

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-530560

(P2018-530560A)

(43) 公表日 平成30年10月18日(2018.10.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 254 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-517603 (P2018-517603)	(71) 出願人	501237039
(86) (22) 出願日	平成28年10月7日 (2016.10.7)		サレプタ セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年5月23日 (2018.5.23)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ファースト
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/056093		ストリート 215
(87) 国際公開番号	W02017/062835	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成29年4月13日 (2017.4.13)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	62/239,812	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成27年10月9日 (2015.10.9)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ディクソン, ジョージ
			イギリス国 エヌダブリュー7 4エヌアール ロンドン, トレタウン ガーデンズ 12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の処置のための組成物および方法

(57) 【要約】

本開示は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の処置のための組成物および方法に関する。デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の処置のための修飾アンチセンスオリゴマーが開示される。本開示は、少なくとも一部において、ミオスタチン治療剤と組み合わせたジストロフィン治療剤による m d x マウス（デュシェンヌ型筋ジストロフィーのマウスモデル）の全身処置により、とりわけ、マウスにおける握力（筋力）が増加したという驚くべき発見に基づく。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジストロフィンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を有する被験体を処置する方法であって、

前記被験体に、17~40サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、前記アンチセンスオリゴマーが、前記エクソンのスキッピングを誘導し、

10

前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害のうちの少なくとも1つを処置する、方法。

【請求項 2】

前記エクソンが、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記エクソンがエクソン23を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記エクソンがエクソン45を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

前記エクソンがエクソン51を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

前記エクソンがエクソン53を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 7】

前記エクソンが、エクソン8、エクソン44、エクソン50、エクソン52またはエクソン55を含む、請求項2に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記アンチセンスオリゴマーが、20~30サブユニットを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記アンチセンスオリゴマーが、配列番号76~配列番号3485から選択される配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記アンチセンスオリゴマーが、エテプリルセン(etepirsen)である、請求項9に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも15の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも17の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記ターゲティング配列が、前記標的領域と100%相補的である、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記ミオスタチン治療剤が、タンパク質または核酸のうちの1つまたは複数から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記タンパク質が、抗ミオスタチン抗体である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記タンパク質が、可溶性受容体である、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

可溶性受容体が、ACVR2である、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前記核酸が、アンチセンスオリゴマーまたはsiRNAのうちの少なくとも1つである、請求項14に記載の方法。

10

【請求項19】

前記アンチセンスオリゴマーが、12~40サブユニットを含み、ミオスタチンプレmRNAの標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含み、

前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオチド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記アンチセンスオリゴマーが、20~30サブユニットを含む、請求項19に記載の方法。

20

【請求項21】

前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも15の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも17の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

前記ターゲティング配列が、前記標的領域と100%相補的である、請求項19に記載の方法。

30

【請求項24】

前記標的領域が、配列番号1を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項25】

前記エクソンが、エクソン2を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項26】

前記標的領域が、(i)少なくとも1つのヌクレオチドが、イントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2に伴うスプライス接合部にわたるヌクレオチド配列、または、(ii)ヌクレオチドが、イントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2に伴うスプライス接合部にわたらないヌクレオチド配列から選択される請求項19に記載の方法。

40

【請求項27】

前記スプライス接合部が、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位を含む配列から選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記スプライスアクセプター部位が、配列番号2の内部に存在し、前記スプライスドナー部位が配列番号3の内部に存在する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記(i)のヌクレオチドが、配列番号16~43から選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項30】

50

前記 (i i) のヌクレオチドが、配列番号 44 ~ 70 から選択される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

前記被験体が、7歳またはこれを超える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法であって、被験体に、12 ~ 40 サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、

前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、

前記被験体が、前記被験体の筋細胞内で機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害のうちの少なくとも1つを処置する、方法。

【請求項 33】

前記被験体が、ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記アンチセンスオリゴマーが、20 ~ 30 サブユニットを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記ターゲティング配列が、標的領域内の少なくとも15の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

前記ターゲティング配列が、標的領域内の少なくとも17の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 37】

前記アンチセンスオリゴマーが、標的領域と100%相補的である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

前記標的領域が、配列番号 1 を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 39】

前記エクソンが、エクソン 2 を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 40】

前記標的領域が、(i) 少なくとも1つのヌクレオチドがイントロン 1 / エクソン 2 およびエクソン 2 / イントロン 2 に伴うスプライス接合部にわたるヌクレオチド配列、または、(i i) ヌクレオチドがイントロン 1 / エクソン 2 およびエクソン 2 / イントロン 2 に伴うスプライス接合部にわたらないヌクレオチド配列から選択される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 41】

前記スプライス接合部が、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位を含む配列から選択される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記スプライスアクセプター部位が、配列番号 2 の内部に存在し、前記スプライスドナー部位が、配列番号 3 の内部に存在する、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記 (i) のヌクレオチドが、配列番号 16 ~ 43 から選択される、請求項 41 に記載の方法。

10

20

30

40

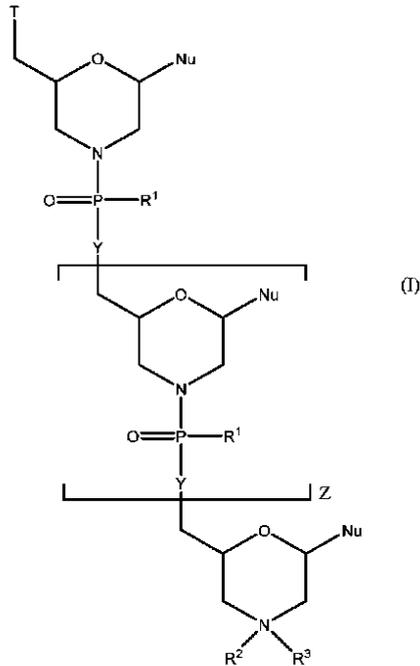
50

- 【請求項 4 4】
前記 (i i) のヌクレオチドが、配列番号 4 4 ~ 7 0 から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。
- 【請求項 4 5】
前記ジストロフィン治療剤が、タンパク質または核酸のうちの 1 つまたは複数から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。
- 【請求項 4 6】
前記核酸が、アンチセンスオリゴマーである、請求項 4 5 に記載の方法。
- 【請求項 4 7】
前記アンチセンスオリゴマーが、2 0 ~ 5 0 サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の 1 0 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含み、
前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットを含む、請求項 4 6 に記載の方法。 10
- 【請求項 4 8】
前記エクソンが、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 1 9、エクソン 2 3、エクソン 4 4、エクソン 4 5、エクソン 5 0、エクソン 5 1、エクソン 5 2、エクソン 5 3 またはエクソン 5 5 から選択される、請求項 4 7 に記載の方法。
- 【請求項 4 9】
前記エクソンが、エクソン 2 3 を含む、請求項 4 8 に記載の方法。 20
- 【請求項 5 0】
前記エクソンが、エクソン 4 5 を含む、請求項 4 8 に記載の方法。
- 【請求項 5 1】
前記エクソンが、エクソン 5 1 を含む、請求項 4 8 に記載の方法。
- 【請求項 5 2】
前記エクソンが、エクソン 5 3 を含む、請求項 4 8 に記載の方法。
- 【請求項 5 3】
前記エクソンが、エクソン 8、エクソン 4 4、エクソン 5 0、エクソン 5 2 またはエクソン 5 5 を含む、請求項 4 8 に記載の方法。 30
- 【請求項 5 4】
前記アンチセンスオリゴマーが、2 0 ~ 3 0 サブユニットを含む、請求項 4 7 に記載の方法。
- 【請求項 5 5】
前記アンチセンスオリゴマーが、配列番号 7 6 ~ 配列番号 3 4 8 5 から選択される配列を含む、請求項 4 7 に記載の方法。
- 【請求項 5 6】
前記アンチセンスオリゴマーが、エテプリルセンである、請求項 5 5 に記載の方法。
- 【請求項 5 7】
前記ターゲティング配列が、標的領域内の少なくとも 1 5 の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項 4 6 に記載の方法。 40
- 【請求項 5 8】
前記ターゲティング配列が、標的領域内の少なくとも 1 7 の連続ヌクレオチドと相補的である、請求項 4 6 に記載の方法。
- 【請求項 5 9】
前記ターゲティング配列が、標的領域と 1 0 0 % 相補的である、請求項 4 6 に記載の方法。
- 【請求項 6 0】
ジストロフィンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有す 50

る被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法であつて、

被験体に、式 (I) :

【化 1 0 3】



10

20

を含む化合物または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および -NR₄ から独立に選択され、式中、各 R₄ は、H、C₁ ~ C₆ アルキル、アラルキル、C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)_nNR₅C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NR₅C(=NH)NH₂ および G から独立に選択され、式中、R₅ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから選択され、n は、

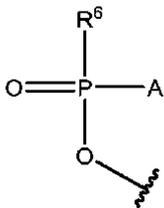
30

40

1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

【化 1 0 4】



40

の部分か選択され、式中、

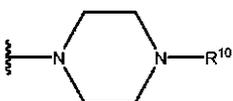
A は、-OH、-N(R⁷)₂R⁸ から選択され、式中、

各 R⁷ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから独立に選択され、

R⁸ は、電子対および H から選択され、そして

R⁶ は、OH、-N(R⁹)CH₂C(O)NH₂ および式：

【化 1 0 5】



50

の部分から選択され、式中、

R^9 は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

R^{10} は、G、 $C(O) - R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4メトキシトリチル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1から5の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3から10の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

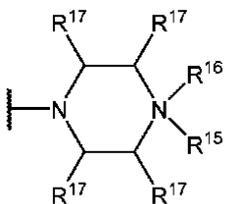
R^{12} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{13} の各例は、

$-N(R^{13})_2R^{14}$ [式中、各 R^{13} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、そして R^{14} は、電子対およびHから選択される]；

式 (II)：

【化106】



(II)

の部分 [式中、

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

R^{18} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

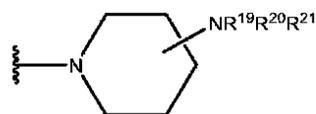
q は、1から5の整数であり、

R^{16} は、電子対およびHから選択され；

各 R^{17} は、Hおよびメチルから独立に選択される]；および

式 (III)：

【化107】



(III)

の部分 [式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ および G から選択され、式中、

R^{22} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

r は、1から5の整数であり、

R^{20} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{21} は、電子対およびHから選択される]

から独立に選択され；

R^{22} は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、-

10

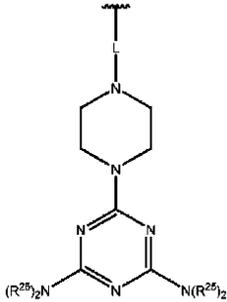
20

30

40

50

$C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{23}$ 、 $-C(O)(CH_2)_sNR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ および式：
【化108】



10

の部分から選択され、式中、

R^{23} は、式 $-(O-アルキル)_v-OH$ を有し、式中、 v は、3 から 10 の整数であり、 v 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{24} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

s は、1 から 5 の整数であり；

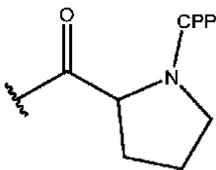
L は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ および $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ から選択され；

各 R^{25} は、式 $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$ を有し、式中、各 R^{26} は、式 $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ を有し；

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、 G は、 $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択される細胞透過性ペプチド（「CPP」）およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化109】



30

を有し、式中、 CPP は、 G の最大で 1 つの例が存在するという条件で、 CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合しており、

ここで、前記ターゲティング配列は、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の 12 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、

ここで、前記被験体は、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害のうちの少なくとも 1 つを処置する、方法。

40

【請求項 61】

各 Nu が、独立に、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジンまたは 10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル)である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記標的領域が、(i) 少なくとも 1 つのヌクレオチドが前記エクソンに伴うスプライス接合部にわたるヌクレオチド配列；または (ii) ヌクレオチドが前記エクソン接合部

50

に伴うスプライス接合部にわたらないヌクレオチド配列から選択される、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 63】

前記ターゲティング配列が、配列番号 76 ~ 3485 から選択される配列を含むか、配列番号 76 ~ 3485 から選択されるターゲティング配列の少なくとも 10 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 76 ~ 3485 から選択されるターゲティング配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する変異体である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 64】

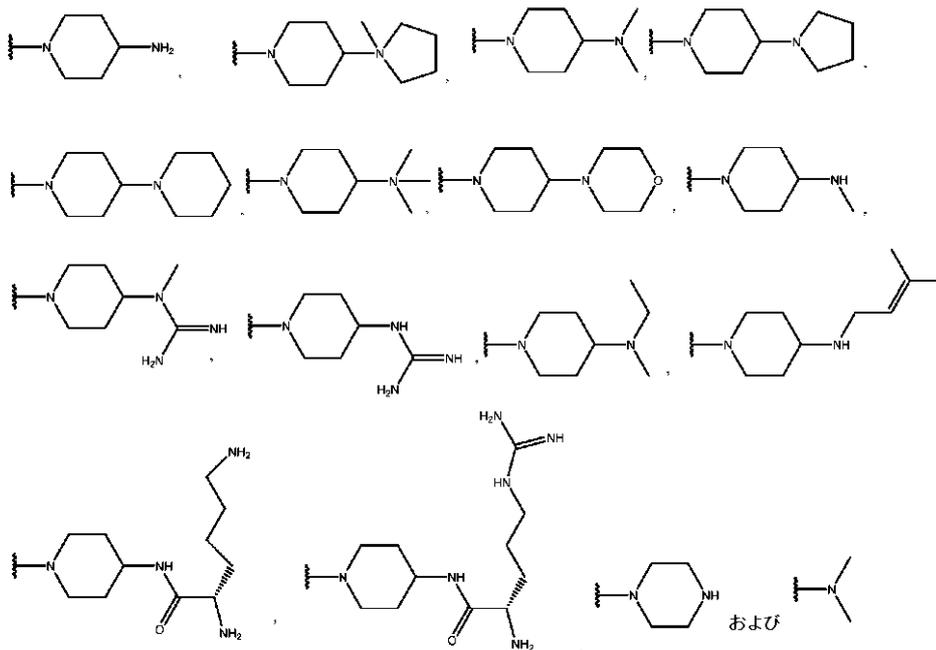
i) Y が、O であり、 R^2 が、H もしくは G から選択され、 R^3 が、電子対もしくは H から選択されるか；

ii) R^2 が、G であり、式中、前記 CPP が配列番号 3486 ~ 3501 から選択される配列を有するか；

iii) 各 R^1 が、 $-N(CH_3)_2$ であるか；

iv) 少なくとも 1 つの R^1 が、

【化 110】



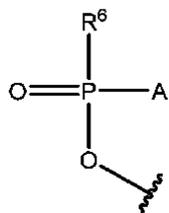
から選択されるか；または

v) R^1 基の 50 ~ 90 % が、 $-N(CH_3)_2$ である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 65】

T が、式：

【化 111】



を有し、式中、A は、 $-N(CH_3)_2$ であり、 R^6 は、式：

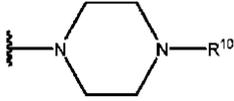
10

20

30

40

【化 1 1 2】

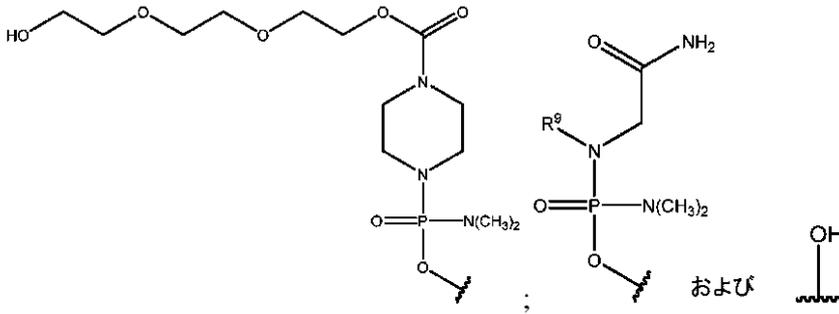


を有し、式中、 R^{10} は、 $-C(O)R^{11}OH$ である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 66】

各 Y が、O であり、T が、

【化 1 1 3】



10

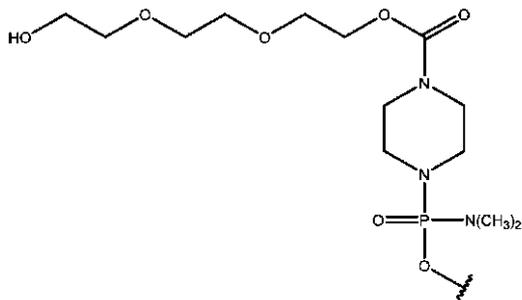
20

から選択される、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 67】

T が、式：

【化 1 1 4】



30

を有する、請求項 60 に記載の方法。

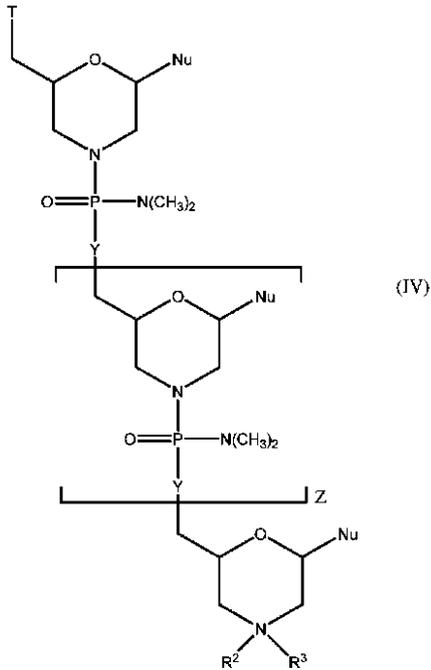
【請求項 68】

ジストロフィンプレ mRNA のプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法であって、

40

被験体に、式 (VI)：

【化 1 1 5】



10

20

を含む化合物または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

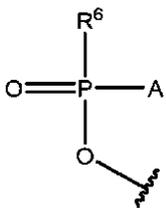
Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 1 1 6】



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中

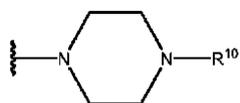
40

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ および式：

【化 1 1 7】



の部分から選択され、式中、

50

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、
 R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1 から 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 から 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ および $-C(O)-R^{23}$ から選択され；

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、前記ターゲティング配列は、配列番号 76 ~ 3485 から選択される配列を含むか、

配列番号 76 ~ 3485 から選択されるか、配列番号 76 ~ 3485 から選択される配列の少なくとも 10 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 76 ~ 3485 から選択される配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する変異体であり、

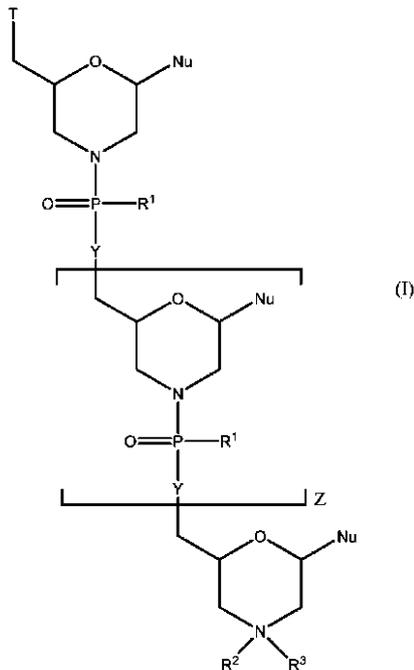
ここで、前記被験体は、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害のうちの少なくとも 1 つを処置する、方法。

【請求項 69】

ヒトジストロフィンプレ mRNA のプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法であって、

被験体に、式 (I) :

【化 118】

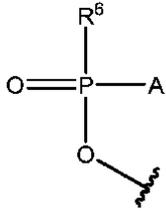


を含む化合物または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、
 各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；
 Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および -NR₄ から独立に選択され、式中、各 R₄ は、H、C₁ ~ C₆ アルキル、アラルキル、C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)_nNR₅C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NR₅C(=NH)NH₂ および G から独立に選択され、式中、R₅ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから選択され、n は 1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

【化 1 1 9】



10

の部分から選択され、式中、

A は、-OH、-N(R⁷)₂R⁸ から選択され、式中

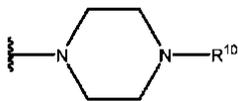
R⁷ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから独立に選択され、

R⁸ は、電子対および H から選択され、

R⁶ は、OH、-N(R⁹)CH₂C(O)NH₂ および式：

20

【化 1 2 0】



の部分から選択され、式中、

R⁹ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから選択され；

R¹⁰ は、G、C(O)-R¹¹OH、アシル、トリチル、4メトキシトリチル、C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)_mNR¹²C(=NH)NH₂ および C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NR¹²C(=NH)NH₂ から選択され、式中

30

m は、1 から 5 の整数であり、

R¹¹ は、式 - (O-アルキル)_y - を有し、式中、y は、3 から 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、C₂ ~ C₆ アルキルから独立に選択され；

R¹² は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから選択され；

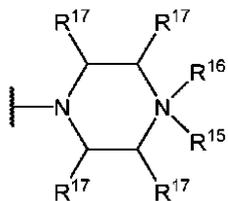
R¹ の各例は、

-N(R¹³)₂R¹⁴ [式中、各 R¹³ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから独立に選択され、R¹⁴ は、電子対および H から選択される]；

40

式 (II)：

【化 1 2 1】



(II)

の部分 [式中、

50

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_q NR^{18} C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NR^{18} C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

R^{18} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

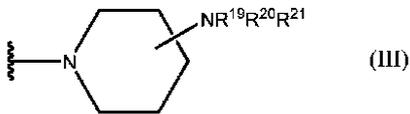
q は、1 から 5 の整数であり、

R^{16} は、電子対および H から選択され；そして

各 R^{17} は、H およびメチルから独立に選択される]；および

式 (III)：

【化 1 2 2】



10

の部分 [式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_r NR^{22} C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3 NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NR^{22} C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4 NH_2$ および G から選択され、式中、

R^{22} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

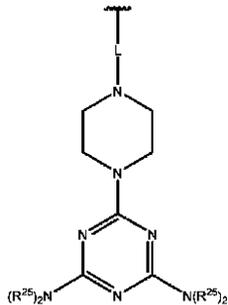
r は、1 から 5 の整数であり、

R^{20} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{21} は、電子対および H から選択される] から独立に選択され；

R^{2} は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{23}$ 、 $-C(O)(CH_2)_s NR^{24} C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NR^{24} C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3 NHC(=NH)NH_2$ および式：

【化 1 2 3】



30

の部分から選択され、式中、

R^{23} は、式 $-(O-アルキル)_v-OH$ を有し、式中、v は、3 から 10 の整数であり、v 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{24} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

s は、1 から 5 の整数であり；

L は、 $-C(O)(CH_2)_6 C(O)-$ および $-C(O)(CH_2)_2 S_2(CH_2)_2 C(O)-$ から選択され、

各 R^{25} は、式 $-(CH_2)_2 OC(O)N(R^{26})_2$ を有し、式中、各 R^{26} は、式 $-(CH_2)_6 NHC(=NH)NH_2$ を有し；

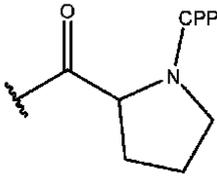
R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、G は、 $-C(O)(CH_2)_5 NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NH-CPP$ および $-C(O)$

50

) $\text{CH}_2\text{NH}-\text{CPP}$ から選択される、細胞透過性ペプチド(「CPP」)およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 1 2 4】



10

を有し、式中、CPP は、G の最大で 1 つの例が存在するという条件で、CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合しており、

ここで、前記ターゲティング配列は、ヒトジストロフィンプレ mRNA のエクソンを含む標的領域内の 10 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、

ここで、前記被験体は、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害のうちの少なくとも 1 つを処置する、方法。

【請求項 7 0】

各 Nu が、独立に、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2, 6 - ジアミノプリン、5 - メチルシトシン、C 5 - プロピニル修飾ピリミジンまたは 10 - (9 - (アミノエトキシ)フェノキサジニル)である、請求項 6 9 に記載の方法。

20

【請求項 7 1】

前記ターゲティング配列が、配列番号 1 6 ~ 7 5 から選択される配列を含むか、配列番号 1 6 ~ 7 5 から選択されるターゲティング配列の少なくとも 10 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 1 6 ~ 7 5 から選択されるターゲティング配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する変異体である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

i) Y が、O であり、 R^2 が、H もしくは G から選択され、 R^3 が、電子対もしくは H から選択されるか；

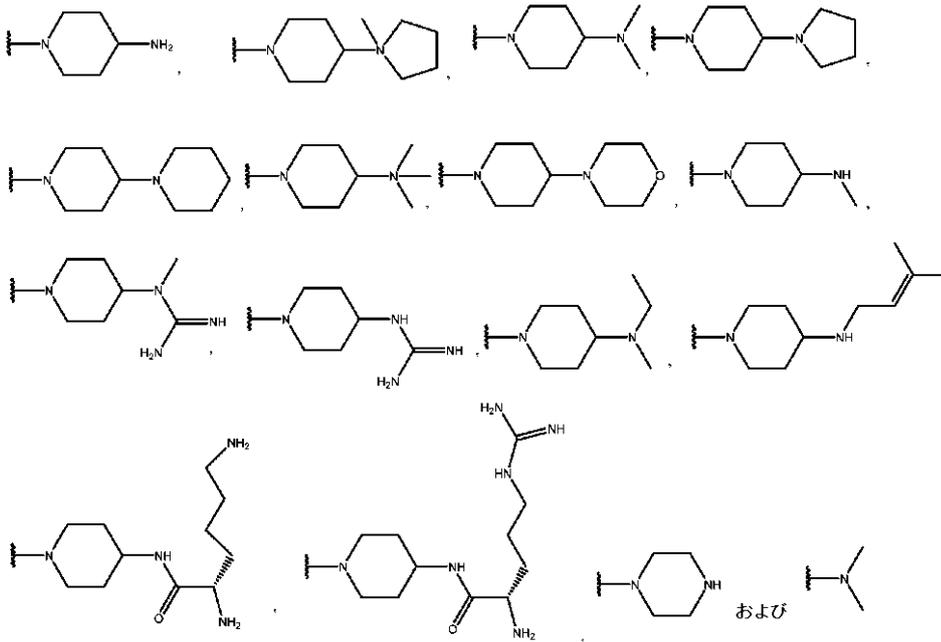
30

ii) R^2 が、G であり、前記 CPP が、配列番号 3 4 8 6 ~ 3 5 0 1 から選択される配列を有するか；

iii) 各 R^1 が、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ であるか；

iv) 少なくとも 1 つの R^1 が、

【化 1 2 5】



10

20

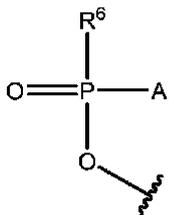
から選択されるか、または

v) R¹ 基の 50 ~ 90 % が、 - N (C H₃)₂ である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 3】

T が、式：

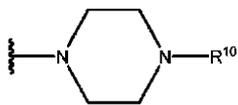
【化 1 2 6】



30

を有し、式中、 A が、 - N (C H₃)₂ であり、 R⁶ が式：

【化 1 2 7】



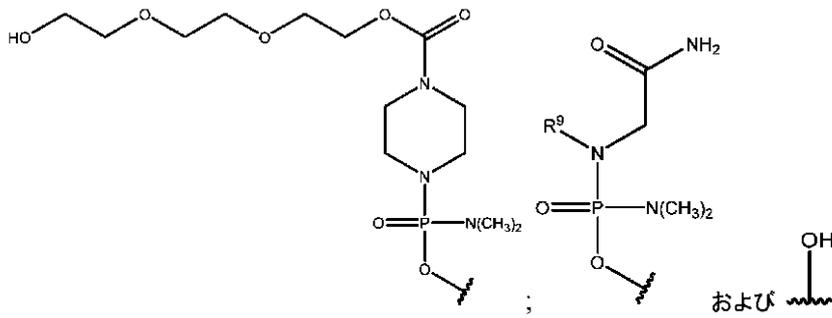
40

を有し、式中、 R^{1 0} が、 - C (O) R^{1 1} O H である、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 4】

各 Y が、 O であり、 T が、

【化 1 2 8】



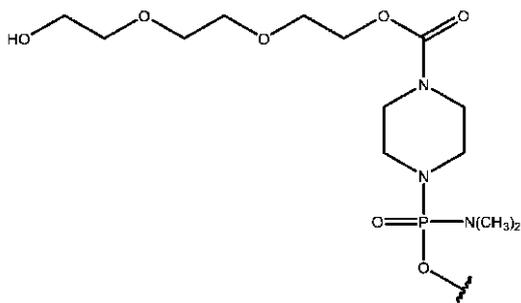
10

から選択される、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 5】

T が、式：

【化 1 2 9】



20

を有する、請求項 6 9 に記載の方法。

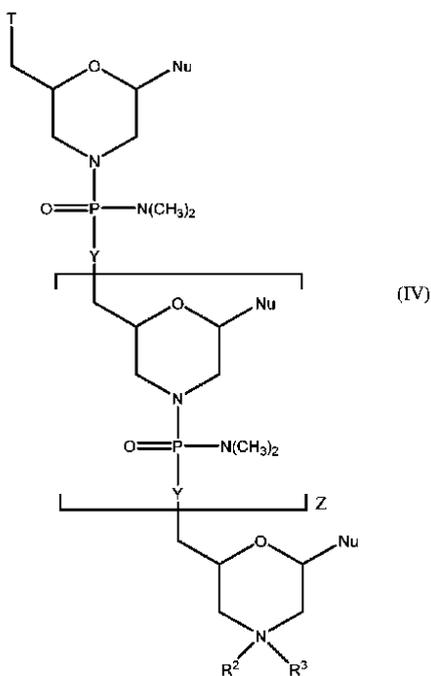
【請求項 7 6】

被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法であって、

被験体に、式 (VI) :

30

【化 1 3 0】



40

50

を含む化合物または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

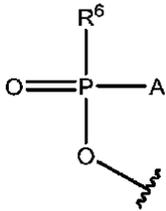
Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

【化 1 3 1】

10



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中、

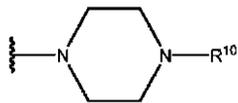
各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ および式：

20

【化 1 3 2】



の部分から選択され、式中、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

30

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1 から 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、y は、3 から 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ および $-C(O)-R^{23}$ から選択され；

40

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、前記ターゲティング配列は、配列番号 16 ~ 75 から選択される配列を含むか、配列番号 16 ~ 75 から選択されるか、配列番号 16 ~ 75 から選択される配列の少なくとも 10 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 16 ~ 75 から選択される配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する変異体であり、

ここで、前記被験体は、前記被験体の筋細胞内で機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害のうちの少なくとも 1 つを処置する、方法。

【請求項 77】

50

12～40サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物と、薬学的に許容される担体とを含むミオスタチン関連医薬組成物であって、前記化合物が、

(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、または(iii) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットと；

ヒトミオスタチンpre-mRNAのエクソンを含む標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列と

を含むミオスタチン関連組成物と組み合わせた、

17～40サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物と、薬学的に許容される担体とを含むジストロフィン関連医薬組成物であって、前記化合物が、

(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、または、(iii) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットと；

ヒトジストロフィンpre-mRNAのエクソンを含む標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列と

を含むジストロフィン関連医薬組成物。

【請求項78】

前記ジストロフィン関連組成物と前記ミオスタチン関連組成物とが、同じ医薬組成物として提供される、77に記載の組成物。

【請求項79】

ヒトミオスタチンpre-mRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得る遺伝子変異を有する被験体においてミオスタチン発現をモジュレートするための方法であって、

前記被験体に、12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンpre-mRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップであって、

前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、または(iii) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含む、ステップと、

ミオスタチンpre-mRNA転写物内の標的領域に前記アンチセンスオリゴマーを結合させるステップと、

前記標的領域のヒトミオスタチンmRNA転写物への転写を阻害するステップとを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法。

【請求項80】

ヒトミオスタチンpre-mRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得る遺伝子変異を有する被験体においてエクソン2の発現を減少させるための方法であって、

前記被験体に、12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンpre-mRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法。

【請求項81】

ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の発現が、約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%減少する、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

10

20

30

40

50

ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体の筋細胞または組織における機能的なミオスタチンタンパク質の蓄積を減少させるための方法であって、

前記被験体に、12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、

ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法。

10

【請求項83】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置するための医薬であって、

(i) 修飾ヌクレオチド間連結、(ii) 修飾糖部分、または(iii) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み；ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、12～40サブユニットを含むアンチセンスオリゴマー化合物と；

機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるジストロフィン治療剤とを含む医薬。

20

【請求項84】

ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の進行を阻害するための方法であって、

前記被験体に、12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーの進行を阻害する、方法。

30

【請求項85】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を有する被験体において機能的なミオスタチンタンパク質の蓄積を減少させる方法であって、

前記被験体に、12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、

ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、

前記被験体における機能的なミオスタチンタンパク質の蓄積が減少し、

前記被験体が、前記被験体の筋細胞内で機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法。

40

【請求項86】

そのような処置を必要とする被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置するための方法であって、

前記被験体において少なくとも約200～400nMのアンチセンスオリゴマーのピークの血中濃度を得るための有効量でアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含む方法。

【請求項87】

ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体において骨格筋量不足を処置する方法であって、

50

(a) 前記被験体におけるミオスタチンタンパク質の血液中または組織中レベルを測定するステップと、

(b) 前記被験体に、12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、

(c) ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップと、

(d) 選択した時間以後、前記被験体におけるミオスタチンタンパク質レベルを測定するステップと、

(e) (d) で測定された前記レベルを使用して前記の投与を反復するステップであって、投与されるアンチセンスオリゴマーの量の用量または投薬スケジュールを調整するステップとを含み、前記被験体におけるミオスタチンタンパク質の前記レベルが、前記アンチセンスオリゴマーの投与後に低下し、

前記被験体が、前記被験体の筋細胞において機能的なジストロフィン発現タンパク質の発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法。

【請求項88】

ジストロフィンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の進行を阻害する方法であって、

前記被験体に、17～40サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、前記アンチセンスオリゴマーが、前記エクソンのスキッピングを誘導し、

前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオチド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるミオスタチンの活性および発現のうち的一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害のうち少なくとも1つの進行を阻害する、方法。

【請求項89】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの進行を阻害する方法であって、

被験体に、12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、

前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオチド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、

前記被験体が、前記被験体の筋細胞において機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーの進行を阻害する、方法。

【請求項90】

前記アンチセンスオリゴマーの3'末端または5'末端にコンジュゲートするアルギニンに富むペプチド配列をさらに含み、前記アルギニンに富むペプチド配列が、配列番号3486～3501から選択される配列を含む、前出の請求項のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項91】

R²が、Gであり、前記CPPが、配列番号3486～3501から選択される配列を含む、請求項60から75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

アンチセンスオリゴマーの3'末端にコンジュゲートするアルギニンに富むペプチド配

10

20

30

40

50

列をさらに含み、前記アルギニンに富むペプチド配列が、配列番号 3 4 8 6 ~ 3 5 0 1 から選択される配列を含む、請求項 8 3 に記載の医薬。

【請求項 9 3】

1 7 ~ 4 0 サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレ mRNA のエクソンを含む標的領域内の 1 2 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含むアンチセンスオリゴマーであって、

(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットを含む、ジストロフィンを標的とする前記オリゴマーと；

1 2 ~ 4 0 サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレ mRNA のエクソンを含む 1 2 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含むアンチセンスオリゴマーであって、

(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットを含む、ミオスタチンを標的とする前記オリゴマーとを含む組成物。

【請求項 9 4】

ヒトジストロフィンプレ mRNA のプロセシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得る遺伝子変異を有する被験体においてジストロフィン発現をモジュレートするための方法であって、

前記被験体に、1 7 ~ 4 0 サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレ mRNA のエクソンを含む 1 2 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、

前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与されている、方法。

【請求項 9 5】

ヒトミオスタチンプレ mRNA のプロセシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得る遺伝子変異を有する被験体においてミオスタチン発現をモジュレートするための方法であって、

前記被験体に、1 2 ~ 4 0 サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレ mRNA のエクソンを含む 1 2 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、

前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットを含み、

前記被験体が、前記被験体の筋細胞内で機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法。

【請求項 9 6】

前記アンチセンスオリゴマー、ジストロフィン治療剤またはミオスタチン治療剤の少なくとも 1 つが、前記被験体に全身投与される、請求項 1 から 9 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 7】

前記被験体が、ヒトである、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記被験体が、7 歳またはこれを超える、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

アンチセンスオリゴマーまたはジストロフィン治療剤が、配列番号 9 2 7 を含まない、請求項 9 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

開示の分野

本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の処置のための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

関連技術の説明

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、タンパク質ジストロフィンの発現の欠陥に起因する。タンパク質をコードする遺伝子は、200万を超えるDNAのヌクレオチドにわたって広がる79のエクソンを含む。エクソンのリーディングフレームを変えるか、または停止コドンを導入するか、あるいはフレームがあていない1もしくは複数のエクソン全体の除去または1もしくは複数のエクソンの重複により特徴付けられるいかなるエクソンの変異も、機能的なジストロフィンの産生を途絶させ、それによりDMDをもたらす可能性がある。

【0003】

疾患の発症は、クレアチンキナーゼレベルの上昇により出生時に実証されることがあり、顕著な運動障害が生後1年で見られる場合がある。DMDを有する大部分の患者は7歳または8歳までに次第に足取りがぎこちなくなり、床から立ち上がり階段を登る能力を失い、10～14歳までにほとんどが車椅子に依存する。DMDは一様に致命的であり、罹患個体は、典型的には、10代後半または20代前半には呼吸および/または心不全により死亡する。DMDの持続的な進行は、疾患の全ての段階で治療的介入が可能であるが、処置は現在のところ糖質コルチコイドに限られており、それは体重増加、行動変化、思春期変化、骨粗鬆症、クッシング様顔貌、発育阻止および白内障を含む多くの副作用を伴う。

【0004】

典型的には1または複数のエクソンの欠失である変異により、ジストロフィン転写物全体にわたって正しいリーディングフレームとなり、その結果、mRNAのタンパク質への翻訳が早まって終了しない場合には、本明細書に記載される関連障害である、低重症型の筋ジストロフィーであるベッカー型筋ジストロフィー（BMD）が発症することがわかっている。変異ジストロフィンプレームRNAのプロセッシングにおいて、上流および下流エクソンの接合により遺伝子の正しいリーディングフレームが維持される場合、若干の活性が保持された、短い内部欠失を有するタンパク質をコードするmRNAが生じ、その結果、ベッカー型の表現型となる。

【0005】

長年、ジストロフィンタンパク質のリーディングフレームを変えない1または複数のエクソンの欠失が、BMD表現型をもたらすが、フレームシフトが生じるエクソン欠失はDMDをもたらすことが公知である（Monaco、Bertelsonら、1988年）。一般に、リーディングフレームを変更し、したがって適切なタンパク質翻訳を中断する、点変異およびエクソン欠失を含むジストロフィン変異は、DMDをもたらす。また、一部のBMDおよびDMD患者は、複数のエクソンにまたがるエクソン欠失を有することに留意すべきである。

【0006】

DMDの処置に対するスプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO）の安全性および有効性を試験した最近の臨床試験は、スプライソソームの立体障害によるプレームRNAの選択的スプライシングを誘導するSSO技術に基づく（Cirakら、2011年；Goe mansら、2011年；Kinaliら、2009年；van Deutekomら、2007年）。しかしながら、これらの成功にもかかわらず、DMDの処置に利用できる薬理的オプションは

10

20

30

40

50

限られている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

ゆえに、DMDの処置のための改善された治療的アプローチに対する強いニーズが依然として存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

要旨

本開示は、少なくとも一部において、ミオスタチン治療剤と組み合わせたジストロフィン治療剤によるmdxマウス（デュシェンヌ型筋ジストロフィーのマウスモデル）の全身処置により、とりわけ、マウスにおける握力（筋力）が増加したという驚くべき発見に基づく。握力（筋力）の増加に加えて、この複合治療的アプローチはまた、単独治療のみと比較して、エクソスキッピング効率およびタンパク質発現、ならびに他のin vivoおよびin vitroエンドポイントを増加させた。これらには、とりわけ、体重、筋肉量、特定の筋線維の肥大および筋肉の再生の改善が含まれる。

10

【0009】

さらに驚くべき発見は、とりわけ本明細書に記載される方法および組合せによる処置に受容的な集団の年齢に関する。若齢のmdxマウスは、筋肉の成長および再生のより長い一定期間を経験し、ゆえにより穏やかな病変を示す傾向があることが一般的に公知である。例えば、McGreevyら、Disease Models & Mechanisms、8巻：195～213頁（2015年）を参照されたい。対照的に、老齢のmdxマウスは、筋肉の完全性および機能のより一層一貫した低下を示し、処置が困難であるより重症の病変により特徴付けられる。しかしながら、驚くべきことに、上記のin vivoおよびin vitroでの結果は、若齢のmdxマウスのみならず老齢のマウスでも生じることを見出した。これは、本明細書に記載される組成物および方法が、より重症の病変および予後不良を有する高齢患者（例えば、7歳またはこれを超える小児患者）の処置に有用であることを示す。

20

【0010】

さらに驚くべき発見は、試験した処置集団における長い寿命および/または高い生存率に関する。若齢のmdxマウスは、ジストロフィン欠損であるにもかかわらず、臨床症状が最小であることが公知である（McGreevyら、2015年）。マウスが15カ月齢またはこれを超えるまで、臨床表現型、例えば筋肉の消耗、脊柱側弯症および心不全をよく表す重症のジストロフィーの表現型が現れない。しかし、mdxマウスの寿命は野生型マウスと比較し約25%短いため、早期死亡がこの時点でしばしば生じる。しかしながら、ここで本発明者らは驚くべきことに、本明細書の方法および組合せに従う処置が、このモデルにおける典型的な寿命/生存率をはるかに超える少なくとも約18～24カ月に、mdxマウスの生存を延長したことを見出した。本明細書の多様な態様および実施形態に従い、老齢のmdxマウスにおいて観察されたこれらの高い治療的利益および長い寿命は、驚くべきである。

30

【0011】

したがって、本明細書に提示される多様な態様は、ジストロフィン治療剤とミオスタチン治療剤との組合せを投与することにより、被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置する方法を含む。

40

【0012】

多様な態様は、ジストロフィンプレmRNAのプロセシングの間、エクソスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する被験体を処置する方法を含む。この方法は、前記被験体に、17～40サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するス

50

テップを含み、前記アンチセンスオリゴマーが、前記エクソンのスキッピングを誘導し、前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、前記被験体が、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置する。

【0013】

多様な実施形態では、前記エクソンが、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択される。一部の実施形態では、前記エクソンがエクソン23を含む。一部の実施形態では、前記エクソンがエクソン45を含む。一部の実施形態では、前記エクソンがエクソン51を含む。一部の実施形態では、前記エクソンがエクソン53を含む。一部の実施形態では、前記エクソンが、エクソン8、エクソン44、エクソン50、エクソン52またはエクソン55を含む。

10

【0014】

多様な実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、20~30サブユニットを含む。一部の実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、配列番号76~配列番号3485から選択される配列を含む。さらなる実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、配列番号76である。

20

【0015】

多様な実施形態では、前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも15の連続ヌクレオチドと相補的である。一部の実施形態では、前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも17の連続ヌクレオチドと相補的である。さらなる実施形態では、前記ターゲティング配列が、前記標的領域と100%相補的である。

【0016】

多様な実施形態では、前記ミオスタチン治療剤が、タンパク質または核酸である。一部の実施形態では、前記タンパク質が、抗ミオスタチン抗体である。一部の実施形態では、前記タンパク質が、可溶性受容体である。さらなる実施形態では、可溶性受容体が、ACVR2である。一部の実施形態では、前記核酸が、アンチセンスオリゴマーまたはsiRNAのうちの少なくとも1つである。

30

【0017】

多様な実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、12~40サブユニットを含み、ミオスタチンpre-mRNAの標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含み、前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含む。実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、20~30サブユニットを含む。一部の実施形態では、前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも15の連続ヌクレオチドと相補的である。さらなる実施形態では、前記ターゲティング配列が、前記標的領域内の少なくとも17の連続ヌクレオチドと相補的である。実施形態では、前記ターゲティング配列が、前記標的領域と100%相補的である。実施形態では、前記標的領域が、配列番号1を含む。実施形態では、前記エクソンが、エクソン2を含む。

40

【0018】

多様な実施形態では、前記標的領域が、(i)少なくとも1つのヌクレオチドが、イントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2に伴うスプライス接合部にわたるヌクレオチド配列、または、(ii)ヌクレオチドが、イントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2に伴うスプライス接合部にわたらないヌクレオチド配列から選択される。実施形態では、前記スプライス接合部が、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位を含む配列から選択される。実施形態では、前記スプライス接合部が、スプライスアクセプター部位またはスプライスドナー部位を含む配列から選択される

50

。一部の実施形態では、前記スプライサクセプター部位が、配列番号2の内部に存在し、前記スプライドナー部位が配列番号3の内部に存在する。

【0019】

多様な実施形態では、前記(i)のヌクレオチドが、配列番号16~43から選択される。実施形態では、前記(ii)のヌクレオチドが、配列番号44~70から選択される。

【0020】

多様な実施形態では、前記被験体が、7歳またはこれを超える小児患者である。

【0021】

多様な態様は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置する方法であって、
被験体に、12~40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンpre-mRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、前記被験体が、前記被験体内でのジストロフィンの発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置する、方法を含む。

10

【0022】

多様な実施形態では、前記被験体が、ヒトミオスタチンpre-mRNAのプロセッシングの間、エクソスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する。

20

【0023】

多様な実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、20~30サブユニットを含む。実施形態では、前記ターゲティング配列が、標的領域内の少なくとも15の連続ヌクレオチドと相補的である。実施形態では、前記ターゲティング配列が、標的領域内の少なくとも17の連続ヌクレオチドと相補的である。実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、標的領域と100%相補的である。実施形態では、前記標的領域が、配列番号1を含む。実施形態では、前記エクソンが、エクソン2を含む。

【0024】

多様な実施形態では、前記標的領域が、(i)少なくとも1つのヌクレオチドがイントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2に伴うスプライス接合部にわたるヌクレオチド配列、または、(ii)ヌクレオチドがイントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2に伴うスプライス接合部にわたらないヌクレオチド配列から選択される。実施形態では、前記スプライス接合部が、スプライサクセプター部位またはスプライドナー部位を含む配列から選択される。実施形態では、前記スプライサクセプター部位が、配列番号2の内部に存在し、前記スプライドナー部位が、配列番号3の内部に存在する。

30

【0025】

多様な実施形態では、前記ジストロフィン治療剤が、タンパク質または核酸のうちの1つまたは複数から選択される。実施形態では、前記核酸が、アンチセンスオリゴマーである。一部の実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーが、20~50サブユニットを含み、ヒトジストロフィンpre-mRNAのエクソンを含む標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含む。

40

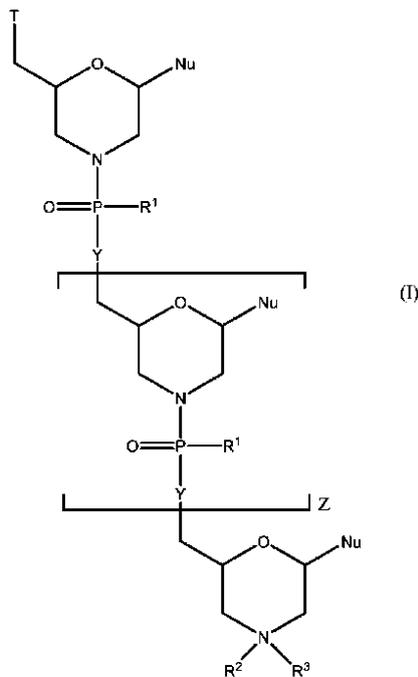
【0026】

様々な態様および実施形態は、ジストロフィンpre-mRNAのプロセッシングの間、エクソスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法を含む。様々な実施形態では、この方法は、被験体に、式(I)

50

:

【化 1】



10

20

を含むターゲティング配列または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Z は、8 から 48 の整数であり；

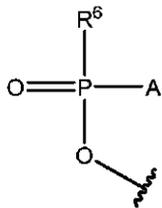
各 Y は、O および -NR⁴ から独立に選択され、式中、各 R⁴ は、H、C₁ ~ C₆ アルキル、アラルキル、C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)_nNR⁵C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NR⁵C(=NH)NH₂ および G から独立に選択され、式中、R⁵ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから選択され、n は、

30

1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

【化 2】



40

の部分か選択され、式中、

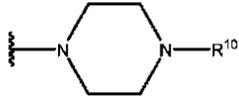
A は、-OH、-N(R⁷)₂R⁸ から選択され、式中、

各 R⁷ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから独立に選択され、

R⁸ は、電子対および H から選択され、そして

R⁶ は、OH、-N(R⁹)CH₂C(O)NH₂ および式：

【化3】



の部分から選択され、式中、

R^9 は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

R^{10} は、G、 $C(O) - R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4メトキシトリチル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1から5の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3から10の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

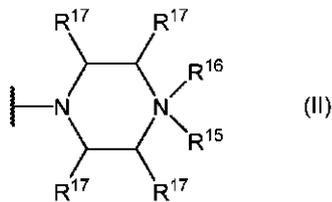
R^{12} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^1 の各例は、

$-N(R^{13})_2R^{14}$ [式中、各 R^{13} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、そして R^{14} は、電子対およびHから選択される]；

式(II)：

【化4】



30

の部分 [式中、

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

R^{18} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

q は、1から5の整数であり、

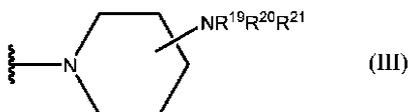
R^{16} は、電子対およびHから選択され；

各 R^{17} は、Hおよびメチルから独立に選択される]；および

式(III)：

【化5】

40



の部分 [式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ およびGから選択され、式中、

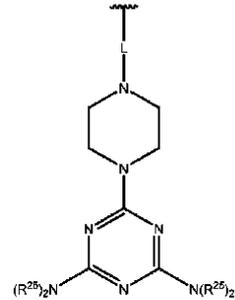
50

R^{22} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；
 r は、1から5の整数であり、
 R^{20} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；
 R^{21} は、電子対およびHから選択される]

から独立に選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{23}$ 、 $-C(O)(CH_2)_s NR^{24} C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NR^{24} C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3 NHC(=NH)NH_2$ および式：

【化6】



10

20

の部分から選択され、式中、

R^{23} は、式 $-(O-アルキル)_v-OH$ を有し、式中、 v は、3から10の整数であり、 v 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{24} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

s は、1から5の整数であり；

L は、 $-C(O)(CH_2)_6 C(O)-$ および $-C(O)(CH_2)_2 S_2 (CH_2)_2 C(O)-$ から選択され；

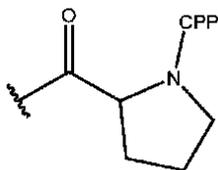
各 R^{25} は、式 $-(CH_2)_2 OC(O)N(R^{26})_2$ を有し、式中、各 R^{26} は、式 $-(CH_2)_6 NHC(=NH)NH_2$ を有し；

R^3 は、電子対、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

30

ここで、 G は、 $-C(O)(CH_2)_5 NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NH-CPP$ および $-C(O)CH_2 NH-CPP$ から選択される細胞透過性ペプチド(「CPP」)およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化7】



40

を有し、式中、 CPP は、 G の最大で1つの例が存在するという条件で、 CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合しており、

ここで、前記ターゲティング配列は、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、

ここで、前記被験体は、ミオスタチン治療剤を投与されており、それにより、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方が抑制される。

【0027】

多様な実施形態では、各 Nu が、独立に、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、 C

50

5 - プロピニル修飾ピリミジンまたは 10 - (9 - (アミノエトキシ)フェノキサジニル)である。

【0028】

多様な実施形態では、前記標的領域が、(i)少なくとも1つのヌクレオチドが前記エクソンに伴うスプライス接合部にわたるヌクレオチド配列；または(ii)ヌクレオチドが前記エクソン接合部に伴うスプライス接合部にわたらないヌクレオチド配列から選択される。実施形態では、前記ターゲティング配列が、配列番号76～3485から選択される配列を含むか、配列番号76～3485から選択されるターゲティング配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号76～3485から選択されるターゲティング配列と少なくとも90%の配列同一性を有する変異体である。

10

【0029】

多様な実施形態では、

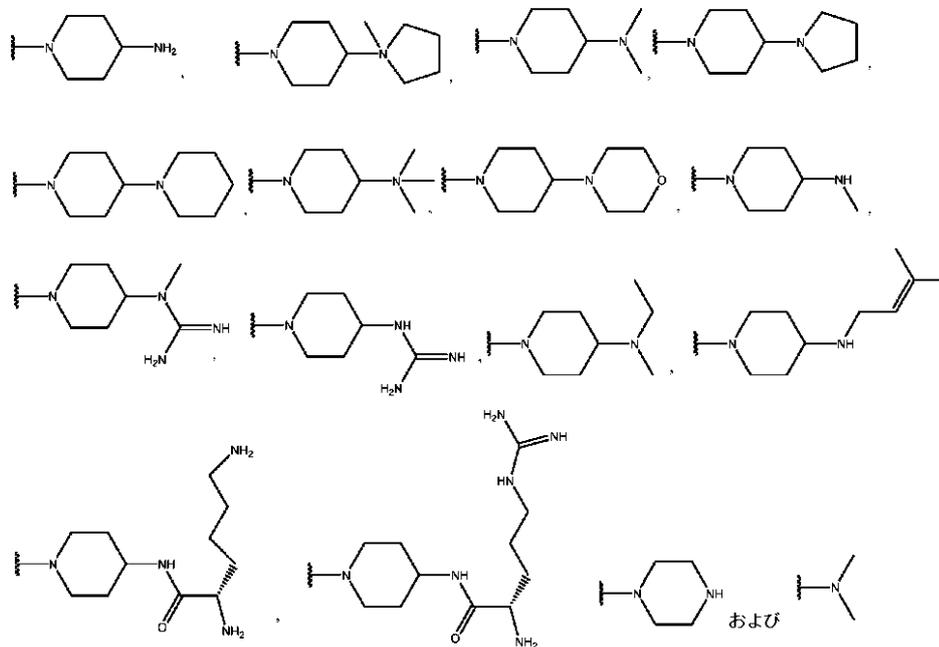
i) Yが、Oであり、R²が、HもしくはGから選択され、R³が、電子対もしくはHから選択されるか；

ii) R²が、Gであり、式中、前記CPPが配列番号3486～3501から選択される配列を有するか；

iii) 各R¹が、-N(CH₃)₂であるか；

iv) 少なくとも1つのR¹が、

【化8】



20

30

から選択されるか；または

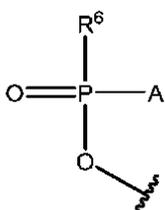
v) R¹基の50～90%が、-N(CH₃)₂である。

40

【0030】

多様な実施形態では、Tが、式：

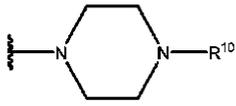
【化9】



50

を有し、式中、Aは、 $-N(CH_3)_2$ であり、 R^6 は、式：

【化10】



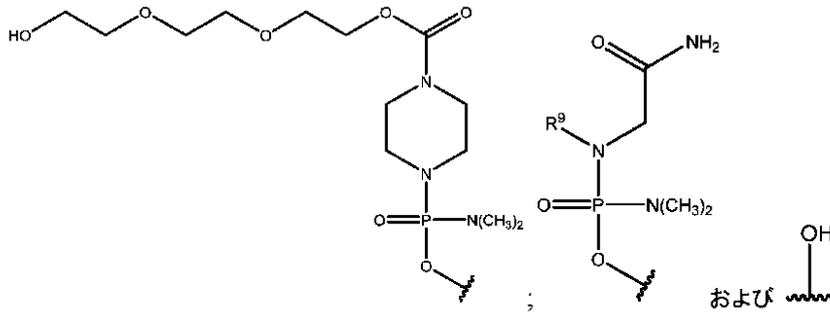
を有し、式中、 R^{10} は、 $-C(O)R^{11}OH$ である。

【0031】

10

多様な実施形態では、各Yが、Oであり、Tが、

【化11】



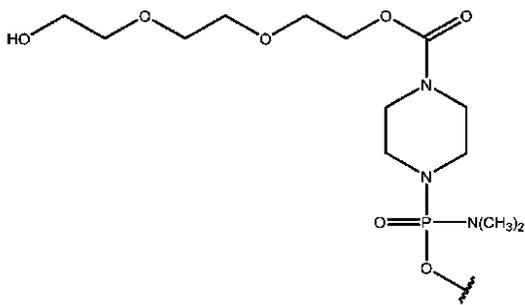
20

から選択される。

【0032】

多様な実施形態では、Tが、式：

【化12】



30

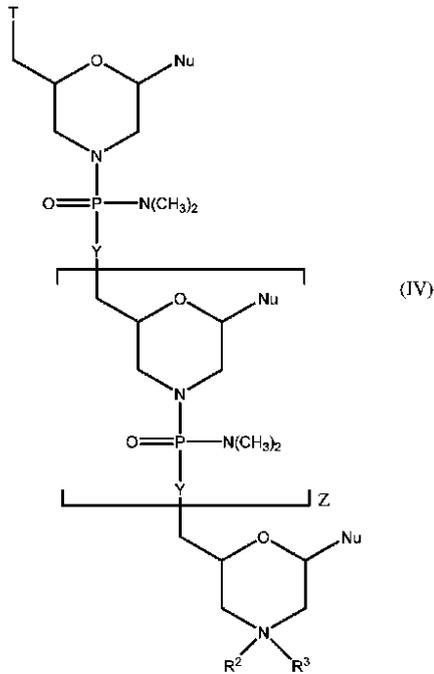
を有する。

【0033】

多様な態様は、ジストロフィンpre-mRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法を含む。この方法は、被験体に、式(VI)：

40

【化 1 3】



10

20

を含む化合物または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

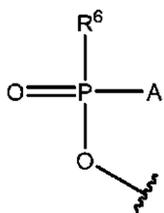
Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 1 4】



の部分から選択され、式中、

40

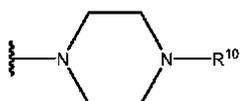
A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ および式：

【化 1 5】



50

の部分から選択され、式中、

R^9 は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

mは、1から5の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、yは、3から10の整数であり、

y個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ および $-C(O)-R^{23}$ から選択され；

R^3 は、電子対、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、前記ターゲティング配列は、配列番号76~3485から選択される配列を含むか、

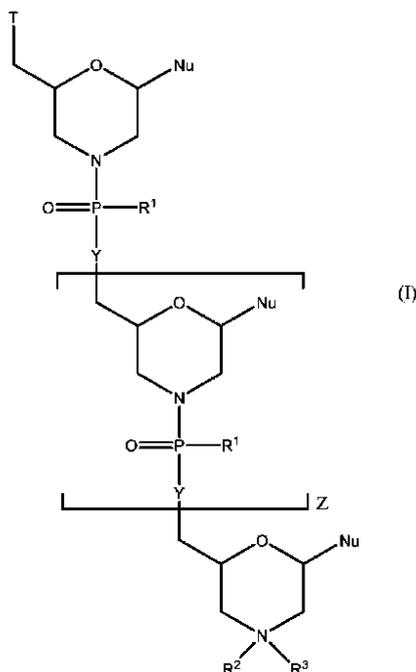
配列番号76~3485から選択されるか、配列番号76~3485から選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号76~3485から選択される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する変異体である。

【0034】

多様な態様は、ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法を含む。実施形態では、この方法は、

被験体に、式(I)：

【化16】



を含む化合物または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、

各Nuは、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Zは、8から48の整数であり；

各Yは、Oおよび $-NR_4$ から独立に選択され、式中、各 R_4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アル

10

20

30

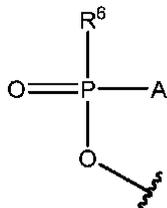
40

50

キル、アラルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_nNR_5C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR_5C(=NH)NH_2$ および G から独立に選択され、式中、 R_5 は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、 n は 1 から 5 の整数であり；

T は、 OH および式：

【化 17】



10

の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ 、 $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中

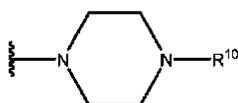
R^7 は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、 OH 、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ および式：

【化 18】

20



の部分から選択され、式中、

R^9 は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{10} は、 G 、 $C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4メトキシトリチル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中

30

m は、1 から 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 から 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

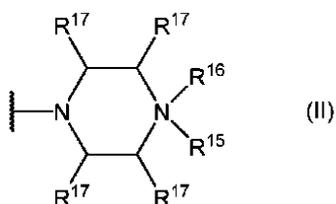
R^{11} の各例は、

$-N(R^{13})_2R^{14}$ [式中、各 R^{13} は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、 R^{14} は、電子対および H から選択される] ；

式 (II) :

40

【化 19】



(II)

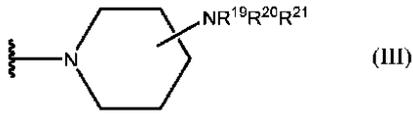
の部分 [式中、

R^{15} は、 H 、 G 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2$

50

q $NR^{18}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、
 R^{18} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；
 q は、1 から 5 の整数であり、
 R^{16} は、電子対および H から選択され；そして
 各 R^{17} は、H およびメチルから独立に選択される]；および
 式 (III)：

【化 20】



10

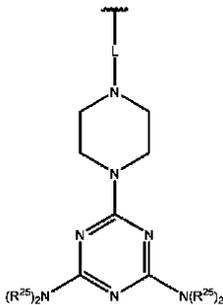
の部分 [式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ および G から選択され、式中、
 R^{22} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；
 r は、1 から 5 の整数であり、
 R^{20} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；
 R^{21} は、電子対および H から選択される] から独立に選択され；
 R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{23}$ 、 $-C(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ および式：

20

30

【化 21】



の部分から選択され、式中、

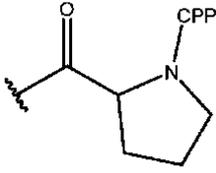
R^{23} は、式 $-(O-アルキル)_v-OH$ を有し、式中、 v は、3 から 10 の整数であり、 v 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；
 R^{24} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；
 s は、1 から 5 の整数であり；
 L は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ および $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ から選択され、
 各 R^{25} は、式 $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$ を有し、式中、各 R^{26} は、式 $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ を有し；
 R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、
 ここで、G は、 $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択される、細胞透過性ペプチド (「CPP」) およびリンカ

40

50

一部分であるか、または G は、式：

【化 2 2】



を有し、式中、CPPは、Gの最大で1つの例が存在するという条件で、CPPのカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合しており、 10

ここで、前記ターゲティング配列は、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、

ここで、前記被験体は、ミオスタチン治療剤を投与されており、それにより、前記被験体におけるミオスタチン活性またはミオスタチン発現の一方または両方が抑制される。

【0035】

多様な実施形態では、各Nuが、独立に、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジンまたは10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル)である。 20

【0036】

多様な実施形態では、前記ターゲティング配列が、配列番号16~75から選択される配列を含むか、配列番号16~75から選択されるターゲティング配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号16~75から選択されるターゲティング配列と少なくとも90%の配列同一性を有する変異体である。

【0037】

多様な実施形態では、

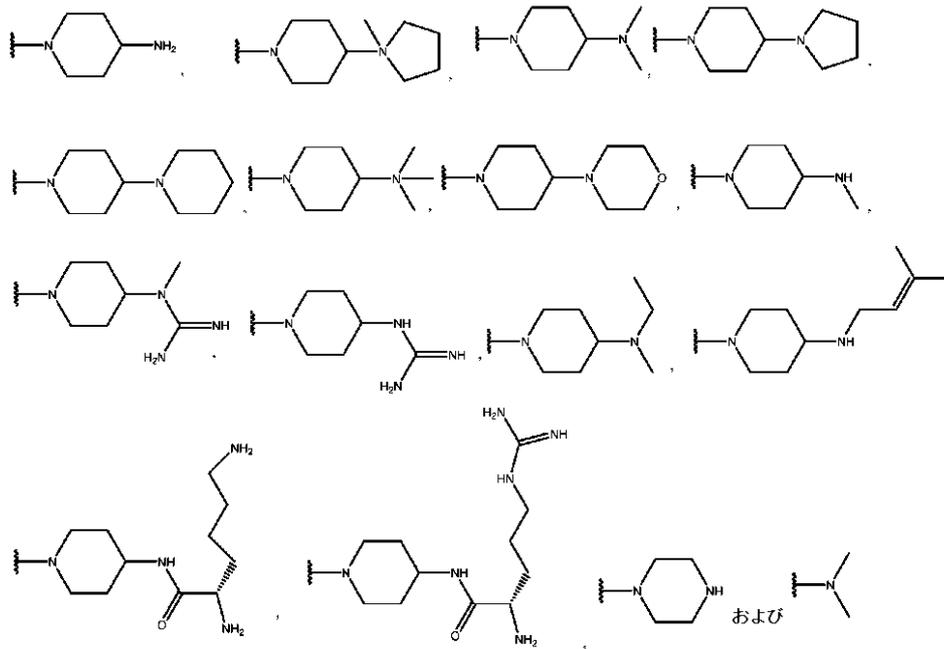
i) Yが、Oであり、R²が、HもしくはGから選択され、R³が、電子対もしくはHから選択されるか；

ii) R²が、Gであり、前記CPPが、配列番号3486~3501から選択される配列を有するか； 30

iii) 各R¹が、-N(CH₃)₂であるか；

iv) 少なくとも1つのR¹が、

【化 2 3】



10

20

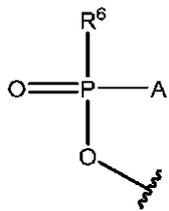
から選択されるか、または

v) R¹ 基の 50 ~ 90 % が、-N(CH₃)₂ である。

【0038】

多様な実施形態では、T が、式：

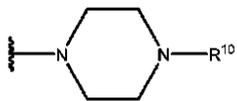
【化 2 4】



30

を有し、式中、A が、-N(CH₃)₂ であり、R⁶ が式：

【化 2 5】



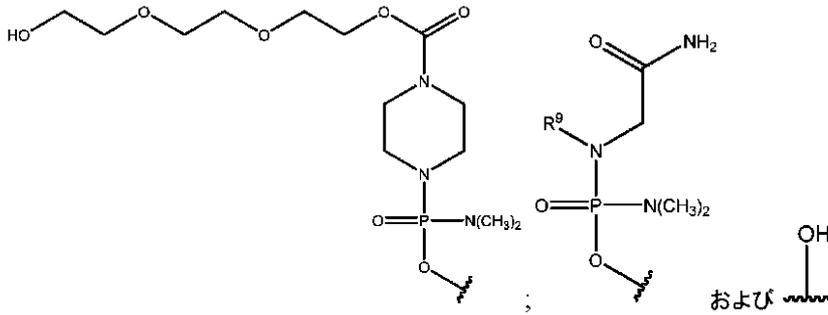
を有し、式中、R¹⁰ が、-C(O)R¹¹OH である。

40

【0039】

多様な実施形態では、各 Y が、O であり、T が、

【化 2 6】



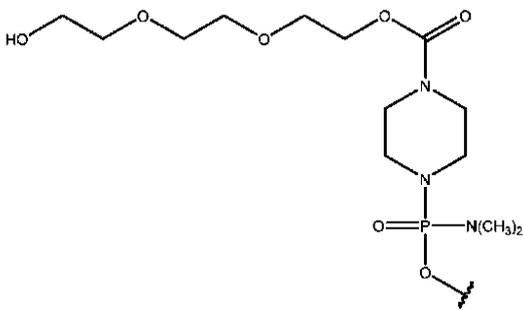
10

から選択される。

【0040】

多様な実施形態では、Tが、式：

【化 2 7】



20

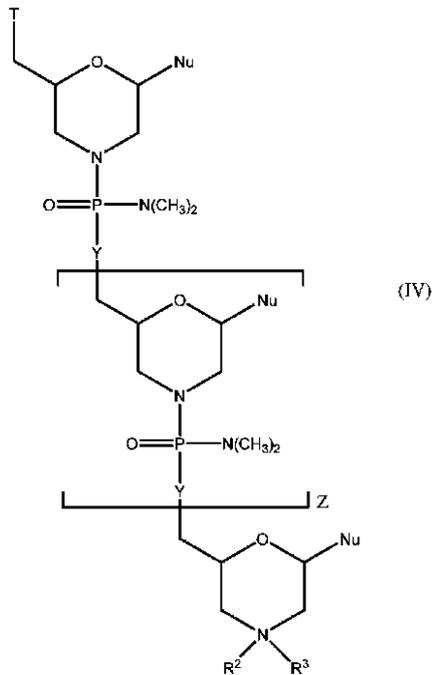
のものである。

【0041】

多様な態様は、ミオスタチンプレmRNAのプロセシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法を含む。多様な実施形態では、この方法は、被験体に、式(VI)：

30

【化 2 8】



10

20

を含む化合物または薬学的に許容されるその塩を投与するステップを含み、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

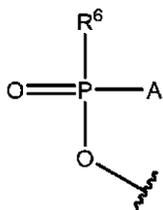
Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 2 9】



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中、

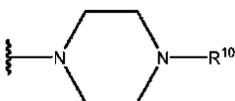
40

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ および式：

【化 3 0】



の部分から選択され、式中、

50

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1 から 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 から 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ および $-C(O)-R^{23}$ から選択され；

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、前記ターゲティング配列は、配列番号 16 ~ 75 から選択される配列を含むか、配列番号 16 ~ 75 から選択されるか、配列番号 16 ~ 75 から選択される配列の少なくとも 10 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 16 ~ 75 から選択される配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する変異体である。

【0042】

多様な態様は、12 ~ 40 サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物と、薬学的に許容される担体とを含むミオスタチン関連医薬組成物であって、前記化合物が、

(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、または (iii) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットと；

ヒトミオスタチンプレ mRNA のエクソンを含む標的領域内の 12 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列とを含むミオスタチン関連組成物と組み合わせた、

20 ~ 50 サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物と、薬学的に許容される担体とを含むジストロフィン関連医薬組成物であって、前記化合物が、

(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、または、(iii) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットと；

ヒトジストロフィンプレ mRNA のエクソンを含む標的領域内の 10 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列とを含むジストロフィン関連医薬組成物を含む。多様な実施形態では、前記ジストロフィン関連組成物と前記ミオスタチン関連組成物とが、同じ医薬組成物として提供される。

【0043】

多様な態様は、ヒトミオスタチンプレ mRNA のプロセッシングの間、エクソスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得る遺伝子変異を有する被験体においてミオスタチン発現をモジュレートするための方法であって、前記被験体に、12 ~ 40 サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレ mRNA のエクソンを含む 12 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップであって、前記オリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、または (iii) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも 1 つのサブユニットを含む、ステップと、ミオスタチンプレ mRNA 転写物内の標的領域に前記アンチセンスオリゴマーを結合させるステップと、前記標的領域のヒトミオスタチン mRNA 転写物への転写を阻害するステップとを含み、前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法を含む。

【0044】

多様な態様は、ヒトミオスタチンプレ mRNA のプロセッシングの間、エクソスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得る遺伝子変異を有する被験体においてエクソン 2 の発現を減少させるための方法であって、前記被験体に、12 ~ 4

10

20

30

40

50

0 サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法を含む。多様な実施形態では、ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の発現が、約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%減少する。

【0045】

多様な態様は、ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体の筋細胞または組織における機能的なミオスタチンタンパク質の蓄積を減少させるための方法であって、前記被験体に、12~40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法を含む。

【0046】

多様な態様は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置するための医薬であって、(i)修飾ヌクレオチド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み；ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、12~40サブユニットを含むアンチセンスオリゴマー化合物と；ジストロフィンの発現を増加させるジストロフィン治療剤とを含む医薬を含む。

【0047】

多様な態様は、ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の進行を阻害するための方法であって、前記被験体に、12~40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、前記被験体が、前記被験体におけるジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーの進行を阻害する、方法を含む。

【0048】

多様な態様は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を有する被験体において機能的なミオスタチンタンパク質の蓄積を減少させる方法であって、前記被験体に、12~40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップとを含み、前記被験体における機能的なミオスタチンタンパク質の蓄積が減少し、前記被験体が、前記被験体内でジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法を含む。

【0049】

多様な態様は、そのような処置を必要とする被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置するための方法であって、前記被験体において少なくとも

10

20

30

40

50

約 200 ~ 400 nM のアンチセンスオリゴマーのピークの血中濃度を得るための有効量でアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含む方法を含む。

【0050】

多様な態様は、ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体において骨格筋量不足を処置する方法であって、(a)前記被験体におけるミオスタチンタンパク質の血液中または組織中レベルを測定するステップと、(b)前記被験体に、12~40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、(c)ミオスタチンmRNA転写物内のエクソン2の転写を阻害するステップと、(d)選択した時間以後、前記被験体におけるミオスタチンタンパク質レベルを測定するステップと、(e)(d)で測定された前記レベルを使用して前記の投与を反復するステップであって、投与されるアンチセンスオリゴマーの量の用量または投薬スケジュールを調整するステップとを含み、前記被験体におけるミオスタチンタンパク質の前記レベルが、前記アンチセンスオリゴマーの投与後に低下し、前記被験体が、前記被験体においてジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与されている、方法を含む。

10

【0051】

多様な態様は、ジストロフィンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得るジストロフィン遺伝子における変異を有する被験体においてデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の進行を阻害する方法であって、前記被験体に、17~40サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、前記アンチセンスオリゴマーが、前記エクソンのスキッピングを誘導し、前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、前記被験体が、前記被験体におけるミオスタチンの活性および発現のうち的一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーの進行を阻害する、方法を含む。

20

30

【0052】

多様な態様は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの進行を阻害する方法であって、被験体に、12~40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、前記被験体が、前記被験体においてジストロフィン発現を増加させるジストロフィン治療剤を投与され、それによりデュシェンヌ型筋ジストロフィーの進行を阻害する、方法を含む。

40

【0053】

多様な態様および実施形態は、アンチセンスオリゴマーの3'末端または5'末端にコンジュゲートするアルギニンに富むペプチド配列をさらに含むアンチセンスオリゴマーを含み、前記アルギニンに富むペプチド配列が、配列番号3486~3501から選択される配列を含む。

【0054】

多様な態様は、17~40サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含むアンチセンスオリゴマーであって、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含む、ジストロフィンを標的とする前記オリゴマー

50

と；12～40サブユニットを含み、ヒトミオスタチンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含むアンチセンスオリゴマーであって、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含む、ミオスタチンを標的とする前記オリゴマーとを含む組成物を含む。

【0055】

多様な態様および実施形態は、ジストロフィン治療剤とミオスタチン治療剤を被験体に投与するステップを含み、前記被験体が、7歳またはこれを超える小児患者である。

【0056】

多様な態様および実施形態は、ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できるアンチセンスオリゴマーによって処置され得る遺伝子変異を有する被験体においてジストロフィン発現をモジュレートするための方法であって、

前記被験体に、17～40サブユニットを含み、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソンを含む12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列をさらに含む、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、

前記オリゴマーが、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットを含み、

前記被験体が、前記被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を阻害するミオスタチン治療剤を投与されている、方法を含む。

【0057】

DMDおよび関連障害を有する被験体において筋肉量をモジュレートする方法をさらに含む多様な態様および実施形態が提供される。

【0058】

別の態様では、本開示は、DMDを有する患者を処置するための方法であって、被験体に、本明細書に記載されるいずれかのジストロフィン治療剤および本明細書に記載されるいずれかのミオスタチン治療剤の一方または両方を投与し、それによりDMDを処置するステップを含む方法を提供する。患者は、例えばエクソンスキッピングを誘導できるオリゴヌクレオチドを使用してエクソンスキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する患者であり得る。一部の実施形態では、患者はエクソン51スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。一部の実施形態では、患者はエクソン53スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。一部の実施形態では、患者はエクソン45スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。一部の実施形態では、患者はエクソン44スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。一部の実施形態では、患者はエクソン52スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。一部の実施形態では、患者はエクソン50スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。一部の実施形態では、患者はエクソン8スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。一部の実施形態では、患者はエクソン55スキッピングされ得るDMD遺伝子における変異を有する。

【0059】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載されるジストロフィン治療剤のいずれか1または複数と、本明細書に記載されるミオスタチン治療剤のいずれか1または複数とを含む組成物(例えば医薬組成物)を提供する。

【0060】

本明細書に記載される方法または組成物の一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤はエテプリルセンである。

【0061】

本明細書に記載される方法または組成物の一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤は、配列番号927に明示された配列を含まず、それからならない。

【0062】

本明細書で記載される方法または組成物の一部の実施形態では、ジストロフィン[®]はヒトジストロフィンである。本明細書で記載される方法または組成物の一部の実施形態では、ミオスタチンはヒトミオスタチンである。本明細書で記載される方法または組成物の一部の実施形態では、被験体はヒトである。

【0063】

本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、被験体はヒト（例えばヒト患者）である。本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、被験体は男性被験体である。本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、被験体は小児患者である。本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、患者は7歳またはこれを超える。本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、患者は少なくとも7歳であるが、約21歳未満である。

10

【0064】

本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤およびミオスタチン治療剤の一方または両方は、例えば静脈内投与により被験体に全身的に送達される。本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤は、被験体に全身的に送達される。本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、被験体に全身的に送達される。

20

【0065】

本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤およびミオスタチン治療剤の一方または両方は、被験体に慢性的に投与される。例えば、本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、治療剤の一方または両方は、各々独立に、毎日、毎週、毎月、2週に1回または2カ月に1回投与され得る。本明細書で記載される方法または組成物のいずれかの一部の実施形態では、治療剤の一方または両方の治療有効量は、各々独立に、単回用量（例えば週1回用量）として、または複数回用量（例えば2回またはこれを超える、例えば3、4、5、6または7回用量）として、処置期間内に、例えば週1回（毎週）または週2回被験体に送達することができる。

30

【0066】

本明細書で記載される方法のいずれかの一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤は1回目に投与され、ミオスタチン治療剤は2回目に投与される。例えば、ジストロフィン治療剤（例えばエテプリルセン）は、ミオスタチン治療剤を被験体に投与する前に、1回目に、被験体の筋細胞内でジストロフィン産生を増加させるのに十分な量および期間投与され得る。したがって、一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤（例えばエテプリルセン）は、ミオスタチン治療剤を投与する前に、週1回、ある期間（例えば6カ月、1年、18カ月、2年またはこれを超える）、被験体の体重1kgあたり約30mgで被験体に投与され、被験体の筋細胞内でジストロフィン発現が増加する。一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤（例えばエテプリルセン）は、ミオスタチン治療剤を投与する前に、週1回、ある期間（例えば6カ月、1年、18カ月、2年またはこれを超える）、被験体の体重1kgあたり約30~約50mgで、被験体に投与され、被験体の筋細胞におけるジストロフィン発現が増加する。本明細書で記載される方法のいずれかの一部の実施形態では、ミオスタチン治療剤は1回目に投与され、ジストロフィン治療剤は2回目に投与される。

40

【0067】

一部の実施形態では、本明細書で記載される組成物および方法に使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物は、細胞透過性ペプチドを含まない。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1A】図1Aは、リンカーを付加するための、5'末端における修飾オリゴマーを例

50

示する。

【図 1 B】図 1 B は、細胞透過性ペプチド (CPP) にコンジュゲートしたアンチセンスオリゴヌクレオチドを例示する。

【図 1 C】図 1 C は、細胞透過性ペプチド (CPP) にコンジュゲートしたアンチセンスオリゴヌクレオチドを例示する。

【図 1 D - G】図 1 D、1 E、1 F および 1 G は、例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを例示する。

【0069】

【図 2 A】図 2 A は、トリチルピペラジンフェニルカルバメートの調製を例示する。

【図 2 B】図 2 B は、樹脂 / 試薬混合物の調製を例示する。

【0070】

【図 3 A】図 3 A は、ヒト横紋筋肉腫 (RD) 細胞における、ミオスタチンエクソン 2 のスキッピングの RT - PCR 産物のゲル電気泳動を例示する。

【図 3 B】図 3 B は、RD 細胞における、ミオスタチンエクソン 2 のスキッピング効率 (%) を例示する。

【0071】

【図 4 A】図 4 A は、RD 細胞における、ミオスタチンエクソン 2 のスキッピングの RT - PCR 産物のゲル電気泳動を例示する。

【図 4 B】図 4 B は、ミオスタチンエクソン 2 のスキッピングの相対的デンストメトリー分析を例示する。

【0072】

【図 5 A】図 5 A は、C2C12 および H2Kb^{m d} × 細胞における、ミオスタチンエクソン 2 のスキッピングを例示する。

【図 5 B】図 5 B は、RT - PCR 産物のデンストメトリー分析、C2C12 細胞におけるミオスタチンエクソン 2 のスキッピング効率 (%) を例示する。

【図 5 C】図 5 C は、RT - PCR 産物のデンストメトリー分析、H2Kb^{m d} × 細胞におけるミオスタチンエクソン 2 のスキッピング効率 (%) を例示する。

【0073】

【図 6 A】図 6 A は、前脛骨 (TA) 筋におけるミオスタチンエクソン 2 のスキッピングのゲル電気泳動産物を例示する。

【図 6 B】図 6 B は、体重に対して正規化した筋肉量を例示する。

【図 6 C】図 6 C は、ミオスタチンエクソン 2 のスキッピングの RT - PCR 産物のデンストメトリー分析を例示する。

【0074】

【図 7 A】図 7 A は、m d x マウス筋肉におけるミオスタチンエクソン 2 のスキッピングのゲル電気泳動を例示する。

【図 7 B】図 7 B は、m d x マウスにおけるミオスタチンエクソン 2 のスキッピングの RT - PCR 産物のデンストメトリー分析を例示する。

【図 7 C】図 7 C は、m d x マウスにおける、初期体重に対して正規化した筋肉重量を例示する。

【図 7 D】図 7 D は、m d x マウスにおける、最終体重に対して正規化した筋肉重量を例示する。

【0075】

【図 8 A】図 8 A は、10 mg / kg の B P M O を投与された m d x マウスにおける体重の増加を例示する。

【図 8 B】図 8 B は、10 mg / kg の B P M O を投与された m d x マウスにおける筋肉量の増加を例示する。

【図 8 C】図 8 C は、20 mg / kg の B P M O を投与された m d x マウスにおける体重の増加を例示する。

【図 8 D】図 8 D は、20 mg / kg の B P M O を投与された m d x マウスにおける筋肉

10

20

30

40

50

量の増加を例示する。

【0076】

【図9A】図9Aは、10mg/kgのBPMOを投与されたmd x マウスの握力試験を例示する。

【図9B】図9Bは、20mg/kgのBPMOを投与されたmd x マウスの握力試験を例示する。

【図9C】図9Cは、10mg/kgのBPMOを投与されたmd x マウスにおけるTA筋の電気生理学的試験を例示する。

【0077】

【図10A】図10Aは、横隔膜(DIA)におけるミオスタチンエクソン2のスキッピングのRT-PCR産物のゲル電気泳動を例示する。

【図10B】図10Bは、DIAにおけるミオスタチンエクソン2のスキッピングのRT-PCR産物のデンシトメトリー分析を例示する。

【図10C】図10Cは、TAにおけるミオスタチンエクソン2のスキッピングのRT-PCR産物のゲル電気泳動を例示する。

【図10D】図10Dは、TAにおけるミオスタチンエクソン2のスキッピングのRT-PCR産物のデンシトメトリー分析を例示する。

【0078】

【図11A】図11Aは、食塩水(陽性対照)を投与された若齢のジストロフィーマウスC57BL10、食塩水(陰性対照)を投与されたmd x マウス、BPMO-M23D(10mg/kg)を投与されたmd x マウス、BPMO-M23D(10mg/kg)およびBPMO-MSTN(10mg/kg)を投与されたmd x マウス、または、BPMO-MSTN(10mg/kg)を投与されたmd x マウスの初期重量に対して正規化した体重を例示する。統計解析は、毎週全ての群を比較する一方向分散分析およびボンフェローニ事後検定により行った。エラーバーは、SEMを表す。

【図11B】図11Bは、食塩水(陽性対照)を投与された若齢のジストロフィーマウスC57BL10、食塩水(陰性対照)を投与されたmd x マウス、BPMO-M23D(10mg/kg)を投与されたmd x マウス、BPMO-M23D(10mg/kg)およびBPMO-MSTN(10mg/kg)を投与されたmd x マウス、または、BPMO-MSTN(10mg/kg)を投与されたmd x マウスにおけるマウス前肢握力分析を例示する。

【0079】

【図12A】図12Aは、エクソンスキッピングによるジストロフィンRNA再フレーミング(reframing)の定量を例示する。

【図12B】図12Bは、イムノプロット法によるジストロフィンタンパク質発現の定量を例示する。

【図12C】図12Cは、ミオスタチンエクソン2のスキッピングの定量を例示する。

【0080】

【図13A】図13Aは、若齢のジストロフィンマウスのTAにおける、最小フェレー径の変動係数を示す。

【図13B】図13Bは、若齢のジストロフィンマウスのTA筋における、中心核線維のパーセンテージを例示する。

【0081】

【図14A】図14Aは、md x マウスにおける体重の増加を例示する。

【図14B】図14Bは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmd x マウスにおける筋肉量の増加を例示する。

【図14C】図14Cは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmd x マウスにおける前肢握力分析を例示する。

【図14D】図14Dは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmd x マウスにおける*in situ*での電気生理学的測定を例示す

10

20

30

40

50

る。

【0082】

【図15A】図15Aは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmdxマウスの筋肉におけるエクソスキッピングによる、ジストロフィンRNA再フレーミングを示すゲル電気泳動を例示する。

【図15B】図15Bは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmdxマウスにおける、RT-PCR産物の相対的デンシトメトリー分析を例示する。

【0083】

【図16A】図16Aは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmdxマウスから回収した筋肉におけるジストロフィンタンパク質発現を例示する。

【図16B】図16Bは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmdxマウスから回収した筋肉における、ジストロフィンタンパク質発現の相対的デンシトメトリー定量を例示する。

【0084】

【図17A】図17Aは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmdxマウスの筋肉における、ミオスタチンのスキッピングの可変性を示すゲル電気泳動を例示する。

【図17B】図17Bは、BPMO-M23DまたはBPMO-M23D+BPMO-MSTNを投与されたmdxマウスにおける、ミオスタチンのスキッピングのRT-PCR産物の相対的デンシトメトリー分析を例示する。

【0085】

【図18A】図18Aは、マウスあたり15回の読取値による、マウス握力試験を例示する。

【図18B】図18Bは、マウスあたり15回の読取値から3つの平均値を採った、マウス握力試験を例示する。

【図18C】図18Cは、マウスあたりの3つの最高の読取値を採った、マウス握力試験を例示する。

【発明を実施するための形態】

【0086】

詳細な説明

以下の説明は、本質的に、単に例示的なものであり、本発明、その応用またはその使用を限定することを意図しない。図面全体を通じて、対応する参照番号は、類似または対応する部分および特徴を示すことを理解すべきである。本発明の多様な実施形態において示される具体例の記載は、説明のみを意図するものであり、本明細書で開示される発明の範囲を限定することを意図しない。さらに、述べられた特徴を有する複数の実施形態の説明は、さらなる特徴を有する他の実施形態、または述べられた特徴の異なる組合せが組み込まれた他の実施形態を除外することを意図しない。

【0087】

さらに、本発明の多様な実施形態の詳細な説明は、例示として多様な実施形態を示す添付の図面を参照する。これらの実施形態は、当業者が本発明を実施することを可能にするのに十分詳細に記載されているが、他の実施形態が実現される可能性があり、本発明の思想および範囲から逸脱することなく、論理的および機構的変更をなし得ることを理解すべきである。このように、本明細書の詳細な説明は、限定を目的としてではなく、説明のみを目的として提示される。例えば、説明において挙げられるステップもしくは機能、いかなる方法、システムまたはプロセスも、いかなる順序で実施してもよく、提示される順序に限定されない。さらに、ステップまたはその機能のいずれかを、1または複数の第三者に外注または実行させてもよい。さらに、単数形へのいかなる言及も、複数の実施形態を含み、1つを超える構成要素に対するいかなる言及も、単数の実施形態を含み得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

I . 定 義

【 0 0 8 9 】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される、全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で記載される方法および材料と同様または同等な、任意の方法および材料を、本開示の主題の実施または試験において使用しうが、好ましい方法および材料について記載する。本開示の目的で、下記では、以下の用語について規定する。

【 0 0 9 0 】

本明細書では、冠詞の「1つの(a)」および「1つの(an)」を、冠詞の文法的対象物の1つまたは1つを超える対象物(すなわち、少なくとも1つの対象物)を指すのに使用する。例を目的として述べると、「ある要素」とは、1つの要素または1つを超える要素を意味する。

10

【 0 0 9 1 】

用語「約」は、基準の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%ほど変動する、数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。数値範囲に関して用語「約」を使用するとき、それは明示された数値の上下限値を拡張することによりその範囲を修正する。一般に、用語「約」は、述べられた値の上下10%の変動により数値を修飾することを意図する。

20

【 0 0 9 2 】

本開示を通して、文脈によりそうでないことが要請されない限り、「~を含む」、「~を含むこと」という語は、言明されるステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群の包含を含意するが、他の任意のステップもしくは要素またはステップもしくは要素の群の除外は含意しないことが理解されるであろう。

【 0 0 9 3 】

用語「~からなること」は、「~からなること」という語句に後続するあらゆる語句を含み、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「~からなること」という語句は、列挙される要素が要請されるかまたは必須であり、他の要素は存在しえないことを指し示す。用語「~から本質的になること」は、この語句の後に列挙される任意の要素を含み、かつ、列挙される要素について、本開示で指定される活性または作用に干渉または寄与しない、他の要素に限定されることを意味する。したがって、「~から本質的になること」という語句は、列挙される要素が要請されるかまたは必須であるが、他の要素は任意選択であり、それらが列挙される要素の活性または作用に、実質的に影響を及ぼすかどうかに応じて、存在してもよく、存在しなくてもよいことを示す。

30

【 0 0 9 4 】

「~を投与すること」または「~を投与する」という用語は、本開示の修飾アンチセンスオリゴマーを含む治療剤の、被験体への、局所投与または全身投与による送達を含む。投与は、局所投与(眼投与、ならびに膣送達および直腸送達を含む、粘膜への投与を含む)、例えば、噴霧器による投与を含む、粉末またはエアゾールによる吸入または送気による、肺投与、気管内投与、鼻腔内投与、表皮投与および経皮投与、経口投与、または非経口投与でありうる。非経口投与は、静脈内注射もしくは静脈内注入、動脈内注射もしくは動脈内注入、皮下注射もしくは皮下注入、腹腔内注射もしくは腹腔内注入、または筋内注射もしくは筋内注入;あるいは頭蓋内投与、例えば、髄腔内投与または脳室内投与を含む。

40

【 0 0 9 5 】

本発明で使用される「共投与」または「共投与すること」または「併用療法」は、一般的には、本明細書で開示される1または複数のミオスタチン治療用化合物と組み合わせた、DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与を指す。言い換えると、用語「共投与すること」または「共投与」または「併用療法」は、薬学的に許容さ

50

れる下記の剤形で、本明細書で開示される1または複数のミオスタチン治療用化合物および任意選択で1または複数の糖質コルチコイドと同時にDMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えばエテプリルセンを投与することを意味する：(i) DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えばエテプリルセンと、本明細書で開示される1または複数のミオスタチン治療用化合物と、任意選択で1または複数の糖質コルチコイドおよび薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を意味する、同じ剤形、例えば同じ錠剤または医薬組成物；(ii) 投与方法が同じ別々の剤形、例えば、DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えばエテプリルセンおよび薬学的に許容される担体を含む非経口投与に適する第1の医薬組成物と、本明細書で開示される1または複数のミオスタチン治療用化合物および薬学的に許容される担体を含む非経口投与に適する第2の医薬組成物と、任意選択で、本明細書で開示される1または複数の糖質コルチコイドおよび薬学的に許容される担体を含む非経口投与に適する第3の医薬組成物とを含むキット、ならびに(iii) 投与方法が異なる別々の剤形、例えば、DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えばエテプリルセンおよび薬学的に許容される担体を含む非経口投与に適する第1の医薬組成物と、本明細書で開示される1または複数のミオスタチン治療用化合物および薬学的に許容される担体を含む経口投与に適する第2の医薬組成物と、任意選択で、本明細書で開示される1または複数の糖質コルチコイドおよび薬学的に許容される担体を含む経口投与に適する第3の医薬組成物とを含むキット。

10

20

30

40

50

【0096】

さらに、本開示の利益を受ける当業者は、本明細書で開示される1つを超えるミオスタチン治療用化合物が投与される時、当該薬剤は、同じ投与方法を共有する必要はなく、例えばDMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えばエテプリルセンおよび薬学的に許容される担体を含む非経口投与に適する第1の医薬組成物と、本明細書で開示される第1のミオスタチン治療用化合物および薬学的に許容される担体を含む経口投与に適する第2の医薬組成物と、本明細書で開示される第2の非ステロイド性抗炎症性化合物および薬学的に許容される担体を含む非経口投与に適する第3の医薬組成物とを含むキットがあり得ると察知するであろう。当業者は、「共投与すること」または「共投与」に関して上で言及された同時投与が、DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物とミオスタチン治療用化合物を含む医薬組成物が、同じスケジュールに従い、すなわち同じ時間および日に、または異なるスケジュール、すなわち異なるが必ずしも明確に区別されないスケジュールに従い投与され得ることを意味すると察知するであろう。

【0097】

そのことに関して、DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物と、ミオスタチン治療用化合物を含む医薬組成物とが、異なるスケジュールに従い投与される時、かかる異なるスケジュールは、本明細書では「バックグラウンド」または「バックグラウンド投与」と称する場合もある。例えば、DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物が1日2回、ある特定の剤形で投与され得、またミオスタチン治療用化合物を含む医薬組成物が1日1回投与され得、ゆえに、1日の投与のうちの1つの間に、DMDエクソスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物が、ミオスタチン治療用化合物を含む医薬組成物と、必ずではないが同時に投与され得る。もちろん、「共投与すること」、「共投与」または「併用療法」に対する他の適切な変形は、本開示の利益を受ける当業者に容易に明らかであり、またこの用語の意味の一部である。

【0098】

本明細書で使用される「慢性投与」は、持続的、定期的、長期的な治療的投与、すなわち実質的な中断のない定期的投与を指す。例えば、患者において筋ジストロフィーを処置する目的で、少なくとも数週間または数カ月または数年間、毎日の投与である。例えば、患者において筋ジストロフィーを処置する目的で、少なくとも数カ月または数年間、毎週

の投与である（例えば少なくとも6週間で毎週、少なくとも12週間で毎週、少なくとも24週間で毎週、少なくとも48週間で毎週、少なくとも72週間で毎週、少なくとも96週間で毎週、少なくとも120週間で毎週、少なくとも144週間で毎週、少なくとも168週間で毎週、少なくとも180週間で毎週、少なくとも192週間で毎週、少なくとも216週間で毎週、または少なくとも240週間で毎週）。ある特定の実施形態では、DMDエクソスキッピング化合物、例えばエテプリルセンは、本明細書で開示されるミオスタチン治療用化合物と組み合わせて、静脈内注入により毎週1回、30 mg/kgで慢性投与される。

【0099】

「細胞を接触させること」、「導入すること」、または「送達すること」という用語は、本開示の治療剤の、細胞への、当技術分野で慣例的な方法（例えば、トランスフェクション（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム、ポリエチレンイミン）、電気穿孔（例えば、ヌクレオフェクション）、マイクロインジェクション）が挙げられる）による送達を含む。

10

【0100】

「アルキル」という用語は、直鎖状（すなわち、非分枝状または非環式）、分枝状、環式、または多環式非芳香族の炭化水素基であって、任意選択で、1または複数の官能基により置換された炭化水素基を指す。そうでないことが指定されない限りにおいて、「アルキル」基は、1～8個の炭素原子を含有し、好ましくは、1～6個の炭素原子を含有する。C₁～C₆アルキルとは、少なくともC₁アルキル基、C₂アルキル基、C₃アルキル基、C₄アルキル基、C₅アルキル基、およびC₆アルキル基を含むことを意図する。低級アルキルとは、1～6個の炭素原子を含有するアルキル基を指す。アルキルの例は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロブチル、ペンチル、イソペンチル、tert-ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、シクロヘキシルなどを含むがこれらに限定されない。アルキルは、置換アルキルの場合もあり、非置換アルキルの場合もある。例示的な置換アルキル基は、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2-フルオロエチル、3-フルオロプロピル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、3-ヒドロキシプロピル、ベンジル、置換ベンジル、フェネチル、置換フェネチルなどを含むがこれらに限定されない。

20

30

【0101】

「アルコキシ」という用語は、アルキルのサブセットであって、上記で規定した、表示の数の炭素を伴うアルキル基が、酸素架橋を介して結合しているサブセットを指す。例えば、「アルコキシ」とは、直鎖状立体配置、分枝状立体配置、環式立体配置である、1～8個の炭素原子を含有する-O-アルキル基を指す。「アルコキシ」の例は、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、i-プロポキシ、t-ブトキシ、n-ブトキシ、s-ペントキシなどを含むがこれらに限定されない。

【0102】

単独で、または「アラルキル」、「アラルコキシ」、または「アリーロキシアルキル」における通り、より大型の部分の一部として使用される「アリール」という用語は、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントラシル、および2-アントラシルなど、6～14個の環原子を有する芳香環基を指す。「アリール」環は、1または複数の置換基を含有しうる。「アリール」という用語は、「アリール環」という用語と互換的に使用することができる。「アリール」はまた、芳香環を1または複数の環へと縮合させた、縮合多環式芳香環系も含む。有用なアリール環基の非限定的な例は、フェニル、ヒドロキシフェニル、ハロフェニル、アルコキシフェニル、ジアルコキシフェニル、トリアルコキシフェニル、アルキレンジオキシフェニル、ナフチル、フェナントリル、アントリル、フェナントロなどのほか、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントラシル、および2-アントラシルを含む。本明細書で使用される「アリール」という用語の範囲内にはまた、芳香環を1または複数の非芳香環へと縮合させた基であって、ラジカルまたは結合点が芳香環

40

50

上にある、インダニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロナフチルなどにおける基も含まれる。

【0103】

「アシル」という用語は、C(O)R基(式中、Rは、上記で規定したH、アルキル、またはアリアルを意味する)を指す。アシル基の例は、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、フェニルアセチル、および類似の基を含む。

【0104】

「同族化合物」という用語は、同じ化学基の逐次的付加により規則的に異なる化合物を指す。例えば、化合物の同族化合物は、1または複数の-CH₂-基、アミノ酸残基、ヌクレオチド、またはヌクレオチド類似体の付加により異なりうる。

10

【0105】

「細胞透過性ペプチド」(CPP)または「細胞取込みを増強するペプチド部分」という用語は、互換的に使用され、「輸送ペプチド」、「担体ペプチド」、または「ペプチド導入ドメイン」ともまた呼ばれる、カチオン性細胞透過性ペプチドを指す。例えば、ペプチドコンジュゲートホスホルアミデートまたはホスホロジアミデートモルホリノ(PPMO)は、本明細書で記載される、細胞取込みを増強する細胞透過性ペプチドまたは細胞透過性ペプチド部分を含みうる。多様な実施形態では、ペプチドは、修飾アンチセンスオリゴマーに共有結合させることができる。さらなる実施形態では、ペプチドは、修飾アンチセンスオリゴマーの3'末端または5'末端にコンジュゲートさせることができる。さらなる実施形態では、ペプチドは、3'末端のモルホリン環のピペラジニル部分または窒素原子へと連結することができる。一部の実施形態では、細胞取込みを増強する、細胞透過性ペプチドまたは細胞透過性ペプチド部分は、本明細書で記載される、アルギニンに富むペプチドを含みうる。非限定的な例において、本明細書で開示される通りの修飾アンチセンスオリゴマーは、(Arg)₆Gly(オリゴヌクレオチドに結合する6つのアルギニンおよび1つのグリシン)などのアルギニンに富むペプチドに結合することができる。

20

【0106】

本明細書で示されるペプチドは、全身投与されると、所与の細胞培養物集団の細胞のうちの約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、または少なくともほぼこれらの比率の細胞内の細胞透過を誘導し、*in vivo*において、複数の組織内の高分子のトランスロケーションを可能とする能力を有する。一部の実施形態では、CPPは、式-[C(O)CHR'NH]_mR''[式中、R'は、天然に存在するアミノ酸、またはその1炭素同族化合物もしくは2炭素同族化合物の側鎖であり、R''は、水素またはアシルから選択され、mは、最大で50の整数である]を有する。当技術分野では、さらなるCPPも周知であり、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国出願公開第20100016215号において開示されている。他の実施形態では、mは、1~50から選択される整数であり、ここで、mが1である場合、部分は、単一のアミノ酸またはその誘導体である。

30

【0107】

「アミノ酸」という用語は、一級アミノ基、カルボン酸基、側鎖、および水素原子が結合している炭素原子を含む化合物を指す。例えば、「アミノ酸」という用語は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン、グルタミン、リシン、アスパラギン酸、ヒスチジン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、システイン、グルタミン酸、セリン、チロシン、ピロリシン、セレノシステイン、およびアルギニンを含むがこれらに限定されない。加えて、本明細書で使用される「アミノ酸」はまた、エステル、およびアミド、および塩など、アミノ酸の誘導体のほか、活性形態へと代謝されると薬理学的特性を有する誘導体を含む、他の誘導体も含む。したがって、「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸を含むことが理解される。

40

【0108】

「電子対」という用語は、他の原子と結合しないかまたは共有されていない、電子の原

50

子価対を指す。

【0109】

「相同性」という用語は、2つもしくはこれを超えるアミノ酸配列または2つもしくはこれを超えるヌクレオチド配列の類似性の量または程度を指す。いくつかの例において、配列相同性には、1または複数の保存的置換であって、対象タンパク質の基本的な構造または機能に影響を及ぼさない当該1または複数の置換が含まれ得る。保存的ヌクレオチド置換には、1つの核酸の別の核酸への置換であって、そのコドンによりコードされるアミノ酸を変化させない置換が含まれ得る。保存的アミノ酸置換には、1つのアミノ酸の別のアミノ酸への置換であって、置換されたアミノ酸が置換をするアミノ酸と同じまたは類似の分類に属する置換、例えばある脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸による置換が含まれ得る。相同性は、GAPなどの配列比較プログラムを使用して決定することができる（Deverauxら、1984年、Nucleic Acids Research、12巻、387～395頁）。このようにして、本明細書で引例される配列と、類似の長さまたは実質的に異なる長さの配列を、アラインメントへのギャップの挿入により比較することができ、このようなギャップを、例えば、GAPにより使用される比較アルゴリズムにより決定する。

10

【0110】

「単離された」という用語は、その生来の状態では通常それに随伴する成分を、実質的または本質的に含まない材料を指す。例えば、本明細書で使用される「単離オリゴヌクレオチド」または「単離オリゴマー」とは、天然に存在する状態ではそれを挟む配列から精製されるかまたは取り出されたオリゴマー、例えば、ゲノム内の断片に隣接する配列から取り出されたDNA断片を指す場合がある。細胞に関する場合の、「～を単離すること」という用語は、細胞（例えば、線維芽細胞、リンパ芽球）の、供給源となる被験体（例えば、オリゴヌクレオチドリピート病を伴う被験体）からの精製を指してもよい。mRNAまたはタンパク質の文脈では、「～を単離すること」とは、mRNAまたはタンパク質の、供給源、例えば、細胞からの回収を指してもよい。

20

【0111】

「～をモジュレートする」という用語は、1または複数の定量化可能なパラメータを、任意選択で、規定された量および/または統計学的に有意な量で「増加」または「減少」させることを含む。「～を増加させる」もしくは「～を増加させること」、「～を増強する」もしくは「～を増強すること」、または「～を刺激する」もしくは「～を刺激すること」とは、一般に、1もしくは複数の修飾アンチセンスオリゴマー化合物もしくは組成物、および/または、1もしくは複数の治療剤が、細胞または被験体において、アンチセンスオリゴマー化合物および/もしくは治療剤を伴わずに引き起こされる応答、または対照化合物により引き起こされる応答と比べて、より大きな生理学的応答（例えば下流における効果）をもたらすかまたは引き起こす能力を指す。関係のある生理学的応答または細胞応答（*in vivo*または*in vitro*）は、当業者には明らかであり、ミオスタチンmRNAにおけるエクソン2の包含の減少（もしくはエクソン2の除外の増加）、および/または、例えばそれを必要とする被験体の細胞もしくは組織における機能的なミオスタチンタンパク質の発現の減少を含み得る。他の関係のある生理学的応答または細胞応答（*in vivo*または*in vitro*）は、ジストロフィンmRNAにおける遺伝子変異を有する1または複数のエクソンの包含の減少（もしくは除外の増加）、および/または、細胞もしくは組織における、機能的もしくは半機能的なジストロフィンタンパク質の発現の増加を含み得る。「減少された」または「低減された」量とは、典型的には、「統計学的に有意な」量であり、修飾アンチセンスオリゴマー化合物および/もしくは治療剤の投与の非存在下で、それを必要とする被験体によりもたらされる量（例えば特定の被験体またはコホートの、「生来」または「自然」の発現率）または対照化合物によりもたらされる量と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50分の1またはこれ未満（例えば100、500、1000分の1）であって、全ての整数およびそれらの間にあり1より大きい小数（decimal point

30

40

50

) (例えば1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9を含む) 分数の減少を含み得る。「~を低減する」または「~を阻害する」という用語は一般に、1もしくは複数のアンチセンスオリゴマー化合物もしくは組成物、および/または、1もしくは複数の治療剤が、本明細書に記載される疾患または状態の症状などの関係のある生理学的応答または細胞応答であって、診断技術分野で慣例的な技法に従い、測定される応答を「減少させる」能力に関する場合がある。「増加した」または「増強された」量とは、典型的には、「統計学的に有意な」量であり、修飾アンチセンスオリゴマー化合物および/もしくは治療剤の非存在下でそれを必要とする被験体によりもたらされる量(例えば特定の被験体またはコホートの「生来の」または「天然の」発現率)または対照化合物によりもたらされる量と比較して、全ての整数およびそれらの間にあって1より大きい小数(例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9)を含めて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍またはこれを超える(例えば100、500、1000倍)増加を含み得る。「~を増強する」という用語は、一般に、1もしくは複数の修飾アンチセンスオリゴマー化合物もしくは組成物、および/または、1もしくは複数の治療剤が、本明細書に記載される疾患または状態の症状などの関係のある生理学的応答または細胞応答を、診断技術分野における慣例的な技法に従って測定したとき「増加させる」能力に関し得る。

【0112】

関係のある生理学的応答または細胞応答(*in vivo*または*in vitro*)は、当業者に明らかであり、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)および関連障害、例えばベッカー型筋ジストロフィー(BMD)、肢帯筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー、眼球咽頭筋ジストロフィー、末梢型筋ジストロフィー、エメリー・ドライフス筋ジストロフィー、筋肉消耗状態または障害、例えばAIDS、がんまたは化学療法関連の筋肉消耗、および線維症または線維症関連障害(例えば骨格筋線維症)などの症状または病変の減少を含み得る。他の実施形態では、例えば、症状または病変の軽減が、機能的なジストロフィンタンパク質の発現の増加および/または機能的なミオスタチンタンパク質の発現の減少に随伴するかまたはこれに関連し得る、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を処置する方法が提供される。応答の「増加」は、修飾アンチセンスオリゴマー化合物および/もしくは治療剤の投与の非存在下でそれを必要とする被験体によりもたらされる応答に比べて(例えば特定の被験体またはコホートの「生来の」または「天然の」発現率と比べて)または対照化合物と比べて「統計学的に有意」であり得、間にある全ての整数を含めて、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の増加を含み得る。

【0113】

本明細書で使用される用語「治療剤」(「*therapeutic*」または「*therapeutic agent*」)とは、治療効果を生じさせることができる薬剤を意味する。一部の実施形態では、治療剤は、ポリペプチド、ポリペプチド類似体、核酸、核酸類似体、アプタマーもしくは小分子であるか、またはそれらを含む。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、長さまたは翻訳後修飾に関係なく、交換可能に使用され、アミノ酸の任意のペプチド結合鎖を意味する。ポリペプチドは、野生型タンパク質、野生型タンパク質の機能的断片、または野生型タンパク質もしくは断片の変異体であってもよい。変異体は、1または複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入を含んでもよい。置換は保存的であっても、非保存的であってもよい。保存的置換には、典型的には、以下の群内の置換が含まれる: グリシンおよびアラニン; バリン、イソロイシンおよびロイシン; アスパラギン酸およびグルタミン酸; アスパラギン、グルタミン、セリンおよびトレオニン; リシン、ヒスチジンおよびアルギニン; ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。一部の実施形態では、タンパク質には抗体または可溶性受容体が含まれる。複数の実

施形態では、可溶性受容体はACVR2（例えばACVR2B）である。一部の実施形態では、核酸はタンパク質、例えばジストロフィン、マイクロジストロフィンまたはミニジストロフィンをコードするものである。複数の実施形態では、核酸はアンチセンスオリゴマーまたはsiRNAである。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは本明細書で記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーである。

【0114】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、2つの軽鎖ポリペプチドと2つの重鎖ポリペプチドとを含む全抗体を指す。全抗体は、IgM、IgG、IgA、IgDおよびIgE抗体を含む異なる抗体アイソタイプを含む。「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ化されたもしくはキメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類抗体、脱免疫原性（deimmunized）抗体および完全ヒト抗体を含む。抗体は、例えば、哺乳動物、例えばヒト、非ヒト霊長類（例えばオランウータン、マントヒヒまたはチンパンジー）、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、スナネズミ、ハムスター、ラットおよびマウスなどの種々の種のいずれかで作製でき、またはそれらに由来し得る。抗体は、精製された抗体または組換え抗体であり得る。

10

【0115】

本明細書で使用するとき、用語「抗体断片」、「抗原結合断片」または類似の用語は、標的抗原と結合し、標的抗原の活性を阻害する能力を保持する抗体の断片を指す。かかる断片は、例えば単鎖抗体、単鎖Fv断片（scFv）、Fd断片、Fab断片、Fab'断片またはF(ab')₂断片を含む。scFv断片は、scFvが由来する抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含む単一のポリペプチド鎖である。さらに、細胞内抗体（intrabodies）、低分子化抗体（minibodies）、三重特異性抗体（triabodies）および二重特異性抗体（diabody）も抗体の定義に含まれ、本明細書で記載される方法での使用に適する。例えば、Todorovskaら、（2001年）J Immunol Methods 248巻（1号）：47～66頁；HudsonおよびKortt（1999年）J Immunol Methods 231巻（1号）：177～189頁；Poljak（1994年）Structure 2巻（12号）：1121～1123頁；RondonおよびMarasco（1997年）Annual Review of Microbiology 51巻：257～283頁を参照されたい。これらの各々は参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。

20

【0116】

本明細書で使用するとき、用語「抗体断片」はまた、例えばラクダ化（camelized）された単ドメイン抗体などの単ドメイン抗体を含む。例えば、Muyldermansら（2001年）Trends Biochem Sci 26巻：230～235頁；Nuttallら（2000年）Curr Pharm Biotech 1巻：253～263頁；Reichmannら（1999年）J Immunol Meth 231巻：25～38頁；PCT出願公開第WO94/04678号および第WO94/25591号；ならびに米国特許第6,005,079号を参照されたい。これらの各々は参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本開示は、単ドメイン抗体が形成されるような修飾がなされた、2つのVHドメインを含む単ドメイン抗体を提供する。

30

【0117】

一部の実施形態では、抗原結合断片は、重鎖ポリペプチドの可変領域と軽鎖ポリペプチドの可変領域とを含む。一部の実施形態では、本明細書で記載される抗原結合断片は、抗体の軽鎖および重鎖ポリペプチドのCDRを含む。

40

【0118】

成長分化因子8（GDF-8）とも称されるミオスタチンは、トランスフォーミング成長因子ベータ（TGF-β）のスーパーファミリーに属する。ミオスタチンは、MSTN遺伝子によりコードされるタンパク質である。ミオスタチンのアミノ酸配列は、MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVI RQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDSSDGSLEDDDYHATTETITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSKIQYNKVVAQLWVILYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMPGTGIVQSDVKTVLQNWIKQPESNLGIEIKALDENGHDLAFTFPGPGEDG

50

LNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWI IAPKRYKANYCSGECEVFVLQKYPHTHLVH QANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQI IYGKIPAMVVDRCGCS (配列番号 3 5 0 2) である。M S T N 遺伝子は主にヒト骨格筋で発現し、筋肉の成長の負の制御因子として作用する。例えば、ミオスタチン遺伝子を欠くように操作したマウスは、正常なマウスの 2 倍の筋肉量の発達を示す (McPherron ら、(1997 年)、Nature 387 巻: 83 ~ 90 頁)。

【0119】

複数の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、被験体におけるミオスタチン活性およびミオスタチン発現の一方または両方を抑制できる。ミオスタチン治療剤は、ミオスタチンプレmRNAを標的とし、ミオスタチンプレmRNAの成熟mRNAへの転写に干渉する治療剤であってもよい。複数の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、ヒトミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソスキッピングを誘導できる。複数の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、ミオスタチンプレmRNAにおけるエクソン2のスキッピングを誘導し、エクソン2を含むミオスタチンプレmRNAの発現を阻害する。ミオスタチン治療剤は、ミオスタチンタンパク質を標的とし、ミオスタチン受容体とのミオスタチンタンパク質の結合に干渉する治療剤であってもよい。ミオスタチン治療用タンパク質は、抗ミオスタチン抗体、例えば、抗GDF8 (Abcam、ケンブリッジ、MA)、ドماغロズマブ (Domagrozumab) (PF-06252616、Pfizer Inc.); スタムルマブ (Stamulumab) (Cambridge Antibody Technology); PF-3446879 (Pfizer Inc.); ランドグロズマブ (Landogrozumab) (LY-2495655; Eli Lilly); またはトレボグルマブ (Trevogrumab) (REGN-103; Regeneron) であってもよい。複数の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、可溶性受容体がACVR2である可溶性受容体であってもよい (例えばACVR2B; MTAPWVAL ALLWGS L CAGSGRGEAETREC IYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWLDFFNCYDRQ ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLP I GGLSL I VLLAFWMYRHRKPPYG HVD I HEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLE I KARGRFGCVWKAQLMND FVAVK I FPLQDKQSWQSERE I FSTPGMKHENLLQF I AA EKRSNLEVELWL I TAFHDKGSLTDYLKGN I I TWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPS I AHRDFKSKNVL LKSDLTAVLADFG LA VRFEPGKPPGDTHGQVGTTRRYMAPEVLEGA I NFQRDAFLR I DMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVD EYMLPFEEE I GQHP SLEELQEVVHKKMRPT I KDHWLKHPLAQLCVT I EECWDHDAEARLSAGCVEERVSL I RRSVNGT TSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESS I ; 配列番号 3 5 0 3)。一部の実施形態では、可溶性受容体 (例えばACVR2B) は、異種性部分、例えば被験体において治療剤の循環半減期を増加させる部分とコンジュゲートする。一部の実施形態では、部分はイムノグロブリンのFc部分 (例えばヒトIgG Fc) である。一部の実施形態では、部分はポリエチレングリコール部分である。一部の実施形態では、部分はアルブミンポリペプチド (例えばヒトアルブミン) の全体または一部を含む。一部の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、ヒトACVR2-Fc融合体、例えばラマテルセプト (ramatercept) (Acceleron) である。ミオスタチン治療剤は、核酸がアンチセンスオリゴマーおよびsiRNAから選択される核酸を含む。アンチセンスオリゴマーは本明細書に記載される通りの修飾ミオスタチンアンチセンスオリゴマーであってもよい。一部の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、小分子、例えばOSX-200 (Ossianix Inc) またはSRK-015 (Scholar Rock Inc.) である。

【0120】

本明細書に記載される方法および組成物に有用なミオスタチンのアンタゴニストは、例えば、抗ミオスタチン抗体などのミオスタチンに直接結合する薬剤 (GDF-8) を含む。かかる抗体は当技術分野において公知であり、例えば国際特許出願公開第WO2006116269号 (Pfizer)、米国特許第8,066,996号 (Eli Lilly)、米国特許第7,807,159号 (Amgen)、米国特許第6,096,506号および米国特許第6,468,535号に記載されており、これらの各々の開示は参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。ミオスタチンアンタゴニストは、可溶性アクチビン (Activin) 受容体タンパク質または、可溶性アクチビタンバ

10

20

30

40

50

ク質を含む融合タンパク質（例えばACVR2-Fc融合タンパク質）も含む。可溶性アクチビン受容体タンパク質は、例えば、国際特許出願公開第WO2010129406号（ジョンズホプキンス大学）、米国特許出願公開第20090005308号（Acceleron）、国際特許出願公開第WO2008/097541号（Acceleron）および国際特許出願公開第WO2010019261号（Acceleron）に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ミオスタチンアンタゴニストは、短鎖干渉核酸（siNA）、短鎖干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、およびミオスタチンに対してRNA干渉（RNAi）を媒介できる短鎖ヘアピンRNA（shRNA）分子などの、ミオスタチンの発現を阻害する核酸である。かかる分子は、例えば米国特許出願公開第20050124566号および米国特許第7,887,793号に記載されており、これらの各々の開示は参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、例えばAbbott Laboratoriesへの米国特許第6,284,882号に記載されている通り、核酸はミオスタチンプロモーターを阻害し、それによりミオスタチン発現を阻害する。ミオスタチンの阻害剤は、その受容体を経るミオスタチンシグナリングを阻害する薬、例えば抗ACVR2B抗体を含む（例えば、米国特許出願公開第20100272734号（Novartis）および国際特許出願公開第WO2014172448号（Anaptysbio）を参照されたい）。ミオスタチンのさらなる例示的な阻害剤は、国際特許出願公開第WO2006/083183号に記載されている。

10

20

【0121】

一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤は1回目に投与され、ミオスタチン治療剤は2回目に投与される。例えば、ジストロフィン治療剤は、治療剤が投与される被験体の筋肉において機能的なジストロフィンタンパク質の発現を促進し、回復させ、および/または増加させるのに十分な時間投与される。次に、ミオスタチン治療剤は、例えば被験体における筋肉量、筋力、および/または弾力性を強化するのに十分な時間で被験体に投与される。複数の実施形態では、ジストロフィン治療剤は、被験体におけるジストロフィンの発現を増加させることができる。ジストロフィン治療剤は、ジストロフィンまたは機能的もしくは半機能的な切断型（truncated）ジストロフィンの発現を増加させ得る。切断型ジストロフィンは、マイクロジストロフィンおよびミニジストロフィンを含むが、これらに限定されない（参照によりその全体において本明細書に組み込まれる欧州特許第2125006号で開示されている）。ジストロフィン治療剤は、ジストロフィンプレmRNAを標的とし、ジストロフィンプレmRNAの成熟mRNA、例えば本明細書に記載される修飾アンチセンスオリゴマーへの転写をモジュレートする治療剤であってもよい。複数の実施形態では、ジストロフィン治療剤は、ヒトジストロフィンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソスキッピングを誘導できる。複数の実施形態では、標的とされるジストロフィンプレmRNAは、1または複数の遺伝子変異を有してもよい。ジストロフィン治療剤が、エクソスキッピングを誘導することにより、1または複数の遺伝子変異を含む1または複数のエクソンが、成熟mRNAへのプロセッシングの間、ジストロフィンプレmRNAから除去される。得られる切断型mRNAは、機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質に翻訳され得る。

30

40

【0122】

一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤は、機能的なジストロフィンタンパク質、例えばマイクロジストロフィンまたはミニジストロフィンタンパク質をコードする核酸であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、核酸はウイルス送達により被験体の筋細胞に導入される。一部の実施形態では、核酸からの機能的なジストロフィンタンパク質の発現は、筋肉特異的プロモーター、例えば筋肉クレアチンキナーゼ（MCK）のプロモーターにより駆動される。DMDの遺伝子治療のための、機能的なジストロフィンタンパク質を含むウイルスベクターの使用は、例えば、Shinら（2013年）Mol Ther 21巻（4号）：750～757頁；Rodino-Klapacら（2011年）Methods Mol Biol

50

709巻：287～298頁；Okadaら（2013年）Pharmaceuticals 6巻（7号）：813～836頁；Rodino-Klapacら（2010年）Mol Ther 18巻（1号）：109～117頁；Vincentら（1993年）Nature Genetics 5巻：130～134頁；Xuら（2007年）Neuromusc Disorders 17巻：209～220頁；Martinら（2009年）Am J Physiol Cell Physiol 296巻：476～488頁；国際特許出願公開第WO2009/088895号および米国特許出願公開第2010003218号および同第20140323956号に記載されており、これらの各々の開示は参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。当業者はまた、目的の細胞への導入遺伝子の送達に使用できる他のベクター系も熟知している（例えば米国特許第5,707,618号；Verhaartら（2012年）Curr Opin Neurol 25巻（5号）：588～596頁；Odomら（2011年）Mol Ther 19巻（1号）：36～45頁；およびKoppantiraら（2010年）Gene Ther 17巻（11号）：1355～1362）。機能的なジストロフィンタンパク質のトランスジェニック送達を評価している進行中の臨床試験は、例えば米国ClinicalTrials.gov識別番号NCT02376816（Nationwide Children's Hospital）およびNCT00428935（Nationwide Children's Hospital）、ならびにBowlesら（2012年）Mol Ther 20巻（2号）：443～455頁により記載された治験を含む。

10

【0123】

当業者であれば、ジストロフィン遺伝子における多様な変異が治療的なエクソスキッピングを受け得ることを熟知している。例えば、エクソン51スキッピングされ得る以下のエクソン中の変異の非限定的な例は、例えば45～50、47～50、48～50、49～50、50、52、52～63を含む（Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database、Leiden University Medical Center、オランダ）。患者がDMD遺伝子中に、エクソスキッピングされ得る変異を有するか否かを判定することも、十分に当業者の技量の範囲内である（例えば、Aartsma-Rusら（2009年）Hum Mut 30巻：293～299頁およびAbbsら（2010年）Neuromusc Disorders 20巻：422～427頁を参照されたい。これらの各々の開示は参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる）。

20

【0124】

エテプリルセン（例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる米国特許第7,807,816号を参照されたい）は、その安全性および効能を試験するための臨床試験の対象であり、また臨床開発が進行中である。エテプリルセンは、ホスホロジアミデートモルホリノ（PMO）アンチセンスオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤はエテプリルセンである。「AVN-4658」としても公知である「エテプリルセン」は、塩基配列5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG-3'（配列番号76）を有するPMOである。エテプリルセンは、CAS登録番号1173755-55-9として登録されている。化学名は、RNA、[P-デオキシ-P-（ジメチルアミノ）]（2',3'-ジデオキシ-2',3'-イミノ-2',3'-セコ）（2'a5'）（C-m5U-C-C-A-A-C-A-m5U-C-A-A-G-G-A-A-G-A-m5U-G-G-C-A-m5U-m5U-m5U-C-m5U-A-G）（配列番号263）、5'-[P-[4-[2-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エトキシ]カルボニル]-1-ピペラジニル]-N,N-ジメチルホスホンアミデート]およびP,2',3'-トリデオキシ-P-（ジメチルアミノ）-5'-O-（P-[4-(10-ヒドロキシ-2,5,8-トリオキサデカノイル)ピペラジン-1-イル]-N,N-ジメチルホスホンアミドイル}-2',3'-イミノ-2',3'-セコシチジリル-（2'a5'）-P,3'-ジデオキシ-P-（ジメチルアミノ）-2',3'-イミノ-2',3'-セコチミジリル-（2'a5'）-P,2',3'-トリデオキシ-P-（ジメチルアミノ）-2',3'-イミノ-2',3'-セコシチジリル-（2'a5'）-P,2',3'-トリデ

30

40

50

オキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコシチジリル -
 (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3'
 ' - イミノ - 2', 3' - セコアデニリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデ
 オキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコアデニリル -
 (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3'
 ' - イミノ - 2', 3' - セコシチジリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデ
 オキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコアデニリル -
 (2' a 5') - P, 3' - ジデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミ
 ノ - 2', 3' - セコチミジリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ -
 P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコシチジリル - (2' a
 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミ
 ノ - 2', 3' - セコアデニリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ -
 P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコアデニリル - (2' a
 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミ
 ノ - 2', 3' - セコグアニリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ -
 P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコグアニリル - (2' a
 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミ
 ノ - 2', 3' - セコアデニリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ -
 P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコアデニリル - (2' a
 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミ
 ノ - 2', 3' - セコグアニリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ -
 P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコアデニリル - (2' a
 5') - P, 3' - ジデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2'
 , 3' - セコチミジリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジ
 メチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコグアニリル - (2' a 5')
 - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2'
 , 3' - セコグアニリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジ
 メチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコシチジリル - (2' a 5')
 - P, 2', 3' - トリデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2'
 , 3' - セコアデニリル - (2' a 5') - P, 3' - ジデオキシ - P - (ジメチルア
 ミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコチミジリル - (2' a 5') - P, 3'
 ' - ジデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコチミ
 ジリル - (2' a 5') - P, 3' - ジデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3'
 ' - イミノ - 2', 3' - セコチミジリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデ
 オキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコシチジリル -
 (2' a 5') - P, 3' - ジデオキシ - P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミ
 ノ - 2', 3' - セコチミジリル - (2' a 5') - P, 2', 3' - トリデオキシ -
 P - (ジメチルアミノ) - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコアデニリル - (2' a
 5') - 2', 3' - ジデオキシ - 2', 3' - イミノ - 2', 3' - セコグアノシン
 を含む。

10

20

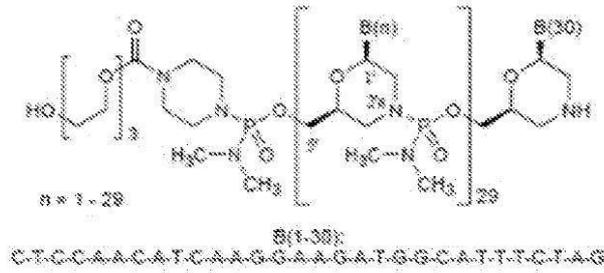
30

40

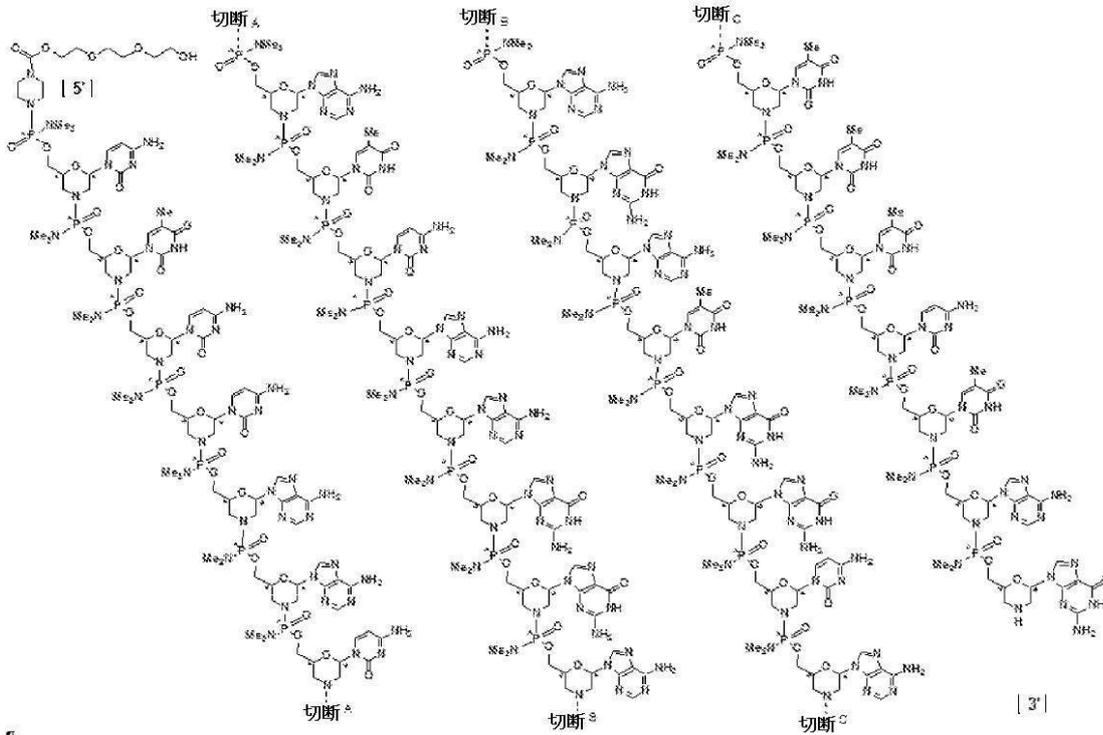
【0125】

エテプリルセンは、以下の構造を有する：

【化 3 1】



10



20

30

【 0 1 2 6】

「ジストロフィン」は、桿状の細胞質タンパク質であり、細胞膜を通じて筋線維の細胞骨格を周囲の細胞外マトリックスへ連結するタンパク質複合体の非常に重要な部分であり、ジストロフィン(すなわちDMD)遺伝子によりコードされる。ジストロフィンは、複数の機能的ドメインを含む。例えば、ジストロフィンは、アミノ酸14~240周辺にアクチン結合ドメインを、およびアミノ酸253~3040周辺に中央桿状ドメインを含む。この大型の中央ドメインは、アルファ-アクチニンおよびスペクトリンとの相同性を有する、約109のアミノ酸からなる24個のスペクトリン様の3重ヘリックスエレメントで形成される。その繰り返しは典型的には、4つのプロリンに富む非繰り返しセグメント(ヒンジ領域とも呼ばれる)により中断される。繰り返し15および16は、ジストロフィンのタンパク質分解切断のための主要部位を提供すると考えられる18アミノ酸の伸長部により分離される。ほとんどの繰り返し同士の配列同一性は、10~25%の範囲である。1つの繰り返しは3つのアルファ-ヘリックス: 1、2および3を含む。アルファ-ヘリックス1および3は各々、7つのヘリクスターンにより形成され、おそらく疎水性インタフェースを介してコイルドコイルとして相互作用している。アルファ-ヘリックス2はより複雑な構造を有し、4つおよび3つのヘリクスターンのセグメントにより形成され、グリシンまたはプロリン残基により分離される。各繰り返しは2つのエクソンによりコードされ、典型的にはアルファ-ヘリックス2の第1の部分におけるアミノ酸47と48との間のイントロンにより中断される。他のイントロンは、繰り返し中の異なる位置

40

50

に存在し、通常、ヘリックス - 3 上に点在する。ジストロフィンはまだ、アミノ酸 3080 ~ 3360 周辺に、粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) アルファ - アクチニンの C 末端ドメインとの相同性を示す、システインに富むセグメント (すなわち 280 のアミノ酸のうち 15 のシステイン) などのシステインに富むドメインを含む。カルボキシ末端ドメインは、アミノ酸 3361 ~ 3685 周辺に存在する。

【0127】

ジストロフィンのアミノ末端は F - アクチンと結合し、カルボキシ末端は筋細胞膜においてジストロフィン関連タンパク質複合体 (DAPC) と結合する。DAPC はジストログリカン、サルコグリカン、インテグリンおよびカベオリンを含み、これらの構成要素のいずれかにおける変異により、常染色体遺伝性の筋ジストロフィーが発症する。ジストロフィンが存在しない場合、DAPC は不安定化し、それにより構成タンパク質のレベルが低下し、その結果、段階的な線維損傷および膜漏出に至る。デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) およびベッカー型筋ジストロフィー (BMD) などの多様な型の筋ジストロフィーにおいて、主に誤ったスプライシングに至る遺伝子配列の変異に起因して、筋細胞は、変形され、機能的に不完全な形状のジストロフィンを産生するか、またはジストロフィンを全く産生しなくなる。不完全なジストロフィンタンパク質のプレドミナントな発現、またはジストロフィンもしくはジストロフィン様タンパク質の完全な欠乏は、上記のように筋変性の急速な進行につながる。この点に関して、「不完全な」ジストロフィンタンパク質は、当技術分野において公知のように、DMD または BMD を有する特定の被験体において産生されるジストロフィンの形状により、または、検出可能なジストロフィンの欠如により特徴付けられ得る。

10

20

【0128】

ジストロフィンタンパク質に関する「機能的」という用語は、野生型タンパク質とも称される、ジストロフィン遺伝子のエクソン 1 ~ 79 の全てに対応する配列を含む mRNA 転写物に由来するタンパク質を含む。機能的なジストロフィンタンパク質とは、DMD または関連障害を有するある特定の被験体に存在する変形されたまたは「不完全な」形状のジストロフィンタンパク質と典型的に比較して、低減しなければデュシェンヌ型筋ジストロフィーに特徴的である筋組織の段階的分解を低減するのに十分な生物学的活性を有するジストロフィンタンパク質を一般に指す。機能的なジストロフィンタンパク質は、当技術分野で慣例的な技法により測定した場合に、野生型ジストロフィンの *in vitro* または *in vivo* 生物学的活性の約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% または 100% (それらの間の全ての整数を含む) を有し得る。1つの例として、*in vitro* での筋肉培養物におけるジストロフィン関連活性は、筋管サイズ、筋原線維の組織化 (または分裂)、収縮活性およびアセチルコリン受容体の自発的なクラスタリングにより測定できる (例えば、Brown ら、*Journal of Cell Science*. 112 巻: 209 ~ 216 頁、1999 年を参照されたい)。動物モデルも疾患の病因を検討するための有用な資源であり、ジストロフィン関連活性を試験する手段を提供する。DMD 研究に最も広く使用されている動物モデルのうち 2 つは、mdx マウスおよびゴールドンレトリバー筋ジストロフィー (GRMD) イヌであり、いずれもジストロフィンネガティブである (例えば、Collins および Morgan、*Int J Exp Pathol* 84 巻: 165 ~ 172 頁、2003 年を参照されたい)。これらおよび他の動物モデルは、多様なジストロフィンタンパク質の機能的活性を測定するために使用できる。本発明のアンチセンスオリゴマー化合物のいくつかにより産生される形状などの切断型ジストロフィンも含まれる。

30

40

【0129】

「機能的な」または「半機能的な」ジストロフィンタンパク質という用語は、切断型の転写物に対応する配列を含む mRNA 転写物、例えばジストロフィン遺伝子のエクソン 1 ~ 79 のうち全てではないエクソンを有するジストロフィン mRNA 転写物に由来するタンパク質を含む。言い換えると、切断型のジストロフィン mRNA は、対応するジストロフィン遺伝子の 1 または複数のエクソンを除外し得る。切断型のジストロフィン mRNA

50

Aは、マイクロジストロフィンタンパク質とも称される、切断または短縮型のジストロフィンタンパク質を発現し得る。

【0130】

ミオスタチンタンパク質に関する「機能的な」という用語は、野生型タンパク質とも称される、ミオスタチン遺伝子のエクソン1、エクソン2およびエクソン3に対応する全ての配列を含むmRNA転写物に由来するタンパク質を含む。

【0131】

非機能的、機能不全、または不活性なミオスタチンタンパク質は、エクソン1、エクソン2およびエクソン3の配列に対応する全長遺伝子の全部もしくは任意の一部を欠失するミオスタチンmRNA転写物に由来するタンパク質、または、イントロン1、イントロン2もしくは他のイントロン配列に対応する配列の全部もしくは一部を含むタンパク質、または、非機能的状態が、各エクソンに由来するような機能的な要素の欠失に関連する場合のタンパク質、または、さもなければ、その部分的または完全な配列を含む各イントロンを含むことに由来するタンパク質を含む。非機能的、機能不全、または不活性なミオスタチンタンパク質は、例えばエクソン2を除外するミオスタチンmRNA転写物に由来するタンパク質、および/または、野生型ミオスタチンタンパク質と比較して機能が低下したタンパク質を含む。

【0132】

このように、多様な実施形態では、機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質の存在、発現または発現増加は、例えば修飾アンチセンスオリゴマーおよび/または本開示の治療剤により処置されたDMD患者由来の筋細胞の、例えばウェスタンブロット解析およびジストロフィン遺伝子の発現により決定できる。多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーおよび/または本開示の治療剤による、DMDの処置を必要とするDMD筋細胞または被験体の処置は、例えば正常な細胞または正常な被験体で発現されるジストロフィンタンパク質の正常な量の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の量の機能的なジストロフィンタンパク質の発現をもたらし得る。

【0133】

多様な実施形態では、DMDの処置を必要とする組織または被験体により発現されるジストロフィンまたは切断型ジストロフィンタンパク質の機能性は、例えば筋線維の数、筋肉量の増加、中心核を有する筋線維のパーセントおよび機能的なジストロフィンタンパク質の量の、未処置の同等物と比較した、免疫組織化学的分析によって決定し得る。DMDの処置を必要とする被験体のジストロフィンまたは切断型ジストロフィンタンパク質の機能性は、筋肉量および握力の測定を含む運動機能試験などの、物理的および生理学的試験によりさらに分析し得る。

【0134】

一部の実施形態では、ジストロフィン治療剤は、目的の細胞におけるジストロフィン発現を回復させる。ジストロフィン合成または産生の「回復」という用語は、一般には、本明細書に記載されるエテプリルセンによる処置後に筋ジストロフィーを有する患者における、切断型ジストロフィンを含めたジストロフィンタンパク質の産生を指す。一部の実施形態では、処置により、患者における新規ジストロフィン産生の、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%（これらの間の全ての整数を含む）の増加をもたらされる。一部の実施形態では、処置により、ジストロフィン陽性線維の数が、被験体において、正常値の少なくとも20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%または約95%~100%に増加する。他の実施形態では、処置により、ジストロフィン陽性線維の数が、被験体において、正常値の約20%~約60%、または約30%~約50%に増加する。処置後の患者におけるジストロフィン陽性線維のパーセントは、公知の技法を使用して筋生検により決定できる。例えば、筋生検は適切な筋肉、例えば患者における上腕二頭筋から

10

20

30

40

50

採取し得る。

【0135】

陽性ジストロフィン線維のパーセンテージの分析は、処置前および/または処置後または一連の処置中の時点で行ってもよい。一部の実施形態では、処置後の生検は、処置前生検と対側の筋肉から採取される。処置前および処置後のジストロフィン発現の検討は、ジストロフィンに関するいかなる適切なアッセイを使用して行ってもよい。一実施形態では、筋生検から得た組織切片に対して、ジストロフィンのマーカーである抗体、例えばモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用して免疫組織化学的検出を実施する。例えば、ジストロフィンに対して非常に感受性の高いマーカーであるMANDYS106抗体が使用できる。いかなる適切な二次抗体も使用し得る。

10

【0136】

一部の実施形態では、ジストロフィン陽性線維のパーセントは、計数される全ての線維で陽性線維数を除算することにより算出される。正常な筋肉試料は、ジストロフィン陽性線維が100%である。したがって、ジストロフィン陽性線維のパーセントは、正常値に対するパーセンテージとして表示できる。処置前筋肉ならびにリバータント(revertant)線維におけるジストロフィンの微量レベルの存在を補正(control)するため、処置後筋肉におけるジストロフィン陽性線維を計数するときには、各患者から得た処置前筋肉の切片を使用してベースラインを設定できる。これは、その患者における処置後筋肉の切片におけるジストロフィン陽性線維を計数するための閾値として使用され得る。他の実施形態では、抗体染色した組織切片は、Bioquant画像解析ソフトウェア(Bioquant Image Analysis Corporation、ナッシュビル、TN)を使用するジストロフィンの定量のために使用することもできる。ジストロフィンの蛍光シグナル強度の合計を、正常値に対するパーセンテージとして報告することができる。さらに、モノクローナルまたはポリクローナル抗ジストロフィン抗体によるウェスタンブロット解析を使用して、ジストロフィン陽性線維のパーセンテージを決定することができる。例えば、Novacastra製の抗ジストロフィン抗体NCL-Dys1を使用してもよい。ジストロフィン産生はまた、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって測定することもできる。機能的なジストロフィタンパク質を産生するジストロフィン遺伝子を測定するよう、プライマーを設計することができる。ジストロフィン陽性線維のパーセンテージはまた、サルコグリカン複合体()の構成要素および/またはニューロンのNOSの発現を測定することにより分析できる。

20

30

【0137】

一部の実施形態では、処置により、処置を行わない場合に予想されるDMDを有する患者における、進行性の呼吸筋機能不全および/または呼吸筋不全が遅延され、または減少する。一部の実施形態では、処置により、DMDを有する患者における呼吸筋機能が安定する。一実施形態では、エテプリルセンによる処置により、処置を行わない場合に予想される換気援助の必要性が減少するか、または除去され得る。一実施形態では、疾患の経過を追跡するための呼吸機能の測定、ならびに治療的介入の可能性の評価は、最大吸気圧(MIP)、最大呼気圧(MEP)および努力性肺活量(FVC)を含む。MIPおよびMEPは、それぞれ、個人の吸入および呼息の間に発生しうる圧力のレベルを測定し、呼吸筋力の精度の高い測定法である。MIPは、横隔膜筋肉の脆弱性の測定法である。

40

【0138】

一部の実施形態では、処置により、被験体の歩行能力が安定化し、維持され、改善され、または向上し得る(例えば歩行運動の安定化)。一部の実施形態では、処置により、例えば、McDonaldら(Muscle Nerve、2010年;42巻:966~74頁;Muscle Nerve、2010年;41巻:500~10頁、その内容は参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)によって記載された6分間歩行試験(6MWT)によって測定した場合に、患者の安定な歩行距離が維持され、増加され、またはその減少が低減される。6MWTは、疾患状態の変化の表れとして経時的な歩行機能の変化を特徴付ける歩行運動に着目した臨床的に有意義なエンドポイントである。

50

【0139】

6分間歩行距離(6MWD)の変化は、絶対値、変化パーセンテージまたは予測値(%)の変化として表され得る。健常者の典型的な能力に対する、6MWTにおけるDMD患者の能力は、予測値(%)を算出することによって決定できる。例えば、予測6MWD(%)は、男性の場合、以下の式を使用して算出され得る： $196.72 + (39.81 \times \text{年齢}) - (1.36 \times \text{年齢}^2) + (132.28 \times \text{身長(メートル)})$ 。女性の場合、予測6MWD(%)は、以下の式を使用して算出され得る： $188.61 + (51.50 \times \text{年齢}) - (1.86 \times \text{年齢}^2) + (86.10 \times \text{身長(メートル)})$ (Henricsonら PLoS Curr.、2012年、2版、その内容は参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)。

10

【0140】

歩行運動は、ノーススター歩行能力評価(North Star Ambulatory Assessment)(NSAA)などの多様な方法により測定できる。NSAAは、DMDを有する歩行可能な男児を評価するために、North Star Clinical NetworkのPhysiotherapy Assessment and Evaluation Groupにより開発され、2~0でスコア化される活動リストを提供する(正常:2および「独立して達成できない」:0)(2006~2011年 MDC/North Star Clinical Network)。これらの活動は、最低3秒立っていられる~箱を上り下りできる~走れる、にわたる。ある特定の実施形態では、エテプリルセンによる処置により、例えばNSAAによって決定した場合に、歩行運動が維持、安定化、上昇または改善され得る。

20

【0141】

本発明では、修飾アンチセンスオリゴマーなどの治療剤を使用することで、エクソン2を含むミオスタチンmRNAの減少が誘導され、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状(例えば機能的なミオスタチンタンパク質の減少)が、未処置と比較して、約30%~約100%の範囲、または機能性に関して上記で開示したパーセンテージで改善される。症状のかかる改善は、ミクロのレベル(例えば、免疫組織化学、免疫蛍光法、ウェスタンブロット解析などにより測定されるミオスタチンタンパク質発現の減少;筋肉の成長の増加;筋肉機能の回復)および生理学的なレベル(例えば、身体検査により評価される運動機能の改善)で観察され得る。

30

【0142】

修飾アンチセンスオリゴマーは、ジストロフィンpre-mRNAのプロセッシングの間にエクソスキッピングを誘導するために使用されるが、その際、ジストロフィンpre-mRNAは、1もしくは複数の遺伝子変異を有するエクソンを含むか、またはジストロフィン遺伝子の1もしくは複数の領域が削除されており、それにより、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに関連する症状および関連障害が改善される(例えば機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質の回復)。機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質は、未処置と比較して、約30%~約100%の範囲、または機能性に関して上記で開示したパーセンテージで増加し得る。症状のかかる改善は、ミクロのレベル(例えば、免疫組織化学、免疫蛍光法、ウェスタンブロット解析などにより測定されるジストロフィンタンパク質発現の増加;筋肉の成長の増加;筋肉機能の回復)および生理学的なレベル(例えば、身体検査により評価される運動機能の改善)で観察され得る。

40

【0143】

「ヌクレオチド」という用語は、ヌクレオ塩基と、糖と、少なくとも1つのリン酸基(例えば、ホスホジエステル連結基)とを含む、天然に存在するヌクレオチドを指す。

【0144】

「ヌクレオチド類似体」という用語は、天然に存在するヌクレオチドの誘導體、または天然に存在するヌクレオチドに対する修飾、例えば、少なくとも1つの修飾を含むヌクレオチドを指す。このような修飾は、(i)修飾ヌクレオチド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せのうちの少なくとも1つを含みうる。当業者は、修飾を

50

、ヌクレオチドサブユニットのうちの任意の1つの構成要素（例えば、修飾糖）に関して指定する場合、ヌクレオチドサブユニットのうちの、指定されていない部分は、依然として非修飾（例えば、非修飾ヌクレオシド間連結、非修飾ヌクレオ塩基）でありうることを察知すると予想される。

【0145】

「オリゴヌクレオチド」、「オリゴマー」、「オリゴ」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、「アンチセンスオリゴマー」、「修飾アンチセンスオリゴマー」および「アンチセンスオリゴ」という用語、ならびにこれらの他の適切な組合せおよび派生語は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の直鎖状配列であって、1または複数のヌクレオ塩基が、ワトソン-クリック塩基対合により、標的配列と称される、オリゴマーが指向される標的RNAの部分とハイブリダイズして、標的配列内で、オリゴマー：RNAヘテロ二重鎖を形成しうる直鎖状配列を指す。具体的に、「アンチセンス」、「オリゴヌクレオチド」、「オリゴマー」、「オリゴ」、および「化合物」という用語は、このようなオリゴマーを指すように、多様な組合せで、かつ、互換的に使用することができる。ヌクレオチドの部分を含む環式サブユニットは、リボースまたは別の五炭糖、糖類似体に基づく場合もあり、ある特定の実施形態では、修飾糖、例えば、モルホリノ基である場合もある（下記のモルホリノベースのオリゴマーについての記載を参照されたい）。

10

【0146】

オリゴマーに言及する場合の、「修飾された」、「天然に存在しない」、または「類似体」という用語、ならびにこれらの他の適切な組合せおよび派生形は、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、例えば、天然に存在するオリゴヌクレオチド内に見出される、標準的なホスホジエステル連結以外のヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、例えば、天然に存在するオリゴヌクレオチド内に見出される、リボース部分もしくはデオキシリボース部分以外の部分、または(iii) 前出の組合せから選択される、少なくとも1つの修飾を有する、1または複数のヌクレオチドサブユニットを有するオリゴマーを指す。多様な実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結およびホスホロトリアミデートヌクレオシド間連結から選択される。さらなる実施形態では、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結は、(1, 4-ピペラジン)-1-イル部分、置換(1, 4-ピペラジン)-1-イル部分、4-アミノピペリジン-1-イル部分、または置換4-アミノピペリジン-1-イル部分に共有結合したリン原子を含む。多様な実施形態では、修飾糖部分は、ペプチド核酸(PNA)サブユニット、ロック核酸(LNA)サブユニット、2' O, 4' C-エチレン架橋核酸(ENA)サブユニット、トリシクロDNA(tc-DNA)サブユニット、2' O-メチルサブユニット、2' O-メトキシエチルサブユニット、2'-フルオロサブユニット、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、およびモルホリノサブユニットから選択される。

20

30

【0147】

ヌクレオシド間連結への修飾は、オリゴマーの、少なくとも2つの糖部分および/または修飾糖部分の間の修飾でありうる。ヌクレオチド類似体は、ワトソン-クリック塩基対合により、天然に存在するオリゴヌクレオチド塩基への水素結合が可能な塩基を担い、ここで、類似体は、オリゴマー類似体分子と、天然に存在するオリゴヌクレオチド（例えば、一本鎖RNAまたは一本鎖DNA）内の塩基との間で、配列特異的に、このような水素結合を可能とするように、塩基を提示する。例示的な類似体は、実質的に非荷電の、リンを含有するヌクレオシド間連結を有する類似体である。

40

【0148】

「ヌクレアーゼ耐性」オリゴマーとは、そのヌクレオシド間連結が、非ハイブリダイズ形態でも、ハイブリダイズ形態でも、ヌクレアーゼによる切断であって、体内の、一般的な、細胞外ヌクレアーゼおよび細胞内ヌクレアーゼによる（例えば、3'-エクソヌクレアーゼなどのエクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNAアーゼHによる）切断に対して実質的に耐性であるオリゴマーを指す；すなわち、オリゴマーは、オリゴマーが曝露

50

される、体内の正常なヌクレアーゼ条件下で、ヌクレアーゼによる切断を、ほとんどまたは全く示さない。「ヌクレアーゼ耐性ヘテロ二重鎖」とは、ヘテロ二重鎖が、細胞内ヌクレアーゼおよび細胞外ヌクレアーゼによる、*in vivo*における分解であって、二本鎖RNA/RNA複合体または二本鎖RNA/DNA複合体を切断することが可能な分解に対して、実質的に耐性となるように、修飾アンチセンスオリゴマーの、その相補的な標的への結合により形成されるヘテロ二重鎖を指す。「ヘテロ二重鎖」とは、修飾アンチセンスオリゴマーと、標的RNAの相補的部分との二重鎖を指す。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴマーは、本明細書で記載される修飾アンチセンスオリゴマーでありうる。

【0149】

「ヌクレオ塩基」(Nu)、「塩基対合部分」、または「塩基」という用語は、自然発生または「生来」のDNAまたはRNA(例えば、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、およびグアニン)のほか、天然に存在するプリンおよびピリミジンの類似体であって、結合アフィニティーなど、改善された特性を、オリゴマーへと付与する類似体において見出される、プリン塩基またはピリミジン塩基を指すように、互換的に使用される。例示的な類似体は、ヒポキサンチン(ヌクレオシドであるイノシンの塩基成分); 2,6-ジアミノプリン; 5-メチルシトシン; C5-プロピニル修飾ピリミジン; 10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル(Gクランプ)などを含む。

10

【0150】

塩基対合部分のさらなる例は、それらのそれぞれのアミノ基を、アシル保護基で保護した、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、グアニン、およびヒポキサンチン(イノシン)、2-フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-プロモウラシル、5-ヨードウラシル、2,6-ジアミノプリン、アザシトシン、シュードイソシトシンおよびシュードウラシルなどのピリミジン類似体、ならびに8-置換プリン、8-置換キサンチン、または8-置換ヒポキサンチン(後者の2つは、天然の分解産物である)など、他の修飾ヌクレオ塩基を含むがこれらに限定されない。それらの内容が参照により本明細書に組み込まれる、ChiuおよびRana、RNA、2003年、9巻、1034~1048頁、Limbachら、Nucleic Acids Research、1994年、22巻、2183~2196頁;ならびにRevankarおよびRao、Comprehensive Natural Products Chemistry、1999年、7巻、313頁において開示されている修飾ヌクレオ塩基もまた想定される。

20

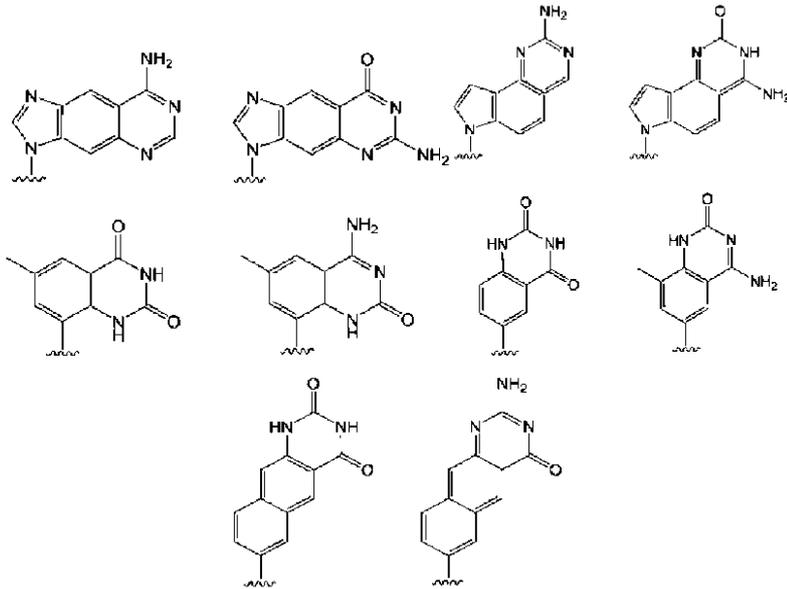
30

【0151】

塩基対合部分のさらなる例は、1または複数のベンゼン環を付加したサイズ拡大型ヌクレオ塩基を含むがこれらに限定されない。核塩基置換(nucleic base replacement)は、以下の例に記載されている: Glen Researchのカタログ(www.glenresearch.com); Krueger ATら、Acc. Chem. Res.、2007年、40巻、141~150頁; Kool, E.T., Acc. Chem. Res.、2002年、35巻、936~943頁; Benner S.A.ら、Nat. Rev. Genet.、2005年、6巻、553~543頁; Romesberg, F.E.ら、Curr. Opin. Chem. Biol.、2003年、7巻、723~733頁; Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol.、2006年、10巻、622~627頁(各例の内容は、本明細書において参考として援用される)。これらは、本明細書で記載される多様なオリゴマーの合成に有用であると想定される。サイズ拡大型ヌクレオ塩基の例を、下記:

40

【化 3 2】



10

に示す。

【0152】

20

リボース、糖類似体、修飾糖、またはホルホリノに共有結合的に連結されたヌクレオ塩基は、ヌクレオシドを含む。「ヌクレオチド」は、少なくとも1つの連結リン酸基と併せたヌクレオシドを含む。リン酸基は、オリゴマーを形成するように、隣接するヌクレオチドへの共有結合的連結を含む。こうして、ヌクレオチドのリン酸基は一般に、「ヌクレオシド間連結」を形成すると称する。したがって、ヌクレオチドは、本明細書でさらに記載されるヌクレオシドと、ヌクレオシド間連結とを含む。一部の実施形態では、本開示の修飾アンチセンスオリゴマーは、サブユニットを含み、ここで、「サブユニット」は、天然に存在するヌクレオチド、本明細書で記載されるヌクレオチド類似体、およびこれらの組合せを含む。ある特定の実施形態では、本開示の修飾アンチセンスオリゴマーは、サブユニットを含み、ここで、少なくとも1つのサブユニットは、ヌクレオチド類似体である。

30

【0153】

「配列同一性」、「配列相同性」および「相補性」という用語（例えば「～と50%同一な配列」、「～と50%相同な配列」および「～と50%相補的な配列」）は、核酸に関しては、配列が、ヌクレオチド対ヌクレオチドベースで、比較ウィンドウにわたり同一である程度を指す。「同一性百分率」、「相同性百分率」および「～と～百分率相補的な」は、2つの最適にアラインメントされた配列を、比較ウィンドウにわたり比較し、両方の配列内で、同一な核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）が生じる位置の数を決定して、マッチさせた位置の数をもたらし、マッチさせた位置の数を、比較ウィンドウ内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除し、結果に100を乗じて、配列同一性の百分率をもたらすことにより計算することができる。比較ウィンドウをアラインメントするための、配列の最適のアラインメントは、コンピュータへのアルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison、Wis.、USAにおける、GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）の実行により行うこともでき、精査と、選択される多様な方法のうちいずれかにより生成される、最良のアラインメント（すなわち、比較ウィンドウにわたり最高の相同性百分率をもたらすアラインメント）とにより行うこともできる。また、例えば、Altschulら、Nucl. Acids Res.、25巻：3389頁、1997年により開示されている通り、BLASTファミリーのプログラムも参照することができる。多様な実施形態では、本開示の修飾アンチセンスオリゴマーは、

40

50

表 1 (配列番号 1 ~ 3) および表 2 (配列番号 4 ~ 15) におけるターゲティング配列に対して、少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有しうる。

【 0 1 5 4 】

本明細書で使用される通り、融点 (T_m) が、40、45、50 を実質的に超え、多様な実施形態では、60 ~ 80 またはこれを超える生理学的条件下で、オリゴマーのターゲティング配列が、標的領域とハイブリダイズする場合に、オリゴマーは、オリゴヌクレオチドの標的領域と、「特異的にハイブリダイズする」。このようなハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に対応することが好ましい。所与のイオン強度および pH において、 T_m は、ターゲティング配列のうちの 50 % が、標的領域における相補的な配列とハイブリダイズする温度である。このようなハイブリダイゼーションは、修飾アンチセンスオリゴマーの、標的領域への「ほぼ (near) 」または「実質的な」相補性により生じうるほか、正確な相補性によっても生じうる。一部の実施形態では、オリゴマーは、標的領域と、約 50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % でハイブリダイズしうる。

10

【 0 1 5 5 】

本明細書で使用される、「サブユニット」という用語は、天然に存在するヌクレオチド、または少なくとも 1 つの修飾を含む、天然に存在するヌクレオチドを指す。修飾は、(i) 修飾ヌクレオチド間連結、(i i) 修飾糖部分、または (i i i) 前出の組合せのうち少なくとも 1 つを含みうる。さらなる実施形態では、修飾は、修飾ヌクレオ塩基を含みうる。

20

【 0 1 5 6 】

本明細書で使用するとき、「十分な長さ」という用語は、プレ m R N A 内の標的領域内の少なくとも 20 ~ 50 の連続ヌクレオ塩基と相補的である修飾アンチセンスオリゴマーを指し、かかる相補性は、エクソン内の標的領域の完全に内部に存在してもよく、または、イントロン / エクソンもしくはエクソン / イントロン領域を横切るスプライス接合部にわたってもよい。複数の実施形態では、十分な長さは、プレ m R N A 内の標的領域の少なくとも 12 の連続ヌクレオ塩基と相補的である修飾アンチセンスオリゴマーを指す場合があり、かかる相補性は、エクソン内の標的領域の完全に内部に存在してもよく、または、イントロン / エクソンもしくはエクソン / イントロン領域を横切るスプライス接合部にわたってもよい。

30

【 0 1 5 7 】

例えば、修飾ミオスタチンアンチセンスオリゴマーは、ミオスタチンプレ m R N A のイントロン 1 / エクソン 2、エクソン 2、またはエクソン 2 / イントロン 2 と相補的であってもよい。多様な実施形態では、修飾ミオスタチンアンチセンスオリゴマーは、ミオスタチンプレ m R N A 配列の標的領域と特異的にハイブリダイズすることが可能な少なくともいくつかのヌクレオチドを含む。好ましくは、十分な長さのオリゴマーは、これらの範囲の間の全ての整数を含めて、12 ~ 40 ヌクレオチド、12 ~ 30 ヌクレオチド、12 ~ 15 ヌクレオチド、12 ~ 20 ヌクレオチド、15 ~ 20 ヌクレオチド、15 ~ 22 ヌクレオチド、12 ~ 22 ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、ミオスタチンアンチセンスオリゴマーは、約 12 ~ 約 40 または約 12 ~ 約 30 塩基の長さである。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約 12 ~ 約 25、約 15 ~ 約 25 または約 15 ~ 約 20 塩基の長さである。一部の実施形態では、ミオスタチンアンチセンスオリゴマー配列は、少なくとも約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 の連続塩基または非連続塩基であって、表 1 の標的配列 (例えば、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3、または配列番号 X、配列番号 Y または配列番号 Z の少なくとも一部にわたる配列) と相補的な連続塩基または非連続塩基を含む。

40

50

【0158】

修飾ジストロフィンアンチセンスオリゴマーは、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55内に完全にある標的領域と相補的であってもよい。多様な実施形態では、修飾ジストロフィンアンチセンスオリゴマーは、ジストロフィンプレmRNA配列の標的領域と特異的にハイブリダイズすることが可能な少なくともいくつかのヌクレオチドを含む。十分な長さのオリゴマーは、17～50ヌクレオチド、17～40ヌクレオチド、14～25ヌクレオチド、15～30ヌクレオチド、17～30ヌクレオチド、17～27ヌクレオチド、10～27ヌクレオチド、10～25ヌクレオチドまたは10～20ヌクレオチドの長さであることが、これらの間の全ての整数を含めて、好ましい。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約17～約40または約10～約30塩基の長さである。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約14～約25または約17～約27塩基の長さである。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマー配列は、少なくとも約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40の連続塩基または非連続塩基であって、表2の標的配列（例えば配列番号4～15）と相補的な連続塩基または非連続塩基を含む。

10

【0159】

本明細書で使用するとき、「被験体」または「それを必要とする被験体」という用語は、ヒト被験体などの哺乳動物被験体を含む。例示的な哺乳動物被験体は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害を有するか、またはこれを有する危険性がある。本明細書で使用するとき、「筋ジストロフィー」、「デュシェンヌ型筋ジストロフィー」および「関連障害」という用語は、ミオスタチンタンパク質の過剰発現、または罹患個体におけるジストロフィン遺伝子の遺伝子変異を多くの場合特徴とするヒト常染色体劣性疾患を指す。一部の実施形態では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害は、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー、眼球咽頭筋ジストロフィー、末梢型筋ジストロフィー、エメリー・ドライフス筋ジストロフィー、筋肉消耗状態または障害、例えばAIDS、がんまたは化学療法関連の筋肉消耗、および線維症または線維症関連障害（例えば骨格筋線維症）を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0160】

本明細書で使用される「患者」は、本明細書に記載される通りに処置され得る症状を呈示するかまたは症状を呈示する危険性がある任意の個人、例えば、DMDもしくはBMD、またはこれらの状態に関連する症状のいずれか（例えば筋線維損失）を有するか、またはそれを有する危険性がある被験体などを含む。

【0161】

本明細書で使用される「小児患者」は、1～21歳（上下限值を含む）の患者である。一部の実施形態では、小児患者は7～21歳（例えば7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21歳）の患者である。一部の実施形態では、小児患者は7歳未満の患者である。一部の実施形態では、小児患者は7歳またはこれを超える患者である。

40

【0162】

本明細書で使用するとき、「標的」または「標的領域」という用語は、ミオスタチンまたはジストロフィンプレmRNAなどのプレmRNA転写物内の領域を指す。多様な実施形態では、ミオスタチン標的領域は、ミオスタチンプレmRNAのイントロン1/エクソン2、エクソン2、またはエクソン2/イントロン2を含む領域である。多様な実施形態では、ジストロフィン標的領域は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55のうちの1または複数を含む領域である。

50

【 0 1 6 3 】

多様な実施形態では、「ターゲティング配列」という用語は、修飾アンチセンスオリゴマー内または修飾アンチセンスオリゴマー類似体内の配列であって、プレmRNA転写物内の標的配列と相補的な配列を指す。修飾アンチセンスオリゴマーの全配列が、標的配列と相補的な場合もあり、修飾アンチセンスオリゴマーの一部だけが、標的配列と相補的な場合もある。例えば、12～50塩基を有するオリゴマー内の、約7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50個は、プレmRNA転写物内の標的領域と相補的な配列（例えば、「ターゲティング配列」）を含有しうる。ターゲティング配列は、オリゴマー内の連続塩基から形成されることが典型的であるが、代替的に、例えば、オリゴマーの反対側の末端から一体とされると、標的配列にわたる配列を構成する非連続配列から形成される場合もある。

10

【 0 1 6 4 】

「ターゲティング配列」は、標的配列に対して「ほぼ」または「実質的な」相補性を有し得、それでもなお、その意図した目的のため、例えば、遺伝子変異を有する1または複数のエクソンを排除したジストロフィンmRNA発現のレベルを上昇させる、または機能的もしくは半機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるために機能し得る。ミオスタチンの場合、ターゲティング配列は、エクソン2を含むミオスタチンmRNAの発現レベルを低下させるか、または機能的なミオスタチンタンパク質の発現を減少させるように機能し得る。本開示における修飾アンチセンスオリゴマー化合物は、標的配列に対して、多くても10ヌクレオチドに1つのミスマッチ、または20ヌクレオチドに1つのミスマッチを有することが好ましい。あるいは、本明細書の修飾アンチセンスオリゴマーは、本明細書で示す例示的な標的配列に対する、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも99%の配列同一性または100%の配列同一性を有する。

20

【 0 1 6 5 】

ジストロフィンの場合、ターゲティング配列は、配列番号76～3485から選択される配列を含み得るか、配列番号76～3485から選択されるか、配列番号76～3485から選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号76～3485から選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号76～3485の各Xはチミン(T)であり、配列番号76～3485の各Yはシトシン(C)である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号76を含み得る。

30

【 0 1 6 6 】

ミオスタチンの場合、ターゲティング配列は、配列番号16～75から選択される配列を含み得るか、配列番号16～75から選択されるか、配列番号16～75から選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号16～75から選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号16～75の各Xはチミン(T)であり、配列番号16～75の各Yはシトシン(C)である。

40

【 0 1 6 7 】

一部の実施形態では、ミオスタチンターゲティング配列は、

a) 配列番号71 (Y Y A G Y Y Y A X Y X X Y X Y Y X G G X Y Y X G G) [Zは25である] ;

b) 配列番号72 (Y A Y X X A Y Y A G Y Y Y A X Y X X Y X Y Y X G G) [Zは25

50

である] ;

c) 配列番号 73 (Y Y A Y X X G Y A X X A G A A A X Y A G Y) [Z は 2 2 である] ;

d) 配列番号 74 (G Y A T T A G A A A A T Y A G Y T A T A A A T G) [Z は 2 4 である] ; および

e) 配列番号 75 (Y Y A T Y Y G Y T T G Y A T T A G A A A G T Y A G Y) [Z は 2 6 である]

から選択され、各 X はウラシル (U) またはチミン (T) から独立に選択され、各 Y はシトシン (C) または 5 - メチルシトシン (5 m C) から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号 71 ~ 75 の各 X はチミン (T) であり、配列番号 71 ~ 75 の各 Y はシトシン (C) である。

10

【 0 1 6 8 】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも 1 つの X は T である。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各 X は T である。

【 0 1 6 9 】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも 1 つの X は U である。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各 X は U である。

【 0 1 7 0 】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも 1 つの Y は 5 m C である。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各 Y は 5 m C である。

20

【 0 1 7 1 】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも 1 つの Y は C である。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各 Y は C である。

【 0 1 7 2 】

多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の少なくとも 1 つの X は T である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 X は T である。

【 0 1 7 3 】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも 1 つの X は U である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 X は U である。

30

【 0 1 7 4 】

多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の少なくとも 1 つの Y は 5 m C である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 Y は 5 m C である。

【 0 1 7 5 】

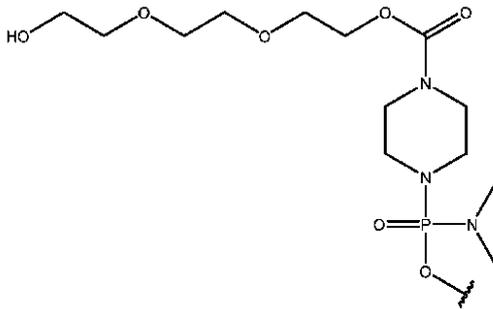
多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の少なくとも 1 つの Y は C である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 Y は C である。

【 0 1 7 6 】

本明細書で使用される「 T E G 」、「トリエチレングリコールテール」または「 E G 3 」という用語は、例えば、その 3 ' 末端または 5 ' 末端でオリゴマーにコンジュゲートしたトリエチレングリコール部分を指す。例えば、一部の実施形態では、「 T E G 」は、例えば、式 (I)、(I V)、(V)、(V I)、(V I I) および (V I I I) の化合物の T が、式：

40

【化 3 3】



10

のものであるものを含む。

【0177】

本明細書で使用される、治療剤または組成物の「治療有効量」または「有効量」という用語は、組成物が有効な処置のために、障害の防止または処置において有効な量を指す。「障害」とは、BMD、肢帯筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー、眼球咽頭筋ジストロフィー、末梢型筋ジストロフィー、エメリー・ドライフス筋ジストロフィー、筋肉消耗状態または障害、例えばAIDS、がんまたは化学療法関連の筋肉消耗、および線維症または線維化関連障害（例えば骨格筋線維症）などのあらゆるデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を指す。

20

【0178】

本明細書で使用される「～を定量化すること」、「定量化」という用語、または他の類縁の語は、核酸、オリゴヌクレオチド、オリゴマー、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の、数量、質量、または単位容量中の濃度を決定することを指す。

【0179】

多様な実施形態では、本明細書で使用される「処置」という用語は、被験体（例えば、ヒトなどの哺乳動物）または細胞の処置（処理）であって、被験体または細胞の現在の経過を変更する処置を含む。処置は、医薬組成物の投与を含むがこれに限定されず、予防的に実施することもでき、病理学的事象の開始または病因作用物質との接触に後続して実施することもできる。また、処置される疾患もしくは状態の進行速度の低減、この疾患もしくは状態の発症の遅延、またはその発症の重症度の軽減を指向しうる「予防的」処置も含まれる。「処置」または「予防」とは、必ずしも、疾患もしくは状態、またはこれらの関連する症状の、完全な根絶、治癒、または防止を指し示すものではない。

30

【0180】

II. プレ mRNA 転写物のスプライシングのモジュレーション

例示を目的とし、理論に束縛されずに述べると、治療剤が修飾アンチセンスオリゴマーである場合、これらは、スプライソソームの作用および成熟 mRNA 転写物の産生を阻害するなどにより、プレ mRNA のプロセシングの遮断、阻害、またはモジュレーションを促進すると考えられ、また、標的とした mRNA の分解も誘導しうる。一部の例では、スプライソソーム (spliceosome) がエクソン/イントロンスプライス接合部に結合するのを阻害して、エクソン/イントロンスプライス接合部がスキップされ、mRNA 転写物から 1 つまたは複数のエクソンが除去されるようにすることができる。野生型 mRNA 転写物より 1 つまたは複数少ないエクソンを有する成熟 mRNA 転写物は、オープンリーディングフレームを保持する mRNA 転写物をもたらし得、それにより、mRNA 転写物は、分解されるのではなく、機能的なタンパク質へと翻訳されうる。野生型 mRNA より少ないエクソンを有する mRNA 転写物から翻訳されたタンパク質は、結果として、野生型 mRNA 転写物から転写されたタンパク質より少ないアミノ酸残基を含む転写タンパク質となり得る。野生型タンパク質より少ないアミノ酸残基で構成された機能的なタンパク質は、野生型タンパク質と同じまたは同様の活性/機能性を有し得る。修飾アンチセンスオリゴ

40

50

マーは、それがハイブリダイズする標的配列または標的領域「を指向する」またはこれら「に対してターゲティングされた」ということができる。ある特定の実施形態では、標的配列はプレmRNAの3'スプライス接合部位もしくは5'スプライス接合部位を含む領域、分岐点、エクソンのスプライシングエンハンサー（ESE）もしくはイントロンのスプライシングエンハンサー（ISE）、またはスプライシングの調節に関する他の配列を含む。イントロン内では、ドナー部位（イントロンの5'末端）およびアクセプター部位（イントロンの3'末端）が、スプライシングに必要である。スプライスドナー部位は、イントロンの5'末端にあるほとんど不変の配列GUを、より大きい、それほど高度に保存されていない領域内に含む。イントロンの3'末端にあるスプライスアクセプター部位は、ほとんど不変のAG配列によってイントロンを終結させる。標的配列は、エクソン内に完全にあり標的配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、エクソン/イントロスプライス接合部内にあるか、またはエクソン/イントロスプライス接合部にわたる、配列を含み得る。標的配列は、エクソン/イントロンドナー/スプライス部位を含み得る。

10

20

30

40

50

【0181】

標的プレmRNA配列に対する配列相補性であって、標的RNAのスプライシングをモジュレートするのに十分な配列相補性を有する修飾アンチセンスオリゴマーは、スプライソソーム複合体に対する結合部位の遮蔽または妨害を誘発するのに十分な配列であって、他の点で、このようなスプライシングに影響を及ぼし、かつ/または、他の点で、ターゲティングされたプレmRNAの三次元構造の変更を含む配列を有する修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

【0182】

A. ミオスタチンプレmRNAのスプライシングのモジュレーション

多様な態様は、ミオスタチンプレmRNAのイントロンおよびエクソンのスプライシングをモジュレートするための方法に関する。さらなる態様は、ミオスタチンプレmRNAのイントロン1/エクソン2とエクソン2/イントロン2のスプライス接合部位でのスプライシングを阻害することに関する。さらなる態様では、所与の試料（例えば、血清試料、血漿試料、組織試料、細胞試料など）において、ミオスタチンエクソン2をコードするmRNAの発現は、例えばエクソン2野生型mRNAと比較して、阻害される。多様な方法は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域と相補的なターゲティング配列を含む本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、ミオスタチンエクソン2のmRNAの発現が、エクソン2野生型（すなわち対照）mRNAの発現と比較して阻害される。

【0183】

多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーのターゲティング配列は、十分な長さおよびミオスタチンプレmRNAの標的領域内の配列に対して十分な相補性を有する。多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマー内のターゲティング配列は、エクソン2内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない標的配列の領域、あるいはミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンまたはエクソン/イントロスプライス接合部にわたる領域、例えばミオスタチンプレmRNAのイントロン2/エクソン2の+24/-01もしくは+18/-07領域、またはエクソン2/イントロン2の-01/+21、-01/+25もしくは-09/+15の領域とハイブリダイズする。一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、約12塩基～約40塩基の場合もあり、ターゲティング配列が、標的配列へのハイブリダイゼーション時に、スプライスマジュレーションを行うのに十分に相補的であり、任意選択で、プレmRNAと共に、Tmが45℃またはこれを超える、ヘテロ二重鎖を形成する限り、少数のミスマッチを含む。

【0184】

多様な実施形態では、アンチセンスターゲティング配列と標的配列との相補性の程度は、安定的な二重鎖を形成するのに十分である。修飾アンチセンスオリゴマーの、標的配列

との相補性の領域は、12～15塩基という短い領域であり得るが、12～20塩基またはこれを超える領域であることが可能であり、例えば、これらの範囲の間の全ての整数を含む、12～40塩基、12～30塩基、12～25塩基、12～22塩基、15～25塩基、15～22塩基または15～20塩基であり得る。ある特定の実施形態では、本明細書で論じられる、必須の結合 T_m を達成するのに、最小の長さの相補塩基が要請され得る。

【0185】

B. ジストロフィンプレmRNAのスプライシングのモジュレーション

多様な態様は、ジストロフィンプレmRNAのイントロンおよびエクソンのスプライシングをモジュレートするための方法に関する。さらなる態様は、ジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンのスプライス接合部位およびエクソン/イントロンスプライス接合部におけるスプライシングを阻害することに関する。さらなる態様では、所与の試料（例えば血清試料、血漿試料、組織試料、細胞試料など）において切断型のジストロフィンコードmRNAの発現は、例えば、全長野生型ジストロフィンmRNAと比較して強化される。多様な方法は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的なターゲティング配列を含む、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、切断型ジストロフィンmRNAの発現が、全長野生型（すなわち対照）mRNAの発現と比較して強化される。

10

【0186】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内部の標的領域と結合する。複数の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択されるエクソンと結合する。複数の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内に完全にあり、ターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない、またはイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる領域である。複数の実施形態では、ジストロフィンプレmRNAの1または複数のエクソンは、1または複数の遺伝子変異を有する。複数の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、1または複数の遺伝子変異を有するエクソンを標的とし、それにより、エクソンが、プロセッシングの間、プレmRNA転写物から成熟mRNAにスプライシングされ、短縮または切断型のジストロフィンmRNAとなる。

20

30

【0187】

多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーのターゲティング配列は、十分な長さおよびジストロフィンプレmRNAの標的領域内の配列への十分な相補性を有する。多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマー内のターゲティング配列は、1または複数のエクソン内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない標的配列の領域、または、ジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部にわたる領域とハイブリダイズする。一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、約8塩基～約50塩基の場合もあり、ターゲティング配列が、標的配列へのハイブリダイゼーション時にスプライスマジュレーションを行うのに十分に相補的であり、任意選択で、RNAと共に、 T_m が45またはこれを超えるヘテロ二重鎖を形成する限り、少数のミスマッチを含む。

40

【0188】

多様な実施形態では、アンチセンスターゲティング配列と標的配列との相補性の程度は、安定的な二重鎖を形成するのに十分である。修飾アンチセンスオリゴマーの、標的配列との相補性の領域は、8～15塩基という短い領域であり得るが、8～20塩基またはこれを超える領域であることが可能であり、例えば、これらの範囲の間の全ての整数を含む、8～40塩基、8～30塩基、8～25塩基、8～22塩基、8～25塩基、8～22塩基、8～20塩基、17～20塩基、17～22塩基、17塩基～25塩基、17～30塩基、17～40塩基または20～30塩基であり得る。ある特定の実施形態では、本

50

明細書で論じられる、必須の結合 T m を達成するのに、最小の長さの相補塩基が要請され得る。

【0189】

多様な態様では、オリゴマーを、バイオアベイラビリティ、安定性、細胞更新 (cellular update)、およびヌクレアーゼ分解に対する耐性を含むがこれらに限定されない、さらなる機能性のために構成する。一般に、50塩基を含むオリゴマーは、適切である可能性があり、ここで、少なくとも最小数の塩基、例えば、8または12塩基は、標的配列と相補的である。多様な態様では、オリゴマーを、促進された細胞取込みまたは能動的な細胞取込みを増強するように構成する。多様な態様では、改変アンチセンスオリゴマーは、1または複数のホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、約8~50ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、約8~30ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、約17~40ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、約12~25ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、約15~25ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、約15~22ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。

10

20

30

40

50

【0190】

多様な態様では、修飾アンチセンスオリゴマーは、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットと、プレmRNA内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドの標的領域と相補的なターゲティング配列とを任意選択で含む、8~50サブユニットを含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる。多様な実施形態では、標的領域は、1または複数のエクソン内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、またはミオスタチンもしくはジストロフィン遺伝子のイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部にわたる領域内の、10、12またはこれを超える連続ヌクレオチドを含む。

【0191】

多様な実施形態では、ミオスタチンプレmRNAの標的領域は、ミオスタチンプレmRNAのエクソン2、イントロン1/エクソン2、または、エクソン2/イントロン2内の領域を含む。さらなる実施形態では、標的領域は、ミオスタチンプレmRNAのイントロン2/エクソン2の+24/-01もしくは+18/-07領域、または、エクソン2/イントロン2の-01/+21、-01/+25もしくは-09/+15領域を含む。

【0192】

多様な実施形態では、ジストロフィンプレmRNAの標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択されるエクソンのうちの1または複数内の領域を含む。

【0193】

多様な態様では、修飾アンチセンスオリゴマーは、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットと、配列番号16~75および配列番号76~3485から選択される配列を含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるターゲティン

グ配列とを任意選択で含む、10～50サブユニットを含むか、これからなるか、またはこれから本質的になる。一部の態様では、修飾アンチセンスオリゴマーは、配列番号71～75および配列番号76から選択される配列を含むことが好ましい。

【0194】

さらなる態様は、ミオスタチンまたはジストロフィンプレmRNA内の標的領域と特異的にハイブリダイズする、8～50サブユニットの修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

【0195】

多様な実施形態では、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域は、ミオスタチン遺伝子のエクソン2、イントロン1/エクソン2、または、エクソン2/イントロン2（またはスプライス接合部にわたる領域）内の領域を含む。多様な実施形態では、標的領域は、ミオスタチンプレmRNAのエクソン2内に完全にある領域を含む。多様な実施形態では、標的領域は、イントロン1/エクソン2またはエクソン2/イントロン2内の領域を含む。多様な実施形態では、標的領域は、イントロン1/エクソン2またはエクソン2/イントロン2のスプライス接合部にわたる領域を含む。さらなる実施形態では、標的領域は、ミオスタチンプレmRNAのイントロン2/エクソン2の+24/-01もしくは+18/-07領域、または、エクソン2/イントロン2の-01/+21、-01/+25もしくは-09/+15領域を含む。

【0196】

さらなる態様は、修飾糖部分を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、修飾アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾糖部分は、ペプチド核酸（PNA）サブユニット、ロック核酸（LNA）サブユニット、2' O, 4' C-エチレン架橋核酸（ENA）サブユニット、トリシクロDNA（tc-DNA）サブユニット、2' O-メチルサブユニット、2' O-メトキシエチルサブユニット、2'-フルオロサブユニット、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、およびモルホリノサブユニットから選択される。

【0197】

さらなる態様は、修飾ヌクレオシド間連結を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、修飾アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結およびホスホロトリアミデートヌクレオシド間連結から選択される。さらなる実施形態では、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結は、(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、置換(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、4-アミノピペリジン-1-イル部分、または置換4-アミノピペリジン-1-イル部分に共有結合したリン原子を含む。

【0198】

さらなる態様は、修飾糖部分と修飾ヌクレオシド間連結の少なくとも1つの組合せを含むヌクレオチド類似体サブユニットを有する修飾アンチセンスオリゴマーを含み、多様な実施形態では、1または複数のサブユニットは、

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロトリアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたモルホリノサブユニット、

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された2' O-メチルサブユニット、

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換される2' O-メトキシエチルサブユニット、

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された2'-フルオロサブユニット、

10

20

30

40

50

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された 2' - O , 4' - C - エチレン架橋核酸サブユニット、

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された 2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル) エチル] サブユニット、

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたトリシクロ DNA サブユニット、

任意選択でホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたロック核酸サブユニット、

ホスホロジアミデートのリン原子がモルホリノ環の窒素原子に共有結合し、(1 , 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分または置換 (1 , 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分に共有結合する、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含むモルホリノサブユニット、

ホスホロジアミデートのリン原子が 4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分または置換 4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分に共有結合する、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含むモルホリノサブユニット、

ホスホロジアミデートのリン原子がモルホリノ環の窒素原子に共有結合し、ジメチルアミノ部分に共有結合する、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含むモルホリノサブユニット、

ホスホロチオエートヌクレオシド間またはホスホルアミデートヌクレオシド間連結で置換されたリボース糖サブユニット、

ホスホロチオエートヌクレオシド間連結またはホスホルアミデートヌクレオシド間連結で置換されたデオキシリボース糖サブユニット、

任意選択で置換されたペプチド核酸サブユニット、
または前出の任意の組合せから選択される。

【 0 1 9 9 】

多様な態様および実施形態では、本開示の修飾アンチセンスオリゴマーは、修飾アンチセンスオリゴマーに共有結合したペプチドをさらに含む。多様な実施形態では、アルギニンに富む細胞透過性ペプチドを、修飾アンチセンスオリゴマーの 3' 末端または 5' 末端にコンジュゲートさせる。

【 0 2 0 0 】

多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、これらの範囲の間の全ての整数を含む、約 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 もしくは 50 塩基、または 8 ~ 50、8 ~ 40、8 ~ 30、8 ~ 25、8 ~ 20、8 ~ 18、12 ~ 30、12 ~ 25、10 ~ 20、10 ~ 18、15 ~ 30、15 ~ 25、15 ~ 20、15 ~ 18、17 ~ 20、17 ~ 30、17 ~ 40、18 ~ 30、18 ~ 25 または 18 ~ 20 の範囲の塩基からなる場合がある。一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、約 8 ~ 約 50、約 8 ~ 約 40 または約 8 ~ 約 30 塩基の長さである。一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、約 12 ~ 約 25 塩基の長さである。一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマー配列は、例えばミオスタチンプレ mRNA のエクソン 2、イントロン 1 / エクソン 2 もしくはエクソン 2 / イントロン 2、またはジストロフィンプレ mRNA のエクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 19、エクソン 23、エクソン 44、エクソン 45、エクソン 50、エクソン 51、エクソン 52、エクソン 53 もしくはエクソン 55 のうちの 1 もしくは複数、またはミオスタチンもしくはジストロフィンプレ mRNA の少なくとも一部にわたる配列など

10

20

30

40

50

の、ミオスタチンまたはジストロフィンプレmRNA内の標的配列と相補的である、少なくとも約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50の連続または非連続塩基を含む。

【0201】

修飾アンチセンスオリゴマーは、典型的には、ミオスタチンタンパク質のミオスタチンプレmRNA配列のエクソン2、イントロン1/エクソン2、または、エクソン2/イントロン2内の配列または領域と十分に相補的である塩基配列を含み得る。下記の表1は、エクソン2、イントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2中の配列または領域を示す。

10

【0202】

【表1】

表1.ミオスタチン遺伝子のエクソン2、イントロン1/エクソン2およびエクソン2/イントロン2の例示的な配列

ミオスタチン 遺伝子内の領域	配列
イントロン1/エクソン2/ イントロン2 (配列番号1)	agcaacttttctttcttattcatttatag/ctgattttctaagcaagtggatggaaaaccca aatggtgcttcttaaaatttagctctaaaatacaatacaataaaagtagtaaaggccaact atggatatatttagaccgctcgagactcctacaacagtggttgcaaatcctgagact catcaaacctatgaaagacggtagaaggtatactggaatccgatctgaaacttgaca tgaacccaggcactggtatttggcagagcattgatgtgaagacagtggtgcaaaatg gctcaaacacactgaaatccaacttaggcattgaaataaaagcttagatgagaatggc atgatcttgctgtaaccttcccaggaccaggagaagatgggctg/gtaagtgataactg aaaataacattataat
SA2 イントロン1/ エクソン2 (配列番号2)	cttttcttttcttattcatttatag/ctgattttctaagcaagtggatgg
SD2 エクソン2/ イントロン2 (配列番号3)	acctcccaggaccaggagaagatgggctg/gtaagtgataactgaaaataacattat aat
「/」は、スプライス部位を示す	

20

30

【0203】

修飾アンチセンスオリゴマーは、典型的には、ジストロフィンタンパク質のジストロフィンプレmRNA配列のエクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55のうちの1または複数のエクソン内の配列または領域と十分に相補的な塩基配列を含み得る。下記の表2は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53およびエクソン55のエクソン内の配列または領域を示す。

40

【0204】

【表 2 - 1】

表2.ジストロフィン遺伝子のエクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55の例示的な配列。

ジストロフィン 遺伝子内の領域	配列
エクソン 7 (配列番号 4)	gccagacctatttgactggaatagtgtggttggccagcagtcagccacacaacgactg gaacatgcatccaacatcgccagatacaataggcatagagaaactactcgcctctg aag
エクソン 8 (配列番号 5)	atggtgataccacctatccagataagaagtccaatcttaattgacatcacatcctctcca agtttgcctcaacaagtgagcattgaagccatccaggaagtggaaatggtccaagg ccacctaaagtgactaaagaagaacatttcagttacatcatcaaatgcactattctcaa cag
エクソン 9 (配列番号 6)	atcacggicagctiagcacaggaiatgagagaactcttccctaagcctcgattcaa gagctatgcctacacacaggctgcttatgtcaccacctctgacctacacggagccca tttcttcacag
エクソン 19 (配列番号 7)	gccatagagcagagaaaaagctgagaagttcagaaaactgcaagatgccagcagatc agctcaggccctggtggaacagatggtgaatg
エクソン 23 (配列番号 8)	gctttacaagttctctgcaagagcaacaagtggcctatactatctcagcaccactgt gaaagagatgtcgaagaagcgcctctgaaattagccggaatatcaatcagaattt gaagaaattgaggacgctggaagaagctctctcccagctggtgagcattgtcaa aagctagaggagcaaatgaataaactccgaaaaattcag
エクソン 44 (配列番号 9)	gcgattgacagatctgttgagaatggcggcgtttcattatgatataaagatattfaat cagtggttaacagaagctgaacagtttctcagaaagacacaaattcctgagaattggg aacatgctaatacaaatggtatcttaag
エクソン 45 (配列番号 10)	gaactccagatggcattgggcagcggcaactgttgcagaacattgaaatgcaact ggggaagaataattcagcaatcctcaaaaacagatgccagtattctacaggaaaaat tgggaagcctgaatctgctggtggcaggaggtctgcaaacagctgtcagacagaaaa aagag
エクソン 50 (配列番号 11)	aggaagttagaagatctgagctctgagtggaggcggtaaccgttacttcaagag ctgagggcaaacgacgctgacctagctcctggactgaccactattggagcct
エクソン 51 (配列番号 12)	ctcctactcagactgttactctggtgacacaacctgtggttactaaggaaactgccatct

10

20

30

【表 2 - 2】

	ccaactagaatgccatcttcttgatgttgaggctactgctctggcagattcaacc gggcttggacagaactaccgactggcttctctgcttgatcaagttataaaatcacaga ggggtgatgggtggctgacctgaggatatcaacgagatgatcatcaagcagaag
エクソン52 (配列番号 13)	gcaacaatgcaggatttgaacagaggcgtcccagttggaagaactcattaccgct gcccaaaattgaaaaaacagaccagcaatcaagaggctagaacaatcattacggat cgaa
エクソン53 (配列番号 14)	ttgaagaattcagaatcagtgaggatgaagtacaagaacaccttcagaaccggaggc aacagttgaatgaaatgtaaggattcaacacatggctggaagctaaggaagaag ctgagcaggcttaggacaggccagagccaagcttgagtcaggaaggagggtccc tatacagtagatgcaatccaaaagaaaatcacagaaccaag
エクソン55 (配列番号 15)	ggtgagtgagcgagaggctgcttggagaactcatagattactgcaacagttcccc ctggacctggaaaagtttctgctggcttacagaagctgaaacaactgccaatgtcct acaggatgctaccgtaaggaaaaggctcctagaagactccaaggagtaaaagag ctgatgaaacaatggcaa

10

【0205】

20

修飾アンチセンスオリゴマーは、エクソン、例えばエクソン2の発現を効果的に減少させ、それにより機能的なミオスタチンタンパク質の発現を減少させることが好ましい。修飾ジストロフィンアンチセンスオリゴマーは、ジストロフィンプレmRNAの異常なスプライシングを効果的にモジュレートし、それにより機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させることが好ましい。この要件は、任意選択で、オリゴマー化合物が、哺乳動物細胞により能動的に取り込まれ、取り込まれると、標的mRNAと共に、任意選択で、Tmが、約40 または45 を超える、安定的な二重鎖（またはヘテロ二重鎖）を形成する能力を有する場合に満たされる。

【0206】

本明細書で使用される「相補的 (complementary)」または「相補的 (complementary)」とは、標的配列と相補的なヌクレオチドターゲティング配列のうちの、約90%~約100%を有する修飾アンチセンスオリゴマーのターゲティング配列を指す。複数の実施形態では、相補的なヌクレオチドターゲティング配列は、標的配列と特異的にハイブリダイズして、所望の効果、例えば、本明細書に記載される治療効果を誘導する。ある特定の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーのターゲティング配列は、オリゴマーターゲティング配列と標的配列との間に形成されるヘテロ二重鎖が、細胞ヌクレアーゼの作用、および *in vivo* において生じうる、他の様態の分解に抗するのに十分に安定である限りにおいて、標的配列と100%相補的な場合もあり、例えば、改変体を擁するように、ミスマッチを含む場合もある。よって、ある特定のオリゴマーターゲティング配列は、オリゴマーターゲティング配列と、標的配列との間の、約90%または少なくとも約90%の配列相補性、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列相補性を意味する、実質的な相補性を有しうる。本明細書では、ヌクレアーゼによる切断を受けにくいオリゴマーのヌクレオシド間連結が提供される。ミスマッチは、存在する場合、ハイブリッド二重鎖の中央部より、末端領域に向かって、より不安定化しにくくなるのが典型的である。許容されるミスマッチの数は、よく理解されている、二重鎖安定性の原理に従い、オリゴマーの長さ、二重鎖内のG:C塩基対の百分率、および二重鎖内のミスマッチの位置に依存すると予想される。このような改変アンチセンスオリゴマーは必ずしも、標的配列に対する、100%の相補性を含むわけではないが、標的プレmRNAのスプライシングを十分にモジュレートする、例えば、本明細書に記載される治療効果を達成するよう

30

40

50

に、標的配列に、有効に、安定的に、かつ特異的に結合するのに十分な相補性を有すべきである。

【0207】

理論に束縛されずに述べると、オリゴマーと、標的配列との間で形成される二重鎖の安定性は、結合 T_m と、二重鎖の、細胞酵素による切断の受けやすさとの関数であると考えられる。相補配列であるRNA二重鎖との関連における、オリゴマーの T_m は、Hamesら、「Nucleic Acid Hybridization」、IRL Press、1985年、107～108頁により記載されている方法、またはMiyada C. G.およびWallace R. B.、1987年、「Oligomer Hybridization Techniques」、Methods Enzymol.、154巻、94～107頁（この内容は、本明細書中に参考として援用される）において記載されている方法など、従来の方法により測定することができる。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、相補配列であるRNA二重鎖との関連における結合 T_m であって、例えば、約45 または50 を超えるなど、体温を超える T_m を有する。60～80 またはこれを超える範囲の T_m もまた含まれる。周知の原理に従い、相補性ベースのRNAハイブリッド二重鎖との関連における、オリゴマーの T_m は、二重鎖内のC：G対合塩基の比を増加させ、かつ/またはヘテロ二重鎖の長さ（塩基対での）を増加させることにより、上昇させることができる。

10

【0208】

下記の表3は、ミオスタチンプレmRNAのエクソン2、イントロン1/エクソン2、または、エクソン2/イントロン2内の標的領域と相補的な例示的なターゲティング配列（5'→3'方向）を示す。

20

【表3-1】

ターゲティング配列	配列
MSTN-D30 (配列番号16)	cagcccatcttctcctggtcctgggaaggt
muhuMSTN-SD2(+24-01) (配列番号17)	ccagcccatcttctcctggtcctgg
muhuMSTN-SD2(+18-07) (配列番号18)	cacttaccagcccatcttctcctgg
huMSTN-SA2(-01+25) (配列番号19)	ccatccgcttcattagaaagtcagc
huMSTN-SA2(-09+15) (配列番号20)	gcattagaaaatcagctataaatg

30

【表 3 - 2】

huMSTN-SA2(-01+21) (配列番号 21)	ccactgcattagaaatcagc	
huMSTN-SA2(-07+18) (配列番号 22)	ctgcattagaaatcagctataa	
huMSTN-SA2(-05+20) (配列番号 23)	cactgcattagaaatcagctata	
huMSTN-SA2(-04+21) (配列番号 24)	ccactgcattagaaatcagctat	10
huMSTN-SA2(-03+22) (配列番号 25)	tccactgcattagaaatcagcta	
huMSTN-SA2(-02+23) (配列番号 26)	atccactgcattagaaatcagct	
huMSTN-SA2(-01+24) (配列番号 27)	catccactgcattagaaatcagc	
muhuMSTN-SD2(+04-21) (配列番号 28)	ttatttcagttatcactaccagc	20
muhuMSTN-SD2(+07-18) (配列番号 29)	tttcagttatcactaccagecca	
muhuMSTN-SD2(+10-15) (配列番号 30)	tcagttatcactaccagccatct	
muhuMSTN-SD2(+13-12) (配列番号 31)	gttactaccagccatcttct	
muhuMSTN-SD2(+16-09) (配列番号 32)	atcactaccagccatcttctct	30
muhuMSTN-SD2(+19-06) (配列番号 33)	actaccagccatcttctctgt	
muhuMSTN-SD2(+22-03) (配列番号 34)	taccagccatcttctctgtct	
muhuMSTN-SD2(+01-24) (配列番号 35)	atgtatttcagttatcactacc	
muhuMSTN-SD2(+02-23) (配列番号 36)	tgttatttcagttatcactacca	
muhuMSTN-SD2(+03-22) (配列番号 37)	gttatttcagttatcactaccag	40
muhuMSTN-SD2(+05-20) (配列番号 38)	tatttcagttatcactaccagcc	

【表 3 - 3】

muhuMSTN-SD2(+06-19) (配列番号 39)	atttcagttatcacttaccagccc	
muhuMSTN-SD2(+08-17) (配列番号 40)	ttcagttatcacttaccagcccat	
muhuMSTN-SD2(+09-16) (配列番号 41)	ttcagttatcacttaccagcccatc	
muhuMSTN-SD2(+11-14) (配列番号 42)	cagttatcacttaccagcccatctt	10
muhuMSTN-SD2(+12-13) (配列番号 43)	agttatcacttaccagcccatcttc	
Mstn D (‘139 app) (配列番号 44)	cagcccatcttctcctggctctgggaaggt	
GDF8/D3 (‘139 app) (配列番号 45)	cagcccatcttctcctggctc	
GDF8/D2 (‘139 app) (配列番号 46)	tctcctggctctgggaaggt	20
GDF8/D1 (‘139 app) (配列番号 47)	ctgggaaggttacagcaaga	
huMSTN-SD2(+18+1) (配列番号 48)	cagcccatcttctcctgg	
muhuMSTN-SD2(+25+03) (配列番号 49)	gcccattctcctggctcctggg	
huMSTN-SA2(+26+50) (配列番号 50)	tttaagaagcaacatttgggttt	
huMSTN-SA2(+41+65) (配列番号 51)	tatttagagctaaatttaagaag	30
huMSTN-SA2(+56+80) (配列番号 52)	tactttattgtattgtatttagag	
huMSTN-SA2(+71+95) (配列番号 53)	tagttggccttactactttattg	
huMSTN-SA2(+86+110) (配列番号 54)	tctcaaatatccatagttgggcc	
huMSTN-SA2(+91+115) (配列番号 55)	acgggtctcaaatatccatagtt	40
huMSTN-SA2(+101+130) (配列番号 56)	gttgtaggagtctcgacgggtctcaaatat	

【表 3 - 4】

huMSTN-SA2(+111+135) (配列番号 57)	acactgttgtaggagctcgcacggg
huMSTN-SA2(+141+165) (配列番号 58)	taggttgatgagctcaggattg
huMSTN-SA2(+151+175) (配列番号 59)	ccgtcttcataggttgatgagtc
huMSTN-SA2(+160+189) (配列番号 60)	cagtatacctgtaccgtcttcataggt
huMSTN-SA2(+196+220) (配列番号 61)	gggtcatgtcaagttcagagatc
huMSTN-SA2(+204+233) (配列番号 62)	aataccagtgcctgggtcatgcaagtt
huMSTN-SA2(+210+234) (配列番号 63)	aaataccagtgcctgggtcatgctc
huMSTN-SA2(+216+240) (配列番号 64)	tctgccaaataccagtgcctgggt
huMSTN-SA2(+231+255) (配列番号 65)	tctcacatcaatgctctgccaat
huMSTN-SA2(+261+285) (配列番号 66)	caggtgttgagccaatttgcaa
huMSTN-SA2(+276+291) (配列番号 67)	tgccctaagttggattcaggtgttt
huMSTN-SA2(+291+305) (配列番号 68)	aagctttattcaatgcctaagtt
huMSTN-SA2(+306+330) (配列番号 69)	gaccattctcatctaaagctttat
huMSTN-SA2(+321+345) (配列番号 70)	ttacagcaagatcatgaccattctc
「/」は、スプライス部位を示す	

10

20

30

【 0 2 0 9 】

ある特定の修飾アンチセンスオリゴマーは、このように、表 3 の配列（例えば配列番号 16 ~ 75）を含むか、これからなるか、もしくはこれから本質的になるか、配列番号 16 ~ 75 から選択されるか、配列番号 16 ~ 75 から選択される配列の少なくとも 12 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 16 ~ 75 から選択される配列に対する少なくとも 90% の配列同一性を有する変異体であり、各 X はウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各 Y はシトシン（C）または 5 - メチルシトシン（5 m C）から独立に選択される。例えば、ある特定の修飾アンチセンスオリゴマーは、配列番号 16 ~ 75 のいずれかの、約または少なくとも約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 の連続または非連続ヌクレオチドを含む。非連続部分においては、介在するヌクレオチドを削除できるか、もしくは異なるヌクレオチドで置換でき、または介在ヌクレオチドを追加できる。変異体の

40

50

さらなる例は、配列番号 16 ~ 75 のいずれかの全長に対して、約または少なくとも約 90% の配列同一性または相同性、例えば 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性または相同性を有するオリゴマーを含む。ある特定の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号 16 ~ 75 から選択される。

【0210】

ジストロフィン遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドは、WO2006/000057、WO2011/057350、WO2010/048586、WO2014/100714、WO2014/153220、米国出願第 US20140315862 号、米国出願第 US20140323544 号、米国出願第 US20120202752 号、米国出願第 US20030235845 号、米国出願第 US20110312086 号、米国出願第 US20090312532 号、米国出願第 US20090269755 号、米国出願第 US20130211062 号、米国出願第 US20140343266 号、米国出願第 US20120059042 号、米国出願第 US20110294753 号、米国出願第 US20140113955 号、米国出願第 US20150166996 号、米国出願第 US20150203849 号、米国出願第 US20150045413 号および米国出願第 US20140057964 号に開示されており、これらは参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。

【0211】

ある特定の修飾アンチセンスオリゴマーは、このように、表 4 の配列（例えば配列番号 76 ~ 3485）を含むか、これからなるか、もしくはこれから本質的になるか、配列番号 76 ~ 3485 から選択されるか、配列番号 76 ~ 3485 から選択される配列の少なくとも 10 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 76 ~ 3485 から選択される配列に対する少なくとも 90% の配列同一性を有する変異体であり、各 X はウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各 Y はシトシン（C）または 5-メチルシトシン（5mC）から独立に選択される。例えば、ある特定の修飾アンチセンスオリゴマーは、配列番号 76 ~ 3485 のいずれかの、約または少なくとも約 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 の連続または非連続ヌクレオチドを含む。非連続部分においては、介在するヌクレオチドを削除でき、もしくは異なるヌクレオチドで置換でき、または介在ヌクレオチドを追加できる。改変体のさらなる例は、約 90% または少なくとも約 90% の配列同一性または配列相同性、例えば、配列番号 76 ~ 3485 のいずれかの全長にわたる、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性または配列相同性を有するオリゴマーを含む。ある特定の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号 76 ~ 3485 から選択される。一部の実施形態では、ターゲティング配列は配列番号 76 を含む。

【0212】

改変アンチセンスオリゴマーおよびその改変体の活性/機能性は、当技術分野における慣例的な技法に従いアッセイすることができる。例えば、サーベイされる RNA のスプライス形態および発現レベルを、転写される核酸またはタンパク質のスプライス形態および/または発現を検出するための、多種多様な周知の方法のうちいずれかにより評価することができる。このような方法の非限定的な例は、RNA のスプライシング形態についての RT-PCR に続く、PCR 産物のサイズによる分離、核酸ハイブリダイゼーション法、例えば、ノーザンブロット、ならびに/または核酸アレイ；核酸増幅法；タンパク質を検出するための免疫学的方法；タンパク質精製法；およびタンパク質機能アッセイまたはタンパク質活性アッセイの使用を含む。

【0213】

RNA 発現レベルは、mRNA / cDNA（すなわち、転写されるオリゴヌクレオチド）を、細胞、組織、または生物体から調製し、mRNA / cDNA を、アッセイされる核

10

20

30

40

50

酸またはその断片の相補体である基準オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることにより評価することができる。cDNAは、任意選択で、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの前に、様々なポリメラーゼ連鎖反応または*in vitro*における転写法のうちのいずれかを使用して増幅することもできるが；増幅しないことが好ましい。1または複数の転写物の発現はまた、転写物の発現レベルについて評価する、定量的PCRを使用して検出することもできる。

【0214】

III. 改変アンチセンスオリゴマー化学

A. 一般的特徴

多様な態様および実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、ミオスタチンブレムRNA内のターゲティング領域と特異的にハイブリダイズする。例示的な改変アンチセンスオリゴマーは、表3に明示されたターゲティング配列、表3のターゲティング配列のうちの、少なくとも12連続ヌクレオチドの断片、または表3のターゲティング配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体を含む。他の例示的な改変アンチセンスオリゴマーは、表3に明示されたターゲティング配列からなるか、またはこれらから本質的になる。

10

【0215】

多様な態様および実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、ジストロフィンブレムRNA内の標的領域と特異的にハイブリダイズする。例示的な修飾アンチセンスオリゴマーは、表4に明示されたターゲティング配列、表4のターゲティング配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片、または表4のターゲティング配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体を含む。他の例示的な修飾アンチセンスのオリゴマーは、表4に明示されたターゲティング配列からなるか、またはこれから本質的になる。

20

【0216】

さらなる態様では、ヌクレアーゼ耐性改変アンチセンスオリゴマーが提供される。多様な実施形態では、1または複数のヌクレオシド間連結の修飾を含む改変アンチセンスオリゴマーが提供される。他の実施形態では、1または複数の修飾糖部分を含む改変アンチセンスオリゴマーが提供される。他の実施形態では、1または複数の修飾ヌクレオシド間連結と、1または複数の修飾糖部分との組合せを含む、改変アンチセンスオリゴマーが提供される。他の実施形態では、修飾ヌクレオ塩基単独、または修飾ヌクレオシド間連結もしくは修飾糖部分のうちのいずれかと組み合わせた修飾ヌクレオ塩基を含む、改変アンチセンスオリゴマーが提供される。

30

【0217】

多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、完全に修飾されたヌクレオシド間連結を有するオリゴマーを含むことが可能であり、例えば、ヌクレオシド間連結の100%が修飾されている（例えば、25merの改変アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される修飾のうちの1つまたはこれらの任意の組合せで修飾された、24のヌクレオシド間連結を含む）。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、そのヌクレオシド間連結の約100%~2.5%が修飾されたものを含みうる。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、そのヌクレオシド間連結のうちの約99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または2.5%、およびその間の整数（iteration）の%が修飾されたものを含みうる。他の実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される修飾の任意の組合せを含みうる。

40

【0218】

修飾ヌクレオシド間連結のパーセントについての実施形態と組み合わせた実施形態を含む、多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、完全修飾糖部分を有するオリゴマーを含むことが可能であり、例えば、糖部分の100%が修飾されている（例えば、25merの改変アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される修飾のうちの1つま

50

たはこれらの任意の組合せで修飾された、25の糖部分を含む)。多様な実施形態では、
 改変アンチセンスオリゴマーは、その糖部分の約100%~2.5%が修飾されたものを
 含む。多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、その糖部分のうちの約
 99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、
 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、ま
 たは2.5%、およびその間の整数の%が修飾されたものを含む。他の実施形態では
 、改変アンチセンスオリゴマーは、本明細書に記載される修飾の任意の組合せを含むう
 。

【0219】

多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、実質的に非荷電であり、任意選
 択で、細胞膜を横切る、能動的な輸送または促進された輸送のための基質として適する。 10
 一部の実施形態では、全てのヌクレオシド間連結は、非荷電である。オリゴマーが、標的
 プレ mRNA と共に、安定的な二重鎖を形成する能力はまた、標的との関連における、改
 変アンチセンスオリゴマーの相補性の長さおよび程度、G:C塩基マッチの、A:T塩基
 マッチに対する比、ならびに任意のミスマッチ塩基の位置を含む、オリゴマーの他の特色
 にも関しうる。改変アンチセンスオリゴマーが、細胞ヌクレアーゼに抵抗する能力は、薬
 剤の存続および細胞質への最終的な送達を促進しうる。

【0220】

多様な実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、生理学的 pH で正に荷電してい
 るか、またはカチオン性である、少なくとも1つのヌクレオシド間連結を有する。さらなる 20
 実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、約5.5~約12の間の pKa を呈示
 する、少なくとも1つのヌクレオシド間連結を有する。さらなる実施形態では、改変アン
 チセンスオリゴマーは、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、も
 しくは10のヌクレオシド間連結、少なくともほぼこれらの数のヌクレオシド間連結、ま
 たはほぼこれらの数を超えないヌクレオシド間連結であって、約4.5~約12の間の pKa
 を呈示するヌクレオシド間連結を含有する。一部の実施形態では、改変アンチセンス
 オリゴマーは、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、
 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、
 もしくは100%のヌクレオシド間連結、または少なくともほぼこれらの比率のヌクレオ
 シド間連結であって、約4.5~約12の間の pKa を呈示するヌクレオシド間連結を含有 30
 する。任意選択で、改変アンチセンスオリゴマーは、塩基性の窒素と、アルキル基、アリ
 ル基、またはアラルキル基との両方を伴う、少なくとも1つのヌクレオシド間連結を
 有する。特定の実施形態では、1または複数のカチオン性ヌクレオシド間連結は、4-ア
 ミノピペリジン-1-イル (APN) 基またはその誘導体を含む。一部の実施形態では、
 改変アンチセンスオリゴマーは、モルホリノ環を含む。理論に束縛されるわけではないが
 、オリゴマー内の、1または複数のカチオン性連結 (例えば、APN 基または APN 誘導
 体) の存在は、標的ヌクレオチド内の、負に荷電したホスフェートへの結合を促進する
 ことが考えられる。こうして、変異体 RNA と、カチオン性連結を含有するオリゴマーとの
 間のヘテロ二重鎖の形成は、イオン性引力およびワトソン-クリック塩基対合の両方によ
 り一体に保持されうる。 40

【0221】

多様な実施形態では、カチオン性連結の数は、少なくとも2つであり、全ヌクレオシド
 間連結の約半分を超えず、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ
 、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20のカチオン
 性連結、またはほぼこれらを超えないカチオン性連結である。一部の実施形態では、し
 かし、ヌクレオシド間連結のうちの、最大で全ては、カチオン性連結であり、例えば、全
 ヌクレオシド間連結のうちの約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ
 、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、
 23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、3
 6、37、38、39、もしくは40、または少なくともほぼこれらの数は、カチオン性 50

連結である。さらなる実施形態では、約19～20単量体サブユニットのオリゴマーは、2つ～10、例えば、4～8つのカチオン性連結と、残りの非荷電連結とを有しうる。他の具体的な実施形態では、14～15サブユニットのオリゴマーは、2～7つ、例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つのカチオン性連結と、残りの非荷電連結とを有しうる。こうして、オリゴマー内のカチオン性連結の総数は、約1～10～18～20～30またはこれを超えて(間の全ての整数を含む)変動することが可能であり、オリゴマー全体にわたり散在しうる。

【0222】

一部の実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、10の非荷電連結ごとに約4つ～5つまたは4つもしくは5つなど、2つ～5つまたは2つ、3つ、4つ、もしくは5つの非荷電連結ごとに約1つのカチオン性連結または最大で約1つのカチオン性連結を有しうる。

10

【0223】

ある特定の実施形態は、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のカチオン性連結を含有する改変アンチセンスオリゴマーを含む。ある特定の実施形態では、アンチセンス活性の最適な改善は、ヌクレオシド間連結のうちの約25%がカチオン性である場合に見ることができる。ある特定の実施形態では、増強は、少数(例えば、10～20%)のカチオン性連結に関して見ることでもでき、カチオン性連結の数が、約60%など、50～80%の範囲内にある場合に見ることでもできる。

20

【0224】

さらなる実施形態では、カチオン性連結を、ヌクレオシド間連結に沿って散在させる。このようなオリゴマーは任意選択で、少なくとも2つの連続非荷電連結を含有する；すなわち、オリゴマーは任意選択で、その全長に沿って、厳密に交互のパターンを有さない。具体的な場合では、各1つまたは2つのカチオン性連結は、ヌクレオシド間連結に沿って、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つの非荷電連結により隔てられる。

【0225】

また、カチオン性連結のブロックと、非荷電連結のブロックとを有するオリゴマーも含まれる。例えば、中央の非荷電連結のブロックが、カチオン性連結のブロックに挟まれる場合もあり、この逆の場合もある。一部の実施形態では、オリゴマーは、ほぼ等長の5'領域、3'領域、および中央領域を有し、中央領域内のカチオン性連結の百分率は、カチオン性連結の総数のうちの、約50%、60%、70%、または80%を超える。

30

【0226】

ある特定の改変アンチセンスオリゴマーでは、カチオン性連結のバルク(例えば、カチオン性連結のうちの70%、75%、80%、90%)は、ヌクレオシド間連結の「中央領域」、例えば、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、または15の真ん中の連結(centermost linkage)に近接して分布する。例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、または24merのオリゴマーは、全カチオン性連結のうちの、少なくとも50%、60%、70%、または80%を、8つ、9つ、10、11、または12の真ん中の連結へと局在化させうる。

40

【0227】

B. 化学の特色

改変アンチセンスオリゴマーは、様々なヌクレオチド類似体サブユニットを含有しうる。さ

らなる例は、

- ホスホルアミデートを含有するオリゴマー、
- ホスホロジアミデートを含有するオリゴマー、
- ホスホロトリアミデートを含有するオリゴマー、
- ホスホロチオエートを含有するオリゴマー、

50

モルホリノを含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロジアミデートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' O - メチルを含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

ロケット核酸 (LNA) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' O - メトキシエチル (MOE) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' - フルオロを含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' O, 4' C - エチレン架橋核酸 (ENA) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

トリシクロDNA (tc-DNA) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル) エチル] を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

モルホリノを含有するオリゴマーであって、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリノ環の窒素原子に共有結合させ、かつ、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、または置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル (PMO プラス) 部分に共有結合させたオリゴマー、

モルホリノを含有するオリゴマーであって、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリノ環の窒素原子に共有結合させ、かつ、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分 (すなわち、APN) または置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル (PMO - X) 部分に共有結合させたオリゴマー、

モルホリノサブユニットであって、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリノ環の窒素原子に共有結合させ、かつ、ジメチルアミノ部分に共有結合させたオリゴマー、

リボース糖を含有するオリゴマーであって、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結またはホスホルアミデートヌクレオシド間連結をさらに含むオリゴマー、

デオキシリボース糖を含有するオリゴマーであってホスホロチオエートヌクレオシド間連結オリゴマーまたはホスホルアミデートヌクレオシド間連結をさらに含むオリゴマー、

任意選択でさらに置換された、ペプチドコンジュゲートホスホロジアミデートモルホリノ含有オリゴマー (PPMO)、

さらなる置換を含む、任意選択でさらに置換された、ペプチド核酸 (PNA) オリゴマー、

および前出のうちのいずれかの組合せを含む。

【0228】

ある特定の実施形態では、ホスホロジアミデート連結のリン原子を、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分、または置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分で、さらに置換する。

【0229】

一般に、PNA化学およびLNA化学は、PMOおよび2' O - Meオリゴマーと比べた、それらの比較的高度な標的結合強度のために、より短いターゲティング配列を活用しうる。ホスホロチオエート化学と、2' O - Me化学とを組み合わせると、2' O - Me - ホスホロチオエート類似体を作出することができる。例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO/2013/112053号および同第WO/2009/008725号を参照されたい。

【0230】

場合によって、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PMO) などの改変アン

10

20

30

40

50

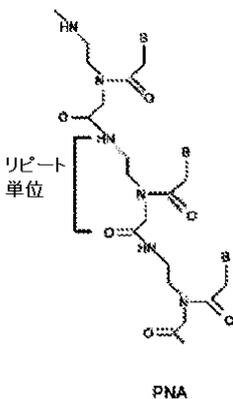
チセンスオリゴマーを、細胞透過性ペプチド (CPP) にコンジュゲートさせて、細胞内送達を促進することができる。ペプチドコンジュゲート PPMO は、PPMO と呼ばれ、ある特定の形態は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT 公開第 WO/2012/150960 号において記載されている PPMO を含む。一部の形態では、例えば、本明細書で記載される改変アンチセンスオリゴマーの 3' 末端にコンジュゲートまたは連結させた、アルギニンに富むペプチド配列を使用することができる。

【0231】

1. ペプチド核酸 (PNA)

ペプチド核酸 (PNA) とは、骨格が、デオキシリボース骨格と構造的に同形である、DNA の類似体であって、ピリミジン塩基またはプリン塩基を結合させた、N-(2-アミノエチル)グリシン単位からなる類似体である。天然のピリミジン塩基およびプリン塩基を含有する PNA は、ワトソン-クリック塩基対合則に従う相補的オリゴマーとハイブリダイズし、塩基対認識の点で、DNA を模倣する (Egholm、Buchardt ら、1993 年)。PNA のヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル結合ではなく、ペプチド結合により形成されることから、アンチセンス適用 (下記の構造を参照されたい) に良好に適する。骨格が非荷電である結果として、通常を超える熱安定性を呈示する、PNA/DNA 二重鎖または PNA/RNA 二重鎖がもたらされる。PNA は、ヌクレアーゼによっても、プロテアーゼによっても認識されない。PNA サブユニットを含む PNA オリゴマーの非限定的な例を、下記：

【化34】



に描示する。

【0232】

天然構造に対する大幅な構造変化にもかかわらず、PNA は、ヘリックス形態による、DNA または RNA への配列特異的結合が可能である。PNA の特徴は、相補的な DNA または RNA に対する高結合アフィニティー、単一塩基ミスマッチにより引き起こされる不安定化効果、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する耐性、塩濃度に依存しない、DNA または RNA とのハイブリダイゼーション、およびホモプリン DNA との三重鎖形成を含む。PANAGENE (Daejeon、Korea) は、Bts PNA 単量体 (Bts; ベンゾチアゾール-2-スルホニル基) と、オリゴマー化工程とを開発している。Bts PNA 単量体を使用する、PNA のオリゴマー化は、脱保護、カップリング、およびキャッピングの反復的サイクルから構成される。PNA は、当技術分野で公知の任意の技法を使用して、合成により作製することができる。例えば、米国特許第 6,969,766 号、同第 7,211,668 号、同第 7,022,851 号、同第 7,125,994 号、同第 7,145,006 号、および同第 7,179,896 号を参照されたい。PNA の調製についてはまた、米国特許第 5,539,082 号；同第 5,714,331 号；および同第 5,719,262 号も参照されたい。PNA 化合物についてのさらなる教示は、Nielsen ら、Science、254 巻：1497~1500 頁、1991 年においても見出すことができる。前出の各々は、参照によりその全体において本

明細書に組み込まれる。

【0233】

2. ロックト核酸 (LNA)

改変アンチセンスオリゴマー化合物はまた、「ロックト核酸」サブユニット (LNA) も含有しうる。「LNA」とは、架橋核酸 (BNA) と呼ばれる修飾のクラスのメンバーである。BNAは、リボース環のコンフォメーションを、C3'-エンド (ノーザン) 糖パッカー (sugar pucker) にロックする共有結合的連結を特徴とする。LNAでは、架橋は、2'-O位と4'-C位との間のメチレンから構成される。LNAは、骨格の事前組織化 (preorganization) および塩基スタッキングを増強して、ハイブリダイゼーションおよび熱安定性を増加させる。

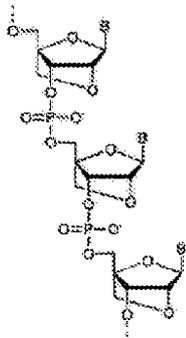
10

【0234】

LNAの構造は、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Wengelら、Chemical Communications (1998年)、455巻; Tetrahedron (1998年)、54巻: 3607頁、およびAccounts of Chem. Research (1999年)、32巻: 301頁; Obikaら、Tetrahedron Letters (1997年)、38巻: 8735頁; (1998年)、39巻: 5401頁、ならびにBioorganic Medicinal Chemistry (2008年)、16巻: 9230頁において見出すことができる。LNAサブユニットと、ホスホジエステルヌクレオシド間連結とを含む、LNAオリゴマーの非限定的な例を、下記:

20

【化35】



LNA

30

に描示する。

【0235】

本開示の化合物には、1または複数のLNAを組み込むことができ、場合によって、化合物を、LNAから完全に構成することもできる。個別のLNAヌクレオシドサブユニットの合成およびオリゴマーへのそれらの組み込みのための方法については、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第7,572,582号、同第7,569,575号、同第7,084,125号、同第7,060,809号、同第7,053,207号、同第7,034,133号、同第6,794,499号、および同第6,670,461号において記載されている。典型的なヌクレオシド間リンカーは、ホスホジエステル部分およびホスホロチオエート部分を含み、代替的に、リン非含有リンカーを使用することもできる。さらなる実施形態は、LNA含有化合物を含み、各LNAサブユニットは、DNAサブユニットで隔てられている。ある特定の化合物は、交互のLNAサブユニットおよびDNAサブユニットから構成され、ヌクレオシド間リンカーは、ホスホロチオエートである。

40

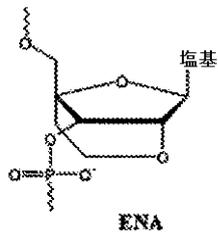
【0236】

2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸 (ENA) は、BNAのクラスの別のメンバーである。ENAサブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結の非限定的な例を、

50

下記：

【化36】



10

に描示する。

【0237】

ENAオリゴマーおよびそれらの調製については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Obikaら、Tetrahedron Lett、38巻(50号)：8735頁において記載されている。本開示の化合物には、1または複数のENAサブユニットを組み込むことができる。

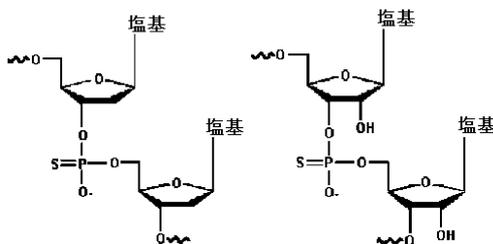
【0238】

3. ホスホロチオエート

「ホスホロチオエート」(またはS-オリゴ)とは、生来DNAまたは生来RNAの改変体であって、ホスホジエステルヌクレオシド間連結の非架橋酸素のうちの1つを、硫黄で置きかえた改変体である。デオキシリボースサブユニットと、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結とを含む、ホスホロチオエートDNA(左)、および、リボースサブユニットと、ホスホロチオエート(phosphorothioate)ヌクレオシド間連結とを含む、ホスホロチオエートRNA(右)の非限定的な例を、下記：

20

【化37】



30

に描示する。

【0239】

ヌクレオシド間結合の硫黄化(sulfurization)は、5'-3'および3'-5'DNA POL 1エクソヌクラーゼ、ヌクラーゼS1およびP1、RNAアーゼ、血清ヌクラーゼ、ならびにヘビ毒ホスホジエステラーゼを含む、エンドヌクラーゼおよびエクソヌクラーゼの作用を低減する。ホスホロチオエートは、2つの主要な経路：ホスホン酸水素上の炭素ジスルフィド内の硫黄元素の溶解作用、または亜リン酸トリエステルを、テトラエチルチウラムジスルフィド(TETD)もしくは3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシド(3H-1,2-bensodithiol-3-one 1,1-dioxide; BDTD)で硫黄化する方法(例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Iyerら、J. Org. Chem. 55巻、4693~4699頁、1990年を参照されたい)により作製し得る。後者の方法は、大半の有機溶媒中の硫黄元素の不溶性および炭素ジスルフィドの毒性の問題を回避する。TETD法およびBDTD法はまた、高純度のホスホロチオエートももたらす。

40

【0240】

4. トリシクロDNAおよびトリシクロホスホロチオエートヌクレオチド

トリシクロDNA(tc-DNA)とは、各ヌクレオチドを、シクロプロパン環の導入

50

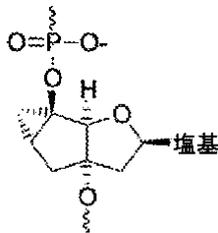
により修飾して、骨格のコンフォメーション可撓性を制約し、ねじれ角の骨格形状を最適化した、拘束DNA類似体のクラスである。ホモ塩基性のアデニン含有tc-DNAおよびチミン含有tc-DNAは、相補的なRNAと共に、極めて安定的なA-T塩基対を形成する。トリシクロDNAおよびそれらの合成については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2010/115993号において記載されている。本開示の化合物には、1または複数のトリシクロDNAサブユニットを組み込むことができ、場合によって、化合物は、トリシクロDNAサブユニットから完全に構成されうる。

【0241】

トリシクロホスホロチオエートヌクレオチドとは、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結を伴うトリシクロDNAサブユニットである。トリシクロホスホロチオエートヌクレオチドおよびそれらの合成については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2013/053928号において記載されている。本開示の化合物には、1または複数のトリシクロDNAサブユニットを組み込むことができ、場合によって、化合物は、トリシクロDNAヌクレオチドから完全に構成されうる。トリシクロDNA/三環系(tricyclic)サブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結の非限定的な例を、下記：

10

【化38】



20

トリシクロ-DNA

に描示する。

【0242】

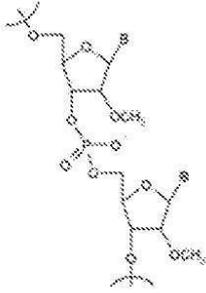
5. 2'-O-メチルオリゴマー、2'-O-MOEオリゴマー、および2'-Fオリゴマー

30

「2'-O-Meオリゴマー」分子は、リボース分子の2'-OH残基において、メチル基を保有するサブユニットを含む。2'-O-Me-RNAは、DNAと同じ(または類似の)挙動を示すが、ヌクレアーゼによる分解に対して保護されている。2'-O-Me-RNAはまた、さらなる安定化のために、ホスホロチオエートオリゴマー(PTO)と組み合わせることもできる。2'-O-Meオリゴマー(2'-OMeサブユニットが、ホスホジエステルヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結により接続されている)は、当技術分野における慣例的な技法(例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Yooら、Nucleic Acids Res.、32巻：2008~16頁、2004年を参照されたい)に従い、合成することができる。2'-OMeサブユニットおよびホスホジエステルサブユニット間連結を含む2'-O-Meオリゴマーの非限定的な例を、下記：

40

【化 3 9】



10

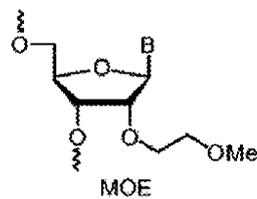
に描示する。

【0243】

2'-O-Meオリゴマーはまた、ホスホロチオエート連結(2'-O-Meホスホロチオエートオリゴマー)も含みうる。2'-O-Meオリゴマーなどの2'-O-メトキシエチルオリゴマー(2'-O-MOE)は、リボース分子の2'-OH残基において、メトキシエチル基を保有するサブユニットを含み、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Martinら、*Helv. Chim. Acta*、78巻、486~504頁、1995年において論じられている。2'-O-MOEサブユニットの非限定的な例を、下記：

20

【化 4 0】



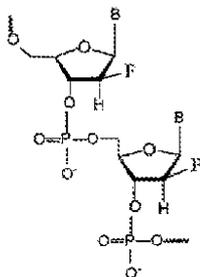
に描示する。

【0244】

前出のアルキル化2'-OHリボース誘導体と対照的に、2'-フルオロオリゴマーは、2'位において、2'-OHの代わりにフルオロラジカルを有するサブユニットを含む。2'-Fサブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結を含む2'-Fオリゴマーの非限定的な例を、下記：

30

【化 4 1】



40

に描示する。

【0245】

2'-フルオロオリゴマーについては、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、WO2004/043977においてさらに記載されている。本開示の化合物には、1または複数の2'-O-メチルサブユニット、2'-O-MOEサブユニット、および2'-Fサブユニットを組み込むことができ、本明細書で記載されるヌクレオシド間連結

50

のうちのいずれかを活用することができる。場合によって、本開示の化合物は、2' O - メチル、2' O - MOE、または2' Fサブユニットから完全に構成しうると予想される。本開示の化合物についての一実施形態は、2' O - メチルサブユニットから完全に構成される。

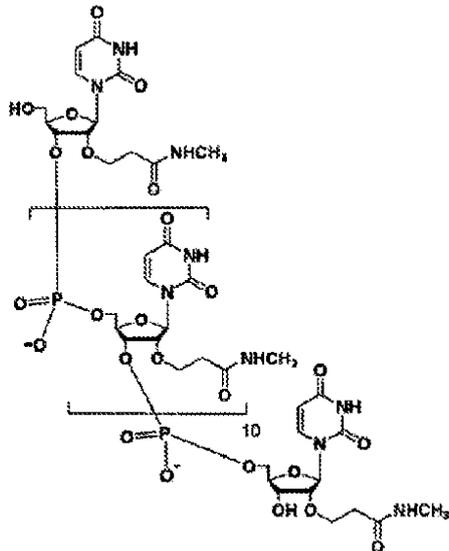
【0246】

6. 2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル) エチル] オリゴマー (MCE)

MCEは、本開示の化合物中で有用な、2' O 修飾リボヌクレオチドの別の例である。この例では、2' OHを、2 - (N - メチルカルバモイル) エチル部分へと誘導体化して、ヌクレアーゼ耐性を増加させる。MCEサブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結を含むMCEオリゴマーの非限定的な例を、下記：

10

【化42】



20

に描示する。

【0247】

MCEおよびそれらの合成については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Yamadaら、J. Org. Chem.、76巻(9号)：3042～53頁において記載されている。本開示の化合物には、1または複数のMCEサブユニットを組み込むことができる。

30

【0248】

7. モルホリノベースのオリゴマー

モルホリノベースのオリゴマーとは、ヌクレオ塩基を支持するモルホリノサブユニットを含むオリゴマーを指し、リボースの代わりに、モルホリニル環を含有する。例示的なヌクレオシド間連結は、例えば、1つのモルホリノサブユニットのモルホリニル環窒素を、隣接するモルホリノサブユニットの4'環外炭素に接合する、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロジアミデートヌクレオシド間連結を含む。各モルホリノサブユニットは、塩基特異的水素結合により、オリゴヌクレオチド内の塩基に結合するのに有効な、プリンまたはピリミジンのヌクレオ塩基を含む。

40

【0249】

モルホリノベースのオリゴマー(改変アンチセンスオリゴマーを含む)については、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第5,698,685号；同第5,217,866号；同第5,142,047号；同第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,521,063号；同第5,506,337号；ならびに係属中の米国特許出願第12/271,036号；同第12/271,040号；およびPCT公開第WO/2009/064471号および同第WO/2012/043730号；ならびにSummertonら、1997年、

50

「Antisense and Nucleic Acid Drug Development」、7巻、187～195頁において詳述されている。「モルホリノサブユニット」という用語は、Summertonらに記載されている通りに使用される。

【0250】

オリゴマー構造内で、リン酸基は一般に、オリゴマーの「ヌクレオシド間連結」を形成する基として言及される。RNAおよびDNAの天然に存在するヌクレオシド間連結は、3'-5'ホスホジエステル連結である。「ホスホルアミデート」基が、3つの結合酸素原子と、1つの結合窒素原子とを有するリンを含むのに対し、「ホスホロジアミデート」基は、2つの結合酸素原子と、2つの結合窒素原子とを有するリンを含む。「ホスホトリアミデート」基（またはリン酸トリアミド基）は、1個の結合する酸素原子および3個の結合する窒素原子を有するリンを含む。本明細書に記載されるモルホリノベースのオリゴマーの非荷電ヌクレオシド間連結またはカチオン性ヌクレオシド間連結では、1つの窒素は常に、連結鎖に対してペンダントであるものである。ホスホロジアミデート連結における第2の窒素は、モルホリノ環構造内の環窒素であることが典型的である。

10

【0251】

「PMO」とは、(i)モルホリノ環の窒素原子への共有結合、および(ii)ジメチルアミノの窒素への第2の共有結合を伴うリン原子を有する、ホスホロジアミデートモルホリノベースのオリゴマーを指す。「PMO-X」とは、(i)モルホリノ環の窒素原子への共有結合、および(ii)例えば、4-アミノピペリジン-1-イル（すなわちAPN）または4-アミノピペリジン-1-イルの誘導体の環窒素への第2の共有結合を伴うリン原子を有するホスホロジアミデートモルホリノベースのオリゴマーを指す。例示的なPMO-Xオリゴマーについては、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、PCT出願第PCT/US2011/38459号およびPCT公開第WO2013/074834号において開示されている。PMO-Xは、リン原子を、モルホリノ基、および4-アミノピペリジン-1-イル（すなわち、APN）の環窒素へと連結する、少なくとも1つのヌクレオシド間連結を含む、PMO-Xオリゴマーを指す。「PMO-apn」、「PMO-APN」または「APN」を含む。具体的な実施形態では、表3および表4に明示されたターゲティング配列を含む修飾アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つのAPNを含有する連結またはAPN誘導体を含有する連結を含む。多様な実施形態は、モルホリノベースのオリゴマーであって、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の、APN/APN誘導体を含有する連結を有し、残りの連結（100%未満である場合）が、非荷電連結であり、例えば、全ヌクレオシド間連結のうちの約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50、または少なくともほぼこれらの数が、APN/APN誘導体を含有する連結であるオリゴマーを含む。

20

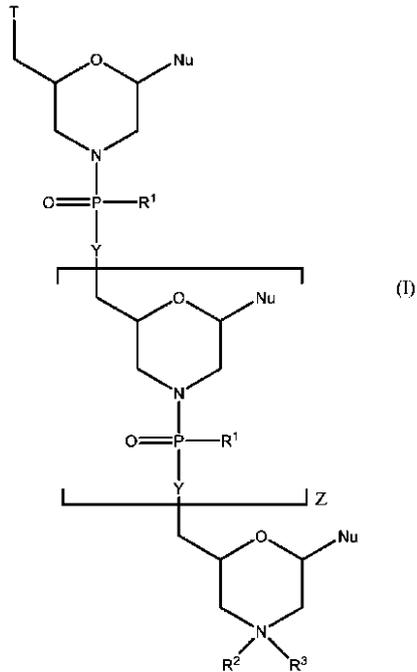
30

【0252】

多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、式(I)：

40

【化 4 3】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩であり、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

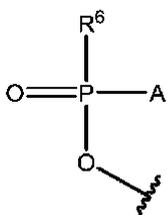
Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および -NR₄ から独立に選択され、式中、各 R₄ は、H、C₁ ~ C₆ アルキル、アラルキル、C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)_nNR₅C(=NH)NH₂、C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NR₅C(=NH)NH₂ および G から独立に選択され、式中、R₅ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから選択され、n は、1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 4 4】



の部分か選択され、式中、

40

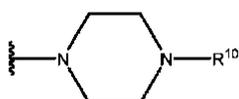
A は、-OH、-N(R⁷)₂R⁸ から選択され、式中、

各 R⁷ は、H および C₁ ~ C₆ アルキルから独立に選択され、

R⁸ は、電子対および H から選択され、そして

R⁶ は、OH、-N(R⁹)CH₂C(O)NH₂ および式：

【化 4 5】



50

の部分から選択され、式中、

R^9 は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

R^{10} は、G、 $C(O) - R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4メトキシトリチル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1から5の整数であり、

R^{11} は、式 - (O - アルキル) $_y$ - を有し、式中、 y は、3から10の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

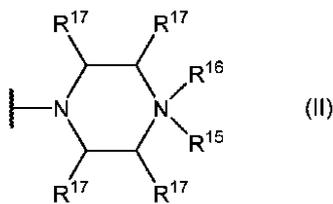
R^{12} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^1 の各例は、

- $N(R^{13})_2R^{14}$ [式中、各 R^{13} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、そして R^{14} は、電子対およびHから選択される] ；

式 (II) ；

【化46】



10

20

の部分 [式中、

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

R^{18} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

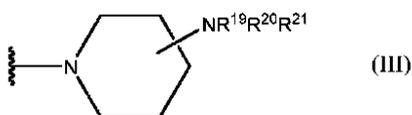
q は、1から5の整数であり、

R^{16} は、電子対およびHから選択され；

各 R^{17} は、Hおよびメチルから独立に選択される] ；および

式 (III) ；

【化47】



30

の部分 [式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ およびGから選択され、式中、

R^{22} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

r は、1から5の整数であり、

R^{20} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{21} は、電子対およびHから選択される]

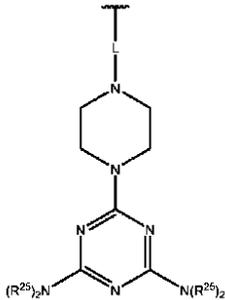
から独立に選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、-

40

50

$C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{23}$ 、 $-C(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ および式：
【化48】



10

の部分から選択され、式中、

R^{23} は、式 $-(O-アルキル)_v-OH$ を有し、式中、 v は、3 から 10 の整数であり、 v 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{24} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

s は、1 から 5 の整数であり；

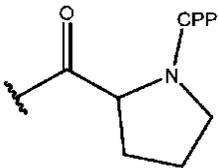
L は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ および $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ から選択され；

各 R^{25} は、式 $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$ を有し、式中、各 R^{26} は、式 $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ を有し；

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、 G は、 $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択される細胞透過性ペプチド（「CPP」）およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化49】



30

を有し、式中、CPP は、 G の最大で 1 つの例が存在するという条件で、CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合している。

【0253】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン2内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない標的領域内の、または、ミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロスプライス接合部にわたる領域（例えば配列番号2～3）の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である。

40

【0254】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択されるジストロフィンプレmRNAのエクソン内の標的領域内の、10またはこれを超える連続ヌ

50

クレオチドと相補的である。複数の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内に完全にありターゲット配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、または、ジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロスプライス接合部にわたる領域である。

【0255】

多様な実施形態では、ミオスタチンターゲット配列は、配列番号16~75のうちの1つを含むか、配列番号16~75のうちの1つから選択されるか、配列番号16~75のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも12の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号16~75のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号16~75の各Xはチミン(T)であり、配列番号16~75の各Yはシトシン(C)である。

10

【0256】

一部の実施形態では、式(I)のミオスタチンターゲット配列は、

a) 配列番号71 (YYAGYYAYXYXXYXYXGGXYXGG) [Zは25である];

b) 配列番号72 (YAYXXAYYAGYYAYXYXXYXYXGG) [Zは25である];

c) 配列番号73 (YYAYXXGYAXXAGAAAAXYAGY) [Zは22である];

d) 配列番号74 (GYATTAGAAAATYAGYTATAAATG) [Zは24である]; および

e) 配列番号75 (YYATYYGYTTGYATTAGAAAAGTYAGY) [Zは26である]

から選択され、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号71~75の各Xはチミン(T)であり、配列番号71~75の各Yはシトシン(C)である。

20

【0257】

多様な実施形態では、ジストロフィンターゲット配列は、配列番号76~3485のうちの1つを含むか、配列番号76~3485のうちの1つから選択されるか、配列番号76~3485のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号76~3485のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号76~3485の各Xはチミン(T)であり、配列番号76~3485の各Yはシトシン(C)である。一部の実施形態では、ターゲット配列は、配列番号76を含み得る。

30

【0258】

多様な実施形態では、ターゲット配列の少なくとも1つのXはTである。多様な実施形態では、ターゲット配列の各XはTである。

40

【0259】

多様な実施形態では、ターゲット配列の少なくとも1つのXはUである。多様な実施形態では、ターゲット配列の各XはUである。

【0260】

多様な実施形態では、ターゲット配列の少なくとも1つのYは5mCである。多様な実施形態では、ターゲット配列の各Yは5mCである。

【0261】

多様な実施形態では、ターゲット配列の少なくとも1つのYはCである。多様な実

50

施形態では、ターゲティング配列の各 Y は C である。

【0262】

多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の少なくとも 1 つの X は T である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 X は T である。

【0263】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも 1 つの X は U である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 X は U である。

【0264】

多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の少なくとも 1 つの Y は 5mC である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 Y は 5mC である。

10

【0265】

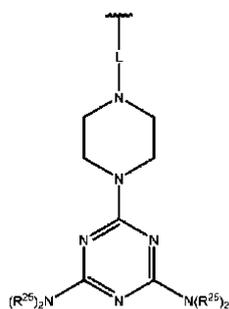
多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の少なくとも 1 つの Y は C である。多様な実施形態では、配列番号 16 ~ 75 および配列番号 76 ~ 3485 の各 Y は C である。

【0266】

一部の実施形態では、R³ は式：

【化50】

20



の部分である [式中、L は、-C(O)(CH₂)₆C(O)- または -C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)- から選択され、各 R²⁵ は、式 -(CH₂)₂OC(O)N(R²⁶)₂ を有し、各 R²⁶ は、式 -(CH₂)₆NHC(=NH)NH₂ を有する。かかる部分は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる米国特許第 7,935,816 号でさらに記載されている。

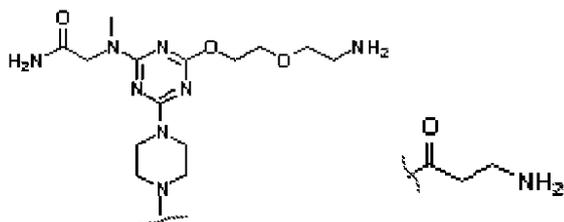
30

【0267】

ある特定の実施形態では、R³ は下記に描示されるいずれの部分を含んでもよい：

【化51】

40



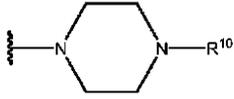
【0268】

多様な実施形態では、各 Y は O であり、R² は H または G から選択され、R³ は、電子対または H から選択される。一部の実施形態では、R² は G であり、CPP は配列番号 3486 ~ 3501 から選択される配列を有する。ある特定の実施形態では、R² は H である。

【0269】

50

【化 5 5】

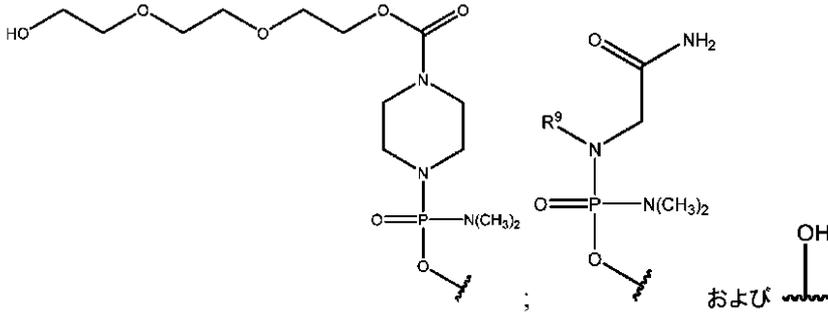


を有し、式中、 R^{10} は $-C(O)R^{11}OH$ である。

【0273】

一部の実施形態では、各 Y は O であり、T は、

【化 5 6】



10

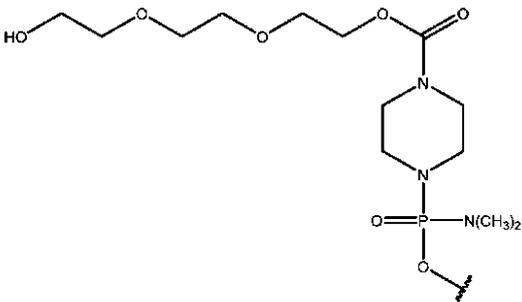
20

から選択される。

【0274】

ある特定の実施形態では、T は式：

【化 5 7】



30

を有する。

【0275】

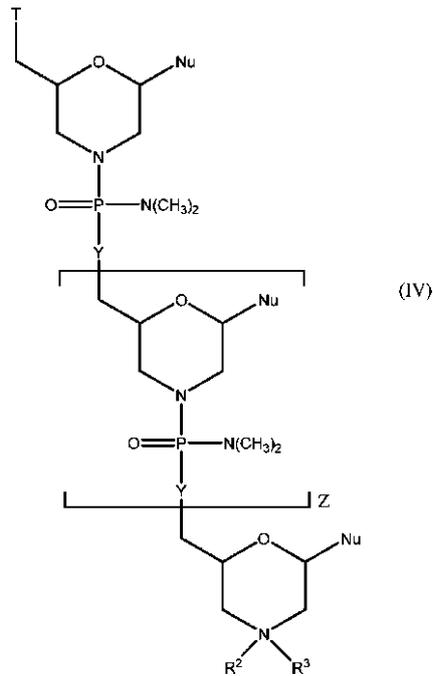
多様な実施形態では、各 Y は O であり、 R^2 は H または G から選択され、 R^3 は電子対または H から選択される。一部の実施形態では、 R^2 は G であり、CPP は、後述する配列番号 3486 ~ 3501 から選択される配列を有する。

【0276】

他の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、式 (IV)：

40

【化 5 8】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩であり、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

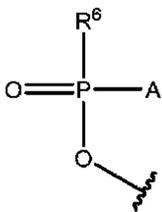
Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1 から 5 の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 5 9】



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中

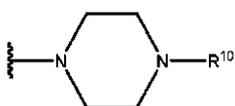
40

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ および式：

【化 6 0】



の部分から選択され、式中、

50

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、
 R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1 から 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 から 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ および $-C(O)-R^{23}$ から選択され；

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される。

【0277】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン2内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチド、または、ミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部（例えば配列番号1~3）にわたる領域と相補的である。

【0278】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択されるジストロフィンプレmRNAのエクソン内の標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である。複数の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、または、ジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部にわたる領域（例えば配列番号76~3485）である。

【0279】

多様な実施形態では、ミオスタチンターゲティング配列は、配列番号4~15のうちの一つを含むか、配列番号4~15のうちの一つから選択されるか、配列番号4~15のうちの一つの少なくとも一つから選択される配列の少なくとも12の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号4~15のうちの一つの少なくとも一つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号4~15の各Xはチミン(T)であり、配列番号4~15の各Yはシトシン(C)である。

【0280】

一部の実施形態では、式(IV)のミオスタチンターゲティング配列は、

a) 配列番号71 (YYAGYYAYXYXXYXYXGGXYXGG) [Zは25である]；

b) 配列番号72 (YAYXXAYYAGYYAYXYXXYXYXGG) [Zは25である]；

c) 配列番号73 (YYAYXXGYAXXAGAAAAXYAGY) [Zは22である]；

d) 配列番号74 (GYATTAGAAAATYAGYTATAAATG) [Zは24である]；および

10

20

30

40

50

e) 配列番号 75 (YYATYYGYTTGYATTAGAAAGTYAGY) [Zは26である]

から選択され、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号71~75の各Xはチミン(T)であり、配列番号71~75の各Yはシトシン(C)である。

【0281】

多様な実施形態では、ジストロフィンターゲット配列は、配列番号76~3485のうちの一つを含むか、配列番号76~3485のうちの一つから選択されるか、配列番号76~3485のうち少なくとも一つから選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号76~3485のうち少なくとも一つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号76~3485の各Xはチミン(T)であり、配列番号76~3485の各Yはシトシン(C)である。一部の実施形態では、ターゲット配列は、配列番号76を含み得る。

10

【0282】

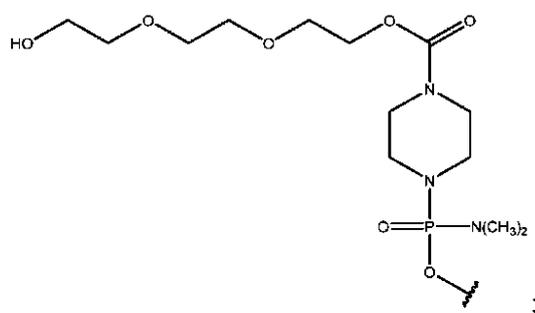
多様な実施形態では、YはOであり、R²はHまたはGから選択され、R³は電子対またはHから選択される。一部の実施形態では、R²はGであり、CPPは配列番号9~24から選択される配列を有する。ある特定の実施形態では、R²はHである。

20

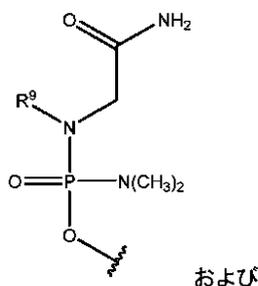
【0283】

一部の実施形態では、YはOであり、Tは、

【化61】



30



40



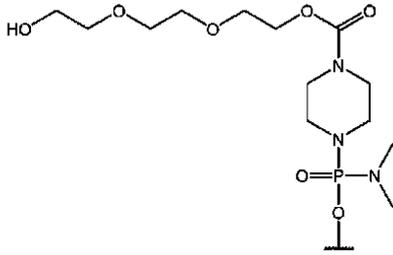
から選択される。

【0284】

一部の実施形態では、Tは式：

50

【化 6 2】



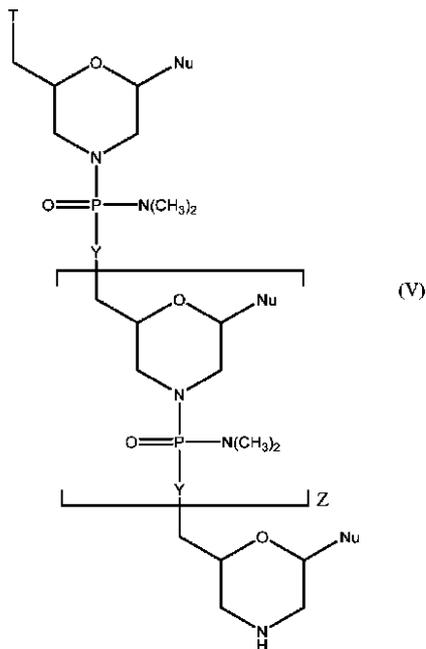
10

を有し、 R^2 は水素であり、 R^3 は電子対である。

【0 2 8 5】

他の実施形態では、改変アンチセンスオリゴマーは、式 (V) :

【化 6 3】



20

30

の化合物または薬学的に許容されるその塩であり、式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

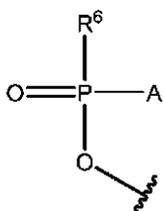
Z は、8 から 48 の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は 1 から 5 の整数であり；

40

T は、OH および式：

【化 6 4】



50

の部分から選択され、式中、

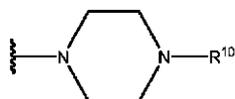
A は、 $-OH$ 、 $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中

R^7 は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、 OH 、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ および式：

【化 6 5】



10

の部分から選択され、式中、

R^9 は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{10} は、 G 、 $C(O)R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4メトキシトリチル、 $C(=NH)NH_2$ 、 $C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ および $C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中

m は、1 から 5 の整数であり、

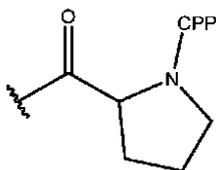
R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 から 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

ここで、 G は、 $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択される、細胞透過性ペプチド（「CPP」）およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 6 6】



30

を有し、式中、 CPP は、 G の最大で 1 つの例が存在するという条件で、 CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合している。

【0286】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン2内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない標的領域内の12もしくはこれを超える連続ヌクレオチド、または、ミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部（例えば配列番号1~3）にわたる領域と相補的である。

40

【0287】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択される、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内の標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である。複数の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmR

50

NAのエクソン内に完全にありターゲット配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、またはジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部(例えば配列番号4~15)にわたる領域である。

【0288】

多様な実施形態では、ミオスタチンターゲット配列は、配列番号16~75のうちの1つを含むか、配列番号16~75のうちの1つから選択されるか、配列番号16~75のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも12の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号16~75のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号16~75の各Xはチミン(T)であり、配列番号16~75の各Yはシトシン(C)である。

10

【0289】

一部の実施形態では、式(V)のミオスタチンターゲット配列は、

a) 配列番号71 (YYAGYYAYAXYXXYXYXGGXYXGG) [Zは25である];

b) 配列番号72 (YAYXXAYYAGYYAYAXYXXYXYXGG) [Zは25である];

c) 配列番号73 (YYAYXXGYAXXAGAAAAXYAGY) [Zは22である];

20

d) 配列番号74 (GYATTAGAAAATYAGYTATAAATG) [Zは24である]; および

e) 配列番号75 (YYATYYGYTTGYATTAGAAAAGTYAGY) [Zは26である]

から選択され、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号71~75の各Xはチミン(T)であり、配列番号71~75の各Yはシトシン(C)である。

【0290】

多様な実施形態では、ジストロフィンターゲット配列は、配列番号76~3485のうちの1つを含むか、配列番号76~3485のうちの1つから選択されるか、配列番号76~3485のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号76~3485のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号76~3485の各Xはチミン(T)であり、配列番号76~3485の各Yはシトシン(C)である。一部の実施形態では、ターゲット配列は、配列番号76を含み得る。

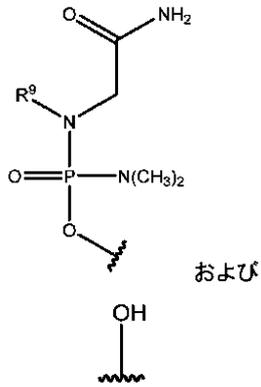
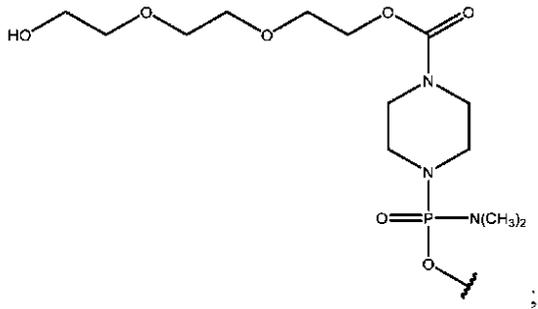
30

【0291】

多様な実施形態では、各YはOであり、Tは、

40

【化 6 7】



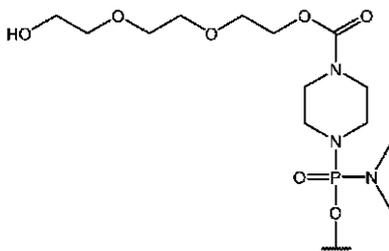
10

20

から選択される。

一部の実施形態では、Tは式：

【化 6 8】



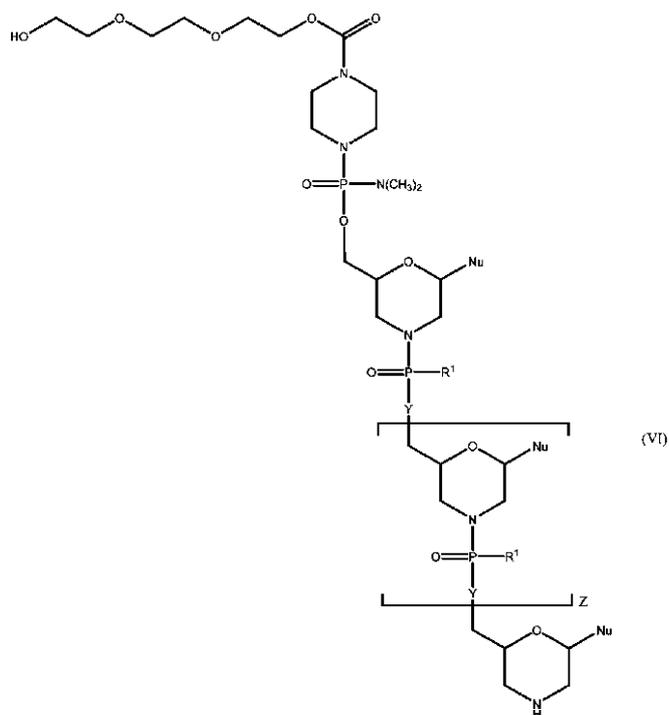
30

を有する。

【0292】

ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(VI)：

【化69】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩であり、式中、

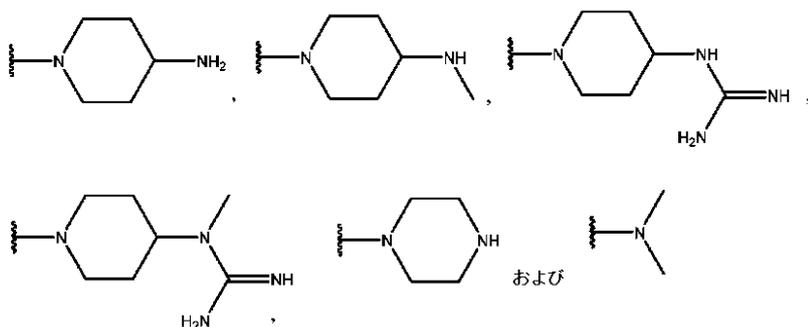
各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり、

Z は、15 ~ 25 の整数であり、

各 Y は、O であり、

各 R¹ は、

【化70】



30

から独立に選択される。

40

【0293】

多様な実施形態では、少なくとも1つの R¹ は -N(CH₃)₂ である。一部の実施形態では、各 R¹ は -N(CH₃)₂ である。

【0294】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン2内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない標的領域内の12またはこれを超える連続ヌクレオチド、または、ミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部(例えば配列番号1~3)にわたる領域と相補的である。

50

【0295】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択される、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内の標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である。一部の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、またはジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部（例えば配列番号4～15）にわたる領域である。

10

【0296】

多様な実施形態では、ミオスタチンターゲティング配列は、配列番号16～75のうちの1つを含むか、配列番号16～75のうちの1つから選択されるか、配列番号16～75のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも12の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号16～75のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各Yはシトシン（C）または5-メチルシトシン（5mC）から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号16～75の各Xはチミン（T）であり、配列番号16～75の各Yはシトシン（C）である。

20

【0297】

一部の実施形態では、式（VI）のミオスタチンターゲティング配列は、
 a）配列番号71（YYAGYYAYAXYXXYXYXGGXYXGG）[Zは25である]；
 b）配列番号72（YAYXXAYYAGYYAYAXYXXYXYXGG）[Zは25である]；
 c）配列番号73（YYAYXXGYAXXAGAAAAXYAGY）[Zは22である]；
 d）配列番号74（GYATTAGAAAATYAGYTATAAATG）[Zは24である]；および
 e）配列番号75（YYATYYGYTTGYATTAGAAAAGTYAGY）[Zは26である]
 から選択され、各Xはウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各Yはシトシン（C）または5-メチルシトシン（5mC）から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号71～75の各Xはチミン（T）であり、配列番号71～75の各Yはシトシン（C）である。

30

【0298】

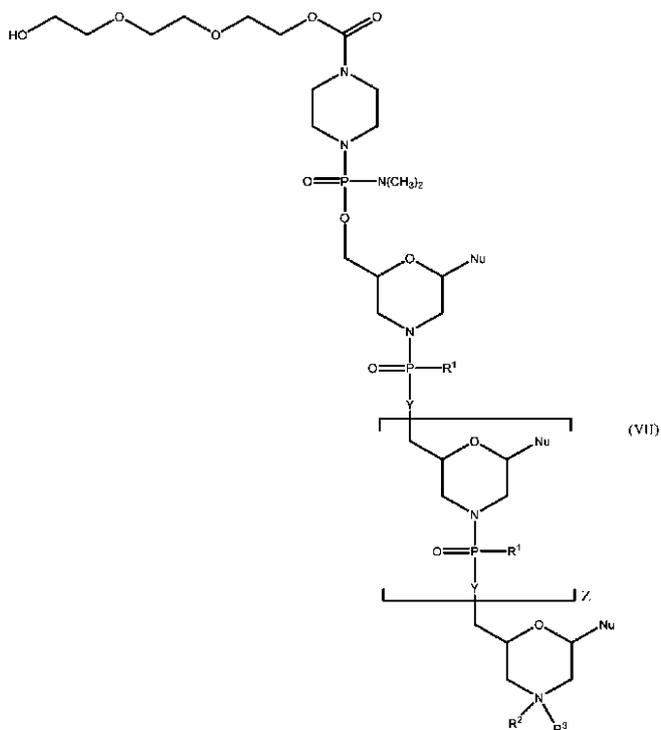
多様な実施形態では、ジストロフィンターゲティング配列は、配列番号76～3485のうちの1つを含むか、配列番号76～3485のうちの1つから選択されるか、配列番号76～3485のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号76～3485のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各Yはシトシン（C）または5-メチルシトシン（5mC）から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号76～3485の各Xはチミン（T）であり、配列番号76～3485の各Yはシトシン（C）である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号76を含み得る。

40

【0299】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは式（VII）：

【化 7 1】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩であり、式中、

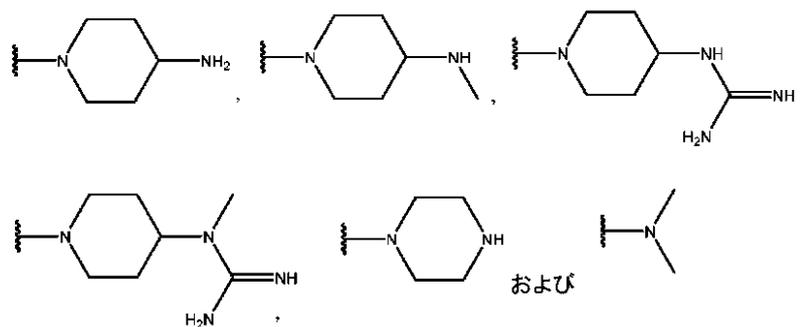
各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり、

Z は、8 ~ 48 の整数であり、

各 Y は、O であり、

各 R¹ は、

【化 7 2】



30

から選択され、

R² は、H、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、C₁ ~ C₆ アルキル、- C (= NH) NH₂ および - C (O) - R^{2 3} から選択され；

R³ は電子対、H および C₁ ~ C₆ アルキルから選択される。

【0300】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNAのエクソン内に完全にある標的領域内の12もしくはこれを超える連続ヌクレオチド、または、ミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部（例えば配列番号1~3）にわたる領域と相補的である。

【0301】

40

50

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択されるジストロフィンプレmRNAのエクソン内の標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である。複数の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、またはジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部（例えば配列番号4～15）にわたる領域である。

【0302】

多様な実施形態では、ミオスタチンターゲティング配列は、配列番号16～75のうちの1つを含むか、配列番号16～75のうちの1つから選択されるか、配列番号16～75のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも12の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号16～75のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各Yはシトシン（C）または5-メチルシトシン（5mC）から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号16～75の各Xはチミン（T）であり、配列番号16～75の各Yはシトシン（C）である。

【0303】

一部の実施形態では、式(VII)のミオスタチンターゲティング配列は、
 a) 配列番号71 (YYAGYYAYAXYXXYXYXGGXYXGG) [Zは25である] ;
 b) 配列番号72 (YAYXXAYYAGYYAYAXYXXYXYXGG) [Zは25である] ;
 c) 配列番号73 (YYAYXXGYAXXAGAAAAXYAGY) [Zは22である] ;
 d) 配列番号74 (GYATTAGAAAATYAGYTATAAATG) [Zは24である] ;および
 e) 配列番号75 (YYATYYGYYTTGYATTAGAAAAGTYAGY) [Zは26である]

から選択され、各Xはウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各Yはシトシン（C）または5-メチルシトシン（5mC）から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号71～75の各Xはチミン（T）であり、配列番号71～75の各Yはシトシン（C）である。

【0304】

多様な実施形態では、ジストロフィンターゲティング配列は、配列番号76～3485のうちの1つを含むか、配列番号76～3485のうちの1つから選択されるか、配列番号76～3485のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号76～3485のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択され、各Yはシトシン（C）または5-メチルシトシン（5mC）から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号76～3485の各Xはチミン（T）であり、配列番号76～3485の各Yはシトシン（C）である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号76を含み得る。

【0305】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも1つのXはTである。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各XはTである。

【0306】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも1つのXはUである。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各XはUである。

10

20

30

40

50

【0307】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも1つのYは5mCである。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各Yは、5mCである。

【0308】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも1つのYはCである。多様な実施形態では、ターゲティング配列の各YはCである。

【0309】

多様な実施形態では、配列番号16~75および配列番号76~3485の少なくとも1つのXはTである。多様な実施形態では、配列番号16~75および配列番号76~3485の各XはTである。

10

【0310】

多様な実施形態では、ターゲティング配列の少なくとも1つのXはUである。多様な実施形態では、配列番号16~75および配列番号76~3485の各XはUである。

【0311】

多様な実施形態では、配列番号16~75および配列番号76~3485の少なくとも1つのYは5mCである。多様な実施形態では、配列番号16~75および配列番号76~3485の各Yは5mCである。

【0312】

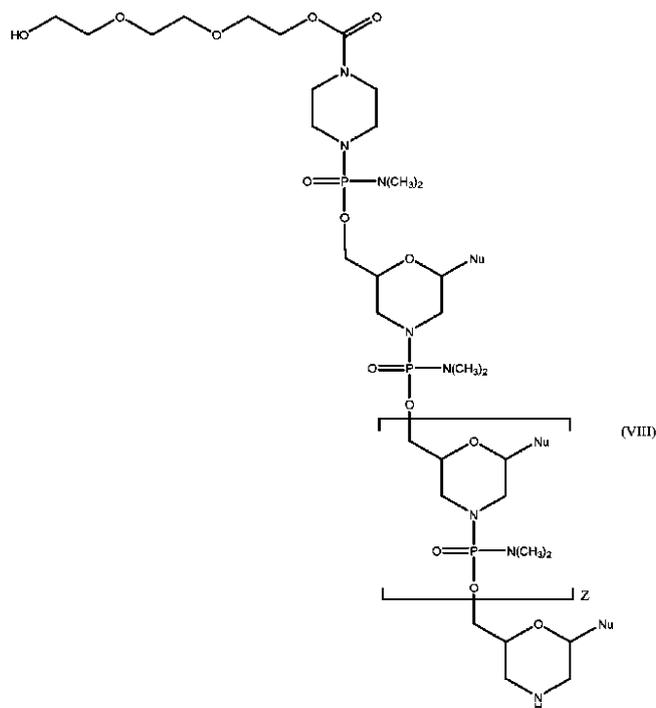
多様な実施形態では、配列番号16~75および配列番号76~3485の少なくとも1つのYはCである。多様な実施形態では、配列番号16~75および配列番号76~3485の各YはCである。

20

【0313】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(VIII)：

【化73】



30

40

の化合物または薬学的に許容されるその塩であり、式中、

各Nuは、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり、

Zは、8~48の整数である。

【0314】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域

50

と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン/イントロンスプライス接合部位内の標的領域内の12もしくはこれを超える連続ヌクレオチド、または、ミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部(例えば配列番号1~3)にわたる領域と相補的である。

【0315】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択される、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内の標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である。複数の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライシング接合部にわたらないか、またはジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部(例えば配列番号4~15)にわたる領域である。

10

【0316】

多様な実施形態では、ミオスタチンターゲティング配列は、配列番号16~75のうちの1つを含むか、配列番号16~75のうちの1つから選択されるか、配列番号16~75のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも12の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号16~75のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号16~75の各Xはチミン(T)であり、配列番号16~75の各Yはシトシン(C)である。

20

【0317】

一部の実施形態では、ミオスタチンターゲティング配列は、

a) 配列番号71 (YYAGYYAYAXYXXYXYXGGXYXGG) [Zは25である];

b) 配列番号72 (YAYXXAYYAGYYAYAXYXXYXYXGG) [Zは25である];

c) 配列番号73 (YYAYXXGYAXXAGAAAAXYAGY) [Zは22である];

d) 配列番号74 (GYATTAGAAAATYAGYTATAAATG) [Zは24である]; および

e) 配列番号75 (YYATYYGYTTGYATTAGAAAAGTYAGY) [Zは26である]

から選択され、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号71~75の各Xはチミン(T)であり、配列番号71~75の各Yはシトシン(C)である。

30

40

【0318】

多様な実施形態では、ジストロフィンターゲティング配列は、配列番号76~3485のうちの1つを含むか、配列番号76~3485のうちの1つから選択されるか、配列番号76~3485のうちの少なくとも1つから選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号76~3485のうちの少なくとも1つから選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、各Xはウラシル(U)またはチミン(T)から独立に選択され、各Yはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から独立に選択される。一部の実施形態では、配列番号76~3485の各Xはチミン(T)であり、配列番号76~3485の各Yはシトシン(C)である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号76を含み得る。

50

【0319】

一部の実施形態では、式 (I)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、および (VIII) の化合物を含む本開示のアンチセンスオリゴマーの各 Nu は、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、ヒポキサンチン (イノシン)、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジン、および 10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル) から独立に選択される。一部の実施形態では、式 (I)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、および (VIII) の化合物を含む本開示のアンチセンスオリゴマーのターゲティング配列は、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列を含むか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択されるか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列のうちの、少なくとも 12 連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列に対する、少なくとも 90% の配列同一性を有する改変体であり、ここで、X は、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択され、I は、イノシンである。

10

【0320】

本開示に従い使用されうる、さらなる改変アンチセンスオリゴマー/化学は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、以下の特許および特許公報：PCT 公開第 WO 2007/002390 号；同第 WO 2010/120820 号；および同第 WO 2010/148249 号；米国特許第 7,838,657 号；ならびに米国特許出願第 2011/0269820 号において記載されているアンチセンスオリゴマー/化学を含む。

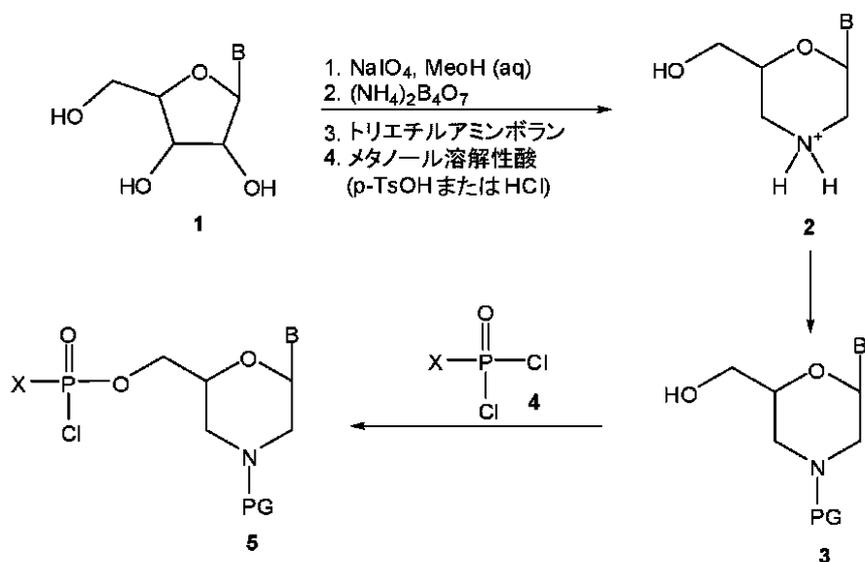
20

【0321】

C. モルホリノサブユニットおよびホスホリアミデートヌクレオシド間リンカーの調製
 モルホリノ単量体サブユニット、修飾ヌクレオシド間連結、およびこれらを含むオリゴマーは、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第 5,185,444 号および同第 7,943,762 号において記載されている通りに調製することができる。モルホリノサブユニットは、以下の一般的な反応スキーム I に従い調製することができる。

【化74】

反応スキーム1. モルホリノサブユニットの調製、保護および活性化



30

40

【0322】

反応スキーム 1 [式中、B は、塩基対合部分を表し、PG は、保護基を表す] を参照すると、モルホリノサブユニットは、示される通り、対応するリボヌクレオシド (1) から調製することができる。モルホリノサブユニット (2) は、任意選択で、適切な保護基前駆体、例えば、トリチルクロリドを伴う反応により保護することができる。下記でより詳

50

細に記載される通り、3'保護基は一般に、固体オリゴマー合成時に除去する。塩基対合部分は、固相オリゴマー合成に適するように保護することができる。適切な保護基は、アデニンおよびシトシンのためのベンゾイル、グアニンのためのフェニルアセチル、およびヒポキサンチン(I)のためのピバロイルオキシメチルを含む。ピバロイルオキシメチル基は、ヒポキサンチン複素環塩基のN¹位へと導入することができる。非保護のヒポキサンチンサブユニットも使用しうるが、塩基を保護する場合の活性化反応の収率は、はるかに優れている。他の適切な保護基は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第8,076,476号において開示されている保護基を含む。

【0323】

活性化リン化合物4を伴う化合物3の反応は、所望の連結部分である化合物5を有するモルホリノサブユニットをもたらす。構造4の化合物は、任意の数の、当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、このような化合物は、対応するアミンと、オキシ塩化リン(phosphorous oxychloride)との反応により調製することができる。この点で、アミン出発材料は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、実施例、ならびに参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,185,444号、同第7,943,762号、および同第8,779,128号において記載されている方法を使用して調製することができる。

【0324】

構造5の化合物は、ヌクレオシド間連結を含むオリゴマーを調製するための固相自動式オリゴマー合成において使用することができる。このような方法は、当技術分野で周知である。略述すると、構造5の化合物は、固体支持体へのリンカーを含有するように、5'末端において修飾することができる。例えば、化合物5は、L11およびL15を含むリンカーにより、固体支持体へと連結することができる。支持がなされたら、保護基(例えば、トリチル)を除去し、遊離アミンを、第2の構造5の化合物の活性化リン部分と反応させる。このシーケンスを、所望の長さのオリゴが得られるまで繰り返す。5'末端における保護基は、除去することもでき、5'修飾が望ましい場合は、残すこともできる。オリゴは、任意の数の方法、例えば、DTTによる処理に続く、水酸化アンモニウムによる処理を使用して、固体支持体から除去することができる。

【0325】

修飾モルホリノサブユニットおよびモルホリノベースのオリゴマーの調製については、実施例においてより詳細に記載する。本明細書に記載される方法、当技術分野で公知であり、かつ/または参照により本明細書に記載される方法を使用して、任意の数の修飾連結を含有するモルホリノベースのオリゴマーを調製することができる。実施例ではまた、既に記載されている(例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2008/036127号を参照されたい)通りに調製された、モルホリノベースのオリゴマーの全般的な修飾についても記載する。

【0326】

「保護基」という用語は、化合物の一部または全部の反応性部分をブロックし、保護基を除去するまで、このような部分が、化学反応に参加することを防止する化学的部分、例えば、T. W. Greene, P. G. M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」、3版、John Wiley & Sons (1999年)(その全体が本明細書において参考として援用される)において列挙および記載されている部分を指す。異なる保護基を使用する場合、各(異なる)保護基が、異なる手段により除去可能であることは、有利でありうる。完全に非対応の反応条件下で切断される保護基は、このような保護基の示差的な除去を可能とする。例えば、保護基は、酸、塩基、および加水分解により除去することができる。トリチル、ジメトキシトリチル、アセタール、およびtert-ブチルジメチルシリルなどの基は、酸不安定性であり、加水分解により除去可能なCbz基、および塩基不安定性のFmoc基で保護されるアミノ基の存在下で、カルボキシ反応性部分およびヒドロキシ反応性部分を保護するのに使用することができる。カルボン酸部分は、限定なしに述べると、メチルま

10

20

30

40

50

たはエチルなどの塩基不安定性基でブロックすることができ、ヒドロキシ反応性部分は、*tert*-ブチルカルバメートなどの酸不安定性基、または酸安定性であり、かつ、塩基安定性であるが、加水分解により除去可能なカルバメートでブロックされるアミンの存在下では、アセチルなどの塩基不安定性基でブロックすることができる。

【0327】

カルボン酸反応性部分およびヒドロキシル反応性部分はまた、ベンジル基など、加水分解により除去可能な保護基でブロックしうるのに対し、アミン基は、Fmocなどの塩基不安定性基でブロックすることができる。式(I)の化合物を合成するのに、特に有用なアミン保護基は、トリフルオロアセトアミドである。カルボン酸反応性部分が、2,4-ジメトキシベンジルなど、酸化により除去可能な保護基(protective group)でブロックしうるのに対し、共存するアミノ基は、フルオリド不安定性シリルカルバメートでブロックすることができる。

10

【0328】

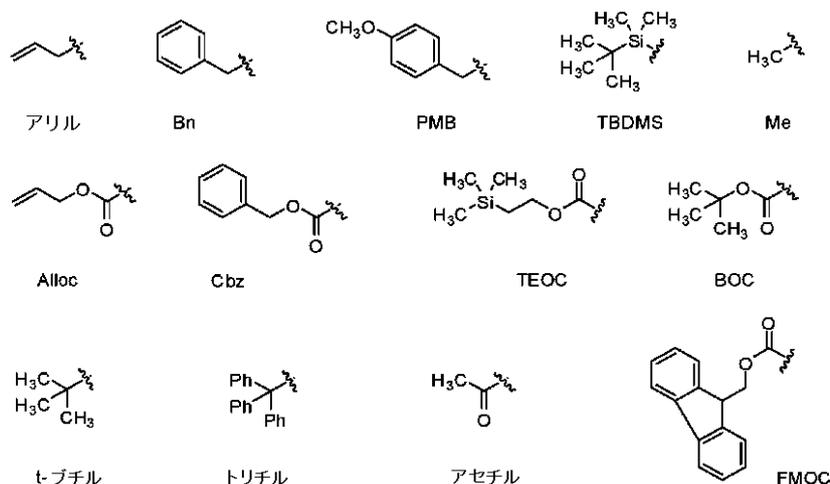
アリルブロッキング基は、酸保護基および塩基保護基の存在下において、前者が、安定であり、その後、金属またはパイ-酸触媒により除去されうるので、有用である。例えば、アリルでブロックされたカルボン酸は、酸不安定性*t*-ブチルカルバメートまたは塩基不安定性アセテートアミン保護基の存在下で、パラジウム(0)触媒反応により脱保護することができる。保護基のさらに別の形態は、化合物または中間体が結合しうる樹脂である。残基が樹脂に結合する限りにおいて、その官能基は、ブロックされており、反応することができない。樹脂から放出されると、官能基は、反応に利用可能である。

20

【0329】

典型的なブロッキング/保護基は、当技術分野で公知であり、以下：

【化75】



30

の部分を含むがこれらに限定されない。

【0330】

40

そうでないことが注記されない限りにおいて、全ての化学物質は、Sigma-Aldrich-Fluka (St. Louis, MO) から得た。ベンゾイルアデノシン、ベンゾイルシチジン、およびフェニルアセチルグアノシンは、Carbosynth Limited (Berkshire, UK) から得た。

【0331】

本明細書に記載される、さらなる連結修飾を含有する、PMO、PMOプラス、PPMO、およびPMO-Xの合成は、当技術分野で公知であり、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許出願第12/271,036号および同第12/271,040号ならびにPCT公開第WO2009/064471号において記載されている方法を使用して行った。

50

【0332】

3'トリチル修飾を伴うPMOは、脱トリチル化(detritylation)ステップを省くことを除き、本質的に、PCT公開第WO2009/064471号において記載されている通りに合成する。

【0333】

D. 細胞透過性ペプチド

本開示の改変アンチセンスオリゴマー化合物は、本明細書ではまた、細胞透過性ペプチド(CPP)とも称するペプチドにコンジュゲートしていてもよい。ある特定の好ましい実施形態では、ペプチドは、化合物の、細胞への輸送を増強するのに有効な、アルギニンに富むペプチド輸送部分である。輸送部分は、オリゴマーの末端に、結合させることが好ましい。ペプチドは、全身投与されると、所与の細胞培養物集団の細胞のうちの30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%であって、間の全ての整数を含む%の細胞内の細胞透過を誘導し、in vivoにおいて、複数の組織内の高分子のトランスロケーションを可能とする能力を有する。一実施形態では、細胞透過性ペプチドは、アルギニンに富むペプチド輸送体でありうる。別の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ペネトラチンまたはTatペプチドでありうる。当技術分野では、これらのペプチドが周知であり、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国公開第2010-0016215A1号において開示されている。ペプチドの、本開示の改変アンチセンスオリゴマーへのコンジュゲーションのための1つの手法は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2012/150960号において見出すことができる。本開示のペプチドコンジュゲートオリゴマーについての一部の実施形態は、CPPと、改変アンチセンスオリゴマーとの間のリンカーとして、グリシンを活用する。例えば、本開示のペプチドコンジュゲートPMOは、R₆-G-PMOからなる。

10

20

【0334】

上記で記載した輸送部分は、結合オリゴマーの細胞移入を、結合輸送部分の非存在下におけるオリゴマーの取込みと比べて大幅に増強することが示されている。取込みは、非コンジュゲート化合物と比べて、少なくとも10倍増強することが好ましく、20倍増強することがより好ましい。

【0335】

アルギニンに富むペプチド輸送体(すなわち、細胞透過性ペプチド)の使用は、本開示を実施するのに特に有用である。ある特定のペプチド輸送体は、アンチセンス化合物の、筋細胞を含む初代細胞への送達において、高度に有効であることが示されている(参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Marshall, Odaら、2007年; Jearawiriyapaisarn, Moultonら、2008年; Wu, Moultonら、2008年)。さらに、ペネトラチンおよびTatペプチドなど、他の公知のペプチド輸送体と比較して、本明細書で記載されるペプチド輸送体は、アンチセンスPMOにコンジュゲートさせると、複数の遺伝子転写物のスプライシングを変更する能力の増強を裏付ける(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Marshall, Odaら、2007年)。

30

40

【0336】

リンカーを除く、例示的なペプチド輸送体を、下記の表5に示す。

【表 5】

表 5. 例示的なペプチド輸送体

名称(表示)	配列	CPP 配列番号 ^A
rTAT	rrrqrrkkr	3486
Tat	rkkrrqrrr	3487
R ₉ F ₂	rrrrrrrrff	3488
R ₅ F ₂ R ₄	rrrrrffrrrr	3489
R ₄	rrrr	3490
R ₅	rrrrr	3491
R ₆	rrrrrr	3492
R ₇	rrrrrrr	3493
R ₈	rrrrrrrr	3494
R ₉	rrrrrrrrr	3495
(RX) ₈	rahxrahxrahxrahxrahxrahxrahxrahx	3496
(RAhxR) ₄ ; (P007)	rahxrrahxrrahxrrahxr	3497
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	rahxrrahxrrahxrrahxrrahxr	3498
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	rahxrrbrrahxrrbr	3499
(RAR) ₄ F ₂	rarrarrarrarff	3500
(RGR) ₄ F ₂	rgrrgrrrgrff	3501

10

20

^A 配列番号に割り当てられた配列は、連結部分(例えば、C(cys)、G(gly)、P(pro)、Ahx、B、AhxB[式中、AhxおよびBは、それぞれ、6-アミノヘキサン酸およびペーターアラニンを指す])を含まない。

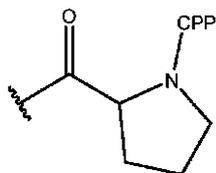
30

【0337】

多様な実施形態では、G(式I、IV、およびVで列挙された)は、以下:

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP、- C(O)(CH₂)₂NH-CPP、- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP、および - C(O)CH₂NH-CPPから選択される細胞透過性ペプチド(「CPP」)およびリンカー部分であるか、またはGは、式:

【化76】



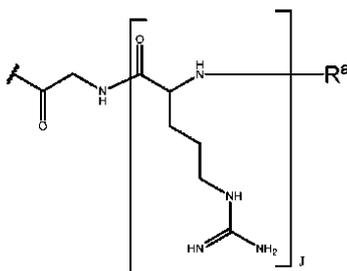
40

のものであり、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合している。一部の実施形態では、CPPは、配列番号3486~3501から選択される。

【0338】

一部の実施形態では、G(式I、IV、およびVにおいて列挙する通り)は、式:

【化 7 7】



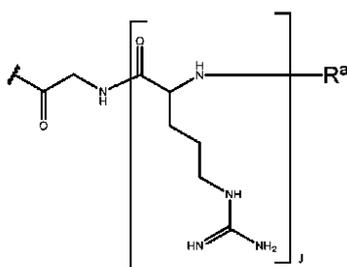
10

であり、 R^a は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、 J は、4 ~ 9 の整数である。ある特定の実施形態では、 J は、6 である。

【0339】

一部の実施形態では、CPP (式 I、IV、および V において列挙する通り) は、式：

【化 7 8】



20

であり、 R^a は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、 J は、4 ~ 9 の整数である。ある特定の実施形態では、CPP は、配列番号 15 である。多様な実施形態では、 J は、6 である。一部の実施形態では、 R_a は、H およびアセチルから選択される。例えば、一部の実施形態では、 R_a は、H である。ある特定の実施形態では、 R_a は、アセチルである。

【0340】

30

IV. 製剤

本開示の化合物はまた、取込み、分布、および/または吸収を支援するために、例えば、リポソーム、受容体にターゲティングされた分子、経口製剤、直腸製剤、局所製剤、または他の製剤として、他の分子、分子構造、または化合物の混合物と混合するか、これらと共に封入するか、これらにコンジュゲートさせるか、またはこれらと他の形で会合させることもできる。このような取込み支援製剤、分布支援製剤、および/または吸収支援製剤の調製について教示する、代表的な米国特許は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第 5, 108, 921 号；同第 5, 354, 844 号；同第 5, 416, 016 号；同第 5, 459, 127 号；同第 5, 521, 291 号；同第 5, 543, 158 号；同第 5, 547, 932 号；同第 5, 583, 020 号；同第 5, 591, 721 号；同第 4, 426, 330 号；同第 4, 534, 899 号；同第 5, 013, 556 号；同第 5, 108, 921 号；同第 5, 213, 804 号；同第 5, 227, 170 号；同第 5, 264, 221 号；同第 5, 356, 633 号；同第 5, 395, 619 号；同第 5, 416, 016 号；同第 5, 417, 978 号；同第 5, 462, 854 号；同第 5, 469, 854 号；同第 5, 512, 295 号；同第 5, 527, 528 号；同第 5, 534, 259 号；同第 5, 543, 152 号；同第 5, 556, 948 号；同第 5, 580, 575 号および同第 5, 595, 756 号を含むがこれらに限定されない。

40

【0341】

本開示のアンチセンス化合物は、任意の薬学的に許容される塩、エステル、もしくはこ

50

のようなエステルの塩、またはヒトを含む動物へと投与されると、生物学的に活性の代謝物もしくはその残余物をもたらす（直接的または間接的に）ことが可能な、他の任意の化合物を包含する。したがって、例えば、本開示はまた、本開示の化合物のプロドラッグおよび薬学的に許容される塩、このようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、および他の生物学的同等物へも導かれる。

【0342】

「プロドラッグ」という用語は、内因性酵素または他の化学物質および/もしくは条件の作用により、体内またはその細胞内で活性形態（すなわち、薬物）へと転換される、不活性形態で調製された治療剤を指し示す。特に、本開示のオリゴマーのプロドラッグバージョンは、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、1993年12月9日に公開された、G o s s e l i nらによるPCT公開第WO1993/24510号またはI m b a c hらによる、PCT公開第WO1994/26764号および米国特許第5,770,713号において開示されている方法に従い、S A T E [(S - アセチル - 2 - チオエチル) ホスフェート] 誘導体として調製される。

10

【0343】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本開示の化合物の、生理学的かつ薬学的に許容される塩：すなわち、親化合物の望ましい生物学的活性を保持し、望ましくない毒性効果をこれに付与しない塩を指す。オリゴマーについては、薬学的に許容される塩およびそれらの使用の例については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

20

【0344】

本開示はまた、本開示のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および製剤も含む。本開示の医薬組成物は、局所処置が望ましいのか、全身処置が望ましいのか、および処置される領域に応じて、多数の方式で投与することができる。投与は、局所投与（眼投与および腔送達および直腸送達を含む粘膜への投与を含む）、肺投与、例えば、噴霧器による投与を含む、散剤またはエアゾールによる吸入または送気による投与；気管内投与、鼻腔内投与、表皮投与および経皮投与、経口投与、または非経口投与でありうる。非経口投与は、静脈内注射もしくは静脈内注入、動脈内注射もしくは動脈内注入、皮下注射もしくは皮下注入、腹腔内注射もしくは腹腔内注入、または筋内注射もしくは筋内注入；あるいは頭蓋内投与、例えば、髄腔内投与または脳室内投与を含む。少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル修飾を伴うオリゴマーは、経口投与に特に有用であると考えられる。局所投与のための医薬組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐剤、スプレー、液剤 (l i q u i d)、および散剤を含みうる。従来の医薬担体、水性、粉末、または油性の基剤、増粘剤などが、必要であるかまたは望ましい場合がある。コーティングされたコンドーム、手袋などもまた、有用でありうる。

30

【0345】

単位剤形で提示されると好都合でありうる本開示の医薬製剤は、製薬業界で周知の従来の技法に従い調製することができる。このような技法は、有効成分を、医薬担体または賦形剤と会合させるステップを含む。一般に、製剤は、有効成分を、液体担体もしくは微細に分割された固体担体、またはこれらの両方と、均一かつ十分に会合させ、次いで、必要な場合、生成物を成形することにより調製する。

40

【0346】

本開示の組成物は、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐剤、および浣腸剤 (e n e m a) などであるがこれらに限定されない、多くの可能な剤形のうちのいずれかへと製剤化することができる。本開示の組成物はまた、水性媒体中、非水性媒体中、または混合媒体中の懸濁物としても製剤化することができる。水性懸濁物は、懸濁物の粘性を増加させる物質であって、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む物質をさらに含有しうる。懸濁物はまた、安定化剤も含有しうる。

【0347】

50

本開示の医薬組成物は、溶液、エマルジョン、泡沫、およびリポソームを含有する製剤を含むがこれらに限定されない。本開示の医薬組成物および製剤は、1または複数の浸透増強剤、担体、賦形剤、または他の活性成分もしくは不活性成分を含みうる。

【0348】

エマルジョンは、通常0.1 μmの直径を超える液滴の形態で、別の液体中に分散させた1つの液体による不均質系であることが典型的である。エマルジョンは、分散相に加えたさらなる成分と、水相中、油相中の溶液、または分離相としてのそれ自体として存在しうる活性薬物とを含有しうる。マイクロエマルジョンは、本開示の実施形態として含まれる。当技術分野では、エマルジョンおよびそれらの使用が周知であり、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

10

【0349】

本開示の製剤は、リポソーム製剤を含む。本開示で使用される「リポソーム」という用語は、1または複数の球状の二重層内に配置された、両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。リポソームとは、親油性材料から形成された膜と、送達される組成物を含有する水性の内部とを有する、単層または多重層の小胞である。カチオン性リポソームは、正に荷電したリポソームであり、負に荷電したDNA分子と相互作用して、安定的な複合体を形成すると考えられる。pH感受性であるか、または負に荷電したリポソームは、DNAと複合体化するのではなく、DNAを捕獲すると考えられる。カチオン性リポソームおよび非カチオン性リポソームのいずれも、DNAを、細胞へと送達するのに使用されている。

20

【0350】

リポソームはまた、本明細書で使用される用語であって、1または複数の特殊化された脂質を含むリポソームを指す、「立体安定化」リポソームも含み、この脂質は、リポソームへと組み込まれると、このような特殊化された脂質を欠くリポソームと比べて、循環寿命の増強を結果としてもたらす。立体安定化リポソームの例は、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、1もしくは複数の糖脂質を含むか、またはリポソームの小胞形成脂質部分の一部を、ポリエチレングリコール(PEG)部分など、1もしくは複数の親水性ポリマーで誘導体化した立体安定化リポソームである。リポソームおよびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

30

【0351】

本開示の医薬製剤および医薬組成物はまた、界面活性剤も含みうる。当技術分野では、薬物製品中、製剤中、およびエマルジョン中の界面活性剤の使用が周知である。界面活性剤およびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

【0352】

一部の実施形態では、本開示は、多様な浸透増強剤を使用して、核酸、特に、オリゴマーの効率的な送達を行う。細胞膜を横切る非親油性薬物の拡散の支援に加えて、浸透増強剤はまた、親油性薬物の透過性も増強する。浸透増強剤は、5つの大きな類別、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、および非キレート化非界面活性剤のうちの1つに属するものとして分類することができる。浸透増強剤およびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

40

【0353】

当業者は、製剤が、それらの意図される使用、すなわち、投与経路に従い、慣例的にデザインされることを認識するであろう。

【0354】

局所投与のための製剤は、本開示のオリゴマーを、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化剤、および界面活性剤など、局所送達剤と混合した製

50

剤を含む。脂質およびリポソームは、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンD O P E、ジミリストイルホスファチジルコリンD M P C、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロールD M P G）、およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルD O T A PおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンD O T M A）を含む。

【0355】

局所投与または他の投与のために、本開示のオリゴマーを含む治療剤を、リポソーム内に封入することもでき、リポソーム、特に、カチオン性リポソームとの複合体を形成することもできる。代替的に、治療剤は、脂質、特に、カチオン性脂質と複合体化させることもできる。脂肪酸およびエステル、薬学的に許容されるそれらの塩、ならびにそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。局所製剤については、それらの全体において本明細書に参考として援用される、1999年5月20日に出願された、米国特許出願第09/315,298号およびMourichら, 2009, J. Invest. Dermatol., 129(8):1945-53において詳細に記載されている。

10

【0356】

経口投与のための組成物および製剤は、粉末または顆粒、マイクロ粒子、ナノ粒子、水中または非水性媒体中の懸濁物または溶液、カプセル、ゲルカプセル、小袋(sachet)、錠剤またはミニ錠剤(minitablet)を含む。増粘剤、矯味矯臭剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましい場合がある。経口製剤は、本開示のオリゴマーを、1または複数の浸透増強剤、界面活性剤、およびキレート剤と共に投与する経口製剤である。界面活性剤は、脂肪酸および/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および/またはその塩を含む。胆汁酸/塩および脂肪酸ならびにそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。一部の実施形態では、本開示は、浸透増強剤の組合せ、例えば、胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩を提示する。例示的な組合せは、ラウリン酸、カプリン酸、およびUDCAのナトリウム塩である。さらなる浸透増強剤は、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルを含む。本開示のオリゴマーは、経口送達することもでき、噴霧乾燥粒子を含む顆粒形態で送達することもでき、マイクロ粒子またはナノ粒子を形成するように複合体化させることもできる。オリゴマー複合体化剤およびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。オリゴマーのための経口製剤およびそれらの調製については、それらの全体において本明細書に参考として援用される、米国出願第09/108,673号(1998年7月1日に出願された)、同第09/315,298号(1999年5月20日に出願された)、および同第10/071,822号(2002年2月8日に出願された)において詳細に記載されている。

20

30

【0357】

非経口投与、髄腔内投与、または脳室内投与のための組成物および製剤は、浸透増強剤、担体化合物、および他の薬学的に許容される担体または賦形剤などであるがこれらに限定されない、緩衝液、希釈剤および他の適切な添加剤もまた含有しうる、滅菌水溶液を含む。

40

【0358】

別の関連する実施形態では、本開示の組成物は、第1の核酸へとターゲティングされた、1または複数のアンチセンス化合物、特にオリゴマーと、第2の核酸標的へとターゲティングされた、1または複数のさらなるアンチセンス化合物とを含有しうる。代替的に、本開示の組成物は、同じ核酸標的の異なる領域へとターゲティングされた、2つまたはこれを超えるアンチセンス化合物を含有しうる。当技術分野では、アンチセンス化合物の多数の例が公知である。2つまたはこれを超える組合せ化合物を、併せて使用することもで

50

き、逐次的に使用することもできる。

【0359】

V. 使用方法

ある特定の態様は、ミオスタチン治療剤を受けている被験体に、ジストロフィン治療剤も投与するステップを含む、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有する被験体を処置する方法に関する。

【0360】

複数の態様では、治療剤は、DMDまたは関連障害を有する被験体に投与される。複数の実施形態では、1または複数の治療剤は、本明細書に記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーによる処置の前に被験体に投与され得る。複数の実施形態では、1または複数の治療剤は、修飾アンチセンスオリゴマーの投与前、それと同時、または投与後に被験体に投与され得る。複数の実施形態では、治療剤はタンパク質または核酸である。一部の実施形態では、タンパク質は抗体または可溶性受容体である。複数の実施形態では、可溶性受容体はACVR2である。複数の実施形態では、核酸はアンチセンスオリゴマーまたはsiRNAである。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書に記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーである。

10

【0361】

複数の実施形態では、治療剤は、被験体におけるミオスタチン活性またはミオスタチン発現のうち的一方または両方を抑制できるミオスタチン治療剤である。ミオスタチン治療剤は、ミオスタチンpre-mRNAを標的とし、ミオスタチンpre-mRNAの成熟mRNAへの転写に干渉する治療剤であり得る。複数の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、ヒトミオスタチンpre-mRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できる。複数の実施形態では、ミオスタチン治療剤は、ミオスタチンpre-mRNAにおけるエクソン2のスキッピングを誘導し、エクソン2を含むミオスタチンpre-mRNAの発現を阻害する。ミオスタチン治療剤は、ミオスタチンタンパク質を標的とし、ミオスタチン受容体とのミオスタチンタンパク質の結合に干渉する治療剤であり得る。

20

【0362】

ミオスタチン治療剤は、タンパク質および核酸から選択される。タンパク質は、抗ミオスタチン抗体、例えば、抗GDF8 (Abcam、ケンブリッジ MA)、または可溶性受容体であり得る。複数の実施形態では、可溶性受容体はACVR2である。核酸は、アンチセンスオリゴマーおよびsiRNAから選択される。アンチセンスオリゴマーは、本明細書に記載される通りの修飾ミオスタチンアンチセンスオリゴマーであり得る。

30

【0363】

複数の実施形態では、治療剤は、被験体においてジストロフィンを増加させることができるジストロフィン治療剤である。ジストロフィン治療剤は、機能的または半機能的なジストロフィンまたは切断型ジストロフィンの発現を増加させ得る。切断型ジストロフィンは、マイクロジストロフィンおよびミニジストロフィン (参照によりその全体において本明細書に組み込まれる欧州特許第2125006号に開示) を含むが、これらに限定されない。ジストロフィン治療剤は、ジストロフィンpre-mRNAを標的とし、ジストロフィンpre-mRNAの成熟mRNAへの転写をモジュレートする治療剤であり得る。複数の実施形態では、ジストロフィン治療剤は、ヒトジストロフィンpre-mRNAのプロセッシングの間、エクソンスキッピングを誘導できる。複数の実施形態では、標的とされるジストロフィンpre-mRNAは、1または複数の遺伝子変異を有する。ジストロフィン治療剤は、エクソンスキッピングを誘導し、それにより、1または複数の遺伝子変異を含む1または複数のエクソンは、成熟mRNAへのプロセッシングの間、ジストロフィンpre-mRNAから除去される。得られる切断型mRNAは、機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質への翻訳が可能である。

40

【0364】

一部の態様では、修飾ジストロフィンアンチセンスオリゴマーは、ジストロフィン遺伝子のpre-mRNA内で領域と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性の

50

ヌクレオチド配列を含み、修飾アンチセンスオリゴマーが当該領域に結合することにより、ジストロフィンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソスキッピングが誘導される。複数の実施形態では、ジストロフィンプレmRNAのプロセッシングの間のエクソスキッピングにより、遺伝子変異を有する1または複数のエクソンがプレmRNAから除去される。複数の実施形態では、遺伝子変異を有する1または複数のエクソンのジストロフィンプレmRNAからの除去により、細胞および/または被験体の組織における非変異ジストロフィンプレmRNAのレベルが上昇する。被験体における非変異ジストロフィンプレmRNAのレベルの上昇は、機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質の発現の増加にさらにつながり得る。このように、本開示は、本明細書に記載される通りの修飾ジストロフィンアンチセンスオリゴマーを使用して、非変異ジストロフィンmRNAのレベルを上昇させることにより、機能的または半機能的なジストロフィンタンパク質を増加させる方法に関する。

10

【0365】

一部の態様では、修飾ミオスタチンアンチセンスオリゴマーは、ミオスタチン遺伝子のプレmRNA内の領域と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性のヌクレオチド配列を含み、修飾アンチセンスオリゴマーが当該領域に結合することにより、ミオスタチンプレmRNAのプロセッシングの間、エクソスキッピングが誘導される。複数の実施形態では、修飾ミオスタチンオリゴマーが当該領域に結合することにより、細胞および/または被験体の組織におけるエクソン2含有ミオスタチンmRNAのレベルが低下する。被験体におけるエクソン2含有ミオスタチンmRNAのレベルの低下は、機能的なミオスタチンタンパク質の発現の減少にさらにつながり得る。

20

【0366】

方法は、治療剤と組み合わせて、有効量の本開示の修飾アンチセンスオリゴマーを被験体に投与することを含む、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）もしくは関連障害に罹患している、またはそれを発症する危険性がある個体を処置するステップを含む。修飾アンチセンスオリゴマーは、同じ組成物中であってもなくてもよく、また、被験体に共投与されてもされなくてもよい。多様な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、治療剤と同時に、またはほぼ同時に投与される。さらなる実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、治療剤とは実質的に異なる時間に投与される。本明細書に記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーにより標的とされる例示的な配列を、表1および2に示す。

30

【0367】

また、DMDもしくは関連障害を処置するための、または、DMDもしくは関連障害の処置のための医薬の調製に使用するための、治療剤および修飾アンチセンスオリゴマーが含まれ、処置または医薬には治療剤が含まれる。複数の実施形態では、医薬は、本明細書に記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを含み、例えば、修飾アンチセンスオリゴマーは、(i)修飾ヌクレオチド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である少なくとも1つのサブユニットと、ジストロフィンまたはミオスタチンプレmRNA内の標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列とを任意選択で有する10~50サブユニットを含む。

40

【0368】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ミオスタチンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン2内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらない標的領域内の12もしくはこれを超える連続ヌクレオチド、または、ミオスタチンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部（例えば配列番号1~3）にわたる領域と相補的である。一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーのターゲティング配列は、(a)配列番号16~75から選択される配列を含むか、(b)配列番号16~75から選択されるか、

50

(c) 配列番号 16 ~ 75 から選択される配列の少なくとも 12 の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、(d) 配列番号 16 ~ 75 から選択される配列に対する少なくとも 90% の配列同一性を有する変異体であり、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択され、C はシトシン (C) または 5 - メチルシトシン (5mC) から選択される。

【0369】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ジストロフィンプレmRNA内の標的領域と相補的である。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン19、エクソン23、エクソン44、エクソン45、エクソン50、エクソン51、エクソン52、エクソン53またはエクソン55から選択される、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内で、標的領域内の10またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である。複数の実施形態では、標的領域は、ジストロフィンプレmRNAのエクソン内に完全にありターゲティング配列のいかなる部分もスプライス接合部にわたらないか、またはジストロフィンプレmRNAのイントロン/エクソンもしくはエクソン/イントロンのスプライス接合部(例えば配列番号4~15)にわたる領域である。一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーのターゲティング配列は、(a) 配列番号76~3485から選択される配列を含むか、(b) 配列番号76~3485から選択されるか、(c) 配列番号76~3485から選択される配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドの断片であるか、または、(d) 配列番号76~3485から選択される配列に対する少なくとも90%の配列同一性を有する変異体であり、Xはウラシル(U) またはチミン(T)から選択され、Cはシトシン(C)または5-メチルシトシン(5mC)から選択される。

【0370】

一部の実施形態では、DMDもしくは関連障害を処置する方法、またはDMDもしくは関連障害を処置するための医薬は、修飾糖部分を含むヌクレオチド類似体サブユニットを有する修飾アンチセンスオリゴマーを含む。修飾糖部分は、ペプチド核酸(PNA)サブユニット、ロケット核酸(LNA)サブユニット、2' O, 4' C-エチレン架橋核酸(ENA)サブユニット、トリシクロDNA(tc-DNA)サブユニット、2' O-メチルサブユニット、2' O-メトキシエチルサブユニット、2'-フルオロサブユニット、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、およびモルホリノサブユニットから選択されうる。

【0371】

これらのさらなる態様および実施形態は、修飾ヌクレオシド間連結を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、修飾アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結から選択される。さらなる実施形態では、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結は、(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、置換(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、4-アミノピペリジン-1-イル部分、または置換4-アミノピペリジン-1-イル部分に共有結合したリン原子を含む。

【0372】

これらのさらなる態様および実施形態は、修飾糖部分と修飾ヌクレオシド間連結との少なくとも1つの組合せを含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

【0373】

一部の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーは、哺乳動物細胞により能動的に取り込まれる。さらなる実施形態では、かかる取り込みを促進するために、本明細書に記載される通り修飾アンチセンスオリゴマーを輸送部分(例えば輸送ペプチドまたはCPP)とコンジュゲートさせてもよい。多様な態様は、本明細書に記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを使用して、細胞、組織および/または被験体における、エクソン2含有ミオスタチンmRNA転写物および/または機能的なミオスタチンタンパク質の発現を

10

20

30

40

50

減少させる方法に関する。一部の場合では、エクソン2含有ミオスタチンmRNA転写物および/または機能的なミオスタチンタンパク質は、対照、例えば対照細胞/被験体(例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有さない被験体)、修飾アンチセンスオリゴマーを含まない対照組成物、処置の欠如および/または当初の時点と比較して、約または少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%減少するか、または低下する。また、健常対照、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有さない被験体のレベルと比較して、エクソン2含有mRNA転写物または機能的なミオスタチンタンパク質の発現を減少させる方法が含まれる。本明細書で使用するとき、「有効量」または「治療的な量」とは、被験体に投与されたとき、ミオスタチンプレmRNA転写物の標的領域と結合し、対照細胞/被験体と比較して、増加に関して開示したパーセンテージの範囲で、エクソン2含有ミオスタチンmRNA転写物および機能的なミオスタチンタンパク質の発現を減少させることができる、修飾アンチセンスオリゴマーの用量を指す。

10

【0374】

多様な態様は、本明細書に記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを使用して、ジストロフィンプレmRNAのイントロンおよびエクソンのスプライシングをモジュレートし、細胞、組織および/または被験体におけるジストロフィンまたは切断型ジストロフィンプレmRNAの発現を増加させる方法に関する。さらなる態様では、例えば全長野生型ジストロフィンプレmRNAと比較して、切断型ジストロフィンプレmRNAの発現が強化される。一部の場合において、ジストロフィンmRNA転写物および/または機能的もしくは半機能的なジストロフィンタンパク質は、対照、例えば、対照細胞/被験体(例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有さない被験体)、修飾アンチセンスオリゴマーを含まない対照組成物、処置の欠如および/または当初の時点と比較して、約または少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%増加するか、または強化される。方法はまた、健常対照、例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有さない被験体のレベルと比較して、ジストロフィンmRNA転写物または機能的もしくは半機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させるステップを含む。本明細書で使用するとき、「有効量」または「治療的な量」は、被験体に投与されたとき、ジストロフィンプレmRNA転写物の標的領域と結合し、対照細胞/被験体と比較して、増加に関して開示したパーセンテージの範囲で、ジストロフィンまたは切断型ジストロフィンmRNA転写物、および機能的なジストロフィンタンパク質の発現を増加させることができる、修飾アンチセンスオリゴマーの用量を指す。

20

30

【0375】

方法はまた、本明細書に記載される通り、細胞、組織および/または被験体における機能的/活性型ミオスタチンタンパク質の発現を減少させるステップを含む。ある特定の場合において、機能的/活性型ミオスタチンタンパク質のレベルは、対照、例えば、対照細胞/被験体(例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有する被験体)、治療剤を含まない対照組成物、処置の欠如および/または当初の時点と比較して、約または少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%減少する。方法はまた、影響を受けた対照、例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有する被験体のレベルと比較して、機能的/活性型ミオスタチンタンパク質の発現を減少させるステップを含む。

40

【0376】

50

方法はまた、本明細書で記載される通り、細胞、組織および/または被験体における機能的または半機能的/活性型ジストロフィンタンパク質の発現を増加させるステップを含む。ある特定の場合において、機能的または半機能的/活性型ジストロフィンタンパク質のレベルは、対照、例えば、対照細胞/被験体(例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有さない被験体)、治療剤を含まない対照組成物、処置の欠如および/または当初の時点と比較して、約または少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%増加する。方法はまた、影響を受けた対照、例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは関連障害を有する被験体のレベルと比較して、機能的または半機能的/活性型ジストロフィンタンパク質の発現を増加させるステップを含む。

【0377】

方法はまた、本明細書で記載される通りのアンチセンスオリゴマーと組み合わせて治療剤を使用して、被験体におけるデュシェンヌ型筋ジストロフィーおよび関連障害の進行を阻害するステップを含む。

【0378】

一部の実施形態では、治療剤および修飾アンチセンスオリゴマーを、1または複数の適切な医薬担体中で、DMDまたは関連障害の1または複数の症状を呈示する被験体に投与する。本明細書で使用する時、「処置」という用語は、DMDもしくは関連障害、またはDMDもしくは関連障害に関連する少なくとも1つの識別可能な症状の改善を指す。一部の実施形態では、「処置」は、被験体によって必ずしも識別可能ではない少なくとも1つの測定可能な物理的および/または生物学的パラメータの改善を指す。被験体は、例えば筋力および協調の物理的な改善を経験する場合がある。それらのパラメータは、例えば自己評価試験、医師の検査、物理的および生理学的測定のための実験室検査、ならびに被験体からの試料の生物学的試験により評価され得る。別の実施形態では、「処置」とは、DMDまたは関連障害の進行を遅延させるか、または進行を逆転させることを指す。本明細書で使用する時、「予防する」または「阻害する」は、DMDまたは関連障害の発症を遅延させるか、またはそれが発症する危険性を低下させることを指す。

【0379】

方法は、それを必要とする被験体において、DMDおよび関連障害の1または複数の症状を適宜、軽減または改善するステップを含む。具体的な例は、頻繁な転倒、臥位または座位からの立ち上がりの困難さ、走行および跳躍の困難さ、アヒル歩行、つま先歩行、ヒラメ筋肉肥大、筋肉の痛みおよび凝りおよび学習障害などの、段階的筋衰弱の症状を含む。

【0380】

方法はまた、被験体における骨格筋量を増加させるステップを含む。方法はまた、健康な被験体または疾患、障害もしくは症状に罹患する被験体において、被験体の筋肉量の減少を処置または予防するステップを含む。方法はまた、疾患、障害または状態に罹患する被験体の骨格筋量不足を処置するステップを含む。多様な実施形態では、ミオスタチンおよびジストロフィンタンパク質の一方または両方の血液中または組織レベルは、治療剤および本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーの一方または両方の投与前に患者において測定する。有効量の、治療剤および本明細書のアンチセンスオリゴマーの一方または両方が被験体に投与される。ミオスタチンおよびジストロフィンタンパク質の一方または両方の血液中または組織中レベルは、選択した時間およびアンチセンスオリゴマーの投与の後、被験体において測定する。任意選択で、治療剤およびアンチセンスオリゴマーの一方または両方の投与量および/または投薬スケジュールは、測定により調整し、例えば、一方または両方の治療的な量が被験体において存在することを確実にするために投与量を増加させる。選択した時間は、本明細書で記載される治療剤およびアンチセンスオリゴマーのうちの一方または両方の投与後の、血流中への吸収ならびに/または肝臓および他の

10

20

30

40

50

代謝プロセスによる代謝に要する時間を見越した時間の量を含み得る。一部の実施形態では、選択した時間は、投与後約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、20、22 または 24 時間であり得る。一部の実施形態では、選択した時間は、投与後約 12、18 または 24 時間であり得る。他の実施形態では、選択した時間は、投与後約 1、2、3、4、5、6 または 7 日であり得る。

【0381】

このような処置と共に、ゲノム薬理学（すなわち、個体の遺伝子型と、外来化合物または薬物へのその個体の応答との関係についての研究）について考慮することもできる。治療剤の代謝の差違は、薬理学的な活性薬物の用量と血中濃度との関係を変更することにより、重度の毒性または治療の失敗をもたらす。こうして、医師または臨床医は、治療剤を投与すべきなのかどうかの決定においてのほか、治療剤による処置の投与量および/または治療レジメンの調整においても関与性のゲノム薬理学研究において得られる知見の適用について考慮することができる。

10

【0382】

修飾アンチセンスオリゴマーを含む治療剤の、標的核酸への有効な投与および送達は、さらなる側面である。治療剤の送達経路は、経口経路および非経口経路を含む、多様な全身経路、例えば、静脈内送達、皮下送達、腹腔内送達、および筋内送達のほか、吸入送達、経皮送達、および局所送達を含むがこれらに限定されない。適切な経路は、当業者が、処置下にある被験体の状態に適切な経路として決定することができる。血管循環または血管外循環の、血液またはリンパ系、および脳脊髄液は、RNAを導入しうる、一部の非限

20

【0383】

特定の実施形態では、治療剤を、被験体に、静脈内（IV）または皮下（SC）投与する、すなわち、アンチセンスオリゴマーを、静脈へと静脈内投与もしくは静脈内送達するか、または皮膚と筋肉との間の脂肪層へと皮下投与もしくは皮下送達する。静脈内注射部位の非限定的な例は、腕、手、脚、または足の静脈を含む。皮下注射部位の非限定的な例は、腹部、大腿部、下方背部（lower back）、または上腕部を含む。例示的な実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーのPMO形態、PMO-X形態、またはPPMO形態を、IV投与またはSC投与する。他の実施形態では、修飾アンチセンスオリゴマーを、被験体に、筋内内（IM）投与する、例えば、アンチセンスオリゴマーを、腕部の三角筋、脚部の外側広筋、腰部の腹側臀筋（ventrogluteal muscle）、臀部の背側臀筋（dorsogluteal muscle）、胸郭の横隔膜筋および内肋間筋へと投与または送達する。

30

【0384】

ある特定の実施形態では、本開示の治療剤は、経皮的な方法により（例えば、このような修飾アンチセンスオリゴマーを、任意選択で、リボソームへとパッケージングする、修飾アンチセンスオリゴマーの、例えば、エマルジョンへの組込みを介して）送達することができる。送達のこのような経皮的な方法およびエマルジョン/リボソーム媒介型の方法は、修飾アンチセンスオリゴマーの送達について、当技術分野、例えば、それらの全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,965,025号において記載されている。

40

【0385】

本明細書に記載される治療剤はまた、植込み可能なデバイスを介して送達することもできる。このようなデバイスのデザインは、当技術分野で認知された工程であって、例えば、それらの全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,969,400号において記載されている、例えば、合成インプラントデザインを伴う工程である。

【0386】

当技術分野で認知された技法（例えば、トランスフェクション、電気穿孔、融合、リボソーム、コロイド状ポリマー性粒子、およびウイルスベクターおよび非ウイルスベクターのほか、当技術分野で公知の他の手段）を使用して、治療剤を、細胞へと導入することが

50

できる。選択される送達法は、例えば、オリゴマー化学、処置（処理）される細胞、および細胞の場所に依存し、そして当業者には明らかであろう。例えば、局在化は、表面上にリポソームを方向づける特異的なマーカーを伴うリポソーム、標的細胞を含有する組織への直接的な注射、特異的な受容体媒介型の取込みなどにより達成することができる。

【0387】

当技術分野で公知の通り、治療剤は、例えば、リポソーム媒介型の取込み、脂質コンジュゲート、ポリリシン媒介型の取込み、ナノ粒子媒介型の取込み、および受容体媒介型のエンドサイトーシスのほか、マイクロインジェクション、透過化（例えば、ストレプトリジンOによる透過化、アニオン性ペプチドによる透過化）、電気穿孔、およびエンドサイトーシス以外の多様な非侵襲性送達法であって、当技術分野で公知の送達法など、エンドサイトーシス以外のさらなる送達方式（参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、DokkaおよびRojanasakul、Advanced Drug Delivery Reviews、44巻、35～49頁（2000）を参照されたい）を伴う方法を使用して送達することができる。

10

【0388】

治療剤は、生理学的小および/または薬学的に許容される、任意の好都合なビヒクルまたは担体により投与することができる。このような組成物は、薬学的に許容される、様々な標準的担体であって、当業者により使用される担体のうちのいずれかを含みうる。例は、食塩水、リン酸緩衝食塩水（PBS）、水、水性エタノール、油/水エマルジョンまたはトリグリセリドエマルジョンなどのエマルジョン、錠剤、およびカプセルを含むがこれらに限定されない。生理学的小に許容される適切な担体の選出は、選出される投与方式に応じて変動するであろう。「薬学的に許容される担体」は、薬学的投与に適合性の担体など、任意で全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤を含むことを意図する。当技術分野では、薬学的に活性な物質のための、このような媒体および薬剤の使用が周知である。任意の従来媒体または薬剤が、活性化化合物に不適合性である場合を除き、組成物中のその使用が想定される。補充の活性化化合物もまた、組成物へと組み込むことができる。

20

【0389】

本開示の修飾アンチセンスオリゴマーは一般に、遊離酸または遊離塩基として活用することができる。代替的に、本開示の化合物は、酸付加塩または塩基付加塩の形態で使用することもできる。本開示の遊離アミノ化合物の酸付加塩は、当技術分野で周知の方法により調製することができ、有機酸および無機酸から形成することができる。適切な有機酸は、マレイン酸、フマル酸、安息香酸、アスコルビン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、プロピオン酸、酒石酸、サリチル酸、クエン酸、グルコン酸、乳酸、マンデル酸、ケイ皮酸、アスパラギン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、グリコール酸、グルタミン酸、およびベンゼンスルホン酸を含む。

30

【0390】

適切な無機酸は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、および硝酸を含む。塩基付加塩は、カルボン酸アニオンと共に形成される塩を含み、さらに、アルカリ金属およびアルカリ土類金属（例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウム、およびカルシウム）から選択されるもののほか、アンモニウムイオンおよびその置換誘導体（例えば、ジベンジルアンモニウム、ベンジルアンモニウム、2-ヒドロキシエチルアンモニウムなど）などの、有機カチオンおよび無機カチオンと共に形成される塩を含む。こうして、「薬学的に許容される塩」という用語は、任意で全ての許容される塩形態を包含することを意図する。

40

【0391】

加えて、本開示の文脈にはまた、プロドラッグも含まれる。プロドラッグとは、このようなプロドラッグを、患者へと投与すると、in vivoにおいて、化合物を放出する、共有結合した任意の担体である。プロドラッグは一般に、慣例的な操作により、またはin vivoにおいて、修飾が切断されて、親化合物をもたらすように、官能基を修飾

50

することにより調製する。プロドラッグは、例えば、本開示の化合物であって、ヒドロキシ基、アミン基、またはスルフヒドリル基を、患者へと投与されると、切断されて、ヒドロキシ基、アミン基、またはスルフヒドリル基を形成する任意の基に結合させた化合物を含む。こうして、プロドラッグの代表例は、本開示の修飾アンチセンスオリゴマーのアルコール官能基およびアミン官能基の、酢酸誘導体、ギ酸誘導体、および安息香酸誘導体を含む（がこれらに限定されない）。さらに、カルボン酸（-COOH）の場合は、メチルエステル、エチルエステルなどのエステルも使用することができる。

【0392】

場合によって、リポソームを使用して、修飾アンチセンスオリゴマーの、細胞への取込みを促進することもできる（例えば、Williams, S. A., *Leukemia*, 10巻(12号): 1980~1989頁、1996年; Lappalainenら、*Antiviral Res.*, 23巻: 119頁、1994年; Uhlmannら、「*modified antisense oligomers: a new therapeutic principle*」、*Chemical Reviews*, 90巻、4号、25544~584頁、1990年; Gregoriadis, G., 14章、「*Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*」、287~341頁、Academic Press, 1979年を参照されたい）。例えば、PCT公開番号WO1993/01286において記載されている通り、ヒドロゲルもまた、修飾アンチセンスオリゴマーを投与するためのビヒクルとして使用することができる。代替的に、オリゴマーは、マイクロスフェアまたはマイクロ粒子により投与することもできる（例えば、Wu, G. Y. および Wu, C. H., *J. Biol. Chem.*, 262巻: 4429~4432頁、30 1987年を参照されたい）。代替的に、米国特許第6,245,747号において記載されている通り、修飾アンチセンスオリゴマーと複合体化させたガス充填マイクロバブルの使用によっても、標的組織への送達を増強することができる。持続放出組成物もまた、使用することができる。これらは、フィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態にある半透性ポリマーマトリクスを含みうる。かかる文献の各々は、その全体が本明細書において参考として援用される。

【0393】

一部の実施形態では、治療剤を、少なくとも200~400 nMの治療剤のピーク血中濃度を結果としてもたらすのに有効な量および様式で投与する。一般に、約1~2週間にわたり、定期的な間隔で、1または複数の用量の治療剤が投与されることが典型的である。経口投与に好ましい用量は、70 kg当たりのオリゴマー約1~1000 mgである。場合によって、患者1人当たりのオリゴマー1000 mgを超える用量が必要でありうる。i.v.投与では、好ましい用量は、70 kg当たりのオリゴマー約0.5 mg~1000 mgである。治療剤は、短期間にわたり、定期的な間隔で、例えば、2週間またはこれ未満にわたり、毎日投与することができる。しかし、場合によって、治療剤を、より長期間にわたり、間欠的に投与する。投与は、抗生剤または他の治療的処置の投与が後続する場合もあり、これらと共時的な場合もある。処置レジメンは、処置下の被験体についての、イムノアッセイ、他の生化学的検査および生理学的精査の結果に基づき指し示される通りに、調整することができる（用量、頻度、経路など）。

【0394】

本開示の治療剤を使用する、*in vivo*における有効な処置レジメンは、持続期間、用量、頻度、および投与経路のほか、処置下の被験体の状態（すなわち、限局感染または全身感染に应答した投与と対比した予防的投与）に従い変化させることができる。したがって、このような*in vivo*における治療は、最適な治療転帰を達成するために、処置下にある特定の種類の障害に適切な検査によるモニタリング、および用量または処置レジメンにおける対応する調整を要請することが多いであろう。

【0395】

処置は、例えば当技術分野において公知の疾患の一般的な指標によりモニターされ得る

10

20

30

40

50

。 *in vivo* 投与された治療剤の効能は、治療剤の投与前、その間、およびその後には被験体から採取した生体試料（組織、血液、尿など）から決定され得る。治療剤が修飾アンチセンスオリゴマーである、かかる試料のアッセイは、（１）当業者に公知の手順、例えば、電気泳動ゲル移動度アッセイを使用して、標的配列および非標的配列によるヘテロ二重鎖の形成の有無をモニターすること；（２）参照エクソン 2 含有ミオスタチン mRNA に関する、ミオスタチンエクソン 2 を含まない mRNA の量をモニターすること；または（３）RT-PCR、ノザンプロットティング、ELISA もしくはウェスタンブロット法などの標準的な技法により決定される、１または複数の遺伝子変異を含む参照ジストロフィン mRNA に関する、１または複数の遺伝子変異を有する１または複数のエクソンを含むジストロフィン mRNA を含まない mRNA の量をモニターすることを含む。一部の 10 実施形態では、処置は症状評価によりモニターされる。それらの評価は、自己評価、医師の検査、筋肉のサイズ、筋肉量、筋力、反射、無意識筋運動の測定を含む運動機能テスト（例えば握力試験）、電気生理学的試験、筋線維および中心核を有する線維の数、ならびに心電図（EKG または EGG）などの心血管機能試験を含む。

【0396】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法はまた、別の治療剤と組み合わせた投与を含む。このさらなる治療剤は、本発明の治療剤（単数または複数）の投与の前に、それと並行して、または並行せずに、例えば、その後投与され得る。例えば、治療剤はステロイドおよび/または抗生物質と組み合わせて投与され得る。別の例では、患者は、エテプリルセンの投与の前に、コルチコステロイドを用いて処置（例えば 4 ~ 6、7、8、9 20、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または 24 週もしくはこれを超える週、一定用量のコルチコステロイド）されている。ステロイドは、糖質コルチコイドまたはプレドニゾンであってもよい。コルチゾールなどの糖質コルチコイドは、炭水化物、脂肪およびタンパク質代謝を制御し、リン脂質の放出を防止することにより抗炎症性であり、それにより好酸球作用およびいくつかの他の作用機序を減少させる。アルドステロンなどの鉱質コルチコイドは、主に腎臓におけるナトリウム貯留を促進することにより、電解質および水分のレベルを制御する。コルチコステロイドは、脊椎動物の副腎皮質で天然に産生されるステロイドホルモン、および実験室 30 で合成されるこれらのホルモンの類似体を含む、化学物質の種類である。コルチコステロイドは、ストレス応答、免疫応答、ならびに炎症、糖質代謝、タンパク質異化、血中電解質レベルおよび挙動の調節など、広範囲にわたる生理学的プロセスに関与する。コルチコステロイドは、ベタメタゾン、ブデソニド、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾンおよびプレドニゾンを含むが、これらに限定されない。本発明の組成物の投与の前に、それと並行して、またはその後投与され得る、目的の、１つの特定のステロイドは、デフラザコルト（*deflazacort*）およびその製剤である（例えば MP-104、Marathon Pharmaceuticals LLC）。

【0397】

一部の実施形態では、治療剤（例えばエテプリルセンなどの治療用オリゴヌクレオチド）の投与量は、DMD を処置するのに十分な期間中、約 30 mg / kg である。一部の 40 実施形態では、治療剤は、患者に、例えば週 1 回、約 25 mg / kg ~ 約 50 mg / kg（例えば約 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 または 50 mg / kg）の用量で投与される。一部の実施形態では、治療剤は、患者に、例えば週 1 回、約 25 mg / kg ~ 約 50 mg / kg（例えば約 30 mg / kg ~ 約 50 mg / kg、約 25 mg / kg ~ 約 40 mg / kg、約 28 mg / kg ~ 約 32 mg / kg または約 30 mg / kg ~ 約 40 mg / kg）の用量で投与される。

【0398】

一部の実施形態では、治療剤は週 1 回静脈内投与される。ある特定の実施形態では、注入時間は約 15 分から約 4 時間までである。一部の実施形態では、注入時間は約 30 分か 50

ら約3時間までである。一部の実施形態では、注入時間は約30分から約2時間までである。一部の実施形態では、注入時間は約1時間から約2時間までである。一部の実施形態では、注入時間は約30分から約1時間までである。一部の実施形態では、注入時間は約60分である。一部の実施形態では、注入時間は35～60分である。

【0399】

VI. 投薬

治療用組成物の製剤化およびそれらのその後における投与（投薬）は、当業者の技術の範囲内にあると考えられる。投薬は、処置される疾患状態の重症度および応答性に依存し、処置の過程は、数日間から数カ月間にわたり持続するか、または治癒がなされるか、もしくは疾患状態の減殺が達成されるまで持続する。最適の投薬スケジュールは、患者の体内の薬物蓄積の測定値から計算することができる。当業者は、最適の投与量、投薬法、および反復速度を容易に決定することができる。最適の投与量は、個々のオリゴマーの相対的効力に応じて変動させることができ、一般に、*in vitro*および*in vivo*の動物モデルにおいて有効であることが見出されているEC50に基づき推定することができる。一般に、投与量は、体重1kg当たり0.01μg～100gであり、毎日、毎週、毎月、もしくは毎年1回もしくは複数回にわたり、なおまたは2～20年間ごとに1回施すことができる。当業者は、体液中または組織内の、薬物の測定された滞留時間および濃度に基づき、投薬の反復速度を、容易に推定することができる。処置が成功した後、患者に、疾患状態の再発を防止する維持療法であって、オリゴマーを、経口投与のためには、体重70kg当たり1～1000mgのオリゴマー、または*i.v.*投与のためには、体重70kg当たり0.5mg～1000mgのオリゴマーの範囲の維持用量で、毎日1回または複数回～20年ごとに1回投与する維持療法を受けさせることが望ましい場合がある。

10

20

【0400】

その実施形態のうちのいくつかに従い、本開示について具体的に記載してきたが、以下の実施例は、本開示を例示することだけに資するものであり、これを限定することを意図するものではない。本出願で列挙される、参考文献、特許、特許出願、GenBank受託番号などの各々は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0401】

30

VI. 実施例

以下の実施例は、例示を目的として使用することができ、本発明の範囲を狭めるものと考えべきではない。

【0402】

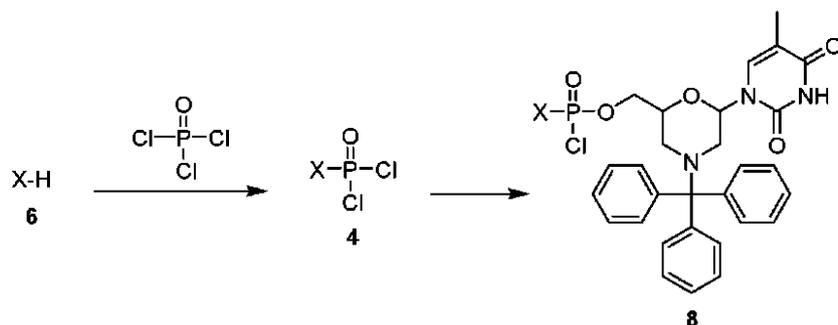
本開示の修飾アンチセンスオリゴマー（図1A～1Gに図示）を、ジストロフィンまたはミオスタチンプレmRNA転写物内の標的領域と結合するようデザインし、以下のプロトコルを使用して調製した。

【0403】

活性サブユニットの調製手順A：

【化79】

40



50

【0404】

ジクロロメタン中の攪拌溶液6（1当量）に、 POCl_3 （1.1当量）を添加し、続いて0 でジイソプロピルエチルアミン（3当量）を添加し、氷浴で冷却した。15分後、氷浴を除去し、溶液を1時間室温へと温めた。反応が完了したら、反応溶液をジクロロメタンで希釈し、10%のクエン酸水溶液で3回洗浄した。 MgSO_4 で乾燥させた後、有機層をシリカゲルプラグに通し、減圧中で濃縮した。得られるホスホロアミドジクロリド（4）をさらに精製せずに次のステップで直接使用した。

【0405】

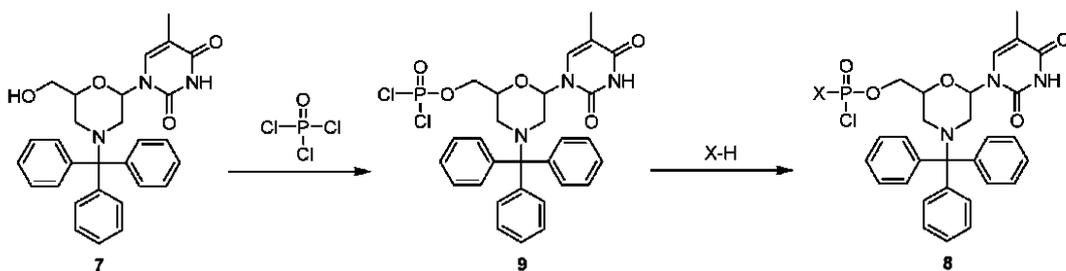
ホスホロアミドジクロリド（4）（1当量）の溶液に、ジクロロメタン中の2,6-ルチジン（1当量）、 $\text{Mo}(\text{Tr})\text{T}$ （7）（0.5当量）/ジクロロメタン溶液を添加し、続いてN-メチルイミダゾール（0.2当量）を添加した。反応液を室温で終夜撹拌した。反応が完了したら、反応溶液をジクロロメタンで希釈し、10%のクエン酸水溶液で3回洗浄した。 MgSO_4 で乾燥させた後、有機層を濾過し、次いで濃縮した。生成物（8）をシリカゲルクロマトグラフィー（酢酸エチル/ヘキサンの勾配で溶出）により精製し、次いで-20 で保存した。LCMS分析により構造を確認した。

10

【0406】

活性化サブユニットの調製手順B：

【化80】



20

【0407】

ジクロロメタン中の POCl_3 （1.1当量）溶液に、2,6-ルチジン（2当量）を添加し、続いて0 で $\text{Mo}(\text{Tr})\text{T}$ （7）（1当量）/ジクロロメタン溶液を滴下添加した。1時間後、反応溶液をジクロロメタンで希釈し、10%のクエン酸水溶液で3回、手早く洗浄した。 MgSO_4 で乾燥させ、溶媒を蒸発させた後、所望のホスホジクロリデート（9）を得た。

30

【0408】

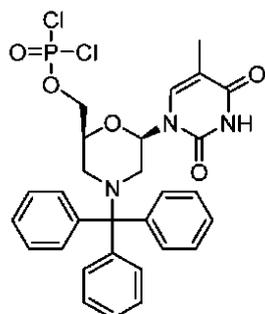
ジクロロメタン中のホスホジクロリデート（1当量）溶液に、0 でアミン（1当量）/ジクロロメタンを溶液への滴下により添加した。15分後、反応混合物を約1時間、室温へと温めた。反応が完了したら、ヘキサンを添加して沈殿させ、続いて濾過することによって、白色固体としての生成物（8）を回収した。生成物を減圧下で乾燥させた後、-20 で保存した。LCMS分析により構造を確認した。

（実施例1）

（（2S,6R）-6-（5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1（2H）-イル）-4-トリチルモルホリン-2-イル）メチルホスホジクロリデート

40

【化 8 1】



10

【0409】

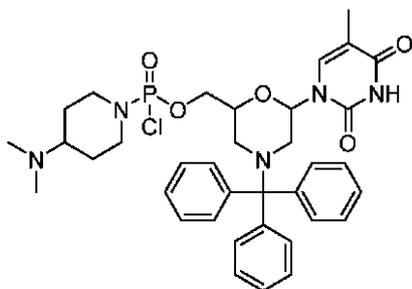
オキシ塩化リン（2.12 mL、22.7 mmol）の冷却（氷/水浴）DCM溶液（20 mL）に、2,6-ルチジン（4.82 mL、41.4 mmol）を滴下添加し、次いで、Mo(Tr)T(2)（10.0 g、20.7 mmol）のDCM溶液（20 mL）を15分にわたり滴下添加し（内部温度：0～10）、次いで浴槽を除去し、20分間周囲温度で撹拌を継続させた。反応物をクエン酸溶液（40 mL × 3、10% w/v水溶液）で洗浄し、乾燥させ（MgSO₄）、濾過し、白色泡状物（9.79 g）となるまで濃縮し、次いで以下の手順に直接使用した。

（実施例 2）

（6-（5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル）-4-トリチルモルホリン-2-イル）メチル（4-（ジメチルアミノ）ピペリジン-1-イル）ホスホクロリデート

20

【化 8 2】



30

【0410】

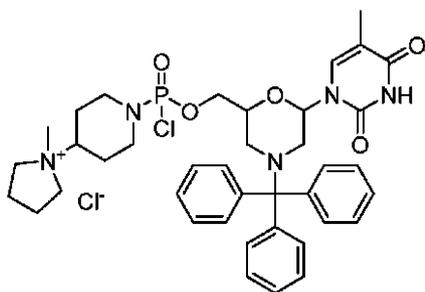
実施例 1 で得たジクロロホスフェート（5.00 g、5.00 mmol）の冷却（氷/水浴）DCM溶液（5 mL）に、ピペリジン（0.61 g、4.76 mmol）のDCM溶液（5 mL）を滴下添加し、次いで浴槽を除去し、周囲温度で30分間撹拌を継続させた。反応物をカラム上に直接ロードした。[SiO₂カラム（40 g）、DCM/EtOH溶出液（勾配 1:0～1:1）]でのクロマトグラフィーにより、白色泡状物として表題化合物（2.5 g）を得た。1（4ニトロフェニル）ピペラジン誘導体 C₄₆H₅₅N₈O₇P のESI/MS：計算値 862.4、実測値 m/z = 863.6（M+1）。

（実施例 3）

1-（1-（クロロ（6-（5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル）-4-トリチルモルホリン-2-イル）メトキシ）ホスホリル）ピペリジン-4-イル）-1-メチルピロリジン-1-イウムクロリド

40

【化 8 3】



【 0 4 1 1】

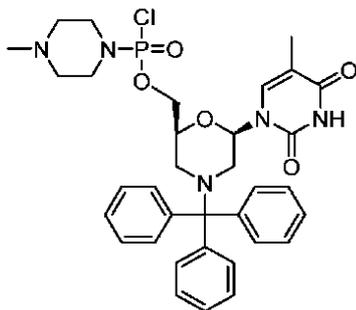
10

実施例 2 に記載の方法と類似の方法で表題化合物を合成し、白色固体として表題化合物 (0.6 g) を得た。1 - (4 - ニトロフェニル) ピペラジン誘導体 $C_{49}H_{60}N_8O_7P$ の ESI/MS : 計算値 903.4、実測値 $m/z = 903.7 (M^+)$ 。

(実施例 4)

((2S, 6R) - 6 - (5 - メチル - 2, 4 - ジオキソ - 3, 4 - ジヒドロピリミジン - 1(2H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチル (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) ホスホクロリデート

【化 8 4】



20

【 0 4 1 2】

30

オキシ塩化リン (1.02 mL、11.0 mmol) の冷却 (氷/水浴) DCM 溶液 (10 mL) に、2, 6 - ルチジン (3.49 mL、29.9 mmol) を滴下添加し、次いでメチルピペラジン (1.00 g、10.0 mmol) の DCM 溶液 (10 mL) を滴下添加し、1 時間攪拌を継続させた。Mo(Tr)T(2) (4.82、10.0 mmol) および NMI (79 μL、1.0 mmol) の DCM 溶液 (10 mL) を添加し、4 時間攪拌し、次いでカラム上に直接ロードした。

【 0 4 1 3】

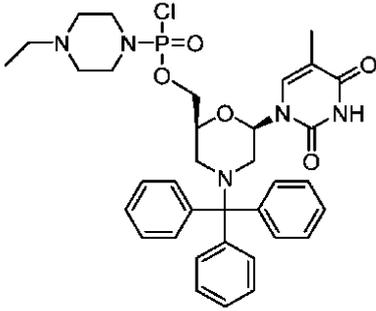
40

(SiO₂ カラム (80 g)、DCM/アセトン (勾配 1 : 0 ~ 0 : 1)、2% の TEA 溶出液) でのクロマトグラフィーにより、白色泡状物として表題化合物 (0.8 g) を得た。1 - (4 - ニトロフェニル) ピペラジン誘導体 $C_{43}H_{48}N_7O_8P$ の ESI/MS : 計算値 834.4、実測値 $m/z = 835.5 (M^+)$ 。

(実施例 5)

((2S, 6R) - 6 - (5 - メチル - 2, 4 - ジオキソ - 3, 4 - ジヒドロピリミジン - 1(2H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチル (4 - エチルピペラジン - 1 - イル) ホスホクロリデート

【化 8 5】



10

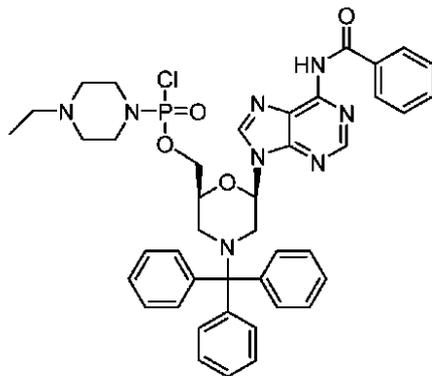
【 0 4 1 4】

実施例 4 に記載の方法と類似の方法で表題化合物を合成し、白色泡状物として表題化合物 (11.5 g) を得た。1 - (4 - ニトロフェニル) ピペラジン誘導体 C₄₅H₅₃N₈O₇P の ESI/MS : 計算値 848.4、実測値 m/z = 849.7 (M + 1)。

(実施例 6)

((2S, 6R) - 6 - (6 - ベンズアミド - 9H - プリン - 9 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル)メチル (4 - エチルピペラジン - 1 - イル)ホスホクロリデート

【化 8 6】



20

30

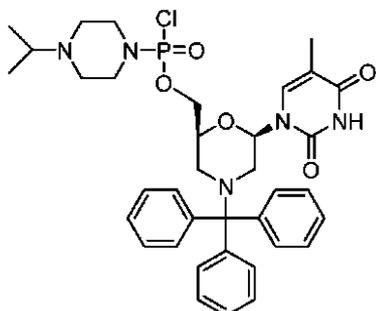
【 0 4 1 5】

実施例 4 に記載の方法と類似の方法で表題化合物を合成し、白色泡状物として表題化合物 (4.5 g) を得た。1 - (4 - ニトロフェニル) ピペラジン誘導体 C₅₂H₅₆N₁₁O₆P の ESI/MS : 計算値 961.4、実測値 m/z = 962.8 (M + 1)。

(実施例 7)

((2S, 6R) - 6 - (5 - メチル - 2, 4 - ジオキソ - 3, 4 - ジヒドロピリミジン - 1(2H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル)メチル (4 - イソプロピルピペラジン - 1 - イル)ホスホクロリデート

【化 8 7】



40

【 0 4 1 6】

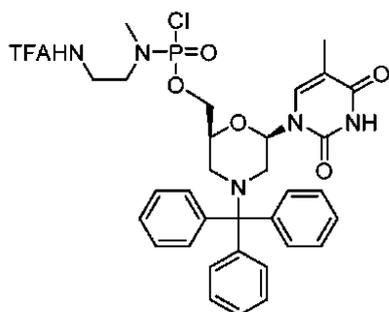
実施例 4 に記載の方法と類似の方法で表題化合物を合成し、白色泡状物として表題化合物

50

物 (3 . 5 g) を得た。1 - (4 - ニトロフェニル) ピペラジン誘導体 $C_{46}H_{55}N_8O_7P$ の ESI / MS : 計算値 862 . 4、実測値 $m/z = 863 . 7 (M + 1)$ 。

(実施例 8)

((2 S , 6 R) - 6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチルメチル (2 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド) エチル) ホスホルアミドクロリデート
【化 8 8】



10

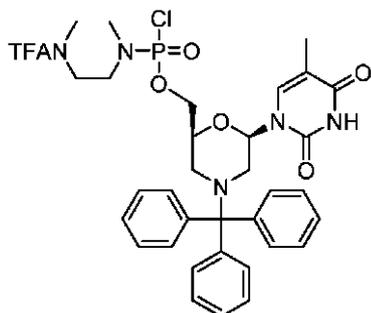
【 0 4 1 7】

実施例 4 に記載の方法と類似の方法により表題化合物を合成し、白色泡状物として表題化合物 (1 . 0 g) を得た。1 - (4 - ニトロフェニル) ピペラジン誘導体 $C_{44}H_{48}F_3N_8O_8P$ の ESI / MS : 計算値 904 . 3、実測値 $m/z = 903 . 7 (M - 1)$ 。

20

(実施例 9)

((2 S , 6 R) - 6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチルメチル (2 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロ - N - メチルアセトアミド) エチル) ホスホルアミドクロリデート
【化 8 9】



30

【 0 4 1 8】

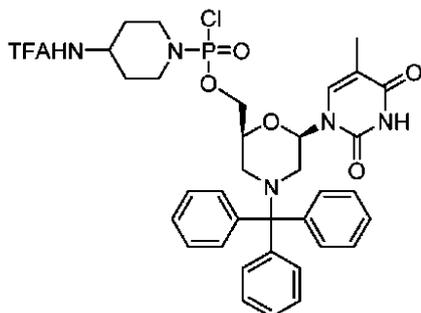
実施例 4 に記載の方法と類似の方法で表題化合物を合成し、白色泡状物として表題化合物 (1 . 8 g) を得た。1 - (4 - ニトロフェニル) ピペラジン誘導体 $C_{45}H_{50}F_3N_8O_8P$ の ESI / MS : 計算値 918 . 3、実測値 $m/z = 1836 . 6 (2M +)$ 。

40

(実施例 1 0)

((2 S , 6 R) - 6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチル (4 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド) ピペリジン - 1 - イル) ホスホクロリデート

【化 9 0】



10

【 0 4 1 9】

DCM (190 mL) 中のオキシ塩化リン (17.7 mL、190 mmol) 冷却溶液 (氷/水浴) に、2,6-ルチジン (101 mL、864 mmol) を滴下添加し、次いで Mo(Tr)T(2) (83.5 g、173 mmol) を 15 分にわたり一部ずつ添加し (内部温度 0 ~ 10)、攪拌した。30 分後、4-アミノピペリジンモノトリフルオロアセトアミド (48.9 g、約 190 mmol) を 15 分にわたり滴下添加し (内部温度 0 ~ 8)、攪拌した。1 時間後、DIPEA (50 mL) を滴下添加し (内部温度 0 ~ 10)、1 時間攪拌した。反応物をクエン酸溶液 (500 mL x 3、10% w/v 水溶液) で洗浄し、乾燥させ (MgSO₄)、濾過し、濃縮して粘稠な油状物を得、それをカラムに直接ロードした。[SiO₂カラム (330 g)、ヘキサン/EtOAc 溶出液 (勾配 1:0 ~ 0:1)] でのクロマトグラフィーにより、白色泡状物として表題化合物 (91.3 g、70% の収率) を得た。1-(4-ニトロフェニル)ピペラジン誘導体 C₄₃H₄₈N₇O₈P の ESI/MS: 計算値 930.9、実測値 m/z = 954.4 (M + Na)。

20

【 0 4 2 0】

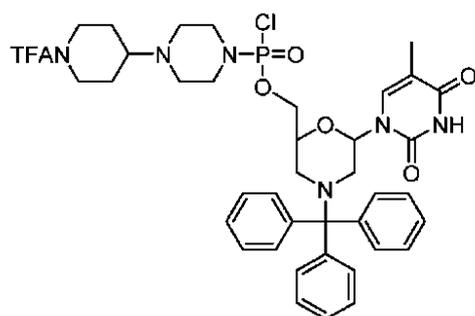
実施例 11 ~ 14 は、上記手順 A により調製した。

(実施例 11)

(6-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-トリチルモルホリン-2-イル)メチル(4-(1-(2,2,2-トリフルオロアセチル)ピペリジン-4-イル)ピペラジン-1-イル)ホスホノクロリデート

30

【化 9 1】

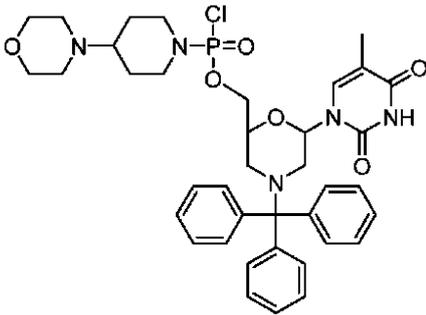


40

(実施例 12)

(6-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-トリチルモルホリン-2-イル)メチル(4-モルホリノピペリジン-1-イル)ホスホノクロリデート

【化 9 2】

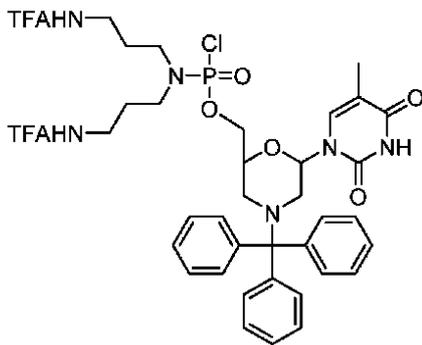


10

(実施例 1 3)

(6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチルビス (3 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド) プロピル) ホスホルアミドクロリデート

【化 9 3】



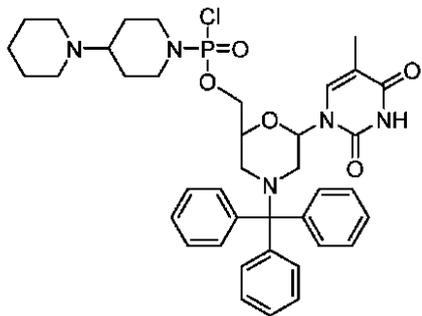
20

(実施例 1 4)

(6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチル [1 , 4 ' - ビペリジン] - 1 ' - イルホスホクロリデート

30

【化 9 4】



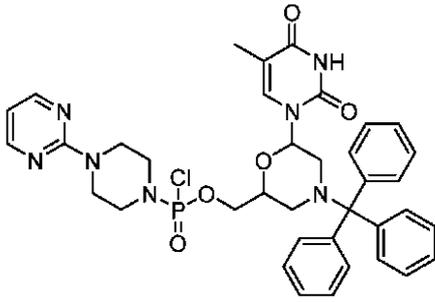
40

以下の実施例 1 5 から 2 0 は、上記の手順 B により調製した。

(実施例 1 5)

(6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチル (4 - (ピリミジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - イル) ホスホクロリデート

【化 9 5】

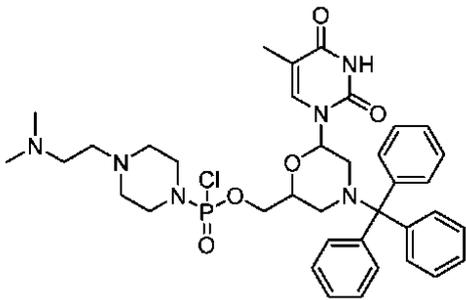


10

(実施例 16)

(6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル)メチル(4 - (2 - (ジメチルアミノ)エチル)ピペラジン - 1 - イル)ホスホクロリデート

【化 9 6】



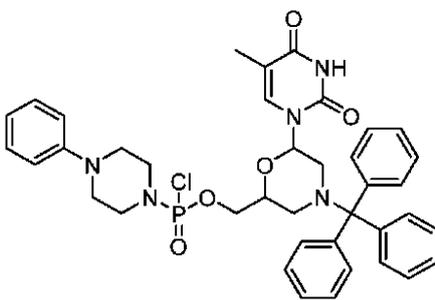
20

(実施例 17)

(6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル)メチル(4 - フェニルピペラジン - 1 - イル)ホスホクロリデート

30

【化 9 7】

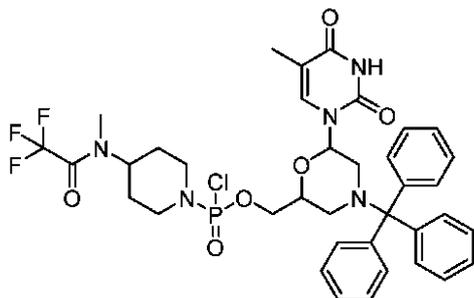


40

(実施例 18)

(6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル)メチル(4 - (2, 2, 2 - トリフルオロ - N - メチルアセトアミド)ピペリジン - 1 - イル)ホスホクロリデート

【化 9 8】

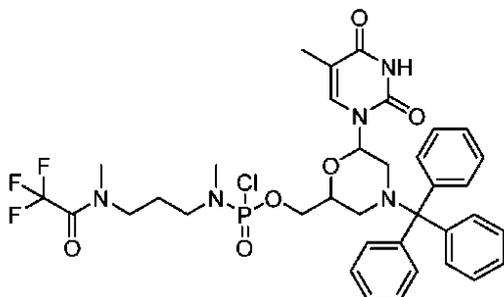


10

(実施例 1 9)

(6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソ - 3 , 4 - ジヒドロピリミジン - 1 (2 H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチルメチル (3 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロ - N - メチルアセトアミド) プロピル) ホスホルアミドクロリデート

【化 9 9】



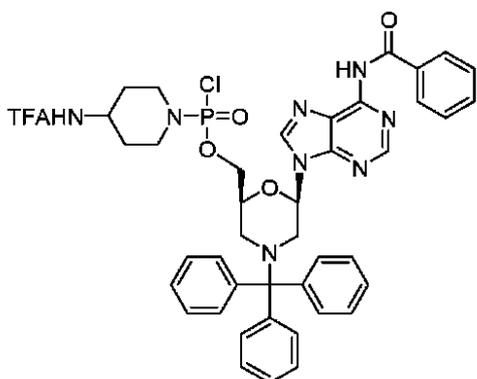
20

(実施例 2 0)

((2 S , 6 R) - 6 - (6 - ベンズアミド - 9 H - プリン - 9 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル) メチル (4 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド) ピペリジン - 1 - イル) ホスホクロリデート

30

【化 1 0 0】



40

(実施例 2 1)

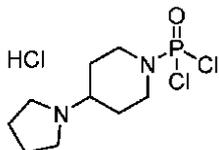
(4 - (ピロリジン - 1 - イル) ピペリジン - 1 - イル) ホスホニックジクロリド塩酸塩
【 0 4 2 1】

DCM (3 0 m L) 中のオキシ塩化リン (5 . 7 0 m L 、 5 5 . 6 m m o l) 冷却 (氷 / 水浴) 溶液に、2 , 6 - ルチジン (1 9 . 4 m L 、 1 6 7 m m o l) および 4 - (1 - ピロリジニル) - ピペリジン (8 . 5 8 g 、 5 5 . 6 m m o l) の D C M 溶液 (3 0 m L) を添加し、1 時間攪拌した。懸濁液を濾過し、固体を過剰量のジエチルエーテルで洗浄

50

し、白色固体として表題のピロリジン (17.7 g、91%の収率) を得た。1-(4-ニトロフェニル)ピペラジン誘導体 $C_{19}H_{30}N_5O_4P$ の ESI/MS: 計算値 423.2、実測値 $m/z = 422.2$ (M-1)。

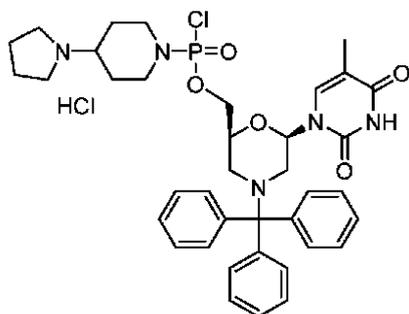
【化101】



(実施例22)

((2S, 6R)-6-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-トリチルモルホリン-2-イル)メチル(4-(ピロリジン-1-イル)ピペリジン-1-イル)ホスホノクロリデート塩酸塩

【化102】



【0422】

DCM (100 mL) 中の実施例 21 で得たジクロロホスホルアミデート (17.7 g、50.6 mmol) 攪拌冷却 (氷/水浴) 溶液に、Mo(Tr)T(2) (24.5 g、50.6 mmol)、2,6-ルチジン (17.7 mL、152 mmol) および 1-メチルイミダゾール (0.401 mL、5.06 mmol) の DCM 溶液 (100 mL) を 10 分にわたり滴下添加した。懸濁液を攪拌しながら、浴槽を周囲温度へと温めた。6 時間後、懸濁液をジエチルエーテル (1 L) 上に注ぎ、15 分間攪拌し、濾過し、固体をさらなるエーテルで洗浄し、白色固体 (45.4 g) を得た。粗生成物をクロマトグラフィ [SiO₂ カラム (120 グラム)、DCM/MeOH 溶出液 (勾配 1:0~6:4)] により精製し、合わせた画分をジエチルエーテル (2.5 L) 上に注ぎ、15 分間攪拌し、濾過し、得られた固体を、さらなるエーテルで洗浄し、白色固体として表題化合物 (23.1 g、60%の収率) を得た。1-(4-ニトロフェニル)ピペラジン誘導体 $C_{48}H_{57}N_8O_7P$ の ESI/MS: 計算値 888.4、実測値 $m/z = 887.6$ (M-1)。

【0423】

(実施例23)

修飾アンチセンスオリゴマーおよび例示的な修飾アンチセンスオリゴマーのデザインおよび製造

トリチルピペラジンフェニルカルバメート 35 の調製 (図 2 A): ジクロロメタン中の化合物 11 の冷却懸濁物 (6 mL/g の 11) に、水中の炭酸カリウム (3.2 当量) 溶液 (4 mL/g の炭酸カリウム) を添加した。この 2 相混合物に、ジクロロメタン中のクロロギ酸フェニル (1.03 当量) 溶液 (2 g/g のクロロギ酸フェニル) を、ゆっくりと添加した。反応混合物を、20℃ へと温めた。反応が完了したら (1~2 時間)、層を分離した。有機層を、水で洗浄し、無水炭酸カリウムで乾燥させた。生成物 35 を、アセトニトリルからの結晶化により単離した。

【0424】

10

20

30

40

50

カルバメートアルコール 36 の調製：水素化ナトリウム（1.2 当量）を、1 - メチル - 2 - ピロリジノン（32 mL / g の水素化ナトリウム）中に懸濁させた。この懸濁物に、トリエチレングリコール（10.0 当量）および化合物 35（1.0 当量）を添加した。結果として得られるスラリーを、95 ℃へと加熱した。反応が完了したら（1 ~ 2 時間）、混合物を、20 ℃へと冷却した。この混合物に、30% のジクロロメタン / メチル tert - ブチルエーテル（v : v）および水を添加した。生成物を含有する有機層を、水性 NaOH、水性コハク酸、および飽和水性塩化ナトリウムで、逐次洗浄した。生成物 36 を、ジクロロメタン / メチル tert - ブチルエーテル / ヘプタンからの結晶化により単離した。

【0425】

テール型酸（Tail acid）37 の調製：テトラヒドロフラン中の化合物 36 の溶液（7 mL / g の 36）に、無水コハク酸（2.0 当量）および DMA P（0.5 当量）を添加した。混合物を、50 ℃へと加熱した。反応が完了したら（5 時間）、混合物を、20 ℃へと冷却し、水性 NaHCO₃ により、pH 8.5 へと調整した。メチル tert - ブチルエーテルを添加し、生成物を、水性層へと抽出した。ジクロロメタンを添加し、混合物を、水性クエン酸により、pH 3 へと調整した。生成物を含有する有機層を、クエン酸緩衝液と、飽和水性塩化ナトリウムとの、pH = 3 の混合物で洗浄した。この 37 のジクロロメタン溶液を、単離せずに、化合物 38 の調製において使用した。

【0426】

38 の調製：化合物 37 の溶液に、N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン - 2, 3 - ジカルボン酸イミド（HONB）（1.02 当量）、4 - ジメチルアミノピリジン（DMA P）（0.34 当量）を添加し、次いで、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - N' - エチルカルボジイミドヒドロクロリド（EDC）（1.1 当量）を添加した。混合物を、55 ℃へと加熱した。反応が完了したら（4 ~ 5 時間）、混合物を、20 ℃へと冷却し、1 : 1 の 0.2 M クエン酸 / ブラインおよびブラインで、逐次洗浄した。ジクロロメタン溶液に、アセトンへの溶媒交換、次いで、N, N - ジメチルホルムアミドへの溶媒交換を施し、生成物を、アセトン / N, N - ジメチルホルムアミドからの、飽和水性塩化ナトリウムへの沈殿により単離した。粗生成物を、水中で、複数回にわたり、再スラリー化させて、残留する N, N - ジメチルホルムアミドおよび塩を除去した。

【0427】

活性化「テール」の、アンカーロード樹脂への導入は、固相合成におけるサブユニットの組み込みのために使用される手順により、ジメチルイミダゾリジノン（DMI）中で実施した。

【0428】

モルホリノベースのオリゴマーの合成のための固体支持体の調製：この手順は、粗い多孔性（40 ~ 60 μm）のガラスフリット、オーバーヘッド攪拌機、および、フリットを介して N₂ を沸騰させるかまたは真空抽出を可能とする、Teflon 製の三方止め栓を伴う、シラン化、ジャケット付きのペプチド容器（Chem Glass、NJ、USA）内で実施した。

【0429】

以下の手順における樹脂処理 / 洗浄ステップは、2 つの基本的な操作からなる：樹脂流動化または攪拌床樹脂反応器および溶媒 / 溶液抽出。樹脂の流動化のために、フリットを通して N₂ の逆流（flow up）を可能とするように、止め栓を位置付け、指定の樹脂処理 / 洗浄液を、反応器へと添加し、樹脂を透過化させ、完全に湿潤させた。次いで、混合を開始し、指定の回数にわたり、樹脂スラリーを混合した。溶媒 / 溶液抽出のために、混合および N₂ の流れを停止させ、真空ポンプを始動させ、次いで、樹脂処理 / 洗浄液を排出して廃棄することを可能とするように、止め栓を位置付けた。そうでないことが注記されない限りにおいて、樹脂処理 / 洗浄液の全容量は、樹脂 1 g 当たり 15 mL であった。

【0430】

10

20

30

40

50

シラン化、ジャケット付きのペプチド容器内のアミノメチルポリスチレン樹脂（100～200メッシュ；窒素置換に基づき、1g当たり約1.0mmolのロード；75g、1当量、Polymer Labs、UK、型番：1464-X799）に、1-メチル-2-ピロリジノン（NMP；樹脂1g当たり20ml）を添加し、樹脂を、混合しながら、1～2時間にわたり膨潤させた。膨潤溶媒（swell solvent）の排出後、樹脂を、ジクロロメタン（2×1～2分間）、25%のイソプロパノール/ジクロロメタン中に5%のジイソプロピルエチルアミン（2×3～4分間）、およびジクロロメタン（2×1～2分間）で洗浄した。最終洗浄液を排出した後、樹脂を、1-メチル-2-ピロリジノン中の、ジスルフィドアンカー-34溶液（0.17M；樹脂1g当たり15mL、約2.5当量）で処理し、樹脂/試薬混合物を、45℃で60時間にわたり加熱した。反応が完了したら、加熱を中断し、アンカー溶液を排出し、樹脂を、1-メチル-2-ピロリジノン（4×3～4分間）およびジクロロメタン（6×1～2分間）で洗浄した。樹脂を、ジクロロメタン中に10%（v/v）のジエチルジカーボネート溶液（16mL/g；2×5～6分間）で処理し、次いで、ジクロロメタン（6×1～2分間）で洗浄した。樹脂39（図2B）を、N2流下で、1～3時間にわたり、次いで、真空下で、一定の重量（±2%）まで乾燥させた。収率：元の樹脂重量の110～150%。

10

【0431】

アミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂のローディングの決定：樹脂のローディング（潜在的に利用可能な反応性部位の数）は、分光アッセイにより、樹脂1グラム当たりのトリフェニルメチル（トリチル）基の数について決定する。

20

【0432】

公知の重量（25±3mg）の乾燥樹脂を、25mlのシラン化メスフラスコへと移し、ジクロロメタン中に2%（v/v）のトリフルオロ酢酸約5mlを添加する。内容物を、静かな回旋により混合し、次いで、30分間にわたり静置する。容量を、ジクロロメタン中に2%（v/v）の、さらなるトリフルオロ酢酸により、25mlへと増量し、内容物を、完全に混合した。容積型ピペット（positive displacement pipette）を使用して、トリチル含有溶液（500μL）のアリコートをし、10mlのメスフラスコへと移し、容量を、メタンスルホン酸により、10mlへと増量する。

30

【0433】

最終溶液中のトリチルカチオン含量は、431.7nmにおけるUV吸光度により測定し、樹脂のローディングは、適切な容量、希釈率、消衰係数（ ϵ ：41μmol⁻¹cm⁻¹）、および樹脂重量を使用して、樹脂1グラム当たりのトリチル基（μmol/g）により計算する。アッセイは、三連で実施し、平均ローディングを計算する。

【0434】

本実施例における樹脂のローディング手順により、約500μmol/gのローディングを有する樹脂を提供する。ジスルフィドアンカーの組込みステップを、室温で24時間にわたり実施する場合、μmol/g単位で300～400のローディングが得られた。

【0435】

テールローディング：アミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂を調製するための設定および容量と同じ設定および容量を使用して、テールを、固体支持体へと導入することができる。アンカーロード樹脂をまず、酸性条件下で脱保護し、結果として得られる材料を中性化させてから、カップリングした。カップリングステップのために、ジスルフィドアンカー溶液の代わりに、4-エチルモルホリン（NEM、0.4M）を含有するDMF中の、38の溶液（0.2M）を使用した。45℃で2時間後、樹脂39を、25%のイソプロパノール/ジクロロメタン中に5%のジイソプロピルエチルアミンで2回にわたり洗浄し、DCMで1回洗浄した。樹脂に、安息香酸無水物（0.4M）およびNEM（0.4M）の溶液を添加した。25分後、反応器ジャケットを、室温へと冷却し、樹脂を、25%のイソプロパノール/ジクロロメタン中に5%のジイソプロピルエチルアミンで、2回にわたり洗浄し、DCMで、8回にわたり洗浄した。樹脂40を濾過し、高真空下

40

50

で乾燥させた。樹脂40に対するローディングは、テールローディングにおいて使用した、元のアミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂39のローディングであると規定する。

【0436】

固相合成：モルホリノベースのオリゴマーは、Gilson AMS-422 Automated Peptide Synthesizer上、2 mLのGilsonポリプロピレン反応カラム（型番：3980270）内で調製した。カラムを合成器に静置するときに、カラムの周囲に、水流のためのチャンネルを伴うアルミニウム製のブロックを入れた。AMS-422は、代替的に、試薬/洗浄液を添加し、指定された時間にわたり保持し、真空を使用して、カラムを排気する。

10

【0437】

最大で約25サブユニットの長さの範囲のオリゴマーでは、ローディングを、樹脂1g当たり約500 μmol とする、アミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂が好ましい。より大型のオリゴマーでは、ローディングを、樹脂1g当たり300~400 μmol とする、アミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂が好ましい。5'テールを伴う分子が所望される場合も、同じローディング指針により、テールでローディングした樹脂を選択する。

【0438】

以下の試薬溶液を調製した。

【0439】

脱トリチル化溶液：4：1ジクロロメタン/アセトニトリル中に、10%のシアノ酢酸（w/v）；中性化溶液：3：1のジクロロメタン/イソプロパノール中に、5%のジイソプロピルエチルアミン；カップリング溶液：所望の塩基型および連結型を有する、0.18 M（または20サブユニットより長くなったオリゴマーには、0.24 M）の活性化モルホリノサブユニット、ならびに1,3-ジメチルイミダゾリジノン中に、0.4 MのNエチルモルホリン。ジクロロメタン（DCM）を、異なる試薬溶液の洗浄を隔てる、一過性洗浄液として使用した。

20

【0440】

ブロックを42 に設定した合成器上で、30 mgのアミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂（またはテール樹脂）を含有する各カラムに、2 mLの1-メチル-2-ピロリジノン添加し、室温で、30分間にわたり静置した。2 mLのジクロロメタンで、2回にわたる洗浄の後、以下の合成サイクルを使用した。

30

【0441】

【表 6】

表 6: 修飾アンチセンスオリゴマーについての合成サイクル

ステップ	容量	送達	保持時間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
カップリング	350~ 500uL	シリンジ	40 分間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間

10

20

30

40

【 0 4 4 2 】

各カラムが、適正な配列の、適正なカップリング溶液（A、C、G、T、I）を受容するように、個々のオリゴマーの配列を、合成器へとプログラムした。カラム内のオリゴマーが、その最終的なサブユニットの組込みを完了したら、カラムを、ブロックから取り出し、0.89 Mの4-エチルモルホリンを含有する、4-メトキシトリフェニルメチルクロリド（DMI中に0.32 M）を含むカップリング溶液により、最終サイクルを、手動で実施した。

【 0 4 4 3 】

樹脂からの切断ならびに塩基および保護基の除去：メトキシトリチル化の後、樹脂を、2 mLの1-メチル-2-ピロリジノンで、8回にわたり洗浄した。1-メチル-2-ピ

50

ロリジノン中に、0.1 Mの1,4-ジチオトレイトール(DTT)および0.73 Mのトリエチルアミンを含む、1 mLの切断溶液を添加し、カラムに蓋をし、室温で、30分間にわたり静置した。この時間の後、溶液を、12 mLのWheatonバイアルへと排出した。大幅に縮んだ樹脂を、300 µLの切断溶液で、2回にわたり洗浄した。溶液に、4.0 mLの濃縮アンモニア水(-20 で保存された)を添加し、バイアルにきつく蓋をし(テフロン(登録商標)加工のねじ蓋により)、混合物を回旋にかけて、溶液をミックスした。バイアルを、45 のオープンに、16~24時間にわたり入れて、塩基および保護基の切断を行った。

【0444】

粗生成物の精製：バイアルに入れた(vial ed)アンモノリシス溶液を、オープンから取り出して、室温へと冷却した。溶液を、20 mLの0.28%の水性アンモニアで希釈し、Macroprep HQ樹脂(BioRad)を含有する、2.5 x 10 cmのカラムに通した。塩勾配(A:0.28%のアンモニアに、B:0.28%のアンモニア中に1 Mの塩化ナトリウムを伴う;60分間でBを0~100%とする)を使用して、メトキシトリチルを含有するピークを溶出させた。合わせた画分をプールし、所望される生成物に応じて、さらに加工した。

10

【0445】

モルホリノベースのオリゴマーの脱メトキシトリチル化：Macroprepによる精製からプールされた画分を、1 MのH₃PO₄で処理して、pHを2.5へと低下させた。初期の混合の後、試料を、室温で4分間にわたり静置し、この時間に、それらを、2.8%のアンモニア/水で、pH 10~11へと中性化させる。生成物は、固相抽出(SPE)により精製した。

20

【0446】

SPEカラムのパッキングおよびコンディショニング：Amberchrome CG-300M(Rohm and Haas; Philadelphia, PA)(3 mL)を、20 mLのフリットカラム(BioRad Econo-Pac Chromatography Columns(732~1011))へとパッキングし、樹脂を、3 mLの以下のもの：0.28%のNH₄OH/80%のアセトニトリル;0.5 MのNaOH/20%のエタノール;水;50 mMのH₃PO₄/80%のアセトニトリル;水;0.5のNaOH/20%のエタノール;水;0.28%のNH₄OHですすいだ。

30

【0447】

SPEの精製：脱メトキシトリチル化からの溶液を、カラムへとロードし、樹脂を、0.28%の水性アンモニア3~6 mLで、3回にわたりすすいだ。Wheatonバイアル(12 mL)を、カラムの下に置き、生成物を、0.28%の水性アンモニア中に、45%のアセトニトリル2 mLで2回にわたる洗浄により溶出させた。

【0448】

生成物の単離：溶液を、ドライアイス内で凍結させ、バイアルを凍結乾燥機に入れて、綿毛状の白色粉末をもたらした。試料を、水中に溶解させ、シリンジを使用して、0.22ミクロンのフィルター(Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mmシリンジフィルターに、0.2ミクロンのHT Tuffryn膜を伴う)を通して濾過し、UV分光光度計上で、光学濃度(OD)を測定して、存在するオリゴマーのOD単位を決定したほか、試料を解析のために分注した。次いで、凍結乾燥させるために、溶液を、Wheatonバイアルに戻した。

40

【0449】

MALDIによる、モルホリノベースのオリゴマーについての解析：MALDI-TOF質量分析を、使用して、精製物中の画分の組成を決定したほか、オリゴマーの正体の証拠(分子量)ももたらした。マトリックスとしての、3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシケイ皮酸(シナピン酸)、3,4,5-トリヒドロキシアセトフェノン(THAP)、またはアルファ-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(HCCA)の溶液による希釈後に、試料を試行にかけた。

50

【0450】

(実施例24)

PMOミオスタチン配列の *in vivo*スクリーニング

ミオスタチンエクソン2をスキップするようにデザインされたPMO配列をスクリーニングした。ヒト横紋筋肉腫(RD)およびマウス筋芽細胞(正常:C2C12、およびストロフィー:H2Kbmdx)細胞の両方において、*in vitro*でPMO配列の有効性を試験した。次に、RD細胞において、ミオスタチンエクソン2の5'末端を標的とする4つのヒト特異的なPMOをスクリーニングした。

【0451】

Nucleofection (Neonトランスフェクションシステム、Life technologies、カールズバッド、CA)によって、製造業者の標準的なプロトコールに従い、PMOをトランスフェクトした。RT-PCR産物のゲル電気泳動結果のデンストメトリー分析に従い、スキップされた産物およびスキップされなかった産物の総密度に対するスキップされた産物の密度のパーセンテージとして、半定量的RT-PCRにより、PMOのスキッピング効率を評価した。配列を表7に列挙する。

10

【0452】

配列PMO39(配列番号48)、PMO42(配列番号16)、PMO43(配列番号49)、PMO44(配列番号17)、PMO45(配列番号18)およびPMO124を、マウスおよびヒトミオスタチンエクソン2の両方と結合するようにデザインした。PMOは、4つの用量(0.25、0.5、1および2 μ M)で3回ずつ試験した。上記のようにRT-PCR(図3A)およびRT-PCR産物のデンストメトリー分析により、スキップされた産物およびスキップされなかった産物の総強度に対するスキップされた産物の強度のパーセンテージとして、ミオスタチンエクソン2のスキッピング効率を評価した。統計解析は、PMOの効率を、個々の用量において、ミオスタチンエクソン2をスキップする有効なPMOとして示されたPMO28(GeneToolsにより合成)のそれと比較する一方向分散分析により実施した(図3B)。

20

【0453】

ヒトミオスタチンエクソン2の5'末端と結合するように全てデザインされた4つのヒト特異的PMO(PMO40、PMO46(配列番号21)、PMO47(配列番号20)、PMO48(配列番号19))を分析した。PMOは、1 μ Mの用量で3回試験し、3'末端を標的とするPMOと同じ濃度で比較した。これらのPMOがエクソン2スキッピングを誘導すると予想されたので、それらの有効性を、確立したRT-PCRプロトコールにより、上記のようなデンストメトリー分析に従い評価した。RT-PCR産物の結果を図4Aに示し、デンストメトリー分析を図4Bに示す。

30

【0454】

ミオスタチンエクソン2の3'末端を標的とするPMOのうち、PMO44(配列番号17)およびPMO45(配列番号18)(ならびにより高い濃度でPMO39(配列番号48))は、特に低い濃度で、他よりも一貫したスキッピングを誘導した(図4B)。ミオスタチンエクソン2の5'末端を標的とするPMOを使用したとき、スキッピング有効性はさらに高く、PMO46(配列番号21)はほぼ100%のスキッピングを誘導し、PMO40および48(配列番号19)は約80%のスキッピングを誘導した(図4B)。

40

マウスミオスタチンのエクソン2のスキッピング用のPMOのスクリーニング:C2C12およびH2Kbmdx細胞におけるPMO39、42、43、44、45、124の用量反応試験

【0455】

mdxマウスモデルにおける特異的および再現可能なエクソンスキッピングの最初の例が、Wiltonら(Wilton、Lloydら1999年、その内容は参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)により報告された。アンチセンス分子をドナースプライス部位に指向させることにより、培養細胞の6時間以内の処理で、一貫したおよび効果的なエクソ

50

ン23のスキッピングがジストロフィンmRNAにおいて誘導された。Wiltonらはまた、より長いアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、マウスジストロフィンブレムRNAのアクセプター領域のターゲティングについて記載している。イントロン23のドナープライス部位を指向する第1のアンチセンスオリゴヌクレオチドが初代培養筋芽細胞において一貫したエクソンスキッピングを誘導した一方で、この化合物が、より高いレベルのジストロフィンを発現する不死化細胞培養ではそれ程効率的でないことがわかった。しかしながら、ターゲティングおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドのデザインを改良することにより、特異的なエクソン除去の効率がほぼ1桁増加した(Mann、Honeymanら、2002年、その内容は参照によりその全体において本明細書に組み込まれる)。

【0456】

最初に、マウス筋芽細胞C2C12細胞において、0.25、0.5、1、2および5 μ Mの用量で各4回、PMOを試験した(図5Aおよび図5C)。PMO配列ならびに0.5および2 μ Mの用量を用いて、スキッピングの変動が反復的に観察された。代わりに筋芽細胞ジストロフィー細胞モデルであるH2Kbmdx細胞においてスクリーニングを行った結果、より一貫した、信頼性が高い結果が示された(図5Aおよび図5B)。

【0457】

試験したH2Kbmdx細胞培養において、PMO28は、高濃度で最高のPMOであり、低濃度で最も効率的なPMOの1つであった(PMO45(配列番号18)およびPMO39(配列番号48)と同程度)(図5B)。

mdxマウスにおける、非コンジュゲートPMO-MSTN配列の予備的*in vivo*スクリーニング

【0458】

*in vitro*の結果に基づき、PMO39(配列番号48)、44(配列番号17)および45(配列番号18)を本試験用を選択した。PMO124を対照として使用した。PMO124の最適用量である3nmol(1.8×10^{14} 分子に相当)を、8週齢のmdxマウスの各前脛骨(TA)筋に注射した。他のPMOの量は、注射したPMO124の同じ分子数に対して正規化した。2匹のマウスの両方のTA筋に、25 μ lの最終量(食塩水で希釈)で、各PMO(群あたりn=4)を注射した。注射の2週後に筋肉を採取した。結果を図6A、図6Bおよび図6Cに図示する。

PMO用量の算出：

a) PMO39(配列番号48(18mer)) = 18.5 μ g(2匹のマウス、4つのTA)

b) PMO44(配列番号17(25mer)) = 25.4 μ g(2匹のマウス、4つのTA)

c) PMO45(配列番号18(25mer)) = 25.5 μ g(2匹のマウス、4つのTA)

d) PMO124(28mer) = 28.8 μ g(2匹のマウス、4つのTA)

これらの μ g量は、各PMOにつき 1.8×10^{14} 個の分子に対応する。

【0459】

試験した全てのPMOは、*in vivo*で生物学的に活性であった。スキッピング効率は、PMO124で処理した筋肉において最も高く、PMO45(配列番号18)で処理した筋肉において最も低かった(図6C)。しかしながら、かかる効率は筋肉重量の増加と相関していなかった。PMO45(配列番号18)で処理した筋肉は、未処理の、またはPMO124もしくは44(配列番号17)で処理された筋肉より重かったが、差が有意でなかった(図6B)。

mdxマウスにおけるPMOの全身注射

【0460】

また、PMO39(配列番号48)、44(配列番号17)、45(配列番号18)および124を、全身的なスキッピング有効性について試験した。8週齢のmdxマウスにおいて尾静脈内注射を通じてスクリーニングを実施した。PMO124を対照として、2

10

20

30

40

50

0.0 μl の食塩水で希釈した 200 mg / kg の用量 (1.253×10^{18} の分子または 20.8 μmol に相当) で使用した。他の PMO の量は、注射した PMO 124 の分子数に対して正規化した。群あたり 3 匹のマウスを使用した。注射の 2 週間後、横隔膜 - DIA、長指伸筋 - EDL、腓腹筋 - GAS、ヒラメ筋 - SOL および前脛骨 - TA を含む筋肉を回収した。結果を図 7 A、図 7 B、図 7 C および図 7 D に図示する。

PMO 用量の算出：

- a) PMO 124 (28 mer) = 200 mg / kg (3 匹のマウス)
- b) PMO 45 (配列番号 18 (25 mer)) = 176.2 μg (3 匹のマウス)
- c) PMO 44 (配列番号 17 (25 mer)) = 176.8 μg (3 匹のマウス)
- d) PMO 39 (配列番号 48 (28 mer)) = 128.6 μg (3 匹のマウス)

これらの μg 量は、各 PMO につき 1.253×10^{18} 個の分子 (20.8 μmol) に対応する。

【0461】

スキッピング結果は、1 匹のマウスから採取した筋肉間、および異なるマウスからの同じタイプの筋肉間で変動していた (図 7 A および図 7 B)。しかしながら、全ての PMO は、1 回の IV 注射後、ジストロフィーの筋肉において生物学的に活性であった。GAS および TA は、PMO 45 (配列番号 18) または 124 の注射後、食塩水を注射されたマウスの、同じタイプの筋肉と比較して、重量が増加する傾向を示した (最終体重に対して正規化、図 7 D)。

C57 マウスにおける、B ペプチドコンジュゲート PMO の *in vivo* スクリーニング

【0462】

前の *in vitro* および *in vivo* スクリーニングから選抜された PMO D30 (配列番号 16)、PMO 39 (配列番号 48) および PMO 45 (配列番号 18) を、PMO の 3' 末端で B ペプチド (RAhxRRBRRAhxRRBRRAhxB : 配列番号 3499 およびペプチドのカルボキシ末端における AhxB リンカー部分) とコンジュゲートさせ、全身尾静脈注射で毎週、14 週間にわたり送達した。B ペプチドコンジュゲート PMO (以下「B PMO」とも称する) を、12 週齢の C57 マウス (群あたり 10 匹のマウス) において実施した。10 または 20 mg / kg の 2 つの用量で試験した。最終の注射後、握力試験により前肢の筋力を測定した (図 9 A および図 9 B)。10 mg / kg の B PMO で処理したマウスの TA 筋の最大筋力を、*in situ* で電気生理学的に測定した (図 9 C)。筋肉量およびミオスタチンエクソスキッピングの評価のため、心臓、DIA および 4 つの骨格筋 (EDL、GAS、SOL、TA) を回収した。

【0463】

20 mg / kg の B PMO - 39 および B PMO - D30 処理群のマウスの何匹かは、尾静脈がほとんど見えなかったため、最後の 4 ~ 6 週の間、IV 注射を受けなかった。その代わりに、これらのマウスには IP 注射を行った。B PMO - 39、20 mg / kg の処理群において、2 匹のマウスは、本試験の間に死亡した。

結果：

【0464】

1) 体重および筋肉量の増加：B PMO - 39 処理群 (10 または 20 mg / kg) におけるマウスの体重は、食塩水およびスクランブル B PMO を注射した動物のいずれの体重と比較しても、有意に増加した (図 8 A および図 8 C)。B PMO - D30 は、20 mg / kg で使用したとき、非常に効果的な体重増加を誘導した (図 8 C)。投与される投与量および検討した筋肉に依存して、筋肉量の変動 (初期体重に対して正規化) が観察された (図 8 B および図 8 D)。B PMO - 39 は、TA (10 または 20 mg / kg の処理、図 8 B および図 8 D) および GAS (10 mg / kg の処理、図 8 B) において最も一貫した筋肉増加を示し、一方、B PMO - D30 または - 45 は、TA (10 mg / kg の処理、図 8 B) または GAS (20 mg / kg の処理、図 8 D) において質量増加を誘導した。20 mg / kg の処理を受けたマウスの DIA では、試験した B PMO の全て

10

20

30

40

50

が有意な筋肉重量増加を誘導した(図8D)。最後の数回の注射の際に使用したIP送達経路は、この結果に対する影響を有した可能性がある。

【0465】

2) 握力の分析：前肢力の測定は、両方のBPMO用量で処理したマウスで実施した(図9Aおよび図9B)。BPMO-39は、食塩水群と比較して、また10mg/kgの処理でのみ、筋力強化を示す唯一の候補であった(図9A)。スクランブルBPMOは、予想外にも、また説明不能であるが、10および20mg/kgの用量の両方で、食塩水処理マウスと比較して有意に異なって、その処理マウスの前肢の筋力を増加させた(図9Aおよび図9B)。

【0466】

3) *in situ*における筋肉の生理学的試験：10mg/kgのBPMOで処理したマウスのTAを、電気生理学的評価を使用して分析した。BPMO-D30は、スクランブルPMOおよび他の試験したBPMOと比較して、発生する最大かつ比筋力を有意に増加させた(図9C)。

【0467】

4) エクソスキッピングの定量：DIA(図10Aおよび図10B)ならびにTA(図10Cおよび図10D)の筋肉のミオスタチンスキッピング効率を分析した。20mg/kgの処理を受けた筋肉のスキッピングレベルは、10mg/kgで処理した筋肉でのレベルより3~4倍高かった(図10Bおよび図10D)。BPMO-D30および-45は、使用した20mg/kgの用量(DIA、図10BとTA、図10D)または10mg/kgの用量(TA、図10D)では、BPMO-39よりも有意に効率が高かった。

【0468】

*in vivo*スクリーニングの暫定的結果：BPMO-D30およびBPMO-45は、筋肉重量、筋力およびエクソスキッピング効率に対する全体的な効果を考慮して、最も有効な分子であった。(筋線維の断面分析に関する有力なデータとして)組織学的分析を行う。

(実施例25)

BPMOの誘導による二重エクソスキッピング：ミオスタチンおよびジストロフィンによる組合せ処理

若齢のジストロフィーマウスにおけるジストロフィンリーディングフレームのレスキュー+ミオスタチンのノックダウン。

【0469】

PMO-M23D(配列番号937)を、PMOの3'末端においてBペプチド(RAhxRRBRRAh x RRBRRAh x B:配列番号3499およびペプチドのカルボキシ末端のAh x Bリンカー部分)とコンジュゲートさせ、BPMO-M23Dと命名した。BPMO-M23D(10mg/kg)および/またはBPMO-MSTN(D30、10mg/kg)を200μlの食塩水で希釈し、6週齢のmdxマウスまたはC57BL/10マウスの尾静脈を通して注射した。10週間にわたり、注射を毎週繰り返した。10匹のマウスを各処理に使用した。5つのマウスの群の詳細は以下の通りである：

- a) C57BL/10マウス+食塩水(陽性対照)
- b) Mdxマウス+食塩水(陰性対照)
- c) Mdxマウス+BPMO-M23D(配列番号937)(10mg/kg)
- d) Mdxマウス+BPMO-M23D(配列番号937)(10mg/kg)およびBPMO-MSTN(配列番号16)(10mg/kg)
- e) Mdxマウス+BPMO-MSTN(配列番号16)(10mg/kg)

結果：

【0470】

12週間の処理の後、処理を受けたmdxマウスにおいて、食塩水を注射された動物と比較した体重の有意な増加が観察されなかった(図11A)。前肢の筋力を測定する握力

10

20

30

40

50

分析は、BPMO-M23Dの注射が、mdxマウスと比較して、筋力の有意な増加を誘導する一方、BPMO-M23DおよびBPMO-MSTNの共注射は、筋力をC57マウスの筋力に対して正常化したことを明らかにした(図11B)。BPMO-MSTN処理単独では、食塩水を注射されたmdxマウスと比較して、処理を受けたマウスの筋力を変化させなかった(図11B)。上で報告された握力試験を、以下の通りにさらに実施した。3日連続で(アクティビティケージ評価に従い)試験を実施した。各試験では、5回の読取値/マウスの値を記録した。各値は、2回の読取値間のインターバルを30秒間とし、30秒以内に測定される前肢の筋力の最も高い値とした。合計15回の読取値/マウス(図18A)として、または、3×5回の読取値の平均/マウス/試験(図18B)として、または、3×5回の読取値の最高値/マウス/試験(図18C)としてデータを示す。統計解析は、一方向分散分析およびボンフェローニ事後検定(群あたりn=10)により行った。エラーバーは、SEMを表す。

10

【0471】

BPMO-M23D処理は、単独で、またはBPMO-MSTNとの組合せで、心臓における約25%のスキッピングを除き、分析した全ての筋肉において、70~80%のジストロフィン再フレーミングとなる非常に効率的なジストロフィンエクソスキッピングを誘導した(図12A)。BPMO-MSTNとBPMO-M23Dとの組合せによる処理は、BPMO-M23D単独による処理よりも、高いDMDエクソスキッピング効率をもたらした。次にジストロフィンタンパク質の回復をウェスタンブロット解析により確認し、骨格筋での発現はC57マウスのレベルの30~100%の間の範囲であった(図12B)。免疫組織化学によりジストロフィン発現を再確認した。ミオスタチンエクソ2のスキッピングは、二重処理を受けたマウスにおいても効率的であり、試験した全ての筋肉において、平均スキッピングが約55%であった(図12C)。

20

【0472】

筋線維肥大および再生に対する処理の効果を試験するため、採取した筋肉においてさらなる組織学的分析を実施した。中心核線維の頻度に加え、筋線維の数および直径を調査した。EDL、GAS、SOLおよびTA筋における治療的利益を評価した。TA線維分析の結果を代表として報告する(図13Aおよび図13B)。BPMO-MSTN単独による処理は、ジストロフィーの表現型を変化させなかったが、BPMO-M23DおよびBPMO-M23D+BPMO-D30処理は、未処理のmdxの筋肉と比較して、筋線維の断面領域の変動(図13A)および中心核線維の存在(図13B)の減少により病変を部分的に改善した。この効果は、基本的に、mdxの筋肉の偽性肥大および筋肉の変性プロセスの両方を低下させるジストロフィンの回復に起因するものであった。

30

老齢のmdxマウスにおけるミオスタチンのジストロフィンリーディングフレームのレスキュー+ノックダウン

【0473】

BPMO-MSTNおよびBPMO-M23Dを、上で報告したように、同一の用量レジメンおよび投与経路を使用して、ヒトで観察されるジストロフィー疾患を(若齢のmdxマウスと比較して)より正確に再現する老齢(>18カ月齢)のmdxマウスに注射した。10mg/kgのBPMO-M23D(n=5)またはBPMOM23D(10mg/kg)とBPMO-MSTN(10mg/kg)(n=5)または、20mg/kgのスクランブルBPMO(n=4)により、週1回で10週間、マウスに注射した。最終の注射の1週間後、前肢の筋力を調査するため、マウスの握力分析を行った。筋肉を採取する前に、処理を受けたマウスのTA筋を、次の週に電気生理学的に分析した。

40

結果：

【0474】

処理を受けたマウスの体重の(スクランブル群と比較した)有意な変化が、7週目以降に観察された(図14A)。スクランブル、BPMO-M23DおよびBPMO-M23D+BPMO-MSTNで処理したマウスの、DIA、EDL、GAS、SOL、TAおよび心筋の筋肉量を試験した(図14B)。しかしながら、スクランブルを注射したマウ

50

スが徐々に死亡し、本試験終了時には1匹のマウスしか生存しなかったため、体重または筋肉重量に関する統計解析は行わなかった。BPMO-M23Dで、またはBPMO-M23D+BPMO-MSTNで処理したマウスは全て、試験期間中生存した。握力分析は、BPMO-M23Dで、またはBPMO-M23D+BPMO-MSTNで処理されたマウスが、スクランブルBPMOで処理されたマウスよりも強いことを示した(図14C)。単一処理と二重処理との間の、TA筋の最大および比筋力をさらに比較した結果、組合せ処理群において良好な効果が見られ、筋肉損傷性の延長収縮(伸張性収縮)に対する抵抗力の有意な改善が示された(図14D)。

【0475】

次に、全ての筋肉においてジストロフィン再フレーミングの顕著なレベルを示したジストロフィンのエクソン23のスキッピング効率を評価するため、RT-PCRを実施した(図15A)。若齢のmdxマウスで観察されるように、BPMO-MSTNの追加により一貫してBPMO-M23Dのスキッピング効率が上昇した(図15B)。ジストロフィンエクソンスキッピングの結果は、分析した全ての筋肉におけるタンパク質発現の有意な増加と相関していた(図16A)。さらに、BPMO-MSTNとBPMO-M23Dとの組合せによる処理が、M23D単独による処理よりもジストロフィンレベルを上昇させることが示された(図16B)。

10

【0476】

採取した全ての筋肉におけるミオスタチンエクソン2のスキッピングを、RT-PCRにより評価した(図17A)。スキッピングのレベルは、分析した筋肉のタイプに応じて5%~40%の間で変動した。全ての筋肉の結果を総合して得られる平均値は約20%であった(図17B)。

20

【0477】

上に明示した開示は、独立した有用性を伴う少なくとも1つの別個の発明を含むと考えられる。本発明は、例示的な形態で開示されているが、多くの変形が可能であるため、本明細書に開示および例示される通りのその特定の実施形態は、限定的な意味で考慮されるべきでない。多様な実施形態、材料、組成物および方法の均等な変更、修飾およびバリエーションが、本発明の範囲内で実質的に類似の結果をもたらす態様で実施され得る。本発明の主題は、本明細書で開示される様々な要素、特徴、機能および/または特性の全ての新規かつ非自明な組合せおよびサブコンビネーションを包含する。

30

【0478】

本明細書では、特定の実施形態に関する利益、他の利点および課題解決手段を記載した。しかしながら、利益、利点、課題解決手段、および任意の利益、利点、または解決手段をもたらすまたはより明らかにし得る任意の要素または要素の組合せは、本発明のいずれかまたは全ての請求項の決定的な、必要な、または不可欠な特徴または要素として解釈されるべきでない。本発明の範囲内における多くの変更および修飾は、全てのそのような修飾を包含する。下記の特許請求の範囲における、全ての要素の対応する構造、材料、操作および均等物は、具体的に特許請求された通りの他の請求項の要素と組み合わせて機能を発揮するあらゆる構造、材料または操作を包含することを意図するものである。本発明の範囲は、上記で示される実施例よりはむしろ、添付の特許請求の範囲およびそれらの法的均等物により決定されるべきである。

40

【表 7 - 1】

表 7. 配列表

配列番号	配列
1	agcaactttctttcttattcattatagctgatttctaatacaagtgatggaaaacccaaatgttgctt ctttaaattagctctaaaatacaatacaataaagtagtaaaggccaactatggatatattgagacc gtcgagactcctacaacagtgttgtgcaaatcctgagactcatcaaacctatgaaagacggtacaag

【表 7 - 2】

	gtatactggaatccgatctctgaaactgacatgaacccaggcactggatttggcagagcattgatgt gaagacagtggtgcaaaattggctcaacaacctgaatccaacttaggcattgaaataaaagcttagat gagaatggctatgatcttctgtaacctccaggaccaggagaagatgggctgtaagtataactga aaataacattataat	
2	ctttcttttcttattcatttatagctgatttictaatgcaagtggtgg	
3	accttcccaggaccaggagaagatgggctg/gtaagtataactgaaaataacattataat	
4	gccagacctatttgactggaaatagtggttggccagcagtcagccacacaacgactggaac atgcattcaacatcgccagafatcaatfaggcatagagaaactactgatcctgaag	
5	atgttgataccacctatccagataagaagtcacatctaatgtacatcacatcacttccaagttt gcctcaacaagtgagcattgaagccatccaggaagtgaaatgttccaaggccacctaaag tgactaaagaagaacatttctgactacatcaaatgcactattctcaacag	10
6	atcacggctcagctagcacaggatagagagaacttctccctaagcctcattcaagagct atgcctacacacagcgtcttatgtcaccacctctgacctacacggagcccatttctctcag	
7	gccatagagcggaaaaagctgagaagttcagaaaactgcaagatgcagcagatcagctca ggccctggtggaacagatggtgaatg	
8	gctttacaagttctctgcaagagcaacaagtggcctatactatctcagcaccactgtgaaga gatgctgaagaagcgcctctgaaattagccggaaatataatcagaattgaagaaattgag ggacgctggaagaagctctcctcccagctggttgagcattgtcaaaagctagaggagcaaatga ataaactccgaaaaattcag	
9	gcgatttgacagatctgtgagaatggcggtttcattatgatataaagatattaatcagtggt aacagaagctgaacagtttctcagaaagacacaattcctgagaattgggaacatgctaaatacaa atggtatcttaag	20
10	gaactccaggatggcattggcagcggcaaacgttgcagaacattgaatgcaactgggaaga aataattcagcaatctcaaaaacagatgccagtattctacagaaaaattgggaagcctgaatctg cggtgccaggaggctgcaaacagctgcagacagaaaaaagag	
11	aggaaagttagaatctgagctctgagtggaagcggtaaaccttacttcaagagctgagggca aagcagcctgacctagctcctggactgaccactattggagcct	
12	ctcctacacagactgttactctggtgacacaacctgtggttactaaggaaactgccatctccaaactag aaatgccatcttcttgatgttgaggtacctgctctggcagattcaaccgggcttggacagaactta ccgactggcttctctgcttgatcaagttataaaatcacagagggtgatggtgggtgacctgaggata tcaacgagatgatcaagcagaag	
13	gcaacaatgcaggatttgaacagaggcgtcccagttggaagaactcattaccgctgcccataatt gaaaaacaagaccagcaatcaagaggctagaacaatcattacggatcga	
14	ttgaaagaattcagaatcagtggtgaagtacaagaacacctcagaaccggaggaacagttgaat gaaatgttaaaggattcaacacaatggctggaagctaaggaagaagctgagcaggtcttaggacagg ccagagccaagcttgagctatggaaggagggtccctatacagtagatgcaatccaaagaaaatcaca gaaaccaag	30
15	ggtgagtgagcagaggctgcttggaaagaaactatagattactgcaacagttcccctggacctgga aaagtcttgcctggcttacagaagctgaaacaactgccaatgtctacaggatgctaccgtaaggaaa ggctcctagaagactccaaggagtaaagagctgatgaaacaatggcaa	
16	cagcccatcttctctggtcctgggaaggt	
17	ccagcccatcttctctggtcctgg	
18	cacttaccagcccatcttctctggt	
19	ccatccgcttgattagaaaagtcagc	
20	gcattagaaaatcagctataaatg	
21	ccacttgattagaaaatcagc	
22	cttgattagaaaatcagctataaa	
23	cacttgattagaaaatcagctata	
24	ccacttgattagaaaatcagctat	
25	tccacttgattagaaaatcagctata	40

【表 7 - 3】

26	atccactgcattagaaaatcagct
27	catccactgcattagaaaatcagc
28	ttatttcagttatcacttaccage
29	ttttcagttatcacttaccagccca
30	tcagttatcacttaccagcccatct
31	gttatcacttaccagcccatctct
32	atcacttaccagcccatctctcct
33	acttaccagcccatctctcctggt
34	taccagcccatctctcctggtcct
35	atgttatttcagttatcacttacc
36	tgttatttcagttatcacttacca
37	gttatttcagttatcacttaccag
38	tatttcagttatcacttaccagcc
39	atttcagttatcacttaccagccc
40	tttcagttatcacttaccagcccat
41	ttcagttatcacttaccagcccatc
42	cagttatcacttaccagcccatctt
43	agttatcacttaccagcccatcttc
44	cagcccatctctcctggtcctgggaaggt
45	cagcccatctctcctggtc
46	tctcctggtcctgggaaggt
47	ctgggaaggttacagcaaga
48	cagcccatctctcctgg
49	gcccacatctctcctggtcctggg
50	tttaagaagcaacatttgggtttt
51	tattttagagctaaatttaagaag
52	tacttattgtattgtatttagag
53	tagttgggaccttactactttattg
54	tctcaaatatcatagttgggccc
55	acgggtctcaaatatcatagtt
56	gttgtaggagctcgcgggtctcaaatat
57	acactgtttaggagctcgcgggg
58	taggtttgatgagctcaggatttg
59	ccgtcttcataggttgatgagtc
60	cagtatacctgtaccgtcttcataggt
61	gggttcatgtcaagttcagagatc
62	aataccagtgacctgggttcatgcaagttt
63	aaataccagtgacctgggttcatgct
64	tctgccaataaccagtgacctgggtt
65	tcttccatcaatgctctgccaat
66	caggttgttgagccaatttgc
67	tgctaagttggattcaggttgtt
68	aagcttttattcaatgcctaagtt
69	gaccattctcatctaaagctttat

10

20

30

40

【表 7 - 4】

70	ttacagcaagatcatgaccattctc
71	yyagyyyaxyxyxyxggxyyxgg
72	yayxxayyagyyyaxyxyxyxgg
73	yyayxxgyaxxagaaaaxyagy
74	gyattagaaaatyagyataaatg
75	yyatygytgyattagaaagtyagy
76	ctccaacatcaaggaagatggcatttctag
77	ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag
78	acaUCAagga agauggcauu ucuag
79	acaUCAagga agauggcauu ucuaguugg
80	gagcaggtac ctccaacatc aaggaa
81	gggauccagu auacuacag gcucc
82	cttacaggct ccaatagtg ttagt
83	cctccggttc tgaaggtgt ctgtac
84	gftgcctccg gttctgaagg tgttc
85	caatgccatc ctggagtcc tg
86	gauagguggu aucaacaucu guaa
87	gauagguggu aucaacaucu g
88	gauagguggu aucaacaucu guaag
89	ggugguauca acaucuguaa
90	guaucaacu cuguaagcac
91	ugcauguucc agucguugug ugg
92	cacuauucca gucaauagg ucugg
93	auuuaccaac cuucaggauc gagua
94	ggccuaaaac acauacacau a
95	cauuuuugac cuacaugugg
96	uuugaccuac auguggaaag
97	uacauuuug accuacaugu ggaaag
98	auuuuugacc uacaugggaa ag
99	uacgaguuga uugucggacc cag
100	guggucuccu uaccuagac ugugg
101	ggucuccuua ccuauga
102	ugucucagua aucuucuac cuau
103	ucuuaccuau gacuuggau gaga
104	gcaugaacuc uuguggaucc
105	ccagguacu acuuacaaua
106	aucguguguc acagcaucca g
107	uguucagggc augaacucu guggauccuu
108	uaggaggcgc cuccaucuu guaggucacu g
109	aggucuaagga ggcgccuccc auccuguagg u
110	gcgccucca uccuguaggu cacug
111	cuucgaggag gucuaggagg cgccuc
112	cuccaucuu guaggucacu g
113	uaccaguuuu ugcccuguca gg

10

20

30

40

【表 7 - 5】

114	ucaauaugcu gcuucccaaa cugaaa
115	cuaggaggcg ccucccaucc uguag
116	uuaugauuuc caucuacgau gucaguacuu c
117	cuuaccugcc aguggaggau uauauuccaa a
118	caucaggauu cuuaccugcc agugg
119	cgaugucagu acuuccaaua uucac
120	accauucauc aggauucu
121	accugccagu ggaggauu
122	ccaauauuca cuaaaaucaac cuguuaa
123	caggauuguu accugccagu ggaggauuau
124	acgaugucag uacuuccaau auucacuaaa u
125	auuuccaucu acgaugucag uacuuccaau a
126	caggagcuuc caaauugcugc a
127	cuugucuuca ggagcuucca aaugcugca
128	uccucagcag aaagaagcca cg
129	uuagaaaucu cuccuugugc
130	uaauuugggu guuacacaau
131	cccugaggca uucccaucuu gaau
132	aggacuuacu ugcuuuguuu
133	cuugaauuuu ggagauucau cug
134	caucuucuga uaaauuuccu guu
135	ucuucuguuu uuguuagcca guca
136	ucuauguaaa cugaaaauuu
137	uucuggagau ccuuuaaac
138	cagcaguugc gugaucucca cuag
139	uucaucaacu accaccacca u
140	cuaagcaaaa uaauugacc uuaag
141	cuuguaaaag aaccagcgg ucuucugu
142	caucuacaga uguuugccca uc
143	gaaggauugc uuguaaaaga acc
144	accuguucuu caguaagacg
145	caugacacac cuguucuua guaa
146	cauuugagaa ggauugcuug
147	aucuccaau accuggagaa gaga
148	gccaugcacu aaaaaggcac ugcaagacau u
149	ucuuuaaagc caguugugug aauc
150	uuucugaaag ccaugcacua a
151	guacauacgg ccaguuuuug aagac
152	cuagaucgc uuuuaaaacc uguuaaaaca a
153	ucuuuucuaug auccgcuuuu aaaaccuguu a
154	cuagaucgc uuuuaaaacc uguua
155	ccgucuucug ggucacugac uua
156	cuagaucgc uuuuaaaacc uguuaa
157	ccgcuuuuaa aaccuguuaa

10

20

30

40

【表 7 - 6】

158	uggauugcuu uuucuuuucu agaucc
159	caugcuuccg ucuucugggu cacug
160	gaucuuguuu gagugaauac agu
161	guuauccagc caugcuuccg uc
162	ugauaaugg uaucacuaac cugug
163	guaucacuaa ccugugcugu ac
164	cugcuggcau cuugcaguu
165	gccugagcug aucugcuggc aucuugcagu u
166	cuggcagaau ucgauccacc ggcuguuc
167	cagcaguagu ugucaucugc uc
168	ugauggggug guggguugg
169	aucugcauaa acaccucua gaaag
170	ccggcuguuc aguuguucug aggc
171	aucugcauaa acaccucua gaaagaaa
172	gaaggagaag agauucuac cuuacaaa
173	auucgaucca ccggcuguuc
174	cagcaguagu ugucaucugc
175	gccgguugac uucauccugu gc
176	cugcauccag gaacaugggu cc
177	gucugcaucc aggaacaugg guc
178	guugaagauc ugauagccgg uuga
179	uacuuacugu cuguagcucu uucu
180	cacucauggu cuccugauag cgca
181	cugcaauucc ccgagucucu gc
182	acugcuggac ccauguccug aug
183	cuaaguugag guauggagag u
184	uauucacaga ccugcaauuc ccc
185	acaguggugc ugagauagua uaggcc
186	uaggccacu uguugcucu gc
187	uucagagggc gcuuucuuc
188	gggcaggcca uuccucuuc aga
189	ucuucaggu uuguanguga uucu
190	cugggcugaa uugucugaau aucacug
191	cuguuggcac augugauccc acugag
192	gucuauaccu guuggcacau guga
193	ugcuuucugu aauucaucug gaguu
194	ccuccuuucu ggcuaagacc uuccac
195	ugugucaucc auucgugcau cucug
196	uuaaggccuc uugugcuaca ggugg
197	ggggcucuuc uuuagcucuc uga
198	gacuuccaaa gucuugcauu uc
199	gccaacaugc ccaacuucc uaag
200	cagagauuc cucagcuccg ccagga
201	cuuacauca gcaccucaga g

10

20

30

40

【表 7 - 7】

202	uccgccaucu guuagggucu gugcc
203	auuuggguua uccucugaa u gucgc
204	cauaccucuu cauguaguuc cc
205	cauuugagcu gcguccaccu ugucug
206	uccugggcag acuggaugcu cuguuc
207	uugccugggc uuccugaggc auu
208	uucugaaaua acauauaccu gugc
209	uaguuuucuga aauaacauau accug
210	gacuugucaa aucagauugg a
211	guuucugaaa uaacauauac cugu
212	caccagaaau acauaccaca
213	caaugauuuu gcugugacug
214	cgaacuuaa uggagacauc uug
215	cuuguagacg cugcucaaaa uggc
216	caugcacaca ccuuugucc
217	ucuguacaau cugacgucca gucu
218	gucuuuauca ccuuuccac uucagac
219	ccgucugcuu uuucuguaca aucug
220	uccauaucug uagcugccag cc
221	ccaggcaacu ucagaaucca aau
222	uuucuguuac cugaaaagaa uuauaugaa
223	cauucuuuc cuuucgcauc uuacg
224	ugaucucuuu gucauuucca uaucug
225	uucagugaua uagguuuuac cuuucccag
226	cuguagcugc cagccauucu gucaag
227	ucuucugcuc gggaggugac a
228	ccaguuacua uucagaagac
229	ucuucaggug caccuucugu
230	ugugaugugg uccacauucu gguca
231	ccauguguuu cugguauucc
232	cguguagagu ccaccuuugg gcgua
233	uacuaauuuc cugcaguggu cacc
234	uucuguguga aauggcugca aauc
235	ccucaaagg aauggaggcc
236	ugcugaauuu cagccuccag ugguu
237	ugaagucuu cucuucaga uucac
238	cuggcuuuc cucaucugug auuc
239	guuguaaguu gucuccucuu
240	uugucuguaa cagcugcugu
241	gcucuaauac cuugagagca
242	cuuugagacc ucaauuccug uu
243	cuuuuuuuu cuuucaucuc ugggc
244	aucguuucuu cacggacagu gucuggg
245	gggcuuguga gacaugagug auuu

10

20

30

40

【表 7 - 8】

246	accuucagag gacuccucuu gc
247	uauguguuac cuaccuugu cgguc
248	ggagagagcu uccuguagcu
249	ucacccuuuc cacaggcguu gca
250	uuugugucuu ucugagaaac
251	aaagacuac cuuaagauac
252	aucugucaaa ucgccugcag
253	uuaccuugac uugcuaagc
254	uccagguuca agugggauac
255	gcucuucugg gcuauggga gcacu
256	accuuuaucc acuggagauu ugucugc
257	uuccaccagu aacugaaaca g
258	ccacucagag cucagauuu cuaacuucc
259	cuuccacuca gagcucagau cuucuaa
260	accagaguua cagucugagu aggagc
261	cucauaccuu cugcuugaug auc
262	uucuguccaa gccggguuga aauc
263	cuccaacauc aaggaagaug gcuuuucag
264	aucuuuuuu cucauaccuu cugcu
265	aucuuuuuu cucauaccuu cugcuaggag cuaaaa
266	caccaccau caccucugu g
267	aucaucucgu ugauauccuc aa
268	uccugcauug uugccuguaa g
269	uccaacuggg gacgccucug uucaaaucc
270	acuggggacg ccucuguucc a
271	ccguaaugau uguucuagcc
272	uguuuuuuuu cuuacuucga
273	cauuaacug uugccuccgg uucug
274	cuguugccuc cgguucugaa ggug
275	cauuaacug uugccuccgg uucugaaggu g
276	uacuaaccuu gguuucugug a
277	cugaaggugu ucuuguacuu caucc
278	uguauaggga cccuccuucc augacuc
279	cuaaccuugg uuucugugau uuucu
280	gguaucuuug auacuaaccu ugguuuc
281	auucuuuca cuagaauaaa ag
282	gauucugaau uuuuacaac agaau
283	aucccacuga uucugaauc
284	uuggcucugg ccuguccuaa ga
285	cucuuuuca gguucaagug ggauacuagc
286	caagcuuuuc uuuuaguugc ugcucuuuuc c
287	uaauuuuuug uucuuuagc cuggagaaag
288	cugcuuccuc caaccuuaa acauuuc
289	ccaaugccau ccuggaguuc cuguaa

10

20

30

40

【表 7 - 9】

290	uccuguagaa uacuggcauc
291	ugcagaccuc cugccaccgc agauuca
292	cuaccucuuu uuucugucug
293	uguuuuugag gauugcugaa
294	gttgccctccg gttctgaagg tgttcttg
295	ctgaagggtg tctgtactt catcc
296	ctgtgccc cggttctgaa ggtgttcttg
297	caactgttgc ctccggttct gaagggtgtc ttg
298	ctccggttct gaagggtgtc ttgta
299	attcatca actgttgcct ccggttct
300	tgaagggtt ctgtacttc atccc
301	catcaactg ttgctccgg ttct
302	tgtgectcc ggttctgaag gt
303	gttgccctcc gttctgaagg tgttc
304	gcctccgggt ctgaagggtg tctgtac
305	cctccgggtc tgaagggtt ctgtac
306	ctccggttct gaagggtgtc ttgtac
307	gcctccgggt ctgaagggtg tcttg
308	cagatctgtc aaatgcctg cagg
309	caacagatct gtcaaatgc ctgcagg
310	ctcaacagat ctgtcaaat gcctgcagg
311	gtgtcttct gagaaactgt tcagc
312	gagaaactgt tcagcttctg ttgcccac
313	gaaactgttc agcttctgtt agccactg
314	ctgttcagct tctgttagcc actg
315	atctgtcaaa tcgctgcag
316	tttgttctt tctgagaaac
317	tgttcagct ctgttagcca ctga
318	gatctgtcaa atcgctgca ggtaa
319	aaactgttca gcttctgtta gccac
320	tttgttctt ctgagaaact gtta
321	caacagatct gtcaaatgc ctgcag
322	cagatctgtc aaatgcctg caggta
323	ctgttcagct tctgttagcc actgatt
324	gaaactgttc agcttctgtt agccactgat t
325	agaaactgtt cagcttctgt tagcca
326	ctgcaggtaa aagcatatgg atcaa
327	atcgctgca ggtaaaagca tatgg
328	gtcaaatgc ctgcaggtaa aagca
329	caacagatct gtcaaatgc ctgca
330	tttctcaaca gatctgtcaa atcgc
331	ccatttctca acagatctgt caaat
332	ataatgaaa cggcgcatt tctca
333	aaatatctt atatcataat gaaaa

10

20

30

40

【表 7 - 1 0】

334	tgtagccac tgattaaata tcttt
335	ccaattctca ggaattgtg tcttt
336	gtatttagca tgttccaat tctca
337	cttaagatac catttgtatt tagca
338	cttaccttaa gataccattt gtatt
339	aaagacttac ctaagatac cattt
340	aatcaaaga cttaccttaa gatac
341	aaaacaaac aaagacttac ctaa
342	tcgaaaaaac aatcaaaga cttac
343	ctgtaagata caaaaaggc aaaac
344	cctgtaagat accaaaaagg caaaa
345	agttcctgta agataccaaa aaggc
346	gagttcctgt aagataccaa aaagg
347	cctggagttc ctgtaagata caaa
348	tcctggagtt cctgtaagat accaa
349	gccatcctgg agttcctgta agata
350	tgccatcctg gagttcctgt aagat
351	ccaatgccat cctggagttc ctgta
352	cccaatgccat tcctggagtt cctgt
353	gctgccaat gccatcctgg agttc
354	cgctgccaat tgccatcctg gagtt
355	aacagtttgc cgctgccaat tgcca
356	ctgacaacag ttgcccgtg cccaa
357	gttgcaatca atgttctgac aacag
358	gctgaattat ttctccca gttgc
359	attattctt ccccagttgc attca
360	ggcatctgtt ttgaggatt gctga
361	ttgaggatt gctgaattat ttctt
362	aattttctt gtagaatact ggcat
363	atactggcat ctgttttga ggatt
364	accgagatt caggcttccc aattt
365	ctgtttgcag acctcctgcc accgc
366	agattcagc ttccaattt ttctt
367	ctctttttc tgtctgacag ctgtt
368	acctcctgcc accgagatt caggc
369	cctaccttt ttctctgt gacag
370	gacagctgtt tgacagctc ctgcc
371	gtgcacctac ctctttttc tgtct
372	gatctgtcgc cctaccttt ttctt
373	tattagatct gtcgccctac ctctt
374	attctatta gatctgtcgc cctac
375	agataccaaa aaggcaaac
376	aagataccaa aaaggcaaaa
377	cctgtaagat accaaaaagg

10

20

30

40

【表 7 - 1 1】

378	gagttcctgt aagataccaa	
379	tcttggagtt cctgtaagat	
380	tgccatcctg gagttcctgt	
381	cccaatgcca tcttggagtt	
382	cgctgccc aa tgccatcctg	
383	ctgacaacag ttgcccgtg	
384	gttgcaatca atgttctgac	
385	attatttctt ccccagttgc	
386	tttgaggatt gctgaattat	10
387	atactggcat ctgttttga	
388	aatttttctt gtagaatact	
389	agattcaggc ttccaattt	
390	acctcctgcc accgcagatt	
391	gacagctgtt tgcagacctc	
392	ctctttttc tgtctgacag	
393	cctacctttt tttctgtct	
394	gtcgccttac ctctttttc	
395	gatctgtcgc cctaccttt	
396	tattagatct gtcgccttac	20
397	attcctatta gatctgtcgc	
398	gggggatttg agaaaataaa attac	
399	atttgagaaa ataaaattac ctgga	
400	ctagcctgga gaaagaagaa taaaa	
401	agaaaataaa attaccttga ctgac	
402	ttcttctagc ctggagaaag aagaa	
403	ataaaattac ctgacttgc tcaag	
404	ttttgtctt ctagcctgga gaaag	
405	attaccttga ctgctcaag ctttt	
406	tattctttg ttcttctagc ctgga	
407	ctgacttgc tcaagctttt ctttt	30
408	caagatattc tttgttctt ctagc	
409	cttttagttg ctgctctttt ccagg	
410	ccaggttcaa gttggatact agcaa	
411	atctctttga aattctgaca agata	
412	agcaatgta tctgcttctt ccaac	
413	aacaaattca tttaaatctc ttgga	
414	ccaaccataa aacaaattca tttaa	
415	ttctccaac cataaaacaa attca	
416	tttaaatctc ttgaaattc tgaca	
417	tgacaagata ttcttttgtt ctctt	40
418	ttcaagtggg atactagcaa tgta	
419	agatattctt ttgttctct agcct	
420	ctgctctttt ccaggttcaa gttgg	
421	ttcttttgtt ctctagcct ggaga	

【表 7 - 1 2】

422	ctttctttt agttgctgct ctttt
423	ttgttcttct agcctggaga aagaa
424	cttctagcct ggagaaagaa gaata
425	agcctggaga aagaagaata aaatt
426	ctggagaaag aagaataaaa ttgtt
427	gaaagaagaa taaaattgtt
428	ggagaaagaa gaataaaatt
429	agcctggaga aagaagaata
430	cttctagcct ggagaaagaa
431	ttgttcttct agcctggaga
432	ttctttgtt cttctagcct
433	tgacaagata ttctttgtt
434	atctcttga aattctgaca
435	aacaaattca ttaaatctc
436	ttctccaac cataaaacaa
437	agcaatgita tctgcttct
438	ttcaagtggg atactagcaa
439	ctgctctttt ccaggtcaa
440	ctttctttt agttgctgct
441	cttgacttgc tcaagctttt
442	attaccttga cttgctcaag
443	ataaaattac cttgacttgc
444	agaaaataaa attaccttga
445	atttgagaaa ataaaattac
446	gggggatttg agaaaataaa
447	ctgaaacaga caaatgcaac aacgt
448	agtaactgaa acagacaaat gcaac
449	ccaccagtaa ctgaaacaga caaat
450	ctctccacc agtaactgaa acaga
451	ggcaactctt ccaccagtaa ctgaa
452	gcaggggcaa ctctccacc agtaa
453	ctggcgcagg ggcaactctt ccacc
454	tttaattgtt tgagaattcc ctggc
455	ttgtttgaga attccctggc gcagg
456	gcacgggtcc tccagttca tttaa
457	tccagttca ttttaattgtt tgaga
458	gcttatggga gcaacttcaa gcacg
459	tacaagcacg ggtcctccag ttcca
460	agtttatctt gctcttctgg gctta
461	tctgcttgag cttatttca agttt
462	atcttgcctt tctgggctta tggga
463	ctttatccac tggagatttg tctgc
464	cttatttca agtttatctt gctct
465	ctaaccttta tccactggag atttg

10

20

30

40

【表 7 - 1 3】

466	attgtctgc ttgagcttat ttca	
467	aatgtctaac ctttatccac tggag	
468	tggtaatgt ctaacctta tccac	
469	agagatgggt aatgtctaac ctta	
470	acggaagaga tggtaatgt ctaac	
471	acagacaaat gcaacaacgt	
472	ctgaaacaga caaatgcaac	
473	agtaactgaa acagacaaat	
474	ccaccagtaa ctgaaacaga	10
475	ctctccacc agtaactgaa	
476	ggcaactctt ccaccagtaa	
477	ctggcgagg ggcaactctt	
478	ttgttgaga atccctggc	
479	tccagttca ttaattgt	
480	tacaagcacg ggtctccag	
481	gcttatggga gcactataa	
482	atctgtctt tctgggctta	
483	cttatttca agttatctt	
484	attgtctgc ttgagcttat	20
485	ctttatccac tggagattg	
486	ctaacctta tccactggag	
487	aatgtctaac ctttatccac	
488	tggtaatgt ctaacctta	
489	agagatgggt aatgtctaac	
490	acggaagaga tggtaatgt	
491	ctgaaaggaa aatacattt aaaaa	
492	cctgaaagga aatacattt taaaa	
493	gaaacctgaa aggaaaatac atttt	
494	ggaaacctga aaggaaaata cattt	
495	ctctggaac ctgaaaggaa aatac	30
496	gctctggaaa cctgaaagga aata	
497	taaagctctg gaaacctgaa aggaa	
498	gtaaagctct ggaaacctga aagga	
499	tcaggtaaag ctctggaac ctgaa	
500	ctcaggtaa gctctggaaa cctga	
501	gtttctcagg taaagctctg gaaac	
502	tgttctcag gtaaagctct ggaaa	
503	aatttctct tgtttctcag gtaaa	
504	tttgagcttc aatttctct tgttt	
505	ttttattga gcttcaatt ctct	40
506	aagctccca aggtcttita ttga	
507	aggtcttcaa gcttttttc aagct	
508	ttcaagcttt tttcaagct gccca	
509	gatgattaa ctgctcttca aggtc	

【表 7 - 1 4】

510	ctgctcttca aggtcttcaa gcttt
511	aggagataac cacagcagca gatga
512	cagcagatga ttaactgct ctca
513	attccaact gattccta ataggag
514	cttggttgg ttggtataa atttc
515	caactgattc ctaataggag ataac
516	ctaacgtca aatggctctt ctgg
517	ttggtataa attccaact gattc
518	cctacctaa cgtcaaatgg tcctt
519	tcctcttgg ttggttgg tataa
520	agttccctac ctaaacgtca aatgg
521	caaaaagttc cctacctaa cgtca
522	taaagcaaaa agttccctac ctta
523	atattaaag caaaaagttc cctac
524	aggaaaatac atttataaaa
525	aaggaaaata catttataaaa
526	cctgaaagga aaatacattt
527	ggaaacctga aaggaaaata
528	gctctggaaa cctgaaagga
529	gtaaagctct ggaaacctga
530	ctcaggtaaa gctctggaaa
531	aatttctct tgttctcag
532	ttttattga gctcaattt
533	aagctgcca aggtcttfta
534	ttcaagcttt tttcaagct
535	ctgctcttca aggtcttcaa
536	cagcagatga ttaactgct
537	aggagataac cacagcagca
538	caactgattc ctaataggag
539	ttggtataa attccaact
540	tcctcttgg ttggttgg
541	ctaacgtca aatggctctt
542	cctacctaa cgtcaaatgg
543	agttccctac ctaaacgtca
544	caaaaagttc cctacctaa
545	taaagcaaaa agttccctac
546	atattaaag caaaaagttc
547	ctggggaaaa gaacccatat agtgc
548	tcctggggaa aagaacccat atagt
549	gttctctggg gaaaagaacc catat
550	cagtttctg gggaaaagaa cccat
551	tttcagttc ctggggaaaa gaacc
552	tattcagtt tctggggaa aagaa
553	tgtatttca gtttctggg gaaaa

10

20

30

40

【表 7 - 1 5】

554	actgctatt cagttcctg gggaa
555	tgaactgcta ttcagttc ctggg
556	cttgaactgc tattcagtt tectg
557	tagcttgaac tgctattca gttc
558	ttagcttga actgctatt cagtt
559	ttccacatcc ggtgtttag ctga
560	tgccctttag acaaaatctc ttcca
561	ttagacaaa atctctcca catcc
562	gttttctt gtacaaatgc tgccc
563	gtacaaatgc tgccctttag acaaa
564	cttcactggc tgagtggctg gttt
565	ggctggttt tcttgtaca aatgc
566	attacctca ctggctgagt ggctg
567	gcttcattac cttcactggc tgagt
568	aggtgcttc attacctca ctggc
569	gctagaggtt gcttcattac ctca
570	atattgctag aggtgcttc attac
571	gaaaagaacc catatagtgc
572	gggaaaagaa cccatatagt
573	tctggggaa aagaacccat
574	cagtttctg gggaaaagaa
575	tattcagtt tctggggaa
576	actgctatt cagttcctg
577	cttgaactgc tattcagtt
578	ttagcttga actgctatt
579	ttccacatcc ggtgtttag
580	ttagacaaa atctctcca
581	gtacaaatgc tgccctttag
582	ggctggttt tcttgtaca
583	cttcactggc tgagtggctg
584	attacctca ctggctgagt
585	gcttcattac cttcactggc
586	aggtgcttc attacctca
587	gctagaggtt gcttcattac
588	atattgctag aggtgcttc
589	cttaacaga aaagcataca catta
590	tctctttaa cagaaaagca tacac
591	ttctctta acagaaaagc ataca
592	taacttctc ttaacagaa aagca
593	ctaacttct cttaacaga aaagc
594	tcttetaact tctctttaa cagaa
595	atcttctaac ttctcttfa acaga
596	tcagatctc taacttctc tftaa
597	ctcagatctt ctaacttct ctfta

10

20

30

40

【表 7 - 1 6】

598	agagctcaga tcttctaact tctc
599	cagagctcag atcttctaac ttct
600	cactcagagc teagatcttc tact
601	ccttcactc agagctcaga tctc
602	gtaaaccggtt taccgccttc cactc
603	ctttgccctc agctcttgaa gtaaa
604	ccctcagctc ttgaagtaaa cggtt
605	ccaggagcta ggtcaggctg ctttg
606	ggtcaggctg ctttgccctc agctc
607	aggctccaat agtggtcagt ccagg
608	tcagtccagg agctaggta ggctg
609	cttacaggct ccaatagtgg tcagt
610	gtatacttac aggtccaat agtgg
611	atccagtata cttacaggct ccaat
612	atgggatcca gtatacttac aggct
613	agagaatggg atccagtata ctac
614	acagaaaagc atacacatta
615	ttaacagaa aagcatacac
616	tcctctttaa cagaaaagca
617	taacttcctc ttaacagaa
618	tcttctaact tcctctttaa
619	tcagatcttc taacttcctc
620	ccttcactc agagctcaga
621	gtaaaccggtt taccgccttc
622	ccctcagctc ttgaagtaaa
623	ggtcaggctg ctttgccctc
624	tcagtccagg agctaggta
625	aggctccaat agtggtcagt
626	cttacaggct ccaatagtgg
627	gtatacttac aggtccaat
628	atccagtata cttacaggct
629	atgggatcca gtatacttac
630	agagaatggg atccagtata
631	ctaaaatatt ttgggtttt gcaaaa
632	gctaaaatat ttgggtttt tgcaaa
633	taggagctaa aatattttgg gtttt
634	agtaggagct aaaatatttt ggggt
635	tgagtaggag ctaaaatatt ttggg
636	ctgagtagga gctaaaatat ttggg
637	cagtctgagt aggagctaaa atatt
638	acagtctgag taggagctaa aatatt
639	gagtaacagt ctgagtagga gctaaa
640	cagagtaaca gtctgagtag gagct
641	caccagagta acagtctgag taggag

10

20

30

40

【表 7 - 1 7】

642	gtcaccagag taacagtctg agtag	
643	aaccacaggt tgtgtacca gagtaa	
644	gttgtgtcac cagagtaaca gtctg	
645	tggcagtttc cttagtaacc acaggt	
646	atttctagtt tggagatggc agtttc	
647	ggaagatggc atttctagtt tggag	
648	catcaaggaa gatggcattt ctagtt	
649	gagcaggtac ctccaacatc aaggaa	
650	atctgccaga gcaggtacct ccaac	10
651	aagtctctgc caagcccggg tgaat	
652	cggttgaaat ctgccagagc aggtac	
653	gagaaagcca gtcggtaagt tctgtc	
654	gtcggtaagt tctgtccaag cccgg	
655	ataacttgat caagcagaga aagcca	
656	aagcagagaa agccagtcgg taagt	
657	cacctctgt gattttataa ctgat	
658	caaggtcacc caccatcacc ctctgt	
659	catcacctc tctgatttta taact	
660	cttctgcttg atgatcatct cgttga	20
661	cettctgctt gatgatcacc tcgttg	
662	atctcgttga taccctcaag gtcacc	
663	tcataccttc tcttgatga tcactt	
664	tcatttttc tcataccttc tcttg	
665	tttttcata ccttctgctt gatgat	
666	ttttatcatt ttttcata ccttct	
667	ccaactttta tcatttttc tcatac	
668	atattttggg tttttgcaaa	
669	aaaatatittt gggtttttgc	
670	gagctaaaat attttgggtt	
671	agtaggagct aaaatatittt	30
672	gtctgagtag gagctaaaat	
673	taacagtctg agtaggagct	
674	cagagtaaca gtctgagtag	
675	cacaggttgt gtcaccagag	
676	agtttcctta gtaaccacag	
677	tagtttggag atggcagttt	
678	ggaagatggc atttctagtt	
679	tacctccaac atcaaggaag	
680	atctgccaga gcaggtacct	
681	ccaagcccgg ttgaaatctg	
682	gtcggtaagt tctgtccaag	40
683	aagcagagaa agccagtcgg	
684	ttttataact tgatcaagca	
685	catcacctc tctgatttta	

【表 7 - 1 8】

686	ctcaaggtea cccaccatca
687	catctcgttg atacctcaa
688	cttctgcttg atgatcatct
689	cataccttct gcttgatgat
690	tttctcatac cttctgcttg
691	cattttttct cataccttct
692	tttatcattt tttctcatac
693	caacttttat cattttttct
694	ctgtaagaac aaatatccct tagta
695	tgctgtaag aacaaatata cctta
696	gttgctgta agaacaata tcct
697	attgtgcct gtaagaacaa atatac
698	gcattgttc ctgtaagaac aaata
699	cctgcattgt tgctgtaag aacaa
700	atcctgcatt gttgcctgta agaac
701	caaatcctgc attgtgcct gtaag
702	tccaaatcct gcattgttc ctgta
703	tgttccaaat cctgcattgt tgct
704	tctgtccaa atcctgcatt gttgc
705	aactggggac gcctctgtc caaat
706	gcctctgtc caaatcctgc attgt
707	cagcggaat gagttctcc aactg
708	ctccaactg gggacgcctc tgttc
709	ctgttttc aaatttggg cagcg
710	ctagcctctt gattgctggt cttgt
711	tttcaaat ttgggcagcg gtaat
712	ttcgatccgt aatgattgt ctagc
713	gattgctggt ctgttttc aaatt
714	cttactcga tccgtaatga ttgt
715	tgttctagc ctcttgattg ctggt
716	aaaaacttac ttcgatccgt aatga
717	tgttaaaaaa cttactcga tccgt
718	atgcttgta aaaaacttac ttcga
719	gtccatgct tgttaaaaaa cttac
720	agaacaata tccttagta
721	gtaagaacaa ataccccta
722	tgctgtaag aacaaatata
723	attgtgcct gtaagaacaa
724	cctgcattgt tgctgtaag
725	caaatcctgc attgtgcct
726	gcctctgtc caaatcctgc
727	ctccaactg gggacgcctc
728	cagcggaat gagttctcc
729	tttcaaat ttgggcagcg

10

20

30

40

【表 7 - 1 9】

730	gattgctggt cttgttttc
731	ttgttctagc ctcttgattg
732	ttcgatccgt aatgattgtt
733	cttacttcga tccgtaatga
734	aaaaacttac ttcgatccgt
735	tgtaaaaaa cttacttcga
736	atgcttgfta aaaaacttac
737	gtcccatgct tgtaaaaaa
738	ctagaataaa aggaaaaata aatat
739	aactagaata aaaggaaaaa taaat
740	ttcaactaga ataaaaggaa aaata
741	ctttcaacta gaataaaaagg aaaaa
742	attctttcaa ctagaataaa aggaa
743	gaattcttc aactagaata aaagg
744	tctgaattct ttcaactaga ataaa
745	attctgaatt ctttcaacta gaata
746	ctgattctga attctttcaa ctaga
747	cactgattct gaattcttc aacta
748	tcccactgat tctgaattct ttcaa
749	catcccactg attctgaatt ctttc
750	tactcatcc cactgattct gaatt
751	cggftctgaa ggtgftcttg tact
752	ctgtgcctc cggftctgaa ggtgt
753	ttcattcaa ctgtgcctc cggft
754	taacattca ttcaactgtt gcctc
755	ttgtgtgaa tctttaaca ttca
756	tcttcttag ctccagcca ttgtg
757	cttagcttc agccattgtg ttgaa
758	gtcctaagac ctgctcagct tcttc
759	ctgctcagct tcttcttag ctccc
760	ctcaagcttg gctctggcct gtcct
761	ggcctgtct aagacctgct cagct
762	tagggaccct ccttccatga ctcaa
763	tttgattgc atctactgta taggg
764	accctcctc catgactcaa gcttg
765	cttggfttct gtgatftct ttggg
766	atctactgta tagggaccct ccttc
767	ctaaccttgg ttctgtgat ttctt
768	tttcttttg attgcatcta ctgta
769	tgatactaac cttggttct gtgat
770	atctttgata ctaaccttgg ttctt
771	aaggatctt tgatactaac cttgg
772	ttaaaaagg atctttgata ctaac
773	ataaaaggaa aaataaatat

10

20

30

40

【表 7 - 2 0】

774	gaataaaagg aaaataaat
775	aactagaata aaaggaaaa
776	cttcaacta gaataaaagg
777	gaattcttc aactagaata
778	attctgaatt cttcaacta
779	tactcatcc cactgattct
780	ctgaagggtg tctgtact
781	ctgtgcctc cggttctgaa
782	taacattca tcaactgtt
783	ttgtgtgaa tctttaaca
784	cttagctcc agccattgig
785	ctgctcagct tcttcttag
786	ggcctgtct aagacctgct
787	cicaagctg gctctggcct
788	accctcctc catgactcaa
789	atctactga tagggacct
790	ttctttgg atgcatcta
791	ctgggttct ggtatttct
792	ctaacctgg ttctgtgat
793	tgatactaac ctggtttct
794	atcttgata ctaacctgg
795	aaggatctt tgatactaac
796	ttaaaaagg atcttgata
797	ctatagatt ttatgagaaa gaga
798	aactgctata gattttatg agaaa
799	tggccaactg ctatagatt ttatg
800	gtctttggcc aactgctata gattt
801	cggaggctt tggccaactg ctata
802	actggcggag gtctttggcc aactg
803	ttgtctgcc actggcggag gtctt
804	agtcattgc cacatctaca ttgt
805	ttgccacat ctacattgt ctgcc
806	ccggagaagt ttcaggcca agtca
807	gtatcatctg cagaataac ccgga
808	taatccgga gaagttcag ggcca
809	ttatcatgtg gactttctg gtatc
810	agaggcattg atattctctg ttatc
811	atgtggactt tcttggtatc atctg
812	ctttatgaa tcttctcca agagg
813	atattctctg ttatcatgtg gactt
814	cataccttt atgaatgctt ctcca
815	ctccaagagg cattgatatt ctctg
816	taattcatac ctttatgaa tgcct
817	taatgtaatt cataccttt atgaa

10

20

30

40

【表 7 - 2 1】

818	agaaataatg taattcatac ctttt	
819	gttttagaaa taatgtaaft catac	
820	gatttttatg agaaagaga	
821	ctatagattt ttatgagaaa	
822	aactgctata gatttttatg	
823	tggccaactg ctatagattt	
824	gicctttggcc aactgctata	
825	cggaggctt tggccaactg	
826	ttgtctgcc actggcggag	10
827	ttgccacat ctacattgt	
828	ttcagggcca agtcatttgc	
829	taatcccgga gaagttcag	
830	gtatcatctg cagaataate	
831	atgtggactt ttctggtac	
832	atattctctg ttatcatgtg	
833	ctccaagagg cattgatatt	
834	cttttatgaa tgcttctcca	
835	catacctttt atgaatgctt	
836	taattcatac cttttatgaa	20
837	taatgtaatt catacctttt	
838	agaaataatg taattcatac	
839	gttttagaaa taatgtaaft	
840	ctgcaaagga ccaaatgttc agatg	
841	tcaccctgca aaggacaaa tgttc	
842	ctcactcacc ctgcaaagga ccaa	
843	tctcgtcac tcaccctgca aagga	
844	cagcctctcg ctcactcacc ctgca	
845	caaagcagcc tctcgtcac tcacc	
846	tcttccaaag cagcctctcg ctcac	
847	tctatgagtt tcttccaaag cagcc	30
848	gttgcaagtaa tctatgagtt tcttc	
849	gaactgttgc agtaatctat gagtt	
850	ttccaggtec agggggaact gttgc	
851	gtaagccagg caagaaactt ttcca	
852	ccaggcaaga aactttcca ggtcc	
853	tggcagttgt ttcagcttct gtaag	
854	ttcagcttct gtaagccagg caaga	
855	ggtagcatcc tgtaggacat tggca	
856	gacattggca gttgtttcag ctct	
857	tctaggagcc ttccctacg ggtag	40
858	cttttactcc ctggagctct tctag	
859	gagccttcc ttacgggtag catcc	
860	ttgccattgt ttcacagct ctttt	
861	cttggagtct tctaggagcc ttcc	

【表 7 - 2 2】

862	cttacttgcc atgtttcat cagct	
863	cagctctttt actcccttgg agtct	
864	cctgacttac ttgccattgt tcat	
865	aaatgcctga cttacttgcc atgt	
866	agcggaaatg cctgacttac ttgcc	
867	gctaaagcgg aaatgcctga cttac	
868	aaggacaaaa tttcagatg	
869	ctgcaaagga ccaaatgtc	10
870	tcaccctgca aaggacaaa	
871	ctcactcacc ctgcaaagga	
872	tctcgctcac tcaccctgca	
873	cagcctctcg ctcactcacc	
874	caaagcagcc tctcgctcac	
875	tctatgagtt tctccaaag	
876	gaactgttgc agtaatctat	
877	ttccaggctc aggggggaact	
878	ccaggcaaga aactttcca	
879	ttcagcttct gtaagccagg	
880	gacattggca gttgtttcag	20
881	ggtagcatcc tctaggacat	
882	gagccttcc ttacgggtag	
883	ctggagctct tctaggagcc	
884	cagctctttt actcccttgg	
885	ttgccattgt tcatcagct	
886	cttacttgcc atgtttcat	
887	cctgacttac ttgccattgt	
888	aaatgcctga cttacttgcc	
889	agcggaaatg cctgacttac	
890	gctaaagcgg aaatgcctga	30
891	ccactcagag ctcagatctt ctaactcc	
892	gggatccagt atacttacag gctcc	
893	cttcacitca gagctcagat cttctaa	
894	acatcaagga agatggcatt tctagtttg	
895	ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag	
896	ttctgtccaa gcccggttga aatc	
897	caccacat caccctcygt g	
898	atcatctctg tgatacctc aa	
899	acatcaagga agatggcatt tctag	
900	accagagtaa cagtctgagt aggagc	
901	tcaaggaaga ttgcatttct	40
902	cctctgtgat ttataactt gat	
903	atcattttt ctcatactt ctgct	
904	ctcatacctt ctgcttgatg atc	
905	ttgcatttct agtttgg	

【表 7 - 2 3】

906	ccagagcagg tacctccaac atc
907	cgccgccatt tctcaacag
908	tgttttgag gattgctgaa
909	gctgaattat ttcttcccc
910	gccaatgcc atcctgg
911	ccaatgccat cctggagttc ctgtaa
912	cattcaactg ttgcctccgg ttctgaaggt g
913	ctgttgcctc cggttctg
914	attctttcaa ctagaataaa ag
915	gccatcctgg agttcctgta agataccaaa
916	ccaatgccat cctggagttc ctgtaagata
917	gccgctgccc aatgccatcc tggagttcct
918	gtttgccgct gccaatgcc atcctggagt
919	caacagttg ccgctgceca atgccatct
920	ctgacaacag ttgccgctg cccaatgcca
921	tgttctgaca acagttgcc gctgccaat
922	caatgtctg acaacagttt gccgctgccc
923	cattcaatgt tctgacaaca gtttgcgct
924	tattcttcc ccagtgcac tcaatgtct
925	gctgaattat ttcttcccca gtgcatca
926	ggattgctga attattctt ccccagttgc
927	tttgaggatt gctgaattat ttcttcccca
928	gtacttcac ccaactgattc tgaattctt
929	tctgtactt catcccactg attctgaatt
930	tgttcttcta ctcatccca ctgattctga
931	cggttctgaa ggtgttctg tacttcatcc
932	ctccggttct gaaggtgtc ttgtactca
933	tgccctccgt tctgaagggtg ttctgtact
934	tgttgcctcc ggttctgaag gtgttctgt
935	aactgttgc tccggttctg aagggttct
936	ttcaactgtt gcttccggtt ctgaagggtg
937	ggccaaacct cggcttacct gaaat
938	cagatctgtc aaatgcctg cagg
939	caacagatct gtcaaatgc ctgcagg
940	ctcaacagat ctgtcaaatc gctgcagg
941	gtgtcttct gagaaactgt tcagc
942	gagaaactgt tcagcttctg tttagccac
943	gaaactgttc agcttctgtt agccactg
944	ctgttcagct tctgttagcc actg
945	atctgtcaaa tcgctgcag
946	tttgtgtct tctgagaac
947	tgttcagctt ctgttagcca ctga
948	gatctgtcaa atcgctgca ggtaa
949	aaactgtca gcttctgtta gccac

10

20

30

40

【表 7 - 2 4】

950	ttgtgtcttt ctgagaaact gtca
951	caacagatct gtcaaatcgc ctgcag
952	cagatctgtc aaatcgctg caggta
953	ctgttcagct tctgttagcc actgatt
954	gaaactgttc agcttctgtt agccactgat t
955	agaaactgtt cagcttctgt tagcca
956	ctggacaga acttaccgac tgg
957	gtttctcca aagcagcctc tcg
958	gcaggattg gaacagaggc g
959	catctacatt tgtctgccac tgg
960	caatgctcct gacctctgtg c
961	gctctttcc aggttcaagt gg
962	gtctacaaca aagctcaggt cg
963	gcaatgttat ctgcttctc caacc
964	gctttgtgt agactatctt ttatattc
965	ccgacctgag ctttgttga gactatct
966	cttctgtag cttaccctt tccacagg
967	gctgggagag agcttctgt agctcac
968	tgttaacctac cctgtcggg cctgtac
969	ctatgaataa tgtcaatccg acctgagc
970	ctgctgtctt cttgctatga ataatgtc
971	ggcgttcac ttgcaatgc tctgtct
972	ttggaaatca agctgggaga gagcttcc
973	cttttccca ttggaaatca agctggga
974	gtcggctctt gtacatttg ttaacttt
975	ctacccttct cggctctgt acattttg
976	gacctgagct ttgtgtaga ctatcttt
977	gtcaatccga cctgagcttt gttgtaga
978	taatgtcaat ccgacctgag ctttgttg
979	cttgcctatga ataatgtcaa tccgacc
980	gtcttcttgc tatgaataat gtcaatcc
981	gcactttgca atgctgctgt ctcttgc
982	ccacaggcgt tgcactttgc aatgctgc
983	agcttcaccc ttccacagg cgttgcac
984	tcaccttcc cacaggcgtt gca
985	ggagagagct tctgttagct
986	tccattgga aatcaagctg ggagagag
987	tatatgtgtt acctaccctt gtcggctc
988	gccatctctgg agttcctgta agatacc
989	gagttcctgt aagataccaa aaagg
990	gccaatgcc atcctggagt tctg
991	ccaatgcat cctggagttc ct
992	aatgccatcc tggagtctct gtaa
993	cctggagttc ctgtaagata ccaa

10

20

30

40

【表 7 - 2 5】

994	tgccatcctg gagttcctgt aagat
995	tcttgagtt cctgtaagat ac
996	ccatcctgga gttcctgtaa gatac
997	cccaatgcca tcttgagtt cctgtaaga
998	ccgctgcca atgccatcct ggagttcc
999	caatgccatc ctggagttcc tgtaagatac
1000	cccaatgcca tcttgagtt cctgtaagat
1001	gccgctgccc aatgccatcc tggagttcct
1002	aatgccatcc tggagttcct gtaagatacc
1003	ccgctgcca atgccatcct ggagttcctg
1004	tgccgctgcc caatgccatc ctggagttcc
1005	tgcccaatgc catcctggag ttctgtaag
1006	caatgccatc ctggagttcc tgtaagat
1007	cccaatgcca tcttgagtt cctgtaag
1008	tgcccaatgc catcctggag ttctgta
1009	gctgccaat gccatcctgg agttcctg
1010	catcctggag ttctgtaag atacc
1011	gccatcctgg agttcctgta agatacc
1012	gctgccaat gccatcctgg agttc
1013	gccaatgcc atcctggagt
1014	tgccgctgcc caatgccatc ctgga
1015	ctgccaatg ccatcctgg
1016	cagtttgccg ctgccaatg ccatcc
1017	acagtttgcc gctgccaat gcca
1018	ctgacaacag ttgcccgtg ccaa
1019	gcattcaatg ttctgacaac
1020	gaattattc tccccagt gcattcaatg
1021	ctggcatctg ttttgagga ttgctgaatt
1022	ccagttgcat tcaatgttct gacaac
1023	ttgctgaatt atttctcc cag
1024	ttttgagga ttgctgaatt atttctcc
1025	ttcctgtag aatactggca tctgt
1026	cttccaatt tttcctgtag aatactggca t
1027	ccaattttc ctgtagaata ctggc
1028	caggcttccc aattttcct gtagaatac
1029	ctcctgccac cgcagattca ggcttc
1030	gcagacctcc tgccaccgca gattc
1031	ttgtttgcag acctcctgcc accgcagatt c
1032	gctgtttgca gacctcctgc cacc
1033	gtttgcagac ctctgccac cgcag
1034	ctttttctg tctgacaget gtttgcagac
1035	ctgtctgaca gctgtttgca g
1036	ctacctttt tttctgtctg acage
1037	tattagatct gtcgccctac ctctt

10

20

30

40

【表 7 - 2 6】

1038	cctattagat ctgtcgcct acctc
1039	cuuuuacaga aaagcauac
1040	ucuuuacag aaaagcauac
1041	ccucuuaac agaaaagcau ac
1042	aacuuccucu uuaacagaaa agcauac
1043	cuucuaacuu ccucuuaac agaaaagcau ac
1044	ccucuuaac agaaaa
1045	aacuuccucu uuaacagaaa ag
1046	aacuuccucu uuaacag
1047	gcucagaucu ucuaacuucc ucuuuacag
1048	aacuuccucu uuaaca
1049	ccacucagag cucagaucuu cuaacuucc
1050	cucagagcuc agaucuu
1051	gcucuugaag uaaacgg
1052	aaugugguc aguccagg
1053	cuuacaggcu ccaauagugg uca
1054	guauacuac aggcuccaau agugguca
1055	uccaguauac uuacaggcuc caauaguggu
1056	cuuacaggcu ccauagu
1057	guauacuac aggcuccaau agu
1058	uccaguauac uuacaggcuc cauagu
1059	uccaguauac uuacaggcuc ca
1060	gggauccagu auacuacag gcucc
1061	uccaguauac uuacaggcu
1062	uccaguauac uuaca
1063	ctccaacatc aaggaagatg gcatttct
1064	catcaaggaa gatggcattt ctagt
1065	ggagctaaaa tatttgggt ttttgc
1066	tttctcata ccttctgctt gatga
1067	aggtacctcc aacatcaagg aagatgg
1068	ctccaacatc aaggaagatg gcatt
1069	ctccaacatc aaggaagatg gcatttct
1070	ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag
1071	aaggaagatg gcatttctag tttgg
1072	cagtctgagt aggagctaaa atatt
1073	gagtaggagc taaaatatt tgggt
1074	cugaaucuu ucaacuagaa uaaaa
1075	gccauugugu ugaauccuuu aacauuuc
1076	ccaugacuca agcuuggcuc uggcc
1077	cccuauacag uagaugcaau
1078	uugauacuaa ccuugguuuc ugug
1079	caactgttc ctccgttct gaag
1080	ggacctctt tccatgactc aagc
1081	ggtatcttg atactaacct tggttc

10

20

30

40

【表 7 - 2 7】

1082	gcccaaugcc auccugg
1083	cccuuuuugu gaauguuuuc uuuu
1084	uugugcauuu acccauuuug ug
1085	uauccucuga augucgcauc
1086	gguuauccuc ugaaugucgc
1087	gagccuuuuu ucuucuug
1088	uccuuucguc ucugggcuc
1089	cuccucuuc uucuucgc
1090	cuucgaaacu gagcaauuu
1091	cuugugagac augagug
1092	cagagacucc ucuugcuu
1093	ugcugcuguc uucuugcu
1094	uuguaacuu uuucccauu
1095	cgccgccauu ucucaacag
1096	uuuguauuuu gcauguuccc
1097	gcugaauuau uucuuccc
1098	cugcuuccuc caacc
1099	gcuuuucuuu uaguugcugc
1100	ucuugcucu uugggcuu
1101	cuugagcuua uuuaaaguu u
1102	uuucuccuug uuucuc
1103	ccauaaaauu ccaacugauu c
1104	cuuccacauc cgguuguuu
1105	guggcugguu uuuccuugu
1106	cucagagcuc agaucuu
1107	ggcugcuuug cccuc
1108	ucaaggaaga uggcauuuc
1109	ccucugugau uuuaaacu gau
1110	cuguugccuc cgguucug
1111	uuggcucugg ccuguccu
1112	gaaaauugug cauuuaccca uuuu
1113	cuuccuggau ggcuucau
1114	guacauuaag auggacuuc
1115	ccauuacagu ugucuguguu
1116	uaaucugccu cuucuuuugg
1117	ucugcuggca ucuugc
1118	ccaucuguuu gggucugug
1119	ucugugccaa uaugcgauc
1120	uuaaaugucu caaguucc
1121	guaguuccu ccaacg
1122	cauguaguuc ccucc
1123	uguaaacuuu uuuccauugg
1124	cauuuuguuu acuuuuuccc
1125	ucuguuuuug aggauugc

10

20

30

40

【表 7 - 2 8】

1126	ccaccgcaga uucaggc
1127	uuugcagacc uccugcc
1128	gaaauucuga caagauauuc u
1129	uaaaacaaau ucauu
1130	uccagguuca agugggauac
1131	uuccagguuc aagug
1132	ucaagcuuuu cuuuuag
1133	cugacaagau auucuu
1134	agguucaagu gggauacua
1135	uccaguuuca uuuuuuuguu ug
1136	cugcuugagc uuauuuucaa guu
1137	agcacuuaca agcacgggu
1138	uucaaguuua ucuugcucu c
1139	ggucuuuuau uugagcuuc
1140	cuucaagcuu uuuuucaagc u
1141	gcuucaauuu cuccuuguu
1142	uuuuuuugag cuucaauuu
1143	gcugccaag gucuuuu
1144	cuucaagguc uucaagcuu u
1145	uaacugcucu ucaaggucuu c
1146	gaaagccagu cgguaaguuc
1147	caccaccau caccc
1148	ugauauccuc aaggucaccc
1149	uugcuggucu uguuuuuc
1150	ccguaaugau uguucu
1151	uacauuuguc ugccacugg
1152	cccggagaag uuucaggg
1153	cuguugcagu aaucuaugag
1154	ugccauuguu ucaucagcuc uuu
1155	ugcaguaauc uaugaguuc
1156	uccuguagga cauuggcagu
1157	gagucuuca ggagccuu
1158	uuuuuuggcu guuuucaucc
1159	guucacucca cuugaaguuc
1160	ccuuccaggg aucucagg
1161	uaggugccug ccggcuu
1162	cugaacugcu ggaagucgc c
1163	uucagcugua gccacacc
1164	uucuuuaguu uucaauucc uc
1165	gaguuuucucu aguccuucc
1166	cauuuuuucc cacucaguau u
1167	uugaaguucc uggagucuu
1168	guucucuuc agaggcgc
1169	gugcugaggu uauacggug

10

20

30

40

【表 7 - 2 9】

1170	gucccugugg gcuucaug
1171	gugcugagau gcuggacc
1172	uggcucucuc ccaggg
1173	gggcacuuug uuuggcg
1174	ggucccagca aguuguuug
1175	guagagcucu gucauuuugg g
1176	gccagaaguu gaucagagu
1177	ucuacuggcc agaaguug
1178	ugaguaucou cgugugaag
1179	gcauaauguu caaugcgug
1180	gauccauugc uguuuucc
1181	gagaugcuau cauuuagau a
1182	cuggcucagg ggggagu
1183	ucuccucuuu ccucacucu
1184	ccuuuanguu cgugcugcu
1185	ggcggccuuu guguugac
1186	gagagguaga aggagagga
1187	auaggcugac ugcugucgg
1188	uuguguccug gggagga
1189	ugcuccauca ccuccucu
1190	gcuuuccagg gguuuuc
1191	cauuggcuuu ccagggg
1192	cccuuuuugu gaauguuuuc uuuu
1193	uugugcauuu acccauuug ug
1194	gaaaauugug cauuuaccca uuuu
1195	cuuccuggau ggcuucau
1196	guacauuaag auggacuuc
1197	ccauuacagu ugucuguguu
1198	uaaucugccu cuucuuuugg
1199	ucugcuggca ucuugc
1200	uauccucuga augucgauc
1201	gguauccuc ugaaugucgc
1202	ccaucuguua gggucugug
1203	ucugugccaa uaugcgauc
1204	uuuuuugucu caaguucc
1205	guaguuccu ccaacg
1206	cauguaguuc ccucc
1207	gagccuuuuu ucuucuug
1208	uccuuucauc ucugggcuc
1209	cuccucuuuc uucucugc
1210	cuucgaaacu gagcauuuu
1211	cuugugagac augagug
1212	cagagacucc ucuugcuu
1213	ugcugcuguc ucuugcu

10

20

30

40

【表 7 - 3 0】

1214	uuguaacuu uuuccauu
1215	uguaacuuu uuccauugg
1216	cauuuugua acuuuuucc
1217	cugagcuuc accuuucc
1218	cgccgcauu ucuaacag
1219	uuuguuuua gcauguucc
1220	gcugaauuu uucuuccc
1221	uuuuucuguc ugacagcug
1222	ucuguuuuug aggauugc
1223	ccaccgaga uucaggc
1224	gccaauugcc auccugg
1225	uuugcagacc uccugcc
1226	cugcuuccuc caacc
1227	guuauucgu uccuccaacc
1228	gcuuuuuuu uaguugcugc
1229	uuaguugcug cucuu
1230	gaaauucuga caagauuuc u
1231	uaaaacaaau ucauu
1232	uccagguuca agugggauac
1233	uuccagguuc aagug
1234	ucaagcuuuu cuuuuag
1235	cugacaagau auucuu
1236	agguucaagu gggauacua
1237	ucuugcucu cugggcuu
1238	cuugagcuua uuuucaaguu u
1239	uccaguuuca uuuaauuguu ug
1240	cugcuugagc uuauuuuca guu
1241	agcacuuaca agcacgggu
1242	uucaaguuua ucuugcucu c
1243	uuucuccuug uuucuc
1244	uuauuuuuu ccaacugau c
1245	ggucuuuuuu uugagcuuc
1246	cuucaagcuu uuuucaagc u
1247	gcuucauuu cuccuuguu
1248	uuuuuuugag cuucauuu
1249	gcugccaag gucuuuu
1250	cuucaagguc uucaagcuu u
1251	uaacugcucu ucaaggucu c
1252	cuuccacauc cgguuuuu
1253	guggcugguu uuuccuugu
1254	cucagagcuc agaucuu
1255	ggcugcuuug cccuc
1256	ucaaggaaga uggcauuuc
1257	gaaagccagu cgguaaguuc

10

20

30

40

【表 7 - 3 1】

1258	caccaccau caccc
1259	ccucugugau uuuaaacuu gau
1260	ugauauccuc aaggucaccc
1261	uugcuggucu uguuuuuc
1262	ccguaaugau uguucu
1263	cuguugccuc cgguucug
1264	uuggcucugg ccuguccu
1265	uacauuuguc ugccacugg
1266	cccggagaag uuucaggg
1267	cuguugcagu aaucuaugag
1268	ugccauuguu ucaucagcuc uuu
1269	ugcaguaaac uaugaguuc
1270	uccuguagga cauuggcagu
1271	gagucuucua ggagccuu
1272	uuuuuuggcu guuuucaucc
1273	guucacucca cuugaaguuc
1274	ccuuccaggg aucucagg
1275	uaggugccug ccggcuu
1276	cugaacugcu ggaaagucgc c
1277	uucagcugua gccacacc
1278	uucuuuaguu uucaauuccc uc
1279	gaguuuucucu aguccuucc
1280	caauuuuucc cacucaguau u
1281	uugaaguucc uggagucuu
1282	guucucuuc agaggcgc
1283	gugcugaggu uauacggug
1284	guccugugg gcuucaug
1285	gugcugagau gcuggacc
1286	uggcucucuc ccaggg
1287	gggcacuuug uuuggcg
1288	gguccagca aguuguuug
1289	guagagcucu gucauuuugg g
1290	gccagaaguu gaucagagu
1291	ucuacuggcc agaaguug
1292	ugaguaucau cgugugaaag
1293	gcuaaanguu caaugcgug
1294	gauccauugc uguuuucc
1295	gagaugcuau cauuuagaua a
1296	cuggcucagg ggggagu
1297	uccccuuu ccucacucu
1298	ccuuuanguu cgugcugcu
1299	ggcggccuuu guguugac
1300	gagagguaga aggagagga
1301	auaggcugac ugcugucgg

10

20

30

40

【表 7 - 3 2】

1302	uuguguccug gggagga
1303	ugcuccauca ccuccucu
1304	gcuuuccagg gguuuuuc
1305	cauuggcuuu ccagggg
1306	cugacgucca gcuuuuauc
1307	gggauuuuucc gucugcuu
1308	ccgccauuuc ucaacag
1309	uucucaggaa uuugugucu u
1310	caguuugccg cugccca
1311	guugcauua auguucugac
1312	auuuuuccug uagaauacug g
1313	gcuggucuug uuuuucaa
1314	uggucuuguu uuucuuuuu
1315	gucuuguuuu ucauuuuug
1316	cuuguuuuuc aaauuuuggg
1317	uguuuuucaa auuuugggc
1318	uccuuaaagc ugagaucug
1319	gccuucugca gcuucgg
1320	ccggttctga aggtgtctt gta
1321	tccggtctg aaggtgtct tgta
1322	ctccggtct gaaggtgtc ttgta
1323	cctccggtc tgaaggtgtt ctgta
1324	gcctccggtt ctgaaggtgt tctgta
1325	tgctccggt tctgaaggtg ttctgta
1326	ccggttctga aggtgtctt gt
1327	tccggtctg aaggtgtct tgt
1328	ctccggtct gaaggtgtc ttgt
1329	cctccggtc tgaaggtgtt ctgt
1330	gcctccggtt ctgaaggtgt tctgt
1331	tgctccggt tctgaaggtg ttctgt
1332	ccggttctga aggtgtctt g
1333	tccggtctg aaggtgtct tg
1334	ctccggtct gaaggtgtc ttg
1335	cctccggtc tgaaggtgtt ctg
1336	gcctccggtt ctgaaggtgt tctg
1337	tgctccggt tctgaaggtg ttctg
1338	ccggttctga aggtgtctt
1339	tccggtctg aaggtgtct t
1340	ctccggtct gaaggtgtc tt
1341	cctccggtc tgaaggtgtt ct
1342	gcctccggtt ctgaaggtgt tct
1343	tgctccggt tctgaaggtg ttct
1344	ccggttctga aggtgtct
1345	tccggtctg aaggtgtct

10

20

30

40

【表 7 - 3 3】

1346	ctccggttct gaaggtgtc t
1347	cctccgggtc tgaaggtgtt ct
1348	gcctccggtt ctgaaggtgt tct
1349	tgctccggt tctgaaggtg ttct
1350	ccggttctga aggtgttc
1351	tccggtctg aaggtgttc
1352	ctccggttct gaaggtgtc
1353	cctccgggtc tgaaggtgtt c
1354	gcctccggtt ctgaaggtgt tc
1355	tgctccggt tctgaaggtg ttc
1356	cattcaactg ttgcctccgg ttctgaaggt g
1357	ttgcctccgg ttctgaaggt gttctgtac
1358	aggatttga acagaggcgt c
1359	gtctgccact ggccggaggtc
1360	catcaagcag aaggcaaca
1361	gaagttcag ggccaagtca
1362	cgggcttggg cagaactac
1363	tccttacggg tagcatcctg
1364	ctgaaggtgt tctgtactt cctcc
1365	tggtgagaaa tggcggcgt
1366	cauucacug uugccuccgg uucugaaggu g
1367	ucccacugau ucugaauucu uuca
1368	cuucaucca cugauucuga auucu
1369	uuguacuca ucccacugau ucuga
1370	uguucuugua cuucaucca cugau
1371	gaagguguuc uuguacuca ucca
1372	guucugaagg uguucuugua cuuca
1373	cuccgguucu gaagguguuc uugua
1374	guugccuccg guucugaagg uguuc
1375	caacuguugc cuccgguucu gaagg
1376	ucauacaacu guugccuccg guucu
1377	acauuacau caacuguugc cuccg
1378	cuuaacau ucauacaacu guugc
1379	gaauccuuu acauuacau caacu
1380	guguugaau cuuaacau ucau
1381	ccauuguguu gaauccuuu acau
1382	uccagccau guguugaau cuua
1383	uagcuuccag ccuuguguu gauc
1384	uuccuagcu uccagccau guguu
1385	gcuucuucc uagcuuccag ccu
1386	gcucagcu uuccuagcu uccag
1387	gaccugcu gcuucuucc uagcu
1388	ccuaagaccu gcucagcu uuccu
1389	ccuguccua gaccugcu gcuuc

10

20

30

40

【表 7 - 3 4】

1390	ucuggccugu ccuaagaccu gcuca
1391	uuggcucugg ccuguccuaa gaccu
1392	caagcuuggc ucuggccugu ccuaa
1393	ugacucaagc uuggcucugg ccugu
1394	uuccaugacu caagcuuggc ucugg
1395	ccuccuucca ugacucaagc uuggc
1396	gggaccuccc uuccaugacu caagc
1397	guauaggac ccuccuucca ugacu
1398	cuacuguaua gggaccuccc uucca
1399	ugcaucuacu guauaggac ccucc
1400	uggauugcau cuacuguaua gggac
1401	ucuuuuggau ugcaucuacu guaua
1402	gauuuucuuu uggauugcau cuacu
1403	ucugugauuu ucuuuuggau ugcau
1404	ugguuucugu gauuuucuuu uggau
1405	ccuagcuuc cagccauugu guuga
1406	ucuuccuag cuuccagcca uugug
1407	ggcucuggcc uguccaaga ccugc
1408	agcuuggcuc uggccugucc uaaga
1409	cucaagcuug gcucuggccu guccu
1410	gaccuccuu ccaugacuca agcuu
1411	auagggacc ccuuccaug acuca
1412	cuguauagg accuccuuc cauga
1413	ugugauuuuc uuuggauug caucu
1414	guuucuguga uuucuuuug gauug
1415	cuugguuuc guguuuuuc uuugg
1416	ccgguucuga agguuuucuu guacu
1417	uccgguucug aaggguuuc uguac
1418	ccuccgguuc ugaaggugu cuugu
1419	gccuccgguu cugaaggugu ucuug
1420	ugccuccgg ucuugaaggug uucuu
1421	uugccuccgg uucugaaggu guucu
1422	uguugccucc gguucugaag guguu
1423	cuguugccuc cgguucugaa ggugu
1424	acuguugccu ccgguucuga aggug
1425	aacuguugcc uccgguucug aaggu
1426	uguugccucc gguucugaag guguucuugu
1427	gguucugaag guguucuugu
1428	uccgguucug aaggguuuc
1429	ccuccgguuc ugaaggugu
1430	uugccuccgg uucugaaggu
1431	uguugccucc gguucugaag
1432	uucugaaggu guucuugu
1433	cgguucugaa gguguuc

10

20

30

40

【表 7 - 3 5】

1434	cuccgguucu gaaggugu
1435	ugccuccggu ucugaagg
1436	uguugccucc gguucuga
1437	uucugaaggu guucu
1438	uccgguucug aaggu
1439	uugccuccgg uucug
1440	cuguugccuc cgguucug
1441	caatgccatc ctggagtcc t
1442	ccaatgcat cctggagtc c
1443	cccaatgcca tctggagtt c
1444	gccaatgcc atcctggagt t
1445	tgccaatgc catcctggag t
1446	cccaatgcca tctggagtt cctgt
1447	cagttgccg ctgccaatg ccacctgga
1448	ccaatgcat cctggagtc
1449	cccaatgcca tctggagtt
1450	cccaatgcca tctggagtt c
1451	gcugcccaau gccauccugg aguuc
1452	uugccgcugc ccaaugccau ccugg
1453	acaguuugcc gcugcccaau gccau
1454	ugacaacagu uugccgcugc ccaau
1455	uguucugaca acaguuugcc gcugc
1456	uucaauguuc ugacaacagu uugcc
1457	uugcauucaa uguucugaca acagu
1458	cccaguugca uucaauguuc ugaca
1459	ucuuccccag uugcauucaa uguuc
1460	uuuuuuuuc cccaguugca uucaa
1461	cugaauuuu ucuuccccag uugca
1462	gauugcugaa uuuuuuuuc cccag
1463	uugaggauug cugaauuuu ucuuc
1464	uguuuuugag gauugcugaa uuuuu
1465	gcaucuguuu uugaggauug cugaa
1466	uacuggcauc uguuuuugag gauug
1467	uuugccgcug cccaugcca uccug
1468	gctcaggtcg gattgacatt
1469	gggcaactct tccaccagta
1470	cctgagaatt gggaacatgc
1471	ttgctgctct ttccaggtt
1472	agcagcctct cgctcactca c
1473	ttccaaagca gcctctcgct c
1474	ttcttccaaa gcagcctctc g
1475	agtttcttcc aaagcagcct c
1476	tttcttccaa agcagcctct c
1477	gtttcttcca aagcagcctc t

10

20

30

40

【表 7 - 3 6】

1478	gagtttctc caaagcagcc t
1479	tgagttctt ccaaagcagc c
1480	gcagccucuc gcucacucac c
1481	ccaagcagc cucucgcuca c
1482	uucuuccaaa gcagccucuc g
1483	aucuaugagu uucuuccaaa g
1484	uguugcagua aucuaugagu u
1485	cagggggaac uguugcagua a
1486	uuuccagguc cagggggaac u
1487	gcaagaaacu uuuccagguc c
1488	uguaagccag gcaagaaacu u
1489	uuucagcuuc uguaagccag g
1490	uuggcaguug uuucagcuuc u
1491	cuguaggaca uuggcaguug u
1492	ggguagcauc cuguaggaca u
1493	cuuuccuuac ggguagcauc c
1494	uucuaaggagc cuuuccuuac g
1495	ccuuggaguc uucuaaggagc c
1496	ucuuuuacuc ccuuggaguc u
1497	uuucaucagc ucuuuuacuc c
1498	uugccauugu uucaucagcu
1499	uccuguagga cauuggcagu
1500	catggaagga gggtcctat
1501	ctgccggctt aatcatcat
1502	ataatgaaaa cgccgccatt t
1503	tcataatgaa aacgcccca t
1504	atcataatga aaacgcccc a
1505	tatcataatg aaaacgccgc c
1506	atatcataat gaaaacgccg c
1507	tatatcataa tgaaaacgcc g
1508	ttatatcata atgaaaacgc c
1509	tgaaaacgcc gccatttctc aacagatctg
1510	atcataatga aaacgccgcc
1511	tatcataatg aaaacgccgc
1512	tatcataatg aaaacgccgc c
1513	cucaacagau cugucaaauc gc
1514	gccgccauuu cucaacagau cu
1515	uaaugaaaac gccgccauuu cu
1516	uaucauaaug aaaacgccgc ca
1517	cuuuuauca uaaugaaaac gc
1518	gauuuuuuu cuuuuauca ua
1519	guuagccacu gauuuuuuu cu
1520	uucagcuucu guuagccacu ga
1521	ugagaaacug uucagcuucu gu

10

20

30

40

【表 7 - 3 7】

1522	ugugucuuuc ugagaaacug uu
1523	guucccaauu cucaggaauu ug
1524	uauuuagcau guucccaauu cu
1525	auaccuuug uauuuagcau gu
1526	ucagcuucug uuagccacug
1527	tccagtatac ttacagctc c
1528	atccagtata cttacagct c
1529	gatccagtat acttacagc t
1530	ggatccagta tacttacag c
1531	gggatccagt atacttacag g
1532	cttacaggct ccaatagtg tcagt
1533	gggatccagt atacttacag gctcc
1534	aacaaccgga tgtggaagag
1535	ttggagatgg cagttcct
1536	cauuucuaa cagaucuguc aa
1537	aaaacgccgc cauuucuaa ca
1538	aaauucuuua uaucuaaug aa
1539	cuucuguuag ccacugauua aa
1540	aacuguucag cuucuguuag cc
1541	cuucugaga aacuguucag cu
1542	gaauuugugu cuucugaga aa
1543	cucaggaauu ugugucuuuc ug
1544	caauucucag gaauuugugu cu
1545	agcauguucc caauucucag ga
1546	gagtcttcta ggagcctt
1547	gtttctcca aagcagctc
1548	agttcttcc aaagcagcct
1549	agttcttcc aaagcagcct c
1550	ggatccagta tacttacagg
1551	gggatccagt atacttacag
1552	tgggatccag tatactfaca g
1553	atgggatcca gtatacttac a
1554	guggcuaaca gaagcu
1555	gggaacaugc uaaauac
1556	agacacaaau uccugaga
1557	cuguugagaa a
1558	ucagcuucug uuagccacug
1559	uucagcuucu guuagccacu
1560	uucagcuucu guuagccacu g
1561	ucagcuucug uuagccacug a
1562	uucagcuucu guuagccacu ga
1563	ucagcuucug uuagccacug a
1564	uucagcuucu guuagccacu ga
1565	ucagcuucug uuagccacug au

10

20

30

40

【表 7 - 3 8】

1566	uucagcuucu guuagccacu gau
1567	ucagcuucug uuagccacug auu
1568	uucagcuucu guuagccacu gauu
1569	ucagcuucug uuagccacug auua
1570	uucagcuucu guuagccacu gaua
1571	ucagcuucug uuagccacug auuaa
1572	uucagcuucu guuagccacu gauuaa
1573	ucagcuucug uuagccacug auuaaa
1574	uucagcuucu guuagccacu gauuaaa
1575	cagcuucugu uagccacug
1576	cagcuucugu uagccacuga u
1577	agcuucuguu agccacugau u
1578	cagcuucugu uagccacuga uu
1579	agcuucuguu agccacugau ua
1580	cagcuucugu uagccacuga uua
1581	agcuucuguu agccacugau uaa
1582	cagcuucugu uagccacuga uuaa
1583	agcuucuguu agccacugau uaaa
1584	cagcuucugu uagccacuga uuaaa
1585	agcuucuguu agccacugau uaaa
1586	agcuucuguu agccacugau
1587	gcuucuguua gccacugauu
1588	agcuucuguu agccacugau u
1589	gcuucuguua gccacugauu a
1590	agcuucuguu agccacugau ua
1591	gcuucuguua gccacugauu aa
1592	agcuucuguu agccacugau uaa
1593	gcuucuguua gccacugauu aaa
1594	agcuucuguu agccacugau uaaa
1595	gcuucuguua gccacugauu aaa
1596	ccauuugau uuagcauguu ccc
1597	agauaccuu uguauuuagc
1598	gccauuucuc aacagaucu
1599	gccauuucuc aacagaucug uca
1600	auucucagga auuugugucu uuc
1601	ucucaggaau uugugucuuu c
1602	guucagcuuc uguuagcc
1603	cugauuaaa auuuuuauu c
1604	gccgccauuu cucaacag
1605	guauuuagca uguuccca
1606	caggaauuug ugucuuuc
1607	ucuguuagcc acugauuaaa u
1608	cgaccugagc uuuguuguag
1609	cgaccugagc uuuguuguag acuai

10

20

30

40

【表 7 - 3 9】

1610	ccugagcuuu guuguagacu auc
1611	cguugcacuu ugcaaugcug cug
1612	cuguagcuuc acccuuucc
1613	gagagagcuu ccuguagcuu cacc
1614	guccuuguac auuuuguuaa cuuuuuc
1615	ucagcuucug uuagccacug
1616	uucagcuucu guuagccacu
1617	uucagcuucu guuagccacu g
1618	ucagcuucug uuagccacug a
1619	uucagcuucu guuagccacu ga
1620	ucagcuucug uuagccacug a
1621	uucagcuucu guuagccacu ga
1622	ucagcuucug uuagccacug au
1623	uucagcuucu guuagccacu gau
1624	ucagcuucug uuagccacug auu
1625	uucagcuucu guuagccacu gauu
1626	ucagcuucug uuagccacug auua
1627	uucagcuucu guuagccacu gaua
1628	ucagcuucug uuagccacug auuaa
1629	uucagcuucu guuagccacu gauuaa
1630	ucagcuucug uuagccacug auuaaa
1631	uucagcuucu guuagccacu gauuaaa
1632	cagcuucugu uagccacug
1633	cagcuucugu uagccacuga u
1634	agcuucuguu agccacugau u
1635	cagcuucugu uagccacuga uu
1636	agcuucuguu agccacugau ua
1637	cagcuucugu uagccacuga uua
1638	agcuucuguu agccacugau uaa
1639	cagcuucugu uagccacuga uuaa
1640	agcuucuguu agccacugau uaaa
1641	cagcuucugu uagccacuga uuaaa
1642	agcuucuguu agccacugau uaaa
1643	agcuucuguu agccacugau
1644	gcuucuguua gccacugauu
1645	agcuucuguu agccacugau u
1646	gcuucuguua gccacugauu a
1647	agcuucuguu agccacugau ua
1648	gcuucuguua gccacugauu aa
1649	agcuucuguu agccacugau uaa
1650	gcuucuguua gccacugauu aaa
1651	agcuucuguu agccacugau uaaa
1652	gcuucuguua gccacugauu aaa
1653	ccauuuguau uuagcauguu ccc

10

20

30

40

【表 7 - 4 0】

1654	agauaccauu uguauuuagc
1655	gccauuucuc aacagaucu
1656	gccauuucuc aacagaucug uca
1657	auucucagga auuugugucu uuc
1658	ucucaggaau uugugucuuu c
1659	guucagcuuc uguuagcc
1660	cugauuaaaau aucuuuauau c
1661	gccgccauuu cucaacag
1662	guauuuagca uguuccca
1663	caggaauuug ugucuuuc
1664	uuugccgcug cccaugcca uccug
1665	auucaauguu cugacaacag uuugc
1666	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
1667	caguugcauu caauguucug ac
1668	aguugcauuc aauguucuga
1669	gauugcugaa uuauuucuu c
1670	gauugcugaa uuauuucuu cccag
1671	auugcugaa uauuucuucc ccagu
1672	uugcugaaau auuucuuccc caguu
1673	ugcugaauua uuucuuccc aguug
1674	gcugaauua uucuucccga guugc
1675	cugaauuaau ucuucccag uugca
1676	ugaauuaauu cuucccagu ugcau
1677	gaauuaauu ucccaguu gcauu
1678	aaauuuuuc ucccaguug cauuc
1679	auuuuuuuu ccccaguugc auuca
1680	uuauuucuu cccaguugca uucaa
1681	uauuucuucc ccaguugcau ucaau
1682	auuucuuccc caguugcauu caaug
1683	uuucuuccc aguugcauuc aaugu
1684	uucuucccga guugcauua auguu
1685	ucuucccag uugcauuaa uguuc
1686	cuucccagu ugcauuaa guucu
1687	ucccaguu gcauuaaug uucug
1688	ucccaguug cauuaaugu ucuga
1689	cccaguugc auucaauguu cugac
1690	cccaguugca uucaauguuc ugaca
1691	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
1692	caguugcauu caauguucug acaac
1693	aguugcauuc aauguucuga caaca
1694	guugcauua auguucugac aacag
1695	uugcauuaa uguucugaca acagu
1696	ugcauuaa guucugacaa caguu
1697	gcauuaaug uucugacaac aguuu

10

20

30

40

【表 7 - 4 1】

1698	cauuc <u>aa</u> guu ucugacaaca guuug
1699	auuca <u>aa</u> guu cugacaacag uuugc
1700	uca <u>aa</u> guucu gacaacaguu ugccg
1701	ca <u>aa</u> guucug acaacaguuu gccgc
1702	aa <u>aa</u> guucuga caacaguuuug ccgcu
1703	au <u>aa</u> guucugac aacaguuuugc cgcug
1704	ugu <u>aa</u> cugaca acaguuuugcc gcugc
1705	gu <u>aa</u> cugacaa caguuuugccg cugcc
1706	uu <u>aa</u> cugacaac aguuuugccgc ugccc
1707	uc <u>aa</u> cugacaaca guuuugccgcu gccca
1708	cugacaacag uuugccgcug cccaa
1709	ugacaacagu uuugccgcugc ccaau
1710	gacaacaguu ugccgcugcc caaug
1711	acaacaguuu gccgcugccc aaugc
1712	caacaguuuug ccgcugccca augcc
1713	aacaguuuugc cgcugcccaa ugcca
1714	acaguuuugcc gcugcccaau gccau
1715	caguuuugccg cugcccaaug ccauc
1716	aguuuugccgc ugcccaaugc caucc
1717	guuuugccgcu gcccaaugcc auccu
1718	uuugccgcug cccaaugcca uccug
1719	uuugccgcugc ccaaugccau ccugg
1720	ugccgcugcc caaugccauc cugga
1721	gccgcugccc aaugccauc ugagg
1722	ccgcugccca augccauc <u>cu</u> ggagu
1723	cgcugcccaa ugccauc <u>cu</u> gaguu
1724	gcuuu <u>cuuuu</u> uaguugcugc uuuu
1725	cuuuu <u>cuuuu</u> aguugcugcu uuuu
1726	uuuu <u>cuuuu</u> a guugcugcuc uuuu
1727	uuu <u>cuuuu</u> ag uugcugcucu uuucc
1728	uuu <u>cuuuu</u> agu ugcugcucu uucca
1729	uuu <u>cuuuu</u> aguu gcugcucu uccag
1730	uuu <u>cuuuu</u> aguug cugcucu uccagg
1731	uuu <u>cuuuu</u> aguugc ugcucu uccagg
1732	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1733	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1734	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1735	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1736	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1737	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1738	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1739	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1740	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg
1741	uuu <u>cuuuu</u> aguugc gcucu uccagg

10

20

30

40

【表 7 - 4 2】

1742	gcucuuuucc agguucaagu gggac
1743	cucuuuucca gguucaagug ggaua
1744	ucuuuuccag guucaagugg gauac
1745	cuuuuccagg uucaaguggg auacu
1746	uuuuccaggu ucaaguggga uacua
1747	uuuccagguu caagugggau acuag
1748	uuccagguuc aagugggaua cuagc
1749	uccagguuca agugggauac uagca
1750	ccagguuca gugggguacu agcaa
1751	cagguucaag ugggguacua gcaau
1752	agguucaagu gggauacuag caaug
1753	gguucaagug ggauacuagc aaugu
1754	guucaagugg gauacuagca auguu
1755	uucaaguggg auacuagcaa uguua
1756	ucaaguggga uacuagcau guuau
1757	caagugggau acuagcaaug uuauc
1758	aagugggaua cuagcaaugu uaucu
1759	agugggauac uagcaaugu aucug
1760	gugggguacu agcaauguua ucugc
1761	ugggguacua gcaauguuau cugcu
1762	gggguacuag caauguuau ucguu
1763	ggauacuagc aauguuauuc gcuuc
1764	gauacuagca auguuauucug cuucc
1765	auacuagcaa uguuauucugc uuccu
1766	uacuagcau guuauucugcu uccuc
1767	acuagcaaug uuauucugcu ccucc
1768	cuagcaaugu uauucugcu cucca
1769	uagcaaugu auucugcuucc uccaa
1770	agcaauguua ucugcuuccu ccaac
1771	gcaauguuau cugcuuccuc caacc
1772	caauguuau ucguuccucc aacca
1773	aauguuauuc gcuuccucca accau
1774	auguuauucug cuuccucca ccaua
1775	uguuauucugc uuccuccaac cauaa
1776	guuauucugcu uccuccaacc auaaa
1777	gcugcucuuu uccagguuc
1778	ucuuuuccag guucaagugg
1779	agguucaagu gggauacua
1780	cucagcucu gaaguaaac
1781	ccucagcucu ugaaguaaac
1782	ccucagcucu ugaaguaaac g
1783	auagugguca guccaggagc u
1784	caguccagga gcuaggucag g
1785	uaguggucag uccaggagcu agguc

10

20

30

40

【表 7 - 4 3】

1786	agagcaggua ccuccaaca caagg
1787	gagcagguac cuccaacauc aagga
1788	agcagguacc uccaacauca aggaa
1789	gcagguaccu ccaacauc aa ggaag
1790	cagguaccuc caacauc aag gaaga
1791	agguaccucc aacauc aagg aagau
1792	gguaccucca acaucaagg aagaug
1793	guaccuccaa caucaaggaa gaugg
1794	uaccuccaac aucaagg aag auggc
1795	accuccaaca ucaagg aaga uggca
1796	ccuccaacauc caagg aagau ggcau
1797	cuccaacauc aagg aagau gcauu
1798	cuccaacauc aagg aagau gcauuuc uag
1799	uccaacauc aagg aagau gcauu
1800	ccaacauc aa ggaagg aag auuuc
1801	caacauc aag gaagg aagca uuuc
1802	aacauc aagg aagg aaggcau uucua
1803	acauc aagg aagg aaggcau ucuag
1804	acauc aagg aagg aaggcau ucuaguuugg
1805	acauc aagg aagg aaggcau ucuag
1806	cauc aagg aagg aaggcauu cuagu
1807	auc aagg aagg aaggcauu uagu
1808	ucaagg aaga uggcauuuc aguuu
1809	ucaagg aaga uggcauuuc
1810	caagg aagau ggcauuucua guuug
1811	aagg aagau gcauuuc uag uuugg
1812	agg aagau gcauuuc uag uuugga
1813	ggaagg aagca uuuc uaguu uggag
1814	gaagg aagca uuuc uaguu ggaga
1815	aagg aagca uuuc uaguu gagau
1816	aagg aagca uuuc uaguu agau
1817	gaagg aagca uuuc uaguu gaugg
1818	aagg aagca uuuc uaguu aggc
1819	uggcauuuc aguuugg aaga uggca
1820	ggcauuuc aguuugg aaga ggag
1821	gcauuuc uag uuugg aag gcagu
1822	cauuuc uag uuugg aag cagu
1823	auuuc uag uuugg aag aguu
1824	uuuc uaguu ggag aagca guuuc
1825	uuuc uaguu gag aagca uuuc
1826	ccuc uaguu gcugg uucuuuu
1827	cuc uaguu cugg uucuuuu
1828	uc uaguu gcugg uucuuuu
1829	cuc uaguu gcugg uucuuuu

10

20

30

40

【表 7 - 4 4】

1830	uugauugcug gucuuguuuu ucaaa
1831	ugauugcugg ucuuguuuuu caaa
1832	gauugcuggu cuuguuuuu aaau
1833	auugcugguc uuguuuuuca aaau
1834	uugcuggucu uguuuuucaa auuu
1835	ugcuggucuu guuuuucaaa uuug
1836	gcuggucuuu uuuuucaaa uuugg
1837	cuggucuuuu uuuucaaaau uuggg
1838	uggucuuuu uuucaaaau ugggc
1839	ggucuuuuu ucaaaauuu gggca
1840	gucuuuuuu ucaaaauuu ggcag
1841	ucuuguuuuu caaaauuuu ggcag
1842	cuuguuuuu aaauuuugg cagcg
1843	uuguuuuuca aaauuuugg agcgg
1844	uguuuuucaa auuuugggca gcggu
1845	guuuuucaaa uuugggag cgua
1846	uuuucaaaau uuugggagc gguaa
1847	uuucaaaau uuugggagc guaau
1848	uuucaaaau ugggagcgg uauug
1849	ucaaaauuu gggagcggg aauga
1850	ucaaaauuu ggcagcgua augag
1851	caaaauuuu ggcagcgua ugagu
1852	aaauuuugg cagcguaau gaguu
1853	aaauuuugg agcguaau aguuc
1854	auuuugggca gcguaaau guucu
1855	ccauuguguu gaaucuuua acuu
1856	ccauuguguu gaaucuuua ac
1857	auuguguuga auccuuuaac
1858	ccuguccuaa gaccugcua
1859	cuuuuggauu gcaucucug uauag
1860	caucaacug uugccuccg uucug
1861	cuguugccuc cggucugaa ggug
1862	caucaacug uugccuccg uucugaaggu g
1863	cugaaggugu ucuuguacu cauc
1864	uguauaggga ccucuuucc augacuc
1865	auccacuga uucugaauuc
1866	uuggcucugg ccuguccua ga
1867	aagaccugc cagcuucuu cuuagcuucc agcca
1868	ggagagagcu uccuguagcu
1869	ucaccuuuc cacaggcguu gca
1870	ugcacuuugc aaugcugcug ucuucugcu au
1871	ucaaaugaa aagccgcca uuucuaaca gauu
1872	uuugucuu ucugagaac
1873	uuuagcugu uccaaauuc caggauuuu

10

20

30

40

【表 7 - 4 5】

1874	uccuguagaa uacuggcauc
1875	ugcagaccuc cugccaccgc agauuca
1876	uugcagaccu ccugccaccg cagauucagg cuuc
1877	uguuuuugag gauugcugaa
1878	uguucugaca acaguugcc gcugcccaau gccauccugg
1879	cucuuuucca gguucaagug ggauacuagc
1880	caagcuuuuc uuuuaguugc ugcucuuuuc c
1881	uaauuuuuug uucuucuagc cuggagaaag
1882	cugcuuccuc caaccuauaa acauuuc
1883	ccacucagag cucagauuu cuaacuucc
1884	cuuccacuca gagcucagau cuucuaa
1885	caguccagga gcuaaggucag gcugcuuugc
1886	ucuugaagua aacgguuuac cgccuuccac ucagagc
1887	uccaacuggg gacgccucug uuccaaauc
1888	acuggggacg ccucuguucc a
1889	ccguaaugau uguucuagcc
1890	uuuugggcag cgguaaugag uucuu
1891	uuugggcagc gguaaugagu ucuuc
1892	uugggcagcg guaaugaguu cuucc
1893	ugggcagcgg uaaugaguuc uuca
1894	gggcagcggg aaugaguucu uccaa
1895	ggcagcggua augaguucuu ccaac
1896	gcagcgguaa ugaguucuu caacu
1897	cagcgguauu gaguucuucc aacug
1898	agcgguaaug aguucuuca acugg
1899	gcgguaauga guucuucaaa cuggg
1900	cgguaaugag uucuucaac ugggg
1901	gguaaugagu ucuucaacu gggga
1902	guaaugaguu cuucaacug gggac
1903	uaaugaguuc uucaacugg ggacg
1904	aaugaguucu ucaacuggg gacgc
1905	augaguucuu ccaacugggg acgcc
1906	ugaguucuu caacugggga cgccu
1907	gaguucuucc aacuggggac gccuc
1908	aguucuuca acuggggacg ccucu
1909	guucuucaaa cuggggacgc cucug
1910	uucuucaac uggggacgcc ucugu
1911	ucuucaacu ggggacgccu cuguu
1912	cuucaacug gggacgccuc uguuc
1913	uucaacugg ggacgccuc guucc
1914	gauugcuggu cuuguuuuuc
1915	ccucuugauu gcuggucuu
1916	gguaaugagu ucuucaacu gg
1917	acuggggacg ccucuguucc

10

20

30

40

【表 7 - 4 6】

1918	ucaaggaaga uggcauuucu
1919	ggccaaaccu cggcuuaccu
1920	uuugccgcug cccaugcca uccug
1921	auucaauguu cugacaacag uuugc
1922	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
1923	caguugcauu caauguucug ac
1924	aguugcauuc aauguucuga
1925	gauugcugaa uuauuucuuc c
1926	gauugcugaa uuauuucuuc cccag
1927	auugcugaa uauuucuucc ccagu
1928	uugcugaauu auuucuuccc caguu
1929	ugcugaauua uuucuucccc aguug
1930	gcugaauuau uuucuuccca guugc
1931	cugaauuauu ucuuccccag uugca
1932	ugaauuuuuu cuuccccagu ugcau
1933	gaauuuuuuc uuccccaguu gcauu
1934	aaauuuuucu ucccaguuug cauuc
1935	auuuuuucu ccccaguugc auuca
1936	uuuuuucuuc cccaguugca uucaa
1937	uauuucuucc ccaguugcau ucaau
1938	auuucuuccc caguugcauu caaug
1939	uuucuucccc aguugcauuc aaugu
1940	uuucuuccca guugcauua auguu
1941	ucuuccccag uugcauuaa uguuc
1942	cuuccccagu ugcauuaa guucu
1943	uuccccaguu gcauuaaug uucug
1944	uccccaguuug cauuaaugu ucuga
1945	cccaguugc auucaauguu cugac
1946	cccaguugca uucaauguuc ugaca
1947	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
1948	caguugcauu caauguucug acaac
1949	aguugcauuc aauguucuga caaca
1950	uccuguagaa uacuggcauc
1951	ugcagaccuc cugccaccgc agauuca
1952	uugcagaccu ccugccaccg cagauucagg cuuc
1953	guugcauua auguucugac aacag
1954	uugcauuaa uguucugaca acagu
1955	ugcauuaau guucugacaa caguu
1956	gcauuaaug uucugacaac aguuu
1957	cauuaaugu ucugacaaca guuug
1958	auucaauguu cugacaacag uuugc
1959	ucaauguucu gacaacaguu ugccg
1960	caauguucug acaacaguuu gccgc
1961	aauguucuga caacaguuug ccgcu

10

20

30

40

【表 7 - 4 7】

1962	auguucugac aacaguuugc cgcug
1963	uguucugaca acaguuugcc gcugc
1964	guucugacaa caguuugccg cugcc
1965	uucugacaac aguuugccgc ugccc
1966	ucugacaaca guuugccgcu gccca
1967	cugacaacag uuugccgcug cccaa
1968	ugacaacagu uugccgcugc ccaau
1969	gacaacaguu ugccgcugcc caaug
1970	acaacaguuu gccgcugccc aaugc
1971	caacaguuug ccgcugccca augcc
1972	aacaguuugc cgcugcccaa ugcca
1973	acaguuugcc gcugcccaau gccau
1974	caguuugccg cugcccaaug ccauc
1975	aguuugccgc ugcccaaugc caucc
1976	guuugccgcu gcccaaugcc auccu
1977	uuugccgcug cccaugcca uccug
1978	uugccgcugc ccaaugccau ccugg
1979	ugccgcugcc caaugccauc cugga
1980	gccgcugccc aaugccauc ugag
1981	ccgcugccca augccauc cuagg
1982	cgcugcccaa ugccauc cuagg
1983	uguuuuugag gauugcugaa
1984	uguucugaca acaguuugcc gcugcccau gccauccugg
1985	gcccaaugcc auccugg
1986	agagcaggua ccuccaacauc caagg
1987	gagcaggua cuccaacauc aagga
1988	agcaggua cuccaacauc aagga
1989	gcaggua cuccaacauc aagga
1990	caggua cuccaacauc aagga
1991	agguaccucc acaucaagg aagau
1992	gguaccucca acaucaagg aagau
1993	guaccucca caucaagg aagau
1994	uaccuccaac aucaagg aagau
1995	accuccaaca ucaagg aagau
1996	ccuccaaca caagg aagau
1997	cuccaacauc aagg aagau
1998	cuccaacauc aagg aagau
1999	uccaacauc aagg aagau
2000	ccaacauc aagg aagau
2001	caacauc aagg aagau
2002	aacauc aagg aagau
2003	acauc aagg aagau
2004	auc aagg aagau
2005	uc aagg aagau

10

20

30

40

【表 7 - 4 8】

2006	caucaaggaa gauggcauuu cuagu
2007	aucaaggaag auggcuuuc uaguu
2008	ucaaggaaga uggcauuucu aguuu
2009	ucaaggaaga uggcauuucu
2010	caaggaagau ggcauuucua guuug
2011	aaggaagaug gcuuuucua uugg
2012	aggaagauagg cauuucuagu uugga
2013	ggaagauaggc auuucuagu uggag
2014	gaagauaggca uuucuaguuu ggaga
2015	aagauaggcau uucuaguuu ggagau
2016	agauaggcau ucuaguuuagg agaug
2017	gauggcauuu cuaguuuugga gaugg
2018	auggcuuuc uaguuuaggag auggc
2019	uggcauuucu aguuuggaga uggca
2020	ggcauuucua guuuggagau ggag
2021	gcuuuucua uuggagauagg gcagu
2022	cauuucuagu uuggagauagg cagu
2023	auuucuagu uggagauaggc aguuu
2024	uuucuaguuu ggagauaggca guuuc
2025	uucuaguuu ggagauaggcag uuucc
2026	ccauuguguu gaauccuuua acuu
2027	ccauuguguu gaauccuuua ac
2028	auuguguuga auccuuuaac
2029	ccuguccuaa gaccugcuca
2030	cuuuuggauu gcaucuacug uauag
2031	cauucacug uugccuccgg uucug
2032	cuguugccuc cggucugaa ggug
2033	cauucacug uugccuccgg uucugaaggu g
2034	cugaaggugu ucuuguacuu caucc
2035	uguauaggga ccuuccuucc augacuc
2036	auccacuga uucugaauuc
2037	uuggcucugg ccuguccuaa ga
2038	aagaccugcu cagcuucuc cuuagcuucc agcca
2039	ugcauguucc agucguugug ugg
2040	cacuauucca gucaauagg ucugg
2041	auuuaccaac cuucaggauc gagua
2042	ggccuuuaac acauacacu a
2043	ucagcuucug uuagccacug
2044	uucagcuucu guuagccacu
2045	uucagcuucu guuagccacu g
2046	ucagcuucug uuagccacug a
2047	uucagcuucu guuagccacu ga
2048	ucagcuucug uuagccacug a
2049	uucagcuucu guuagccacu ga

10

20

30

40

【表 7 - 4 9】

2050	ucagcuucug uuagccacug au
2051	uucagcuucu guuagccacu gau
2052	ucagcuucug uuagccacug auu
2053	uucagcuucu guuagccacu gauu
2054	ucagcuucug uuagccacug auua
2055	uucagcuucu guuagccacu gaua
2056	ucagcuucug uuagccacug auuaa
2057	uucagcuucu guuagccacu gauuaa
2058	ucagcuucug uuagccacug auuaaa
2059	uucagcuucu guuagccacu gauuaaa
2060	cagcuucugu uagccacug
2061	cagcuucugu uagccacuga u
2062	agcuucuguu agccacugau u
2063	cagcuucugu uagccacuga uu
2064	agcuucuguu agccacugau ua
2065	cagcuucugu uagccacuga uua
2066	agcuucuguu agccacugau uaa
2067	cagcuucugu uagccacuga uuaa
2068	agcuucuguu agccacugau uaaa
2069	cagcuucugu uagccacuga uaaaa
2070	agcuucuguu agccacugau uaaa
2071	agcuucuguu agccacugau
2072	gcuucuguua gccacugauu
2073	agcuucuguu agccacugau u
2074	gcuucuguua gccacugauu a
2075	agcuucuguu agccacugau ua
2076	gcuucuguua gccacugauu aa
2077	agcuucuguu agccacugau uaa
2078	gcuucuguua gccacugauu aaa
2079	agcuucuguu agccacugau uaaa
2080	gcuucuguua gccacugauu aaa
2081	ccauuuguau uuagcauguu ccc
2082	agauaccuu uguuuuagc
2083	gccauuucuc aacagaucu
2084	gccauuucuc aacagaucug uca
2085	auucucagga auuugugucu uuc
2086	ucucaggaau uugugucuuu c
2087	guucagcuuc uguuagcc
2088	cugauuaaa auuuuuauu c
2089	gccgccauuu cucaacag
2090	guauuuagca uguuicca
2091	caggaauuug ugucuuuc
2092	gcuuuucuuu uaguugcugc ucuuu
2093	cuuuucuuuu aguugcugcu cuuuu

10

20

30

40

【表 7 - 5 0】

2094	uuuuuuuuu guugcugcuc uuuuc
2095	uuuuuuuag uugcugcucu uuucc
2096	uuuuuuuagu ugcugcucuu uucca
2097	uuuuuuaguu gcugcucuuu uccag
2098	uuuuuaguug cugcucuuuu ccagg
2099	uuuuaguugc ugcucuuuuc caggu
2100	uuuaguugcu gcucuuuucc agguu
2101	uuaguugcug cucuuuucca gguuc
2102	uaguugcugc uuuuuuccag guuca
2103	aguugcugcu uuuuuccagg uucaa
2104	guugcugcuc uuuuccaggu ucaag
2105	uugcugcucu uuuccagguu caagu
2106	ugcugcucuu uuccagguuc aagug
2107	gcugcucuuu uccagguuca agugg
2108	cugcucuuuu ccagguucaa guggg
2109	ugcucuuuuc cagguucaag uggga
2110	gcucuuuucc agguucaagu gggac
2111	cucuuuucca gguucaagug ggaua
2112	uuuuuuccag guucaagugg gauac
2113	uuuuuccagg uucaaguggg auacu
2114	uuuuccaggu ucaaguggga uacua
2115	uuuccagguu caagugggau acuag
2116	uuccagguuc aagugggaur cuagc
2117	uccagguuca agugggauac uagca
2118	ccagguucaa gugggauracu agcaa
2119	cagguucaag ugggauracua gcaau
2120	agguucaagu gggauracuag caaug
2121	gguucaagug ggauracuagc aaugu
2122	guucaagugg gauracuagca auguu
2123	uucaaguggg auracuagca uguua
2124	ucaaguggga uacuagcau guuau
2125	caagugggau acuagcaaug uuauc
2126	aagugggaur cuagcaaugu uaucu
2127	agugggaurac uagcaauguu aucug
2128	gugggauracu agcaauguua ucugc
2129	ugggauracua gcaauguuau cugcu
2130	gggauracuag caauguuauc ugcuu
2131	ggauracuagc aauguuaucu gcuuc
2132	gauracuagca auguuauauc cuucc
2133	auracuagca uguuauaucug uuccu
2134	uacuagcau guuauaucugc uccuc
2135	acuagcaaug uuauaucugcu ccucc
2136	cuagcaaugu uaucugcuuc cucca
2137	uagcaauguu aucugcuucc uccaa

10

20

30

40

【表 7 - 5 1】

2138	agcaauguua ucugcuuccu ccaac
2139	gcaauguuau cugcuuccuc caacc
2140	caauguuau ucugcuuccu aacca
2141	aauguuau cuugcuuccu accau
2142	auguuau cuugcuuccu ccaua
2143	uguuau cuugcuuccu cauaa
2144	guuau cuugcuuccu auaaa
2145	gcugcucuuu uccagguuc
2146	ucuuuuccag guucaagugg
2147	agguucaagu gggauacua
2148	cauuuuucc cacucaguau u
2149	uugaaguucc uggagucuu
2150	uccucaggag gcagcucuaa au
2151	gcgcugguca caaaauccug uugaac
2152	cacuugcuug aaaaggucua caaagga
2153	ggugaauaac uuacaaauuu ggaagc
2154	ccacaggcgu ugcacuuugc aaugc
2155	cacaggcguu gcacuuugca augcu
2156	acaggcguug cacuuugcaa ugcug
2157	caggcguugc acuuugcaau gcugc
2158	aggcguugca cuuugcaaug cugcu
2159	ggcguugcac uuugcaaugc ugcug
2160	gcuugcacu uuugcaaugc gcugu
2161	cguugcacu uuugcaaugc cuguc
2162	cguugcacu uuugcaaugc cug
2163	guugcacuuu gcaaugcugc ugucu
2164	uugcacuuu gcaaugcugc gucuu
2165	ugcacuuugc aaugcugcug ucuuc
2166	gcacuuugca augcugcugc cuucu
2167	cacuuugca augcugcugc uucuu
2168	acuuugcaau gcugcuguc ucuug
2169	cuuugcaaug cugcugucuu cuugc
2170	uuugcaaugc ugcugucuu uugcu
2171	uugcaaugc gcugucuu ugcua
2172	ugcaaugcug cugucuuu gcuaa
2173	gcaaugcugc ugucuuuug cuaug
2174	caaugcugc ucucuuuugc uauga
2175	aaugcugcug ucucuuuugc augaa
2176	augcugcugc ucucuuuugc ugaau
2177	ugcugcugc ucucuuuugc gaaua
2178	gcugcugc ucucuuuugc auaaa
2179	cugcugcucuu cuugcuanga auaau
2180	ugcugcucuu cuugcuanga uaaua
2181	gcugcucuu cuugcuanga auaau

10

20

30

40

【表 7 - 5 2】

2182	cugucuucuu gcuaugaaua auguc
2183	ugucuucuuug cuaugaauaa uguca
2184	gucuucuuugc uaugaauaaau gucaa
2185	ucuuucuuugcu augaauaaug ucaau
2186	cuucuuugcua ugaauaaugu caauc
2187	uucuuugcuau gaauaauguc aauc
2188	ucuuugcuauug aauaauguca auccg
2189	cuugcuauuga auaaugucaa uccga
2190	uugcuauugaa uaaugucaau ccgac
2191	ugcuauugaau aaugucaauc cgacc
2192	gcuaugaaua augucaaucc gaccu
2193	cuaugaauaa ugucaauccg accug
2194	uaugaauaaau gucaauccga ccuga
2195	augaaauaug ucaauccgac cugag
2196	ugaauaaugu caauccgacc ugagc
2197	gaauaauguc aaucgaccu gagcu
2198	aaauaauguca auccgaccug agcuu
2199	aaauauguca uccgaccuga gcuuu
2200	uaauugucaau ccgaccugag cuuug
2201	aaugucaauc cgaccugagc uuugu
2202	augucaaucc gaccugagcu uuugu
2203	ugucaauccg accugagcuu uguug
2204	gucaauccga ccugagcuuu guugu
2205	ucaauccgac cugagcuuug uugua
2206	caauccgacc ugagcuuugu uguag
2207	aaucgaccu gagcuuuguu guaga
2208	auccgaccug agcuuuguug uagac
2209	uccgaccuga gcuuuguugu agacu
2210	ccgaccugag cuuuguugua gacua
2211	cgaccugagc uuuguuguag
2212	cgaccugagc uuuguuguag acuai
2213	gaccugagcu uuuguuguaga cuauc
2214	accugagcuu uguuguagac uauca
2215	ccugagcuuu guuguagacu auc
2216	gcuuuucuuu uaguugcugc ucuuu
2217	cuuuucuuuu aguugcugcu cuuuu
2218	uuuuucuuua guugcugcuc uuuu
2219	uuucuuuuag uugcugcucu uuucc
2220	uucuuuuagu ugcugcucu uucca
2221	ucuuuuaguu gcugcucuuu uccag
2222	cuuuuaguug cugcucuuuu ccagg
2223	uuuuaguugc ugcucuuuuc caggu
2224	uuuaguugcu gcucuuuucc agguu
2225	uuaguugcug cucuuuucca gguuc

10

20

30

40

【表 7 - 5 3】

2226	uaguugcugc ucuuuuccag guuca
2227	aguugcugcu cuuuuccagg uucaa
2228	guugcugcuc uuuuccaggu ucaag
2229	uugcugcucu uuuccagguu caagu
2230	ugcugcucuu uuccagguuc aagug
2231	gcugcucuuu uccagguuca agugg
2232	cugcucuuuu ccagguuca guggg
2233	ugcucuuuuc cagguucaag uggga
2234	gcucuuuucc agguucaagu gggac
2235	cucuuuucca gguucaagug ggaua
2236	ucuuuuccag guucaagugg gauac
2237	ucuuuuccag guucaagugg
2238	cuuuuccagg uucaaguggg auacu
2239	uuuuccaggu ucaaguggga uacua
2240	uuuccagguu caagugggau acuag
2241	uuccagguuc aagugggaua cuagc
2242	uccagguuca agugggauac uagca
2243	ccagguuca gugggauacu agcaa
2244	cagguucaag ugggauacua gcaau
2245	agguucaagu gggauacuag caaug
2246	gguucaagug ggauacuagc aaugu
2247	guucaagugg gauacuagca auguu
2248	uucaaguggg auacuagca uguua
2249	ucaaguggga uacuagcau guuau
2250	caagugggau acuagcaaug uuauc
2251	aagugggaua cuagcaaugu uaucu
2252	agugggauac uagcaauguu aucug
2253	gugggauacu agcaauguua ucugc
2254	ugggauacua gcaauguuau cugcu
2255	gggauacuag caauguuauc ugcuu
2256	ggauacuagc aauguuaucu gcuuc
2257	gauacuagca auguuauaucug cuucc
2258	auacuagcau uguuauaucug uuccu
2259	uacuagcau guuauaucugc uccuc
2260	acuagcaaug uuaucugcuu ccucc
2261	cuagcaaugu uaucugcuuc cucca
2262	uagcaauguu aucugcuucc uccaa
2263	agcaauguua ucugcuuccu ccaac
2264	gcaauguuau cugcuuccuc caacc
2265	caauguuauc ugcuuccucc aacca
2266	aauguuaucu gcuuccucca accau
2267	auguuauaucug cuuccucca ccaua
2268	uguuauaucug uuccuccaac cauaa
2269	ccaauagugg ucaguccagg agcua

10

20

30

40

【表 7 - 5 4】

2270	caauaguggu caguccagga gcuag
2271	aaugugguc aguccaggag cuagg
2272	auagugguca guccaggagc uaggu
2273	auagugguca guccaggagc u
2274	uaguggucag uccaggagcu agguc
2275	aguggucagu ccaggagcua ggucua
2276	guggucaguc caggagcuag gucag
2277	uggucagucc aggagcuagg ucagg
2278	ggucagucca ggagcuaggu caggc
2279	gucaguccag gagcuagguc aggcu
2280	ucaguccagg agcuagguca ggucg
2281	caguccagga gcuaggucag gcugc
2282	aguccaggag cuaggucagg cugcu
2283	guccaggagc uaggucaggc ugcuu
2284	uccaggagcu aggucaggcu gcuuu
2285	ccaggagcua ggucaggcug cuuug
2286	caggagcuag gucaggcugc uuugc
2287	aggagcuagg ucaggcugcu uugcc
2288	ggagcuaggu caggcugcuu ugccc
2289	gagcuagguc aggcugcuuu gcccu
2290	agcuagguca ggucgcuuug ccuc
2291	gcuaggucag gcugcuuugc ccuca
2292	cuaggucagg cugcuuugcc cucag
2293	uaggucaggc ugcuuugccc ucagc
2294	aggucaggcu gcuuugcccu cagcu
2295	ggucaggcug cuuugcccuc agcuc
2296	gucaggcugc uuugcccuca gcucu
2297	ucaggcugcu uugcccucag cucuu
2298	caggcugcuu ugcccucagc ucuug
2299	aggcugcuuu gccucagcu cuuga
2300	ggcugcuuug ccucagcuc uugaa
2301	gcugcuuugc ccucagcucu ugaag
2302	cugcuuugcc cucagcucu gaagu
2303	ugcuuugccc ucagcucuug aagua
2304	gcuuugcccu cagcucuuga aguaa
2305	cuuugcccuc agcucuugaa guaaa
2306	uuugcccuca gcucuugaag uaaac
2307	uugcccucag cucuugaagu aaacg
2308	ugcccucagc ucuugaagua aacgg
2309	gccucagcu cuugaagua acggu
2310	cccucagcuc uugaaguaaa cgguu
2311	ccucagcucu ugaaguuaaac
2312	ccucagcucu ugaaguuaaac g
2313	cucagcucu gaaguuaaacg

10

20

30

40

【表 7 - 5 5】

2314	guaccuccaa caucaaggaa gaugg
2315	uaccuccaac aucaaggaag auggc
2316	accuccaaca ucaaggaaga uggca
2317	ccuccaacau caaggaagau ggcau
2318	cuccaacauc aaggaagaug gcauu
2319	uccaacauca aggaagaugg cauuu
2320	ccaacaucua ggaagauggc auuuc
2321	caacaucag gaagauggca uuucu
2322	aacaucagg aagauggcau uucua
2323	acaucaggga agauggcauu ucuag
2324	caucaaggaa gauggcauuu cuagu
2325	aucaaggaag auggcuuuc uaguu
2326	ucaaggaaga uggcauuucu aguuu
2327	caaggaagau ggcauuucua guuug
2328	aaggaagaug gcauuucuag uuugg
2329	aggaagaugg cauuucuagu uugga
2330	ggaagauggc auuucuaguu uggag
2331	gaagauggca uuucuaguuu ggaga
2332	aagauggcau uucuaguug gagau
2333	agauggcauu ucuaguugga agaug
2334	gauggcauuu cuaguugga gaugg
2335	auggcuuuc uaguuggag auggc
2336	uggcauuucu aguuuggaga uggca
2337	ggcauuucua guuuggagau ggcag
2338	gcauuucuag uuuggagau gcauu
2339	cauuucuagu uggagaugg caguu
2340	auuucuaguu uggagauggc aguuu
2341	uuucuaguuu ggagauggca guuuc
2342	uucuaguug gagauggcag uuucc
2343	ucuaguugga agauggcagu uuucc
2344	cuaguugga gauggcaguu uccuu
2345	uaguuggag auggcaguuu ccuaa
2346	aguuggaga uggcaguuuc cuuag
2347	guuuggagau ggcaguuucc uuagu
2348	uuuggagau ggcaguuucc uagua
2349	uuggagaugg caguuuccuu aguaa
2350	uggagauggc aguuuccua guaac
2351	gagauggcag uuuccuagu aacca
2352	agauggcagu uuccuagua accac
2353	gauggcaguu uccuaguaa ccaca
2354	auggcaguuu ccuaguaac cacag
2355	uggcaguuuc cuuaguaacc acagg
2356	ggcaguuucc uuaguaacca caggu
2357	gcaguuuccu uaguaaccac agguu

10

20

30

40

【表 7 - 5 6】

2358	caguuccuu aguaaccaca gguug
2359	aguuuccuua guaaccacag guugu
2360	guuuccuag uaaccacagg uugug
2361	uuuccuuagu aaccacaggu ugugu
2362	uuccuuagua accacagguu guguc
2363	uccuuaguaa ccacagguug uguca
2364	ccuuaguaac cacagguugu gucac
2365	cuuaguaacc acagguugug ucacc
2366	uuaguaacca cagguugugu cacca
2367	uaguaaccac agguuguguc accag
2368	aguaaccaca gguuguguca ccaga
2369	guaaccacag guugugucac cagag
2370	uaaccacagg uugugucacc agagu
2371	aaccacaggu ugugucacca gagua
2372	accacagguu gugucaccag aguaa
2373	ccacagguug ugucaccaga guaac
2374	cacagguugu gucaccagag uaaca
2375	acagguugug ucaccagagu aacag
2376	cagguugugu caccagagua acagu
2377	agguuguguc accagaguaa caguc
2378	gguuguguca ccagaguaac agucu
2379	guugugucac cagaguaaca gucug
2380	uugugucacc agaguaacag ucuga
2381	ugugucacca gaguaacagu cugag
2382	gugucaccag aguaacaguc ugagu
2383	ugucaccaga guaacagucu gagua
2384	gucaccagag uaacagucug aguag
2385	ucaccagagu aacagucuga guagg
2386	caccagagua acagucugag uagga
2387	accagaguaa cagucugagu aggag
2388	agccucuuga ugcuggucu uguuu
2389	gccucuugau ugcuggucu guuuu
2390	ccucuugauu gcuggucuug uuuuu
2391	ccucuugauu gcuggucuug
2392	cucuugauug cuggucuugu uuuuc
2393	ucuugauugc uggucuuguu uuuca
2394	cuugauugcu ggucuuguuu uucaa
2395	uugauugcug gucuuguuuu ucaaa
2396	ugauugcugg ucuuguuuuu caaau
2397	gauugcuggu cuuguuuuuc aaauu
2398	gauugcuggu cuuguuuuuc
2399	auugcugguc uuguuuuuc aauuu
2400	uugcuggucu uguuuuuc aaauu
2401	ugcuggucu guuuuuc aaauu

10

20

30

40

【表 7 - 5 7】

2402	gcuggucuuug uuuucaaau uuugg
2403	cuggucuuugu uuuucaaau uuggg
2404	uggucuuugu uuuucaaau ugggc
2405	ggucuuugu uuuucaaau gggca
2406	gucuuugu uuuucaaau ggcag
2407	ucuuugu uuuucaaau ggcag
2408	cuuuuuuuuc aaauuuuggg cagcg
2409	uuuuuuuca aaauuuuggg agcgg
2410	uuuuuuuca aaauuuuggg cgggu
2411	guuuuucaaa uuuuugggag cggua
2412	uuuuucaaau uuuuugggag gguaa
2413	uuuucaaau uuuuugggag gaaau
2414	uuucaaauuu ugggcagcgg uaaug
2415	uucaaauuuu gggcagcggg aauga
2416	ucaaaauuuu ggcagcggua augag
2417	caaaauuuu ggcagcggua ugagu
2418	aaaauuuuggg cagcgguaau gaguu
2419	aaauuuuggg agcgguaaug aguuc
2420	aaauuuuggg cgguaaaua guucu
2421	uuuuugggag cgguaaaua guucu
2422	uuuuugggag gguaaugagu ucuuc
2423	uuuuugggag gaaugagu cuucc
2424	uuuuugggag uaaugagu uucca
2425	uuuuugggag aaugagu uucca
2426	uuuuugggag augagu uucca
2427	uuuuugggag ugagu uucca
2428	uuuuugggag gagu uucca
2429	uuuuugggag aguu uucca
2430	uuuuugggag guuu uucca
2431	uuuuugggag guuu uucca
2432	uuuuugggag guuu uucca
2433	uuuuugggag guuu gg
2434	uuuuugggag guuu ggcag
2435	uuuuugggag guuu ggcag
2436	uuuuugggag guuu ggcag
2437	uuuuugggag guuu acgcc
2438	uuuuugggag guuu cgccu
2439	uuuuugggag guuu gccuc
2440	uuuuugggag guuu ccucu
2441	uuuuugggag guuu cucug
2442	uuuuugggag guuu ucugu
2443	uuuuugggag guuu cuguu
2444	uuuuugggag guuu uguuc
2445	uuuuugggag guuu guucc

10

20

30

40

【表 7 - 5 8】

2446	uccaacuggg gacgccucug uucca
2447	ccaacugggg acgccucugu uucca
2448	caacugggga cggccucugu ccaaa
2449	aacuggggac gccucuguuc caaa
2450	acuggggacg ccucuguuucc aauc
2451	cuggggacgc cucuguucca aauc
2452	uggggacgcc ucuguuccaa auccu
2453	ggggacgccu cuguuccaaa uccug
2454	gggacgccuc uguuccaaa ccugc
2455	ggacgccuc guuccaaauc cugca
2456	gacgccucug uuccaaauc ugcau
2457	cucuggccug uccuaagacc ugcuc
2458	ucuggccugu ccuaagaccu gcuca
2459	uggccugucc uaagaccugc ucagc
2460	ggccuguccu aagaccugc cagcu
2461	gccuguccua agaccugcuc agcuu
2462	ccuguccuaa gaccugcuca gcuuc
2463	cuguccuaag accugcucag cuucu
2464	uguccuaaga ccugcucagc uucuu
2465	guccuaagac cugcucagcu ucuuc
2466	uccuaagacc ugcucagcuu cuucc
2467	ccuaagaccu gcucagcuuc uccu
2468	cuaagaccug cucagcuuc uccu
2469	uaagaccugc ucagcuucuu ccua
2470	aagaccugcu cagcuucuc cuuag
2471	agaccugcuc agcuucucc uuagc
2472	gaccugcuca gcuuuuccu uagcu
2473	accugcucag cuucuuuccu agcuu
2474	ccugcucagc uucuuuccua gcuuc
2475	cugcucagcu ucuuuccuag cuucc
2476	ugcucagcuu cuuccuagc uucca
2477	gcucagcuuc uuccuagcu uccag
2478	cucagcuuc uccuagcuu ccagc
2479	ucagcuucuu ccuagcuuc cagcc
2480	cagcuucuc cuuagcuucc agcca
2481	agcuucucc uuagcuucc gccau
2482	gcuuuuccu uagcuuccag ccuu
2483	cuucuuuccu agcuuccagc cauug
2484	uucuuuccua gcuuuccagcc auugu
2485	ucuuuccuag cuuccagcca uugug
2486	cuuccuagc uuccagccau ugugu
2487	uuccuagcu uccagccauu guguu
2488	uccuagcuu ccagccauug uguug
2489	ccuagcuuc cagccauugu guuga

10

20

30

40

【表 7 - 5 9】

2490	cuuagcuucc agccauugug uugaa
2491	uuagcuucca gccauugugu ugaau
2492	uagcuuccag ccuuguguu gaau
2493	agcuuccagc cauuguguug aauc
2494	gcuuccagcc auuguguuga auccu
2495	cuuccagcca uuguguugaa uccuu
2496	uuccagccau uguguugaau ccuuu
2497	uccagccauu guguugaauc cuuua
2498	ccagccauug uguugaaucc uuuaa
2499	cagccauugu guugaauccu uuaac
2500	agccauugug uugaauccuu uaaca
2501	gccauugugu ugaauccuuu aacau
2502	ccauuguguu gaauccuuua acuuu
2503	cauuguguug aaucuuuuua cauuu
2504	cauuuuugac cuacaugugg
2505	uuugaccuac auguggaaag
2506	uacauuuuug accuacaugu ggaaag
2507	ggucuccuua ccuuga
2508	ucuuaccuau gacuauggau gaga
2509	auuuuugacc uacaugggaa ag
2510	uacgaguuga uuugcggacc cag
2511	guggucuccu uaccuagac ugugg
2512	ugucucagua aucuucuuac cuau
2513	ugcauguucc agucguugug ugg
2514	cacuauucca gucaauagg ucugg
2515	auuuaccaac cuucaggauc gagua
2516	ggccuaaaac acauacacau a
2517	cccugaggca uucccaucuu gaau
2518	aggacuacu ugcuuuuuu
2519	cuugaauua ggagauucau cug
2520	caucuucuga uauuuuuccu guu
2521	ccauuacagu ugucuguguu
2522	ugacagccug ugaaucugu gag
2523	uaaucugccu cuucuuuugg
2524	cagcaguagu ugucaucugc
2525	gccugagcug aucugcuggc aucuugc
2526	gccugagcug aucugcuggc aucuugcagu u
2527	ucugcuggca ucuugc
2528	gccgguugac uucauccugu gc
2529	gucugcaucc aggaacaugg guc
2530	uacuuacugu cuguagcucu uucu
2531	cugcauccag gaacaugggu cc
2532	guugaagauc ugauagccgg uuga
2533	ucagcuucug uuagccacug

10

20

30

40

【表 7 - 6 0】

2534	uucagcuucu guuagccacu
2535	uucagcuucu guuagccacu g
2536	ucagcuucug uuagccacug a
2537	uucagcuucu guuagccacu ga
2538	ucagcuucug uuagccacug a
2539	uucagcuucu guuagccacu ga
2540	ucagcuucug uuagccacug au
2541	uucagcuucu guuagccacu gau
2542	ucagcuucug uuagccacug auu
2543	uucagcuucu guuagccacu gauu
2544	ucagcuucug uuagccacug auua
2545	uucagcuucu guuagccacu gaua
2546	ucagcuucug uuagccacug auuaa
2547	uucagcuucu guuagccacu gauuaa
2548	ucagcuucug uuagccacug auuaaa
2549	uucagcuucu guuagccacu gauuaaa
2550	cagcuucugu uagccacug
2551	cagcuucugu uagccacuga u
2552	agcuucuguu agccacugau u
2553	cagcuucugu uagccacuga uu
2554	agcuucuguu agccacugau ua
2555	cagcuucugu uagccacuga uua
2556	agcuucuguu agccacugau uaa
2557	cagcuucugu uagccacuga uuaa
2558	agcuucuguu agccacugau uaaa
2559	cagcuucugu uagccacuga uuaaa
2560	agcuucuguu agccacugau uaaa
2561	agcuucuguu agccacugau
2562	gcuucuguua gccacugauu
2563	agcuucuguu agccacugau u
2564	gcuucuguua gccacugauu a
2565	agcuucuguu agccacugau ua
2566	gcuucuguua gccacugauu aa
2567	agcuucuguu agccacugau uaa
2568	gcuucuguua gccacugauu aaa
2569	agcuucuguu agccacugau uaaa
2570	gcuucuguua gccacugauu aaa
2571	ccauuugau uuagcauguu ccc
2572	agauaccuu uguauuuagc
2573	gccauuucuc aacagaucu
2574	gccauuucuc aacagaucug uca
2575	auucucagga auuugugucu uuc
2576	ucucaggaau uuugucuuu c
2577	guucagcuuc uguuagcc

10

20

30

40

【表 7 - 6 1】

2578	cugauuaau aucuuuauau c
2579	gccgccauuu cucaacag
2580	gccgccauuu cucaacag
2581	caggauuuug ugucuuuc
2582	uuugccgcug cccaugcca uccug
2583	auucaauguu cugacaacag uuugc
2584	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
2585	caguugcauu caauguucug ac
2586	aguugcauuc aauguucuga
2587	gauugcugaa uuauuucuu c
2588	gauugcugaa uuauuucuu cccag
2589	auugcugaa uauuucuucc ccagu
2590	uugcugaaau auuucuuccc caguu
2591	ugcugaaaua uuucuucccc aguug
2592	gcugaauuau uuucuuccca guugc
2593	cugaauuauu ucuucccag uugca
2594	ugaauuauuu cuucccagu ugcau
2595	gaauuauuuc uucccaguu gcauu
2596	aaauauuuc ucccaguug cauuc
2597	aaauuucuu cccaguugc auuca
2598	uuauuucuu cccaguugca uucaa
2599	uuuucuucc ccaguugcau ucaau
2600	auuucuuccc caguugcauu caaug
2601	uuucuucccc aguugcauuc aaugu
2602	uuucuuccca guugcauua auguu
2603	ucuucccag uugcauuaa uguuc
2604	cuucccagu ugcauuaa guucu
2605	uucccaguu gcauuaaug uucug
2606	ucccaguug cauuaaagu ucuga
2607	cccaguugc auucaauguu cugac
2608	cccaguugca uucaauguuc ugaca
2609	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
2610	caguugcauu caauguucug acaac
2611	aguugcauuc aauguucuga caaca
2612	uccuguagaa uacuggcauc
2613	ugcagaccuc cugccaccgc agauuca
2614	uugcagaccu ccugccaccg cagauucagg cuuc
2615	guugcauua auguucugac aacag
2616	uugcauuaa uguucugaca acagu
2617	ugcauuaa guucugaca caguu
2618	gcauuaaug uucugacaac aguuu
2619	cauuaaagu ucugacaaca guuug
2620	auucaauguu cugacaacag uuugc
2621	ucaauguucu gacaacaguu ugccg

10

20

30

40

【表 7 - 6 2】

2622	caanguucug acaacaguuu gccgc
2623	aauguucuga caacaguuug ccgcu
2624	auguucugac aacaguuugc cgcug
2625	uguucugaca acaguuugcc gcugc
2626	guucugacaa caguuugccg cugcc
2627	uucugacaac aguuugccgc ugccc
2628	ucugacaaca guuugccgcu gccca
2629	cugacaacag uuugccgcug ccca
2630	ugacaacagu uuugccgcug ccaau
2631	gacaacaguu ugccgcugcc caaug
2632	acaacaguuu gccgcugccc aaugc
2633	caacaguuug ccgcugccca augcc
2634	aacaguuugc cgcugcccaa ugcca
2635	acaguuugcc gcugcccaau gccau
2636	caguuugccg cugcccaaug ccauc
2637	aguuugccgc ugcccaaugc caucc
2638	guuugccgcu gcccaaugcc auccu
2639	uuugccgcug cccaugcca uccug
2640	uuugccgcug ccaaugccau ccugg
2641	ugccgcugcc caaugccauc cugga
2642	gccgcugccc aaugccauc uggag
2643	ccgcugccca augccauc uggagu
2644	cgugcccaa ugccaucug gaguu
2645	uguuuugag gauugcugaa
2646	uguucugaca acaguuugcc gcugcccaau gccaucugg
2647	cuguugcagu aaucuaugag
2648	ugcaguaauc uaugaguuc
2649	gagucuucua ggagccuu
2650	ugccauuguu ucaucagcuc uuu
2651	uccuguagga cauuggcagu
2652	cuuggagucu ucuaggagcc
2653	uaggugccug ccggcuu
2654	uucagcugua gccacacc
2655	cugaacugcu ggaaagucgc c
2656	cuggcuucca aaugggaccu gaaaaagaac
2657	cauuuuucc cacucaguau u
2658	uugaaguucc uggagucuu
2659	uccucaggag gcagcucuaa au
2660	uggcucucuc ccaggg
2661	gagauggcuc ucuccaggg acccugg
2662	gggcacuuug uuuggcg
2663	gguccagca aguuguuug
2664	ugggaugguc ccagcaaguu guuug
2665	guagagcucu gucauuuugg g

10

20

30

40

【表 7 - 6 3】

2666	gcucaagaga uccacugcaa aaaac
2667	gccauacgua cguaucuaaa acauuc
2668	ucugcaggau auccaugggc ugguc
2669	gauccuccu guucguccc uauuug
2670	ugcuuugac uccuguaccu gaua
2671	ggcggccuuu guguugac
2672	ggacaggccu uuauguucgu gcugc
2673	ccuuuanguu cgugcugcu
2674	ccucagcucu ugaaguaaac gguuu
2675	cucagcucu gaaguaaacg guuuu
2676	ucagcucuug aaguaaacgg uuuac
2677	cagcucuuga aguaaacggu uuacc
2678	agcucuugaa guaaacgguu uaccg
2679	gcucuugaag uaaacgguuu accgc
2680	cucuugaagu aaacgguuuu ccgcc
2681	guaccuccaa caucaaggaa gaugg
2682	uaccuccaac aucaaggaag auggc
2683	accuccaaca ucaaggaaga uggca
2684	ccuccaacu caaggaagau ggcau
2685	cuccaacauc aaggaagau gcauu
2686	uccaacauc aggaagau gcauu
2687	ccaacauc ggaagau gcauu
2688	caacauc gaagau gcauu
2689	aacauc aagau gcauu
2690	acauc aagau gcauu
2691	cauc aagau gcauu
2692	auc aagau gcauu
2693	ucaaggaaga uggcauuuc aguuu
2694	caaggaagau ggcauuucua guuug
2695	aaggaagau gcauuucua guuug
2696	aggaagau gcauuucua guuug
2697	ggaagau gcauuucua guuug
2698	gaagau gcauuucua guuug
2699	aagau gcauuucua guuug
2700	agau gcauuucua guuug
2701	gau gcauuucua guuug
2702	augcauuuc uaguuggag auggc
2703	uggcauuuc aguuuggaga uggca
2704	ggcauuucua guuuggagau ggcag
2705	gcauuucua guuuggagau ggcag
2706	cauuucua guuuggagau ggcag
2707	auuucua guuuggagau ggcag
2708	uuucua guuuggagau ggcag
2709	uucua guuuggagau ggcag

10

20

30

40

【表 7 - 6 4】

2710	ucuaguuugg agauggcagu uuccu
2711	cuaguuugga gauggcaguu uccuu
2712	uaguuuggag auggcaguuu ccuaa
2713	aguugggaga uggcaguuuc cuuag
2714	guuuggagau ggcaguuucc uuagu
2715	uuuggagaug gcaguuuccu uagua
2716	uuggagaugg caguuuccuu aguaa
2717	uggagauggc aguuuccuaa guaac
2718	gagauggcag uuuccuagu aacca
2719	agauggcagu uuccuagua accac
2720	gauggcaguu uccuaguaa ccaca
2721	auggcaguuu ccuaguaac cacag
2722	uggcaguuuc cuuaguaacc acagg
2723	ggcaguuucc uuaguaacca caggu
2724	gcaguuuccu uaguaaccac agguu
2725	caguuuccuu aguaaccaca gguug
2726	aguuccuua guaaccacag guugu
2727	guuccuag uaaccacagg uugug
2728	uuuccuagu aaccacaggu ugugu
2729	uuccuagua accacagguu guguc
2730	uccuaguaa ccacagguug uguca
2731	ccuaguaac cacagguugu gucac
2732	cuuaguaacc acagguugug ucacc
2733	uuaguaacca cagguugugu cacca
2734	uaguaaccac agguuguguc accag
2735	aguaaccaca gguuguguca ccaga
2736	guaaccacag guugugucac cagag
2737	uaaccacagg uugugucacc agagu
2738	aaccacaggu ugugucacca gagua
2739	accacagguu gugucaccag aguaa
2740	ccacagguug ugucaccaga guaac
2741	cacagguugu gucaccagag uaaca
2742	acagguugug ucaccagagu aacag
2743	cagguugugu caccagagua acagu
2744	agguuguguc accagaguaa caguc
2745	gguuguguca ccagaguaac agucu
2746	guugugucac cagaguaaca gucug
2747	uugugucacc agaguaacag ucuga
2748	ugugucacca gaguaacagu cugag
2749	gugucaccag aguaacaguc ugagu
2750	ugucaccaga guaacagucu gagua
2751	gucaccagag uaacagucug aguag
2752	ucaccagagu aacagucuga guagg
2753	caccagagua acagucugag uagga

10

20

30

40

【表 7 - 6 5】

2754	accagaguaa cagucugagu aggag
2755	uuugccgcug cccaugcca uccug
2756	auucaauguu cugacaacag uuugc
2757	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
2758	caguugcauu caauguucug ac
2759	aguugcauuc aauguucuga
2760	gauugcugaa uuauuucuc c
2761	gauugcugaa uuauuucuc cccag
2762	auugcugaau uuauuucucc ccagu
2763	uugcugaauu auuucuccc caguu
2764	ugcugaauua uuucucccc aguug
2765	gcugaauuau uucucccca guugc
2766	cugaauuauu ucuccccag uugca
2767	ugaauuauuu cuuccccagu ugcau
2768	gaauuauuuc uuccccaguu gcauu
2769	aaauauuuc uuccccaguug cauuc
2770	auuauuucuu cccagauugc auuca
2771	uuauuucuc cccagauugca uucaa
2772	uauuucucc ccagauugcau ucaau
2773	auuucuccc caguugcauu caaug
2774	uuucucccc aguugcauuc aaugu
2775	uucucccca guugcauua auguu
2776	ucuccccag uugcauucua uguuc
2777	cuuccccagu ugcauucuu guucu
2778	uuccccaguu gcauucuaug uucug
2779	uccccaguug cauucuaugu ucuga
2780	cccagauugc auucaauguu cugac
2781	cccagauugca uucaauguuc ugaca
2782	ccaguugcau ucaauguucu gacaa
2783	caguugcauu caauguucug acaac
2784	aguugcauuc aauguucuga caaca
2785	uccuguagaa uacuggcauc
2786	ugcagaccuc cugccaccgc agauuca
2787	uugcagaccu ccugccaccg cagauucagg cuuc
2788	guugcauua auguucugac aacag
2789	uugcauucua uguucugaca acagu
2790	ugcauucuu guucugacaa caguu
2791	gcauucuaug uucugacaac aguuu
2792	cauucuaugu ucugacaaca guuug
2793	auucaauguu cugacaacag uuugc
2794	ucaauguucu gacaacaguu ugccc
2795	caauguucug acaacaguuu gccgc
2796	aauguucuga caacaguuug ccgcu
2797	auguucugac aacaguuugc cgcug

10

20

30

40

【表 7 - 6 6】

2798	uguucugaca acaguuugcc gcugc
2799	guucugacaa caguuugccg cugcc
2800	uucugacaac aguugccgc ugccc
2801	ucugacaaca guuugccgcu gccca
2802	cugacaacag uuugccgcug ccca
2803	ugacaacagu uugccgcugc ccaau
2804	gacaacaguu ugccgcugcc caaug
2805	acaacaguuu gccgcugccc aaugc
2806	caacaguuug ccgcugccca augcc
2807	aacaguuugc cgcugcccaa ugcca
2808	acaguuugcc gcugcccaau gccau
2809	caguuugccg cugcccaaug ccauc
2810	aguugccgc ugcccaaugc caucc
2811	guuugccgcu gcccaaugcc auccu
2812	uuugccgcug cccaugcca uccug
2813	uuugccgcugc ccaaugccau ccugg
2814	ugccgcugcc caaugccauc cugga
2815	gccgcugccc aaugccauc ugag
2816	ccgcugccca augccaucuu ggagu
2817	cgcugcccaa ugccaucug gaguu
2818	uguuuuugag gauugcugaa
2819	uguucugaca acaguuugcc gcugcccaau gcccauccgg
2820	cucuggccug uccuaagacc uguc
2821	ucuggccugu ccuaagaccu gcuca
2822	cuggccuguc cuaagaccug cucag
2823	uggccugucc uaagaccugc ucagc
2824	ggccuguccu aagaccugcu cagcu
2825	gccuguccua agaccugcuc agcuu
2826	ccuguccuaa gaccugcua gcuuc
2827	cuguccuaag accugcucag cuucu
2828	uguccuaaga ccugcucagc uucuu
2829	guccuaagac cugcucagcu ucuuc
2830	uccuaagacc ugcucagcuu cuucc
2831	ccuaagaccu gcucagcuuc uuccu
2832	cuaagaccug cucagcuucu uccuu
2833	uaagaccugc ucagcuucu ccuaa
2834	aagaccugcu cagcuucuuc cuuag
2835	agaccugcuc agcuucuucc uuagc
2836	gaccugcua gcuucuuccu uagcu
2837	accugcucag cuucuuccu agcuu
2838	ccugcucagc uucuuccua gcuuc
2839	cugcucagcu ucuuccuag cuucc
2840	ugcucagcuu cuuccuagc uucca
2841	gcucagcuuc uuccuagcu uccag

10

20

30

40

【表 7 - 6 7】

2842	cucagcuucu uccuagcuu ccagc
2843	ucagcuucuu ccuagcuuc cagcc
2844	cagcuucuuu cuuagcuucc agcca
2845	agcuucuucc uuagcuucca gccau
2846	gcuucuuucc uagcuuccag ccuuu
2847	cuucuuuccu agcuuccagc cauug
2848	uucuuuccuu gcuuccagcc auugu
2849	ucuuuccuuag cuuccagcca uugug
2850	cuuccuuagc uuccagccau ugugu
2851	uuccuuagcu uccagccauu guguu
2852	uccuuagcuu ccagccauug uguug
2853	ccuuagcuuc cagccauugu guuga
2854	cuuagcuucc agccauugug uugaa
2855	uuagcuucca gccauugugu ugaau
2856	uagcuuccag ccuuuguguu gaauc
2857	agcuuccagc cauuguguug aaucc
2858	gcuuccagcc auuguguuga auccu
2859	cuuccagcca uuguguugaa uccuu
2860	uuccagccau uguguugaau ccuuu
2861	uccagccauu guguguugauc cuuua
2862	ccagccauug uguugaaucc uuuaa
2863	cagccauugu guugaauccu uuaac
2864	agccauugug uugaauccuu uaaca
2865	gccauugugu ugaauccuuu acaau
2866	ccauuguguu gaaucuuua acauu
2867	cauuguguug aaucuuuaa cauuu
2868	ucagcuucug uuagccacug
2869	uucagcuucu guuagccacu
2870	uucagcuucu guuagccacu g
2871	ucagcuucug uuagccacug a
2872	uucagcuucu guuagccacu ga
2873	ucagcuucug uuagccacug a
2874	uucagcuucu guuagccacu ga
2875	ucagcuucug uuagccacug au
2876	uucagcuucu guuagccacu gau
2877	ucagcuucug uuagccacug auu
2878	uucagcuucu guuagccacu gauu
2879	ucagcuucug uuagccacug auua
2880	uucagcuucu guuagccacu gaaa
2881	ucagcuucug uuagccacug auuaa
2882	uucagcuucu guuagccacu gaauaa
2883	ucagcuucug uuagccacug auuaaa
2884	uucagcuucu guuagccacu gaauaaa
2885	cagcuucugu uagccacug

10

20

30

40

【表 7 - 6 8】

2886	cagcuucugu uagccacuga u
2887	agcuucuguu agccacugau u
2888	cagcuucugu uagccacuga uu
2889	agcuucuguu agccacugau ua
2890	cagcuucugu uagccacuga uua
2891	agcuucuguu agccacugau uaa
2892	cagcuucugu uagccacuga uuaa
2893	agcuucuguu agccacugau uaaa
2894	cagcuucugu uagccacuga uaaaa
2895	agcuucuguu agccacugau uaaa
2896	agcuucuguu agccacugau
2897	gcuucuguua gccacugauu
2898	agcuucuguu agccacugau u
2899	gcuucuguua gccacugauu a
2900	agcuucuguu agccacugau ua
2901	gcuucuguua gccacugauu aa
2902	agcuucuguu agccacugau uaa
2903	gcuucuguua gccacugauu aaa
2904	agcuucuguu agccacugau uaaa
2905	gcuucuguua gccacugauu aaa
2906	ccauuugau uuagcauguu ccc
2907	aganaccuu uguauuuagc
2908	gccauuucuc aacagaucu
2909	gccauuucuc aacagaucug uca
2910	auucucagga auuugugucu uuc
2911	ucucaggaau uuugugucuuu c
2912	guucagcuuc uguuagcc
2913	cugauuaaa auuuuuauu c
2914	gccgccauuu cucaacag
2915	guauuuagca uguuicca
2916	caggaauuug ugucuuuc
2917	gcuuuuuuu uaguugcugc ucuuu
2918	cuuuuuuuu aguugcugcu cuuuu
2919	uuuuuuuuu guugcugcuc uuuuc
2920	uuuuuuuag uugcugcucu uuucc
2921	uuuuuuuagu ugcugcucu uucca
2922	uuuuuuagu gcugcucu uccag
2923	uuuuuaguug cugcucu uccagg
2924	uuuuaguugc ugcucu uccagg
2925	uuuaguugcu gcucu uccagg
2926	uuaguugcug cucuuuucca gguuc
2927	uaguugcugc uuuuuccag guuca
2928	aguugcugcu uuuuuccagg uucaa
2929	guugcugcuc uuuuuccagg ucaag

10

20

30

40

【表 7 - 6 9】

2930	uugcugcucu uuuccagguu caagu
2931	ugcugcucuu uuccagguuc aagug
2932	gcugcucuuu uccagguuca agugg
2933	cugcucuuuu ccagguuca guggg
2934	ugcucuuuuc cagguucaag uggga
2935	gcucuuuucc agguucaagu gggac
2936	cucuuuucca gguucaagug ggaua
2937	ucuuuuccag guucaagugg gauac
2938	ucuuuuccag guucaagugg
2939	cuuuuccagg uucaaguggg auacu
2940	uuuuccaggu ucaaguggga uacua
2941	uuuccagguu caagugggau acuag
2942	uuccagguuc aagugggaua cuagc
2943	uccagguuca agugggauac uagca
2944	ccagguuca gugggauacu agcaa
2945	cagguucaag ugggauacua gcaau
2946	agguucaagu gggauacuag caaug
2947	gguucaagug ggauacuagc aaugu
2948	guucaagugg gauacuagca auguu
2949	uucaaguggg auacuagcaa uguua
2950	ucaaguggga uacuagcau guuau
2951	caagugggau acuagcaaug uuauc
2952	aagugggaua cuagcaaugu uaucu
2953	agugggauac uagcaaugu aucug
2954	gugggauacu agcaauguua ucugc
2955	ugggauacua gcaauguuau cugcu
2956	gggauacuag caauguuauc ugcuu
2957	ggauacuagc aauguuaucu gcuuc
2958	gauacuagca auguuauaug cuucc
2959	auacuagcaa uguuauaugc uuccu
2960	uacuagcau guuauaugcu uccuc
2961	acuagcaaug uuauaugcu ccucc
2962	cuagcaaugu uauaugcuuc cucca
2963	uagcaaugu auaugcuucc uccaa
2964	agcaauguua ucugcuuccu ccaac
2965	gcaauguuau cugcuuccuc caacc
2966	caauguuauc ugcuuccuc aacca
2967	aauguuaucu gcuuccuca accau
2968	auguuauaug cuuccuccaa ccaua
2969	uguuauaugc uuccuccaac cauaa
2970	agccucuuga uugcuggucu uguuu
2971	gccucuugau ugucuggucu guuuu
2972	ccucuugau gcuggucuug uuuuu
2973	ccucuugau gcuggucuug

10

20

30

40

【表 7 - 7 0】

2974	cucuugauug cuggucuugu uuuuc
2975	ucuugauugc uggucuuguu uuuca
2976	cuugauugcu ggucuuguuu uucaa
2977	uugauugcug gucuuguuuu ucaaa
2978	ugauugcugg ucuuguuuuu caaau
2979	gauugcuggu cuuguuuuuu aaaa
2980	gauugcuggu cuuguuuuuu
2981	auugcugguc uuguuuuuca aaaa
2982	uugcuggucu uguuuuucaa aaaa
2983	ugcuggucu uuuuucaaa uuug
2984	gcuggucuug uuuucaaau uuugg
2985	cuggucuugu uuuucaaau uuugg
2986	uggucuugu uucaaaaau ugggc
2987	ggucuuguuu uucaaaaau uggca
2988	gucuuguuu ucaaaaau uggcag
2989	ucuuguuuu caaaaau uggcagc
2990	cuuguuuu aaaaau uggcagc
2991	uuguuuuca aaaaau uggcagc
2992	uguuuuca aaaaau uggcagc
2993	guuuucaaa uuuu uggcagc
2994	uuuucaaa uuuu uggcagc
2995	uuucaaau uuuu uggcagc
2996	uuucaaau uuuu uggcagc
2997	uuucaaau uuuu uggcagc
2998	uuucaaau uuuu uggcagc
2999	uuucaaau uuuu uggcagc
3000	uuucaaau uuuu uggcagc
3001	uuucaaau uuuu uggcagc
3002	uuucaaau uuuu uggcagc
3003	uuucaaau uuuu uggcagc
3004	uuucaaau uuuu uggcagc
3005	uuucaaau uuuu uggcagc
3006	uuucaaau uuuu uggcagc
3007	uuucaaau uuuu uggcagc
3008	uuucaaau uuuu uggcagc
3009	uuucaaau uuuu uggcagc
3010	uuucaaau uuuu uggcagc
3011	uuucaaau uuuu uggcagc
3012	uuucaaau uuuu uggcagc
3013	uuucaaau uuuu uggcagc
3014	uuucaaau uuuu uggcagc
3015	uuucaaau uuuu uggcagc
3016	uuucaaau uuuu uggcagc
3017	uuucaaau uuuu uggcagc

10

20

30

40

【表 7 - 7 1】

3018	aaugaguucu uccaacuggg gacgc
3019	augaguucuu ccaacugggg acgcc
3020	ugaguucuuc caacugggga cgccu
3021	gaguucuucc aacuggggac gccuc
3022	aguucuucca acuggggacg ccucu
3023	guucuucaa cuggggacgc cucug
3024	uucuucaac uggggacgcc ucugu
3025	ucuucaacu ggggacgccu cuguu
3026	cuuccaacug gggacgccuc uguuc
3027	uuccaacugg ggacgccucu guucc
3028	uccaacuggg gacgccucug uucca
3029	ccaacugggg acgccucugu uccaa
3030	caacugggga cgccucuguu caaa
3031	aacuggggac gccucuguuc caaau
3032	acuggggacg ccucuguucc aaauc
3033	cuggggacgc cucuguucca aaucc
3034	uggggacgcc ucuguuccaa auccu
3035	ggggacgccu cuguuuccaa uccug
3036	gggacgccuc uguuccaaau ccugc
3037	ggacgccucu guuccaauc cugca
3038	gacgccucug uuccaaaucc ugcua
3039	ccaauagugg ucaguccagg agcua
3040	caauaguggu caguccagga gcua
3041	aaugugguc aguccaggag cuagg
3042	auagugguca guccaggagc uaggu
3043	auagugguca guccaggagc u
3044	uaguggucag uccaggagcu agguc
3045	aguggucagu ccaggagcua gguc
3046	guggucaguc caggagcuag gucag
3047	uggucaguucc aggagcuagg ucagg
3048	ggucagucca ggagcuaggu caggc
3049	gucaguccag gagcuagguc aggcu
3050	ucaguccagg agcuagguca ggucg
3051	caguccagga gcuaggucag gcugc
3052	aguccaggag cuaggucagg cugcu
3053	guccaggagc uaggucaggc ugcuu
3054	uccaggagcu aggucaggcu gcuuu
3055	ccaggagcua ggucaggcug cuuug
3056	caggagcuag gucaggcugc uuugc
3057	aggagcuagg ucaggcugcu uugcc
3058	ggagcuaggu caggcugcuu ugccc
3059	gagcuagguc aggcugcuuu gcccu
3060	agcuagguca ggcugcuuug ccuc
3061	gcuaggucag gcugcuuugc ccuca

10

20

30

40

【表 7 - 7 2】

3062	cucagcucuu gaaguaaacg guuuu
3063	cagcucuuga aguaaacggu uuacc
3064	gcucuugaag uaaacgguuu accgc
3065	cuaggucagg cugcuuugcc cucag
3066	uaggucaggc ugcuuugccc ucagc
3067	aggucaggcu gcuuugcccu cagcu
3068	ggucaggcug cuuugcccuc agcuc
3069	gucaggcugc uuugcccua gcucu
3070	ucaggcugcu uugcccucag cucuu
3071	caggcugcuu ugcccucagc ucuug
3072	aggcugcuuu gcccucagcu cuuga
3073	ggcugcuuug ccucagcuc uugaa
3074	gcugcuuugc ccucagcucu ugaag
3075	cugcuuugcc cucagcucuu gaagu
3076	ugcuuugccc ucagcucuug aagua
3077	gcuuugcccu cagcucuuga aguaa
3078	cuuugcccuc agcucuugaa guaaa
3079	uuugcccua gcucuugaag uaaac
3080	uugcccucag cucuugaagu aaacg
3081	ugcccucagc ucuugaagua aacgg
3082	gcccucagcu cuugaagua acggu
3083	ccucagcuc uugaaguaaa cgguu
3084	ccucagcucu ugaaguaaac
3085	ccucagcucu ugaaguaaac g
3086	cucagcucuu gaaguaaacg
3087	ccucagcucu ugaaguaaac gguuu
3088	ucagcucuug aaguaaacgg uuuac
3089	agcucuugaa guaaacgguu uaccg
3090	cucuugaagu aaacgguuuu ccgcc
3091	ccacaggcgu ugcacuuugc aaugc
3092	cacaggcguu gcacuuugca augcu
3093	acaggcguug cacuuugcaa ugcug
3094	caggcguugc acuuugcaau gcugc
3095	aggcguugca cuuugcaaug cugcu
3096	ggcguugcac uuugcaaugc ugcug
3097	gcuugcacu uugcaaugcu gcugu
3098	cguugcacuu ugcaaugcug cuguc
3099	cguugcacuu ugcaaugcug cug
3100	guugcacuuu gcaaugcugc ugucu
3101	uugcacuuug caaugcugcu gucuu
3102	ugcacuuugc aaugcugcug ucuuc
3103	gcacuuugca augcugcugu cuucu
3104	cacuuugcaa ugcugcuguc uuucu
3105	acuuugcaau gcugcugucu ucuug

10

20

30

40

【表 7 - 7 3】

3106	cuuugcaaug cugcugucuu cuugc
3107	uuugcaaugc ugcugucuu ucugc
3108	uugcaaugcu gcugucuu ucugc
3109	ugcaaugcug cugucuuuu gcua
3110	gcaaugcugc ugucuuuu cuugc
3111	caaugcugcu gucuuuugc uauga
3112	aaugcugcug ucuuuugcu augaa
3113	augcugcugu cuuuugcua ugaau
3114	ugcugcuguc ucuuuugcu gaaua
3115	gcugcugucu ucuugcuaug aauaa
3116	cugcugucuu cuugcuauga auuu
3117	ugcugucuu ucugcuauga uauug
3118	gcugucuu ucugcuauga auuu
3119	cugucuuuu gcuaugaau auguc
3120	ugucuuuu cuugcuauga uuu
3121	gucuuuu ucugcuauga uuu
3122	ucuuuuugc augaauuu ucuu
3123	cuuuugcua ugaauuuuu cauc
3124	uuuuugcua gaauuuuu auuc
3125	ucuuugcua auuuuuuu auccg
3126	cuugcuauga auuuuuuu uccga
3127	uuugcuauga auuuuuuu ccgac
3128	ugcuaugaau auuuuuuu cgacc
3129	gcuuuuuuu auuuuuuu gaccu
3130	cuuuuuuu uuuuuuuu accug
3131	uuuuuuuu guuuuuuu ccuga
3132	uuuuuuuu uuuuuuuuu cugag
3133	uuuuuuuu auuuuuuu ugagc
3134	uuuuuuuu auuuuuuu gagcu
3135	uuuuuuuu auuuuuuu agcuu
3136	uuuuuuuu auuuuuuu gcuuu
3137	uuuuuuuu auuuuuuu cuuuu
3138	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3139	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3140	uuuuuuuu auuuuuuu uguug
3141	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3142	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3143	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3144	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3145	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3146	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3147	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3148	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu
3149	uuuuuuuu auuuuuuu uuugu

10

20

30

40

【表 7 - 7 4】

3150	gaccugagcu uuguuguaga cuauc
3151	accugagcuu uguuguagac uauca
3152	ccugagcuuu guuguagacu auc
3153	cauuuuugac cuacaugugg
3154	uuugaccuac auguggaaag
3155	uacauuuuug accuacaugu ggaaag
3156	ggucuccua ccuauga
3157	ucuuaccuau gacuauggau gaga
3158	auuuuugacc uacaugggaa ag
3159	uacgaguuga uugucggacc cag
3160	guggucuccu uaccuauagac ugugg
3161	ugucucagua aucuucuac cuau
3162	ugcauguucc agucguugug ugg
3163	cacauuucca gucaauagg ucugg
3164	auuuaccaac cuucaggauc gagua
3165	ggccuaaaac acauacacau a
3166	gauagguggu aucaacucu guaa
3167	gauagguggu aucaacucu g
3168	cuuccuggau ggcuugaau
3169	uguuguuguu uaugcucuu
3170	guacauuaag auggacuuc
3171	cuguugcagu aaucuauagag
3172	ugcaguaauc uaugaguuc
3173	gagucuucua ggagccuu
3174	ugccauuguu ucaucagcuc uuu
3175	uccuguagga cauuggcagu
3176	cuuggagucu ucuaggagcc
3177	ccauuuugug aauguuuucu uuugaacuc
3178	cccuuuuugu gaauguuuuc uuuu
3179	gaaaauugug cauuuaccca uuuu
3180	uugugcauuu acccauuuug ug
3181	cccugaggca uucccaucuu gaau
3182	aggacuuacu ugcuuuuguu
3183	cuugaauuuu ggagauucau cug
3184	caucuucuga uauuuuuccu guu
3185	ccauuacagu ugucuguguu
3186	ugacagccug ugaaaucugu gag
3187	uaaucugccu cuuuuuugg
3188	cagcaguagu ugcaucugc
3189	gccugagcug aucugcuggc aucuugc
3190	gccugagcug aucugcuggc aucuugcagu u
3191	ucugcuggca ucuugc
3192	gccgguugac uucauccugu gc
3193	gucugcaucc aggaacaugg guc

10

20

30

40

【表 7 - 7 5】

3194	uacuuacugu cuguagcucu uucu
3195	cugcauccag gaacaugggu cc
3196	guugaagauc ugauagccgg uuga
3197	uaggugccug ccggcuu
3198	uucagcugua gccacacc
3199	cugaacugcu ggaaagucgc c
3200	cuggcuucca aaugggaccu gaaaaagaac
3201	caauuuuucc cacucaguau u
3202	uugaaguucc uggagucuu
3203	uccucaggag gcagcucuaa au
3204	uggcucucuc ccaggg
3205	gagauggcuc ucuccaggg acccugg
3206	gggcacuuug uuuggcg
3207	ggucccagca aguuguuug
3208	ugggaugguc ccagcaaguu guuug
3209	guagagcucu gucauuuugg g
3210	gcucaagaga uccacugcaa aaaac
3211	gccauacgua cguaucauaa acauuc
3212	ucugcaggau auccaugggc ugguc
3213	gauccuccu guucgucucc uauuaug
3214	ugcuuuagac uccuguaccu gaua
3215	ggcggccuuu guguugac
3216	ggacaggccu uuauuuucgu gcugc
3217	ccuuuauuu cgugcugcu
3218	ucaaggaaga uggcauuucu
3219	ucaangaaga uggcauuucu
3220	ucaagnaaga uggcauuucu
3221	ucaaggaana uggcauuucu
3222	ucaaggaaga unggcauuucu
3223	ucaaggaaga ugncauuucu
3224	ncaaggaaga uggcauuucu
3225	ucaaggaaga ngggcauuucu
3226	ucaaggaaga uggcanuucu
3227	ucaaggaaga uggcaunucu
3228	ucaaggaaga uggcauuncu
3229	ucaaggaaga uggcauuucn
3230	ucnaggaaga uggcauuucu
3231	ucanggaaga uggcauuucu
3232	ucaaggnaga uggcauuucu
3233	ucaagganga uggcauuucu
3234	ucaaggaagn uggcauuucu
3235	ucaaggaaga uggcnuuucu
3236	uuugccncug cccaugcca uccug
3237	uuugccgcun cccaugcca uccug

10

20

30

40

【表 7 - 7 6】

3238	uuugccgcug cccauncca uccug
3239	uuunccgcug cccaugcca uccug
3240	uuugccgcug cccaugcca uccun
3241	nuugccgcug cccaugcca uccug
3242	unugccgcug cccaugcca uccug
3243	uungccgcug cccaugcca uccug
3244	uuugccgcng cccaugcca uccug
3245	uuugccgcug cccanugcca uccug
3246	uuugccgcug cccaugccn uccug
3247	uuuncncug cccaugcca uccug
3248	uuugccgcug cccaangcca uccug
3249	uuugccgcug cccaugcca nccug
3250	uuugccgcug cccaugcca ucnug
3251	uuugccgcug ccnauugcca uccug
3252	ucagcuucun uuagccacug
3253	ucagcuucug uuancacug
3254	ucancuucug uuagccacug
3255	ucagcuucug uuagccacun
3256	gnnnnnnnnn nnnngnnnn
3257	nnngnnnnng nnnngnnnnng
3258	nnngnnnnnn gnnngnnnnn
3259	nnnnnnnggn nnnngngnnn nnn
3260	nnnnngnnn nnnngnnngn nnn
3261	nnnnnggnn nngngnnnnn n
3262	gnnnnnnnnn nnnngnnnnng nnn
3263	nnngnnngng nnnnnngnnn nnnng
3264	nngnnngngn nnnnnngnnn nnnng
3265	nngnnngngn nnnnnngnnn nnnngg
3266	ngnnngnnn nnnngnnnnn nng
3267	ngnnngnnn nnnngnnnnn nngg
3268	gnnngnnnn nnnngnnnnn ng
3269	nngnnngnnn nngnnnnnnn gg
3270	nnngnnnnng nnnnnngnnn nnnng
3271	nngnnngngg nngnnnnng nnnnn
3272	nngnnngngg nngnnnnng nnnnnnggn
3273	nnnnngngn nggnnnnnn
3274	nggnnnnnn ngnnngg
3275	nnnnnggnn gnnngnnnnn nn
3276	nnnnnnngg gnnngnggn nnnnn
3277	nnnnngngn nnnnnnnnnn gnn
3278	nnngngngg nnnnnnnnnn nnn
3279	nnnnnnnggn ngngngnnn nnnngnnngg
3280	nnnnnnnggn ngngngnnn nnnng
3281	nnnnngnnng nnggnnnngn nnnnn

10

20

30

40

【表 7 - 7 7】

3282	ggnnnnngn nnnnnnnn gg
3283	nnnngnnngn nggnnnngnn nnnnn
3284	nnnnnnnngg ggngnnnnnn gnnnn
3285	ngnnnnngnn nnnngnnngn nggnn
3286	nnngnnnnn nggnnnng
3287	nnnnngnnngn nnnngnnnn gn
3288	nnnnngnnngn nnnngnnnn gnn
3289	nnnnngnnngn nnnngnnnn gng
3290	nnngnnnnn nggnnnngnn gg
3291	nnngnnnnn nggnnnngnn ggn
3292	nnngnnnnn nggnnnngnn ggng
3293	nnngnnnnn nggnnnngnn ggngn
3294	gngnnnnng gnnngnnng ngnnn
3295	gnnnnnggn nnngngngn nnnng
3296	nnngnnngg nnnngnggn gnnnnngnn
3297	nnngnnnnn nggnnnngnn ggngnnnnng
3298	nnnnngnnng nnnngnnnn gngngnnnn nng
3299	gngnnnnnn nnnngngnn nnnn
3300	nnngngnnnn nnnnnngnn gnnnn
3301	ngnnnnngn nggnnnngg nngn
3302	nnnnngngng gnnnnnggn gng
3303	nnngngngn nnnngngng ngnn
3304	nnngngnnn nggnngng nnnn
3305	nnnnnnnnn ngn
3306	ngnnnnngnn ngnnn
3307	nnnnnnnggn n
3308	nnngnnnnn ngnn
3309	nnnnnnnnn ngnnngnnn
3310	nnnnnnnnn ngn
3311	nnngnnngn nn
3312	nnngngngng nnnnnngnn
3313	ngngnnnnn ngnnnnng
3314	gngngnnnn nnnngnnnn
3315	nnngngngng gnn
3316	ngngngngg nn
3317	ngngngggn
3318	ngngggnnn nnnn
3319	nnnnnnnnn
3320	nnngngnnn nnnnn
3321	nnngnnnnn nnn
3322	ngnnnnnnn
3323	ngnnnnngn
3324	gngnnnnng gnnngngg
3325	nnngggnnn gngnggnnn

10

20

30

40

【表 7 - 7 8】

3326	nnnnnggnnn ngnggn
3327	ngnnnnnnnn nngnn
3328	ngnnnnnnnn n
3329	ngnnnnnngn nggnnnnngg nn
3330	ngnnnnnngn n
3331	nnnnngnngg n
3332	nggnnnnngg nn
3333	guugccucgg guucugaagg uguuc
3334	guugnunng guunugaagg uguun
3335	caacaucaag gaagauggca uuucu
3336	gccauuucuc aacagaucu
3337	ucagcuucug uuagccacug
3338	uuuguauuuu gcauguuccc
3339	auucucagga auuugugucu uuc
3340	ccauuuguau uuagcauguu ccc
3341	ucucaggaau uugugucuuu c
3342	gccauuucuc aacagaucug uca
3343	uuugccgug ccaaugcca uccug
3344	uugccgugc ccaugccau ccug
3345	uugccgugc ccaugccau ccugg
3346	ugccgugcc caaugccauc cug
3347	ugccgugcc caaugccauc cugg
3348	gccgugccc aaugccauc ug
3349	ccgugccca augccauc gg
3350	uuugccnug ccaaugcca uccug
3351	caguugccg cugcccaaug ccauc
3352	caguugccg cugcccaaug ccauccugga
3353	ucaaggaaga uggaauucu
3354	uggcauuucu aguuugg
3355	caucaaggaa gauggcauuu cu
3356	caacaucaag gaagauggca uuucu
3357	ccucugugau uuuaaacuu gau
3358	ccagagcagg uaccuccaac auc
3359	acaucaagga agauggcauu ucuaguugg
3360	acaucaagga agauggcauu ucuag
3361	cucuugaug cuggucuuu uuuc
3362	gguaaugagu ucuuccaac gg
3363	ucuugaugc uggucuuuu uuuca
3364	uuccaacugg ggacgccucu guucc
3365	uguucuagcc ucuugaugc ugguc
3366	cuguugccuc cgguucug
3367	caacuguugc cuccgguucu ga
3368	caacuguugc cuccgguucu gaa
3369	caacuguugc cuccgguucu gaag

10

20

30

40

【表 7 - 7 9】

3370	cuguugccuc cgguucugaa gg
3371	cuguugccuc cgguucugaa ggu
3372	cuguugccuc cgguucugaa ggug
3373	cuguugccuc cgguucugaa ggugu
3374	guugccuccg guucugaagg uguuc
3375	gccuccgguu cugaaggugu ucuug
3376	uugccuccgg uucugaaggu guucuuguac
3377	cuguugccuc cgguucugaa gguguucuug
3378	caacuguugc cuccgguuu gaagguguuc uug
3379	gaguuuuuc caaagcagcc ucuc
3380	uagaguuuu uuccaaagca gccuc
3381	agcauccugu aggacauugg cagu
3382	cauccuguag gacauuggca guug
3383	uccuguagga cauuggcagu uguu
3384	cuguaggaca uuggcaguug uuuc
3385	auuucucaac aga
3386	agcuucuguu agcca
3387	auucucagga a
3388	auuuguauuu agca
3389	auuucucaac agaucuguca
3390	auuucucaac aga
3391	acagaucugu ca
3392	uuugccgcug cccaaugcca
3393	cgcugcccaa ugccauccug
3394	gccgcugccc aaugccauc
3395	aaggaagaug gca
3396	aggaagaugg ca
3397	agagcaggua
3398	agcagguacc ucca
3399	accuccaaca
3400	aaugaguucu uccaa
3401	augaguucuu cca
3402	aguucuuca
3403	agccucuuga
3404	guugccuccg guucugaagg
3405	cuccgguuu gaagguguuc
3406	ccuccgguu ugaaggu
3407	aguuuuucc aaagca
3408	aguuuuucc a
3409	agcauccugu aggacauugg ca
3410	agcauccugu a
3411	auccuguagg a
3412	aggacauugg ca
3413	gguaaugagu unuunnaanuu gg

10

20

30

40

【表 7 - 8 0】

3414	ggnaangagn ncnccaacn gg
3415	ggunnugngu ucuuccnncu gg
3416	ggnaangagn nnnnnnaann gg
3417	ggunnugngu unuunnnnu gg
3418	ggnnngngn ncnccnncn gg
3419	ggnnngngn nnnnnnnnnn gg
3420	uguunuagnn unuugauugn uggun
3421	ngnncnagcc ncnnganngc nggnc
3422	uguucungcc ucuugnuugc ugguc
3423	ngnnnagnn nnnnganngn ngggn
3424	uguunungnn unuugnuugn uggun
3425	ngnncnngcc ncnngnngc nggnc
3426	ngnnnnngnn nnnngnngn ngggn
3427	gaguunuun naaagnagnn unun
3428	gagnnncnc caaagcagcc ncnc
3429	gnguuucuc cnnngcngcc ucuc
3430	gagnnnnnn naaagnagnn nnnn
3431	gnguuunuun nnnngnngn unun
3432	gngnncnc cnnngcngcc ncnc
3433	gngnnnnnn nnnngnngn nnnn
3434	agnaunnugu agganauugg nagu
3435	agcancngn aggacanngg cagn
3436	ngnucugug nggncnuugg cngu
3437	agnannngn aggananngg nagn
3438	ngnunnugu nggnnuugg nngu
3439	ngcncngn nggncnngg cngn
3440	ngnnnnngn nggnnnngg nngn
3441	guugnunng guunugaagg uguun
3442	uuugnngug nnaaugnna unnug
3443	nunuugauug nuggunuugu uuuun
3444	ncaaggaaga nggcanncn
3445	nnaaggaaga nggnannnn
3446	ncagcnng nnagccng
3447	nnagnnnng nnagnanng
3448	ucnngngn uggcnuuucu
3449	ucngcuucug uungccncug
3450	unagnuunug uuagnnanug
3451	nnngnngng nnaangnna nnnng
3452	uuugccgug cccnngccn uccug
3453	gngccnccg gncngaagg ngnnc
3454	gngnnnnng gnnngaagg ngnnn
3455	guugccuccg guucugngg uguuc
3456	ggccaaccn cggcnaccn
3457	unaaggaaga ugnauuuu

10

20

30

40

【表 7 - 8 1】

3458	ggccaaaccu cggcuuaccu	
3459	guugnucgg guunugaagg uguun	
3460	guugnucgg guucugaagg uguuc	
3461	guugcnuccg guunugaagg uguun	
3462	ngaaaacgcc gccannncnc aacagancng	
3463	canaangaaa acgccgccaan nncncaacag	
3464	ngnncagcnn cngnagcca cngannaaan	
3465	cagnnngccg cngcccaang ccancncgga	
3466	nngccgcngc ccaangccaan ccnggagnnc	10
3467	ngcngcncnn nncaggnnc aagngggana	
3468	cnnnnagnng cngcncnnnn ccaggnncaa	
3469	cnnnnnnnn agnngcngcn cnnnncagg	
3470	nnagnngcng cncnnnncca ggncnaagng	
3471	cngnngccnc cggmncgaa gngnncng	
3472	caacngngc cncggnnncn gaagngnnc	
3473	nngcncgg nnengaaggn gnnncnngnac	
3474	tgaaaacgcc gccatttctc aacagatctg	
3475	cataatgaaa acgccgccat ttctcaacag	
3476	tgctcagctt ctgtagcca ctgattaat	20
3477	cagttgccc ctgccaatg ccatcctgga	
3478	tgccgctgc ccaatgccat cctggagttc	
3479	tgctcctt ttccaggttc aagtgggata	
3480	cttttagtg ctgctcttt ccaggtcaa	
3481	ctttcttt agttgctgct ctttccagg	
3482	ttagtgctg ctctttcca ggtcaagtg	
3483	ctgtgcctc cggttctgaa ggtgtcttg	
3484	caactgtgc ctccgttct gaaggtgtc	
3485	ttgcctccg ttctgaaggt gttctgtac	
3486	rrrqrkr	
3487	rkkrrqr	30
3488	rrrrrrrff	
3489	rrrrffrrr	
3490	rrrr	
3491	rrrr	
3492	rrrrr	
3493	rrrrrr	
3494	rrrrrrr	
3495	rrrrrrrr	
3496	rahxrahxrahxrahxrahxrahxrahx	
3497	rahxrrahxrrahxrrahxr	
3498	rahxrrahxrrahxrrahxrrahxr	40
3499	rahxrrbrahxrrbr	
3500	rarrarrarff	
3501	rgrrrrgrgrff	

【表 7 - 8 2】

3502	<p>MQKLQLCVYIYLFMLIVAGPVDLNENSEQKENVEKEGLCNACTWRQN TKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQRD DSSDGSLEDDDYHATTETIITMPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYN KVVKAQLWIYLRPVETPTTVFVQILRLIKPMKDGTRYTGIRSLKLDMNP GTGIWQSIDVKTVLQNWLKQPESNLGIEIKALDENGHDLAVTFPGPGED GLNPFLEVKVTDTPKRSRRDFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGW DWIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTLVHQANPRGSAGPCCTPT KMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS</p>
3503	<p>MTAPWVALALLWGSLCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLE RCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATE ENPVQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYS LPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLL EIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKH ENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIIITWNELCHV AETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLA DFGLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDM YAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVH KKMRTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLI RRSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKESI</p>

10

【 0 4 7 9】

実施形態では、本明細書に記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーのいずれかにおけるいかなるウラシル（U）またはチミン（T）ヌクレオチドも、Xまたはnで置換され得る。実施形態では、各Xまたはnは、ウラシル（U）またはチミン（T）から独立に選択される。

20

【 図 1 A】

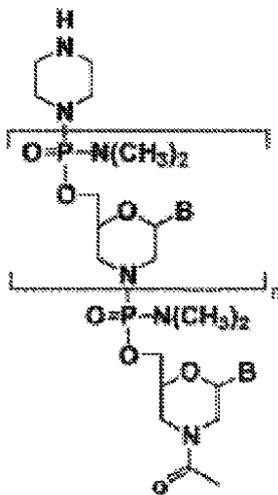


FIG.1A

【 図 1 B】

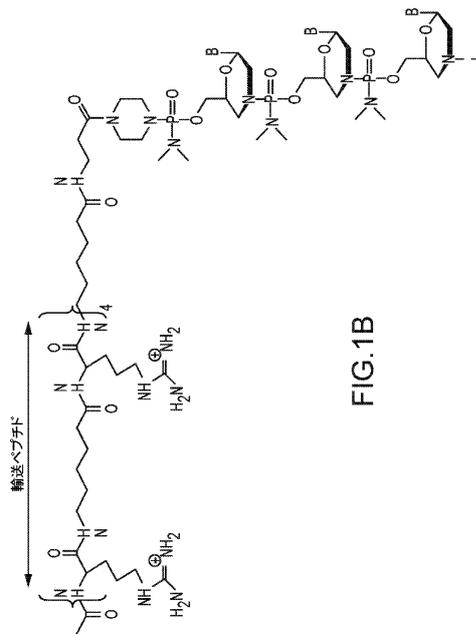


FIG.1B

【 図 1 C 】

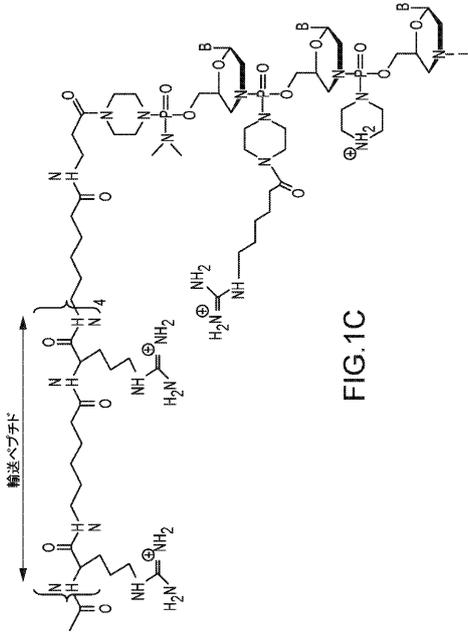


FIG.1C

【 図 1 D 】

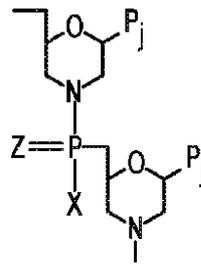


FIG.1D

【 図 1 E 】

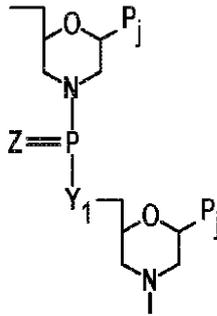


FIG.1E

【 図 1 F 】

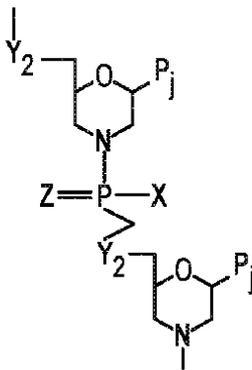


FIG.1F

【 図 1 G 】

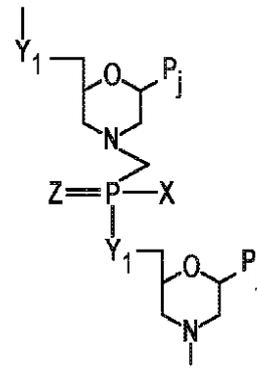


FIG.1G

【 図 2 A 】

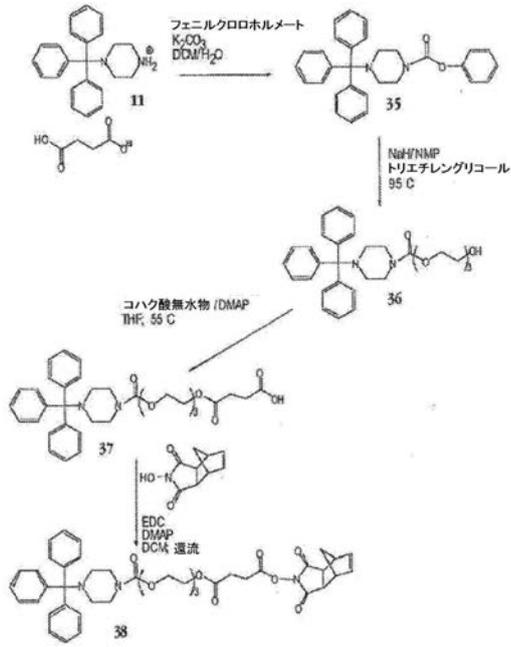


FIG.2A

【 図 2 B 】

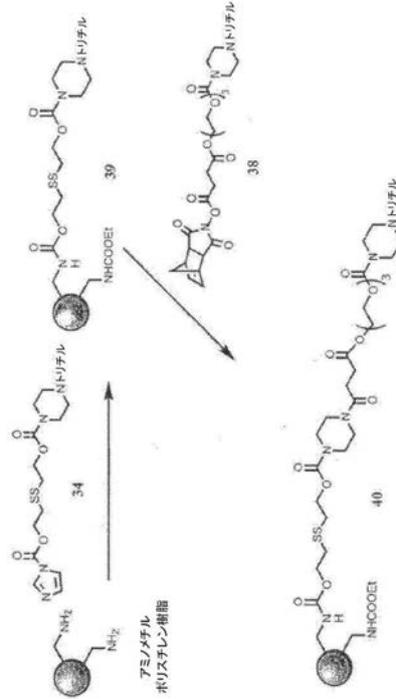


FIG.2B

【 図 3 A 】

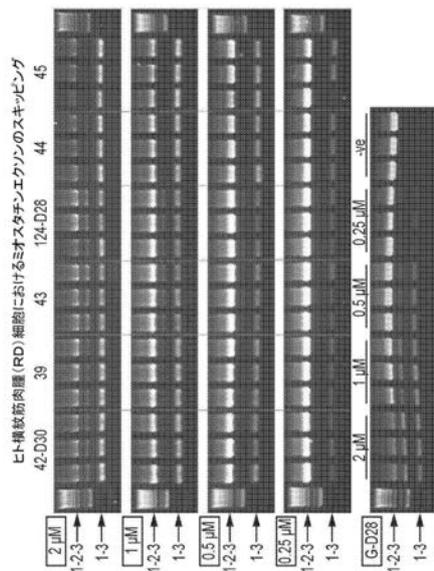


FIG.3A

【 図 3 B 】

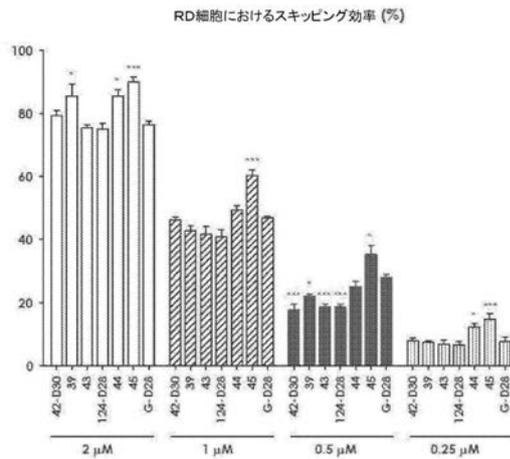


FIG.3B

【 図 4 A 】

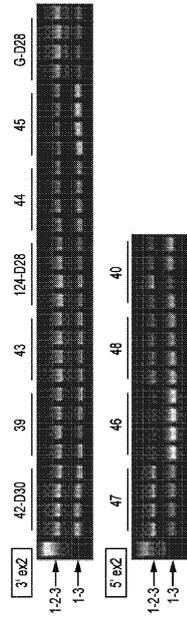


FIG.4A

【 図 4 B 】

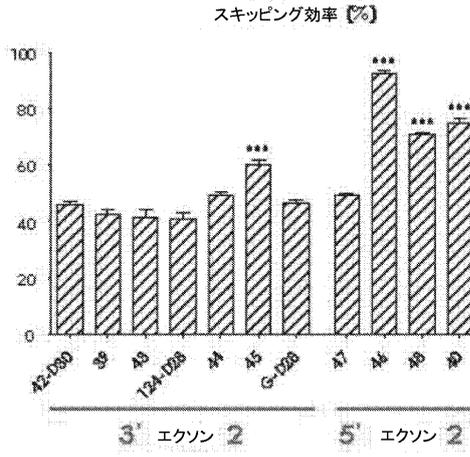


FIG.4B

【 図 5 A 】

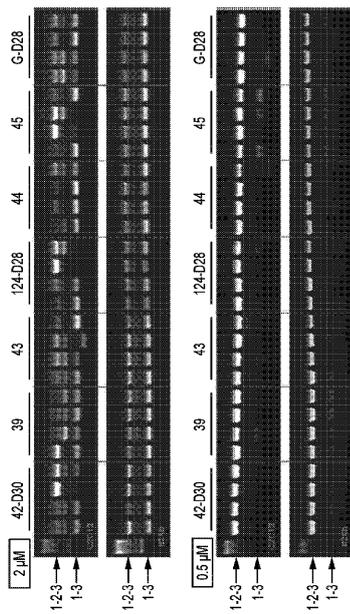


FIG.5A

【 図 5 B 】

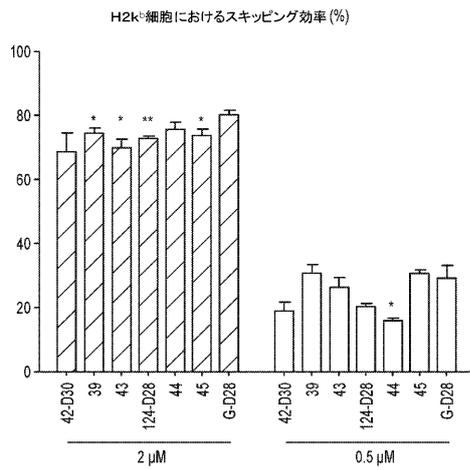


FIG.5B

【 図 5 C 】

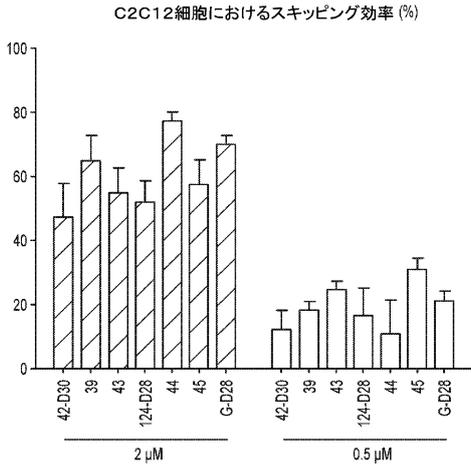


FIG.5C

【 図 6 A 】

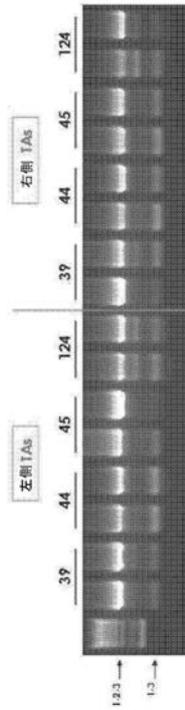


FIG.6A

【 図 6 B 】

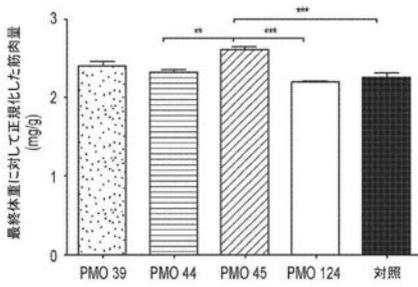


FIG.6B

【 図 6 C 】

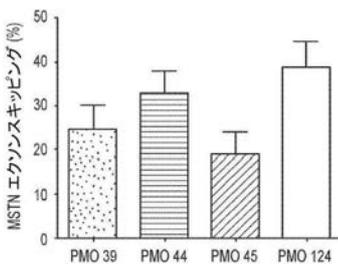


FIG.6C

【 図 7 A 】

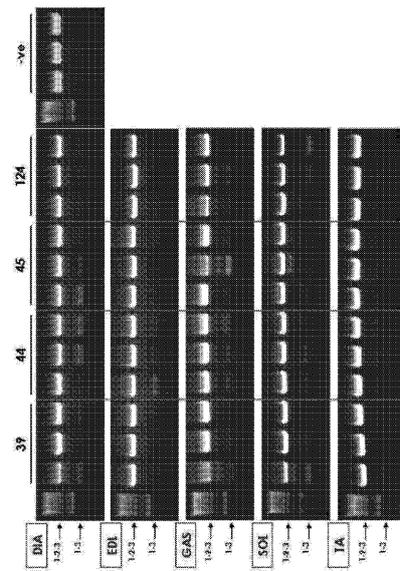


FIG.7A

【 図 7 B 】

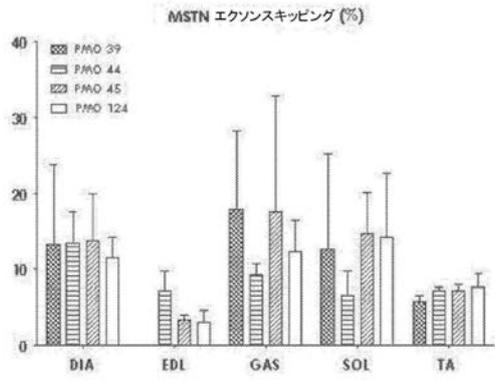


FIG.7B

【 図 7 C 】

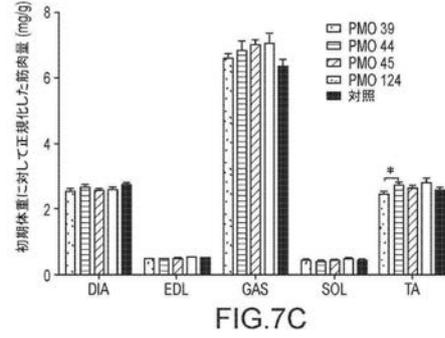


FIG.7C

【 図 7 D 】

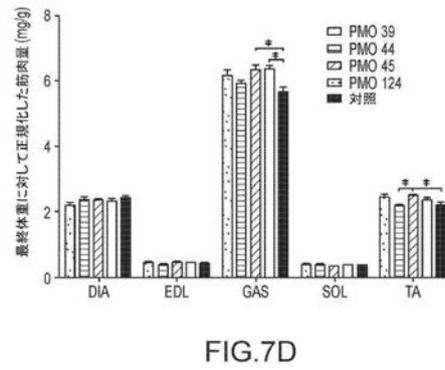


FIG.7D

【 図 8 A 】

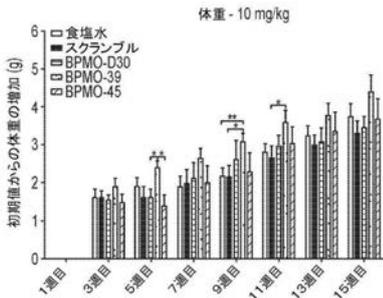


FIG.8A

【 図 8 C 】

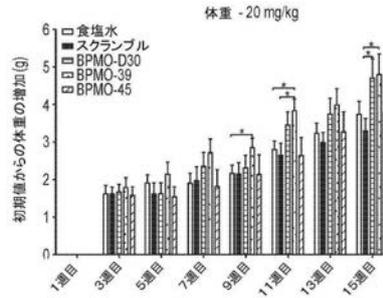


FIG.8C

【 図 8 B 】

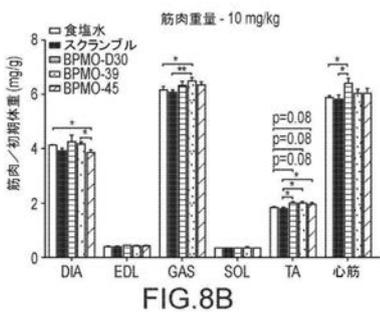


FIG.8B

【 図 8 D 】

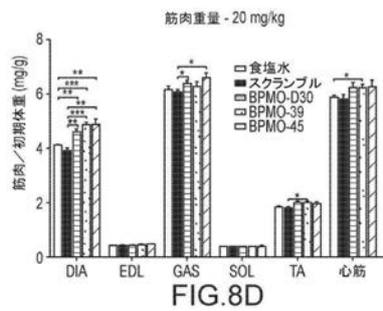


FIG.8D

【 図 9 A 】

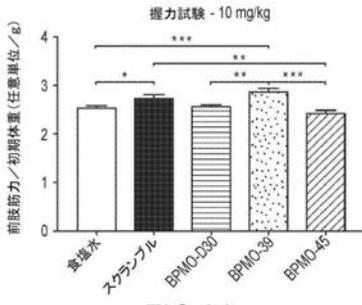


FIG.9A

【 図 9 B 】

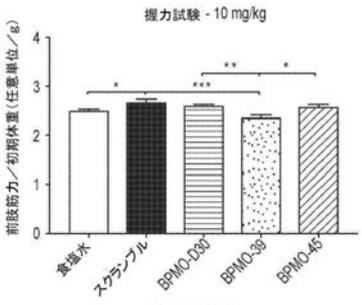


FIG.9B

【 図 9 C 】

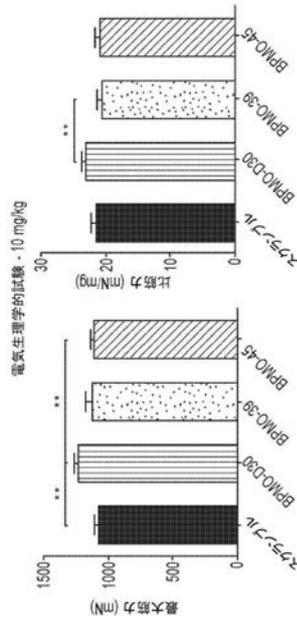


FIG.9C

【 図 10 A 】

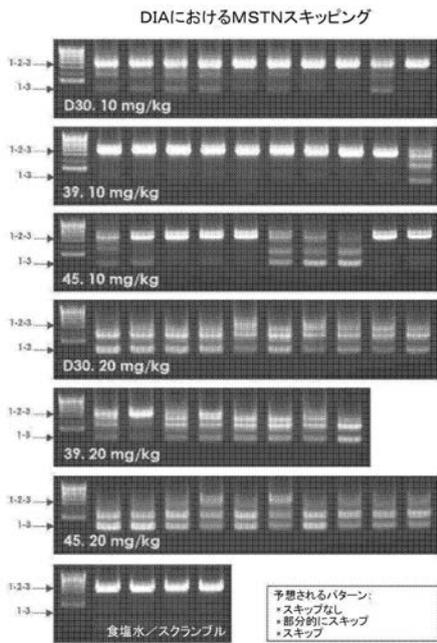


FIG.10A

【 図 10 B 】

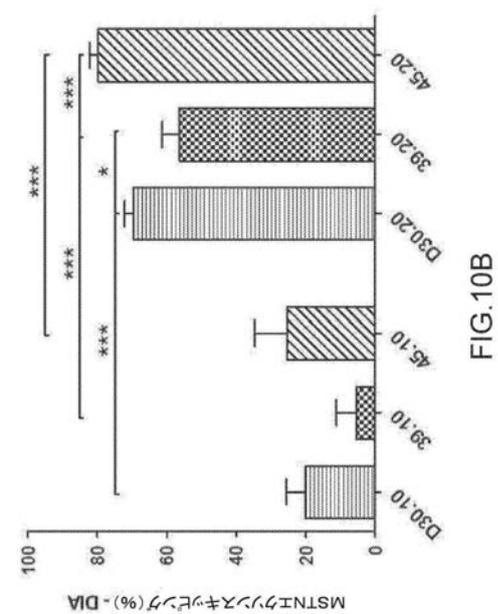


FIG.10B

【 図 1 0 C 】

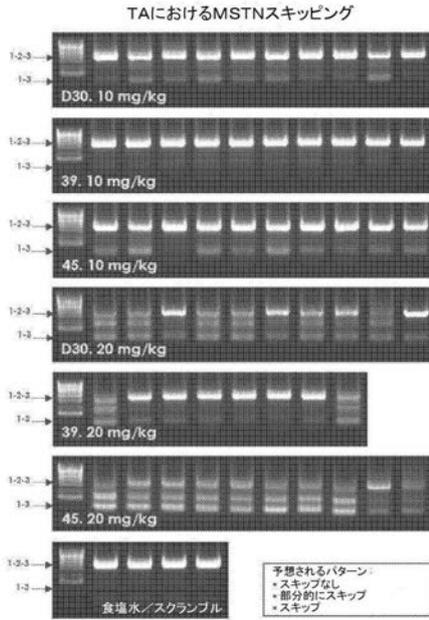


FIG.10C

【 図 1 0 D 】

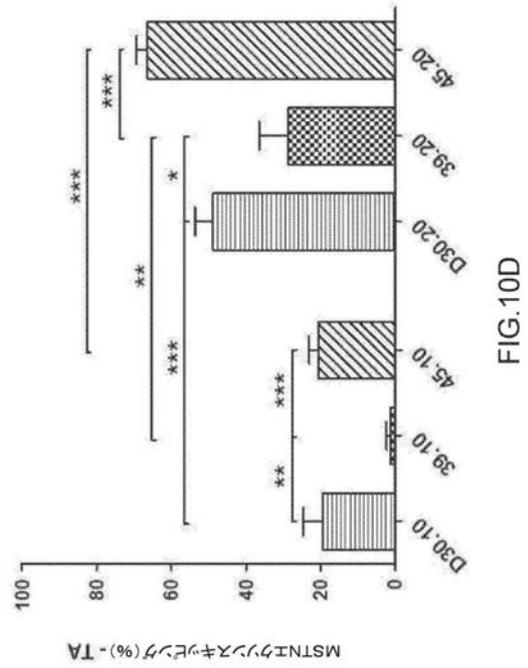


FIG.10D

【 図 1 1 A 】

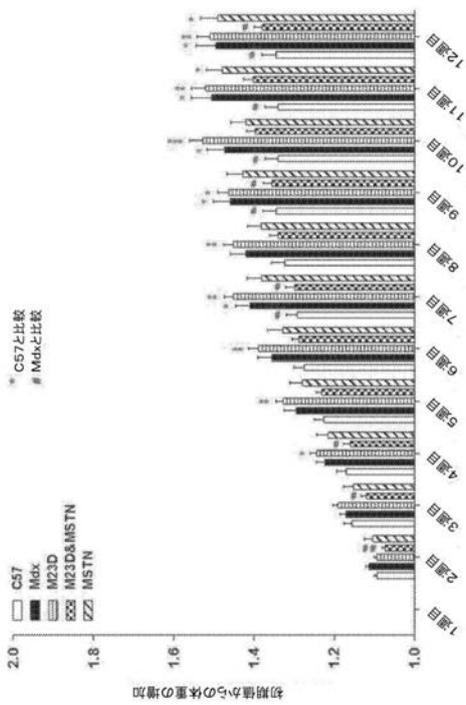


FIG.11A

【 図 1 1 B 】

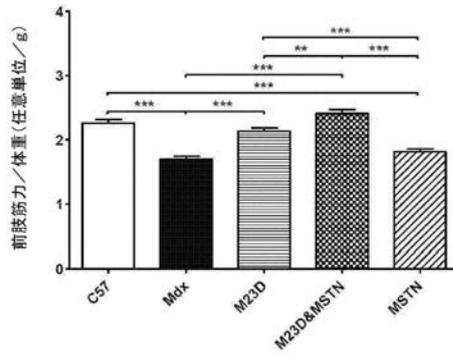


FIG.11B

【 図 1 2 A 】

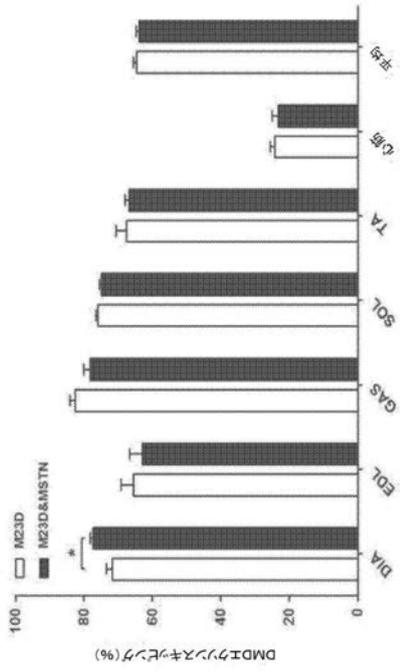


FIG.12A

【 図 1 2 B 】

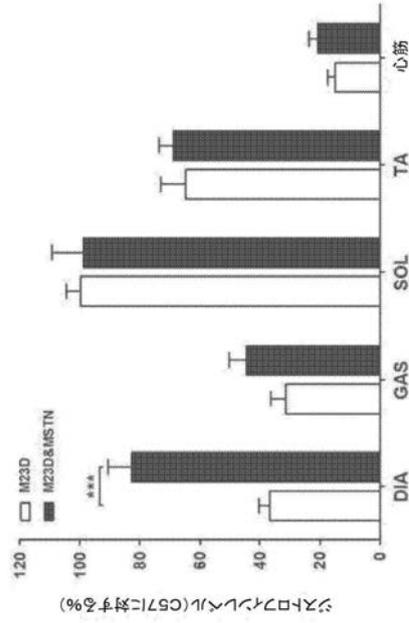


FIG.12B

【 図 1 2 C 】

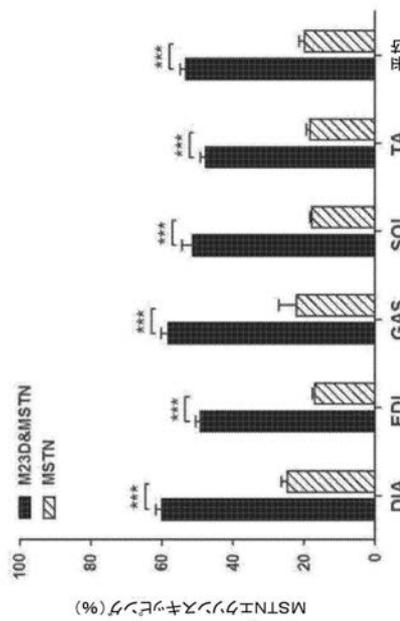


FIG.12C

【 図 1 3 A 】

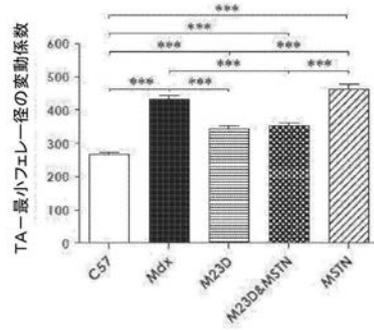


FIG.13A

【 図 1 3 B 】

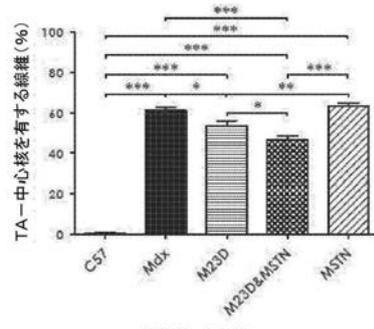


FIG.13B

【 図 1 4 A 】

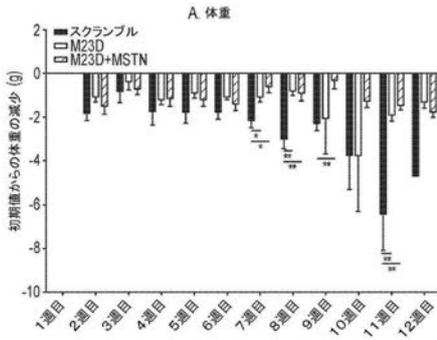


FIG.14A

【 図 1 4 B 】

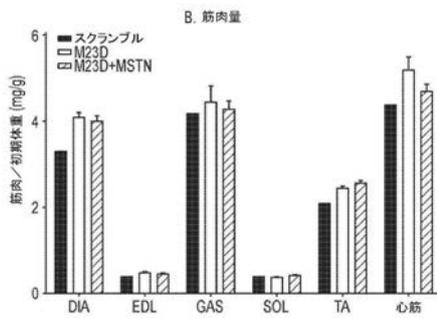


FIG.14B

【 図 1 4 D 】

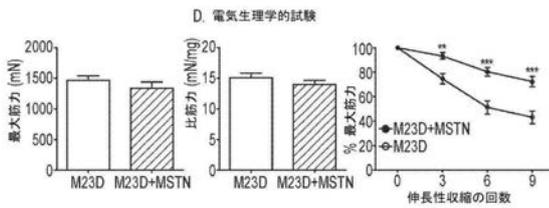


FIG.14D

【 図 1 4 C 】

C. 握力試験

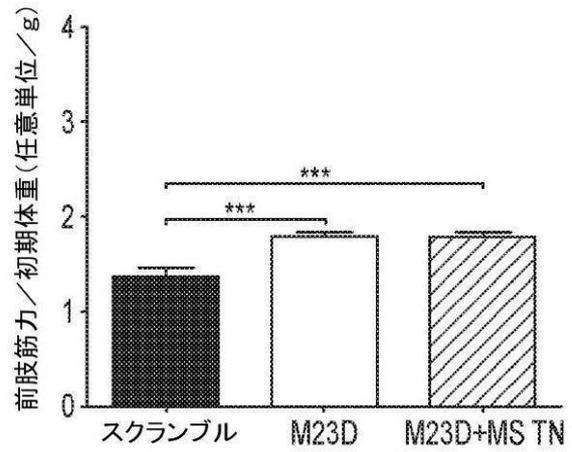


FIG.14C

【 図 1 5 A 】

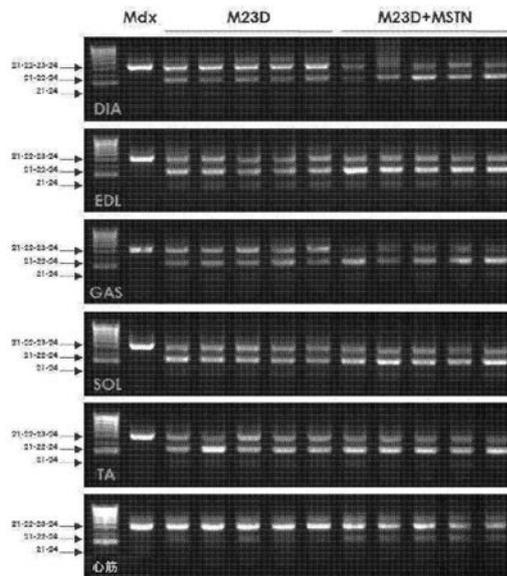


FIG.15A

【 図 1 5 B 】

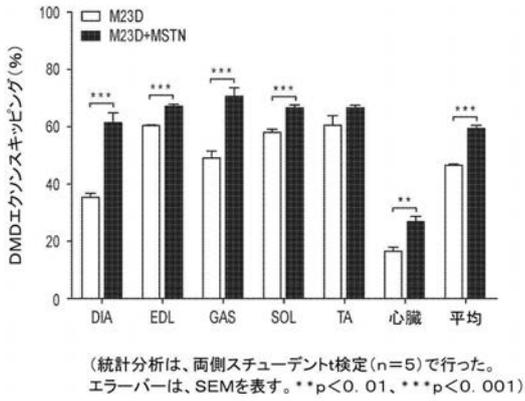


FIG.15B

【 図 1 6 A 】

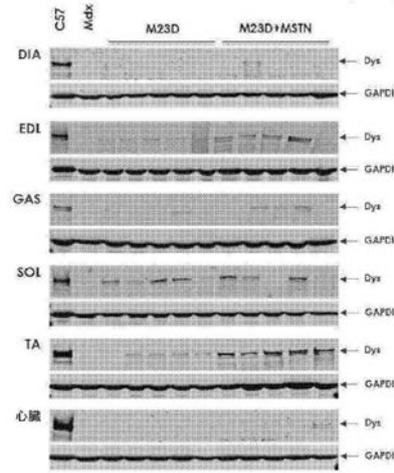


FIG.16A

【 図 1 6 B 】

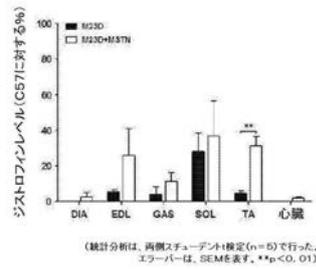


FIG.16B

【 図 1 7 A 】

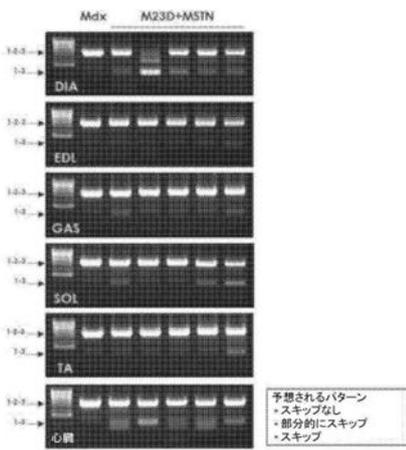


FIG. 17A

【 図 1 7 B 】

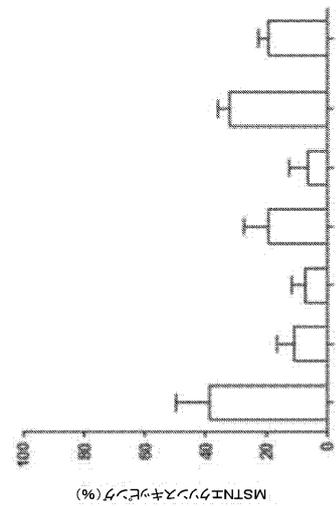


FIG.17B

【 図 1 8 A 】

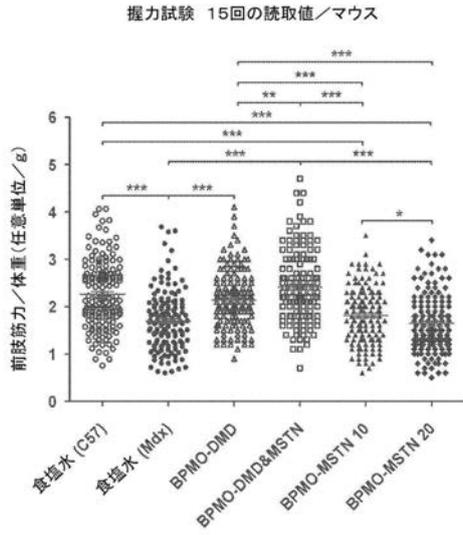


FIG.18A

【 図 1 8 B 】

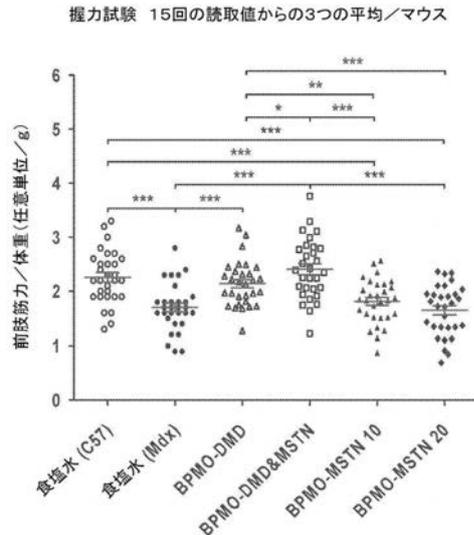


FIG.18B

【 図 1 8 C 】

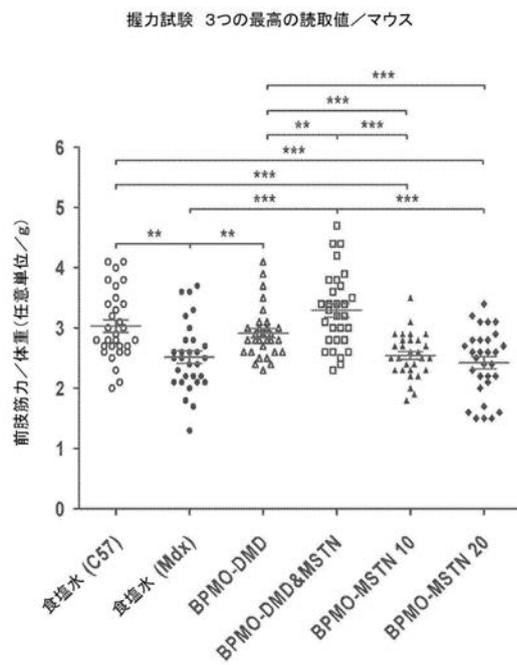


FIG.18C

【配列表】

2018530560000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/56093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12N 15/113; A61K 31/7125; C07H 21/04 (2017.01) CPC - C12N 15/113; A61K 31/7125; C07H 21/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2014/0315862 A1 (SAREPTA THERAPEUTICS, INC.) October 23, 2014; figure 1B; paragraphs [0020]-[0021], [0027], [0029]-[0030], [0037], [0047], [0056]-[0057], [0121]-[0144], [0164]	1, 8-14, 18, 31-37, 45-47, 54-61, 63-70, 72-75, 77, 78, 88, 93, 94 2-7, 15-17, 19-27, 29, 30, 38-41, 43, 44, 48-53, 62, 71, 76, 90/1-27, 90/29-41, 90/43-78, 90/88, 91/60-75
Y	(AARTSMA-RUS, A et al.) 'Theoretic Applicability of Antisense-Mediated Exon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy Mutations'; 20 January 2009, Human Mutation; Volume 30, Number 3, pages 293-299; page 294, table 1	2-7, 25, 39, 48-53, 90/2-7, 90/25, 90/39, 90/48-53
Y	WO 2010/129406 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) November 11, 2010; abstract	15-17, 19-24, 26, 27, 29, 30, 90/15-17, 90/19-24, 90/26-27, 90-29-30
Y	EMBL Accession No. DQ927047, Homo sapiens isolate AFRAM_A02 myostatin (GDF8). 15 December 2006; page 1-2; downloaded from the internet, April 4, 2017.	24, 38, 90/24, 90/38 --
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 04 April 2017 (04.04.2017)	Date of mailing of the international search report 28 APR 2017	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/56093

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0099066 A1 (MOULTON, HM et al.) April 16, 2009; paragraph [0191]; SEQ ID NO: 34	26, 27, 29, 30, 40, 41, 43, 44, 62, 90/26-27, 90/29-30, 90/40-41, 90/43-44, 90/62, 91/62
Y	US 2013/0085139 A1 (ROYAL HOLLOWAY AND BEDFORD NEW COLLEGE) April 4, 2013; page 18; SEQ ID NO: 35	29, 30, 43, 44, 71, 76, 90/29-30, 90/43-44, 90/71, 90/76, 91/71
Y	US 2007/0122821 A1 (IVERSEN, PL et al.) May 31, 2007; paragraph [0039]; SEQ ID NO: 12	27, 41, 43, 44, 90/27, 90/41, 90/43-44
Y	US 2004/0265879 A1 (IVERSEN, PL et al.) December 30, 2004; paragraph [0188], table 1; SEQ ID NO: 12	90/1-27, 90/29-41, 90/43-78, 90/88, 91/60-75
A	US 2003D129171 A1 (GROBET, L et al.) July 10, 2003; abstract; SEQ ID NO: 54	28, 42, 90/28, 90/42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/56093

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 96-99
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-78, 88, 90 (in-part), 91, 93 and 94 are directed toward methods of treating a subject with Duchenne muscular dystrophy, comprising administering an antisense oligomer that modulates exon skipping during processing of the dystrophin pre-mRNA; and compositions therefor.

Group II, Claims 79-85, 87, 89, 90 (in-part), 92 and 95 are directed toward methods for decreasing expression of exon 2 of myostatin, modulating myostatin expression, and treating Duchenne muscular dystrophy and skeletal muscle mass deficiency; and a medicament therefor.

---Please See Supplemental Page---

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-78, 88, 90 (in-part), 91, 93, 94

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US16/56093

****-Continued from Box III: Observations where unity of invention is lacking-****

Group III, Claims 86 and 90 (in-part) are directed toward a method for treating Duchenne muscular dystrophy and related disorders in a subject in need of such treatment, comprising: administering an antisense oligomer in an effective amount to result in a peak blood concentration of at least about 200-400 nM of antisense oligomer in the subject.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include SEQ ID NO: 76, not present in either of Groups II or III; the special technical features of Group II include skipping exon 2 of myostatin, not present in either of Groups I or III; the special technical features of Group III include a peak blood concentration of 200-400 nM of antisense oligomer, not present in either of Groups I or II.

Groups I-III share the technical features including: a method for treating Duchenne muscular dystrophy in a subject in need of such treatment, comprising administering an antisense oligomer in an effective amount; and an arginine-rich peptide sequence conjugated to the 3' terminal end or the 5' terminal end of the antisense oligomer, wherein the arginine-rich peptide sequence comprises a sequence selected from SEQ ID NOS: 3486-3501. Groups I and II share the technical features including: a pharmaceutical composition, comprising an antisense oligomer compound of 12 to 40 subunits and a pharmaceutically acceptable carrier, the compound comprising: at least one subunit that is a nucleotide analog having (i) a modified internucleoside linkage, (ii) a modified sugar moiety, or (iii) a combination of the foregoing; and a targeting sequence complementary to 12 or more contiguous nucleotides in a target region comprising an exon of human myostatin pre-mRNA; and a method of inhibiting the progression of Duchenne muscular dystrophy and related disorders in a subject having a mutation in the dystrophin gene that is amenable to treatment by an antisense oligomer capable of inducing exon skipping during processing of pre-mRNA, the method comprising: administering to the subject an effective amount of an antisense oligomer comprising 12 to 40 subunits, and further comprising a targeting sequence complementary to 12 or more contiguous nucleotides comprising an exon of a human pre-mRNA; and wherein a subject has been administered a dystrophin therapeutic that increases dystrophin expression in the subject to thereby inhibit the progression of Duchenne muscular dystrophy.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2015/0045415 A1 to Royal Holloway and Bedford New College (hereinafter "Holloway") in view of US 2004/0265679 A1 to Iversen et al. (hereinafter "Iversen").

Holloway discloses a method for treating Duchenne muscular dystrophy in a subject in need of such treatment (a method for treating Duchenne muscular dystrophy in a subject in need of such treatment, paragraphs [0005], [0029], [0031]), comprising administering an antisense oligomer in an effective amount (comprising administering an antisense oligomer in an effective amount; paragraphs [0005], [0028], [0029], [0031]); and an arginine-rich peptide conjugated to the 3' terminal end or the 5' terminal end of the antisense oligomer (and a peptide conjugated to the 3' terminal end or the 5' terminal end of the antisense oligomer; paragraph [0016]); a pharmaceutical composition (a pharmaceutical composition; paragraph [0019]), comprising an antisense oligomer compound of 12 to 40 subunits (comprising an antisense oligomer compound of 12 to 40 subunits; paragraphs [0015], [0019]) and a pharmaceutically acceptable carrier (and a pharmaceutically acceptable carrier; paragraph [0019]), the compound comprising: at least one subunit that is a nucleotide analog having (i) a modified internucleoside linkage, (ii) a modified sugar moiety, or (iii) a combination of the foregoing; paragraph [0008]); and a targeting sequence complementary to 12 or more contiguous nucleotides in a target region comprising an exon of a human pre-mRNA (a targeting sequence complementary to 12 or more contiguous nucleotides in a target region comprising an exon of a human pre-mRNA; paragraphs [0039], [0040]); and a method of inhibiting the progression of Duchenne muscular dystrophy and related disorders in a subject (a method for ameliorating (inhibiting the progression of) Duchenne muscular dystrophy in a subject; paragraphs [0005], [0031]) having a mutation in the dystrophin gene that is amenable to treatment by an antisense oligomer capable of inducing exon skipping during processing of pre-mRNA (having a mutation in the dystrophin gene that is amenable to treatment by an antisense oligomer capable of inducing exon skipping during processing of pre-mRNA; paragraphs [0002], [0004]), the method comprising: administering to the subject an effective amount of an antisense oligomer (the method comprising: administering to the subject an effective amount of an antisense oligomer; paragraphs [0005], [0028], [0029], [0031]) comprising 12 to 40 subunits (comprising 12 to 40 subunits; paragraphs [0015], [0019]), and further comprising a targeting sequence complementary to 12 or more contiguous nucleotides comprising an exon of a human myostatin pre-mRNA (a targeting sequence complementary to 12 or more contiguous nucleotides in a target region comprising an exon of a human myostatin pre-mRNA; paragraphs [0039], [0040]); wherein a subject has been administered a dystrophin therapeutic that increases dystrophin expression in the subject (wherein a subject has been administered a dystrophin therapeutic that increases dystrophin expression in the subject; paragraphs [0003], [0027]) to thereby inhibit the progression of Duchenne muscular dystrophy (to thereby inhibit the progression of Duchenne muscular dystrophy; paragraphs [0005], [0031]).

Holloway does not disclose an arginine-rich peptide sequence comprising a sequence selected from SEQ ID NOS: 3486-3501; and Iversen discloses compositions for enhancing the delivery of molecules into cells, including nucleic acid analogs (compositions for enhancing the delivery of molecules into cells, including nucleic acid analogs; abstract); wherein the compositions comprise a peptide, transporter conjugated to the cargo (wherein the compositions comprise a peptide transporter conjugated to the cargo; abstract); and wherein the peptide comprises SEQ ID NO: 3486 (wherein the peptide comprises SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 3486); paragraph [0187], Table 1, SEQ ID NO: 12; wherein SEQ ID NO: 12 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 3486).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure o

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z N A Z
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA13 AA19 BA03 CA62 MA02 NA05 NA14 ZA941 ZA942
 ZC412 ZC751
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA04 MA05 NA05 NA14 ZC75
 4H045 AA11 AA30 DA50 DA76 EA20 FA74