



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115210376 A

(43) 申请公布日 2022.10.18

(21) 申请号 202180017313.6

长谷川佐季 武田伸一 青木吉嗣

(22) 申请日 2021.02.26

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(30) 优先权数据

11105

2020-033483 2020.02.28 JP

专利代理师 沈雪

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2022.08.26

C12N 15/113 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/7088 (2006.01)

PCT/JP2021/007286 2021.02.26

A61K 48/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 21/04 (2006.01)

W02021/172498 JA 2021.09.02

G07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

(71) 申请人 日本新药株式会社

地址 日本京都府

申请人 国立研究开发法人国立精神·神经
医疗研究中心

权利要求书3页 说明书31页

(72) 发明人 本多优 鞭马奏萌 福井崇弘

序列表27页 附图9页

(54) 发明名称

诱导外显子51的跳读的反义核酸

(57) 摘要

本说明书中提供使人抗肌萎缩蛋白基因第51位外显子高效率地跳读的药剂。另外,本说明书中提供具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因第51位外显子的跳读的活性的反义低聚物。

1. 一种反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,所述反义低聚物不包括由序列号90及97~126中任一个碱基序列构成的反义低聚物,且选自下述(a1)~(d1):

(a1) 包含序列号1~89及91~93中任一个碱基序列的反义低聚物;

(b1) 包含相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列缺失、置换、插入、和/或添加了1~5个碱基的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

(c1) 包含相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有80%以上的序列同一性的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

(d1) 与由和序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

2. 一种反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,所述反义低聚物不包括由序列号90及97~126中任一个碱基序列构成的反义低聚物,且选自以下的(e)~(h):

(e) 由序列号1~89及91~93中任一个碱基序列构成的反义低聚物;

(f) 由相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列缺失和/或置换了1~5个碱基的碱基序列构成、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

(g) 由相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有80%以上的序列同一性的碱基序列构成、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

(h) 与由和序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在高严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

3. 根据权利要求1或2所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

所述反义低聚物为具备相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有90%以上的序列同一性的核苷酸序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

4. 根据权利要求1所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

所述反义低聚物选自:

(a2) 包含序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列的反义低聚物;

(b2) 包含相对于序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列缺失、置换、插入、和/或添加了1~5个碱基的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

(c2) 包含相对于序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列具有80%以上的序列同一性的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

(d2) 与由和序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳

读的活性的反义低聚物。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其为寡核苷酸。

6. 根据权利要求5所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分和/或磷酸键部分经过修饰。

7. 根据权利要求5或6所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分是2'位的-OH基被选自OR、R、R'OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br及I中的任意基团(上述R表示烷基或芳基,上述R'表示亚烷基)取代的核糖。

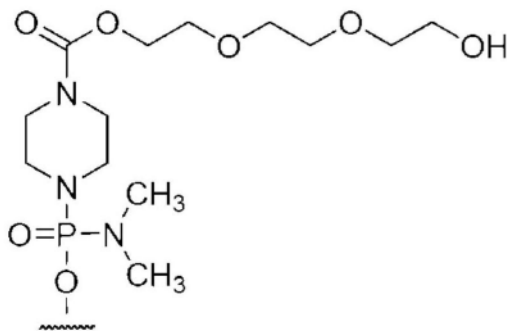
8. 根据权利要求5~7中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的磷酸键部分为选自硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸烷基酯键、氨基磷酸酯键、以及硼烷磷酸酯键中的任意1种。

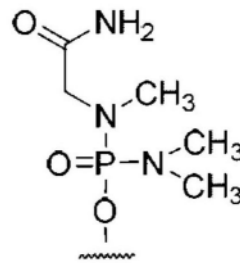
9. 根据权利要求1~4中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其为吗啉基低聚物。

10. 根据权利要求9所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其为二氨基磷酸酯吗啉基低聚物。

11. 根据权利要求9或10所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其5'末端为下述化学式(1)~(3)中的任意基团,



(1)



(2)



(3)。

12. 一种肌营养不良症治疗用医药组合物,其包含权利要求1~11中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物。

13. 根据权利要求12所述的医药组合物,其进一步包含医药上能够允许的载体。

14. 根据权利要求12或13所述的医药组合物,其用于对肌营养不良症患者给药,所述患者是抗肌萎缩蛋白基因具有成为外显子51跳读的对象的患者。

15. 根据权利要求14所述的医药组合物,其中,

所述患者具有如下抗肌萎缩蛋白基因,该抗肌萎缩蛋白基因具有至少由外显子51附近的外显子的缺失所导致的移码突变、并且可通过外显子51的跳读使氨基酸的可读框被修正。

16. 根据权利要求14或15所述的医药组合物,其中,
所述患者的抗肌萎缩蛋白基因具有由外显子13-50、29-50、40-50、43-50、45-50、47-50、48-50、49-50、50、52、52-63的缺失所导致的移码突变。
17. 根据权利要求14~16中任一项所述的医药组合物,其中,
所述患者为人。
18. 权利要求1~11中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物在肌营养不良症治疗用医药的制造中的用途。
19. 一种肌营养不良症的治疗方法,该方法包括:
对肌营养不良症患者给药有效量的权利要求1~11中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物、或者权利要求12~16中任一项所述的医药组合物的步骤。
20. 根据权利要求19所述的治疗方法,其中,
所述患者为人。
21. 权利要求1~11中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物、或者权利要求12~16中任一项所述的医药组合物,其用于肌营养不良症的治疗。
22. 根据权利要求21所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物、或者医药组合物,其中,
在所述治疗中,肌营养不良症患者为人。

诱导外显子51的跳读的反义核酸

技术领域

[0001] 本发明涉及诱导人抗肌萎缩蛋白基因的第51位外显子的跳读的反义低聚物及包含该反义低聚物的医药组合物。

背景技术

[0002] 杜兴氏肌营养不良症 (DMD) 是约3,500人新生男孩中1人发病的频率最高的严重的遗传性进行性肌萎缩症。虽然在婴幼儿期显示出与健全人基本上没有差别的运动能力,但从4~5岁时起可观察到肌力降低。然后DMD患者的肌力降低会进一步发展,至12岁时,DMD患者变得无法行走,在20多岁时因心力衰竭或呼吸衰竭导致死亡。目前,没有针对DMD的有效治疗方法,迫切需要开发有效的治疗药。

[0003] 已知DMD的原因是抗肌萎缩蛋白基因的突变。抗肌萎缩蛋白基因存在于X染色体,是由220万碱基对的DNA形成的巨大基因。由DNA转录至mRNA前体,再通过剪接去除内含子,79个外显子接合并成为与翻译区域对应的11,058个碱基的mRNA。由该mRNA翻译成3,685个氨基酸,生成抗肌萎缩蛋白。抗肌萎缩蛋白与肌细胞的膜稳定性的保持有关,为了使肌细胞不容易破坏,抗肌萎缩蛋白是必需的。DMD患者的抗肌萎缩蛋白基因存在变异,因此在肌细胞中基本上无法表达具有功能的抗肌萎缩蛋白。因此,在DMD患者体内,无法保持肌细胞的结构,大量的钙离子流入肌细胞内。其结果是发生类似炎症的反应,发生纤维化,从而使肌细胞变得难以再生。

[0004] 贝克 (Becker) 肌营养不良症 (BMD) 的原因也是抗肌萎缩蛋白基因的突变,其症状虽然表现出因肌萎缩导致的肌力降低,但通常比DMD轻,肌力降低的发展慢,在多数情况下在成年期发病。可以认为DMD与BMD的临床症状的不同在于,由于突变,在抗肌萎缩蛋白的mRNA翻译为抗肌萎缩蛋白时,氨基酸可读框被破坏或保持(非专利文献1)。即,对于DMD而言,由于存在氨基酸可读框错位的突变,因此基本上不表达保持功能的抗肌萎缩蛋白,但对于BMD而言,由于变异而使外显子的一部分缺失,但保持了氨基酸可读框,因此可以产生虽然不完全但是有功能的抗肌萎缩蛋白。

[0005] 作为DMD的治疗方法,外显子跳读法正在受到期待。该方法是通过改变剪接而修复抗肌萎缩蛋白的mRNA的氨基酸可读框,从而诱导表达部分恢复了功能的抗肌萎缩蛋白的方法(非专利文献2)。成为外显子跳读的对象氨基酸序列部分被丢失。因此,在该治疗中表达的抗肌萎缩蛋白比正常的抗肌萎缩蛋白短,但由于保持了氨基酸可读框,因此部分保持了使肌细胞稳定的功能。由此期待通过外显子跳读能使DMD表现出与更轻症状的BMD相同的症状。外显子跳读法经过基于小鼠、犬的动物实验,已经在进行对人DMD患者的临床试验。

[0006] 可以通过以5' 或3' 剪接点中任一者或两者、或者外显子的内部为目标的反义核酸的结合来诱导外显子跳读。外显子仅在两个剪接点通过剪接体复合体进行识别的情况下包含在mRNA中。因此,通过利用反义核酸靶向剪接点,可以诱导外显子跳读。另外可以认为,由于外显子被剪接机构所识别,因此需要将SR蛋白质结合于外显子剪接增强子(ESE),即使靶向ESE也能够诱导外显子跳读。

[0007] 抗肌萎缩蛋白基因的突变随DMD患者而不同,因此需要与基因突变的部位、种类相应的反义核酸。目前为止,西澳大利亚大学的Steve Wilton等制备了对全部79个外显子诱导外显子跳读的反义核酸(非专利文献3),荷兰的Annemieke Aartsma-Rus等制备了对39种外显子诱导外显子跳读的反义核酸(非专利文献4)。

[0008] 可以认为全部DMD患者的13%左右能够通过跳读第51位外显子(以下称为“外显子51”)来治疗。近年来,已经报告了多个对于以抗肌萎缩蛋白基因的外显子51作为外显子跳读的靶点的研究(专利文献1~10;非专利文献3~7)。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:国际公开第2015/137409号

[0012] 专利文献2:国际公开第2019/241385号

[0013] 专利文献3:国际公开第2002/024906号

[0014] 专利文献4:国际公开第2004/048570号

[0015] 专利文献5:国际公开第2004/083432号

[0016] 专利文献6:国际公开第2006/000057号

[0017] 专利文献7:国际公开第2010/048586号

[0018] 专利文献8:国际公开第2009/054725号

[0019] 专利文献9:国际公开第2010/050801号

[0020] 专利文献10:国际公开第2010/050802号

[0021] 非专利文献1:Monaco A.P.et al.,Genomics 2:90-95(1988)

[0022] 非专利文献2:Matsuo M.,Brain and Development 18:167-172(1996)

[0023] 非专利文献3:Wilton S.D.et al.,Molecular Therapy 15:1288-1296(2007)

[0024] 非专利文献4:Annemieke Aartsma-Rus et al.,Neuromuscular Disorders 12: S71-S77(2002)

[0025] 非专利文献5:Aoki Y.et al.,Molecular Therapy 18:1995-2005(2010)

[0026] 非专利文献6:Nakano S.et al.,Pediatrics International 53:524-529(2011)

[0027] 非专利文献7:Echigoya Y et al.,Molecular Therapy 25:2561-2572(2017)

发明内容

[0028] 发明要解决的课题

[0029] 在上述状况下,期望有高效率地诱导抗肌萎缩蛋白基因的外显子51的跳读的新型反义低聚物。另外,期望有保持高效率地诱导抗肌萎缩蛋白基因的外显子51的跳读的活性、并且具有作为医药品的优异的性质(例如溶解性、安全性)的反义低聚物。

[0030] 解决课题的方法

[0031] 本发明人等对上述文献中记载的技术内容及抗肌萎缩蛋白基因的结构等进行了详细研究,结果发现,通过给药具有序列号1~89及91~93中任一者所示的碱基序列的反义低聚物,可高效率地诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读。另外,研究的结果是发现了可高效率地诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读、且具有优异的溶解性及安全性的反义低聚物。本发明人等基于上述见解完成了本发明。

[0032] 即,本发明如下所述。

[0033] [1]一种反义低聚物(其中,不包括由序列号90及97~126中任一个碱基序列构成的反义低聚物)、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其选自下述(a1)~(d1):

[0034] (a1)包含序列号1~89及91~93中任一个碱基序列的反义低聚物;

[0035] (b1)包含相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列缺失、置换、插入、和/或添加了1~5个碱基的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

[0036] (c1)包含相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有80%以上的序列同一性的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

[0037] (d1)与由和序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

[0038] [2]一种反义低聚物(其中,不包括由序列号90及97~126中任一个碱基序列构成的反义低聚物)、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其选自以下的(e)~(h):

[0039] (e)由序列号1~89及91~93中任一个碱基序列构成的反义低聚物;

[0040] (f)由相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列缺失和/或置换了1~5个碱基的碱基序列构成、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

[0041] (g)由相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有80%以上的序列同一性的碱基序列构成、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

[0042] (h)与由和序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在高严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

[0043] [3]根据上述[1]或[2]所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

[0044] 上述反义低聚物为具备相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有90%以上的序列同一性的核苷酸序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

[0045] [4]根据上述[1]所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

[0046] 上述反义低聚物选自:

[0047] (a2)包含序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列的反义低聚物;

[0048] (b2)包含相对于序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列缺失、置换、插入、和/或添加了1~5个碱基的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

[0049] (c2)包含相对于序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列具有

80%以上的序列同一性的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

[0050] (d2) 与由和序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

[0051] [5]根据上述[1]~[4]中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其为寡核苷酸。

[0052] [6]根据上述[5]所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

[0053] 构成上述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分和/或磷酸键部分经过修饰。

[0054] [7]根据上述[5]或[6]所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

[0055] 构成上述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分是2'位的-OH基被选自OR、R、R' OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br及I中的任意基团(上述R表示烷基或芳基,上述R'表示亚烷基。)取代的核糖。

[0056] [8]根据上述[5]~[7]中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其中,

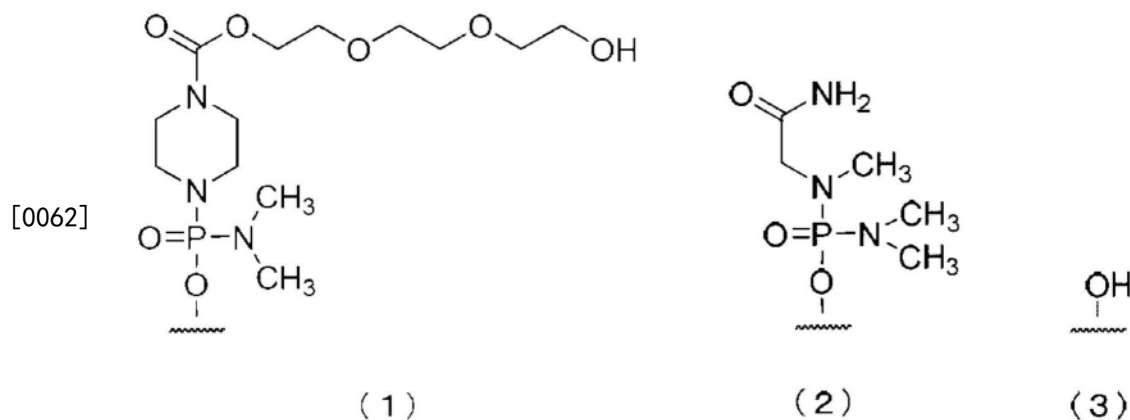
[0057] 构成上述寡核苷酸的至少1个核苷酸的磷酸键部分为选自硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、膦酸烷基酯键、氨基磷酸酯键、以及硼烷磷酸酯键中的任意1种。

[0058] [9]根据上述[1]~[4]中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其为吗啉基低聚物。

[0059] [10]根据上述[9]所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其为二氨基磷酸酯吗啉基低聚物。

[0060] [11]根据上述[9]或[10]所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物,其5'末端为下述化学式(1)~(3)中的任意基团。

[0061] [化学式1]



[0063] [12]一种肌营养不良症治疗用医药组合物,其包含上述[1]~[11]中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物。

[0064] [13]根据上述[12]所述的医药组合物,其进一步包含医药上能够允许的载体。

[0065] [14]根据上述[12]或[13]所述的医药组合物,其用于对肌营养不良症患者给药,

上述患者是抗肌萎缩蛋白基因具有成为外显子51跳读的对象突变的患者。

[0066] [15]根据上述[14]所述的医药组合物,

[0067] 上述患者具有如下抗肌萎缩蛋白基因,该抗肌萎缩蛋白基因具有至少由外显子51附近的外显子的缺失所导致的移码突变、并且可通过外显子51的跳读使氨基酸的可读框被修正。

[0068] [16]根据上述[14]或[15]所述的医药组合物,其中,

[0069] 上述患者的抗肌萎缩蛋白基因具有由外显子13-50、29-50、40-50、43-50、45-50、47-50、48-50、49-50、50、52、52-63的缺失所导致的移码突变。

[0070] [17]根据上述[14]~[16]中任一项所述的医药组合物,其中,

[0071] 上述患者为人。

[0072] [18]上述[1]~[11]中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物在肌营养不良症治疗用医药品的制造中的用途。

[0073] [19]一种肌营养不良症的治疗方法,该方法包括:

[0074] 对肌营养不良症患者给药有效量的上述[1]~[11]中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物、或者上述[12]~[16]中任一项所述的医药组合物的步骤。

[0075] [20]根据上述[19]所述的治疗方法,其中,

[0076] 上述患者为人。

[0077] [21]上述[1]~[11]中任一项所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物、或者上述[12]~[16]中任一项所述的医药组合物,其用于肌营养不良症的治疗。

[0078] [22]根据上述[21]所述的反义低聚物、或者其医药上能够允许的盐或它们的水合物、或者医药组合物,其中,

[0079] 在上述治疗中,肌营养不良症患者为人。

[0080] 发明的效果

[0081] 通过本发明,可以提供高效率地诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的反义低聚物。另外,通过本发明,可以提供保持高效率地诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性、并且具有优异的溶解性的反义低聚物。此外,通过本发明,可以提供保持高效率地诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性、并且具有优异的溶解性及安全性(例如,没有对肾脏及肝脏的功能的影响、或造成影响的可能性极低)的反义低聚物。

附图说明

[0082] 图1示出了PMO No.43、44、45、46的反义低聚物对人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0083] 图2示出了PMO No.42、45、47、48、49、50的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0084] 图3示出了PMO No.42、62、63、89的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0085] 图4示出了PMO No.83、85的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子

51的跳读效率。

[0086] 图5示出了PMO No.33、34、35、36、37、38的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0087] 图6示出了PMO No.83、85、90的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0088] 图7示出了PMO No.82、84、86、87的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0089] 图8示出了PMO No.45、51、52、56、57、58、59、60、61的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0090] 图9示出了PMO No.42、64、65、66、85的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0091] 图10示出了PMO No.1、2、42、66、67、85、88、92、93的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0092] 图11示出了PMO No.3、4、5、6、7、8、42、68、69、70、85的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0093] 图12示出了PMO No.8、9、10、11、12、13、14、42、71、72、73、91的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0094] 图13示出了PMO No.8、15、16、17、42、74、75、76的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0095] 图14示出了PMO No.8、18、19、20、42、63、75、76、77的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0096] 图15示出了PMO No.8、21、22、23、24、25、26、42、77、78的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0097] 图16示出了PMO No.8、21、27、28、29、30、42、79、80、81的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0098] 图17示出了PMO No.8、16、21、31、32、67的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0099] 图18示出了PMO No.16、21、94的反义低聚物对RD细胞中的人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读效率。

[0100] 图19示出了PMO No.42的反义低聚物在小鼠中的安全性试验的结果。从左起以平均值±标准偏差表示天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 值、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 值、尿素氮量 (BUN) 值、肌酸酐值 (Student的t检验的显著性水平： $p < 0.05$)。

[0101] 图20示出了PMO No.16及90的反义低聚物在小鼠中的安全性试验的结果。从左起以平均值±标准偏差表示AST值、ALT值、BUN值、肌酸酐值，对观察到显著升高的值表示p值 (Dunnett的检验的显著性水平： $p < 0.05$)。

[0102] 图21示出了PMO No.21的反义低聚物在小鼠中的安全性试验的结果。从左起以平均值±标准偏差表示AST值、ALT值、BUN值、肌酸酐值 (Student的t检验的显著性水平： $p < 0.05$)。

具体实施方式

[0103] 以下,对本发明详细地进行说明。以下的实施方式是用于说明本发明的例子,并不是将本发明仅限于该实施方式。本发明只要不脱离其主旨即可,可以以各种方式实施。

[0104] 1.反义低聚物

[0105] 本发明提供高效率地跳读人抗肌萎缩蛋白基因的第51位外显子的反义低聚物(以下称为“本发明的反义低聚物”)。

[0106] [人抗肌萎缩蛋白基因的第51位外显子]

[0107] 在本发明中,“基因”除了基因组基因以外,还包括cDNA、mRNA前体及mRNA。基因优选为mRNA前体,即pre-mRNA。

[0108] 在人基因组中,人抗肌萎缩蛋白基因存在于基因座Xp21.2。人抗肌萎缩蛋白基因具有220万碱基对的大小,作为已知的人基因是最大的基因。但是,人抗肌萎缩蛋白基因的编码区域仅有14kb,该编码区域以79个外显子的形式分散于抗肌萎缩蛋白基因内(Roberts,RG.,et al.,Genomics,16:536-538(1993);Koenig,M.,et al.,Cell 53 219-228,(1988))。作为人抗肌萎缩蛋白基因的转录物的pre-mRNA经过剪接而生成14kb的成熟mRNA。人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的碱基序列是公知的(GenBank Accession No.NM_004006)。

[0109] 将包含人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子51的碱基序列示于序列号127。

[0110] [反义低聚物]

[0111] 制备本发明的反义低聚物的目的在于,通过人抗肌萎缩蛋白基因的外显子51的跳读,将由DMD型抗肌萎缩蛋白基因编码的蛋白质改变为BMD型抗肌萎缩蛋白。因此,作为反义低聚物的外显子跳读的对象,抗肌萎缩蛋白基因的外显子51不仅包括野生型,也包括突变型。

[0112] 本发明的反义低聚物具体为选自以下(a1)~(d1)中任一项所述的反义低聚物。

[0113] (a1) 包含序列号1~89及91~93中任一个碱基序列的反义低聚物;

[0114] (b1) 包含相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列缺失、置换、插入、和/或添加了1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个碱基的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

[0115] (c1) 包含相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有80%以上、84%以上、85%以上、89%以上、90%以上、94%以上或95%以上的序列同一性的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

[0116] (d1) 与由和序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

[0117] 作为其它方式,本发明的反义低聚物具体为选自以下(e)~(h)中任一项所述的反义低聚物。

[0118] (e) 由序列号1~89及91~93中任一个碱基序列构成的反义低聚物;

[0119] (f) 由相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列缺失和/或置换了1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个碱基的碱基序列构成、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

[0120] (g) 由相对于序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有80%以上、84%以上、85%以上、89%以上、90%以上、94%以上或95%以上的序列同一性的碱基序列构成、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

[0121] (h) 与由和序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在高严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

[0122] 作为本发明的反义低聚物,更优选为选自以下(a2)~(d2)中任一项所述的反义低聚物。

[0123] (a2) 包含序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列的反义低聚物;

[0124] (b2) 包含相对于序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列缺失、置换、插入、和/或添加了1~5个碱基的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;

[0125] (c2) 包含相对于序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列具有80%以上的序列同一性的碱基序列、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物;以及

[0126] (d2) 与由和序列号7、8、10、16、21、24、31、42、67及76中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸在严格条件下进行杂交、且具有诱导人抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的反义低聚物。

[0127] 上述(b1)~(d1)、(f)~(h)及(b2)~(d2)的反义低聚物具体而言分别为(a1)、(e)及(a2)的反义低聚物的突变体,这是考虑到与患者的抗肌萎缩蛋白基因的突变(例如,多态性)等相对应。

[0128] 其中,本发明的反义低聚物不包括国际公开第2015/137409号中记载的由下述碱基序列构成的反义低聚物(不包含)。

[0129] [表1]

[0130]

序列	序列号
CGGTAAGTTCTGTCCTCAAGGAAGATGGCA	90
CTCATACCTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	97
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	98
AACATCAAGGAAGATGGCATT	99
TCCAACATCAAGGAAGATGGC	100
ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	101
GAGU AACAGUCUGAGUAGGAG	102
UGUGUCACCAGAGU AACAGUC	103
AACCACAGGUUGUGUCACCAG	104
UUUCCUUAGU AACACAGGUU	105
GAGAU GGCAGUUUCCUUAGUA	106
UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	107
AAGAU GGC AUUUCUAGUUUGG	108

AACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	109
AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	110
CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	111
CGGUUGAAAUCUGCCAGAGCA	112
UGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC	113
CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	114
GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	115
AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	116
UUUAUAACUUGAUCAAGCAGAG	117
CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	118
CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	119
CAAGGUCACCCACCAUCACCC	120
UUGAUUAUCCUCAAGGUCACCC	121
GAUCAUCUCGUUGAUAUCCUC	122
UCUGCUUGAUGAUCAUCUCGU	123
GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	124
CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	125
CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	126

[0131] 在本说明书中，“在严格条件下进行杂交的反义低聚物”是指，例如，以由与序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列构成的寡核苷酸的全部或部分作为探针，通过使用菌落杂交法、噬菌斑杂交法或Southern杂交法等而得到的反义低聚物。作为杂交的方法，例如，可以利用“Sambrook&Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol.3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001”及“Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons 1987-1997”等中记载的方法。

[0132] 在本说明书中，“严格条件”可以是低严格条件、中严格条件及高严格条件中的任一种。“低严格条件”是指，例如，5×SSC、5×邓哈特溶液(Denhardt's solution)、0.5% SDS、50%甲酰胺、32℃的条件。另外，“中严格条件”是指，例如，5×SSC、5×邓哈特溶液(Denhardt's solution)、0.5% SDS、50%甲酰胺、42℃或5×SSC、1% SDS、50mM Tris-HCl (pH7.5)、50%甲酰胺、42℃的条件。“高严格条件”是指，例如，(1) 5×SSC、5×邓哈特溶液(Denhardt's solution)、0.5% SDS、50%甲酰胺、50℃、(2) 0.2×SSC、0.1% SDS、60℃、(3) 0.2×SSC、0.1% SDS、62℃、(4) 0.2×SSC、0.1% SDS、65℃、或(5) 0.1×SSC、0.1% SDS、65℃的条件，但并不限于此。在这些条件中，温度越高，越可以期待能够高效地得到具有较高序列同一性的反义低聚物。其中，作为影响杂交的严格性的因素，可以考虑温度、探针浓度、探针长度、离子强度、时间、盐浓度等多种因素，本领域技术人员可以通过对这些因素进行适当选择来实现相同的严格性。这里，“序列同一性”是指，对于某2个一对的核酸，作为比较对象的碱基序列在全部范围中的同一性，以使用本发明的技术领域中公知的数学算法得到的碱基序列的最佳比对中一致的碱基的比例(%)来表示。例如，相对于某个由20个碱基的碱基序列构成的反义低聚物，具有由“80%的序列同一性”的碱基序列构成的反义低聚物是指，相对于上述的20个碱基的反义低聚物，具有16个碱基以上的相同碱基的反义低聚物。

[0133] 序列同一性可以使用FASTA (Science 227 (4693):1435-1441, (1985))、或Karlin和Altschul的算法BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 872264-2268,1990;Proc Natl Acad Sci USA 90:5873,1993)来确定。开发了基于BLAST的算法的被称为blastn、blastx、tblastn、tblastx的程序 (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215:403,1990)。在使用blastn分析碱基序列时,参数可以设为例如得分=100、字长=12。在使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用各程序的默认参数。

[0134] 在将市售的试剂盒用于杂交时,可以使用例如Alkphos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare)。在该情况下,可以按照试剂盒附带的实验方案,与标记了的探针进行过夜的孵育,然后在55°C的条件下用含0.1% (w/v) SDS的1次清洗缓冲液对膜进行清洗后,对杂交了的反义低聚物进行检测。或者,在基于与序列号1~89及91~93中任一个碱基序列互补的碱基序列的全部或部分来制作探针时,在使用市售的试剂(例如,PCR Labeling Mix (Roche Diagnostics公司)等)对该探针标记异羟洋地黄毒苷配基 (DIG)的情况下,可以使用DIG核酸检测试剂盒 (Roche Diagnostics公司)对杂交进行检测。

[0135] 作为上述以外的能够杂交的反义低聚物,可以列举在通过FASTA、BLAST等同源性检索软件使用默认的参数进行计算时,与序列号1~89及91~93中任一个碱基序列具有90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、或99.9%以上的序列同一性的反义低聚物。

[0136] “诱导人抗肌萎缩蛋白基因的第51位外显子的跳读”是指,通过本发明的反义低聚物与相当于人抗肌萎缩蛋白基因的转录物(例如,pre-mRNA)的外显子51和/或其相邻内含子的部位结合,在该转录物受到剪接时发生外显子51的去除,例如,在缺失了外显子52的DMD患者的情况下,相当于外显子50的3'末端的碱基序列与相当于外显子53的5'末端的碱基序列连接,形成不发生密码子移码的成熟mRNA。

[0137] 因此,如果是在抗肌萎缩蛋白基因中具有成为外显子51的跳读的对象突变的DMD患者,就能够通过外显子51的跳读进行治疗。作为这样的DMD患者,例如,可以举出具有如下抗肌萎缩蛋白基因的DMD患者,所述抗肌萎缩蛋白基因具有至少由外显子51附近的外显子的缺失所导致的移码突变、并且可通过外显子51的跳读使氨基酸的可读框被修正,更具体而言,例如,可以举出具有因抗肌萎缩蛋白基因的外显子13-50、29-50、40-50、43-50、45-50、47-50、48-50、49-50、50-52、52-63等的缺失而导致的移码突变的DMD患者。

[0138] 这里,上述“结合”是指在将本发明的反义低聚物与人抗肌萎缩蛋白基因的转录物进行混合时,在生理条件下两者杂交而形成双链。上述“生理条件下”是指调节至与生物体内类似的pH、盐组成、温度的条件。例如,可以列举:25~40°C、优选为37°C, pH 5~8、优选为pH 7.4,氯化钠浓度为150mM的条件。

[0139] 人抗肌萎缩蛋白基因的外显子51是否发生跳读可以通过以下方式确认:将本发明的反义低聚物导入抗肌萎缩蛋白表达细胞(例如人横纹肌肉瘤细胞),从上述抗肌萎缩蛋白表达细胞的总RNA中对人抗肌萎缩蛋白基因的mRNA的外显子51的附近区域进行RT-PCR扩增,对该PCR扩增产物进行巢式PCR或序列分析。

[0140] 跳读效率ES(单位:%)可以通过下述方式进行计算:从受试细胞中回收人抗肌萎

缩蛋白基因的mRNA,对该mRNA中跳读了外显子51的条带的多核苷酸量“A”和未跳读外显子51的条带的多核苷酸量“B”进行测定,基于上述“A”和“B”的测定值,按照下式(1)进行计算。对于跳读效率的计算,可以参照国际公开第2012/029986号。

[0141] $ES=100 \times A / (A+B) \cdot \cdot \cdot (1)$

[0142] 本发明的反义低聚物优选以10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上的效率跳读外显子51。

[0143] 本发明的反义低聚物进一步优选在生理盐水中的溶解性高。在生理盐水中的溶解性高的反义低聚物与溶解性低的反义低聚物不同,制剂保存时发生析出而变得无法使用的可能性极低,而且,在利用含盐的输液时发生析出而变得无法使用的可能性极低。此外,在生理盐水中的溶解性高的反义低聚物由于不易析出,因此在给药时显示出毒性的可能性(Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences 1,91-99(2007))也极低。因此,在生理盐水中的溶解性高的反义低聚物作为医药的有效成分的利用价值非常高。

[0144] 在生理盐水中的溶解性优选为20mg/mL以上,更优选为30mg/mL以上,进一步优选为40mg/mL以上,特别优选为50mg/mL以上。反义低聚物在生理盐水中的溶解性可以通过以下方式进行评价:将反义低聚物以目标浓度溶解于生理盐水,在一定时间后通过肉眼观察确认有无沉淀。

[0145] 另外,反义低聚物优选作为医药的有效成分的安全性高。安全性例如可以以给药反义低聚物后的血液中的天冬氨酸氨基转移酶(AST)值、丙氨酸氨基转移酶(ALT)值、尿素氮(BUN)值及肌酸酐值作为指标来评价。AST值在肝脏发生损伤时增高,ALT值在肝脏存在问题时增高,BUN值在肾脏功能降低时增高,肌酸酐值在肾小球的过滤功能降低时增高,由于具有这样的倾向,因此,可以以这些值作为指标来评价反义低聚物对肾脏及肝脏的功能造成的影响。

[0146] 具体而言,例如,在对健康小鼠给药反义低聚物后,测定血液中的AST值、ALT值、BUN值及肌酸酐值,进行统计学显著性检验,在与对照组(给药溶剂或未处理)的测定值相比观察到显著上升时,判定为异常值,可以判断所给药的的反义低聚物会对肾脏及肝脏的功能造成影响、或者造成影响的可能性高。反之,在未观察到显著上升时,可以判断不会对肾脏及肝脏的功能的影响、或者造成影响的可能性低。另外,在与对照组的测定值相比观察到特定的上升率、具体而言例如为30%以上的上升率时,也可以判定为异常值。

[0147] 作为本发明的反义低聚物,可以举出例如具有16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个碱基的长度的寡核苷酸、吗啉基低聚物、或肽核酸(Peptide Nucleic Acid:PNA)低聚物。作为反义低聚物的长度,优选为20~30个碱基、20~29个碱基、22~30个碱基、22~29个碱基或25~29个碱基的长度,更优选为22~30个碱基、22~29个碱基或25~29个碱基的长度,优选为吗啉基低聚物。

[0148] 上述寡核苷酸(以下称为“本发明的寡核苷酸”)是以核苷酸为结构单元的本发明的反义低聚物,所述核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或修饰核苷酸的任一种。

[0149] 修饰核苷酸是指构成核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的核酸碱基、糖部分及磷酸键部分的全部或一部分经过修饰的核苷酸。

[0150] 在本发明中,作为核酸碱基,可以列举例如:腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶或它们的修饰碱基。作为所述修饰碱基,可以列举例如:假尿嘧啶、3-甲基尿

嘧啶、二氢尿嘧啶、5-烷基胞嘧啶(例如5-甲基胞嘧啶)、5-烷基尿嘧啶(例如5-乙基尿嘧啶)、5-卤代尿嘧啶(5-溴尿嘧啶)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(6-甲基尿嘧啶)、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5'-羧基甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、1-甲基腺嘌呤、1-甲基次黄嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲羰基甲基尿嘧啶、5-甲基氧基尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸、2-硫胞嘧啶、嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、异鸟嘌呤、吡啶、咪唑、黄嘌呤等,但并不限于此。

[0151] 作为糖部分的修饰,可以列举例如:核糖2'位的修饰及糖的其它部分的修饰。作为核糖2'位的修饰,可以列举例如:将核糖的2'位的-OH基取代为OR、R、R' OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br、I的修饰。这里,R表示烷基或芳基,R'表示亚烷基。

[0152] 作为糖的其它部分的修饰,可以列举例如:将核糖或脱氧核糖的4'位的O取代为S而得到的糖、将糖的2'位与4'位交联而成的糖、例如LNA(锁定核酸,Locked Nucleic Acid)或ENA(2'-O,4'-C-亚乙基桥接的核酸,2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)等,但并不限于此。

[0153] 作为磷酸键部分的修饰,可以列举例如:将磷酸二酯键替换为硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、膦酸烷基酯键、氨基磷酸酯键、硼烷磷酸酯键(boranophosphate bond)(Enya et al:Bioorganic&Medicinal Chemistry,2008,18,9154-9160)的修饰(例如,参考专利再公表公报第2006/129594号及第2006/038608号)。

[0154] 在本发明中,作为烷基,优选为直链状或支链状的碳原子数1~6的烷基。具体而言,可以列举例如:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、正己基、异己基。该烷基可以被取代,作为所述取代基,可以列举例如:卤素、烷氧基、氰基、硝基,可以取代1~3个这些基团。

[0155] 在本发明中,作为环烷基,优选碳原子数5~12的环烷基。具体而言,可以列举例如:环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二烷基。

[0156] 在本发明中,作为卤素,可以列举:氟、氯、溴、碘。

[0157] 作为烷氧基,可以列举直链状或支链状的碳原子数1~6的烷氧基,例如:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、异戊氧基、正己氧基、异己氧基等。特别优选为碳原子数1~3的烷氧基。

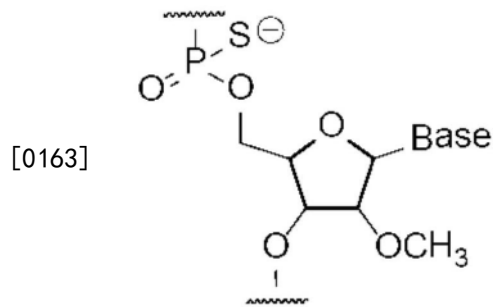
[0158] 在本发明中,作为芳基,优选为碳原子数6~10的芳基。具体而言,可以列举例如:苯基、 α -萘基、 β -萘基。特别优选为苯基。该芳基可以被取代,作为所述取代基,可以列举例如:烷基、卤素、烷氧基、氰基、硝基,可以取代1~3个这些基团。

[0159] 在本发明中,作为亚烷基,优选为直链状或支链状的碳原子数1~6的亚烷基。具体而言,可以列举例如:亚甲基、二亚甲基(ethylene)、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、2-(乙基)三亚甲基、1-(甲基)四亚甲基。

[0160] 在本发明中,作为酰基,可以列举直链状或支链状的烷酰基或芳酰基。作为烷酰基,可以列举例如:甲酰基、乙酰基、2-甲基乙酰基、2,2-二甲基乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、2,2-二甲基丙酰基、己酰基等。作为芳酰基,可以列举例如:苯甲酰基、甲苯酰基、萘甲酰基。所述芳酰基可以在能够取代的位置发生取代,可以用烷基取代。

[0161] 本发明的寡核苷酸优选为以下述通式表示的基团作为结构单元的本发明的反义低聚物,其中,核糖的2'位的-OH基被甲氧基取代,磷酸键部分为硫代磷酸酯键。

[0162] [化学式2]

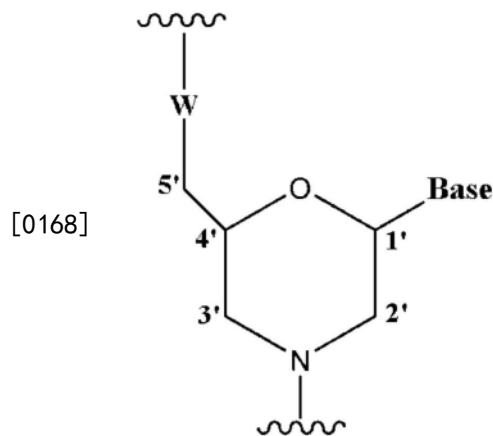


[0164] (式中,Base表示核酸碱基。)

[0165] 本发明的寡核苷酸可以用各种自动合成装置(例如,AKTA oligopilot plus10/100 (GE Healthcare))来容易地合成,或者可以委托第三方机构(例如,Promega公司、Takara公司、或Japan Bio Services公司)等来制作。

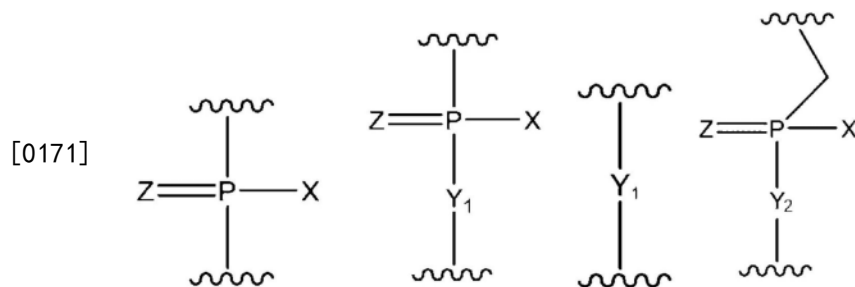
[0166] 本发明的吗啉基低聚物为以下述通式表示的基团作为结构单元的本发明的反义低聚物。

[0167] [化学式3]



[0169] (式中,Base与上述含义相同;W表示以下任意式所示的基团。)

[0170] [化学式4]



[0172] (式中,X表示 $-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 或F;

[0173] R^1 表示H、烷基;

[0174] R^2 及 R^3 相同或不同,表示H、烷基、环烷基或芳基;

[0175] Y_1 表示O、S、 CH_2 或 NR^1 ;

[0176] Y_2 表示O、S或 NR^1 ;

[0177] Z表示O或S。))

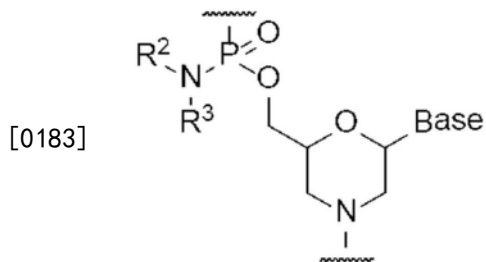
[0178] 作为本发明的吗啉基低聚物的合成中所使用的吗啉基单体化合物的例子,可以列举下述表中记载的吗啉基单体化合物(A)、吗啉基单体化合物(C)、吗啉基单体化合物(T)、以及吗啉基单体化合物(G),但并不限于此。

[0179] [表2]

	吗啉基单体化合物 (A)	吗啉基单体化合物 (C)	吗啉基单体化合物 (T)	吗啉基单体化合物 (G)
[0180]				

[0181] 吗啉基低聚物优选为以下式所示的基团作为结构单元的低聚物(二氨基磷酸酯吗啉基低聚物(以下,称为“PMO”))。

[0182] [化学式5]



[0184] (式中,Base、R²、R³与上述含义相同。)

[0185] 本发明的吗啉基低聚物包括构成上述低聚物的核酸碱基、吗啉环部分、磷酸键部分、3'末端和/或5'末端的全部或部分经过修饰的低聚物。

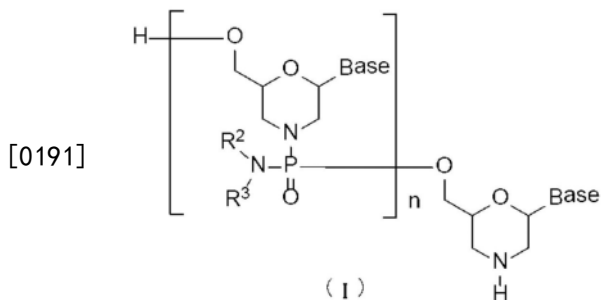
[0186] 作为磷酸键部分的修饰,可以列举例如替换为二氨基磷酸酯键、硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、膦酸烷基酯键、氨基磷酸酯键、硼烷磷酸酯键(Enya et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160)的修饰(例如,参照日本专利再公表公报第2006/129594号及第2006/038608号)。

[0187] 吗啉基低聚物例如可以按照国际公开第1991/009033号、或国际公开第2009/064471号进行制造。特别是PMO可以按照国际公开第2009/064471号中记载的方法进行制造,或者按照以下所示的方法进行制造。

[0188] [PMO的制造方法]

[0189] 作为PMO的1个方式,可以举出例如以下述通式(I)表示的化合物(以下称为PMO(I))。

[0190] [化学式6]



[0192] [式中,各Base、R²、R³与上述含义相同;

[0193] n为1~99的范围内的任意整数,优选为19~29、19~28、21~29、21~28或24~28的范围内的任意整数,更优选为21~29、21~28或24~28。]

[0194] PMO (I) 可以按照公知的方法来制造,例如,可以通过实施下述工序的操作来制造。

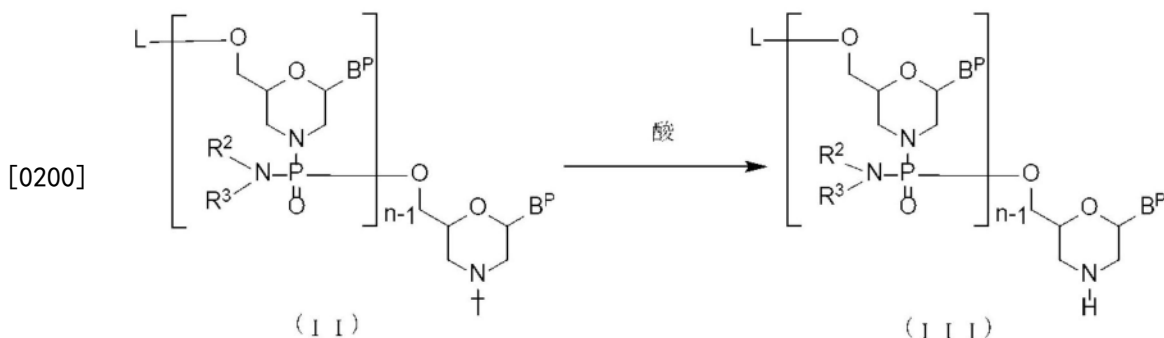
[0195] 下述工序中所使用的化合物及试剂只要是在PMO制造中通常使用的即可,没有特别限定。

[0196] 另外,下述的全部工序可以通过液相法或固相法(使用手动或市售的固相自动合成机)来实施。在用固相法制造PMO时,从操作步骤的简化及合成的正确性的观点考虑,优选使用自动合成机的方法。

[0197] (1) 工序A:

[0198] 通过使下述通式 (II) 所示的化合物(以下称为化合物 (II)) 与酸作用来制造下述通式 (III) 所示的化合物(以下称为化合物 (III)) 的工序。

[0199] [化学式7]



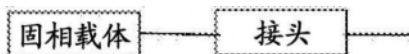
[0201] [式中,n、R²、R³与上述含义相同;

[0202] 各B^P独立地表示任选被保护的核酸碱基;

[0203] T表示三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

[0204] L表示氢、酰基或下述通式 (IV) 所示的基团(以下称为基团 (IV))。]

[0205] [化学式8]



[0206]

(IV)

[0207] 作为B^P的“核酸碱基”,可以举出与Base相同的“核酸碱基”。其中,B^P的核酸碱基的氨基或羟基可以被保护。

[0208] 作为所述氨基的保护基,只要是能够作为核酸的保护基使用的基团即可,没有特

别限制,具体而言可以例举例如:苯甲酰基、4-甲氧基苯甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、苯乙酰基、苯氧乙酰基、4-叔丁基苯氧乙酰基、4-异丙基苯氧乙酰基、(二甲基氨基)亚甲基。作为羟基的保护基,可以列举例如:2-氰基乙基、4-硝基苯乙基、苯基磺酰基乙基、甲基磺酰基乙基、三甲基甲硅烷基乙基、在可取代的任意位置任选被1~5个吸电子基团取代的苯基、二苯基氨基甲酰基、二甲基氨基甲酰基、二乙基氨基甲酰基、甲基苯基氨基甲酰基、1-吡咯烷基氨基甲酰基、吗啉基氨基甲酰基、4-(叔丁基羧基)苄基、4-[(二甲基氨基)羧基]苄基、4-(苯基羧基)苄基(例如,参考国际公开公报第2009/064471号公报)。

[0209] 作为“固相载体”,只要是能够用于核酸的固相反应的载体即可,没有特别限制,例如优选具有如下性质的载体:(i)基本上不溶于能够用于吗啉基核酸衍生物的合成的试剂(例如,二氯甲烷、乙腈、四唑、N-甲基咪唑、吡啶、乙酸酐、二甲基吡啶、三氟乙酸),(ii)对能够用于吗啉基核酸衍生物的合成的试剂在化学上稳定,(iii)可进行化学修饰,(iv)能够装填希望的吗啉基核酸衍生物,(v)具有能够耐受处理中所施加的高压的足够强度,(vi)具有一定的粒径范围和分布。具体而言可以列举:溶胀性聚苯乙烯(例如,氨基甲基聚苯乙烯树脂与1%二乙烯基苯交联(200~400目)(2.4~3.0mmol/g)(东京化成株式会社制造)、氨基甲基化的聚苯乙烯树脂·HCl(Aminomethylated Polystyrene Resin·HCl)[二乙烯基苯1%,100~200目](株式会社肽研究所制造)、非溶胀性聚苯乙烯(例如Primer Support(GE Healthcare公司制造)、PEG链键合型聚苯乙烯(例如NH₂-PEG树脂(渡边化学株式会社制造)、TentaGel resin)、可控孔度玻璃(controlled pore glass;CPG)(例如CPG公司制造)、乙二酰化-可控孔度玻璃(例如参考Alul等,Nucleic Acids Research,Vol.19,1527(1991))、TentaGel支撑体-氨基聚乙二醇衍生物化支撑体(例如参考Wright等,Tetrahedron Letters,Vol.34,3373(1993))、Poros-聚苯乙烯/二乙烯基苯的共聚物。

[0210] 作为“接头”,可以使用通常用于连接核酸、吗啉基核酸衍生物的公知的接头,可以列举例如:3-氨基丙基、丁二酰基、2,2'-二乙醇磺酰基、长链烷基氨基(LCAA)。

[0211] 本工序可以通过使酸与化合物(II)作用来实施。

[0212] 作为能够用于本工序的“酸”,可以列举例如:三氟乙酸、二氯乙酸或三氯乙酸。作为酸的用量,例如,相对于化合物(II)1摩尔,在0.1摩尔当量~1000摩尔当量的范围内是适当的,优选为1摩尔当量~100摩尔当量的范围内。

[0213] 另外,可以与上述酸同时使用有机胺。作为有机胺,没有特别限定,可以列举例如三乙胺。作为有机胺的用量,例如,相对于酸1摩尔,在0.01摩尔当量~10摩尔当量的范围内是适当的,优选为0.1摩尔当量~2摩尔当量的范围内。

[0214] 在本工序中,使用酸和有机胺的盐或混合物时,可以举出例如三氟乙酸与三乙胺的盐或混合物,更具体而言,可以举出对三氟乙酸2当量混合三乙胺1当量而得到的物质。

[0215] 能够用于本工序的酸可以用适当的溶剂稀释至0.1%~30%的浓度范围内使用。作为溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举例如:二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或它们的混合物。

[0216] 上述反应中的反应温度优选为例如10℃~50℃的范围内,更优选为20℃~40℃的范围内,进一步优选为25℃~35℃的范围内。

[0217] 反应时间根据使用的酸的种类、反应温度而不同,通常在0.1分钟~24小时的范围内是适当的。优选为1分钟~5小时的范围内。

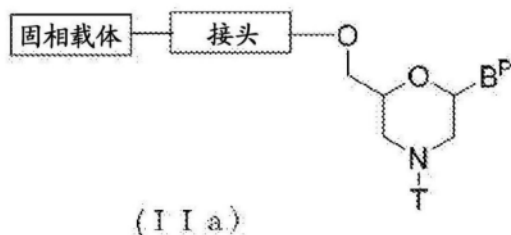
[0218] 另外,在本工序结束后,可以根据需要添加用于中和体系中存在的酸的碱。作为“碱”,没有特别限定,可以列举例如二异丙基乙胺。碱可以用适当的溶剂稀释至0.1% (v/v) ~30% (v/v) 的浓度来使用。

[0219] 作为本工序中使用的溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举:二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或它们的混合物。反应温度优选为例如10°C ~50°C 的范围内,更优选为20°C ~40°C 的范围内,进一步优选为25°C ~35°C 的范围内。

[0220] 反应时间根据使用的碱的种类、反应温度而不同,通常在0.1分钟~24小时的范围内是适当的,优选为1分钟~5小时的范围内。

[0221] 需要说明的是,在化合物(II)中, $n=1$,L为基团(IV),下述通式(IIa)所示的化合物(以下称为化合物(IIa))可以按照以下方法来制造。

[0222] [化学式9]

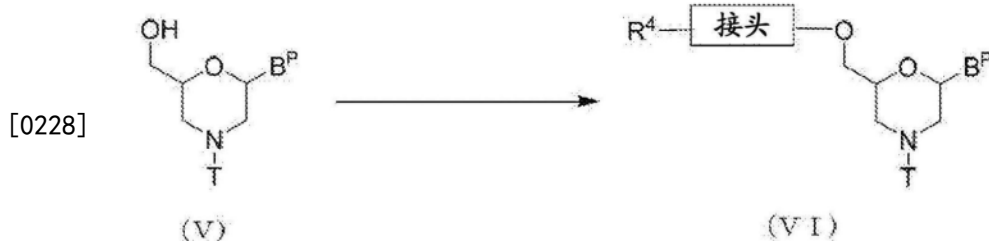


[0224] [式中, B^p 、T、接头、固相载体与上述含义相同。]

[0225] 工序1:

[0226] 通过使酰化剂与下述通式(V)所示的化合物作用来制造下述通式(VI)所示的化合物(以下称为化合物(VI))的工序。

[0227] [化学式10]



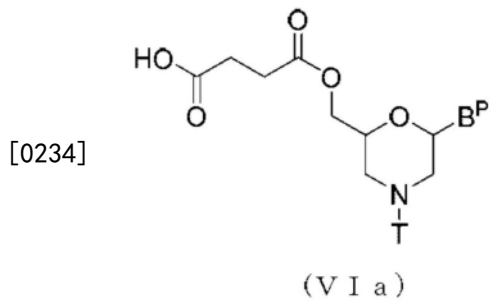
[0229] [式中, B^p 、T、接头与上述含义相同;

[0230] R^4 表示羟基、卤素、羧基或氨基。]

[0231] 本工序可以将化合物(V)作为起始原料,通过公知的接头导入反应来实施。

[0232] 特别是下述通式(VIa)所示的化合物,可以通过实施作为使用化合物(V)和丁二酸酐进行酯化反应的已知方法来制造。

[0233] [化学式11]



[0235] [式中, B^P 、 T 与上述含义相同。]

[0236] 工序2:

[0237] 通过使缩合剂等与化合物(VI)作用而与固相载体发生反应,制造化合物(IIa)的工序。

[0238] [化学式12]

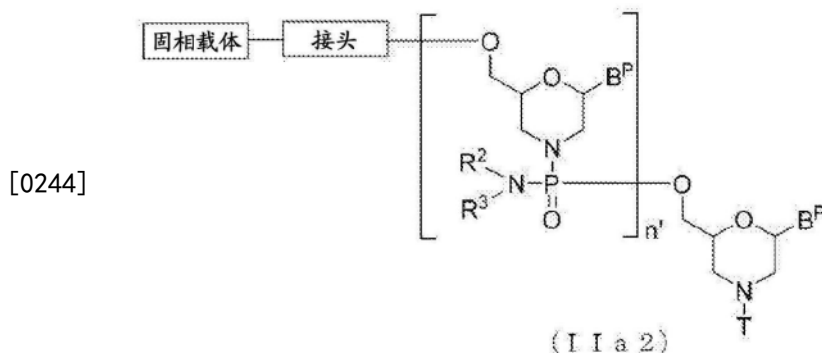


[0240] [式中, B^P 、 R^4 、 T 、接头、固相载体与上述含义相同。]

[0241] 本工序可以通过使用化合物(VI)和固相载体进行缩合反应的已知方法来进行制造。

[0242] 在化合物(II)中, $n=1\sim 99$ (在特定的方式中 n 例如为 $2\sim 29$ 、 $2\sim 28$ 、 $2\sim 27$ 、 $2\sim 26$ 、 $2\sim 25$ 、 $2\sim 24$ 、 $2\sim 23$ 、 $2\sim 22$ 、 $2\sim 21$ 或 $2\sim 20$ 、优选为 $19\sim 29$ 、 $19\sim 28$ 、 $21\sim 29$ 、 $21\sim 28$ 或 $24\sim 28$ 的范围内的任意整数,更优选为 $21\sim 29$ 、 $21\sim 28$ 或 $24\sim 28$), L 为基团(IV), 下述通式(IIa2)所示的化合物可以将化合物(IIa)作为起始原料,通过重复实施希望次数的本说明书中记载的PMO制造方法中的工序A和工序B来制造。

[0243] [化学式13]

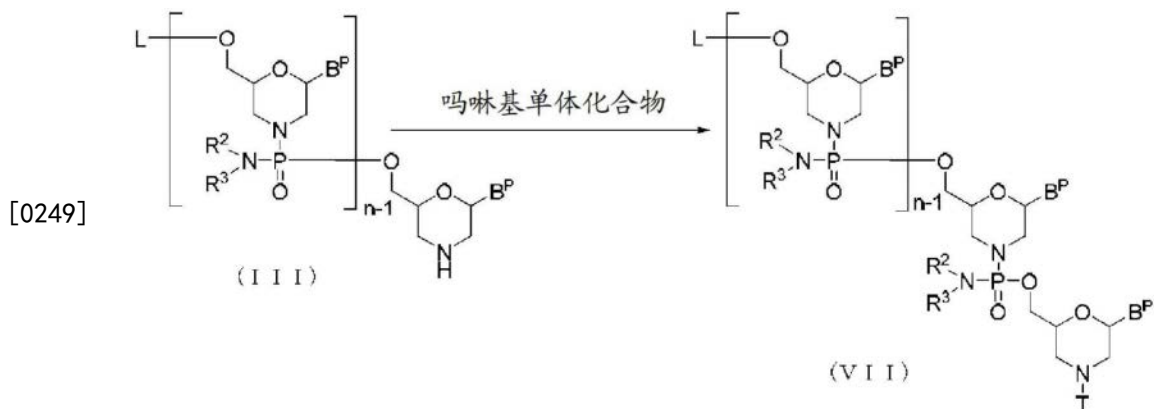


[0245] [式中, B^P 、 n 、 R^2 、 R^3 、 T 、接头、固相载体与上述含义相同。]

[0246] (2) 工序B:

[0247] 通过在碱存在下使吗啉基单体化合物与化合物(III)作用来制造下述通式(VII)所示的化合物(以下称为化合物(VII))的工序。

[0248] [化学式14]

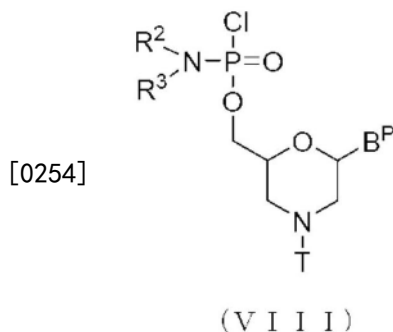


[0250] [式中,各 B^P 、 L 、 n 、 R^2 、 R^3 、 T 与上述含义相同。]

[0251] 本工序可以通过在碱存在下使吗啉基单体化合物与化合物(III)作用来实施。

[0252] 作为吗啉基单体化合物,可以列举例如下述通式(VIII)所示的化合物。

[0253] [化学式15]



[0255] [式中, B^P 、 R^2 、 R^3 、 T 与上述含义相同。]

[0256] 作为能够在本工序中使用的“碱”,可以列举例如:二异丙基乙胺、三乙胺或N-乙基吗啉。作为碱的用量,例如,相对于化合物(III)1摩尔,在1摩尔当量~1000摩尔当量的范围内是适当的,优选为10摩尔当量~100摩尔当量的范围内。

[0257] 能够用于本工序的吗啉基单体化合物及碱基可以使用适当的溶剂稀释至0.1%~30%的浓度来使用。作为溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举例如:N,N-二甲基咪唑啉酮、N-甲基哌啶酮、DMF、二氯甲烷、乙腈、四氢呋喃或它们的混合物。

[0258] 反应温度例如优选为0℃~100℃的范围内,更优选为10℃~50℃的范围内。

[0259] 反应时间根据使用的碱的种类、反应温度而不同,通常在1分钟~48小时的范围内是适当的,优选为30分钟~24小时的范围内。

[0260] 另外,在本工序结束后可以根据需要添加酰化剂。作为“酰化剂”,可以列举例如:乙酸酐、乙酰氯、苯氧乙酸酐。酰化剂例如可以使用适当的溶剂稀释至0.1%~30%的浓度来使用。作为溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举例如:二氯甲烷、乙腈、四氢呋喃、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或它们的混合物。

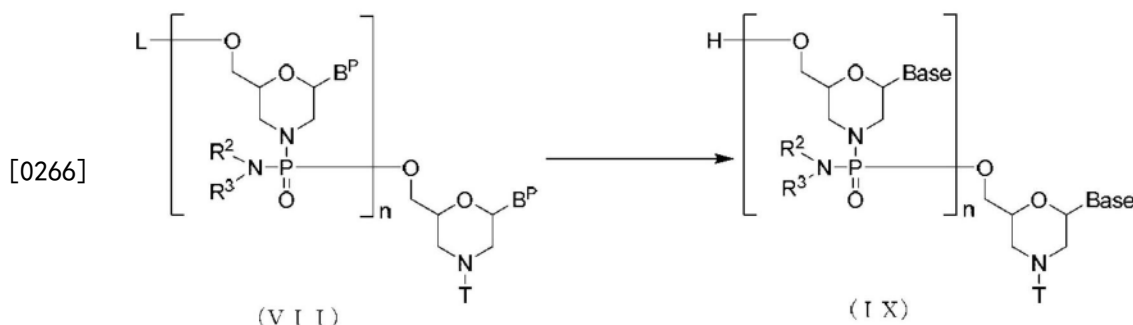
[0261] 另外,如果需要,可以与酰化剂一起使用例如吡啶、二甲基吡啶、三甲基吡啶(collidine)、三乙胺、二异丙基乙胺、N-乙基吗啉等碱。作为酰化剂的用量,优选为0.1摩尔当量~10000摩尔当量的范围内,更优选为1摩尔当量~1000摩尔当量的范围内。作为碱的用量,例如,相对于酰化剂1摩尔,0.1摩尔当量~100摩尔当量的范围内是适当的,优选为1摩尔当量~10摩尔当量的范围内。

[0262] 本反应的反应温度优选为10℃~50℃的范围内,更优选为10℃~50℃的范围内,更优选为10℃~50℃的范围内,更优选为20℃~40℃的范围内,进一步优选为25℃~35℃的范围内。反应时间例如根据使用的酰化剂的种类、反应温度而不同,通常在0.1分钟~24小时的范围内是适当的,优选为1分钟~5小时的范围内。

[0263] (3) 工序C:

[0264] 对于在工序B中制造的化合物(VII),使用脱保护剂脱去保护基,从而制造通式(IX)所示的化合物的工序。

[0265] [化学式16]



[0267] [式中,Base、B^P、L、n、R²、R³、T与上述含义相同。]

[0268] 本工序可以通过使脱保护剂与化合物(VII)作用来实施。

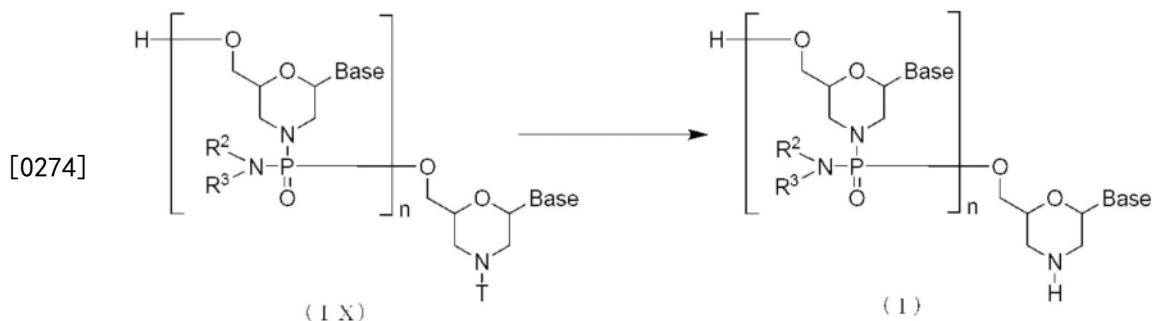
[0269] 作为“脱保护剂”,可以列举例如:浓氨水、甲胺。能够用于本工序的“脱保护剂”可以用例如水、甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、四氢呋喃、DMF、N,N-二甲基咪唑啉酮、N-甲基哌啶酮或它们的混合溶剂进行稀释来使用。其中,优选为乙醇。作为脱保护剂的用量,例如,相对于化合物(VII)1摩尔,例如在1摩尔当量~100000摩尔当量的范围内是适当的,优选为10摩尔当量~1000摩尔当量的范围内。

[0270] 反应温度在例如15℃~75℃的范围内是适当的,优选为40℃~70℃的范围内,更优选为50℃~60℃的范围内。脱保护反应时间根据化合物(VII)的种类、反应温度等而不同,在10分钟~30小时的范围内是适当的,优选为30分钟~24小时的范围内,更优选为5小时~20小时的范围内。

[0271] (4) 工序D:

[0272] 通过使酸与工序C中制造的化合物(IX)作用来制造PMO(I)的工序。

[0273] [化学式17]



[0275] [式中,Base、n、R²、R³、T与上述含义相同。]

[0276] 本工序可以通过向化合物(IX)中加入酸来实施。

[0277] 作为在本工序中可以使用的“酸”,可以列举例如:三氯乙酸、二氯乙酸、乙酸、磷酸

及盐酸等。作为酸的用量,例如在溶液的pH为0.1~4.0的范围内使用是适当的,更优选在1.0~3.0的范围内使用。作为溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举例如:乙腈、水或它们的混合溶剂。

[0278] 反应温度优选为10℃~50℃的范围内,更优选为20℃~40℃的范围内,进一步优选为25℃~35℃的范围内。脱保护反应时间根据化合物(IX)的种类、反应温度等而不同,在0.1分钟~5小时的范围内是适当的,优选为1分钟~1小时的范围内,更优选为1分钟~30分钟的范围内。

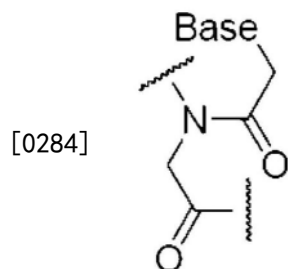
[0279] PMO(I)可以通过单独使用或组合使用通常的分离纯化方法从本工序中得到的反应混合物中得到,所述通常的分离纯化方法例如有提取、浓缩、中和、过滤、离心分离、重结晶、C₈~C₁₈的反相柱色谱、阳离子交换柱色谱、阴离子交换柱色谱、凝胶过滤柱色谱、高效液相色谱、透析、超滤等方法,可以对希望的PMO(I)进行分离纯化(例如,参考国际公开公报W01991/09033)。

[0280] 在使用反相色谱法对PMO(I)进行纯化时,作为洗脱溶剂,可以使用例如20mM的三乙胺/乙酸缓冲液与乙腈的混合溶液。

[0281] 另外,在使用离子交换色谱法对PMO(I)进行纯化时,可以使用例如1M的食盐水与10mM的氢氧化钠水溶液的混合溶液。

[0282] 肽核酸是以下述通式所示的基团作为结构单元的本发明的反义低聚物。

[0283] [化学式18]



[0285] (式中,Base与上述含义相同。)

[0286] 肽核酸例如可以按照以下文献来进行制造。

[0287] 1) P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)

[0288] 2) M.Egholm, O.Buchardt, P.E.Nielsen, R.H.Berg, JACS., 114, 1895 (1992)

[0289] 3) K.L.Dueholm, M.Egholm, C.Behrens, L.Christensen, H.F.Hansen, T.Vulpius, K.H.Petersen, R.H.Berg, P.E.Nielsen, O.Buchardt, J.Org.Chem., 59, 5767 (1994)

[0290] 4) L.Christensen, R.Fitzpatrick, B.Gildea, K.H.Petersen, H.F.Hansen, T.Koch, M.Egholm, O.Buchardt, P.E.Nielsen, J.Coull, R.H.Berg, J.Pept.Sci., 1, 175 (1995)

[0291] 5) T.Koch, H.F.Hansen, P.Andersen, T.Larsen, H.G.Batz, K.Otteson, H.Orum, J.Pept.Res., 49, 80 (1997)

[0292] 另外,就本发明的反义低聚物而言,5'末端可以是下述化学式(1)~(3)中任一种基团。优选为(3)-OH。

[0293] [化学式19]

显子13-50、29-50、40-50、43-50、45-50、47-50、48-50、49-50、50、52、52-63等的缺失而导致的移码突变的DMD患者。

[0302] 更具体而言,可以预测,通过对DMD患者(具有通过外显子51跳读而in-frame化的突变的患者,例如,外显子13-50缺失患者、外显子29-50缺失患者、外显子40-50缺失患者、外显子43-50缺失患者、外显子45-50缺失患者、外显子47-50缺失患者、外显子48-50缺失患者、外显子49-50缺失患者、外显子50缺失患者、外显子52缺失患者、外显子52-63缺失患者等)给药包含本发明的反义低聚物的医药组合物,能够高效率地缓和肌营养不良症的症状。例如,在使用包含本发明的反义低聚物的医药组合物的情况下,与现有技术的低聚物相比,即使以更少量的给药量也可以获得同等程度的治疗效果,因此能够减轻副作用,而且是经济的。

[0303] 另外,本发明的反义低聚物在保持高效率地诱导外显子51跳读的活性的同时具有优异的溶解性,因此,在医药组合物的制备中是有用的。此外,本发明的反义低聚物在保持高效率地诱导外显子51的跳读的活性的同时具有优异的溶解性及安全性,因此,作为医药组合物是有用的。

[0304] 另外,作为其它实施方式,提供一种以本发明的反义低聚物、其医药上能够允许的盐或水合物作为有效成分的肌营养不良症治疗用医药组合物(以下称为“本发明的组合物”)。

[0305] 另外,本发明提供一种肌营养不良症的治疗方法,该方法包括:对DMD患者给药本发明的反义低聚物的步骤。

[0306] 在该治疗方法中,本发明的反义低聚物可以以上述肌营养不良症治疗用医药组合物的形式进行给药。

[0307] 此外,本发明提供本发明的反义低聚物在肌营养不良症治疗用医药组合物的制造中的用途、以及用于肌营养不良症治疗的本发明的反义低聚物。

[0308] 作为本发明的组合物中包含的本发明的反义低聚物的医药上能够允许的盐的例子,可以列举:钠盐、钾盐、锂盐这样的碱金属盐;钙盐、镁盐这样的碱土金属盐;铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等金属盐;铵盐;叔辛胺盐、二苄胺盐、吗啉盐、葡糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基-苯乙胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐这样的有机胺盐;氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐这样的氢卤酸盐;硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等无机酸盐;甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐这样的低级烷基磺酸盐;苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐这样的芳基磺酸盐;乙酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等有机酸盐;甘氨酸盐、赖氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐这样的氨基酸盐等。这些盐可以用公知的方法来制造。或者,本发明的组合物中含有的本发明的反义低聚物可以为其水合物的形态。

[0309] 本发明的组合物的给药方式只要是医药上能够允许的给药方式即可,没有特别限制,可以根据治疗方法来选择,从传递至肌组织的容易性的观点考虑,优选静脉内给药、动脉内给药、肌肉内给药、皮下给药、口服给药、间质给药(interstitial administration)、经皮给药等。另外,作为本发明的组合物可采用的剂型,没有特别限制,可以列举例如:各种注射剂、口服剂、输液剂、吸入剂、软膏剂、洗剂等。

[0310] 在对肌营养不良症患者给药本发明的反义低聚物时,本发明的组合物可以包含促进该低聚物传递至肌组织的载体。这样的载体只要在医药上能够允许即可,没有特别限制,作为其例子,可以列举:阳离子性脂质体、阳离子性聚合物等阳离子性载体、或者利用了病毒包膜的载体。作为阳离子性脂质体,可以列举例如:以2-0-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰基-1,3-0-二油酸甘油酯和磷脂作为必需结构成分而形成的脂质体(以下称为“脂质体A”)、Oligofectamine(注册商标)(Invitrogen公司制造)、Lipofectin(注册商标)(Invitrogen公司制造)、Lipofectamine(注册商标)(Invitrogen公司制造)、Lipofectamine 2000(注册商标)(Invitrogen公司制造)、DMRIE-C(注册商标)(Invitrogen公司制造)、GeneSilencer(注册商标)(Gene Therapy Systems公司制造)、TransMessenger(注册商标)(QIAGEN公司制造)、TransIT TKO(注册商标)(Mirus公司制造)、Nucleofector II(Lonza)。其中,优选脂质体A。作为阳离子性聚合物,可以列举例如:JetSI(注册商标)(Qbiogene公司制造)、Jet-PEI(注册商标)(聚乙烯亚胺、Qbiogene公司制造)。作为利用了病毒包膜的载体,可以列举例如:GenomeOne(注册商标)(HVJ-E脂质体、石原产业株式会社制造)。或者可以使用日本专利2924179号中记载的医药器件、专利再公表公报第2006/129594号(JP W02006/129594)及专利再公表公报第2008/096690号(JP W02008/096690)中记载的阳离子性载体。

[0311] 关于详细情况,可以参照美国专利第4,235,871号、美国专利第4,737,323号、国际公开第96/14057号、“New RRC,Liposomes:A practical approach,IRL Press,Oxford (1990) pages 33-104”等。

[0312] 本发明的组合物中包含的本发明的反义低聚物的浓度根据载体的种类等而不同,在一个方式中,在0.1nM~100 μ M的范围内是适当的,优选为100nM~10 μ M的范围内。另外,本发明的组合物中包含的本发明的反义低聚物与载体的重量比(载体/本发明的反义低聚物)根据该低聚物的性质及该载体的种类等而不同,在0.1~100的范围内是适当的,优选为0.1~10的范围内。

[0313] 本发明的组合物可以为水溶液的形态。在该情况下,本发明的组合物可以以2.5~500mg/mL、5~450mg/mL、10~400mg/mL、15~350mg/mL、20~300mg/mL、20~250mg/mL、20~200mg/mL、20~150mg/mL、20~100mg/mL、20~50mg/mL、20~40mg/mL、20~30mg/mL、23~27mg/mL、24~26mg/mL、或25mg/mL的浓度包含本发明的反义低聚物。或者,本发明的组合物可以以10~100mg/mL、15~95mg/mL、20~80mg/mL、25~75mg/mL、30~70mg/mL、35~65mg/mL、40~60mg/mL、45~55mg/mL、47~53mg/mL、48~52mg/mL、49~51mg/mL、或50mg/mL的浓度包含本发明的反义低聚物。

[0314] 本发明的组合物可以为干燥形态。在该情况下,为了制备水溶液形态的本发明的组合物,例如,可以将包含125mg或250mg干燥形态的本发明反义低聚物的、干燥形态的本发明的组合物与0.5mL~100mL水混合(相当于1.25mg/mL~250mg/mL或2.5mg/mL~500mg/mL的本发明的反义低聚物浓度)、优选与1mL~50mL水混合(相当于2.5mg/mL~125mg/mL或5mg/mL~250mg/mL的本发明的反义低聚物浓度)、更优选与5mL~10mL水混合(相当于12.5mg/mL~25mg/mL或25mg/mL~50mg/mL的本发明的反义低聚物浓度)而使用。

[0315] 除了本发明的反义低聚物和上述载体以外,本发明的组合物中可以任意配合医药上能够允许的添加剂。作为所述添加剂,可以列举例如:乳化助剂(例如,碳原子数6~22的脂肪酸、其在医药上能够允许的盐、白蛋白、右旋糖酐)、稳定剂(例如,胆固醇、磷脂酸、蔗

糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇)、等渗剂(例如,氯化钠、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇)、pH调节剂(例如,盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙醇胺)。这些添加剂可以使用一种或两种以上。本发明的组合物中该添加剂的含量为90重量%以下是适当的,优选为70重量%以下,更优选为50重量%以下。

[0316] 本发明的组合物可以通过在载体的分散液中加入本发明的反义低聚物并适当搅拌来制备。另外,添加剂可以在本发明的反义低聚物添加前的适当的工序中添加,也可以在添加后的适当的工序中添加。在本发明的组合物为水溶液的形态的情况下,作为添加本发明的反义低聚物时可以使用的水性溶剂,只要是医药上能够允许的溶剂即可,没有特别限制,可以列举例如:注射用水、注射用蒸馏水、生理盐水等电解质液、葡萄糖液、麦芽糖液等糖液。另外,对于上述情况下的pH及温度等条件而言,本领域技术人员可以适当选择。

[0317] 本发明的组合物可以制成例如液体制剂、其冷冻干燥制剂。作为本发明的组合物的干燥形态的一个方式,该冷冻干燥制剂可以按照通常方法对具有液体制剂形态的本发明的组合物进行冷冻干燥处理来制备。例如,可以在对具有液体制剂形态的本发明的组合物进行适当灭菌之后,将给定量分配于管型瓶中,在约-40~-20℃的条件下进行2小时左右的预冷冻,在约0~10℃、减压下进行一次干燥,接着在约15~25℃、减压下进行二次干燥,进行冷冻干燥。然后,通常将管型瓶内部置换为氮气并压盖,可以得到本发明的组合物的冷冻干燥制剂。

[0318] 本发明的组合物的冷冻干燥制剂通常可以通过添加任意适当的溶液(再溶解液)而再溶解来使用。作为这样的再溶解液,可以列举:注射用水、生理盐水、其它普通输液。该再溶解液的液量根据用途等而不同,没有特别限制,为冷冻干燥前的液量的0.5~2倍量或500mL以下是适当的。

[0319] 作为给药本发明的组合物时的用量,优选在考虑了所含有的本发明的反义低聚物的种类、剂型、年龄、体重等患者的状态、给药途径、疾病性质与程度的基础上进行制备,作为对成人的本发明的反义低聚物的量,通常为每1天0.1mg~10g/人的范围内,优选为1mg~1g/人的范围内。该数值有时根据作为目标的疾病种类、给药方式、靶分子而有所不同。因此,根据情况,有时在此以下就足够了,反之,有时需要在此以上的用量。另外,可以1天1次至数次给药、或者以1天~数天的间隔进行给药。

[0320] 作为本发明的组合物的其它方式,可以列举:包含能够表达本发明的寡核苷酸的载体和上述载体的医药组合物。所述表达载体可以是能够表达多个本发明的寡核苷酸的载体。可以与含有本发明低聚物的本发明的组合物同样地在该组合物中添加医药上能够允许的添加剂。该组合物中含有的表达载体的浓度根据载体的种类等而不同,在一个方式中,在0.1nM~100μM的范围内是适当的,优选为100nM~10μM的范围内。该组合物中含有的表达载体与载体的重量比(载体/表达载体)根据表达载体的性质、载体的种类等而不同,在0.1~100的范围内是适当的,优选为0.1~10的范围内。另外,该组合物中含有的载体的含量与含有本发明的反义低聚物的本发明的组合物的情况相同,关于其制备方法等也与本发明的组合物的情况相同。

[0321] 以下,列举实施例及试验例对本发明进一步详细地进行说明,但本发明并不限定于实施例所示的范围。

[0322] 实施例

[0323] [实施例1:反义低聚物的合成]

[0324] 按照国际公开第2015/137409号中记载的方法,合成了表1所示的反义低聚物(PMO No.1~93(序列号1~93)),其以人抗肌萎缩蛋白基因的外显子51和/或作为其5'侧相邻内含子的内含子50的一部分的碱基序列作为靶点。表中示出了各反义低聚物的分子量的理论值及基于ESI-TOF-MS的实测值。

[0325] 在表1中,例如“H51_67-81_131-142”表示,在以人抗肌萎缩蛋白基因的外显子51的5'末端的碱基作为第1位的碱基、并对向3'侧延续的碱基依次赋予编号的情况下,反义低聚物以第67位~第81位的碱基的序列及第131位~第142位的碱基的序列作为靶点。需要说明的是,靶碱基序列中的第-1位以前的碱基的序列为内含子50中的碱基序列。将包含人野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子51的序列和内含子50的3'端附近的序列的碱基序列示于序列号128。

[0326] [表3-1]

[0327] 表1合成的反义低聚物(PMO No.1~93)

[0328]

PMO No.	靶碱基序列	全长	PMO的碱基序列	分子量		序列号
				理论值	实测值	
1	H51_67-81_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCTA	8977.10	8977.68	1
2	H51_68-81_131-142	26	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCT	8637.98	8637.42	2
3	H51_74-89_132-142	27	TCGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGC	9021.13	9021.40	3
4	H51_73-89_132-141	27	CGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGCA	9030.14	9030.55	4
5	H51_69-81_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	9308.21	9308.75	5
6	H51_66-79_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTCTAG	8653.98	8653.47	6
7	H51_67-79_134-146	26	CCAGTCGGTAAGTGATGGCATTCTA	8647.99	8647.86	7
8	H51_68-80_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8653.98	8654.05	8
9	H51_70-81_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAGATGGCATT	8677.99	8677.82	9
10	H51_70-81_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	8662.99	8663.07	10
11	H51_68-80_131-142	25	TCGGTAAGTTCTAGATGGCATTCT	8298.86	8298.84	11
12	H51_67-78_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTATGGCATTCTA	8628.97	8628.97	12
13	H51_67-79_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCTA	8653.98	8653.04	13
14	H51_68-79_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8644.97	8644.45	14
15	H51_68-79_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCT	8314.86	8315.29	15
16	H51_69-80_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8653.98	8653.51	16
17	H51_70-81_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAAGATGGCATT	8347.88	8348.16	17
18	H51_69-80_131-143	25	GTCGGTAAGTTCTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.63	18
19	H51_69-79_131-142	23	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7629.63	7629.47	19
20	H51_68-80_130-141	25	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8323.87	8323.29	20
21	H51_69-80_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTTC	8323.87	8323.51	21
22	H51_72-82_130-142	24	TCGGTAAGTTCTGGAAGATGGCAT	8042.78	8042.42	22
23	H51_69-80_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.17	23
24	H51_70-80_130-141	23	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATT	7678.65	7678.31	24
25	H51_69-79_130-141	23	CGGTAAGTTCTGGATGGCATTTC	7654.64	7654.67	25
26	H51_68-78_130-141	23	CGGTAAGTTCTGATGGCATTCT	7629.63	7629.34	26
27	H51_68-78_129-141	24	CGGTAAGTTCTGTATGGCATTCT	7959.74	7959.98	27
28	H51_69-79_131-141	22	CGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7299.52	7299.75	28
29	H51_68-78_132-145	25	CAGTCGGTAAGTTCTATGGCATTCT	8283.86	8283.22	29
30	H51_73-82_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCGAAGATGGCA	8342.89	8342.97	30

[0329] [表3-2]

31	H51_68-79_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8314.86	8314.76	31	
32	H51_68-78_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8274.85	8274.92	32	
33	H51_77-89_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTCCATCAAGGAAGAT	9005.13	9005.19	33	
34	H51_74-88_131-142	27	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	9036.13	9035.95	34	
35	H51_69-82_133-145	27	CAGTCGGTAAGTTGAAGATGGCATTTC	9027.12	9026.95	35	
36	H51_77-90_137-150	28	AAAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.13	36	
37	H51_74-88_131-145	30	CAGTCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	10045.48	10045.48	37	
38	H51_77-91_134-148	30	AGCCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	10047.50	10047.18	38	
39	H51_77-91_139-150	27	AAAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9032.16	9032.47	39	
40	H51_69-82_132-145	28	CAGTCGGTAAGTTCTGAAGATGGCATTTC	9342.23	9342.41	40	
41	H51_77-89_137-150	27	AAAGCCAGTCGGTACATCAAGGAAGAT	9023.15	9023.88	41	
42	H51_70-81_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	8993.10	8993.92	42	
43	H51_68-81_134-146	27	CCAGTCGGTAAGTAAGATGGCATTCT	8987.11	8987.53	43	
44	H51_77-88_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTGATCAAGGAAGAT	9011.12	9011.04	44	
45	H51_72-86-131-142	27	TCGGTAAGTTCTCAAGGAAGATGGCAT	9036.13	9036.50	45	
46	H51_73-87_131-143	28	GTCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCA	9391.25	9391.64	46	
47	H51_73-88_131-142	28	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGCA	9375.25	9375.16	47	
[0330]	48	H51_78-90_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTCACATCAAGGAAGA	9014.14	9014.43	48
49	H51_77-92_131-141	27	CGGTAAGTTCTCAACATCAAGGAAGAT	8989.13	8988.67	49	
50	H51_77-89_131-143	26	GTCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGAT	8681.01	8680.23	50	
51	H51_77-91_135-146	27	CCAGTCGGTAAGAACATCAAGGAAGAT	9023.15	9022.73	51	
52	H51_77-91_137-149	28	AAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.60	52	
53	H51_76-89_130-142	27	TCGGTAAGTTCTGCATCAAGGAAGATG	9036.13	9036.49	53	
54	H51_71-85_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGGAAGATGGCATT	9051.13	9051.24	54	
55	H51_71-87_131-142	29	TCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCATT	9696.35	9696.96	55	
56	H51_74-89_141-152	28	AGAAAGCCAGTCCATCAAGGAAGATGGC	9363.26	9363.78	56	
57	H51_77-91_132-144	28	AGTCGGTAAGTTCAACATCAAGGAAGAT	9368.26	9368.63	57	
58	H51_77-91_133-146	29	CCAGTCGGTAAGTTAACATCAAGGAAGAT	9683.37	9683.05	58	
59	H51_77-91_131-144	29	AGTCGGTAAGTTCTAACATCAAGGAAGAT	9698.37	9698.22	59	
60	H51_77-91_134-146	28	CCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	9353.26	9353.46	60	
61	H51_74-89_131-142	28	TCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGATGGC	9351.24	9351.27	61	
62	H51_77-91_136-148	28	AGCCAGTCGGTAAAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.95	62	
63	H51_-2-12_127-142	30	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGAGCT	9994.43	9995.15	63	
64	H51_128-141_6-18	27	TAACAGTCTGAGTCGGTAAGTTCTGTC	8978.10	8978.67	64	
65	H51_8-20_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTGATCAAGGAAGAT	8987.11	8987.52	65	

[0331] [表3-3]

66	H51_4-16_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCCACAGTCTGAGTAG	9003.11	9003.22	66
67	H51_6-17_127-141	27	CGGTAAGTTCTGTCCAACAGTCTGAGT	8963.09	8963.28	67
68	H51_5-15_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8638.98	8638.76	68
69	H51_5-16_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTACAGTCTGAGTA	8663.99	8633.39	69
70	H51_6-16_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCCACAGTCTGAGT	8638.98	8638.34	70
71	H51_5-17_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGTA	9002.11	9002.21	71
72	H51_6-17_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.75	72
73	H51_6-18_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8993.10	8993.63	73
74	H51_2-12_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGA	8678.99	8679.82	74
75	H51_2-11_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGA	8348.74	8348.88	75
76	H51_-1-13_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGC	8704.00	8703.95	76
77	H51_5-15_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8308.87	8308.76	77
78	H51_4-13_131-142	22	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAG	7339.53	7339.90	78
79	H51_-3-7_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTA	8348.88	8348.60	79
80	H51_-2-9_129-142	25	TCGGTAAGTTCTGTGAGTAGGAGCT	8388.89	8388.22	80
81	H51_2-11_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCCTGAGTAGGA	8333.88	8333.90	81
82	H51_-2-13_127-138	27	TAAGTTCTGTCCGCTGAGTAGGAGCT	8994.10	8994.30	82
83	H51_-7-7_128-141	28	CGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	9366.24	9366.55	83
84	H51_-3-11_120-133	28	TCTGTCCAAGCCCGCTGAGTAGGAGCTA	9288.21	9288.36	84
85	H51_6-18_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCTAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.58	85
86	H51_-1-15_125-136	28	AGTTCTGTCCAACAGTCTGAGTAGGAGC	9327.22	9326.72	86
87	H51_-1-12_125-138	27	TAAGTTCTGTCCAATCTGAGTAGGAGC	8987.11	8987.28	87
88	H51_6-17_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8647.99	8648.53	88
89	H51_6-18_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8662.99	8663.19	89
90	H51_73-87_127-141	30	CGGTAAGTTCTGTCTCAAGGAAGATGGCA	10021.94	10021.47	90
91	H51_70-82_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTCTCAAGATGGCATT	9348.22	9348.21	91
92	H51_69-81_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	8978.10	8978.55	92
93	H51_70-82_127-141	28	CGGTAAGTTCTGTCTCAAGATGGCATT	9333.22	9333.36	93

[0333] [实施例2:反义低聚物的外显子跳读活性试验]

[0334] 人抗肌萎缩蛋白基因的外显子51跳读的体外试验

[0335] (1) 试验方法

[0336] 对于 3.5×10^5 个RD细胞(人横纹肌肉瘤细胞株、CCL-136、由ATCC购入),使用Amaya Cell Line Nucleofector Kit L通过Nucleofector II(Lonza)导入表1、2的各反义低聚物 $0.3 \sim 120 \mu\text{M}$ 。就用于导入的脉冲程序而言,使用了T-030。

[0337] 在包含10%胎牛血清(FBS)(Invitrogen公司制造)的Eagle's minimal essential medium(EMEM)培养基(Sigma公司制造、以下相同)2mL中,于 37°C 、5% CO_2 条件下将导入后的RD细胞培养三夜。

[0338] 用PBS(Nissui公司制造、以下相同)将培养后的RD细胞清洗1次后,向细胞添加包含1%的2-巯基乙醇(Nacalai Tesque公司制造)的Buffer RA1(Takara Bio公司制造)350 μL ,在室温放置数分钟,使细胞溶解,回收至NucleoSpin(注册商标)Filter(Takara Bio公司制造)上。以 $11,000 \times g$ 离心1分钟,制备了匀浆。按照NucleoSpin(注册商标)RNA(Takara

Bio公司制造)所附带的实验方案提取总RNA。提取出的总RNA的浓度使用NanoDrop ONE (Thermo Fisher公司制造)进行了测定。

[0339] 使用QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN公司制造)及热循环仪对提取出的总RNA 400ng进行了One-Step RT-PCR。按照上述试剂盒附带的实验方案制备了反应液。热循环仪使用了TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio公司制造)。使用的RT-PCR程序如下所述。

[0340] 50℃、30分钟:逆转录反应

[0341] 95℃、15分钟:聚合酶活性化、逆转录酶灭活、cDNA热变性

[0342] [94℃、30秒钟;60℃、30秒钟;72℃、1分钟]×35循环:PCR扩增

[0343] 72℃、10分钟:最终延长反应

[0344] RT-PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如下所述。

[0345] 正向引物:5'-CTGAGTGGGAAGGCGGTAAAC-3' (序列号95)

[0346] 反向引物:5'-GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (序列号96)

[0347] 使用Bioanalyzer (Agilent公司制造)或MultiNA (株式会社岛津制作所制造)对上述PCR的反应产物1μL进行了分析。

[0348] 以条带的信号强度的形式对跳读了外显子51的条带的多核苷酸量“A”和未跳读外显子51的条带的多核苷酸量“B”进行了测定。基于这些“A”及“B”的测定值,按照上述的式(1)求出了跳读效率。

[0349] (2) 试验结果

[0350] 对于各反义低聚物,将得到的外显子51的跳读效率的结果示于图1~18。需要说明的是,作为直接或间接的比较对照,按照日本特开2015-91229号公报中记载的方法合成并使用了表2所示的反义低聚物(PMO No.94 (序列号94)),其具有与作为外显子51的跳读药物的依特立生(etelplirsen) (WHO Drug Information 24,2,137-139 (2010), Proposed INN List 103)相同的碱基序列、且具有相同的5'末端修饰:即5'末端具有上述基团(1),因此,整体结构是相同的。

[0351] 与整体结构和依特立生相同的表2的反义低聚物相比,表1的本发明的反义低聚物的跳读效率明显高,极其有效地跳读了外显子51。

[0352] [表4]

[0353] 表2合成的具有与依特立生相同的碱基序列及5'末端修饰的反义低聚物(PMO No.94)

PMO No.	靶碱基序列	全长	PMO的碱基序列	分子量		序列号
				理论值	实测值	
94	H51_66-95	30	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	10300.59	10300.43	94

[0355] [实施例3:反义低聚物的溶解性试验]

[0356] 反义低聚物相对于生理盐水的溶解性试验

[0357] 对于在实施例2中跳读效率非常高的PMO No.7、8、10、16、21、24、31、42、67、76及90的各反义低聚物,为了进一步验证在医药用途上的有用性而进行了相对于生理盐水的溶解性试验。

[0358] (1) 试验方法

[0359] 在加入有5.7mg的上述各反义低聚物的样品瓶中添加注射用水57 μ L,使用超声波和涡旋搅拌器使其溶解后,加入2倍浓度生理盐水57 μ L,使用涡旋搅拌器进行搅拌,制成50mg/mL的生理盐水溶液。在室温下静置24小时,在静置后通过肉眼观察确认有无沉淀,将未观察到沉淀的反义低聚物评价为溶解性高的反义低聚物。

[0360] (2) 试验结果

[0361] 在进行了试验的各反义低聚物中,PMO No.7、8、10、16、21、24、31、42、67及76的各反义低聚物显示出相对于生理盐水为50mg/mL以上的溶解性。

[0362] 根据该结果可知,这些反义低聚物的外显子51的跳读效率显著高,相对于生理盐水的溶解性也高,因此是作为医药品的利用价值高的反义低聚物。

[0363] [实施例4:反义低聚物的安全性评价]

[0364] 在实施例3中实施了相对于生理盐水的溶解性试验的各反义低聚物当中,为了验证医药用途上的安全性,对于PMO No.16、21、42、90进行了安全性评价。

[0365] (1) 评价方法

[0366] 将各反义低聚物溶解于生理盐水,对C57BL/6N雄性6周龄小鼠的尾静脉内给药。次日,从小鼠回收血清,测定了血液中的天冬氨酸氨基转移酶(AST)值、丙氨酸氨基转移酶(ALT)值、尿素氮量(BUN)值及肌酸酐值。将仅给药了作为介质而使用的生理盐水的小鼠或未处理小鼠的对照组中的测定值作为正常值,进行统计学显著性检验(Student的t检验或Dunnett的检验),在各反义低聚物的给药组中观察到数值以 $p < 0.05$ 的显著性水平显著上升的情况下,判定为异常值。各检验使用了统计分析系统SAS(注册商标、SAS Institute公司)版本9.3。在1000mg/kg的用量下AST值、ALT值、BUN值及肌酸酐值均未观察到异常值的情况下,判断为安全性高的反义低聚物。

[0367] (2) 评价结果

[0368] 对于PMO No.16、21、42的各反义低聚物,在1000mg/kg的用量下AST值、ALT值、BUN值及肌酸酐值均未观察到异常值,确认了是安全性高(具体而言,对肾脏及肝脏的功能没有影响、或者造成影响的可能性极低)的反义低聚物。对于各结果,示于图19~21。需要说明的是,在以 $p < 0.05$ 的显著性水平观察到显著上升的值(异常值)的情况下,示出p值。

[0369] 以上的结果表明,本发明的反义低聚物在显示出高效率地诱导抗肌萎缩蛋白基因外显子51的跳读的活性的同时具有作为医药品的优异的物性及安全性。

[0370] 序列表自由文本

[0371] 序列号1~126:合成核酸。

序列表

<110> 日本新药株式会社

国立研究开发法人国立精神.神经医疗研究中心

<120> 诱导外显子51的跳读的反义核酸

<130> G2505W0

<150> JP2020-033483

<151> 2020-02-28

<160> 128

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 1

tcggtaagtt ctaagatggc atttcta 27

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 2

tcggtaagtt ctaagatggc atttct 26

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 3

tcggtaagtt ccatcaagga agatggc 27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸
<400> 4
cggtaagttc catcaaggaa gatggca 27
<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 5
tcggtaagtt ctgtcaagat ggcatttc 28
<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 6
tcggtaagtt ctgatggcat ttctag 26
<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 7
ccagtcggta agtgatggca tttcta 26
<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 8
tcggtaagtt ctgagatggc atttct 26
<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成核酸
<400> 9
tcggtaagtt ctgtaagatg gcattt 26
<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 10
cggtaagttc tgtcaagatg gcattt 26
<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 11
tcggtaagtt ctagatggca tttct 25
<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 12
tcggtaagtt ctgtatggca tttcta 26
<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 13
tcggtaagtt ctggatggca tttcta 26
<210> 14
<211> 26
<212> DNA

<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 14
tcggtaagtt ctgtgatggc atttct 26
<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 15
tcggtaagtt ctggatggca tttct 25
<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 16
tcggtaagtt ctgtagatgg catttc 26
<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 17
tcggtaagtt ctgaagatgg cattt 25
<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 18
gtcggtaagt tctagatggc atttc 25
<210> 19
<211> 23

<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 19
tcggtaagtt ctgatggcat ttc 23
<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 20
cggtaagttc tgagatggca tttct 25
<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 21
tcggtaagtt ctgagatggc atttc 25
<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 22
tcggtaagtt ctggaagatg gcat 24
<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 23
cggtaagttc tgtagatggc atttc 25
<210> 24

<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 24
cggtaagttc tgagatggca ttt 23
<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 25
cggtaagttc tggatggcat ttc 23
<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 26
cggtaagttc tgatggcatt tct 23
<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 27
cggtaagttc tgtatggcat ttct 24
<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 28
cggtaagttc tgatggcatt tc 22

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 29
cagtcggtaa gttcatggca tttct 25
<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 30
cggtaagttc tgtccgaaga tggca 25
<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 31
cggtaagttc tgtgatggca tttct 25
<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 32
cggtaagttc tgtcatggca tttct 25
<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 33

cagtcggtaa gttccatcaa ggaagat 27
<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 34
tcggttaagtt ctatcaagga agatggc 27
<210> 35
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 35
cagtcggtaa gttgaagatg gcatttc 27
<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 36
aaagccagtc ggtaacatca aggaagat 28
<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 37
cagtcggtaa gttctatcaa ggaagatggc 30
<210> 38
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸

<400> 38
agccagtcgg taagtaacat caaggaagat 30
<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 39
aaagccagtc ggaacatcaa ggaagat 27
<210> 40
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 40
cagtcggtaa gttcgaagat ggcatttc 28
<210> 41
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 41
aaagccagtc ggtacatcaa ggaagat 27
<210> 42
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 42
tcgtaagtt ctgtcaagat ggcattt 27
<210> 43
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>

<223> 合成核酸
<400> 43
ccagtcggta agtaagatgg catttct 27
<210> 44
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 44
tcggttaagtt ctgtcatcaa ggaagat 27
<210> 45
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 45
tcggttaagtt ctcaaggaag atggcat 27
<210> 46
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 46
gtcggtaagt tcttcaagga agatggca 28
<210> 47
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 47
tcggttaagtt ctatcaagga agatggca 28
<210> 48
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成核酸
<400> 48
cagtcggtaa gttcacatca aggaaga 27
<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 49
cggtaagttc tcaacatcaa ggaagat 27
<210> 50
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 50
gtcggtaagt tctcatcaag gaagat 26
<210> 51
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 51
ccagtcggta agaacatcaa ggaagat 27
<210> 52
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 52
aagccagtcg gtaaacaatca aggaagat 28
<210> 53
<211> 27
<212> DNA

<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 53
tcggtaagtt ctgcatcaag gaagatg 27
<210> 54
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 54
tcggtaagtt ctaaggaaga tggcatt 27
<210> 55
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 55
tcggtaagtt cttcaaggaa gatggcatt 29
<210> 56
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 56
agaaagccag tccatcaagg aagatggc 28
<210> 57
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 57
agtcggtaag ttcaacatca aggaagat 28
<210> 58
<211> 29

<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 58
ccagtcggta agttaacatc aaggaagat 29
<210> 59
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 59
agtcggtaag ttctaacatc aaggaagat 29
<210> 60
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 60
ccagtcggta agtaacatca aggaagat 28
<210> 61
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 61
tcggttaagtt ctcatcaagg aagatggc 28
<210> 62
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 62
agccagtcgg taaaacatca aggaagat 28
<210> 63

<211> 30
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 63
tcggtaagtt ctgtcctctg agtaggagct 30
<210> 64
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 64
taacagtctg agtcggtaag ttctgtc 27
<210> 65
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 65
cggtaagttc tgtcagtaac agtctga 27
<210> 66
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 66
cggtaagttc tgtcacagtc tgagtag 27
<210> 67
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 67
cggtaagttc tgtccaacag tctgagt 27

<210> 68
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 68
tcggtaagtt ctgtccagtc tgagta 26
<210> 69
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 69
tcggtaagtt ctgtacagtc tgagta 26
<210> 70
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 70
tcggtaagtt ctgtcacagt ctgagt 26
<210> 71
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 71
tcggtaagtt ctgtaacagt ctgagta 27
<210> 72
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 72

tcggtaagtt ctgtcaacag tctgagt 27

<210> 73

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 73

tcggtaagtt ctgttaacag tctgagt 27

<210> 74

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 74

tcggtaagtt ctgtctctga gtagga 26

<210> 75

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 75

tcggtaagtt ctgtcctgag tagga 25

<210> 76

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 76

tcggtaagtt ctgtctgagt aggagc 26

<210> 77

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 77
cggtaagttc tgtccagtct gagta 25
<210> 78
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 78
tcggtaagtt ctgtctgagt ag 22
<210> 79
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 79
tcggtaagtt ctgtcgtagg agcta 25
<210> 80
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 80
tcggtaagtt ctgtgagtag gagct 25
<210> 81
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 81
cggtaagttc tgtccctgag tagga 25
<210> 82
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>

<223> 合成核酸
<400> 82
taagttctgt ccgtctgagt aggagct 27
<210> 83
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 83
cggtaagttc tgcgtagga gctaaaat 28
<210> 84
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 84
tctgtccaag cccgctgagt aggagcta 28
<210> 85
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 85
cggtaagttc tgtctaacag tctgagt 27
<210> 86
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 86
agttctgtcc aacagtctga gtaggagc 28
<210> 87
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 合成核酸
<400> 87
taagttctgt ccaatctgag taggagc 27
<210> 88
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 88
cggtaagttc tgtcaacagt ctgagt 26
<210> 89
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 89
tcggtaagtt ctgtaacagt ctgagt 26
<210> 90
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 90
cggtaagttc tgcctcaag gaagatggca 30
<210> 91
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 91
tcggtaagtt ctgtcgaaga tggcattt 28
<210> 92
<211> 27
<212> DNA

<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 92
cggtaagttc tgtcaagatg gcatttc 27
<210> 93
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 93
cggtaagttc tgtccgaaga tggcattt 28
<210> 94
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 94
ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30
<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 95
ctgagtggaa ggcggtaaac 20
<210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 96
gaagtttcag ggccaagtca 20
<210> 97
<211> 30

<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 97
ctcatacctt ctgcttcaag gaagatggca 30
<210> 98
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 98
ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30
<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 99
aacatcaagg aagatggcat t 21
<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 100
tccaacatca aggaagatgg c 21
<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 101
acctcaaca tcaaggaaga t 21
<210> 102

<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 102
gaguaacagu cugaguagga g 21
<210> 103
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 103
ugugucacca gaguaacagu c 21
<210> 104
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 104
aaccacaggu ugugucacca g 21
<210> 105
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 105
uuuccuuagu aaccacaggu u 21
<210> 106
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 106
gagauggcag uuuccuuagu a 21

<210> 107
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 107
uucuaguuug gagauggcag u 21
<210> 108
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 108
aagauggcau uucuaguuug g 21
<210> 109
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 109
aacaucaagg aagauggcau u 21
<210> 110
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 110
agguaccucc aacaucaagg a 21
<210> 111
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 111

cugccagagc agguaccucc a 21
<210> 112
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 112

cgguugaaaau cugccagagc a 21
<210> 113
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 113

uguccaagcc cgguugaaaau c 21
<210> 114
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 114

cgguaaguuc uguccaagcc c 21
<210> 115
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 115

gaaagccagu cgguaaguuc u 21
<210> 116
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸

<400> 116
aucaagcaga gaaagccagu c 21
<210> 117
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 117
uuauaacuug aucaagcaga g 21
<210> 118
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 118
cucugugauu uuauaacuug a 21
<210> 119
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 119
caccaucacc cucugugauu u 21
<210> 120
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 120
caaggucacc caccaucacc c 21
<210> 121
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>

<223> 合成核酸
<400> 121
uugauauccu caaggucacc c 21
<210> 122
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 122
gaucaucucg uugauauccu c 21
<210> 123
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 123
ucugcuugau gaucaucucg u 21
<210> 124
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 124
ggcauuucua guuuggagau g 21
<210> 125
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工
<220>
<223> 合成核酸
<400> 125
caaggaagau ggcauuucua g 21
<210> 126
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工

<220>

<223> 合成核酸

<400> 126

ccuccaacau caaggaagau g 21

<210> 127

<211> 233

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 127

ctcctactca gactgttact ctggtgacac aacctgtggt tactaaggaa actgccatct 60
ccaaactaga aatgccatct tccttgatgt tggaggtacc tgctctggca gatttcaacc 120
gggcttggac agaacttacc gactggcttt ctctgcttga tcaagttata aaatcacaga 180
gggtgatggt gggtgacctt gaggatatca acgagatgat catcaagcag aag 233

<210> 128

<211> 251

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 128

aaacccaaaa tatttttagct cctactcaga ctgttactct ggtgacacaa cctgtggtta 60
ctaaggaaac tgccatctcc aaactagaaa tgccatcttc cttgatgttg gaggtacctg 120
ctctggcaga tttcaaccgg gcttggacag aacttaccga ctggctttct ctgcttgatc 180
aagttataaa atcacagagg gtgatggtgg gtgaccttga ggatatcaac gagatgatca 240
tcaagcagaa g 251

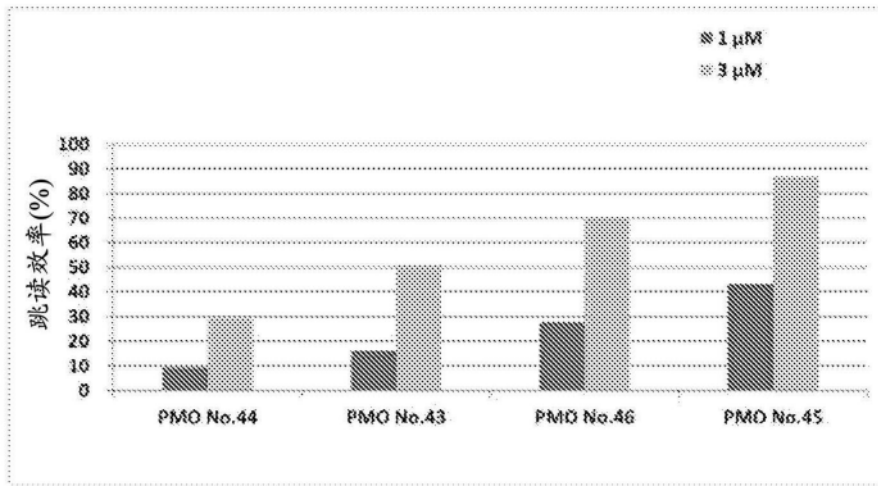


图1

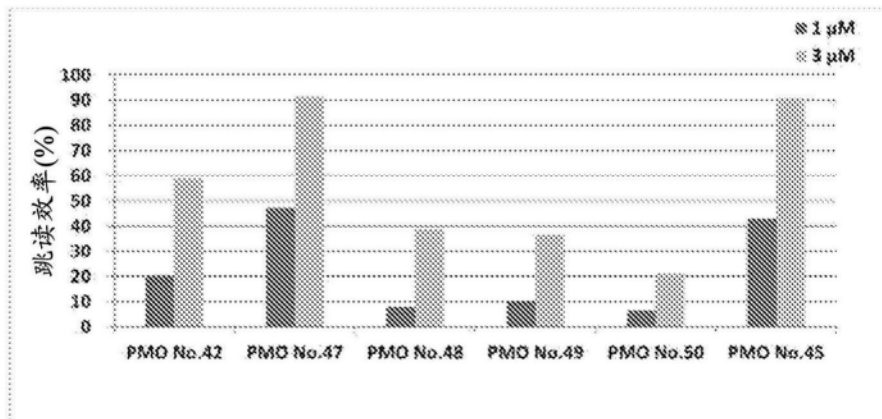


图2

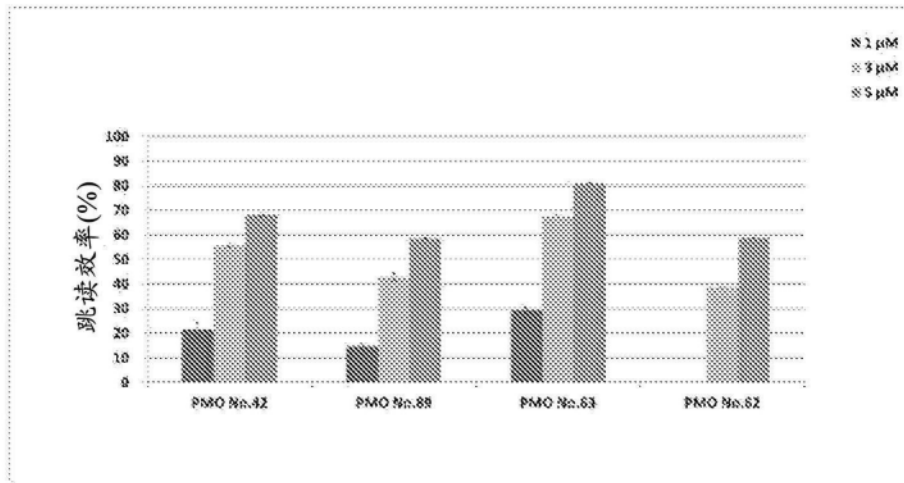


图3

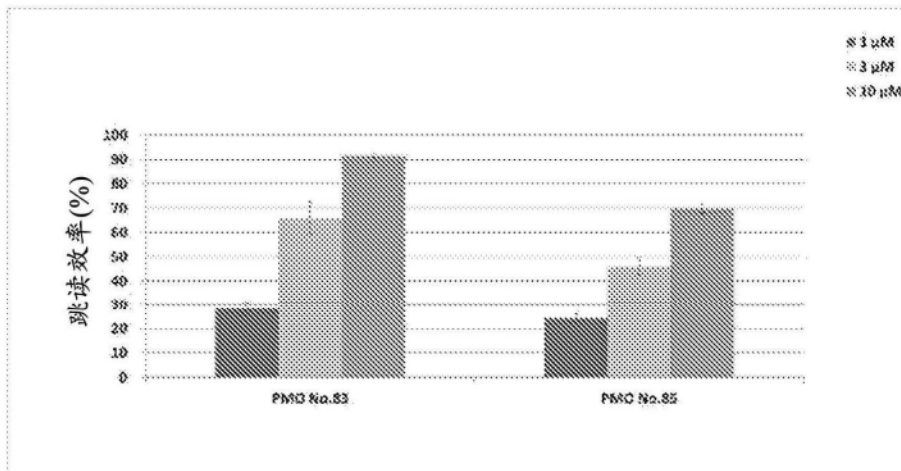


图4

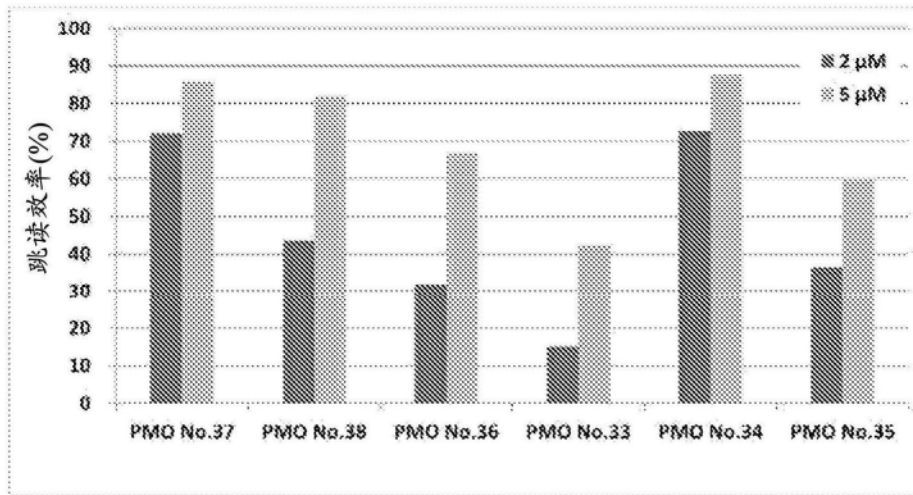


图5

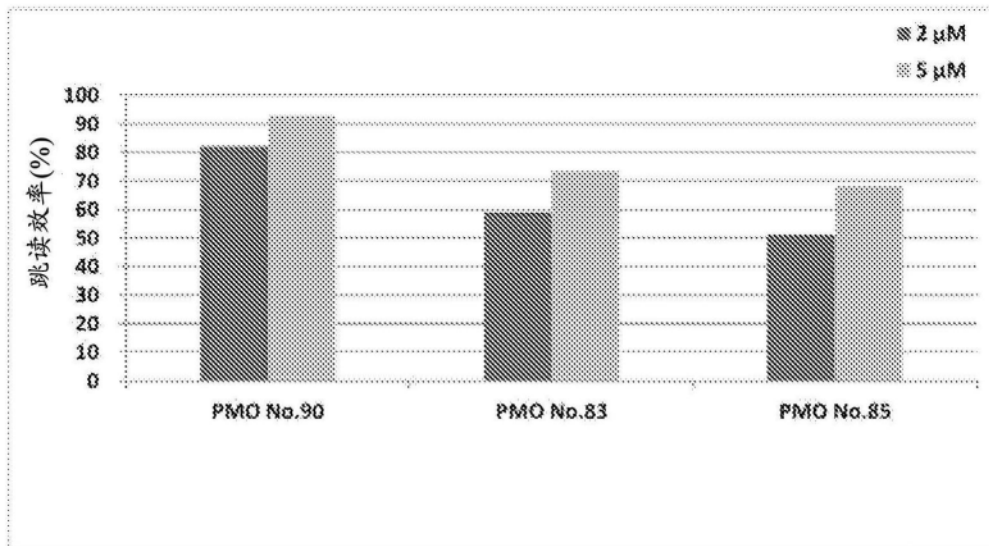


图6

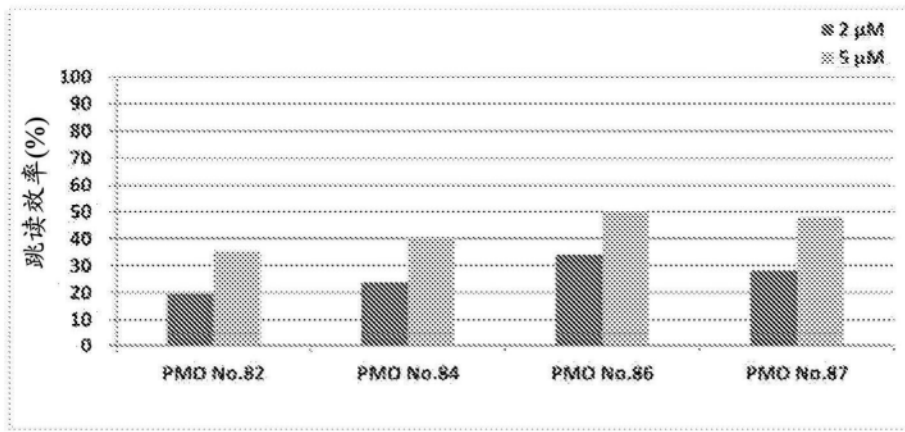


图7

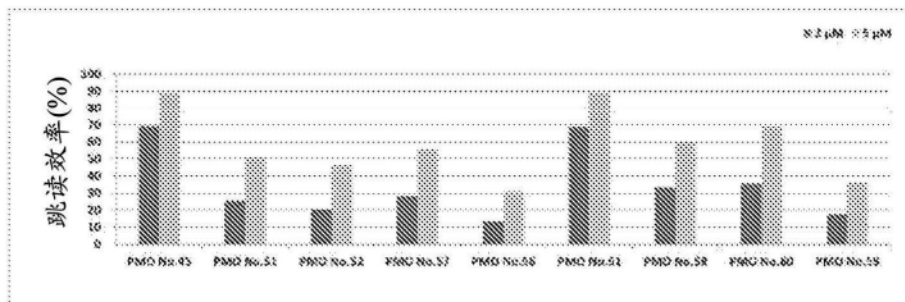


图8

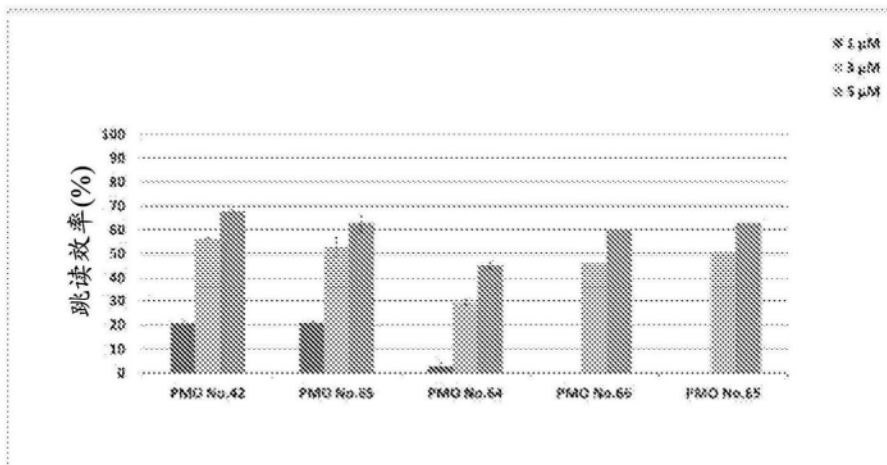


图9

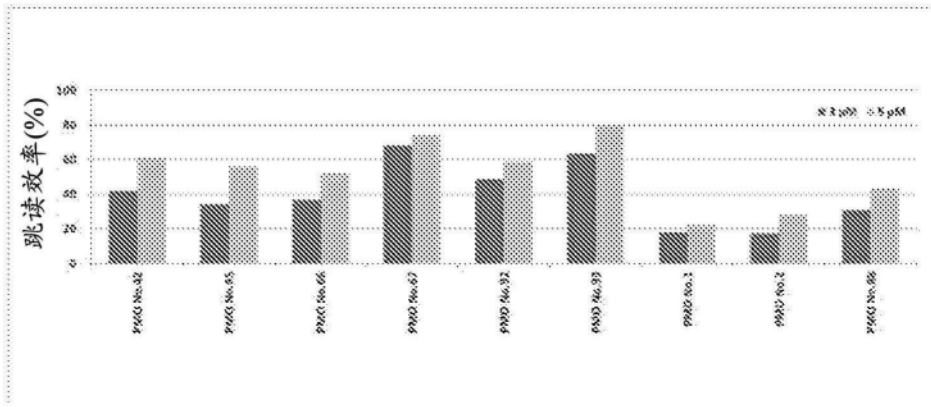


图10

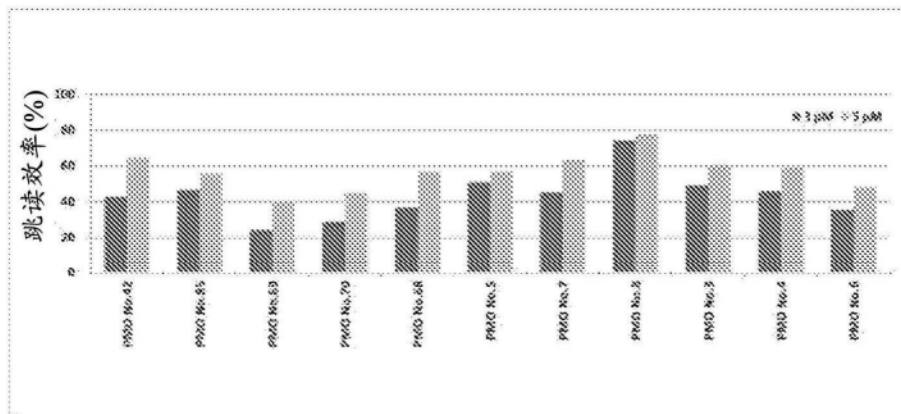


图11

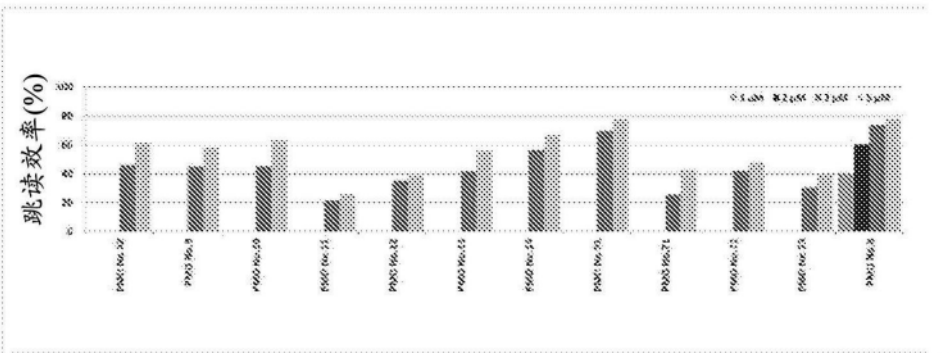


图12

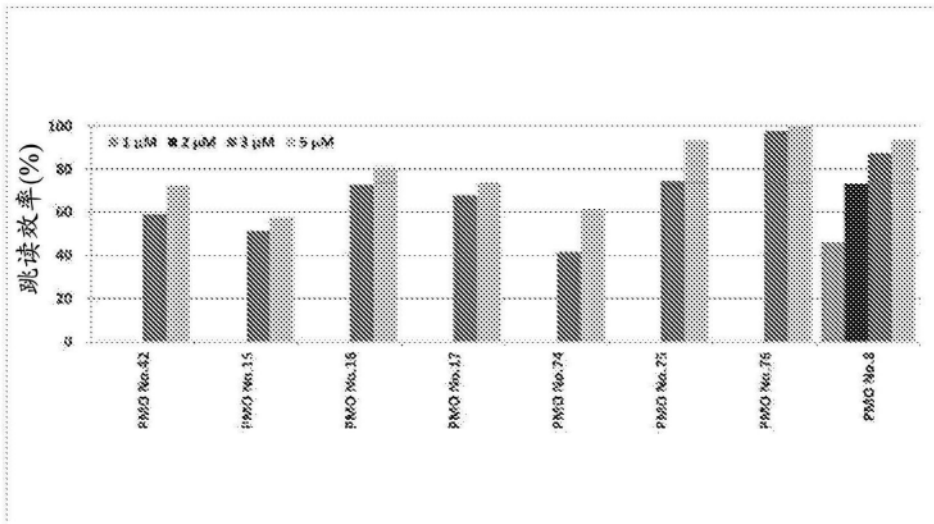


图13

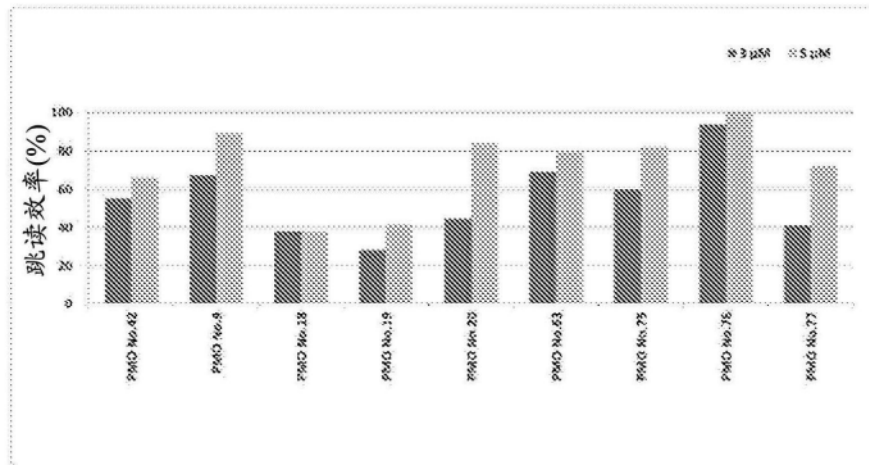


图14

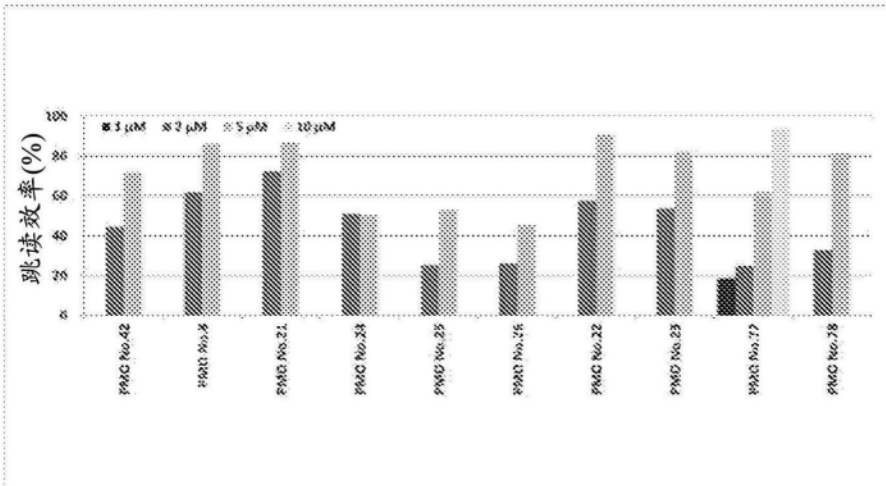


图15

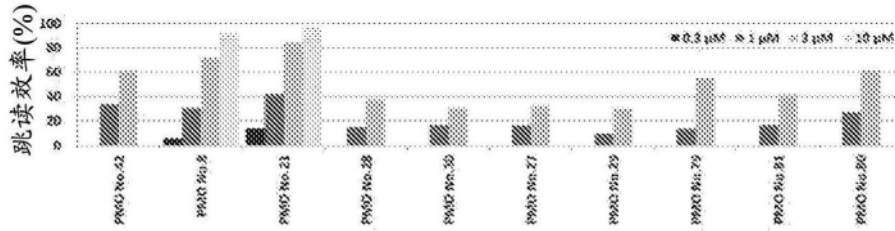


图16

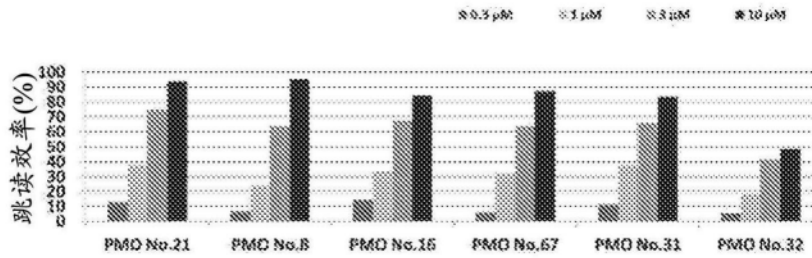


图17

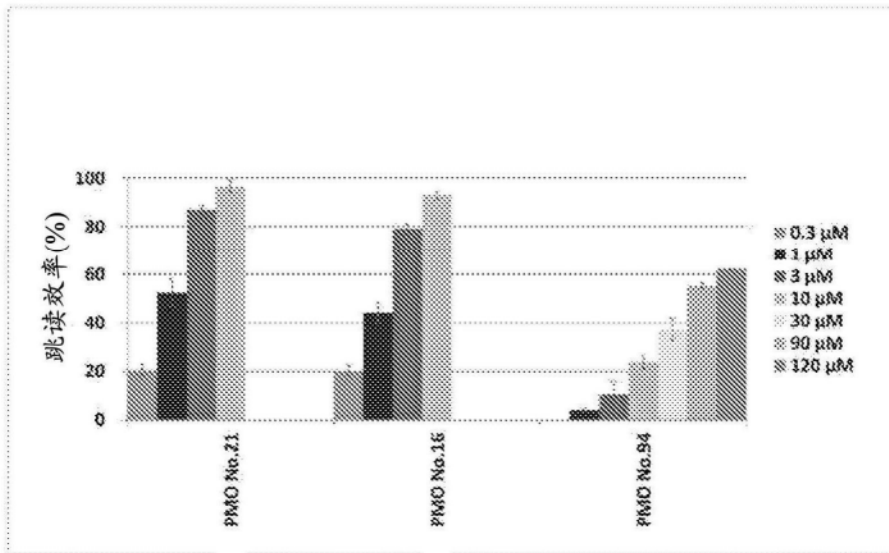


图18

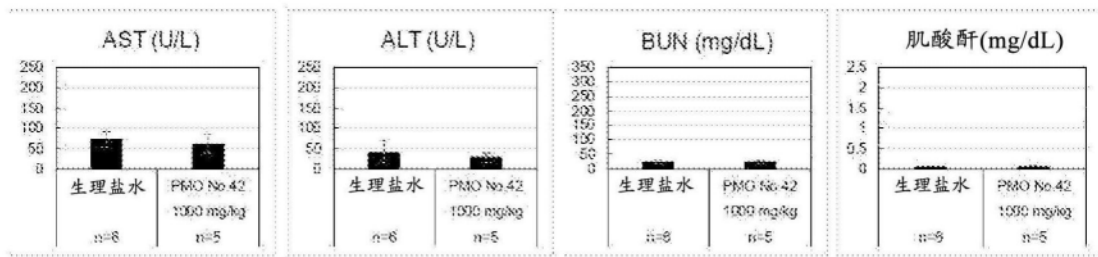


图19

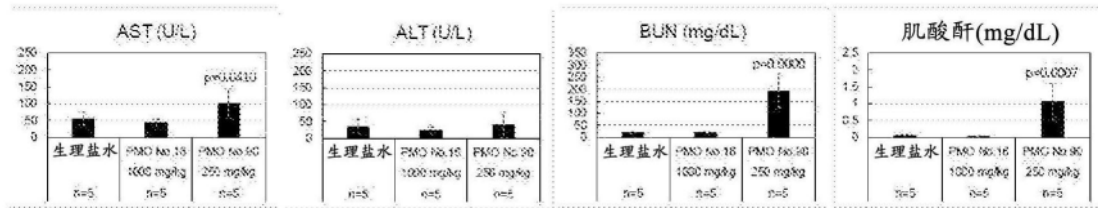


图20

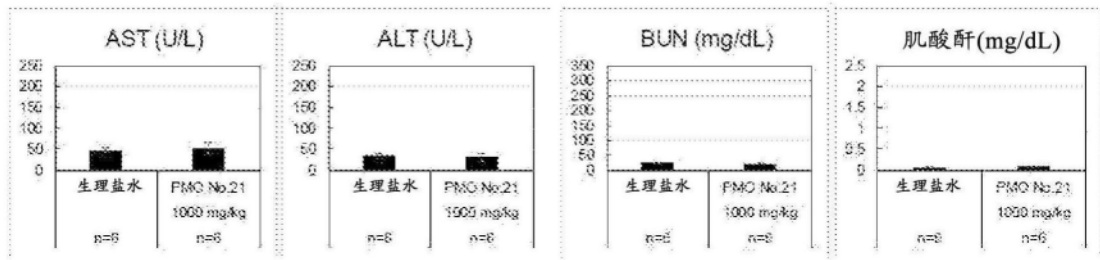


图21