

(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  
2023年3月23日(23.03.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/042876 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
A61P 43/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)  
A61K 47/54 (2017.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61K 47/64 (2017.01)

TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/034531

(22) 国際出願日: 2022年9月15日(15.09.2022)

(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 2021-150310 2021年9月15日(15.09.2021) JP

(72) 発明者: 横田 隆徳 (YOKOTA Takanori); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).  
吉岡 耕太郎 (YOSHIOKA Kotaro); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番4号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

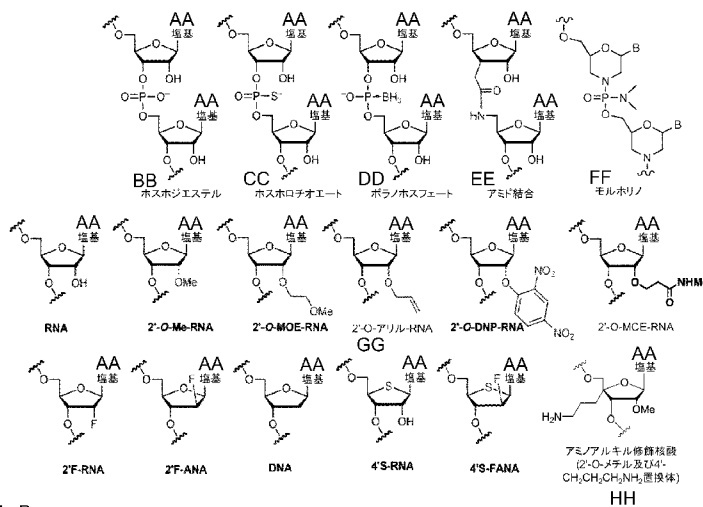
(71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー3 2階 Tokyo (JP).

(54) Title: HETERONUCLEIC ACID INCLUDING 2'-MODIFIED NUCLEOSIDE

(54) 発明の名称: 2'-修飾ヌクレオシドを含むヘテロ核酸

[図2]



AA Base  
BB Phosphodiester  
CC Phosphorothioate  
DD Boranophosphate  
EE Amide bond  
FF Morpholino  
GG 2'-O-allyl-RNA  
HH Aminoalkyl-modified nucleic acid (2'-O-methyl and 4'-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> substituted forms)

(57) Abstract: A problem addressed is to provide a double-stranded nucleic acid complex with reduced central nervous system toxicity. Provided is a double-stranded nucleic acid complex including a first nucleic acid strand and a second nucleic acid strand, wherein the first nucleic acid strand can hybridize with at least a part of a target gene or a transcript thereof and has an antisense effect on the target gene or transcript thereof, and the second nucleic acid strand includes a base sequence complementary to that of the first nucleic acid strand and includes one or more 2'-modified nucleosides.



WO 2023/042876 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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))

(57) 要約: 中枢神経毒性が軽減した二本鎖核酸複合体を提供することを課題とする。第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む二本鎖核酸複合体であって、前記第1核酸鎖は、標的遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、前記標的遺伝子又はその転写産物に対してアンチセンス効果を有し、前記第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ2'-修飾ヌクレオシドを1個以上含む、前記二本鎖核酸複合体を提供する。

## 明 細 書

発明の名称： 2' -修飾ヌクレオシドを含むヘテロ核酸

### 技術分野

[0001] 本発明は、2'-修飾ヌクレオシドを含む二本鎖核酸複合体、及びそれを有効成分として含む医薬組成物等に関する。

### 背景技術

[0002] 近年、核酸医薬と呼ばれる医薬品の現在進行中の開発において、オリゴヌクレオチドが関心を集めており、また特に、標的遺伝子の高い選択性及び低毒性の点から考えて、アンチセンス法を利用する核酸医薬の開発が積極的に進められている。アンチセンス法とは、標的遺伝子より転写されたmRNAやmiRNAの部分配列を標的センス鎖として、それに相補的なオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド：本明細書ではしばしば「ASO（Antisense Oligonucleotide）」と表記する）を細胞に導入することによって、標的遺伝子によってコードされたタンパク質の発現やmiRNAの活性を選択的に改変又は阻害することを含む方法である。

[0003] アンチセンス法を利用した核酸として、本発明者らは、アンチセンスオリゴヌクレオチドとそれに対する相補鎖とをアニーリングさせた二本鎖核酸複合体（ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド(heteroduplex oligonucleotide、HDO))を開発した(特許文献1、非特許文献1及び2)。二本鎖核酸複合体は高いアンチセンス効果を有し、血液脳関門を超えて中枢神経系の制御を可能とした画期的な技術である。

[0004] 一方、近年では核酸医薬の臨床開発が進み、前臨床試験の結果が蓄積されてきた。その結果、ASO等の核酸医薬では毒性や有害事象が問題になる場合が少なくないことが明らかになった。例えば、2013～2016年における核酸医薬品の開発中止原因では、毒性や有害事象が半数近くを占めた（非特許文献3）。それ故、核酸医薬の毒性を回避する技術が必要とされている。

### 先行技術文献

## 特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2013/089283号

特許文献2：国際公開第2014/192310号

## 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Nishina K, et. al., "DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing", Nature Communication, 2015, 6:7969.

非特許文献2：Asami Y, et al., "Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides", Drug Discoveries & Therapeutics. 2016; 10(5):256-262.

非特許文献3：Harrison R.K., "Phase II and phase III failures: 2013-2015", Nature Reviews Drug Discovery, 2016; 15:817-818.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 中枢神経毒性が軽減した二本鎖核酸複合体を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0008] 一本鎖のギャップマー型アンチセンス核酸を脳室内に投与したマウスでは、投与から数時間以内に中枢神経毒性に基づく活動低下や運動機能障害が観察される。本発明者らは、核酸医薬の中枢神経毒性を軽減し得る新たな技術を求めて鋭意研究を行い、2'-修飾ヌクレオシドを二本鎖核酸複合体に導入した。その結果、2'-修飾ヌクレオシドの導入により、二本鎖核酸複合体の中枢神経毒性を劇的に軽減又は消失させることができることを見出した。この毒性抑制効果は、従来予想を大きく超える、驚くべき効果である。本発明は上記知見に基づくものであって、以下を提供する。

[0009] (1) 第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む二本鎖核酸複合体であって、前記第1核酸鎖は、標的遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、前記標的遺伝子又はその転写産物に対してアンチセンス効果

を有し、前記第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ2'-修飾ヌクレオシドを1個以上含む、前記二本鎖核酸複合体。

(2) 前記第1核酸鎖がギャップマーである、(1)に記載の二本鎖核酸複合体。

(3) 前記第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが修飾ヌクレオシドである、(1)に記載の二本鎖核酸複合体。

(4) 前記第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシドである、(3)に記載の二本鎖核酸複合体。

(5) 前記第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドである、(4)に記載の二本鎖核酸複合体。

(6) 前記第2核酸鎖が、5'末端に位置する1個又は連続する2~10個の2'-修飾ヌクレオシド、及び/又は3'末端に位置する1個又は連続する2~10個の2'-修飾ヌクレオシドを含む、(1)~(5)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(7) 前記第2核酸鎖が、5'末端及び3'末端以外の位置に、1~7個の2'-修飾ヌクレオシドを含む、(1)~(6)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(8) 前記第1核酸鎖が、

(1)少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む中央領域、

(2)前記中央領域の5'末端側に配置された、非天然ヌクレオシドを含む5'ウイング領域、及び

(3)前記中央領域の3'末端側に配置された、非天然ヌクレオシドを含む3'ウイング領域を含む、(2)に記載の二本鎖核酸複合体。

(9) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖の5'ウイング領域及び/又は3'ウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域に2'-修飾ヌクレオシドを含む、(8)に記載の二本鎖核酸複合体。

(10) 前記第2核酸鎖において、前記第1核酸鎖の5'ウイング領域及び/又は3'ウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが

2'-修飾ヌクレオシドである、(9)に記載の二本鎖核酸複合体。

(11) 前記第2核酸鎖における前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、プリン塩基を含む全てのヌクレオシドがリボヌクレオシドである、(10)に記載の二本鎖核酸複合体。

(12) 前記第2核酸鎖における前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、ピリミジン塩基を含む全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドである、(11)に記載の二本鎖核酸複合体。

(13) 前記第2核酸鎖において、前記2'-修飾ヌクレオシドが、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド又は2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである、(12)に記載の二本鎖核酸複合体。

(14) 前記第2核酸鎖において、前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが、

(a)デオキシリボヌクレオシド、

(b)デオキシリボヌクレオシド及びリボヌクレオシド、

(c)デオキシリボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、

(d)リボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、又は

(e)デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、及び2'-修飾ヌクレオシド

である、(8)～(10)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(15) 前記第2核酸鎖において、前記第1核酸鎖の5' ウィング領域及び3' ウィング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドであり、かつ前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドである、(14)に記載の二本鎖核酸複合体。

(16) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖の前記中央領域における少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドに相補的な、少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドを含む、(8)～(10)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(17) (i)前記第1核酸鎖における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、

(ii)前記グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、

(iii)前記グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は

(iv) (i)~(iii)の任意の組み合わせ

に相補的である前記第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドである、(1)~(16)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(18) (i)前記第1核酸鎖の5'ウイング領域における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、

(ii)前記グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、

(iii)前記グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は

(iv) (i)~(iii)の任意の組み合わせ

に相補的である前記第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドである、(1)~(17)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(19) 前記第2核酸鎖において、アデニン塩基又はピリミジン塩基を含むヌクレオシドの少なくとも1個が2'-修飾ヌクレオシド及び/又はデオキシリボヌクレオシドである、(1)~(18)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(20) 前記第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの少なくとも1個が2'-修飾ヌクレオシド及び/又はデオキシリボヌクレオシドである、(1)~(19)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(21) 前記第2核酸鎖が、ピリミジン塩基を含む天然リボヌクレオシドを含まない、(1)~(20)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(22) 前記第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシド及び/又はデオキシリボヌクレオシドである、(21)に記載の二本鎖核酸複合体。

(23) 前記第2核酸鎖において、ヌクレオシドの20%以上が、2'-修飾ヌクレオシドである、(1)～(22)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(24) 前記第2核酸鎖において、2'-修飾ヌクレオシド以外の全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドである、(1)～(23)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(25) 前記第2核酸鎖において、第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドである、(1)～(24)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(26) 前記第2核酸鎖において、前記2'-修飾ヌクレオシドが、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド及び／又は2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである、(1)～(25)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(27) 前記第2核酸鎖が、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、scpBNAヌクレオシド、AmNAヌクレオシド、又はBNA-NCを少なくとも1個含む、(1)～(26)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(28) 前記第1核酸鎖がミックスマーである、(1)に記載の二本鎖核酸複合体。

(29) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を少なくとも1つ含む、(1)～(28)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(30) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に対して、非相補的塩基、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、(1)～(29)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(31) 前記第2核酸鎖が、前記非相補的塩基を1～3個含む、(30)に記載の二本鎖核酸複合体。

(32) 前記挿入配列が1～8塩基からなる、(30)又は(31)に記載の二本鎖核酸複合体。

(33) 前記欠失が連続する1～4塩基からなる、(30)～(32)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(34) 前記第2核酸鎖の前記非相補的塩基がバルジ構造を形成する、又は前記第2核酸鎖の前記欠失位置に、前記第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を含む、(30)～(33)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(35) 前記バルジ構造が糖非修飾ヌクレオシドを含む、又は前記バルジ構造において全てのヌクレオシドが糖非修飾ヌクレオシドである、(29)又は(34)に記載の二本鎖核酸複合体。

(36) 前記バルジ構造が1～10塩基長である、(29)、(34)、又は(35)に記載の二本鎖核酸複合体。

(37) 前記第2核酸鎖において、前記バルジ構造以外の全てのヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドである、(29)及び(34)～(36)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(38) 前記第2核酸鎖が少なくとも8塩基長である、(1)～(37)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(39) 前記第2核酸鎖の塩基長が第1核酸鎖の塩基長よりも短い、(1)～(38)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(40) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域の5'末端側及び／又は3'末端側に位置する少なくとも1つのオーバーハング領域を含む、(1)～(39)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(41) 前記オーバーハング領域が1～20塩基長である、(40)に記載の二本鎖核酸複合体。

(42) 前記オーバーハング領域が、少なくとも1個のデオキシリボヌクレオシド及び／又は非天然ヌクレオシドを含む、(40)又は(41)に記載の二本鎖核酸複合体。

(43) 前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖とがリンカーを介して結合している、(1)～(42)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(44) 前記リンカーが、前記第1核酸鎖の5'末端と前記第2核酸鎖の3'末端とを結合する、及び／又は前記第1核酸鎖の3'末端と前記第2核酸鎖の5'末端

とを結合する、(43)に記載の二本鎖核酸複合体。

(45) 前記リンカーが切断性 (cleavable) 又は非切断 (uncleavable) リンカーである、(43) 又は (44) に記載の二本鎖核酸複合体。

(46) 前記リンカーが、天然ヌクレオシド及び／若しくは非天然ヌクレオシドを含む核酸、又はポリエチレングリコールからなる、(43)～(45) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(47) 前記核酸からなるリンカーが2～10塩基長である、(46) に記載の二本鎖核酸複合体。

(48) 前記第2核酸鎖がリガンドに結合している、(1)～(47) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(49) 前記リガンドが、低分子、ペプチド、脂質、及び核酸アプタマーからなる群から選択されるいずれか1以上である、(48) に記載の二本鎖核酸複合体。

(50) 前記脂質がコレステロール若しくはその類縁体、又はトコフェロール若しくはその類縁体である、(49) に記載の二本鎖核酸複合体。

(51) 前記リガンドが前記第2核酸鎖の5' 末端及び／又は3' 末端に結合している、(48)～(50) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(52) リガンドと結合していない、(1)～(47) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(53) 前記第1核酸鎖及び／又は前記第2核酸鎖のヌクレオシド間結合の全部又は一部が修飾ヌクレオシド間結合である、(1)～(52) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(54) 前記修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、(53) に記載の二本鎖核酸複合体。

[0010] (55) (1)～(54) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体を有効成分として含む医薬組成物。

(56) 被検体の中枢神経系疾患を治療するための、(55) に記載の医薬組成物。

(57) 脳室内投与又は髄腔内投与される、(55)又は(56)に記載の医薬組成物。

(58) 前記髄腔内投与が後頭窩穿刺又は腰椎穿刺である、(57)に記載の医薬組成物。

(59) 前記二本鎖核酸複合体が0.1mg~200mg投与される、(57)又は(58)に記載の医薬組成物。

(60) 静脈内投与又は皮下投与される、(55)又は(56)に記載の医薬組成物。

(61) 前記二本鎖核酸複合体が0.1mg/kg~100mg/kg投与される、(60)に記載の医薬組成物。

(62) 中枢神経毒性が低減されている、(55)~(61)のいずれかに記載の医薬組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-150310号の開示内容を包含する。

## 発明の効果

[0011] 本発明によれば、中枢神経毒性が軽減した二本鎖核酸複合体が提供される。

。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、様々な架橋核酸の構造を示す。

[図2]図2は、様々な天然ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチドの構造を示す。

。

[図3]図3は、核酸剤投与後のマウスにおいて中枢神経毒性を評価するためのスコアリングシステムを示す。

[図4]図4は、実施例1で用いた核酸の構造を示す。図4Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0の構造を示す。図4Bは、HD0(all RNA)の構造を示す。図4Cは、HD0(all DNA)の構造を示す。図4Dは、HD0(6MOE wing)の構造を示す。図4Eは、HD0(all MOE)の構造を示す。

[図5]図5は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分~4時間にお

ける急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図6]図6は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図6Aは5分間の総移動距離を示す。図6Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図7]図7は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの海馬におけるMapt mRNA 発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図8]図8は、実施例2で用いた核酸の構造を示す。図8Aは、BACE1遺伝子を標的とするAS0の構造を示す。図8Bは、HD0(all RNA)の構造を示す。図8Cは、HD0(all DNA)の構造を示す。図8Dは、HD0(5MOE wing)の構造を示す。

[図9]図9は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分~4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図10]図10は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図10Aは5分間の総移動距離を示す。図10Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図11]図11は、実施例3で用いた核酸の構造を示す。図11Aは、Malat1遺伝子を標的とするAS0の構造を示す。図11Bは、HD0(all RNA)の構造を示す。図11Cは、HD0(all DNA)の構造を示す。図11Dは、HD0(10MOE wing)の構造を示す。

[図12]図12は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分~4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図13]図13は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図13Aは5分間の総移動距離を示す。図13Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図14]図14は、実施例4で用いた核酸の構造を示す。図14Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図14Bは、HD0(RNA 6MOE wing)の構造を示す。図14Cは、HD0(6MOE wing)の構造を示す。図14Dは、HD0(60

Me wing)の構造を示す。図14Eは、HD0(6F wing)の構造を示す。

[図15]図15は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図16]図16は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図16Aは5分間の総移動距離を示す。図16Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図17]図17は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後3時間における運動機能を示す。図17Aは5分間の総移動距離を示す。図17Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図18]図18は、実施例5で用いた核酸の構造を示す。図18Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0の構造を示す。図18Bは、HD0(6MOE wing)の構造を示す。図18Cは、HD0(G<sup>MOE</sup>)の構造を示す。図18Dは、HD0(G<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図18Eは、HD0(inosine)の構造を示す。

[図19]図19は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図20]図20は、実施例6で用いた核酸の構造を示す。図20Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図20Bは、HD0(6MOE-5' & 3')の構造を示す。図20Cは、HD0(6MOE-5')の構造を示す。図20Dは、HD0(6MOE-3')の構造を示す。図20Eは、HD0(10MOE-5')の構造を示す。図20Fは、HD0(10MOE-3')の構造を示す。

[図21]図21は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図22]図22は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図22Aは5分間の総移動距離を示す。図22Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図23]図23は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後3時間における運動機能を示す。図23Aは5分間の総移動距離を示す。図23Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図24]図24は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの海馬におけるMapt mRNA発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図25]図25は、実施例7で用いた核酸の構造を示す。図25Aは、BACE1遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図25Bは、HD0(5MOE-5')の構造を示す。図25Cは、HD0(5MOE-3')の構造を示す。図25Dは、HD0(8MOE-5')の構造を示す。図25Eは、HD0(8MOE-3')の構造を示す。図25Fは、HD0(10MOE-5')の構造を示す。図25Gは、HD0(10MOE-3')の構造を示す。

[図26]図26は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分~4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図27]図27は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図27Aは5分間の総移動距離を示す。図27Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図28]図28は、実施例8で用いた核酸の構造を示す。図28Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図28Bは、HD0(6MOE wing)の構造を示す。図28Cは、HD0(9MOE wing)の構造を示す。図28Dは、HD0(11MOE wing)の構造を示す。図28Eは、HD0(13MOE wing)の構造を示す。図28Fは、HD0(15MOE wing)の構造を示す。

[図29]図29は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分~4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図30]図30は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図27Aは5分間の総移動距離を示す。図27Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図31]図31は、実施例9で用いた核酸の構造を示す。図31Aは、Mapt遺伝子を

標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図31Bは、HD0(A<sup>MOE</sup>)の構造を示す。図31Cは、HD0(G<sup>MOE</sup>)の構造を示す。図31Dは、HD0(C<sup>MOE</sup>)の構造を示す。図31Eは、HD0(T<sup>MOE</sup>)の構造を示す。

[図32]図32は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図33]図33は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図33Aは5分間の総移動距離を示す。図33Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図34]図34は、実施例10で用いた核酸の構造を示す。図34Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図34Bは、HD0(C<sup>MOE</sup>)の構造を示す。図34Cは、HD0(2C<sup>MOE</sup>-5)の構造を示す。図34Dは、HD0(2C<sup>MOE</sup>-3)の構造を示す。図34Eは、HD0(3C<sup>MOE</sup>)の構造を示す。

[図35]図35は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコア (acute tolerability score) を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図36]図36は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後1時間における運動機能を示す。図36Aは5分間の総移動距離を示す。図36Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図37]図37は、各種核酸剤のヒト髄液中における安定性を示す。図37A, Bは、実施例11で用いた核酸の構造を示す。図37Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0の構造を示す。図37Bは、HD0(AS0/cRNA)の構造を示す。図37Cは、各種核酸剤をヒト髄液 (Human CSF; hCSF) と10分又は6時間混合した後、電気泳動により安定性を検討した結果を示す。図37Dは、HD0(AS0/cRNA)におけるHD0 2本鎖のバンド強度を定量した結果を示す。

[図38]図38は、各種核酸剤のヒト及びラットの髄液中における安定性を示す。図38A, Bは、実施例11で用いた核酸の構造を示す。図38Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(AS0/cRNA)の構造を示す。図38Bは、HD0(AS0/cDNA)

の構造を示す。図38Cは、各種核酸剤をヒト又はラットの髄液と6時間混合した後、電気泳動により安定性を検討した結果を示す。図38Dは、HD0(AS0/cRNA)及びHD0(AS0/cDNA)における第2核酸鎖(cRNA及びcDNA)のヒト及びラットの髄液中における安定性を示す。

[図39]図39は、各種核酸剤のマウス、ラット、サル、及びヒトの髄液中における安定性を示す。図39A, Bは、実施例12で用いた核酸の構造を示す。図39Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all RNA)の構造を示す。図39Bは、HD0(all DNA)の構造を示す。図39Cは、各種核酸剤をマウス、ラット、サル、及びヒトの髄液と6時間混合した後、電気泳動により安定性を検討した結果を示す。

[図40]図40は、各種核酸剤のマウス、ラット、サル、及びヒトの髄液中における安定性を示す。図40A, Bは、実施例12で用いた核酸の構造を示す。図40Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(cRNA 6MOE wing)の構造を示す。図40Bは、HD0(cDNA 6MOE wing)の構造を示す。図40Cは、各種核酸剤をマウス、ラット、サル、及びヒトの髄液と6時間混合した後、電気泳動により安定性を検討した結果を示す。

[図41]図41は、実施例13で用いた核酸の構造を示す。図41Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図41Bは、HD0(A<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図41Cは、HD0(G<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図41Dは、HD0(C<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図41Eは、HD0(U<sup>RNA</sup>)の構造を示す。

[図42]図42は、各種核酸剤をヒト髄液と6時間混合した後、電気泳動により安定性を検討した結果を示す。

[図43]図43は、実施例14で用いた核酸の構造を示す。図43Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図43Bは、HD0(GA<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図43Cは、HD0(CU<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図43Dは、HD0(C<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図43Eは、HD0(U<sup>RNA</sup>)の構造を示す。

[図44]図44は、各種核酸剤をヒト髄液と1時間又は6時間混合した後、電気泳動により安定性を検討した結果を示す。

[図45]図45は、実施例15で用いた核酸の構造を示す。図45Aは、Malat1遺伝子を標的とするAS0を含むHD0(all DNA)の構造を示す。図45Bは、HD0(A<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図45Cは、HD0(G<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図45Dは、HD0(C<sup>RNA</sup>)の構造を示す。図45Eは、HD0(U<sup>RNA</sup>)の構造を示す。

[図46]図46は、各種核酸剤をヒト髄液と6時間混合した後、電気泳動により安定性を検討した結果を示す。

[図47]図47は、サルにおいて核酸剤の中枢神経毒性を評価した結果を示す。図47A-Cは、実施例16で用いた核酸の構造を示す。図47Aは、Mapt遺伝子を標的とするAS0の構造を示す。図47Bは、HD0(RNA-MOE)の構造を示す。図47Cは、HD0(DNA-MOE)の構造を示す。図47Dは、実施例16においてサルに対する中枢神経毒性を評価した手順を示す。図47Eは、サルにおいて各種核酸剤の中枢神経系毒性を評価した結果を示す。

[図48]図48は、実施例17で用いる核酸の構造を示す。図48Aは、HD0(all DNA)の構造を示す。図48Bは、HD0(all MOE)の構造を示す。図48Cは、HD0(bulge1)の構造を示す。図48Dは、HD0(bulge2)の構造を示す。

[図49]図49は、各種核酸剤を導入したヒト神経芽細胞腫由来細胞におけるMapt mRNA発現レベル及びLDH活性を示す。図49Aは、相対的Mapt mRNAレベルを示す。図49Bは、上清における相対的LDH放出レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図50]図50は、実施例18で用いる核酸の構造を示す。図50Aは、HD0(bulge)の構造を示す。図50Bは、HD0(ssHD0)の構造を示す。図50Cは、PEG linker ssHD0の構造を示す。図50Dは、Bulge plus ssHD0の構造を示す。

[図51]図51は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。図51Aは5分間の総移動距離を示す。図51Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図52]図52は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの脳におけるMalat1 RNAの発現レベルを示す。図52Aは、左前頭皮質の結果を示す。図52Bは、右前頭皮質の結果を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図53]図53は、脳組織ホモジネート中で各種核酸剤を7日間インキュベートした後、電気泳動により二本鎖の解離効率を評価した結果を示す。

[図54]図54は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコアを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図55]図55は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。図55Aは5分間の総移動距離を示す。図55Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図56]図56は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコアを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図57]図57は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。図57Aは5分間の総移動距離を示す。図57Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図58]図58は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスの体重を測定した結果を示す。エラーバーは標準誤差を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図59]図59は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与1日後以降に運動機能を評価した結果を示す。

[図60]図60は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの右前頭葉におけるMapt mRNAの発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図61]図61は、脳組織ホモジネート中で各種核酸剤を7日間インキュベートした後、電気泳動により二本鎖の解離効率を評価した結果を示す。

[図62]図62は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスの投与後30分～4時間における急性期忍容性スコアを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図63]図63は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。図63Aは5分間の総移動距離を示す。図63Bは最大移動速度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図64]図64は、各種核酸剤を導入したマウス神経芽細胞腫由来細胞（Neuro2a細胞株）におけるLDH活性及びBace1 mRNA発現レベルを示す。図64Aは、上清における相対的LDH放出レベルを示す。図64Bは、相対的Bace1 mRNAレベルを

示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図65]図65は、修正FOBスコアの評価方法を示す。

[図66]図66は、各種核酸剤を髄腔内投与したサルを対象として修正FOBスコアを評価した結果を示す。

[図67]図67は、各種核酸剤を髄腔内投与したサルを対象として3分間のビデオ動画によって自発的運動時間及びジャンプ回数を測定した結果を示す。

## 発明を実施するための形態

### [0013] 1. 二本鎖核酸複合体

#### 1-1. 概要

本発明の第1態様は二本鎖核酸複合体である。本発明の二本鎖核酸複合体は第1核酸鎖及び第2核酸鎖を含み、2'-修飾ヌクレオシドを1個以上含む。本発明の二本鎖核酸複合体は、ヒトを含む霊長類の髄液中で安定であり、中枢神経毒性等の毒性が低減されている。

### [0014] 1-2. 用語の定義

本明細書において、標的遺伝子の「転写産物」とは、本発明の核酸複合体の直接的な標的となり、かつRNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAをいう。具体的には、標的遺伝子から転写されるmRNA（成熟mRNA、mRNA前駆体、塩基修飾を受けていないmRNA等を含む）、miRNA等のノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)、ロングノンコーディングRNA(lncRNA)、ナチュラルアンチセンスRNAを含み得る。

[0015] 本明細書において「標的遺伝子」とは、本発明の二本鎖核酸複合体のアンチセンス効果により、その転写産物又は翻訳産物の発現量が抑制若しくは亢進され得る、その転写産物又は翻訳産物の機能が阻害され得る、又はステリックブロッキング、スプライシングスイッチ、RNA編集、エクソンスキッピング若しくはエクソンインクルージョンが誘導され得る遺伝子である。標的遺伝子の種類は、生体内で発現する限り特に限定されないが、例えば、本発明に係る二本鎖核酸複合体を導入する生物由来の遺伝子、例えば、様々な疾患において、その発現が増加する遺伝子が挙げられる。例えば、スカベンジャ

一受容体B1(scavenger receptor B1 : 本明細書では、しばしば「SR-B1」と表記する) 遺伝子、転移関連肺腺癌転写産物1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 : 本明細書では、しばしば「Malat1」と表記する) 遺伝子、微小管結合タンパク質タウ (microtubule-associated protein tau : 本明細書では、しばしば「Mapt」と表記する) 遺伝子、 $\beta$ -セクレターゼ1(beta-secretase 1 : 本明細書では、しばしば「BACE1」と表記する) 遺伝子、DMPK(dystrophia myotonica-protein kinase) 遺伝子、及びジストロフィン遺伝子等が挙げられる。

[0016] 本明細書において「標的転写産物」とは、本発明の核酸複合体の直接的な標的となり、かつRNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAをいう。一般的には「標的遺伝子の転写産物」が該当する。具体的には、標的遺伝子から転写されるmRNA (成熟mRNA、mRNA前駆体、塩基修飾を受けていないmRNA等を含む)、miRNA等のノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)、ロングノンコーディングRNA (lncRNA)、ナチュラルアンチセンスRNAを含み得る。標的遺伝子の転写産物として、例えば、SR-B1遺伝子の転写産物であるSR-B1 mRNA、Mapt遺伝子の転写産物であるMapt mRNA、BACE1遺伝子の転写産物であるBACE1 mRNA、Malat1遺伝子の転写産物であるMalat1ノンコーディングRNA、DMPK遺伝子の転写産物であるDMPK mRNA、及びジストロフィン遺伝子の転写産物であるジストロフィン mRNA又はその前駆体 (pre-mRNA) が挙げられる。

[0017] 標的転写産物の具体例として、Dystrophin pre-mRNA(GenBankアクセッション番号:NC\_000086.7)のエクソン23/イントロン23境界領域、例えば83803482位~83803566位、例えば83803512位~83803536位が挙げられる。標的転写産物の別の具体例として、配列番号7にマウスDMPK mRNAの塩基配列を、配列番号8にヒトDMPK mRNAの塩基配列を示す。なお、配列番号7~8は、いずれもmRNAの塩基配列をDNAの塩基配列に置き換えている。これらの遺伝子及び転写産物の塩基配列情報は、例えばNCBI(米国国立生物工学情報センター)データベース等の公知のデータベースから入手できる。

[0018] 本明細書において「アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)」又は「アン

「アンチセンス核酸」とは、標的転写産物(主として標的遺伝子の転写産物)の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な(すなわち、相補的な)塩基配列を含み、標的転写産物にアンチセンス効果をもたらすことができる、一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。本発明の二本鎖核酸複合体では、第1核酸鎖がASOとして機能し、その標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、又は他のいずれの核酸領域を含んでいてもよい。標的転写産物の標的領域は、少なくとも8塩基長、例えば、10~35塩基長、12~25塩基長、13~20塩基長、14~19塩基長、若しくは15~18塩基長、又は13~22塩基長、16~22塩基長、若しくは16~20塩基長とすることができる。

[0019] 「アンチセンス効果」とは、ASOが標的転写産物(例えばRNAセンス鎖)にハイブリダイズすることによって、その標的転写産物にもたらされる発現又は編集を調節する効果をいう。「標的転写産物の発現又は編集を調節する」とは、標的遺伝子の発現又は標的転写産物の発現量(本明細書では、「標的転写産物の発現量」をしばしば「標的転写産物のレベル」と表記する)の抑制又は低下、翻訳の阻害、RNA編集、スプライシング機能改変効果(例えばスプライシングスイッチ、エクソンインクルージョン、エクソンスキッピング等)、又は転写産物の分解をいう。例えば、標的遺伝子の転写後阻害では、ASOとしてRNAオリゴヌクレオチドが細胞に導入されると、ASOは標的遺伝子の転写産物であるmRNAとアニーリングによって部分的二本鎖を形成する。この部分的二本鎖はリボソームによる翻訳を妨げるためのカバーとしての役割を果たし、それによって標的遺伝子にコードされた標的タンパク質の発現が翻訳レベルで阻害される(ステリックブロッキング)。一方、ASOとしてDNAを含むオリゴヌクレオチドが細胞に導入されると、部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖構造がRNase Hによって認識される結果、標的遺伝子のmRNAが分解され、標的遺伝子にコードされたタンパク質の発現が発現レベルで阻害される。さらに、アンチセンス効果は、mRNA前駆体におけるイントロンを標的としてももたらされ得る。さらに、アンチセンス効果は

、miRNAを標的としてももたらされ得る。この場合、そのmiRNAの機能阻害により、当該miRNAが通常発現を制御している遺伝子の発現が増加し得る。一実施形態で、標的転写産物の発現調節は、標的転写産物量の低下であってもよい。

[0020] アンチセンス効果の測定は、例えば、被験核酸化合物を被検体(例えばマウス)に投与し、例えば数日後(例えば2~7日後)に、被験核酸化合物によって提供されるアンチセンス効果により発現が調節される標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベル(量)(例えば、mRNA量若しくはマイクロRNA等のRNA量、cDNA量、タンパク質量等)を測定することによって、実施することができる。

[0021] 例えば、測定された標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベルが、陰性対照(例えばビヒクル投与)と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、又は少なくとも40%減少している場合に、被験核酸化合物がアンチセンス効果(例えば、標的転写産物量の低下)をもたらし得ることが示される。

[0022] 核酸鎖における非天然ヌクレオチドの数、種類及び位置は、核酸複合体によって提供されるアンチセンス効果等に影響を及ぼし得る。修飾の選択は、標的遺伝子等の配列によって異なり得るが、当業者であれば、アンチセンス法に関連する文献(例えば、WO 2007/143315、WO 2008/043753、及びWO 2008/049085)の説明を参照することによって好適な実施形態を決定することができる。さらに、修飾後の核酸複合体が有するアンチセンス効果が測定される場合、このようにして得られた測定値が修飾前の核酸複合体の測定値と比較して有意に低くない場合(例えば、修飾後に得られた測定値が、修飾前の核酸複合体の測定値の70%以上、80%以上又は90%以上である場合)、関連修飾を評価することができる。

[0023] 本明細書において「標的遺伝子の翻訳産物」とは、本発明の核酸複合体の直接的な標的となる前記標的転写産物又は標的遺伝子の転写産物の翻訳によって合成される任意のポリペプチド又はタンパク質をいう。

[0024] 本明細書において、「アプタマー」とは、細胞内、細胞膜上、又は細胞外

、例えば細胞膜上又は細胞外の特定の標的分子と特異的に結合する核酸分子をいう。アプタマーは、当該分野で公知の方法、例えば、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法を用いた試験管内選別法により作製することができる。

[0025] 本明細書において、「デコイ」とは、転写因子（例えばNF- $\kappa$ B）の結合部位の配列又は類似の配列を有する核酸を指し、これらを「おとり」として細胞内に導入することによって転写因子の作用を抑制（転写活性化因子であれば転写を抑制、転写抑制因子であれば転写を促進）するものをいう。デコイ核酸は、標的となる転写因子の結合配列の情報に基づいて容易に設計することができる。

[0026] 本明細書において、「bait(ベイト)」とは、細胞内で特定の標的分子と特異的に結合する核酸分子であって、標的分子の機能を修飾するものをいう。baitと相互作用する標的を、「prey(プレイ)」ともいう。

[0027] 本明細書中で使用される用語「核酸」又は「核酸分子」は、モノマーのヌクレオチド又はヌクレオシドを指してもよいし、複数のモノマーからなるオリゴヌクレオチドを意味してもよく、またポリマーであればポリヌクレオチドを意味する。「天然核酸」とは、自然界に存在する核酸をいう。天然核酸には後述の天然ヌクレオシドや天然ヌクレオチド等が含まれる。「非天然核酸」又は「人工核酸」とは、天然核酸以外の任意の核酸を指す。非天然核酸又は人工核酸には、後述の非天然ヌクレオシドや非天然ヌクレオチド等が含まれる。

[0028] 本明細書において「核酸鎖」又は単なる「鎖」とは、ヌクレオシド間結合によって連結された2以上のヌクレオシドを意味し、例えばオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであってもよい。核酸鎖は、例えば自動合成装置を使用した化学的合成法により、又はポリメラーゼ、リガーゼ、又は制限反応による酵素的工程により全長鎖又は部分鎖を作製することができる。核酸鎖は、天然ヌクレオチド及び／又は非天然ヌクレオチドを含み得る。

[0029] 「ヌクレオシド」とは、一般に塩基及び糖の組み合わせからなる分子をい

う。ヌクレオシドの糖部分は、限定はしないが、通常、ペントフラノシル糖で構成され、その具体例としてリボースやデオキシリボースが挙げられる。ヌクレオシドの塩基部分（核酸塩基）は、通常は、複素環式塩基部分である。限定はしないが、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシルや、それ以外の修飾核酸塩基（修飾塩基）が挙げられる。

[0030] 「ヌクレオチド」とは、前記ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。ペントフラノシル糖を含むヌクレオチドの場合、通常、糖の2'位、3'位、又は5'位のヒドロキシル基にリン酸基が連結されている。

[0031] 「オリゴヌクレオチド」とは、隣接するヌクレオチド間で糖部分のヒドロキシル基とリン酸基が共有結合によって数個～数十個連結することによって形成される直鎖状のオリゴマーをいう。また「ポリヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチドよりも多数のヌクレオチドが前記共有結合によって数十個以上、好ましくは数百個以上連結することによって形成される直鎖状のポリマーをいう。オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構造の内部で、リン酸基は、一般にヌクレオシド間結合を形成するとみなされる。

[0032] 本明細書において「天然ヌクレオシド」とは、自然界に存在するヌクレオシドをいう。例えば、リボースと前記アデニン、シトシン、グアニン、又はウラシル等の塩基からなるリボヌクレオシドや、デオキシリボースと前記アデニン、シトシン、グアニン、又はチミン等の塩基からなるデオキシリボヌクレオシドが挙げられる。なお、RNA中に見られるリボヌクレオシド、及びDNA中に見られるデオキシリボヌクレオシドを、本明細書では、しばしば、それぞれ「DNAヌクレオシド」及び「RNAヌクレオシド」と称する。

[0033] 本明細書において「天然ヌクレオチド」とは、自然界に存在するヌクレオチドで、前記天然ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。例えば、リボヌクレオシドにリン酸基が結合した、RNAの構成単位として知られるリボヌクレオチド、及びデオキシリボヌクレオシドにリン酸基が結合した、DNAの構成単位として知られるデオキシリボヌクレオチドが挙げられる。

- [0034] 本明細書において「非天然ヌクレオチド」とは、天然ヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドを指し、修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド模倣体を含む。本明細書において「修飾ヌクレオチド」とは、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、及び修飾核酸塩基のいずれか1つ以上を有するヌクレオチドを意味する。ここでいう「ヌクレオチド模倣体」とは、オリゴマー化合物の一以上の位置において、ヌクレオシド及び結合を置換するために使用される構造体を含む。ヌクレオチド模倣体としては、例えば、ペプチド核酸又はモルホリノ核酸(-N(H)-C(=O)-O-又は他の非ホスホジエステル結合によって結合されるモルホリノ)が挙げられる。ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid、PNA)は、糖の代わりにN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合した主鎖を有するヌクレオチド模倣体である。本明細書において非天然オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増加、又は阻害活性の増加等の望ましい特性を有する。したがって、天然ヌクレオチドよりも好ましい。
- [0035] 本明細書において「非天然ヌクレオシド」とは、天然ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドをいう。例えば、修飾ヌクレオシド及びヌクレオシド模倣体を含む。本明細書において「修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分及び／又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。
- [0036] 本明細書において「模倣体」とは、糖、核酸塩基、及び／又はヌクレオシド間結合を置換する官能基を指す。一般に、模倣体は、糖又は糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせの代わりに使用され、核酸塩基は、選択される標的に対するハイブリダイゼーションのために維持される。ここでいう「ヌクレオシド模倣体」とは、オリゴマー化合物の一以上の位置において糖を置換するために、又は糖及び塩基を置換するために、又はオリゴマー化合物を構成するモノマーサブユニット間の結合等を置換するために使用される構造体を含む。「オリゴマー化合物」とは、核酸分子のある領域に少なくともハイブリダイズ可能な連結したモノマーサブユニットのポリマーを意味する。ヌク

レオシド模倣体としては、例えば、モルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、二環式又は三環式糖模倣体、例えば、非フラノース糖単位を有するヌクレオシド模倣体が挙げられる。

[0037] 「修飾糖」とは、天然糖部分(すなわち、DNA(2'-H)又はRNA(2'-OH)中に認められる糖部分)からの置換及び/又は任意の変化を有する糖を指し、「糖修飾」とは、天然糖部分からの置換及び/又は任意の変化をいう。核酸鎖は、場合により、修飾糖を含む1つ以上の修飾ヌクレオシドを含んでもよい。「糖修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分を有するヌクレオシドをいう。かかる糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の強化、結合親和性の増加、又は他の何らかの有益な生物学的特性を核酸鎖に付与し得る。特定の実施形態では、ヌクレオシドは、化学修飾リボフラノース環部分を含む。化学修飾リボフラノース環の例としては、限定するものではないが、置換基(5'及び2'置換基を含む)の付加、非ジェミナル環原子の架橋形成による二環式核酸(架橋核酸、BNA)の形成、リボシル環酸素原子のS、N(R)、又はC(R1)(R2)(R、R1及びR2は、それぞれ独立して、H、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>アルキル、又は保護基を表す)での置換、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

[0038] 糖修飾ヌクレオシドの例としては、限定するものではないが、5'-ビニル、5'-メチル(R又はS)、5'-アリル(R又はS)、4'-S、2'-F(2'-フルオロ基)、2'-OCH<sub>3</sub>(2'-O-Me基若しくは2'-O-メチル基)、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル](2'-O-MCE基)、及び2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE若しくは2-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、-O-アリル、-O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル、-OCF<sub>3</sub>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(Rm)(Rn)、及びO-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(Rm)(Rn)から選択することができ、各Rm及びRnは、独立して、H又は置換若しくは非置換C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキルである。「2'-修飾糖」は、2'位で修飾されたフラノシル糖を意味する。2'-修飾糖を含むヌクレオシドを「2'-修飾ヌクレオシド」又は「2'-糖修飾ヌクレオシド」と称することもある。

[0039] 「二環式ヌクレオシド」は、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す

。二環式糖部分を含む核酸は、一般に架橋核酸(bridged nucleic acid、BNA)と称される。二環式糖部分を含むヌクレオシドは、「架橋ヌクレオシド」、「架橋型の非天然ヌクレオシド」、又は「BNAヌクレオシド」と称することもある。図1に架橋核酸を一部例示する。

[0040] 二環式糖は、2'位の炭素原子及び4'位の炭素原子が2つ以上の原子によって架橋されている糖であってよい。二環式糖の例は当業者に公知である。二環式糖を含む核酸(BNA)又はBNAヌクレオシドの1つのサブグループは、 $4'-(\text{CH}_2)_p-0-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p-\text{CH}_2-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p-\text{S}-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p-\text{OCO}-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{R}_3)-0-(\text{CH}_2)_m-2'$  [式中、 $p$ 、 $m$ 及び $n$ は、それぞれ1~4の整数、 $0$ ~ $2$ の整数、及び1~3の整数を表し；また $\text{R}_3$ は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及びユニット置換基(蛍光若しくは化学発光標識分子、核酸切断活性を有する機能性基、細胞内又は核内局在化シグナルペプチド等)を表す]により架橋された2'位の炭素原子と4'位の炭素原子を有すると説明することができる。さらに、特定の実施形態によるBNA又はBNAヌクレオシドに関し、3'位の炭素原子上の $\text{O}\text{R}_2$ 置換基及び5'位の炭素原子上の $\text{O}\text{R}_1$ 置換基において、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は、典型的には水素原子であるが、互いに同一であっても異なってもよく、さらにまた、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基によって保護されているリン酸基、又は $\text{P}(\text{R}_4)\text{R}_5$  [ここで、 $\text{R}_4$ 及び $\text{R}_5$ は、互いに同一であっても異なってもよく、それぞれヒドロキシル基、核酸合成のための保護基によって保護されているヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基によって保護されているメルカプト基、アミノ基、1~5個の炭素原子を有するアルコキシ基、1~5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、1~6個の炭素原子を有するシアノアルコキシ基、又は1~5個の炭素原子を有するアルキル基で置換されているアミノ基を表す]であってもよい。このようなBNAの非限定的な例としては、メチレンオキシ( $4'-\text{CH}_2-0-2'$ )BNA(LNA(Locked Nucleic Acid(登録

商標)、2',4'-BNAとしても知られている)(例えば、 $\alpha$ -L-メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNA若しくは $\beta$ -D-メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNA)、エチレンオキシ(4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2')BNA(ENAとしても知られている)、 $\beta$ -D-チオ(4'-CH<sub>2</sub>-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R<sub>3</sub>)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-2')BNA(2',4'-BNA<sup>NC</sup>としても知られている; R=Hは2',4'-BNA<sup>NC</sup>[N-H]、R=Meは2',4'-BNA<sup>NC</sup>[N-Me])、2',4'-BNA<sup>COO</sup>、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2')BNA(cEt BNAとしても知られている)、(4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2')BNA(cMOE BNAとしても知られている)、アミドBNA(アミド架橋型核酸)若しくは(4'-C(O)-N(R)-2')BNA(R=H、Me)(AmNAとしても知られている; 図1のR=HはAmNA[N-H]、R=MeはAmNA[N-Me]))、グアニジンBNA(GuNA(例、図1のR=HはGuNA[N-H]、R=MeはGuNA[N-Me]))としても知られる)、アミンBNA(2'-Amino-LNAとしても知られている)(例、3-(Bis(3-アミノプロピル)アミノ)プロパノイル置換体)、2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸(scPbNAとしても知られている)及び当業者に公知の他のBNAが挙げられる。このようなBNAヌクレオシドの非限定的な例としては、メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNAヌクレオシド(LNAヌクレオシド、2',4'-BNAヌクレオシドとしても知られている)(例、 $\alpha$ -L-メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNAヌクレオシド、 $\beta$ -D-メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNAヌクレオシド)、エチレンオキシ(4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2')BNAヌクレオシド(ENAヌクレオシドとしても知られている)、 $\beta$ -D-チオ(4'-CH<sub>2</sub>-S-2')BNAヌクレオシド、アミノオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R<sub>3</sub>)-2')BNAヌクレオシド、オキシアミノ(4'-CH<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-2')BNAヌクレオシド(2',4'-BNA<sup>NC</sup>ヌクレオシドとしても知られている; R=Hは2',4'-BNA<sup>NC</sup>[N-H]ヌクレオシド、R=Meは2',4'-BNA<sup>NC</sup>[N-Me]ヌクレオシド)、2',4'-BNA<sup>COO</sup>ヌクレオシド、3'-アミノ-2',4'-BNAヌクレオシド、5'-メチルBNAヌクレオシド、(4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2')BNAヌクレオシド(cEtヌクレオシドとしても知られている)、(4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2')BNAヌクレオシド(cMOEヌクレオシドとしても知られている)、アミドBNAヌクレオシド若しくは(4'-C(O)-N(R)-2')BNAヌクレオシド(R=H、Me)(AmNAヌクレオシドとしても知られている; 図1のR=HはAmNA[N-H]ヌクレオシド、R=MeはAmNA[N-Me]ヌクレオシド))、グアニ

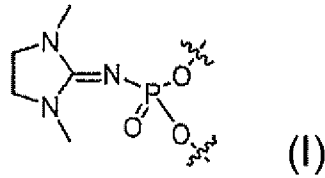
ジンBNAヌクレオシド(GuNAヌクレオシド(例、図1のR=HはGuNA[N-H]ヌクレオシド、R=MeはGuNA[N-Me]ヌクレオシド)としても知られる)、アミンBNAヌクレオシド(2'-Amino-LNAヌクレオシドとしても知られている)(例、3-(Bis(3-アミノプロピル)アミノ)プロパノイル置換ヌクレオシド)、2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋ヌクレオシド(scxBNAヌクレオシドとしても知られている)及び当業者に公知の他のBNAヌクレオシドが挙げられる。

[0041] 本明細書において、「カチオン性ヌクレオシド」は、あるpH(例えば、ヒトの生理学的pH(約7.4)、送達部位(例えば、オルガネラ、細胞、組織、臓器、生物体等)のpH等)において、中性形態(リボヌクレオシドの中性形態等)と比較して、カチオン形態として存在する修飾ヌクレオシドである。カチオン性ヌクレオシドはヌクレオシドの任意の位置に1つ以上のカチオン性修飾基を含んでもよい。一実施形態では、カチオン性ヌクレオシドは、2'-Amino-LNAヌクレオシド(例、3-(Bis(3-アミノプロピル)アミノ)プロパノイル置換ヌクレオシド)、アミノアルキル修飾ヌクレオシド(例、2'-O-メチル及び4'-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>置換ヌクレオシド)、GuNAヌクレオシド(例、図3のR=HはGuNA[N-H]ヌクレオシド、R=MeはGuNA[N-Me]ヌクレオシド)等である。メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')架橋を有する二環式ヌクレオシドを、LNAヌクレオシドと称することもある。

[0042] 本明細書において「修飾ヌクレオシド間結合」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合(すなわち、ホスホジエステル結合)からの置換又は任意の変化を有するヌクレオシド間結合を指す。修飾ヌクレオシド間結合には、リン原子を含むヌクレオシド間結合、及びリン原子を含まないヌクレオシド間結合が含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホトリエステル結合(米国特許登録番号5,955,599記載のメチルホスホトリエステル結合、エチルホスホトリエステル結合)、アルキルホスホネート結合(例、米国特許登録番号5,264,423及び5,286,717記載のメチルホスホネート結合、国際公開第2015/168172号記載のメトキシプロピルホスホネート結合)、ア

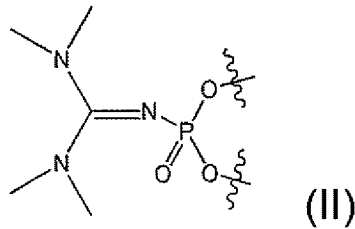
ルキルチオホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、環状グアニジン部分を含むヌクレオシド間結合（例、以下の式(I)で表される部分構造：

[化1]



）、1～4個のC<sub>1~6</sub>のアルキル基で置換されたグアニジン部分（例えば、テトラメチルグアニジン（TMG）部分）を含むヌクレオシド間結合（例、以下の式(II)で表される部分構造：

[化2]



）、国際公開第2016/081600号記載の自己中和核酸(ZON)に用いられるヌクレオシド間結合及びホスホロアミデート結合が挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロチオエート結合は、ホスホジエステル結合の非架橋酸素原子を硫黄原子に置換したヌクレオシド間結合を指す。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は周知である。修飾ヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性が天然に存在するヌクレオシド間結合よりも高い結合であることが好ましい。

[0043] ヌクレオシド間結合がキラル中心を有する場合、ヌクレオシド間結合はキラル制御されたものであってもよい。「キラル制御された」とは、キラル中心、例えばキラル結合リンに関して単一のジアステレオマーで存在することを意図する。キラル制御されたヌクレオシド間結合は、完全にキラル純粋なものであってもよいし、キラル純度が高いもの、例えば90%de、95%de、98

%de、99%de、99.5%de、99.8%de、99.9%de、又はそれ以上のキラル純度を有するものであってよい。本明細書において「キラル純度」は、ジアステレオマーの混合物中の1つのジアステレオマーの割合を指し、ジアステレオマー過剰率(%de)として表され、(対象のジアステレオマー—その他のジアステレオマー)/(総ジアステレオマー)×100(%)として定義される。

[0044] 例えば、ヌクレオシド間結合は、Rp配置又はSp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合、1～4個のC<sub>1~6</sub>のアルキル基で置換されたグアニジン部分(例えば、テトラメチルグアニジン(TMG)部分;例えばAlexander A. Lomzov et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2019, 513(4), 807-811を参照のこと)を含むヌクレオシド間結合、及び/又は環状グアニジン部分を含むヌクレオシド間結合であってよい。キラル制御されたヌクレオシド間結合の調製方法は公知であり、例えばRp配置又はSp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合は、Naoki Iwamoto et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009, 48(3), 496-9、Natsuhisa Oka et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8307-8317、Natsuhisa Oka et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16031-16037、Yohei Nukaga et al., *J. Org. Chem.* 2016, 81, 2753-2762、Yohei Nukaga et al., *J. Org. Chem.* 2012, 77, 7913-7922に記載の方法に従って合成することができる。Rp配置又はSp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合も公知であり、例えばNaoki Iwamoto et al., *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35(9), 845-851、Anastasia Khvorova et al., *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35(3), 238-248に記載されるような効果を奏することが知られている。例えば、一実施形態において、Sp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合は、Rp配置のものよりも安定であり、及び/又はSp配置にキラル制御されたAS0は、RNase H1による標的RNA切断を促進し、生体内でより持続的な応答をもたらす。1～4個のC<sub>1~6</sub>のアルキル基で置換されたグアニジン部分(例えば、TMG部分)を含むヌクレオシド間結合の調製方法は公知であり、例えばAlexander A. Lomzov et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2019, 513(4), 807-811に記載の方法に従って合成することができる。

[0045] 本明細書中で使用される用語「核酸塩基」又は「塩基」とは、核酸を構成する塩基成分(複素環部分)であって、主としてアデニン、グアニン、シトシン、チミン、及びウラシルが知られる。本明細書において「核酸塩基」又は「塩基」は、特に断りのない場合、修飾又は非修飾の核酸塩基(塩基)のいずれをも包含する。したがって、特に断りのない場合、プリン塩基は修飾又は非修飾のプリン塩基のいずれであってもよい。また、特に断りのない場合、ピリミジン塩基は修飾又は非修飾のピリミジン塩基のいずれであってもよい。

[0046] 「修飾核酸塩基」又は「修飾塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシル以外のあらゆる核酸塩基を意味する。「非修飾核酸塩基」又は「非修飾塩基」(天然核酸塩基)とは、プリン塩基であるアデニン(A)及びグアニン(G)、並びにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)、及びウラシル(U)を意味する。修飾核酸塩基の例としては、ヒポキサンチン、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシン又はN4-メチルシトシン；N6-メチルアデニン又は8-ブロモアデニン；2-チオ-チミン；並びにN2-メチルグアニン又は8-ブロモグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。修飾核酸塩基は、好ましくは、5-メチルシトシンである。

[0047] 本明細書中で使用される用語「相補的」とは、核酸塩基が水素結合を介して、いわゆるワトソン-クリック塩基対(天然型塩基対)又は非ワトソン-クリック塩基対(フーグスティーン型塩基対等)を形成し得る関係を意味する。本発明において、第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、標的転写産物(例えば、標的遺伝子の転写産物)の少なくとも一部と完全に相補的であることは必ずしも必要ではなく、塩基配列が少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)の相補性を有していれば許容される。第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、塩基配列が相補的である場合に(典型的には、塩基配列が標的転写産物の少なくとも一部の塩基配列に

相補的である場合に)、標的転写産物にハイブリダイズすることができる。同様に、第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖の少なくとも一部と完全に相補的であることは必ずしも必要ではなく、塩基配列が少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)の相補性を有していれば許容される。第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖の少なくとも一部と塩基配列が相補的である場合に、アニールすることができる。塩基配列の相補性は、BLASTプログラム等を使用することによって決定することができる。当業者であれば、鎖間の相補度を考慮して、2本の鎖がアニール又はハイブリダイズし得る条件(温度、塩濃度等)を容易に決定することができる。またさらに、当業者であれば、例えば標的遺伝子の塩基配列の情報に基づいて、標的転写産物に相補的なアンチセンス核酸を容易に設計することができる。

[0048] ハイブリダイゼーション条件は、例えば、低ストリンジェントな条件及び高ストリンジェントな条件等の様々なストリンジェントな条件であってもよい。低ストリンジェントな条件は、比較的低温で、かつ高塩濃度の条件、例えば、30℃、2×SSC、0.1%SDSであってよい。高ストリンジェントな条件は、比較的高温で、かつ低塩濃度の条件、例えば、65℃、0.1×SSC、0.1%SDSであってよい。温度及び塩濃度等の条件を変えることによって、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを調整できる。ここで、1×SSCは、150mM塩化ナトリウム及び15mMクエン酸ナトリウムを含む。

[0049] 本明細書において「毒性」とは、例えば、死、痛み、振戦、けいれん、運動障害、認知機能障害、意識障害、全身倦怠感、疲労感、嘔気、嘔吐、めまい、しびれ、ふらつきなど、被検体に好ましくない他覚的若しくは自覚的症狀又は機能異常を引き起こす作用をいう。毒性は、いずれかの臓器での毒性であってもよい。毒性は、神経毒性であってもよい。

[0050] 本明細書において「神経毒性」とは、中枢神経組織及び末梢神経組織を含む神経組織に損傷を引き起こし、神経系の正常な活動を妨げる作用を指す。神経毒性は、死亡、呼吸異常、心血管異常、頭痛、嘔気もしくは嘔吐、無反

応もしくは低反応、意識障害、精神障害、性格変化、幻覚、妄想、認知機能障害、姿勢異常、不随意運動、震え、けいれん、活動過剰運動機能障害、麻痺、感覚障害または自律神経機能障害から選択される症状を引き起こし得る。神経毒性は、急性神経毒性であってもよい。急性神経毒性は、投与から1、3、6、9、12、24または48時間以内に生じる神経毒性であり得る。毒性は、例えば、後述の実施例に記載するように、急性期忍容性スコア、副作用イベント率または死亡率などによって評価することができる。

[0051] 本明細書において「中枢神経毒性」とは、神経組織のうち少なくとも中枢神経組織に損傷を引き起こし、神経系の正常な活動を妨げる作用をいう。

[0052] 本明細書で「被検体」とは、本発明の二本鎖核酸複合体又は医薬組成物を適用する対象をいう。被検体は、個体の他、器官、組織、及び細胞を含む。被検体が個体の場合、ヒトを含むあらゆる動物が該当し得る。例えば、ヒト以外では、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物等が挙げられる。限定はしないが、被検体は、標的転写産物の発現量を減少させる必要がある個体や、疾患の治療又は予防が必要な個体であってもよい。

[0053] 1 - 3. 構成

本発明の二本鎖核酸複合体は、第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む。各核酸鎖の具体的な構成を以下に示す。

[0054] 本発明の二本鎖核酸複合体において、第1核酸鎖は、標的遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、標的遺伝子又はその転写産物に対してアンチセンス効果を有し、第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、2'-修飾ヌクレオシドを1個以上含む。

[0055] 第2核酸鎖に含まれる、2'-修飾ヌクレオシドの数は少なくとも1個であり、第2核酸鎖を構成する全てのヌクレオシドの数（すなわち、第2核酸鎖の塩基長）以下である。第2核酸鎖に含まれる、2'-修飾ヌクレオシドの具体的な数は、例えば2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、又は10個以上であってもよく、30個以下、25個以下、20個以下、15個以下、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4

個以下、3個以下、又は2個以下であってもよい。例えば、第2核酸鎖において2'-修飾ヌクレオシドの数は、1~30個、1~25個、1~24個、1~23個、1~22個、1~21個、1~20個、1~19個、1~18個、1~17個、1~16個、1~15個、1~14個、1~13個、1~12個、1~11個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、又は1~6個であってもよい。例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個であってもよい。

[0056] 一実施形態において、第2核酸鎖中のヌクレオシドの1%以上、2%以上、3%以上、4%以上、5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、若しくは99%以上、かつ/又は100%以下、95%以下、90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、若しくは5%以下が2'-修飾ヌクレオシドである。例えば、10%~90%、20%~80%、30%~70%、又は40%~60%が2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0057] 第2核酸鎖に含まれる2'-修飾ヌクレオシド以外のヌクレオシドは、天然ヌクレオシド、架橋型ヌクレオシド等の非天然ヌクレオシド、又はその任意の組合せであってもよい。第2核酸鎖に含まれる2'-修飾ヌクレオシド以外のヌクレオシドの数は、限定しないが、例えば、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、又は10個以上であってもよく、例えば1~40個、1~30個、1~20個、1~15個、1~12個、1~10個、1~8個、又は1~6個であり、例えば1~5個、例えば1個、2個、3個、4個、又は5個であってもよい。

[0058] 一実施形態において、第2核酸鎖は、2'-修飾ヌクレオシドを1個含む。別の実施形態では、第2核酸鎖を構成するヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシドである。例えば、第2核酸鎖において、第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。さ

らなる実施形態において、第2核酸鎖は、2'-修飾ヌクレオシドを1個以上全部未満含む。本明細書において、第2核酸鎖が2'-修飾ヌクレオシドを「全部未満含む」とは、第2核酸鎖が2'-修飾ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドを少なくとも1個含むことをいう。

[0059] 一実施形態において、第2核酸鎖は、5'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む。本明細書において「連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む」とは、任意のヌクレオシド間結合で連結された複数の2'-修飾ヌクレオシドを含むことを意味する。例えば、第2核酸鎖は、5'末端に位置する1個、又は連続する2~12個、2~10個、2~8個、2~6個、2~5個、2~4個、若しくは2~3個、例えば2個、3個、若しくは4個の2'-修飾ヌクレオシドを含んでもよい。

[0060] 一実施形態において、第2核酸鎖は、3'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む。例えば、第2核酸鎖は、3'末端に位置する1個、又は連続する2~12個、2~10個、2~8個、2~6個、2~5個、2~4個、若しくは2~3個、例えば2個、3個、若しくは4個の2'-修飾ヌクレオシドを含んでもよい。

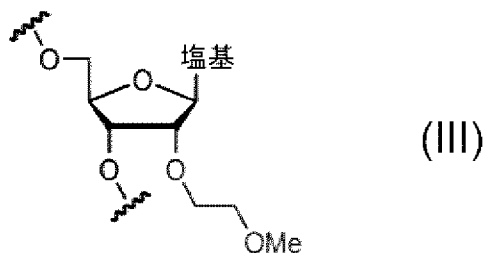
[0061] さらなる実施形態では、第2核酸鎖は、5'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシド、及び3'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む。

[0062] 一実施形態において、第2核酸鎖は、5'末端及び3'末端以外の位置に2'-修飾ヌクレオシドを含む。本明細書において、第2核酸鎖が「5'末端及び3'末端以外の位置に2'-修飾ヌクレオシドを含む」とは、上述の5'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシド、及び3'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシド以外の位置に2'-修飾ヌクレオシドを含むことを意味する。例えば、第2核酸鎖は、5'末端及び3'末端以外の位置に1~30個、1~25個、1~20個、1~15個、1~12個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、又は1~3個、例えば1個又は2個の2'-修飾ヌクレオシドを含む。

[0063] 一実施形態において、第2核酸鎖は、2'-修飾ヌクレオシド以外のヌクレオシドを1個以上含む。さらなる実施形態では、第2核酸鎖において（例えば、第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域において）2'-修飾ヌクレオシド以外のヌクレオシドの全てがデオキシリボヌクレオシドであり得る。

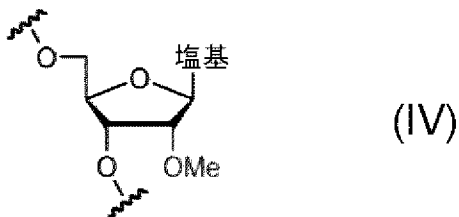
[0064] 一実施形態において、2'-修飾ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド及び／又は2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである。2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドは、以下の式（III）：

[化3]



で示される。また、2'-O-メチル修飾ヌクレオシドは、以下の式（IV）：

[化4]



で示される。一実施形態において、2'-修飾ヌクレオシドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである。より好ましい実施形態では、2'-修飾ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドである。

[0065] 一実施形態において、第1核酸鎖では、ヌクレオシドの全てが非天然ヌクレオシド又は修飾ヌクレオシドであってもよい。さらなる実施形態において、第1核酸鎖では、ヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。なおさらなる実施形態では、第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0066] 第1核酸鎖は、標的転写産物にハイブリダイズしている場合に、RNase Hに

よって認識される少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、又は少なくとも7個の連続するヌクレオシドを含むことができる。通常、4~20塩基、5~16塩基、又は6~12塩基の連続するヌクレオシドを含む領域であればよい。RNase Hによって認識されるヌクレオシドとして、例えば天然型デオキシリボヌクレオシドを用いることができる。修飾されたデオキシリボヌクレオシド、及び他の塩基を含む好適なヌクレオシドは、当該分野において周知である。また、リボヌクレオシド等の、2'位にヒドロキシ基を有するヌクレオシドが、前記ヌクレオシドとして不適當であることも知られている。「少なくとも4個の連続するヌクレオシド」を含むこの領域への利用に関し、ヌクレオシドの適合性を容易に決定することができる。一実施形態で、第1核酸鎖は、少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み得る。

[0067] 一実施形態において、第1核酸鎖のヌクレオシドは、デオキシリボヌクレオシドを含むか又はこれからなり、例えば第1核酸鎖のヌクレオシドの70%以上、80%以上、90%以上、又は95%以上がデオキシリボヌクレオシドである。

[0068] 一実施形態において、第1核酸鎖はギャップマー (gapmer) であってもよい。本明細書において「ギャップマー」とは、原則として、中央領域 (DNAギャップ領域) と、その5'末端及び3'末端に直接配置されたウイング領域 (それぞれ、5'ウイング領域及び3'ウイング領域と称する) からなる一本鎖核酸をいう。DNAギャップ領域の長さは、13~22塩基長、16~22塩基長、若しくは16~20塩基長、又は4~20塩基長、5~18塩基長、6~16塩基長、7~14塩基長、若しくは8~12塩基長であってもよい。ギャップマーにおける前記中央領域は少なくとも3個又は少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み、前記ウイング領域は少なくとも1つの非天然ヌクレオシドを含む。限定はしないが、ウイング領域に含まれる非天然ヌクレオシドは、通常、天然ヌクレオシドよりもRNAとの結合力が高く、核酸分解酵素(ヌクレアーゼ等)に対する耐性の高い性質を有する。ウイング領域を構成する非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドを含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「BNA/DNAギャップマー」と称する。5'ウイング領域及び3'ウイング領域

に含まれる架橋ヌクレオシドの数は、少なくとも1個であり、例えば、2又は3個であってもよい。5' ウィング領域及び3' ウィング領域に含まれる架橋ヌクレオシドは、5' ウィング領域及び3' ウィング領域内に連続又は非連続に存在していてもよい。架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)をさらに含むことができる。架橋ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである場合、前記ギャップマーを「LNA/DNAギャップマー」と称する。5' ウィング領域及び3' ウィング領域を構成する非天然ヌクレオシドがペプチド核酸を含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「ペプチド核酸ギャップマー」と称する。5' ウィング領域及び3' ウィング領域を構成する非天然ヌクレオシドがモルホリノ核酸を含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「モルホリノ核酸ギャップマー」と称する。5' ウィング領域及び3' ウィング領域の塩基長は、それぞれ独立して、少なくとも2塩基長、例えば、2~10塩基長、2~7塩基長、又は3~5塩基長であればよい。一実施形態において、5' ウィング領域及び/又は3' ウィング領域は、非天然ヌクレオシドを少なくとも1種含んでいればよく、天然ヌクレオシドをさらに含んでいてもよい。5' ウィング領域及び3' ウィング領域は、例えば、ホスホロチオエート結合等の修飾ヌクレオシド間結合で連結された非天然ヌクレオシド、例えばLNAヌクレオシド等の架橋ヌクレオシドや、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド等の2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0069] ギャップマーにおいて中央領域(DNAギャップ領域)は、少なくとも3個又は少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み、ウィング領域(5' ウィング領域及び3' ウィング領域)は少なくとも1つの非天然ヌクレオシドを含む。ギャップマーにおいて中央領域(DNAギャップ領域)とウィング領域との境界位置は、当業者であればヌクレオシドの配列から容易に判定することができる。例えば中央領域は、RNase H1によって認識され得る領域として機能的に定義することができる。ここで「RNase H1によって認識され得る」とは、ギャップマーが標的RNAと結合した場合に、ギャップマーと対合した標的RNA中の配列がRNase H1によって切断され得ることをいう。したがって

、ギャップマーにおいてRNase H1によって認識され得る領域を中央領域、RNase H1によって認識されない領域をウイング領域（5' ウイング領域及び3' ウイング領域）として、境界位置を決定することができる。なお、本明細書において、5' ウイング領域及び3' ウイング領域において中央領域と隣接したヌクレオシドは非天然ヌクレオシドとし、中央領域において5' ウイング領域又は3' ウイング領域と隣接したヌクレオシドは天然ヌクレオシドとする。

[0070] 前記ギャップマーを構成する第1核酸鎖は、5' 末端から順に、2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の架橋ヌクレオシド、4~15塩基長若しくは8~12塩基長（例えば8又は10塩基長）のリボヌクレオシド又はデオキシリボヌクレオシド、及び2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の架橋ヌクレオシドから構成されていてもよい。

[0071] なお、ウイング領域を5' 末端側又は3' 末端側のいずれか一方にのみ有する核酸鎖は、当該分野では「ヘミギャップマー」と呼ばれるが、本明細書においては、ヘミギャップマーもギャップマーに包含されるものとする。

[0072] 一実施形態において、第2核酸鎖は、第1核酸鎖の5' ウイング領域及び／又は3' ウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域に2'-修飾ヌクレオシドを含む。さらなる実施形態では、第2核酸鎖は、第1核酸鎖の5' ウイング領域及び／又は3' ウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドであり得る。2'-修飾ヌクレオシドは、例えば2'-0-メトキシエチル修飾ヌクレオシド又は2'-0-メチル修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0073] 一実施形態において、第2核酸鎖では、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、プリン塩基を含むヌクレオシドはリボヌクレオシドであってもよい。例えば、第2核酸鎖では、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、プリン塩基を含む全てのヌクレオシドがリボヌクレオシドであり得る。

[0074] 一実施形態において、第2核酸鎖では、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、ピリミジン塩基を含むヌクレオシドはデオキ

シリボヌクレオシドであってもよい。例えば、第2核酸鎖では、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、ピリミジン塩基を含む全てのヌクレオシドはデオキシシリボヌクレオシドであり得る。

[0075] さらに実施形態において、第2核酸鎖では、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、プリン塩基を含む全てのヌクレオシドがリボヌクレオシドであり、かつピリミジン塩基を含む全てのヌクレオシドはデオキシリボヌクレオシドであり得る。

[0076] 好ましい実施形態では、第2核酸鎖は、第1核酸鎖の5' ウィング領域及び又は3' ウィング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシド（例えば2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド又は2'-O-メチル修飾ヌクレオシド）であり、さらに第2核酸鎖では、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、プリン塩基を含む全てのヌクレオシドがリボヌクレオシドであり、かつピリミジン塩基を含む全てのヌクレオシドはデオキシリボヌクレオシドであり得る。

[0077] 一実施形態において、(i)第1核酸鎖における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、(ii)当該グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、(iii)当該グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は(iv)上記(i)~(iii)の任意の組合せに相補的である第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。さらに実施形態では、(i)第1核酸鎖における全てのグアノシンヌクレオシド、(ii)当該グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、(iii)当該グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は(iv)上記(i)~(iii)の任意の組合せに相補的である第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0078] 一実施形態では、(i)第1核酸鎖の3' ウィング領域及び/又は5' ウィング領域における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、(ii)当該グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、(iii)当該グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は(iv)上記(i)~(iii)の任意

の組合せに相補的である第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。さらなる実施形態では、(i)第1核酸鎖の3' ウィング領域及び／又は5' ウィング領域における全てのグアノシンヌクレオシド、(ii)当該グアノシンヌクレオシドの5' 末端側に隣接するヌクレオシド、(iii)当該グアノシンヌクレオシドの3' 末端側に隣接するヌクレオシド、又は(iv)上記(i)～(iii)の任意の組合せに相補的である第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0079] 一実施形態では、第2核酸鎖において、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドは、(a)デオキシリボヌクレオシド、(b)デオキシリボヌクレオシド及びリボヌクレオシド、(c)デオキシリボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、又は(d)リボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、又は(e)デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、及び2'-修飾ヌクレオシドである。

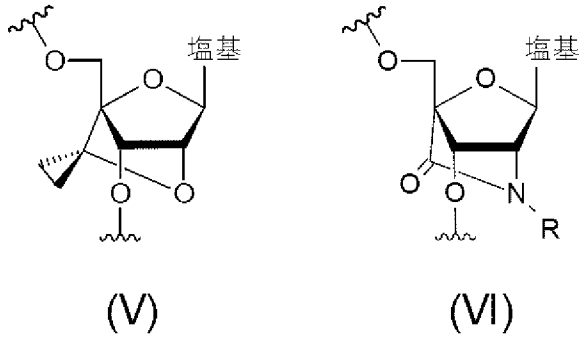
[0080] 一実施形態では、第1核酸鎖の5' ウィング領域及び3' ウィング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドであり、かつ第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであり得る。

[0081] 一実施形態では、第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの少なくとも1個が2'-修飾ヌクレオシド及び／又はデオキシリボヌクレオシドであってもよい。さらなる実施形態では、第2核酸鎖はピリミジン塩基を含む天然リボヌクレオシドを含まず、例えば第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシド及び／又はデオキシリボヌクレオシドであってもよい。

[0082] 一実施形態では、第2核酸鎖は、2'-修飾ヌクレオシドに加えて、2'-修飾ヌクレオシド以外の修飾ヌクレオシドを含んでもよい。例えば、第2核酸鎖は、上述の式(IV)で示される2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、以下の式(V)で示されるscpBNAヌクレオシド、以下の式(VI)で示されるAmNAヌクレオシド、又はオキシアミノ(4'-CH<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-2')BNAヌクレオシド(2',4'-BNAN<sup>o</sup>ヌクレオ

シドとしても知られている；R=Hは2',4'-BNA<sup>NC</sup>[N-H]ヌクレオシド、R=Meは2',4'-BNA<sup>NC</sup>[N-Me]ヌクレオシド)を少なくとも1個含んでもよい。

[0083] [化5]



(式中、Rは水素原子又はメチル基を示す。)

[0084] 上記式 (V) で示される架橋型の非天然ヌクレオシドは、2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸であり、本明細書では主として「scpBNA」と表記する。また、上記式 (VI) で示される架橋型の非天然ヌクレオシドは、アミドBNA (アミド架橋型核酸) であり、(4'-C(=O)-N(R)-2')BNA (R=H, Me) と表記することもできるが、本明細書では主として「AmNA」と表記する。上記式 (VI) 中、Rは水素原子又はメチル基のいずれであってもよい。本明細書において、特に断りのない場合、Rは水素原子又はメチル基のいずれであってもよいが、両者を区別する場合には、Rが水素原子の場合にはAmNA[N-H]、Rがメチル基の場合にはAmNA[N-Me]と表記することもできる。

[0085] 本発明の二本鎖核酸複合体において第1核酸鎖は、ミックスマー (mixmer) であってもよい。本明細書において「ミックスマー」とは、周期的又は無作為セグメント長の交互型の天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドを含み、かつ4個以上の連続するデオキシリボヌクレオシド及びリボヌクレオシドを含まない核酸鎖をいう。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドであり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「BNA/DNAミックスマー」と称する。前記架橋ヌクレオシドは、上記式 (V) 又は式 (VI) で示される架橋型の非天然ヌクレオシドであってもよい。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドが

ペプチド核酸であり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「ペプチド核酸／DNAミックスマー」と称する。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドがモルホリノ核酸であり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「モルホリノ核酸／DNAミックスマー」と称する。ミックスマーは、2種のヌクレオシドのみを含むようには制限されない。ミックスマーは、天然若しくは修飾のヌクレオシド又はヌクレオシド模倣体であるか否かに関わらず、任意の数の種類のヌクレオシドを含むことができる。例えば、架橋ヌクレオシド(例えば、LNAヌクレオシドや上記式(V)又は式(VI)で示される架橋型の非天然ヌクレオシド)により分離された1又は2個の連続するデオキシリボヌクレオシドを有してもよい。架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)をさらに含んでもよい。

[0086] 一実施形態では、第2核酸鎖は、第1核酸鎖の中央領域における上記の少なくとも4個の連続するヌクレオシド(例えばデオキシリボヌクレオシド)に相補的な、少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドを含んでいてもよい。第2核酸鎖が、第1核酸鎖と部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖を形成し、RNaseHによって認識され切断されるようにするためである。第2核酸鎖中の少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドは、好ましくは、天然に存在するヌクレオシド間結合、すなわちホスホジエステル結合によって連結される。

[0087] さらなる実施形態では、第2核酸鎖は、上記の少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドに加えて、少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドをさらに含んでもよい。当該少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドは、第1核酸鎖に相補的であり、第1核酸鎖の中央領域に相補的な領域に含まれてもよい。当該少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドは、上記の少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドの5'側又は3'側のいずれに位置してもよく、5'側及び3'側の両方に位置してもよい。また、当該少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドは、2個、3個、4個、5個、又は6個以上の連続するデオキシリボヌクレオシドであってもよい。

- [0088] 第2核酸鎖の末端（5'末端、3'末端、又は両末端）から少なくとも1個、少なくとも2個（例えば2個）、少なくとも3個、又は少なくとも4個のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドであってもよい。修飾ヌクレオシドは、修飾糖及び／又は修飾核酸塩基を含んでいてもよい。修飾糖は、2'-修飾糖（例えば、2'-O-メチル基を含む糖）であってもよい。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンとすることもできる。
- [0089] 第2核酸鎖は、5'末端から順に、2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の修飾ヌクレオシド（例えば、2'-修飾糖を含む修飾ヌクレオシド）、4~15塩基長若しくは8~12塩基長（例えば8又は10塩基長）の（場合により、修飾ヌクレオシド間結合で連結された）リボヌクレオシド又はデオキシリボヌクレオシド、及び2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の修飾ヌクレオシド（例えば、2'-修飾糖を含む修飾ヌクレオシド）から構成されていてもよい。この場合、第1核酸鎖は、ギャップマーであってもよい。
- [0090] 第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖は、全部又は一部にヌクレオシド模倣体又はヌクレオチド模倣体を含んでもよい。ヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸及び／又はモルホリノ核酸であってもよい。
- [0091] 一実施形態において、第2核酸鎖は、第1核酸鎖に対して、非相補的塩基、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含み得る。第2核酸鎖における非相補的塩基の数は、限定しないが、例えば1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個、又は1個又は2個であってもよい。非相補的塩基からなる配列は後述のバルジ構造を形成していてもよい。第2核酸鎖における挿入配列の塩基長数は、限定しないが、例えば1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個、又は1個又は2個であってもよい。挿入配列は後述のバルジ構造を形成する配列であってもよい。第2核酸鎖における欠失の連続する塩基長は、限定しないが、例えば1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、1~2個、又は1個又は2個であってもよい。

第2核酸鎖は、欠失位置に後述のバルジ構造を含んでもよい。

[0092] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基長は、特に限定されないが、少なくとも8塩基長、少なくとも9塩基長、少なくとも10塩基長、少なくとも11塩基長、少なくとも12塩基長、少なくとも13塩基長、少なくとも14塩基長、又は少なくとも15塩基長であってもよい。また、第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基長は、35塩基長以下、30塩基長以下、25塩基長以下、24塩基長以下、23塩基長以下、22塩基長以下、21塩基長以下、20塩基長以下、19塩基長以下、18塩基長以下、17塩基長以下、又は16塩基長以下であってもよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖は、同じ長さであっても、異なる長さ（例えば、いずれか一方が1~3塩基短い又は長い長さ）であってもよい。一実施形態において、第2核酸鎖の長さは第1核酸鎖より短い。この場合、第2核酸鎖が第1核酸鎖と結合し得る位置は問わない。例えば、第1核酸鎖中の5'側の領域、中央の領域、又は3'側の領域のいずれと結合し得るものであってもよい。一実施形態において、第2核酸鎖が少なくとも8塩基長であってもよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖が形成する二本鎖構造は、バルジを含んでいてもよい。長さの選択は、例えば費用、合成収率等の他の因子の中でも特に、アンチセンス効果の強度と標的に対する核酸鎖の特異性とのバランスによって決定することができる。

[0093] 一実施形態において、第2核酸鎖は、その5'末端側及び3'末端側の一方又は両方に位置する少なくとも1つのオーバーハング領域を含み得る。「オーバーハング領域」とは、第2核酸鎖において第1核酸鎖に相補的な領域に隣接する領域で、第1核酸鎖と第2核酸鎖がアニールして二本鎖構造を形成した場合、第2核酸鎖の5'末端が第1核酸鎖の3'末端を越えて伸長する、及び／又は第2核酸鎖の3'末端が第1核酸鎖の5'末端を越えて伸長する、つまり、二本鎖構造から突出した第2核酸鎖中のヌクレオチド領域を指す。第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、相補的領域の5'末端側に位置してもよく、3'末端側に位置してもよい。第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、相補的領域の5'末端側及び3'末端側に位置してもよい。

[0094] オーバーハング領域の長さは、限定しないが、1~20塩基長であってもよく

、例えば2～15塩基長、2～12塩基長、2～10塩基長、2～8塩基長、2～6塩基長、2～5塩基長、2～4塩基長、又は2～3塩基長であってもよい。また、オーバーハング領域を構成するヌクレオシドの種類は限定しない。例えば、天然ヌクレオシド（例えばデオキシリボヌクレオシド）又は非天然ヌクレオシド（例えばLNAヌクレオシド等の架橋ヌクレオシド）で構成されていてもよい。また、オーバーハング領域のヌクレオシド間結合の全部又は一部は修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。修飾ヌクレオシド間結合は、例えばホスホロチオエート結合であってもよい。オーバーハング領域は、タンパク質結合性、脂溶性、及び／又はヌクレアーゼ耐性を有することが好ましく、例えばホスホロチオエート結合により連結されたデオキシリボヌクレオシド又はLNAヌクレオシドで構成されていてもよい。なお、オーバーハング領域の塩基配列は標的遺伝子の塩基配列と関係しない配列であってもよい。

[0095] 第2核酸鎖の末端（5'末端、3'末端、又は両末端）から少なくとも1個、少なくとも2個（例えば2個）、少なくとも3個、又は少なくとも4個のヌクレオシドは、非天然ヌクレオシド（修飾ヌクレオシド）であってもよい。修飾ヌクレオシドは、修飾糖及び／又は修飾核酸塩基を含んでいてもよい。修飾糖は、2'-修飾糖（例えば、2'-O-メチル基を含む糖）であってもよい。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンとすることもできる。

[0096] 一実施形態において、第2核酸鎖は、第1核酸鎖との二本鎖形成が可能である限り、第1核酸鎖に対して1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、又は1～3個（例えば、1～2個、又は1個）の非相補的塩基、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、又は1～3個（例えば、1～2個、又は1個）の欠失塩基、及び／又は1～20個（例えば、1～15個、1～12個、1～10個、1～8個、1～6個、1～4個、1～3個、又は1個）の挿入塩基を有していてもよい。挿入塩基からなる配列領域はバルジ構造を形成してもよい。

[0097] 一実施形態において、2核酸鎖は、第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を少なくとも1つ含む。本明細書において「バルジ構造」とは、二本鎖核酸において、二本鎖を構成するいずれかの核酸鎖の一部の核

酸が塩基対合せずに二本鎖構造から突き出した部分をいう。バルジ構造の塩基長は、限定しない。例えば、1~50塩基長、1~40塩基長、1~30塩基長、1~20塩基長、1~15塩基長、好ましくは1~10塩基長である。

[0098] 一実施形態において、バルジ構造は糖非修飾ヌクレオシドを含む。さらなる実施形態において、バルジ構造の全てのヌクレオシドが糖非修飾ヌクレオシドである。

[0099] 一実施形態において、第2核酸鎖がバルジ構造を含む場合、バルジ構造以外のヌクレオシドの全ては、2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0100] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖における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及び/又は修飾ヌクレオシド間結合であってよい。限定はしないが、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の末端(5'末端、3'末端若しくは両端)から少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合であることが好ましい。ここで、例えば核酸鎖の末端から2つのヌクレオシド間結合とは、核酸鎖の末端に最も近接するヌクレオシド間結合と、それに隣接し、かつ末端とは反対側に位置するヌクレオシド間結合を意味する。核酸鎖の末端領域における修飾ヌクレオシド間結合は、核酸鎖の望ましくない分解を抑制又は阻害できるため好ましい。

[0101] 一実施形態で、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の全部又は一部のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、修飾ヌクレオシド間結合を1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、又はそれ以上含んでいてもよい。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、修飾ヌクレオシド間結合を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも93%、

少なくとも95%、少なくとも98%、又は100%含んでいてもよい。一実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合又はボラノホスフェート結合であってよい。一実施形態において第1核酸鎖中の核酸がモルホリノ核酸からなる場合、第1核酸鎖中の全部又は一部のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であってよい。

[0102] 一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、キラル制御されたヌクレオシド間結合を1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、又はそれ以上含んでいてもよい。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、キラル制御されたヌクレオシド間結合を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又はそれ以上含んでいてもよい。

[0103] 一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、非負荷電ヌクレオシド間結合（好ましくは、中性のヌクレオシド間結合）を1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、又はそれ以上含んでいてもよい。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、非負荷電ヌクレオシド間結合を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又はそれ以上含んでいてもよい。

[0104] 一実施形態では、第2核酸鎖の5'末端から少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。第2核酸鎖の3'末端から少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合、例えばホスホ

ロチオエート結合、1~4個のC<sub>1~6</sub>のアルキル基で置換されたグアニジン部分（例えば、TMG部分）を含むヌクレオシド間結合及び/又は環状グアニジン部分を含むヌクレオシド間結合であってもよい。修飾ヌクレオシド間結合は、R<sub>p</sub>配置又はSp配置にキラル制御されていてもよい。

[0105] 第2核酸鎖の3'末端から少なくとも1個（例えば3個）のヌクレオシド間結合は、RNase耐性の高いホスホロチオエート結合のような修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。第2核酸鎖の3'末端にホスホロチオエート修飾等の修飾ヌクレオシド間結合を含む場合、二本鎖核酸複合体の遺伝子抑制活性が向上するので好ましい。

[0106] 一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の修飾ヌクレオシド間結合は、あるpH（例えば、ヒトの生理学的pH（約7.4）、送達部位（例えば、オルガネラ、細胞、組織、臓器、生物体等）のpH等）において、当該修飾ヌクレオシド間結合が、アニオン形態（例えば、 $-O-P(0)(O^-)-O^-$ （天然リン酸結合のアニオン形態）、 $-O-P(0)(S^-)-O^-$ （ホスホロチオエート結合のアニオン形態）等）と比較して、中性形態又はカチオン形態として存在する非負荷電（それぞれ中性又はカチオン性の）ヌクレオシド間結合を含む。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の修飾ヌクレオシド間結合は、中性のヌクレオシド間結合を含む。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の修飾ヌクレオシド間結合は、カチオン性のヌクレオシド間結合を含む。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合（例えば、中性のヌクレオシド間結合）は、その中性形態をとるとき、pKaが8未満、9未満、10未満、11未満、12未満、13未満、又は14未満の部分をも有さない。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合は、例えば、米国特許登録番号5,264,423及び5,286,717記載のメチルホスホネート結合、米国特許登録番号5,955,599記載のメチルホストリエステル結合、エチルホストリエステル結合、国際公開第2015/168172号記載のメトキシプロピルホスホネート結合、国際公開第2016/081600号記載の自己中和核酸(ZON)に用いられるヌクレオシド間結合等である。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合は、トリアゾール部分又はアルキン部分を

含む。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合は、環状グアニジン部分及び/又は1～4個のC<sub>1~6</sub>のアルキル基で置換されたグアニジン部分（好ましくは、TMG部分）を含む。一実施形態では、環状グアニジン部分を含む修飾ヌクレオシド間結合は、式(I)で表される部分構造を有する。一実施形態では、1～4個のC<sub>1~6</sub>のアルキル基で置換されたグアニジン部分は、式(II)で表される部分構造を有する。一実施形態では、環状グアニジン部分及び/又は1～4個のC<sub>1~6</sub>のアルキル基で置換されたグアニジン部分を含む中性のヌクレオシド間結合は、キラル制御される。一実施形態では、本開示は、少なくとも1つの中性のヌクレオシド間結合及び少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。いずれかの特定の理論によって拘束されることを望むものではないが、少なくともいくつかの場合では、中性のヌクレオチド間結合は、中性のヌクレオチド間結合を含まない同等の核酸と比較して特性及び/又は活性を改善することができ、例えば、送達を改善し、エキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼに対する耐性を改善し、細胞取り込みを改善し、エンドソーム脱出を改善し、及び/又は核取り込みを改善等する。

[0107] 一実施形態において、第2核酸鎖は、リガンド（本明細書においてバインダーと称する場合もある）と結合していてもよい。リガンドとしては、低分子（低分子リガンド）、中分子（中分子リガンド）、高分子（高分子リガンド）、ペプチド（ペプチドリガンド）、脂質（脂質リガンド）、及びアプタマー（例えば核酸アプタマー）が挙げられる。

[0108] 本明細書において「ペプチド」とは、1つ以上のペプチド結合を有するアミノ酸ポリマーをいう。「ペプチド」は、ペプチドに含まれるアミノ酸残基の数によって限定されない。したがって、「ペプチド」には、ジペプチドやトリペプチド等の数個のアミノ酸残基を含むオリゴペプチドから、多数のアミノ酸残基を含むポリペプチド（タンパク質）までが包含される。ペプチドは直鎖状、分岐状又は環状のペプチドでありうる。

[0109] ペプチドリガンドは、細胞表面上若しくは細胞内、又は体液中に存在する

分子に結合するものであってもよい。

- [0110] 一実施形態において、ペプチドは、抗体又はその活性断片であってもよい。抗体の例として、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体やヒト化抗体等の組換え抗体、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、VHH等が挙げられる。抗体の活性断片の例として、scFv (single chain Fragment of variable region : 単鎖抗体)、ダイアボディ (diabody)、トリアボディ (triabody) 又はテトラボディ (tetrabody) 等が挙げられる。
- [0111] 脂質 (脂質リガンド) は、トコフェロール、コレステロール、脂肪酸、リン脂質及びそれらの類縁体 ; 葉酸、ビタミンC、ビタミンB1、ビタミンB2 ; エストラジオール、アンドロスタン及びそれらの類縁体 ; ステロイド及びその類縁体 ; LDLR、SRBI又はLRP1/2のリガンド ; FK-506、及びシクロスポリン ; PCT/JP2019/012077、PCT/JP2019/010392及びPCT/JP2020/035117記載の脂質等が挙げられるが、これらに限定されない。また、脂質 (脂質リガンド) は、トコフェロール又はその類縁体及び/又はコレステロール又はその類縁体、置換された若しくは置換されていないC<sub>1</sub>~<sub>30</sub>のアルキル基、置換された若しくは置換されていないC<sub>2</sub>~<sub>30</sub>のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていないC<sub>1</sub>~<sub>30</sub>のアルコキシ基であってもよい。
- [0112] 本明細書において「トコフェロール」は、トコロールのメチル化誘導体で、クロマンと呼ばれる環状構造を有する脂溶性ビタミン (ビタミンE) である。トコロールは、強い抗酸化作用を有しており、それ故に、生体内では、抗酸化物質として、代謝によって生じるフリーラジカルを消失させ、細胞を傷害から保護する機能を有する。
- [0113] トコフェロールは、クロマンに結合するメチル基の位置に基づき、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、及び $\delta$ -トコフェロールからなる複数の異なる型が知られている。本明細書におけるトコフェロールは、いずれのトコフェロールであってもよい。また、トコフェロールの類縁体としては、トコフェロールの種々の不飽和類縁体、例えば、 $\alpha$ -トコトリエノール、 $\beta$ -トコトリエノール、 $\gamma$ -トコトリエノール、 $\delta$ -トコトリエノール

ル等が挙げられる。好ましくは、トコフェロールは、 $\alpha$ -トコフェロールである。

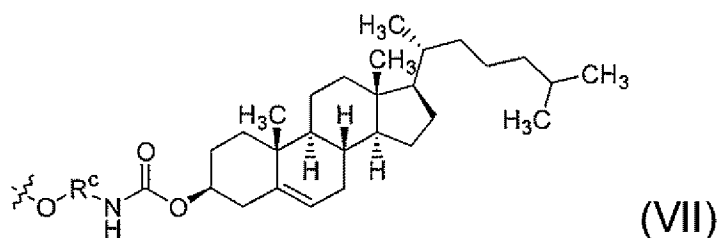
[0114] 本明細書において「コレステロール」とは、ステロイドアルコールとも呼ばれるステロールの1種であり、特に動物において多く存在する。コレステロールは、生体内における代謝過程で重要な機能を果たしている他、動物細胞では、リン脂質と共に細胞の膜系を構成する主要な構成成分でもある。また、コレステロールの類縁体は、ステロール骨格を有するアルコールである、種々のコレステロール代謝産物及び類縁体等を指し、限定されるものではないが、コレスタノール、ラノステロール、セレブロステロール、デヒドロコレステロール、及びコプロスタノール等を含む。

[0115] 本明細書において「類縁体(analog)」とは、同一又は類似の基本骨格を有する類似した構造及び性質を有する化合物を指す。類縁体は、例えば、生成中間体、代謝産物、置換基を有する化合物等を含む。ある化合物が他の化合物の類縁体であるか否かは、当業者であれば技術常識に基づき判定できる。

[0116] コレステロールの類縁体は、ステロール骨格を有するアルコールである、種々のコレステロール代謝産物及び類縁体等を指し、限定されるものではないが、コレスタノール、ラノステロール、セレブロステロール、デヒドロコレステロール、及びコプロスタノール等を含む。

[0117] 一実施形態において、第2核酸鎖はトコフェロール若しくはコレステロール又はそれらの類縁体と結合していてもよい。コレステロール又はその類縁体と結合した第2核酸鎖は、以下の一般式(VII)で示される基を有してもよい。

[0118] [化6]



[式中、 $R^c$ は、置換基を有していてもよい炭素数4~18個、好ましくは炭素

数5~16個のアルキレン基を表す(ここで、該置換基はハロゲン原子、又はヒドロキシ基で置換されていてもよい炭素数1~3個のアルキル基、例えばヒドロキシメチル基であり、該アルキレン基は相隣接しない炭素原子が酸素原子で置換されていてもよい)。

[0119] R<sup>c</sup>は、限定されないが、 $-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-$ 、又は $-(\text{CH}_2)_6-$ であってもよい。

[0120] 上記一般式(VII)で示される基は、第2核酸鎖の5'末端又は3'末端にリン酸エステル結合を介して結合することができる。

[0121] コレステロール又はその類縁体等のリガンドは、第2核酸鎖の5'末端、又は3'末端、或いは両端のいずれに結合していてもよい。また、コレステロール又はその類縁体等のリガンドは、第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに結合していてもよい。

[0122] 第2核酸鎖が、コレステロール又はその類縁体を複数含む場合、それらは同一であってもよいし、異なってもよい。例えば、第2核酸鎖の5'末端にコレステロールが、3'末端に他のコレステロール類縁体がそれぞれ1つずつ結合している場合が該当する。結合位置に関して、コレステロール又はその類縁体は、第2核酸鎖の複数の位置に結合していてもよく、及び/又は1つの位置に一群として結合していてもよい。コレステロール又はその類縁体が、第2核酸鎖の5'末端と3'末端にそれぞれ1つずつ連結されていてもよい。

[0123] 第2核酸鎖とリガンドとの結合は、直接結合であってもよいし、他の物質によって介在される間接結合であってもよい。

[0124] 第2核酸鎖とリガンドが直接結合をする場合、例えば、共有結合、イオン性結合、水素結合等を介して第2核酸鎖に結合されていればよい。より安定した結合を得ることができるという点を鑑みれば、共有結合が好ましい。

[0125] 一実施形態において、第2核酸鎖は、リガンドと結合していない。本明細書において「リガンドと結合していない」とは、トコフェロールやコレステロール等のリガンドが結合していないことをいう。さらなる実施形態では、本

発明の二本鎖核酸複合体はリガンドと結合していない、すなわち第1核酸鎖及び第2核酸鎖のいずれもリガンドと結合していない。

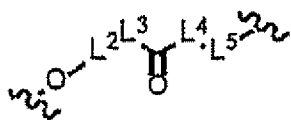
[0126] 第2核酸鎖とリガンドが間接結合をする場合、連結基（本明細書では、しばしば「リンカー」と表記する）を介して結合していてもよい。リンカーは切断可能な（cleavable）リンカー又は非切断（uncleavable）リンカーにいずれであってもよい。

[0127] 「切断可能なリンカー」とは、生理学的条件下、例えば、細胞内又は動物体内（例えば、ヒト体内）で切断され得るリンカーを意味する。切断可能なリンカーは、ヌクレアーゼ等の内在性酵素によって選択的に切断される。切断可能なリンカーは、限定はしないが、アミド、エステル、ホスホジエステルの一方若しくは両方のエステル、リン酸エステル、カルバメート、及びジスルフィド結合、並びに天然DNAリンカーが挙げられる。一例として、コレステロール又はその類縁体がジスルフィド結合を介して連結されていてもよい。

[0128] 「非切断性リンカー」とは、生理学的条件下、例えば、細胞内又は動物体内（例えば、ヒト体内）で切断されないリンカーを意味する。非切断性リンカーは、限定はしないが、ホスホロチオエート結合、及びホスホロチオエート結合で連結された修飾若しくは非修飾のデオキシリボヌクレオシド又は修飾若しくは非修飾のリボヌクレオシドからなるリンカー等が挙げられる。リンカーがDNA等の核酸又はオリゴヌクレオチドの場合、鎖長は、特に限定はされないが、通常は2~20塩基長、3~10塩基長又は4~6塩基長であればよい。

リンカーの一具体例として、以下の式(VIII)で表されるリンカーが挙げられる。

[0129] [化7]



(VIII)

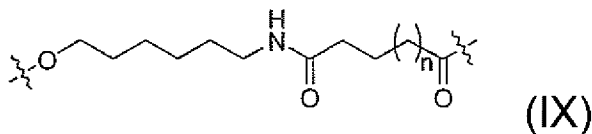
[式中、L<sup>2</sup>は、置換された若しくは置換されていないC<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>のアルキレン基（例、プロピレン、ヘキシレン、ドデシレン）、置換された若しくは置換さ

れていない $C_3\sim C_8$ シクロアルキレン基（例、シクロヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ を表し、 $L^3$ は、 $-NH-$ 又は結合を表し、 $L^4$ は、置換された若しくは置換されていない $C_1\sim C_{12}$ のアルキレン基（例、エチレン、ペンチレン、ヘプチレン、アンデシレン）、置換された若しくは置換されていない $C_3\sim C_8$ のシクロアルキレン基（例、シクロヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_2]_m-$ 、又は結合を表し、ここで、 $m$ は1~25の整数を表し、 $L^5$ は、 $-NH-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、又は結合を表す（ここで、該置換は、好ましくはハロゲン原子によりなされる）。]

[0130] 一実施形態において、式(VIII)で表されるリンカーは、 $L^2$ が、置換されていない $C_3\sim C_6$ のアルキレン基（例、プロピレン、ヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ であり、 $L^3$ が、 $-NH-$ であり、 $L^4$ 及び $L^5$ が、結合である。

[0131] また、リンカーの別の具体例として、以下の一般式(IX)で表わされるリンカーが挙げられる。

[0132] [化8]



[式中、 $n$ は0又は1を表す。]

[0133] 第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖（好ましくは第2核酸鎖）は、核酸鎖を構成するポリヌクレオチドに結合した少なくとも1つの機能性部分をさらに含んでもよい。「機能性部分」とは、二本鎖核酸複合体及び/又は当該機能性部分が結合している核酸鎖に所望の機能を付与する部分をいう。所望の機能には、例えば、標識機能、又は精製機能等が挙げられる。標識機能を与える部分の例としては、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ等の化合物が挙げられる。また、精製機能を与える部分の例としては、ビオチン、アビジン、Hisタグペプチド、GSTタグペプチド、FLAGタグペプチド等の化合物が挙げられる。一

実施形態において、第1核酸鎖を特異性高く効率的に標的部位に送達し、かつ当該核酸によって標的遺伝子の発現を非常に効果的に抑制するという観点から、第2核酸鎖に機能性部分として、ある実施形態における二重鎖核酸複合体を標的部位に送達させる活性を有する分子が結合していることが好ましい。標的への送達機能を与える部分の例としては、脂質、抗体、アプタマー、特定のレセプターに対するリガンド等が挙げられる。一実施形態において、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖（好ましくは第2核酸鎖）は、機能性部分と結合している。第2核酸鎖と機能性部分との結合は、直接的な結合であってもよく、他の物質を介した間接的な結合であってもよいが、ある実施形態において、共有結合、イオン結合、水素結合等で第2核酸鎖と機能性部分とが直接的に結合していることが好ましく、より安定した結合が得られるという観点から、共有結合がより好ましい。

- [0134] 第1核酸鎖と第2核酸鎖は、リンカーを介して結合していてもよい。この場合、第1核酸鎖と第2核酸鎖は、リンカーを介して連結され、一本鎖を形成しうる。この場合の二本鎖核酸複合体は、ヒンジ核酸、一本鎖HD0、又はssHD0等と呼ぶことができる。しかし、その場合も機能領域は二本鎖核酸複合体と同じ構成であることから、本明細書では、このような一本鎖核酸も本発明の二本鎖核酸複合体の一実施形態として包含する。
- [0135] 一実施形態において、リンカーは第1核酸鎖の5'末端と第2核酸鎖の3'末端とを結合する。別の実施形態において、リンカーは第1核酸鎖の3'末端と前記第2核酸鎖の5'末端とを結合する。さらなる実施形態において、リンカーは第1核酸鎖の5'末端と第2核酸鎖の3'末端とを結合し、かつ第1核酸鎖の3'末端と前記第2核酸鎖の5'末端とを結合する。この場合、二本鎖核酸複合体は環状構造となる。
- [0136] リンカーは、任意のポリマーでありうる。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アルキレン等に加えて、上述のように第2核酸鎖とリガンドとを連結するリンカーを用いることもできる。具体的には、例えば、DNA、RNAといった天然のヌクレオチドやヌクレオシド、又はペプチド核酸、モルホリノ

核酸といった非天然のヌクレオチドやヌクレオシドから構成されうる。また、ポリエチレングリコール等のポリエーテルから構成されていてもよい。リンカーが核酸からなる場合、リンカーの鎖長は少なくとも1塩基、例えば、2～50塩基、2～40塩基、2～30塩基、2～20塩基、2～15塩基、2～12塩基、3～10塩基又は4～6塩基の鎖長をとりうる。好ましくは4塩基の鎖長である。リンカーの位置は、第1核酸鎖の5'側でも3'側のいずれでも可能であるが、例えば、第2核酸鎖の5'側にコレステロール又はその類縁体を結合させた構成の場合には、第1核酸鎖の5'末端と第2核酸鎖の3'末端とがリンカーを介して連結されることになる。リンカーは切断性(cleavable)又は非切断性(uncleavable)のいずれであってもよい。

[0137] さらに実施形態では、第1核酸鎖と第2核酸鎖はリンカーを介して結合しており、かつ第2核酸鎖は第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を少なくとも1つ含むことができる。

[0138] 本発明の二本鎖核酸複合体において、第1核酸鎖が有する標的転写産物に対するアンチセンス効果は、当該分野で公知の方法で測定できる。例えば、二本鎖核酸複合体を細胞等に導入した後、ノーザンブロットィング、定量PCR、又はウェスタンブロットィング等の公知技術を使用することにより測定すればよい。特定の組織における標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベル(例えば、mRNA量若しくはマイクロRNA等のRNA量、cDNA量、タンパク質量等)を測定することで、それらの部位において二本鎖核酸複合体によって標的遺伝子発現が抑制されるか否かを判定できる。また例えばエクソンスキッピングであれば、エクソンスキッピングで生じる産物と、エクソンスキッピングがない場合の産物を比較することにより、その効果を判定できる。

[0139] 上記のように、本発明の二本鎖核酸複合体の例示的实施形態について説明したが、本発明の二本鎖核酸複合体は上記の例示的实施形態に限定されない。

[0140] 1-4. 二本鎖核酸複合体の製造方法

本発明の二本鎖核酸複合体は、当業者であれば、公知の方法を適切に選択

することによって製造することができる。限定はしないが、通常は、まず二本鎖核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖のそれぞれを設計し、製造するところから始まる。例えば、標的転写産物の塩基配列（例えば、標的遺伝子の塩基配列）情報に基づいて第1核酸鎖を設計し、その相補鎖として第2核酸鎖を設計する。続いて、設計した塩基配列情報に基づいて、それぞれの核酸鎖を、例えば、GE Healthcare社、Thermo Fisher Scientific社、Beckman Coulter社等の市販の自動核酸合成装置を使用して合成すればよい。その後は、得られたオリゴヌクレオチドに逆相カラム等を使用して精製することもできる。

[0141] また、機能性部分が結合した二本鎖核酸複合体の場合には、第1核酸鎖は上記方法に準じて製造すればよい。一方、機能性部分が結合した第2核酸鎖は、機能性部分が予め結合した核酸種を用いて、上記の合成、及び精製を行い、製造することができる。例えば、コレステロール又はその類縁体が予め結合された核酸種を用いて、上記の合成及び精製を実施することによって第2核酸鎖を製造してもよい。或いは、上記の合成及び精製を実施することによって製造された第2核酸鎖に、公知の方法によりコレステロール又はその類縁体を結合させてもよい。各核酸鎖を製造後、第1核酸鎖と第2核酸鎖に対して、アニリングを実施することによって目的とする機能性部分が結合した二本鎖核酸複合体製造することができる。具体的には、核酸を適切な緩衝溶液中で混合し、約90℃～98℃で数分間（例えば5分間）変性させ、その後核酸を約30℃～70℃で約1～8時間アニールして、本発明の二本鎖核酸複合体の1つを製造することができる。機能性部分を核酸に連結する方法は当該技術分野において周知である。また、核酸鎖は、塩基配列並びに修飾部位及び種類を指定して、各種メーカー（例えば、株式会社ジーンデザイン）に注文し、入手することもできる。

[0142] 1-5. 二本鎖核酸複合体の用途

一実施形態において、本発明の二本鎖核酸複合体は、以下の少なくとも一つの作用：標的遺伝子の転写産物又は翻訳産物の発現量を抑制若しくは亢進

する作用、標的遺伝子の転写産物又は翻訳産物の機能を阻害する作用、RNAスプライシングを制御する作用、及び標的遺伝子のタンパク質への結合を阻害する作用を用途とするもの、例えばエクソスキッピングのためのものであってもよい。例えば、本発明の二本鎖核酸複合体は、以下の少なくとも一つの作用：エクソスキッピング、エクソンインクルージョン、ステリックブロッキング、及びRNA発現亢進のためのものであってもよい。本発明の二本鎖核酸複合体は、特定の組織、例えば脳、脊髄、腎臓、肝臓、肺、腸管、脾臓、副腎、眼、網膜、皮膚、末梢神経、例えば脳において上記作用を発揮するためのものであってもよい。脳は大腦、間脳、脳幹、小脳のいずれであってもよく、例えば、大腦（大腦皮質等）、脳幹、小脳、海馬、及び線状体のいずれか一つ以上であってもよい。また、本発明の二本鎖核酸複合体は、心筋及び骨格筋を含む筋組織において上記作用を発揮するためのものであってもよい。

[0143] 一実施形態において、本発明の二本鎖核酸複合体は、疾患又は予防するためのものである。疾患は骨格筋機能障害又は心機能障害であってもよい。疾患の例としては、例えば、筋ジストロフィー（デュシェンヌ型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィータイプ1（DM1）、福山型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー等）、先天性ミオパチー、原発性年齢関連タウオパチー（PART）、アルツハイマー病（AD）、進行性核上性麻痺（PSP）、大腦皮質基底核変性症/大腦皮質基底核症候群（CBD）、ピック病、前頭側頭型認知症、神経封入体病、脊髄性筋萎縮症（SMA）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、ハンチントン病、遺伝性脊髄小脳変性症（SCA）、多系統萎縮症、遺伝性痙攣性対麻痺、多発性硬化症、脳梗塞、脳腫瘍、てんかん及び脳炎が挙げられる。

[0144] 1-6. 効果

本発明の二本鎖核酸複合体によれば、二本鎖核酸複合体の有効性が損なうことなく、二本鎖核酸複合体の中樞神経毒性等の毒性を軽減又は消失することができる。すなわち、従来の二本鎖核酸複合体と比較して、標的遺伝子に

対するアンチセンス効果を損なうことなく、中枢神経毒性が低減されている。

[0145] 2. 医薬組成物

2-1. 概要

本発明の第2態様は医薬組成物である。本発明の医薬組成物は、前記第1態様の二本鎖核酸複合体を有効成分として含む。本発明の医薬組成物は、中枢神経毒性が軽減されており、副作用を伴うことなく髄腔内投与又は脳室内投与することができる。

以下、本発明の医薬組成物が包含し得る各成分について具体的に説明をする。

[0146] 2-2. 構成

2-2-1. 有効成分

本発明の医薬組成物は、有効成分として少なくとも第1態様に記載の二本鎖核酸複合体を包含する。本発明の医薬組成物は、二本鎖核酸複合体を二種以上含んでもよい。

[0147] 医薬組成物に含まれる二本鎖核酸複合体の量（含有量）は、二本鎖核酸複合体の種類、送達部位、医薬組成物の剤形、医薬組成物の投与量、並びに後述する担体の種類によって異なる。したがって、それぞれの条件を勘案して適宜定めればよい。通常は、単回投与量の医薬組成物に有効量の二本鎖核酸複合体が包含されるように調整する。「有効量」とは、二本鎖核酸複合体が有効成分としての機能を発揮する上で必要な量であって、かつそれを適用する生体に対して有害な副作用をほとんど又は全く付与しない量をいう。この有効量は、被検体の情報、投与経路、及び投与回数等の様々な条件によって変化し得る。最終的には医師、獣医師又は薬剤師等の判断によって決定される。「被検体の情報」とは、医薬組成物を適用する生体の様々な個体情報である。例えば、被検体がヒトであれば、年齢、体重、性別、食生活、健康状態、疾患の進行度や重症度、薬剤感受性、併用薬物の有無等を含む。

[0148] 2-2-2. 担体

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体を含むことができる。「薬学的に許容可能な担体」とは、製剤技術分野において通常使用する添加剤をいう。例えば、溶媒、植物性油、基剤、乳化剤、懸濁化剤、界面活性剤、pH調整剤、安定化剤、香味料、香料、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、鎮静剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、増粘剤、矯味剤、溶解助剤、及び他の添加剤が挙げられる。

[0149] 溶媒には、例えば、水若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る水溶液、又は薬学的に許容される有機溶剤のいずれであってもよい。水溶液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液が挙げられる。補助剤としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム、その他にも低濃度の非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。

[0150] 上記担体は、有効成分である二本鎖核酸複合体の生体内での酵素等による分解を回避又は抑制する他、製剤化や投与方法を容易にし、剤形及び薬効を維持するために用いられるものであり、必要に応じて適宜使用すればよい。

[0151] 2-2-3. 剤形

本発明の医薬組成物の剤形は、有効成分である第1態様に記載の二本鎖核酸複合体を分解等により不活化させることなく、標的部位まで送達し、生体内でその有効成分の薬理効果（標的遺伝子の発現に対するアンチセンス効果）を発揮し得る形態であれば特に限定しない。

[0152] 具体的な剤形は、投与方法及び／又は処方条件によって異なる。投与方法は、非経口投与と経口投与に大別することができるので、それぞれの投与方法に適した剤形にすればよい。

[0153] 投与方法が非経口投与であれば、好ましい剤形は、対象部位への直接投与又は循環系を介した全身投与が可能な液剤である。液剤の例としては、注射剤が挙げられる。注射剤は、前記賦形剤、エリキシル剤、乳化剤、懸濁剤、

界面活性剤、安定剤、pH調節剤等と適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。その他、軟膏、硬膏剤(plaster)、パップ剤(cataplast)、経皮剤、ローション剤、吸入剤、エアロゾル剤、点眼剤、及び坐剤であってもよい。

[0154] 投与方法が経口投与であれば、好ましい剤形は、固形剤や液剤であってもよく、例えば、錠剤、カプセル剤、ドロップ剤、トローチ剤、丸剤、顆粒剤、粉剤、散剤、内用水剤、乳剤、シロップ剤、ペレット剤、舌下剤、解膠剤(peptizer)、バッカル剤、ペースト剤、懸濁剤、エリキシル剤、コーティング剤、軟膏、硬膏剤(plaster)、パップ剤(cataplast)、経皮剤、ローション剤、吸入剤、エアロゾル剤、点眼剤、注射剤、及び坐剤が挙げられる。固形剤であれば、必要に応じて、当該技術分野で公知の剤皮を施した剤形、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠にすることができる。

[0155] なお、上記各剤形の具体的な形状、大きさについては、いずれもそれぞれの剤形において当該分野で公知の剤形の範囲内にあればよく、特に限定はしない。本発明の医薬組成物の製造方法については、当該技術分野の常法に従って製剤化すればよい。

[0156] 特定の実施形態において、本発明の二本鎖核酸複合体は、水、日本薬局方溶出試験第2液、又は日本薬局方崩壊試験第2液に対する溶解性に優れ、体内動態（例、血中薬物半減期、脳内移行性、代謝安定性、CYP阻害）に優れ、毒性が低く（例えば、急性毒性、慢性毒性、遺伝毒性、生殖毒性、心毒性、薬物相互作用、癌原性、光毒性等の点から医薬として、より優れている）、かつ副作用も少ない（例えば、過沈静（sedation）の抑制、層状壊死の回避）等の医薬品として優れた性質も有する。

[0157] 2-3. 投与形態及び投与量

本明細書において、医薬組成物の好ましい投与形態には特定の限定はない。例えば、経口投与又は非経口投与であればよい。非経口投与の具体例として、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与（埋め込

み型持続皮下投与を含む)、皮内投与、気管/気管支投与、直腸投与、輸血による投与、脳室内投与、髄腔内投与、経鼻投与、及び筋肉内投与が挙げられる。髄腔内投与は、例えば後頭窩穿刺又は腰椎穿刺であってもよい。

[0158] 医薬組成物が投与又は摂取により適用される場合、投与量又は摂取量は、例えば、包含する二本鎖核酸複合体が0.00001mg/kg/日~10000mg/kg/日、又は0.001mg/kg/日~100mg/kg/日となるようにすればよい。医薬組成物は、単回投与でも、複数回投与であってもよい。複数回投与の場合、毎日若しくは適当な時間間隔で(例えば1日、2日、3日、1週間、2週間、1ヶ月の間隔で)、例えば2~20回等投与することもできる。上記の二本鎖核酸複合体の1回の投与量は、例えば、0.001mg/kg以上、0.005mg/kg以上、0.01mg/kg以上、0.25mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1mg/kg以上、2.5mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1.0mg/kg以上、2.0mg/kg以上、3.0mg/kg以上、4.0mg/kg以上、5mg/kg以上、10mg/kg以上、20mg/kg以上、30mg/kg以上、40mg/kg以上、50mg/kg以上、75mg/kg以上、100mg/kg以上、150mg/kg以上、200mg/kg以上、300mg/kg以上、400mg/kg以上、若しくは500mg/kg以上とすることができ、例えば、0.001mg/kg~500mg/kgの範囲に含まれる任意の量(例えば、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、若しくは200mg/kg)を適宜選択することができる。

[0159] 本発明の二本鎖核酸複合体は、0.01~10mg/kg(例えば約6.25mg/kg)の用量で週2回の頻度で4回投与してもよい。また、二本鎖核酸複合体は、0.05~30mg/kg(例えば約25mg/kg)の用量で週1~2回の頻度で2~4回、例えば週2回の頻度で2回投与してもよい。このような投与レジメン(分割投与)の採用により、より高用量の単回投与に比べて、毒性(例えば血小板の減少を回避する)を下げ、被検体への負荷を低減することができる。

[0160] 医薬組成物は反復投与でも細胞内において抑制効果が相加的に働く。また、反復投与する場合、ある程度の投与間隔(例えば、半日以上)をおいた方が有効性を向上させることができる。

[0161] 一実施形態において、本態様の医薬組成物は脳室内投与又は髄腔内投与さ

れる。本態様の医薬組成物を脳室内投与又は髄腔内投与する場合、サルやヒトの場合には0.01mg以上、0.1mg以上、又は1mg以上、例えば、2mg以上、3mg以上、4mg以上、5mg以上、10mg以上、20mg以上、30mg以上、40mg以上、50mg以上、75mg以上、100mg以上、200mg以上、300mg以上、400mg以上、又は500mg以上投与してもよく、0.01mg～1000mg、0.1mg～200mg、又は1mg～20mg投与してもよく、マウスの場合には1 $\mu$ g以上投与してもよい。

[0162] 一実施形態において、本態様の医薬組成物は静脈内投与又は皮下投与される。本態様の医薬組成物を静脈内投与又は皮下投与する場合、0.01mg/kg以上、0.1mg/kg以上、又は1mg/kg以上、例えば、2mg/kg以上、3mg/kg以上、4mg/kg以上、5mg/kg以上、10mg/kg以上、20mg/kg以上、30mg/kg以上、40mg/kg以上、50mg/kg以上、75mg/kg以上、100mg/kg以上、150mg/kg以上、200mg/kg以上、300mg/kg以上、400mg/kg以上、又は500mg/kg以上投与してもよく、0.01mg/kg～1000mg/kg、0.1mg/kg～100mg/kg、又は1mg/kg～10mg/kg投与してもよい。

[0163] 2-4. 適用対象疾患

医薬組成物の適用対象となる疾患は、限定しない。本発明の二本鎖核酸複合体のアンチセンス効果により、その転写産物又は翻訳産物の発現量が抑制若しくは亢進され得る、その転写産物又は翻訳産物の機能が阻害され得る、又はステリックブロッキング、スプライシングスイッチ、RNA編集、エクソンスキッピング若しくはエクソンインクルージョンが誘導され得る遺伝子が関係し得る疾患を対象とすることができる。疾患の具体例は「1-5. 二本鎖核酸複合体の用途」の記載に準じる。

[0164] 一実施形態において、本態様の医薬組成物は被検体の中枢神経系疾患を治療するために用いることができる。本態様の医薬組成物の適用対象となる中枢神経系疾患として、特に限定されないが、例えば、脳腫瘍、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、ハンチントン病等が挙げられる。

[0165] 2-5. 効果

本発明の医薬組成物は、中枢神経毒性が軽減されている。それ故、本発明の医薬組成物は、脳室内投与や髄腔内投与により副作用を伴うことなく予防効果又は治療効果を達成することができる。

[0166] 特に、アルツハイマー病等の神経疾患の治療には高用量の核酸剤の投与が必要となり、副作用を伴うリスクがあるが、本発明の医薬組成物によればそのような副作用を大幅に低減することが可能となる。

[0167] 上記の二本鎖核酸複合体又は医薬組成物を被検体に投与することを含む、中枢神経系疾患等の疾患の治療及び／又は予防方法もまた提供される。

[0168] また、疾患を治療及び／又は予防するための医薬の製造における、本発明の二本鎖核酸複合体の使用もまた提供される。

## 実施例

[0169] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0170] <実施例1：Mapt遺伝子を標的とするHD0のMOE修飾>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするアンチセンス核酸（以下、「AS0」と称する）からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド（以下、「HD0」と称する）を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、MOE修飾に基づく毒性軽減効果を *in vivo* 実験により検証する。

[0171] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表1及び図4に示す。

[0172]

[表1]

表1: Mapt 遺伝子を標的とする ASO 及び HDO

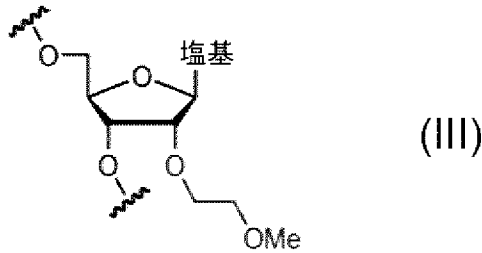
		配列(5'-3')	配列番号
ASO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
HDO (all RNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all RNA)	UCACCAGAGUGACUAU	2
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (6MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6MOE wing)	<u>TC</u> (5) <u>Accagagtgac</u> <u>TAT</u>	4
HDO (all MOE)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all MOE)	<u>TC</u> (5) <u>AC</u> (5) <u>C</u> (5) <u>AGAGTGAC</u> (5) <u>TAT</u>	5

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は5-メチルシチシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0173] 本実施例で用いたASOは、マウスのmicrotubule-associated protein tau (Mapt) mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5'末端の3個のLNAヌクレオシド、3'末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all RNA)、HDO(all DNA)、HDO(6MOE wing)、及びHDO(all MOE)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all RNA)の第2核酸鎖 (c(all RNA)) はRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6MOE wing)の第2核酸鎖 (c(6MOE wing)) は、5'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(all MOE)の第2核酸鎖 (c(all MOE)) は2'-O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0174] なお、本明細書の実施例で使用した2'-O-MOE-RNAヌクレオシドは、以下の式 (III) :

[化9]



で示される非天然ヌクレオシドである。

[0175] 表1に記載される二本鎖核酸複合体を調製するために、第1核酸鎖と第2核酸鎖とを等モル量で混合し、溶液を95℃で5分間加熱し、その後37℃に冷却して1時間保持し、これにより核酸鎖をアニールして二本鎖核酸複合体を調製した。アニールした核酸を4℃又は氷上で保存した。全てのオリゴヌクレオチドは株式会社ジーンデザイン(Gene Design)(大阪、日本)によって委託合成された。

[0176] (2) *in vivo*実験

7週齢雌のICRマウスを、2.5~4%イソフルレン麻酔下にて脳定位固定装置に固定した。その後、耳間に前後2~3cmで皮膚を切開し、ブレグマ(bregma)の1mm左方かつ0.2mm後方に1mm径ドリルで穿孔した。ハミルトン(Hamilton)シリンジ内に核酸剤を充填した。穿孔部より針を3mm程度刺入し、2~3 $\mu$ l/分の速度で、マウス1匹当たり19nmol/匹の用量で核酸剤を左側脳室内投与し(n=4~7)、ナイロン糸で皮膚縫合した。また、陰性対照群としてPBSのみを投与したマウスも作製した。

[0177] (3) 核酸剤投与後の中枢神経毒性評価及び運動機能評価

各種核酸剤投与後のマウスにおいて、中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。

中枢神経毒性評価として、核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後に、図3に示すスコアリングシステムを用いて行動評価を行った。

[0178] 図3に示すスコアリングシステムでは、5つのカテゴリーに属する行動が評

価対象となる（図3、カテゴリー1～5）。各カテゴリーには各々2つの行動評価項目が含まれている。各行動評価項目は0～5点（図3、スコア0～5）の5段階で評価され、正常であれば0点となり、高毒性になるほどスコアが高くなる。各カテゴリーでは、2つの行動評価項目のうち高い方のスコアをそのカテゴリーのスコアとして採用する。5つのカテゴリーのスコアを合計した値を急性期忍容性スコア（0～20点）とする。

[0179] また、運動機能評価として、各種核酸剤投与後の各時点でオープンフィールドテストを行った。具体的には、マウスをケージ（幅50cm×直径50cm×高さ40cm）の中央に配置し、マウスの軌跡を5分間記録した。記録データに基づく総移動距離(m)及び最大移動速度(m/s)をビデオトラッキングソフト（ANY-maze）により計測した。各投与群の間の統計学的有意差はボンフェローニ検定によって評価した。

[0180] （4）遺伝子抑制効果の評価

各種核酸剤投与から7日後のマウスから海馬を摘出した。IsogenIキット（株式会社ジーンデザイン）を使用して、摘出した左海馬からRNAを抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master, DNase（ロシュ・ダイアグノスティックス社(Roche Diagnostics)）を使用してプロトコルに従って合成した。

[0181] 次に、得られたcDNAを鋳型として定量RT-PCRを行うことにより、Mapt mRNA及びActb mRNA（内部標準遺伝子）の発現量を測定した。定量RT-PCRは、TaqMan（ロシュ・アプライドサイエンス社(Roche Applied Science)）により実施した。定量RT-PCRにおいて使用したプライマーは、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社(Thermo Fisher Scientific、旧ライフ・テクノロジーズ社(Life Technologies Corp))によって設計及び製造された製品であった。増幅条件(温度及び時間)は以下の通りであった：95℃で15秒、60℃で30秒、及び72℃で1秒(1サイクル)を40サイクル繰り返した。

[0182] Actb mRNA(内部標準遺伝子)の発現量に対するMapt mRNAの発現量の比率を計算し、PBS投与群の値に対して標準化した値を相対的Mapt mRNAレベルとし

た。

[0183] (結果)

図5は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(6MOE wing)及びHD0(all MOE)の投与群では、AS0、HD0(all RNA)、及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、急性期忍容性スコア (acute tolerability score) が著しく減少した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0では中枢神経毒性が顕著に低下することが示された。

[0184] 図6は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(6MOE wing)及びHD0(all MOE)の投与群では、AS0、HD0(all RNA)、及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、総移動距離 (図6A) 及び最大移動速度 (図6B) が著しく改善した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0では、運動機能を抑制する効果が極めて小さく、毒性が極めて低いことが示された。

[0185] 図7は、各種核酸剤の脳室内投与から7日後において海馬におけるMapt mRNA発現レベルを示す。HD0(all MOE)投与群では、AS0、HD0(all RNA)、及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、遺伝子抑制効果が低下していた。一方、HD0(6MOE wing)投与群は、AS0、HD0(all RNA)、及びHD0(all DNA)の投与群と同等な遺伝子抑制効果を示した。以上の結果から、HD0(6MOE wing)によって、実質的に中枢神経毒性を伴うことなく、高い遺伝子抑制効果が得られることが示された。

[0186] <実施例2 : BACE1遺伝子を標的とするHD0のMOE修飾>

(目的)

BACE1遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、MOE修飾に基づく毒性軽減効果をin vivo実験により検証する。

[0187] (方法)

本実施例で用いたAS0、並びにHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表2及び図8に示す。

[0188] [表2]

表 2: BACE1 遺伝子を標的とする ASO 及び HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO	ASO	<u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> a <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	6
HDO (all RNA)	ASO	<u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> a <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	6
	c(all RNA)	UCCUCAGCAAUAC	7
HDO (all DNA)	ASO	<u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> a <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	6
	c(all DNA)	tcctcagcaatac	8
HDO (5MOE wing)	ASO	<u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> a <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	6
	c(5MOE wing)	<u>TC (5) C (5) tcagcaatAC (5)</u>	9

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNAを表す); ^:ホスホロチオエート結合(PS 結合)

[0189] 本実施例で用いたAS0は、マウスのβ-セクレターゼ1(beta-secretase 1、BACE1) mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、BACE1 mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5'末端の2個のLNAヌクレオシド、3'末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の8個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all RNA)、HDO(all DNA)、及びHDO(5MOE wing)は、いずれも上記AS0を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all RNA)の第2核酸鎖(c(all RNA))はRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(all DNA)の第2核酸鎖(c(all DNA))はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(5MOE wing)の第2核酸鎖(c(5MOE wing))は、5'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3'末端の2個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の8個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0190] 表2に記載されるAS0、HDO(all RNA)、HDO(all DNA)、及びHDO(5MOE wing)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当

たりの核酸剤投与量は、11.5nmol/匹とした。

[0191] (結果)

図9は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(5MOE wing)投与群では、AS0、HD0(all RNA)、及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0では中枢神経毒性が顕著に低下することが示された。

[0192] 図10は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(5MOE wing)投与群では、AS0、HD0(all RNA)、及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、総移動距離(図10A)及び最大移動速度(図10B)が著しく改善した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0では、運動機能を抑制する効果が極めて小さく、毒性が極めて低いことが示された。

[0193] <実施例3: Malat1遺伝子を標的とするHD0のMOE修飾>

(目的)

Malat1遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、MOE修飾に基づく毒性軽減効果をin vivo実験により検証する。

[0194] (方法)

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表3及び図11に示す。

[0195]

[表3]

表 3: Malat1 遺伝子を標的とする ASO 及び HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <sup>a</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> G <sup>^</sup> C(5) <sup>T</sup> <sup>A</sup> <sup>G</sup>	10
HDO (all RNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <sup>a</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> G <sup>^</sup> C(5) <sup>T</sup> <sup>A</sup> <sup>G</sup>	10
	c(all RNA)	CUAGCAUUGGCAGCUGACCC	11
HDO (all DNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <sup>a</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> G <sup>^</sup> C(5) <sup>T</sup> <sup>A</sup> <sup>G</sup>	10
	c(all DNA)	ctagcattggcagctgaccc	12
HDO (10MOE wing)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <sup>a</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t <sup>^</sup> G <sup>^</sup> C(5) <sup>T</sup> <sup>A</sup> <sup>G</sup>	10
	c(10MOE wing)	C(5) TAGC(5) attggcagctGAC(5) C(5) C(5)	13

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA(c(5)は 5-メチルシトシン LNA を表す); 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA(C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合(PS 結合)

[0196] 本実施例で用いたASOは、マウスの転移関連肺腺癌転写産物1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, Malat1) ノンコーディングRNAを標的とする2'-O-MOE-RNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Malat1 ncRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all RNA)、HDO(all DNA)、及びHDO(10MOE wing)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all RNA)の第2核酸鎖 (c(all RNA)) はRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(10MOE wing)の第2核酸鎖 (c(10MOE wing)) は、5' 末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0197] 表3に記載されるASO、HDO(all RNA)、HDO(all DNA)、及びHDO(10MOE wing)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当

たりの核酸剤投与量は、13.86nmol/匹とした。

[0198] (結果)

図12は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(5MOE wing)投与群では、AS0及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。また、核酸剤の投与から30分後、1時間後、及び2時間後の時点において、HD0(5MOE wing)投与群では、HD0(all RNA)投与群と比較して、急性期忍容性スコアが低かった。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0では中枢神経毒性が顕著に低下することが示された。

[0199] 図13は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(10MOE wing)投与群では、AS0、HD0(all RNA)、及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、総移動距離 (図13A) 及び最大移動速度 (図13B) が著しく改善した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0では、運動機能を抑制する効果が極めて小さく、毒性が極めて低いことが示された。

[0200] <実施例4：MOE修飾、2' OMe修飾、及び2' F修飾の比較>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、MOE修飾、2' OMe修飾、及び2' F修飾による毒性軽減効果を *in vivo* 実験により比較する。

[0201] (方法)

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表4及び図14に示す。

[0202]

[表4]

表 4: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (RNA 6MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(RNA 6MOE wing)	<u>TC (5) ACCAGAGUGACTAT</u>	14
HDO (6MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6MOE wing)	<u>TC (5) AccagagtgacTAT</u>	4
HDO (6OMe wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6OMe wing)	<u>U (M) C (M) A (M) ccagagtgacU (M) A (M) U (M)</u>	15
HDO (6F wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6F wing)	<u>U (F) C (F) A (F) ccagagtgacU (F) A (F) U (F)</u>	16

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); 大文字(M):2'-O-Me-RNA; 大文字(F):2F-RNA; ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0203] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(RNA 6MOE wing)、HDO(6MOE wing)、HDO(6OMe wing)、及びHDO(6F wing)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(RNA 6MOE wing)の第2核酸鎖 (c(RNA 6MOE wing)) は、5' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6MOE wing)の第2核酸鎖 (c(6MOE wing)) は、5' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6OMe wing)の第2核酸鎖 (c(6OMe wing)) は、5' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6F wing)の第2核酸鎖

(c(6F wing)) は、5' 末端の3個の2' F-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2' F-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0204] 表4に記載されるHD0(RNA 6MOE wing)、HD0(6MOE wing)、HD0(60Me wing)、及びHD0(6F wing)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、*in vivo*実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、19nmol/匹とした。

[0205] (結果)

図15は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(RNA 6MOE wing)及びHD0(6MOE wing)の投与群では、HD0(all DNA)、HD0(60Me wing)、及びHD0(6F wing)の投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。さらに、HD0(6MOE wing)投与群は、HD0(RNA 6MOE wing)投与群と比較して低い急性期忍容性スコアを示した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0は、2'-O-Me-RNAや2' F-RNAヌクレオシドヌクレオシドを含むHD0と比較しても低い中枢神経毒性を達成し得ることが示された。

[0206] 図16~17は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後及び3時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(RNA 6MOE wing)及びHD0(6MOE wing)の投与群では、HD0(all DNA)、HD0(60Me wing)、及びHD0(6F wing)の投与群と比較して、総移動距離 (図16A、図17A) 及び最大移動速度 (図16B、図17B) が著しく改善した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0は、2'-O-Me-RNAや2' F-RNAヌクレオシドヌクレオシドを含むHD0と比較しても、運動機能を抑制する効果が極めて小さく、毒性が極めて低いことが示された。

[0207] <実施例5：グアノシンヌクレオシドの置換>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な

塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHDOを脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、第2核酸鎖におけるグアノシンヌクレオシドの置換による毒性軽減効果を *in vivo* 実験により検討する。

[0208] (方法)

本実施例で用いたASO、並びにHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表5及び図18に示す。

[0209] [表5]

表 5: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> g <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> g <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> g <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> g <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(6MOE wing)	c(6MOE wing)	<u>TC (5) AccagagtgacTAT</u>	4
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> g <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> g <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(G <sup>MOE</sup> )	c(G <sup>MOE</sup> )	<u>TC (5) AccaGaGtGacTAT</u>	17
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> g <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> g <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(G <sup>RNA</sup> )	c(G <sup>RNA</sup> )	<u>TC (5) AccaGaGtGacTAT</u>	18
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> g <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> t <sup>^</sup> g <sup>^</sup> g <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(inosine)	c(inosine)	<u>TC (5) AccaiaitiacTAT</u>	19

小文字:DNA (i はイノシン DNA を表す); 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5) は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0210] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(6MOE wing)、HDO(G<sup>MOE</sup>)、HDO(G<sup>RNA</sup>)、及びHDO(inosine)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(6MOE wing)の第2核酸鎖 (c(6MOE wing)) は、5' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(G<sup>MOE</sup>)の第2核酸鎖 (c(G<sup>MOE</sup>)) は、c(6MOE wing)においてグアニン塩基を含むDNAヌクレオシドが2'-O-MOE-RNAヌクレオシドに置換されている。HDO(G<sup>RNA</sup>)の第2核酸鎖 (c(G<sup>RNA</sup>)) は、c(6MOE

wing)においてグアニン塩基を含むDNAヌクレオシドがRNAヌクレオシドに置換されている。HD0(inosine)の第2核酸鎖 (c(inosine)) は、c(6MOE wing)においてDNAヌクレオシドに含まれるグアニン塩基がイノシン塩基に置換されている。

[0211] 表5に記載されるAS0、HD0(6MOE wing)、HD0(G<sup>MOE</sup>)、HD0(G<sup>RNA</sup>)、及びHD0(inosine)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、18.86nmol/匹とした。

[0212] (結果)

図19は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(G<sup>MOE</sup>)及びHD0(G<sup>RNA</sup>)の投与群は、HD0(6MOE wing)投与群に対して同等かそれより低い急性期忍容性スコアを示した。

[0213] <実施例6：Mapt遺伝子を標的とするHD0における様々なMOE修飾>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、様々なMOE修飾に基づく毒性軽減効果をin vivo実験により検証する。

[0214] (方法)

本実施例で用いたHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表6及び図20に示す。

[0215]

[表6]

表 6: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (6MOE-5'&3')	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6MOE-5'&3')	<u>TC (5) AccagagtgacTAT</u>	4
HDO (6MOE-5')	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6MOE-5')	<u>TC (5) AC (5) C (5) Agagtgactat</u>	20
HDO (6MOE-3')	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6MOE-3')	tcaccagagtGAC (5) TAT	21
HDO (10MOE-5')	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(10MOE-5')	<u>TC (5) AC (5) C (5) AGAGTgactat</u>	22
HDO (10MOE-3')	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(10MOE-3')	tcaccaGAGTGAC (5) TAT	23

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

- [0216] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(6MOE-5' & 3')、HDO(6MOE-5')、HDO(6MOE-3')、HDO(10MOE-5')、及びHDO(10MOE-3')は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6MOE-5' & 3')の第2核酸鎖 (c(6MOE-5' & 3')) は、5' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6MOE-5')の第2核酸鎖 (c(6MOE-5')) は、5' 末端の6個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及び3' 末端の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6MOE-3')の第2核酸鎖 (c(6MOE-3')) は、5' 末端の10個のDNAヌクレオシド、及び3' 末端の6個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結

合で連結された構造を有する。HD0(10MOE-5')の第2核酸鎖(c(10MOE-5'))は、5'末端の10個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及び3'末端の6個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(10MOE-3')の第2核酸鎖(c(10MOE-3'))は、5'末端の6個のDNAヌクレオシド、及び3'末端の10個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0217] 表6に記載されるHD0(all DNA)、HD0(6MOE-5' & 3')、HD0(6MOE-5')、HD0(6MOE-3')、HD0(10MOE-5')、及びHD0(10MOE-3')について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、*in vivo*実験、中枢神経毒性評価及び運動機能評価、並びに遺伝子抑制効果の評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、18.86nmol/匹とした。

[0218] (結果)

図21は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(6MOE-5' & 3')、HD0(6MOE-5')、HD0(6MOE-3')、HD0(10MOE-5')、及びHD0(10MOE-3')の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。特にHD0(10MOE-5')及びHD0(10MOE-3')の投与群における急性期忍容性スコアがHD0投与群で最小となった。

[0219] 図22~23は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後及び3時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(6MOE-5' & 3')、HD0(6MOE-5')、HD0(6MOE-3')、HD0(10MOE-5')、及びHD0(10MOE-3')の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、総移動距離(図22A、図23A)及び最大移動速度(図22B、図23B)が著しく改善した。投与後1時間の時点では、HD0(10MOE-5')及びHD0(10MOE-3')の投与群における改善効果がHD0投与群で最大となった。投与後3時間の時点では、HD0(6MOE-5' & 3')投与群における改善効果がHD0投与群で最大となった。

[0220] 図24は、各種核酸剤の脳室内投与から7日後において海馬におけるMapt mRNA

A発現レベルを示す。HDO(all DNA)、HDO(6MOE-5' & 3')、HDO(6MOE-5')、HDO(6MOE-3')、HDO(10MOE-5')、及びHDO(10MOE-3')の投与群は、PBSのみを投与した陰性対照と比較して、Mapt mRNA発現レベルの有意な低下を示した。

[0221] <実施例7：BACE1遺伝子を標的とするHDOにおける様々なMOE修飾>

(目的)

BACE1遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHDOを脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、様々なMOE修飾に基づく毒性軽減効果をin vivo実験により検証する。

[0222] (方法)

本実施例で用いたHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表7及び図25に示す。

[0223] [表7]

表 7: BACE1 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	6
	c(all DNA)	tcctcagcaatac	8
HDO (5MOE-5')	ASO	<u>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	6
	c(5MOE-5')	<u>TC (5) C (5) TC (5) agcaatac</u>	24
HDO (5MOE-3')	ASO	<u>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	6
	c(5MOE-3')	tcctcagc <u>AATAC (5)</u>	25
HDO (8MOE-5')	ASO	<u>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	6
	c(8MOE-5')	<u>TC (5) C (5) TC (5) AGC (5) aatac</u>	26
HDO (8MOE-3')	ASO	<u>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	6
	c(8MOE-3')	tcctc <u>AGC (5) AATAC (5)</u>	27
HDO (10MOE-5')	ASO	<u>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	6
	c(10MOE-5')	<u>TC (5) C (5) TC (5) AGC (5) AAtac</u>	28
HDO (10MOE-3')	ASO	<u>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	6
	c(10MOE-3')	tc <u>TC (5) AGC (5) AATAC (5)</u>	29

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNAを表す); ^:ホスホロチオエート結合(PS結合)

[0224] 本実施例で用いたASOは、BACE1 mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、BACE1 mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5'末端の2個のLNAヌクレオシド、3'末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれら

の間の8個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHD0(all DNA)、HD0(5MOE-5')、HD0(5MOE-3')、HD0(8MOE-5')、HD0(8MOE-3')、HD0(10MOE-5')、及びHD0(10MOE-3')は、いずれも上記AS0を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HD0(all DNA)の第2核酸鎖(c(all DNA))はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(5MOE-5')の第2核酸鎖(c(5MOE-5'))は、5'末端の5個の2'-0-MOE-RNAヌクレオシド、及び3'末端の8個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(5MOE-3')の第2核酸鎖(c(5MOE-3'))は、5'末端の8個のDNAヌクレオシド、及び3'末端の5個の2'-0-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(8MOE-5')の第2核酸鎖(c(8MOE-5'))は、5'末端の8個の2'-0-MOE-RNAヌクレオシド、及び3'末端の5個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(8MOE-3')の第2核酸鎖(c(8MOE-3'))は、5'末端の5個のDNAヌクレオシド、及び3'末端の8個の2'-0-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(10MOE-5')の第2核酸鎖(c(10MOE-5'))は、5'末端の10個の2'-0-MOE-RNAヌクレオシド、及び3'末端の3個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(10MOE-3')の第2核酸鎖(c(10MOE-3'))は、5'末端の3個のDNAヌクレオシド、及び3'末端の10個の2'-0-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0225] 表7に記載されるHD0(all DNA)、HD0(5MOE-5')、HD0(5MOE-3')、HD0(8MOE-5')、HD0(8MOE-3')、HD0(10MOE-5')、及びHD0(10MOE-3')について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、11.5nmol/匹とした。

[0226] (結果)

図26は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後

、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(5MOE-5')、HD0(5MOE-3')、HD0(8MOE-5')、HD0(8MOE-3')、HD0(10MOE-5')、及びHD0(10MOE-3')の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。

[0227] 図27は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。、HD0(5MOE-5')、HD0(5MOE-3')、HD0(8MOE-5')、HD0(8MOE-3')、HD0(10MOE-5')、及びHD0(10MOE-3')の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、総移動距離(図27A)及び最大移動速度(図27B)が著しく改善した。

[0228] <実施例8 : Mapt遺伝子を標的とするHD0における様々なMOE修飾>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、様々なMOE修飾に基づく毒性軽減効果をin vivo実験により検証する。

[0229] (方法)

本実施例で用いたHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表8及び図28に示す。

[0230]

[表8]

表 8: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgcactat	3
HDO (6MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6MOE wing)	<b>TC (5) AccagagtgcTAT</b>	4
HDO (9MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(9MOE wing)	<b>TC (5) AC (5) C (5) agagtgaC (5) TAT</b>	30
HDO (11MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(11MOE wing)	<b>TC (5) AC (5) C (5) AgagtgaC (5) TAT</b>	31
HDO (13MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(13MOE wing)	<b>TC (5) AC (5) C (5) AGagtGAC (5) TAT</b>	32
HDO (15MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(15MOE wing)	<b>TC (5) AC (5) C (5) AGAgTGAC (5) TAT</b>	33

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0231] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(6MOE wing)、HDO(9MOE wing)、HDO(11MOE wing)、HDO(13MOE wing)、及びHDO(15MOE wing)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(6MOE wing)の第2核酸鎖 (c(6MOE wing)) は、5' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(9MOE wing)の第2核酸鎖 (c(9MOE wing)) は、5' 末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の4個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の7個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(11MOE wing)の第2核酸鎖 (c(11MOE wing)) は、5' 末端の6個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の5個のDNAヌ

クレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(13MOE wing)の第2核酸鎖 (c(13MOE wing)) は、5' 末端の7個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の6個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の3個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(15MOE wing)の第2核酸鎖 (c(15MOE wing)) は、5' 末端の8個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の7個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の1個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0232] 表8に記載されるHD0(all DNA)、HD0(6MOE wing)、HD0(9MOE wing)、HD0(11MOE wing)、HD0(13MOE wing)、及びHD0(15MOE wing)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、中枢神経毒性評価及び運動機能評価、並びに遺伝子抑制効果の評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、18.86nmol/匹とした。

[0233] (結果)

図29は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(6MOE wing)、HD0(9MOE wing)、HD0(11MOE wing)、HD0(13MOE wing)、及びHD0(15MOE wing)の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。

[0234] 図30は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能の評価した結果を示す。、HD0(6MOE wing)、HD0(9MOE wing)、HD0(11MOE wing)、HD0(13MOE wing)、及びHD0(15MOE wing)の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、総移動距離 (図30A) 及び最大移動速度 (図30B) が著しく改善した。

[0235] <実施例9：MOE修飾における塩基種の比較>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、第2核酸鎖においてMOE修飾を導入するヌクレオシドの種

類（アデニン塩基、グアニン塩基、シトシン塩基、又はチミン塩基を含むヌクレオシド）による毒性軽減効果の違いについて *in vivo* 実験により比較する。

[0236] (方法)

本実施例で用いたASO、並びにHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表9及び図31に示す。

[0237] [表9]

表 9: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (A <sup>MOE</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(A <sup>MOE</sup> )	tc <u>AccAgAgtgActAt</u>	44
HDO (G <sup>MOE</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(G <sup>MOE</sup> )	tcacca <u>GaGtGactat</u>	45
HDO (C <sup>MOE</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(C <sup>MOE</sup> )	t <u>C(5)aC(5)C(5)agagtgaC(5)tat</u>	46
HDO (T <sup>MOE</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(T <sup>MOE</sup> )	<u>TcaccagagTgacTaT</u>	47

小文字:DNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0238] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(A<sup>MOE</sup>)、HDO(G<sup>MOE</sup>)、HDO(C<sup>MOE</sup>)、及びHDO(T<sup>MOE</sup>)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(A<sup>MOE</sup>)の第2核酸鎖 (a(A<sup>MOE</sup>)) は、アデニン塩基を含むDNAヌクレオシドを全て2'-O-MOE-RNAヌクレオシドに置換した構造を有し、同様にHDO(G<sup>MOE</sup>)はグアニン塩基を、HDO(C<sup>MOE</sup>)はシトシン塩基を、HDO(T<sup>MOE</sup>)はチミン塩基を含むDNAヌクレオシドをそれぞれ全て2'-O-MOE-RNAヌクレオシドに置換した構造を有する

。

[0239] 表9に記載されるHD0(all DNA)、HD0(A<sup>MOE</sup>)、HD0(G<sup>MOE</sup>)、HD0(C<sup>MOE</sup>)、及びHD0(T<sup>MOE</sup>)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、19nmol/匹とした。

[0240] (結果)

図32は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(A<sup>MOE</sup>)、HD0(C<sup>MOE</sup>)、及びHD0(T<sup>MOE</sup>)の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少し、HD0(G<sup>MOE</sup>)投与群は、HD0(all DNA)投与群と比較して急性期忍容性スコアがわずかに減少した。この結果から、第2核酸鎖においてアデニン塩基、シトシン塩基、又はチミン塩基を含むヌクレオシドを2'-O-MOE-RNAヌクレオシドに置換したHD0は、第2核酸鎖がDNAヌクレオシドのみからなるHD0と比較して中枢神経毒性を軽減し得ることが示された。

[0241] 図33は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後及び3時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(A<sup>MOE</sup>)、HD0(C<sup>MOE</sup>)、及びHD0(T<sup>MOE</sup>)の投与群では、HD0(all DNA)投与群と比較して、総移動距離 (図33A) 及び最大移動速度 (図33B) が著しく改善し、HD0(G<sup>MOE</sup>)投与群は、HD0(all DNA)の投与群と比較して総移動距離 (図33A) 及び最大移動速度 (図33B) がわずかに改善した。この結果から、第2核酸鎖においてアデニン塩基、シトシン塩基、又はチミン塩基を含むヌクレオシドを2'-O-MOE-RNAヌクレオシドに置換したHD0は、第2核酸鎖がDNAヌクレオシドのみからなるHD0と比較して中枢神経毒性を軽減し得ることが示された。

[0242] <実施例10：MOE修飾における隣接核酸の比較>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢

神経毒性について、第2核酸鎖においてシトシン塩基を含むヌクレオシド並びにその5'側及び／又は3'側に隣接するヌクレオシドへのMOE修飾の導入による毒性軽減効果をin vivo実験により比較する。

[0243] (方法)

本実施例で用いたAS0、並びにHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表10及び図34に示す。

[0244] [表10]

表 10: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (C <sup>MOE</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(C <sup>MOE</sup> )	<u>tC(5)</u> <u>aC(5)</u> <u>C(5)</u> agagtga <u>C(5)</u> <u>tat</u>	46
HDO (2C <sup>MOE-5</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(2C <sup>MOE-5</sup> )	<u>TC(5)</u> <u>AC(5)</u> <u>C(5)</u> agagtga <u>AC(5)</u> <u>tat</u>	48
HDO (2C <sup>MOE-3</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(2C <sup>MOE-3</sup> )	<u>tC(5)</u> <u>AC(5)</u> <u>C(5)</u> Agagtga <u>C(5)</u> <u>Tat</u>	49
HDO (3C <sup>MOE</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(3C <sup>MOE</sup> )	<u>TC(5)</u> <u>AC(5)</u> <u>C(5)</u> Agagtga <u>AC(5)</u> <u>Tat</u>	50

小文字:DNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合(PS 結合)

[0245] 本実施例で用いたAS0は、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5'末端の3個のLNAヌクレオシド、3'末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(C<sup>MOE</sup>)、HDO(2C<sup>MOE-5</sup>)、HDO(2C<sup>MOE-3</sup>)及びHDO(3C<sup>MOE</sup>)は、いずれも上記AS0を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖(c(all DNA))はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(C<sup>MOE</sup>)の第2核酸鎖(c(C<sup>MOE</sup>))はシトシン塩基を含むDNAヌクレオシドを全て2'-O-MOE-RNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(2C<sup>MOE-5</sup>)の第2核酸鎖(c(2C<sup>MOE-5</sup>))はシトシン塩基を含むDNAヌクレオシド及びその5'側に隣接するDNAヌクレオシドを全て2'-O-MOE-RNAヌクレオシドに置換した構造を有

する。HD0(2C<sup>MOE</sup>-3)の第2核酸鎖 (c(2C<sup>MOE</sup>-3)) はシトシン塩基を含むDNAヌクレオシド及びその3' に隣接するDNAヌクレオシドを全て2' -0-MOE-RNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HD0(3C<sup>MOE</sup>)の第2核酸鎖 (c(3C<sup>MOE</sup>)) はシトシン塩基を含むDNAヌクレオシド及びその5' 側及び3' 側に隣接するDNAヌクレオシドを全て2' -0-MOE-RNAヌクレオシドに置換した構造を有する。

[0246] 表10に記載されるHD0(all DNA)、HD0(C<sup>MOE</sup>)、HD0(2C<sup>MOE</sup>-5)、HD0(2C<sup>MOE</sup>-3)及びHD0(3C<sup>MOE</sup>)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、19nmol/匹とした。

[0247] (結果)

図35は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(2C<sup>MOE</sup>-5)、HD0(2C<sup>MOE</sup>-3)及びHD0(3C<sup>MOE</sup>)の投与群では、HD0(all DNA)及びHD0(C<sup>MOE</sup>)の投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。この結果から、第2核酸鎖においてシトシン塩基を含むヌクレオシド及びその隣接するヌクレオシドを2' -0-MOE-RNAヌクレオシドに置換したHD0は、第2核酸鎖がDNAヌクレオシドからなるHD0と比較して中枢神経毒性が軽減されることが示された。

[0248] 図36は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後及び3時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(2C<sup>MOE</sup>-5)、HD0(2C<sup>MOE</sup>-3)及びHD0(3C<sup>MOE</sup>)の投与群では、HD0(all DNA)及びHD0(C<sup>MOE</sup>)の投与群と比較して、総移動距離 (図36A) 及び最大移動速度 (図36B) が著しく改善した。この結果から、第2核酸鎖においてシトシン塩基を含むヌクレオシド及びその隣接するヌクレオシドを2' -0-MOE-RNAヌクレオシドに置換したHD0は、第2核酸鎖がDNAヌクレオシドからなるHD0と比較して、中枢神経毒性が軽減され得ることが示された。

[0249] <実施例11：髄液中におけるHD0の安定性>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0をヒト又はラットの髄液中でインキュベートし、その安定性を検討する。

[0250] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表11、図37A、図37B、図38A、及び図38Bに示す。

[0251] [表11]

表 11: Mapt 遺伝子を標的とする HD0

		配列(5'-3')	配列番号
ASO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(ASO/cRNA)	cRNA	U <sup>^</sup> C <sup>^</sup> A <sup>^</sup> CCAGAGUGAC <sup>^</sup> U <sup>^</sup> A <sup>^</sup> U	2
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(ASO/cDNA)	cDNA	t <sup>^</sup> c <sup>^</sup> a <sup>^</sup> ccagagt <sup>^</sup> gac <sup>^</sup> t <sup>^</sup> a <sup>^</sup> t	3

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0252] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHD0(ASO/cRNA)及びHD0(ASO/cDNA)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HD0(ASO/cRNA)の第2核酸鎖 (cRNA) は、RNAヌクレオシドが、5' 末端から3個のホスホロチオエート結合、3' 末端から3個のホスホロチオエート結合、及びそれらの間の9個のホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(ASO/cDNA)の第2核酸鎖 (cDNA) は、DNAヌクレオシドが、5' 末端から3個のホスホロチオエート結合、3' 末端から3個のホスホロチオエート結合、及びそれらの間の9個のホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0253] 表11に記載されるHD0(ASO/cRNA)及びHD0(ASO/cDNA)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製を行った。

[0254] (2) 髄液中における核酸剤の安定性評価

10  $\mu$ MのHD0(AS0/cRNA)及びHD0(AS0/cDNA)各4  $\mu$ Lを用意した。HD0 4  $\mu$ Lに対して、ヒト髄液又はラット髄液を16  $\mu$ L混合し、37°C incubatorでインキュベートした。10分後、1時間後、及び6時間後の各時点で、液体窒素に投入して反応を停止させた。

[0255] 16%アクリルアミドゲル(1×TBE)を準備、作製した。上記サンプル6  $\mu$ Lをゲルにロードし、100V 80分で泳動した。対照としてAS0単独及びcRNA単独を同時に泳動した。その後、1×TBEでGelRed(×10000)水溶液(Biotium)を1/10000の濃度に希釈した溶液を作製した。ゲルを10分間その溶液で浸透した。その後、ChemiDoc Touchイメージングシステム(BioRad社)でゲルを撮影した。

[0256] (結果)

図37Cは、HD0(AS0/cRNA)をヒト髄液(Human CSF)中で10分間及び6時間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。図37Dは、図37Cの泳動結果におけるHD0 2本鎖バンドのバンド強度を定量した結果を示す。HD0(AS0/cRNA)は、ヒト髄液中での10分間のインキュベートで大部分が分解され、6時間で全部が分解された。

[0257] 図38Cは、HD0(AS0/cRNA)又はHD0(AS0/cDNA)をヒト髄液又はラット髄液中で6時間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。ヒト髄液中では、HD0(AS0/cRNA)は分解されて不安定であった一方、HD0(AS0/cDNA)は分解されずに安定であった。ラット髄液中では、HD0(AS0/cRNA)及びHD0(AS0/cDNA)のいずれも分解されず、安定であった(図38D)。

[0258] <実施例12：髄液中におけるHD0の安定性>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0をマウス、ラット、サル、又はヒトの髄液中でインキュベートし、その安定性を検討する。

[0259] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表12、図39A、図39B、図40A、及び図40Bに示す。

[0260] [表12]

表 12: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all RNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	cRNA	UCACCAGAGUGACUAU	2
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	cDNA	tcaccagagtgactat	3
HDO (cRNA 6MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	cRNA(6MOE wing)	<u>TC (5) ACCAGAGUGACTAT</u>	14
HDO (cDNA 6MOE wing)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	cDNA(6MOE wing)	<u>TC (5) AccagagtgactTAT</u>	4

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0261] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all RNA)、HDO(all DNA)、HDO(cRNA 6MOE wing)、及びHDO(cDNA 6MOE wing)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all RNA)の第2核酸鎖 (cRNA) はRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (cDNA) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(cRNA 6MOE wing)の第2核酸鎖 (cRNA(6MOE wing)) は、5' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(cDNA 6MOE wing)の第2核酸鎖 (cDNA(6MOE wing)) は、5' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0262] 表12に記載されるHDO(all RNA)、HDO(all DNA)、HDO(cRNA 6MOE wing)、及

びHD0(cDNA 6MOE wing)について、実施例11と同様の方法により核酸の調製及び髄液中の安定性評価を行った。

[0263] (結果)

図39Cは、HD0(all RNA)及びHD0(all DNA)をマウス、ラット、サル、及びヒトの髄液中で6時間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。HD0(all RNA)は、マウス及びラットの髄液中では分解されず安定であった一方、サル及びヒトの髄液中では分解され、不安定であった。これに対して、HD0(all DNA)は、マウス、ラット、サル、及びヒトのいずれの髄液中でも分解されず安定であった。

[0264] 図40Cは、HD0(cRNA 6MOE wing)及びHD0(cDNA 6MOE wing)をマウス、ラット、サル、及びヒトの髄液中で6時間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。HD0(cRNA 6MOE wing)は、マウス及びラットの髄液中では分解されず安定であった一方、サル及びヒトの髄液中では分解され、不安定であった。これに対してHD0(cDNA 6MOE wing)は、マウス、ラット、サル、及びヒトのいずれの髄液中でも分解されず安定であった。

[0265] <実施例13：髄液中におけるHD0の安定性>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0において、第2核酸鎖中の一部のDNAヌクレオシドをRNAヌクレオシドに置換した場合の髄液中での安定性を検討する。

[0266] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表13及び図41に示す。

[0267]

[表13]

表 13: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(all DNA)	<u>tcaccagagtgactat</u>	3
HDO (ARNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(ARNA)	<u>tcAccAgAgtgActAt</u>	34
HDO (GRNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(GRNA)	<u>tcaccaGaGtGactat</u>	35
HDO (CRNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(CRNA)	<u>tCaCCagagtgactat</u>	36
HDO (URNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(URNA)	<u>UcaccagagUgacUaU</u>	37

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; ^:ホスホロチオエート結合(PS 結合)

[0268] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(ARNA)、HDO(GRNA)、HDO(CRNA)、及びHDO(URNA)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖(c(all DNA))はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(ARNA)の第2核酸鎖(c(ARNA))は、c(all DNA)においてアデニン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(GRNA)の第2核酸鎖(c(GRNA))は、c(all DNA)においてグアニン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(CRNA)の第2核酸鎖(c(CRNA))は、c(all DNA)においてシトシン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(URNA)の第2核酸鎖(c(URNA))は、c(all DNA)においてチミン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてウラシル塩基を含むRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。

[0269] 表13に記載されるHDO(all DNA)、HDO(ARNA)、HDO(GRNA)、HDO(CRNA)、及びHDO(URNA)について、実施例11と同様の方法により核酸の調製及び髄液中の安定性評

価を行った。

[0270] (結果)

図42は、HDO(all DNA)、HDO(A<sup>RNA</sup>)、HDO(G<sup>RNA</sup>)、HDO(C<sup>RNA</sup>)、及びHDO(U<sup>RNA</sup>)をヒト髄液中で6時間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。HDO(all DNA)、HDO(A<sup>RNA</sup>)、及びHDO(G<sup>RNA</sup>)は、ヒト髄液中で分解されず安定であった。一方、HDO(C<sup>RNA</sup>)及びHDO(U<sup>RNA</sup>)は、ヒト髄液中で分解され、不安定であった。

[0271] <実施例14：髄液中におけるHDOの安定性>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHDOにおいて、第2核酸鎖中の一部のDNAヌクレオシドをRNAヌクレオシドに置換した場合の髄液中での安定性を検討する。

[0272] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表14及び図43に示す。

[0273] [表14]

表 14: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (GAR <sup>RNA</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(GAR <sup>RNA</sup> )	tCAccAGAGtGActAt	38
HDO (CUR <sup>RNA</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(CUR <sup>RNA</sup> )	UCaCCagagUgaCUaU	39
HDO (CR <sup>RNA</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(CR <sup>RNA</sup> )	tCaCCagagtgaCtat	36
HDO (UR <sup>RNA</sup> )	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup>	1
	c(UR <sup>RNA</sup> )	UcaccagagUgacUaU	37

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; ^:ホスホロチオエート結合(PS 結合)

[0274] 本実施例で用いたASOは、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末

端の3個のLNAヌクレオシド、3'末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(GA<sup>RNA</sup>)、HDO(CU<sup>RNA</sup>)、HDO(C<sup>RNA</sup>)、及びHDO(U<sup>RNA</sup>)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖(c(all DNA))はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(GA<sup>RNA</sup>)の第2核酸鎖(c(GA<sup>RNA</sup>))は、c(all DNA)においてグアニン塩基を含むDNAヌクレオシド及びアデニン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(CU<sup>RNA</sup>)の第2核酸鎖(c(CU<sup>RNA</sup>))は、c(all DNA)においてシトシン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換し、チミン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてウラシル塩基を含むRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(C<sup>RNA</sup>)の第2核酸鎖(c(C<sup>RNA</sup>))は、c(all DNA)においてシトシン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(U<sup>RNA</sup>)の第2核酸鎖(c(U<sup>RNA</sup>))は、c(all DNA)においてチミン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてウラシル塩基を含むRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。

[0275] 表14に記載されるHDO(all DNA)、HDO(GA<sup>RNA</sup>)、HDO(CU<sup>RNA</sup>)、HDO(C<sup>RNA</sup>)、及びHDO(U<sup>RNA</sup>)について、実施例11と同様の方法により核酸の調製及び髄液中の安定性評価を行った。

[0276] (結果)

図44は、HDO(all DNA)、HDO(GA<sup>RNA</sup>)、HDO(CU<sup>RNA</sup>)、HDO(C<sup>RNA</sup>)、及びHDO(U<sup>RNA</sup>)をヒト髄液中で1時間及び6時間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。HDO(all DNA)及びHDO(GA<sup>RNA</sup>)は、ヒト髄液中で分解されず安定であった。一方、HDO(CU<sup>RNA</sup>)、HDO(C<sup>RNA</sup>)、及びHDO(U<sup>RNA</sup>)は、ヒト髄液中で分解され、不安定であった。

[0277] <実施例15：髄液中におけるHDOの安定性>

(目的)

Malat1遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的

な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHDOにおいて、第2核酸鎖中の一部のDNAヌクレオシドをRNAヌクレオシドに置換した場合の髄液中での安定性を検討する。

[0278] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表15及び図45に示す。

[0279] [表15]

表 15: Malat1 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(all DNA)	ctagcattggcagctgaccc	12
HDO (ARNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(ARNA)	ctAgcAttggcAgctgAcCC	40
HDO (GRNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(GRNA)	ctaGcattGGcaGctGacCC	41
HDO (CRNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(CRNA)	CtagCattggCagCtgaCCC	42
HDO (URNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(URNA)	cUagcaUUggcagcUgacCC	43

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA(C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNAを表す);  
^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0280] 本実施例で用いたASOは、Malat1 ncRNAを標的とする2'-O-MOE-RNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Malat1 ncRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5'末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3'末端の5個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(ARNA)、HDO(GRNA)、HDO(CRNA)、及びHDO(URNA)は、いずれも上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖(c(all DNA))はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(ARNA)の第2核酸鎖(c(ARNA))は、c(all DNA)においてアデニン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(GRNA)の第2核酸鎖(c(GRNA))は、c(all DNA)においてグアニン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシド

に置換した構造を有する。HDO(C<sup>RNA</sup>)の第2核酸鎖 (c(C<sup>RNA</sup>)) は、c(all DNA)においてシトシン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。HDO(U<sup>RNA</sup>)の第2核酸鎖 (c(U<sup>RNA</sup>)) は、c(all DNA)においてチミン塩基を含むDNAヌクレオシドをすべてウラシル塩基を含むRNAヌクレオシドに置換した構造を有する。

[0281] 表15に記載されるHDO(all DNA)、HDO(A<sup>RNA</sup>)、HDO(G<sup>RNA</sup>)、HDO(C<sup>RNA</sup>)、及びHDO(U<sup>RNA</sup>)について、実施例11と同様の方法により核酸の調製及び髄液中の安定性評価を行った。

[0282] (結果)

図46は、HDO(all DNA)、HDO(A<sup>RNA</sup>)、HDO(G<sup>RNA</sup>)、HDO(C<sup>RNA</sup>)、及びHDO(U<sup>RNA</sup>)をヒト髄液中で6時間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。HDO(all DNA)、HDO(A<sup>RNA</sup>)、及びHDO(G<sup>RNA</sup>)は、ヒト髄液中で分解されず安定であった。一方、HDO(C<sup>RNA</sup>)及びHDO(U<sup>RNA</sup>)は、ヒト髄液中で分解され、不安定であった。

[0283] <実施例16：サルにおける中枢神経毒性評価>

(目的)

MOE修飾を含むHDOをサルに髄腔内投与して、中枢神経毒性を評価する。

[0284] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたASO、並びにHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表16及び図47A-Cに示す。

[0285] [表16]

表 16: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(RNA-MOE)	c(RNA-MOE)	<u>TC (5) ACCAGAGUGACTAT</u>	14
HDO	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
(DNA-MOE)	c(DNA-MOE)	<u>TC (5) AccagagtgacTAT</u>	4

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNAを表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0286] 表16に記載されるAS0、HD0(RNA-MOE)、及びHD0(DNA-MOE)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製を行った。

[0287] (2) サルにおける中枢神経毒性の評価

雄のカニクイザル(3歳齢、2kg)を対象として、AS0、HD0(RNA-MOE)、及びHD0(DNA-MOE)を投与した。投与方法としては、AS0 5mg又はHD0 0.94 $\mu$ molを髄腔内投与した。

髄腔内投与から2時間後のサルについて、行動観察を行った(図47D)。

[0288] (結果)

結果を図47Eに示す。AS0を髄腔内投与したサルは重篤な四肢麻痺を示し、強い中枢神経毒性を示した。HD0(RNA-MOE)を髄腔内投与したサルは、下肢に中程度の麻痺を示したものの、AS0の髄腔内投与と比較して中枢神経系毒性は軽減していた。HD0(DNA-MOE)を髄腔内投与したサルは、麻痺を示さず、正常な意識状態及び運動機能を示した。

[0289] <実施例17: バルジ構造を有するHD0>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を神経細胞株に導入する。第2核酸鎖へのバルジ構造の導入による毒性軽減効果及び遺伝子抑制効果を*in vitro*実験により検証する。

[0290] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いるHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表17及び図48に示す。

[0291]

[表17]

表 17:バルジ構造を有する HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (all MOE)	ASO	<u>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	1
	c(all MOE)	<u>TC (5) AC (5) C (5) AGAGTGAC (5) TAT</u>	5
HDO (bulge1)	ASO	<u>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	1
	c(bulge1)	<u>TC (5) AC (5) C (5) AGAttGTGAC (5) TAT</u>	51
HDO (bulge2)	ASO	<u>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a</u>	1
	c(bulge2)	<u>TC (5) AC (5) C (5) AGtttGTGAC (5) TAT</u>	52

小文字:DNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0292] 本実施例で用いたAS0は、Mapt mRNAを標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(all MOE)、HDO(bulge1)、及びHDO(bulge2)は、いずれも上記AS0を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を含む。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(all MOE)の第2核酸鎖 (c(all MOE)) は2'-O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0293] HDO(bulge1)の第2核酸鎖 (c(bulge1)) は、第1核酸鎖の全長に対して相補的な塩基配列からなる相補領域、及び相補領域の中央に配置されたバルジ構造を含む。相補領域は2'-O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。バルジ構造は2個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0294] HDO(bulge2)の第2核酸鎖 (c(bulge2)) は、第1核酸鎖に対して相補的な塩基配列からなる相補領域、及び相補領域の中央に配置されたバルジ構造を含むが、相補領域は第1核酸鎖に対して1塩基の欠失を有し、この欠失位置にバルジ構造が配置されている。相補領域は2'-O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホ

ジエステル結合で連結された構造を有する。バルジ構造は3個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。

[0295] 表17に記載されるHD0(all DNA)、HD0(all MOE)、HD0(bulge1)、及びHD0(bulge2)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製を行った。

[0296] (2) 遺伝子抑制効果の評価

(1) で調製したHD0をヒト神経芽細胞腫由来細胞 (BE(2)-M17細胞株) にリポフェクション法(lipofectamine2000)を用いて導入した。

[0297] HD0導入から48時間後にIsogenIキット(株式会社ジーンデザイン)を使用して、細胞からRNAを抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master, DNase (ロシュ・ダイアグノスティクス社(Roche Diagnostics)) を使用してプロトコルに従って合成した。次に、得られたcDNAを鋳型として定量RT-PCRを行うことにより、Mapt mRNA及びActb mRNA (内部標準遺伝子)の発現量を測定した。定量RT-PCRは、TaqMan(ロシュ・アプライドサイエンス社(Roche Applied Science))により実施した。定量RT-PCRにおいて使用したプライマーとして、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社(Thermo Fisher Scientific、旧ライフ・テクノロジーズ社(Life Technologies Corp))によって設計及び製造された製品を用いた。増幅は、95°C15秒、60°C30秒、及び72°C1秒(1サイクル)を40サイクル繰り返すことにより行った。

[0298] Actb mRNA(内部標準遺伝子)発現量に対するMapt mRNA発現量の比率を計算し、PBS投与群の値に対して標準化した値を相対的Mapt mRNAレベルとした。

[0299] (3) 細胞毒性の評価

導入48時間後に神経細胞毒性の評価として、細胞上清中の乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定した。LDH活性測定は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を使用して、添付プロトコルに従って実施した。PBS投与群のLDH活性に対して標準化した値を相対的LDH放出レベルとした。

[0300] (結果)

図49Aは、ヒト神経芽細胞腫由来細胞 (BE(2)-M17細胞株) において各種核酸剤による標的遺伝子抑制効果の評価した結果を示す。HD0(all MOE)の投与

群ではHD0(all DNA)に比して抑制効果が著しく減弱した。これに対して、HD0(bulge1)及びHD0(bulge2)の投与群ではHD0(all DNA)と同等の強い遺伝子抑制効果が得られた。

[0301] 図49Bは、各種核酸剤を細胞内に導入した際の細胞毒性として、上清中のLDH活性を評価した結果を示す。HD0(all DNA)投与群はLDH活性の上昇を示したのに対して、HD0(all MOE)、HD0(bulge1)、及びHD0(bulge2)ではLDH活性がPBS投与群と同等以下となり、細胞毒性が著しく減少した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むHD0では細胞毒性が顕著に低下することが示された。

[0302] 以上の結果から、HD0(bulge1)及びHD0(bulge2)によって、神経細胞毒性を伴うことなく、強い遺伝子抑制効果が得られることが示された。

[0303] <実施例18：一本鎖HD0>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、第2核酸鎖へのバルジ構造の導入、第1核酸鎖と第2核酸鎖とのリンカーによる連結、及びその両方による毒性軽減効果及び遺伝子抑制効果をin vivo実験により検証する。

[0304] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたHD0の塩基配列と化学修飾を表18及び図50に示す。

[0305]

[表18]

表 18: 一本鎖 HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (bulge)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(bulge)	<u>TC</u> (5) <u>AC</u> (5) <u>C</u> (5) <u>AGAtttGTGAC</u> (5) <u>TAT</u>	53
ssHDO		<u>TC</u> (5) <u>AccagagtgacTATA</u> aaa <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	54
PEG linker ssHDO		<u>TC</u> (5) <u>AccagagtgacTAT</u> * <u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	55
Bulge plus ssHDO		<u>TC</u> (5) <u>AC</u> (5) <u>C</u> (5) <u>tttAGAGTG</u> ttt <u>AC</u> (5) <u>TATA</u> aaa <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	56

小文字:DNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合); \*:PEG リンカー

- [0306] 本実施例に用いるHDO(bulge)、ssHDO、PEG linker ssHDO、及びBulge plus ssHDOはいずれも第1核酸鎖及び第2核酸鎖を含む。HDO(bulge)、ssHDO、PEG linker ssHDO、及びBulge plus ssHDOの第1核酸鎖はいずれもLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Mapt mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する。HDO(bulge)の第1核酸鎖と第2核酸鎖はリンカーによって連結されていないが、ssHDO、PEG linker ssHDO、及びBulge plus ssHDOでは、第2核酸鎖の3' 末端が第1核酸鎖の5' 末端にリンカーを介して結合している。
- [0307] HDO(bulge)の第2核酸鎖 (c(bulge)) は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる相補領域、及びバルジ構造を含む。相補領域は2' -O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。バルジ構造は3個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。
- [0308] ssHDOの第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な配列を有し、3個の2' -O-MOE-RNAヌクレオシド、10個のDNAヌクレオシド、及び3個の2' -O-MOE-RNAヌクレオシドが5' 末端から順にホスホジエステル結合で連結された構造を有する。ssHDOにおいて第1核酸鎖と第2核酸鎖を連結するリンカーは、ホスホジエステル結合により連結された3個のDNAヌクレオシドからなる。
- [0309] PEG linker ssHDOの第2核酸鎖の構成は、上記ssHDOの第2核酸鎖と同一であ

る。PEG linker ssHD0において第1核酸鎖と第2核酸鎖を連結するリンカーはPEG（ポリエチレングリコール）からなる。

[0310] Bulge plus ssHD0の第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる相補領域、及び2個のバルジ構造を含む。相補領域は2'-O-MOE-RNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。2個のバルジ構造の各々は、3個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。Bulge plus ssHD0において第1核酸鎖と第2核酸鎖を連結するリンカーは、ホスホジエステル結合により連結された3個のDNAヌクレオシドからなる。

[0311] 表18に記載のssHD0、PEG linker ssHD0、及びBulge plus ssHD0について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、中枢神経毒性評価及び運動機能評価、並びに遺伝子抑制効果の評価を行う。

[0312] （結果）

HD0(bulge)、ssHD0、PEG linker ssHD0、及びBulge plus ssHD0を脳室内投与したマウスでは、実施例1で用いたHD0(all DNA)を投与したマウス等と比較して、投与から30分～4時間後の急性期忍容性スコアが著しく減少する。また、HD0(bulge)、ssHD0、PEG linker ssHD0、及びBulge plus ssHD0を脳室内投与したマウスでは、実施例1で用いたHD0(all DNA)を投与したマウス等と比較して、投与から1時間後の運動機能、例えば総移動距離や最大移動速度が著しく改善する。さらに、HD0(bulge)、ssHD0、PEG linker ssHD0、及びBulge plus ssHD0を脳室内投与したマウスでは、実施例1で用いたHD0(all MOE)を投与したマウス等と比較して、投与から7日後の海馬においてMapt mRNA発現レベルが低下し、標的遺伝子抑制効果の向上が判明する。以上の結果から、第2核酸鎖にバルジ構造を導入すること、及びHD0の第1核酸鎖と第2核酸鎖をリンカーで連結することにより、中枢神経毒性の軽減と優れた遺伝子抑制効果の両方を達成できることが示される。また、HD0にバルジ構造とリンカーの両方を導入することにより、中枢神経毒性の軽減と優れた遺伝子抑制効果の両方を達成できることが示される。

[0313] <実施例19：第2核酸鎖のギャップ領域に導入すべき核酸種の検討>

(目的)

Malat1遺伝子を標的とするHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、第2核酸鎖において第1核酸鎖の中央領域（ギャップ領域）に相補的な塩基配列からなる領域（以下、第2核酸鎖においても「ギャップ領域」という）に導入する核酸種の影響を検討する。具体的には、第2核酸鎖のギャップ領域において、全てのヌクレオシドがRNAヌクレオシドであるHD0、全てのヌクレオシドがDNAヌクレオシドであるHD0、並びにアデニン塩基及びグアニン塩基の位置にRNAヌクレオシドを配置し、シトシン塩基及びチミン塩基の位置にDNAヌクレオシドを配置したHD0について、毒性をin vivo実験により比較する。

[0314] (方法)

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表19に示す。

[0315]

[表19]

表 19: Malat1 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c</u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
HDO (all DNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c</u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(all DNA)	ctagcattggcagctgaccc	11
HDO (cRNA 10MOE)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c</u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(RNA 10MOE)	<u>C(5) TAGC(5) AUUGGCAGCUGAC(5)</u> <u>C(5) C(5)</u>	57
HDO (cDNA 10MOE)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c</u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(DNA 10MOE)	<u>C(5) TAGC(5) attggcagctGAC(5)</u> <u>C(5) C(5)</u>	13
HDO (agRNA 10MOE)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C(5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c</u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C(5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G</u>	10
	c(agRNA 10MOE)	<u>C(5) TAGC(5) AttGGcAGctGAC(5)</u> <u>C(5) C(5)</u>	58

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA(c(5)は 5-メチルシトシン LNA を表す);  
 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA(C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す);  
 ^:ホスホロチオエート結合(PS 結合)

[0316] 本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(cRNA 10MOE)、HDO(cDNA 10MOE)及びHDO(agRNA 10MOE)は、共通の上記ASOを第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖(c(all DNA))はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(cRNA 10MOE)の第2核酸鎖c(RNA 10MOE)は、第1核酸鎖のウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域(以下、第2核酸鎖においても「ウイング領域」という)が2'-O-MOE-RNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域がRNAヌクレオシドで構成されており; HDO(cDNA 10MOE)の第2核酸鎖c(DNA 10MOE)は、ウイング領域が2'-O-MOE-RNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域がDNAヌクレオシド構造で構成されており; HDO(agRNA 10MOE)の第2核酸鎖c(agRNA 10MOE)は、ウイング領域が2'-O-MOE-RNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNA

ヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドである。

表19に記載される核酸分子について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、*in vivo*実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、14nmol/匹とした。

[0317] (結果)

図51は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能の評価した結果を示す。HD0(all DNA)、HD0(cRNA 10MOE)、HD0(cDNA 10MOE)及びHD0(agRNA 10MOE)の投与群では、AS0投与群と比較して、総移動距離(図51A)及び平均移動速度(図51B)を著しく改善させた。また、HD0(cRNA 10MOE)、HD0(cDNA 10MOE)及びHD0(agRNA 10MOE)の投与群では、総移動距離及び平均移動速度がHD0(all DNA)の投与群と比較して改善した。更にHD0(agRNA 10MOE)の投与群では、総移動距離及び平均移動速度がHD0(cRNA 10MOE)及びHD0(cDNA 10MOE)の投与群と比較して改善した。この結果から、第2核酸鎖のギャップ領域においてアデニン塩基及びグアニン塩基の位置がRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基の位置がDNAヌクレオシドであるHD0は、1本鎖AS0及び他のHD0と比較して中枢神経毒性を顕著に軽減し得ることが示された。

図52は、各種核酸剤の脳室内投与から7日後において右左の前頭葉におけるMalat1 RNA発現レベルを示す。HD0(agRNA 10MOE)投与群はAS0投与群及び他のHD0投与群と比較して、Malat1 RNA発現レベルを顕著に抑制する効果を示した。この結果から、ギャップ領域においてアデニン塩基及びグアニン塩基の位置がRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基の位置がDNAヌクレオシドである第2核酸鎖を含むHD0が、ギャップ領域において全てのヌクレオシドがDNAヌクレオシド又はRNAヌクレオシドである第2核酸鎖を含むHD0と比較して、優れた遺伝子発現抑制効果を達成し得ることが示された。

[0318] <実施例20：脳組織における2本鎖解離効率の評価>

(目的)

標的組織において第1核酸鎖は第2核酸鎖から解離し、標的遺伝子やその転写産物に対するアンチセンス効果を発揮し得る。そのため、第1核酸鎖及び第2核酸鎖を含むHD0をマウスの脳組織ホモジネート中でインキュベートし、その2本鎖解離効率を検討する。

[0319] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例では、実施例19と同一のAS0、HD0(cRNA 10MOE)、HD0(cDNA 10MOE)、及びHD0(agRNA 10MOE)を使用した。AS0及びHD0は、実施例19と同様の方法により調製した。

[0320] (2) 脳組織ホモジネート中における2本鎖解離効率の評価

25  $\mu$ MのHD0(AS0/cRNA)及びHD0(AS0/cDNA)各5.2  $\mu$ Lに対して、マウス脳ホモジネート溶液を16.7  $\mu$ L及びPBSを28.1  $\mu$ L混合し、37°C incubatorでインキュベートした。インキュベーション後、プロテインキナーゼKとの混合により反応を停止させた。

16%アクリルアミドゲル(1×TBE)を準備、作製した。上記サンプル9.6  $\mu$ Lをゲルにロードし、100V 120分で泳動した。対照としてAS0単独を同時に泳動した。その後、1×TBEでGelRed(×10000)水溶液(Biotium)を1/10000の濃度に希釈した溶液を作製した。ゲルを10分間その溶液で浸透した。その後、Chemi Doc Touchイメージングシステム(BioRad社)でゲルを撮影した。

[0321] (結果)

図53は、AS0、HD0(cRNA 10MOE)、HD0(cDNA 10MOE)及びHD0(agRNA 10MOE)をマウス脳組織ホモジネート中で7日間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。HD0(agRNA 10MOE)は、HD0(cRNA 10MOE)及びHD0(cDNA 10MOE)と比較して、7日間インキュベート後の2本鎖核酸(図53、矢印)が著しく減少し、脳組織内で極めて優れた2本鎖分離能力を有することが明らかになった。ギャップ領域においてアデニン塩基及びグアニン塩基の位置がRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基の位置がDNAヌクレオシドである第2核酸鎖を含むHD0は、ギャップ領域において全てのヌクレオシドがDNAヌクレオシド

又はRNAヌクレオシドである第2核酸鎖を含むHD0と比較して脳組織内において2本鎖解離効率が極めて高く、上記の実施例19において標的遺伝子の発現を顕著に抑制した結果を強く裏付けた。

[0322] <実施例21：第2核酸鎖のウイング領域に導入すべき核酸修飾の検討>

(目的)

Malat1遺伝子を標的とするHD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、第2核酸鎖のウイング領域及びギャップ領域におけるMOE修飾核酸又は天然核酸（RNA又はDNA）の導入による影響をin vivo実験により比較する。

[0323] (方法)

本実施例で用いたHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表20に示す。

[0324]

[表20]

表 20: Malat1 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C (5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup></u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C (5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup></u>	10
	c(all DNA)	<u>ctagcattggcagctgaccc</u>	12
HDO (cRNA MOEwing)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C (5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup></u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C (5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup></u>	10
	c(RNA MOEwing)	<u>C (5) TAGC (5) AUUGGCAGCUGAC (5)</u> <u>C (5) C (5)</u>	57
HDO (gapMOE RNA)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C (5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup></u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C (5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup></u>	10
	c(gapMOE RNA)	<u>CUAGCATTGGC (5) AGC (5) TGACCC</u>	59
HDO (cDNA MOEwing)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C (5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup></u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C (5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup></u>	10
	c(DNA MOEwing)	<u>C (5) TAGC (5) attggcagctGAC (5)</u> <u>C (5) C (5)</u>	13
HDO (gapDNA MOE)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C (5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup></u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C (5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup></u>	10
	c(gapDNA MOE)	<u>ctagcATTGGC (5) AGC (5) Tgaccc</u>	60
HDO (agRNA MOEwing)	ASO	<u>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>C (5)</u> <u>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup></u> <u>a<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C (5)</u> <u>T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup></u>	10
	c(agRNA MOEwing)	<u>C (5) TAGC (5) AttGGcAGctGAC (5)</u> <u>C (5) C (5)</u>	58

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA (c(5)は 5-メチルシトシン LNA を表す);  
 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す);  
 ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0325] 本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(cRNA MOEwing)、HDO(gapMOE RNA)、HDO(cDNA MOEwing)、HDO(gapDNA MOE)及びHDO(agRNA 10MOE)は、いずれも上記ASOを共通の第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖は、DNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(cRNA MOEwing)の第2核酸鎖は、ウイング領域が2'-O-MOE-RNAヌクレオシドで構成され;ギャップ領域がRNAヌクレオシド構造で構成されており;HDO(gapMOE RNA)の第2核酸鎖は、ウイング領域に相当する領域がRNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域に

相当する領域が2'-0-MOE-RNAヌクレオシド構造で構成されており；HDO(cDNA MOEwing)の第2核酸鎖は、ウイング領域が2'-0-MOE-RNAヌクレオシドで構成され、ギャップ遼言う気がDNAヌクレオシド構造で構成されており；HDO(gapMOE DNA)の第2核酸鎖は、ウイング領域に相当する領域がDNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域が2'-0-MOE-RNAヌクレオシド構造で構成されており；HDO(agRNA 10MOE)の第2核酸鎖は、ウイング領域が2'-0-MOE-RNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドである。

表21に記載される核酸分子について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、*in vivo*実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、28nmol/匹とした。

[0326] (結果)

図54は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として中枢神経毒性を評価した結果を示す。HDO(cRNA MOEwing)、HDO(gapMOE RNA)、HDO(cDNA MOEwing)、HDO(gapDNA MOE)及びHDO(agRNA 10MOE)の投与群では、HDO(all DNA)の投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。また、HDO(gapMOE RNA)、HDO(cDNA MOEwing)、HDO(gapDNA MOE)及びHDO(agRNA 10MOE)の投与群では、HDO(cDNA MOEwing)の投与群と比較して、急性期忍容性スコアが更に減少した。

[0327] 図55は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。HDO(cRNA MOEwing)、HDO(gapMOE RNA)、HDO(cDNA MOEwing)、HDO(gapDNA MOE)及びHDO(agRNA 10MOE)の投与群では、HDO(all DNA)の投与群と比較して、総移動距離(図55A)及び平均移動速度(図55B)を著しく改善させた。また、HDO(gapMOE RNA)、HDO(cDNA MOEwing)、HDO(gapDNA MOE)及びHDO(agRNA 10MOE)の投与群では、HDO(cDNA MOEwing)の投与群と比較して、総移動距離及び平均移動速度を改善させた。

この結果から、第2核酸鎖においてMOE修飾をウイング領域又はギャップ領

域に含むHDOは、第2核酸鎖がDNAヌクレオシドからなるHDOと比較して、中枢神経毒性の軽減を達成し得ることが示された。

[0328] <実施例22：第2核酸鎖のギャップ領域に導入すべき核酸種の検討：急性／遅発性神経毒性の比較>

(目的)

Mapt遺伝子を標的とするASOからなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有するMOE wing修飾型第2核酸鎖を含むHDOを脳室内投与する場合に見られる、投与後1日以内の急性神経毒性、及び投与1日後以降の遅発性神経毒性について、毒性軽減効果をin vivo実験により比較する。

[0329] (方法)

本実施例で用いたASO、並びにHDOを構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表21に示す。

[0330] [表21]

表 21: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO		<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (cRNA 6MOE)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(RNA 6MOE wing)	<b><u>TC (5) ACCAGAGUGACTAT</u></b>	14
HDO (cDNA 6MOE)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(6MOE wing)	<b><u>TC (5) AccagagtgacTAT</u></b>	4
HDO (agRNA 6MOE)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(agRNA 6MOE)	<b><u>TC (5) AccAGAGtGAcTAT</u></b>	61

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

本実施例で用いたHDO(all DNA)、HDO(cRNA 6MOE)、HDO(cDNA 6MOE)、及びHDO(agRNA 6MOE)は、上記ASOを共通の第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖 (c(

all DNA)) はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(cRNA 6MOE)の第2核酸鎖は、5'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(cDNA 6MOE)の第2核酸鎖は、5'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HD0(agRNA 6MOE)の第2核酸鎖は、5'末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、3'末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、及びそれらの間のギャップ領域から構成され、ギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドである。

表21に記載されるAS0、HD0(all DNA)、HD0(cRNA 6MOE)、HD0(cDNA 6MOE)、及びHD0(agRNA 6MOE)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、*in vivo*実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、28nmol/匹とした。

[0331] (結果1：急性神経毒性)

図56は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として投与1日以内の急性の中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(cRNA 6MOE)、HD0(cDNA 6MOE)、及びHD0(agRNA 6MOE)の投与群では、AS0及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。さらに、HD0(agRNA 6MOE)投与群は、HD0(cRNA 6MOE)及びHD0(cDNA 6MOE)の投与群と比較して低い急性期忍容性スコアを示した。この結果から、第2核酸鎖のギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドであるHD0は、その他のHD0と比較しても中枢神経毒性を顕著に軽減する効果を達成し得ることが示された。

図57は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(cRNA 6MOE)、HD0(cDNA 6MOE)、及びHD0(agRNA 6MOE)の投与群では、AS0及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、総移動距離(図57A)及び最大移動速度(図57B)が改善した。更にHD0(agRNA 6MOE)投与群では、HD0(cRNA 6MOE)及びHD0(cDNA 6MOE)投与群と比較して運動機能が著しく改善した。この結果から、第2核酸鎖のギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドであるHD0は、その他のHD0と比較しても、運動機能に与える影響が極めて小さく、毒性が極めて低いことが示された。

[0332] (結果2：遅発性神経毒性)

図58は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として投与1日後以降の遅発性の中枢神経毒性としてマウスの体重減少を評価した結果を示す。投与0、7、14、及び21日後に体重を測定したところ、投与7、14、及び21日のいずれの時点においてもAS0及びHD0(all DNA)の投与群はPBS投与群と比較して体重減少を示し、HD0(cRNA 6MOE)、HD0(cDNA 6MOE)、及びHD0(agRNA 6MOE)の投与群では、AS0及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、体重減少効果の軽減を示した。

図59は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として投与1日後以降の遅発性の中枢神経毒性としてマウスの運動機能を評価した結果を示す。投与から7、14、21日後のいずれの時点においてもHD0(cRNA 6MOE)、HD0(cDNA 6MOE)、及びHD0(agRNA 6MOE)の投与群では、AS0及びHD0(all DNA)の投与群と比較して、最大移動速度に対する減少効果が軽減された。

[0333] (結果3：標的遺伝子抑制効果)

図60は、各種核酸剤の脳室内投与から21日後において右前頭葉におけるMapt mRNA発現レベルを示す。HD0(agRNA 6MOE)投与群は、HD0(cRNA 6MOE)及びHD0(cDNA 6MOE)の投与群と比較して、Mapt mRNA発現レベルを顕著に抑制する効果を示した。この結果から、第2核酸鎖のギャップ領域においてアデニン塩基

及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドであるHD0が、第2核酸鎖がDNAヌクレオシド又はRNAヌクレオシドからなるHD0と比較して優れた遺伝子発現抑制効果を達成し得ることが示された。

[0334] (結果4：脳組織ホモジネート中における2本鎖解離効率の評価)

図61は、脳組織ホモジネート中における核酸剤の2本鎖解離効率評価のために実施例20と同様の方法を用いて、HD0(cRNA 6MOE)、HD0(cDNA 6MOE)、及びHD0(agRNA 6MOE)をマウス脳組織中で7日間インキュベートした後の電気泳動結果を示す。HD0(agRNA 6MOE)は、HD0(cRNA 6MOE)及びHD0(cDNA 6MOE)と比較して脳組織ホモジネート中で高い2本鎖解離効率を示した。この結果から、第2核酸鎖のギャップ領域においてアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドであるHD0が、第2核酸鎖がDNAヌクレオシド又はRNAヌクレオシドからなるHD0と比較して脳組織内において2本鎖解離効率が極めて高く、上記の結果3において標的遺伝子の発現を顕著に抑制した結果を強く裏付けた。

[0335] <実施例23：全MOE修飾型AS0を含むHD0の第2核酸鎖へのMOE修飾の導入>

(目的)

本実施例では、Mecp2遺伝子を標的としてスプライシングを制御することができる、全てのヌクレオシドがMOE修飾ヌクレオシドで構成されるAS0（以下、「全MOE修飾型AS0」という）を第1核酸鎖として含むHD0を対象とする。当該HD0を脳室内投与する場合に見られる中枢神経毒性について、第2核酸鎖にMOE修飾を導入することによって毒性が軽減され得ることをin vivo実験により検証する。

[0336] (方法)

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表22に示す。

[0337]

[表22]

表 22: Mecp2 遺伝子を標的とする ASO 及び HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO		<u>T<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>A<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^A<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup></u>	62
HDO (all DNA)	ASO	<u>T<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>A<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^A<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup></u>	62
	c(all DNA)	acaccttgcttctgtaga	63
HDO (cRDNA MOE)	ASO	<u>T<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^T<sup>^</sup>A<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>A<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>C<sup>(5)</sup></u> <u>^A<sup>^</sup>A<sup>^</sup>G<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup>G<sup>^</sup>T<sup>^</sup></u>	62
	c(cRDNA MOE)	<u>AC<sup>(5)</sup></u> <u>AccttgcttctGtAGA</u>	64

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA (c(5)は 5-メチルシトシン LNA を表す);  
 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す);  
 ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0338] 本実施例で用いたASOは、MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) pre-mRNAを標的とする非ギャップマー型のアンチセンス核酸であり、MECP2 pre-mRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、全てのヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された2'-O-MOE-RNAヌクレオシドである。

本実施例で用いたHDO(all DNA)及びHDO(cRDNA MOE)は、上記ASOを共通の第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、HDO(all DNA)の第2核酸鎖はDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された構造を有する。HDO(cRDNA MOE)の第2核酸鎖は、5'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、3'末端の3個の2'-O-MOE-RNAヌクレオシド、及びそれらの間のギャップ領域から構成され、ギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドである。

表22に記載されるASO、HDO(all DNA)、及びHDO(cRDNA MOE)について、実施例1と同様の方法により核酸の調製、in vivo実験、並びに中枢神経毒性評価及び運動機能評価を行った。但し、本実施例ではマウス1匹当たりの核酸剤投与量は、28nmol/匹とした。

[0339] (結果)

図62は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスを対象として急性の中樞神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から30分後、1時間後、2時間後、3時間後、及び4時間後のいずれの時点においても、HD0(all DNA)及びHD0(cRDNA MOE)の投与群では、AS0投与群と比較して、急性期忍容性スコアが著しく減少した。さらに、HD0(cRDNA MOE)投与群は、HD0(all DNA)投与群と比較して低い急性期忍容性スコアを示した。この結果から、第2核酸鎖のウイング領域が2'-0-MOE-RNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドであるHD0は、その他のHD0と比較しても低い中樞神経毒性を達成し得ることが示された。

図63は、各種核酸剤を脳室内投与したマウスにおいて投与から1時間後に運動機能を評価した結果を示す。HD0(all DNA)及びHD0(cRDNA MOE)の投与群では、AS0投与群と比較して、総移動距離（図63A）及び最大移動速度（図63B）が改善した。更にHD0(cRDNA MOE)投与群は、HD0(all DNA)投与群と比較して総移動距離及び最大移動速度を改善した。この結果から、第2核酸鎖のウイング領域が2'-0-MOE-RNAヌクレオシドで構成され、ギャップ領域においてはアデニン塩基及びグアニン塩基を有するヌクレオシドがRNAヌクレオシドであり、シトシン塩基及びチミン塩基を有するヌクレオシドがDNAヌクレオシドであるHD0は、その他のHD0と比較しても、運動機能を抑制する効果が極めて小さく、毒性が極めて低いことが示された。

[0340] <実施例24：一本鎖HD0>

(目的)

Bace1遺伝子を標的とするAS0からなる第1核酸鎖と第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖とをリンカーにより連結した一本鎖HD0 (ssHD0) の神経細胞毒性について、in vitro実験により検証する。

[0341] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたHDO及びssHDOの塩基配列と化学修飾を表23に示す。

[0342] [表23]

表 23: BACE1 遺伝子を標的とする ASO 及び HDO

		配列(5'-3')	配列番号
HDO (all DNA)	ASO	<u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>a</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>c</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>a</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>a</u>	6
	c(all DNA)	tcctcagcaatac	8
ssHDO		<u>TC (5) C (5) aaaTC (5) AGC (5) AAcccTA</u> <u>C (5) aaaa</u> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>a</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>c</u> <sup>ˆ</sup> <u>t</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>a</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>g</u> <sup>ˆ</sup> <u>a</u>	65

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA;  
 下線付大文字:2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す);  
 ˆ:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0343] (2) 遺伝子抑制効果の評価

(1) で調製したHDOをヒト神経芽細胞腫由来細胞 (Neuro2a細胞株) にリポフェクション法 (lipofectamine2000) を用いて導入した。

HDO導入から48時間後にIsogenIキット (株式会社ジーンデザイン) を使用して、細胞からRNAを抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master, DNase (ロシュ・ダイアグノスティクス社 (Roche Diagnostics)) を使用してプロトコルに従って合成した。次に、得られたcDNAを鋳型として定量RT-PCRを行うことにより、Bace1 mRNA及びActb mRNA (内部標準遺伝子) の発現量を測定した。定量RT-PCRは、TaqMan (ロシュ・アプライドサイエンス社 (Roche Applied Science)) により実施した。定量RT-PCRにおいて使用したプライマーとして、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社 (Thermo Fisher Scientific、旧ライフ・テクノロジーズ社 (Life Technologies Corp)) によって設計及び製造された製品を用いた。増幅は、95°C15秒、60°C30秒、及び72°C1秒 (1サイクル) を40サイクル繰り返すことにより行った。

Actb mRNA (内部標準遺伝子) 発現量に対するBace1 mRNA発現量の比率を計算し、PBS投与群の値に対して標準化した値を相対的Bace1 mRNAレベルとした。

[0344] (3) 細胞毒性の評価

導入48時間後に神経細胞毒性の評価として、細胞上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。LDH活性測定は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

(同仁化学研究所) を使用して、添付プロトコルに従って実施した。PBS投与群のLDH活性に対して標準化した値を相対的LDH放出レベルとした。

[0345] (結果)

図64Bは、マウス神経芽細胞腫由来細胞 (Neuro2a細胞株) において各種核酸剤による標的遺伝子抑制効果を評価した結果を示す。ssHD0の投与群ではHD0(all DNA)と同等の強い遺伝子抑制効果が得られた。

図64Aは、各種核酸剤を細胞内に導入した際の細胞毒性として、上清中のLDH活性を評価した結果を示す。ssHD0を5nM及び25nMで投与した細胞では、それぞれHD0(all DNA)を5nM及び25nMで投与した細胞と比較して、LDH活性の上昇が抑制されており、細胞毒性が著しく減少した。この結果から、2'-O-MOE-RNAヌクレオシドを含むssHD0では細胞毒性が顕著に低下することが示された。

以上の結果から、ssHD0によって、神経細胞毒性の軽減と強力な遺伝子抑制効果の両方が達成されることが示された。

[0346] <実施例25：サルにおける中枢神経毒性評価>

(目的)

MOE修飾を含むHD0をサルに髄腔内投与して、中枢神経毒性を評価する。

[0347] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基配列と化学修飾を表24に示す。

[0348]

[表24]

表 24: Mapt 遺伝子を標的とする HDO

		配列(5'-3')	配列番号
ASO		<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
HDO (all DNA)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(all DNA)	tcaccagagtgactat	3
HDO (DNA MOE)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(DNA MOE)	<u>TC (5) AccagagtgacTAT</u>	4
HDO (RNA MOE)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(RNA MOE)	<u>TC (5) ACCAGAGUGACTAT</u>	14
HDO (DNARNA MOE)	ASO	<u>a</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>a</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>c</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>t</u> <sup>^</sup> <u>g</u> <sup>^</sup> <u>a</u>	1
	c(DNARNA MOE)	<u>TC (5) AccAGAGtGAcTAT</u>	61

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付小文字:LNA; 下線付大文字:  
2'-O-MOE-RNA (C(5)は 5-メチルシトシン 2'-O-MOE-RNA を表す); ^:ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

[0349] 表24に記載されるASO、HDO(all DNA)、及びHDO(DNA MOE)、HDO(RNA MOE) HDO(DNARNA MOE)をについて、実施例1と同様の方法により核酸の調製を行った。

[0350] (2) サルにおける中枢神経毒性の評価

雄のカニクイザル (3歳齢、2kg) 2頭を対象として、ASO、HDO(all DNA)、HDO(DNA MOE)、HDO(RNA MOE)、及びHDO(DNARNA MOE)を投与した。投与方法としては、ASO又はHDO を0.94 μmolを腰椎穿刺のうえ髄腔内投与した。

髄腔内投与から1、2、及び3時間後のサルについて、中枢神経毒性を評価するために図65に示す修正FOBスコア及び3分間のビデオ動画による自発的運動時間またはジャンプ回数の測定を、それぞれ盲検化された評価者による行動評価を行った。

[0351] (結果)

図66は、各種核酸剤を髄腔内投与したサルを対象として急性の中枢神経毒性を評価した結果を示す。核酸剤の投与から1時間後、2時間後、及び3時間後のいずれの時点においても、HDO(all DNA)、HDO(DNA MOE)、HDO(RNA MOE)、及びHDO(DNARNA MOE)の投与群では、ASO投与群と比較して、修正FOBスコアが著しく減少した。更に、HDO(DNA MOE)及びHDO(DNARNA MOE)の投与群では、HD

0(all DNA)投与群と比較して、修正FOBスコアが減少した。

また、3分間のビデオ動画による自発的運動時間及びジャンプ回数を測定した結果を図67に示す。HDO(all DNA)、HDO(DNA MOE)、HDO(RNA MOE)、及びHDO(DNARNA MOE)の投与群では、ASO投与群と比較して、自発的運動時間又はジャンプ回数が減少する効果が抑制された。更に、HDO(DNA MOE)及びHDO(DNARNA MOE)の投与群では、HDO(all DNA)投与群と比較して、自発的運動時間又はジャンプ回数が減少する効果が抑制された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む二本鎖核酸複合体であって、  
前記第1核酸鎖は、標的遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、前記標的遺伝子又はその転写産物に対してアンチセンス効果を有し、  
前記第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ2'-修飾ヌクレオシドを1個以上含む、前記二本鎖核酸複合体。
- [請求項2] 前記第1核酸鎖がギャップマーである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項3] 前記第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが修飾ヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項4] 前記第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシドである、請求項3に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項5] 前記第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドである、請求項4に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項6] 前記第2核酸鎖が、5'末端に位置する1個又は連続する2~10個の2'-修飾ヌクレオシド、及び／又は3'末端に位置する1個又は連続する2~10個の2'-修飾ヌクレオシドを含む、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項7] 前記第2核酸鎖が、5'末端及び3'末端以外の位置に、1~7個の2'-修飾ヌクレオシドを含む、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項8] 前記第1核酸鎖が、  
(1)少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む中央領域、  
(2)前記中央領域の5'末端側に配置された、非天然ヌクレオシドを含む5'ウイング領域、及び  
(3)前記中央領域の3'末端側に配置された、非天然ヌクレオシドを含む3'ウイング領域を含む、請求項2に記載の二本鎖核酸複合体。

- [請求項9] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖の5' ウィング領域及び／又は3' ウィング領域に相補的な塩基配列からなる領域に2'-修飾ヌクレオシドを含む、請求項8に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項10] 前記第2核酸鎖において、前記第1核酸鎖の5' ウィング領域及び／又は3' ウィング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドである、請求項9に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項11] 前記第2核酸鎖における前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、プリン塩基を含む全てのヌクレオシドがリボヌクレオシドである、請求項10に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項12] 前記第2核酸鎖における前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域において、ピリミジン塩基を含む全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドである、請求項11に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項13] 前記第2核酸鎖において、前記2'-修飾ヌクレオシドが、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド又は2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである、請求項12に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項14] 前記第2核酸鎖において、前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが、
- (a)デオキシリボヌクレオシド、
  - (b)デオキシリボヌクレオシド及びリボヌクレオシド、
  - (c)デオキシリボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、
  - (d)リボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、又は
  - (e)デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、及び2'-修飾ヌクレオシド
- である、請求項8に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項15] 前記第2核酸鎖において、
- 前記第1核酸鎖の5' ウィング領域及び3' ウィング領域に相補的な

塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドであり、かつ

前記第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドである、請求項14に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項16] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖の前記中央領域における少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドに相補的な、少なくとも4個の連続するリボヌクレオシドを含む、請求項8に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項17] (i)前記第1核酸鎖における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、  
(ii)前記グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、  
(iii)前記グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は  
(iv) (i)~(iii)の任意の組み合わせ  
に相補的である前記第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項18] (i)前記第1核酸鎖の5'ウイング領域における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、  
(ii)前記グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、  
(iii)前記グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は  
(iv) (i)~(iii)の任意の組み合わせ  
に相補的である前記第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項19] 前記第2核酸鎖において、アデニン塩基又はピリミジン塩基を含む

ヌクレオシドの少なくとも1個が2'-修飾ヌクレオシド及び／又はデオキシリボヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項20] 前記第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの少なくとも1個が2'-修飾ヌクレオシド及び／又はデオキシリボヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項21] 前記第2核酸鎖が、ピリミジン塩基を含む天然リボヌクレオシドを含まない、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項22] 前記第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシド及び／又はデオキシリボヌクレオシドである、請求項18に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項23] 前記第2核酸鎖において、ヌクレオシドの20%以上が、2'-修飾ヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項24] 前記第2核酸鎖において、2'-修飾ヌクレオシド以外の全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項25] 前記第2核酸鎖において、第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項26] 前記第2核酸鎖において、前記2'-修飾ヌクレオシドが、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド及び／又は2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項27] 前記第2核酸鎖が、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、scpBNAヌクレオシド、AmNAヌクレオシド、又はBNA-NCを少なくとも1個含む、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項28] 前記第1核酸鎖がミックスマーである、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項29] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を少なくとも1つ含む、請求項1に記載の二本鎖核酸

複合体。

- [請求項30] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に対して、非相補的塩基、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項31] 前記第2核酸鎖が、前記非相補的塩基を1～3個含む、請求項27に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項32] 前記挿入配列が1～8塩基からなる、請求項30に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項33] 前記欠失が連続する1～4塩基からなる、請求項30に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項34] 前記第2核酸鎖の前記非相補的塩基がバルジ構造を形成する、又は前記第2核酸鎖の前記欠失位置に、前記第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を含む、請求項30に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項35] 前記バルジ構造が糖非修飾ヌクレオシドを含む、又は前記バルジ構造において全てのヌクレオシドが糖非修飾ヌクレオシドである、請求項29に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項36] 前記バルジ構造が1～10塩基長である、請求項29に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項37] 前記第2核酸鎖において、前記バルジ構造以外の全てのヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドである、請求項29に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項38] 前記第2核酸鎖が少なくとも8塩基長である、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項39] 前記第2核酸鎖の塩基長が第1核酸鎖の塩基長よりも短い、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項40] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域の5'末端側及び／又は3'末端側に位置する少なくとも1つのオーバー

ハング領域を含む、請求項 1 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項41] 前記オーバーハング領域が1~20塩基長である、請求項 4 0 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項42] 前記オーバーハング領域が、少なくとも1個のデオキシリボヌクレオシド及び／又は非天然ヌクレオシドを含む、請求項 4 0 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項43] 前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖とがリンカーを介して結合している、請求項 1 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項44] 前記リンカーが、  
前記第1核酸鎖の5'末端と前記第2核酸鎖の3'末端とを結合する、及び／又は  
前記第1核酸鎖の3'末端と前記第2核酸鎖の5'末端とを結合する、請求項 4 3 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項45] 前記リンカーが切断性 (cleavable) 又は非切断 (uncleavable) リンカーである、請求項 4 3 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項46] 前記リンカーが、天然ヌクレオシド及び／若しくは非天然ヌクレオシドを含む核酸、又はポリエチレングリコールからなる、請求項 4 3 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項47] 前記核酸からなるリンカーが2~10塩基長である、請求項 4 6 に記載の二本鎖核酸複合体。

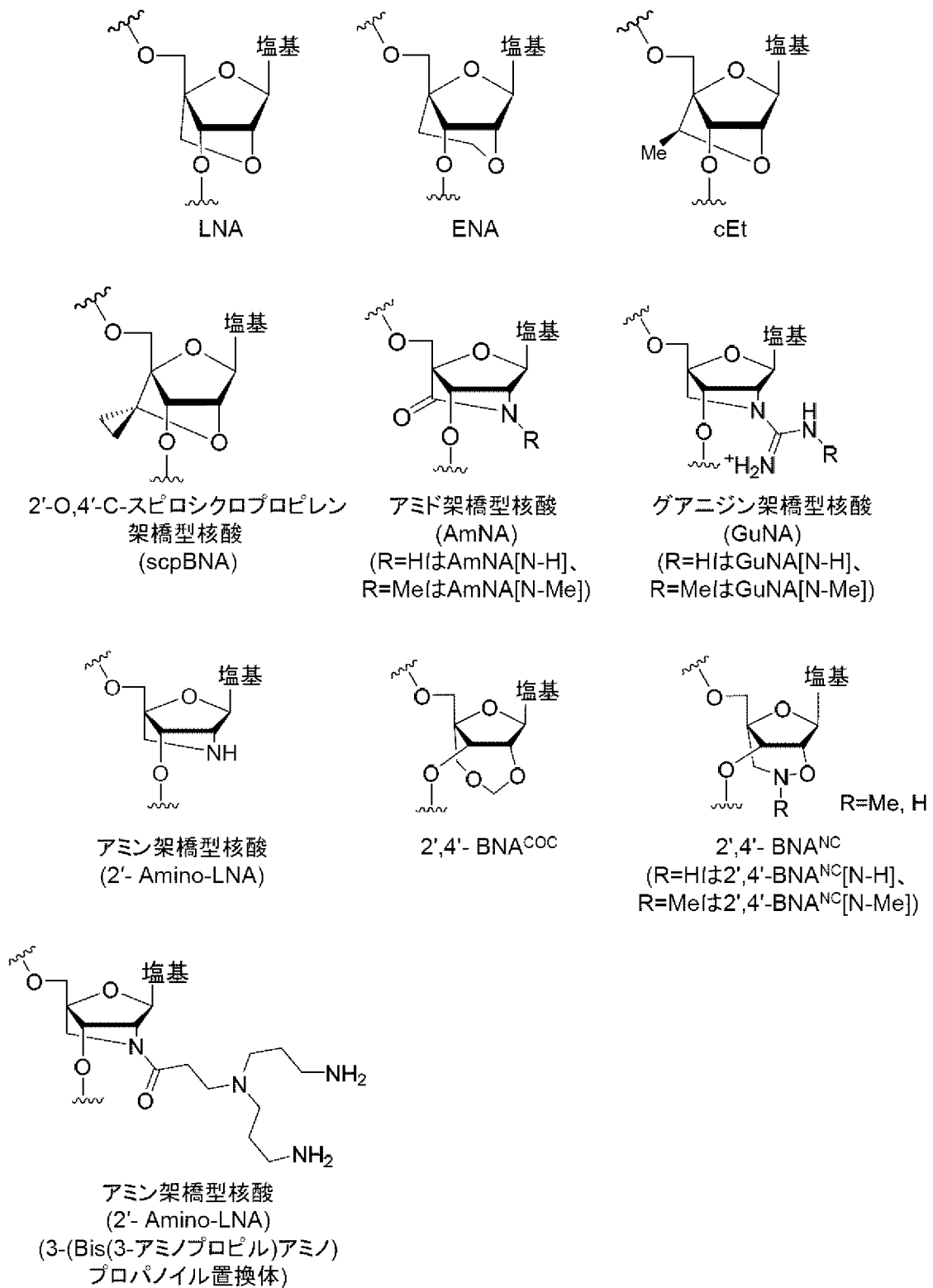
[請求項48] 前記第2核酸鎖がリガンドに結合している、請求項 1 に記載の二本鎖核酸複合体。

[請求項49] 前記リガンドが、低分子、ペプチド、脂質、及び核酸アプタマーからなる群から選択されるいずれか1以上である、請求項 4 8 に記載の二本鎖核酸複合体。

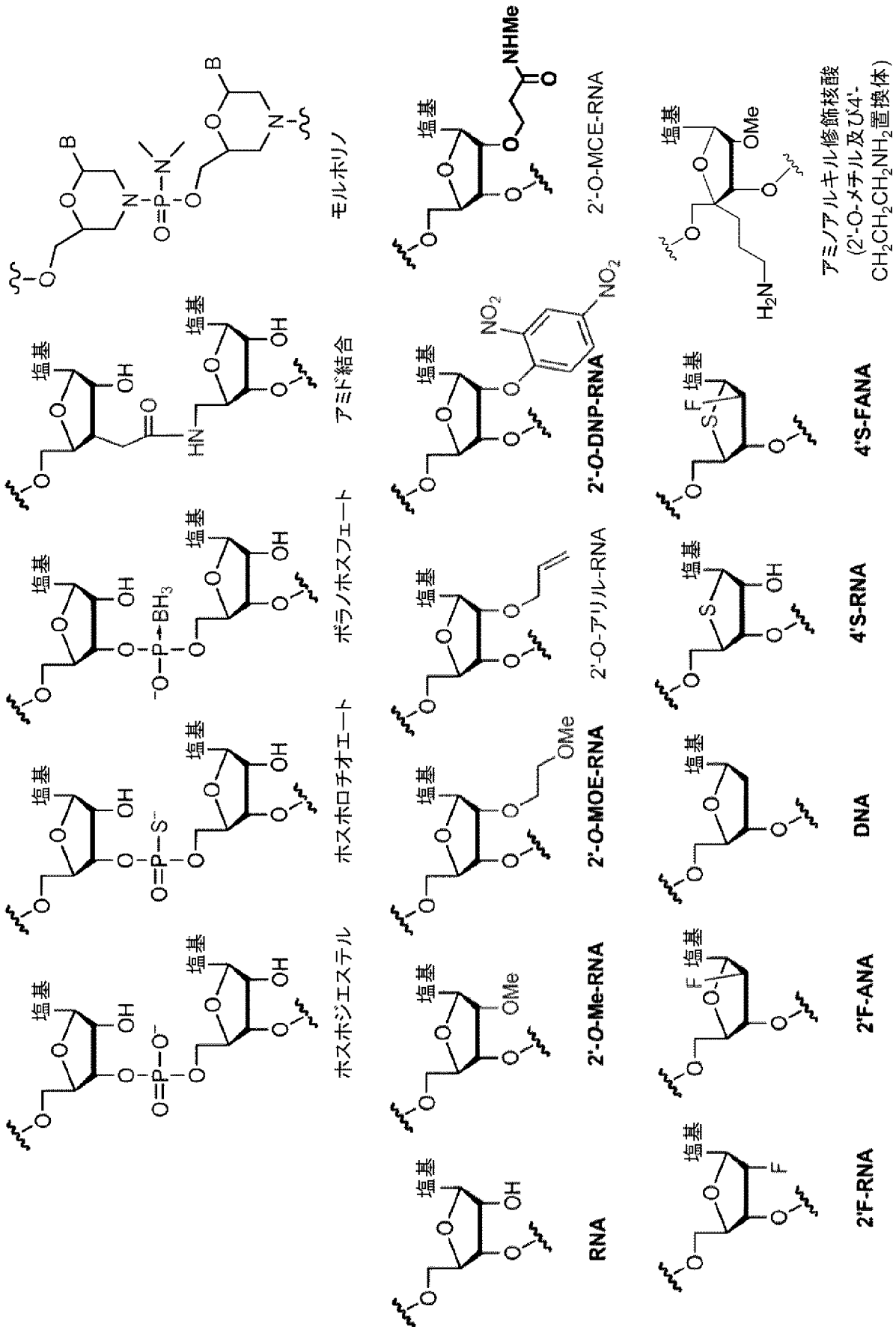
[請求項50] 前記脂質がコレステロール若しくはその類縁体、又はトコフェロール若しくはその類縁体である、請求項 4 9 に記載の二本鎖核酸複合体。

- [請求項51] 前記リガンドが前記第2核酸鎖の5'末端及び／又は3'末端に結合している、請求項45に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項52] リガンドと結合していない、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項53] 前記第1核酸鎖及び／又は前記第2核酸鎖のヌクレオシド間結合の全部又は一部が修飾ヌクレオシド間結合である、請求項1に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項54] 前記修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項53に記載の二本鎖核酸複合体。
- [請求項55] 請求項1～54のいずれか一項に記載の二本鎖核酸複合体を有効成分として含む医薬組成物。
- [請求項56] 被検体の中枢神経系疾患を治療するための、請求項55に記載の医薬組成物。
- [請求項57] 脳室内投与又は髄腔内投与される、請求項55に記載の医薬組成物。
- [請求項58] 前記髄腔内投与が後頭窩穿刺又は腰椎穿刺である、請求項57に記載の医薬組成物。
- [請求項59] 前記二本鎖核酸複合体が0.1mg～200mg投与される、請求項57に記載の医薬組成物。
- [請求項60] 静脈内投与又は皮下投与される、請求項55に記載の医薬組成物。
- [請求項61] 前記二本鎖核酸複合体が0.1mg/kg～100mg/kg投与される、請求項60に記載の医薬組成物。
- [請求項62] 中枢神経毒性が低減されている、請求項55に記載の医薬組成物。

[図1]



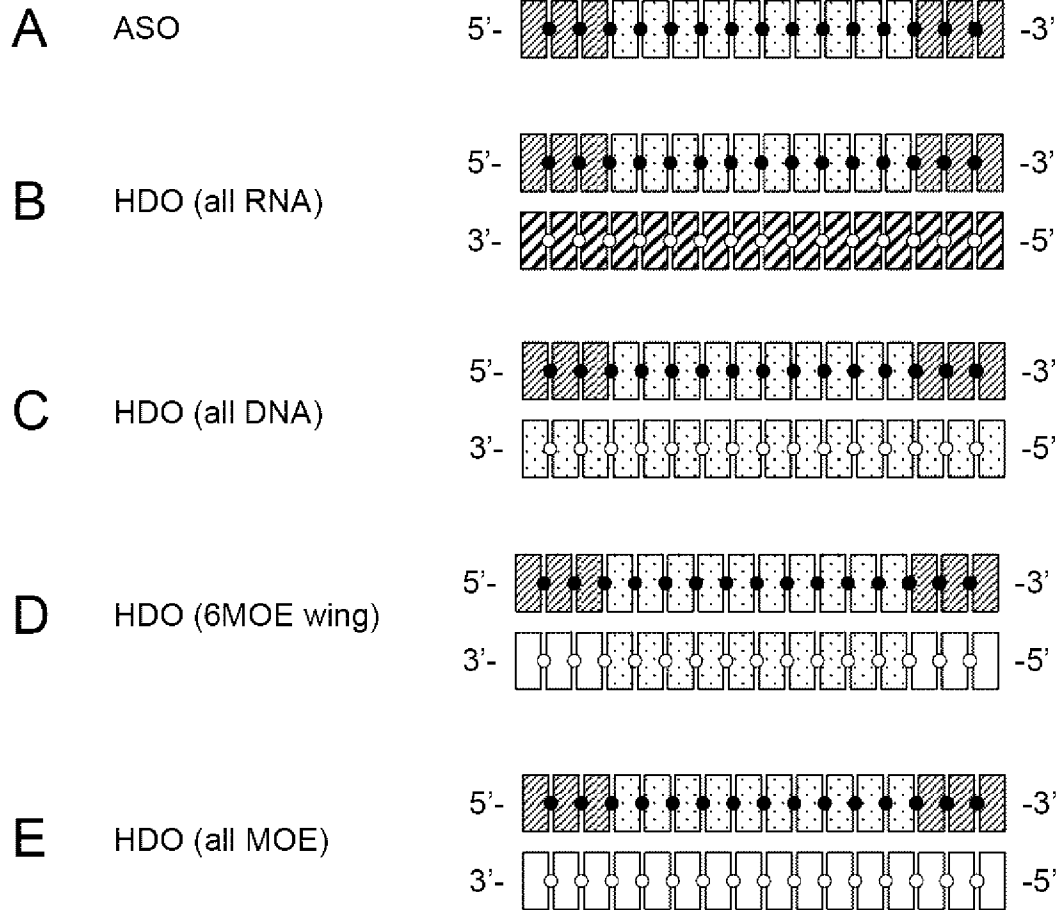
[図2]



[図3]

	スコア1	スコア2	スコア3	スコア4
カテゴリー1 運動亢進	ケージ探索の増加	増加 (例:掘る、埋める)	中程度の増加 (例:手足をひかく)	顕著に増加
	常同性	わずか (例:グルーミングの増加)	中程度 (例:旋回、反復行動)	顕著
カテゴリー2 活動低下及び 低覚醒状態	探索又は 随意運動の低下	探索低下	探索なし	探索なし
	反応性低下	わずか (例:接触又は ハンドリングに対する 反応低下)	中度 (例:持ち上げた際の 反応低下、まばたきなし)	顕著 (例:テールピンチに 対する反応低下)
カテゴリー3 運動機能障害 ／運動失調	運動失調	中度 (例:遅い正向反射、 揺れ動く)	中度 (例:よろめき、落下、 歩行異常)	重度 (例:這い歩き)
	筋力	ケージ上部の斜面を 登れない	歩けない	立てない
カテゴリー4 異常な姿勢 及び呼吸	姿勢異常	軽度 (例:背中が丸くなっている、 伸びている、低姿勢、拳尾)	中程度 (例:腹這い)	重度 (例:側臥位)
	呼吸異常	正常	浅い	困難
カテゴリー5 振戦／痙攣	振戦	顕著	N.A.	N.A.
	痙攣 (例:走る、跳び上がる、 間代及び／又は強直性)	検出可能 (-)	少し又は部分的	繰り返し又は連続 (例:1分を超える)

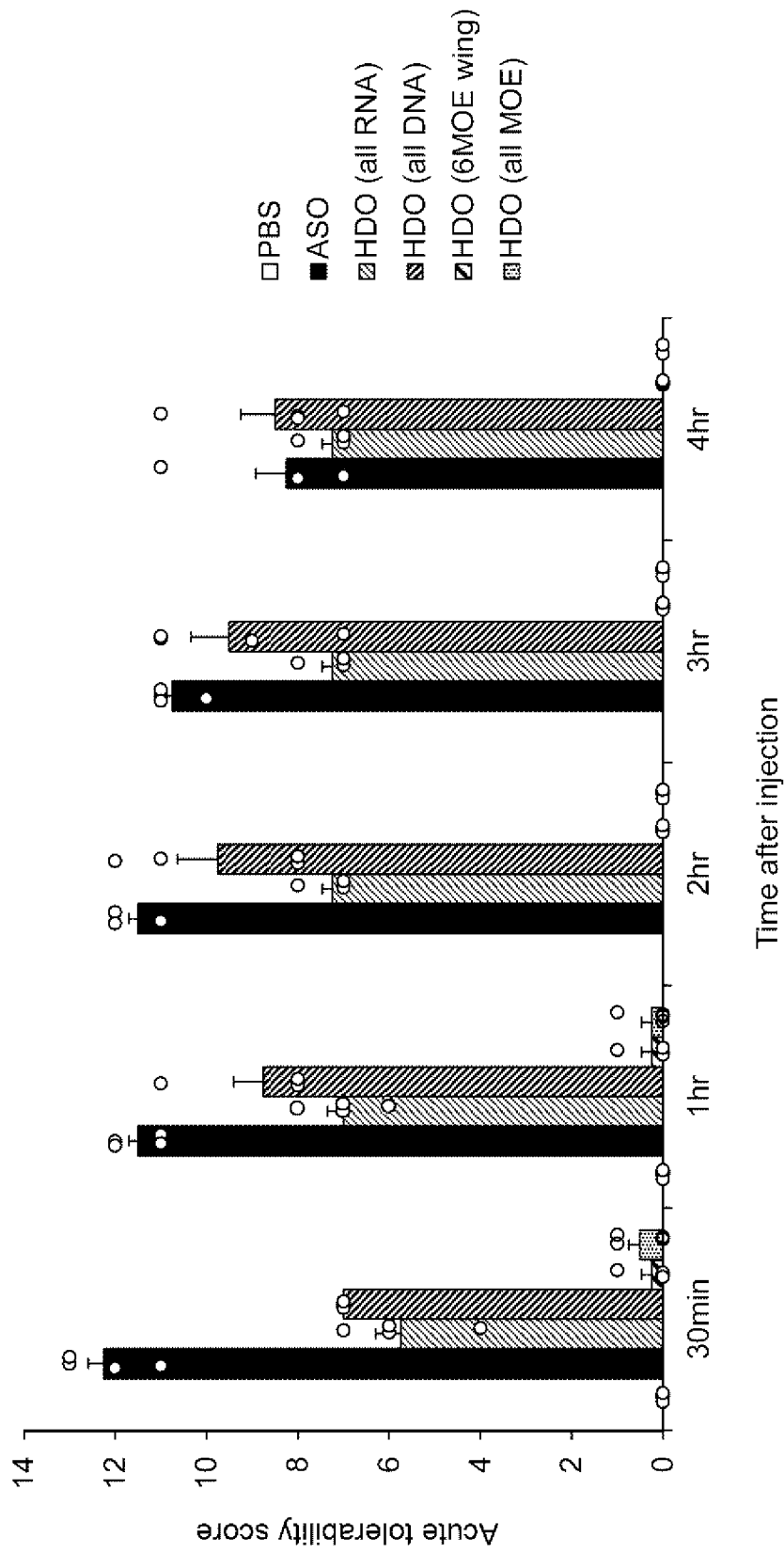
[図4]



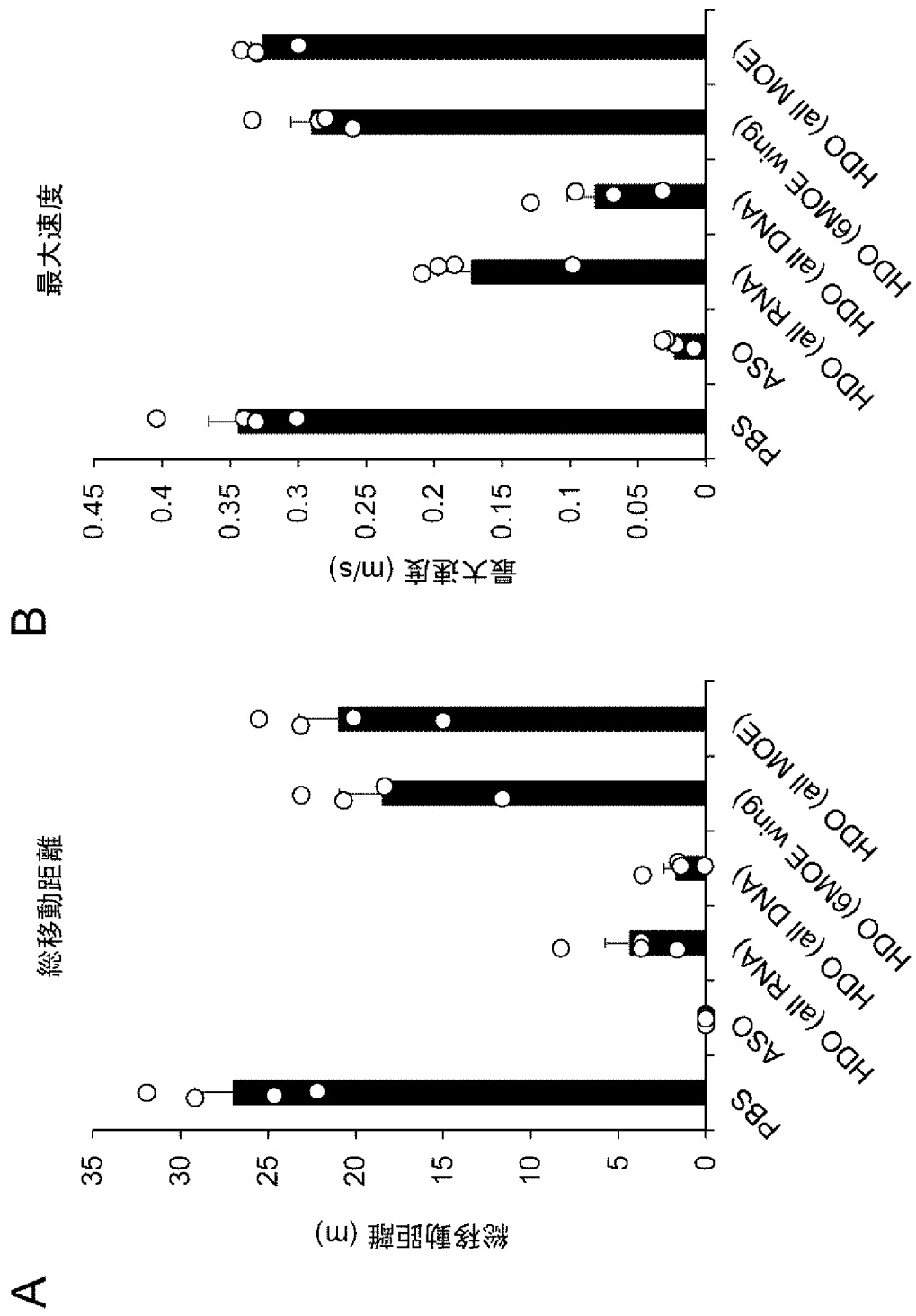
= DNA   
 = RNA   
 = LNA   
 = 2'-O-MOE-RNA

○ = ホスホジエステル結合   
 ● = ホスホロチオエート結合

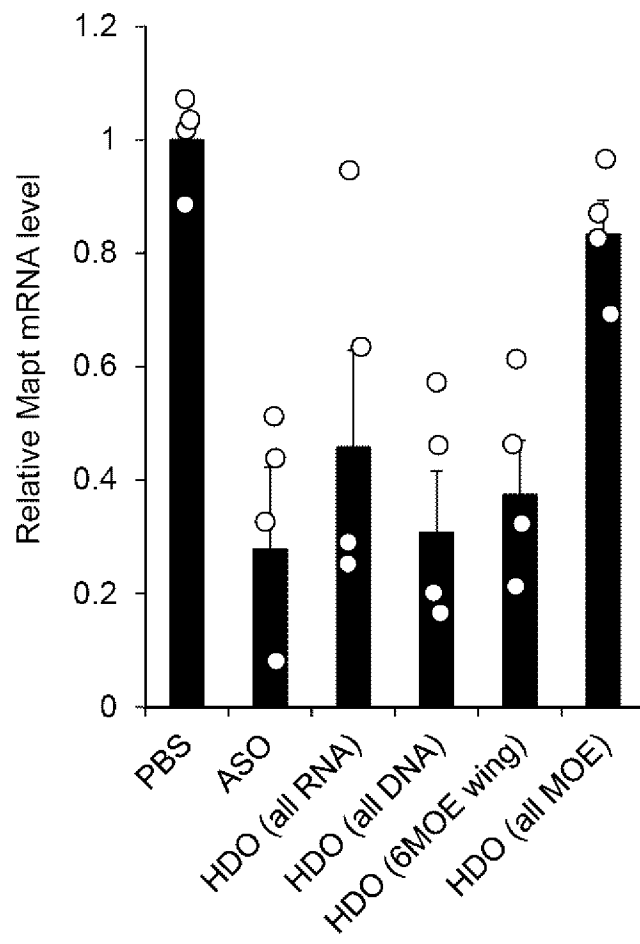
[図5]



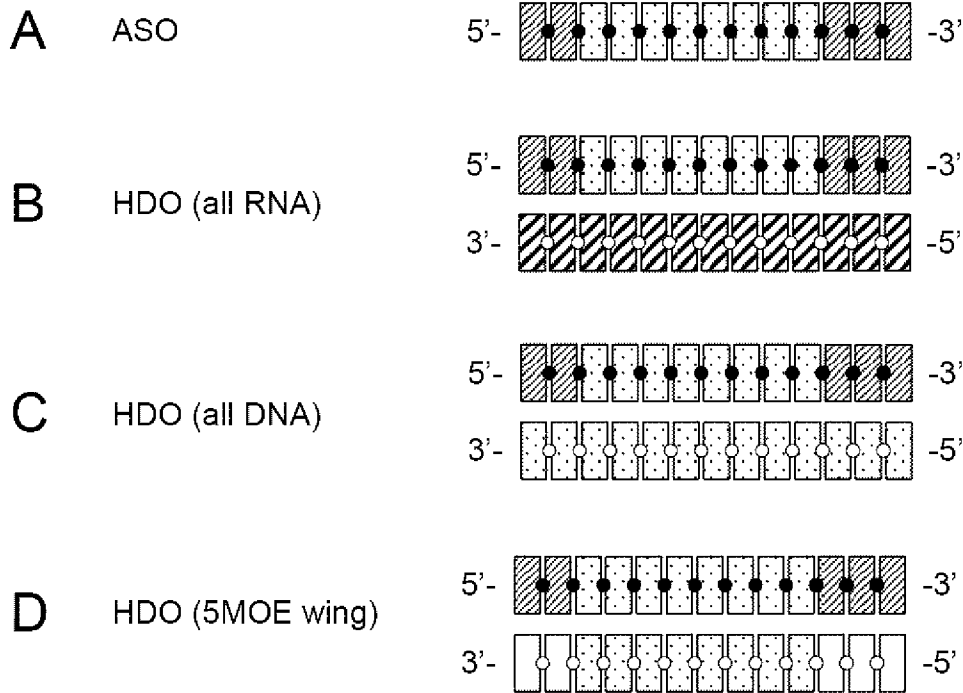
[図6]







[Fig. 7]



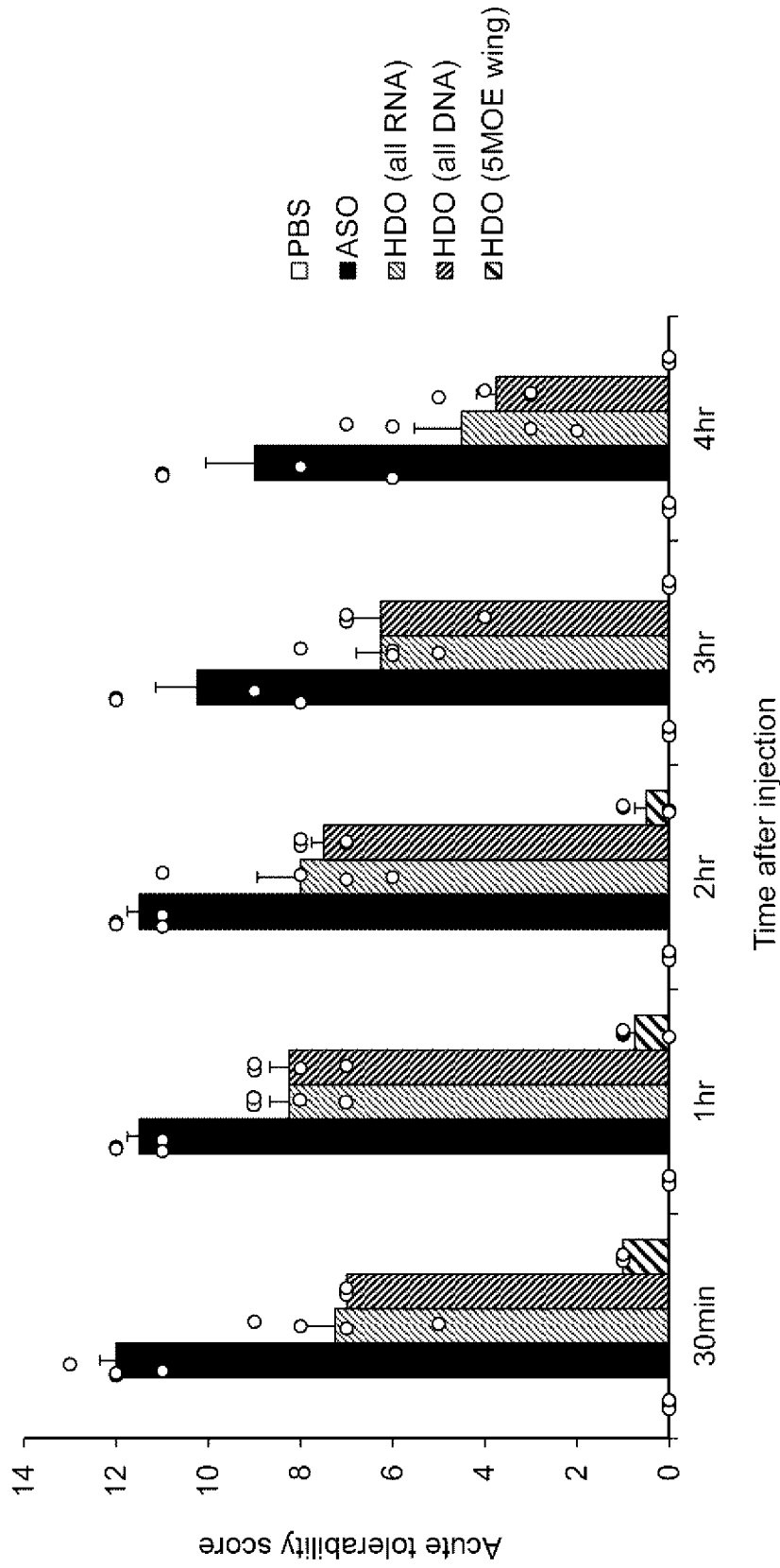
[図8]



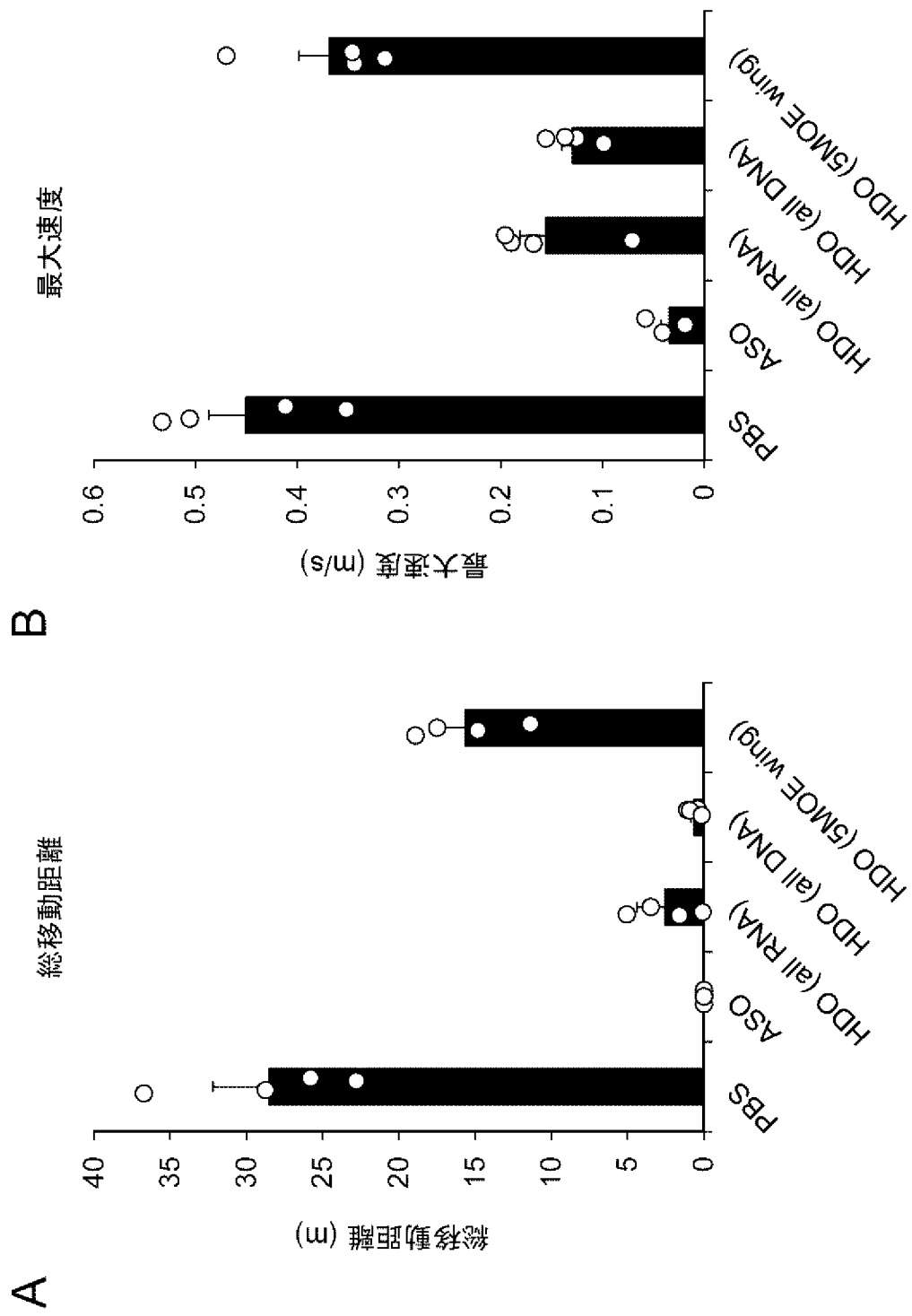
 = DNA   
  = RNA   
  = LNA   
  = 2'-O-MOE-RNA

○ = ホスホジエステル結合    ● = ホスホロチオエート結合

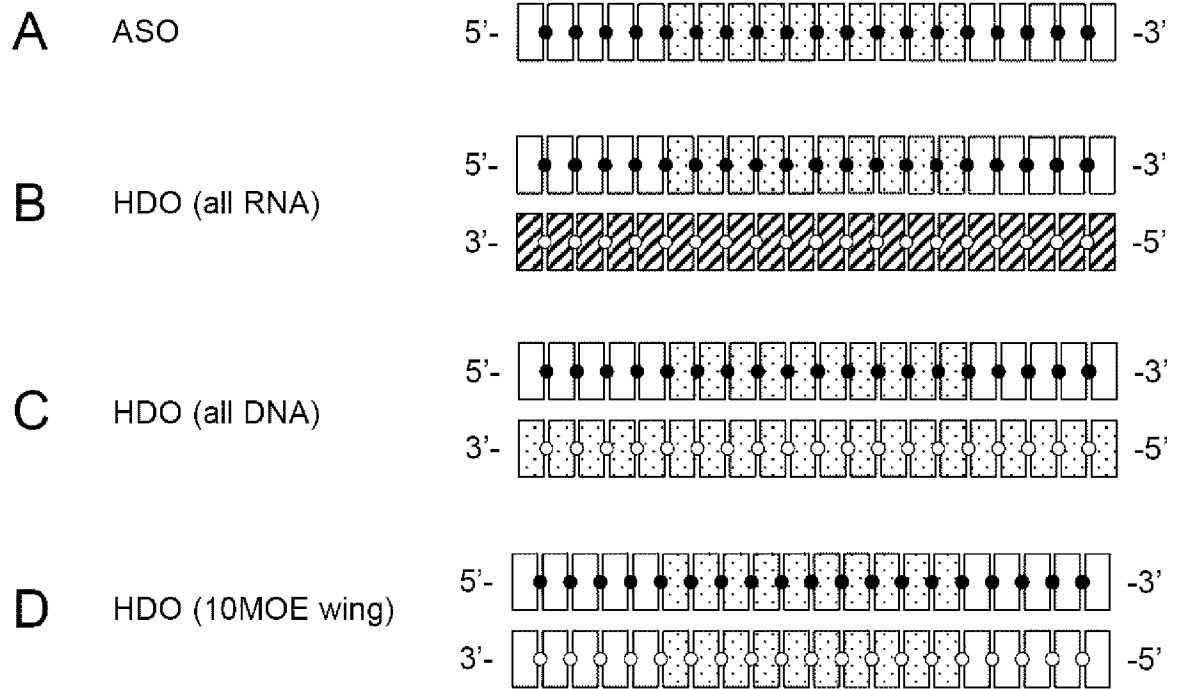
[Figure 9]





[図10]



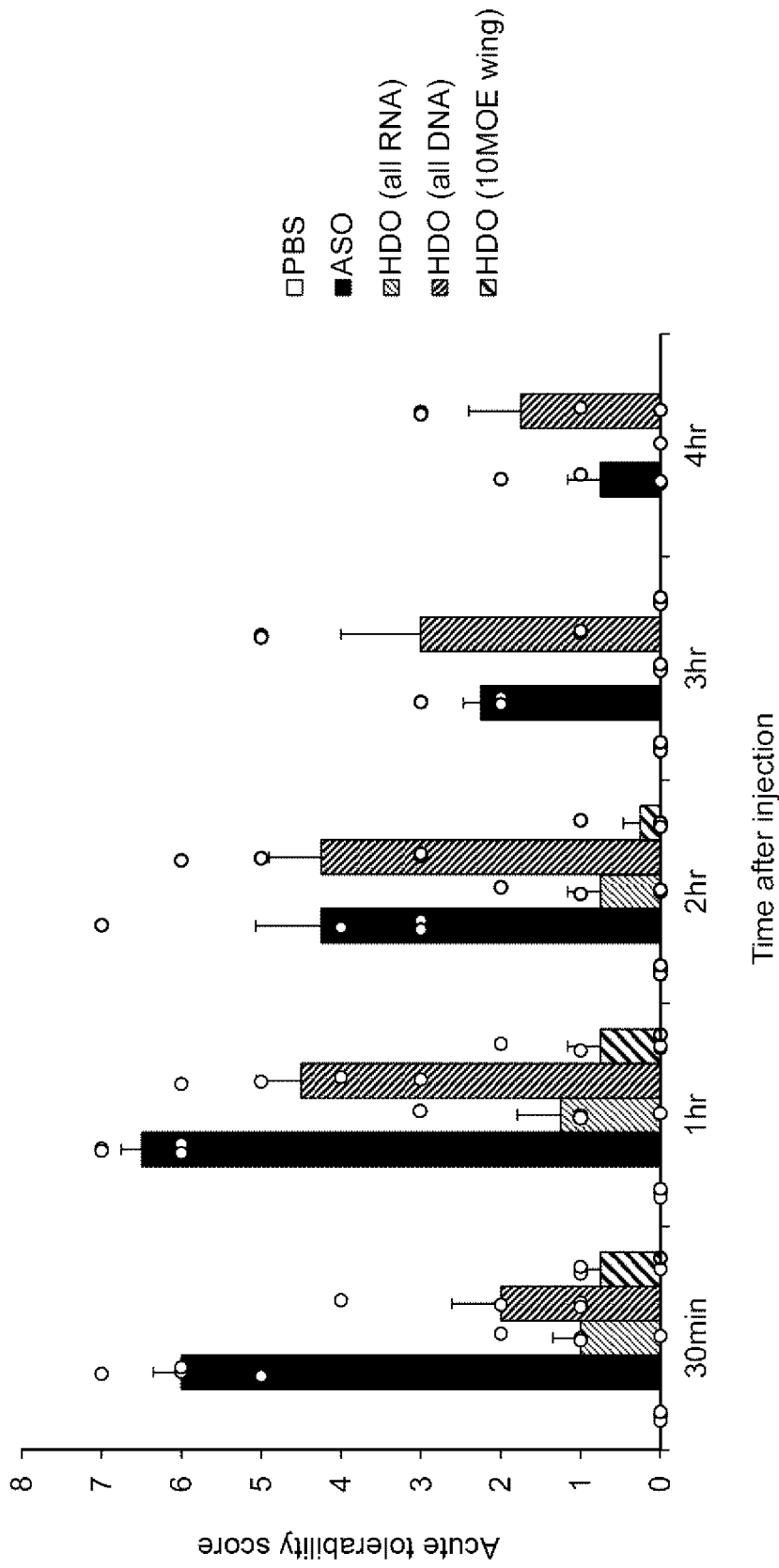
[図11]



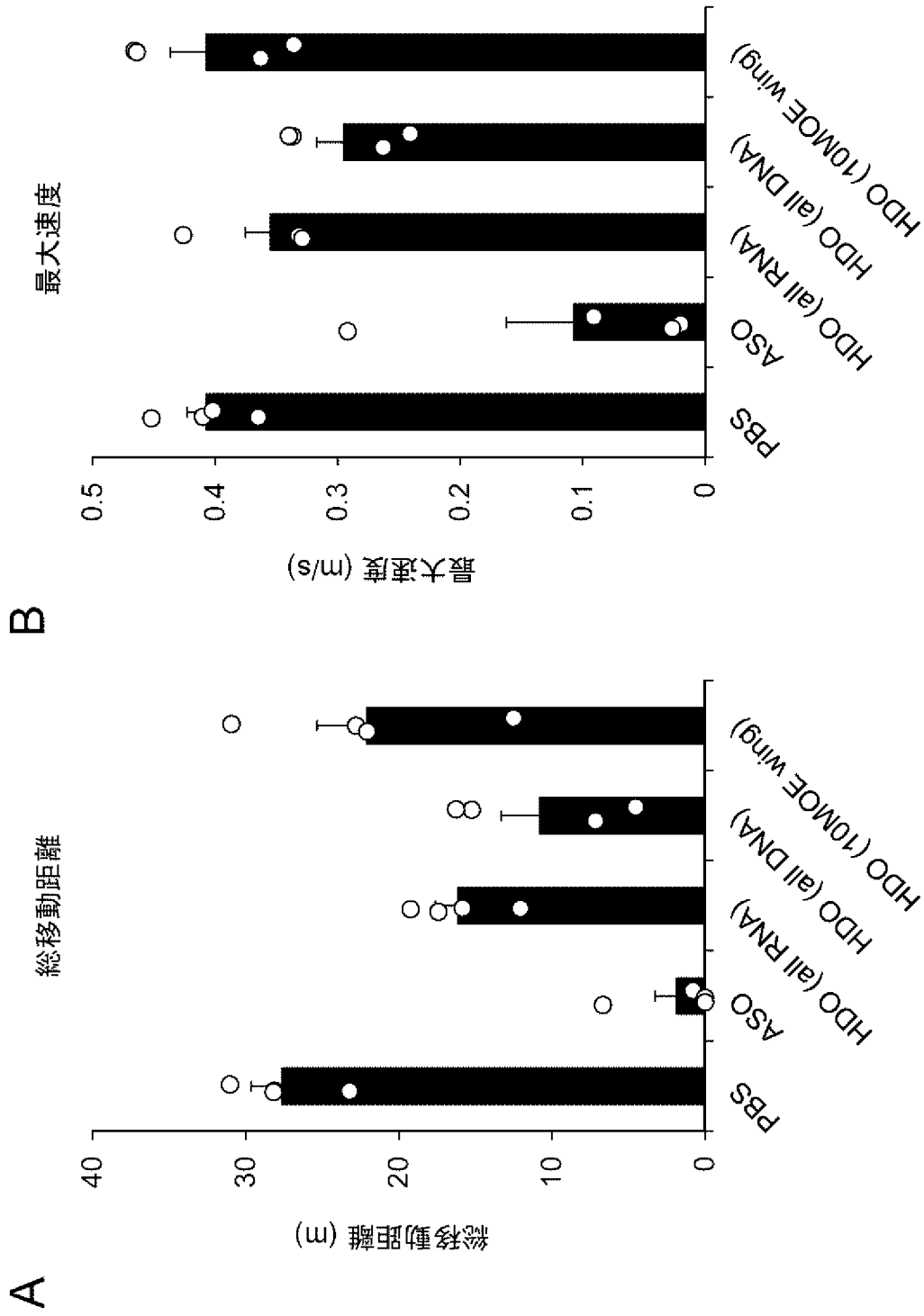
 = DNA   
  = RNA   
  = 2'-O-MOE-RNA

 = ホスホジエステル結合   
  = ホスホロチオエート結合

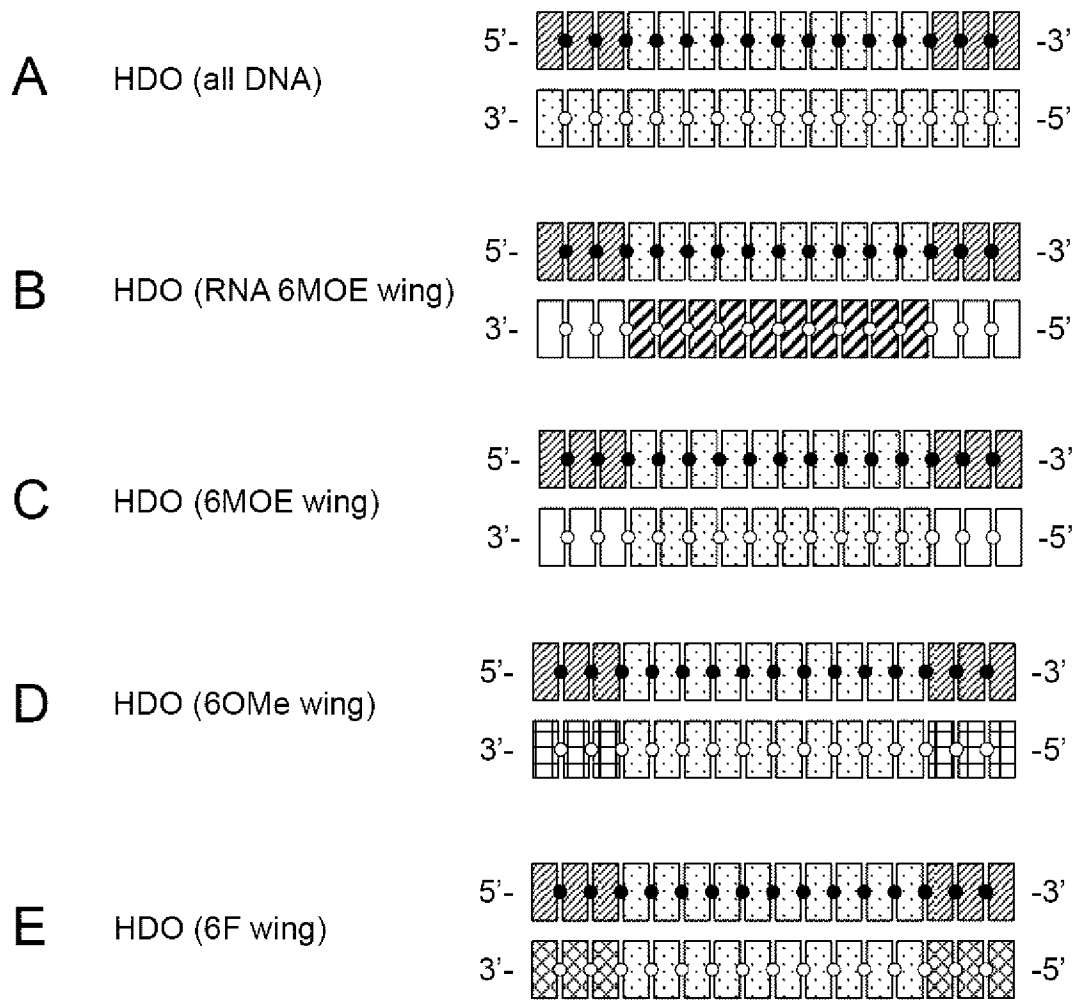
[12]



[図13]



[図14]

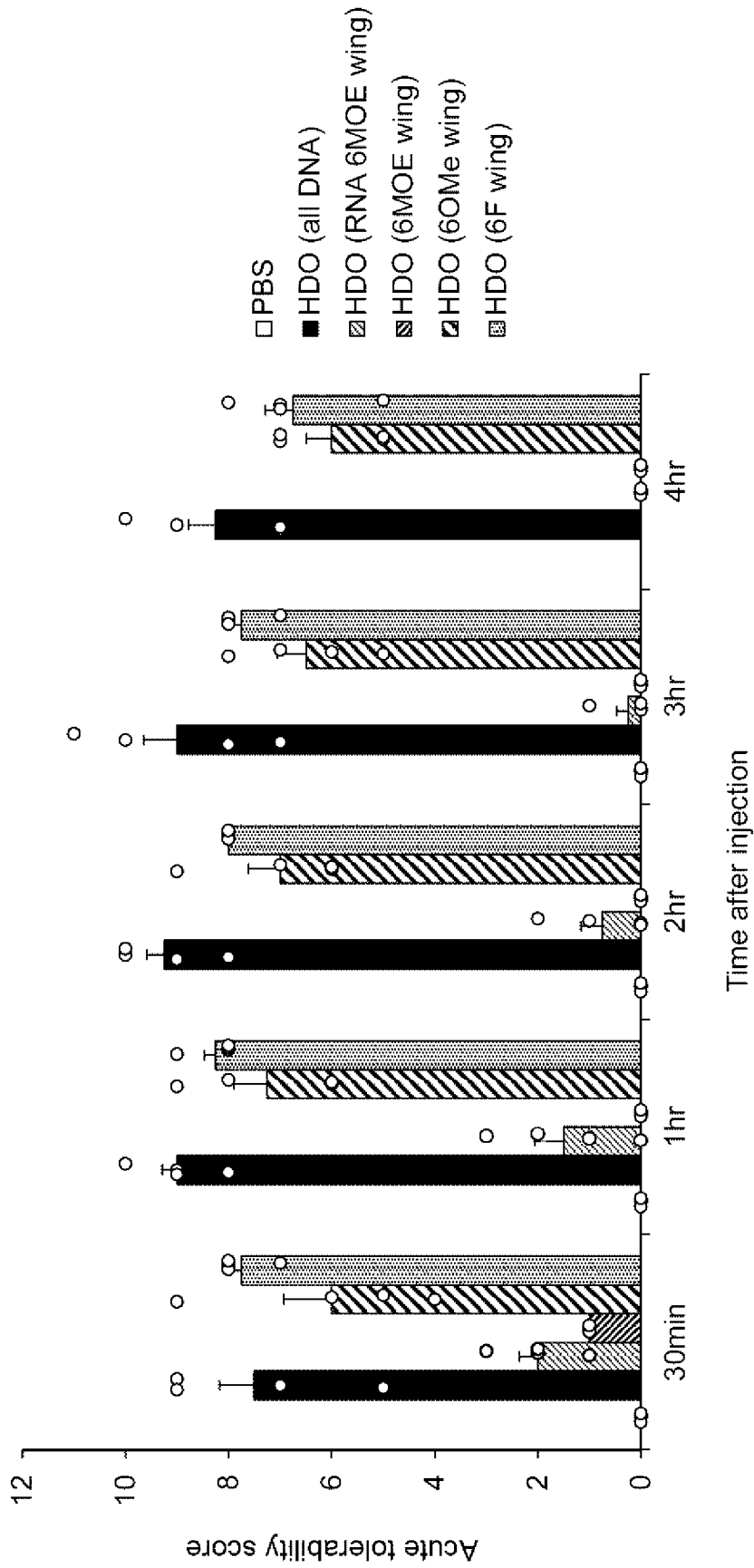


= DNA    = RNA    = LNA

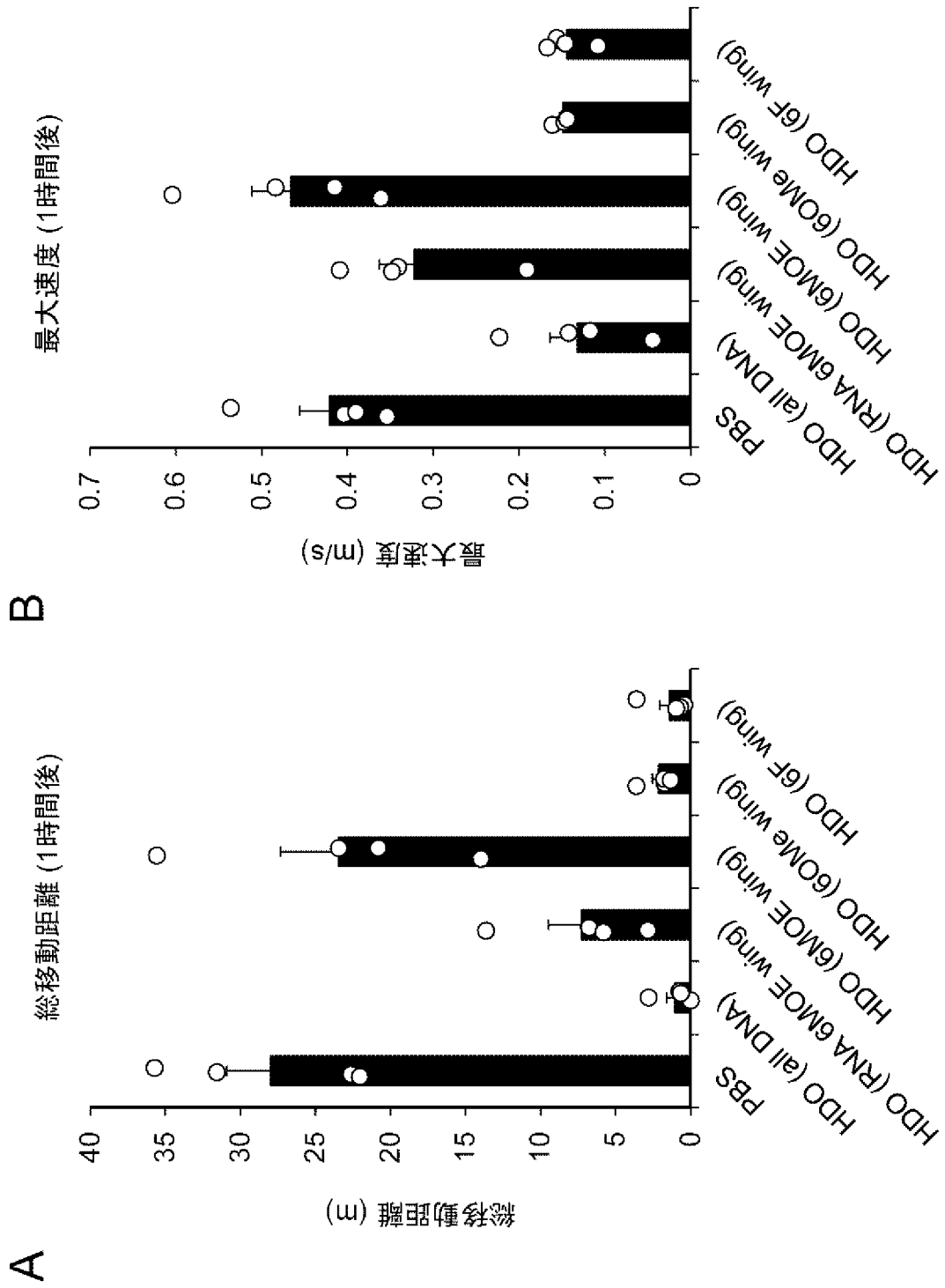
= 2'-O-MOE-RNA    = 2'-O-Me-RNA    = 2'-F-RNA

= ホスホジエステル結合    = ホスホロチオエート結合

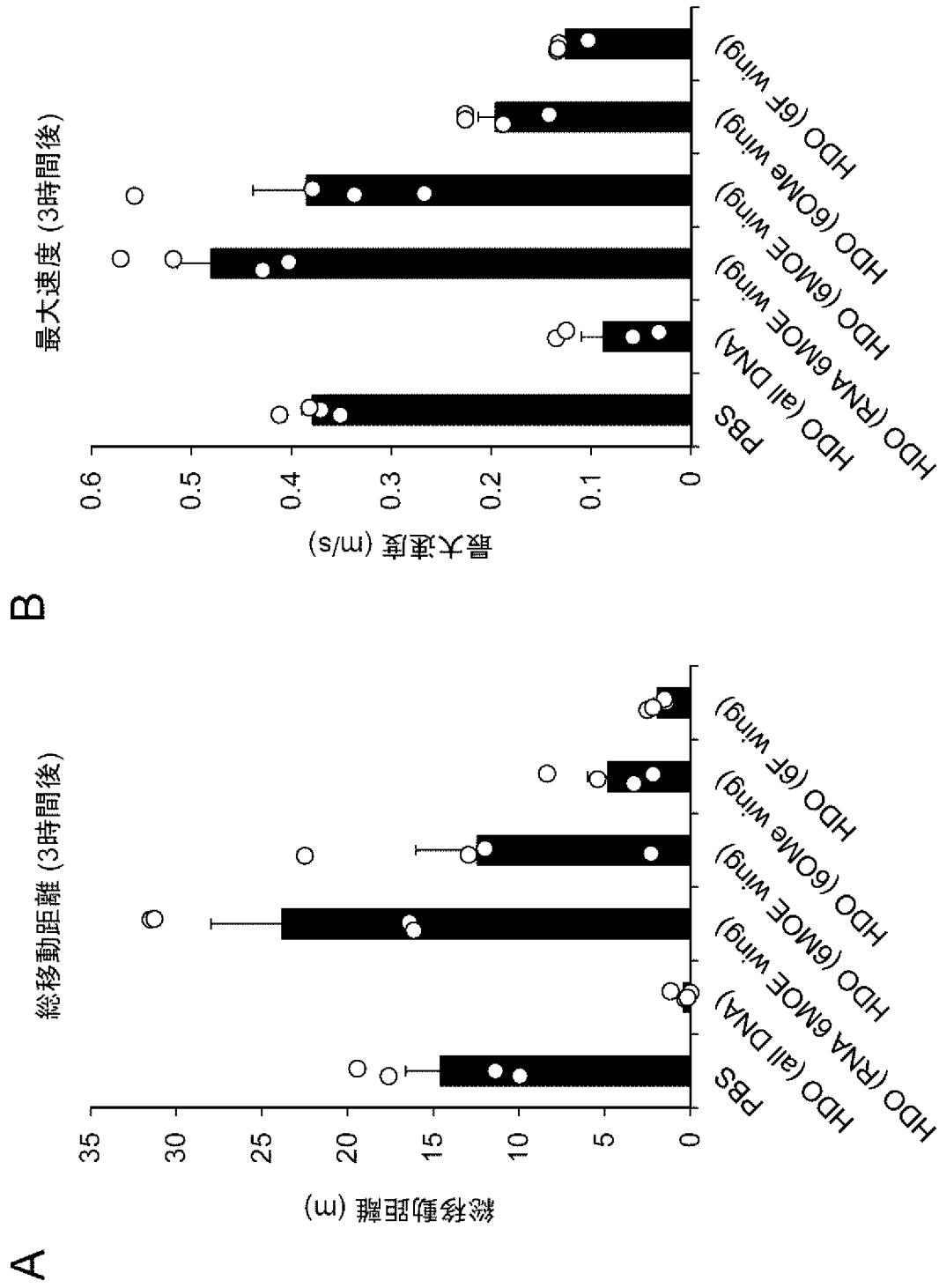
[15]



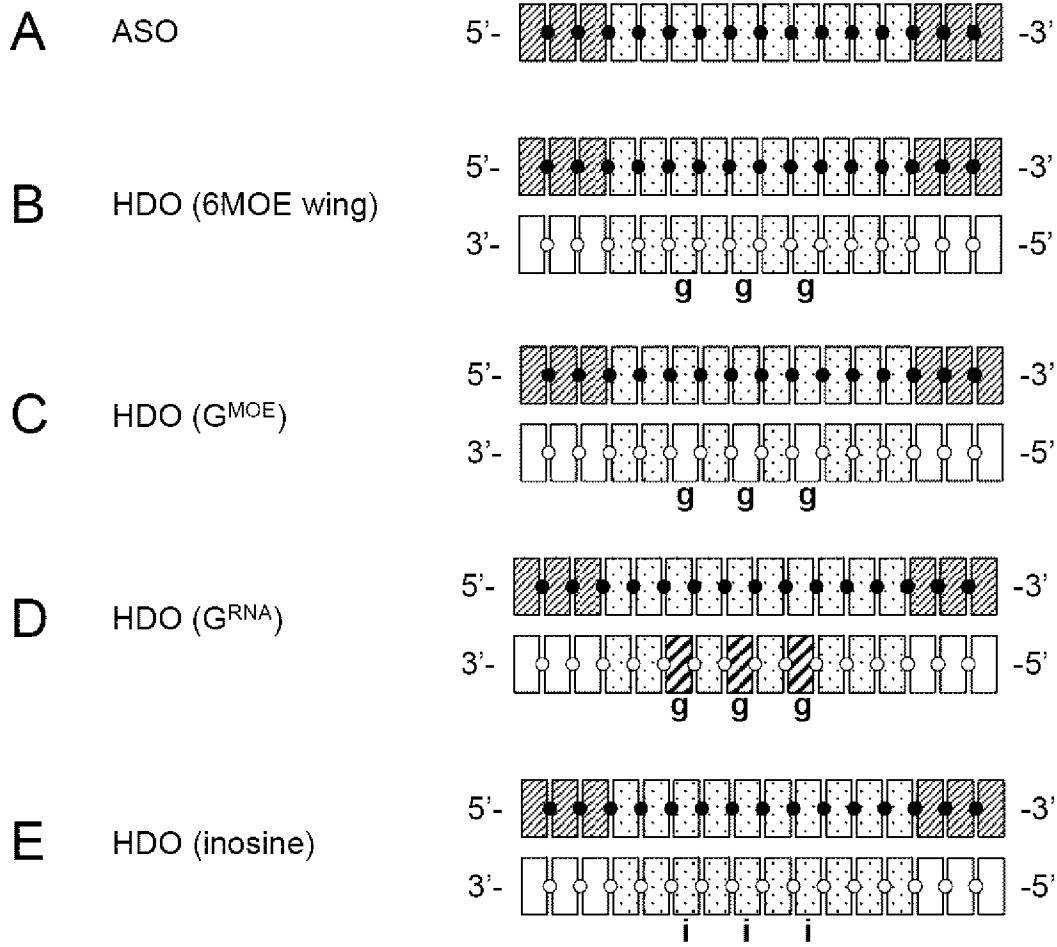
[図16]



[図17]



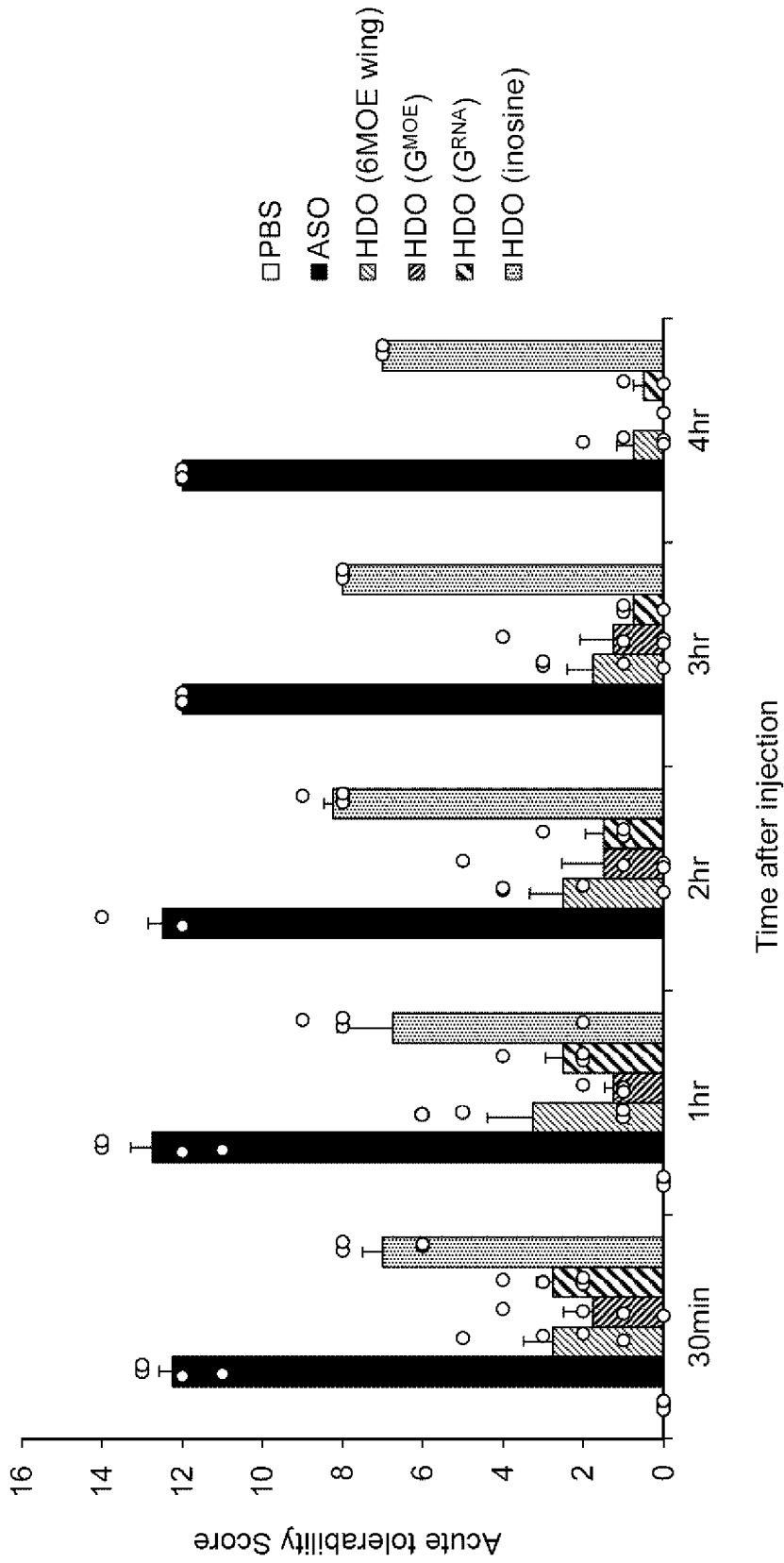
[図18]



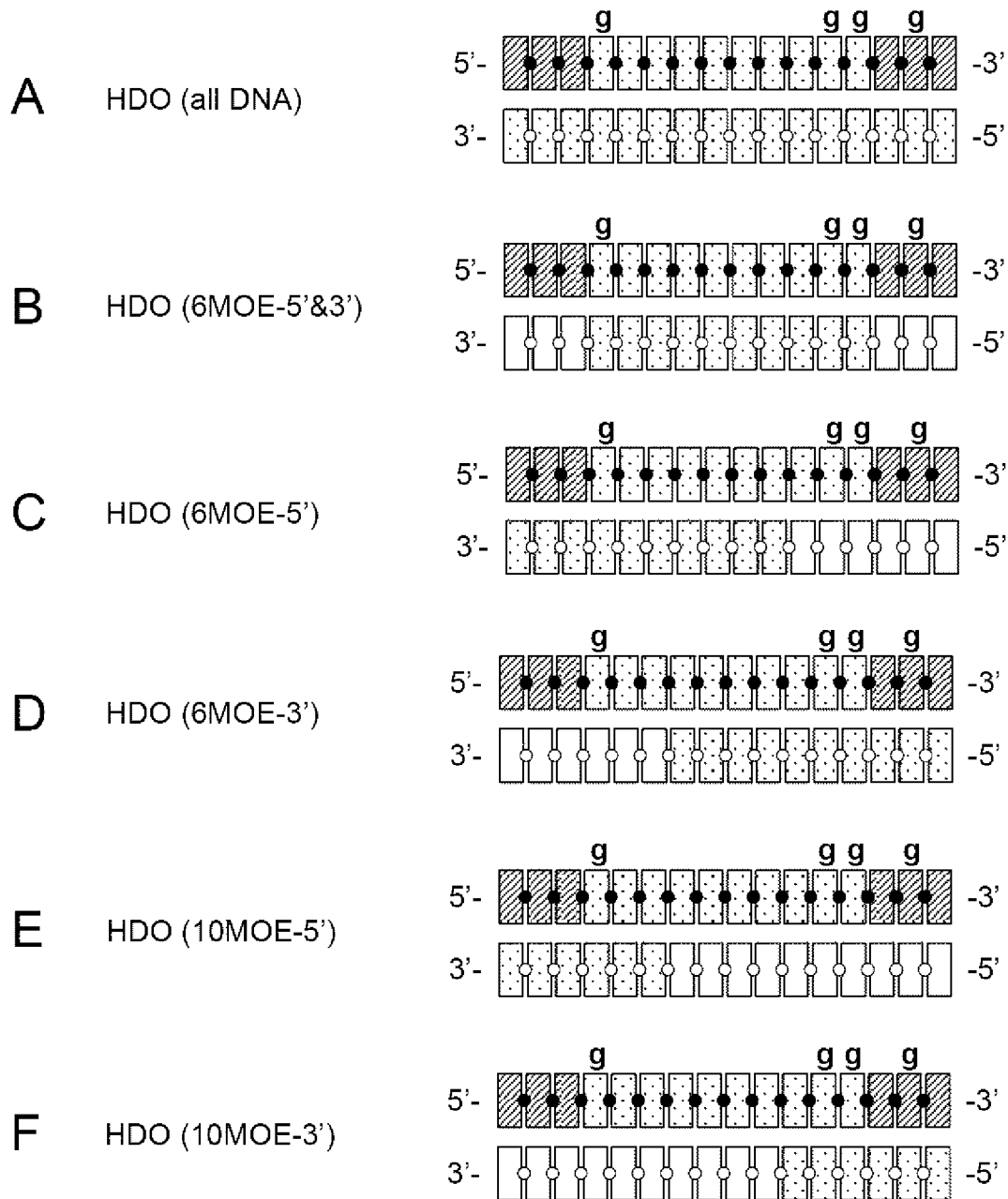
= DNA   
 = RNA   
 = LNA   
 = 2'-O-MOE-RNA

= ホスホジエステル結合   
 = ホスホロチオエート結合

[Figure 19]



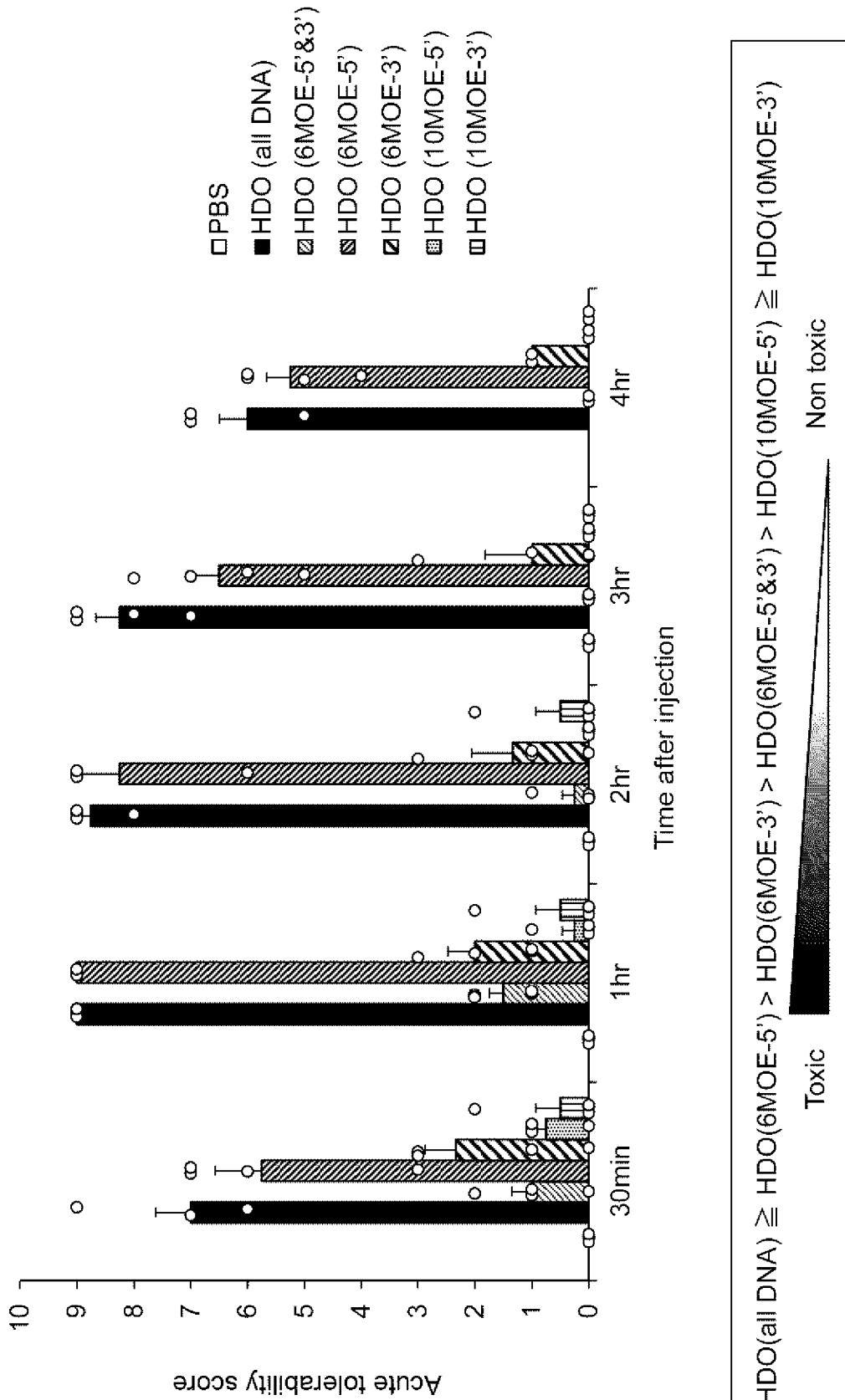
[図20]



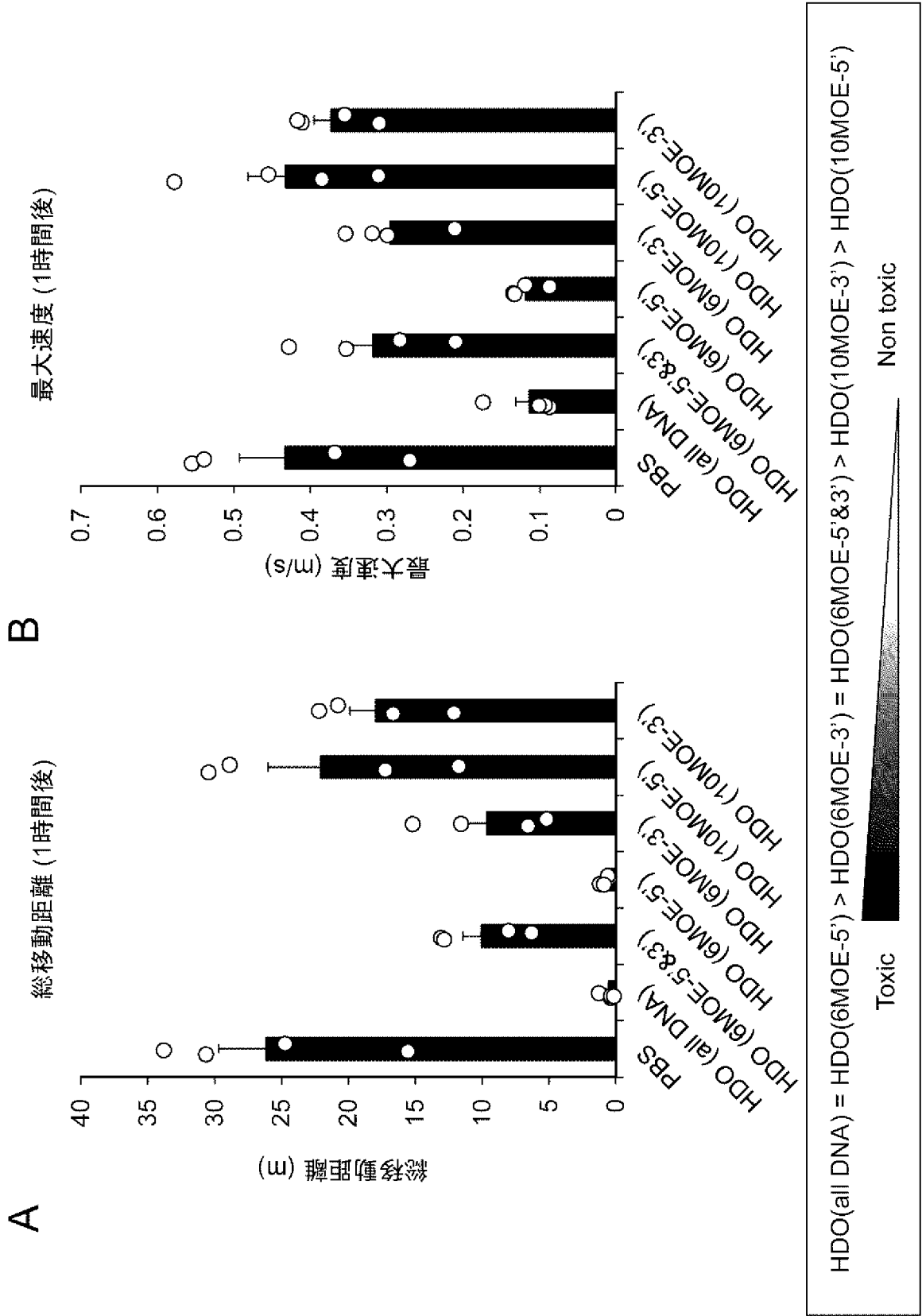
= DNA     
 = LNA     
 = 2'-O-MOE-RNA

= ホスホジエステル結合     
 = ホスホロチオエート結合

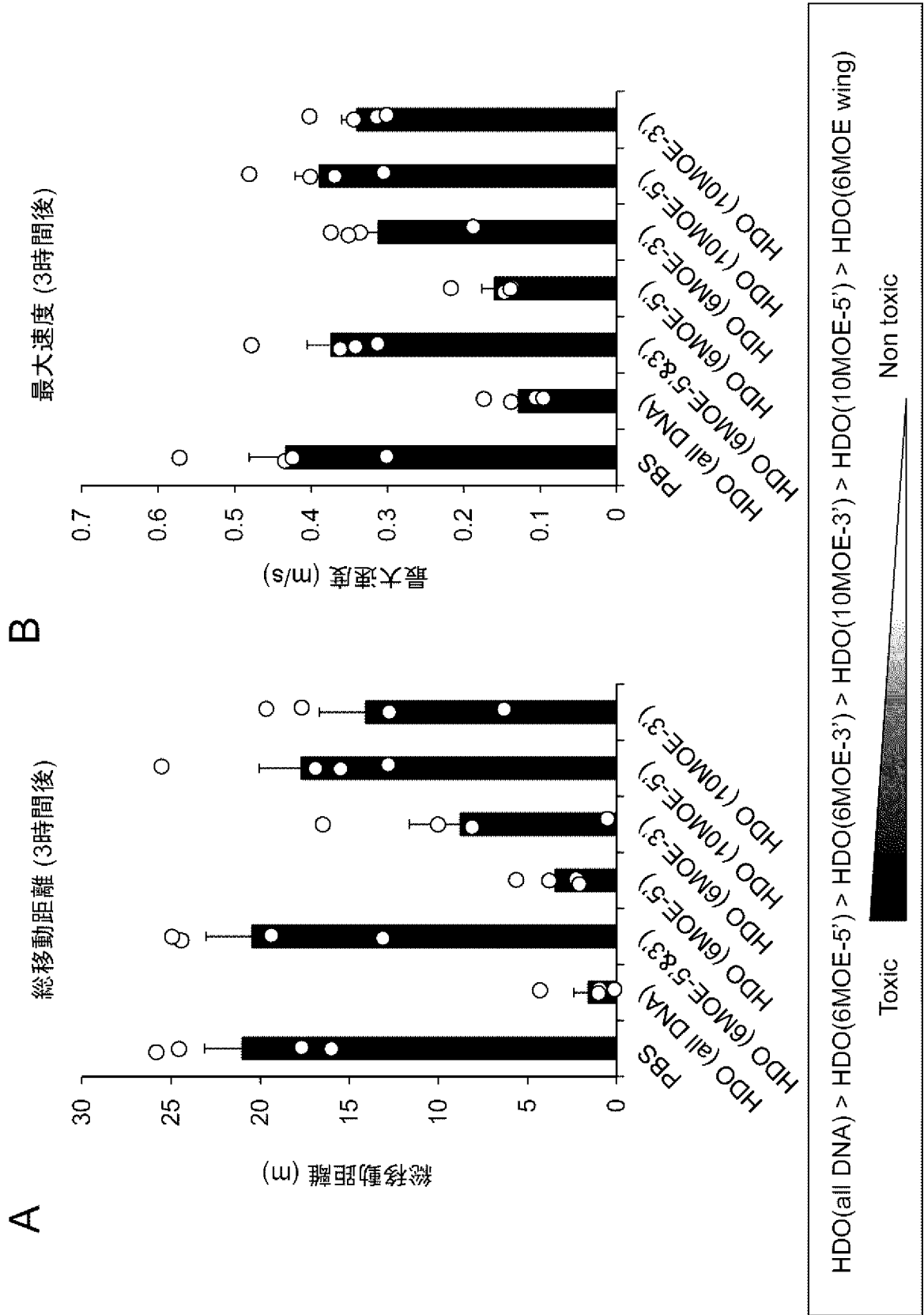
[21]



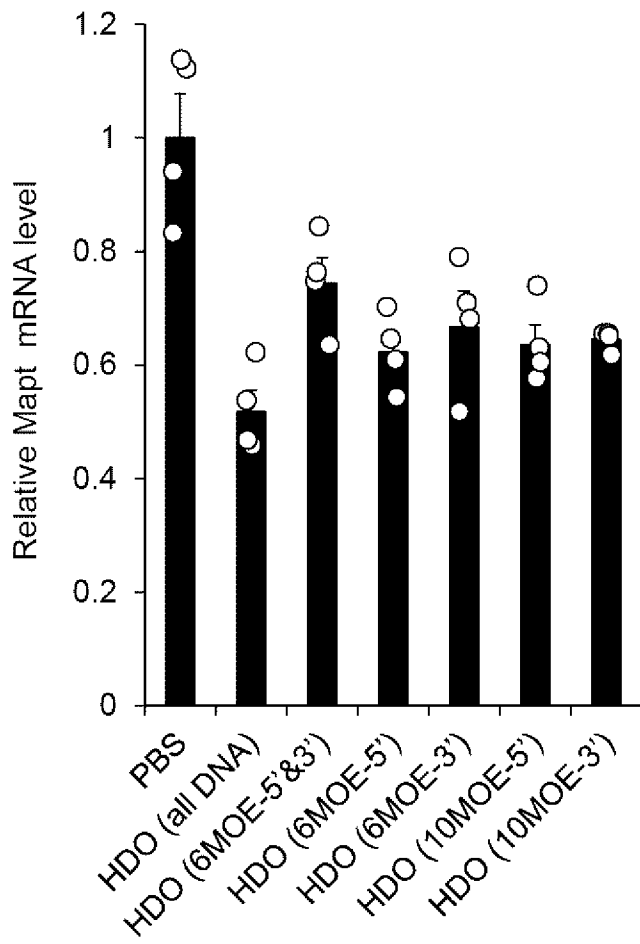
[図22]



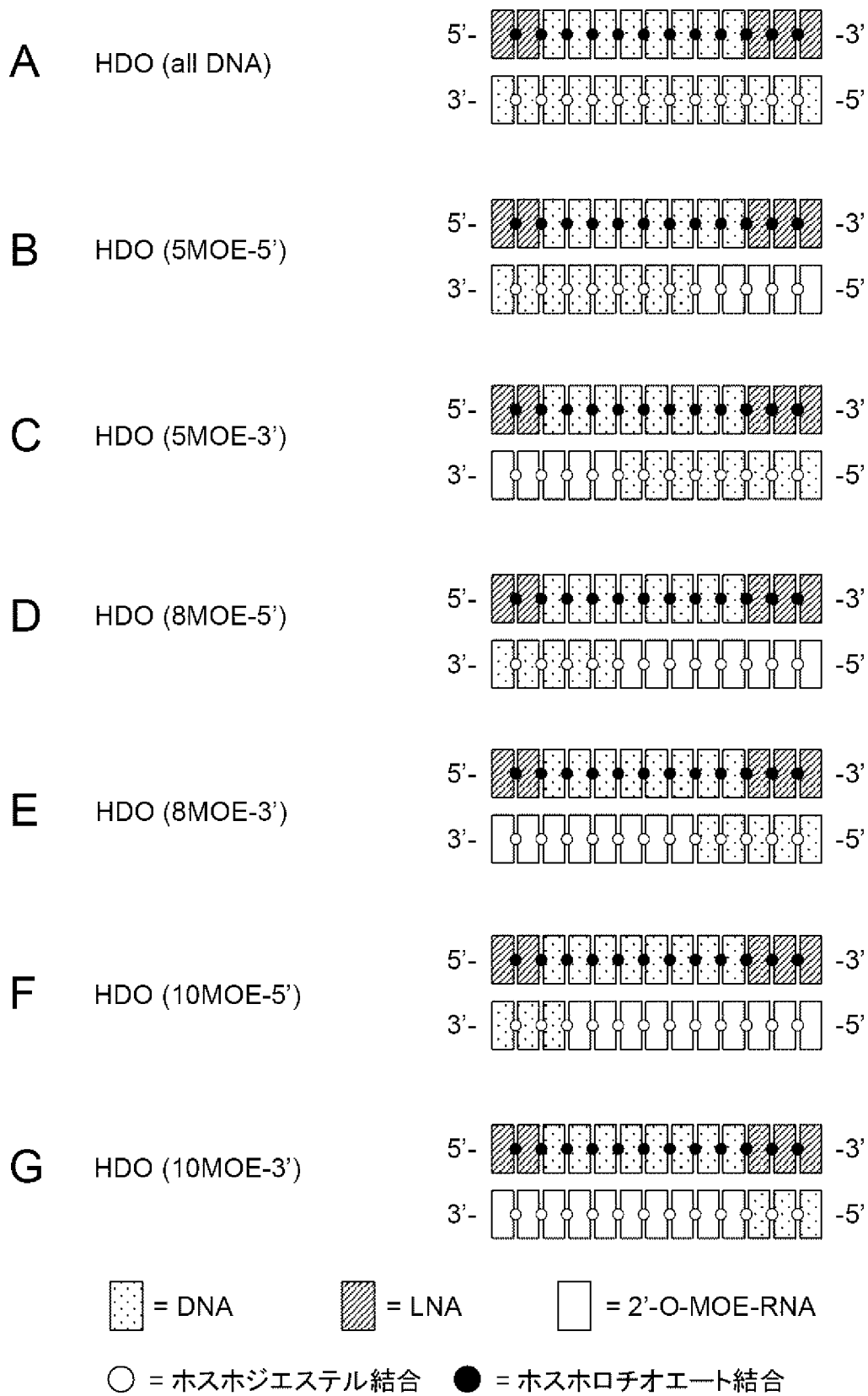
[図23]



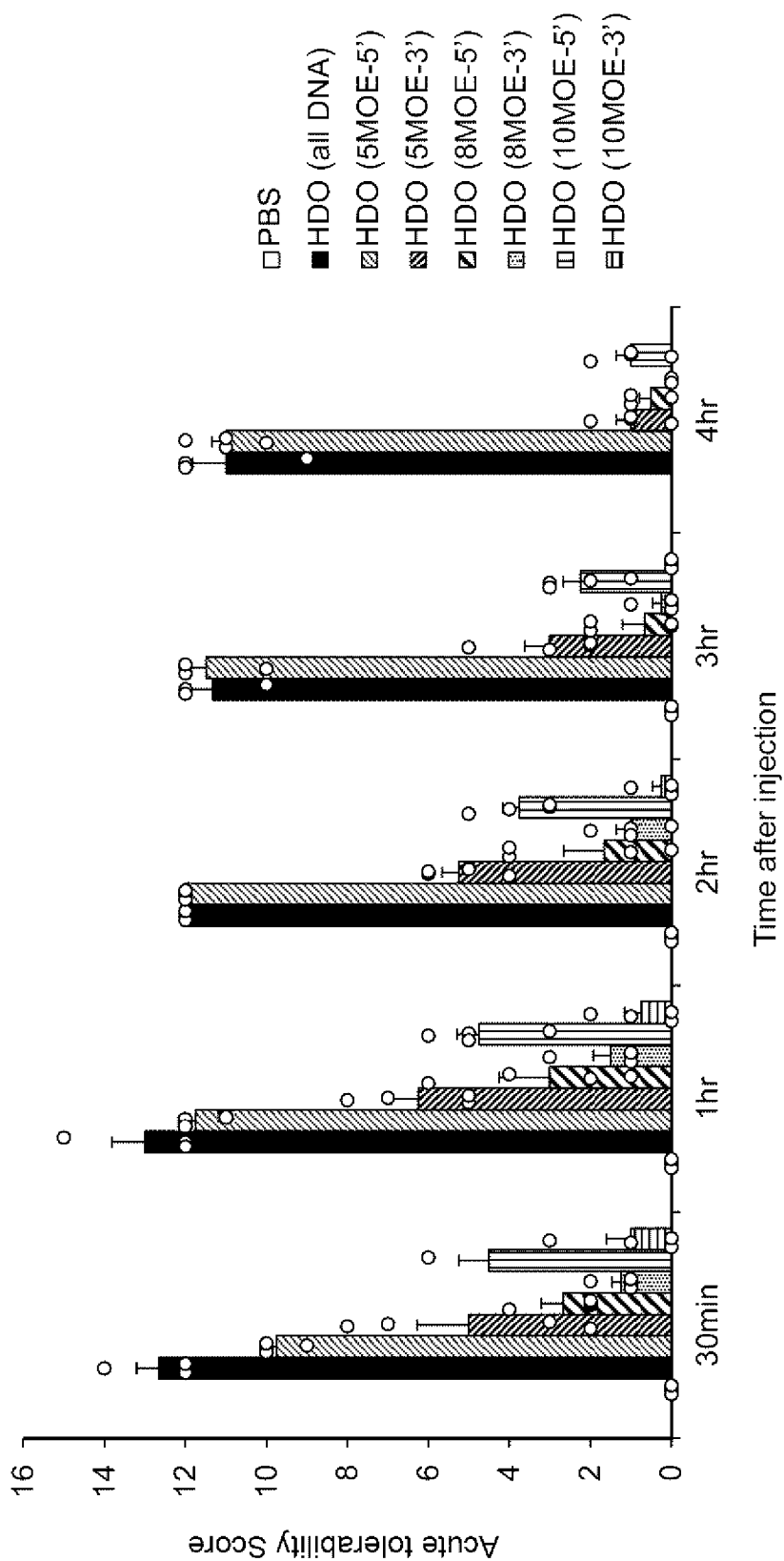
[図24]



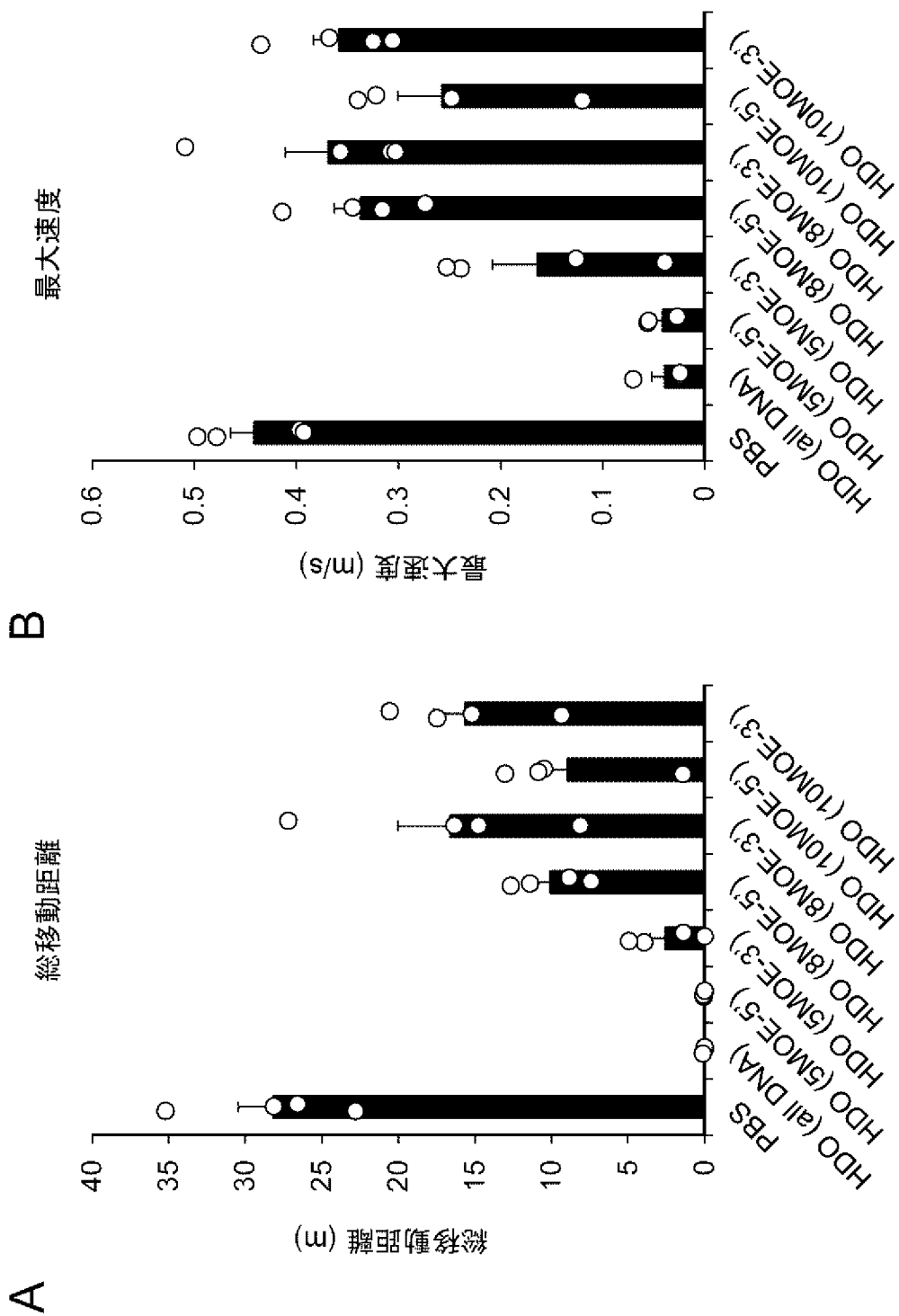
[図25]



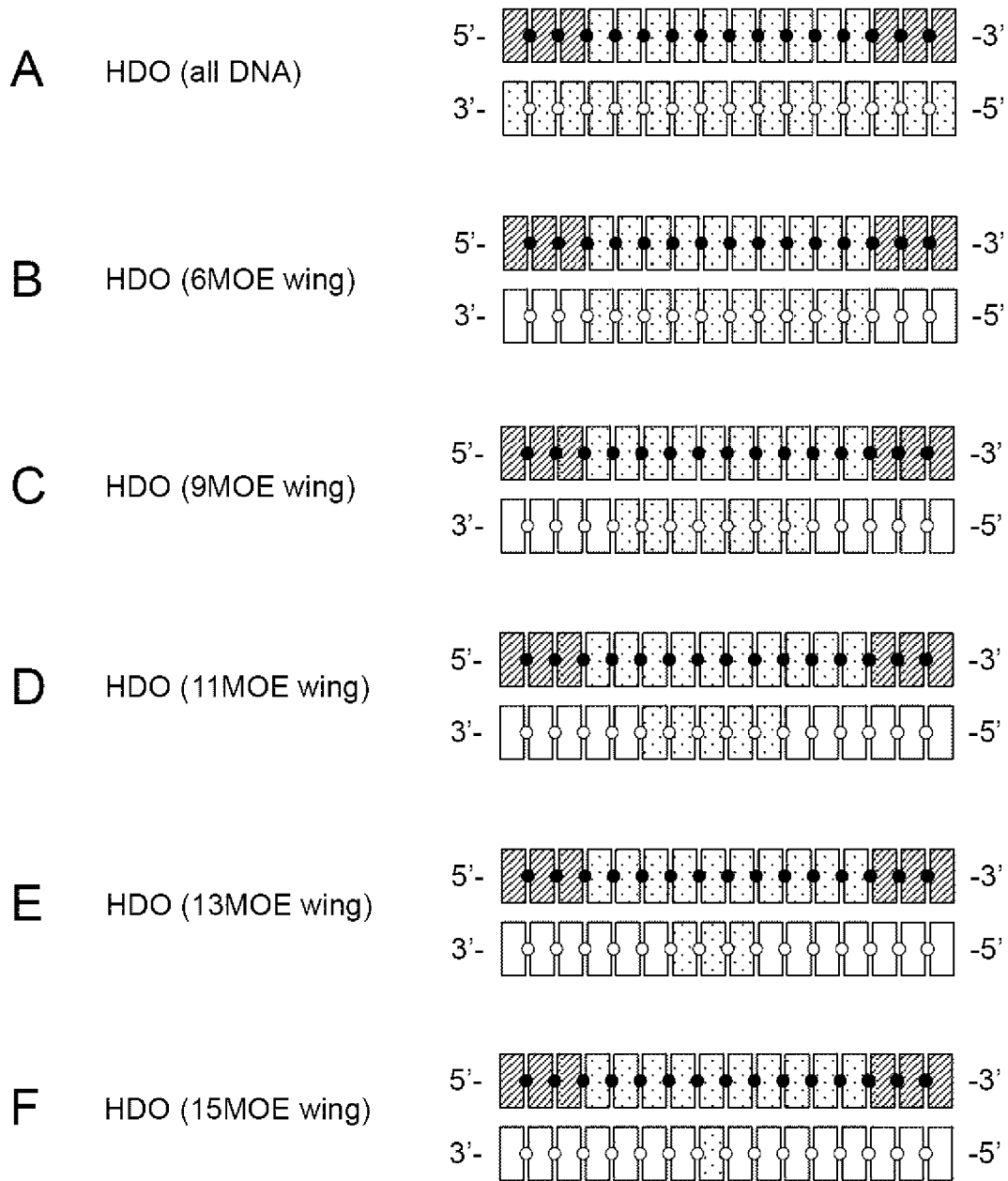
[26]






[図27]



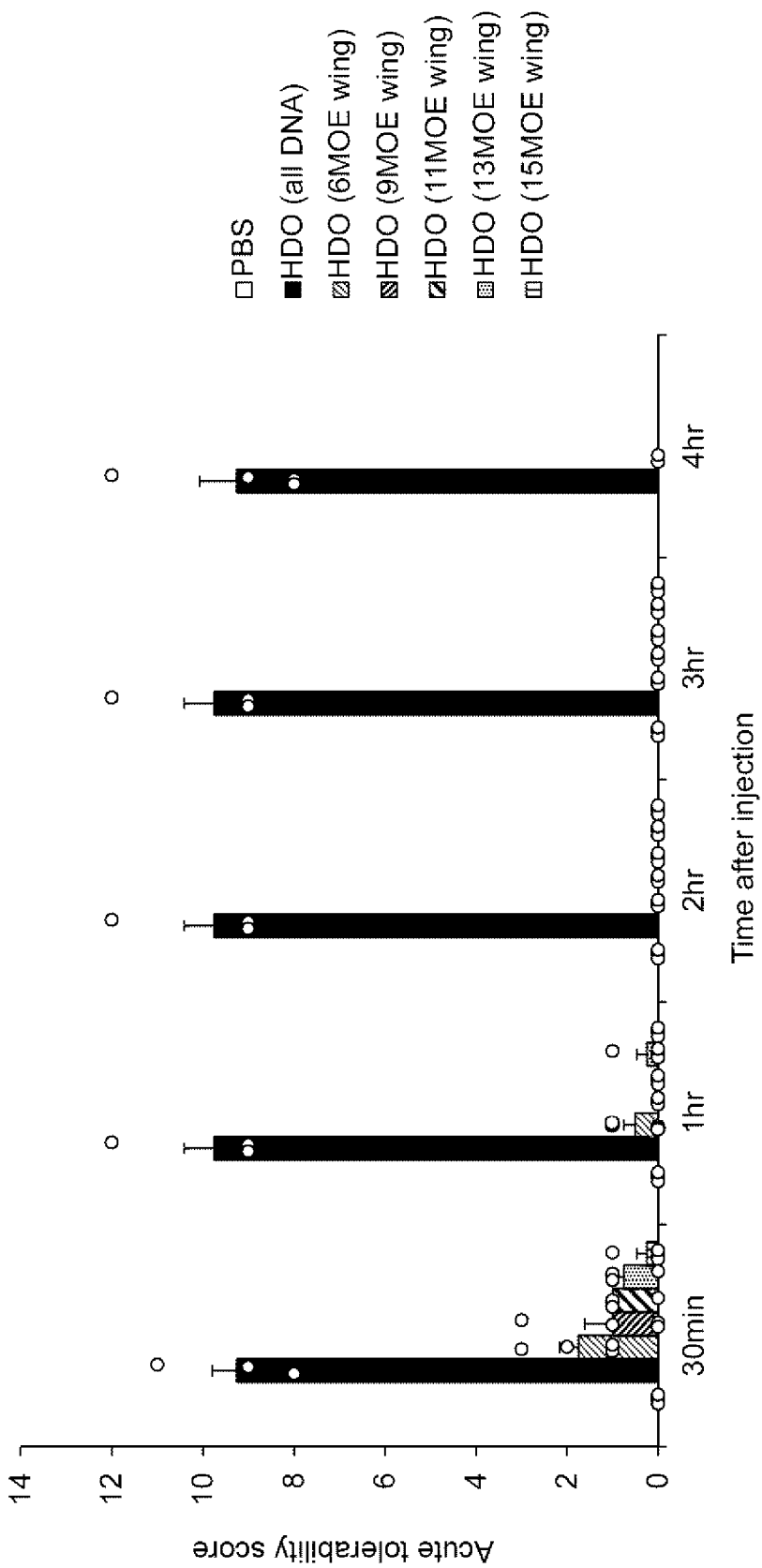
[図28]



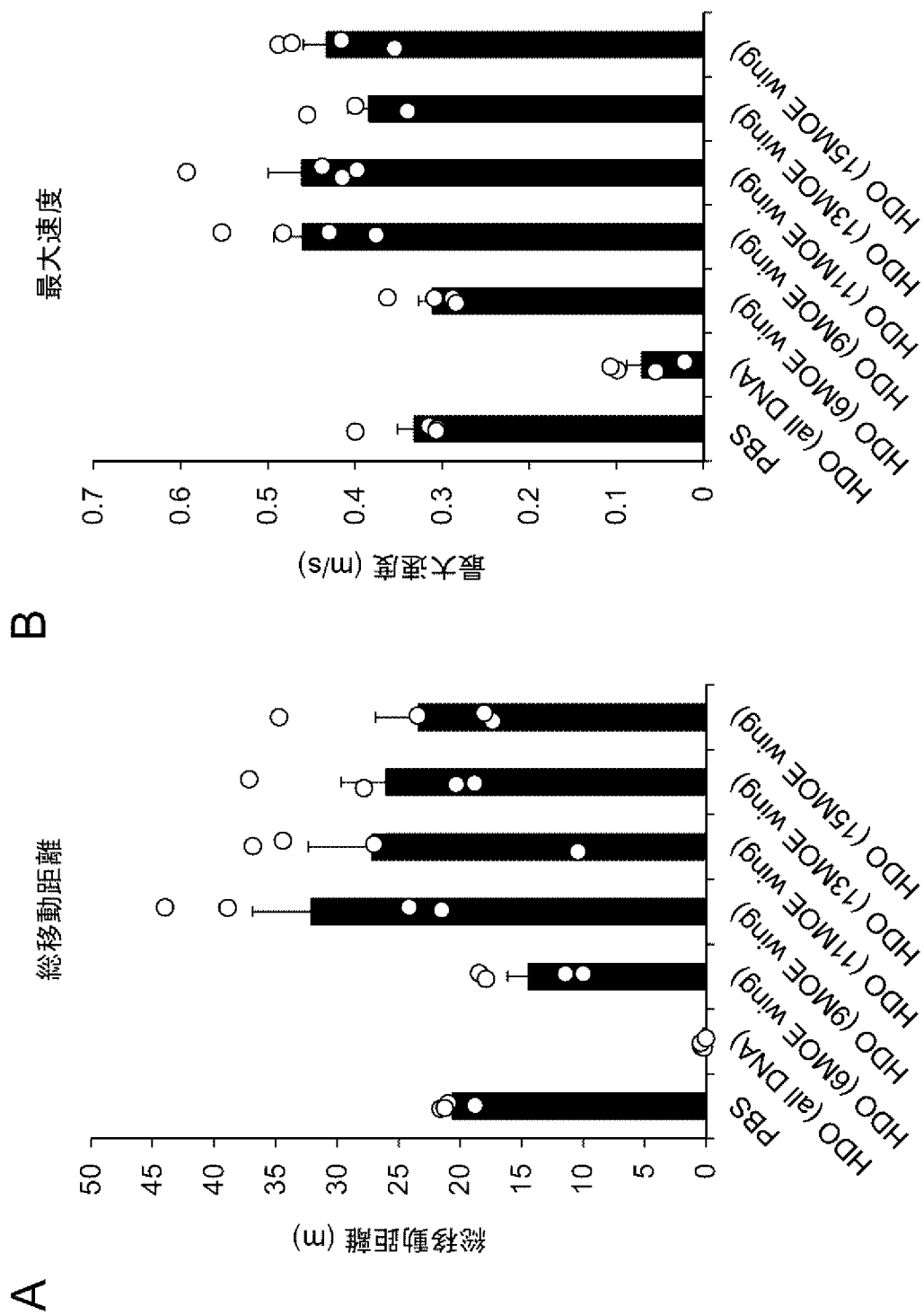
 = DNA     
  = LNA     
  = 2'-O-MOE-RNA

 = ホスホジエステル結合     
  = ホスホロチオエート結合

[29]

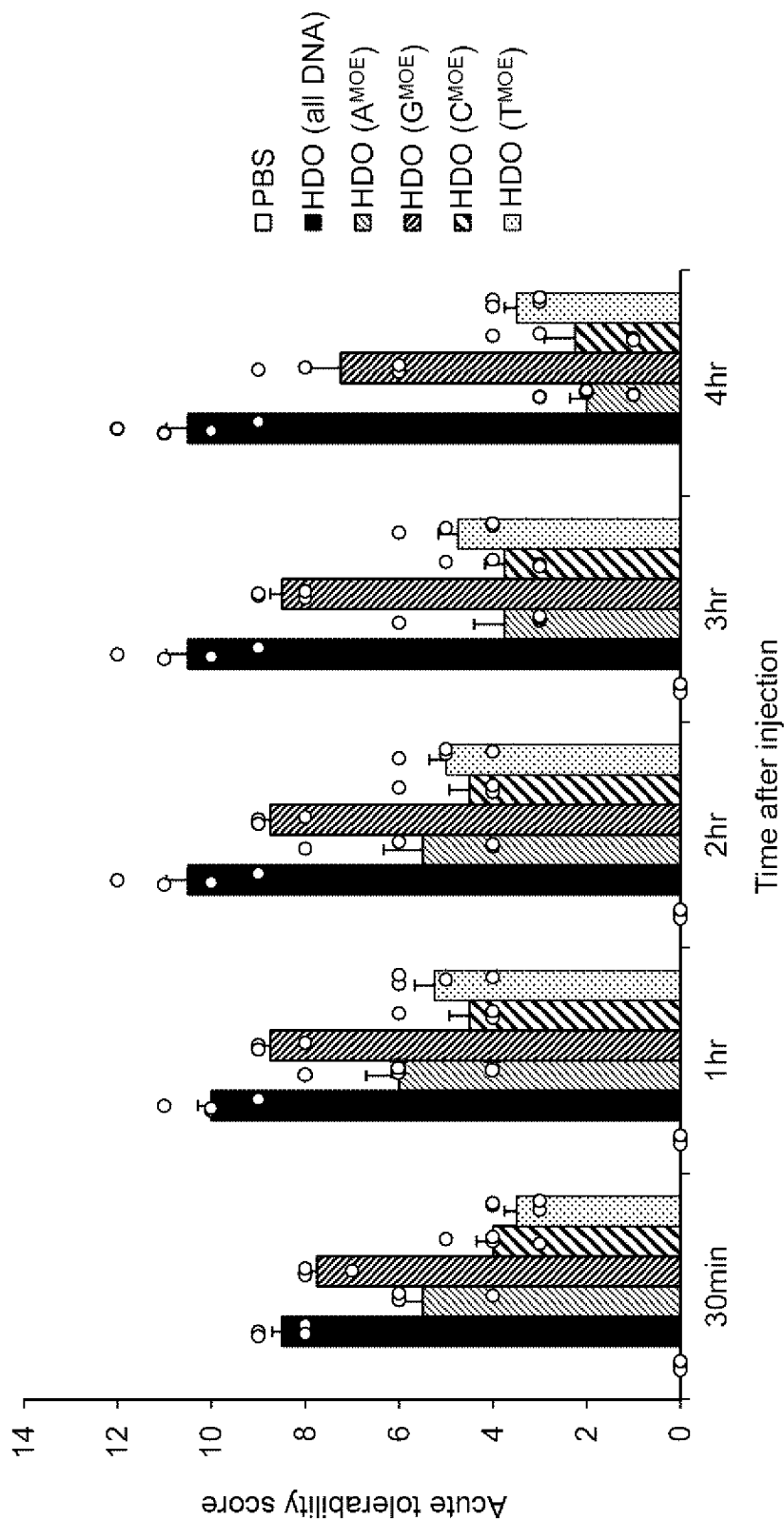


[図30]

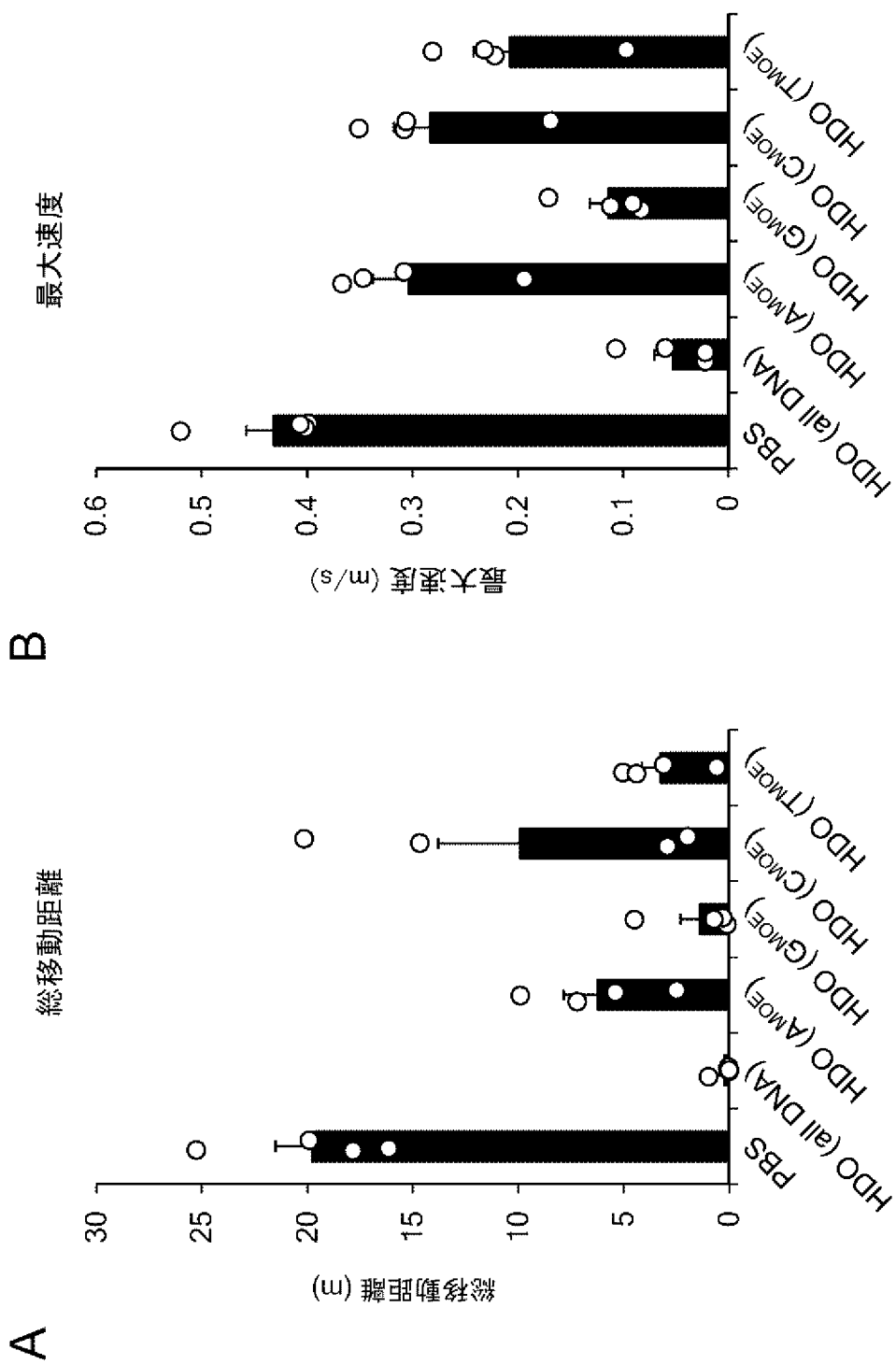




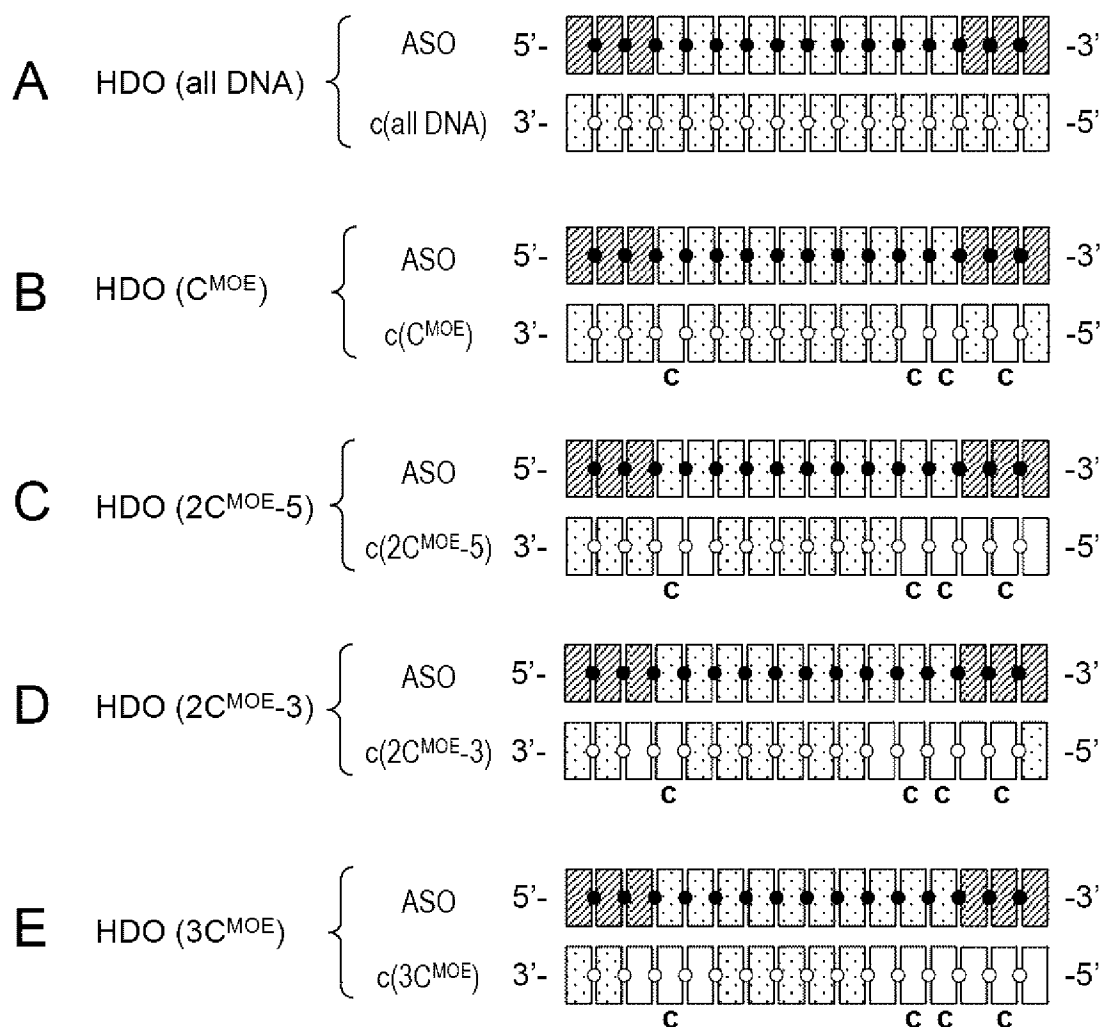
[32]






[図33]



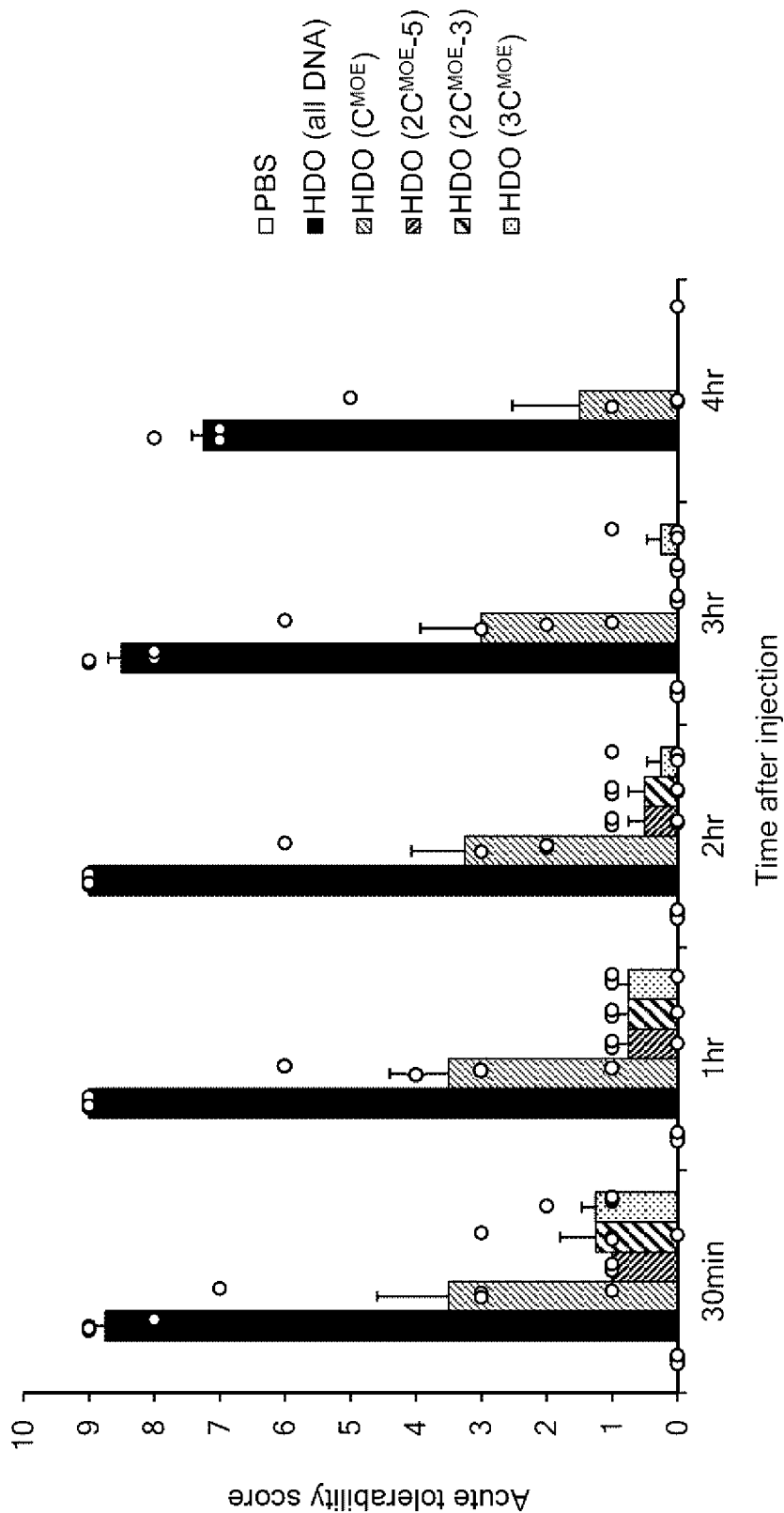
[図34]



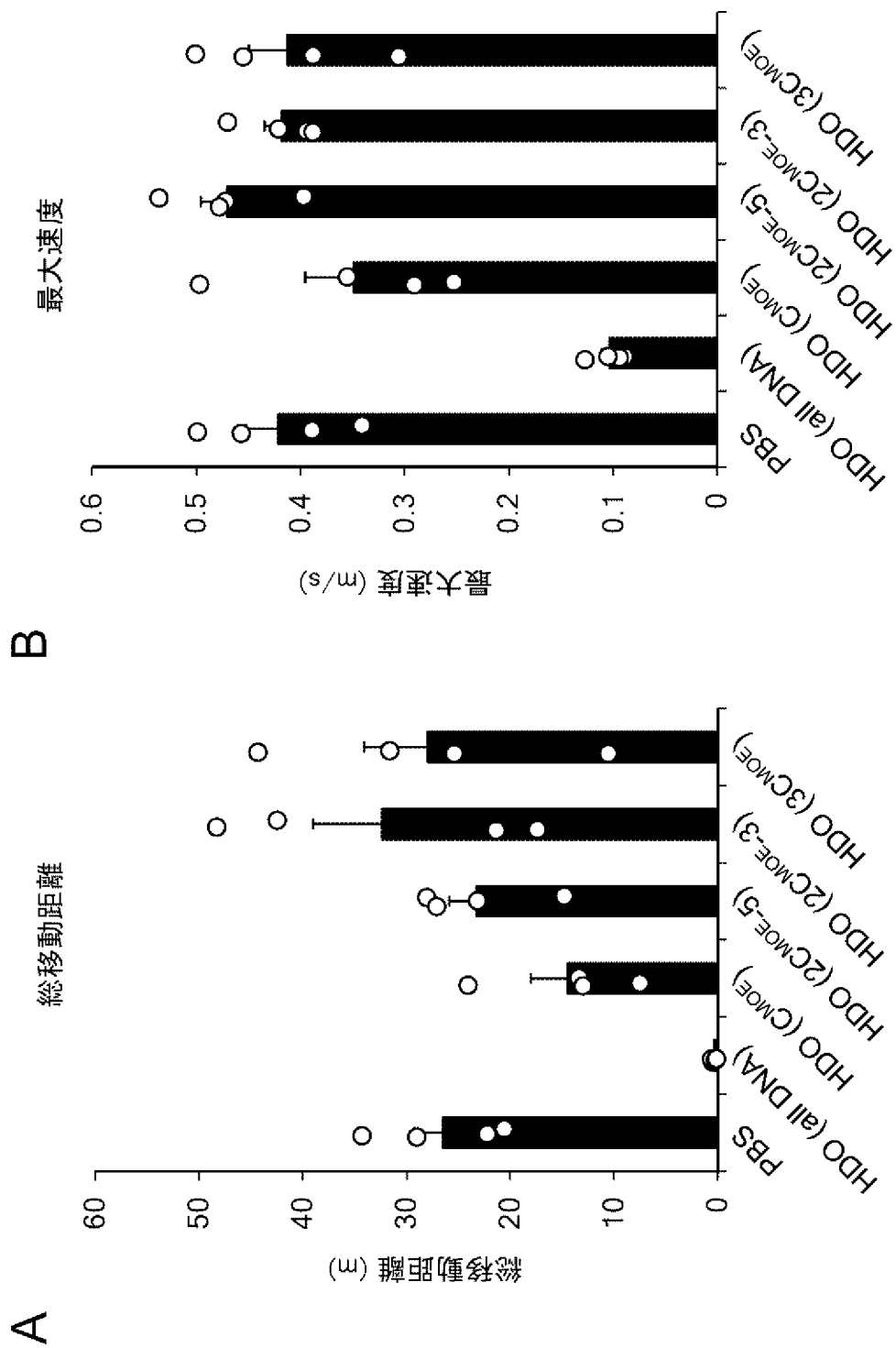
 = DNA       = LNA       = 2'-O-MOE-RNA

 = ホスホジエステル結合       = ホスホロチオエート結合

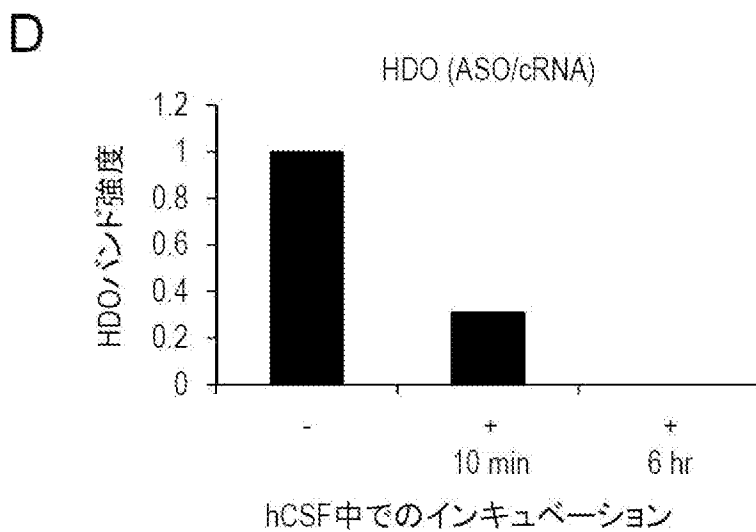
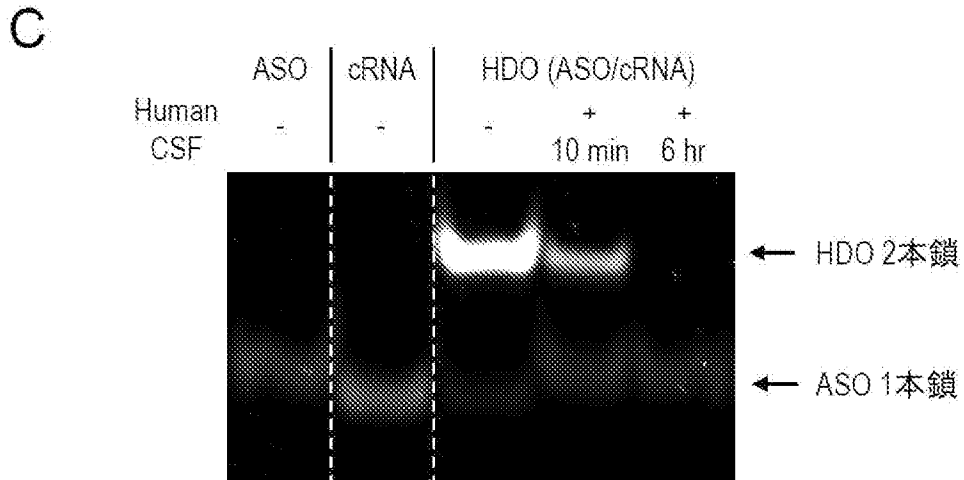
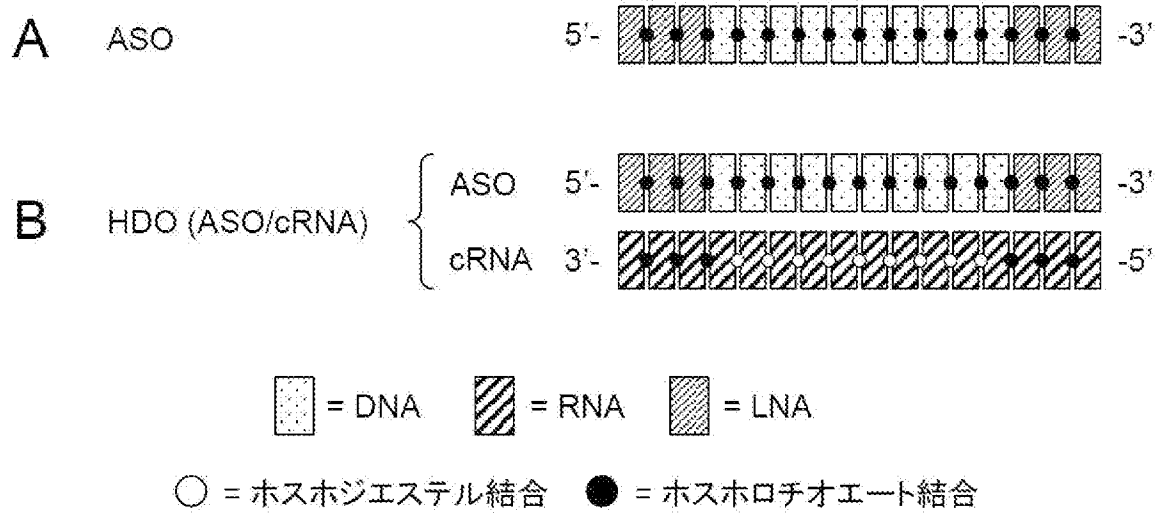
[35]



[図36]

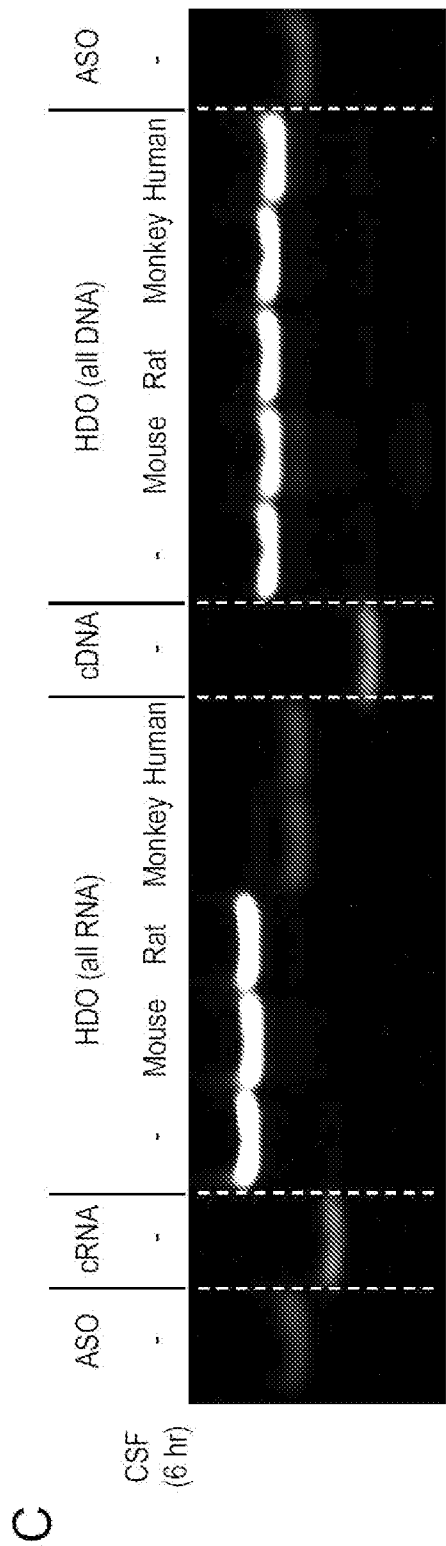
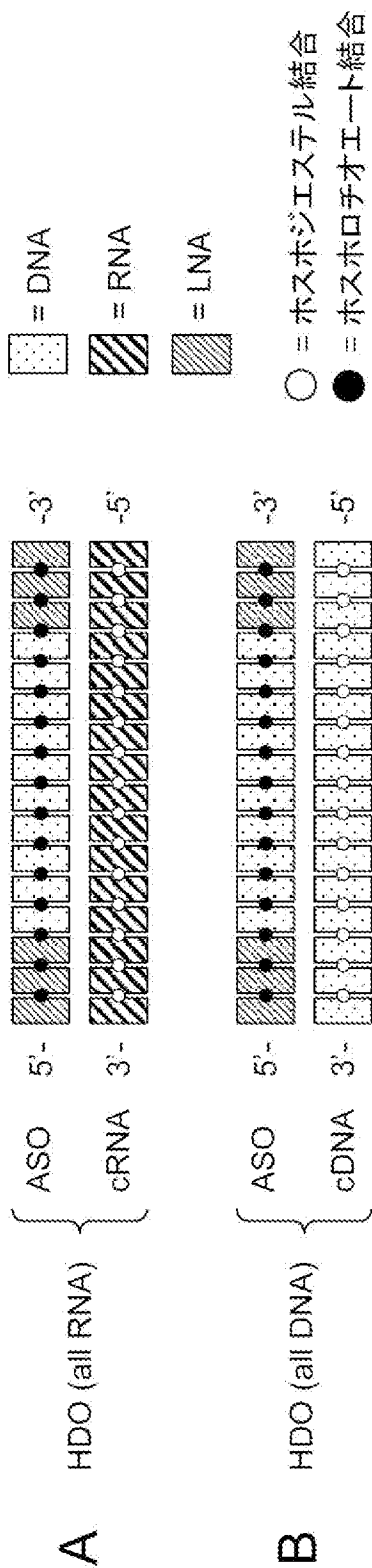


[図37]

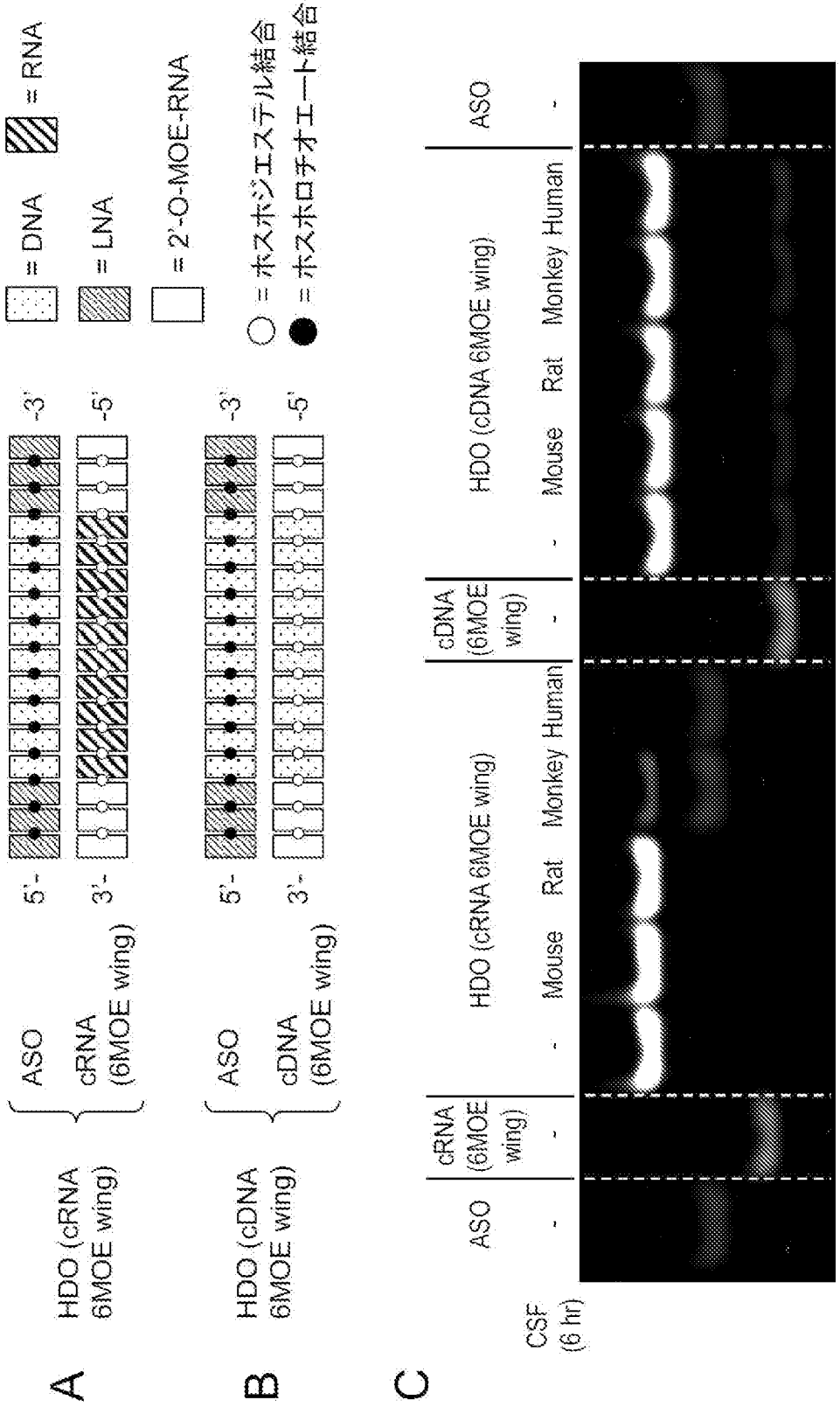




[図39]

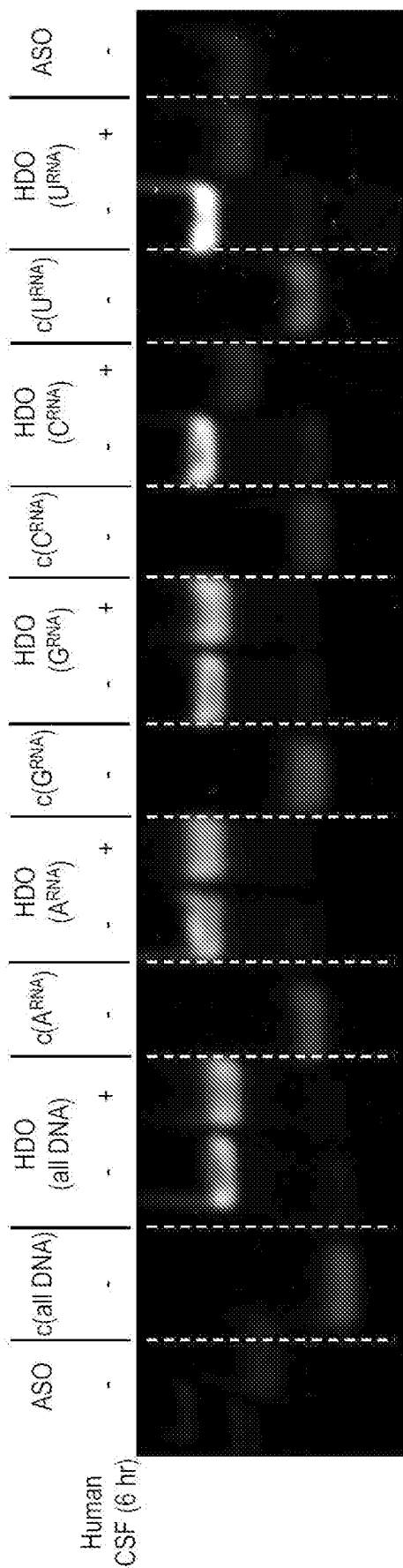


[図40]



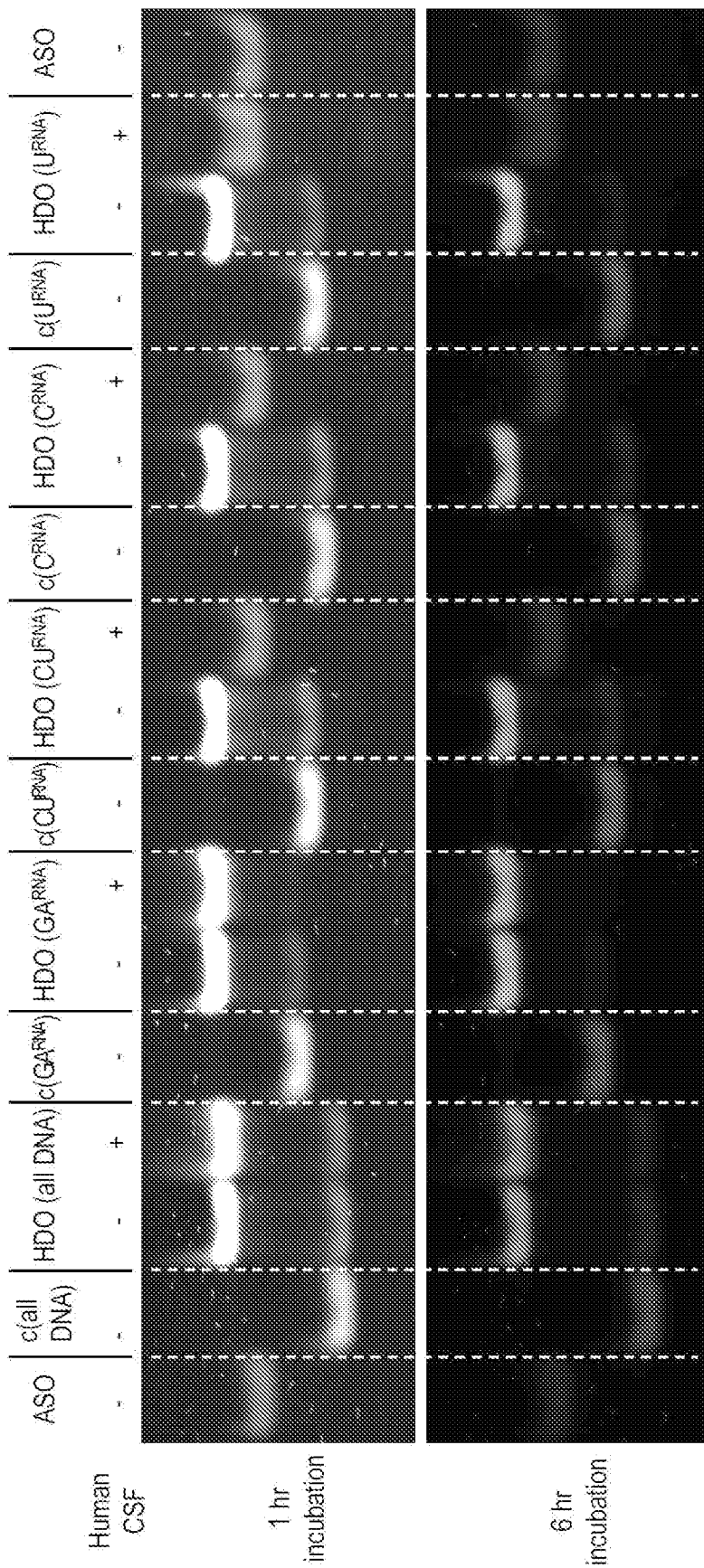


[42]



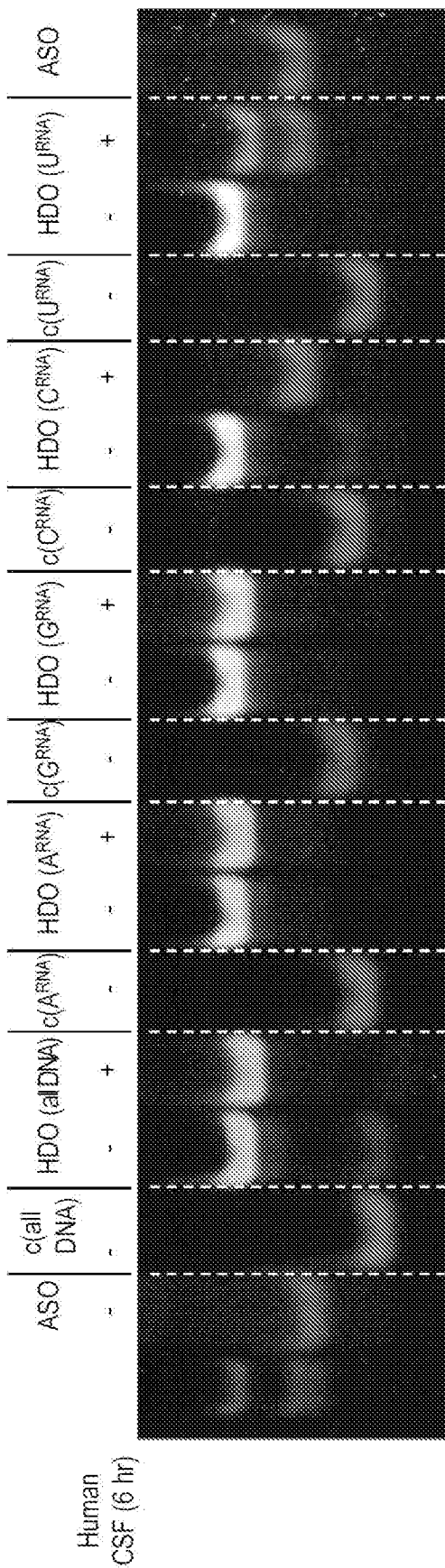


[44]



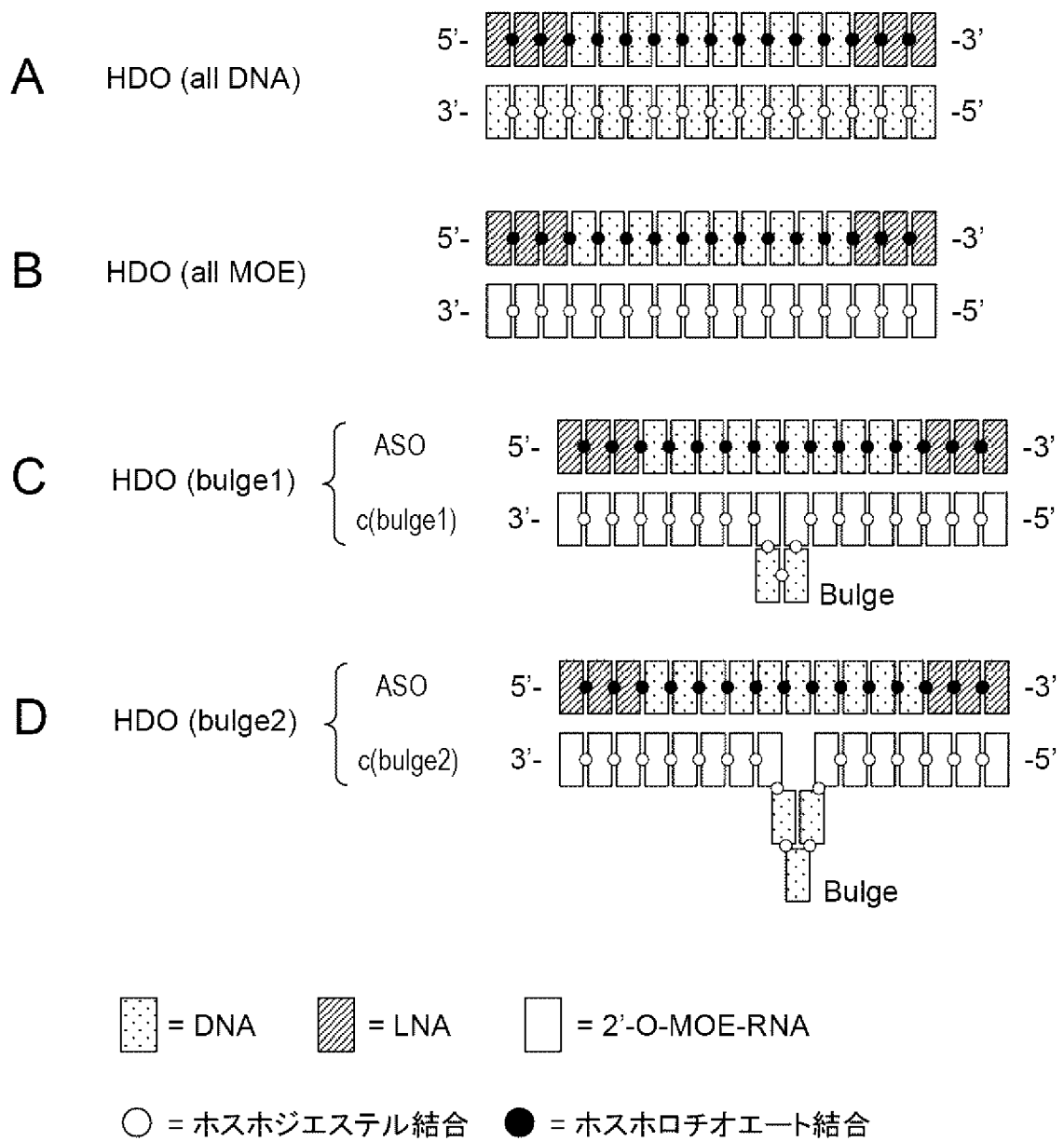


[46]



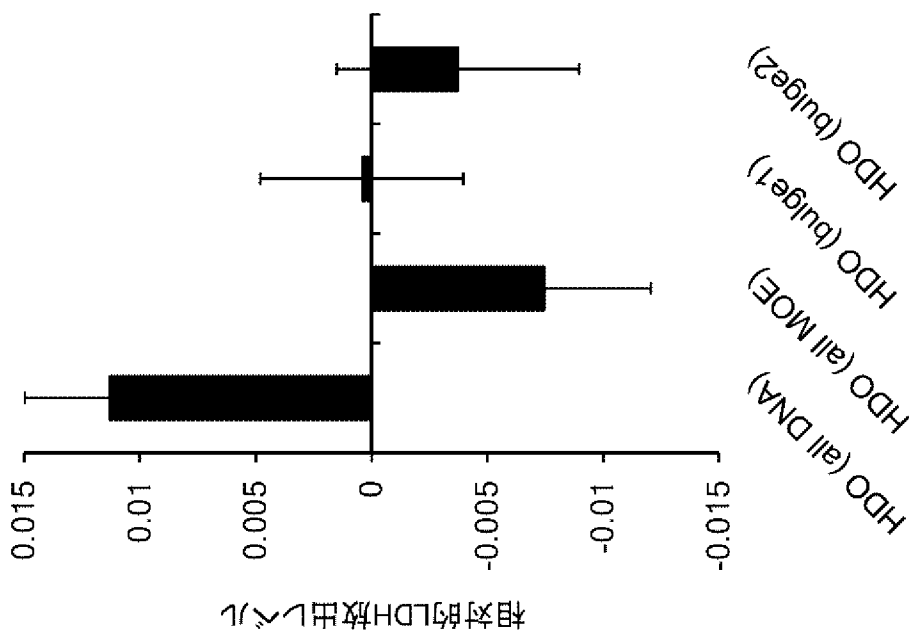


[図48]

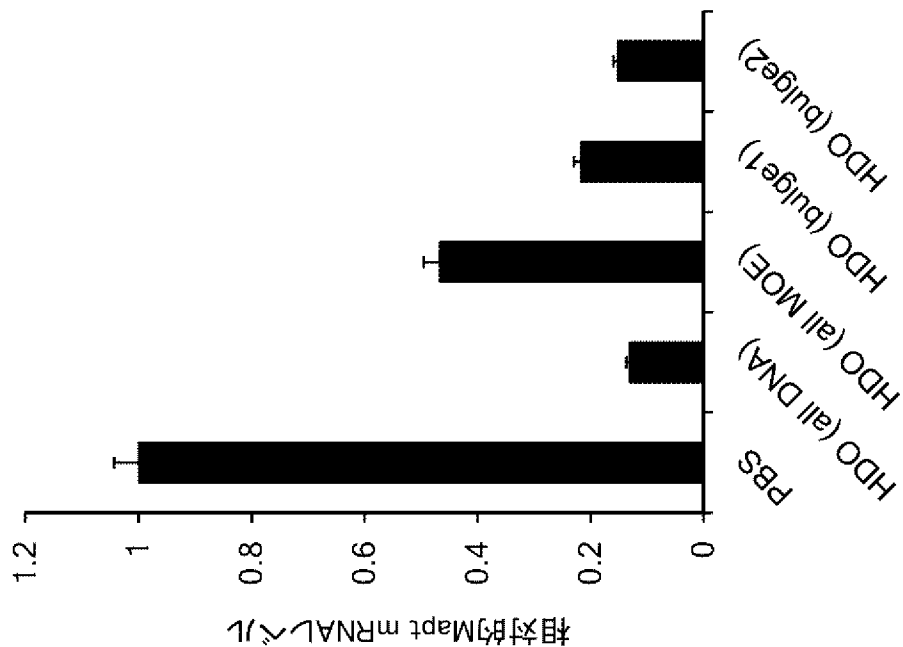


[図49]

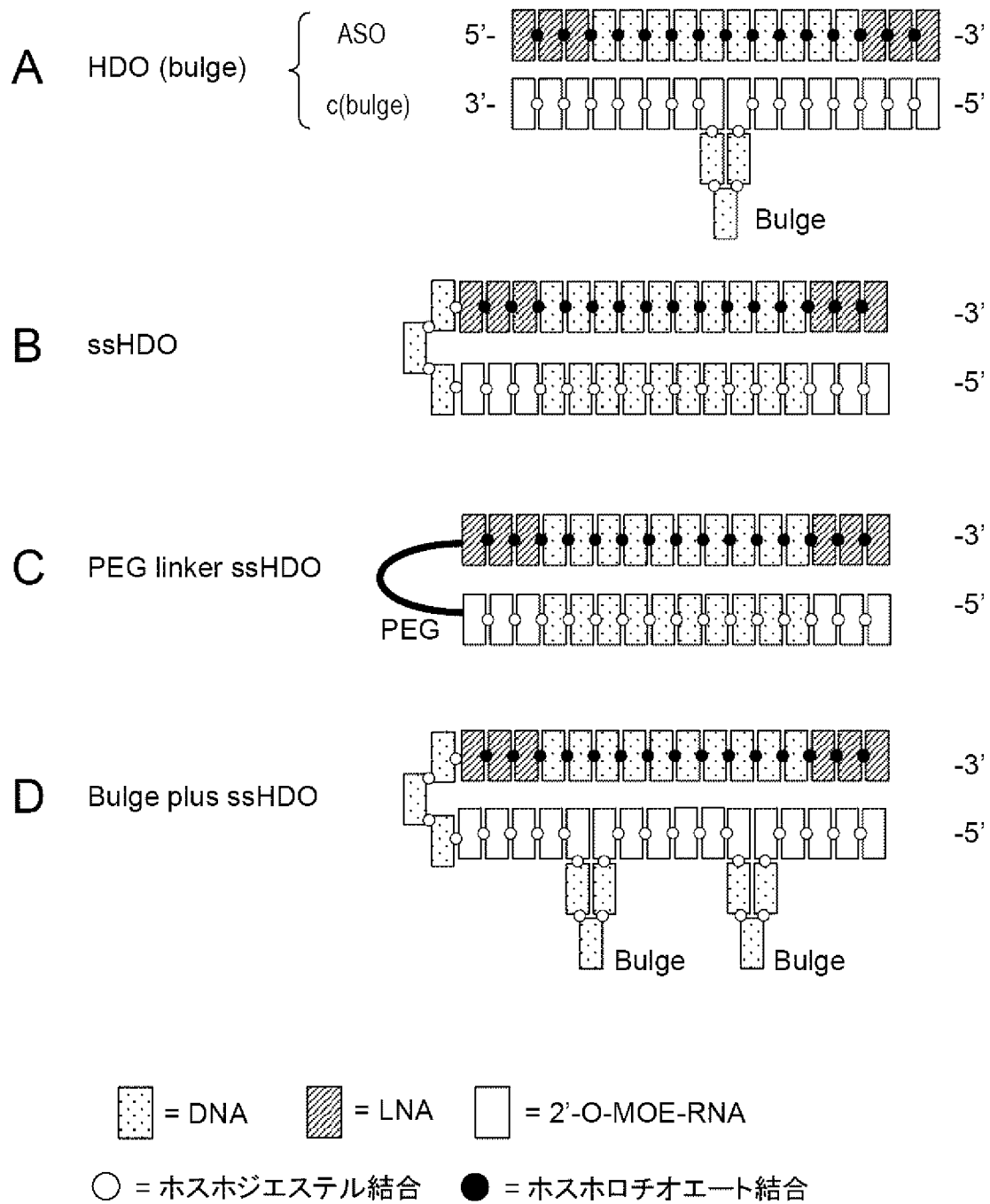
B



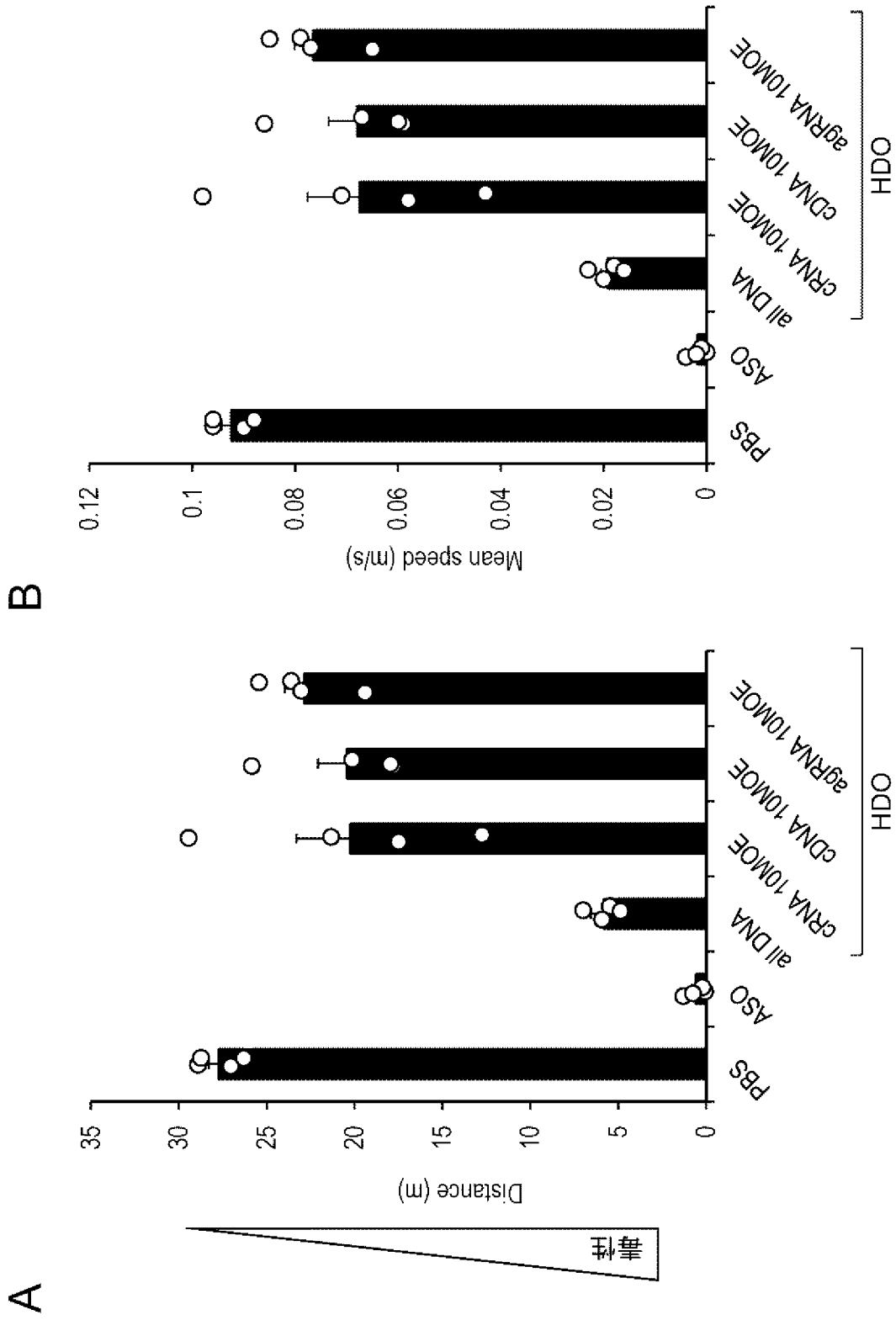
A



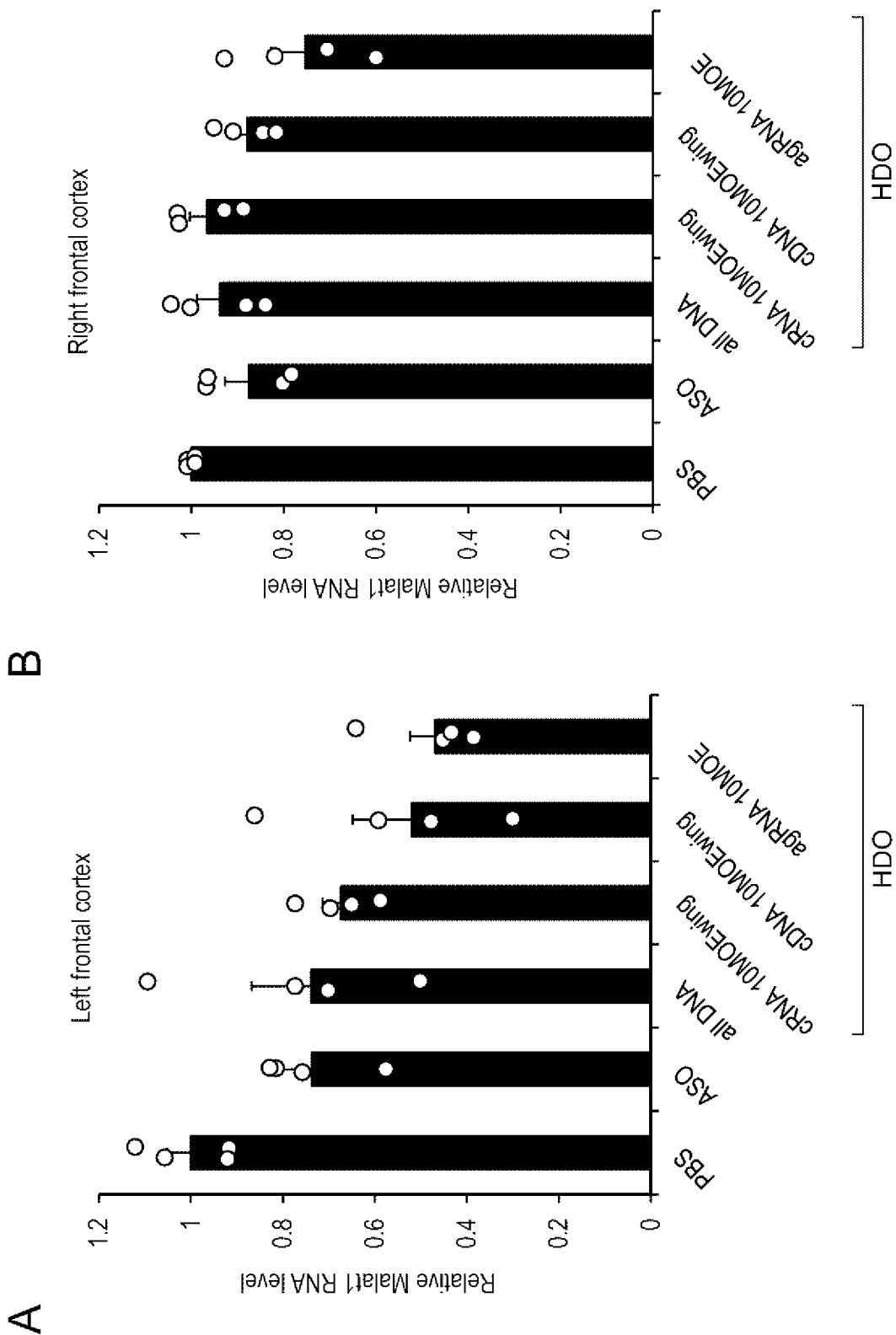
[図50]



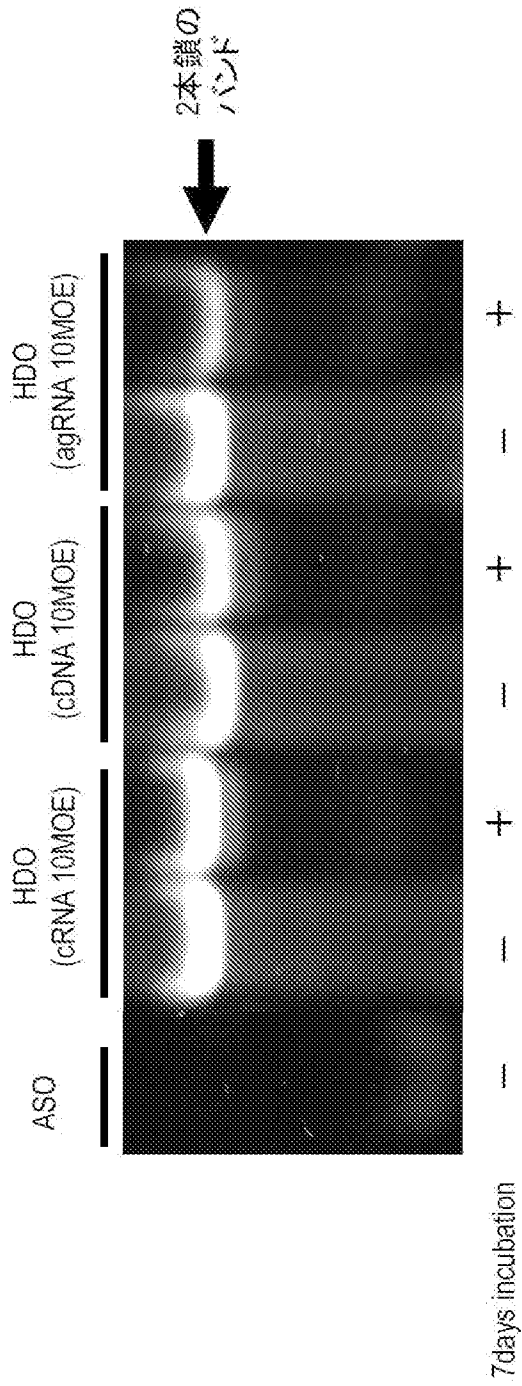
[図51]



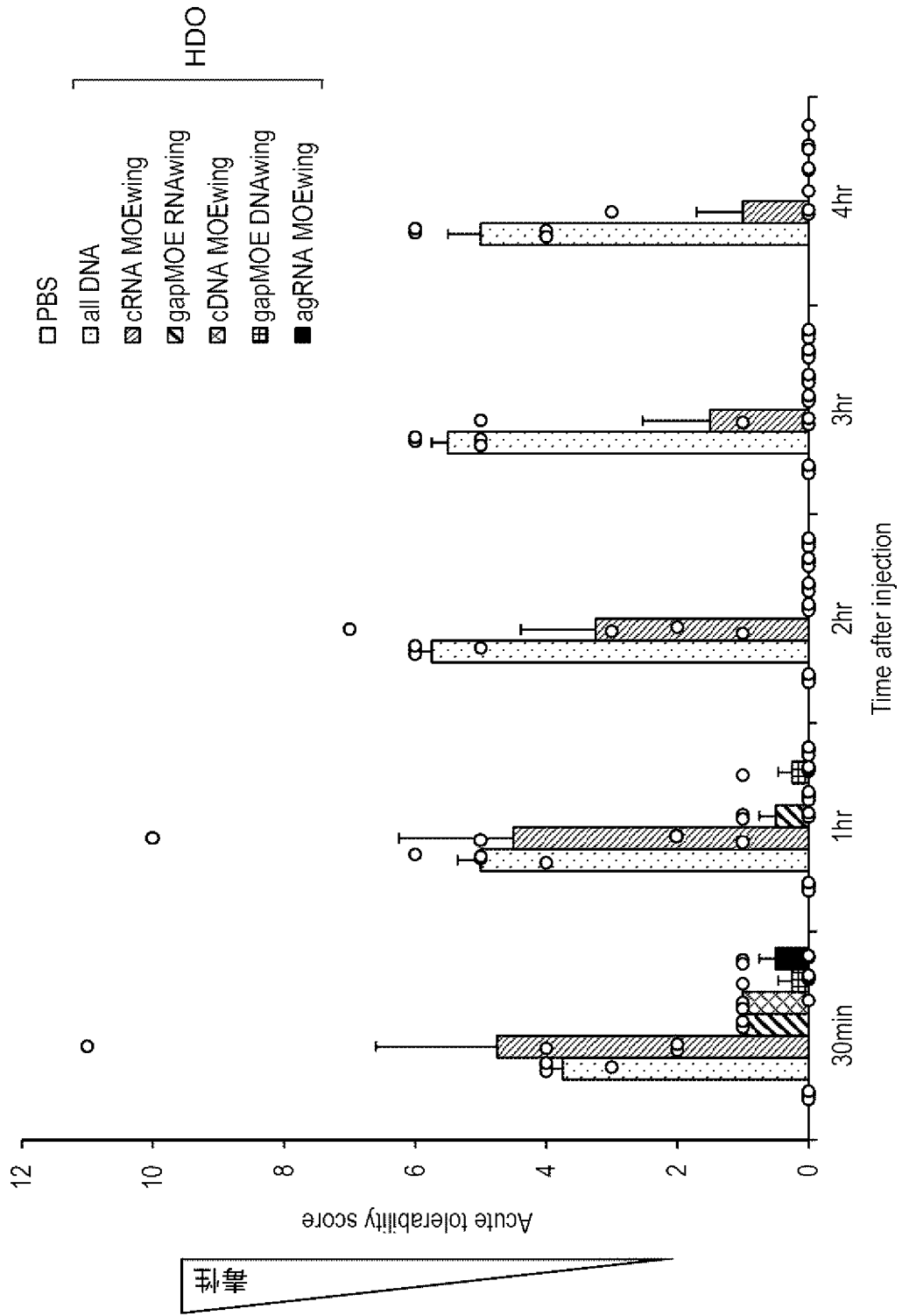
[52]



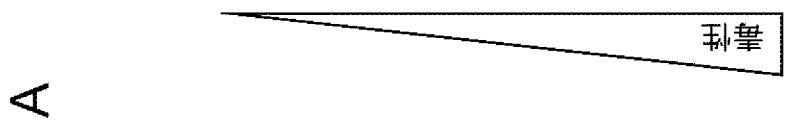
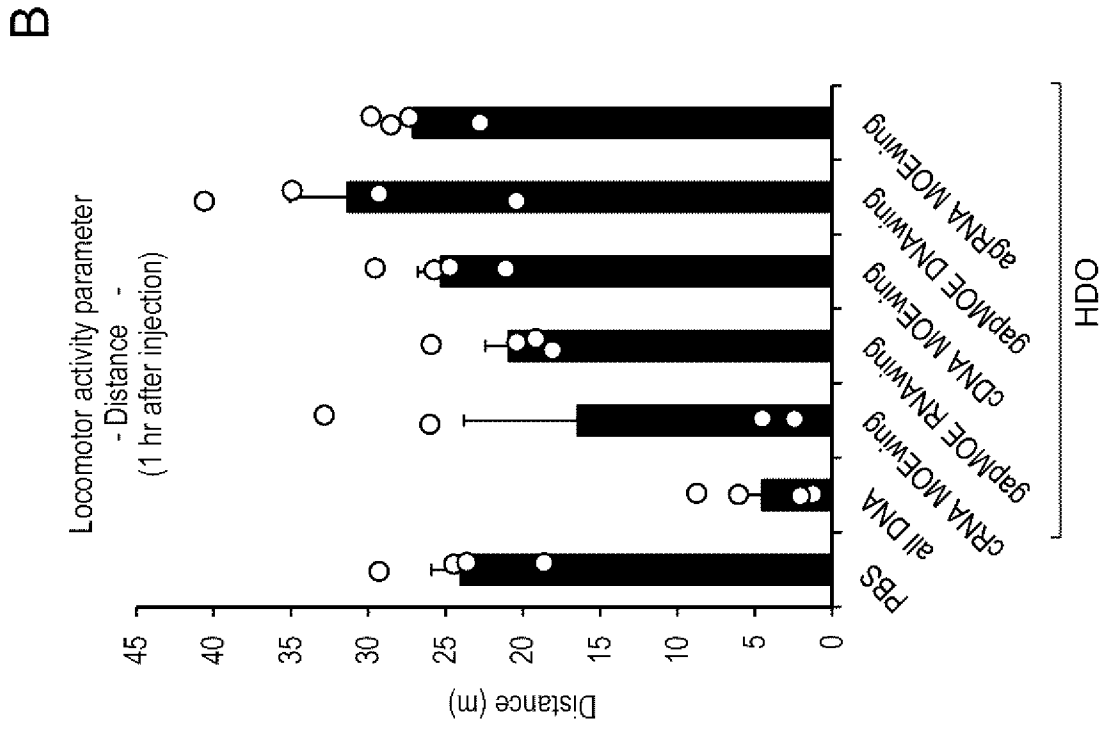
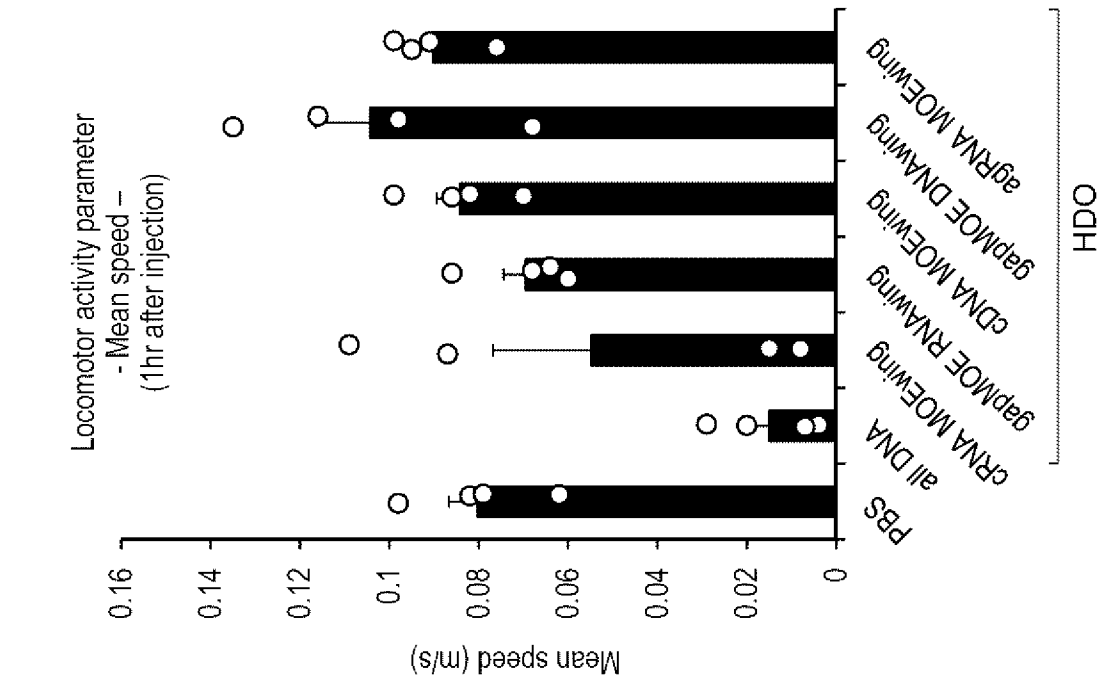
[図53]



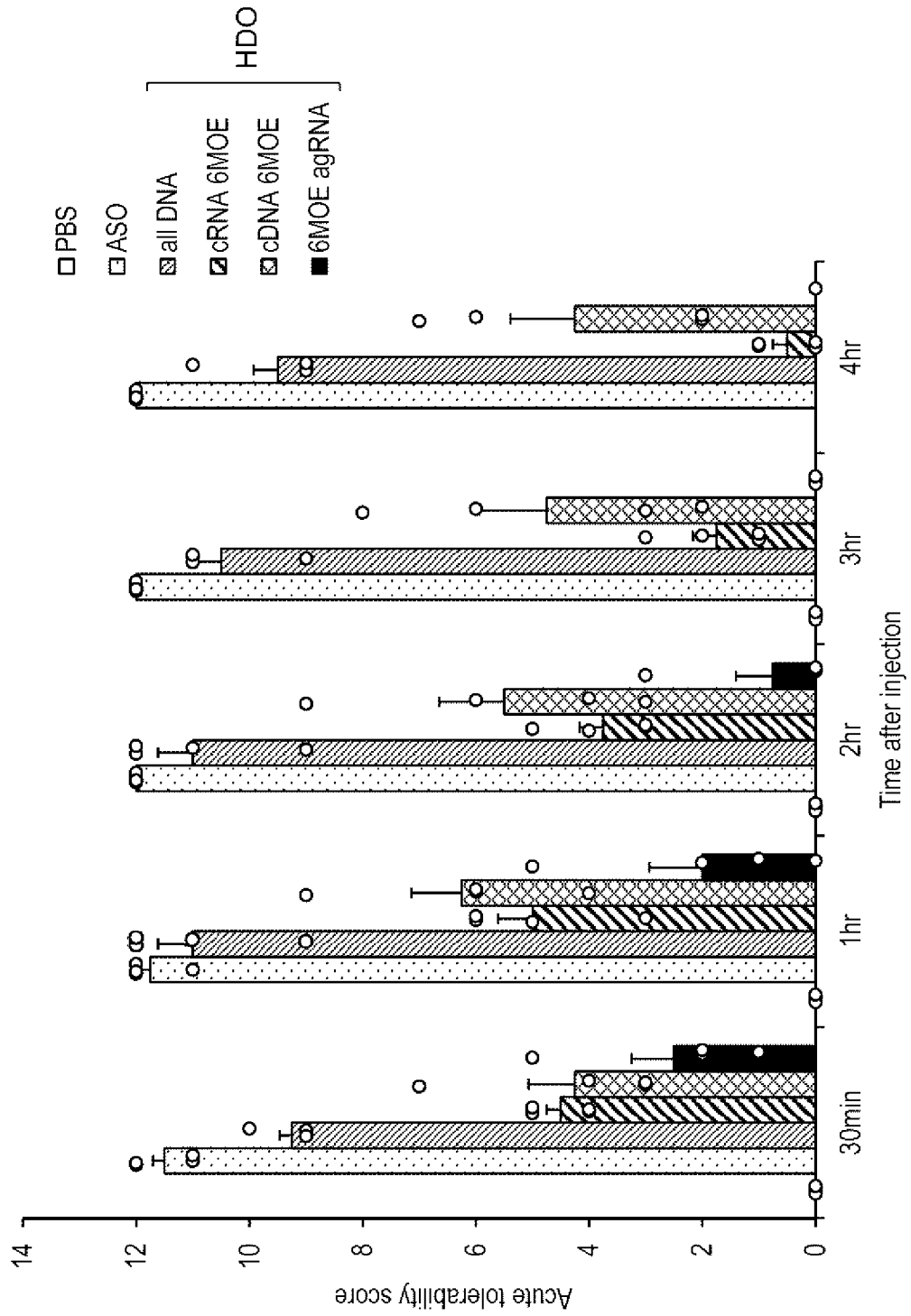
[図54]



[55]



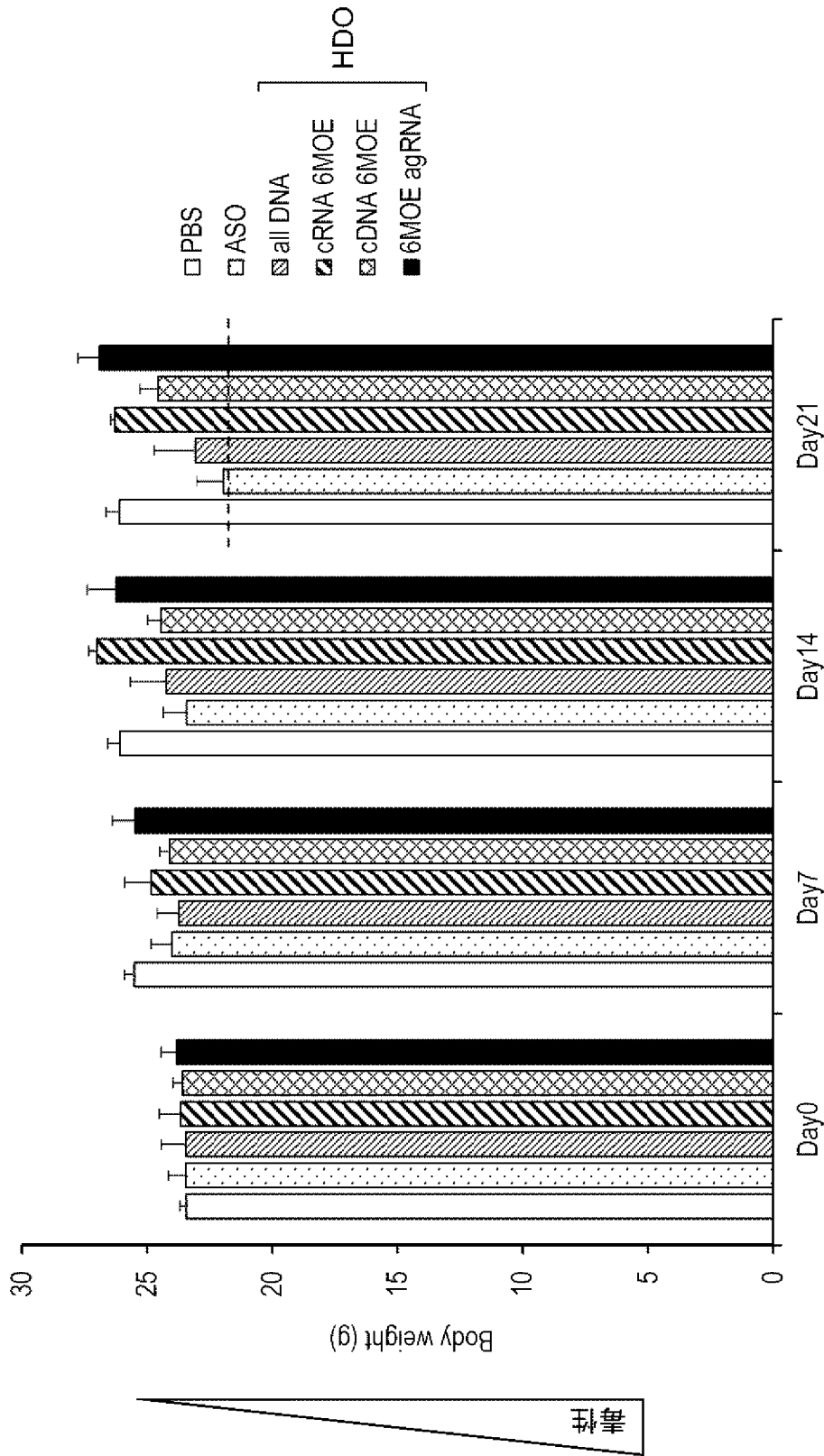
[図56]



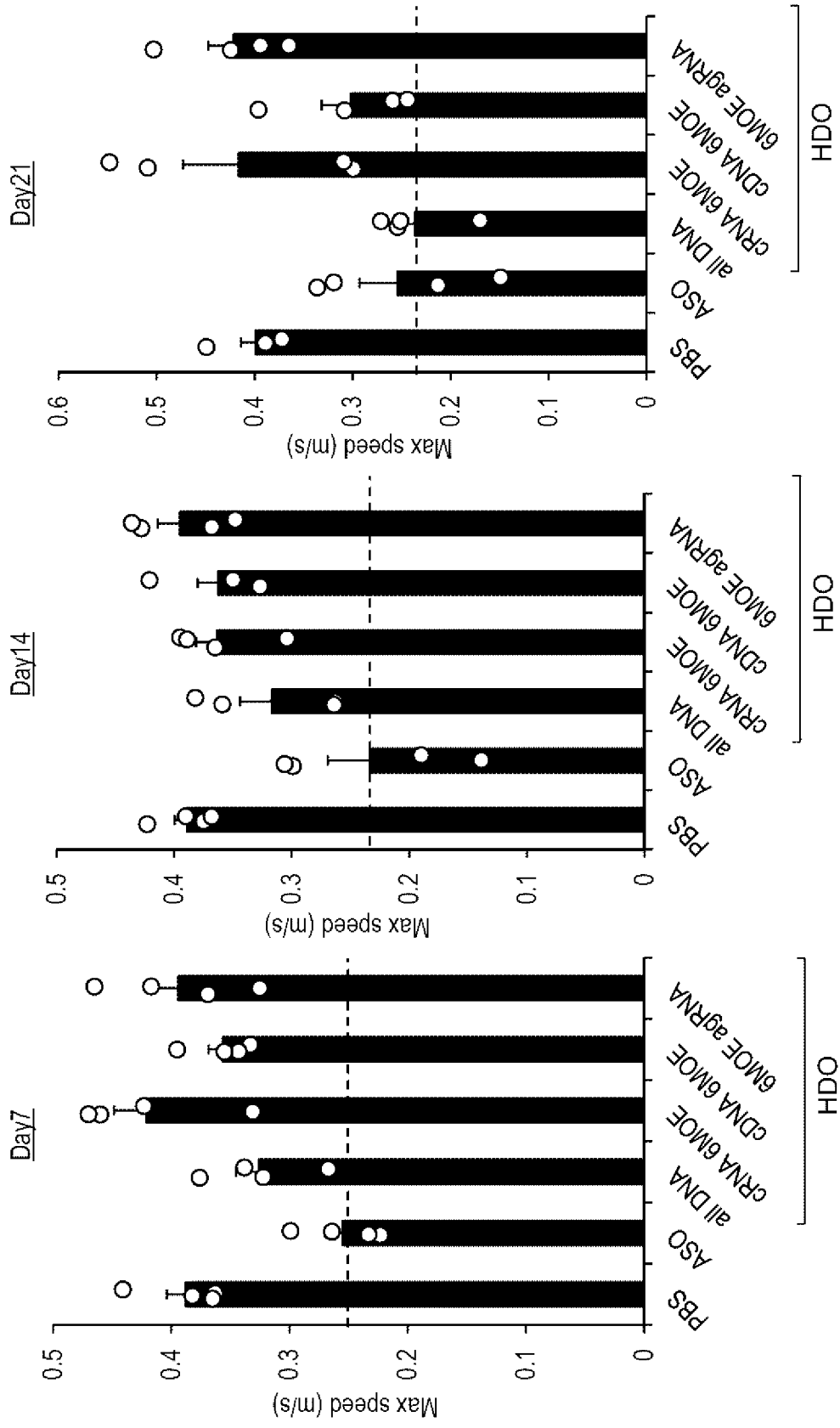
毒性



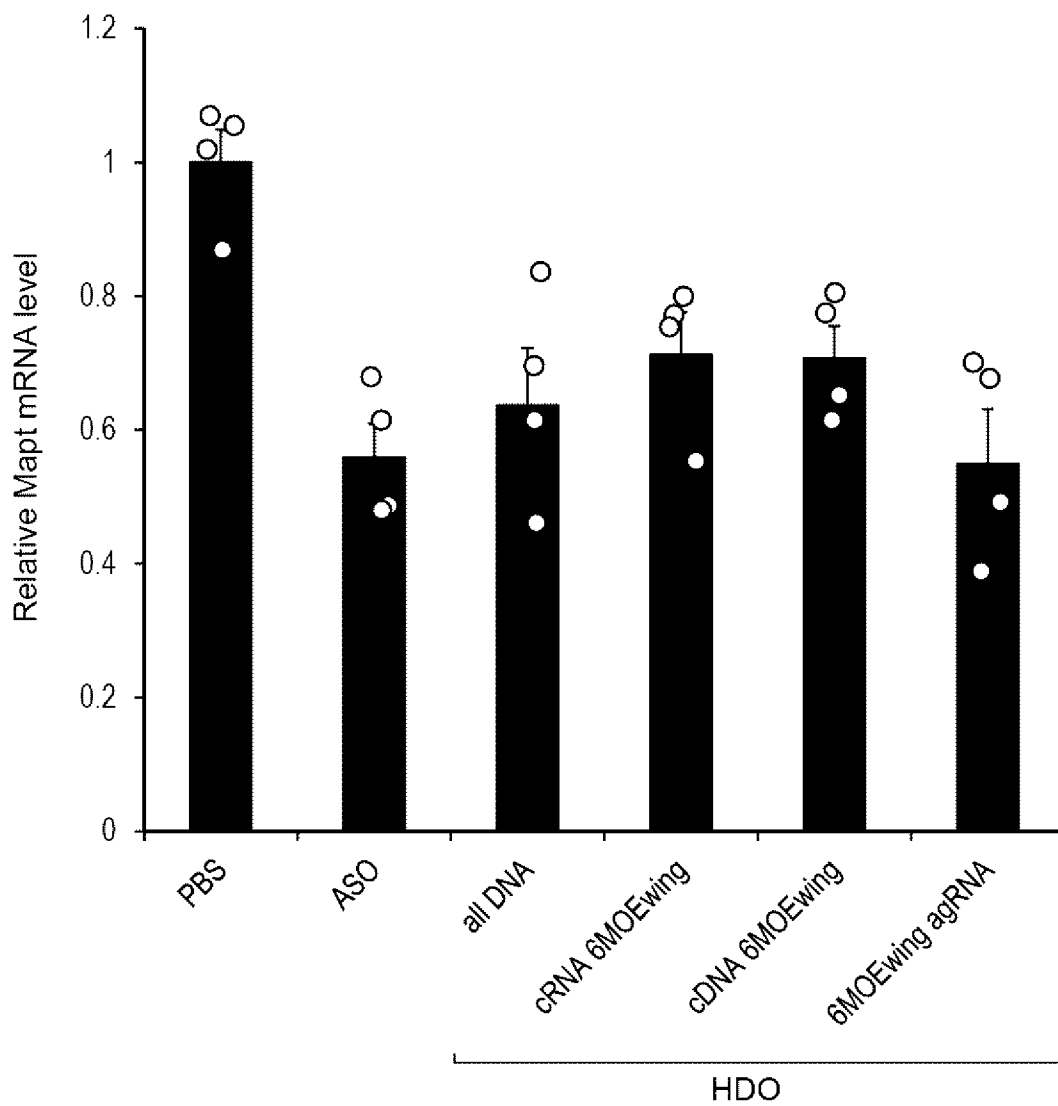
[図58]



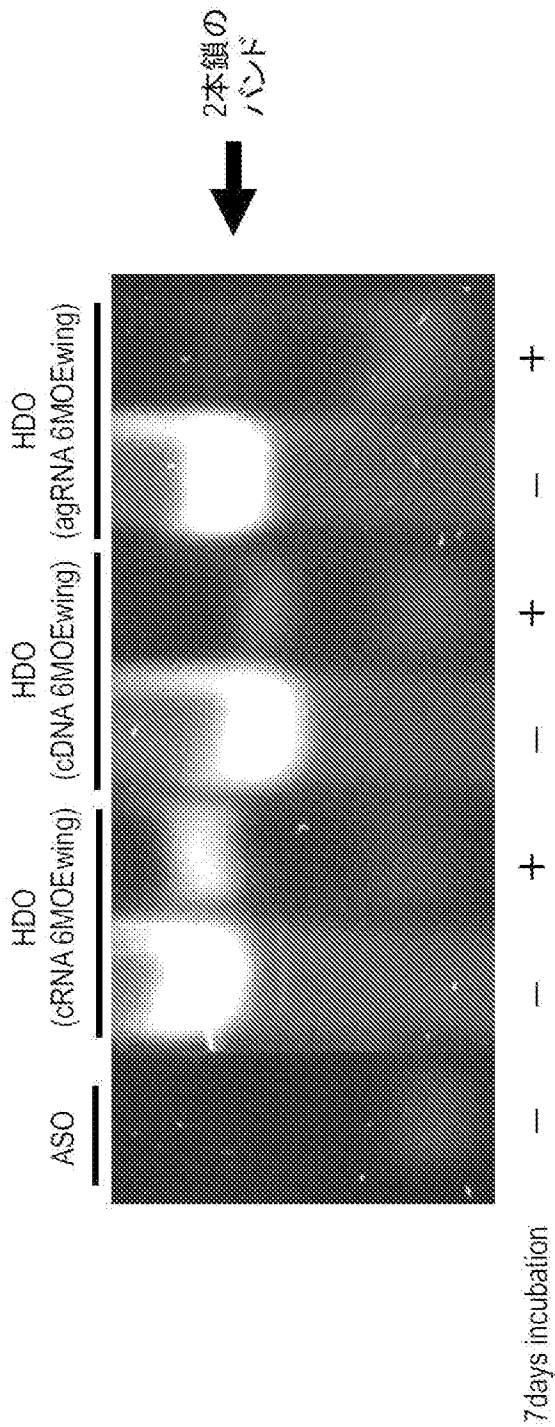
[59]



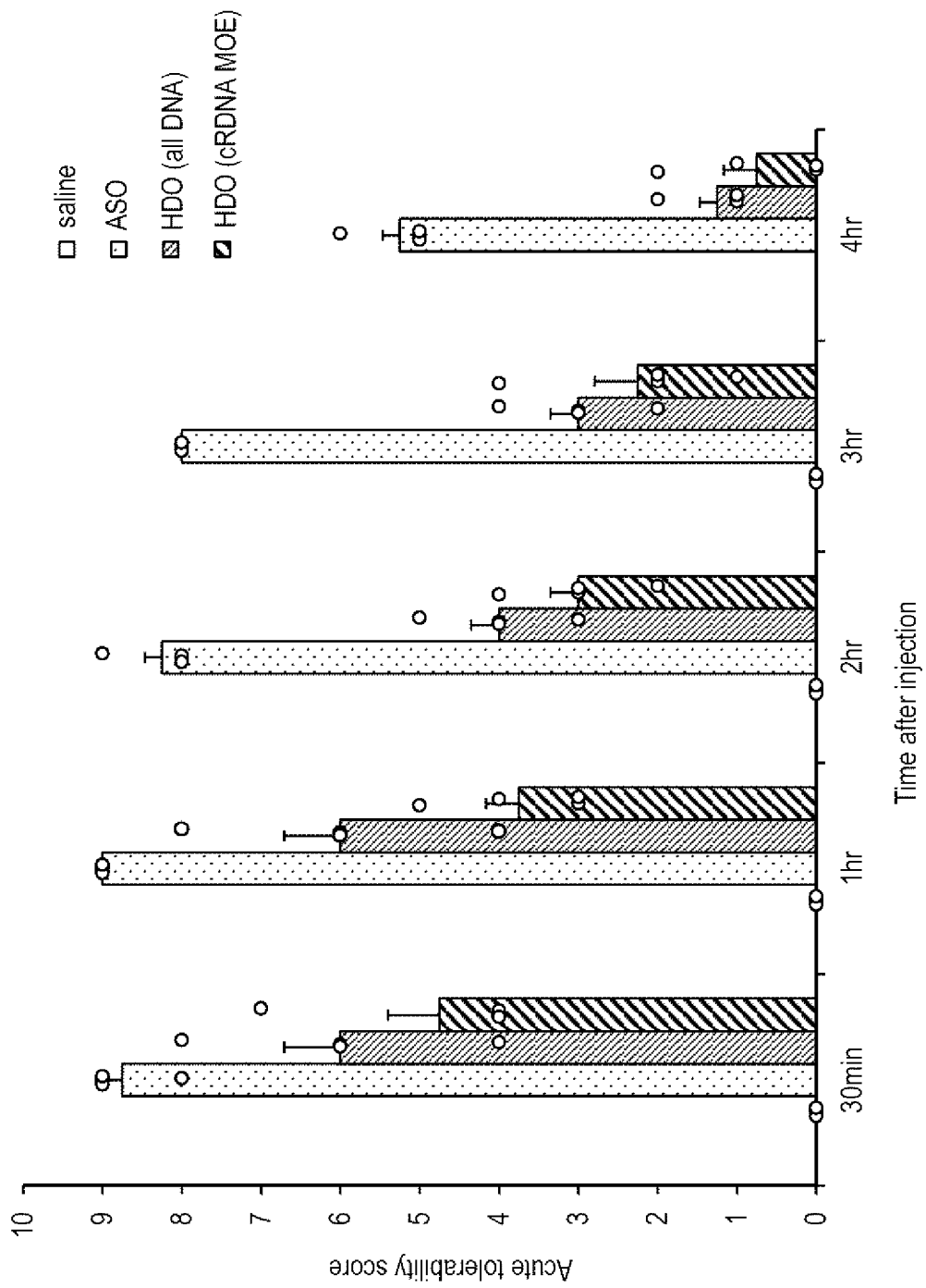
[Fig. 60]



[図61]

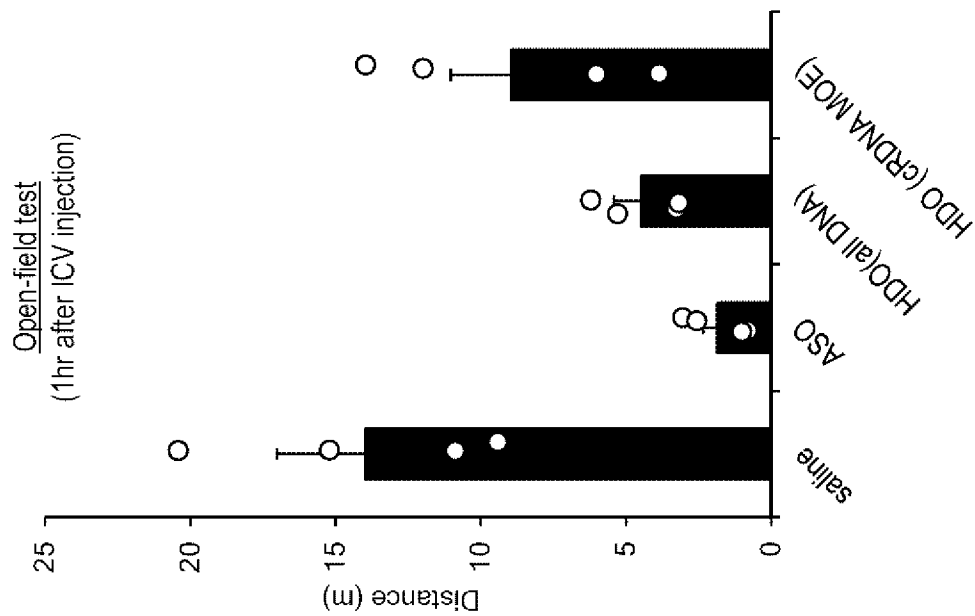


[Fig. 62]

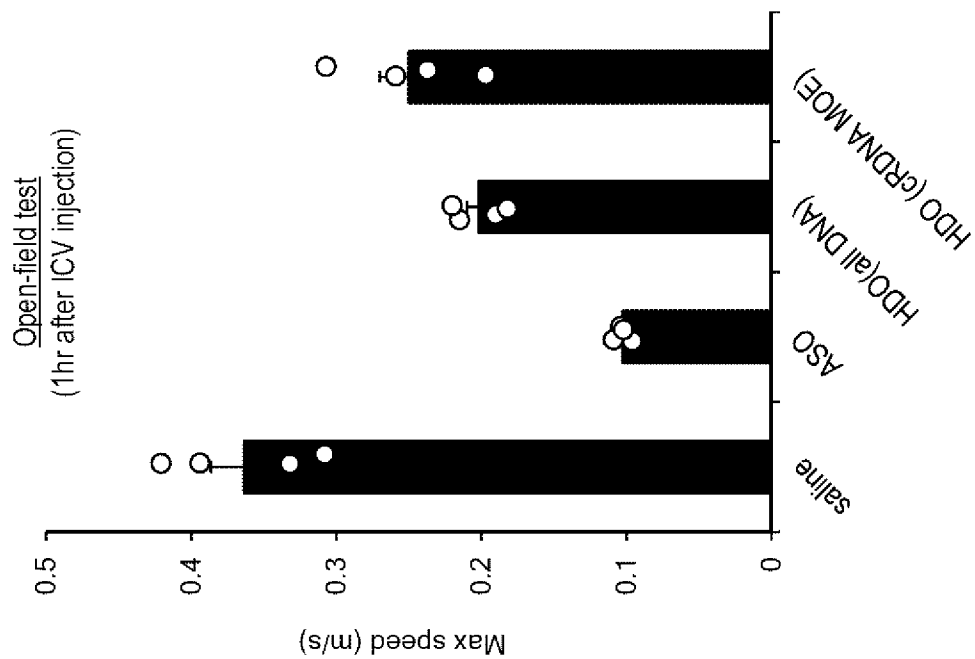


[図63]

A

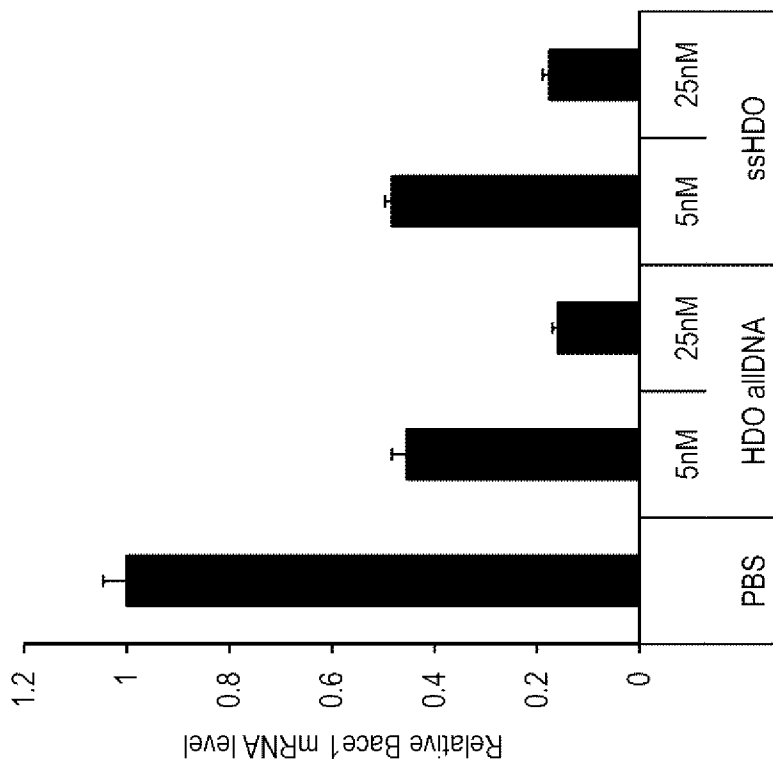


B

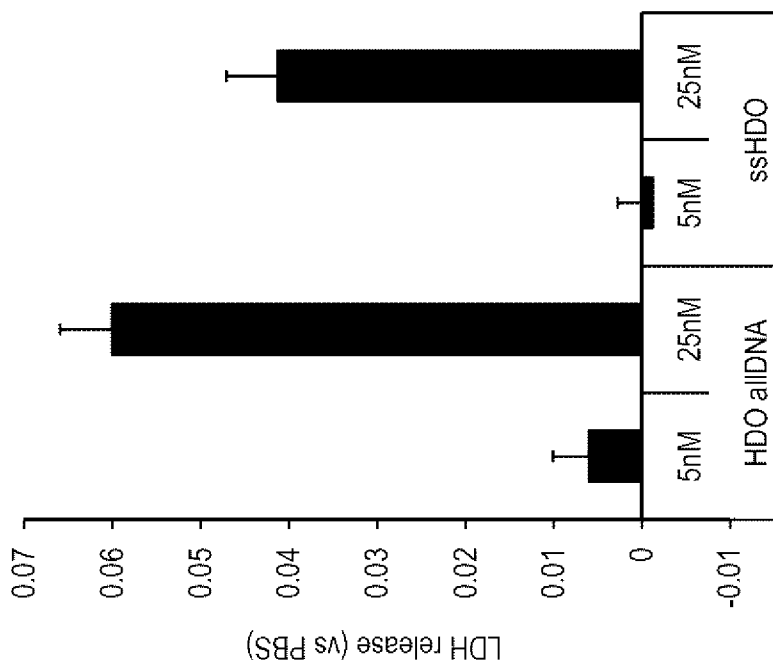


[図64]

B



A



毒性

[ 65]

**○ Mental state**

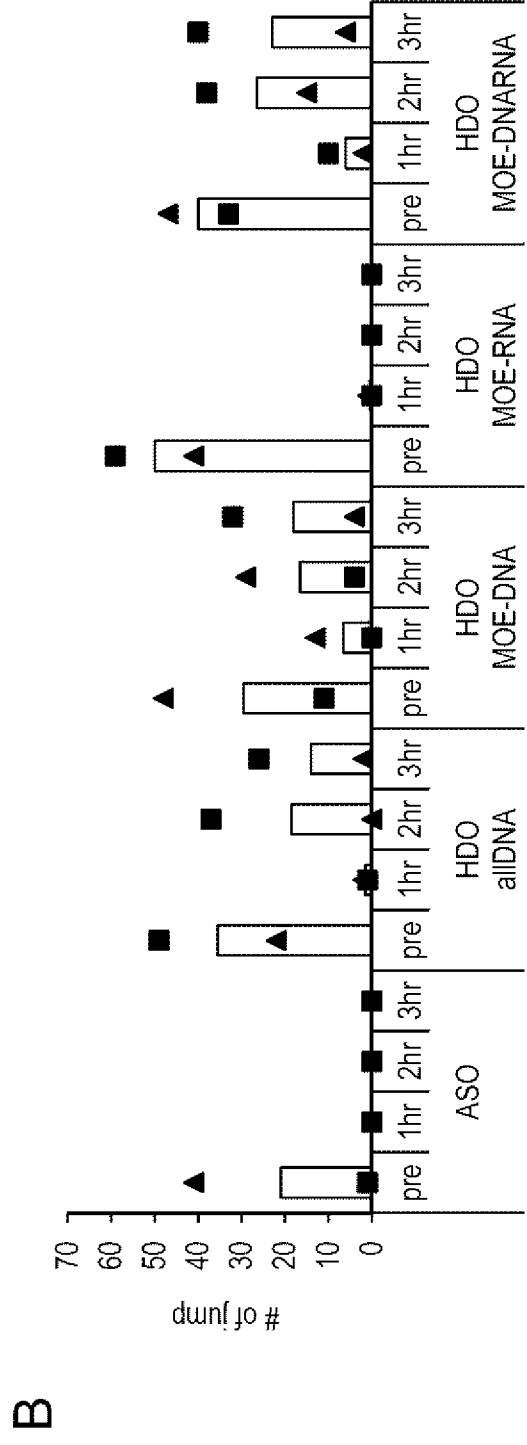
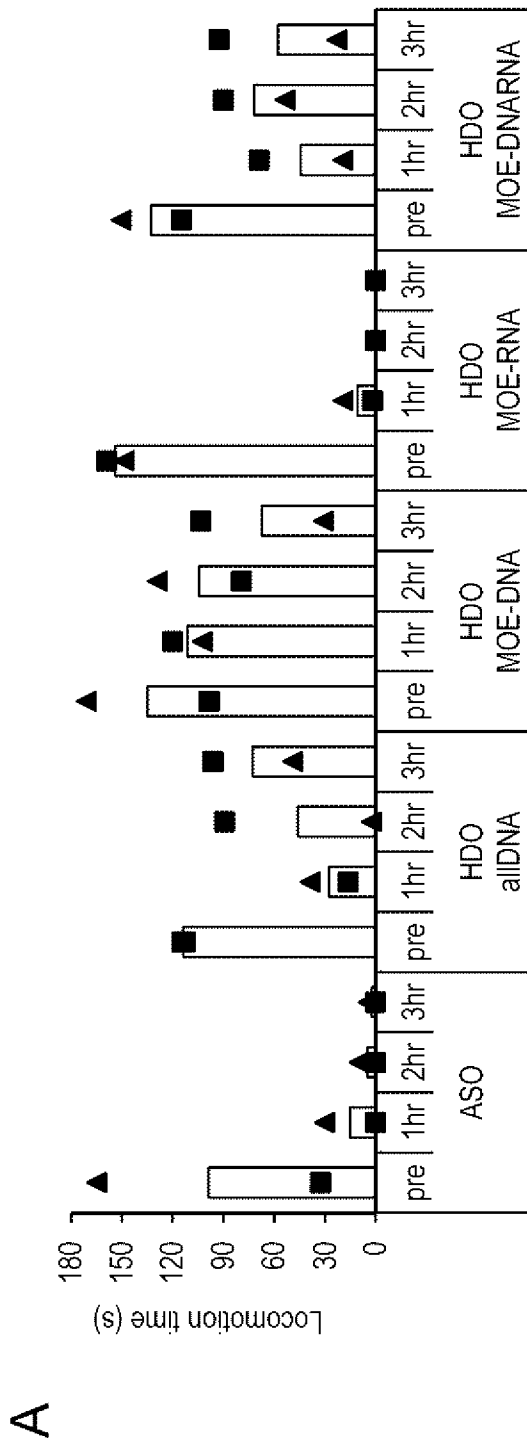
- a) Arousal:
  - +2: Frenetic, agitated, hyperkinetic behaviors; animal does not sit or stand for greater than a few seconds; almost constantly moving around cage.
  - +1: High arousal state (shows stereotypic behaviors, agitation, hyper-responsiveness to presence of observer; may be overly aggressive).
  - 0: Normal active (directs attention to the presence of the observer, moves energetically around cage, shows aggressive behavior, e.g., showing teeth)
  - 1: Normal, quiet (directs attention to the presence of the observer, moves calmly around cage, but lacks normal aggressive behavior)
  - 2: Low arousal state (no activity, does not respond to presence of the observer, responds to physical stimuli)
  - 3: Very low arousal state (unconscious, no response to the observer or physical stimuli)
- b) Posture:
  - 0 (Normal)
  - +2: Frenetic, wildly moving in cage, extreme excitation
  - +1: Excited, agitated
  - 0: Normal
  - 1: Sitting in a hunched position
  - 2: Lying down

**○ Motor system**

- a) Paresis:
  - 0: Not presented
  - 1: Monoparesis
  - 2: Paraparesis
  - 3: Hemiparesis
  - 4: Quadriparesis
- b) Grip response
  - 0: Positive
  - 1: Negative
- c) Tail response
  - 0: Positive
  - 1: Negative



[67]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/034531

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><b>A61K 48/00</b>(2006.01)i; <b>A61P 43/00</b>(2006.01)i; <b>A61K 47/54</b>(2017.01)i; <b>A61K 47/64</b>(2017.01)i; <b>C12N 15/113</b>(2010.01)i; <b>A61K 31/713</b>(2006.01)i; <b>A61P 25/00</b>(2006.01)i</p> <p>FI: C12N15/113 Z ZNA; A61K31/713; A61K48/00; A61K47/54; A61K47/64; A61P25/00; A61P43/00 105</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K48/00; A61P25/00; A61P43/00; A61K47/54; A61K47/64; C12N15/113; A61K31/713		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2022</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2022</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2015-502134 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 22 January 2015 (2015-01-22) claims 1, 11, 14, 16, 28, 34, 58, paragraph [0050], example 13	1-62
A	井上貴雄, 他, 核酸医薬開発の現状と今後の展望, DRUG DELIVERY SYSTEM. 2019 entirety, (INOUE, Takao et al. Current status of development of oligonucleotide therapeutics.)	1-62
A	ASAMI, Y. et al. Efficient Gene Suppression by DNA/DNA Double-Stranded Oligonucleotide In Vivo. MOLECULAR THERAPY. 07 December 2020 entirety	1-62
A	西川元也, 他, 核酸医薬品開発における体内動態とDDS, DRUG DELIVERY SYSTEM. 25 January 2021 entirety, (NISHIKAWA, Makiya et al. Development of Oligonucleotide Therapeutics: Tissue Distribution and Drug Delivery Systems.)	1-62
<input 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>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 October 2022		08 November 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Telephone No.

**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:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/034531**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2015-502134 A	22 January 2015	US 2014/0302603 A1 claims 1, 11, 14, 16, 28, 34, 58, paragraph [0137], example 13	
		US 2018/0073024 A1	
		US 2018/0320181 A1	
		US 2019/0270996 A1	
		US 2021/0340540 A1	
		WO 2013/089283 A1	
		EP 2791335 A1	

---

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 48/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i;                  C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i                  FI: C12N15/113 Z ZNA; A61K31/713; A61K48/00; A61K47/54; A61K47/64; A61P25/00; A61P43/00 105</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））</p> <p>A61K48/00; A61P25/00; A61P43/00; A61K47/54; A61K47/64; C12N15/113; A61K31/713</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> <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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (STN)</p>			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>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2015-502134 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 22.01.2015 (2015 - 01 - 22) 請求項1, 11, 14, 16, 28, 34, 58, [0050], 実施例13</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>井上貴雄, 他, 核酸医薬開発の現状と今後の展望, DRUG DELIVERY SYSTEM, 2019 全体</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ASAMI Y., et al., Efficient Gene Suppression by DNA/DNA Double-Stranded Oligonucleotide In Vivo, MOLECULAR THERAPY, 2020.12.07 全体</td> <td>1-62</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>西川元也, 他, 核酸医薬品開発における体内動態とDDS, DRUG DELIVERY SYSTEM, 2021.01.25 全体</td> <td>1-62</td> </tr> </tbody> </table>			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 2015-502134 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 22.01.2015 (2015 - 01 - 22) 請求項1, 11, 14, 16, 28, 34, 58, [0050], 実施例13	1-62	A	井上貴雄, 他, 核酸医薬開発の現状と今後の展望, DRUG DELIVERY SYSTEM, 2019 全体	1-62	A	ASAMI Y., et al., Efficient Gene Suppression by DNA/DNA Double-Stranded Oligonucleotide In Vivo, MOLECULAR THERAPY, 2020.12.07 全体	1-62	A	西川元也, 他, 核酸医薬品開発における体内動態とDDS, DRUG DELIVERY SYSTEM, 2021.01.25 全体	1-62
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 2015-502134 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 22.01.2015 (2015 - 01 - 22) 請求項1, 11, 14, 16, 28, 34, 58, [0050], 実施例13	1-62															
A	井上貴雄, 他, 核酸医薬開発の現状と今後の展望, DRUG DELIVERY SYSTEM, 2019 全体	1-62															
A	ASAMI Y., et al., Efficient Gene Suppression by DNA/DNA Double-Stranded Oligonucleotide In Vivo, MOLECULAR THERAPY, 2020.12.07 全体	1-62															
A	西川元也, 他, 核酸医薬品開発における体内動態とDDS, DRUG DELIVERY SYSTEM, 2021.01.25 全体	1-62															
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>25.10.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>08.11.2022</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>濱田 光浩 4B 3763</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>																

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/JP2022/034531

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2015-502134 A	22.01.2015	US 2014/0302603 A1 claims1, 11, 14, 16, 28, 34, 58, [0137], Example 13 US 2018/0073024 A1 US 2018/0320181 A1 US 2019/0270996 A1 US 2021/0340540 A1 WO 2013/089283 A1 EP 2791335 A1	

## 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:
- 上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。