

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-141296

(P2017-141296A)

(43) 公開日 平成29年8月17日(2017.8.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/41 (2006.01)	A 6 1 K 31/41	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7036 (2006.01)	A 6 1 K 31/7036	
A 6 1 K 31/708 (2006.01)	A 6 1 K 31/708	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 56 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-95804 (P2017-95804)	(71) 出願人	510114583
(22) 出願日	平成29年5月12日 (2017.5.12)		アカデミシュ ジーケンハウス ライデン
(62) 分割の表示	特願2015-219928 (P2015-219928) の分割		オランダ国 エンエル - 2 3 3 3 ゼ ットアー ライデン、アルビヌスドレーフ 2
原出願日	平成20年10月27日 (2008.10.27)	(71) 出願人	510114594
(31) 優先権主張番号	07119351.0		バイオマリン テクノロジーズ ベー. フ ェー.
(32) 優先日	平成19年10月26日 (2007.10.26)		オランダ国 エンエル - 2 3 3 3 セ ーハー ライデン、イェー. ハー. オール トウェク 2 1
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	110000855
(31) 優先権主張番号	61/000,670		特許業務法人浅村特許事務所
(32) 優先日	平成19年10月26日 (2007.10.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 筋障害を相殺するための手段と方法

(57) 【要約】

【課題】デュシェンヌ型筋ジストロフィー及び／又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状（単数又は複数）を軽減するための手段及び方法の提供。

【解決手段】以下の組み合わせた物：

個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、炎症を抑制するための、及び／又はカルシウムの恒常性、筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための、補助化合物、であって、該組み合わせは薬物として用いられる、前記組み合わせた物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの 1 つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物を前記個人に投与することと、

炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物を前記個人に投与することと

を含む方法。

10

【請求項 2】

薬物としての使用のための、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、

炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は

筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物

のうちの少なくとも 1 つとの組合せ。

【請求項 3】

個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの 1 つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物とのうちの少なくとも 1 つの使用。

20

【請求項 4】

個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、

炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物と、

薬剂的に許容可能な担体、アジュバンド、希釈剤及び／又は賦形剤と

を含む医薬製剤。

【請求項 5】

前記補助化合物が、ステロイド、好ましくは、（グルコ）コルチコステロイド、ACE 阻害剤（好ましくは、ペリンドプリル）、アンジオテンシン 1 型受容体遮断剤 Losartan、腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）阻害剤、mIGF-1 の供給源、抗酸化剤、イオンチャネル阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、L-アルギニン並びに／或いはエキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害するための化合物を含む、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

30

【請求項 6】

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が、前記個人において異常なジストロフィンタンパク質の産生を少なくとも部分的に減少させるためのオリゴヌクレオチド、又はその機能性同等物を含む、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

40

【請求項 7】

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィン mRNA 前駆体のエキソンの、前記 mRNA 前駆体のスプライシングから産生される mRNA への包含を阻害するためのオリゴヌクレオチド、又はその機能性同等物を含み、好ましくは、ジストロフィン mRNA 前駆体から産生される前記エキソンの、mRNA からの欠失が機能性ジストロフィンタンパク質のコード領域を作製する、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

【請求項 8】

50

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体エキソンの少なくとも一部分、又はジストロフィンmRNA前駆体の非エキソン領域の少なくとも一部分であって、少なくとも13ヌクレオチドを有する前記一部分に相補的である配列を含むオリゴヌクレオチド、又はその機能性同等物を含む、請求項1から7までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

【請求項9】

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が、終止コドンを抑止するための化合物を含み、好ましくは、この化合物がゲンタマイシン、PTC124又はその機能性同等物を含む、請求項1から8までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

10

【請求項10】

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が、転写物中のジストロフィンエキソンの正確なスプライシングに必要な調節RNA配列に特異的に結合するためのオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含み、好ましくは、前記オリゴヌクレオチド又はその機能性同等物がイントロンスプライシングエンハンサー（ISE）、エキソンスプライシングエンハンサー（ESE）、イントロンスプライシングサイレンサー（ISS）、及び／又はエキソンスプライシングサイレンサー（ESS）に相補的である、請求項1から9までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

【請求項11】

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体のエキソンのRNAの13と50ヌクレオチドの間の、好ましくは、14と25ヌクレオチドの間の連続する部分に相補的である配列を含むオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含む、請求項1から10までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

20

【請求項12】

前記オリゴヌクレオチドがRNAを含み、好ましくは、前記RNAが修飾物、好ましくは、2'-O-メチル修飾リボース（RNA）若しくはデオキシリボース（DNA）修飾物を含有しており、又は前記オリゴヌクレオチドの前記機能性同等物が、ペプチド核酸、ロックド核酸、モルフォリノホスホロジアミダート、若しくはその任意の組合せ、最も好ましくは、モルフォリノホスホロジアミダートを含む、請求項6から11までのいずれか

30

【請求項13】

前記エキソンがエキソン51、44、45、53、46、43、2、8、50及び／又は52を含む、請求項7から12までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

【請求項14】

前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記オリゴヌクレオチドが、ジストロフィンmRNA前駆体中の少なくとも2つのエキソンに相補的であり、前記オリゴヌクレオチドが、第1の部分が前記少なくとも2つのエキソンの第1に相補的である少なくとも8、好ましくは16から80の間の連続するヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを含み、第2の部分が前記ジストロフィンmRNA前駆体中の第2のエキソンに相補的である少なくとも8、好ましくは16から80の間の連続するヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを含む少なくとも2つの部分を含み、好ましくは前記第1及び第2のエキソンが、前記ジストロフィンmRNA前駆体中で、前記オリゴヌクレオチドが相補的ではない少なくとも1つのエキソンにより分離されている、請求項7から13までのいずれか一項に記載の方法、組合せ、使用又は医薬製剤。

40

【請求項15】

異常なジストロフィンタンパク質をコードするジストロフィン遺伝子のmRNA前駆体を含む細胞内で機能性ジストロフィンタンパク質の産生を少なくとも部分的に増加させるための方法であって、

50

前記ジストロフィン遺伝子のmRNA前駆体のスプライシングから産生されるmRNAへのエキソンの包含を阻害するための化合物を前記細胞に与えることと、

炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物を前記細胞に与えること、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物を前記細胞に与えることと

を含み、

前記mRNA前駆体のスプライシングから産生されるmRNAを翻訳させることをさらに含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、分子生物学及び医薬の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

筋障害とは、通常、個人の生命に重大な影響を及ぼす疾患である。筋障害は、遺伝的原因を有することも、非遺伝的原因を有することもある。遺伝的原因を有する筋肉疾患の重要なグループは、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）及びデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）である。これらの疾患は、筋肉タンパク質の遺伝子の欠損により引き起こされる。

【0003】

20

ベッカー型筋ジストロフィー及びデュシェンヌ型筋ジストロフィーは、発生率が比較的高い遺伝性筋ジストロフィーである。デュシェンヌ型筋ジストロフィーもベッカー型筋ジストロフィーも、筋肉タンパク質ジストロフィンが冒される。デュシェンヌ型ではジストロフィンが欠失しており、ベッカー型では一部分のジストロフィンは存在しているが、その産生はほとんどの場合十分ではない及び／又は存在するジストロフィンは異常に形成されている。両疾患は劣性X連鎖遺伝に関連している。DMDは、DMD遺伝子のフレームシフト突然変異に起因する。DMD遺伝子のフレームシフトにより、切断型非機能性ジストロフィタンパク質が産生され、進行性の筋消耗及び筋力低下が起こる。突然変異が起きてもDMD遺伝子にフレームシフトを引き起こさないときにはBMDが起こる。ジストロフィンが欠失しているDMDとは対照的に、BMDでは一部分のジストロフィンが存在するので、BMDはDMDほど症状が重症ではない。DMDの発症はBMDよりも早い。DMDは通常、初期小児期に現れ、BMDは十代に又は初期成人期に現れる。BMDの進行はDMDよりも遅く、予想しにくい。BMD患者は中期から後期成人期まで生存することができる。DMD患者は30代過ぎまで生存することはまれである。

30

【0004】

ジストロフィンは筋線維において重要な構造的役割を果たしており、細胞外マトリックスと細胞骨格を繋いでいる。N末端領域はアクチンと結合し、C末端はジストロフィン糖タンパク質複合体（DGC）の一部であり、この複合体は筋細胞膜に広がっている。ジストロフィンが欠失していると、機械的ストレスにより筋細胞膜断裂が起こり、筋線維内部へのカルシウムの制御されない流入が引き起こされ、それによってカルシウム活性化プロテアーゼ及び線維壊死が誘発される。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

大半の遺伝性筋ジストロフィーでは、臨床的に適用可能な効果的治療法で、現在利用可能なものはない。エキソンスキッピング技法は、遺伝性筋ジストロフィーと闘うために現在調査されている。mdxマウス及びDMD患者由来の細胞においてジストロフィンmRNA前駆体のリーディングフレームを修復することを目標とする遺伝子治療に関する有望な報告が、我々及び他の者により最近報告されている¹⁻¹¹。特定のエキソンの標的スキッピングにより、DMD表現型（ジストロフィンの欠損）は、より軽度のBMD表現型

50

に（部分的におおむね機能性のジストロフィンに）転換される。エキソンのスキッピングは、好ましくは、スプライス部位のうちの1つ若しくは両方、又はエキソン内部配列のいずれかを標的するアンチセンスオリゴリボヌクレオチド（AON）の結合により誘導される。両スプライス部位がスプライソソーム複合体により認識されるときのみ、エキソンはmRNA中に包含されることになるので、スプライス部位はAONの明らかな標的である。代わりに、又はさらに、1つ又は複数のエキソン配列の少なくとも一部分に特異的な1つ又は複数のAONが使用される。エキソン46配列に特異的なエキソン内部AONを使用して、我々は以前、エキソン45欠失の2人の異なるDMD患者由来の培養筋管においてスプライシングパターンを調節することができた¹¹。AON処置に続いて、エキソン46がスキップされ、その結果リーディングフレームが修復され、細胞の少なくとも75%においてジストロフィン合成が誘導された。エキソン内部AONを使用して、39の異なるDMDエキソンに対してヒト対照及び患者筋細胞においてもエキソンスキッピングを効率的に誘導することができることを、我々は最近明らかにした^{1, 2, 11-15}。

【0006】

したがって、ジストロフィン遺伝子に適用されるエキソンスキッピング技法により、DMD患者において、短くはなるが、少なくとも部分的に機能性のジストロフィタンパク質が産生される。DMDは機能障害性ジストロフィタンパク質によって引き起こされるので、DMD患者が機能性ジストロフィタンパク質を与えられた後では、DMDの症状は十分に軽減されると予想されるであろう。しかし、本発明は、エキソンスキッピング技法がジストロフィン合成を誘導することができるとしても、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物をDMD患者に投与することにより、DMD症状（単数又は複数）はさらに軽減されるという洞察を提供する。本発明によれば、DMD患者においてジストロフィタンパク質欠損が修復されたときでも、組織炎症及び損傷筋細胞の存在はそれでもDMDの症状の一因となり続ける。したがって、DMDの原因、すなわち、機能障害性ジストロフィタンパク質が軽減されるとしても、本発明に従った補助治療をさらに使用することにより、DMDの治療はさらに改善される。さらに、本発明は、炎症が抑えられたからといって筋細胞によるAONの取込みが著しく減少するわけではないという洞察を提供する。一般に炎症は細胞、血液及び他の化合物の輸送を増強するので、これは驚くべきことである。その結果、AON取込み／送達も炎症中は増強される。したがって、本発明の以前には、炎症を相殺する補助治療は、AON治療にマイナスの影響を与える危険を伴うと予想されたであろう。しかし、実際はそうではないように思われる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

したがって、本発明は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、前記個人に（少なくとも部分的に）機能性ジストロフィタンパク質を与えるための化合物を前記個人に投与することと、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物を前記個人に投与することを含む方法を提供する。

【0008】

別の好ましい実施形態では、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法は、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物を前記個人に投与することを含む。

【0009】

驚くべきことに、エキソンに、又は前記エキソンの1つ若しくは両方のスプライス部位

に向けられたオリゴヌクレオチドを使用すると、前記mRNA前駆体を発現する細胞に、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物を与える場合、前記エキソンを含むmRNA前駆体からのジストロフィンエキソンのスキッピング頻度が増強されることが見出されている。増強されたスキッピング頻度は、DMD又はBMDの個人の筋細胞において産生される機能性ジストロフィンタンパク質のレベルも増加させる。

【0010】

本発明は、ジストロフィンmRNA前駆体を発現している細胞において前記mRNA前駆体からのエキソンのスキッピングを増強するための方法であって、

前記細胞内の前記mRNA前駆体を前記エキソンをスキップするためのオリゴヌクレオチドに接触させることと、

前記細胞を、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物に、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物に接触させることと

を含む前記方法をさらに提供する。

【0011】

デュシェンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィーは筋細胞において明白な表現型を有するので、前記細胞は筋細胞であることが好ましい。好ましくは、前記細胞は、突然変異ジストロフィンタンパク質をコードする遺伝子を含む。好ましくは、前記細胞はDMD又はBMDに罹っている個人の細胞である。

【0012】

本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーに罹っている個人における、ジストロフィンmRNA前駆体を発現している細胞内でジストロフィンmRNA前駆体からのエキソンのスキッピングを増強するための方法であって、

前記個人に（少なくとも部分的に）機能性のジストロフィンタンパク質を与えるための化合物を前記個人に投与することと、

炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物を前記個人に投与することと

を含む方法をさらに提供する。

【0013】

個人は、種々の形で機能性ジストロフィンタンパク質を与えられる。一実施形態では、エキソンスキッピング技法が適用される。しかし、たとえば、ゲンタマイシン又はPTC 124^{16, 17}（3-（5-（2-フルオロフェニル）-1, 2, 4-オキサジアゾール-3-イル）安息香酸としても知られる）による終止コドン抑制、及び／又は機能性ミニ若しくはマイクロジストロフィン遺伝子のアデノ随伴ウイルス（AAV）媒介遺伝子送達^{18~20}などの別の方法が利用可能である。PTC 124（商標）は、PTC Therapeutics, Inc. South Plainfield, New Jerseyの登録商標である。

【0014】

本明細書に定義されるように、機能性ジストロフィンとは、好ましくは、配列番号1に同定されるアミノ酸配列を有するタンパク質に対応する野生型ジストロフィンである。機能性ジストロフィンとは、好ましくは、ジストロフィンであって、そのN末端部分（N末端の最初の240アミノ酸）、システインリッチドメイン（アミノ酸3361から3685まで）及びC末端ドメイン（C末端の最後の325アミノ酸）にアクチン結合ドメインを有し、これらのドメインはそれぞれが当業者に既知の野生型ジストロフィンに存在している。本明細書に示されるアミノ酸は、配列番号1により表されている野生型ジストロフィンのアミノ酸に対応する。言い換えると、機能性ジストロフィンは、少なくともある程度は野生型ジストロフィンの活性を示すジストロフィンである。「少なくともある程度は」とは、好ましくは、野生型機能性ジストロフィンの対応する活性の少なくとも30%、40

10

20

30

40

50

%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は100%を意味する。この文脈では、機能性ジストロフィンの活性は、好ましくは、アクチンに及びジストロフィン結合糖タンパク質複合体(DGC)に結合することである^{5 6}。当業者には既知であるように、アクチンへの及びDGCへのジストロフィンの結合は、ジストロフィーであると疑われる筋肉の生検から、全タンパク質抽出物を使った免疫共沈降法、又は横断面の免疫蛍光解析のいずれかにより可視化してもよい。

【0015】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーに罹っている個人は、典型的には、完全タンパク質の合成を妨げているジストロフィンをコードする遺伝子の突然変異を有しており、すなわち、中途終止がC末端の合成を妨げている。ベッカー型筋ジストロフィーでは、ジストロフィン遺伝子は、野生型と比べると突然変異も含むが、その突然変異は典型的には、中途終止を含まず、C末端は典型的に合成される。その結果、少なくとも野生型タンパク質と同種の活性を有する機能性ジストロフィンタンパク質が合成されるが、必ずしも同量の活性ではない。BMD個人のゲノムは典型的には、N末端部分(N末端での最初の240アミノ酸)、システインリッチドメイン(アミノ酸3361から3685まで)及びC末端ドメイン(C末端での最後の325アミノ酸)を含むジストロフィンタンパク質をコードしているが、その中央部桿状ドメインは野生型ジストロフィンのものより短いことがある^{5 6}。DMDの治療のためのエキソンスキッピングは、典型的には、桿ドメイン形ドメインのエキソンをスキップして、リーディングフレームを訂正してC末端を含むジストロフィンタンパク質の残りを合成させることにより、mRNA前駆体における中途終止を克服することに向けられているが、桿ドメインが小さくなった結果、タンパク質がいくらか小さくなる。好ましい実施形態では、DMDを有し本明細書に定義する方法で治療を受けている個人は、少なくともある程度は野生型ジストロフィンの活性を示すジストロフィンを与えられることになる。さらに好ましくは、前記個人がデュシェンヌ型患者である、又はデュシェンヌ型患者であると疑われている場合、機能性ジストロフィンはBMDを有する個人のジストロフィンであり、すなわち、典型的には、前記ジストロフィンはアクチンともDGCとも相互作用をすることができるが、その中央部桿状ドメインは野生型ジストロフィンのものよりも短くなることがある(Aartsma-Rusら、(2006、ref 56))。野生型ジストロフィンの中央部桿状ドメインは24スペクトリン様反復を含む^{5 6}。たとえば、本明細書に提供されるジストロフィンの中央部桿状ドメインは、それがアクチンに及びDGC結合することができる限り、5~23、10~22又は12~18スペクトリン様反復を含んでいてもよい。

【0016】

本発明の方法において個人におけるデュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減することは、以下のアッセイ法、すなわち、歩行の喪失までの時間の延長、筋力の改善、重りを持ち上げる能力の改善、床から立ち上がる所要時間の改善、9メートル歩行時間の改善、4階段を上る所要時間の改善、脚機能等級の改善、肺機能の改善、心機能の改善、生活の質の改善のどれによって評価してもよい。これらのアッセイ法はそれぞれが当業者には既知である。例として、Manzurらの論文(2008、ref 58)は、これらのアッセイ法それぞれについて詳細な説明をしている。これらのアッセイ法それぞれで、アッセイ法において測定されるパラメータの検出可能な改善又は延長が見出されたらすぐに、好ましくは、本発明の方法を使用して個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状が軽減されたことを意味することになる。検出可能な改善又は延長は、好ましくは、Hodgettsら(2006、ref 57)に記載されている統計的に有意な改善又は延長である。代わりに、デュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状の軽減は、本明細書において後に定義される筋線維機能、完全性及び/又は生存の改善を測定することにより評価してもよい。

【0017】

炎症を抑えるための補助化合物は、炎症を、好ましくは、損傷筋細胞により引き起こさ

れる炎症を少なくとも部分的に抑えることができるどんな治療も含む。前記補助化合物は、最も好ましくは、筋組織炎症を抑えることができる。炎症は、好ましくは、ジストロフィーと疑われる筋組織における好中球及び／又は肥満細胞及び／又は樹状細胞及び／又はリンパ細胞などの浸潤性免疫細胞の数の増加を検出することにより評価される。この評価は、好ましくは、上で同定される免疫細胞を特異的に染色した後に、ジストロフィーと疑われる筋組織の生検^{5 7}の横断面において実施される。定量化は、好ましくは、顕微鏡下で実施される。したがって、炎症を抑えることは、好ましくは、ジストロフィーと疑われる筋組織の横断面において免疫細胞の数の減少を検出することにより評価される。減少を検出することは、好ましくは、上で同定される少なくとも1種類の免疫細胞の数が、治療前の同一個人の対応する免疫細胞の数と比べて、少なくとも1%、2%、3%、5%、7%、10%、12%、15%、17%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上減少していることを意味する。最も好ましくは、前記生検の横断面において浸潤性免疫細胞はまったく検出されない。

【0018】

筋線維機能、完全性及び／又は生存を改善するための補助化合物は、前記補助化合物が存在しないが他の点では類似する状況と比べて、筋線維機能、完全性及び／又は生存を測定可能な程度に増強することができるどんな治療も含む。筋線維機能、完全性及び／又は生存の改善は、以下のアッセイ法、すなわち、血液中のクレアチンキナーゼの検出可能な減少、ジストロフィーと疑われる筋肉の生検横断面における筋線維の壊死の検出可能な減少、及び／又はジストロフィーと疑われる筋肉の生検横断面における筋線維の径の均一性の検出可能な増加のうちの少なくとも1つを使用して評価してもよい。これらのアッセイ法はそれぞれが当業者には既知である。

【0019】

クレアチンキナーゼは、57に記載される通りに血液中で検出してもよい。クレアチンキナーゼの検出可能な減少とは、治療前の同一個人のクレアチンキナーゼ濃度と比べて5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の減少を意味してもよい。

【0020】

筋線維の壊死の検出可能な減少は、好ましくは、筋生検において、さらに好ましくは、生検横断面を使用した57に記載される通りに評価される。壊死の検出可能な減少とは、生検横断面を使用して壊死が同定されている領域の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の減少でもよい。減少は、治療前の同一個人において評価される壊死と比べることにより測定される。

【0021】

筋線維の径の均一性の検出可能な増加は、好ましくは、筋生検横断面において、さらに好ましくは、57に記載される通りに評価される。

【0022】

本発明に従った方法における治療は、少なくとも約1週間、少なくとも約1カ月、少なくとも約数カ月、少なくとも約1年、少なくとも約2、3、4、5、6年以上である。

【0023】

一実施形態では、損傷筋細胞の代謝回転を増加させるための補助化合物が使用される。損傷筋細胞の代謝回転を増加させるための補助化合物は、損傷筋細胞の代謝回転を少なくとも部分的に誘導する且つ／又は増加させることができるどんな治療も含む。損傷筋細胞は、健常な無傷の筋細胞よりも臨床的に測定可能な機能性が有意に少ない筋細胞である。ジストロフィンが欠失していると、機械的ストレスにより筋細胞膜断裂が起こり、筋線維内部へのカルシウムの制御されない流入が引き起こされ、それによってカルシウム活性化プロテアーゼ及び線維壊死が誘発され、損傷筋細胞が生じる。損傷筋細胞の代謝回転を増加させることは、損傷筋細胞の代謝回転が増加していない状況と比べて、損傷筋細胞が速く分解される且つ／又は取り除かれることを意味する。損傷筋細胞の代謝回転は、好ましくは、筋生検において、さらに好ましくは、生検の横断面を使用した57に記載される通

りに評価される。代謝回転の検出可能な増加は、生検横断面を使用して代謝回転が同定されている領域の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の増加であってもよい。増加は、治療前の同一個人において評価される代謝回転と比べることにより測定される。

【0024】

理論に拘泥するものではないが、筋細胞の代謝回転が増加するのは、これにより炎症応答が減少するので好ましいと考えられる。

【0025】

本発明に従えば、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための治療と、個人において炎症を抑えるための、好ましくは筋組織炎症を抑えるための補助治療と一緒に組み合わせるのは、薬物としての使用に特に適している。そのような組合せは、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための単独治療と比べて、デュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状をはるかによく軽減することができる。本実施形態は、エキソンに、又は前記エキソンの1つの若しくは両方のスプライス部位に向けられたオリゴヌクレオチドを使用するとき、前記エキソンを含むMRNA前駆体からのジストロフィンエキソンのスキッピング頻度も増強する。増強されたスキッピング頻度は、DMD又はBMD個人の筋細胞において産生される機能性ジストロフィンタンパク質のレベルも増加させる。

【0026】

したがって、薬物としての使用のための、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、前記個人において炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物との組合せがさらに提供される。前記組合せはDMDを相殺するのに特に適しているので、本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物、及び前記個人において炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物の使用も提供する。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。

【0027】

炎症を抑えるための好ましい補助化合物には、ステロイド、TNF α 阻害剤、mIGF-1の供給源及び／又は抗酸化剤が挙げられる。しかし、本明細書に定義される炎症を抑えることができる他のどんな化合物も、本発明内に包含される。これらの化合物はそれぞれが、後で広範囲に示される。広範囲に示される化合物はそれぞれが、別々に、又は互いに組み合わせて並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するために使用される1つ若しくは複数の補助化合物と組み合わせて使用してもよい。

【0028】

さらに、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための治療と、個人において筋線維機能、完全性及び／又は生存を改善するための補助治療と一緒に組合せは、薬物としての使用に特に適している。そのような組合せは、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための単独治療と比べると、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状をはるかによく軽減することができる。

【0029】

したがって、薬物としての使用のための、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、前記個人において筋線維機能、完全性及び／又は生存を改善するための補助化合物との組合せがさらに提供される。この組合せは、DMDを相殺するのにも特に適している。したがって、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物、並びに前記個人において筋線維機能、完全性及び／又は生存を改善するための補助化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するた

めに、前記組合せは使用される。

【0030】

筋線維機能、完全性及び／又は生存を改善するための好ましい補助化合物には、イオンチャンネル阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、Lアルギニン及び／又はアンジオテンシン1型受容体遮断剤が挙げられる。しかし、本明細書に定義する筋線維機能、完全性及び／又は生存を改善することができる他のどんな化合物も本発明内に包含される。これらの化合物はそれぞれが、後で広範囲に示される。広範囲に示される化合物はそれぞれが、別々に、又は互いに組み合わせて並びに／又は炎症を抑えるために使用される1つ若しくは複数の補助化合物と組み合わせて使用してもよい。

【0031】

一実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、本発明に従った補助化合物とを一緒に含む上記組合せのうちの少なくとも1つを含む医薬製剤が作製される。したがって、

個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と、

前記個人において炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は前記個人において筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物と、

薬剂的に許容可能な担体、アジュバント、希釈剤及び／又は賦形剤とを

含む医薬製剤がさらに提供される。適切な担体及びアジュバントの例は当技術分野では既知であり、たとえば、生理食塩水を含む。本発明に従った医薬製剤中で使用される化合物の用量範囲は、厳格なプロトコル必要条件が存在する臨床試験における漸増用量試験に基づいて設計される。

【0032】

特に好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物はステロイドと組み合わせられる。実施例において示されるように、そのような組合せによりDMD症状が著しく軽減される。したがって、本発明の好ましい実施形態は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、前記個人にステロイドと、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物を投与することを含む方法を提供する。薬物として使用するための、ステロイドと個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、ステロイド及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。本実施形態は、エキソンに、又は前記エキソンの1つの若しくは両方のスプライス部位に向けられるオリゴヌクレオチドを使用する場合には、前記エキソンを含むMRNA前駆体からのジストロフィンエキソンのスキッピング頻度も増強する。増強されたスキッピング頻度は、DMD又はBMD個人の筋細胞において産生される機能性ジストロフィンタンパク質のレベルも増加させる。

【0033】

一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。

【0034】

ステロイドは、4つの縮合環が一般に6-6-6-5の形で配置された炭素骨格により特徴づけられるテルペノイド脂質である。ステロイド類は、これらの環に結合する官能基及び環の酸化状態により異なる。ステロイド類には、たとえば、プレドニゾン、デキサメタゾン及びビタミンDなどの通常は腫脹及び炎症を軽減するのに使用されるホルモン及び薬物が挙げられる。

【0035】

本発明に従えば、DMD患者における補助ステロイド治療の付加的効果には、組織炎症の減少、細胞障害性細胞の抑制、及び改善されたカルシウム恒常性が挙げられる。大半のプラス結果は、低年齢の男子で得られる。好ましくは、ステロイドは副腎皮質ステロイド

10

20

30

40

50

(グルココルチコステロイド)である。好ましくは、本発明に従った方法において(プレドニゾン、プレドニゾン又はデフラザコートなどの)プレドニゾンステロイドが使用される^{2 1}。本明細書に記載される治療的適用において使用される(グルココルチコ)ステロイドの用量範囲は、厳格なプロトコル必要条件が存在する臨床試験における漸増用量試験に基づいて設計される。常用量は、プレドニゾン及びプレドニゾンでは約0.5~1.0mg/kg/日、好ましくは、約0.75mg/kg/日、デフラザコートでは約0.4~1.4mg/kg/日、好ましくは、約0.9mg/kg/日である。

【0036】

一実施形態では、ステロイドは、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物を投与するのに先立って前記個人に投与される。本実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物を投与する少なくとも1日、さらに好ましくは少なくとも1週間、さらに好ましくは少なくとも2週間、さらに好ましくは少なくとも3週間前に前記ステロイドが投与されるのが好ましい。

【0037】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物は、腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)阻害剤と組み合わせられる。腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)は、炎症応答を刺激する炎症促進性サイトカインである。中和抗体インフリキシマブ(Remicade)を使用したTNF α 活性の薬理的遮断は、炎症性疾患の症状を抑えるのに臨床的に極めて効果的である。mdxマウスでは、インフリキシマブもエタネルセプトも、ジストロフィー筋の壊死を遅延させて抑え^{2 4}, ^{2 5}、筋力、塩素チャンネル機能及び減少したCKレベルに対する追加の生理学的効果が長期間治療を受ける運動成体mdxマウスにおいて実証されている^{2 6}。他の臨床状態において使用するために設計されたそのような高度に特異的抗炎症薬は、DMDへのステロイドの使用に対する魅力的な代替法である。一実施形態では、TNF α 阻害剤の使用は、筋損傷及び悪化が特に明白な男子の集中的筋成長の時期に限定されている。

【0038】

したがって、本発明の一態様は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、前記個人にTNF α 阻害剤及び、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物を投与することを含む方法を提供する。薬物として使用するための、TNF α 阻害剤と個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、TNF α 阻害剤及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。好ましいTNF α 阻害剤は、ヒトIgG1のFc部分に連結しているTNF α のヒトp75受容体の細胞外リガンド結合ドメインからなる二量体融合タンパク質である。さらに好ましいTNF α 阻害剤はエタネルセプト(Amgen、America)である^{2 6}。エタネルセプトの常用量は、週2回の約0.2mg/kg、さらに好ましくは約0.5mg/kgである。投与は好ましくは皮下である。

【0039】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物は、mIGF-1の供給源と組み合わせられる。本明細書に定義するように、IGF-1の供給源は、好ましくは、mIGF-1自体、mIGF-1発現及び/又は活性を増強することができる化合物を包含する。増強するは、本明細書では、増加させると同義である。mIGF-1の発現はmIGF-1の量と同義である。mIGF-1は、サテライト細胞活性の増加を通じて筋肉の再生を促進し、炎症及び線維症を抑える^{2 7}。筋肉の局所損傷により、mIGF-1発現が増加する。余分なIGF-1遺伝子を有するトランスジェニックマウスでは、筋肉肥大及び肥大筋線維が観察される^{2 7}。同様に、トランスジェニックmdxマウスは、減少した筋線維変性を示す^{2 8}。したがって、mIGF-1遺伝

10

20

30

40

50

子の上方調節及び／又は余分な量のm I G F-1タンパク質若しくはその機能性同等物（特にm I G F-1 E aアイソフォーム〔27に記載されている、ヒト相同体I G F-1アイソフォーム4：配列番号2〕）の投与により、アンチセンス誘導エキソンスキッピングを含むDMDに対する他の、好ましくは遺伝的治療の効果が促進される。上記トランスジェニックマウスにおける追加のm I G F-1レベルは、心臓障害を誘導することではなく、癌も促進せず、病的副作用もない。したがって、本発明の一態様は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与え、且つ前記個人にm I G F-1の供給源、好ましくは、m I G F-1自体を与えるための化合物、m I G F-1発現及び／又は活性を増加させることができる化合物を前記個人に投与することを含む方法を提供する。前述のように、たとえば、m I G F-1遺伝子の発現を増強することにより、並びに／又はm I G F-1タンパク質及び／若しくはその機能性同等物（特にm I G F-1 E aアイソフォーム〔27に記載されている、ヒト相同体I G F-1アイソフォーム4：配列番号2〕）を投与することにより、m I G F-1の量は増加される。薬物として使用するための、m I G F-1、又はm I G F-1発現若しくはm I G F-1活性を増強することができる化合物と、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、m I G F-1、又はm I G F-1発現若しくはm I G F-1活性を増強することができる化合物、及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、そのような組合せは使用される。

10

20

【0040】

本発明の文脈内で、I G F-1遺伝子の遺伝子発現レベルを増加させることにより、対応するI G F-1タンパク質の量を増加させることにより、及び／又はI G F-1タンパク質の活性を増加させることにより、m I G F-1の増加した量又は活性を実現してもよい。好ましいm I G F-1タンパク質は本明細書において以前に定義済みである。前記タンパク質の活性の増加は、治療を受けたことがない個人の前記活性又は定常状態と比べて、前記タンパク質により発揮される生物活性又は前記タンパク質の定常状態レベルのどんな検出可能な変化をも意味すると、本明細書では理解されている。m I G F-1の増加した量又は活性は、好ましくは、筋肉肥大バイオマーカーG A T A-2の増加した発現の検出により評価される（27に記載されている）。

30

【0041】

遺伝子発現レベルは、好ましくは、（リアルタイム）P C R、アレイ又はノーザン解析などの古典的分子生物学的技法を使用して評価される。タンパク質の定常状態レベルは、タンパク質の量を定量化することにより直接決定される。タンパク質量の定量化は、ウエスタンブロッティング又はタンパク質に対して産生される抗体を使用した免疫アッセイ法などのどんな既知の技法により実施してもよい。二者択一的に、又は遺伝子発現レベル及び／若しくは対応するタンパク質の定量化と組み合わせて、対応するタンパク質の基質又は対応するタンパク質の機能若しくは活性に関連することが分かっている任意の化合物の定量化、或いは特定のアッセイ法を使用した対応するタンパク質の前記機能又は活性の定量化を使用して、タンパク質の活性又は定常状態レベルの変化を評価してもよいことは、当業者であれば理解するであろう。

40

【0042】

本発明の方法では、前記タンパク質の活性又は定常状態レベルは、たとえば、外来供給源由来の細胞にタンパク質を与えることにより、タンパク質自体のレベルで改変してもよい。

【0043】

好ましくは、前記遺伝子の発現レベルの増加又は上方調節は、アレイを使用して前記遺伝子の発現レベルの少なくとも5%の増加を意味する。さらに好ましくは、前記遺伝子の

50

発現レベルの増加は、少なくとも10%、さらに好ましくは、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも150%以上の増加を意味する。別の好ましい実施形態では、前記タンパク質の発現レベルの増加は、ウエスタンブロッティングを使用して、且つ／又はELISA若しくは適切なアッセイ法を使用して、前記タンパク質の発現レベルの少なくとも5%の増加を意味する。さらに好ましくは、タンパク質の発現レベルの増加は、少なくとも10%、さらに好ましくは、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも150%以上の増加を意味する。

【0044】

別の好ましい実施形態では、ポリペプチド活性の増加は、適切なアッセイ法を使ってポリペプチド活性の少なくとも5%の増加を意味する。さらに好ましくは、ポリペプチド活性の増加は、少なくとも10%、さらに好ましくは、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも150%以上の増加を意味する。増加は、好ましくは、治療前の個人における対応する活性と比べることにより評価される。

【0045】

mIGF-1の供給源を提供する好ましい方法は、mIGF-1を、好ましくは、mIGF-1 Eαアイソフォーム（27に記載されている、ヒト相同体IGF-1アイソフォーム4：配列番号2）を、さらに好ましくは、本明細書において後に定義されるAAVベクターにおいてコードする導入遺伝子を導入することである。mIGF-1のそのような供給源は、27におけるマウスにおいて記載される筋組織で特異的に発現される。

【0046】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物は抗酸化剤と組み合わせられる。酸化ストレスはDMDの進行において重要な要因であり、慢性炎症及び線維症を促進する²⁹。酸化ストレスの最も蔓延する産物、すなわち過酸化脂質は、デュシェンヌ型の男子では平均で35%増加する。酵素スーパーオキシドジスムターゼ及びカタラーゼのレベルが増加すれば、これらの効果を引き起こす過量のフリーラジカルを抑える。実際、栄養補助食品のProtandim（登録商標）（LifeVantage）は臨床的試験をされ、スーパーオキシドジスムターゼ（最大30%）及びカタラーゼ（最大54%）のレベルを増加させることが見出され、これにより実際に29人の健常者において脂質の過酸化が著しく阻害された³⁰。したがって、酸化ストレスのそのような効果的管理により筋質が保存され、したがって、DMD治療のプラス効果が促進される。イデベノンは、天然補酵素Q10由来の化学構造を有するもう一つの強力な抗酸化剤である。イデベノンは、アデノシン三リン酸（ATP）が酸化的リン酸化により生成されるミトコンドリアを保護する。DMDにおいてジストロフィンが欠失すると、心臓での、及びおそらく骨格筋でもこのプロセスにマイナスの影響を及ぼす。イデベノンは、最近、米国及び欧州において臨床試験に適用され、フリードライヒ運動失調症の神経学的側面に対する有効性を実証した³¹。年齢が8～16歳の21人のデュシェンヌ型の男子を含む、イデベノンを使用した第IIa相二重盲検プラセボ対照無作為臨床試験が最近ベルギーで開始された。この研究の第1目的は、心筋機能に対するイデベノンの効果を判定することである。さらに、患者における筋力に対するその考えられる機能的利点を検出するために、いくつかの異なる試験が実施されることになっている。効果的である場合には、イデベノンは、特に心臓において、DMD治療の治療効果を増強するために、本発明に従った方法において使用するための好ましい補助化合物である。したがって、本発明の一態様は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、抗酸化剤と前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物とを前記個人に投与することを含む方法を提供する。薬物として使用するための、抗酸化剤と前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための

10

20

30

40

50

、抗酸化剤及び前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。抗酸化剤の種類に応じて、当業者であればどの量が好ましく使用されるかが分かるであろう。抗酸化剤には、バコシド、シリマリン、クルクミン、ポリフェノール、好ましくは、エピガロカテキン-3-没食子酸(EGCG)が含まれていてもよい。好ましくは、抗酸化剤は、栄養補助食品のProtandium(登録商標)(Life Vantage)のような抗酸化剤の混合物である。675mgのProtandium(登録商標)の1日量カプセルには、150mgのバコパモニエラ(B. monniera)(45%バコサイド)、225mgのオオアザミ(S. marianum)(70~80%シリマリン)、150mgのウィザニアソムニフェラ(W. somnifera)粉末、75mgの緑茶(45%EGCGの98%ポリフェノール)及び75mgのウコン(95%クルクミン)が含まれる。

10

【0047】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物はイオンチャネル阻害剤と組み合わされる。DMDにおいて損傷筋膜が存在すると、筋線維へのカルシウムイオンの通過が妨げられ、そのためにカルシウム恒常性が乱れて、追加の損傷及び筋壊死を引き起こす多くの酵素、たとえば、プロテアーゼが活性化される。ジストロフィー筋中においてカルシウムの病的蓄積の直接の一因となるイオンチャネルは、DMDを治療するための補助化合物の潜在的標的である。ペントキシフィリンなどの一部分の薬剤は運動感受性カルシウムチャネルを遮断し³²、伸展活性化チャネルを遮断する抗生物質はmdxマウスにおいて筋線維壊死を、DMD男子においてCKレベルを抑えるという証拠が存在する³³。したがって、一実施形態は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、イオンチャネル阻害剤と前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物とを前記個人に投与することを含む方法を提供する。薬物として使用するための、イオンチャネル阻害剤と個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、イオンチャネル阻害剤及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。

20

30

【0048】

好ましくは、キサンチンの種類のイオンチャネル阻害剤が使用される。さらに好ましくは、前記キサンチンはメチルキサンチンの誘導体であり、最も好ましくは、前記メチルキサンチン誘導体は、ペントキシフィリン、フラフィリン、リソフィリン、プロペントフィリン、ベンチフィリン、テオフィリン、トルバフィリン、アルビフィリン、エンプロフィリン及びその誘導体からなるグループから選択される。ペントキシフィリンの使用が最も好ましい。キサンチンの種類のイオンチャネル阻害剤は、エキソンに、又は前記エキソンの1つの若しくは両方のスプライス部位に向けられたオリゴヌクレオチドを使用する場合、前記エキソンを含むMRNA前駆体からのジストロフィンエキソンのスキッピング頻度を増強する。増強されたスキッピング頻度は、DMD又はBMD個人の筋細胞において産生される機能性ジストロフィンタンパク質のレベルも増加させる。

40

【0049】

イオンチャネル阻害剤の種類に応じて、当業者であれば、どの量であれば好ましく使用されるかが分かるであろう。ペントキシフィリンの適切な用量は、約1mg/kg/日~約100mg/kg/日の間であり、好ましい用量は約10mg/kg/日~50mg/kg/日である。ヒトに使用される典型的用量は、20mg/kg/日である。

【0050】

一実施形態では、イオンチャネル阻害剤は、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を

50

与えるための化合物を投与するのに先立って、前記個人に投与される。本実施形態では、前記イオンチャンネル阻害剤は、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物を投与する少なくとも1日、さらに好ましくは少なくとも1週間、さらに好ましくは少なくとも2週間、さらに好ましくは少なくとも3週間前に投与される。

【0051】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物はプロテアーゼ阻害剤と組み合わせられる。カルパインは、ジストロフィー筋中において増加するカルシウム活性化プロテアーゼであり、筋線維変性の原因である。したがって、カルバスタチン、ロイペプチン^{3 4}、カルペプチン、カルパイン阻害剤 I I I、又は P D 1 5 0 6 0 6 などのカルパイン阻害剤が変性プロセスを抑えるために適用される。カルパイン阻害剤及び抗酸化剤の両方として二重作用を有する新しい化合物である B N 8 2 2 7 0 (I p s e n) は、筋力を増加させ、血清 C K を減少させ、m d x 横隔膜の線維症を抑え、この新しい化合物を使用した治療効果を示した^{3 5}。別の化合物の L e u p e p t i n / C a r n i t i t e (M y o d u r) は最近、DMD患者での臨床試験に提案された。

【0052】

M G 1 3 2 は、筋膜損傷を抑え、筋ジストロフィーの病理組織学的徴候を寛解させることを示したもう一つのプロテアソーム阻害剤である^{3 6}。M G 1 3 2 (C B Z - ロイシル - ロイシル - ロイシナール) は、細胞透過性プロテアソーム阻害剤 (K i = 4 n M) であり、これは I κ B 分解を妨げることにより N F κ B 活性化を阻害する (I C 5 0 = 3 μ M)。さらに、M G 1 3 2 は、2 0 S 及び 2 6 S プロテアソームに結合して不活化することにより、ユビキチン依存性タンパク質分解を阻害するペプチドアルデヒドである。M G 1 3 2 は、ジストロフィー m d x マウスモデルにおいてジストロフィン関連タンパク質のプロテアソーム分解を阻害することを示している^{3 6}。したがって、この化合物も、DMD に対する補助薬理学的化合物として使用するのに適している。したがって、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、プロテアーゼ阻害剤と前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質とを与えるための化合物を前記個人に投与することを含む方法がさらに提供される。薬物として使用するための、プロテアーゼ阻害剤と個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMD の1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、プロテアーゼ阻害剤及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型の BMD の1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。プロテアーゼ阻害剤の種類に応じて、当業者であれば、どの量であれば好ましく使用されるかが分かるであろう。

【0053】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物は L - アルギニンと組み合わせられる。ジストロフィン欠損は、神経型一酸化窒素合成酵素 (n N O S) を含む、線維膜での D G C 複合体の喪失と関連している。m d x マウスで n N O S 導入遺伝子が発現されると、筋膜損傷が大いに抑えられた。同様に、L - アルギニン (一酸化窒素合成酵素の基質) を投与すると、m d x マウスでの N O 産生が増加し、ユートロフィン発現が上方調節された。6 週間の L - アルギニン処置により、m d x マウスでは筋病理が改善され、血清 C K が減少した^{3 7}。個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物と組み合わせた補助治療としての L - アルギニンの使用はまだ開示されたことがない。

【0054】

したがって、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、L - アルギニンと前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物とを前記個人に投与することを含む方法がさらに提供される。薬物として使用するための、L - アルギニンと個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与

えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、L-アルギニン及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。

【0055】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物は、ジストロフィン欠損mdxマウスモデルにおいて示されるように^{2 3}、筋構築、修復及び機能を正常化するアンジオテンシン1型受容体遮断剤Losartanと組み合わせられる。したがって、本発明の一態様は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、アンジオテンシン1型受容体遮断剤Losartanと前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物とを前記個人に投与することを含む方法をさらに提供する。薬物として使用するための、アンジオテンシン1型受容体遮断剤Losartanと個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、アンジオテンシン1型受容体遮断剤Losartan及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。アンジオテンシン1型受容体遮断剤の種類に応じて、当業者であれば、どの量であれば好ましく使用されるかが分かるであろう。

【0056】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、好ましくは、ペリンドプリルと組み合わせられる。ACE阻害剤は血圧を下げるができる。ペリンドプリルを使用した治療の早期開始は、DMD患者の死亡率の低下と関連している^{2 2}。したがって、本発明の一態様は、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽減するための方法であって、ACE阻害剤、好ましくは、ペリンドプリルと前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物とを前記個人に投与することを含む方法を提供する。薬物として使用するための、ACE阻害剤、好ましくは、ペリンドプリルと個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、ACE阻害剤、好ましくは、ペリンドプリル及び個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。ACE阻害剤、好ましくは、ペリンドプリルの常用量は、約2～4 mg/日である^{2 2}。さらに好ましい実施形態では、ACE阻害剤は、以前に同定された補助化合物の少なくとも1つと組み合わせられる。

【0057】

別の好ましい実施形態では、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物は、エキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害することができる化合物と組み合わせられる。たとえば、特定のインドール誘導体などの小化合物は、たとえば、セリン及びアルギニンリッチ（SR）タンパク質がその認識スプライシングエンハンサー（ISE若しくはESE）に結合するのを妨げることにより、並びに／又はスプライシングリプレッサーがサイレンサー配列（ESS若しくはISS）に結合するのを妨げることにより、スプライソソーム構築及びスプライシングを選択的に阻害する^{3 8}ことが明らかにされている。したがって、これらの化合物は、エキソンスキッピングを増強する補助化合物としての適用に適している。

【0058】

したがって、個人においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーの1つ又は複数の症状を軽

減する方法であって、エキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害するための化合物と前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物とを前記個人に投与することを含む方法がさらに提供される。薬物として使用するための、エキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害するための化合物と個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物との組合せのほかにも、DMDの1つ又は複数の症状を軽減するための薬物の調製のための、エキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害するための化合物並びに個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物の使用も提供される。一実施形態では、十分に機能性ではない非常に短いジストロフィンタンパク質が形成される重症型のBMDの1つ又は複数の症状を軽減するために、前記組合せは使用される。エキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害することができる化合物の種類に応じて、当業者であれば、どの量であれば好ましく使用されるかが分かるであろう。さらに好ましい実施形態では、エキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害するための化合物は、ACE阻害剤と及び／又は本明細書で前に同定されたどんな補助化合物とでも組み合わせられる。

10

【0059】

個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物、上記の補助化合物のうちのいずれか、並びに薬剤的に許容可能な担体、充填剤、保存剤、アジュバンド、可溶化剤、希釈剤及び／又は賦形剤を含む医薬製剤も提供される。そのような薬剤的に許容可能な担体、充填剤、保存剤、アジュバンド、可溶化剤、希釈剤及び／又は賦形剤は、たとえば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000に見出せる。

20

【0060】

したがって、本発明は、前記補助化合物が、ステロイド、ACE阻害剤（好ましくは、ペリンドプリル）、アンジオテンシン1型受容体遮断剤Losartan、腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）阻害剤、mIGF-1の供給源、好ましくはmIGF-1、mIGF-1発現を増強するための化合物、mIGF-1活性を増強するための化合物、抗酸化剤、イオンチャネル阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、L-アルギニン並びに／或いはエキソンスキッピングを増強し且つ／又はスプライソソーム構築及び／若しくはスプライシングを阻害するための化合物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤を提供する。本明細書において以前記載したように、種々の形で、たとえば、ゲンタマイシン若しくはPTC124^{16, 17}による終止コドン抑制により、又は機能性ミニ若しくはミクロジストロフィン遺伝子のアデノ随伴ウイルス（AAV）媒介遺伝子送達により^{18~20}、個人には機能性ジストロフィンタンパク質が与えられる。

30

【0061】

しかし、好ましくは、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物は、前記個人において異常なジストロフィンタンパク質の産生を少なくとも部分的に減少させるためのオリゴヌクレオチド、又はその機能性同等物を含む。異常なジストロフィンmRNA、又は異常なジストロフィンタンパク質の産生を減少させるとは、好ましくは、RT-PCR（mRNA）又は免疫蛍光若しくはウェスタンブロット解析（タンパク質）により、異常なジストロフィンmRNA、又は異常なジストロフィンタンパク質の初期量の90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%以下がまだ検出可能であることを意味する。異常なジストロフィンmRNA又はタンパク質は、本明細書では非機能性ジストロフィンmRNA又はタンパク質とも呼ばれる。非機能性ジストロフィンタンパク質は、好ましくは、アクチン及び／又はDGCタンパク質複合体のメンバーに結合することができないジストロフィンタンパク質である。非機能性ジストロフィンタンパク質又はジストロフィンmRNAは典型的には、タンパク質の無

40

50

傷のC末端を有するジストロフィンタンパク質を有していない、又はコードしていない。前記オリゴヌクレオチドは、好ましくは、アンチセンスオリゴリボヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、エキソンスキッピング技法が適用される。エキソンスキッピングは、真核細胞内で起きている天然のスプライシングプロセスを妨げる。高等真核生物では、細胞のDNA中のタンパク質の遺伝情報は、イントロン配列により互いに分離されているエキソンにコードされている。これらのイントロンは場合によっては非常に長い。真核生物の転写機構は、エキソンもイントロンも含有するmRNA前駆体を産生するが、スプライシング機構は、多くの場合すでにmRNA前駆体の産生中に、mRNA前駆体中に存在するエキソンを継ぎ合わせるによりタンパク質の実際のコード領域を産生している。

10

【0062】

エキソンスキッピングにより、少なくとも1つのスキップされたエキソンを欠く成熟mRNAが生じる。したがって、前記エキソンがアミノ酸をコードする場合、エキソンスキッピングにより改変産物が発現される。エキソンスキッピング技術は最近、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)の使用に向けられている。この研究の多くは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのmdxマウスモデルで行われている。mdxマウスは、そのジストロフィン遺伝子のエキソン23にナンセンス突然変異体を担っているが、DMDの動物モデルとして使用されてきた。機能性ジストロフィンタンパク質の合成を妨げるはずのmdx突然変異にもかかわらず、mdx筋組織にはまれな天然に存在するジストロフィン陽性線維が観察されている。これらのジストロフィン陽性線維は、体細胞突然変異のせいで、又は選択的スプライシングを通じて、見かけ上天然に存在するエキソンスキッピング機構から生じたと考えられる。それぞれジストロフィンmRNA前駆体のイントロン22及び23の3'及び/又は5'スプライス部位に向けられたAONは、通常はイントロン23の除去に関与している因子を妨害し、そのためにエキソン23もmRNAから除去されたことが明らかにされている^{3, 5, 6, 39, 40}。

20

【0063】

特定のエキソンの標的スキッピングにより、DMD表現型はより軽度のBMD表現型に変換される。エキソンのスキッピングは、好ましくは、スプライス部位のうちの1つ若しくは両方、又はエキソン内部配列のいずれかを標的するAONの結合により誘導される。エキソン内部配列に向けられるオリゴヌクレオチドは典型的には、非エキソン配列との重複を示さない。このオリゴヌクレオチドは、好ましくは、少なくともこれらのスプライス部位がイントロン中に存在しない限り、スプライス部位と重複することはない。エキソン内部配列に向けられるオリゴヌクレオチドは、好ましくは、隣接イントロンに相補的な配列を含有していない。したがって、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体のエキソンを、前記mRNA前駆体のスプライシングから産生されるmRNAに包含することを阻害するためのオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤がさらに提供される。好ましくは、ジストロフィンmRNA前駆体から産生されるmRNAにエキソンが欠失していることにより、短くはなるが、機能性のジストロフィンタンパク質のコード領域が生み出されるように、エキソンスキッピング技法は適用される。この文脈では、エキソンの包含を阻害することは、好ましくは、最初の異常なジストロフィンmRNAの検出が、RT-PCRにより評価されると少なくとも約10%減少すること、又は対応する異常なジストロフィンタンパク質が、免疫蛍光若しくはウェスタンブロット解析により評価されると少なくとも約10%減少することを意味する。減少は、好ましくは、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%である。

30

40

【0064】

DMD患者に機能性ジストロフィンタンパク質が与えられると、DMDの原因が取り除かれる。したがって、次に、DMDの症状は十分に軽減されると予想されるであろう。しかし、すでに前に記載したように、本発明は、エキソンスキッピング技法が機能性ジスト

50

ロフィントンパク質を与えることができるとしても、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性、及び／若しくは生存を改善するための補助化合物をDMD患者に投与することにより、DMDの症状はさらに軽減されるという洞察を提供する。さらに、本発明は、炎症を相殺する補助治療はAON治療にマイナスの影響を与えないという洞察を提供する。本発明は、エキソンに又は前記エキソンの1つの若しくは両方のスプライス部位に向けられたオリゴヌクレオチドを使用する場合は、前記エキソンを含むmRNA前駆体からのジストロフィンエキソンのスキッピング頻度は増強されるという洞察をさらに提供する。増強されたスキッピング頻度は、DMD又はBMD個人の筋細胞で産生される機能性ジストロフィントンパク質のレベルも増加させる。

10

【0065】

ジストロフィンmRNA前駆体のエキソンは、両スプライス部位がスプライソソーム複合体により認識される場合のみ、こうして得られるmRNA中に含まれることになるために、スプライス部位はAONの明白な標的である。したがって、一実施形態は、前記個人に機能性ジストロフィントンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体の非エキソン領域に相補的である配列を含むオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤を提供する。一実施形態では、ジストロフィンmRNA前駆体の非エキソン領域にのみ相補的であるAONが使用される。しかし、これは必須ではなく、イントロン特異的配列のほかにもエキソン特異的配列を含むAONを使用することも可能である。そのようなAONは、ジストロフィンmRNA前駆体の非エキソン領域に相補的である配列のほかにもジストロフィンmRNA前駆体のエキソン領域に相補的である配列も含む。当然のことながら、AONは必ずしもジストロフィンエキソン又はイントロンの全配列に相補的ではない。そのようなエキソン又はイントロンの一部分に相補的なAONが好ましい。AONは、好ましくは、ジストロフィンエキソン及び／又はイントロンの少なくとも一部分に相補的であり、前記部分は少なくとも13ヌクレオチドを有する。

20

【0066】

ジストロフィンmRNA前駆体のスプライシングは、2つの連続的エステル転移反応を介して起こる。まず、スプライソソーム構築中に定義されるイントロン内の特定の分枝部位ヌクレオチドの2'OHが、イントロンの最初のヌクレオチドに5'スプライス部位で求核攻撃を行い、ラリアット中間体を形成する。第2に、次に、放出された5'エキソンの3'OHが、イントロンの最後のヌクレオチドに3'スプライス部位で求核攻撃を行い、したがってエキソン同士を結合させイントロンラリアットを放出する。このように、イントロンの分枝部位とスプライス部位はスプライシング事象に関与している。したがって、そのような分枝部位及び／又はスプライス部位に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドは、好ましくは、エキソンスキッピングのために使用される。したがって、前記個人に機能性ジストロフィントンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体のスプライス部位及び／若しくは分枝部位に相補的である配列を含むオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤がさらに提供される。

30

40

【0067】

スプライス部位はコンセンサス配列を含有するので、スプライス部位に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物（本明細書ではAONとも呼ばれる）の使用は乱雑なハイブリダイゼーションの危険を伴う。スキップされることになるエキソンの部位以外のスプライス部位へのAONのハイブリダイゼーションは、スプライシングプロセスの正確さを容易に妨げるおそれがある。イントロン配列に相補的なAONの使用に関連するこれら及び他の潜在的問題を克服するために、好ましい実施形態は、前記個人に機能性ジストロフィントンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体エキソンに相補的である配列を含むオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤を提供する。好ましくは、前記AON

50

は、前記ジストロフィンmRNA前駆体中の少なくとも1つのエキソンのエキソン包含シグナルを特異的に阻害することができる。エキソン包含シグナル(EIS)の妨害は、そのようなエレメントがエキソン内に位置しているという利点がある。スキップされることになるエキソンの内部に対するAONを与えることにより、エキソン包含シグナルを妨害し、それによりスプライシング装置から効果的にエキソンをマスクすることが可能である。したがって、スプライシング装置がスキップされることになるエキソンを認識できないと、エキソンが最終mRNAから排除される。本実施形態は、スプライシング機構の酵素的プロセス(エキソン同士の結合)を直接に妨害しない。このせいで、方法はより特異的で及び/又は信頼性のあるものになると考えられる。EISは、スプライス受容部位及び供与部位が特定の空間的立体構造を帯びることを可能にするエキソンの特定の構造であると考えられる。この概念では、スプライス機構がエキソンを認識するのを可能にするのは特定の空間的立体構造である。しかし、本発明は確かにこのモデルに限定されるものではない。エキソンに結合できる薬剤は、EISを阻害することができるが見出されている。AONは、どの時点でも前記エキソンに特異的に接触する可能性があり、それでも前記EISを特異的に阻害することができる。

【0068】

エキソン46配列に特異的なエキソン内部AONを使用して、我々は以前、エキソン45欠損を有する2人の異なるDMD患者由来の培養筋管においてスプライシングパターンを調節することができた。AON処置に続いて、エキソン46がスキップされ、そのためにリーディングフレームが修復され、少なくとも75%の細胞においてジストロフィン合成が誘導された。エキソンスキッピングは、ヒト対照並びにエキソン内部AONを使用した39の異なるDMDエキソンに対して、欠損、重複及び点突然変異を含む異なる突然変異体を有する一連の患者にも効率的に誘導することができることを、我々は最近明らかにした^{1, 2, 11~15}。

【0069】

本発明の文脈内で、オリゴヌクレオチドの機能性同等物とは、好ましくは、1つ又は複数のヌクレオチドが置換されており、前記機能性同等物の活性が少なくともある程度は保持されている本明細書において定義されるオリゴヌクレオチドを意味する。好ましくは、前記機能性同等物の活性とは、機能性ジストロフィンタンパク質を与えることである。したがって、前記機能性同等物の前記活性は、好ましくは、機能性ジストロフィンタンパク質の量を定量化することにより評価される。機能性ジストロフィンとは、本明細書において好ましくは、アクチン及びDGCタンパク質複合体のメンバーに結合することができるジストロフィンであると定義される。オリゴヌクレオチドの前記活性の評価は、好ましくは、RT-PCRにより、又は免疫蛍光若しくはウエスタンブロット解析により行われる。前記活性は、好ましくは、それが機能性同等物が由来する前記オリゴヌクレオチドの対応する活性の少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%以上を表している場合には、少なくともある程度は保持されている。本出願全体で、用語オリゴヌクレオチドが使用される場合、それは本明細書において定義されるその機能性同等物で置き換えてもよい。

【0070】

したがって、ジストロフィンmRNA前駆体エキソンに相補的である配列を含む若しくはからなるオリゴヌクレオチド、又はその機能性同等物の使用は、良好な抗DMD結果を与える。好ましい実施形態では、ジストロフィンmRNA前駆体エキソンの2、8、9、17、19、29、40~46、48~53、55若しくは59の少なくとも一部分であって、前記部分が少なくとも13ヌクレオチドを有する部分に相補的である配列を含む若しくは上記配列からなるオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物が使用される。しかし、前記部分は、少なくとも14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチドを有してもよい。

【0071】

最も好ましくは、ジストロフィンmRNA前駆体エキソン51、44、45、53、46、43、2、8、50及び／若しくは52の少なくとも一部分であって、少なくとも13ヌクレオチドを有する部分に相補的である配列を含む若しくは上記配列からなるAONが使用される。しかし、前記部分は、少なくとも14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチドを有してもよい。最も好ましいオリゴヌクレオチドは、以下の配列、すなわち配列番号3から配列番号284までのそれぞれにより同定される。したがって、本明細書で使用される非常に好ましいオリゴヌクレオチドは、配列番号3から配列番号284までの配列によって表される。本明細書で使用する非常に好ましいオリゴヌクレオチドは配列番号3から配列番号284までからなるグループから選択される。

10

【0072】

前記エキソンは、患者集団適用性の減少する順序で記載されている。したがって、ジストロフィンmRNA前駆体エキソン44その他に相補的な配列を含むAONと比べると、ジストロフィンmRNA前駆体エキソン51の少なくとも一部分に相補的である配列を含むAONの使用が、DMD患者集団の大部分での使用に適している。

【0073】

好ましい実施形態では、ジストロフィンmRNA前駆体の一部分に相補的である配列を含む本発明のオリゴヌクレオチドは、その相補的部分が本発明のオリゴヌクレオチドの長さの少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも60%、さらに好ましくは少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、又はさらに好ましくは少なくとも95%、又はさらに好ましくは少なくとも98%以上であるようなものである。非常に好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、本明細書で定義されるジストロフィンmRNA前駆体の一部分に相補的である配列からなる。たとえば、オリゴヌクレオチドは、本明細書で定義されるジストロフィンmRNA前駆体の一部分に相補的である配列及び追加の隣接配列を含んでいてもよい。さらに好ましい実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの前記相補的部分の長さは、少なくとも13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチドである。好ましくは、追加の隣接配列を使用して、オリゴヌクレオチドへのタンパク質の結合を改変する、又はオリゴヌクレオチドの熱力学的特性を改変する、さらに好ましくは、標的RNA結合親和性を改変する。

20

30

【0074】

好ましい実施形態は、前記個人に機能性ジストロフィントタンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体エキソンの別の部分にハイブリダイズしているジストロフィンmRNA前駆体エキソンの領域（閉鎖構造）に相補的である配列と、前記ジストロフィンmRNA前駆体においてハイブリダイズしていないジストロフィンmRNA前駆体エキソンの領域（開放構造）に相補的である配列とを含むオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤を提供する。

【0075】

本実施形態では、我々のWO2004/083432特許公開を参照する。RNA分子は、大部分が同一RNA内の相補的又は部分的に相補的ストレッチの塩基対形成のせいで強固な二次構造を示している。RNAにおける構造がRNAの機能に役割を果たしているずっと以前から考えられてきた。理論に拘泥するものではないが、エキソンのRNAの二次構造がスプライシングプロセスを構築するのに役割を果たしていると考えられる。その構造を通じて、エキソンはmRNAに含める必要がある部分として認識される。本明細書では、このシグナル伝達機能は、エキソン包含シグナルと呼ばれている。本実施形態の相補的オリゴヌクレオチドは、エキソンの構造を妨害することができ、それによってエキソンのエキソン包含シグナルを妨害することができる。多くの相補的オリゴヌクレオチドが実際にこの能力を備えており、効率にはオリゴヌクレオチドにより差があることが見出

40

50

されている。この好ましい実施形態のオリゴヌクレオチド、すなわち、前記重複が天然エキソンRNAの開放及び閉鎖構造に向けられたオリゴヌクレオチドは、あらゆる考えられるオリゴヌクレオチドから選ばれたものである。選ばれたものは、エキソン包含シグナルを効率的に妨害することができるオリゴヌクレオチドを包含する。理論に拘泥するものではないが、開放構造との重複はオリゴヌクレオチドの侵入効率を改善し（すなわち、オリゴヌクレオチドがその構造に入ることができる効率を増加させる）、閉鎖構造との重複は、続いてエキソンのRNAの二次構造を妨害する効率を増加させ、それによってエキソン包含シグナルを妨害すると考えられる。閉鎖及び開放構造の両方に対する部分的相補性の長さは極端に制限されることはないことが見出されている。どちらかの構造における相補性の長さが可変であるオリゴヌクレオチドを使用して高効率を我々は観察している。相補性という用語は、生理的条件下で核酸の別のストレッチにハイブリダイズすることができる核酸のストレッチに言及するために本明細書では使用される。したがって、相補性の領域のすべての塩基が反対鎖の塩基と対形成することができることが絶対的に要求されるわけではない。たとえば、オリゴヌクレオチドを設計する際に、たとえば、相補鎖上の塩基と塩基対形成をしない残基を組み入れたいことがある。細胞内の状況下で、ヌクレオチドのストレッチが相補的部分とハイブリダイズすることができれば、ミスマッチはある程度は許されてよい。好ましい実施形態では、（前記開放又は前記閉鎖構造のどちらかに対して）相補的部分は、少なくとも3、さらに好ましくは少なくとも4連続ヌクレオチドを含む。相補的領域は、好ましくは、結合したときに、その領域がmRNA前駆体のエキソンに特異的であるように設計される。そのような特異性は、これは系内の他のmRNA（前駆体）の実際の配列に依存するために、種々の長さの相補的領域を使用して生み出してもよい。1つ又は複数の他のmRNA前駆体もオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができることになる危険は、オリゴヌクレオチドの大きさが増加するに従って減少する。相補性の領域にミスマッチを含むが、mRNA前駆体の標的領域（単数又は複数）にハイブリダイズする能力を保持しているオリゴヌクレオチドは、本発明において使用することができることは明らかである。しかし、好ましくは、少なくとも相補的部分は、これらの部分が典型的には、1つ又は複数の相補的領域にそのようなミスマッチを有するオリゴヌクレオチドよりも高い効率及び高い特異性を有するために、そのようなミスマッチを含まない。ハイブリダイゼーション強度が高いほど（すなわち、反対鎖との相互作用の数が増加する）系のスプライシング機構を妨害するプロセスの効率を増加させるのに有利であると考えられる。好ましくは、相補性は90と100%の間である。一般に、これは、約20ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド中にほぼ1又は2ミスマッチを許す。

【0076】

二次構造は、エキソンが存在するmRNA前駆体という状況で分析されるのが最もよい。そのような構造は実際のRNAで分析してもよい。しかし、構造モデリングプログラムを使用して、極めてよく（最も低いエネルギーコストで）RNA分子の二次構造を予測することが現在可能である。適切なプログラムの非限定的例は、RNAmfoldバージョン3.1サーバーである⁴¹。当業者であれば、ヌクレオチド配列が与えられたら、適切な再現性でエキソンの可能性の高い構造を予測することができるであろう。そのようなモデリングプログラムにエキソン及び隣接イントロン配列の両方を与えた場合には、最良の予測が得られる。典型的に、全mRNA前駆体の構造のモデルを作る必要はない。

【0077】

オリゴヌクレオチドが向けられる開放及び閉鎖構造は、好ましくは、互いに隣接している。このような形で、開放構造へのオリゴヌクレオチドのアニーリングにより、アニーリングがこの閉鎖構造の中にまで進むとすぐに閉鎖構造の開口が誘導される。この作用を通じて、以前閉鎖していた構造は異なる立体構造を帯びる。異なる立体構造のせいで、エキソン包含シグナルが乱される。しかし、潜在的（隠れた）スプライス受容部位及び／又は供与部位配列が標的エキソン内に存在する場合は、時折新しいエキソン包含シグナルが生み出されて、異なる（ネオ）エキソン、すなわち、異なる5'末端、異なる3'末端、又は両方を有するエキソンを定義する。標的エキソンはmRNAから排除されるために、こ

の種の活性は本発明の範囲内である。mRNA中に標的エキソンの部分を含有する新しいエキソンが存在しても、標的エキソンそれ自体が排除されるという事実は変わらない。ネオエキソンの包含は、時折しか起こらない副作用と見なすことができる。エキソンスキッピングを使用して、突然変異の結果として乱されるジストロフィンのオープンリーディングフレーム（の一部）を修復する場合には、2つの可能性が存在する。1つは、ネオエキソンがリーディングフレームの修復において機能性であり、他方の場合には、リーディングフレームは修復されない。エキソンスキッピングを用いてジストロフィンリーディングフレームを修復するためのオリゴヌクレオチドを選択する際、当然のことながら、これらの条件下では、ネオエキソンがあってもなくても、ジストロフィンオープンリーディングフレームを修復するエキソンスキッピングを実際に生じるオリゴヌクレオチドのみが選択されることは明らかである。

【0078】

前記個人に機能性ジストロフィントタンパク質を与えるための前記化合物が、ジストロフィンmRNA前駆体のエキソンのRNA中のセリン-アルギニン（SR）タンパク質に対する結合部位に相補的である配列を含むオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤がさらに提供される。我々の特許出願WO2006/112705において、エキソンスキッピングを誘導する際のエキソン内部アンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）の有効性と前記AONの標的mRNA前駆体部位における（たとえばESEfinderにより）予想されるSR結合部位の存在との間に相関関係が存在することを我々はすでに開示した。したがって、一実施形態では、ジストロフィンエキソンのRNAにおけるSR（Ser-Arg）タンパク質に対する（推定）結合部位を決定すること及び前記RNAに相補的であり、前記（推定）結合部位に少なくとも部分的に重複しているオリゴヌクレオチドを作製することを含めて、オリゴヌクレオチドが作製される。用語「少なくとも部分的に重複している」は、SR結合部位のわずか1個のヌクレオチドのほかにも前記結合部位の複数のヌクレオチドの重複のほかにも前記結合部位の完全な重複を含むこととして本明細書では定義されている。本実施形態は、好ましくは、前記RNAの二次構造から、前記RNAの別の部分にハイブリダイズしている領域（閉鎖構造）及び前記構造中でハイブリダイズしていない領域（開放構造）を決定し、続いて、前記（推定）結合部位に少なくとも部分的に重複し、前記閉鎖構造の少なくとも一部分に重複し且つ前記開放構造の少なくとも一部分に重複するオリゴヌクレオチドを作製することをさらに含む。このような形で、我々は、mRNA前駆体からmRNAへのエキソン包含を妨害することができるオリゴヌクレオチドを得る機会を増加させる。最初を選択されたSR結合領域には要求される開放-閉鎖構造がないことがあり得るが、その場合には別の（第2の）SRタンパク質結合部位が選択され、次に、続いて開放-閉鎖構造の存在について試験される。SRタンパク質結合部位のほかにも（部分的に重複している）開放-閉鎖構造を含有する配列が同定されるまで、このプロセスは続けられる。次に、この配列を使用して、前記配列に相補的であるオリゴヌクレオチドを設計する。

【0079】

オリゴヌクレオチドを作製するためのそのような方法は、記載の順序、すなわち、ジストロフィンエキソン由来のRNAの二次構造から、前記RNAの別の部分にハイブリダイズしている構造を帯びる領域（閉鎖構造）及び前記構造中でハイブリダイズしていない領域（開放構造）を決定し、続いて、前記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が前記閉鎖構造に相補的であり、前記オリゴヌクレオチドの少なくとも別の一部分が前記開放構造に相補的であるオリゴヌクレオチドを作製することを含めて、先ずオリゴヌクレオチドを作製することを逆転させることによっても実施される。次に、これに続いて、SRタンパク質結合部位が前記開放/閉鎖構造と少なくとも重複しているかどうかを判定する。このような形で、WO2004/083432の方法は改善される。さらに別の実施形態では、選択は同時に実施される。

【0080】

どんな理論にも拘泥するものでもないが、SRタンパク質結合部位に向けられたオリゴ

ヌクレオチドを使用すれば、S Rタンパク質の結合部位へのS Rタンパク質の結合が（少なくとも部分的に）損なわれ、スプライシングが乱される又は損なわれると現在考えられる。

【0081】

好ましくは、開放／閉鎖構造とS Rタンパク質結合部位は部分的に重複しており、さらに好ましくは、開放／閉鎖構造はS Rタンパク質結合部位と完全に重複しており、又はS Rタンパク質結合部位は開放／閉鎖構造と完全に重複している。これにより、エキソン包含を乱すことの改善が可能になる。

【0082】

コンセンサススプライス部位配列に加えて、多くの（すべてではないにしても）エキソンは、スプライソソームによる本当のスプライス部位の認識を促進するエキソンスプライシングエンハンサー（ESE）配列などのスプライシング調節配列を含有する^{42, 43}。S Rタンパク質と呼ばれるスプライシング因子のサブグループは、これらのESEに結合して、U1及びU2AFなどの他のスプライシング因子を（弱く定義される）スプライス部位へ動員することができる。4種の最も豊富なS Rタンパク質（SF2/ASF、SC35、SRp40及びSRp55）の結合部位は詳細に分析されており、これらの結果は、これらのS Rタンパク質に対する潜在的結合部位を予想するウェブ情報源であるESEfinderに組み入れられている^{42, 43}。AONの有効性とSF2/ASF、SC35及びSRp40結合部位の有無の間には相関関係が存在する。好ましい実施形態では、したがって、本発明は、前記S Rタンパク質がSF2/ASF又はSC35又はSRp40である、上記の方法、組合せ、使用又は医薬製剤を提供する。

【0083】

一実施形態では、DMD患者は、転写物中のジストロフィンエキソンの正確なスプライシングに必要な調節RNA配列に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチド、又はその機能性同等物を使用することにより、機能性ジストロフィタンパク質を与えられる。いくつかのシス作用性RNA配列が、転写物中のエキソンの正確なスプライシングに必要である。特に、イントロン又はエキソンスプライシングエンハンサー（ISE及びESE）若しくはサイレンサー（ISS及びESS）などの補充エレメントが、構成的又は代替エキソンの特異的及び効率的スプライシングを調節するために同定される。エレメントに結合する配列特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）を使用して、DMDで示されるように、その調節機能はエキソンがスキップされるように乱される。したがって、好ましい実施形態では、イントロンスプライシングエンハンサー（ISE）、エキソンスプライシングエンハンサー（ESE）、イントロンスプライシングサイレンサー（ISS）、及び／又はエキソンスプライシングサイレンサー（ESS）に相補的であるオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物が使用される。本明細書で以前すでに記載したように、前記エキソンがmRNAに含まれる必要がある一部分としてスプライシング機構により認識されないように、前記エキソンのエキソン包含シグナルを特異的に阻害することができる薬剤によりジストロフィンエキソンは、好ましい実施形態では、スキップされる。そのために、前記エキソンのないmRNAが形成される。

【0084】

本発明の方法で使用されるAONは、好ましくは、ジストロフィンエキソンRNA、又はジストロフィンイントロンRNAの13と50ヌクレオチド間の連続する部分に相補的である。一実施形態では、本発明の方法で使用されるAONは、ジストロフィンエキソンRNA、又はジストロフィンイントロンRNAの16と50ヌクレオチド間の連続する部分に相補的である。好ましくは、前記AONは前記エキソンRNAの15から25ヌクレオチドの間の連続する部分に相補的である。さらに好ましくは、ジストロフィンエキソンRNA、又はジストロフィンイントロンRNAの20から25ヌクレオチドの間の連続する部分に相補的である配列を含むAONが使用される。

【0085】

異なる種類の核酸を使用してオリゴヌクレオチドを作製してもよい。好ましくは、RN

10

20

30

40

50

A/RNAハイブリッドは非常に安定なので、前記オリゴヌクレオチドはRNAを含む。エキソンスキッピング技法の目的の1つは被験者におけるスプライシングを方向づけることであるために、オリゴヌクレオチドRNAは、RNAに追加の特性、たとえば、エンドヌクレアーゼ及びリボヌクレアーゼHに対する耐性、追加のハイブリダイゼーション強度、増加した安定性（たとえば、体液中における）、増加した又は減少した柔軟性、低下した毒性、増加した細胞内輸送、組織特異性、などを与える修飾物を含むことが好ましい。好ましくは、前記修飾物は、2'-O-メチル-ホスホロチオエートオリゴリボヌクレオチド修飾物を含む。好ましくは、前記修飾物は、2'-O-メチル-ホスホロチオエートオリゴデオキシリボヌクレオチド修飾物を含む。したがって、一実施形態は、修飾物、好ましくは、2'-O-メチル修飾リボース（RNA）又はデオキシリボース（DNA）修飾物を含むRNAを含むオリゴヌクレオチドが使用される、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤を提供する。

10

【0086】

一実施形態では、本発明は、2'-O-メチル-ホスホロチオエートオリゴ（デオキシ）リボヌクレオチド修飾物を含むオリゴヌクレオチド及びロックド核酸を含むハイブリッドオリゴヌクレオチドを提供する。この特定の組合せは、ロックド核酸からなる同等物と比べて優れた配列特異性を有し、2'-O-メチル-ホスホロチオエートオリゴ（デオキシ）リボヌクレオチド修飾物からなるオリゴヌクレオチドと比べた場合には改善された有効性を有する。

【0087】

核酸模倣技術の出現により、核酸それ自体と必ずしも量においては類似していないが種類において類似している、好ましくは同一のハイブリダイゼーション特徴を有する分子を作製することが可能になった。そのような機能性同等物は、当然のことながら、本発明の方法における使用にも適している。オリゴヌクレオチドの機能性同等物の好ましい例は、ペプチド核酸及び／又はロックド核酸である。最も好ましくは、モルフォリノホスホロジアミダートが使用される。本発明のオリゴヌクレオチドの同等物の適切であるが非限定的例は、44～50に見出せる。1つ又は複数の同等物の互いの間及び／又は核酸との間のハイブリッドも、当然のことながら適切である。好ましい実施形態では、ロックド核酸はより高度な標的親和性及び低下した毒性を示し、したがって、エキソンスキッピングのより高度な効率を示すために、ロックド核酸はオリゴヌクレオチドの機能性同等物として使用される。

20

30

【0088】

一実施形態では、ジストロフィンエキソンのジストロフィンmRNAへの包含を阻害することができるオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物は、別のジストロフィンエキソンのジストロフィンmRNAへの包含を阻害することができる少なくとも1つの他のオリゴヌクレオチド又はその機能性同等物と組み合わせられる。このような形で、このmRNA前駆体から産生されるmRNA中へのジストロフィンmRNA前駆体の2つ以上のエキソンの包含が妨げられる。この実施形態は、さらに二重又は多重エキソンスキッピングと呼ばれる^{2, 15}。大半の場合、二重エキソンスキッピングにより、ジストロフィンmRNA前駆体から2つの標的エキソンのみが排除される。しかし、他の場合、標的エキソン及び前記mRNA前駆体中の前記エキソン同士の中間の領域全体が、他のエキソン（介在するエキソン）がそのような領域に存在する場合でも、産生されたmRNA中に存在しないことが見出された。DMD遺伝子を転写している細胞に、エキソン45に対する1つのオリゴヌクレオチド及びエキソン51に対する1つのオリゴヌクレオチドが添加される、DMD遺伝子由来のオリゴヌクレオチドの組合せで、この多重スキッピングは顕著に上述の通りとなった。そのような設定では、エキソン45から51までを含有しないmRNAが産生された。明らかに、言及されたオリゴヌクレオチドの存在下でのmRNA前駆体の構造は、スプライシング機構が刺激されてエキソン44と52を互いに連結するような構造であった。

40

【0089】

50

したがって、ジストロフィンmRNA前駆体の第1エクソンに相補的である少なくとも8、好ましくは16から80の間の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列が使用される、及び前記ジストロフィンmRNA前駆体の第2エクソンに相補的である少なくとも8、好ましくは16から80の間の連続するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列が使用される、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤がさらに提供される。

【0090】

好ましい実施形態では、前記第1及び前記第2エクソンは、前記ジストロフィンmRNA前駆体中で、前記オリゴヌクレオチドが相補的ではない少なくとも1つのエクソンにより分離されている。

【0091】

2つの相補的オリゴヌクレオチド間に連鎖を与えることにより、介在するエクソンのスキッピングも特異的に促進することが可能である。したがって、一実施形態では、少なくとも2つのジストロフィンエクソンに相補的なヌクレオチドのストレッチは、連結部分により分離される。したがって、ヌクレオチドの少なくとも2つのストレッチは、単一分子を形成するように本実施形態では連結される。したがって、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記オリゴヌクレオチド、又はその機能性同等物がジストロフィンmRNA前駆体中の少なくとも2つのエクソンに相補的であり、前記オリゴヌクレオチド、又は機能性同等物が少なくとも2つの部分を含み、第1の部分が前記少なくとも2つのエクソンの第1に相補的である少なくとも8、好ましくは16から80の間の連続するヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを含み、第2の部分が前記ジストロフィンmRNA前駆体中の第2のエクソンに相補的である少なくとも8、好ましくは16から80の間の連続するヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤がさらに提供される。連鎖はどんな手段を通じてでもよいが、好ましくは、ヌクレオチド連鎖を通じて実現される。後者の場合、一方の相補的エクソンと他方の相補的エクソンとの間に重複を含有しないヌクレオチドの数はゼロであることが可能であるが、好ましくは、4〜40ヌクレオチドの間である。連結部分は、オリゴヌクレオチドを連結することができるどんな種類の部分でも可能である。好ましくは、前記連結部分は少なくとも4ウラシルヌクレオチドを含む。現在、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特徴を模倣する多くの異なる化合物が入手可能である。そのような化合物は、本明細書ではオリゴヌクレオチドの機能性同等物と呼ばれるが、そのような同等物が、必ずしも量においてではないが種類において類似するハイブリダイゼーション特徴を有するならば、本発明にも適している。適切な機能性同等物は本記述において以前に言及されている。言及したように、本発明のオリゴヌクレオチドは、標的エクソンへのハイブリダイゼーションに寄与するオリゴヌクレオチドのみからなる必要はない。追加の材料及び／又はヌクレオチドが加えられてもよい。

【0092】

DMD遺伝子は、多くの異なるエクソンがある大きな遺伝子である。この遺伝子がX染色体上に位置していることを考慮すると、女子も両親からこの遺伝子の不良なコピーを受け取ることがあるためにこの疾患に冒されることがあるが、冒されるのは、又はその筋細胞において特に偏ったX染色体不活化のせいで機能性対立遺伝子の特に偏った不活化を患っているのは大部分が男子である。このタンパク質は、少なくとも2、6Mbの範囲にわたり複数のエクソン(79)によりコードされている。DMD遺伝子のどの部分でも欠損が起こる可能性がある。特定のエクソン(単数又は複数)のスキッピングにより、正常よりは短い但至少部分的には機能性のジストロフィンタンパク質をコードする再構築されたmRNAが生じることが非常に多い。エクソンスキッピング技術に基づく薬物の開発における実際的問題は、細胞内の機能性ジストロフィンタンパク質の欠損を生じる可能性がある複数の突然変異である。単一エクソンのスキッピングによりすでに複数の異なる突然変異が補正できるという事実にもかかわらず、突然変異が異なれば異なるエクソンがスキップされる必要があるので、この複数の突然変異は多数の異なる医薬品を作製する必要がある。2つ以上のエクソンのスキッピングを誘導することができる化合物の利点は、

10

20

30

40

50

単一の医薬品を使用して2つ以上のエキソンをスキップすることができることである。この特性は、多くの異なるDMD、又は特に、重症BMD突然変異を治療するために限られた数の医薬品だけを作製すれば済むという点で実際的に非常に有用であるだけではない。現在当業者に開かれているもう1つの選択肢は、特に機能性の再構築ジストロフィンタンパク質を選択し、これらの好ましいジストロフィンタンパク質を産生することができる化合物を作製することである。そのような好ましい最終結果は、軽度表現型ジストロフィンとさらに呼ばれる。

【0093】

本発明に従って使用するために本明細書に定義される各化合物、オリゴヌクレオチド及び／又は補助化合物は、DMD若しくはBMDに冒された又はDMD若しくはBMDを発症する危険のある個人のインビボでの細胞、組織及び／又は器官への直接投与に適している可能性があり、インビボ、エクスビボ又はインビトロで直接投与してもよい。

【0094】

代わりに、細胞にオリゴヌクレオチド又はその同等物を与えるための適切な手段は、当技術分野に存在している。オリゴヌクレオチド又はその機能性同等物は、たとえば、発現ベクターが前記オリゴヌクレオチドを含む転写物をコードする発現ベクターの形で細胞に与えてもよい。発現ベクターは、好ましくは、遺伝子送達媒体を介して細胞内に導入される。好ましい送達媒体は、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)などのウイルスベクター、又はレンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクター⁴、⁵¹、⁵²、等である。プラスミド、人工染色体、標的相同組換え及び細胞のヒトゲノムへの組込みに適したプラスミドも、本明細書で定義されるオリゴヌクレオチドの送達に適宜適用してもよい。本発明に好ましいのは、転写がPol IIIプロモーターから推進される、及び／又は転写物が小転写物の送達に良好な結果をもたらすU1若しくはU7転写物との融合物の形であるベクターである。適切な転写物を設計するのは技術者の技能の範囲内である。好ましいのは、Pol III推進転写物である。好ましいのは、U1又はU7転写物との融合転写物の形である⁴、⁵¹、⁵²。そのような融合物は記載の通りに作製してよい⁵³、⁵⁴。オリゴヌクレオチドはそのまま送達してもよい。しかし、オリゴヌクレオチドはウイルスベクターにコードされていてもよい。典型的には、これは、転写物の一部にオリゴヌクレオチドの配列を含むRNA転写物の形においてである。

【0095】

これまですでに達成された前進を考慮すると、細胞にオリゴヌクレオチド又はその同等物を与えるための手段の改良が期待される。そのような将来の改良は、当然のことながら、本発明の方法を使用してmRNAの再構築への言及される効果を実現するために組み込まれてもよい。オリゴヌクレオチド又はその同等物はそのまま細胞に送達することができる。オリゴヌクレオチド又はその同等物を個人に投与する場合、オリゴヌクレオチドは送達方法に適合する溶液中に溶解されるのが好ましい。静脈内、皮下、筋肉内、くも膜下腔内及び／又は脳室内投与では、溶液は生理食塩水であることが好ましい。本発明の方法のために特に好ましいのは、本明細書で定義される化合物の、好ましくは、オリゴヌクレオチドの、及び随意に補助化合物と一緒に、細胞への及び細胞内、好ましくは筋細胞内への送達に役立つことになる賦形剤の使用である。好ましいのは、本明細書で定義されるような化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドを、及び随意にベシクル又はリポソームと複合された又は閉じ込められた補助化合物と一緒に、細胞膜を通して送達する複合体、ベシクル及び／又はリポソームを形成することができる賦形剤である。これらの賦形剤の多くは当技術分野では既知である。適切な賦形剤は、ポリエチレンイミン(PEI)、又はポリプロピレンイミン若しくはポリエチレンイミン共重合体(PEC)及び誘導体、Ex Gen 500、合成両親媒性物質(SAINT-18)、リポフェクチンTM、DOTAPを含む類似のカチオン重合体、並びに／或いはそのような化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドを、及び随意に本明細書に定義される補助化合物と一緒に、細胞に、好ましくは、筋細胞に送達することができる粒子に自己組織化できるウイルスカプシドタンパク質を含む。そのような賦形剤は、(アンチセンスなどのオリゴヌクレオチド)核酸を、筋

10

20

30

40

50

細胞を含む幅広い種類の培養細胞に効率的に送達することが明らかにされている。その高いトランスフェクションポテンシャルは、全体の細胞生存の観点から許容される低度から中程度の毒性と組み合わせられる。構造改変の容易さを利用して、追加の改変並びにその追加の（インビボ）核酸移行特性及び毒性の分析を可能にすることができる。

【0096】

リポフェクチンは、リポソーマルトランスフェクション薬剤の例を表す。リポフェクチンは、2つの脂質成分、すなわちカチオン脂質N-[1-(2,3ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)(c.p.メチル硫酸塩であるDOTAP)及び中性脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)からなる。中性成分は細胞内放出を媒介する。別のグループの送達システムは重合体ナノ粒子である。

10

【0097】

DNAトランスフェクション試薬としてよく知られているジエチルアミノエチルアミノエチル(DEAE)デキストランなどのポリカチオンは、ブチルシアノアクリレート(PBCA)及びヘキシルシアノアクリレート(PHCA)と組み合わせて、本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドを、及び随意に補助化合物と一緒に、細胞膜を通して細胞内に送達することができるカチオンナノ粒子を処方することができる。

【0098】

これらの一般的ナノ粒子材料に加えて、カチオンペプチドプロタミンは、本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドを、及び随意に補助化合物と一緒に、コロイドとして処方する別のアプローチを提供する。このコロイドナノ粒子システムは、本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドの、随意に補助化合物と一緒に細胞内放出をパッケージし媒介する単純自己組織化プロセスにより調製することができるいわゆるプロティクルを形成することができる。当業者であれば、上記の又は他の市販の代替りの賦形剤、並びに本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドを、及び随意にヒトにおけるデュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィーの治療のための前記化合物を送達する本発明において使用するための補助化合物と一緒に、パッケージし送達する送達システムのどれでも選択し適用してもよい。

20

【0099】

さらに、本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドを、及び随意に補助化合物と一緒に、細胞、細胞質及び／又はその核への取込みを促進するよう特異的に設計された標的リガンドに共有又は非共有結合させることもできると考えられる。そのようなリガンドは、(i)細胞取込みを促進する細胞、組織、若しくは器官特異的エレメントを認識する(ペプチド(様)構造を含むがこれに限定されることはない)化合物、並びに／又は(ii)細胞への取込み及び／若しくは本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドの、及び随意に補助化合物と一緒に、ベシクル、たとえば、エンドソーム若しくはリソソームからの細胞内放出を促進することができる化合物を含むことができると考えられる。

30

【0100】

したがって、好ましい実施形態では、本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドは、及び随意に補助化合物と一緒に、少なくとも賦形剤及び／又は送達のための標的リガンド及び／又は前記化合物の細胞への送達装置及び／又はその細胞内送達を増強することと一緒に与えられる薬物に処方される。したがって、本発明は、本明細書で定義される化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチドを、及び随意に補助化合物と一緒に含み、少なくとも1つの賦形剤及び／又は送達のための標的リガンド及び／又は前記化合物の細胞への送達装置及び／又はその細胞内送達を増強することをさらに含む薬剂的に許容可能な組成物も包含する。オリゴヌクレオチド及び補助化合物は単一の組成物又は調製物に処方しなくてもよいことは理解されるべきである。その種類に応じて、当業者であれば、化合物ごとにどのような種類の処方が最も適切であるか分かるであろう。

40

【0101】

50

好ましい実施形態では、本発明は、個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための化合物、並びに炎症を抑える、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物、並びに／又は筋線維機能、完全性及び／若しくは生存を改善するための補助化合物を含む部分のキットを提供する。

【0102】

好ましい実施形態では、約0.1 nMと約1 μ M間の幅がある本明細書に定義されるオリゴヌクレオチドの濃度が使用される。さらに好ましくは、使用される濃度は、約0.3から約400 nMの間の幅があり、さらに好ましくは、約1から約200 nMの間の幅がある。いくつかのオリゴヌクレオチドが使用される場合、この濃度はオリゴヌクレオチドの総濃度又は添加される各オリゴヌクレオチドの濃度のことでよい。上に与えられるオリゴヌクレオチド（単数又は複数）の濃度範囲は、インビトロ又はエキスピボ使用に好ましい濃度である。当業者であれば、使用されるオリゴヌクレオチド（単数又は複数）、治療される標的細胞、遺伝子標的及びその発現レベル、使用される培地、並びにトランスフェクション及びインキュベーション条件に応じて、使用されるオリゴヌクレオチド（単数又は複数）の濃度はさらに変わってもよく、これ以上最適化される必要があってもよい。

【0103】

さらに好ましくは、DMD又はBMDを予防する、治療をするための本発明で使用されることになる化合物、好ましくは、オリゴヌクレオチド及び補助化合物は、合成的に作製され、薬剤的に許容可能な組成物又は調製物に処方された形で細胞、組織、器官及び／又は患者に直接投与される。医薬組成物の被験者への送達は、好ましくは、1つ又は複数の非経口注射、たとえば、静脈内及び／又は皮下及び／又は筋肉内及び／又はくも膜下腔内及び／又は脳室内投与により、好ましくは、注射により、人体の1つの部位に又は複数の部位に実施される。

【0104】

エキソンスキッピングに加えて、終止コドンのリードスルーに基づく治療を使用して、DMD患者に機能性ジストロフィンタンパク質を与えることも可能である。終止コドンを抑制することができる化合物は、ジストロフィン遺伝子内で終止コドンが形成されることになるナンセンス突然変異に冒されているDMD患者のサブグループ（約7%）に特に適している。一実施形態では、終止コドンを抑制することができる前記化合物は、抗生物質のゲンタマイシンを含む。mdxマウスでの最近の研究では、動物間で変動はあったが、ゲンタマイシン処置により正常レベルの20%まで新規のジストロフィン発現が誘導された。しかし、ゲンタマイシンを使用した人体試験では、結論に達していない⁵⁵。PTC124は、ゲンタマイシンのリードスルー活性を比較的低濃度で模倣する新しい種類の小分子に属する。PTC124を投与すると、インビトロでもmdxマウスにおいても完全長の機能的に活性なジストロフィンが産生される¹⁶。PTC124を使用した第I/I相試験が、DMDでの適用のためだけではなく嚢胞性線維症に対しても現在進行中である^{16, 17}。参考文献16及び17は、本発明において使用するためのPCIT124化合物の好ましい用量も記載している。したがって、前記個人に機能性ジストロフィンタンパク質を与えるための前記化合物が終止コドンを抑制するための化合物を含む、本発明に従った方法、組合せ、使用又は医薬製剤がさらに提供される。終止コドンを抑制するための前記化合物は、好ましくは、ゲンタマイシン、PTC124又はその機能性同等物を含む。最も好ましくは、前記化合物はPTC124を含む。

【0105】

一実施形態では、個人は、マイクロミニージストロフィン遺伝子を含むベクター、好ましくは、ウイルスベクターを使用して、機能性ジストロフィンタンパク質を与えられる。最も好ましくは、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）ベクターが使用される。AAVは、非病原性でヘルパー依存性生活環を示す一本鎖DNAパルボウイルスである。他のウイルス（アデノウイルス、レトロウイルス、及び単純ヘルペスウイルス）とは対照的に、rAAVベクターは、成熟骨格筋を形質導入するのに非常に効率的であることを実証している。古典的DMD「遺伝子付加」研究におけるrAAVの適用は、その制限されたパッ

ケーシング限界 (< 5 kb) により妨げられてきた。したがって、rAAVは、好ましくは、はるかに小さいマイクロ又はミニジストロフィン遺伝子の効率的送達に適用される。そのようなマイクロ又はミニジストロフィン遺伝子の投与により、少なくとも部分的に機能性のジストロフィントランスポーターが存在することになる。18~20を参照されたい。

【0106】

個人に機能性ジストロフィントランスポーター及び本発明に従った少なくとも1つの補助化合物を与えるための化合物は、どんな順番でも個人に投与することができる。一実施形態では、個人に機能性ジストロフィントランスポーター及び前記少なくとも1つの補助化合物を与えるための前記化合物は、同時に投与される(すなわち、前記化合物は10時間以内に、好ましくは、1時間以内に投与される)。しかし、これは必須というわけではない。一実施形態では、個人に機能性ジストロフィントランスポーターを与えるための化合物の投与前に、少なくとも1つの補助化合物はそれを必要とする個人に投与される。したがって、炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物をそれを必要とする個人に投与すること、並びに/又は筋線維機能、完全性及び/若しくは生存を改善するための補助化合物を前記個人に投与することと、続いて、前記個人に機能性ジストロフィントランスポーターを与えるための化合物を前記個人に投与することと

を含む、本発明に従った方法がさらに提供される。

【0107】

さらに別の実施形態では、前記少なくとも1つの補助化合物の投与前に、個人に機能性ジストロフィントランスポーターを与えるための前記化合物は投与される。

【0108】

異常なジストロフィントランスポーターをコードするジストロフィン遺伝子のmRNA前駆体を含む細胞内での機能性ジストロフィントランスポーターの産生を少なくとも部分的に増加させるための方法であって、

前記ジストロフィンmRNA前駆体のスプライシングから産生されるmRNAへのエキソンの包含を阻害するための化合物を前記細胞に与えることと、

炎症を抑えるための、好ましくは、筋組織炎症を抑えるための補助化合物を前記細胞に与えること、並びに/又は筋線維機能、完全性及び/若しくは生存を改善するための補助化合物を前記細胞に与えることと

を含み、

前記mRNA前駆体のスプライシングから産生されるmRNAを翻訳させることをさらに含む方法が、さらに提供される。一実施形態では、前記方法は、たとえば、細胞培養を使用して、インビトロで実施される。

【0109】

この文脈では、機能性ジストロフィントランスポーターの産生を増加させることは、本明細書において以前にすでに定義済みである。

【0110】

他の方法で示されることがなければ、本明細書に記載する各実施形態は、本明細書に記載する他の実施形態と組み合わせてもよい。

【0111】

本文書及びその特許請求の範囲において、動詞「含む (to comprise)」及びその活用は、非限定的な意味で使用されて、その用語の後に続く項目が含まれるが、具体的に言及されない項目は排除されないことを意味する。さらに、動詞「なる (to consist)」は、本明細書で定義される化合物又は補助化合物が、具体的に同定される成分以外の追加の成分(単数又は複数)であって、本発明の独自の特徴を変えない前記追加の成分(単数又は複数)を含んでもよいことを意味する「本質的にからなる (to consist essentially of)」により置き換えられてもよい。

【0112】

さらに、不定冠詞「a」又は「an」による要素への言及は、文脈が唯一の要素が存在

10

20

30

40

50

することを明確に要求しなければ、1つより多い要素が存在する可能性を排除しない。したがって、不定冠詞「a」又は「an」は、通常「少なくとも1つ」を意味する。

【0113】

用語「ほぼ (a p p r o x i m a t e l y)」又は「約 (a b o u t)」は、数値に付随して使用される場合 (ほぼ10、約10)、好ましくは、その値が、所与の値の10の1%多い又は少ない値であってよいことを意味する。

【0114】

本明細書に引用される特許及び参考文献はすべて、これによって参照によりその全体を組み込まれているものとする。

【0115】

本発明は以下の実施例によりさらに説明される。これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではなく、本発明を明確にする助けとなるだけである。

【図面の簡単な説明】

【0116】

【図1】エキソンスキッピングの略図である。エキソン50の欠失がありデュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する患者では、エキソン49がエキソン51にスプライシングされるフレーム外転写産物が生成する (図A)。結果として、ジストロフィン合成を時期尚早に中断する終始コドンが、エキソン51において生成する。エキソン内アンチセンスオリゴヌクレオチド P R O O 5 1 の配列特異的結合はスプライシング中のエキソン51の正確な封入に干渉し、したがってエキソンは実際スキッピングされる (図B)。これは転写産物のオープンリーディングフレームを修復し、ベッカー型筋ジストロフィー (BMD) を有する患者におけるそれと類似したジストロフィンの合成を可能にする。

【図2】4人の患者のプレスクリーニング試験の図である。4人の患者の下肢 (患者3の左脚及び他の3人の患者の右脚) の磁気共鳴画像は、前頸骨筋の適切な状態 (50%未満の脂肪浸潤及び線維症) を示す (図A)。これらの患者におけるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの診断結果は、大腿四頭筋から事前に得た生検標本の横断切片のジアミノベンジジン四塩酸塩染色によって確認した (図B)。患者2における1つのジストロフィン陽性又は復帰突然変異体線維細胞以外、ジストロフィンの発現は観察されなかった (矢印)。患者の突然変異及びエキソン51と隣接する転写産物領域の逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 分析によって、未治療筋管 (N T) 中の個々の突然変異と、R N A レベルでの治療筋管 (T) 中の P R O O 5 1 に対する陽性応答 (すなわち、エキソン51スキッピング) との両方を確認した (図C)。エキソンスキッピングの有効性は、患者1に関して49%、患者2に関して84%、患者3に関して58%、及び患者4に関して90%であった。エキソン51内の潜在的スプライス部位は細胞培養中に P R O O 5 1 によって時折活性化され、患者4由来の治療サンプル中に見られるように、別の異常なスプライシング産物をもたらす。レーンMは100-bpサイズのマーカーを示し、且つレーンCは健常対照の筋肉由来のR N Aを示す。治療及び未治療筋管由来のR T - P C R断片の配列分析によって、それぞれの患者に関するエキソン51の正確なスキッピングを同定した (図D)。モノクローナル抗体N C L - D Y S 2の使用による治療筋管の免疫蛍光分析により検出したように、新たなフレーム内転写産物は相当なジストロフィン合成をもたらした (図E)。治療前にジストロフィン検出はなかった。

【図3】患者由来の生検標本の連続切片から単離したR N AのR T - P C R分析の図である。P R O O 5 1を用いた治療後、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 分析は、それぞれの患者に関する、新規な、短い転写産物断片を示す。これらの断片のサイズと配列の両方によって、エキソン51の正確なスキッピングを確認する。追加的なスプライス変異体は観察しなかった。第28日に、依然相当なフレーム内R N A転写産物を検出し、筋肉中でのP R O O 5 1の長期の持続を示唆した。少量の切片材料のため、高感度P C R条件を使用し、このプロセスはスキッピングの有効性、及びR N Aのレベルとタンパク質のレベルの間の有意な相関関係の正確な定量化を妨げた。Mはサイズマーカー、及びCは対照を示す。

10

20

30

40

50

【図4】PRO051の単回筋肉内投与ジストロフィン修復効果の図である。ジストロフィン抗体MANDYS106の使用による免疫蛍光分析は、それぞれの患者から得た生検標本中の大部分の線維細胞の膜におけるジストロフィン発現を明らかに示す（図A）。四角形によって示す領域は、図B中に高倍率で示す。比較用に、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）を有する未治療患者由来のサンプル及びひ腹筋由来の健常対照サンプル（HC）を、これらの患者由来のサンプルと共に含める。推定復帰突然変異体線維細胞を矢印によって示す。ジストロフィン及びラミニン α 2を含有していた筋線維の合計数を手作業で数え、ジストロフィンとラミニン α 2の比をプロットした（図C）。NCLE-DYS1抗体の使用によって患者の生検標本から単離した全タンパク質抽出物のウエスタンブロット分析は、全患者における修復したジストロフィン発現を示す（図E）。それぞれの患者に関して、30 μ g（右レーン）及び60 μ g（左レーン）を充填し、比較用に、健常ひ腹筋サンプル由来の3 μ gの全タンパク質も充填した（過剰曝露を避けるため）。これらの患者のDMD遺伝子における比較的小さな欠失のために、タンパク質サイズの差は観察しなかった。患者1では、移動の不規則性は60 μ gレーン中のシグナル検出を阻害した。異なる横断切片中の筋線維の様々な密度を補正するために、それぞれの横断切片中の全蛍光ジストロフィンシグナル（領域中の割合）を、ラミニン α 2の領域中の割合との比としてプロットした（図D）。 10

【図5】PS49単独（群3）又はPS49及びプレドニゾロン（群4）で治療したmdxマウス（群当たり2匹のマウス）における、異なる筋肉群（Q：大腿四頭筋、TA：前頸骨筋、DIA：横隔膜筋）中のRNAレベルでのエキソン23スキッピングレベルの図である。 20

【図6A】筋細胞において、DMD遺伝子のエキソン44（A）又はエキソン45（B）のスキッピングレベルが、高濃度のペントキシフィリン（0～0.5mg/ml）で増大する図である。

【図6B】筋細胞において、DMD遺伝子のエキソン44（A）又はエキソン45（B）のスキッピングレベルが、高濃度のペントキシフィリン（0～0.5mg/ml）で増大する図である。

【図6C】PS49単独（群3）又はPS49及びペントキシフィリン（群4）で治療したmdxマウス（群当たり2匹のマウス）における、異なる筋肉群（Q：大腿四頭筋、TA：前頸骨筋、Tri：三頭筋、HRT：心筋）中のRNAレベルでのエキソン23スキッピングレベルの図である。 30

【図7】ジストロフィン（DMD）遺伝子のアミノ酸配列の図である。

【図8】ヒトIGF-1アイソフォーム4のアミノ酸配列の図である。

【図9】ジストロフィン（DMD）遺伝子の示したエキソンを対象とする様々なオリゴヌクレオチドの図である。

【実施例】

【0117】

（例1）

近年の臨床試験において、アンチセンス化合物PRO051の局所安全性、耐性、及びジストロフィン修復効果を評価した。この臨床試験は近年公開された。この刊行物の内容は、本明細書では例1Aで再現する。簡潔に言うと、PRO051は、配列5'-UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU-3'を有する合成修飾RNA分子であり、エキソン51のスキッピングを特異的に誘導するように設計する⁵⁹。それは完全長2'-オームチル置換リボース部分及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する。エキソン51のスキッピングによって修正可能な異なる特定のDMD遺伝子の欠失を有する4人のDMD患者を含めた。第0日に、一連の安全性パラメータを評価した。患者の脚（すなわち、前頸骨筋）をオーダーメイドのプラスチックモールドで固定し、その位置を注意深く記録した。局所麻酔薬（EMLA）を使用して皮膚を麻痺させた。2.5cmの筋電図針（MyoJect Disposable Hypodermic Needle Electrode、TECA Accessories）を使用して、PRO051の4回 40 50

の注射を、2つの小さな皮膚のタトゥー間の1.5cmの線に沿って与え、筋肉内送達を確実にした。それぞれの注射体積は200 μ lであり、200 μ gのPRO051を含有しており、これを約30°の角度で同等の場所に分散させた。第28日に、同じ一連の安全性パラメータを再度評価した。脚は患者の専用モールドを使用して位置を合わせ、2つの先の鋭い顎部分を有するかん子(Blakesley Conchotoma、DK Instruments)を使用して、半開状態の筋生検を局所麻酔下でタトゥー間において得た。生検は液体窒素冷却2-メチルブタン中で瞬間凍結させた。患者は連続的に治療した。試験時に、2人の患者(番号1及び2)はさらにコルチコステロイドで(プレドニゾン又はデフラザコルト)治療中であり、1人の患者はステロイド治療をちょうど止めたところであり(番号4)、且つ1人の患者は決してステロイドを使用しなかった(番号3)(表1参照)。この後者の患者は、他の3人の患者と比較したとき、若い年齢で歩行機能を消失した患者でもあった。RNAレベルでの特異的エキソンスキッピング(RT-PCR分析、示さず)、及びタンパク質レベルでのジストロフィンの新規な発現(免疫蛍光及びウエスタンブロット分析、表1中に要約)を検出するために、生検を分析した。治療前後の一連の安全性パラメータ(腎臓及び肝臓機能に関する通常の高血圧及び尿パラメータ、電解質レベル、血球数、ヘモグロビン、aPTT、AP50及びCH50値)の評価は、PRO051化合物は局所で安全であり十分耐性があったことを示した。免疫蛍光分析用に、アセトン固定した生検の横断切片を、中央部桿ドメイン(MANDYS106、Dr. G. Morris、UK、1:60)、C末端ドメイン(NCL-DYS2、Novocastrolaboratories Ltd.、1:30)に対するモノクローナル抗体と共に90分間、又は参照としてラミニン- α 2(Chemicon International、Inc、1:150)、次にAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG(H+L)(Molecular Probes、Inc、1:250)抗体と共に1時間インキュベートした。Vectashield封入剤(Vector Laboratories Inc.)で切片を封入した。定量的画像解析用に、ImageJソフトウェア(W. Rasband、NIH、USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>)を記載されたように使用した⁶⁰、⁶¹。切片の大きさに応じて、横断切片全体を一連の6~10の隣接画像に細分化した。信頼できる測定を確実にするため、一定の露出設定を使用し、且つピクセル飽和を避けながら、切片の染色及び全画像の記録は1セッションで実施した。低い強度閾値をデュシェンヌ型筋ジストロフィーのバックグラウンドで設定し、且つそれぞれの横断切片(領域中の割合)に関して、ジストロフィンとラミニン- α 2の両方に関して、陽性蛍光を定量化した。生検中の4つの一連の50 μ m切片組からプールしたホモジェネートを使用して、ウエスタンブロット分析を記載されたように実施した¹。患者用に30及び60 μ gの全タンパク質、対照用にサンプル3 μ gを施用した。プロットはジストロフィンモノクローナル抗体NCL-DYS1(Novocastrolaboratories、1:125)と共に一晩、次にヤギ抗マウスIgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology、1:10,000)と共に1時間インキュベートした。免疫反応性バンドを、ECL Plusウエスタンブロット検出システム(GE Healthcare)及びHyperfilm ECL(Amersham、Biosciences)を使用して可視化した。シグナル強度はImageJを使用して測定した。

【0118】

筋繊維鞘における新規なジストロフィタンパク質の発現を、全4人の患者における治療部位内の大部分の筋繊維において検出した。それぞれの切片中の線維を、ラミニン- α 2、ジストロフィン欠損によって影響を受けない基底膜タンパク質の染色後に手作業で数えた。生検の大きさ及び患者の筋肉の質と一致して、個々の数は変わった。最大切片中で、患者2は726の線維を有し、そのうち620がジストロフィン陽性であり、一方患者3は120の線維を有し、そのうち117がジストロフィン陽性であった。ジストロフィン強度は、健常者筋肉生検における強度より典型的には低かった。ウエスタンブロット分析によって、様々な量でジストロフィンの存在を確認した。ジストロフィンシグナルをス

10

20

30

40

50

キャンし、対照に対して補正した（全タンパク質 $1 \mu\text{g}$ 当たり）。その量は、最もジストロフィー性の筋肉を有する患者 3 における 3 % から、保存状態が良い筋肉を有する患者 2 における 12 % まで変化した。全タンパク質に基づくこのような比較は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者における様々な量の線維性及び脂肪組織を補正しないので、本発明者らは、ImageJ 分析により、それぞれの切片中に同様に位置するラミニン- $\alpha 2$ のシグナルに対するジストロフィン蛍光シグナルも定量化した。このジストロフィン／ラミニン- $\alpha 2$ の割合を対照切片に関して 100 % で設定したとき、コルチコステロイドで同時治療した 2 人の患者は、最高の割合のジストロフィン、すなわち、患者 1 では 32 % 及び患者 2 では 35 % を示した（表 1）。最小の割合のジストロフィンは、患者 3 で検出され、17 % であった。患者 4 では、中間の割合の 25 % を観察した。これらの割合は標的筋肉の相対的性質に対して補正され、それは患者番号 1 及び 2 において最良であり、患者番号 3 において最悪であった。

【表 1】

表 1.				
	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4
年齢（歳）	10	13	13	11
歩行機能消失時の年齢（歳）	9	11	7	10
ステロイド治療	あり	あり	全くなし	2006 年 1 月まで
ジストロフィン／ラミニン- $\alpha 2$ の割合	32%	35%	17%	25%

【0119】

結論：PRO051 アンチセンス化合物の影響は、コルチコステロイドも施された患者でより顕著であった。

【0120】

（例 1A）

Van Deutekom JC ら、（2007）アンチセンスオリゴヌクレオチド PRO051 は DMD 患者における局所ジストロフィンを修復する。（Antisense Oligonucleotide PRO051 Restores Local Dystrophin in DMD Patients.）N Engl J Med.、357（26）：2677～86 ページから再現した。

【0121】

方法

患者及び試験設計

8 歳と 16 歳の間でありデュシェンヌ型筋ジストロフィーを有していた患者が、この試験に参加するのに適任であった。すべての患者はエキソン 51 のスキッピングによって修正可能であった欠失を有しており、以前の診断的筋生検上にジストロフィンの痕跡はなかった。併用グルココルチコイド療法が可能であった。文書化したインフォームド Consent を、必要に応じて患者又は彼らの両親から得た。プレスクリーニング期間（最大 60 日）中に、それぞれの患者の突然変異状態及びインビトロでの PRO051 に対する陽性エキソンスキッピング応答を確認し、前頸骨筋の状態を T₁ 加重磁気共鳴映像法（MRI）によって決定した^{6,2}。試験中に含めた患者に関して、線維性及び脂肪組織はそれらの標的筋肉のわずか 50 % を構成し得る。

【0122】

ベースラインビジット中に、安全対策を評価した。それぞれの患者において、注射した脚はオーダーメイドのプラスチックモールドで固定し、その位置を記録した。局所麻酔薬（EMLA）の局所共晶混合物を使用して皮膚を麻痺させた。2.5 cm の筋電図針（Myoject Disposable Hypodermic Needle Electrode、TECA Accessories）を使用して、PRO051 の 4 回の注

射を2つの小さな皮膚タトゥー間の1.5cmの線に沿って与え、筋肉内送達を確実にした。それぞれの注射体積は200 μ lであり、200 μ gのPRO051を含有しており、これを約30°の角度で同等の場所に分散させた。

【0123】

第28日に、安全対策を再度評価した。注射した脚は患者の専用モールドを使用して位置を合わせ、2つの先の鋭い顎部分を有するかん子(Blakesley Conchotoma、DK Instruments)を使用して、半開状態の筋生検を局所麻酔下でタトゥー間において実施した(63)。生検標本は液体窒素冷却2-メチルブタン中で瞬間凍結させた。

【0124】

患者は2006年5月から2007年3月まで連続的に治療し、Good Clinical Practiceガイドライン及びDeclaration of Helsinkiの規程に従った。この試験は、Dutch Central Committee on Research Involving Human Subjectsによって、及びLeiden University Medical Centerにおいて現地の施設内治験審査委員会によって承認された。試験設計に貢献し、データの収集及び分析に参加したすべての著者が完全且つ自由にデータを利用することができ、共同で原稿を書き、示したデータ及び分析の完全性及び精度を裏付けた。

【0125】

PRO051の記載

PRO051は、配列5'-UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU-3'を有する合成修飾RNA分子である^{1,2}。それは完全長2'-O-メチル置換リボース分子及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する。

【0126】

この薬剤は賦形剤を含まない1mgの凍結乾燥物質のバイアル中にProsenza B.V.によって与えられた。それを溶かし、滅菌済みの非保存生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム)に施した。細菌のエイズ試験によってPRO051が突然変異誘発性であることは分からなかった。規定された医薬品安全性試験実施基準の安全性試験において、筋肉内に体重1キログラム当たり最大8mg及び静脈内に1キログラム当たり50mgの一回投与を施したラットは悪影響を示さず、静脈内1時間注入又は皮下注射により薬剤を投与したとき、臨床上関連がある悪影響なしで、1カ月間PRO051を施したサルは1週間で1キログラム当たり16mgまでの投与に耐性があるようであった。

【0127】

インビトロプレスクリーニング

既存の一次筋芽細胞培養を患者4のプレスクリーニングに使用した¹。他の3人の患者に関しては、以前に記載されたように、筋原性転写因子(Myod)の遺伝子を含有するアデノウイルスベクターの感染後に線維芽細胞は筋原細胞に変わった^{1,64,65}。筋管培養物を、ExGen500に関する製造者の説明書に従い(MBI Fermentas)、PRO051(100nM)及びポリエチレンイミン(1マイクログラムのPRO051当たり2 μ l)でトランスフェクトした。RNAは48時間後に単離した。逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、免疫蛍光、及びウエスタンブロット分析は以前に報告されたように実施した^{1,12}。PCR断片は2100Bioanalyzer(Agilent)の使用によって分析し、Leiden Genome Technology Centerによる塩基配列決定用に単離した。

【0128】

安全性評価

ベースライン、並びに注射後2時間、1日、及び28日で、すべての患者に(生存兆候の測定を含めた)全身の診察を行い、心電図検査を実施した。さらに、血漿及び尿を得て、古典的(CH50)及び代替(AP50)経路において、腎臓及び肝臓機能、電解質レベル、全血球計算値、活性化部分トロンボプラスチン時間、及び補体活性値を決定した。

併用薬の使用を記録した。ベースライン及び28日で、前頸骨筋の強度を医学研究審議会の尺度の使用によって評価して^{6 6}、手順が筋肉の性能に影響を与えたかどうかを評価した（この尺度では、0のスコアは運動がないことを示し、且つ5のスコアは正常な筋力を示す）。筋肉の小さな領域のみを治療したので、増大した筋力の観点での臨床的利点は予想できなかった。毎回の視察時に、有害事象を記録した。

【0129】

RNAの評価

凍結した筋生検標本の連続切片（50 µm）を、RNA-Bee溶液（Campro Scientific）及びMagNA Lyser Green Beads（Roche Diagnostics）中に均質化した。製造者の説明書に従い全RNAを単離及び精製した。相補的DNAに関しては、合成はTranscriptor逆転写酵素（Roche Diagnostics）を用いて、30分間55℃で20 µl反応混合物中に500 ngのRNA及びヒトエキソン53又は54特異的逆方向プライマーを使用することによって実施した。PCR分析は以前に記載されたように実施した¹、¹²。生成物は2%アガロースゲル上で分析し、塩基配列決定した。さらに、タンパク質切断試験用のプライマーセットを使用することによるRT-PCRを使用して、DMD遺伝子中の特異的で異常なスプライシング事象を迅速にスクリーニングした^{6 7}。

【0130】

タンパク質レベルの評価

免疫蛍光分析用に、アセトン固定した切片を、1:60の希釈で中央部桿ドメイン（MANDYS106、Dr. G. Morris、英国）、1:30の希釈でC末端ドメイン（NCL-DYS2、Novocastrolaboratories）に対するモノクローナル抗体と共に、又は1:150の希釈で、ジストロフィン欠損によって影響を受けない基底膜タンパク質、ラミニン-α2（Chemicon International、Inc）（対照として）と共に90分間、次に1:250の希釈でAlexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG（H+L）抗体（Molecular Probes）と共に1時間インキュベートした。Vectashield封入剤（Vector Laboratories）で切片を封入した。定量的画像解析用に、ImageJソフトウェア（W. Rasband、National Institutes of Health、<http://rsb.info.nih.gov/ij>）を以前に記載されたように使用した⁶⁰、⁶¹。切片の大きさに応じて、横断切片全体を一連の6~10の隣接画像に細分化した。信頼できる測定を確実にするため、一定の露出設定を使用し、且つピクセル飽和を避けながら、切片の染色及び全画像の記録は1セッションで実施した。低い強度閾値をデュシェンヌ型筋ジストロフィーのバックグラウンドで設定し、且つそれぞれの切片（領域中の割合）に関して、ジストロフィンとラミニンα2の両方に関して、陽性蛍光を定量化した。

【0131】

生検標本中の4つの一連の50 µm切片組からプールしたホモジェネートを使用して、ウェスタンブロット分析を以前に記載されたように実施した¹。それぞれの患者用に、2つの量の全タンパク質—30 µg及び60 µg—、対照用にサンプル3 µgを施用した。ウェスタンブロットは、1:125の希釈でジストロフィンモノクローナル抗体NCL-DYS1（Novocastrolaboratories）と共に一晩、次に1:10,000の希釈でホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG（Santa Cruz Biotechnology）と共に1時間インキュベートした。免疫反応性バンドを、ECL Plusウェスタンブロットティング検出システム（GE Healthcare）及びHyperfilm ECL（Amersham、Biosciences）を使用して可視化した。シグナル強度はImageJソフトウェアを使用して測定した。

【0132】

結果

患者のプレスクリーニング

この試験は4～6人の患者を含むように計画した。6人の患者に参加を促し、1人に拒否された。残りの5人の患者をプレスクリーニングした。最初に、前頸骨筋の状態をMRIで評価した。4人の患者の筋肉の状態がこの試験に適していると考え（図2A）、ジストロフィンの不在を患者の本来の生検標本において確認した（図2B）。第二に、これらの4人の患者の突然変異状態及びPROO51に対する陽性エキソンスキッピング応答を線維芽細胞培養において確認した。PROO51処理によって、全RT-PCR産物の46%（患者4）～90%（患者1）を示す、それぞれの患者に関するメッセンジャーRNAの新規な、短い断片が生成した（図2C）。正確なエキソン51スキッピングを塩基配列決定によって確認した（図2D）。他の転写産物領域が変化したのは見られなかった。免疫蛍光分析によって、ジストロフィン陽性筋管の優勢を示し（図2E）、この結果はウェスタンブロット分析（示さず）により確認された。したがって、4人の患者はPROO51処理が適していたと判断した。患者らのベースライン特性は表2中に示す。

10

【0133】

安全性及び有害事象

すべての患者が1つ又は複数の有害事象を有していた。しかしながら、ただ1人の患者が注射部位での軽度の局所の痛みを報告し、それは試験薬剤と関係がある有害事象であると考えた。他の事象には、筋生検後の軽度～中程度の痛みがあった。2人の患者が、創縫合に使用した包帯の下で水泡形成があった。注射と生検との間の時間に、2人の患者が数日間のインフルエンザ様症状を報告し、且つ1人の患者は1日軽度の下痢があった。ベースラインで、患者1、2、3、及び4において治療した前頸骨筋の筋強度スコアは、医学研究審議会の尺度で、それぞれ4、2、3、及び4であった。1人の患者も、試験中にこの筋肉の強度の変化、又は補体分解産物若しくは活性化部分トロンボプラスチン時間の標準的な研究室測定値若しくは増大した測定値の有意な変化を示さなかった。患者の筋肉切片中で局所炎症又は毒性反応は検出しなかった（データ示さず）。試験終了後、患者3に予め計画した口内側わん症の手術を首尾よく施した。

20

【0134】

RNA及びタンパク質レベル

第28日で、それぞれの患者における治療部位の生検を実施した。すべての筋肉のRNAは、生検標本中の連続切片から単離した。すべての患者において、塩基配列決定によって確認したように、RT-PCRは、エキソン51スキッピングによって引き起こされた、新規な、短い断片を同定した（図3）。さらなる転写産物の分析は、他の変化を示さなかった（データ示さず）。それぞれの患者の生検標本中の切片の免疫蛍光分析は、大部分の筋繊維における明らかな筋繊維鞘ジストロフィンシグナルを示した（図4A及び4B）。使用した欠失と近位及び遠位のジストロフィン抗体には、MANDYS106（図4A及び4B）及びNCL-DYS2（MANDYS106と同様、示さず）があった。ラミニン α 2の染色後それぞれの切片中の線維を手作業で数えた^{6,8}。生検標本の大きさ及び筋肉の質と一致して、個々の数は変わった。最大切片中で、患者2は726の線維を有し、そのうち620がジストロフィン陽性であり、一方患者3は120の線維を有し、そのうち117がジストロフィン陽性であった（図4A及び4C）。ジストロフィン強度は、健常者筋肉生検標本における強度より典型的には低かった（図4B）。患者2及び3における、より強力なジストロフィンシグナルを有する単線維は十分に復帰突然変異体線維であり得る（図4B）。

30

40

【0135】

ウェスタンブロット分析によって、様々な量でジストロフィンの存在を確認した（図4E）。ジストロフィンシグナルをスキャンし、対照に対して補正した（全タンパク質1 μ g当たり）。その量は、最もジストロフィー性の筋肉を有する患者3における3%から、最も保存状態が良い筋肉を有する患者2における12%まで変化した。全タンパク質に基づくこのような比較は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する患者における様々な量の線維性及び脂肪組織を補正しないので、本発明者らは、ImageJ分析により、それ

50

ぞれの切片中に同様に位置するラミニン α 2のシグナルに対するジストロフィン蛍光シグナルも定量化した(図4A及び4B)。ジストロフィンとラミニン α 2の割合を対照切片に関して100で設定したとき、患者1、2、3、及び4はそれぞれ33、35、17、及び25の割合を有していた(図4D)。

【0136】

考察

本発明者らの試験は、PRO051、エキソン51内の20ヌクレオチド配列と相補的な2OMePSアンチセンスオリゴリボヌクレオチドの局所筋肉内注射は、エキソン51スキッピングを誘導し、リーディングフレームを修正し、したがって治療を施したデュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する4人の患者すべてにおいて筋肉中にジストロフィンを導入したことを示した。ジストロフィン陽性線維は患者の生検標本全体で見られ、注射領域中の化合物の分散を示した。送達増強賦形剤は使用しなかったため、PRO051の取込みは主な考えられる制限要因ではなかったようである。本発明者らは、ジストロフィー性線維膜の増大した透過性に好ましい影響があったことを無視することはできない。全タンパク質のウェスタンブロット分析で示したように、患者は健常対照筋肉中で3~12%のレベルであったレベルのジストロフィンを生成した。線維症及び脂肪の存在は全タンパク質抽出物中のジストロフィンについて幾らかの過小評価をもたらす可能性があるため、本発明者らは、横断切片中のジストロフィンとラミニン α 2との比を決定し、それは対照筋肉中の100と比較して17~35の範囲であった。PRO051のジストロフィン修復効果は治療部位に限られ、筋肉全体の強度改善は観察しなかった。今後の全身治療は、ジストロフィン発現を高レベルで増大及び維持するため、並びに臨床的有効性を得るために反復投与を必要とするはずである。

【0137】

未成年者への介入に関する医療-倫理規定のため、本発明者らは、患者の注射しなかった対側筋から生検標本を得ることができなかった。しかしながら、試験の開始前5~9年で得た元の診断的生検標本において、患者は1%未満の復帰突然変異体線維を示した(表2及び図2B)。本発明者らは、本発明者らが観察した影響は、復帰突然変異体線維の顕著な増大より、PRO051試薬の性質及び配列と関係があった可能性が非常に高いと考える。実際、増大したジストロフィンシグナルを有していた、一種の、おそらく復帰突然変異体である線維を患者2と患者3の両方で観察した(図4B)。要約すると、本発明者らの試験は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する4人の患者における筋肉へのPRO051の局所投与は、全タンパク質又は筋線維含量に対する定量化に応じて、3~12%又は17~35%の範囲のレベルまでジストロフィンを修復したことを示した。明らかに局在する治療の性質と一致して、機能的改善は観察しなかった。最も進行した疾患を有していた患者3における絶えず乏しい結果は、比較的少量の筋肉組織が線維性及び脂肪組織によって置換されている時期で、比較的若い年齢の患者において臨床試験を実施する重要性を示唆する。本発明者らの発見は、アンチセンス伸介型エキソンスキッピングは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する患者の筋肉中のジストロフィン合成を修復するための、将来性がある手法であり得る指標となる。

【0138】

(例2)

mdxマウス(DMDの動物モデル)における前臨床試験において、AON誘導型エキソンスキッピングに対する補助化合物プレドニゾンの影響を評価した。Mdxマウス(C57Bl/10ScSn-mdx/J)はCharles River Laboratories(オランダ)から得た。エキソン23におけるナンセンス突然変異のため、これらのマウスはジストロフィン欠損性である。AON誘導型エキソン23スキッピングは、ナンセンス突然変異を除去すること及びオープンリーディングフレームを修正することによって、mdxマウスにおいて治療的である。一群当たり2匹のmdxマウスに、群1)生理食塩(第1~8週)、群2)プレドニゾロン(1mg/kg、第1~8週)、群3)エキソン23スキッピングを特異的に誘導するように設計したマウス特異的アンチセン

スオリゴヌクレオチドPS49 (100mg/kg、第4週(5回)、第5~8週(2回)、群4) プレドニゾロン(1mg/kg、第1~8週)+PS49 (100mg/kg、第4週(5回)、第5~8週(2回))を皮下注射した。PS49 (5'GGCCAAACCCUCGGCUUACCU3')は、完全長ホスホロチオエート骨格及び2'-O-メチル修飾リボース分子を有する。

【0139】

すべてのマウスは最後の注射後1週間で屠殺した。大腿四頭筋、前頸骨筋、及び横隔膜筋を含めた異なる筋肉群を単離し、液体窒素冷却2'-メチルブタン中で凍結させた。RT-PCR分析用に、筋肉サンプルをRNA-Bee溶液(Campro Scientific、オランダ)中に均質化した。製造者の説明書に従い全RNAを単離及び精製した。逆転写酵素(Roche Diagnostics、オランダ)を用いたcDNA合成用に、30分間55℃で20µl反応混合物において300ngのRNAを使用し、マウスDMD遺伝子特異的プライマーで逆方向にプライマー処理した。最初のPCRは、アウタープライマーセットを用いて94℃(40秒)、60℃(40秒)、及び72℃(60秒)の20サイクルで実施した。次いで1µlのこの反応混合物(1:10に希釈)を、94℃(40秒)、60℃(40秒)、及び72℃(60秒)の30サイクルで、エキソン23と直接隣接するエキソンにおけるネストプライマーの組合せを使用して再増幅した。PCR産物は2%アガロースゲル上で分析した。スキッピング効率は、DNA1000 LabChip(登録商標)キット及びAgilent 2100 バイオアナライザー(Agilent Technologies、オランダ)を使用して、PCR産物の定量化によって決定した。生理食塩又はプレドニゾロンのみ(群1及び2)で治療したマウス由来の筋肉において、エキソン23スキッピングは観察しなかった。エキソン23スキッピングのレベルを検出し、PS49のみで治療したマウス(群3)とPS49及び補助化合物プレドニゾロンで治療したマウス(群4)との間で、筋肉群当たりで比較した。大腿四頭筋(Q)、前頸骨筋(TA)、及び横隔膜(DIA)筋において、エキソン23のスキッピングレベルは、群3と比較すると、群4中で典型的には高かった(図5)。これは、補助化合物プレドニゾロンが、PS49で治療したmdxマウスにおいてエキソン23のスキッピングレベルを実際に高めることを示す。

【0140】

(例3)

A.、B. 健常対照個体由来の分化した筋肉細胞培養物(筋管)を、トランスフェクション試薬ポリマーUNIFectylinを使用して(AON1µg当たり2,0µlのUNIFectylin、0,15MのNaCl)、0~0.5mg/mlのペントキシフィリンの存在下で、250nMのPS188([5'UCAGCUUCUGUUAGCCACUG3';配列番号10]エキソン44)を特異的にスキップするように最適化したAON、又は250nMのPS221([5'AUUCAAUGUUCUGACAAACAGUUUGC3';配列番号60]エキソン45)を特異的にスキップするように最適化したAONでトランスフェクトした。核酸が負に帯電しているという条件で(2'-O-メチルホスホロチオエートAONなど)、UNIFectylinは核酸と静電的に相互作用する。ペントキシフィリン(Sigma Aldrich)は水に溶かした。製造者の説明書に従い、RNA-Bee溶液(Campro Scientific、オランダ)中でのトランスフェクション後24時間で全RNAを単離した。逆転写酵素(Roche Diagnostics、オランダ)を用いたcDNA合成用に、30分間55℃で20µl反応混合物において500ngのRNAを使用し、DMD遺伝子特異的プライマーで逆方向にプライマー処理した。最初のPCRは、アウタープライマーセットを用いて94℃(40秒)、60℃(40秒)、及び72℃(60秒)の20サイクルで実施した。次いで1µlのこの反応混合物(1:10に希釈)を、94℃(40秒)、60℃(40秒)、及び72℃(60秒)の30サイクルで、エキソン44又は45と直接隣接するエキソンにおけるネストプライマーの組合せを使用して再増幅した。PCR産物は2%アガロースゲル上で分析した。スキッピング効率は、DNA1000 LabChip (

登録商標) キット及びAgilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies、オランダ) を使用して、PCR産物の定量化によって決定した。

【0141】

PS188とPS221の両方で、エキソン44又は45スキッピングの増大したレベルを、ペントキシフィリンで同時治療しなかった細胞内で得た濃度と比較したとき増大した、補助化合物ペントキシフィリンの濃度と共に得た (図6参照)。これらの結果は、ペントキシフィリンが筋細胞内のエキソンスキッピングのレベルを高めることを示す。

【0142】

C.

mdxマウス (DMDの動物モデル) における前臨床試験において、AON誘導型エキソンスキッピングに対する補助化合物ペントキシフィリンの影響を評価した。Mdxマウス (C57Bl/10ScSn-mdx/J) はCharles River Laboratories (オランダ) から得た。エキソン23におけるナンセンス突然変異のため、これらのマウスはジストロフィン欠損性である。AON誘導型エキソン23スキッピングは、ナンセンス突然変異を除去すること及びオープンリーディングフレームを修正することによって、mdxマウスにおいて治療的である。一群当たり2匹のmdxマウスに、群1) ペントキシフィリン (50mg/kg、第1~2週)、群2) エキソン23スキッピングを特異的に誘導するように設計したマウス特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドPS49 (100mg/kg、第2週 (2回)、群3) ペントキシフィリン (50mg/kg、第1~2週) + PS49 (100mg/kg、第2週 (2回)) を皮下注射した。PS49 (5' GGCCAAACCU CGGC UUACCU 3') は、完全長ホスホロチオエート骨格及び2'-O-メチル修飾リボース分子を有する。

【0143】

すべてのマウスは最後の注射後1週間で屠殺した。大腿四頭筋、前頸骨筋、三頭筋及び心筋を含めた異なる筋肉群を単離し、液体窒素冷却2-メチルブタン中で凍結させた。RT-PCR分析用に、筋肉サンプルをRNA-Bee溶液 (Campro Scientific、オランダ) 中に均質化した。製造者の説明書に従い全RNAを単離及び精製した。逆転写酵素 (Roche Diagnostics、オランダ) を用いたcDNA合成用に、30分間55℃で20µl反応混合物において300ngのRNAを使用し、マウスDMD遺伝子特異的プライマーで逆方向にプライマー処理した。最初のPCRは、アウタープライマーセットを用いて94℃ (40秒)、60℃ (40秒)、及び72℃ (60秒) の20サイクルで実施した。次いで1µlのこの反応混合物 (1:10に希釈) を、94℃ (40秒)、60℃ (40秒)、及び72℃ (60秒) の30サイクルで、エキソン23と直接隣接するエキソンにおけるネストプライマーの組合せを使用して再増幅した。PCR産物は2%アガロースゲル上で分析した。スキッピング効率は、DNA1000LabChip (登録商標) キット及びAgilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies、オランダ) を使用して、PCR産物の定量化によって決定した。ペントキシフィリンのみで治療したマウス (群1) 由来の筋肉において、エキソン23スキッピングは観察しなかった。エキソン23スキッピングのレベルを検出し、PS49のみで治療したマウス (群2) とPS49及び補助化合物ペントキシフィリンで治療したマウス (群3) との間で、筋肉群当たりで比較した。大腿四頭筋 (Q)、前頸骨筋 (TA)、三頭筋 (Tri) 及び心臓 (HRT) 筋において、エキソン23のスキッピングレベルは、群2と比較すると、群3中で典型的には高かった (図6c)。これは、補助化合物ペントキシフィリンが、PS49で治療したmdxマウスにおいてエキソン23のスキッピングレベルを実際に高めることを示す。

表2. DMD患者のベースライン特性				
	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4
年齢 (歳)	10	13	13	11
欠失	エキソン 50	エキソン 48-50	エキソン 49-50	エキソン 52
歩行不能時の年齢 (歳)	9	11	7	10
側わん症	なし	なし	あり	あり
クレアチンキナーゼレベル (U/l) ¹	5823	2531	717	4711
ステロイド治療	あり	あり	全くなし	2006年1月まで
TA筋の強度 (MRCR度)	4	2	3	4
MRI でのTA 筋の状態	適度 ²	適度 ²	適度 ²	適度 ²
復帰突然変異体線維細胞の割合	N.D.	<1%	N.D.	

¹正常レベル: <200 U/l

²50%未満の脂肪浸潤及び／又は線維症 (Mercuri ら、2005)

参考文献

1. Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003;12(8):907-14.
2. Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004;74(1):83-92. 10
3. Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006;12(2):175-7.
4. Goyenvalle A, Vulin A, Fougereousse F, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004;306(5702):1796-9. 20
5. Lu QL, Mann CJ, Lou F, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003;6:6.
6. Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, et al. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(1):198-203. 30
7. McClorey G, Fall AM, Moulton HM, et al. Induced dystrophin exon skipping in human muscle explants. *Neuromuscul Disord* 2006;16(9-10):583-90.
8. McClorey G, Moulton HM, Iversen PL, et al. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther* 2006;13(19):1373-81. 40
9. Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, Matsuo M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(2):445-9.

10. Takeshima Y, Yagi M, Wada H, et al. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 2006;59(5):690-4.
11. van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001;10(15):1547-54.
12. Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson A, den Dunnen J, van Ommen G, van Deutekom J. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2002;12 Suppl:S71-S77. 10
13. Aartsma-Rus A, De Winter CL, Janson AA, et al. Functional analysis of 114 exon-internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 2005;15(4):284-97. 20
14. Aartsma-Rus A, Janson AA, Heemskerk JA, CL de Winter, GJ Van Ommen, JC Van Deutekom. Therapeutic Modulation of DMD Splicing by Blocking Exonic Splicing Enhancer Sites with Antisense Oligonucleotides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1082:74-6.
15. Aartsma-Rus A, Kaman WE, Weij R, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Exploring the frontiers of therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy by double targeting within one or multiple exons. *Mol Ther* 2006;14(3):401-7. 30
16. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447(7140):87-91.
17. Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *Journal of clinical pharmacology* 2007;47(4):430-44. 40
18. Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13714-9.

19. Fabb SA, Wells DJ, Serpente P, Dickson G. Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet* 2002;11(7):733-41.
20. Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* 2007;15(6):1160-6. 10
21. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;2.
22. Duboc D, Meune C, Pierre B, et al. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *American heart journal* 2007;154(3):596-602. 20
23. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 2007;13(2):204-10.
24. Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *Faseb J* 2004;18(6):676-82.
25. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006;16(9-10):591-602. 30
26. Pierno S, Nico B, Burdi R, et al. Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. *Neuropathology and applied neurobiology* 2007;33(3):344-59. 40
27. Musaro A, McCullagh K, Paul A, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 2001;27(2):195-200.

28. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 2002;157(1):137-48.
29. Disatnik MH, Dhawan J, Yu Y, et al. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci* 1998;161(1):77-84.
30. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free radical biology & medicine* 2006;40(2):341-7.
31. Hart PE, Lodi R, Rajagopalan B, et al. Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Archives of neurology* 2005;62(4):621-6.
32. Rolland JF, De Luca A, Burdi R, Andreetta F, Confalonieri P, Conte Camerino D. Overactivity of exercise-sensitive cation channels and their impaired modulation by IGF-1 in mdx native muscle fibers: beneficial effect of pentoxifylline. *Neurobiol Dis* 2006;24(3):466-74.
33. Whitehead NP, Streamer M, Lusambili LI, Sachs F, Allen DG. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006;16(12):845-54.
34. Badalamente MA, Stracher A. Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition. *Muscle Nerve* 2000;23(1):106-11.
35. Burdi R, Didonna MP, Pignol B, et al. First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. *Neuromuscul Disord* 2006;16(4):237-48.
36. Bonuccelli G, Sotgia F, Schubert W, et al. Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am J Pathol* 2003;163(4):1663-75.
37. Voisin V, Sebrerie C, Matecki S, et al. L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. *Neurobiol Dis* 2005;20(1):123-30.

10

20

30

40

50

38. Soret J, Bakkour N, Maire S, et al. Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8764-9.
39. Mann CJ, Honeyman K, McClorey G, Fletcher S, Wilton SD. Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J Gene Med* 2002;4(6):644-54.
40. Graham IR, Hill VJ, Manoharan M, Inamati GB, Dickson G. Towards a therapeutic inhibition of dystrophin exon 23 splicing in mdx mouse muscle induced by antisense oligoribonucleotides (splicomers): target sequence optimisation using oligonucleotide arrays. *J Gene Med* 2004;6(10):1149-58.
41. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999;288(5):911-40.
42. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3(4):285-98.
43. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3568-71.
44. Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001;8(1):1-7.
45. Braasch DA, Corey DR. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 2002;41(14):4503-10.
46. Elayadi AN, Corey DR. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2(4):558-61.
47. Larsen HJ, Bentin T, Nielsen PE. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489(1):159-66.
48. Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489(1):141-58.

10

20

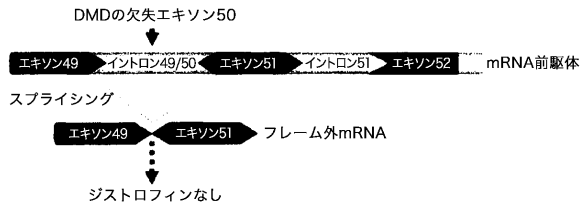
30

40

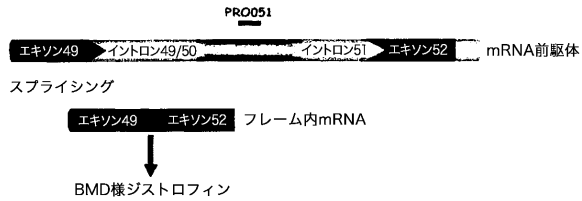
49. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7(3):187-95.
50. Wahlestedt C, Salmi P, Good L, et al. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(10):5633-8.
51. De Angelis FG, Sthandier O, Berarducci B, et al. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(14):9456-61. 10
52. Denti MA, Rosa A, D'Antona G, et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum Gene Ther* 2006;17(5):565-74. 20
53. Gorman L, Suter D, Emerick V, Schumperli D, Kole R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):4929-34.
54. Suter D, Tomasini R, Reber U, Gorman L, Kole R, Schumperli D. Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. *Hum Mol Genet* 1999;8(13):2415-23. 30
55. Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001;49(6):706-11.
56. Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, *Muscle Nerve*, 34: 135-144. 40
57. Hodgetts S., et al, (2006), *Neuromuscular Disorders*, 16: 591-602.
58. Manzur AY et al, (2008), *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy (review)*, Wiley publishers, The Cochrane collaboration.

59. Van Deutekom JC et al, (2007) Antisense Oligonucleotide PRO051 Restores Local Dystrophin in DMD Patients. *N Engl J Med.*, 357(26): 2677-86.
60. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:946-56.
61. Koop K, Bakker RC, Eikmans M, et al. Differentiation between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity by analysis of renal cortical mRNA. *Kindney Int* 2004;66:2038-46. 10
62. Mercuri E, Bushby K, Ricci e., et al. Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures. *Neuromuscul Disord* 2005;15:164-71.
63. Dorph C, Nennesmo I, Lundberg IE. Percutaneous conchotome muscle biopsy: a useful diagnostic and assessment tool. *J Rheumatol* 2001;28:1591-9. 20
64. Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, et al. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol* 2002;76:4612-20.
65. Roest PA, van der Tuijn AC, Ginjaar HB, et al. Application of in vitro Myo-differentiation of non-muscle cells to enhance gene expression and facilitate analysis of muscle proteins. *Neuromuscul Disord* 1996;6:195-202.
66. John J. Grading of muscular power: comparison of MRC and analogue scales by physiotherapists. *Int J Rehabil Res* 1984;7:173-81. 30
67. Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscul Disord* 1993;3:391-4.
68. Cullen MJ, Walsh J, Roberds SL, Campbell KP. Ultrastructural localization of adhalin, alpha-dystroglycan and merosin in normal and dystrophic muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996;22:30-7. 40

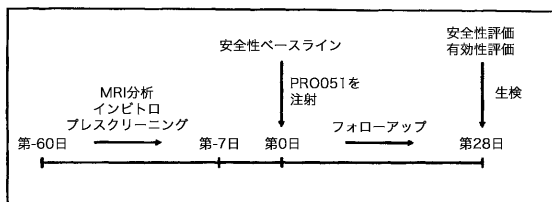
【図 1 A】



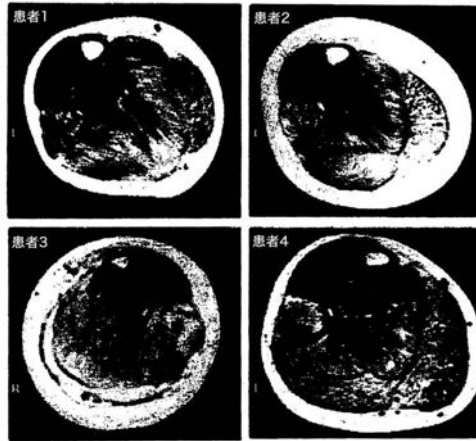
【図 1 B】



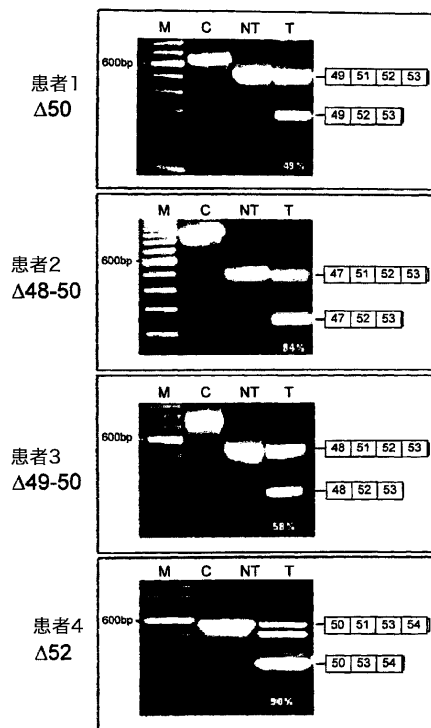
【図 2】



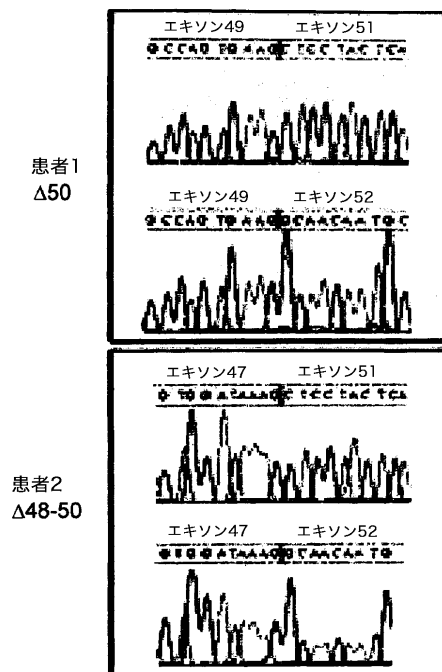
【図 3 A】



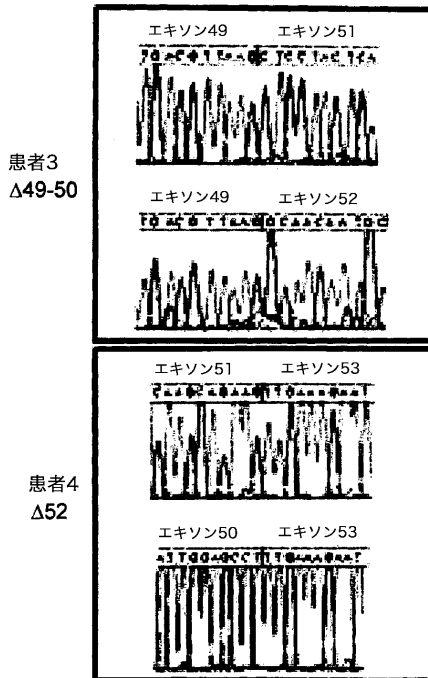
【図 3 B】



【図 3 C - 1】

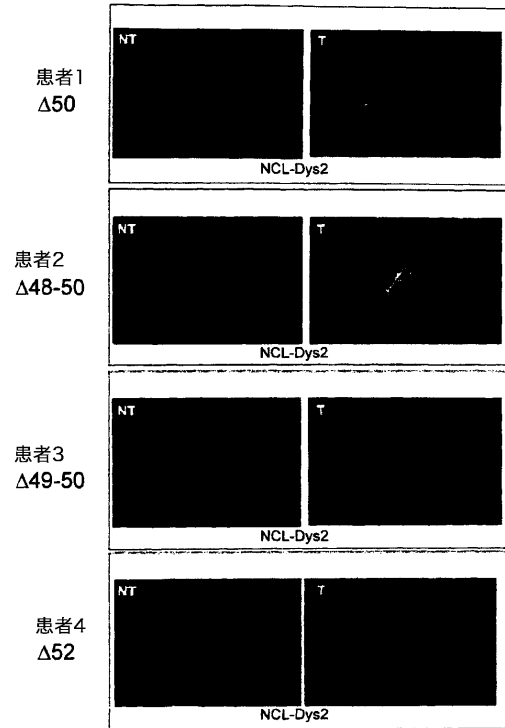


【図 3 C - 2】

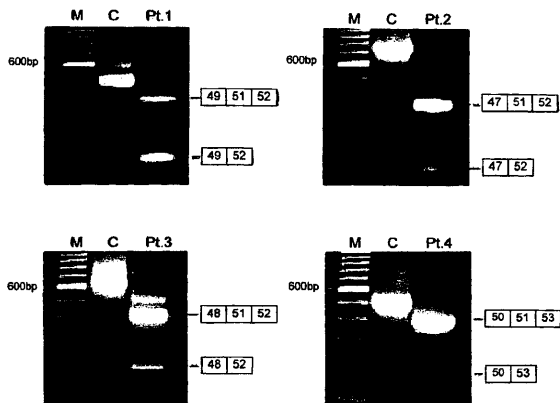


続き

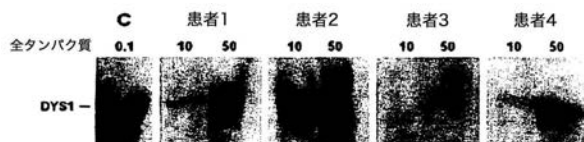
【図 3 D】



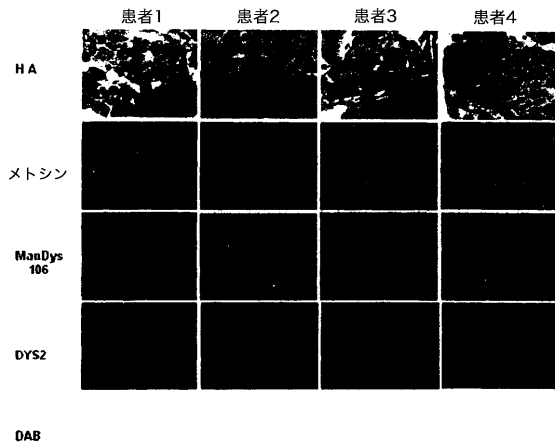
【図 4 A】



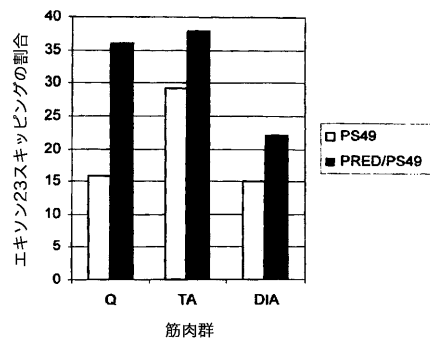
【図 4 B】



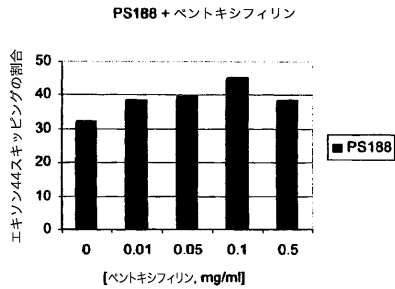
【図 4 C】



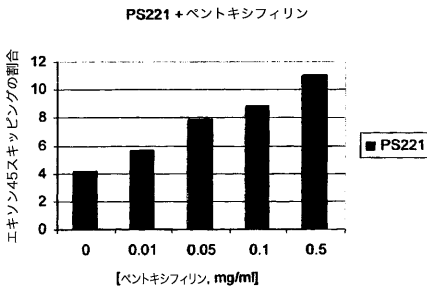
【図 5】



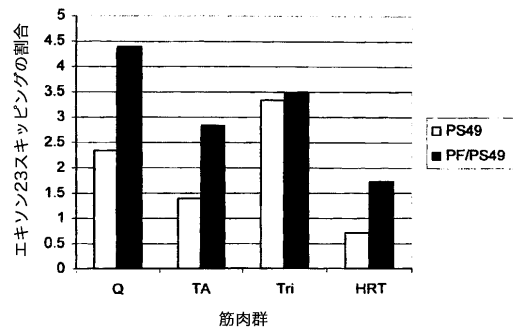
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】



【図 7 - 1】

配列番号 1:

MLWWEVEEDCYEREDVQKKTPTTKWVNAQPSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLDLLLEGLTG
QKLPKEKGSTRVHALNNVKNALRVLQNNVNDLVNMGSTDIVDGNHKLTLCLVWNLHWWQ
VKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHPDL
FDWNSVVCQASATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDVDTTPDKKSILMYTSLFQVLPQQ
VSEIAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHSYQQITVSLAQQYERTSSPKRPFKSYAYTTQ
AAVYTTSDPTRSPFSQHLKAPEDKSGSSLMSESVNLDTRYQTALKEEVLWLLSAEDTLQA
QGEISNDVVEVKDQFHTTHEGVMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTKLSEDEETEVEQGM
NLNSRWECRLVASMEKQSNLHRVLMDLQNVQLKELNDWLTKTEERTKMEEEPLGPDIL
EDLKRQVQHHVLQEDLEQGRVYNSLTHMVVVYDESGDHATAALEEQKLKVLGDRWAN
ICRWTEORWVLLQDILLKWKQLTBEQCLPSAWLSEKEDAVNKIHTTGFQDQNMELSSQK
LAVLKADLEKKQSMGKLSYSLKQDILLSTLKNKSVTQKTAWLDNFAKOWDNLVQLKES
TAQISQAVTTTQPSLTQTVMTEVTVTVTTRQVLVKAHQEELPPPPQKKRQITVDSERKRL
DVIDTELHSWITRSEAVLQSPFAIRKEGNFSDLKKEKYNALEREKAEFRKLQDASRSQA
LVEQMVNCGVNADSIKQASEQLNSRWIEFQCLLSERLNLWLEYQNNIAFYNLQQLLEQMT
TTAENWLKIQPTTPTSEPTAISKQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDA
DFVAFNTNHFQVPSDVQAREKELQITFTDTPPMRYQETMSAIRTWVQSQSETKLSIPQLSVT
DYIMEQRLLGELQALQSSLAQEQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRYQSEFEIEIGRWKK
LSSQLVEHQKLEEQMNKLRKIQNHQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSILAKQLKQC
RLLVSDQITQPSLNSNEGQKQKNEAEPEFASRLTELEKELNTQWDHMQQVVAKEAL
KGLKKTYSLQKDLSEMHFWMTQAEIEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKE
AKVKLLTESVNVIAQAPPAVQAEALKKELETLTNTYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHEL
LSYLEKANKWLNVEFEKLTNTENPGGAEEISEVLENDLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLD
GGVMDLINEELETFTNSRWRELHHEAVRRQKLEQSQSAQETESLHLIQESLTFIDKQLA
AYIADKYDAAQMPQEAQKIQSDLTSHIESLEEMKGINQGEAAQRVLSQIDVAQKKLQDV
SMKFRILFQKPAFNEBQLQESKMLIDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSGLNHCVNLYKSLSE
VKSEVEMVITORGIVQKKQTEAPNELDEVTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSR
KMRKEMNVLTEWLATDMELTKRSAVEGMPNSNLOSVAWGKAQKQIEKQVHLKSITE
VGRALKTVLQKKEKTVEDIKLSLNSNWIAVTSRAEFWVNLLEYQKHMETPDQNVHITK
WITQADTLDESEKKKPPQKEDVLKRLKAELENDIRPKVLDSTRAQANLMANRGDHCRKL
EPQISLNLHRAFAISHRIKTGASIFLKELEQFNDSIQKLEPLEAEIQQGVNKEEDPNKD
MNEJNEGTVVELLQRGDNLQRTDERKREIEIKKQILLQTKHNAKDLRSQRKKALEIS
HQWYQYKQADDLLKCLDIEKKLASLPEPRDERKIKEDIRELQKKKEELNAVRRQAEGEL
SEDGAAMAVEPTQIQLSKRWEIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMYTMEDMPLISYVP
STYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLQKESLKNKIDSLQSSORIDITHSKKT
AALQSAATPVERVKLQALSQLDPQWEKVNMYKIDGQRFORSVEKWRFFHYDIDKPNQW
LTAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDQIGQRQTVVRLNATGEEIIQSSKTDASIL
QEKLGSLNLRWQEVCKLSDRKKRLEEQKNLSEFQRDLNFEVFLWLEADNIAISPLEPGK
EQQLKFKLEQVKLLVEELPLRQGHKLQNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENLKTNLQWI
KVSRALEKQGEIEAQKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLWLSPIRNQLIYNQPNQEGPFD
VQETIAVQAKQPDVEEHLKSGQHLYKEKPATQPVKRLKLEDLSSEWKAVNRLQLRAKQP
DLAPGLTTGASPTQTVTLVTPQVVTKETATSKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDLWLS
LLDQVKSQRVMVGDLEDINEMIKQKATMQDLEQRFPQLEELITAAQNLKNKTSNGEART
ITDRIERIQNWDEVEQHILQNRQQLNEMHKDSTQWLEAKEEABQVLQARAKLESWE
OPTVDAJQKKTETQLAKDLRQWQTVNVDANDLALKLLREDYSADDTKRVHMTENNAS
WRSHIKRVSEAEALETHRLQFPFLDLKFLAWLTAETTANVLQDATRKERLLEDKSG
VKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLNDSNQKILRELSGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSEL
RKKSINRSHLEASSDQWKRLLHLSQELLVWLQKDDLSRQAFIQQGDFPAVQKQNDVHR
AFKRELKTKPEVMSTLETVRIFLQTEQPLEGLEKLYQEPRELPPPEERAQNVTRLKQAEV
NTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEAETDELDKLRQAEVIGKSWQPVGLDILSL

【図 7 - 2】

続き

QDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLQIQLSYPYNLSTLEDNTRWKLQVAVE
DRVRQLHEAHRDFGPASQHFLLSTSVQGPWERAISPKNKVPYINHETQITCWDHPKMTLEY
QSLADLNNVRFSAVRTAMKLRRLQKALCLDLSLSAACDALDQHNKQNDQPMQDILQIINC
LITTYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMLCNWLLNVYDVTGRTGRIRVLSFKTGHSILCKAHLEDK
YRYLFKQVASTGFCQDQRRGLLLHDSIQIPRQLGEVASPGSGNIEPSVRSQFPANNKPEIE
AALFLDWMRLPEQSMVWLPLVLRHAAETAHKHQAQKCNCKECPHGFYRSLKHPNYDICQ
SCFFSGRVARKHGMHYPMVEYCTYTTSGEDVRDFAKVLKKNKFTKTEFAKHPRMGYLPV
QTVLEGDNMETPVTILNFWVPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIHYASRLAEMENSNGSVLNS
ISPNEISDDEHLLIQHYQCSLNQDSPLSQPSRPAQILISLESEBERGELERILADLEENRNLQ
AEYDRLKQHEHKGSLPLSPPEMMPPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILE
HNKQLLESQHLRLQLLEQPAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGE
EDLLSPPDQDSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

【図 8】

ヒトIGF-1アイソフォーム4のアミノ酸配列

配列番号 2:

MGKISSLPQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYALCLLTFTSSATAGPETLQGAELVDAL
QFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRLRELMYCAPLKAQSARSVRA
QRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

【図 9 - 2】

DMD遺伝子のエキソン43

配列番号 3	CGACC UGAGC UUUGU UGUAG
配列番号 4	CGACC UGAGC UUUGU UGUAG ACUAA
配列番号 5	CCUGA GCUUU GUUGU AGACU AUC
配列番号 6	CGUUG CACUU UGCAA UGCUG CUG
配列番号 7	CUGUA GCUUC ACCCU UUCC
配列番号 8	GAGAG AGCUU CCUGU AGCUU CACC
配列番号 9	GUCCU UGUAC AUUUU GUUAA CUUUU UC
配列番号 263	GGA GAG AGC UUC CUG UAG CU
配列番号 264	UCA CCC UUU CCA CAG GCG UUG CA
配列番号 265	UGACAUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGCUAU

光緒

DMD遺伝子のエキソン44

配列番号 10	UCAGCUCUCUGUAGGCCACUG	配列番号 35	AGCUCUCUGUAGCCACUGAUAAA
配列番号 11	UTUCAGCUCUCUGUAGGCACU	配列番号 36	CAGCUCUCUGUAGCCACUGAUAAA
配列番号 12	UTUCAGCUCUCUGUAGGCCACUG	配列番号 37	AGCUCUCUGUAGCCACUGAUAAA
配列番号 13	UCAGCUCUCUGUAGGCCACUGA	配列番号 38	AGCUCUCUGUAGCCACUCAGU
配列番号 14	UTUCAGCUCUCUGUAGGCCACUGA	配列番号 39	GCUCUCUGUAGGCCACUCAUU
配列番号 15	UCAGCUCUCUCUGUAGGCCACUGA	配列番号 40	AGCUCUCUGUAGCCACUCAGU
配列番号 16	UTUCAGCUCUCUGUAGGCCACUGA	配列番号 41	GCUCUCUGUAGGCCACUGAUUA
配列番号 17	UCAGCUCUCUCUGUAGCCACUGAU	配列番号 42	AGCUCUCUGUAGCCACUCAGUUA
配列番号 18	UTUCAGCUCUCUGUAGGCCACUGAU	配列番号 43	GCUCUCUGUAGGCCACUGAUUAA
配列番号 19	UCAGCUCUCUCUGUAGCCACUGAUU	配列番号 44	AGCUCUCUGUAGCCACUCAGUUA
配列番号 20	UTUCAGCUCUCUGUAGGCCACUGAUU	配列番号 45	GCUCUCUGUAGGCCACUGAUUAA
配列番号 21	UCAGCUCUCUCUGUAGCCACUGAUUA	配列番号 46	AGCUCUCUGUAGCCACUCAGUUA
配列番号 22	UTUCAGCUCUCUCUGUAGCCACUGAUUA	配列番号 47	GCUCUCUGUAGGCCACUGAUUAA
配列番号 23	UCAGCUCUCUCUGUAGCCACUGAUUAA	配列番号 48	CCAUUCUGUUAUUGAGCAUUCUCC

【図 9 - 4】

24	配列番号	UUU CAGCUCUCUUUAGCCACUGUAUAA	配列番号	AGAUUACCAUUTUGUAUUUAGC
25	配列番号	UCAGCUUUUCUGUUAAGCCACUGUAUAA	配列番号	GCCAUUTUUCUACACAGAUU
26	配列番号	UUU CAGCUCUCUUUUAAGCCACUGUAUAA	配列番号	GCCAUUTUUCUACACAGAUUCUUA
27	配列番号	CAGCUCUCUCUGUUAGCCACUG	配列番号	AUUUUCUACGGAUUUUUGUGUCUUUC
28	配列番号	CAGCUCUCUCUGUUUAAGCCACUGAUU	配列番号	UUUCACGGAUUUUUGUGUCUUUC
29	配列番号	AGCUCUCUCUUUAGCCACUGAUU	配列番号	GUUCACGCUUUUCUUUUUAGCC
30	配列番号	CAGCUCUCUCUUUUAAGCCACUGAUU	配列番号	CUGUAUUAAUUUUUUUAUUAU C
31	配列番号	CAGCUCUCUCUUUUAAGCCACUGAUUA	配列番号	GGCCGCAUUUUCUUAACAG
32	配列番号	CAGCUCUCUCUUUUAAGCCACUGAUUA	配列番号	GUUUUUAGCAUUGUUUCCCA
33	配列番号	AGCUCUCUCUUUUAAGCCACUGAUUAA	配列番号	CAGGAUUUUUUUGUGUCUUUC
34	配列番号	CAGCUCUCUCUUUUAAGCCACUGAUUAA	配列番号	UUU GUG UCU UUC UGA GAA AC
35	配列番号	UUUUAUUAAGAAAGCCGCCAUUUUUCUACACAGAUUCU	配列番号	UUUUAGCAUUGUUUCCCAUUUUUUAGGAUUUUUG

統志

DMD遺伝子のエキソン45

配列番号 59	UUUGCCGCGCCCAUGGCAUCCUG	配列番号 89	GUUGCAUUAUUGUUCUGACACAG
配列番号 60	AUUCAUUGUUCUGACACAGUUUGC	配列番号 90	UUUCAUUAUUGUUCUGACACAGU
配列番号 61	CCAGUUGCAUUAUUGUUCUGACAA	配列番号 91	UGCAUUAUUGUUCUGACACAGUU
配列番号 62	CAGUUGCAUUGCAUGUUCUUGAC	配列番号 92	GCUAUUAUUGUUCUGACACAGUUU
配列番号 63	AGUUGCAUUAUGUUCUGA	配列番号 93	CAUUAUUGUUCUGACACAGUUUG
配列番号 64	GAUUGCGAAUUAUUGUUCG	配列番号 94	AUUAUUGUUCUGACACAGUUUGC
配列番号 65	GAUUGCGAAUUAUUGUUCGCCAG	配列番号 95	UCAUUGUUCUGACACAGUUUGCCG
配列番号 66	AUUGCGAAUUAUUGUUCUCCCGAGU	配列番号 96	CAUUGUUCUGACACAGUUUGCCGC
配列番号 67	UUUGCGAAUUAUUGUUCUCCCGAGU	配列番号 97	AUUGUUCUGACACAGUUUGCCGCU
配列番号 68	UGCGAAUUAUUGUUCUCCCGAGUUG	配列番号 98	AUGUUCUGACACAGUUUGCCGCGUG
配列番号 69	CGUGAAUUAUUGUUCUCCCGAGUUGC	配列番号 99	UGUUCUGACAGUUUGCCGCGUGC
配列番号 70	CUGAUUAUUGUUCGCCAGUUGCA	配列番号 100	GUGUUGACACAGUUUGCCGCGUGCC
配列番号 71	UGAAUUAUUAUUGUUCGCCAGUUGCAU	配列番号 101	UUUGACACAGUUUGCCGCGUGCC
配列番号 72	GAUUAUUAUUGUUCGCCAGUUGCAUU	配列番号 102	UCUGACACAGUUUGCCGCGUGCCA
配列番号 73	AUUAUUAUUGUUCGCCAGUUGCAUUC	配列番号 103	CUGACACAGUUUGCCGCGUGCCAA

【図 9 - 6】

[illegible]

九
統

DMD遺伝子のエキソン46

配列番号 116	GGUUUUUUUUUUAGUUUUUUUUUUUU	配列番号 117	AGUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 120	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 148	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 121	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 149	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 122	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 150	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 123	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 151	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 125	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 153	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 126	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 154	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 127	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 155	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 128	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 156	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 129	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 157	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 130	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 158	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
配列番号 131	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	配列番号 159	UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU

【图 9-8】

続き

DMD遺伝子のエキソン50

配列番号 132	UUUCUGUCUUUUUCCAGGUTUCAAAGU	配列番号 160	AUUCUAGCAAUGUUUAUUCUGUCUUUUU
配列番号 133	UGUCUCUUUUUUUCCAGGUTUCAAAGUG	配列番号 161	UACUAGCAAUGUUUAUUCUGUCUUUUUCCUC
配列番号 134	GCUGUCUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGUG	配列番号 162	ACUAGCAAUGUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCUC
配列番号 135	CUGUCUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGGG	配列番号 163	CUAGCAAUGUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCCA
配列番号 136	UGUCUUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGGGA	配列番号 164	UAGCAAUGUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCCAA
配列番号 137	GCUCUUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGGGAC	配列番号 165	AGCAAUUUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCGACAC
配列番号 138	GCUUUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGGGAAU	配列番号 166	GCUAUGUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCAAACC
配列番号 139	UCUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGGGAAUAC	配列番号 167	CAAUUUUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCAAACCA
配列番号 140	UUUUUCCAGGUTUCAAAGUGGGAAUACU	配列番号 168	AUUUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCAAACCAU
配列番号 141	UUUUCCAGGUTUCAAAGUGGGAAUACUA	配列番号 169	AUUUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCAAACCAUA
配列番号 142	UUUCCAGGUTUCAAAGUGGGAAUACUAG	配列番号 170	UGUUUAUUCUGUCUUUUUCCUCAAACCAUAA
配列番号 143	UUCCAAGGUTUCAAAGUGGGAAUACUAGC	配列番号 171	GUUUUAUCUGUCUUUUUCCUCAAACCAUAAA
配列番号 144	UCCAGGUTUCAAAGUGGGAAUACUAGCA	配列番号 172	GCUGUCUUUUUUUCCAGGUTUC
配列番号 145	CCAGGUTUCAAAGUGGGAAUACUAGCAA	配列番号 173	UCUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGG
配列番号 146	CAGGUTUCAAAGUGGGAAUACUAGCAAU	配列番号 174	AGGUTUCAAAGUGGGAAUACUA
配列番号 214	CUUUUUUCCAGGUTUCAAAGUGGGAAUACUAGC	配列番号 215	UAUUUUUUUUUUUCCUUCUUCAGCGCUGGGAAG
配列番号 215	CAAGCGUUUUUUUUAAGUUGUCGUCUUUUUCC	配列番号 217	CGUCUUUUUCCUCAAACCAU/AAAACAAUUUC

配列番号 175	CUCAGCUCUUGAAGUAAACG
配列番号 176	CCUCAGCUCUCUUGAAGUAAAC
配列番号 177	CCUCAGCUCUCUUGAAGUAAACG
配列番号 178	AUAGUGGUCAGUCCAGGAGCU
配列番号 179	CAGUC CAGGA GCUAG GUCAGG
配列番号 180	UAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUC
配列番号 278	CCACUCAGAGCUCAGAUUCUUAACUUC
配列番号 279	CUUCCACUCAGAGCUCAGAUUCUUA
配列番号 280	CAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGC
配列番号 281	UCUUGAAGUAAACGGUUUACCGCCUCCACUCAGAGC

続き

【図 9 - 9】

DMD駆動子のエンジン51

配列番号 181	AGAGCAGGUACUCUCCAAACAUCAAGG	配列番号 203	UCAAGGAAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 182	CAGCAGGUACUCUCCACACAUCAAGGA	配列番号 204	UCAAGGAAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 183	AGCAGGUACUCUCCACACAUCAAGGA	配列番号 205	CAAGGAAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 184	GCAGGUACUCUCCACACAUCAAGGAAG	配列番号 206	AAGGAAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 185	CAGGUACUCUCCACACAUCAAGGAAGA	配列番号 207	AGGAAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 186	AGGUACUCUCCACACAUCAAGGAAGAU	配列番号 208	GGAAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 187	GGUACUCUCCACACAUCAAGGAAGAU	配列番号 209	GAAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 188	GUACUCUCCACACAUCAAGGAAGAU	配列番号 210	AAGUUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 189	UAACUCUCCACACAUCAAGGAAGU	配列番号 211	AGAUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 190	ACUCUCCACACAUCAAGGAAGU	配列番号 212	GAUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 191	CCUCUCCACACAUCAAGGAAGU	配列番号 213	AUGGCAUUTUCUAGUTUU
配列番号 192	CUCCACACAUCAAGGAAGU	配列番号 214	UGGCAUUTUCUAGUTUU

続き

【図 9 - 11】

DMD駆動子のエンジン52

配列番号 221	CCUCUUGAUUGUCUGUCUUGUUUUUU	配列番号 250	UUUUUGGCGACGGGUAAUUGAGUUCUU
配列番号 222	CUUCUUGAUUGUCUGUCUUGUUUUUU	配列番号 251	UUUUUGGCGACGGGUAAUUGAGUUCUU
配列番号 223	UCUUGAUUGUCUGUCUUGUUUUUUUA	配列番号 252	UUUUUGGCGACGGGUAAUUGAGUUCUU
配列番号 224	CUUGAUUGUCUGUCUUGUUUUUUUCAA	配列番号 253	UUUUUGGCGACGGGUAAUUGAGUUCUU
配列番号 225	UUGAUUGUCUGUCUUGUUUUUUUCAAA	配列番号 254	GGGACGGGUAAUUGAGUUCUUCCAA
配列番号 226	UGAUUGUCUGUCUUGUUUUUUUCAAAU	配列番号 255	GGCAGCGGUAAUUGAGUUCUUCCAAC
配列番号 227	GAUUGUCUGUCUUGUUUUUUUCAAAUU	配列番号 256	GCAGCGGUAAUUGAGUUCUUCCAACU
配列番号 228	AUUGUCUGUCUUGUUUUUUUCAAAUUU	配列番号 257	CAGCGGUAAUUGAGUUCUUCCAACUG
配列番号 229	UUGUCUGUCUUGUUUUUUUCAAAUUUU	配列番号 258	AGCGGUAAUUGAGUUCUUCCAACUGG
配列番号 230	UGUCUGUCUUGUUUUUUUCAAAUUUUU	配列番号 259	CGCGUAAUUGAGUUCUUCCAACUGGG
配列番号 231	GCUGUCUUGUUUUUUUCAAAUUUUUGG	配列番号 260	CGGUAAUUGAGUUCUUCCAACUGGGG
配列番号 232	CUGUCUUGUUUUUUUCAAAUUUUUGGG	配列番号 261	GGUAAUUGAGUUCUUCCAACUGGGGA
配列番号 233	UGUCUUGUUUUUUUCAAAUUUUUGGGC	配列番号 262	GUAAUUGAGUUCUUCCAACUGGGGAC
配列番号 234	GGUCUUGUUUUUUUCAAAUUUUUGGGCA	配列番号 263	UAAUUGAGUUCUUCCAACUGGGGACG

【図 9 - 10】

配列番号 193	CUCCACACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUCUAG	配列番号 215	GGCAUUTUCUAGUUTUGGAGAUUGGCAG
配列番号 194	UCCACACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTU	配列番号 216	GCATUUTUCUAGUUTUGGAGAUUGGCAGU
配列番号 195	CCAACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUC	配列番号 217	CAUUTUCUAGUUTUGGAGAUUGGCAGUU
配列番号 196	CAACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUCU	配列番号 218	AUUTUCUAGUUTUGGAGAUUGGCAGUUU
配列番号 197	AACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUCUA	配列番号 219	UUUCUAGUUTUGGAGAUUGGCAGUUTUC
配列番号 198	ACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUCUAG	配列番号 220	UUUCUAGUUTUGGAGAUUGGCAGUUTUC
配列番号 199	ACAUCAGGAAGAUUGGCAUUTUCUAGUUTUGG		
配列番号 200	ACAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUCUAG		
配列番号 201	CAUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUCUAGU		
配列番号 202	AUCAAGGAAGAUUGGCAUUTUCUAGU		

【図 9 - 12】

配列番号 235	GUUCUUGUUUUUCAAAUUUUUGGGCAG	配列番号 264	AAUAGUUTUCUCCAACTUGGGGACGC
配列番号 236	UCUCUUGUUUUUCAAAUUUUUGGGCAGC	配列番号 265	AUGAGUUTUCUCCAACTUGGGGACGCC
配列番号 237	CUUGUUUUUCAAAUUUUUGGGCAGCG	配列番号 266	UGAGUUTUCUCCAACTUGGGGACGCCU
配列番号 238	UUUUUUUCAAAUUUUUGGGCAGCGG	配列番号 267	GAGUUTUCUCCAACTUGGGGACGCCU
配列番号 239	UGUUUUUCAAAUUUUUGGGCAGCGGU	配列番号 268	AGUUTUCUCCAACTUGGGGACGCCU
配列番号 240	GUUUUUUCAAAUUUUUGGGCAGCGGU	配列番号 269	GUUCUCCAACTUGGGGACGCCUUG
配列番号 241	UUUUUCAAAUUUUUGGGCAGCGGUAA	配列番号 270	UUCUCCAACTUGGGGACGCCUUGU
配列番号 242	UUUCAAAUUUUGGGCAGCGGUAAU	配列番号 271	UCUCCAACTUGGGGACGCCUUGUU
配列番号 243	UUUCAAAUUUUUGGGCAGCGGUAAUG	配列番号 272	CUUCCAACTUGGGGACGCCUUGUUC
配列番号 244	UUCAAAUUUUGGGCAGCGGUAAUGA	配列番号 273	UUCCAACTUGGGGACGCCUUGUUDCC
配列番号 245	UCAAAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAG	配列番号 274	GAUUG CUUGU CUUGU UUUUC
配列番号 246	CAAAUUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGU	配列番号 275	CCUUC UGAUU GCUGG UCUGG
配列番号 247	AAAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUU	配列番号 276	GGUAA UGAGU UCUUC CAACTU GG
配列番号 248	AAUUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUC	配列番号 277	ACUUG GAGCG CCUCU GUUCC
配列番号 249	AUUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUCU	配列番号 283	ACUUGGACGCCUUCUUUUCCA
配列番号 282	UCCAACTUGGGGACGCCUUCUUGUUC AUAUCC	配列番号 284	CCGUAAUGAUUGUUUCUAGCC

【図 9 - 1 3】

続き

DMD遺伝子のエキソン53

配列番号 250	CCAUGUGUGAUAUCCUUUAACAUU
配列番号 251	CCAUGUGUGAUAUCCUUUAAC
配列番号 252	AUUGUGUGAUAUCCUUUAAC
配列番号 253	CCUGUCCUAAGACCUGCUCU
配列番号 254	CUUUUGGUAUGCAUCUACUGUAUAG
配列番号 255	CAUUAACUGUUGCCUCCGGUUCUG
配列番号 256	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG
配列番号 257	CAUUAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG
配列番号 258	CUGAAGGUGUUCUUGACUUCAUCC
配列番号 259	UGUAUAGGACCCUCCUCCAUAGACUC
配列番号 260	AUCCACUGAUUCUGAAUUC
配列番号 261	UUGGCUCUGGCCUGUCCUAAGA
配列番号 262	AAGACCUGCUCAGCUCUUCUCCUAGCUUCCAGCCA

【配列表】

2017141296000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A G
(72)発明者 デ キンペ、ヨセフス、ヨハネス		
オランダ国、ユトレヒト、ピーター ベルナジェシュトラート	2 7	
(72)発明者 プラテンブルク、ジェラルドゥス、ヨハネス		
オランダ国、フォールスホーテン、ヴィンガールデンラン	5 6	
(72)発明者 ファン ドイテコム、ジュディス クリスティーナ テオドーラ		
オランダ国、ドルドレヒト、アビールシュトラート	1 3	
(72)発明者 アールツマ ー ラス、アンネミーケ		
オランダ国、ホーフトドルプ、ナホナ	4 2	
(72)発明者 ファン オメン、ギャリット ー ヤン、ボウデヴィン		
オランダ国、アムステルダム、ウェスターシュトラート	7 3	
F ターム(参考) 4C084 AA13 AA19 AA20 MA02 NA14 ZA941 ZC751		
4C086 AA01 AA02 EA09 EA16 MA02 MA04 NA14 ZA94 ZC75		