(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
2021年9月10日(10.09.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/177267 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01)　*A61K 31/7115* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)　*A61K 31/712* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)　*A61K 31/7125* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)　*A61K 31/713* (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2021/007822

(22) 国際出願日：　2021年3月2日(02.03.2021)

(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 2020-034619　2020年3月2日(02.03.2020)　JP

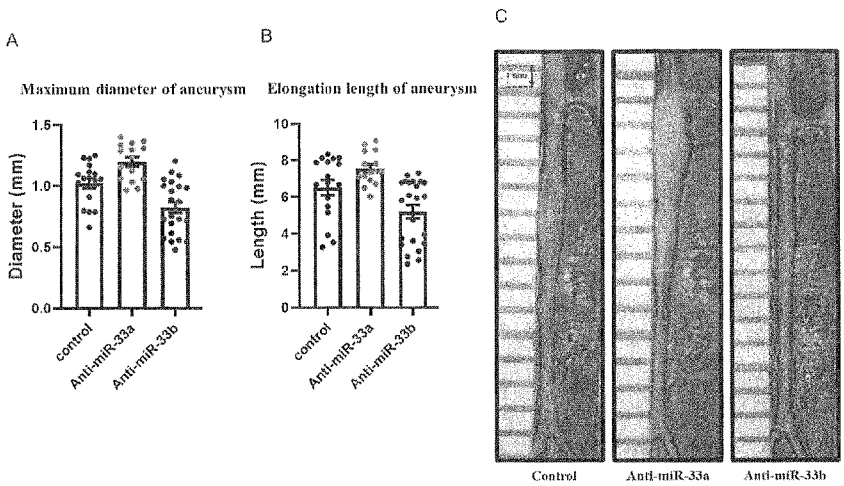
(71) 出願人: 田辺三菱製薬株式会社(**MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION**) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目２番１０号 Osaka (JP). 国立大学法人京都大学(**KYOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP). 国立大学法人大阪大学(**OSAKA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP). 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所(**NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION**) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目６番８号 Osaka (JP).

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

(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所(**IP FIRM SHUWA**); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル８階 Tokyo (JP).

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

(54) 発明の名称： ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質による動脈瘤の予防または治療



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

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

［続葉有］

WO 2021/177267 A1

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

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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ：

ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質による動脈瘤の予防または治療

技術分野

[0001] 本発明は、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質を有効成分として含有する動脈瘤の予防または治療剤に関する。

背景技術

[0002] 大動脈瘤の有病率は長寿命とライフスタイルの変化のために増加している。例えば、腹部大動脈瘤は心血管死亡の３番目に多い原因であり、６５歳以上の男性集団における全死亡の１％から３％を占める。コンピュータ断層撮影スキャンによる早期診断は臨床で可能であるが、大動脈瘤の促進を予防する薬剤はこれまでには存在しない。大動脈瘤は無症候性に進行し、致死的な破裂をもたらす可能性があるため、大動脈瘤の進行を抑制するための薬物療法を開発することが緊急のアンメットニーズである。現在、プロテアーゼの活性化による細胞外マトリックス分解の亢進、大血管平滑筋細胞の細胞死および内皮機能障害等が動脈壁の炎症の重要なステップであり、それらに伴う炎症が、中膜の破壊と大動脈壁の脆弱性を引き起こし、大動脈瘤の形成および進展に関わっていると考えられている（非特許文献１）。

[0003] これまでの薬剤開発では、大動脈壁脆弱性を引き起こすと考えられる細胞外マトリックス分解を阻害することに焦点が当てられてきたが、大動脈瘤の病因におけるプロテアーゼの主要グループの一つであるマトリックスメタロプロテアーゼの阻害剤ドキシサイクリンは、動脈瘤の進展に対して明らかな臨床効果を示さなかった（非特許文献１）。

[0004] ｍｉＲＮＡ（マイクロＲＮＡ）はゲノム上にコードされ、多段階的な生成過程を経て最終的に１９－２５塩基長となる微小な1本鎖ＲＮＡであり、標的とする複数のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の３’－非翻訳領域に結合して、その翻訳を抑制、もしくは分解を促進することにより、標的遺伝子の

発現を負に制御する。現在、ヒトにおいて２０００種以上のｍｉＲＮＡが同定されており、ヒト遺伝子産物の６０％以上がｍｉＲＮＡによって何らかの制御を受けているといわれている。また、ｍｉＲＮＡは様々な生体現象や病態の発症、進行に関わることから、バイオマーカーや新規治療標的として注目を集めている。

[0005] ｍｉＲ－３３（マイクロＲＮＡ－３３）は、ＡＴＰ結合カセットトランスポーターＡ１（ＡＢＣＡ１）を標的としてコレステロール代謝を調節し、高密度リポ蛋白質コレステロール（ＨＤＬ－Ｃ）レベルを低下させるｍｉＲＮＡとして見出された。ヒトにおいては、ｍｉＲ－３３ａおよびｍｉＲ－３３ｂが存在するのに対し、マウスにおいては、ｍｉＲ－３３（ヒトのｍｉＲ－３３ａに相当）のみが存在することが報告されている（非特許文献２）。

[0006] 動脈瘤とｍｉＲ－３３との関連性については、ｍｉＲ－３３（ヒトｍｉＲ－３３ａに相当）のノックアウトマウスを動脈瘤モデルで評価し、動脈瘤形成が抑制されたことや、マクロファージの蓄積ならびにｍｏｎｏｃｙｔｅ ｃｈｅｍｏｔａｃｔｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ－１の発現が抑制されたことが報告されている（非特許文献３）。

また、ヒトにおいては、脳動脈瘤の患者の血液サンプルにおける網羅的遺伝子発現解析データを利用し、ｍｉＲ－３３ｂの標的遺伝子であるＩＲＳ２の発現レベルが上昇したことが報告されている（非特許文献４）。ＩＲＳ２の発現は、ｍｉＲ－３３ｂにより直接的な制御（発現抑制）を受けるため（非特許文献５）、この事象からは、ヒト動脈瘤形成を抑制するにはｍｉＲ－３３ｂの阻害ではなく補充が有効であることが示唆される。

また、ヒト腹部大動脈瘤の患者の腹部大動脈においてｍｉＲ－３３－５ｐの発現が上昇することや、ヒト単球由来のマクロファージ細胞株において、ｍｉＲ－３３－５ｐの阻害剤によりＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９、ＴＮＦ－αの遺伝子発現が抑制され、コレステロール排出を促進することにより泡沫化マクロファージ中のコレステロールを減少させることが報告されている（非特許文献６）。ここで、ｍｉＲ－３３－５ｐの配列としてはｍｉＲ－３３ｂの

配列が記載されているが、発現解析ではｍｉＲ－３３ａとｍｉＲ－３３ｂの区別はされておらず、また、ｍｉＲ－３３－５ｐの阻害剤の標的分子がヒトｍｉＲ－３３ａであるのかｍｉＲ－３３ｂであるのかについては述べられていない。そして、この文献では腹部大動脈瘤の治療効果まで示されていない。

また、ヒトｍｉＲ－３３ａまたはヒトｍｉＲ－３３ｂをそれぞれ発現するマウスを作成し、ｍｉＲ－３３ｂを発現するマウスにおいて動脈硬化がより悪化したことが報告されており、このことは高コレステロール食負荷により、肝臓細胞においてｍｉＲ－３３ｂの発現が上昇するとともにＨＤＬコレステロールの産生が低下することにより、ｍｉＲ－３３ｂが動脈硬化の悪化に関与すると考えられた（非特許文献２）。動脈瘤にはマクロファージが関連するとの報告があるが（非特許文献１）、マクロファージにおけるｍｉＲ－３３ａとｍｉＲ－３３ｂの発現レベルの変化に差はなく、機能的な違いもないと報告されている（非特許文献２）。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：日内会誌９９．、ｐ２３７－２４４（２０１０）

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

非特許文献3：Ａｒｔｅｒｉｏｓｃｌｅｒ Ｔｈｒｏｍｂ Ｖａｓｃ Ｂｉｏｌ．、３７（１１）、ｐ２１６１－２１７０（２０１７）

非特許文献4：Ｍｅｄ Ｓｃｉ Ｍｏｎｉｔ．、２３、ｐ４５１８－４５２５（２０１７）

非特許文献5：Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ，１０８（２２）、 ９２３２－７（２０１１）

非特許文献6：Ｐｅｒｆｕｓｉｏｎ．、ｄｏｉ：１０．１１７７／０２６７６５９１１９８５０６８５（２０１９）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、動脈瘤の予防および治療に有効な薬剤を用いた、動脈瘤の予防および／または治療を目的とする。より詳細には、本発明は、発生した動脈瘤に対する治療全般に関わり、瘤の発生または拡大を阻止することのできる、あるいは瘤の退縮により破裂を阻止することができる、動脈瘤予防用および／または治療用薬剤の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは大動脈瘤におけるｍｉＲ－３３ａとｍｉＲ－３３ｂの寄与を解析するためにこれらの阻害剤を用いて検討を行った結果、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質が、動脈瘤の治療、予防、又は軽減に有用であることを見出し、本発明に至った。

[0010] 本開示は、以下の項［１］～［２５］に記載の非限定な番号付けされた実施態様に関するものであるが、これらに限定されない。

［１］ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質を有効成分とする、動脈瘤の予防または治療剤。

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

［３］ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質が、核酸である、［２］に記載の予防または治療剤。

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

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

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

［７］ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが

１）７～２０ヌクレオチド残基からなり、

２）配列番号１の塩基配列を有するｍｉＲ－３３ｂの等長部分に９０％以上相補的な塩基配列であって、配列番号１に記載のｍｉＲ－３３ｂの塩基配列の５´末端から数えて９番目かつ１０番目の核酸塩基とはミスマッチを有さない塩基配列を有する、［６］に記載の予防または治療剤。

（配列番号１）ＧＵＧＣＡＵＵＧＣＵＧＵＵＧＣＡＵＵＧＣ

［８］ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが

ＡＡＣＡＧＣＡＡＴＧＣＡ（配列番号５）、

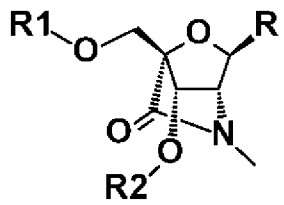
に記載される配列からなる核酸塩基配列（ただし、Ｃは５－メチルシトシン（Ｍ）でもよい）を有する、［７］に記載の予防または治療剤。

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

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

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

[化1]



ＡｍＮＡ

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

［１２］前記修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

Ａａｓ Ａｄｓ Ｍａｓ Ａｄｓ Ｇａｓ Ｃｄｓ Ａａｓ Ａｄｓ Ｔａ

ｓ　Ｇｄｓ　Ｍａｓ　Ａｄ；

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

Ａ＝アデニン、Ｔ＝チミン、Ｇ＝グアニン、Ｃ＝シトシン、Ｍ＝５－メチルシトシン、

に従って示され；

各糖部分が下記記号：

ａ＝上記のＡｍＮＡの糖部分、ｄ＝２’－デオキシリボース、

に従って示され；

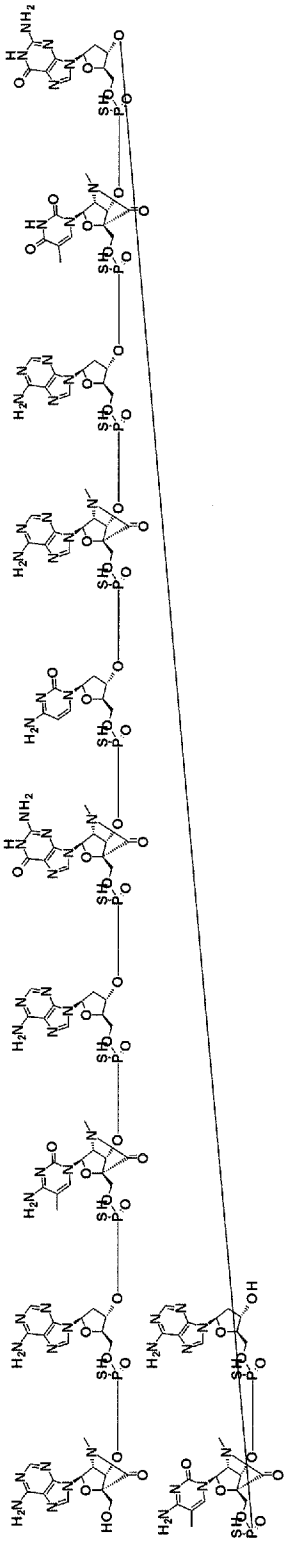
各ヌクレオシド間結合が下記記号：

ｓ＝ホスホロチオエートに従って示される、［１１］に記載の予防または治療剤。

［１３］前記修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

[化2]



で示される修飾オリゴヌクレオチドである、［１２］に記載の予防または治

療剤。

［１４］動脈瘤が大動脈瘤または脳動脈瘤である、［１］～［１３］のいずれかに記載の予防または治療剤。

［１５］ＡＡＣＡＧＣＡＡＴＧＣＡ（配列番号５）

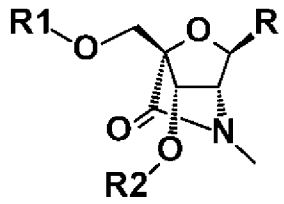
に記載される配列からなる核酸塩基配列を有する、ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［１６］アンチセンスオリゴヌクレオチドが修飾オリゴヌクレオチドである、［１５］に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［１７］修飾オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも１つのヌクレオシドが修飾糖を含む、［１６］に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［１８］修飾糖が、ＡｍＮＡの糖部分から選択される、［１７］に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[化3]



ＡｍＮＡ

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

［１９］修飾オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも１つのヌクレオシドが修飾核酸塩基を含む、［１６］から［１８］のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［２０］修飾核酸塩基が５－メチルシトシンである、［１９］に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［２１］修飾オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、［１６］～[２０]のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［２２］修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

Ａａｓ　Ａｄｓ　Ｍａｓ　Ａｄｓ　Ｇａｓ　Ｃｄｓ　Ａａｓ　Ａｄｓ　Ｔａｓ　Ｇｄｓ　Ｍａｓ　Ａｄ；

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

Ａ＝アデニン、Ｔ＝チミン、Ｇ＝グアニン、Ｃ＝シトシン、Ｍ＝５－メチルシトシン、

に従って示され；

各糖部分が下記記号：

ａ＝上記のＡｍＮＡの糖部分、ｄ＝２’－デオキシリボース、

に従って示され；

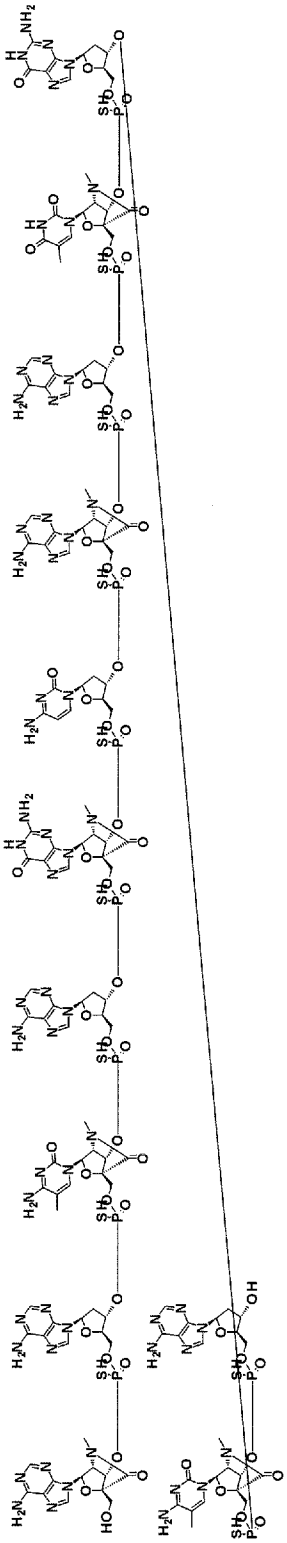
各ヌクレオシド間結合が下記記号：

ｓ＝ホスホロチオエートに従って示される、［１６］～［２１］のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［２３］修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

[化4]



で示される、[２２]に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

［２４］［１５］～[２３]のいずれかに記載のアンチセンスオリゴヌクレオ

チドまたはその医薬的に許容可能な塩、および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

［２５］ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質の、動脈瘤の予防または治療剤の製造における使用。

発明の効果

[0011] ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質は、動脈瘤の発生または拡大を抑制するため、動脈瘤の予防及び／又は治療薬として用いることができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図１は、マウス大動脈におけるｍｉＲ－３３ａ（Ａ）およびｍｉＲ－３３ｂ（Ｂ）の発現レベルに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したＩｎ　ｖｉｖｏ投与試験の結果を示すグラフである。

[図2]図２は、マウス大動脈におけるＭＣＰ－１タンパク質の発現レベル（Ａ）、リン酸化ＪＮＫ１タンパク質の発現レベル（Ｂ）およびＪＮＫ１タンパク質の発現レベル（Ｃ）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したＩｎ　ｖｉｖｏ投与試験の結果を示すグラフ（一部は電気泳動写真）である。

[図3]図３は、マウス大動脈におけるＭＭＰ－９活性レベルに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したＩｎ　ｖｉｖｏ投与試験の結果を示すグラフ（一部は電気泳動写真）である。

[図4]図４は、マウス大動脈瘤モデル１週における動脈瘤の径拡大（Ａ）および伸展（Ｂ）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したＩｎ　ｖｉｖｏ投与試験の結果を示すグラフである。

[図5]図５は、マウス大動脈瘤モデル６週における動脈瘤の径拡大（Ａ、Ｃ）および伸展（Ｂ、Ｃ）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したＩｎ　ｖｉｖｏ投与試験の結果を示すグラフ（一部は組織形状を示す写真）である。

[図6]図６は、大動脈瘤モデルのマウスにおけるＡＳＴ（Ａ）、ＡＬＴ（Ｂ）、Ｔ－Ｂｉｌ（Ｃ）およびＣＲＥ（Ｄ）のレベルに対するアンチセンスオリ

ゴヌクレオチドの効果を評価したｉｎ　ｖｉｖｏ投与試験の結果を示すグラフである。

[図7]図７は、ヒトＴＨＰ－１細胞におけるｍｉＲ－３３ａ（Ａ）、ｍｉＲ－３３ｂ（Ｂ）およびＡＢＣＡ１　ｍＲＮＡ（Ｃ）の発現レベルに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したｉｎ　ｖｉｔｒｏ投与試験の結果を示すグラフである。

[図8]図８は、ヒトＴＨＰ－１細胞におけるＳＲＥＢＦ１の発現レベルに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したｉｎ　ｖｉｔｒｏ投与試験の結果を示すグラフである。

[図9]図９は、ヒトＴＨＰ－１細胞におけるＭＭＰ－９ｍＲＮＡの発現レベル（Ａ）、ＭＣＰ－１ｍＲＮＡの発現レベル（Ｂ）およびＪＮＫ１ｍＲＮＡの発現レベル（Ｃ）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したｉｎ　ｖｉｔｒｏ投与試験の結果を示すグラフである。

[図10]図１０は、ヒトＴＨＰ－１細胞におけるｐｒｏ型ＭＭＰ－９タンパク質の酵素活性レベル（Ａ）、切断型ＭＭＰ－９タンパク質の酵素活性レベル（Ｂ）、リン酸化ＪＮＫ１タンパク質の発現レベル（Ｃ）、ＪＮＫ１タンパク質の発現レベル（Ｄ）および総ＪＮＫ１タンパク質量に対するリン酸化ＪＮＫ１タンパク質の発現レベル（Ｅ）に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を評価したｉｎ　ｖｉｔｒｏ投与試験の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013]（定義）

「核酸」は、ヌクレオチド単位で構成される分子を指す。核酸の例としては、天然核酸（リボ核酸（ＲＮＡ）、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ））、非天然核酸があり、核酸の形態には一本鎖の核酸、二本鎖の核酸があり、また機能的な核酸として、低分子干渉リボ核酸（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）などが挙げられるが、これらに限定されない。核酸は、これらの要素の組み合わせを単一分子中に含むこともできる。

[0014] 「核酸塩基」は、別の核酸の塩基と対形成することができる複素環部分を意味する。核酸塩基には、「修飾核酸塩基」と「非修飾核酸塩基」がある。

[0015] 「ヌクレオシド」は、糖に連結した核酸塩基を意味する。ある種の実施態様では、ヌクレオシドはリン酸基に連結している。

[0016] 「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分と共有結合したリン酸基などを有するヌクレオシドを意味する。天然に存在するヌクレオチドは糖部分がリボースまたはデオキシリボースであり、リン酸基とホスホジエステル結合により共有結合し、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドを形成している。

[0017] 「修飾ヌクレオチド」は、独立に、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合または修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。「修飾ヌクレオシド」は、独立に、修飾糖部分または修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

[0018] 「非修飾ヌクレオチド」は、天然に存在する核酸塩基、糖部分及びヌクレオシド間結合から成るヌクレオチドを意味する。ある種の実施態様では、非修飾ヌクレオチドはＲＮＡヌクレオチド（すなわちβ－Ｄ－リボヌクレオシドを有するヌクレオチド）またはＤＮＡヌクレオチド（すなわちβ－Ｄ－デオキシリボヌクレオシドを有するヌクレオチド）であるが、これらに限定されない。

[0019] 「ヌクレオシド間結合」は、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

[0020] 「修飾ヌクレオシド間結合」は、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換または任意の変化を指す。例えば、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合があるが、これに限定されない。

[0021] 「ホスホロチオエートヌクレオシド間結合」は、非架橋酸素原子の１つを硫黄原子で置き換えることによってホスホジエステル結合が修飾される、ヌクレオシド間の結合を意味する。ホスホロチオエート結合は、当該修飾ヌクレオシド間結合の１例である。

[0022] 「修飾核酸塩基」は、アデニン、シトシン、グアニン、チミジンまたはウラシル以外の任意の核酸塩基を指す。例えば、５－メチルシトシンがあるが、これに限定されない。「非修飾核酸塩基」は、プリン塩基のアデニン（Ａ）及びグアニン（Ｇ）、並びにピリミジン塩基のチミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）及びウラシル（Ｕ）を意味する。

[0023] 「ｍｉＲＮＡ」は、酵素Ｄｉｃｅｒによるｐｒｅ－ｍｉＲの切断産物であり、長さ１８～２５核酸塩基の内在性非コードＲＮＡを意味する。ｍｉＲＮＡの例は、ｍｉＲＢａｓｅと呼ばれるｍｉＲＮＡデータベースで確認される（ｈｔｔｐ：／／ｍｉｃｒｏｒｎａ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／）。ある種の実施態様では、ｍｉＲＮＡは、「ｍｉＲ」または「マイクロＲＮＡ」と略記される。

[0024] 「ｐｒｅ－ｍｉＲ」は、Ｄｒｏｓｈａと呼ばれる二本鎖ＲＮＡ特異的リボヌクレアーゼによるｐｒｉ－ｍｉＲの切断産物であり、ヘアピン構造を有する非コードＲＮＡを意味する。

[0025] 「ステムループ配列」は、ヘアピン構造を有し、かつ成熟型ｍｉＲＮＡ配列を含むＲＮＡを意味する。ある実施態様では、ステムループ配列はｐｒｅ－ｍｉＲである。ステムループ配列の例は、ｍｉＲＢａｓｅと呼ばれるｍｉＲＮＡデータベースで確認される（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｍｉｒｂａｓｅ．ｏｒｇ／）。

[0026] 「ｐｒｉ－ｍｉＲ」は、二本鎖ＲＮＡ特異的リボヌクレアーゼＤｒｏｓｈａの基質であり、ヘアピン構造を有する非コードＲＮＡを意味する。

[0027] 「ｍｉＲＮＡ前駆体」は、ゲノムＤＮＡに由来し、かつ、１つまたは複数のｍｉＲＮＡ配列を含む非コードｓｔｒｕｃｔｕｒｅｄ　ＲＮＡを含む転写物を意味する。例えば、ある種の実施態様では、ｍｉＲＮＡ前駆体はｐｒｅ－ＲＮＡである。ある種の実施態様では、ｍｉＲＮＡ前駆体はｐｒｉ－ｍｉＲである。ある種の実施態様では、ｍｉＲＮＡ前駆体はステムループ配列である。

[0028] 「ｍｉＲＮＡの標的ｍＲＮＡ」は、ｍｉＲＮＡの直接的な標的ｍＲＮＡを

意味する。ｍｉＲＮＡは標的ｍＲＮＡと完全にまたはほぼ完全に相補的であり、しばしばシード配列（ｍｉＲＮＡの５’末端側より２番目～８番目までの７塩基の配列をいう）と相補的に結合し、標的ｍＲＮＡの不安定化または翻訳阻害をもたらす。

[0029] 「ｍｉＲＮＡの標的タンパク質」はｍｉＲＮＡの標的ｍＲＮＡが翻訳されることによって生じるタンパク質を意味する。

[0030] 「ｍｉＲ－３３ｂステムループ配列」は、核酸塩基配列ＧＣＧＧＧＣＧＧＣＣＣＣＧＣＧＧＵＧＣＡＵＵＧＣＵＧＵＵＧＣＡＵＵＧＣＡＣＧＵＧＵＧＵＧＡＧＧＣＧＧＧＵＧＣＡＧＵＧＣＣＵＣＧＧＣＡＧＵＧＣＡＧＣＣＣＧＧＡＧＣＣＧＧＣＣＣＣＵＧＧＣＡＣＣＡＣ（配列番号４）を有するｍｉＲＮＡ－３３ｂのｐｒｅ－ｍｉＲを意味する。

[0031] 「ｍｉＲ－３３a」は、核酸塩基配列ＧＵＧＣＡＵＵＧＵＡＧＵＵＧＣＡＵＵＧＣＡ（配列番号２）を有するｍｉＲＮＡを意味する。（なお、本明細書においては、塩基配列は５’から３’の順で記載される。）

[0032] 「ｍｉＲ－３３ｂ」は、核酸塩基配列ＧＵＧＣＡＵＵＧＣＵＧＵＵＧＣＡＵＵＧＣ（配列番号１）を有するｍｉＲＮＡを意味する。

[0033] 「ｍｉＲ－３３」は、核酸塩基配列ＧＵＧＣＡＵＵＧＵＡＧＵＵＧＣＡＵＵＧＣＡ（配列番号３）を有するｍｉＲＮＡを意味する。

[0034] ヒトにおいては、ｍｉＲ－３３ａならびにｍｉＲ－３３ｂが存在する。マウスにおいては、ｍｉＲ－３３が存在する。ヒトのｍｉＲ－３３ａとマウスのｍｉＲ－３３は共通の配列である。従って、マウスにおいては、ヒトのｍｉＲ－３３ａに相当するｍｉＲＮＡのみが存在し、ヒトのｍｉＲ－３３ｂに相当するｍｉＲは存在しない。

[0035] 「ｍｉＲ－３３ｂシード配列（シード領域ともいう）」は、ｍｉＲ－３３ｂ核酸塩基配列のうち、ＵＧＣＡＵＵＧを指す。配列番号１や２にはシード配列が2つ含まれる。

[0036] 「ｍｉＲ－３３ａレベル」、「ｍｉＲ－３３ｂレベル」、「ｍｉＲ－３３レベル」とは、それぞれ、細胞内でマイクロＲＮＡとして機能するｍｉＲ－

３３ａ、ｍｉＲ－３３ｂ、ｍｉＲ－３３の存在（レベル）、言い換えれば発現レベルを意味する。

[0037] 「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸にハイブリダイズすることのできるアンチセンス核酸（ＲＮＡもしくはＤＮＡ）である。本願においてアンチセンスオリゴヌクレオチドとは、ｍｉＲＮＡに結合して、ｍｉＲＮＡの活性または機能を阻害する分子を意味する。本願におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドは天然の核酸分子以外に人工的な核酸分子を含んでもよい。

[0038] 「ｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ）」は１５－３０塩基対から成る低分子二本鎖ＲＮＡである。ｓｉＲＮＡはＲＮＡ干渉と呼ばれる現象に関与しており、標的核酸の破壊によって配列特異的に核酸の発現を抑制する。本願においてｓｉＲＮＡとは、ｍｉＲ－３３ａやｍｉＲ－３３ｂを破壊してｍｉＲ－３３ａやｍｉＲ－３３ｂの発現を抑制するアンタゴニストとして機能する分子を意味する。本願におけるｓｉＲＮＡは天然の核酸分子以外に人工的な核酸分子を含んでもよい。

[0039] 「ｓｈＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｈａｉｒｐｉｎ ＲＮＡ）」は、ヘアピン構造を有しプロセシングを受けてｍｉＲＮＡやｓｉＲＮＡ（ｓｈｏｒｔ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ＲＮＡ）が生じる。ある種の実施形態では、ｓｈＲＮＡは細胞内において、ｓｈＲＮＡ発現ベクターから転写される。

[0040] 「相補的」は、第一の核酸と第二の核酸の核酸塩基間の対形成に対する能力を意味する。具体的には、例えば、アデニンはチミジンまたはウラシルと相補的であり、シトシンはグアニンと相補的であり、５－メチルシトシンはグアニンと相補的であるが、これらに限定されない。

[0041] 「完全に相補的（相補性ともいう）」または「１００％相補的（相補性ともいう）」は、第一の核酸の核酸塩基配列の各核酸塩基のすべてが、第二の核酸の第二の核酸塩基配列中に相補的核酸塩基を有することを意味する。ある種の実施態様では、第一の核酸は修飾オリゴヌクレオチドであり、標的核酸が第二の核酸である。

[0042] 「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸分子のアニーリングを意味する。

[0043] 「ミスマッチ」または「非相補的核酸塩基」は、第一の核酸の核酸塩基が、第二の核酸または標的核酸の対応する核酸塩基と対形成できない場合を指す。

[0044] 「予防」は、数分から無期限の期間にわたって、疾患、障害もしくは好ましくない健康状態、または当該疾患、障害もしくは好ましくない健康状態に関連する1つ以上の症状、の発症または発生を遅延させるかまたは未然に防ぐことを意味する。予防するは、疾患、障害または好ましくない健康状態を発生する危険性を低減させることも意味する。

[0045] 「治療」は、疾患、障害もしくは好ましくない健康状態、または当該疾患、障害もしくは好ましくない健康状態に関連する１つ以上の症状、を軽減するか、もしくは排除するか、または、当該疾患、障害、もしくは好ましくない健康状態自体の１つもしくはそれ以上の原因を部分的に解消するかまたは根絶することを意味する。

[0046] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の本実施形態に制限されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

[0047] （ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質）

本発明は、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質（以下、「本発明化合物」と称することがある）を含む、動脈瘤の治療又は予防剤である。ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質としては、ｍｉＲ－３３ｂの発現または機能を阻害し、その結果、動脈瘤に関与する細胞、例えば単球やマクロファージ細胞（以下、これを「細胞」と称することがある）、におけるＭＭＰ－９の活性レベル、ＭＣＰ－１の発現レベル及び／またはリン酸化ＪＮＫ１の発現レベルを抑制するものであることが好ましい。

ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質はｍｉＲ－３３ｂの発現または機能を阻害し、その結果、ｍｉＲ－３３ｂの標的ｍＲＮＡ、および／またはｍｉＲ－３３ｂの

標的タンパク質の細胞内での存在レベルを増加させるものが好ましい。ｍｉＲ－３３ｂの標的としては、例えばＡＴＰ結合カセットトランスポーターＡ１（ＡＢＣＡ１）が挙げられる。すなわち、ＡＢＣＡ１などのｍｉＲ－３３ｂの標的分子は、通常、ｍｉＲ－３３ｂによって発現阻害を受けるところ、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質によりｍｉＲ－３３ｂが阻害されることにより、細胞内での存在レベルが増加する。

[0048] また、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質としては、具体的には、例えば、細胞内におけるｍｉＲ－３３ｂとして機能する分子のレベルを低減させる物質（以下これを「ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質」と称することがある）が挙げられる。ｍｉＲ－３３ｂレベルの低減とは、ｍｉＲ－３３ｂの標的ｍＲＮＡに細胞内で作用して、ｍＲＮＡの不安定化や翻訳阻害を介し、当該細胞内における標的ｍＲＮＡおよび／またはタンパク質レベルを低減させる機能を有するｍｉＲ－３３ｂレベルを低減させることを意味する。

本発明においてｍｉＲ－３３ｂの標的ｍＲＮＡは、ｍｉＲ－３３ｂが直接結合してその発現レベルを低下させるものであればいずれのものでもよいが、具体的には、例えば、ＡＴＰ結合カセットトランスポーターＡ１（ＡＢＣＡ１）、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ１（ＣＰＴ１）等があげられる。これらの標的ｍＲＮＡは、いずれか一つ以上、複数でもよい。

[0049] また、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質としては、少なくともｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルを低減させるものであればよく、たとえば、さらにｍｉＲ－３３ａの当該細胞内におけるレベルを低減させる作用を有していてもよい。しかし、この場合、好ましくはｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルを低減させる作用がｍｉＲ－３３ａの細胞内でのレベルを低減させる作用よりも強い物質であることが好ましく、後述するＴＨＰ－１細胞におけるｍｉＲ－３３ｂレベルを測定する系において、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減率がｍｉＲ－３３ａレベル低減率より高いｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質が好ましく用いられる。ｍｉＲ－３３ｂレベル低減率とは、例えば、１００＊（ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質非添加時のｍｉＲ－３３ｂのレベル－ｍｉ

Ｒ－３３ｂレベル低減物質添加時のｍｉＲ－３３ｂレベル）／ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質非添加時のｍｉＲ－３３ｂレベル、により算出することができる。また、ｍｉＲ－３３ａレベル低減率とは、例えば、１００＊（ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質非添加時のｍｉＲ－３３ａレベル－ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質添加時のｍｉＲ－３３ａレベル）／ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質非添加時のｍｉＲ－３３ａレベル、により算出することができる。ｍｉＲ－３３ｂレベル低減率がｍｉＲ－３３ａレベル低減率より高いｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質として、具体的には、例えば、ｍｉＲ－３３ａレベル低減率/ｍｉＲ－３３ｂレベル低減率を算出した時の値が０．８以下、０．７以下、０．６以下、０．５以下、０．４以下、０．３以下、０．２以下または０．１以下があげられ、好ましくは０．６以下、より好ましくは０．３以下、さらに好ましくは０．１以下があげられる。

[0050] 本発明のｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質による細胞内のｍｉＲ－３３ｂレベルの低減とは、例えば、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質と細胞を接触させることにより、非接触時または陰性対照物質接触時と比較して細胞内におけるｍｉＲ－３３ｂレベルが低下することをいう。ここで、当該細胞内におけるｍｉＲ－３３ｂレベルの低下の程度は、細胞内におけるｍｉＲ－３３ｂレベルが低下し、その結果として後述するｍｉＲ－３３ｂの標的ｍＲＮＡ、および／またはｍｉＲ－３３ｂの標的タンパク質の当該細胞内におけるレベルを増加させる程度、または細胞内におけるｍｉＲ－３３ｂレベルが低下し、その結果としてｍｉＲ－３３ｂ発現細胞の表現型が、疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整される程度であればいずれの程度でもよいが、具体的には、例えば、本発明のｍｉＲ－３３レベル低減物質と細胞を接触させた後、ｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルが、非接触時または陰性対照物質接触時と比較して、少なくとも５０％以下、好ましくは３０％以下さらに好ましくは１０％以下となる程度が好ましい。

[0051] 一方、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質によるｍｉＲ－３３ｂの標的ｍＲＮＡ発現レベルの増加の程度は、その標的ｍＲＮＡがコードするタンパク質が

調整する疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整される程度であればいずれのものでもよいが、例えば、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質と細胞を接触させた後、非接触時または陰性対照物質接触時と比較して、標的ｍＲＮＡ発現レベルが少なくとも１．２倍以上、好ましくは１．５倍以上、さらに好ましくは２倍以上上昇する程度が例示される。

ｍｉＲ－３３ｂの標的ｍＲＮＡがコードするタンパク質が調整する疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整されるとは、具体的には、例えば、細胞の炎症状態の抑制であり、例えば、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のｍＲＮＡ発現レベルまたはそれらがコードするタンパク質の発現レベルが抑制されること、ＭＭＰ－９活性が抑制されること、及び／またはＪＮＫ１のリン酸化が抑制されることである。ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質による、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のｍＲＮＡ発現レベルまたはそれらがコードするタンパク質の発現レベルの抑制の程度は、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質と細胞（マクロファージ細胞など）を接触させた後、非接触時または陰性対照物質接触時と比較して、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のｍＲＮＡ発現レベルまたはそれらがコードするタンパク質の発現レベルが０．８倍以下、０．７倍以下、０．６倍以下、０．５倍以下、０．４倍以下、０．３倍以下、０．２倍以下または０．１倍以下があげられ、好ましくは０．６倍以下、より好ましくは０．３倍以下、さらに好ましくは０．１倍以下があげられる。また、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質による、ＭＭＰ－９活性の抑制、及びＪＮＫ１のリン酸化の抑制の程度は、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質と細胞（マクロファージ細胞など）を接触させた後、非接触時または陰性対照物質接触時と比較して、ＭＭＰ－９活性及び／またはＪＮＫ１のリン酸化レベルが０．８倍以下、０．７倍以下、０．６倍以下、０．５倍以下、０．４倍以下、０．３倍以下、０．２倍以下または０．１倍以下があげられ、好ましくは０．６倍以下、より好ましくは０．３倍以下、さらに好ましくは０．１倍以下があげられる。

[0052] また、本発明化合物による標的ｍＲＮＡがコードするタンパク質発現レベ

ルの増加についても、標的タンパク質が調整する疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整される程度であればいずれのものでもよいが、本発明化合物と細胞を接触させた後、非接触時または陰性コントロール物質接触時と比較して、標的タンパク質発現レベルが少なくとも１．２倍以上、好ましくは１．５倍以上、さらに好ましくは２倍以上上昇する程度が例示される。

[0053] ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質としては、ｍｉＲ－３３ｂの機能を阻害するものであってもよい。本発明化合物によるｍｉＲ－３３ｂの機能を阻害するとは、ｍｉＲ－３３ｂの標的ｍＲＮＡ、および／または標的タンパク質の発現レベルを増加させ、あるいはｍｉＲ－３３ｂの標的核酸へ作用し、その結果としてｍｉＲ－３３ｂ特異的なシグナル伝達経路を抑制することで、疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整されることをいう。疾患関連物質が疾患の改善の方向へ調整されるとは、具体的には、例えば、細胞の炎症状態の抑制であり、例えば、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のｍＲＮＡまたはタンパク質の発現レベルが抑制されること、ＭＭＰ－９活性が抑制されること、及び／またはＪＮＫ１のリン酸化が抑制されることである。したがって、本発明化合物は、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のｍＲＮＡの発現レベルを抑制させるために使用されうる。また、本発明化合物は、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のタンパク質の発現レベルを抑制させるために使用されうる。

[0054] ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質としては、具体的には、例えば、ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡまたはこれらを発現するベクターが挙げられるが、ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（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）が好ましく用いられる。また、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質としてｍｉＲ－３３ｂの機能を阻害する化合物を用いてもよい。

[0055] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルを低減させる、１）７～２０残基からなり、２）配列番号４に

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

[0056] 上記ミスマッチ核酸塩基は、クラスター化されていてもよいし、相補的核酸塩基が挟まれていてもよく、互いにまたは相補的核酸塩基と連続的である必要はない。ｍｉＲ－３３ｂとの本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの相補性パーセントは、例えば、当技術分野で既知のＢＬＡＳＴプログラム（ｂａｓｉｃ ｌｏｃａｌ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｓｅａｒｃｈｔｏｏｌｓ）及びＰｏｗｅｒＢＬＡＳＴプログラム（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９９０，２１５，４０３ ４１０；Ｚｈａｎｇ ａｎｄ Ｍａｄｄｅｎ，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．，１９９７，７，６４９ ６５６）を使用して、慣例的に決定することができる。相同性パーセント、配列同一性または相補性は、例えば、ギャッププログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ８ ｆｏｒ Ｕｎｉｘ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ，Ｍａｄｉｓｏｎ Ｗｉｓ．）によっ

て、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ（Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．，１９８１，２，４８２ ４８９）のアルゴリズムを使用するデフォルト設定を使用して決定することができる。

[0057] 配列番号１に記載のｍｉＲ－３３ｂの核酸塩基配列は、ｍｉＲ－３３ｂステムループ配列内に含まれており、本発明化合物が標的とするｍｉＲ－３３ｂ核酸塩基配列には、ｍｉＲ－３３ｂステムループ配列全長も含まれる。

[0058] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号４に記載のｍｉＲ－３３ｂステムループ配列の塩基配列の相補鎖、好ましくは配列番号１のｍｉＲ－３３ｂ塩基配列の相補鎖の等長部分としていずれのものでもよく、配列長はいずれのものであってもよいが、例えば、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０残基が挙げられ、好ましくは、配列番号１に記載のｍｉＲ－３３ｂの核酸塩基配列において、５´末端から数えて９～１０番目に相補的な配列を含み、配列長は、１２～１９残基が好ましく、１２～１６残基がより好ましい。

具体的には例えば、

ＡＡＣＡＧＣＡＡＴＧＣＡ（配列番号５）または

ＴＧＣＡＡＣＡＧＣＡＡＴＧＣＡＣ（配列番号６）等が挙げられ、

ＡＡＣＡＧＣＡＡＴＧＣＡ（配列番号５）

が好ましく用いられる。

ある種の実施態様では配列番号５または６の配列のシトシン塩基の一部または全部が５－メチルシトシンであるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。一部のシトシン塩基が５－メチルシトシンである修飾オリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号８、１０が挙げられる。

[0059] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドでありうる。修飾オリゴヌクレオチドとしては上記の５－メチルシトシンのような修飾塩基を含むものでもよいし、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも１つのヌクレオシドが修飾糖を含むものでもよい。

本発明において修飾糖とは、糖部分が修飾されたものをいい、当該修飾糖

を１つ以上含む修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ安定性の増強、結合親和性の増大等の有利な特徴を有する。修飾糖のうち少なくとも一つは、二環式糖または置換糖部分を有することが好ましい。

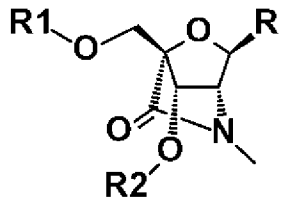
[0060] 修飾糖を有するヌクレオシドの例としては、５’－ビニル、５’－メチル（ＲまたはＳ）、４’－Ｓ、２’－Ｆ、２’－ＯＣＨ$_3$、２’－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_3$、２’－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｆ及び２’－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＣＨ$_3$置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。２’位の置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、Ｏ－アリル、Ｏ－Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキル、ＯＣＦ$_3$、ＯＣＨ$_2$Ｆ、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_2$ＳＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｏ－Ｎ（Ｒ$_m$）（Ｒ$_n$）、Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_m$）（Ｒ$_n$）及びＯ－ＣＨ$_2$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_l$）－（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｎ（Ｒ$_m$）（Ｒ$_n$）（式中、各Ｒ$_l$、Ｒ$_m$及びＲ$_n$は独立に、Ｈまたは置換もしくは無置換のＣ$_1$～Ｃ$_{10}$アルキルである）から選択することもできる。

[0061] 二環式糖を有するヌクレオシドの例としては、４’と２’のリボシル環原子の間の架橋を含むヌクレオシドが挙げられる。ある種の実施態様では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、架橋が以下の式の１つを含む、１つまたは複数の二環式糖を有するヌクレオシドを含む：４’－（ＣＨ$_2$）－Ｏ－２’（ＬＮＡ）；４’－（ＣＨ$_2$）－Ｓ－２’；４’－（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｏ－２’（ＥＮＡ）；４’－ＣＨ（ＣＨ$_3$）－Ｏ－２’及び４’－ＣＨ（ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_3$）－Ｏ－２’（及びそれらの類似物。米国特許７，３９９，８４５号を参照されたい）；４’－Ｃ（ＣＨ$_3$）（ＣＨ$_3$）－Ｏ－２’（及びそれらの類似物。ＷＯ２００９／００６４７８号を参照されたい）；４’－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＯＣＨ$_3$）－２’（及びそれらの類似物。ＷＯ２００８／１５０７２９号を参照されたい）；４’－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｎ（ＣＨ$_3$）－２’（ＵＳ２００４－０１７１５７０号を参照されたい）；４’－ＣＨ$_2$－Ｎ（Ｒ）－Ｏ－２’（式中、Ｒは、Ｈ、Ｃ１～Ｃ１２アルキルまたは保護基である）（米国特許７，４２７，６７２号を参照されたい）；４’－ＣＨ$_2$－Ｃ（Ｈ）（ＣＨ$_3$）－２’（Ｃｈａｔｔｏｐａｄｈｙａｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，２００９，７４，１１８－１３４を参照されたい）；並びに４’－ＣＨ$_2$－Ｃ（

＝ＣＨ$_2$）－２’（及びそれらの類似物。ＷＯ２００８／１５４４０１号を参照されたい）。

[0062] ある種の実施態様（ＡｍＮＡ）では、二環式糖を有するヌクレオシドは以下の式：

[化5]



ＡｍＮＡ

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

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

[0063] ある種の実施態様では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの核酸塩基がシトシンである核酸塩基配列を有する。ある種の実施態様では、少なくとも１つのシトシンは修飾核酸塩基の５－メチルシトシンである。ある種の実施態様では、すべてのシトシンは５－メチルシトシンである。

[0064] ＲＮＡ及びＤＮＡの天然に存在するヌクレオシド間結合は、３’－５’ホスホジエステル結合である。１つまたは複数の修飾された、すなわち天然に存在しない、ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取り込みの増強、標的核酸に対する親和性の増強及びヌクレアーゼの存在下での安定性の増大などの特性が理由で、天然に存在するヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドよりも好ましいことが多い。

[0065] 修飾ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子を保持するヌクレオシド間結合及びリン原子を有さないヌクレオシド間結合を含む。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、これらに限定されないが

、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート及びホスホロチオエートの１つ以上が挙げられる。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は周知である。

[0066] ある種の実施態様では、本発明修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合は、全てホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

[0067] 本明細書中、ヌクレオチドを表す「Ｇａｓ」等の記号において、左側位置に示す略号は核酸塩基部分を意味し、中央位置に示す略号は糖部分を意味し、そして、右側位置に示す略号はヌクレオシド間結合の様式を意味する。

[0068] ある種の実施態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、

下式：

Ｔａｓ Ｇｄｓ Ｍａｓ Ａｄｓ Ａａｓ Ｃｄｓ Ａａｓ Ｇｄｓ Ｍａｓ Ａｄｓ Ａａｓ Ｔｄｓ Ｇａｓ Ｃｄｓ Ａａｓ Ｃｄ；

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

Ａ＝アデニン、Ｔ＝チミン、Ｇ＝グアニン、Ｃ＝シトシン、Ｍ＝５－メチルシトシン

に従って示され；

各糖部分が下記記号：

ａ＝ＡｍＮＡの糖部分、ｄ＝２’－デオキシリボース、

に従って示され；

各ヌクレオシド間結合が下記記号：

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

[0069] ある種の実施態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、

下式：

Ａａｓ Ａｄｓ Ｍａｓ Ａｄｓ Ｇａｓ Ｃｄｓ Ａａｓ Ａｄｓ Ｔａｓ Ｇｄｓ Ｍａｓ Ａｄ；

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

Ａ＝アデニン、Ｔ＝チミン、Ｇ＝グアニン、Ｃ＝シトシン、

に従って示され；

各糖部分が下記記号：

ａ＝ＡｍＮＡの糖部分、ｄ＝２’－デオキシリボース、

に従って示され；

各ヌクレオシド間結合が下記記号：

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

[0070]（ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質の選抜方法）

本発明化合物の選抜方法としては、本発明化合物がｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルの低減あるいは機能の阻害を検証できる方法であればいかなるものでもよいが、本発明化合物ではｍｉＲ－３３ｂレベル低減率がｍｉＲ－３３ａレベル低減率より高いｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質が好ましく用いられるため、ｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａの細胞内におけるレベルの低減を検証できる方法が好ましく用いられる。具体的には、例えば、以下に示すｉｎ　ｖｉｔｒｏ、及びｉｎ　ｖｉｖｏの検証方法が用いられる。

[0071] 本発明化合物のｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルの低減に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ検証は、ｍｉＲ－３３ｂが発現している細胞系、好ましくはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉｒＲ－３３ａが発現している細胞系（以下、「ｍｉＲ－３３ｂ発現細胞系」と称することがある）であればいずれのものも用いることができるが、例えば、ＴＨＰ－１細胞（ヒトマクロファージ細胞、例えば、ATCC TIB-202）が挙げられる。また、ヒトのｍｉＲ－３３ｂ、好ましくはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａを導入した細胞系を選択することもできる。ｍｉＲ－３３ｂまたはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａの

導入に用いる細胞系は、動物由来で通常用いられる細胞であれば特に制限はない。これらの細胞系は商業的供給業者から入手可能であり、一般的に用いられる市販の試薬を使用して、供給業者の説明書に従って培養される。これらの細胞系へのｍｉＲ－３３ｂまたはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａの導入方法としては、一般的には、例えば、ｍｉＲ－３３ｂまたはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａの発現用のベクターをトランスフェクションする方法等が挙げられるがこれに限られない。

[0072] 本発明化合物をｍｉＲ－３３ｂ発現細胞系に接触させる方法も特に制限はないが、一般的に核酸を細胞内へ導入するために用いられる方法が挙げられる。具体的には、例えば、リポフェクション法やエレクトロポレーション法、Ｇｙｍｎｏｓｉｓ法等である。

[0073] ｍｉＲ－３３ｂまたはｍｉＲ－３３ａの細胞内におけるレベルは、当技術分野で既知の様々な方法でアッセイすることができる。具体的には、ノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）または定量的リアルタイムＰＣＲ等が挙げられる。ｍｉＲＮＡを単離する際には、当技術分野で周知の方法を使用して、例えば、製造業者の推奨プロトコールに従ってTri Pure Isolation Reagent (Roche)、Ｍａｘｗｅｌｌ ＲＳＣ ｍｉＲＮＡ Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）等を使用することができる。このようにしてｍｉＲ－３３ｂまたはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａの発現レベルを解析することができる。

[0074] 本発明化合物が、ｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルを低減させること、またはｍｉＲ－３３ｂ発現細胞の表現型を変化させる能力を評価するために、ｉｎ ｖｉｖｏで試験を行うことができる。本発明化合物のｍｉＲ－３３ｂの当該細胞内におけるレベルの低減に対する検証は、例えば、ｍｉＲ－３３ｂ、好ましくはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａを発現する動物に対して、本発明化合物を投与し、当該細胞において上述のｍｉＲ－３３ｂまたはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａ発現レベルの解析を行う方法が挙げられる。また、本発明化合物によるｍｉＲ－３３ｂ発現細胞の表現型を

変化させる能力の評価は、実験用の疾患モデル、例えば動脈瘤のモデル、例えば、塩化カルシウム塗布モデルを用いて実施することができる。

[0075] 本発明化合物のｍｉＲ－３３ｂのレベル低減またはｍｉＲ－３３ｂの機能阻害に対するｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏ検証は、ｍｉＲ－３３ｂ発現細胞系またはｍｉＲ－３３ｂ、好ましくはｍｉＲ－３３ｂおよびｍｉＲ－３３ａを発現する動物に対して、本発明化合物を投与し、ＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のｍＲＮＡもしくはタンパク質の発現レベルを測定することで行うことができる。

[0076] （本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの製造方法）

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

[0077] 本発明のｓｉＲＮＡおよびｓｈＲＮＡは、人工的に化学合成することができる。また、ｓｉＲＮＡおよびｓｈＲＮＡは、例えば、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼおよびＴ７プロモーターを用いて、鋳型ＤＮＡからアンチセンスおよびセンスのＲＮＡをインビトロで合成することができる。

[0078] 本発明のｍｉＲ－３３ｂを阻害する活性を有する化合物は、例えば、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．１１３（２１）：５８９８－９０３（２０１６）、Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍ．１６（２）：９１４－９２０（２０１９）、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１３９（９）：３４４６－３４５５（２０１７）等に開示されている方法で合成することができる。

[0079] （本発明化合物による動脈瘤治療）

本発明におけるｍｉＲ－３３ｂ阻害物質によって、動脈瘤を治療又は予防することができる。

動脈瘤は、炎症メディエーター亢進等による慢性炎症と細胞外基質代謝異

常がその主要な病態である。これらが相互に関連しながら病態を増幅・遷延し大動脈瘤を進展させる。

炎症性メディエーターとしては、例えば、ｃｈｅｍｏａｔｔｒａｃｔａｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ （ＭＣＰ－１）、ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ（ＴＮＦ）、ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ（ＩＬ）－６、ＩＬ－１等の炎症性サイトカインや、プロスタグランディンやロイコトリエン等の脂質メディエーター、ガスメディエーターの一酸化窒素あるいは種々の酸化ストレスが知られている。炎症メディエーターは各種炎症細胞を誘導し、浸潤した炎症細胞はさらなる炎症メディエーターを分泌して炎症の病態過程を増幅および遷延すると考えられている。

また、炎症メディエーターは、細胞内シグナル伝達分子を活性化する．細胞内シグナル伝達分子としては、例えば、Ｊａｎｕｓ ｋｉｎａｓｅ（ＪＡＫ）、ｍｉｔｏｇｅｎ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ（ＭＡＰ）キナーゼ、ｎｕｃｌｅａｒ ｆａｃｔｏｒ （ＮＦ）－κＢ、ｓｉｇｎａｌ ｔｒａｎｓｄｕｃｅｒ ａｎｄ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｏｆ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ（ＳＴＡＴ）、ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ（ＴＧＦ）、ＳＭＡＤなどが挙げられる。

シグナル伝達分子の活性化は、細胞外基質分解酵素の分泌を促進する．その結果、大動脈壁の主要な構成成分であるエラスチンやコラーゲン等の分解が亢進し、大動脈壁の脆弱化を引き起こす。細胞外基質分解酵素としては、例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）－９あるいはＭＭＰ－２が挙げられる。さらに、シグナル伝達分子の活性化は、細胞外基質合成酵素の産生を抑制や平滑筋細胞死の誘導を引き起こす。

このようにして、細胞外基質代謝バランスが分解亢進に傾くとともに平滑筋細胞が減少し、壁が脆弱化し、動脈瘤の形成および進展に至る。このような炎症メディエーター産生やシグナル伝達分子の活性化は、動脈瘤に関与する細胞、例えば、マクロファージ、単球、血管内皮細胞または平滑筋細胞で生じており、例えば、マクロファージの活性化を抑制することが、動脈瘤の

形成および進展を防ぐには重要である。

[0080] 本発明者らが検討した結果、後述する実施例２に示すように、本発明におけるｍｉＲ－３３ｂ阻害物質は、ｍｉＲ－３３ｂの細胞内におけるレベルを低減させ、動脈瘤の形成および進展を抑制した。ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質による動脈瘤の形成および進展の抑制メカニズムとしては、例えば、後述する実施例２に示すように、炎症性メディエーターのＭＣＰ－１の発現抑制、細胞内シグナル伝達分子のＪＡＫの活性化抑制および／または細胞外基質分解酵素のＭＭＰ－９の活性抑制が挙げられるが、ｍｉＲ－３３ｂの下流標的は多数存在し、下流には複数のシグナル伝達経路が存在することから、これらに限られない。一方、ｍｉＲ－３３ａに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、後述する実施例２に示すように、ｍｉＲ－３３ｂの発現を上昇させ、動脈瘤の形成および進展を引き起こした。

このように、本発明では、動脈瘤形成におけるｍｉＲ－３３ｂの役割を初めて明らかにし、ｍｉＲ－３３ｂを選択的に阻害する阻害物質を用いることで動脈瘤を予防または治療できることを見出したのである。

以上のように、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質は、動脈瘤の発生または拡大を抑制することができ、動脈瘤を退縮させることができるため、動脈瘤の治療、予防、または軽減をすることができる。

[0081] ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質は、血管壁の脆弱化を防ぐことにより動脈瘤の発生を阻止し、動脈瘤のそれ以上の拡大を阻止し、あるいは動脈瘤を退縮または消失させ、これらを通して動脈瘤の破裂を阻止することができる。

[0082] 本発明において、動脈瘤は、通常、動脈瘤といわれる病態を全て含むものである。動脈瘤はその発生部位、その原因、またはその形状により様々に分類され、発生部位による分類としては、例えば、胸部大動脈瘤や腹部大動脈瘤を含む大動脈瘤、脳動脈瘤や腎動脈瘤などの内臓動脈瘤または末梢動脈に発生する瘤等が挙げられ、本発明において好ましくは大動脈瘤、脳動脈瘤または腎動脈瘤、より好ましくは大動脈瘤または脳動脈瘤、特に好ましくは大動脈瘤が挙げられる。壁構造によっては、例えば、真性動脈瘤、解離性動脈

瘤、仮性動脈瘤等のように分類することができる。原因による分類としては、例えば、動脈硬化性動脈瘤、炎症性動脈瘤、先天性動脈瘤、外傷性動脈瘤または細菌性動脈瘤、真菌性動脈瘤、梅毒性動脈瘤に代表される感染性動脈瘤等のように分類することができる。形状による分類としては、例えば、嚢状動脈瘤と紡錘状動脈瘤等のように分類することができる。本発明はこれらの分類に特に限定されない。

[0083] 動脈瘤は、例えば、マルファン症候群、孔脳症、ロイス・ディーツ症候群、常染色体優性脳動脈症、エーラス・ダンロス症候群、家族性大動脈瘤・解離、遺伝性脳小血管病、川崎病、ベーチェット病または高安動脈炎に伴う動脈瘤であってもよく、これらの疾患に伴う、胸部大動脈瘤、腹部大動脈瘤、脳動脈瘤、腎動脈瘤などであってもよいが、これらに限定されない。

[0084] 本発明におけるｍｉＲ－３３ｂ阻害物質は、動脈瘤に関与する細胞、例えばマクロファージ、単球、血管内皮細胞、平滑筋細胞におけるＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１及び／またはＪＮＫ１のｍＲＮＡもしくはタンパク質の発現レベルを抑制させ、ＭＭＰ－９活性を抑制させ、及び／またはＪＮＫ１のリン酸化を抑制させる。従って、これらの因子のうち少なくとも１つの発現又は活性が上昇している血管障害疾患の予防および治療に用いることができる。

[0085] 上述のとおりｍｉＲ－３３ｂ阻害物質は動脈瘤を治療又は予防するために使用することができ、したがって、本発明は、動脈瘤の治療に使用するためのｍｉＲ－３３ｂ阻害物質；動脈瘤の治療に使用するための医薬組成物；動脈瘤を治療するためのｍｉＲ－３３ｂ阻害物質の使用；動脈瘤の治療用医薬の製造におけるｍｉＲ－３３ｂ阻害物質の使用；動脈瘤の治療用医薬の製造に使用するためのｍｉＲ－３３ｂ阻害物質；有効量のｍｉＲ－３３ｂ阻害物質を、その必要のある対象に投与することを含む、動脈瘤の治療または予防方法；を提供する。

[0086] 本発明化合物、またはその医薬的に許容可能な塩、および薬学的に許容可能な担体を含む本発明組成物は、医薬組成物として用いることができる。医薬組成物の調製のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを１つ以上の医

薬的に許容可能な活性または不活性な物質と混合することができる。医薬組成物の製剤化のための組成物及び方法は、投与経路、疾患の程度または投与される用量を含めたいくつかの判断基準によって選択することができる。

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

[0087] 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フイルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロツプ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

[0088] また、本発明の医薬組成物には、核酸導入用試薬を含むことができる。該核酸導入用試薬としては、リポソーム、リポフェクチン、リポフェクタミン、ＤＯＧＳ（トランスフェクタム）、ＤＯＰＥ、ＤＯＴＡＰ、ＤＤＡＢ、ＤＨＤＥＡＢ、ＨＤＥＡＢ、ポリブレン、あるいはポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）等の陽イオン性脂質等を用いることができる。

[0089] また、本発明の医薬組成物に含まれるアンチセンスオリゴヌクレオチドは

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

[0090] 上記コンジュゲート基はアンチセンスオリゴヌクレオチドに直接結合しているものか、あるいはコンジュゲート基は、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、不飽和部分（例えば、二重または三重結合）、８－アミノ－３，６－ジオキサオクタン酸（ＡＤＯ）、スクシニミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、６－アミノヘキサン酸（ＡＨＥＸまたはＡＨＡ）、置換Ｃ１～Ｃ１０アルキル、置換若しくは非置換Ｃ２～Ｃ１０アルケニル、及び置換若しくは非置換Ｃ２～Ｃ１０アルキニルから選択される連結部分によりアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合している。ここで、置換基は、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルから選択される。

[0091] 本発明の医薬組成物は、副作用の少ないものを選択することができる。副作用としては、注射部位反応、肝機能検査の異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常、ミオパシー及び倦怠等が挙げられる。例えば、血液中のＡＬＴ、ＡＳＴまたはγ－ＧＴＰレベルの上昇は、肝毒性または肝機能異常を示し得る。例えば、ビリルビンの上昇は、肝毒性または肝機能異常を示し得る。また、尿たんぱくの上昇、血液中のクレアチニン、もしくはＢＵＮの上昇は、腎毒性または腎機能異常を示し得る。

[0092] 本発明の医薬組成物は、これを対象個体に適当な方法で投与することにより、動脈瘤の治療、予防、または軽減をすることができる。すなわち、本発明は、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質、好ましくはｍｉＲ－３３ｂに対するアンチ

センスオリゴヌクレオチド、もしくはそれを含む医薬組成物の有効量を、それを必要とする対象個体に適当な方法で投与することにより、動脈瘤の治療、予防、または軽減をする方法を提供する。

[0093] 本発明の医薬組成物の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内などの全身投与であってもよいし、局所注射又は経口投与などの局所投与であってもよい。本発明の医薬組成物の投与量は、使用目的、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別等により適宜変更し得るが、通常、アンチセンスオリゴヌクレオチド量として、0.1ng～100mg/kg/日、好ましくは、1ng～10mg/kg/日の範囲から選ぶことができる。

実施例

[0094] 非限定開示及び参照による組み込み

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

[0095] 実施例１

アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成および精製

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

合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドを以下の表１に示す。３３ｂ－２－ＡｍＮＡおよび３３ｂ－１－ＡｍＮＡは、ｍｉＲ－３３ｂに対するオリゴヌクレオチドを、３３ａ－２－ＡｍＮＡおよび３３ａ－１－ＡｍＮＡは、ｍｉＲ－３３ａに対するオリゴヌクレオチドを示し、ＮＥＧ－ＡｍＮＡはコントロールアンチセンスオリゴヌクレオチドを示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの表記は、各ヌクレオチドが３文字で表される。但し３’末端のヌクレオチドはヌクレオシド間結合がないため２文字で表される。

１）第１文字は大文字で表され、下記核酸塩基を示す：

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

ａ＝ＡｍＮＡの糖部分、ｄ＝２’－デオキシリボース、

３）第３文字は下記ヌクレオシド間結合を示す：

ｓ＝ホスホロチオエート。

[0096] [表1]

表１

アンチセンスオリゴヌクレオチドの名称	配列番号	配列	m/z
33a-2-AmNA(12)	7	AasAdsMasTdsAasCdsAasAdsTasGdsMasAd	4156.5
33b-2-AmNA(12)	8	AasAdsMasAdsGasCdsAasAdsTasGdsMasAd	4181.33
33a-1-AmNA(16)	9	TasGdsMasAdsAasCdsTasAdsMasAdsAasTdsGasCdsAasCd	5541.23
33b-1-AmNA(16)	10	TasGdsMasAdsAasCdsAasGdsMasAdsAasTdsGasCdsAasCd	5566.28
NEG-AmNA (12)	11	AasAdsMasAdsAasTdsAasCdsTasAdsMasGd	4156.15

[0097] 実施例２

ｍｉＲ－３３ｂノックインマウスを用いた塩化カルシウム誘発大動脈瘤モデルにおける３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）の薬理効果の測定

Ｃ５７ＢＬ／６をバックグラウンドとした、ｍｉＲ－３３ｂノックインマウスを用いた。ＭｉＲ－３３ｂノックインマウスは　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ　ＲＥＰＯＲＴＳ　４：５３１２　ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ０５３１２で報告されているものを使用した。８週齢のｍｉＲ－３３ｂノックインオスマウスを用いて塩化カルシウムを塗布した腹部大動脈瘤モデル（Ａｔｈｅｒｏｓｃｌｅｒｏｓｉｓ　２０１３；　２２６：２９－３９．報告の方法に準ずる）を作成した。マウスへの麻酔方法は３種混合麻酔（メデトミジン　０．３　ｍｇ／ｋｇ、ミダゾラム　４．０　ｍｇ／ｋｇ、ブトルファノール　１．０　ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内投与とした。腹部大動脈瘤モデルは、腎動脈下から総腸骨動脈分岐部まで分離し、その外表面へガーゼに浸み込ませた０．５　ｍｏｌ／Ｌの塩化カルシウムを塗布し、２０分後に塩化カルシウム塗布ガーゼを取り除き、生理食塩水を浸み込ませたガーゼにて腹部大動脈周囲を洗浄の上、離開創を縫合とした。腹部大動脈瘤作成後１週間後あるいは６週間後に、腹部大動脈瘤の最大径並びに長軸方向伸展距離測定、解析

を行った。この際、上記三種混合麻酔薬の通常の５倍量を用いて安楽死とし、左心室よりＰＢＳを生理的な圧で還流とした。腹部大動脈瘤の最大径並びに長軸方向伸展距離計測は、対外での血管構造の虚脱を防ぐため、大動脈を体内から取り出す前にメジャーを用いて計測、写真撮影の後に解析とした。

[0098] １週間後に解析を行った群ではアンチセンスオリゴヌクレオチド投与（３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２））は、外科的処置前日、外科的処置翌日、外科的処置４日後にそれぞれ１０ ｍｇ／ｋｇの量を皮下注射とした。６週後に解析を行った群では、外科的処置前日、外科的処置翌日、外科的処置１週間後から６週間後まで週１回それぞれ１０ｍｇ／ｋｇの量を皮下注射とした。最終投与後７日後に採材し各種測定をおこなった.

[0099] 全てのマウスは京都大学医学部附属動物実験施設にて飼育とし、その施設はＳＰＦ（ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐａｔｈｏｇｅｎ ｆｒｅｅ）の状態が維持されており、この研究は京都大学医の倫理委員会の認可を得て行ったものである。

[0100] アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＮＥＧ－ＡｍＮＡ（１２）、３３ａ－２－ＡｍＮＡ （１２）、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２））投与によるｍｉＲ－３３ａおよびｍｉＲ－３３ｂの発現レベル測定を行った（以下、図において、ＮＥＧ－ＡｍＮＡ（１２）を「ｃｏｎｔｒｏｌ」、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）を「Ａｎｔｉ－ｍｉＲ－３３ａ」、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ （１２）を「Ａｎｔｉ－ｍｉＲ－３３ｂ」と称することがある）。ｍｉＲＮＡ測定は、ＲＮＡはＴｒｉＰｕｒｅ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｒｏｃｈｅ）を用いて分離、純化とし、ＴａｑＭａｎ ＭｉｃｒｏＲＮＡ ａｓｓａｙ ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて測定とした。生成物はサーマルサイクラー（ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ ７９００ＨＴ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ）を用いて解析し、発現はＵ６ ｓｎＲＮＡを用いて標準化とした。

[0101] 図１に示すように、６週間後に解析を行った群では、大動脈において、３

３ａ－２－ＡｍＮＡ （１２）投与群ではｍｉＲ－３３ａレベルの強い抑制が、また、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ （１２）投与群ではｍｉＲ－３３ｂレベルの強い抑制が観察された。一方、３３ａ－２－ＡｍＮＡ （１２）投与群ではｍｉＲ－３３ｂレベルの増加が観察された。ｍｉＲ－３３ａレベル低減率/ｍｉＲ－３３ｂレベル低減率の値は、０．２３であった。

[0102] ｍｉＲ－３３ｂノックインマウスを用いた塩化カルシウム誘発大動脈瘤モデルにおいて、誘発１週間後の、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与によるＭＭＰ－９、ＭＣＰ－１およびＪＮＫ１タンパク質の発現レベルまたはリン酸化レベルを以下の方法で測定した。十分量の麻酔を施したマウスへ左室から生理的な圧でＰＢＳを用いて還流とし、標本を採取とした。ウエスタンブロッティングは、標準的な方法を用いて行った。Ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｍｉｎｉ ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ（Ｒｏｃｈｅ）、ＡＬＬＮ（２５ ｍｇ／ｍＬ）、０．５ ｍＭ ＮａＦ、１０ ｍＭ Ｎａ３ＶＯ４とともに、１００ ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、７５ ｍｍｏｌ／Ｌ ＮａＣｌ、１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で作成したｌｙｓｉｓ ｂｕｆｆｅｒを用いた。タンパク濃度はｂｉｃｉｎｃｈｏｎｉｎｉｃ ａｃｉｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｓｓａｙ ｋｉｔ （Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いて測定し、ＮｕＰＡＧＥ ４％－１２％ Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ （Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）ゲルを用いて泳動の後、Ｐｒｏｔｒａｎ ｎｉｔｒｏｃｅｌｌｕｌｏｓｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｍｅｍｂｒａｎｅ （Ｗｈａｔｍａｎ）へ転写とした。メンブレンは１～５％の無脂肪乳を用いてブロッキングとし、一次抗体としてＡｎｔｉ－ｐｈｏｓｐｈｏ－ＳＡＰＫ／ＪＮＫ （１：５００、 Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ４６６８Ｓ）、ａｎｔｉ－ＳＡＰＫ／ＪＮＫ （１：５００、 Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ９２５２Ｓ）、Ａｎｔｉ－ＧＡＰＤＨ（１：３０００、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ２１１８Ｓ）を用いて４℃で一晩撹拌とした。ＰＢＳ－０．０５％ Ｔｗｅｅｎ ２０ （０．０５％ Ｔ－ＰＢＳ）を用いて洗浄の後、２次抗体（ａｎｔｉ－ｒａｂｂｉｔ、ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ

－ｌｉｎｋｅｄ；　１：２０００）を用いて４℃で１時間撹拌し、ＰＢＳ－０．０５％　Ｔｗｅｅｎ　２０　（０．０５％　Ｔ－ＰＢＳ）を用いて洗浄の後にＥＣＬ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ　（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を加えて撮像とした。

[0103] ゼラチンザイモグラフィ法は、上記と同様に、ｌｙｓｉｓ　ｂｕｆｆｅｒを用いてタンパクを抽出し、１０　μｇのタンパクを測定に使用した。Ｇｅｌａｔｉｎ－Ｚｙｍｏｇｒａｐｈｙ　Ｋｉｔ（コスモバイオ）を用いて添付文書通りにＭＭＰ－９の活性を測定した。

[0104] ＭＣＰ－１タンパク質の発現レベルは、腹部大動脈瘤モデルを作成後に採取した血清50 μLをサンプルとし、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems)を用いてＭＣＰ－１濃度測定を添付文書通りに行った。

[0105] 図２に示すように、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群では、ＭＣＰ－１およびＪＮＫ１のタンパク質発現レベルの上昇、ならびにＪＮＫ１のリン酸化レベルの上昇が認められた。一方、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群では、ＭＣＰ－１およびＪＮＫ１のタンパク質発現レベルの減少、ならびにＪＮＫ１のリン酸化レベルの減少が認められた。

[0106] 図３に示すように、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群ではＭＭＰ－９活性の上昇が、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群ではＭＭＰ－９活性の減少が認められた。

[0107] 次に、ｍｉＲ－３３ｂノックインマウスを用いた塩化カルシウム誘発大動脈瘤モデルを用いて、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）または３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）による、動脈瘤形成への影響を調べた。その結果、１週間後の解析では、図４に示すように、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）では、コントロール群（ＮＥＧ－ＡｍＮＡ（１２））で認められる動脈直径拡大および動脈長の伸展が認められなかった。６週後の解析でも、図５に示すように、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）では、コントロール群（ＮＥＧ－ＡｍＮＡ（１２））で認められる動脈直径拡大および動脈長の伸展が認められなかった

。すなわち動脈瘤の形成抑制効果が認められた。一方、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）では、コントロール群よりもさらに動脈直径の拡大および動脈長の伸展が認められ、動脈瘤形成が促進された。

[0108] 血清生化学解析については、麻酔を行ったマウスの下大静脈から血液を採取し４℃で血清を遠心分離とし、－８０℃で保存とした。生化学解析は日立７１８０自動分析装置（長浜ライフサイエンス）を用いて行った。その結果、図６に示すように、肝機能パラメータであるＡＳＴ、ＡＬＴ、Ｔ－Ｂｉｌや、腎機能パラメータであるＣＲＥにおいては、毒性的に重篤な所見は認められなかった。

[0109] 実施例３

ヒトマクロファージＴＨＰ－１細胞を用いた３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ　（１２）の薬理効果の測定

ＴＨＰ－１細胞はＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎより購入とし、１０％ＦＢＳを加えたＲＰＭＩ　１６４０を用いて培養とし、１００　ｎＭ　ＰＭＡ（ナカライテスク）を用いてＴＨＰ－１マクロファージへ分化させた。ＡｍＮＡをＴＨＰ－１マクロファージへｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎする際、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭＡＸ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ　（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ）　を用いて添付文書通りに実験を行った。ＡｍＮＡ含有アンチセンスオリゴ（ＮＥＧ－ＡｍＮＡ（１２）、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２））は、５０　ｎＭで導入し、導入４日後に細胞を回収し、以下のようにＲＮＡの抽出と各種ＲＮＡ測定をおこなった。

ＲＮＡ抽出とリアルタイムＰＣＲは、以下の手順で実施した。ＲＮＡはＴｒｉＰｕｒｅ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ　（Ｒｏｃｈｅ）を用いて分離、純化とし、添付文書通りにＴｒａｎｓｃｒｉｐｔｏｒ　Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　ｃＤＮＡ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｋｉｔ　（Ｒｏｃｈｅ）を用いてｃＤＮＡを合成の後、ＳＹＢＲＴＭ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａ

ｓｔｅｒ Ｍｉｘ （Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて特異遺伝子を４０サイクル増幅とした。発現はハウスキーピング遺伝子としてβ－ａｃｔｉｎあるいはＵ６を用いて標準化した。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

ＳＲＥＢＦ１ Ｆｏｒｗａｒｄ、 ＡＡＣＡＧＴＣＣＣＡＣＴＧＧＴＣＧＴＡＧＡＴ（配列番号１２）

ＳＲＥＢＦ１ Ｒｅｖｅｒｓｅ、 ＴＧＴＴＧＣＡＧＡＡＡＧＣＧＡＡＴＧＴＡＧＴ（配列番号１３）

ＡＣＴＢ Ｆｏｒｗａｒｄ、 ＡＧＧＣＡＣＴＣＴＴＣＣＡＧＣＣＴＴＣＣ（配列番号１４）

ＡＣＴＢ Ｒｅｖｅｒｓｅ、 ＧＣＡＣＴＧＴＧＴＴＧＧＣＧＴＡＣＡＧＧ（配列番号１５）

ＭＭＰ－９ Ｆｏｒｗａｒｄ、 ＴＴＧＡＣＡＧＣＧＡＣＡＡＧＡＡＧＴＧＧ（配列番号１６）

ＭＭＰ－９ Ｒｅｖｅｒｓｅ、 ＧＣＣＡＴＴＣＡＣＧＴＣＧＴＣＣＴＴＡＴ（配列番号１７）

ＭＣＰ－１ Ｆｏｒｗａｒｄ、 ＣＣＣＣＡＧＴＣＡＣＣＴＧＣＴＧＴＴＡＴ（配列番号１８）

ＭＣＰ－１ Ｒｅｖｅｒｓｅ、 ＴＧＧＡＡＴＣＣＴＧＡＡＣＣＣＡＣＴＴＣ（配列番号１９）

ＪＮＫ１ Ｆｏｒｗａｒｄ、 ＴＧＣＣＴＧＡＣＴＣＡＣＡＣＴＣＡＡＧＧ（配列番号２０）

ＪＮＫ１ Ｒｅｖｅｒｓｅ、 ＧＧＣＴＴＣＴＣＡＧＣＡＡＣＴＧＡＡＣＣ（配列番号２１）

ＡＢＣＡ１ Ｆｏｒｗａｒｄ、ＡＡＣＡＧＴＴＴＧＴＧＧＣＣＣＴＴＴＴＧ（配列番号２２）

ＡＢＣＡ１ Ｒｅｖｅｒｓｅ、ＡＧＴＴＣＣＡＧＧＣＴＧＧＧＧＴＡＣＴＴ（配列番号２３）

[0110] 図７に示すように、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）導入群ではｍｉＲ－３３ａの発現レベルが、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）導入群ではｍｉＲ３３ｂの発現レベルに関し、それぞれ強い抑制が観察された。一方、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）導入群では、ｍｉＲ－３３ｂの発現レベルの誘導が観察された。ｍｉＲ－３３ａレベル低減率/ｍｉＲ－３３ｂレベル低減率の値は、０．５２であった。ｍｉＲ－３３ａおよびｍｉＲ－３３ｂの標的遺伝子であるＡＢＣＡ１の　ｍＲＮＡ発現レベルについては、いずれのオリゴヌクレオチドも顕著な増加を示し、それぞれｍｉＲ－３３ａまたはｂを抑制していることが確認できた.

[0111] 図８に示すように、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）導入群ではＳＲＥＢＦ１ｍＲＮＡ発現レベルの誘導が認められた。ｍｉＲ－３３ｂはＳＲＥＢＰ１遺伝子のイントロンに存在することから、ＳＲＥＢＦ１遺伝子の発現上昇が、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）導入群つまりｍｉＲ－３３ａアンチセンスオリゴヌクレオチドを処理した際にｍｉＲ－３３ｂの発現が誘導される要因と考えられる。

[0112] ＭＭＰ－９ｍＲＮＡ、ＭＣＰ－１ｍＲＮＡおよびＪＮＫ１ｍＲＮＡ発現レベルの変動に関し、ＴＮＦα非刺激時（ｖｅｈｉｃｌｅ）またはＴＮＦα刺激時に、上述の方法でｍＲＮＡ発現レベルを測定をした。その結果、図９に示すように、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群では、いずれのｍＲＮＡのレベルも抑制されたのに対し、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群ではいずれのｍＲＮＡのレベルも増加した。

[0113] ＭＭＰ－９タンパク質およびリン酸化ＪＮＫタンパク質レベルの変動に関し、上述の方法で、ウエスタンブロットおよびゼラチンザイモグラフィー法により測定をした。その結果、図１０に示すように、３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群では、ＭＭＰ－９の活性およびリン酸化ＪＮＫタンパク質の発現レベルが抑制され、マクロファージ活性化抑制作用を示すのに対し、３３ａ－２－ＡｍＮＡ（１２）投与群ではＭＭＰ－９の活性およびリン酸化ＪＮＫタンパク質の発現レベルが増強し、マクロファージ活性化増強作用を示

した。

以上のように、マウス動脈瘤モデルでの３３ｂ－２－ＡｍＮＡ（１２）の病態形成作用メカニズムの一部であるマクロファージの活性化抑制作用について、ヒト細胞においても同様の作用を示すことが明らかになり、ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質はヒト動脈溜の治療において有用であることを示した。

[0114] 本明細書では、別段の記載がない限り、単数形の使用は複数形を含む。本明細書では、別段の記載がない限り、「または」の使用は「及び／または」を意味する。さらに、用語「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」並びに他の形態、例えば「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」及び「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」の使用は、限定的なものではない。さらに、別段の記載がない限り、「要素」などの用語は、１つのユニットを含む要素と１つを超えるサブユニットを含む要素を包含する。

[0115] 本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のためだけであり、記載される主題を制限するものとして解釈されるべきでない。これらに限定されないが、特許、特許出願、記事、書籍及び論文を含めた、本出願で引用されるすべての文書または文書の一部分は、本明細書で論じる文書の一部分に関して、及びその全体が、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

[0116] 具体的な定義が与えられない限り、本明細書に記載の分析化学、有機合成化学、並びに医化学及び薬化学に関連して利用される命名法、及びそれらの手順及び技法は、当技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。標準的な技法を、本明細書中で使用する化学合成及び化学分析に使用することができる。許容される場合、本明細書の開示の全体を通して言及される、すべての特許、出願、公開出願及び他の刊行物、国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）などのデータベースを通して入手可能なＧｅｎＢａｎｋ受託番号及び関連する配列情報並びに他のデータは、本明細書に論じる文書の一部分に関して、及びその全体が、参照により組み込まれる。

また、本明細書は、電子フォーマットの配列表と共に出願するが、当該電

子フォーマット中に記載する配列表の情報は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

請求の範囲

[請求項1] ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質を有効成分とする、動脈瘤の予防または治療剤。

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

[請求項3] ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質が、核酸である、請求項２に記載の予防または治療剤。

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

[請求項5] 前記ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質は、ｍｉＲ－３３ｂレベル低減率がｍｉＲ－３３ａレベル低減率より高い、請求項２～４のいずれか一項に記載の予防または治療剤。

[請求項6] ｍｉＲ－３３ｂレベル低減物質が、ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項２～５のいずれか一項に記載の予防または治療剤。

[請求項7] ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが

１）７～２０ヌクレオチド残基からなり、

２）配列番号１の塩基配列を有するｍｉＲ－３３ｂの等長部分に９０％以上相補的な塩基配列であって、配列番号１に記載のｍｉＲ－３３ｂの塩基配列の５´末端から数えて９番目かつ１０番目の核酸塩基とはミスマッチを有さない塩基配列を有する、請求項６に記載の予防または治療剤。

（配列番号１）ＧＵＧＣＡＵＵＧＣＵＧＵＵＧＣＡＵＵＧＣ

[請求項8] ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが

ＡＡＣＡＧＣＡＡＴＧＣＡ（配列番号５）、

に記載される配列からなる核酸塩基配列（ただし、Ｃは５－メチルシトシン（Ｍ）でもよい）を有する、請求項７に記載の予防または治療

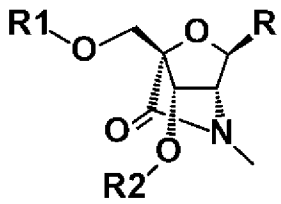
剤。

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

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

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

[化1]



ＡｍＮＡ

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

[請求項12] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

Ａａｓ Ａｄｓ Ｍａｓ Ａｄｓ Ｇａｓ Ｃｄｓ Ａａｓ Ａｄｓ Ｔａｓ Ｇｄｓ Ｍａｓ Ａｄ；

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

Ａ＝アデニン、Ｔ＝チミン、Ｇ＝グアニン、Ｃ＝シトシン、Ｍ＝５－メチルシトシン、

に従って示され；

各糖部分が下記記号：

ａ＝上記のＡｍＮＡの糖部分、ｄ＝２’－デオキシリボース、

に従って示され；

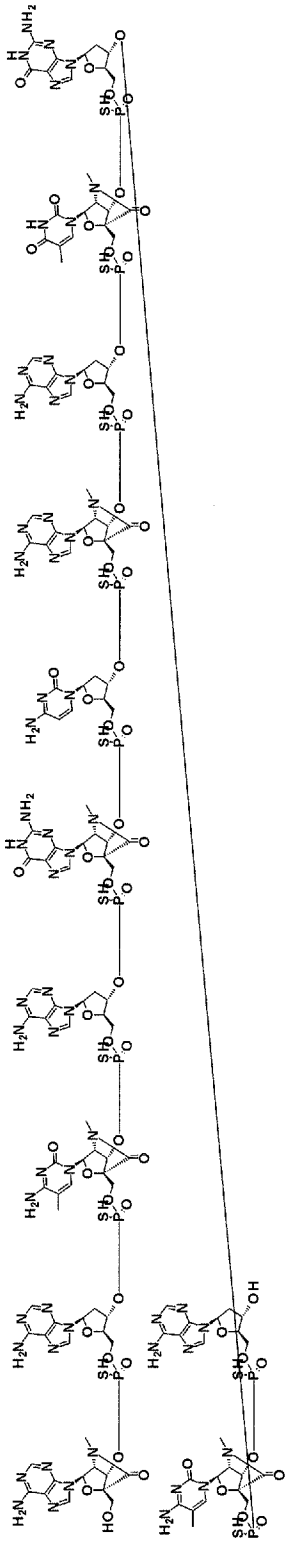
各ヌクレオシド間結合が下記記号：

ｓ＝ホスホロチオエートに従って示される、請求項１１に記載の予防または治療剤。

[請求項13] 前記修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

[化2]



で示される修飾オリゴヌクレオチドである、請求項１２に記載の予防

または治療剤。

[請求項14] 動脈瘤が大動脈瘤または脳動脈瘤である、請求項１～１３のいずれか一項に記載の予防または治療剤。

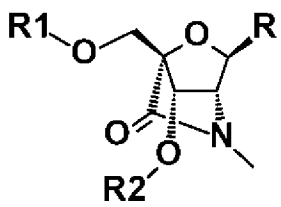
[請求項15] ＡＡＣＡＧＣＡＡＴＧＣＡ（配列番号５）
に記載される配列からなる核酸塩基配列を有する、ｍｉＲ－３３ｂに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項16] アンチセンスオリゴヌクレオチドが修飾オリゴヌクレオチドである、請求項１５に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項17] 修飾オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも１つのヌクレオシドが修飾糖を含む、請求項１６に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項18] 修飾糖が、ＡｍＮＡの糖部分から選択される、請求項１７に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[化3]



ＡｍＮＡ

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

[請求項19] 修飾オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも１つのヌクレオシドが修飾核酸塩基を含む、請求項１６から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。

[請求項20] 修飾核酸塩基が５－メチルシトシンである、請求項１９に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項21] 修飾オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項１６～２０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。

[請求項22] 修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

Ａａｓ　Ａｄｓ　Ｍａｓ　Ａｄｓ　Ｇａｓ　Ｃｄｓ　Ａａｓ　Ａｄｓ　Ｔａｓ　Ｇｄｓ　Ｍａｓ　Ａｄ；

で示される修飾オリゴヌクレオチドであって、

式中、

各核酸塩基が下記記号：

Ａ＝アデニン、Ｔ＝チミン、Ｇ＝グアニン、Ｃ＝シトシン、Ｍ＝５－メチルシトシン、

に従って示され；

各糖部分が下記記号：

ａ＝上記のＡｍＮＡの糖部分、ｄ＝２’－デオキシリボース、

に従って示され；

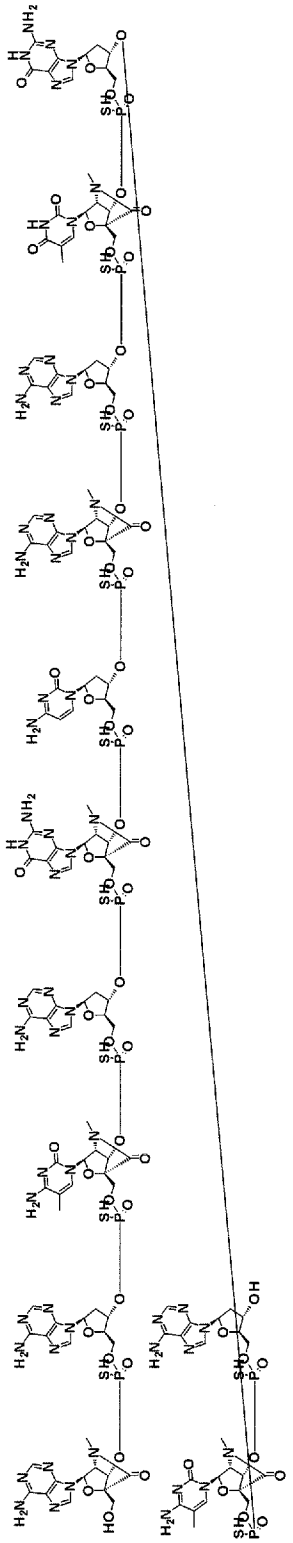
各ヌクレオシド間結合が下記記号：

ｓ＝ホスホロチオエートに従って示される、請求項１６～２１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。

[請求項23] 修飾オリゴヌクレオチドが、

下式：

[化4]



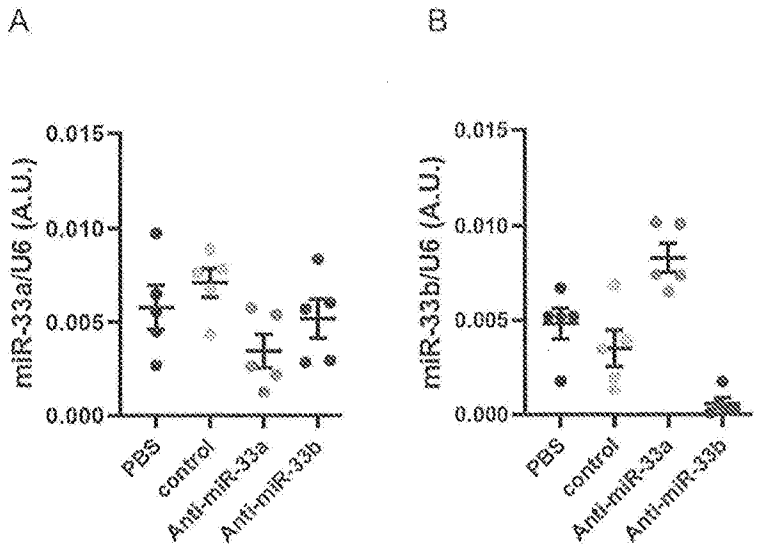
で示される、請求項２２に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

[請求項24] 請求項１５～２３のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレ

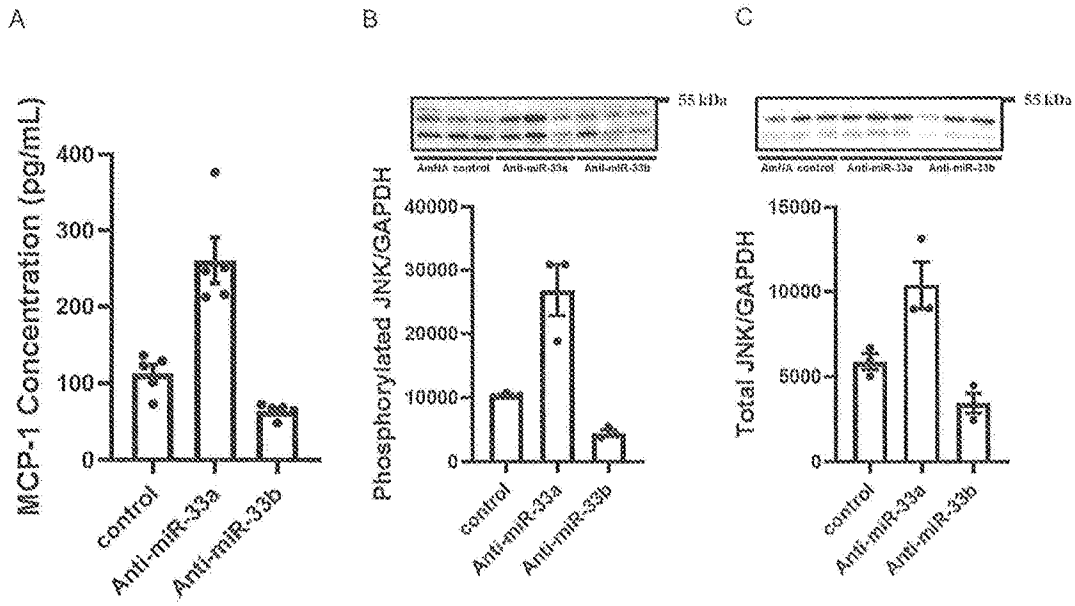
オチドまたはその医薬的に許容可能な塩、および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

[請求項25] ｍｉＲ－３３ｂ阻害物質の、動脈瘤の予防または治療剤の製造における使用。

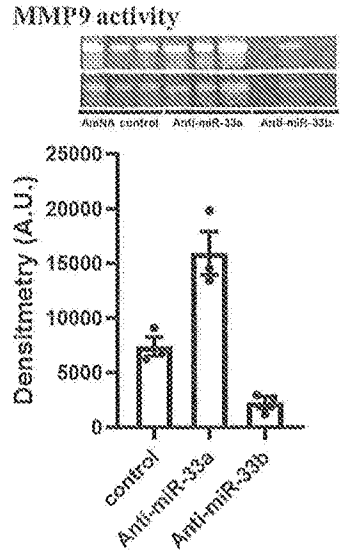
[図1]


A
B
miR-33a/U6 (A.U.)
miR-33b/U6 (A.U.)
0.015
0.010
0.005
0.000
PBS
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

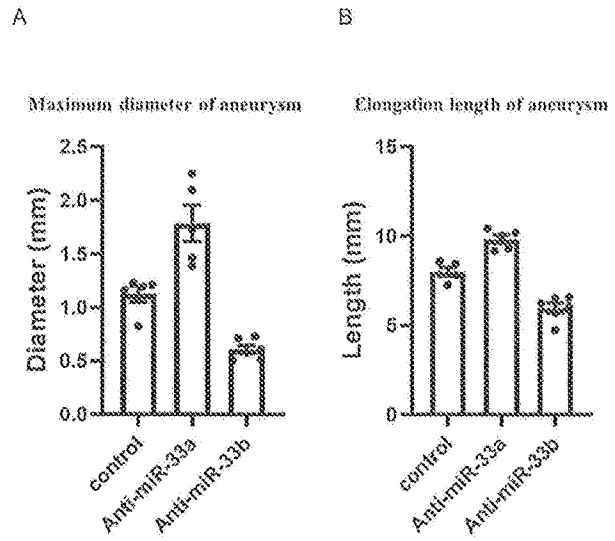
[図2]


A
B
C
MCP-1 Concentration (pg/mL)
400
300
200
100
0
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
55 kDa
AntiA control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
Phosphorylated JNK/GAPDH
40000
30000
20000
10000
0
Total JNK/GAPDH
15000
10000
5000
0

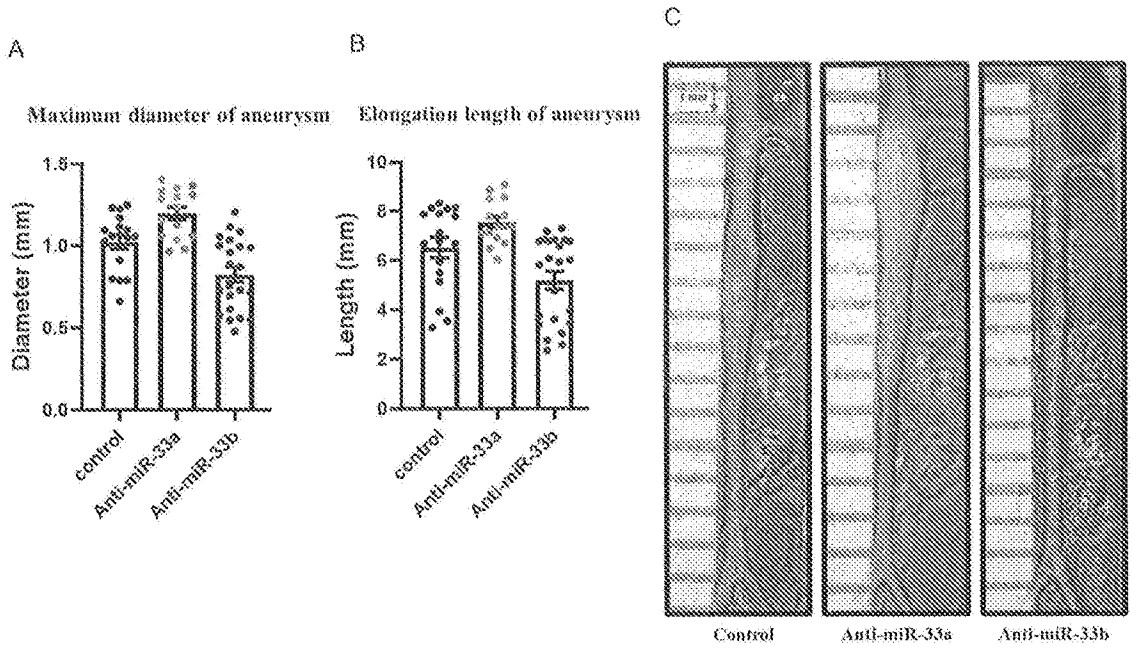
[図3]


MMP9 activity
AntiA control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
Densitmetry (A.U.)
25000
20000
15000
10000
5000
0
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

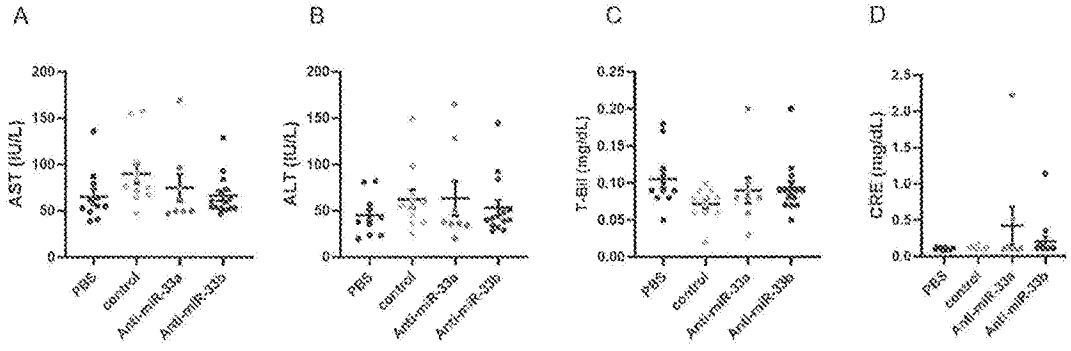
[図4]


A
B
Maximum diameter of aneurysm
Elongation length of aneurysm
Diameter (mm)
Length (mm)
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

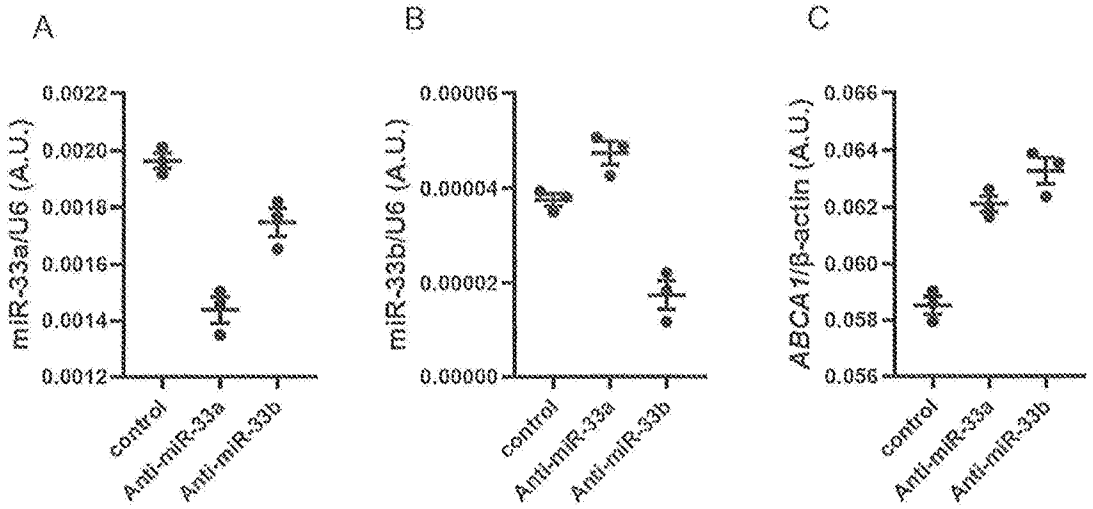
[図5]


A
B
C
Maximum diameter of aneurysm
Elongation length of aneurysm
Diameter (mm)
Length (mm)
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b
Control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

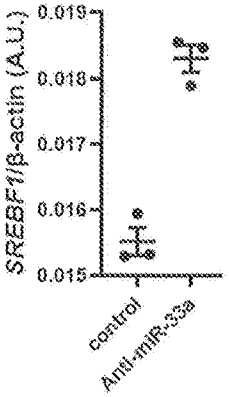
[図6]


A
B
C
D
AST (IU/L)
ALT (IU/L)
T-Bil (mg/dL)
CRE (mg/dL)
PBS
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

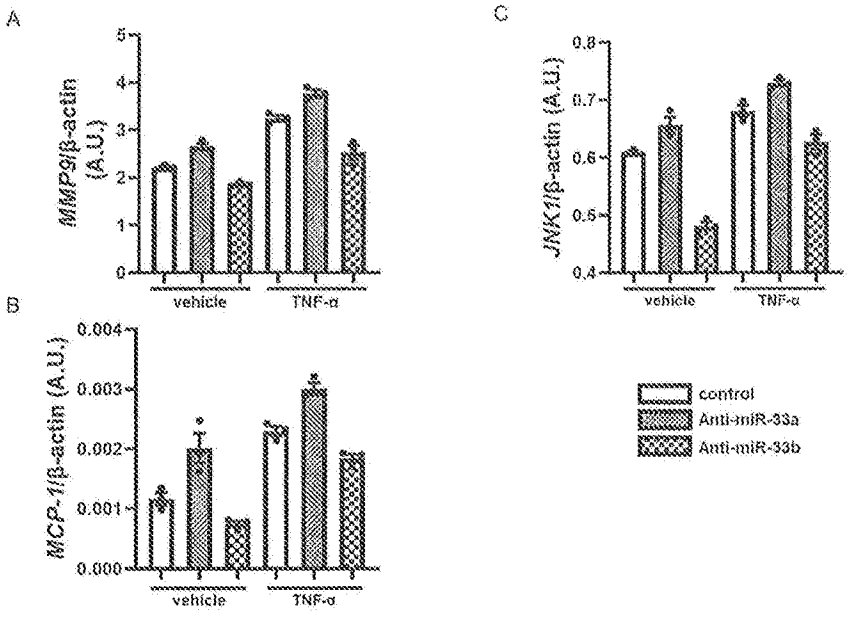
[図7]


A
B
C
miR-33a/U6 (A.U.)
miR-33b/U6 (A.U.)
ABCA1/β-actin (A.U.)
0.0022
0.0020
0.0018
0.0016
0.0014
0.0012
0.00006
0.00004
0.00002
0.00000
0.066
0.064
0.062
0.060
0.058
0.056
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

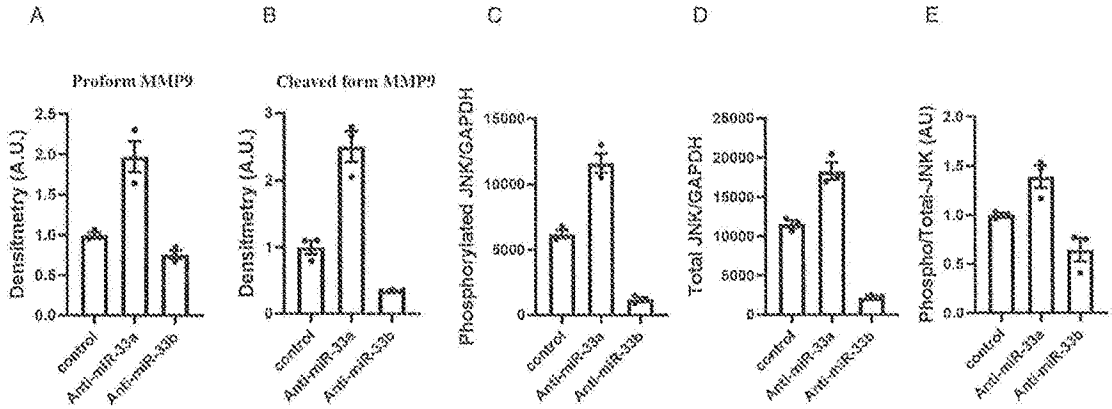
[図8]


SREBF1/β-actin (A.U.)
0.019
0.018
0.017
0.016
0.015
control
Anti-miR-33a

[図9]


A
B
C
MMP9/β-actin (A.U.)
MCP-1/β-actin (A.U.)
JNK1/β-actin (A.U.)
vehicle
TNF-α
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

[図10]


A
B
C
D
E
Proform MMP9
Densitometry (A.U.)
Cleaved form MMP9
Densitometry (A.U.)
Phosphorylated JNK/GAPDH
Total JNK/GAPDH
Phospho/Total-JNK (AU)
control
Anti-miR-33a
Anti-miR-33b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/007822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K31/7115(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61K31/7125(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i
FI: A61K45/00, A61P9/10, A61K31/7105, A61K31/713, A61K31/712, A61K31/7115, A61K31/711, A61K31/7125, C12N15/113ZZNA
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)
Int.Cl. A61K45/00, A61P9/10, C12N15/113, A61K31/7105, A61K31/711, A61K31/7115, A61K31/712, A61K31/7125, A61K31/713

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO, L. F. et al., miR-33-5p knockdown attenuates abdominal aortic aneurysm progression via	1, 2, 5, 14, 25
Y	promoting target adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 expression and activating the PI3K/Akt signaling pathway, Perfusion, 06 June 2019, vol. 35, no. 1, pp. 57-65, abstract, fig. 2	1-14, 25
Y	NISHINO, Tomohiro et al., SREBF1/MicroRNA-33b Axis Exhibits Potent Effect on Unstable Atherosclerotic Plaque Formation In Vivo, Arterioscler Thromb Vase Biol., 26 July 2018, vol. 2018, no, 38, pp. 2460-2473, suppl. abstract, sup fig. VI	1-14, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 26 March 2021	Date of mailing of the international search report 06 April 2021
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/007822

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2012-522509 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 27 September 2012 (2012-09-27), abstract, claim 1, paragraph [0055], example 2, fig. 17, SEQ ID NO. 2, 4	15-24 3, 4, 6-13
X Y	JP 2009-532392 A (SANTARIS PHARMA A/S) 10 September 2009 (2009-09-10), claims 1, 75, paragraph [0178], scheme 1, example 30, SEQ ID NO. 444	15-24 3, 4, 6-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/007822

JP 2012-522509 A	27 September 2012	WO 2010/120508 A2 abstract, claim 1, page, 16, example 2, fig. 17, SEQ ID NO. 2, 4
JP 2009-532392 A	10 September 2009	WO 2007/112754 A2 claims 1, 75, page 32, scheme 1, example 30, SEQ ID NO. 444

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/007822

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 45/00(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 31/711(2006.01)i; A61K 31/7115(2006.01)i; A61K 31/712(2006.01)i; A61K 31/7125(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i
FI: A61K45/00; A61P9/10; A61K31/7105; A61K31/713; A61K31/712; A61K31/7115; A61K31/711; A61K31/7125; C12N15/113 Z ZNA

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））

A61K45/00; A61P9/10; C12N15/113; A61K31/7105; A61K31/711; A61K31/7115; A61K31/712; A61K31/7125; A61K31/713

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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	ZHAO, Lingfeng et al., miR-33-5p knockdown attenuates abdominal aortic aneurysm progression via promoting target adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 expression and activating the PI3K/Akt signaling pathway, Perfusion, 2019.06.06, Vol. 35, No. 1, p. 57-65 要約、fig. 2	1,2,5,14,25
Y	要約、fig. 2	1-14,25
Y	NISHINO, Tomohiro et al., SREBF1/MicroRNA-33b Axis Exhibits Potent Effect on Unstable Atherosclerotic Plaque Formation In Vivo, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2018.07.26, Vol. 2018 No, 38, p. 2460-2473, suppl. 要約、sup fig. VI	1-14,25
X	JP 2012-522509 A (ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイション) 27.09.2012 (2012-09-27) 要約、請求項１、段落５５、実施例２、図１７、配列番号２，４	15-24
Y	要約、請求項１、段落５５、実施例２、図１７、配列番号２，４	3,4,6-13

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“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	国際調査報告の発送日
26.03.2021	06.04.2021

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）
大島　彰公 4U 4869

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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	JP 2009-532392 A (サンタリス ファーマ アー／エス) 10.09.2009 (2009-09-10) 請求項１，７５、段落１７８、化１、実施例３０、配列番号４４４	15-24
Y	請求項１，７５、段落１７８、化１、実施例３０、配列番号４４４	3,4,6-13

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/007822

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/JP2021/007822

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2012-522509 A	27.09.2012	WO 2010/120508 A2 要約、請求項１、１６頁、実施例２、図１７、配列番号２，４	
JP 2009-532392 A	10.09.2009	WO 2007/112754 A2 請求項１，７５、３２頁，Scheme 1、実施例３０、配列番号４４４	