

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7509801号
(P7509801)

(45)発行日 令和6年7月2日(2024.7.2)

(24)登録日 令和6年6月24日(2024.6.24)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 4 0 Z
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K 31/712(2006.01)	A 6 1 K	31/712	
A 6 1 K 31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
請求項の数 22 (全72頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2021-561143(P2021-561143)	(73)特許権者	000004156 日本新薬株式会社 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町1 4番地
(86)(22)出願日	令和1年12月26日(2019.12.26)	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(65)公表番号	特表2022-516207(P2022-516207 A)	(74)代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(43)公表日	令和4年2月24日(2022.2.24)	(72)発明者	中川 慎一郎 茨城県つくば市桜3丁目14-1 日本 新薬株式会社内
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/051651	審査官	上條 のぶよ
(87)国際公開番号	WO2020/138509		
(87)国際公開日	令和2年7月2日(2020.7.2)		
審査請求日	令和4年12月26日(2022.12.26)		
(31)優先権主張番号	1821269.6		
(32)優先日	平成30年12月28日(2018.12.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 マイオスタチンシグナル阻害剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部もしくは全部をコードする配列の一部が存在しない変異型アクチビン受容体2B型(ACVR2B)mRNAを標的細胞が産生することを可能にすることができる化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物であって、

前記化合物がACVR2Bの細胞内領域の一部をコードするエクソン8のスキップを誘導することができるアンチセンスオリゴマーであり、

前記化合物が配列番号25~32、46~70、及び90~98からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、又はそれからなる、

化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項2】

前記化合物が配列番号25~29、31~32、48、50~51、53~54、57~58、60~62、64~70、90~91、及び93~98からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、又はそれからなる、請求項1に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項3】

10~50個の核酸塩基を含む、請求項1または2に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項4】

前記エクソン 8 が、配列番号 4 の配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項 5】

前記アンチセンスオリゴマーがオリゴヌクレオチドである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドにおける少なくとも 1 つの糖部分および / または少なくとも 1 つのリン酸結合部分が修飾されている、請求項 5 に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項 7】

前記修飾された糖部分が、2' 位の -OH 基が、OR、R、R'OR、SH、SR、N₂H、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br および I (R はアルキルまたはアシルを表し、R' はアルキレンを表す) からなる群から選択されるいずれかの基で置換されているリボースである、請求項 6 に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項 8】

前記修飾されたリン酸結合部分が、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合およびボラノホスフェート結合からなる群から選択される、請求項 6 または 7 に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項 9】

前記アンチセンスオリゴマーが少なくとも 1 つのモルホリノ環を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

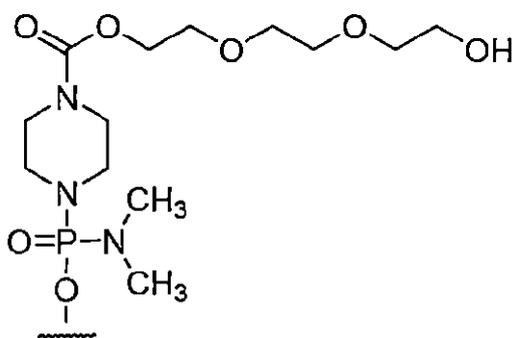
【請求項 10】

モルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである、請求項 9 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

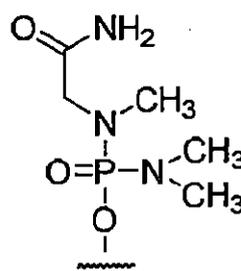
【請求項 11】

下記の化学式 (1) ~ (3)

【化 1】



(1)



(2)



(3)

で表される基のいずれか 1 つをその 5' 末端に有する、請求項 9 または 10 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の化合物に細胞浸透性ペプチドが結合されたコンジュゲートである化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を含む医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4】

少なくとも1つの薬学的に許容される担体または添加剤をさらに含む、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

凍結乾燥されている、請求項 1 3 または 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

対象における療法に使用するための、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を含む組成物、あるいは請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記療法が、対象における筋萎縮性疾患、筋肉消耗性疾患もしくはサルコペニア性疾患の予防または治療である、請求項 1 6 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 1 8】

前記筋萎縮性疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 1 7 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記対象がヒトである、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 2 0】

対象における筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患、またはサルコペニア性疾患を予防または治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の使用。

【請求項 2 1】

前記筋萎縮性疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記対象がヒトである、請求項 2 0 または 2 1 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

G D F 8 としても知られるマイオスタチンは、T G F - スーパーファミリーに属する新規サイトカインとして1997年に発見された。マイオスタチンの組織発現は、運動および代謝活性を担う主要組織である骨格筋に特異的である。マイオスタチン欠損変異を有する動物は有意な筋肥大を示し、骨格筋の量が野生型対応動物の大きさの2倍に増加する (McPherron et al., Nature. 387(6628):83-90, 1997)。この観察に基づいて、マイオスタチンは骨格筋体積を制御する重要な因子として作用すると考えられる。

【0 0 0 2】

マイオスタチンがそのシグナルを細胞の内部に伝達した場合、他のT G F - と同様のプロセスを経て、最初にI I型受容体に結合し、次にI型受容体と結合してリガンド-受容体複合体を形成する。このプロセスを通じて、各受容体はその細胞内ドメイン (intercellular domain) 上でリン酸化を受け、S m a d 依存性またはS m a d 非依存性経路を介してシグナル伝達を生じる (Chang et al., Endocrine Reviews. 23(6):787-823, 2002)。I型受容体とI I型受容体の両方は、それぞれ複数の遺伝子にコードされる。T G F - スーパーファミリーに属する各分子は、特異的な受容体の組み合わせに結合する。マイオスタチンは、I型受容体としてはA L K 4 またはA L K 5 と、I I型受容体としてはA C V R 2 B との組み合わせに結合する。しかしながら、前記の組み合わせはマイオスタチンに限定されず、G D F 1 1、アクチピンAなどを含むいくつかの他のT G F - スーパーファミリー分子によって使用される (Wakefield and Hill. Nat Rev Cancer. 13(5):328-41, 2013, doi:10.1038/nrc3500)。したがって、A C V R 2 B / A L K 4 またはA C V R 2 B / A L K 5 へのマイオスタチン以外のリガンドの結合は、マイオスタチン結合と同様に筋体積への抑制シグナルの伝達を引き起こす可能性がある。実際に、マイ

10

20

30

40

50

オスタチン遺伝子を欠損したマウスに、膜貫通ドメインおよびその下流領域が抗体 - Fcドメインで置換されているACVR2Bまたは可溶性ACVR2Bに対する中和抗体を投与すると、マイオスタチン欠損によって引き起こされる増加に加えて筋体積がさらに増加することが報告されている (Lach-Trifilieff et al., Mol Cell Biol. 34(4):606-18, 2014. doi: 10.1128/MCB.01307-13; Lee et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102(50):18117-22, 2005を参照されたい)。このさらなる増加は、ACVR2Bに結合することによって筋体積を抑制するマイオスタチンに対する追加の因子が存在することを示唆する。

【0003】

マイオスタチンシグナル伝達を低下させる手段は、特定の筋肉消耗および他の筋肉関連疾患の治療または予防に有用である可能性がある。本発明は、mRNAレベルでACVR2Bを標的とすることによってマイオスタチンシグナル伝達を阻害するための新しいアプローチを提供する。

10

【発明の概要】

【0004】

本発明の第1の態様によれば、野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部または全部をコードするmRNA配列の一部が存在しない変異型アクチビン受容体2B型 (ACVR2B) mRNAを標的細胞が産生することを可能にすることができる化合物が提供される。

【0005】

本発明の第1の態様のバリエーションによれば、野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部を欠く切断型バージョンとしてアクチビン受容体2B型 (ACVR2B) タンパク質の産生を引き起こすことができる化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物が提供される。

20

【0006】

特定の実施形態では、化合物は、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10のうちの1つ以上のエクソンスキッピングをもたらすことができるオリゴヌクレオチドである。

【0007】

本発明の第2の態様によれば、本発明の第1の態様の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を含む医薬組成物が提供される。

30

【0008】

本発明の第3の態様によれば、療法に使用するための、本発明の第1の態様の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、あるいは本発明の第2の態様の医薬組成物が提供される。特定の実施形態では、療法は、筋消耗性疾患、サルコペニア性疾患または筋萎縮性疾患、例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーの予防または治療である。

【0009】

本発明の第4の態様によれば、ACVR2Bの細胞内領域の一部を欠く変異型ACVR2B mRNAを発現する遺伝子操作された動物が提供される。

【0010】

本発明の特定の態様および実施形態は、以下を含む：

40

[1] 野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部もしくは全部をコードする配列の一部が存在しない変異型アクチビン受容体2B型 (ACVR2B) mRNAを標的細胞が産生することを可能にすることができる化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[2] 野生型ACVR2Bの前記細胞内領域が野生型ACVR2Bのエクソン5~11によってコードされる、[1]に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[3] 野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部を欠く切断型ACVR2Bタンパク質を標的細胞に産生させることができる、[1]または[2]に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[4] 切断型ACVR2Bタンパク質が、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9お

50

よび10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンによってコードされる細胞内領域の全部または一部を欠いている、[3]に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[5]ACVR2Bの細胞内領域の一部をコードするエクソンのスキップを誘導することができるアンチセンスオリゴマーである、[1]~[3]のいずれか一つに記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[6]スキップされる前記エクソンが、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される、[5]に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[7]10~50個の核酸塩基を含む、[5]または[6]に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。 10

[8]ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択されるエクソンの10~50個の連続するヌクレオチドに相補的な配列を含む、[5]~[7]のいずれか一つに記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[9]エクソンが、配列番号1~6からなる群から選択される配列を含む、[5]~[8]のいずれか一つに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[10]配列番号12~36および43~111からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、[5]~[9]のいずれか一つに記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[11]配列番号12~36および43~111からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、[5]~[10]のいずれか一つに記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。 20

[12]アンチセンスオリゴマーがオリゴヌクレオチドである、[5]~[11]のいずれか一つに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[13]オリゴヌクレオチドにおける少なくとも1つの糖部分および/または少なくとも1つのリン酸結合部分が修飾されている、[12]に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[14]修飾された糖部分が、2'位の-OH基が、OR、R、R'OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、BrおよびI(Rはアルキルまたはアリールを表し、R'はアルキレンを表す)からなる群から選択されるいずれかの基で置換されているリボースである、[13]に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。 30

[15]修飾されたリン酸結合部分が、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合およびボラノホスフェート結合からなる群から選択される、[13]または[14]に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

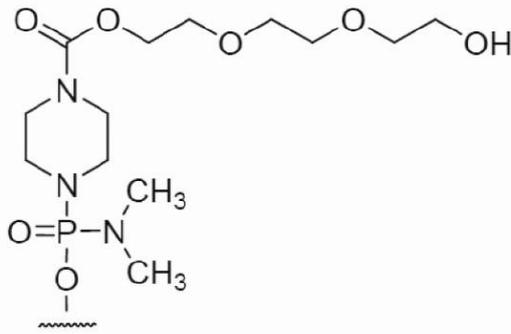
[16]アンチセンスオリゴマーが少なくとも1つのモルホリノ環を含む、[5]~[11]のいずれか一つに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[17]モルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである、[16]に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。 40

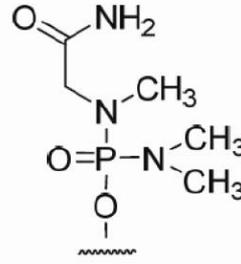
[18]下記の化学式(1)~(3)

【0011】

【化 1】



(1)



(2)



(3)

10

で表される基のいずれか1つをその5'末端に有する、[16]または[17]に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[19][1]~[18]のいずれか一つに記載の化合物に細胞浸透性ペプチドが結合されたコンジュゲートである化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物。

[20][1]~[19]のいずれか一つに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を含む医薬組成物。

20

[21]少なくとも1つの薬学的に許容される担体または添加剤をさらに含む、[20]に記載の医薬組成物。

[22]凍結乾燥されている、[20]または[21]に記載の医薬組成物。

[23]対象における療法に使用するための、[1]~[19]のいずれか一つに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、あるいは[20]~[22]のいずれか一つに記載の医薬組成物。

[24]療法は、対象における筋萎縮性疾患、筋肉消耗性疾患もしくはサルコペニア性疾患の予防または治療である、[23]に記載の使用のための化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、あるいは[23]に記載の使用のための医薬組成物。

30

[25]筋萎縮性疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、[24]に記載の使用のための化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、あるいは[24]に記載の使用のための医薬組成物。

[26]対象がヒトである、[23]~[25]のいずれか一つに記載の使用のための化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、あるいは[23]~[25]のいずれか一つに記載の使用のための医薬組成物。

[27]対象における筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患を治療する方法であって、[1]~[19]のいずれか一つに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の治療有効量、あるいは[20]~[22]のいずれか一つに記載の医薬組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含む方法。

40

[28]筋萎縮性疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、[27]に記載の方法。

[29]対象がヒトである、[27]または[28]に記載の方法。

[30]対象における筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患、またはサルコペニア性疾患を予防または治療するための医薬の製造における、[1]~[19]のいずれか一つに記載の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の使用。

[31]筋萎縮性疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、[30]に記載の使用。

[32]対象がヒトである、[30]または[31]に記載の使用。

[33]野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部または全部をコードする配列の一部が存在しない、変異型アクチビン受容体2B型(ACVR2B)mRNAを発現する遺伝子操作された動物。

50

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】示されたホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）（aおよびb）、ホスホロチオエート（PS）オリゴヌクレオチド（c）またはPMO-ペプチドコンジュゲート（d）による各エクソンのスキッピング効率（%）を示す図である。

【図2】切断型ACVR2Bの発現によるマイオスタチンシグナル伝達の抑制を示し、切断型ACVR2Bは、内因性の野生型ACVR2Bよりも優位に発現されることを示す図である。

【図3】マイオスタチンシグナル強度の指標として作用するSMAD7 mRNA発現の抑制を示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、以下により詳細に説明される。以下の実施形態は、例示としてのみ本発明を説明することを意図したものであり、本発明をこれらの実施形態のみに限定することを意図したものではない。本発明は、本発明の精神から逸脱することなく、種々のモードで実施することができる。ヌクレオチド配列は、5'末端が左端に、3'末端が右端に配置されるように提示される。アミノ酸配列は、N末端が左端に、C末端が右端に配置されるように提示される。

【0014】

化合物

20

本発明は、野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部もしくは全部をコードするmRNA配列の一部が存在しない変異型アクチビン受容体型2B（ACVR2B）mRNAを標的細胞が産生することを可能にすることができる化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を提供する。

【0015】

ACVR2Bタンパク質は、ActRIIBとしても公知であり、512個のアミノ酸からなる。ACVR2Bの細胞遺伝学的地図の位置は、3p22-p21.3である。ACVR2Bは、3つの主要ドメインである細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内セリン/トレオニンキナーゼドメインからなる。Ishikawa et al. (Journal of Human Genetics volume 43, pages 132-134 (1998))は、ACVR2B遺伝子は11個のエクソンを含み、約30kbに及ぶことを報告した。野生型ヒトACVR2B（以下「野生型ACVR2B」と称する）のmRNA配列は、NCBI参照配列：NM_0001106.4および本明細書中の配列番号8に開示される。

30

【0016】

ヒトACVR2Bの代表的なコード配列（CDS）を配列番号10に示す。ACVR2B CDSのヌクレオチド配列は、配列番号10として示されるものに限定されず、配列番号10の長さの90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%を有するバリエーション配列を含み、配列番号10に対して90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有する。

40

【0017】

ヒトACVR2Bタンパク質の代表的なアミノ酸配列を配列番号11に示す。ACVR2Bタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号11として示されるものに限定されず、配列番号11の長さの90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%を有し、配列番号11に対して90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有するバリエーション配列を含む。

【0018】

50

本発明の化合物が A C V R 2 B を発現する細胞に提供される場合、それは、野生型 A C V R 2 B の細胞内領域の一部または全部をコードする m R N A 配列の一部が存在しない変異型 A C V R 2 B m R N A の、細胞による産生を引き起こす。「野生型 A C V R 2 B の細胞内領域の一部または全部をコードする m R N A 配列の一部が存在しない変異型 A C V R 2 B m R N A 」(以下、「本発明の変異型 A C V R 2 B m R N A 」と称する)とは、野生型 A C V R 2 B m R N A において見出される配列の一部を欠く変異型/バリエーション A C V R 2 B m R N A であって、野生型 A C V R 2 B との比較において存在しない前記配列が野生型 A C V R 2 B の細胞内領域の一部または全部をコードする変異型/バリエーション A C V R 2 B m R N A を意味するか、または野生型 A C V R 2 B m R N A に見出される、野生型 A C V R 2 B の細胞内領域の一部または全部をコードする配列の一部を欠く変異型 A C V R 2 B m R N A を意味する。

10

【0019】

ヒト A C V R 2 B の細胞内領域は、N末端側から 159 ~ 512 番目のアミノ酸からなる。代表的な野生型 A C V R 2 B の細胞内領域の一部または全部をコードする m R N A 配列を配列番号 9 に示す。

【0020】

本発明の変異型 A C V R 2 B m R N A は、配列番号 9 の 1、2、3、4、5、6、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、3

20

30

40

50

6 1、8 6 2、8 6 3、8 6 4、8 6 5、8 6 6、8 6 7、8 6 8、8 6 9、8 7 0、8
 7 1、8 7 2、8 7 3、8 7 4、8 7 5、8 7 6、8 7 7、8 7 8、8 7 9、8 8 0、8
 8 1、8 8 2、8 8 3、8 8 4、8 8 5、8 8 6、8 8 7、8 8 8、8 8 9、8 9 0、8
 9 1、8 9 2、8 9 3、8 9 4、8 9 5、8 9 6、8 9 7、8 9 8、8 9 9、9 0 0、9
 0 1、9 0 2、9 0 3、9 0 4、9 0 5、9 0 6、9 0 7、9 0 8、9 0 9、9 1 0、9
 1 1、9 1 2、9 1 3、9 1 4、9 1 5、9 1 6、9 1 7、9 1 8、9 1 9、9 2 0、9
 2 1、9 2 2、9 2 3、9 2 4、9 2 5、9 2 6、9 2 7、9 2 8、9 2 9、9 3 0、9
 3 1、9 3 2、9 3 3、9 3 4、9 3 5、9 3 6、9 3 7、9 3 8、9 3 9、9 4 0、9
 4 1、9 4 2、9 4 3、9 4 4、9 4 5、9 4 6、9 4 7、9 4 8、9 4 9、9 5 0、9
 5 1、9 5 2、9 5 3、9 5 4、9 5 5、9 5 6、9 5 7、9 5 8、9 5 9、9 6 0、9
 6 1、9 6 2、9 6 3、9 6 4、9 6 5、9 6 6、9 6 7、9 6 8、9 6 9、9 7 0、9
 7 1、9 7 2、9 7 3、9 7 4、9 7 5、9 7 6、9 7 7、9 7 8、9 7 9、9 8 0、9
 8 1、9 8 2、9 8 3、9 8 4、9 8 5、9 8 6、9 8 7、9 8 8、9 8 9、9 9 0、9
 9 1、9 9 2、9 9 3、9 9 4、9 9 5、9 9 6、9 9 7、9 9 8、9 9 9、1 0 0 0、
 1 0 0 1、1 0 0 2、1 0 0 3、1 0 0 4、1 0 0 5、1 0 0 6、1 0 0 7、1 0 0 8、
 1 0 0 9、1 0 1 0、1 0 1 1、1 0 1 2、1 0 1 3、1 0 1 4、1 0 1 5、1 0 1 6、
 1 0 1 7、1 0 1 8、1 0 1 9、1 0 2 0、1 0 2 1、1 0 2 2、1 0 2 3、1 0 2 4、
 1 0 2 5、1 0 2 6、1 0 2 7、1 0 2 8、1 0 2 9、1 0 3 0、1 0 3 1、1 0 3 2、
 1 0 3 3、1 0 3 4、1 0 3 5、1 0 3 6、1 0 3 7、1 0 3 8、1 0 3 9、1 0 4 0、
 1 0 4 1、1 0 4 2、1 0 4 3、1 0 4 4、1 0 4 5、1 0 4 6、1 0 4 7、1 0 4 8、
 1 0 4 9、1 0 5 0、1 0 5 1、1 0 5 2、1 0 5 3、1 0 5 4、1 0 5 5、1 0 5 6、
 1 0 5 7、1 0 5 8、1 0 5 9、1 0 6 0、1 0 6 1、1 0 6 2、1 0 6 3、1 0 6 4ま
 たは1 0 6 5ヌクレオチドを欠く場合がある。

10

20

【0 0 2 1】

本明細書の実施例のセクションで実証されるように、mRNAレベルでのヒトACVR2Bの細胞内領域の破壊は、マイオスタチンシグナル伝達を効率的に減少させる。したがって、ACVR2Bの細胞内領域は、マイオスタチンシグナルを破壊する良好な標的である。

【0 0 2 2】

一実施形態では、本発明の化合物は、野生型ACVR2Bタンパク質の細胞内領域の一部、例えば、配列番号11の中の配列を有するものを欠く切断型ACVR2Bタンパク質の、標的細胞による産生を引き起こすことができる。

30

【0 0 2 3】

本明細書で使用される場合、「野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部を欠く切断型ACVR2Bタンパク質」（以下、「ACVR2Bタンパク質の切断型バージョン」または「切断型ACVR2Bタンパク質」と称する）とは、野生型ACVR2Bの前記細胞内領域の中の少なくとも1つのアミノ酸を欠く任意の切断型バージョンのACVR2Bタンパク質を指す。野生型ACVR2Bに比べて存在しないACVR2Bの細胞内領域の部分は、野生型ACVR2Bに存在するが、切断型ACVR2Bには存在しない1つ以上のアミノ酸を指す。例えば、ACVR2Bタンパク質の切断型バージョンは、野生型ACVR2Bタンパク質、例えば、配列番号11として示されるものに見出される細胞内領域の1個のアミノ酸、または2、3、4、5、6、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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、1

40

50

1 6、1 1 7、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4、1 2 5、1
 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1
 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 4、1 4 5、1
 4 6、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 4、1 5 5、1
 5 6、1 5 7、1 5 8、1 5 9、1 6 0、1 6 1、1 6 2、1 6 3、1 6 4、1 6 5、1
 6 6、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 0、1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4、1 7 5、1
 7 6、1 7 7、1 7 8、1 7 9、1 8 0、1 8 1、1 8 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、1
 8 6、1 8 7、1 8 8、1 8 9、1 9 0、1 9 1、1 9 2、1 9 3、1 9 4、1 9 5、1
 9 6、1 9 7、1 9 8、1 9 9、2 0 0、2 0 1、2 0 2、2 0 3、2 0 4、2 0 5、2
 0 6、2 0 7、2 0 8、2 0 9、2 1 0、2 1 1、2 1 2、2 1 3、2 1 4、2 1 5、2
 1 6、2 1 7、2 1 8、2 1 9、2 2 0、2 2 1、2 2 2、2 2 3、2 2 4、2 2 5、2
 2 6、2 2 7、2 2 8、2 2 9、2 3 0、2 3 1、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2
 3 6、2 3 7、2 3 8、2 3 9、2 4 0、2 4 1、2 4 2、2 4 3、2 4 4、2 4 5、2
 4 6、2 4 7、2 4 8、2 4 9、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5 3、2 5 4、2 5 5、2
 5 6、2 5 7、2 5 8、2 5 9、2 6 0、2 6 1、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2 6 5、2
 6 6、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 1、2 7 2、2 7 3、2 7 4、2 7 5、2
 7 6、2 7 7、2 7 8、2 7 9、2 8 0、2 8 1、2 8 2、2 8 3、2 8 4、2 8 5、2
 8 6、2 8 7、2 8 8、2 8 9、2 9 0、2 9 1、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2
 9 6、2 9 7、2 9 8、2 9 9、3 0 0、3 0 1、3 0 2、3 0 3、3 0 4、3 0 5、3
 0 6、3 0 7、3 0 8、3 0 9、3 1 0、3 1 1、3 1 2、3 1 3、3 1 4、3 1 5、3
 1 6、3 1 7、3 1 8、3 1 9、3 2 0、3 2 1、3 2 2、3 2 3、3 2 4、3 2 5、3
 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3
 3 6、3 3 7、3 3 8、3 3 9、3 4 0、3 4 1、3 4 2、3 4 3、3 4 4、3 4 5、3
 4 6、3 4 7、3 4 8、3 4 9、3 5 0、3 5 1、3 5 2、3 5 3、または3 5 4個のア
 ミノ酸を欠く場合がある。明らかであるとおりに、切断型バージョンノバリエーションは、単に
 、タンパク質のカルボキシ末端またはアミノ末端から除去された1つ以上のアミノ酸を有
 するバージョンをカバーするだけでなく、ACVR2Bタンパク質内から1つ以上のアミ
 ノ酸を欠くバリエーションもまたカバーする。

10

20

【0024】

切断型バージョンにおいて存在しないまたは欠いているACVR2Bの細胞内領域の部
 分は、野生型ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群か
 ら選択される少なくとも1つのエクソンの全部または一部によってコードされる。

30

【0025】

本明細書で使用される場合、「切断型バージョンとしてのACVR2Bタンパク質の産
 生を引き起こすことができる」とは、本発明の化合物が、本明細書でより十分に説明され
 るように、化合物が添加された細胞が切断型ACVR2Bを合成または産生することを可
 能にすることを意味する。

【0026】

ACVR2Bの細胞外領域および膜貫通領域が依然として存在するため、本発明のAC
 VR2Bの切断型バージョンは、その天然リガンドに結合し得るが、マイオスタチンリガ
 ンドの結合に関しては、マイオスタチンシグナルの伝達効率は、野生型ACVR2Bのも
 のと比較して減少し得る。ACVR2Bに結合し得る天然リガンドの例としては、アクチ
 ピン-A、アクチピン-B、GDF1、GDF3、NODAL、GDF11、マイオスタ
 チン(GDF8としても公知である)、BMP2、BMP5、GDF5(BMP14とし
 ても知られる)、GDF6、GDF7、BMP5、BMP6、BMP7およびBMP8が
 挙げられる。リガンドの好ましい例は、GDF8としても知られるマイオスタチンである。

40

【0027】

本明細書で使用される場合、シグナルの「伝達」は、シグナルに関連する下流因子を活
 性化することによって、またはシグナルに関連する下流因子を不活性化することによっ
 て、シグナルを中継することを意味することが意図される。

50

【 0 0 2 8 】

特定の実施形態では、本発明の A C V R 2 B タンパク質の切断型バージョンは、マイオスタチンに結合することができる。

【 0 0 2 9 】

本発明の切断型 A C V R 2 B タンパク質は、リガンドの A C V R 2 B への結合時にシグナルを伝達するが、野生型 A C V R 2 B よりも強度は低い。一実施形態では、切断型 A C V R 2 B タンパク質は、マイオスタチンのそれへの結合時に、野生型 A C V R 2 B よりも低い強度でマイオスタチンシグナルを伝達する。本明細書で使用される場合、用語「野生型 A C V R 2 B よりも低い強度」とは、シグナル強度（シグナル能力）が、同リガンドの野生型 A C V R 2 B への結合によって伝達されたシグナル強度と比較して、1%、2%、3%、4%、5%、6%、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%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%減少することを指す。シグナル強度は、伝達されたシグナルによってその発現が誘発される1つ以上の遺伝子の mRNA 発現レベルを定量することによって間接的に決定することができる。例えば、マイオスタチン誘発性シグナル伝達のシグナル強度は、S M A D 7 の mRNA 発現レベルを測定することによって評価することができる。この場合、本発明の化合物は、マイオスタチンシグナルの強度を、野生型 A C V R 2 B のマイオスタチンシグナル伝達に起因するものと比較して、S M A D 7 の mRNA 発現レベルの1%、2%、3%、4%、5%、6%、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%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の減少と相関するレベルまで減少させることができる。

【 0 0 3 0 】

別の実施形態では、本発明の変異型 A C V R 2 B mRNA は、フレームシフト変異のために、野生型 A C V R 2 B の細胞内領域の一部または全部をコードする配列の一部を欠いてもよい。このようなフレームシフト変異は、野生型 mRNA とは異なるリーディングフレームをその下流に生成することができる。したがって、この場合、本発明の変異型 A C V R 2 B mRNA は、野生型 A C V R 2 B の細胞内領域の一部または全部をコードする配列の一部を欠く。

【 0 0 3 1 】

このようなフレームシフトにより、本発明の変異型 A C V R 2 B mRNA は、A C V R 2 B のナンセンス媒介 mRNA 崩壊 (NMD) を経ることもできる。NMD は、全ての真核生物が有する mRNA の品質を制御する機構であり、典型的には変異によって引き起こされる、元の終止コドンの上流 (5' 末端に向かって) の位置に終止コドンを有する異常な mRNA を破壊する。一部のエクソン、特に3ヌクレオチドの非倍数の長さの配列を有するエクソン (すなわち、N が所与の整数である 3N ではない) がスキップされた場合、

10

20

30

40

50

トリプレットの翻訳フレームがシフトされ、これは、元の終止コドンの上流に新規の終止コドンを生成し得る。例えば、ACVR2Bのエクソン8がスキップされた場合、エクソン7と9は直接接続される。エクソン7および9の接続におけるリーディングフレーム、「AG/GTAG」は、エクソン7の最も3'末端の2ヌクレオチド、すなわち「AG」と、エクソン9の最も5'末端の4ヌクレオチド、すなわち「GTAG」で構成される。AGGTAGはアルギニン(Arg)および終止コドンをコードし、ナンセンス変異様mRNAを生成する。このような変異mRNAは、次に、NMDによって破壊され得る。一方、野生型ACVR2Bでは、エクソン7および8の接続部に位置するリーディングフレーム「AG/GGAU」は、エクソン7の最も3'末端の2ヌクレオチド、すなわち「AG」、およびエクソン8の最も5'末端の4ヌクレオチド、すなわち「GGAU」で構成される。AGGGAUはアルギニン(Arg)およびアスパラギン酸(Asp)をコードする。

10

【0032】

フレームシフトのために新たな終止コドンが生成される状況では、本発明の変異型ACVR2B mRNAが生成されるが、次に、典型的には、NMDを介して分解/減衰される。

【0033】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」は、本発明の化合物が導入され、ACVR2B(例えば、野生型ACVR2B)を発現する任意の細胞であり得る。標的細胞の例としては、筋細胞、筋芽細胞、または筋管細胞が挙げられる。一実施形態では、標的細胞は動物細胞である。別の実施形態では、標的細胞は哺乳動物細胞である。別の実施形態では、標的細胞はヒト細胞である。

20

【0034】

本発明の化合物は、野生型ACVR2Bの細胞内領域の一部を欠く切断型バージョンとしてACVR2B mRNAおよび/またはタンパク質の産生を引き起こすことができる任意の化合物である。本発明の適切な化合物の例としては、適切なエンドヌクレアーゼにより、その細胞内領域の一部をコードするACVR2B遺伝子の一部を切り出し/除去することができるCRISPR-CAS9ガイドRNA配列、細胞内領域ACVR2Bの一部をコードする少なくとも1つのエクソンをスキップするためのアンチセンスオリゴマー、およびその細胞内領域の一部をコードするACVR2B遺伝子の一部をノックアウトするためのloxP系化合物が挙げられる。

30

【0035】

当業者には理解されるように、TALENまたは亜鉛フィンガー(ZFN)などの他の周知の遺伝子編集技術を用いて、本発明のACVR2Bの切断型バージョンを生成することもできる。

【0036】

CRISPR-CAS9を用いてマイオスタチンシグナルを阻害する場合、ACVR2BまたはACVR2Bの一部(例えば、野生型ACVR2Bの細胞内領域)をコードするゲノムDNAの標的配列に相補的な配列を有するガイドRNAを標的細胞に導入し、それによって切断される標的配列を同定する。標的細胞に導入されたCas9タンパク質は、ゲノムDNAおよびガイドRNAで構成される二本鎖部分を切断する。切断部位を修復するプロセスを通じて、変異(複数可)は、ヌクレオチドの欠失および/または挿入によって引き起こされ、それによってACVR2Bの全部または一部のノックアウトを引き起こす。ゲノムDNAの標的配列の例としては、ACVR2Bのエクソンの任意の配列、例えばACVR2Bのエクソン1~11が挙げられる。適切には、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。一実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6、7、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエク

40

50

ソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5および6からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7、8および9からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7および8からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5である。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン6である。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7である。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン8である。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン9である。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン10である。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン11である。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7、8、9および10からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンのいずれかの配列を含む。あるいは、イントロンは、CRISPR-CAS9によって標的化され得る。例えば、エクソン8をサンドイッチするイントロン7および8を切断することができる。切断された部位が修復される場合、エクソン8が不存在になり、エクソン8が欠失した変異型mRNAを生じることができる。同様に、イントロン4および5、またはイントロン5および6、またはイントロン6および7、またはイントロン8および9、またはイントロン9および10、またはイントロン10および11を標的化して、切断することができる。したがって、本発明の化合物は、上記されるCRISPR-CAS9のためのガイドRNA、またはその転写物としてガイドRNAを提供するDNA（例えば、発現プラスミド）、またはCAS9（もしくはCas9様）タンパク質、またはCAS9（もしくはCas9様）タンパク質をコードし、提供するDNA（例えば、発現プラスミド）、またはそれらの組み合わせであり得る。

【0037】

siRNAを用いてマイオスタチンシグナルを阻害した場合、ACVR2B mRNAの配列を標的とするように設計されたsiRNAが標的細胞に導入される。このように導入されたsiRNAのガイド鎖が標的配列にハイブリダイズした場合、標的細胞中の内因性RISCタンパク質は、ガイド鎖および標的mRNA鎖で構成される二本鎖部分を同定し、mRNAの標的配列を切断する。そうすることにより、ACVR2Bタンパク質レベルが減少する。したがって、別の実施形態では、本発明の化合物は、siRNAまたはその転写物としてsiRNAを提供するDNA（発現プラスミドなど）であり得る。

【0038】

アンチセンスオリゴマー

変異型ACVR2B mRNAはまた、細胞を、タンパク質の細胞内領域をコードする1つ以上のACVR2Bエクソンのエクソンスキップを誘導することができるアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)に接触させることによって細胞内で産生され得る。

【0039】

一実施形態では、本発明の化合物は、ACVR2Bの細胞内領域の一部をコードするエクソンのスキッピングを誘導することができるアンチセンスオリゴマー（以下、「本発明のアンチセンスオリゴマー」または「アンチセンスオリゴマー」と称する）である。適切には、スキップされるエクソンは、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択されるものである。一実施形態では、スキップされるエクソンは、エクソン5、6、7、9および10からなる群から選択されるものである。別の実施形態では、スキップされるエクソンはエクソン5である。さらに別の実施形態では、スキップされる

エクソンはエクソン 6 である。さらに別の実施形態では、スキップされるエクソンはエクソン 7 である。さらに別の実施形態では、スキップされるエクソンはエクソン 8 である。さらに別の実施形態では、スキップされるエクソンはエクソン 9 である。さらに別の実施形態では、スキップされるエクソンはエクソン 10 である。さらに別の実施形態では、スキップされるエクソンはエクソン 11 である。さらに別の実施形態では、スキップされるエクソンは、ACVR2B のエクソン 7、8、9 および 10 からなる群、または ACVR2B のエクソン 5、6、7、8、9 および 10 からなる群から選択されるものである。

【0040】

エクソン 5、6、7、8、9、10 および 11 の代表的なヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号 1、2、3、4、5、6 および 7 として示されるものである。エクソン 5、6、7、8、9、10 および 11 のヌクレオチド配列は、配列番号 1、2、3、4、5、6 および 7 として示されるものに限定されず、それぞれ、配列番号 1、2、3、4、5、6 および 7 の長さの 90% 以上、91% 以上、92% 以上、93% 以上、94% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、99% 以上、または 100% の長さを有し、それぞれ、配列番号 1、2、3、4、5、6 および 7 に対して 90% 以上、91% 以上、92% 以上、93% 以上、94% 以上、95% 以上、96% 以上、97% 以上、98% 以上、99% 以上、または 100% の配列同一性を有するバリエーション配列を含む。

【0041】

用語「ACVR2B の細胞内領域の一部をコードするエクソンのスキッピングを誘導することができる」とは、本発明のアンチセンスオリゴマーが、ACVR2B 遺伝子（例えば、ヒト ACVR2B 遺伝子）の転写物（例えば、プレ mRNA）の細胞内領域の一部をコードするエクソンのその標的部位に結合した後、前記エクソンがスプライシングされることを意味する。例えば、本発明のアンチセンスオリゴマーが ACVR2B プレ mRNA のエクソン 6 の一部に結合する場合、エクソン 6 の下流のエクソン、すなわちエクソン 7 の 5' 末端に対応するヌクレオチド配列は、エクソン 6 の上流のエクソン、すなわちエクソン 5 の 3' 末端に対応するヌクレオチド配列でスプライシングされる。これは、本発明のアンチセンスオリゴマーの結合に続く正常なスプライシング機構の破壊によって引き起こされる。次に、mRNA によりコードされる ACVR2B ポリペプチドは、エクソン 7 に接続されたエクソン 5 によりコードされるアミノ酸を含み、エクソン 6 によりコードされるものは、切断型 ACVR2B バリエーションから省略される（存在しない）。

【0042】

ここで、用語「結合」とは、本発明のアンチセンスオリゴマーが、ACVR2B 遺伝子（例えば、ヒト ACVR2B 遺伝子）の転写物のコピーと接触（例えば、混合）された場合、相補配列が生理学的条件下でハイブリダイズし、二本鎖核酸を形成することを意味する。用語「生理学的条件下」とは、pH、塩組成および温度に関してインビボ環境を模倣する条件を指す。適切な条件は、以下の温度、pH および塩濃度の任意の組み合わせであり得る。

温度：25 ~ 40、35 ~ 38、36 ~ 38、または 37；

pH：pH 5 ~ 8、pH 6 ~ 8、pH 7 ~ 8、または pH 7.4；および

塩濃度：100 ~ 200 mM、130 ~ 170 mM、140 ~ 160 mM、または 150 mM の塩化ナトリウム濃度。

【0043】

本明細書で使用される場合、ヌクレオチド配列に関する「配列同一性」および「相同性」とは、配列をアライメントし、必要であれば最大の配列同一性パーセントを達成するためにギャップを許容し、配列同一性の一部としていずれの保存的置換も考慮しないようにした後、対象ヌクレオチド配列中のヌクレオチド残基と同一である候補標的配列中のヌクレオチド残基のパーセンテージを指す。ヌクレオチド配列同一性パーセントを決定する目的でのアライメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ClustalW2、ALIGN または MEGALIGN TM (DNASTAR) ソフトウェアなどの公に入手可能なコンピュータソフトウェアを用いて、当業者の技術の範囲内の種々の方法で達成する

ことができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。例えば、2つ以上のヌクレオチド配列の配列同一性は、KarlinおよびAltschulのアルゴリズム、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993) を用いて決定することができる。BLASTのアルゴリズムに基づいて、BLASTNおよびBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990)。BLASTNがヌクレオチド配列分析に使用される場合、パラメータは、例えば、スコア = 100 およびワード長 = 12 に設定され得る。BLASTおよびGapped BLASTプログラムが使用される場合、各プログラムのデフォルトパラメータを使用することができる。

10

【0044】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、オリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドである。本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」は、修飾を含み得るかまたは含み得ない、以下で定義される長さの連結ヌクレオチドの配列である。修飾オリゴヌクレオチドは、他の箇所に詳細に記載される。

【0045】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、その5'末端から3'末端に10~70ヌクレオチドの長さ、例えば11~70、12~70、13~70、14~70、15~70、16
 ~70、17~70、18~70、19~70、20~70、21~70、22~70、
 23~70、24~70、25~70、10~65、11~65、12~65、13~6
 5、14~65、15~65、16~65、17~65、18~65、19~65、20
 ~65、21~65、22~65、23~65、24~65、25~65、10~60、
 11~60、12~60、13~60、14~60、15~60、16~60、17~6
 0、18~60、19~60、20~60、21~60、22~60、23~60、24
 ~60、25~60、10~55、11~55、12~55、13~55、14~55、
 15~55、16~55、17~55、18~55、19~55、20~55、21~5
 5、22~55、23~55、24~55、25~55、10~50、11~50、12
 ~50、13~50、14~50、15~50、16~50、17~50、18~50、
 19~50、20~50、21~50、22~50、23~50、24~50、25~5
 0、10~45、11~45、12~45、13~45、14~45、15~45、16
 ~45、17~45、18~45、19~45、20~45、21~45、22~45、
 23~45、24~45、25~45、10~40、11~40、12~40、13~4
 0、14~40、15~40、16~40、17~40、18~40、19~40、20
 ~40、21~40、22~40、23~40、24~40、25~40、10~38、
 11~38、12~38、13~38、14~38、15~38、16~38、17~3
 8、18~38、19~38、20~38、21~38、22~38、23~38、24
 ~38、25~38、10~36、11~36、12~36、13~36、14~36、
 15~36、16~36、17~36、18~36、19~36、20~36、21~3
 6、22~36、23~36、24~36、25~36、10~35、11~35、12
 ~35、13~35、14~35、15~35、16~35、17~35、18~35、
 19~35、20~35、21~35、22~35、23~35、24~35、25~3
 5、10~34、11~34、12~34、13~34、14~34、15~34、16
 ~34、17~34、18~34、19~34、20~34、21~34、22~34、
 23~34、24~34、25~34、10~33、11~33、12~33、13~3
 3、14~33、15~33、16~33、17~33、18~33、19~33、20
 ~33、21~33、22~33、23~33、24~33、25~33、10~32、
 11~32、12~32、13~32、14~32、15~32、16~32、17~3
 2、18~32、19~32、20~32、21~32、22~32、23~32、24

20

30

40

50

~ 3 2、2 5 ~ 3 2、1 0 ~ 3 0、1 1 ~ 3 0、1 2 ~ 3 0、1 3 ~ 3 0、1 4 ~ 3 0、
 1 5 ~ 3 0、1 6 ~ 3 0、1 7 ~ 3 0、1 8 ~ 3 0、1 9 ~ 3 0、2 0 ~ 3 0、2 1 ~ 3
 0、2 2 ~ 3 0、2 3 ~ 3 0、2 4 ~ 3 0、2 5 ~ 3 0、1 0 ~ 2 9、1 1 ~ 2 9、1 2
 ~ 2 9、1 3 ~ 2 9、1 4 ~ 2 9、1 5 ~ 2 9、1 6 ~ 2 9、1 7 ~ 2 9、1 8 ~ 2 9、
 1 9 ~ 2 9、2 0 ~ 2 9、2 1 ~ 2 9、2 2 ~ 2 9、2 3 ~ 2 9、2 4 ~ 2 9、2 5 ~ 2
 9、1 0 ~ 2 8、1 1 ~ 2 8、1 2 ~ 2 8、1 3 ~ 2 8、1 4 ~ 2 8、1 5 ~ 2 8、1 6
 ~ 2 8、1 7 ~ 2 8、1 8 ~ 2 8、1 9 ~ 2 8、2 0 ~ 2 8、2 1 ~ 2 8、2 2 ~ 2 8、
 2 3 ~ 2 8、2 4 ~ 2 8、2 5 ~ 2 8、1 0 ~ 2 7、1 1 ~ 2 7、1 2 ~ 2 7、1 3 ~ 2
 7、1 4 ~ 2 7、1 5 ~ 2 7、1 6 ~ 2 7、1 7 ~ 2 7、1 8 ~ 2 7、1 9 ~ 2 7、2 0
 ~ 2 7、2 1 ~ 2 7、2 2 ~ 2 7、2 3 ~ 2 7、2 4 ~ 2 7、2 5 ~ 2 7、1 0 ~ 2 6、
 1 1 ~ 2 6、1 2 ~ 2 6、1 3 ~ 2 6、1 4 ~ 2 6、1 5 ~ 2 6、1 6 ~ 2 6、1 7 ~ 2
 6、1 8 ~ 2 6、1 9 ~ 2 6、2 0 ~ 2 6、2 1 ~ 2 6、2 2 ~ 2 6、2 3 ~ 2 6、2 4
 ~ 2 6、2 5 ~ 2 6、1 0 ~ 2 5、1 1 ~ 2 5、1 2 ~ 2 5、1 3 ~ 2 5、1 4 ~ 2 5、
 1 5 ~ 2 5、1 6 ~ 2 5、1 7 ~ 2 5、1 8 ~ 2 5、1 9 ~ 2 5、2 0 ~ 2 5、2 1 ~ 2
 5、2 2 ~ 2 5、2 3 ~ 2 5、2 4 ~ 2 5、1 0 ~ 2 4、1 1 ~ 2 4、1 2 ~ 2 4、1 3
 ~ 2 4、1 4 ~ 2 4、1 5 ~ 2 4、1 6 ~ 2 4、1 7 ~ 2 4、1 8 ~ 2 4、1 9 ~ 2 4、
 2 0 ~ 2 4、2 1 ~ 2 4、2 2 ~ 2 4、2 3 ~ 2 4、1 0 ~ 2 3、1 1 ~ 2 3、1 2 ~ 2
 3、1 3 ~ 2 3、1 4 ~ 2 3、1 5 ~ 2 3、1 6 ~ 2 3、1 7 ~ 2 3、1 8 ~ 2 3、1 9
 ~ 2 3、2 0 ~ 2 3、2 1 ~ 2 3、2 2 ~ 2 3、1 0 ~ 2 2、1 1 ~ 2 2、1 2 ~ 2 2、
 1 3 ~ 2 2、1 4 ~ 2 2、1 5 ~ 2 2、1 6 ~ 2 2、1 7 ~ 2 2、1 8 ~ 2 2、1 9 ~ 2
 2、2 0 ~ 2 2、2 1 ~ 2 2、1 0 ~ 2 1、1 1 ~ 2 1、1 2 ~ 2 1、1 3 ~ 2 1、1 4
 ~ 2 1、1 5 ~ 2 1、1 6 ~ 2 1、1 7 ~ 2 1、1 8 ~ 2 1、1 9 ~ 2 1、2 0 ~ 2 1、
 1 0 ~ 2 0、1 1 ~ 2 0、1 2 ~ 2 0、1 3 ~ 2 0、1 4 ~ 2 0、1 5 ~ 2 0、1 6 ~ 2
 0、1 7 ~ 2 0、1 8 ~ 2 0、1 9 ~ 2 0、1 0 ~ 1 9、1 1 ~ 1 9、1 2 ~ 1 9、1 3
 ~ 1 9、1 4 ~ 1 9、1 5 ~ 1 9、1 6 ~ 1 9、1 7 ~ 1 9、1 8 ~ 1 9、1 0 ~ 1 8、
 1 1 ~ 1 8、1 2 ~ 1 8、1 3 ~ 1 8、1 4 ~ 1 8、1 5 ~ 1 8、1 6 ~ 1 8、1 7 ~ 1
 8、1 0 ~ 1 7、1 1 ~ 1 7、1 2 ~ 1 7、1 3 ~ 1 7、1 4 ~ 1 7、1 5 ~ 1 7、1 6
 ~ 1 7、1 0 ~ 1 6、1 1 ~ 1 6、1 2 ~ 1 6、1 3 ~ 1 6、1 4 ~ 1 6、1 5 ~ 1 6、
 1 0 ~ 1 5、1 1 ~ 1 5、1 2 ~ 1 5、1 3 ~ 1 5および1 4 ~ 1 5ヌクレオチドを有す
 ることができる(以下、「本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さ範囲」と称す
 る)。本発明のアンチセンスオリゴマーは、その5'末端から3'末端に10、11、12
 、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、
 26、27、28、29、30、33、32、33、34、35、36、37、38、3
 9、40、44、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、52
 、53、54、55、56、57、58、59、60、66、62、63、64、65、
 66、67、68、69、または70ヌクレオチドの長さを有することができる(以下、
 「本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さ」と称する)。本発明のオリゴマーの
 長さに特に適した範囲は、その5'末端から3'末端に15~45、17~35、15~2
 4、15~26、および20~40ヌクレオチドを含む。

【0046】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、1
 0および11からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10
 からなる群から選択されるエクソンのヌクレオチド配列の一部に相補的なヌクレオチド配
 列を含む。ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群、ま
 たはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択されるエ
 クソンのヌクレオチド配列の一部は、本明細書では「標的配列」とも称する。エクソン5
 、6、7、8、9、10および11の代表的なヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号1
 、2、3、4、5、6および7として示されるものである。エクソン5、6、7、8、9
 、10および11のヌクレオチド配列は、配列番号1、2、3、4、5、6および7とし
 て示されるものに限定されず、それぞれ、配列番号1、2、3、4、5、6および7のい

10

20

30

40

50

いずれかに開示される配列と90%以上、91%以上、92%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有するバリエーション配列を含む。したがって、本発明の特定の実施形態によれば、本発明のオリゴマーは、それぞれ、配列番号1、2、3、4、5、6および7のいずれかに開示される配列と90%以上、91%以上、92%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有する配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。

【0047】

標的配列は、それが本発明のアンチセンスオリゴマーの長さと同じであるかまたはそれよりも短い限り、任意の長さであり得る。例えば、標的配列は、5'末端から3'末端に10~70ヌクレオチドの長さ、例えば11~70、12~70、13~70、14~70、15~70、16~70、17~70、18~70、19~70、20~70、21~70、22~70、23~70、24~70、25~70、10~65、11~65、12~65、13~65、14~65、15~65、16~65、17~65、18~65、19~65、20~65、21~65、22~65、23~65、24~65、25~65、10~60、11~60、12~60、13~60、14~60、15~60、16~60、17~60、18~60、19~60、20~60、21~60、22~60、23~60、24~60、25~60、10~55、11~55、12~55、13~55、14~55、15~55、16~55、17~55、18~55、19~55、20~55、21~55、22~55、23~55、24~55、25~55、10~50、11~50、12~50、13~50、14~50、15~50、16~50、17~50、18~50、19~50、20~50、21~50、22~50、23~50、24~50、25~50、10~45、11~45、12~45、13~45、14~45、15~45、16~45、17~45、18~45、19~45、20~45、21~45、22~45、23~45、24~45、25~45、10~40、11~40、12~40、13~40、14~40、15~40、16~40、17~40、18~40、19~40、20~40、21~40、22~40、23~40、24~40、25~40、10~38、11~38、12~38、13~38、14~38、15~38、16~38、17~38、18~38、19~38、20~38、21~38、22~38、23~38、24~38、25~38、10~36、11~36、12~36、13~36、14~36、15~36、16~36、17~36、18~36、19~36、20~36、21~36、22~36、23~36、24~36、25~36、10~35、11~35、12~35、13~35、14~35、15~35、16~35、17~35、18~35、19~35、20~35、21~35、22~35、23~35、24~35、25~35、10~34、11~34、12~34、13~34、14~34、15~34、16~34、17~34、18~34、19~34、20~34、21~34、22~34、23~34、24~34、25~34、10~33、11~33、12~33、13~33、14~33、15~33、16~33、17~33、18~33、19~33、20~33、21~33、22~33、23~33、24~33、25~33、10~32、11~32、12~32、13~32、14~32、15~32、16~32、17~32、18~32、19~32、20~32、21~32、22~32、23~32、24~32、25~32、10~30、11~30、12~30、13~30、14~30、15~30、16~30、17~30、18~30、19~30、20~30、21~30、22~30、23~30、24~30、25~30、10~29、11~29、12~29、13~29、14~29、15~29、16~29、17~29、18~29、19~29、20~29、21~29、22~29、23~29、24~29、25~29、10~28、11~28、12~28、13~28、14~28、15~28、16~28、17~28、18~28、19~28、20~28、21~28、22~28、23~28、24~28、25~28、10~27、11~27、12~27、13~27、14~27、15~27、16~27、17~27、18~27

10

20

30

40

50

、 19 ~ 27、 20 ~ 27、 21 ~ 27、 22 ~ 27、 23 ~ 27、 24 ~ 27、 25 ~ 27、 10 ~ 26、 11 ~ 26、 12 ~ 26、 13 ~ 26、 14 ~ 26、 15 ~ 26、 16 ~ 26、 17 ~ 26、 18 ~ 26、 19 ~ 26、 20 ~ 26、 21 ~ 26、 22 ~ 26、 23 ~ 26、 24 ~ 26、 25 ~ 26、 10 ~ 25、 11 ~ 25、 12 ~ 25、 13 ~ 25、 14 ~ 25、 15 ~ 25、 16 ~ 25、 17 ~ 25、 18 ~ 25、 19 ~ 25、 20 ~ 25、 21 ~ 25、 22 ~ 25、 23 ~ 25、 24 ~ 25、 10 ~ 24、 11 ~ 24、 12 ~ 24、 13 ~ 24、 14 ~ 24、 15 ~ 24、 16 ~ 24、 17 ~ 24、 18 ~ 24、 19 ~ 24、 20 ~ 24、 21 ~ 24、 22 ~ 24、 23 ~ 24、 10 ~ 23、 11 ~ 23、 12 ~ 23、 13 ~ 23、 14 ~ 23、 15 ~ 23、 16 ~ 23、 17 ~ 23、 18 ~ 23、 19 ~ 23、 20 ~ 23、 21 ~ 23、 22 ~ 23、 10 ~ 22、 11 ~ 22、 12 ~ 22、 13 ~ 22、 14 ~ 22、 15 ~ 22、 16 ~ 22、 17 ~ 22、 18 ~ 22、 19 ~ 22、 20 ~ 22、 21 ~ 22、 10 ~ 21、 11 ~ 21、 12 ~ 21、 13 ~ 21、 14 ~ 21、 15 ~ 21、 16 ~ 21、 17 ~ 21、 18 ~ 21、 19 ~ 21、 20 ~ 21、 10 ~ 20、 11 ~ 20、 12 ~ 20、 13 ~ 20、 14 ~ 20、 15 ~ 20、 16 ~ 20、 17 ~ 20、 18 ~ 20、 19 ~ 20、 10 ~ 19、 11 ~ 19、 12 ~ 19、 13 ~ 19、 14 ~ 19、 15 ~ 19、 16 ~ 19、 17 ~ 19、 18 ~ 19、 10 ~ 18、 11 ~ 18、 12 ~ 18、 13 ~ 18、 14 ~ 18、 15 ~ 18、 16 ~ 18、 17 ~ 18、 10 ~ 17、 11 ~ 17、 12 ~ 17、 13 ~ 17、 14 ~ 17、 15 ~ 17、 16 ~ 17、 10 ~ 16、 11 ~ 16、 12 ~ 16、 13 ~ 16、 14 ~ 16、 15 ~ 16、 10 ~ 15、 11 ~ 15、 12 ~ 15、 13 ~ 15 および 14 ~ 15、 15 ~ 15、 16 ~ 15、 17 ~ 15、 18 ~ 15、 19 ~ 15、 20 ~ 15、 21 ~ 15、 22 ~ 15、 23 ~ 15、 24 ~ 15、 25 ~ 15、 26 ~ 15、 27 ~ 15、 28 ~ 15、 29 ~ 15、 30 ~ 15、 31 ~ 15、 32 ~ 15、 33 ~ 15、 34 ~ 15、 35 ~ 15、 36 ~ 15、 37 ~ 15、 38 ~ 15、 39 ~ 15、 40 ~ 15、 41 ~ 15、 42 ~ 15、 43 ~ 15、 44 ~ 15、 45 ~ 15、 46 ~ 15、 47 ~ 15、 48 ~ 15、 49 ~ 15、 50 ~ 15、 51 ~ 15、 52 ~ 15、 53 ~ 15、 54 ~ 15、 55 ~ 15、 56 ~ 15、 57 ~ 15、 58 ~ 15、 59 ~ 15、 60 ~ 15、 61 ~ 15、 62 ~ 15、 63 ~ 15、 64 ~ 15、 65 ~ 15、 66 ~ 15、 67 ~ 15、 68 ~ 15、 69 ~ 15、 または 70ヌクレオチドの長さを有することができる。

【 0048 】

標的配列に相補的なヌクレオチド配列（以下、「ハイブリダイズ配列」と称する）は、標的配列と同じ長さであるべきである。したがって、ハイブリダイズ配列の例示的な長さは、5'末端から3'末端に10~70ヌクレオチド、例えば11~70、12~70、13~70、14~70、15~70、16~70、17~70、18~70、19~70、20~70、21~70、22~70、23~70、24~70、25~70、10~65、11~65、12~65、13~65、14~65、15~65、16~65、17~65、18~65、19~65、20~65、21~65、22~65、23~65、24~65、25~65、10~60、11~60、12~60、13~60、14~60、15~60、16~60、17~60、18~60、19~60、20~60、21~60、22~60、23~60、24~60、25~60、10~55、11~55、12~55、13~55、14~55、15~55、16~55、17~55、18~55、19~55、20~55、21~55、22~55、23~55、24~55、25~55、10~50、11~50、12~50、13~50、14~50、15~50、16~50、17~50、18~50、19~50、20~50、21~50、22~50、23~50、24~50、25~50、10~45、11~45、12~45、13~45、14~45、15~45、16~45、17~45、18~45、19~45、20~45、21~45、22~45、23~45、24~45、25~45、10~40、11~40、12~40、13~40、14~40、15~40、16~40、17~40、18~40、19~40、20~40、21~40、22~40、23~40、24~40、25~40、10~38、11~38、12~38、13~38、14~38、15~38、16~38、17~38、18~38、19~38、20~38、21~38、22~38、23~38、24~38、25~38、10~36、11~36、12~36、13~36、14~36、15~36、16~36、17~36、18~

10

20

30

40

50

36、19~36、20~36、21~36、22~36、23~36、24~36、25~36、10~35、11~35、12~35、13~35、14~35、15~35、16~35、17~35、18~35、19~35、20~35、21~35、22~35、23~35、24~35、25~35、10~34、11~34、12~34、13~34、14~34、15~34、16~34、17~34、18~34、19~34、20~34、21~34、22~34、23~34、24~34、25~34、10~33、11~33、12~33、13~33、14~33、15~33、16~33、17~33、18~33、19~33、20~33、21~33、22~33、23~33、24~33、25~33、10~32、11~32、12~32、13~32、14~32、15~32、16~32、17~32、18~32、19~32、20~32、21~32、22~32、23~32、24~32、25~32、10~30、11~30、12~30、13~30、14~30、15~30、16~30、17~30、18~30、19~30、20~30、21~30、22~30、23~30、24~30、25~30、10~29、11~29、12~29、13~29、14~29、15~29、16~29、17~29、18~29、19~29、20~29、21~29、22~29、23~29、24~29、25~29、10~28、11~28、12~28、13~28、14~28、15~28、16~28、17~28、18~28、19~28、20~28、21~28、22~28、23~28、24~28、25~28、10~27、11~27、12~27、13~27、14~27、15~27、16~27、17~27、18~27、19~27、20~27、21~27、22~27、23~27、24~27、25~27、10~26、11~26、12~26、13~26、14~26、15~26、16~26、17~26、18~26、19~26、20~26、21~26、22~26、23~26、24~26、25~26、10~25、11~25、12~25、13~25、14~25、15~25、16~25、17~25、18~25、19~25、20~25、21~25、22~25、23~25、24~25、10~24、11~24、12~24、13~24、14~24、15~24、16~24、17~24、18~24、19~24、20~24、21~24、22~24、23~24、10~23、11~23、12~23、13~23、14~23、15~23、16~23、17~23、18~23、19~23、20~23、21~23、22~23、10~22、11~22、12~22、13~22、14~22、15~22、16~22、17~22、18~22、19~22、20~22、21~22、10~21、11~21、12~21、13~21、14~21、15~21、16~21、17~21、18~21、19~21、20~21、10~20、11~20、12~20、13~20、14~20、15~20、16~20、17~20、18~20、19~20、10~19、11~19、12~19、13~19、14~19、15~19、16~19、17~19、18~19、10~18、11~18、12~18、13~18、14~18、15~18、16~18、17~18、10~17、11~17、12~17、13~17、14~17、15~17、16~17、10~16、11~16、12~16、13~16、14~16、15~16、10~15、11~15、12~15、13~15および14~15ヌクレオチドを含み得る。ハイブリダイズ配列は、その5'末端から3'末端に10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、33、32、33、34、35、36、37、38、39、40、44、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、52、53、54、55、56、57、58、59、60、66、62、63、64、65、66、67、68、69、または70ヌクレオチドの長さを有することができる。

【0049】

適切なハイブリダイズ配列の例としては、配列番号12~36および43~111のいずれかが挙げられる。本発明のアンチセンスオリゴマーは、配列番号12~36および43~111のいずれかからなる群から選択されるヌクレオチド配列（以下、「適切なハイ

10

20

30

40

50

ブリダイズ配列」または「適切な複数のハイブリダイズ配列」と称する)を含み得る。

【0050】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、必ずしもハイブリダイズ配列のみを含むとは限らない場合がある。本発明のアンチセンスオリゴマーが、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンに対するスキッピング活性を保持する限り、本発明のアンチセンスオリゴマーは、上記の適切なハイブリダイズ配列の部分配列を含み得る。一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴマーは、配列番号12～36および43～111に開示される配列のいずれか1つの、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の連続するヌクレオチドを含むことができる。別の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴマーは、配列番号12～36および43～111に開示される配列のいずれか1つの、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の連続するヌクレオチドを含むことができる。

10

【0051】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、必ずしもハイブリダイズ配列のみを含むとは限らない場合がある。本発明のアンチセンスオリゴマーが、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンに対するスキッピング活性を保持する限り、本発明のアンチセンスオリゴマーは、標的領域に相補的でない追加の配列(塩基)を含み得る。

20

【0052】

本発明のアンチセンスオリゴマーにより標的化される配列の例としては、ACVR2BプレmRNAのエクソンの任意の配列、例えばエクソン1～11が挙げられる。適切には、標的配列は、ACVR2BプレmRNAのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群、またはACVR2BプレmRNAのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。一実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列は、エクソン5、6、7、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列は、エクソン5、6、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列は、エクソン5、6および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列は、エクソン5および6からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列は、エクソン7、8および9からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列は、エクソン7および8からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列はエクソン5である。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列はエクソン6である。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列はエクソン7である。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列はエクソン8である。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列はエクソン9である。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列はエクソン10である。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列はエクソン11である。別の実施形態では、ACVR2BプレmRNAの標的配列は、エクソン7、8、9および10からなる群、またはエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。

30

40

【0053】

特定の実施形態では、本発明のオリゴマーは、オリゴマーと同じ長さであるか、またはオリゴマーよりも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10ヌクレオチド短い八

50

イブリダイズ配列を有する。例えば、オリゴマーは、長さが24ヌクレオチドであり、同じ長さであるハイブリダイズ配列を有し得、すなわち、オリゴマー中の全ての24ヌクレオチドが標的領域に相補的であるか、またはオリゴマーは、長さが20ヌクレオチド(オリゴマー長よりも4ヌクレオチド短い)であるハイブリダイズ配列を有し得、したがって、オリゴマーは、標的領域に相補的でない(したがって、ハイブリダイズ配列の一部ではない)4ヌクレオチドも有することができる。このようなオリゴマーは、例えば、標的領域に相補的でないハイブリダイズ配列のいずれかの側に2つのヌクレオチド、または一方の側に3つ、他方に1つ、または一方の末端に4つのヌクレオチドを有することができる。

【0054】

ハイブリダイズ配列または部分ハイブリダイズ配列に加えて、本発明のアンチセンスオリゴマーは、標的配列へのハイブリダイズに寄与してもよく寄与しなくてもよい追加配列を含み得る。このような追加の配列は、ハイブリダイズ配列の5'末端、3'末端、もしくは両末端、または部分的ハイブリダイズ配列に結合され得る。この場合、本発明のアンチセンスオリゴマーの全長は、本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さの範囲、または本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さ内に入る。

【0055】

別の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴマーは、配列番号12~36および43~111のいずれかに示されるヌクレオチド配列からなり得る。一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴマーは、配列番号12~36および43~111のいずれかに示される配列の5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個の連続したヌクレオチドからなり得る。

別の実施形態では、本発明は、機能性ペプチド、例えば細胞浸透性ペプチド(CPP)が本発明のアンチセンスオリゴマーに結合しているコンジュゲートを提供すること。公知の機能性ペプチドまたは市販の機能性ペプチドを本発明において使用することができる。本発明で使用することができる機能性ペプチドには、例えば、国際公開第2008/036127号パンフレットに開示されているアルギニンリッチペプチド；または国際公開第2009/005793号パンフレットに開示されている臓器を標的とするペプチド、例えば、RXR、RBRなど；または国際公開第2012/150960号パンフレットに開示されているアミノ酸サブユニットを含むペプチドが含まれる。細胞浸透性ペプチド(CPP)は、哺乳動物細胞の細胞膜を通過することができ、したがって、細胞ドラッグデリバリーを改善することができる10~約30アミノ酸の短いペプチド配列を表す(例えば、Hum Mol Genet. 2011 Aug 15; 20(16): 3151-3160; Pharmacology & Therapeutics 154 (2015) 78-86を参照されたい)。公知のCPPまたは市販のCPPを本発明において使用することができる。本発明において使用することができるCPPは、例えば、Pharmacology & Therapeutics 154 (2015) 78-86の80頁の表1に列挙されたCPPが含まれ、例えば、TAT(48-60)、ペネトラチン、ポリアルギニン、Oct4、WT1-pTj、DPV3、トランスポータン、MAP、VP22、Rep1、KW、KFGF、FGF12、インテグリン3ペプチド、C105Y、TP2；特表2017-500856明細書(国際公開第2015/089487号パンフレット)の段落[0085]、表1に列挙されるCPP、例えばDPV10/6、DPV15b、YM-3、Tat、LR11、C45D18、Lyp-1、Lyp-2、BMV GAG、hLF1-22、C45D18、LR20などが挙げられる。CPPは、例えば、Funakoshi, Co., Ltd. から市販されている。TAT(Funakoshi, Co., Ltd.)、ペネトラチン(Funakoshi, Co., Ltd.)などの市販のCPP、または公知のCPP、例えばR8などを本発明において使用することができる。本発明において用いることができる好ましいCPPは、例えば、hLIMK、TAT、ペネトラチン、R8などを含む(国際公開第2016/187425号パンフレット、国際公開第2018/118662号パンフレット、国際公開第2018/118599号パンフレット、国際公開第2018/118627号パンフレット、EBioMedicine 45 (2019) 630-645などを参照されたい)。CPPは、本発明のアンチセンスオリゴマーに直接結合

10

20

30

40

50

することができ、またはC P Pをアンチセンスオリゴマーに結合することができるリンカーを介して結合することができる。公知のリンカーを本発明において使用することができる。このようなリンカーには、例えば、特表2017-500856明細書（国際公開第2015/089487号パンフレット）、国際公開第2015/089487号パンフレット、国際公開第2009/073809号パンフレット、国際公開第2013/075035号パンフレット、国際公開第2015/105083号パンフレット、国際公開第2014/179620号パンフレット、国際公開第2015/006740号パンフレット、国際公開第2017/010575号パンフレットなどに記載されるものが含まれる。本発明において使用することができる好ましいリンカーは、例えば、4-マレイミド酪酸、ジスルフィド結合を介して本発明の機能性ペプチドまたはアンチセンスオリゴマーに結合することができるリンカーなどを含む。本発明のコンジュゲートは、当業者に公知の方法によって調製することができる。

10

【0056】

スキッピング効率：

特定のオリゴマーが、A C V R 2 B 遺伝子中のエクソンまたは複数のエクソンのスキッピングをもたらし得るか否かは、A C V R 2 B を発現する細胞（例えば、ヒト横紋筋肉腫細胞）に本発明のアンチセンスオリゴマーを導入し、R T - P C R または P C R 増幅産物に関する配列分析により、A C V R 2 B 発現細胞の総 R N A から A C V R 2 B の細胞内領域をコードする A C V R 2 B m R N A の領域を増幅することによって評価または確認することができる。

20

【0057】

スキッピングの効率は、以下のように決定することができる：R T - P C R 反応溶液は、エクソンスキッピングを伴う P C R 増幅産物のポリヌクレオチドレベル「A」（例えば、切断型 A C V R 2 B の m R N A 量）、およびエクソンスキッピングを伴わない P C R 増幅産物のポリヌクレオチドレベル「B」（例えば、全長 A C V R 2 B の m R N A 量）について測定され、続いて、「A」および「B」のこれらの測定値に基づいて、次の式に従って計算される。

$$\text{スキッピング効率}(\%) = \{ A / (A + B) \} \times 100$$

【0058】

好ましい実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴマーは、エクソンスキッピングを10%以上、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、62.5%以上、65%以上、67.5%以上、70%以上、72.5%以上、75%以上、77.5%以上、80%以上、82.5%以上、85%以上、87.5%以上、90%以上、92.5%以上、95%以上、97.5%以上、98%以上または99%以上の効率で引き起こす。有効なアンチセンスオリゴマーが同定されると、当業者は、有効なアンチセンスオリゴマーの配列とオーバーラップする配列を有する種々のアンチセンスオリゴマーを設計し、本明細書に記載される手順を用いてそれらを試験することによって、より最適な配列を同定することを試みることができる。

30

【0059】

オリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴマーまたはペプチド核酸オリゴマー：

本発明のアンチセンスオリゴマーは、オリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴマーまたはペプチド核酸（P N A ）オリゴマーであり得、各々は、本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さの範囲、または本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さである。

40

【0060】

上記オリゴヌクレオチド（以下、「本発明のオリゴヌクレオチド」と称する）は、本発明のアンチセンスオリゴマーであり、その構成単位はヌクレオチドであり、このようなヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドのいずれかであり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には一本鎖である。

【0061】

50

「修飾ヌクレオチド」とは、核酸塩基、糖部分およびリン酸結合部分が全てまたは部分的に修飾されたリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを指す。

【0062】

本発明では、核酸塩基の例としては、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの修飾塩基が挙げられる。このような修飾塩基は、シュードウラシル、3-メチルウラシル、ジヒドロウラシル、5-アルキルシトシン（例えば、5-メチルシトシン）、5-アルキルウラシル（例えば、5-エチルウラシル）、5-ハロウラシル（例えば、5-ブロモウラシル）、6-アザピリミジン、6-アルキルピリミジン（例えば、6-メチルウラシル）、2-チオウラシル、4-チオウラシル、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、1-メチルアデニン、1-メチルヒポキサンチン、2,2-ジメチルグアニン、3-メチルシトシン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メチルカルボニルメチルウラシル、5-メチルオキシウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸、2-チオシトシン、プリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、イソグアニン、インドール、イミダゾール、キサンチンなどによって例示され得るが、これらに限定されない。

【0063】

糖部分への修飾は、リボースの2'位での修飾および糖の他の位置での修飾によって例示され得る。リボースの2'位における修飾の例としては、リボースの2'位での-OH基をOR、R、R'OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、BrまたはIで置換することを意図した修飾が挙げられ、Rはアルキルまたはアリアルを表し、R'はアルキレンを表す。

【0064】

糖の他の位置での修飾の例としては、リボースまたはデオキシリボースの4'位でのOのSへの置換、およびLNA（ロックド核酸）またはENA（2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸）によって例示されるように、糖の2'位と4'位の間の架橋が挙げられるが、これらに限定されない。

【0065】

リン酸結合部分への修飾は、ホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合またはボラノホスフェート結合で置換することを意図した修飾（Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160）によって例示され得る（例えば、国際公開第2006/129594号パンフレットおよび国際公開第2006/038608号パンフレットを参照されたい）。

【0066】

本発明では、アルキルは、好ましくは1~6個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖アルキルである。より具体的には、例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、n-ヘキシルおよびイソヘキシルが挙げられる。このようなアルキルは、ハロゲン、アルコキシ、シアノ、ニトロなどの1~3個の置換基で置換され得る。

【0067】

本発明では、シクロアルキルは、好ましくは5~12個の炭素原子を含むシクロアルキルである。より具体的には、例としては、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロデシルおよびシクロドデシルが挙げられる。

【0068】

本発明では、ハロゲンにはフッ素、塩素、臭素およびヨウ素が含まれる。

【0069】

アルコキシは、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、イソブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ、*n*-ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、*n*-ヘキシルオキシ、イソヘキシルオキシなどによって例示される1~6個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖アルコキシであり得る。特に好ましいものは、1~3個の炭素原子を含むアルコキシである。

【0070】

本発明では、アリールは、好ましくは6~10個の炭素原子を含むアリールである。より具体的には、例として、フェニル、*p*-ナフチルおよび*m*-ナフチルが挙げられる。特に好ましいものはフェニルである。このようなアリールは、アルキル、ハロゲン、アルコキシ、シアノ、ニトロなどを含む1~3個の置換基で置換され得る。

10

【0071】

本発明では、アルキレンは、好ましくは1~6個の炭素原子を含む直鎖または分岐鎖アルキレンである。より具体的には、例には、メチレン、エチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、2-(エチル)トリメチレンおよび1-(メチル)テトラメチレンが挙げられる。

【0072】

本発明では、アシルは、直鎖もしくは分岐鎖アルカノイルまたはアロイルであり得る。このようなアルカノイルの例としては、ホルミル、アセチル、2-メチルアセチル、2,2-ジメチルアセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、2,2-ジメチルプロピオニル、ヘキサノイルなどが挙げられる。アロイルの例としては、ベンゾイル、トルオイルおよびナフトイルが挙げられる。このようなアロイルは、任意の置換可能な位置で置換され得、アルキル(複数可)で置換され得る。

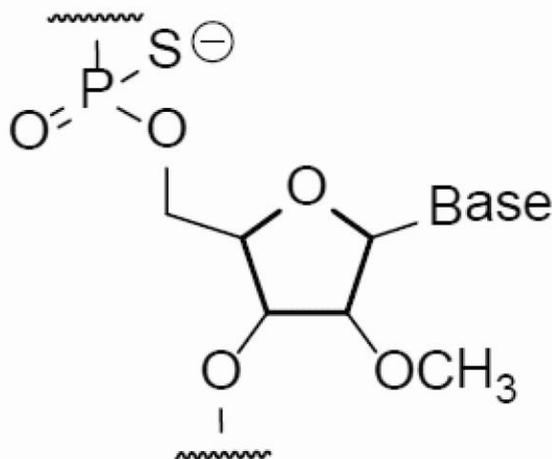
20

【0073】

本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、その構成単位が、以下の一般式によって表される基であり、リボースの2'位の-OH基がメトキシで置換され、リン酸結合部分がホスホロチオネート結合である本発明によるアンチセンスオリゴマーである。

【0074】

【化2】



30

(式中、Baseは核酸塩基を表す)。

【0075】

本発明のオリゴヌクレオチドは、種々の自動シンセサイザー(例えば、FOCUS(Apptec)、AKTAオリゴパイロットプラス10/100(GE Healthcare))で容易に合成することができ、あるいはその合成を第三者(例えば、Promega、Takara、またはJapan Bio Services)などに委託するこ

50

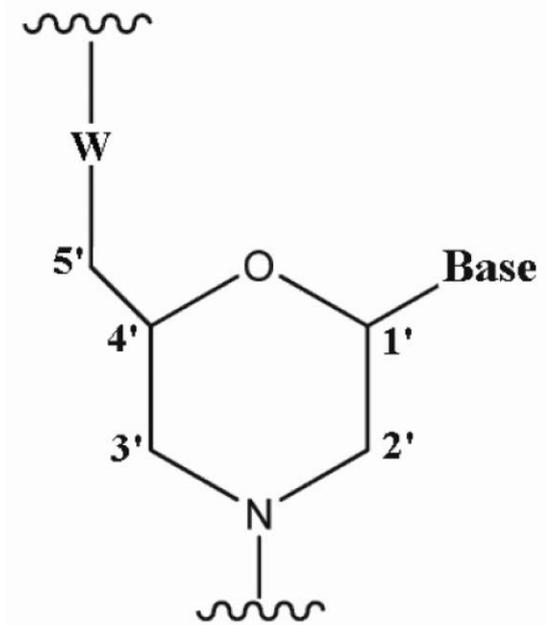
とができる。

【 0 0 7 6 】

本発明のモルホリノオリゴマーは、その構成単位が、以下の一般式：

【 0 0 7 7 】

【 化 3 】



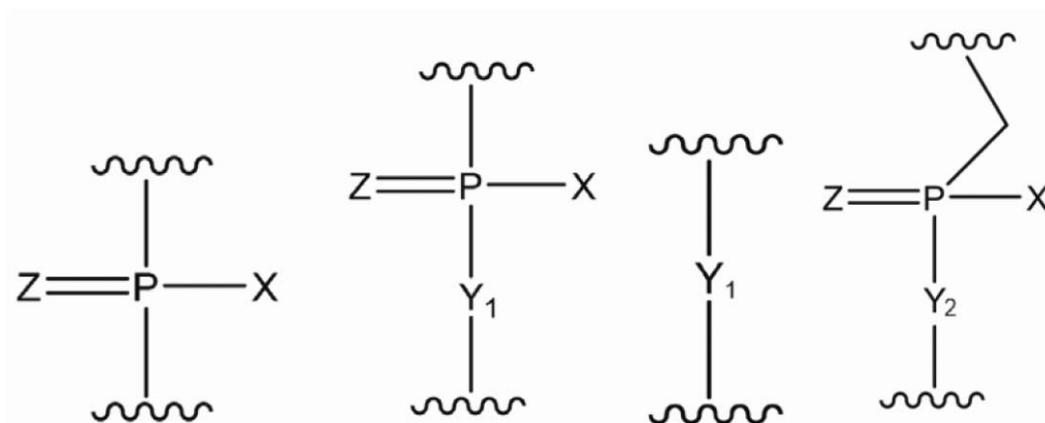
10

20

(式中、Baseは上記で定義されるものと同じであり、Wは、以下の式：

【 0 0 7 8 】

【 化 4 】



30

40

(式中、Xは、 $-CH_2R^1$ 、 $-O-CH_2R^1$ 、 $-S-CH_2R^1$ 、 $-NR_2R^3$ またはFを表し；

R^1 は、Hまたはアルキルを表し；

R^2 および R^3 は、同一であるかまたは異なることができ、各々が、H、アルキル、シクロアルキルまたはアリールを表し；

Y_1 は、O、S、 CH_2 または NR^1 を表し；

Y_2 は、O、Sまたは NR^1 を表し；および

Zは、OまたはSを表す)

のいずれかで表される基を表す)

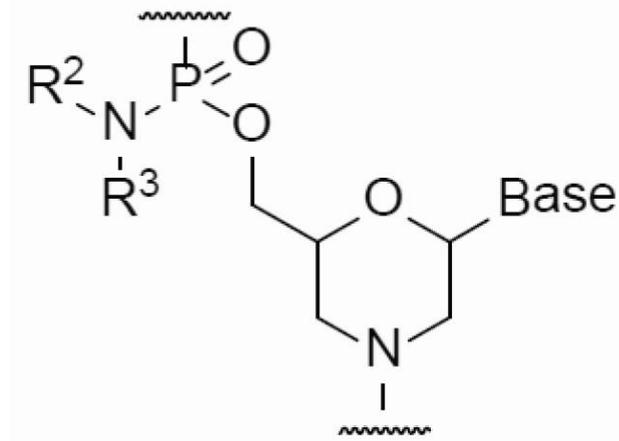
50

で表される基である、本発明によるアンチセンスオリゴマーである。

モルホリノオリゴマーは、好ましくは、構成単位が以下の式：

【0079】

【化5】



10

(式中、Base、 R^2 および R^3 は、上記で定義されるものと同じである)

で表される基であるオリゴマー(すなわち、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(以下、「PMO」と称する))である。

20

【0080】

例えば、モルホリノオリゴマーは、国際公開第1991/009033号パンフレットまたは国際公開第2009/064471号パンフレットに従って調製することができる。特に、PMOは、国際公開第2009/064471号に記載される手順に従って調製することができ、または以下に示される手順に従って調製することができる。

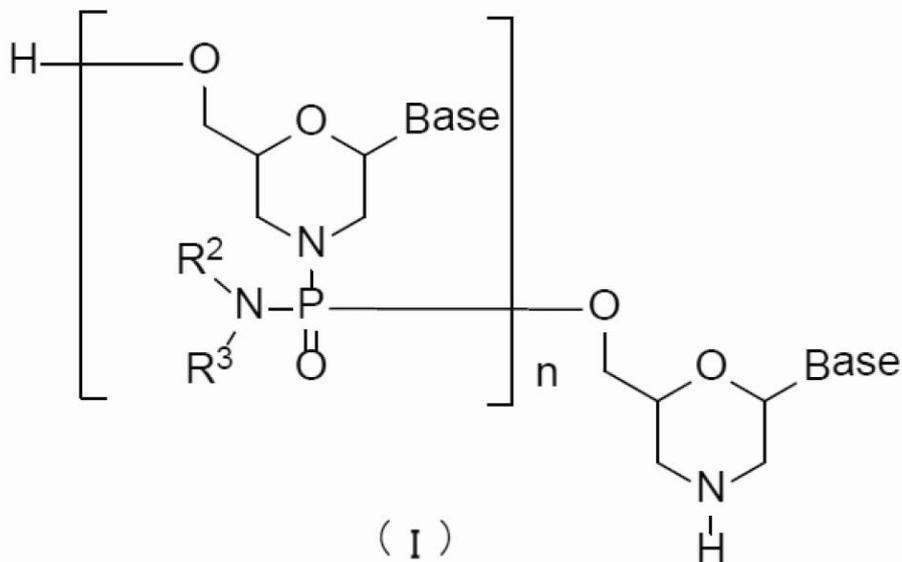
【0081】

[PMO調製のためのプロセス]

PMOの一実施形態として、以下の一般式(I)：

【0082】

【化6】



40

[式中、各Base、 R^2 および R^3 は、上記で定義されるものと同じであり；nは、1

50

～ 99 の範囲の任意の整数であり、適切には 13 ～ 29、14 ～ 28 または 15 ～ 27、16 ～ 26、17 ～ 25 の範囲の任意の整数である]

で表される化合物 (以下、PMO (I) と称する) が、例として与えられ得る。

【0083】

PMO (I) は、例えば、以下のステップに示される操作を行うことによって、公知の手順に従って調製することができる。以下のステップで使用される化合物および試薬は、それらが一般的に PMO 調製に使用される限り、いずれの方法においても限定されない。さらに、以下の全てのステップは、液相法または固相法によって (取扱説明書に従って、または市販の固相自動シンセサイザーを使用して) 達成することができる。PMO を固相法で調製する場合、簡単な操作および正確な合成の観点から、自動シンセサイザーを使用

10

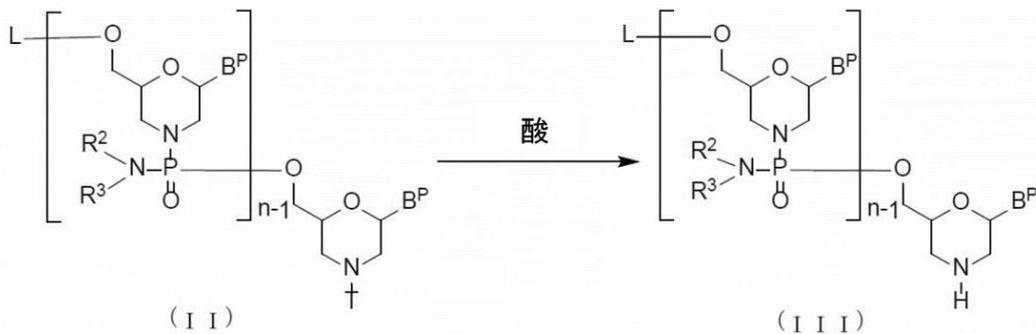
【0084】

(1) ステップ A :

これは、以下の一般式 (II) で表される化合物 (以下、化合物 (II) と称する) を酸で処理して、以下の一般式 (III) :

【0085】

【化7】



20

[式中、n、R² および R³ は、上記で定義されるものと同じであり ;

30

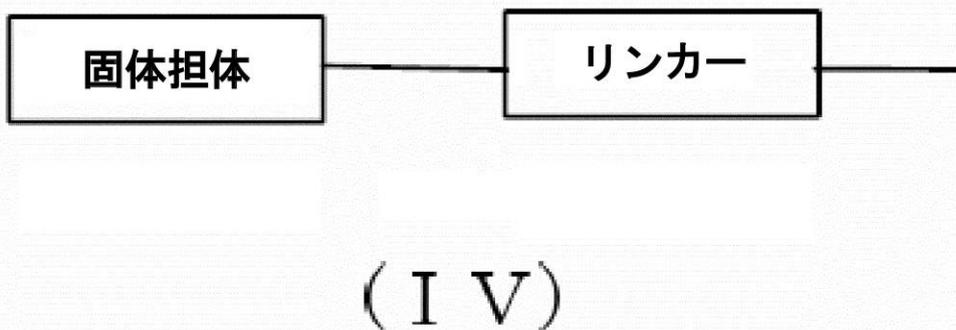
各 B^P は、独立して、保護され得る核酸塩基を表し ;

T は、トリチル基、モノメトキシトリチル基またはジメトキシトリチル基を表し ;

L は、水素、アシルまたは以下の一般式 (IV) で表される基 (以下、基 (IV) と称する) :

【0086】

【化8】



40

を表す]

で表される化合物 (以下、化合物 (III) と称する) を調製するステップである。

【0087】

50

B^Pの可能性がある「核酸塩基」は、Baseについて列挙されるのと同じ「核酸塩基」によって例示され得るが、ただし、B^Pに関するこれらの核酸塩基中のアミノ基またはヒドロキシル基が保護され得ることを条件とする。

【0088】

これらのアミノ基の保護基は、それらが核酸の保護基として使用される限り、いずれの方法においても限定されない。より具体的には、例としては、ベンゾイル、4-メトキシベンゾイル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、フェニルアセチル、フェノキシアセチル、4-tert-ブチルフェノキシアセチル、4-イソプロピルフェノキシアセチル、および(ジメチルアミノ)メチレンが挙げられる。ヒドロキシル基の保護基としては、例えば、2-シアノエチル、4-ニトロフェネチル、フェニルスルホニルエチル、メチルスルホニルエチル、トリメチルシリルエチル、任意の置換可能な位置(複数可)において1~5個の電子求引基で置換され得るフェニル、ジフェニルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、メチルフェニルカルバモイル、1-ピロリジニルカルバモイル、モルホリノカルバモイル、4-(tert-ブチルカルボキシ)ベンジル、4-[(ジメチルアミノ)カルボキシ]ベンジル、および4-(フェニルカルボキシ)ベンジルが挙げられる(例えば、国際公開第2009/064471号パンフレットを参照されたい)。

10

【0089】

「固体担体」は、それが核酸の固相反応における使用に利用可能な担体である限り、いずれの方法においても限定されないが、例えば、(i)モルホリノ核酸誘導体の合成における使用に利用可能な試薬(例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、テトラゾール、N-メチルイミダゾール、ピリジン、無水酢酸、ルチジン、トリフルオロ酢酸)にはわずかに可溶であり、(ii)モルホリノ核酸誘導体の合成における使用に利用可能な試薬に対して化学的に安定であり、(iii)化学的に修飾することができ、(iv)所望のモルホリノ核酸誘導体をローディングすることができ、(v)処理中の高圧に耐えるのに十分な強度を有し、および(vi)特定の範囲の粒子サイズと分布を有する担体を用いるのが望ましい。より具体的には、例として、膨潤ポリスチレン(例えば、1%ジビニルベンゼンで架橋されたアミノメチルポリスチレンレジン(200~400メッシュ)(2.4~3.0mmol/g)(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japan)、アミノメチル化ポリスチレンレジンHCl[ジビニルベンゼン1%、100~200メッシュ](Peptide Institute, Inc., Japan)、非膨潤ポリスチレン(例えば、プライマーサポート(GE Healthcare)、PEG鎖様ポリスチレン(例えば、NH₂-PEGレジン(Watanabe Chemical Industries, Ltd., Japan)、TentaGelレジン)、制御された孔質ガラス(CPG)(CPG Inc.の製品)、オキサリル化された制御された孔質ガラス(例えば、Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)を参照されたい)、TentaGel支持体-アミノポリエチレングリコール誘導体化支持体(例えば、Wright et al., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)を参照されたい)、および多孔質ポリスチレン/ジビニルベンゼンコポリマーが挙げられる。

20

30

40

【0090】

「リンカー」として、核酸またはモルホリノ核酸誘導体を連結するために一般的に使用される公知のリンカーを使用することが可能である。適切な例としては、3-アミノプロピル、スクシニル、2,2'-ジエタノールスルホニル、および長鎖アルキルアミノ(LCAA)が挙げられる。

【0091】

このステップにおける使用に利用可能な「酸」の例としては、トリフルオロ酢酸、ジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸が挙げられる。使用される酸の量は、例えば、1モルの化合物(II)に対して、0.1モル当量~1000モル当量の範囲、例えば、1モル当量~100モル当量の範囲である。

50

【0092】

さらに、有機アミンを上記酸とともに使用することが可能である。この目的のために任意の有機アミンを使用することができ、例としては、トリエチルアミンが挙げられる。使用される有機アミンの量は、例えば、1モルの酸に対して、合理的には0.01モル当量～10モル当量の範囲、例えば、0.1モル当量～2モル当量の範囲である。

【0093】

このステップにおいて酸および有機アミンが塩または混合物として使用される場合、例としては、トリフルオロ酢酸およびトリエチルアミンの塩または混合物、より具体的には、2当量のトリフルオロ酢酸および1当量のトリエチルアミンを含む混合物が挙げられる。

【0094】

このステップにおける使用に利用可能な酸は、0.1%～30%の範囲の濃度を得るために適切な溶媒で希釈することによって使用することができる。反応に対して不活性である限り、任意の溶媒をこの目的のために使用することができ、例としては、ジクロロメタン、アセトニトリル、アルコール（例えば、エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノール）、水、またはそれらの混合物が挙げられる。

【0095】

上記反応における反応温度は、例えば、10～50の範囲であり、例えば20～40の範囲または25～35の範囲である。

【0096】

反応時間は、使用される酸のタイプおよび/または反応温度に依存して変化するが、一般的に0.1分～24時間の範囲であり、適切には1分～5時間の範囲である。

【0097】

さらに、このステップの完了後、塩基を場合により添加して、システム内に残存する酸を中和することができる。この目的のために、任意の「塩基」を使用することができ、例として、ジイソプロピルエチルアミンが挙げられる。このような塩基は、0.1% (v/v)～30% (v/v)の範囲の濃度を与えるように適切な溶媒で希釈することによって使用することができる。

【0098】

反応に対して不活性である限り、任意の溶媒をこのステップに使用することができ、例としては、ジクロロメタン、アセトニトリル、アルコール（例えば、エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノール）、水、またはそれらの混合物が挙げられる。反応温度は、例えば、10～50の範囲であり、例えば20～40の範囲、適切には25～35の範囲である。

【0099】

反応時間は、使用される塩基のタイプおよび/または反応温度に依存して変化するが、一般的に0.1分～24時間の範囲であり、適切には1分～5時間の範囲である。

【0100】

n = 1であり、Lが基(IV)である化合物(II)、すなわち、以下の一般式(IIa)：

【0101】

10

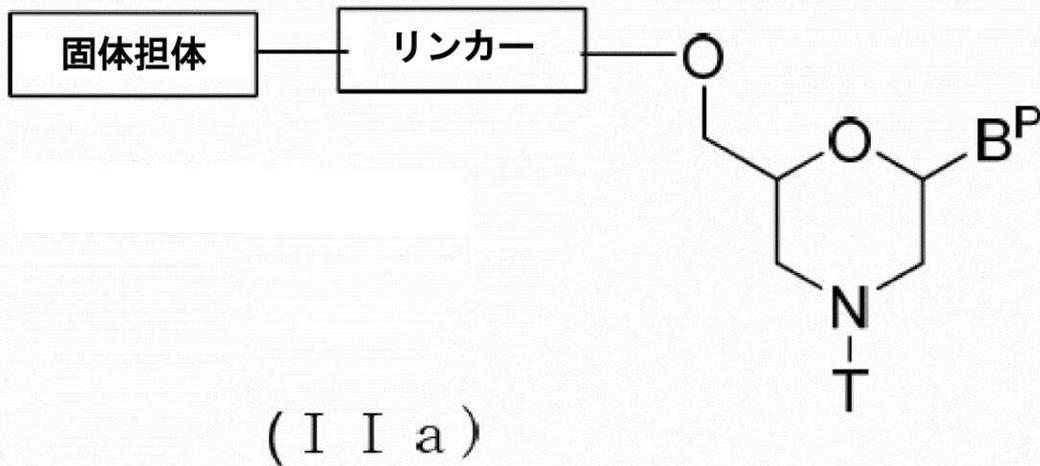
20

30

40

50

【化9】



10

[式中、 B^P 、 T 、リンカーおよび固体キャリアは、上記で定義されるものと同じである]
 で表される化合物 (以下、化合物 (II a) と称する) は、以下の手順に従って調製する
 ことができることに留意されたい。

20

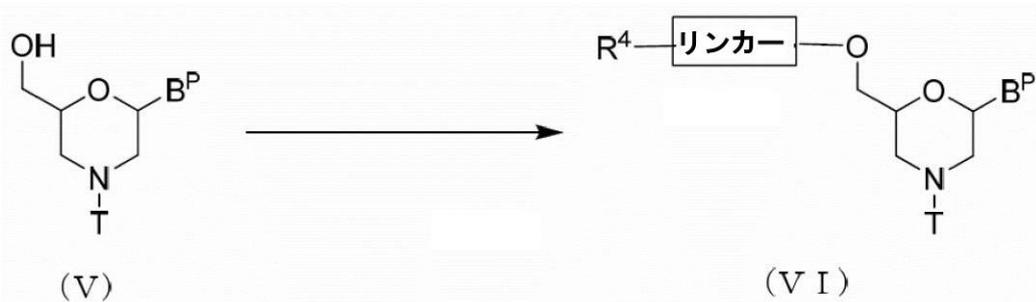
【0102】

ステップ1:

これは、以下の一般式 (V) で表される化合物をアシル化剤で処理して、以下の一般式
 (VI) :

【0103】

【化10】



30

[式中、 B^P 、 T およびリンカーは、上記で定義されるものと同じであり ; ならびに
 R^4 は、ヒドロキシル基、ハロゲン、カルボキシル基またはアミノを表す]
 で表される化合物 (以下、化合物 (VI) と称する) を調製するステップである。

【0104】

40

このステップは、リンカー導入のための任意の既知の反応によって化合物 (V) から出
 発して達成することができる。

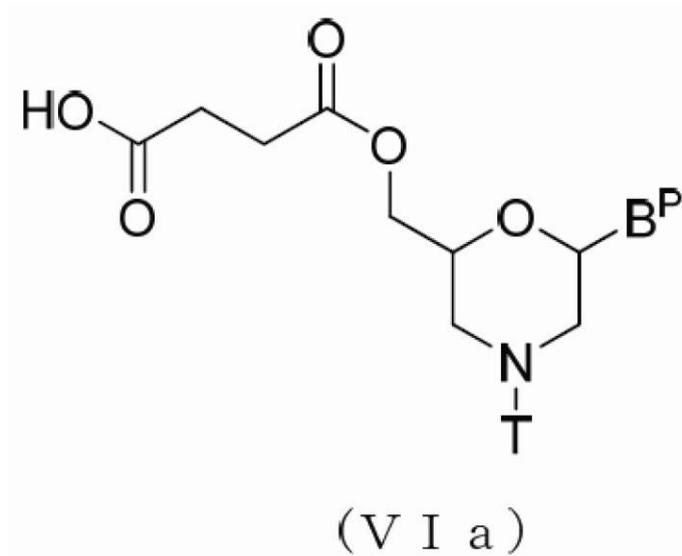
【0105】

特に、以下の一般式 (VI a) :

【0106】

50

【化 1 1】



10

[式中、 B^P および T は、上記で定義されるものと同じである]
 で表される化合物は、化合物 (V) および無水コハク酸の使用によるエステル化反応として既知である任意のプロセスによって調製することができる。

20

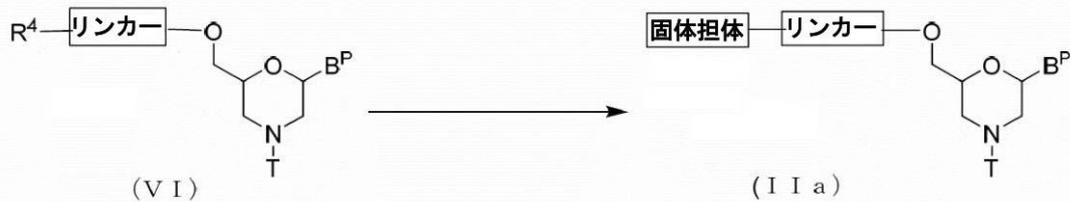
【0107】

ステップ 2 :

これは、化合物 (VI) を、縮合剤などで処理して固体担体と反応させ、化合物 (II a) を調製するステップである。

【0108】

【化 1 2】



30

[式中、 B^P 、 R^4 、 T 、リンカーおよび固体担体は、上記で定義されるものと同じである]。

【0109】

このステップは、化合物 (VI) および固体担体を使用する縮合反応として既知である任意のステップによって達成することができる。

40

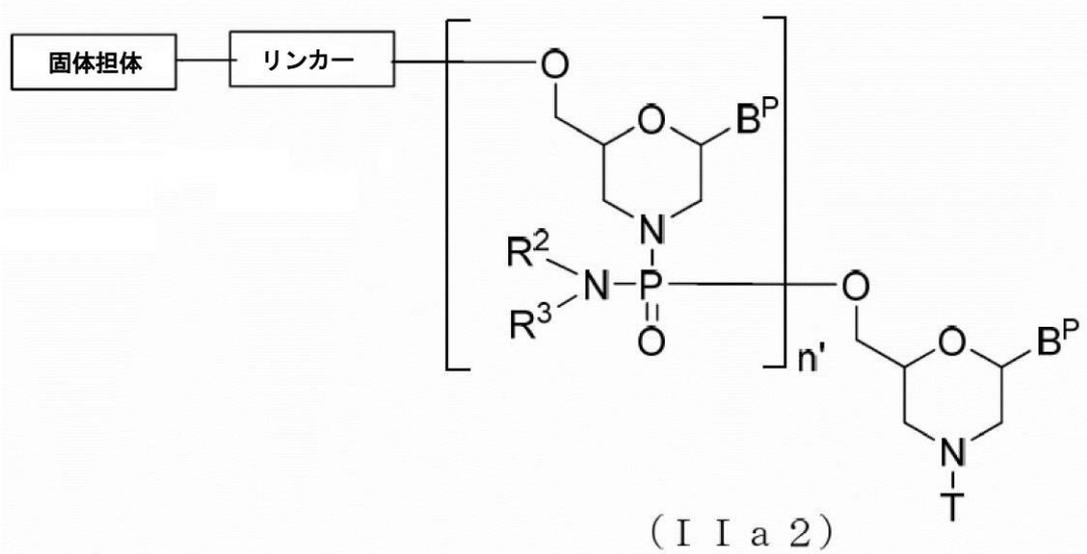
【0110】

$n = 2 \sim 99$ (適切には $13 \sim 29$ 、 $14 \sim 28$ 、 $15 \sim 27$ 、 $16 \sim 26$ 、または $17 \sim 25$ の範囲の任意の整数) であり、 L が基 (IV) である化合物 (II)、すなわち、以下の一般式 (II a 2) :

【0111】

50

【化13】



10

[式中、 B^P 、 R^2 、 R^3 、 T 、リンカーおよび固体担体は、上記で定義されるものと同じであり；

20

n' は、1～98を表す（特定の実施形態では、 n' は、1～28、1～27、1～26、1～25、または1～24を表す）]

によって表される化合物は、本明細書に開示されるPMOを調製するためのプロセスのステップAおよびBを所望の回数繰り返すことにより化合物(IIa)から開始して調製することができる。

【0112】

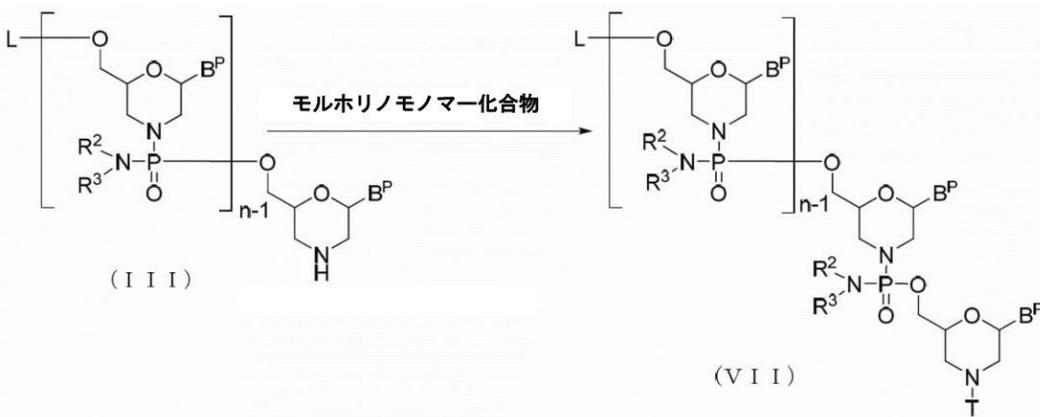
(2) ステップB：

これは、化合物(III)を塩基の存在下でモルホリノモノマー化合物で処理して、以下の一般式(VII)：

【0113】

30

【化14】



40

[式中、各 B^P 、 L 、 n 、 R^2 、 R^3 および T は、上記で定義されるものと同じである]で表される化合物(以下、化合物(VII)と称する)を調製するステップである。

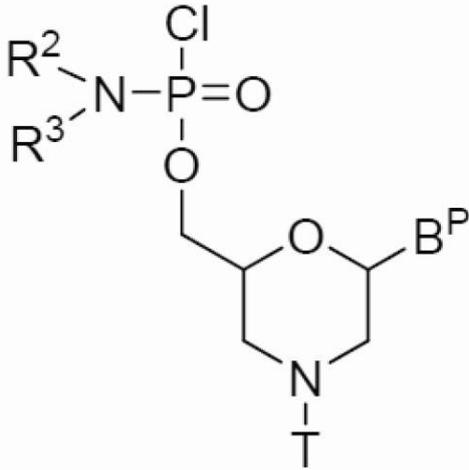
【0114】

このステップは、塩基の存在下でモルホリノモノマー化合物で化合物(III)を処理することによって達成することができる。

【0115】

50

このようなモルホリノモノマー化合物は、以下の一般式 (V I I I) :
 【 0 1 1 6 】
 【 化 1 5 】



(V I I I)

[式中、B^P、R²、R³およびTは、上記で定義されるものと同じである]
 で表される化合物によって例示することができる。

【 0 1 1 7 】

このステップにおける使用に利用可能な「塩基」の例としては、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミンまたはN - エチルモルホリンが挙げられる。使用される塩基の量は、例えば、1モルの化合物 (I I I) に対して、1モル当量 ~ 1000モル当量の範囲であり、適切には10モル当量 ~ 100モル当量の範囲である。

【 0 1 1 8 】

このようなモルホリノモノマー化合物およびこのステップにおける使用に利用可能な塩基は、0.1% ~ 30%の濃度を得るために適切な溶媒で希釈することによって使用することができる。反応に対して不活性である限り、任意の溶媒をこの目的のために使用することができ、例としては、N, N - ジメチルイミダゾリジノン、N - メチルピペリドン、DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、またはそれらの混合物が挙げられる。

【 0 1 1 9 】

反応温度は、例えば、0 ~ 100 の範囲であり、適切には10 ~ 50 の範囲である。

【 0 1 2 0 】

反応時間は、使用される塩基のタイプおよび/または反応温度に依存して変化するが、一般的に1分 ~ 48時間の範囲であり、適切には30分 ~ 24時間の範囲である。

【 0 1 2 1 】

さらに、このステップの完了後、アシル化剤を場合により添加することができる。「アシル化剤」の例としては、無水酢酸、塩化酢酸および無水フェノキシ酢酸が挙げられる。このようなアシル化剤は、適切な溶媒で希釈して、例えば0.1% ~ 30%の範囲の濃度を与えることによって使用することができる。反応に対して不活性である限り、任意の溶媒をこの目的のために使用することができ、例としては、ジクロロメタン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、アルコール (例えば、エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノール)、水、またはそれらの混合物が挙げられる。

【 0 1 2 2 】

10

20

30

40

50

必要に応じて、塩基（例えば、ピリジン、ルチジン、コリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、N - エチルモルホリン）をアシル化剤とともに使用することが可能である。使用されるアシル化剤の量は、0.1モル当量～10000モル当量の範囲であり、より適切には1モル当量～1000モル当量の範囲である。使用される塩基の量は、例えば、1モルのアシル化剤に対して、0.1モル当量～100モル当量の範囲であり、適切には1モル当量～10モル当量の範囲である。

【0123】

この反応における反応温度は、適切には10～50の範囲であり、例えば、20～40の範囲であり、適切には25～35の範囲である。反応時間は、例えば、使用されるアシル化剤のタイプおよび/または反応温度に依存して変化するが、一般的に0.1分～24時間の範囲であり、適切には1分～5時間の範囲である。

10

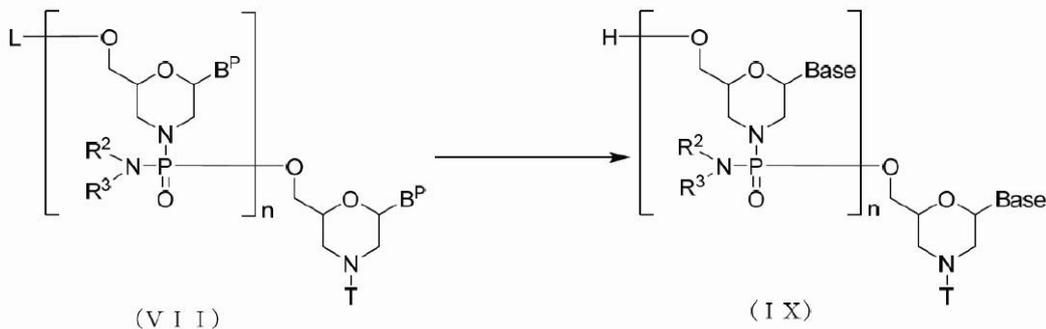
【0124】

(3)ステップC:

これは、ステップBで調製された化合物(VII)から保護基を除去するために脱保護剤を使用し、それによって一般式(IX)：

【0125】

【化16】



20

[式中、Base、B^p、L、n、R²、R³およびTは、上記で定義されるものと同じである]

30

で表される化合物を調製するステップである。

【0126】

このステップは、化合物(VII)を脱保護剤で処理することによって達成することができる。

【0127】

「脱保護剤」の例としては、濃縮水性アンモニア (concentrated aqueous ammonia) およびメチルアミンが挙げられる。このステップにおける使用に利用可能なこのような「脱保護剤」は、水、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、DMF、N, N - ジメチルイミダゾリジノン、N - メチルピペリドン、またはそれらの混合溶媒で希釈することによって使用することができる。その中で、好ましいものはエタノールである。使用される脱保護剤の量は、例えば、例として1モルの化合物(VII)に対して、1モル当量～10000モル当量の範囲であり、適切には10モル当量～1000モル当量の範囲である。

40

【0128】

反応温度は、例えば、15～75の範囲であり、適切には40～60の範囲であるかまたは50～60の範囲である。脱保護のための反応時間は、化合物(VII)のタイプおよび/または反応温度などに依存して変化するが、合理的には10分～30時間の範囲であり、適切には30分～24時間の範囲であり、より適切には5時間～20時間の範囲である。

【0129】

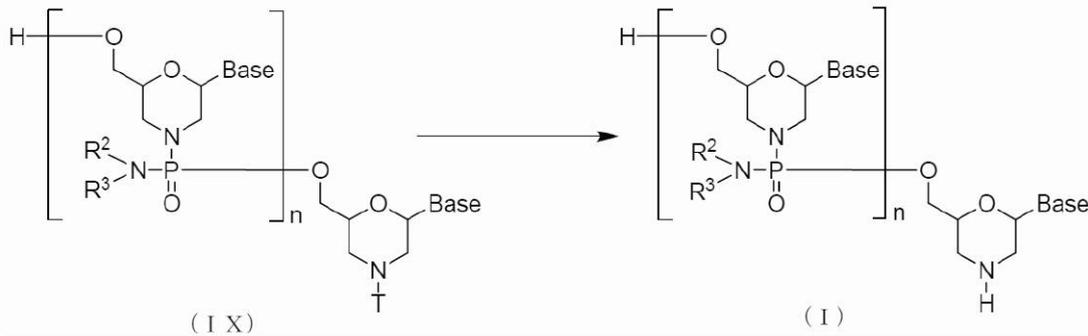
50

(4) ステップD:

これは、ステップCで調製された化合物(IX)を酸で処理してPMO(I)を調製するステップである:

【0130】

【化17】



10

[式中、Base、n、R²、R³およびTは、上記で定義されるものと同じである]。

【0131】

このステップは、化合物(IX)に酸を添加することによって達成することができる。

【0132】

このステップにおける使用に利用可能な「酸」の例としては、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、酢酸、リン酸および塩酸などが挙げられる。使用される酸の量に関しては、例えば0.1~4.0の範囲で、適切には1.0~3.0の範囲で溶液pHを与える量で酸を使用することが合理的である。反応に対して不活性である限り、任意の溶媒をこのステップに使用することができ、例としてアセトニトリル、水、またはそれらの混合溶媒が挙げられる。

20

【0133】

反応温度は、10~50の範囲、例えば20~40の範囲または25~35の範囲が適切である。脱保護のための反応時間は、化合物(IX)のタイプおよび/または反応温度などに依存して変化するが、適切には0.1分~5時間の範囲、例えば1分~1時間の範囲、より適切には1分~30分の範囲である。

30

【0134】

PMO(I)は、単独でまたは組み合わせて使用することができる、抽出、濃縮、中和、濾過、遠心分離、再結晶、C₈~C₁₈逆相カラムクロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析、限外濾過および他の手段を含む、一般的に使用される分離および精製手段によってこのステップで得られる反応混合物から得ることができ、それにより所望のPMO(I)を単離および精製することができる(例えば、国際公開第1991/09033号パンフレットを参照されたい)。

【0135】

PMO(I)の精製に逆相クロマトグラフィーを使用する場合、例として20mMトリエチルアミン/酢酸緩衝液とアセトニトリルとの混合溶液を、溶出溶媒として使用することができる。

40

【0136】

同様に、PMO(I)の精製のためにイオン交換クロマトグラフィーを使用する場合、例として1M塩化ナトリウム水溶液と10mM水酸化ナトリウム水溶液との混合溶液を使用することができる。

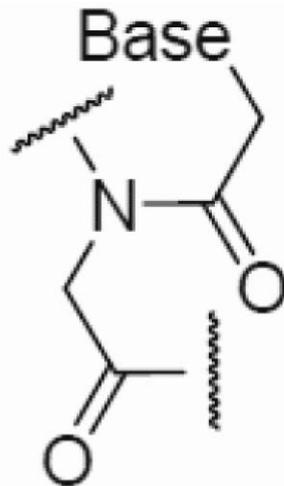
【0137】

ペプチド核酸オリゴマーは、本発明によるアンチセンスオリゴマーであり、その構成単位は、以下の一般式:

50

【 0 1 3 8 】

【 化 1 8 】



10

(式中、Baseは上記で定義されるものと同じである)
で表される基である。

【 0 1 3 9 】

20

ペプチド核酸は、例えば、以下に列挙する文献に従って調製することができる。

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

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

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

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

5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. O rum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

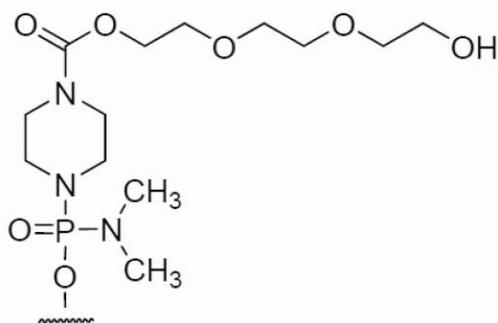
30

【 0 1 4 0 】

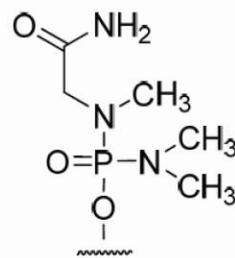
本発明のアンチセンスオリゴマーは、その5'末端が、以下に示される化学式(1)~(3)で表される基のいずれか1つであるように構成することができ、(3)-OHが好ましい。

【 0 1 4 1 】

【 化 1 9 】



(1)



(2)



(3)

40

50

上述されるように、機能性ペプチド（例えば、CPP（細胞浸透性ペプチド））は、リンカーなしでまたはリンカーを介してアンチセンスオリゴマーに結合され得る。機能性ペプチドがリンカーを介してアンチセンスオリゴマーに結合される場合、さらなるアミノ酸が機能性ペプチドに結合され得る。好ましい実施形態では、機能性ペプチドは、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（「PMO」）に5'末端または3'末端で結合され得、3'末端への結合が好ましい。また、好ましい実施形態では、機能性ペプチドのC末端をPMOに結合させることができる。

【0142】

薬学的に許容される塩および水和物

本発明の化合物（例えば、アンチセンスオリゴマー）の薬学的に許容される塩の例としては、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩）；アルカリ土類金属塩（例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩）；金属塩（例えば、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩）；アンモニウム塩；有機アミン塩（例えば、t-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩）；ハロゲン化水素酸塩（例えば、フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩）；無機酸性塩（すなわち、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩）；低級アルカンスルホン酸塩（例えば、メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩）；アリールスルホン酸塩（例えば、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩）；有機酸塩（例えば、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩）；アミノ酸塩（例えば、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩）などが挙げられる。これらの塩は、任意の既知の方法で調製することができる。

【0143】

本発明の化合物（例えば、アンチセンスオリゴマー）の水和物は、任意の既知の方法で調製することができる。

【0144】

特定の実施形態

本発明のアンチセンスオリゴマーは、例えば、本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さ範囲の長さまたは本発明のアンチセンスオリゴマーの例示的な長さを有するオリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴマーまたはPNAを含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド中の少なくとも1つの糖部分および/または少なくとも1つのリン酸結合部分が修飾されているアンチセンスオリゴマーである。

【0145】

特定の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'位の-OH基が、OR、R、R'OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、BrおよびI（Rはアルキルまたはアリールを表し、R'はアルキレンを表す）からなる群から選択されるいずれかの基で置換されているリボースである少なくとも1つの修飾された糖部分を含む。

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合およびボラノホスフェート結合からなる群から選択される少なくとも1つの修飾されたリン酸結合部分を含む。

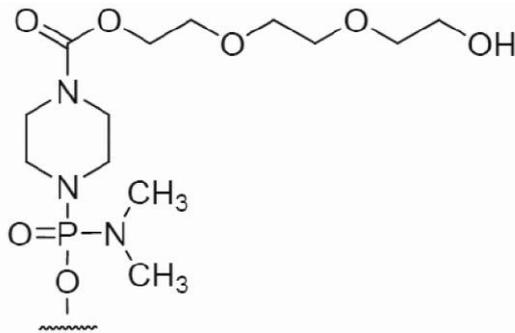
【0146】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのモルホリノ環を含むアンチセンスオリゴマーである。特定の実施形態では、アンチセンスは、モルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである。

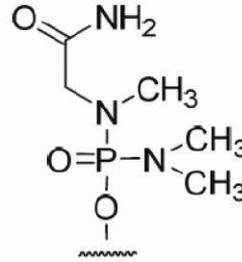
さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、下記に示される化学式(1)~(3)で表される基のいずれか1つをその5'末端に有する。

【0147】

【化20】



(1)



(2)



(3)

10

実施例のセクションで試験された全てのアンチセンスオリゴマーは、上記される任意の化学的修飾を用いることができる。

20

上述されるように、機能性ペプチド(例えば、CPP(細胞浸透性ペプチド))は、リンカーなしでまたはリンカーを介してアンチセンスオリゴマーに結合され得る。機能性ペプチドがリンカーを介してアンチセンスオリゴマーに結合される場合、さらなるアミノ酸が機能性ペプチドに結合され得る。好ましい実施形態では、機能性ペプチドは、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(「PMO」)に5'末端または3'末端で結合され得る。

【0148】

医薬組成物

本発明の第2の態様によれば、本発明の化合物(例えば、本発明のアンチセンスオリゴマー)またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を活性成分として含む医薬組成物(以下、「本発明の医薬組成物」と称する)が提供される。

30

特定の実施形態では、医薬組成物は、前述のオリゴマーまたはオリゴヌクレオチドのいずれか、またはその薬学的な塩もしくは水和物、ならびに少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤および/または担体を含む。

本発明において使用するのに適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985に見出される。ドラッグデリバリーのための方法の簡単な概説については、例えば、Langer (Science 249:1527-1533, 1990)を参照されたい。

【0149】

担体は、オリゴマーの筋肉組織への送達を促進するのに役立つことができる。このような担体は、それが薬学的に許容される限り、いずれの方法においても限定されない。適切な例としては、カチオン性担体(例えば、カチオン性リポソーム、カチオン性ポリマー)またはウイルスエンベロープベースの担体が挙げられる。カチオン性リポソームの例としては、必須成分としての2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-O-ジオレオイルグリセロールおよびリン脂質から形成されるリポソーム(以下「リポソームA」と称する)、Oligofectamine(登録商標)(Invitrogen)、Lipofectin(登録商標)(Invitrogen)、Lipofectamine(登録商標)(Invitrogen)、Lipofectamine 2000(登録商標)(Invitrogen)、DMRIE-C(登録商標)(Invitrogen)、GeneSilencer(登録商標)(Gene Therapy Sy

40

50

systems)、TransMessenger(登録商標)(QIAGEN)、TransIT TKO(登録商標)(Mirus)およびNucleofector II(Lonza)が挙げられる。それらの中で好ましいものはリポソームAである。カチオン性ポリマーの例としては、JetSI(登録商標)(Qiogene)およびJet-PEI(登録商標)(ポリエチレンジアミン、Qiogene)が挙げられる。ウイルスエンベロープベースの担体の例としては、GenomeOne(登録商標)(HVJ-Eリポソーム、Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Japan)が挙げられる。あるいは、日本特許第2924179号に示される医薬デバイス、または国際公開第2006/129594号パンフレットおよび国際公開第2008/096690号パンフレットに示されるカチオン性担体もまた使用することができる。

10

【0150】

より詳細については、米国特許第4,235,871号明細書および同第4,737,323号明細書、国際公開第96/14057号パンフレット、「New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990) pages 33-104」などを参照することができる。

【0151】

本発明の医薬組成物は、場合により、本発明のアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、および/または上記される担体に加えて、薬学的に許容される添加剤を含み得る。このような添加剤の例としては、乳化助剤(例えば、炭素原子6~22個を含む脂肪酸またはその薬学的に許容される塩、アルブミン、デキストラン)、安定化剤(例えば、コレステロール、ホスファチジン酸)、および等張化剤(例えば、塩化ナトリウム、グルコース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース)、およびpH調整剤(例えば、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエタノールアミン)が挙げられる。これらの添加剤は、単独でまたは組み合わせで使用することができる。本発明の医薬組成物中の添加剤(複数可)の含有量は、合理的には90重量%以下、例えば60重量%以下、および適切には50重量%以下である。

20

【0152】

本発明の医薬組成物は、本発明の化合物(例えば、アンチセンスオリゴマー)またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を担体の分散物に添加し、続いて適切に攪拌することによって調製することができる。添加剤は、本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を添加する前または後のいずれかの任意の適切な段階で添加することができる。任意の水溶性溶媒は、薬学的に許容される限り、本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物を添加するために使用することができ、例としては、注射用水、注射用蒸留水、電解液(例えば、生理食塩水)、および糖溶液(例えば、グルコース溶液、マルトース溶液)が挙げられる。さらに、この場合、pHおよび温度を含む条件は、当業者によって必要に応じて選択することができる。

30

【0153】

本発明の医薬組成物は、溶液またはその凍結乾燥製剤に製剤化することができる。このような凍結乾燥製剤は、本発明の医薬組成物を溶液形態で凍結乾燥することによって標準的な方法で調製することができる。例えば、溶液形態の本発明の医薬組成物は、必要に応じて滅菌し、次にバイアルボトルに所定量で分注され、続いて約-40~-20の条件下で約2時間、予備凍結され、約0~10にて減圧下で一次乾燥され、次に約15~25にて減圧下で二次乾燥され得る。さらに、ほとんどの場合、バイアルを窒素ガスでパージし、次にキャップし、それにより本発明の医薬組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。

40

【0154】

本発明の医薬組成物のこのような凍結乾燥製剤は、一般的に任意の適切な溶液(すなわち、復元溶液)の添加によって復元させた後に使用することができる。このような復元溶液の例としては、注射用水、生理食塩水、および他の一般的に使用される輸液が挙げられる。このような復元溶液の体積は、例えば、意図された用途に応じて変化し、いかなる方

50

法によっても限定されないが、合理的には、凍結乾燥前の溶液体積よりも0.5倍～2倍大きいか、または500mL以下である。

【0155】

本発明の医薬組成物に含まれる、本発明の化合物（例えば、アンチセンスオリゴマー）またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物は、その水和物の形態であり得る。このような水和物は、任意の既知の方法で調製することができる。

【0156】

医薬組成物の製剤化のための組成物および方法は、限定されないが、投与経路、疾患の範囲、または投与される用量を含む多数の基準に依存する。

【0157】

これらの組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌され得るか、または滅菌濾過され得る。得られた水溶液は、そのまま使用するためにパッケージされ得るか、または凍結乾燥され得、凍結乾燥調製物を投与前に無菌水性担体と組み合わせることができる。調製物のpHは、典型的には3～11、適切には5～9または6～8、最も適切には7～8、例えば7～7.5である。得られた固体形態の組成物は、複数の単回投薬単位でパッケージすることができ、各々は、固定量の上記薬剤または複数の薬剤を含み、例えば、錠剤またはカプセルの密封されたパッケージに含む。固体形態の組成物はまた、局所的に適用可能なクリームまたは軟膏のために設計された、絞ることができるチューブなどの柔軟な量のための容器にパッケージすることができる。

【0158】

本発明の医薬組成物は、任意の薬学的に許容される様式で投与することができ、意図された治療方法に適しているように選択することができる。しかしながら、筋肉組織への容易な送達の観点から、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経口投与、間質投与、経皮投与などが好ましい。さらに、本発明の組成物は、任意の投薬形態であり得、例としては、種々のタイプの注射、経口製剤、点滴、吸入剤、軟膏、ローションなどが挙げられる。

【0159】

本発明の医薬組成物に含まれる、本発明の化合物（例えば、アンチセンスオリゴマー）またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の濃度は、例えば、担体のタイプに依存して変化するが、合理的には0.1nM～100μMの範囲であり、適切には100nM～10μMの範囲である。同様に、本発明の医薬組成物に含まれる、担体对本発明のアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の重量比（すなわち、担体/アンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩もしくは水和物比）は、例えば、オリゴマーの特性および担体のタイプに依存して変化するが、合理的には0.1～100の範囲であり、適切には0.1～10の範囲である。

【0160】

本発明の化合物、その薬学的に許容される塩または水和物は、対象に重篤な副作用を引き起こすことなく、治療的に許容される量を対象に送達するのに十分な量で、薬学的に許容される担体または希釈剤などの単位製剤中に含まれ得る。

【0161】

本発明の医薬組成物の投与量は、望ましくは、その中に含まれる、本発明のアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩もしくは水和物のタイプ、意図される投与形態、年齢および体重などの対象の状態、投与経路、ならびに疾患の性質および重症度を考慮して調整される。対象がヒト対象である場合、本発明のアンチセンスオリゴマーまたはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の量として計算される、成人の1日用量は、一般的に、体重1kgあたり0.1mg～10gの範囲、例えば、体重1kgあたり1mg～1g、体重1kgあたり20mg～120mg、体重1kgあたり30mg～100mg、または体重1kgあたり40mg～80mgの範囲である。この数値範囲は、標的とする疾患のタイプ、投与様式、および/または標的分子のタイプに依存して変化し得る。したがって、この範囲を下回る用量は、ある場合は十分であり得、または逆に、この範

10

20

30

40

50

囲を上回る用量は、ある場合は必要とされるべきである。さらに、本発明の医薬組成物は、1日に1～数回、または1～数日の間隔で投与することができる。

【0162】

別の実施形態では、本発明の医薬組成物は、本発明の化合物（例えば、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド）を発現させることができるベクターと、上記される担体とを含む医薬組成物であり得る。このような発現ベクターは、本発明による複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるものであってよい。このような医薬組成物は、上記されるように、場合により薬学的に許容される添加剤を含み得る。この医薬組成物に含まれる発現ベクターの濃度は、例えば、担体のタイプに依存して変化するが、合理的には0.1 nM～100 μMの範囲であり、適切には100 nM～10 μMの範囲である。この医薬組成物に含まれる担体対発現ベクターの重量比（すなわち、担体/発現ベクター比）は、例えば、発現ベクターの特性および担体のタイプに依存して変化するが、合理的には0.1～100の範囲であり、適切には0.1～10の範囲である。さらに、この医薬組成物に含まれる担体の含有量は、上記されるものと同じであり、調製手順もまた上記されるものと同じである。

10

【0163】

治療用途

本発明の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物、またはこれらを含む本発明の医薬組成物（以下、「本発明の治療薬」と称する）は、療法、例えばヒトの治療に使用することができる。

20

【0164】

本発明の治療薬は、代謝障害（例えば、肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病）、筋萎縮性疾患、または筋消耗性疾患、またはサルコペニア性疾患の予防または治療に使用するために提供され得る。筋萎縮性疾患または筋消耗性疾患の例としては、筋原性筋萎縮症（例えば、筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、福山型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー）、先天性ミオパシー、封入体筋炎）、神経原性筋萎縮症（例えば、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症）、廃用筋萎縮症（例えば、卒中誘導型廃用症候群）、筋消耗性疾患（例えば、癌性悪液質、敗血症関連筋萎縮症）、および加齢に伴う骨格筋の喪失（加齢に関連したサルコペニア）を含む様々な種類のサルコペニア性疾患が挙げられ、筋ジストロフィーが特に適切である。

30

【0165】

本発明の一部の実施形態では、筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患の予防または治療のための方法が提供され、筋萎縮性疾患または筋消耗性疾患の予防または治療を必要とする対象に、本発明の治療薬の治療有効量を投与するステップを含む。特定の実施形態では、本発明の化合物（例えば、アンチセンスオリゴマー）またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物は、本発明の医薬組成物の形態で対象に投与され得る。

【0166】

本発明との関連では、用語「対象」は、ヒト対象、またはトリおよび非ヒト哺乳動物（例えば、ウシ、サル、ネコ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、イヌ、ウサギ、ヒツジ、ウマ）によって例示される非ヒト温血動物を意味することが意図される。「対象」は、好ましくはヒト対象である。

40

【0167】

本発明の特定の実施形態では、筋萎縮性疾患または筋消耗性疾患の予防または治療のための医薬組成物の製造における本発明の治療薬の使用が提供される。

本発明の特定の実施形態では、筋萎縮性疾患または筋消耗性疾患の予防または治療のための医薬組成物の製造における本発明の化合物（例えば、アンチセンスオリゴマー）またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の使用が提供される。

【0168】

本発明の他の実施形態では、筋萎縮性疾患または筋消耗性疾患の治療に使用するための本発明の治療薬が提供される。

50

【0169】

上記されるように、本発明の化合物は、例えば、エクソスキッピングまたはmRNA分解の誘導を介して、mRNAレベルでのマイオスタチンシグナル伝達の阻害を可能にする。一実施形態では、本発明の化合物は、本発明のアンチセンスオリゴマーであり得る。

【0170】

筋肉組織におけるマイオスタチンシグナルの阻害は、筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患の予防または治療に適用され得る。骨格筋の萎縮は、対象の生活の質を低下させるだけでなく、栄養不良および呼吸不全などの重篤な全身性合併症を伴うため、この医療ニーズに対応することができる薬剤および治療が必要である。

【0171】

したがって、本発明の治療薬を筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患の予防または治療を必要とする対象に投与した場合、筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患を予防または治療することができる。

【0172】

本発明はまた、対象における療法に使用するための本発明の治療薬を提供する。

前記療法は、上記に列挙された疾患の予防または治療であり得る。

一実施形態では、療法は、対象における筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患の予防または治療であり得る。一実施形態では、筋萎縮性疾患はデュシェンヌ型筋ジストロフィーであり得る。対象はヒト対象であり得る。

【0173】

本発明はまた、対象における筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患を予防または治療するための医薬（例えば、医薬組成物）の製造における、本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは水和物の使用を提供する。一実施形態では、筋萎縮性疾患はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。一実施形態では、対象はヒトである。

【0174】

用量および投与経路は、本発明の医薬組成物について列挙されたものと同じであり得る。

【0175】

本発明はまた、対象における疾患を治療するための方法を提供し、前記対象に本発明の治療薬の治療有効量を投与するステップを含む。この疾患は、代謝性障害（例えば、肥満、メタボリックシンドローム、糖尿病）、筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患であり得る。筋萎縮性疾患または筋消耗性疾患の例としては、筋原性筋萎縮症（例えば、筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、福山型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー）、先天性ミオパシー、封入体筋炎）、神経原性筋萎縮症（例えば、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症）、廃用筋萎縮症（例えば、卒中誘導型廃用症候群）、筋消耗性疾患（例えば、癌性悪液質、敗血症関連筋萎縮症）、および加齢に伴う骨格筋の喪失（加齢に関連したサルコペニア）を含む様々な種類のサルコペニア性疾患が挙げられ、筋ジストロフィーが特に適切である。一実施形態では、療法は、対象における筋萎縮性疾患、筋消耗性疾患またはサルコペニア性疾患の予防または治療であり得る。一実施形態では、筋萎縮性疾患はデュシェンヌ型筋ジストロフィーであり得る。対象はヒト対象であり得る。用量および投与経路は、本発明の医薬組成物について列挙されたものと同じであり得る。

【0176】

動物

本発明はまた、ACVR2Bの細胞内領域の一部を欠くACVR2Bタンパク質の切断型バージョンを産生する遺伝子操作された動物（以下、「本発明のGM動物」と称する）を提供する。本明細書で使用される場合、動物は、ヒトを除く任意の種であり得る。特に適した動物は、魚（例えば、マグロ）、ウシ、ヒツジ、ヤギまたはブタなどの家畜である。

当業者は、標準的な技術を用いて、このような遺伝子操作された動物を作製することができる。例えば、本発明のGM動物は、本発明の化合物または本発明の医薬組成物を投与

10

20

30

40

50

することによって生成することができる。例えば、本発明のGM動物は、CRISPR-CAS9、siRNA、LoxPノックアウトシステム、TALEN、亜鉛フィンガー（ZFN）またはアンチセンスオリゴマーによって生成することができる。

【0177】

CRISPR-CAS9を使用する場合、ACVR2BまたはACVR2Bの一部（例えば、野生型ACVR2Bの細胞内領域）をコードするゲノムDNAの標的配列に相補的な配列を有するガイドRNAを標的細胞または宿主動物に導入し、それによって切断される標的配列を同定する。標的細胞に導入されたCas9（またはCas9様）タンパク質は、ゲノムDNAおよびガイドRNAで構成される二本鎖部分を切断する。切断部位を修復するプロセスを通じて、変異（複数可）はヌクレオチドの欠損および/または挿入によって引き起こされ、それによってACVR2Bのノックアウトを引き起こす。ゲノムDNAの標的配列の例としては、ACVR2Bのエクソンの任意の配列、例えばACVR2Bのエクソン1～11が挙げられる。好ましくは、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9、10および11からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。一実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6、7、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5、6および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5および6からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7、8および9からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7および8からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンの任意の配列を含む。別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン5である。さらに別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン6である。さらに別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7である。さらに別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン8である。さらに別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン9である。さらに別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン10である。さらに別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン11である。さらに別の実施形態では、ゲノムDNAの標的配列は、ACVR2Bのエクソン7、8、9および10からなる群、またはACVR2Bのエクソン5、6、7、8、9および10からなる群から選択される少なくとも1つのエクソンのいずれかの配列を含む。

あるいは、イントロンは、CRISPR-CAS9によって標的化され得る。例えば、エクソン8をサンドイッチするイントロン7および8を切断することができる。切断された部位が修復される場合、エクソン8が欠損し、エクソン8欠損変異型mRNAが生成され得る。同様に、イントロン4および5、またはイントロン5および6、またはイントロン6および7、またはイントロン8および9、またはイントロン9および10、またはイントロン10および11を切断するために標的化することができる。

【0178】

siRNAを用いてマイオスタチンシグナルを阻害した場合、ACVR2B mRNAの配列を標的とするように設計されたsiRNAが標的細胞に導入される。このように導入されたsiRNAのガイド鎖が標的配列にハイブリダイズした場合、標的細胞の内因性RISCタンパク質は、ガイド鎖および標的mRNA鎖で構成される二本鎖部分を認識し、mRNAの標的配列を切断する。これにより、本発明のGM動物におけるACVR2Bタンパク質レベルが減少する。

10

20

30

40

50

【0179】

先行技術文献、特許公報および他の特許文献を含めて、本明細書中で引用される全ての刊行物は、参照により本明細書に組み込まれることに留意されたい。本発明を以下の例示的な実施例により、以下により詳細にさらに記載するが、本発明はそれに限定されない。

【実施例】

【0180】

[参考実施例1]

アミノポリスチレンレジンをローディングした4 - { [(2S, 6R) - 6 - (5 - メチル - 2, 4 - ジオキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

ステップ1: 4 - { [(2S, 6R) - 6 - (5 - メチル - 2, 4 - ジオキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸の調製

アルゴン雰囲気下で、1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 5 - メチルピリミジン - 2, 4 - ジオン (41.11 g) および 4 - ジメチルアミノピリジン (4 - DMAP) (15.58 g) をジクロロメタン (850 mL) に懸濁し、次に、無水コハク酸 (12.76 g) をそこに添加し、続いて室温で3.5時間攪拌した。反応溶液をジクロロメタンおよび1Mリン酸二水素ナトリウム水溶液で抽出した。得られた有機層を1Mリン酸二水素ナトリウム水溶液および飽和塩化ナトリウム水溶液で連続して洗浄した。得られた有機層を硫酸ナトリウム上で脱水し、減圧下で濃縮した。得られた固体にジクロロメタン (600 mL) を添加して結晶化させ、続いて濾過した。追加のジクロロメタン (300 mL) を添加した後、結晶を5分間攪拌し、次に濾過し、減圧下で一晩乾燥させて所望の製造物 (50.2 g) を得た。

【0181】

ステップ2: アミノポリスチレンレジンをローディングした4 - { [(2S, 6R) - 6 - (5 - メチル - 2, 4 - ジオキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸の調製

4 - { [(2S, 6R) - 6 - (5 - メチル - 2, 4 - ジオキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸 (50.2 g) をピリジン (脱水) (600 mL) に溶解し、続いて4 - DMAP (12.4 g) および1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (77.6 g) を添加した。アミノポリスチレンレジンはアミノメチルレジン (Watanabe Chemical Industries, Ltd., Japan の製品、A00673、200 ~ 400メッシュ、1 mmol / g、1% DVB) (40.5 g) およびトリエチルアミン (69.6 mL) をこの混合物に添加し、次に室温で4日間振とうした。反応後、レジンを濾過により回収した。得られたレジンをピリジン、メタノールおよびジクロロメタンで連続して洗浄し、次に減圧下で乾燥させた。得られたレジンを、テトラヒドロフラン (無水) (500 mL)、無水酢酸 (104 mL) および2, 6 - ルチジン (128 mL) を添加し、次に室温で4時間振とうした。レジンを濾過により回収し、ピリジン、メタノールおよびジクロロメタンで連続して洗浄し、次に減圧下で乾燥させて、59.0 g の所望の製造物を得た。

【0182】

所望の製造物のローディング量を決定するために、レジンの1グラムあたりのトリチルのモル量を、409 nmでのUV吸光度として既知の方法で測定した。レジンへのローディング量は467.83 μmol / gであることが分かった。

UV測定条件

機器: U-2910 (Hitachi, Ltd., Japan)

溶媒: メタンスルホン酸

波長: 409 nm

値: 45000

10

20

30

40

50

【0183】

[参考実施例2]

アミノポリスチレンレジンにローディングした4 - { [(2S, 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

参考実施例1に示されるのと同じ手順を繰り返して、参考実施例1のステップ1で使用した1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 5 - メチルピリミジン - 2, 4 - ジオンを、このステップではN - { 1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 4 - イル } ベンズアミドで置き換えたことを除いて、表題化合物を調製した。

10

【0184】

所望の製造物のローディング量を決定するために、レジンの1グラムあたりのトリチルのモル量を、409nmでのUV吸光度として既知の方法で測定した。レジンへのローディング量は460.28 $\mu\text{mol/g}$ であることが分かった。

【0185】

[参考実施例3]

アミノポリスチレンレジンにローディングした4 - { [(2S, 6R) - 6 - (6 - ベンズアミドプリン - 9 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

参考実施例1に示されたのと同じ手順を繰り返して、参考実施例1のステップ1で使用した1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 5 - メチルピリミジン - 2, 4 - ジオンを、このステップではN - { 9 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] プリン - 6 - イル } ベンズアミドで置き換えたことを除いて、表題化合物を調製した。

20

【0186】

所望の製造物のローディング量を決定するために、レジンの1グラムあたりのトリチルのモル量を、409nmでのUV吸光度として既知の方法で測定した。レジンへのローディング量は425.13 $\mu\text{mol/g}$ であることが分かった。

【0187】

[参考実施例4]

アミノポリスチレンレジンにローディングした4 - { (2S, 6R) - 6 - { 6 - (2 - シアノエトキシ) - 2 - [(2 - フェノキシアセチル) アミノ] プリン - 9 - イル } - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル } メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

参考実施例1に示されたのと同じ手順を繰り返して、参考実施例1のステップ1で使用した1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 5 - メチルピリミジン - 2, 4 - ジオンを、このステップではN - { 6 - (2 - シアノエトキシ) - 9 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] プリン - 2 - イル } - 2 - フェノキシアセトアミドで置き換えたことを除いて、表題化合物を調製した。

40

【0188】

所望の製造物のローディング量を決定するために、レジンの1グラムあたりのトリチルのモル量を、409nmにおけるUV吸光度として既知の方法で測定した。レジンへのローディング量は341.09 $\mu\text{mol/g}$ であることが分かった。

【0189】

以下に示される実施例1の記載に従って、または核酸シンセサイザー (AKTA Oligopilot 10 plus) を用いる国際出願第PCT/JP2015/57180号明細書に記載された手順に従って、PMOを合成した(5'末端は基(3)である)。合成されたPMOの中で、スキッピング活性を示すものを表1に列挙した。

【0190】

50

【表 1 - 1】

PMO No.	配列名	スクレオチド配列 (5'から3')	分子量 (計算値)	分子量 (測定値)	配列番号
1	ACVR2B_H5_48-71	CGAGCC TTGATCTCCAGCAGCTGC	7884.72	7884.73	12
2	ACVR2B_H5_51-74	CCCCGAGCC TTGATCTCCAGCAGC	7829.72	7829.16	13
3	ACVR2B_H5_86-109	TCATGAGCTGGGCCCTCCAGACAC	7908.75	7908.84	14
4	ACVR2B_H5_119-142	GGAGTGGGAAGATCTTGACAGCTA	8076.80	8077.00	15
5	ACVR2B_H5_121-144	CTGGAGTGGGAAGATCTTGACAGC	8052.79	8052.66	16
6	ACVR2B_H5_123-146	ACCTGGAGTGGGAAGATCTTGACA	8036.79	8036.89	17
7	ACVR2B_H6_126-149	CTCACCTTGTCATGGAAGGCCGTG	7939.74	7940.09	18
8	ACVR2B_H7_10-33	GATGTTCCCTTGAGGTAATCCGT	7929.74	7929.60	19
9	ACVR2B_H7_28-51	CAGTTCGTTCCATGTGATGATGTT	7959.74	7959.31	20
10	ACVR2B_H7_38-61	CTACATGACACACAGTTCGTTCCATG	7882.73	7882.07	21
11	ACVR2B_H7_66-89	TA TGAGAGGCCCTCGTGACATCGTC	7963.76	7964.32	22
12	ACVR2B_H7_76-99	CTCATGCAGGTA TGAGAGGCCCTCG	7988.77	7988.06	23
13	ACVR2B_H7_86-109	AGGGCACATCCTCATGCAGGTA TG	7972.77	7972.02	24
14	ACVR2B_H8_19-42	GTGAGGTCGCTCTTCAGCAATACA	7947.75	7947.21	25
15	ACVR2B_H8_21-44	CTGTGAGGTCGCTCTTCAGCAATA	7938.74	7938.21	26
16	ACVR2B_H8_26-49	CACGGCTGTGAGGTCGCTCTTCAG	7955.74	7955.23	27

【表 1】

【 0 1 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

17	ACVR2B_H8_45-68	CCAAGCCAAAAGTCAGCCAGCACGG	7920.77	7920.76	28
18	ACVR2B_H8_73-96	GGAGGTTTCCCTGGCTCAAATCGA	7963.76	7963.38	29
19	ACVR2B_H8_78-101	CCCTGGAGGTTTCCCTGGCTCAA	7875.73	7875.76	30
20	ACVR2B_H8_87-110	CGTGGGTGTCCTCCCTGGAGGTTTCC	7962.74	7962.81	31
21	ACVR2B_H8_93-116	CCTGTCCGTGGGTGTCCTCCCTGGAG	7947.73	7947.60	32
22	ACVR2B_H9_56-79	CAATGCGCAGGAAGGCAICTCTCT	7932.76	7933.08	33
23	ACVR2B_H9_66-89	GCATACATGTCAAATGCGCAGGAAG	8005.79	8005.48	34
24	ACVR2B_H10_1-23	CAGCATGTACTCAITCCACGGGTCC	7868.74	7868.93	35
25	ACVR2B_H10_49-72	CCTGCAGCTCCTCCAACGAAAGGGT	7893.75	7893.29	36
26	ACVR2B_H6_16-39	GCTGAAAGATCTCCCGTTCACCTCTG	7874.73	7874.32	43
27	ACVR2B_H6_46-69	TAGCAGGTTCTCGTGTCTTCATGCC	7905.72	7906.34	44
28	ACVR2B_H7_96-119	CCACGGCACCCAGGGGCACATCCTCA	7847.75	7848.04	45
29	ACVR2B_H8_34-57	TCAGCCAGCACGGCTGTGAGGTCG	7989.76	7989.50	46
30	ACVR2B_H8_38-61	AAAGTCAGCCAGCACGGCTGTGAG	8006.78	8007.05	47
31	ACVR2B_H8_30-53	CCAGCACGGCTGTGAGGTCGCTCT	7940.74	7940.81	48
32	ACVR2B_H8_69-92	GTTTCCCTGGCTCAAATCGAACAG	7907.74	7907.61	49
33	ACVR2B_H8_12-35	CGCTCTTCAGCAATACATCTTAC	7817.71	7817.90	50
34	ACVR2B_H8_16-39	AGGTCGCTCTTCAGCAATACATTC	7882.73	7882.72	51
35	ACVR2B_H8_42-65	AGCCAAAAGTCAGCCAGCACGGCTG	7951.77	7951.66	52
36	ACVR2B_H8_24-47	CGGCTGTGAGGTCGCTCTTCAGCA	7955.74	7955.10	53

【 0 1 9 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

37	ACVR2B_H8_46-69	GCCAAAGCCAAAAGTCAGCCAGCAGC	7920.77	7920.54	54
38	ACVR2B_H8_53-76	TCGAAACAGCCAAAGCCAAAAGTCAGC	7919.77	7919.50	55
39	ACVR2B_H8_82-105	GTGTCCCTCGGAGGTTTCCCTGGC	7922.72	7922.98	56
40	ACVR2B_H8_45-67	CAAGCCAAAAGTCAGCCAGCAGCAGG	7605.66	7605.47	57
41	ACVR2B_H8_97-120	GTTACCTGTCCGTGGGTGTCGCCCT	7897.71	7897.41	58
42	ACVR2B_H8_61-84	GGCTCAAATCGAACACAGCCAAAGCCA	7919.77	7919.58	59
43	ACVR2B_H8_89-112	TCCGTGGGTGTCGCCCTGGAGGTTT	7977.73	7977.47	60
44	ACVR2B_H8_15-38	GGTCGCTTTCAGCAATACATCT	7873.72	7873.52	61
45	ACVR2B_H8_5-19	ATTCTTACTTTTAAAAGTCCCTGTG	7878.72	7878.48	62
46	ACVR2B_H8_2-22	TACATTTTACTTTTAAAAGTCCCT	7822.70	7822.60	63
47	ACVR2B_H8_18-41	TGAGGTGCTTTCAGCAATACAT	7922.74	7922.70	64
48	ACVR2B_H8_14-37	GTCGCTTTCAGCAATACATCTT	7848.71	7848.54	65
49	ACVR2B_H8_22-45	GCTGTGAGGTGCTTTCAGCAAT	7954.74	7954.19	66
50	ACVR2B_H8_23-46	GGCTGTGAGGTGCTTTCAGCAA	7979.75	7979.16	67
51	ACVR2B_H8_13-36	TCGCTTTCAGCAATACATCTT	7832.71	7832.30	68
52	ACVR2B_H8_20-43	TGTGAGGTGCTTTCAGCAATAC	7938.74	7938.70	69
53	ACVR2B_H8_17-40	GAGGTGCTTTCAGCAATACAT	7922.74	7922.78	70

10

20

30

40

【 0 1 9 3 】

[実施例 1]

アミノポリスチレンレジンにローディングした 4 - { [(2 S , 6 R) - 6 - (5 - メチル - 2 , 4 - ジオキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸 (参考実施例 1) 、 またはアミノポリスチレンレジンにローディングした 4 - { [(2 S , 6 R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸 (参考実施例 2) 、 またはアミノポリスチレンレジンにローディングした 4 - { [(2 S , 6 R) - 6 - (6 - ベンズアミドプリン - 9 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2

50

-イル}メトキシ}-4-オキソブタン酸(参考実施例3)、またはアミノポリスチレンレジンにローディングした4-{{(2S,6R)-6-{6-(2-シアノエトキシ)-2-[(2-フェノキシアセチル)アミノ]プリン-9-イル}-4-トリチルモルホリン-2-イル}メトキシ}-4-オキソブタン酸(参考実施例4)は、各々5'末端塩基に対応し、ペプチドシンセサイザー(FOCUS)を使用して次の合成サイクルを開始するために、フィルターを備えた反応容器に0.1gの量で充填させた。表1に指示される各化合物のヌクレオチド配列を与えるために、所望のモルホリノモノマー化合物を各カップリングサイクルに添加した(下記の表2を参照されたい)。

【0194】

【表2】

[表2]

ステップ	試薬	体積 (mL/回)	時間 (分/回)	回数
1	デブロッキング溶液	1.8~3	0.1~2	3~8
2	中和溶液	2~10	1	3
3	ジクロロメタン	2~10	-	5
4	活性剤溶液	1.8~3	-	1
5	モノマー溶液	1~1.5	-	1
6	活性剤溶液	0.9~1.4	-	1
7	ステップ5および6で投入した試薬とのカップリング反応		120~180	
8	ジクロロメタン	2~10	-	5
9	キャッピング溶液	2~3	2	2
10	ジクロロメタン	2~10	-	5

【0195】

使用したデブロッキング溶液は、トリフルオロ酢酸(2当量)とトリエチルアミン(1当量)の混合物を、1%(v/v)エタノールおよび10%(v/v)2,2,2-トリフルオロエタノールを含むジクロロメタン溶液中に3%(w/v)の濃度で溶解することによって調製されたことに留意されたい。使用した中和溶液は、25%(v/v)の2-プロパノールを含むジクロロメタン溶液中に5%(v/v)の濃度でN,N-ジイソプロピルエチルアミンを溶解することによって調製された。使用した活性剤溶液は、20%(v/v)のN,N-ジイソプロピルエチルアミンを含む1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン溶液であった。使用したモノマー溶液は、テトラヒドロフラン中に0.20Mの濃度でモルホリノモノマー化合物を溶解することによって調製された。使用したキャッピング溶液は、ジクロロメタン中に10%(v/v)で無水酢酸および15%(v/v)で2,6-ルチジンを溶解することによって調製された。

【0196】

上記で合成したPMOをローディングしたアミノポリスチレンレジン反応容器から回収し、減圧下で30にて2時間以上乾燥させた。アミノポリスチレンレジンにローディングした乾燥PMOを反応容器に投入し、それに5mLの28%アンモニア-エタノール

水溶液（1 / 3）を添加し、続いて55 で16時間放置した。アミノポリスチレンレジンを濾過により分離し、3 mLの水 - アセトニトリル（1 / 1）で洗浄した。得られた濾液をエタノール（3 mL）およびジエチルエーテル（35 mL）と混合した後、混合物を遠心分離し、上清を除去するためにデカントし、残渣を減圧下で乾燥させた。得られた残渣を20 mM酢酸アンモニウム水溶液およびアセトニトリル（4 / 1）を含む10 mLの混合溶媒に溶解し、次に逆相HPLCにより精製した。使用条件は、下記の表3に指示される通りである。

【0197】

【表3】

[表3]

カラム	Xブリッジ5 μ m C18(水、 Φ 19 \times 50mm、1CV=14mL)
流量	10mL/分
カラム温度	室温
溶液A	20mM 酢酸アンモニウム水溶液
溶液B	CH ₃ CN
勾配	(B)濃度 20%→50% 10CV

CV : カラム体積

【0198】

画分をそれぞれ分析し、所望の製造物を回収した。得られた溶液を0.1 M塩酸水溶液（4 mL）と混合し、2時間放置した。反応後、1 M水酸化ナトリウム水溶液（0.4 mL）を添加して、混合物を中和し、次に、メンブランフィルター（0.22 m）を通して濾過した。

【0199】

所望の製造物を含む得られた水溶液を1 M水酸化ナトリウム水溶液（0.4 mL）でアルカリ性にし、陰イオン交換レジンカラムを通して精製した。使用条件は、下記の表4に指示される通りである。

【0200】

10

20

30

40

50

【表 4】

[表 4]

カラム	Source 15Q (GE Healthcare、 $\Phi 16 \times 97$ mm、1CV=19.5mL)
流量	10mL/分
カラム温度	室温
溶液 A	10 mM 水酸化ナトリウム水溶液
溶液 B	10 mM 水酸化ナトリウム水溶液、 1M 塩化ナトリウム水溶液
勾配	(B)濃度 5%→50% 20CV

10

【0201】

画分を各々 (HPLC により) 分析して、所望の製造物を水溶液として得た。得られた水溶液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で中和し、次、下記の表 5 に示される条件下で逆相 HPLC により脱塩した。

20

【0202】

【表 5】

[表 5]

カラム	YMC GEL C4 HG 10 μ m (YMC、 $\Phi 10 \times 35$ mm、1CV=2.7mL)
流量	10mL/分
カラム温度	室温
溶液 A	水
溶液 B	CH ₃ CN
勾配	(B)濃度 0%→50% 10CV

30

【0203】

所望の製造物を回収し、減圧下で濃縮した。得られた残渣を水に溶解し、凍結乾燥して、所望の化合物を白色綿状固体として得た。ESI-TOF-MS の計算値と測定値を表 1 に示す。

40

【0204】

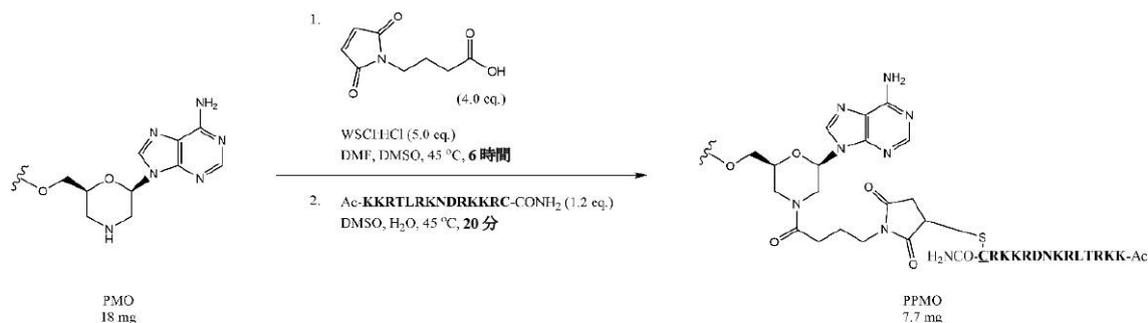
[実施例 2]

アンチセンスオリゴマー - ペプチドコンジュゲート (PMO - ペプチドコンジュゲート) の合成

【0205】

50

【化 2 1】



10

PMO (PMO No. 15、18.1 mg、1.0 当量) を DMSO (284.0 μL) および DMF (17.5 μL) に溶解した。この溶液に DMSO (23.2 μL) および DMF (22.2 μL) 中の 4 - マレイミド酪酸 (1.7 mg、4.0 当量) と WSCI·HCl (2.2 mg、5.0 当量) の混合物を添加した。反応混合物を 45 °C で 6 時間攪拌した。反応がほぼ完了に達した後、CH₂Cl₂ (13.2 mL) を混合物に添加して沈殿物を得た。沈殿物を遠心分離により回収し、続いて真空中で乾燥させた。乾燥させた沈殿物を DMSO (175.0 μL) および H₂O (52.7 μL) に再溶解した。得られた溶液に hLIMK (Ac-KKRTLKNDKRC-CONH₂、5.1 mg、1.2 当量) (配列番号 112) を添加し、混合物を 45 °C で 30 分間攪拌した。HPLC 分析による反応の完了を確認した後、アセトニトリル溶液 (H₂O 中 10% ; 400 μL) の添加により反応を停止させた。溶液を水 (約 40 mL) で希釈し、所望の製造物を陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。使用条件を下記の表 6 に示す。

20

【0206】

【表 6】

表 6

カラム	Source 15S (GE Healthcare、Φ16×50mm、1CV=10mL)
流量	10 mL/分
カラム温度	室温
溶液 A	25%MeCN(pH3.5)を伴う 25mM KH ₂ PO ₄
溶液 B	25%MeCN (pH3.5)および 1.5M KCl を伴う 25mM KH ₂ PO ₄
勾配	(B)濃度 0%→90% 30CV

30

CV : カラム体積

【0207】

画分を HPLC で分析し、適切な画分を回収した。水溶液を水で 7 回希釈し、次に、下記の表 7 に示される条件下で逆相 HPLC により脱塩した。

【0208】

40

50

【表 7】

表 7

カラム	AMBERCHROM_CG300m_10 mm × 30 mm (1 CV = 2.4 mL)
流量	5 mL/分
カラム温度	室温
溶液 A	水
溶液 B	MeOH
勾配	(B)濃度 0%→90% 30CV

10

【0209】

所望の製造物を回収し、減圧下で濃縮した。得られた残渣を水に溶解し、凍結乾燥して所望の化合物 (PPMO No. 1 と称する) を白色綿状固体 (7.7 mg、収率 34.0%) として得た。

【0210】

得られた化合物 (PPMO No. 1) の分子量は、ESI-TOF-MS を用いて決定した (計算値: 9973.92、観測値: 9973.54)。

【0211】

[実施例 3]

アンチセンスオリゴマーのスキッピング活性の評価

細胞内への PPMO のトランスフェクション

3×10^5 個の RD 細胞 (ヒト横紋筋肉腫細胞株) に、表 1 に示されるアンチセンスオリゴマーを各々、10 または 30 μ M で、Nucleofector II (Lonza) および Amaxa Cell Line Nucleofector Kit を用いてトランスフェクトした。使用したパルスプログラムは T-030 であった。

トランスフェクション後、細胞を、10% ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma-Aldrich) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Sigma-Aldrich) 中で 5% CO₂ 下、6 ウェルプレートのウェルで培養した。トランスフェクションの 3 日後、培地を 0.4 ng/mL の組換えマイオスタチン (R&D Systems) を含む無血清 DMEM に置換し、細胞をさらに 2 時間、37 °C にて 5% CO₂ 下で培養した。

20

30

【0212】

ホスホロチオエート (PS) オリゴヌクレオチドの細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションの前日に、RD 細胞を 3×10^4 細胞/ウェルの密度で 24 ウェルプレートに播種し、10% FBS (Sigma-Aldrich) を含む DMEM (Sigma-Aldrich) 中、5% CO₂ 下で培養した。翌日、表 8 に示される 2'-O-メチルホスホロチオエート (PS) オリゴヌクレオチド (JbioS) のアンチセンスオリゴマーを各々、10 または 30 nM で、リポフェクタミン 3000 トランスフェクション試薬 (Thermo Scientific) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクション後の 3 日間、細胞を培養した。

40

【0213】

50

【表 8 - 1】

PS No.	配列名	ヌクレオチド配列 (5'から 3')	分子量 (計算値)	分子量 (測定値)	配列番号
1	ACVR2B_054	CAGCUGCAGUGGCUUCAGGCCAC	8347	8352.5791	71
2	ACVR2B_055	UGAUCUCCAGCAGCUGCAGUGGCU	8349	8355.2591	72
3	ACVR2B_056	CCCCGAGCCUUGAUCUCCAGCAGC	8267	8270.6786	73
4	ACVR2B_060	GUCAUUCAUGAGCUGGGCCUCCCA	8310	8314.0250	74
5	ACVR2B_061	CAGCUACAAAGUCAUUCAUUGAGCU	8325	8327.7387	75
6	ACVR2B_062	AAGAUCUUGACAGCUACAAAGUCA	8372	8376.2644	76
7	ACVR2B_063	CUGGAGUGGGAAGAUCUUGACAGC	8476	8480.5301	77
8	ACVR2B_006	AACUGUAGCAGGUUCUCGUGCUUC	8311	8313.9651	78
9	ACVR2B_014	CUUGAGGUAAUCCGUGAGGGAGCC	8452	8455.6050	79
10	ACVR2B_015	GAUGUUCCCCUUGAGGUAAUCCGU	8311	8317.1643	80
11	ACVR2B_016	CCAUGUGAUGAUGUUCUCCUUGAG	8311	8313.8275	81
12	ACVR2B_017	CAGUUCGUUCCAUGUGAUGAUGUU	8313	8315.9555	82
13	ACVR2B_018	UACAUGACACAGUUCGUUCCAUUG	8279	8281.5703	83
14	ACVR2B_019	CGUCUCUGCUACAUGACACAGUUC	8254	8258.0108	84
15	ACVR2B_020	CUCGUGACAUCGUCUCUGCUACAUC	8231	8235.1182	85
16	ACVR2B_021	UAUGAGAGGCCUUCGUGACAUCGUC	8373	8375.2037	86

【表 8】

【 0 2 1 4 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

17	ACVR2B_022	CUCAUGCAGGU AUGAGAGGCCUCG	8412	8416.8200	87
18	ACVR2B_023	AGGCCACAUCUCAUGCAGUAUG	8396	8399.2399	88
19	ACVR2B_024	CCACGGCACACAGGGACAUCUCA	8313	8318.7891	89
20	ACVR2B_030	GUGAGGUCGCUCUCAGCAAUACA	8357	8361.8757	90
21	ACVR2B_031	AGCACGGCUGUGAGGUCGCUCUC	8365	8369.4975	91
22	ACVR2B_032	AAGUCAGCCAGCACGGCUGGAGG	8474	8475.5442	92
23	ACVR2B_033	GCCAAAGCCAAAAGUCAGCCAGCACG	8400	8402.1792	93
24	ACVR2B_034	AAUCGAAACAGCCAAAGCCAAAAGUCA	8393	8397.0875	94
25	ACVR2B_035	CCUGGCUCAAAUCGAAACAGCCAAG	8362	8366.7717	95
26	ACVR2B_036	GGAGGUUCCCCUGGCUCAAAUCGA	8373	8375.6335	96
27	ACVR2B_037	GUGUCCCCUGGAGGUUCCCCUGGC	8318	8322.6302	97
28	ACVR2B_038	CUGUCCGUGGGUGUCCCCUGGAGG	8397	8399.1436	98
29	ACVR2B_064	AGCCAUGUACCGUUCUGGUCUAC	8269	8273.6442	99
30	ACVR2B_065	CACCUCAGGAGCCAU GUACCGUCU	8292	8297.9971	100
31	ACVR2B_068	UCUCUGGAAAGUUGAUGGCUCUCCUC	8287	8287.8070	101
32	ACVR2B_069	GAAGGCAUCUCUCUGGAAAGUUGAU	8398	8400.5961	102
33	ACVR2B_070	CAAU GCGCAGGAAAGGCAUCUCUCU	8356	8360.2476	103
34	ACVR2B_071	GCAUACAUGUCAAU GCGCAGGAAAG	8443	8447.4672	104
35	ACVR2B_073	CCCACAGCACCAACCCCAUGGCAU	8257	8262.1851	105
36	ACVR2B_074	GACACAAGCUCCACACAGCACCAAC	8304	8308.9227	106

【 0 2 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

37	ACVR2B_075	CUUGCAGCGAGACACAAGCUCCCA	8338	8342.7494	107
38	ACVR2B_076	CGUCUGCAGCCUUGCAGCGAGACA	8371	8376.4996	108
39	ACVR2B_039	GCAGCAUGUACUCAUCCACGGGUC	8332	8336.2184	109
40	ACVR2B_043	UCCAACGAAAGGGUGCUGGCCAAUC	8395	8401.4766	110
41	ACVR2B_044	CUGCAGCUCCUCCAAACGAAGGGUG	8371	8377.0700	111

10

20

30

40

【0216】

細胞内へのPMO - ペプチドコンジュゲートのジムノティック (gymnotic) 送達

トランスフェクションの前日に、RD細胞を 4×10^4 細胞/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種し、10% FBS (Sigma - Aldrich) を含むDMEM (Sigma - Aldrich) 中、5% CO₂ 下で培養した。翌日、実施例2で合成されたアンチセンスオリゴマー - ペプチドコンジュゲート (PMO - ペプチドコンジュゲート) を培地に添加した。細胞をPMO - ペプチドコンジュゲートの添加後の3日間培養した。

【0217】

RNA抽出

50

細胞をPBS (Nissui Pharmaceutical) で1回洗浄し、次に、1%の2-メルカプトエタノール (Nacalai Tesque) を含む350 μ Lの緩衝液RLT (Qiagen) を細胞に添加し、細胞を室温で数分間放置することにより溶解させた。細胞溶解物をQIAshredderホモジナイザー (Qiagen) に回収し、20,400 \times gで2分間、遠心分離してホモジネートを調製した。RNeasy Mini Kit (Qiagen) の製造者の指示に従って全RNAを抽出した。抽出された全RNAの濃度をNanoDrop ND-1000分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

【0218】

スキッピング効率の測定

10

抽出された全RNA (150 ng) を鋳型として用い、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) を用いたワンステップRT-PCRを行った。キットに添付されたプロトコルに従って反応溶液を調製した。使用したサーマルサイクラーは、Takara PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio) であった。使用したRT-PCRプログラムは、以下に示される通りである。

50 で30分間：逆転写反応

95 で15分間：ポリメラーゼ活性化、逆転写酵素不活性化

[94 で30秒間；62 で30秒間；72 で50秒間] \times 32サイクル：PCR

72 で7分間：最終伸長反応

20

【0219】

RT-PCRに用いるフォワードプライマーおよびリバースプライマーのヌクレオチド配列は、以下に示される通りである。

エクソン5のスキッピングの検出用：

フォワードプライマー：5' - TGCTACGATAGGCAGGAGTG - 3' (配列番号37)

リバースプライマー：5' - AGCAGGTTCTCTGCTTCAT - 3' (配列番号38)

エクソン6、7、または8のスキッピングの検出用：

フォワードプライマー：5' - CATGTGGACATCCATGAGGA - 3' (配列番号39)

30

リバースプライマー：5' - GAGACACAAGCTCCCACAGC - 3' (配列番号40)

エクソン9または10のスキッピングの検出用：

フォワードプライマー：5' - TCTATTGCCACAGGGACTT - 3' (配列番号41)

リバースプライマー：5' - GAGCCTCTGCATCATGGTC - 3' (配列番号42)

【0220】

上記PCR反応液 (1 μ L) をBioanalyzer (Agilent) を用いて分析した。エクソンスキッピングを伴うPCRアンプリコン、すなわち切断型ACVR2B cDNAのポリヌクレオチドモル濃度「A」、および野生型PCRアンプリコン、すなわち野生型ACVR2B cDNAのポリヌクレオチドモル濃度「B」を測定した。これらの「A」および「B」の測定値に基づき、下記式に従ってスキッピング効率を決定した。

40

$$\text{スキッピング効率 (\%)} = A / (A + B) \times 100$$

得られた結果を図1a~dに示す。図1a~dは、本発明のアンチセンスオリゴマーおよびアンチセンスオリゴマー-ペプチドコンジュゲートがエクソンスキッピングを引き起こすことを示した。

【0221】

50

[実施例 4]

ドミナントネガティブ活性の測定

8 × 10³ 個の HEK - 293 細胞 (ヒト胚性腎細胞株) を 96 ウェル白色プレート (Thermo Fisher Scientific) に播種し、10% FBS を含む最小必須培地イーグル (Sigma - Aldrich) 中で 37 °C にて 5% CO₂ 下で培養した。翌日、各エクソン (エクソン 5、6、7、8、9 または 10) スキッピング生成物 (Eurofins Genomics をコードする DNA を有する 10 ng の pB Apo - CMV (Takara Bio)、および 14 ng のルシフェラーゼレポーター DNA (Signal SMAD Reporter Assay Kit、Qiagen) をリポフェクタミン LTX (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクションの 2 日後、無血清最小必須培地イーグルで希釈された組換えマイオスタチン (R&D Systems) を 10 ng/mL の最終濃度で培地に添加した。さらに 24 時間の培養後、ルシフェラーゼレポーターアッセイを、製造者の指示に従って Dual - Glo ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を用いて行った。ルシフェラーゼ活性をルミノメーター、Tecan infinite F200 PRO (Tecan) を用いて測定した。

10

【0222】

得られた結果を図 2 に示す。図 2 に示されるように、マイオスタチンの添加によって誘導されたルシフェラーゼ活性は、各エクソンスキッピング生成物をコードする DNA でトランスフェクトされた細胞においてほぼ完全に抑制された。図 2 は、エクソンスキッピング (エクソン 5、6、7、8、9 および 10) のいずれもマイオスタチンシグナルを効果的に抑制し得ることを示した。

20

【0223】

[実施例 5]

マイオスタチンシグナルの測定

抽出された全 RNA (360 ng) を鋳型として使用し、高容量 cDNA 逆転写キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて RT 反応を行った。反応溶液の調製および熱条件は、キットの製造者の指示に従った。使用したサーマルサイクラーは、Takara PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio) であった。

30

RT 反応溶液 (0.6 μL) を鋳型として使用し、TaqMan 遺伝子発現マスターミックス (Thermo Fisher Scientific)、ならびに SMAD7 および PPIB の TaqMan 遺伝子発現アッセイ (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR を行った。qPCR に使用した機器は、QuantStudio 6 Flex Systems (Thermo Fisher Scientific) であった。

【0224】

得られた結果を図 3 に示す。

図 3 に示されるように、SMAD7 遺伝子の発現は、マイオスタチンによる刺激により 6 倍増加した。本発明のアンチセンスオリゴマーは、SMAD7 遺伝子の発現増加を抑制した。

40

これらのアンチセンスオリゴマーは、BLAST 分析において SMAD7 遺伝子に相同性を示さない。したがって、これらの SMAD7 遺伝子発現阻害活性は、マイオスタチンシグナル阻害活性に特異的である。

【0225】

50

配列識別子:

配列番号 1

GACCCUGGGCCUCCACCACCAUCCCUCUGGGGCCUGAAGCCACUGCAGCU
GCUGGAGAUCAAGGCUCGGGGGCGCUUUGGCUGUGUCUGGAAGGCCAGCUCA
UGAAUGACUUUGUAGCUGUCAAGAUCUCCCACUCCAG

配列番号 2

10

GACAAGCAGUCGUGGCAGAGUGAACGGGAGAUCUUCAGCACACCUGGCAUGA
AGCACGAGAACCUGCUACAGUUCAUUGCUGCCGAGAAGCGAGGCUCCAACCUC
GAAGUAGAGCUGUGGCUCAUCACGGCCUCCAUGACAAG

配列番号 3

GGCUCCCUCACGGAUUACCUCAAGGGGAACAUCAUCAUGGAACGAACUGUG
UCAUGUAGCAGAGACGAUGUCACGAGGCCUCUCAUACCUGCAUGAGGAUGUGC
CCUGGUGCCGUGGCGAGGGCCACAAGCCGUCUAUUGCCCACAG

20

配列番号 4

GGACUUUAAAAGUAAGAAUGUAUUGCUGAAGAGCGACCUCACAGCCGUGCUG
GCUGACUUUGGCUUGGCUGUUCGAUUUGAGCCAGGGAAACCUCCAGGGGACAC
CCACGGACAG

配列番号 5

GUAGGCACGAGACGGUACAUGGCUCCUGAGGUGCUCGAGGGAGCCAUCAACUU
CCAGAGAGAUGCCUCCUGCGCAUUGACAUGUAUGCCAUGGGGUUGGUGCUG
UGGGAGCUUGUGUCUCGCUGCAAGGCUGCAGACG

30

配列番号 6

GACCCUGGAUGAGUACAUGCUGCCCUUUGAGGAAGAGAUUGGCCAGCACCCU
UCGUUGGAGGAGCUGCAGGAGGUGGUGGCACAAGAAGAUGAGGCCACCA
UUAAGAUCACUGGUUGAAACACCCG

配列番号 7 (末端 UAA 終止コドンを含むエクソン 11)

40

GGCCUGGCCAGCUUUGUGUGACCAUCGAGGAGUGCUGGGACCAUGAUGCAGA
 GGCUCGCUUUGUCCGCGGGCUGUGUGGAGGAGCGGGUGUCCUGAUUCGGAGG
 UCGGUCAACGGCACUACCUCGGACUGUCUCGUUCCUGGUGACCUCUGUCAC
 CAAUGUGGACCUGCCCCUAAAGAGUCAAGCAUCUAA

配列番号 8:

GGCUCGGCUCCGUGGCCGCCGCUCAGGAGCCAUUUUGGACUCGGUUCAGCUCC
 CCUCCCCCCCCACCCUCCCCCGUUAUGGCCCCUCCGGACUCGGCCCCUGCGC
 CCGGGGCCGGGCCAGCCCCGCCGCGCUAUGCCUGAGUCGGGCGCGCCCCGGC
 CCGUGCCCCGCCGCCCCCCCGCCCCCGUCGCCCCGGAGCCCCGGGCCGCA
 GCCUGCGCCGCCCGCAGCGGCCUAGGCCGGCCCCGCCGACCGGCCUUGGAG
 CCCGAACGCUCGUCGGGGACGAAGGCGCAGGAAGCGCGCAGGGAACGAGACCG
 AAGGAAGGAGCGGGAAGGAGAGCGCAGCCGCCUGGCCUGCGCGCCCCGG
 GAGCGCCGUGCGGCCUGCCCGGGGUCGGGUGUGCGGGGGCGGCCCGC
 GGAACAUGACGGCGCCUGGGUGGCCUCGCCUCCUCUGGGGAUCGCUGUGC
 GCCGGCUCUGGGCGUGGGGAGGCUGAGACACGGGAGUGCAUCUACAACGC
 CAACUGGGAGCUGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCUGGAGCGCUGCGAAGGCG
 AGCAGGACAAGCGGCUGCACUGCUACGCCUCCUGGCGAACAGCUCUGGCACC
 AUCGAGCUCGUGAAGAAGGGCUCGUGGCUAGAUGACUUAACUGCUACGAUA
 GGCAGGAGUGUGUGGCCACUGAGGAGAACCCCCAGGUGUACUUCUGCUCUGU
 GAAGGCAACUUCUGCAACGAACGCUUCACUCAUUGCCAGAGGCUGGGGGCCC
 GGAAGUCACGUACGAGCCACCCCCGACAGCCCCACCCUGCUCACGGUGCUGG
 CCUACUCACUGCUGCCCAUCGGGGGCCUUCUCCUCAUCGUCCUGCUGGCCUUU
 UGGAUGUACCGGCAUCGCAAGCCCCCUACGGUCAUGUGGACAUCAUGAGGA
 CCCUGGGCCUCCACCACCAUCCCCUCUGGUGGGCCUGAAGCCACUGCAGCUGC
 UGGAGAUAAGGCUCGGGGGCGCUUUGGCUGUGUCUGGAAGGCCAGCUCAU
 GAAUGACUUUGUAGCUGUCAAGAUCUCCCACUCCAGGACAAGCAGUCGUGGC
 AGAGUGAACGGGAGAUCUUCAGCACACCUGGCAUGAAGCACGAGAACCUGCUA
 CAGUUCAUUGCUGCCGAGAAGCGAGGCUCAACCUCGAAGUAGAGCUGUGGCU
 CAUCACGGCCUCCAUGACAAGGGCUCUCCACGGAUUACCUCAAGGGGAACA
 UCAUCACAUGGAACGAACUGUGUCAUGUAGCAGAGACGAUGUCACGAGGCCUC
 UCAUACCUGCAUGAGGAUGUGCCUGGUGCCGUGGCGAGGGCCACAAGCCGUC
 UAUUGCCCACAGGGACUUUAAAAGUAAGAAUGUAUUGCUGAAGAGCGACCUC

10

20

30

40

50

ACAGCCGUGCUGGCUGACUUUGGCUUGGCUGUUCGAUUUGAGCCAGGGAAACC
 UCCAGGGGACACCCACGGACAGGUAGGCACGAGACGGUACAUGGCUCUGAGG
 UGCUCGAGGGAGCCAUCAACUUCAGAGAGAUGCCUUCUGCGCAUUGACAUG
 UAUGCCAUGGGGUUGGUGCUGUGGGAGCUUGUGUCUCGCUGCAAGGCUGCAG
 ACGGACCCGUGGAUGAGUACAUGCUGCCCUUUGAGGAAGAGAUUGGCCAGCAC
 CCUUCGUUGGAGGAGCUGCAGGAGGUGGUGGCACAAGAAGAUGAGGCCCA
 CCAUUAAGAUCACUGGUUGAAACACCCGGGCCUGGCCAGCUUUGUGUGACC
 AUCGAGGAGUGCUGGGACCAUGAUGCAGAGGCUCGCUUGUCCGCGGGCUGUG
 UGGAGGAGCGGGUGUCCUGAUUCGGAGGUCGGUCAACGGCACUACCUCGGAC
 UGUCUCGUUUCUGGUGACCUCUGUCACCAUGUGGACCUGCCCCUAAAGA
 GUCAAGCAUCUAAGCCCAGGACAUGAGUGUCUGUCCAGACUCAGUGGAUCUGA
 AGAAAAAAGGAAAAAAGUUGUUGUUUUGGAAAUCCCAUAAAACCAAC
 AAACACAUAAAUGCAGCUGCUAUUUUACCUUGACUUUUUAUUAUUAUUUU
 AUAUUUAUUAUAAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU
 UUACCAGCAUUAUUGCUCUACUGUAUCACAAACAGCGGACACGUCAGCAGGCGU
 UGAGGUGCUGAGCUGUGGAUGCAGAACCAGCGCCAUGCUGAAGAGCCUCAGCC
 ACCUCCUGUCCUUUGGGAUUCGUUUUUCGCUUUCUCUUUGUUUGUCGUCUC
 AGAAUCUGUGACACAAAGAAACCAUCUCCUGUCUUAGGAAACCUAAUGCUGC
 AAACUCUACCUAGAGGAACCUUUGAAGACUGUUACAUAAGAACAUAACCUUCCU
 CAGAAGAGGAGUUUCCUCUGCCCUUGCCCUUCUCCCUUGCCUCCCUCCUCC
 CUCCUUUUUAUUUGUUUUAGUGAGCUUAAGAAACAGCAGAUGUGUCUUUCAC
 GGAUCUAACGGGUGUUGUCCUGAUCGAGAAAAAACUGGGGAUGAGAAUGGUU
 UGGACUGGAGUUGGAAGGGGAGGACGGUACUGGGGUAGGGUUUGGAACAGA
 GCUACACUGGACUCGGGCACAUUCGGAGCAGCAUCCUUUAGUAUGGAGGCUAC
 UUCUCAGGUAACCAGGAAUUGAGGGGAAGGACCUUGUGGAGGCCGAGCAUUA
 ACAGCAAGAGCGGGGUUGGAGAAAGUCUGAGAUUGGGUGCAGCCCUGACUU
 ACCUGCUGGCCUGACCAGUUUCUUUCACUAACUUGGCCUUGGGCAUAGGAU
 GAAACAUUUUUCUGCCCUAAUUUAAAACUAGGUGAGGGUAGAAUCAUCAC
 AGGUUAGGAAUACAUUCUUAUAAGACACGAUGCUGUAAAUACCCUAAUGG
 ACGAAAAGUUGAAAUACUUUUGUUUCCUCUUGGAGCAGUUCAGGGAAAUGCC
 CACAGGGGAUUGUCCUGCACAGAUAGGGCAAGAGGAUUUCCUGGGUGGAGUC
 UGCCAAGGCCUGCCUCGCUGGGGACCCAGAGUCCUGCACCUCUGGUUCCGCC
 CCAGGUGGUGACAUUACUGUCCCCGUUCUGUGGCUCGUGGACAAGACUUUCUC

10

20

30

40

50

CAGACCCCUUAAAGUGGUACAUAUUCUAAAAACUGUUUUUCUAUUAUGCCA
 UAACCUUGCUCUAGUCAGUGAAUGUUCUAAUGCUGCUGUUCAACAUUUGA
 AUUCUUUUUAAUUUAUGAAACAUGCIAAAUUUUUUUUUCAAACAAAACACA
 CACAUCCACAUAUACACAUGCUUCGCUAUGUGGCUUCCAAGGUUAAAUUUUU
 AAAAGUAAAAGAAUUAAAACUUCACGACCACAGAUCACCUCAAACCAGAAAU
 ACCUCAGAAUUUUUCUACUUAUGUAAGGUUUUUUAUUAUUUUUGUUAGUUGUG
 UUGUCUUGUAGUAAGUAUUAUUUAAGUUAAGUUGGCUUUUGUGACAAGGAAG
 UUUAAAAGAAAUAGAGAAAAAGAAAAAGUUUGCAUCUUCUAGGGAGUGCUA
 CCAUUUUUGUUUGAUAAACGCCCCUUGUAAAUAUUUGUCAUCAACUGUAGGU
 UGGCUGUCUGGGCCAAGUCUGGGCAUUUAUCAGUCUUGUUUGUGAAGGCUUU
 UCCUUCUGGUUUUCUUUAGAUAUUUUUUUAAAACAGUGCAUCUCUUCUUC
 GUGAGGGUAGGCAAGGCGGGGGCCGUGGGGAGAGGUUGACCUGGGUGAGAAC
 UGAAGAGGCCGCCUCCUCUUGGGUUGUUUGGAGCUUCACAUGUAAUUCACAU
 GUAACAUGUAACUUGAUCGGUCAGUGUUCAGAAUGACAAGUAACCCCGCUUA
 AACUUGGUAGAAGGAUGGCCCUUAGACCUGAAUGGGGUGAUUUUACUUGGGA
 UUUAAUCUUCUUCAGCAAUUAAACAGCAACGUUGGAAGAGAUCUGUGGCGCCU
 CUGUGAAGCACACCGUGACUCAGGCCAGUCUUUUAGUGCAGCGUGUCUGGGAG
 UGAAGGGUUUUUGCCUUGCUGGUCUUGGAGUCCACAGUGUGAGGGGCACUGC
 ACAUGCCUGGGCAUCUACCUAGUGUGCUAUGUUCAGUGUCUGGGGCUUACUGC
 CCCGGGGUCCUUCCUCUGGGUGUUGGGGCACAGGGUGCUAUGGGAGGCCCAU
 UUGCUUCCUCUCGGAGCUCAGUUUUUGCUUCAUGGGUCAAAAUGUGGGCUG
 GCCAAGUGGUUACAGGAACAGGGUUUCGGUAAGCUAUGUUGUCUUUUUUUU
 UUUUUUUUUUUUUUUUUUUAAUGGUUUGAUUUUGUGCUGUGGUUUUUUUUUC
 CCUUAGAAUAAUUUUUAAUGGCAAACAGGCCUUACAGCAGUUGCUUUUCU
 UACCAUUUAUUUCUUUAAGAAGCUUUAAAUAUUUAUUGAAAAGUGCCAUAU
 CUAUUUCUUUAGCUUUCGCCUCAGGCAGUGCAGGCAUCUUUACUUUUCAUCC
 UCAGAAGAAACAAACGACUAACAAAUGUAGCAAUUUACUGCAGGAAUAGUU
 AGGUCAUGAUACUACCUGAACACUAAACCCAGCCUCUUGUUUGGUUUUAGU
 UCCUCUGGGUGGUUUUUUCUUUUGUGUGCUGGCUUGAUUCUUGUGAGAAGUU
 UGACCUGGCCAAGGGAGGGUUGAGCCAUGGUUCUGGUGUGGGACUUUGCGGU
 CAAGACACAGUACAGACAGGUCAGGCCUGCGUGCCUUUUCUCUGGGUGGCCUC
 CCCGUUAGGCCACCGUACGCUCAGCCACUAUAGUGUCCUGUGGGGCCUUGC
 CAUCAGAUUGUGUGUCAGGAGAUGGUACCUUUUUGGUGUGGCUGGGGAGGAG

10

20

30

40

50

UGUGGUCCAUGCCAGUUCUUUGGGCUUCAGGCCACUCUCCCCUCAUGCUGUG
 GUGUAAAGUGCACCCAUCAGGUGGUUAUAUCUGGUUCUGAUGGCAAGAAGAAG
 GUGGGGGAUCUCCUUAUAGGGCAUGGGUCUAGGAGCACAGAUGGGCCUUUUG
 CCCC GGUAAAUGCUUGUCUGUUUGCUGUCAUGUGUUCUUUGAGGAGUGAGC
 CAUCUCGAGCCCUGCUUUGAAUUUACUGGGUCAUAGAGCCUCUGCCUGUGCUC
 UUUUCCAUA AUGACUUCAUGUGACAUGCACUUUUGGUGGGCUCAGAUAAUUG
 GUUUCUUUUUGUUUUUGACCUCAGGCUCUGUGGCAGACUGGGGAAA AUGGGG
 CCUGGCAUCAUUUCCCUGUCA AUGGGAGGGGCUGUCCAUGCAGGGUGGGGA
 GGGGACCAAGUUAGCAGAGAGUAGCCAAGGAUCCUUGCUUCUCCUUUCUAG
 UGUGCUGUCAUCCAAGCAGGCUCCUGGCUGUAGGGAUGGGCCUUGGGGAAGA
 AUCUUCUUUGAAAGCAUCUAUGAUAAACUGAGAAGUCAUCCCUAGUUGGAGAA
 AUCCAGUAAUGAGCAGAAGGAGGAAGCAAGUGAGGACAGAGGCCAUUGUAUU
 ACAGUGUCACGCAGAGGGCCCUCAAUGAUGGGGCAUUGGGGAAGGCUGUAGA
 CAUAGUCAUCAGAAAUCCUGGCCUGGCAUAAGCUGGGUUUUCUCCUGGGACC
 AUUGGUCCUCAGCAGGAGUUCUUUGCAUGAGUUGCUCAGGGGCAAGGGCUGC
 AAGUGGGCUGUGC UUAGGAGAAAGUGACACCUGGCAGUGAGGGAAGAUGGUG
 AGCAUUAUAGCCUUUGUUGUCCAGCAUGGCCUUCUUGUCCUGUCUGCUCUGG
 AGAGGAGCCUGUGGGACCAGUCCUGCCUGGGGAGGGCAUACCCACACGUGCCA
 GCUGAUUCUGACUCUGAAUACAUCAUGUCCGGACUUGGGGGUGUUUCUGCAG
 AAAAAGGAGGUUGUUUUUCAGCCUUGAACAUUCUUCAGGAGGAUAGAGACUCU
 UGCUCACAU AUUCUAGCAAAGGGGAAGGGUCUCUCAUCUCCAGGCCACAGAGA
 UAGUUCUCCA UUGCCCUAAGAGGCUAGGCUAACCCUCUUGACAUAACUUAGA
 CAGCAAAGCACUUCAUCCUGUAGUUGGGCUCUGUCACCUUUCUCUUCAGUUGG
 CCACAUUCUCGUUUCUCCAUCCUGCUAUGCUUUGUGUGCUCGGGCUGUGUGU
 GGGGUUUUCCCUGGUGGAAGGAAGCCCAGCUGUGUAUUGAAUGUCCUUCAU
 GUGUUGUGUGUGGCUCAGAAAGCCUGUCACUUGGCCCCUGUGCUCUGAGCCGU
 GAGGGUGGGGAGGUGGCUGUCCAUA AAGUGGGAGUAUUGGAUGGCCUCU
 UGAAACUAGAAUUUUGCCUUUUUUAGUAUGCAGUAUA AAGUUUCCAGCAUCU
 AUUGGUAACACAAAGAUUUGCUGGUUUUUAAAUAUACAGUAAGCAUAAGU
 AUGUAAGUUUUAGAAUUGGUACUAGAAGUUGGACAGCUAGUUAUUCUCGAG
 AACUUUAUUUCACUAGAAAAUAUACUAAUUGGAAAGCAGUUUCCAGGAGUU
 AACUCAGUUUAUUUUCAGUCUCAGUUAUUUUAGCCUGUUGAGUUUUUGAUG
 GCACACCUUUGGAGAGAUGGCCACGCCUGAUUCCA UUCAGGGGCAUCAGAC

10

20

30

40

50

CAUACCUUUUUAAGAAGCUCCGUGAAUCUAGUCAUCUACCCUUCAUCCUGGGC
GAACAGCCAAAAAGAGAAGGGGACAAGGUGUCUUUUUCUCCUUCUCACUGGG
GUGACAUGAAUUCUUUUAGUAAAUGGCUGUUUGCAAAUUCUAAACUAAUGAA
AUACUUAGCAGCUAACAUGUUCAAUCUAGUAAUGAUGAGUUUAAAUCUCAAU
UGACAGUAAUGUUUUAGAUAAACAGGCCAGUAAUUCAGUUGAUGAACUGUA
UAUCUUCUCAGUCUAGAUUUUGUAAAUGUUUAAUGAAUUCAGGGUUUAAGCA
UAGUUCUUUAAGUAAGAUUCCAGAUAGUUGAUUUUGCAACCAGCAGUCUACCU
AUGAAUGUAUCCCAAACCUUUAGAAGAUUGGAAAAGAUUUUUGAAAUAUGA
UUUAGUUUUUGUAGGAAAAACACCCCUUGAAAAUUAUUCGGUUGACCCAGU
AACAUUUUUUAAAACAAUUGGUGGCUCCAAAGGCCUGCCAACAAAGAAAAG
UCCAAAUUAUCUAGUGGGACAUUUUGAAUGUUUUAUGUUUAUUUUGGGUCCA
CUGUAAACUUUGGUUCAAAAAAGAAUUGAAUUUAAAAGAAUUUACCAUUAUU
UAAAUAUUACCAAGUUUUACAUUUUCUGAUGGUUUUUUCCAGGUUAUGAA
UGAAACAUGACUUUUUGAUUGUGGUACUCCUGUAUCCCUUGUAGUGCCAAA
ACCAGUGAUACUUUAUUUGCUCCUUAUGGCAGCUCUAGAGGUAACCGAAGUG
AUUUUUCUCAGUAAUUGAAACACAUAUUCUCUAAAUGCCAAUGUGUGGUGA
UGGGCCUGCACUGCCUUCUUUCUCUAGGGCAGUGUCUUUGGAUUGUCUAGG
GCCUAGGUAAUUCUGAGAACUACUGUAAACCAACCACAGGGCACUAAAGCAAU
GUACACACCACUCUUUGUGUGUAUGGAAGGGGUUAUAUAAAACCGGGCUAUG
CUGGACAUCUACAGAAGAGUAUUACAUUCACUUGCAAAGUUUACAUUUUUGA
GCUCACAGUUUUGAAAAUAUGACCCACAAGUUUUUCAGGCAGGUGAGGAUG
GGUCUUCUUGCAAUGCAUGAGUUCUGUCUUGAGUCCUGGGAACUUCUCUGU
UGGUUGAGUGUGGGUCUUAUCCUGACUCUCCUAAUCAUGUUUGCGUCAGAA
UGUUAGCAUUGUAAAUAAAAGAAUAGGUUGUAUAAUAGAUACACAACACUUG
AAACUUUACUUUAAAAAAUCGAUAGUUCUACAUAUAUUAUUUAGUUUAUCA
CUUGACAGAUUUUCUACACAGUGUGGAGAUUGUUUUUAUACCACAGAUUAU
UUUUUAUAAAGUUAGUGAAUUUGAAUGAUUUUGUAAUCAGAGCUAAUGAGCUU
UACCUUUAAGAGAAACGUACACUGGAGCAUGAGUGGUGUGGAACUUUUACU
UAGUGUUUAUUGGAUUCUUGUGAUACACUGGCAGACUGGAGUCAAUUUGCG
GGUCUUUUUUGGCCAAAACUCCACUUGUGGUUGUGUAGGACAGUGAUUAUCA
GCUCAGCUUCUUGUGGAUUGGGAGGAGAGGGCCUGCAAUGUGUUUUACA
UGGUGCUUCCUCCUGAGAUUUCUGUUGAACAAAGGGUUCUGAGGUCAAAAU
UAGUUUGUAAGCCUUUGCCAUAGGACAUAUGUCAUGUGAGAGUGUUUGGGGA

10

20

30

40

50

ACAGAAAUUGUAUAGGGGUGCCUAUUGGGGUGGGAUGGGACUCGAAUAAGAU
 UCAGGUACAAAAACUUUGAAAUGAGAAUCUGGUGGUUUGAGUAAUCCACCAG
 ACUGAAUUAUCUAAGAUCACAUUAUCCAGGUUGGGGGCAGAAUACCCAGU
 UAAGUAAUUGUUCAGAAAAGUGGGGAGGGUGGCAUGUGGAUGCAGUGAUCCA
 AUUAAAUGGAGAGCUGCCAGGCACAUUUUGUCCUCUCUGGUCAGUGAGAAUG
 GUUGGGUUGGCUCGCUGCUUCAUCUGUGGAAUCAGCCAGGAGCCCAGUGAG
 GAAGCUCAGAACCCCAGUAACAGCAGAGCAUCUUUCAGAUAGCUCCAGAGUUU
 UCCUGCUUUUCUGAGGAAGCUCAGCAUCACUGCCACAAUACGGAAAGUGGUCU
 UCAUUUUAGCCUAUUUAUUUUUAGGCAGAGAGUGGAUGGUUAUUUGUGUGGG
 ACUUUUGGUGGCGAUUAUAAUGAAUAAUUAAGUAAUUUCUGGUAUGCAUA
 AUGGCCAGUCCUGAGGCCCAGCUGAAGACCUGUCCCCAGACCCUGCCCGCUG
 GCUUCAGGCUGCUGCUUCUAGACAGAGGUGCACUGGACGGGAUAGUUUUAC
 AAGAGAAUCCCUAAUGUGUCAUUUAAACCAGCUGUGCUUUUUAUUCAUUCU
 GGUUGAGCGUAUAGGUUUACACUUUACCCUUUUUAUCUUGGAAUAAAUUUA
 GUUCCAGCAGAUCUAGUAGCACUCCAGAAACCAACCCCAUCUGUCCCCAUA
 AAAGAACAUUUUCUCUGCUCUCCAGCCACGUGUCUUGGAAUGUAAUUCUGUU
 GUGCCUUUGUUUUUAUCACUCUCUUCGCCCCAAAAGCAACUGCUGUAAGCUUU
 UUUUCUACUUGUCUUUUUCUAGUCCCCAACCCUACCUUUUUCCUUUUUCCAGC
 CCUAAUUUCUGGAUGCACUUCUGUGAUCCAGGUUUUUUAGAACCAGUUACC
 UCAGACCUCAUGUUGAACAGUGUCGCCAUCUGGGUCCUCUUGAUACUGCAGAC
 UUUUAACGUACACAUGCAGGAACCCUGCUGAGCGUGGGCACUUGUUUUAAAG
 CAAAACUCUCCCCAAGGACUGAAGAAAGGGCUUCUGGCAAGCUCGUAUGGCA
 UUGUGGUGGGGAUGGGUCUAGAGUGUCAUCUGAAUGGUGCUUCCUGUGUCCU
 CUUUGAAUUCUGCCAUUUUCAGUAUUCUUGUGUGUCUGAAUAGGCAAAGCGA
 UUUAAUUGGCUGGUCUUGCACGCAAUUAGUCCAAAGAUAAAGCUCUUUGUA
 ACACAUUUCAGUCGCUAAUGCUAAAUGUAGAACAUCCUUUAAAUGGCAG
 GAUAAAAAACCCACUAUCCACCAUAGUGCAUUUUGGGAAGAUGUCUGUAGCA
 UAUGUUGCUGUGAAAUUAGGCCUUGUGGGAUAUGGCUGUUUGUCAUUUUGAU
 GUAUUUUAAAUAAAUAUAUAUUUUUAAAGAGCCUUUUUACCAGUUCAA
 AAAGUUUAAUUAACCAGCAGUCACCGCAUCUGAAUUUUUGUCUCUGGGGCAU
 AGAUGGCAGACCAAGAUUAAAAGUGGUAACUCAGCUAUACGAGCAUGGGCUA
 CCUCCUGGGCUCUCCUGCAGUCCUGUAGACCUGCUGUCCGCAGACCAUGGG
 ACACAAGGUCAGUGUGUCCAGUGAGGGUCCCAAGUCAGUCAUCUUAAGUG

10

20

30

40

50

UUUGUUCUCUGCCCCAUUCAGUGGACUGUUGACUUCAGUCCCUGCAAGUGCUU
 UAGCCCCGAGUGGGGUUUUCUCAGAGCACUGCCACGAGUUAAGUGUGUGUUUA
 GCCAAAUAUUUCUCGGUAAGGGAAAAAUGCAGUCACCCAAAUUUACCAACA
 AUGACAGAGAUGAGAGUAGAAAAGAUUAGGCAACAUCUGAGUUUUAACUUGA
 AAAGUGUCCAAGUCAUCAUGAAAGGCCGACUGGGAGCAAGUGAUUAUUAGAG
 AUUCUUCAGGAGACCUCAUCUGAAAAUGUUAAGACUGCCAGUGAGGGAAGGA
 AUUGUUA AAAAUGCCAGCGGCUUUUUUUUCCUCUUUUUUUCUGUAAUUCUGUA
 AAAAUGCAGAGAAAGUUGAGUGGUACUUCAGAAUUGAGGGAGAGGGUUACCG
 CAGAGUAGAAAUAUUAUUUCUAGAUUUCAGUUCACACCACAAAUCCACAACAA
 UGCCAUUUUUAACUGUACAAAAAUCUGCUUAUGAACUGGACAUGAUCUUA
 UGGUAGUGUCAAGGCCAAGUUUUUACCCUGUAAUAUUUUUCCACAUUUGU
 CCUUGAAUCUGAAUAACUUUAUACAGUACUGUAAAUAACUUAACUUGAGU
 UUGUUGUCAAUUCUUAUGAAAAGAGCUUUCUGCAUGUAACACAUACGGUUA
 AGAACACAGCAAAGGACAAAAUUUGCAGGAACAGUUUUGGAACCAACAGAAA
 AUGUCACCUUUUAUUUGCCAUCUUAUAUAUCUAUCAGUUUUUACCAGCUAC
 UUCUAAAUUUGUACAUAUUUGUAAGGGAAAGAAGGAAAACCCUAAGACUUG
 UCUAACUUAGUGGAGAAUGUGUGUGUUGGGCUUAGGAUGGAUAGCUAAGUCU
 UAUUGAGCUGUGUUAACCUUGUAUAUAAAAUUGUAAUAAAAGUUUGG
 GUUCACCGUUUCACAGUUUAAAAUGAUGAGUAAUUGCAAACUCUGGAAA
 UGUGACUAGUAUAUGAUUUAAGGCUGUAGAAGCAAGGAAGCUCUUUCAAGUG
 CUAAAACUAAAGACUUCUAGUUUUUGGCUCAAAUAAGUACUGUUUGUAUACC
 AGGAUAUGUGAGAUGUAAAUGUAGUAGGUCACUUUUCACCCUUGUAGCUAUA
 AAUA AAAAUUUUGUAGAACAGAAAUAGCUUGUACUACUGAAUUAACAAAAG
 UUAUACUAAAGUAUCAUGUUUAAAAAAAUAUAUAUAUAUAUACAGAGUUA
 GCUUGUUGCUGUUACCCUGUCUGGAUUUGAAAAGUGUGCUGAUUUUAUAUA
 UAUUUACA
 CACACACACACACACACACACACACACAUACACCUAAAAUGGCCUAAAGCAGACA
 UCCAUGUAAUACAGUUGCAAAAUGAAAACAUUUUGGAAAGAACAUUGUAUC
 AUAGUUCAUUAUUUGCAGUGGAUCUUUGUUCUUUUUACUGUGGUAAUUUU
 AGAAAUGAGUGUCAAGUUUGAAAUAAGAUCUGCUAAGUUGGGGUUUUGCUGC
 UUGAACUCUGCACUGGGUCCUAAAUAACCGAUGUGAAUGUAGUUUUUCC
 CCCUGUGUGAAGAAGCAGUUACACCCCAACAUAAGGAGGAAAAAUCUAGAAC
 UAUUUAAGUUUAUCUUUUUGUAUAUGAAAUA AAAUAAUAAAACAA

10

20

30

40

50

配列番号 9:

AUGUACCGGCAUCGCAAGCCCCCUACGGUCAUGUGGACAUCCAUGAGGACCC
 UGGGCCUCCACCACCAUCCCCUCUGGUGGGCCUGAAGCCACUGCAGCUGCUGG
 AGAUCAAGGCUCGGGGCGCUUUGGCUGUGUCUGGAAGGCCAGCUCAUGAA
 UGACUUUGUAGCUGUCAAGAUCUUCCCACUCCAGGACAAGCAGUCGUGGCAGA
 GUGAACGGGAGAUCUUCAGCACACCUUGGCAUGAAGCACGAGAACCUGCUACAG
 UUCAUUGCUGCCGAGAAGCGAGGCCUCCAACCUCGAAGUAGAGCUGUGGCUCAU
 CACGGCCUCCAUGACAAGGGCUCUCCACGGAUUACCUCAAGGGGAACAUCA
 UCACAUGGAACGAACUGUGUCAUGUAGCAGAGACGAUGUCACGAGGCCUCUCA
 UACCUGCAUGAGGAUGUGCCCUGGUGCCGUGGCGAGGGCCACAAGCCGUCUAU
 UGCCCACAGGGACUUUAAAAGUAAGAAUGUAUUGCUGAAGAGCGACCUCACA
 GCCGUGCUGGCUGACUUUGGCUUGGCUGUUCGAUUUGAGCCAGGGAAACCUCC
 AGGGGACACCCACGGACAGGUAGGCACGAGACGGUACAUGGCUCCUGAGGUGC
 UCGAGGGAGCCAUCAACUUCAGAGAGAUGCCUUCUGCGCAUUGACAUGUAU
 GCCAUGGGGUUGGUGCUGUGGGAGCUUGUGUCUCGCUGCAAGGCUGCAGACG
 GACCCGUGGAUGAGUACAUGCUGCCCUUUGAGGAAGAGAUUGGCCAGCACCCU
 UCGUUGGAGGAGCUGCAGGAGGUGGUGGCACAAGAAGAUGAGGCCACCA
 UUAAGAUCACUGGUUGAAACACCCGGGCCUGGCCAGCUUUGUGUGACCAUC
 GAGGAGUGCUGGGACCAUGAUGCAGAGGCUCGCUUGUCCGCGGGCUGUGUGG
 AGGAGCGGGUGUCCUGAUUCGGAGGUCGGUCAACGGCACUACCUCGGACUGU
 CUCGUUCCCCUGGUGACCUCUGUCACCAAUGUGGACCUGCCCCCUAAAGAGUC
 AAGCAUCUAA

10

20

配列番号 10.

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGCGCCGGCT
 CTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGG
 AGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGAC
 AAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGCGCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCG
 TGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGT
 GGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTA CT TCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGC
 AACGAACGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAG

30

40

50

CCACCCCGACAGCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCA
TCGGGGCCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAG
CCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACCACCATCCCC
TCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGCTTT
GGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGATCTTCCC
ACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGG
CATGAAGCACGAGAACCTGCTACAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAAC
CTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGG
ATTACCTCAAGGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTATGTAGCAGAGAC
GATGTCACGAGGCCTCTCATACTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCGAG
GGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGA
AGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCTGTTGATTGAGCC
AGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGC
TCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCTTCCCTGCGCATT
GACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTG
CAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCA
CCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCAC
CATTAAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCAGCTTTGTGTGACCATC
GAGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAG
GAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTGCGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCG
TTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATC
TAA

10

20

配列番号 11.

30

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser
Leu Cys Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu
Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg
Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile
Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys
Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg

40

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr
 Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala
 Tyr Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu
 Leu Ala Phe Trp Met Tyr Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly
 His Val Asp Ile His Glu Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser
 Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu Leu Glu Ile Lys
 Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln Leu Met
 Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly
 Met Lys His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys
 Arg Gly Ser Asn Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala
 Phe His Asp Lys Gly Ser Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn
 Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys His Val Ala Glu Thr Met
 Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp Val Pro Trp Cys
 Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg Asp Phe
 Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys
 Pro Pro Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr
 Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg
 Asp Ala Phe Leu Arg Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val
 Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys Lys Ala Ala Asp Gly Pro
 Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu Glu Ile Gly Gln
 His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val His Lys
 Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp
 His Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu
 Arg Val Ser Leu Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser
 Asp Cys Leu Val Ser Leu Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp
 Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile

10

20

30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】

図 1a

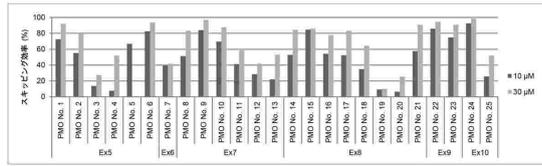


図 1b

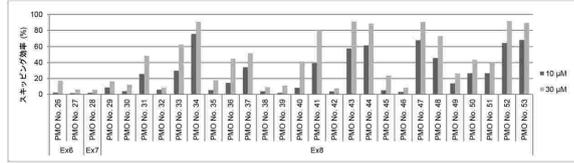


図 1c

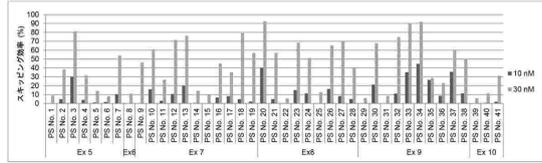
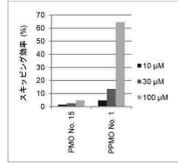
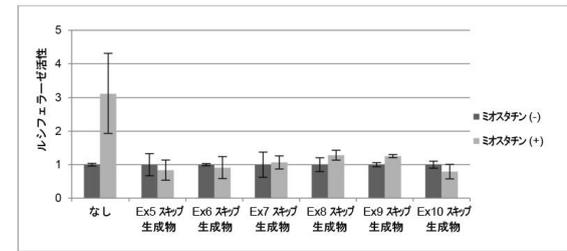


図 1d



【 図 2 】

図 2

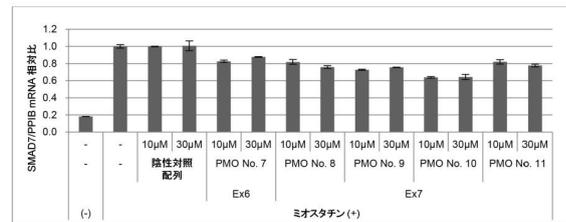


10

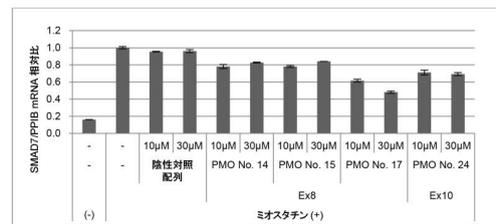
20

【 図 3 】

図 3



30



40

【 配列表 】

0007509801000001.app

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
C 0 7 H	21/04	(2006.01)	C 0 7 H	21/04		Z N A

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 9 9 8 6 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 8 / 2 2 3 0 5 6 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 6 / 0 8 7 8 4 2 (W O , A 1)
 特表 2 0 1 8 - 5 3 0 5 6 0 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 7 / 0 4 7 7 4 1 (W O , A 1)
 Nucleic Acids Research , 2015年 , Vol.43, No.1 , p.29-39
 PNAS , 2001年 , Vol.98, No.16 , p.9306-9311

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3
 A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8 - 3 1 / 7 1 3
 C 0 7 H 2 1 / 0 4
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
 N)