

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年9月26日(26.09.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/182109 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/113 (2010.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61P 25/14 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61K 47/56 (2017.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/012077

(22) 国際出願日: 2019年3月22日(22.03.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2018-055372 2018年3月22日(22.03.2018) JP

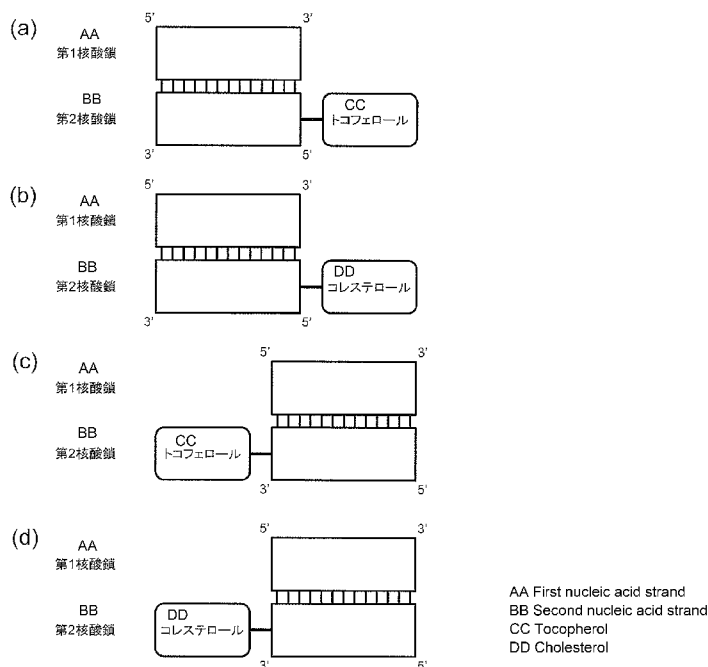
(71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4 5号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 横田 隆徳(YOKOTA Takanori); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4 5号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 永田 哲也(NAGATA Tetsuya); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4 5号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 古川 英紀(FURUKAWA Hideki); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2 6 番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 中川 泰男(NAKAGAWA Yasuo); 〒2510012 神奈川

(54) Title: BBB-PASSING LIPID LIGAND OF HETERO NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: ヘテロ核酸のBBB通過脂質リガンド

[図1]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a nucleic acid agent and a composition including the same, said nucleic acid agent having an antisense effect on a target transcriptional product at the site of delivery and being efficiently delivered to the nervous system, particularly the central nervous system, to which delivery of drugs is hindered by the BBB mechanism. Provided is a double-stranded nucleic acid complex that is obtained by annealing a first nucleic acid strand and a second nucleic acid strand, said first nucleic

県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 余郷 能紀(YOGO Takatoshi); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 得能 僚資(TOKUNOH Ryosuke); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 佐々木 茂和(SASAKI Shigekazu); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 日▲高▼ 功介(HIDAKA Kosuke); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 関 倫宏(SEKI Tomohiro); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 宮田 健一(MIYATA Kenichi); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 安達 祐介(ADACHI Yusuke); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 有村 直人(ARIMURA Naoto); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー32階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

acid strand being hybridized to a section of a target transcriptional product and having an antisense effect on said target transcriptional product, and said second nucleic acid strand including a base sequence that is complementary to the first nucleic acid strand and being bonded to tocopherol or an analogue thereof, cholesterol or an analogue thereof, a substituted or unsubstituted C₁₋₃₀ alkyl group, a substituted or unsubstituted C₂₋₃₀ alkenyl group, or a substituted or unsubstituted C₁₋₃₀ alkoxy group.

(57) 要約: 本発明は、神経系、特にBBB機構により薬剤送達が阻まれる中枢神経系へ効率的に送達され、かつ送達場所で標的転写産物に対してアンチセンス効果をもたらす核酸剤、及びそれを含む組成物を提供することを課題とする。標的転写産物の一部にハイブリダイズし、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有する第1核酸鎖と、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、トコフェロール若しくはその類縁体、コレステロール若しくはその類縁体、又は置換された若しくは置換されていないC₁₋₃₀のアルキル基、若しくは置換された若しくは置換されていないC₂₋₃₀のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていないC₁₋₃₀のアルコキシ基と結合している第2核酸鎖がアニールしてなる二本鎖の核酸複合体を提供する。

明 細 書

発明の名称：ヘテロ核酸のBBB通過脂質リガンド

技術分野

[0001] 本発明は、神経系、特に中枢神経系においてアンチセンス効果をもたらし得る核酸複合体又はその塩、及びそれを含む組成物等に関する。

背景技術

[0002] 近年、核酸医薬と呼ばれる医薬品の現在進行中の開発において、オリゴヌクレオチドが関心を集めており、また特に、標的遺伝子の高い選択性及び低毒性の点から考えて、アンチセンス法を利用する核酸医薬の開発が積極的に進められている。アンチセンス法とは、標的遺伝子より転写されたmRNAやmiRNAの部分配列を標的センス鎖として、それに相補的なオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド：本明細書ではしばしば「ASO（AntiSense Oligonucleotide）」と表記する）を細胞に導入することによって、標的遺伝子によってコードされたタンパク質の発現やmiRNAの活性を選択的に改変又は阻害することを含む方法である。

[0003] 特許文献1では、第1オリゴマー化合物、及びコレステロール等の共役基を含む第2オリゴマー化合物からなり、肝外組織若しくは肝外細胞、又は肝組織若しくは肝細胞における標的核酸の量や活性を調節することのできる二本鎖核酸分子や、該二本鎖核酸分子からなるアンチセンス化合物が開示されている。

[0004] ところで、脳を含む中枢神経系においてアンチセンス効果を発揮させるためには前記ASO等の核酸剤を中枢神経系に送達させる必要がある。しかし、脳には、血液を介して脳へ移行される物質を選択し、制限する血液脳関門（Blood Brain Barrier：以下、本明細書ではしばしば「BBB」と表記する）と呼ばれる機構が存在する。このBBB機構は、有害物質から脳を保護する一方で、脳への薬剤送達の障壁にもなっている。それ故に脳を含む中枢神経系へASO等の核酸剤を送達する方法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2017/053999号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、神経系、特にBBB機構により薬剤送達が阻まれる中枢神経系へ効率的に送達され、かつ送達場所で標的転写産物に対してアンチセンス効果をもたらす核酸剤、及びそれを含む組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、ASOと、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等を結合させたASOの相補鎖とをアニールさせた核酸複合体が中枢神経系に効率的に送達され、そこで高いアンチセンス効果を示すことを見出した。これらの知見に基づき、本発明者らは本発明を完成するに至った。すなわち本発明は以下の態様を包含する。

[0008] [1] 第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む核酸複合体又はその塩であって、

該第1核酸鎖は、標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、

該第2核酸鎖は、該第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、

(1) トコフェロール若しくはその類縁体、

(2) コレステロール若しくはその類縁体、又は

(3) 置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルコキシ基と結合しており、

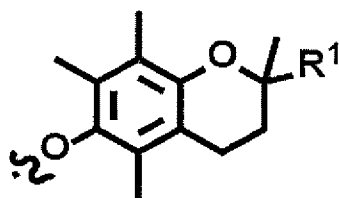
該第1核酸鎖は、該第2核酸鎖にアニールしている、核酸複合体又はその塩

。

[2] (1) トコフェロール若しくはその類縁体、
 (2) コレステロール若しくはその類縁体、又は
 (3) 置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim 30$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ のアルコキシ基
 と結合している核酸鎖であって、標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有する、前記核酸鎖又はその塩。

[3] 前記トコフェロール又はその類縁体が、下式 (I) :

[化1]

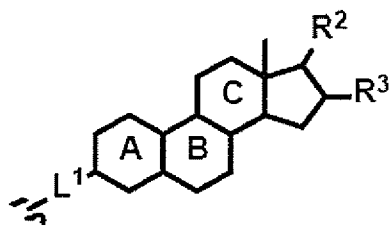


(I)

(式中、 R^1 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ のアルキル基又は置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim 30$ アルケニル基を表す)
 で表される、[1]又は[2]記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[4] 前記コレステロール又はその類縁体が、下式 (II)、(V)、(VI)、及び (VII) :

[化2]



(II)

(式中、
 環Aは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないベンゼンを表し、

環Bは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサジエンを表し、

環Cは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサンを表し、

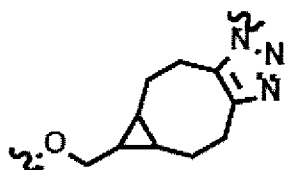
R^2 は、水素原子、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim_{30}$ のアルケニル基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル-オキシ基、又はオキソ基を表し、

R^3 は、水素原子を表し、

R^2 及び R^3 は、一緒になって、置換された若しくは置換されていない1, 6-ジオキサスピロ[4. 5]デカン環を形成してもよく、

L^1 は、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、

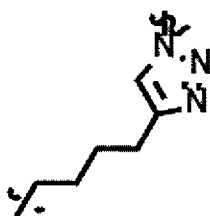
[化3]



(III)、

、又は

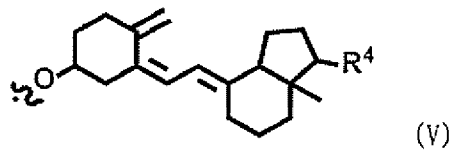
[化4]



(IV)

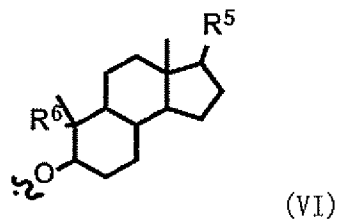
を表す)、

[化5]



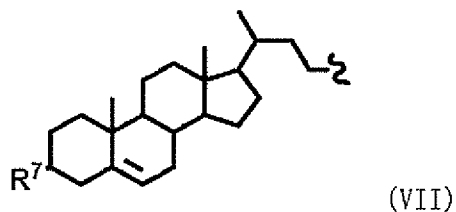
(式中、 R^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ のアルキル基、又は置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim 30$ のアルケニル基を表す)

[化6]



(式中、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ のアルキル基、又は置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim 30$ のアルケニル基を表す)、並びに

[0009] [化7]

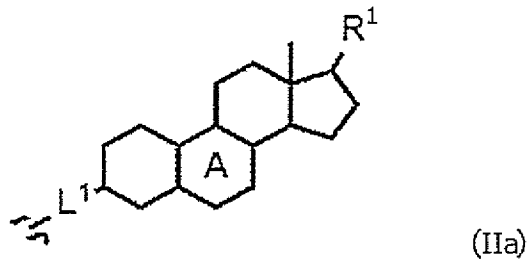


(式中、 R^7 は、ヒドロキシ基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ アルキル-カルボニル-オキシ基、又は置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ アルケニル-カルボニル-オキシ基を表す)

から成る群より選択される式で表される、[1]～[3]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[5] 前記コレステロール又はその類縁体が、下式 (IIa) :

[化8]



(式中、

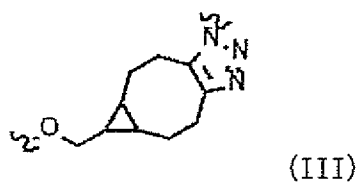
環Aは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサジエンを表し、

R¹は、置換された若しくは置換されていないC₁～₃₀のアルキル基、置換された若しくは置換されていないC₂～₃₀のアルケニル基、置換された若しくは置換されていないC₁～₆アルキル-カルボニル基、置換された若しくは置換されていないC₁～₆アルキル-カルボニル-オキシ基、又はオキシ基を表し、

、

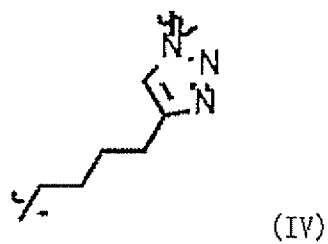
L¹は、-O-、-NH-

[化9]



、又は

[化10]

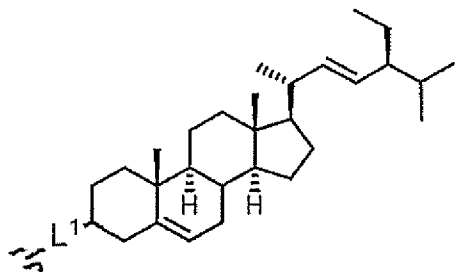


を表す)

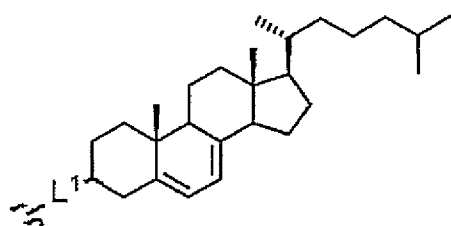
で表される、[1] 又は [2] 記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[6] 前記コレステロール又はその類縁体が、下式 (IIa-1)、(IIa-2)、(IIa-3)、及び (IIa-4) :

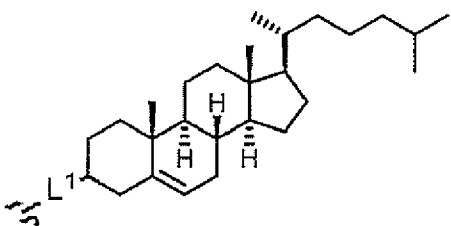
[化11]



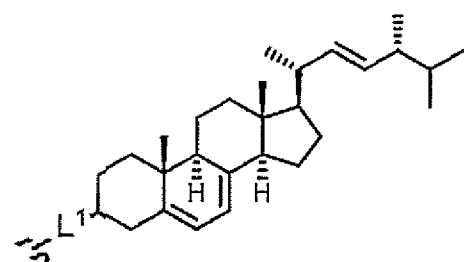
(IIa-1)、



(IIa-2)、



(IIa-3)、

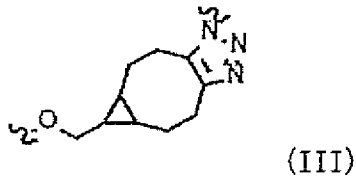


(IIa-4)

(式中、

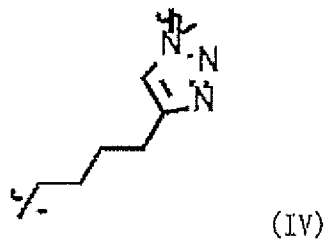
L¹は、-O-、-NH-、

[化12]



、又は

[化13]

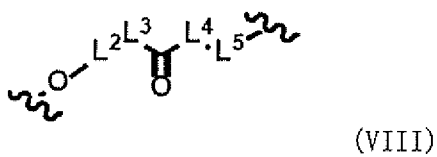


を表す)、

から成る群より選択される式で表される、[1]又は[2]記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[7] 第2核酸鎖が、下式(VIII)：

[化14]



(式中、

L^2 は、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_{3\sim 8}$ シクロアルキレン基、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ を表し、

L^3 は、 $-NH-$ 又は結合を表し、

L^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_{3\sim 8}$ のシクロアルキレン基、 $-(CH_2)$

$_2 - [O - (CH_2)_2]_m -$ 、又は結合を表し、ここで、 m は1～25の整数を表し、

L^5 は、 $-NH - (C=O) -$ 、 $-(C=O) -$ 、又は結合を表す)

で表されるリンカーを介して、

- (1) トコフェロール若しくはその類縁体、
 - (2) コレステロール若しくはその類縁体、又は
 - (3) 置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルコキシ基
- と結合している、[1]～[6]のいずれか記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[8] 前記第1核酸鎖が、少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む、[1]～[7]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[9] 前記第1核酸鎖が、ギャップマーである、[1]～[8]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[10] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖中の少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドに相補的な、少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドを含む、[8]又は[9]に記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[11] 前記第1核酸鎖が、ミックスマーである、[1]～[7]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[12] 前記第1核酸鎖が、13～20塩基長である、[1]～[11]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[13] 前記第2核酸鎖が天然リボヌクレオシドを含まない、[1]～[12]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[14] 前記第2核酸鎖の核酸部分が修飾若しくは非修飾のヌクレオシド間結合により連結されたデオキシリボヌクレオシド及び／又は糖修飾ヌクレオ

シドから成る、[1]～[13]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩。

[15] [1]～[14]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩を含む、被験体の中枢神経系において標的転写産物の発現又は編集を調節するための組成物。

[16] 被験体の中枢神経系疾患治療用である、[15]に記載の組成物。

[17] 前記中枢神経系疾患が、免疫性中枢神経系疾患である、[16]に記載の組成物。

[18] [1]～[14]のいずれかに記載の核酸複合体、核酸鎖、又はその塩を含む、被験体の中枢神経系に薬剤を送達するための組成物。

[19] 前記中枢神経系が、大脳皮質、大脳基底核、大脳白質、間脳、脳幹、小脳、及び脊髄からなる群から選択される、[15]～[18]のいずれかに記載の組成物。

[20] 前記中枢神経系が、前頭葉、側頭葉、海馬、海馬傍回、頭頂葉、後頭葉、線条体、淡蒼球、前障、視床、視床下核、中脳、黒質、橋、延髄、小脳皮質、小脳核、頸髄、胸髄及び腰髄からなる群から選択される、[15]～[18]のいずれかに記載の組成物。

[21] 静脈内投与用又は皮下投与用である、[15]～[20]のいずれかに記載の組成物。

[22] 1回の投与量中に5mg/kg以上の前記核酸複合体、核酸鎖、又はその塩を含む、[15]～[21]のいずれかに記載の組成物。

[23] 前記核酸複合体、核酸鎖、又はその塩が血液脳関門(BBB)を通過する、[15]～[22]のいずれかに記載の組成物。

[24] 前記免疫性中枢神経疾患が、ミクログリア関連疾患である、[17]に記載の組成物。

[25] 前記ミクログリア関連疾患が、アルツハイマー病、多発性硬化症、ALS、または神経障害性疼痛である、[24]に記載の組成物。

[26] ミクログリアにおける標的転写産物の発現又は編集を調節するため

の、[15]～[25]のいずれかに記載の組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2018-055372号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0010] 本発明により、中枢神経系へ効率的に送達し、かつ送達場所でアンチセンス効果をもたらす核酸剤、及びそれを含む組成物を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、本発明で用いる核酸複合体の特定の実施形態の例を示す模式図である。この図では、第2核酸鎖におけるトコフェロール又はコレステロールの結合位置による4つの様式を示している。図1aは、第2核酸鎖の5'末端にトコフェロールが結合している核酸複合体を示す。図1bは、第2核酸鎖の5'末端にコレステロールが結合している核酸複合体を示す。図1cは、第2核酸鎖の3'末端にトコフェロールが結合している核酸複合体を示す。図1dは、第2核酸鎖の3'末端にコレステロールが結合している核酸複合体を示す。

[図2]図2は、アンチセンス法の一般的な機構の一例を示す図である。図中、「X」は遺伝子の発現から翻訳までの工程で抑制又は阻害する箇所を示す。破線内の図は、ヘテロ二本鎖部分がRNase Hによって認識され、標的遺伝子のmRNAが分解される模式図である。

[図3]図3は、様々な架橋核酸の構造を示す図である。

[図4]図4は、様々な天然ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチドの構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の第1態様は、核酸複合体、より好ましくは血液脳関門通過型核酸複合体である。この核酸複合体は、第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む。第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含むヌクレオチド鎖である。核酸複合体において、第1核酸鎖は、第2核酸鎖にアニールしている。一実施形態では、第2核酸鎖は、(1) トコフェロール若しくはその類縁体、(2) コレステロール若しくはその類縁体、又は(3) 置換された若しくは置換されていない

い $C_1\sim_{30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_2\sim_{30}$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_1\sim_{30}$ のアルコキシ基と結合している（本明細書では、上記（１）～（３）をまとめて、しばしば「トコフェロール若しくはコレステロール又はその類似体等」とも表記する）。

[0013] 前記核酸複合体の代表的な模式図を図1に示す。図1aは、第2核酸鎖の5'末端にトコフェロールが結合している核酸複合体を示す。図1bは、第2核酸鎖の5'末端にコレステロールが結合している核酸複合体を示す。図1cは、第2核酸鎖の3'末端にトコフェロールが結合している核酸複合体を示す。図1dは、第2核酸鎖の3'末端にコレステロールが結合している核酸複合体を示す。しかし、後述のように、トコフェロール若しくはコレステロール又はそれらの類縁体等は、第2核酸鎖の5'末端、3'末端又は両端に結合していてもよく、第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに結合していてもよい。

[0014] 一実施形態において、第1核酸鎖は、標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含むヌクレオチド鎖である。特定の実施形態において、第1核酸鎖は、標的遺伝子の転写産物又は標的転写産物に対してアンチセンス効果を有するヌクレオチド鎖である。

[0015] 一実施形態において、本発明は、（１）トコフェロール若しくはその類縁体、（２）コレステロール若しくはその類縁体、又は（３）置換された若しくは置換されていない $C_1\sim_{30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_2\sim_{30}$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_1\sim_{30}$ のアルコキシ基と結合している一本鎖核酸鎖に関する。該核酸鎖は、前記核酸複合体の第1核酸鎖に相当するもので、標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含むヌクレオチド鎖である。特定の実施形態において、該核酸鎖は、標的遺伝子の転写産物又は標的転写産物に対してアンチセンス効果を有するヌクレオチド鎖である。

[0016] （用語の定義）

本明細書において「標的転写産物」とは、本発明の核酸複合体の標的とな

り得、かつDNA依存性RNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAをいう。一般的には標的遺伝子の転写産物が該当する。具体的には、標的遺伝子から転写されるmRNA（成熟mRNA、mRNA前駆体、塩基修飾を受けていないmRNA等を含む）、miRNA等のノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)を含み得る。

[0017] 本明細書において「標的遺伝子」は特に限定されないが、例えば、本発明に係る核酸複合体を導入する生物由来の遺伝子、例えば、様々な疾患において、その発現が増加する遺伝子が挙げられる。また、標的転写産物には、標的遺伝子をコードするゲノムDNAから転写されるmRNAであり、さらにまた、塩基修飾を受けていないmRNA、プロセッシングされていないmRNA前駆体等を含む。「標的転写産物」は、mRNAだけでなく、miRNA等のノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)も含み得る。さらに一般的に「転写産物」は、DNA依存性RNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAであってよい。一実施形態では、「標的転写産物」は、例えば、スカベンジャー受容体B1(scavenger receptor B1：スカベンジャー受容体B1(scavenger receptor B1：本明細書ではしばしば「SR-B1 mRNA」と表記する)又は転移関連肺腺癌転写産物1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1：本明細書ではしばしば「Malat1」と表記する) ノンコーディングRNAであってもよい。配列番号3にマウスMalat1ノンコーディングRNAの塩基配列を、配列番号4にヒトMalat1ノンコーディングRNAの塩基配列を示す。また、配列番号5にマウスSR-B1 mRNAの塩基配列を、配列番号6にヒトSR-B1 mRNAの塩基配列を示す。そして、配列番号7にマウスDMPK mRNAの塩基配列を、配列番号8にヒトDMPK mRNAの塩基配列を示す。なお、配列番号1～8は、いずれもmRNAの塩基配列をDNAの塩基配列に置き換えている。これらの遺伝子及び転写産物の塩基配列情報は、例えばNCBI(米国国立生物工学情報センター)データベース等の公知のデータベースから入手できる。

[0018] 本明細書において「アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)」又は「アンチセンス核酸」とは、標的転写産物の少なくとも一部、例えば、任意の標的

領域にハイブリダイズ可能な相補的塩基配列を含み、アンチセンス効果によってその標的遺伝子の転写産物の発現又は標的転写産物のレベルを抑制制御し得る一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。本発明の核酸複合体では、第1核酸鎖がASOとして機能し、その標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、又は他のいずれの核酸領域を含んでいてもよい。標的転写産物の標的領域は、少なくとも8塩基長、例えば、10～35塩基長、12～25塩基長、13～20塩基長、14～19塩基長、又は15～18塩基長とすることができる。

[0019] 「アンチセンス効果」とは、ASOが標的転写産物（例えばRNAセンス鎖）にハイブリダイズすることによって、その標的転写産物にもたらされる発現又は編集を調節する効果をいう。「標的転写産物の発現又は編集を調節する」とは、標的遺伝子の発現又は標的転写産物の発現量（本明細書では、「標的転写産物の発現量」をしばしば「標的転写産物のレベル」と表記する）の抑制又は低下、翻訳の阻害、スプライシング機能改変効果（例えばエクソスキッピング等）、又は転写産物の分解をいう。例えば、図2で示すように、翻訳の阻害では、オリゴヌクレオチド（例、RNA）がASOとして細胞に導入されると、ASOは標的遺伝子の転写産物であるmRNA等に結合して部分的二本鎖が形成される。この部分的二本鎖はリボソームによる翻訳を妨げるためのカバーとしての役割を果たし、それによって標的遺伝子にコードされたタンパク質の発現が翻訳レベルで阻害される（図2破線外×印）。一方、DNAを含むオリゴヌクレオチドがASOとして細胞に導入されると、部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖構造がRNase Hによって認識される結果、標的遺伝子のmRNAが分解され、標的遺伝子にコードされたタンパク質の発現が発現レベルで阻害される（図2破線内）。これは、「RNase H依存性経路」と称される。さらに、特定の例において、アンチセンス効果は、mRNA前駆体のイントロンを標的化することによってもたらされ得る。アンチセンス効果はまた、miRNAを標的化することによってもたらされてもよく、この場合、当該miRNAの機能は阻害され、当該miRNAが通常発現を制御している遺伝子の発現

は増加し得る。一実施形態で、標的転写産物の発現調節は、標的転写産物量の低下であってもよい。

[0020] 本明細書中で使用される用語「核酸」又は「核酸分子」とは、モノマーであればヌクレオシド又はヌクレオチドを、オリゴマーであればオリゴヌクレオチドを、またポリマーであればポリヌクレオチド意味する。

[0021] 「ヌクレオシド」とは、一般に塩基及び糖の組み合わせからなる分子をいう。ヌクレオシドの糖部分は、限定はしないが、通常、ペントフラノシル糖で構成され、その具体例としてリボースやデオキシリボースが挙げられる。ヌクレオシドの塩基部分（核酸塩基）は、通常は、複素環式塩基部分である。限定はしないが、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシルや、それ以外の修飾核酸塩基（修飾塩基）が挙げられる。

[0022] 「ヌクレオチド」とは、前記ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。ペントフラノシル糖を含むヌクレオチドの場合、通常、糖の2'位、3'位、又は5'位のヒドロキシル基にリン酸基が連結されている。

[0023] 「オリゴヌクレオチド」とは、隣接するヌクレオチド間で糖部分のヒドロキシル基とリン酸基が共有結合によって数個～数十個連結することによって形成される直鎖状のオリゴマーをいう。また「ポリヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチドよりも多数のヌクレオチドが前記共有結合によって数十個以上、好ましくは数百個以上連結することによって形成される直鎖状のポリマーをいう。オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構造の内部で、リン酸基は、一般にヌクレオシド間結合を形成するとみなされる。

[0024] 本明細書中で使用される用語「核酸鎖」又は単なる「鎖」とは、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを意味する。核酸鎖は、例えば自動合成装置を使用した化学的合成法により、又はポリメラーゼ、リガーゼ、又は制限反応による酵素的工程により全長鎖又は部分鎖を作製することができる。核酸鎖は、天然ヌクレオチド及び／又は非天然ヌクレオチドを含み得る。

[0025] 本明細書において「天然ヌクレオシド」とは、自然界に存在するヌクレオシドをいう。例えば、リボースと前記アデニン、シトシン、グアニン、又は

ウラシル等の塩基からなるリボヌクレオシドや、デオキシリボースと前記アデニン、シトシン、グアニン、又はチミン等の塩基からなるデオキシリボヌクレオシドが挙げられる。なお、RNA中に見られるリボヌクレオシド、及びDNA中に見られるデオキシリボヌクレオシドを、それぞれ「DNAヌクレオシド」及び「RNAヌクレオシド」と称することもある。同様に、「天然ヌクレオチド」とは、自然界に存在するヌクレオチドで、前記天然ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。例えば、リボヌクレオシドにリン酸基が結合した、RNAの構成単位として知られるリボヌクレオチド、及びデオキシリボヌクレオシドにリン酸基が結合した、DNAの構成単位として知られるデオキシリボヌクレオチドが挙げられる。

[0026] 本明細書において「非天然ヌクレオシド」とは、天然ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドをいう。例えば、修飾ヌクレオシド及びヌクレオシド模倣体を含む。本明細書において「修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分及び／又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。非天然オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増加、又は阻害活性の増加等の望ましい特性により、天然型よりも好ましい。

[0027] 本明細書において「模倣体」とは、糖、核酸塩基、及び／又はヌクレオシド間結合を置換する官能基を指す。一般に、模倣体は、糖又は糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせの代わりに使用され、核酸塩基は、選択される標的に対するハイブリダイゼーションのために維持される。「ヌクレオシド模倣体」とは、オリゴマー化合物の一以上の位置において糖を置換するために、又は糖及び塩基を置換するために、又はオリゴマー化合物を構成するモノマーサブユニット間の結合等を置換するために使用される構造体を含む。「オリゴマー化合物」とは、核酸分子のある領域に少なくともハイブリダイズ可能な連結したモノマーサブユニットのポリマーを意味する。ヌクレオシド模倣体としては、例えば、モルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、二環式又は三環式糖模倣体、例えば、非フラノース

糖単位を有するヌクレオシド模倣体が挙げられる。

[0028] 本明細書において「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドをいう。二環式糖部分を含む核酸は、一般に架橋核酸(bridged nucleic acid、BNA)と称される。本明細書において、二環式糖部分を含むヌクレオシドは、「架橋ヌクレオシド」と称することもある。図3に架橋核酸を一部例示する。

[0029] 二環式糖は、2'位の炭素原子及び4'位の炭素原子が2つ以上の原子によって架橋されている糖であってよい。二環式糖の例は当業者に公知である。二環式糖を含む核酸(BNA)の1つのサブグループは、 $4'-(\text{CH}_2)_p\text{-O-}2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p\text{-CH}_2\text{-}2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p\text{-S-}2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p\text{-O-CH}_2\text{-}2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_n\text{-N(R}_3\text{)-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-}2'$ [式中、 p 、 m 及び n は、それぞれ1~4の整数、0~2の整数、及び1~3の整数を表し；また R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及びユニット置換基(蛍光若しくは化学発光標識分子、核酸切断活性を有する機能性基、細胞内又は核内局在化シグナルペプチド等)を表す]により架橋された2'位の炭素原子と4'位の炭素原子を有すると説明することができる。さらに、特定の実施形態によるBNAに関し、3'位の炭素原子上の OR_2 置換基及び5'位の炭素原子上の OR_1 置換基において、 R_1 及び R_2 は、典型的には水素原子であるが、互いに同一であっても異なってもよく、さらにまた、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基によって保護されているリン酸基、又は $\text{P(R}_4\text{)R}_5$ [ここで、 R_4 及び R_5 は、互いに同一であっても異なってもよく、それぞれヒドロキシル基、核酸合成のための保護基によって保護されているヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基によって保護されているメルカプト基、アミノ基、1~5個の炭素原子を有するアルコキシ基、1~5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、1~6個の炭素原子を有するシアノアルコキシ基、又は1~5個の炭素原子を有するアルキル基で置換されているアミノ基を表す]であってもよ

い。このようなBNAの非限定的な例としては、メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA(LNA(Locked Nucleic Acid(登録商標)、2',4'-BNAとしても知られている)、例えば、 α -L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA若しくは β -D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2')BNA(ENAとしても知られている)、 β -D-チオ(4'-CH₂-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R₃)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH₂-N(R₃)-O-2')BNA(2',4'-BNA^{nc}としても知られている)、2',4'-BNA^{cc}、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH₃)-O-2')BNA(cEt BNAとしても知られている)、(4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2')BNA(cMOE BNAとしても知られている)、アミドBNA(4'-C(O)-N(R)-2')BNA(R=H、Me)(AmNAとしても知られている)、2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸(sc_pBNAとしても知られている)及び当業者に公知の他のBNAが挙げられる。本明細書において、メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')架橋を有する二環式ヌクレオシドを「LNAヌクレオシド」と称することもある。

[0030] 本明細書において「非天然ヌクレオチド」とは、天然ヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドを指し、修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド模倣体を含む。本明細書において「修飾ヌクレオチド」とは、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、及び修飾核酸塩基のいずれか1つ以上を有するヌクレオチドを意味する。

[0031] 「ヌクレオチド模倣体」とは、オリゴマー化合物の一以上の位置において、ヌクレオシド及び結合を置換するために使用される構造体を含む。ヌクレオチド模倣体としては、例えば、ペプチド核酸又はモルホリノ核酸(-N(H)-C(=O)-O-又は他の非ホスホジエステル結合によって結合されるモルホリノ)が挙げられる。ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid、PNA)は、糖の代わりにN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合した主鎖を有するヌクレオチド模倣体である。モルホリノ核酸の構造の一例を図4に示す。本明細書において非天然オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増加、又は阻害活性の増加等の望ましい特性を有する。したがって、天然

ヌクレオチドよりも好ましい。

[0032] 本明細書において「修飾ヌクレオシド間結合」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステル結合）からの置換又は任意の変化を有するヌクレオシド間結合をいう。修飾ヌクレオシド間結合には、リン原子を含むリン含有ヌクレオシド間結合とリン原子を含まない非リン含有ヌクレオシド間結合が含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホトリエステル結合、アルキルホスホネート結合、アルキルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、及びホスホロアミデート結合等が挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロチオエート結合は、ホスホジエステル結合の非架橋酸素原子を硫黄原子に置換したヌクレオシド間結合である。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は周知である。修飾ヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性が天然に存在するヌクレオシド間結合よりも高い結合であることが好ましい。

[0033] 本明細書において「修飾核酸塩基」又は「修飾塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシル以外のあらゆる核酸塩基を意味する。修飾核酸塩基の例としては、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシン、N4-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、8-ブロモアデニン、N2-メチルグアニン、又は8-ブロモグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。「非修飾核酸塩基」又は「非修飾塩基」とは、天然核酸塩基と同義であり、プリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）を意味する。

[0034] 本明細書において「修飾糖」とは、天然糖部分（すなわち、DNA(2'-H)又はRNA(2'-OH)中に認められる糖部分）からの置換及び／又は任意の変化を有する糖を指す。本明細書において核酸鎖は、場合により修飾糖を含む1つ以上の修飾ヌクレオシドを含んでもよい。糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安

定性の強化、結合親和性の増加、又は他の何らかの有益な生物学的特性を核酸鎖に付与し得る。ヌクレオシドは、化学修飾リボフラノース環部分を含んでいてもよい。化学修飾リボフラノース環の例としては、限定するものではないが、置換基(5'及び2'置換基を含む)の付加、非ジェミナル環原子の架橋形成による二環式核酸(架橋核酸、BNA)の形成、リボシル環酸素原子のS、N(R)、又はC(R1)(R2)(R、R1及びR2は、それぞれ独立して、H、C₁-C₁₂アルキル、又は保護基を表す)での置換、及びそれらの組み合わせが挙げられる。本明細書において、修飾糖部分を有するヌクレオシドの例としては、限定するものではないが、5'-ビニル、5'-メチル(R又はS)、4'-S、2'-F(2'-フルオロ基)、2'-OCH₃(2'-OMe基若しくは2'-O-メチル基)、及び2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、-O-アリル、-O-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、-O(CH₂)₂SCH₃、-O(CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn)、及びO-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn)から選択することができ、各Rm及びRnは、独立して、H又は置換若しくは非置換C₁-C₁₀アルキルである。本明細書において「2'-修飾糖」は、2'位で修飾されたフラノシル糖を意味する。

[0035] 修飾糖の調製方法は、当業者に周知である。修飾糖部分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分(天然、修飾、又はそれらの組み合わせ)は、適切な核酸標的とのハイブリダイゼーションのために維持されてよい。

[0036] 一般的には、修飾は、同一鎖中のヌクレオチドが独立して異なる修飾を受けられるように実施することができる。また、酵素的切断に対する抵抗性を与えるため、同一のヌクレオチドが、修飾ヌクレオシド間結合(例えば、ホスホロチオエート結合)を有し、さらに、修飾糖(例えば、2'-O-メチル修飾糖又は二環式糖)を有することができる。同一のヌクレオチドはまた、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)を有し、さらに、修飾糖(例えば、2'-O-メチル修飾糖又は二環式糖)を有することができる。

[0037] 核酸鎖における非天然ヌクレオチドの数、種類及び位置は、本発明の核酸複合体によって提供されるアンチセンス効果等に影響を及ぼし得る。修飾の選択は、標的遺伝子等の配列によって異なり得るが、当業者であれば、アン

チセンス法に関連する文献(例えば、WO 2007/143315、WO 2008/043753、及び WO 2008/049085)の説明を参照することによって好適な実施形態を決定することができる。さらに、修飾後の核酸複合体が有するアンチセンス効果が測定される場合、このようにして得られた測定値が修飾前の核酸複合体の測定値と比較して有意に低くない場合(例えば、修飾後に得られた測定値が、修飾前の核酸複合体の測定値の70%以上、80%以上又は90%以上である場合)、関連修飾を評価することができる。

[0038] 本明細書中で使用される用語「相補的」とは、核酸塩基が水素結合を介して、いわゆるワトソン-クリック塩基対(天然型塩基対)又は非ワトソン-クリック塩基対(フーグスティーン型塩基対等)を形成し得る関係を意味する。本発明において、第1核酸鎖は、標的転写産物(例えば、標的遺伝子の転写産物)の少なくとも一部と完全に相補的であることは必ずしも必要ではなく、塩基配列が少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)の相補性を有していれば許容される。同様に、第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖の少なくとも一部と完全に相補的であることは必ずしも必要ではなく、塩基配列が少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)の相補性を有していれば許容される。

[0039] 本明細書中で使用される用語「血液脳関門(BBB)」は、前述のように、脳へ移行する物質を選択及び制限する機構であり、脳を有害物質から保護する役割を担っている。

[0040] 本明細書中で使用される用語「中枢神経系」とは、脳及び脊髄からなり、末梢神経系と共に神経系を構成する組織である。脳は、大脳(大脳皮質、大脳白質、大脳基底核)、間脳(視床、視床下核)、小脳(小脳皮質、小脳核)及び脳幹(中脳、黒質、橋、延髄)を含む。また、脊髄は、頸髄、胸髄、腰髄、仙髄及び尾髄を含む。本明細書における中枢神経系は、これらのいずれの領域であってもよいが、大脳皮質(前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉)、小脳、線条

体、淡蒼球、前障、海馬、海馬傍回、脳幹、頸髄、胸髄又は腰髄が好ましい。

[0041] 本明細書において、「その塩」とは、本発明の核酸複合体の塩であって、本発明の核酸複合体の生理学的におよび製薬上許容される塩、すなわち、当該核酸複合体の所望される生物学的な活性を保持し、そこで望まれない毒物学的効果を与えない塩のことをいう。そのような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩；*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、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*-ベンジルー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、ジオラミン塩、メグルミン塩のようなアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；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のような低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩；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、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、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、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩が挙げられる。

[0042] 特定の実施形態において、本発明の核酸複合体は、核酸複合体の任意の薬学的に許容される塩、核酸複合体のエステル、または当該エステルの塩を包含する。好適な薬学的に許容される塩には、ナトリウム塩、カリウム塩及びメグルミン塩が挙げられるが、これらに限定されない。

[0043] (第1核酸鎖と第2核酸鎖の構成)

一態様において、本発明は、第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む核酸複合体に関する。

[0044] 第1核酸鎖は、標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、標的転写産物に対してアンチセンス効果をもたらす一本鎖オリゴヌクレオチド鎖である。

[0045] 第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチド鎖である。第2核酸鎖は、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等と結合している。核酸複合体において、第2核酸鎖は、相補的塩基対の水素結合を介して第1核酸鎖にアニールしている。

[0046] 一実施形態において、本発明は、(1) トコフェロール若しくはその類縁体、(2) コレステロール若しくはその類縁体、又は(3) 置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルコキシ基と結合している一本鎖核酸鎖に関する。該一本鎖核酸の構成は、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類似体等と連結している以外は、第1核酸鎖と同一である。また、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類似体等の構成、及びその核酸鎖との連結の形態は、本明細書において核酸複合体において記載する通りである。

[0047] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基長は、通常、少なくとも8塩基長、少なくとも9塩基長、少なくとも10塩基長、少なくとも11塩基長、少なくとも12塩基長、少なくとも13塩基長、少なくとも14塩基長、又は少なくとも15塩基長であればよいが、特に限定されない。また、第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基長は、35塩基長以下、30塩基長以下、25塩基長以下、24塩基長以下、23塩基長以下、22塩基長以下、21塩基長以下、20塩基長以下、19塩基長以下、18塩基長以下、17塩基長以下、又は16塩基長以下であればよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖は、約100塩基長であってもよいし、又は、10～35塩基長、12～25塩基長、13～20塩基長、14～19塩基長、若しくは15～18塩基長であってもよい。第1

核酸鎖及び第2核酸鎖は、同じ長さであっても、異なる長さ（例えば、いずれか一方が1～3塩基短い又は長い長さ）であってもよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖が形成する二本鎖構造は、バルジを含んでいてもよい。長さの選択は、例えば費用、合成収率などの他の因子の中でも特に、アンチセンス効果の強度と標的に対する核酸鎖の特異性とのバランスによって決定することができる。

[0048] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖におけるヌクレオシド間結合は、天然に存在するヌクレオシド間結合及び／又は修飾ヌクレオシド間結合であってよい。限定はしないが、第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖の末端（5'末端、3'末端若しくは両端）から少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合であることが好ましい。ここで、例えば核酸鎖の末端から2つのヌクレオシド間結合とは、核酸鎖の末端に最も近接するヌクレオシド間結合と、それに隣接し、かつ末端とは反対側に位置するヌクレオシド間結合を意味する。核酸鎖の末端領域における修飾ヌクレオシド間結合は、核酸鎖の望ましくない分解を抑制又は阻害できるように好ましい。一実施形態で、第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖の全てのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であってよい。

[0049] 第2核酸鎖の3'末端から少なくとも1個（例えば3個）のヌクレオシド間結合は、RNase耐性の高いホスホロチオエート結合のような修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。第2核酸鎖の3'末端にホスホロチオエート修飾等の修飾ヌクレオシド間結合を含む場合、二本鎖核酸複合体の遺伝子抑制活性が向上するので好ましい。

[0050] 第2核酸鎖の5'末端及び3'末端において、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等と未結合の末端の2～6個の塩基のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合（例えばホスホロチオエート結合）であってもよい。

[0051] 第2核酸鎖の3'末端から少なくとも1個（例えば3個）のヌクレオシドは、例

例えば、RNase耐性の高い2' F-RNA、2' -OMe等の修飾ヌクレオシドであってもよい。第2核酸鎖の3' 末端に2' F-RNA、2' -OMe等の修飾ヌクレオシドを含む場合、二本鎖核酸複合体の遺伝子抑制活性が高まるために好ましい。

[0052] 第2核酸鎖の5' 末端及び3' 末端において、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等と未結合の末端の1〜5個のヌクレオシドは、例えば、RNase耐性の高い2' F-RNA等の修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0053] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖におけるヌクレオシドは、天然ヌクレオシド(デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、若しくは両者)及び／又は非天然ヌクレオシドであってよい。

[0054] 本明細書では、第1核酸鎖の塩基配列が標的転写産物の少なくとも一部の塩基配列に相補的であることから標的転写産物にハイブリダイズ(又はアニール)することができる。塩基配列の相補性は、BLASTプログラム等を使用することによって決定することができる。当業者であれば、鎖間の相補度を考慮して、2本の鎖がハイブリダイズし得る条件(温度、塩濃度等)を容易に決定することができる。さらに、当業者であれば、例えば標的遺伝子の塩基配列の情報に基づいて、標的転写産物に相補的なアンチセンス核酸を容易に設計することもできる。

[0055] ハイブリダイゼーション条件は、例えば、低ストリンジェントな条件及び高ストリンジェントな条件等の様々なストリンジェントな条件であってもよい。低ストリンジェントな条件は、比較的低温で、かつ高塩濃度の条件、例えば、30℃、2×SSC、0.1%SDSであってよい。高ストリンジェントな条件は、比較的高温で、かつ低塩濃度の条件、例えば、65℃、0.1×SSC、0.1%SDSであってよい。温度及び塩濃度等の条件を変えることによって、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを調整できる。ここで、1×SSCは、150mM塩化ナトリウム及び15mMクエン酸ナトリウムを含む。

[0056] 第1核酸鎖は、標的転写産物にハイブリダイズしている場合に、RNase Hによって認識される少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、又は少なくとも7個の連続するヌクレオシドを含むことができる。通常、4〜20塩基、5

～16塩基、又は6～12塩基の連続するヌクレオシドを含む領域であればよい。RNase Hによって認識されるヌクレオシドとして、例えば天然型デオキシリボヌクレオシドを用いることができる。修飾されたデオキシリボヌクレオシド、及び他の塩基を含む好適なヌクレオシドは、当該分野において周知である。また、リボヌクレオシド等の、2'位にヒドロキシ基を有するヌクレオシドが、前記ヌクレオシドとして不適当であることも知られている。「少なくとも4個の連続するヌクレオシド」を含むこの領域への利用に関し、ヌクレオシドの適合性を容易に決定することができる。一実施形態で、第1核酸鎖は、少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み得る。

[0057] 一実施形態では、第1核酸鎖の全長は、天然リボヌクレオシドのみで構成されてはいない。第1核酸鎖の天然リボヌクレオシドは、全長の半数以下であるか、又は含まないことが好ましい。

[0058] 一実施形態では、第2核酸鎖は、第1核酸鎖中の上記の少なくとも4個の連続するヌクレオシド(例えばデオキシリボヌクレオシド)に相補的な、少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドを含んでいてもよい。第2核酸鎖が、第1核酸鎖と部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖を形成し、RNaseHによって認識され切断されるようにするためである。第2核酸鎖中の少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドは、好ましくは、天然に存在するヌクレオシド間結合、すなわちホスホジエステル結合によって連結される。

[0059] 第2核酸鎖は、全てのヌクレオシドがリボヌクレオシド及び／又は修飾ヌクレオシドから構成されていてもよい。第2核酸鎖の全てのヌクレオシドが、デオキシリボヌクレオシド及び／又は修飾ヌクレオシドから構成されていてもよく、リボヌクレオシドを含まなくてもよい。

[0060] 本発明の核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖は、ギャップマー (gapmer)であってもよい。本明細書において「ギャップマー」とは、中央領域 (DNAギャップ領域) と、その5'末端及び3'末端の両側に配置された5'ウイング領域及び3'ウイング領域からなる一本鎖核酸をいう。ギャップマーにおける前記中央領域は少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシ

ドを含み、前記5' ウイング領域及び3' ウイング領域は非天然ヌクレオシドを含む。5' ウイング領域及び3' ウイング領域を構成する非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドを含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「BNA/DNAギャップマー」と称する。5' ウイング領域及び3' ウイング領域を構成する非天然ヌクレオシドがペプチド核酸を含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「ペプチド核酸ギャップマー」と称する。5' ウイング領域及び3' ウイング領域を構成する非天然ヌクレオシドがペプチド核酸を含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「モルホリノ核酸ギャップマー」と称する。5' ウイング領域及び3' ウイング領域に含まれる架橋ヌクレオシドの数は、2又は3個であってもよい。5' ウイング領域及び3' ウイング領域に含まれる架橋ヌクレオシドは、5' ウイング領域及び3' ウイング領域内に連続又は非連続に存在していてもよい。架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)をさらに含むことができる。架橋ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである場合、前記ギャップマーを「LNA/DNAギャップマー」と称する。5' ウイング領域及び3' ウイング領域の塩基長は、それぞれ独立して、少なくとも2塩基長、例えば、2~10塩基長、2~7塩基長、又は3~5塩基長であればよい。5' ウイング領域及び3' ウイング領域は、非天然ヌクレオシドを少なくとも1種含んでいればよく、天然ヌクレオシドをさらに含んでいてもよい。

[0061] 前記ギャップマーを構成する第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖は、5' 末端から順に、2~7塩基長若しくは3~5塩基長の架橋ヌクレオシド、4~15塩基長若しくは8~12塩基長のリボヌクレオシド又はデオキシリボヌクレオシド、及び2~7塩基長若しくは3~5塩基長の架橋ヌクレオシドから構成されていてもよい。

[0062] 本発明の核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖は、ミックスマー (mixmer) であってもよい。本明細書において「ミックスマー」とは、周期的又は無作為セグメント長の交互型の天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドを含み、かつ4個以上の連続するデオキシリボヌクレオシド及びリ

ボヌクレオシドを含まない核酸鎖をいう。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドであり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「BNA/DNAミックスマー」と称する。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドがペプチド核酸であり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「ペプチド核酸/DNAミックスマー」と称する。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドがモルホリノ核酸であり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「モルホリノ核酸/DNAミックスマー」と称する。ミックスマーは、2種のヌクレオシドのみを含むようには制限されない。ミックスマーは、天然若しくは修飾のヌクレオシド又はヌクレオシド模倣体であるか否かに関わらず、任意の数の種類のヌクレオシドを含むことができる。例えば、架橋ヌクレオシド(例えば、LNAヌクレオシド)により分離された1又は2個の連続するデオキシリボヌクレオシドを有してもよい。架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)をさらに含んでもよい。

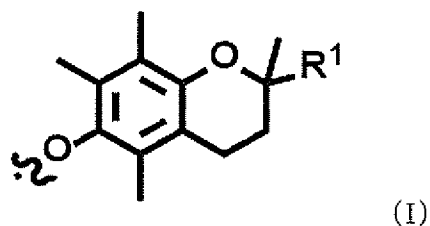
[0063] 第2核酸鎖の末端(5'末端、3'末端、又は両末端)から少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、又は少なくとも4個のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドであってもよい。修飾ヌクレオシドは、修飾糖及び/又は修飾核酸塩基を含んでいてもよい。修飾糖は、2'-修飾糖(例えば、2'-O-メチル基を含む糖)であってもよい。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンとすることもできる。

[0064] 第2核酸鎖は、5'末端から順に、2~7塩基長若しくは3~5塩基長の修飾ヌクレオシド(例えば、2'-修飾糖を含む修飾ヌクレオシド)、4~15塩基長若しくは8~12塩基長の(場合により、修飾ヌクレオシド間結合で連結された)リボヌクレオシド又はデオキシリボヌクレオシド、及び2~7塩基長若しくは3~5塩基長の修飾ヌクレオシド(例えば、2'-修飾糖を含む修飾ヌクレオシド)から構成されていてもよい。この場合、第1核酸鎖は、ギャップマーであってもよい。

- [0065] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖は、全部又は一部にヌクレオシド模倣体又はヌクレオチド模倣体を含んでもよい。ヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸及び／又はモルホリノ核酸であってもよい。第1核酸鎖は、修飾ヌクレオシドを少なくとも1つ含んでもいてもよい。修飾ヌクレオシドは、2'-修飾糖を含んでもよい。この2'-修飾糖は、2'-O-メチル基を含む糖であってもよい。
- [0066] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖は、上記の修飾ヌクレオシド間結合及び修飾ヌクレオシドの任意の組み合わせを含んでもよい。
- [0067] 第2核酸鎖は、(1) トコフェロール若しくはその類縁体、(2) コレステロール若しくはその類縁体、又は(3) 置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim_{30}$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルコキシ基と結合している。トコフェロール若しくはコレステロール又はその類似体等は、当業者であれば自体公知の方法により、製造することができる。
- [0068] 本明細書において「類縁体(analog)」とは、同一又は類似の基本骨格を有する類似した構造及び性質を有する化合物を指す。類縁体は、例えば、生成中間体、代謝産物等を含む。ある化合物が別の化合物の類縁体であるかどうかは、当業者であれば判定できる。
- [0069] トコフェロールは、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、及び δ -トコフェロールからなる群から選択され得る。トコフェロールの類縁体としては、トコフェロールの種々の不飽和類縁体、例えば、 α -トコトリエノール、 β -トコトリエノール、 γ -トコトリエノール、 δ -トコトリエノールなどが挙げられる。好ましくは、トコフェロールは、 α -トコフェロールである。
- [0070] コレステロールの類縁体は、ステロール骨格を有するアルコールである、種々のコレステロール代謝産物及び類縁体などを指し、限定されるものではないが、コレスタノール、ラノステロール、セブレロステロール、デヒドロコレステロール、及びコプロスタノールなどを含む。
- [0071] トコフェロール又はその類縁体と結合した第2核酸鎖は、以下の一般式(I)

で示される基を有してもよい。

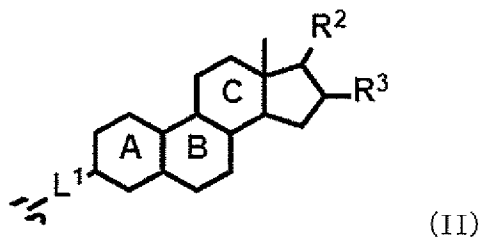
[0072] [化15]



[式中、R¹は、置換された若しくは置換されていないC₁～₃₀のアルキル基（例、メチル、4,8,12-トリメチルトリデシル）又は置換された若しくは置換されていないC₂～₃₀アルケニル基（例、4,8,12-トリメチル-3,7,11-トリデカトリエン-1-イル）を表す（ここで、該置換は、好ましくはハロゲン原子によりなされる）。]

[0073] コレステロール又はその類縁体と結合した第2核酸鎖は、以下の一般式(II)、(V)、(VI)、及び(VII)から成る群から選択される基を有してもよい：

[化16]

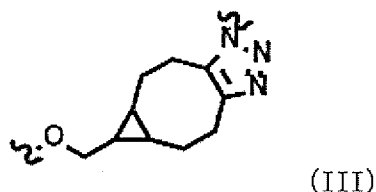


(式中、
環Aは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないベンゼンを表し、環Bは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサジエンを表し、環Cは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサンを表し、R²は、水素原子、置換された若しくは置換されていないC₁～₃₀のアルキル基（例、エチル、イソプロピル、1-メチルプロピル、1,5-ジメチルヘキシル、4-エチル-1,5-

ジメチルヘキシル)、置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基(例、1,5-ジメチル-4-ヘキセン-1-イル、1,4,5-トリメチル-2-ヘキセン-1-イル、4-エチル-1,5-ジメチル-2-ヘキセン-1-イル)、置換された若しくは置換されていない $C_1\sim 6$ アルキル-カルボニル基(例、1-オキソエチル)、置換された若しくは置換されていない $C_1\sim 6$ アルキル-カルボニル-オキシ基(例、(1-オキソヘプチル)オキシ)、又はオキソ基を表し、 R^3 は、水素原子を表し、 R^2 及び R^3 は、一緒になって、置換された若しくは置換されていない1,6-ジオキサスピロ[4.5]デカン環を形成してもよい)。

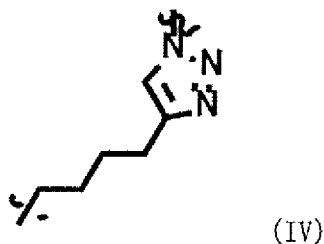
[0074] 式中、 L^1 は、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、

[化17]



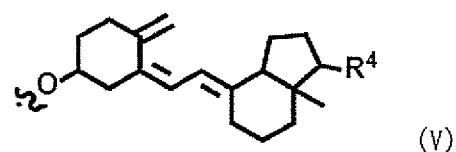
、又は

[化18]



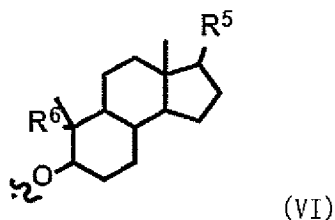
を表す)、

[化19]



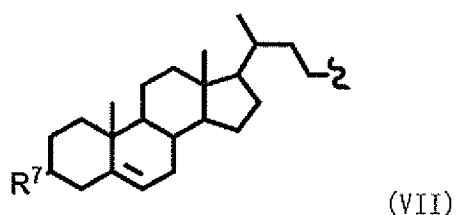
(式中、 R^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_1\sim 30$ のアルキル基(例、1,5-ジメチルヘキシル)、又は置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基を表す)、

[化20]



(式中、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルキル基(例、ブチル、1,5-ジメチルヘキシル)、又は置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim_{30}$ のアルケニル基を表す)、並びに

[化21]



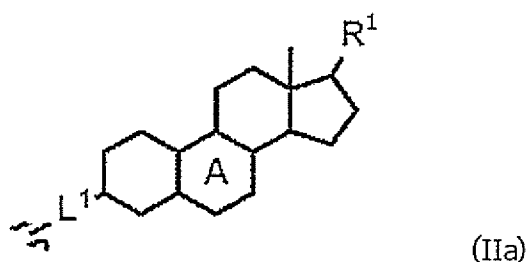
(式中、 R^7 は、ヒドロキシ基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ アルキル-カルボニル-オキシ基(例、(1-オキソドデシル)オキシ)、又は置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ アルケニル-カルボニル-オキシ基(例、(1-オキソ-9-オクタデケニル)オキシ)を表す)。上記(II)、(V)、(VI)、及び(VII)から成る群から選択される基において、置換はいずれも、好ましくはハロゲン原子(例、フッ素原子)、 $C_1 \sim_3$ アルキル基(例、メチル)、ヒドロキシ基、 $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル基(例、1-オキソ-2-メチルプロピル)、1~3個のハロゲン原子で置換された1~5個の $C_1 \sim_3$ アルキル基で置換されたフェニル基でモノまたはジ置換されたカルバモイル基(例、[3,5-ビス(トリフルオロメチル)ベンゾイル]アミノ)、又は $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル基(例、2-メチル-1-オキソプロピル)、によりなされる。

[0075] 一実施形態において、第2核酸鎖は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルキル基(例、ヘプタデシル、16-メチルヘプタデシル、ヘニコシル)、置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim_{30}$ のアルケニル基(例、2,6-ジメチル-1,3,5,7-オクタテトラエン-1-イル、8-ヘプタデケン-1-イル、

8,11-ヘプタデカジエン-1-イル、8,11,14-ヘプタデカトリエン-1-イル）、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルコキシ基（例、ヘニコソキシ）、と結合している（ここで、該置換は、好ましくはハロゲン原子、又は1～5個の $C_1 \sim_3$ アルキル基で置換されたシクロヘキセニル基（例、2,6,6-トリメチル-1-シクロヘキセン-1-イル）によりなされる。）。）。

[0076] 一実施形態において、トコフェロール又はその類縁体と結合した第2核酸鎖は、以下の式（IIa）で表される基を有してもよい。：

[化22]



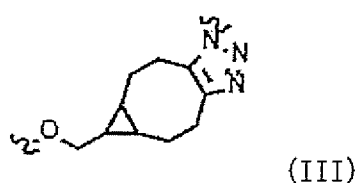
（式中、

環Aは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサジエンを表し、

R^1 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルキル基（例えば、 $C_2 \sim_{20}$ 、 $C_4 \sim_{16}$ 、 $C_6 \sim_{12}$ 又は $C_8 \sim_{10}$ のアルキル基）、置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim_{30}$ のアルケニル基（例えば、 $C_2 \sim_{20}$ 、 $C_4 \sim_{16}$ 、 $C_6 \sim_{12}$ 又は $C_8 \sim_{10}$ のアルケニル基））、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル-オキシ基、又はオキシ基を表し、

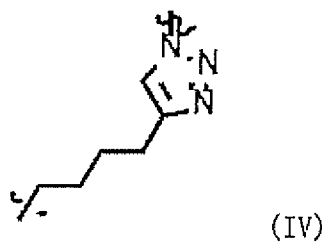
L^1 は、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、

[化23]



、又は

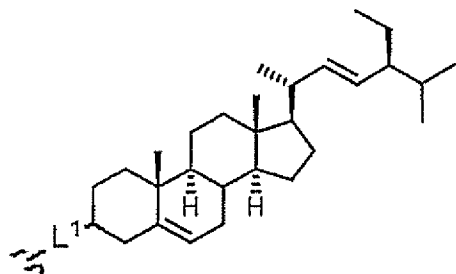
[化24]



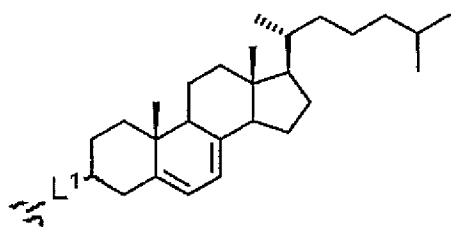
を表す)

[0077] 一実施形態において、トコフェロール又はその類縁体と結合した第2核酸鎖は、以下の式 (IIa-1)、(IIa-2)、(IIa-3)、及び (IIa-4) で表される基を有してもよい。

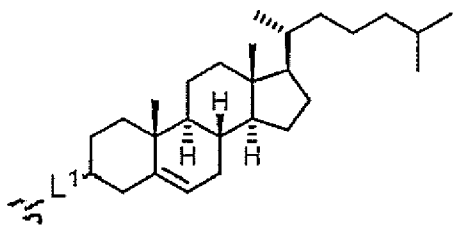
[化25]



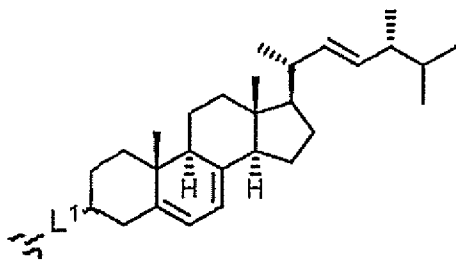
(IIa-1)



(IIa-2)



(IIa-3)

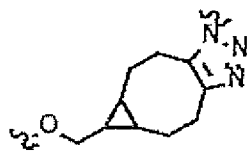


(IIa-4)

(式中、

L^1 は、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、

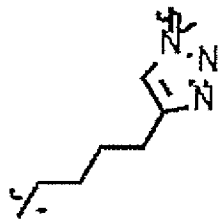
[化26]



(III)

、又は

[化27]



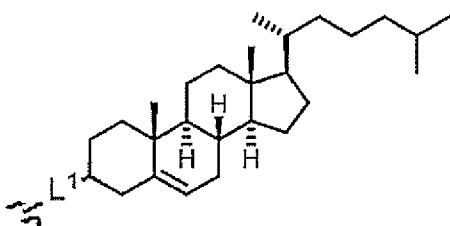
(IV)

を表す)、

から成る群より選択される。

[0078] 一実施形態において、トコフェロール又はその類縁体と結合した第2核酸鎖は、以下の一般式(IIa-3)で示される基を有さない。

[化28]



(IIa-3)

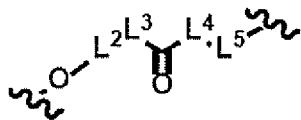
- [0079] トコフェロール若しくはコレステロール又はそれらの類縁体等は、第2核酸鎖の5'末端、又は3'末端、あるいは両端に連結されていてもよい。あるいは、トコフェロール若しくはコレステロール又はそれらの類縁体等は、第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに連結されていてもよい。例えば、コレステロールは、第2核酸鎖の5'末端に結合されうる。他の実施形態において、第2核酸鎖は、トコフェロール若しくはコレステロール又はそれらの類縁体等を2つ以上含み、これらは第2核酸鎖の複数の位置に連結されていてもよく、及び/又は第2核酸鎖の1つの位置に一群として連結されていてもよい。トコフェロール若しくはコレステロール又はそれらの類縁体等は、第2核酸鎖の5'末端と3'末端にそれぞれ1つずつ連結されていてもよい。コレステロール又はその類縁体が、第2核酸鎖の5'末端と3'末端にそれぞれ1つずつ連結されていてもよい。
- [0080] 第2核酸鎖とトコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等との結合は、直接結合及び間接結合を問わない。直接結合とは2つの分子が直接的に結合することをいう。間接結合とは、結合すべき2つの分子が別の物質を介在して結合することをいう。
- [0081] 一実施形態において、第2核酸鎖とトコフェロール若しくはコレステロール及び/又はその類縁体等との結合は、第2核酸鎖の5'末端、3'末端、又は第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合していてもよい。
- [0082] 一実施形態では、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合している。
- [0083] 一実施形態では、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合を介して結合している。
- [0084] 第2核酸鎖とトコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等が間接結合をする場合、連結基（本明細書では、しばしば「リンカー」と表記する）を介して結合していてもよい。リンカーは、第2核酸鎖の5'末端、3'末端、又は第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合していてもよい。

[0085] 一実施形態では、リンカーは、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合している。

[0086] 一実施形態では、リンカーは、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合を介して結合している。

[0087] 前記リンカーの一具体例として、以下の一般式 (VIII) で表されるリンカーが挙げられる：

[化29]



(VIII)

(式中、

L^2 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 12$ のアルキレン基（例、プロピレン、ヘキシレン、ドデシレン）、置換された若しくは置換されていない $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン基（例、シクロヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ を表し、 L^3 は、 $-NH-$ 又は結合を表し、 L^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 12$ のアルキレン基（例、エチレン、ペンチレン、ヘプチレン、アンデシレン）、置換された若しくは置換されていない $C_3 \sim 8$ のシクロアルキレン基（例、シクロヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_2]_m-$ 、又は結合を表し、ここで、 m は1～25の整数を表し、 L^5 は、 $-NH-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、又は結合を表す（ここで、該置換は、好ましくはハロゲン原子によりなされる）。

[0088] 第2核酸鎖とトコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等が間接結合をする場合、両者は切断可能なリンカーを介して結合していてもよい。「切断可能なリンカー」とは、生理学的条件下、例えば細胞内又は動物体内（例えば、ヒト体内）で切断され得る連結基をいう。切断可能なリンカーは、ヌクレアーゼ、ペプチダーゼ等の内在性酵素、酸性条件、還元的環境下

等によって選択的に切断されてもよい。そのような具体例として、例えば、アミド結合、エステル結合、リン酸エステル結合、ホスホジエステル結合の一方若しくは両方のエステル結合、カルバメート結合、及びジスルフィド結合、並びに天然DNAリンカー等のヌクレオチドリンカーが挙げられる。

[0089] 反対に、第2核酸鎖とトコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等が間接結合をする場合、両者は非切断性 (uncleavable) リンカーを介して結合していてもよい。「非切断性リンカー」は、生理学的条件下では切断されない連結基をいう。そのような非切断性リンカーとして、例えば、ホスホロチオエート結合、及びホスホロチオエート結合で連結された修飾又は非修飾のデオキシリボヌクレオシド、又は修飾又は非修飾のリボヌクレオシドからなるリンカー等が挙げられる。

[0090] 切断可能なリンカー又は非切断性リンカーの鎖長は、DNA等の核酸又はオリゴヌクレオチドの場合、特に限定はされないが、通常は1～20塩基長、1～10塩基長又は1～6塩基長でよい。

[0091] 特定の実施形態において、本発明の核酸複合体が、光学異性体、立体異性体、位置異性体、回轉異性体を含有する場合には、これらも本発明の核酸複合体として含有されるとともに、自体公知の合成手法、分離手法によりそれぞれを単品として得ることができる。例えば、本発明の核酸複合体に光学異性体が存在する場合には、該化合物から分割された光学異性体も本発明の核酸複合体に包含される。

[0092] 特定の実施形態において、本発明の核酸複合体は、プロドラッグ及び当該プロドラッグの薬学的に許容される塩を含む。本発明の核酸複合体のプロドラッグ及び当該プロドラッグの薬学的に許容される塩は、生体内における生理条件下で酵素、胃酸等による反応により本発明の核酸複合体に変換する化合物、すなわち酵素的に酸化、還元、加水分解等を起こして本発明の核酸複合体に変化する化合物、胃酸等により加水分解等を起こして本発明の核酸複合体に変化する化合物をいう。特定の実施形態において、核酸複合体のプロドラッグは、第1核酸鎖または第2核酸鎖に結合された、トコフェロール若し

くはコレステロール又はその類似体等を1つ以上含む。

[0093] 本発明の核酸複合体において、第1核酸鎖が有する標的転写産物に対するアンチセンス効果は、当該分野で公知の方法で測定できる。例えば、核酸複合体を細胞等に導入した後、ノーザンブロットング、定量PCR、又はウェスタンブロットング等の公知技術を使用することにより測定できる。具体的には、細胞内の標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベル(例えば、mRNA量若しくはマイクロRNA等のRNA量、cDNA量、タンパク質量等)がアンチセンス効果によって低下することを前述の公知技術を用いて検証すればよい。

[0094] 本発明の核酸複合体の中枢神経系におけるアンチセンス効果の測定、及び血液脳関門の通過の判定も当該分野で公知の方法で測定できる。限定はしないが、例えば、本発明の核酸複合体を被験体(例えばマウス)に投与し、数日後～数ヶ月後(例えば2～7日後又は1ヶ月後)に中枢神経系における標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベルが抑制されるか否かを測定することで前記判定が可能となる。前記判定の基準は、標的遺伝子の発現量又は標的転写産物の測定値が、陰性対照(例えばビヒクル投与)の測定値と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、又は少なくとも40%減少している場合に、本発明の核酸複合体が血液脳関門を通過し、中枢神経系にアンチセンス効果をもたらしたと判定できる。また、血液脳関門の通過の判定は、本発明の核酸複合体を被験体(例えばマウス)に投与し、数日後～数ヶ月後(例えば2～7日後又は1ヶ月後)に、中枢神経系における本発明の核酸複合体の存在量(濃度)を測定することによって判定することができる。

[0095] 上記のように、本発明の核酸複合体の例示的实施形態について説明したが、本発明の核酸複合体は上記の例示的实施形態に限定されない。さらに、当業者であれば、公知の方法を適切に選択することによって、本発明の様々な実施形態による核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖を製造することができる。例えば、本発明の核酸分子は、標的転写産物の塩基配列(例えば、標的遺伝子の塩基配列)情報に基づいて各核酸分子を設計し、例えば、G

E Healthcare社、Thermo Fisher Scientific社、Beckman Coulter社等の市販の自動核酸合成装置を使用して核酸を合成し、その後、得られたオリゴヌクレオチドに逆相カラム等を使用して精製することにより製造することができる。

- [0096] 第2核酸鎖は、ポリヌクレオチドに結合された少なくとも1つの機能性部分をさらに含んでもよい。機能性部分が、核酸複合体及び／又は機能性部分が結合している鎖に所望の機能を与える限り、特定の実施形態による「機能性部分」の構造について特定の限定はない。所望の機能としては、標識機能及び精製機能が挙げられる。標識機能を与える部分の例としては、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ等の化合物が挙げられる。精製機能を与える部分の例としては、ビオチン、アビジン、Hisタグペプチド、GSTタグペプチド、FLAGタグペプチド等の化合物が挙げられる。機能性部分の第2核酸鎖における結合位置及び結合の種類は、トコフェロール若しくはコレステロール又はそれらの類縁体等と第2核酸鎖との結合について上に記載されるとおりである。
- [0097] 一実施形態では、機能性部分が結合している核酸複合体は、機能性部分が予め結合した核酸種を用いて、上記の合成、精製及びアニーリングを実施することによって製造することができる。例えば、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等が予め結合された核酸種を用いて、上記の合成及び精製を実施することによって第2核酸鎖を製造することができる。
- [0098] 一実施形態では、上記の合成及び精製を実施することによって製造された第2核酸鎖に、自体公知の方法によりトコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等を結合させることができる。機能性部分を核酸に連結するための方法は当該技術分野において周知である。この方法で製造した核酸を適切な緩衝溶液中で混合し、約90℃～98℃で数分間（例えば5分間）変性させ、その後核酸を約30℃～70℃で約1～8時間アニールして、本発明の核酸複合体の一つを製造することができる。また、核酸鎖は、塩基配列並びに修飾部位及び種類を指定して、各種メーカー（例えば、株式会社ジーンデザイン）に注文し、入手することもできる。上記アニール工程は、室温（約10℃～約35℃

）に約5～60分間静置することで、行うことができる。

[0099] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖をそれぞれ、約70℃～98℃の緩衝液（例えばリン酸緩衝生理食塩水）又は水中で溶解し、得られた2つの溶液を混合し、混合液を約70℃～98℃で数分間（例えば5分間）保持し、その後、混合液を約30℃～70℃（又は30℃～50℃）で約1～8時間保持して、本発明の一部の実施形態の核酸複合体を調製してもよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖はそれぞれ、室温（約10℃～約35℃）で緩衝液（例えばリン酸緩衝生理食塩水）又は水中で溶解することもできる。

[0100] ただし、核酸複合体の作製時におけるアニーリングの条件（時間及び温度）は、上記条件に限定されない。また、核酸鎖のアニーリングを促進するのに適した条件は、当該技術分野において周知である。

[0101] （核酸複合体の効果）

本発明の核酸複合体は、被験体の中枢神経系において標的miRNAの効果を阻害することができる。例えば、具体的には、第1核酸鎖は、標的miRNAの少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、その標的miRNAに対してアンチセンス効果を有し、第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等と結合しており、第1核酸鎖と第2核酸鎖に互いにアニールしている核酸複合体が挙げられる。この核酸複合体によって標的miRNAの効果を阻害することにより、当該標的miRNAが通常ダウンレギュレートしている遺伝子の発現をアップレギュレートすることができる。

[0102] 本発明の核酸複合体は、被験体の中枢神経系において標的RNAの発現又は編集を調節することができる。例えば、具体的には、第1核酸鎖は、標的RNAの少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、標的RNAに対してアンチセンス効果を有し、第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等と結合しており、第1核酸鎖と第2核酸鎖は互いにアニールしている核酸複合体が挙げられる。ここで、「標的RNAの発現調節」とは、例えば

、発現量の上方制御及び下方制御を含む。また「標的RNAの編集調節」とは、RNA編集によるスプライシングの調節、例えば、エクソンスキッピングやエクソンインクルージョンを含む。標的RNAは、ウイルス若しくは細菌のRNA、又は毒性のRNA(Toxic RNA)であってもよい。

[0103] 本発明の核酸複合体は、被験体の中枢神経系において標的mRNAの翻訳を阻害することができる。例えば、具体的には、第1核酸鎖は、標的mRNAの少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、標的mRNAに対してアンチセンス効果を有し、第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等と結合しており、第1核酸鎖と第2核酸鎖が互いにアニールしている核酸複合体が挙げられる。この核酸複合体によって第1核酸鎖が標的mRNAに結合することにより、ステリックブロックが生じ、mRNAの翻訳が阻害される。

[0104] なお、本発明の核酸複合体は、それに限定されるものではないが、中枢神経系のミクログリア（小膠細胞）における標的転写産物の発現又は編集の調節において有効に使用することができる。

[0105] <組成物>

本発明の第2態様は組成物である。本発明の組成物は、前記第1態様の核酸複合体又は一本鎖核酸鎖を有効成分として、及び／又は薬剤送達分子として包含する。前記第1態様の核酸複合体又は一本鎖核酸鎖は、BBBを通過し、中枢神経系にて標的転写産物の発現量をアンチセンス効果によって調節する(例えば、発現量を減少させる)ことができる。したがって、本発明の組成物は、被験体に投与することで、核酸複合体を送達し、被験体を治療する組成物であってもよく、また医薬組成物であってもよい。なお、本発明の組成物は、それに限定されるものではないが、中枢神経系のミクログリア（小膠細胞）における標的転写産物の発現又は編集の調節において有効に使用することができる。

[0106] また、本発明の一実施形態では、核酸複合体を含む組成物を投与することで各中枢神経系疾患を治療する治療方法に関する。

[0107] (製剤化)

本明細書において、組成物は自体公知の方法により製剤化することができる。例えば、本組成物は、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、微粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、解膠剤(peptizer)、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、コーティング剤、軟膏、硬膏剤(plaster)、パップ剤(cataplasma)、経皮剤、ローション剤、吸入剤、エアロゾル剤、点眼剤、注射剤及び坐剤の形態で、経口的に又は非経口的に使用することができる。

[0108] これらの製剤の製剤化に関して、薬学的に許容可能な担体若しくは溶媒又は食品及び飲料品として許容可能な担体若しくは溶媒を適切に組み込むことができる。そのような担体又は溶媒として、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物性油、基剤、乳化剤、懸濁化剤、界面活性剤、pH調整剤、安定化剤、香味料、香料、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、鎮静剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、増粘剤、矯味剤、溶解助剤、及び他の添加剤が挙げられる。

[0109] (投与形態・投与量)

本明細書において、組成物の好ましい投与形態には特定の限定はない。例えば、経口投与又は非経口投与であればよい。非経口投与の具体例として、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、気管／気管支投与、直腸投与、及び筋肉内投与、並びに輸血による投与が挙げられる。筋肉内注射投与、静脈内点滴投与、又は埋め込み型持続皮下投与で投与することもできる。皮下投与は、患者自身による自己注射が可能であるので好適である。また、静脈内投与の場合、組成物1回の投与量中に含まれる核酸複合体の量、すなわち核酸複合体の単回投与量は、例えば、0.001mg/kg以上、0.005mg/kg以上、0.01mg/kg以上、0.025mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1mg/kg以上、2.5mg/kg以上、5mg/kg以上、10mg/kg以上、20mg/kg以上、30mg/kg以上、40mg/kg以上、50mg/kg以上、75mg/kg以上、100mg/kg以上、150mg/kg以上、200mg/kg以上、300mg/kg以上、400mg/kg以上、若しくは500mg/kg以上とすることができる。

きる。例えば、0.001mg/kg～500mg/kgの範囲に含まれる任意の量（例えば、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、若しくは200mg/kg）を適宜選択することができる。

[0110] （被検体・適用対象）

本明細書で「被検体」とは、本発明の組成物を適用する対象をいう。被検体は、個体の他、器官、組織、及び細胞を含む。被検体が個体の場合、本発明の組成物は、ヒトを含むあらゆる動物に適用することができる。ヒト以外の対象としては、例えば、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物等が適用対象となり得る。被検体は、中枢神経系で標的転写産物の発現量を減少させることが必要な個体や、中枢神経系疾患の治療が必要な個体であってもよい。

[0111] 本発明の組成物は、包含する第1態様の核酸複合体又は一本鎖核酸鎖のBBB通過作用及びアンチセンス効果により、中枢神経系における標的転写産物の発現量を減少させることができる。

[0112] 本発明の組成物を中枢神経系疾患の治療用として適用する場合、適用対象疾患は、遺伝子発現の増加又は減少に関連する中枢神経系疾患、特に標的転写産物又は標的遺伝子の発現の増加に関連する疾患（腫瘍等）が好ましい。限定されないが、例えば、脳腫瘍、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、ハンチントン病等が挙げられる。

[0113] 一実施形態において、本発明の組成物は、免疫性中枢神経系疾患の治療用として適用される。免疫性中枢神経系疾患の例としては、例えばミクログリア関連疾患が挙げられ、ミクログリア関連疾患としては例えば、アルツハイマー病、多発性硬化症、ALS、神経障害性疼痛などが挙げられる。

[0114] 本発明の組成物の送達部位、より具体的には組成物中に含まれる有効成分の送達部位は、特に限定はしないが、各疾患に応じて適切な部位に送達されることで、より効果的な結果が得られ得る。具体例を挙げると、アルツハイマー病の治療では、海馬及び／又は頭頂葉への薬剤送達が有効となり得る。また、前頭側頭型認知症（FTD）（前頭側頭葉変性症（FTLD）、意味性認知症（SD）、進行性非流暢性失語（PNFA）等を含む）、及びピック病の治療では

、前頭葉、側頭葉及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。さらに、パーキンソン病認知症の治療では、後頭葉、黒質及び／又は線条体への薬剤送達が有効となり得る。また、パーキンソン病の治療では、黒質及び／又は線条体への薬剤送達が有効となり得る。皮質基底核変性症（CBD）の治療では、前頭葉、頭頂葉、大脳基底核及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。進行性核上性麻痺（PSP）の治療では、前頭葉、大脳基底核及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。筋萎縮性側索硬化症の治療では、前頭葉、頭頂葉、大脳基底核及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。脊髓小脳変性症（SCD）SCA1型～SCA34型までの治療では、脳幹及び／又は小脳への薬剤送達が有効となり得る。歯状核赤核淡蒼球ルイ体変性症（DRPLA）の治療では、大脳基底核、脳幹及び／又は小脳への薬剤送達が有効となり得る。球脊髄性萎縮症（SBMA）の治療においては、脳幹及び／又は脊髄への薬剤送達が有効となり得る。フリードライヒ失調症（FA）の治療では、脳幹及び／又は小脳への薬剤送達が有効となり得る。ハンチントン病の治療では、線条体、前頭葉、頭頂葉及び／又は大脳基底核への薬剤送達が有効となり得る。プリオン病（狂牛病、GSSを含む）の治療では、大脳皮質、大脳白質、大脳基底核及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。大脳白質性脳症の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。脳炎（ウイルス性、細菌性、真菌性、結核性を含む）、髄膜炎（ウイルス性、細菌性、真菌性、結核性を含む）の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。代謝性脳症、中毒性脳症、栄養障害性脳症の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。大脳白質性脳症の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、もやもや病、無酸素脳症の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。大脳白質性脳症の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。びまん性軸索損傷（Diffuse axonal injury）の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。頭部外傷の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。多発性硬化症（MS）、視神経脊髄炎（NM0）の治療では、大脳白質、大脳皮質、視神経及び／又は脊髄への薬剤送達

が有効となり得る。筋緊張型ジストロフィー症（DM1，DM2）の治療では、骨格筋、心筋、大脳皮質及び／又は大脳白質への薬剤送達が可能となり得る。家族性痙攣性対麻痺（HSP）の治療では、頭頂葉及び／又は脊髄への薬剤送達が可能となり得る。福山型筋ジストロフィーの治療では、骨格筋、大脳皮質及び／又は大脳白質への薬剤送達が可能となり得る。レビー小体型認知症（DLB）の治療では、黒質、線条体、後頭葉、前頭葉及び／又は頭頂葉への薬剤送達が可能となり得る。多系統萎縮症（MSA）の治療では、線条体、大脳基底核、小脳、黒質、前頭葉及び／又は側頭葉への薬剤送達が可能となり得る。アレキサンダー病の治療では、大脳白質への薬剤送達が可能となり得る。CADASIL、CARASILの治療においては、大脳白質への薬剤送達が可能となり得る。

[0115] 組成物が投与又は摂取により適用される場合、投与量又は摂取量は、被験体の年齢（月齢、週齢を含む）、体重、症状及び健康状態、組成物の種類（医薬品、食品及び飲料品等）等に従って適切に選択すればよい。本発明の組成物の被検体への摂取有効量は、例えば、包含する核酸複合体が0.00001mg/kg/日～10000mg/kg/日、又は0.001mg/kg/日～100mg/kg/日となるようにすればよい。組成物は、単回投与でも、複数回投与であってもよい。複数回投与の場合、毎日若しくは適当な時間間隔で（例えば1日、2日、3日、1週間、2週間、1ヶ月の間隔で）、例えば2～20回等投与することもできる。上記の核酸複合体の1回の投与量は、例えば、0.001mg/kg以上、0.005mg/kg以上、0.01mg/kg以上、0.025mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1mg/kg以上、2.5mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1.0mg/kg以上、2.0mg/kg以上、3.0mg/kg以上、4.0mg/kg以上、5mg/kg以上、10mg/kg以上、20mg/kg以上、30mg/kg以上、40mg/kg以上、50mg/kg以上、75mg/kg以上、100mg/kg以上、150mg/kg以上、200mg/kg以上、300mg/kg以上、400mg/kg以上、若しくは500mg/kg以上とすることができ、例えば、0.001mg/kg～500mg/kgの範囲に含まれる任意の量（例えば、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、若しくは200mg/kg）を適宜選択することができる。

[0116] 本発明の核酸複合体は、0.01～10mg/kg（例えば約6.25mg/kg）の用量で週2

回の頻度で4回投与してもよい。また、核酸複合体は、0.05～30mg/kg（例えば約25mg/kg）の用量で週1～2回の頻度で2～4回、例えば週2回の頻度で2回投与してもよい。このような投与レジメン（分割投与）の採用により、より高用量の単回投与に比べて、毒性を下げ、被検体への負荷を低減することができる。

[0117] 核酸複合体の単回投与によるBBB通過量、BNB通過量には制限（上限）があるが、反復投与でも抑制効果は細胞内において相加的に働くと考えられる。すなわち、BBB通過、BNB通過の制限以上の高用量（例えば25mg/kg以上）では1回の投与量の増量では有効性の増強は低減するが、ある程度の投与間隔（例えば、半日以上）をおいた反復投与により有効性を向上させることができると考えられる。

[0118] （薬剤送達）

本発明の組成物は、有効成分として含有する第1態様の核酸複合体又は一本鎖核酸鎖がBBBを通過し、中枢神経系に効率的に送達され得ることを利用して、特定の薬剤を第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖に結合させることによって、その薬剤を神経系、特に中枢神経系に送達することができる。神経系に送達される薬剤は、特に限定されないが、ペプチド、タンパク質又は核酸薬剤、あるいはその他の有機化合物等、例えば抗腫瘍薬、ホルモン薬、抗生物質、抗ウイルス剤、抗炎症薬等が挙げられる。薬剤は、好ましくは、小分子薬剤である。「小分子薬剤」とは、当該技術分野において十分に理解されている。小分子薬剤は、典型的には、1,000ダルトン未満の分子量を有する薬剤を指す。薬剤は、親油性薬剤であってもよい。核酸薬剤としては、特に限定されないが、ASO、アンタゴmiR、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド、アプタマー、一本鎖siRNA、マイクロRNA、プレ-マイクロRNA等が挙げられる。薬剤の第2核酸鎖における結合位置及び結合の種類は、トコフェロール若しくはコレステロール又はその類縁体等と第2核酸鎖との結合について上に記載される通りである。

[0119] 本発明の組成物は、以下の実施例で開示される通り、高効率に中枢神経系

に送達され、標的遺伝子の発現又は標的転写産物のレベルを効果的に改変又は抑制することができる。したがって、被験体の中枢神経系において標的転写産物の発現量を減少させる方法であって、上記の核酸複合体を含む組成物を被験体に投与することを含む、方法が提供される。当該方法は、被験体の中枢神経系疾患を治療する方法であってもよい。また、被験体の中枢神経系に薬剤を送達する方法であって、上記の核酸複合体を含む組成物を被験体に投与することを含む、薬剤送達方法も提供される。

実施例

[0120] 本発明は、更に以下の参考例及び実施例によって詳しく説明されるが、これらは本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

[0121] 以下の実施例中の「室温」は通常約 10℃～約 35℃を示す。混合溶媒において示した比は、特に断らない限り容量比を示す。％は、特に断らない限り重量％を示す。

[0122] 実施例のカラムクロマトグラフィーにおける溶出は、特に言及しない限り、TLC (Thin Layer Chromatography, 薄層クロマトグラフィー) による観察下に行った。TLC 観察においては、TLC プレートとしてメルク (Merck) 社製の 60 F₂₅₄ を用い、展開溶媒として、カラムクロマトグラフィーで溶出溶媒として用いた溶媒を用いた。また、検出には UV 検出器を採用した。分取 HPLC (高速液体クロマトグラフィー) において、C18 と記載した場合はオクタデシル結合シリカゲルを用いた。溶出溶媒において示した比は、特に断らない限り容量比を示す。

¹H NMR の解析には ACD/SpecManager (商品名) ソフトウェアなどを用いた。水酸基やアミノ基などのプロトンピークが非常に緩やかなピークについては記載していないことがある。

[0123] 以下に、実施例で用いた略語の意味を示す。

M : モル濃度

N : 規定度

CDCl_3 : 重クロロホルム

$\text{DMSO}-d_6$: 重ジメチルスルホキシド

^1H NMR : プロトン核磁気共鳴

LC/MS : 液体クロマトグラフ質量分析計

DIPEA : N, N-ジイソプロピルエチルアミン

DMAPI : 4-ジメチルアミノピリジン

DMF : ジメチルホルムアミド

DMSO : ジメチルスルホキシド

HATU : O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N', N

'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロリン酸塩

NMP : N-メチル-2-ピロリドン

PBS : リン酸緩衝生理食塩水

TEA : トリエチルアミン

TEAA : トリエチルアミンアセタート

THF : テトラヒドロフラン

[0124] 以下の実施例で用いるオリゴヌクレオチドの構造を表1にまとめて示す。

実施例で用いるオリゴヌクレオチドのうちAS0(Malat1)、Y61-cRNA(Malat1)、Y62-cRNA(Malat1)、Y63-cRNA(Malat1)、Y64-cRNA(Malat1)、Y59-cRNA(Malat1)、Y60-cRNA(Malat1)及びChol-cRNA(Malat1)は、株式会社ジーンデザイン（大阪、日本）によって合成された。

[0125]

[表1]

二本鎖番号	二本鎖核酸剤名	オリゴヌクレオチド名	5'-修飾	配列 (5' から 3')	配列番号
n/a	n/a	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
n/a	n/a	Chol-cRNA (Malat1)	Chol-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
n/a	n/a	Y61-cRNA (Malat1)	Y61-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
n/a	n/a	Y62-cRNA (Malat1)	Y62-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
n/a	n/a	Y63-cRNA (Malat1)	Y63-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
n/a	n/a	Y64-cRNA (Malat1)	Y64-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
1	Y1-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y1-cRNA (Malat1)	Y1-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
3	Y3-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y3-cRNA (Malat1)	Y3-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
4	Y4-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y4-cRNA (Malat1)	Y4-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
5	Y5-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y5-cRNA (Malat1)	Y5-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
6	Y6-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y6-cRNA (Malat1)	Y6-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
7	Y7-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y7-cRNA (Malat1)	Y7-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
8	Y8-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y8-cRNA (Malat1)	Y8-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
9	Y9-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y9-cRNA (Malat1)	Y9-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
10	Y10-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y10-cRNA (Malat1)	Y10-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2

11	Y11-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y11-cRNA (Malat1)	Y11-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
12	Y12-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y12-cRNA (Malat1)	Y12-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
13	Y13-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y13-cRNA (Malat1)	Y13-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
14	Y14-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y14-cRNA (Malat1)	Y14-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
15	Y15-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y15-cRNA (Malat1)	Y15-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
16	Y16-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y16-cRNA (Malat1)	Y16-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
17	Y17-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y17-cRNA (Malat1)	Y17-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
18	Y18-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y18-cRNA (Malat1)	Y18-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
19	Y19-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y19-cRNA (Malat1)	Y19-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
20	Y20-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y20-cRNA (Malat1)	Y20-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
59	Y59-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y59-cRNA (Malat1)	Y59-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
60	Y60-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y60-cRNA (Malat1)	Y60-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2
21	Y21-HDO	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*t*g*a*a*t* <u>T</u> *G* <u>C</u>	1
		Y21-cRNA (Malat1)	Y21-	<u>G</u> *c*a*UUCAGUGAAC* <u>U</u> *a* <u>g</u>	2

22	Y22-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y22-cRNA (Malat1)	Y22-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
23	Y23-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y23-cRNA (Malat1)	Y23-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
24	Y24-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y24-cRNA (Malat1)	Y24-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
25	Y25-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y25-cRNA (Malat1)	Y25-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
26	Y26-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y26-cRNA (Malat1)	Y26-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
27	Y27-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y27-cRNA (Malat1)	Y27-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
28	Y28-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y28-cRNA (Malat1)	Y28-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
29	Y29-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y29-cRNA (Malat1)	Y29-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
30	Y30-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y30-cRNA (Malat1)	Y30-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
31	Y31-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y31-cRNA (Malat1)	Y31-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
32	Y32-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y32-cRNA (Malat1)	Y32-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
33	Y33-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y33-cRNA (Malat1)	Y33-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
34	Y34-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y34-cRNA (Malat1)	Y34-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>U</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2

35	Y35-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y35-cRNA (Malat1)	Y35-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
36	Y36-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y36-cRNA (Malat1)	Y36-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
37	Y37-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y37-cRNA (Malat1)	Y37-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
38	Y38-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y38-cRNA (Malat1)	Y38-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
39	Y39-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y39-cRNA (Malat1)	Y39-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
40	Y40-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y40-cRNA (Malat1)	Y40-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
41	Y41-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y41-cRNA (Malat1)	Y41-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
42	Y42-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y42-cRNA (Malat1)	Y42-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
43	Y43-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y43-cRNA (Malat1)	Y43-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
44	Y44-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y44-cRNA (Malat1)	Y44-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
45	Y45-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y45-cRNA (Malat1)	Y45-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
46	Y46-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y46-cRNA (Malat1)	Y46-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2
47	Y47-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
		Y47-cRNA (Malat1)	Y47-	<u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>UUCAGUGAAC</u> * <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	2

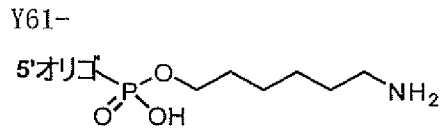
48	Y48-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y48-cRNA (Malat1)	Y48-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
49	Y49-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y49-cRNA (Malat1)	Y49-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
50	Y50-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y50-cRNA (Malat1)	Y50-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
51	Y51-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y51-cRNA (Malat1)	Y51-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
52	Y52-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y52-cRNA (Malat1)	Y52-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
53	Y53-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y53-cRNA (Malat1)	Y53-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
54	Y54-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y54-cRNA (Malat1)	Y54-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
55	Y55-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y55-cRNA (Malat1)	Y55-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
57	Y57-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Y57-cRNA (Malat1)	Y57-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2
58	Chol-HD0	ASO (Malat1)		C* <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> *G*C	1
		Chol-cRNA (Malat1)	Chol-	<u>g</u> *c*a*UUCAGUGAAC <u>ku</u> *a* <u>g</u>	2

大文字/下線： LNA (C=5-メチルシトシン LNA)、小文字： DNA、大文字： RNA、小文字/下線： 2'-Ome RNA、*： ホスホロチオエート結合

[0126] 表1に示すオリゴヌクレオチドY61-cRNA(Malat1)の5'末端構造を以下に示

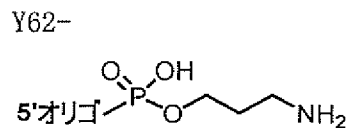
す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0127] [化30]



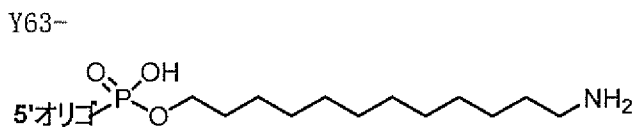
[0128] 表1に示すオリゴヌクレオチドY62-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0129] [化31]



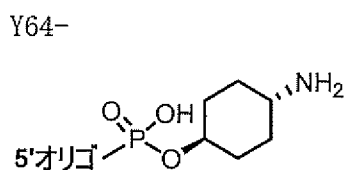
[0130] 表1に示すオリゴヌクレオチドY63-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0131] [化32]



[0132] 表1に示すオリゴヌクレオチドY64-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0133] [化33]

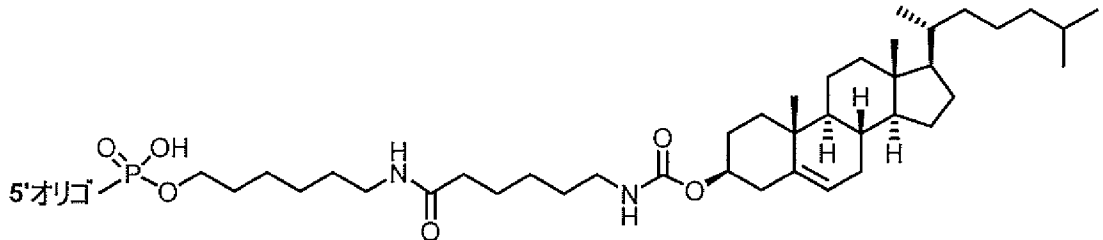


[0134] 表1に示すオリゴヌクレオチドY1-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す

。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0135] [化34]

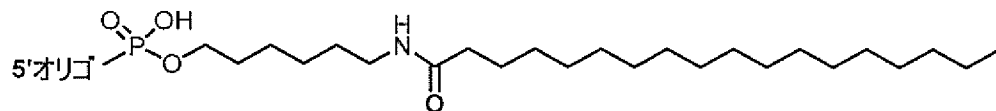
Y1-



[0136] 表1に示すオリゴヌクレオチドY3-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0137] [化35]

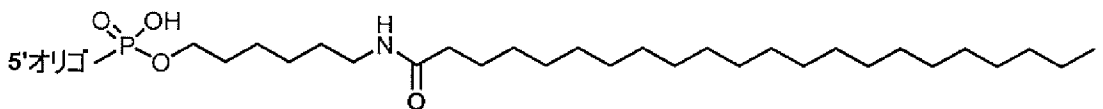
Y3-



[0138] 表1に示すオリゴヌクレオチドY4-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0139] [化36]

Y4-

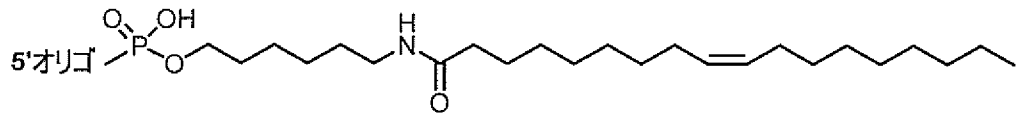


[0140] 表1に示すオリゴヌクレオチドY5-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0141]

[化37]

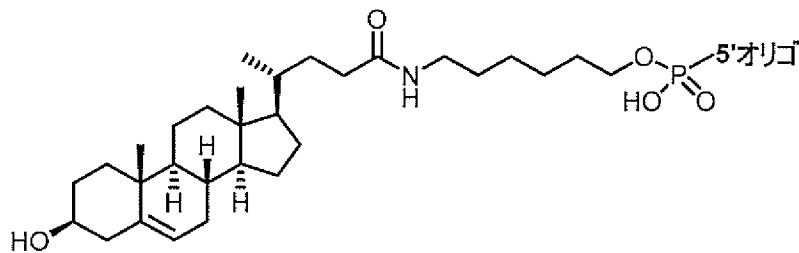
Y5-



[0142] 表1に示すオリゴヌクレオチドY6-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0143] [化38]

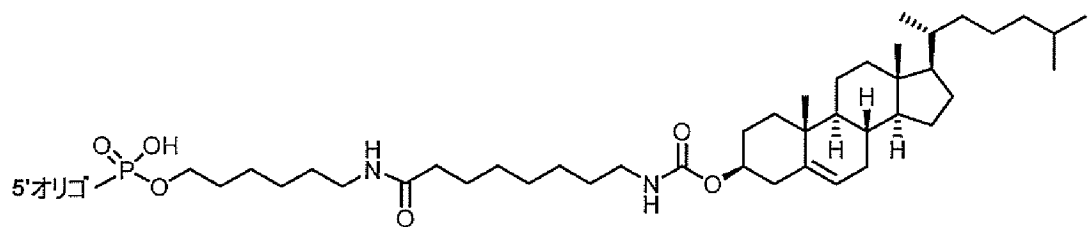
Y6-



[0144] 表1に示すオリゴヌクレオチドY7-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0145] [化39]

Y7-

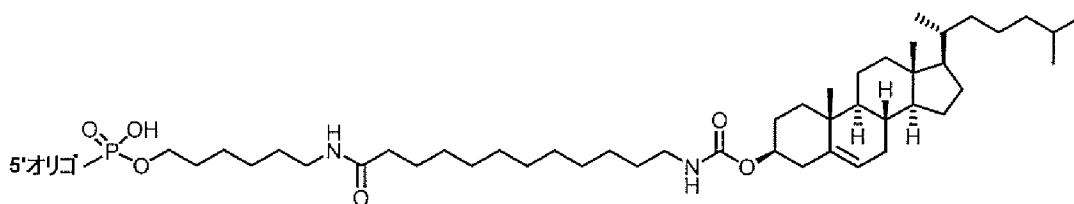


[0146] 表1に示すオリゴヌクレオチドY8-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0147]

[化40]

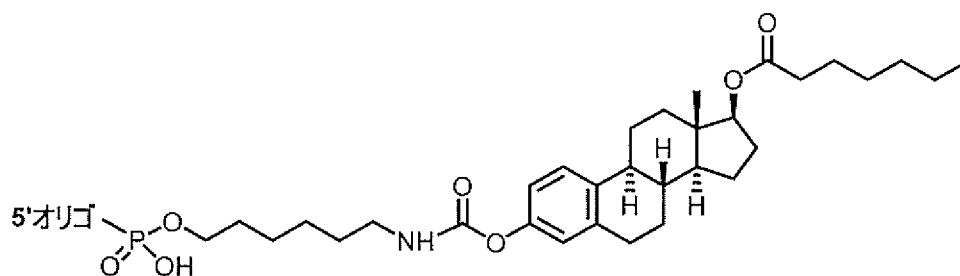
Y8-



[0148] 表1に示すオリゴヌクレオチドY9-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0149] [化41]

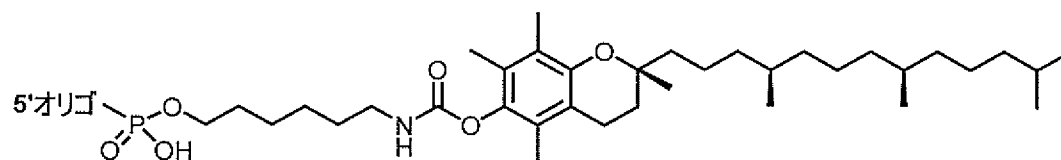
Y9-



[0150] 表1に示すオリゴヌクレオチドY10-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0151] [化42]

Y10-

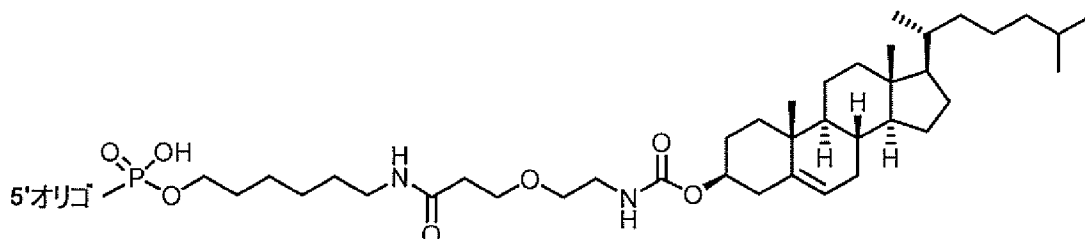


[0152] 表1に示すオリゴヌクレオチドY11-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0153]

[化43]

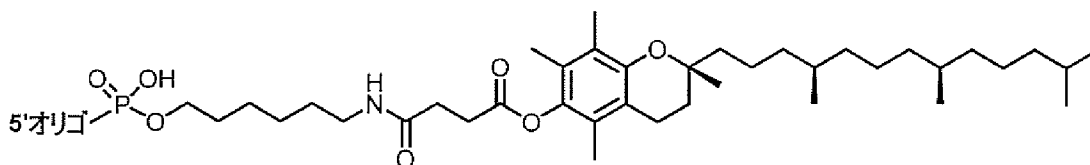
Y11-



[0154] 表1に示すオリゴヌクレオチドY12-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0155] [化44]

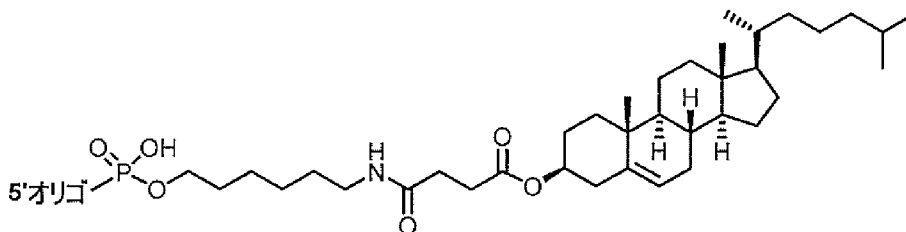
Y12-



[0156] 表1に示すオリゴヌクレオチドY13-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0157] [化45]

Y13-

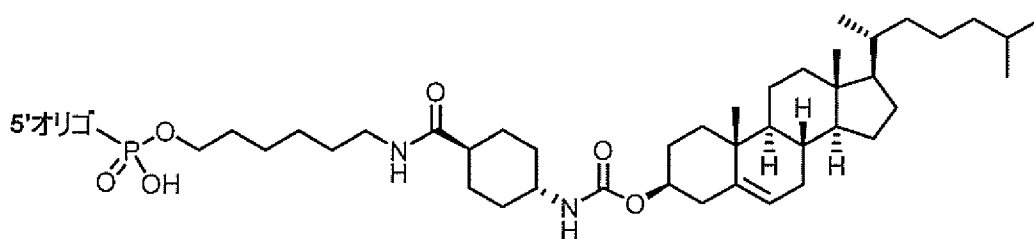


[0158] 表1に示すオリゴヌクレオチドY14-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0159]

[化46]

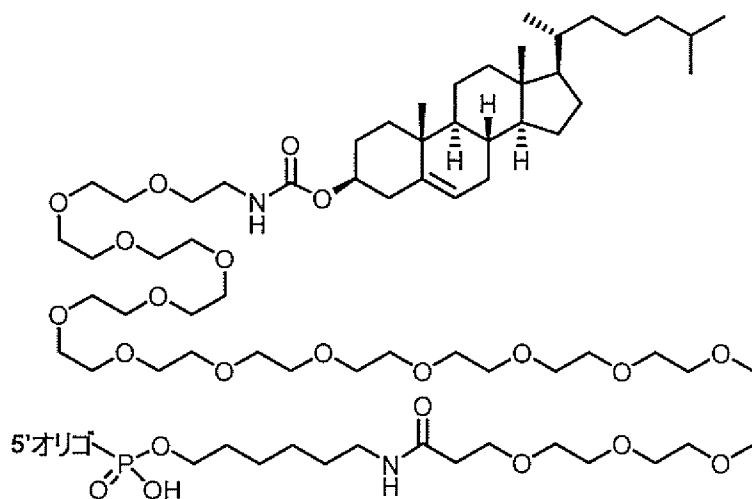
Y14-



[0160] 表1に示すオリゴヌクレオチドY15-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0161] [化47]

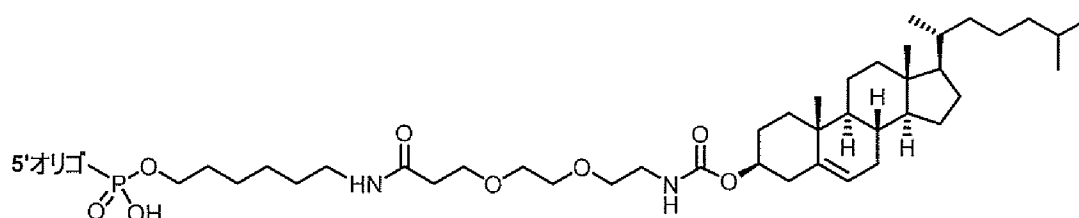
Y15-



[0162] 表1に示すオリゴヌクレオチドY16-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0163] [化48]

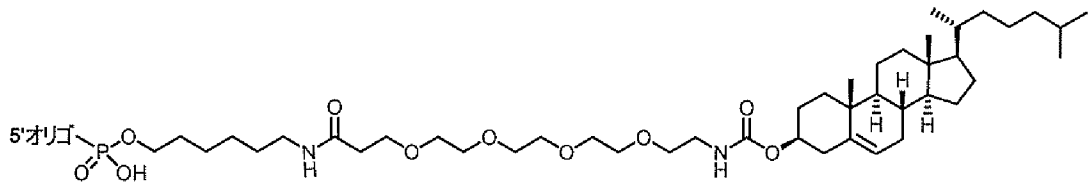
Y16-



[0164] 表1に示すオリゴヌクレオチドY17-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0165] [化49]

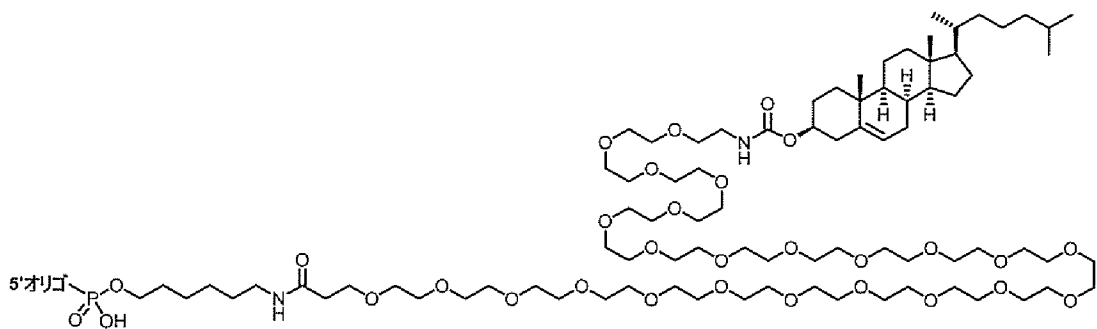
Y17-



[0166] 表1に示すオリゴヌクレオチドY18-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0167] [化50]

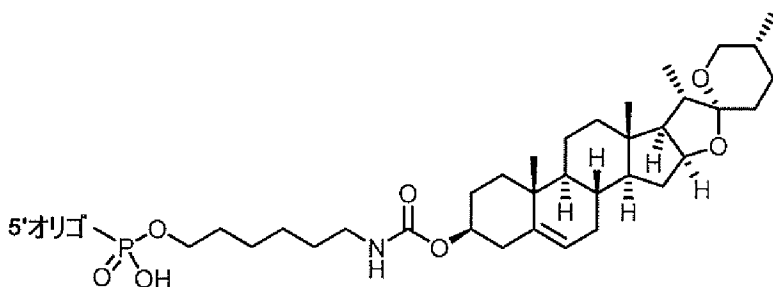
Y18-



[0168] 表1に示すオリゴヌクレオチドY19-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0169] [化51]

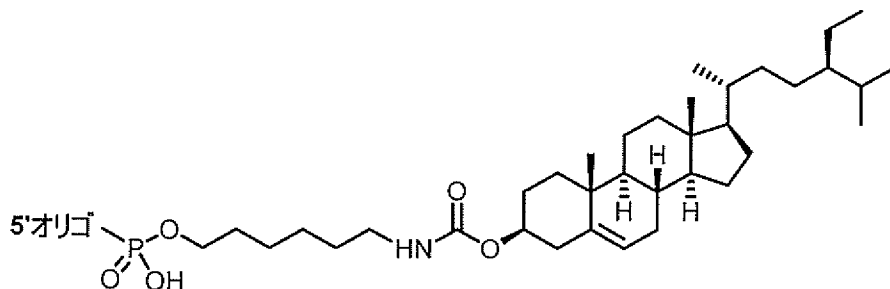
Y19-



[0170] 表1に示すオリゴヌクレオチドY20-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0171] [化52]

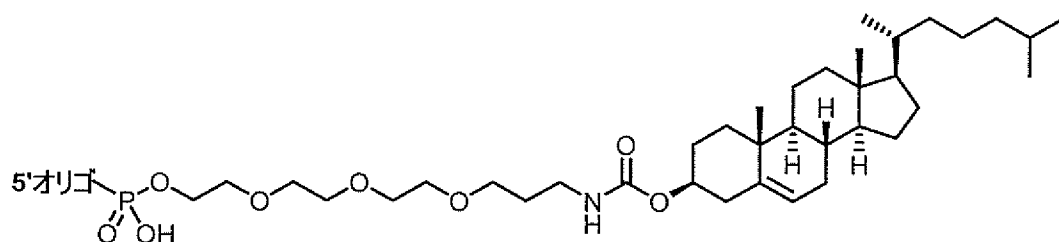
Y20-



[0172] 表1に示すオリゴヌクレオチドY59-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0173] [化53]

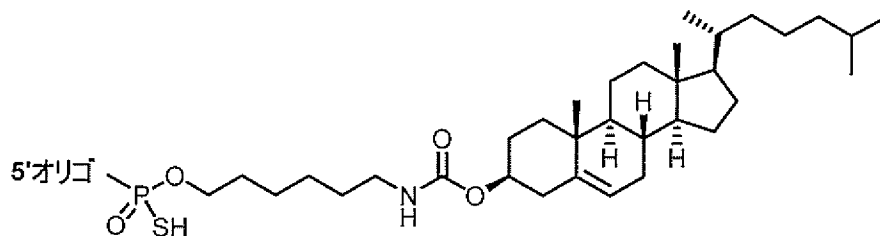
Y59-



[0174] 表1に示すオリゴヌクレオチドY60-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0175] [化54]

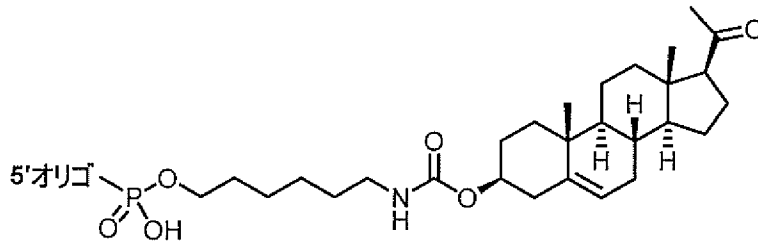
Y60-



[0176] 表1に示すオリゴヌクレオチドY21-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0177] [化55]

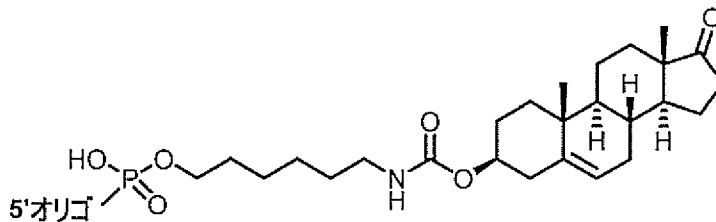
Y21-



[0178] 表1に示すオリゴヌクレオチドY22-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0179] [化56]

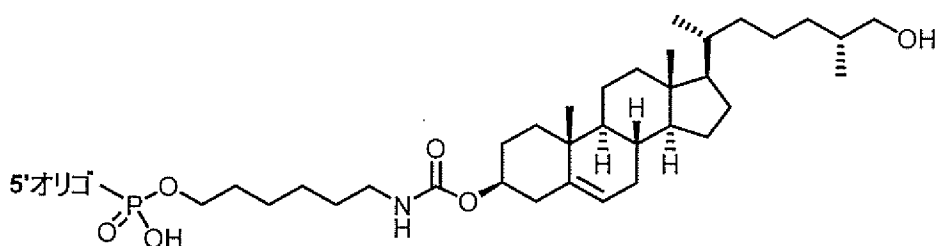
Y22-



[0180] 表1に示すオリゴヌクレオチドY23-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0181] [化57]

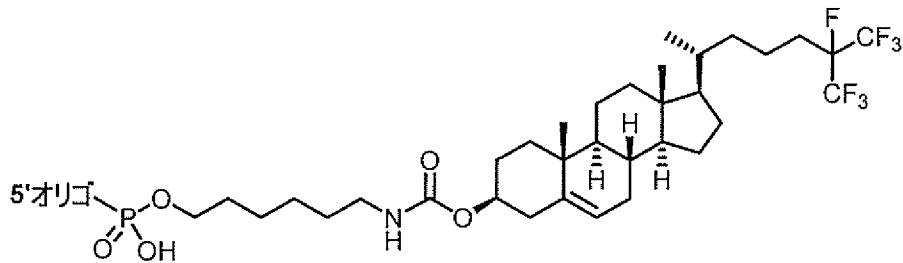
Y23-



[0182] 表1に示すオリゴヌクレオチドY24-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0183] [化58]

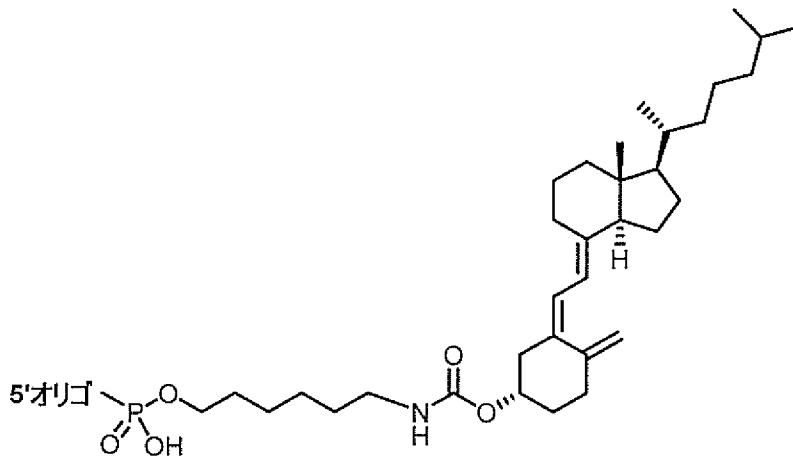
Y24-



[0184] 表1に示すオリゴヌクレオチドY25-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0185] [化59]

Y25-

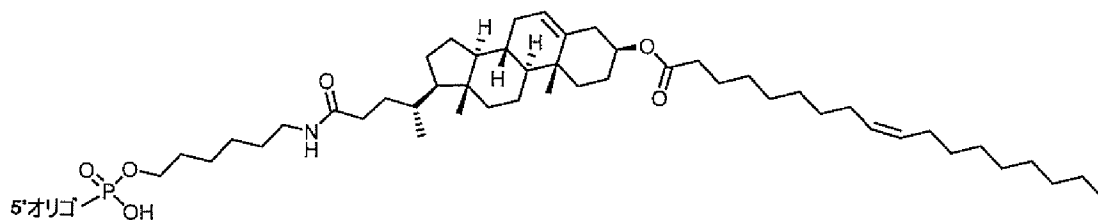


[0186] 表1に示すオリゴヌクレオチドY26-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0187]

[化60]

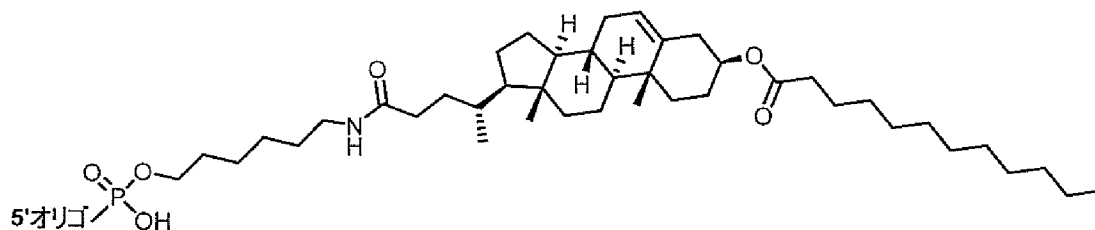
Y26-



[0188] 表1に示すオリゴヌクレオチドY27-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0189] [化61]

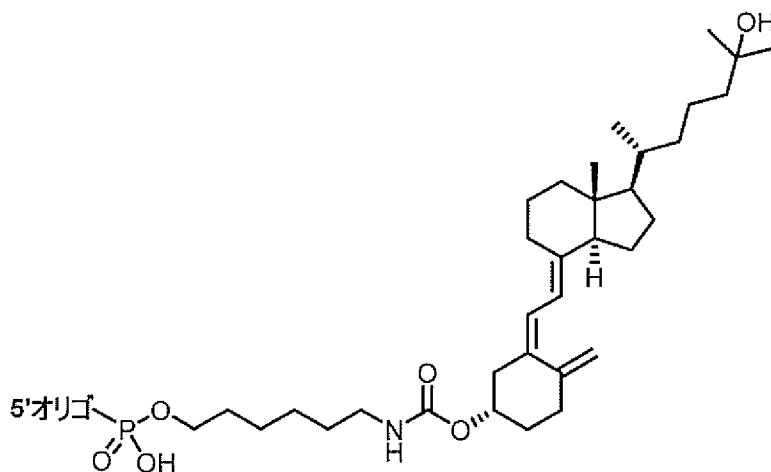
Y27-



[0190] 表1に示すオリゴヌクレオチドY28-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0191] [化62]

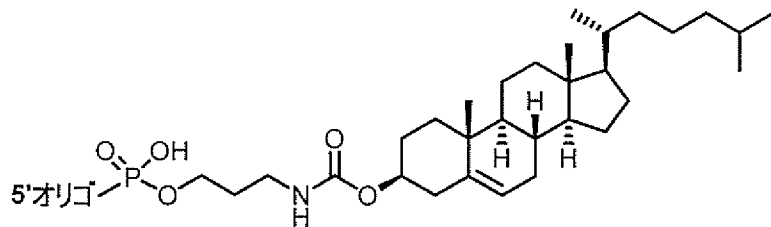
Y28-



[0192] 表 1 に示すオリゴヌクレオチド Y29-cRNA(Ma lat1) の 5' 末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0193] [化63]

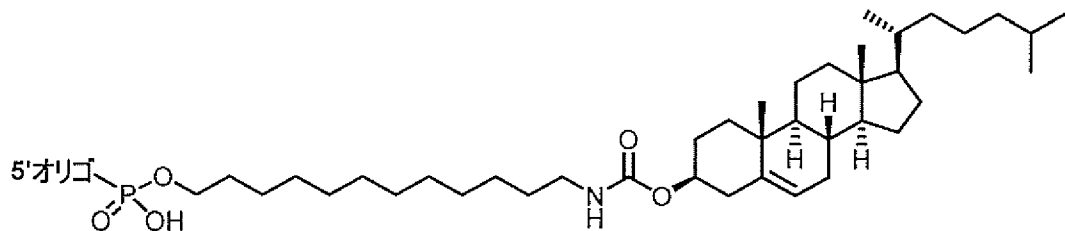
Y29-



[0194] 表 1 に示すオリゴヌクレオチド Y30-cRNA(Ma lat1) の 5' 末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0195] [化64]

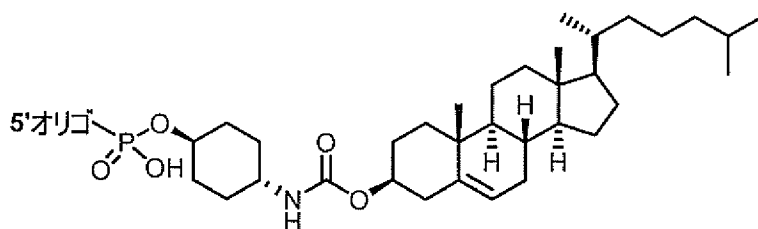
Y30-



[0196] 表 1 に示すオリゴヌクレオチド Y31-cRNA(Ma lat1) の 5' 末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0197] [化65]

Y31-

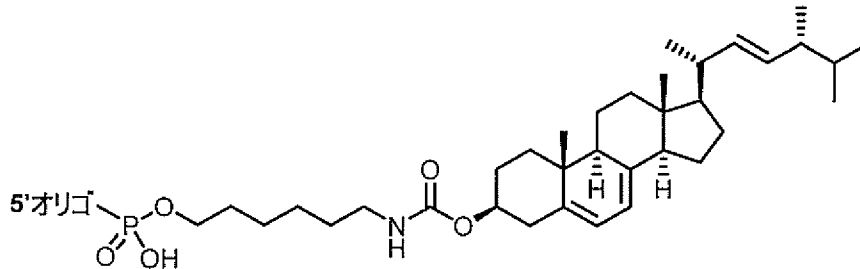


[0198] 表 1 に示すオリゴヌクレオチド Y32-cRNA(Ma lat1) の 5' 末端構造を以下に示

す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0199] [化66]

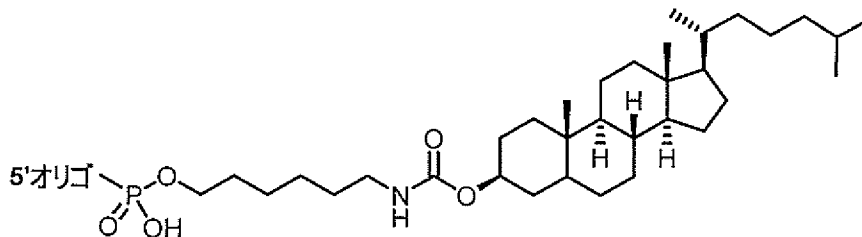
Y32-



[0200] 表1に示すオリゴヌクレオチドY33-cRNA(Mal at1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0201] [化67]

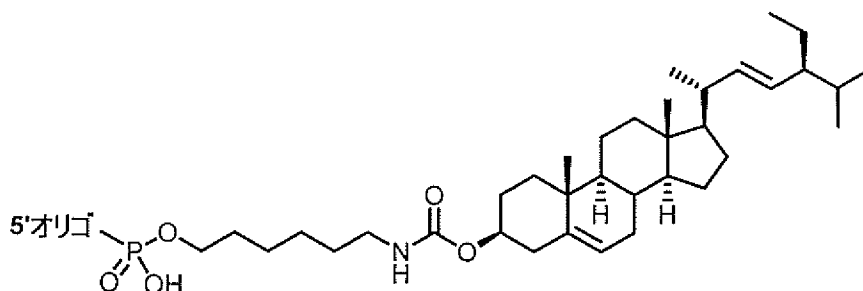
Y33-



[0202] 表1に示すオリゴヌクレオチドY34-cRNA(Mal at1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0203] [化68]

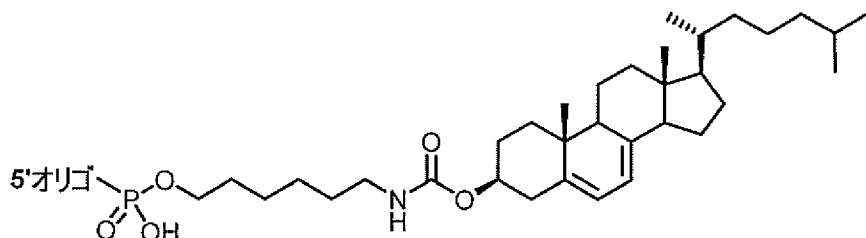
Y34-



[0204] 表1に示すオリゴヌクレオチドY35-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0205] [化69]

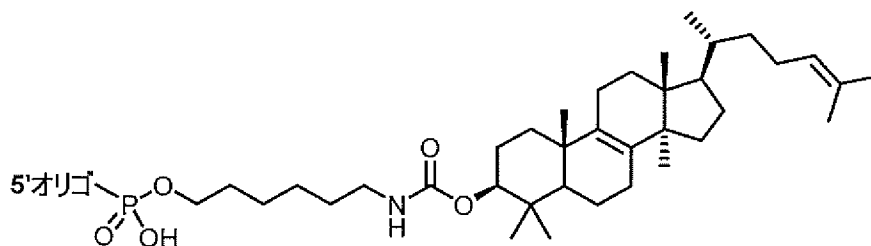
Y35-



[0206] 表1に示すオリゴヌクレオチドY36-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0207] [化70]

Y36-

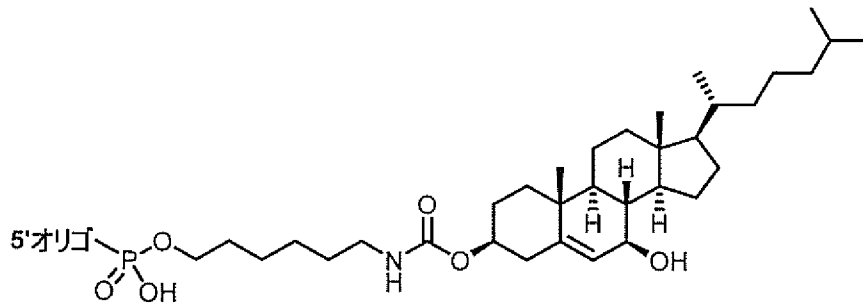


[0208] 表1に示すオリゴヌクレオチドY37-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0209]

[化71]

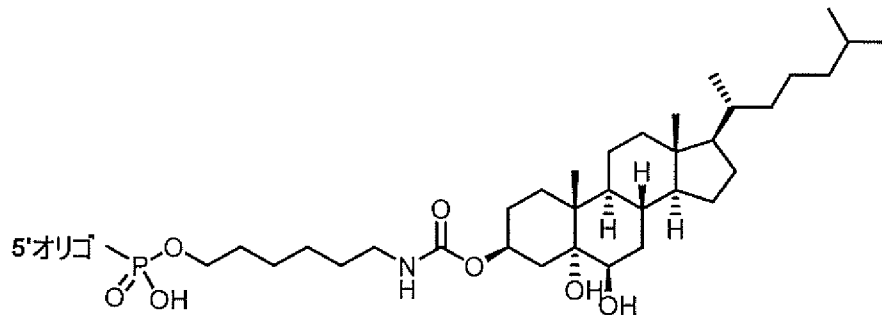
Y37-



[0210] 表1に示すオリゴヌクレオチドY38-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0211] [化72]

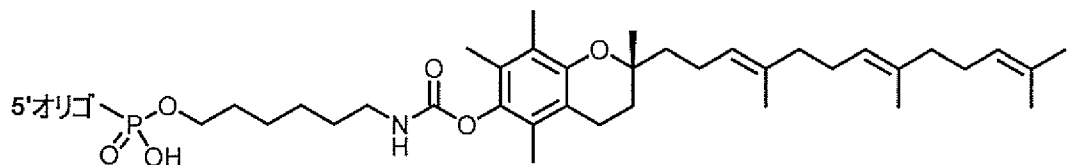
Y38-



[0212] 表1に示すオリゴヌクレオチドY39-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0213] [化73]

Y39-

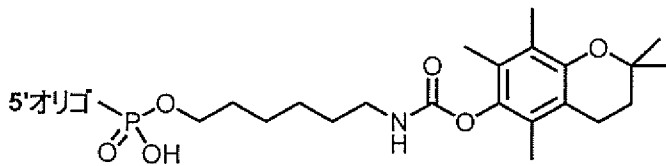


[0214] 表1に示すオリゴヌクレオチドY40-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

示す。

[0215] [化74]

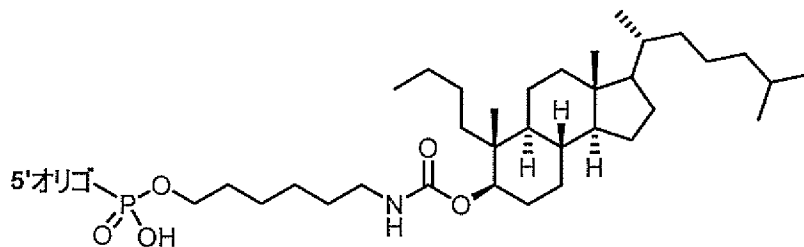
Y40-



[0216] 表1に示すオリゴヌクレオチドY41-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0217] [化75]

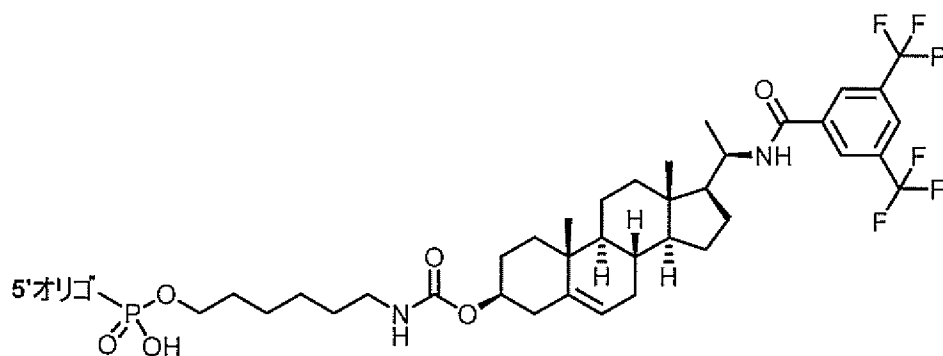
Y41-



[0218] 表1に示すオリゴヌクレオチドY42-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0219] [化76]

Y42-

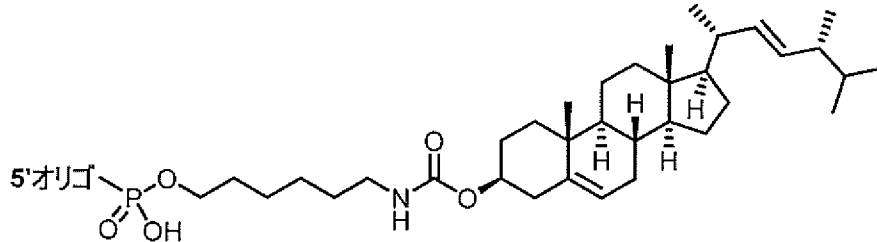


[0220] 表1に示すオリゴヌクレオチドY43-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示

す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0221] [化77]

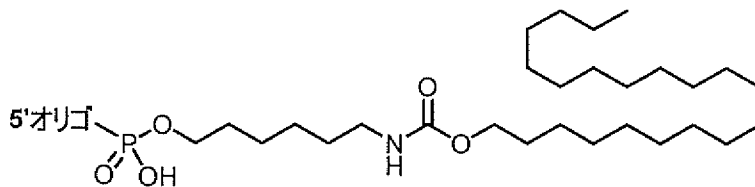
Y43-



[0222] 表1に示すオリゴヌクレオチドY44-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0223] [化78]

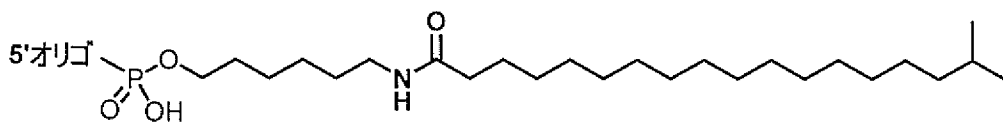
Y44-



[0224] 表1に示すオリゴヌクレオチドY45-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0225] [化79]

Y45-

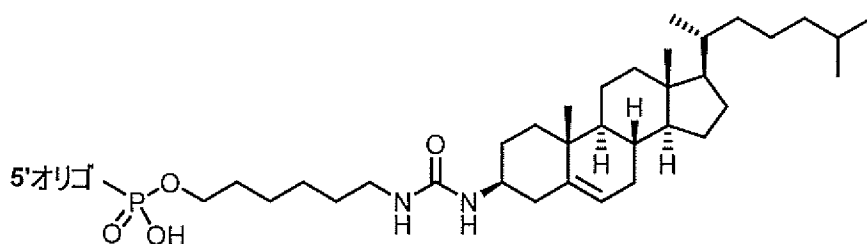


[0226] 表1に示すオリゴヌクレオチドY46-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0227]

[化80]

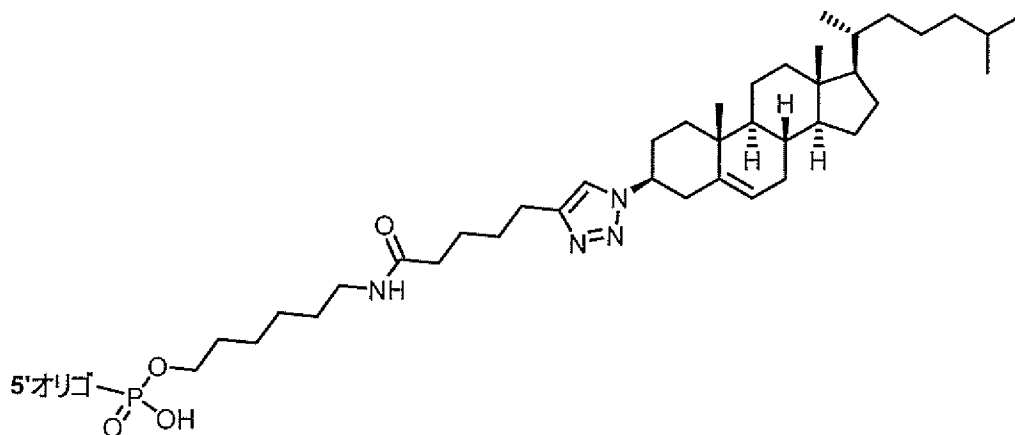
Y46-



[0228] 表1に示すオリゴヌクレオチドY47-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0229] [化81]

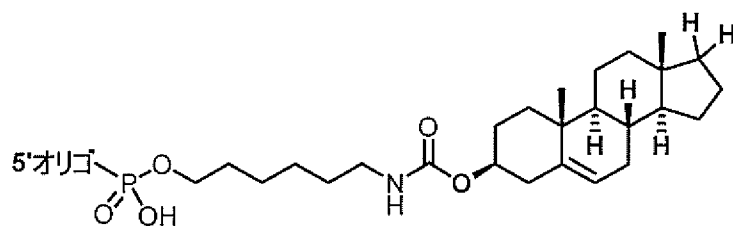
Y47-



[0230] 表1に示すオリゴヌクレオチドY48-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0231] [化82]

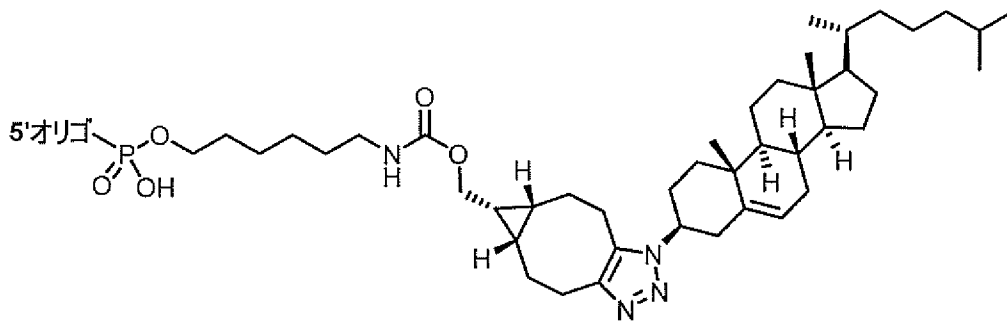
Y48-



[0232] 表1に示すオリゴヌクレオチドY49-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0233] [化83]

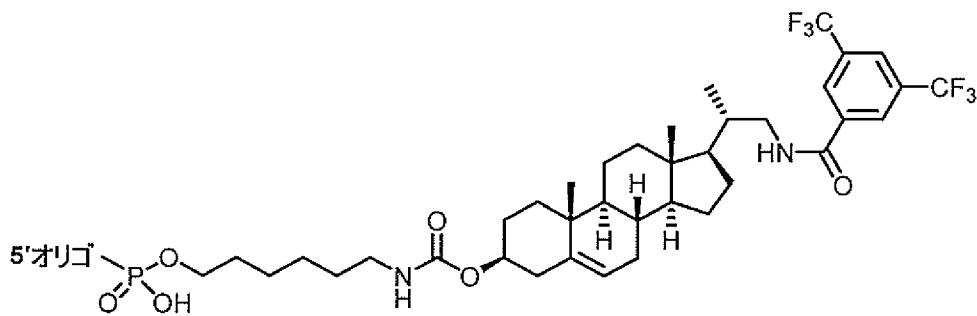
Y49-



[0234] 表1に示すオリゴヌクレオチドY50-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0235] [化84]

Y50-

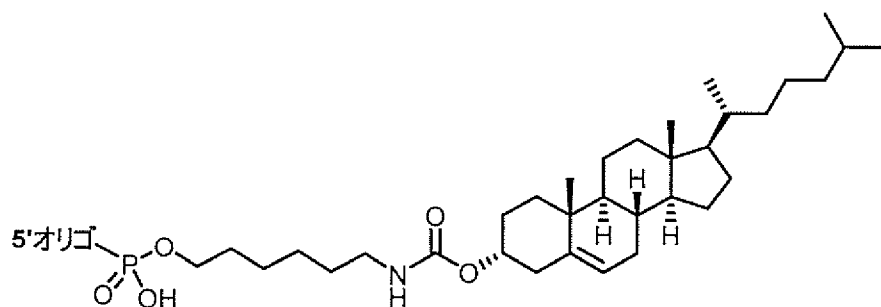


[0236] 表1に示すオリゴヌクレオチドY51-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0237]

[化85]

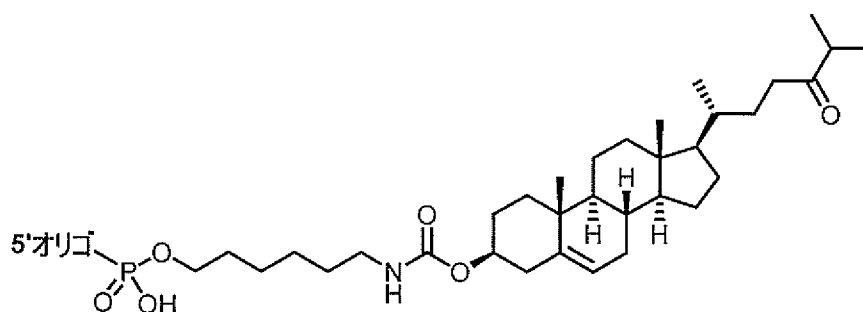
Y51-



[0238] 表1に示すオリゴヌクレオチドY52-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0239] [化86]

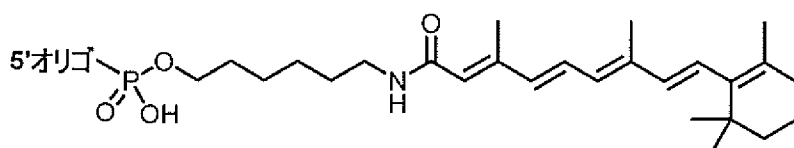
Y52-



[0240] 表1に示すオリゴヌクレオチドY53-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0241] [化87]

Y53-

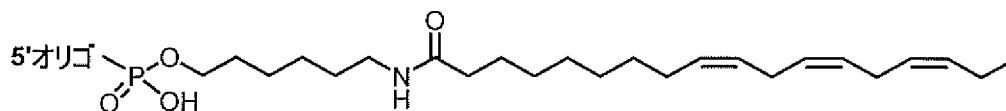


[0242] 表1に示すオリゴヌクレオチドY54-cRNA(MaLat1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

示す。

[0243] [化88]

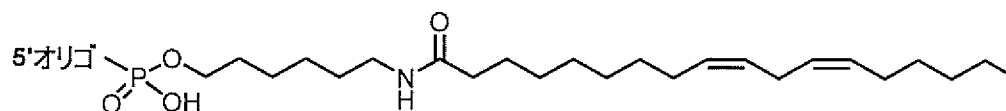
Y54-



[0244] 表1に示すオリゴヌクレオチドY55-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0245] [化89]

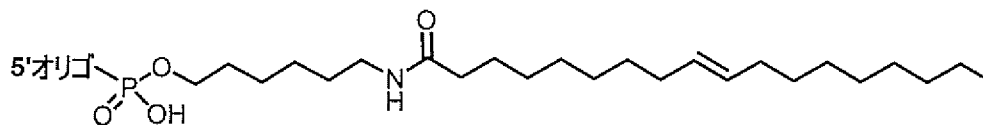
Y55-



[0246] 表1に示すオリゴヌクレオチドY57-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0247] [化90]

Y57-

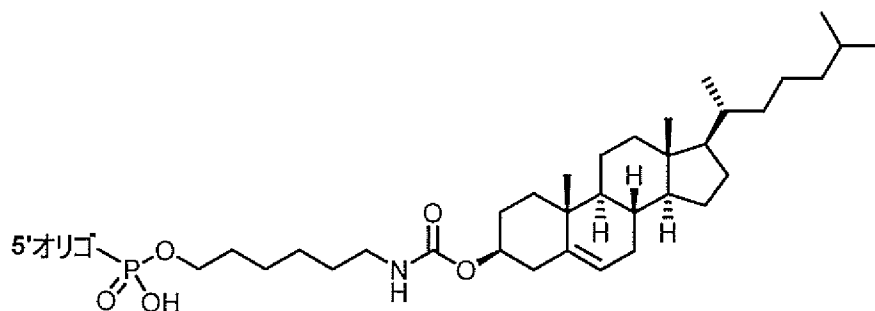


[0248] 表1に示すオリゴヌクレオチドChol-cRNA(Mal1)の5'末端構造を以下に示す。なお、以下の化学式で「オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドを示す。

[0249]

[化91]

Chol-



[0250] 参考例 1

IY1の合成

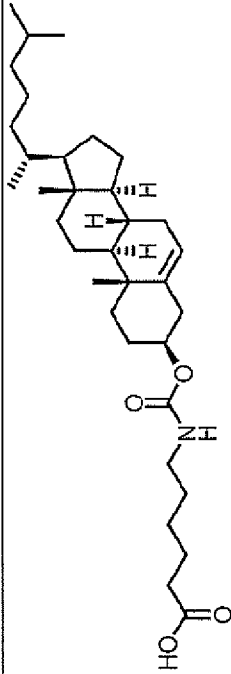
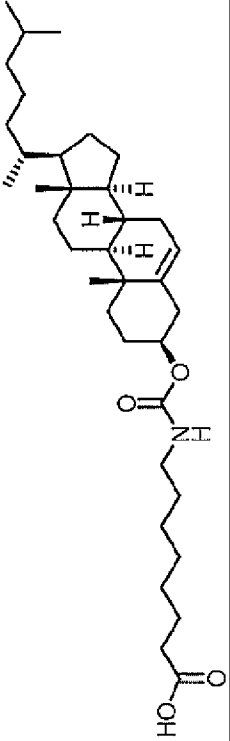
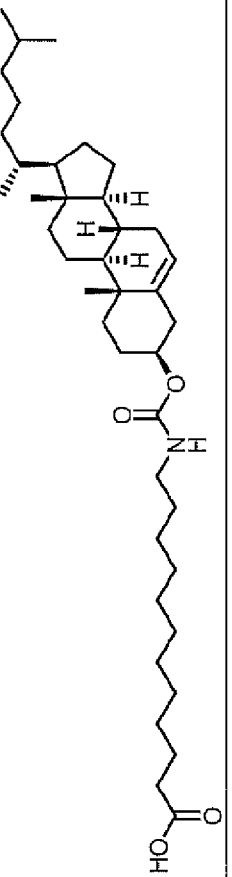
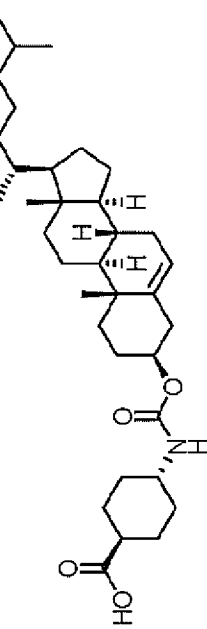
6-アミノヘキサン酸(146 mg)のピリジン溶液(5567 μL)にトリメチルシリルクロリド(569 μL)を 0°C で加えた。反応混合物を窒素雰囲気下、30分室温で攪拌した。クロロギ酸 コレステロール(500 mg)を 0°C で加え、反応混合物を窒素雰囲気下、30分室温で攪拌した。反応混合物に1規定塩酸水溶液を 0°C で加えて中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水、続いて飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮乾固した。得られた固体をジイソプロピルエーテルで洗浄し、表題化合物を200 mg得た。

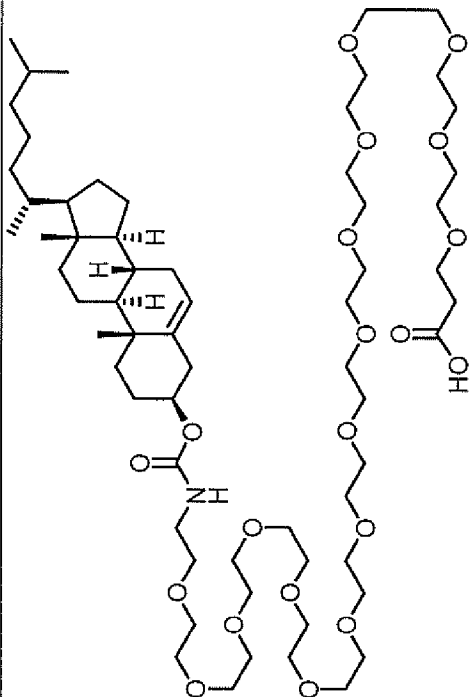
[0251] 参考例 1 と同様の方法により、参考例7、8、14及び15の化合物を製造した。

[0252] 以下の表 2 に、参考例1、7、8、14及び15の化合物の化学構造式及びNMRデータを示す。

[0253]

[表2]

参考例	化合物名	構造式	NMR データ
1	IY1		¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 0.67 (3H, s), 0.86 (6H, dd, J = 6.6, 2.0 Hz), 0.90-1.58 (31H, m), 1.62-1.71 (2H, m), 1.77-1.91 (3H, m), 1.92-2.05 (2H, m), 2.36 (4H, t, J = 7.5 Hz), 3.07-3.22 (2H, m), 4.39-4.56 (1H, m), 4.63 (1H, brs), 5.34-5.41 (1H, m).
7	IY7		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.67 (3H, s), 0.83-0.93 (9H, m), 0.98-1.68 (34H, m), 1.74-2.08 (5H, m), 2.25-2.44 (4H, m), 2.98-3.29 (2H, m), 4.35-4.71 (2H, m), 5.37 (1H, d, J = 5.1 Hz).
8	IY8		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.67 (3H, s), 0.84-0.93 (9H, m), 0.99-1.21 (12H, m), 1.26-1.40 (17H, m), 1.41-1.68 (12H, m), 1.72-2.10 (6H, m), 2.16-2.44 (4H, m), 3.15 (2H, q, J = 6.6 Hz), 4.37-4.68 (2H, m), 5.37 (1H, d, J = 5.1 Hz).
14	IY14		¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 0.65 (3H, s), 0.80-0.90 (9H, m), 0.96 (16H, s), 1.32 (12H, d, J = 9.0 Hz), 1.82 (9H, d, J = 13.8 Hz), 2.05-2.35 (3H, m), 3.19 (1H, dd, J = 7.5, 4.0 Hz), 4.10-4.43 (1H, m), 5.34 (1H, brs), 7.01 (1H, d, J = 7.6 Hz), 12.04 (1H, brs).

15	IY15	 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.68 (3H, s), 0.78-1.67 (34H, m), 1.73-2.07 (6H, m), 2.17-2.46 (3H, m), 2.60 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.24-3.49 (3H, m), 3.50-3.72 (59H, m), 3.78 (2H, t, J = 6.0 Hz), 4.37-4.63 (1H, m), 5.22 (1H, t, J = 5.7 Hz), 5.37 (1H, d, J = 5.3 Hz).
----	------	--

[0254] 参考例9

IY9の合成

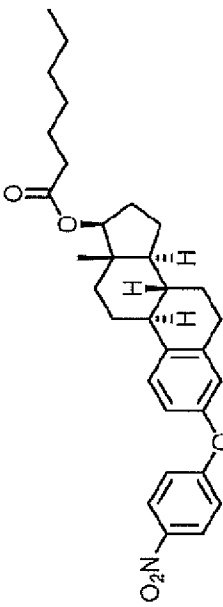
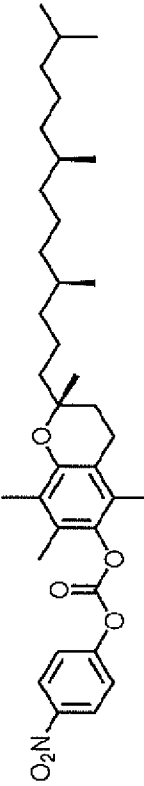
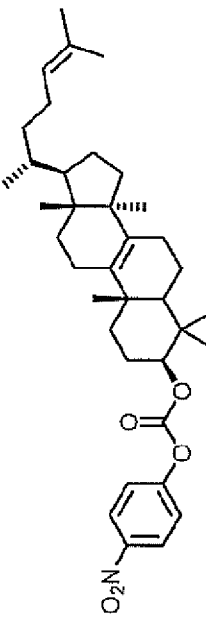
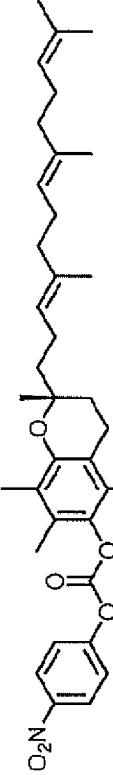
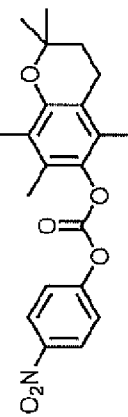
エストラジオールエナントート(200 mg)とピリジン(535 μ L)のTHF溶液(5 mL)にニトロフェニルカルボノクロリダート(210 mg)を0 °Cで加えた。反応混合物を室温で3時間反応させた。沈殿物をセライトろ過で除去し、ろ過物をジイソプロピルエーテルで洗浄した。ろ液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/ヘキサン）で精製して標題化合物を80 mg得た。

[0255] 参考例9と同様の方法により、参考例10、36、39及び40の化合物を製造した。

以下の表3に、参考例9、10、36、39及び40の化合物の化学構造式及びNMRデータを示す。

[0256]

[表3]

参考例	化合物名	構造式	NMR データ
9	IY9		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.78-0.98 (6H, m), 1.19-1.99 (18H, m), 2.13-2.44 (5H, m), 2.81-3.01 (2H, m), 4.71 (1H, dd, $J = 9.1, 7.6$ Hz), 6.95-7.07 (2H, m), 7.33 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.43-7.53 (2H, m), 8.27-8.36 (2H, m).
10	IY10		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.68-0.96 (15H, m), 0.98-1.95 (23H, m), 2.04-2.23 (9H, m), 2.62 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 7.48 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 8.31 (2H, d, $J = 8.9$ Hz).
36	IY36		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.69 (3H, s), 0.80-1.53 (27H, m), 1.57-2.19 (17H, m), 4.48 (1H, dd, $J = 11.5, 4.5$ Hz), 5.10 (1H, brs), 7.39 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 8.28 (2H, d, $J = 8.9$ Hz).
39	IY39		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.27 (3H, s), 1.49-2.25 (35H, m), 2.63 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 5.10 (3H, brs), 7.48 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 8.31 (2H, d, $J = 8.9$ Hz).
40	IY40		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.31 (6H, s), 1.81 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 2.12 (6H, s), 2.16 (3H, s), 2.64 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 7.48 (2H, d, $J = 9.2$ Hz), 8.31 (2H, d, $J = 9.4$ Hz).

[0257] 参考例11

IY11の合成

A) IY11-1の合成

クロロギ酸コレステロール(300 mg)と3-(2-アミノエトキシ)プロパン酸(89 mg)を用いて参考例1と同様の方法により表題化合物を得た。この化合物は精製せずに次工程で用いた。

[0258] B) IY11の合成

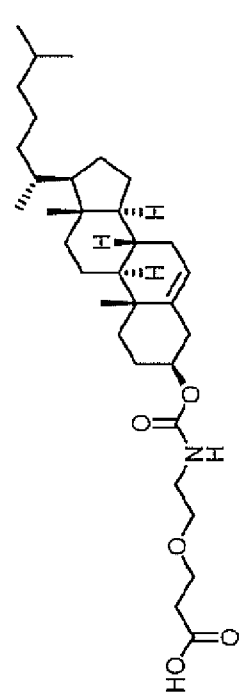
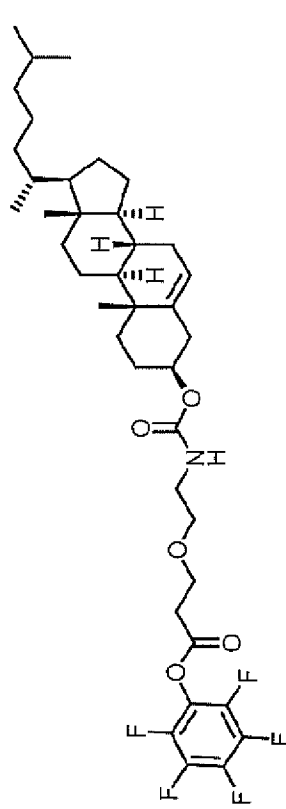
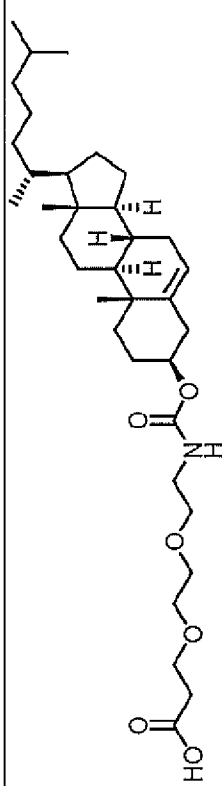
工程Aで得られたIY11-1のテトラヒドロフラン溶液(6700 μ L)にビス(ペンタフルオロフェニル)カルボナート(528 mg)を加え、反応混合物を窒素雰囲気下室温で1時間攪拌した。反応混合物を室温で水に加え、酢酸エチルで抽出した。抽出液を水と飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を127 mg得た。

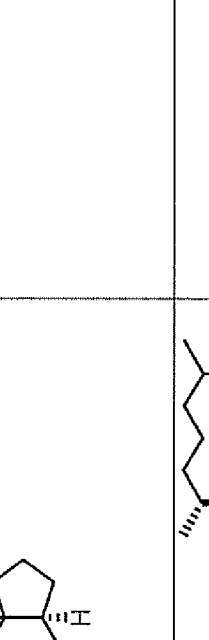
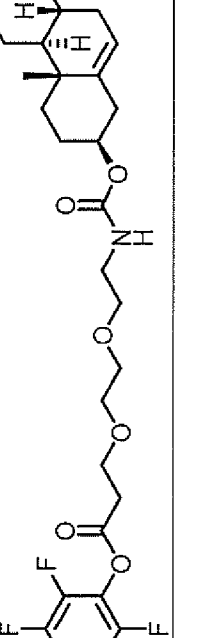
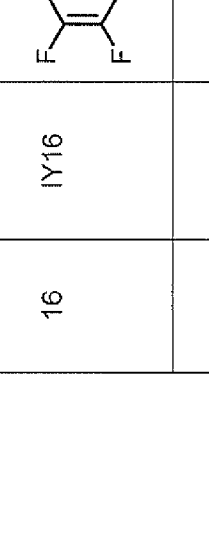
[0259] 参考例11の工程A)と同様の方法により、参考例16のIY16-1及び参考例17のIY17-1を製造した。参考例11の工程B)と同様の方法により、参考例16のIY16及び参考例17のIY17を製造した。

[0260] 以下の表4に、IY11-1、IY11、IY16-1、IY16、IY17-1及びIY17の化学構造式及びNMRデータを示す。

[0261]

[表4]

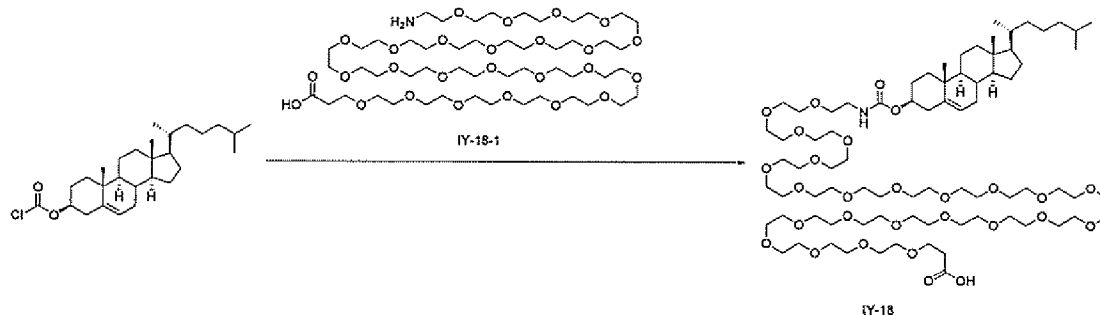
参考例	化合物名	構造式	NMR データ
11	IY11-1		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.68 (3H, s), 0.84-0.93 (9H, m), 0.93-1.21 (13H, m), 1.23-1.64 (11H, m), 1.77-2.11 (5H, m), 2.17-2.40 (2H, m), 2.93 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.38 (2H, q, J = 5.1 Hz), 3.52-3.63 (2H, m), 3.85 (2H, t, J = 6.0 Hz), 4.49 (1H, d, J = 4.5 Hz), 5.04 (1H, brs), 5.36 (1H, d, J = 5.3 Hz).
11	IY11		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.68 (3H, s), 0.86 (6H, dd, J = 6.7, 1.2 Hz), 0.91 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.98-1.29 (13H, m), 1.30-1.63 (10H, m), 1.76-2.05 (5H, m), 2.17-2.40 (2H, m), 2.93 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.38 (2H, q, J = 5.1 Hz), 3.49-3.65 (2H, m), 3.85 (2H, t, J = 6.0 Hz), 4.49 (1H, d, J = 4.5 Hz), 5.04 (1H, brs), 5.36 (1H, d, J = 5.3 Hz).
16	IY16-1		

16	IY16		
17	IY17-1		
17	IY17		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.67 (3H, s), 0.80-1.68 (33H, m), 1.76-2.09 (5H, m), 2.19-2.44 (2H, m), 2.95 (2H, t, J = 6.3 Hz), 3.30-3.41 (2H, m), 3.51-3.57 (2H, m), 3.59-3.70 (12H, m), 3.88 (2H, t, J = 6.2 Hz), 4.49 (1H, t, J = 11.0 Hz), 5.16 (1H, brs), 5.37 (1H, d, J = 5.2 Hz).

[0262] 参考例18

IY18の合成

[0263] [化92]



[0264] クロロギ酸コレステロール(49.1 mg)のTHF溶液 (3 mL) にIY18-1(138 mg)の水酸化ナトリウム水溶液 (0.1規定、2.4 mL) を氷冷下に加え、室温で5時間攪拌した。1規定塩酸で反応溶液を酸性とし、反応混合物をTHF-酢酸エチル(1:1)で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、濃縮乾固し、表題化合物を151 mg得た。

[0265] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.68 (3H, s), 0.80–1.69 (37H, m), 1.73–2.07 (6H, m), 2.18–2.71 (11H, m), 3.27–3.46 (3H, m), 3.47–3.73 (80H, m), 3.78 (2H, t, $J = 6.1$ Hz), 4.39–4.66 (1H, m), 5.24 (1H, brs), 5.37 (1H, d, $J = 5.4$ Hz), 6.98 (1H, s).

[0266] 参考例19

IY19の合成

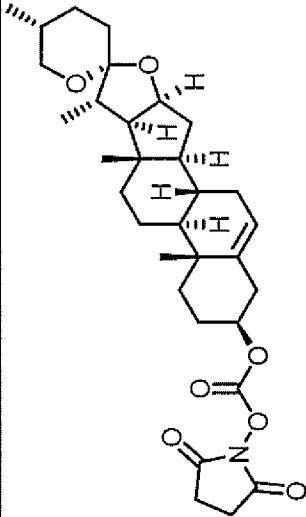
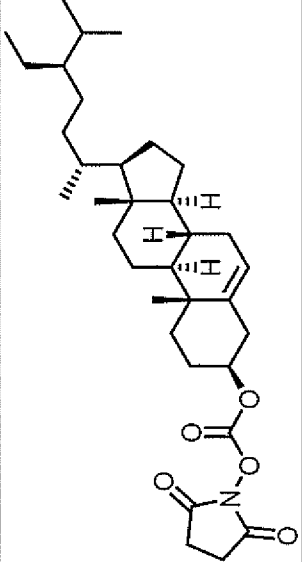
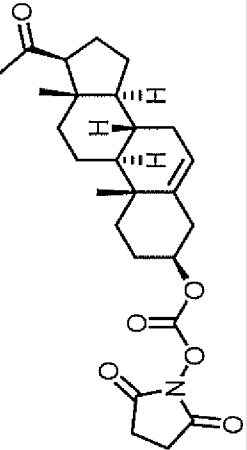
ジオスゲニン(445 mg)、ビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) カルボナート(1650 mg)、トリエチルアミン(2.244 mL)およびアセトニトリル(10 mL)の混合物を超音波条件下3時間反応させた。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム溶液で希釈下後、酢酸エチルとジエチルエーテルの混合溶媒で抽出した。抽出液を水と飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を55 mg得た。

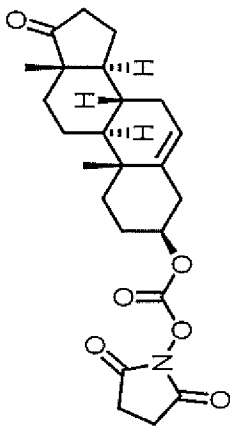
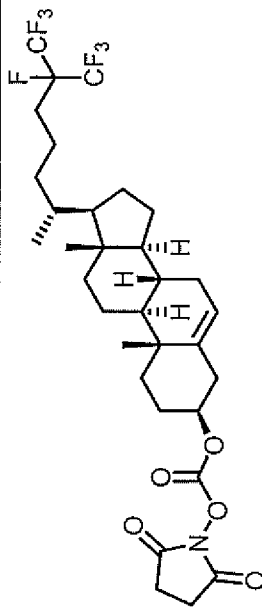
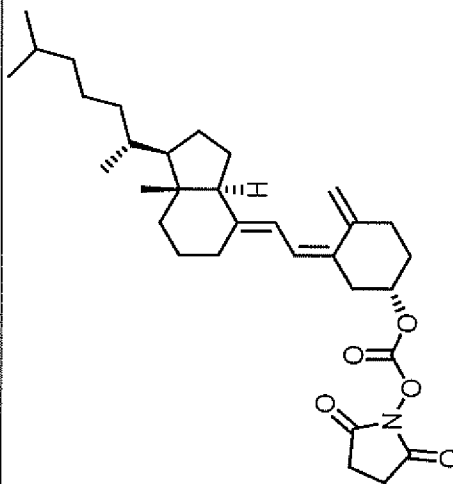
[0267] 参考例19と同様の方法により、参考例20、21、22、24、25、28、29、32、3

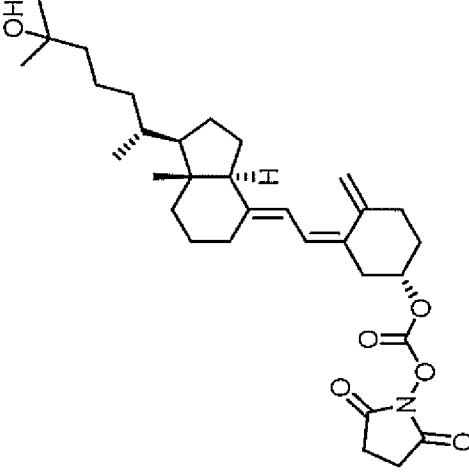
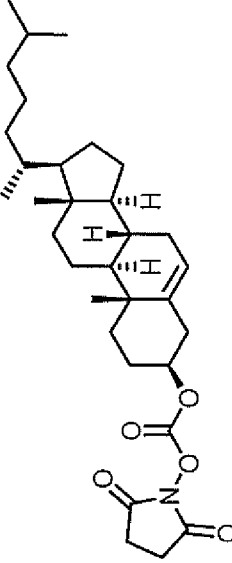
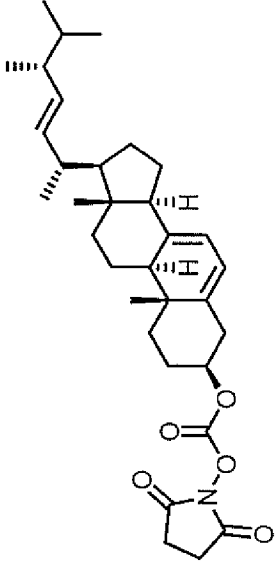
3、34、35、43、44、48、51及び52の化合物を製造した。

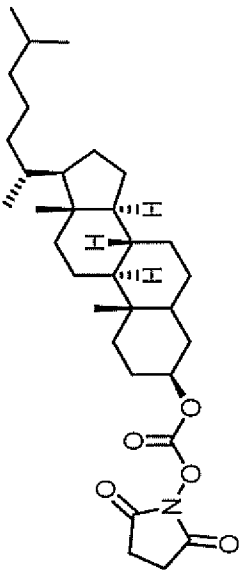
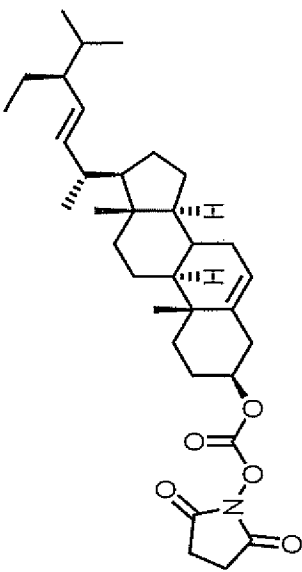
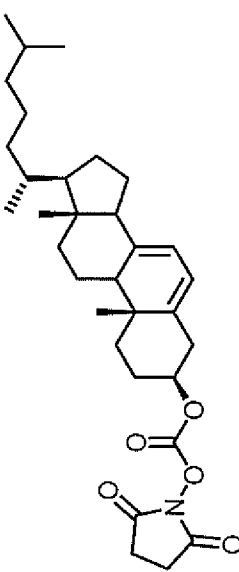
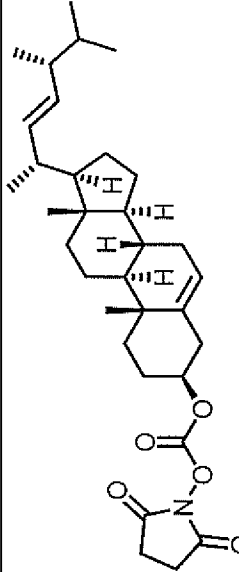
[0268] 以下の表5に、参考例19、20、21、22、24、25、28、29、32、33、34、35、43、44、48、51及び52の化合物の化学構造式及びNMRデータを示す。

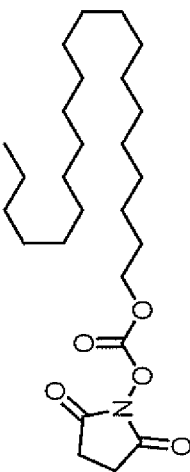
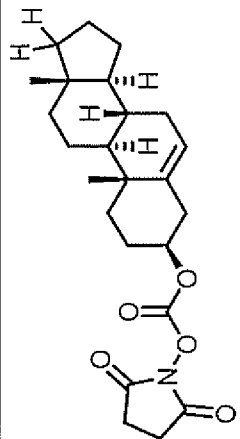
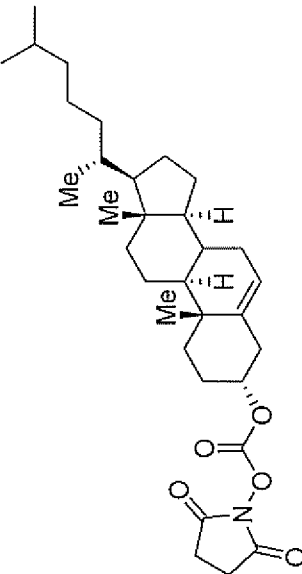
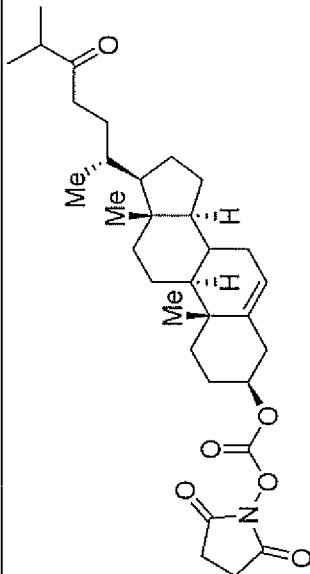
[0269] [表5]

参考例	化合物名	構造式	NMRデータ
19	IY19		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.67-0.85 (6H, m), 0.90-1.21 (11H, m), 1.36-1.54 (4H, m), 1.58-2.03 (12H, m), 2.25-2.60 (2H, m), 2.71-2.94 (4H, m), 3.20-3.57 (2H, m), 3.84-4.01 (1H, m), 4.27-4.49 (1H, m), 4.58 (1H, s), 5.42 (1H, d, $J = 5.3$ Hz).
20	IY20		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.68 (3H, s), 0.73-1.49 (34H, m), 1.57-2.12 (8H, m), 2.49 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 2.83 (4H, s), 4.62 (1H, brs), 5.43 (1H, brs).
21	IY21		^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.64 (3H, s), 1.03 (4H, s), 1.08-2.28 (19H, m), 2.41-2.61 (3H, m), 2.84 (4H, s), 4.50-4.69 (1H, m, $J = 5.5$ Hz), 5.43 (1H, brs).

22	Y22		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.89 (3H, s), 1.14-2.58 (22H, m), 2.84 (4H, s), 4.60 (1H, d, J = 5.7 Hz), 5.45 (1H, brs).
24	Y24		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.69 (3H, s), 0.78-2.11 (31H, m), 2.49 (2H, d, J = 8.1 Hz), 2.83 (4H, s), 4.52-4.75 (1H, m), 5.42 (1H, d, J = 5.8 Hz).
25	Y25		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.54 (3H, s), 0.79-0.96 (9H, m), 0.98-1.53 (14H, m), 1.61-2.73 (11H, m), 2.75-2.92 (5H, m), 4.87 (1H, d, J = 2.3 Hz), 4.91-5.03 (1H, m), 5.09 (1H, d, J = 2.3 Hz), 6.02 (1H, d, J = 11.5 Hz), 6.26 (1H, d, J = 11.5 Hz)

28	Y28		¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.54 (3H, s), 0.94 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.01-2.04 (25H, m), 2.15-2.59 (3H, m), 2.62-2.73 (1H, m), 2.81 (6H, s), 3.41 (1H, brs), 4.87 (1H, d, J = 2.3 Hz), 4.90-5.04 (1H, m), 5.09 (1H, d, J = 2.1 Hz), 6.02 (1H, d, J = 11.3 Hz), 6.26 (1H, d, J = 11.3 Hz).
29	Y29		¹H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 0.68 (s, 3 H) 0.79 - 1.51 (m, 31 H) 1.58 - 2.12 (m, 7 H) 2.48 (d, J=8.29 Hz, 2 H) 2.84 (s, 4 H) 4.51 - 4.68 (m, 1 H) 5.42 (d, J=5.09 Hz, 1 H)
32	Y32		¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.63 (3H, s), 0.83 (6H, dd, J = 6.7, 4.6 Hz), 0.88-0.99 (6H, m), 1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz), 1.16-1.50 (6H, m), 1.58-2.21 (12H, m), 2.44-2.59 (1H, m), 2.61-2.73 (1H, m), 2.84 (4H, s), 4.60-4.83 (1H, m), 5.07-5.31 (2H, m), 5.34-5.46 (1H, m), 5.61 (1H, dd, J = 5.7, 2.3 Hz).

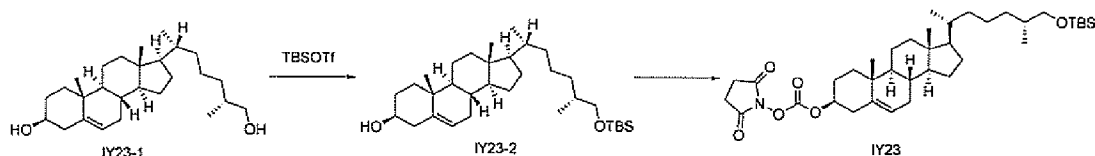
33	IY33		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.65 (3H, s), 0.78-0.94 (12H, m), 0.96-1.51 (22H, m), 1.60-2.14 (9H, m), 2.83 (4H, s), 4.52-4.81 (1H, m).
34	IY34		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.70 (3H, s), 0.75-0.89 (9H, m), 0.92-2.12 (29H, m), 2.48 (2H, d, J = 7.7 Hz), 2.83 (3H, s), 4.51-4.69 (1H, m), 4.95-5.08 (1H, m), 5.09-5.22 (1H, m, J = 8.5 Hz), 5.09-5.22 (1H, m), 5.42 (1H, d, J = 5.1 Hz).
35	IY35		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.62 (3H, s), 0.76-1.52 (25H, m), 1.58-2.18 (10H, m), 2.42-2.74 (2H, m), 2.84 (4H, s), 4.58-4.80 (1H, m), 5.40 (1H, brs), 5.61 (1H, brs).
43	IY43		¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.69 (3H, s), 0.76-2.13 (36H, m), 2.48 (2H, d, J = 7.9 Hz), 2.83 (4H, s), 4.41-4.73 (1H, m), 5.03-5.31 (2H, m), 5.41 (1H, d, J = 4.9 Hz).

44	IY44		1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.88 (3H, t, J = 5.7 Hz), 1.18-1.45 (36H, m), 1.75 (2H, quin, J = 5.7 Hz), 2.84 (4H, s), 4.32 (2H, t, J = 6.8 Hz).
48	IY48		1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.72 (3H, s), 0.82-1.06 (5H, m), 1.07-1.28 (4H, m), 1.31-1.83 (10H, m), 1.88-2.11 (3H, m), 2.49 (2H, d, J = 8.3 Hz), 2.83 (4H, s), 4.50-4.74 (1H, m), 5.42 (1H, d, J = 4.7 Hz).
51	IY51		1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.68 (3H, s), 0.78-2.13 (38H, m), 2.29-2.46 (1H, m), 2.49-2.65 (1H, m), 2.82 (4H, s), 5.01 (1H, brs), 5.38 (1H, brs).
52	IY52		1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.68 (3H, s), 0.92 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.03 (3H, s), 1.09 (6H, d, J = 7.0 Hz), 1.11-2.71 (26H, m), 2.84 (4H, s), 4.65 (1H, brs), 5.43 (1H, brs).

[0270] 参考例23

IY-23の合成

[化93]



A) IY23-2の合成

IY23-1 (300 mg) のジクロロメタン溶液 (10 mL) にイミダゾール (152 mg)、DMAP (91 mg) を室温で加え、15分撹拌した。tert-ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (0.34 mL) を加え、室温で16時間撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物を150 mg得た。

[0271] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.01 (6H, s), 0.67 (3H, s), 0.66 - 0.96 (15H, m), 0.91 - 1.14 (9H, m), 1.11 - 1.40 (8H, m), 1.42 (2H, dd, $J = 8.0, 4.6$ Hz), 1.44 - 1.53 (6H, m), 1.77 - 1.89 (3H, m), 1.91 - 2.05 (2H, m), 2.17 - 2.33 (2H, m), 3.34 (1H, dd, $J = 9.7, 6.8$ Hz), 3.42 (1H, dd, $J = 9.6, 6.0$ Hz), 3.47 - 3.57 (1H, m), 5.34 (1H, d, $J = 4.8$ Hz).

[0272] B) IY23の合成

工程Aで得られたIY23-1を用いて参考例19と同様の方法により、標題化合物を得た。

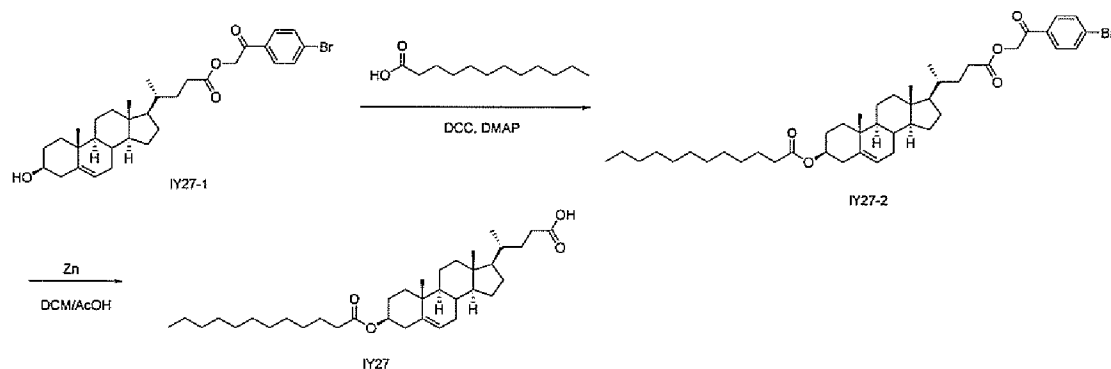
得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.04 (s, 6 H) 0.68 (s, 3 H) 0.77 - 1.63 (m, 38 H) 1.67 - 2.18 (m, 6 H) 2.48 (d, $J = 7.54$ Hz, 2 H) 2.83 (s, 4 H) 3.28 - 3.51 (m, 2 H) 4.51 - 4.70 (m, 1 H) 5.42 (d, $J = 4.14$ Hz, 1 H)

[0273] 参考例27

IY27の合成

[化94]



A) IY27-2の合成

ラウリン酸(148 mg)のジクロロメタン溶液(15 mL)にジシクロヘキシルカルボジイミド(226 mg)、IY27-1(250 mg)、DMAP(26.7 mg)を加え、室温で16時間撹拌した。ジクロロメタン(50 mL)で反応溶液を希釈し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を230 mg得た。

[0274] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.68 (3H, s), 0.87 (3H, t, $J = 5.5$ Hz), 0.95 (3H, d, $J = 6.1$ Hz), 1.01 (3H, s), 1.05 – 1.18 (3H, m), 1.25 (16H, s), 1.36–1.65 (14H, m), 1.80 – 1.89 (4H, m), 1.91 – 2.04 (2H, m), 2.21 – 2.33 (4H, m), 2.34 – 2.45 (1H, m), 2.46 – 2.59 (1H, m), 4.55 – 4.65 (1H, m), 5.27 (2H, s), 5.36 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 7.62 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.77 (2H, d, $J = 8.5$ Hz).

[0275] B) IY27の合成

工程Aで得られたIY27-2(180 mg)のジクロロメタン溶液(10 mL)に酢酸(10 mL)、亜鉛粉末(113 mg)を加え、室温で16時間撹拌した。反応混合物をセライトでろ過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を100 mg得た。

[0276] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

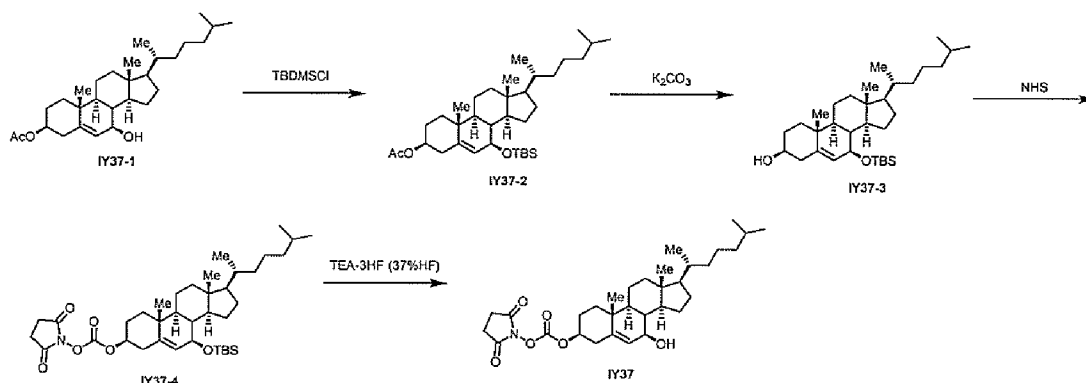
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.67 (3H, s), 0.86 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.9

3 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 1.01 (3H, s), 1.06 – 1.19 (3H, m), 1.24 (14H, s), 1.36 – 1.65 (14H, m), 1.80 – 1.88 (5H, m), 1.91 – 2.02 (2H, m), 2.27 (7H, dt, $J = 15.1, 7.3$ Hz), 4.53 – 4.67 (1H, m), 5.36 (1H, d, $J = 5.8$ Hz).

[0277] 参考例37

IY37の合成

[化95]



A) IY37-2の合成

IY37-1 (1.0 g) のDMF溶液 (10 mL) にイミダゾール (460 mg) とDMAP (275 mg) を室温で加え、15分間攪拌した。tert-ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (1.03 mL) を加え、室温で16時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン) で精製して標題化合物を1 g 得た。

[0278] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.04 (6H, d, $J = 4.6$ Hz), δ 0.66 (3H, s), 0.81 – 0.93 (17H, m), 0.95 – 1.17 (12H, m), 1.22 – 1.39 (6H, m), 1.39 – 1.54 (4H, m), 1.71 – 1.91 (5H, m), 1.94 – 2.06 (4H, m), 2.31 (2H, q, $J = 7.5$ Hz), 3.93 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 4.54 – 4.66 (1H, m), 5.29 (1H, s).

[0279] B) IY37-3の合成

工程Aで得られたIY37-2(1 g)のエタノール(4 mL)、ジクロロメタン(2 mL)溶液に水酸化ナトリウム水溶液(10%、2.86 mL)を加え、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣に酢酸エチルを加え、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、標題化合物を800 mg得た。

[0280] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.04 - 0.09 (6H, m), 0.66 (3H, s), 0.82 - 0.93 (18H, m), 0.94 - 1.16 (12H, m), 1.24 (1H, d, J = 7.3 Hz), 1.28 - 1.41 (4H, m), 1.52 (6H, d, J = 32.7 Hz), 1.73 - 1.86 (4H, m), 1.95 - 2.05 (1H, m), 2.24 (2H, d, J = 10.9 Hz), 3.47 - 3.58 (1H, m), 3.93 (1H, d, J = 7.6 Hz), 5.26 (1H, s).

[0281] C) IY37-4の合成

工程Bで得られたIY37-3(800 mg)のアセトニトリル(4 mL)、ジクロロメタン(4 mL)溶液にトリエチルアミン(3.26 mL)とビス(2,5-ジオキソピロリジン-1-イル)カルボナート(2.38 g)を加え、45 °Cで16時間攪拌した。反応混合物をセライトでろ過し、5%クエン酸溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を800 mg得た。

[0282] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.05 (6H, d, J = 4.6 Hz), 0.66 (3H, s), 0.84 - 0.92 (17H, m), 0.95 - 1.16 (12H, m), 1.21 - 1.37 (6H, m), 1.40 - 1.55 (3H, m), 1.70 - 1.82 (3H, m), 1.89 (1H, d, J = 13.8 Hz), 1.95 - 2.06 (3H, m), 2.47 (2H, d, J = 7.8 Hz), 2.82 (4H, s), 3.92 (1H, d, J = 7.5 Hz), 4.53 - 4.67 (1H, m), 5.31 (1H, d, J = 15.7 Hz).

[0283] D) IY37の合成

工程Cで得られたIY37-4(800 mg)のTHF(8 mL)溶液にトリエチルアミン・3フ

ッ化水素塩 (2.64 mL)を0℃で加え、室温で16時間撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を110 mg得た。

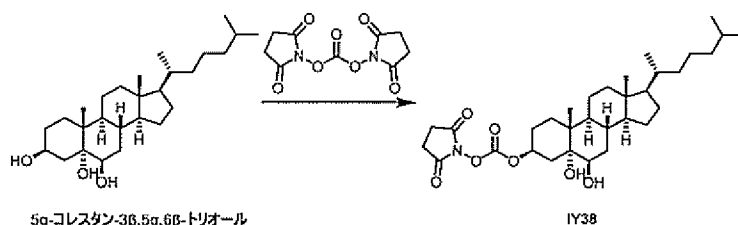
[0284] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.68 (3H, s), 0.86 (6H, d, $J = 5.0$ Hz), 0.91 (3H, d, $J = 6.2$ Hz), 0.98 – 1.17 (11H, m), 1.22 – 1.43 (8H, m), 1.41 – 1.53 (3H, m), 1.70 – 1.83 (2H, m), 1.84 – 1.96 (2H, m), 2.04 (2H, s), 2.51 (2H, t, $J = 9.1$ Hz), 2.83 (4H, s), 3.85 (1H, s), 4.55 – 4.69 (1H, m), 5.35 (1H, s).

[0285] 参考例 38

IY38の合成

[化96]



5α-コレスタン-3β,5α,6β-トリオールを用いて、参考例37の工程Cと同様の方法により標題化合物を合成した。

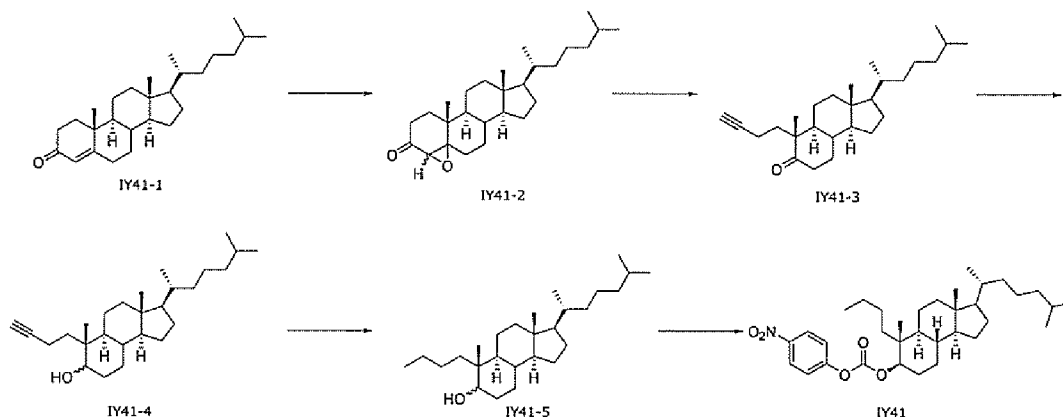
[0286] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.63 (3H, s), 0.86 (8H, dd, $J = 16.0, 5.6$ Hz), 0.94 – 1.38 (21H, m), 1.44 – 1.69 (6H, m), 1.71 – 1.81 (1H, m), 1.82 – 1.97 (2H, m), 2.15 (1H, t, $J = 12.0$ Hz), 2.80 (4H, s), 3.38 (1H, s), 4.13 (1H, s), 4.64 (1H, d, $J = 4.0$ Hz), 5.03 – 5.14 (1H, m)

[0287] 参考例41

IY41の合成

[化97]



[0288] A) IY41-2の合成

8規定水酸化ナトリウム水溶液 (2.92 mL)と過酸化水素水 (14.3 mL)をIY41-1 (1.8 g)のメタノール溶液(3.12 mL)-ヘキサン(6.24 mL)混合溶液に加えた。反応混合物を室温で終夜攪拌した。過酸化水素水 (1.43 mL)を加えた。尿素・過酸化水素(1.32 g)を加え1時間攪拌した。反応混合物を6規定塩酸水溶液中で中和し、チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、1規定塩酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、続いて飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を立体異性体混合物 ($4\alpha, 5\alpha$ エポキシ体及び $4\beta, 5\beta$ エポキシ体)として700 mg得た。

[0289] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.64-0.73 (3H, m), 0.80-0.93 (9H, m), 0.94-2.47 (31H, m), 2.98 (1H, s, 4-H beta), 3.03 (1H, 2, 4-H alpha).

[0290] B) IY41-3の合成

工程Aで得られたIY41-2 (700 mg)の酢酸 (10 mL) とTHF (10 mL) の混合溶液にp-トルエンスルホニル ヒドラジド(342 mg)を小分けにして加えた反応混合物を室温で4時間攪拌した。反応混合物に飽和食塩水(30 mL)を加え、有機層を分離した。水層を酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲル

ルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を560 mg得た。

[0291] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.73 (3H, s), 0.82–0.95 (9H, m), 0.96–1.08 (3H, m), 1.09 (3H, s), 1.10–2.39 (25H, m), 2.44–2.62 (1H, m).

[0292] C) IY41-4の合成

工程Bで得られたIY41-3(560 mg)のメタノール溶液(10 mL)に水素化ホウ素ナトリウム(110 mg)を室温で加えた。反応混合物を室温で30分撹拌した後、酢酸エチルで希釈した。有機層を分離し、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物)を立体異性体混合物(5 α 及び5 β ヒドロキシ体)として560 mg得た。

[0293] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.65 (9H, d, J = 3.4 Hz), 0.74–2.36 (35H, m), 3.43–3.56 (1H, m, 5-H α), (1H, d, J = 2.4 Hz, 5-H α).

[0294] D) IY41-5の合成

工程Cで得られたIY41-4(540 mg)のエタノール溶液(7 mL)にパラジウム/炭素(7.4 mg)を加え、水素雰囲気下終夜撹拌した。反応混合物をアミノシリカパッドでろ取し、溶媒を留去し、標題化合物を立体異性体混合物(5 α 及び5 β ヒドロキシ体)として540 mg得た。

[0295] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.61–0.69 (3H, m), 0.80 (3H, s), 0.81–1.91 (42H, m), 1.92–2.03 (1H, m), 3.43–3.55 (1H, m, 5-H α), 3.63 (1H, brs, 5-H β).

[0296] E) IY41の合成

工程Dで得られたIY41-5を用いて参考例9と同様の方法により、標題化合物を単一異性体として得た。本反応条件下未反応であったIY41-5の α ヒドロキシ体は精製の過程において取り除かれた。

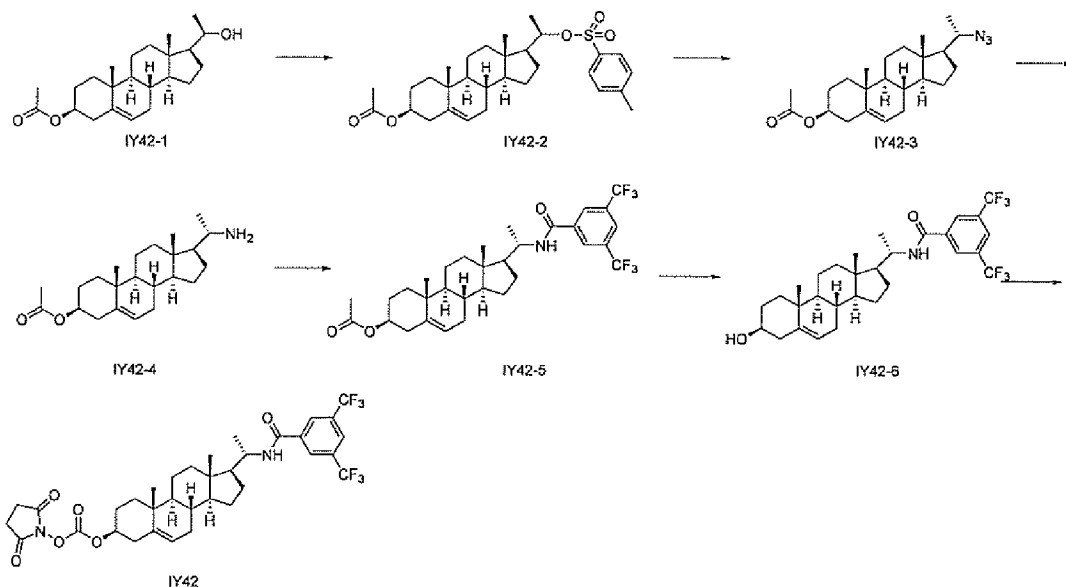
[0297] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.66 (4H, s), 0.73–2.07 (47H, m), 4.72 (1H, dd, $J = 11.2, 4.2$ Hz), 7.36 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 8.28 (2H, d, $J = 8.3$ Hz).

[0298] 参考例42

IY42の合成

[化98]



A) IY42-2の合成

IY42-1 (3.03 g)のピリジン溶液(30 mL)にp-トルエンスルホニルクロリド(2.40 g)を室温に加えた。反応混合物を3時間攪拌した後、p-トルエンスルホニルクロリド(2.40 g)を加え、終夜攪拌した。反応混合物に1規定塩酸水溶液を室温に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をジイソプロピルエーテルで洗浄し標題化合物を1.45g得た。粗生成物は精製せずに次の工程に用いた。

[0299] B) IY42-3の合成

工程Aで得られたIY42-2 (377 mg)のDMF (3 mL)にアジ化ナトリウム(238 mg)を室温に加え、70度で4時間攪拌した。反応混合物を水に室温に加え、酢酸

エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をジイソプロピルエーテルで洗浄し標題化合物を310 mg得た。粗生成物は精製せずに次の工程に用いた。

[0300] C) IY42-5の合成

工程Bで得られたIY42-3 (493 mg)のTHF (10 mL)と水 (1 mL)の混合溶媒にポリマー担持トリフェニルホスフィン (3 mmol/g) (1.32 g)を加え、70°Cで3時間攪拌した。不溶固体をろ過し、さらに酢酸エチルで洗浄した。ろ液に飽和食塩水を加え、有機層を分離、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をピリジン(10 mL)に溶解させ、3,5-ビス(トリフルオロメチル)-ベンゾイル クロリド (0.241 mL)を室温に加えた。反応混合物を終夜攪拌後、1規定塩酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水、次いで飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を370 mg得た。

[0301] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.81 (3H, s), 0.94–1.74 (22H, m), 1.74–2.12 (5H, m), 2.33 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 4.20–4.38 (1H, m), 4.62 (1H, brs), 5.39 (1H, brs), 5.96 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 8.00 (1H, s), 8.16 (2H, s).

[0302] D) IY42-6の合成

工程Cで得られたIY49-5 (370 mg)をメタノール(3 mL)–THF (3 mL)に溶解後、炭酸カリウム(256 mg)を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物の溶媒を留去して得られた残渣に1規定塩酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。水層を0°Cで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、水、次いで飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を183 mg得た。

[0303] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.80 (3H, s), 0.90–2.12 (25H, m), 2.16–2.65 (2H, m), 3.53 (1H, brs), 4.25 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 5.36 (1H, brs), 6.08 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.99 (1H, s), 8.16 (2H, s).

[0304] E) IY42の合成

工程Dで得られたIY42-6を用いて参考例19と同様の方法により標題化合物を合成した。

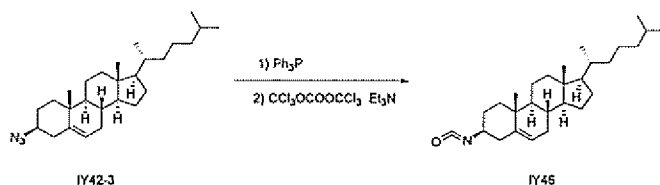
[0305] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.81 (3H, s), 0.90–1.24 (7H, m), 1.32 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.41–2.16 (14H, m), 2.49 (2H, d, $J = 7.0$ Hz), 2.84 (4H, s), 4.27 (1H, s), 4.62 (1H, s), 5.42 (1H, d, $J = 4.7$ Hz), 5.92 (1H, d, $J = 9.4$ Hz), 8.00 (1H, s), 8.15 (2H, s).

[0306] 参考例46

IY46の合成

[化99]



[0307] 参考例42の工程Bで得られたIY42-3 (830 mg)とトリフェニルホスフィン(577 mg)のTHF(10mL)と水(1mL)の混合物を70℃で1時間攪拌した。反応混合物を1規定塩酸水溶液に加え、不溶性固体をろ取した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣にTHF (20 mL)、トリエチルアミン (0.562 mL)、及びトリホスゲン(598 mg)を0℃で加え、室温で終夜攪拌した。反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を0℃で加えて中和し、酢酸エチルとTHFの混合溶媒で抽出した。有機層を分離し、水、次いで飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を485 mg得た。

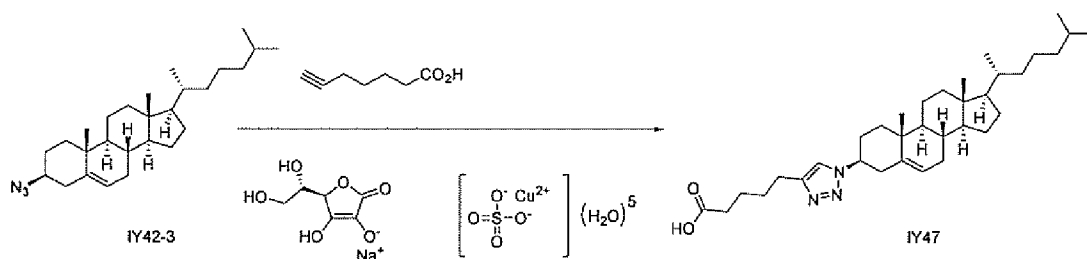
[0308] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.67 (3H, s), 0.78–2.12 (38H, m), 2.35 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 3.24 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 5.37 (1H, d, $J = 5.1$ Hz).

[0309] 参考例47

IY47の合成

[化100]



[0310] 参考例42の工程Bで得られたIY42-3 (570 mg)、ヘプタ-6-イン酸(0.226 mL)、硫酸銅(II)5水和物(346 mg)、エタノール(5 mL)、水(5 mL)とTHF (10 mL)の混合物にアスコルビン酸ナトリウム(1920 mg)を室温に加え、終夜撹拌した。不溶固体をろ過し、ろ液の溶媒を減圧下留去した。残渣に1規定塩酸水溶液を加え、酢酸エチル-THF(4:1)を加えた。有機層を分離し、水、次いで飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を188 mg得た。

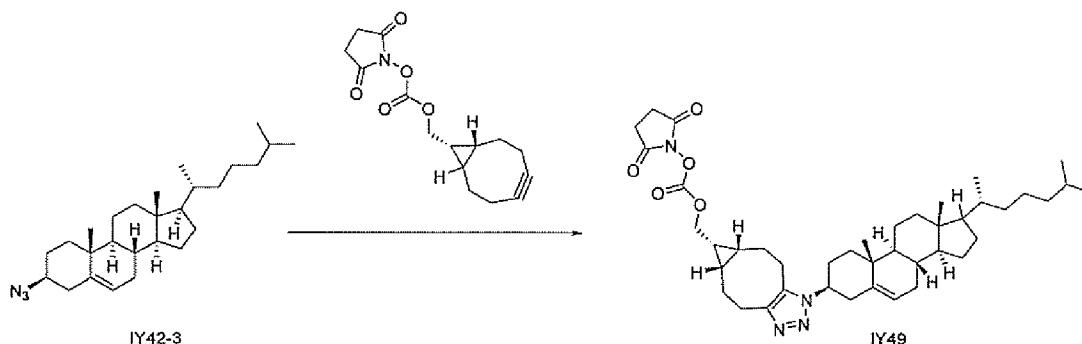
[0311] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.69 (3H, s), 0.79–2.19 (43H, m), 2.27–2.89 (6H, m), 4.34 (1H, brs), 5.45 (1H, brs), 7.32 (1H, s).

[0312] 参考例49

IY49の合成

[化101]



[0313] 参考例42の工程Bで得られたIY42-3 (200 mg)と(1R, 9S)-ビスクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル (2,5-ジオキソピロリジン-1-イル) カルボナート(142 mg)とTHF(15 mL)の混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を水に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン)で精製して標題化合物を134 mg得た。

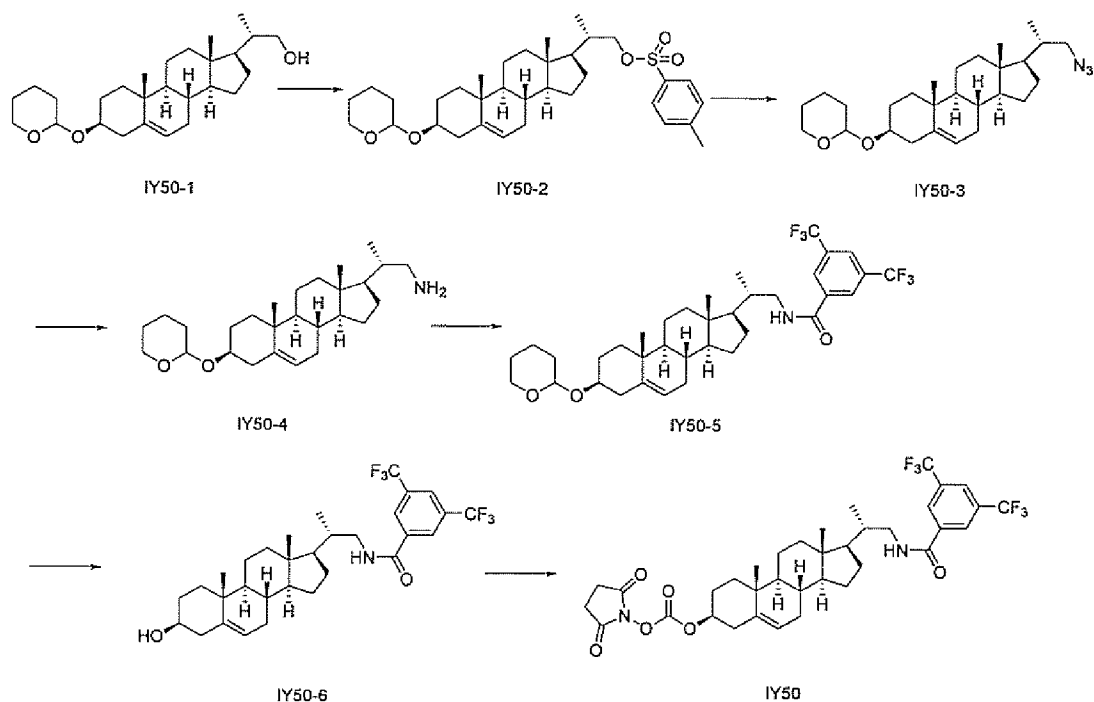
[0314] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) - 0.70 (3H, s), 0.80-1.66 (36H, m), 1.70-2.12 (6H, m), 2.17-2.51 (4H, m), 2.68 (1H, ddt, J = 16.0, 10.0, 3.2 Hz), 2.85 (4H, s), 2.89-3.27 (4H, m), 4.01 (1H, tt, J = 12.2, 3.9 Hz), 4.29-4.44 (1H, m), 4.47-4.61 (1H, m), 5.42 (1H, d, J = 1.9 Hz).

[0315] 参考例50

IY50の合成

[化102]



[0316] A) IY50-2の合成

IY50-1 (1.02 g) を出発原料として、参考例42の工程Aと同様の方法により標題化合物を825 mg得た。

[0317] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.64 (3H, s), 0.81–2.39 (33H, m), 2.45 (3H, s), 3.50 (2H, brs), 3.67–4.06 (3H, m), 4.71 (1H, brs), 5.33 (1H, brs), 7.34 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.78 (2H, d, $J = 7.9$ Hz).

[0318] B) IY50-3の合成

工程Aで得られたIY50-2 (411 mg) を出発原料として、参考例42の工程Bと同様の方法により標題化合物を258 mg得た。

[0319] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.69 (3H, s), 0.82–2.43 (33H, m), 3.04 (1H, dd, $J = 11.8, 7.4$ Hz), 3.28–3.68 (3H, m), 3.81–4.03 (1H, m), 4.72 (1H, brs), 5.35 (1H, brs).

[0320] C) IY50-5の合成

工程Bで得られたIY50-3 (258 mg)を出発原料として、参考例42の工程Cと同様の方法により標題化合物を190 mg得た。

[0321] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.73 (3H, s), 0.87–1.43 (22H, m), 1.63–2.14 (8H, m), 2.37 (1H, s), 3.03–4.03 (7H, m), 4.72 (1H, brs), 5.36 (1H, s), 6.13 (1H, s), 8.01 (1H, s), 8.20 (2H, s).

[0322] D)IY50-6の合成

工程Cで得られたIY50-5 (190 mg)、パラトルエンスルホン酸ピリジニウム (101 mg)とメタノール(5 mL)の混合物を加熱還流下1時間攪拌した。減圧条件下溶媒を留去し、残渣を水に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去し、標題化合物を170 mgを得た。粗生成物は精製せずに次の工程に用いた。

[0323] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.74 (3H, s), 0.86–2.45 (28H, m), 3.10–3.33 (1H, m), 3.41–3.69 (2H, m), 5.35 (1H, brs), 6.15 (1H, brs), 8.01 (1H, s), 8.20 (2H, s).

[0324] E)IY50の合成

工程Dで得られたIY53-6を用いて参考例19と同様にして標題化合物を得た。

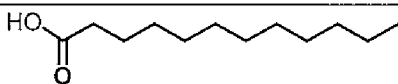
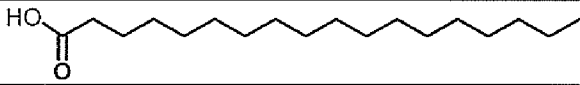
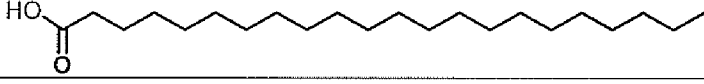
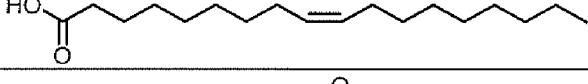
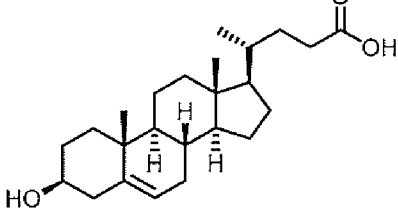
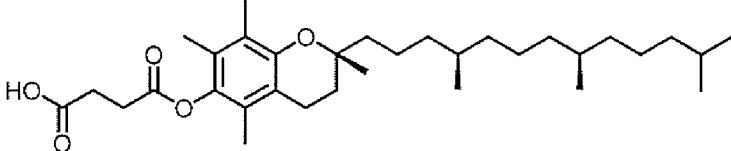
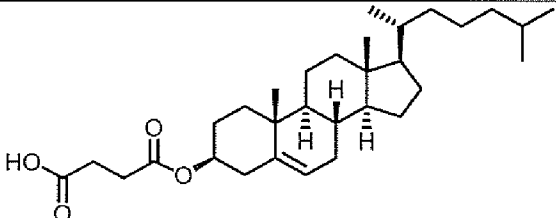
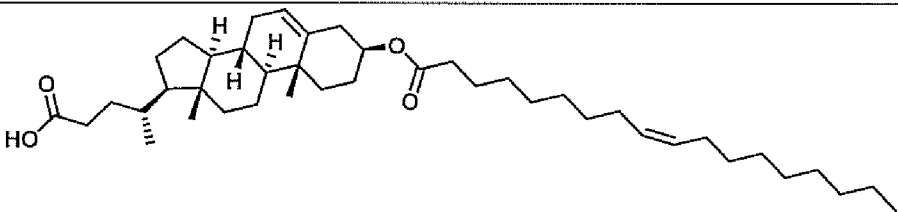
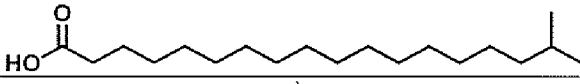
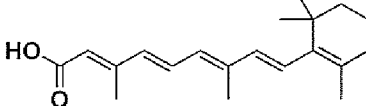
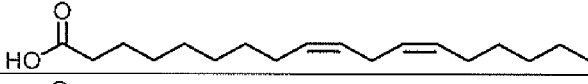
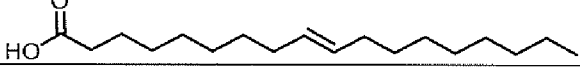
[0325] 得られた化合物のNMRの結果は以下の通りである。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.74 (3H, s), 0.88–2.21 (25H, m), 2.49 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 2.84 (4H, s), 3.09–3.32 (1H, m), 3.59 (1H, d, $J = 12.8$ Hz), 4.60 (1H, brs), 5.43 (1H, brs), 6.15 (1H, brs), 8.01 (1H, s), 8.20 (2H, s).

[0326] その他の実施例で用いる化合物を下表に示した。それぞれ市販品をそのまま用いてもよく、また、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法により製造することもできる。

[0327]

[表6]

化合物名	構造式
IY2	
IY3	
IY4	
IY5	
IY6	
IY12	
IY13	
IY26	
IY45	
IY53	
IY54	
IY55	
IY57	

[0328] 実施例 1

A) 5' 末端にY1-を結合させたcRNA(Y1-cRNA(Mal at1))の合成

IY1の50 mM NMP溶液(800 μ L)、HATUの75 mM NMP溶液(800 μ L)、DIPEA の150 mM NMP溶液(800 μ L)をエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で30分反応させた。そこに、表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液(2000 nmol)、NMP(2100 μ L)、蒸留水 (153 μ L)、DIPEA (63 μ L) を加え、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Pur i f-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液に1 M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を690 nmol得た。B) 二本鎖核酸剤Y1-HD0の合成

転移関連肺腺癌転写産物 (Malat1) ノンコーディングRNAを標的とする16merの一本鎖LNA/DNAギャップマー (AS0(Mal at1)) は、5' 末端の3個及び3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、並びにそれらの間の10個のDNAヌクレオシドを含む。このLNA/DNAギャップマーは、マウスのMalat1ノンコーディングRNA (GenBa nkアクセッション番号NR_002847、配列番号3) の1316~1331に相補的な塩基配列を有する。AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY1-cRNA(Mal at1) (第2鎖) とを等モル量で混合し、混合液を70℃で5分加熱した。その後室温に徐冷し、上記の二本鎖核酸剤であるY1結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y1-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y1-HD0) を調製した。

[0329] 実施例 3

A) 5' 末端にY3-を結合させたcRNA(Y3-cRNA(Mal at1))の合成

IY3の50 mM DMSO溶液(240 μ L)、HATUの75 mM NMP溶液 (240 μ L)、DIPEA (240 μ L) の150 mM NMP溶液(240 μ L)をエッペン中で混合し、攪拌、沈降し

た後、室温で15分反応させた。そこに、表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液(253 μ L, 1200 nmol)、DMSO(1980 μ L)、蒸留水 (47.4 μ L)、DIPEA (38 μ L) を加え、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。反応液をNMP濃度が10v/v%になるように蒸留水で希釈した後、酢酸エチルで抽出し、水層を限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により精製した。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を定量的に得た。

B) 二本鎖核酸剤Y3-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY3-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY3結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y3-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y3-HD0) を調製した。

[0330] 実施例4

A) 5' 末端にY4-を結合させたcRNA(Y4-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (2000 nmol) 及びIY4を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を590 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y4-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY4-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY4結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y4-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y4-HD0) を調製した。

[0331] 実施例5

A) 5' 末端にY5-を結合させたcRNA(Y5-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (1000 nmol) 及びIY5を用いて実施例3の工程Aと同様にして標題化合物を776 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y5-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY5-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY5結合型ヘテロ

二重鎖オリゴヌクレオチド (Y5-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y5-HD0) を調製した。

[0332] 実施例 6

A) 5' 末端にY6-を結合させたcRNA(Y6-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (1000 nmol) 及びIY6を用いて実施例 3 の工程Aと同様にして標題化合物を880 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y6-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY6-cRNA(Mal at1) (第 2 鎖) を用いて、実施例 1 の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY6結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y6-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y6-HD0) を調製した。

[0333] 実施例 7

A) 5' 末端にY7-を結合させたcRNA(Y7-cRNA(Mal at1))の合成

IY7の50 mM NMP溶液(1200 μ L)、HATUの75 mM NMP溶液(1200 μ L)、DIPEAの150 mM NMP溶液(1200 μ L)をエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で30分反応させた。そこに、表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液(548 μ L, 3000 nmol)、NMP(3150 μ L)、蒸留水 (202 μ L)、DIPEA (94 μ L)を加え、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液を凍結乾燥した後、蒸留水で溶解することにより、標題化合物を780 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y7-HD0の合成

転移関連肺腺癌転写産物 (Mal at1) ノンコーディングRNAを標的とする16merの一本鎖LNA/DNAギャップマー (AS0(Mal at1)) は、5' 末端の3個及び3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、並びにそれらの間の10個のDNAヌクレオシドを含む。このLNA/DNAギャップマーは、マウスのMal at1ノンコーディングRNA (GenBankアクセッション番号NR_002847、配列番号3) の1316~1331に相補的な塩基

配列を有する。AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY1-cRNA(Malat1) (第2鎖) とを等モル量で混合し、混合液を70℃で5分加熱した。その後、混合液を室温に徐冷した。さらにBT AG 50W-X8 Resinを用いてナトリウム塩へとイオン交換した後、凍結乾燥し蒸留水を加えることで二本鎖核酸剤であるY7結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y1-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y7-HD0) を調製した。

[0334] 実施例 8

A) 5' 末端にY8-を結合させたcRNA(Y8-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (3000 nmol) 及びIY8を用いて実施例7の工程Aと同様にして標題化合物を630 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y8-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY8-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例7の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY8結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y8-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y8-HD0) を調製した。

[0335] 実施例 9

A) 5' 末端にY9-を結合させたcRNA(Y9-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(260 μ L, 1500 nmol)にIY9の50 mM NMP溶液(900 μ L)、蒸留水(190 μ L)、NMP(2100 μ L)、Borate Buffer, pH 8.5+/-0.2, 5X Concentrate (375 μ L)、の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で、2時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液を凍結乾燥し、標題化合物を578 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y9-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY9-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例7の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY9結合型ヘテロ

二重鎖オリゴヌクレオチド (Y9-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y9-HD0) を調製した。

[0336] 実施例 1 0

A) 5' 末端にY10-を結合させたcRNA(Y10-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(421 μ L, 2000 nmol)にIY10の50 mM NMP溶液(800 μ L)、蒸留水(79 μ L)、NMP(3200 μ L)、Borate Buffer, pH 8.5+/-0.2, 5X Concentrate (500 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で1時間反応させた。反応液をNMP濃度が10v/v%になるように蒸留水で希釈した後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により濃縮及びNMP等の低分子試薬の除去を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を1185 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y10-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY10-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY10結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y10-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y10-HD0) を調製した。

[0337] 実施例 1 1

A) 5' 末端にY11-を結合させたcRNA(Y11-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(173.5 μ L, 1000 nmol)にIY11の50 mM NMP溶液(400 μ L)、蒸留水(76.5 μ L)、NMP(1600 μ L)、 $\times 10$ PBS (250 μ L)、DIPEA (31 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、70°Cで、1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液に1 M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理

行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を592 nmol得た。B) 二本鎖核酸剤Y11-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY11-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY11結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y11-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y11-HD0) を調製した。

[0338] 実施例1 2

A) 5' 末端にY12-を結合させたcRNA(Y12-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (3000 nmol) 及びIY12を用いて実施例7の工程Aと同様にして標題化合物を1770 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y12-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY12-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例7の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY12結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y12-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y12-HD0) を調製した。

[0339] 実施例1 3

A) 5' 末端にY13-を結合させたcRNA(Y13-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (3000 nmol) 及びIY13を用いて実施例7工程Aと同様にして標題化合物を1230 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y13-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY13-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例7の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY13結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y13-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y13-HD0) を調製した。

[0340] 実施例1 4

A) 5' 末端にY14-を結合させたcRNA(Y14-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (3000 nmol) 及びIY14を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を1650 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y14-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY14-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY14結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y14-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y14-HD0) を調製した。

[0341] 実施例 1 5

A) 5' 末端にY15-を結合させたcRNA(Y15-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (210 μ l nmol, 1000 nmol) 及びIY15を用いて実施例3の工程Aと同様にして標題化合物を900 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y15-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY15-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY15結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y15-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y15-HD0) を調製した。

[0342] 実施例 1 6

A) 5' 末端にY16-を結合させたcRNA(Y16-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (176 μ L, 1000 nmol) 及びIY16を用いて実施例11の工程Aと同様にして標題化合物を532 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y16-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY16-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY16結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y16-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y16-HD0) を調製した。

[0343] 実施例 1 7

A) 5' 末端にY17-を結合させたcRNA(Y17-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (176 μ L, 1000 nmol) 及びIY17を用いて実施例11の工程Aと同様にして標題化合物を686 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y17-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY17-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY17結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y17-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y17-HD0) を調製した。

[0344] 実施例18

A) 5' 末端にY18-を結合させたcRNA(Y18-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (274 μ L, 1500 nmol) 及びIY18を用いて実施例3の工程Aと同様にして標題化合物を1398 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y18-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY18-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY18結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y18-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y18-HD0) を調製した。

[0345] 実施例19

A) 5' 末端にY19-を結合させたcRNA(Y19-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(210.5 μ L, 1000 nmol)にIY19の50 mM NMP溶液(400 μ L)、蒸留水(39.5 μ L)、NMP(1600 μ L)、 $\times 10$ PBS (250 μ L)、DIPEA (31 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。反应用液をNMP濃度が10v/v%になるように蒸留水で希釈した後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により濃縮及びNMP等の低分子試薬の除去を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を927 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y19-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY19-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY19結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y19-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y19-HD0) を調製した。

[0346] 実施例 2 0

A) 5' 末端にY20-を結合させたcRNA(Y20-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (260 μ L, 1500 nmol) 及びIY19を用いて実施例 1 1 の工程Aと同様にして標題化合物を686 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y20-HD0の合成

AS0(Malat1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY20-cRNA(Malat1) (第 2 鎖) を用いて、実施例 1 の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY20結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y20-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y20-HD0) を調製した。

[0347] 実施例 2 1

A) 5' 末端にY21-を結合させたcRNA(Y21-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(260 μ L, 1500 nmol)にIY21の50 mM NMP溶液(300 μ L)、蒸留水(115 μ L)、NMP(2400 μ L)、 $\times 10$ PBS (375 μ L)、50 mM DMAP (300 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、70°Cで、1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を917 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y21-HD0の合成

AS0(Malat1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY21-cRNA(Malat1) (第 2 鎖) を用いて、実施例 1 の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY21結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y21-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y21-HD0) を調製した。

[0348] 実施例 2 2

A) 5' 末端にY22-を結合させたcRNA(Y22-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (365 μ L, 2000 nmol) 及びIY22を用いて実施例 2 1 の工程Aと同様にして標題化合物を1253 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y22-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY22-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY22結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y22-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y22-HD0) を調製した。

[0349] 実施例23

A) 5'末端にY23-を結合させたcRNA(Y23-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(382 μ L, 2200 nmol)にIY23の50 mM NMP溶液(440 μ L)、蒸留水(168 μ L)、NMP(3520 μ L)、 $\times 10$ PBS (550 μ L)、50 mM DMAP (440 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、70°Cで、1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液を1000 μ Lに蒸留水で希釈し、蒸留水(200 μ L)、NMP(400 μ L)、メタノール (4400 μ L) 、50 mM フッ化水素のDMSO溶液(2000 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。反応液に300 mMトリメチルエトキシシランのDMSO溶液 (2000 μ L)を加えた。反応混合物をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を1114 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y23-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY23-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例7の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY23結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y23-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y23-HD0) を調製した。

[0350] 実施例24

A) 5' 末端にY24-を結合させたcRNA(Y24-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (174 μ L, 1000 nmol) 及びIY24を用いて実施例21の工程Aと同様にして標題化合物を870 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y24-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY24-cRNA(Mal at1) (第2鎖) を用いて、実施例7の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY24結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y24-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y24-HD0) を調製した。

[0351] 実施例 2 5

A) 5' 末端にY25-を結合させたcRNA(Y25-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (274 μ L, 1500 nmol) 及びIY25を用いて実施例11の工程Aと同様にして標題化合物を760 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y25-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY25-cRNA(Mal at1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY25結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y25-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y25-HD0) を調製した。

[0352] 実施例 2 6

A) 5' 末端にY26-を結合させたcRNA(Y26-cRNA(Mal at1))の合成

IY26の50 mM THF溶液(400 μ L)、HATUの75 mM NMP溶液(400 μ L)、DIPEAの150 mM NMP溶液(400 μ L)をエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で30分反応させた。そこに、表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液(315 μ L, 2000 nmol)、NMP(1450 μ L)、THF(1850 μ L)、蒸留水 (184 μ L)、DIPEA (63 μ L) を加え、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。さらに、IY26の50 mM THF溶液(400 μ L)、HATUの75 mM NMP溶液(400 μ L)、DIPEAの150 mM NMP溶液(400 μ L)をファルコンチューブ中で混合し15分静置した後に、反応液に合わせ、DIPEA (125 μ L) を加え室温で2時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光

サイエンス製、移動相：TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液に1 M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。最終物を0.20 μm のメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を237 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y26-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY26-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY26結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y26-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y26-HD0) を調製した。

[0353] 実施例27

A) 5' 末端にY27-を結合させたcRNA(Y27-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (312 μL , 2000 nmol) 及びIY27を用いて実施例11の工程Aと同様にして標題化合物を705 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y27-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY27-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY27結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y27-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y27-HD0) を調製した。

[0354] 実施例28

A) 5' 末端にY28-を結合させたcRNA(Y28-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (346 μL , 2530 nmol) 及びIY28を用いて実施例11の工程Aと同様にして標題化合物を1046 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y28-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY28-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY28結合型ヘ

テロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y28-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y28-HD0) を調製した。

[0355] 実施例 29

A) 5' 末端にY29-を結合させたcRNA(Y29-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y62-cRNA(Malat1))の水溶液 (369 μ L, 1500 nmol) 及びIY29を用いて実施例 21 の工程Aと同様にして標題化合物を903nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y29-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY29-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例 7 の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY29結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y29-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y29-HD0) を調製した。

[0356] 実施例 30

A) 5' 末端にY30-を結合させたcRNA(Y30-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y63-cRNA(Malat1))の水溶液 (358 μ L, 1500 nmol) 及びクロロギ酸コレステロールを用いて実施例 11 の工程Aと同様にして標題化合物を1228 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y30-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY30-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例 1 の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY30結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y30-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y30-HD0) を調製した。

[0357] 実施例 31

A) 5' 末端にY31-を結合させたcRNA(Y31-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y64-cRNA(Malat1))の水溶液 (355 μ L, 1400 nmol) 及びIY29を用いて実施例 21 の工程Aと同様にして標題化合物を657 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y31-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY31-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例 7 の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY31結合型ヘ

テロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y31-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y31-HD0) を調製した。

[0358] 実施例 3 2

A) 5' 末端にY32-を結合させたcRNA(Y32-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (315 μ L, 2000 nmol) 及びIY32を用いて実施例 1 1 の工程Aと同様にして標題化合物を864 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y32-HD0の合成

AS0(Malat1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY32-cRNA(Malat1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY32結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y32-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y32-HD0) を調製した。

[0359] 実施例 3 3

A) 5' 末端にY33-を結合させたcRNA(Y33-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(365 μ L, 2000 nmol)にIY33の50 mM NMP溶液(400 μ L)、蒸留水(135 μ L)、NMP(3200 μ L)、 $\times 10$ PBS (500 μ L)、50 mM DMAP (400 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、70°Cで、1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液に1 M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を963 nmol得た。B) 二本鎖核酸剤Y33-HD0の合成

AS0(Malat1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY33-cRNA(Malat1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY33結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y33-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y33-HD0) を調製した。

[0360] 実施例 3 4

A) 5' 末端にY34-を結合させたcRNA(Y34-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (365 μ L, 2000 nmol) 及びIY34を用いて実施例 3 3 の工程Aと同様にして標題化合物を1083 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y34-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY34-cRNA(Mal at1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY34結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y34-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y34-HD0) を調製した。

[0361] 実施例 3 5

A) 5' 末端にY35-を結合させたcRNA(Y35-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (315 μ L, 2000 nmol) を用いて実施例 3 3 の工程Aと同様にして標題化合物を830 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y35-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY35-cRNA(Mal at1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY35結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y35-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y35-HD0) を調製した。

[0362] 実施例 3 6

A) 5' 末端にY36-を結合させたcRNA(Y36-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (329 μ L, 2000 nmol) 及びIY36を用いて実施例 3 3 の工程Aと同様にして標題化合物を830 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y36-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY36-cRNA(Mal at1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY36結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y36-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y36-HD0) を調製した。

[0363] 実施例 3 7

A) 5' 末端にY37-を結合させたcRNA(Y37-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (400 μ L, 2000 nmol) 及びIY37を用いて実施例33の工程Aと同様にして標題化合物を1189 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y37-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY37-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY37結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y37-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y37-HD0) を調製した。

[0364] 実施例38

A) 5' 末端にY38-を結合させたcRNA(Y38-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (329 μ L, 2000 nmol) 及びIY38を用いて実施例33の工程Aと同様にして標題化合物を1032 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y38-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY38-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY38結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y38-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y38-HD0) を調製した。

[0365] 実施例39

A) 5' 末端にY39-を結合させたcRNA(Y39-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(329 μ L, 2000 nmol)にIY39の50 mM NMP溶液(800 μ L)、蒸留水(270 μ L)、NMP(2800 μ L)、Borate Buffer, pH 8.5+/-0.2, 5X Concentrate (500 μ L)、の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。さらに、IY39の50 mM NMP溶液(400 μ L)を追加して室温で1時間反応させた。さらに、IY39の50 mM NMP溶液(400 μ L)、Borate Buffer, pH 8.5+/-0.2, 5X Concentrate (100 μ L)を追加して室温で終夜反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、

蒸留水)により脱塩処理を行った。得られた溶液に1 M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水)により脱塩処理を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を1554 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y39-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖)と前工程Aで得られたY39-cRNA(Malat1) (第2鎖)を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY39結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y39-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y39-HD0)を調製した。

[0366] 実施例 4 0

A) 5' 末端にY40-を結合させたcRNA(Y40-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (364 μ L, 2000 nmol) 及びIY40を用いて実施例39の工程Aと同様にして標題化合物を607 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y40-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖)と前工程Aで得られたY40-cRNA(Malat1) (第2鎖)を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY40結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y40-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y40-HD0)を調製した。

[0367] 実施例 4 1

A) 5' 末端にY41-を結合させたcRNA(Y41-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (329 μ L, 2000 nmol) 及びIY41を用いて実施例39の工程Aと同様にして標題化合物を1400 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y41-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖)と前工程Aで得られたY41-cRNA(Malat1) (第2鎖)を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY41結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y41-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y41-HD0)を調製した。

[0368] 実施例 4 2

A) 5' 末端にY42-を結合させたcRNA(Y42-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (365 μ L, 2000 nmol) 及びIY42を用いて実施例 3 9 の工程Aと同様にして標題化合物を1061 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y42-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY42-cRNA(Mal at1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY42結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y42-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y42-HD0) を調製した。

[0369] 実施例 4 3

A) 5' 末端にY43-を結合させたcRNA(Y43-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (329 μ L, 2000 nmol) 及びIY43を用いて実施例 3 9 の工程Aと同様にして標題化合物を820 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y43-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY43-cRNA(Mal at1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY43結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y43-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y43-HD0) を調製した。

[0370] 実施例 4 4

A) 5' 末端にY44-を結合させたcRNA(Y44-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (329 μ L, 2000 nmol) 及びIY44を用いて実施例 3 9 の工程Aと同様にして標題化合物を969 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y44-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第 1 鎖) と前工程Aで得られたY44-cRNA(Mal at1) (第 2 鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY44結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y44-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y44-HD0) を調製した。

[0371] 実施例 4 5

A) 5' 末端にY45-を結合させたcRNA(Y45-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (164 μ L, 1000 nmol) 及びIY45を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を653 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y45-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY45-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY45結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y45-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y45-HD0) を調製した。

[0372] 実施例 4 6

A) 5' 末端にY46-を結合させたcRNA(Y46-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA (Malat1))の水溶液(312 μ L, 2000 nmol)にIY46の50 mM NMP溶液(400 μ L)、蒸留水(188 μ L)、NMP(3200 μ L)、 $\times 10$ PBS (500 μ L)、50 mM DMAP (400 μ L)の順にエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、70 $^{\circ}$ Cで、1時間反応させた。さらに、IY46の50 mM NMP溶液(400 μ L)及び50 mM DMAP (400 μ L)を加え、70 $^{\circ}$ Cで1時間、室温で終夜反応させた。さらに、IY46の50 mM NMP溶液(400 μ L)及び150 mM DIPEA (400 μ L)を加えて70 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack(登録商標)-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセトニトリル)にて精製し、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。得られた溶液に1 M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により脱塩処理を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を980 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y46-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY46-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY46結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y46-conjugated heteroduplex oligonucleotide

de、Y46-HD0) を調製した。

[0373] 実施例 4 7

A) 5' 末端にY47-を結合させたcRNA(Y47-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (315 μ L, 2000 nmol) 及びIY47を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を569nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y47-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY47-cRNA(Mal at1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY47結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y47-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y47-HD0) を調製した。

[0374] 実施例 4 8

A) 5' 末端にY48-を結合させたcRNA(Y48-cRNA(Mal at1))の合成

IY48の50 mM NMP溶液(800 μ L)、HATUの75 mM NMP溶液(800 μ L)、DIPEAの150 mM NMP溶液(800 μ L)をエッペン中で混合し、攪拌、沈降した後、室温で30分反応させた。そこに、表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液(2000 nmol)、NMP(2100 μ L)、蒸留水 (153 μ L)、DIPEA (63 μ L) を加え、攪拌、沈降した後、室温で、1時間反応させた。反应用液をNMP濃度が10v/v%になるように蒸留水で希釈した後、限外ろ過 (Amicon ultra 3kDa、メルクミリポア社製、蒸留水) により濃縮及びNMP等の低分子試薬の除去を行った。最終物を0.20 μ mのメンブレンフィルターでfiltrationし、凍結乾燥後、標題化合物を1085 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y48-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY48-cRNA(Mal at1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY48結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y48-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y48-HD0) を調製した。

[0375] 実施例 4 9

A) 5' 末端にY49-を結合させたcRNA(Y49-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (329 μ L, 2000 nmol) 及びI Y49を用いて実施例39の工程Aと同様にして標題化合物を1176 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y49-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY49-cRNA(Mal at1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY49結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y49-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y49-HD0) を調製した。

[0376] 実施例50

A) 5' 末端にY50-を結合させたcRNA(Y50-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (315 μ L, 2000 nmol) 及びI Y50を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を674 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y50-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY50-cRNA(Mal at1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY50結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y50-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y50-HD0) を調製した。

[0377] 実施例51

A) 5' 末端にY51-を結合させたcRNA(Y51-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (315 μ L, 2000 nmol) 及びI Y51を用いて実施例39の工程Aと同様にして標題化合物を827 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y51-HD0の合成

AS0(Mal at1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY51-cRNA(Mal at1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY51結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y51-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y51-HD0) を調製した。

[0378] 実施例52

A) 5' 末端にY52-を結合させたcRNA(Y52-cRNA(Mal at1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Mal at1))の水溶液 (164 μ L, 1000 nmol) 及びI

Y52を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を653 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y52-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY52-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY52結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y52-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y52-HD0) を調製した。

[0379] 実施例5 3

A) 5' 末端にY53-を結合させたcRNA(Y53-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (313 μ L, 2000 nmol) 及びIY53を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を865 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y53-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY53-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY53結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y53-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y53-HD0) を調製した。

[0380] 実施例5 4

A) 5' 末端にY54-を結合させたcRNA(Y54-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (313 μ L, 2000 nmol) 及びIY54を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を1165 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y54-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY54-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY54結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y54-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y54-HD0) を調製した。

[0381] 実施例5 5

A) 5' 末端にY55-を結合させたcRNA(Y55-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (313 μ L, 2000 nmol) 及びIY55を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を1401 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y55-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY55-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY55結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y55-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y55-HD0) を調製した。

[0382] 実施例 5 7

A) 5' 末端にY57-を結合させたcRNA(Y57-cRNA(Malat1))の合成

表1に示すRNA鎖(Y61-cRNA(Malat1))の水溶液 (394 μ L, 2500 nmol) 及びIY57を用いて実施例1の工程Aと同様にして標題化合物を641 nmol得た。

B) 二本鎖核酸剤Y57-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と前工程Aで得られたY57-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY57結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y57-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y57-HD0) を調製した。

[0383] 実施例 5 8

二本鎖核酸剤Y59-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と表1に示すY59-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY59結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y59-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y59-HD0) を調製した。

[0384] 実施例 5 9

二本鎖核酸剤Y60-HD0の合成

AS0(Malat1) (第1鎖) と表1に示すY60-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるY60結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Y60-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Y60-HD0) を調製した。

[0385] 実施例 6 0

二本鎖核酸剤Chol-HD0の合成

ASO(Malat1) (第1鎖) と表1に示すChol-cRNA(Malat1) (第2鎖) を用いて、実施例1の工程Bと同様にして、二本鎖核酸剤であるChol結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Chol-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Chol-HD0) を調製した。

[0386] 実施例 6 1

(A) in vivo実験

実験動物には、7週齢の雄性C57BL/6Jマウス (日本チャールズリバー) を使用し、一群あたり2-4匹を実験に供した。実験群では、核酸を含む溶液をマウスの尾静脈から5mL/kgの投与量で静脈内に単回投与した。また、比較対象群では、核酸溶液の調製に用いた溶媒 (5%ブドウ糖液) を実験群と同様の手順でマウスに静脈内投与した。

[0387] (B) 発現解析

核酸溶液投与して72時間後に、ペントバルビタールを50mg/kgで前記マウスに腹腔内投与によって麻酔して、採血及び屠殺し、脳(大脳皮質)を摘出した。脳組織からの全RNA抽出は、RNA抽出用試薬ISOGEN (ニッポン・ジーン社) を用いた。ISOGEN溶液中で摘出した脳組織を破砕した後、クロロホルムでRNA画分として分離した。その後に、核酸分離システムQuickGene RNA tissue kit SII(倉敷紡績社)で実施した。全RNAからのcDNA合成は、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡社) を用い、THUNDERBIRD qPCR Mix (東洋紡社) による定量PCRを実施した。定量PCRには蛍光プローブ法を採用し、蛍光プローブにはマウスMalat1 (Integrated DNA Technologies社) 及びマウスGapdh (Thermo Fisher Scientific社) を用いた。定量PCRの遺伝子断片増幅反応条件は、上記THUNDERBIRD qPCR Mix (東洋紡社) のプロトコルに従った。マウスMalat1及びGapdh (内部標準遺伝子) の発現量を相対検量線によって算出し、相対発現レベルをMalat1/Gapdhとして計算した。一群あたり2-4匹のマウスの結果から、相対発現レベルの平均値を算出した。比較対象群の相対発現レベルの平均値を100%とした場合の実験群の相対発現レベルの平均値の割合を、相対的Malat1 ncRNA発現レベルとして算出した。

[0388] (C) 結果

実施例61の結果を表7に示す。表中、投与量はAS0(Malat1)の量を示す。

[0389] 二本鎖番号1、3～55、57、59及び60は、いずれも大脳皮質におけるMalat1ノンコーディングRNAの発現を抑制した。この結果から、本発明の核酸複合体は、脳に送達され、そこでアンチセンス効果をもたらし得ることが立証された。

[0390]

[表7]

二本鎖番号	投与量	相対的 Malat1 ncRNA 発現レベル
1	50 mg/kg	48%
3	50 mg/kg	82%
4	50 mg/kg	75%
5	50 mg/kg	89%
6	50 mg/kg	85%
7	50 mg/kg	70%
8	50 mg/kg	68%
9	50 mg/kg	90%
10	50 mg/kg	84%
11	50 mg/kg	60%
12	50 mg/kg	86%
13	50 mg/kg	62%
14	50 mg/kg	51%
16	50 mg/kg	66%
17	50 mg/kg	61%
19	50 mg/kg	76%
20	50 mg/kg	78%
59	50 mg/kg	49%
60	50 mg/kg	55%
21	50 mg/kg	90%
22	50 mg/kg	78%
23	50 mg/kg	87%
24	50 mg/kg	73%
25	50 mg/kg	96%
26	50 mg/kg	77%
27	50 mg/kg	67%
28	50 mg/kg	98%
29	50 mg/kg	60%
30	50 mg/kg	71%
31	50 mg/kg	68%
32	50 mg/kg	56%
33	50 mg/kg	62%
34	50 mg/kg	49%
35	50 mg/kg	56%
36	50 mg/kg	72%
37	50 mg/kg	68%
38	50 mg/kg	68%
39	50 mg/kg	61%
40	50 mg/kg	101%
41	50 mg/kg	75%
42	50 mg/kg	62%

43	50 mg/kg	60%
44	50 mg/kg	71%
45	50 mg/kg	79%
46	50 mg/kg	50%
47	50 mg/kg	70%
48	50 mg/kg	75%
49	50 mg/kg	59%
50	50 mg/kg	78%
51	50 mg/kg	62%
52	50 mg/kg	78%
53	50 mg/kg	83%
54	50 mg/kg	75%
55	50 mg/kg	77%
57	50 mg/kg	85%

[0391] 実施例 6 2

(A) in vivo実験

実験動物には、10週齢の雄性C57BL/6Jマウス（日本チャールズリバー）を使用し、一群あたり3匹を実験に供した。実験群では、核酸を含む溶液をマウスの尾静脈から5mL/kgの投与量で静脈内に単回投与した。また、比較対象群では、核酸溶液の調製に用いた溶媒（生理食塩水）を実験群と同様の手順でマウスに静脈内投与した。

[0392] (B) ミクログリア単離

核酸溶液を投与して72時間後に、イソフルラン麻酔下でマウスを開腹し横隔膜を切開して心臓を露出させ、左心室より生理食塩水を注射針にて注入し、右心房を切開して放血させた後、脳を摘出した。脳をNeural Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec社)を用いて、プロトコルに従い酵素処理を行い、Debris Removal Solution (Miltenyi Biotec社)を用いてDebris除去を行い、脳細胞液を調製した。ミクログリアの単離にはCD11b (Microglia) Microbeads (Miltenyi Biotec社)を用いて、プロトコルに従い、脳細胞液からミクログリアを単離した。

[0393] (C) 発現解析

単離したミクログリアからの全RNA抽出は、RNeasy Micro Kit(QIAGEN)を用

いた。全RNAからのcDNA合成は、High Capacity cDNA RT Kit (Thermo Fisher Scientific社) を用い、TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) による定量PCRを実施した。定量PCRには蛍光プローブ法を採用し、蛍光プローブにはマウスMalat1 (Thermo Fisher Scientific社) 及びマウスGapdh (Thermo Fisher Scientific社) を用いた。定量PCRの遺伝子断片増幅反応条件は、上記TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific社) のプロトコルに従った。マウスMalat1及びGapdh (内部標準遺伝子) の発現量を比較Ct法にて算出し、相対発現レベルをMalat1/Gapdhとして計算した。一群あたり3匹のマウスの結果から、相対発現レベルの平均値を算出した。比較対象群の相対発現レベルの平均値を100%とした場合の実験群の相対発現レベルの平均値の割合を、相対的Malat1 ncRNA発現レベルとして算出した。

[0394] (D) 結果

実施例62の結果を表8に示す。表中、投与量はAS0(Malat1)の量を示す。

二本鎖番号58は、ミクログリアにおけるMalat1ノンコーディングRNAの発現を抑制した。この結果から、本発明の核酸複合体は、脳に送達され、ミクログリアにおいてもアンチセンス効果をもたらし得ることが立証された。

[0395] [表8]

二本鎖番号	投与量	相対的 Malat1 ncRNA 発現レベル
58	50 mg/kg	22%

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1]

第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む核酸複合体であって、

該第1核酸鎖は、標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、

該第2核酸鎖は、該第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、

(1) トコフェロール若しくはその類縁体、

(2) コレステロール若しくはその類縁体、又は

(3) 置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルキル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルコキシ基

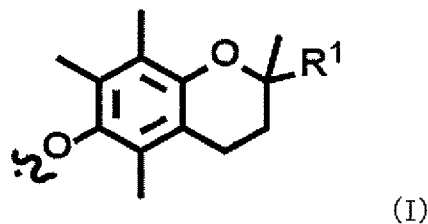
と結合しており、

該第1核酸鎖は、該第2核酸鎖にアニールしている、核酸複合体。

[請求項2]

前記トコフェロール又はその類縁体が、下式 (I) :

[化1]



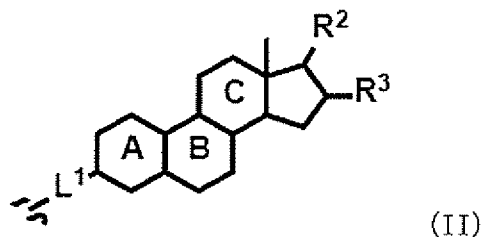
(式中、 R^1 は、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルキル基又は置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ アルケニル基を表す)

で表される、請求項1に記載の核酸複合体。

[請求項3]

前記コレステロール又はその類縁体が、下式 (II)、(V)、(VI)、及び (VII) :

[化2]



(式中、

環Aは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないベンゼンを表し、

環Bは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサジエンを表し、

環Cは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサンを表し、

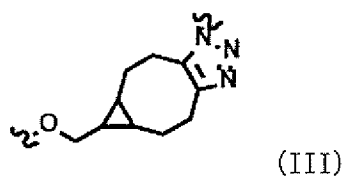
R^2 は、水素原子、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 6}$ アルキル-カルボニル基、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 6}$ アルキル-カルボニル-オキシ基、又はオキシ基を表し、

R^3 は、水素原子を表し、

R^2 及び R^3 は、一緒になって、置換された若しくは置換されていない1, 6-ジオキサスピロ[4. 5]デカン環を形成してもよく、

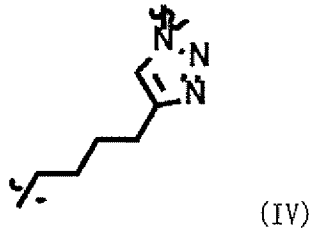
L^1 は、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、

[化3]



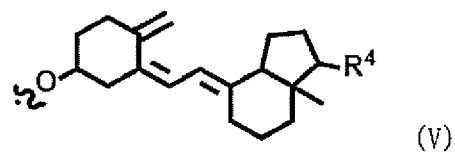
、又は

[化4]



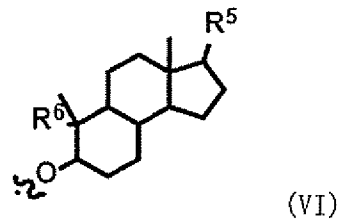
を表す)、

[化5]



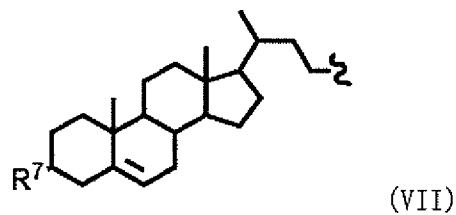
(式中、 R^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ のアルキル基、又は置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim 30$ のアルケニル基を表す)、

[化6]



(式中、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ のアルキル基、又は置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim 30$ のアルケニル基を表す)、並びに

[化7]



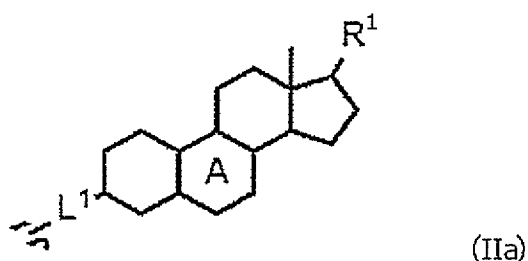
(式中、 R^7 は、ヒドロキシ基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim 30$ アルキル-カルボニル-オキシ基、又は置換された若しく

は置換されていない $C_1 \sim_{30}$ アルケニル-カルボニル-オキシ基を表す)

から成る群より選択される式で表される、請求項1に記載の核酸複合体。

[請求項4] 前記コレステロール又はその類縁体が、下式(IIa)：

[化8]



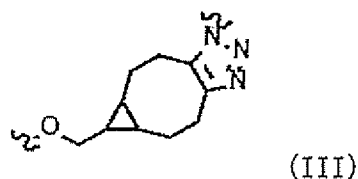
(式中、

環Aは、置換された若しくは置換されていないシクロヘキセン、置換された若しくは置換されていないシクロヘキサン又は置換された若しくは置換されていないシクロヘキサジエンを表し、

R^1 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_{30}$ のアルキル基、置換された若しくは置換されていない $C_2 \sim_{30}$ のアルケニル基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル基、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim_6$ アルキル-カルボニル-オキシ基、又はオキシ基を表し、

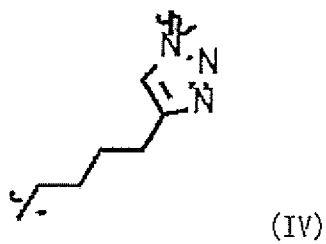
L^1 は、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、

[化9]



、又は

[化10]

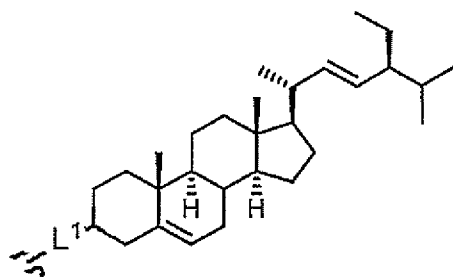


を表す)

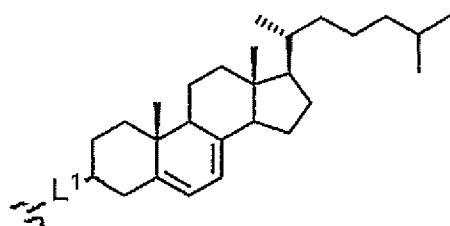
で表される、請求項1に記載の核酸複合体。

[請求項5] 前記コレステロール又はその類縁体が、下式 (IIa-1)、(IIa-2)、(IIa-3)、及び (IIa-4) :

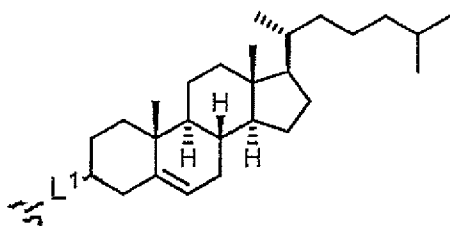
[化11]



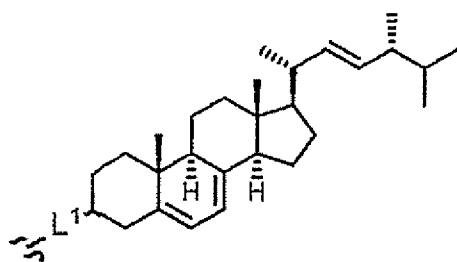
(IIa-1)、



(IIa-2)、



(IIa-3)、

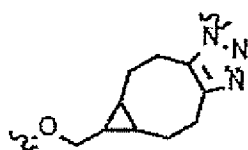


(IIa-4)

(式中、

 L^1 は、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、

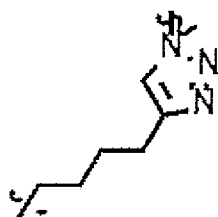
[化12]



(III)

、又は

[化13]



(IV)

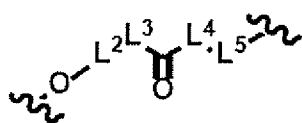
を表す)、

から成る群より選択される式で表される、請求項1に記載の核酸複合体。

[請求項6]

第2核酸鎖が、下式(VIII)：

[化14]



(VIII)

(式中、

L^2 は、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_{3\sim 8}$ シクロアルキレン基、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ を表し、

L^3 は、 $-NH-$ 又は結合を表し、

L^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_{3\sim 8}$ のシクロアルキレン基、 $-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_2]_m-$ 、又は結合を表し、ここで、 m は1～25の整数を表し、

L^5 は、 $-NH-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、又は結合を表す)で表されるリンカーを介して、

(1) トコフェロール若しくはその類縁体、

(2) コレステロール若しくはその類縁体、又は

(3) 置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 30}$ のアルキル基、若しくは置換された若しくは置換されていない $C_{2\sim 30}$ のアルケニル基

と結合している、請求項1～5のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項7] 前記第1核酸鎖が、少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項8] 前記第1核酸鎖が、ギャップマーである、請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項9] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖中の少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドに相補的な、少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドを含む、請求項7又は8に記載の核酸複合体。

[請求項10] 前記第1核酸鎖が、ミックスマーである、請求項1～6のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項11] 前記第1核酸鎖が、13～20塩基長である、請求項1～10のい

ずれか一項に記載の核酸複合体。

- [請求項12] 前記第2核酸鎖が天然リボヌクレオシドを含まない、請求項1～11のいずれか一項に記載の核酸複合体。
- [請求項13] 前記第2核酸鎖の核酸部分が修飾若しくは非修飾のヌクレオシド間結合により連結されたデオキシリボヌクレオシド及び／又は糖修飾ヌクレオシドから成る、請求項1～12のいずれか一項に記載の核酸複合体。
- [請求項14] 請求項1～13のいずれか一項に記載の核酸複合体を含む、被験体の中枢神経系において標的転写産物の発現又は編集を調節するための組成物。
- [請求項15] 被験体の中枢神経系疾患治療用である、請求項14に記載の組成物。
- [請求項16] 前記中枢神経系疾患が、免疫性中枢神経系疾患である、請求項15に記載の組成物。
- [請求項17] 請求項1～13のいずれか一項に記載の核酸複合体を含む、被験体の中枢神経系に薬剤を送達するための組成物。
- [請求項18] 前記中枢神経系が、大脳皮質、大脳基底核、大脳白質、間脳、脳幹、小脳、及び脊髄からなる群から選択される、請求項14～17のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項19] 前記中枢神経系が、前頭葉、側頭葉、海馬、海馬傍回、頭頂葉、後頭葉、線条体、淡蒼球、前障、視床、視床下核、中脳、黒質、橋、延髄、小脳皮質、小脳核、頸髄、胸髄及び腰髄からなる群から選択される、請求項14～17のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項20] 静脈内投与用又は皮下投与用である、請求項14～19のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項21] 1回の投与量中に5mg/kg以上の前記核酸複合体を含む、請求項14～20のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項22] 前記核酸複合体が血液脳関門（BBB）を通過する、請求項14～

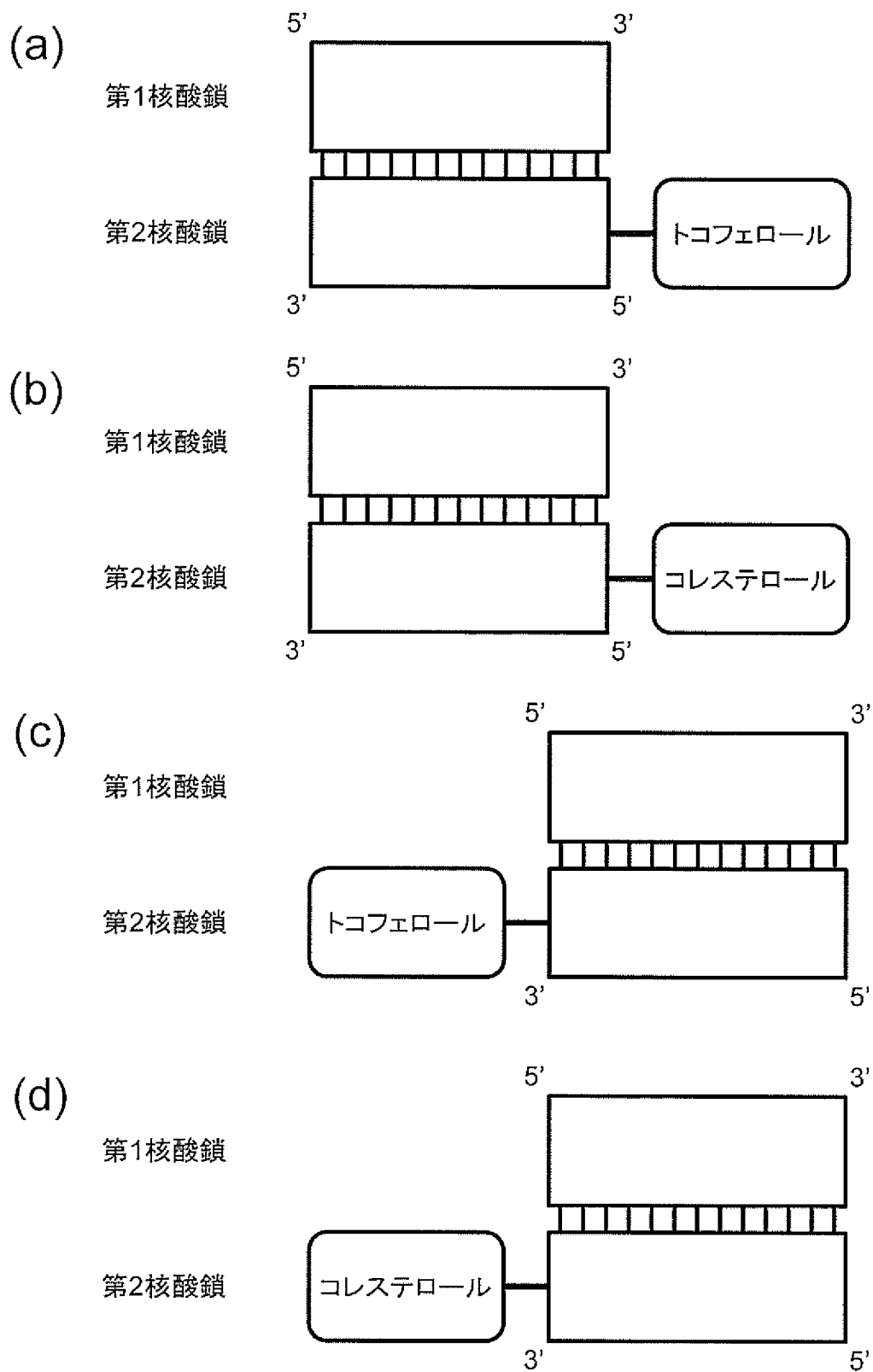
2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項23] 前記免疫性中枢神経疾患が、ミクログリア関連疾患である、請求項 1 6 に記載の組成物。

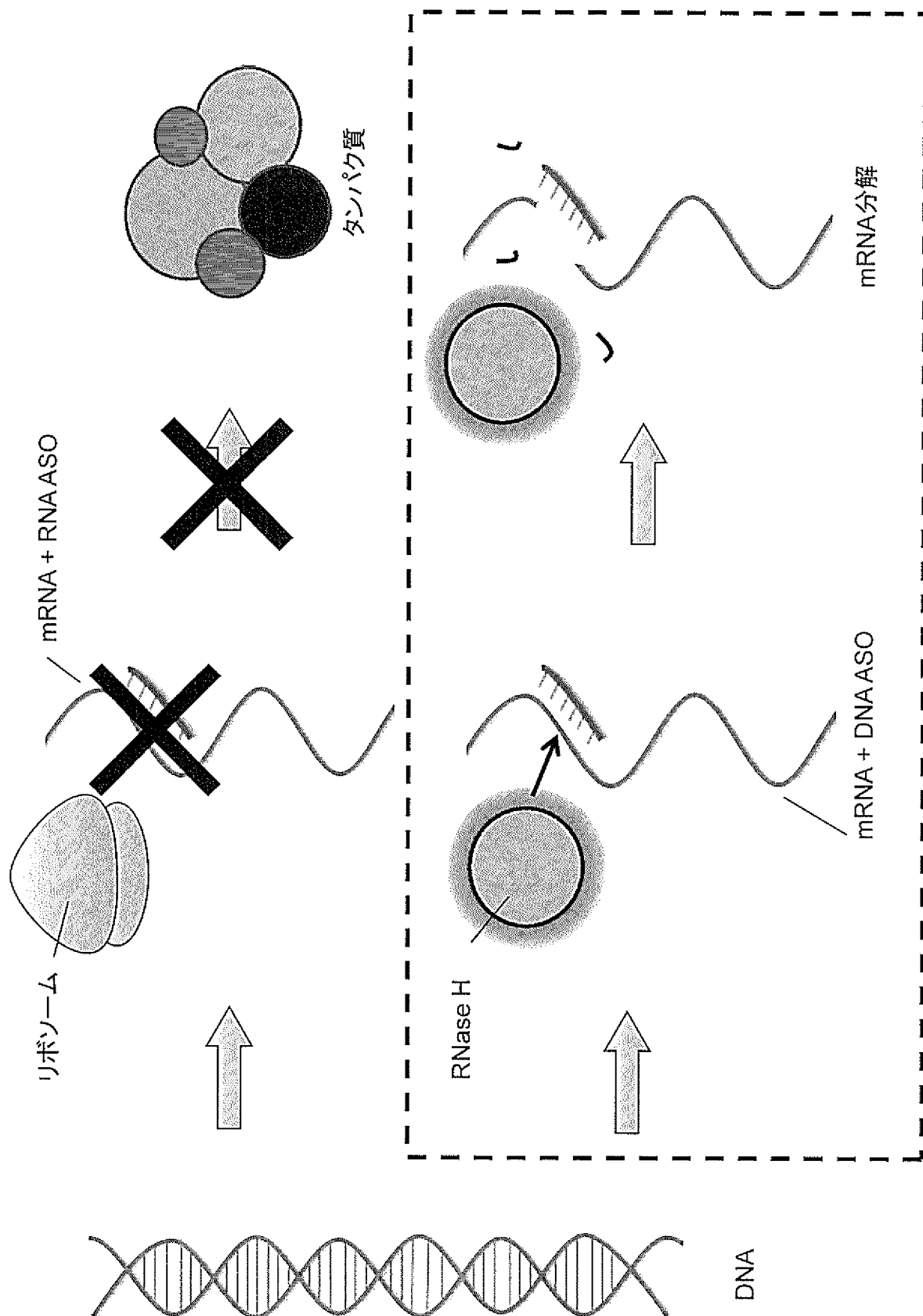
[請求項24] 前記ミクログリア関連疾患が、アルツハイマー病、多発性硬化症、A L S、または神経障害性痛である、請求項 2 3 に記載の組成物。

[請求項25] ミクログリアにおける標的転写産物の発現又は編集を調節するための、請求項 1 4 ～ 2 4 のいずれかに記載の組成物。

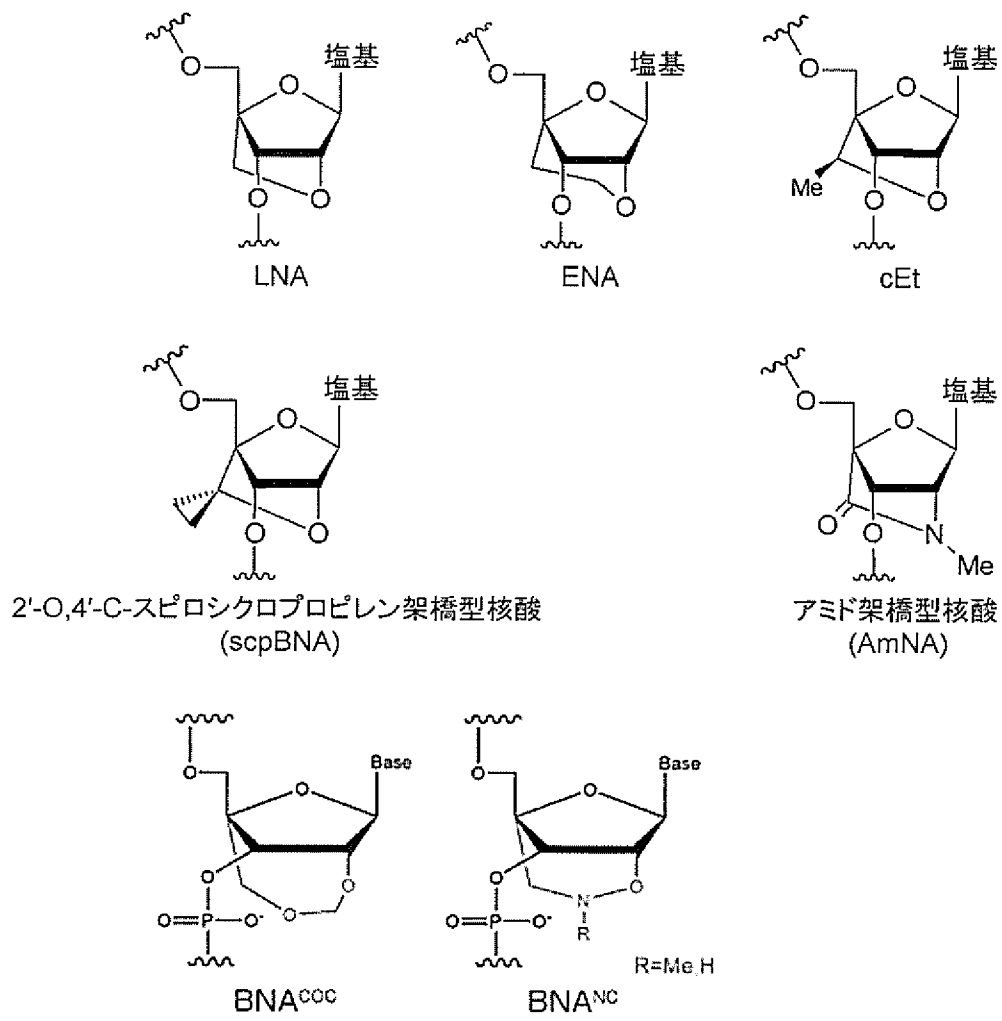
[図1]



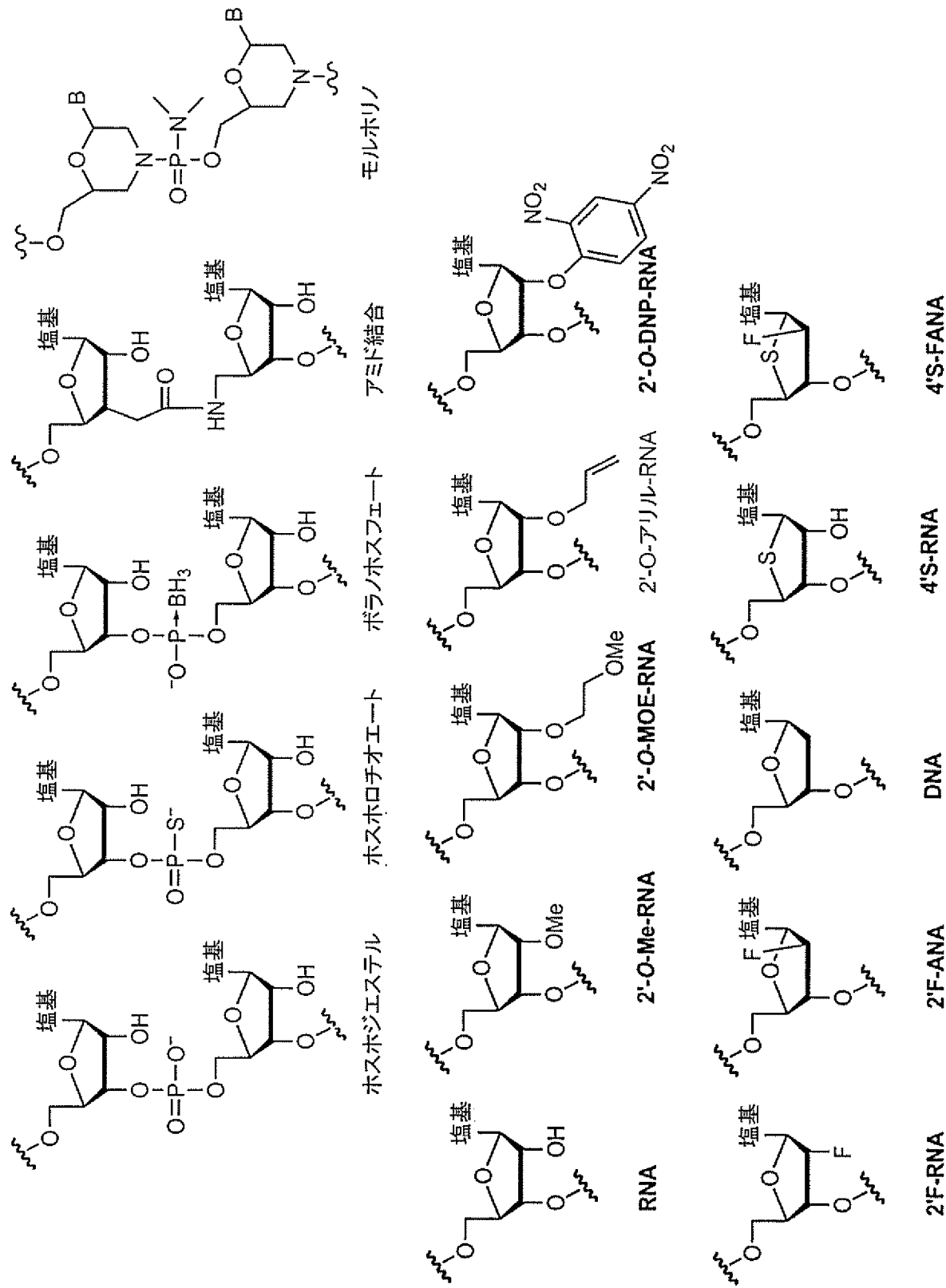
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/012077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/113 (2010.01) i, A61K9/08 (2006.01) i,
A61K31/7088 (2006.01) i, A61K47/56 (2017.01) i,
A61P21/00 (2006.01) i, A61P25/00 (2006.01) i, A61P25/14 (2006.01) i,
A61P25/16 (2006.01) i, A61P25/28 (2006.01) i, A61P35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/113, A61K9/08, A61K31/7088, A61K47/56, A61P21/00,
A61P25/00, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY (STN),
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUWAHARA, H., et al., "Modulation of blood-brain barrier function by a heteroduplex oligonucleotide in vivo", Scientific Reports (2018) vol. 8, no. 4377, pp. 1-12 (published online 12 March 2018), ISSN: 2045-2322, page 1, abstract, page 2, paragraph [0004], page 2, paragraph [0006] to page 5, paragraph [0002], page 2, fig. 1, page 3, fig. 2, page 4, fig. 3, page 5, fig 4, page 6, fig. 5, page 7, paragraph [0001] to page 8, paragraph [0005], page 9, paragraphs [0002]-[0003], page 10, paragraph [0002]	1-2, 7-9, 11, 13-25
Y		1, 3-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☐ See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 10 June 2019 (10.06.2019)	Date of mailing of the international search report 18 June 2019 (18.06.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/012077

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2017/053999 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS, INC.) 30 March 2017, claims, page 44, line 25 to page 45, line 13, page 45, line 25 to page 46, line 18, example 1 & US 2018/0256729 A1 & EP 3353306 A1 & JP 2018-528783 A	1-15, 17-21 1, 3-25
X Y	JP 2015-502134 A (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 22 January 2015, claims, paragraph [0054], examples 10-12, 14-15 & US 2014/0302603 A1, claims, paragraph [0141], examples 10-12, 14-15 & EP 2791335 A1 & WO 2013/089283 A1	1-5, 7-13 1, 3-25
Y	JP 2015-527314 A (BASECLICK GMBH) 17 September 2015, claims, fig. 2, 7 & US 2015/0209441 A1, claims, fig. 2, 7 & EP 2872180 A1 & WO 2014/009429 A1	3-25
P, X	WO 2018/056442 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 29 March 2018, claims, examples (Family: none)	1-25
P, X	WO 2018/062510 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 05 April 2018, claims, paragraphs [0083]-[0088], examples (Family: none)	1-5, 7-25

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K9/08(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K47/56(2017.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/14(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/113, A61K9/08, A61K31/7088, A61K47/56, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/14, A61P25/16, A61P25/28, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY (STN), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	KUWAHARA H., et al., Modulation of blood-brain barrier function by a heteroduplex oligonucleotide in vivo, Scientific Reports (2018) Vol.8, No.4377, pp.1-12 (published online 12 March 2018), ISSN:2045-2322, 第1頁要約、第2頁第4段落、第2頁第6段落—第5頁第2段落、 第2頁図1、第3頁図2、第4頁図3、第5頁図4、第6頁図5、 第7頁第1段落—第8頁第5段落、第9頁第2—3段落、第10頁第2段落	1-2, 7-9, 11, 13-25
Y		1, 3-25

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.06.2019

国際調査報告の発送日

18.06.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤澤 雅樹

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

5802

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2017/053999 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS, INC.) 2017.03.30, 特許請求の範囲, 第44頁第25行—第45頁第13行, 第45頁第25行—第46頁18行, 実施例1 & US 2018/0256729 A1 & EP 3353306 A1 & JP 2018-528783 A	1-15, 17-21 1, 3-25
X Y	JP 2015-502134 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2015.01.22, 特許請求の範囲, [0054], 実施例10-12、14-15 & US 2014/0302603 A1, 特許請求の範囲, [0141], 実施例10-12、14-15 & EP 2791335 A1 & WO 2013/089283 A1	1-5, 7-13 1, 3-25
Y	JP 2015-527314 A (ベースクリック ゲーエムベーハー) 2015.09.17, 特許請求の範囲、図2、図7 & US 2015/0209441 A1, 特許請求の範囲、図2、図7 & EP 2872180 A1 & WO 2014/009429 A1	3-25
P, X	WO 2018/056442 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 2018.03.29, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-25
P, X	WO 2018/062510 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 2018.04.05, 特許請求の範囲, [0083] — [0088], 実施例 (ファミリーなし)	1-5, 7-25