

(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
2024年12月19日(19.12.2024)



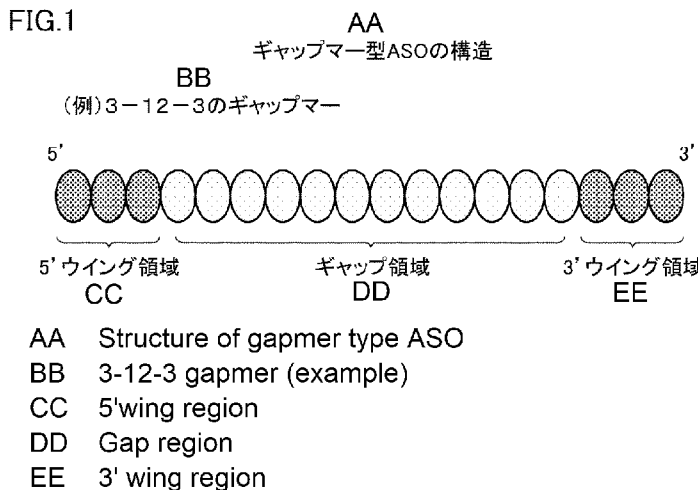
(10) 国際公開番号

WO 2024/257848 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021614
- (22) 国際出願日: 2024年6月14日(14.06.2024)
- (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 2023-099440 2023年6月16日(16.06.2023) JP
- (71) 出願人: ルクサナバイオテック株式会社(LUXNA BIOTECH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 青山 智彦 (AOYAMA, Tomohiko); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友ファーマ株式会社内 Osaka (JP). 浅野 成宏 (ASANO, Shigehiro); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友ファーマ株式会社内 Osaka (JP). 角谷 友美 (KAKUTANI, Tomomi); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友ファーマ株式会社内 Osaka (JP). 川野邊 峻哲 (KAWANOBE, Takaaki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2番8号 テクノアライアンスC棟C907 ルクサナバイオテック株式会社内 Osaka (JP). セレスタ アジャヤラム (SHRESTHA, Ajaya Ram); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2番8号 テクノアライアンスC棟C907 ルクサナバイオテック株式会社内 Osaka (JP). 鈴木 高

(54) Title: METHOD FOR DESIGNING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE HAVING REDUCED DELAYED CENTRAL TOXICITY, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法、及びその製造方法



(57) Abstract: Provided is a method for designing an antisense oligonucleotide having reduced delayed central toxicity, the method comprising a step for designing a second antisense oligonucleotide on the basis of a first antisense oligonucleotide. The first antisense oligonucleotide is configured such that nucleosides are bonded together via a phosphate group and/or a modified phosphate group. The first antisense oligonucleotide comprises a gap region, a 3' wing region that is bonded to the 3' end of the gap region, and a 5' wing region that is bonded to the 5' end of the gap region. The gap region has nucleic acids constituted of deoxyribose that may include a nucleic acid in which sugar is modified; the 3' wing region and the 5' wing region are modified nucleic acids having a substituent at the 2' position; and the base length is 12-30 mer. The second antisense oligonucleotide has the same base sequences for the gap region, the 3' wing region and the 5' wing region as the first antisense oligonucleotide, and has the same sugar structures of the nucleic acids in the 3' wing region

尾(SUZUKI, Takao); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2番8号 テクノアライアンスC棟C907 ルクサナバイオテク株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人深見特許事務所(FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 中之島フェスティバルタワー・ウエスト Osaka (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

and the 5' wing region as those of the first antisense oligonucleotide. The gap region contains at least one 5'-CP nucleic acid, and the delayed central toxicity is reduced as compared with the first antisense oligonucleotide.

(57) 要約: 第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドに基づいて、第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する工程を含む、遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法であって、前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシドがリン酸基及び/又は修飾リン酸基で結合されており、ギャップ領域と、前記ギャップ領域の3'末端に結合している3'ウイング領域と、前記ギャップ領域の5'末端に結合している5'ウイング領域とを含み、前記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、前記3'ウイング領域及び前記5'ウイング領域は2'位に置換基を有する修飾核酸であり、塩基長は、12~30merである、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップ領域、3'ウイング領域及び5'ウイング領域の塩基配列が、前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、3'ウイング領域及び5'ウイング領域の核酸の糖部の構造が、前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、前記ギャップ領域に少なくとも1つの5'-CP核酸を含み、前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、遅発性中枢毒性が低減されている、アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

明 細 書

発明の名称：

遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法、及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的となる核酸配列にハイブリダイズして遺伝子発現自体を抑制することで作用を発現する。アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性の向上や、標的核酸への結合親和性、特異性などの改善を目的として様々な修飾核酸が開発及び導入され、様々な製剤が上市されるようになったが、昨今新たな問題として浮上したのが、修飾核酸が潜在的に有する毒性をどう回避するかという問題である。

[0003] アンチセンスオリゴヌクレオチドの毒性は、いわゆる「標的外RNAとのハイブリダイゼーションに起因する毒性（狭義のオフターゲット毒性）」と細胞内外のタンパク質や金属イオン等との結合に起因する等の「RNAとのハイブリダイゼーションに起因しない毒性（広義のオフターゲット毒性）」にカテゴライズすることができる。そしてこれらの毒性を回避するために様々なアプローチが採用されている。

[0004] 例えば広義のオフターゲット毒性については、特許文献1において、核酸の塩基部や糖部に適切な化学修飾を行うことで回避できることが開示されている。また、狭義のオフターゲット毒性については、特許文献2において、塩基部（チミン）の2'位カルボニル基を修飾することと糖部2'位-4'位を架橋することで、標的外RNAとのハイブリダイゼーションにおける非ワトソンクリック型塩基対の形成を抑制することによって回避できることが開示されている。さらに、一般的にヌクレオシド間のホスホロチオエート修

飾が肝毒性発現の原因であることが知られているところ（例えば、非特許文献1）、特許文献3には、特定の臓器（例えば、肝臓）への集積などが懸念されるホスホロチオエート型核酸を5'位にシクロプロパン構造を有する修飾核酸に置換することで、活性を維持したまま肝毒性を低減できることが開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：国際公開第2018/155450号
特許文献2：国際公開第2018/155451号
特許文献3：国際公開第2020/158910号
特許文献4：国際公開第2016/127000号
特許文献5：国際公開第2011/052436号
特許文献6：国際公開第2014/046212号
特許文献7：国際公開第2015/125783号
特許文献8：国際公開第99/14226号

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Migawa M.T. et al., *Nucleic Acids Res*, 20;47(11): 5465-5479 (2019)
非特許文献2：Moazami M.P. et al., *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431096> (2021)
非特許文献3：W. Brad Wan et. Al. *J. Med. Chem.* (2016) 59: 9645-9667.
非特許文献4：Peter H. Hagedorn et. Al. *Nucleic Acid Ther.* (2022) 32: 151-162.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] これまでのアンチセンスオリゴヌクレオチドの毒性低減技術に係る毒性評

価は、全身曝露した後に集積しやすい臓器が肝臓であることを考慮して主に肝毒性を指標になされ、それ以外の組織における毒性評価について深い知見は得られていない。例えば、中枢毒性（急性期中枢毒性、遅発性中枢毒性等）は医薬品の安全性試験において重要な評価項目であるが、近年、中枢神経疾患を対象疾患としたアンチセンスオリゴヌクレオチドの開発が盛んに進められている中、アンチセンスオリゴヌクレオチドの中枢毒性に関してはほとんど知見がない。

[0008] アンチセンスオリゴヌクレオチドと中枢毒性の関係、特に中枢毒性の低減に着目した知見としては、特許文献4にアンチセンスオリゴ核酸の配列と中枢毒性（神経細胞における細胞内遊離カルシウム濃度の振動）の相関関係が開示されている。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおけるホスホロチオエート修飾による中枢毒性を評価した文献は、本発明者らが知る限りにおいて、2件しか存在しない（非特許文献2、非特許文献4）。非特許文献2において、ホスホロチオエート修飾を有するギャップマー型オリゴヌクレオチドにおいて、ウイング部分のホスホロチオエート結合をホスホジエステル結合に置換することで、中枢毒性を低減できることが開示されている。

[0009] しかしながら、非特許文献2には、一部のホスホロチオエート修飾を除去し、かつ糖部の2'位に安定性に関与する修飾を付したアンチセンスオリゴヌクレオチド（以下、「ASO」と称することがある。）では、ホスホロチオエート修飾が除去されていないASOと比較して、アンチセンス活性が低下し得ることが開示されている。前記アンチセンス活性の低下は、ホスホロチオエート修飾の除去に起因するASOの安定性の低下によるものと考えられる。

[0010] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、アンチセンス活性を保持したまま遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法及びその製造方法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

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を進めた結果、アンチセ

ンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩（以下、「本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド」と称することがある。）において、ギャップ領域に5' -CP核酸が含まれるように設計、製造することによって、アンチセンス活性を保持したまま遅発性中枢毒性が低減されることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の通りである。

- [0012] [1] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法は、
- 第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドに基づいて、第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する工程を含む、
 - 遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法であって、
 - 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、
 - 各ヌクレオシドがリン酸基及び／又は修飾リン酸基で結合されており、
 - ギャップ領域と、上記ギャップ領域の3'末端に結合している3'ウイング領域と、上記ギャップ領域の5'末端に結合している5'ウイング領域とを含み、
 - 上記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、
 - 上記3'ウイング領域及び上記5'ウイング領域は2'位に置換基を有する修飾核酸であり、
 - 塩基長は、12~30merである、
 - アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、
 - 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、
 - ギャップ領域、3'ウイング領域及び5'ウイング領域の塩基配列が、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、
 - 3'ウイング領域及び5'ウイング領域の核酸の糖部の構造が、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、
 - 上記ギャップ領域に少なくとも1つの5' -CP核酸を含み、
 - 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、遅発性中枢毒

性が低減されている。

[0013] [2] 上記 [1] において、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域は、5' -CP 核酸を含まず、

上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域の5' -CP 核酸以外の糖部の構造が上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であることが好ましい。

[0014] [3] 上記 [1] 又は [2] において、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記ギャップ領域の塩基数は、5 ~ 20 mer であり、

上記3' ウィング領域は、3 ~ 5 mer の、2' 位に置換基を有する修飾核酸であり、

上記5' ウィング領域は、3 ~ 5 mer の、2' 位に置換基を有する修飾核酸であることが好ましい。

[0015] [4] 上記 [1] ~ [3] のいずれかにおいて、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

塩基長は、15 ~ 30 mer であることが好ましい。

[0016] [5] 上記 [1] ~ [4] のいずれかにおいて、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記ギャップ領域に配置されるシトシンが、5-メチルシトシンであることが好ましい。

[0017] [6] 上記 [1] ~ [5] のいずれかにおいて、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記3' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸は、2' -MOE 核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、

上記5' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸は、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むことが好ましい。

[0018] [7] 上記[1]～[6]のいずれかにおいて、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

塩基配列におけるGCの比率が0.2～0.6であることが好ましい。

[0019] [8] 上記[1]～[7]のいずれかにおいて、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドが一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであることが好ましい。

[0020] [9] 上記[1]～[8]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸は、上記ギャップ領域の5' 側から数えて2番目に少なくとも配置されていることが好ましい。

[0021] [10] 上記[1]～[9]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸は、上記ギャップ領域に2個以上配置されていることが好ましい。

[0022] [11] 上記[1]～[10]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸は、上記ギャップ領域に2～5個配置されていることが好ましい。

[0023] [12] 上記[1]～[11]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸は、上記ギャップ領域の少なくとも1か所において連続して2～4mer配置されていることが好ましい。

[0024] [13] 上記[1]～[12]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸が、上記ギャップ領域に対して9分の1以上配置されていることが好ましい。

[0025] [14] 上記[1]～[13]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸が、上記ギャップ領域に対して5分の1以上配置されていることが好ましい。

[0026] [15] 上記[1]～[14]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸は、上記ギャップ領域における5'末端側に配置されていることが好ましい。

[0027] [16] 上記[1]～[15]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

上記5' -CP核酸は、上記ギャップ領域における5'末端側及び3'末端側に配置されていることが好ましい。

[0028] [17] 上記[1]～[16]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシド間結合において、

ホスホロチオエート結合の割合が50%～80%であることが好ましい。

[0029] [18] 上記[1]～[17]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシド間結合において、

ホスホロチオエート結合の割合が50%～70%であることが好ましい。

[0030] [19] 上記[1]～[18]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

上記5' -CP核酸と、上記5' -CP核酸の3'側に隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホロチオエート結合であることが好ましい（ただし、上記5' -CP核酸がギャップ領域の3'末端に配置されている場合を除く）。

[0031] [20] 上記[1]～[19]のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

上記5' -CP核酸と、上記5' -CP核酸の3' 側で隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホロチオエート結合であることが好ましい（ただし、上記5' -CP核酸がギャップ領域の3' 末端に配置されている場合と上記5' -CP核酸の3' 側で隣接しているヌクレオシドが5' -CP核酸である場合を除く）。

[0032] [21] 上記[1] ~ [20] のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

上記5' -CP核酸と、上記5' -CP核酸の5' 側で隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホジエステル結合であることが好ましい。

[0033] [22] 上記[1] ~ [21] のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただし、5' -CP核酸は含まない）で構成される塩基の数が5個以上であることが好ましい。

[0034] [23] 上記[1] ~ [22] のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただし、5' -CP核酸は含まない）で構成される塩基の数は、5~10個であることが好ましい。

[0035] [24] 上記[1] ~ [23] のいずれかにおいて、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただし、5' -CP核酸は含まない）で構成される塩基は、5~10個連続して配置されていることが好ましい。

[0036] [25] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩の製造方法は、

遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩の製造方法であって、

上記 [1] ~ [2 4] のいずれかにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法によって、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する工程と、

上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成する工程とを含む。

[0037] [2 6] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩であって、

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシドがリン酸基及び／又は修飾リン酸基で結合されており、

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップ領域と、上記ギャップ領域の 3' 末端に結合している 3' ウィング領域と、上記ギャップ領域の 5' 末端に結合している 5' ウィング領域と、を含み、

上記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、

上記ギャップ領域は、少なくとも 1 つの 5' -C P 核酸を含み、

上記 3' ウィング領域及び上記 5' ウィング領域は 2' 位に置換基を有する修飾核酸であり、

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基長は、12~30merである。

[0038] [2 7] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体又はその製薬学的に許容される塩は、

上記 [2 6] のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩と、

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合している付加物質と、を有する、アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体又はその製薬学的に許容される塩であって、

上記付加物質は、ポリエチレングリコール、ペプチド、アルキル鎖、核酸、リガンド化合物、抗体、タンパク質、及び糖鎖からなる群より選ばれる。

[0039] [28] 本発明の第一の態様における疾患の治療剤は、
上記 [26] のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩、又は、上記 [27] のアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体若しくはその製薬学的に許容される塩を含む、疾患の治療剤であって、
上記治療剤は、中枢神経系に曝露されるように投与するように用いられる。

[0040] [29] 本発明の第二の態様における疾患の治療剤は、
上記 [26] のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩、又は、上記 [27] アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体若しくはその製薬学的に許容される塩を含む、疾患の治療剤であって、
上記治療剤は、遅発性中枢毒性に敏感な対象に投与される。

[0041] [30] 本発明の第三の態様における疾患の治療剤は、
上記 [26] のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩、又は、上記 [27] のアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体若しくはその製薬学的に許容される塩を含む、疾患の治療剤であって、
上記疾患は、中枢神経系の疾患である、治療剤。

発明の効果

[0042] 本発明によれば、アンチセンス活性を保持したまま遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法及びその製造方法を提供することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0043] [図1]図1は、本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドの構成の一例を示す模式図である。

[図2]図2は、本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたときの、標的RNAの発現が抑制されるメカニズムを説明する模式図である。

発明を実施するための形態

[0044] 以下、本発明の一実施形態（以下「本実施形態」と記す。）について説明する。ただし、本実施形態はこれに限定されるものではない。本明細書にお

いて「I～J」という形式の表記は、範囲の上限下限（すなわちI以上J以下）を意味し、Iにおいて単位の記載がなく、Jにおいてのみ単位が記載されている場合、Iの単位とJの単位とは同じである。

[0045] 《遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法》

本実施形態の遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法は、

第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドに基づいて、第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する工程を含む、

遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法であって、

上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

各ヌクレオシドがリン酸基及び／又は修飾リン酸基で結合されており、ギャップ領域と、上記ギャップ領域の3'末端に結合している3'ウイング領域と、上記ギャップ領域の5'末端に結合している5'ウイング領域とを含み、

上記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、

上記3'ウイング領域及び上記5'ウイング領域は2'位に置換基を有する修飾核酸であり、

塩基長は、12～30merである、

アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

ギャップ領域、3'ウイング領域及び5'ウイング領域の塩基配列が、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、

3'ウイング領域及び5'ウイング領域の核酸の糖部の構造が、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、

上記ギャップ領域に少なくとも1つの5'-CP核酸を含み、

上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、遅発性中枢毒性が低減されている。

[0046] <用語の定義等>

まず、本明細書において用いられる用語の定義等について以下に説明する。

[0047] (一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド)

本実施形態において「一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、又は「ASO」とは、標的遺伝子のmRNA、mRNA前駆体、又はncRNA(ノンコーディングRNA)(以下、これら三者をまとめて「標的RNA」と称することがある。)に対して相補的なオリゴヌクレオチド又はその薬理学上許容される塩を意味する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA、RNA及び/又はそれらの類似体から構成される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、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、標的とするmRNA、mRNA前駆体又はncRNAの働きを抑制する。アンチセンスオリゴヌクレオチドには、標的となるmRNA、mRNA前駆体、又はncRNAの塩基配列に対して、完全に相補的な塩基配列を有するもの、当該相補的な塩基配列において1個又は数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列を有するもの、及びゆらぎ塩基対を形成する塩基をその塩基配列中に含むものが含まれる。

また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、後述する「糖部が修飾糖である修飾核酸」(糖修飾されている修飾ヌクレオチド)以外の、当該分野で公知の修飾ヌクレオチドを更に含んでもよい。当該分野で公知の修飾ヌクレオチドとしては、糖修飾されている修飾ヌクレオチドに加えて、例えば、後述するリン酸基修飾されている修飾ヌクレオチド、核酸塩基修飾されている修飾ヌクレオチド等が挙げられる。

なお、本実施形態におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その両末端の構造は特に制限されず、例えば、-OHであってもよいし、-OR(た

だし、Rはアルキル鎖、リン酸エステル体、又は後述する付加物質を示す。
）であってもよい。

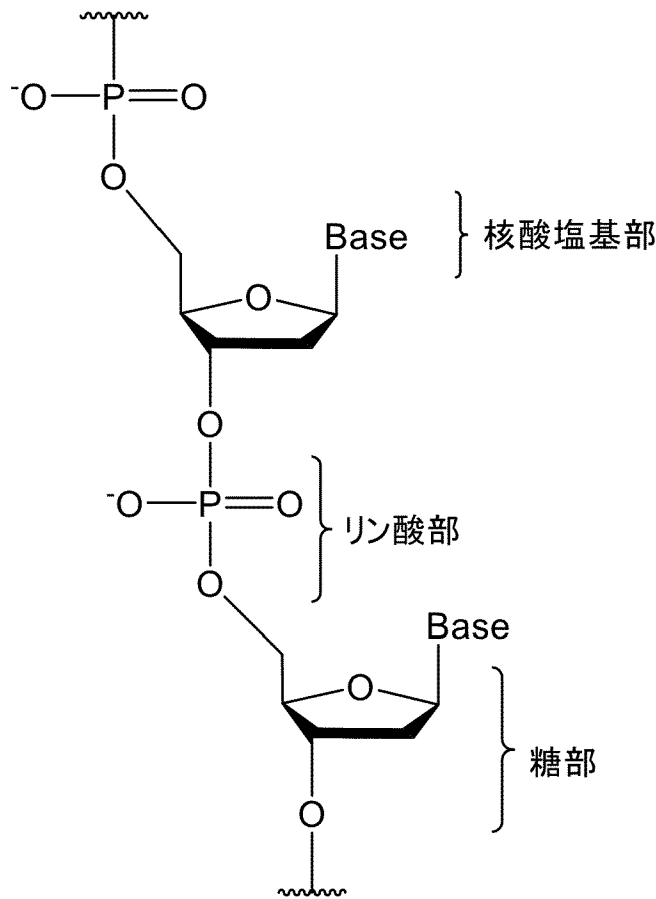
また、本実施形態における一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖の形態であってもよいし、後述する第二鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイズして二本鎖の形態をとってもよい。上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドと、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズしている第二鎖オリゴヌクレオチドとからなる二本鎖オリゴヌクレオチドを、「二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド」と称することがある。

[0048] (オリゴヌクレオチド)

本実施形態において「オリゴヌクレオチド」とは、同一又は異なるヌクレオチドが、リン酸ジエステル結合又はその他の結合で2～30個連結されたヌクレオチドのポリマーを意味する。上記オリゴヌクレオチドは、以下の構造式で示すように核酸塩基部、リン酸部、及び糖部から構成されていると把握することもできる。

[0049]

[化1]



[0050] 上記オリゴヌクレオチドは、天然型のオリゴヌクレオチドと非天然型のオリゴヌクレオチドとに大別される。「天然のオリゴヌクレオチド」とは天然に存在しているヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドを意味する。「非天然のオリゴヌクレオチド」とは、後述する修飾ヌクレオチドを構成単位として少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを意味する。「非天然型のオリゴヌクレオチド」としては、好ましくは、糖部が修飾された修飾糖誘導体；リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が硫黄原子で1つ置き換えられたホスホチオエート誘導体；リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が硫黄原子で2つ置き換えられたホスホジチオエート誘導体；リン酸ジエステル結合がトリエステル化されたエステル誘導体；リン酸ジエステル結合がアミド化されたホスホアミド誘導体；リン酸ジエステル結合がボロン酸エステル化されたボラノホスフェート誘導体；リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子がアルキル基に置換されたアルキルホスホネート（例えば、メチルホスホネ

ート、メトキシプロピルホスホネート等) 誘導体；リン酸ジエステル結合がアミド結合に置換されたアミド誘導体；核酸塩基が修飾された修飾塩基誘導体が挙げられる。更に好ましくは、上記非天然のオリゴヌクレオチドは、糖部が修飾された架橋型修飾糖誘導体；リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が硫黄原子で1つ置き換えられたホスホロチオエート誘導体；リン酸ジエステル結合がエステル化されたエステル誘導体；及び、糖部が後述する修飾糖（例えば、架橋型糖）で修飾され、かつリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が硫黄原子で1つ置き換えられているか、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子がアルキル基に置換されたアルキルホスホネート化されている誘導体等が挙げられる。

[0051] (ヌクレオシド)

本実施形態において「ヌクレオシド」とは、プリン塩基又はピリミジン塩基と糖とが結合した化合物を意味する。天然に存在しているヌクレオシドを「天然ヌクレオシド」という場合がある。天然に存在していない修飾されたヌクレオシドを「修飾ヌクレオシド」という場合がある。特に糖部分が修飾された修飾ヌクレオシドを「修飾糖ヌクレオシド」という場合がある。

[0052] (ヌクレオチド)

本実施形態において「ヌクレオチド」とは、上記ヌクレオシドの糖にリン酸基が結合した化合物を意味する。天然に存在しているヌクレオチドを「天然ヌクレオチド」という場合がある。天然に存在していない修飾されたヌクレオチドを「修飾ヌクレオチド」又は「修飾核酸」という場合がある。「修飾ヌクレオチド」又は「修飾核酸」としては、上記修飾ヌクレオシドの糖部にリン酸基が結合した化合物、上記修飾ヌクレオシドの糖部に後述する修飾リン酸基が結合した化合物、及び、天然ヌクレオシドの糖部に後述する修飾リン酸基が結合した化合物等が挙げられる。

[0053] (糖修飾、修飾糖)

本実施形態において「糖修飾」とは、上記ヌクレオチドの糖部が修飾されていることを意味する。修飾された糖部を特に「修飾糖」という場合がある

。糖修飾が施されている修飾ヌクレオチドは修飾核酸として利用可能であり、例えば、AmNA(アミド架橋型修飾核酸、Amido-bridged nucleic acid)、GuNA(グアニジン架橋型修飾核酸、Guanidino-bridged nucleic acid)、scpBNA(2'-O, 4'-C-Spirocyclopropylene bridged nucleic acid)、2'-O-アルキル(例えば、2'-O-メチル核酸、2'-MOE核酸など)、2'-F、5'-メチル-DNA、LNA(2', 4'-Bridged Nucleic Acid/Locked Nucleic acid)、ENA(2'-O, 4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acid)、ScEt(2', 4'-constrained Ethyl Nucleic Acid)、5'-CP核酸(5'-cyclopropyl Nucleic Acid)等が挙げられる。

LNAとしては、例えば、後述する記号「A(L)」、「5(L)」、「G(L)」、「T(L)」で示される構造を含むものが挙げられる。AmNAとしては、例えば、後述する記号「A(Y)」、「5(Y)」、「G(Y)」、「T(Y)」で示される構造を含むものが挙げられる。GuNAとしては、例えば、後述する記号「A(Gx)」、「5(Gx)」、「G(Gx)」、「T(Gx)」で示される構造を含むものが挙げられる。scpBNAとしては、例えば、後述する記号「A(S)」、「5(S)」、「G(S)」、「T(S)」で示される構造を含むものが挙げられる。2'-MOE核酸としては、例えば、後述する記号「A(m)」、「5(m)」、「G(m)」、「T(m)」で示される構造を含むものが挙げられる。5'-CP核酸としては、例えば、後述する記号「A(5'-CP)」、「5(5'-CP)」、「G(5'-CP)」、「T(5'-CP)」で示される構造を含むものが挙げられる。2'-OMe核酸としては、例えば、後述する記号「A(M)」、「C(M)」、「G(M)」、「U(M)」、「T(M)」で示される構造を含むものが挙げられる。MCE核酸としては、例えば、後

述する「A (M_x)」、「C (M_x)」、「G (M_x)」、「U (M_x)」で示される構造を含むものが挙げられる。

[0054] (2' 位に置換基を有する修飾核酸)

本実施形態において「2' 位に置換基を有する修飾核酸」とは、上記ヌクレオチドの糖部2' 位に置換基を有する修飾核酸を意味する。例えば、非架橋型修飾核酸として、2' -O-アルキル（例えば、2' -O-メチル核酸、2' -MOE核酸、MCE核酸など）、2' -F等が挙げられ、架橋型修飾核酸として、LNA、AmNA、GuNA、scpBNA、ENA、ScEt等が挙げられる。

[0055] (糖修飾以外の当該分野で公知のヌクレオチドの修飾)

上記糖修飾以外の当該分野で公知のヌクレオチドの修飾は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを製造するための修飾核酸として利用可能である。ヌクレオチドの修飾としては、後述するリン酸基修飾、核酸塩基修飾が知られている。このようなヌクレオチドの修飾は、例えば、W. Brad Wan et. Al. J. Med. Chem. (2016) 59:9645-9667. (非特許文献3)等に記載されているヌクレオチドの修飾が挙げられる。これらのヌクレオチドの修飾は、上記文献で引用されている文献において述べられている当該分野で公知の方法に基づいて行うことができる。

[0056] (リン酸基)

本実施形態において「リン酸基」とは、上記ヌクレオチドのリン酸部の結合様式が天然に存在するホスホジエステル結合（後述する記号「-」で示される結合）であるものを意味する。

[0057] (リン酸基修飾、修飾リン酸基)

本実施形態において「リン酸基修飾」とは、上記ヌクレオチドのリン酸部が修飾されていることを意味する。修飾されたリン酸部を特に「修飾リン酸基」という場合がある。上記修飾リン酸基を含む結合様式としては、例えば、ホスホロチオエート結合（後述する記号「^」で示される結合）、ホスホ

ロジチオエート結合、ホスホアミダート結合（後述する記号「＝」で示される結合）、又はボラノホスフェート結合（後述する記号「×」で示される結合）、アルキルホスホネート等が挙げられる。

[0058] （核酸塩基修飾、修飾核酸塩基）

本実施形態において「核酸塩基修飾」とは、上記ヌクレオチドの核酸塩基部が修飾されていることを意味する。修飾された核酸塩基部を特に「修飾核酸塩基」という場合がある。修飾核酸塩基としては、例えば、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-プロピニルシトシン等が挙げられる。

[0059] （DNA又はRNAの類似体）

上記DNA又はRNAの類似体とは、DNA又はRNAに類似の構造を持つ分子を意味する。例えば、ペプチド核酸(pNA)、モルホリノ核酸等が挙げられる。

[0060] （ncRNA）

本実施形態において「ncRNA」とは、タンパク質の翻訳には関わらないRNAの総称を意味する。上記ncRNAとしては、例えば、リボソームRNA、転移RNA、miRNA、Natural Antisense Transcript (NAT) 等が挙げられる。

[0061] （オリゴヌクレオチドの核酸塩基部）

上記オリゴヌクレオチドの核酸塩基部としては、チミニル基、シトシニル基、アデニニル基、グアニニル基、5-メチルシトシニル基、ウラシリル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、及び2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基等が挙げられる。好ましくは、上記核酸塩基部としては、チミニル基、シトシニル基、アデニニル基、グアニニル基、5-メチルシトシニル基、及びウラシリル基等が挙げられる。当該核酸塩基のうち、ウ

ラシル（U）とチミン（T）とは互換性があり、どちらも、相補鎖のアデニン（A）との塩基対を形成することができる。また、シトシン（C）と5-メチルシトシン（5（x））とは互換性があり、どちらも相補鎖のグアニン（G）との塩基対を形成することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基部においても同様である。

[0062] （標的RNA）

本実施形態において「標的RNA」とは、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドが結合することによって、その機能が制御されるRNAを意味する。

[0063] （標的RNAとの結合）

本実施形態において「標的RNAとの結合」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基が、標的RNAとの相補性によって、当該標的RNAの核酸塩基と共に二本鎖核酸を形成することを意味する。上記二本鎖核酸は、上記標的RNAの少なくとも一部において形成されていればよい。なお、上記標的RNAとの結合の強さは、例えば、熱安定性の指標により測定することができる。上記熱安定性の指標としては、例えば、上記二本鎖核酸の融解温度（ T_m 値）等が挙げられる。上記 T_m 値としては、好ましくは $40\sim 90^{\circ}\text{C}$ であり、より好ましくは $50\sim 70^{\circ}\text{C}$ である。

[0064] （標的領域）

上記標的領域とは、標的RNAにおける、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドと結合する領域を意味する。

[0065] （標的領域との結合）

上記標的領域との結合とは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが標的領域と二本鎖を形成することを意味する。ただし、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、必ずしも標的領域全体と二本鎖を形成する必要はなく、標的領域の一部の領域と二本鎖形成するものであればよい。すなわち、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的領域と完全な相補性を有しているものであることが好ましいが、標的RNAと結合する限りにおいて、標的領域の少なくとも一部の領域と相補的であればよい。

[0066] (標的領域の一部)

上記標的領域の一部とは、標的領域のうち10～15merの塩基長の領域を意味する。

[0067] (標的領域の少なくとも一部と相補的)

上記標的領域の少なくとも一部と相補的とは、標的RNA上の標的領域の少なくとも一部の領域の塩基と相補的であることを意味する。ここにおいて、少なくとも一部の領域に対応するmRNA又はmRNA前駆体上の領域の塩基と相補的であることも含む。

[0068] (アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計)

本実施形態において、「アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを実際に合成することまでは要さず、頭の中でイメージすることで十分である。しかしながら、典型的には、該イメージされたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、電子計算機上で機能するプログラム(例:オリゴヌクレオチド設計用ソフトウェア、グラフィックデザインツール、オフィスソフト等)上や紙面上で具体化される。したがって、例えば後述の実施例に記載されるように、遅発性中枢毒性が低減されると予想されるアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを表の形式でまとめる行為も、本発明の設計方法の実施に該当する。

[0069] (中枢毒性)

本実施形態において、「中枢毒性」は、「中枢神経毒性」ともいい、げっ歯類から非ヒト霊長類やヒトにおける一般状態変化や脳病理組織学的変化により同定される中枢神経系に由来する毒性所見を指す。上記中枢毒性には、急性期中枢毒性と遅発性中枢毒性とに分類される。中枢神経系に由来する毒性所見としては、例えば、げっ歯類においては、易刺激性・自発運動減少・失調性歩行及び眼瞼下垂の可逆的で軽微な症状から痙攣や死亡等の重篤な症状を含む一般状態変化が挙げられる。具体的には、「中枢毒性」は、Irwinの変法(Irwin S., Psychopharmacologia, 1968; 13(3): 222-25

7) により行う行動スコアにより評価することができる。

[0070] (遅発性中枢毒性)

本実施形態において「遅発性中枢毒性」とは、急性期中枢毒性が現れ得る期間が経過し、回復した後に現れる中枢毒性を意味する。遅発性中枢毒性によって認められる症状としては、例えば、自発運動減少、歩行異常及び後肢の機能異常、振戦、後肢又は尾部の脱力、後肢の反射の消失、体重減少等が挙げられる。

[0071] (遅発性中枢毒性の低減)

本実施形態において、「遅発性中枢毒性が低減した」とは、後述する第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドが有する遅発性中枢毒性と比較して、第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドが有する遅発性中枢毒性が低いこと、あるいは低いと予想されることを意味する。本毒性は観察日に認められた一般状態所見を以下に例示する基準でスコア化し、観察期間を通してスコアを合算することでClinical sign scoreを算出するが、スコア化する基準についてはこれに限らない。毒性所見の強度によってスコアが加算されるため、低いClinical sign scoreが算出されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、安全性が高いと判断することができる。また、脳の病理検査において、異常所見が認められた場合と認められなかった場合をスコア化することでPathological scoreを算出するが、スコア化する基準についてはこれに限らない。各スコアは群ごとに平均値を採用する。例えば、一群3匹を用いて実施した場合、採材時点において1匹のみに病理学的所見が認められた時のPathological scoreは $1 \div 3 = 0.33$ と算出される。また、「遅発性中枢毒性に敏感な対象(個体)」とは、バイオマーカー等で選別される対象を指す。

Clinical sign score;

0点: 異常なし

1点: 後肢機能異常、振戦、自発運動減少

2点：後肢のひきずり、尾部又は後肢の脱力

3点：完全な後肢機能不全、後肢の麻痺、横臥、腹臥

4点：安楽殺

Pathological score ;

0点：異常なし

1点：異常あり（単細胞壊死、空胞化等）

[0072] <第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド>

本実施形態において第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

各ヌクレオシドがリン酸基及び／又は修飾リン酸基で結合されており、

ギャップ領域と、上記ギャップ領域の3'末端に結合している3'ウイング領域と、上記ギャップ領域の5'末端に結合している5'ウイング領域とを含み、

上記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、

上記3'ウイング領域及び上記5'ウイング領域は2'位に置換基を有する修飾核酸であり、

塩基長は、12~30merである、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本実施形態に係る設計方法における「ベースとなるアンチセンスオリゴヌクレオチド」、「改良前のアンチセンスオリゴヌクレオチド」と把握することもできる。

[0073] <第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド>

本実施形態において第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

ギャップ領域、3'ウイング領域及び5'ウイング領域の塩基配列が、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、

3'ウイング領域及び5'ウイング領域の核酸の糖部の構造が、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、

上記ギャップ領域に少なくとも1つの5'-CP核酸を含み、

上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、遅発性中枢毒性が低減されている。

上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本実施形態に係る設計方法における「改良後のアンチセンスオリゴヌクレオチド」と把握することもできる。

[0074] 本実施形態において、「塩基配列が同一である」とは、2つのオリゴヌクレオチドを比較したとき、両者の塩基配列が完全に同一である場合のみならず、対応する核酸塩基がその核酸塩基の修飾体（例えば、母核の構造が同一で、置換基が異なる修飾体）に置き換わっている場合も含まれる。例えば、シトシンと5-メチルシトシンとは同一とみなすことができる。

[0075] 本実施形態において、「核酸の糖部の構造が同一である」とは、2つのオリゴヌクレオチドを比較したとき、両者の同じ位置に配置されているヌクレオチドの糖部の構造それぞれが同一であることを意味する。

[0076] <アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列>

本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列は、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドとで同一であれば、特に制限されないが例えば、後述する実施例に記載の塩基配列が挙げられる。

本実施形態の一側面において、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列は、

(A) 配列番号1～27のいずれかに記載の塩基配列を基準として、90%以上100%以下の配列同一性を有する塩基配列、

(B) 配列番号1～27のいずれかに記載の塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加された塩基配列、又は、

(C) 配列番号1～27のいずれかに記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドに対して、ストリンジентな条件でハイブリダイズする塩基配列、であることが好ましい。

また、本実施形態において、配列表に示されている各塩基配列は核酸塩基

部の配列情報のみを示すために用いるものとする。上記核酸塩基部に加えて糖部及びリン酸部を含めたオリゴヌクレオチドの構造情報は、後述する実施例における表1に示される記載形式で示すものとする。

[0077] 本実施形態において「配列同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つの塩基配列をアラインさせた場合の最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方又は両方へのギャップの導入を考慮し得るものである。）における、オーバーラップする全塩基配列に対する同一塩基の割合（％）を意味する。塩基配列の「配列同一性」は、当業者であれば容易に確認することができる。例えば、NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用いることができる。

[0078] 本実施形態に係る一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列は、配列番号1～27のいずれかに記載の塩基配列に対して95％以上100％以下の配列同一性を有することが好ましく、98％以上100％以下の配列同一性を有することがより好ましく、100％の配列同一性を有することが更に好ましい。

[0079] 本実施形態において、「1又は数個の塩基が欠失、置換、挿入又は付加された塩基配列」としては、例えば、欠失、置換、挿入又は付加によって、欠失、置換、挿入又は付加される前の塩基配列に対して80％以上、85％以上、90％以上、95％以上、97％以上、98％以上、又は99％以上の配列同一性を有する塩基配列を挙げることができる。「1又は数個の塩基」の具体的な数としては、上述の欠失、置換、挿入又は付加が、それぞれ独立して、1カ所、2カ所、3カ所、4カ所、又は5カ所に存在してもよいし、複数が組み合わさっておこっていてもよい。

[0080] 本実施形態において「ストリンジентな条件」とは、例えば、6×SSC (1×SSCの組成：0.15MのNaCl、0.015Mのクエン酸ナ

トリウム、pH 7.0)と0.5% SDSと5×デンハルトと100 μg/mLの変性サケ精子DNAと50%(v/v)ホルムアミドとを含む溶液中、室温にて12時間インキュベートし、更に0.5×SSCで50°C以上の温度で洗浄する条件をいう。更に、よりストリンジेंटな条件、例えば、45°C又は60°Cにて12時間インキュベートすること、0.2×SSC又は0.1×SSCで洗浄すること、洗浄に際し60°C又は65°C以上の温度条件で洗浄すること等の、より厳しい条件も含む。

[0081] <薬理学上許容される塩>

本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドは、薬理学上許容される塩の形態であってもよい。ここで、「薬理学上許容される塩」とは、本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩であって、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの生理学的に許容される塩、すなわち、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望される生物学的な活性を保持し、かつ望まれない毒物学的効果を保持しない塩を意味する。なお、後述する二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド及びアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体についても同様である。

[0082] <製薬学的に許容される塩>

本実施形態の一側面において、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、製薬学的に許容される塩の形態であってもよい。ここで「製薬学的に許容される塩」とは、上述の薬理学上許容される塩であってかつ酸付加塩又は塩基付加塩であるものを意味する。酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩及びリン酸塩等の無機酸塩、並びに、クエン酸塩、シュウ酸塩、フタル酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、para-トルエンスルホン酸塩及びカンファースルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。また、塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩及びアルミニウム塩等の無機塩基

塩、並びに、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン [トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミン]、tert-ブチルアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン及びN, N-ジベンジルエチルアミン等の有機塩基塩等が挙げられる。更には、アルギニン、リジン、オルニチン、アスパラギン酸又はグルタミン酸等の塩基性アミノ酸又は酸性アミノ酸との塩 (アミノ酸塩) が挙げられる。なお、後述する二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド及びアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体についても同様である。

[0083] <アンチセンスオリゴヌクレオチドの構造>

本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップ領域と、上記ギャップ領域の3'末端に結合している3'ウイング領域と、上記ギャップ領域の5'末端に結合している5'ウイング領域と、を含む (例えば、図1参照)。上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖の形態 (一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド) であることが好ましい。本実施形態の一側面において、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、後述する第二鎖オリゴヌクレオチドとハイブリダイズして二本鎖の形態 (二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド) をとつてもよい。上記第二鎖オリゴヌクレオチドの塩基配列は、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列に対して相補的な塩基配列を基準として、90%以上100%以下の配列同一性を有する塩基配列であることが好ましい。

[0084] 上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、いわゆるギャップマー型の本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドである。ギャップマー型の本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下のメカニズムで、標的RNAの機能を阻害する。まず、当該一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的RNAの標的領域に結合する (図2の上部から中央部)。次に、RNA分解酵素であるRNase Hが、当該一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的RNAの複合体を認識し結合する (図2の中央部)。その後、RNase

Hによる酵素分解反応により標的RNAが切断、分解される。このとき、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNase Hによる酵素分解の影響を受けない（図2の下部）。そのため、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、別の標的RNAに結合して当該RNAを切断、分解することが可能になる。このようにギャップマー型的一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上述のRNase Hによる酵素分解反応において触媒として機能するため、少量の投与であっても持続的に所定の効果を奏すと考えられる。

[0085] (ギャップ領域)

上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、ギャップ領域は、少なくとも1つの5' -CP核酸を含む。

また、第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域は、5~20merの、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であることが好ましい。言い換えると、上記ギャップ領域は、5~20merの、糖部が修飾されていてもよいデオキシリボースを含む核酸であると把握することもできる。また、上記ギャップ領域は、5~20merの、糖部がデオキシリボースである天然ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド又はこれらの両方から構成されていると把握することもできる。上記ギャップ領域は、糖部がデオキシリボース又は修飾されたデオキシリボースであることによって、RNase Hが認識可能な複合体を、標的RNAと共に形成することが可能になる。ここで、修飾されたデオキシリボースを含む核酸としては、例えば、5' -CP核酸が挙げられる。

[0086] 上記ギャップ領域の塩基数は、5~20merであることが好ましく、6~17merであることがより好ましく、7~13merであることが更に好ましく、9~13merが更に好ましい。

[0087] 糖部がデオキシリボースである天然ヌクレオチドとしては、例えば、デオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、チミジンーリン酸

、デオキシシチジナーリン酸、デオキシ-5-メチルシチジナーリン酸（5-メチルデオキシシチジンとも言う。）等が挙げられる。言い換えると、上記ギャップ領域を構成する天然ヌクレオチドとしては、後述する記号 a、g、t 及び c それぞれに対応する構造式を含むものが挙げられる。

[0088] 糖部がデオキシリボース又は修飾されたデオキシリボースである非天然ヌクレオチドとしては、例えば、5'-CP 核酸、2-チオチミジナーリン酸、2-アミノアデノシンーリン酸、7-デアザグアノシンーリン酸等が挙げられる。

[0089] なお、上記ギャップ領域は、本発明の効果が奏する限りにおいて、糖部がデオキシリボースである天然ヌクレオチドの一部の糖部が修飾糖であってもよい。すなわち、本実施形態の一側面において、上記ギャップ領域は、一部の糖部がデオキシリボースであり、且つ他の一部の糖部が修飾糖（例えば、修飾されたデオキシリボース）である核酸であってもよい。

[0090] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記 5'-CP 核酸が、上記ギャップ領域の 5' 側から数えて 2 番目に少なくとも配置されていることが好ましい。

[0091] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記 5'-CP 核酸が、上記ギャップ領域において 2 個以上配置されていることが好ましく、2~5 個配置されていることがより好ましい。ここで、「2 個以上配置されている」とは、対象の 5'-CP 核酸が連続して 2 個以上配置されている態様と、上記ギャップ領域において分散して 2 個以上配置されている態様が含まれる概念である。

[0092] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記 5'-CP 核酸が、上記ギャップ領域の少なくとも 1 か所において連続して 2~4 mer 配置されていることが好ましい。

[0093] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記 5'-CP 核酸が、上記ギャップ領域における 5' 末端側に配置されていることが好ましい。また、上記 5'-CP 核酸が、上記ギャップ領域における 5' 末端側及

び3'末端側に配置されていることが好ましい。ここで、「ギャップ領域における5'末端側に配置されている」とは、ギャップ領域の中心よりも5'末端側に配置されていることを意味する。「ギャップ領域における3'末端側に配置されている」とは、ギャップ領域の中心よりも3'末端側に配置されていることを意味する。

[0094] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記5' -C P 核酸が、上記ギャップ領域に対して9分の1以上配置されていることが好ましく、5分の1以上配置されていることがより好ましい。このとき、上限値は、例えば、2分の1以下であってもよい。

[0095] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記5' -C P 核酸が、上記ギャップ領域の5'側から数えて2番目に少なくとも配置されており、かつ2個以上配置されていてもよい。また、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記5' -C P 核酸が、上記ギャップ領域の5'側から数えて2番目に少なくとも配置されており、かつ少なくとも1か所において連続して2~4mer配置されていてもよい。また、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記5' -C P 核酸が、上記ギャップ領域における5'末端側に配置されており、かつ少なくとも1か所において連続して2~4mer配置されていてもよい。また、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記5' -C P 核酸が、上記ギャップ領域における5'末端側及び3'末端側に配置されており、かつ少なくとも1か所において連続して2~4mer配置されていてもよい。

[0096] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、上記5' -C P 核酸と、上記5' -C P 核酸の3'側で隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホロチオエート結合であることが好ましい（ただし、上記5' -C P 核酸がギャップ領域の3'末端に配置されている場合を除く）。ここで、「5' -C P 核酸がギャップ領域の3'末端に配置されている」とは、「当該5' -C P 核酸が3'ウイング領域のヌクレオシド

と結合している」と把握することもできる。

本実施形態の一側面において、上記ギャップ領域において、上記5' - C P 核酸と、上記5' - C P 核酸の3' 側で隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホロチオエート結合であることが好ましい（ただし、上記5' - C P 核酸がギャップ領域の3' 末端に配置されている場合と上記5' - C P 核酸の3' 側で隣接しているヌクレオシドが5' - C P 核酸である場合を除く）。

[0097] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、上記5' - C P 核酸と、上記5' - C P 核酸の5' 側で隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホジエステル結合であることが好ましい。

[0098] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただし、5' - C P 核酸は含まない）で構成される塩基の数が5 個以上であることが好ましく、5 ~ 10 個であることがより好ましい。

[0099] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、上記5' - C P 核酸が2 個以上配置されており、かつ糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただし、5' - C P 核酸は含まない）で構成される塩基の数が5 個以上であってもよい。また、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、上記5' - C P 核酸が2 ~ 5 個配置されており、かつ糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただし、5' - C P 核酸は含まない）で構成される塩基の数が5 ~ 10 個であってもよい。

[0100] 本実施形態の一側面において、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域は、5' - C P 核酸を含まず、

上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域の5' - C P 核酸以外の糖部の構造が上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であることが好ましい。

[0101] 本実施形態の他の側面において、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域に配置されるシトシンは、5-メチルシトシンであってもよい。

[0102] (3' ウイング領域)

上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記3' ウイング領域は、2' 位に置換基を有する修飾核酸である。言い換えると、上記3' ウイング領域は、2' 位に置換基を有する修飾ヌクレオチドから構成されていると把握することもできる。上記3' ウイング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸は、非架橋型の2' 位修飾核酸として、2'-O-メチル核酸、2'-MOE核酸及びMCE核酸、架橋型修飾核酸として、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むことが好ましい。上記3' ウイング領域及び後述する上記5' ウイング領域が、上記所定の修飾ヌクレオチドから構成されることによって、標的RNAに対して高い結合親和性が期待でき、ひいては標的RNAの機能を効果的に制御できると考えられる。本実施形態の一側面において、上記3' ウイング領域は、糖部が修飾糖である修飾核酸であってもよい。糖部が修飾糖である修飾核酸としては、上記(糖修飾、修飾糖)で挙げられたものが例示される。本実施形態の一側面において、3' ウイング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸は、2'-MOE核酸のみで構成されていてもよい。なお、上記3' ウイング領域における修飾核酸は、1つの一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの中に複数種類含まれていてもよい。

[0103] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記3' ウイング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸が、2'-MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むことが好ましく、2'-MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる修飾核酸で構成されていることがより好ましい。

[0104] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記3' ウィング領域の塩基数は、3~5merであることが好ましい。

[0105] (5' ウィング領域)

上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記5' ウィング領域は、2' 位に置換基を有する修飾核酸である。言い換えると、上記5' ウィング領域は、2' 位に置換基を有する修飾ヌクレオチドから構成されていると把握することもできる。上記5' ウィング領域における上記修飾核酸は、非架橋型の2' 位修飾核酸として、2' -O-メチル核酸、2' -MOE核酸及びMCE核酸、架橋型修飾核酸として、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むことが好ましい。本実施形態の一側面において、上記5' ウィング領域は、糖部が修飾糖である修飾核酸であってもよい。糖部が修飾糖である修飾核酸としては、上記(糖修飾、修飾糖)で挙げられたものが例示される。本実施形態の一側面において、5' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸は、2' -MOE核酸のみで構成されていてもよい。なお、上記5' ウィング領域における修飾核酸は、1つの一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの中に複数種類含まれていてもよい。本実施形態の他の側面において、3' ウィング領域及び5' ウィング領域における上記修飾核酸は、2' -MOE核酸のみで構成されていてもよい。

[0106] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記5' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸が、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むことが好ましく、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる修飾核酸で構成されていることがより好ましい。

[0107] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリ

ゴヌクレオチドにおいて、上記3' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸が、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、

上記5' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸が、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むことが好ましい。

また、上記3' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸が、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる修飾核酸で構成されていて、

上記5' ウィング領域における上記2' 位に置換基を有する修飾核酸が、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる修飾核酸で構成されていることがより好ましい。

[0108] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記5' ウィング領域の塩基数は、3~5merであることが好ましい。

[0109] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域の塩基数は5~20merであり、上記3' ウィング領域の塩基数は3~5merであり、上記5' ウィング領域の塩基数は3~5merであることが好ましい。

[0110] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域の塩基数は7~13merであり、上記3' ウィング領域の塩基数は3~5merであり、上記5' ウィング領域の塩基数は3~5merであることがより好ましい。

[0111] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、上記ギャップ領域の塩基数は9~13merであり、上記3' ウィング領域の塩基数は3~5merであり、上記5' ウィング領域の塩基数は3~5merであることが更に好ましい。

[0112] (核酸の糖部の構造)

核酸の糖部の構造は、上記（ギャップ領域）、（3' ウィング領域）、及び（5' ウィング領域）の欄において述べた構成であれば特に制限されないが、例えば、以下の表 1 に示すものが挙げられる。表 1 において、構造例 1、5、9、12、15、20、22、及び 25 は、上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおける糖部の構造に対応し、それら以外は、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおける糖部の構造に対応する。

[0113]

本実施形態の一側面において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記3' ウィング領域の3' 末端に結合している天然ヌクレオチドを更に含んでいてもよい。上記3' ウィング領域の3' 末端に結合している天然ヌクレオチドの塩基数は、1又は数個であってもよく、1個であってもよい。

[0115] (ギャップマー型の構造の表記方法)

本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマー型である。ギャップマー型の構造を表記するにあたっては、「X-Y-Z」の表記方法を用いることがある。上述の表記方法において、「X」は5' ウィング領域の塩基数を示し、「Y」はギャップ領域の塩基数を示し、「Z」は3' ウィング領域の塩基数を示す。

[0116] 「X-Y-Z」としては、2-8-4、2-8-3、2-8-5、2-9-2、2-9-3、2-9-4、2-9-5、2-10-3、2-10-4、2-10-5、2-11-3、2-11-4、2-11-5、2-12-3、2-12-4、2-12-5、3-8-2、3-8-3、3-8-4、3-8-5、3-9-3、3-9-4、3-9-5、3-10-3、3-10-4、3-10-5、3-11-3、3-11-4、3-11-5、3-12-3、3-12-4、3-12-5、3-13-3、3-13-4、4-8-2、4-8-3、4-8-4、4-8-5、4-9-3、4-9-4、4-9-5、4-10-3、4-10-4、4-10-5、4-11-2、4-11-3、4-11-4、4-11-5、4-12-4、4-13-3、5-8-2、5-8-3、5-8-4、5-8-5、5-9-2、5-9-3、5-9-4、5-9-5、5-10-2、5-10-3、5-10-4、5-10-5、5-11-2、5-11-3、5-11-4、5-11-5等が挙げられる。例えば、「2-8-4」と表記した場合、5' ウィング領域は2merのオリゴヌクレオチドであり、ギャップ領域は8merのオリゴヌクレオチドであり、3' ウィング領域は4merのオリゴヌクレオチドであることを意味する。

[0117] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び第二のアンチセンスオリ

ゴヌクレオチドにおいて、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基長は、15～30merであり、好ましくは15～20merであり、より好ましくは18～20merである。本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基長が、15～20mer、18～20merである場合、特に、標的RNAへの結合が強く、標的RNAの発現の調節をより効果的に行うことができる。

[0118] 本実施形態において、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシドがリン酸基及び／又は修飾リン酸基で結合されており、ホスホジエステル結合又はホスホロチオエート結合で結合されていることが好ましい。

[0119] 本実施形態の一側面において、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であることが好ましい。本実施形態の他の側面において、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオシド間結合がホスホジエステル結合であることが好ましい。

[0120] 上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシド間結合において、ホスホロチオエート結合の割合が50%～80%であることが好ましく、50%～70%であることがより好ましい。

[0121] 上記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

塩基配列におけるGCの比率が0.2～0.6であることが好ましい。「GCの比率」とは、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列の全体に対する、グアニン及びシトシン（5-メチルシトシンも含む）の個数の割合を意味する。

[0122] 本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）の一態様としては、5～20merからなるギャップ領域、3～5merからなる5'ウイング領域、及び3～5merからなる3'ウイング領域を有するギャップマー型の本鎖アンチセンスオリゴヌ

クレオチドである。ここにおいて、該ギャップ領域は、該5' ウィング領域と該3' ウィング領域の間に位置付けられる。該ギャップ領域は、少なくとも1つの5' -CP核酸を含む。そして、該5' ウィング領域及び該3' ウィング領域には、それぞれ少なくとも1つの2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、又はscpBNAが含まれることが好ましい。該5' ウィング領域及び該3' ウィング領域には、2' -O-アルキル化若しくは2' -F化されたヌクレオチドが含まれていてもよい。2' -O-アルキル化ヌクレオチドとしては、D-リボフラノースの2' -O-アルキル化（例えば、2' -O-メチル化等）ヌクレオチドを用いてもよい。また、上記ギャップマー型的一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、第二鎖オリゴヌクレオチドとのハイブリダイズによって二本鎖を形成していてもよい。

- [0123] 本実施形態の一側面において、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩であって、
- 上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオチドがリン酸基及び／又は修飾リン酸基で結合されており、
- 上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップ領域と、上記ギャップ領域の3' 末端に結合している3' ウィング領域と、上記ギャップ領域の5' 末端に結合している5' ウィング領域と、を含み、
- 上記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、
- 上記ギャップ領域は、少なくとも1つの5' -CP核酸を含み、
- 上記3' ウィング領域及び上記5' ウィング領域は2' 位に置換基を有する修飾核酸であり、
- 上記アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基長は、12～30merである。

- [0124] 本実施形態の一側面において、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、後述する表2-1～

2-8における、配列番号2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 及び27からなる群より選ばれる少なくとも1つであることが好ましい。ここで、「表2-1における配列番号2の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、表2-1における配列名が「h451-465-N」である一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを意味する。他の場合も同様である。

[0125] <二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド>

本実施形態に係る二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）と、

上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドに対してハイブリダイズしている第二鎖オリゴヌクレオチドと、を含む二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩である。上記第二鎖オリゴヌクレオチドの塩基配列は、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列に対して相補的な塩基配列を基準として、90%以上100%以下の配列同一性を有する塩基配列であることが好ましい。

[0126] 上記二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、溶液中で解離して、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドと、上記第二鎖オリゴヌクレオチドとに分離することができる。分離した上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上述した標的RNAに結合することができる。なお、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記第二鎖オリゴヌクレオチドとの関係において、「第一鎖オリゴヌクレオチド」と把握することもできる。なお、上記二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するオリゴヌクレオチドのうち上記第一鎖オリゴヌクレオチドが上述した標的RNAに対するアンチセンス鎖を有しているが、上記第一鎖オリゴヌクレオチドと上記第二鎖オリゴヌクレオチドからなる二本鎖オリゴヌクレオチドを便宜上「二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド」と呼ぶことにする。

[0127] <<一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法>>

本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩の製造方法は、

遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩の製造方法であって、

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法によって、上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する工程と、

上記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成する工程とを含む。

[0128] 本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、ホスホロアミダイト法による固相合成により製造することができる。例えば、市販の核酸自動合成機を使用して固相担体上で所定の塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドをまず合成する。次に、塩基性物質等を用いて固相担体から合成した一本鎖オリゴヌクレオチドを切出し、脱保護を行ない、粗体の一本鎖オリゴヌクレオチドを得る。その後、得られた粗体の一本鎖オリゴヌクレオチドを、HPLC等を用いて精製する。上述の製造法に限らず、本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当業者に公知の方法に準じて、核酸の塩基配列、修飾部位等を適宜変更することにより製造できる。また、AmNA、GuNA、及びscpBNAについては、それぞれ国際公開第2011/052436号（特許文献5）、国際公開第2014/046212号（特許文献6）、及び国際公開第2015/125783号（特許文献7）に記載の方法により製造することができる。2'-MOE核酸については、試薬として購入可能なアミダイトを用いることにより製造することができる。5'-CP核酸については、国際公開第2020/158910号（特許文献3）に記載の方法により製造することができる。LNAについては、国際公開第99/14226号（特許文献8）に記載の方法により製造することができる。

[0129] 《二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法》

本発明の二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、まず、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドと同様の製造方法を用いて、該一本鎖アンチ

センスオリゴヌクレオチドに相補的な塩基配列を基準として所定の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド（第二鎖オリゴヌクレオチド）を製造する。その後、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび上記第二鎖オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせることにより製造することができる。

[0130] 《アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体》

本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体は、

上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）若しくはその製薬学的に許容される塩、又は上記二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩と、

上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又は上記第二鎖オリゴヌクレオチドに結合している付加物質と、

を有する。上記付加物質は、ポリエチレングリコール、ペプチド、アルキル鎖（例えば、飽和脂肪族炭化水素等）、核酸、リガンド化合物、抗体、タンパク質、及び糖鎖（例えば、炭水化物、多糖等）からなる群より選ばれる。

[0131] 本実施形態の一側面において、上記アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体は、

上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩と、

上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合している付加物質と、を有し、上記付加物質は、ポリエチレングリコール、ペプチド、アルキル鎖（例えば、飽和脂肪族炭化水素等）、核酸、リガンド化合物、抗体、タンパク質、及び糖鎖（例えば、炭水化物、多糖等）からなる群より選ばれる。

[0132] 本実施形態の他の側面において、上記アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体は、

上記二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩と、

上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又は上記第二鎖オリゴヌクレ

オチドに結合している付加物質と、を有し、上記付加物質は、ポリエチレングリコール、ペプチド、アルキル鎖（例えば、飽和脂肪族炭化水素等）、核酸、リガンド化合物、抗体、タンパク質、及び糖鎖（例えば、炭水化物、多糖等）からなる群より選ばれる。

[0133] 本実施形態において「付加物質」とは、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又は上記第二鎖オリゴヌクレオチドに結合している物質であって、所定の作用を付与するために用いられる物質を意味する。上記付加物質は、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端に結合していてもよいし、3'末端に結合していてもよいし、5'末端及び3'末端の両方に結合していてもよい。また、上記付加物質は、上記第二鎖オリゴヌクレオチドの5'末端に結合していてもよいし、3'末端に結合していてもよいし、5'末端及び3'末端の両方に結合していてもよい。本実施形態の一側面において、上記付加物質は、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又は上記第二鎖オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端のいずれか一方に結合していることが好ましい。また、上記付加物質は、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又は上記第二鎖オリゴヌクレオチドと直接、共有結合で結合していてもよい。上記付加物質は、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又は上記第二鎖オリゴヌクレオチドと、リンカー物質を介して結合していてもよい。上記リンカー物質としては例えば、アルキル、ポリエチレングリコール、ペプチド、ジスルフィド、核酸等及び／又はこれらの組み合わせで構成されたリンカーが挙げられる。上記付加物質を上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又は上記第二鎖オリゴヌクレオチドに結合させる方法は、例えば後述する実施例に記載の方法が挙げられる。

[0134] 上記付加物質として用いられるペプチドとしては、例えば、以下のようなものが挙げられるが、これらに限らない。CPPs (Cell Penetrating Peptides: 細胞膜透過性ペプチド)、核移行性ペプチド、TAT (Trans-Activator of Transcription protein)、ポリアルギニン、グルカゴン様ペプチド-1

類縁ペプチド、合成環状RGDペプチド、脳移行性ペプチド

[0135] 上記付加物質として用いられるリガンド化合物としては、例えば、以下のようなものが挙げられるが、これらに限らない。N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、糖類 (グルコース、マンノース等)、脂質類 (コレステロール、パルミチン酸、ドコサヘキサエン酸等)、ビタミン類 (葉酸、ビタミンA、ビタミンE (トコフェロール) 等)、アミノ酸、モノアミン受容体リガンド (インダトラリン等)

[0136] 上記付加物質として用いられる抗体としては、例えば、以下のようなものが挙げられるが、これらに限らない。抗インスリン受容体抗体、抗トランスフェリン受容体抗体、抗LDL受容体関連タンパク質抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗HER2抗体

[0137] 上記付加物質として用いられるタンパク質としては、例えば、以下のようなものが挙げられるが、これに限らない。アルブミン

[0138] 上記付加物質として用いられる核酸としては、例えば、以下のようなものが挙げられる。天然ヌクレオチド、アプタマー

なお、上記付加物質として用いられる核酸は、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基長にはカウントしないものとする。

[0139] ≪一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド等を有効成分として含有する医薬組成物≫

本実施形態に係る医薬組成物は、本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド (第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド) 若しくはその製薬学的に許容される塩、上記二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩、又は上記アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体若しくはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含む。上記医薬組成物としては、例えば、疾患の治療剤、疾患の予防剤等が挙げられる。本実施形態の医薬組成物の投与方法及び製剤は、当該分野で公知の投与方法及び製剤であれば、いずれも利用可能である。以下、上記医薬組成物を、「アンチセンスオリゴヌクレオチド等の医薬組成物」と表記することがある。

[0140] 上記医薬組成物（治療剤、予防剤等）は、中枢神経系の疾患の治療又は予防に用いられる。上記中枢神経系の疾患としては、例えば、R P S 2 5 遺伝子に関連した疾患、すなわちR A N翻訳によって産生したジペプチドリピートによって引き起こされうる疾患（「リピート病」と表記する場合がある。）が挙げられる。リピート病の具体例としては、例えば、C 9 o r f 7 2 A L S、C 9 o r f 7 2 F T L D、ハンチントン病、脊髄小脳失調症（1、2、3、6、7、8、12、17型）、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、F r i e d r e i c h失調症、脆弱X随伴振戦失調症候群、筋強直性ジストロフィー等をはじめとする種々の精神神経疾患及び筋疾患等が挙げられる。

[0141] <個体>

上記個体とは、哺乳動物を意味する。上記個体は、好ましくは、ヒト、サル、マーモセット、イヌ、ブタ、ウサギ、モルモット、ラット及びマウスである。上記個体は、より好ましくはヒトである。

[0142] 本実施形態の一側面において、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）又はその医薬組成物は、遅発性中枢毒性に敏感な対象（個体）に好適な投与経路で投与されうる。ここで、「遅発性中枢毒性」とは、急性期中枢毒性が現れ得る期間が経過し、回復した後に現れる中枢毒性を意味する。遅発性中枢毒性によって認められる症状としては、例えば、自発運動減少、歩行異常及び後肢の機能異常、振戦、後肢又は尾部の脱力、後肢の反射の消失、体重減少等が挙げられる。

[0143] 本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬組成物を投与するに当たっては、その投与方法及び剤型は特に限定されない。すなわち、当該分野における公知の投与方法及び製剤であれば、いずれも本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の投与方法及び製剤として用いることができる。投与方法としては、例えば、経口投与、非経口投与等が挙げられる。非経口投与としては、点眼投与、腔内投与、直腸内投与、鼻腔内投与、経皮投与、静脈内注射、点滴、皮下、腹腔内若しくは筋肉内注入、吸引若しくは

吸入による肺投与、髄腔内投与、脳室内投与等が挙げられる。本実施形態の一側面において、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬組成物は、中枢神経系に曝露されるように投与されることが好ましい。中枢神経系に曝露されるような投与方法としては、例えば、髄腔内投与、脳室内投与等が挙げられる。

[0144] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の製剤には、賦形剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤、矯味剤、芳香剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤、保存剤、等張剤等の各種医薬用添加剤を必要に応じて混合することができる。

[0145] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の医薬組成物を局所投与する場合、例えば、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴下剤、坐剤、噴霧剤、液剤、散剤等の製剤を用いることができる。

[0146] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の医薬組成物を経口投与する場合、例えば、散剤、顆粒剤、水若しくは非水性媒体に溶解させた懸濁液又は溶液、カプセル、粉末剤、錠剤等の製剤を用いることができる。

[0147] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の医薬組成物を非経口、髄腔内、又は脳室内投与する場合、例えば、無菌水溶液等の製剤を用いることができる。

[0148] 本発明の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの有効投与量は、投与される個体の性別、年齢、体重、症状等により、任意に定めることができる。更に、投与の方法、経路、頻度等に応じて任意に定めることができる。例えば、投与量として0.01~100mg/kg等が挙げられる。好ましくは0.1~50mg/kgであり、更に好ましくは0.1~10mg/kgである。

[0149] 以上、本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法、及び製造方法について説明した。上述の設計方法及び製造方法によって得られる上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップ領域に少なくとも1つの5'-CP核酸が含まれているため、遅発性中枢毒性が低減される

。

実施例

[0150] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0151] 《一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計》

まず、表2-1～表2-8に示される一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計した。それぞれの表の中で、最初の行に記載した配列が親配列（第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する配列）、2行目以下はその親配列に基づいて5'-CP核酸を導入した配列（第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドに対応する配列）である。

[0152] [表2-1]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
h451-465-C	T(Y)-T(Y)-5(Y) ^c a ^a a ^t g ^t a ^c A(Y)-G(Y)-5(S)	5053.7	1
h451-465-N	T(Y) ^t T(Y)-5(Y)-5(5'-CP)-A(5'-CP) ^a a ^t g ^t a ^c A(Y)-G(Y) ⁵ (S)	5119.2	2
h451-465-O	T(Y) ^t T(Y) ⁵ (Y)-5(5'-CP)-A(5'-CP)-A(5'-CP)-A(5'-CP) ^t g ^t a ^c A(Y) ⁵ (S)	5171.2	3
h451-465-AL	T(Y) ^t T(Y) ⁵ (Y)-5(5'-CP)-A(5'-CP) ^a a ^t g ^t A(5'-CP)-5(5'-CP)-A(Y) ⁵ (S)	5184.3	4
h451-465-AR	T(Y) ^t T(Y) ⁵ (Y)-5(5'-CP)-A(5'-CP)-a ^a t ^g t ^a 5(x) ⁵ A(Y)-G(Y) ⁵ (S)	5133.2	5

[0153] [表2-2]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
h450-466-B	T(Y)-T(Y)-T(Y) ^c c ^a a ^a t ^g t ^a c ^a G(Y)-5(Y)-T(S)	5679.7	6
h450-466-C	T(Y) ^t T(Y)-T(Y)-5(5'-CP)-5(5'-CP) ^a a ^a t ^g t ^a 5(x) ⁵ A(5'-CP)-G(Y)-5(Y) ^t (S)	5783.4	7
h450-466-E	T(Y) ^t T(Y)-T(Y)-5(5'-CP)-5(5'-CP)-A(5'-CP)-A(5'-CP) ^a t ^g t ^a 5(x) ⁵ A ⁵ (Y)-5(Y) ^t (S)	5793.3	8

[0154]

[表2-3]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
h453-472-A	T(Y)-T(Y)-T(Y) ⁵ a ⁵ t ⁵ t ⁵ t ⁵ t ⁵ (x) ⁵ (x) ⁵ a ⁵ a ⁵ a ⁵ t ⁵ g ⁵ T(GtB)- A(Y)-5(Y)-A(GtB)	6848.4	9
h453-472-B	T(Y) ⁵ T(Y)-T(Y)-A(5'-CP)-T(5'-CP)-T(5'-CP)-T(5'- CP) ⁵ t ⁵ (x) ⁵ (x) ⁵ a ⁵ a ⁵ a ⁵ t ⁵ -G(5'-CP) ⁵ T(GtB)- A(Y) ⁵ (Y) ⁵ A(GtB)	6946.6	10

[0155] [表2-4]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
h451-465-AB	T(Y)-T(Y)-5(Y) ⁵ (x) ⁵ a ⁵ a ⁵ a ⁵ t ⁵ g ⁵ t ⁵ a ⁵ (x) ⁵ A(Y)-G(Y)-5(S)	5080.2	11
h451-465-BE	T(Y) ⁵ T(Y) ⁵ (Y)-5(5'-CP)-A(5'-CP)-A(5'-CP)-A(5'-CP) ⁵ t ⁵ g ⁵ t ⁵ a ⁵ (x) ⁵ A(Y) ⁵ G(Y) ⁵ (S)	5185.1	12
h451-465-AU	T(Y) ⁵ T(Y) ⁵ (Y)-5(x)-A(5'-CP)-A(5'-CP)-A(5'-CP) ⁵ t ⁵ g ⁵ t ⁵ a ⁵ (x) ⁵ A(Y) ⁵ G(Y) ⁵ (S)	5159.7	13

[0156] [表2-5]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
h451-469-A	A(m) ⁵ T(m)-T(m)-T(m)-T(m) ⁵ t ⁵ (x) ⁵ (x) ⁵ a ⁵ a ⁵ a ⁵ t ⁵ g ⁵ t ⁵ A(m)-5(m)-A(m)-G(m) ⁵ (m)	6751.5	14
h451-469-F	A(m) ⁵ T(m)-T(m)-T(m)-T(m) ⁵ T(5'-CP)-5(5'-CP) ⁵ (x) ⁵ a ⁵ a ⁵ t ⁵ g ⁵ T(5'-CP) ⁵ A(m)-5(m)-A(m) ⁵ G(m) ⁵ (m)	6829.6	15
h451-469-E	A(m) ⁵ T(m)-T(m)-T(m)-t-T(5'-CP)-5(5'-CP) ⁵ (x) ⁵ a ⁵ a ⁵ a ⁵ t ⁵ g ⁵ t ⁵ a ⁵ (GtB)-A(GtB) ⁵ G(GtB) ⁵ (m)	6808.6	16

[0157]

[表2-6]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
h451-469-D	A(Y)-T(Y)-T(Y) ^t t ^t t ^t 5(x) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t a ⁵ (S)-A(Y)-G(Y)-5(S)	6409.9	17
h451-469-G	A(Y) ^t T(Y)-T(Y)-T(5'-CP)-T(5'-CP)-T(5'-CP) ⁵ (x) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t -A(5'-CP) ⁵ (S)-A(Y) ^a G(Y) ⁵ (S)	6498.1	18
h451-469-H	A(Y) ^t T(Y)-T(Y)-T(5'-CP)-T(5'-CP)-T(5'-CP)-5(5'-CP) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t a ⁵ (S)-A(Y) ^a G(Y) ⁵ (S)	6498.1	19
h451-469-I	A(Y) ^t T(Y)-T(Y)-T(5'-CP)-T(5'-CP)-T(5'-CP)-5(5'-CP) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t -A(5'-CP) ⁵ (S)-A(Y) ^a G(Y) ⁵ (S)	6508.1	20
h451-469-J	A(Y) ^t T(Y)-T(Y)-T(5'-CP)-T(5'-CP)-T(5'-CP) ⁵ (x) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t T(5'-CP)-A(5'-CP)-5(S)-A(Y)-G(Y) ⁵ (S)	6492.1	21

[0158] [表2-7]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
h453-472-C	T(GtB) ^t T(m)-T(m)-A(m)-t ^t t ^t t ^t 5(x) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t T(m)-A(m)-5(GtB) ^t A(GtB)	7068.8	22
h453-472-D	T(GtB) ^t T(m)-T(m)-A(m)-t-T(5'-CP) ^t t ^t t ^t 5(x) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t T(m)-A(m)-5(GtB) ^t A(GtB)	7078.8	23
h453-472-E	T(m) ^t T(m) ^t T(m)-A(GtB)-t-T(5'-CP) ^t T(5'-CP) ^t 5(x) ⁵ (x) ^a a ^a a ^t g ^t T(GtB)-A(m)-5(m) ^t A(GtB)	7104.9	24

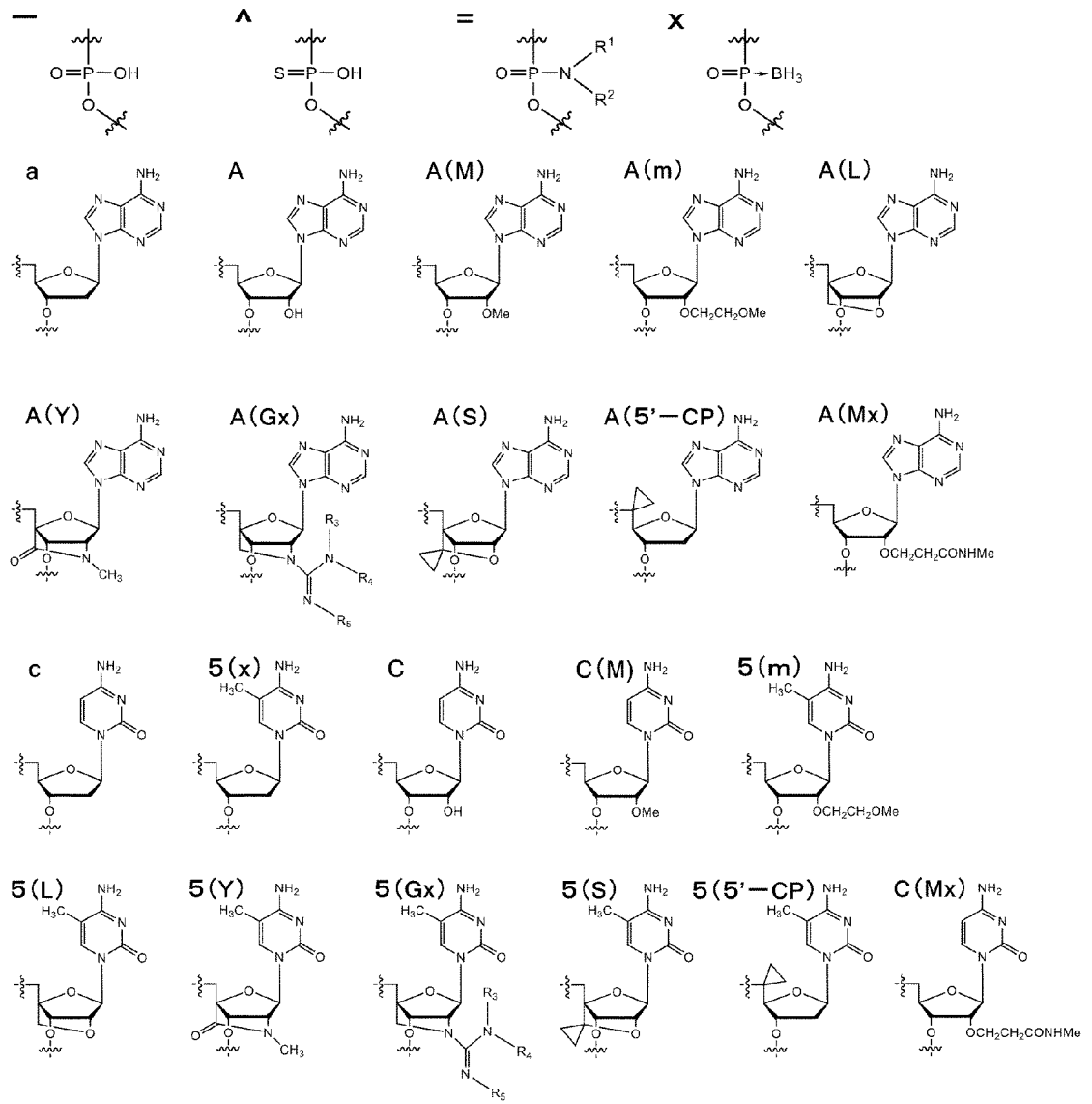
[0159] [表2-8]

配列名	配列 (5'→3')	分子量 (実測値)	配列番号
LX-A7033	A(L) ^a G(L) ^a A(L) ^a t ^a g ^a c ^a c ^a a ^t c ^t 5(L) ^t T(L) ^t T(L) ^a G(L)	5980.7	25
LX-A7152	A(L) ^a G(L) ^a A(L)-A(5'-CP)-T(5'-CP)-G(5'-CP)-G(5'-CP) ^a c ^a c ^a a ^t c ^t 5(L) ^t T(L) ^t T(L) ^a G(L)	6020.1	26
LX-A7153	A(L) ^a G(L)-A(L) ^a A(5'-CP)-T(5'-CP) ^a g ^a c ^a c ^a a ^t -5(5'-CP) ^t (5'-CP) ⁵ (L)-T(L) ^t T(L) ^a G(L)	6033.9	27

[0160] 本明細書において、下記記号又は表記を用いて、対応する構造を表すことがある。

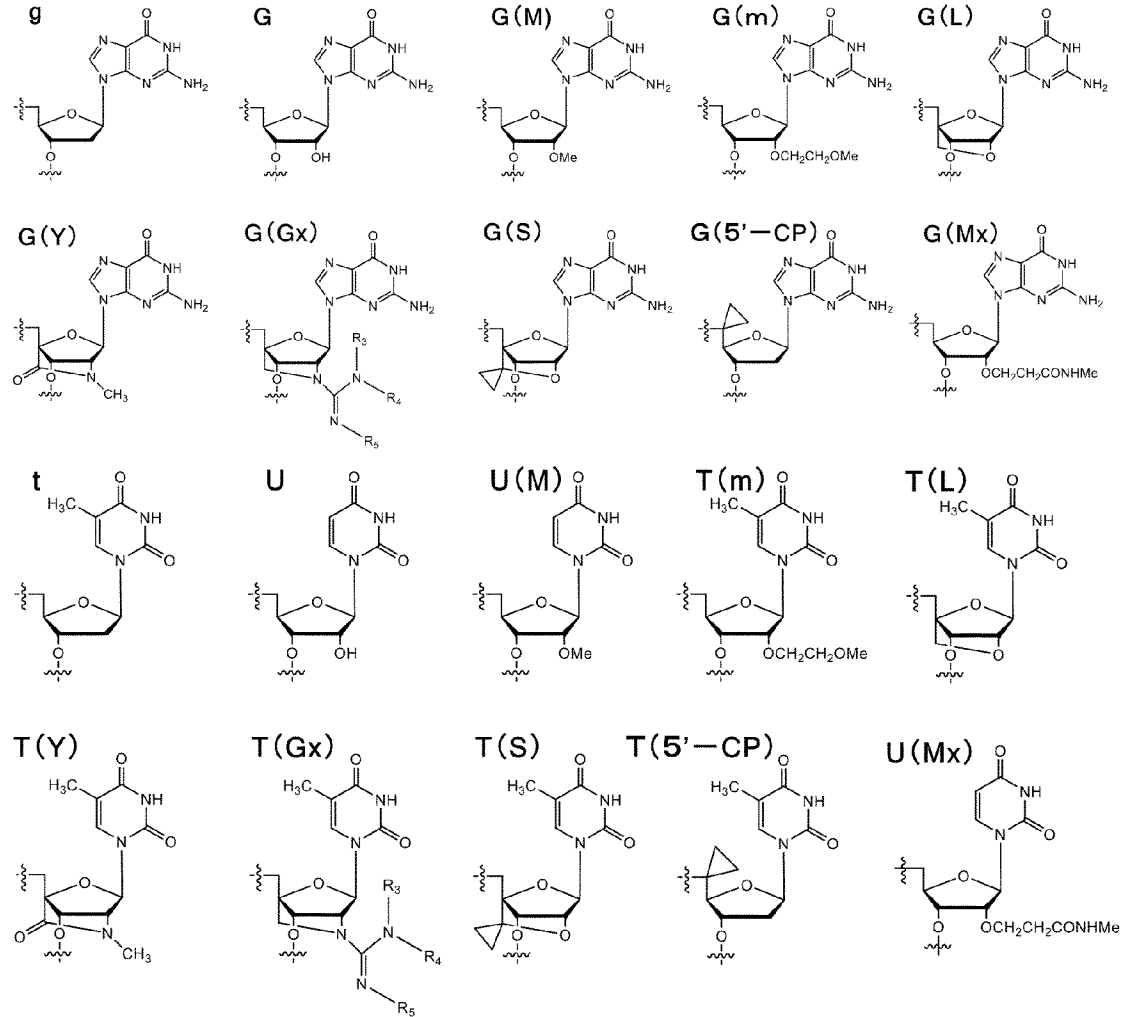
[0161]

[化2]



[0162]

[化3]



[0163] 上に示す構造式において、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立して、水素原子、又は、直鎖若しくは分岐の炭素数1から3のアルキル基を示す。ここで、上述の「=」で示される結合における R^1 及び R^2 は、共にメチル基を示す。 R^3 、 R^4 、及び R^5 は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖若しくは分岐の炭素数1から7のアルキル基、又は炭素数3から7のシクロアルキル基を示す。ここにおいて、上述の「Gx」で示されるG u N Aにおける R^3 及び R^5 が共に水素原子で、かつ、 R^4 がメチル基の場合は、「Gm」と示し、 R^3 が水素原子で、かつ、 R^4 及び R^5 が共にメチル基の場合は、「Gdm」と示し、 R^3 及び R^5 が水素原子で、かつ、 R^4 がtert-ブチル基の場合は、「GtB」と示す。

[0164] 《一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの製造》

設計したものの一部について、以下の手順で一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを作製した。

修飾核酸として、2' -O-メチル核酸、2' -MOE核酸、AmNA、scpBNA、5' -CP核酸、及び／又はGuNA、並びに／或いは、核酸塩基部が5-メチルシトシンである核酸を含む一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、核酸自動合成機（nS-8型、株式会社ジーンデザイン製）を用いて、0.2 μmolスケールで合成した。鎖長の伸長は、標準的なホスホロアミダイトプロトコールにて実施した。ただし、5'位にレブニリル保護基を有するモノマーを付加する場合は、固相担体をピリジン-酢酸（1:1 v/v）中の0.5 Mヒドラジン水和物で1時間、合成器の外で室温処理することによって脱保護を行い、その後、固相担体を合成装置に取り付け、合成を再開した。固相担体は、CPGレジンを使用した。また、ホスホロチオエート化（PS）骨格形成のための硫化はDDTT（（Dimethylamino-methylidene）amino）-3H-1,2,4-dithiazoline-3-thione）等を使用した。2' -MOE核酸、AmNA及び／又はscpBNAを含む一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、末端の5'位の水酸基がDMTr（4,4'-ジメトキシトリチル）基で保護されておらず、かつ3'位が固相に担持されたものとして得た。続いてアルカリ処理することにより、上記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを固相担体から切り出し、溶液の状態を回収した。その後、回収した溶液から溶媒を留去することで粗生成物を得た。得られた粗生成物を逆相HPLCにて精製することにより精製された一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを得た。得られた各一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの純度及び構造をLC-MS（Waters社製）により確認した。測定結果は、表2-1～表2-8に記載した。

[0165] 《アンチセンスオリゴヌクレオチドの中枢毒性評価（1）》

一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドにおける遅発性中枢毒性は、FVB/NJc1マウス又はICRマウスに脳室内投与を実施し、投与後最大2

8日まで飼育し、一般状態・体重の観察及び組織サンプルの採材時点での病理学的検査（ヘマトキシリン・エオシン染色）を行うことで評価した。「score」の欄は、以下の評価基準に基づき算出した。各scoreは、群ごとの平均値を採用した。

Clinical sign score ;

0点：異常なし

1点：後肢機能異常、振戦、自発運動減少

2点：後肢のひきずり、尾部又は後肢の脱力

3点：完全な後肢機能不全、後肢の麻痺、横臥、腹臥

4点：安楽殺

Pathological score ;

0点：異常なし

1点：異常あり（単細胞壊死、空胞化等）

[0166] 代表例として、表2-1～表2-7に記載の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの遅発性中枢毒性の評価結果を表3-1～表3-7に示す。なお、表3-1～表3-8において、「-」で示されているもの箇所は測定評価を行っていないことを意味する。また、表3-7における「観察日」及び「Clinical sign score」の欄は、後述する「アンチセンスオリゴヌクレオチドの中枢毒性評価（2）」に記載されている実験によって得られた評価結果である。表3-1～表3-7の結果から、親配列の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド）に比べて、5'-CPを導入した配列の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）において、遅発性中枢毒性が低減していることが確認された。

[0167]

[表3-1]

配列番号	配列名	投与量	観察日	Clinical sign score	採材日	Pathological score
1	h451-465-C	100 µg (20 nmol)	d28	1.60	d43	1.00
2	h451-465-N	20 nmol	d27	0.00	d27	0.67
3	h451-465-O	20 nmol	d27	0.00	d27	0.33
4	h451-465-AL	20 nmol	d28	0.00	d28	0.33
5	h451-465-AR	20 nmol	d28	0.00	-	-

[0168] [表3-2]

配列番号	配列名	投与量	観察日	Clinical sign score	採材日	Pathological score
6	h450-466-B	150 µg (26 nmol)	d27	3.00	d21, d30, d42 (各 1 個体)	0.33
7	h450-466-C	20 nmol	d28	0.00	d 28	0.33
8	h450-466-E	20 nmol	d28	0.00	d 28	0.00

[0169] [表3-3]

配列番号	配列名	投与量	観察日	Clinical sign score	採材日	Pathological score
9	h453-472-A	20 nmol	d14/d28	0.33/2.67	d28	0.00
10	h453-472-B	20 nmol	d14/d28	0.00/0.00	d28	0.00

[0170] [表3-4]

配列番号	配列名	投与量	観察日	Clinical sign score	採材日	Pathological score
11	h451-465-AB	20 nmol	d27	0.00	d27	0.67
12	h451-465-BE	20 nmol	d28	0.00	-	-
13	h451-465-AU	20 nmol	d28	0.00	-	-

[0171] [表3-5]

配列番号	配列名	投与量	観察日	Clinical sign score	採材日	Pathological score
14	h451-469-A	60 nmol	d29	0.00	d29	0.00
15	h451-469-F	60 nmol	d14/d28	0.00/0.00	-	-
16	h451-469-E	20 nmol	d14/d28	0.00/0.00	d28	0.00

[0172] [表3-6]

配列番号	配列名	投与量	観察日	Clinical sign score	採材日	Pathological score
17	h451-469-D	20 nmol	d14/d28	0.00/0.00	d28	1.00
18	h451-469-G	20 nmol	d14/d28	0.00/0.00	-	-
19	h451-469-H	20 nmol	d14/d28	0.00/0.00	d28	0.00
20	h451-469-I	20 nmol	d14/d28	0.00/0.00	-	-
21	h451-469-J	20 nmol	d14/d28	0.00/0.00	-	-

[0173] 《アンチセンスオリゴヌクレオチドの中枢毒性評価（2）》

表2-7～表2-8に記載の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドにおける遅発性中枢毒性は、FVB/NJc1マウスまたはICRマウスに脳室内投与を実施し、投与後最大28日まで評価することによって行った。評価項目は行動評価、一般状態及び体重の観察、及び採材時点の脳の病理学的検査（ヘマトキシリン・エオシン染色）である。マウスの行動評価は、Functional observational battery (FOB) によって行った。評価項目として、1) 姿勢、2) 外見上の異常、3) 常同行動、4) 刺激に対する反応性、5) グリップ力、6) 呼吸、7) 身震い・痙攣についてそれぞれ正常を0、やや異常ありを1、極度に異常ありを2とスコア化した（表3-7におけるClinical sign scoreの欄）。各病理組織所見は大脳皮質上の2か所における神経細胞の1) 単細胞壊死、2) 空胞化、3) 泡沫化の程度に応じてスコア化を行い、所見なしは0、軽度は1、中等度は2、重度は3とした（表3-8における病理組織所見スコアの欄）。

[0174] 代表例として、表2-7～表2-8に記載の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの遅発性中枢毒性の評価結果を表3-7～3-8に示す。なお、表3-7における「採材日」及び「Pathological score」の欄は、上述の「アンチセンスオリゴヌクレオチドの中枢毒性評価（1）」に記載されている実験によって得られた評価結果である。表3-7～3-8の結果から、親配列の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド）に比べて、5'-CPを導入した配列の一

本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）において、遅発性中枢毒性が低減していることが確認された。

[0175] [表3-7]

配列番号	配列名	投与量	観察日	Clinical sign score	採材日	Pathological score
22	h453-472-C	60 nmol	d28	0.0	-	-
23	h453-472-D	60 nmol	d28	0.0	d28	0.0
24	h453-472-E	60 nmol	d28	0.0	-	-

[0176] [表3-8]

配列番号	配列名	投与量	病理組織所見スコア	投与 28 日後の体重増加割合
25	LX-A7033	20 nmol	7.3	0.94
26	LX-A7152	20 nmol	0.0	1.16
27	LX-A7153	20 nmol	2.7	1.14

[0177] 《R P S 2 5 遺伝子の発現評価（in vitro 評価）》

R P S 2 5 遺伝子の発現評価は、製造した一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドに応じて、ヒト胎児腎細胞を用いた発現評価で行った。また上記 R P S 2 5 遺伝子の発現評価は、ヒト i P S 細胞由来神経細胞を用いても行うことができる。本実施例における遺伝子発現評価とは、逆転写反応によって得られた相補的 DNA（cDNA）量を測定することで mRNA 量を評価することを意味する。以下、各発現評価の具体的手順について説明する。

[0178] <ヒト胎児腎細胞を用いた発現評価>

ヒト胎児腎細胞 HEK 2 9 3 T（ATCC（登録商標）CRL-3216（商標））を、培養培地中、37°C、5%CO₂の条件で培養した。HEK 2 9 3 T 細胞の培養培地としては、以下の組成のものを用いた。

[0179] HEK 2 9 3 T 細胞の培養培地組成

ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）：SIGMA社製、Cat # D6429

10% ウシ胎児血清（FBS）：biowest社製、Cat # S1820

0

100倍希釈ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液：ナカライテスク社製 Cat # 09367-34 (ペニシリン 10000ユニット/ml, ストレプトマイシン 10000 μ g/ml、安定剤含有)

[0180] まず、ヒトRPS25遺伝子の発現量測定を行う前日に、96穴プレートにHEK293T細胞(12000 cells/well)を播種し、37°C、5%CO₂の条件で一晩培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈した各一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド(終濃度0.5 nM、5 nM、15 nM、又は50 nM)をリポフェクション法にて、上述の細胞にトランスフェクションした。陰性対照群としては、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドが溶解していないPBSをトランスフェクションした細胞を用いた。トランスフェクションした細胞を増殖培地中で37°C、5%CO₂の条件で48時間培養した。その後、上記増殖培地を除去し、Taqman Fast Cells-to-CT Kit (Thermo Fisher Scientific社製、Cat # 4399003)を用いて、抽出した全RNAに対して逆転写反応を実施した。この逆転写反応から得られた相補的DNA(cDNA)を利用して、Taqman gene expression assays (Applied Biosystems社製)で、予め設計された遺伝子特異的プローブ(下記参照)を用いてリアルタイムPCRを実施した(95°C; 3秒間、60°C; 30秒間を40サイクル)。

[0181] ヒトRPS25遺伝子の発現評価で用いた遺伝子特異的プローブ一覧
human RPS25: Hs01568661_g1
human GAPDH: 4326317E (インターナルコントロール)

[0182] 上述の方法で求められた、ヒトRPS25 mRNAに対する各一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドにおけるヒトRPS25 mRNAの発現比率を表4-1~表4-7に示す(「in vitro評価」の欄)。このとき、陰性対照群において求められたヒトRPS25 mRNAの発現比率を1.00

とした。発現比率が0.80以下であるものを、ヒトRPS25 mRNAの発現を抑制することが可能な一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであると判断した。なお、表中、「-」で示されているものは測定を行っていないことを意味する。一般にmRNAの発現が抑制されるとその後のタンパク質への翻訳等も抑制されると考えられる。そのため、上記発現比率が0.80以下であるものは、ヒトRPS25遺伝子の機能を調節することが可能な一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであると判断できる。

[0183] 《RPS25遺伝子の*in vivo*発現評価》

RPS25遺伝子の発現評価は、マウス脳室内投与を実施し前頭前皮質のそれぞれの部位のmRNA量を測定することによって行った。本実施例における遺伝子発現評価とは、逆転写反応によって得られた相補的DNA(cDNA)量を測定することでmRNA量を評価することを意味する。以下、各発現評価の具体的手順について説明する。

[0184] イソフルラン(ファイザー社製、Cat#114133403)を用いてFVBマウス(日本クレア)に麻酔をかけた。次に、50 μ Lハミルトンシリンジ(ハミルトン社製、Cat#705LT)に装着した2段針(トップ社製、医療機器承認番号15800BZZ01460000)を用いて、人工脳脊髄液(Tocris Bioscience社製、Cat#3525/25mL)に溶解したアンチセンスオリゴヌクレオチドを10 μ L/個体で麻酔したFVBマウスに投与した。陰性対照群のマウスには人工脳脊髄液のみを10 μ L/個体で投与した。

[0185] 投与後一定の飼育期間を設けたのち、上記FVBマウスを安楽死させ、脳、頸髄、腰髄の3部位を採取した。採取した組織は、RNA later(Applied Biosystems社製、Cat#AM7024)に漬けて一晩静置したのち-80 $^{\circ}$ Cにて保管した。保管した組織サンプルからのRNA抽出は、RNeasy Mini Kit(QIAGEN社製、Cat#74106)を用いて実施した。抽出したmRNAからの逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transc

ription Kit (Applied Biosystem社製、Cat # 4368814) を用いて実施した。逆転写反応には、 $1 \mu\text{g}$ の mRNA を $20 \mu\text{L}$ に希釈して使用した。この逆転写反応から得られた相補的 DNA (cDNA) を利用して、Taqman expression assays (Applied Biosystems社製) で、予め設計された遺伝子特異的プローブ (下記参照) を用いて、リアルタイムPCRを実施した (95°C ; 3秒間、 60°C ; 30秒間を40サイクル)。

[0186] マウス RPS25 遺伝子の発現評価で用いた遺伝子特異的プローブ一覧
mouse Rps25: Mm02342783_g1
mouse GAPDH: 4352339E (インターナルコントロール)

[0187] 代表例として、表2-1~表2-7に記載の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドについて、上述の方法で求められたマウス RPS25 mRNA の発現比率を表4-1~表4-7に示す(「in vivo評価」の欄)。この時、陰性対象群において求められたマウス RPS25、RNA の発現比率を1.00とした。表4-1~表4-7における「採材日」は、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与してから所定の組織を採取するまでの日数を示している。一般に mRNA の発現が抑制されるとその後のタンパク質への翻訳等も抑制されると考えられるため、上記発現比率が0.80以下の場合、マウス RPS25 遺伝子の機能を調節することが可能な一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであると判断できる。なお、表4-1~表4-7に列挙されている一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドが結合する標的領域は、ヒト RPS25 遺伝子とマウス RPS25 遺伝子との間で配列が保存されている領域である。

[0188]

[表4-1]

配列番号	配列名	in vitro 評価	in vivo 評価		
		ヒト RPS25 発現比率 (@50 nM)	投与量	採材日	RPS25 mRNA 発現比率
1	h451-465-C	0.04	20 nmol	d27	0.47
2	h451-465-N	0.08	20 nmol	d27	0.50
3	h451-465-O	0.06	20 nmol	d27	0.40
4	h451-465-AL	0.07	20 nmol	d28	0.63
5	h451-465-AR	0.05	20 nmol	d28	0.93

[0189] [表4-2]

配列番号	配列名	in vitro 評価	in vivo 評価		
		ヒト RPS25 発現比率 (@50 nM)	投与量	採材日	RPS25 mRNA 発現比率
6	h450-466-B	0.06	-	-	-
7	h450-466-C	0.05	20 nmol	d28	0.38
8	h450-466-E	0.04	20 nmol	d28	0.39

[0190] [表4-3]

配列番号	配列名	in vitro 評価	in vivo 評価		
		ヒト RPS25 発現比率 (@50 nM)	投与量	採材日	RPS25 mRNA 発現比率
9	h453-472-A	0.02	20 nmol	d28	0.28
10	h453-472-B	0.04	20 nmol	d28	0.49

[0191] [表4-4]

配列番号	配列名	in vitro 評価	in vivo 評価		
		ヒト RPS25 発現比率 (@50 nM)	投与量	採材日	RPS25 mRNA 発現比率
11	h451-465-AB	0.04	20 nmol	d28	0.79
12	h451-465-BE	0.10	20 nmol	d28	0.56
13	h451-465-AU	0.10	20 nmol	d28	0.64

[0192] [表4-5]

配列番号	配列名	in vitro 評価	in vivo 評価		
		ヒト RPS25 発現比率 (@50 nM)	投与量	採材日	RPS25 mRNA 発現比率
14	h451-469-A	0.16	60 nmol	d27	0.43
15	h451-469-F	0.90	60 nmol	d28	0.78
16	h451-469-E	0.11	20 nmol	d28	0.46

[0193] [表4-6]

配列番号	配列名	in vitro 評価	in vivo 評価		
		ヒト RPS25 発現比率 (@50 nM)	投与量	採材日	RPS25 mRNA 発現比率
17	h451-469-D	0.05	20 nmol	d28	0.13
18	h451-469-G	0.05	20 nmol	d28	0.33
19	h451-469-H	0.09	20 nmol	d28	0.15
20	h451-469-I	0.09	20 nmol	d28	0.45
21	h451-469-J	0.10	20 nmol	d28	0.55

[0194] [表4-7]

配列番号	配列名	in vitro 評価	in vivo 評価		
		ヒト RPS25 発現比率 (@50 nM)	投与量	採材日	RPS25 mRNA 発現比率
22	h453-472-C	0.06	60 nmol	d28	0.51
23	h453-472-D	0.05	60 nmol	d28	0.44
24	h453-472-E	0.07	60 nmol	d28	0.77

[0195] 《ヒト神経芽細胞腫株におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの mRNA 発現抑制》

アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、ヒト神経芽細胞腫株における UBE3A-ATS mRNA 発現抑制効果を評価した。アンチセンスオリゴで処理しない細胞株をコントロールとした。ヒト神経芽細胞腫株として、KELLY細胞 (EACC社、EC92110411-F0) を用いた。各アンチセンスオリゴヌクレオチドを市販のトランスフェクション試薬 (ThermoFisher Scientific社、リポフェクトアミン3000) を用いてKELLY細胞に取り込ませ、qRT-PCR法にて mRNA の発現量を測定し、ノックダウン活性 (mRNA の発現抑制) を調べた。以下に具体的な手順を示す。

[0196] 対数増殖期のKELLY細胞を 2.0×10^4 個/ウェルにて、96ウェルプレートのウェル (10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI-1640)) 中に播種した。24時間後、各アンチセンスオリゴヌクレオチドをウェル内に添加し、24時間インキュベートした (培地中でのアンチセンスオリゴヌクレオチドの終濃度: 1 nM又は

10 nM)。

[0197] インキュベート後、細胞を回収し、RNA抽出試薬 (ThermoFisher Scientific社、MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit) を用いて、total RNAを抽出した。当該total RNAを鋳型として、核酸増幅反応用試薬 (QIAGEN社、Quantinova Probe RT-PCR kit) を用いて逆転写反応とPCR増幅反応を行った。核酸増幅反応は、45°C、10分→95°C、5分→[(95°C、5秒→60°C、30秒)×40サイクル]の温度サイクリングで行った。リアルタイムPCRでは、ハウスキーパー遺伝子のβアクチン (ACTB) のmRNA量も同時に定量し、ACTBのmRNA量に対するUBE3A-ATSのmRNA量を $\Delta\Delta Ct$ 法によって評価した。各アンチセンスオリゴヌクレオチドによるmRNA量は、オリゴヌクレオチド無処理細胞のmRNA量を1とした場合の相対値にて示した。

[0198] 用いたプライマーセットは、下記のとおりである：(PTEN検出用プライマーセット) TaqMan Gene Expression Assay Hs01372957_m1 (ThermoFisher Scientific社) (ACTB検出用プライマーセット) TaqMan Gene Expression Assay Hs99999903_m1 (ThermoFisher Scientific社)

[0199] 結果を表4-8に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドを取り込んでいない細胞 (無処理細胞、「コントロール」) を1としたときに、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞ではUBE3A-ATS遺伝子のノックダウン (mRNAの発現抑制) を示すことが確認された。

[0200]

[表4-8]

配列番号	配列名	UBE3A-ATS KD (@1 nM) ratio of control	UBE3A-ATS KD (@10 nM) ratio of control
25	LX-A7033	0.80	0.77
26	LX-A7152	0.68	0.58
27	LX-A7153	0.65	0.41

[0201] ≪ヒト子宮頸癌由来 HeLa S3 細胞株におけるアンチセンスヌクレオチドによるカスパーゼ 3 / 7 活性評価≫

以下の手順で、カスパーゼ 3 / 7 の活性を評価した。ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株として、HeLa S3 細胞 (ATCC 社、CCL-2.2) を用いた。各アンチセンスオリゴヌクレオチドを市販のトランスフェクション試薬 (ThermoFisher Scientific 社、リポフェクトアミン 3000) を用いて HeLa S3 細胞に取り込ませ、Caspase-Glo 3 / 7 Assay System (Promega 社) を用いてカスパーゼ 3 / 7 活性を調べた。以下により具体的な手順を示す。

[0202] まず、対数増殖期の HeLa S3 細胞を 2.0×10^4 個 / ウェルにて、96 ウェルプレートのウェル (10% ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中に播種した。24 時間後、各アンチセンスオリゴヌクレオチドをウェル内に添加し (培地中でのアンチセンスオリゴヌクレオチドの終濃度: 3、10、30、100、または 300 nM)、24 時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を回収し、キットを用いてカスパーゼ 3 / 7 活性を調べた。各アンチセンスオリゴヌクレオチドによる活性値は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを取り込んでいない細胞 (無処理細胞、「コントロール」) の活性値を 100 とした場合の相対値にて示した。

[0203] 結果を表 5 に示す。表 5 の結果から、親配列の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド (第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド) に比べて、5' -

CPを導入した配列の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド）においてカスパーゼ3／7活性の上昇が抑制されており、細胞毒性が低減していることが確認された。

[0204] [表5]

配列番号	配列名	Caspase 3/7 activation % of control				
		3 nM	10 nM	30 nM	100 nM	300 nM
25	LX-A7033	107	126	238	418	545
26	LX-A7152	122	137	128	179	162
27	LX-A7153	130	139	122	142	133

[0205] 以上のように本発明の実施形態及び実施例について説明を行なったが、上述の各実施形態及び各実施例の構成を適宜組み合わせることも当初から予定している。

[0206] 今回開示された実施の形態及び実施例はすべての点で例示であって、制限的なものではないと考えられるべきである。本発明の範囲は上記した実施の形態及び実施例ではなく請求の範囲によって示され、請求の範囲と均等の意味、および範囲内でのすべての変更が含まれることが意図される。

請求の範囲

[請求項1]

第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドに基づいて、第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する工程を含む、

遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法であって、

前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

各ヌクレオシドがリン酸基及び／又は修飾リン酸基で結合されており、

ギャップ領域と、前記ギャップ領域の3'末端に結合している3'ウイング領域と、前記ギャップ領域の5'末端に結合している5'ウイング領域とを含み、

前記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、

前記3'ウイング領域及び前記5'ウイング領域は2'位に置換基を有する修飾核酸であり、

塩基長は、12～30merである、

アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

ギャップ領域、3'ウイング領域及び5'ウイング領域の塩基配列が、前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、

3'ウイング領域及び5'ウイング領域の核酸の糖部の構造が、前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一であり、

前記ギャップ領域に少なくとも1つの5'-CP核酸を含み、

前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、遅発性中枢毒性が低減されている、

アンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項2]

前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、前記ギャップ領域は、5'-CP核酸を含まず、

前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、前記ギャップ領域の5' - C P 核酸以外の糖部の構造が前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同一である、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項3] 前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

前記ギャップ領域の塩基数は、5～20merであり、

前記3' ウイング領域は、3～5merの、2' 位に置換基を有する修飾核酸であり、

前記5' ウイング領域は、3～5merの、2' 位に置換基を有する修飾核酸である、請求項1又は請求項2に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項4] 前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

塩基長は、15～30merである、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項5] 前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

前記ギャップ領域に配置されるシトシンが、5-メチルシトシンである、請求項1～請求項4のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項6] 前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

前記3' ウイング領域における前記2' 位に置換基を有する修飾核酸は、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscpBNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、

前記5' ウイング領域における前記2' 位に置換基を有する修飾核酸は、2' -MOE核酸、LNA、AmNA、GuNA、及びscp

BNAからなる群より選ばれる少なくとも1つを含む、請求項1～請求項5のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項7] 前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、

塩基配列におけるGCの比率が0.2～0.6である、請求項1～請求項6のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項8] 前記第一のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドが一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1～請求項7のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項9] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸は、前記ギャップ領域の5'側から数えて2番目に少なくとも配置されている、請求項1～請求項8のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項10] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸は、前記ギャップ領域に2個以上配置されている、請求項1～請求項9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項11] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸は、前記ギャップ領域に2～5個配置されている、請求項1～請求項10のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項12] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸は、前記ギャップ領域の少なくとも1か所において連続して2～4mer配置されている、請求項1～請求項11のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

- [請求項13] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸が、前記ギャップ領域に対して9分の1以上配置されている、請求項1～請求項12のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。
- [請求項14] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸が、前記ギャップ領域に対して5分の1以上配置されている、請求項1～請求項13のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。
- [請求項15] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸は、前記ギャップ領域における5'末端側に配置されている、請求項1～請求項14のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。
- [請求項16] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、
前記5' -CP核酸は、前記ギャップ領域における5'末端側及び3'末端側に配置されている、請求項1～請求項15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。
- [請求項17] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシド間結合において、
ホスホロチオエート結合の割合が50%～80%である、請求項1～請求項16のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。
- [請求項18] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシド間結合において、
ホスホロチオエート結合の割合が50%～70%である、請求項1～請求項17のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。
- [請求項19] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

前記5' - C P核酸と、前記5' - C P核酸の3' 側に隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホロチオエート結合である（ただし、前記5' - C P核酸がギャップ領域の3' 末端に配置されている場合を除く）、請求項1～請求項18のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項20]

前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

前記5' - C P核酸と、前記5' - C P核酸の3' 側で隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホロチオエート結合である（ただし、前記5' - C P核酸がギャップ領域の3' 末端に配置されている場合と前記5' - C P核酸の3' 側で隣接しているヌクレオシドが5' - C P核酸である場合を除く）、請求項1～請求項19のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項21]

前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

前記5' - C P核酸と、前記5' - C P核酸の5' 側で隣接しているヌクレオシドとの結合が、ホスホジエステル結合である、請求項1～請求項20のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項22]

前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただし、5' - C P核酸は含まない）で構成される塩基の数が5個以上である、請求項1～請求項21のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項23]

前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース（ただ

し、5' -CP核酸は含まない)で構成される塩基の数は、5~10個である、請求項1~請求項22のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項24] 前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するギャップ領域において、

糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボース(ただし、5' -CP核酸は含まない)で構成される塩基は、5~10個連続して配置されている、請求項1~請求項23のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法。

[請求項25] 遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩の製造方法であって、

請求項1~請求項24のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計方法によって、前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計する工程と、

前記第二のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成する工程とを含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩の製造方法。

[請求項26] 遅発性中枢毒性が低減されているアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩であって、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオチドがリン酸基及び/又は修飾リン酸基で結合されており、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップ領域と、前記ギャップ領域の3'末端に結合している3'ウイング領域と、前記ギャップ領域の5'末端に結合している5'ウイング領域と、を含み、

前記ギャップ領域は、糖部が修飾された核酸を含んでいてもよいデオキシリボースから構成される核酸であり、

前記ギャップ領域は、少なくとも1つの5' -CP核酸を含み、

前記3'ウイング領域及び前記5'ウイング領域は2'位に置換基

を有する修飾核酸であり、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基長は、12～30merである、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその製薬学的に許容される塩。

[請求項27]

請求項26に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩と、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合している付加物質と、を有する、アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体又はその製薬学的に許容される塩であって、

前記付加物質は、ポリエチレングリコール、ペプチド、アルキル鎖、核酸、リガンド化合物、抗体、タンパク質、及び糖鎖からなる群より選ばれる、アンチセンスオリゴヌクレオチド複合体又はその製薬学的に許容される塩。

[請求項28]

請求項26に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩、又は、請求項27に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体若しくはその製薬学的に許容される塩を含む、疾患の治療剤であって、

前記治療剤は、中枢神経系に曝露されるように投与するように用いられる、治療剤。

[請求項29]

請求項26に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩、又は、請求項27に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体若しくはその製薬学的に許容される塩を含む、疾患の治療剤であって、

前記治療剤は、遅発性中枢毒性に敏感な対象に投与される、治療剤。

[請求項30]

請求項26に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド若しくはその製薬学的に許容される塩、又は、請求項27に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド複合体若しくはその製薬学的に許容される塩を含む

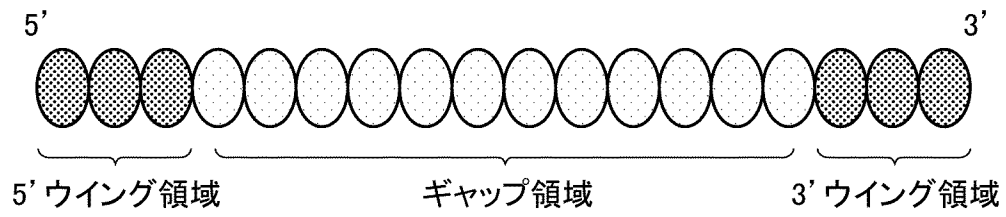
、疾患の治療剤であって、
前記疾患は、中枢神経系の疾患である、治療剤。

[図1]

FIG.1

ギャップマー型ASOの構造

(例) 3-12-3のギャップマー



[図2]

ギャッププーマー型ASOの標的RNA分解機構

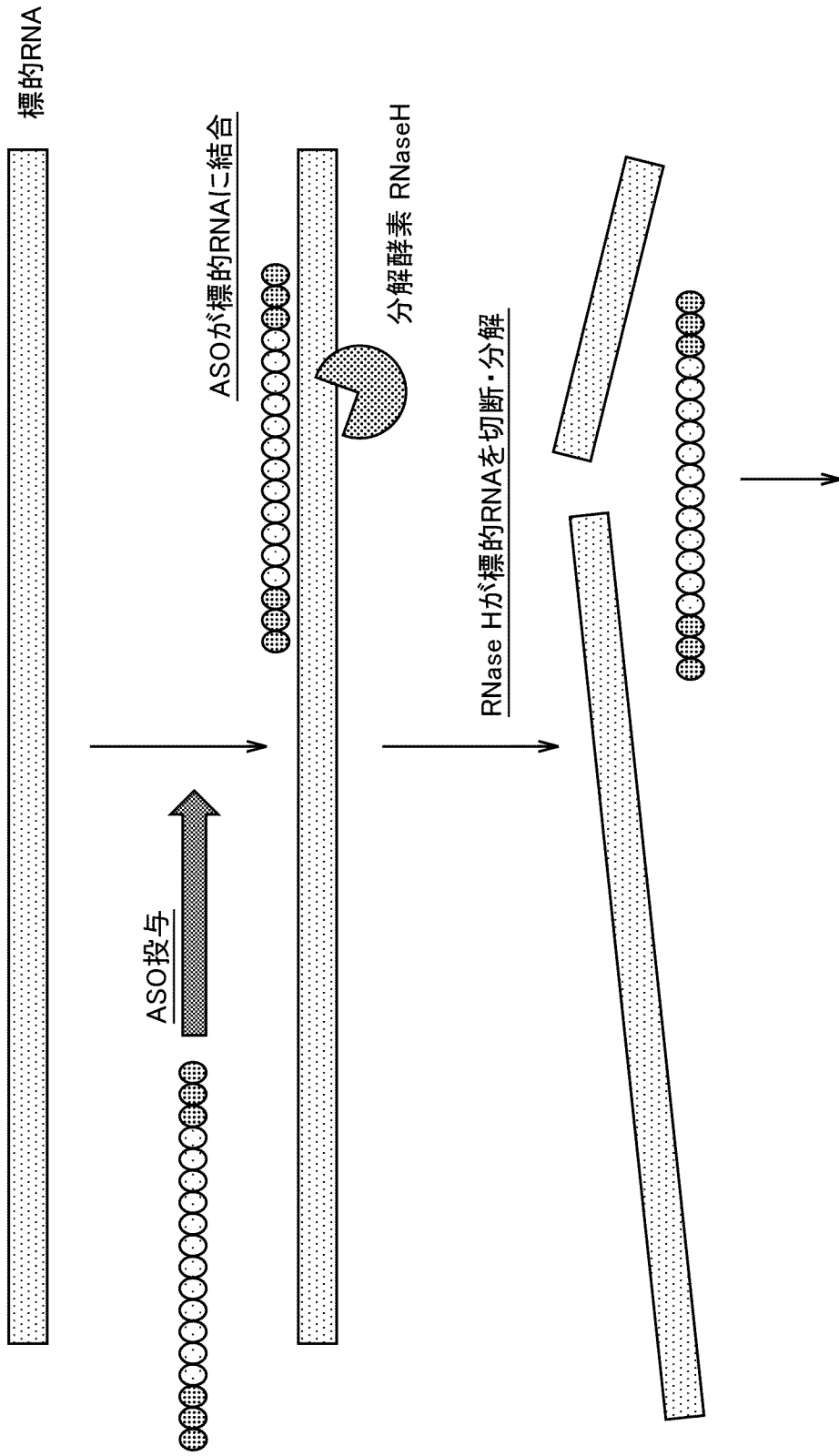


FIG.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021614

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/113</i> (2010.01)i; <i>A61K 31/711</i> (2006.01)i; <i>A61P 25/00</i> (2006.01)i FI: C12N15/113 Z ZNA; A61K31/711; A61P25/00		
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) C12N15/113; A61K31/711; A61P25/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/234855 A1 (LUXNA BIOTECH CO., LTD.) 10 November 2022 (2022-11-10) paragraphs [0078], [0092], [0104]-[0106], examples 1-4, SEQ ID NO: 1, 5, 8	1-4, 6-17, 19-26, 28-30
Y		5, 18, 27
Y	JP 2023-509793 A (DYNE THERAPEUTICS, INC.) 09 March 2023 (2023-03-09) paragraphs [0028], [0604]	5, 18, 27
Y	WO 2022/147209 A1 (DYNE THERAPEUTICS, INC.) 07 July 2022 (2022-07-07) claims 1, 2, paragraph [0272]	5, 18, 27
P, X	WO 2024/071099 A1 (UNIV NAT CORP TOKYO MEDICAL & DENTAL) 04 April 2024 (2024-04-04) claims, examples 1, 3, 9, paragraph [0060]	1-11, 13-15, 19-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 02 August 2024		Date of mailing of the international search report 13 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021614

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/021614

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2022/234855	A1	10 November 2022	EP 4335859 A1 paragraphs [0053], [0065], [0077], examples 1-4, SEQ ID NO: 1, 5, 8	
-----				CN 117529488	A
JP	2023-509793	A	09 March 2023	US 2023/0144436 A1 paragraphs [0031], [0586]	
-----				WO 2021/142234	A1
-----				KR 10-2022-0125800	A
-----				CN 115427108	A
WO	2022/147209	A1	07 July 2022	JP 2024-503609 A claims 1, 2, paragraph [0272]	
-----				US 2024/0117356	A1
-----				KR 10-2023-0128050	A
-----				CN 116940680	A
WO	2024/071099	A1	04 April 2024	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/711(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i FI: C12N15/113 Z ZNA; A61K31/711; A61P25/00		
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）） C12N15/113; A61K31/711; A61P25/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024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/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 Y	WO 2022/234855 A1 (ルクサナバイオテック株式会社) 10.11.2022 (2022-11-10) [0078], [0092], [0104] - [0106], 実施例1-4, 配列番号1, 5, 8	1-4, 6-17, 19-26, 28-30 5, 18, 27
Y	JP 2023-509793 A (ダイン セラピューティクス, インコーポレーテッド) 09.03.2023 (2023-03-09) [0028], [0604]	5, 18, 27
Y	WO 2022/147209 A1 (DYNE THERAPEUTICS, INC.) 07.07.2022 (2022-07-07) 請求項1, 2, [000272]	5, 18, 27
P, X	WO 2024/071099 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 04.04.2024 (2024-04-04) 請求の範囲, 実施例1, 3, 9, [0060]	1-11, 13-15, 19-30
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 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 “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 02.08.2024	国際調査報告の発送日 13.08.2024	
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） 山内 達人 4B 3348 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

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/JP2024/021614

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2022/234855	A1	10.11.2022	EP	4335859	A1	
				[0053] , [0065] , [0077] , 実施例1-4, 配列 番号1, 5, 8			
				CN	117529488	A	

JP	2023-509793	A	09.03.2023	US	2023/0144436	A1	
				[0031] , [0586]			
				WO	2021/142234	A1	
				KR	10-2022-0125800	A	
				CN	115427108	A	

WO	2022/147209	A1	07.07.2022	JP	2024-503609	A	
				請求項1, 2, [0272]			
				US	2024/0117356	A1	
				KR	10-2023-0128050	A	
				CN	116940680	A	

WO	2024/071099	A1	04.04.2024	(ファミリーなし)			
