

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年12月30日(30.12.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/262555 A1

(51) 国際特許分類:

A61P 39/04 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 43/00 (2006.01) *A61K 38/08* (2019.01)
C07K 2/00 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01) *A61K 31/7088* (2006.01)

TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 Tokyo (JP). 学校法人東京理科大学(**TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE FOUNDATION**) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/025093

(22) 国際出願日: 2020年6月25日(25.06.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

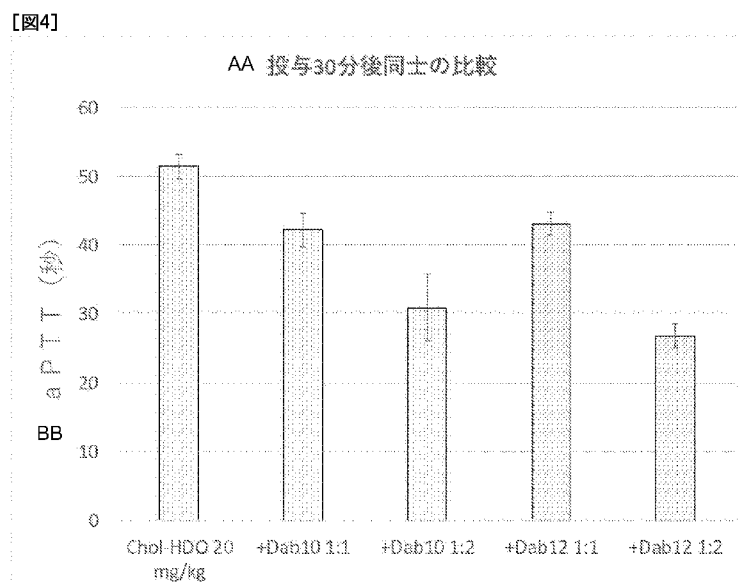
(30) 優先権データ:
特願 2019-120908 2019年6月28日(28.06.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION**

(72) 発明者: 横田 隆徳 (**YOKOTA, Takanori**); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 永田 哲也(**NAGATA, Tetsuya**); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 原 倫太郎(**HARA, Rintaro**); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 大原 正裕(**OHARA,**

(54) **Title:** SIDE EFFECT REDUCING AGENT FOR NUCLEIC ACID DRUG, MEDICINAL COMPOSITION COMPRISING SIDE EFFECT REDUCING AGENT FOR NUCLEIC ACID DRUG, AND METHOD FOR REDUCING SIDE EFFECT INDUCING PROPERTIES OF NUCLEIC ACID DRUG

(54) 発明の名称: 核酸医薬副作用軽減剤、該核酸医薬副作用軽減剤を含む医薬組成物、並びに核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法



AA Comparison of groups 30 minutes after administration
BB aPTT (seconds)

(57) **Abstract:** A side effect reducing agent for a nucleic acid drug that comprises an oligopeptide containing an oligopeptide domain, said oligopeptide domain consisting of 2-40 amino acids and including a structure W that has two or more specific consecutive amino acid residues, wherein, when the oligopeptide domain includes two or more structures W

Masahiro); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 和田 猛(**WADA, Takeshi**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目 3 番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 佐藤 一樹(**SATO, Kazuki**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目 3 番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 前田 雄介(**MAEDA, Yusuke**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目 3 番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 高木 一憲(**TAKAGI, Kazunori**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目 3 番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人太陽国際特許事務所 (**TAIYO, NAKAJIMA & KATO**); 〒1600022 東京都新宿区新宿 4 丁目 3 番 1 7 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

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

therein, then adjacent structures W are linked to each other via one amino acid residue X that is not represented by formula (I), and the oligopeptide domain is composed of either a single structure W or two or more structures W with the amino acid residue X.

(57) 要約: 核酸医薬副作用軽減剤は、特定アミノ酸残基が2個以上連続する構造Wを含む2～40個のアミノ酸からなるオリゴペプチド領域を含むオリゴペプチドからなり、前記オリゴペプチド領域の中に構造Wが2つ以上存在する場合、隣接する構造W同士は式(1)ではない1個のアミノ酸残基Xにより連結されており、前記オリゴペプチド領域は、1つの構造Wから構成されるか、又は2つ以上の構造W及びアミノ酸残基Xから構成される。

明 細 書

発明の名称：

核酸医薬副作用軽減剤、該核酸医薬副作用軽減剤を含む医薬組成物、並びに核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法

技術分野

[0001] 本開示は、核酸医薬副作用軽減剤、該核酸医薬副作用軽減剤を含む医薬組成物、並びに核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法に関するものである。

背景技術

[0002] 従来、疾患の治療又は予防に用いられる医薬品の開発は低分子化合物を対象に行われ、大きな成功をおさめてきた。近年、核酸－核酸相互作用の特異性を利用して特定の遺伝子又は非コード領域の発現制御を行う核酸医薬が開発され、臨床への応用も始まってきている。

[0003] 核酸医薬の生体内における安定性を向上させることにより、核酸医薬の有効性を向上する試みもなされている。例えば、国際公開第2014/148620号は二本鎖核酸結合剤を記載しており、この二本鎖核酸結合剤は核酸のヌクレアーゼ分解性を制御している。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本開示は、核酸医薬のクラスエフェクトとしての副作用を軽減する核酸医薬副作用軽減剤、該核酸医薬副作用軽減剤を含む医薬組成物、並びに核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法を提供することに関する。

課題を解決するための手段

[0005] 本開示に係る態様は以下のものを含む。

< 1 >

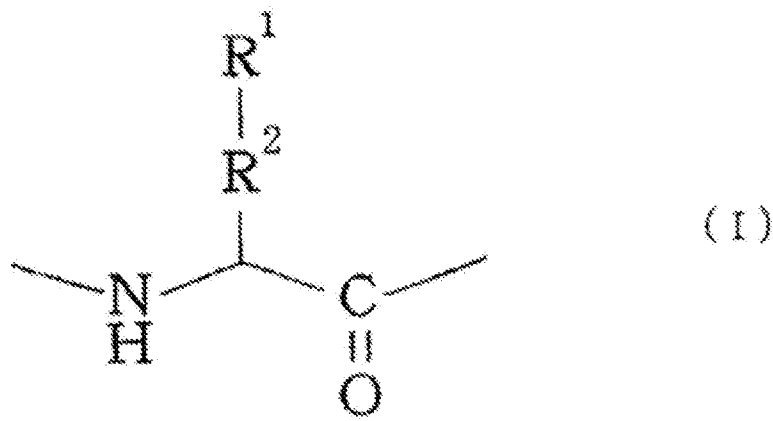
下記式（1）のアミノ酸残基が2個以上連続する構造である構造Wを含む2～40個のアミノ酸からなるオリゴペプチド領域を含むオリゴペプチドからなり、

前記オリゴペプチド領域の中に構造Wが2つ以上存在する場合、隣接する構造W同士は式(Ⅰ)ではない1個のアミノ酸残基Xにより連結されており、

前記オリゴペプチド領域は、1つの構造Wから構成されるか、又は2つ以上の構造W及びアミノ酸残基Xから構成される、

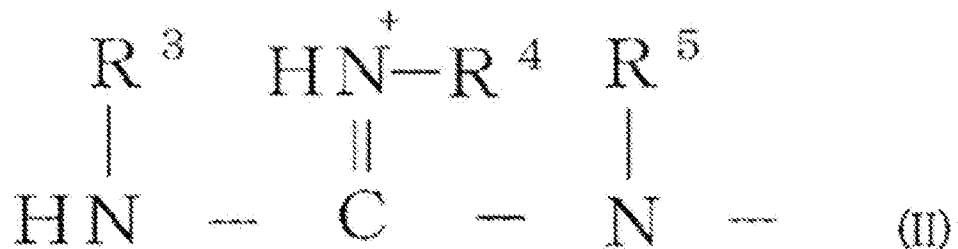
核酸医薬副作用軽減剤。

[化1]



[式(Ⅰ)において、 R^1 は、基 $H_3N^+-CH_2-$ 、又は、式(Ⅱ)で示される基である。 R^2 は、 R^1 が基 $H_3N^+-CH_2-$ の場合は、存在しないか、若しくは、炭素原子数1～3のアルキレン基であり、 R^1 が式(Ⅱ)で示される基の場合は炭素原子数1～4のアルキレン基である。一つのオリゴペプチド領域において R^1 及び R^2 は全て同一である。]

[化2]



[式(Ⅱ)中、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、それぞれ独立に、水素原子若しくはメチル基である。]

< 2 >

R^1 は式 (11) の基である、< 1 >に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 3 >

式 (11) の基の R^3 、 R^4 及び R^5 は全て水素原子である、< 2 >に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 4 >

R^1 は基 $H_3N^+-CH_2-$ である、< 1 >に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 5 >

一本鎖核酸を含む核酸医薬の副作用軽減に用いられる、< 1 >~< 4 >のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 6 >

前記一本鎖核酸が一本鎖RNA又は一本鎖DNAである、< 5 >に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 7 >

二本鎖核酸構造を含む核酸を含む核酸医薬の副作用軽減に用いられる、< 1 >~< 4 >のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 8 >

前記核酸は、少なくとも部分的にA型二本鎖核酸構造を含む、< 7 >に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 9 >

前記二本鎖核酸構造において、少なくとも一方の核酸鎖が、以下の条件 (i) 及び (i i) のうち少なくとも一方を満たす、< 7 >又は< 8 >に記載の核酸医薬副作用軽減剤：

(i) 核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数が、核酸鎖に含まれるヌクレオシドの総数の30%以上である

(i i) 核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数が6以上である。

< 10 >

前記核酸が一本鎖核酸であり、前記二本鎖核酸構造が前記一本鎖核酸の分子内ハイブリダイゼーションにより形成されている、＜7＞～＜9＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

[0006] ＜1 1＞

前記二本鎖核酸構造が分子間ハイブリダイゼーションにより形成されている、＜7＞～＜9＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜1 2＞

前記二本鎖核酸構造はRNA-DNA複合二本鎖核酸構造を含む、＜7＞～＜1 1＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜1 3＞

前記核酸はA型二本鎖核酸である、＜1 1＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜1 4＞

前記A型二本鎖核酸は二本鎖RNAである、＜1 3＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜1 5＞

前記二本鎖核酸構造がA型二本鎖核酸構造を含み、前記核酸における相補鎖のうちの第1の核酸鎖が、デオキシリボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造を含む核酸鎖であり、前記核酸における相補鎖のうちの第2の核酸鎖が前記第1の核酸鎖と相補的な塩基配列を有し、かつRNA及びPNAのうちの少なくとも1種を含む、＜1 1＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜1 6＞

前記相補鎖の第1の核酸鎖は、4個以上連続して連結されたデオキシリボヌクレオシドからなる領域の5'末端側及び／又は3'末端側に、連続又は不連続に非天然ヌクレオシドを含む領域が設けられている複合DNA鎖である、＜1 5＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜1 7＞

前記二本鎖核酸構造がA型二本鎖核酸構造を含み、前記核酸における相補

鎖のうちの第1の核酸鎖が、天然ヌクレオシドからなるセグメント並びに非天然ヌクレオシドからなるセグメントが交互に並んだ構造を有し、かつ4個以上連続するデオキシリボヌクレオチド及び4個以上連続するリボヌクレオチドのいずれをも有さない核酸鎖であり、前記核酸における相補鎖のうちの第2の核酸鎖が前記第1の核酸鎖と相補的な塩基配列を有し、かつRNA及びPNAのうちの少なくとも1種を含む、＜11＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜18＞

前記相補鎖の第1の核酸鎖における前記非天然ヌクレオシドはLNAヌクレオシドを含む、＜16＞又は＜17＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜19＞

前記相補鎖の第2の核酸鎖がRNAであって、前記相補鎖の第1の核酸鎖の前記非天然ヌクレオシドを含む領域に対して相補的な領域が非天然ヌクレオシドにより構成されている、＜16＞～＜18＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜20＞

前記A型二本鎖核酸構造はRNA-DNA複合二本鎖核酸構造を含む、＜15＞～＜19＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜21＞

前記相補鎖の第2の核酸鎖における前記非天然ヌクレオシドが、2'-O-メチル化及び／又はホスホロチオエート化されたヌクレオシドである、＜19＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜22＞

前記相補鎖の第2の核酸鎖に機能性分子が結合している、＜15＞～＜21＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜23＞

前記機能性分子は、前記二本鎖核酸構造を含む核酸を標的部位に送達する活性を有する分子である、＜22＞に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 2 4 >

前記二本鎖核酸構造を含む核酸の長さは 1 5 ～ 2 5 塩基長である、< 1 1 > ～ < 2 3 > のうちいずれか 1 つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 2 5 >

式 (1) の R^2 はメチレン基である、< 8 > ～ < 2 4 > のうちいずれか 1 つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 2 6 >

前記二本鎖核酸構造は B 型二本鎖核酸構造である、< 7 > に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 2 7 >

前記二本鎖核酸構造を含む核酸は二本鎖 DNA である、< 2 6 > に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 2 8 >

式 (1) の R^2 はトリメチレン基である、< 2 6 > 又は < 2 7 > に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 2 9 >

前記オリゴペプチド領域の全てが式 (1) のアミノ酸残基からなる、< 1 > ～ < 2 8 > のうちいずれか 1 つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 3 0 >

1 0 ～ 2 5 塩基長の核酸を含む核酸医薬の副作用軽減に用いられ、かつ、前記オリゴペプチド領域のアミノ酸残基数が 6 ～ 3 4 である、< 1 > ～ < 2 9 > のうちいずれか 1 つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 3 1 >

前記核酸が二本鎖核酸としての siRNA である、< 3 0 > に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

< 3 2 >

前記オリゴペプチド領域を構成するアミノ酸残基のうち光学活性を伴うアミノ酸残基は、全て L 型、あるいは、全て D 型の光学活性を有するアミノ酸

残基である、＜1＞～＜31＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜33＞

核酸を標的部位に送達する活性を有するデリバリー分子が前記オリゴペプチドに結合している、＜1＞～＜32＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜34＞

核酸医薬に含まれる核酸のRNase Hによる分解を促進する、＜1＞～＜33＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜35＞

10～50塩基長の核酸を含む核酸医薬と共に、前記10～50塩基長の核酸1モルに対して0.5～20モルの比で用いられる、＜1＞～＜34＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤。

＜36＞

＜1＞～＜35＞のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤、及び核酸医薬を含む、医薬組成物。

＜37＞

前記核酸医薬が10～50塩基長の核酸を含み、前記10～50塩基長の核酸1モルに対して0.5～20モルの比で核酸医薬副作用軽減剤を含む、＜36＞に記載の医薬組成物。

＜38＞

前記核酸医薬が15～25塩基長のA型二本鎖核酸を含み、前記15～25塩基長のA型二本鎖核酸1モルに対して0.8～2.5モルの比で核酸医薬副作用軽減剤を含む、＜37＞に記載の医薬組成物。

＜39＞

前記核酸医薬に起因する副作用を軽減しつつ、前記核酸医薬が対象とする特定疾患を治療又は予防するために用いられる、＜36＞～＜38＞のうちいずれか1つに記載の医薬組成物。

<40>

急速静注用である、<36>～<39>のうちいずれか1つに記載の医薬組成物。

<41>

単回投与量が、核酸の量として、前記医薬組成物の投与を受ける対象の体重1kg当たり0.01mg～200mgである、<36>～<40>のうちいずれか1つに記載の医薬組成物。

<42>

さらにポリエチレングリコール（PEG）及びグリセロールのうち少なくとも1つを含む、<36>～<41>のうちいずれか1つに記載の医薬組成物。

<43>

<1>～<35>のうちいずれか1つに記載の核酸医薬副作用軽減剤を核酸医薬に添加することを含む、核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法。

発明の効果

[0007] 本開示によれば、核酸医薬のクラスエフェクトとしての副作用を軽減する核酸医薬副作用軽減剤、該核酸医薬副作用軽減剤を含む医薬組成物、並びに核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]核酸医薬を本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤と共に用いた場合の、核酸医薬による遺伝子発現抑制効果を示す。

[図2]核酸医薬を本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤と共に用いた場合の、核酸医薬による遺伝子発現抑制効果を示す。

[図3]核酸医薬を本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤と共に用いた場合の、核酸医薬による遺伝子発現抑制効果を示す。

[図4]実施例2における、Dab10/Dab12を添加したコレステロール結合核酸複合体の投与後30分におけるaPTTの測定結果である。エラーバーは標準誤差を示す。

[図5]実施例2における、D a b 8 / D a b 1 0 / D a b 1 2 を添加したコレステロール結合核酸複合体の投与後120分におけるa P T Tの測定結果である。エラーバーは標準誤差を示す。

[図6]実施例2における、D a b 1 0 / D a b 1 2 を添加したコレステロール結合核酸複合体の投与後240分におけるa P T Tの測定結果である。エラーバーは標準誤差を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 本開示において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。本開示中で段階的に記載されている数値範囲において、ある数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示に記載されている数値範囲において、ある数値範囲で記載された上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

本開示において、組成物中の各成分の量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合は、特に断らない限り、組成物中に存在する該複数の物質の合計量を意味する。

本開示において、特段の断りが無く、また明らかな矛盾又は支障が生じない限りは、各要素は1つのみ存在しても複数存在していてもよい。

本開示において、好ましい態様の組み合わせはより好ましい態様である。

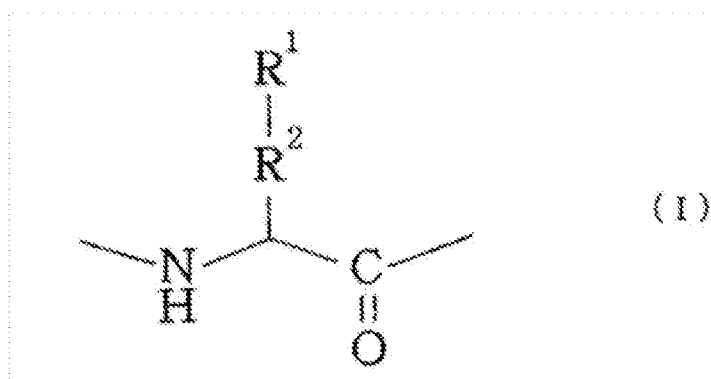
[0010] 本開示において、「核酸」の語は、ポリヌクレオシド及びオリゴヌクレオシドと同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオシドのポリマー又はオリゴマーをいう。核酸は特に断りの無い限り、一本鎖であっても、二本鎖であっても構わない。ここで、ヌクレオシド同士の連結は、天然核酸において見られるホスホジエステル結合による連結に限定されず、後述のとおりホスホロチオエート結合等であってもよい。このため、本開示においてはヌクレオシド間の連結様式を特に明記せずに「連続するヌクレオシド」、「ポリヌクレオシド」、「オリゴヌクレオシド」といった表現を用いる場合がある。

本開示において、ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオシドを「HDO (heteroduplex oligonucleoside)」と称し、アンチセンスオリゴヌクレオシドを「ASO (antisense oligonucleoside)」と称する場合がある。

[0011] 《核酸医薬副作用軽減剤》

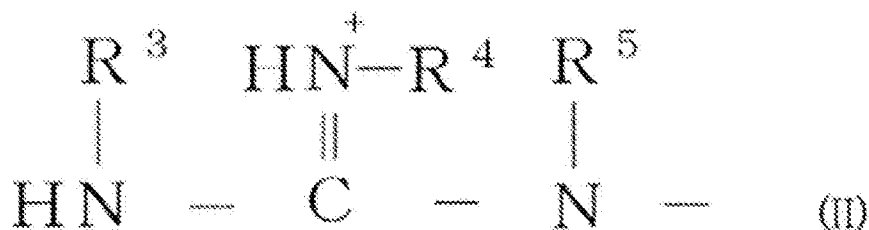
本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤は、オリゴペプチドからなる核酸医薬副作用軽減剤であって、該オリゴペプチドは、下記式(1)のアミノ酸残基が2個以上連続する構造である構造Wを含む2～40個のアミノ酸からなるオリゴペプチド領域を含み、前記オリゴペプチド領域の中に構造Wが2つ以上存在する場合、隣接する構造W同士は式(1)ではない1個のアミノ酸残基Xにより連結されており、前記オリゴペプチド領域は、1つの構造Wから構成されるか、又は2つ以上の構造W及びアミノ酸残基Xから構成される。

[化3]



式(1)において、R¹は、基H₃N⁺—CH₂—、又は、式(11)で示される基である。R²は、R¹が基H₃N⁺—CH₂—の場合は、存在しないか、若しくは、炭素原子数1～3のアルキレン基であり、R¹が式(11)で示される基の場合は炭素原子数1～4のアルキレン基である。一つのオリゴペプチド領域においてR¹及びR²は全て同一である。

[化4]



式(II)中、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、それぞれ独立に、水素原子若しくはメチル基である。上記で規定されるオリゴペプチドを、本開示に係るオリゴペプチドとも称する。式(II)において、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、全て水素原子であってもよい。

[0012] R^2 が炭素原子数1～3のアルキレン基である場合、該アルキレン基は、例えば、メチレン基、エチレン基、1,2-プロピレン基、又はトリメチレン基である。 R^2 が炭素原子数1～4のアルキレン基である場合、該アルキレン基は、例えば、メチレン基、エチレン基、1,2-プロピレン基、トリメチレン基、1,2-ブチレン基、1,3-ブチレン基、又はテトラメチレン基である。

[0013] 以下、式(I)のアミノ酸残基が2個以上連続する構造(式(I)のアミノ酸残基が2個以上連続して並んだ構造)を A_n (n はアミノ酸残基Aの繰り返し数を示す正の整数である)と略記しつつ、特定オリゴペプチド領域の具体的な態様を例示列举する。 A_n は上記構造Wに相当する。

[0014] 特定オリゴペプチド領域は、 A_n (n は2～40の整数)で表される構造、つまり、特定オリゴペプチド領域全てが連続する式(I)のアミノ酸残基で構成される構造であってもよい。この場合、 n は好ましくは4～20の整数であり、より好ましくは6～15の整数である。

[0015] あるいは、特定オリゴペプチド領域は、 $[A_m-X]_p$ で表される構造であってもよい。各 A_m は上記構造Wに相当する。ここで、各 m はそれぞれ独立に2又は3以上の整数であり、 p は $[A_m-X]$ 単位の繰り返し数を表し、 $[A_m-X]_p$ で表される構造中に含まれるAの数が2～40となるように選択さ

れる。pは例えば2～20の整数である。各Xは、それぞれ独立に、式(1)のアミノ酸残基以外のアミノ酸残基を表す。

すなわち $[A_m-X]_p$ で表される構造は、式(1)のアミノ酸残基が2個、又は2個を超える数連なる単位の間、他のアミノ酸残基を挟む態様である。この他のアミノ酸残基は特定オリゴペプチド領域の自由度(フレキシビリティ)を増す、場合によっては減ずる等の目的で挿入することができる。この態様(2)の具体例として例えば、以下のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0016] (2)-1: $A_2-X-A_2-X-A_2-\cdots$ (各Xは、それぞれ独立に、式(1)のアミノ酸残基以外のアミノ酸残基を表す)、

(2)-2: $A_3-X-A_2-X-A_3-\cdots$ (Xは、それぞれ独立に、式(1)のアミノ酸残基以外のアミノ酸残基を表す)

[0017] mは好ましくは2～20の整数を表し、より好ましくは2～10の整数を表す。pは好ましくは2～20の整数を表し、より好ましくは2～10の整数を表す。

[0018] 上記の「他のアミノ酸残基」(Aで表されるアミノ酸残基以外のアミノ酸残基)は特に限定されず、オリゴペプチドに与えることを企図する自由度に応じて適宜選択することができる。自由度の大きなアミノ酸残基としてグリシンが挙げられるが、それ以外にオリゴペプチドの自由度に影響を与えるアミノ酸残基としては、例えばL-アラニン、L-プロリンの他、プロリン骨格を有するアミノ酸として、L-アミノプロリン、L-グアニジノプロリン等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

[0019] 本開示に係るオリゴペプチドにおける、特定オリゴペプチド領域以外の部分は必要に応じて適宜選択すればよく、特に限定されない。例えば、必要に応じて保護基やフルオレセイン等の蛍光基等のシグナル源が結合されているアミノ酸誘導体残基を用いてもよい。いわゆるデリバリー分子を本開示に係るオリゴペプチドに結合させてもよい。デリバリー分子としては、本開示に係るオリゴペプチドを細胞内に導入し得るシグナルペプチド等の分子、標的

選択性を有する分子等を挙げることができる。

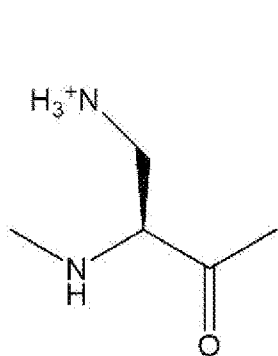
[0020] 例えば、脂質をデリバリー分子として用いることで、肝臓等に対して選択的に本開示に係るオリゴペプチドを体内導入することができる。当該脂質としては、例えばコレステロール；ビタミンE（トコフェロール類、トコトリエノール類等）、ビタミンA、ビタミンK等の脂溶性ビタミン；アシルカルニチン、アシルCoA等の中間代謝物；糖脂質；グリセリド等の脂質、並びに、これらの脂質の誘導体が挙げられる。これらの中でコレステロール又はビタミンE類は、安全性等の観点から一般的な好適例として挙げられる。さらに、グルコースやスクロース等の糖をデリバリー分子として用いることで、脳に対して選択的に本開示に係るオリゴペプチドを導入することが可能となる。また、各臓器の細胞表面にある各種のタンパク質や受容体に本開示に係るオリゴペプチドを結合させることも選択的な導入手段として認められるため、これらの細胞表面蛋白等に特異的な抗体やリガンドをデリバリー分子として用いることも可能である。

[0021] 本開示に係るオリゴペプチドは、N末端やC末端に上記のデリバリー分子を結合させるために、N末端をアセチル基で保護され、及び／又はC末端をアミド基で保護されていてもよい。例えば、本開示に係るオリゴペプチドは、 A_n で表される構造又は $[A_m-X]_p$ で表される構造のN末端側に $Ac-YGG-$ で表されるアミノ酸残基群を有するオリゴペプチドであってもよい。ここでAcはアセチル基を表す。 A_n で表される構造又は $[A_m-X]_p$ で表される構造のN末端側にアミノ酸残基が存在する場合、当該N末端側領域の配列は特に限定されないものの、その長さは1～5アミノ酸残基であることが好ましい。N末端側領域にアミノ酸残基は存在しなくてもよい。同様に、 A_n で表される構造又は $[A_m-X]_p$ で表される構造のC末端側にアミノ酸残基が存在する場合、当該C末端側領域の配列は特に限定されないものの、その長さは1～5アミノ酸残基であることが好ましい。C末端側領域にアミノ酸残基は存在しなくてもよい。

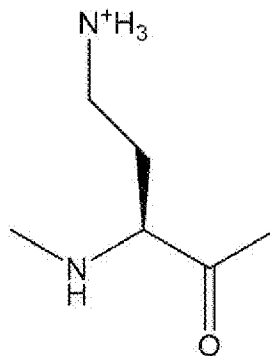
[0022] 本開示に係るオリゴペプチドにおけるAで表されるアミノ酸残基としては

、例えば以下の構造が挙げられる。各構造の左右両端の棒は、隣接するアミノ酸残基への結合を表す。なお、以下の構造式ではL型アミノ酸由来のアミノ酸残基の構造を示しているが、Aで表されるアミノ酸残基はD型アミノ酸由来のアミノ酸残基であっても構わない。

[0023] [化5]

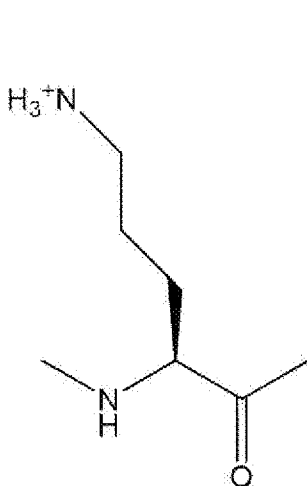


Dap (Diaminopropionic acid)

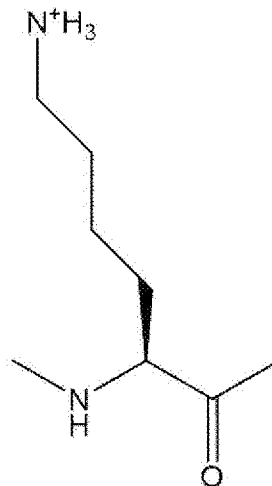


Dab (Diaminobutanoic acid)

[0024] [化6]



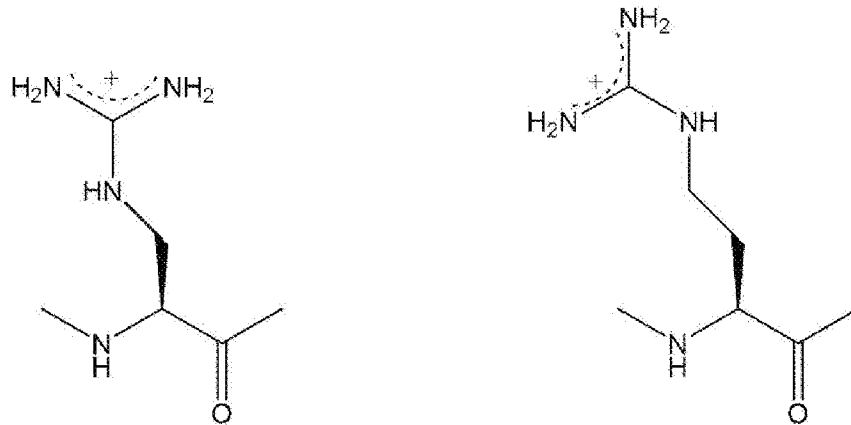
Orn (Ornithine)



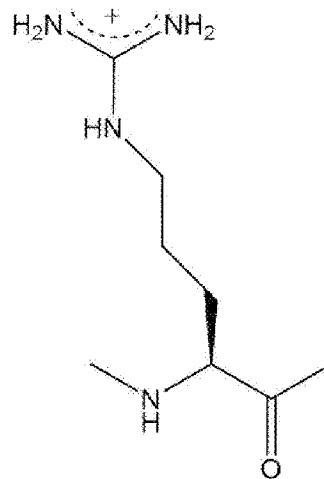
Lys (Lysine)

[0025]

[化7]



Agp (2-amino-3-guanidino-propionic acid) Agb (2-amino-4-guanidino-butanoic acid)



Arg (Arginine)

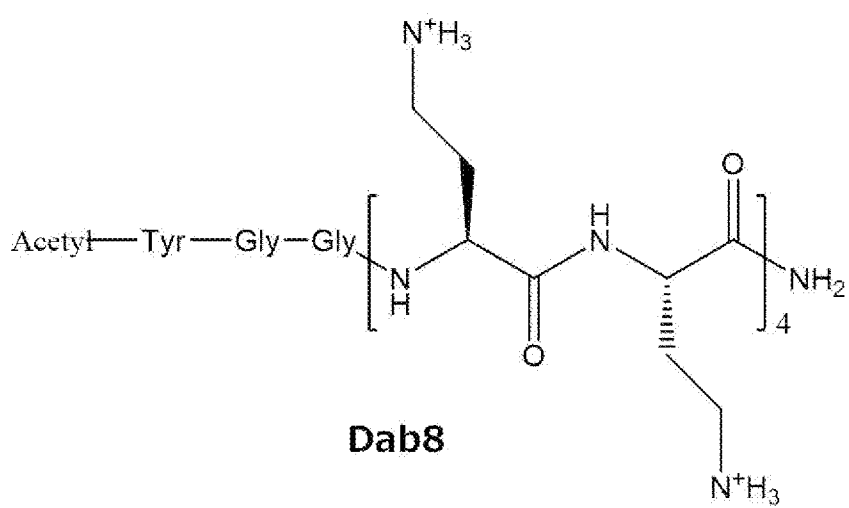
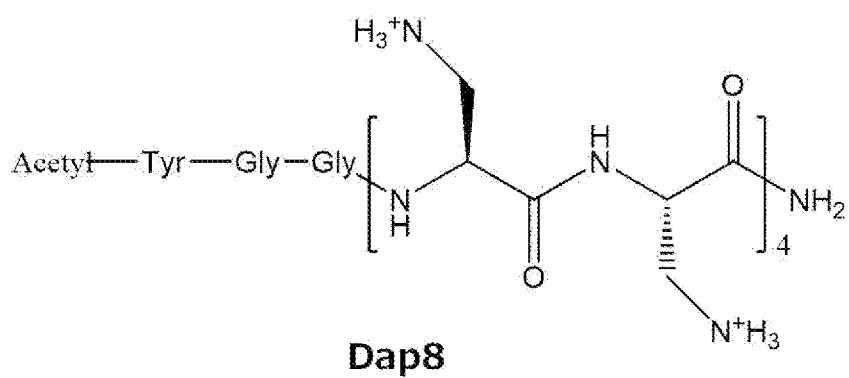
[0026] A_n で表される構造の具体例としては、 $(Dab)_8$ 、 $(Dab)_{12}$ などが挙げられる。本開示に係るオリゴペプチドのアミノ酸残基数は特に限定されないが、例えば6～50アミノ酸残基であってもよい。また、例えば、10～25塩基長の核酸を含む核酸医薬の副作用軽減のために、オリゴペプチド領域のアミノ酸残基数が6～34であるオリゴペプチドを用いてもよく、あるいはオリゴペプチド領域のアミノ酸残基数が7～20であるオリゴペプチドを用いてもよく、あるいはオリゴペプチド領域のアミノ酸残基数が8～14であるオリゴペプチドを用いてもよい。

[0027] 本開示に係るオリゴペプチドは、公知のペプチドの化学合成法に従い製造することが可能である。すなわち、今や常法として確立している液相ペプチド合成法、又は、固相ペプチド合成法を用いて製造することが可能である。そして、一般的に好適な化学合成法として認識されている固相ペプチド合成法も、Boc固相法又はFmoc固相法を用いることが可能であり、必要に応じてライゲーション法を用いることも可能である。後述する実施例では、現時点で最も一般的に行われているFmoc固相法を用いて必要なオリゴペプチドの合成を行った。また、オリゴペプチドを構成する個々のアミノ酸は、公知の方法により製造可能であり、市販品を用いることも可能である。

[0028] 合成したオリゴペプチドは常法に従い、脱保護等の工程後に、逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相HPLC）等の常法により精製することが可能である。そして、質量分析法（matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight: MALDI-TOF、又は、liquid chromatography-electro spray ionization: LC-ESI）により目的のオリゴペプチドの同定を行うことが可能である。最終的にはオリゴペプチドを加水分解して、アミノ酸組成と含有量の確認を行うことができる。以下に、特定オリゴペプチド領域を構成する最小単位の2アミノ酸残基がペプチド結合を介して連なっている状態を基にして、本開示に係るオリゴペプチドの化学式を例示する。なお、各化学式の下に付された名称は、アミノ末端部分のアセチルチロシンーグリシンーグリシンの後の繰り返し構造についての名称を繰り返し数と共に記載したものであるが、化合物全体の名称としても用いられる。Dapはジアミノプロピオン酸を、Dabはジアミノブタン酸を、Ornはオルニチンを、Lysはリシンを、Agpは2-アミノ-3-グアニジノプロピオン酸を、Agbは2-アミノ-3-グアニジノブタン酸を、Argはアルギニンを表す。

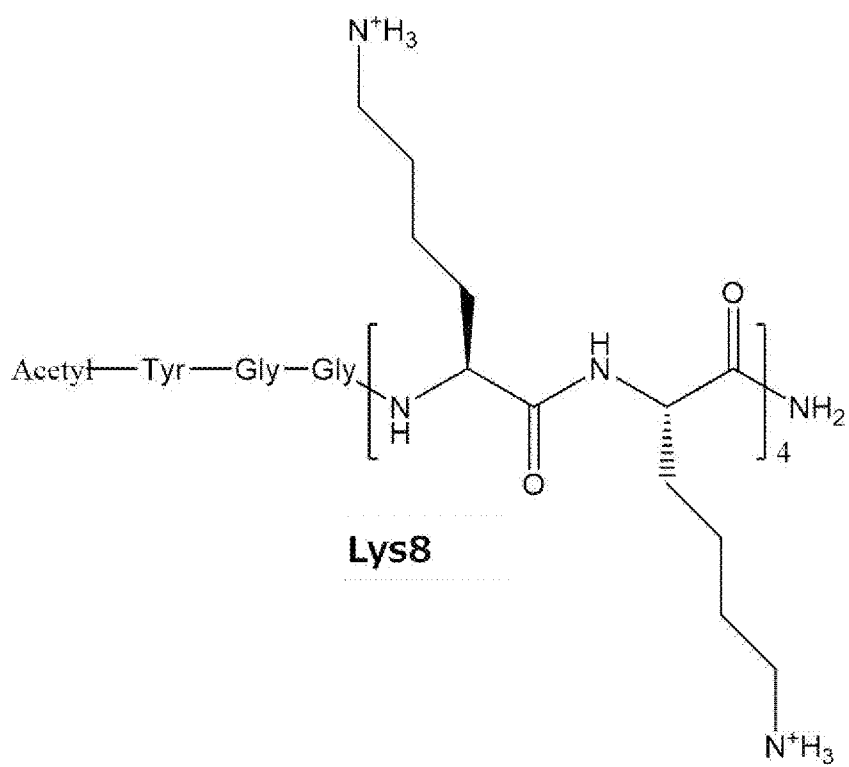
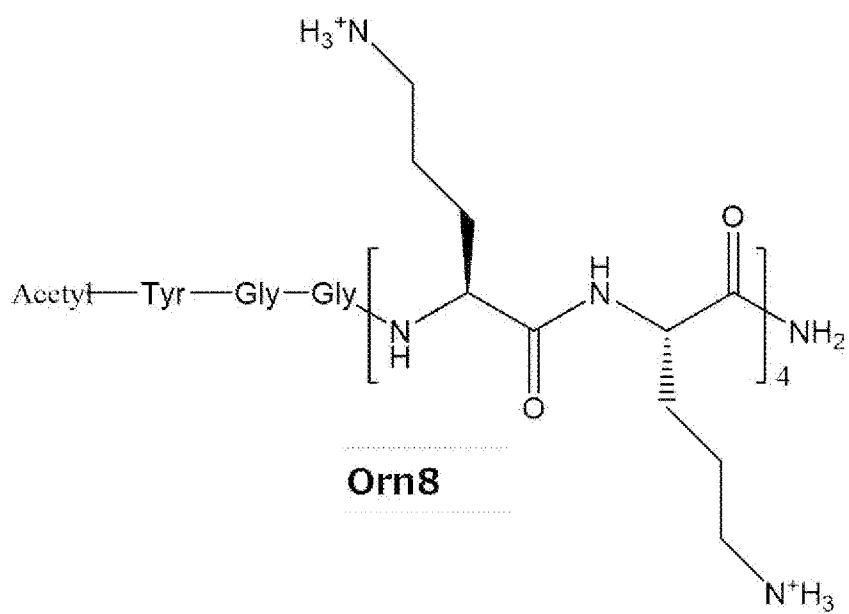
[0029]

[化8]



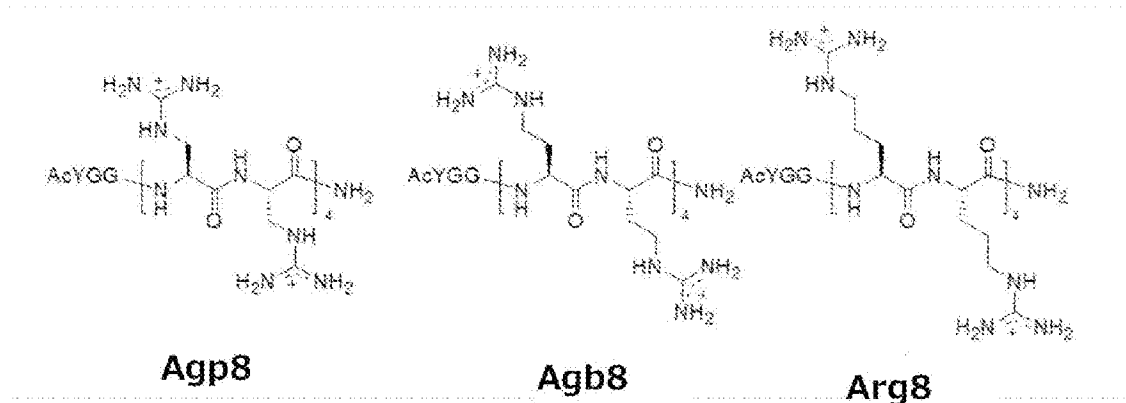
[0030]

[化9]

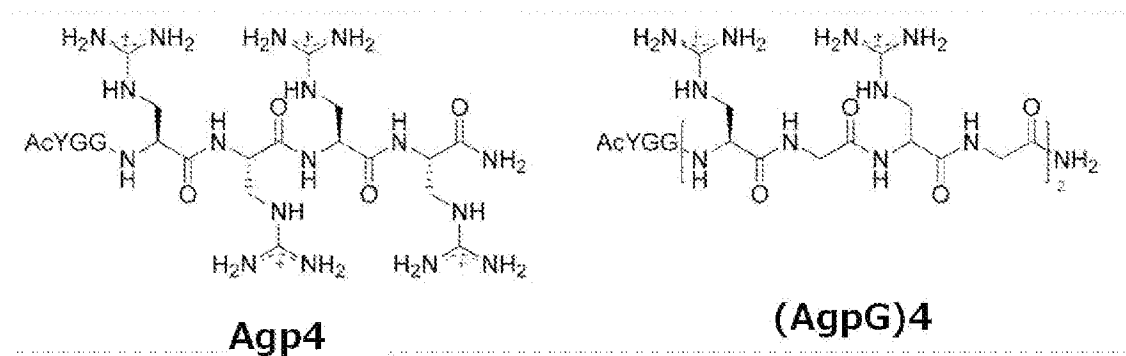


[0031]

[化10]



[0032] [化11]



[0033] 本開示に係るオリゴペプチドにおいて、特定オリゴペプチド領域を構成するアミノ酸残基の全てが式（１）のアミノ酸残基からなることは本開示に係るオリゴペプチドの好適な態様の一つである。ここで本開示に係るオリゴペプチドにおける「特定オリゴペプチド領域」とそれ以外の部分は、上記した「特定オリゴペプチド領域」の定義により導かれる。すなわち、「式（１）以外のアミノ酸残基」が２個以上連続する（ただし、「式（１）以外」という条件を満たす限りは、互いに同じアミノ酸残基であっても、互いに異なるアミノ酸残基であってもよい）箇所は、「特定オリゴペプチド領域」からは外れることになる。この場合、２個以上連続する式（１）のアミノ酸残基のうち、「式（１）以外のアミノ酸残基」が２個以上連続する箇所に最も近い式（１）のアミノ酸残基、が、Ｃ末端側もＮ末端側も同様に「特定オリゴペプチド領域の末端」となる。

[0034] また、特定オリゴペプチド領域を構成するアミノ酸残基のうち、光学活性

を伴うアミノ酸残基は、全てL型、あるいは、全てD型の同一の光学活性を有するアミノ酸残基であることが好適である。

[0035] さらに本開示に係るオリゴペプチドを、概ね細胞膜を効率的に通過させる、特定の標的（臓器等）に選択的に送達する等の目的のために、いわゆるデリバリー分子を本開示に係るオリゴペプチドに結合させてもよい。

[0036] 本開示に係るオリゴペプチドによれば、核酸医薬に含まれる二本鎖核酸又は二本鎖核酸構造がRNase H以外のヌクレアーゼによって分解されることを抑制する効果も得ることができる。特に核酸医薬にRNA鎖を有する核酸が含まれる場合、核酸医薬を投与しても血中、消化管中に存在するRNaseにより核酸は速やかに分解されてしまい、所期の効果を得ることができない傾向にある。本開示に係るオリゴペプチドはこのような分解から核酸を保護する働きを有する。ただし、後述のヘテロ核酸等はRNase Hによるセンス鎖の分解を介して機能するようになっているため、RNase Hによる分解性まで損なわれることは好ましくない。RNase HはRNA-DNA複合二本鎖等のキメラ型二本鎖等を特異的に認識して分解する。本開示に係るオリゴペプチドは、RNase HによるRNA鎖の分解性を損なわないという好ましい性質を有している。

[0037] 前述の二本鎖核酸又は二本鎖核酸構造を分解するRNase H以外のヌクレアーゼとしては、例えば、RNase A、オリゴヌクレオチダーゼ（oligonucleotidase）、RNase II、RNase III、Spleen exonuclease、DNase I、DNase II、エクソデオキシリボヌクレアーゼ（Exodeoxyribonuclease）VII等が挙げられる。ここではヒトにおいて存在するヌクレアーゼを一部例示列挙したが、他の生物に存在するヌクレアーゼも上記ヌクレアーゼの範疇に含まれる。上記ヌクレアーゼの範囲には、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼのどちらも含まれる。

[0038] 前述のRNase Hは、別名をCalf thymus ribonuclease H、エキソリボヌクレアーゼ（Exoribonuclease）と称される。

e) H、又は、RNA-DNA-ハイブリッドリボヌクレオチドハイドロラーゼ (hybrid ribonucleotidohydrolase) ともいい、RNA-DNA複合二本鎖等のキメラ型二本鎖のRNAをエンド的に分解して5'-ホスホモノオリゴヌクレオチド又は5'-ホスホノオリゴヌクレオチドを生成する。RNase Hは、細菌から哺乳類まで広く存在が認められ、1つの細胞に2〜3種類のRNase Hが存在することが知られている。

[0039] 上述した通りに本開示に係るオリゴペプチドは、核酸医薬に含まれる核酸がRNase A等のヌクレアーゼにより分解されることを抑制しつつ、RNase Hによるキメラ型二本鎖の分解は抑制しない。この一見相反する働きは、二本鎖核酸又は二本鎖核酸構造におけるヌクレアーゼ結合部位の違いに基づくものである。すなわち、キメラ型二本鎖核酸又はキメラ型二本鎖核酸構造の場合、RNase Aは二本鎖核酸又は二本鎖核酸構造のメジャーグループ側に存在する本開示に係るオリゴペプチドが結合する部位に結合すると考えられるために、本開示に係るオリゴペプチドの存在により働きが阻害される。一方、RNase Hは、マイナーグループ側に結合するため、RNA鎖の分解は抑制されないものと考えられる。

[0040] 《核酸医薬》

本開示における核酸医薬は、生体に投与されることにより疾患又は症状の治療又は予防上の効能を奏する核酸医薬であれば特に限定されない。核酸医薬に含まれる核酸は、一本鎖核酸であっても、二本鎖核酸であってもよい。核酸医薬に一本鎖核酸が含まれる場合、一本鎖核酸は一本鎖RNAであっても、一本鎖DNAであってもよい。核酸医薬に二本鎖核酸が含まれる場合、二本鎖核酸はA型二本鎖核酸であってもよいし、B型二本鎖核酸であってもよい。また、二本鎖核酸は、二本鎖RNAであっても、二本鎖DNAであっても、RNA-DNA複合二本鎖であってもよい。二本鎖RNA及びRNA-DNA複合二本鎖は、少なくとも生理的環境下ではA型二本鎖核酸構造をとることが知られている。一方、二本鎖DNAは、少なくとも生理的環境下

ではB型二本鎖核酸構造をとることが知られている。前記A型二本鎖核酸は、15～25塩基長であってもよい。

核酸医薬に含まれる核酸は、二本鎖核酸構造を含む核酸であってもよい。二本鎖核酸構造を含む核酸は、その全体が二本鎖核酸を形成していても、その一部のみが二本鎖核酸を形成していてもよい。このような二本鎖核酸構造は、2分子の核酸分子による分子間ハイブリダイゼーションにより形成される構造に限定されず、1分子の核酸分子（一本鎖確認分子）が分子内に自己相補的な領域を有することで、分子内ハイブリダイゼーションにより形成される構造であってもよい。本開示において、二本鎖核酸についての説明は、矛盾が生じない限り二本鎖核酸構造についても当てはまる。例えば、二本鎖核酸構造は、RNA-DNA複合二本鎖核酸構造であってもよい。

二本鎖核酸構造は、A型二本鎖核酸構造を含んでいてもよく、B型二本鎖核酸構造を含んでいてもよい。二本鎖核酸構造がA型二本鎖核酸構造を含む場合、二本鎖核酸構造の全長がA型二本鎖核酸構造であってもよく、あるいは、一部のみがA型二本鎖核酸構造であってもよい。つまり、二本鎖核酸構造は、少なくとも部分的にA型二本鎖核酸構造を含んでいてもよいともいえる。二本鎖核酸構造がB型二本鎖核酸構造を含む場合、二本鎖核酸構造の全長がB型二本鎖核酸構造であってもよく、あるいは、一部のみがB型二本鎖核酸構造であってもよい。

核酸医薬の例としては、一本鎖核酸であるアンチセンス核酸、二本鎖RNAであるsiRNA（small interfering RNA）、一本鎖核酸であるアプタマー、二本鎖DNAであるデコイ、一本鎖DNAであるCpGオリゴ、RNA鎖とDNA鎖とによる二本鎖であるヘテロ核酸などが挙げられる。

[0041] 二本鎖核酸構造において、少なくとも一方の核酸鎖が、以下の条件（i）及び（ii）のうち少なくとも一方を満たすことが好ましい。

（i）核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数が、核酸鎖に含まれるヌクレオシドの総数の30%以上である

(i i) 核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数が6以上である。

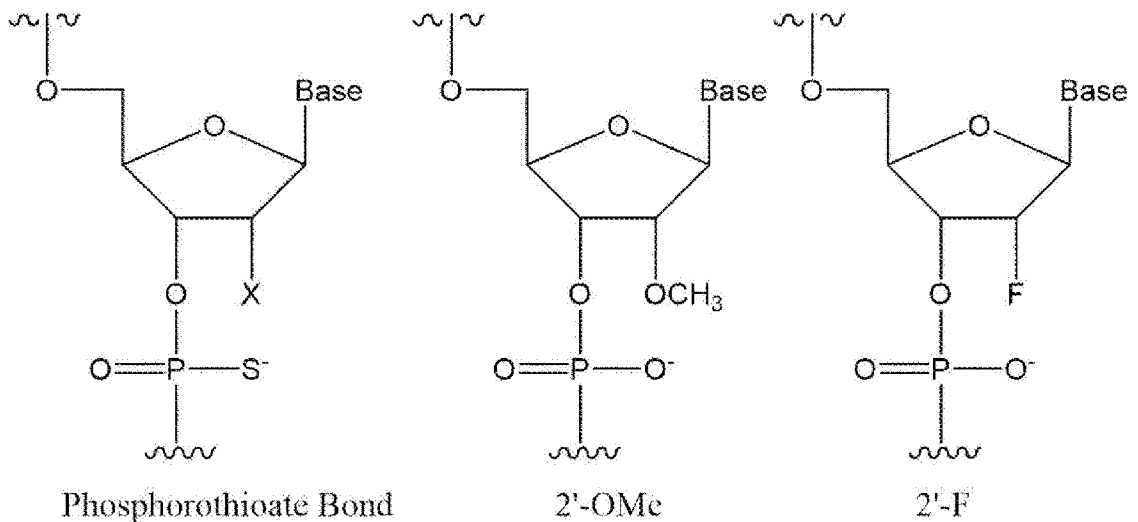
ここで、各核酸鎖について条件(i)、(i i)の判定を行う際には、前記二本鎖核酸構造中における着目する1つの核酸鎖における含まれるヌクレオシドの数を数えるものとする。

条件(i)において、核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数が、核酸鎖に含まれるヌクレオシドの総数の40%以上であることがより好ましく、50%以上であることがさらに好ましく、60%以上であることがいっそう好ましい。また、条件(i i)において、核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数は8以上であることがより好ましく、10以上であることがさらに好ましく、12以上であることがいっそう好ましい。

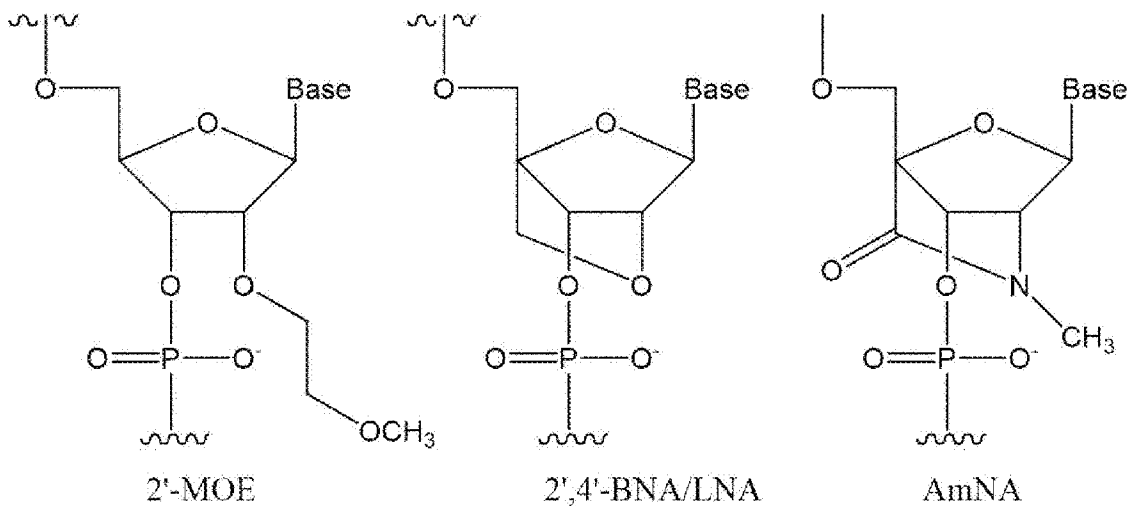
[0042] アンチセンス核酸は、例えば、mRNAに対して相補的に結合してmRNAの分解及び／又はスプライシング阻害により、遺伝子の発現を妨げる核酸であってもよい。あるいは、アンチセンス核酸は、miRNA（マイクロRNA）に相補的に結合してmiRNAの働きを阻害及び／又はmiRNAを分解するものであってもよい。アンチセンス核酸は、DNAであっても、RNAであっても、DNAとRNAとのキメラオリゴヌクレオシドであってもよい。また、任意に化学修飾を受けていてもよい。化学修飾の例としては、(i)ヌクレオシド間のリン酸基のS化、つまりホスホジエステル結合からホスホロチオエート結合への変更、(i i)リボースの2位のヒドロキシ基の修飾、例えばO原子のメトキシエチル基若しくはメチル基による修飾、又はOH基のF原子への置換、(i i i) 2' - 4' - BNA（通称LNA）、AmNA等の架橋型人工核酸の使用などがある。これらの修飾ヌクレオシド及び隣接するヌクレオシドとの結合の構造を以下に示す。

[0043]

[化12]



[0044] [化13]



[0045] 遺伝子を標的とするアンチセンス核酸は、典型的には12～30塩基長である。miRNAを標的とするアンチセンス核酸は、典型的には12～16塩基長である。アンチセンス核酸の配列は、結合対象となるmRNA又はmiRNAに対して完全に相補的な配列でなくてもよいが、特異性の観点からは、結合対象となるmRNA又はmiRNAに対して相補性が高いほど好ましい。

後述する特定二本鎖核酸における第1核酸鎖と同様の核酸鎖を、アンチセンス核酸として用いてもよい。

- [0046] siRNAは、RNaseを含む複合体であるRNA-induced silencing complex (RISC)に取り込まれ、巻き戻されてサイレンシングの対象となるRNAに相補的なアンチセンス鎖だけが残し、サイレンシング対象となるRNAをRISCにより分解する。siRNAは、任意に、上記で説明したような化学修飾を受けていてもよい。また、cell-penetrating peptide (CPP)等のデリバリー分子がジスルフィド結合等により結合していてもよい。遺伝子を標的とするsiRNAは、基本的に21塩基長である。ただし、Dicer酵素により切り出されたsiRNAの場合、各鎖の5'側は2塩基長分オーバーハングしているため、各鎖は基本的に23塩基長となっている。アンチセンス鎖の配列は、サイレンシング対象のRNAに対して完全に相補的なものでなくてもよいが、特異性の観点からは、相補性が高いほど好ましい。
- [0047] アプタマーは、その配列に応じた独特の立体構造を有する一本鎖核酸であり、当該立体構造によりタンパク質等の分子に結合する。当該結合により、タンパク質等の分子の活性制御、特に活性抑制を行うことができる。アンチセンス核酸は、DNAであっても、RNAであっても、DNAとRNAとのキメラオリゴヌクレオシドであってもよい。アプタマーの長さは典型的には26～45塩基長である。
- [0048] デコイは転写因子に結合することにより特定のゲノム領域の転写阻害を行う二本鎖DNAである。デコイの配列は対象とする転写因子によって認識される配列とすればよく、デコイの長さは典型的には20塩基長程度である。
- [0049] CpGオリゴは、強いアジュバント効果を奏する一本鎖DNA分子であり、Toll-like Receptor 9 (TLR9)等のタンパク質と相互作用することにより免疫系を活性化する。CpGオリゴの長さは、典型的には20塩基長程度である。
- [0050] ヘテロ核酸（以降、HDOとも称する）は、RNA-DNA複合二本鎖等のキメラ型二本鎖部分を有する核酸である。キメラ型二本鎖はRNase Hによって認識され、RNA鎖が分解される。このため、DNA部分を含む

鎖をサイレンシング対象のRNAに対して相補的にしておくことにより、サイレンシング対象のRNAを分解することができる。ヘテロ核酸は、任意に、上記で説明したような化学修飾を受けていてもよい。また、デリバリー分子が結合していてもよい。ヘテロ核酸の長さは、典型的には、12～45塩基長である。DNA部分を含む鎖の配列は、サイレンシング対象のRNAに対して完全に相補的なものでなくてもよいが、特異性の観点からは、相補性が高いほど好ましい。

[0051] 核酸医薬に含まれる核酸は、以下に説明する二本鎖核酸（以下、特定二本鎖核酸ともいう）であってもよい。

特定二本鎖核酸は、第1核酸鎖と、第1核酸鎖と相補的な塩基配列である相補的領域を含む第2核酸鎖と、が結合した二本鎖核酸であって、第1核酸鎖は、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドからなる群より選ばれる少なくとも一つを含む。前記相補的領域は少なくとも一部にRNAで構成された領域を含む。

RNA鎖とDNA鎖とから構成される二本鎖核酸領域は、細胞内でRNase Hの基質となるため、細胞内でのアンチセンス効果が得られ、標的遺伝子の発現を抑制することができる

[0052] 本開示において、「アンチセンス効果」とは、アンチセンスオリゴヌクレオシドとRNAセンス鎖等の転写産物との二本鎖形成により、例えばスプライシング等のRNA編集、RNA-protein結合、RNase Hによる消化等のRNA分解、タンパク質への翻訳等のRNA翻訳などが変化し、その結果、転写産物の翻訳物であるタンパク質、あるいは転写産物そのものが有する生物学的活性のレベルを低減することを意味する。

[0053] 翻訳の阻害又はスプライシング機能改変効果として、例えば、エクソスキッピングなどが、アンチセンスオリゴヌクレオシド（例えば第1核酸鎖）の転写産物へのハイブリダイゼーションによって引き起こされ得る。又は、転写産物の分解が、アンチセンスオリゴヌクレオシドと転写産物とのハイブリダイゼーション部分をRNase H等が認識する結果として生じ得る。

例えば、翻訳の阻害では、RNAを含むオリゴヌクレオシドがアンチセンスオリゴヌクレオシド（ASO）として細胞に導入されると、ASOは、標的遺伝子の転写産物（mRNA）に結合し、部分的二本鎖が形成される。この二本鎖は、リボソームによる翻訳を妨げるためのカバーとしての役割を果たし、このため標的遺伝子によりコードされるタンパク質の発現が阻害される。一方、DNAを含むオリゴヌクレオシドがASOとして細胞に導入されると、部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖が形成される。この構造がRNase Hによって認識され、その結果、標的遺伝子のmRNAが分解されるため、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現が阻害され、これは、RNase H依存性経路と称される。さらに、例えば、アンチセンス効果は、プレ-mRNAのイントロンを標的化することによってもたらされ得る。アンチセンス効果はまた、miRNAを標的化することによってもたらされてもよく、この場合、当該miRNAの機能は阻害され、当該miRNAが発現を抑制している遺伝子の発現は増加し得る。

[0054] 「アンチセンスオリゴヌクレオシド」又は「アンチセンス核酸」とは、標的遺伝子の転写産物又は標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な（すなわち、相補的な）塩基配列を含み、主にアンチセンス効果により標的遺伝子の転写産物の発現又は標的転写産物の発現レベルを抑制し得る、一本鎖オリゴヌクレオシドを指す。

[0055] アンチセンス効果によって、発現が抑制され、変更され、若しくは、改変される「標的遺伝子」又は「標的転写産物」は特に限定されない。「標的遺伝子」としては、例えば、本開示に係る特定二本鎖核酸を導入する生物由来の遺伝子、様々な疾患においてその発現が増加する遺伝子等が挙げられる。

加えて、「標的遺伝子の転写産物」とは、ゲノムDNAから転写される、例えば、mRNA、miRNA等のRNAである。例えばmRNAの場合は、タンパク質をコードするゲノムDNAから転写されるRNAである。

[0056] 本開示の一実施形態では、転写産物は塩基修飾を受けていないRNAであってもよく、スプライスされていないRNA、及び同類のものであってもよ

い。本開示の一実施形態では、「標的転写産物」はmRNAだけではなく、例えば、miRNAのようなノンコーディングRNA（即ち、ncRNA）であってもよい。したがって、「転写産物」はDNA依存性RNAポリメラーゼにより合成される任意のRNAであってもよい。

さらに一般的には、「転写産物」は、DNA依存性RNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAであってもよい。

本開示の一実施形態では、「標的転写産物」は、例えば、アポリポタンパク質B (Apolipoprotein B、ApoB) mRNA、スカベンジャー受容体B1 (scavenger receptor B1、SRB1) mRNA、転移関連肺腺癌転写産物1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1、MALAT1) ノンコーディングRNA、マイクロRNA-122 (miR-122)、 β -セクレターゼ1 (beta-secretase 1、BACE1) mRNA、又はPTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) mRNAであってもよい。

[0057] 遺伝子及び転写産物の塩基配列は、例えばNCBI（米国国立生物工学情報センター）データベースなどの公知のデータベースから入手できる。マイクロRNAの塩基配列は、例えば、miRBaseデータベース (Kozomara A, Griffiths-Jones S. NAR 2014 42:D68-D73; Kozomara A, Griffiths-Jones S. NAR 2011 39:D152-D157; Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. NAR 2008 36:D154-D158; Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR 2006 34:D140-D144; Griffiths-Jones S. NAR 2004 32:D109-D111) から入手できる。

[0058] ヌクレアーゼ耐性の観点から、第1核酸鎖及び前記第2核酸鎖からなる群より選ばれる少なくとも一つの核酸鎖において、リン原子を含む結合が、ホスホロチオエート結合であることが好ましい。

なお、ホスホロチオエート結合とは、ホスホジエステル結合の非架橋酸素原子を硫黄原子に置換したヌクレオシド間の結合を指す。

[0059] 本開示において「天然ヌクレオチド」とは、DNA中に見られるデオキシリボヌクレオチド及びRNA中に見られるリボヌクレオチドを含む。

本開示において、「デオキシリボヌクレオチド」及び「リボヌクレオチド」は、それぞれ、「DNAヌクレオチド」及び「RNAヌクレオチド」と称することもある。

本開示において「天然ヌクレオシド」とは、DNAに含まれるデオキシリボヌクレオシド及びRNAに含まれるリボヌクレオシドを含む。

本開示において、「デオキシリボヌクレオシド」及び「リボヌクレオシド」は、それぞれ、「DNAヌクレオシド」及び「RNAヌクレオシド」と称することもある。

本開示において「非天然ヌクレオチド」とは、天然ヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドを指し、「非天然ヌクレオチド」には、修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド模倣体が含まれる。

同様に、本開示において「非天然ヌクレオシド」とは、天然ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドを指し、「非天然ヌクレオシド」には、修飾ヌクレオシド及びヌクレオシド模倣体が含まれる。

[0060] 本開示において「ヌクレオシド模倣体」は、ヌクレオシドの糖又は糖及び塩基、並びに必ずではないが結合を、別の糖に、別の糖及び塩基に、又は別の結合に置換した構造体である。

ヌクレオシド模倣体としては、例えば、ヌクレオシドの糖の代わりにシクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、二環式糖模倣体又は三環式糖模倣体を有するヌクレオシド模倣体が挙げられ、例えば、非フラノース糖単位を有するヌクレオシド模倣体が挙げられる。

「ヌクレオチド模倣体」は、ヌクレオチドのヌクレオシド及び／又は結合を、ヌクレオシド模倣体及び／又は別の結合に置換した構造体である。

非天然オリゴヌクレオシドを含む核酸鎖は、天然オリゴヌクレオシドを含む核酸鎖と比べて、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下における安定性の増加又は阻害活性の増加等の特性を有する。同様に、非天然オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖は、天然オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖と比べて、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標

的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下における安定性の増加又は阻害活性の増加等の特性を有する。

[0061] 本開示において「修飾ヌクレオチド」とは、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、及び修飾核酸塩基のうちの少なくとも1つを有するヌクレオチドを意味する。

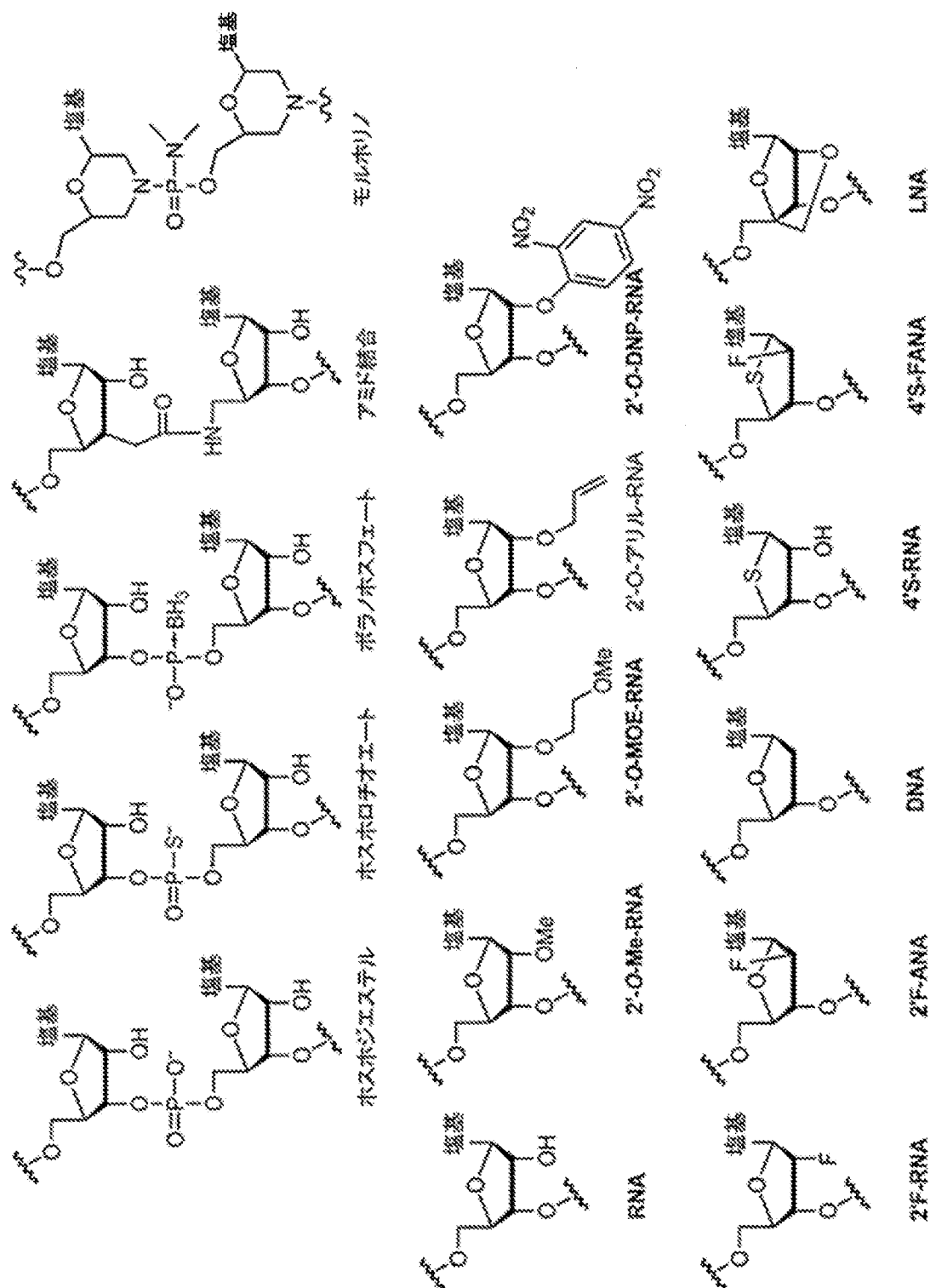
本開示において「修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分及び修飾核酸塩基からなる群より選ばれる少なくとも1つを有するヌクレオシドを意味する。

本開示において「修飾ヌクレオシド間結合」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステル結合）とは異なるヌクレオシド間結合を指す。修飾ヌクレオシド間結合は、一般的には、天然に存在するヌクレオシド間結合よりも、ヌクレアーゼ耐性が高い結合である。

[0062] 様々な天然ヌクレオシド、天然ヌクレオチド、非天然ヌクレオシド、及び非天然ヌクレオチドの構造を以下に示す。

[0063]

[化14]



[0064] <第1 核酸鎖>

第1 核酸鎖は、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドからなる群より

選ばれる少なくとも一つを含む。本開示に係る第1核酸鎖は、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの両方を含んでいてもよい。

[0065] 本開示に係る特定二本鎖核酸において、第1核酸鎖は、第1核酸鎖の5'末端及び3'末端からヌクレオシドを2～10個連続して含む2つの末端領域と、末端領域との間に位置し、少なくとも4つのヌクレオシドを含む中央領域と、から構成されることが好ましい。

[0066] 上記末端領域及び中央領域におけるヌクレオシドは、特に制限はなく、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドからなる群より選ばれる少なくとも一つを含んでいてもよく、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの両方を含んでいてもよい。

末端領域におけるヌクレオシドは、少なくとも一つの非天然ヌクレオシドを含み、非天然ヌクレオシド及び天然ヌクレオシドの両方を含んでいてもよい。

中央領域におけるヌクレオシドは、特に制限はなく、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドからなる群より選ばれる少なくとも一つを含んでいてもよく、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの両方を含んでいてもよい。

これらの領域が非天然ヌクレオシドを含む場合、例えば、架橋ヌクレオシド、2'-O-MOE基を含むヌクレオシド等を含んでいてもよい。

なお、末端領域及び中央領域における天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの例及び好ましい例は、後述のウイング領域における天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドにおける天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの例及び好ましい例と同様である。

[0067] (末端領域)

第1核酸鎖における2つの末端領域のそれぞれは、2～10塩基長であることが好ましく、同じヌクレオシドを2～5つ連続して含むことがより好ましい。第1核酸鎖における末端領域に含まれるヌクレオシドは特に制限されないが、末端領域が非天然ヌクレオシドを含む場合、非天然ヌクレオシドを

連続して含む領域を「ウイング領域」と称する場合がある。

[0068] (中央領域)

第1核酸鎖における中央領域は、少なくとも4塩基長であることが好ましく、4～12塩基長であることがより好ましい。

なお、第1核酸鎖における中央領域に含まれるヌクレオシドは特に制限されないが、中央領域に含まれるヌクレオシドが天然ヌクレオシドである場合、天然ヌクレオシドを4個以上連続して含む領域を「ギャップ領域」と称する場合がある。

[0069] 本開示に係る特定二本鎖核酸は、RNase Hによって認識されうる核酸構造を含んでいてもよい。

RNase Hによって認識されうる核酸構造としては、例えば、RNase Hにより切断される部位等が挙げられる。

RNase Hは、ヒトを含む動物の特定二本鎖核酸を認識してRNAを切断できる酵素であれば、特に制限されない。

[0070] 本開示に係る特定二本鎖核酸は、第1核酸鎖は、デオキシリボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造を含み、後述の第2核酸鎖は、リボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造を含み、かつ、特定二本鎖核酸は、前記デオキシリボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造と前記リボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造との相補塩基対を含む構造から構成されていてもよい。

[0071] 例えば、特定二本鎖核酸は、相補鎖のうちの第1の核酸鎖がデオキシリボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造を含む核酸であり、相補鎖のうちの第2の核酸鎖が前記第1の核酸鎖と相補的な塩基配列を有し、かつRNA及びPNAのうちの少なくとも1種を含む核酸である、A型二本鎖核酸構造を含む核酸であってもよい。第2の核酸鎖は、RNA及びPNAのうちの少なくとも1種のみから構成されていてもよく、これら以外の核酸構造をさらに含んでいてもよい。同様に、第2の核酸鎖における、第1の核酸鎖と相補的な塩基配列の領域は、RNA及びPNAのうちの少なくとも1種のみか

ら構成されていてもよく、これら以外の核酸構造をさらに含んでいてもよい。また、前記相補鎖の第1の核酸鎖は、4個以上連続したデオキシリボヌクレオシドからなる領域の5'末端側及び／又は3'末端側に、連続又は不連続に非天然ヌクレオシドを含む領域が設けられている複合DNA鎖であってもよい。前記相補鎖の第1の核酸鎖における前記非天然ヌクレオシドはLNAヌクレオシドであってもよい。

[0072] 本開示に係る特定二本鎖核酸において、第1核酸鎖は、天然ヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造を含むギャップ領域と、前記ギャップ領域の5'末端側に位置し非天然ヌクレオシドが連続して並んだ構造を含む領域から構成されるウイング領域及び前記ギャップ領域の3'末端側に位置し非天然ヌクレオシドが連続して並んだ構造を含む領域から構成されるウイング領域のうち少なくとも一方とから構成される。以降、5'末端側のウイング領域（5'ウイング領域）と、3'末端側のウイング領域（3'ウイング領域）は、特に断りの無い限り、まとめて「ウイング領域」として説明する。特定二本鎖核酸における第1核酸鎖が、ウイング領域及びギャップ領域を有することで、アンチセンス効果がより効果的に得られる。本開示に係る特定二本鎖核酸において、第1核酸鎖は「ギャップマー」であってもよい。

本開示において「ギャップマー」とは、デオキシリボヌクレオシドが少なくとも4個連続して並んだ構造を含むギャップ領域（DNAギャップ領域）と、ギャップ領域の5'末端側及び3'末端側に配置された非天然ヌクレオシドを含む領域（5'ウイング領域及び3'ウイング領域）と、からなる核酸鎖を指す。

[0073] （ウイング領域）

ウイング領域は、ギャップ領域の5'末端から連続して非天然ヌクレオシドが並んだ構造及びギャップ領域の3'末端から連続して非天然ヌクレオシドが並んだ構造のうち少なくとも一方を含むことが好ましい。

なお、本開示において、ギャップ領域の5'末端側のウイング領域を「5'ウイング領域」と称し、ギャップ領域の3'末端側のウイング領域を「3'ウ

イング領域」と称する場合がある。

5' ウイング領域及び3' ウイング領域の塩基長（長さ）は、それぞれ独立して、通常、2～10塩基長、2～7塩基長、又は2～5塩基長であってもよい。

5' ウイング領域及び3' ウイング領域は、非天然ヌクレオシドが連続して並んだ構造を含んでいれば、天然ヌクレオシドを更に含んでいてもよい。

[0074] 第1核酸鎖において、非天然ヌクレオシドとしては、ヌクレアーゼに対する安定性の観点から、糖修飾ヌクレオシドであることが好ましい。

本開示において「糖修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖を含む修飾ヌクレオシドを示す。また、「修飾糖」とは、天然糖（すなわち、DNA（2'－H）又はRNA（2'－OH）中に認められる糖部分）中の任意の構造の別の構造への置換等の、天然糖からの任意の変化を有する糖を示す。

糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼに対する安定性の強化、結合親和性の増加、又は他の何らかの分子生物学的特性の変化を核酸鎖に付与しうる。

[0075] 糖修飾ヌクレオシドは、化学修飾リボフラノース環部分を含む。化学修飾リボフラノース環の例としては、限定するものではないが、置換基（5'又は2'置換基を含む）の付加、非ジェミナル環原子の架橋形成による二環式核酸（架橋核酸、BNA）の形成、リボシル環酸素原子のS、N（R）、又はC（R¹）（R²）（R、R¹及びR²は、それぞれ独立して、水素原子、炭素数1～炭素数12のアルキル、又は保護基を表す）での置換、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

[0076] 糖修飾ヌクレオシドは、2'－修飾糖を含んでよい。2'－修飾糖は、2'－O－メチル基を含む糖であってもよい。

本開示において「2'－修飾糖」は、2'位で修飾されたフラノシル糖を意味する。

[0077] 糖修飾ヌクレオシドの例としては、限定するものではないが、5'－ビニル、5'－メチル（R又はS）、4'－S、2'－F（2'－フルオロ基）、2'－OCH₃（2'－OMe基若しくは2'－O－メチル基）、又は2'

—O(CH₂)₂OCH₃ (2'—O—MOE) 置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。

2' 位の置換基はまた、アリル基、アミノ基、アジド基、チオ基、アリルオキシ基、炭素数 1～炭素数 10 のアルコキシ基、—OCF₃、—O(CH₂)₂SCH₃、—O(CH₂)₂—O—N(R_m)(R_n)、及び—O—CH₂—C(=O)—N(R_m)(R_n) からなる群より選択することができ、各 R_m 及び R_n は、独立して、水素原子又は置換若しくは非置換の炭素数 1～炭素数 10 のアルキルである。

本開示において「2'—修飾糖」は、2' 位で修飾されたフラノシル糖を意味する。

[0078] 糖修飾ヌクレオシドのさらなる例としては、二環式ヌクレオシドが挙げられる。

本開示において「二環式ヌクレオシド」は、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す。二環式糖部分を含む核酸は、一般に、架橋核酸(bridged nucleic acid、BNA)と称される場合がある。

本開示において、二環式糖部分を含むヌクレオシドは、「架橋ヌクレオシド」と称することもある。

[0079] 二環式糖は、2' 位の炭素原子及び 4' 位の炭素原子が 2 個以上の原子によって架橋されている糖であってよい。二環式糖としては、公知公用のものが挙げられる。

[0080] 二環式糖を含む核酸(BNA)の 1 つのサブグループは、4'-(CH₂)_p-O-2'、4'-(CH₂)_p-CH₂-2'、4'-(CH₂)_p-S-2'、4'-(CH₂)_p-OCO-2'、4'-(CH₂)_n-N(R₃)-O-(CH₂)_m-2' (式中、p、m 及び n は、それぞれ 1～4 の整数、0～2 の整数、及び 1～3 の整数を表し；又は R₃ は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及びユニット置換基(蛍光若しくは化学発光標識分子、核酸切断活性を有する機能性基、細胞内又は核内局在化シグナルペプチド等)を表す)により架橋された 2' 位の炭素原子と 4' 位の炭素原子を有すると説明することができる。

。

[0081] さらに、特定の実施形態による架橋核酸（BNA）に関し、3'位の炭素原子上のOR₂置換基及び5'位の炭素原子上のOR₁置換基において、R₁及びR₂は、典型的には水素原子であるが、互いに同一であっても異なってもよく、さらにまた、核酸合成のためのヒドロキシ基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基によって保護されているリン酸基、又は-P(R₄)R₅で表される基（R₄及びR₅は、互いに同一であっても異なってもよく、それぞれヒドロキシ基、核酸合成のための保護基によって保護されているヒドロキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基によって保護されているメルカプト基、アミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルコキシ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキルチオ基、1つ～6つの炭素原子を有するシアノアルコキシ基、又は1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基で置換されているアミノ基を表す）であってもよい。

[0082] このような架橋核酸（BNA）としては、特に制限はない。公知公用の架橋核酸（BNA）としては、例えば、メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA（LNA（Locked Nucleic Acid（登録商標））、2',4'-BNAとしても知られている）、α-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA若しくはβ-D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2')BNA（ENAとしても知られている）、β-D-チオ(4'-CH₂-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R₃)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH₂-N(R₃)-O-2')BNA（2',4'-BNANCとしても知られている）、2',4'-BNA^{ccc}、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH₃)-O-2')BNA（cEt BNAとしても知られている）、(4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2')BNA（cMOE BNAとしても知られている）、アミドBNA(4'-C(O)-N(R)-2')BNA（R=H又はMe）（AmNAとしても知られている）が挙げられる。

[0083] 本開示において、メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')架橋を有する架橋ヌクレオ

シド（二環式ヌクレオシド）を、「LNAヌクレオシド」と称することもある。

[0084] 修飾糖の調製方法は、公知公用の方法で調製することができる。

修飾糖ヌクレオシドにおいて、核酸塩基部分（天然、修飾、又はそれらの組み合わせ）は、標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持されていてもよい。

[0085] 第1核酸鎖において、糖修飾ヌクレオシドは、架橋ヌクレオシドを含むことが好ましく、LNAヌクレオシドを含むことがより好ましい。

[0086] 架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基を含んでいてもよい。

本開示において「修飾核酸塩基」又は「修飾塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシル以外のあらゆる核酸塩基を意味する。「非修飾核酸塩基」又は「非修飾塩基」（天然核酸塩基）とは、プリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）を意味する。

修飾核酸塩基の例としては、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシン又はN4-メチルシトシン；5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル又は5-ヨードウラシル；2-チオチミン；N6-メチルアデニン又は8-ブロモアデニン；並びにN2-メチルグアニン又は8-ブロモグアニン等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0087] （ギャップ領域）

ギャップ領域は、3'ウイング領域と5'ウイング領域との間に位置し、天然ヌクレオシドを4個以上連続して含む。

ギャップ領域は、天然ヌクレオシドを4個以上連続して含んでいれば、特に制限はなく、非天然ヌクレオシドを含んでいてもよく、例えば、2'-O-MOE基を含むヌクレオシドを含んでいてもよい。

なお、非天然ヌクレオシドの具体例は、ウイング領域における非天然ヌクレオシドと同義であり、好ましい範囲も同様である。

ギャップ領域の塩基長としては、4塩基～20塩基であることが好ましく、4塩基～15塩基であることがより好ましく、4塩基～10塩基であることが更に好ましい。

[0088] ギャップ領域において天然ヌクレオシドとしては、デオキシリボヌクレオシド又はリボヌクレオシドであることが好ましく、デオキシリボヌクレオシドであることがより好ましい。

[0089] アンチセンス効果の観点から、第1核酸鎖の塩基長が、8塩基～30塩基であることが好ましく、8塩基～20塩基であることがより好ましく、10塩基～15塩基であることが更に好ましい。

[0090] 第1核酸鎖は、ペプチド核酸を更に含んでいてもよい。

ペプチド核酸は、既述のヌクレオチド模倣体の1種である。

ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid、PNA)は、糖の代わりにN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合した主鎖を有するヌクレオチド模倣体である。

本開示に係る特定二本鎖核酸において、第1核酸鎖は「ミックスマー」であってもよい。

本開示において「ミックスマー」とは、天然ヌクレオシド（デオキシリボヌクレオシド及びリボヌクレオシドからなる群より選ばれる少なくとも一つを意味する）からなるセグメント並びに非天然ヌクレオシドからなるセグメントが交互に並び、セグメントの並びは周期的であっても無作為であってもよく、かつ4個以上連続するデオキシリボヌクレオシド及び4個以上連続するリボヌクレオシドを有さない核酸鎖を指す。

非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドであり、天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを、「BNA/DNAミックスマー」と称する場合がある。非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドであり、天然ヌクレオシドがリボヌクレオシドであるミックスマーを、「BNA/RNAミックスマー」と称する場合がある。

ミックスマーは、必ずしも2種のヌクレオシド（ここでいう2種とは、G

、C等の種類ではなく、BNA、DNA等の種類を指す) だけを含むように制限される必要はない。ミックスマーは、任意の種類数のヌクレオシドを含んでもよく、各種類のヌクレオシドは天然のヌクレオシドであっても、修飾ヌクレオシドであっても、ヌクレオシド模倣体であってもよい。例えば、ミックスマーは、架橋ヌクレオシド（例えば、LNAヌクレオシド）により互いに分離されたデオキシリボヌクレオシドセグメントを有していてもよく、それぞれのデオキシリボヌクレオシドセグメントは1個のデオキシリボヌクレオシドから形成されていても、2個の連続したデオキシリボヌクレオシドから形成されていてもよい。架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基（例えば、5-メチルシトシン）を含んでもよい。

[0091] <第2核酸鎖>

本開示に係る特定二本鎖核酸において、第2核酸鎖は、上記第1核酸鎖と相補的な塩基配列である相補的領域を有する。そのため、特定二本鎖核酸において上記第1核酸鎖は、第2核酸鎖中の相補的領域にアニールしている。

第2核酸鎖中の相補的領域は、天然ヌクレオシドであってもよく、非天然ヌクレオシドであってもよく、これらを両方含んでもよい。

相補的領域は、第2核酸鎖の全長にわたっていてもよいが、後述するオーバーハング領域が存在する場合などは、第2核酸鎖の長さの一部の領域に該当する。本開示において、「第1の核酸鎖と相補的な塩基配列を有する」とは、このように、第1の核酸鎖と相補的な塩基配列以外の配列がさらに存在する場合をも含んでいる。

[0092] 優れたアンチセンス効果が得られる観点から、本開示に係る特定二本鎖核酸において、第1核酸鎖が上記ウイング領域とギャップ領域とから構成され、ギャップ領域がデオキシリボヌクレオシドを含む場合、第2核酸鎖中の相補的領域は、リボヌクレオシドを含むことが好ましく、リボヌクレオシドが連続して並んだ構造を含むことがより好ましく、更に好ましくはリボヌクレオシドが3個以上連続して、特に好ましくは4個連続して又は5個連続して並んだ構造を含むことが好ましい。

第2核酸鎖の相補的領域が、このような、リボヌクレオシドが連続して並んだ構造を有する場合、第1核酸鎖のDNAギャップ領域と二本鎖を形成し得る。この二本鎖は、RNase Hによって認識され、RNase Hによる第2核酸鎖の切断を生じさせることができる。

[0093] 第2核酸鎖中の相補的領域は、リボヌクレオシドが2個以上連続して並んだ構造を含まないものであってもよい。上述したように、本開示において「連続した」ヌクレオシドとは、必ずしも同一のヌクレオシドが連続していなくても、当該ヌクレオシドについての規定を満たす限りは異なるヌクレオシド（例えば塩基が異なるヌクレオシド）が連続していてもよい。

[0094] また、本開示に係る特定二本鎖核酸は、第1核酸鎖と、第1核酸鎖と相補的な塩基配列である相補的領域を有する第2核酸鎖と、が結合した特定二本鎖核酸であって、第1核酸鎖は、デオキシリボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造を含むギャップ領域と、ギャップ領域の5'末端から連続して架橋ヌクレオシドが並んだ構造を含む5'側ウイング領域及びギャップ領域の3'末端から連続して架橋ヌクレオシドが並んだ構造を含む3'側ウイング領域のうち少なくとも一方と、を有してもよい。また、第2核酸鎖は、リボヌクレオシドを含むことが好ましい。

[0095] 第2核酸鎖がRNAである場合、前記第1核酸鎖の非天然ヌクレオチドを含む領域に対して相補的な領域が非天然ヌクレオチドにより構成されていてもよい。前記第2の核酸鎖における前記非天然ヌクレオチドは、2'-O-メチル化及び／又はホスホロチオエート化を有する非天然ヌクレオチドであってもよい。

[0096] (機能性分子)

標的部位への輸送性に優れる観点から、第2核酸鎖は、ポリヌクレオシドと結合した少なくとも1つの機能性分子を更に含んでもよい。

機能性分子は、第2核酸鎖の5'末端に連結されていてよく、又は3'末端に連結されていてよく、ポリヌクレオシドの内部のヌクレオシドに連結されていてよい。

なお、ここで「ポリヌクレオシドと結合した」、「ヌクレオシドと結合した」といった表現は、ヌクレオシドに結合したリン酸基、ホスホロチオエート構造などに結合している場合も含む。

[0097] 第2核酸鎖において、機能性分子の数としては、特に制限はなく、2つ以上であってもよい。第2核酸鎖が2つ以上の機能性分子を含む場合、2つ以上の機能性分子の配置は特に制限されず、2つ以上の機能性分子はポリヌクレオシドの別々の位置に連結されていてもよく、ポリヌクレオシドの1つの位置に一群として連結されていてもよい。

[0098] 第2核酸鎖と機能性分子との間の結合は、直結していてもよいし、別の物質により間接的に結合していてもよい。

本開示の一実施形態においては、機能性分子は、共有結合、イオン性結合、水素結合等を介して第2核酸鎖に直接結合していることが好ましく、より安定した結合が得られる観点から、共有結合を介して第2核酸鎖に直接結合していることがより好ましい。

[0099] 機能性分子は、切断可能なリンカー部分（連結基）を介して第2核酸鎖に結合されていてもよく、例えば、機能性分子は、ジスルフィド結合を介して連結されていてもよい。

[0100] 機能性分子は、特定二本鎖核酸、及び、機能性分子が結合している第2の核酸鎖からなる群より選ばれる少なくとも一方に、標識機能、精製機能、及び、標的送達機能のうち1つ以上を付与する部分であれば、機能性分子の構造について特に制限されない。

[0101] 第2核酸鎖において機能性分子は、標識機能、精製機能、及び、標的送達機能からなる群より選ばれる少なくとも1つの機能を有することが好ましい。

[0102] 標識機能を与える部分の例としては、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどの化合物が挙げられる。精製機能を与える部分の例としては、ビオチン、アビジン、Hisタグペプチド、GSTタグペプチド、FLAGタグペプチドなどの化合物が挙げられる。

- [0103] 本開示の一実施形態において、機能性分子は、細胞又は細胞核への輸送を増強する役割を果たす。例えば、特定のペプチドタグは、オリゴヌクレオシドにコンジュゲートされると、オリゴヌクレオシドの細胞取り込みを増強することが示されている。例としては、HaiFang Yinら、*Human Molecular Genetics*, Vol. 17(24), 3909-3918 (2008年)及びその参考文献中に開示されるアルギニンリッチペプチドP O O 7及びBペプチドが挙げられる。核内輸送は、m 3 G - C A P (Pedro M. D. Morenoら、*Nucleic Acids Res.*, Vol. 37, 1925-1935 (2009年)を参照)などの部分をオリゴヌクレオシドにコンジュゲートすることによって増強することができる。
- [0104] さらに、本開示に係る特定二本鎖核酸（又は第1核酸鎖）を体内の標的部位又は標的領域に高特異性及び高効率で送達し、これにより関連核酸による標的転写産物（例えば、標的遺伝子）の発現を効果的に抑制するという観点から、本開示の一実施形態の特定二本鎖核酸を体内の「標的部位」に送達する活性を有する分子が、機能性分子として第2核酸鎖に結合していることが好ましい。
- [0105] 機能性分子が「標的送達機能」を有する場合、本開示に係る特定二本鎖核酸を、例えば、肝臓などに高特異性及び高効率で送達し得るという観点から、脂質、抗体、ペプチド及びタンパク質から選択される少なくとも1種の分子であることが好ましい。
- [0106] 脂質の例としては、コレステロール及び脂肪酸などの脂質（例えば、ビタミンE（トコフェロール、トコトリエノール）、ビタミンA、及びビタミンD）；ビタミンKなどの脂溶性ビタミン（例えば、アシルカルニチン）；アシル-CoAなどの中間代謝産物；糖脂質、グリセリド、及びそれらの誘導体が挙げられる。
- これらの中でも、より高い安全性を有するという観点から、脂質としては、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選択される少なくとも1種であることが好ましい。
- [0107] さらに、本開示に係る特定二本鎖核酸を特異的、かつ、高い効率で脳に送

達し得るという観点から、機能性分子が、コレステロール又はその類縁体、トコフェロール又はその類縁体、糖（例えば、グルコース及びスクロース）であってもよい。

[0108] 第2核酸鎖は、前記相補的領域の5'末端及び3'末端からなる群より選ばれる少なくとも一方の末端に位置するオーバーハング領域を、更に含んでもよい。オーバーハング領域は、好ましくは一本鎖領域である。

[0109] 本開示において「オーバーハング領域」とは、第1核酸鎖と第2核酸鎖とがアニールして二本鎖核酸構造を形成した場合、第2核酸鎖の5'末端が第1核酸鎖の3'末端を超えて伸長した第2核酸鎖中のヌクレオシド領域、及び、第2核酸鎖の3'末端が第1核酸鎖の5'末端を超えて伸長した第2核酸鎖中のヌクレオシド領域からなる群より選ばれる少なくとも一つの領域を示す。すなわち、オーバーハング領域は、二本鎖核酸構造から突出する、第2核酸鎖中のヌクレオシド領域であり、上記相補的領域に隣接する領域である。

[0110] 第2核酸鎖において、オーバーハング領域の位置は、特に制限はなく、相補的領域の5'末端側のみに存在してもよく、3'末端側のみに存在してもよく、相補的領域の5'末端側及び3'末端側の両方に存在してもよい。

[0111] 各オーバーハング領域の塩基長は、1塩基長以上、好ましくは9塩基長以上である。各オーバーハング領域の塩基長は、例えば、1～30塩基長であり、好ましくは9～17塩基長であり、さらに好ましくは11～15塩基長である。

第2核酸鎖に2つのオーバーハング領域が存在する場合、それぞれのオーバーハング領域の長さは互いに同じであってもよく、異なってもよい。

[0112] 第2核酸鎖の塩基長は特に制限されないが、合成コストや送達効率の観点から、40塩基長以下であることが好ましく、より好ましくは18～30塩基長であり、さらに好ましくは21～28塩基長である。

なお、第2核酸鎖がオーバーハング領域を含む場合、第2核酸鎖の塩基長

は、相補的領域及び全てのオーバーハング領域の合計の塩基長を意味する。

[0113] オーバーハング領域は、天然ヌクレオシドから形成されてもよく、非天然ヌクレオシドから形成されてもよく、天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの両方から形成されていてもよい。

[0114] 第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、治療用オリゴヌクレオシド領域ではないことが好ましい。

治療用オリゴヌクレオシド領域は、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオシド、マイクロRNA阻害薬 (antimiR)、スプライススイッチングオリゴヌクレオシド、siRNA、マイクロRNA、又はプレーマイクロRNAなどとしての機能を発揮する領域である。

第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、上記のような治療用オリゴヌクレオシド領域を有しないので、細胞内の転写産物に実質的にハイブリダイズする能力を持たず、遺伝子発現には影響を及ぼしにくい。

[0115] オーバーハング領域に結合していない相補的領域の末端（以下、「相補的領域の遊離末端」とも称する場合がある。）が存在する場合、該末端から少なくとも1ヌクレオシド（具体的には例えば1～3ヌクレオシド）は、糖修飾ヌクレオシドであることが好ましい。

オーバーハング領域に結合している相補的領域の末端についても、該末端から少なくとも1ヌクレオシド（例えば、少なくとも2ヌクレオシド又は少なくとも3ヌクレオシド、より具体的には1～3ヌクレオシド）は、修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0116] オーバーハング領域は、糖修飾ヌクレオシドを含み、かつ、塩基長が9～12塩基長である領域であってもよい。オーバーハング領域は、糖修飾ヌクレオシドを含まず、かつ、前記オーバーハング領域の塩基長が9～17塩基長である領域であってもよい。

[0117] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖は、それぞれ、例えば、標的転写産物の塩基配列（又は、一部の例においては、標的遺伝子の塩基配列）の情報に基づいて核酸のそれぞれの塩基配列を設計し、市販の自動核酸合成装置（アプライドバ

イオシステムズ社 (Applied Biosystems, Inc.) の製品、ベックマン・コー
ルター社 (Beckman Coulter, Inc.) の製品など) を使用することによって核
酸鎖を合成し、その後、結果として得られたオリゴヌクレオシドを逆相カ
ラムなどを使用して精製することにより製造することができる。

この方法で製造した核酸鎖同士を適切な緩衝溶液中で混合し、約 90℃～
98℃で数分間 (例えば、5 分間) 変性させ、その後核酸を約 30℃～70
℃で約 1 時間～8 時間アニールし、本開示に係る特定二本鎖核酸を製造す
ることができる。ただし、特定二本鎖核酸の作製は、上記の時間及び温度プロ
トコルに限定されない。

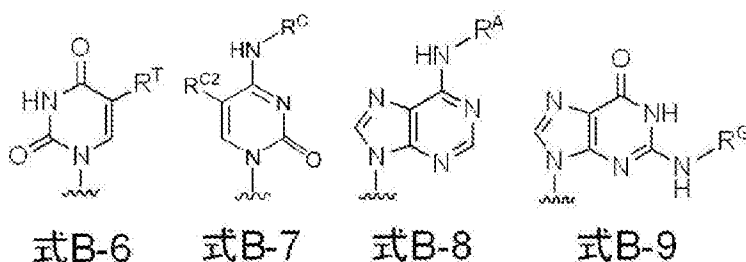
二本鎖のアニールリングを促進するのに適した条件は、当技術分野において
周知である。さらに、機能性分子が結合している核酸複合体は、機能性分
子が予め結合されたヌクレオシドを使用し、上記の合成、精製及びアニー
リングを実施することによって製造することができる。

機能性分子をヌクレオシドに連結するための方法は、公知公用の方法であ
ってよい。特定二本鎖核酸を構成する核酸鎖は、塩基配列並びに修飾部位若
しくは種類を指定して合成してもよい。

[0118] 本開示に係る特定二本鎖核酸は、生体内に効率的に送達され、アンチセン
ス効果によって標的遺伝子の発現又は標的転写産物のレベルを抑制するこ
とができる。したがって、本開示に係る特定二本鎖核酸は、標的遺伝子の発現
又は標的転写産物のレベルの抑制に使用するためのものであってよい。

[0119] 本開示において、核酸医薬に含まれる核酸中の核酸塩基部分の構造の例を
以下に示す。

[0120] [化15]



- [0121] 式B-6～式B-9中、 R^T は水素原子、アルキル基、アルケニル基、又はアルキニル基を表し、 R^C 、 R^A 及び R^G は、水素原子を表し、 R^{C2} は水素原子またはアルキル基を表し、波線部は他の構造との結合部位を表す。
- [0122] 核酸医薬におけるヌクレオシド間を連結する結合としては、特に制限はなく、例えば、ホスホロチオエート結合、ホスホトリエステル結合、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、及びホスホロアミデート結合が挙げられる。
- [0123] ヌクレアーゼ耐性の観点から、第1核酸鎖及び前記第2核酸鎖からなる群より選ばれる少なくとも一つの核酸鎖において、ヌクレオシド間を連結する結合として、ホスホロチオエート結合が含まれることが好ましい。
- 特に、耐ヌクレアーゼ活性の観点から、デオキシリボヌクレオシド間の結合は、ホスホロチオエート結合であることが好ましい。
- [0124] 本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤は、上記で説明したような核酸医薬に結合することにより、核酸医薬のクラスエフェクトとしての副作用の少なくとも1つ、例えばAPTの増大、血小板減少、脳梗塞、鎮静効果等の少なくとも1つを軽減する。このような効果は、本開示において初めて見出された効果である。また、驚くべきことに、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤を用いても、核酸医薬の有効性は依然として有効な範囲にある。つまり、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤は、単純に核酸医薬の他分子との相互作用を防止することで副作用を軽減しているわけではなく、核酸医薬が効能を発揮できる程度に核酸医薬と目的分子との相互作用は許容しつつ、副作用を生じさせるような他分子との相互作用を抑制していると考えられる。
- [0125] 本開示に係るオリゴペプチドの使用量は特に限定されないが、核酸医薬の副作用を軽減しつつ核酸医薬の効果を十分に発揮させる（つまり、核酸医薬が対象とする特定疾患を治療又は予防する）観点からは、核酸医薬が10～50塩基長の核酸を含む場合、当該核酸1モルに対して本開示に係るオリゴペプチド0.5～20.0モルの比で使用することが好ましく、0.6～10.0モルの比で使用することがより好ましい。本開示に係るオリゴペプチ

ドは、前記核酸 1 モルに対して 0.8～5.0 モルの比で使用してもよく、1.0～3.0 モルの比で使用してもよく、1.2～2.7 モルの比で使用してもよく、1.5～2.5 モルの比で使用してもよい。より具体的には、核酸医薬が 15～25 塩基長の A 型二本鎖核酸構造含有核酸を含む場合、当該 A 型二本鎖核酸構造含有核酸 1 モルに対して 0.5～10.0 モルの比で使用するものが好ましく、0.6～5.0 モルの比で使用するものがより好ましく、0.8～2.5 モルの比で使用するものがさらに好ましく、1.0～2.0 モルの比で使用するものがいっそう好ましい。あるいは、核酸医薬が 15～25 塩基長の A 型二本鎖核酸構造含有核酸を含む場合、本開示に係るオリゴペプチドを当該 A 型二本鎖核酸構造含有核酸 1 モルに対して 1.2～1.7 モルの比で使用してもよく、1.5～2.5 モルの比で使用してもよい。核酸医薬の副作用をより効果的に軽減する観点から、本開示に係るオリゴペプチドは、式 (1) のアミノ酸残基を 6 個以上含むことが好ましく、式 (1) のアミノ酸残基を例えば 5～20 個、6～15 個、8～14 個、又は 10～12 個含むものであってもよい。これらの例としては、後述の D a b 8、D a b 10、D a b 12 等が挙げられる。

[0126] 本開示に係るオリゴペプチドにおける特定オリゴペプチド領域中の式 (1) のアミノ酸残基の数を S とし、核酸医薬に含まれる核酸の塩基長を T とした場合、当該核酸 1 モルに対して本開示に係るオリゴペプチドの量 (モル数) は、 $0.4 \times (T/S)$ 以上となる量であることが好ましく、 $0.6 \times (T/S)$ 以上となる量であることがより好ましく、 $0.8 \times (T/S)$ 以上となる量であることがさらに好ましい。当該核酸 1 モルに対して本開示に係るオリゴペプチドの量 (モル数) は、 $0.2 \times (T/S) \sim 10.0 \times (T/S)$ としてもよく、 $0.3 \times (T/S) \sim 5.0 \times (T/S)$ としてもよく、 $0.4 \times (T/S) \sim 3.0 \times (T/S)$ としてもよく、 $0.4 \times (T/S) \sim 2.0 \times (T/S)$ としてもよく、 $0.4 \times (T/S) \sim 1.5 \times (T/S)$ としてもよく、 $0.6 \times (T/S) \sim 1.2 \times (T/S)$ としてもよい。なお、本開示において、二本鎖核酸にオーバーハング部分が存在す

る場合、当該核酸の塩基長とは、オーバーハング部分を含まない長さを意味する。例えば、核酸医薬に含まれる核酸が16merであり、オリゴペプチドがDab8である場合、 T/S の値は $16/8=2$ となる。また、核酸医薬に含まれる核酸が16merであり、オリゴペプチドがDab12である場合、 T/S の値は $16/12=約1.33$ となる。

[0127] 本開示に係るオリゴペプチドを核酸医薬中の核酸に複合させるときには、該オリゴペプチドを該核酸と緩衝液中で共存させればよい。リン酸緩衝液を用いることも可能であるが、二本鎖核酸のリン酸基との相互作用を考慮して、二価の陰イオン、特にリン酸イオンを含有しない緩衝液を用いることが、凝集現象を回避するために好適である。好適な緩衝液としては、例えば、Tris緩衝液、HEPES緩衝液、カコジル酸緩衝液等が例示できる。

[0128] 本開示に係るオリゴペプチドを核酸医薬と共に用いる場合、オリゴペプチド及び核酸医薬の溶媒中での溶解度を向上させるための溶解度向上剤をさらに用いてもよい。溶解度向上剤を用いることで、例えば注射液等の溶液中に溶解するオリゴペプチド及び核酸医薬の量を増やすことができ、核酸医薬の効能をより効率的に発揮することができる傾向にある。溶解度向上剤としては例えばポリエチレングリコール（PEG）、グリセロールが挙げられ、そのより具体的な例はPEG200である。溶解度向上剤の使用量はオリゴペプチドの量及び核酸医薬の量に応じて適切に設定すればよいが、例えば、オリゴペプチドの及び核酸医薬を含む注射液等の溶液の全量に対して1質量%～50質量%としてもよく、5質量%～20質量%としてもよい。

[0129] 本開示はまた、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤及び核酸医薬を含む医薬組成物も提供する。該医薬組成物は、核酸医薬によるクラスエフェクトとしての副作用を抑制しつつ、核酸医薬の効能を発揮することができる。

本開示に係る医薬組成物は、任意に、薬学的に許容可能な担体をさらに含んでもよい。また、上記の溶解度向上剤、例えばPEG及びグリセロールのうち少なくとも1つをさらに含んでもよい。溶解度向上剤の使用量はオリゴペプチドの量及び核酸医薬の量に応じて適切に設定すればよいが、例え

ば、医薬組成物の全量に対して1質量%～50質量%としてもよく、5質量%～20質量%としてもよい。

[0130] 本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤を用いることで、核酸医薬の副作用を軽減することができる。このことは、核酸医薬の用法及び用量の選択における自由度を拡げる。具体的にいうと、核酸医薬はそのクラスエフェクトとして上述したような副作用を生じるため、用量を低く抑えなければならず、あるいは血中濃度の上昇を抑えるために筋肉注射、皮下注射、点滴等の投与方法を採らなければならなかった。言い換えると、大用量の急速静注のような投与方法を採ることはできなかった。この結果、投与は患者にとって簡便なものではなく、アドヒアランスの低下といった問題も生じ得た。

[0131] しかし、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤を用いることで、核酸医薬の副作用を軽減することができるため、大用量の投与が可能になり（つまり、用量上の制約が緩和され）、また、急速静注の採用も可能となるため用法上の制約も緩和される。これにより、必要量の核酸医薬を患者にとって簡便な方法で投与することができるようになった。

[0132] 本開示に係る医薬組成物は、公知の製薬法により製剤化することができる。例えば、医薬組成物は、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、微粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、解膠剤(peptizer)、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、コーティング剤、軟膏、硬膏剤(plaster)、パップ剤(cataplastm)、経皮剤、ローション剤、吸入剤、エアロゾル剤、点眼剤、注射剤及び坐剤の形態で、経口的に又は非経口的に使用することができる。

[0133] これらの製剤の製剤化に関して、薬学的に許容可能な担体又は食品及び飲料品として許容可能な担体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物性油、溶媒、基剤、乳化剤、懸濁化剤、界面活性剤、pH調整剤、安定化剤、香料、香料、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、鎮静剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、増粘剤、矯味剤、溶解助剤、及び他の添加剤を適切に組み込むことができる。

[0134] 本開示に係る医薬組成物の投与方法は特に限定されず、例えば、経口投与又は非経口投与、より具体的には、静脈内投与、脳室内投与、髄腔内投与、皮下投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮内投与、気管支内投与、直腸投与、眼内投与、経鼻投与及び筋肉内投与、並びに輸血による投与が挙げられる。本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤による効果が顕著に発揮される観点からは、静脈内投与が好ましく、急速静注がより好ましい。

本開示の一実施形態において、皮下投与に用いる場合、本開示に係る特定二本鎖核酸は、ビタミンE（トコフェロール、トコトリエノール）及びコレステロールなどの脂質を結合していないものであってもよい。

[0135] 本開示に係る医薬組成物の使用又は方法は、特に制限はなく、例えば、細胞に投与して、細胞内の転写産物の機能を改変する使用又は方法であってもよく、細胞内のタンパク質の発現レベルを変化させる使用又は方法であってもよく、細胞内のタンパク質構造を変化させる使用又は方法であってもよい。

[0136] 本開示に係る医薬組成物を投与する細胞の種類は特に限定されない。細胞の種類としては、免疫細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞等が挙げられる。

[0137] 本開示に係る医薬組成物は、被験体としてヒトを含む動物に使用することができる。ヒトを除く動物については、特に限定はなく、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物などが一部の実施形態の被験体となり得る。

[0138] 本開示に係る医薬組成物が投与又は摂取される場合、投与量又は摂取量は、被験体の年齢、体重、症状及び健康状態、組成物の種類（医薬品、食品及び飲料品等）などに従って適切に選択することができる。

本開示に係る医薬組成物の用量は、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤により大用量の核酸医薬の投与も可能となる。このため、本開示に係る医薬組成物の単回投与量（投与を受ける対象の体重1kgあたり）は、核酸の量として、例えば、0.01mg/kg～200mg/kg、0.1mg/kg～70mg/kg又は0.2mg/kg～50mg/kgであってもよい。

投与経路については上述のとおりであり、例えば静注を採用できる。投与頻度は、例えば、1日1回～4週間に1回程度であり、例えば1週間に1回である。

なお、本開示に係る医薬組成物中における本開示に係るオリゴペプチドの量については、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤の説明中における本開示に係るオリゴペプチドの量と同様である。

[0139] 本開示に係る医薬組成物は、また、例えば、遺伝子変異、又は標的遺伝子の発現の増加、に関連する疾患（例えば、代謝疾患、腫瘍、及び感染症等）を治療又は予防するために用いてもよい。

[0140] 本開示に係る医薬組成物は、中枢神経系疾患を治療又は予防するために脳室内又は髄腔内に投与するための医薬組成物であってよい。

一実施形態において、脳室内投与又は髄腔内投与に用いる特定二本鎖核酸は、ビタミンE（トコフェロール、トコトリエノール）及びコレステロールなどの脂質を結合していないものであってもよい。

[0141] 本開示に係る医薬組成物を細胞に投与して、中枢神経系疾患を治療する方法であってよい。

中枢神経系疾患としては、例えば、ハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脳腫瘍などが挙げられるが、これらに限定はされない。

[0142] 本開示に係る医薬組成物は、がんや各種疾患の治療薬や、HIVやHCVの抗ウイルス薬として用いることが可能である。例を挙げれば、FAK遺伝子を標的遺伝子とした腎細胞がん治療薬、VEGF遺伝子をターゲット遺伝子とした加齢性黄斑変性症（AMD）と糖尿病による黄斑浮腫の治療薬、VEGFR1遺伝子やRTP801遺伝子をターゲット遺伝子とした加齢性黄斑変性症（AMD）治療薬、プロテインキナーゼ $\text{N}\beta$ をターゲットとした膵臓がん治療薬、VEGF遺伝子とキネシン紡錘体タンパク質をターゲットとした肝がん治療薬、リボヌクレオチドレダクターゼM2サブユニットをターゲットとした肝がん治療薬、HBVゲノムをターゲットとしたB型肝炎治療

薬、HCVゲノムをターゲットとしたC型肝炎治療薬、RSVゲノムをターゲットとしたRSV治療薬、インフルエンザウイルスゲノムをターゲットとしたインフルエンザ治療薬、Th2サイトカインをターゲットとした喘息治療薬、PCSK9遺伝子をターゲットとした高コレステロール血症治療薬、HIV-1ゲノムをターゲットにしたAIDS治療薬、hair growth geneをターゲットとした脱毛治療薬、Huntingtin又は α -synucleinをターゲットとしたパーキンソン病治療薬、スーパーオキシドムスターゼをターゲットとした筋萎縮性側索硬化症（ALS）治療薬、TNF- α をターゲットとする炎症性疾患治療薬、等が挙げられる。

[0143] 本開示によれば、本開示に係る医薬組成物の投与を必要とする対象に、本開示に係る医薬組成物を治療有効量又は予防有効量投与することを含む、疾患の治療又は予防方法も提供される。該方法においては、核酸医薬のクラスエフェクトとしての副作用を軽減しつつ、治療に適切な用量、用法を高い自由度で選択することができる。

[0144] また、本開示によれば、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤を核酸医薬に添加することを含む、核酸医薬の副作用惹起性の軽減方法、及び核酸医薬の副作用惹起性を軽減することにおける本開示に係るオリゴペプチドの使用も提供される。上述したように、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤が共在することにより、核酸医薬のクラスエフェクトとしての副作用が顕著に軽減される。

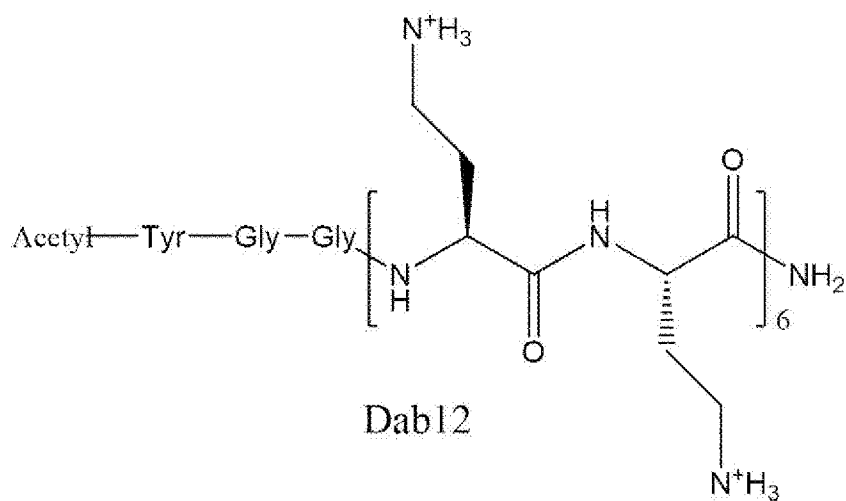
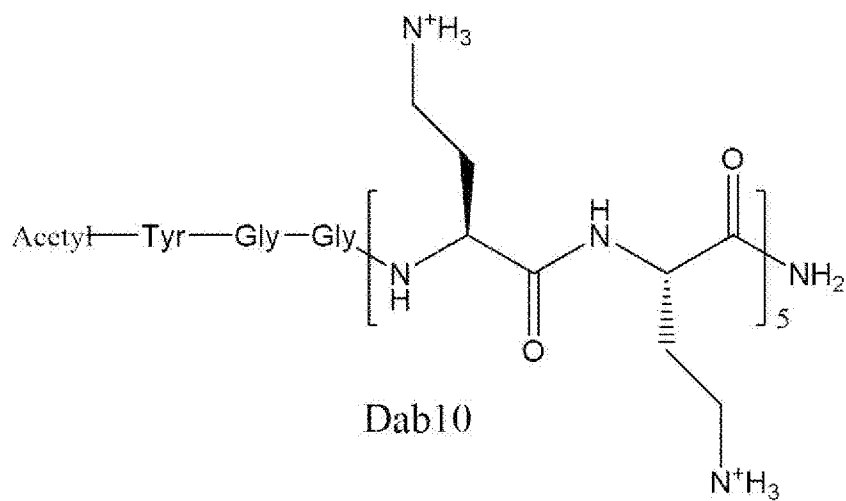
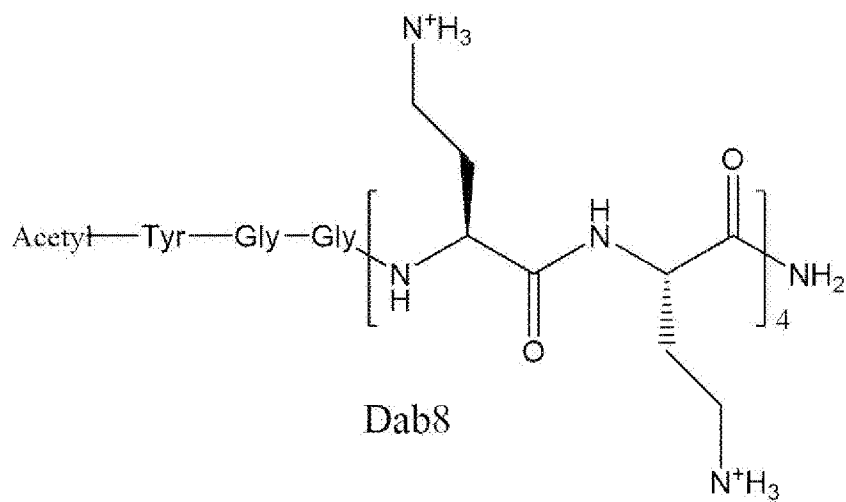
実施例

[0145] 以下、実施例を用いて実施形態をさらに具体的に説明する。但し、実施形態はこれら実施例に限定されるものではない。

[0146] 実施例1では、アンチセンスオリゴヌクレオシドとコレステロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体と、核酸医薬副作用軽減剤としてのDab8、Dab10又はDab12のそれぞれとを混合した後に、当該二本鎖核酸複合体をマウスに単回投与し、マウスの脳及び肝臓の様々な部位におけるアンチセンス効果並びにAPT（活性化部分トロンボプラスチン時間）

、血小板数及び脳病理を評価した。D a b 8、D a b 1 0 及びD a b 1 2 の構造を以下に示す。なお、これらの名称は、アミノ末端部分のアセチルチロシンーグリシンーグリシンの後の繰り返し構造についての名称を繰り返し数と共に記載したものである。

[0147]



[0148] 具体的には、長鎖ノンコーディングRNAであるmalat1を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオシドと、5'末端にコレステロールが結合し

た相補鎖とからなる二本鎖核酸剤を、それぞれの核酸医薬副作用軽減剤（D a b 8、D a b 1 0又はD a b 1 2）と混合した後に マウスに単回投与を行い、脳内におけるm a l a t 1 RNAの発現をi n v i v oで阻害する効果を評価する実験を行った。ここで、二本鎖核酸複合体：核酸医薬副作用軽減剤（D a b 8、D a b 1 0又はD a b 1 2）の量比は、モル比で1：1又は1：2として実験を行った。活性化部分トロンボプラスチン時間（a c t i v a t e d p a r t i a l t h r o m b o p l a s t i n t i m e ; a P T T）、血小板数、脳病理及び投与直後の鎮静効果の評価も併せて行った。具体的な実験内容は、以下に説明する。

[0149] （二本鎖核酸複合体の調製）

m a l a t 1 ノンコーディングRNAを標的とする1 6 m e r の一本鎖L N A / D N A ギャップマー（A S O（m M a l a t 1）を第1鎖とし、5'末端にコレステロールが結合したコレステロール結合型相補鎖RNA（C h o l - c R N A（m M a l a t 1））を第2鎖として、第1鎖と第2鎖とをアニールさせることにより、二本鎖核酸複合体を調製した。前記L N A / D N A ギャップマーは、5'末端に位置する3個のL N A ヌクレオシド、3'末端に位置する3個のL N A ヌクレオシド、及びそれらの間に位置する1 0 個のD N A ヌクレオシドを含むものであった。このL N A / D N A ギャップマーは、マウスのm a l a t 1 ノンコーディングRNA（G e n B a n k アクセッション番号N R _ 0 0 2 8 4 7）の1 3 1 6 ~ 1 3 3 1 位に相補的な塩基配列を有していた。第1鎖と第2鎖とのアニーリングは、第1鎖と第2鎖とをそれぞれP B Sで溶解後、等モル量で混合し、得られた溶液を9 5 °Cで5分間加熱し、その後3 7 °Cに冷却して1時間保持することによって行った。調製した二本鎖核酸複合体をC h o l - H D Oと称する。核酸医薬副作用軽減剤（D a b 8、D a b 1 0又はD a b 1 2）はいずれもP B Sで最終濃度5 m Mになるように溶解した。

[0150] 実施例1で用いた第1鎖及び第2鎖の名称及び配列を以下に示す。

[0151]

[化16]

・第1鎖: ASO (mMala1a11) 5' - C*I*A*g*t*t*c*a*c*t*g
*a*a*I*G*C-3' (配列番号1)。

[0152] 第1鎖において、下線付の大文字はLNAを表し、ただし「C」は5-メチルシトシンLNAを表し、小文字はDNAを表し、星印はヌクレオシド同士を連結するホスホロチオエート結合を表す。

[0153] [化17]

・第2鎖: Chol-cRNA (mMala1a11) 5' - Chol-g*c*u*U
UCAGUGAAC*u*u*u-3' (配列番号2)。

[0154] 第2鎖において、大文字はRNAを表し、下線付きの小文字は2'-O-メチル化RNAを表し、星印はヌクレオシド同士を連結するホスホロチオエート結合を表し、Cholは、コレステロールを表す。

[0155] (i n v i v o 実験)

実験に使用したマウスは、体重20gの6～7週齢の雄のC57BL/6マウスであった。マウスを使用する実験は、nの値が明記されている場合を除き、全て、n=4で実施した。上記の二本鎖核酸複合体の溶液（二本鎖核酸複合体の濃度は800 μM）と核酸医薬副作用軽減剤（Dab8、Dab10又はDab12）の溶液とを、二本鎖核酸複合体と核酸医薬副作用軽減剤との量比が1:1のモル比又は1:2のモル比（二本鎖核酸複合体:核酸医薬副作用軽減剤）となるように混合して、混合液を30分間室温でインキュベートした。インキュベート後に、混合液をマウスに尾静脈を通じてChol-HDOの投与量が50mg/kgとなる量で静脈内注射した（単回投与）。さらにまた、対照群として、PBS溶液のみを注射したマウス、及び上記Chol-HDOの溶液のみを注射したマウスも作製した。またChol-HDOと核酸医薬副作用軽減剤（Dab8、Dab10又はDab12）の混合液の溶解度を上げるために、最終濃度10質量%になるようにPEG200（Sigma-Aldrich製）を加えた群も作製した。

[0156] 実験において、それぞれのマウス群に対する投与の内容は以下のとおりである。なお、モル比は二本鎖核酸複合体:核酸医薬副作用軽減剤を表す。

マウス群1 : P B S 溶液

マウス群2 : C h o l - H D O 溶液

マウス群3 : C h o l - H D O と D a b 8 との混合液 (モル比は 1 : 1)

マウス群4 : C h o l - H D O と D a b 8 との混合液 (モル比は 1 : 2)

マウス群5 : C h o l - H D O と D a b 8 との混合液 (モル比は 1 : 2) +
10 質量% P E G 200

マウス群6 : C h o l - H D O と D a b 10 との混合液 (モル比は 1 : 1)

マウス群7 : C h o l - H D O と D a b 10 との混合液 (モル比は 1 : 2)

マウス群8 : C h o l - H D O と D a b 10 との混合液 (モル比は 1 : 2)
+ 10 質量% P E G 200

マウス群9 : C h o l - H D O と D a b 12 との混合液 (モル比は 1 : 1)

マウス群10 : C h o l - H D O と D a b 12 との混合液 (モル比は 1 : 2)
)

マウス群11 : C h o l - H D O と D a b 12 との混合液 (モル比は 1 : 1)
) + 10 質量% P E G 200

[0157] (発現解析)

上記静脈内注射の72時間後に、P B S をマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して大脳皮質、小脳、線条体、肝臓、脊髄、及び脳幹を別々に採取した。続いて、m R N A を、各組織からハイスループット全自動核酸抽出装置 M a g N A P u r e 96 (ロシュ・ライフサイエンス社製) を使用してプロトコルに従って抽出した。抽出したm R N A から、c D N A を、逆転写反応試薬である P r i m e S c r i p t R T M a s t e r M i x (TAKARA-B i o) をプロトコルに従って使用することで合成した。さらに、定量R T - P C R を、R T - P C R 用試薬である L i g h t C y c l e r 480 P r o b e s M a s t e r (ロシュ・ライフサイエンス社製) 及びR T - P C R 装置である L i g h t C y c l e r 480 (ロシュ・ライフサイエンス社製) により実施した。定量R T - P C R において使用したプライマーは、様々な遺伝子数に対応して、サーモ・フィッシャー・サ

イエンティフィック社 (Thermo Fisher Scientific) によって設計及び製造された製品であった。増幅条件 (温度及び時間) は以下のとおりであった: 95℃で15秒、60℃で30秒、及び72℃で1秒からなるサイクルを1サイクルとし、該サイクルを40サイクル繰り返した。このようにして得られた定量RT-PCRの結果に基づいて、malat1のmRNAの発現量/内部標準遺伝子としてのACTBのmRNAの発現量の値を計算し、相対的発現レベルを得た。得られた相対的発現レベルの平均値及び標準誤差を算出した。得られた結果を図1～図3に示す。図1～図3において、「PBS」はマウス群1を表し、「Dab-」はマウス群2を表し、「Dab8 1:1」はマウス群3を表し、「Dab8 1:2」はマウス群4を表し、「Dab10 1:1」はマウス群6を表し、「Dab10 1:2」はマウス群7を表し、「Dab10 1:2+PEG」はマウス群8を表し、「Dab12 1:1+PEG」はマウス群11を表し、「Dab12 1:1」はマウス群9を表し、「Dab12 1:2」はマウス群10を表し、「Dab8 1:2+PEG」はマウス群5を表す。また、相対発現量はマウス群1の結果の場合を1とする相対値で示した。

[0158] 図1～図3に示した結果から分かるように、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤を併用した場合であっても、核酸医薬の効果は発揮されることが示された。また、核酸医薬の量に対する核酸医薬副作用軽減剤の使用量を増加させた場合に核酸医薬の効果が低減する傾向が見られる場合があったが、PEG200を使用することにより当該低減を抑えることができることが示された。

また、核酸医薬の作用は肝臓において特に顕著に認められた。

[0159] (病理解析)

採取したマウスの脳の半分をホルマリンで72時間固定し、その後、自動固定包埋装置であるエクセルシアES (Thermo fisher社製) を使用して脱水、脱脂及びパラフィン浸透を行い、パラフィンブロック作製装置であるヒストスター (Thermo fisher社製) を用いてパラ

フィンブロックを作製した。大型滑走式マイクロームであるROM-380（大和光機工業株式会社製）を用いて4 μ m厚にカットして、ヘマトキシリン・エオジン（武藤化学株式会社製）で染色後、オリンパス株式会社製の顕微鏡AX80で観察した。解析は、マウス群1～5及びマウス群9～11について行った。結果を以下の表1に示す。

[0160] [表1]

マウス群	投与内容	Dab8 (Chol-HDO O:Dab8)	Dab12 (Chol-HDO :Dab12)	10質量 PEG200	壊死が観察され た個体数
マウス群1	PBS	添加せず	添加せず	添加せず	0/4
マウス群2	Chol-HDO 50 mg/kg	添加せず	添加せず	添加せず	2/4
マウス群3	Chol-HDO 50 mg/kg	1 : 1	添加せず	添加せず	0/3
マウス群4	Chol-HDO 50 mg/kg	1 : 2	添加せず	添加せず	0/3
マウス群5	Chol-HDO 50 mg/kg	1 : 2	添加せず	添加	0/3
マウス群9	Chol-HDO 50 mg/kg	添加せず	1 : 1	添加せず	0/3
マウス群10	Chol-HDO 50 mg/kg	添加せず	1 : 2	添加せず	0/3
マウス群11	Chol-HDO 50 mg/kg	添加せず	1 : 1	添加	0/3

[0161] マウス群2の2匹について壊死が認められたが、マウス群1、3～5及びマウス群9～11については全ての個体について壊死が認められなかった。

[0162] (APTT測定)

上記静脈内注射の2時間後の時点で、各マウス（各群n=1）から採血し、自動血液凝固測定装置CA-50（シスメックス株式会社製）を用いて、活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time; aPTT）を測定した。各群におけるAPTT値が、マウス群1では21.1秒であったのに対し、マウス群2では149秒と長くなっていた。これは核酸医薬投与によるAPTT延長という副作用を表している。しかし、本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤を投与したマウス群3では86.4秒に、マウス群4では33.1秒へと顕著な改善が見られた。

[0163] (血小板数測定)

上記静脈内注射の72時間後の時点で各マウスから採血し、株式会社LSIメディエンスに血小板数の測定を委託した。結果を以下の表2及び表3に

示す。なお、表2及び表3において、血小板数は平均値で表している。表2においては、マウス群によってn＝1又は2であり、表3においてはn＝3である。また、値はマウス群2における血小板数に対する相対値で示す。表2及び表3に示すように、核酸医薬を本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤と共に用いることで、核酸医薬の副作用としての血小板数減少を顕著に軽減できることが分かる。

[0164] [表2]

マウス群	投与内容	Dab8 (Chol-HDO :Dab8)	10質量 PEG200	血小板数の相対値
マウス群2	Chol-HDO 50 mg/kg	添加せず	添加せず	1.00
マウス群4	Chol-HDO 50 mg/kg	1 : 2	添加せず	1.71

[0165] [表3]

マウス群	投与内容	Dab12 (Chol-HDO :Dab12)	10質量 PEG200	血小板数の相対値
マウス群2	Chol-HDO 50 mg/kg	添加せず	添加せず	1.00
マウス群9	Chol-HDO 50 mg/kg	1 : 1	添加せず	1.22
マウス群10	Chol-HDO 50 mg/kg	1 : 2	添加せず	1.63

[0166] (鎮静効果の観察)

上記静脈内注射の直後から1.5時間後までの間におけるマウスの行動を観察した。以下の基準に従って、評価を行った。

- A : マウスの行動に異常は無く、活発に活動している。
- B : マウスの行動がやや減少している。
- C : マウスの行動が大きく減少している。
- D : マウスはほとんど動かない。

結果を以下の表4に示す。

[0167]

[表4]

マウス群	投与内容	評価
1	PBS	A
2	Chol-HDO	D
3	Chol-HDO+Dab8 (1:1)	C
4	Chol-HDO+Dab8 (1:2)	A
5	Chol-HDO+Dab8 (1:2)+PEG200	A
6	Chol-HDO+Dab10 (1:1)	B
7	Chol-HDO+Dab10 (1:2)	A
8	Chol-HDO+Dab10 (1:2)+PEG200	A
9	Chol-HDO+Dab12 (1:1)	B
10	Chol-HDO+Dab12 (1:2)	A
11	Chol-HDO+Dab12 (1:1)+PEG200	A

[0168] 表4に示された結果から、核酸医薬を本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤と共に用いることで、核酸医薬の副作用としての鎮静効果を顕著に軽減できることが分かる。

[0169] 実施例2（さらなる *in vivo* 実験：アンチセンスオリゴヌクレオチドとコレステロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体と核酸医薬副作用軽減剤の添加によるマウス *in vivo* におけるAPT延長効果の評価）

実施例1の「二本鎖核酸複合体の調製」の項に記載したmalat1を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとコレステロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸剤に本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤を混合して、マウスに投与し、所定時間経過後に採血して核酸のAPT延長効果の改善を評価する実験を行った。実験の詳細は以下のとおりである。

[0170] 実験に使用したマウスは、体重20gの6～7週齢の雄のCrl:CD1マウスであった。上記の二本鎖核酸複合体の溶液（二本鎖核酸複合体の濃度は800 μ M）と核酸医薬副作用軽減剤（Dab8、Dab10又はDab12）の溶液とを、二本鎖核酸複合体と核酸医薬副作用軽減剤との量比が1:1のモル比又は1:2のモル比（二本鎖核酸複合体：核酸医薬副作用軽減剤）となるように混合して、混合液を30分間室温でインキュベートした。インキュベート後に、混合液をマウスに尾静脈を通じてChol-HDOの

投与量が20mg/kgとなる量で単回、静脈内注射した。さらに、対照群として、上記Chol-HDOの溶液のみを注射したマウス群も作製した。いずれの群もn=3で実験を行った。

[0171] 実験において、それぞれのマウス群に対する投与の内容は以下のとおりである。なお、モル比は二本鎖核酸複合体：核酸医薬副作用軽減剤を表す。

マウス群1：Chol-HDO溶液

マウス群2：Chol-HDOとDab8との混合液（モル比は1：1）

マウス群3：Chol-HDOとDab8との混合液（モル比は1：2）

マウス群4：Chol-HDOとDab10との混合液（モル比は1：1）

マウス群5：Chol-HDOとDab10との混合液（モル比は1：2）

マウス群6：Chol-HDOとDab12との混合液（モル比は1：1）

マウス群7：Chol-HDOとDab12との混合液（モル比は1：2）

[0172] 参考のため、核酸医薬に含まれる核酸の塩基長Tと、特定オリゴペプチド領域中の式(1)のアミノ酸残基の数Sとの比(T/S)、及び核酸医薬副作用軽減剤のモル数と二本鎖核酸複合体とのモル数との比（核酸医薬副作用軽減剤のモル数／二本鎖核酸複合体とのモル数）が、(T/S)の何倍であるかを以下の表5に示す。

[0173] [表5]

マウス群	核酸医薬副作用軽減剤	Chol-HDO：核酸医薬副作用軽減剤のモル比	T/S	核酸医薬副作用軽減剤のモル数／二本鎖核酸複合体のモル数
マウス群1	なし	N/A	N/A	N/A
マウス群2	Dab8	1：1	16/8	(1/2) × (T/S)
マウス群3	Dab8	1：2	16/8	(1/1) × (T/S)
マウス群4	Dab10	1：1	16/10	(5/8) × (T/S)
マウス群5	Dab10	1：2	16/10	(5/4) × (T/S)
マウス群6	Dab12	1：1	16/12	(3/4) × (T/S)
マウス群7	Dab12	1：2	16/12	(3/2) × (T/S)

[0174] (aPTT測定)

上記静脈内注射の120分後の時点で、各マウス（各群 $n=3$ ）から採血し、自動血液凝固測定装置CA-50（シスメックス株式会社製）を用いて、aPTTを測定した。マウス群1及び4～7については、静脈内注射の30分後及び240分後の時点でも同様にaPTTを測定した。上記のマウス群に加え、aPTTの正常対照群として同週齢のCrl:CD1マウス（ $n=3$ ）を作製し、同様にaPTTを測定した。この正常対照群で得られたaPTTの値（平均値）は21.7秒であった。

[0175] （結果）

実施例2の結果を、図4～図6のグラフに示す。図4～図6において、「Chol-HDO 20mg/kg」は、マウス群1を表し、「+Dab8 1:1」はマウス群2を表し、「+Dab8 1:2」はマウス群3を表し、「+Dab10 1:1」はマウス群4を表し、「+Dab10 1:2」はマウス群5を表し、「+Dab12 1:1」はマウス群6を表し、「+Dab12 1:2」はマウス群7を表す。また、図4～図6のグラフにおいて、エラーバーは標準誤差を示す。実施例2の結果では以下のことが観察された。

・マウス群1のChol-HDO単独投与群では、投与30分後のaPTT値（平均）が、51.4秒、120分後のaPTT値では42.6秒、投与240分後のaPTT値は、29.3秒といずれもaPTTの延長を認めた（図4～図6）。

[0176] ・各群における投与30分後のaPTT値（平均）は、マウス群1では51.4秒であったのに対し、マウス群4では42.2秒、マウス群5では30.9秒、マウス群6では43.1秒、マウス群7では26.7秒であった（図4）。各群における投与120分後のaPTT値（平均）は、マウス群1では42.6秒であったのに対し、マウス群2では39.0秒、マウス群3では33.6秒、マウス群4では40.4秒、マウス群5では22.4秒、マウス群6では35.6秒、マウス群7では18.7秒であった（図5）。また、各群における投与240分後のaPTT値（平均）は、マウス群1で

は29.3秒であったのに対し、マウス群4では28.0秒、マウス群5では17.7秒、マウス群6では26.4秒、マウス群7では17.5秒であった(図6)。

[0177] Dab8/10/12のそれぞれの用量依存性のaPTTの短縮効果に関しては、ウィリアムズの検定で解析した。その結果、以下のことが分かった。

- ・マウス群1と比較して、Dab8を1:1で加えたマウス群2、Dab8を1:2で加えたマウス群3では、投与120分後におけるaPTTの短縮はさほど大きなものではなかった(図4～図6)。

- ・マウス群1と比較して、Dab10を1:1で加えたマウス群4、Dab10を1:2で加えたマウス群5では、投与30分後、投与120分後、及び投与240分後のいずれにおいてもそれぞれ有意にaPTTが短縮した(投与30分後におけるマウス群1 vs マウス群4: $P=0.01$ 、投与30分後におけるマウス群1 vs マウス群5: $P=0.006$ (図4)、投与120分後におけるマウス群1 vs マウス群4: $P=0.002$ 、投与120分後におけるマウス群1 vs マウス群5: $P<0.001$ (図5)、投与240分後におけるマウス群1 vs マウス群4: $P=0.004$ 、投与240分後におけるマウス群1 vs マウス群4: $P<0.001$ (図6))。また、aPTT短縮効果はDab10の用量依存的に(つまり、Chol-HDO:Dab10のモル比が1:1の場合よりも、該モル比が1:2の場合の方が)大きい傾向であった(図4～図6)。

[0178] ・マウス群1と比較して、Dab12を1:1で加えたマウス群6、Dab12を1:2で加えたマウス群7では、投与30分後、投与120分後、及び投与240分後のいずれにおいてもそれぞれ有意にaPTTが短縮した(投与30分後におけるマウス群1 vs マウス群6: $P<0.001$ 、投与30分後におけるマウス群1 vs マウス群7: $P<0.001$ (図4)、投与120分後におけるマウス群1 vs マウス群6: $P<0.001$ 、投与120分後におけるマウス群1 vs マウス群7: $P<0.001$ 、投与240分後におけるマウス群1 vs マウス群6: $P<0.001$ 、投与240分後におけるマウス群1 vs マウス群7: $P<0.001$ (図5))。

1 (図5)、投与240分後におけるマウス群1 vs マウス群6 : $P = 0.009$ 、投与240分後におけるマウス群1 vs マウス群7 : $P = 0.002$ (図6)。また、aPTT短縮効果はDab12を加える量が多いほど (つまり、Chol-HDO : Dab12のモル比が1 : 1の場合よりも、該モル比が1 : 2の場合の方が) 大きい傾向であった。

・ペプチド鎖長による影響を調べるために、Dab8、Dab10、及びDab12のそれぞれのaPTTの短縮効果に関して、ウィリアムズの検定で解析した。マウス群Dab8を1 : 1加えたマウス群2、Dab10を1 : 1加えたマウス群4、Dab12を1 : 1加えたマウス群6を比較した。カチオン性ペプチドの長さが長い方が (つまり、Dab8よりもDab10の方が、またDab10よりもDab12の方が) aPTTの短縮効果は大きい傾向であり (図4～図6)、投与120分後ではマウス群1に対してDab12を1 : 1で加えたマウス群6において有意なaPTT短縮が観察された ($P = 0.04$)。

[0179] (実験結果のまとめ)

上記の *in vivo* 実験の結果、核酸医薬を本開示に係る核酸医薬副作用軽減剤と共に投与することにより、核酸医薬の副作用が軽減できることが示された。また、核酸医薬の量に対する核酸医薬副作用軽減剤の量を本開示に例示された量に調整することで、核酸医薬の効果と、核酸医薬の副作用軽減との両立をより良好に達成することができることが示された。

[0180] 2019年6月28日出願の日本国特許出願2019-120908の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

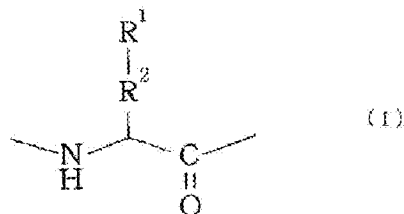
[請求項1] 下記式（１）のアミノ酸残基が２個以上連続する構造である構造Wを含む２～４０個のアミノ酸からなるオリゴペプチド領域を含むオリゴペプチドからなり、

前記オリゴペプチド領域の中に構造Wが2つ以上存在する場合、隣接する構造W同士は式（1）ではない1個のアミノ酸残基Xにより連結されており、

前記オリゴペプチド領域は、1つの構造Wから構成されるか、又は2つ以上の構造W及びアミノ酸残基Xから構成される、

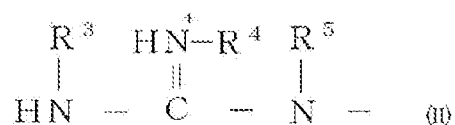
核酸医薬副作用軽減剤。

[化1]



[式(1)において、 R^1 は、基 $H_3N^+-CH_2-$ 、又は、式(11)で示される基である。 R^2 は、 R^1 が基 $H_3N^+-CH_2-$ の場合は、存在しないか、若しくは、炭素原子数1~3のアルキレン基であり、 R^1 が式(11)で示される基の場合は炭素原子数1~4のアルキレン基である。一つのオリゴペプチド領域において R^1 及び R^2 は全て同一である。]

[化2]



[式(11)中、 R^3 、 R^4 及び R^5 は、それぞれ独立に、水素原子若

しくはメチル基である。]

- [請求項2] R^1 は式(11)の基である、請求項1に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項3] 式(11)の基の R^3 、 R^4 及び R^5 は全て水素原子である、請求項2に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項4] R^1 は基 $H_3N^+-CH_2-$ である、請求項1に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項5] 一本鎖核酸を含む核酸医薬の副作用軽減に用いられる、請求項1～4のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項6] 前記一本鎖核酸が一本鎖RNA又は一本鎖DNAである、請求項5に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項7] 二本鎖核酸構造を含む核酸を含む核酸医薬の副作用軽減に用いられる、請求項1～4のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項8] 前記核酸は、少なくとも部分的にA型二本鎖核酸構造を含む、請求項7に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項9] 前記二本鎖核酸構造において、少なくとも一方の核酸鎖が、以下の条件(i)及び(ii)のうち少なくとも一方を満たす、請求項7又は請求項8に記載の核酸医薬副作用軽減剤：
- (i) 核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数が、核酸鎖に含まれるヌクレオシドの総数の30%以上である
- (ii) 核酸鎖に含まれるリボヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドの総数が6以上である。
- [請求項10] 前記核酸が一本鎖核酸であり、前記二本鎖核酸構造が前記一本鎖核酸の分子内ハイブリダイゼーションにより形成されている、請求項7～9のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項11] 前記二本鎖核酸構造が分子間ハイブリダイゼーションにより形成されている、請求項7～9のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用

軽減剤。

- [請求項12] 前記二本鎖核酸構造はRNA-DNA複合二本鎖核酸構造を含む、請求項7～11のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項13] 前記核酸はA型二本鎖核酸である、請求項11に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項14] 前記A型二本鎖核酸は二本鎖RNAである、請求項13に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項15] 前記二本鎖核酸構造がA型二本鎖核酸構造を含み、前記核酸における相補鎖のうちの第1の核酸鎖が、デオキシリボヌクレオシドが4個以上連続して並んだ構造を含む核酸鎖であり、前記核酸における相補鎖のうちの第2の核酸鎖が前記第1の核酸鎖と相補的な塩基配列を有し、かつRNA及びPNAのうちの少なくとも1種を含む、請求項11に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項16] 前記相補鎖の第1の核酸鎖は、4個以上連続して連結されたデオキシリボヌクレオシドからなる領域の5'末端側及び／又は3'末端側に、連続又は不連続に非天然ヌクレオシドを含む領域が設けられている複合DNA鎖である、請求項15に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項17] 前記二本鎖核酸構造がA型二本鎖核酸構造を含み、前記核酸における相補鎖のうちの第1の核酸鎖が、天然ヌクレオシドからなるセグメント並びに非天然ヌクレオシドからなるセグメントが交互に並んだ構造を有し、かつ4個以上連続するデオキシリボヌクレオチド及び4個以上連続するリボヌクレオチドのいずれをも有さない核酸鎖であり、前記核酸における相補鎖のうちの第2の核酸鎖が前記第1の核酸鎖と相補的な塩基配列を有し、かつRNA及びPNAのうちの少なくとも1種を含む、請求項11に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項18] 前記相補鎖の第1の核酸鎖における前記非天然ヌクレオシドはLNAヌクレオシドを含む、請求項16又は請求項17に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

- [請求項19] 前記相補鎖の第2の核酸鎖がRNAであって、前記相補鎖の第1の核酸鎖の前記非天然ヌクレオシドを含む領域に対して相補的な領域が非天然ヌクレオシドにより構成されている、請求項16～18のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項20] 前記A型二本鎖核酸構造はRNA-DNA複合二本鎖核酸構造を含む、請求項15～19のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項21] 前記相補鎖の第2の核酸鎖における前記非天然ヌクレオシドが、2'-O-メチル化及び／又はホスホロチオエート化されたヌクレオシドである、請求項19に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項22] 前記相補鎖の第2の核酸鎖に機能性分子が結合している、請求項15～21のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項23] 前記機能性分子は、前記二本鎖核酸構造を含む核酸を標的部位に送達する活性を有する分子である、請求項22に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項24] 前記二本鎖核酸構造を含む核酸の長さは15～25塩基長である、請求項11～23のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項25] 式(1)の R^2 はメチレン基である、請求項8～24のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項26] 前記二本鎖核酸構造はB型二本鎖核酸構造である、請求項7に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項27] 前記二本鎖核酸構造を含む核酸は二本鎖DNAである、請求項26に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項28] 式(1)の R^2 はトリメチレン基である、請求項26又は請求項27に記載の核酸医薬副作用軽減剤。
- [請求項29] 前記オリゴペプチド領域の全てが式(1)のアミノ酸残基からなる、請求項1～28のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

。

[請求項30] 10～25塩基長の核酸を含む核酸医薬の副作用軽減に用いられ、かつ、前記オリゴペプチド領域のアミノ酸残基数が6～34である、請求項1～29のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

[請求項31] 前記核酸が二本鎖核酸としてのsiRNAである、請求項30に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

[請求項32] 前記オリゴペプチド領域を構成するアミノ酸残基のうち光学活性を伴うアミノ酸残基は、全てL型、あるいは、全てD型の光学活性を有するアミノ酸残基である、請求項1～31のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

[請求項33] 核酸を標的部位に送達する活性を有するデリバリー分子が前記オリゴペプチドに結合している、請求項1～32のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

[請求項34] 核酸医薬に含まれる核酸のRNaseHによる分解を促進する、請求項1～33のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

[請求項35] 10～50塩基長の核酸を含む核酸医薬と共に、前記10～50塩基長の核酸1モルに対して0.5～20モルの比で用いられる、請求項1～34のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤。

[請求項36] 請求項1～35のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤、及び核酸医薬を含む、医薬組成物。

[請求項37] 前記核酸医薬が10～50塩基長の核酸を含み、前記10～50塩基長の核酸1モルに対して0.5～20モルの比で核酸医薬副作用軽減剤を含む、請求項36に記載の医薬組成物。

[請求項38] 前記核酸医薬が15～25塩基長のA型二本鎖核酸を含み、前記15～25塩基長のA型二本鎖核酸1モルに対して0.8～2.5モルの比で核酸医薬副作用軽減剤を含む、請求項37に記載の医薬組成物。

。

[請求項39] 前記核酸医薬に起因する副作用を軽減しつつ、前記核酸医薬が対象

とする特定疾患を治療又は予防するために用いられる、請求項 36～38 のうちいずれか一項に記載の医薬組成物。

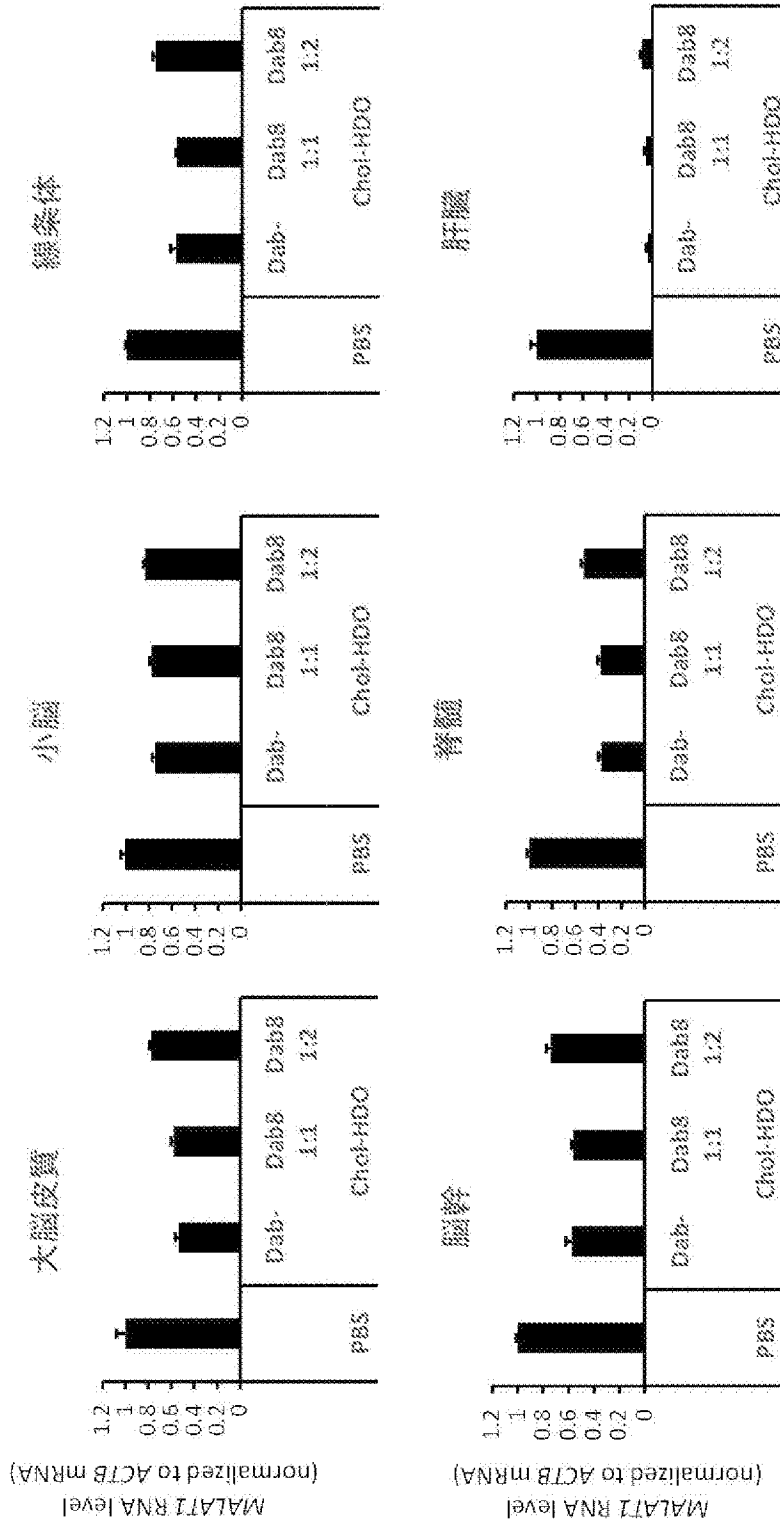
[請求項40] 急速静注用である、請求項 36～39 のうちいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項41] 単回投与量が、核酸の量として、前記医薬組成物の投与を受ける対象の体重 1 kg 当たり 0.01 mg～200 mg である、請求項 36～40 のうちいずれか一項に記載の医薬組成物。

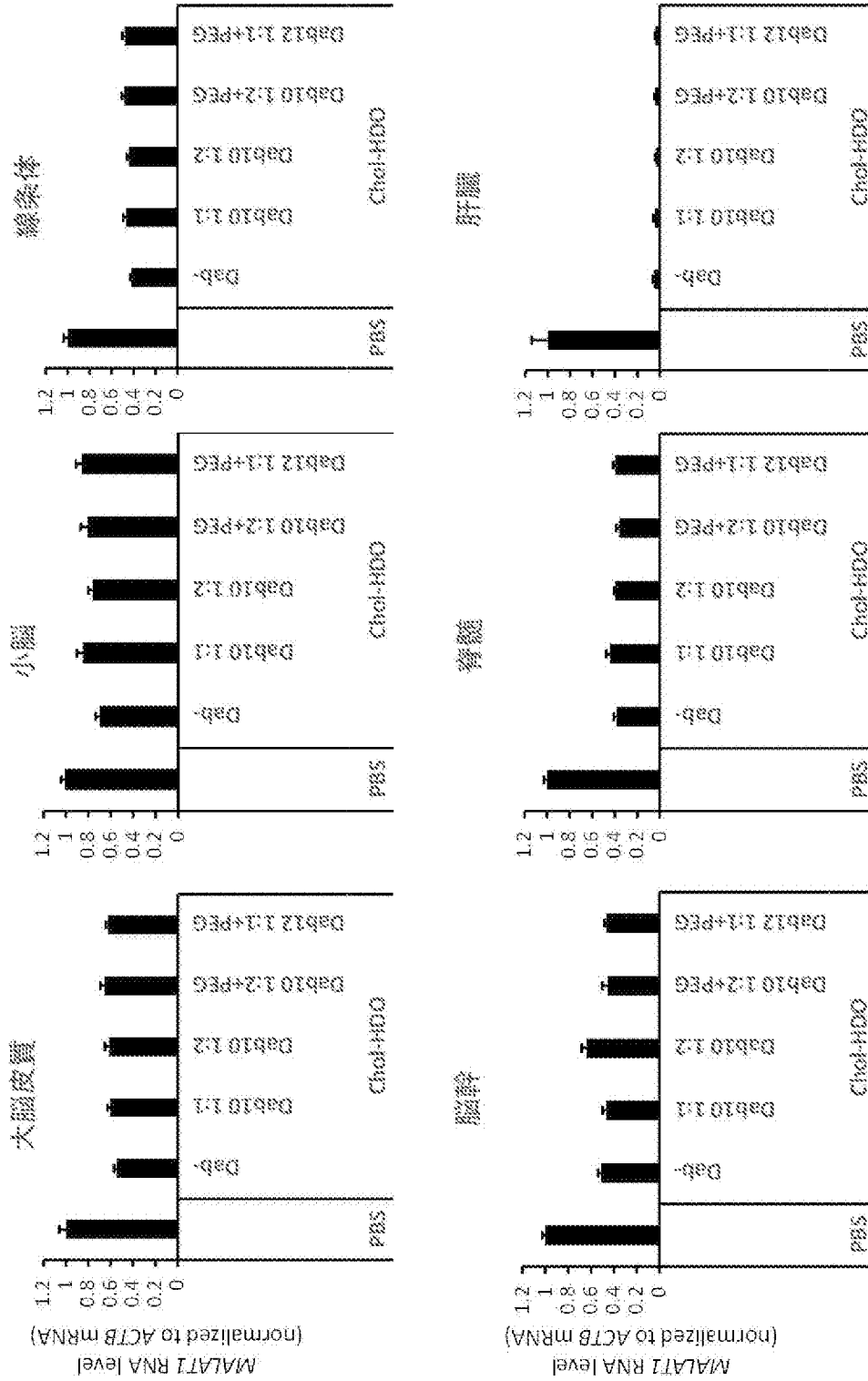
[請求項42] さらにポリエチレングリコール（PEG）及びグリセロールのうち少なくとも 1 つを含む、請求項 36～41 のうちいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項43] 請求項 1～35 のうちいずれか一項に記載の核酸医薬副作用軽減剤を核酸医薬に添加することを含む、核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法。

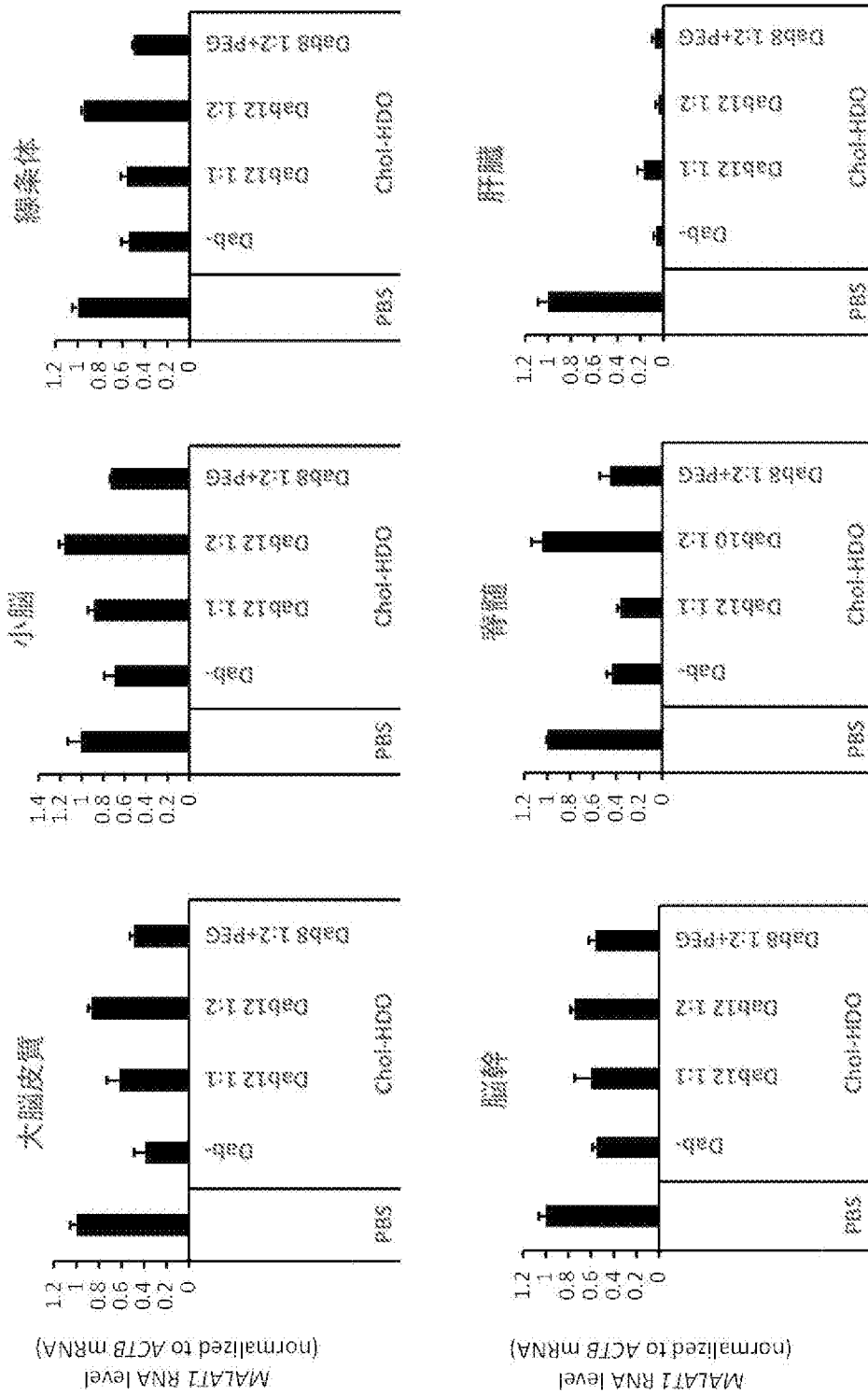
[図1]



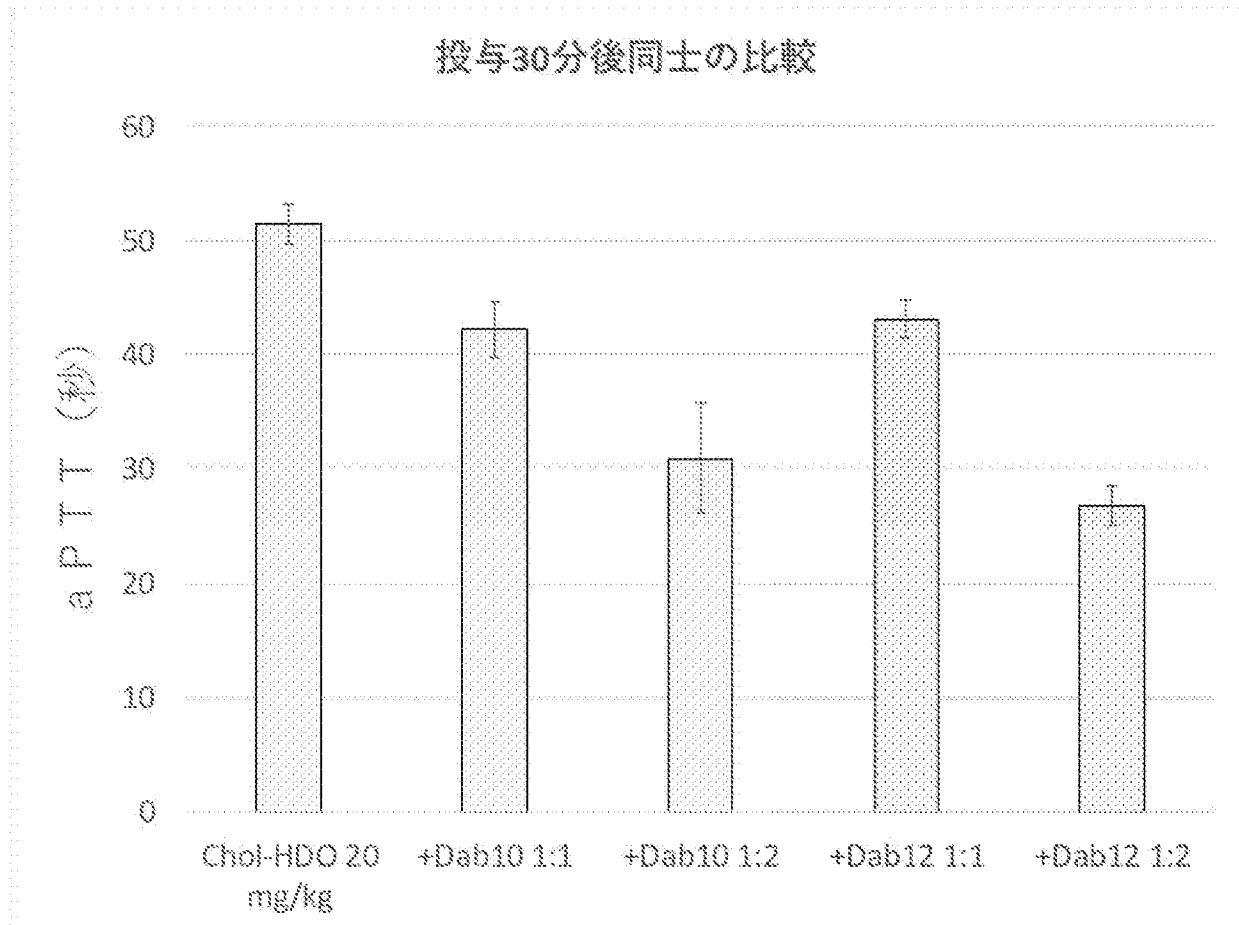
[図2]



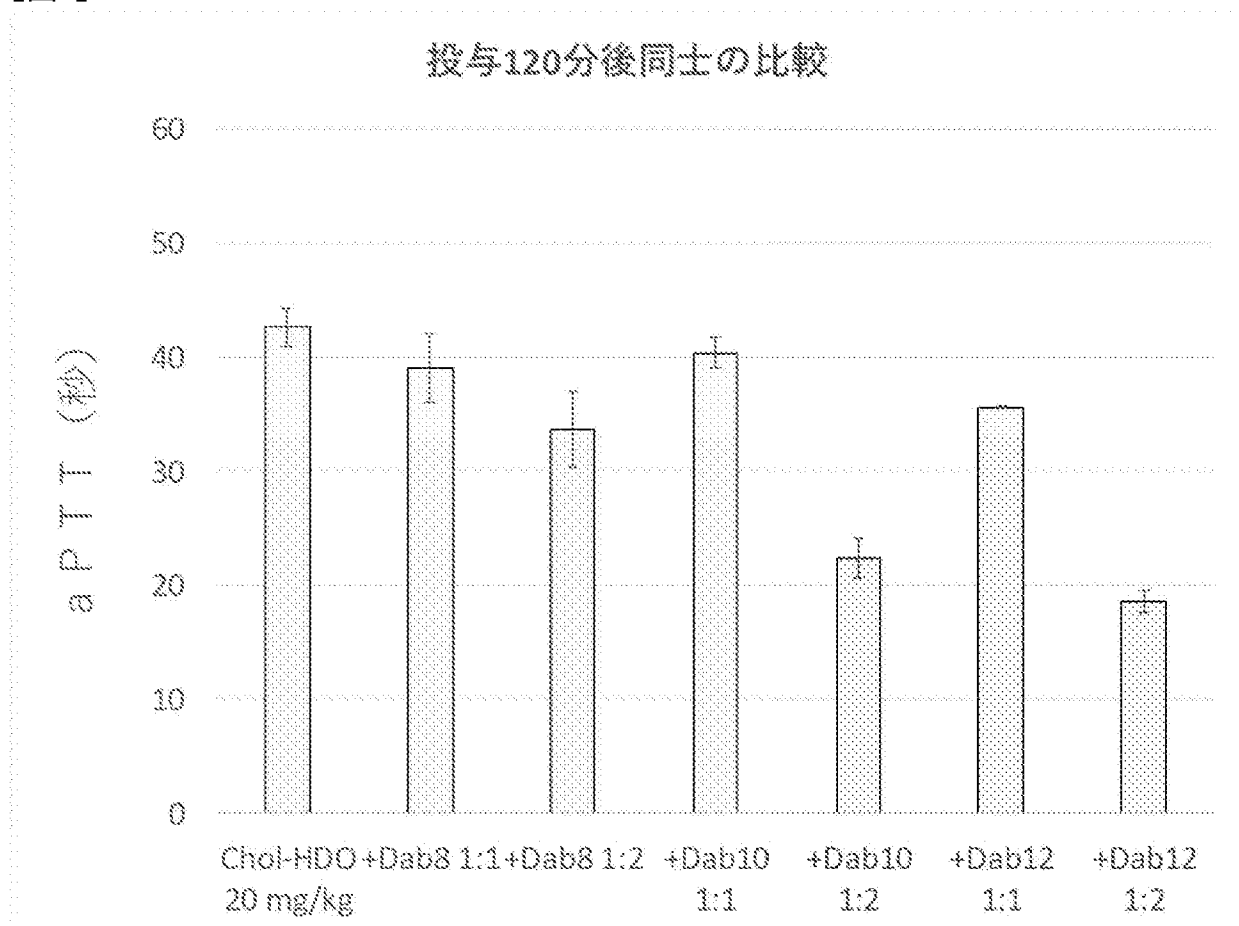
[図3]



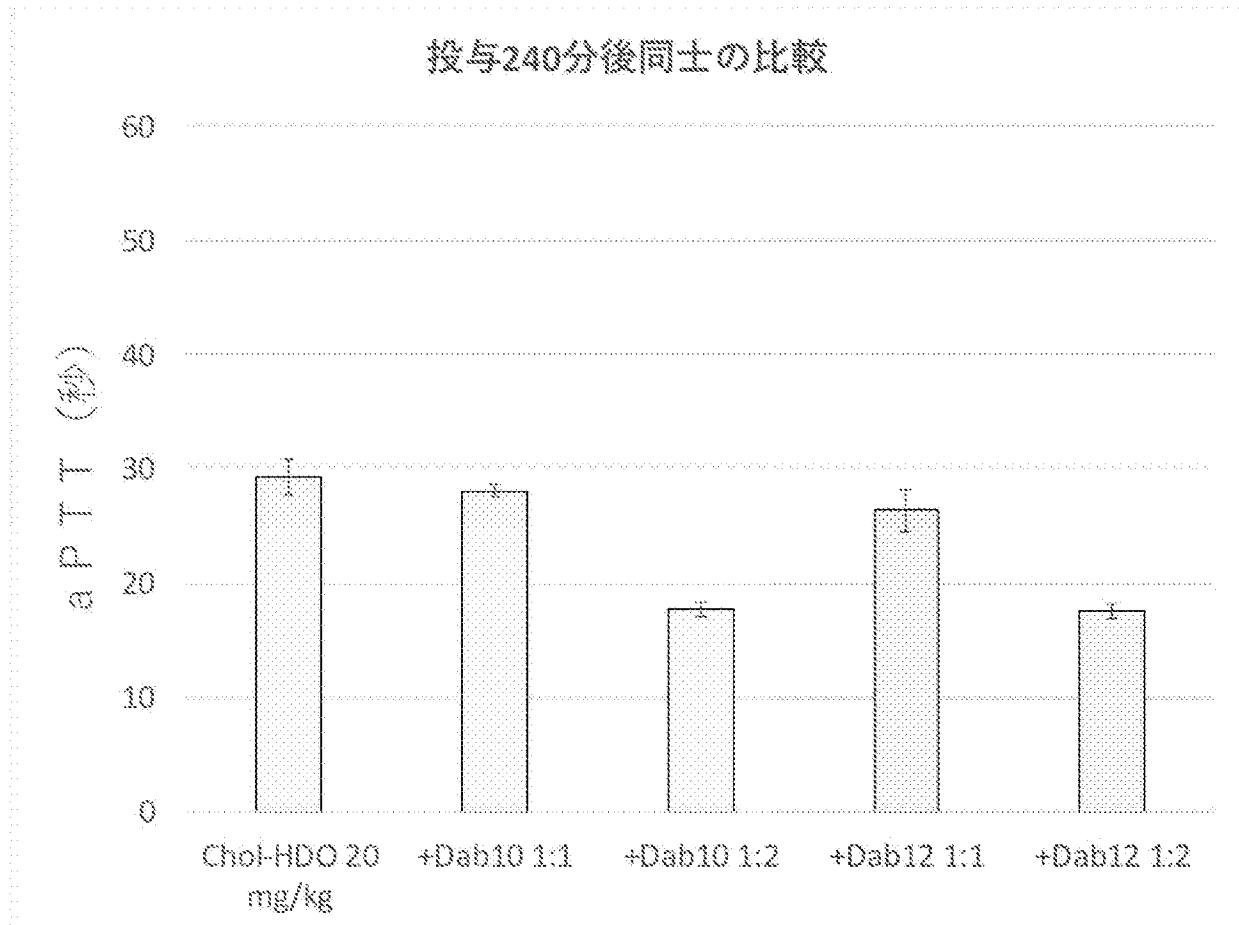
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/025093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61P 39/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 2/00(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i

FI: A61K38/08; A61K31/7088; A61K38/10; A61K47/42; A61P39/04; A61P43/00 105; C07K2/00 ZNA; C12N15/113 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61P39/04; A61P43/00; C07K2/00; A61K47/42; C12N15/113; A61K38/08; A61K38/10; A61K31/7088

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/013255 A1 (TOKYO UNIVERSITY OF PHARMACY AND LIFE SCIENCES) 17.01.2019 (2019-01-17) claims 1-21, paragraphs [0006], [0007], [0080], [0083], [0084], [0090], [0091], examples 1-37	1-43
X	WO 2014/148620 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 25.09.2014 (2014-09-25) claims 1-40, examples 1-4	1-4, 7-9, 11-15, 20, 24-32, 34-39, 43
X	MAEDA, Y. et al., "Synthesis and properties of cationic oligopeptides with different side chain lengths that bind to RNA duplexes", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, vol. 21, no. 7, pp. 1717-1723 abstract, fig. 1, tables 1, 2, 2.4 ITC measurement	1-4, 7-9, 11-15, 24-32, 34-39, 43



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 August 2020 (13.08.2020)

Date of mailing of the international search report
01 September 2020 (01.09.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/025093

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAEDA, Y. et al., "Artificial cationic peptides that increase nuclease resistance of siRNA without disturbing RNAi activity", Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2019, vol. 38, no. 5, pp. 338-348 abstract, fig. 1, page 339, paragraph [0004]	1-4, 7-9, 11, 13, 14, 24-26, 28-32, 34-39, 43
X	IWATAHARA, R et al., "Enhancement in RNase H activity of a DNA/RNA hybrid duplex using artificial cationic oligopeptides", Chem Commun, 2018, vol. 54, no. 61, pp. 8526-8529 abstract, table 1	1-4, 7-9, 11-13, 15, 16, 20, 24-26, 28-30, 32, 34-39, 43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/025093

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2019/013255 A1	17 Jan. 2019	(Family: none)	
WO 2014/148620 A1	25 Sep. 2014	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61P 39/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 2/00(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i FI: A61K38/08; A61K31/7088; A61K38/10; A61K47/42; A61P39/04; A61P43/00 105; C07K2/00 ZNA; C12N15/113 Z										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61P39/04; A61P43/00; C07K2/00; A61K47/42; C12N15/113; A61K38/08; A61K38/10; A61K31/7088										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2020年									
日本国実用新案登録公報	1996-2020年									
日本国登録実用新案公報	1994-2020年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	WO 2019/013255 A1 (学校法人東京薬科大学) 17.01.2019 (2019-01-17) 請求項1-21, [0006], [0007], [0080], [0083], [0084], [0090], [0091], 実施例1-37	1-43								
X	WO 2014/148620 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 25.09.2014 (2014-09-25) 請求項1-40, 実施例1-4	1-4, 7-9, 11-15, 20, 24-32, 34-39, 43								
X	MAEDA, Y et al., Synthesis and properties of cationic oligopeptides with different side chain lengths that bind to RNA duplexes, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013, Vol.21, No.7, p.1717-1723 Abstract, Fig.1, Table 1, 2, 2.4 ITC measurement	1-4, 7-9, 11-15, 24-32, 34-39, 43								
X	MAEDA, Y et al., Artificial cationic peptides that increase nuclease resistance of siRNA without disturbing RNAi activity, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2019, Vol.38, No.5, p.338-348 Abstract, Fig.1, 第339頁第4パラグラフ	1-4, 7-9, 11, 13, 14, 24-26, 28-32, 34-39, 43								
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献										
国際調査を完了した日 13.08.2020		国際調査報告の発送日 01.09.2020								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 小堀 麻子 4U 2938 電話番号 03-3581-1101 内線 3452								

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	IWATA HARA, R et al., Enhancement in RNase H activity of a DNA/RNA hybrid duplex using artificial cationic oligopeptides, Chem Commun, 2018, Vol.54, No.61, p.8526-8529 Abstract, Table 1	1-4, 7-9, 11-13, 15, 16, 20, 24-26, 28-30, 32, 34-39, 43

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/025093

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2019/013255	A1	17.01.2019	(ファミリーなし)	
WO	2014/148620	A1	25.09.2014	(ファミリーなし)	