

(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
2022年11月3日(03.11.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/230987 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 21/04 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/019329

(22) 国際出願日: 2022年4月28日(28.04.2022)

(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 2021-077723 2021年4月30日(30.04.2021) JP

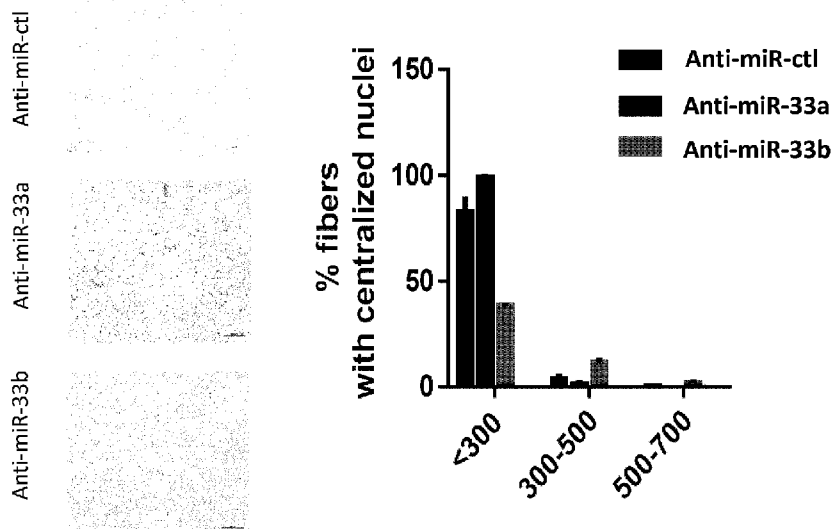
(71) 出願人: 田辺三菱製薬株式会社(MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目2番10号 Osaka (JP). 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP). 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650873 大阪府吹田市山田丘1番1号

Osaka (JP). 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所(NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 小寺 淳(KOTERA, Jun); 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目2番10号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP). 尾野 亘(ONO, Koh); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 堀江 貴裕(HORIE, Takahiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 曾和尚也(SOWA, Naoya); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 井手 裕也(IDE, Yuya); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 小比賀 聡(OBIKA, Satoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 笠原 勇矢(KASAHARA, Yuya); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP).

(54) Title: PREVENTION OR TREATMENT OF MYOPATHY USING MIR-33B INHIBITOR

(54) 発明の名称: miR-33b阻害物質による筋疾患の予防又は治療



(57) Abstract: A prophylactic or therapeutic agent for myopathy, containing a miR-33b inhibitor, preferably an antisense oligonucleotide against miR-33b, as an active ingredient.

(57) 要約: miR-33b阻害物質、好ましくはmiR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とする、筋疾患の予防又は治療剤。

WO 2022/230987 A1

(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所 (IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス 21ビル8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, IT, JM, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

明 細 書

発明の名称：

m i R - 3 3 b 阻害物質による筋疾患の予防又は治療

技術分野

[0001] 本発明は、m i R - 3 3 b 阻害物質を有効成分として含有する筋疾患の予防又は治療剤に関する。

背景技術

[0002] 筋疾患には、（１）神経原性筋萎縮症として、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症等、（２）筋原性筋萎縮症として、筋ジストロフィー（先天性筋ジストロフィー、肢体型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー等）、先天性ミオパチー、炎症性ミオパチー（多発筋炎、皮膚筋炎、封入体筋炎等）、代謝性ミオパチー（先天性代謝傷害によるミオパチー、周期性四肢麻痺等）、内分泌疾患に伴う筋傷害（甲状腺疾患、糖尿病等）等、（３）神経筋接合部の疾患として、重症筋無力症、筋無力症候群、先天性筋無力症等、が含まれる（非特許文献１）。

これらの筋疾患では、骨格筋障害に伴う運動機能障害を主症状として、筋力や筋機能の低下に伴い日常生活に支障が生じ、関節拘縮・変形、呼吸機能障害、心筋障害等を合併し、死に至る疾患も多い。神経原性萎縮症は、脊髄にある二次（下位）運動ニューロンが障害を受ける運動ニューロン疾患と、末梢の神経が障害を受ける末梢神経障害に大別される。筋原性筋萎縮（ミオパチー）は、筋肉自体に傷害があり、進行性が明確な筋ジストロフィーなどがある。

筋ジストロフィーは、５０以上の原因遺伝子が解明された遺伝性筋疾患である。骨格筋、呼吸筋、心筋の障害を引き起こすことにより、運動障害を主症状とした疾患であるが、病状が進行すると呼吸機能障害、心筋障害により死に至ることもある。病型としては、原因遺伝子毎に分類され、ジストロフ

イン遺伝子に異常のあるデュシェンヌ型／ベッカー型の性染色体劣勢遺伝型筋ジストロフィー、福山型もしくは非福山型先天性筋ジストロフィー、カルパイン3、ジスフェルリン、ミオティリン遺伝子などの多種の遺伝子に異常のある肢帯型筋ジストロフィー、DUX4遺伝子に異常のある顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、DMPK遺伝子に異常のある筋強直性ジストロフィー、その他、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィーなどが報告されている。デュシェンヌ型の一部のタイプにおいては、近年、特定遺伝子異常を正常化し、デュシェンヌ型からベッカー型へと変換させるアンチセンスオリゴ核酸の開発が進み、一部は上市されて患者の治療に用いられている。しかしながら、デュシェンヌ型のジストロフィン変異は多様であることから、全てのデュシェンヌ型筋ジストロフィンには対応できず、また他の筋ジストロフィーに対しての治療薬は開発中であることから、既存薬における治療対象患者は限定的であり、十分な治療効果は報告されていない。

- [0003] これまでの薬剤開発は、ジストロフィンを原因遺伝子とした場合の、限定的な機能正常化による筋機能の改善を目的としたものであるが、現在のところ、筋機能の回復は限定的であり、筋機能の積極的な回復が期待できる薬剤が求められている。
- [0004] 他の筋疾患においても、例えば、神経原性筋萎縮症である筋萎縮性側索硬化症では、原因遺伝子を正常化することにより、神経機能の回復を目指しているが、その医薬品開発は、筋萎縮性側索硬化症のサブタイプや他の神経・筋疾患全体からみると限定的であり、新規な医薬品開発が求められている。
- [0005] このように、これまでの薬剤開発は、原因遺伝子に対する正常化を狙った進行抑制効果が主な効果であるため、積極的な筋機能改善のメカニズムによる筋疾患の治療薬創生が重要であると考えられる。
- [0006] また、上記記載の筋疾患以外にも筋肉の機能低下を引き起こす疾患や症状として、カヘキシア、サルコペニア、非活動性萎縮、遺伝性痙性対麻痺などが挙げられる。

- [0007] miRNA（マイクロRNA）はゲノム上にコードされ、多段階的な生成過程を経て最終的に19-25塩基長となる微小な1本鎖RNAであり、直接標的とする複数のメッセンジャーRNA（mRNA）の3'-非翻訳領域に結合して、その翻訳を抑制、もしくは分解を促進することにより、標的遺伝子を負に制御する。現在、ヒトにおいて2000種以上のmiRNAが同定されており、ヒト遺伝子産物の60%以上がmiRNAによって何らかの制御を受けているといわれている。また、miRNAは様々な生体现象や病態の発症、進行に関わることから、バイオマーカーや新規治療標的として注目を集めている。
- [0008] miR-33（マイクロRNA-33）は、ATP結合カセットトランスポーターA1（ABCA1）を標的としてコレステロール代謝を調節し、高密度リポ蛋白質コレステロール（HDL-C）レベルを低下させるmiRNAとして見出された。ヒトにおいては、miR-33a及びmiR-33bが存在するのに対し、マウスにおいては、miR-33（ヒトのmiR-33aに相当）のみが存在することが報告されている（非特許文献2）。
- [0009] 非特許文献3には、遺伝性痙性対麻痺の治療にmiR-33aアンチセンスオリゴヌクレオチドが利用できることが開示されているが、作用は神経細胞への作用に限定されており、遺伝性痙性対麻痺におけるmiR-33bの関与は不明である。また、非特許文献4には、miR-33aが筋芽細胞の増殖を抑制すること、miR-33aの減少が筋芽細胞の増殖を増強すること、miR-33a発現の調整が骨格筋の初期発生を促進することが記載されているが、miR-33bへの言及はない。
- [0010] 特許文献1には、miRNA分子を標的として、疾患、障害、又は状態を有する被験体を処置する方法が開示され、標的miRNA分子の候補の一例としてmiR-33があげられ、疾患の一例に筋萎縮性側索硬化症（ALS）が記載されている。また、同様に、特許文献2では、標的miRNA分子の候補の一例としてmiR-33a及びmiR-33bが記載され、疾患の一例として重症筋無力症（MG）が記載されている（特許文献2）。

しかしながら、いずれもmiR-33bを治療標的とした具体的データはなく、miR-33bの阻害による筋機能向上やそれに伴う筋疾患の予防及び治療効果を示唆するものではない。

[0011] このように、miR-33bを阻害することにより筋機能の改善を誘導する遺伝子の発現変化及び筋細胞の分化促進作用、さらに筋ジストロフィーに代表される筋疾患の治療及び予防について述べた文献は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：WO2004076622

特許文献2：WO2012119051

非特許文献

[0013] 非特許文献1：日本神経病理学会 ホームページ

非特許文献2：J Am Heart Assoc.、8(13)、e012609(2019)

非特許文献3：Clinical science (London, England : 1979), Vol. 133, No. 4, pp. 583-595.

非特許文献4：Bioscience reports, (20200626) Vol. 40, No. 6. Journal code: 8102797. E-ISSN: 1573-4935

非特許文献5：Nat Rev Neurol 2019 Jul;15(7):373-386.

非特許文献6：Acta Neuropathologica volume 134, pages 869-888 (2017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、新規な筋疾患の予防用及び／又は治療用薬剤の提供を目的とす

る。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。具体的には、従来筋疾患との関連が知られていなかったmiR-33分子に注目し、筋疾患におけるmiR-33aとmiR-33bの寄与を解析するためにこれらの阻害剤を用いて検討を行った。その結果、miR-33b阻害物質が、筋疾患の治療、予防、又は軽減に有用であることを見出し、本発明に至った。

[0016] 本開示は、以下の項[1]～[19]に記載の非限定な番号付けされた実施態様に関する

ものであるが、これらに限定されない。

[1] miR-33b阻害物質を有効成分とする、筋疾患の予防又は治療剤。

[2] miR-33b阻害物質がmiR-33bレベル低減物質である、[1]に記載の予防又は治療剤。

[3] miR-33bレベル低減物質が、核酸である、[2]に記載の予防又は治療剤。[4] miR-33bレベル低減物質が、miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA又はshRNAである、[3]に記載の予防又は治療剤。

[5] 前記miR-33bレベル低減物質は、miR-33bレベル低減率がmiR-33aレベル低減率より高い、[2]～[4]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[6] miR-33bレベル低減物質が、miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、[2]～[5]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[7] miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが

1) 7～20ヌクレオチド残基からなり、

2) 配列番号1の塩基配列を有するmiR-33bの等長部分に90%以上相補的な塩基配列であって、配列番号1に記載のmiR-33bの塩基配列

の5'末端から数えて9番目かつ10番目の核酸塩基とはミスマッチを有さない塩基配列を有する、[6]に記載の予防又は治療剤。

(配列番号1) GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC

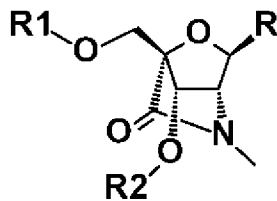
[8] miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが AACAGCAATGCA (配列番号5)、
に記載される配列からなる核酸塩基配列 (ただし、Cは5-メチルシトシン (M) でもよい) を有する、[7]に記載の予防又は治療剤。

[9] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが修飾オリゴヌクレオチドである、[8]に記載の予防又は治療剤。

[10] 前記修飾オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1つのヌクレオチドが修飾糖を含む、[9]に記載の予防又は治療剤。

[11] 前記修飾糖が、AmNAの糖部分から選択される、[10]に記載の予防又は治療剤。

[化1]



AmNA

[式中、Rは核酸塩基であり、R1、R2はそれぞれ独立して置換されてもよいリン酸基を示す。]

[12] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

Aas Ads Mas Ads Gas Cds Aas Ads Tas
s Gds Mas Ad (配列番号8) ;

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

A = アデニン、T = チミン、G = グアニン、C = シトシン、M = 5 - メチル
シトシン、に従って示され；

各糖部分が下記記号：

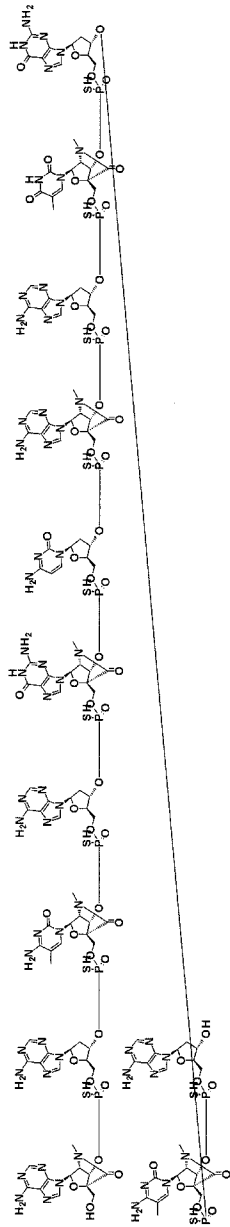
a = 上記の A m N A の糖部分、d = 2' - デオキシリボース、
に従って示され；

各ヌクレオシド間結合が下記記号：

s = ホスホロチオエートに従って示される、[1 1] に記載の予防又は治療
剤。

[1 3] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、
下式：

[化2]



で示される修飾オリゴヌクレオチドである、[12]に記載の予防又は治療剤。

[14] 筋線維断面積を増加させることにより筋疾患の予防又は治療効果を発揮する、[1]～[13]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[15] 筋分化を促進させることにより筋疾患の予防又は治療効果を発揮する、[1]～[13]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[16] 筋疾患が神経原性筋萎縮症、筋原性筋萎縮症及び神経筋接合部の疾患からなる群から選択される、[1]～[15]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[17] 筋疾患がカヘキシア、サルコペニア、非活動性萎縮及び遺伝性痙性対麻痺からなる群から選択される、[1]～[15]のいずれかに記載の予防又は治療剤。

[18] 神経原性筋萎縮症が、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症及び筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される、[16]に記載の予防又は治療剤。

[19] 筋原性筋萎縮症が、筋ジストロフィー、先天性ミオパチー、炎症性ミオパチー及び代謝性ミオパチーからなる群から選択される、[16]に記載の予防又は治療剤。

[20] 神経筋接合部の疾患が、重症筋無力症、筋無力症候群及び先天性筋無力症からなる群から選択される、[16]に記載の予防又は治療剤。

発明の効果

[0017] miR-33b阻害物質は、筋疾患の発生又は進行を抑制するため、筋疾患の予防及び／又は治療薬として用いることができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1A]図1Aは、miR-33bノックイン/mdxマウス由来初代骨格筋細胞におけるmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの筋分化促進作用を示す組織染色写真である。

[図1B]図1Bは、miR-33bノックイン/mdxマウス由来初代骨格筋細胞におけるmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの筋分化促進作用を示すグラフである。

[図2]図2は、miR-33bノックイン/mdxマウスにおける骨格筋のmiR-33a及びmiR-33bの発現レベルに対するmiR-33a又はmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したin vivo筋局所投与試験の結果を示すグラフである。

[図3]図3は、miR-33bノックイン/mdxマウスにおける骨格筋の各種遺伝子発現に対するmiR-33a又はmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したIn vivo筋局所投与試験の結果を示すグラフである。

[図4]図4は、miR-33bノックイン/mdxマウスにおける筋線維 (muscle fiber) の筋断面積の大きさに対するmiR-33a又はmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したIn vivo筋局所投与試験の結果を示す図 (一部写真) である。

[図5]図5は、miR-33bノックイン/mdxマウスにおける筋組織の線維化 (muscle fibrosis) に対するmiR-33a又はmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したIn vivo筋局所投与試験の結果を示す図 (一部写真) である。

[図6]図6は、miR-33bノックイン/mdxマウスにおける筋衛星細胞のPax7/MyoDの発現に対するmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したIn vivo筋局所投与試験の結果を示す図 (一部写真) である。

[図7]図7は、miR-33bノックイン/mdxマウスにおけるutrophinの発現に対するmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したIn vivo筋局所投与試験の結果を示す図 (写真) である。

[図8]図8は、miR-33bノックイン/mdxマウスにおける骨格筋の各種遺伝子のタンパク質発現に対するmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したIn vivo筋局所投与試験の結果を示す図 (写真) である。

発明を実施するための形態

[0019] (定義)

「核酸」は、ヌクレオチド単位で構成される分子を指す。核酸の例としては、天然核酸リボ核酸 (RNA)、デオキシリボ核酸 (DNA)、非天然核酸があり、核酸の形態には一本鎖の核酸、二本鎖の核酸があり、また機能

的な核酸として、低分子干渉リボ核酸 (s i R N A)、マイクロRNA (m i R N A) などが挙げられるが、これらに限定されない。核酸は、これらの要素の組み合わせを単一分子中に含むこともできる。

[0020] 「核酸塩基」は、別の核酸の塩基と対形成することができる複素環部分を意味する。核酸塩基には、「修飾核酸塩基」と「非修飾核酸塩基」がある。

[0021] 「ヌクレオシド」は、糖に連結した核酸塩基を意味する。ある種の実施態様では、ヌクレオシドはリン酸基に連結している。

[0022] 「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分と共有結合したリン酸基などを有するヌクレオシドを意味する。天然に存在するヌクレオチドは糖部分がリボース又はデオキシリボースであり、リン酸基とホスホジエステル結合により共有結合し、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドを形成している。

[0023] 「修飾ヌクレオチド」は、独立に、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合又は修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。「修飾ヌクレオシド」は、独立に、修飾糖部分又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

[0024] 「非修飾ヌクレオチド」は、天然に存在する核酸塩基、糖部分及びヌクレオシド間結合から成るヌクレオチドを意味する。ある種の実施態様では、非修飾ヌクレオチドはRNAヌクレオチド（すなわち β -D-リボヌクレオシドを有するヌクレオチド）又はDNAヌクレオチド（すなわち β -D-デオキシリボヌクレオシドを有するヌクレオチド）であるが、これらに限定されない。

[0025] 「ヌクレオシド間結合」は、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

[0026] 「修飾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（すなわち、ホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換又は任意の変化を指す。例えば、ホスホチオエートヌクレオシド間結合があるが、これに限定されない。

[0027] 「ホスホチオエートヌクレオシド間結合」は、非架橋酸素原子の1つを硫黄原子で置き換えることによってホスホジエステル結合が修飾される、ヌ

クレオシド間の結合を意味する。ホスホロチオエート結合は、当該修飾ヌクレオシド間結合の1例である。

[0028] 「修飾核酸塩基」は、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン又はウラシル以外の任意の核酸塩基を指す。例えば、5-メチルシトシンがあるが、これに限定されない。「非修飾核酸塩基」は、プリン塩基のアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を意味する。

[0029] 「miRNA」は、酵素Dicerによるpre-miRの切断産物であり、長さ18～25核酸塩基の内在性非コードRNAを意味する。miRNAの例は、miRBaseと呼ばれるmiRNAデータベースで確認される（<http://microrna.sanger.ac.uk/>）。ある種の実施態様では、miRNAは、「miR」又は「マイクロRNA」と略記される。

[0030] 「pre-miR」は、Droshaと呼ばれる二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼによるpri-miRの切断産物であり、ヘアピン構造を有する非コードRNAを意味する。

[0031] 「ステムループ配列」は、ヘアピン構造を有し、かつ成熟型miRNA配列を含むRNAを意味する。ある実施態様では、ステムループ配列はpre-miRである。ステムループ配列の例は、miRBaseと呼ばれるmiRNAデータベースで確認される（<http://www.mirbase.org/>）。

[0032] 「pri-miR」は、二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼDroshaの基質であり、ヘアピン構造を有する非コードRNAを意味する。

[0033] 「miRNA前駆体」は、ゲノムDNAに由来し、かつ、1つ又は複数のmiRNA配列を含む非コードstructured RNAを含む転写物を意味する。例えば、ある種の実施態様では、miRNA前駆体はpre-RNAである。ある種の実施態様では、miRNA前駆体はpri-miRである。ある種の実施態様では、miRNA前駆体はステムループ配列であ

る。

[0034] 「miRNAの直接の標的mRNA」は、miRNAの直接的な標的mRNAを意味する。miRNAは標的mRNAと完全に又はほぼ完全に相補的であり、しばしばシード配列（miRNAの5'末端側より2番目～8番目までの7塩基の配列をいう）と相補的に結合し、直接の標的mRNAの不安定化又は翻訳阻害をもたらす。

[0035] 「miRNAの直接の標的タンパク質」はmiRNAの直接の標的mRNAが翻訳されることによって生じるタンパク質を意味する。

[0036] 「miR-33bステムループ配列」は、核酸塩基配列GCGGGCGGCCCCGCGGUGCAUUGCUGUUGCAUUGCACGUGUGUGAGGCGGGUGCAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCCGGAGCCGGCCCCUGGCACCAC（配列番号4）を有するmiRNA-33bのpre-miRを意味する。

[0037] 「miR-33a」は、核酸塩基配列GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA（配列番号2）を有するmiRNAを意味する。（なお、本明細書においては、塩基配列は5'から3'の順で記載される。）

[0038] 「miR-33b」は、核酸塩基配列GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC（配列番号1）を有するmiRNAを意味する。

[0039] 「miR-33」は、核酸塩基配列GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA（配列番号3）を有するmiRNAを意味する。

[0040] ヒトにおいては、miR-33aならびにmiR-33bが存在する。マウスにおいては、miR-33が存在する。ヒトのmiR-33aとマウスのmiR-33は共通の配列である。従って、マウスにおいては、ヒトのmiR-33aに相当するmiRNAのみが存在し、ヒトのmiR-33bに相当するmiRNAは存在しない。

[0041] 「miR-33bシード配列（シード領域ともいう）」は、miR-33b核酸塩基配列のうち、UGCAUUGを指す。

[0042] 「miR-33aレベル」、「miR-33bレベル」、「miR-33

レベル」とは、それぞれ、細胞内でマイクロRNAとして機能するmiR-33a、miR-33b、miR-33の存在（レベル）を意味する。

[0043] 「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸にハイブリダイズすることのできるアンチセンス核酸（RNAもしくはDNA）である。本願においてアンチセンスオリゴヌクレオチドとは、miRNAに結合して、miRNAの活性又は機能を阻害する分子を意味する。本願におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドは天然の核酸分子以外に人工的な核酸分子を含んでもよい。

[0044] 「siRNA (small interfering RNA)」は15-30塩基対から成る低分子二本鎖RNAである。siRNAはRNA干渉と呼ばれる現象に関与しており、標的核酸の破壊によって配列特異的に核酸の発現を抑制する。本願においてsiRNAとは、miR-33aやmiR-33bを破壊してmiR-33aやmiR-33bの発現を抑制するアンタゴニストとして機能する分子を意味する。本願におけるsiRNAは天然の核酸分子以外に人工的な核酸分子を含んでもよい。

[0045] 「shRNA (short hairpin RNA)」は、ヘアピン構造を有しプロセッシングを受けてmiRNAやsiRNA (short interference RNA) が生じる。ある種の実施形態では、shRNAは細胞内において、shRNA発現ベクターから転写される。

[0046] 「相補的」は、第一の核酸と第二の核酸の核酸塩基間の対形成に対する能力を意味する。具体的には、例えば、アデニンはチミジン又はウラシルと相補的であり、シトシンはグアニンと相補的であり、5-メチルシトシンはグアニンと相補的であるが、これらに限定されない。

[0047] 「完全に相補的（相補性ともいう）」又は「100%相補的（相補性ともいう）」は、第一の核酸の核酸塩基配列の各核酸塩基のすべてが、第二の核酸の第二の核酸塩基配列中に相補的核酸塩基を有することを意味する。ある種の実施態様では、第一の核酸は修飾オリゴヌクレオチドであり、標的核酸が第二の核酸である。

[0048] 「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸分子のアニーリングを意味する。

[0049] 「ミスマッチ」又は「非相補的核酸塩基」は、第一の核酸の核酸塩基が、第二の核酸又は標的核酸の対応する核酸塩基と対形成できない場合を指す。

[0050] 「予防」は、数分から無期限の期間にわたって、疾患、障害もしくは好ましくない健康状態、又は当該疾患、障害もしくは好ましくない健康状態に関連する1つ以上の症状、の発症又は発生を遅延させるか又は未然に防ぐことを意味する。予防するは、疾患、障害又は好ましくない健康状態を発生する危険性を低減させることも意味する。

[0051] 「治療」は、疾患、障害もしくは好ましくない健康状態、又は当該疾患、障害もしくは好ましくない健康状態に関連する1つ以上の症状、を軽減するか、排除するか、もしくは進行を抑制するか、又は、当該疾患、障害、もしくは好ましくない健康状態自体の1つもしくはそれ以上の原因を部分的に解消するか又は根絶することを意味する。

[0052] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の本実施形態に制限されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

[0053] (miR-33b阻害物質)

本発明は、miR-33b阻害物質を含む、筋疾患の治療又は予防剤に関する。

miR-33b阻害物質はmiR-33bの発現又は機能を阻害する物質を含む。

miR-33b阻害物質としては、具体的には、例えば、細胞内におけるmiR-33bとして機能する分子のレベルを低減させる物質（以下これを「miR-33bレベル低減物質」と称することがある）が挙げられる。miR-33bレベルの低減とは、miR-33bの直接の標的mRNAに細胞内で作用して、mRNAの不安定化や翻訳阻害を介し、当該細胞内におけるmiR-33bの直接の標的mRNA及び／又はタンパク質レベルを低減

させる機能を有することを意味する。

[0054] miR-33bレベル低減物質による細胞内のmiR-33bレベルの低減とは、例えば、miR-33bレベル低減物質と細胞を接触させることにより、非接触時又は陰性対照物質接触時と比較して細胞内におけるmiR-33bレベルが低下することをいう。ここで、当該細胞内におけるmiR-33bレベルの低下の程度は、細胞内におけるmiR-33bレベルが低下し、その結果としてmiR-33bの直接の標的mRNA、及び／又はmiR-33bの直接の標的タンパク質の当該細胞内におけるレベルを増加させる程度、又は細胞内におけるmiR-33bレベルが低下し、その結果としてmiR-33b発現細胞の表現型が、疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整される程度であればいずれの程度でもよいが、具体的には、例えば、miR-33bレベル低減物質と細胞を接触させた後、細胞内miR-33bレベルが、非接触時又は陰性対照物質接触時と比較して、少なくとも50%以下、好ましくは30%以下さらに好ましくは10%以下となる程度が好ましい。

[0055] miR-33bレベル低減物質としては、少なくともmiR-33bの細胞内におけるレベルを低減させるものであればよいが、さらにmiR-33aの当該細胞内におけるレベルを低減させる作用を有していてもよい。この場合、好ましくは細胞内miR-33bレベルを低減させる作用が細胞内miR-33aレベルを低減させる作用よりも強い物質であることが好ましく、例えば、後述するmiR-33aおよびmiR-33bを発現する動物の前脛骨筋でmiR-33aおよびmiR-33bレベルを測定する系において、miR-33bレベル低減率がmiR-33aレベル低減率より高いmiR-33bレベル低減物質が好ましく用いられる。miR-33bレベル低減率とは、例えば、 $100 * (\text{miR-33bレベル低減物質非添加時のmiR-33bのレベル} - \text{miR-33bレベル低減物質添加時のmiR-33bレベル}) / \text{miR-33bレベル低減物質非添加時のmiR-33bレベル}$ 、により算出することができる。また、miR-33aレベル低減率

とは、例えば、 $100 * (miR-33b \text{レベル低減物質非添加時の} miR-33a \text{レベル} - miR-33b \text{レベル低減物質添加時の} miR-33a \text{レベル}) / miR-33b \text{レベル低減物質非添加時の} miR-33a \text{レベル}$ 、により算出することができる。

前記 $miR-33b$ レベル低減率が $miR-33a$ レベル低減率より高い $miR-33b$ レベル低減物質として、具体的には、例えば、 $miR-33a$ レベル低減率/ $miR-33b$ レベル低減率を算出した時の値が 0.8 以下、0.7 以下、0.6 以下、0.5 以下、0.4 以下、0.3 以下、0.2 以下又は 0.1 以下があげられ、好ましくは 0.6 以下、より好ましくは 0.3 以下、さらに好ましくは 0.1 以下である $miR-33b$ レベル低減物質が挙げられる。

[0056] $miR-33b$ 阻害物質としては、 $miR-33b$ の機能を阻害するものであってもよい。 $miR-33b$ 阻害物質による $miR-33b$ の機能を阻害するとは、 $miR-33b$ による直接の標的 mRNA の阻害作用および $miR-33b$ 特異的なシグナル伝達経路を阻害することを意味し、その結果、 $miR-33b$ の直接の標的 mRNA 及び／又は直接の標的タンパク質の発現レベルを増加させ、疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整されるようにすることをいう。

[0057] $miR-33b$ 阻害物質としてはまた、 $miR-33b$ の発現又は機能を阻害し、その結果、 $miR-33b$ の直接の標的 mRNA、および／または $miR-33b$ の直接の標的タンパク質の細胞内での存在レベルを増加させるものが好ましい。

$miR-33b$ の直接の標的 mRNA は、 $miR-33b$ が直接結合してその発現レベルを低下させるものが挙げられ、具体的には、例えば、ATP 結合カセットトランスポーター A1 (ABCA1) 等があげられる。

ABCA1 などの $miR-33b$ の直接の標的分子は、通常、 $miR-33b$ によって発現阻害を受けるところ、 $miR-33b$ 阻害物質により $miR-33b$ が阻害されることにより、細胞内での存在レベルが増加する。

なお、直接の標的mRNAは、いずれか一つ以上、複数でもよい。

- [0058] 本発明においては、miR-33bの標的mRNAには、miR-33bによって直接的または間接的に発現レベルが低下するmRNAが含まれる。例えば、Paired Box 7 (Pax7)、Syntropin、Cyclin Dependent Kinase 6 (Cdk6)、CYCLIN D1 (CCND1)、Follistatin (Fst)、UtrophinおよびMyogenetic Differentiation 1 (MyoD1、以下、単にMyoDとよぶことがある)が挙げられ、これらはmiR-33b阻害物質により、細胞内での発現レベルが増加する。
- [0059] したがって、miR-33b阻害物質は、筋細胞、例えば、筋原細胞、筋芽細胞、衛星細胞、筋管細胞、多核細胞（以下、単に「細胞」と称することがある）におけるABCA1、Pax7、Syntropin、Cdk6、CCND1、Follistatin、UtrophinおよびMyoDの1種類以上のmRNA及び／又はタンパク質の発現レベルを増強するものであることが好ましい。
- [0060] ABCA1、Pax7、Syntropin、Cdk6、CCND1、Follistatin、UtrophinおよびMyoD等のmRNA及び／又はタンパク質の発現レベル増強やそれに伴う筋芽細胞の分化促進（筋分化の促進）と成熟、筋線維 (muscle fiber) の増大、筋組織の線維化 (muscle fibrosis) 抑制については、筋ジストロフィーの改善に重要な要素であることが報告されている（非特許文献5）。
- [0061] 筋分化の促進とは、衛星細胞から筋芽細胞、筋細胞への分化促進を指す。また、筋線維とは、筋管細胞が融合し、細胞が線維状になることを指し、筋線維が集まり筋束を形成し、さらにそれらが集まり筋組織を構成する。筋線維の増大は、後述の筋線維断面積の増加を指標とすることができる。
- また、筋組織の線維化とは、筋組織の障害に伴い、筋組織間質でコラーゲン等の物質が蓄積することを指す。
- [0062] また、ABCA1、Pax7、Syntropin、Cdk6、CCND

1、Follistatin、UtrrophinおよびMyoD等の遺伝子については、筋ジストロフィーのみならず、例えば、重症筋無力症、封入体筋炎、皮膚筋炎、先天性ミオパチー、筋萎縮性側索硬化症、遺伝性痙性対麻痺等の筋疾患においても、これらのRNA及び／又はタンパク質の発現レベル増強やそれに伴う筋芽細胞の分化促進と成熟、筋線維の増大、筋組織線維化抑制が、これらの疾患の症状改善に寄与することが示唆されており（非特許文献6）、これら遺伝子の発現増強作用を有するmiR-33b阻害物質が、上記疾患の予防及び治療薬になることが期待される。

[0063] miR-33bレベル低減物質によるmiR-33bの標的mRNA発現レベルの増加の程度は、その標的mRNAがコードするタンパク質が調整する疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整される程度の増加であればいずれでもよいが、例えば、miR-33bレベル低減物質と細胞を接触させた後、非接触時又は陰性対照物質接触時と比較して、標的mRNA発現レベルが少なくとも1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、さらに好ましくは2倍以上上昇する程度が例示される。

[0064] また、miR-33b阻害物質による標的mRNAがコードするタンパク質発現レベルの増加についても、標的タンパク質が調整する疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整される程度であればいずれのものでもよいが、miR-33b阻害物質と細胞を接触させた後、非接触時又は陰性コントロール物質接触時と比較して、標的タンパク質発現レベルが少なくとも1.2倍以上、好ましくは1.5倍以上、さらに好ましくは2倍以上上昇する程度が例示される。

[0065] miR-33bレベル低減物質による、ABCA1、Pax7、Syntropin、Cdk6、CCND1、Follistatin、UtrrophinおよびMyoDから選択される1種類以上のmRNAの発現レベル又はそれらがコードするタンパク質の発現レベルの増強の程度は、疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整される程度の増加であればいずれでもよいが、例えば、miR-33bレベル低減物質を筋疾患モデル動物（mdxマウス

など)に投与した後、非投与時又は陰性対照物質投与時と比較して、ABC A1、Pax7、Syntropin、Cdk6、CCND1、Follistatin、UtrrophinおよびMyoDから選択される1種類以上のmRNAの発現レベル又はそれらがコードするタンパク質の発現レベルが1.2倍以上、1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上又は2.0倍以上があげられ、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは1.8倍以上、さらに好ましくは2.0倍以上が挙げられる。

[0066] 疾患の改善の方向とは、具体的には、例えば、筋分化の促進、筋線維の増大(例えば、筋線維断面積の増加)及び/又は筋組織の線維化の抑制が見られる方向が挙げられる。

miR-33bレベル低減物質による、筋線維断面積の増加の程度は、miR-33bレベル低減物質を筋疾患モデル動物(mdxマウスなど)に投与した後、非投与時又は陰性対照物質投与時と比較して、筋線維断面積が増加すればよいが、例えば、300-500(μm^2)の筋線維断面積の割合が、1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上、2.0倍以上、2.5倍以上又は3.0倍以上があげられ、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2.0倍以上、さらに好ましくは3.0倍以上が挙げられる。

また、miR-33bレベル低減物質による、筋組織の線維化抑制の程度は、miR-33bレベル低減物質を筋疾患モデル動物(mdxマウスなど)に投与した後、非投与時又は陰性対照物質投与時と比較して、筋組織の線維化が減少すればよいが、例えば、0.8倍以下、0.7倍以下、0.6倍以下、0.5倍以下、0.4倍以下、0.3倍以下、0.2倍以下又は0.1倍以下があげられ、好ましくは0.6倍以下、より好ましくは0.3倍以下、さらに好ましくは0.1倍以下が挙げられる。

miR-33b阻害物質は、筋分化促進、筋線維増大、筋組織の線維化抑制のために使用されうる。

[0067] miR-33b レベル低減物質としては、具体的には、例えば、miR-33b に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA 又はこれらを発現するベクターが挙げられるが、miR-33b に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましく用いられる。また、miR-33b 阻害物質としてmiR-33bの機能を阻害する化合物を用いてもよい。

[0068] miR-33b に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、miR-33b の細胞内におけるレベルを低減させる、1) 7~20 残基からなり、2) 配列番号4に記載のmiR-33b ステムループ配列、好ましくは配列番号1に記載のmiR-33b (hsa-miR-33b-5pともいう) の核酸塩基配列の等長部分に90%以上相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。等長部分とは、特定の塩基配列において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの各核酸塩基配列と、miR-33b の核酸塩基配列とで相補性を有する部分を意味する。つまり、miR-33b に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、miR-33b の核酸塩基配列の等長部分に対して完全相補的であることが望ましいが、1つ又は複数のミスマッチ核酸塩基を有していてもよく、85%以上、90%以上、好ましくは95%以上の相補性を有するものが用いられる。このようなミスマッチを有するmiR-33b に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列とは、miR-33b とハイブリダイズでき、miR-33b の細胞内におけるレベルを低減させるものであればいずれのものでもよいが、miR-33a への結合を低下させるため、配列番号1に記載のmiR-33b の核酸塩基配列の5' 末端から数えて9番目かつ10番目の核酸塩基とはミスマッチを有さないことが好ましい。

[0069] 上記ミスマッチ核酸塩基は、クラスター化されていてもよいし、相補的核酸塩基が挟まれていてもよく、互いに又は相補的核酸塩基と連続的である必要はない。miR-33b に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとmiR-33b との相補性パーセントは、例えば、当技術分野で既知のBLASTプログラム (basic local alignment search t

ools)、PowerBLASTプログラム(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)、Genetyxソフトウェア(GENETYX CORPORATION)を使用して、慣例的に決定することができる。相補性は、例えば、ギャッププログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)によって、Smith and Waterman(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)のアルゴリズムを使用するデフォルト設定、Genetyxソフトウェア(GENETYX CORPORATION)を使用して決定することができる。

[0070] 配列番号1に記載のmiR-33bの核酸塩基配列は、miR-33bステムループ配列内に含まれており、miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とするmiR-33b核酸塩基配列には、miR-33bステムループ配列全長も含まれる。

[0071] miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号4に記載のmiR-33bステムループ配列の塩基配列の相補鎖、好ましくは配列番号1のmiR-33b塩基配列の相補鎖の等長部分としていずれのものでもよく、配列長はいずれのものであってもよいが、例えば、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20残基が挙げられ、好ましくは、配列番号1に記載のmiR-33bの核酸塩基配列において、5'末端から数えて9~10番目に相補的な配列を含み、配列長は、12~19残基が好ましく、12~16残基がより好ましい。

具体的には例えば、

AACAGCAATGCA(配列番号5)又は

TGCAACAGCAATGCAC (配列番号6) 等が挙げられ、
AACAGCAATGCA (配列番号5)
が好ましく用いられる。

ある種の実施態様では配列番号5又は6の配列のシトシン塩基の一部又は全部が5-メチルシトシンであるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。一部のシトシン塩基が5-メチルシトシンである修飾オリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号8が挙げられる。

[0072] miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドでありうる。修飾オリゴヌクレオチドとしては上記の5-メチルシトシンのような修飾塩基を含むものでもよいし、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1つのヌクレオチドが修飾糖を含むものでもよい。

修飾糖とは、糖部分が修飾されたものをいい、当該修飾糖を1つ以上含む修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ安定性の増強、結合親和性の増大等の有利な特徴を有する。修飾糖のうち少なくとも一つは、二環式糖又は置換糖部分を有することが好ましい。

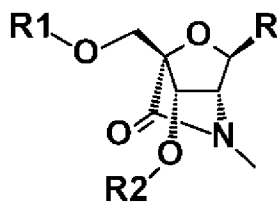
[0073] 修飾糖を有するヌクレオチドの例としては、5'-ビニル、5'-メチル(R又はS)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F及び2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオチドが挙げられる。2'位の置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁~C₁₀アルキル、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)及びO-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n) (式中、各R₁、R_m及びR_nは独立に、H又は置換もしくは無置換のC₁~C₁₀アルキルである)から選択することもできる。

[0074] 二環式糖を有するヌクレオチドの例としては、4'と2'のリボシル環原子の間の架橋を含むヌクレオチドが挙げられる。ある種の実施態様では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、架橋が以下の式の1つを含む、1つ又は複数の二環式糖を有するヌクレオチドを含む：4'-(CH₂)-O

$-2'$ (LNA) ; $4' - (CH_2) - S - 2'$; $4' - (CH_2)_2 - O - 2'$
 $'$ (ENA) ; $4' - CH(CH_3) - O - 2'$ 及び $4' - CH(CH_2OCH_3) - O - 2'$ (及びそれらの類似物。米国特許7, 399, 845号を参照されたい) ; $4' - C(CH_3)(CH_3) - O - 2'$ (及びそれらの類似物。WO2009/006478号を参照されたい) ; $4' - CH_2 - N(OCH_3) - 2'$ (及びそれらの類似物。WO2008/150729号を参照されたい) ; $4' - CH_2 - O - N(CH_3) - 2'$ (US2004-0171570号を参照されたい) ; $4' - CH_2 - N(R) - O - 2'$ (式中、Rは、H、C1~C12アルキル又は保護基である) (米国特許7, 427, 672号を参照されたい) ; $4' - CH_2 - C(H)(CH_3) - 2'$ (Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照されたい) ; 並びに $4' - CH_2 - C(=CH_2) - 2'$ (及びそれらの類似物。WO2008/154401号を参照されたい)。

[0075] ある種の実施態様 (AmNA) では、二環式糖を有するヌクレオシドは以下の式：

[化3]



AmNA

[式中、Rは核酸塩基であり、R1、R2はそれぞれ独立して置換されてもよいリン酸基を示す。]

で表されるヌクレオシドを挙げることができる。修飾糖の調製方法はWO11/052436等により当業者に周知である。

[0076] ある種の実施態様では、miR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの核酸塩基がシトシンである核酸塩基配列を有

する。ある種の実施態様では、少なくとも1つのシトシンは修飾核酸塩基の5-メチルシトシンである。ある種の実施態様では、すべてのシトシンは5-メチルシトシンである。

[0077] RNA及びDNAの天然に存在するヌクレオシド間結合は、3'-5'ホスホジエステル結合である。1つ又は複数の修飾された、すなわち天然に存在しない、ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取り込みの増強、標的核酸に対する親和性の増強及びヌクレアーゼの存在下での安定性の増大などの特性が理由で、天然に存在するヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドよりも好ましいことが多い。

[0078] 修飾ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子を保持するヌクレオシド間結合及びリン原子を有さないヌクレオシド間結合を含む。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、これらに限定されないが、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート及びホスホロチオエートの1つ以上が挙げられる。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は周知である。

[0079] ある種の実施態様では、miR-33bに対する修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合は、全てホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

[0080] 本明細書中、ヌクレオチドを表す「Gas」等の記号において、左側位置に示す略号は核酸塩基部分を意味し、中央位置に示す略号は糖部分を意味し、そして、右側位置に示す略号はヌクレオシド間結合の様式を意味する。

[0081] ある種の実施態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、

下式：

A a s A d s M a s A d s G a s C d s A a s A d s T a
s G d s M a s A d (配列番号8)；

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

A = アデニン、T = チミン、G = グアニン、C = シトシン、
に従って示され；

各糖部分が下記記号：

a = A m N A の糖部分、d = 2' - デオキシリボース、
に従って示され；

各ヌクレオシド間結合が下記記号：

s = ホスホロチオエートに従って示される、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

[0082] (m i R - 3 3 b 阻害物質の選抜方法)

m i R - 3 3 b 阻害物質の選抜方法としては、m i R - 3 3 b 阻害物質による細胞内 m i R - 3 3 b レベルの低減あるいは機能の阻害を検証できる方法であればいかなるものでもよいが、m i R - 3 3 b 阻害物質としては m i R - 3 3 b レベル低減率が m i R - 3 3 a レベル低減率より高い m i R - 3 3 b レベル低減物質が好ましく用いられるため、m i R - 3 3 b 及び m i R - 3 3 a の細胞内におけるレベルの低減を検証できる方法が好ましく用いられる。具体的には、例えば、以下に示す *in vitro*、及び *in vivo* の検証方法が用いられる。

[0083] m i R - 3 3 b 阻害物質による細胞内 m i R - 3 3 b レベル低減に対する *in vitro* 検証は、m i R - 3 3 b が発現している細胞系、好ましくは m i R - 3 3 b および m i R - 3 3 a が発現している細胞系（以下、「m i R - 3 3 b 発現細胞系」と称することがある）であればいずれのものも用いることができるが、例えば、m i R - 3 3 a 及び m i R - 3 3 b を発現するマウスから採取した筋細胞が挙げられる。また、ヒトの m i R - 3 3 b、好ましくは m i R - 3 3 b 及び m i R - 3 3 a を導入した細胞系を選択することもできる。m i R - 3 3 b 又は m i R - 3 3 b 及び m i R - 3 3 a の導入に用いる細胞系は、動物由来で通常用いられる細胞であれば特に制限はない。これらの細胞系は商業的供給業者から入手可能であり、一般的に用いられる市販の試薬を使用して、供給業者の説明書に従って培養される。これら

の細胞系へのmiR-33bの導入方法としては、一般的には、例えば、miR-33b又はmiR-33b及びmiR-33aの発現用のベクターをトランスフェクションする方法等が挙げられるがこれに限られない。

[0084] miR-33b阻害物質をmiR-33b発現細胞系に接触させる方法も特に制限はないが、一般的に核酸を細胞内へ導入するために用いられる方法が挙げられる。具体的には、例えば、リポフェクション法やエレクトロポレーション法、Gymnosis法等である。

[0085] miR-33b又はmiR-33aの細胞内におけるレベルは、当技術分野で既知の様々な方法でアッセイすることができる。具体的には、ノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）又は定量的リアルタイムPCR等が挙げられる。miRNAを単離する際には、当技術分野で周知の方法を使用して、例えば、製造業者の推奨プロトコールに従ってTriPure Isolation Reagent（Roche）、Maxwell RSC miRNA Tissue Kit試薬（Promega）等を使用することができる。このようにしてmiR-33b又はmiR-33b及びmiR-33aの発現レベルを解析することができる。

[0086] miR-33b阻害物質が、miR-33bの細胞内におけるレベルを低減させること、又はmiR-33b発現細胞の表現型を変化させる能力を評価するために、*in vivo*で試験を行うことができる。miR-33b阻害物質のmiR-33bの当該細胞内におけるレベルの低減に対する検証は、例えば、miR-33bを発現する動物に対して、miR-33b阻害物質を投与し、例えば、前脛骨筋において、当該細胞における上述のmiR-33b又はmiR-33b及びmiR-33aレベルの解析を行う方法が挙げられる。また、miR-33b阻害物質によるmiR-33b発現細胞の表現型を変化させる能力の評価は、実験用の疾患モデル、例えば筋ジストロフィーモデル、例えばmdxマウスモデルを用いて実施することができる。

[0087] miR-33b阻害物質のmiR-33bのレベル低減又はmiR-33bの機能阻害に対する*in vitro*又は*in vivo*検証は、miR

−33b発現細胞系又はmiR−33b、好ましくはmiR−33b及びmiR−33aを発現する動物に対して、miR−33b阻害物質を投与し、ABCA1、Pax7、Syntropin、Cdk6、CCND1、Follistatin、Utrophin、MyoDから選択される1種類以上のmRNAもしくはタンパク質の発現レベルを測定することで行うことができる。

[0088] 本発明の選抜方法により得られるmiR−33b阻害物質は、筋疾患の発生又は進行を抑制するため、筋疾患の予防及び／又は治療薬として用いることができる。すなわち、本発明は、上記方法によりmiR−33b阻害物質を選抜する工程を含む、筋疾患の予防及び／又は治療薬のスクリーニング方法を提供する。

[0089] (miR−33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法)

miR−33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは常法によって合成することができ、例えば、市販の核酸合成装置によって容易に合成することができる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドに含まれてもよい、ヌクレオシドの糖修飾のAmNAは、WO11/052436に開示されている方法で合成することができる。

[0090] miR−33bに対するsiRNA及びshRNAは、人工的に化学合成することができる。また、siRNA及びshRNAは、例えば、T7RNAポリメラーゼ及びT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンス及びセンスのRNAをインビトロで合成することができる。

[0091] miR−33bを阻害する活性を有する化合物は、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 113(21):5898−903(2016)、Mol. Pharm. 16(2):914−920(2019)、J. Am. Chem. Soc. 139(9):3446−3455(2017)等が開示されている方法で合成することができる。

[0092] (miR−33b阻害物質による筋疾患治療)

miR-33b阻害物質によって、筋疾患を治療又は予防することができる。

[0093] 本発明者らが検討した結果、後述する実施例に示すように、miR-33b阻害物質は、細胞内miR-33bレベルを低減させ、筋分化の促進、筋線維の増大、筋組織の線維化の抑制を介して、筋疾患の症状を改善し、筋疾患の進行を抑制した。

本発明において、筋線維の増大には太い筋線維が増加し、細い筋線維が減少することを含む。

miR-33b阻害物質による筋疾患の改善メカニズムとしては、例えば、後述する実施例に示すように、ABCA1、Pax7、Syntrophin、Cdk6、CCND1、Follistatin、UtrrophinおよびMyoDなどの標的mRNA及び／またはタンパク質の発現増強が挙げられるが、miR-33bの下流標的は多数存在し、下流には複数のシグナル伝達経路が存在することから、これらに限られない。一方、miR-33aに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、筋分化の促進、筋線維の増大、筋組織の線維化の抑制は見られなかった。

このように、本発明では、筋疾患におけるmiR-33bの役割を初めて明らかにし、miR-33bを選択的に阻害する阻害物質を用いることで筋疾患を予防又は治療できることを見出したのである。

以上のように、miR-33b阻害物質は、筋疾患の発生又は進行を抑制することができ、症状を改善することができ、及び／又は筋力の増強（筋力低下の抑制を含む）を介して運動機能を維持又は向上させ、予防又は治療効果を発揮することができるため、筋疾患の治療又は予防剤として有用である。

[0094] 筋疾患は、筋における疾患であって、筋分化の促進、筋線維の増大及び／又は筋組織の線維化の抑制を介して予防または治療しうる疾患であれば特に制限されないが、例えば、神経原性筋萎縮、筋原性筋萎縮、神経筋接合部の疾患が挙げられ、好ましくは筋原性筋萎縮、より好ましくは筋ジストロフィー

が挙げられる。

[0095] 神経原性筋萎縮は、例えば、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症が挙げられる。

[0096] 筋原性筋萎縮は、例えば、筋ジストロフィー、先天性ミオパチー、炎症性ミオパチー、代謝性ミオパチー、内分泌疾患に伴う筋傷害が挙げられる。ここで、筋ジストロフィーとして具体的には、例えば、先天性筋ジストロフィー、肢体型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーが挙げられ、炎症性ミオパチーとして具体的には、例えば、多発筋炎、皮膚筋炎、封入体筋炎が挙げられ、代謝性ミオパチーとして具体的には、例えば、先天性代謝傷害によるミオパチー、周期性四肢麻痺が挙げられ、内分泌疾患に伴う筋傷害として具体的には、例えば、甲状腺疾患や糖尿病に伴う筋傷害が挙げられる。

[0097] 神経筋接合部の疾患は、例えば、重症筋無力症、筋無力症候群、先天性筋無力症が挙げられる。

[0098] その他の筋疾患として、筋肉の機能低下を引き起こす疾患や症状が挙げられ、例えば、カヘキシア、サルコペニア、非活動性萎縮、遺伝性痙性対麻痺が挙げられる。

[0099] 上述のとおりmiR-33b阻害物質は筋疾患を治療又は予防するために使用することができ、したがって、本発明は、筋疾患の治療に使用するためのmiR-33b阻害物質；筋疾患の治療に使用するための医薬組成物；筋疾患を治療するためのmiR-33b阻害物質の使用；筋疾患の治療用医薬の製造におけるmiR-33b阻害物質の使用；筋疾患の治療用医薬の製造に使用するためのmiR-33b阻害物質；有効量のmiR-33b阻害物質を、その必要のある対象に投与することを含む、筋疾患の治療又は予防方法；
を提供する。

[0100] miR-33b阻害物質、又はその医薬的に許容可能な塩、及び薬学的に許容可能な担体を含む組成物は、医薬組成物として用いることができる。医

薬組成物の調製のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを1つ以上の医薬的に許容可能な活性又は不活性な物質と混合することができる。医薬組成物の製剤化のための組成物及び方法は、投与経路、疾患の程度又は投与される用量を含めたいくつかの判断基準によって選択することができる。

例えば、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。好ましくは静脈注射剤または筋肉注射剤である。注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁又は乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、リン酸緩衝食塩水、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HC0-50(polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。また、緩衝剤、pH調整剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、安定化剤などを含むことができる。

[0101] 経口投与のための組成物としては、固体又は液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

[0102] また、本発明の医薬組成物には、核酸導入用試薬を含むことができる。該核酸導入用試薬としては、リポソーム、リポフェクチン、リポフェクタミン、DOGS(トランスフェクタム)、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ(エチレンイミン)(

PEI)等の陽イオン性脂質等を用いることができる。

[0103] また、本発明の医薬組成物に含まれるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の場所で、コレステロール、糖質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、ビタミン、ペプチド、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び色素等のコンジュゲート基とコンジュゲートしたものが好ましく用いられる。上記コンジュゲートしたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その活性、筋疾患部位を標的とする組織又は細胞への取り込みを増強するものを選択することができる。

上記コンジュゲート基は、コレステロール又は脂質が好ましい。

[0104] 上記コンジュゲート基はアンチセンスオリゴヌクレオチドに直接結合しているものか、あるいはコンジュゲート基は、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、不飽和部分（例えば、二重又は三重結合）、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（ADO）、スクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、6-アミノヘキサン酸（AHEX又はAHA）、置換C1~C10アルキル、置換若しくは非置換C2~C10アルケニル、及び置換若しくは非置換C2~C10アルキニルから選択される連結部分によりアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合している。ここで、置換基は、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルから選択される。

[0105] 本発明の医薬組成物は、副作用の少ないものを選択することができる。副作用としては、注射部位反応、肝機能検査の異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常、ミオパシー及び倦怠等が挙げられる。例えば、血液中のALT、AST又は γ -GTPレベルの上昇は、肝毒性又は肝機能異常を示し得る。例えば、ビリルビンの上昇は、肝毒性又は肝機能異常を示し得る。また、尿たんぱくの上昇、血液中のクレアチニン、もしくはBUNの上昇は、腎毒性又は腎機能異常を示し得る。

[0106] 本発明の医薬組成物は、これを対象個体に適当な方法で投与することにより、筋疾患の治療、予防、又は軽減をすることができる。すなわち、本発明は、miR-33b阻害物質、好ましくはmiR-33bに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、もしくはそれを含む医薬組成物の有効量を、それを必要とする対象個体に適当な方法で投与することにより、筋疾患の治療、予防、又は軽減をする方法を提供する。

[0107] 本発明の医薬組成物の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内などの全身投与であってもよいし、局所注射又は経口投与などの局所投与であってもよい。好ましくは静脈内注射または皮下注射による投与である。本発明の医薬組成物の投与量は、使用目的、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別等により適宜変更し得るが、通常、アンチセンスオリゴヌクレオチド量として、0.1 ng~100 mg/kg/日、好ましくは、1 ng~10 mg/kg/日の範囲から選ぶことができる。

実施例

[0108] 非限定開示及び参照による組み込み

本明細書に記載のある種の化合物、組成物及び方法は、ある種の実施態様に従って特異的に記載されているが、以下の実施例は、本明細書に記載の化合物を例示する役割を果たすにすぎず、これを限定することを意図しない。本出願に記載される参考文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

[0109] 実施例 1

アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成及び精製

AmNAアミダイトは株式会社大阪合成有機化学研究所より入手し、AmNA含有アンチセンスオリゴヌクレオチドは味の素バイオファーマサービス・株式会社ジーンデザインにおいて合成し精製された。

合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドを表1に示す。33b-2-AmNAはmiR-33bに対するオリゴヌクレオチド（以下、「anti-miR-33b」と称することがある）を、33a-2-AmNAはmiR

− 3 3 a に対するオリゴヌクレオチド（以下、「anti-miR-33a」と称することがある）を示し、NEG-AmNAはコントロールアンチセンスオリゴヌクレオチド（以下、「anti-miR-ctrl」と称することがある）を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの表記は、各ヌクレオチドが3文字で表される。但し3'末端のヌクレオチドはヌクレオシド間結合がないため2文字で表される。

1) 第1文字は大文字で表され、下記核酸塩基を示す：

A = アデニン、T = チミン、G = グアニン、C = シトシン、M = 5-メチルシトシン、2) 第2文字は下記各糖部分を示す：

a = AmNAの糖部分、d = 2'-デオキシリボース、

3) 第3文字は下記ヌクレオシド間結合を示す：

s = ホスホロチオエート。

[0110] [表1]

アンチセンスオリゴヌクレオチド名	配列番号	配列	m/z
33a-2-AmNA(12)	7	AasAdsMasTdsAasCdsAasAdsTasGdsMasAd	4156.5
33b-2-AmNA(12)	8	AasAdsMasAcsGasCdsAasAdsTasGdsMasAd	4181.33
NEG-AmNA (12)	11	AasAdsMasAcsAasTdsAasCdsTasAdsMasGd	4156.15

[0111] 実施例2

miR-33bノックイン/mdxマウス由来初代骨格筋細胞におけるmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの筋形成促進作用の測定

C57BL/6をバックグラウンドとした、miR-33bノックインマウスとジストロフィン欠損mdxマウスを交配してmiR-33bノックイン/mdxマウスを得た。miR-33bノックインを行ったのは、マウスではmiR-33bが存在せず、ヒトにはmiR-33bが存在するため、筋疾患モデルマウスにmiR-33bを強制的に発現させてmiR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を調べるためである。

8週齢のmiR-33bノックイン/mdxマウスから初代骨格筋細胞を以下の方法で樹立した。方法は、骨格筋（前脛骨筋）を摘出し、0.2% コラゲナーゼType 2 溶液にて筋繊維を単離し、collagen type

1をコーティングした薄いシリコン膜上で初代培養した。培養した細胞は筋芽細胞(前駆細胞)であり、増殖後に2% Horse serumの培地に交換することにより、筋芽細胞から筋細胞へ分化させ、さらに融合させることで筋管細胞を形成させた。

初代骨格筋細胞に対しanti-miR-ct1およびanti-miR-33bを25nMで添加し、3日後の筋形成促進作用をミオシン重鎖(MHC)の検出及び筋管細胞の融合率にて測定した(図1A、B)。その結果、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドはコントロールに対し、有意な筋形成促進作用を示した。

[0112] miR-33bノックイン/mdxマウスにおける骨格筋におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド単回投与における骨格筋各種パラメーターの測定

8週齢のmiR-33bノックイン/mdxマウスに対し、両前脛骨筋にアンチセンスオリゴヌクレオチド(anti-miR-ct1、anti-miR-33bおよびanti-miR-33a)を10mg/mlで各50 μ l投与し、3日後に投与部位の前脛骨筋を採材し、miR-33a及びmiR-33bの発現を以下の方法で測定した。miRNA測定は、RNAをTriPure Isolation Reagent (Roche)を用いて分離、純化し、TaqMan MicroRNA assay protocols (Applied Biosystems)を用いて測定した。発現量はサーマルサイクラー(ABI Prism Step One Plus sequence detection system)を用いて解析し、U6 snRNAを用いて標準化とした。

その結果(図2)、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドはmiR-33aの発現はほとんど変化させず、miR-33bの発現を強く低下させた。また、miR-33aアンチセンスオリゴヌクレオチドはmiR-33bの発現はほとんど変化させず、miR-33aの発現を強く低下させた。miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドによるmiR-33aレベル低減率/miR-33bレベル低減率の値は、0.02であった。

[0113] 8週齢のmiR-33bノックイン/mdxマウスに対し両前脛骨筋にアンチセンスオリゴヌクレオチド (anti-miR-ctl、anti-miR-33bおよびanti-miR-33a) を10mg/mlで各50μl投与し、3日後に投与部位の前脛骨筋を採材して各種遺伝子発現を解析した。その結果、図3に示すように、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ABCA1、Cdk6、MyoD、Utrophin、Fst及びPax7の発現をコントロールアンチセンスオリゴヌクレオチドに対して、それぞれ1.65倍、1.76倍、1.70倍、1.49倍、1.50倍、2.03倍に増加させた。一方、miR-33aアンチセンスオリゴヌクレオチドは、これらの遺伝子の発現を増加させなかった。

なお、RNA抽出とリアルタイムPCRは、以下の手順で実施した。RNAはTriPure Isolation Reagent (Roche) を用いて分離、純化し、添付文書通りにVerso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) を用いてcDNAを合成した後、THUNDERBIRD PCR Master Mix (TOYOBO) を用いて特異遺伝子を40サイクル増幅した。発現量はハウスキーピング遺伝子としてGAPDHを用いて標準化した。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

ABCA1 Forward, AACAGTTTGTGGCCCTTTTG
(配列番号9)

ABCA1 Reverse, AGTTCCAGGCTGGGGTACTT
(配列番号10)

Cdk6 Forward, TGTTTCAGCTTCTCCGAGGT (配列番号12)

Cdk6 Reverse, CTGGACTGGAGCAGGACTTTC
(配列番号13)

MyoD Forward, CTTCTACGCACCTGGACCG (配列番号14)
MyoD Reverse, ACTGTAGTAGGCGGT

GTCGT (配列番号15)

Utropin Forward, GCCCTCCCTGCAGATTAT
TTGG (配列番号16)

Utrophin TROPHIN Reverse, CTGTCCAGTT
GACCTTTGATACTCTTC (配列番号17)

Pax7 Forward, GAGTTTCGATTAGCCGAGTGC (配列番号18)

Pax7 Reverse, GTCGGGTTCTGATTCCACAT (配列番号19)

Fst Forward, ATGGACCGAGGAGGATGTGA (配列番号20)

Fst Reverse, TTGCATCTGGCCTTGAGGAG (配列番号21)

GAPDH Forward, AAATGGTGAAGGTCGGTGTG
(配列番号22)

2)

GAPDH Reverse, AATCTCCACTTTGCCACTGC
(配列番号23)

[0114] 実施例3

miR-33bノックイン/mdxマウスにおける骨格筋におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの反復投与における骨格筋各種パラメーターの測定

8週齢のmiR-33bノックイン/mdxマウスに対し、両前脛骨筋にアンチセンスオリゴヌクレオチド (anti-miR-ctl、anti-miR-33bおよびanti-miR-33a) を1mg/mlで各50 μ l投与し、7日後、14日後、21日後及び35日後に同様にアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与し、最終投与3日後に投与部位の前脛骨筋を採材して各種解析を行った。

[0115] miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるmiR-33

bノックイン／mdxマウス前脛骨筋における骨格筋線維の筋断面積の大きさの変化をImageJ (National Institute of Health) により定量解析した。その結果、図4に示すように、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、コントロールに対し、断面積300-500 (μm^2) の筋線維の割合を3.2倍と有意に増加させた。また、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細い筋線維である断面積300 (μm^2) 以下の線維の割合を減少させ、500-700 (μm^2) の筋線維の割合を増加させた。一方、miR-33aアンチセンスオリゴヌクレオチドは、断面積300 (μm^2) 以下の線維の割合を増加させ、断面積300-500 (μm^2) および500-700 (μm^2) の筋線維の割合を減少させた。従って、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、筋線維を増大させることが明らかとなった。

[0116] miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるmiR-33bノックイン／mdxマウス前脛骨筋における筋組織の線維化の変化をマッソントリクローム染色により測定した。その結果、図5に示すように、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、コントロールに対し、0.58倍と有意に筋組織の線維化を減少させた。一方、miR-33aアンチセンスオリゴヌクレオチドは、コントロールに対し筋組織の線維化を減少させなかった。従って、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、筋組織の線維化を抑制することが明らかとなった。

なお、マッソントリクローム染色法を以下に示す。

脱パラフィンした後、鉄ヘマトキシリンで核を黒く染め小分子である酸フクシンで細胞質を赤く染めた。大分子であるアニリンブルーでコラーゲン線維を青く染めてから画像解析 (ImageJ) で線維化部分を定量した。

[0117] miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるmiR-33bノックイン／mdxマウス前脛骨筋における筋衛星細胞のPax7/MyoD発現の変化を蛍光免疫染色によって測定した。その結果、図6に示すように、miR-33bアンチセンスオリゴヌクレオチドは、コントロールに

対し、有意に Pax7⁺/MyoD⁻群を増加させた。Pax7⁺/MyoD⁻は、休止期の衛生細胞のマーカである。miR-33b アンチセンスオリゴヌクレオチドは、休止期の衛生細胞を増加させるため、筋損傷の際に、衛生細胞を枯渇することなく提供でき、筋再生を促進させると考えられる。なお、衛生細胞から筋芽細胞、筋細胞への分化過程において、Pax7⁺/MyoD⁻は Pax7⁺/MyoD⁺となるため、MyoDの衛生細胞における低下は衛生細胞の増加を示し、MyoDの上昇は筋分化の促進を示す。

蛍光免疫染色法を以下に示す。

脱パラフィンした後、抗原賦活化を行い Pax7、MyoD の二重染色 (Fab フラグメントを用いた) 方法で行った。

- [0118] miR-33b アンチセンスオリゴヌクレオチド投与による miR-33b ノックイン/mdx マウス前脛骨筋における utrophin の発現の変化を抗 utrophin 抗体による蛍光免疫染色法で測定した。その結果、図7に示すように、miR-33b アンチセンスオリゴヌクレオチドは、コントロールに対し、有意に utrophin 陽性細胞数が増加させた。

なお、蛍光免疫染色法を以下に示す。

脱パラフィンした後、抗原賦活化を行い utrophin 抗体 (一次抗体) 反応させてから交差性のある蛍光二次抗体を用いて反応させた。

- [0119] miR-33b アンチセンスオリゴヌクレオチド投与による miR-33b ノックイン/mdx マウス前脛骨筋における各種タンパク質発現の変化をウェスタンブロット法にて測定した。その結果、図8に示すように、miR-33b アンチセンスオリゴヌクレオチドは、コントロールに対し、Utrophin、ABCA1、Pax7、Fst、Cdk6、CCND1、Syntrophin のタンパク質の発現を増加させた。

- [0120] ウェスタンブロット法を以下に示す。

SDS-PAGE 後のゲルにメンブレンを密着させ、分離したタンパクに電圧をかけてゲルからメンブレンに転写した。メンブレンに一次抗体 (目的とするタンパクに対する抗体) を反応させてから次に HRP の酵素で標識した二

次抗体を用いて反応させた。最後は化学発光法により検出した。

用いた抗体は以下の通りである。

anti-utrophin, Santa cruz 8A4
anti-ABCA1, Novus NB400-105
anti-Pax7, DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank)
anti-Cdk6, Cell Signal Technology CST#3136
anti-Follistatin, Santa cruz C-8
anti-GAPDH, Cell Signal Technology CST#2118
anti- Syntrophin Santa cruz D-7
anti- CCND1 Abcam ab92566

[0121] 全てのマウスは京都大学医学部附属動物実験施設にて飼育とし、その施設はSPF (specific pathogen free) の状態が維持されており、この研究は京都大学医の倫理委員会の認可を得て行ったものである。

[0122] 本明細書では、別段の記載がない限り、単数形の使用は複数形を含む。本明細書では、別段の記載がない限り、「又は」の使用は「及び／又は」を意味する。さらに、用語「含むこと (including)」並びに他の形態、例えば「含む (includes)」及び「含まれる (included)」の使用は、限定的なものではない。さらに、別段の記載がない限り、「要素」などの用語は、1つのユニットを含む要素と1つを超えるサブユニットを含む要素を包含する。

[0123] 本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のためだけであり、記載される主題を制限するものとして解釈されるべきでない。これらに限定されないが、特許、特許出願、記事、書籍及び論文を含めた、本出願で引用されるすべての文書又は文書の一部は、本明細書で論じる文書の一部に関して、及びその全体が、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

[0124] 具体的な定義が与えられない限り、本明細書に記載の分析化学、有機合成

化学、並びに医化学及び薬化学に関連して利用される命名法、及びそれらの手順及び技法は、当技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。標準的な技法を、本明細書中で使用する化学合成及び化学分析に使用することができる。許容される場合、本明細書の開示の全体を通して言及される、すべての特許、出願、公開出願及び他の刊行物、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）などのデータベースを通して入手可能なGenBank受託番号及び関連する配列情報並びに他のデータは、本明細書に論じる文書の一部に関して、及びその全体が、参照により組み込まれる。

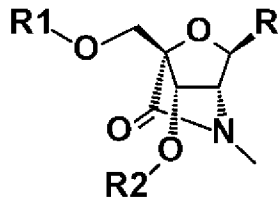
また、本明細書は、電子フォーマットの配列表と共に出願するが、当該電子フォーマット中に記載する配列表の情報は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] *miR-33b* 阻害物質を有効成分とする、筋疾患の予防又は治療剤。
- [請求項2] *miR-33b* 阻害物質が *miR-33b* レベル低減物質である、請求項1に記載の予防又は治療剤。
- [請求項3] *miR-33b* レベル低減物質が、核酸である、請求項2に記載の予防又は治療剤。
- [請求項4] *miR-33b* レベル低減物質が、*miR-33b* に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA* 又は *shRNA* である、請求項3に記載の予防又は治療剤。
- [請求項5] 前記 *miR-33b* レベル低減物質は、*miR-33b* レベル低減率が *miR-33a* レベル低減率より高い、請求項2～4のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項6] *miR-33b* レベル低減物質が、*miR-33b* に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項2～5のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項7] *miR-33b* に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが
- 1) 7～20ヌクレオチド残基からなり、
 - 2) 配列番号1の塩基配列を有する *miR-33b* の等長部分に90%以上相補的な塩基配列であって、配列番号1に記載の *miR-33b* の塩基配列の5'末端から数えて9番目かつ10番目の核酸塩基とはミスマッチを有さない塩基配列を有する、請求項6に記載の予防又は治療剤。
- (配列番号1) GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC
- [請求項8] *miR-33b* に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが AACAGCAATGCA (配列番号5)、
- に記載される配列からなる核酸塩基配列 (ただし、Cは5-メチルシトシン (M) でもよい) を有する、請求項7に記載の予防又は治療剤

- 。
- [請求項9] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが修飾オリゴヌクレオチドである、請求項8に記載の予防又は治療剤。
- [請求項10] 前記修飾オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1つのヌクレオシドが修飾糖を含む、請求項9に記載の予防又は治療剤。
- [請求項11] 前記修飾糖が、AmNAの糖部分から選択される、請求項10に記載の予防又は治療剤。

[化1]



AmNA

[式中、Rは核酸塩基であり、R1、R2はそれぞれ独立して置換されてもよいリン酸基を示す。]

- [請求項12] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、
下式：
A a s A d s M a s A d s G a s C d s A a s A d s
T a s G d s M a s A d (配列番号8)；
で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、
式中、
各核酸塩基が下記記号：
A = アデニン、T = チミン、G = グアニン、C = シトシン、M = 5-
メチルシトシン、に従って示され；
各糖部分が下記記号：
a = 上記のAmNAの糖部分、d = 2'-デオキシリボース、
に従って示され；

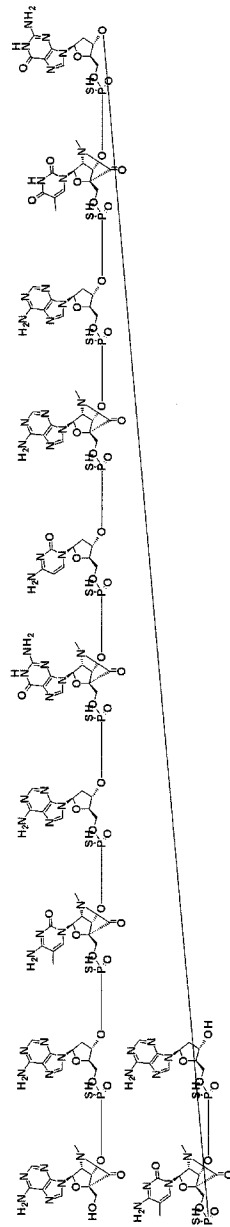
各ヌクレオシド間結合が下記記号：

s = ホスホロチオエートに従って示される、請求項 1 1 に記載の予防
又は治療剤。

[請求項13] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

[化2]

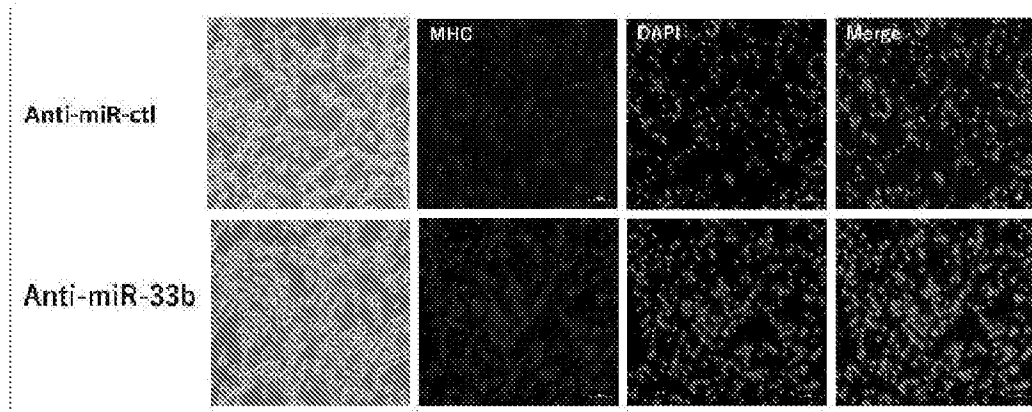


で示される修飾オリゴヌクレオチドである、請求項 1 2 に記載の予防

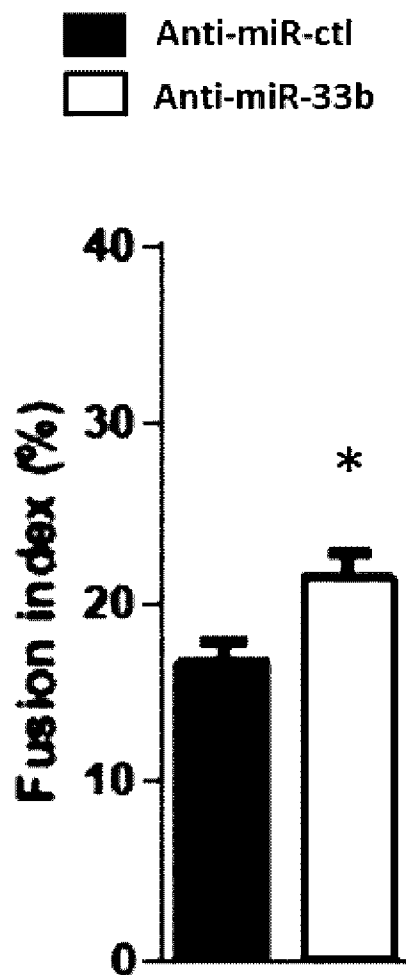
又は治療剤。

- [請求項14] 筋線維断面積を増加させることにより筋疾患の予防又は治療効果を発揮する、請求項1～13のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項15] 筋分化を促進させることにより筋疾患の予防又は治療効果を発揮する、請求項1～13のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項16] 筋疾患が神経原性筋萎縮症、筋原性筋萎縮症及び神経筋接合部の疾患からなる群から選択される、請求項1～15のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項17] 筋疾患がカヘキシア、サルコペニア、非活動性萎縮及び遺伝性痙性対麻痺からなる群から選択される、請求項1～15のいずれか一項に記載の予防又は治療剤。
- [請求項18] 神経原性筋萎縮症が、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症及び筋萎縮性側索硬化症からなる群から選択される、請求項16に記載の予防又は治療剤。
- [請求項19] 筋原性筋萎縮症が、筋ジストロフィー、先天性ミオパチー、炎症性ミオパチー及び代謝性ミオパチーからなる群から選択される、請求項16に記載の予防又は治療剤。
- [請求項20] 神経筋接合部の疾患が、重症筋無力症、筋無力症候群及び先天性筋無力症からなる群から選択される、請求項16に記載の予防又は治療剤。

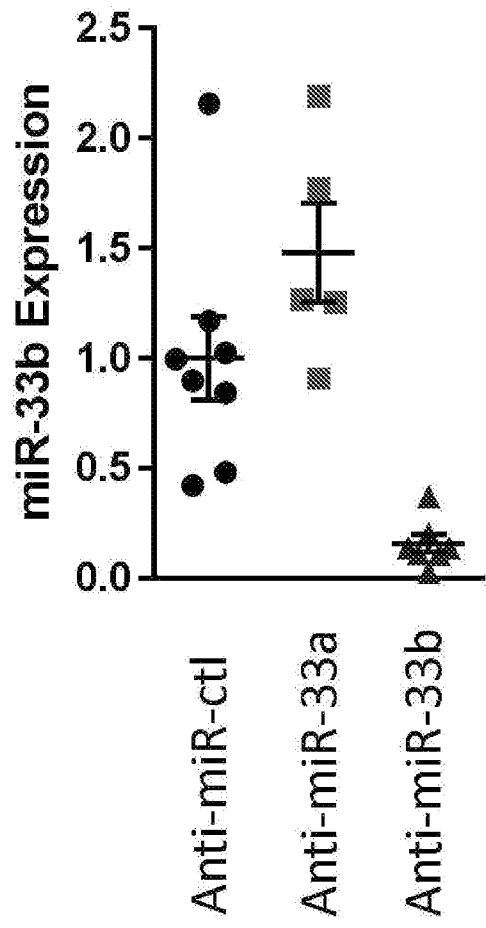
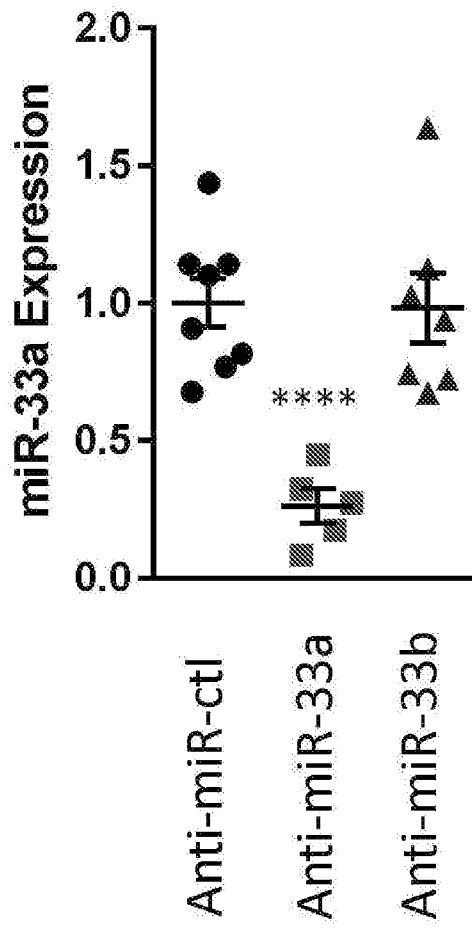
[図1A]



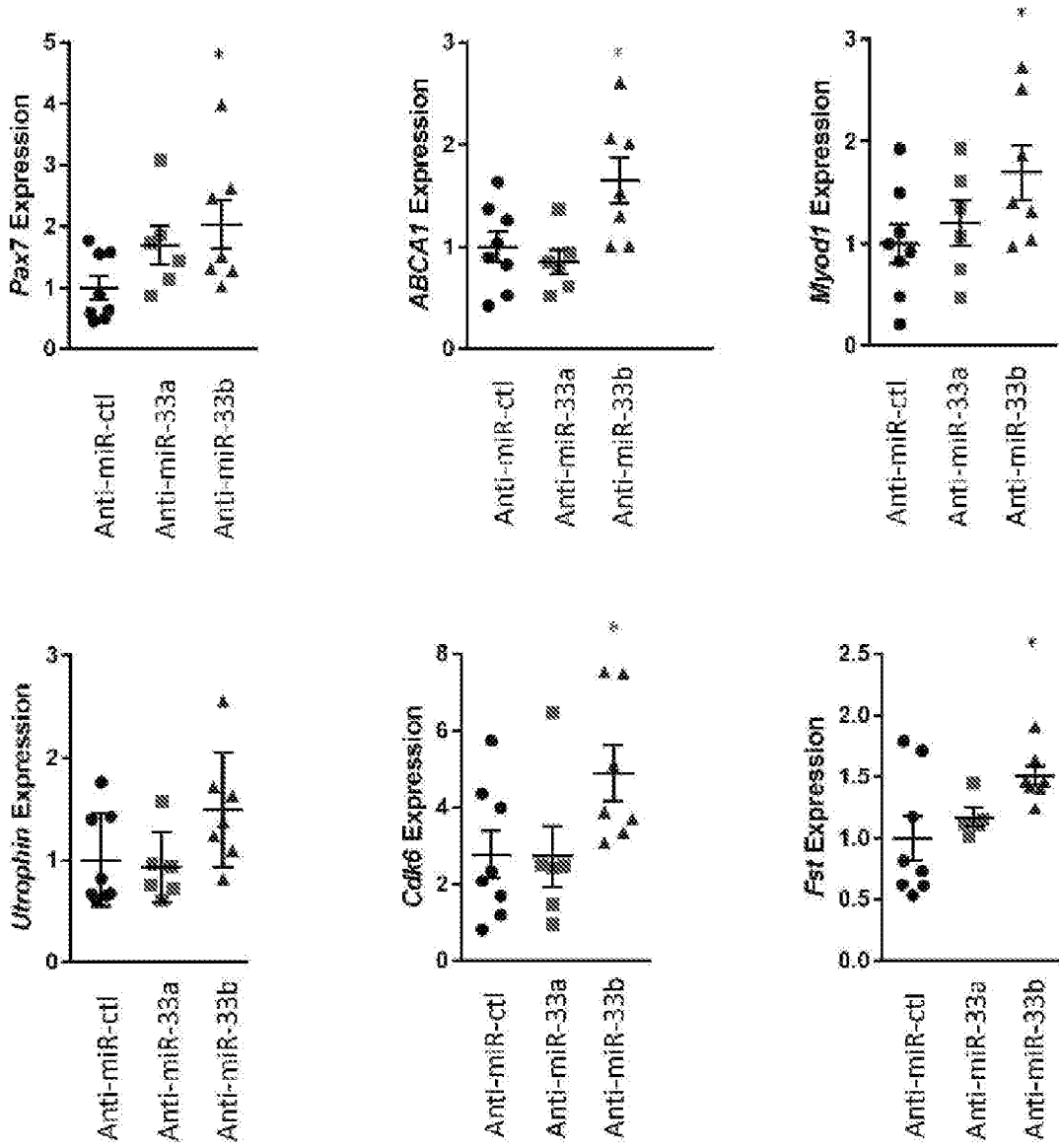
[図1B]



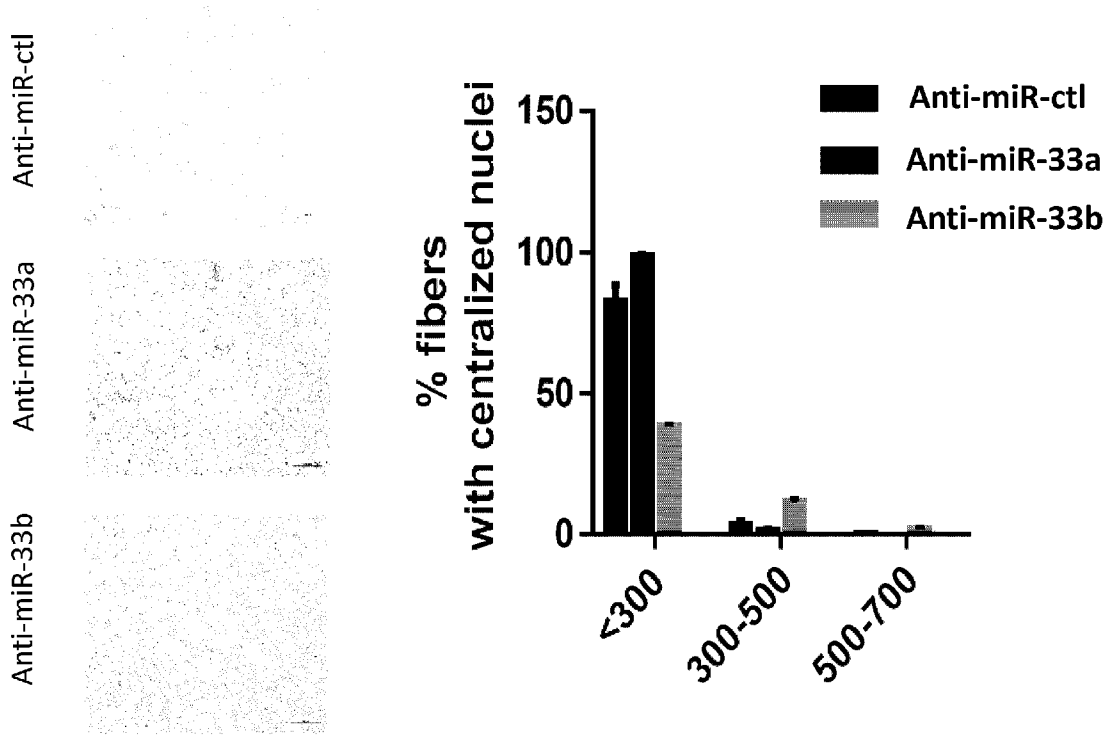
[図2]



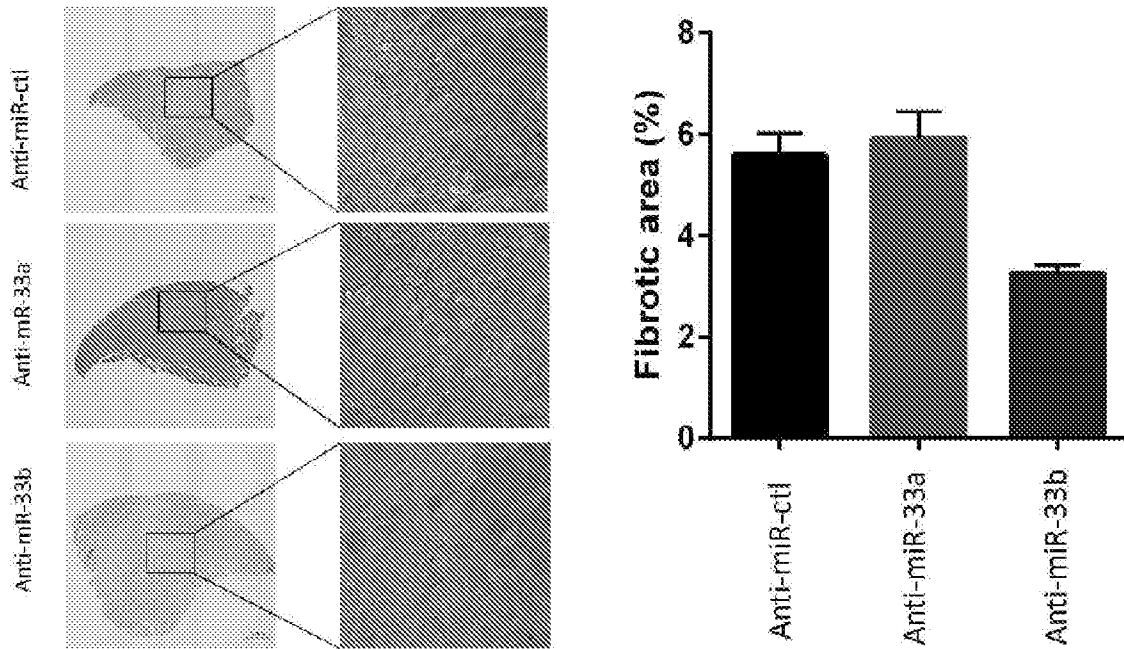
[Figure 3]



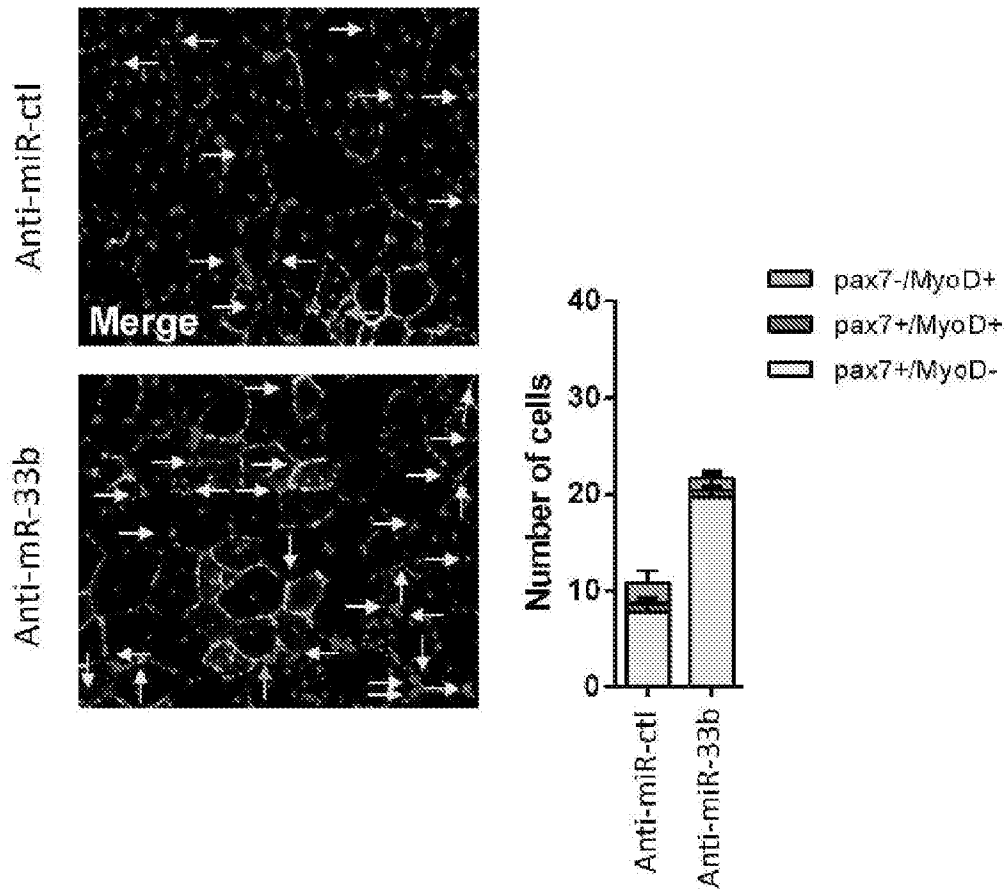
[Fig 4]



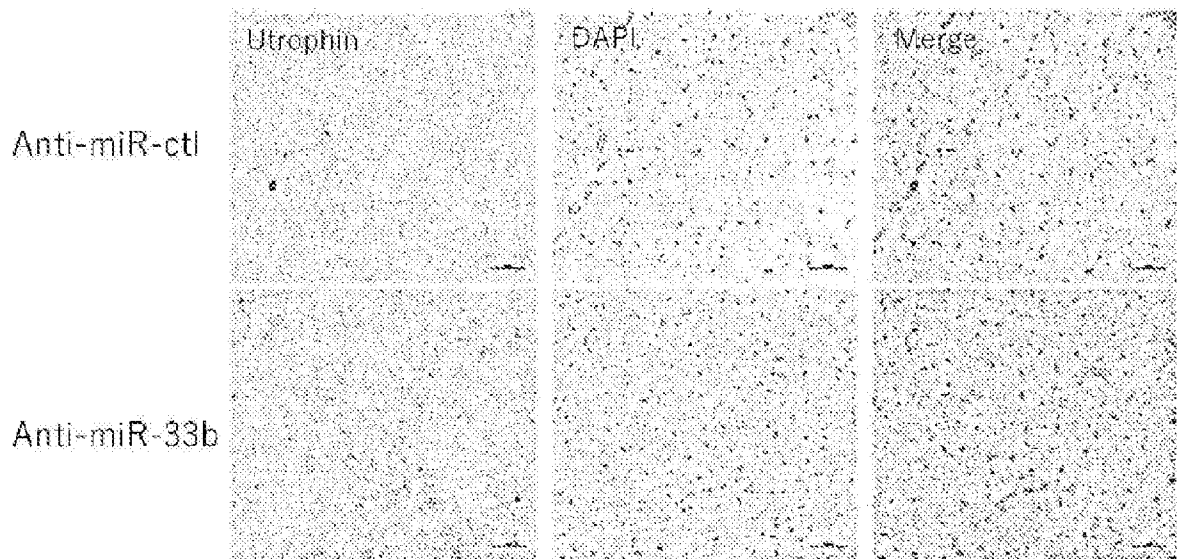
[Fig 5]



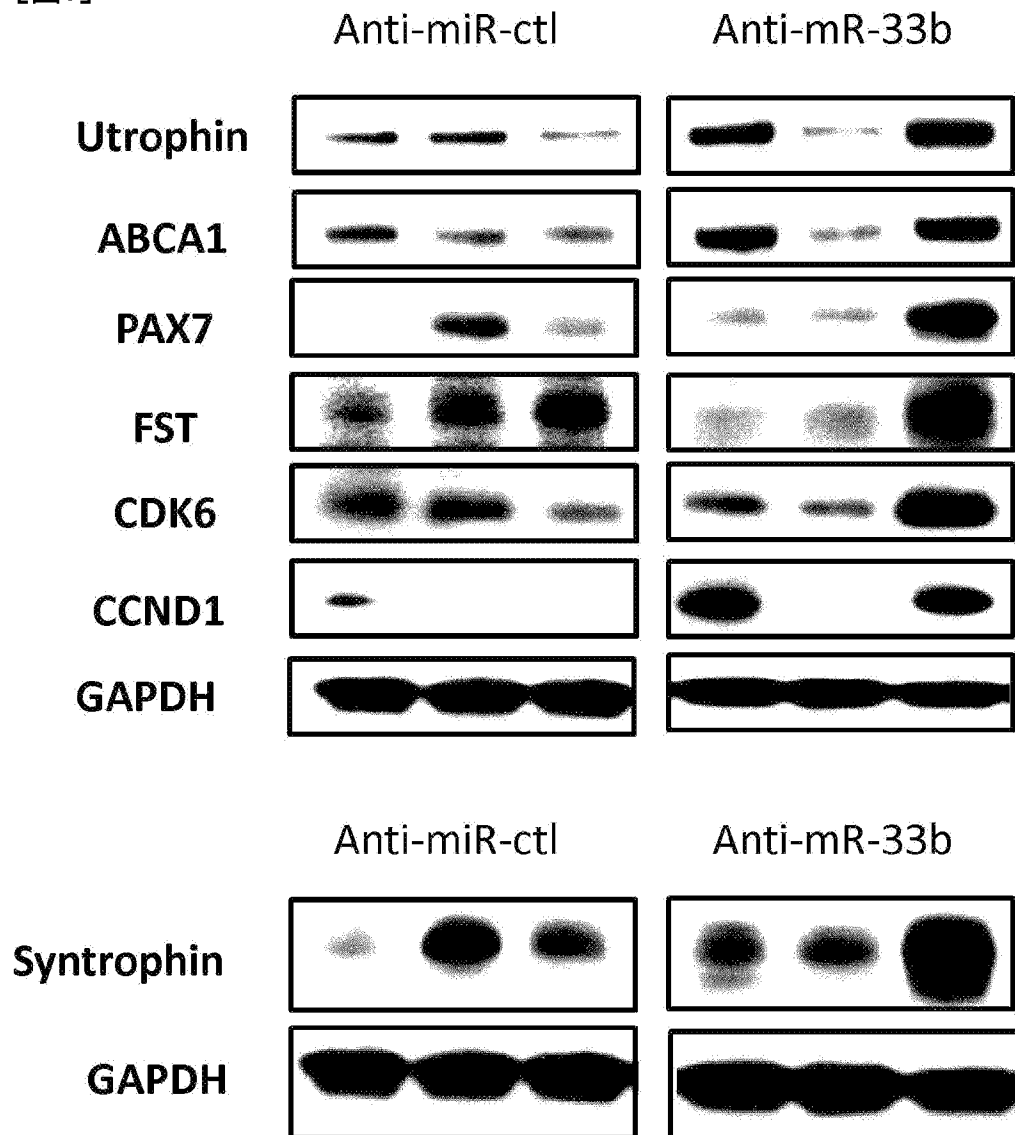
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/019329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/712(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 21/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i FI: A61K45/00; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K31/712; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04; A61P43/00 111; C12N15/113 Z ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K45/00; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K31/712; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04; A61P43/00; C12N15/113		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TANIGUCHI, M. et al. MicroRNA-33b downregulates the differentiation and development of porcine preadipocytes. Mol. Biol. Rep. 2014, vol. 41, no. 2, 1081-1090 abstract	1-20
A	CRIADO-MESAS L. et al. Expression analysis of porcine miR-33a/b in liver, adipose tissue and muscle and its potential role in fatty acid metabolism. PLoS One. January 2021, vol. 16, no. 1, article.e0245858 abstract	1-20
A	LIN, Y. MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2. SALL4 and Twist1. Sci. Rep., 2015, vol. 5, article.9995 abstract	1-20
A	WU, L. et al. LncRNA NEXN-AS1 attenuates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through sponging miR-33a/b. RSC Adv. 2019, vol. 9, no. 48, pp. 27856-27864 abstract	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 04 July 2022		Date of mailing of the international search report 19 July 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/019329

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/160121 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 06 August 2020 (2020-08-06) claims	1-20
A	WO 2021/058524 A1 (INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY – ICGEB) 01 April 2021 (2021-04-01) claims	1-20
A	CN 110665010 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 10 January 2020 (2020-01-10) claims	1-20

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/019329

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020/160121	A1	06 August 2020	JP	2022-523320	A	
				claims			
				EP	3918072	A1	
WO	2021/058524	A1	01 April 2021	(Family: none)			
CN	110665010	A	10 January 2020	(Family: none)			

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/712(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 21/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i FI: A61K45/00; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K31/712; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04; A61P43/00 111; C12N15/113 Z ZNA</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K45/00; A61K31/7088; A61K31/7105; A61K31/712; A61K48/00; A61P21/00; A61P21/04; A61P43/00; C12N15/113</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>TANIGUCHI M., et al., MicroRNA-33b downregulates the differentiation and development of porcine preadipocytes, Mol. Biol. Rep., 2014, Vol.41, No.2, 1081-1090 Abstract</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CRIADO-MESAS L., et al., Expression analysis of porcine miR-33a/b in liver, adipose tissue and muscle and its potential role in fatty acid metabolism, PLoS One, 2021.01, Vol.16, No.1, Article.e0245858 Abstract</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LIN Y., MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2, SALL4 and Twist1, Sci. Rep., 2015, Vol.5, Article.9995 Abstract</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			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	A	TANIGUCHI M., et al., MicroRNA-33b downregulates the differentiation and development of porcine preadipocytes, Mol. Biol. Rep., 2014, Vol.41, No.2, 1081-1090 Abstract	1-20	A	CRIADO-MESAS L., et al., Expression analysis of porcine miR-33a/b in liver, adipose tissue and muscle and its potential role in fatty acid metabolism, PLoS One, 2021.01, Vol.16, No.1, Article.e0245858 Abstract	1-20	A	LIN Y., MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2, SALL4 and Twist1, Sci. Rep., 2015, Vol.5, Article.9995 Abstract	1-20
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												
A	TANIGUCHI M., et al., MicroRNA-33b downregulates the differentiation and development of porcine preadipocytes, Mol. Biol. Rep., 2014, Vol.41, No.2, 1081-1090 Abstract	1-20												
A	CRIADO-MESAS L., et al., Expression analysis of porcine miR-33a/b in liver, adipose tissue and muscle and its potential role in fatty acid metabolism, PLoS One, 2021.01, Vol.16, No.1, Article.e0245858 Abstract	1-20												
A	LIN Y., MicroRNA-33b Inhibits Breast Cancer Metastasis by Targeting HMGA2, SALL4 and Twist1, Sci. Rep., 2015, Vol.5, Article.9995 Abstract	1-20												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>04.07.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>19.07.2022</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>柴原 直司 4U 3534</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>													

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
A	WU L., et al., LncRNA NEXN-AS1 attenuates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through sponging miR-33a/b, RSC Adv., 2019, Vol.9, No.48, p.27856-27864 Abstract	1-20
A	WO 2020/160121 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 06.08.2020 (2020 - 08 - 06) 特許請求の範囲	1-20
A	WO 2021/058524 A1 (INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY - ICGEB) 01.04.2021 (2021 - 04 - 01) 特許請求の範囲	1-20
A	CN 110665010 A (浙江大学) 10.01.2020 (2020 - 01 - 10) 特許請求の範囲	1-20

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式 (PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
特許請求の範囲
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/019329

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/160121 A1	06.08.2020	JP 2022-523320 A 特許請求の範囲 EP 3918072 A1	
WO 2021/058524 A1	01.04.2021	(ファミリーなし)	
CN 110665010 A	10.01.2020	(ファミリーなし)	