

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年11月10日(10.11.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/234855 A1

- (51) 国際特許分類:
C07H 21/04 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C12Q 1/6813* (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/019561

(22) 国際出願日: 2022年5月6日(06.05.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-078507 2021年5月6日(06.05.2021) JP
特願 2021-151543 2021年9月16日(16.09.2021) 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2-8 Osaka (JP).

(72) 発明者: 川野邊 峻 哲 (KAWANOBE, Takaaki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2-8 大阪大学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). 山上 正輝

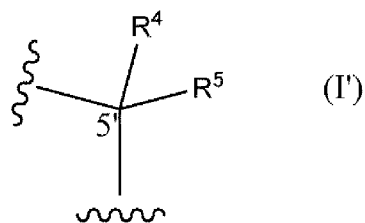
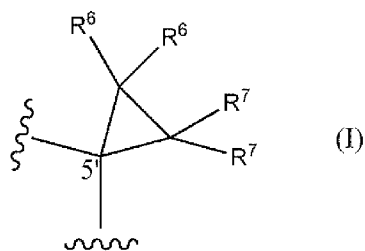
(YAMAGAMI, Masaki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2-8 大阪大学テクノアライアンスC棟C907 ルクサナバイオテック株式会社内 Osaka (JP). 梅本 忠士(UMEMOTO, Tadashi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2-8 大阪大学テクノアライアンスC棟C907 ルクサナバイオテック株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 村岡 皓一郎, 外(MURAOKA, Koichiro et al.); 〒6008216 京都府京都市下京区烏丸通七条下ル東塩小路町735-1 京阪京都ビル8階 Kyoto (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, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: METHOD FOR DESIGNING OLIGONUCLEOTIDE HAVING REDUCED CENTRAL TOXICITY.

(54) 発明の名称: 中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドの設計方法



(57) Abstract: The present invention provides a method for designing an oligonucleotide having a reduced central toxicity, the method being characterized by including a step for substituting a carbon atom at the 5' position of a sugar portion of at least one nucleoside that constitutes an oligonucleotide having a phosphorothioate modification with a structure represented by formula I (in the formula, R⁶ and R⁷ are each independently a hydrogen atom, a halogen atom or a methyl group) or a structure represented by formula I' (in the formula, R⁴ and R⁵ are each independently a hydrogen atom, a methyl group or an ethyl group (excluding a case where R⁴ and R⁵ are both hydrogen atoms)).

(57) 要約: 本発明は、中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドを設計する方法であって、ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオシドの糖部5'位炭素原子を、下記式I(式中、R⁶およびR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基である)または下記式I'(式中、R⁴およびR⁵は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基またはエチル基である(ただし、R⁴およびR⁵が共に水素原子である場合を除く))で表される構造に置換する工程を含むことを特徴とする、方法を提供する。

WO 2022/234855 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類 :

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

明 細 書

発明の名称： 中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドの設計方法 技術分野

[0001] 本発明は、中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドの設計方法、該設計結果に基づき合成されたオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む治療薬などに関する。

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人工核酸が開発・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、人工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「RNAとのハイブリダイゼーションに起因する毒性（オフターゲット毒性）」と「RNAとのハイブリダイゼーションに依存せず、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毒性（非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] 例えば非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'位カルボニル基の修飾と糖部2'位-4'位を架橋することで、mRNA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し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、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人工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。

しかしながら、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肝毒性を主な指標になされ、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、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。

[0005] 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、1件しか存在しない（非特許文献2）。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。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 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

非特許文献

- [0007] 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)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 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'位に安定性に関する修飾を付したアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)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。

[0009] したがって、本発明の課題は、ASOの糖部の2'位以外の部位に修飾を付すことで、好ましくはさらにASOの一部のホスホロチオエート修飾を除去することで、元のASOと比較して中枢毒性が低減され得る、好ましくはさらにアンチセンス活性が維持または増強され得るASOを設計する方法及び該設計結果に基づき合成されたASOなどを提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた。その結果、核酸修飾で広く用いられる糖部の2'位や4'位における修飾(例えば、非特許文献2)ではなく、糖部の5'位における修飾に着目した。具体的には、特許文献3に開示されたように、ホスホロチオエート修飾ヌクレオシドの糖部5'位にシクロプロパン構造などの特定の構造を導入することで、アンチセンス活性を維持しながら非特異的なタンパク質との結合抑制を介した中枢毒性を低減させることができるのではないかとこの着想を得た。特許文献3において、ヌクレオシドの糖部の5'位に修飾を導入し、かつ該修飾の近傍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したASOでは、肝毒性が低減されることが開示されている。しかしながら、ASOによる肝毒性と中枢毒性とではその発生メカニズムが大きく異なると考えられるため、上記着想は特許文献3や先行技術文献には記載も示唆もない全く独創的なものであった。かかる着想に基づき本発明者らはさらに鋭意検討し、本発明を完成するに至った。

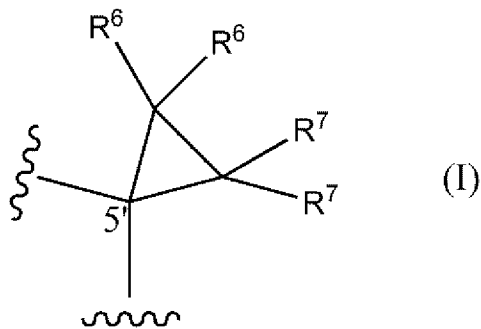
[0011] すなわち本発明は以下の通りである。

[1]

中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドを設計する方法であって、

(1) ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオシドの糖部5'位炭素原子を、下記式I

[0012] [化1]

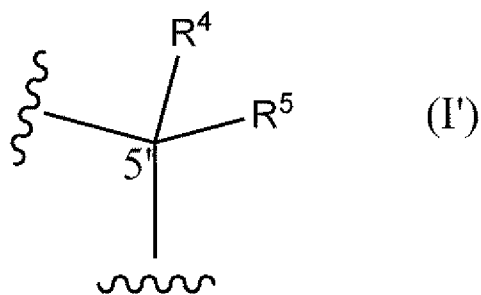


[0013] (式中、

R⁶およびR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基である)

または下記式I'

[0014] [化2]



[0015] (式中、

R⁴およびR⁵は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基またはエチル基である(ただし、R⁴およびR⁵が共に水素原子である場合を除く)

で表される構造に置換する工程、および任意により

(2) 該オリゴヌクレオチドが有する少なくとも一つ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工程

を含むことを特徴とする、方法。

[2]

オリゴヌクレオチドがギャップマー型オリゴヌクレオチドである、[1]に記載の方法。

[3]

上記工程(1)で置換されるヌクレオシドの少なくとも一つがギャップ領域に位置する、[2]に記載の方法。

[4]

上記工程(2)で置換されるホスホロチオエート結合の少なくとも一つがギャップ領域に位置する、[2]または[3]に記載の方法。

[5]

3' ウィング領域および5' ウィング領域を構成する少なくとも一つのヌクレオシドが架橋型ヌクレオシドである、[2]～[4]のいずれか一つに記載の方法。

[6]

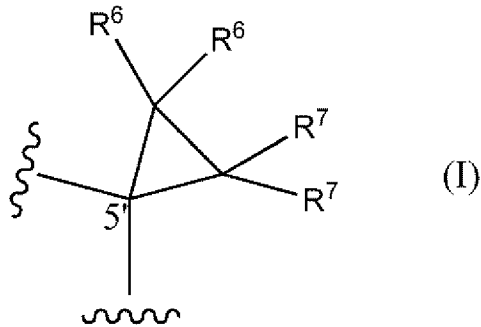
ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチドの中枢毒性の低減の程度を評価する方法であって、以下の工程(1)～(3)：

(1) ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチドを準備する工程、
(2) [1]～[5]のいずれか一つに記載の方法により設計したオリゴヌクレオチドを準備する工程、および
(3) 工程(2)で準備したオリゴヌクレオチドの中枢毒性と、工程(1)で準備したオリゴヌクレオチドの中枢毒性とを比較する工程
を含む、方法。

[7]

中枢毒性が低減したホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオシドの糖部5'位炭素原子が、下記式I

[0016] [化3]

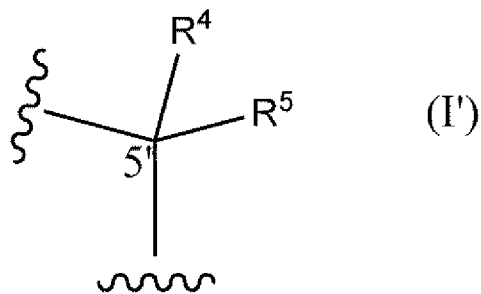


[0017] (式中、

R⁶およびR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基である)

または下記式I'

[0018] [化4]



[0019] (式中、

R⁴およびR⁵は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基またはエチル基である(ただし、R⁴およびR⁵が共に水素原子である場合を除く)

で表される構造を形成しており、任意により少なくとも一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、オリゴヌクレオチド。

[8]

ギャップマー型オリゴヌクレオチドである、[7]に記載のオリゴヌクレオチド。

[9]

上記式IまたはI'で表される構造を有するヌクレオシドの少なくとも一つがギャップ領域に位置する、[8]に記載のオリゴヌクレオチド。

[10]

前記ホスホジエステル結合の少なくとも一つがギャップ領域に位置する、
[8] または [9] に記載のオリゴヌクレオチド。

[11]

3' ウィング領域および5' ウィング領域を構成する少なくとも一つのヌクレオシドが架橋型ヌクレオシドである、 [8] ~ [10] のいずれか一つに記載のオリゴヌクレオチド。

[12]

[7] ~ [11] のいずれか一つに記載のオリゴヌクレオチドを含む、遺伝子の発現制御用試薬。

[13]

[7] ~ [11] のいずれか一つに記載のオリゴヌクレオチドを含む、疾患の治療薬。

[14]

(1) [1] ~ [5] のいずれか一つに記載の方法によりオリゴヌクレオチドを設計する工程、および

(2) 工程 (1) で設計したオリゴヌクレオチドを合成する工程を含む、低中枢毒性オリゴヌクレオチドの製造方法。

[15]

[7] ~ [11] のいずれか一つに記載のオリゴヌクレオチドを投与することを含む、遺伝子の発現制御方法。

[16]

哺乳動物に対し、 [7] ~ [11] のいずれか一つに記載のオリゴヌクレオチドの有効量を投与することを特徴とする、該哺乳動物における疾患の治療方法。

[17]

疾患の治療における使用のための [7] ~ [11] のいずれか一つに記載のオリゴヌクレオチド。

[18]

疾患の治療薬を製造するための[7]～[11]のいずれか一つに記載のオリゴヌクレオチドの使用。

発明の効果

[0020] 本発明により、数多くのアンチセンス開発品で用いられているホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを糖部5'位修飾ヌクレオチドにより置換することなどで、中枢毒性が低減した安全性の高いアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計および製造が可能になる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は、マウスにアンチセンスオリゴヌクレオチド(LX-A4285)を脳室内投与した場合における、行動スコアの測定結果を示す。

[図2]図2は、ヒト神経芽細胞にマウスにアンチセンスオリゴヌクレオチド(LX-A0070、LX-A4285、LX-A5106、LX-A5108及びLX-A5113)を投与した場合における、アンチセンス効果の評価結果を示す。

[図3]図3は、マウスにアンチセンスオリゴヌクレオチド(LX-A4285、LX-A5108及びLX-A5113)を脳室内投与した場合における、行動スコアの測定結果を示す。

発明を実施するための形態

[0022] 1. 中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドの設計方法

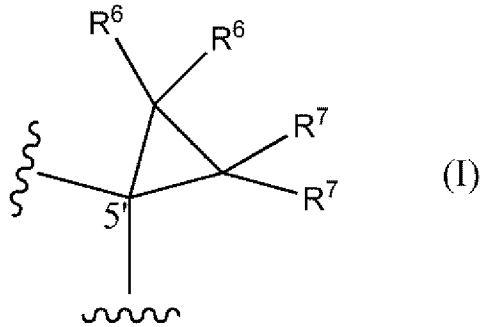
本発明は、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに代わる修飾ヌクレオチドとして5'-シクロプロパン構造を有するヌクレオシドを用いることで、中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドを設計できることを発見したことに基づいて完成した発明である。

[0023] 具体的には、本発明により、中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドを設計する方法であって、

(1) ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチド(以下、「PS修飾ヌクレオチド」と称することがある。)を構成する少なくとも一つの

ヌクレオシドの糖部5'位炭素原子を、下記式I

[0024] [化5]

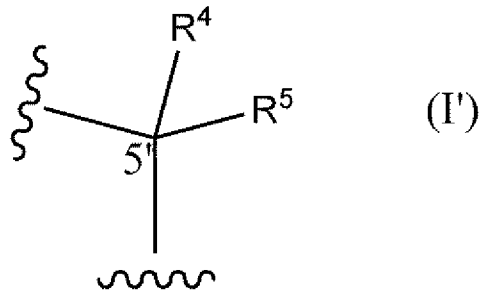


[0025] (式中、

R⁶およびR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基である)

または下記式I'

[0026] [化6]



[0027] (式中、

R⁴およびR⁵は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基またはエチル基である(ただし、R⁴およびR⁵が共に水素原子である場合を除く))

で表される構造に置換する工程を含むことを特徴とする、方法(以下、「本発明の設計方法」と称することがある。)が提供される。一態様において、

R⁶およびR⁷は共に水素原子である。本明細書において、オリゴヌクレオチドには、薬理学上許容されるオリゴヌクレオチドの塩も含まれるものとする。

。

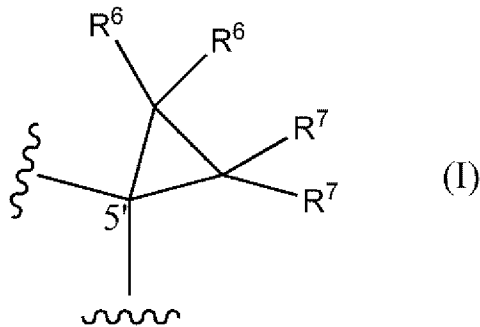
[0028] 中枢毒性をさらに低減させる観点から、本発明の設計方法には、(2)上記オリゴヌクレオチドが有する少なくとも一つのホスホロチオエート結合を

ホスホジエステル結合に置換する工程が含まれていてもよい。

[0029] また、別の態様において、本発明により、オリゴヌクレオチドの中核毒性を低減させる方法であって、

(1') PS修飾ヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオチドの糖部5'位炭素原子を、下記式I

[0030] [化7]

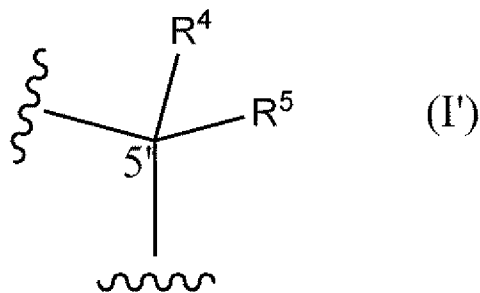


[0031] (式中、

R⁶およびR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基である)

または下記式I'

[0032] [化8]



[0033] (式中、

R⁴およびR⁵は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基またはエチル基である(ただし、R⁴およびR⁵が共に水素原子である場合を除く)

で表される構造に置換する工程を含むことを特徴とする、方法(以下、「本発明の毒性低減方法」と称することがある。)が提供される。一態様において、R⁶およびR⁷は共に水素原子である。

[0034] 本発明の毒性低減方法には、

(2') 上記オリゴヌクレオチドが有する少なくとも一つ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工程、が含まれていてもよい。

以下では、本発明の設計方法と本発明の毒性低減方法の両方に適用する事項については、これらの方法をまとめて単に「本発明の方法」と称することがある。

[0035] 本発明において、「ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチドの少なくとも一つのヌクレオシド間の結合がホスホロチオエート結合である（すなわち、ヌクレオシド間のリン酸基の酸素原子が硫黄原子に置換されている）オリゴヌクレオチドを意味する。天然型のオリゴヌクレオチドであるDNAやRNAにおける生体内での安定性、とりわけ酵素耐性を高めるためにホスホロチオエート修飾が一般的に用いられている。一方これらのホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドは共通して毒性を有する点で問題を内包している。

本発明の方法は、ホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドが有する毒性のうち、中枢毒性に注目しそれを低減する目的で研究を進めた結果完成したものである。

[0036] 本発明における「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。例えば、げっ歯類においては、易刺激性・自発運動減少・呼吸緩徐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、本発明における「中枢毒性」は、Irwinの変法 (Irwin S., Psychopharmacologia, 1968; 13(3): 222-257) により行う行動スコアにより評価することができる。

[0037] 本発明において、「中枢毒性が低減した」とは、本発明の方法の対象（設計元）となるPS修飾ヌクレオチド（以下、「対象オリゴヌクレオチド」と

称することがある。)が有する中枢毒性と比較して、本発明の方法の工程(1)または(1')を実施した後のオリゴヌクレオチド(すなわち、設計されたオリゴヌクレオチド、あるいは毒性が低減したオリゴヌクレオチド)(以下、「本発明実施後のオリゴヌクレオチド」と称することがある。)が有する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。具体的には、後述の実施例に記載されるように、上記 *l r w i n* の変法を用いて、対象オリゴヌクレオチドが投与された群における行動スコアの中央値と、本発明実施後のオリゴヌクレオチドが投与された群における行動スコアの中央値との差が1以上(例: 1、5、10、20またはそれ以上)である場合に、中枢毒性が低減したと評価することができ、かかる値により中枢毒性の程度を評価することもできる。

[0038] 本発明の設計方法の工程(1)では、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1に記載されるように、中枢毒性が低減されると予想されるオリゴヌクレオチドを設計し、該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。

[0039] 対象オリゴヌクレオチドは、該オリゴヌクレオチドの配列と相補的な配列を含む標的mRNA(本明細書において、mRNAには、pre-mRNAも含まれるものとする。)の機能(転写後修飾、翻訳など)を抑制するもの(以下、「抑制型ASO」と称することがある。)であってもよく、該機能を亢進するもの(以下、「亢進型ASO」と称することがある。)であってもよい。抑制型ASOは、典型的には、標的mRNAと二本鎖領域を形成し、該二本鎖領域がリボヌクレアーゼH(RNase H)により切断されることで、標的mRNAの機能を抑制することができる。一方で亢進型ASOは、典型的には、pre-mRNAのスプライシング促進配列と二本鎖領域を

形成して該配列をマスキングし、スプライシングをスキップさせることで、mRNAの機能を亢進（回復）することができる（これにより、機能的なタンパク質の細胞中での存在量が上昇することとなる）。あるいは、標的mRNAに含まれる、該mRNAを分解する酵素の結合配列と二本鎖領域を形成して該配列をマスキングし、該mRNAの分解を抑制することで、mRNAの機能を亢進することができる。

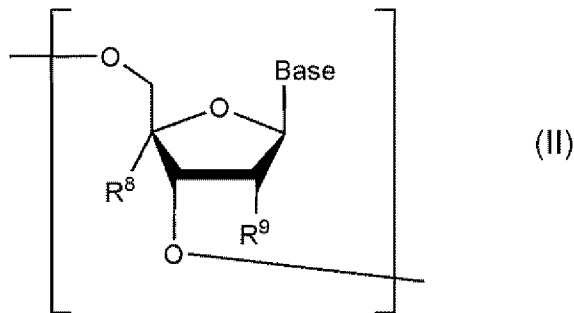
[0040] 抑制型ASOは、生体内での安定性および効率的なmRNAの切断の観点から、ギャップマー（Gapmer）型オリゴヌクレオチドであることが好ましい。本発明において「ギャップマー型オリゴヌクレオチド」とは、RNase Hにより認識される複数（例：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上）のヌクレオチドを有する内部領域（本明細書において、「ギャップ領域」と称することがある。）が、リボヌクレアーゼに対する耐性を付与するように修飾された少なくとも一つ（例：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上）のヌクレオチドを有する外部領域（本明細書において、3'側の外部領域を「3'ウイング領域」と、5'側の外部領域を「5'ウイング領域」と称することがある。）間に配置されるキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを意味する。3'ウイング領域と5'ウイング領域の各領域を構成する少なくとも一つのヌクレオチドは、架橋型ヌクレオチドであることが好ましい。

[0041] 亢進型ASOは、生体内での安定性の観点から、RNaseに対する耐性を付与するように修飾されたヌクレオチドを少なくとも一つ有するものがよい。かかるASOは、すべてのヌクレオチド残基が修飾されたものであってもよく、一部のヌクレオチド残基が修飾されたもの（すなわち、ミックスマー（Mixer）型オリゴヌクレオチド）であってもよい。かかる修飾されたヌクレオチドとしては、架橋型ヌクレオチドが好ましい。

[0042] 対象オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドとしては、例えば、下記式IIで表されるヌクレオチドなどが挙げられる。

[0043]

[化9]



[0044] (式中、

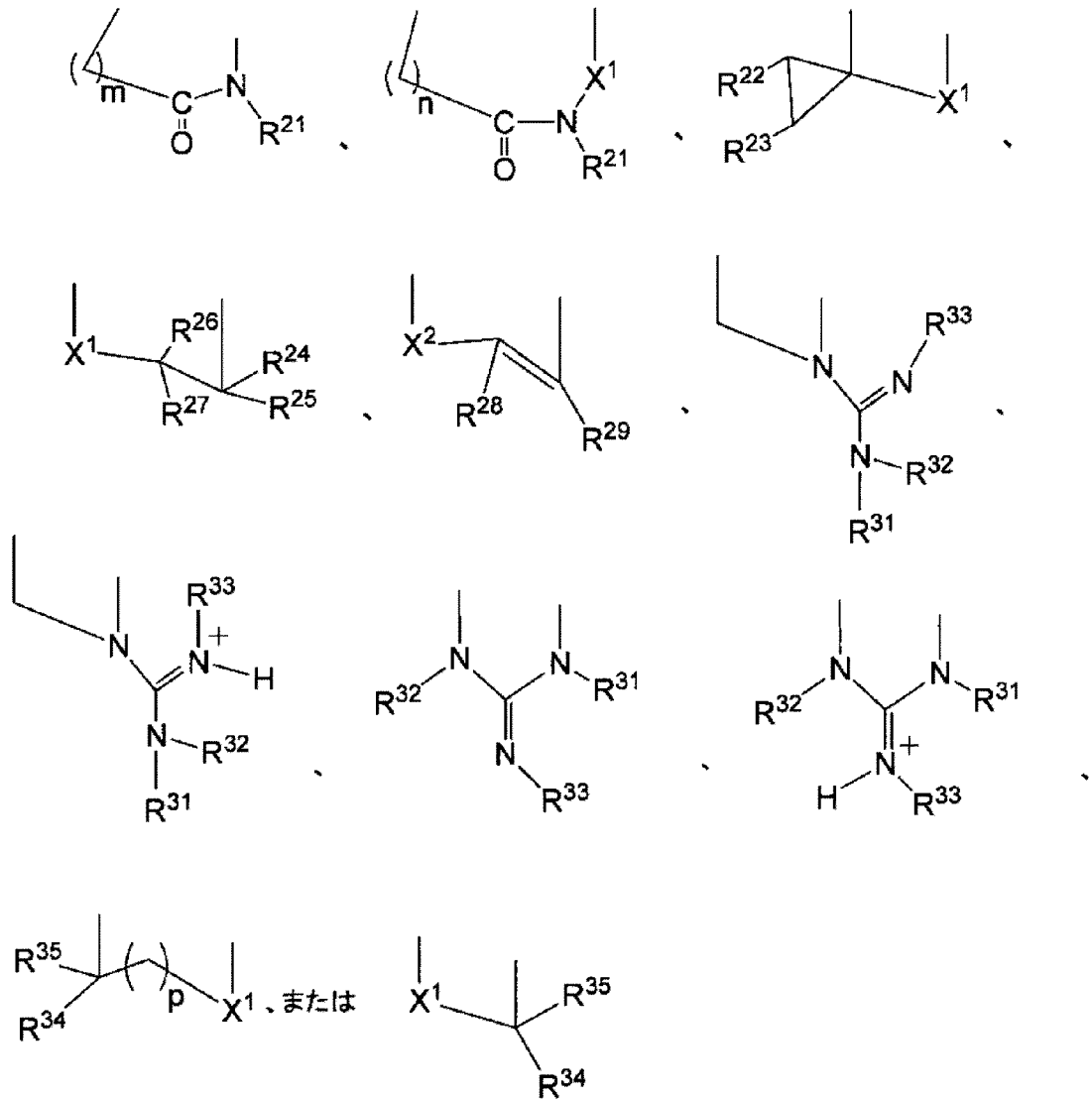
Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子、または炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基である。)

[0045] また、 R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[0046]

[化10]



[0047] (式中、

R²¹は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、前記α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から10のアリール基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6の

アルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は0から2の整数であり；

n は0から1の整数であり；

p は0から1の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

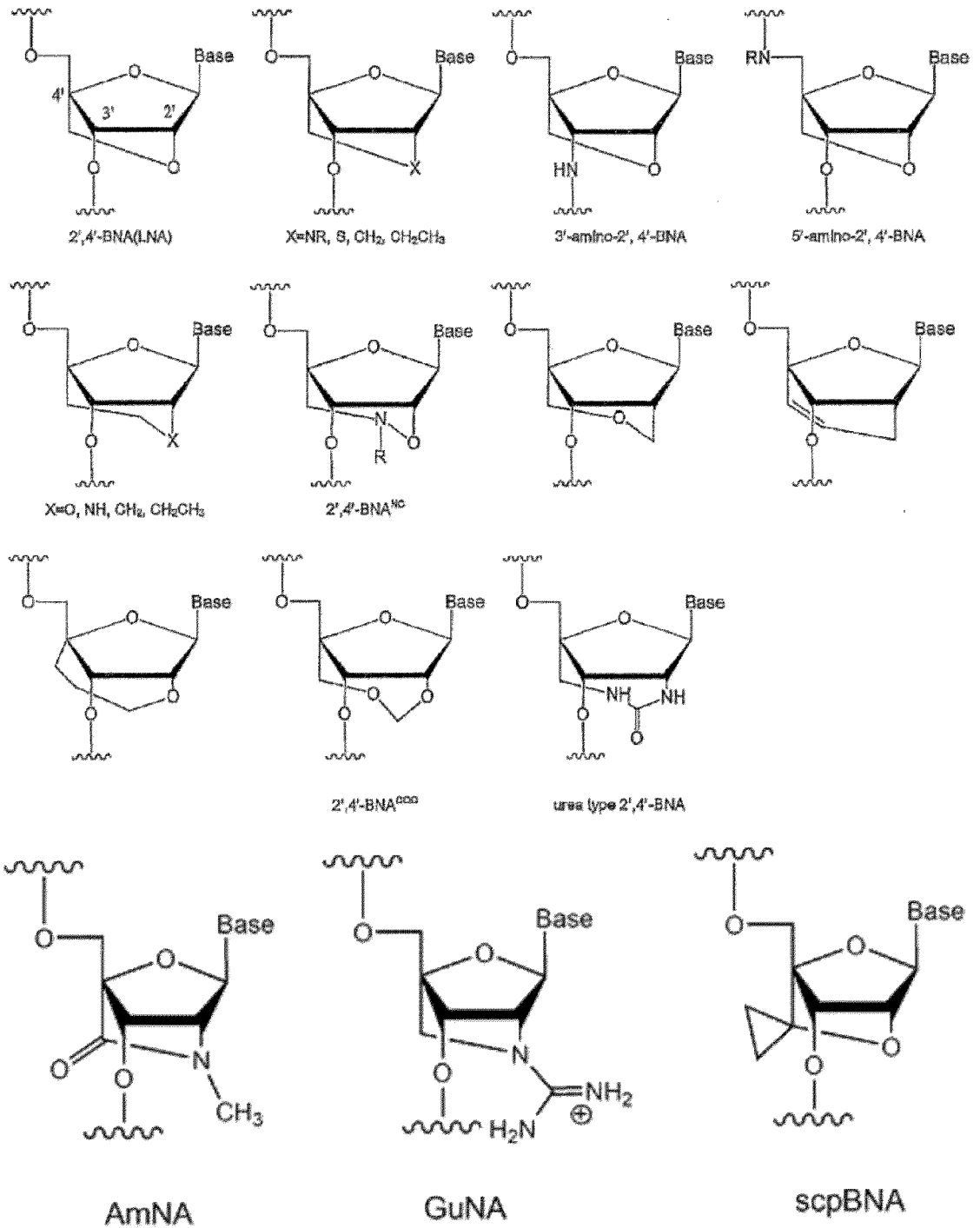
X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

で表される二価の基を表す。)を構成してもよく、かかる構成を有するヌクレオシドを架橋型ヌクレオシドと称することがある。

[0048] より具体的には、上記架橋型ヌクレオシドとして、例えば、下記構造式を有するヌクレオシドなどが挙げられる。

[0049]

[化11]



[0050] (式中、Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール基、ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有する

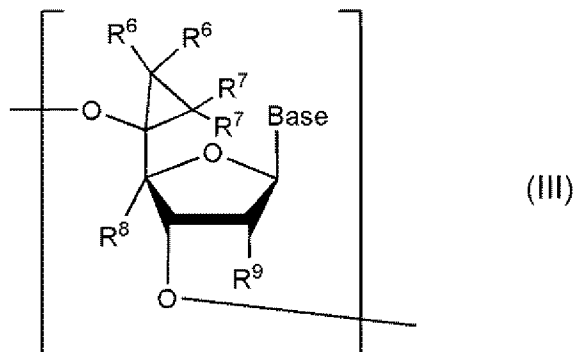
アルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基を表す。好ましくは、Rは、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、またはベンジル基であり、より好ましくは、Rは、水素原子またはメチル基である。Baseの定義は、上記式I Iにおける定義と同一である。)

[0051] 対象オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシドは、天然型のヌクレオシドであってもよく、かかる天然型のヌクレオシドとしては、アデノシン、N6-メチルアデノシン、グアノシン、ウリジン、5-メチルウリジン、シチジン、デオキシアデノシン、N6-メチル-2'-デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、チミジン、デオキシウリジン、デオキシシチジン、5-メチル-2'-デオキシシチジンなどが挙げられる。

[0052] 対象オリゴヌクレオチドの長さは、アンチセンス活性を有する限り特に限定されないが、典型的には10~50ヌクレオチド長であり、好ましくは10~30ヌクレオチド長であり、より好ましくは13~30ヌクレオチド長であり、さらに好ましくは15~20ヌクレオチド長である。

[0053] 本発明実施後のオリゴヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオシドは、下記式IIIまたはIII'で表すことができる。

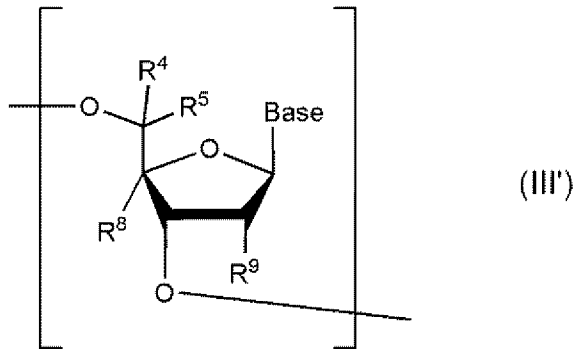
[0054] [化12]



[0055] (式中、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、Baseの定義は、上記式I及び式I Iにおける定義と同一である。一態様において、R⁶およびR⁷は共に水素原子である。)

[0056]

[化13]



[0057] (式中、 R^4 、 R^5 、 R^8 、 R^9 、Baseの定義は、上記式I'及び式IIにおける定義と同一である。)

[0058] 本発明の方法の工程(1)または(1')の結果、上記式Iまたは式I'で表される構造を有することとなるヌクレオシドは、対象PS修飾ヌクレオチドのいずれの位置に存在してもよいが、少なくとも一つ(例: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上)のヌクレオシドは、ギャップ領域に位置することが好ましい。

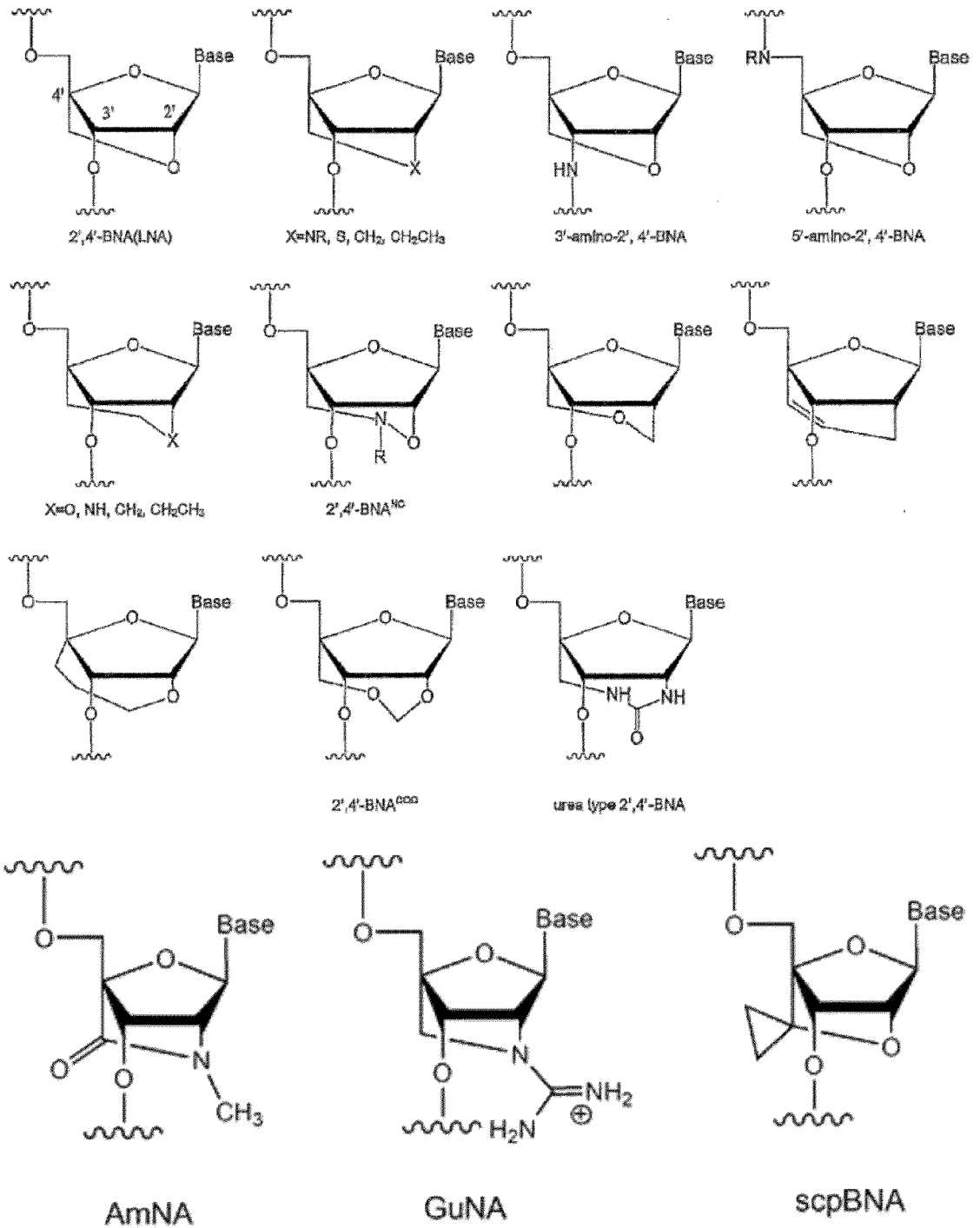
[0059] 本発明の方法の工程(2)または(2')の結果、置換されることとなるホスホロチオエート結合は、対象PS修飾ヌクレオチドのいずれのヌクレオシド間に存在してもよいが、少なくとも一つ(例: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上)のヌクレオシド間のホスホロチオエート結合は、ギャップ領域に位置することが好ましい。換言すれば、本発明の方法の工程(2)または(2')において、対象PS修飾ヌクレオチドのギャップ領域に位置するホスホロチオエート結合をホスホジエステル結合に置換することが好ましい。

[0060] また、本発明の方法の工程(2)または(2')の結果、置換されることとなるホスホロチオエート結合は、本発明の方法の工程(1)または(1')で置換したヌクレオシドの5'側または3'側に隣接する結合であってもよく、隣接していない結合であってもよい。すなわち、本発明の工程(1)または(1')と工程(2)または(2')の対象となるヌクレオチド残基は、それぞれ任意に選択することができる。

[0061] 本発明の方法において、ヌクレオシドの糖部5'位炭素原子の置換や、ホスホロチオエート結合の置換以外に、さらに修飾を施してもよい。かかる修飾としては、例えば、糖部の2'-O-メトキシエチル修飾、糖部の2'-O-メチル修飾、糖部の2'フルオロ修飾、糖部の2'位と4'位との架橋（架橋型ヌクレオシドへの置換）、架橋型ヌクレオシドから別の架橋型ヌクレオシドへの置換、Base（塩基部）のメチル化またはアセチル化、Baseの置換などが挙げられるが、これらに限定されない。Baseを置換する場合には、置換する前のBaseの標的の（すなわち、該Baseと塩基対を形成する）塩基と、塩基対を形成できるものに置換することが好ましい。前記塩基対は、ワトソンクリック型塩基対だけでなく、フーグスティーン型塩基対やゆらぎ塩基対（Wobble base pair）であってもよい。前記架橋型ヌクレオシドとしては、例えば、下記構造式を有するヌクレオシドなどが挙げられる。

[0062]

[化14]



[0063] (式中、Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール基、ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有する

アラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基を表す。好ましくは、Rは、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、またはベンジル基であり、より好ましくは、Rは、水素原子またはメチル基である。Baseの定義は、上記式IIにおける定義と同一である。）

[0064] PS修飾ヌクレオチドに対して本発明の方法の工程(1)または(1')を実施することで、理論上は、PS修飾ヌクレオチドと比較して中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドが設計される、あるいはPS修飾ヌクレオチドの中枢毒性が低減される。しかしながら、本発明実施後のオリゴヌクレオチドの中枢毒性が低減されていることを実際に確認してもよく、また本発明実施後のオリゴヌクレオチドの中神経毒性の低減の程度を評価してもよい。

[0065] したがって、本発明のさらに別の態様において、PS修飾ヌクレオチドの中枢毒性の低減の程度を評価する方法であって、以下の工程(1)~(111)：

(1) PS修飾ヌクレオチドを準備する工程、

(11) 本発明の設計方法により設計したオリゴヌクレオチドを準備する工程、および

(111) 工程(11)で準備したオリゴヌクレオチドの中枢毒性と、工程(1)で準備したオリゴヌクレオチドの中枢毒性を比較する工程

を含む、方法(以下、「本発明の評価方法」と称する場合がある。)が提供される。

[0066] 本発明の評価方法の工程(1)で準備するPS修飾ヌクレオチドは、市販品を購入すること、公知の合成方法により作製すること、あるいは合成委託により他者により作製させることなどにより入手することができる。また、本発明の評価方法の工程(11)で準備するオリゴヌクレオチドは、本発明の設計方法により設計したオリゴヌクレオチドの構造を元に、後述の公知の合成方法により作製すること、あるいは合成委託により他者により作製させることなどにより入手することができる。

[0067] 本発明の評価方法の工程（11）は、上記の *lrwin* の変法によりスコアを算出する方法や、その他公知の方法を用いて行うことができる。上記スコア等を比較することなどにより、本発明の評価方法の工程（111）を実施することができる。

[0068] 本発明の方法により設計したオリゴヌクレオチドは、中枢毒性が低減されるだけでなく、アンチセンス活性も維持し得る。本発明において「アンチセンス活性の維持」とは、対象オリゴヌクレオチドのアンチセンス活性と比較して、本発明実施後のオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性が維持されること、または高いことを意味する。かかるアンチセンス活性の評価は、抑制型ASOにおいては、例えば、後述の実施例に記載されるように、SH-SY5Y細胞に各アンチセンスオリゴヌクレオチドを同量接触させ、24時間以上後に該細胞からmRNAを回収し、該mRNAの量の比較により行うことができる。本発明実施後のオリゴヌクレオチドを接触させた群において、対象オリゴヌクレオチドを接触させた群と比較して標的mRNAの量に統計学的な有意差がない場合あるいは低下している場合には、アンチセンス活性が維持されていると評価することができる。一方で亢進型ASOにおいては、SH-SY5Y細胞に各アンチセンスオリゴヌクレオチドを同量接触させ、24時間以上後に該細胞から標的mRNAにコードされるタンパク質を回収し、該タンパク質のうち機能的なタンパク質の量の比較により行うことができる。

[0069] したがって、本発明の方法は、さらに本発明実施後のオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性を評価する工程を含んでもよい。かかる工程は、上記の標的mRNAまたは該mRNAにコードされるタンパク質量を測定する方法や、その他公知の方法を用いて行うことができる。

[0070] 2. 低中枢毒性オリゴヌクレオチドの製造方法

別の態様において、本発明により、

（1）本発明の設計方法によりオリゴヌクレオチドを設計する工程、および

(2) 工程(1)で設計したオリゴヌクレオチドを合成する工程を含む、低中枢毒性オリゴヌクレオチドの製造方法(以下、「本発明の製法」と称することがある。)が提供される。

[0071] 本発明において、「低中枢毒性オリゴヌクレオチド」とは、対象オリゴヌクレオチドと比較して、中枢毒性が低いこと、あるいは低いと予想されるオリゴヌクレオチドを意味する。具体的には、後述の実施例に記載されるように、上記 *Irwin* の変法を用いて、対象オリゴヌクレオチドが投与された群における行動スコアの中央値と、本発明実施後のオリゴヌクレオチドが投与された群における行動スコアの中央値との差が1以上(例: 1、5、10、20またはそれ以上)である場合に、低中枢毒性オリゴヌクレオチドであると評価することができ、かかる値により中枢毒性の程度を評価することもできる。

[0072] 本発明の製法の工程(2)におけるオリゴヌクレオチドの合成方法は、特に制限されず、公知の方法を採用することができる。かかる公知の方法として、例えば、ホスホロアミダイト法、ホスホネート法などの化学合成法が挙げられる。前記化学合成法において、市販の自動核酸合成機を使用することができる。また、前記化学合成法は、一般に、アミダイトが使用される。前記アミダイトは、特に制限されず、公知の方法(例えば、特許文献3、国際公開第2020/166551号に記載の方法)により作製してもよく、市販のアミダイトを用いてもよい。

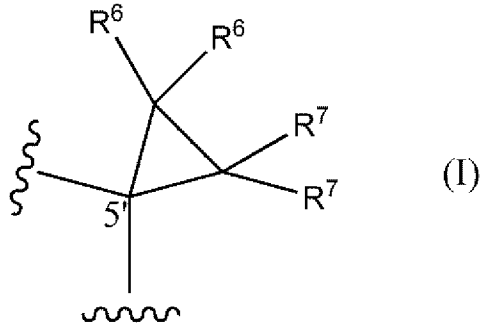
[0073] 本発明の製法により製造したオリゴヌクレオチドに対して、本発明の評価方法の工程(111)と同様の工程を実施することにより、実際に中枢毒性を評価してもよい。

[0074] 3. 中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチド

前述のとおり、本発明により、中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドを設計または製造することができる。したがって、別の態様において、中枢毒性が低減したホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドであって

オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオシドの糖部5'位炭素原子が、下記式I

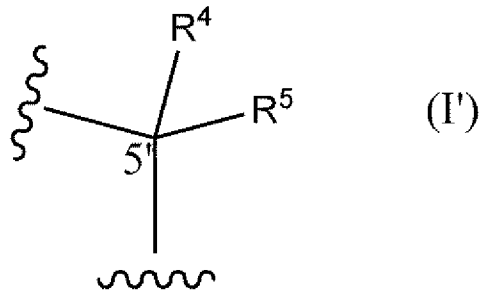
[0075] [化15]



[0076] (式中、 R^6 および R^7 の定義は、上記1.の式Iにおける定義と同一である)

または下記式I'

[0077] [化16]



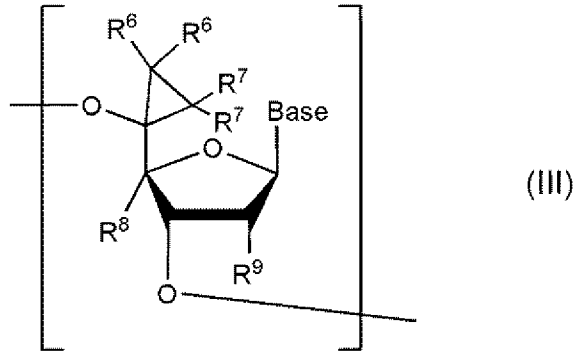
[0078] (式中、 R^4 および R^5 の定義は、上記1.の式I'における定義と同一である)

で表される構造を形成していることを特徴とする、ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチド（以下、「本発明のASO」と称することがある）が提供される。一態様において、 R^6 および R^7 は共に水素原子である。本発明のASOは、中枢毒性をさらに低減させる観点からは、少なくとも一つのヌクレオチ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。

[0079] したがって、本発明のASOを構成する少なくとも一つのヌクレオチドは、下記式IIIまたはIII'で表すことができる。

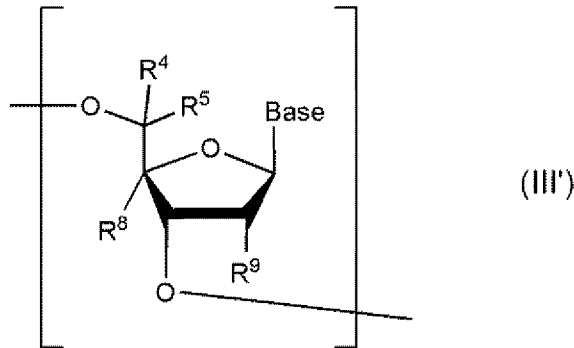
[0080]

[化17]



[0081] (式中、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、Baseの定義は、1. の式I及び式I'における定義と同一である。一態様において、 R^6 および R^7 は共に水素原子である。)

[0082] [化18]



[0083] (式中、 R^4 、 R^5 、 R^8 、 R^9 、Baseの定義は、1. の式I'及び式I'における定義と同一である。)

[0084] 本発明のASOは、抑制型ASOであってもよく、亢進型ASOであってもよい。抑制型ASOの場合には、ギャップマー型オリゴヌクレオチドであることが好ましいが、これに限定されない。亢進型ASOの場合には、ミックスマー型オリゴヌクレオチドであることが好ましいが、これに限定されない。

[0085] 上記式Iまたは式I'で表される構造を有するヌクレオシドは、本発明のASOのいずれの位置に存在してもよいが、少なくとも一つ(例: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上)のヌクレオシドは、ギャップ領域に位置することが好ましい。

- [0086] 本発明のASOのヌクレオシド間結合にホスホジエステル結合が存在する場合、該ホスホジエステル結合は、本発明のASOのいずれのヌクレオシド間に存在してもよいが、少なくとも一つ（例：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上）のヌクレオシド間のホスホジエステル結合は、ギャップ領域に位置することが好ましい。また、本発明のASOのヌクレオシド間結合にホスホジエステル結合が位置する場合、該ホスホジエステル結合は、上記式Iまたは式I'で表される構造を有するヌクレオシドの5'側または3'側に隣接していてもよく、隣接していなくともよい。
- [0087] 本発明のASOにおいて、3'ウイング領域と5'ウイング領域の各領域を構成する少なくとも一つのヌクレオシドは、架橋型ヌクレオシドであることが好ましい。かかる架橋型ヌクレオシドとしては、上記1.に記載の架橋型ヌクレオシドと同一のものを挙げるができる。
- [0088] 本発明のASOは、標的mRNAの機能を抑制または亢進することができ、それにより遺伝子の発現を制御することができる。したがって、本発明のASOは、遺伝子の発現制御用試薬（以下、「本発明の試薬」と称する場合がある。）として用いることができる。「遺伝子の発現制御用試薬」との用語には、「遺伝子の発現抑制用試薬」および「遺伝子の発現亢進用試薬」の両方の用語が包含されるものとする。
- [0089] 本発明の試薬が2種以上のASOを含む場合や、その他の試薬類を含む場合、該試薬は、各ASO、試薬類を別個の試薬中に含む試薬キットとして提供され得る。本発明において「遺伝子の発現」とは、特にことわらない限り、少なくとも「標的mRNAにコードされた機能的なタンパク質の産生」を含む意味で用いられるが、さらに「標的mRNAの産生」をも含む意味で用いられる。したがって、遺伝子の発現抑制とは、本発明のASOの投与により、該遺伝子にコードされる機能的なタンパク質の細胞中での存在量が減少することだけでなく、該遺伝子から転写されるmRNAの細胞中での存在量が減少することも含んでいてもよい。同様に、遺伝子の発現亢進とは、本発明のASOの投与により、該遺伝子にコードされる機能的なタンパク質の細

胞中での存在量が増加することだけでなく、該遺伝子から転写される mRNA の細胞中での存在量が増加することも含んでいてもよい。

- [0090] 本発明の試薬は、例えば、対象に、前記 ASO を単独で、あるいは薬理学的許容される担体とともに投与することができる。前記導入対象は、例えば、ヒトを含む哺乳類動物の細胞、組織、器官などが挙げられる。よって、本発明の ASO を対象に投与することを含む、該対象における遺伝子の発現制御方法も提供される。
- [0091] 本発明の ASO の標的細胞内への導入を促進するために、本発明の試薬は、更に核酸導入用試薬を含んでいてもよい。該核酸導入用試薬として、塩化カルシウム、Calcium enrichment 試薬、アテロコラーゲン；リポソーム；ナノパーティクル；リポフェクチン、リポフェクタミン (lipofectamine)、DOG S (トランスフェクタム)、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ (エチレンジアミン) (PEI) 等の陽イオン性脂質等を用いることができる。
- [0092] 前述のとおり、本発明の ASO は、中枢毒性が低減されているため、医薬として用いることに特に適している。したがって、本発明の ASO を含む、疾患の治療薬（以下、「本発明の治療薬」と称することがある。）が提供される。本発明において、「治療」には、症状の軽減や改善、病気や症状の進行、あるいは症状の顕在化の予防、遅延や停止も包含される。このような疾患として、例えば、本発明の ASO の標的 mRNA にコードされるタンパク質の過剰発現または過剰蓄積、あるいは本発明の ASO の標的 mRNA にコードされるタンパク質の欠失または減少に起因する疾患が挙げられる。かかる疾患としては、例えば、神経疾患（例：タウオパチーなどの神経変性疾患）などが挙げられる。
- [0093] 本発明の治療薬として、有効量の本発明の ASO を単独で用いてもよいし、任意の担体、例えば医薬上許容される担体とともに、医薬組成物として製剤化してもよい（製剤化したものを治療剤とも称する）。
- [0094] 医薬上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン等の賦形剤、

セルロース、メチルセルロース等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル等の滑剤、クエン酸、メントール等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリド等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、ベースワックス等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

[0095] 本発明のASOの標的細胞内への導入を促進するために、本発明の治療薬は更に核酸導入用試薬を含んでいてもよい。該核酸導入用試薬としては、上述したものと同様のものを用いることができる。

[0096] また、本発明の治療薬は、本発明のASOがリポソームに封入されてなる医薬組成物であってもよい。リポソームは、1以上の脂質二重層により包囲された内相を有する微細閉鎖小胞であり、通常は水溶性物質を内相に、脂溶性物質を脂質二重層内に保持することができる。本明細書において「封入」という場合には、本発明のASOはリポソーム内相に保持されてもよいし、脂質二重層内に保持されてもよい。本発明に用いられるリポソームは単層膜であっても多層膜であってもよく、また、粒子径は、例えば10~1000nm、好ましくは50~300nmの範囲で適宜選択できる。標的組織への送達性を考慮すると、粒子径は、例えば200nm以下、好ましくは100nm以下である。

[0097] オリゴヌクレオチドのような水溶性化合物のリポソームへの封入法としては、リピドフィルム法（ボルテックス法）、逆相蒸発法、界面活性剤除去法、凍結融解法、リモートローディング法等が挙げられるが、これらに限定されず、任意の公知の方法を適宜選択することができる。

[0098] 本発明の医薬は、経口的に又は非経口的に、哺乳動物（例：ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウシ、イヌ、ネコ、サル）に対して投与することが可能であるが、非経口的に投与するのが望ましい。よって、哺乳動物に対し、本発明のASOの有効量を投与することを特徴とする、該哺乳動物における疾患の治療方法も提供される。

- [0099] 非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、静脈内注入、局所注入（局所外用、局所塗布）、脳室内投与、髄腔内投与、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性及び非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性及び非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分及び医薬上許容される担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解又は懸濁すればよい状態で保存することもできる。非経口的な投与に好適な別の製剤としては、噴霧剤等を挙げることができる。
- [0100] 医薬組成物中の本発明のASOの含有量は、例えば、医薬組成物全体の約0.1ないし100重量%である。
- [0101] 本発明の治療薬の投与量は、投与の目的、投与方法、対象疾患の種類、重篤度、投与対象の状況（性別、年齢、体重など）によって異なるが、例えば、成人に全身投与する場合、通常、本発明のASOの一回投与量として0.01 mg/kg以上1000 mg/kg以下、局所投与する場合、0.001 mg/body以上100 mg/body以下が望ましい。かかる投与量を1~10回、より好ましくは5~10回投与することが望ましい。
- [0102] 本発明の治療薬は、例えば既に上市されている疾患に対する治療薬と組み合わせ用いることもできる。これらの併用薬剤は、本発明の医薬とともに製剤化して単一の製剤として投与することもできるし、あるいは、本発明の医薬とは別個に製剤化して、本発明の医薬と同一もしくは別ルートで、同時もしくは時間差をおいて投与することもできる。また、これらの併用薬剤の投与量は、該薬剤を単独投与する場合に通常用いられる量であってよく、あるいは通常用いられる量より減量することもできる。
- [0103] 以下、実施例等により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0104] 実施例 1 : アンチセンスヌクレオチドの設計および合成

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる中枢毒性を評価するために、以下のオリゴヌクレオチドを設計および合成した。LX-A4285はヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であり、WO 2016/127000 A1により中枢毒性を示すことが知られている配列である。表中、5は5-メチルシトシンを、LnはLNAを、^はホスホロチオエート結合を、Cpは糖部5' 位にシクロプロパン構造を導入したDNA（本明細書中では「5' -シクロプロパンDNA」と表記する）をそれぞれ示す。

[0105] [表1]

配列 (5' → 3')	参照番号	配列番号
A(Ln)^5(Ln)^5(Ln)^a^t^g^a^t^c^t^t^a^g^G(Ln)^5(Ln)^T(Ln)	LX-A4285	1
A(Ln)^5(Ln)^5(Ln)A(Cp)^t^g^a^t^c^t^t^a^g^G(Ln)^5(Ln)^T(Ln)	LX-A5105	2
A(Ln)^5(Ln)^5(Ln)A(Cp)T(Cp)^g^a^t^c^t^t^a^g^G(Ln)^5(Ln)^T(Ln)	LX-A5106	3
A(Ln)^5(Ln)^5(Ln)A(Cp)T(Cp)G(Cp)^a^t^c^t^t^a^g^G(Ln)^5(Ln)^T(Ln)	LX-A5107	4
A(Ln)^5(Ln)^5(Ln)A(Cp)T(Cp)G(Cp)A(cp)^t^c^t^t^a^g^G(Ln)^5(Ln)^T(Ln)	LX-A5108	5

[0106] [表2]

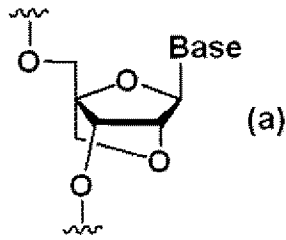
配列 (5' → 3')	参照番号	配列番号
A(Ln)5(Ln)5(Ln)at^g^a^t^c^t^t^a^g^G(Ln)5(Ln)T(Ln)	LX-A4286	7
A(Ln)^5(Ln)^5(Ln)A(Cp)T(Cp)^g^a^t^c^t^tA(Cp)G(Cp)^G(Ln)^5(Ln)^T(Ln)	LX-A5113	8

[0107] 本発明に関連するオリゴヌクレオチドは、Tetrahedron Letters 22, 1859-1862 (1981)、国際公開第2011/052436号等に記載される方法によって合成した。

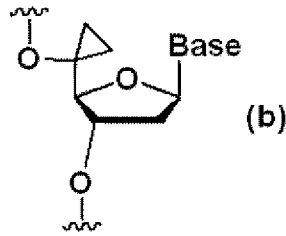
[0108] 糖修飾ヌクレオシドとして、式(a)で示されるLocked Nucleic Acid(LNA)または式(b)で示される5' -シクロプロパンDNA(5' -CP-DNA)を用いた。

[0109]

[化19]



[0110] [化20]



[0111] (式中、Baseは5-メチルシトシン-1-イル基、チミン-1-イル基、アデニン-9-イル基またはグアニン-9-イル基である。)

[0112] 5'-シクロプロパンDNA(5'-CP-DNA)を含むオリゴヌクレオチドは、国際公開第2020/158910号に記載の方法を参照して合成した。

[0113] Locked Nucleic Acid(LNA)または5'-シクロプロパンDNA(5'-CP-DNA)を含む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(固相担体:CPG、ホスホロジエステル(P0)骨格形成のための酸化はヨウ素を、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)等を使用して実施した。Locked Nucleic Acid(LNA)または5'-シクロプロパンDNA(5'-CP)を含むオリゴヌクレオチドとして、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を得た。続いて塩基処理することにより、目的物を固相担体から切り出した後に溶媒を留去し、得られた粗生成物を逆相HPLCにて精製することにより目的物を得た。

[0114] 得られた各オリゴヌクレオチドの純度および構造をLC-MS(Waters社製)により確認した。

[0115] 実施例 2 : マウス中枢神経におけるアンチセンスヌクレオチドの毒性評価方法の構築

アンチセンスオリゴヌクレオチドによるマウス中枢毒性の評価には、BALB/cCrSlc(オス、7週齢、日本エスエルシー株式会社)を用いた。動物は温度：18～28℃、湿度：30～80%、照明時間：12時間/日の環境下のオープンラックにて飼育し、全ての動物は飼料および水分を自由摂取させた。

[0116] アンチセンスオリゴヌクレオチドのマウスへの投与は、中枢毒性を評価すべく脳室内投与とした。3種混合麻酔薬（酒石酸ブトルファンール5mg/kg、ミダゾラム4mg/kg、塩酸メデトミジン0.3mg/kg）を10mL/kgの容量で腹腔内投与することによる深麻酔下で、マウスを脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を露出させ、歯科用ドリルを用いて投与部位（脳座標：bregmaから尾側へ-0.2mm、右側へ-1.0mm、深さ-2.5mm）に穴を開け、30Gニードル、マイクロシリンジ及びポリエチレンチューブを用いて脳室内に単回投与した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは表1に示されるLX-A4285を用いた。

[0117] LX-A4285の脳室内単回投与後1～24時間に、マウスの行動解析をIrwinの変法によって行った。評価項目としては、自発運動、立ち上がり行動、多動、歩行、グルーミング、眼瞼下垂、発声、振戦、痙攣等の項目をスコア化した。

[0118] 結果を図1に示す。LX-A4285によるスコアは、Irwinの変法における正常スコアからの乖離値から算出し、各群の中央値で示した。正常な行動を示す場合はおよそ0付近のスコアを示すことに対し、乖離値が認められたLX-A4285は、中枢毒性を生じることが示された。すなわち、マウス中枢神経におけるアンチセンスヌクレオチドの毒性評価方法が適切に構築されたといえる。

[0119] 実施例 3 : ヒト神経芽細胞におけるアンチセンスヌクレオチドのインビトロでのmRNA発現抑制

上記実施例1において使用したアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、ヒト神経芽細胞におけるMAPT mRNA発現抑制効果を評価した。

オリゴヌクレオチドを添加しないものをコントロールとした。また、比較のために、ネガティブコントロールのオリゴヌクレオチド (Negative Control; NCとも称する) : 5(Y)⁵A(Y)⁵T(Y)⁵t⁵t⁵a⁵g⁵a⁵a⁵g⁵t⁵c⁵(Y)⁵T(Y)⁵c (LX-A0070; 配列番号6) を用いた。前記配列中、5は5-メチルシトシンを、YはAmNAをそれぞれ示す。

[0120] ヒト神経芽細胞として、SH-SY5Y 細胞 (ECACC社、EC94030304-F0) を用いた。各アンチセンスオリゴヌクレオチド (LX-A0070、LX-A4285、LX-A5106、LX-A5108及びLX-A5113) 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SH-SY5Y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。以下に手順を示す。

対数増殖期の SH-SY5Y 細胞を 3.0×10^4 個/ウェルにて、24ウェルプレート (10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むHam's F12 (Ham's F12) およびイーグル最小必須培地 (E-MEM) の等比混合培地を含む) 中に播いた。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濃度: 1、3、10、30または100 nM)、24時間以上インキュベートした。

[0121] インキュベート後、細胞を回収し、RNA抽出試薬 (MACHEREY-NAGEL社、Nucleo ZOL) を用いて、total RNAを抽出した。当該total RNAを鋳型として、核酸増幅反应用試薬 (QIAGEN社、QuantiFast 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、50℃ 10分→95℃ 5分→[(95℃ 10秒→60℃ 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、ハウスキーピング遺伝子のヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) のmRNA量も同時に定量し、GAPDHのmRNA量に対するMAPTのmRNA量を評価した。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添加細胞のmRNA量を1とした場合の相対値にて示す。

[0122] 用いたプライマーセットは、下記のとおりである :

(MAPT検出用プライマーセット)

TaqMan Gene Expression Assay Hs00902194_m1_4331182 (ThermoFisher Scientific社)

(GAPDH検出用プライマーセット)

TaqMan Gene Expression Assay Hs02786624_g1_4331182 (ThermoFisher Scientific社)

[0123] 結果を図2に示す。オリゴヌクレオチド無添加細胞(「コントロール」)およびNegative Control添加細胞と比較して、アンチセンスオリゴヌクレオチドは用量依存的なノックダウン活性(mRNAの発現抑制)を示すことが確認された。よって、5'位修飾ヌクレオシドを有するアンチセンスヌクレオチドは、mRNAの発現抑制活性が維持されていると評価することができた。

[0124] 実施例4: マウス中枢神経におけるアンチセンスヌクレオチドの急性毒性
表1及び表2に記載のアンチセンスヌクレオチドの中から、代表としてノックダウン活性を維持しつつ細胞毒性が低いもの(データは示さず)を2つ(LX-A5108及びLX-A5113)選択し、該ヌクレオチドについて、マウス中枢神経における急性毒性を評価した。評価方法は実施例2に記載の方法に従った。結果を図3に示す。図3から、ホスホロチオエート結合のみを有するアンチセンスヌクレオチドと比較して、5'-CPを有しホスホジエステル結合の割合が増加した配列では中枢毒性が低減することを確認した。

[0125] 上記実施例3および4の結果から、5'位修飾ヌクレオシドを有するアンチセンスヌクレオチドは、中枢毒性を低減しつつmRNAの発現抑制活性を保持することを確認した。

産業上の利用可能性

[0126] 本発明により、中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドを設計することができる。該設計結果に基づき合成されたオリゴヌクレオチドは、細胞あるいは個体への投与により、副作用を抑制しつつ遺伝子発現の制御が可能となるため、疾患の治療薬として用いることができる。

[0127] 本出願は、日本で出願された特願2021-078507(出願日: 20

21年5月6日)及び特願2021-151543(出願日:2021年9月16日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

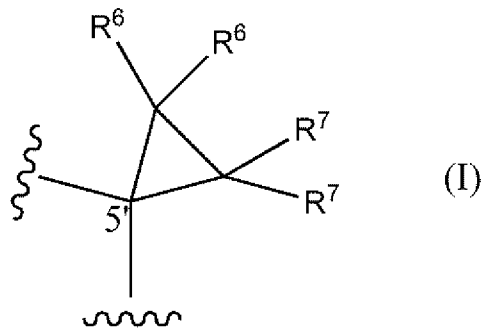
請求の範囲

[請求項1]

中枢毒性が低減したオリゴヌクレオチドを設計する方法であって、

(1) ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオシドの糖部5'位炭素原子を、下記式I

[化1]

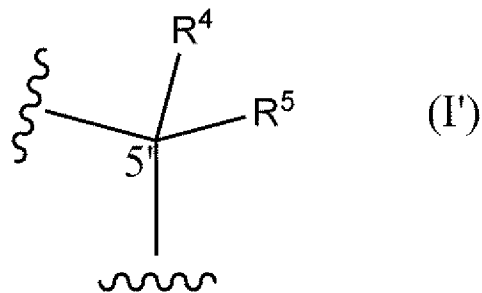


(式中、

R⁶およびR⁷は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基である)

または下記式I'

[化2]



(式中、

R⁴およびR⁵は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基またはエチル基である(ただし、R⁴およびR⁵が共に水素原子である場合を除く))

で表される構造に置換する工程、および任意により

(2) 該オリゴヌクレオチドが有する少なくとも一つのホスホロチ

オエート結合をホスホジエステル結合に置換する工程を含むことを特徴とする、方法。

[請求項2] オリゴヌクレオチドがギャップマー型オリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 上記工程(1)で置換されるヌクレオシドの少なくとも一つがギャップ領域に位置する、請求項2に記載の方法。

[請求項4] 上記工程(2)で置換されるホスホロチオエート結合の少なくとも一つがギャップ領域に位置する、請求項2または3に記載の方法。

[請求項5] 3' ウィング領域および5' ウィング領域を構成する少なくとも一つのヌクレオシドが架橋型ヌクレオシドである、請求項2～4のいずれか1項に記載の方法。

[請求項6] ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチドの中枢毒性の低減の程度を評価する方法であって、以下の工程(1)～(3)：

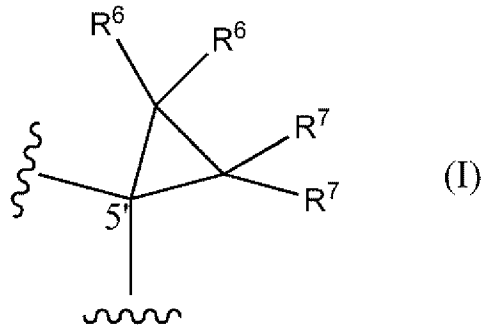
(1) ホスホロチオエート修飾を有するオリゴヌクレオチドを準備する工程、

(2) 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法により設計したオリゴヌクレオチドを準備する工程、および

(3) 工程(2)で準備したオリゴヌクレオチドの中枢毒性と、工程(1)で準備したオリゴヌクレオチドの中枢毒性とを比較する工程を含む、方法。

[請求項7] 中枢毒性が低減したホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも一つのヌクレオシドの糖部5'位炭素原子が、下記式I

[化3]

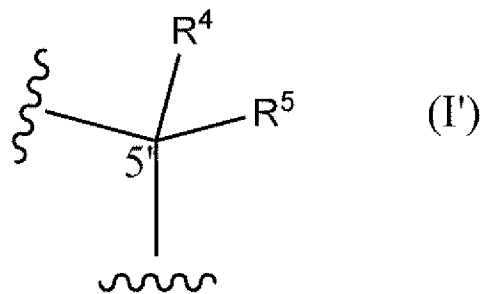


(式中、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基である)

または下記式I'

[化4]



(式中、

R^4 および R^5 は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基またはエチル基である (ただし、 R^4 および R^5 が共に水素原子である場合を除く))

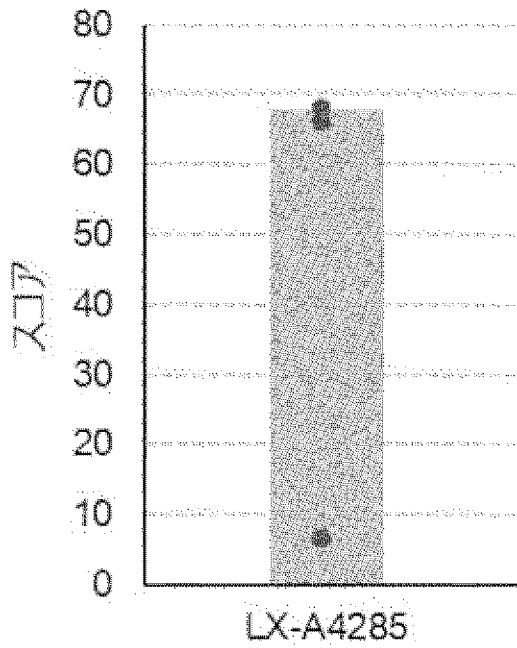
で表される構造を形成しており、任意により少なくとも一つのヌクレオシド間結合がホスホジエステル結合である、オリゴヌクレオチド。

[請求項8] ギャップマー型オリゴヌクレオチドである、請求項7に記載のオリゴヌクレオチド。

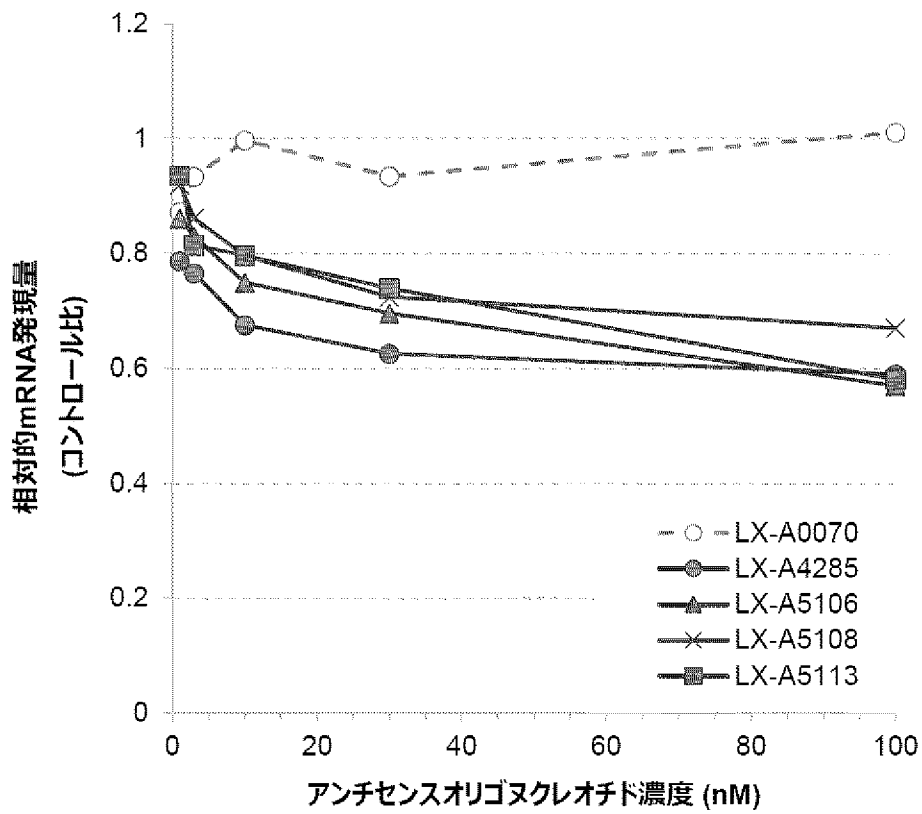
[請求項9] 上記式IまたはI' で表される構造を有するヌクレオシドの少なくとも一つがギャップ領域に位置する、請求項8に記載のオリゴヌクレオチド。

- [請求項10] 前記ホスホジエステル結合の少なくとも一つがギャップ領域に位置する、請求項8または9に記載のオリゴヌクレオチド。
- [請求項11] 3' ウィング領域および5' ウィング領域を構成する少なくとも一つのヌクレオチドが架橋型ヌクレオチドである、請求項8～10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。
- [請求項12] 請求項7～11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを含む、遺伝子の発現制御用試薬。
- [請求項13] 請求項7～11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを含む、疾患の治療薬。
- [請求項14] (1) 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法によりオリゴヌクレオチドを設計する工程、および
(2) 工程(1)で設計したオリゴヌクレオチドを合成する工程を含む、低中枢毒性オリゴヌクレオチドの製造方法。

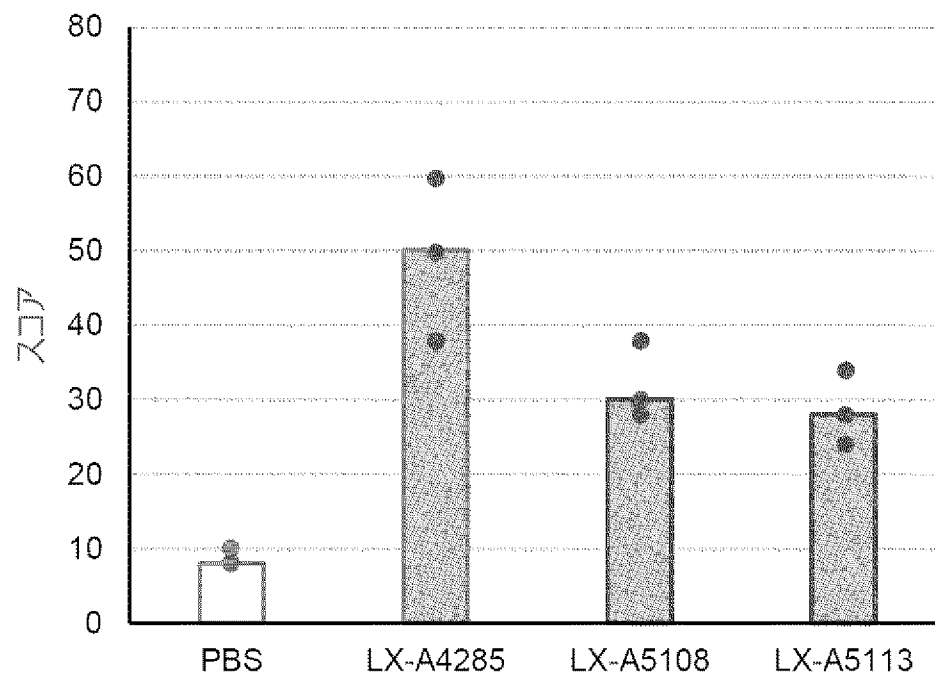
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/019561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C07H 21/04</i>(2006.01)i; <i>A61K 31/7125</i>(2006.01)i; <i>A61K 48/00</i>(2006.01)i; <i>A61P 25/00</i>(2006.01)i; <i>A61P 25/28</i>(2006.01)i; <i>A61P 43/00</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/113</i>(2010.01)i; <i>C12Q 1/6813</i>(2018.01)i FI: C07H21/04 Z CSP; A61P25/28; A61P43/00 105; A61K48/00; A61K31/7125; C12Q1/6813 Z; A61P25/00; C12N15/113 Z ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H21/04; A61K31/7125; A61K48/00; A61P25/00; A61P25/28; A61P43/00; C12N15/113; C12Q1/6813		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (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 2020/166551 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 20 August 2020 (2020-08-20) claims, examples	1-5, 7-14
Y		1-14
X	WO 2020/158910 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 06 August 2020 (2020-08-06) claims, examples	1-5, 7-14
Y		1-14
X	VASQUEZ, G. et al. Site-specific incorporation of 5'-methyl DNA enhances the therapeutic profile of gapmer ASOs. <i>Nucleic Acids Research</i> . 05 February 2021, vol. 49, no. 4, pp. 1828-1839 abstract, fig. 1-6	1-5, 7-14
Y		1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 01 July 2022		Date of mailing of the international search report 12 July 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/019561

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOAZAMI, M. P. et al. bioRxiv [online], 15 February 2021, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.14.431096 , [retrieved on 01 July 2022] entire text	1-14
Y	WO 2016/127000 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 11 August 2016 (2016-08-11) claims, examples	1-14

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2022/019561

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/166551	A1	20 August 2020	EP 3925965 A1 claims, examples	
WO	2020/158910	A1	06 August 2020	EP 3919501 A1 claims, examples	
WO	2016/127000	A1	11 August 2016	JP 2018-511302 A US 2019/0383797 A1 EP 3254104 A1 CN 107636159 A KR 10-2018-0016970 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07H 21/04(2006.01)i; A61K 31/7125(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/6813(2018.01)i FI: C07H21/04 Z CSP; A61P25/28; A61P43/00 105; A61K48/00; A61K31/7125; C12Q1/6813 Z; A61P25/00; C12N15/113 Z ZNA</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07H21/04; A61K31/7125; A61K48/00; A61P25/00; A61P25/28; A61P43/00; C12N15/113; C12Q1/6813</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年									
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN)</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
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 2020/166551 A1 (国立大学法人大阪大学) 20.08.2020 (2020 - 08 - 20) 請求の範囲、実施例	1-5, 7-14								
Y		1-14								
X	WO 2020/158910 A1 (国立大学法人大阪大学) 06.08.2020 (2020 - 08 - 06) 請求の範囲、実施例	1-5, 7-14								
Y		1-14								
X	VASQUEZ, G. et al, Site-specific incorporation of 5'-methyl DNA enhances the therapeutic profile of gapmer ASOs, Nucleic Acids Research, 2021.02.05, Vol.49, No.4, pp.1828-1839 ABSTRACT, Figure 1-6	1-5, 7-14								
Y		1-14								
Y	MOAZAMI M.P. et al., bioRxiv [online], 2021.02.15, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.14.431096 [検索日 2022.07.01] 全文	1-14								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “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</p>										
国際調査を完了した日	01.07.2022	国際調査報告の発送日 12.07.2022								
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） 三上 晶子 4P 4042 電話番号 03-3581-1101 内線 3492									

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
Y	WO 2016/127000 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 11.08.2016 (2016 - 08 - 11) claims, Example	1-14

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

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

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/019561

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/166551	A1	20.08.2020	EP	3925965	A1	
claims, Example							
WO	2020/158910	A1	06.08.2020	EP	3919501	A1	
claims, Example							
WO	2016/127000	A1	11.08.2016	JP	2018-511302	A	
				US	2019/0383797	A1	
				EP	3254104	A1	
				CN	107636159	A	
				KR	10-2018-0016970	A	