



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113913426 B

(45) 授权公告日 2024.08.02

(21) 申请号 202111073029.9

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2016.09.15

11105

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113913426 A

专利代理人 沈雪

(43) 申请公布日 2022.01.11

(51) Int.CI.

C12N 15/113 (2010.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/712 (2006.01)

2015-182145 2015.09.15 JP

A61P 21/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

201680053726.9 2016.09.15

CN 108026531 B, 2021.09.14

审查员 林海生

(73) 专利权人 日本新药株式会社

地址 日本京都府

专利权人 国立研究开发法人国立精神.神
经医疗研究中心

(72) 发明人 盐谷由辉子 户根悠一郎

权利要求书2页 说明书39页

武田伸一 青木吉嗣

序列表31页 附图13页

(54) 发明名称

反义核酸

(57) 摘要

本发明提供一种能够跳读人抗肌萎缩蛋白
基因的第45号外显子的低聚物。

1. 一种反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其碱基序列如选自序列号9、14~24、26~29、31、32、和81~86中的任意一个碱基序列所示。

2. 根据权利要求1所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其是寡核苷酸。

3. 根据权利要求2所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其中, 构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分和/或磷酸键部分经过修饰。

4. 根据权利要求2或3所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其中, 构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分是2'位的-OH基被选自OR、R、R' OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br及I中的任一基团取代而得到的核糖,

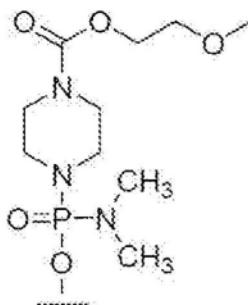
所述R表示烷基或芳基, 所述R'表示亚烷基。

5. 根据权利要求3所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其中, 构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的磷酸键部分为选自硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、膦酸烷基酯键、氨基磷酸酯键及硼磷酸酯键中的任意1种。

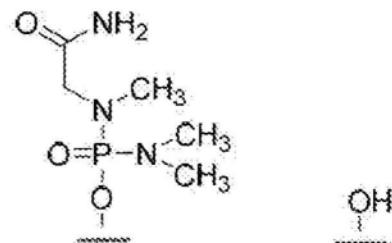
6. 根据权利要求1所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其是吗啉基低聚物。

7. 根据权利要求6所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其是二氨基磷酸酯吗啉基低聚物。

8. 根据权利要求6或7所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其5'末端为下述化学式(1)~(3)中的任一基团,



(1)



(2)



(3)

9. 根据权利要求1、2或6中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其用于肌营养不良症治疗。

10. 根据权利要求9所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其中, 在所述治疗中, 肌营养不良症患者是在抗肌萎缩蛋白基因中具有成为外显子45跳读对象的变异的患者。

11. 根据权利要求10所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物, 其中, 所述患者是人。

12. 一种肌营养不良症治疗用医药组合物, 其以权利要求1~8中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物作为有效成分。

13. 根据权利要求12所述的肌营养不良症治疗用医药组合物, 其还包含医药上能够允

许的载体。

14. 权利要求1~8中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物、或者权利要求12或13所述的所述医药组合物在制造肌营养不良症患者的肌营养不良症治疗用药中的用途。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中,所述肌营养不良症患者是在抗肌萎缩蛋白基因中具有成为外显子45跳读对象的变异的患者。

16. 根据权利要求14或15所述的用途,其中,所述患者是人。

反义核酸

[0001] 本申请是申请日为2016年9月15日、申请号为201680053726.9的中国发明申请“反义核酸”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及能够跳读人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的反义低聚物及包含该低聚物的医药组合物。

背景技术

[0003] 迪谢内肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是约3,500人新生男孩中1人发病的频率最高的遗传性进行性肌病。虽然在婴幼儿期显示出与正常人基本上没有差别的运动能力,但从4~5岁时起可观察到肌力降低。然后肌力降低发展至12岁时变得无法行走,在20多岁时因心力衰竭或呼吸衰竭导致死亡,是严重疾病。目前,没有针对DMD的有效治疗方法,迫切需要开发新型治疗药。

[0004] 已知DMD的原因是抗肌萎缩蛋白基因的变异。抗肌萎缩蛋白基因存在于X染色体,是由220万碱基的DNA形成的巨大基因。由DNA转录至mRNA前体,再通过剪接去除内含子,79个外显子接合而成的mRNA为13,993个碱基。由该mRNA翻译成3,685个氨基酸,生成抗肌萎缩蛋白。抗肌萎缩蛋白与肌细胞的膜稳定性的保持有关,为了使肌细胞不容易破坏,抗肌萎缩蛋白是必需的。DMD患者的抗肌萎缩蛋白基因存在变异,因此在肌细胞中基本上无法表达保持功能的抗肌萎缩蛋白。因此,在DMD患者体内,无法保持肌细胞的结构,大量的钙离子流入肌细胞内。其结果是发生类似炎症的反应,发生纤维化,从而使肌细胞变得难以再生。

[0005] 贝克(Becker)肌营养不良症(BMD)的原因也是抗肌萎缩蛋白基因的变异,其症状虽然表现出肌力降低,但通常比DMD轻,肌力降低的发展慢,在多数情况下在成年期发病。可以认为DMD与BMD的临床症状的不同在于,由于变异,在抗肌萎缩蛋白的mRNA翻译为抗肌萎缩蛋白时,氨基酸可读框被破坏或保持(非专利文献1)。即,对于DMD而言,由于存在氨基酸可读框错位的变异,因此基本上不表达保持功能的抗肌萎缩蛋白,但对于BMD而言,由于变异而使外显子的一部分缺失,但保持了氨基酸可读框,因此可以产生虽然不完全但是有功能的抗肌萎缩蛋白。

[0006] 期待着外显子跳读法作为DMD的治疗方法。该方法是通过改变剪接而修复抗肌萎缩蛋白的mRNA的氨基酸可读框,从而诱导表达部分恢复了功能的抗肌萎缩蛋白的方法(非专利文献2)。成为外显子跳读的对象的氨基酸序列部分被丢失。因此,在该治疗中表达的抗肌萎缩蛋白比正常的抗肌萎缩蛋白短,但由于保持了氨基酸可读框,因此部分保持了使肌细胞稳定的功能。由此期待通过外显子跳读能使DMD表现出与更轻症状的BMD相同的症状。外显子跳读法经过动物实验,已经在进行对人DMD患者的临床试验。

[0007] 可以通过以5'或3'剪接点中任一者或两者、或者外显子的内部为目标的反义核酸的结合来诱导外显子跳读。外显子仅在两个剪接点通过剪接体复合体进行识别的情况下包含在mRNA中。因此,通过利用反义核酸以剪接点为靶向可以诱导外显子跳读。另外可以认

为,由于外显子被剪接机构所识别,因此需要将丝氨酸和精氨酸丰富的SR蛋白质结合于外显子剪接增强子(ESE),以ESE为靶向也能够诱导外显子跳读。

[0008] 抗肌萎缩蛋白基因的变异根据DMD患者而有所不同,因此需要与基因变异的部位、种类相对应的反义核酸。对于抗肌萎缩蛋白基因的单一外显子,以一个连续的序列作为目标来诱导外显子跳读的反义核酸已有多个报告(专利文献1~6及非专利文献1和2)。另外,将以抗肌萎缩蛋白基因的同一外显子作为目标的两种反义核酸进行混合而使其发挥作用(双重靶向)时,跳读活性比单独使用各反义核酸的情况有所增强,对于这种情况也已有报告(专利文献7)。

[0009] 但是,以同一外显子内的2个以上部位为目标的连接的单链反义核酸(连接型)显示出跳读活性的情况尚未报告(专利文献1)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:国际公开公报第2004/048570号

[0013] 专利文献2:国际公开公报第2009/139630号

[0014] 专利文献3:国际公开公报第2010/048586号

[0015] 专利文献4:美国专利公开公报第2010/0168212号

[0016] 专利文献5:国际公开公报第2011/057350号

[0017] 专利文献6:国际公开公报第2006/000057号

[0018] 专利文献7:国际公开公报第2007/135105号

[0019] 非专利文献

[0020] 非专利文献1:Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12:S71-S77

[0021] 非专利文献2:Wilton S.D., et al., Molecular Therapy 2007:15:p.1288-96

发明内容

[0022] 发明要解决的课题

[0023] 鉴于上述情况,本发明的主要目的在于提供一种以抗肌萎缩蛋白基因的同一外显子内2个不同部位的碱基序列为目標来诱导外显子跳读的新型连接型反义低聚物及包含该低聚物的肌营养不良症治疗药。

[0024] 解决课题的方法

[0025] 本发明人等对上述文献中记载的技术内容和抗肌萎缩蛋白基因的结构等进行了深入研究,结果发现将以人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45中不同的2个部位作为目標的低聚物进行连接而得到的反义低聚物能够诱导该外显子的跳读。本发明人等基于该见解而完成了本发明。

[0026] 即,本发明如下所述。

[0027] [1]

[0028] 一种反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物,其是选自下述(a)~(e)的2个单元低聚物连接而成的14~32个碱基的长度的反义低聚物:

[0029] (a)由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第-5~15号核苷酸

序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的碱基序列所构成的单元低聚物；

[0030] (b) 由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第48~70号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的碱基序列所构成的单元低聚物；

[0031] (c) 由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第128~150号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的碱基序列所构成的单元低聚物；

[0032] (d) 由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第15~40号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的碱基序列所构成的单元低聚物；以及

[0033] (e) 由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第110~125号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的碱基序列所构成的单元低聚物，

[0034] 其中，

[0035] 2个单元低聚物不连续或不相互重复。

[0036] [2]

[0037] 根据上述[1]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其中，所述2个单元低聚物中的一个为(a)。

[0038] [3]

[0039] 根据上述[1]或[2]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其由选自序列号7~12、14~33、40~52、57、64、65、79~86中的任意一个碱基序列构成。

[0040] [4]

[0041] 根据上述[1]~[3]中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其由选自序列号8、10、25、30、33、79、80中的任意一个碱基序列构成。

[0042] [5]

[0043] 根据上述[1]~[4]中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其是寡核苷酸。

[0044] [6]

[0045] 根据上述[5]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其中，构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分和/或磷酸键部分经过修饰。

[0046] [7]

[0047] 根据上述[5]或[6]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其中，构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的糖部分是2'位的-OH基被选自OR、R、R' OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br及I中的任一基团取代而得到的核糖。

[0048] (所述R表示烷基或芳基，所述R'表示亚烷基。)

[0049] [8]

[0050] 根据上述[6]或[7]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其中，构成所述寡核苷酸的至少1个核苷酸的磷酸键部分为选自硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、膦酸烷基酯键、氨基磷酸酯键及硼磷酸酯键中的任意1种。

[0051] [9]

[0052] 根据上述[1]~[4]中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其是吗啉基低聚物。

[0053] [10]

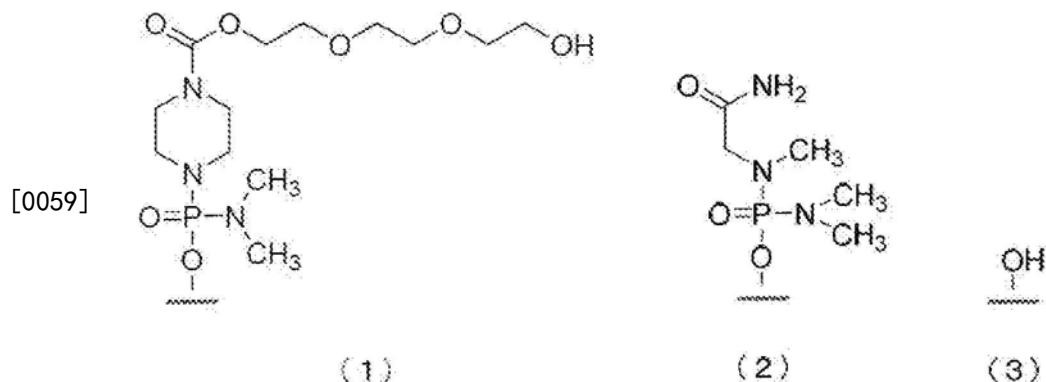
[0054] 根据上述[9]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其是二氨基磷酸酯吗啉基低聚物。

[0055] 「11」

[0056] 根据上述[4]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物,其是二氨基磷酸酯吗啉基低聚物。

[0057] [12]根据上述[9]～[11]中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其5'末端为下述化学式(1)～(3)中的任一基团。

[0058] [化学式1]



[0060] [13]

[0061] 一种肌营养不良症治疗用医药组合物,其以所述[1]~[12]中任一项所述的反义低聚物、其医药上能够允许的盐或水合物作为有效成分。

[0062] [14]

[0063] 根据上述[13]所述的医药组合物,其还包含医药上能够允许的载体。

[0064] [15]

[0065] 一种肌营养不良症的治疗方法,该方法包括下述工序:

[0066] 对肌营养不良症患者给药所述[1]～[12]中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物、或者所述[13]或[14]所述的所述医药组合物。

[0067] [16]

[0068] 根据上述[15]所述的治疗方法,其中,所述肌营养不良症患者是在抗肌萎缩蛋白基因中具有成为外显子45跳读对象的变异的患者。

[0069] [17]

[0070] 根据上述[15]或[16]所述的治疗方法,其中,所述患者是人。

〔0071〕 〔18〕

[0072] 上述[1]～[12]中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物在制造营养不良症治疗用医药组合物中的用途。

〔0073〕 〔19〕

[0074] 根据上述[1]～[12]中任一项所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物，其用于肌营养不良症治疗。

〔0075〕 〔20〕

[0076] 根据上述[19]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物,其中,在所述治疗由肌营养不良症患者是在抗肌萎缩蛋白基因具有成为外显子45跳读对象的变

异的患者。

[0077] [21]

[0078] 根据上述[19]或[20]所述的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物,其中,所述患者是人。

[0079] 发明的效果

[0080] 利用本发明的反义低聚物能够高效率地诱导人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读。另外,通过给药本发明的医药组合物,能够有效地减轻假肥大型肌营养不良症的症状。成为对象的患者的缺失外显子可以列举18-44,44,46,46-47,46-48,46-49,46-51,46-53等。

附图说明

[0081] 图1是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0082] 图2是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0083] 图3是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0084] 图4是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0085] 图5是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0086] 图6是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0087] 图7是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0088] 图8是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0089] 图9是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0090] 图10是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0091] 图11是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0092] 图12是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0093] 图13是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0094] 图14是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0095] 图15是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0096] 图16是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0097] 图17是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0098] 图18是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0099] 图19是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0100] 图20是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0101] 图21是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0102] 图22是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0103] 图23是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0104] 图24是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

[0105] 图25是示出人横纹肌肉瘤细胞(RD细胞)中人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读效率的图。

具体实施方式

[0106] 以下,对本发明详细地进行说明。以下的实施方式是用于说明本发明的例子,并不是将本发明仅限定于该实施方式。本发明只要不脱离其主旨即可,可以以各种方式实施。

[0107] 需要说明的是,在本说明书中以参考的方式将引用的全部文献、及公开公报、专利公报等其它专利文献引用到本说明书中。而且,本说明书包括作为本申请所要求的优先权的基础的2015年9月15日申请的日本专利申请(特愿2015-182145号)的说明书及附图中记载的内容。

[0108] 1.反义低聚物

[0109] 本发明提供一种可以跳读人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物(以下,也称为“本发明的低聚物”)。

[0110] [人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子]

[0111] 在本发明中,“基因”除了基因组基因以外,还包括cDNA、mRNA前体及mRNA。优选基因为mRNA前体,即pre-mRNA。

[0112] 在人基因组中,人抗肌萎缩蛋白基因存在于基因座Xp21.2。人抗肌萎缩蛋白基因具有3.0Mbp的大小,作为已知的人基因是最大的基因。但是,人抗肌萎缩蛋白基因的编码区域仅有14kb,该编码区域以79个外显子的形式分散于抗肌萎缩蛋白基因内(Roberts, RG.,

et al., *Genomics*, 16:536-538 (1993)。作为人抗肌萎缩蛋白基因的转录物的pre-mRNA经过剪接而生成14kb的成熟mRNA。人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的碱基序列是公知的 (GenBank Accession No.NM_004006)。

[0113] 将人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的碱基序列示于序列号13。另外,在人的野生型抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的核苷酸序列(序列号13)中,将由从5'末端起计第-5~15号碱基构成的序列示于序列号3。同样地将第48~70号碱基构成的序列、第128~150号碱基构成的序列、第15~40号碱基构成的序列及第110~125号碱基构成的序列分别示于序列号4~6、143。

[0114] 制作本发明的低聚物的目的在于,通过人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45的跳读,将由DMD型抗肌萎缩蛋白基因编码的蛋白质改变为BMD型抗肌萎缩蛋白蛋白质。因此,作为本发明的低聚物的外显子跳读的对象,抗肌萎缩蛋白基因的外显子45不仅包括野生型,也包括变异型。

[0115] 具体而言,人抗肌萎缩蛋白基因的变异型外显子45或其一部分是以下的(I)或(II)所述的多核苷酸。

[0116] (I) 在严格条件下与由下述碱基序列互补的碱基序列所构成的多核苷酸杂交的多核苷酸,所述碱基序列是选自序列号13、序列号3、序列号4、序列号5、序列号6及序列号143中的任一碱基序列

[0117] (II) 由下述碱基序列构成的多核苷酸,所述碱基序列相对于选自序列号13、序列号3、序列号4、序列号5、序列号6及序列号143中的任一碱基序列具有90%以上的同一性

[0118] 在本说明书中,“多核苷酸”是指DNA或RNA。

[0119] 在本说明书中,“在严格条件下杂交的多核苷酸”是指,例如以由与选自序列号13、序列号3、序列号4、序列号5、序列号6及序列号143中的任一碱基序列互补的碱基序列构成的多核苷酸的全部或一部分作为探针,使用菌落杂交法、噬菌斑杂交法或DNA杂交 (Southern hybridization) 法等得到的多核苷酸。作为杂交的方法,例如可以使用在 “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” 等记载的方法。

[0120] 在本说明书中,“互补的碱基序列”并不限定于与作为对象的碱基序列形成沃森-克里克配对 (Watson-Crick pair) 的碱基序列,还包括形成摆动碱基对 (wobble base pair) 的碱基序列。这里,沃森-克里克配对是指在腺嘌呤-胸腺嘧啶、腺嘌呤-尿嘧啶及鸟嘌呤-胞嘧啶之间可形成氢键的碱基对,摆动碱基对是指在鸟嘌呤-尿嘧啶、肌苷-尿嘧啶、肌苷-腺嘌呤及肌苷-胞嘧啶之间可形成氢键的碱基对。另外,“互补的碱基序列”可以与作为对象的碱基序列不具有100%的互补性,例如,相对于作为对象的碱基序列,可以含有1~3个、1~2个或1个非互补的碱基。

[0121] 在本说明书中,“严格条件”可以是低严格条件、中严格条件及高严格条件中的任一种。“低严格条件”为例如5×SSC、5×邓哈特溶液 (Denhardt's solution)、0.5% SDS、50% 甲酰胺、32°C的条件。另外“中严格条件”为例如5×SSC、5×邓哈特溶液、0.5% SDS、50% 甲酰胺、42°C或5×SSC、1% SDS、50mM Tris-HCl (pH7.5)、50% 甲酰胺、42°C的条件。“高严格条件”为例如5×SSC、5×邓哈特溶液、0.5% SDS、50% 甲酰胺、50°C或0.2×SSC、0.1%

SDS、65°C的条件。在这些条件下,可以期待温度越高,越能高效地得到具有较高同一性的多核苷酸。其中,作为影响杂交的严格性的因素,可以考虑温度、探针浓度、探针长度、离子强度、时间、盐浓度等多种因素,本领域技术人员可以通过对这些因素进行适当选择来实现相同的严格性。

[0122] 需要说明的是,在将市售的试剂盒用于杂交时,可以使用例如Alkphos Direct Labelling and Detection System(GE Healthcare)。在该情况下,可以按照试剂盒附带的实验方案,与标记的探针进行过夜的保温孵育,然后在55°C的条件下用含0.1% (w/v) SDS的1次清洗缓冲液对膜进行清洗后,对杂交后的多核苷酸进行检测。或者,在基于与选自序列号13、序列号3、序列号4、序列号5、序列号6及序列号143中的任一碱基序列、或选自序列号3、序列号4、序列号5、序列号6及序列号143中的任一碱基序列互补的碱基序列的全部或一部分来制作探针时,在使用市售的试剂(例如,PCR Labeling Mix (Roche Diagnostics公司)等)将该探针标记异羟洋地黄毒苷配基(DIG)的情况下,可以使用DIG核酸检测试剂盒(Roche Diagnostics公司)对杂交进行检测。

[0123] 作为上述能够杂交的多核苷酸以外的多核苷酸,可以列举在通过同源性检索软件BLAST使用默认的参数进行计算时,与选自序列号13、序列号3、序列号4、序列号5、序列号6及序列号143中的任一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。

[0124] 需要说明的是,碱基序列的同源性可以使用Karlin和Altschul的算法BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268,1990; Proc Natl Acad Sci USA 90:5873,1993)来确定。开发了基于BLAST的算法的被称为BLASTN,BLASTX的程序(Altschul SF, et al:J Mol Biol 215:403,1990)。在使用BLASTN分析碱基序列时,参数可以设为例如得分=100、字长=12。在使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用各程序的默认参数。

[0125] 在一个实施方式中,本发明的低聚物为选自下述(a)~(e)的2个单元低聚物连接而成的14~32个碱基长度的反义低聚物或者其医药上能够允许的盐或水合物。

[0126] (a)由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第-5~15号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的序列所构成的单元低聚物;

[0127] (b)由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第48~70号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的序列所构成的单元低聚物;

[0128] (c)由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第128~150号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的序列所构成的单元低聚物;

[0129] (d)由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第15~40号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的序列所构成的单元低聚物;以及

[0130] (e)由与选自从人抗肌萎缩蛋白基因第45号外显子的5'末端起第110~125号核苷酸序列的连续7~16个碱基的核苷酸序列互补的碱基序列所构成的单元低聚物,

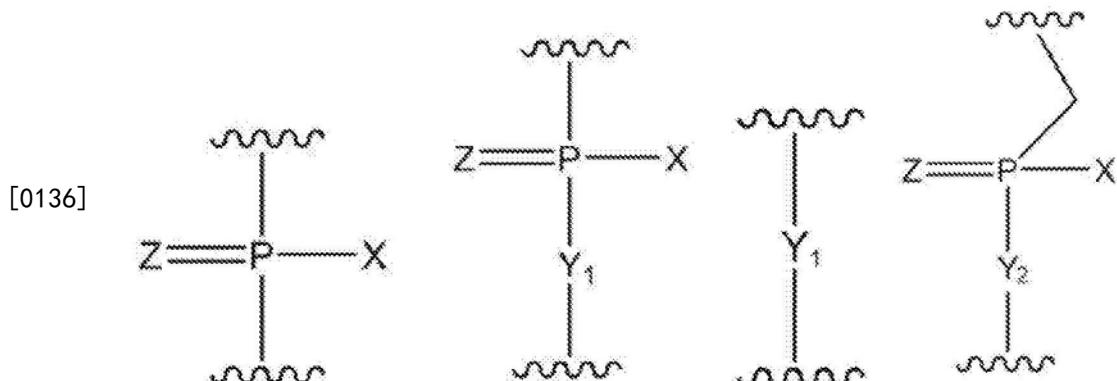
[0131] 上述(a)~(e)的各单元低聚物(以下,有时也简称为“单元”)的大小为7~16个碱基长度,优选为8~16个碱基长度、9~16个碱基长度。各单元的大小可以相同,也可以不同。

[0132] 另外,在从(a)~(e)中选择2个单元低聚物时,2个单元低聚物可以是(a)~(e)的相同的组合(即,(a)和(a)、(b)和(b)、(c)和(c)、(d)和(d)、(e)和(e)),或者也可以是不同的组合,优选为不同的组合。例如,在选择(a)作为1个单元时,另外的单元优选为(b)~(e)中的任一种。同样地,在选择单元(b)作为一个单元的情况下,另一单元优选为(a)、(c)、(d)或(e),另外,在选择单元(c)作为一个单元的情况下,另一单元优选为(a)、(b)、(d)或(e)。

[0133] 在从(a)~(e)中选择了2个单元的情况下,可以将选择的2个单元中任一个配置于5'末端侧,但在选择了(a)和(b)的情况下,优选单元(a)连接于3'末端侧,在选择了(b)和(c)的情况下,优选单元(b)连接于3'末端侧,在选择了(a)和(c)的情况下,优选单元(a)连接于3'末端侧,在选择了(a)和(d)的情况下,优选单元(a)连接于3'末端侧,在选择了(a)和(e)的情况下,优选单元(a)连接于3'末端侧。

[0134] 这里,“连接”是指选自(a)~(e)的2个单元直接连接。即,在2个单元连接的情况下,位于5'末端侧的单元的3'末端与位于3'末端侧的单元的5'末端形成磷酸键或以下基团中任一个。

[0135] [化学式2]



[0137] (式中,X表示-0H、-CH₂R¹、-O-CH₂R¹、-S-CH₂R¹、-NR²R³或F;

[0138] R¹表示H、烷基;

[0139] R²及R³相同或不同,表示H、烷基、环烷基或芳基;

[0140] Y₁表示O、S、CH₂或NR¹;

[0141] Y₂表示O、S或NR¹;

[0142] Z表示O或S。)

[0143] “能够进行人抗肌萎缩蛋白基因的第45号外显子的跳读”是指,通过将本发明的低聚物结合于与人抗肌萎缩蛋白基因的转录物(例如pre-mRNA)的外显子45相当的部位,在该转录物受到剪接时,例如在具有外显子44缺失的DMD患者的情况下,相当于外显子46的5'末端的碱基连接于相当于外显子43的3'末端的碱基,可以形成未发生密码子的移码的成熟mRNA。

[0144] 这里,上述“结合”是指在将本发明的低聚物与人抗肌萎缩蛋白基因的转录物进行混合时,在生理条件下两者杂交而形成双链。上述“生理条件下”是指调节至与生物体内类似的pH、盐组成、温度的条件。例如,可以列举:25~40°C、优选为37°C, pH 5~8、优选为pH 7.4, 氯化钠浓度为150mM的条件。

[0145] 人抗肌萎缩蛋白基因的外显子45是否发生跳读可以通过以下方式来确认:将本发

明的低聚物导入抗肌萎缩蛋白表达细胞(例如人横纹肌肉瘤细胞),从上述抗肌萎缩蛋白表达细胞的总RNA中对人抗肌萎缩蛋白基因的mRNA的外显子45的附近区域进行RT-PCR扩增,对该PCR扩增产物进行巢式PCR或序列分析。跳读效率可以通过下述方式进行计算:从受试细胞中回收人抗肌萎缩蛋白基因的mRNA,对该mRNA中跳读了外显子45的条带的多核苷酸量“A”和未跳读外显子45的条带的多核苷酸量“B”进行测定,基于上述“A”和“B”的测定值,按照下式进行计算。

[0146] 跳读效率(%) = A / (A+B) × 100

[0147] 本发明的低聚物优选以10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上的效率跳读外显子45。

[0148] 对于跳读效率的计算,也可以参考国际公开公报第2012/029986号。

[0149] 作为本发明的低聚物,可以列举例如:具有14~32个碱基的长度的寡核苷酸、吗啉基低聚物或肽核酸(Peptide Nucleic Acid:PNA)低聚物。本发明的低聚物优选为16~30个碱基、17~30个碱基、18~30个碱基、19~30个碱基、20~30个碱基、20~29个碱基、20~28个碱基、20~27个碱基、20~26个碱基或21~26个碱基的长度,优选为吗啉基低聚物。

[0150] 上述寡核苷酸(以下称为“本发明的寡核苷酸”)是以核苷酸为结构单元的本发明的低聚物,所述核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或修饰核苷酸的任一种。

[0151] 修饰核苷酸是指构成核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的核酸碱基、糖部分及磷酸键部分的全部或一部分经过修饰的核苷酸。

[0152] 作为核酸碱基,可以列举例如:腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶或它们的修饰碱基。作为所述修饰碱基,可以列举例如:假尿嘧啶、3-甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、5-烷基胞嘧啶(例如5-甲基胞嘧啶)、5-烷基尿嘧啶(例如5-乙基尿嘧啶)、5-卤代尿嘧啶(5-溴尿嘧啶)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(6-甲基尿嘧啶)、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5'-羧基甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、1-甲基腺嘌呤、1-甲基次黄嘌呤、2,2'-二甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲酰基甲基尿嘧啶、5-甲基氧基尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸、2-硫胞嘧啶、嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、异鸟嘌呤、吲哚、咪唑、黄嘌呤等,但并不限定于此。

[0153] 作为糖部分的修饰,可以列举例如:核糖2'位的修饰及糖的其它部分的修饰。作为核糖2'位的修饰,可以列举例如:将核糖的2'位的-OH基取代为OR、R、R' OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br、I的修饰。这里,R表示烷基或芳基,R'表示亚烷基。

[0154] 作为糖的其它部分的修饰,可以列举例如:将核糖或脱氧核糖的4'位的O取代为S而得到的糖、将糖的2'位与4'位交联而成的糖、例如LNA(锁定核酸,Locked Nucleic Acid)或ENA(2'-O,4'-C-亚乙基桥接的核酸,2'-O,4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids)等,但并不限定于此。

[0155] 作为磷酸键部分的修饰,可以列举例如:将磷酸二酯键替换为硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、磷酸烷基酯键、氨基磷酸酯键、硼磷酸酯键(boranophosphate bond)(Enya et al:Bioorganic&Medicinal Chemistry,2008,18,9154-9160)的修饰(例如,参考专利再公表公报第2006/129594号及第2006/038608号)。

[0156] 作为烷基,优选为直链状或支链状的碳原子数1~6的烷基。具体而言,可以列举例如:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、叔戊基、正己基、异己基。该烷基可以被取代,作为所述取代基,可以列举例如:卤素、烷氧基、氰基、硝基,可以取代1~3个这些基团。

[0157] 作为环烷基,优选碳原子数5~12的环烷基。具体而言,可以列举例如:环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二烷基。

[0158] 作为卤素,可以列举:氟、氯、溴、碘。

[0159] 作为烷氧基,可以列举直链状或支链状的碳原子数1~6的烷氧基,例如:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、异戊氧基、正己氧基、异己氧基等。特别优选为碳原子数1~3的烷氧基。

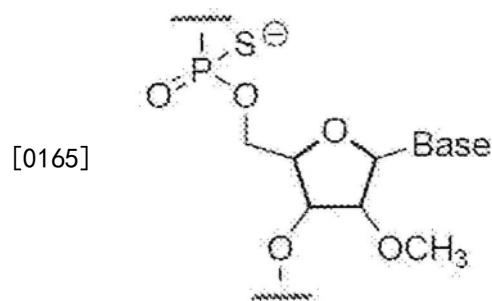
[0160] 作为芳基,优选为碳原子数6~10的芳基。具体而言,可以列举例如:苯基、 α -萘基、 β -萘基。特别优选为苯基。该芳基可以被取代,作为所述取代基,可以列举例如:烷基、卤素、烷氧基、氰基、硝基,可以取代1~3个这些基团。

[0161] 作为亚烷基,优选为直链状或支链状的碳原子数1~6的亚烷基。具体而言,可以列举例如:亚甲基、二亚甲基(ethylene)、三亚甲基、四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、2-(乙基)三亚甲基、1-(甲基)四亚甲基。

[0162] 作为酰基,可以列举直链状或支链状的烷酰基或芳酰基。作为烷酰基,可以列举例如:甲酰基、乙酰基、2-甲基乙酰基、2,2-二甲基乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、2,2-二甲基丙酰基、己酰基等。作为芳酰基,可以列举例如:苯甲酰基、甲苯酰基、萘甲酰基。所述芳酰基可以在能够取代的位置发生取代,可以用烷基取代。

[0163] 本发明的寡核苷酸优选为以下述通式所示的基团作为结构单元的本发明的低聚物,其中,优选核糖的2'位-OH基被甲氧基取代,磷酸键部分为硫代磷酸酯键。

[0164] [化学式3]

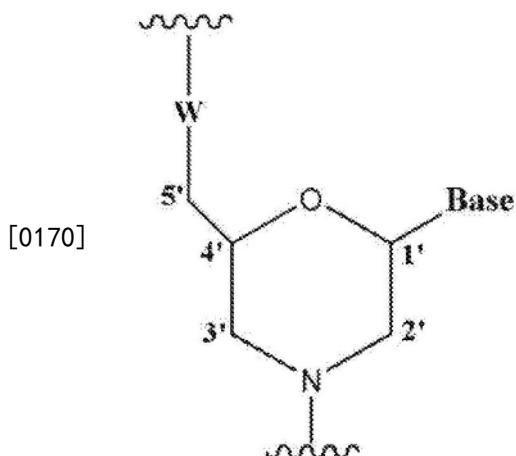


[0166] (式中,Base表示核酸碱基。)

[0167] 本发明的寡核苷酸可以用各种自动合成装置(例如,AKTA oligopilot plus 10/100(GE Healthcare))来容易地合成,或者可以委托第三方机构(例如Promega公司或Takara公司)等来制作。

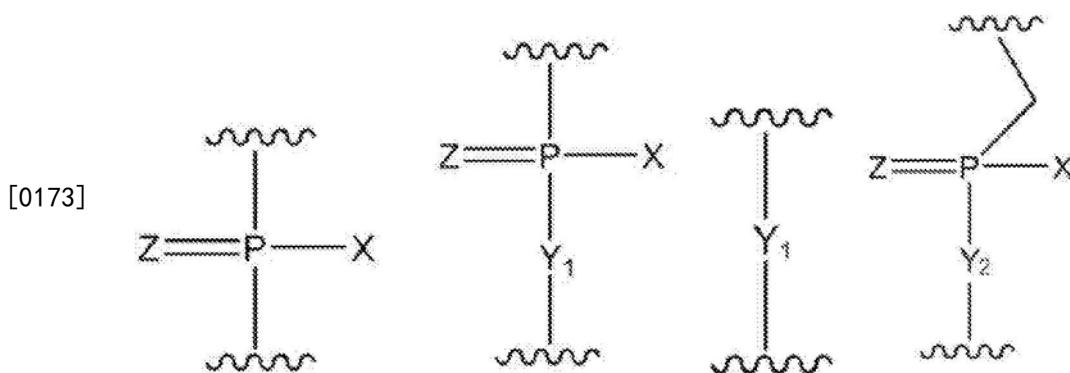
[0168] 上述吗啉基低聚物是以下述通式所示的基团作为结构单元的本发明的低聚物。

[0169] [化学式4]



[0171] (式中,Base与上述含义相同;W表示以下任一式所示的基团。

[0172] [化学式5]



[0174] (式中,X表示-CH₂R¹、-O-CH₂R¹、-S-CH₂R¹、-NR²R³或F;

[0175] R¹表示H、烷基;

[0176] R²及R³相同或不同,表示H、烷基、环烷基或芳基;

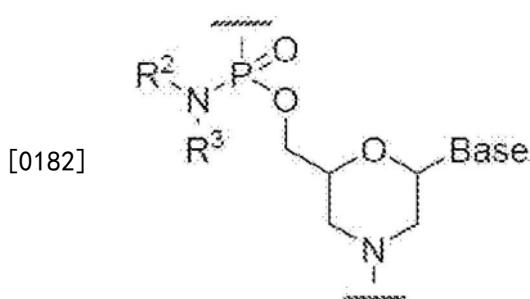
[0177] Y₁表示O、S、CH₂或NR¹;

[0178] Y₂表示O、S或NR¹;

[0179] Z表示O或S。)

[0180] 吡咯基低聚物优选为以下式所示的基团作为结构单元的低聚物(二氨基磷酸酯吡咯基低聚物(以下称为“PMO”))。

[0181] [化学式6]



[0183] (式中,Base、R²、R³与上述含义相同。)

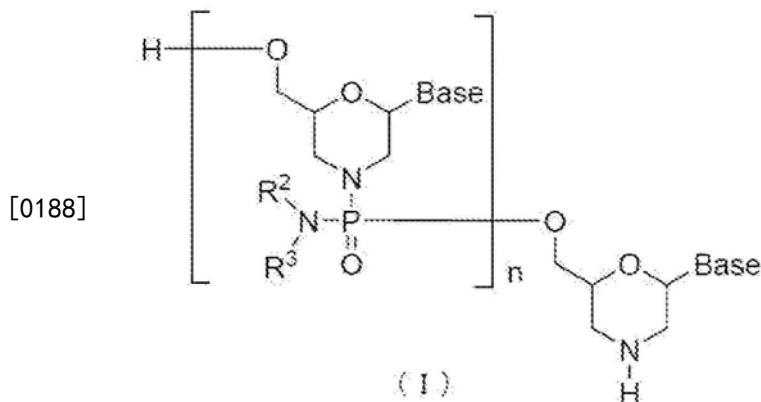
[0184] 吡咯基低聚物可以按照例如国际公开公报第1991/009033号或国际公开公报第2009/064471号来制造。特别是PMO可以按照国际公开公报第2009/064471号中记载的方法

来制造,或者按照国际公开公报第2013/100190号中记载的方法来制造。

[0185] [PMO的制造方法]

[0186] 作为PMO的1个方式,可以列举例如下述通式(I)所示的化合物(以下称为PMO(I))。

[0187] [化学式7]



[0189] 「式中,各Base、R²、R³与上述含义相同;」

[0190] n为1~99的范围内的任意整数,优选为13~31的范围内的任意整数。]

[0191] PMO(I)可以按照公知的方法制造,例如,可以通过实施下述工序的操作来制造。

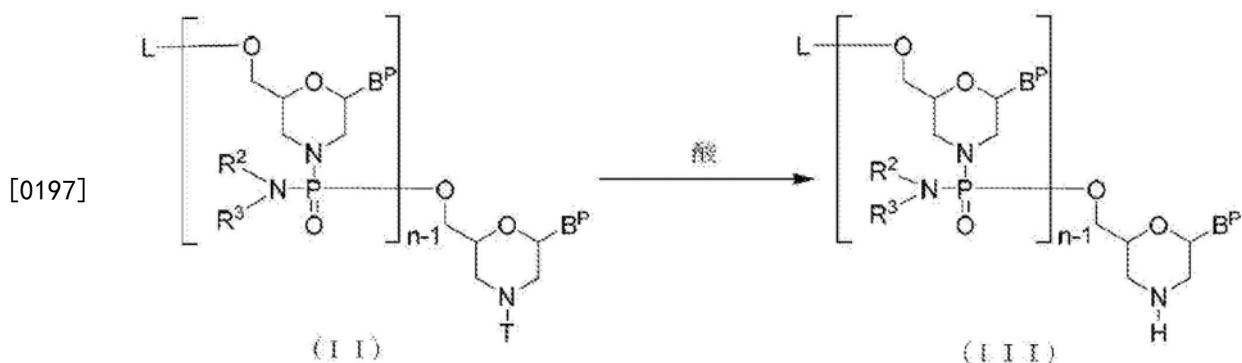
[0192] 对于下述工序所使用的化合物及试剂而言,只要是通常用于PMO的制造的化合物及试剂即可,没有特别限定。

[0193] 另外,下述所有工序可以通过液相法或固相法(使用手动或市售的固相自动合成机)来实施。在用固相法制造PMO时,从操作步骤的简化及合成的正确性的观点考虑,优选使用自动合成机的方法。

〔0194〕 (1) 丁序A.

[0195] 通过使下述通式(II)所示的化合物(以下称为化合物(II))与酸作用来制造下述通式(III)所示的化合物(以下称为化合物(III))的工序。

[0196] [化学式8]



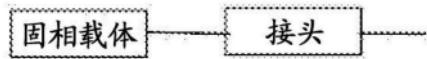
[0198] [式中, n 、 R^2 、 R^3 与上述含义相同。]

[0199] 各B^P独立地表示任选被保护的核酸碱基；

〔0200〕 T表示三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基：

[0201] [表示氯、酷基或下述通式 (IV) 所示的基团(以下称为基团 (IV))。]

〔0202〕 〔化学式9〕



[0203]

(I V)

[0204] 作为B^P的“核酸碱基”，可以举出与Base相同的“核酸碱基”。其中，B^P的核酸碱基的氨基或羟基可以被保护。

[0205] 作为所述氨基的保护基，只要是能够作为核酸的保护基使用的基团即可，没有特别限制，具体而言可以例举例如：苯甲酰基、4-甲氧基苯甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、苯乙酰基、苯氧乙酰基、4-叔丁基苯氧乙酰基、4-异丙基苯氧乙酰基、(二甲基氨基)亚甲基。作为羟基的保护基，可以列举例如：2-氰基乙基、4-硝基苯乙基、苯基磺酰基乙基、甲基磺酰基乙基、三甲基甲硅烷基乙基、在可取代的任意位置任选被1~5个吸电子基团取代的苯基、二苯基氨基甲酰基、二甲基氨基甲酰基、二乙基氨基甲酰基、甲基苯基氨基甲酰基、1-吡咯烷基氨基甲酰基、吗啉基氨基甲酰基、4-(叔丁基羧基)苄基、4-[(二甲基氨基)羧基]苄基、4-(苯基羧基)苄基(例如，参考国际公开公报第2009/064471号公报)。

[0206] 作为“固相载体”，只要是能够用于核酸的固相反应的载体即可，没有特别限制，例如优选具有如下性质的载体：(i)基本上不溶于能够用于吗啉基核酸衍生物的合成的试剂(例如，二氯甲烷、乙腈、四唑、N-甲基咪唑、吡啶、乙酸酐、二甲基吡啶、三氟乙酸)，(ii)对能够用于吗啉基核酸衍生物的合成的试剂在化学上稳定，(iii)可进行化学修饰，(iv)能够装填希望的吗啉基核酸衍生物，(v)具有能够耐受处理中所施加的高压的足够强度，(vi)具有一定的粒径范围和分布。具体而言可以列举：溶胀性聚苯乙烯(例如，氨基甲基聚苯乙烯树脂与1%二乙烯基苯交联(200~400目)(2.4~3.0mmol/g)(东京化成株式会社制造)、氨基甲基化的聚苯乙烯树脂·HCl(Aminomethylated Polystyrene Resin·HCl)[二乙烯基苯1%，100~200目](株式会社肽研究所制造))、非溶胀性聚苯乙烯(例如Primer Support(GE Healthcare公司制造))、PEG链键合型聚苯乙烯(例如NH₂-PEG树脂(渡边化学株式会社制造)、TentaGel resin)、可控孔度玻璃(controlled pore glass; CPG)(例如CPG公司制造)、乙二酰化-可控孔度玻璃(例如参考Alul等，Nucleic Acids Research, Vol.19, 1527 (1991))、TentaGel支撑体-氨基聚乙二醇衍生物化支撑体(例如参考Wright等，Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993))、Poros-聚苯乙烯/二乙烯基苯的共聚物。

[0207] 作为“接头”，可以使用通常用于连接核酸、吗啉基核酸衍生物的公知的接头，可以列举例如：3-氨基丙基、丁二酰基、2,2'-二乙醇磺酰基、长链烷基氨基(LCAA)。

[0208] 本工序可以通过使酸与化合物(II)作用来实施。

[0209] 作为能够用于本工序的“酸”，可以列举例如：三氟乙酸、二氯乙酸或三氯乙酸。作为酸的用量，例如，相对于化合物(II)1摩尔，在0.1摩尔当量~1000摩尔当量的范围内是适当的，优选为1摩尔当量~100摩尔当量的范围内。

[0210] 另外，可以与上述酸同时使用有机胺。作为有机胺，没有特别限定，可以列举例如三乙胺。作为有机胺的用量，例如，相对于酸1摩尔，在0.01摩尔当量~10摩尔当量的范围内是适当的，优选为0.1摩尔当量~2摩尔当量的范围内。

[0211] 在本工序中，使用酸和有机胺的盐或混合物时，可以举出例如三氟乙酸与三乙胺的盐或混合物，更具体而言，可以举出对三氟乙酸2当量混合三乙胺1当量而得到的物质。

[0212] 能够用于本工序的酸可以用适当的溶剂稀释至0.1%~30%的范围内的浓度来使用。作为溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举例如:二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或它们的混合物。

[0213] 上述反应中的反应温度优选为例如10°C~50°C的范围内,更优选为20°C~40°C的范围内,进一步优选为25°C~35°C的范围内。

[0214] 反应时间根据使用的酸的种类、反应温度而不同,通常在0.1分钟~24小时的范围内是适当的。优选为1分钟~5小时的范围内。

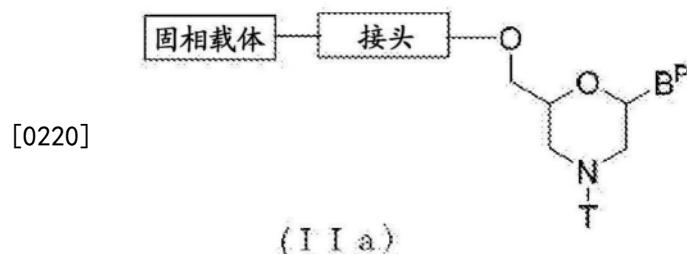
[0215] 另外,在本工序结束后,可以根据需要添加用于中和体系中存在的酸的碱。作为“碱”,没有特别限定,可以列举例如二异丙基乙胺。碱可以用适当的溶剂稀释至0.1% (v/v)~30% (v/v) 的范围内的浓度来使用。

[0216] 作为本工序中使用的溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举:二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或它们的混合物。反应温度优选为例如10°C~50°C的范围内,更优选为20°C~40°C的范围内,进一步优选为25°C~35°C的范围内。

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

[0218] 需要说明的是,在化合物(II)中,n=1,L为基团(IV),下述通式(IIa)所示的化合物(以下称为化合物(IIa))可以按照以下方法来制造。

[0219] [化学式10]

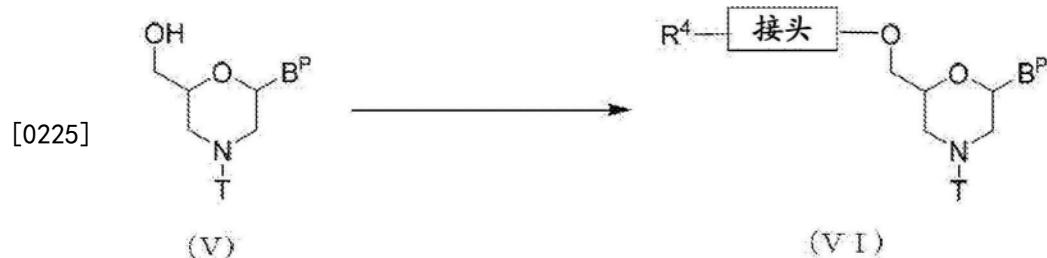


[0221] [式中,B^P、T、接头、固相载体与上述含义相同。]

[0222] 工序1:

[0223] 通过使酰化剂与下述通式(V)所示的化合物作用来制造下述通式(VI)所示的化合物(以下称为化合物(VI))的工序。

[0224] [化学式11]



[0226] [式中,B^P、T、接头与上述含义相同;]

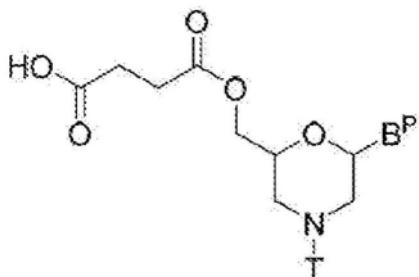
[0227] R⁴表示羟基、卤素或氨基。]

[0228] 本工序可以将化合物(V)作为起始原料,通过公知的接头导入反应来实施。

[0229] 特别是下述通式(VIa)所示的化合物,可以通过实施使用化合物(V)和丁二酸酐进

行酯化反应的已知方法来制造。

[0230] [化学式12]



[0231]

(V I a)

[0232] [式中, B^P 、 T 与上述含义相同。]

[0233] 工序2:

[0234] 通过使缩合剂等与化合物(VI)作用而与固相载体发生反应,制造化合物(IIa)的工序。

[0235] [化学式13]

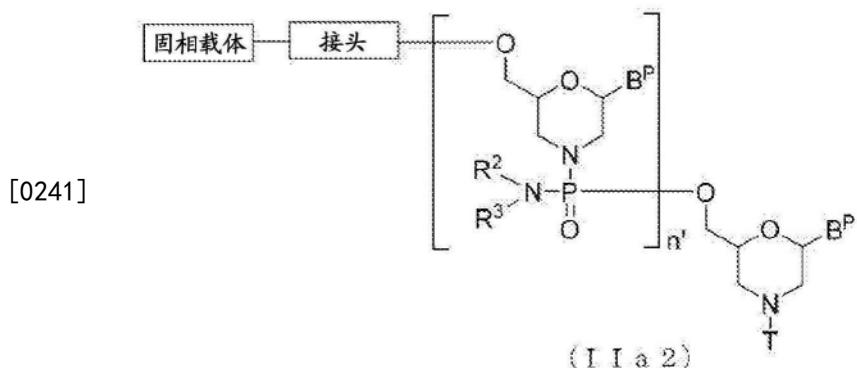


[0237] 「式中, B^P 、 R^4 、T、接头、固相载体与上述含义相同。」

[0238] 本工序可以通过使用化合物(VI)和固相载体进行缩合反应的已知方法来进行制造。

[0239] 在化合物(II)中, $n=2 \sim 99$, L为基团(IV), 下述通式(IIa2)所示的化合物可以将化合物(IIa)作为起始原料, 通过重复实施希望次数的本说明书中记载的PMO制造方法中的工序A和工序B来制造。

[0240] 「化学式14」

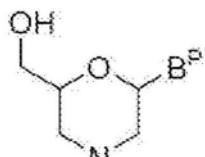


[0242] 「式中、 B^P 、 R^2 、 R^3 、T、接头、固相载体与上述含义相同。」

[0243] n' 表示1~98。]

[0244] 另外,在化合物(II)中,n=1,L为氢,下述通式(IIb)所示的化合物可以通过例如国际公开公报第1991/009033号中记载的方法来制造。

[0245] [化学式15]



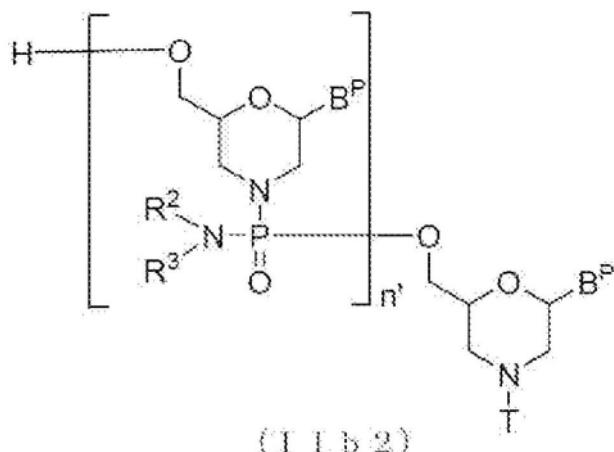
[0246]

(IIb)

[0247] [式中, B^P、T与上述含义相同。]

[0248] 在化合物(II)中, n=2~99, L为氢, 下述通式(IIb2)所示的化合物可以将化合物(IIb)作为起始原料, 通过重复实施希望次数的本说明书中记载的PMO制造方法中的工序A和工序B来制造。

[0249] [化学式16]



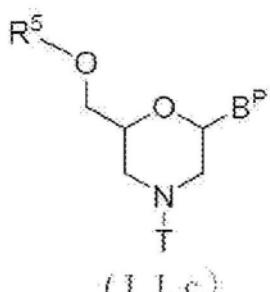
[0250]

(IIb2)

[0251] [式中, B^P、n'、R²、R³、T与上述含义相同。]

[0252] 另外, 在化合物(II)中, n=1, L为酰基, 下述通式(IIc)所示的化合物可以通过实施对化合物(IIb)进行酰化反应的已知方法来制造。

[0253] [化学式17]



[0254]

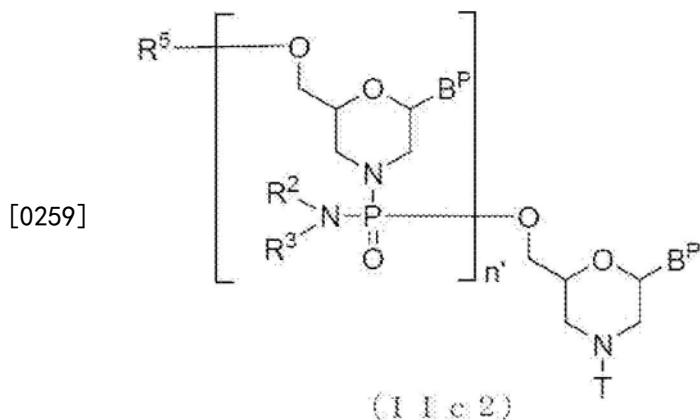
(IIc)

[0255] [式中, B^P、T与上述含义相同;]

[0256] R⁵表示酰基。]

[0257] 在化合物(II)中, n=2~99, L为酰基, 下述通式(IIc2)所示的化合物可以将化合物(IIc)作为起始原料, 通过重复实施希望次数的本说明书中记载的PMO制造方法中的工序A和工序B来制造。

[0258] [化学式18]

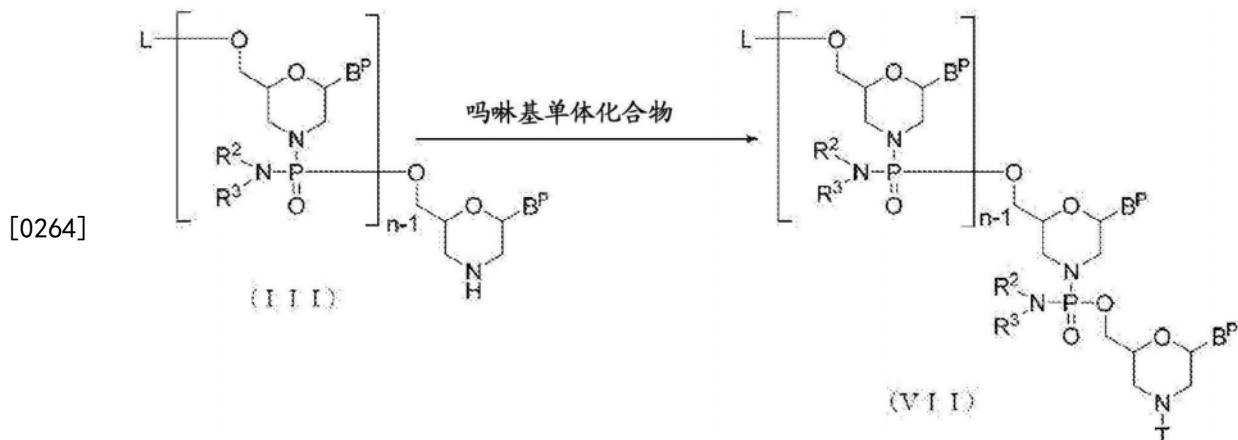


[0260] [式中, B^P 、 n' 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、 T 与上述含义相同。]

[0261] (2) 工序B:

[0262] 通过在碱存在下使吗啉基单体化合物与化合物(III)作用来制造下述通式(VII)所示的化合物(以下称为化合物(VII))的工序。

[0263] [化学式19]

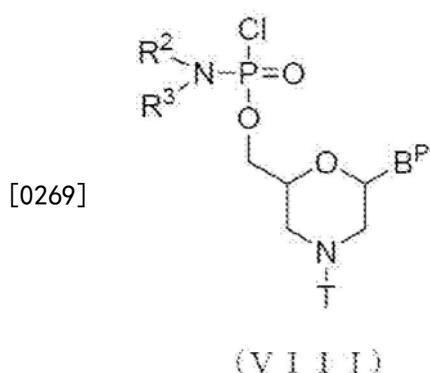


[0265] [式中, 各 B^P 、 L 、 n 、 R^2 、 R^3 、 T 与上述含义相同。]

[0266] 本工序可以通过在碱存在下使吗啉基单体化合物与化合物(III)作用来实施。

[0267] 作为吗啉基单体化合物, 可以列举例如下述通式(VIII)所示的化合物。

[0268] [化学式20]



[0270] [式中, B^P 、 R^2 、 R^3 、 T 与上述含义相同。]

[0271] 作为能够在本工序中使用的“碱”, 可以列举例如: 二异丙基乙胺、三乙胺或N-乙基吗啉。作为碱的用量, 例如, 相对于化合物(III)1摩尔, 在1摩尔当量~1000摩尔当量的范围

内是适当的,优选为10摩尔当量~100摩尔当量的范围内。

[0272] 能够用于本工序的吗啉基单体化合物及碱基可以使用适当的溶剂稀释至0.1%~30%的浓度来使用。作为溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举例如:N,N-二甲基咪唑啉酮、N-甲基哌啶酮、DMF、二氯甲烷、乙腈、四氢呋喃或它们的混合物。

[0273] 反应温度例如优选为0°C ~ 100°C的范围内,更优选为10°C ~ 50°C的范围内。

[0274] 反应时间根据使用的碱的种类、反应温度而不同,通常在1分钟~48小时的范围内是适当的,优选为30分钟~24小时的范围内。

[0275] 另外,在本工序结束后可以根据需要添加酰化剂。作为“酰化剂”,可以列举例如:乙酸酐、乙酰氯、苯氧乙酸酐。酰化剂例如可以使用适当的溶剂稀释至0.1%~30%的范围内的浓度来使用。作为溶剂,只要不参与反应就没有特别限定,可以列举例如:二氯甲烷、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、三氟乙醇等)、水或它们的混合物。

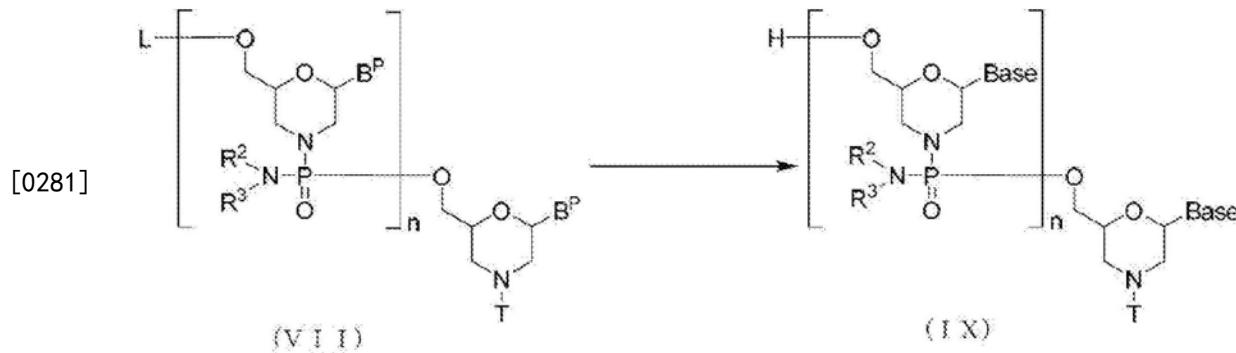
[0276] 另外,如果需要,可以与酰化剂一起使用例如吡啶、二甲基吡啶、三甲基吡啶(collidine)、三乙胺、二异丙基乙胺、N-乙基吗啉等碱。作为酰化剂的用量,优选为0.1摩尔当量~10000摩尔当量的范围内,更优选为1摩尔当量~1000摩尔当量的范围内。作为碱的用量,例如,相对于酰化剂1摩尔,0.1摩尔当量~100摩尔当量的范围内是适当的,优选为1摩尔当量~10摩尔当量的范围内。

[0277] 本反应的反应温度优选为10°C ~ 50°C的范围内,更优选为10°C ~ 50°C的范围内,更优选为20°C ~ 40°C的范围内,进一步优选为25°C ~ 35°C的范围内。反应时间例如根据使用的酰化剂的种类、反应温度而不同,通常在0.1分钟~24小时的范围内是适当的,优选为1分钟~5小时的范围内。

[0278] (3) 工序C:

[0279] 对于在工序B中制造的化合物(VII),使用脱保护剂脱去保护基,从而制造通式(IX)所示的化合物的工序。

[0280] [化学式21]



[0282] [式中,Base、B^P、L、n、R²、R³、T与上述含义相同。]

[0283] 本工序可以通过使脱保护剂与化合物(VII)作用来实施。

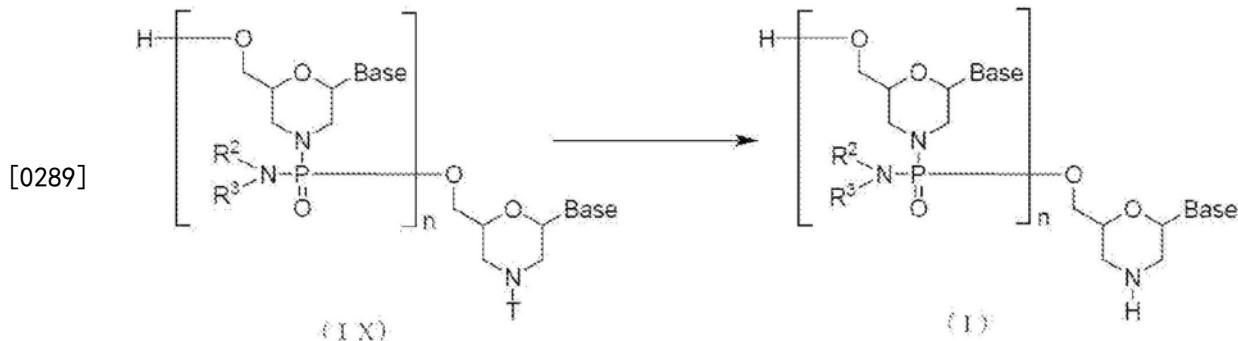
[0284] 作为“脱保护剂”，可以列举例如：浓氨水、甲胺。能够用于本工序的“脱保护剂”可以用例如水、甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、四氢呋喃、DMF、N,N-二甲基咪唑啉酮、N-甲基哌啶酮或它们的混合溶剂进行稀释来使用。其中，优选为乙醇。作为脱保护剂的用量，例如，相对于化合物(VII)1摩尔，例如在1摩尔当量～100000摩尔当量的范围内是适当的，优选为10摩尔当量～1000摩尔当量的范围内。

[0285] 反应温度在例如15°C ~ 75°C的范围内是适当的,优选为40°C ~ 70°C的范围内,更优选为50°C ~ 60°C的范围内。脱保护反应时间根据化合物(VII)的种类、反应温度等而不同,在10分钟~30小时的范围内是适当的,优选为30分钟~24小时的范围内,更优选为5小时~20小时的范围内。

[0286] (4) 工序D:

[0287] 通过使酸与工序C中制造的化合物(IX)作用来制造PMO(I)的工序。

[0288] [化学式22]



[0290] [式中,Base、n、R²、R³、T与上述含义相同。]

[0291] 本工序可以通过向化合物(IX)中加入酸来实施。

[0292] 作为在本工序中可以使用的“酸”，可以列举例如：三氯乙酸、二氯乙酸、乙酸、磷酸及盐酸等。作为酸的用量，例如在溶液的pH为0.1~4.0的范围内使用是适当的，更优选在1.0~3.0的范围内使用。作为溶剂，只要不参与反应就没有特别限定，可以列举例如：乙腈、水或它们的混合溶剂。

[0293] 反应温度优选为10°C ~ 50°C的范围内,更优选为20°C ~ 40°C的范围内,进一步优选为25°C ~ 35°C的范围内。脱保护反应时间根据化合物(IX)的种类、反应温度等而不同,在0.1分钟~5小时的范围内是适当的,优选为1分钟~1小时的范围内,更优选为1分钟~30分钟的范围内。

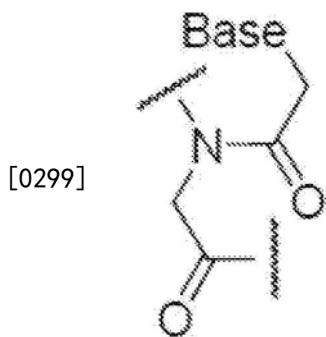
[0294] PMO (I) 可以通过单独使用或组合使用通常的分离纯化方法从本工序中得到的反应混合物中得到, 所述通常的分离纯化方法例如有提取、浓缩、中和、过滤、离心分离、重结晶、 $C_8 \sim C_{18}$ 的反相柱色谱、阳离子交换柱色谱、阴离子交换柱色谱、凝胶过滤柱色谱、高效液相色谱、透析、超滤等方法, 可以对希望的PMO (I) 进行分离纯化(例如, 参考国际公开公报 WO1991/09033)。

[0295] 在使用反相色谱法对PMO (I) 进行纯化时,作为洗脱溶剂,可以使用例如20mM的三乙胺/乙酸缓冲液与乙腈的混合溶液。

[0296] 另外,在使用离子交换色谱法对PMO (I) 进行纯化时,可以使用例如1M的食盐水与10mM的氢氧化钠水溶液的混合溶液。

[0297] 上述肽核酸低聚物是以下述通式所示的基团作为结构单元的本发明的低聚物。

[0298] [化学式23]



[0300] (式中,Base与上述含义相同。)

[0301] 肽核酸例如可以按照以下文献来进行制造。

[0302] 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **254**, 1497 (1991).

[0303] 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *Jacs.*, 114, 1895 (1992)

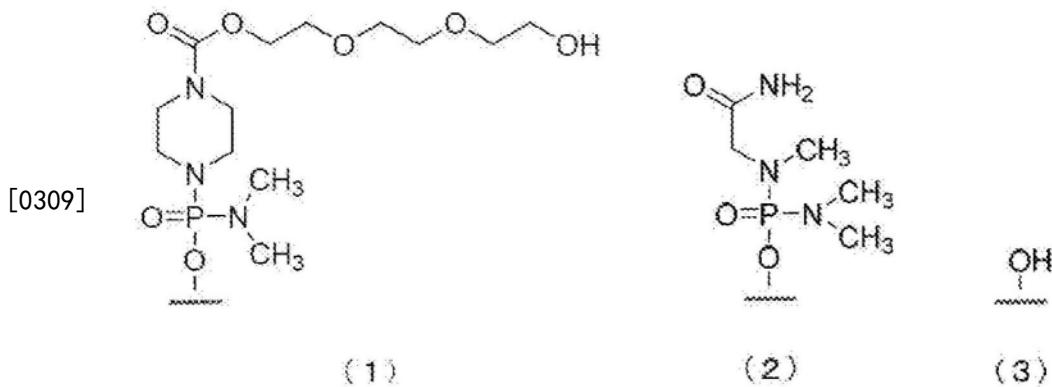
[0304] 3) K.L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H.F. Hansen, T. Vulpius, K.H. Petersen, R.H. Berg, P.E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, 59, 5767 (1994)

[0305] 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)

[0306] 5) T.Koch, H.F.Hansen, P.Andersen, T.Larsen, H.G.Batz, K.Otteson, H.Orum, J.Pept.Res., 49, 80 (1997)

[0307] 另外,本发明的低聚物的5'末端可以是下述化学式(1)~(3)中任一种基团。优选为(3)-OH。

[0308] [化学式24]



[0310] 以下,将上述(1)、(2)及(3)所示的基团分别称为“基团(1)”、“基团(2)”及“基团(3)”。

[0311] 2. 医药组合物

[0312] 本发明的低聚物能够跳读抗肌萎缩蛋白基因的外显子45。因此可以预测，通过对DMD患者给药含有本发明的低聚物的医药组合物，能够缓解肌营养不良症的症状，所述DMD患者在抗肌萎缩蛋白基因具有成为外显子45跳读的对象的变异(通过外显子45跳读而转化为符合读码框(in-frame化)的变异)。另外，由短链长构成的本发明的低聚物具有制造工序简便，而且可降低制造成本的优点。

[0313] 下面,作为其它实施方式,提供一种以本发明的低聚物、其医药上能够允许的盐或

水合物作为有效成分的肌营养不良症治疗用医药组合物(以下称为“本发明的组合物”)。

[0314] 作为本发明的组合物中含有的本发明低聚物的医药上能够允许的盐的例子,可以列举:钠盐、钾盐、锂盐这样的碱金属盐;钙盐、镁盐这样的碱土金属盐;铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等金属盐;铵盐;叔辛胺盐、二苄胺盐、吗啉盐、葡糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡萄糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基-苯乙胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐这样的有机胺盐;氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐这样的氢卤酸盐;硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等无机酸盐;甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐这样的低级烷基磺酸盐;苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐这样的芳基磺酸盐;乙酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等有机酸盐;甘氨酸盐、赖氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐这样的氨基酸盐等。这些盐可以用公知的方法来制造。或者,本发明的组合物中含有的本发明的低聚物可以为其水合物的形态。

[0315] 本发明的组合物的给药方式只要是医药上能够允许的给药方式即可,没有特别限制,可以根据治疗方法来选择,从传递至肌组织的容易性的观点考虑,优选静脉内给药、动脉内给药、肌肉内给药、皮下给药、口服给药、间质给药(interstitial administration)、经皮给药等。另外,作为本发明的组合物可采用的剂型,没有特别限制,可以列举例如:各种注射剂、口服剂、输液剂、吸入剂、软膏剂、洗剂等。

[0316] 在对肌营养不良症患者给药本发明的低聚物时,优选本发明的组合物包含促进该低聚物传递至肌组织的载体。这样的载体只要在医药上能够允许即可,没有特别限制,作为其例子,可以列举:阳离子性脂质体、阳离子性聚合物等阳离子性载体、或者利用了病毒包膜的载体。作为阳离子性脂质体,可以列举例如:以2-0-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰基-1,3-0-二油酸甘油酯和磷脂作为必需结构成分而形成的脂质体(以下称为“脂质体A”)、Oligofectamine(注册商标)(Invitrogen公司制造)、Lipofectin(注册商标)(Invitrogen公司制造)、Lipofectamine(注册商标)(Invitrogen公司制造)、Lipofectamine 2000(注册商标)(Invitrogen公司制造)、DMRIE-C(注册商标)(Invitrogen公司制造)、GeneSilencer(注册商标)(Gene Therapy Systems公司制造)、TransMessenger(注册商标)(QIAGEN公司制造)、TransIT TKO(注册商标)(Mirus公司制造)、Nucleofector II(Lonza)。其中,优选脂质体A。作为阳离子性聚合物,可以列举例如:JetSI(注册商标)(Qbiogene公司制造)、Jet-PEI(注册商标)(聚乙烯亚胺、Qbiogene公司制造)。作为利用了病毒包膜的载体,可以列举例如:GenomeOne(注册商标)(HVJ-E脂质体、石原产业株式会社制造)。或者可以使用日本专利2924179号中记载的医药器件、专利再公表公报第2006/129594号(JP WO2006/129594)及专利再公表公报第2008/096690号(JP WO2008/096690)中记载的阳离子性载体。

[0317] 本发明的组合物中含有的本发明低聚物的浓度根据载体的种类等而不同,在0.1nM~100μM的范围内是适当的,优选为1nM~10μM的范围内,更优选为10nM~1μM的范围内。另外,本发明的组合物中含有的本发明的低聚物与载体的重量比(载体/本发明的低聚物)根据该低聚物的性质及该载体的种类等而不同,在0.1~100的范围内是适当的,优选为1~50的范围内,更优选为10~20的范围内。

[0318] 除了本发明的低聚物和上述载体以外,本发明的组合物中可以任意配合医药上能够允许的添加剂。作为所述添加剂,可以列举例如:乳化助剂(例如,碳原子数6~22的脂肪

酸、其在医药上能够允许的盐、白蛋白、右旋糖酐)、稳定剂(例如,胆固醇、磷脂酸)、等渗剂(例如,氯化钠、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖)、pH调节剂(例如,盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙醇胺)。这些添加剂可以使用一种或两种以上。本发明的组合物中该添加剂的含量为90重量%以下是适当的,优选为70重量%以下,更优选为50重量%以下。

[0319] 本发明的组合物可以通过在载体的分散液中加入本发明的低聚物并适当搅拌来制备。另外,添加剂可以在本发明的低聚物添加前的适当的工序中添加,也可以在添加后的适当的工序中添加。作为添加本发明的低聚物时可以使用的水性溶剂,只要是医药上能够允许的溶剂即可,没有特别限制,可以列举例如:注射用水、注射用蒸馏水、生理盐水等电解质液、葡萄糖液、麦芽糖液等糖液。另外,对于上述情况下的pH及温度等条件而言,本领域技术人员可以适当选择。

[0320] 本发明的组合物可以制成例如液体制剂、其冷冻干燥制剂。该冷冻干燥制剂可以按照通常方法对具有液体制剂形态的本发明的组合物进行冷冻干燥处理来制备。例如,可以在对具有液体制剂形态的本发明的组合物进行适当灭菌之后,将给定量分配于管型瓶中,在约-40~-20°C的条件下进行2小时左右的预冷冻,在约0~10°C、减压下进行一次干燥,接着在约15~25°C、减压下进行二次干燥,进行冷冻干燥。然后,通常将管型瓶内部置换为氮气并压盖,可以得到本发明的组合物的冷冻干燥制剂。

[0321] 本发明的组合物的冷冻干燥制剂通常可以通过添加任意适当的溶液(再溶解液)而再溶解来使用。作为这样的再溶解液,可以列举:注射用水、生理盐水、其它普通输液。该再溶解液的液量根据用途等而不同,没有特别限制,为冷冻干燥前的液量的0.5~2倍量或500mL以下是适当的。

[0322] 作为给药本发明的组合物时的用量,优选在考虑了所含有的本发明低聚物的种类、剂型、年龄、体重等患者的状态、给药途径、疾病性质与程度的基础上进行制备,作为对成人的本发明的低聚物的量,通常为每1天0.1mg~10g/人的范围内,优选为1mg~1g/人的范围内。该数值有时根据作为目标的疾病种类、给药方式、靶分子而有所不同。因此,根据情况,有时在此以下就足够了,反之,有时需要在此以上的用量。另外,可以1天1次至数次给药、或者以1天~数天的间隔进行给药。

[0323] 作为本发明的组合物的其它方式,可以列举:包含能够表达本发明的寡核苷酸的载体和上述载体的医药组合物。所述表达载体可以是能够表达多个本发明的寡核苷酸的载体。可以与含有本发明低聚物的本发明的组合物同样地在该组合物中添加医药上能够允许的添加剂。该组合物中含有的表达载体的浓度根据载体的种类等而不同,在0.1nM~100μM的范围内是适当的,优选为1nM~10μM的范围内,更优选为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、载体的种类等而不同,在0.1~100的范围内是适当的,优选为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量与含有本发明低聚物的本发明的组合物的情况相同,关于其制备方法等也与本发明的组合物的情况相同。

[0324] 以下,列举实施例及试验例对本发明进一步详细地进行说明,但本发明并不限定于实施例所示的范围。

[0325] 实施例

[0326] [参考例1]

[0327] 担载于氨基聚苯乙烯树脂的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

[0328] 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

[0329] 在氩气氛围中将N-{1-[(2R,6S)-6-(羟甲基)-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4-二甲氨基吡啶(4-DMAP)1.1g悬浮于二氯甲烷50mL中,加入琥珀酸酐0.90g,在室温下搅拌3小时。向反应液中加入甲醇10mL,进行减压浓缩。使用乙酸乙酯和0.5M磷酸二氢钾水溶液对残渣进行提取操作。按照0.5M磷酸二氢钾水溶液、水、饱和食盐水的顺序对得到的有机层进行清洗。用硫酸钠干燥得到的有机层,进行减压浓缩,得到了4.0g目标产物。

[0330] 工序2:担载于氨基聚苯乙烯树脂的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

[0331] 将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溶解于吡啶(脱水)200mL,加入4-DMAP 0.73g、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐11.5g。接着,加入氨基聚苯乙烯树脂Primer support 200 amino(GE Healthcare Japan公司制造、17-5214-97)25.0g、三乙胺8.5mL,在室温下振荡4天。反应后,滤取树脂。按照吡啶、甲醇、二氯甲烷的顺序清洗得到的树脂并进行减压干燥。向得到的树脂中加入四氢呋喃(脱水)200mL、乙酸酐15mL、2,6-二甲基吡啶15mL,在室温下振荡2小时。滤取树脂,并按照吡啶、甲醇、二氯甲烷的顺序清洗,并进行减压干燥,得到了26.7g的目标产物。

[0332] 对于该目标产物的装载量而言,通过使用公知的方法对409nm的UV吸光度进行测定来确定每1g树脂的三苯甲基摩尔量。树脂的装载量为129.2 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

[0333] UV测定条件

[0334] 仪器:U-2910(株式会社日立制作所)

[0335] 溶剂:甲磺酸

[0336] 波长:409nm

[0337] ϵ 值:45000

[0338] [参考例2]

[0339] 担载于氨基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸

[0340] 按照与参考例1相同的方法制造了标题化合物。其中,在本工序中使用了1-[(2R,6S)-6-(羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]-5-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮来代替参考例1的工序1中使用的N-{1-[(2R,6S)-6-(羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基}苯甲酰胺。

[0341] 对于该目标产物的装载量而言,通过使用公知的方法对409nm的UV吸光度进行测定来确定每1g树脂的三苯甲基摩尔量。树脂的装载量为164.0 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

[0342] [参考例3]

[0343] 担载于氨基聚苯乙烯树脂的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

[0344] 按照与参考例1相同的方法制造了标题化合物。其中,在本工序中使用了N- {9- [(2R,6S)-6- (羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基] 嘌呤-6-基} 苯甲酰胺来代替参考例1的工序1中使用的N- {1- [(2R,6S)-6- (羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]-2- 氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基} 苯甲酰胺。

[0345] 对于该目标产物的装载量而言,通过使用公知的方法对409nm的UV吸光度进行测定来确定每1g树脂的三苯甲基摩尔量。树脂的装载量为185.7 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

[0346] [参考例4]

[0347] 担载于氨基聚苯乙烯树脂的4- { { (2S,6R)-6- {6- (2- 氰基乙氧基)-2- [(2- 苯氧乙酰基) 氨基] 嘌呤-9-基} -4- 三苯甲基吗啉-2-基} 甲氧基} -4- 氧代丁酸

[0348] 按照与参考例1相同的方法制造了标题化合物。其中,在本工序中使用了N- {6- (2- 氰基乙氧基)-9- [(2R,6S)-6- (羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基] 嘌呤-2-基} -2- 苯氧基乙酰胺来代替参考例1的工序1中使用的N- {1- [(2R,6S)-6- (羟甲基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]-2- 氧代-1,2-二氢嘧啶-4-基} 苯甲酰胺。

[0349] 对于该目标产物的装载量而言,通过使用公知的方法对409nm的UV吸光度进行测定来确定每1g树脂的三苯甲基摩尔量。树脂的装载量为164.8 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

[0350] 按照以下实施例1的记载,合成了具有表1的PMO No.1 ~ 81的碱基序列的PMO (R²、R³为甲基,5' 末端为基团(3))。用注射用水(株式会社大塚制药工场制造)溶解合成的PMO。

[0351] [表1-1]

PMO No.	碱基序列	序列名	序列号
1	TTGCCGCTGCCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_18-30	14
2	GTTCGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-2-11_20-32	7
3	GCCGCTGCCACATCCTGGAGTTCC	H45_-2-13_18-28	15
4	CCGCTGCCAATGTCCCTGGAGTTCC	H45_-2-11_15-27	16
5	TTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-2-11_18-30	17
6	TTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-2-13_21-31	18
7	TTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_20-31	19
8	TGCCGCTGCCGCCATCCTGGAGTTCC	H45_1-15_19-29	20
9	GTTCGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-2-10_21-32	8
10	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-2-13_20-34	9
11	CAGTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-2-8_19-34	10
12	GTTCGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_1-12_20-32	21
13	CAGTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-2-8_21-34	22
14	ACAGTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-2-9_23-35	23
15	CAGTTGCCGCTGCCGGAGTTCC	H45_-2-7_20-34	24
16	GTTCGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-32	25
17	CAGTTGCCGCTGCCGGAGTTCC	H45_-3-7_20-34	26
18	CCGCTGCCAATGTGGAGTTCC	H45_-4-8_15-27	27
19	CAGTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_1-8_19-34	28
20	CCGCTGCCAATCTGGAGTTCC	H45_-2-9_16-27	29
21	CAGTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-34	30
22	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCC	H45_-2-9_18-30	31
23	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCC	H45_-4-9_18-30	32
24	ACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-35	33
25	GTTCGCCGCTGC	H45_21-32	34
26	CCTGGAGTTCC	H45_-2-10	35
27	TGGAGTTCC	H45_-2-8	36
28	CAGTTGCCGCTGCC	H45_19-34	37
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	H45_2-14_53-65	38
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_2-14_136-148	39
31	TTCTTCCCCAGTTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_1-15_52-66	11
32	CAGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_1-15_135-149	12
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_1-14_136-147	40

[0352]

[表1-2]

31	TCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTC	H45_1-15_52-62	41
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTC	H45_1-15_137-147	42
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTC	H45_1-14_53-64	43
37	TTCCCCAGTTGACATCCTGGAGTC	H45_1-13_51-63	44
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTC	H45_1-13_133-145	45
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTC	H45_1-13_134-146	46
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTC	H45_1-13_55-67	47
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTC	H45_1-13_138-150	48
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTC	H45_1-13_52-66	49
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTCCT	H45_-2-9_50-61	50
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTC	H45_-1-10_52-66	51
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTC	H45_-2-13_52-64	52
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTC	H45_1-11_135-149	53
47	TGCAGACCTCCTGCCCTGGAGTC	H45_1-11_137-151	54
48	CTGTTTGCAGACCCATCCTGGAGTC	H45_1-13_144-156	55
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTC	H45_-5-8_141-153	56
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTC	H45_1-15_128-142	57
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGGCGCTGCCAAT	H45_16-30_132-146	58
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTC	H45_1-13_98-110	59
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTT	H45_85-97_132-144	60
54	ACCTCCTGCCACCGCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-65_132-146	61
55	TGGCATCTGTTTATCCTGGAGTC	H45_1-13_85-97	62
56	TTATTTCTTCCCCAGTCCTGTAGA	H45_-8-5_58-70	63
57	GCTTCCAATGCCATCCTGGAGTC	H45_-1-15_114-123	64
58	GGCTTCCAATGCCATCCTGGAGTC	H45_1-15_114-124	65
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	H45_129-143_156-170	66
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	H45_69-83_129-143	67
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTT	H45_84-98_129-143	68
62	TCCTGCCACCGCAGATTTCTGTAGAATA	H45_99-113_129-143	69
63	GCCATCCTGGAGTC	H45_1-15	70
64	TTCTTCCCCAGTC	H45_52-66	71
65	CAGACCTCCTGCCAC	H45_135-149	72
66	TCCTGGAGTC	H45_-2-11	73
67	GTTCGCCGCTGCC	H45_20-32	74
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCAAT	H45_16-28_132-144	75

[0354]

[表1-3]

[0356]	69	ATTCAGGCTTCCCTCCCCAGTTGCA	H45_51-63_117-129	76
	70	TGGAGTTCC	H45_-1-8	77
	71	TGGAGTTC	H45_1-8	78
	72	CAGTTTGCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-34	79
	73	ACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-2-9_25-35	80
	74	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_20-32	81
	75	AACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-10_26-36	82
	76	CAGTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_1-10_25-34	83
	77	CAGTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_1-11_24-34	84
	78	AGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_1-11_24-33	85
	79	ACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-9_25-35	86
	80	TGCCGCTGCCCATCCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_18-29	87
	81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAATGC	H45_14-27_130-141	88
	82	CCTGGAGTTCC	H45_-1-10	144
	83	CAGTTGCCG	H45_25-34	145
	84	ACAGTTGCCG	H45_25-35	146

[0357] [实施例1]

[0358] 将与5'末端碱基对应的担载于氨基聚苯乙烯树脂的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)、或担载于氨基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸(参考例2)、或担载于氨基聚苯乙烯树脂的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3)、或担载于氨基聚苯乙烯树脂的4-{{(2S,6R)-6-{6-(2-氰基乙氧基)-2-[(2-苯氧乙酰基)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4)0.2g填充于带过滤器的柱中,使用核酸合成仪(AKTA Oligopilot 10 plus)开始下述合成循环。在各偶联循环中添加希望的吗啉基单体化合物,使其为表1所述的各化合物的碱基序列(参考下述表2)。

[0359] [表2]

步骤	试剂	量 (mL)	时间 (分钟)
1	解封闭溶液	18~32	1.8~3.2
2	中和/清洗溶液	30	1.5
3	偶联溶液 B	5	0.5
4	偶联溶液 A	1.3	0.25
[0360]	利用步骤3和4中投入的试剂进行的偶联反应		120~300
6	乙腈	20	1.0
7	封端溶液	9	2.0
8	乙腈	30	2.0

[0361] (注) 仅在3'端乙酰化的情况下,在最后一个循环后再次实施

[0362] 步骤1、2、7和8。

[0363] 需要说明的是,作为解封闭溶液,使用了含有3% (w/v) 三氟乙酸的二氯甲烷溶液。作为中和/清洗溶液,使用在含有35% (v/v) 乙腈的二氯甲烷溶液中溶解了N,N-二异丙基乙胺10% (v/v) 且溶解了四氢呋喃5% (v/v) 而得到的溶液。作为偶联溶液A,使用用四氢呋喃溶解吗啉基单体化合物为0.10M而得到的溶液。作为偶联溶液B,使用在乙腈中溶解了N,N-二异丙基乙胺20% (v/v) 且溶解了四氢呋喃10% (v/v) 而得到溶液。作为封端溶液,使用在乙腈中溶解了20% (v/v) 的乙酸酐和30% (v/v) 的2,6-二甲基吡啶而得到的溶液。

[0364] 从反应容器中回收担载有上述合成的PMO的氨基聚苯乙烯树脂,在室温下减压干燥2小时以上。将担载于氨基聚苯乙烯树脂的干燥的PMO加入反应容器,加入28%氨水-乙醇(1/4) 5mL,在55°C下搅拌15小时。对氨基聚苯乙烯树脂进行过滤,并用水-乙醇(1/4) 1mL清洗。对得到的滤液进行减压浓缩。将得到的残渣溶解于20mM乙酸-三乙胺缓冲液(TEAA缓冲液)与乙腈的混合溶剂(4/1) 10mL,用膜滤器进行过滤。通过反相HPLC纯化得到的滤液。使用的条件如以下表3所示。

[0365] 表3

柱	Xbridge 5 μ m C18 (Waters, φ 19 \times 50mm, 1CV = 14mL)
流速	10mL/分
柱温	室温
A液	20mM TEAA缓冲液
B液	CH ₃ CN
梯度	(B) 浓度10→70% / 15CV

[0367] CV:柱体积

[0368] 对各级分进行分析,回收目标物,并进行减压浓缩。向浓缩残渣中加入2M的磷酸水溶液0.5mL,搅拌15分钟。再加入2M的氢氧化钠水溶液2mL,使其呈碱性,用膜滤器(0.45 μ m)进行过滤。

[0369] 用阴离子交换树脂柱对含有得到的目标物的水溶液进行纯化。使用的条件如下述

表4所示。

[0370] 表4

[0371]	柱	Source 15Q (GE Healthcare, $\varphi 10 \times 108\text{mm}$, $1\text{CV}=8.5\text{mL}$)
	流速	8.5mL/分
	柱温	室温
	A液	10mM的氢氧化钠水溶液
	B液	10mM的氢氧化钠水溶液, 1M的氯化钠水溶液
	梯度	(B) 浓度1→50% / 40CV

[0372] 对各级分进行分析 (HPLC), 以水溶液的形式得到了目标物。向得到的水溶液中添加0.1M的磷酸缓冲液 (pH 6.0) 进行中和。接着, 在下述表5所示的条件下用反相HPLC进行脱盐。

[0373] 表5

[0374]	柱	Xbridge 5 μm C8 (Waters, $\varphi 10 \times 50\text{mm}$, $1\text{CV}=4\text{mL}$)
	流速	4mL/分
	柱温	60°C
	A液	水
	B液	CH ₃ CN
	梯度	(B) 浓度0→50% / 20CV

[0375] 回收目标物并进行减压浓缩。将得到的残渣溶于水, 进行冷冻干燥, 以白色棉状固体的形式得到了目标化合物。将ESI-TOF-MS的计算值、测定值示于下述表6。

[0376] [表6-1]

PMO No.	碱基序列	计算值	测定值
1	TTGCCGCTGCCACATCCTGGAGTTC	8520.95	8520.65
2	GTTCGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8542.94	8542.57
3	GCCGCTGCCACATCCTGGAGTTCCT	8505.95	8506.57
4	CCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCCT	8520.95	8521.37
5	TTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8511.94	8511.70
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8526.94	8527.07
7	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	7857.71	7857.32
8	TGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	8521.95	8521.98
9	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	7897.72	7897.71
10	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	9851.40	9851.60
11	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8551.95	8551.80
12	GTTCGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	8236.84	8236.69
13	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	7921.73	7921.91
14	ACAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	7905.73	7905.53
15	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	7906.73	7906.65
16	GTTCGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	7567.61	7567.35
17	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8261.85	8261.67
18	CCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCCT	8245.85	8245.68
19	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	7906.73	7906.70
20	CCGCTGCCAACATCCTGGAGTTCCT	7520.61	7520.60
21	CAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	8221.84	8221.48
22	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCCT	7866.72	7866.77
23	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCCT	8551.95	8552.23
24	ACAGTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	7245.51	7245.48
25	GTTCGCCGCTGC	3912.36	3912.16
26	CCTGGAGTTCCT	3896.36	3896.12
27	TGGAGTTCCT	3266.14	3265.99
28	CAGTTGCCGCTGCC	5196.81	5196.30
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	8510.93	8511.8
30	AGACCTCCCTGCCACCATCCTGGAGTT	8513.95	8513.72
31	TTCTTCCCCAGTTGCCACCATCCTGGAGTT	9826.39	9826.15
32	CAGACCTCCCTGCCACCATCCTGGAGTT	9814.41	9813.82
33	GACCTCCCTGCCACCATCCTGGAGTT	8489.95	8490.01

[0377]

[0378] [表6-2]

34	TCCCCAGTTGCCGCATCCTGGAGTTC	8520. 95	8520. 97
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	8505. 95	8506. 48
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	8495. 94	8495. 43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	8519. 95	8520. 35
38	CCTCCTGCCACCGCATTGCCATCCTGGAGTTC	8465. 94	8466. 23
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	8449. 94	8449. 88
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	8485. 93	8486. 01
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	8529. 96	8529. 54
42	TTCTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	9156. 16	9156. 62
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCCT	7535. 61	7535. 92
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTCC	8486. 93	8486. 27
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCC	9141. 16	9141. 18
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	8489. 95	8489. 65
47	TGCAGACCTCCTGCCCTGGAGTTC	8520. 95	8520. 58
48	CTGTTTGAGACCCATCCTGGAGTTC	8559. 96	8560. 66
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCTGTAA	8574. 96	8574. 85
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	9854. 42	9854. 07
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCAAT	9750. 39	9750. 67
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	8567. 97	8567. 11
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTT	8486. 93	8486. 39
54	ACCTCCTGCCACCGCTTCCCCAGTTGCA	9725. 38	9725. 57
55	TGGCATCTGTTTCATCCTGGAGTTC	8580. 95	8580. 81
56	TTATTCTTCCCCAGTTCTGTAAAGA	8508. 94	8508. 7
57	GCTTCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8504. 95	8504. 88
58	GGCTTCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8544. 96	8544. 72
59	TTTCTGCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	9844. 41	9844. 1
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	9957. 45	9957. 8
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTT	9850. 4	9850. 45
62	TCCTGCCACCGCAGATTTCCTGTAGAATA	9867. 42	9867. 85
63	GCCATCCTGGAGTTC	4905. 71	4905. 02
64	TTCTTCCCCAGTTG	4831. 68	4831. 14
65	CAGACCTCCTGCCAC	4819. 7	4819. 64
66	TCCTGGAGTTCC	4226. 47	4226. 03
67	GTTCGCCGCTGCC	4227. 47	4227. 48
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCAAT	8435. 93	8436. 58

[0379]

[表6-3]

[0381]	69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	8479. 93	8479. 03
	70	TGGAGTTCC	2936. 03	2936. 07
	71	TGGAGTTC	2620. 92	2620. 97
	72	CAGTTGCCGCCTGGAGTTCC	6906. 39	6906. 44
	73	ACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	7260. 51	7260. 67
	74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	7252. 5	7252. 48
	75	AACAGTTGCCCTGGAGTTCC	7229. 51	7229. 07
	76	CAGTTGCCGCCTGGAGTTTC	6591. 28	6591. 07
	77	CAGTTGCCGCTCCTGGAGTTTC	7236. 5	7236. 76
	78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTTC	6921. 39	6921. 06
	79	ACAGTTGCCGCTGGAGTTCC	6930. 4	6930. 42
	80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	7851. 72	7852. 1
	81	CTGCCACCCGAGCCGCTGCCCAATGC	8484. 96	8484. 68
	82	CCTGGAGTTCC	3566. 25	3566. 51
	83	CAGTTGCCG	3251. 14	3251. 19
	84	ACAGTTGCCG	3590. 26	3590. 04

[0382] [试验例1]

[0383] 体外测定

[0384] 使用Amixa Cell Line Nucleofector Kit L通过Nucleofector II (Lonza) 对 3.5×10^5 个RD细胞(人横纹肌肉瘤细胞株)导入了表1的反义低聚物1~10 μM 。程序使用T-030。

[0385] 导入后,在含有10%胎牛血清(FCS)(Invitrogen公司制造)的Eagle最小基本培养基(minimal essential medium)(EMEM)培养基(Sigma-Aldrich公司制造,以下相同)2mL中、37°C、5%CO₂的条件下对细胞培养三天。

[0386] 用PBS(Nissui公司制造,以下相同)清洗1次细胞,然后向细胞添加350 μL 含有1%的2-巯基乙醇(Nacalai tesque公司制造)的缓冲液RLT(Qiagen公司制造),在室温下静置数分钟,使细胞溶解,回收于QIAshredder匀浆器(Qiagen公司制造)中。以15,000rpm离心2分钟,制作了匀浆。按照RNeasy Mini Kit (Qiagen公司制造)所附带的方案提取总RNA。使用NanoDrop ND-1000分光光度计(LMS公司制造)测定了提取出的总RNA的浓度。

[0387] 使用QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen公司制造)对提取出的总RNA 400ng进行了One-Step RT-PCR。按照试剂盒所附带的方案制备了反应液。热循环仪使用PTC-100 (MJ Research公司制造)或TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch(Takara Bio公司制造)。使用的RT-PCR程序如下所述。

[0388] 50°C、30分钟:逆转录反应

[0389] 95°C、15分钟:聚合酶活性化、逆转录酶灭活、cDNA热变性

[0390] [94°C、30秒钟;60°C、30秒钟;72°C、1分钟] × 35循环:PCR扩增

[0391] 72°C、10分钟:最终延长反应

[0392] RT-PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如下所述。

[0393] 正向引物:5' -GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (序列号1)

[0394] 反向引物:5' -GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (序列号2)

[0395] 使用Bioanalyzer (Agilent公司制造) 及MultiNA(株式会社岛津制作所制造) 对上述PCR的反应产物1μL进行了分析。

[0396] 对跳读了外显子45的条带的多核苷酸量“A”和未跳读外显子45的条带的多核苷酸量“B”进行了测定。基于这些“A”及“B”的测定值按照下述式求出了跳读效率。

[0397] 跳读效率(%) = A / (A+B) × 100

[0398] 实验结果

[0399] 将结果示于图1～5、8、10、11及16～24。通过本实验可知,本发明的低聚物可有效地跳读外显子45。

[0400] [试验例2]

[0401] 体外测定

[0402] 用与试验例1相同的方法进行了实验。其中,使用Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L通过Nucleofector II (Lonza) 对 3.5×10^5 个RD细胞(人横纹肌肉瘤细胞株) 分别以3μM的浓度单独地导入了本发明低聚物 (PMO NO.11或PMO NO.9),或者将构成上述本发明低聚物的2个单元低聚物中任一个单独地导入或使其混合后导入。程序使用T-030。导入的序列的组合如下所述。

[0403] [表7]

[0404] 导入序列的组合

序列组合	导入浓度 (μM)
PMO NO. 11 (PMO No.27 与 PMO No.28 连接)	3 μM
PMO NO. 27	3 μM
PMO NO. 28	3 μM
PMO No.27 和 PMO No.28	各3 μM
PMO NO. 9 (PMO No.25 与 PMO No.26 连接)	3 μM
PMO NO. 25	3 μM
PMO NO. 26	3 μM
PMO No.25 和 PMO No.26	各3 μM
PMO NO. 72 (PMO No.82 与 PMO No.83 连接)	3 μM
PMO NO. 82	3 μM
PMO NO. 83	3 μM
PMO No.82 和 PMO No.83	各3 μM

[0405]

[0406] 实验结果

[0407] 将结果示于图6、25。通过本实验可知,对于以外显子45内的不同部位作为目标的2个反义低聚物连接而成的PMO NO.11(序列号10)、PMO NO.9(序列号8)、或PMO NO.72(序列号79)的本发明低聚物而言,与构成其的各反义低聚物(PMO NO.27(序列号36)、PMO NO.28(序列号37)、PMO NO.25(序列号34)、PMO NO.26(序列号35)、PMO NO.82(序列号144)、或PMO NO.83(序列号145))或其混合物(PMO NO.27及PMO NO.28、PMO NO.25及PMO NO.26、或PMO NO.82及PMO NO.83)相比,可高效率地跳读外显子45。

[0408] [试验例3]

[0409] 体外测定

[0410] 使用序列号89～141、11及12中记载的2'-0-甲氧基-硫代磷酸酯体(2'-OMe-S-RNA)的反义低聚物进行了实验。测定所用的各种反义低聚物由Japan Bio Services公司购入。将各种反义低聚物的序列示于以下。

[0411] [表8-1]

碱基序列	序列名	序列号
H45_1-15_48-62	UCCCCAGUUGCACUCGCCAUCCUGGAGUUC	89
H45_1-15_56-70	UUUUUCUUCUCCCCAGGCCAUCCUGGAGUUC	90
H45_1-15_131-145	CCUCUCGCCACCGCAGCCAUCCUGGAGUUC	91
H45_2-13_131-145	CCUCUCGCCACCGCACAUCCUGGAGUUCU	92
H45_2-13_135-149	CAGACCUCCUGCCACCAUCCUGGAGUUCU	93
H45_2-13_48-62	UCCCCAGUUGCACUCCAUCCUGGAGUUCU	94
H45_2-13_52-66	UUUUCCCCAGUUGCACAUCCUGGAGUUCU	95
H45_2-13_56-70	UUUUUCUUCUCCCCAGCAUCCUGGAGUUCU	96
H45_2-13_18-32	GUUGCCGCUUGCCACAUCCUGGAGUUCU	97
H45_2-13_139-153	UUUGCAGACCUCCUGCAUCCUGGAGUUCU	98
H45_1-17_135-147	GACCUCCUGCCACAUCCUGGAGUUC	99
H45_1-17_52-64	CUUCCCCAGUUGCAUGCCAUCCUGGAGUUC	100
H45_1-15_139-153	UUUGCAGACCUCCUGGCCAUCCUGGAGUUC	101
H45_2-13_99-113	UUUUCCUGUAGAAUACAUCCUGGAGUUCU	102
H45_53-67_132-146	ACCUCCUGCCACCGCUUUCUUCUCCCCAGUUG	103
H45_16-30_99-113	UUUUCCUGUAGAAUAUUGCCGCUUCCCCAAU	104
H45_1-15_153-167	CUUGCUGACAGCUUGGCCAUCCUGGAGUUC	105
H45_1-15_67-81	GGAUUGCUGAAUUAUGCCAUCCUGGAGUUC	106
H45_1-15_99-113	UUUUCCUGUAGAAUAGCCAUCCUGGAGUUC	107
H45_1-13_46-58	CAGUUGCAUUCACACAUCCUGGAGUUC	108
H45_1-13_54-66	UUUUCCCCAGUUCAUCCUGGAGUUC	109
H45_1-13_62-74	UGAAUUUAUUCUCAUCCUGGAGUUC	110
H45_6-18_46-58	CAGUUGCAUUCAAAUGCCAUCCUGG	111
H45_6-18_54-66	UUUUCCCCAGUUAUGCCAUCCUGG	112
H45_6-18_62-74	UGAAUUUAUUCUAAUGCCAUCCUGG	113
H45_1-13_121-133	GCAGAUUCAGGCUCAUCCUGGAGUUC	114
H45_1-13_129-141	CUGCCACCGCAGACAUCCUGGAGUUC	115
H45_1-13_137-149	CAGACCUCCUGCCAUCCUGGAGUUC	116
H45_6-18_121-133	GCAGAUUCAGGCUAAUGCCAUCCUGG	117
H45_6-18_129-141	CUGCCACCGCAGAAUGCCAUCCUGG	118
H45_6-18_137-149	CAGACCUCCUGCCAUCCUGGAGUUC	142
H45_16-28_116-128	UUUAGGCUUCCCCAGGCCUUGCCAAU	119
H45_16-28_124-136	ACCGCAGAUUCAGGCCGCUUGCCAAU	120

[0412]

[0413] [表8-2]

[0414]	H45_16-28_132-144	CUCCUGCCACCGCGCCGUGCCCAU	121
	H45_26-38_116-128	UUUCAGGCUUCCCAACAACAGUUUGCC	122
	H45_26-38_124-136	ACCGCAGAUUCAGACAACAGUUUGCC	123
	H45_26-38_132-144	CUCCUGCCACCGCACAAACAGUUUGCC	124
	H45_51-63_110-122	CUUCCAAUULUUUCCCCAGUUGCA	125
	H45_51-63_117-129	AUUCAGGCUUCCCUUCCCCAGUUGCA	126
	H45_51-63_124-136	ACCGCAGAUUCAGUUCCCCAGUUGCA	127
	H45_60-72_110-122	CUUCCAAUULUUAAUUAUUCUUCC	128
	H45_60-72_117-129	AUUCAGGCUUCCCAAUUAUUCUUCC	129
	H45_60-72_124-136	ACCGCAGAUUCAGAAUUAUUCUUCC	130
	H45_68-80_110-122	CUUCCAAUULUUGAUUGCUGAUUA	131
	H45_68-80_117-129	AUUCAGGCUUCCGAUUGCUGAUUA	132
	H45_68-80_124-136	ACCGCAGAUUCAGGAUUGCUGAUUA	133
	H45_-10-5_52-66	UUUCUCCCCAGUUGCAGUUCGUGUAAGAU	134
	H45_-10-5_135-149	CAGACCUCCUGCCACAGUUCGUGUAAGAU	135
	H45_69-83_95-109	CCUGUAGAAUACUGGGAGGAUUGCUAAU	136
	H45_16-30_84-98	CUGGCAUCUGLUUUUUUGCCUGGCCAAU	137
	H45_16-30_53-67	UUUCUCCCCAGUUGUUGCCUGGCCAAU	138
	H45_1-15_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUGCCAUCUGGAGUUC	139
	H45_84-98_132-146	ACCUCCUGCCACCGGCCUGGCAUCUGUU	140
	H45_53-67_99-113	UUUUCCUGUAGAAUAUUCLUCCCCAGUUG	141
	H45_1-15_52-66	UUUCUCCCCAGUUGCGCCAUCUGGAGUUC	11
	H45_1-15_135-149	CAGACCUCCUGCCACGCCAACUGGAGUUC	12

[0415] 将 5×10^4 个RD细胞(人横纹肌肉瘤细胞株)接种于24孔板的每孔,在含有10%胎牛血清(FCS)(Invitrogen公司制造)的Eagle最小基本培养基(minimal essential medium)(EMEM)培养基(Sigma-Aldrich公司制造,以下相同)0.5mL中、37℃、5%CO₂条件下培养过夜。制成上述的外显子45跳读用的各种反义低聚物(Japan Bio Services公司制造)(1μM或300nM)与Lipofectamine 2000(Invitrogen公司制造)的复合体,对以0.45mL进行了培养基更换的RD细胞添加每孔50μL,使最终浓度为100nM或30nM。

[0416] 在添加后,培养过夜。用PBS(Nissui公司制造,以下相同)清洗1次细胞,然后向细胞添加350μL含有1%的2-巯基乙醇(Nacalai tesque公司制造)的缓冲液RLT(Qiagen公司制造),在室温下静置数分钟,使细胞溶解,回收于QIAshredder匀浆器(Qiagen公司制造)中。以15,000rpm离心2分钟,制作了匀浆。按照RNeasy Mini Kit(Qiagen公司制造)所附带的方案提取总RNA。使用NanoDrop ND-1000分光光度计(LMS公司制造)测定了提取出的总RNA的浓度。

[0417] 使用QIAGEN OneStep RT-PCR Kit(Qiagen公司制造)对提取出的总RNA400ng进行了One-Step RT-PCR。按照试剂盒所附带的方案制备了反应液。热循环仪使用PTC-100(MJ Research公司制造)或TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch(Takara Bio公司制造)。使用的RT-PCR程序如下所述。

- [0418] 50°C、30分钟:逆转录反应
- [0419] 95°C、15分钟:聚合酶活性化、逆转录酶灭活、cDNA热变性
- [0420] [94°C、30秒钟;60°C、30秒钟;72°C、1分钟] × 35循环:PCR扩增
- [0421] 72°C、10分钟:最终延长反应
- [0422] RT-PCR中使用的正向引物和反向引物的碱基序列如下所述。
- [0423] 正向引物:5' -GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (序列号1)
- [0424] 反向引物:5' -GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (序列号2)
- [0425] 使用Bioanalyzer (Agilent公司制造) 及MultiNA (株式会社岛津制作所制造) 对上述PCR的反应产物1μL进行了分析。
- [0426] 对跳读了外显子45的条带的多核苷酸量“A”和未跳读外显子45的条带的多核苷酸量“B”进行了测定。基于这些“A”及“B”的测定值按照下述式求出了跳读效率。
- [0427] 跳读效率 (%) = A / (A+B) × 100
- [0428] 实验结果
- [0429] 将结果示于图7、12~15。通过本实验可知,本发明的反义低聚物可有效地跳读外显子45。
- [0430] [试验例4]
- [0431] 体外测定
- [0432] 用与试验例1相同的方法进行了实验。其中,使用Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L通过Nucleofector II (Lonza) 对 3.5×10^5 个RD细胞(人横纹肌肉瘤细胞株)分别以3μM或10μM的浓度导入了单独的本发明低聚物 (PMO No.2、PMO No.31或PMO No.32)、各构成上述本发明低聚物的2个单元低聚物的任一种。程序使用T-030。导入的序列的组合如下所述。
- [0433] [表9]

序列组合	导入浓度
PMO No. 2 (PMO No.66 与 PMO No.67 连接)	3μM 或 10μM
PMO No. 66	3μM 或 10μM
PMO No. 67	3μM 或 10μM
PMO No. 31 (PMO No.63 与 PMO No.64 连接)	3μM 或 10μM
PMO No. 63	3μM 或 10μM
PMO No. 64	3μM 或 10μM
PMO No. 32 (PMO No.63 与 PMO No.65 连接)	3μM 或 10μM
PMO No. 65	3μM 或 10μM

- [0435] 实验结果
- [0436] 将结果示于图9。通过本实验可知,对于以外显子45内的不同部位作为目标的2个

反义低聚物连接而成的PMO No.2(序列号7)、PMO No.31(序列号11)、或PMO No.32(序列号12)的本发明低聚物而言,与构成其的各反义核酸(PMO No.66、PMO No.63、PMO No.64、或PMO No.65)相比,可高效率地跳读外显子45。

[0437] 工业实用性

[0438] 根据试验例所示的实验结果表明,连接短低聚物而得到的本发明低聚物在RD细胞中引起外显子45跳读。因此,本发明的低聚物在DMD的治疗中非常有用。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 日本新药株式会社
- [0003] 国立研究开发法人国立精神・神经医疗研究中心
- [0004] <120> 反义核酸
- [0005] <130> P248158
- [0006] <150> JP2015-182145
- [0007] <151> 2015-09-15
- [0008] <160> 146
- [0009] <170> PatentIn version 3.5
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 20
- [0012] <212> DNA
- [0013] <213> 人工的
- [0014] <220>
- [0015] <223> 合成核酸
- [0016] <400> 1
- [0017] gctcaggtcg gattgacatt 20
- [0018] <210> 2
- [0019] <211> 20
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 人工的
- [0022] <220>
- [0023] <223> 合成核酸
- [0024] <400> 2
- [0025] gggcaactct tccaccagta 20
- [0026] <210> 3
- [0027] <211> 20
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工的
- [0030] <220>
- [0031] <223> 合成核酸
- [0032] <400> 3
- [0033] tacaggaact ccaggatggc 20
- [0034] <210> 4
- [0035] <211> 23
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> 人工的
- [0038] <220>

- [0039] <223> 合成核酸
[0040] <400> 4
[0041] gaatgcaact ggggaagaaa taa 23
[0042] <210> 5
[0043] <211> 23
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 人工的
[0046] <220>
[0047] <223> 合成核酸
[0048] <400> 5
[0049] atctgcggtg gcaggaggc tgc 23
[0050] <210> 6
[0051] <211> 26
[0052] <212> DNA
[0053] <213> 人工的
[0054] <220>
[0055] <223> 合成核酸
[0056] <400> 6
[0057] cattggcag cggcaaactg ttgtca 26
[0058] <210> 7
[0059] <211> 26
[0060] <212> DNA
[0061] <213> 人工的
[0062] <220>
[0063] <223> 合成核酸
[0064] <400> 7
[0065] gtttgcgcgt gcctcctgga gttcct 26
[0066] <210> 8
[0067] <211> 24
[0068] <212> DNA
[0069] <213> 人工的
[0070] <220>
[0071] <223> 合成核酸
[0072] <400> 8
[0073] gtttgcgcgt gccctggagt tcct 24
[0074] <210> 9
[0075] <211> 30
[0076] <212> DNA
[0077] <213> 人工的

- [0078] <220>
- [0079] <223> 合成核酸
- [0080] <400> 9
- [0081] cagtttgcgg ctgcccattcc tggagttcct 30
- [0082] <210> 10
- [0083] <211> 26
- [0084] <212> DNA
- [0085] <213> 人工的
- [0086] <220>
- [0087] <223> 合成核酸
- [0088] <400> 10
- [0089] cagtttgcgg ctgccttgaa gttcct 26
- [0090] <210> 11
- [0091] <211> 30
- [0092] <212> DNA
- [0093] <213> 人工的
- [0094] <220>
- [0095] <223> 合成核酸
- [0096] <400> 11
- [0097] ttctccccca gttgcgcatt cctggagttc 30
- [0098] <210> 12
- [0099] <211> 30
- [0100] <212> DNA
- [0101] <213> 人工的
- [0102] <220>
- [0103] <223> 合成核酸
- [0104] <400> 12
- [0105] cagacccctt gccacgcatt cctggagttc 30
- [0106] <210> 13
- [0107] <211> 176
- [0108] <212> DNA
- [0109] <213> 人类
- [0110] <400> 13
- [0111] gaactccagg atggcattgg gcagcggcaa actgttgtca gaacattgaa tgcaactggg 60
- [0112] gaagaaataa ttcagcaate ctcaaaaaca gatgccagta ttctacagga aaaattggga 120
- [0113] agcctgaatc tgcggtggca ggaggtctgc aaacagctgt cagacagaaaa aaagag 176
- [0114] <210> 14
- [0115] <211> 26
- [0116] <212> DNA

- [0117] <213> 人工的
- [0118] <220>
- [0119] <223> 合成核酸
- [0120] <400> 14
- [0121] ttgccgctgc ccacatcctg gagttc 26
- [0122] <210> 15
- [0123] <211> 26
- [0124] <212> DNA
- [0125] <213> 人工的
- [0126] <220>
- [0127] <223> 合成核酸
- [0128] <400> 15
- [0129] gccgctgccc acatcctgga gttcct 26
- [0130] <210> 16
- [0131] <211> 26
- [0132] <212> DNA
- [0133] <213> 人工的
- [0134] <220>
- [0135] <223> 合成核酸
- [0136] <400> 16
- [0137] ccgctgccc atgtcctgga gttcct 26
- [0138] <210> 17
- [0139] <211> 26
- [0140] <212> DNA
- [0141] <213> 人工的
- [0142] <220>
- [0143] <223> 合成核酸
- [0144] <400> 17
- [0145] ttgccgctgc ccatcctgga gttcct 26
- [0146] <210> 18
- [0147] <211> 26
- [0148] <212> DNA
- [0149] <213> 人工的
- [0150] <220>
- [0151] <223> 合成核酸
- [0152] <400> 18
- [0153] ttgccgctg ccatcctgga gttcct 26
- [0154] <210> 19
- [0155] <211> 24

- [0156] <212> DNA
- [0157] <213> 人工的
- [0158] <220>
- [0159] <223> 合成核酸
- [0160] <400> 19
- [0161] ttgccgctg cctcctggag ttcc 24
- [0162] <210> 20
- [0163] <211> 26
- [0164] <212> DNA
- [0165] <213> 人工的
- [0166] <220>
- [0167] <223> 合成核酸
- [0168] <400> 20
- [0169] tgccgctgcc cgccatcctg gagttc 26
- [0170] <210> 21
- [0171] <211> 25
- [0172] <212> DNA
- [0173] <213> 人工的
- [0174] <220>
- [0175] <223> 合成核酸
- [0176] <400> 21
- [0177] gtttgcgcgt gccatcctgg agttc 25
- [0178] <210> 22
- [0179] <211> 24
- [0180] <212> DNA
- [0181] <213> 人工的
- [0182] <220>
- [0183] <223> 合成核酸
- [0184] <400> 22
- [0185] cagtttgcgcgt ctgctggagt tcct 24
- [0186] <210> 23
- [0187] <211> 24
- [0188] <212> DNA
- [0189] <213> 人工的
- [0190] <220>
- [0191] <223> 合成核酸
- [0192] <400> 23
- [0193] acagtttgcgcgt gctctggagt tcct 24
- [0194] <210> 24

- [0195] <211> 24
- [0196] <212> DNA
- [0197] <213> 人工的
- [0198] <220>
- [0199] <223> 合成核酸
- [0200] <400> 24
- [0201] cagttgccg ctgccggagt tcct 24
- [0202] <210> 25
- [0203] <211> 23
- [0204] <212> DNA
- [0205] <213> 人工的
- [0206] <220>
- [0207] <223> 合成核酸
- [0208] <400> 25
- [0209] gtttgcgcgt gccctggagt tcc 23
- [0210] <210> 26
- [0211] <211> 25
- [0212] <212> DNA
- [0213] <213> 人工的
- [0214] <220>
- [0215] <223> 合成核酸
- [0216] <400> 26
- [0217] cagttgccg ctgccggagt tcctg 25
- [0218] <210> 27
- [0219] <211> 25
- [0220] <212> DNA
- [0221] <213> 人工的
- [0222] <220>
- [0223] <223> 合成核酸
- [0224] <400> 27
- [0225] ccgcgtgccta atgtggagtt cctgt 25
- [0226] <210> 28
- [0227] <211> 24
- [0228] <212> DNA
- [0229] <213> 人工的
- [0230] <220>
- [0231] <223> 合成核酸
- [0232] <400> 28
- [0233] cagttgccg ctgccctgga gttc 24

- [0234] <210> 29
- [0235] <211> 23
- [0236] <212> DNA
- [0237] <213> 人工的
- [0238] <220>
- [0239] <223> 合成核酸
- [0240] <400> 29
- [0241] ccgctgccca atctggagtt cct 23
- [0242] <210> 30
- [0243] <211> 25
- [0244] <212> DNA
- [0245] <213> 人工的
- [0246] <220>
- [0247] <223> 合成核酸
- [0248] <400> 30
- [0249] cagttgccg ctgcctgga gttcc 25
- [0250] <210> 31
- [0251] <211> 24
- [0252] <212> DNA
- [0253] <213> 人工的
- [0254] <220>
- [0255] <223> 合成核酸
- [0256] <400> 31
- [0257] ttgccgctgc ccactggagt tcct 24
- [0258] <210> 32
- [0259] <211> 26
- [0260] <212> DNA
- [0261] <213> 人工的
- [0262] <220>
- [0263] <223> 合成核酸
- [0264] <400> 32
- [0265] ttgccgctgc ccactggagt tcctgt 26
- [0266] <210> 33
- [0267] <211> 22
- [0268] <212> DNA
- [0269] <213> 人工的
- [0270] <220>
- [0271] <223> 合成核酸
- [0272] <400> 33

- [0273] acagttgcc gcctggagtt cc 22
- [0274] <210> 34
- [0275] <211> 12
- [0276] <212> DNA
- [0277] <213> 人工的
- [0278] <220>
- [0279] <223> 合成核酸
- [0280] <400> 34
- [0281] gttgccgct gc 12
- [0282] <210> 35
- [0283] <211> 12
- [0284] <212> DNA
- [0285] <213> 人工的
- [0286] <220>
- [0287] <223> 合成核酸
- [0288] <400> 35
- [0289] cctggagttc ct 12
- [0290] <210> 36
- [0291] <211> 10
- [0292] <212> DNA
- [0293] <213> 人工的
- [0294] <220>
- [0295] <223> 合成核酸
- [0296] <400> 36
- [0297] tggagttcct 10
- [0298] <210> 37
- [0299] <211> 16
- [0300] <212> DNA
- [0301] <213> 人工的
- [0302] <220>
- [0303] <223> 合成核酸
- [0304] <400> 37
- [0305] cagttgccg ctgcc 16
- [0306] <210> 38
- [0307] <211> 26
- [0308] <212> DNA
- [0309] <213> 人工的
- [0310] <220>
- [0311] <223> 合成核酸

- [0312] <400> 38
- [0313] tcttccccag ttgccatcct ggagtt 26
- [0314] <210> 39
- [0315] <211> 26
- [0316] <212> DNA
- [0317] <213> 人工的
- [0318] <220>
- [0319] <223> 合成核酸
- [0320] <400> 39
- [0321] agacctcctg ccaccatcct ggagtt 26
- [0322] <210> 40
- [0323] <211> 26
- [0324] <212> DNA
- [0325] <213> 人工的
- [0326] <220>
- [0327] <223> 合成核酸
- [0328] <400> 40
- [0329] gacctcctgc caccatcctg gagttc 26
- [0330] <210> 41
- [0331] <211> 26
- [0332] <212> DNA
- [0333] <213> 人工的
- [0334] <220>
- [0335] <223> 合成核酸
- [0336] <400> 41
- [0337] tccccagttg cgccatcctg gagttc 26
- [0338] <210> 42
- [0339] <211> 26
- [0340] <212> DNA
- [0341] <213> 人工的
- [0342] <220>
- [0343] <223> 合成核酸
- [0344] <400> 42
- [0345] gacctcctgc cgccatcctg gagttc 26
- [0346] <210> 43
- [0347] <211> 26
- [0348] <212> DNA
- [0349] <213> 人工的
- [0350] <220>

- [0351] <223> 合成核酸
- [0352] <400> 43
- [0353] cttccccagt tgccatcctg gagttc 26
- [0354] <210> 44
- [0355] <211> 26
- [0356] <212> DNA
- [0357] <213> 人工的
- [0358] <220>
- [0359] <223> 合成核酸
- [0360] <400> 44
- [0361] ttccccagtt gcacatcctg gagttc 26
- [0362] <210> 45
- [0363] <211> 26
- [0364] <212> DNA
- [0365] <213> 人工的
- [0366] <220>
- [0367] <223> 合成核酸
- [0368] <400> 45
- [0369] cctcctgccca ccgcattcctg gagttc 26
- [0370] <210> 46
- [0371] <211> 26
- [0372] <212> DNA
- [0373] <213> 人工的
- [0374] <220>
- [0375] <223> 合成核酸
- [0376] <400> 46
- [0377] acctcctgcc acccatcctg gagttc 26
- [0378] <210> 47
- [0379] <211> 26
- [0380] <212> DNA
- [0381] <213> 人工的
- [0382] <220>
- [0383] <223> 合成核酸
- [0384] <400> 47
- [0385] ttctttcccc agtcatcctg gagttc 26
- [0386] <210> 48
- [0387] <211> 26
- [0388] <212> DNA
- [0389] <213> 人工的

- [0390] <220>
- [0391] <223> 合成核酸
- [0392] <400> 48
- [0393] gcagacacctcc tgccatcctg gagttc 26
- [0394] <210> 49
- [0395] <211> 28
- [0396] <212> DNA
- [0397] <213> 人工的
- [0398] <220>
- [0399] <223> 合成核酸
- [0400] <400> 49
- [0401] ttcttccccca gttgccatcc tggagttc 28
- [0402] <210> 50
- [0403] <211> 23
- [0404] <212> DNA
- [0405] <213> 人工的
- [0406] <220>
- [0407] <223> 合成核酸
- [0408] <400> 50
- [0409] ccccgagttgc atctggagtt cct 23
- [0410] <210> 51
- [0411] <211> 26
- [0412] <212> DNA
- [0413] <213> 人工的
- [0414] <220>
- [0415] <223> 合成核酸
- [0416] <400> 51
- [0417] ttcttccccca gttgccctgg agttcc 26
- [0418] <210> 52
- [0419] <211> 28
- [0420] <212> DNA
- [0421] <213> 人工的
- [0422] <220>
- [0423] <223> 合成核酸
- [0424] <400> 52
- [0425] cttccccagt tgccatcctg gagttcct 28
- [0426] <210> 53
- [0427] <211> 26
- [0428] <212> DNA

- [0429] <213> 人工的
- [0430] <220>
- [0431] <223> 合成核酸
- [0432] <400> 53
- [0433] cagacccctt gccactcctg gagttc 26
- [0434] <210> 54
- [0435] <211> 26
- [0436] <212> DNA
- [0437] <213> 人工的
- [0438] <220>
- [0439] <223> 合成核酸
- [0440] <400> 54
- [0441] tgcagacccctc ctgcctcctg gagttc 26
- [0442] <210> 55
- [0443] <211> 26
- [0444] <212> DNA
- [0445] <213> 人工的
- [0446] <220>
- [0447] <223> 合成核酸
- [0448] <400> 55
- [0449] ctgtttgcag accccatcctg gagttc 26
- [0450] <210> 56
- [0451] <211> 26
- [0452] <212> DNA
- [0453] <213> 人工的
- [0454] <220>
- [0455] <223> 合成核酸
- [0456] <400> 56
- [0457] ttgcagacc tcctggagtt cctgta 26
- [0458] <210> 57
- [0459] <211> 30
- [0460] <212> DNA
- [0461] <213> 人工的
- [0462] <220>
- [0463] <223> 合成核酸
- [0464] <400> 57
- [0465] cctgccaccg cagatgccat cctggagttc 30
- [0466] <210> 58
- [0467] <211> 30

- [0468] <212> DNA
[0469] <213> 人工的
[0470] <220>
[0471] <223> 合成核酸
[0472] <400> 58
[0473] acctcctgcc accgcttgcc gctgcccatt 30
[0474] <210> 59
[0475] <211> 26
[0476] <212> DNA
[0477] <213> 人工的
[0478] <220>
[0479] <223> 合成核酸
[0480] <400> 59
[0481] tcctgttagaa taccatcctg gagttc 26
[0482] <210> 60
[0483] <211> 26
[0484] <212> DNA
[0485] <213> 人工的
[0486] <220>
[0487] <223> 合成核酸
[0488] <400> 60
[0489] ctcctgccac cgctggcattc tggttt 26
[0490] <210> 61
[0491] <211> 30
[0492] <212> DNA
[0493] <213> 人工的
[0494] <220>
[0495] <223> 合成核酸
[0496] <400> 61
[0497] acctcctgcc accgctcttc cccagttgca 30
[0498] <210> 62
[0499] <211> 26
[0500] <212> DNA
[0501] <213> 人工的
[0502] <220>
[0503] <223> 合成核酸
[0504] <400> 62
[0505] tggcatctgt tttcatcctg gagttc 26
[0506] <210> 63

- [0507] <211> 26
- [0508] <212> DNA
- [0509] <213> 人工的
- [0510] <220>
- [0511] <223> 合成核酸
- [0512] <400> 63
- [0513] ttatttcttc cccagttcct gtaaga 26
- [0514] <210> 64
- [0515] <211> 26
- [0516] <212> DNA
- [0517] <213> 人工的
- [0518] <220>
- [0519] <223> 合成核酸
- [0520] <400> 64
- [0521] gcttcccaat gccatcctgg agttcc 26
- [0522] <210> 65
- [0523] <211> 26
- [0524] <212> DNA
- [0525] <213> 人工的
- [0526] <220>
- [0527] <223> 合成核酸
- [0528] <400> 65
- [0529] ggcttcccaa tgccatcctg gagttc 26
- [0530] <210> 66
- [0531] <211> 30
- [0532] <212> DNA
- [0533] <213> 人工的
- [0534] <220>
- [0535] <223> 合成核酸
- [0536] <400> 66
- [0537] tttctgtctg acagctcctg ccacccgaga 30
- [0538] <210> 67
- [0539] <211> 30
- [0540] <212> DNA
- [0541] <213> 人工的
- [0542] <220>
- [0543] <223> 合成核酸
- [0544] <400> 67
- [0545] tcctgccacc gcagagagga ttgctgaatt 30

- [0546] <210> 68
- [0547] <211> 30
- [0548] <212> DNA
- [0549] <213> 人工的
- [0550] <220>
- [0551] <223> 合成核酸
- [0552] <400> 68
- [0553] tcctgccacc gcagactggc atctgtttt 30
- [0554] <210> 69
- [0555] <211> 30
- [0556] <212> DNA
- [0557] <213> 人工的
- [0558] <220>
- [0559] <223> 合成核酸
- [0560] <400> 69
- [0561] tcctgccacc gcagatttc ctgtagaata 30
- [0562] <210> 70
- [0563] <211> 15
- [0564] <212> DNA
- [0565] <213> 人工的
- [0566] <220>
- [0567] <223> 合成核酸
- [0568] <400> 70
- [0569] gccatcctgg agttc 15
- [0570] <210> 71
- [0571] <211> 15
- [0572] <212> DNA
- [0573] <213> 人工的
- [0574] <220>
- [0575] <223> 合成核酸
- [0576] <400> 71
- [0577] ttctccccca gttgc 15
- [0578] <210> 72
- [0579] <211> 15
- [0580] <212> DNA
- [0581] <213> 人工的
- [0582] <220>
- [0583] <223> 合成核酸
- [0584] <400> 72

- [0585] cagacccctt gccac 15
[0586] <210> 73
[0587] <211> 13
[0588] <212> DNA
[0589] <213> 人工的
[0590] <220>
[0591] <223> 合成核酸
[0592] <400> 73
[0593] tcctggagtt cct 13
[0594] <210> 74
[0595] <211> 13
[0596] <212> DNA
[0597] <213> 人工的
[0598] <220>
[0599] <223> 合成核酸
[0600] <400> 74
[0601] gtttgcgcgtt gcc 13
[0602] <210> 75
[0603] <211> 26
[0604] <212> DNA
[0605] <213> 人工的
[0606] <220>
[0607] <223> 合成核酸
[0608] <400> 75
[0609] ctcctgccac cgcgccgctg cccaat 26
[0610] <210> 76
[0611] <211> 26
[0612] <212> DNA
[0613] <213> 人工的
[0614] <220>
[0615] <223> 合成核酸
[0616] <400> 76
[0617] attcaggctt cccttccca gttgca 26
[0618] <210> 77
[0619] <211> 9
[0620] <212> DNA
[0621] <213> 人工的
[0622] <220>
[0623] <223> 合成核酸

- [0624] <400> 77
- [0625] tggagttcc 9
- [0626] <210> 78
- [0627] <211> 8
- [0628] <212> DNA
- [0629] <213> 人工的
- [0630] <220>
- [0631] <223> 合成核酸
- [0632] <400> 78
- [0633] tggagttc 8
- [0634] <210> 79
- [0635] <211> 21
- [0636] <212> DNA
- [0637] <213> 人工的
- [0638] <220>
- [0639] <223> 合成核酸
- [0640] <400> 79
- [0641] cagtttgccg cctggagttc c 21
- [0642] <210> 80
- [0643] <211> 22
- [0644] <212> DNA
- [0645] <213> 人工的
- [0646] <220>
- [0647] <223> 合成核酸
- [0648] <400> 80
- [0649] acagtttgcc gctggagttc ct 22
- [0650] <210> 81
- [0651] <211> 22
- [0652] <212> DNA
- [0653] <213> 人工的
- [0654] <220>
- [0655] <223> 合成核酸
- [0656] <400> 81
- [0657] gtttgcgcgt gcctggagtt cc 22
- [0658] <210> 82
- [0659] <211> 22
- [0660] <212> DNA
- [0661] <213> 人工的
- [0662] <220>

- [0663] <223> 合成核酸
- [0664] <400> 82
- [0665] aacagttgc ccctggagtt cc 22
- [0666] <210> 83
- [0667] <211> 20
- [0668] <212> DNA
- [0669] <213> 人工的
- [0670] <220>
- [0671] <223> 合成核酸
- [0672] <400> 83
- [0673] cagttgccg cctggagttc 20
- [0674] <210> 84
- [0675] <211> 22
- [0676] <212> DNA
- [0677] <213> 人工的
- [0678] <220>
- [0679] <223> 合成核酸
- [0680] <400> 84
- [0681] cagttgccg ctcctggagt tc 22
- [0682] <210> 85
- [0683] <211> 21
- [0684] <212> DNA
- [0685] <213> 人工的
- [0686] <220>
- [0687] <223> 合成核酸
- [0688] <400> 85
- [0689] agttgccgc tcctggagtt c 21
- [0690] <210> 86
- [0691] <211> 21
- [0692] <212> DNA
- [0693] <213> 人工的
- [0694] <220>
- [0695] <223> 合成核酸
- [0696] <400> 86
- [0697] acagttgcc gctggagttc c 21
- [0698] <210> 87
- [0699] <211> 24
- [0700] <212> DNA
- [0701] <213> 人工的

- [0702] <220>
- [0703] <223> 合成核酸
- [0704] <400> 87
- [0705] tgccgctgcc catcctggag ttcc 24
- [0706] <210> 88
- [0707] <211> 26
- [0708] <212> DNA
- [0709] <213> 人工的
- [0710] <220>
- [0711] <223> 合成核酸
- [0712] <400> 88
- [0713] ctgccaccgc agccgctgcc caatgc 26
- [0714] <210> 89
- [0715] <211> 30
- [0716] <212> DNA
- [0717] <213> 人工的
- [0718] <220>
- [0719] <223> 合成核酸
- [0720] <400> 89
- [0721] uccccaguug cauucgccau ccuggaguuc 30
- [0722] <210> 90
- [0723] <211> 30
- [0724] <212> DNA
- [0725] <213> 人工的
- [0726] <220>
- [0727] <223> 合成核酸
- [0728] <400> 90
- [0729] uuauuuucuuc cccaggccau ccuggaguuc 30
- [0730] <210> 91
- [0731] <211> 30
- [0732] <212> DNA
- [0733] <213> 人工的
- [0734] <220>
- [0735] <223> 合成核酸
- [0736] <400> 91
- [0737] ccuccugcca ccgcagccau ccuggaguuc 30
- [0738] <210> 92
- [0739] <211> 30
- [0740] <212> DNA

- [0741] <213> 人工的
[0742] <220>
[0743] <223> 合成核酸
[0744] <400> 92
[0745] ccuccugcca ccgcacaucc uggagiuuccu 30
[0746] <210> 93
[0747] <211> 30
[0748] <212> DNA
[0749] <213> 人工的
[0750] <220>
[0751] <223> 合成核酸
[0752] <400> 93
[0753] cagaccuccu gccaccaucc uggagiuuccu 30
[0754] <210> 94
[0755] <211> 30
[0756] <212> DNA
[0757] <213> 人工的
[0758] <220>
[0759] <223> 合成核酸
[0760] <400> 94
[0761] uccccaguug cauuccaucc uggagiuuccu 30
[0762] <210> 95
[0763] <211> 30
[0764] <212> DNA
[0765] <213> 人工的
[0766] <220>
[0767] <223> 合成核酸
[0768] <400> 95
[0769] uucuuuccca guugccaucc uggagiuuccu 30
[0770] <210> 96
[0771] <211> 30
[0772] <212> DNA
[0773] <213> 人工的
[0774] <220>
[0775] <223> 合成核酸
[0776] <400> 96
[0777] uuauuuucuuc cccagcaucc uggagiuuccu 30
[0778] <210> 97
[0779] <211> 30

- [0780] <212> DNA
[0781] <213> 人工的
[0782] <220>
[0783] <223> 合成核酸
[0784] <400> 97
[0785] guuugccgcu gcccacaucc uggaguuucc 30
[0786] <210> 98
[0787] <211> 30
[0788] <212> DNA
[0789] <213> 人工的
[0790] <220>
[0791] <223> 合成核酸
[0792] <400> 98
[0793] uuugcagacc uccugcaucc uggaguuucc 30
[0794] <210> 99
[0795] <211> 30
[0796] <212> DNA
[0797] <213> 人工的
[0798] <220>
[0799] <223> 合成核酸
[0800] <400> 99
[0801] gaccuccugc cacaugccau ccuggaguuc 30
[0802] <210> 100
[0803] <211> 30
[0804] <212> DNA
[0805] <213> 人工的
[0806] <220>
[0807] <223> 合成核酸
[0808] <400> 100
[0809] cuuccccagu ugcaugccau ccuggaguuc 30
[0810] <210> 101
[0811] <211> 30
[0812] <212> DNA
[0813] <213> 人工的
[0814] <220>
[0815] <223> 合成核酸
[0816] <400> 101
[0817] uuugcagacc uccuggccau ccuggaguuc 30
[0818] <210> 102

- [0819] <211> 30
[0820] <212> DNA
[0821] <213> 人工的
[0822] <220>
[0823] <223> 合成核酸
[0824] <400> 102
[0825] uuuccugua gaauacaucc uggaguuccu 30
[0826] <210> 103
[0827] <211> 30
[0828] <212> DNA
[0829] <213> 人工的
[0830] <220>
[0831] <223> 合成核酸
[0832] <400> 103
[0833] accuccugcc accgcuuuuc uccccaguug 30
[0834] <210> 104
[0835] <211> 30
[0836] <212> DNA
[0837] <213> 人工的
[0838] <220>
[0839] <223> 合成核酸
[0840] <400> 104
[0841] uuuccugua gaauauugcc gcugcccaau 30
[0842] <210> 105
[0843] <211> 30
[0844] <212> DNA
[0845] <213> 人工的
[0846] <220>
[0847] <223> 合成核酸
[0848] <400> 105
[0849] cugucugaca gcugugccau ccuggaguuc 30
[0850] <210> 106
[0851] <211> 30
[0852] <212> DNA
[0853] <213> 人工的
[0854] <220>
[0855] <223> 合成核酸
[0856] <400> 106
[0857] ggauugcuga auuaugccau ccuggaguuc 30

- [0858] <210> 107
[0859] <211> 30
[0860] <212> DNA
[0861] <213> 人工的
[0862] <220>
[0863] <223> 合成核酸
[0864] <400> 107
[0865] uuuccugua gaauagccau ccuggaguuc 30
[0866] <210> 108
[0867] <211> 26
[0868] <212> DNA
[0869] <213> 人工的
[0870] <220>
[0871] <223> 合成核酸
[0872] <400> 108
[0873] caguugcauu caacaucug gaguuc 26
[0874] <210> 109
[0875] <211> 26
[0876] <212> DNA
[0877] <213> 人工的
[0878] <220>
[0879] <223> 合成核酸
[0880] <400> 109
[0881] uucuuccccca guucaucug gaguuc 26
[0882] <210> 110
[0883] <211> 26
[0884] <212> DNA
[0885] <213> 人工的
[0886] <220>
[0887] <223> 合成核酸
[0888] <400> 110
[0889] ugaauuauuu cuucaucug gaguuc 26
[0890] <210> 111
[0891] <211> 26
[0892] <212> DNA
[0893] <213> 人工的
[0894] <220>
[0895] <223> 合成核酸
[0896] <400> 111

- [0897] caguugcauu caaaaugcca uccugg 26
[0898] <210> 112
[0899] <211> 26
[0900] <212> DNA
[0901] <213> 人工的
[0902] <220>
[0903] <223> 合成核酸
[0904] <400> 112
[0905] uucuuccccca guuaaugcca uccugg 26
[0906] <210> 113
[0907] <211> 26
[0908] <212> DNA
[0909] <213> 人工的
[0910] <220>
[0911] <223> 合成核酸
[0912] <400> 113
[0913] ugaauuuauuu cuuaaugcca uccugg 26
[0914] <210> 114
[0915] <211> 26
[0916] <212> DNA
[0917] <213> 人工的
[0918] <220>
[0919] <223> 合成核酸
[0920] <400> 114
[0921] gcagauucag gcucauccug gaguuc 26
[0922] <210> 115
[0923] <211> 26
[0924] <212> DNA
[0925] <213> 人工的
[0926] <220>
[0927] <223> 合成核酸
[0928] <400> 115
[0929] cugccaccgc agacaauccug gaguuc 26
[0930] <210> 116
[0931] <211> 26
[0932] <212> DNA
[0933] <213> 人工的
[0934] <220>
[0935] <223> 合成核酸

- [0936] <400> 116
- [0937] cagaccuccu gcccauccug gaguuc 26
- [0938] <210> 117
- [0939] <211> 26
- [0940] <212> DNA
- [0941] <213> 人工的
- [0942] <220>
- [0943] <223> 合成核酸
- [0944] <400> 117
- [0945] gcagauucag gcuaaugcca uccugg 26
- [0946] <210> 118
- [0947] <211> 26
- [0948] <212> DNA
- [0949] <213> 人工的
- [0950] <220>
- [0951] <223> 合成核酸
- [0952] <400> 118
- [0953] cugccaccgc agaaaugcca uccugg 26
- [0954] <210> 119
- [0955] <211> 26
- [0956] <212> DNA
- [0957] <213> 人工的
- [0958] <220>
- [0959] <223> 合成核酸
- [0960] <400> 119
- [0961] uucaggcuuc ccagccgcug cccaaau 26
- [0962] <210> 120
- [0963] <211> 26
- [0964] <212> DNA
- [0965] <213> 人工的
- [0966] <220>
- [0967] <223> 合成核酸
- [0968] <400> 120
- [0969] accgcagauu caggccgcug cccaaau 26
- [0970] <210> 121
- [0971] <211> 26
- [0972] <212> DNA
- [0973] <213> 人工的
- [0974] <220>

- [0975] <223> 合成核酸
- [0976] <400> 121
- [0977] cuccugccac cgcgccgcug cccaaau 26
- [0978] <210> 122
- [0979] <211> 26
- [0980] <212> DNA
- [0981] <213> 人工的
- [0982] <220>
- [0983] <223> 合成核酸
- [0984] <400> 122
- [0985] uucaggcuuc ccaacaacag uuugcc 26
- [0986] <210> 123
- [0987] <211> 26
- [0988] <212> DNA
- [0989] <213> 人工的
- [0990] <220>
- [0991] <223> 合成核酸
- [0992] <400> 123
- [0993] accgcagauu cagacaacag uuugcc 26
- [0994] <210> 124
- [0995] <211> 26
- [0996] <212> DNA
- [0997] <213> 人工的
- [0998] <220>
- [0999] <223> 合成核酸
- [1000] <400> 124
- [1001] cuccugccac cgcacaacag uuugcc 26
- [1002] <210> 125
- [1003] <211> 26
- [1004] <212> DNA
- [1005] <213> 人工的
- [1006] <220>
- [1007] <223> 合成核酸
- [1008] <400> 125
- [1009] cuucccaauu uuuuuuccca guugca 26
- [1010] <210> 126
- [1011] <211> 26
- [1012] <212> DNA
- [1013] <213> 人工的

- [1014] <220>
- [1015] <223> 合成核酸
- [1016] <400> 126
- [1017] auucaggcuu cccuuuccca guugca 26
- [1018] <210> 127
- [1019] <211> 26
- [1020] <212> DNA
- [1021] <213> 人工的
- [1022] <220>
- [1023] <223> 合成核酸
- [1024] <400> 127
- [1025] accgcagauu caguucccca guugca 26
- [1026] <210> 128
- [1027] <211> 26
- [1028] <212> DNA
- [1029] <213> 人工的
- [1030] <220>
- [1031] <223> 合成核酸
- [1032] <400> 128
- [1033] cuucccaauu uuuuauuuauu ucuuucc 26
- [1034] <210> 129
- [1035] <211> 26
- [1036] <212> DNA
- [1037] <213> 人工的
- [1038] <220>
- [1039] <223> 合成核酸
- [1040] <400> 129
- [1041] auucaggcuu cccaaauuauu ucuuucc 26
- [1042] <210> 130
- [1043] <211> 26
- [1044] <212> DNA
- [1045] <213> 人工的
- [1046] <220>
- [1047] <223> 合成核酸
- [1048] <400> 130
- [1049] accgcagauu cagaauuuauu ucuuucc 26
- [1050] <210> 131
- [1051] <211> 26
- [1052] <212> DNA

- [1053] <213> 人工的
[1054] <220>
[1055] <223> 合成核酸
[1056] <400> 131
[1057] cuucccaaauu uuugauugcu gaauua 26
[1058] <210> 132
[1059] <211> 26
[1060] <212> DNA
[1061] <213> 人工的
[1062] <220>
[1063] <223> 合成核酸
[1064] <400> 132
[1065] auucaggccuu cccgauugcu gaauua 26
[1066] <210> 133
[1067] <211> 26
[1068] <212> DNA
[1069] <213> 人工的
[1070] <220>
[1071] <223> 合成核酸
[1072] <400> 133
[1073] accgcagauu caggauugcu gaauua 26
[1074] <210> 134
[1075] <211> 30
[1076] <212> DNA
[1077] <213> 人工的
[1078] <220>
[1079] <223> 合成核酸
[1080] <400> 134
[1081] uucuuuccca guugcaguuc cuguaagaua 30
[1082] <210> 135
[1083] <211> 30
[1084] <212> DNA
[1085] <213> 人工的
[1086] <220>
[1087] <223> 合成核酸
[1088] <400> 135
[1089] cagaccuccu gccacaguuc cuguaagaua 30
[1090] <210> 136
[1091] <211> 30

- [1092] <212> DNA
- [1093] <213> 人工的
- [1094] <220>
- [1095] <223> 合成核酸
- [1096] <400> 136
- [1097] ccuguagaau acugggagga uugcugaauu 30
- [1098] <210> 137
- [1099] <211> 30
- [1100] <212> DNA
- [1101] <213> 人工的
- [1102] <220>
- [1103] <223> 合成核酸
- [1104] <400> 137
- [1105] cuggcaucug uuuuuuugcc gcugcccaaau 30
- [1106] <210> 138
- [1107] <211> 30
- [1108] <212> DNA
- [1109] <213> 人工的
- [1110] <220>
- [1111] <223> 合成核酸
- [1112] <400> 138
- [1113] uuucuucccc aguuguugcc gcugcccaaau 30
- [1114] <210> 139
- [1115] <211> 30
- [1116] <212> DNA
- [1117] <213> 人工的
- [1118] <220>
- [1119] <223> 合成核酸
- [1120] <400> 139
- [1121] cuggcaucug uuuuugccau ccuggagauuc 30
- [1122] <210> 140
- [1123] <211> 30
- [1124] <212> DNA
- [1125] <213> 人工的
- [1126] <220>
- [1127] <223> 合成核酸
- [1128] <400> 140
- [1129] accuccugcc accgcccuggc aucuguuuuu 30
- [1130] <210> 141

- [1131] <211> 30
- [1132] <212> DNA
- [1133] <213> 人工的
- [1134] <220>
- [1135] <223> 合成核酸
- [1136] <400> 141
- [1137] uuuuuccugua gaauauuuucu ucccccaguug 30
- [1138] <210> 142
- [1139] <211> 26
- [1140] <212> DNA
- [1141] <213> 人工的
- [1142] <220>
- [1143] <223> 合成核酸
- [1144] <400> 142
- [1145] cagaccuccu gccaaugcca uccugg 26
- [1146] <210> 143
- [1147] <211> 16
- [1148] <212> DNA
- [1149] <213> 人工的
- [1150] <220>
- [1151] <223> 合成核酸
- [1152] <400> 143
- [1153] aaaaattggg aagcct 16
- [1154] <210> 144
- [1155] <211> 11
- [1156] <212> DNA
- [1157] <213> 人工序列
- [1158] <220>
- [1159] <223> 合成核酸
- [1160] <400> 144
- [1161] cctggagttc c 11
- [1162] <210> 145
- [1163] <211> 10
- [1164] <212> DNA
- [1165] <213> 人工序列
- [1166] <220>
- [1167] <223> 合成核酸
- [1168] <400> 145
- [1169] cagtttgccg 10

- [1170] <210> 146
- [1171] <211> 11
- [1172] <212> DNA
- [1173] <213> 人工序列
- [1174] <220>
- [1175] <223> 合成核酸
- [1176] <400> 146
- [1177] acagtttgcc g 11

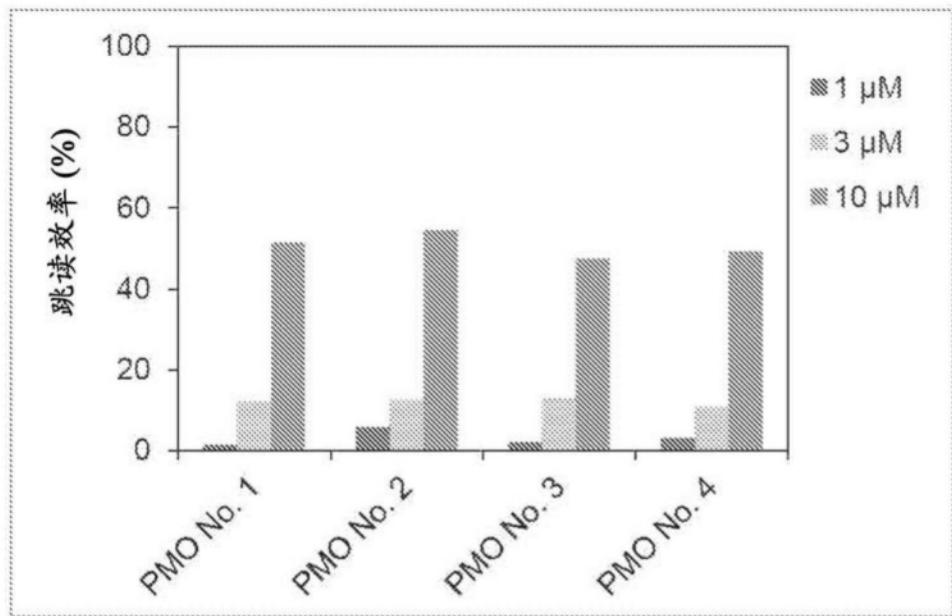


图1

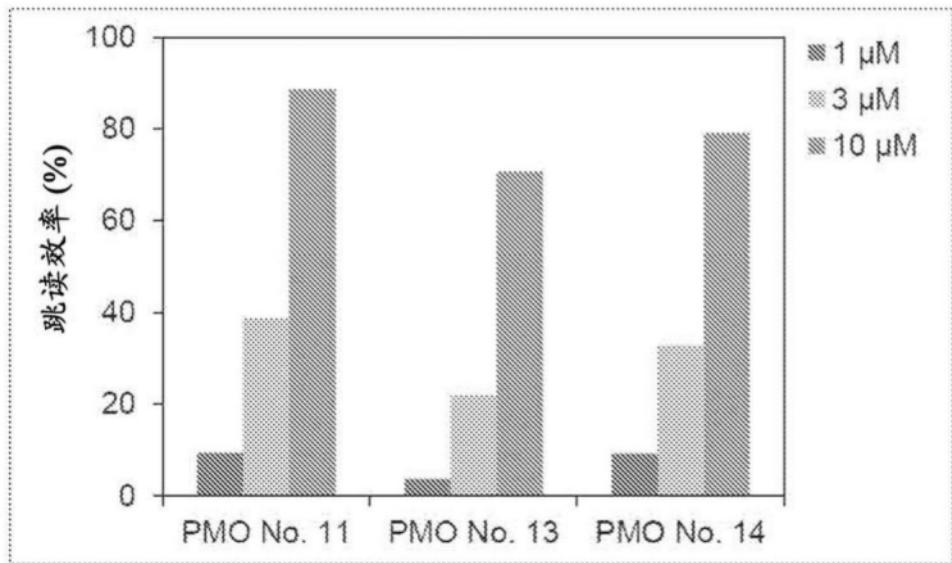


图2

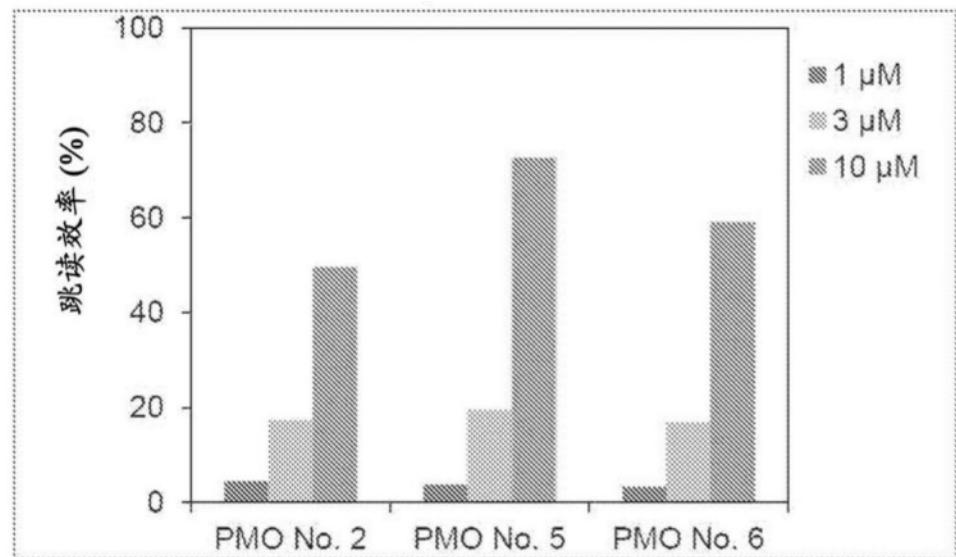


图3

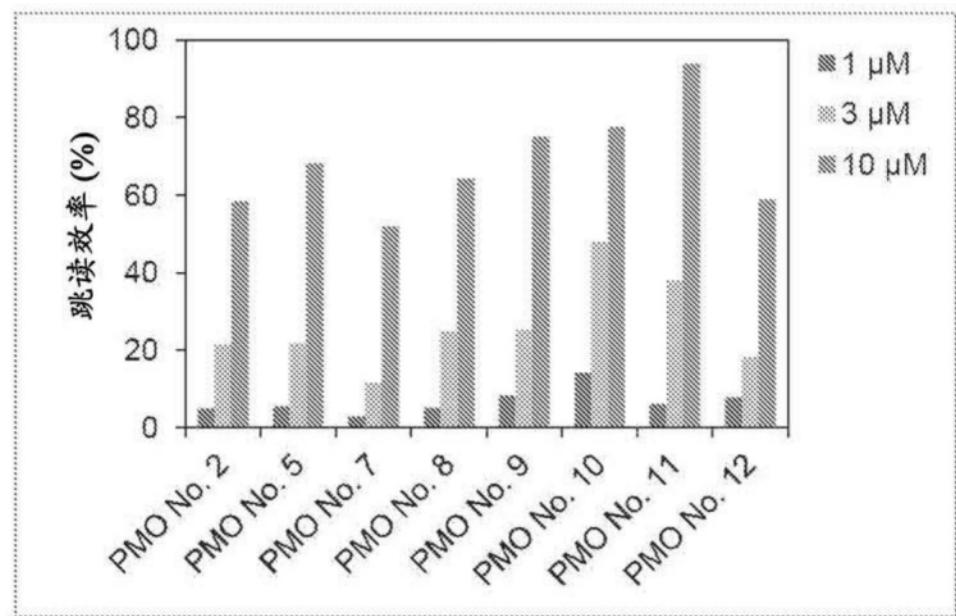


图4

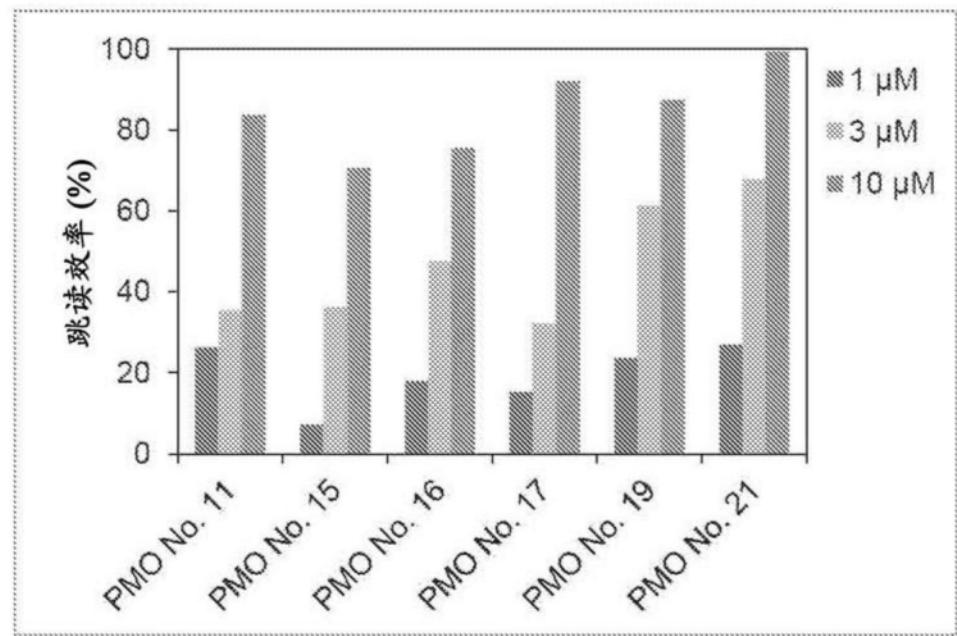


图5

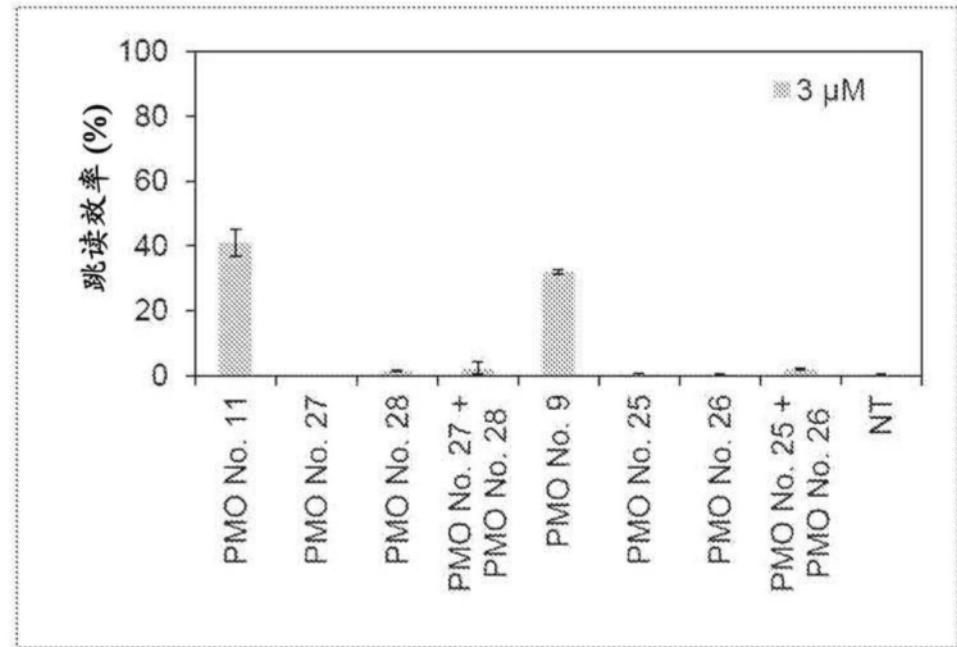


图6

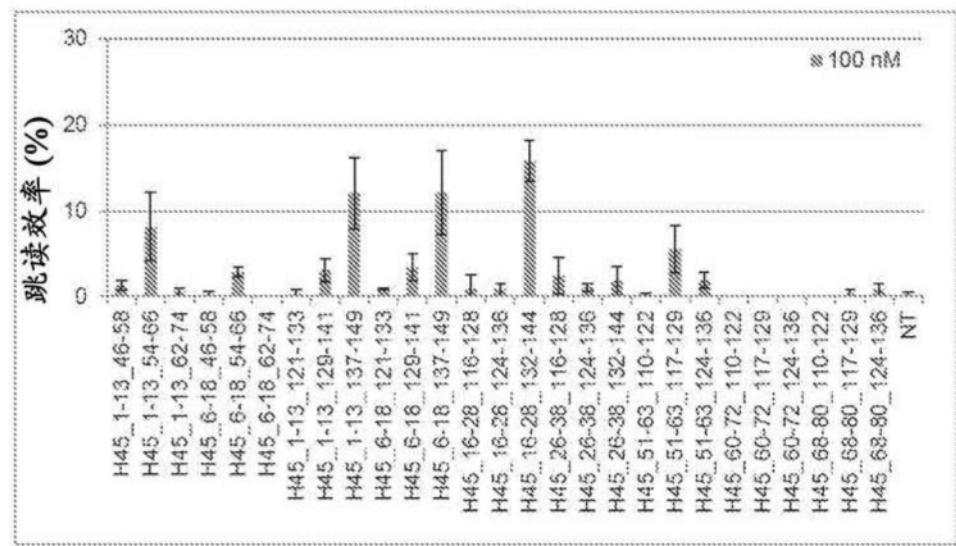


图7

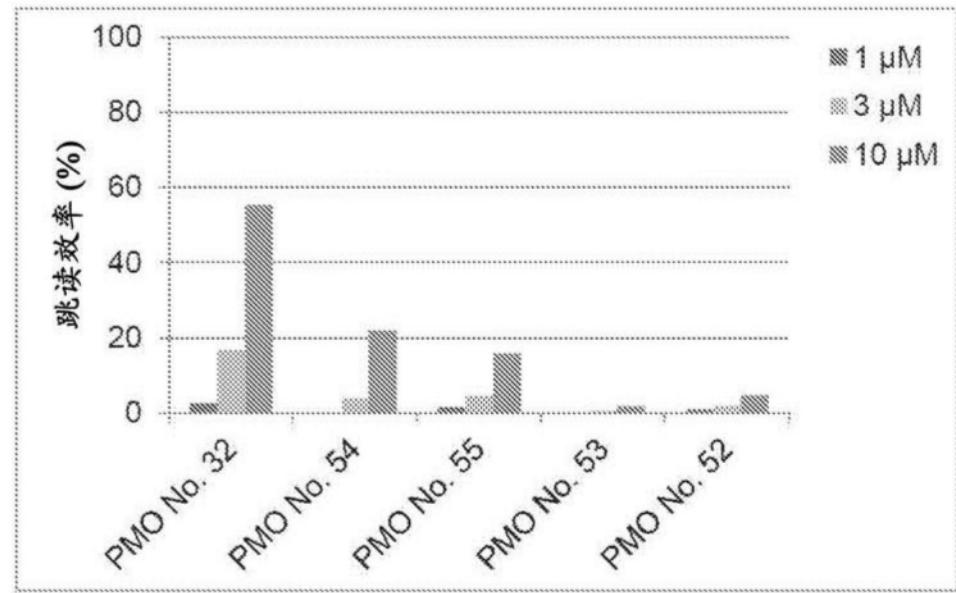


图8

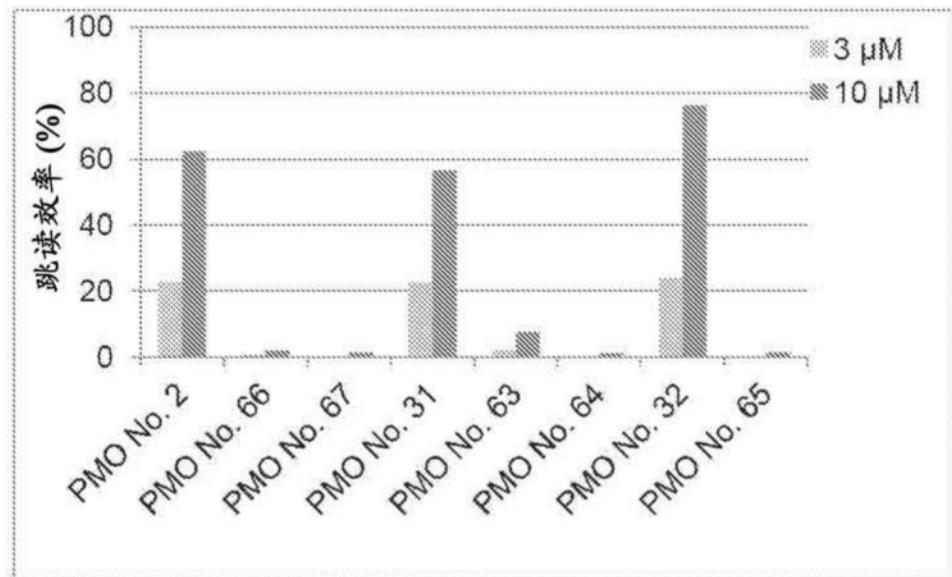


图9

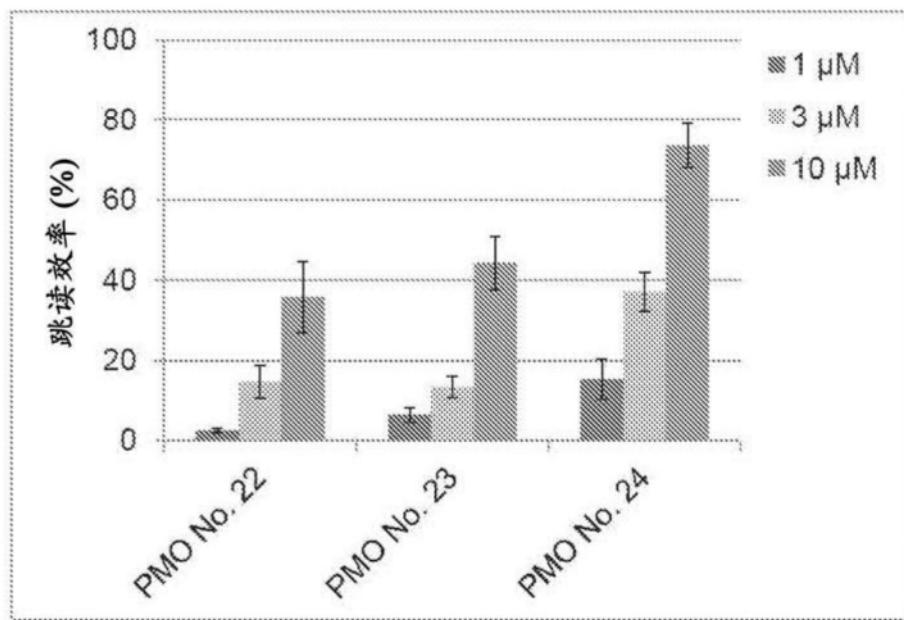


图10

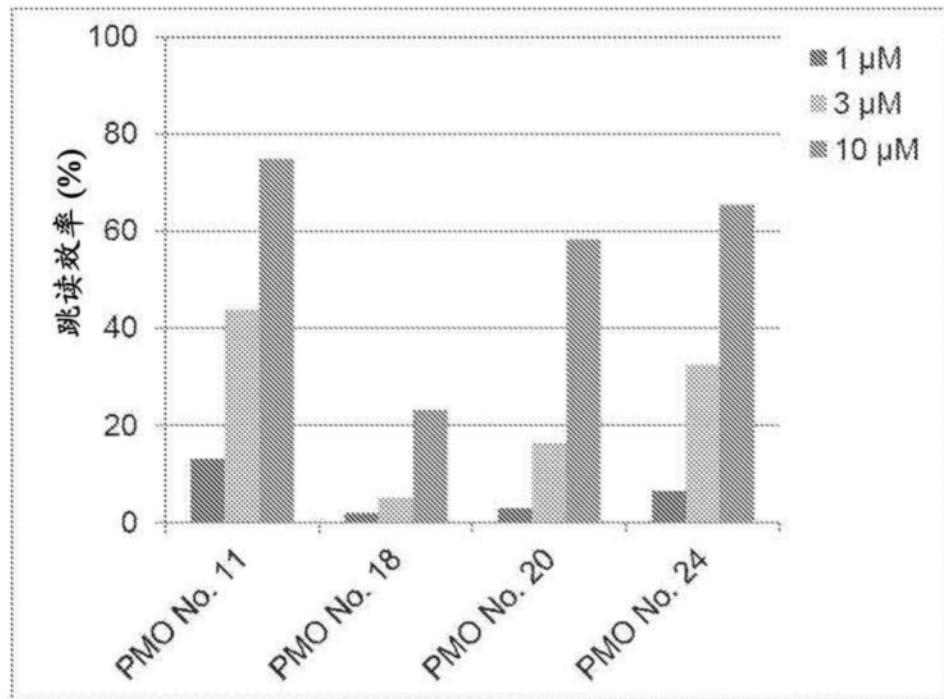


图11

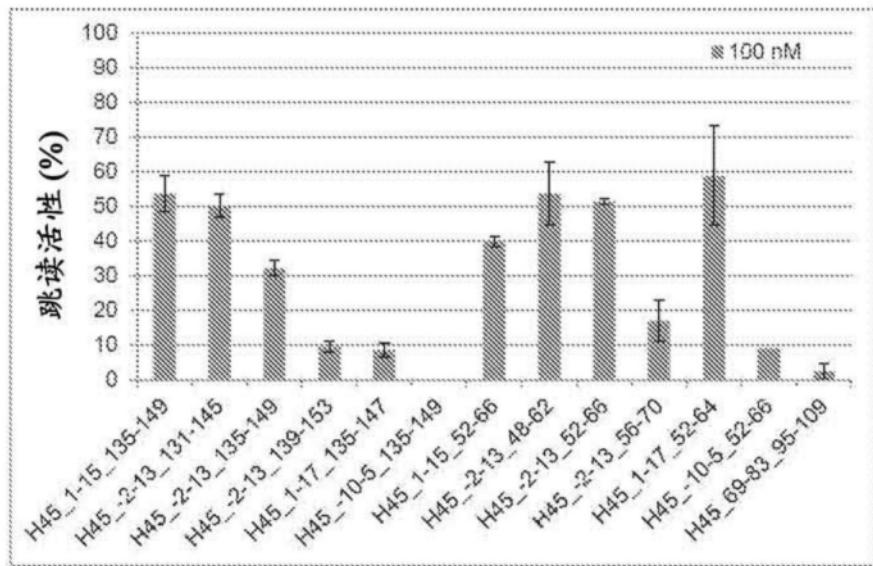


图12

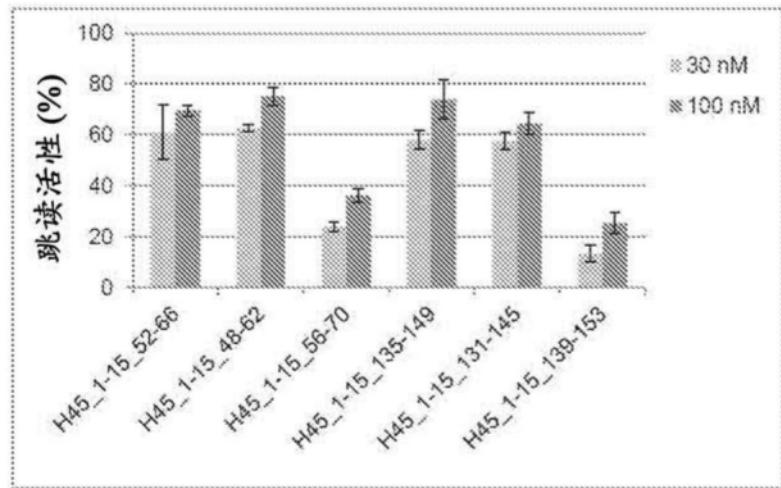


图13

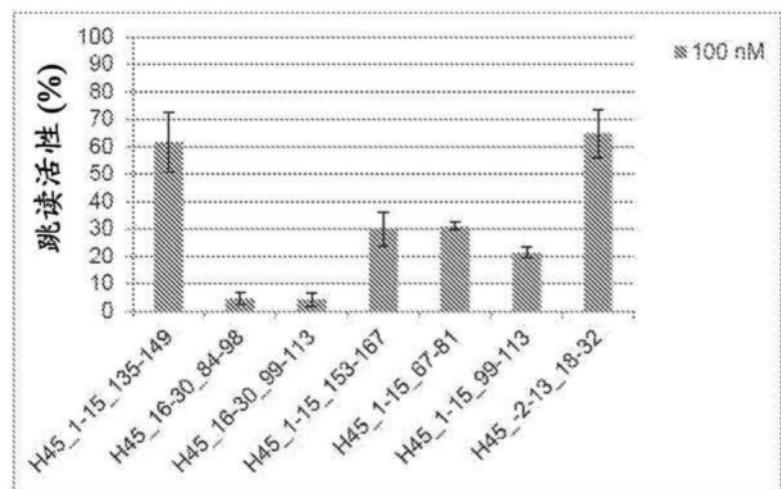


图14

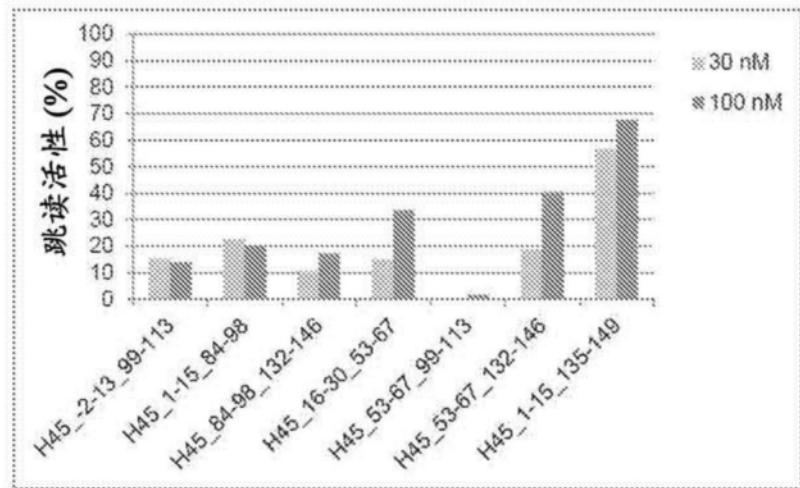


图15

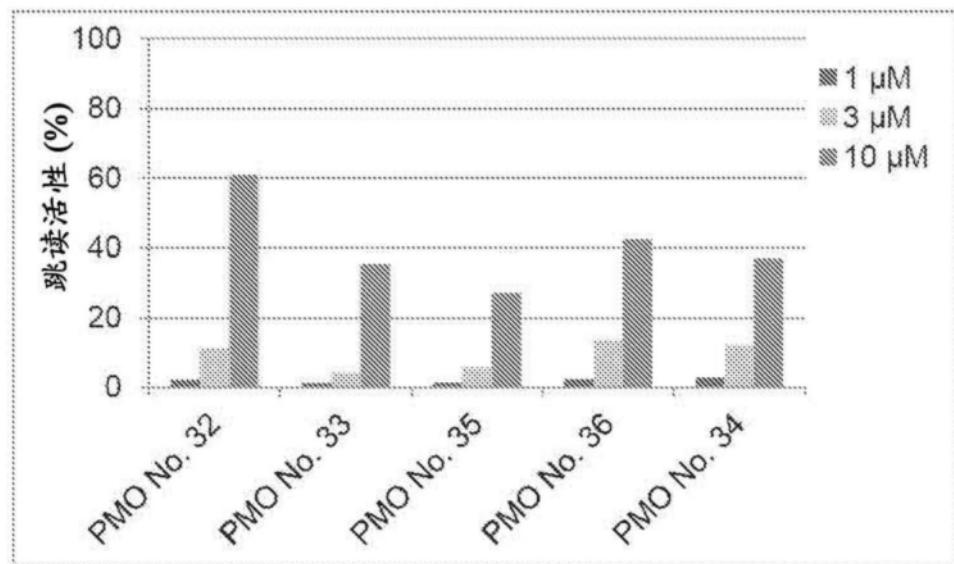


图16

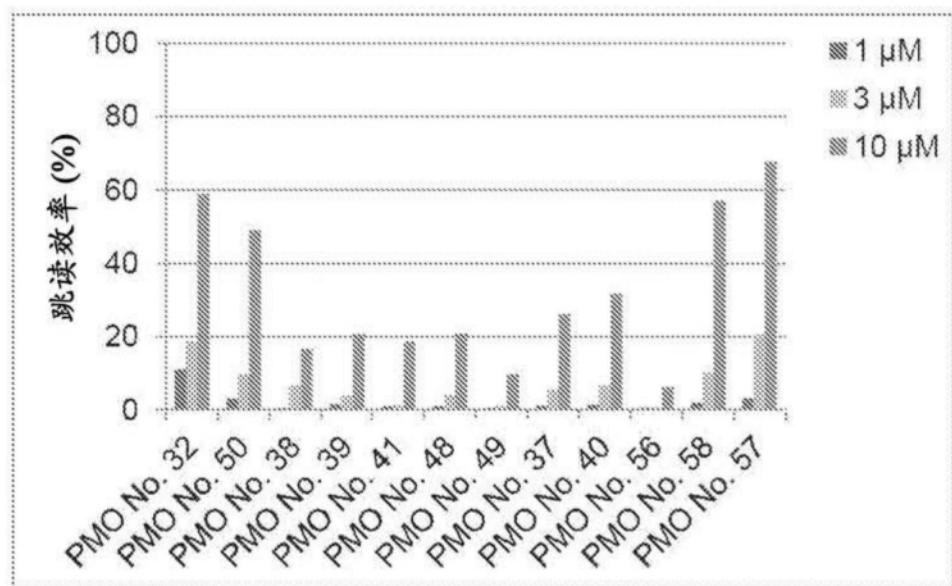


图17

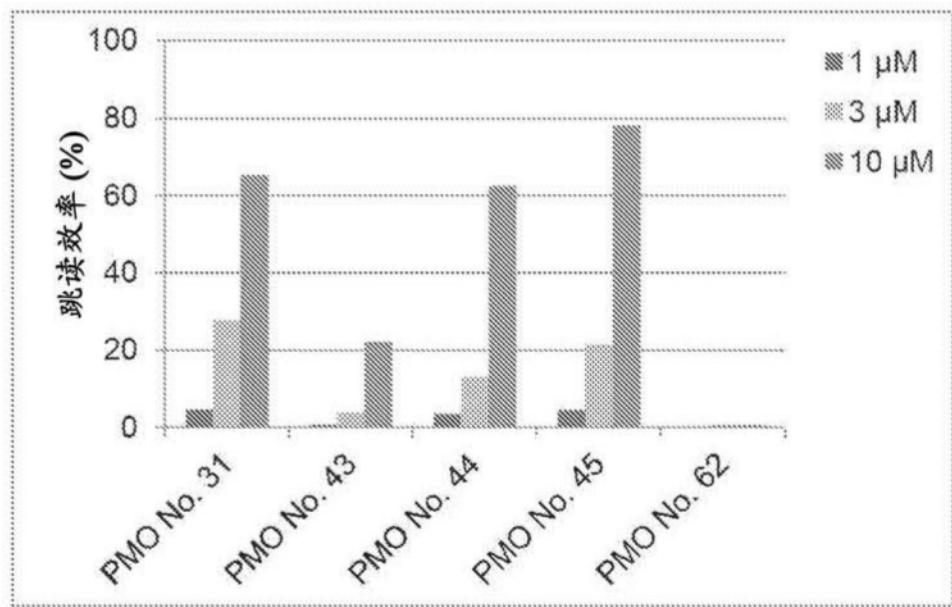


图18

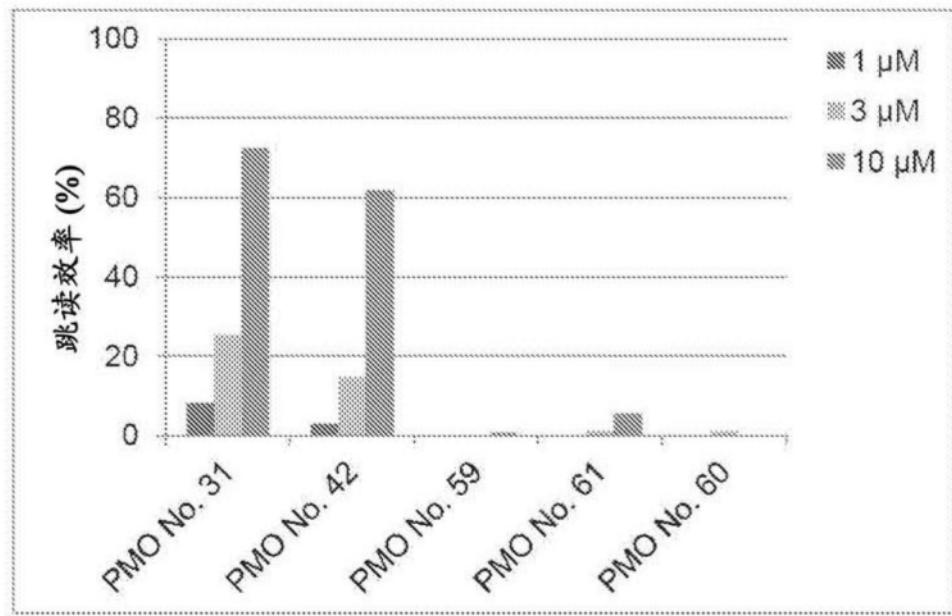


图19

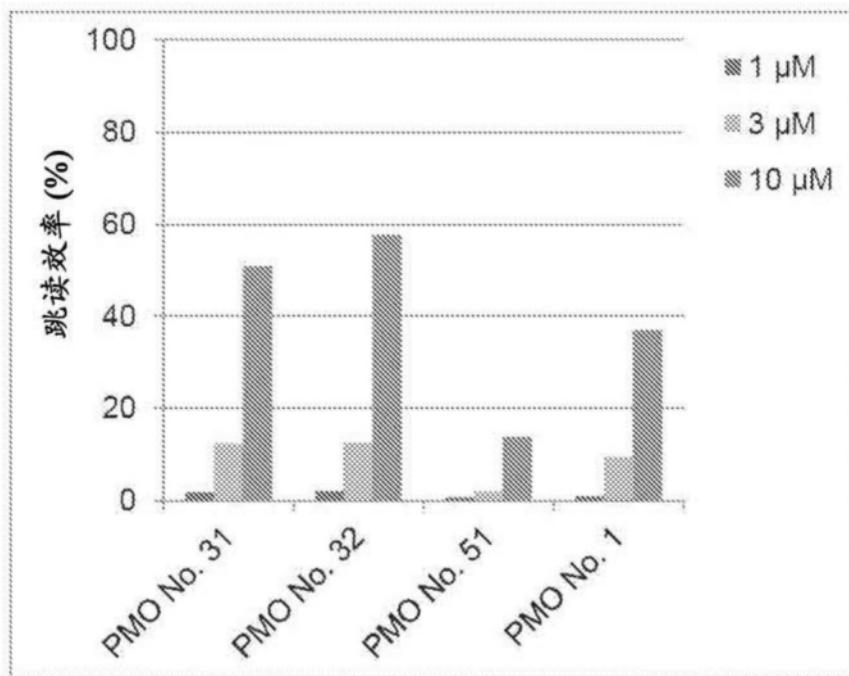


图20

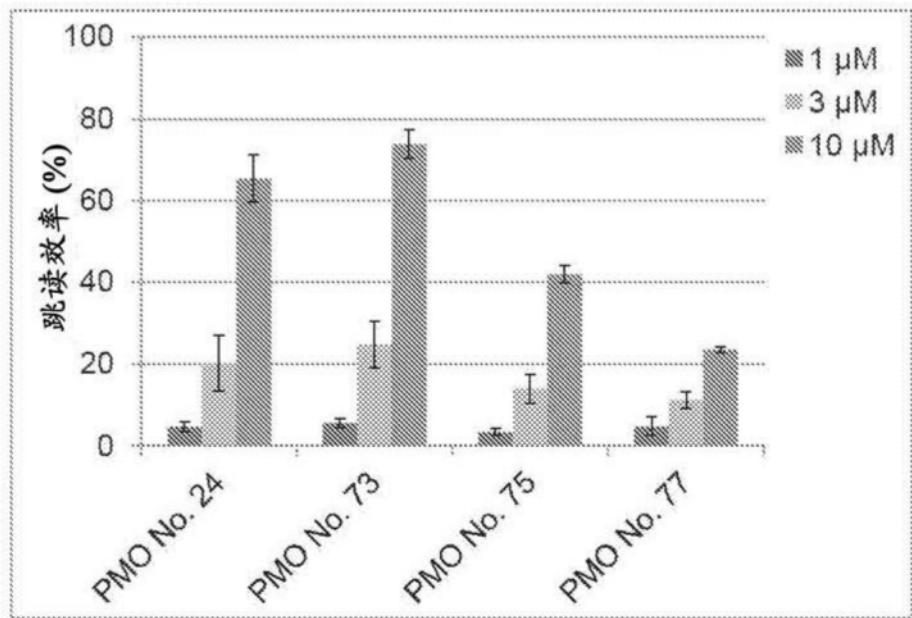


图21

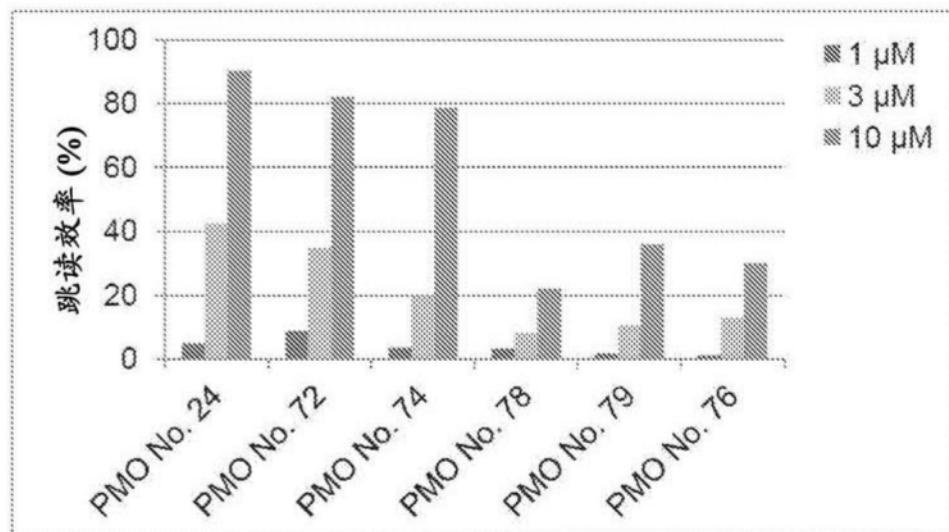


图22

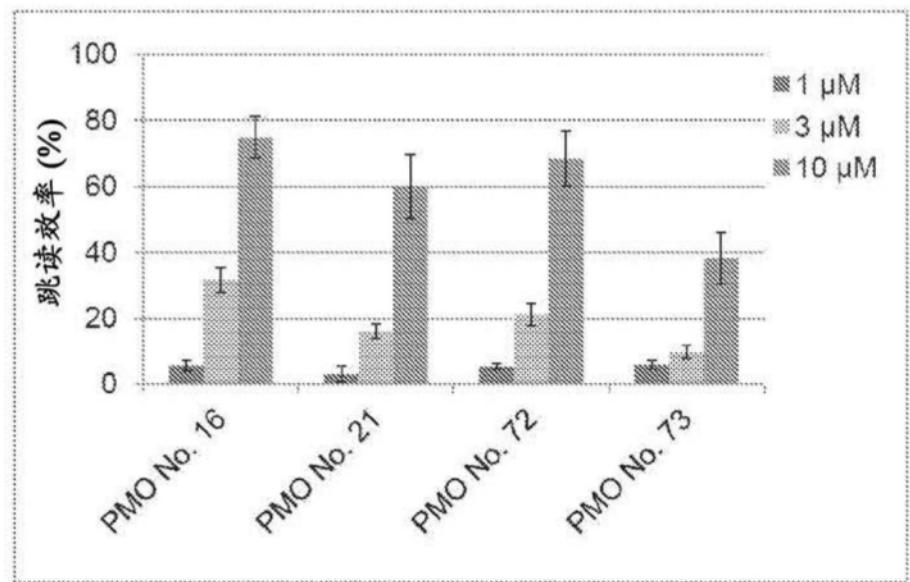


图23

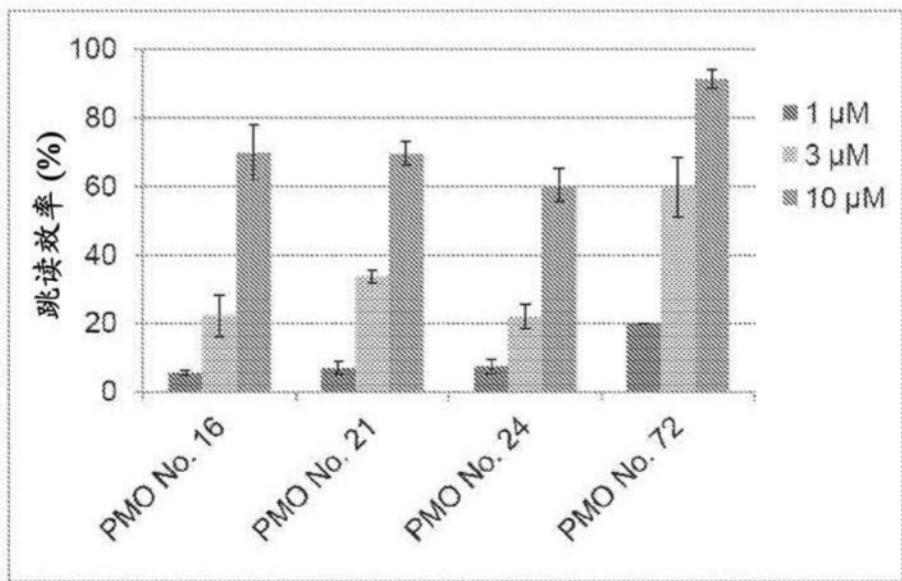


图24

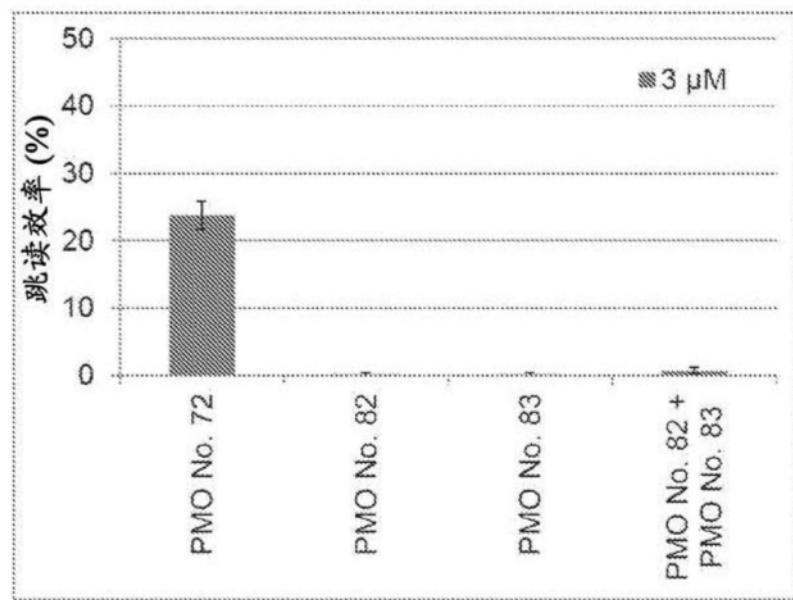


图25