(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108588073 A
(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810389742.6

(22)申请日 2012.12.27

(30)优先权数据
2011-288040 2011.12.28 JP
2012-043092 2012.02.29 JP

(62)分案原申请数据
201280064590.3 2012.12.27

(71)申请人 日本新药株式会社
地址 日本京都府
申请人 国立精神·神经医疗研究中心

(72)发明人 渡边直树 濑尾春奈 武田伸一 永田哲也

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
代理人 张永康

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)

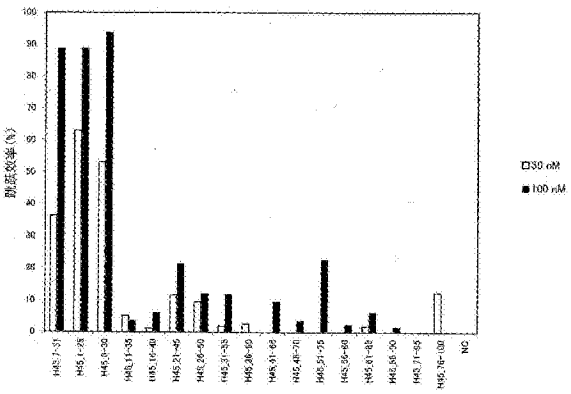
权利要求书3页 说明书62页
序列表26页 附图31页

(54)发明名称

反义核酸

(57)摘要

本发明涉及反义核酸。本发明的目的是提供能够高效地使人抗肌萎缩蛋白基因的第55、45、50以及44号外显子发生跳跃的药剂。本发明提供能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第55、45、50以及44号外显子发生跳跃的寡聚物。



CN 108588073 A

1.一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子的5’末端开始的第14～34号、第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第3～19号、第3～20号、第3～21号、第3～22号、第3～23号、第9～29号、第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第10～29号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第11～29号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第12～29号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第13～29号、第13～30号、第13～31号、第13～32号、第13～33号、第12～34号、第12～35号、第12～36号、第13～34号、第13～35号、第13～36号、第14～32号、第14～33号、第14～35号、第14～36号、第15～32号、第15～33号、第15～34号、第15～35号、第15～36号、第16～32号、第16～33号、第16～34号、第16～35号或第16～36号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

2.一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子的5’末端开始的第-3～19号、第-3～20号、第-3～21号、第-3～22号、第-3～23号、第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第-2～24号、第-2～25号、第-2～26号、第-2～27号、第-1～24号、第-1～25号、第-1～26号、第-1～27号、第1～24号、第1～25号、第1～26号、第1～27号、第2～24号、第2～25号、第2～26号、第2～27号、第3～23号、第3～24号、第3～25号、第3～26号、第3～27号、第4～28号、第4～29号、第4～30号、第4～31号、第4～32号、第5～28号、第5～29号、第5～30号、第5～31号、第5～32号、第6～28号、第6～29号、第6～30号、第6～31号、第6～32号、第7～28号、第7～29号、第7～30号、第7～31号、第7～32号、第8～28号、第8～29号、第8～30号、第8～31号或第8～32号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

3.一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子的5’末端开始的第105～125号、第105～126号、第105～127号、第105～128号、第105～129号、第106～125号、第106～126号、第106～127号、第106～128号、第106～129号、第107～125号、第107～126号、第107～127号、第107～128号、第107～129号、第108～125号、第108～126号、第108～127号、第108～128号、第108～129号、第109～125号、第109～126号、第109～127号、第109～128号或第109～129号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

4.一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子的5’末端开始的第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第9～34号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第10～34号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第11～34号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第12～34号、第13～30号、第13～31号、第13～32号、第13～33号、第13～34号、第24～45号、第24～46号、第24～47号、第24～48号、

第24～49号、第25～45号、第25～46号、第25～47号、第25～48号、第25～49号、第26～45号、第26～46号、第26～47号、第26～48号、第26～49号、第27～45号、第27～46号、第27～47号、第27～48号、第27～49号、第28～45号、第28～46号、第28～47号、第28～48号、第28～49号、第29～45号、第29～46号、第29～47号、第29～48号或第29～49号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

5.如权利要求1所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子的5’末端开始的第1～21号、第11～31号或第14～34号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

6.如权利要求1所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号5的第170～190号、第160～180号或第157～177号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

7.如权利要求2所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子的5’末端开始的第-2～19号、第1～21号、第1～25号或第6～30号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

8.如权利要求2所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号6的第158～178号、第156～176号、第152～176号或第147～171号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

9.如权利要求3所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子的5’末端开始的第106～126号或第107～127号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

10.如权利要求3所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号7的第4～24号或第3～23号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

11.如权利要求4所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子的5’末端开始的第11～32号、第25～45号、第26～46号、第26～47号或第27～47号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

12.如权利要求4所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号8的第117～138号、第104～124号、第103～123号、第102～123号或第102～122号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

13.如权利要求1～12中任一项所述的反义寡聚物，其中，其是寡核苷酸。

14.如权利要求13所述的反义寡聚物，其中，构成前述寡核苷酸的至少一个的核苷酸的糖部分和/或磷酸键部分被修饰。

15.如权利要求14所述的反义寡聚物，其中，构成前述寡核苷酸的至少一个的核苷酸的糖部分是2’位的－OH基被从由OR、R、R’OR、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2、N_3、CN、F、Cl、Br、及I构成的组中选出的任一者的基团取代的核糖，

并且，上述R是表示烷基或者芳基，上述R’是表示亚烷基。

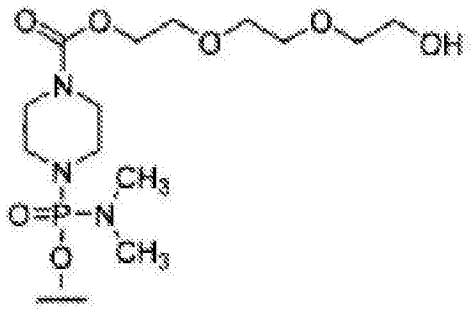
16.如权利要求14或15所述的反义寡聚物，其中，构成前述寡核苷酸的至少一个的核苷酸的磷酸键部分是从由硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基膦酸酯键、酰胺磷酸酯键、及硼烷磷酸酯键构成的组中选出的任一者。

17.如权利要求1～12中任一项所述的反义寡聚物，其中，其是吗啉寡聚物。

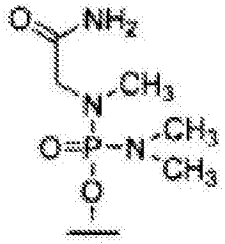
18.如权利要求17所述的反义寡聚物，其中，其是二酰胺磷酸酯吗啉寡聚物。

19.如权利要求17或18所述的反义寡聚物，其中，5’末端是下述化学式(1)～(3)中的任

意的基团，



(1)



(2)



(3)

。

20.一种肌营养不良治疗用医药组合物，其中，其是以权利要求1～19中任一项所述的反义寡聚物、该反义寡聚物的药学上可允许的盐或水和物作为有效成分。

反义核酸

[0001] 本申请是申请日为2012年12月27日、申请号为201280064590.3、发明名称为“反义核酸”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第55、45、50以及44号外显子发生跳跃的反义寡聚物及含有该寡聚物的医药组合物。

背景技术

[0003] 杜氏肌营养不良症(DMD)，是在出生男子中约3500人中就会有1人发病的频度最高的遗传性进行性肌萎缩症。该症，在乳幼儿期间显示出与正常人几乎没有变化的运动机能，但是，从4～5岁左右开始显现出肌力低下。然后，肌力低下进一步发展，到12岁左右变得不能步行，到20多岁会成为由于心不全或呼吸器不全而至死亡的重症的疾病。现在，没有对于DMD的有效的治疗方法，在强烈寻求新的治疗药的开发。

[0004] 对于DMD，已知抗肌萎缩蛋白基因的变异是其原因。抗肌萎缩蛋白基因，存在于X染色体，并且是由220万碱基对的DNA构成的巨大的基因。从DNA转录至mRNA前驱体，进一步地，通过剪接(Splicing)除去内含子，合成结合有79个外显子的mRNA。从该mRNA翻译成3,685个的氨基酸，生成抗肌萎缩蛋白质。抗肌萎缩蛋白质，参与肌细胞的膜稳定性的维持，因此为了使肌细胞难以破坏，该抗肌萎缩蛋白质是必须的。DMD患者的抗肌萎缩蛋白基因产生变异，因此，在肌细胞中，几乎没有发现具有机能的抗肌萎缩蛋白质。因此，在DMD患者体内，不能维持肌细胞的构造，大量的钙离子流入肌细胞内。其结果，产生与炎症相似的反应，纤维化发生推进，肌细胞变得难以再生。

[0005] 贝克型肌营养不良症(BMD)，其产生原因也是抗肌萎缩蛋白基因的变异，但是，其症状虽然也呈现出由于肌萎缩而引起的肌力低下，但是通常比DMD轻，肌力低下的进展也慢，在多数情况下，在成人期发病。DMD与BMD的临床症状的差异，被认为是在于，通过变异而在抗肌萎缩蛋白的mRNA向抗肌萎缩蛋白质翻译时的氨基酸的阅读框被破坏，或者是被维持(非专利文献1)。即，在DMD的情形，氨基酸阅读框具有不对齐变异，因此，几乎没有发现具有机能的抗肌萎缩蛋白质，但是在BMD的情形，虽然由于变异外显子的一部分发生缺失，但是氨基酸阅读框被维持，因此，产生了虽然不完全但是具有机能的抗肌萎缩蛋白质。

[0006] 作为DMD的治疗方法，可期待外显子跳跃法。该方法，是通过改变剪接来修复抗肌萎缩蛋白的mRNA的氨基酸阅读框，诱导部分恢复机能的抗肌萎缩蛋白质的表达的方法(非专利文献2)。成为外显子跳跃的对象的氨基酸序列部分会发生缺失。因此，在该治疗中表达的抗肌萎缩蛋白质比正常蛋白质短，但是氨基酸阅读框被维持，因此，使肌细胞稳定化的机能被部分保持。因此，通过外显子跳跃，可以期待DMD显现出与更轻症的BMD相同的症状。外显子跳跃法，经过通过小鼠或狗进行的动物实验，已应用于对于人DMD患者的临床试验。

[0007] 外显子跳跃，能够通过5’或3’剪接部位的任一者或两者、或以外显子的内部作为靶的反义核酸的结合进行诱导。外显子，仅在两者的剪接部位通过剪接体复合体识别的情

形会包含在mRNA中。因此，通过使用反义核酸靶向剪接部位，能够诱导外显子跳跃。另外，为了使外显子被剪接机构识别，认为对外显子剪接增强子(ESE)的SR蛋白质的结合是需要的，在靶向ESE时，也能够诱导外显子的跳跃。

[0008] 抗肌萎缩蛋白基因的变异，根据DMD患者的不同而不同，因此，需要适用于基因变异的场所或种类的反义核酸。至今为止，西澳大利亚大学的Steve Wilton等制作了对于所有的79个的外显子进行诱导外显子跳跃的反义核酸(非专利文献3)、荷兰的Annemieke Aartsma-Rus等制作了对于39种类的外显子进行诱导外显子跳跃的反义核酸(非专利文献4)。

[0009] 全DMD患者的20％左右，认为通过跳跃第55、45、50以及44号外显子(以下，称为“外显子55”，“外显子45”，“外显子50”以及“外显子44”)，可进行治疗。近年来，对于以抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50以及44作为外显子跳跃的靶而进行的研究，有多个研究机构做出了报告(专利文献1～8)。但是，使外显子55、45、50以及44在患者细胞中高效地跳跃的技术，至今尚未确立。

[0010] 专利文献1：国际公开公报WO 2006/000057。

[0011] 专利文献2：国际公开公报WO 2004/048570。

[0012] 专利文献3：美国专利公开公报US 2010/0168212。

[0013] 专利文献4：国际公开公报WO 2010/048586。

[0014] 专利文献5：国际公开公报WO 2004/083446。

[0015] 专利文献6：国际公开公报WO 2010/050801。

[0016] 专利文献7：国际公开公报WO 2009/139630。

[0017] 非专利文献1：Monaco A.P.et al.,Genomics 1988;2:p.90－95。

[0018] 非专利文献2：Matsuo M.,Brain Dev 1996;18:p.167－172。

[0019] 非专利文献3：Wilton S.D.,et al.,Molecular Therapy 2007:15:p.1288－96。

[0020] 非专利文献4：Annemieke Aartsma－Rus et al.,(2002)Neuromuscular Disorders 12:S71-S77。

[0021] 非专利文献5：Linda J.Popplewell et al.,(2010)Neuromuscular Disorders,vol.20,no.2,p.102－10。

发明内容

[0022] 在上述情形下，希望能够有一种能够强烈诱导抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50以及44跳跃的反义寡聚物及含有该寡聚物的肌营养不良治疗药物。

[0023] 本发明人等，仔细研究抗肌萎缩蛋白基因的结构的结果发现，在抗肌萎缩蛋白基因的mRNA前驱体(以下，称为“pre－mRNA”)中，通过使用反义寡聚物对由外显子55的5’末端开始的第1～21号、第11～31号、第14～34号周边的核苷酸构成的序列进行靶向，能够高效率地诱导外显子55的跳跃。

[0024] 另外，本发明人等发现，在抗肌萎缩蛋白基因pre－mRNA中，通过使用反义寡聚物对由外显子45的5’末端开始的第1～25号以及第6～30号周边的核苷酸构成的序列进行靶向，能够高效率地诱导外显子45的跳跃。

[0025] 此外，本发明人等发现，在抗肌萎缩蛋白基因pre－mRNA中，通过使用反义寡聚物

对由外显子50的5’末端开始的第107～127号周边的核苷酸构成的序列进行靶向，能够高效率地诱导外显子50的跳跃。

[0026] 另外，本发明人等发现，在抗肌萎缩蛋白基因pre－mRNA中，通过使用反义寡聚物对由外显子44的5’末端开始的第11～32号以及第26～47号周边的核苷酸构成的序列进行靶向，能够高效率地诱导外显子44的跳跃。

[0027] 本发明人等，根据该认识，完成了本发明。

[0028] 即，本发明如下所示。

[0029] [1]一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子的5’末端开始的第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第3～19号、第3～20号、第3～21号、第3～22号、第3～23号、第9～29号、第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第10～29号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第11～29号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第12～29号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第13～29号、第13～30号、第13～31号、第13～32号、第13～33号、第12～34号、第12～35号、第12～36号、第13～34号、第13～35号、第13～36号、第14～32号、第14～33号、第14～34号、第14～35号、第14～36号、第15～32号、第15～33号、第15～34号、第15～35号、第15～36号、第16～32号、第16～33号、第16～34号、第16～35号或第16～36号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

[0030] [2]一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子的5’末端开始的第-3～19号、第-3～20号、第-3～21号、第-3～22号、第-3～23号、第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第-2～24号、第-2～25号、第-2～26号、第-2～27号、第-1～24号、第-1～25号、第-1～26号、第-1～27号、第1～24号、第1～25号、第1～26号、第1～27号、第2～24号、第2～25号、第2～26号、第2～27号、第3～23号、第3～24号、第3～25号、第3～26号、第3～27号、第4～28号、第4～29号、第4～30号、第4～31号、第4～32号、第5～28号、第5～29号、第5～30号、第5～31号、第5～32号、第6～28号、第6～29号、第6～30号、第6～31号、第6～32号、第7～28号、第7～29号、第7～30号、第7～31号、第7～32号、第8～28号、第8～29号、第8～30号、第8～31号或第8～32号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

[0031] [3]一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子的5’末端开始的第105～125号、第105～126号、第105～127号、第105～128号、第105～129号、第106～125号、第106～126号、第106～127号、第106～128号、第106～129号、第107～125号、第107～126号、第107～127号、第107～128号、第107～129号、第108～125号、第108～126号、第108～127号、第108～128号、第108～129号、第109～125号、第109～126号、第109～127号、第109

～128号或第109～129号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

[0032] [4]一种反义寡聚物，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子发生跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子的5’末端开始的第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第9～34号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第10～34号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第11～34号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第12～34号、第13～30号、第13～31号、第13～32号、第13～33号、第13～34号、第24～45号、第24～46号、第24～47号、第24～48号、第24～49号、第25～45号、第25～46号、第25～47号、第25～48号、第25～49号、第26～45号、第26～46号、第26～47号、第26～48号、第26～49号、第27～45号、第27～46号、第27～47号、第27～48号、第27～49号、第28～45号、第28～46号、第28～47号、第28～48号、第28～49号、第29～45号、第29～46号、第29～47号、第29～48号或第29～49号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列构成。

[0033] [5]如前述[1]所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子的5’末端开始的第1～21号、第11～31号或第14～34号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

[0034] [6]如前述[1]所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号5的第170～190号、第160～180号或第157～177号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

[0035] [7]如前述[2]所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子的5’末端开始的第-2～19号、第1～21号、第1～25号或第6～30号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

[0036] [8]如前述[2]所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号6的第158～178号、第156～176号、第152～176号或第147～171号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

[0037] [9]如前述[3]所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子的5’末端开始的第106～126号或第107～127号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

[0038] [10]如前述[3]所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号7的第4～24号或第3～23号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

[0039] [11]如前述[4]所述的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子的5’末端开始的第11～32号、第25～45号、第26～46号、第26～47号或第27～47号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列构成。

[0040] [12]如前述[4]所述的反义寡聚物，其中，其是由序列号8的第117～138号、第104～124号、第103～123号、第102～123号或第102～122号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列构成。

[0041] [13]如前述[1]～[12]中任一项所述的反义寡聚物，其中，其是寡核苷酸。

[0042] [14]如前述[13]所述的反义寡聚物，其中，构成前述寡核苷酸的至少一个的核苷酸的糖部分和/或磷酸键部分被修饰。

[0043] [15]如前述[14]所述的反义寡聚物，其中，构成前述寡核苷酸的至少一个的核苷酸的糖部分是2’位的－OH基被从由OR、R、R’OR、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2、N_3、CN、F、Cl、Br、及I构成的组中选出的任一者的基团取代的核糖。

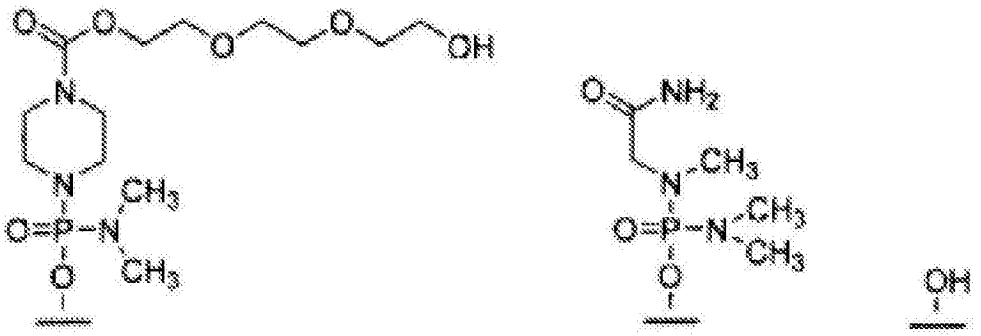
[0044] (上述R是表示烷基或者芳基,上述R'是表示亚烷基。)

[0045] [16]如前述[14]或[15]所述的反义寡聚物,其中,构成前述寡核苷酸的至少一个的核苷酸的磷酸键部分是从由硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基膦酸酯键、酰胺磷酸酯(phosphoroamidate)键、及硼烷磷酸酯(boranophosphate)键构成的组中选出的任一者。

[0046] [17]如前述[1]～[12]中任一项所述的反义寡聚物,其中,其是吗啉寡聚物。

[0047] [18]如前述[17]所述的反义寡聚物,其中,其是二酰胺磷酸酯(phosphorodiamidate)吗啉寡聚物。

[0048] [19]如前述[17]或[18]所述的反义寡聚物,其中,5'末端是下述化学式(1)～(3)中的任意的基团。

[0049] 

(1) (2) (3)

[0050] [20]一种肌营养不良治疗用医药组合物,其中,其是以前述[1]～[19]中任一项所述的反义寡聚物、该反义寡聚物的药学上可允许的盐或水和物作为有效成分。

[0051] 根据本发明的反义寡聚物,能够高效地诱导人抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50以及44的跳跃。另外,通过施予本发明的医药组合物,能够有效地减轻杜氏肌营养不良的症状。另外,本发明的反义寡聚物仅将患者的外显子序列作为靶,因此与将内含子作为靶的反义寡聚物情况相比,靶序列保存在个体之间(个人之间),从而以能够得到无关于个体差(个人差)的良好的跳跃效率为特征。另外,本发明的反义寡聚物的链长为20bp左右,其长度短,因此与以往的以DMD治疗为目的的反义寡聚物(25bp左右)相比,靶序列中含有SNP(Single Nucleotide Polymorphism:单核苷酸多态性)等的个体(个人)间的变异的可能性低,从此观点考虑时,同样以能够得到无关于个体差(个人差)的良好的跳跃效率为特征。另外,一般来说,短链的反义寡聚物较难诱导免疫,因此,本发明的反义寡聚物具有使细胞因子等的诱导引起的副作用难以发生的特征。

[0052] 此外,本发明的反义寡聚物因为链长短,因此制造成本较低。

附图说明

[0053] 图1是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的2'－OMe－S－RNA寡聚物产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子45的跳跃效率的图。

[0054] 图2是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的2'－OMe－S－RNA寡聚物产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子45的跳跃效率的图。

[0055] 图3是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子45的跳跃效率的图。

[0056] 图4是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子45的跳跃效率的图。

[0057] 图5是表示往来自人DMD患者的纤维芽细胞(GM05017细胞)中导入人MyoD基因诱导分化成肌肉细胞的细胞中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子45的跳跃效率的图。

[0058] 图6是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的2'－OMe－S－RNA寡聚物产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃效率的图。

[0059] 图7是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的2'－OMe－S－RNA寡聚物产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃效率的图。

[0060] 图8是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃效率的图。

[0061] 图9是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的2'－OMe－S－RNA寡聚物产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子44的跳跃效率的图。

[0062] 图10是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的2'－OMe－S－RNA寡聚物产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子44的跳跃效率的图。

[0063] 图11是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子44的跳跃效率的图。

[0064] 图12是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子44的跳跃效率的图。

[0065] 图13是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃效率的图。

[0066] 图14是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子45的跳跃效率的图。

[0067] 图15是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子45的跳跃效率的图。

[0068] 图16是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃效率的图。

[0069] 图17是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃效率的图。

[0070] 图18是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子44の跳跃效率的图。

[0071] 图19是表示人横纹肌肉瘤细胞株(RD细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃效率的图。

[0072] 图20是表示往来自外显子45缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM05112细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子44的跳跃效率的图。

[0073] 图21是表示往来自外显子45缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM05112细胞)中的PMO导致的人抗肌萎缩蛋白基因外显子44的跳跃结果(蛋白质印迹:Western blotting)的图。

[0074] 图22是表示往来自外显子45缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM05112细胞中的PMO导致的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃结果(RT－PCR)的图。

[0075] 图23是表示往来自外显子45缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM05112细胞)中的PMO产

生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃效率的图。

[0076] 图24是表示往来自外显子45缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM05112细胞)中的PMO导致的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃结果(RT－PCR)的图。

[0077] 图25是表示往来自外显子45缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM05112细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃效率的图。

[0078] 图26是表示往来自外显子8－9重复DMD患者的纤维芽细胞(11－0627细胞)中的PMO导致的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃结果(RT－PCR)的图。

[0079] 图27是表示往来自外显子8－9重复DMD患者的纤维芽细胞(11－0627细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃效率的图。

[0080] 图28是表示往来自外显子51－55缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM04364细胞)中的PMO导致的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃结果(RT－PCR)的图。

[0081] 图29是表示往来自外显子51－55缺失DMD患者的纤维芽细胞(GM04364细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子50的跳跃效率的图。

[0082] 图30是表示往来自外显子54单独缺失DMD患者的细胞(04－035细胞)中的PMO导致的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃结果(RT－PCR)的图。

[0083] 图31是表示往来自外显子54单独缺失DMD患者的细胞(04－035细胞)中的PMO产生的人抗肌萎缩蛋白基因外显子55的跳跃效率的图。

具体实施方式

[0084] 以下，详细说明本发明。以下的实施方式，仅是用于说明本发明的例示，并不是用于将本发明限定于该实施方式。本发明，只要不脱离其要旨，能够以各种方式进行实施。

[0085] 此外，本说明书中引用的所有的文献、以及公开公报、专利公报及其它的专利文献，均作为参照并入本说明书中。另外，本说明书包含作为本申请的优先权基础的2011年12月28日提出的日本专利申请(日本特愿2011－288040号)以及2012年02月29日提出的日本专利申请(日本特愿2012－043092号)的说明书及附图中记载的内容。

[0086] 以下，详细说明本发明。以下的实施方式，仅是用于说明本发明的例示，并不是用于将本发明限定于该实施方式。本发明，只要不脱离其要旨，能够以各种方式进行实施。

[0087] 另外，若没有特别记载，氨基酸序列是左端表示氨基末端、右端表示羧基末端，碱基序列是左端表示5’末端、右端表示3’末端。

[0088] 1.反义寡聚物

[0089] 本发明提供一种反义寡聚物(以下，称为“本发明的外显子55跳跃寡聚物”)，其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子跳跃的反义寡聚物，其中，其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子的5’末端开始的第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第3～19号、第3～20号、第3～21号、第3～22号、第3～23号、第9～29号、第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第10～29号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第11～29号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第12～29号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第13～29号、第13～30号、

第13～31号、第13～32号、第13～33号、第12～34号、第12～35号、第12～36号、第13～34号、第13～35号、第13～36号、第14～32号、第14～33号、第14～34号、第14～35号、第14～36号、第15～32号、第15～33号、第15～34号、第15～35号、第15～36号、第16～32号、第16～33号、第16～34号、第16～35号或第16～36号的核苷酸构成的序列(以下,也称为“外显子55靶序列”)中的任一者互补的碱基序列构成。

[0090] 另外,本发明提供一种反义寡聚物(以下,称为“本发明的外显子45跳跃寡聚物”),其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子跳跃的反义寡聚物,其中,其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子的5’末端开始的第-3～19号、第-3～20号、第-3～21号、第-3～22号、第-3～23号、第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第-2～24号、第-2～25号、第-2～26号、第-2～27号、第-1～24号、第-1～25号、第-1～26号、第-1～27号、第1～24号、第1～25号、第1～26号、第1～27号、第2～24号、第2～25号、第2～26号、第2～27号、第3～23号、第3～24号、第3～25号、第3～26号、第3～27号、第4～28号、第4～29号、第4～30号、第4～31号、第4～32号、第5～28号、第5～29号、第5～30号、第5～31号、第5～32号、第6～28号、第6～29号、第6～30号、第6～31号、第6～32号、第7～28号、第7～29号、第7～30号、第7～31号、第7～32号、第8～28号、第8～29号、第8～30号、第8～31号或第8～32号的核苷酸构成的序列(以下,也称为“外显子45靶序列”)中的任一者互补的碱基序列构成。

[0091] 另外,本发明提供一种反义寡聚物(以下,称为“本发明的外显子50跳跃寡聚物”),其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子跳跃的反义寡聚物,其中,其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子的5’末端开始的第105～125号、第105～126号、第105～127号、第105～128号、第105～129号、第106～125号、第106～126号、第106～127号、第106～128号、第106～129号、第107～125号、第107～126号、第107～127号、第107～128号、第107～129号、第108～125号、第108～126号、第108～127号、第108～128号、第108～129号、第109～125号、第109～126号、第109～127号、第109～128号或第109～129号的核苷酸构成的序列(以下,也称为“外显子50靶序列”)中的任一者互补的碱基序列构成。

[0092] 另外,本发明提供一种反义寡聚物(以下,称为“本发明的外显子44跳跃寡聚物”),其是能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子跳跃的反义寡聚物,其中,其是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子的5’末端开始的第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第9～34号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第10～34号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第11～34号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第12～34号、第13～30号、第13～31号、第13～32号、第13～33号、第13～34号、第24～45号、第24～46号、第24～47号、第24～48号、第24～49号、第25～45号、第25～46号、第25～47号、第25～48号、第25～49号、第26～45号、第26～46号、第26～47号、第26～48号、第26～49号、第27～45号、第27～46号、第27～47号、第27～48号、第27～49号、第28～45号、第28～46号、第28～47号、第28～48号、第28～49号、第29～45号、第29～46号、第29～47号、第29～48号或第29～49号的核苷酸构成的序列(以下,也称为“外显子44靶序列”)中的任一者互补的碱基序列构成。

[0093] 以下，有时将本发明的外显子55、45、50以及44跳跃寡聚物总称为“本发明的寡聚物”。

[0094] [人抗肌萎缩蛋白基因的第55、45、50以及44号外显子]

[0095] 在本发明中，在“基因”中，在基因组基因以外，也包括cDNA、mRNA前驱体及mRNA。优选地，基因是mRNA前驱体，即，pre－mRNA。

[0096] 在人基因组中，人抗肌萎缩蛋白基因存在于基因座Xp21.2中。人抗肌萎缩蛋白基因，具有3.0Mbp的大小，作为已知的人基因是最大的基因。其中，人抗肌萎缩蛋白基因的编码区域仅只不过是14kb，该编码区域，作为79个的外显子，分散在抗肌萎缩蛋白基因内(Roberts,RG.,et al.,Genomics,16:536－538(1993))。作为人抗肌萎缩蛋白基因的转录物的pre－mRNA，接受剪接生成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(基因银行(GenBank)登记号NM_004006)。

[0097] 由从人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子55的5’末端开始的第-2～190号的核苷酸构成的碱基序列示于序列号1。另外，由从人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的5’末端开始的第-3～176号的核苷酸构成的碱基序列示于序列号2。另外，由从人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子50的5’末端开始的第1～109号以及从内含子50的5’末端开始的第1～20号的核苷酸构成的碱基序列示于序列号3。

[0098] 另外，由从人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子44的5’末端开始的第1～148号的核苷酸构成的碱基序列示于序列号4。

[0099] 本发明的寡聚物，是以下述目的而制作的，即，其通过人抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50或44的跳跃，使通过DMD型抗肌萎缩蛋白基因编码的蛋白质改变为BMD型抗肌萎缩蛋白质。因此，成为本发明的寡聚物的外显子跳跃的对象的抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50以及44中，不仅是野生型，也包括其各变异型。

[0100] 变异型的人抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50以及44，具体地，是下述的(a)或(b)中记载的多核苷酸。

[0101] (a)多核苷酸，其是与由与序列号1(或者序列号1的第3～192号的核苷酸构成的序列)、2(或者序列号2的第4～179号的核苷酸构成的序列)、3(或者序列号3的第1～109号的核苷酸构成的序列)或者4的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸在严格条件下进行杂交的多核苷酸；

[0102] (b)多核苷酸，其是由相对于序列号1(或者序列号1的第3～192号的核苷酸构成的序列)、2(或者序列号2的第4～179号的核苷酸构成的序列)、3(或者序列号3的第1～109号的核苷酸构成的序列)或者4的碱基序列具有90％以上的同一性的碱基序列构成的多核苷酸。

[0103] 本说明书中，“多核苷酸”是指DNA或RNA。

[0104] 本说明书中，“严格条件下进行杂交的多核苷酸”是指，例如，以由与序列号1(或者序列号1的第3～192号的核苷酸构成的序列)、2(或者序列号2的第4～179号的核苷酸构成的序列)、3(或者序列号3的第1～109号的核苷酸构成的序列)或者4的碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸的全部或部分作为探针，通过使用菌落杂交法、菌斑杂交法或萨瑟恩杂交法等获得的多核苷酸。作为杂交的方法，例如，可以使用“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。

[0105] 本说明书中,所述“互补的碱基序列”,不是限定于与成为对象的碱基序列形成沃森－克里克碱基对的碱基序列,而是也包含形成不稳定配对(Wobble base pair)的碱基序列。此处,所谓沃森－克里克碱基对是指在腺嘌呤－胸腺嘧啶、腺嘌呤－尿嘧啶及鸟嘌呤－胞嘧啶之间形成氢键的碱基对,所谓不稳定配对是指在鸟嘌呤－尿嘧啶、肌苷－尿嘧啶、肌苷－腺嘌呤及肌苷－胞嘧啶之间形成氢键的碱基对。另外,所谓“互补的碱基序列”,可以是与成为对象的碱基序列之间不具有100％的互补性,例如,也可以是相对于成为对象的碱基序列含有1～3个、1～2个或1个的非互补的碱基。

[0106] 本说明书中,所谓“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。所谓“低严格条件”,例如,是5×SSC、5×邓哈特溶液(Denhardt’s Splution)、0.5％SDS、50％甲酰胺、32℃的条件。另外,所谓“中严格条件”,例如,是5×SSC、5×邓哈特溶液、0.5％SDS、50％甲酰胺、42℃或5×SSC、1％SDS、50mM三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris－HCl)(pH7.5)、50％甲酰胺、42℃的条件。所谓“高严格条件”,例如,是5×SSC、5×邓哈特溶液、0.5％SDS、50％甲酰胺、50℃或0.2×SSC、0.1％SDS、65℃的条件。在这些的条件中,越提高温度越能够期待有效地获得具有高同一性的多核苷酸。其中,作为影响杂交的严格性的要素,考虑有温度、探针浓度、探针的长度、离子强度、时间、盐浓度等的多个要素,只要是本领域技术人员,即可通过适宜地选择这些的要素实现同样的严格性。

[0107] 此外,杂交中使用市售的试剂盒的情形,例如,能够使用碱性磷酸酶直接标记和检测系统(Alkphos Direct Labelling and Detection System)(GE Healthcare公司制)。该情形时,按照试剂盒所附的说明书(Protocol),进行一晚与标识的探针的培育,然后,在55℃的条件下用含有0.1％(w/v)SDS的1次清洗缓冲液清洗膜后,能够检测杂交的多核苷酸。或者,在根据与序列号1(或者序列号1的第3～192号的核苷酸构成的序列)、2(或者序列号2的第4～179号的核苷酸构成的序列)、3(或者序列号3的第1～109号的核苷酸构成的序列)或者4的碱基序列互补的碱基序列的全部或部分制作探针时,使用市售的试剂(例如,PCR标记混合物(ロシュ・ダイアグノス公司制)等)对该探针进行异羟基洋地黄毒苷元(DIG)标记的情形时,使用DIG核酸检测试剂盒(ロシュ・ダイアグノス公司制)能够检测杂交。

[0108] 作为上述的可杂交的多核苷酸以外的多核苷酸,通过相同性检索软件BLAST,使用默认的参数进行计算时,能够举出与由序列号1(或者序列号1的第3～192号的核苷酸构成的序列)、2(或者序列号2的第4～179号的核苷酸构成的序列)、3(或者序列号3的第1～109号的核苷酸构成的序列)或者4的多核苷酸构成的序列具有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％以上的同一性的多核苷酸。

[0109] 此外,碱基序列的同一性,可使用卡林(カーリン)和亚瑟(アルチュール)给出的算法BLAST(基本局部比对搜索工具:Basic Local AlignMent Search tool)(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 872264－2268,1990;Proc Natl Acad Sci USA 90:5873,1993)决定。并且,已开发出了基于BLAST的算法的称为BLASTN或BLASTX的程序(Altschul SF,et al:J Mol Biol 215:403,1990)。在使用BLASTN解析碱基序列时,参数设为例如

Score＝100(分＝100)、wordlength＝12(字长＝12)。使用BLAST和缺口BLAST(Gapped BLAST)程序的情形,使用各程序的默认参数。

[0110] 与从外显子55的5'末端开始的第-2～190号的核苷酸的序列互补的序列示于序列号5。此处,由从外显子55的5'末端开始的第-2～-1号的核苷酸构成的序列(由序列号1的第1～2号的核苷酸构成的序列)是,表示由存在于外显子54和外显子55之间的内含子54的3'末端的最下流的两个核苷酸构成的序列。即,外显子55的碱基序列是,由序列号1的第3～192号的核苷酸构成的序列;与外显子55的碱基序列互补的序列是,由序列号5的第1～190号的核苷酸构成的序列。

[0111] 此处,与由人抗肌萎缩蛋白基因的第55号的外显子的5'末端开始的第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第3～19号、第3～20号、第3～21号、第3～22号、第3～23号、第9～29号、第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第10～29号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第11～29号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第12～29号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第13～29号、第13～30号、第13～31号、第13～32号、第13～33号、第12～34号、第12～35号、第12～36号、第13～34号、第13～35号、第13～36号、第14～32号、第14～33号、第14～34号、第14～35号、第14～36号、第15～32号、第15～33号、第15～34号、第15～35号、第15～36号、第16～32号、第16～33号、第16～34号、第16～35号或第16～36号的核苷酸构成的碱基序列互补的序列,分别相同于,由序列号5的第172～192号、第171～192号、第170～192号、第169～192号、第168～192号、第172～191号、第171～191号、第170～191号、第169～191号、第168～191号、第172～190号、第171～190号、第170～190号、第169～190号、第168～190号、第172～189号、第171～189号、第170～189号、第169～189号、第168～189号、第172～188号、第171～188号、第170～188号、第169～188号、第168～188号、第162～182号、第161～182号、第160～182号、第159～182号、第158～182号、第162～181号、第161～181号、第160～181号、第159～181号、第158～181号、第162～180号、第161～180号、第160～180号、第159～180号、第158～180号、第162～179号、第161～179号、第160～179号、第159～179号、第158～179号、第162～178号、第161～178号、第160～178号、第159～178号、第158～178号、第157～179号、第156～179号、第155～179号、第157～178号、第156～178号、第155～178号、第159～177号、第158～177号、第157～177号、第156～177号、第155～177号、第159～176号、第158～176号、第157～176号、第156～176号、第155～176号、第159～175号、第158～175号、第157～175号、第156～175号或第155～175号的核苷酸构成的序列。

[0112] 与从外显子45的5'末端开始的第-3～176号的核苷酸的序列互补的序列示于序列号6。此处,由从外显子45的5'末端开始的第-3～-1号的核苷酸构成的序列(由序列号2的第1～3号的核苷酸构成的序列)是,表示存在于外显子44和外显子45的之间的内含子44的3'末端的最下流的三个核苷酸构成的序列。即,外显子45的碱基序列是,由序列号2的第4～179号的核苷酸构成的序列;与外显子45的碱基序列互补的序列是,由序列号6的第1～176号的核苷酸构成的序列。

[0113] 此处,与由人抗肌萎缩蛋白基因的第45号的外显子的5'末端开始的第-3～19号、

第-3～20号、第-3～21号、第-3～22号、第-3～23号、第-2～19号、第-2～20号、第-2～21号、第-2～22号、第-2～23号、第-1～19号、第-1～20号、第-1～21号、第-1～22号、第-1～23号、第1～19号、第1～20号、第1～21号、第1～22号、第1～23号、第2～19号、第2～20号、第2～21号、第2～22号、第2～23号、第-2～24号、第-2～25号、第-2～26号、第-2～27号、第-1～24号、第-1～25号、第-1～26号、第-1～27号、第1～24号、第1～25号、第1～26号、第1～27号、第2～24号、第2～25号、第2～26号、第2～27号、第3～23号、第3～24号、第3～25号、第3～26号、第3～27号、第4～28号、第4～29号、第4～30号、第4～31号、第4～32号、第5～28号、第5～29号、第5～30号、第5～31号、第5～32号、第6～28号、第6～29号、第6～30号、第6～31号、第6～32号、第7～28号、第7～29号、第7～30号、第7～31号、第7～32号、第8～28号、第8～29号、第8～30号、第8～31号或第8～32号的核苷酸构成的序列互补的碱基序列，分别相同于，由序列号6的第158～179号、第157～179号、第156～179号、第155～179号、第154～179号、第158～178号、第157～178号、第156～178号、第155～178号、第154～178号、第158～177号、第157～177号、第156～177号、第155～177号、第154～177号、第158～176号、第157～176号、第156～176号、第155～176号、第154～176号、第158～175号、第157～175号、第156～175号、第155～175号、第154～175号、第153～178号、第152～178号、第151～178号、第150～178号、第153～177号、第152～177号、第151～177号、第150～177号、第153～176号、第152～176号、第151～176号、第150～176号、第153～175号、第152～175号、第151～175号、第150～175号、第154～174号、第153～174号、第152～174号、第151～174号、第150～174号、第149～173号、第148～173号、第147～173号、第146～173号、第147～173号、第149～172号、第148～172号、第147～172号、第146～172号、第145～172号、第149～171号、第148～171号、第147～171号、第146～171号、第145～171号、第149～170号、第148～170号、第147～170号、第146～170号、第145～170号、第149～169号、第148～169号、第147～169号、第146～169号或第145～169号的核苷酸构成的序列。

[0114] 与由外显子50的5’末端开始的第1～109号的核苷酸以及内含子50的5’末端开始的第1～20号的核苷酸构成的碱基序列互补的序列示于序列号7。此处，由从内含子50的5’末端开始的第1～20号的核苷酸构成的序列(由序列号3的第110～129号的核苷酸构成的序列)是，表示存在于外显子50和外显子51之间的内含子50的5’末端的最上流的20个核苷酸构成的序列。即，外显子50的碱基序列是，由序列号3的第1～109号的核苷酸构成的序列；与外显子50的碱基序列互补的序列是，由序列号7的第21～129号的核苷酸构成的序列。

[0115] 此处，与由人抗肌萎缩蛋白基因的第50号的外显子的5’末端开始的第105～125号、第105～126号、第105～127号、第105～128号、第105～129号、第106～125号、第106～126号、第106～127号、第106～128号、第106～129号、第107～125号、第107～126号、第107～127号、第107～128号、第107～129号、第108～125号、第108～126号、第108～127号、第108～128号、第108～129号、第109～125号、第109～126号、第109～127号、第109～128号或第109～129号的核苷酸构成的碱基序列互补的序列，分别相同于，由序列号7的第5～25号、第4～25号、第3～25号、第2～25号、第1～25号、第5～24号、第4～24号、第3～24号、第2～24号、第1～24号、第5～23号、第4～23号、第3～23号、第2～23号、第1～23号、第5～22号、第4～22号、第3～22号、第2～22号、第1～22号、第5～21号、第4～21号、第3～21号、第2～21号或第1～21号的核苷酸构成的序列。

[0116] 与从外显子44的5’末端开始的第1～148号的核苷酸的序列互补的序列示于序列号8。

[0117] 此处，与由人抗肌萎缩蛋白基因的第44号的外显子的5’末端开始的第9～30号、第9～31号、第9～32号、第9～33号、第9～34号、第10～30号、第10～31号、第10～32号、第10～33号、第10～34号、第11～30号、第11～31号、第11～32号、第11～33号、第11～34号、第12～30号、第12～31号、第12～32号、第12～33号、第12～34号、第13～30号、第13～31号、第13～32号、第13～33号、第13～34号、第24～45号、第24～46号、第24～47号、第24～48号、第24～49号、第25～45号、第25～46号、第25～47号、第25～48号、第25～49号、第26～45号、第26～46号、第26～47号、第26～48号、第26～49号、第27～45号、第27～46号、第27～47号、第27～48号、第27～49号、第28～45号、第28～46号、第28～47号、第28～48号、第28～49号、第29～45号、第29～46号、第29～47号、第29～48号或第29～49号的核苷酸构成的碱基序列互补的序列，分别相同于，由序列号8的第119～140号、第118～140号、第117～140号、第116～140号、第115～140号、第119～139号、第118～139号、第117～139号、第116～139号、第115～139号、第119～138号、第118～138号、第117～138号、第116～138号、第115～138号、第119～137号、第118～137号、第117～137号、第116～137号、第115～137号、第119～136号、第118～136号、第117～136号、第116～136号、第115～136号、第104～125号、第103～125号、第102～125号、第101～125号、第100～125号、第104～124号、第103～124号、第102～124号、第101～124号、第100～124号、第104～123号、第103～123号、第102～123号、第101～123号、第100～123号、第104～122号、第103～122号、第102～122号、第101～122号、第100～122号、第104～121号、第103～121号、第102～121号、第101～121号、第100～121号、第104～120号、第103～120号、第102～120号、第101～120号或第100～120号的核苷酸构成的序列。

[0118] 如下表所示，可总结外显子55、45、50以及44的碱基序列和序列号5～8的对应关系。

[0119] 表1

[0120]

外显子 55 的 5’末端开始的核苷酸位置	序列号 5 中的对应核苷酸位置
第-2～19 号	第 172～192 号
第-2～20 号	第 171～192 号
第-2～21 号	第 170～192 号
第-2～22 号	第 169～192 号
第-2～23 号	第 168～192 号
第-1～19 号	第 172～191 号
第-1～20 号	第 171～191 号
第-1～21 号	第 170～191 号
第-1～22 号	第 169～191 号
第-1～23 号	第 168～191 号
第 1～19 号	第 172～190 号
第 1～20 号	第 171～190 号

[0121]

第 1～21 号	第 170～190 号
第 1～22 号	第 169～190 号
第 1～23 号	第 168～190 号
第 2～19 号	第 172～189 号
第 2～20 号	第 171～189 号
第 2～21 号	第 170～189 号
第 2～22 号	第 169～189 号
第 2～23 号	第 168～189 号
第 3～19 号	第 172～188 号
第 3～20 号	第 171～188 号
第 3～21 号	第 170～188 号
第 3～22 号	第 169～188 号
第 3～23 号	第 168～188 号
第 9～29 号	第 162～182 号
第 9～30 号	第 161～182 号
第 9～31 号	第 160～182 号
第 9～32 号	第 159～182 号
第 9～33 号	第 158～182 号
第 10～29 号	第 162～181 号
第 10～30 号	第 161～181 号
第 10～31 号	第 160～181 号
第 10～32 号	第 159～181 号
第 10～33 号	第 158～181 号
第 11～29 号	第 162～180 号
第 11～30 号	第 161～180 号
第 11～31 号	第 160～180 号
第 11～32 号	第 159～180 号
第 11～33 号	第 158～180 号
第 12～29 号	第 162～179 号
第 12～30 号	第 161～179 号
第 12～31 号	第 160～179 号
第 12～32 号	第 159～179 号
第 12～33 号	第 158～179 号
第 13～29 号	第 162～178 号
第 13～30 号	第 161～178 号
第 13～31 号	第 160～178 号
第 13～32 号	第 159～178 号

[0122]

第 13～33 号	第 158～178 号
第 12～34 号	第 157～179 号
第 12～35 号	第 156～179 号
第 12～36 号	第 155～179 号
第 13～34 号	第 157～178 号
第 13～35 号	第 156～178 号
第 13～36 号	第 155～178 号
第 14～32 号	第 159～177 号
第 14～33 号	第 158～177 号
第 14～34 号	第 157～177 号
第 14～35 号	第 156～177 号
第 14～36 号	第 155～177 号
第 15～32 号	第 159～176 号
第 15～33 号	第 158～176 号
第 15～34 号	第 157～176 号
第 15～35 号	第 156～176 号
第 15～36 号	第 155～176 号
第 16～32 号	第 159～175 号
第 16～33 号	第 158～175 号
第 16～34 号	第 157～175 号
第 16～35 号	第 156～175 号
第 16～36 号	第 155～175 号

[0123] 表2

[0124]

外显子 45 的 5’末端开始的核苷酸位置	序列号 6 中的对应核苷酸位置
第-3～19 号	第 158～179 号
第-3～20 号	第 157～179 号
第-3～21 号	第 156～179 号
第-3～22 号	第 155～179 号
第-3～23 号	第 154～179 号
第-2～19 号	第 158～178 号
第-2～20 号	第 157～178 号
第-2～21 号	第 156～178 号
第-2～22 号	第 155～178 号
第-2～23 号	第 154～178 号
第-1～19 号	第 158～177 号

[0125]

第-1～20 号	第 157～177 号
第-1～21 号	第 156～177 号
第-1～22 号	第 155～177 号
第-1～23 号	第 154～177 号
第 1～19 号	第 158～176 号
第 1～20 号	第 157～176 号
第 1～21 号	第 156～176 号
第 1～22 号	第 155～176 号
第 1～23 号	第 154～176 号
第 2～19 号	第 158～175 号
第 2～20 号	第 157～175 号
第 2～21 号	第 156～175 号
第 2～22 号	第 155～175 号
第 2～23 号	第 154～175 号
第-2～24 号	第 153～178 号
第-2～25 号	第 152～178 号
第-2～26 号	第 151～178 号
第-2～27 号	第 150～178 号
第-1～24 号	第 153～177 号
第-1～25 号	第 152～177 号
第-1～26 号	第 151～177 号
第-1～27 号	第 150～177 号
第 1～24 号	第 153～176 号
第 1～25 号	第 152～176 号
第 1～26 号	第 151～176 号
第 1～27 号	第 150～176 号
第 2～24 号	第 153～175 号
第 2～25 号	第 152～175 号
第 2～26 号	第 151～175 号
第 2～27 号	第 150～175 号
第 3～23 号	第 154～174 号
第 3～24 号	第 153～174 号
第 3～25 号	第 152～174 号
第 3～26 号	第 151～174 号
第 3～27 号	第 150～174 号
第 4～28 号	第 149～173 号
第 4～29 号	第 148～173 号

[0126]

第 4～30 号	第 147～173 号
第 4～31 号	第 146～173 号
第 4～32 号	第 147～173 号
第 5～28 号	第 149～172 号
第 5～29 号	第 148～172 号
第 5～30 号	第 147～172 号
第 5～31 号	第 146～172 号
第 5～32 号	第 145～172 号
第 6～28 号	第 149～171 号
第 6～29 号	第 148～171 号
第 6～30 号	第 147～171 号
第 6～31 号	第 146～171 号
第 6～32 号	第 145～171 号
第 7～28 号	第 149～170 号
第 7～29 号	第 148～170 号
第 7～30 号	第 147～170 号
第 7～31 号	第 146～170 号
第 7～32 号	第 145～170 号
第 8～28 号	第 149～169 号
第 8～29 号	第 148～169 号
第 8～30 号	第 147～169 号
第 8～31 号	第 146～169 号
第 8～32 号	第 145～169 号

[0127] 表3

[0128]

外显子 50 的 5’末端开始的核苷酸位置	序列号 7 中的对应核苷酸位置
第 105～125 号	第 5～25 号
第 105～126 号	第 4～25 号
第 105～127 号	第 3～25 号
第 105～128 号	第 2～25 号
第 105～129 号	第 1～25 号
第 106～125 号	第 5～24 号
第 106～126 号	第 4～24 号
第 106～127 号	第 3～24 号
第 106～128 号	第 2～24 号
第 106～129 号	第 1～24 号

[0129]

第 107～125 号	第 5～23 号
第 107～126 号	第 4～23 号
第 107～127 号	第 3～23 号
第 107～128 号	第 2～23 号
第 107～129 号	第 1～23 号
第 108～125 号	第 5～22 号
第 108～126 号	第 4～22 号
第 108～127 号	第 3～22 号
第 108～128 号	第 2～22 号
第 108～129 号	第 1～22 号
第 109～125 号	第 5～21 号
第 109～126 号	第 4～21 号
第 109～127 号	第 3～21 号
第 109～128 号	第 2～21 号
第 109～129 号	第 1～21 号

[0130] 表4

[0131]

外显子 44 的 5’末端开始的核苷酸位置	序列号 8 中的对应核苷酸位置
第 9～30 号	第 119～140 号
第 9～31 号	第 118～140 号
第 9～32 号	第 117～140 号
第 9～33 号	第 116～140 号
第 9～34 号	第 115～140 号
第 10～30 号	第 119～139 号
第 10～31 号	第 118～139 号
第 10～32 号	第 117～139 号
第 10～33 号	第 116～139 号
第 10～34 号	第 115～139 号
第 11～30 号	第 119～138 号
第 11～31 号	第 118～138 号
第 11～32 号	第 117～138 号
第 11～33 号	第 116～138 号
第 11～34 号	第 115～138 号
第 12～30 号	第 119～137 号
第 12～31 号	第 118～137 号
第 12～32 号	第 117～137 号

[0132]

第12～33号	第116～137号
第12～34号	第115～137号
第13～30号	第119～136号
第13～31号	第118～136号
第13～32号	第117～136号
第13～33号	第116～136号
第13～34号	第115～136号
第24～45号	第104～125号
第24～46号	第103～125号
第24～47号	第102～125号
第24～48号	第101～125号
第24～49号	第100～125号
第25～45号	第104～124号
第25～46号	第103～124号
第25～47号	第102～124号
第25～48号	第101～124号
第25～49号	第100～124号
第26～45号	第104～123号
第26～46号	第103～123号
第26～47号	第102～123号
第26～48号	第101～123号
第26～49号	第100～123号
第27～45号	第104～122号
第27～46号	第103～122号
第27～47号	第102～122号
第27～48号	第101～122号
第27～49号	第100～122号
第28～45号	第104～121号
第28～46号	第103～121号
第28～47号	第102～121号
第28～48号	第101～121号
第28～49号	第100～121号
第29～45号	第104～120号
第29～46号	第103～120号
第29～47号	第102～120号
第29～48号	第101～120号
第29～49号	第100～120号

[0133] 本发明的外显子55跳跃寡聚物，优选地，是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第55号

的外显子的5’末端开始的第1～21号、第11～31号或第14～34号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列(例如,由序列号5的第170～190号、第160～180号或第157～177号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列)构成。

[0134] 本发明的外显子45跳跃寡聚物,优选地,是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第45号的外显子的5’末端开始的第-2～19号、第1～21号、第1～25号或第6～30号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列(例如,由序列号6的第158～178号、第156～176号、第152～176号或第147～171号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列)构成。

[0135] 本发明的外显子50跳跃寡聚物,优选地,是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第50号的外显子的5’末端开始的第106～126号或第107～127号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列(例如,由序列号7的第4～24号或第3～23号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列)构成。

[0136] 本发明的外显子44跳跃寡聚物,优选地,是由与从人抗肌萎缩蛋白基因的第44号的外显子的5’末端开始的第11～32号、第25～45号、第26～46号、第26～47号或第27～47号的核苷酸构成的序列中的任一者互补的碱基序列(例如,由序列号8的第117～138号、第104～124号、第103～123号、第102～123号或第102～122号的核苷酸构成的序列中的任一者的碱基序列)构成。

[0137] 所谓“能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第55号外显子跳跃”,是指通过在人抗肌萎缩蛋白基因的转录物(例如,pre－mRNA)的与外显子55相当的部位上结合本发明的寡聚物,由此在该转录物接受剪接时,例如,在外显子54缺失的DMD患者的情形,相当于外显子53的3’末端的碱基序列的3’侧上连接与外显子56的5’末端相当的碱基序列,形成不发生密码子的移码的成熟mRNA。

[0138] 同样地,所谓“能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子跳跃”,是指通过在人抗肌萎缩蛋白基因的转录物(例如,pre－mRNA)的与外显子45相当的部位上结合本发明的寡聚物,由此在该转录物接受剪接时,例如,在外显子44缺失的DMD患者的情形,相当于外显子43的3’末端的碱基序列的3’侧上连接与外显子46的5’末端相当的碱基序列,形成不发生密码子的移码的成熟mRNA。

[0139] 另外,所谓“能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第50号外显子跳跃”,是指通过在人抗肌萎缩蛋白基因的转录物(例如,pre－mRNA)的与外显子50相当的部位上结合本发明的寡聚物,由此在该转录物接受剪接时,例如,在外显子51缺失的DMD患者的情形,相当于外显子49的3’末端的碱基序列的3’侧上连接与外显子52的5’末端相当的碱基序列,形成不发生密码子的移码的成熟mRNA。

[0140] 另外,同样地,所谓“能够使人抗肌萎缩蛋白基因的第44号外显子跳跃”,是指通过在人抗肌萎缩蛋白基因的转录物(例如,pre－mRNA)的与外显子44相当的部位上结合本发明的寡聚物,由此在该转录物接受剪接时,例如,在外显子45缺失的DMD患者的情形,相当于外显子43的3’末端的碱基序列的3’侧上连接与外显子46的5’末端相当的碱基序列,形成不发生密码子的移码的成熟mRNA。

[0141] 因此,本发明的寡聚物,只要能够使人抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50以及44发生跳跃,也可以相对于各个靶序列(外显子55、45、50以及44)不具有100％互补的碱基序列。例如,在本发明的寡聚物中,相对于靶序列,也可以含有1～3个、1～2个或1个的非互

补的碱基。

[0142] 此处，前述“结合”，是指混合本发明的寡聚物与人抗肌萎缩蛋白基因的转录物的情形，在生理条件下两者发生杂交形成双链。上述“生理条件下”，是指调节成与生物体内类似的pH、盐组成、温度的条件。例如，可举出25～40℃、优选37℃、pH5～8、优选pH7.4，氯化钠浓度为150mM的条件。

[0143] 人抗肌萎缩蛋白基因的外显子55、45、50以及44的跳跃是否发生，能够通过在抗肌萎缩蛋白表达细胞(例如，人横纹肌肉瘤细胞)中导入本发明的寡聚物，从前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55、45、50以及44的周边区域进行RT－PCR扩增，对于该PCR扩增产物进行巢式PCR(Nested PCR)或序列解析，来进行确认。

[0144] 跳跃效率，能够通过从被检细胞中回收人抗肌萎缩蛋白基因的mRNA，在该mRNA中，测定外显子55、45、50以及44发生跳跃的条带的多核苷酸量“A”、和外显子55、45、50以及44没有发生跳跃的条带的多核苷酸量“B”，基于这些“A”及“B”的测定值，根据下式进行计算。

[0145] 跳跃效率(%)＝A/(A+B)×100

[0146] 作为本发明的寡聚物，例如，可举出具有18～28碱基的长度的寡核苷酸、吗啉寡聚物、或肽核酸(Peptide Nucleic Acid:PNA)寡聚物。优选15～30碱基或20～25碱基的长度，优选吗啉寡聚物。

[0147] 前述寡核苷酸(以下，称为“本发明的寡核苷酸”)，是以核苷酸作为构成单元的本发明的寡聚物，该核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或修饰核苷酸中的任一者。

[0148] 作为修饰核苷酸，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被修饰的核苷酸。

[0149] 作为核酸碱基，例如，可举出腺嘌呤、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。作为该修饰碱基，例如，可举出假尿嘧啶、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－硫代尿嘧啶、4－硫代尿嘧啶、4－乙酰基胞嘧啶、5－(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5’－羧基甲基氨基甲基－2－硫代尿嘧啶、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－硫代尿嘧啶、5－甲基氨基甲基尿嘧啶、5－甲基羰基甲基尿嘧啶、5－甲基氧基尿嘧啶、5－甲基－2－硫代尿嘧啶、2－甲基硫代－N6－异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶－5－氧基乙酸、2－硫代胞嘧啶、嘌呤、2,6－二氨基嘌呤、2－氨基嘌呤、异鸟嘌呤、吲哚、咪唑、黄嘌呤等，但是并不限定于此。

[0150] 作为糖部分的修饰，例如，可举出核糖的2’位的修饰及糖的其他部分的修饰。作为核糖的2’位的修饰，例如，可举出将核糖的2’位的－OH基取代为OR、R、R’OR、SH、SR、NH_2、NHR、NR_2、N_3、CN、F、Cl、Br、I的修饰。此处，R表示烷基或芳基。R’表示亚烷基。

[0151] 作为糖的其他部分的修饰，例如，可举出将核糖或脱氧核糖的4’位的O取代为S的修饰、将糖的2’位和4’位交联的修饰，例如，可举出LNA(锁核酸:Locked Nucleic Acid)或ENA(2’－O,4’－C－乙烯交联核酸:2’－O,4’－C－Ethylene－bridged nucleic Acids)等，但是并不限定于此。

[0152] 作为磷酸键部分的修饰，例如，可举出将磷酸二酯键取代为硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基膦酸酯键、酰胺磷酸酯键、硼烷磷酸酯键(Enya et al:Bioorganic& Medicinal Chemistry,2008,18,9154－9160)的修饰(例如，参照日本特许再公表公报第2006/129594号及第2006/038608号)。

[0153] 作为烷基，优选为直链状或者是支链状的碳原子数1～6的烷基。具体地，例如，可举出甲基、乙基、n－丙基、异丙基、n－丁基、异丁基、仲－丁基、叔－丁基、n－戊基、异戊基、新戊基、叔－戊基、n－己基、异己基。该烷基也可被取代，作为该取代基，例如，可举出卤素、烷氧基、氰基、硝基，这些可被1～3个取代。

[0154] 作为环烷基，优选碳原子数5～12的环烷基。具体地，例如，可举出环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二(烷)基。

[0155] 作为卤素，可举出氟、氯、溴、碘。

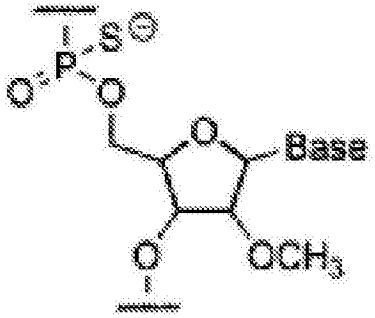
[0156] 作为烷氧基，可举出直链状或者是支链状的碳原子数1～6的烷氧基、例如，甲氧基、乙氧基、n－丙氧基、异丙氧基、n－丁氧基、异丁氧基、仲－丁氧基、叔－丁氧基、n－戊基氧基、异戊基氧基、n－己基氧基、异己基氧基等。特别是，优选碳原子数1～3的烷氧基。

[0157] 作为芳基，优选碳原子数6～10的芳基。具体地，例如，可举出苯基、α－萘基、β－萘基。特别优选苯基。该芳基可被取代，作为该取代基，例如，可举出烷基、卤素、烷氧基、氰基、硝基，这些可被1～3个取代。

[0158] 作为亚烷基，优选直链状或者是支链状的碳原子数1～6的亚烷基。具体地，例如，可举出亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、2－(乙基)亚丙基、1－(甲基)亚丁基。

[0159] 作为酰基，可举出直链状或支链状的烷酰基、或芳酰基。作为烷酰基，例如，可举出甲酰基、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，例如，可举出苯甲酰基、甲基苯甲酰基、萘甲酰基。该芳酰基，可在能够取代的位置进行取代，也可用烷基取代。

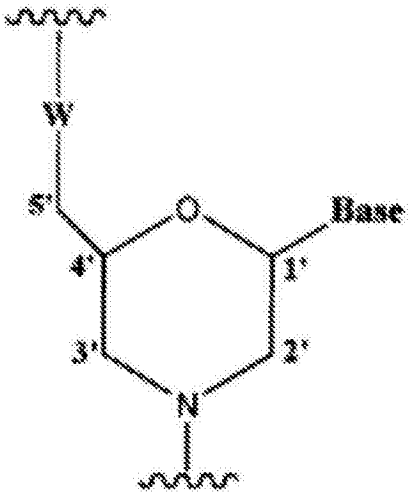
[0160] 本发明的寡核苷酸，优选地，是以在核糖的2'位的－OH基被甲氧基取代且磷酸键部分是硫代磷酸酯键的下述通式表示的基团作为构成单元的本发明的寡聚物。

[0161] 

[0162] (式中，Base表示核酸碱基。)

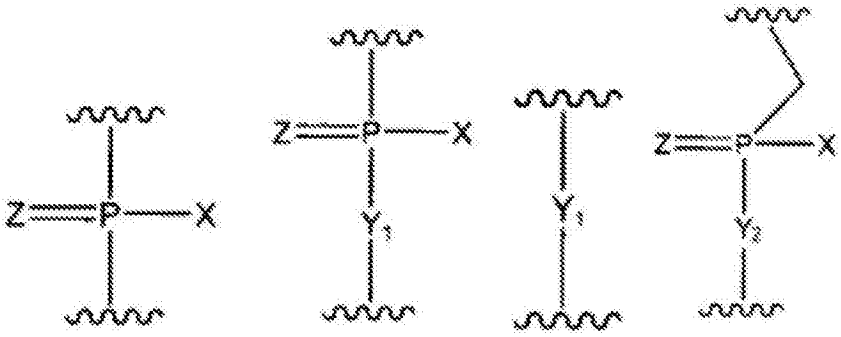
[0163] 本发明的寡核苷酸，能够使用各种自动合成装置(例如，核酸合成仪：AKTA Oligopilot pluS 10/100(GE Healthcare公司制))进行容易地合成，或者，也可委托第三方机构(例如，Promega公司或Takara公司)等进行制作。

[0164] 本发明的吗啉寡聚物，是以下述通式表示的基团作为构成单元的本发明的寡聚物。

[0165] 

[0166] (式中，Base与前述含义相同；

[0167] W表示用下述的任意式表示的基团。

[0168] 

[0169] (式中，X表示－CH_2R^1、－O－CH_2R^1、－S－CH_2R^1、－NR^2R^3或F；

[0170] R^1表示H、烷基；

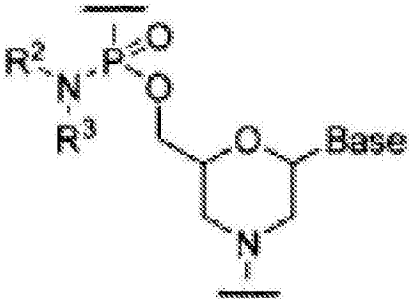
[0171] R^2及R^3相同或不同，表示H、烷基、环烷基、或芳基；

[0172] Y_1表示O、S、CH_2或NR^1；

[0173] Y_2表示O、S或NR^1；

[0174] Z表示O或S。))

[0175] 吗啉寡聚物，优选地，是以下述式表示的基团作为构成单元的寡聚物(二酰胺磷酸酯吗啉寡聚物(以下，称为“PMO”))。

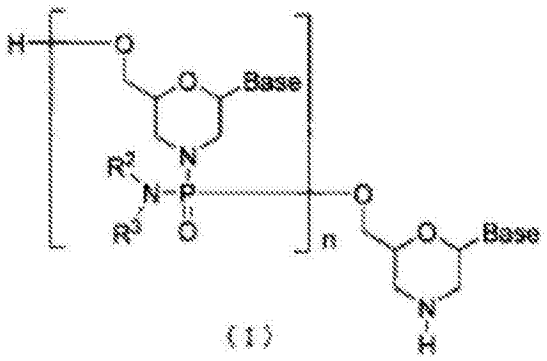
[0176] 

[0177] (式中，Base、R^2、R^3与前述含义相同。)

[0178] 吗啉寡聚物，例如，可根据国际公开公报第1991/009033号、或国际公开公报第2009/064471号进行制造。特别地，PMO可根据国际公开公报第2009/064471号中记载的方法进行制造，或根据以下所示的方法进行制造。

[0179] [PMO的制造方法]

[0180] 作为PMO的一个方案，例如，可举出下面的通式(I)所表示的化合物(以下，称为PMO(I))。

[0181] 

(I)

[0182] [式中，各Base、R^2、R^3与前述含义相同；

[0183] n是1～99的范围内的任意的整数，优选地，是18～28的范围内的任意的整数。]

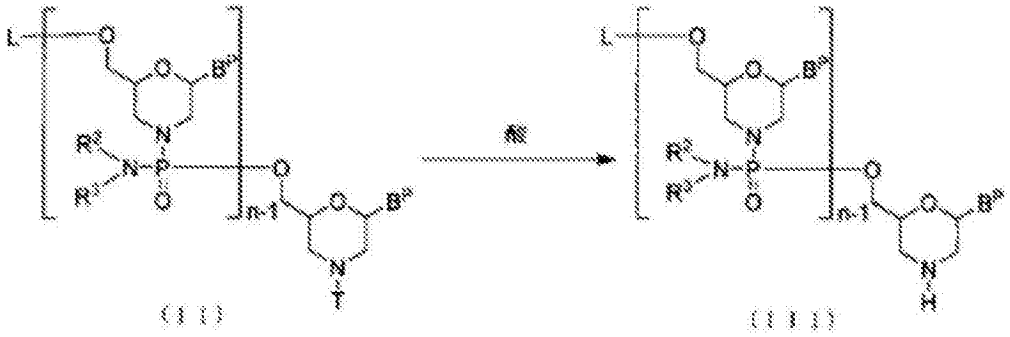
[0184] PMO(I)可根据公知的方法进行制造，例如，可通过实施下述工序的操作进行制造。

[0185] 下述工序中使用的化合物及试剂，只要是PMO的制造中通常使用的化合物及试剂即可，没有特别的限定。

[0186] 另外，下述的所有的工序，能够通过液相法或固相法(手工操作或使用市售的固相自动合成机)来实施。通过固相法来制造PMO时，从操作顺序的简便化及合成的正确性方面考虑，优选使用自动合成机的方法

[0187] (1)工序A：

[0188] 通过使下述通式(II)表示的化合物(以下，称为化合物(II))与酸作用，制造下述通式(III)表示的化合物(以下，称为化合物(III))的工序。

[0189] 

(II) (III)

[0190] [式中，n、R^2、R^3与上述含义相同；

[0191] 各B^P相互独立表示可以被保护的核酸碱基；

[0192] T表示三苯甲基、单甲氧基三苯甲基、或二甲氧基三苯甲基；

[0193] L表示氢、酰基、或下述通式(IV)表示的基团(以下，称为基团(IV))。]

[0194] 

(IV)

[0195] 作为B^P的“核酸碱基”，可举出与Base相同的“核酸碱基”。但是，B^P的核酸碱基的氨基或羟基可被保护。

[0196] 作为该氨基的保护基，只要是作为核酸的保护基使用的保护基即可，没有特别限定，具体地，例如，可举出苯甲酰基、4－甲氧基苯甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰

基、苯基乙酰基、苯氧基乙酰基、4－叔－丁基苯氧基乙酰基、4－异丙基苯氧基乙酰基、(二甲基氨基)亚甲基。作为羟基的保护基，例如，可举出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、可在可取代的任意的位置上被1～5个吸电子基取代的苯基、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，参照国际公开公报第2009/064471号公报)。

[0197] 作为“固相载体”，只要是核酸的固相反应中可使用的载体即可，没有特别的限定，例如，优选下述载体：(i)几乎不溶于吗啉核酸衍生物的合成中可使用的试剂(例如，二氯甲烷、乙腈、四氮唑、N－甲基咪唑、吡啶、乙酸酐、二甲基吡啶、三氟乙酸)、(ii)相对于吗啉核酸衍生物的合成中可使用的试剂在化学上是稳定的，(iii)能够化学修饰，(iv)能够进行所需要的吗啉核酸衍生物的装填、(v)具有能够耐受处理中的高压的充分的强度、(vi)具有一定的粒径范围和分布。具体地，可举出膨润性聚苯乙烯(例如，氨基甲基聚苯乙烯树脂1％二苄基苯交联(200～400网目)(2.4～3.0mmol/g)(东京化成公司制)、氨甲基聚苯乙烯树脂(Amino methylated Polystyrene Resin)·HCl[二苄基苯1％，100～200网目](ペプチド研究所公司制))、非膨润性聚苯乙烯(例如，Primer Support(引物支持)(GE Healthcare公司制))、PEG链结合型聚苯乙烯(例如，NH_2－PEG树脂(渡边化学公司制)、Tentagel(商标名称)树脂)、定孔玻璃(controlled poreglass;CPG)(例如，CPG公司制)、草酰基化－定孔玻璃(例如，参照Alul等，Nucleic Acids Research，Vol.19，1527(1991))、Tentagel(商标名称)支撑体－氨基聚乙二醇衍生物支撑体(例如，参照Wright等，Tetrahedron Letters，Vol.34，3373(1993))、POROS(商标名称)－聚苯乙烯/二乙烯苯的共聚物。

[0198] 作为“连接子”，可使用通常用于连接核酸或吗啉核酸衍生物的公知的连接子，例如，可举出3－氨基丙基、琥珀酰基、2，2’－二乙醇基磺酰基、长链烷基氨基(LCAA)。

[0199] 本工序能够通过使化合物(II)与酸作用来实施。

[0200] 作为本工序中可使用的“酸”，例如，可举出三氟乙酸、二氯乙酸或三氯乙酸。酸的用量，例如，相对于化合物(II)1摩尔，其为0.1摩尔当量～1000摩尔当量的范围内是合适的，优选地是1摩尔当量～100摩尔当量的范围内。

[0201] 另外，与前述酸一起可使用有机胺。作为有机胺，没有特别的限定，例如，可举出三乙基胺。有机胺的用量，例如，相对于酸1摩尔，其为0.01摩尔当量～10摩尔当量的范围内是合适的，优选地，是0.1摩尔当量～2摩尔当量的范围内。

[0202] 本工序中，在使用酸和有机胺的盐或混合物的情形时，例如，可举出三氟乙酸和三乙基胺的盐或混合物，更具体地，可举出相对于三氟乙酸2当量混合三乙基胺1当量的盐或混合物。

[0203] 本工序中可使用的酸，可使用适当的溶剂进行稀释使其成为0.1％～30％的范围内的浓度来进行使用。作为溶剂，只要不参与反应即可，没有特别限定，例如，可举出二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或这些的混合物。

[0204] 上述反应中的反应温度，例如，优选10℃～50℃的范围内，更优选地，是20℃～40℃的范围内，更优选地，25℃～35℃的范围内。

[0205] 反应时间，根据使用的酸的种类、反应温度的不同而不同，通常0.1分钟～24小时

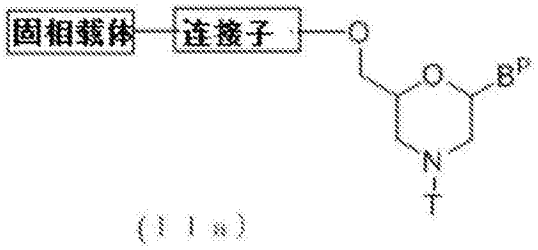
的范围内是适当的。优选地，是1分钟～5小时的范围内。

[0206] 另外，本工序结束后，根据需要，也可在体系中添加用于中和存在的酸的碱基。作为“碱基”，没有特别限定，例如，可举出二异丙基胺。碱基，可使用适当的溶剂进行稀释使其成为0.1％(v/v)～30％(v/v)的范围内的浓度来进行使用。

[0207] 作为本工序中使用的溶剂，只要不参与反应即可，没有特别的限定，可举出二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或这些的混合物。反应温度，例如，优选10℃～50℃的范围内，更优选地，是20℃～40℃的范围内，更优选地，25℃～35℃的范围内。

[0208] 反应时间，根据使用的碱基的种类、反应温度而不同，但是，通常0.1分钟～24小时的范围内是适当的，优选地，1分钟～5小时的范围内。

[0209] 此外，在化合物(II)中，n＝1、L是基团(IV)的用下述通式(IIa)表示的化合物(以下，称为化合物(IIa))，可根据以下的方法进行制造。

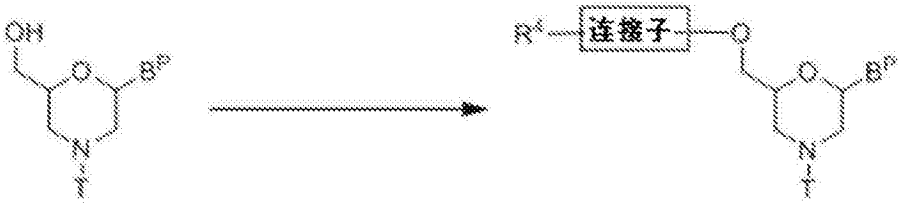
[0210] 

(IIa)

[0211] [式中，B^P、T、连接子、固相载体与上述含义相同。]

[0212] 工序1：

[0213] 通过用下述通式(V)表示的化合物与酰基化剂作用，制造下述通式(VI)表示的化合物(以下，称为化合物(VI))的工序。

[0214] 

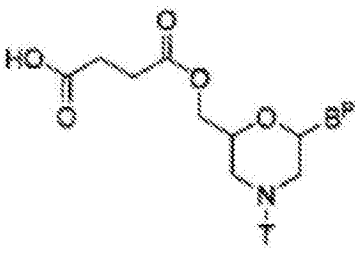
(V) (VI)

[0215] [式中，B^P、T、连接子与上述含义相同；

[0216] R^4表示羟基、卤素、或、氨基。]

[0217] 本工序，可将化合物(V)作为起始原料，通过公知的连接子的导入反应来实施。

[0218] 特别地，用下述通式(VIa)表示的化合物，可通过使用化合物(V)与琥珀酸酐实施作为酯化反应已知的方法来进行制造。

[0219] 

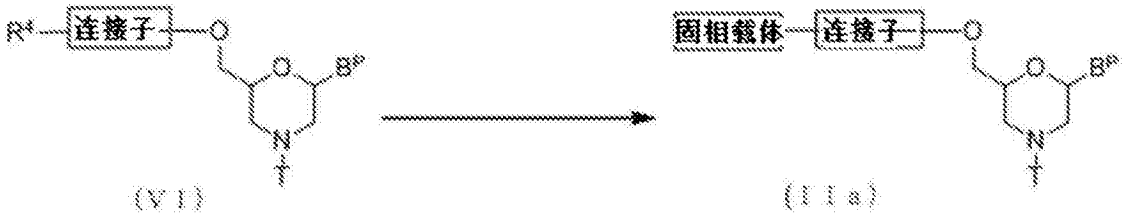
(VIa)

[0220] [式中，B^P、T与上述含义相同。]

[0221] 工序2：

[0222] 通过使化合物(VI)与缩合剂等作用，并且使其与固相载体反应，制造化合物(IIa)的工序。

[0223]



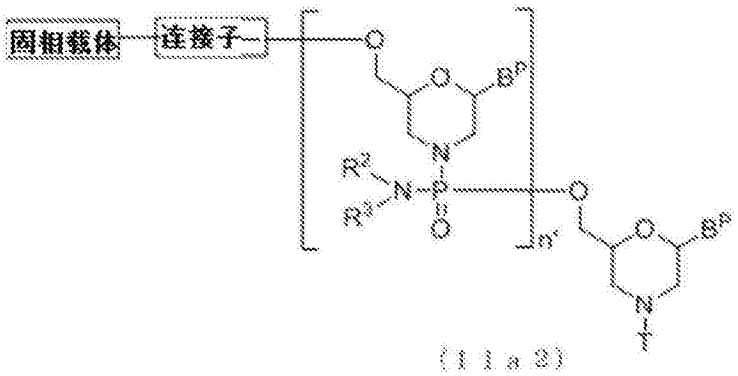
(VI) (IIa)

[0224] [式中，B^P、R^4、T、连接子、固相载体与上述含义相同。]

[0225] 本工序，可使用化合物(VI)和固相载体通过作为缩合反应已知的方法来进行制造。

[0226] 在化合物(II)中，n＝2～99、L是基团(IV)的下述通式(IIa2)表示的化合物，可将化合物(IIa)作为起始原料，通过反复实施规定次数的本说明书中记载的PMO的制造方法中的工序A及工序B来制造。

[0227]



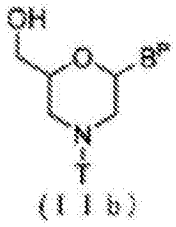
(IIa2)

[0228] [式中，B^P、R^2、R^3、T、连接子、固相载体与上述含义相同；

[0229] n'表示1～98。]

[0230] 另外，在化合物(II)中，n＝1、L是氢的下述通式(IIb)表示的化合物，例如，可通过国际公开公报第1991/009033号中记载的方法来制造。

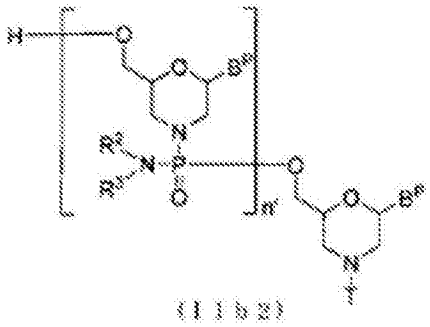
[0231]



(IIb)

[0232] [式中，B^P、T与上述含义相同。]

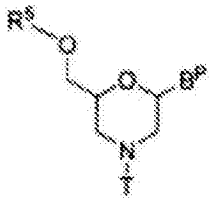
[0233] 在化合物(II)中，n＝2～99、L是氢的下述通式(IIb2)表示的化合物，可将化合物(IIb)作为起始原料，通过反复实施规定次数的本说明书中记载的PMO的制造方法中的工序A及工序B来制造。

[0234] 

(IIb2)

[0235] [式中，B^P、n'、R^2、R^3、T与上述含义相同。]

[0236] 另外，在化合物(II)中，n＝1、L是酰基的下述通式(IIc)表示的化合物，可通过相对于化合物(IIb)实施作为酰基化反应已知的方法来制造。

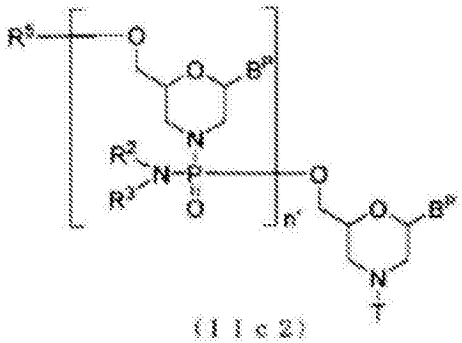
[0237] 

(IIc)

[0238] [式中，B^P、T与上述含义相同；

[0239] R^5表示酰基。]

[0240] 在化合物(II)中，n＝2～99、L是酰基的下述通式(IIc2)表示的化合物，可将化合物(IIc)作为起始原料，通过反复实施规定次数的本说明书中记载的PMO的制造方法中的工序A及工序B来制造。

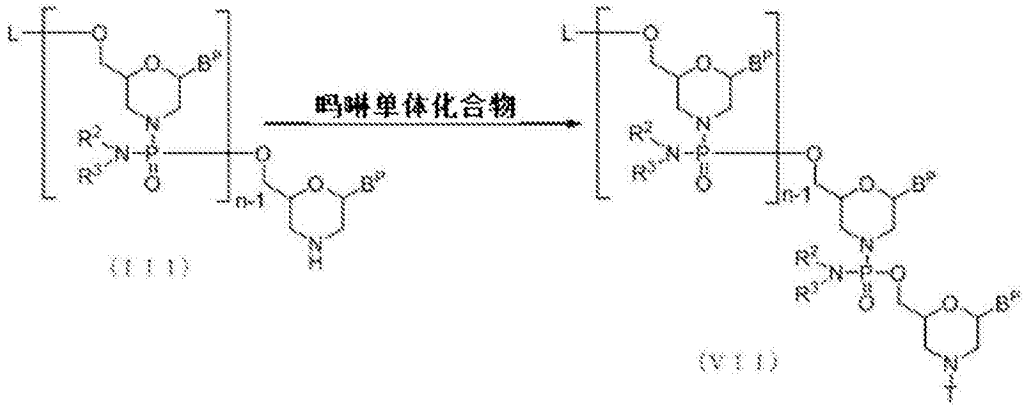
[0241] 

(IIc2)

[0242] [式中，B^P、N'、R^2、R^3、R^5、T与上述含义相同。]

[0243] (2)工序B：

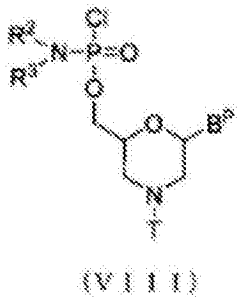
[0244] 通过化合物(III)在碱基存在下与吗啉单体化合物作用，制造用下述通式(VII)表示的化合物(以下，称为化合物(VII))的工序。

[0245] 

[0246] [式中，各B^P、L、N、R^2、R^3、T与上述含义相同。]

[0247] 本工序可通过使化合物(III)在碱基存在下与吗啉单体化合物作用来实施。

[0248] 作为吗啉单体化合物，例如，可举出下述通式(VIII)表示的化合物。

[0249] 

[0250] [式中，B^P、R^2、R^3、T与上述含义相同。]

[0251] 作为本工序中可使用的“碱基”，例如，可举出二异丙基胺、三乙基胺、或、N－乙基吗啉。作为碱基的用量，例如，相对于化合物(III)1摩尔，其为1摩尔当量～1000摩尔当量的范围内是适当的，优选10摩尔当量～100摩尔当量的范围内。

[0252] 本工序中可使用的的吗啉单体化合物及碱基，可使用适当的溶剂稀释至0.1％～30％的浓度来进行使用。作为溶剂，只要不参与反应即可，没有特别的限定，例如，可举出N,N－二甲基咪唑烷酮、N－甲基哌啶酮、DMF、二氯甲烷、乙腈、四氢呋喃、或这些的混合物。

[0253] 反应温度，例如，优选在0℃～100℃的范围内，更优选地，是10℃～50℃的范围内。

[0254] 反应时间，根据使用的碱基的种类、反应温度的不同而不同，但是通常1分钟～48小时的范围内是合适的，优选地，是30分钟～24小时的范围内。

[0255] 进一步地，本工序结束后，根据需要，可添加酰基化剂。作为“酰基化剂”，例如，可举出乙酸酐、乙酰氯、苯氧基乙酸酐。酰基化剂，例如，可通过使用适当的溶剂稀释至0.1％～30％的范围内的浓度来进行使用。作为溶剂，只要不参与反应即可，没有特别的限定，例如，可举出二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或这些的混合物。

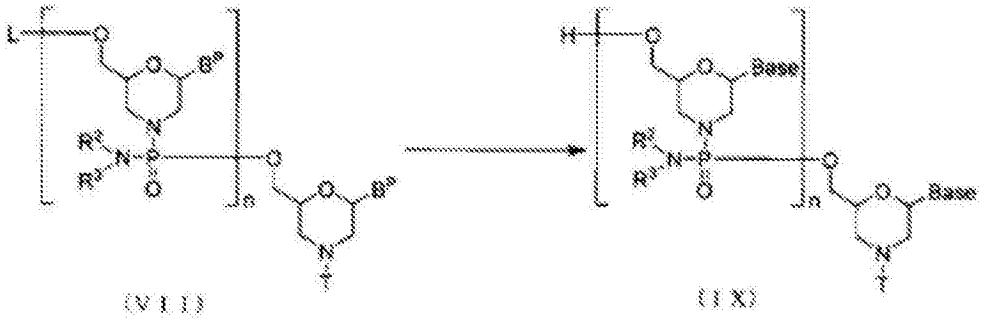
[0256] 另外，根据需要，可与酰基化剂一起使用，例如，吡啶、二甲基吡啶、紫堇定、三乙基胺、二异丙基乙基胺、N－乙基吗啉等的碱基。作为酰基化剂的用量，优选是0.1摩尔当量～10000摩尔当量的范围内，更优选是1摩尔当量～1000摩尔当量的范围内。作为碱基的用量，例如，相对于酰基化剂1摩尔，其为0.1摩尔当量～100摩尔当量的范围内是合适的，优选1摩尔当量～10摩尔当量的范围内。

[0257] 本反应的反应温度，优选是10℃～50℃的范围内，更优选地，10℃～50℃的范围内是优选的，更优选地，是20℃～40℃的范围内，特别优选地，是25℃～35℃的范围内。反应时

间，例如，根据使用的酰基化剂的种类、反应温度的不同而不同，通常0.1分钟～24小时的范围内是适当的，优选地，是1分钟至5小时的范围内。

[0258] (3)工序C：

[0259] 在工序B中制造的化合物(VII)中，使用脱保护剂脱离保护基，制造通式(IX)表示的化合物的工序。

[0260] 

[0261] [式中，Base、B^P、L、n、R^2、R^3、T与上述含义相同。]

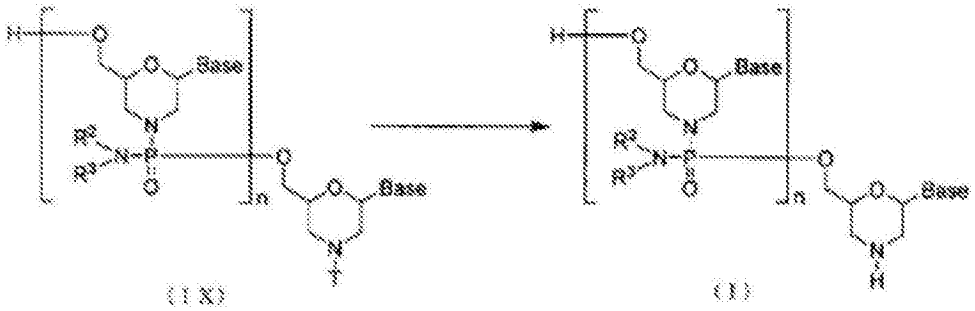
[0262] 本工序可通过使化合物(VII)与脱保护剂作用来实施。

[0263] 作为“脱保护剂”，例如，可举出浓氨水、甲基胺。本工序中可使用的“脱保护剂”，例如，也可使用水、甲醇、乙醇、异丙基醇、乙腈、四氢呋喃、DMF、N,N－二甲基咪唑烷酮、N－甲基哌啶酮或这些的混合溶剂进行稀释后使用。其中，优选乙醇。作为脱保护剂的用量，例如，相对于化合物(VII)1摩尔，例如，其为1摩尔当量～100000摩尔当量的范围内是适当的，优选10摩尔当量～1000摩尔当量的范围内。

[0264] 反应温度，例如，15℃～75℃的范围内是适当的，优选40℃～70℃的范围内，更优选50℃～60℃的范围内。脱保护反应时间，根据化合物(VII)的种类、反应温度等的不同而不同，但是10分钟～30小时的范围内是适当的，优选30分钟～24小时的范围内、更优选5小时～20小时的范围内。

[0265] (4)工序D：

[0266] 通过在工序C中制造的化合物(IX)与酸作用，制造PMO(I)的工序。

[0267] 

[0268] [式中，Base、N、R^2、R^3、T与上述含义相同。]

[0269] 本工序可通过在化合物(IX)上添加酸来实施。

[0270] 作为在本工序中可使用的“酸”，例如，可举出三氯乙酸、二氯乙酸、乙酸、磷酸及盐酸等。作为酸的用量，例如，使溶液的pH在0.1～4.0的范围内来使用是适当的，更优选使成为1.0～3.0的范围内来使用。作为溶剂，只要不参与反应即可，没有特别的限定，例如，可举出乙腈、水、或这些的混合溶剂。

[0271] 反应温度，优选10℃～50℃的范围内，更优选地，是20℃～40℃的范围内，特别优

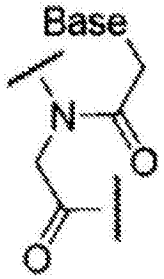
选地，是25℃～35℃的范围内。脱保护反应时间，根据化合物(IX)的种类、反应温度等的不同而不同，0.1分钟～5小时的范围内是适当的，优选1分钟～1小时的范围内，更优选1分钟～30分钟的范围内。

[0272] PMO(I)，可从本工序获得的反应混合物通过通常的分离精制方法、例如，单独或组合使用萃取、浓缩、中和、过滤、离心分离、重结晶、C_8至C_{18}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、高速液相色谱、透析、超滤等的方法来获得，能够分离精制所希望的PMO(I)(例如，参照国际公开公报WO1991/09033)。

[0273] 使用反相色谱精制PMO(I)的情形时，作为溶出溶剂，例如，可使用20mM的三乙基胺/乙酸缓冲液和乙腈的混合溶液。

[0274] 另外，在使用离子交换色谱精制PMO(I)的情形时，例如，可使用1M的食盐水和10mM的氢氧化钠水溶液的混合溶液。

[0275] 肽核酸是以下述通式表示的基团作为构成单元的本发明的寡聚物。

[0276] 

[0277] (式中，Base与上述含义相同。)

[0278] 肽核酸，例如，可按照以下的文献进行制造。

[0279] 1)P.E.Nielsen,M.Egholm,R.H.Berg,O.Buchardt,Science,254,1497(1991)。

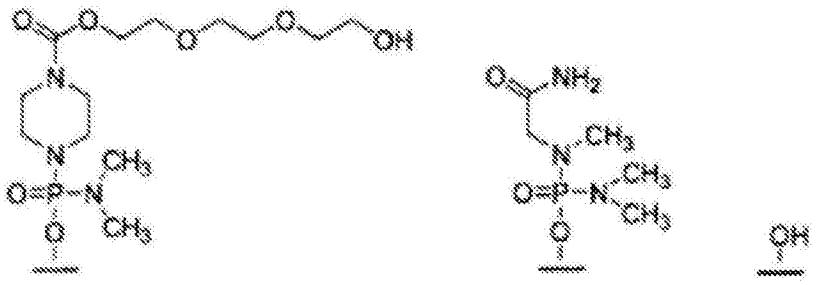
[0280] 2)M.Egholm,O.Buchardt,P.E.Nielsen,R.H.Berg,Jacs.,114,1895(1992)。

[0281] 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)。

[0282] 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)。

[0283] 5)T.Koch,H.F.Hansen,P.andersen,T.Larsen,H.G.Batz,K.Otteson,H.orum,J.Pept.Res.,49,80(1997)。

[0284] 另外，本发明的寡聚物，5'末端可以是下述化学式(1)～(3)中的任意基团。优选是(3)－OH。

[0285] 

(1) (2) (3)

[0286] 以下，上述(1)、(2)及(3)表示的基团分别称为“基团(1)”、“基团(2)”及“基团(3)”。

[0287] 2.医药组合物

[0288] 本发明的寡聚物，与以往技术的反义寡聚物相比，能够高效率使外显子55、45、50以及44发生跳跃。因此，通过将含有本发明的寡聚物的医药组合物施予DMD患者，应能够高效地缓和肌营养不良的症状。例如，使用含有本发明的寡聚物的医药组合物的情形，与以往技术的寡聚物相比，即使少量的施予量，也能够得到同程度的治疗效果，因此，能够减轻副作用、并且是经济的。

[0289] 因此，作为另外的实施方式，提供一种以本发明的寡聚物、该寡聚物药学上允许的盐或水和物作为有效成分的肌营养不良治疗用医药组合物(以下，称为“本发明的组合物”)。

[0290] 作为本发明的组合物中含有的本发明的寡聚物的药学上可允许的盐的实例，可举出钠盐、钾盐、锂盐等的碱金属盐、钙盐、镁盐等的碱土类金属盐；铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等的金属盐；铵盐；t－辛基胺盐、二苄基胺盐、吗啉盐、葡萄糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、亚乙基二胺盐、N－甲基还原葡糖胺盐、胍盐、二乙基胺盐、三乙基胺盐、二环己基胺盐、N,N’－二苄基亚乙基二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇基胺盐、N－苄基－苯乙基胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟基甲基)氨基甲烷盐等的有机胺盐；氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐等的氢卤酸盐；硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等的无机酸盐；甲烷磺酸盐、三氟甲烷磺酸盐、乙烷磺酸盐等的低级烷烃磺酸盐；苯磺酸盐、p－甲苯磺酸盐等的芳基磺酸盐；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、马来酸盐等的有机酸盐；甘氨酸盐、赖氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸酸盐、天冬氨酸盐等的氨基酸盐等。这些的盐，可通过公知的方法进行制造。或者，本发明的组合物中的含有的本发明的寡聚物，可以是其水和物形态。

[0291] 本发明的组合物的施予方式，只要是药学上可允许的施予方式即可，没有特别的限定，可根据治疗方法进行选择，但是从对肌组织送达容易性的观点出发，优选静脉内施予、动脉内施予、肌肉内施予、皮下施予、口服施予、组织内施予、经皮施予等。另外，作为本发明的组合物的可取的剂型，没有特别的限定，例如，可举出各种的注射剂、口服剂、点滴剂、吸入剂、软膏剂、乳液剂(lotion)等。

[0292] 将本发明的寡聚物施予肌营养不良患者的情形，本发明的组合物，优选含有促进将该寡聚物向肌组织送达的载体。该类载体，只要是药学上可允许的载体即可，没有特别限定，作为其实例，可举出阳离子性脂质体、阳离子性聚合物等的阳离子载体、或者是利用包膜病毒的载体。作为阳离子性脂质体，例如，可举出以2－O－(2－二乙基氨基乙基)氨基甲酰基－1,3－O－二油酰基甘油和磷脂质为必须构成成分形成的脂质体(以下，称为“脂质体A”)、オリゴフェクトアミン(注册商标)(Invitrogen公司制)、リポフェクチン(注册商标)(Invitrogen公司制)、リポフェクトアミン(注册商标)(Invitrogen公司制)、Lipofectamine2000(注册商标)(Invitrogen公司制)、DMRIE－C(注册商标)(Invitrogen公司制)、GeneSilencer(注册商标)(Gene Therapy Systems公司制)、Transmessenger(注册商标)(QIAGEN公司制)、TransIT TKO(注册商标)(Mirus公司制)、NucleofectorII(Lonza公司制)。其中，优选脂质体A。作为阳离子性聚合物，例如，可举出JetSI(注册商标)(Qbiogene

公司制)、Jet－PEI(注册商标)(聚亚乙基亚胺,Qbiogene公司制)。作为利用包膜病毒的载体,例如,可举出GenomeOne(注册商标)(HVJ－E脂质体,石原产业公司制)。或者,可使用日本特许2924179号中记载的医药设备、日本特许再公表公报第2006/129594号及日本特许再公表公报第2008/096690号中记载的阳离子性载体。

[0293] 本发明的组合物中含有的本发明的寡聚物的浓度,根据载体的种类等的不同而不同,0.1nM～100μM的范围内是适当的,优选1nM～10μM的范围内,更优选10nM～1μM的范围内。另外,本发明的组合物中含有的本发明的寡聚物和载体的重量比(载体/本发明的寡聚物),根据该寡聚物的性质及该载体的种类等的不同而不同,0.1～100的范围内是适当的,优选1～50的范围内,更优选10～20的范围内。

[0294] 本发明的组合物中,除本发明的寡聚物和上述的载体以外,可任意地配合药学上可允许的添加剂。作为该添加剂,例如,可举出乳化辅助剂(例如,碳原子数6～22的脂肪酸或其药学上可允许的盐、白蛋白、葡聚糖)、稳定化剂(例如,胆固醇、磷脂酸)、等渗剂(例如,氯化钠、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖)、pH调整剂(例如,盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙醇胺)。这些添加剂可使用一种或二种以上。本发明的组合物中的该添加剂的含有量,90重量%以下是适当的,优选70重量%以下,更优选50重量%以下。

[0295] 本发明的组合物,可通过在载体的分散液中添加本发明的寡聚物,进行适当地搅拌来进行制备。另外,添加剂,即可在本发明的寡聚物的添加前也可在添加后通过适当的工序进行添加。作为在添加本发明的寡聚物时可使用的水性溶剂,只要是药学上可允许的水性溶剂即可,没有特别限定,例如,可举出注射用水、注射用蒸留水、生理食盐水等的电解质液、葡萄糖液、麦芽糖液等的糖液。另外,该情形的pH及温度等的条件,本领域技术人员可适宜地进行选择。

[0296] 本发明的组合物,例如,可制成液剂或其冷冻干燥制剂。该冷冻干燥制剂,可根据常规方法,通过冷冻干燥处理具有液剂的形态的本发明的组合物来制备。例如,可将具有液剂的形态的本发明的组合物进行适当的灭菌后,往西林瓶中分注入规定量,在约-40～-20℃的条件下进行预备冷冻2小时左右,在约0～10℃减压下进行一次干燥,接下来,在约15～25℃减压下进行二次干燥,而进行冷冻干燥。然后,通常,用氮气置换西林瓶内部,塞住制得本发明的组合物的冷冻干燥制剂。

[0297] 本发明的组合物的冷冻干燥制剂,通常可通过添加任意的适当的溶液(再溶解液)进行再溶解来使用。作为该类的再溶解液,可举出注射用水、生理食盐水、其他的一般输液。该再溶解液的液量,根据用途等的不同而不同,没有特别限定,冷冻干燥前的液量的0.5～2倍量、或500mL以下是适当的。

[0298] 作为施予本发明的组合物时的用量,优选考虑到含有的本发明的寡聚物的种类、剂形、年龄或体重等的患者的状态、施予方式、疾病的性质和程度的基础上,进行制备。作为相对于成人的本发明的寡聚物的量,一般是每1日0.1mg～10g/人的范围内,优选1mg～1g/人的范围内。该数值,根据作为靶的疾病的种类、施予方式、靶分子的不同有时也不同。因此,根据不同情形,即使是在此以下也是充分的,另外,反之有时需要在此以上的用量。另外,可以1日1次至数次进行施予,或间隔1日至数日进行施予。

[0299] 作为本发明的组合物的其他的实施方式,可举出含有能够表达本发明的寡核苷酸的表达载体和上述的载体的医药组合物。作为该表达载体,可以是能够表达多个的本发明

的寡核苷酸的表达载体。该组合物中，与含有本发明的寡聚物的本发明的组合物同样地，可添加药学上可允许的添加剂。该组合物中含有的表达载体的浓度，根据载体的种类等的不同而不同，0.1nM～100μM的范围内是适当的，优选1nM～10μM的范围内，更优选10nM～1μM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、载体的种类等的不同而不同，0.1～100的范围内是适当的，优选1～50的范围内，更优选为10～20的范围内。另外，该组合物中含有的载体的含有量，与含有本发明的寡聚物的本发明的组合物的情形相同，关于其制备方法等，也与本发明的组合物的情形相同。

[0300] 实施例

[0301] 以下，举出实施例及试验例，更详细地说明本发明，但是，本发明并不限定于实施例中所示的范围。

[0302] [参考例1]

[0303] 氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(4－苯甲酰胺－2－氧代嘧啶－1－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸

[0304] 工序1:4－{[(2S,6R)－6－(4－苯甲酰胺－2－氧代嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸的制造

[0305] 在氩环境下，在二氯甲烷50mL中悬浮N－{1－[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]－2－氧代－1,2－二氢嘧啶－4－基}苯甲酰胺3.44g和4－二甲基氨基吡啶(4－DMAP)1.1g，添加琥珀酸酐0.90g，在室温搅拌3小时。在反应液中添加甲醇10mL，进行减压浓缩。在残渣中使用乙酸乙酯和0.5M的磷酸二氢钾水溶液进行萃取操作。按顺序使用0.5M的磷酸二氢钾水溶液、水、饱和食盐水清洗有机层。使用硫酸钠干燥所获得的有机层，进行减压浓缩，获得4.0g目的物。

[0306] 工序2:氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(4－苯甲酰胺－2－氧代嘧啶－1－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸的制造

[0307] 在吡啶(脱水)200mL中溶解4－{[(2S,6R)－6－(4－苯甲酰胺－2－氧代嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸4.0g，添加4－DMAP 0.73g、1－乙基－3-(3－二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐11.5g。接下来，添加氨基聚苯乙烯树脂(氨基引物支持200(Primer Support 200amino))(GE Healthcare日本公司制，17－5214－97)25.0g、三乙基胺8.5mL，在室温振动4日。反应后，过滤取得树脂。按照顺序使用吡啶、甲醇、二氯甲烷清洗所得到的树脂，进行减压干燥。在得到的树脂中添加四氢呋喃(脱水)200mL、乙酸酐15mL、2,6－二甲基吡啶15mL，在室温振动2小时。过滤取得树脂，按照顺序使用吡啶、甲醇、二氯甲烷进行清洗，进行减压干燥，获得26.7g的目的物。

[0308] 该目的物的装载量，使用公知的方法，通过测定409nm中的UV吸光度，确定每树脂1g中的三苯甲基的摩尔量。树脂的装载量是129.2μmol/g。

[0309] UV测定条件

[0310] 机器:U－2910(日立制作所)。

[0311] 溶剂:甲烷磺酸。

[0312] 波长:265nm。

[0313] ε值:45000。

[0314] [参考例2]

[0315] 氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸

[0316] 工序1:N^2－(苯氧基乙酰基)鸟苷的制造

[0317] 将鸟苷100g在80℃减压下,干燥24小时。添加吡啶(脱水)500mL、二氯甲烷(脱水)500mL,在氩环境下,在0℃滴加三甲基氯硅烷401mL,在室温搅拌3小时。再度冰冷,滴加苯氧基乙酰基氯66.3g,在冰冷下,再搅拌3小时。在反应液中添加甲醇500mL,在室温搅拌一整夜后,在减压下蒸馏去溶剂。在残渣中添加甲醇500mL,在减压下进行3次浓缩。在残渣中添加水4L,在冰冷下搅拌1小时,过滤取得析出物。用水、接下来,用冷甲醇清洗该析出物,干燥获得目的化合物150.2g(收率:102%)(参考:Org.Lett.(2004),Vol.6,No.15,2555－2557)。

[0318] 工序2:N^9－{[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－吗啉－2－基]－6－氧代－6,9－二氢－1H－嘌呤－2－基}－2－苯氧基乙酰胺p－甲苯磺酸盐

[0319] 将工序1中获得的化合物30g在甲醇480mL中悬浮,在冰冷下,添加2N盐酸130mL。接下来,按顺序添加四硼酸铵4水和物56.8g、高碘酸钠16.2g,在室温搅拌3小时。将反应液冰冷,过滤除去不溶物,将其用甲醇100mL清洗。将滤液与清洗液合并进行冰冷,添加2－甲基吡啶硼烷11.52g,搅拌20分钟后,缓慢添加p－甲苯磺酸·1水和物54.6g,在4℃搅拌一夜。过滤取得析出物,用冷甲醇500mL清洗后,干燥获得目的化合物17.7g(收率:43.3%)。

[0320] ^{1}H NMR(δ,DMSO－d6):9.9－9.2(2H,br)、8.35(1H,s)、7.55(2H,m)、7.35(2H,m)、7.10(2H,d,J＝7.82Hz)、7.00(3H,m)、5.95(1H,dd,J＝10.64,2.42Hz)、4.85(2H,s)、4.00(1H,m)、3.90－3.60(2H,m)、3.50－3.20(5H,m)、2.90(1H,m)、2.25(3H,s)。

[0321] 工序3:N^9－{(2R,6S)－6－羟基甲基－4－三苯甲基吗啉－2－基}－N^2－(苯氧基乙酰基)鸟嘌呤的制造

[0322] 将工序2中获得的化合物2.0g悬浮于二氯甲烷(30mL),在冰冷下,添加三乙基胺(13.9g)、三苯甲基氯(18.3g),在室温搅拌1小时。将反应液用饱和碳酸氢钠水溶液,然后用水清洗后,回收有机层,用硫酸镁干燥,减压浓缩有机层。在残渣中添加0.2M柠檬酸钠缓冲液(pH3)/甲醇(1:4(v/v),40mL)进行搅拌,接下来,添加水(40mL),在冰冷下搅拌1小时(悬浮状态)。对其进行过滤,通过冷甲醇进行清洗,干燥后获得目的化合物1.84g(收率:82.0%)。

[0323] 工序4:N^9－[(2R,6S)－6－{(叔－丁基二甲基甲硅烷基氧基)甲基}－4－三苯甲基吗啉－2－基]－N^2－(苯氧基乙酰基)鸟嘌呤的制造

[0324] 将工序3中获得的化合物(38.3g)溶解于二氯甲烷(300mL),在冰冷下,按顺序添加咪唑(4.64g)、t－丁基二甲基甲硅烷基氯(9.47g),在室温搅拌1小时。将反应液用0.2M柠檬酸钠缓冲液(pH3),然后用饱和盐水清洗后,回收有机层,用硫酸镁干燥,减压浓缩有机层,由此获得目的化合物粗产物44.1g。

[0325] 工序5:N^9－[(2R,6S)－6－{(叔－丁基二甲基甲硅烷基氧基)甲基}－4－三苯甲基吗啉－2－基]－N^2－(苯氧基乙酰基)－O^6－三异丙基苯基磺酰鸟嘌呤的制造

[0326] 将工序4中获得的化合物(44.1g)溶解于二氯甲烷(300mL),在冰冷下,添加4－二甲基氨基吡啶(0.64g)、三乙基胺(29.2mL)、三异丙基苯基磺酰氯(19.0g),在室温搅拌1小时。将反应液用1M磷酸二氢钠水溶液清洗后,回收有机层,用硫酸镁干燥,减压浓缩有机层,由此获得目的化合物粗产物60.5g。

[0327] 工序6:N^9－[(2R,6S)－6－{(叔－丁基二甲基甲硅烷基氧基)甲基}－4－三苯甲基吗啉－2－基]－N^2－(苯氧基乙酰基)－O^6－(2－氰基乙基)鸟嘌呤的制造

[0328] 将工序5中获得的化合物(60.5g)溶解于二氯甲烷(300mL),在冰冷下,添加N－甲基吡咯烷(54.5mL),搅拌1小时。反应液中添加乙撑氰醇(37.2g),接下来,添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(11.96g),在冰冷下,再搅拌2小时。将反应液用1M磷酸二氢钠水溶液,然后用水清洗后,回收有机层,用硫酸镁干燥,减压浓缩有机层,由此获得目的化合物粗产物72.4。

[0329] 工序7:N^9－[(2R,6S)－6－羟基甲基－4－三苯甲基吗啉－2－基]－N^2－(苯氧基乙酰基)－O^6－(2－氰基乙基)鸟嘌呤的制造

[0330] 将工序6中获得的化合物(72.4g)溶解于二氯甲烷(300mL),添加三乙基胺三氢氟化物(21.1g),在室温搅拌17小时。将反应液注入于冷饱和碳酸氢钠水溶液,中和后回收二氯甲烷层,用硫酸镁干燥,减压浓缩。通过硅胶柱色谱法(PSQ100B(富士硅化学株式会社(冨士シリシア化学株式会社)制,以下相同))精制残渣,由此获得目的化合物14.3g(由工序4得出的收率:39.2%)。

[0331] 工序8:在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸的制造

[0332] 通过与参考例1相同的方法制造标记化合物。但是,代替在参考例1的工序1中使用的N－{1－[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]－2－氧代－1,2－二氢嘧啶－4－基}苯甲酰胺,本工序中使用N^9－[(2R,6S)－6－羟基甲基－4－三苯甲基吗啉－2－基]－N^2－(苯氧基乙酰基)－O^6－(2－氰基乙基)鸟嘌呤。

[0333] [参考例3]

[0334] 在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸

[0335] 通过与参考例1相同的方法制造标记化合物。但是,代替在参考例1的工序1中使用的N－{1－[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]－2－氧代－1,2－二氢嘧啶－4－基}苯甲酰胺,本工序中使用1－[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]－5－甲基嘧啶－2,4(1H,3H)－二酮。

[0336] [参考例4]

[0337] 在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸

[0338] 通过与参考例1相同的方法制造标记化合物。但是,代替在参考例1的工序1中使用的N－{1－[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]－2－氧代－1,2－二氢嘧啶－4－基}苯甲酰胺,本工序中使用N－{9－[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]嘌呤－6－基}苯甲酰胺。

[0339] [参考例5]

[0340] 在氨基聚苯乙烯树脂上载持的1,12－二氧代－1－(4－三苯甲基哌嗪－1－基)－2,5,8,11－四氧代－15－十五烷酸

[0341] 通过与参考例1相同的方法制造标记化合物。但是,代替在参考例1的工序1中使用

的N－{1－[(2R,6S)－6－(羟基甲基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]－2－氧代－1,2－二氢嘧啶－4－基}苯甲酰胺,本工序中使用2－[2－(2－羟基乙氧基)乙氧基]乙基4－三苯甲基哌嗪－1－羧酸(国际公开公报第2009/064471号中记载的化合物)。

[0342] 对于外显子45

[0343] 根据下述的实施例1～8以及比较例1的记载,合成了表5的PMO编号1～6以及8～10中所示的各种PMO。将合成的PMO使用注射用水(大塚制药工厂公司制)溶解。此外,PMO编号7是从ジーンツールズ公司购买获得。

[0344] 表5

[0345]

PMO 编号	序列名	备注	序列号
1	H45_-2-19（OH）	5’末端：基团(3)	9
2	H45_-1-20（OH）	5’末端：基团(3)	10
3	H45_1-21（OH）	5’末端：基团(3)	11
4	H45_2-22（OH）	5’末端：基团(3)	12
5	H45_3-23（OH）	5’末端：基团(3)	13
6	H45_-4-21（OH）	相当于专利文献4记载的序列号（SEQ ID NO）：30的序列5’末端：基团(3)	14
7	H45_5-34（GT）	相当于专利文献3记载的序列号（SEQ ID NO）：4的序列5’末端：基团(2)	15
8	H45_1-20（OH）	5’末端：基团(3)	16
9	H45_2-21（OH）	5’末端：基团(3)	17
10	H45_1-21（TEG）	5’末端：基团(1)	18

[0346] [实施例1]

[0347] PMO编号1

[0348] 将在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(4－苯甲酰胺－2－氧代嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例1)0.2g(26μmol)填充于带有过滤器的柱,使用核酸合成机(AKTA Oligopilot 10plus),开始下述合成循环。在各耦联循环中添加希望的吗啉单体化合物使成为标记化合物的碱基序列。

[0349] 表6

[0350]

步骤	试剂	量（mL）	时间（分钟）
1	脱保护溶液（Deblocking Solution）	18～32	1.8～3.2
2	中和·清洗溶液	30	1.5
3	偶联剂溶液 B	5	0.5
4	偶联剂溶液 A	1.3	0.25
5	步骤 3 和步骤 4 的试剂的混合液	6.3	120～300
6	乙腈	20	1.0
7	封端溶液（Capping solution）	9	2.0
8	乙腈	30	2.0

[0351] 此外，作为脱保护溶液，使用含有3％(w/v)三氟乙酸的二氯甲烷溶液。作为中和·清洗溶液使用如下溶液：使用含有35％(v/v)的乙腈的二氯甲烷溶液溶解，致使N,N－二异丙基乙基胺为10％(v/v)，且使四氢呋喃为5％(v/v)。作为偶联剂溶液A使用如下溶液：使用四氢呋喃溶解，致使吗啉单体化合物为0.10M。作为偶联剂溶液B使用如下溶液：使用乙腈溶解，致使N,N－二异丙基乙基胺为20％(v/v)，且使四氢呋喃成为10％(v/v)。作为封端溶液使用相对于乙腈溶解有20％(v/v)的乙酸酐和30％(v/v)的2,6－二甲基吡啶的溶液。

[0352] 将载持上述合成的PMO的氨基聚苯乙烯树脂从反应容器回收，在2小时以上室温进行减压干燥。将干燥的氨基聚苯乙烯树脂上载持的PMO加入反应容器，添加28％氨水－乙醇(1/4)5mL，在55℃搅拌15小时。过滤分离氨基聚苯乙烯树脂，用水－乙醇(1/4)1mL进行清洗。将得到的滤液进行减压浓缩。将得到的残渣溶解在20mM的乙酸－三乙基胺缓冲液(TEAA缓冲液)和乙腈的混合溶剂(4/1)10mL中，使用膜过滤器进行过滤。将得到的滤液使用反相HPLC进行精制。使用的条件如以下所示。

[0353] 表7

[0354]

柱	XBridge 5μm C18（沃特世科技（Waters）公司制，φ19×50mm，1CV＝14mL）
流速	10mL/分钟
柱温度	室温
A 液	20mM TEAA 缓冲液
B 液	CH_3CN
梯度（Gradient）	（B）浓度（conc.）10→70%/15CV

[0355] 分离各组分(fraction)，回收目的物，进行减压浓缩。在浓缩残渣中添加2M的磷酸水溶液0.5mL，搅拌15分钟。进一步地，添加2M的氢氧化钠水溶液2mL使其成为碱性，用膜过滤器(0.45μm)进行过滤。

[0356] 将得到的含有目的物的水溶液使用阴离子交换树脂柱进行精制。使用的条件如下述所示。

[0357] 表8

[0358]

柱	Source 15Q（GE Healthcare 公司制，φ10×108mm，1CV＝8.5mL）
流速	8.5mL/分钟
柱温度	室温
A 液	10mM 氢氧化钠水溶液
B 液	10mM 氢氧化钠水溶液，1M 的氯化钠水溶液
梯度（Gradient）	（B）浓度（conc.）1→50%/40CV

[0359] 分离各组分(fraction)(HPLC)，作为水溶液获得目的物。在得到的水溶液中添加0.1M的磷酸缓冲液(pH6.0)进行中和。接下来，在下述条件下用反相HPLC进行脱盐。

[0360] 表9

[0361]

柱	XBridge 5μm C8（沃特世科技（Waters）公司制，φ10×50mm，1CV＝4mL）
流速	4mL/分钟
柱温度	60℃
A 液	水
B 液	CH_3CN
梯度（Gradient）	（B）浓度（conc.）0→50%/20CV

[0362] 回收目的物，进行减压浓缩。将得到的残渣溶于水中，进行冷冻干燥，作为白色棉状固体获得1.5mg的目的化合物。

[0363] ESI－TOF－MS计算值:6877.8

[0364] 测定值:6877.4

[0365] [实施例2]

[0366] PMO.编号3

[0367] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。

[0368] ESI－TOF－MS计算值:6862.8

[0369] 测定值:6862.5

[0370] [实施例3]

[0371] PMO.编号2

[0372] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。

[0373] ESI－TOF－MS计算值:6862.8

[0374] 测定值:6862.3

[0375] [实施例4]

[0376] PMO.编号4

[0377] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0378] ESI－TOF－MS计算值:6902.8

[0379] 测定值:6902.3

[0380] [实施例5]

[0381] PMO.编号5

[0382] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0383] ESI－TOF－MS计算值:6902.8

[0384] 测定值:6902.4

[0385] [实施例6]

[0386] PMO.编号8

[0387] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。

[0388] ESI－TOF－MS计算值:6547.5

[0389] 测定值:6547.2

[0390] [实施例7]

[0391] PMO.编号9

[0392] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。

[0393] ESI－TOF－MS计算值:6547.5

[0394] 测定值:6547.2

[0395] [实施例8]

[0396] PMO.编号10

[0397] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的1,12－二氧代－1－(4－三苯甲基哌嗪－1－基)－2,5,8,11－四氧代－15－十五烷酸(参考例5)。

[0398] ESI－TOF－MS计算值:7214.1

[0399] 测定值:7213.7

[0400] [比较例1]

[0401] PMO.编号6

[0402] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。

[0403] ESI－TOF－MS计算值:8193.9

[0404] 测定值:8195.3

[0405] [试验例1]

[0406] 体外(in vitro)试验

[0407] 使用序列号19～35中记载的2'－O－甲氧基－硫代磷酸酯体(2'－OMe－S－RNA)的反义寡聚物进行实验。试验中使用的各种反义寡聚物，是从日本バイオサービス公司购买获得。各种反义寡聚物的序列如以下所示。

[0408] 表10

[0409]

反义寡聚物	碱基序列	序列号
H45_1-25	GCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUC	19
H45_6-30	UUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGG	20
H45_11-35	ACAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAU	21
H45_16-40	UGACAACAGUUUGCCGCUGCCCAAU	22
H45_21-45	UGUUCUGACAACAGUUUGCCGCUGC	23
H45_26-50	UUCAAUGUUCUGACAACAGUUUGCC	24
H45_31-55	UUGCAUUCAAUGUUCUGACAACAGU	25
H45_36-60	CCCAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACA	26
H45_41-65	UCUUCCCCAGUUGCAUUCAAUGUUC	27
H45_46-70	UUAUUUCUUCCCCAGUUGCAUUCAA	28
H45_51-75	CUGAAUUAUUUCUUCCCCAGUUGCA	29
H45_56-80	GAUUGCUGAAUUAUUUCUUCCCCAG	30
H45_61-85	UUGAGGAUUGCUGAAUUAUUUCUUC	31
H45_66-90	UGUUUUUGAGGAUUGCUGAAUUAUU	32
H45_71-95	GCAUCUGUUUUUGAGGAUUGCUGAA	33
H45_76-100	UACUGGCAUCUGUUUUUGAGGAUUG	34
H45_7-31	UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG	35

[0410] 将RD细胞(人横纹肌肉瘤细胞株)1×10^5个播种于12孔板，在含有10％牛胎儿血清(FCS)(インビトロジェン公司制)的伊格尔培养液(Eagle's minimal essential medium)(EMEM)培养基(シグマ公司制，以下相同)1mL中，37℃、5％CO_2条件下培育一晚。制成上述的

外显子45跳跃用的各种反义寡聚物(日本バイオサービス公司制)(0.3或1μm)和Lipofectamine 2000(商品名,インビトロジェン公司制)的复合体,在0.9mL培养基交换的RD细胞中,添加100μl,终浓度为30或100nM。

[0411] 添加后,培养一晚。用PBS(ニッスイ公司制,以下相同)清洗2次细胞后,在细胞中添加ISOGEN(商品名,ニッポンジーン公司制)250μl,在室温放置数分钟,将细胞溶解,将该溶解物回收于艾本德管(Eppendorf tube)。按照ISOGEN所附的说明书萃取总RNA。使用Nanodrop ND-1000(商品名,エル・エム・エス公司制)测定萃取的总RNA的浓度。

[0412] 相对于萃取的总RNA 400ng,使用QIAGEN OneStep RT-PCR试剂盒进行RT－PCR。按照试剂盒中所附的说明书,制备反应液。热循环仪使用PTC-100(商品名,MJ Research公司制)。使用的RT－PCR的程序如以下所示。

[0413] 50℃、30分钟:逆转录反应。

[0414] 95℃、15分钟:热变性。

[0415] [94℃、30秒钟;60℃、30秒钟;72℃、1分钟]×35循环:PCR扩增。

[0416] 72℃、10分钟:

[0417] RT－PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如以下所示。

[0418] 正向引物:5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3'(序列号36)

[0419] 反向引物:5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3'(序列号37)

[0420] 使用生物分析仪(Bioanalyzer)(アジレント公司制)解析上述PCR的反应产物1μl。

[0421] 测定了外显子45发生跳跃的条带的多核苷酸量"A"和外显子45没有发生跳跃的条带的多核苷酸量"B"。根据这些"A"及"B"的测定值,按照下式,求出跳跃效率。

[0422] 跳跃效率(%)＝A/(A+B)×100

[0423] 实验结果

[0424] 将结果示于图1、2。根据本实验,确认到,从人抗肌萎缩蛋白基因的第45号的外显子的5'末端开始的第1～25号或第6～30号上设计反义寡聚物的情况,与从第45号的外显子的5'末端开始的第7～31号上设计反义寡聚物的情况相比,以高效率使外显子45发生跳跃。

[0425] [试验例2]

[0426] 体外试验

[0427] 相对于RD细胞(人横纹肌肉瘤细胞株)3.5×10^5个,使用细胞核转染系统(Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L)通过核转染(Nucleofector II)(Lonza公司)导入PMO编号1～5及8～10的本发明的寡聚物以及PMO编号6及7的反义寡聚物各1、3、10μM。程序是使用T－030。

[0428] 导入后,将细胞在含有10％牛胎儿血清(FCS)(インビトロジェン公司制)的伊格尔培养液(Eagle's minimal essential medium)(EMEM)培养基(シグマ公司制,以下相同。)2mL中,37℃、5％CO_2条件下培养3天。将细胞使用PBS(ニッスイ公司制,以下相同。)清洗2次,然后,在细胞中添加ISOGEN(ニッポンジーン公司制)500μl,室温放置数分钟,使细胞溶解,将该溶解物回收至艾本德管。按照ISOGEN所附的说明书,萃取总RNA。萃取的总RNA的浓度使用NanoDrop ND-1000(商品名,エル・エム・エス公司制)测定。

[0429] 针对萃取的总RNA 400ng,使用QIAGEN OneStep RT-PCR试剂盒(キアゲン公司制)进行RT－PCR。按照试剂盒中所附的说明书,制备反应液。热循环仪使用PTC-100(MJ

Research公司制)。使用的RT－PCR的程序,如以下所示。

[0430] 50℃、30分钟:逆转录反应。

[0431] 95℃、15分钟:热变性。

[0432] [94℃、30秒钟;60℃、30秒钟;72℃、1分钟]×35循环:PCR扩增。

[0433] 72℃、10分钟:

[0434] RT－PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如以下所示。

[0435] 正向引物:5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3'(序列号36)

[0436] 反向引物:5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3'(序列号37)

[0437] 使用生物分析仪(Bioanalyzer)(アジレント公司制)解析上述PCR的反应产物1μl。

[0438] 测定了外显子45发生跳跃的条带的多核苷酸量"A"和外显子45没有发生跳跃的条带的多核苷酸量"B"。根据这些"A"及"B"的测定值,按照下式,求出跳跃效率。

[0439] 跳跃效率(%)＝A/(A+B)×100

[0440] 实验结果

[0441] 将结果示于图3、图4、图14以及图15。根据本实验,确认到,PMO编号1、3的本发明的寡聚物,在RD细胞中,以同等于PMO编号6的反义寡聚物的效率使外显子45发生跳跃(图3、图4)。另外,与PMO编号7的反义寡聚物相比,PMO编号1、2、3的本发明的寡聚物,在RD细胞中,以高效率使外显子45发生跳跃(图14)。进一步地,PMO编号3与末端结构不同的PMO编号10相比,以高效率使外显子45发生跳跃(图15)。

[0442] [试验例3]

[0443] 使用了人纤维芽细胞的体外试验

[0444] 通过ZsGreen1共表达逆转录病毒载体在GM05017细胞(来自人DMD患者的纤维芽细胞、卡瑞尔医学研究所:Coriell Institute for Medical Research)中导入人MyoD基因(序列号38)。

[0445] 培育4至5天之后,通过FACS回收ZsGreen阳性的MyoD转换纤维芽细胞,播种在12孔板上使成为5×10^4个/cm^2。繁殖培养基是使用含有10％FCS以及1％青霉素/链霉素(Penicillin/Streptomycin)(P/S)(シグマアルドリッチ公司制)的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium):营养混合物(Nutrient Mixture)F-12(DMEM・F-12)(インビトロジェン公司制)1mL。

[0446] 24小时后,换成分化培养基(含有2％马血清(インビトロジェン公司制)、1％P/S及ITS液体介质补充物(ITS Liquid Media Supplement)(シグマ公司制)的DMEM/F-12)。每隔2、3天,进行培养基交换,培育12至14日,分化成肌管细胞。

[0447] 然后,分化培养基换成含有6μM的Endo-Porter(商品名,ジーンツール公司制)的分化培养基,添加吗啉寡聚物使终浓度为10μM。在48小时培育后,通过TRIzol(商品名,インビトロジェン公司制),从细胞中萃取总RNA。相对于萃取后的总RNA 50ng,使用QIAGEN OneStep RT-PCR试剂盒进行RT－PCR。按照所附的说明书,制备反应液。热循环仪是使用iCycler(商品名,Bio-Rad公司制)。所使用的RT－PCR的程序是如以下所示。

[0448] 50℃、30分钟:逆转录反应。

[0449] 95℃、15分钟:热变性。

[0450] [94℃、1分钟;60℃、1分钟;72℃、1分钟]×35循环:PCR扩增。

[0451] 72℃、7分钟:聚合酶的热失活。

[0452] 引物是使用hDMD44F及hDMD46R。

[0453] hDMD44F:5'-CCTGAGAATTGGGAACATGC-3'(序列号39)

[0454] hDMD46R:5'-TTGCTGCTCTTTTCCAGGTT-3'(序列号40)

[0455] 上述RT-PCR反应的反应产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行分离,通过Gene Flash(商品名,Syngene公司)拍摄凝胶照片。通过Image J(商品名,美国国立卫生研究所制),测定外显子45发生跳跃的条带的多核苷酸量"A"和外显子45没有发生跳跃的条带的多核苷酸量"B"。根据这些"A"及"B"的测定值,按照下式求出跳跃效率。

[0456] 跳跃效率(%)=A/(A+B)×100

[0457] 实验结果

[0458] 将结果示于图5。根据本实验,确认到,PMO编号3的本发明的寡聚物,在GM05017细胞中,以高效率使外显子45发生跳跃。

[0459] 对于外显子55

[0460] 根据下述的实施例9~19的记载,合成了表11的PMO编号11~14及16~22中所示的各种PMO。将合成的PMO使用注射用水(大塚制药工厂公司制)溶解。此外,PMO编号15是从ジーンツールズ公司购买获得。

[0461] 表11

[0462]

PMO 编号	序列名	备注	序列号
11	H55_2-22(OH)	5'末端:基团(3)	41
12	H55_8-28(OH)	5'末端:基团(3)	42
13	H55_11-31(OH)	5'末端:基团(3)	43
14	H55_14-34(OH)	5'末端:基团(3)	44
15	H55_139-156(GT)	相当于专利文献 5 记载的 h55AON6 的序列 5'末端:基团(2)	115
16	H55_12-32(OH)	5'末端:基团(3)	45
17	H55_13-33(OH)	5'末端:基团(3)	46
18	H55_15-35(OH)	5'末端:基团(3)	47
19	H55_16-36(OH)	5'末端:基团(3)	48
20	H55_14-33(OH)	5'末端:基团(3)	116
21	H55_15-34(OH)	5'末端:基团(3)	117
22	H55_14-34(TEG)	5'末端:基团(1)	118

[0463] [实施例9]

[0464] PMO.编号11

[0465] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0466] ESI－TOF－MS计算值:6807.8

[0467] 测定值:6807.0

[0468] [实施例10]

[0469] PMO.编号12

[0470] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0471] ESI－TOF－MS计算值:6822.8

[0472] 测定值:6822.5

[0473] [实施例11]

[0474] PMO.编号13

[0475] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0476] ESI－TOF－MS计算值:6837.8

[0477] 测定值:6837.3

[0478] [实施例12]

[0479] PMO.编号14

[0480] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0481] ESI－TOF－MS计算值:6861.8

[0482] 测定值:6861.4

[0483] [实施例13]

[0484] PMO.编号16

[0485] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0486] ESI－TOF－MS计算值:6812.8

[0487] 测定值:6812.7

[0488] [实施例14]

[0489] PMO.编号17

[0490] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0491] ESI－TOF－MS计算值:6852.8

[0492] 测定值:6852.7

[0493] [实施例15]

[0494] PMO.编号18

[0495] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0496] ESI－TOF－MS计算值:6901.8

[0497] 测定值:6901.5

[0498] [实施例16]

[0499] PMO.编号19

[0500] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0501] ESI－TOF－MS计算值:6901.8

[0502] 测定值:6901.7

[0503] [实施例17]

[0504] PMO.编号20

[0505] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0506] ESI－TOF－MS计算值:6522.5

[0507] 测定值:6522.0

[0508] [实施例18]

[0509] PMO.编号21

[0510] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0511] ESI－TOF－MS计算值:6546.5

[0512] 测定值:6546.0

[0513] [实施例19]

[0514] PMO.编号22

[0515] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的1,12－二氧代－1－(4－三苯甲基哌嗪－1－基)－2,5,8,11－四氧代－15－十五烷酸(参考例5)。

[0516] ESI－TOF－MS计算值:7213.1

[0517] 测定值:7212.5

[0518] [试验例4]

[0519] 体外试验

[0520] 使用序列号49～68中记载的2'－O－甲氧基－硫代磷酸酯体(2'－OMe－S－RNA)

的反义寡聚物进行实验。试验中使用的各种反义寡聚物，是从日本バイオサービス公司购买获得。各种反义寡聚物的序列如以下所示。

[0521] 表12

[0522]

反义寡聚物	碱基序列	序列编号
H55_1-21	GCAGCCUCUCGCUCACUCACC	49
H55_6-26	CCAAAGCAGCCUCUCGCUCAC	50
H55_11-31	UUCUUCCAAAGCAGCCUCUCG	51
H55_21-41	AUCUAUGAGUUUCUUCCAAAG	52
H55_31-51	UGUUGCAGUAAUCUAUGAGUU	53
H55_41-61	CAGGGGGAACUGUUGCAGUAA	54
H55_51-71	UUUCCAGGUCCAGGGGGAACU	55
H55_61-81	GCAAGAAACUUUUCCAGGUCC	56
H55_71-91	UGUAAGCCAGGCAAGAAACUU	57
H55_81-101	UUUCAGCUUCUGUAAGCCAGG	58
H55_91-111	UUGGCAGUUGUUUCAGCUUCU	59
H55_101-121	CUGUAGGACAUUGGCAGUUGU	60
H55_111-131	GGGUAGCAUCCUGUAGGACAU	61
H55_121-141	CUUUCCUUACGGGUAGCAUCC	62
H55_131-151	UUCUAGGAGCCUUUCCUUACG	63
H55_141-161	CCUUGGAGUCUUCUAGGAGCC	64
H55_151-171	UCUUUUACUCCCUUGGAGUCU	65
H55_161-181	UUUCAUCAGCUCUUUUACUCC	66
H55_171-190	UUGCCAUUGUUUCAUCAGCU	67
H55_104-123	UCCUGUAGGACAUUGGCAGU	68

[0523] 除通过以下的引物实施RT－PCR以外，以与外显子45(试验例1)同样的条件·步骤进行实验。

[0524] 正向引物:5'-CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3'(序列号69)

[0525] 反向引物:5'-CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3'(序列号70)

[0526] 实验结果

[0527] 将结果示于图6、7。根据本实验，确认到，从人抗肌萎缩蛋白基因的第55号的外显子的5'末端开始的第1～21号或第11～31号上设计反义寡聚物的情况，与从第55号的外显子的5'末端开始的第104～123号上设计反义寡聚物的情况相比，以高效率使外显子55发生跳跃。

[0528] [试验例5]

[0529] 体外试验

[0530] 除通过以下的引物实施RT－PCR以外，以与外显子45(试验例2)同样的条件·步骤进行实验。

[0531] 正向引物:5'-CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3'(序列号69)

[0532] 反向引物:5'-CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3'(序列号70)

[0533] 实验结果

[0534] 将结果示于图8、16及17。根据本实验,确认到,PMO编号12、13、14(H55_8－28(OH)、H55_11－31(OH)及H55_14－34(OH))的本发明的寡聚物,在RD细胞中,以高效率使外显子55发生跳跃(图8)。另外,PMO编号14、16、17、18、19(H55__14－34(OH)、H55__12－32(OH)、H55_13－33(OH)、H55_15－35(OH)及H55_16－36(OH))的本发明寡聚物,在RD细胞中,与PMO编号15(H55__139－156(GT))的反义寡聚物相比,以显著的高效率使外显子55发生跳跃(图16)。PMO编号14的本发明寡聚物与将链长缩短1碱基的PMO编号21(H55__15－34(OH))是,以同等的效率使外显子55发生跳跃(图17)。此外,PMO编号14的本发明寡聚物,与末端结构不同的PMO编号22(H55__14－34(TEG))相比,以同等的效率使外显子55发生跳跃(图17)。

[0535] 对于外显子44

[0536] 根据下述的实施例20～29的记载,合成了下述表的PMO编号23～29及31～33中所示的各种PMO。将合成的PMO使用注射用水(大塚制药工厂公司制)溶解。此外,PMO编号30是从ジーンツールズ公司购买获得。

[0537] 表13

[0538]

PMO 编号	序列名	备注	序列号
23	H44__23-43（OH）	5’末端：基团(3)	71
24	H44__25-45（OH）	5’末端：基团(3)	72
25	H44__26-46（OH）	5’末端：基团(3)	73
26	H44__27-47（OH）	5’末端：基团(3)	74
27	H44__28-48（OH）	5’末端：基团(3)	75
28	H44__29-49（OH）	5’末端：基团(3)	76
29	H44__30-50（OH）	5’末端：基团(3)	77
30	H44__10-39（GT）	相当于专利文献3记载的序列号（SEQ ID NO）：1的序列5’末端：基团(2)	78
31	H44__27-46（OH）	5’末端：基团(3)	79
32	H44__28-47（OH）	5’末端：基团(3)	80
33	H44__27-47（TEG）	5’末端：基团(1)	81

[0539] [实施例20]

[0540] PMO.编号23

[0541] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1

(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0542] ESI－TOF－MS计算值:6918.9

[0543] 测定值:6918.3

[0544] [实施例21]

[0545] PMO.编号24

[0546] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0547] ESI－TOF－MS计算值:6903.9

[0548] 测定值:6904.2

[0549] [实施例22]

[0550] PMO.编号25

[0551] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0552] ESI－TOF－MS计算值:6912.9

[0553] 测定值:6912.4

[0554] [实施例23]

[0555] PMO.编号26

[0556] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0557] ESI－TOF－MS计算值:6903.9

[0558] 测定值:6904.2

[0559] [实施例24]

[0560] PMO.编号27

[0561] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0562] ESI－TOF－MS计算值:6927.9

[0563] 测定值:6927.4

[0564] [实施例25]

[0565] PMO.编号28

[0566] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0567] ESI－TOF－MS计算值:6942.9

[0568] 测定值:6942.3

[0569] [实施例26]

[0570] PMO.编号29

[0571] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0572] ESI－TOF－MS计算值:6917.9

[0573] 测定值:6918.3

[0574] [实施例27]

[0575] PMO.编号31

[0576] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0577] ESI－TOF－MS计算值:6573.6

[0578] 测定值:6572.4

[0579] [实施例28]

[0580] PMO.编号32

[0581] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0582] ESI－TOF－MS计算值:6588.6

[0583] 测定值:6588.3

[0584] [实施例29]

[0585] PMO.编号33

[0586] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的1,12－二氧代－1－(4－三苯甲基哌嗪－1－基)－2,5,8,11－四氧代－15－十五烷酸(参考例5)。

[0587] ESI－TOF－MS计算值:7255.2

[0588] 测定值:7254.7

[0589] [试验例6]

[0590] 体外试验

[0591] 使用序列号82～95及序列号109～118中记载的2'－O－甲氧基－硫代磷酸酯体(2'－OMe－S－RNA)的反义寡聚物进行实验。试验中使用的各种反义寡聚物，是从日本バイオサービス公司购买获得。各种反义寡聚物的序列如以下所示。

[0592] 表14

[0593]

反义寡聚物	碱基序列	序列号
H44_1-22	CUCAACAGAUCUGUCAAAUCGC	82
H44_6-27	CAUUUCUCAACAGAUCUGUCAA	105
H44_11-32	GCCGCCAUUUCUCAACAGAUCU	83
H44_16-37	AAAACGCCGCCAUUUCUCAACA	106

H44_21-42	UAAUGAAAACGCCGCCAUUUCU	84
H44_26-47	UAUCAUAAUGAAAACGCCGCCA	85
H44_31-52	CUUUAUAUCAUAAUGAAAACGC	86
H44_36-57	AAUAUCUUUAUAUCAUAAUGAA	107
H44_41-62	GAUUAAAUAUCUUUAUAUCAUA	87
H44_51-72	GUUAGCCACUGAUUAAAUAUCU	88
H44_56-77	CUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	108
H44_61-82	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	89
H44_66-87	AACUGUUCAGCUUCUGUUAGCC	109
H44_71-92	UGAGAAACUGUUCAGCUUCUGU	90
H44_76-97	CUUUCUGAGAAACUGUUCAGCU	110
H44_81-102	UGUGUCUUUCUGAGAAACUGUU	91
H44_86-107	GAAUUUGUGUCUUUCUGAGAAA	111
H44_91-112	CUCAGGAAUUUGUGUCUUUCUG	112
H44_96-117	CAAUUCUCAGGAAUUUGUGUCU	113
H44_101-122	GUUCCCAAUUCUCAGGAAUUUG	92
H44_106-127	AGCAUGUUCCCAAUUCUCAGGA	114
H44_111-132	UAUUUAGCAUGUUCCCAAUUCU	93
H44_121-142	AUACCAUUUGUAUUUAGCAUGU	94
H44_62-81	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG	95

[0594] 以与外显子45(试验例1)同样的条件、步骤进行实验。

[0595] 实验结果

[0596] 将结果示于图9、10。根据本实验，确认到，从人抗肌萎缩蛋白基因的第44号的外显子的5’末端开始的第11～32号或第26～47号上设计反义寡聚物的情况，以与从第44号的外显子的5’末端开始的第62～81号上设计反义寡聚物的情况同等的效率使外显子44发生跳跃。

[0597] [试验例7]

[0598] 体外试验

[0599] 以与外显子45(试验例2)同样的条件、步骤进行实验。

[0600] 实验结果

[0601] 将结果示于图11、12及18。根据本实验，确认到，PMO编号24、26(H44__25－45(OH)、H44__27－47(OH))的本发明的寡聚物是，在RD细胞中，以与PMO编号30(H44__10－39(OH))的反义寡聚物同等的效率使外显子44发生跳跃(图11、12)。PMO编号26的本发明寡聚物与将链长缩短1碱基的PMO编号31(H44__27－46(OH))是，以同等的效率使外显子44发生跳跃(图18)。此外，PMO编号26的本发明寡聚物，与末端结构不同的PMO编号33(H44__27－47(TEG))相比，以同等的效率使外显子44发生跳跃(图18)。

[0602] 对于外显子50

[0603] 根据下述的实施例30～39的记载，合成了表15的PMO编号34～38及41～45中所示的各种PMO。将合成的PMO使用注射用水(大塚制药工厂公司制)溶解。此外，PMO编号39、40是

从ジーンツールズ公司购买获得。

[0604] 表15

[0605]

PMO 编号	序列名	备注	序列号
34	H50__103-123（OH）	5’末端：基团(3)	96
35	H50__104-124（OH）	5’末端：基团(3)	97
36	H50__105-125（OH）	5’末端：基团(3)	98
37	H50__106-126（OH）	5’末端：基团(3)	99
38	H50__107-127（OH）	5’末端：基团(3)	100
39	H50__90-114（GT）	相当于专利文献 4 记载的序列号（SEQ ID NO）：287 的序列 5’末端：基团(2)	101
40	H50__103-127（GT）	相当于专利文献 1 记载的序列号（SEQ ID NO）：175 的序列 5’末端：基团(2)	102
41	H50__107-126（OH）	5’末端：基团(3)	119
42	H50__108-127（OH）	5’末端：基团(3)	120
43	H50__108-128（OH）	5’末端：基团(3)	121
44	H50__109-129（OH）	5’末端：基团(3)	122
45	H50__107-127（TEG）	5’末端：基团(1)	100

[0606] [实施例30]

[0607] PMO.编号34

[0608] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0609] ESI－TOF－MS计算值:6861.8

[0610] 测定值:6861.8

[0611] [实施例31]

[0612] PMO.编号35

[0613] 按照与实施例1相同的方法，制造标记化合物。但是，作为起始原料，使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0614] ESI－TOF－MS计算值:6885.8

[0615] 测定值:6885.9

[0616] [实施例32]

[0617] PMO.编号36

[0618] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0619] ESI－TOF－MS计算值:6925.9

[0620] 测定值:6925.9

[0621] [实施例33]

[0622] PMO.编号37

[0623] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0624] ESI－TOF－MS计算值:6950.9

[0625] 测定值:6950.9

[0626] [实施例34]

[0627] PMO.编号38

[0628] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0629] ESI－TOF－MS计算值:6990.9

[0630] 测定值:6991.0

[0631] [实施例35]

[0632] PMO.编号41

[0633] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0634] ESI－TOF－MS计算值:6635.6

[0635] 测定值:6635.0

[0636] [实施例36]

[0637] PMO.编号42

[0638] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－[[(2S,6R)－6－[6－(2－氰基乙氧基)－2－[(2－苯氧基乙酰基)氨基]嘌呤－9－基]－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基]－4－氧代－丁酸(参考例2)。

[0639] ESI－TOF－MS计算值:6635.6

[0640] 测定值:6634.9

[0641] [实施例37]

[0642] PMO.编号43

[0643] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基

聚苯乙烯树脂上载持的4－(((2S,6R)－6－(5－甲基－2,4－二氧代－3,4－二氢嘧啶－1(2H)－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基)甲氧基)－4－氧代丁酸(参考例3)。

[0644] ESI－TOF－MS计算值:6965.9

[0645] 测定值:6965.2

[0646] [实施例38]

[0647] PMO.编号44

[0648] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的4－{[(2S,6R)－6－(6－苯甲酰胺嘌呤－9－基)－4－三苯甲基吗啉－2－基]甲氧基}－4－氧代丁酸(参考例4)。

[0649] ESI－TOF－MS计算值:6949.9

[0650] 测定值:6949.2

[0651] [实施例39]

[0652] PMO.编号45

[0653] 按照与实施例1相同的方法,制造标记化合物。但是,作为起始原料,使用了在氨基聚苯乙烯树脂上载持的1,12－二氧代－1－(4－三苯甲基哌嗪－1－基)－2,5,8,11－四氧代－15－十五烷酸(参考例5)。

[0654] ESI－TOF－MS计算值:7342.2

[0655] 测定值:7341.6

[0656] [试验例8]

[0657] 体外试验

[0658] 除浓度为0.1、0.3、1μM、通过以下的引物实施RT－PCR以外,以与外显子45(试验例2)同样的条件、步骤进行实验。

[0659] 正向引物:5'-AACAACCGGATGTGGAAGAG-3'(序列号103)

[0660] 反向引物:5'-TTGGAGATGGCAGTTTCCTT-3'(序列号104)

[0661] 实验结果

[0662] 将结果示于图13、19。根据本实验,确认到,与PMO编号39或40(H50__90－114(GT)、H50__103－127(GT))的反义寡聚物相比,PMO编号38(H50__107－127(OH))的本发明的寡聚物,在RD细胞中,以高效率使外显子50发生跳跃。另外,PMO编号38,与末端结构不同的PMO编号45(H50__107－127(TEG))相比,以高效率使外显子50发生跳跃(图19)。

[0663] 外显子44跳跃研究

[0664] 使用了人纤维芽细胞的体外试验

[0665] [试验例9]

[0666] 使用GM05112细胞(来自外显子45缺失DMD患者的纤维芽细胞,卡瑞尔医学研究所:Coriell Institute for Medical Research),检验了外显子44跳跃活性。增殖培养基是使用含有10％FCS及1％青霉素/链霉素(Penicillin/Streptomycin)(P/S)(シグマアルドリッチ公司制)的达尔伯克改良伊格尔培养基(DulbECco's Modified Eagle Medium):营养混合物(Nutrient Mixture)F-12(DMEM・F-12)(インビトロジェン公司制),5％CO_2存在下,以37℃条件培育。

[0667] 细胞在T225烧瓶中培育,相对于增殖培养基35mL添加2.5mL的来自人的MyoD(序列

号38)表达逆转录病毒(ZsGreen1共表达)以及以终浓度8μg/mL添加凝聚胺(シグマアルドリッチ公司制)。32℃培育2天后,换成新鲜的增殖培养基,进一步以37℃培育3天。通过BD流式细胞分选仪(BD FACSAria Cell Sorter)(BD Bioscience公司制)选择ZsGreen1阳性细胞,回收MyoD转换纤维芽细胞,在包被胶原(Collagen Coated)的24－孔板上以9×10^4细胞/孔(cells/well)方式进行播种。次日,换成分化培养基(含有2%马血清(インビトロジェン公司制)、1%P/S及ITS液体介质补充物(ITS Liquid Media Supplement)(シグマ公司制)的DMEM/F-12)。每隔2～3天,进行培养基交换的同时进行培育,分化诱导成肌管细胞。

[0668] 换成分化培养基之后的第7天,换成添加Endo-Porter(ジーンツール公司制)使终浓度为6μM的分化培养基,并添加PMO编号26及31使终浓度为1、3、10μM。培育7天之后,回收细胞,使用RNeasy迷你试剂盒(キアゲン公司制)萃取总RNA。相对于萃取的总RNA 50ng,使用QIAGEN OneStep RT-PCR试剂盒进行RT－PCR。按照所附的说明书,制备反应液。热循环仪是使用iCycler(商品名,Bio-Rad公司制)。所使用的RT－PCR的程序是如以下所示。

[0669] 50℃、30分钟:逆转录反应

[0670] 95℃、15分钟:热变性

[0671] [94℃、1分钟;60℃、1分钟;72℃、1分钟]×35循环:PCR扩增

[0672] 72℃、7分钟:最终延长反应

[0673] RT－PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如以下所示。

[0674] 正向引物:5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3'(序列号36)

[0675] 反向引物:5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3'(序列号37)

[0676] 上述RT－PCR反应的反应产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行分离,通过图像分析仪(ImageQuant LAS 4000mini)(富士フィルム公司制)拍摄凝胶照片。通过所附的软件,测定外显子44发生跳跃的条带的多核苷酸量"A"和外显子44没有发生跳跃的条带的多核苷酸量"B"。根据这些"A"及"B"的测定值,按照下式求出跳跃效率。

[0677] 跳跃效率(%)＝A/(A+B)×100

[0678] 实验结果

[0679] 将结果示于图20。根据本实验,确认到,PMO编号26及31的本发明的寡聚物,在GM05112细胞中,以高效率使外显子44发生跳跃。

[0680] [试验例10]

[0681] 与试验例9相同,使用GM05112细胞制备MyoD转换纤维芽细胞,分化诱导成肌管细胞。换成分化培养基之后的第6天,换成添加Endo-Porter(ジーンツール公司制)使终浓度为6μM的分化培养基,并添加PMO编号26及31使终浓度为10μM。培育14天之后,通过添加蛋白酶抑制剂混合物(Protease Inhibitor Cocktail)(Complete Mini)(ロッシュ公司制)的细胞溶解缓冲液(RIPA buffer)(Pierce公司制),用刮板回收细胞。通过超声波破碎机(Bioruptor UCD-250)(东湘电机公司制)破碎细胞,回收离心后的上清液,作为细胞裂解产物。细胞裂解产物的蛋白质浓度是,使用Pierce BCA protein assay试剂盒(Pierce公司制)求出。波长544nm的吸光度是,使用读板仪(Plate reader)Thermo Appliskan Type 2001(Thermo Electron公司制)测定。

[0682] 将细胞裂解产物3μg使用聚丙烯酰胺凝胶NuPAGE Novex Tris-乙酸酯凝胶(Acetate Gel)3－8%(インビトロジェン公司制)进行电泳。电泳结束后,通过半干转印

(Semi-dry Blotting)法转录到Immobilon-P membrane(Millipore公司制)。转录的膜用含有0.1％吐温20(Tween20)的PBS(PBST)清洗之后，用含有5％Amersham ECL素阻断剂(Amersham ECL Prime Blocking agent Amersham)(GE Healthcare公司制)的PBST在冷藏库内阻断一晚。用PBST洗净膜之后，在将抗抗肌萎缩蛋白抗体(NCL-Dys1，Novocastra公司制)用Can Get Signal1(商品名，TOYOBO)稀释50倍的溶液中，在室温下培育1小时。用PBST洗净之后，在将过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG抗体(170－6516、Bio-Rad公司制)用Can Get Signal2(商品名，TOYOBO公司制)稀释2,500倍的溶液中，在室温下培育10分钟。用PBST洗净之后，用加免疫印迹检测系统(ECL Plus Western Blotting Detection System ECL)(GE Healthcare公司制)处理。对于缺失相当于外显子44－45的部分的抗肌萎缩蛋白的化学发光，通过Lumino·图像分析仪(ImageQuant LAS 4000mini)(富士フィルム公司制)进行检测。

[0683] 实验结果

[0684] 将蛋白质印迹的结果示于图21。图21中，箭头是表示已确认表达的抗肌萎缩蛋白蛋白质的条带。根据本实验，确认到，PMO编号26及31的本发明的寡聚物是，在GM05112细胞中，诱导抗肌萎缩蛋白蛋白质的表达。

[0685] 外显子50跳跃研究

[0686] 使用了人纤维芽细胞的体外试验

[0687] [试验例11]

[0688] 与试验例9相同，使用GM05112细胞制备MyoD转换纤维芽细胞，分化诱导成肌管细胞。

[0689] 换成分化培养基之后的第12天，换成添加Endo-Porter(ジーンツール公司制)使终浓度为6μM的分化培养基，并添加PMO编号38使终浓度为0.1、0.3、1、3、10μM。培育2天之后，回收细胞。与试验例9相同，萃取总RNA之后，实施RT－PCR，求出跳跃效率。其中，RT－PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如以下所示。

[0690] 正向引物:5’-AACAACCGGATGTGGAAGAG-3’(序列号103)

[0691] 反向引物:5’-TTGGAGATGGCAGTTTCCTT-3’(序列号104)

[0692] 实验结果

[0693] 将RT－PCR的结果示于图22、跳跃效率示于图23。根据本实验，确认到，PMO编号38的本发明的寡聚物是，在GM05112细胞中，以高效率使外显子50发生跳跃，EC50值是1.3μM。

[0694] [试验例12]

[0695] 除使用11－0627细胞(来自外显子8－9重复DMD患者的纤维芽细胞、国立精神·神经医疗研究中心神经·肌疾患研究资源资源库)、PMO编号38添加时的终浓度为0.1、1、10μM以外，与试验例11相同的条件、步骤进行跳跃试验。

[0696] 实验结果

[0697] 将RT－PCR的结果示于图26、跳跃效率示于图27。根据本实验，确认到，PMO编号38的本发明的寡聚物是，在11－0627细胞中，以高效率使外显子50发生跳跃。

[0698] [试验例13]

[0699] pLVX-MyoD-ZsGreen1慢病毒的制作

[0700] 从pLVX-puro(8120bp、Clontech公司制)的多克隆位点内XhoI(位置2816)至嘌呤

霉素(puromycin)抗性基因编码区域的3'末端附近(位置3890),在删除1164bp而直链化的载体上,组合以人MyoD基因、IRES序列、ZsGreen1基因的顺序编码的序列(2272bp),制作慢病毒表达载体pLVX－MyoD－ZsGreen1(9210bp)。按照所附的Lenti-X HTX包装系统(Clontech公司制)的说明书,Lenti-X293T细胞播种于10cm包被胶原(Collagen Coated)盘中。在向纤维芽细胞的感染予定日的3天前,转染慢病毒表达载体、包装载体,4小时之后交换培养基,之后不交换培养基,培养3天。感染予定日当天,将培养上清液作为病毒液回收(每10cm盘约9mL)。将培育上清液用细胞筛网(40μm)过滤,将其进一步以500xg、10分钟离心。将该上清液按照Lenti-X浓缩器(Clontech公司制)的说明书进行浓缩,并溶解于DMEM/F12培养基,最终达到立即回收后的10倍浓度。将此溶液作为病毒液使用。

[0701] 向纤维芽细胞的病毒感染

[0702] 感染予定日之前,在包被胶原(Collagen Coated)24孔板中,将GM04364细胞(来自外显子51－55缺失DMD患者的纤维芽细胞、卡瑞尔医学研究所:Coriell Institute for Medical Research)以3×10^4/孔密度进行播种。感染予定日当天,每1孔添加分化培养基400uL、病毒液100uL、凝聚胺最终浓度8ug/mL。感染第二天,将含有病毒培养基换成分化培养基500uL。之后,每隔2～3天换成分化培养基、培养12天,由此分化诱导成肌管细胞。

[0703] 换成分化培养基之后的第12天,换成添加Endo-Porter(ジーンツール公司制)使终浓度为6μM的分化培养基,并添加PMO编号38使终浓度为0.1、0.3、1、3、10μM。培育2天之后,回收细胞。与试验例11相同,求出跳跃效率。其中,RT－PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如以下所示。

[0704] 正向引物:5'-AACAACCGGATGTGGAAGAG-3'(序列号103)

[0705] 反向引物:5'-CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3'(序列号70)

[0706] 实验结果

[0707] 将RT－PCR的结果示于图28、跳跃效率示于图29。根据本实验,确认到,PMO编号38的本发明的寡聚物是,在GM04364细胞中,以高效率使外显子50发生跳跃。

[0708] 外显子55跳跃研究

[0709] 使用了人纤维芽细胞的体外试验

[0710] [试验例14]

[0711] 除使用PMO编号14、21、通过以下的引物实施RT－PCR以外,以与试验例11同样的条件、步骤进行实验。

[0712] 正向引物:5'-CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3'(序列号69)

[0713] 反向引物:5'-CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3'(序列号70)

[0714] 实验结果

[0715] 将RT－PCR的结果示于图24、跳跃效率示于图25。根据本实验,确认到,PMO编号14、21的本发明的寡聚物是,在GM05112细胞中,以高效率使外显子55发生跳跃,EC50值分别为3.5μM、7.5μM。

[0716] [试验例15]

[0717] 除将细胞使用04－035细胞(来自外显子54单独缺失DMD患者的细胞、国立精神·神经医疗研究中心神经·肌疾患研究资源资源库)、以终浓度1、3、10μM添加PMO编号14、21、通过以下的引物实施RT－PCR以外,以与试验例13同样的条件、步骤进行实验。

[0718] 正向引物:5'-CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3'(序列号69)

[0719] 反向引物:5'-CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3'(序列号70)

[0720] 实验结果

[0721] 将RT－PCR的结果示于图30、跳跃效率示于图31。根据本实验,确认到,PMO编号14、21的本发明的寡聚物是,在来自外显子54单独缺失DMD患者的细胞中,以高效率使外显子55发生跳跃。

[0722] 工业实用性

[0723] 根据试验例中所示的实验结果,本发明的寡聚物在RD细胞及来自DMD患者的细胞的两种环境中,显示以显著高的效率使靶外显子(如,外显子55等)发生跳跃。

[0724] 因此,本发明的寡聚物,DMD的治疗中,是非常有用的。

[0725] 序列表自由文字(free text)

[0726] 序列号9:合成核酸。

[0727] 序列号10:合成核酸。

[0728] 序列号11:合成核酸。

[0729] 序列号12:合成核酸。

[0730] 序列号13:合成核酸。

[0731] 序列号14:合成核酸。

[0732] 序列号15:合成核酸。

[0733] 序列号16:合成核酸。

[0734] 序列号17:合成核酸。

[0735] 序列号18:合成核酸。

[0736] 序列号19:合成核酸。

[0737] 序列号20:合成核酸。

[0738] 序列号21:合成核酸。

[0739] 序列号22:合成核酸。

[0740] 序列号23:合成核酸。

[0741] 序列号24:合成核酸。

[0742] 序列号25:合成核酸。

[0743] 序列号26:合成核酸。

[0744] 序列号27:合成核酸。

[0745] 序列号28:合成核酸。

[0746] 序列号29:合成核酸。

[0747] 序列号30:合成核酸。

[0748] 序列号31:合成核酸。

[0749] 序列号32:合成核酸。

[0750] 序列号33:合成核酸。

[0751] 序列号34:合成核酸。

[0752] 序列号35:合成核酸。

[0753] 序列号36:合成核酸。

[0754] 序列号37:合成核酸。

[0755] 序列号38:合成核酸。

[0756] 序列号39:合成核酸。

[0757] 序列号40:合成核酸。

[0758] 序列号41:合成核酸。

[0759] 序列号42:合成核酸。

[0760] 序列号43:合成核酸。

[0761] 序列号45:合成核酸。

[0762] 序列号46:合成核酸。

[0763] 序列号47:合成核酸。

[0764] 序列号48:合成核酸。

[0765] 序列号49:合成核酸。

[0766] 序列号50:合成核酸。

[0767] 序列号51:合成核酸。

[0768] 序列号52:合成核酸。

[0769] 序列号53:合成核酸。

[0770] 序列号54:合成核酸。

[0771] 序列号55:合成核酸。

[0772] 序列号56:合成核酸。

[0773] 序列号57:合成核酸。

[0774] 序列号58:合成核酸。

[0775] 序列号59:合成核酸。

[0776] 序列号60:合成核酸。

[0777] 序列号61:合成核酸。

[0778] 序列号62:合成核酸。

[0779] 序列号63:合成核酸。

[0780] 序列号64:合成核酸。

[0781] 序列号65:合成核酸。

[0782] 序列号66:合成核酸。

[0783] 序列号67:合成核酸。

[0784] 序列号68:合成核酸。

[0785] 序列号69:合成核酸。

[0786] 序列号70:合成核酸。

[0787] 序列号71:合成核酸。

[0788] 序列号72:合成核酸。

[0789] 序列号73:合成核酸。

[0790] 序列号74:合成核酸。

[0791] 序列号75:合成核酸。

[0792] 序列号76:合成核酸。

[0793] 序列号77:合成核酸。

[0794] 序列号78:合成核酸。

[0795] 序列号79:合成核酸。

[0796] 序列号80:合成核酸。

[0797] 序列号81:合成核酸。

[0798] 序列号82:合成核酸。

[0799] 序列号83:合成核酸。

[0800] 序列号84:合成核酸。

[0801] 序列号85:合成核酸。

[0802] 序列号86:合成核酸。

[0803] 序列号87:合成核酸。

[0804] 序列号88:合成核酸。

[0805] 序列号89:合成核酸。

[0806] 序列号90:合成核酸。

[0807] 序列号91:合成核酸。

[0808] 序列号92:合成核酸。

[0809] 序列号93:合成核酸。

[0810] 序列号94:合成核酸。

[0811] 序列号95:合成核酸。

[0812] 序列号96:合成核酸。

[0813] 序列号97:合成核酸。

[0814] 序列号98:合成核酸。

[0815] 序列号99:合成核酸。

[0816] 序列号100:合成核酸。

[0817] 序列号101:合成核酸。

[0818] 序列号102:合成核酸。

[0819] 序列号103:合成核酸。

[0820] 序列号104:合成核酸。

[0821] 序列号105:合成核酸。

[0822] 序列号106:合成核酸。

[0823] 序列号107:合成核酸。

[0824] 序列号108:合成核酸。

[0825] 序列号109:合成核酸。

[0826] 序列号110:合成核酸。

[0827] 序列号111:合成核酸。

[0828] 序列号112:合成核酸。

[0829] 序列号113:合成核酸。

[0830] 序列号114:合成核酸。

[0831] 序列号115:合成核酸。

[0832] 序列号116:合成核酸。

[0833] 序列号117:合成核酸。

[0834] 序列号118:合成核酸。

[0835] 序列号119:合成核酸。

[0836] 序列号120:合成核酸。

[0837] 序列号121:合成核酸。

[0838] 序列号122:合成核酸。

[0839] 序列表。

序列表

<110> 日本新药株式会社(NIPPON SHINYAKU CO., LTD.)

国立精神·神经医疗研究中心(NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY)

<120> 反义核酸(ANTISENSE NUCLEIC ACID)

<130> PCT12-0051

<150> JP 2011-288040

<151> 2011-12-28

<150> JP 2012-043092

<151> 2012-02-29

<160> 122

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 192

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

agggtgagtg agcgagaggc tgctttggaa gaaactcata gattactgca acagttcccc 60

ctggacctgg aaaagtttct tgcctggctt acagaagctg aaacaactgc caatgtccta 120

caggatgcta cccgtaagga aaggctccta gaagactcca agggagtaaa agagctgatg 180

aaacaatggc aa 192

<210> 2

<211> 179

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

caggaactcc aggatggcat tgggcagcgg caaactgttg tcagaacatt gaatgcaact 60

ggggaagaaa taattcagca atcctcaaaa acagatgcca gtattctaca ggaaaaattg 120

ggaagcctga atctgcggtg gcaggaggtc tgcaaacagc tgtcagacag aaaaaagag 179

<210> 3

<211> 129

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

aggaagttag aagatctgag ctctgagtgg aaggcggtaa accgtttact tcaagagctg 60

agggcaaagc agcctgacct agctcctgga ctgaccacta ttggagcctg taagtatact 120

ggatcccat 129

<210> 4

<211> 148

<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 4
gcgatttgac agatctgttg agaaatggcg gcgttttcat tatgatataa agatatttaa 60
tcagtggcta acagaagctg aacagtttct cagaaagaca caaattcctg agaattggga 120
acatgctaaa tacaaatggt atcttaag 148
<210> 5
<211> 192
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 5
ttgccattgt ttcatcagct cttttactcc cttggagtct tctaggagcc tttccttacg 60
ggtagcatcc tgtaggacat tggcagttgt ttcagcttct gtaagccagg caagaaactt 120
ttccaggtcc agggggaact gttgcagtaa tctatgagtt tcttccaaag cagcctctcg 180
ctcactcacc ct 192
<210> 6
<211> 179
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 6
ctctttttc tgtctgacag ctgtttgcag acctcctgcc accgcagatt caggcttccc 60
aatttttcct gtagaatact ggcatctgtt tttgaggatt gctgaattat ttcttcccca 120
gttgcattca atgttctgac aacagtttgc cgctgcccaa tgccatcctg gagttcctg 179
<210> 7
<211> 129
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 7
atgggatcca gtatacttac aggctccaat agtggtcagt ccaggagcta ggtcaggctg 60
ctttgccctc agctcttgaa gtaaacggtt taccgccttc cactcagagc tcagatcttc 120
taacttcct 129
<210> 8
<211> 148
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 8
cttaagatac catttgtatt tagcatgttc ccaattctca ggaatttgtg tctttctgag 60
aaactgttca gcttctgtta gccactgatt aaatatcttt atatcataat gaaaacgccg 120
ccatttctca acagatctgt caaatcgc 148

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 9
caatgccatc ctggagttcc t 21
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 10
ccaatgccat cctggagttc c 21
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 11
cccaatgcca tcctggagtt c 21
<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 12
gcccaatgcc atcctggagt t 21
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 13

tgcccaatgc catcctggag t 21

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 14

cccaatgcca tcctggagtt cctgt 25

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 15

cagtttgccg ctgcccaatg ccatcctgga 30

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 16

ccaatgccat cctggagttc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 17

cccaatgcca tcctggagtt 20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 18
cccaatgcca tcctggagtt c 21
<210> 19
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 19
gcugcccaau gccauccugg aguuc 25
<210> 20
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 20
uugccgcugc ccaaugccau ccugg 25
<210> 21
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 21
acaguuugcc gcugcccaau gccau 25
<210> 22
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 22
ugacaacagu uugccgcugc ccaau 25
<210> 23
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 23
uguucugaca acaguuugcc gcugc 25
<210> 24
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 24
uucaauguuc ugacaacagu uugcc 25
<210> 25
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 25
uugcauucaa uguucugaca acagu 25
<210> 26
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 26
cccaguugca uucaauguuc ugaca 25
<210> 27
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 27
ucuuccccag uugcauucaa uguuc 25
<210> 28
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)

<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 28
uuauuucuuc cccaguugca uucaa 25
<210> 29
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 29
cugaauuauu ucuuccccag uugca 25
<210> 30
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 30
gauugcugaa uuauuucuuc cccag 25
<210> 31
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 31
uugaggauug cugaauuauu ucuuc 25
<210> 32
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 32
uguuuuugag gauugcugaa uuauu 25
<210> 33
<211> 25
<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 33
gcaucuguuu uugaggauug cugaa 25
<210> 34
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 34
uacuggcauc uguuuuugag gauug 25
<210> 35
<211> 25
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 35
uuugccgcug cccaaugcca uccug 25
<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 36
gctcaggtcg gattgacatt 20
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 37
gggcaactct tccaccagta 20
<210> 38
<211> 963

<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 38
atggagctac tgtcgccacc gctccgcgac gtagacctga cggccccga cggctctctc 60
tgctcctttg ccacaacgga cgacttctat gacgacccgt gtttcgactc cccggacctg 120
cgcttcttcg aagacctgga cccgcgcctg atgcacgtgg gcgcgctcct gaaacccgaa 180
gagcactcgc acttccccgc ggcggtgcac ccggccccgg gcgcacgtga ggacgagcat 240
gtgcgcgcgc ccagcgggca ccaccaggcg ggccgctgcc tactgtgggc ctgcaaggcg 300
tgcaagcgca agaccaccaa cgccgaccgc cgcaaggccg ccaccatgcg cgagcggcgc 360
cgcctgagca aagtaaatga ggcctttgag acactcaagc gctgcacgtc gagcaatcca 420
aaccagcggt tgcccaaggt ggagatcctg cgcaacgcca tccgctatat cgagggcctg 480
caggctctgc tgcgcgacca ggacgccgcg ccccctggcg ccgcagccgc cttctatgcg 540
ccgggcccgc tgcccccggg ccgcggcggc gagcactaca gcggcgactc cgacgcgtcc 600
agcccgcgct ccaactgctc cgacggcatg atggactaca gcggcccccc gagcggcgcc 660
cggcggcgga actgctacga aggcgcctac tacaacgagg cgcccagcga acccaggccc 720
gggaagagtg cggcggtgtc gagcctagac tgcctgtcca gcatcgtgga gcgcatctcc 780
accgagagcc ctgcggcgcc cgccctcctg ctggcggacg tgccttctga gtcgcctccg 840
cgcaggcaag aggctgccgc ccccagcgag ggagagagca gcggcgaccc cacccagtca 900
ccggacgccg ccccgcagtg ccctgcgggt gcgaacccca acccgatata ccaggtgctc 960
tga 963
<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 39
cctgagaatt gggaacatgc 20
<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 40
ttgctgctct tttccaggtt 20
<210> 41
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 41
agcagcctct cgctcactca c 21
<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 42
ttccaaagca gcctctcgct c 21
<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 43
ttcttccaaa gcagcctctc g 21
<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 44
agtttcttcc aaagcagcct c 21
<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 45
tttcttccaa agcagcctct c 21
<210> 46
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 46
gtttcttcca aagcagcctc t 21
<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 47
gagtttcttc caaagcagcc t 21
<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 48
tgagtttctt ccaaagcagc c 21
<210> 49
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 49
gcagccucuc gcucacucac c 21
<210> 50
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 50
ccaaagcagc cucucgcuca c 21
<210> 51

<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 51
uucuuccaaa gcagccucuc g 21
<210> 52
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 52
aucuaugagu uucuuccaaa g 21
<210> 53
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 53
uguugcagua aucuaugagu u 21
<210> 54
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 54
caggggaac uguugcagua a 21
<210> 55
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 55
uuuccagguc caggggaac u 21

<210> 56
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 56
gcaagaaacu uuuccagguc c 21
<210> 57
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 57
uguaagccag gcaagaaacu u 21
<210> 58
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 58
uuucagcuuc uguaagccag g 21
<210> 59
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 59
uuggcaguug uuucagcuuc u 21
<210> 60
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 60

cuguaggaca uuggcaguug u 21

<210> 61

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 61

ggguagcauc cuguaggaca u 21

<210> 62

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 62

cuuuccuuac ggguagcauc c 21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 63

uucuaggagc cuuuccuuac g 21

<210> 64

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 64

ccuuggaguc uucuaggagc c 21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 65
ucuuuuacuc ccuuggaguc u 21
<210> 66
<211> 21
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 66
uuucaucagc ucuuuuacuc c 21
<210> 67
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 67
uugccauugu uucaucagcu 20
<210> 68
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 68
uccuguagga cauuggcagu 20
<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 69
catggaagga gggtccctat 20
<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 70
ctgccggctt aattcatcat 20
<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 71
ataatgaaaa cgccgccatt t 21
<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 72
tcataatgaa aacgccgcca t 21
<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 73
atcataatga aaacgccgcc a 21
<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 74
tatcataatg aaaacgccgc c 21
<210> 75
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)

<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 75
atatcataat gaaaacgccg c 21
<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 76
tatatcataa tgaaaacgcc g 21
<210> 77
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 77
ttatatcata atgaaaacgc c 21
<210> 78
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 78
tgaaaacgcc gccatttctc aacagatctg 30
<210> 79
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 79
atcataatga aaacgccgcc 20
<210> 80
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 80
tatcataatg aaaacgccgc 20
<210> 81
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 81
tatcataatg aaaacgccgc c 21
<210> 82
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 82
cucaacagau cugucaaauc gc 22
<210> 83
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 83
gccgccauuu cucaacagau cu 22
<210> 84
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 84
uaaugaaaac gccgccauuu cu 22
<210> 85
<211> 22

<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 85
uaucauaaug aaaacgccgc ca 22
<210> 86
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 86
cuuuauauca uaaugaaaac gc 22
<210> 87
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 87
gauuaaauau cuuuauauca ua 22
<210> 88
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 88
guuagccacu gauuaaauau cu 22
<210> 89
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 89
uucagcuucu guuagccacu ga 22
<210> 90

<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 90
ugagaaacug uucagcuucu gu 22
<210> 91
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 91
ugugucuuuc ugagaaacug uu 22
<210> 92
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 92
guucccaauu cucaggaauu ug 22
<210> 93
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 93
uauuuagcau guucccaauu cu 22
<210> 94
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 94
auaccauuug uauuuagcau gu 22

<210> 95
<211> 20
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 95
ucagcuucug uuagccacug 20
<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 96
tccagtatac ttacaggctc c 21
<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 97
atccagtata cttacaggct c 21
<210> 98
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 98
gatccagtat acttacaggc t 21
<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 99

ggatccagta tacttacagg c 21

<210> 100

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 100

gggatccagt atacttacag g 21

<210> 101

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 101

cttacaggct ccaatagtgg tcagt 25

<210> 102

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 102

gggatccagt atacttacag gctcc 25

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 103

aacaaccgga tgtggaagag 20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)

<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)

<400> 104
ttggagatgg cagtttcctt 20
<210> 105
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 105
cauuucucaa cagaucuguc aa 22
<210> 106
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 106
aaaacgccgc cauuucucaa ca 22
<210> 107
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 107
aauaucuuua uaucauaaug aa 22
<210> 108
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 108
cuucuguuag ccacugauua aa 22
<210> 109
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>

<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 109
aacuguucag cuucuguuag cc 22
<210> 110
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 110
cuuucugaga aacuguucag cu 22
<210> 111
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 111
gaauuugugu cuuucugaga aa 22
<210> 112
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 112
cucaggaauu ugugucuuuc ug 22
<210> 113
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 113
caauucucag gaauuugugu cu 22
<210> 114
<211> 22
<212> DNA/RNA
<213> 人工序列(Artificial)

<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 114
agcauguucc caauucucag ga 22
<210> 115
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 115
gagtcttcta ggagcctt 18
<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 116
gtttcttcca aagcagcctc 20
<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 117
agtttcttcc aaagcagcct 20
<210> 118
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 118
agtttcttcc aaagcagcct c 21
<210> 119
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 119
ggatccagta tacttacagg 20
<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 120
gggatccagt atacttacag 20
<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 121
tgggatccag tatacttaca g 21
<210> 122
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial)
<220>
<223> 合成核酸(Synthetic Nucleic Acid)
<400> 122
atgggatcca gtatacttac a 21

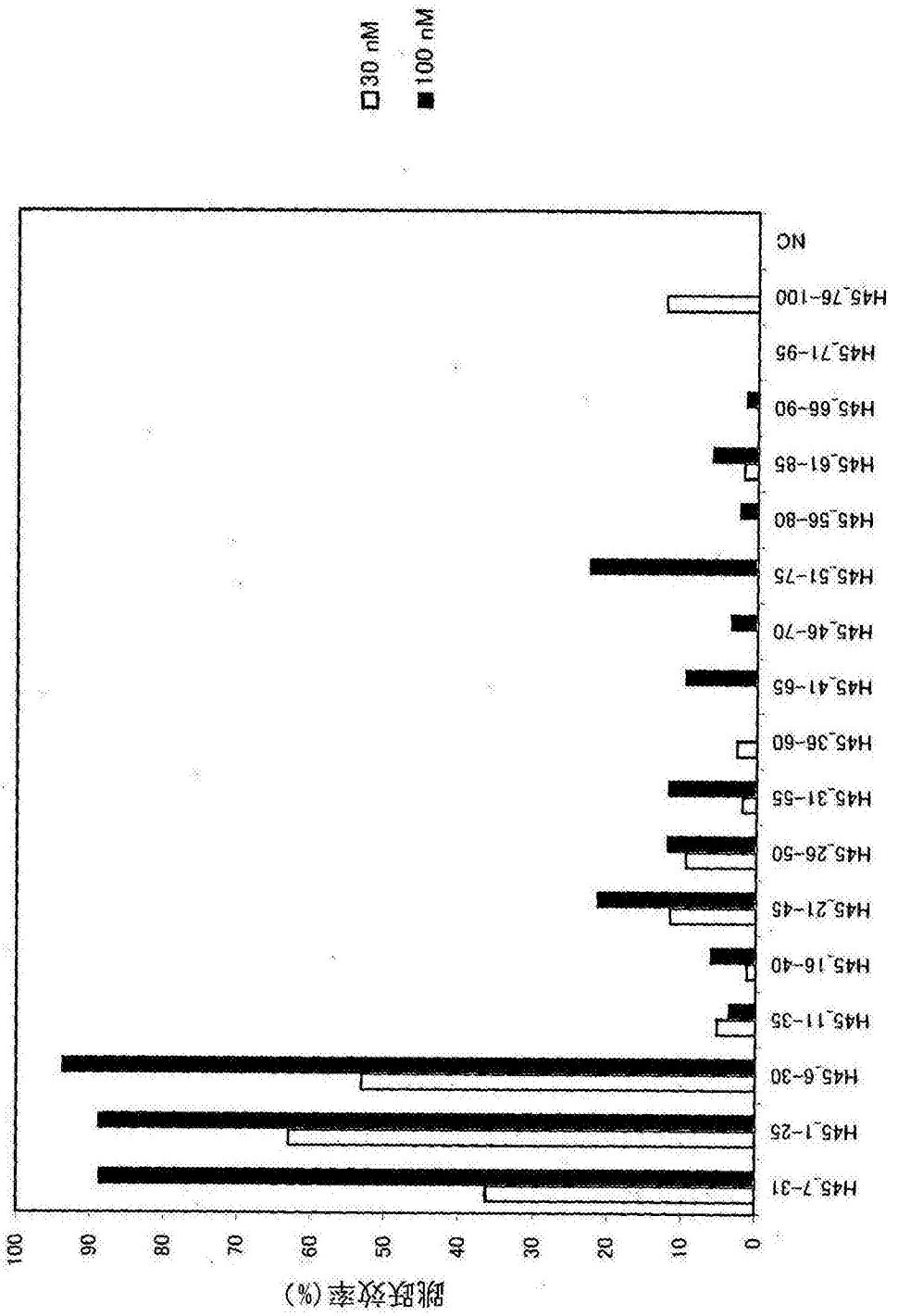

30 nM
100 nM
NC
H45_76-100
H45_71-95
H45_66-90
H45_61-85
H45_56-80
H45_51-75
H45_46-70
H45_41-65
H45_36-60
H45_31-55
H45_26-50
H45_21-45
H45_16-40
H45_11-35
H45_6-30
H45_1-25
H45_7-31
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
跳跃效率(%)

图1

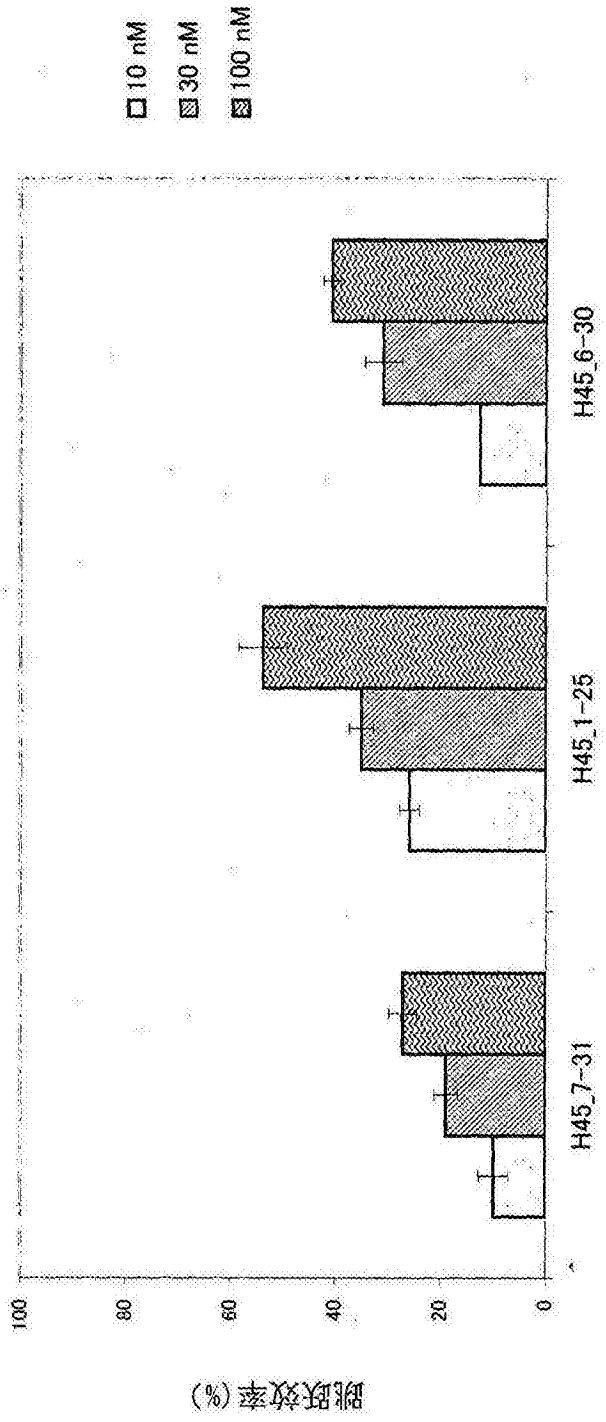


图2

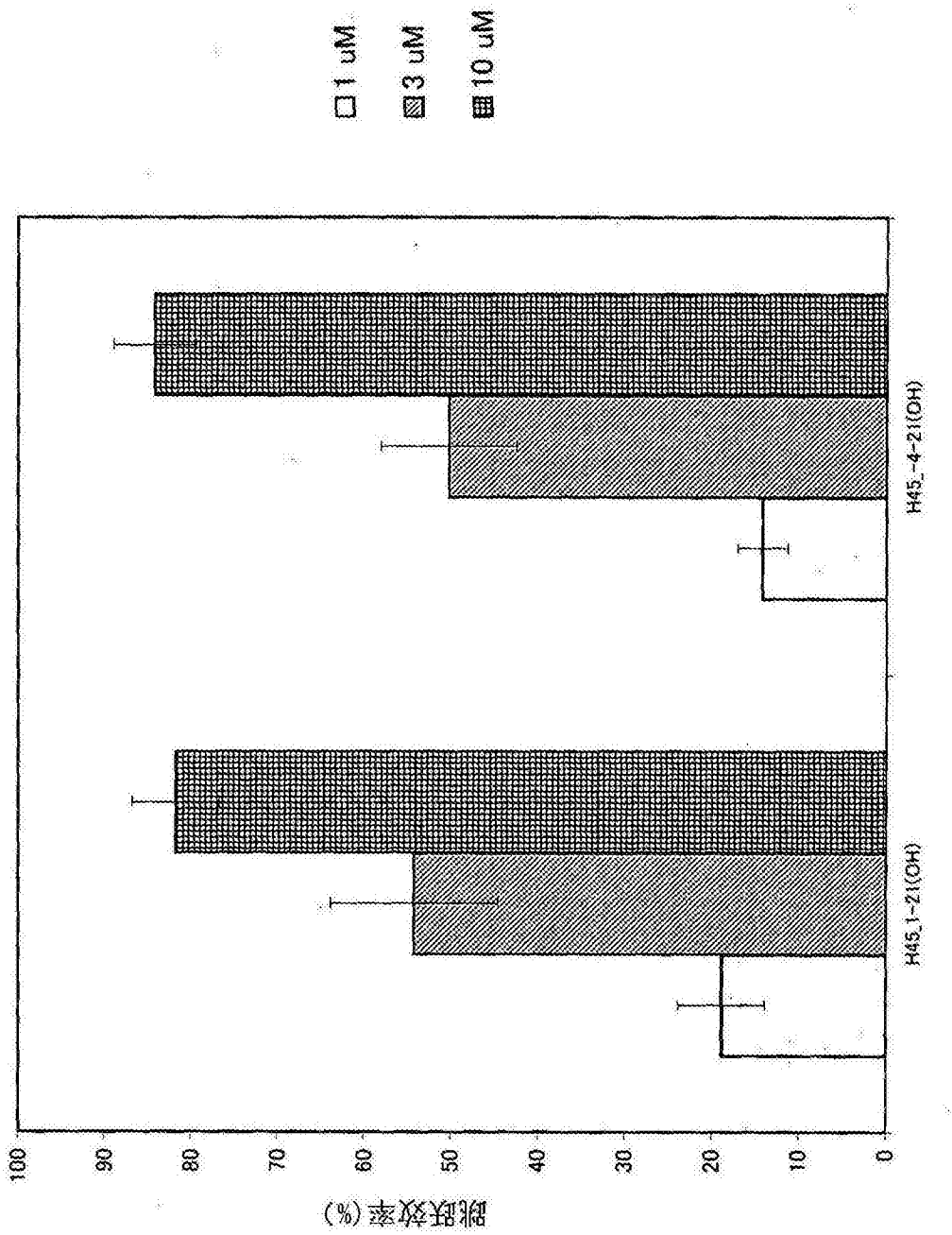

1 uM
3 uM
10 uM
H45_4-21(OH)
H45_1-21(OH)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
跳跃效率(%)

图3

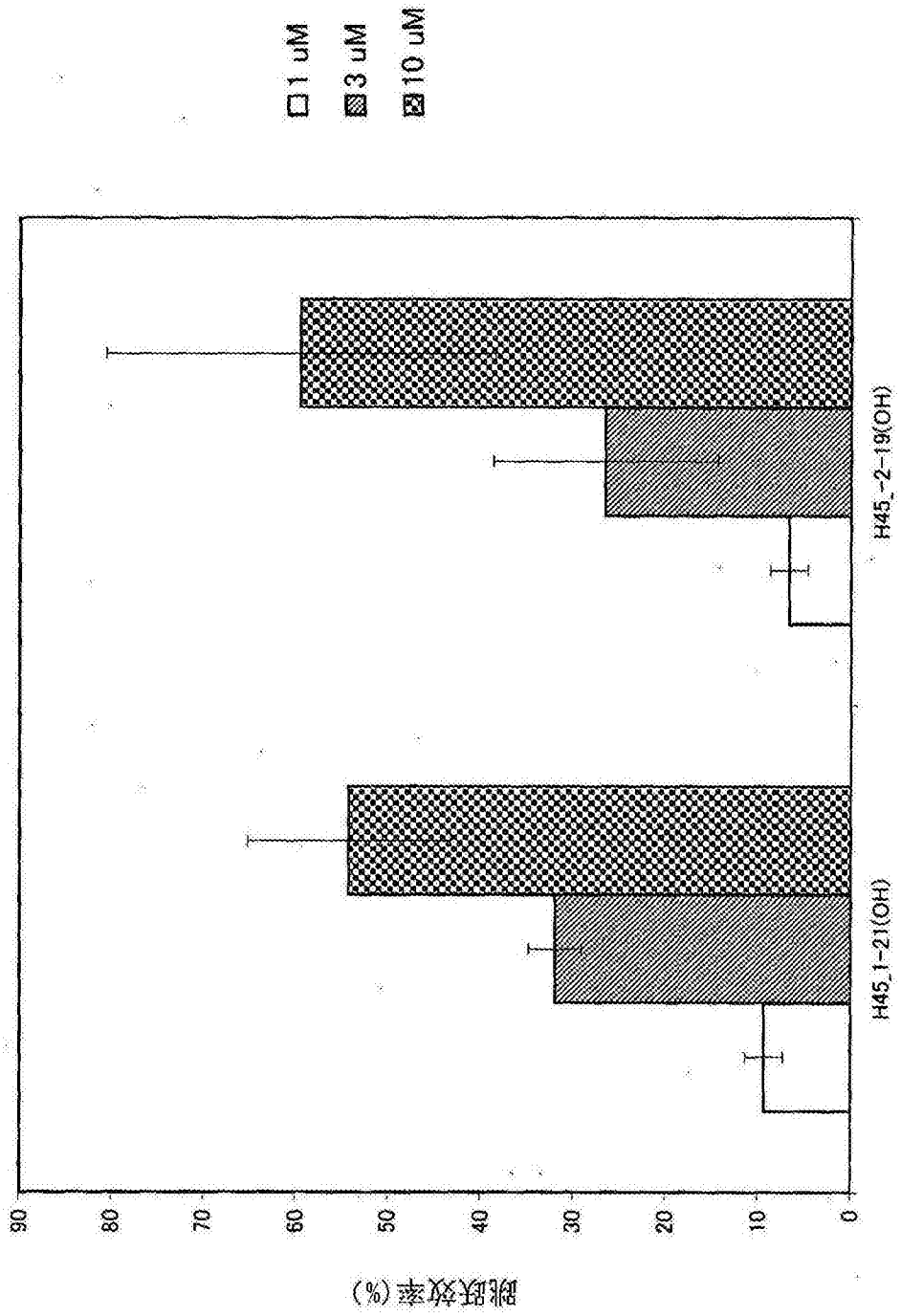


图4

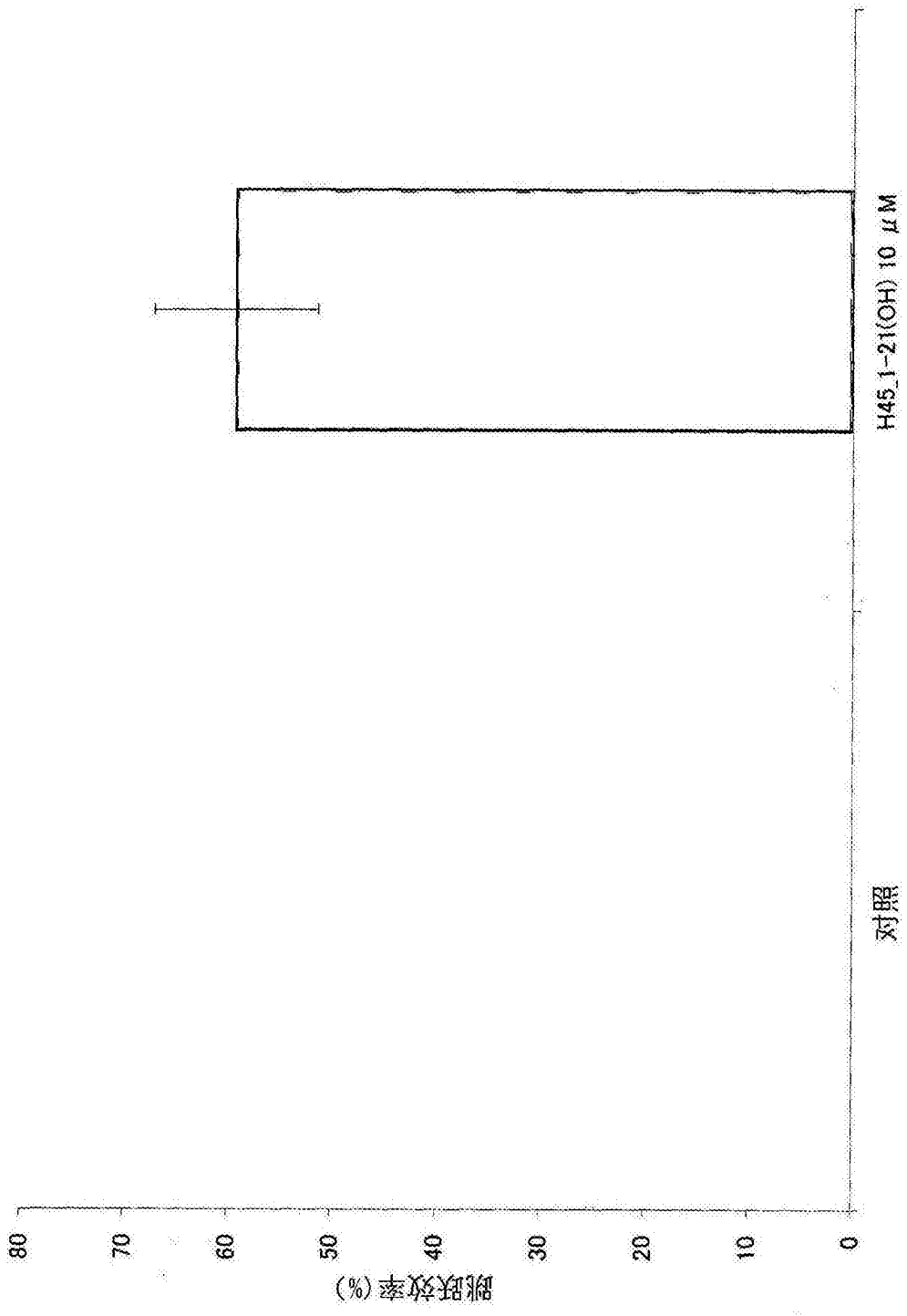


图5

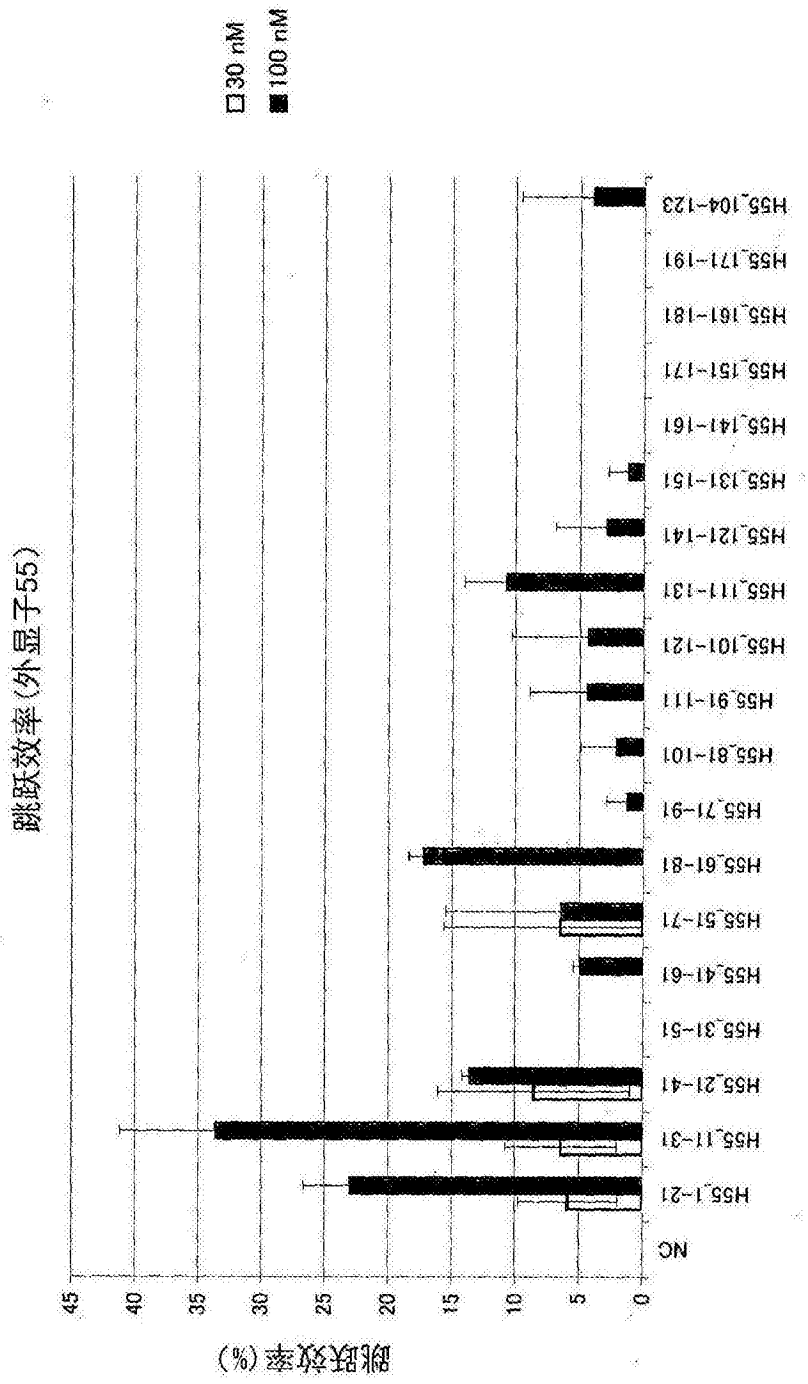

30 nM
100 nM
跳跃效率(外显子55)
跳跃效率(%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
NC
H55_1-21
H55_11-31
H55_21-41
H55_31-51
H55_41-61
H55_51-71
H55_61-81
H55_71-91
H55_81-101
H55_91-111
H55_101-121
H55_111-131
H55_121-141
H55_131-151
H55_141-161
H55_151-171
H55_161-181
H55_171-191
H55_104-123

图6

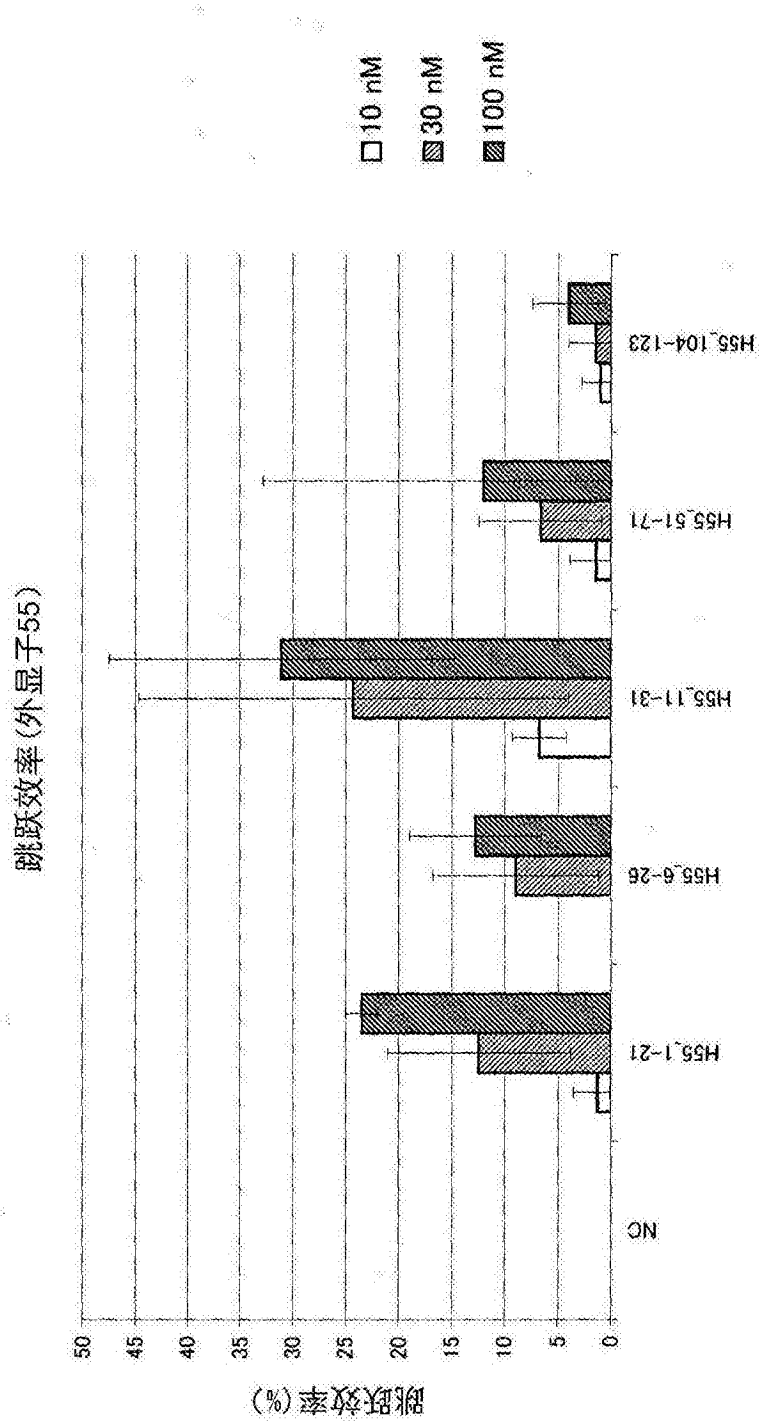

10 nM
30 nM
100 nM
跳跃效率(外显子55)
跳跃效率(%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
NC
H55_1-21
H55_6-26
H55_11-31
H55_51-71
H55_104-123

图7

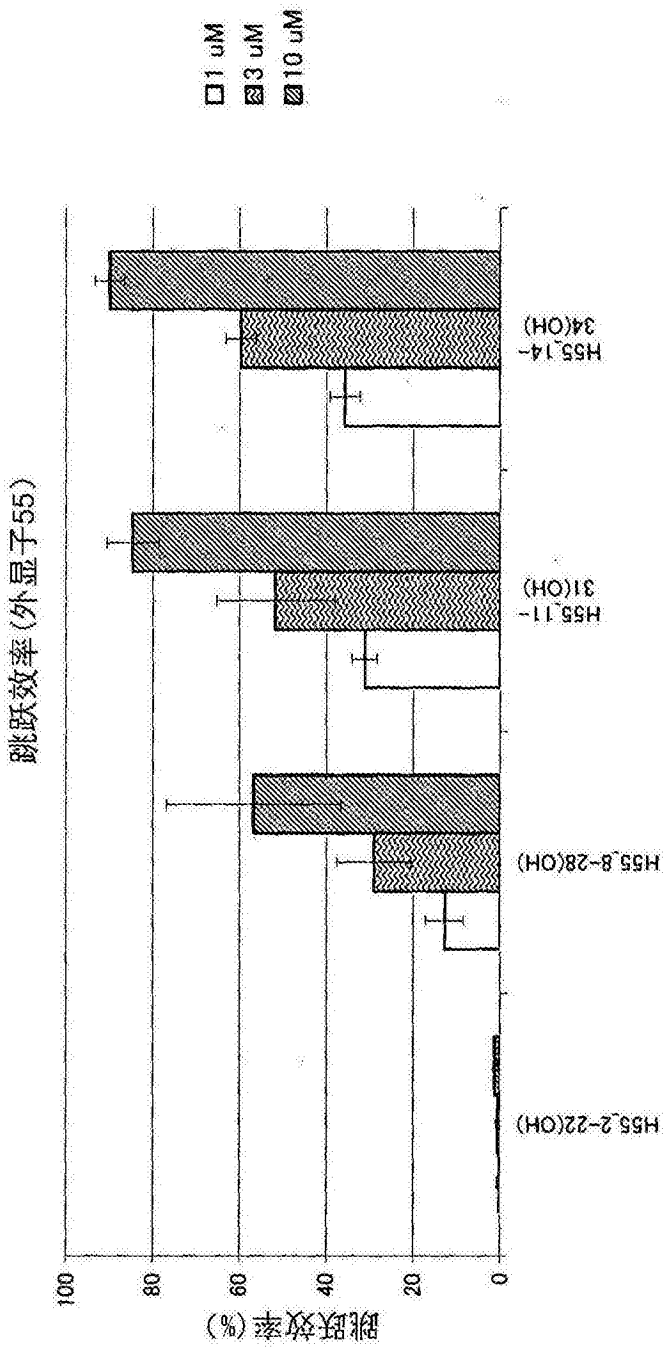

1 uM
3 uM
10 uM
跳跃效率(外显子55)
H55_14-34(OH)
H55_11-31(OH)
H55_8-28(OH)
H55_2-22(OH)
100
80
60
40
20
0
跳跃效率(%)

图8

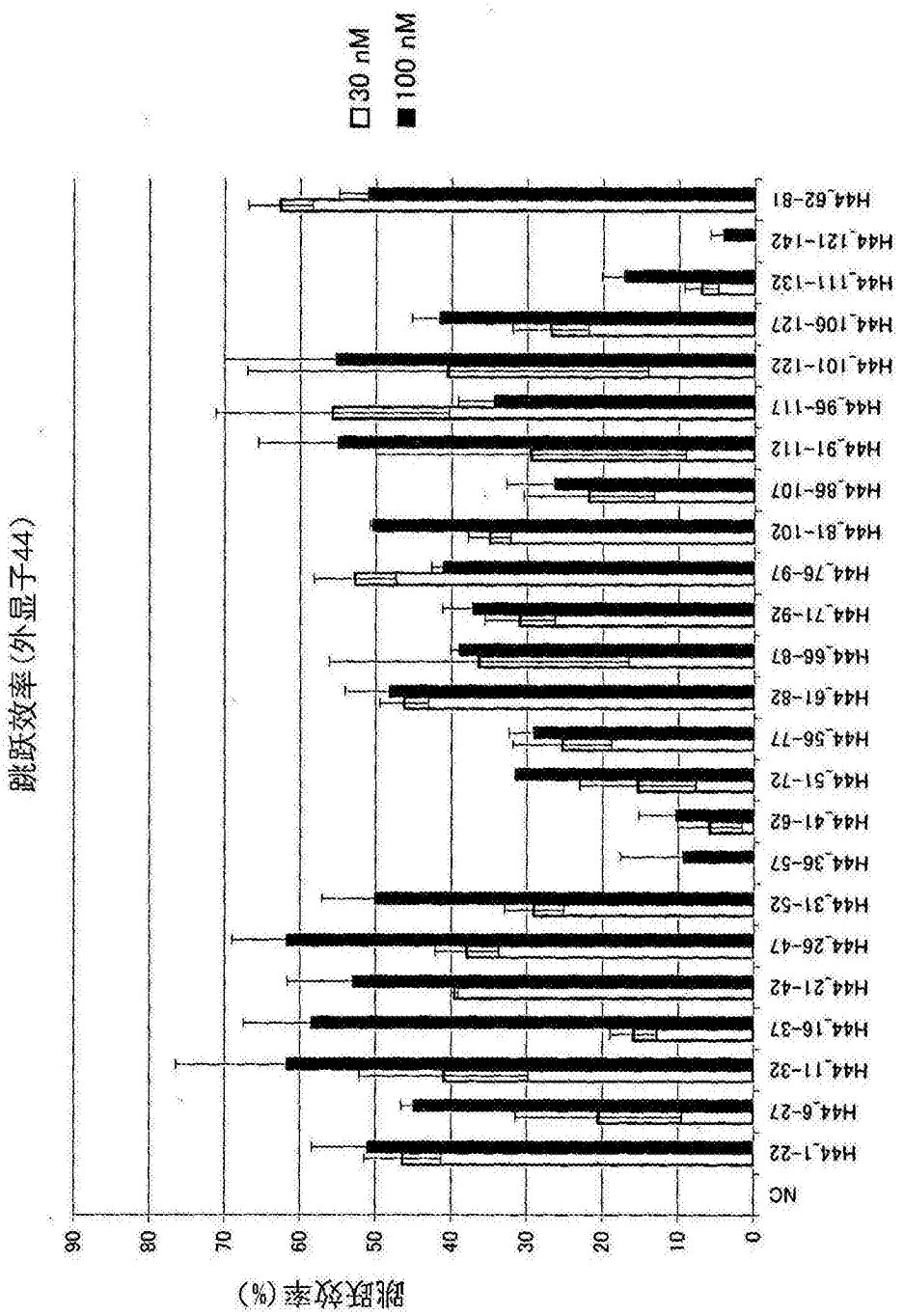

30 nM
100 nM
跳跃效率(外显子44)
跳跃效率(%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
NC
H44_1-22
H44_6-27
H44_11-32
H44_16-37
H44_21-42
H44_26-47
H44_31-52
H44_36-57
H44_41-62
H44_51-72
H44_56-77
H44_61-82
H44_66-87
H44_71-92
H44_76-97
H44_81-102
H44_86-107
H44_91-112
H44_96-117
H44_101-122
H44_106-127
H44_111-132
H44_121-142
H44_62-81

图9

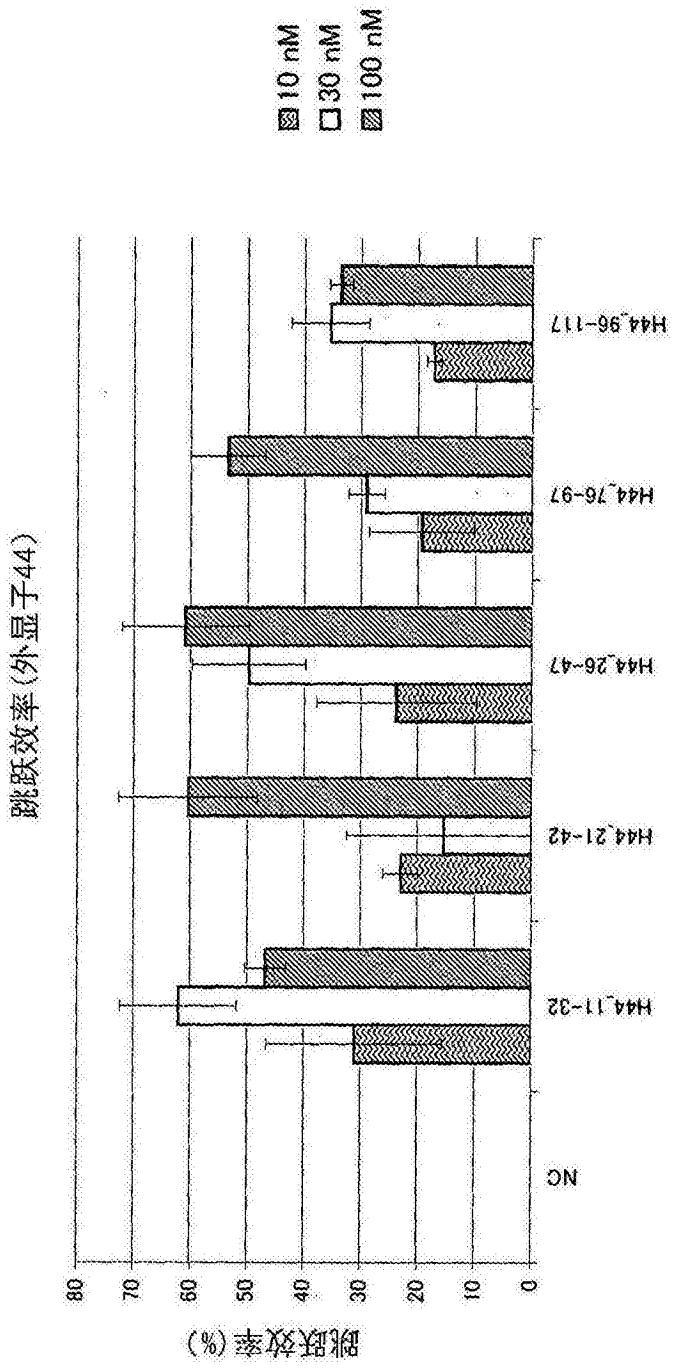

10 nM
30 nM
100 nM
跳跃效率(外显子44)
H44_96-117
H44_76-97
H44_26-47
H44_21-42
H44_11-32
NC
80
70
60
50
40
30
20
10
0
跳跃效率(%)

图10

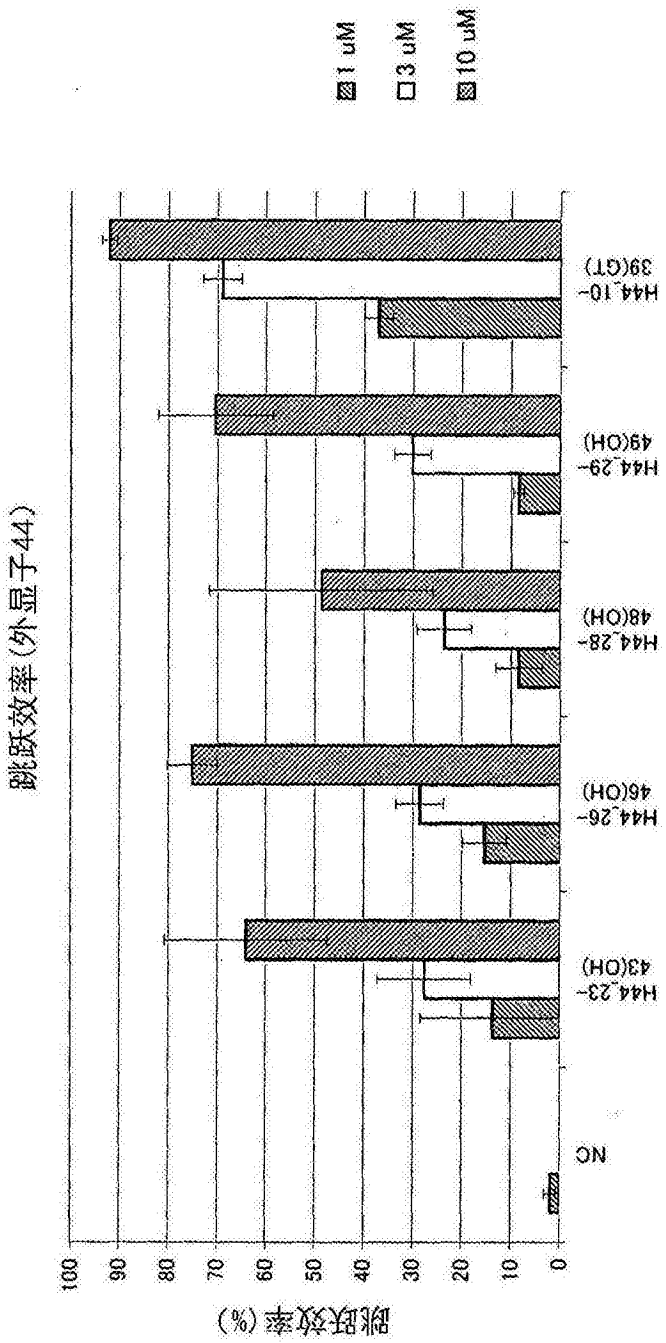

1 uM
3 uM
10 uM
跳跃效率(外显子44)
跳跃效率(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NC
H44_23-43(OH)
H44_26-46(OH)
H44_28-48(OH)
H44_29-49(OH)
H44_10-39(GT)

图11

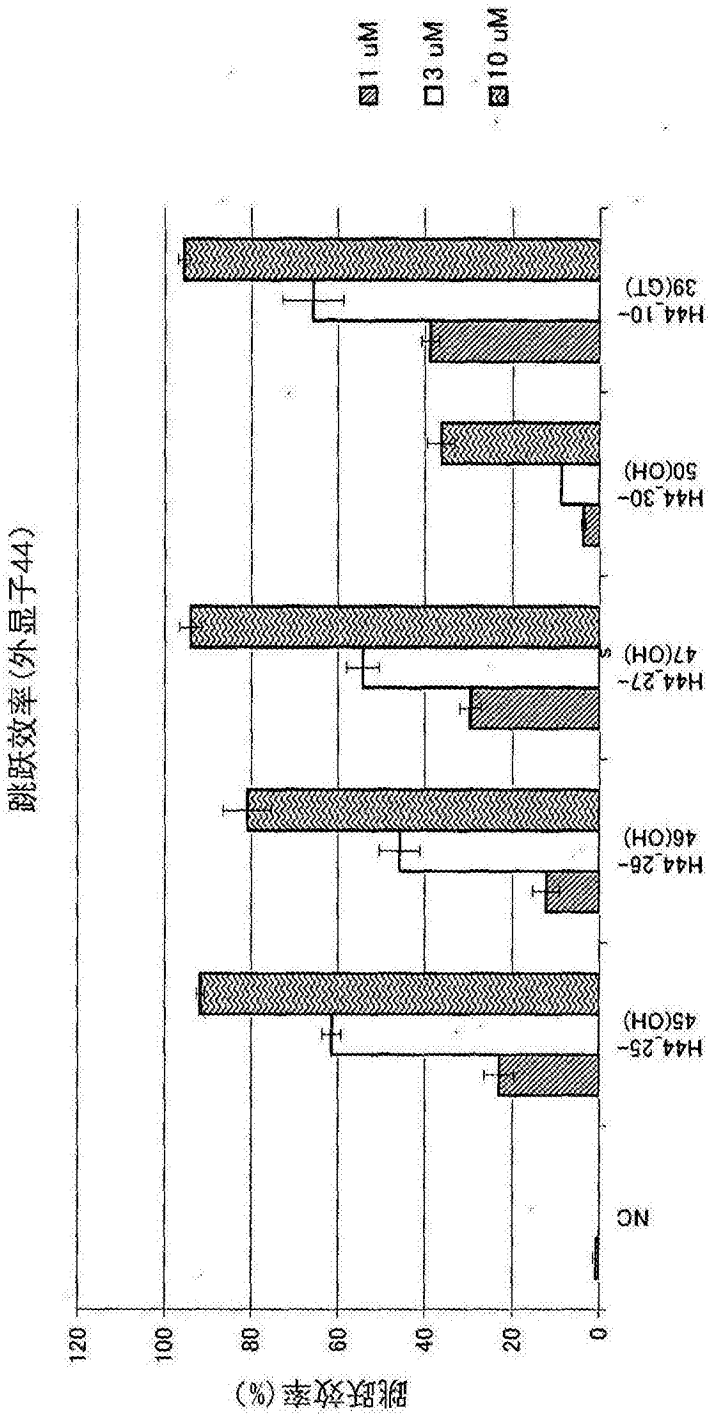

1 uM
3 uM
10 uM
跳跃效率(外显子44)
跳跃效率(%)
120
100
80
60
40
20
0
NC
H44_25-45(OH)
H44_26-46(OH)
H44_27-47(OH)
H44_30-50(OH)
H44_10-39(GT)

图12

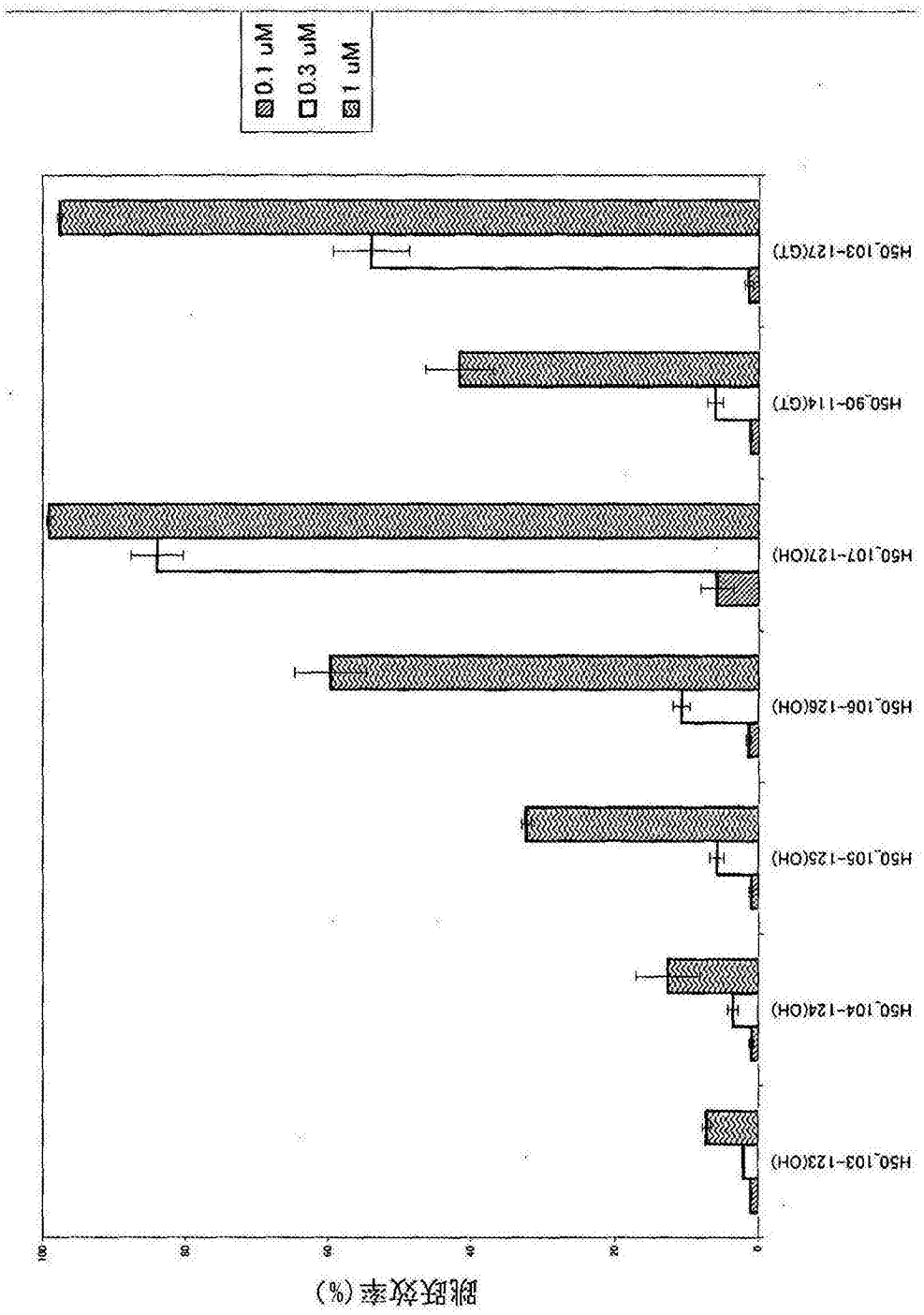

0.1 uM
0.3 uM
1 uM
H50_103-127(GT)
H50_90-114(GT)
H50_107-127(OH)
H50_106-126(OH)
H50_105-125(OH)
H50_104-124(OH)
H50_103-123(OH)
100
80
60
40
20
0
跳跃效率(%)

图13

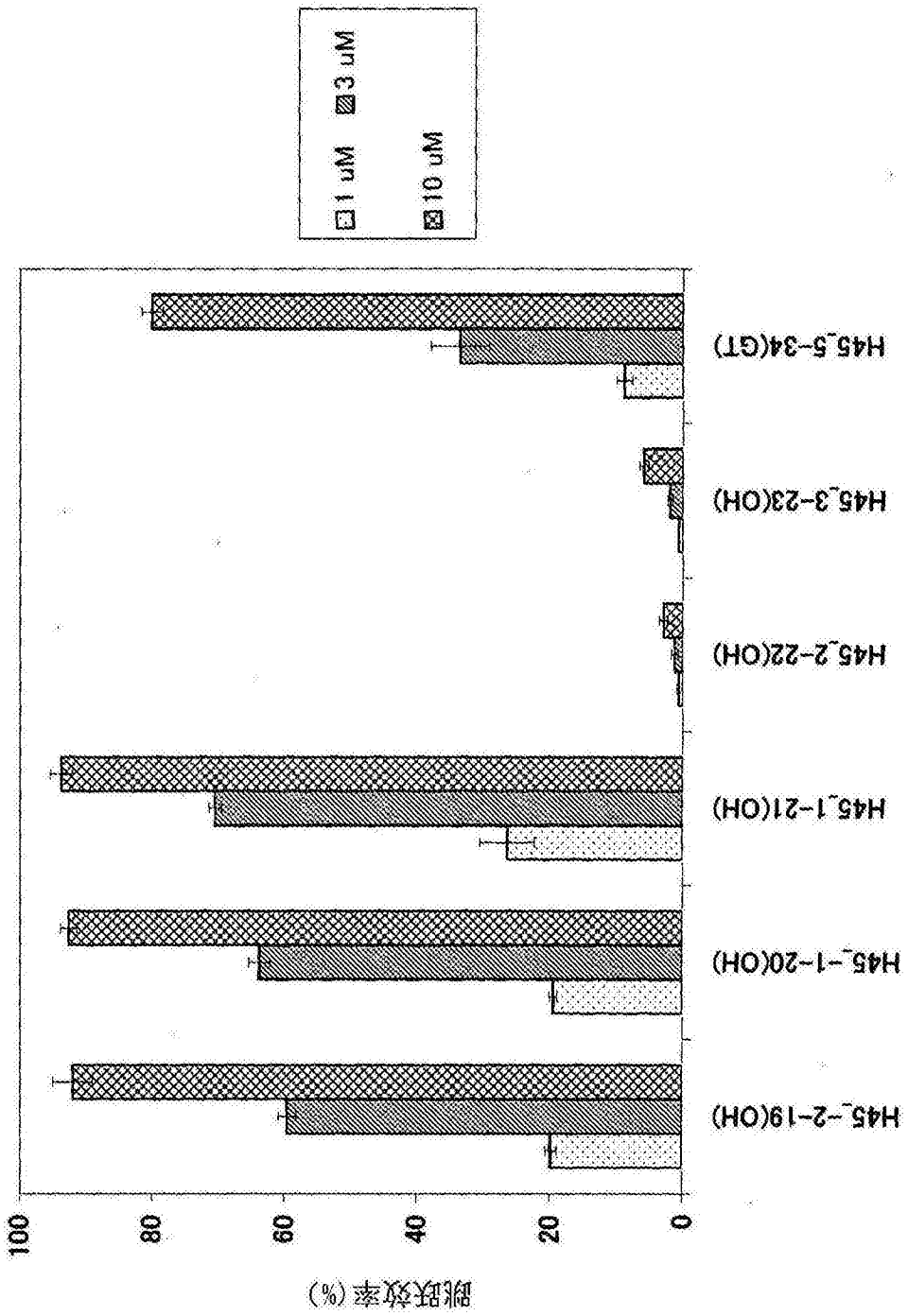

1 uM
3 uM
10 uM
H45_5-34(GT)
H45_3-23(OH)
H45_2-22(OH)
H45_1-21(OH)
H45_-1-20(OH)
H45_-2-19(OH)
100
80
60
40
20
0
跳跃效率(%)

图14

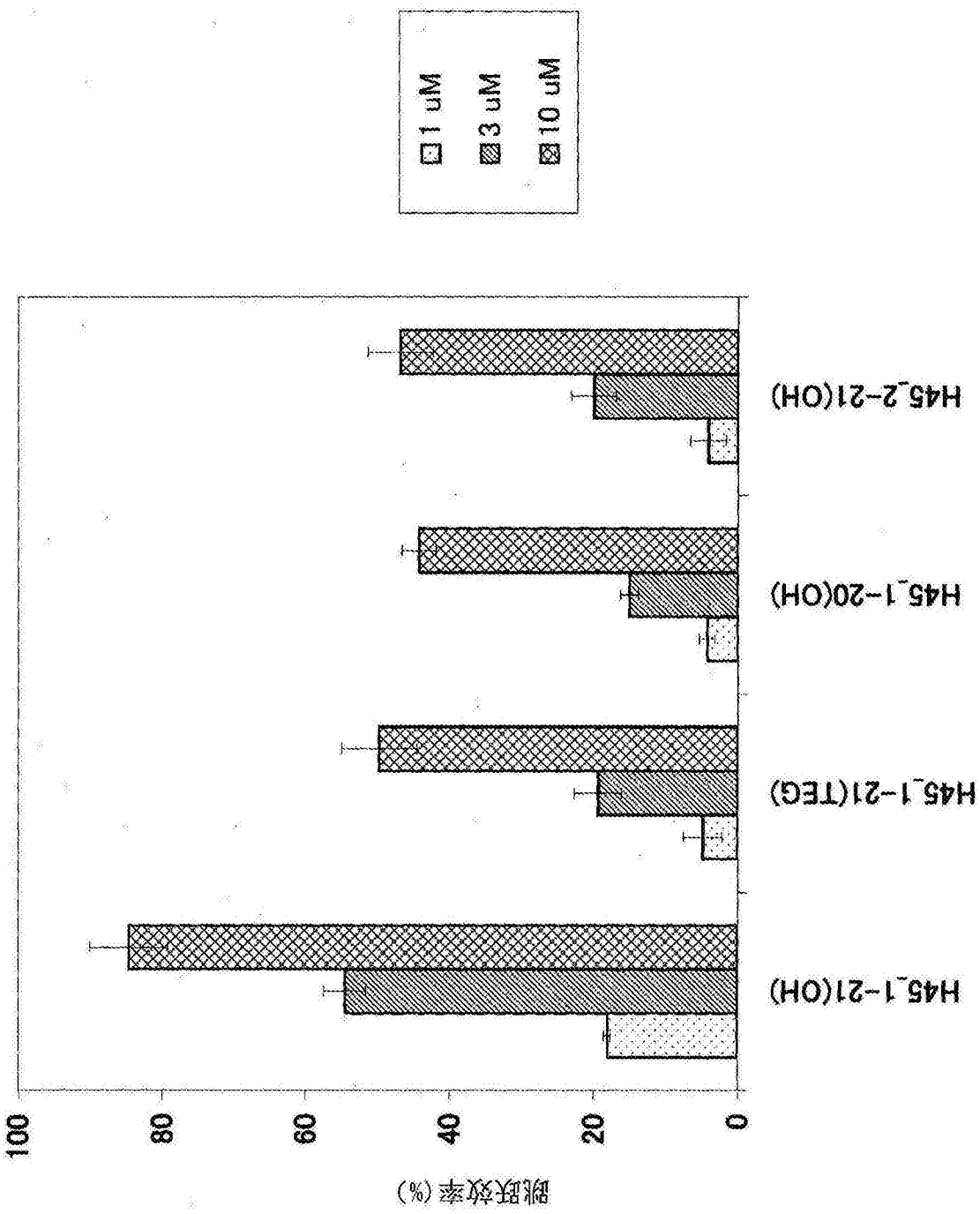

1 uM
3 uM
10 uM
H45_2-21(OH)
H45_1-20(OH)
H45_1-21(TEG)
H45_1-21(OH)
100
80
60
40
20
0
跳跃效率(%)

图15

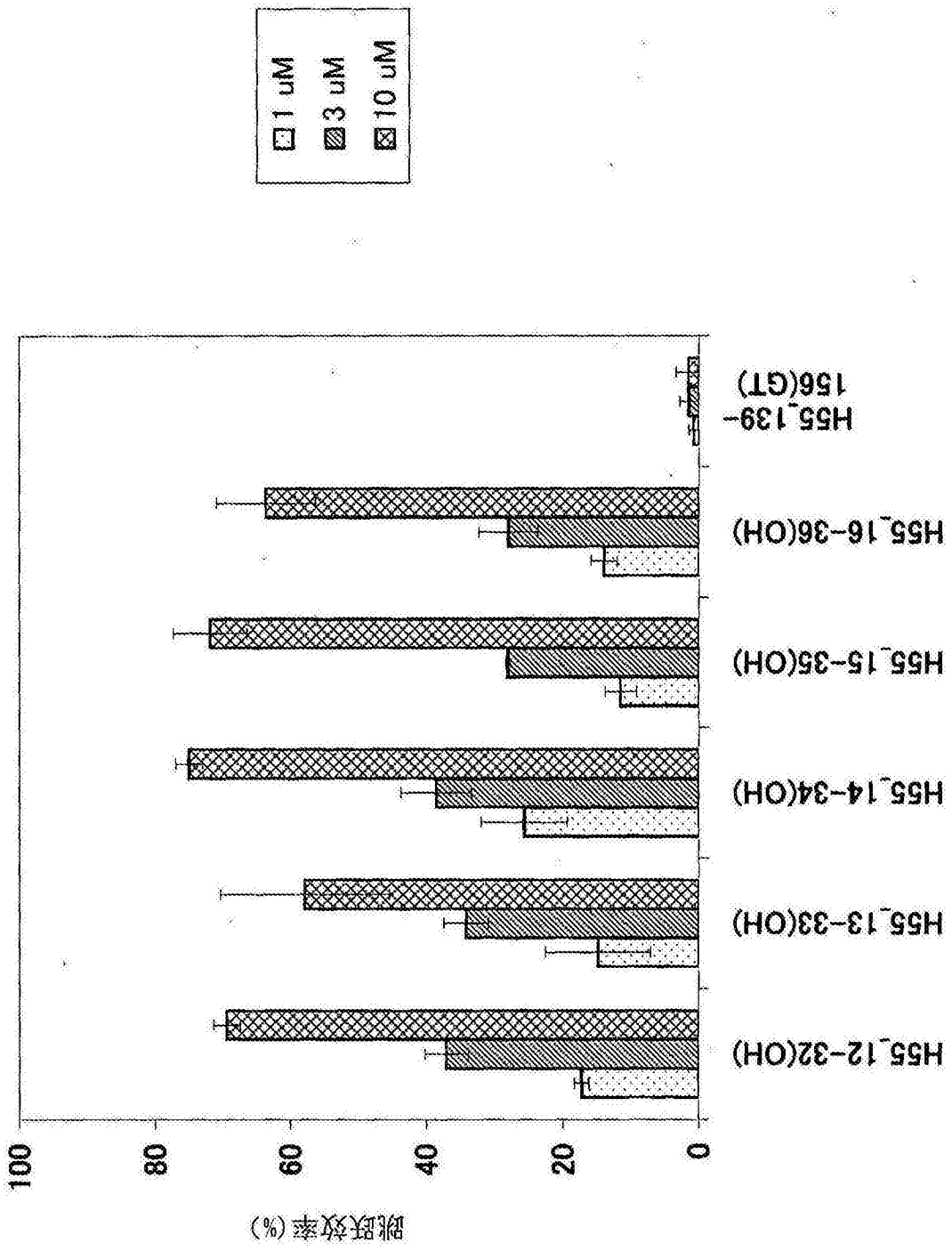

1 uM
3 uM
10 uM
H55_139-156(GT)
H55_16-36(OH)
H55_15-35(OH)
H55_14-34(OH)
H55_13-33(OH)
H55_12-32(OH)
0
20
40
60
80
100
跳跃效率(%)

图16

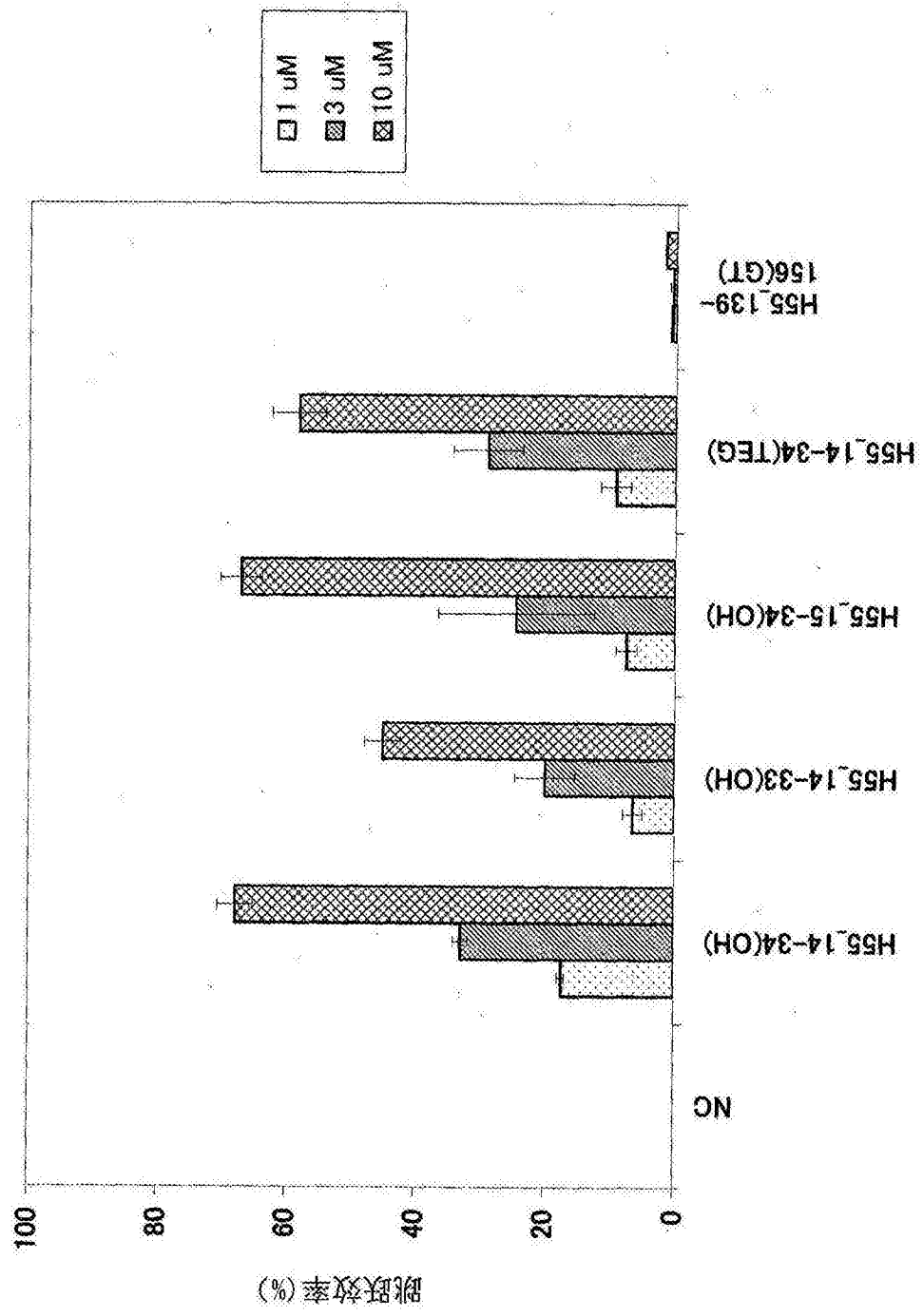

1 uM
3 uM
10 uM
H55_139-156(GT)
H55_14-34(TEG)
H55_15-34(OH)
H55_14-33(OH)
H55_14-34(OH)
NC
100
80
60
40
20
0
跳跃效率(%)

图17

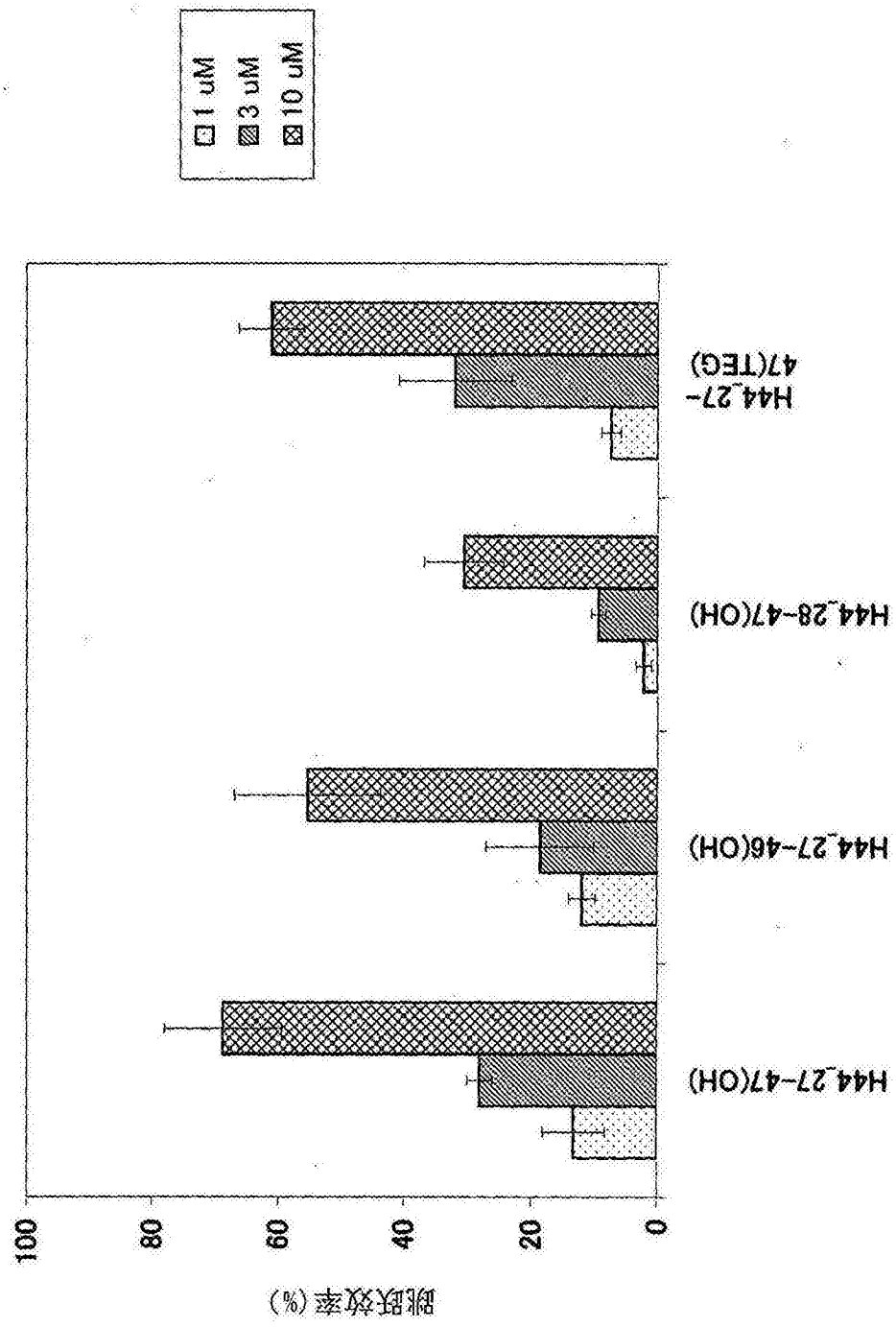

1 uM
3 uM
10 uM
H44_27-47(TEG)
H44_28-47(OH)
H44_27-46(OH)
H44_27-47(OH)
100
80
60
40
20
0
跳跃效率(%)

图18

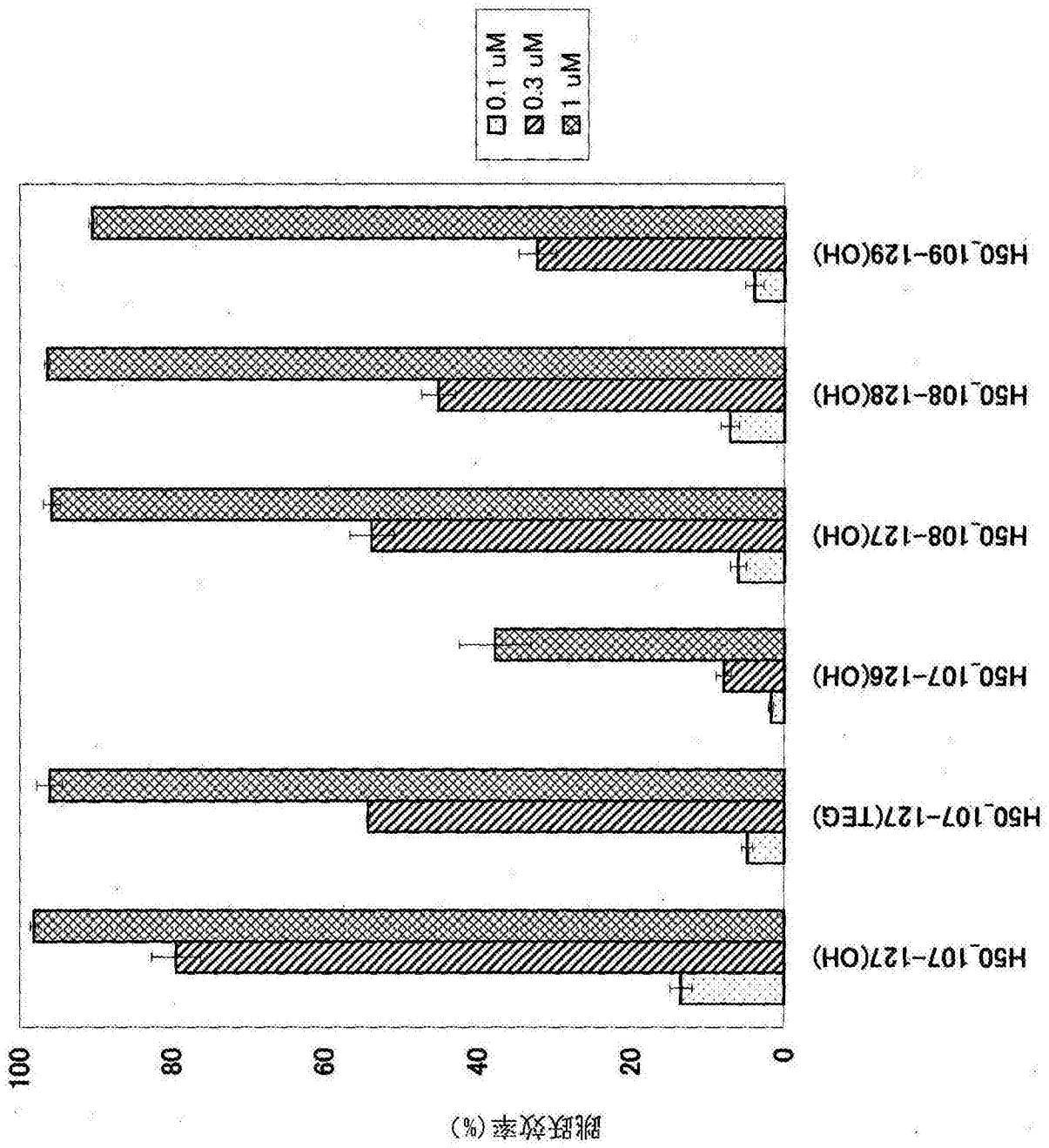

0.1 uM
0.3 uM
1 uM
H50_109-129(OH)
H50_108-128(OH)
H50_108-127(OH)
H50_107-126(OH)
H50_107-127(TEG)
H50_107-127(OH)
100
80
60
40
20
0
跳跃效率(%)

图19

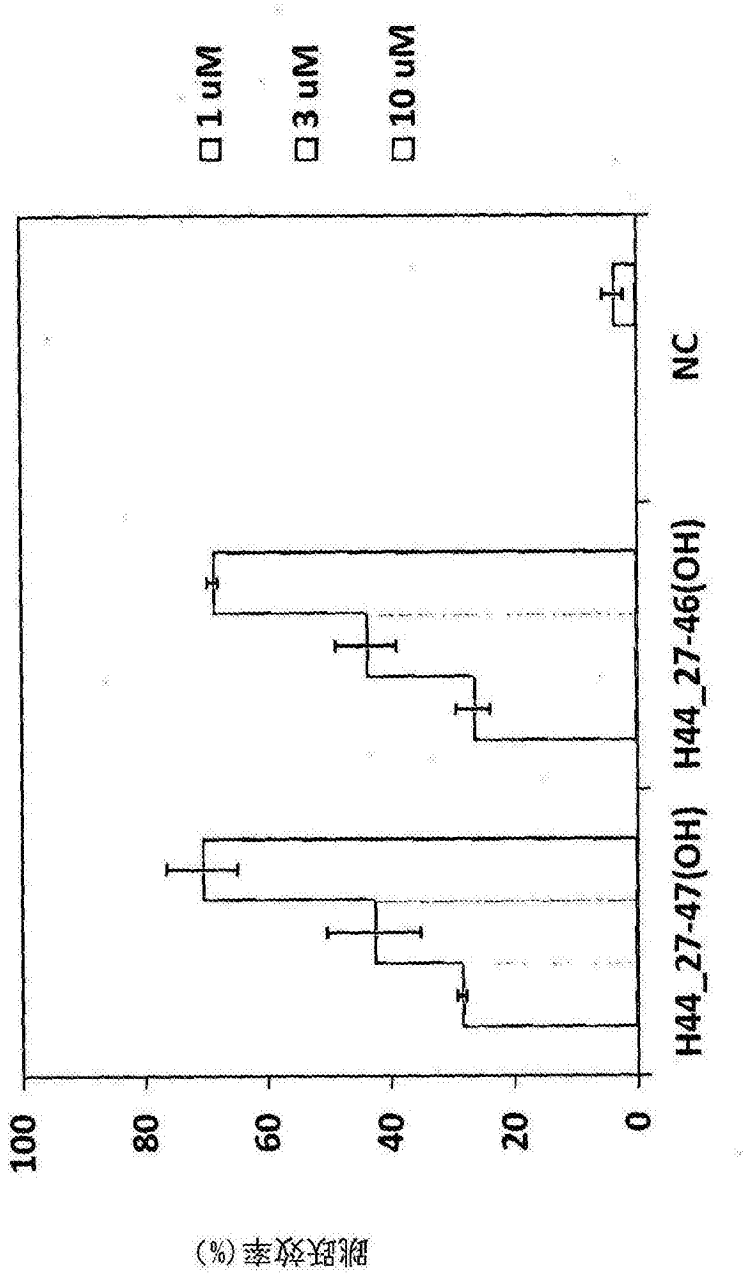


图20

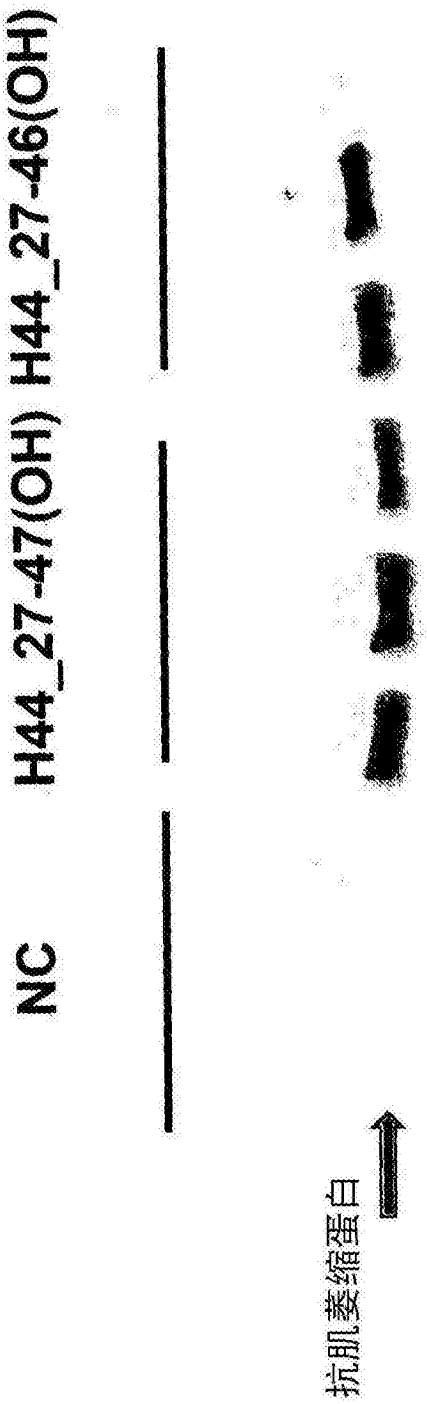


图21

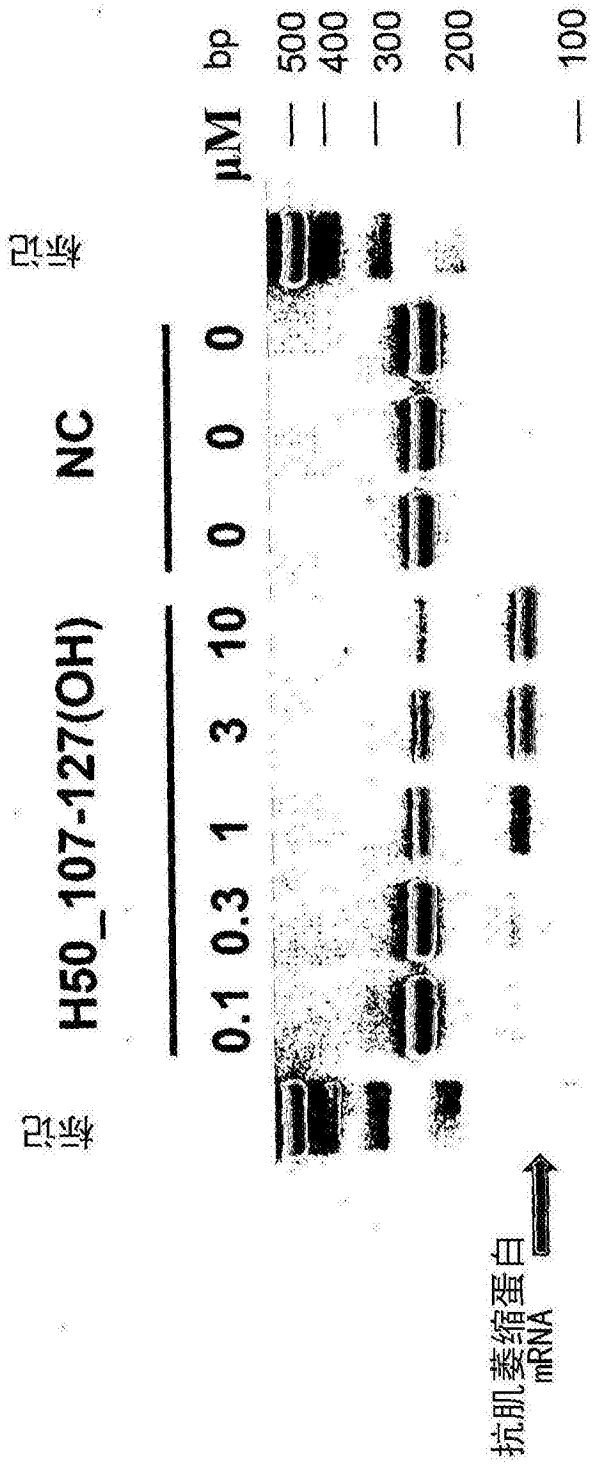

bp
500
400
300
200
100
μM
标记
H50_107-127(OH)
0.1 0.3 1 3 10
NC
0 0 0
标记
抗肌萎缩蛋白
mRNA

图22

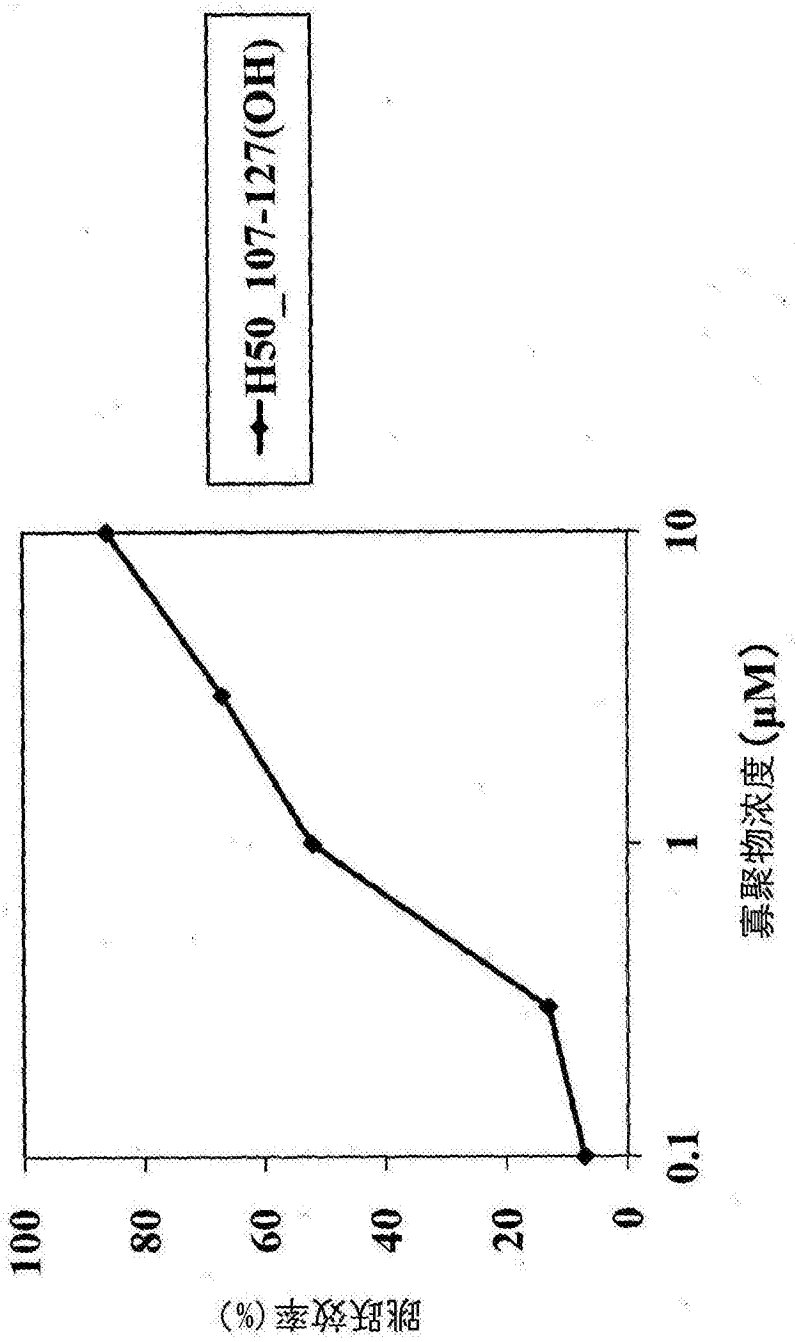


图23

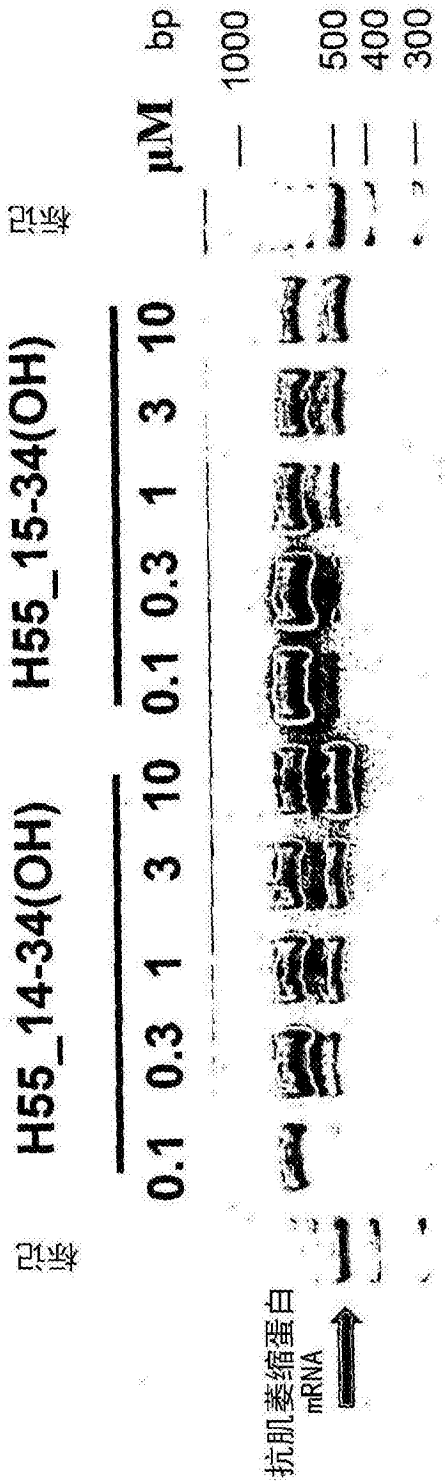

bp
1000
500
400
300
μM
标记
H55_14-34(OH)
0.1 0.3 1 3 10
H55_15-34(OH)
0.1 0.3 1 3 10
标记
抗肌萎缩蛋白
mRNA

图24

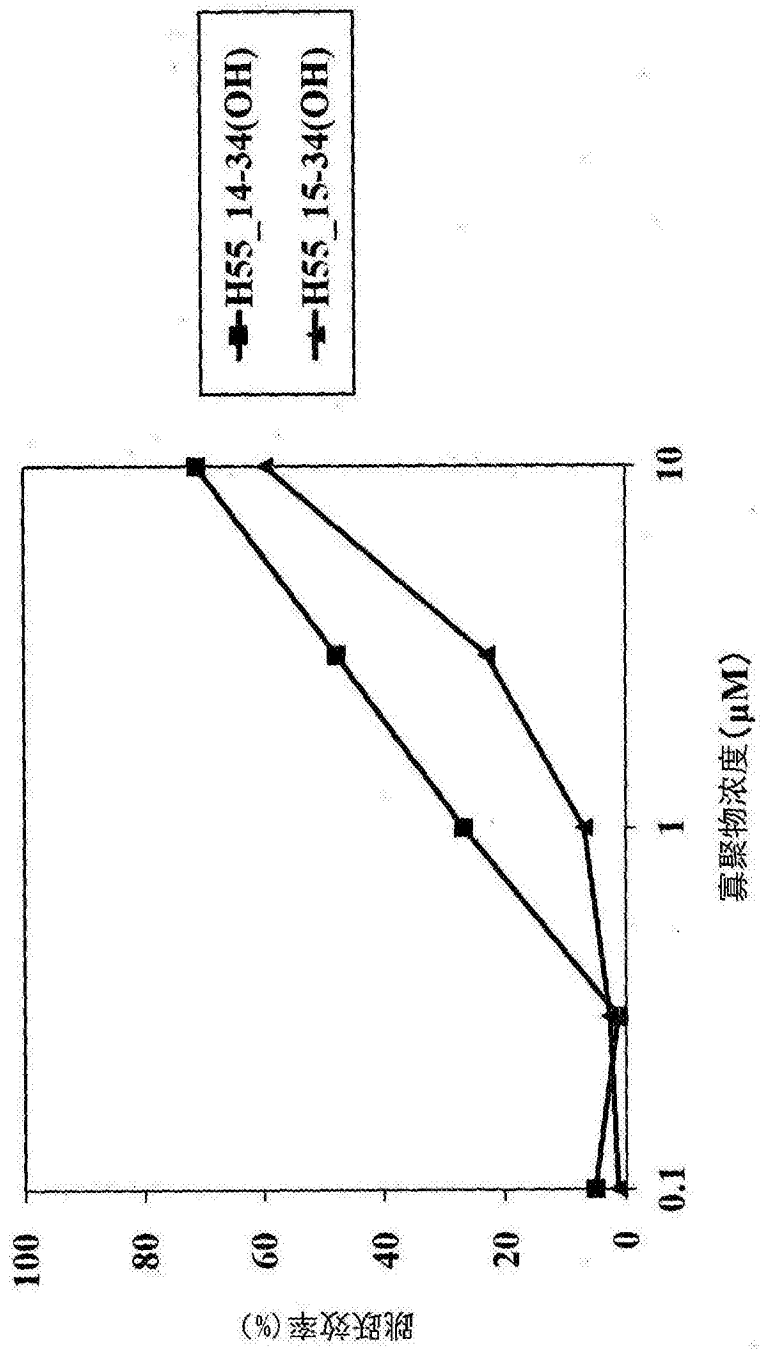


图25

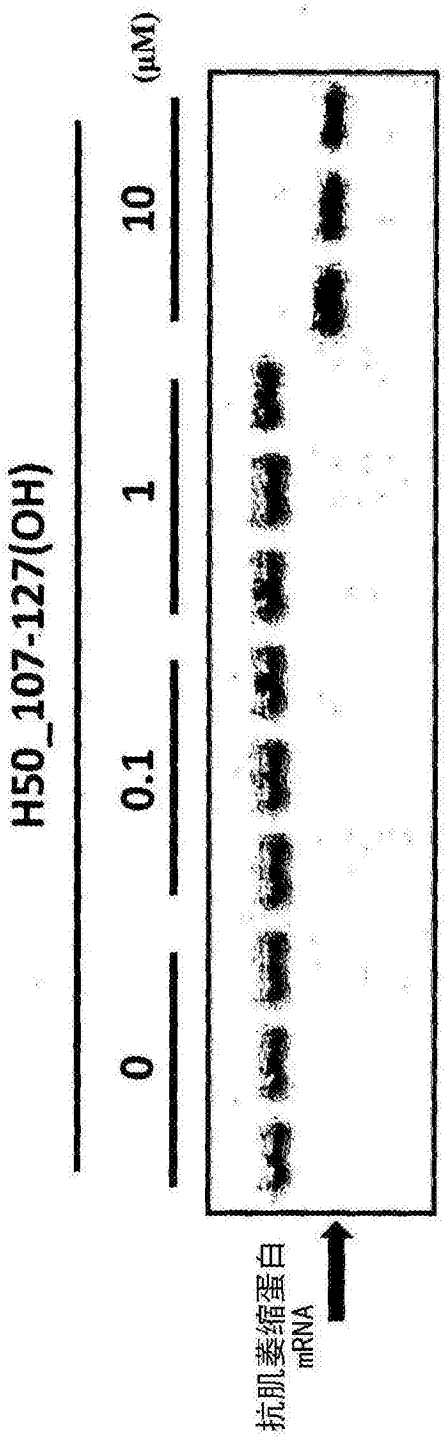


图26

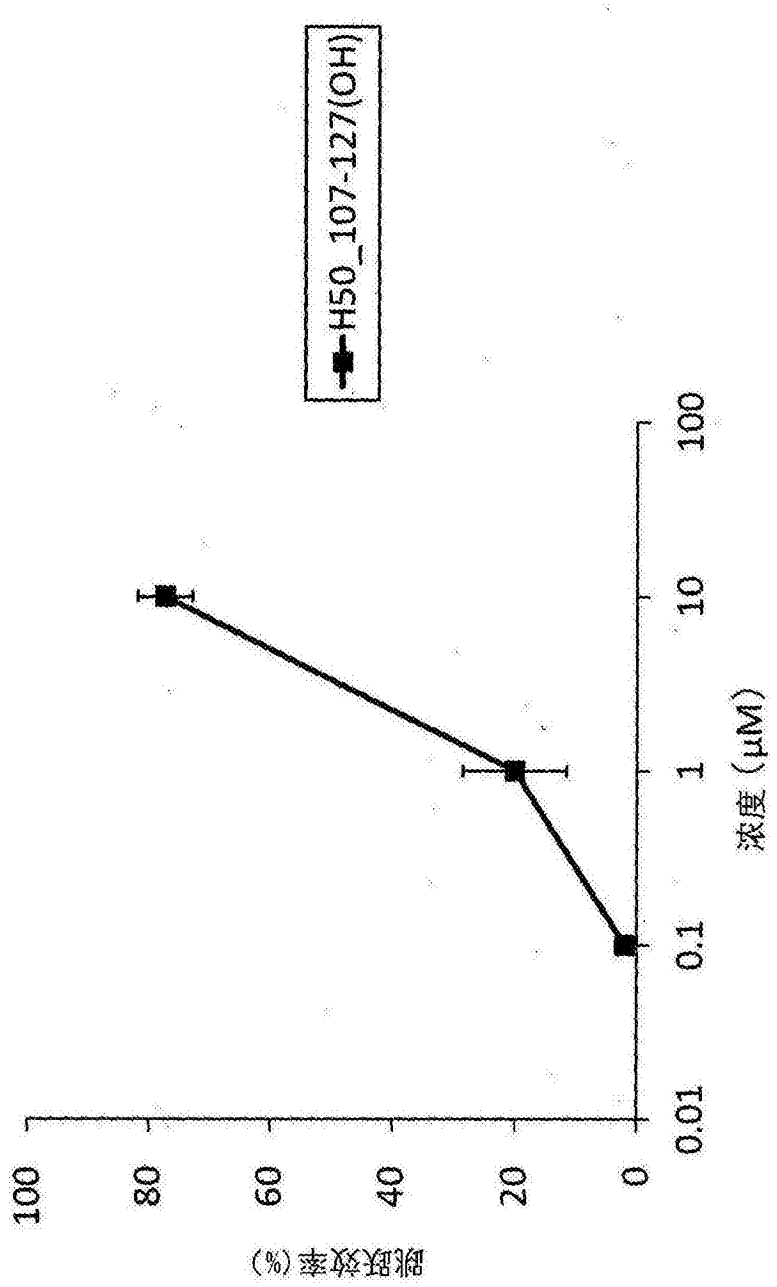


图27

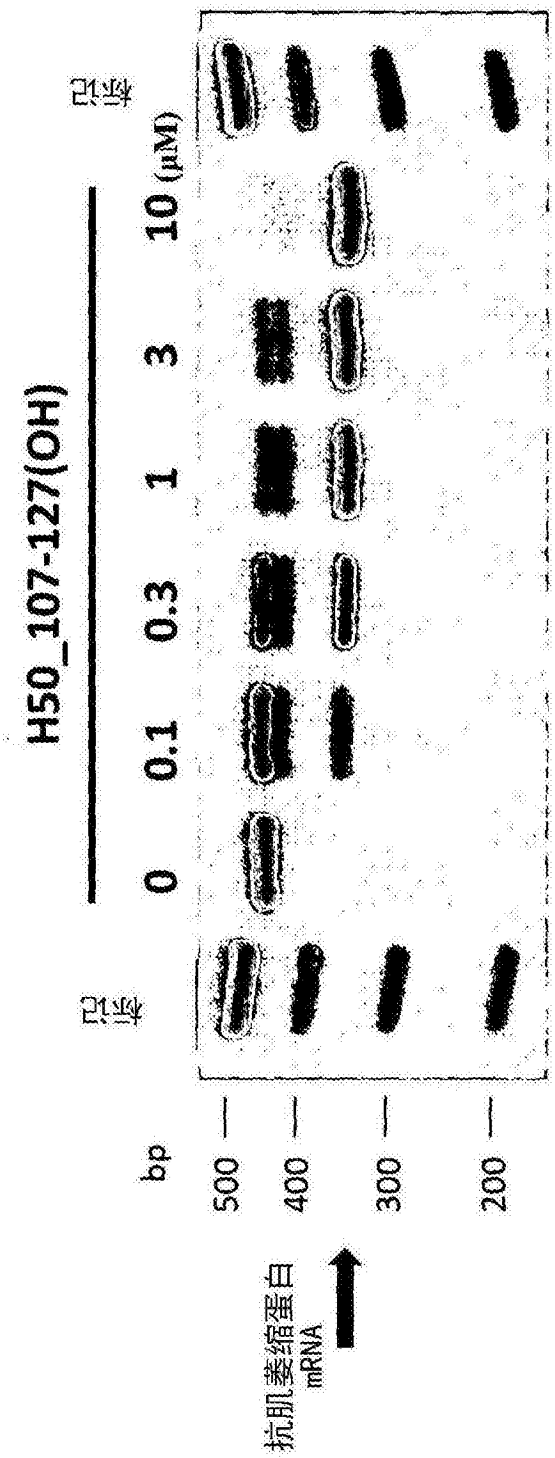

标记
H50_107-127(OH)
0
0.1
0.3
1
3
10 (μM)
标记
bp
500
400
300
200
抗肌萎缩蛋白
mRNA

图28

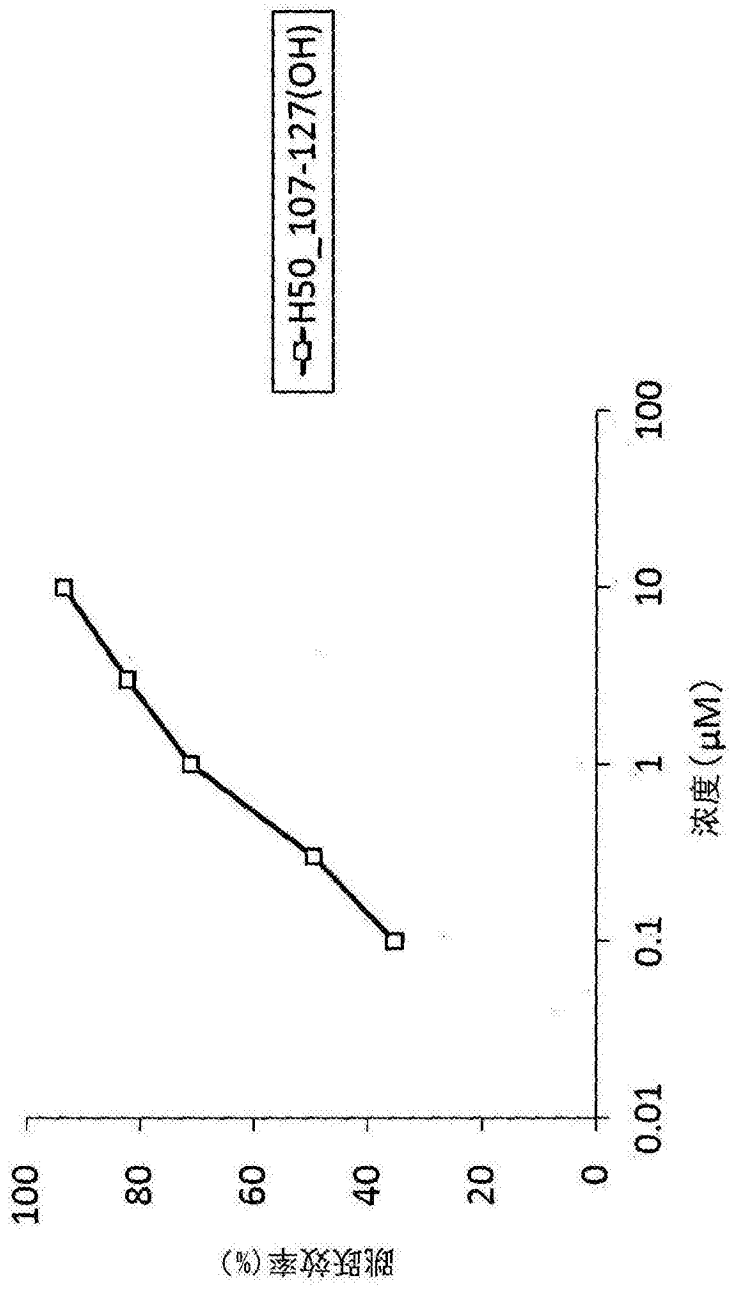


图29

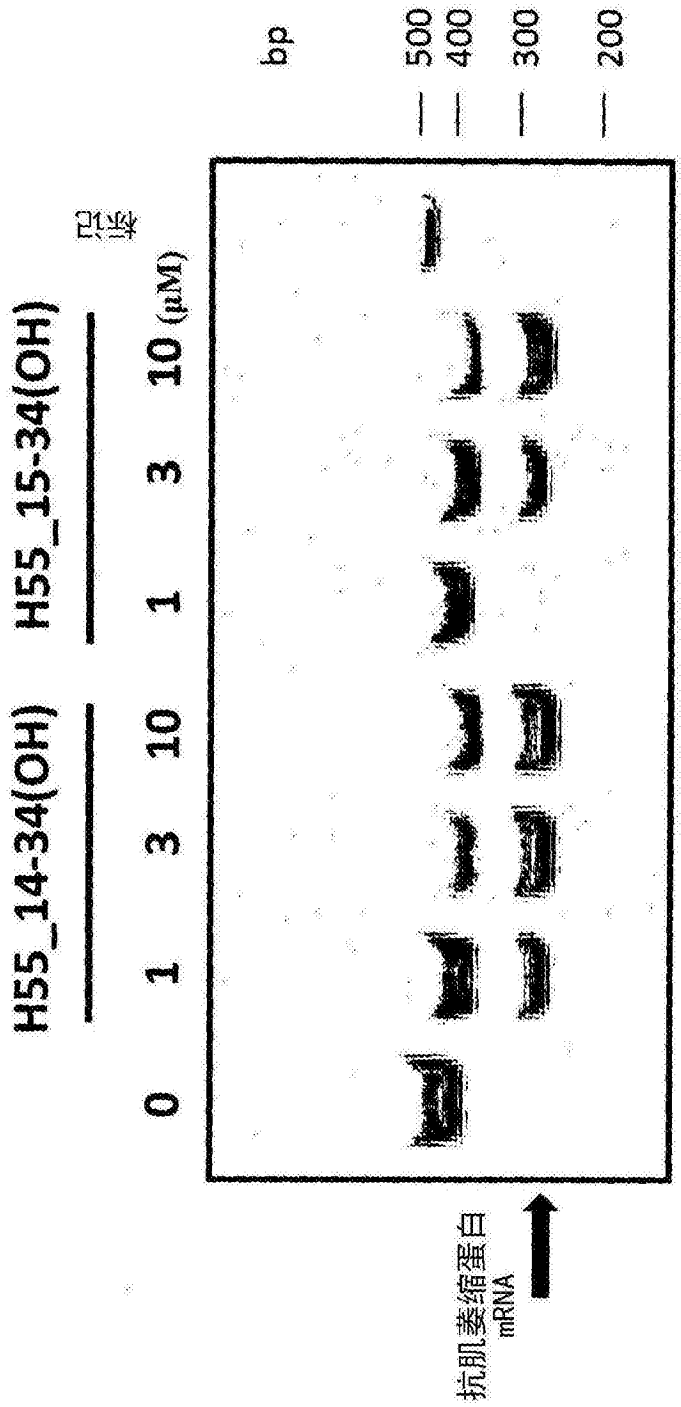

bp
500
400
300
200
标记
H55_14-34(OH)
H55_15-34(OH)
0
1
3
10
1
3
10 (μM)
抗肌萎缩蛋白
mRNA

图30

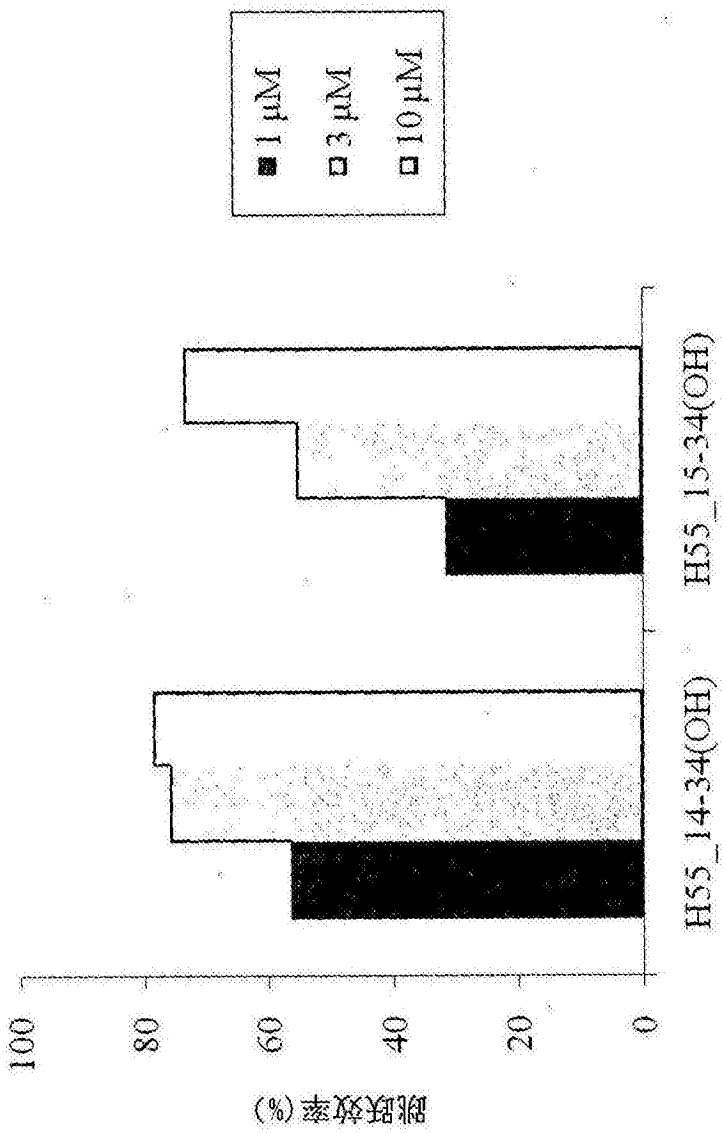


图31