

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7384033号
(P7384033)

(45)発行日 令和5年11月21日(2023.11.21)

(24)登録日 令和5年11月13日(2023.11.13)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113
A 6 1 K	31/712(2006.01)	A 6 1 K	31/712
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	47/56 (2017.01)	A 6 1 K	47/56
請求項の数 24 (全59頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2019-532860(P2019-532860)	(73)特許権者	000003986
(86)(22)出願日	平成30年7月26日(2018.7.26)		日産化学株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2018/028075		東京都中央区日本橋二丁目5番1号
(87)国際公開番号	WO2019/022196	(74)代理人	110001508
(87)国際公開日	平成31年1月31日(2019.1.31)		弁理士法人 津国
審査請求日	令和3年7月26日(2021.7.26)	(72)発明者	入山 友輔
(31)優先権主張番号	特願2017-144575(P2017-144575)		千葉県船橋市坪井西2丁目10番1号
(32)優先日	平成29年7月26日(2017.7.26)		日産化学株式会社 物質科学研究所内
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(72)発明者	中嶋 宏之
			埼玉県白岡市白岡1470 日産化学株
			式会社 生物科学研究所内
		(72)発明者	金木 達朗
			埼玉県白岡市白岡1470 日産化学株
			式会社 生物科学研究所内
		審査官	西 賢二
			最終頁に続く

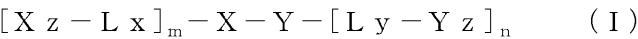
(54)【発明の名称】 一本鎖オリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)

【化1】



{ 式中、

Yは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個のリボヌクレオチドを含む4～40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドYに由来する基であり、

Xは、式

【化2】

$X_b - X_a$

(式中、X_bは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む4～40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドX_bに由来する基であり、

X_aは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む1～40個

のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド X a に由来する基であり、X a は、その両端で、オリゴヌクレオチド Y 及びオリゴヌクレオチド X b にそれぞれ結合する) で表され、5 ~ 80 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド X に由来する基であり、

X z は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含む 5 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド X z に由来する基であり、

Y z は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含む 5 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y z に由来する基であり、

L x は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 0 ~ 20 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド L x に由来する基であり、前記 X b に結合し、

10

L y は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 0 ~ 20 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド L y に由来する基であり、

m は、0 又は 1 であり、

m が 0 であるとき、n は、0 又は 1 であり、

m が 1 であるとき、n は、0 であり、

前記オリゴヌクレオチド X はヌクレオチド配列 X を有し、前記オリゴヌクレオチド X a はヌクレオチド配列 X a を有し、前記オリゴヌクレオチド X b はヌクレオチド配列 X b を有し、前記オリゴヌクレオチド Y はヌクレオチド配列 Y を有し、前記オリゴヌクレオチド X z はヌクレオチド配列 X z を有し、前記オリゴヌクレオチド Y z はヌクレオチド配列 Y z を有し、前記オリゴヌクレオチド L x はヌクレオチド配列 L x を有し、前記オリゴヌクレオチド L y はヌクレオチド配列 L y を有し、

20

前記ヌクレオチド配列 X b は、前記ヌクレオチド配列 Y と相補的であり、

前記ヌクレオチド配列 X は、標的 RNA とのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

X a は、X が含むアンチセンス配列部分の一部であり、X b は、X が含むアンチセンス配列部分の一部であり、

前記ヌクレオチド配列 Y は、RNAse H によって切断される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチドを含み、

30

m が 1 であり、n が 0 であるとき、

前記ヌクレオチド配列 X z が、標的 RNA とのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

m が 0 であり、n が 1 であるとき、

前記ヌクレオチド配列 Y z が、標的 RNA とのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

前記アンチセンス配列を 2 以上有する場合、それぞれのアンチセンス配列部分がハイブリダイズする標的 RNA は同一でも異なってもよく、

少なくとも 1 つのアンチセンス配列が、RNAse H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチドを含む配列であり、当該アンチセンス配列部分が、前記 RNAse H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチドを含む配列部分の 5' 側及び 3' 側に、隣接して結合する糖部修飾ヌクレオチドを含み、

40

アンチセンス配列部分は、ホスホロチオエート結合を含む}

で表され、X b と Y とがハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

X b が 3' 側で X a に結合し、Y が 5' 側で X a に結合する、請求項 1 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

X b が 5' 側で X a に結合し、Y が 3' 側で X a に結合する、請求項 1 に記載の一本鎖オ

50

リゴヌクレオチド。

【請求項 4】

アンチセンス配列が、デオキシリボヌクレオチドを少なくとも 1 個含む 10 ~ 30 個のヌクレオチドからなる配列である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

オリゴヌクレオチド Y が、オリゴヌクレオチド Y の 5' 側及び 3' 側の少なくとも一方に、1 又は複数の糖部修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

m が 0 であり、n が 0 である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

m が 0 であり、n が 1 である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

オリゴヌクレオチド L_y に含まれるヌクレオチドが、ホスホジエステル結合で互いに連結されている、請求項 7 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

オリゴヌクレオチド L_y が、DNA 又は RNA である、請求項 7 又は 8 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

m が 1 であり、n が 0 である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

オリゴヌクレオチド L_x に含まれるヌクレオチドが、ホスホジエステル結合で互いに連結されている、請求項 10 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

オリゴヌクレオチド L_x が、DNA 又は RNA である、請求項 10 又は 11 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

前記糖部修飾ヌクレオチドが、ヘキシトールヌクレオチド、シクロヘキセンヌクレオチド、ペプチド核酸、グリコール核酸、トレオヌクレオチド、モルホリノ核酸、トリシクロ-DNA、2'-O-メチル化ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチド、2'-O-アミノプロピル化ヌクレオチド、2'-フルオロ化ヌクレオチド、2'-F-アラビノヌクレオチド、架橋化ヌクレオチド、および 2'-O-メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも 1 つである、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

標識機能、精製機能及び標的部への送達機能からなる群から選択される少なくとも 1 種の機能を有する機能性分子に由来する基をさらに含む、請求項 1 から 13 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

前記機能性分子が、糖、脂質、ペプチド及びタンパク質並びにそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項 14 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

前記機能性分子が、コレステロール、トコフェロール及びトコトリエノールからなる群から選択される脂質である、請求項 14 又は 15 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

前記機能性分子が、アシアロ糖タンパク質受容体と相互作用する糖誘導体である、請求

10

20

30

40

50

項 1 4 又は 1 5 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 1 8】

前記機能性分子が、受容体のリガンド及び抗体からなる群から選択される、ペプチド又はタンパク質である、請求項 1 4 又は 1 5 に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 1 9】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと、薬理学上許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 2 0】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと細胞（ヒトの細胞を除く）とを接触させる工程を含む、標的 RNA の機能を制御する方法。

10

【請求項 2 1】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を、哺乳動物（ヒトを除く）に投与する工程を含む、該哺乳動物における標的 RNA の機能を制御する方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと細胞（ヒトの細胞を除く）とを接触させる工程を含む、標的遺伝子の発現を制御する方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を、哺乳動物（ヒトを除く）に投与する工程を含む、該哺乳動物における標的遺伝子の発現を制御する方法。

20

【請求項 2 4】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの製造方法であって、X 及び Y の少なくとも 1 つを含むオリゴヌクレオチドの 3' 末端又は 5' 末端でヌクレオチド鎖を伸長する工程を含む、製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一本鎖オリゴヌクレオチドに関する。

【背景技術】

30

【0002】

アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）は、標的遺伝子の mRNA、mRNA 前駆体又はリボソーム RNA、転移 RNA、miRNA 等の ncRNA（ノンコーディング RNA）に対して相補的なオリゴヌクレオチドであり、約 8 ～ 30 塩基からなる 1 本鎖の DNA、RNA 及び / 又はそれらの構造類似体である。ASO は、該アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とする mRNA、mRNA 前駆体又は ncRNA と二本鎖を形成することにより mRNA、mRNA 前駆体又は ncRNA の働きを抑制する。

【0003】

しかし、ASO は、生体内のヌクレアーゼにより分解されやすく、また標的細胞への取り込み効率が低いため、実用化は難しい。これら 2 つの大きな問題点を克服するために、有効成分であるオリゴヌクレオチド自体の化学修飾と、オリゴヌクレオチドを標的細胞内へ送達させるドラッグデリバリーシステム（DDS）の研究が長年行われている。

40

【0004】

ASO 自体の化学修飾の例としては、リン酸部分が修飾されている S - オリゴ（ホスホロチオエート）、糖部分が修飾されている 2' , 4' - BNA（bridged nucleic acid）/ LNA（locked nucleic acid）（特許文献 1 ～ 5 参照）等が知られている。

【0005】

DDS の例としては、カチオン性リボソームや高分子ミセル等のキャリアを利用する方法等が知られている。また、特許文献 6 にはアシアロ糖タンパク質受容体と相互作用を有

50

する糖誘導体であるGalNAc (N - アセチルガラクトサミン) 誘導体がリンカーを介して結合しているASOが記載されており、該ASOを投与すると、肝臓での標的遺伝子の発現が抑制されたことが記載されている。

【0006】

特許文献7及び非特許文献1には、ASOと相補的なRNAオリゴヌクレオチドを含む二本鎖オリゴヌクレオチド(HDO)にトコフェロール(Toc)を結合させることにより、マウスにおいて、ASOと比較して、効率よく肝臓に送達、集積され、肝臓での標的遺伝子の発現が抑制されたことが記載されている。特許文献8には、HDOにGalNAc誘導体が発現がリンカーを介して結合しているASOが記載されており、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを皮下投与すると、トコフェロール(Toc)修飾体より効率的に発現が抑制されたことが記載されている。

10

【0007】

特許文献9には、DNAとRNAの二本鎖オリゴヌクレオチドユニットのRNA鎖末端にASOが結合したオリゴヌクレオチド(HCDO)が、ASOと比較して効率よく標的RNAを抑制することが記載されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】ネイチャー コミュニケーションズ、6巻、アーティクル ナンバー 7969 (2015年)

20

【特許文献】

【0009】

【文献】国際公開第98/39352号

【文献】国際公開第2005/021570号

【文献】国際公開第2003/068795号

【文献】国際公開第2011/052436号

【文献】国際公開第2011/156202号

【文献】国際公開第2014/179620号

【文献】国際公開第2013/089283号

【文献】国際公開第2015/105083号

【文献】国際公開第2014/192310号

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

医薬品として臨床現場にてヒトを含む哺乳動物に適用する場合においては、効率的に標的遺伝子の発現を制御できる新たな核酸医薬品が望まれていた。また、二本鎖オリゴヌクレオチド(例えば、前記HDO、HCDO)を製造する場合、アンチセンス鎖と相補的なRNA鎖を別々に合成した上で、最後にこれらの鎖をハイブリダイズする工程が必要となる。さらに動物や細胞に投与する際には、一本鎖への解離を抑制した状態とする必要があり、その取扱い条件の設定にも労力を要する場合が想定される。

40

【0011】

本発明は、高効率に標的遺伝子の発現を制御できる新たなオリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。また、二本鎖オリゴヌクレオチドよりも容易に製造することが可能なオリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記目的を達成するために、本発明者らは、アンチセンス配列を含むオリゴヌクレオチド鎖(X鎖)と、RNAを含むオリゴヌクレオチド鎖(Y鎖)が連結した一本鎖オリゴヌクレオチドであって、前記X鎖は、前記Y鎖と連結するXa鎖及び連結しないXb鎖からなり、前記Y鎖と前記Xb鎖とが分子内で部分的にハイブリダイズする構造を有する一本

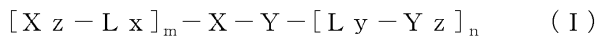
50

鎖オリゴヌクレオチドが、二本鎖オリゴヌクレオチドと同等以上のアンチセンス効果を示すことを見出した。また、当該一本鎖オリゴヌクレオチドは、一本鎖であるため、二本鎖を形成させるハイブリダイズ工程がなく、効率よく製造可能である。本発明は以下の様態を包含する。

【 0 0 1 3 】

1. 式 (I) :

【 化 1 】



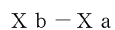
10

{ 式中、

Y は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも 1 個のリボヌクレオチドを含む 4 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y に由来する基であり、

X は、式 :

【 化 2 】



(式中、Xb は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含む 4 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb に由来する基であり、

20

Xa は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含む 1 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xa に由来する基であり、Xa は、その両端で、オリゴヌクレオチド Y 及びオリゴヌクレオチド Xb にそれぞれ結合する) で表され、5 ~ 80 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド X に由来する基であり、

Xz は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含む 5 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xz に由来する基であり、

Yz は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含む 5 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Yz に由来する基であり、

30

Lx は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 0 ~ 20 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Lx に由来する基であり、前記 Xb に結合し、

Ly は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 0 ~ 20 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Ly に由来する基であり、

m は、0 又は 1 であり、

m が 0 であるとき、n は、0 又は 1 であり、

40

m が 1 であるとき、n は、0 であり、

前記オリゴヌクレオチド X はヌクレオチド配列 X を有し、前記オリゴヌクレオチド Xa はヌクレオチド配列 Xa を有し、前記オリゴヌクレオチド Xb はヌクレオチド配列 Xb を有し、前記オリゴヌクレオチド Y はヌクレオチド配列 Y を有し、前記オリゴヌクレオチド Xz はヌクレオチド配列 Xz を有し、前記オリゴヌクレオチド Yz はヌクレオチド配列 Yz を有し、前記オリゴヌクレオチド Lx はヌクレオチド配列 Lx を有し、前記オリゴヌクレオチド Ly はヌクレオチド配列 Ly を有し、

前記ヌクレオチド配列 Xb は、前記ヌクレオチド配列 Y と相補的であり、

前記ヌクレオチド配列 X は、標的 RNA とのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

50

mが1であり、nが0であるとき、

前記ヌクレオチド配列Xzが、標的RNAとのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

mが0であり、nが1であるとき、

前記ヌクレオチド配列Yzが、標的RNAとのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

前記アンチセンス配列を2以上有する場合、それぞれのアンチセンス配列部分がハイブリダイズする標的RNAは同一でも異なってもよい}

で表され、XbとYとがハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0014】

2. Xbが3'側でXaに結合し、Yが5'側でXaに結合する、1.に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

3. Xbが5'側でXaに結合し、Yが3'側でXaに結合する、1.に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

4. アンチセンス配列が、それぞれ独立して、RNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列、又は、

少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない配列である、1.から3.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

5. 少なくとも1つのアンチセンス配列が、RNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列であり、当該アンチセンス配列部分が、前記RNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列部分の5'側及び3'側に、隣接して結合する糖部修飾ヌクレオチドを含む、4.に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0015】

6. アンチセンス配列部分が、ホスホロチオエート結合を含む、1.から5.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

7. アンチセンス配列が、デオキシリボヌクレオチドを少なくとも1個含む10~30個のヌクレオチドからなる配列である、1.から6.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

8. ヌクレオチド配列Yは、RNAseHによって切断される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列である、1.から7.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

9. オリゴヌクレオチドYが、オリゴヌクレオチドYの5'側及び3'側の少なくとも一方に、1又は複数の糖部修飾ヌクレオチドを含む、1.から8.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10. mが0であり、nが0である、1.から9.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0016】

11. mが0であり、nが1である、1.から9.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

12. オリゴヌクレオチドLyに含まれるヌクレオチドが、ホスホジエステル結合で互いに連結されている、11.に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

13. オリゴヌクレオチドLyが、DNA又はRNAである、11.又は12.に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

14. mが1であり、nが0である、1.から9.のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

15. オリゴヌクレオチドLxに含まれるヌクレオチドが、ホスホジエステル結合で互いに連結されている、14.に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

16. オリゴヌクレオチドLxが、DNA又はRNAである、14.又は15.のいづ

10

20

30

40

50

れか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

17. 標識機能、精製機能及び標的部位への送達機能からなる群から選択される少なくとも1種の機能を有する機能性分子に由来する基をさらに含む、1. から16. のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

18. 前記機能性分子が、糖、脂質、ペプチド及びタンパク質並びにそれらの誘導体からなる群から選択される、17. に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

19. 前記機能性分子が、コレステロール、トコフェロール及びトコトリエノールからなる群から選択される脂質である、17. 又は18. に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

20. 前記機能性分子が、アシアロ糖タンパク質受容体と相互作用する糖誘導体である、17. 又は18. に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

【0017】

21. 前記機能性分子が、受容体のリガンド及び抗体からなる群から選択される、ペプチド又はタンパク質である、17. 又は18. に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

22. 1. から21. のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと、薬理学上許容される担体とを含む、医薬組成物。

23. 1. から21. のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと細胞とを接触させる工程を含む、標的RNAの機能を制御する方法。

24. 1. から21. のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を、哺乳動物に投与する工程を含む、該哺乳動物における標的RNAの機能を制御する方法。

20

25. 1. から21. のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと細胞とを接触させる工程を含む、標的遺伝子の発現を制御する方法。

【0018】

26. 1. から21. のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を、哺乳動物に投与する工程を含む、該哺乳動物における標的遺伝子の発現を制御する方法。

27. 1. から21. のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの製造方法であって、X及びYの少なくとも1つを含むオリゴヌクレオチドの3'末端又は5'末端でヌクレオチド鎖を伸長する工程を含む、製造方法。

【発明の効果】

30

【0019】

本発明によれば、高効率で標的RNAを制御できるオリゴヌクレオチドを提供することができる。

【0020】

本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、その構成要素であるアンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的遺伝子の発現を効果的に制御することが可能であり、核酸医薬品として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドのXbとYとが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

40

【図2】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドのXbとYとが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図3】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドのXbとYとが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図4】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドのXbとYとが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図5】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドのXbとYとが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図6】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドのXbとYとが分子内でハイ

50

ブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図 7】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドの X b と Y とが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図 8】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドの X b と Y とが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図 9】本実施形態の一例である一本鎖オリゴヌクレオチドの X b と Y とが分子内でハイブリダイズする一様態を表す概念図である。

【図 10】本実施形態に係る一本鎖オリゴヌクレオチドを投与した C 5 7 B L / 6 J マウスの肝臓における S R B 1 の発現レベルへの影響を示すグラフである。

【図 11】本実施形態に係る一本鎖オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション処理前後のゲル電気泳動結果である。

10

【図 12】本実施形態に係る一本鎖オリゴヌクレオチドのヒト肝癌由来細胞における P T E N の発現レベルへの影響を示すグラフである。

【図 13】本実施形態に係る一本鎖オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション処理前後のゲル電気泳動結果である。

【図 14】本実施形態に係る一本鎖オリゴヌクレオチドを投与した C 5 7 B L / 6 J マウスの肝臓における S R B 1 の発現レベルへの影響を示すグラフである。

【図 15】本実施形態に係る一本鎖オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション処理前後のゲル電気泳動結果である。

【 0 0 2 2 】

20

本明細書において使用される用語は、特に言及する場合を除いて、当該分野で通常用いられる意味で用いられる。以下に、本明細書中で使用する各用語を説明する。なお、本明細書中、各用語は単独で使用されている場合も、又は他の用語と一緒に使用されている場合も、特に記載の無い限り、同一の意義を有する。

【 0 0 2 3 】

「アンチセンス効果」とは、標的遺伝子に対応して選択される標的 R N A と、例えば、その部分配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドとがハイブリダイズすることによって、標的 R N A の機能が制御されることを意味する。例えば、標的 R N A が m R N A の場合、ハイブリダイゼーションにより前記標的 R N A の翻訳が阻害されること、エキソンスキッピング等のスプライシング機能変換効果、ハイブリダイズした部分が認識されることにより前記標的 R N A が分解されること等を意味する。前記アンチセンス効果が生じるオリゴヌクレオチドとしては、例えば、D N A 及びオリゴデオキシリボヌクレオチド等が挙げられるが、アンチセンス効果が生じるオリゴヌクレオチドは、これらに限定されず、R N A、オリゴリボヌクレオチド又はアンチセンス効果が通常生じるように設計されたオリゴヌクレオチド等でもよい。

30

【 0 0 2 4 】

「標的 R N A」は、m R N A、m R N A 前駆体又は n c R N A を意味し、標的遺伝子をコードするゲノム D N A から転写された m R N A、塩基の修飾を受けていない m R N A、スプライシングを受けていない m R N A 前駆体及び n c R N A 等を含む。アンチセンス効果によって機能が制御される「標的 R N A」としては、特に制限はなく、各種疾患において発現が亢進する遺伝子に関連する R N A が挙げられる。「標的 R N A」は、D N A 依存性 R N A ポリメラーゼによって合成されるいかなる R N A でもよく、好ましくは m R N A 又は m R N A 前駆体である。より好ましくは、哺乳動物の m R N A 又は m R N A 前駆体であり、更に好ましくは、ヒトの m R N A 又は m R N A 前駆体である。

40

【 0 0 2 5 】

「ハイブリダイズ」とは、相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに由来する基同士で二重鎖を形成させる行為、及び相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに由来する基同士が二重鎖を形成する現象を意味する。

【 0 0 2 6 】

「相補的」とは、2つの核酸塩基が、水素結合を介して、ワトソン - クリック型塩基対

50

(天然型塩基対)又は非ワトソン・クリック型塩基対(フーグスティーン型塩基対等)を形成できることを意味する。2つのオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに由来する基は、それらの配列が相補的である場合に「ハイブリダイズ」し得る。2つのオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに由来する基がハイブリダイズするために、それらが完全に相補的である必要はないが、2つのオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに由来する基がハイブリダイズするための相補性は、好ましくは70%以上であり、より好ましくは80%以上であり、さらに好ましくは90%以上(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)である。配列の相補性は、オリゴヌクレオチドの部分配列を自動的に同定するコンピュータプログラムを利用することにより決定することができる。例えば、OligoAnalyzerは、そのようなソフトウェアの1つであり、Integrated DNA Technologies社が提供している。このプログラムは、ウェブサイトでも利用することができる。当業者は、2つのオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに由来する基がハイブリダイズできる条件(温度、塩濃度等)を容易に決定することができる。また、当業者は、例えば、標的RNAのヌクレオチド配列の情報に基づいて、BLASTプログラム等を利用することにより、標的RNAに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを容易に設計することができる。BLASTプログラムについては、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ(1990年、87巻、2264~68頁; 1993年、90巻、5873~77頁)、及びジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(1990年、215巻、403頁)等を参照できる。

10

20

【0027】

「ヌクレオチド」は、核酸(オリゴヌクレオチド)の構成単位となりうる分子を意味し、通常、構成要素として塩基を有する。ヌクレオチドは、例えば、糖、塩基及びリン酸から構成される。ヌクレオチドは、後述するリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドを包含する。

【0028】

「オリゴヌクレオチド」は、1つ以上の前記ヌクレオチドが重合した構造を有する分子を意味する。「オリゴヌクレオチド」が1つのヌクレオチドから構成されるとき、そのオリゴヌクレオチドは、「ヌクレオチド」と言うことができる。

本発明の「一本鎖オリゴヌクレオチド」分子が含むヌクレオチドは、それぞれ独立して、互いにホスホジエステル結合又は後述する修飾されたホスホジエステル結合で連結されている。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子の3'末端のヌクレオチドは、その3'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、より好ましくはヒドロキシ基を有し、通常はヒドロキシ基を有する。一本鎖オリゴヌクレオチド分子の5'末端のヌクレオチドは、その5'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、より好ましくはヒドロキシ基を有し、通常はヒドロキシ基を有する。

30

【0029】

「オリゴヌクレオチドに由来する基」は、前記オリゴヌクレオチドの3'末端及び5'末端の少なくとも一方のヒドロキシ基から水素原子、ヒドロキシ基等を取り除いた基を意味し、他の基(例えば、他のオリゴヌクレオチドに由来する基)と、ホスホジエステル結合若しくは修飾されたホスホジエステル結合を形成して間接的に共有結合で連結されている。前記3'末端又は5'末端のヒドロキシ基とは、リン酸基が有するヒドロキシ基を含む。例えば、オリゴヌクレオチドの3'末端のヒドロキシ基から水素原子を取り除いた基と、他のオリゴヌクレオチドの5'末端のリン酸基からヒドロキシ基を取り除いた基がホスホジエステル結合若しくは修飾されたホスホジエステル結合を形成する。

40

【0030】

「ヌクレオチド配列」は、オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドの塩基配列を意味する。

「ヌクレオチド配列部分」は、オリゴヌクレオチド鎖のうち、前記ヌクレオチド配列を有する領域の部分構造を意味する。

50

【 0 0 3 1 】

本明細書において、「ヌクレオチド配列」が、所定のヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド鎖を含む又は含まないこと等は、対応する「ヌクレオチドを含む配列部分」が、該ヌクレオチド若しくは該オリゴヌクレオチド鎖を含む又は含まないこと等と同様の意味を有する。

【 0 0 3 2 】

「配列部分」は、オリゴヌクレオチド鎖の部分構造を意味する。例えば、ヌクレオチドを含む配列部分は、オリゴヌクレオチド鎖のうち、該ヌクレオチドを含む領域の部分構造である。

ヌクレオチド配列が、所定のヌクレオチドから選ばれる配列、所定のヌクレオチドが連続する配列等であることは、対応するヌクレオチド配列部分が、それぞれ、該ヌクレオチドから選ばれる配列部分、該ヌクレオチドが連続する配列部分等であることと、同様の意味を有する。

10

【 0 0 3 3 】

「デオキシリボヌクレオチド」は、前記「ヌクレオチド」のうち、糖が2'-デオキシリボースであり、2'-デオキシリボースの1'位の炭素原子に塩基が結合し、3'位又は5'位にリン酸基を有する分子を意味する。本発明におけるデオキシリボヌクレオチドは、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドであっても、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドの塩基部分若しくはホスホジエステル結合部分が修飾されたデオキシリボヌクレオチドであってもよい。塩基部分の修飾やホスホジエステル結合部位の修飾は1つのデオキシリボヌクレオチドに対して、複数種組み合わせられてもよい。前記修飾されたデオキシリボヌクレオチドは、例えば、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー - (2016年、59巻、21号、9645 - 9667頁)、メディシナル・ケミストリー・コミュニケーションズ(2014年、5巻、1454 - 1471頁)、フューチャー・メディシナル・ケミストリー(2011年、3巻、3号、339 - 365頁)等に記載されている。

20

【 0 0 3 4 】

前記「デオキシリボヌクレオチド」が本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子を構成する際、通常、デオキシリボヌクレオチドの3'位がホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合(例えば、ホスホロチオエート結合)で他のヌクレオチド等と連結され、デオキシリボヌクレオチドの5'位がホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合(例えば、ホスホロチオエート結合)で別のヌクレオチド等と連結されている。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子の3'末端のデオキシリボヌクレオチドは、その3'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、5'位は前述の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチド分子の5'末端のデオキシリボヌクレオチドは、その5'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、3'位は前述の通りである。

30

【 0 0 3 5 】

「オリゴデオキシリボヌクレオチド」は、前記デオキシリボヌクレオチドにより構成されるオリゴヌクレオチドを意味する。オリゴデオキシリボヌクレオチドを構成するデオキシリボヌクレオチドは、それぞれ同一であっても異なってもよい。

40

【 0 0 3 6 】

「DNA」は、天然のデオキシリボヌクレオチドにより構成されるオリゴヌクレオチドを意味する。DNAを構成する天然のデオキシリボヌクレオチドは、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【 0 0 3 7 】

「リボヌクレオチド」は、前記「ヌクレオチド」のうち、糖がリボースであり、リボースの1'位の炭素原子に塩基が結合し、2'位、3'位又は5'位にリン酸基を有する分子を意味する。本発明におけるリボヌクレオチドは、天然に存在するリボヌクレオチドであっても、天然に存在するリボヌクレオチドの塩基部分若しくはホスホジエステル結合部分が修飾されたリボヌクレオチドであってもよい。塩基部分の修飾やホスホジエステル結合部位

50

の修飾は1つのリボヌクレオチドに対して、複数種組み合わせて施されてもよい。前記修飾されたリボヌクレオチドは、例えば、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（2016年、59巻、21号、9645 - 9667頁）、メディシナル・ケミストリー・コミュニケーションズ（2014年、5巻、1454 - 1471頁）、フューチャー・メディシナル・ケミストリー（2011年、3巻、3号、339 - 365頁）等に記載されている。

【0038】

前記「リボヌクレオチド」が本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子を構成する際、典型的には、リボヌクレオチドの3'位がホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合（例えば、ホスホロチオエート結合）で他のヌクレオチドと連結され、リボヌクレオチドの5'位がホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合（例えば、ホスホロチオエート結合）で別のヌクレオチド等と連結されている。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子の3'末端のリボヌクレオチドは、その3'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、5'位は前述の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチド分子の5'末端のリボヌクレオチドは、その5'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、3'位は前述の通りである。

【0039】

「オリゴリボヌクレオチド」は、前記リボヌクレオチドにより構成されるオリゴヌクレオチドを意味する。オリゴリボヌクレオチドを構成するリボヌクレオチドは、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【0040】

「RNA」は、天然のリボヌクレオチドにより構成されるオリゴヌクレオチドを意味する。RNAを構成する天然のリボヌクレオチドは、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【0041】

「糖部修飾ヌクレオチド」は、前記デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドの糖部分が、部分的に1つ以上の置換基によって置換されているか、又はその糖骨格全体がリボース及び2'-デオキシリボースとは異なる糖骨格（例えば、ヘキシトール、トレオース等の5から6員の糖骨格）に置き換えられているか、又はその糖骨格全体又は糖骨格の環の部分が5から7員の飽和若しくは不飽和環（例えば、シクロヘキサン、シクロヘキセン、モルホリン等）又は5から7員の環を水素結合によって形成し得る部分構造（例えば、ペプチド構造）に置き換えられているか、又は糖部分の環が開環しているか、さらに、該開環した部分が修飾されたヌクレオチドを意味する。「糖部修飾ヌクレオチド」の塩基部分は、天然に存在する塩基であっても修飾された塩基であってもよい。また、「糖部修飾ヌクレオチド」のホスホジエステル結合部分は、ホスホジエステル結合であっても修飾されたホスホジエステル結合であってもよい。塩基部分の修飾やホスホジエステル結合部位の修飾は1つの糖部修飾ヌクレオチドに対して、複数種組み合わせて施されてもよい。前記開環した部分の修飾は、例えば、ハロゲン化、アルキル化（例えば、メチル化、エチル化）、水酸化、アミノ化、及びチオ化等の他に、デメチル化等も含む。

【0042】

「糖部修飾ヌクレオチド」は、架橋化ヌクレオチドであっても、非架橋化ヌクレオチドであってもよい。糖部修飾ヌクレオチドとしては例えば、特開平10-304889号公報、国際公開第2005/021570号、特開平10-195098号公報、特表2002-521310号公報、国際公開第2007/143315号、国際公開第2008/043753号、国際公開第2008/029619号及び国際公開第2008/049085号（以下、これら文献を「アンチセンス法に関する文献」と称する）等において、アンチセンス法に好適に用いられるとして開示されているヌクレオチド等が挙げられる。前記文献には、ヘキシトールヌクレオチド（HNA）、シクロヘキセンヌクレオチド（CeNA）、ペプチド核酸（PNA）、グリコール核酸（GNA）、トレオヌクレオチド（TNA）、モルホリノ核酸、トリシクロ-DNA（tcDNA）、2'-O-メチル化ヌ

10

20

30

40

50

クレオチド、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)化ヌクレオチド、2'-O-アミノプロピル(2'-AP)化ヌクレオチド、2'-フルオロ化ヌクレオチド、2'-F-アラビノヌクレオチド(2'-F-ANA)、架橋化ヌクレオチド(BNA(Bridged Nucleic Acid))、2'-O-{(N-メチルカルバモイル)エチル}(2'-MCE)化ヌクレオチド等のヌクレオチドが開示されている。また、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(2016年、59巻、21号、9645-9667頁)、メディシナル・ケミストリー・コミュニケーションズ(2014年、5巻、1454-1471頁)、フューチャー・メディシナル・ケミストリー(2011年、3巻、3号、339-365頁)等にも、糖部修飾ヌクレオチドが開示されている。

【0043】

前記「糖部修飾ヌクレオチド」が本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子を構成する際、例えば、該糖部修飾ヌクレオチドの3'位がホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合(例えば、ホスホロチオエート結合)で他のヌクレオチド等と連結され、該糖部修飾ヌクレオチドの5'位がホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合(例えば、ホスホロチオエート結合)で別のヌクレオチド等と連結されている。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子の3'末端の糖部修飾ヌクレオチドは、例えば、その3'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、5'位は前述の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチド分子の5'末端の糖部修飾ヌクレオチドは、例えば、その5'位に、好ましくはヒドロキシ基又はリン酸基を有し、3'位は前述の通りである。

【0044】

デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドにおける塩基部分は、好ましくは、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)、ウラシル(U)及び5-メチルシトシン(5-me-C)からなる群から選ばれる少なくとも1種である。

【0045】

デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドにおける塩基部分の修飾の例としては、ハロゲン化、メチル化、エチル化、n-プロピル化、イソプロピル化、シクロプロピル化、n-ブチル化、イソブチル化、s-ブチル化、t-ブチル化、シクロブチル化、水酸化、アミノ化、チオ化及びデメチル化等が挙げられる。より具体的には、シトシンの5-メチル化、5-フルオロ化、5-プロモ化、5-ヨード化及びN4-メチル化；チミンの2-チオ化、5-デメチル化、5-フルオロ化、5-プロモ化及び5-ヨード化；ウラシルの2-チオ化、5-フルオロ化、5-プロモ化及び5-ヨード化；アデニンのN6-メチル化及び8-プロモ化；グアニンのN2-メチル化及び8-プロモ化等が挙げられる。また、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(2016年、59巻、21号、9645-9667頁)、メディシナル・ケミストリー・コミュニケーションズ(2014年、5巻、1454-1471頁)、フューチャー・メディシナル・ケミストリー(2011年、3巻、3号、339-365頁)等に、ヌクレオチドにおける塩基部分の修飾の例が開示されており、これらをデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドにおける塩基部分に用いることができる。

【0046】

デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドにおけるホスホジエステル結合部分の修飾の例としては、ホスホロチオエート化、メチルホスホネート化(キラル-メチルホスホネート化を含む)、メチルチオホスホネート化、ホスホロジチオエート化、ホスホロアミデート化、ホスホロジアミデート化、ホスホロアミドチオエート化及びボラノホスフェート化等が挙げられる。また、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー(2016年、59巻、21号、9645-9667頁)、メディシナル・ケミストリー・コミュニケーションズ(2014年、5巻、1454-1471頁)、フューチャー・メディシナル・ケミストリー(2011年、3巻、3号、339-365頁)等に、ヌクレオチドにおけるホスホジエステル結合部分の修飾の例が開示されており、これらをデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドにお

10

20

30

40

50

けるホスホジエステル結合部分に用いることができる。

【0047】

デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドの糖部分が、部分的に1個の置換基によって置換されている修飾の例としては、2'-O-メチル化、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)化、2'-O-アミノプロピル(2'-AP)化、2'-フルオリ化及び2'-O-{(N-メチルカルバモイル)エチル}(2'-MCE)化等が挙げられる。

【0048】

「架橋化ヌクレオチド」とは、糖部分における2箇所の置換によって架橋ユニットが置換された糖部修飾ヌクレオチドであり、例えば、2'位と4'位が架橋したヌクレオチドが挙げられる。

10

【0049】

2'位と4'位が架橋したヌクレオチド(2', 4'-BNA)としては、2'位の炭素原子と4'位の炭素原子とが、2以上の原子によって架橋されている糖部分を有するヌクレオチドであればよく、例えば、C₂-6アルキレン基(該アルキレン基は無置換であるか、又はハロゲン原子、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される1個以上の置換基で置換されており、かつ該アルキレン基の1若しくは2つのメチレン基は、置き換えられていないか、又は独立して-O-、-NR¹-(R¹は水素原子、C₁-6アルキル基又はハロC₁-6アルキル基を示す)及び-S-からなる群から選択される基で置き換えられている)で架橋された糖部分を有するヌクレオチドが挙げられる。

前記置換と置き換えを組み合わせ、2', 4'-BNAの2'位と4'位を架橋する基は、20
-C(=O)-O-、-O-C(=O)-NR¹-(R¹は水素原子、C₁-6アルキル基又はハロC₁-6アルキル基を示す)、-C(=O)-NR¹-(R¹は水素原子、C₁-6アルキル基又はハロC₁-6アルキル基を示す)、-C(=S)-NR¹-(R¹は水素原子、C₁-6アルキル基又はハロC₁-6アルキル基を示す)等で表される基を含んでいてもよい。

【0050】

このようなBNAとしては、例えば、LNAとも称されるロックド核酸(Locked Nucleic Acid(登録商標))、α-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA又はβ-D-メチレンオキシ(4'-C₂H-O-2')BNA、ENAとも称されるエチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2')BNA、β-D-チオ(4'-C₂H-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-C₂H-O-N(R¹¹)-2')BNA(R¹¹は、H又はCH₃である)、2', 4'-BN^{AC}とも称されるオキシアミノ(4'-CH₂-N(R¹²)-O-2')BNA(R¹²は、H又はCH₃である)、2', 4'-BN^{CA}O^C、3'-アミノ-2', 4'-BNA、5'-メチルBNA、cet-BNAとも称される(4'-CH(CH₃)-O-2')BNA、cMOE-BNAとも称される(4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2')BNA、AmNAとも称されるアミド型BNA(4'-C(=O)-N(R¹³)-2')BNA(R¹³は、H又はCH₃である)、当業者に知られた他のBNA等が挙げられる。

30

【0051】

「糖部、塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されたヌクレオチド」は、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドの塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されたデオキシリボヌクレオチド、天然に存在するリボヌクレオチドの塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されたリボヌクレオチド又は糖部修飾ヌクレオチドを意味する。

40

【0052】

「n-」はノルマル、「s-」はセカンダリー、「t-」はターシャリーを意味する。

【0053】

「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子を意味する。

【0054】

「C₁-6アルキル基」とは、炭素数が1から6の直鎖又は分枝状の飽和炭化水素基を意味し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、

50

イソブチル基、s - ブチル基、t - ブチル基、n - ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、n - ヘキシル基及びイソヘキシル基等が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

「ハロC₁₋₆アルキル基」とは、前記「C₁₋₆アルキル基」の任意の位置の水素原子が、1個以上の前記「ハロゲン原子」で置換された基を意味する。

【 0 0 5 6 】

「C₁₋₆アルキレン基」とは、炭素数が1から6の直鎖又は分枝状の飽和炭化水素基から任意の位置の水素原子を1個取り除いた2価の基を意味し、例としては、メチレン基、エチレン（エタンジイル）基、プロパン - 1, 3 - ジイル基、プロパン - 2, 2 - ジイル基、2, 2 - ジメチル - プロパン - 1, 3 - ジイル基、ヘキサン - 1, 6 - ジイル基及び3 - メチルブタン - 1, 2 - ジイル基等が挙げられる。

10

「C₂₋₆アルキレン基」とは、前記「C₁₋₆アルキレン基」のうち、炭素数が2から6の直鎖又は分枝状の2価の基を意味し、例としては、メチレン基を除き、前記「C₁₋₆アルキレン基」と同様である。

「C₂₋₂₀アルキレン基」とは、炭素数が2から20の直鎖又は分枝状の飽和炭化水素基から任意の位置の水素原子を1個取り除いた2価の基を意味する。同様に「C₈₋₁₂アルキレン基」とは、炭素数が8から12の直鎖又は分枝状の飽和炭化水素基から任意の位置の水素原子を1個取り除いた2価の基を意味する。

【 0 0 5 7 】

「C₂₋₂₀アルケニレン基」とは、炭素数が2から20の、少なくとも1個の二重結合を含む直鎖又は分枝状の不飽和炭化水素基から任意の位置の水素原子を1個取り除いた2価の基を意味する。

20

【 0 0 5 8 】

「オキソ基」とは、酸素原子が二重結合を介して置換した基（=O）を示す。オキソ基が炭素原子に置換した場合は当該炭素原子と一緒にとなってカルボニル基を形成する。

【 0 0 5 9 】

「チオキソ基」とは、硫黄原子が二重結合を介して置換した基（=S）を示す。チオキソ基が炭素原子に置換した場合は当該炭素原子と一緒にとなってチオカルボニル基を形成する。

【 0 0 6 0 】

30

糖部修飾ヌクレオチドは、ここで例示されたものに限定されるわけではない。多数の糖部修飾ヌクレオチドが当該分野では知られており、例えば、T a c h a sらの米国特許第8299039号明細書（特に17から22欄）、又はジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（2016年、59巻、21、9645 - 9667頁）、メディシナル・ケミストリー・コミュニケーションズ（2014年、5巻、1454 - 1471頁）、フューチャー・メディシナル・ケミストリー（2011年、3巻、3号、339 - 365頁）等に記載の糖部修飾ヌクレオチドを、本発明の実施態様として利用することもできる。

【 0 0 6 1 】

当業者であれば、このような糖部修飾ヌクレオチドの中から、アンチセンス効果、標的RNAの部分配列に対する親和性、核酸分解酵素に対する耐性等の観点を検討し、適宜糖部修飾ヌクレオチドを選択して利用することができる。

40

【 0 0 6 2 】

「RNAse H」は、一般的には、DNAとRNAとがハイブリダイズした二重鎖を認識して、そのRNAを切断し一本鎖DNAを生じさせるリボヌクレアーゼとして知られている。RNAse Hは、DNAとRNAがハイブリダイズした二重鎖に限らず、DNA及びRNAの少なくとも一方の、塩基部分、ホスホジエステル結合部分及び糖部分の少なくとも1つが修飾された二重鎖をも認識し得る。例えば、オリゴデオキシリボヌクレオチドとオリゴリボヌクレオチドがハイブリダイズした二重鎖をも認識し得る。

よって、DNAは、RNAとハイブリダイズした際に、RNAse Hによって認識される。DNA及びRNAの少なくとも一方において、塩基部分、ホスホジエステル結合部

50

分及び糖部分の少なくとも1つが修飾された場合も、同様である。例えば、代表的なものとして、DNAのホスホジエステル結合部分が、ホスホロチオエートに修飾されたオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

RNAは、DNAとハイブリダイズした際に、RNAse Hによって切断され得る。DNA及びRNAの少なくとも一方において、塩基部分、ホスホジエステル結合部分及び糖部分の少なくとも1つが修飾された場合も、同様である。

RNAse Hによって認識され得るDNA及び/又はRNAの修飾例は、例えば、ヌクレック・アシッズ・リサーチ(2014年、42巻、8号、5378~89頁)、バイオオーガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー・レターズ(2008年、18巻、2296~2300頁)、モレキュラー・バイオシステムズ(2009年、5巻、838~843頁)、ヌクレック・アシッド・セラピューティクス(2015年、25巻、5号、266~274頁)、ザ・ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(2004年、279巻、35号、36317~36326頁)等に記載されている。

本発明に用いられるRNAse Hは、好ましくは哺乳動物のRNAse Hであり、より好ましくはヒトのRNAse Hであり、特に好ましくはヒトRNAse H1である。

【0063】

「RNAse Hによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」は、4個以上の連続するヌクレオチドを含み、RNAse Hによって認識される限り特に限定されないが、該連続するヌクレオチドは、好ましくはデオキシリボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドから独立して選ばれ、より好ましくは、デオキシリボヌクレオチドから独立して選ばれる。この連続するヌクレオチドは、それぞれ同一であっても、異なってもよい。

【0064】

「RNAse Hによって切断される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」は、4個の連続するヌクレオチドを含み、RNAse Hによって切断される限り特に限定されないが、少なくとも1個のリボヌクレオチドを含む。また、オリゴリボヌクレオチドを含むことが好ましく、RNAを含むことがより好ましい。該連続するヌクレオチドは、リボヌクレオチドから独立して選ばれることがさらに好ましい。また、該連続するヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されていることがさらに好ましい。この連続するヌクレオチドは、それぞれ同一であっても、異なってもよい。

【0065】

次に本発明におけるアンチセンス配列及びアンチセンス配列部分について説明する。

【0066】

「アンチセンス配列」とは、標的RNAとのハイブリダイズを可能にするオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドの塩基配列を意味する。

【0067】

「アンチセンス配列部分」は、オリゴヌクレオチド鎖のうち、前記アンチセンス配列を有する領域の部分構造を意味する。

【0068】

なお、本明細書において、「アンチセンス配列」が、所定のヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド鎖を含む又は含まないこと等は、対応する「アンチセンス配列部分」が、該ヌクレオチド若しくは該オリゴヌクレオチド鎖を含む又は含まないこと等と同様の意味を有する。

【0069】

前記アンチセンス配列部分は、標的RNAの全体とハイブリダイズする必要はなく、標的RNAの少なくとも一部とハイブリダイズすればよいが、通常は、標的RNAの少なくとも一部とハイブリダイズする。例えば、標的RNAの部分配列に相補的なアンチセンス配列を有するオリゴヌクレオチド(DNA、オリゴデオキシリボヌクレオチド又は通常アンチセンス効果が生じるように設計されたオリゴヌクレオチド等)と標的RNAの少なくとも一部がハイブリダイズすることによって、標的遺伝子の発現が制御される。また、ア

ンチセンス配列部分の全体がハイブリダイズする必要はなく、一部がハイブリダイズしなくてもよいが、アンチセンス配列部分の全体がハイブリダイズすることが、好ましい。

【0070】

前記アンチセンス配列と標的RNAの部分配列との相補性は、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上）である。アンチセンス配列部分と標的RNAの少なくとも一部とがハイブリダイズするために、それらの配列が完全に相補的である必要はないが、完全に相補的であることがさらにより好ましい。

【0071】

前記アンチセンス配列は、「標的RNAとハイブリダイズした際にRNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」を含む配列であるか、又は「少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」配列であることが好ましい。

10

【0072】

当業者は、「標的RNAとのハイブリダイズを可能にする」アンチセンス配列に適合する塩基配列を、BLASTプログラム等を利用することにより容易に決定することができる。「標的RNAとハイブリダイズした際にRNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」に適合するヌクレオチド配列も同様である。

【0073】

「標的RNAとハイブリダイズした際にRNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」は、通常、4～30の連続するヌクレオチドであるが、好ましくは4～20の連続するヌクレオチドであり、より好ましくは5～16の連続するヌクレオチドであり、さらに好ましくは6～12の連続するヌクレオチドであり、特に好ましくは8～10の連続するヌクレオチドである。前記連続するヌクレオチドは、好ましくは、デオキシリボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドから独立して選ばれ、より好ましくは、デオキシリボヌクレオチドから独立して選ばれる。特に好ましくは、8～10個の連続するデオキシリボヌクレオチドである。この連続するヌクレオチドは、それぞれ同一であっても、異なってもよい。

20

【0074】

また、体内動態に優れているという観点から、この連続したヌクレオチドのうち、少なくとも1個のヌクレオチドがホスホロチオエート化されていることが好ましい。この連続するヌクレオチドのうち、3'末端及び5'末端のヌクレオチドのうち少なくとも一方がホスホロチオエート化されていることがより好ましく、3'末端及び5'末端のヌクレオチドの両方がホスホロチオエート化されていることがより好ましい。この連続するヌクレオチドのうち、80%のヌクレオチドがホスホロチオエート化されていることが更に好ましく、90%のヌクレオチドがホスホロチオエート化されていることが更に好ましい。この連続するヌクレオチドの全てがホスホロチオエート化されていることが特に好ましい。

30

【0075】

アンチセンス配列が、「標的RNAとハイブリダイズした際にRNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」を含む配列である場合、標的RNAの部分配列に対する親和性又は核酸分解酵素に対する耐性が増大するという観点から、「標的RNAとハイブリダイズした際にRNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」の3'側及び5'側の少なくとも一方に隣接して1～10個の糖部修飾ヌクレオチドが結合していることが好ましく、該3'側及び5'側の少なくとも一方に隣接して2～5個の糖部修飾ヌクレオチドが結合していることがより好ましく、該3'側及び5'側の少なくとも一方に隣接して2～3個の糖部修飾ヌクレオチドが結合していることが更に好ましい。ここで、該3'側及び5'側の少なくとも一方における複数の糖部修飾ヌクレオチドの間に、一又は複数のデオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド又はその両方が含まれていてもよいが、該複数の糖部修飾ヌクレオチドは、連続していることが好ましい。また、該一又は複数の糖部修飾ヌクレオチドは、前記「標的RNAとハイブ

40

50

リダイズした際にRNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」の3'側及び5'側の両方に隣接して結合していることが好ましい。該「標的RNAとハイブリダイズした際にRNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」の3'側及び5'側の少なくとも一方に隣接して複数の糖部修飾ヌクレオチドが結合している場合、「隣接して複数の糖部修飾ヌクレオチドが結合している」とは、該複数の糖部修飾ヌクレオチド及び、該複数の糖部修飾ヌクレオチドの間に含まれるデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が隣接して結合していることを意味する。該3'側及び5'側の少なくとも一方に隣接して複数の糖部修飾ヌクレオチドが結合している場合、それぞれの糖部修飾ヌクレオチドは同一であっても、異なってもよい。

10

【0076】

前記「標的RNAとハイブリダイズした際にRNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」の3'側及び5'側の少なくとも一方に隣接して結合している糖部修飾ヌクレオチド部分は、標的RNAにハイブリダイズしてもよく、しなくてもよいが、標的RNAにハイブリダイズすることが前記と同様の観点から好ましい。アンチセンス配列部分が「標的RNAとハイブリダイズした際にRNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」を含み、該3'側及び5'側に隣接して一又は複数の糖部修飾ヌクレオチドが結合し、該糖部修飾ヌクレオチド部分が標的RNAにハイブリダイズする場合、該一又は複数の糖部修飾ヌクレオチド部分もアンチセンス配列部分の一部である。すなわち、「標的RNAとハイブリダイズした際にRNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」、及び該3'側及び5'側に隣接して結合する一又は複数の糖部修飾ヌクレオチドが、アンチセンス配列部分を構成する。該アンチセンス配列部分は、ギャップマーと呼ばれる。

20

【0077】

また、体内動態に優れているという観点から、前記「標的RNAとハイブリダイズした際にRNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」の3'側及び5'側の少なくとも一方に隣接して結合している糖部修飾ヌクレオチド部分の少なくとも1個が、ホスホロチオエート化されていることが好ましく、3'側に隣接する糖部修飾ヌクレオチド部分の少なくとも1個及び5'側に隣接する糖部修飾ヌクレオチド部分の少なくとも1個がホスホロチオエート化されていることがより好ましく、50%がホスホロチオエート化されていることがさらに好ましく、80%がホスホロチオエート化されていることがさらに好ましい。また、全てがホスホロチオエート化されていることが好ましい。該3'側に複数の糖部修飾ヌクレオチドが隣接する場合、該ヌクレオチドの間の結合はホスホロチオエート化されていることが好ましく、該5'側に複数の糖部修飾ヌクレオチドが隣接する場合も同様である。

30

【0078】

ギャップマーは、好ましくは、1~10個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド、4~30個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴデオキシリボヌクレオチド、及び1~10個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドが順に連結されたオリゴヌクレオチドであり、より好ましくは、2~5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド、4~20個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴデオキシリボヌクレオチド、及び2~5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドが順に連結されたオリゴヌクレオチドであり、さらに好ましくは、2又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド、5~15個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴデオキシリボヌクレオチド、及び2又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドが順に連結されたオリゴヌクレオチドであり、特に好ましくは、2又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド、8~12個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴデオキシリボヌクレオチド、及び2又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドが順に連結されたオリゴヌクレオチドである。その他の態様として特に好ましくは、4又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌク

40

50

レオチド、8～12個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴデオキシリボヌクレオチド、及び4又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドが順に連結されたオリゴヌクレオチドである。

【0079】

アンチセンス配列が、「少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」配列である場合、該アンチセンス配列部分は、リボヌクレオチドを含んでも含まなくてもよく、デオキシリボヌクレオチドを含んでも含まなくてもよいが、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない。該アンチセンス配列部分は、ミックスマーと呼ばれる。該アンチセンス配列部分は、好ましくは、デオキシリボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドから独立して選ばれるヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドの部分構造であり、糖部修飾ヌクレオチドの含有率は、例えば25%以上である。糖部修飾ヌクレオチドの含有率は、標的RNAの部分配列に対する親和性又は核酸分解酵素に対する耐性が増大するという観点から、好ましくは30%以上であり、より好ましくは50%以上である。同様の観点から、このアンチセンス配列部分の3'側のヌクレオチド及び5'側のヌクレオチドの少なくとも一方が、糖部修飾ヌクレオチドであることが好ましく、前記3'側のヌクレオチド及び5'側のヌクレオチドが糖部修飾ヌクレオチドであることがより好ましい。

10

その他の態様として、前記アンチセンス配列部分の糖部修飾ヌクレオチドの含有率は、好ましくは100%である。

【0080】

20

「少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」アンチセンス配列部分は、連続する3個のデオキシリボヌクレオチドを含まないことがより好ましい。

【0081】

「少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」アンチセンス配列部分（ミックスマー）は、通常、4～30の連続するヌクレオチドであるが、好ましくは8～25の連続するヌクレオチドであり、より好ましくは10～20の連続するヌクレオチドである。この連続するヌクレオチドは、それぞれ同一であっても、異なってもよい。

【0082】

30

また、体内動態に優れているという観点から、該「少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」アンチセンス配列部分（ミックスマー）を構成するヌクレオチドのうち、少なくとも1個のヌクレオチドがホスホロチオエート化されていることが好ましい。該アンチセンス配列部分の3'末端及び5'末端のヌクレオチドのうち少なくとも一方がホスホロチオエート化されていることがより好ましい。該アンチセンス配列部分が含むヌクレオチドの間の結合のうち、80%がホスホロチオエート化されていることが更に好ましく、90%がホスホロチオエート化されていることが更に好ましく、全てがホスホロチオエート化されていることが特に好ましい。

【0083】

40

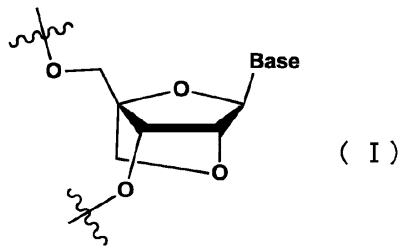
アンチセンス配列部分に含まれる「糖部修飾ヌクレオチド」は、置換等により、標的RNAの部分配列に対する親和性が増大したヌクレオチド又は核酸分解酵素に対する耐性が増大したヌクレオチドであればよいが、好ましくは、2'-O-メチル化ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル（2'-MOE）化ヌクレオチド、2'-O-アミノプロピル（2'-AP）化ヌクレオチド、2'-フルオロ化ヌクレオチド、2'-F-アラビノヌクレオチド（2'-F-ANA）、架橋化ヌクレオチド（BNA（Bridged Nucleic Acid））又は2'-O-メチルカルバモイルエチル（2'-MCE）化ヌクレオチドであり、より好ましくは、BNA又は2'-O-メチル化ヌクレオチドであり、さらにより好ましくは、下記式（II）で表わされる部分構造を含むLNA、又は2'-O-メチル化ヌクレオチドであり、特に好ましくは、LNAである。アンチセンス配列部分に含まれる「糖

50

部修飾ヌクレオチド」は、特に好ましくは、前記架橋化ヌクレオチドの他に、2'-MOE化ヌクレオチド、2'-MCE化ヌクレオチドである。

【0084】

【化3】



10

【0085】

式中、Baseは、塩基部分を表し、プリン-9-イル基又は2-オキソ-ピリミジン-1-イル基であり、該プリン-9-イル基及び2-オキソ-ピリミジン-1-イル基は、修飾されていないか、修飾されている。ここで2-オキソ-ピリミジン-1-イル基は、2-オキソ-1H-ピリミジン-1-イル基と同義である。また、プリン-9-イル基及び2-オキソ-ピリミジン-1-イル基は、それぞれの互変異性体をも包含する。

【0086】

アンチセンス配列部分における糖部修飾ヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの種類、数及び位置は、ここで開示する一本鎖オリゴヌクレオチドが奏するアンチセンス効果等に影響を与えうる。その種類、数及び位置は、標的RNAの配列等によっても異なるため、一概には言えないが、当業者は、前記アンチセンス法に関する文献の記載を参酌しながら、好ましい態様を決定することができる。また、塩基部分、糖部分又はホスホジエステル結合部分の修飾後の一本鎖オリゴヌクレオチドが有するアンチセンス効果を測定し、得られた測定値が、修飾前の一本鎖オリゴヌクレオチドのそれよりも有意に低下していなければ（例えば、修飾後一本鎖オリゴヌクレオチドの測定値が修飾前の一本鎖オリゴヌクレオチドの測定値の30%以上であれば）、当該修飾が好ましい態様であると評価することができる。アンチセンス効果の測定は、例えば、後述の実施例において示されているように、細胞等に被検オリゴヌクレオチドを導入し、該被検オリゴヌクレオチドが奏するアンチセンス効果によって制御された標的RNAの発現量、標的RNAに関連しているcDNAの発現量、標的RNAに関連しているタンパク質の量等を、ノザンプロットティング、定量的PCR、ウェスタンプロットティング等の公知の手法を適宜利用することによって行うことができる。

20

30

【0087】

「少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」アンチセンス配列部分の3'側及び5'側の少なくとも一方の側の2個のヌクレオチドは、糖部修飾ヌクレオチドであることが好ましく、該糖部修飾ヌクレオチドは好ましくは架橋化ヌクレオチドであり、特に好ましくはLNAである。該アンチセンス配列部分の3'側の2個のヌクレオチドが、糖部修飾ヌクレオチドであるとき、5'側の3個のヌクレオチドの2個以上が糖部修飾ヌクレオチドであり、該アンチセンス配列部分の末端側から順に、以下の順のいずれかで連結されていることが好ましい。該アンチセンス配列部分の5'側の2個のヌクレオチドが、糖部修飾ヌクレオチドであるとき、3'側の3個のヌクレオチドの2個以上が糖部修飾ヌクレオチドであり、該アンチセンス配列部分の末端側から順に、以下の順のいずれかで連結されていることが好ましい。なお、これらの順において、左側がアンチセンス配列部分の末端側であり、右側がアンチセンス配列部分の内側である。該糖部修飾ヌクレオチドは、好ましくは架橋化ヌクレオチドであり、特に好ましくはLNAである。

40

糖部修飾ヌクレオチド - 糖部修飾ヌクレオチド - 糖部修飾ヌクレオチド

糖部修飾ヌクレオチド - 糖部修飾ヌクレオチド - デオキシリボヌクレオチド

50

糖部修飾ヌクレオチド - デオキシリボヌクレオチド - 糖部修飾ヌクレオチド

【0088】

次に、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド分子について説明する。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、X及びYを含む。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドの実施態様としては、

XzとLx、YzとLyの両方を含まない実施態様（前記式（I）中、mが0であり、nが0である）、

XzとLxを含まず、YzとLyを含む実施態様（前記式（I）中、mが0であり、nが1である）、

XzとLxを含み、YzとLyを含まない実施態様（前記式（I）中、mが1であり、nが0である）が挙げられる。

10

【0089】

以下に本発明におけるXa、Xb、X、Y、Xz、及びYzについて説明する。本発明には幾つかの実施態様があるが、まず、共通点を説明する。

【0090】

Xaは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される1～40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドXaに由来する基であり、該デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾されていないか、塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されている。オリゴヌクレオチドXaは、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドXaはヌクレオチド配列Xaを有する。Xaは、Yとハイブリダイズしないため、ヌクレオチド配列Xaは、ヌクレオチド配列Yと相補的な配列を含まないことが好ましい。

20

【0091】

ヌクレオチド配列Xaは、オリゴヌクレオチドXaを構成するヌクレオチドの塩基配列である。

【0092】

Xaに含まれるヌクレオチドの数は、1～40であり、好ましくは2～20であり、より好ましくは3～10であり、さらに好ましくは4～8であり、さらにより好ましくは、4又は5であり、特に好ましくは、5である。Xaに含まれるヌクレオチドの数は、通常、前記標的RNAに対するアンチセンス効果の強さ、分子内でハイブリダイズした構造の安定性、費用、合成収率等の他の要素に応じて選択される。

30

【0093】

Xbは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される4～40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドXbに由来する基であり、該デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾されていないか、塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されている。オリゴヌクレオチドXbは、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドXbはヌクレオチド配列Xbを有し、ヌクレオチド配列Xbは、ヌクレオチド配列Yと相補的な配列を含む。

40

【0094】

ヌクレオチド配列Xbは、オリゴヌクレオチドXbを構成するヌクレオチドの塩基配列である。

【0095】

Xbに含まれるヌクレオチドの数は、4～40であり、好ましくは6～25であり、より好ましくは8～16であり、さらに好ましくは9～13であり、特に好ましくは、9～11である。Xbに含まれるヌクレオチドの数は、通常、前記標的RNAに対するアンチセンス効果の強さ、分子内でハイブリダイズした構造の安定性、費用、合成収率等の他の要素に応じて選択される。

【0096】

50

オリゴヌクレオチドXは、前記オリゴヌクレオチドX aの一方の末端と前記オリゴヌクレオチドX bの一方の末端が、それぞれ共有結合で連結されたオリゴヌクレオチドであり、X aの5'末端のヌクレオチドの5'位と、X bの3'末端のヌクレオチドの3'位が、ホスホジエステル結合若しくは修飾されたホスホジエステル結合を形成して連結されているか、あるいは、X bの5'末端のヌクレオチドの5'位と、X aの3'末端のヌクレオチドの3'位が、ホスホジエステル結合若しくは修飾されたホスホジエステル結合を形成して連結されている。

【0097】

Xは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される5～80個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドXに由来する基であり、該デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾されていないか、塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されている。オリゴヌクレオチドXは、少なくとも2個の糖部修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドXはヌクレオチド配列Xを有する。

10

【0098】

ヌクレオチド配列Xは、オリゴヌクレオチドXを構成するヌクレオチドの塩基配列である。ヌクレオチド配列Xは、ヌクレオチド配列(X b - X a)と同義である。

【0099】

Xに含まれるヌクレオチドの数は、5～80であり、好ましくは8～45であり、より好ましくは11～26であり、さらに好ましくは13～21であり、特に好ましくは、13～16である。Xに含まれるヌクレオチドの数は、通常、前記標的RNAに対するアンチセンス効果の強さ、分子内でハイブリダイズした構造の安定性、費用、合成収率等の他の要素に応じて選択される。

20

【0100】

Yは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される4～40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドYに由来する基であり、該デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾されていないか、塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されている。オリゴヌクレオチドYは、少なくとも1個のリボヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドYは、ヌクレオチド配列Yを有し、ヌクレオチド配列Yは、ヌクレオチド配列X bと相補的な配列を含む。

30

【0101】

ヌクレオチド配列Yは、オリゴヌクレオチドYを構成するヌクレオチドの塩基配列である。

【0102】

Yに含まれるヌクレオチドの数は、4～40であり、好ましくは6～25であり、より好ましくは8～16であり、特に好ましくは10～13である。Yに含まれるヌクレオチドの数は、X bに含まれるヌクレオチドの数と同一であってもよく、異なってもよい。Yに含まれるヌクレオチドの数は、通常、前記標的RNAに対するアンチセンス効果の強さ、分子内でハイブリダイズした構造の安定性、費用、合成収率等の他の要素に応じて選択される。Yに含まれるヌクレオチドの数とX bに含まれるヌクレオチドの数の差は、好ましくは10以内であり、より好ましくは5以内であり、さらに好ましくは4以内であり、さらにより好ましくは2以内であり、特に好ましくは0である。

40

【0103】

X zは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される5～40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドX zに由来する基であり、該デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾されていないか、塩基部及びリン酸部の少なくとも1つが修飾されている。オリゴヌクレオチドX zは、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドX zはヌクレオチド配列X zを有する。

50

【 0 1 0 4 】

ヌクレオチド配列 X z は、オリゴヌクレオチド X z を構成するヌクレオチドの塩基配列である。

【 0 1 0 5 】

X z に含まれるヌクレオチドの数は、5 ~ 40 であり、好ましくは 8 ~ 30 であり、より好ましくは 11 ~ 25 であり、さらにより好ましくは 12 ~ 21 塩基であり、特に好ましくは 13 ~ 14 塩基である。X z に含まれるヌクレオチドの数は、通常、前記標的 R N A に対するアンチセンス効果の強さ、前記 X と Y とが分子内でハイブリダイズした構造の安定性、費用、合成収率等の他の要素に応じて選択される。

【 0 1 0 6 】

Y z は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 5 ~ 40 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y z に由来する基であり、該デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾されていないか、塩基部及びリン酸部の少なくとも 1 つが修飾されている。オリゴヌクレオチド Y z は、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチド Y z はヌクレオチド配列 Y z を有する。

【 0 1 0 7 】

ヌクレオチド配列 Y z は、オリゴヌクレオチド Y z を構成するヌクレオチドの塩基配列である。

【 0 1 0 8 】

Y z に含まれるヌクレオチドの数は、5 ~ 40 であり、好ましくは 8 ~ 30 であり、より好ましくは 11 ~ 25 であり、さらにより好ましくは 12 ~ 21 塩基であり、特に好ましくは 13 ~ 14 塩基である。Y z に含まれるヌクレオチドの数は、通常、前記標的 R N A に対するアンチセンス効果の強さ、前記 X と Y とが分子内でハイブリダイズした構造の安定性、費用、合成収率等の他の要素に応じて選択される。

【 0 1 0 9 】

X と Y とは、X b - X a - Y の順番で連結している。X b が 3' 側で X a に結合するとき、Y は 5' 側で X a に結合する。X b が 5' 側で X a に結合するとき、Y は 3' 側で X a に結合する。

【 0 1 1 0 】

X a と Y とは共有結合で連結され、X a の 5' 末端のヌクレオチドの 5' 位と、Y の 3' 末端のヌクレオチドの 3' 位が、ホスホジエステル結合若しくは修飾されたホスホジエステル結合を形成して連結しているか、あるいは、Y の 5' 末端のヌクレオチドの 5' 位と、X a の 3' 末端のヌクレオチドの 3' 位が、ホスホジエステル結合若しくは修飾されたホスホジエステル結合を形成して連結している。X a と Y とは、ホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。

【 0 1 1 1 】

X a は、X a のオリゴヌクレオチドに由来する基内において部分的に相補的な配列を含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。

【 0 1 1 2 】

X b と Y とは、分子内でハイブリダイズする。

【 0 1 1 3 】

ヌクレオチド配列 X b とヌクレオチド配列 Y とは、X b と Y とがハイブリダイズするために完全に相補的である必要はないが、相補性は、好ましくは 70 % 以上であり、より好ましくは 80 % 以上であり、さらに好ましくは 90 % 以上（例えば、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 以上）である。ヌクレオチド配列 X b とヌクレオチド配列 Y とは、完全に相補的であってもよい。

【 0 1 1 4 】

Y の全体が、アンチセンス配列部分の一部である X b にハイブリダイズする必要はなく、Y の一部がハイブリダイズしなくてもよいが、全体がハイブリダイズすることが好まし

10

20

30

40

50

い。

Y が、アンチセンス配列部分の一部である X b と部分的にハイブリダイズする場合、Y の内少なくとも X a 側の末端は、X b とハイブリダイズすることが好ましい。部分的にハイブリダイズするヌクレオチドの数は、通常、分子間あるいは分子内でハイブリダイズした構造の安定性、前記標的 RNA に対するアンチセンス効果の強さや、費用、合成収率等の他の要素に応じて選択される。

【0115】

ヌクレオチド配列 X は、アンチセンス配列を含む。ヌクレオチド配列 X のうち、アンチセンス配列が占める割合は、好ましくは 70 % 以上であり、さらに好ましくは 90 % 以上であり、特に好ましくは 100 % である。ヌクレオチド配列 X が含むアンチセンス配列は、

10

「標的 RNA とハイブリダイズした際に RNase H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチド」を含む配列であるか、「少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する 4 個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」配列を含む配列であり、好ましい態様等は、アンチセンス配列及びアンチセンス配列部分で述べた通りである。

【0116】

X b は、X が含むアンチセンス配列部分の一部であり、分子内でハイブリダイズし、X a は、X が含むアンチセンス配列部分の一部であり、分子内でハイブリダイズしない。X に含まれるアンチセンス配列部分が、「標的 RNA とハイブリダイズした際に RNase H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチド」を含む配列であるとき、前記「標的 RNA とハイブリダイズした際に RNase H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチド」の一部が、X b に含まれて、分子内でハイブリダイズし、一部は X a に含まれて、分子内でハイブリダイズしないことが好ましい。その他の態様として、前記「標的 RNA とハイブリダイズした際に RNase H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチド」の全体が、X b に含まれてハイブリダイズすることが好ましい。「標的 RNA とハイブリダイズした際に RNase H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチド」の 3' 側及び 5' 側の少なくとも一方に隣接して結合している糖部修飾ヌクレオチド」配列部分のうち、X b に含まれる部分は分子内でハイブリダイズし、X a に含まれる部分はハイブリダイズしないことが好ましい。

20

【0117】

オリゴヌクレオチド X において、オリゴヌクレオチド X が含むアンチセンス配列部分の X b 側に隣接して、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 1 ~ 10 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が結合していてもしていなくてもよいが、結合しないことが好ましい。結合する場合、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドからなる群から独立して選択されるヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が、アンチセンス配列部分の X b 側の末端に隣接して結合することが好ましい。該アンチセンス配列部分の X b 側に隣接して、1 ~ 10 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が結合する場合、アンチセンス配列部分の X b 側と前記オリゴヌクレオチド鎖とは、ホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。

30

【0118】

ヌクレオチド配列 X z は、アンチセンス配列を含み、ヌクレオチド配列 X z のうち、アンチセンス配列が占める割合は、好ましくは 70 % 以上であり、さらに好ましくは 90 % 以上であり、特に好ましくは 100 % である。ヌクレオチド配列 X z が含むアンチセンス配列は、「標的 RNA とハイブリダイズした際に RNase H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチド」を含む配列であるか、「少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する 4 個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」配列を含む配列であり、好ましい態様等は、アンチセンス配列及びアンチセンス配列部分で述べた通りである。

40

【0119】

X z が含むアンチセンス配列部分は、分子内でハイブリダイズしない。

50

【 0 1 2 0 】

オリゴヌクレオチド X z において、オリゴヌクレオチド X z が含むアンチセンス配列部分の L x に結合しない側の末端に隣接して、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 1 ~ 10 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が結合していてもしていなくてもよいが、結合しないことが好ましい。結合する場合、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドからなる群から独立して選択されるヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が、X z が含むアンチセンス配列部分の L x に結合しない側に、隣接して結合することが好ましい。該アンチセンス配列部分の L x に結合しない側の末端に隣接して、1 ~ 10 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が結合する場合、該アンチセンス配列部分と前記オリゴヌクレオチド鎖とは、ホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。

10

【 0 1 2 1 】

ヌクレオチド配列 Y z は、アンチセンス配列を含み、ヌクレオチド配列 Y z のうち、アンチセンス配列が占める割合は、好ましくは 70 % 以上であり、さらに好ましくは 90 % 以上であり、特に好ましくは 100 % である。ヌクレオチド配列 Y z が含むアンチセンス配列は、「標的 RNA とハイブリダイズした際に R N a s e H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチド」を含む配列であるか、「少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する 4 個のデオキシリボヌクレオチドを含まない」配列を含む配列であり、好ましい態様等は、アンチセンス配列及びアンチセンス配列部分で述べた通りである。

20

【 0 1 2 2 】

Y z が含むアンチセンス配列部分は、分子内でハイブリダイズしない。

【 0 1 2 3 】

オリゴヌクレオチド Y z において、オリゴヌクレオチド Y z が含むアンチセンス配列部分の L y に結合しない側の末端に隣接して、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 1 ~ 10 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が結合していてもしていなくてもよいが、結合しないことが好ましい。結合する場合、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドからなる群から独立して選択されるヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が、Y z が含むアンチセンス配列部分の L y に結合しない側に、隣接して結合することが好ましい。該アンチセンス配列部分の 3' 側及び 5' 側の少なくとも一方に隣接して、1 ~ 10 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド鎖が結合する場合、該アンチセンス配列部分と前記オリゴヌクレオチド鎖とは、ホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。

30

【 0 1 2 4 】

オリゴヌクレオチド X における糖部修飾ヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの種類、数及び修飾の位置は、一本鎖オリゴヌクレオチドが奏するアンチセンス効果等に影響を与える場合がある。その好ましい態様は、修飾対象となるヌクレオチドの種類、配列等によっても異なるため、一概には言えないが、前述のアンチセンス配列部分と同様に、修飾後の一本鎖オリゴヌクレオチドが有するアンチセンス効果を測定することにより特定することができる。X z 及び Y z も、オリゴヌクレオチド X と同様である。

40

【 0 1 2 5 】

オリゴヌクレオチド X 及び X z が、同一の標的 RNA にハイブリダイズする場合、それらのアンチセンス配列はそれぞれ同一であってもよく、異なってもよい。オリゴヌクレオチド X 及び X z は、それぞれ別の標的 RNA にハイブリダイズしてもよい。

【 0 1 2 6 】

オリゴヌクレオチド X 及び Y z が、同一の標的 RNA にハイブリダイズする場合、それらのアンチセンス配列はそれぞれ同一であってもよく、異なってもよい。オリゴヌクレオチド X 及び Y z は、それぞれ別の標的 RNA にハイブリダイズしてもよい。

【 0 1 2 7 】

50

Yにおける糖部修飾ヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの種類、数及び修飾の位置は、一本鎖オリゴヌクレオチドが奏するアンチセンス効果等に影響を与える場合がある。その好ましい態様は、修飾対象となるヌクレオチドの種類、配列等によっても異なるため、一概には言えないが、前述のアンチセンス配列部分と同様に、修飾後のオリゴヌクレオチド複合体が有するアンチセンス効果を測定することにより特定することができる。特定の細胞内においてRNase H等のヌクレアーゼによりYが分解されることにより、アンチセンス配列部分を含むオリゴヌクレオチドが生成しアンチセンス効果を発揮し易いという観点から、ヌクレオチド配列Yは、「RNase Hによって切断される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」を含むことが好ましく、少なくとも1個のリボヌクレオチドを含むことが好ましい。該連続するヌクレオチドは、リボヌクレオチドから独立して選ばれることがさらに好ましい。また、該連続するヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されていることがさらに好ましい。この連続するヌクレオチドは、それぞれ同一であっても、異なっていてよい。また、ヌクレオチド配列Yは、オリゴリボヌクレオチドを含むことが好ましく、RNAを含むことがより好ましい。

10

「RNase Hによって切断される少なくとも4個の連続するヌクレオチド」は、4～25個の連続するヌクレオチドを含むことがより好ましい。

【0128】

次に、[A]XzとLx、YzとLyの両方を含まない場合、[B]XzとLxを含まず、YzとLyを含む場合及び[C]XzとLxを含み、YzとLyを含まない場合のそれぞれの態様について順に説明する。

20

【0129】

[A]XzとLx、YzとLyの両方を含まない場合(m=0、n=0)

【0130】

ヌクレオチド配列Yは、RNase Hによって切断される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含むことが好ましく、4～25個の連続するヌクレオチドを含むことがより好ましい。この連続するヌクレオチドは、それぞれ同一であっても、異なっていてよい。Yは、オリゴリボヌクレオチドを含むことが好ましく、RNAを含むことがより好ましい。オリゴヌクレオチドYの5'側及び3'側のヌクレオチドのうち、少なくとも一方がホスホロチオエート化されていることが好ましい。Xbが3'側でXaに結合し、Yが5'側でXaに結合する場合、オリゴヌクレオチドYの3'側がホスホロチオエート化されていることが好ましい。Xbが5'側でXaに結合し、Yが3'側でXaに結合する場合、オリゴヌクレオチドYの5'側がホスホロチオエート化されていることが好ましい。Xbが3'側でXaに結合し、Yが5'側でXaに結合する場合、オリゴヌクレオチドYの3'側が、1～10個の糖部修飾ヌクレオチドを含むことが好ましく、2～5個の糖部修飾ヌクレオチドを含むことがより好ましく、2又は3個の糖部修飾ヌクレオチドを含むことがさらに好ましい。Xbが5'側でXaに結合し、Yが3'側でXaに結合する場合、オリゴヌクレオチドYの5'側が、1～10個の糖部修飾ヌクレオチドを含むことが好ましく、2～5個の糖部修飾ヌクレオチドを含むことがより好ましく、2又は3個の糖部修飾ヌクレオチドを含むことがさらに好ましい。前記複数の糖部修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結されていることが好ましい。ここで、該3'側及び5'側の少なくとも一方における複数の糖部修飾ヌクレオチドの間に、複数のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド又はその両方が含まれていてもよいが、該複数の糖部修飾ヌクレオチドは、連続していることが好ましい。オリゴヌクレオチドYの3'側及び5'側の少なくとも一方に、複数の糖部修飾ヌクレオチドを含むとき、それぞれの糖部修飾ヌクレオチドは同一であっても、異なっていてよい。

30

40

【0131】

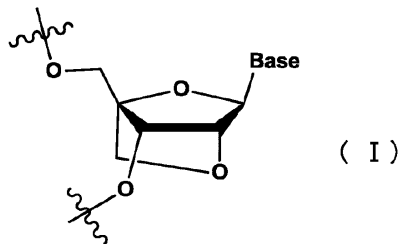
オリゴヌクレオチドYの3'側及び5'側の少なくとも一方に含む糖部修飾ヌクレオチドは、好ましくは、2'-O-メチル化ヌクレオチド、2'-MOE(2'-O-メトキシエチル)化ヌクレオチド、2'-AP(2'-O-アミノプロピル)化ヌクレオチド、2'-フルオロ化ヌクレオチド、2'-F-アラビノヌクレオチド(2'-F-ANA)、架橋化ヌク

50

レオチド (BNA (Bridged Nucleic Acid)) 又は 2' - O - メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチド (MCE) であり、より好ましくは、BNA 又は 2' - O - メチル化ヌクレオチドであり、さらにより好ましくは、下記式 (I) で表わされる部分構造を含む LNA、又は 2' - O - メチル化ヌクレオチドであり、特に好ましくは、2' - O - メチル化ヌクレオチドである。

【0132】

【化4】



10

【0133】

式中、Base は、塩基部分を表し、プリン - 9 - イル基又は 2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基であり、該プリン - 9 - イル基及び 2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基は、修飾されていないか、修飾されている。

【0134】

その他の態様として、Y に含まれるヌクレオチドは、リボヌクレオチドから独立して選ばれることが好ましい。また、Y に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。

20

【0135】

[B] Xz と Lx を含まず、Yz と Ly を含む場合 (m = 0、n = 1)

【0136】

ヌクレオチド配列 Y は、RNase H によって切断される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチドを含むことが好ましく、4 ~ 25 個の連続するヌクレオチドを含むことがより好ましい。この連続するヌクレオチドは、それぞれ同一であっても、異なってもよい。オリゴヌクレオチド Y は、オリゴリボヌクレオチドを含むことが好ましく、RNA を含むことがより好ましく、RNA に由来する基であることが特に好ましい。Y に含まれるヌクレオチドは、リボヌクレオチドから独立して選ばれることが好ましい。Y に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。

30

【0137】

[C] Xz と Lx を含み、Yz と Ly を含まない場合 (m = 1、n = 0)

【0138】

ヌクレオチド配列 Y の好ましい態様は、前述の [A] Xz と Lx、Yz と Ly の両方を含まない場合と同様である。

【0139】

次に、Lx、Ly 及び機能性分子について説明する。以下は、前記の幾つかの態様に共通する。

40

【0140】

Lx は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 0 ~ 20 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Lx に由来する基であり、前述の Xb と Xz とを連結するリンカーである。Lx は前述の Xb と Xz とを、Xz - Lx - Xb の順に連結する。

m が 1 であり、オリゴヌクレオチド Lx が、0 個のヌクレオチドからなるとき、Xb と Xz とは、直接連結される。

【0141】

Ly は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドから

50

なる群から独立して選択される 0 ~ 20 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド L_y に由来する基であり、前述の Y と Y_z とを連結するリンカーである。 L_y は前述の Y と Y_z とを、 $Y - L_y - Y_z$ の順に連結する。

n が 1 であり、オリゴヌクレオチド L_y が、0 個のヌクレオチドからなるとき、 Y と Y_z とは、直接連結される。

【0142】

L_x と X_b とは共有結合で連結され、例えば、 X_b の末端ヌクレオチドの糖部分（糖部修飾ヌクレオチドにおいては、糖骨格から置き換わった部分構造を含む）のヒドロキシ基から水素原子を取り除いた酸素原子が L_x の末端ヌクレオチドの糖部分と、ホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。 L_x と X_z とは共有結合で連結され、例えば、 X_z の末端ヌクレオチドの糖部分（糖部修飾ヌクレオチドにおいては、糖骨格から置き換わった部分構造を含む）のヒドロキシ基から水素原子を取り除いた酸素原子が L_x の末端ヌクレオチドの糖部分と、ホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合で連結されていることが好ましい。

また同様に、 L_y と Y とは、 L_y の末端ヌクレオチドの糖部分と Y の末端ヌクレオチドの糖部分で連結されていることが好ましく、 L_y と Y_z とは、 L_y の末端ヌクレオチドの糖部分と Y_z の末端ヌクレオチドの糖部分で連結されていることが好ましい。 X_b と X_z とが、直接連結されるとき、同様に、 X_b の末端ヌクレオチドの糖部分と X_z の末端ヌクレオチドの糖部分が、ホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合で連結されていることが好ましく、ホスホジエステル結合で連結されていることがより好ましい。 Y と Y_z とが、直接連結されるとき、同様に、 Y の末端ヌクレオチドの糖部分と Y_z の末端ヌクレオチドの糖部分が、ホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合で連結されていることが好ましく、ホスホジエステル結合で連結されていることがより好ましい。前記末端ヌクレオチドが糖部修飾ヌクレオチドの場合は、前記糖部分は、糖骨格から置き換わった部分構造等を含む。

【0143】

X_b が 3' 側で X_a に結合するとき、 Y は 5' 側で X_a に結合する。さらに m が 1 である場合、 X_b は 5' 側で L_x に結合し、 X_z は 3' 側で L_x に結合する。 X_b が 3' 側で X_a に結合し、 Y が 5' 側で X_a に結合し、さらに n が 1 である場合、 Y は 3' 側で L_y に結合し、 Y_z は 5' 側で L_y に結合する。

【0144】

X_b が 5' 側で X_a に結合するとき、 Y は 3' 側で X_a に結合する。さらに m が 1 である場合、 X_b は 3' 側で L_x に結合し、 X_z は 5' 側で L_x に結合する。 X_b が 5' 側で X_a に結合し、 Y が 3' 側で X_a に結合し、さらに n が 1 である場合、 Y は 5' 側で L_y に結合し、 Y_z は 3' 側で L_y に結合する。

【0145】

L_x 及び L_y は、前述のアンチセンス配列部分より速やかに分解されることが望ましい。

【0146】

前記オリゴヌクレオチド L_x は、生理的条件下で分解されるオリゴヌクレオチドが好ましい。

【0147】

前記オリゴヌクレオチド L_y は、生理的条件下で分解されるオリゴヌクレオチドが好ましい。

【0148】

ここで、「生理的条件下で分解されるオリゴヌクレオチド」は、生理的条件下にて各種 $DNAse$ （デオキシリボヌクレアーゼ）及び $RNAse$ （リボヌクレアーゼ）等の酵素によって分解されるオリゴヌクレオチドであればよく、該オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、その一部あるいは全部において、塩基、糖若しくはリン酸塩結合に化学修飾がされていてもよく、されていなくてもよい。

【0149】

前記オリゴヌクレオチド L_x は、好ましくはホスホジエステル結合で連結されたオリゴヌクレオチドであり、より好ましくはオリゴデオキシリボヌクレオチド又はオリゴリボヌクレオチドであり、さらに好ましくはDNA又はRNAであり、さらにより好ましくはRNAである。オリゴヌクレオチド L_y も、オリゴヌクレオチド L_x と同様である。

【0150】

オリゴヌクレオチド L_x は、オリゴヌクレオチド L_x 内において部分的に相補的な配列を含んでいてもよく、含んでいなくてもよいが、オリゴヌクレオチド L_x は、好ましくは、オリゴヌクレオチド L_x 内において部分的に相補的な配列を含んでいないオリゴヌクレオチドである。そのようなオリゴヌクレオチドに由来する基の例として、ホスホジエステル結合で連結された $(N)_k$ (N は、それぞれ独立してアデノシン、ウリジン、シチジン、グアノシン、2'-デオキシアデノシン、チミジン、2'-デオキシシチジン、または2'-デオキシグアノシンであり、 k は1~20の整数(繰り返し数)である)を挙げることができる。中でも、 k は好ましくは1~12であり、より好ましくは1~8であり、さらに好ましくは1~5であり、さらにより好ましくは、1~3である。オリゴヌクレオチド L_y も、オリゴヌクレオチド L_x と同様である。

10

【0151】

X (X_a 及び X_b を含む)、 Y 、 X_z 、 Y_z 、 L_x 及び L_y には、直接的に又は間接的に機能性分子が結合していてもよい。前述 $[A]$ X_z と L_x 、 Y_z と L_y の両方を含まない場合、機能性分子は、オリゴヌクレオチド Y に結合していることが好ましい。前述 $[B]$ X_z と L_x を含まず、 Y_z と L_y を含む場合、機能性分子は、オリゴヌクレオチド X_b 又はオリゴヌクレオチド Y に結合していることが好ましい。前述 $[C]$ X_z と L_x を含む、 Y_z と L_y を含まない場合、機能性分子は、オリゴヌクレオチド Y に結合していることが好ましい。機能性分子とオリゴヌクレオチド Y 又はオリゴヌクレオチド X_b との結合は、直接的でも、他の物質を介して間接的でもよいが、共有結合、イオン結合又は水素結合でオリゴヌクレオチド Y 又はオリゴヌクレオチド X_b と機能性分子とが結合していることが好ましい。その結合の安定性が高いという観点から、共有結合で直接的に結合していること、又は共有結合でリンカー(連結基)を介して結合していることがより好ましい。

20

【0152】

前記機能性分子が、共有結合で一本鎖オリゴヌクレオチドに結合する場合、前記機能性分子は、一本鎖オリゴヌクレオチド分子の3'末端又は5'末端に、直接的に又は間接的に結合していることが好ましい。前記リンカー又は機能性分子と、一本鎖オリゴヌクレオチド分子の末端ヌクレオチドとの結合は、機能性分子に応じて選択される。

30

前記リンカー又は機能性分子と、一本鎖オリゴヌクレオチド分子の末端ヌクレオチドとは、ホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合で連結されていることが好ましく、ホスホジエステル結合で連結されていることがより好ましい。

前記リンカー又は機能性分子は、一本鎖オリゴヌクレオチド分子の3'末端のヌクレオチドが有する3'位の酸素原子又は5'末端のヌクレオチドが有する5'位の酸素原子に直接連結されていてもよい。

【0153】

「機能性分子」の構造は、特に制限はなく、それが結合することにより一本鎖オリゴヌクレオチドに所望の機能が付与される。所望の機能としては、標識機能、精製機能及び標的部位への送達機能が挙げられる。標識機能を付与する分子の例としては、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。精製機能を付与する分子の例としては、ピオチン、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。

40

【0154】

また、一本鎖オリゴヌクレオチドを特異性高く効率的に標的部位(例えば、標的細胞)に送達し、かつ当該一本鎖オリゴヌクレオチドによって標的遺伝子の発現を非常に効果的に制御するという観点から、機能性分子として、一本鎖オリゴヌクレオチドを標的部位に送達させる機能を有する分子が結合していることが好ましい。該送達機能を有する分子は

50

、例えば、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・ファーマシューティカルズ・アンド・バイオファーマシューティクス、107巻、321～340頁(2016年)、アドバンス・ドラッグ・デリバリー・レビューズ、104巻、78～92頁(2016年)、エキスパート・オピニオン・オン・ドラッグ・デリバリー、11巻、791～822頁(2014年)等を参照できる。

【0155】

標的RNAへの送達機能を付与する分子として、例えば、肝臓等に特異性高く効率的に一本鎖オリゴヌクレオチドを送達できるという観点から、脂質、糖が挙げられる。このような脂質としては、コレステロール；脂肪酸；ビタミンE(トコフェロール類、トコトリエノール類)、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンK等の脂溶性ビタミン；アシルカルニチン、アシルCoA等の中間代謝物；糖脂質；グリセリド；それらの誘導体等が挙げられる。これらの中では、より安全性が高いという観点から、コレステロール、ビタミンE(トコフェロール類、トコトリエノール類)が好ましい。中でも、トコフェロール類がより好ましく、トコフェロールが更に好ましく、 α -トコフェロールが特に好ましい。糖としては、アシアロ糖タンパク質受容体と相互作用を有する糖誘導体が挙げられる。

10

【0156】

「アシアロ糖タンパク質受容体」は肝臓細胞表面に存在し、アシアロ糖タンパク質のガラクトース残基を認識して、その分子を細胞内に取り込み分解する作用を持つ。「アシアロ糖タンパク質受容体と相互作用する糖誘導体」は、ガラクトース残基と類似した構造を持ち、アシアロ糖タンパク質受容体との相互作用により細胞内に取り込まれる化合物が好ましく、例えば、GalNAc(N-アセチルガラクトサミン)誘導体、ガラクトース誘導体及びラクトース誘導体が挙げられる。また、脳に特異性高く効率的に本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドを送達できるという観点では、「機能性分子」として、糖(例えば、グルコース、スクロース等)が挙げられる。また、各臓器の細胞表面にある各種タンパク質に相互作用することにより、当該臓器に特異性高く効率的に一本鎖オリゴヌクレオチドを送達できるという観点では、「機能性分子」として、受容体のリガンド、抗体、それらの断片のペプチド又はタンパク質が挙げられる。

20

【0157】

機能性分子と、X(Xa及びXbを含む)、Y、Xz、Yz、Lx及びLyとの結合を介するリンカーは、一本鎖オリゴヌクレオチド分子として機能性分子が有する機能を発揮できればよい。ため、該機能性分子と該オリゴヌクレオチドとを、安定して結合させるリンカーであれば特に限定されない。該リンカーとしては、例えば、ヌクレオチド数が2～20のオリゴヌクレオチドに由来する基、アミノ酸数が2～20のポリペプチドに由来する基、炭素数が2～20のアルキレン基及び炭素数が2～20のアルケニレン基等が挙げられる。前記ヌクレオチド数が2～20のオリゴヌクレオチドに由来する基は、ヌクレオチド数が2～20のオリゴヌクレオチドから、ヒドロキシ基、水素原子等を取り除いた基である。前記アミノ酸数が2～20のポリペプチドに由来する基は、アミノ酸数が2～20のポリペプチドから、ヒドロキシ基、水素原子、アミノ基等を取り除いた基である。

30

【0158】

リンカーは、好ましくは、C₂₋₂₀アルキレン基又はC₂₋₂₀アルケニレン基(該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される1又は2の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は-O-、-NR^B- (R^Bは、水素原子、C₁₋₆アルキル基又はハロC₁₋₆アルキル基である)、-S-、-S(=O)-又は-S(=O)₂-により置き換えられている)である。ここで、前記置換と置き換えを組み合わせると、リンカーは、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-NR¹- (R¹は水素原子、C₁₋₆アルキル基又はハロC₁₋₆アルキル基を示す)、-C(=O)-NR¹- (R¹は水素原子、C₁₋₆アルキル基又はハロC₁₋₆アルキル基を示す)、-C(=S)-NR¹- (R¹は水素原子、C₁₋₆アル

40

50

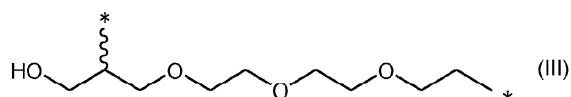
キル基又はハロ C₁ - 6 アルキル基を示す)、- NR¹ - C(=O) - NR¹ - (R¹はそれぞれ独立して、水素原子、C₁ - 6 アルキル基又はハロ C₁ - 6 アルキル基を示す)等で表される基を含んでいてもよい。

【0159】

リンカーは、より好ましくは、C₂ - 20 アルキレン基 (該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O - により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基又は保護されたヒドロキシ基に置換されている) であり、さらに好ましくは C₈ - 12 アルキレン基 (該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O - により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている) であり、特に好ましくは、1, 8 - オクチレン基である。またその他の態様として、リンカーは特に好ましくは、下記式 (III) で表される基である。

【0160】

【化5】



【0161】

式中、一つの * は、オリゴヌクレオチドに由来する基との結合位置 (ヌクレオチドを構成する原子) を表し、他方の * は、機能性分子に由来する基との結合位置 (機能性分子に由来する基を構成する原子) を表す。

【0162】

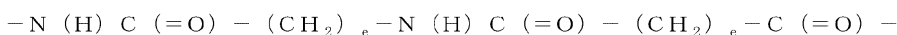
その他の態様として、リンカーは、より好ましくは、C₂ - 20 アルキレン基 (該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O - 若しくは - NR^B - (R^Bは、水素原子又は C₁ - 6 アルキル基である) により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はオキソ基により置換されている) であり、さらに好ましくは、下記式：

【化6】



(式中 e は、それぞれ独立して 1 から 6 の整数である) で表される基であり、特に好ましくは、下記式：

【化7】



で表される基である。

【0163】

前記「保護されたヒドロキシ基」の保護基は、機能性分子とオリゴヌクレオチドとを結合させる際に安定であればよいため、特に限定されない。リンカーとして特に限定されず、例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第3版、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ (JOHN WILLY & SONS) 出版 (1999年) 等に記載されている任意の保護基を挙げることができる。具体的には、メチル基、ベンジル基、p - メトキシベンジル基、tert - ブチル基、メトキシメチル基、メトキシエチル基、2 - テトラヒドロピラニル基、エトキシエチル基、シアノエチル基、シアノエトキシメチル基、フェニルカルバモイル基、1, 1 - ジオキソチオモルホリン - 4 - チオカルバモイル基、アセチル基、ピパロイル基、ベンゾイル基、トリメチルシリル基、トリエチ

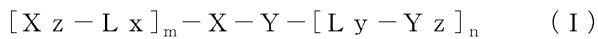
ルシリル基、トリイソプロピルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、[(トリイソプロピルシリル)オキシ]メチル基(Tom基)、1-(4-クロロフェニル)-4-エトキシピペリジン-4-イル基(Cpep基)、トリフェニルメチル基(トリチル基)、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基(DMTri基)、トリメトキシトリチル基、9-フェニルキサンテン-9-イル基(Pixyl基)、9-(p-メトキシフェニル)キサンテン-9-イル基(MOX基)等を挙げることができる。「保護されたヒドロキシ基」の保護基は、好ましくは、ベンゾイル基、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、トリフェニルメチル基、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基、トリメトキシトリチル基、9-フェニルキサンテン-9-イル基又は9-(p-メトキシフェニル)キサンテン-9-イル基であり、より好ましくは、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基又はトリメトキシトリチル基であり、さらにより好ましくはジメトキシトリチル基である。

【0164】

核酸医薬品に用いる好ましい一本鎖オリゴヌクレオチドとしては以下に示すものが挙げられる。

1) 式(I)

【化8】

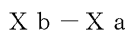


{式中、

Yは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個のリボヌクレオチドを含む4~40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドYに由来する基であり、

Xは、式：

【化9】



(式中、X_bは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む4~40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドX_bに由来する基であり、

X_aは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む1~40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドX_aに由来する基であり、X_aは、その両端で、オリゴヌクレオチドY及びオリゴヌクレオチドX_bにそれぞれ結合する)で表され、5~80個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドXに由来する基であり、

X_zは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む5~40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドX_zに由来する基であり、

Y_zは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択され、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含む5~40個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドY_zに由来する基であり、

L_xは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される0~20個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドL_xに由来する基であり、

L_yは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される0~20個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドL_yに由来する基であり、

mは、0又は1であり、

mが0であるとき、nは、0又は1であり、

mが1であるとき、nは、0であり、

前記オリゴヌクレオチド X はヌクレオチド配列 X を有し、前記オリゴヌクレオチド X a はヌクレオチド配列 X a を有し、前記オリゴヌクレオチド X b はヌクレオチド配列 X b を有し、前記オリゴヌクレオチド Y はヌクレオチド配列 Y を有し、前記オリゴヌクレオチド X z はヌクレオチド配列 X z を有し、前記オリゴヌクレオチド Y z はヌクレオチド配列 Y z を有し、前記オリゴヌクレオチド L x はヌクレオチド配列 L x を有し、前記オリゴヌクレオチド L y はヌクレオチド配列 L y を有し、

前記ヌクレオチド配列 X b は、前記ヌクレオチド配列 Y と相補的であり、

前記ヌクレオチド配列 X は、標的 RNA とのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

m が 1 であり、n が 0 であるとき、

10

前記ヌクレオチド配列 X z が、標的 RNA とのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

m が 0 であり、n が 1 であるとき、

前記ヌクレオチド配列 Y z が、標的 RNA とのハイブリダイズを可能にするアンチセンス配列を含み、

前記アンチセンス配列を 2 以上有する場合、それぞれのアンチセンス配列部分がハイブリダイズする標的 RNA は同一でも異なってもよい)

で表され、X b と Y とがハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド。

【 0 1 6 5 】

2) X b が 3 ' 側で X a に結合し、Y が 5 ' 側で X a に結合する、1) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。 20

3) X b が 5 ' 側で X a に結合し、Y が 3 ' 側で X a に結合する、1) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【 0 1 6 6 】

4) 前記アンチセンス配列と標的 RNA の配列との相補性が 7 0 % 以上である、1) から 3) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

5) ヌクレオチド配列 X b とヌクレオチド配列 Y との相補性が 7 0 % 以上である、1) から 4) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

6) 式 (1) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドに含まれる各ヌクレオチドが、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ホスホロジチオエート結合及びホスホロアミデート結合からなる群からそれぞれ独立して選ばれる少なくとも一種で互いに連結されている、1) から 5) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。 30

7) 式 (1) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドに含まれる各ヌクレオチドが、ホスホジエステル結合及びホスホロチオエート結合からそれぞれ独立して選ばれる少なくとも一種で互いに連結されている、1) から 6) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

8) X が含むアンチセンス配列部分が、ホスホロチオエート結合を含む、1) から 7) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

9) 前記ヌクレオチド配列 X が含むアンチセンス配列が、互いにホスホロチオエート結合で連結されたヌクレオチドを含む配列である、1) から 8) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。 40

1 0) オリゴヌクレオチド X に含まれるヌクレオチドが、ホスホロチオエート結合で互いに連結されている、1) から 9) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【 0 1 6 7 】

1 1) オリゴヌクレオチド X が含むアンチセンス配列部分の 3 ' 側のヌクレオチド及び 5 ' 側のヌクレオチドの少なくとも一方が、糖部修飾ヌクレオチドである、1) から 1 0) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

1 2) オリゴヌクレオチド X が含むアンチセンス配列部分の 3 ' 側のヌクレオチド及び 5 ' 側のヌクレオチドが、糖部修飾ヌクレオチドである、1) から 1 1) のいずれか 1 つに記 50

載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

13) 前記ヌクレオチド配列Xが含むアンチセンス配列が、糖部修飾ヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドから独立して選ばれる11～26個のヌクレオチドからなる配列である、1)から12)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

14) 前記ヌクレオチド配列Xが含むアンチセンス配列が、少なくとも1個のデオキシリボヌクレオチドを含む11～26個のヌクレオチドからなる配列である、1)から13)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0168】

15) 前記ヌクレオチド配列Xが含むアンチセンス配列が、標的RNAとハイブリダイズした際に、RNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列である、1)から14)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

16) 前記アンチセンス配列部分が、「前記RNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列部分」の5'側及び3'側に、隣接して結合する糖部修飾ヌクレオチドを含む、15)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

17) 前記「標的RNAとハイブリダイズした際に、RNAseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列」が、少なくとも1個のデオキシリボヌクレオチドを含む4～20個のヌクレオチドからなる配列である、15)又は16)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0169】

18) 前記ヌクレオチド配列Xが含むアンチセンス配列部分は、少なくとも1個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する4個のデオキシリボヌクレオチドを含まない、1)から14)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

20

19) 前記ヌクレオチド配列Xが含むアンチセンス配列が、4～30個の糖部修飾ヌクレオチドからなる配列である、1)から13)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0170】

20) ヌクレオチド配列Yは、RNAseHによって切断される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列である、1)から19)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

21) ヌクレオチド配列Yが、6～25個のリボヌクレオチドからなる配列である、1)から20)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

30

22) オリゴヌクレオチドYが、オリゴヌクレオチドYの5'側及び3'側の少なくとも一方に、1つ以上の糖部修飾ヌクレオチドを含む、1)から21)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

23) オリゴヌクレオチドYが、ホスホジエステル結合を含む、1)から22)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

24) Yの5'側及び3'側の少なくとも一方が、隣接するヌクレオチドとホスホジエステル結合で連結されている、1)から23)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

25) オリゴヌクレオチドXaが、デオキシリボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される3～10個のヌクレオチドからなり、オリゴヌクレオチドXbが、デオキシリボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される8～16個のヌクレオチドからなる、1)から24)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

40

26) mが0であり、nが0である、1)から25)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

27) Yの5'側及び3'側のヌクレオチドのうち、少なくとも一方が、ホスホロチオエート化されている、26)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0171】

28) mが1であり、nが0である、1)から25)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチ

50

ド。

29) Xz が含むアンチセンス配列部分が、ホスホロチオエート結合を含む、28) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

30) 前記ヌクレオチド配列 Xz が含むアンチセンス配列が、互いにホスホロチオエート結合で連結されたヌクレオチドを含む配列である、28) 又は 29) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

31) オリゴヌクレオチド Xz に含まれるヌクレオチドが、ホスホロチオエート結合で互いに連結されている、28) から 30) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0172】

32) オリゴヌクレオチド Xz が含むアンチセンス配列部分の 3' 側のヌクレオチド及び 5' 側のヌクレオチドの少なくとも一方が、糖部修飾ヌクレオチドである、28) から 31) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

33) オリゴヌクレオチド Xz が含むアンチセンス配列部分の 3' 側のヌクレオチド及び 5' 側のヌクレオチドが、糖部修飾ヌクレオチドである、28) から 32) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

34) 前記ヌクレオチド配列 Xz が含むアンチセンス配列が、糖部修飾ヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドから独立して選ばれる 11 ~ 26 個のヌクレオチドからなる配列である、33) から 34) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

35) 前記ヌクレオチド配列 Xz が含むアンチセンス配列が、少なくとも 1 個のデオキシリボヌクレオチドを含む 11 ~ 26 個のヌクレオチドからなる配列である、28) から 34) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0173】

36) 前記ヌクレオチド配列 Xz が含むアンチセンス配列が、標的 RNA とハイブリダイズした際に、RNAse H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチドを含む配列である、28) から 35) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

37) 前記アンチセンス配列部分が、「前記 RNAse H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチドを含む配列部分」の 5' 側及び 3' 側に、隣接して結合する糖部修飾ヌクレオチドを含む、36) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

38) 前記「標的 RNA とハイブリダイズした際に、RNAse H によって認識される少なくとも 4 個の連続するヌクレオチドを含む配列」が、少なくとも 1 個のデオキシリボヌクレオチドを含む 4 ~ 20 個のヌクレオチドからなる配列である、36) 又は 37) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0174】

39) 前記ヌクレオチド配列 Xz が含むアンチセンス配列部分は、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する 4 個のデオキシリボヌクレオチドを含まない、28) から 35) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

40) 前記ヌクレオチド配列 Xz が含むアンチセンス配列が、4 ~ 30 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる配列である、28) から 34) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

41) オリゴヌクレオチド Lx が、0 個のヌクレオチドからなり、Xb と Xz とが、ホスホジエステル結合で連結されている、28) から 40) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

42) Lx が、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 1 ~ 20 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Lx に由来する基である、28) から 40) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

43) オリゴヌクレオチド Lx が、ホスホジエステル結合を含む、42) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

44) オリゴヌクレオチド Lx に含まれるヌクレオチドが、ホスホジエステル結合で互

10

20

30

40

50

いに連結されている、42)又は43)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

45) オリゴヌクレオチドLxが、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドからなる群から独立して選択される1～8個のヌクレオチドからなる、42)から44)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

46) オリゴヌクレオチドLxが、オリゴデオキシリボヌクレオチド又はオリゴリボヌクレオチドである、42)から45)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

47) オリゴヌクレオチドLxが、DNA又はRNAである、42)から46)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

48) オリゴヌクレオチドLxが、RNAである、42)から46)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

49) オリゴヌクレオチドYの5'側及び3'側のヌクレオチドのうち、少なくとも一方が、ホスホロチオエート化されている、28)から48)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0175】

50) mが0であり、nが1である、1)から25)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

51) Yzが含むアンチセンス配列部分が、ホスホロチオエート結合を含む、50)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

52) 前記ヌクレオチド配列Yzが含むアンチセンス配列が、互いにホスホロチオエート結合で連結されたヌクレオチドを含む配列である、50)又は51)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

20

53) オリゴヌクレオチドYzに含まれるヌクレオチドが、ホスホロチオエート結合で互いに連結されている、50)から52)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0176】

54) オリゴヌクレオチドYzが含むアンチセンス配列部分の3'側のヌクレオチド及び5'側のヌクレオチドの少なくとも一方が、糖部修飾ヌクレオチドである、50)から53)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

55) オリゴヌクレオチドYzが含むアンチセンス配列部分の3'側のヌクレオチド及び5'側のヌクレオチドが、糖部修飾ヌクレオチドである、50)から54)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

30

56) 前記ヌクレオチド配列Yzが含むアンチセンス配列が、糖部修飾ヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドから独立して選ばれる11～26個のヌクレオチドからなる配列である、50)から55)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

57) 前記ヌクレオチド配列Yzが含むアンチセンス配列が、少なくとも1個のデオキシリボヌクレオチドを含む11～26個のヌクレオチドからなる配列である、50)から56)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0177】

58) 前記ヌクレオチド配列Yzが含むアンチセンス配列が、標的RNAとハイブリダイズした際に、RNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列である、50)から57)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

40

59) 前記アンチセンス配列部分が、「前記RNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列部分」の5'側及び3'側に、隣接して結合する糖部修飾ヌクレオチドを含む、58)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

60) 前記「標的RNAとハイブリダイズした際に、RNaseHによって認識される少なくとも4個の連続するヌクレオチドを含む配列」が、少なくとも1個のデオキシリボヌクレオチドを含む4～20個のヌクレオチドからなる配列である、58)又は59)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0178】

50

6 1) 前記ヌクレオチド配列 Y z が含むアンチセンス配列部分は、少なくとも 1 個の糖部修飾ヌクレオチドを含み、連続する 4 個のデオキシリボヌクレオチドを含まない、5 0) から 5 7) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

6 2) 前記ヌクレオチド配列 Y z が含むアンチセンス配列が、4 ~ 3 0 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる配列である、5 0) から 5 6) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

6 3) オリゴヌクレオチド L y が、0 個のヌクレオチドからなり、Y と Y z とが、ホスホジエステル結合で連結されている、5 0) から 6 2) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

6 4) L y が、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドからなる群から独立して選択される 1 ~ 2 0 個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド L y に由来する基である、5 0) から 6 2) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

6 5) オリゴヌクレオチド L y が、ホスホジエステル結合を含む、6 4) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

6 6) オリゴヌクレオチド L y に含まれるヌクレオチドが、ホスホジエステル結合で互いに連結されている、6 4) 又は 6 5) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

6 7) オリゴヌクレオチド L y が、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドからなる群から独立して選択される 1 ~ 8 個のヌクレオチドからなる、6 4) から 6 6) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

20

6 8) オリゴヌクレオチド L y が、オリゴデオキシリボヌクレオチド又はオリゴリボヌクレオチドである、6 4) から 6 7) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

6 9) オリゴヌクレオチド L y が、DNA 又は RNA である、6 4) から 6 8) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

7 0) オリゴヌクレオチド L y が、RNA である、6 4) から 6 9) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【 0 1 7 9 】

7 1) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、2' - O - メチル化ヌクレオチド、2' - O - メトキシエチル化ヌクレオチド、2' - O - アミノプロピル化ヌクレオチド、2' - フルオロ化ヌクレオチド、2' - F - アラビノヌクレオチド、架橋化ヌクレオチド又は 2' - O - メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドである、1) から 7 0) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

30

7 2) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、2' - O - メチル化ヌクレオチド又は LNA である、1) から 7 1) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【 0 1 8 0 】

7 3) 標識機能、精製機能及び標的 RNA への送達機能からなる群から選択される少なくとも 1 種の機能を有する機能性分子に由来する基をさらに含む、1) から 7 2) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

7 4) 前記機能性分子に由来する基が、式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの 5' 末端のヌクレオチドに直接的又は間接的に結合している、7 3) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

40

7 5) 前記機能性分子に由来する基が、式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの 3' 末端のヌクレオチドに直接的又は間接的に結合している、7 3) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【 0 1 8 1 】

7 6) 前記機能性分子に由来する基が、C₂ - 2 0 アルキレン基又は C₂ - 2 0 アルケニレン基 (該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される 1 つ以上の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられて

50

いないか、又は - O - 、 - NR^B - (R^B は、水素原子、C₁ - 6 アルキル基又はハロC₁ - 6 アルキル基である)、 - S - 、 - S (= O) - 又は - S (= O)₂ - により置き換えられている) を介して、又は直接共有結合により式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドと結合している、73) から75) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

77) 前記機能性分子に由来する基が連結したC₂ - 20 アルキレン基又はC₂ - 20 アルケニレン基と、式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの5' 末端又は3' 末端のヌクレオチドとが、ホスホジエステル結合又は修飾されたホスホジエステル結合で連結されている、73) から75) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

78) 前記機能性分子に由来する基が連結したC₂ - 20 アルキレン基又はC₂ - 20 アルケニレン基と、式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの5' 末端又は3' 末端のヌクレオチドとが、ホスホジエステル結合で連結されている、73) から75) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

79) 前記機能性分子が、糖、脂質、ペプチド及びタンパク質及びそれらの誘導体からなる群から選択される、73) から78) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0182】

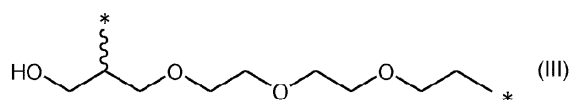
80) 前記機能性分子が、コレステロール、脂肪酸、脂溶性ビタミン、糖脂質及びグリセリドからなる群から選択される脂質である、73) から79) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

81) 前記機能性分子が、コレステロール、トコフェロール及びトコトリエノールからなる群から選択される脂質である、73) から80) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

82) 前記機能性分子がトコフェロールであり、トコフェロールのヒドロキシ基が、C₂ - 20 アルキレン基 (該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O - により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている) を介して、式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの5' 末端又は3' 末端のヌクレオチドと結合している、73) から75) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

83) トコフェロールのヒドロキシ基が、下記式 (III)

【化10】



(式中、一つの * は、オリゴヌクレオチドに由来する基との結合位置 (ヌクレオチドを構成する原子) を表し、他方の * は、機能性分子に由来する基との結合位置 (機能性分子に由来する基を構成する原子) を表す。)

で表される基を介して式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの5' 末端又は3' 末端のヌクレオチドと結合している、73) から75) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

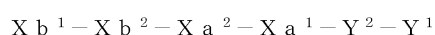
84) 前記機能性分子が、アシアロ糖タンパク質受容体と相互作用する糖誘導体である、73) から79) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

85) 前記機能性分子が、受容体のリガンド及び抗体からなる群から選択される、ペプチド又はタンパク質である、73) から79) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0183】

B - 1) 式 :

【化11】



10

20

30

40

50

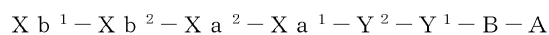
(式中、 Xb^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^1 に由来する基であり、
 Xb^2 は、6～8個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^2 に由来する基であり、
 Xa^2 は、1～3個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xa^2 に由来する基であり、
 Xa^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xa^1 に由来する基であり、
 Y^2 は、6～8個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^2 に由来する基であり、
 Y^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^1 に由来する基である。)で表される、1)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

【0184】

B-2) 式

【化12】



(式中、 Xb^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、
 Xb^2 は、6～8個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、
 Xa^2 は、1～3個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xa^2 に由来する基であり、
 Xa^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、
 Y^2 は、6～8個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、
 Y^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、
Bは、 C_{2-20} アルキレン基又は C_{2-20} アルケニレン基(該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される1つ以上の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は $-O-$ 、 $-NR^B-$ (R^B は、水素原子、 C_{1-6} アルキル基又はハロ C_{1-6} アルキル基である。)、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 又は $-S(O)_2-$ により置き換えられている。)であり、
Aは、機能性分子に由来する基である。)で表される、73)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

20

30

B-3) Bは、 C_{2-20} アルキレン基(該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は $-O-$ により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている。)であり、Aは、トコフェロールに由来する基である、B-2)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

40

B-4) Bは、 Y^1 の末端ヌクレオチドとホスホジエステル結合で連結されている、B-2)又はB-3)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0185】

B-5) Xa^2 は、2個又は3個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xa^2 に由来する基である、B-1)からB-4)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0186】

B-6) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2'-O-メチル化ヌク

50

レオチド、2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチド及び2'-O-メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドからなる群から選択される、B-1)からB-5)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B-7) Xb^1 及び Xa^2 に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、LNAである、B-1)からB-6)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B-8) Y^1 に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル化ヌクレオチドである、B-1)からB-7)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0187】

B-9) Xb^1 、 Xb^2 、 Xa^1 、 Xa^2 及び Y^1 に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホロチオエート結合で連結され、 Y^2 に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されている。)で表される、B-1)からB-8)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B-10) Xb^1 と Xb^2 、 Xb^2 と Xa^1 、 Xa^1 と Xa^2 及び Y^2 と Y^1 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結され、 Xa^2 と Y^2 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で連結されている、B-1)からB-9)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

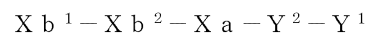
【0188】

前記B-1)からB-10)において、オリゴヌクレオチド Xb は、 $Xb^1 - Xb^2$ で表され、オリゴヌクレオチド Xa は、 $Xa^2 - Xa^1$ で表され、オリゴヌクレオチド Y は、 $Y^2 - Y^1$ で表される。

【0189】

B-11) 式

【化13】



(式中、 Xb^1 は、4個又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^1 に由来する基であり、

Xb^2 は、8～10個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^2 に由来する基であり、

Xa は、4個又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなり、

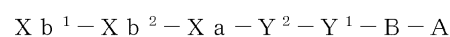
Y^2 は、8～10個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^2 に由来する基であり、

Y^1 は、4個又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^1 に由来する基である。)で表される、1)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0190】

B-12) 式

【化14】



(式中、 Xb^1 は、4個又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^1 に由来する基であり、

Xb^2 は、8～10個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^2 に由来する基であり、

Xa は、4個又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなり、

Y^2 は、8～10個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^2 に由来する基であり、

Y^1 は、4個又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^1 に由来する基であり、

Bは、 C_{2-20} アルキレン基又は C_{2-20} アルケニレン基(該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、

ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキシ基及びチオキシ基からなる群から選択される1つ以上の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O - 、 - N R^B - (R^B は、水素原子、C₁ - 6 アルキル基又はハロ C₁ - 6 アルキル基である。) 、 - S - 、 - S (O) - 又は - S (O)₂ - により置き換えられている。) であり、A は、機能性分子に由来する基である。) で表される、73) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 13) B は、C₂ - 20 アルキレン基 (該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O - により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている。) であり、A は、トコフェロールに由来する基である、B - 12) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

B - 14) B は、Y¹ の末端ヌクレオチドとホスホジエステル結合で連結されている、B - 12) 又は B - 13) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0191】

B - 15) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2' - O - メチル化ヌクレオチド、2' - O - メトキシエチル化ヌクレオチド及び2' - O - メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドからなる群から選択される、B - 11) から B - 14) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 16) X b¹ 及び X a に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA 又は 2' - O - メトキシエチル化ヌクレオチドである、B - 11) から B - 15) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

20

B - 17) Y¹ に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、2' - O - メチル化ヌクレオチドである、B - 11) から B - 16) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0192】

B - 18) X b¹、X b²、X a 及び Y¹ に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホロチオエート結合で連結され、Y² に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されている。) で表される、B - 11) から B - 17) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 19) X b¹ と X b²、X b² と X a 及び Y² と Y¹ のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結され、X a と Y² のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で連結されている、B - 11) から B - 18) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

30

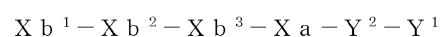
【0193】

前記 B - 11) から B - 19) において、オリゴヌクレオチド X b は、X b¹ - X b² で表され、オリゴヌクレオチド Y は、Y² - Y¹ で表される。

【0194】

B - 20) 式

【化15】



40

(式中、X b¹ は、4 ~ 6 個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド X b¹ に由来する基であり、

X b² は、8 ~ 10 個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド X b² に由来する基であり、

X b³ は、1 個又は 2 個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド X b¹ に由来する基であり、

X a は、3 個又は 4 個の糖部修飾ヌクレオチドからなり、

Y² は、9 ~ 12 個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y² に由来する基であり、

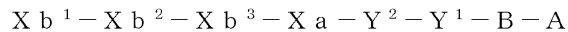
50

Y¹は、4～6個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドY¹に由来する基である。)で表される、1)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0195】

B-21) 式

【化16】



(式中、Xb¹は、4～6個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドXb¹に由来する基であり、

10

Xb²は、8～10個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドXb²に由来する基であり、

Xb³は、1個又は2個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドXb¹に由来する基であり、

Xaは、3個又は4個の糖部修飾ヌクレオチドからなり、

Y²は、9～12個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドY²に由来する基であり、

Y¹は、4～6個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドY¹に由来する基であり、

Bは、C₂₋₂₀アルキレン基又はC₂₋₂₀アルケニレン基(該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される1つ以上の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は-O-、-NR^B- (R^Bは、水素原子、C₁₋₆アルキル基又はハロC₁₋₆アルキル基である。)、-S-、-S(O)-又は-S(O)₂-により置き換えられている。)であり、

20

Aは、機能性分子に由来する基である。)で表される、73)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B-22) Bは、C₂₋₂₀アルキレン基(該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は-O-により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている。)であり、Aは、トコフェロールに由来する基である、B-21)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

30

B-23) Bは、Y¹の末端ヌクレオチドとホスホジエステル結合で連結されている、B-21)又はB-22)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0196】

B-24) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2'-O-メチル化ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチド及び2'-O-メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドからなる群から選択される、B-20)からB-23)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

40

B-25) Xb¹、Xb³及びXaに含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA又は2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチドである、B-20)からB-24)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B-26) Y¹に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル化ヌクレオチドである、B-20)からB-25)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0197】

B-27) Xb¹、Xb²、Xb³、Xa及びY¹に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホロチオエート結合で連結され、Y²に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されている。)で表される、B-20)からB-26)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

50

B - 28) Xb^1 と Xb^2 、 Xb^2 と Xb^3 、 Xb^3 と Xa 及び Y^2 と Y^1 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結され、 Xa と Y^2 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で連結されている、B - 20) から B - 27) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

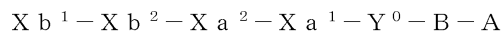
【0198】

前記B - 20) から B - 28) において、オリゴヌクレオチド Xb は、 $Xb^1 - Xb^2 - Xb^3$ で表され、オリゴヌクレオチド Y は、 $Y^2 - Y^1$ で表される。

【0199】

B - 29) 式

【化17】



(式中、 Xb^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、

Xb^2 は、6～8個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、

Xa^2 は、1～3個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xa^2 に由来する基であり、

Xa^1 は、2個又は3個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、

Y^0 は、8～11個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドに由来する基であり、

Bは、 C_{2-20} アルキレン基又は C_{2-20} アルケニレン基(該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される1つ以上の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は $-O-$ 、 $-NR^B-$ (R^B は、水素原子、 C_{1-6} アルキル基又はハロ C_{1-6} アルキル基である。)、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 又は $-S(O)_2-$ により置き換えられている。)であり、

Aは、機能性分子に由来する基である。)で表される、73)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 30) Bは、 C_{2-20} アルキレン基(該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は $-O-$ により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている。)であり、Aは、トコフェロールに由来する基である、B - 28)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 31) Bは、 Y^0 の末端ヌクレオチドとホスホジエステル結合で連結されている、

B - 29) 又は B - 30) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0200】

B - 32) Xa^2 は、2個又は3個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xa^2 に由来する基である、B - 29) から B - 31) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0201】

B - 33) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2'-O-メチル化ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチド及び2'-O-メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドからなる群から選択される、B - 29) から B - 32) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 34) Xb^1 及び Xa^2 に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、LNA、2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチド又は2'-O-メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドである、B - 29) から B - 33) のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0202】

10

20

30

40

50

B - 35) Xb^1 、 Xb^2 、 Xa^1 及び Xa^2 に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホロチオエート結合で連結され、 Y^0 に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されている。) で表される、B - 29) から B - 34) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 36) Xb^1 と Xb^2 、 Xb^2 と Xa^1 、及び Xa^1 と Xa^2 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結され、 Xa^2 と Y^0 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で連結されている、B - 29) から B - 35) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

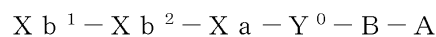
【0203】

前記 B - 29) から B - 36) において、オリゴヌクレオチド Xb は、 $Xb^1 - Xb^2$ で表され、オリゴヌクレオチド Xa は、 $Xa^2 - Xa^1$ で表され、オリゴヌクレオチド Y は、 Y^0 で表される。

【0204】

B - 37) 式

【化18】



(式中、 Xb^1 は、4 個又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^1 に由来する基であり、

Xb^2 は、8 ~ 10 個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^2 に由来する基であり、

Xa は、4 個又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなり、

Y^0 は、12 ~ 15 個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^0 に由来する基であり、

B は、 C_{2-20} アルキレン基又は C_{2-20} アルケニレン基 (該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される 1 つ以上の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は -O-、-NR^B- (R^B は、水素原子、 C_{1-6} アルキル基又はハロ C_{1-6} アルキル基である。)、-S-、-S(O)- 又は -S(O)₂- により置き換えられている。) であり、

A は、機能性分子に由来する基である。) で表される、73) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 38) B は、 C_{2-20} アルキレン基 (該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は -O- により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている。) であり、A は、トコフェロールに由来する基である、B - 37) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 39) B は、 Y^0 の末端ヌクレオチドとホスホジエステル結合で連結されている、B - 37) 又は B - 38) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0205】

B - 40) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2'-O-メチル化ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチド及び 2'-O-メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドからなる群から選択される、B - 37) から B - 39) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 41) Xb^1 及び Xa に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチド又は 2'-O-メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドである、B - 37) から B - 40) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0206】

10

20

30

40

50

B - 42) Xb^1 、 Xb^2 、及び Xa に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホロチオエート結合で連結され、 Y^0 に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されている。) で表される、B - 37) から B - 41) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 43) Xb^1 と Xb^2 、及び Xb^2 と Xa のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結され、 Xa と Y^0 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で連結されている、B - 37) から B - 42) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0207】

前記 B - 37) から B - 43) において、オリゴヌクレオチド Xb は、 $Xb^1 - Xb^2$ で表され、オリゴヌクレオチド Y は、 Y^0 で表される。

【0208】

B - 44) 式

【化19】

$Xb^1 - Xb^2 - Xb^3 - Xa - Y^0 - B - A$

(式中、 Xb^1 は、4 ~ 6 個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^1 に由来する基であり、

Xb^2 は、8 ~ 10 個のデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^2 に由来する基であり、

Xb^3 は、1 個又は 2 個の糖部修飾ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Xb^1 に由来する基であり、

Xa は、3 個又は 4 個の糖部修飾ヌクレオチドからなり、

Y^0 は、13 ~ 18 個のリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチド Y^0 に由来する基であり、

B は、 C_{2-20} アルキレン基又は C_{2-20} アルケニレン基 (該アルキレン基及びアルケニレン基に含まれるメチレン基は、それぞれ独立して、無置換であるか、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、保護されたヒドロキシ基、オキソ基及びチオキソ基からなる群から選択される 1 つ以上の置換基により置換されている。また、該アルキレン基及びアルケニレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O -、- NR^B - (R^B は、水素原子、 C_{1-6} アルキル基又はハロ C_{1-6} アルキル基である。)、- S -、- S(O) - 又は - S(O)₂ - により置き換えられている。) であり、

A は、機能性分子に由来する基である。) で表される、73) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 45) B は、 C_{2-20} アルキレン基 (該アルキレン基のメチレン基は、それぞれ独立して、置き換えられていないか、又は - O - により置き換えられている。置き換えられていないメチレン基は、それぞれ独立して無置換であるか、又はヒドロキシ基に置換されている。) であり、A は、トコフェロールに由来する基である、B - 42) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 46) B は、 Y^0 の末端ヌクレオチドとホスホジエステル結合で連結されている、

B - 44) 又は B - 45) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0209】

B - 47) 糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2' - O - メチル化ヌクレオチド、2' - O - メトキシエチル化ヌクレオチド及び 2' - O - メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドからなる群から選択される、B - 44) から B - 46) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 48) Xb^1 、 Xb^3 及び Xa に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、それぞれ独立して、LNA、2' - O - メトキシエチル化ヌクレオチド又は 2' - O - メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドである、B - 44) から B - 47) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

B - 49) Xb^1 、 Xb^3 及び Xa に含まれる糖部修飾ヌクレオチドが、2' - O - メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドである、B - 44) から B - 47) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

【0210】

B - 50) Xb^1 、 Xb^2 、 Xb^3 、及び Xa に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホロチオエート結合で連結され、 Y^0 に含まれるヌクレオチドは、互いにホスホジエステル結合で連結されている。) で表される、B - 44) から B - 48) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

B - 51) Xb^1 と Xb^2 、 Xb^2 と Xb^3 、及び Xb^3 と Xa のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合で連結され、 Xa と Y^0 のそれぞれの末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で連結されている、B - 44) から B - 50) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

10

【0211】

前記 B - 44) から B - 51) において、オリゴヌクレオチド Xb は、 $Xb^1 - Xb^2 - Xb^3$ で表され、オリゴヌクレオチド Y は、 Y^0 で表される。

【0212】

B - 52) デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び糖部修飾ヌクレオチドにおける塩基部分が、アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C)、ウラシル (U) 及び 5 - メチルシトシン (5 - me - C) からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である、1) から 85) 及び B - 1) から B - 51) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチド。

20

【0213】

D - 1) 1) から 85) 及び B - 1) から B - 52) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドを有効成分として含有する医薬。

【0214】

$Xb^1 - Xb^2 - Xa^2 - Xa^1$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2$ で表される部分と $Y^2 - Y^1$ で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする B - 1) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図 1 に示す。図 1 に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、6 ~ 8 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、1 ~ 3 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xa^2 と 2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa^1 と、6 ~ 8 個のリボヌクレオチドからなる Y^2 と、2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Y^1 とが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^1 への結合方向は、5' から 3' 方向であっても、3' から 5' 方向であってもよい。図 1 では、 Xb^2 と Y^2 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^1 とは、二重鎖を形成している。

30

【0215】

$Xb^1 - Xb^2 - Xa^2 - Xa^1$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2$ で表される部分と $Y^2 - Y^1$ で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする B - 2) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図 2 に示す。図 2 に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、6 ~ 8 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、1 ~ 3 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xa^2 と 2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa^1 と、6 ~ 8 個のリボヌクレオチドからなる Y^2 と、2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Y^1 と、 C_{2-20} アルキレン基等である B と、機能性分子に由来する基である A とが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^1 への結合方向は、5' から 3' 方向であっても、3' から 5' 方向であってもよい。図 2 では、 Xb^2 と Y^2 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^1 とは、二重鎖を形成している。

40

【0216】

$Xb^1 - Xb^2 - Xa$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2$ で表される部分と $Y^2 - Y^1$ で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする B - 11)

50

に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図 3 に示す。図 3 に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、4 又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、8 ~ 10 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、4 又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa と、8 ~ 10 個のリボヌクレオチドからなる Y^2 と、4 又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Y^1 とが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^1 への結合方向は、5' から 3' 方向であっても、3' から 5' 方向であってもよい。図 3 では、 Xb^1 と Y^2 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^1 とは、二重鎖を形成している。

【0217】

$Xb^1 - Xb^2 - Xa$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2$ で表される部分と $Y^2 - Y^1$ で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする B - 12) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図 4 に示す。図 4 に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、4 又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、8 ~ 10 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、4 又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa と、8 ~ 10 個のリボヌクレオチドからなる Y^2 と、4 又は 5 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Y^1 と、 C_{2-20} アルキレン基等である B と、機能性分子に由来する基である A とが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^1 への結合方向は、5' から 3' 方向であっても、3' から 5' 方向であってもよい。図 4 では、 Xb^1 と Y^2 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^1 とは、二重鎖を形成している。

【0218】

$Xb^1 - Xb^2 - Xb^3 - Xa$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2 - Xb^3$ で表される部分と、 $Y^2 - Y^1$ で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする B - 20) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図 5 に示す。図 5 に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、4 ~ 6 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、8 ~ 10 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、1 又は 2 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^3 と、3 又は 4 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa と、9 ~ 12 個のリボヌクレオチドからなる Y^2 と、4 ~ 6 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Y^1 とが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^1 への結合方向は、5' から 3' 方向であっても、3' から 5' 方向であってもよい。図 5 では、 Xb^1 と Y^2 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^1 とは、二重鎖を形成している。

【0219】

$Xb^1 - Xb^2 - Xb^3 - Xa$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2 - Xb^3$ で表される部分と、 $Y^2 - Y^1$ で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする B - 21) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図 6 に示す。図 6 に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、4 ~ 6 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、8 ~ 10 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、1 又は 2 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^3 と、3 又は 4 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa と、9 ~ 12 個のリボヌクレオチドからなる Y^2 と、4 ~ 6 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Y^1 と、 C_{2-20} アルキレン基等である B と、機能性分子に由来する基である A が、この順に結合している。 Xb^1 から Y^1 への結合方向は、5' から 3' 方向であっても、3' から 5' 方向であってもよい。図 6 では、 Xb^2 と Y^2 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^1 とは、二重鎖を形成している。

【0220】

$Xb^1 - Xb^2 - Xa^2 - Xa^1$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2$ で表される部分と Y^0 で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする B - 29) に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図 7 に示す。図 7 に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、6 ~ 8 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、1 ~ 3 個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xa^2 と 2 又は 3 個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa^1 と、8 ~ 11 個のリボヌクレオチドからなる Y^0 と C_{2-20} アルキレン基等である B と、機能性分子に由来する基である A とが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^0 への結合方向は、5' から 3' 方向

であっても、3'から5'方向であってもよい。図7では、 X^2b と Y^0 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^0 とは、二重鎖を形成している。

【0221】

$Xb^1 - Xb^2 - Xa$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2$ で表される部分と Y^0 で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする(B-37)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図8に示す。図8に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、4又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、8～10個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、4又は5個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa と、12～15個のリボヌクレオチドからなる Y^0 と、 C_{2-20} アルキレン基等であるBと、機能性分子に由来する基であるAとが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^0 への結合方向は、5'から3'方向であっても、3'から5'方向であってもよい。図8では、 Xb^2 と Y^0 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^0 とは、二重鎖を形成している。

【0222】

$Xb^1 - Xb^2 - Xb^3 - Xa$ で表される部分がアンチセンス配列部分であり、 $Xb^1 - Xb^2 - Xb^3$ で表される部分と、 Y^0 で表される部分とが、分子内でハイブリダイズする(B-44)に記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの概念図を図9に示す。図9に示される一本鎖オリゴヌクレオチドでは、4～6個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^1 と、8～10個のデオキシリボヌクレオチドからなる Xb^2 と、1又は2個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xb^3 と、3又は4個の糖部修飾ヌクレオチドからなる Xa と、13～18個のリボヌクレオチドからなる Y^0 と、 C_{2-20} アルキレン基等であるBと、機能性分子に由来する基であるAが、この順に結合している。 Xb^1 から Y^0 への結合方向は、5'から3'方向であっても、3'から5'方向であってもよい。図9では、 Xb^1 と Y^0 とが二重鎖を形成している。 Xb^1 と Y^0 とは、二重鎖を形成している。

【0223】

本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドを使用する好ましい方法としては以下に示すものが挙げられる。

E-1) 1)から85)及びB-1)からB-52)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと細胞を接触させる工程を含む、標的RNAの機能を制御する方法。

E-2) 1)から85)及びB-1)からB-52)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を、哺乳動物に投与する工程を含む、該哺乳動物における標的RNAの機能を制御する方法。

E-3) 哺乳動物がヒトである、E-2)に記載の方法。

E-4) 投与経路が経腸管的である、E-2)又はE-3)に記載の方法。

E-5) 投与経路が非経腸管的である、E-2)又はE-3)に記載の方法。

E-6) 哺乳動物において、標的RNAの機能を制御するための、1)から85)及びB-1)からB-52)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの使用。

E-7) 哺乳動物において、標的RNAの機能を制御するための薬剤を製造するための、1)から85)及びB-1)からB-52)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの使用。

E-8) 哺乳動物がヒトである、E-6)又はE-7)に記載の使用。

【0224】

本発明における標的RNAの機能の制御は、アンチセンス配列部分がハイブリダイゼーションにより標的RNAの一部を被覆することによって生じる、翻訳の阻害又はエキソスキッピング等のスプライシング機能が調節若しくは変換されること、又は、アンチセンス配列部分と標的RNAの一部とがハイブリダイズした部分が認識されることにより生じる前記標的RNAの分解によって、標的RNAの機能が抑制されること等を意味する。

【0225】

E-9) 1)から85)及びB-1)からB-52)のいずれか1つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドと細胞を接触させる工程を含む、標的遺伝子の発現を制御する方法。

E-10) 1)から85)及びB-1)からB-52)のいずれか1つに記載の一本鎖

オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を、哺乳動物に投与する工程を含む、該哺乳動物における標的遺伝子の発現を制御する方法。

E - 1 1) 哺乳動物がヒトである、E - 1 0) に記載の方法。

E - 1 2) 投与経路が経腸管的である、E - 1 0) 又は E - 1 1) に記載の方法。

E - 1 3) 投与経路が非経腸管的である、E - 1 0) 又は E - 1 1) に記載の方法。

E - 1 4) 哺乳動物において、標的遺伝子の発現を制御するための、1) から 8 5) 及び B - 1) から B - 5 2) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの使用。

E - 1 5) 哺乳動物において、標的遺伝子の発現を制御するための薬剤を製造するための、1) から 8 5) 及び B - 1) から B - 5 2) のいずれか 1 つに記載の一本鎖オリゴヌクレオチドの使用。

10

E - 1 6) 哺乳動物がヒトである、E - 1 4) 又は E - 1 5) に記載の使用。

【 0 2 2 6 】

以上、一本鎖オリゴヌクレオチドの好適な態様について説明したが、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは上記態様に限定されるものではない。一本鎖オリゴヌクレオチドは、例えばそれに含まれる、環内、環外を問わずそれらの互変異性、幾何異性を経由して存在することに加えて、その混合物或いはそれぞれの異性体の混合物として存在するものも含む。又、不斉中心が存在する場合、或いは異性化の結果、不斉中心が生じる場合はそれぞれの光学異性体及び任意の比率の混合物として存在するものも含む。また、不斉中心を 2 個以上持つ化合物の場合には、さらにそれぞれの光学異性によるジアステレオマーも存在する。本発明は、これらすべての型を、任意の割合で含んだものも含む。

20

【 0 2 2 7 】

本発明には、式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの医薬的に許容され得る塩も含む。

式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドは、必要に応じて医薬的に許容され得る塩に変換することも、又は生成した塩から遊離させることもできる。式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドの医薬的に許容され得る塩としては、例えば、アルカリ金属 (リチウム、ナトリウム、カリウムなど)、アルカリ土類金属 (マグネシウム、カルシウムなど)、アンモニウム、有機塩基 (トリエチルアミン、トリメチルアミンなど)、アミノ酸 (グリシン、リシン、グルタミン酸など)、無機酸 (塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸など) 又は有機酸 (酢酸、クエン酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、ベンゼンスルホン酸、メタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸など) との塩が挙げられる。

30

特に、 $-P(=O)(OH)-$ で表される部分構造が、 $-P(=O)(O^-)-$ で表されるアニオン性の部分構造へ変換されて、アルカリ金属 (リチウム、ナトリウム、カリウムなど)、アルカリ土類金属 (マグネシウム、カルシウムなど) 又はアンモニウム等と塩を形成してもよい。また、ホスホロチオエート結合を形成する、 $-P(=O)(SH)-$ で表される部分構造が、 $-P(=O)(S^-)-$ で表されるアニオン性の部分構造へ変換されて、同様に、アルカリ金属、アルカリ土類金属又はアンモニウム等と塩を形成してもよい。

【 0 2 2 8 】

本発明には、式 (I) で表される一本鎖オリゴヌクレオチドのプロドラッグも含む。

40

プロドラッグとは、化学的又は代謝的に分解できる基を有する医薬品化合物の誘導体であり、加溶媒分解により又は生理的条件下のインビボ (*in vivo*) において分解され薬理的に活性な医薬品化合物へと誘導される化合物である。適当なプロドラッグ誘導体を選択する方法及び製造する方法は、例えば デザイン オブ プロドラッグス (エルゼビア、アムステルダム 1985) (*Design of Prodrugs* (Elsevier, Amsterdam 1985)) に記載されている。本発明の場合、水酸基を有する場合は、その化合物と適当なアシルハライド、適当な酸無水物又は適当なハロゲン化アルキルオキシカルボニル化合物とを反応させることによって製造されるアシルオキシ誘導体のようなプロドラッグが例示される。プロドラッグとして特に好ましい構造としては $-O-COC_2H_5$ 、 $-O-CO(t-Bu)$ 、 $-O-COC_{15}H_{31}$ 、 $-O-CO($

50

m - CO₂Na - Ph)、 - O - COCH₂CH₂CO₂Na - OCOCH(NH₂)CH₃、 - O - COCH₂N(CH₃)₂又は - O - CH₂OC(=O)CH₃などが挙げられる。本発明を形成する一本鎖オリゴヌクレオチドがアミノ基を有する場合は、アミノ基を有する化合物と適当な酸ハロゲン化物、適当な混合酸無水物又は適当なハロゲン化アルキルオキシカルボニル化合物とを反応させることにより製造されるプロドラッグが例示される。プロドラッグとして特に好ましい構造としては、 - NH - CO(CH₂)₂OCH₃、 - NH - COCH(NH₂)CH₃、 - NH - CH₂OC(=O)CH₃等が挙げられる。

【0229】

本発明の式(I)で示される一本鎖オリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容される塩は、製造条件により任意の結晶形として存在することができ、任意の水和物として存在することができるが、これら結晶形や水和物及びそれらの混合物も本発明の範囲に含有される。またアセトン、エタノール、1 - プロパノール、2 - プロパノールなどの有機溶媒を含む溶媒和物として存在することもあるが、これらの形態はいずれも本発明の範囲に含有される。

10

【0230】

一本鎖オリゴヌクレオチドは、当業者であれば公知の方法を適宜選択することにより調製することができる。例えば、当業者は、標的RNAのヌクレオチド配列の情報に基づいて、一本鎖オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を設計し、市販の核酸自動合成機(アプライドバイオシステムズ社製、ベックマン社製、ジーンデザイン社等)を用いて合成することができる。また、酵素を用いた反応によって合成することもできる。前記酵素としては、ポリメラーゼ、ライゲース及び制限酵素等が挙げられるが、これらに限定されない。すなわち、本実施形態に係る一本鎖オリゴヌクレオチドの製造方法は、X、Y、X_z、Y_z、L_x及びL_yの少なくとも1つを含むオリゴヌクレオチド(中でも、X及びYの少なくとも1つを含むオリゴヌクレオチド)の3'末端又は5'末端でヌクレオチド鎖を伸長する工程を含むことができる。

20

【0231】

機能性分子と該オリゴヌクレオチドとを結合させるための多くの方法は、当該分野においてよく知られており、例えば、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・ファーマシューティカルズ・アンド・バイオフィーマシューティクス、107巻、321~340頁(2016年)、アドバンスド・ドラッグ・デリバリー・レビューズ、104巻、78~92頁(2016年)、エキスパート・オピニオン・オン・ドラッグ・デリバリー、11巻、791~822頁(2014年)等を参照できる。例えば、機能性分子とリンカーとを公知の方法により結合させた後に、それをアミダイト化試薬によりアミダイト体へ、又はH - ホスホネート試薬によりH - ホスホネート体へと誘導し、オリゴヌクレオチドと結合させることができる。

30

【0232】

得られるオリゴヌクレオチドを逆相カラムクロマトグラフィー等により精製することにより、一本鎖オリゴヌクレオチドを調製することができる。そして、調製された一本鎖オリゴヌクレオチドを適当な緩衝液中にて混合し、90~98℃にて数分間(例えば、5分間)かけて変性させた後、30~70℃にて1~8時間かけてハイブリダイズさせることにより、分子内でハイブリダイズした一本鎖オリゴヌクレオチドを調製することができる。当該分子内でハイブリダイズさせる工程を省略することができる場合がある。

40

【0233】

一本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を効果的に制御することができる。従って、一本鎖オリゴヌクレオチドを有効成分として含有する、例えば、標的遺伝子の発現をアンチセンス効果によって制御するための組成物を、本発明は提供することができる。特に、一本鎖オリゴヌクレオチドは、低濃度の投与により高い薬効を得ることができ、代謝性疾患、腫瘍、感染症といった標的遺伝子の発現亢進に伴う疾患を治療、予防、改善するための医薬組成物も、いくつかの実施形態において提供することができる。

【0234】

50

一本鎖オリゴヌクレオチドを含む組成物は、公知の製剤学的方法により製剤化することができる。例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、咀嚼剤、パッカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、塗布剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、経皮吸収型製剤、ローション剤、吸引剤、エアゾール剤、注射剤、坐剤等として、経腸管的（経口的等）又は非経腸管的に使用することができる。

【0235】

これら製剤化においては、薬理学上もしくは飲食品として許容される担体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、溶剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、pH調節剤、安定剤、香味剤、芳香剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、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、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等と適宜組み合わせることができる。

10

【0236】

一本鎖オリゴヌクレオチドを含む組成物の投与形態としては特に制限はないが、経腸管的（経口的等）又は非経腸管的投与が挙げられる。より好ましくは、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、気道内投与、直腸投与、筋肉内投与、髄腔内投与、脳室内投与、経鼻投与及び硝子体内投与等及び輸液による投与が挙げられる。

【0237】

一本鎖オリゴヌクレオチドを利用した核酸医薬品が治療、予防、改善できる疾患は、特に制限されず、例えば、代謝性疾患、循環器疾患、腫瘍、感染症、眼疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、遺伝性希少疾患等、遺伝子の発現が原因となる疾患等が挙げられる。より具体的には、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、脊髄性筋萎縮症、筋ジストロフィー（デュシェンヌ型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー（福山型先天性筋ジストロフィー、ウールリッヒ型先天性筋ジストロフィー、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー、インテグリン欠損症、ウォーカーワールブルグ症候群等）、ベッカー型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、三好型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー等）、ハンチントン病、アルツハイマー症、トランスサイレチン型アミロイドーシス、家族性アミロイド性心筋症、多発性硬化症、クローン病、炎症性大腸疾患、先端巨大症、2型糖尿病、慢性腎症、RSウイルス感染症、エボラ出血熱、マールブルグ熱、HIV、インフルエンザ、B型肝炎、C型肝炎、肝硬変、慢性心不全、心筋線維化、心房細動、前立腺がん、メラノーマ、乳がん、膵臓癌、大腸癌、腎細胞癌、胆管癌、子宮頸癌、肝癌、肺癌、白血病、非ホジキンリンパ腫、アトピー性皮膚炎、緑内障、加齢性黄斑変性症等が挙げられる。前記疾患の種類に応じて、その疾患の原因となる遺伝子を前記標的遺伝子に設定し、さらに、前記標的遺伝子の配列に応じて、前記発現制御配列（例えば、アンチセンス配列）を適宜設定することができる。

20

30

【0238】

ヒトなどの霊長類に加えて、様々な他の哺乳類の疾患を、一本鎖オリゴヌクレオチドを含む組成物により治療、予防、改善することができる。例えば、それだけに限らないが、ウシ（cow）、ヒツジ（sheep）、ヤギ、ウマ（horse）、イヌ（dog）、ネコ（cat）、テンジクネズミ、又は他のウシ（bovine）、ヒツジ（ovine）、ウマ（equine）、イヌ（canine）、ネコ（feline）、マウスなどの齧歯類の種を含めた哺乳類の種の疾患を治療することができる。また、一本鎖オリゴヌクレオチドを含む組成物は、鳥類（例えば、ニワトリ）などの他の種においても適用することができる。

40

【0239】

一本鎖オリゴヌクレオチドを含む組成物を、ヒトを含む動物に投与又は摂取する場合、その投与量又は摂取量は、対象の年齢、体重、症状、健康状態、組成物の種類（医薬品、飲食品など）等に応じて、適宜選択されるが、その投与量又は摂取量は、一本鎖オリゴヌクレオチド換算で0.0001mg/kg/日～100mg/kg/日であることが好ましい。

50

【 0 2 4 0 】

一本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現を非常に効果的に制御することができる。従って、ヒトを含む動物に一本鎖オリゴヌクレオチドを投与し、標的遺伝子の発現をアンチセンス効果によって制御する方法を提供することができる。また、一本鎖オリゴヌクレオチドを含む組成物を、ヒトを含む動物に投与することを含む、標的遺伝子の発現亢進等を伴う各種疾患を治療、予防、改善するための方法をも提供することができる。

【実施例】

【 0 2 4 1 】

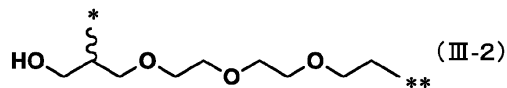
以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、実施形態は以下の実施例に限定されるものではない。以下の実施例及び図 1 0、1 2 及び 1 4 において、「Example」は、実施例を意味し、「Comparative」は、比較例を意味し、「control」はコントロールを意味する。

【 0 2 4 2 】

(実施例 1、比較例 1)

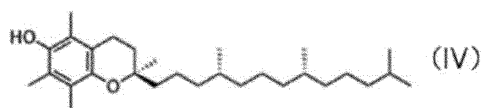
表 1 に記載されたオリゴヌクレオチドを、核酸自動合成機 n S - 8 II (ジーンデザイン社製) を使用して調製した。標的遺伝子は、マウススカベンジャー受容体クラス B メンバー 1 (SRB1) である。なお、表 1 中の配列表記において、「(L)」は LNA を意味し、「(M)」は 2' - O - メチル化ヌクレオチドを意味し、小文字のアルファベットはデオキシリボヌクレオチドを意味し、大文字のアルファベット (前記 (L) 及び (M) 付のアルファベットは除く) はリボヌクレオチドを意味し、「^」はホスホロチオエート結合を意味し、「5」は、そのヌクレオチドの塩基が 5 - メチルシトシンであることを意味する。「Toc - TEG -」は、5' 末端のリン酸基の 1 つの酸素原子に、下記式 (III - 2)

【化 2 0】



(式中、* は、オリゴヌクレオチド Y との結合位置を表し、** は、トコフェロールとの結合位置を表す。) で表される基を介して、下記式 (IV) で表されるトコフェロールのヒドロキシ基から水素原子を取り除いた部分が結合していることを意味する。

【化 2 1】



【 0 2 4 3 】

【表 1】

	配列 (左側が 5' 側を表し、右側が 3' 側を表す)	備考
実施例 1 (配列番号 1)	Toc-TEG-G(M)^A(M)^AGUCAUGAT(L)^5(L)^a^g^t^c^a^t^g^a^c^t^T(L)^5(L)	1~10 塩基: Y 11~24 塩基: X (11~14 塩基: Xa、 15~24 塩基: Xb)
比較例 1 (配列番号 2,3)	T(L)^5(L)^a^g^t^c^a^t^g^a^c^t^T(L)^5(L) Toc-TEG-G(M)^A(M)^AGUCAUGACU^G(M)^A(M)	機能性分子を結合

【 0 2 4 4 】

実施例 1 における分子内ハイブリダイゼーション及び、比較例 1 における 2 つのオリゴヌクレオチドの分子間ハイブリダイゼーションは、9 5 にて 5 分間加熱した後、3 7 にて 1 時間、定温にて放置することで行った。ハイブリダイゼーションの確認は、非変性ポリアクリドアミドゲル電気泳動により確認した。

【 0 2 4 5 】

[評価例 1]

10

20

30

40

50

C57BL/6Jマウス(オス5週齢、日本チャールス・リバー社)へ、生理食塩水(大塚生食注、(株)大塚製薬工場)に溶解した実施例1及び比較例1を、マウス個体あたりの投与量がアンチセンスオリゴヌクレオチド量換算で40nmol/kgとなるように静脈投与した。コントロールとして、生理食塩水(大塚生食注、(株)大塚製薬工場)のみを投与した。投与3日後に眼窩静脈叢から採血した後、イソフルラン麻酔下で肝臓組織を採取した。肝臓からのRNA抽出はRNeasy Mini Kit(Qiagen社製)を用いてQiagen社の推奨プロトコル通りに行った。Total RNAからPrimeScript RT Master Mix(タカラバイオ(株)製)を用いてcDNAを得た。得られたcDNA及びTaqMan(登録商標)Gene Expression ID(Applied Biosystems社製)を用いて7500 Real-Time PCR System(Applied Biosystems社製)によりリアルタイムPCRを行い、SRB1のmRNA量を定量した。リアルタイムPCRでは、ハウスキーピング遺伝子のCyclophilinのmRNA量も同時に定量し、CyclophilinのmRNA量に対するSRB1のmRNA量を、SRB1の発現レベルとして評価した。結果を図10に示す。

10

なお、用いたプライマーは、TaqMan Gene Expression Assay(Applied Biosystems社製)であり、Assay IDは、以下のとおりであった：

マウスSRB1定量用：Mm00450234__m1

マウスcyclophilin定量用：Mm0234230__g1

20

【0246】

図10から明らかなように、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチド(実施例1)はHDO(比較例1)に比較して、同等のアンチセンス効果を示すことが確認された。

【0247】

[評価例2]

実施例1における、前記分子内ハイブリダイゼーション処理前後の非変性ポリアクリドアミドゲル電気泳動結果を図11に示す。一本鎖DNAのサイズマーカーとして、ジーンデザイン社製電気泳動用一本鎖DNAサイズマーカーを用いた。これは、ヌクレオチド数が15、20、30、40、50、60及び80の一本鎖のDNAを含む。二本鎖RNAのサイズマーカーとして、ジーンデザイン社製電気泳動用2本鎖RNAサイズマーカーを用いた。これは、塩基対の数が17、21、25及び29の二本鎖のRNAを含む。なお、図11中、「Lane No.」は前記電気泳動試験におけるレーン番号を、「Example No.」は実施例番号を、「before」は上記ハイブリダイゼーション処理前を、「after」は上記ハイブリダイゼーション処理後を、「ss-DNA size marker」は、一本鎖DNAのサイズマーカーを、「ds-RNA size marker」は、二本鎖RNAのサイズマーカーを、「mer」は塩基数を、「bp」は塩基対の数を意味する。

30

【0248】

図11から明らかなように、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチドは、特別なハイブリダイゼーション工程を経ることなく、あるいは簡単な加熱、冷却操作によって分子内ハイブリダイゼーションの構造をとることが確認された。

40

【0249】

(実施例2、比較例2)

表2に記載されたオリゴヌクレオチドを、核酸自動合成機nS-8II(ジーンデザイン社製)を使用して調製した。標的遺伝子は、ヒトPhosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10(PTEN)である。なお、表2中の配列表記において、「(m)」は2'-O-メトキシエチル化ヌクレオチドを意味し、「5」は、そのヌクレオチドの塩基が5-メチルシトシンであることを意味し、「5(x)」は、そのデオキシリボヌクレオチドの塩基が5-メチルシトシンであることを意味し、その他の配列表記は、表1と同様である。

50

【表 2】

	配列(左側が5'側を表し、右側が3'側を表す)	備考
実施例2 (配列番号4)	U(M) ⁵ C(M) ⁵ A(M) ⁵ A(M) ⁵ UCCAGAGGCUA5(m) ⁵ T(m) ⁵ G(m) ⁵ 5(m) ⁵ T(m) ⁵ a ⁵ g ⁵ (x) ⁵ 5(x) ⁵ t ⁵ 5(x) ⁵ t ⁵ g ⁵ a ⁵ T(m) ⁵ T(m) ⁵ T(m) ⁵ G(m) ⁵ A(m)	1~16塩基:Y 17~36塩基:X (17~20塩基:Xa、 21~36塩基:Xb)
比較例2 (配列番号5)	5(m) ⁵ T(m) ⁵ G(m) ⁵ 5(m) ⁵ T(m) ⁵ a ⁵ g ⁵ (x) ⁵ 5(x) ⁵ t ⁵ 5(x) ⁵ t ⁵ g ⁵ a ⁵ T(m) ⁵ T(m) ⁵ T(m) ⁵ G(m) ⁵ A(m)	
比較例3 (配列番号6)	U(M) ⁵ C(M) ⁵ A(M) ⁵ A(M) ⁵ A(M) ⁵ UCCAGAGGCUAGCAGAAAA5(m) ⁵ T(m) ⁵ G(m) ⁵ 5(m) ⁵ T(m) ⁵ a ⁵ g ⁵ (x) ⁵ 5(x) ⁵ t ⁵ 5(x) ⁵ t ⁵ g ⁵ a ⁵ T(m) ⁵ T(m) ⁵ T(m) ⁵ G(m) ⁵ A(m)	

【0250】

実施例2及び比較例3における分子内ハイブリダイゼーションは、95℃にて5分間加熱した後、37℃にて1時間、定温にて放置することで行った。ハイブリダイゼーションの確認は、非変性ポリアクリドアミドゲル電気泳動により確認した。

【0251】

[評価例3]

ヒト肝癌由来細胞株HuH-7の細胞を3000細胞/ウェルとなるように96ウェルプレートに播き、5%CO₂下37℃にて24時間培養した。表2の各オリゴヌクレオチドを、その最終濃度が1nMとなるようにLipofectamine(登録商標)RNAiMax(Thermo Fisher Scientific社製)を用いて各ウェルに添加した(トランスフェクション)。4時間後に培地を交換し、さらに20時間後に細胞を回収し、細胞からRNeasy mini kit(QIAGEN社製)を用いてTotal RNAを抽出した。

Total RNAからPrimeScript RT Master Mix(タカラバイオ(株)製)を用いてcDNAを得た。得られたcDNA及びTaqMan(登録商標)Gene Expression ID(Applied Biosystems社製)を用いて7500 Real-Time PCR System(Applied Biosystems社製)によりリアルタイムPCRを行い、PTENのmRNA量を定量した。リアルタイムPCRでは、ハウスキーピング遺伝子のGAPDH(Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)のmRNA量も同時に定量し、GAPDHのmRNA量に対するPTENのmRNA量を、それぞれPTENの発現レベルとして評価した。トランスフェクション操作を行わなかった細胞をコントロールとして用いた。結果を図12に示す。

なお、用いたプライマーは、TaqMan Gene Expression Assay(Applied Biosystems社製)であり、Assay IDは、以下の通りであった：

ヒトPTEN定量用：Hs02621230

ヒトGAPDH定量用：Hs99999905__m1

【0252】

図12から明らかなように、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチド(実施例2)はASO(比較例2)に比較して、高いアンチセンス効果を示すことが確認された。また、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチド(実施例2)は、オリゴヌクレオチドで連結したHDO(比較例3)に比較して、同等以上のアンチセンス効果を示すことが確認された。

【0253】

[評価例4]

実施例2における、前記分子内ハイブリダイゼーション処理前後の非変性ポリアクリドアミドゲル電気泳動結果を図13に示す。一本鎖DNAのサイズマーカーとして、ジーンデザイン社製電気泳動用一本鎖DNAサイズマーカーを用いた。二本鎖RNAのサイズマーカーとして、ジーンデザイン社製電気泳動用2本鎖RNAサイズマーカーを用いた。なお、図13中の略語等は、図11と同様である。

【0254】

図13から明らかなように、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチドは、特別なハイブ

リダイゼーション工程を経ることなく、あるいは簡単な加熱、冷却操作によって分子内ハイブリダイゼーションの構造をとることが確認された。

【 0 2 5 5 】

(実施例 3、比較例 4 及び 5)

表 3 に記載されたオリゴヌクレオチドを、核酸自動合成機 n S - 8 II (ジーンデザイン社製) を使用して調製した。標的遺伝子は、マウススカベンジャー受容体クラス B メンバー 1 (S R B 1) である。なお、表 3 中の配列表記において、「 (V) 」は 2 ' - O - メチルカルバモイルエチル化ヌクレオチドを意味し、その他の配列表記は、表 1 及び表 2 と同様である。

【表 3】

[illegible]

10

【 0 2 5 6 】

実施例 3 及び比較例 5 における分子内ハイブリダイゼーションは、95℃にて5分間加熱した後、37℃にて1時間、定温にて放置することで行った。ハイブリダイゼーションの確認は、非変性ポリアクリドアミドゲル電気泳動により確認した。

20

【 0 2 5 7 】

「評価例 5」

評価例 1 と同じ評価方法を用いた。表 3 の実施例 3 及び比較例 5 の各オリゴヌクレオチドをマウス個体あたりの投与量がアンチセンスオリゴヌクレオチド量換算で $0.7 \mu\text{mol} / \text{kg}$ 、比較例 4 のオリゴヌクレオチドをマウス個体あたりの投与量がアンチセンスオリゴヌクレオチド量換算で $1.4 \mu\text{mol} / \text{kg}$ となるように静脈投与した。コントロールとして、生理食塩水（大塚生食注、（株）大塚製薬工場）のみを投与した。投与 3 日後の肝臓組織における、Cyclophilin の mRNA 量に対する SRB1 の mRNA 量を、SRB1 の発現レベルとして評価した。結果を図 14 に示す。

30

【 0 2 5 8 】

図 14 から明らかなように、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチド（実施例 3）は A S O（比較例 4）に比較して、高いアンチセンス効果を示すことが確認された。また、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチド（実施例 3）は、オリゴヌクレオチドで連結した H D O（比較例 5）に比較して、同等以上のアンチセンス効果を示すことが確認された。

【 0 2 5 9 】

「評価例 6」

実施例 3 における、前記分子内ハイブリダイゼーション処理前後の非変性ポリアクリドアミドゲル電気泳動結果を図 15 に示す。一本鎖 DNA のサイズマーカーとして、ジーンデザイン社製電気泳動用一本鎖 DNA サイズマーカーを用いた。二本鎖 RNA のサイズマーカーとして、ジーンデザイン社製電気泳動用 2 本鎖 RNA サイズマーカーを用いた。なお、図 15 中の略語は、図 11 と同様である。

40

【 0 2 6 0 】

図 15 から明らかなように、本発明に係る一本鎖オリゴヌクレオチドは、特別なハイブリダイゼーション工程を経ることなく、あるいは簡単な加熱、冷却操作によって分子内ハイブリダイゼーションの構造をとることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【 0 2 6 1 】

本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドを用いることによって、アンチセンス核酸を特異性

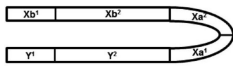
50

高く効率的に特定の臓器（細胞）に送達し、かつ当該核酸によって、標的RNAの機能を効果的に制御すること、及び/又は標的遺伝子の発現を効果的に抑制することが可能となる。また、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドには、特定の臓器に送達させるための機能性分子として、脂質（例えば、トコフェロール、コレステロール）、糖（例えば、グルコース、スクロース）、タンパク質、ペプチド、抗体等の多種多様な分子を適用できるため、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、様々な臓器、組織、細胞を標的とすることができる。さらには、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドに、RNAse等に対する耐性を付与するための修飾を施しても、そのアンチセンス効果は低減することはないため、経腸投与の態様でも利用できる。

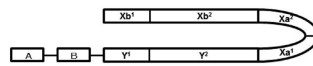
したがって、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、低濃度の投与により高い薬効を得ることができ、かつアンチセンス核酸の標的以外の臓器における分布を抑制することにより、副作用も低減できるという点に優れているため、代謝性疾患、腫瘍、感染症等の、標的RNAの機能及び/又は標的遺伝子の発現亢進に伴う疾患を治療、予防するための医薬組成物等として、有用である。

【図面】

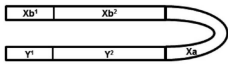
【図 1】



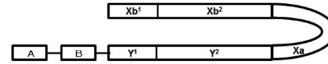
【図 2】



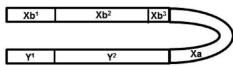
【図 3】



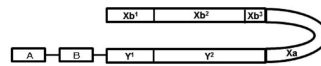
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

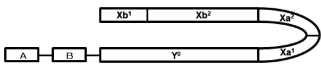
20

30

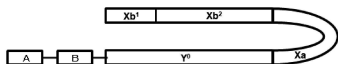
40

50

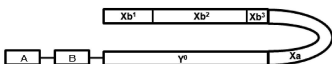
【 7 】



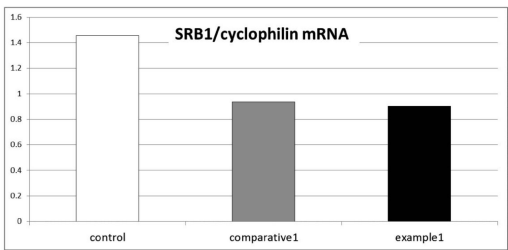
【 8 】



【 9 】

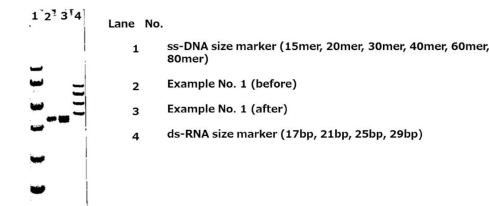


【 1 0 】

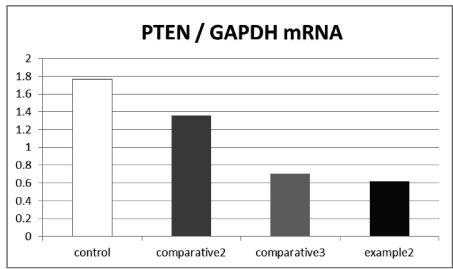


10

【 1 1 】

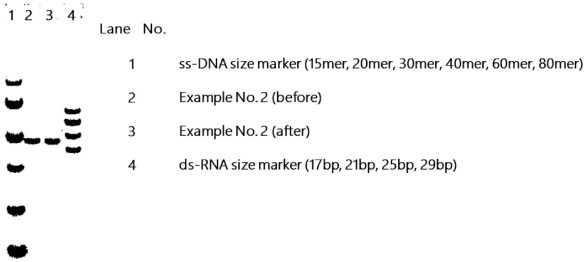


【 1 2 】

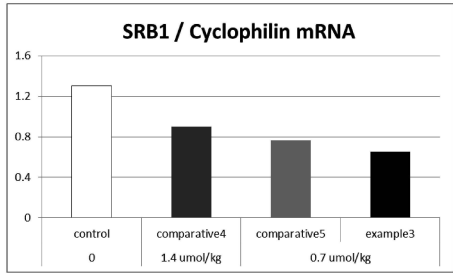


20

【 1 3 】



【 1 4 】

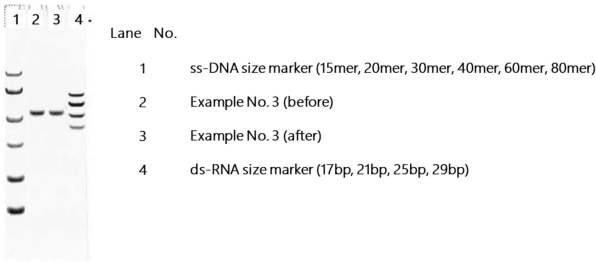


30

40

50

【図 15】



【配列表】

0007384033000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/66 (2017.01) A 6 1 K 47/66
 A 6 1 K 47/68 (2017.01) A 6 1 K 47/68

(56)参考文献

特表 2 0 1 5 - 5 0 2 1 3 4 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 2 9 4 6 9 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 0 5 6 2 3 (J P , A)

特表 2 0 1 2 - 5 0 5 6 5 7 (J P , A)

SUBRAMANIAN, Romesh R. et al. , Enhancing antisense efficacy with multimers and multi-targeting oligonucleotides (MTOs) using cleavable linkers , Nucleic Acids Research , 2015年 , Vol. 43, No. 19 , p. 9123-9132

Hosono, K. et al. , "Properties of base-pairing in the stem region of hairpin antisense oligonucleotides containing 2'-methoxynucleosides" , Biochim. Biophys. Acta , 1995年 , Vol. 1244 , pp. 339-344

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 4 8 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)