

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7687682号
(P7687682)

(45)発行日 令和7年6月3日(2025.6.3)

(24)登録日 令和7年5月26日(2025.5.26)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z Z N A
請求項の数 11 (全60頁)		

(21)出願番号	特願2021-513667(P2021-513667)	(73)特許権者	304021417 国立大学法人東京科学大学 東京都目黒区大岡山二丁目1 2 番 1 号
(86)(22)出願日	令和2年4月8日(2020.4.8)	(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/015818	(72)発明者	横田 隆徳 東京都文京区湯島一丁目5番4 5号 国立大学法人東京医科歯科大学内
(87)国際公開番号	WO2020/209285	(72)発明者	永田 哲也 東京都文京区湯島一丁目5番4 5号 国立大学法人東京医科歯科大学内
(87)国際公開日	令和2年10月15日(2020.10.15)	審査官	坂崎 恵美子
審査請求日	令和5年4月7日(2023.4.7)		
(31)優先権主張番号	特願2019-73832(P2019-73832)		
(32)優先日	平成31年4月8日(2019.4.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 筋疾患治療用医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含み、被検体の骨格筋又は心筋において標的遺伝子のエクソンスキッピングを誘導するための二本鎖核酸複合体を有効成分として含む、被検体の筋ジストロフィー治療用である医薬組成物であって、

前記第1核酸鎖は、前記標的遺伝子の転写産物の全部又は一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ前記転写産物に対してエクソンスキッピングを誘導する効果を有し、

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、且つコレステロール、コレスタノール、ラノステロール、セレプロステロール、デヒドロコレステロール、若しくはコプロスタノール、又はトコフェロール、 α -トコトリエノール、 β -トコトリエノール、 γ -トコトリエノール、若しくは δ -トコトリエノールである機能性部分を結合しており、

前記第1核酸鎖は前記第2核酸鎖にアニールしており、
前記第1核酸鎖中の塩基の100%がモルホリノ核酸であり、
前記標的遺伝子が、ジストロフィン遺伝子である、前記医薬組成物。

【請求項2】

前記第2核酸鎖が天然リボヌクレオシドを含まない、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記第2核酸鎖の核酸部分が修飾若しくは非修飾のヌクレオシド間結合により連結されたデオキシリボヌクレオシド及び/又は糖修飾ヌクレオシドからなる、請求項1又は2に記載

載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記機能性部分が、コレステロール、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、又はコプロスタノールである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記コレステロール、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、又はコプロスタノールが前記第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 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記第2核酸鎖に切断性(cleavable)又は非切断性(uncleavable)リンカーを介してリガンドが結合している、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記筋ジストロフィーが筋強直性ジストロフィー又はデュシャンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

静脈内投与又は皮下投与される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記二本鎖核酸複合体の1回の投与量が0.1mg/kg以上である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記二本鎖核酸複合体の1回の投与量が0.01mg/kg ~ 200mg/kgである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記二本鎖核酸複合体中の第1核酸鎖の塩基配列が、配列番号 25 ~ 28 のいずれかで表わされる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、骨格筋及び心筋で発現する標的遺伝子の発現を特異的に抑制することのできる二本鎖核酸複合体、及びそれを有効成分として含有する筋疾患の治療又は予防用医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

筋疾患の一種である筋ジストロフィーは、骨格筋の筋線維が変性又は壊死することにより筋肉の萎縮や筋力低下を生じる進行性の遺伝性筋疾患である。重症化すると歩行困難等の運動機能に障害を生じる他、呼吸器不全や心不全により死に至るケースも少なくない。筋ジストロフィーは、遺伝形式や臨床症状により、デュシャンヌ型、ベッカー型、肢帯型、顔面肩甲上腕型等の様々な病型が知られている(非特許文献1)。

【0003】

現在までのところ筋ジストロフィーの根治療法はなく、多くは対症療法によって対応している。例えば、デュシャンヌ型筋ジストロフィーでは、従来ステロイドによる骨格筋障害の治療が行われてきた。米食品医薬品局(FDA)は、2017年2月に5歳以上の小児並びに成人におけるデュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)治療薬として、デフラザコート(daflazacort:商品名Emflaza(登録商標))を承認している。この治療薬は、免疫系の活動を低下させ、炎症を抑制するコルチコステロイド剤である。また、米国FDAは、2016年9月にデュシャンヌ型筋ジストロフィー治療薬として、新たにエテプリルセン(eteolirsen:商品名EXONDYS 51)を承認している。この治療薬は、ジストロフィン遺伝子発現時におけるpre-mRNAスプライシングにおいてエクソスキッピングを誘導し、51番目のエクソンを欠損したmRNAが合成されるように設計された核酸医薬である。

10

20

30

40

50

【0004】

筋ジストロフィーの有病率は、人口10万人当たり17～20人とされているが、関連する治療薬の市場規模は年々拡大しており、2022年には785億ドルに達するとの推定がある。

【0005】

近年、核酸医薬と呼ばれる医薬品の開発において、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、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り、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を選択的に改変又は阻害する方法である。

10

【0006】

アンチセンス法を利用した核酸として、本発明者らは、これまでに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を開発している。例えば、特許文献1では、トコフェロールを結合させた相補鎖とアニーリングさせたアンチセンスオリゴヌクレオチドが、肝臓に効率的に送達され、また、高いアンチセンス効果を有することを開示している。また、特許文献2では、エクソスキッピング効果を有する二本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを付加ヌクレオチドがギャップマー(アンチセンスオリゴヌクレオチド)の5'末端、3'末端、若しくは5'末端及び3'末端の両方に付加されている短いギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドを開発した。さらに、特許文献3では、治療用オリゴヌクレオチドを送達するための二本鎖剤も開発している。

20

【0007】

前述のように筋ジストロフィーの死因の多くは、変異遺伝子の発現によって発症する呼吸器不全や心不全である。もしも、前述の核酸医薬によって横隔膜等の骨格筋や心筋で発現するそれらの遺伝子の発現を調節することができれば、筋ジストロフィーによる死亡率を低減できる可能性がある。また、他の筋疾患であるミオパチーや心筋症等についても同様の方法で治療や予防が可能となり得る。

【0008】

しかしながら、骨格筋、又は心筋に効率的に送達され、当該部位において優れたアンチセンス効果を示す核酸複合体は、現在まで開発されていない。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【文献】国際公開第2013/089283号

【文献】国際公開第2014/203518号

【文献】国際公開第2014/192310号

【非特許文献】

【0010】

【文献】杉田秀夫, 小澤 英 二郎, 桢中征哉 編集, 1995, 新筋肉病学. 南江堂, 東京: pp469-550

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の課題は、骨格筋及び/又は心筋に効率的に送達され、当該部位において優れたアンチセンス効果を示す核酸複合体を開発することである。また、そのような核酸複合体を有効成分として、骨格筋や心筋等で発症する筋疾患の治療又は予防用の組成物を開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

50

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、従来、主として肝臓に送達されると考えられていた、アンチセンスオリゴヌクレオチドと脂質、特にコレステロールを結合させた相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体が、骨格筋や心筋にも効率的に送達され、当該部位において非常に優れたアンチセンス効果を示すことを見出した。

【0013】

したがって、上記構成を有する二本鎖核酸複合体（二本鎖核酸剤）の標的遺伝子を骨格筋及び/又は心筋で発現する筋疾患の原因遺伝子に設計することで、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドを効率的に骨格筋及び/又は心筋に送達し、その標的遺伝子の発現を調節することによって、筋疾患を治療する治療又は予防用の組成物にもなり得る。本発明は、上記知見及び開発結果に基づくものであって、以下を提供する。

10

【0014】

(1) 第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含み、被検体の骨格筋又は心筋において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、又は標的遺伝子の転写産物又は翻訳産物の機能を阻害するための二本鎖核酸複合体であって、前記第1核酸鎖は、前記標的遺伝子の転写産物の全部又は一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、前記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、かつコレステロール又はその類縁体その類縁体を結合しており、前記第1核酸鎖は前記第2核酸鎖にアニールしている、前記二本鎖核酸複合体。

(2) 前記第1核酸鎖が、少なくとも4個の連続デオキシリボヌクレオシドを含む、(1)に記載の二本鎖核酸複合体。

20

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

(4) 前記第1核酸鎖がミックスマーである、(1)又は(2)に記載の二本鎖核酸複合体。

(5) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖中の少なくとも4個の連続デオキシリボヌクレオシドに相補的な、少なくとも4個の連続リボヌクレオシドを含む、(1)～(4)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(6) 前記第2核酸鎖が天然リボヌクレオシドを含まない、(1)～(5)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(7) 前記第2核酸鎖の核酸部分が修飾若しくは非修飾のヌクレオシド間結合により連結されたデオキシリボヌクレオシド及び/又は糖修飾ヌクレオシドからなる、(1)～(6)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

30

(8) 前記第2核酸鎖がコレステロール又はその類縁体を結合している、(1)～(7)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(9) 前記コレステロール又はその類縁体が前記第2核酸鎖の5'末端及び/又は3'末端に結合している、(1)～(8)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(10) 前記第2核酸鎖に切断性(cleavable)又は非切断性(uncleavable)リンカーを介してリガンドが結合している、(1)～(9)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

【0015】

(11) 前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖とが前記リンカーを介して結合している、(1)～(10)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

40

(12) 前記リンカーが核酸からなる、(10)又は(11)に記載の二本鎖核酸複合体。

(13) (1)～(12)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。

(14) 被検体の骨格筋機能障害、又は心機能障害治療用である、(13)に記載の医薬組成物。

(15) 前記骨格筋機能障害、又は心機能障害が筋ジストロフィー、ミオパチー、炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、ダノン病、筋無力症候群、ミトコンドリア病、ミオグロビン尿症、糖原病、周期性四肢麻痺、遺伝性心筋症、肥大型心筋症、拡張型心筋症、遺伝性不整脈、神経変性疾患、サルコペニア、及びカヘキシアからなる群から選択される疾患である、(13)又は(14)に記載の医薬組成物。

50

(1 6) 静脈内投与、筋肉内投与又は皮下投与される、(1 3) ~ (1 5) のいずれかに記載の医薬組成物。

(1 7) 前記二本鎖核酸複合体の1回の投与量が0.1mg/kg以上である、(1 3) ~ (1 6) のいずれかに記載の医薬組成物。

(1 8) 前記二本鎖核酸複合体の1回の投与量が0.01mg/kg ~ 200mg/kgである、(1 3) ~ (1 7) のいずれかに記載の医薬組成物。

(1 9) 標的遺伝子の転写産物が、mRNA、マイクロRNA、pre-mRNA、ロングノンコーディングRNA、及びナチュラルアンチセンスRNAからなる群より選択されるいずれかのRNAである、(1 3) ~ (1 8) のいずれかに記載の医薬組成物。

(2 0) 第1核酸鎖が、ステリックブロッキング、スプライシングスイッチ、エクソスキッピング、及びエクソンインクルージョンからなる群から選択されるいずれかのRNAである、(1 3) ~ (1 9) のいずれかに記載の医薬組成物。

【 0 0 1 6 】

(2 1) 前記二本鎖核酸複合体中の第1核酸鎖の塩基配列が配列番号 2 4 で表わされる、(1 3) ~ (2 0) のいずれかに記載の医薬組成物。

(2 2) 第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含み、被検体の骨格筋又は心筋において標的遺伝子のRNA編集、エクソスキッピング、若しくはエクソンインクルージョンを誘導するための、又は標的RNAをステリックブロックするための二本鎖核酸複合体であって、前記第1核酸鎖は、前記標的遺伝子の転写産物の全部又は一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ前記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、前記第1核酸鎖は前記第2核酸鎖にアニールしている、前記二本鎖核酸複合体。

(2 3) 前記第1核酸鎖が少なくとも1個のモルホリノ核酸又はリボース2'位修飾核酸を含む、(2 2) に記載の二本鎖核酸複合体。

(2 4) 前記第1核酸鎖中の塩基の50%以上がモルホリノ核酸又はリボース2'位修飾核酸である、(2 2) 又は(2 3) に記載の二本鎖核酸複合体。

(2 5) 前記第1核酸鎖がミックスマーである、(2 2) ~ (2 4) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(2 6) 前記第1核酸鎖中の塩基の100%がモルホリノ核酸又はリボース2'位修飾核酸である、(2 2) ~ (2 5) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(2 7) 前記第2核酸鎖が天然リボヌクレオシドを含まない、(2 2) ~ (2 6) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(2 8) 前記第2核酸鎖の核酸部分が修飾若しくは非修飾のヌクレオシド間結合により連結されたデオキシリボヌクレオシド及び/又は糖修飾ヌクレオシドからなる、(2 2) ~ (2 7) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(2 9) 前記第2核酸鎖が機能性部分を結合している、(2 2) ~ (2 8) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(3 0) 前記機能性部分がコレステロール又はその類縁体、トコフェロール又はその類縁体、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体、置換された若しくは置換されていないC 1 ~ 3 0 のアルキル基、置換された若しくは置換されていないC 2 ~ 3 0 のアルケニル基、及び、置換された若しくは置換されていないC 1 ~ 3 0 のアルコキシ基から成る群より選択される、(2 2) ~ (2 8) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(3 1) 前記機能性部分がコレステロール又はその類縁体である、(3 0) に記載の二本鎖核酸複合体。

(3 2) 前記コレステロール又はその類縁体が前記第2核酸鎖の5'末端及び/又は3'末端に結合している、(2 2) ~ (3 1) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

【 0 0 1 7 】

(3 3) 前記第2核酸鎖に切断性(cleavable)又は非切断性(uncleavable)リンカーを介してリガンドが結合している、(2 2) ~ (3 2) のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(3 4) (2 2) ~ (3 3) 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

10

20

30

40

50

医薬組成物。

(35) 被検体の筋ジストロフィー治療用である、(34)に記載の医薬組成物。

(36) 前記筋ジストロフィーが筋強直性ジストロフィー又はデュシャンヌ型筋ジストロフィーである、(35)に記載の医薬組成物。

(37) 静脈内投与又は皮下投与される、(34)～(36)のいずれかに記載の医薬組成物。

(38) 前記二本鎖核酸複合体の1回の投与量が0.1mg/kg以上である、(34)～(37)のいずれかに記載の医薬組成物。

(39) 前記二本鎖核酸複合体の1回の投与量が0.01mg/kg～200mg/kgである、(34)～(38)のいずれかに記載の医薬組成物。

(40) 前記二本鎖核酸複合体中の第1核酸鎖の塩基配列が、配列番号25～28のいずれかで表わされる、(34)～(39)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2019-073832号の開示内容を包含する。

【発明の効果】

【0018】

本発明により、二本鎖核酸複合体剤を骨格筋及び心筋に効率的に送達し、当該部位において、アンチセンス効果をもたらす二本鎖核酸複合体が提供される。そのアンチセンス効果によって、標的遺伝子の発現抑制若しくは亢進、機能阻害やエクソスキッピングの誘導が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明の二本鎖核酸複合体の代表例の模式図を示す。図1aは、第2核酸鎖の5'末端にトコフェロールが結合している二本鎖核酸複合体を示す。図1bは、第2核酸鎖の5'末端にコレステロールが結合している二本鎖核酸複合体を示す。図1cは、図1bの二本鎖核酸複合体をRNAリンカーで結合した一本鎖核酸を自己アニールさせたものを示す。ここでは図示しないが、第2核酸鎖の3'末端にコレステロール又はその類縁体が結合していてもよい。また、第2核酸鎖の両末端にコレステロール又はその類縁体が結合していてもよい。さらに、第2核酸鎖の内部のヌクレオチド又は一本鎖核酸のRNA領域にコレステロール又はその類縁体が結合していてもよい。

【図2】様々な架橋核酸の構造を示す図である。

【図3】第2核酸鎖にトコフェロール又はコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mSR-B1)、及びChol#1HDO(mSR-B1))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的SR-B1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、ASOは陽性対照であり、一本鎖核酸分子であるASO(mSR-B1)を、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図4】第2核酸鎖にトコフェロール又はコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mMalat1)、及びChol#1HDO(mMalat1))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的Malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、ASOは陽性対照であり、一本鎖核酸分子であるASO(mMalat1)を、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図5】第2核酸鎖にトコフェロール又はコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mDMPK)、及びChol#1HDO(mDMPK))を12.5mg/kgで投与した時の腓腹筋(GC)、前脛骨筋(TA)、上腕三頭筋(TB)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)、及び心筋(Heart)における標的DMPK遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、ASOは陽性対照であり、一本鎖核酸分子であるASO(mDMPK)を、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図6】第2核酸鎖にトコフェロール又はコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mDMPK)、及びChol#1HDO(mDMPK))を25mg/kgで投与した時の腓腹筋(GC)、前脛骨筋(TA)、上腕三頭筋(TB)、大腿四頭筋(Quadri

10

20

30

40

50

ceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)、及び心筋(Heart)における標的DMPK遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、ASOは陽性対照であり、一本鎖核酸分子であるASO(mDMPK)を、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図7】第2核酸鎖にトコフェロール又はコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mDMPK)、及びChol#1HDO(mDMPK))を50mg/kgで投与した時の腓腹筋(GC)、前脛骨筋(TA)、上腕三頭筋(TB)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)、及び心筋(Heart)における標的DMPK遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、ASOは陽性対照であり、一本鎖核酸分子であるASO(mDMPK)を、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図8】第2核酸鎖にトコフェロール又はコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1DNA/DNA(mMalat1)、及びChol#1DNA/DNA(mMalat1))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)における標的malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。この二本鎖核酸複合体を構成する第2核酸鎖もDNAのみで構成されている。図中、ASOは陽性対照であり、一本鎖核酸分子であるASO(mMalat1)を、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図9】第2核酸鎖として、コレステロールが結合し、DNAのみで構成され、かつヌクレオシド間が、全てホスホロチオエート結合で構成されたChol#1-cDNA(mMalat1)(PS)、又は全てホスホジエステル結合で構成されたChol#1-cDNA(mMalat1)(PO)を含む本発明の二本鎖核酸複合体による心筋(Heart)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図10】第2核酸鎖の5'側にコレステロールが結合した第2核酸鎖のヌクレオシド間にホスホジエステル結合又はホスホロチオエート結合を含む、Chol#1HDO(mMalat1)(PO)、Chol#1HDO(5'PS)、そしてChol#1HDO(3'PS)で構成された本発明の二本鎖核酸複合体による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図11】第2核酸鎖にトコフェロール又はコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mMalat1)、及びChol#1HDO(mMalat1))を複数回投与したときの心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的Malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、ASOは陽性対照であり、一本鎖核酸分子であるASO(mMalat1)を、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図12】第2核酸鎖にコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(Chol#1HDO(mDMPK))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的DMPK遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図13】第2核酸鎖にコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体Chol#1HDO(mMalat1)による(a)心筋(Heart)、(b)固有背筋(Back)、(c)大腿四頭筋(QF)、及び(d)横隔膜(Dia)における標的遺伝子(malat1)の発現抑制効果を示す図である。縦軸はmalat1ノンコーディングRNAの相対発現量、横軸は投与後の経過期間(日)を示す。図中、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図14】投与後8週間(56日)目の各組織におけるmalat1ノンコーディングRNAの相対発現量を示す。図中、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図15】本発明の二本鎖核酸複合体Chol#1HDO(mMalat1)を様々な用量で単回投与したときの(a)大腿四頭筋(Quadriceps)、(b)心筋(Heart)、(c)固有背筋(Back)、及び(d)横隔膜(Diaphragm)における標的malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。

【図16】第2核酸鎖に結合するコレステロールと核酸末端との間に炭素数6個のヘキシル基からなるリンカーが結合した本発明の二本鎖核酸複合体による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、及び固有背筋(Back)における標的m

10

20

30

40

50

alat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。図中、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図17】標的遺伝子に対する相補鎖の長さが異なる第1核酸鎖を含む二本鎖核酸複合体剤による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、及び固有背筋(Back)における標的遺伝子(malat1)発現抑制効果を示す図である。図中、PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図18】本発明の二本鎖核酸複合体剤を皮下投与したときの(a)心筋(Heart)、(b)大腿四頭筋(Quadriceps)、及び(c)横隔膜(Diaphragm)における標的遺伝子(malat1)発現抑制効果を示す図である。

【図19】コレステロールを末端に結合した一本鎖核酸複合体剤、本発明の二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(mMalat1)、及び陰性対照用のPBSによる心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、及び固有背筋(Back)におけるmalat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。

10

【図20】コレステロールを末端に結合した一本鎖核酸複合体剤(5'Chol-ASO-DNA、3'Chol-ASO-DNA)、本発明の二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(mMalat1)、及び陰性対照用のPBS投与72時間後のマウス血中の血小板数を示す図である。

【図21】Bioanalyzer2100(Agilent社製)で泳動したPCRの結果のうち代表的な電気泳動図を示す。(a)は心臓(Heart)のPCR産物を、また(b)は大腿四頭筋(Quadriceps)のPCR産物を示している。図中、矢頭はエクソン23がスキップしなかったバンド(Unskipped band)を、また矢印はエクソン23がスキップしたバンド(skipped band)を示す。

20

【図22】mdxマウス(デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス)における一本鎖核酸複合体剤(PMO)、本発明のトコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(PMO)、及び陰性対照用のPBSによるジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピング率を示す図である。(a)は心筋(Heart)、(b)は横隔膜(Diaphragm)、(c)は固有背筋(Back)、(d)は大腿四頭筋(Quadriceps)、(e)が前脛骨筋(Tibialis anterior)、そして(f)が上腕三頭筋(Triceps)を示す。

【図23】ジストロフィンタンパク質の発現を示すウェスタンブロット図である。mdxマウスに一本鎖核酸複合体剤(PMO)、本発明のトコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、及び陰性対照用のPBSを(a)心筋(Heart)、及び(b)固有背筋(Back)に投与後のジストロフィンを示す。B10(正常マウス)は陽性対照用のジストロフィンを示す。

30

【図24】mdxマウスにおける一本鎖核酸複合体剤(PMO)、本発明のトコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)投与後の心筋、固有背筋におけるジストロフィンタンパク質の発現を示す免疫染色の図である。

【図25】mdxマウスにおける一本鎖核酸複合体剤(PMO)、本発明のトコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、Chol#1HDO(Chol-HDO)及び陰性対照用のPBSによる心筋、横隔膜、大腿四頭筋、前脛骨筋、及び上腕三頭筋におけるジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを示す図である。

【図26】mdxマウスにおける一本鎖核酸複合体剤(Mixmer)、本発明のトコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-Mixmer)及び陰性対照用のPBSによる心筋、大腿四頭筋、前脛骨筋、上腕三頭筋、及び固有背筋におけるジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを示す図である。

40

【図27】本発明の二本鎖核酸複合体(Chol#1HDO(mMalat1))と図1cで示すようにChol-HDOをRNAリンカーで結合させた一本鎖核酸を自己アニールさせた核酸分子Chol-sHDOによる心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的Malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図28】第2核酸鎖にコレステロールが結合した本発明の二本鎖核酸複合体(Chol#1HDO(mMalat1))と、第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な配列を有し、かつその3'末端に

50

、コレステロールが結合した鎖であって、コレステロールと第2核酸鎖の末端との間にテトラエチレングリコールからなるリンカー(TEG)を介在させた構成を有する核酸(3' Chol(TEG)HDO(mMalat1))による、心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的Malat1遺伝子の発現抑制効果を示す図である。PBSは陰性対照である溶媒に用いたPBSを示す。

【図29】正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの、運動負荷試験における走行継続時間を示す図である。

【図30】正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの、(a)握力(grip power)及び(b)保持力積(holding impulse)の測定結果を示す図である。

【図31】正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの血清中における、(a)クレアチンキナーゼ(CK)、(b)アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、及び(c)アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の測定値を示す図である。

【図32】正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの、心電図測定における修正QT時間(QTc)を示す図である。

【図33】心筋におけるジストロフィンタンパク質の発現を示すウェスタンブロット図である。正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの心筋における、(a)ジストロフィンタンパク質、及び(b)ピンキュリタンパク質の発現を示す。

【図34】大腿四頭筋におけるジストロフィンタンパク質の発現を示すウェスタンブロット図である。正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの大腿四頭筋における、(a)ジストロフィンタンパク質、及び(b)ピンキュリタンパク質を示す。

【図35】心筋におけるジストロフィンタンパク質の発現を示す免疫染色図である。正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの心筋における、ジストロフィンタンパク質の発現を示す。スケールバーは200µmを示す。

【図36】大腿四頭筋におけるジストロフィンタンパク質の発現を示す免疫染色図である。正常マウス(B10)、並びにPBSのみ(mdx)、一本鎖核酸複合体剤(PMO)、トコフェロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Toc#1HDO(Toc-HDO)、又はコレステロールを末端に結合した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(Chol-HDO)を投与したmdxマウスの大腿四頭筋における、ジストロフィンタンパク質の発現を示す。スケールバーは200µmを示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

1. 二本鎖核酸複合体

10

20

30

40

50

1 - 1 . 概要

本発明の第1態様は、二本鎖核酸複合体に関する。本発明の二本鎖核酸複合体は、アンチセンス効果によって、被検体の骨格筋又は心筋における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、標的遺伝子の転写産物又は翻訳産物の機能阻害、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を誘導することができる。

【0021】

本発明の二本鎖核酸複合体は、互いにアニールした第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む。この第1核酸鎖は、標的遺伝子の転写産物の全部又は一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、前記転写産物に対してアンチセンス効果を有する。また、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、その5'末端及び/又は3'末端に機能性部分を結合している。

【0022】

1 - 2 . 用語の定義

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、スカベンジャー受容体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、DMPK (dystrophia myotonic a-protein kinase) 遺伝子、及びジストロフィン遺伝子等が挙げられる。

【0023】

ここで、スカベンジャー受容体は、いずれも変性リポタンパク質の受容体膜タンパク質で、コレステロールやリポタンパク質代謝に関与することが知られている。SR-B1は進化的に保存されたCD36ファミリーに属する2回膜貫通タンパク質で、長い細胞外領域とアミノ末端とカルボキシル末端のそれぞれを含む2つの短い細胞内領域を有する。

【0024】

Malat1は、肺癌をはじめとする悪性腫瘍で高発現している長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) で、筋細胞の核内に滞留することが知られている。

【0025】

DMPK遺伝子は、ミオトニンプロテインキナーゼをコードし、筋ジストロフィーの中でも成人で発症頻度が最も高い筋緊張性ジストロフィーの原因遺伝子として知られており、DMPK遺伝子の3'非翻訳領域に存在するCTG反復配列の異常な伸長が該疾患の原因とされている。

【0026】

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、Malat1遺伝子の転写産物であるMalat1 ノンコーディングRNA、及びDMPK遺伝子の転写産物であるDMPK mRNAが挙げられる。

【0027】

具体例として、配列番号1にマウスSR-B1 mRNAの塩基配列を、配列番号2にヒトSR-B1 mRNAの塩基配列を示す。また、配列番号3にマウスmalat1 ノンコーディングRNAの

10

20

30

40

50

塩基配列を、配列番号4にヒトMalat1ノンコーディングRNAの塩基配列を示す。さらに、配列番号5にマウスDMPK mRNAの塩基配列を、配列番号6にヒトDMPK mRNAの塩基配列を示す。なお、配列番号1～6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。

【0028】

また、公知のアンチセンス医薬の塩基配列も利用することもできる。例えば、筋強直性ジストロフィーの治療薬であり、その原因遺伝子であるDMPK遺伝子に対するISIS 598769 (IONIS)を構成する配列番号24で示す塩基配列、デュセンヌ型筋ジストロフィーの治療薬として知られ、ジストロフィン遺伝子のpre-mRNAのエクソスキッピングを誘導するEteplirsen (Sarepta ; Exondys 51)を構成する配列番号25で示す塩基配列、Golodirsen (Sarepta)を構成する配列番号26で示す塩基配列、NS-065/NCNP-01(日本新薬)を構成する配列番号27で示す塩基配列、及びCasimersen(Sarepta)を構成する配列番号28で示す塩基配列等を用いてもよい。

【0029】

本明細書において「アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)」とは、標的転写産物の全部又は一部、例えば、任意の標的領域にハイブリダイズ可能な相補的塩基配列を含み、アンチセンス効果によってその標的遺伝子の転写産物の発現又は標的転写産物のレベルを抑制制御し得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、又は15～18塩基長とすることができる。

【0030】

「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。

【0031】

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り、かつ前記標的転写産物、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。標的遺伝子の翻訳産物として、例えば、SR-B1遺伝子の翻訳産物であるSR-B1タンパク質、Malat1遺伝子の翻訳産物であるMalat1タンパク質、及びDMPK遺伝子の翻訳産物であるDMPKタンパク質が挙げられる。

【0032】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される用語「核酸」又は「核酸分子」とは、モノマーであればヌクレオシド又はヌクレオチドを、オリゴマーであればオリゴヌクレオチドを、またポリマーであればポリヌクレオチドを意味する。

【0033】

「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。

【0034】

「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。

【0035】

「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。

【0036】

本明細書において「核酸鎖」又は単なる「鎖」とは、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを意味する。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。

【0037】

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。

【0038】

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。

【0039】

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。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により、天然型よりも好ましい。

【0040】

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

10

20

30

40

50

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。

【0041】

本明細書において「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドをいう。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。本明細書において、二環式糖部分を含むヌクレオシドは、「架橋ヌクレオシド」と称することもある。図2に架橋核酸を一部例示する。

【0042】

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)の1つのサブグループは、4'-(CH₂)_p-O-2'、4'-(CH₂)_p-CH₂-2'、4'-(CH₂)_p-S-2'、4'-(CH₂)_p-O-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)_n-N(R₃)-O-(CH₂)_m-2'[式中、p、m及びnは、それぞれ1~4の整数、0~2の整数、及び1~3の整数を表し；またR₃は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及びユニット置換基(蛍光若しくは化学発光標識分子、核酸切断活性を有する機能性基、細胞内又は核内局在化シグナルペプチド等)を表す]により架橋された2'位の炭素原子と4'位の炭素原子を有すると説明することができる。さらに、特定の実施形態によるBNAに関し、3'位の炭素原子上のOR₂置換基及び5'位の炭素原子上のOR₁置換基において、R₁及びR₂は、典型的には水素原子であるが、互いに同一であっても異なってもよく、さらにまた、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、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P(R₄)R₅[ここで、R₄及びR₅は、互いに同一であっても異なってもよく、それぞれヒドロキシル基、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'-CH₂-O-2')BNA(LNA(Locked Nucleic Acid(登録商標)、2',4'-BNAとしても知られている)、例えば、-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA若しくは-D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2')BNA(ENAとしても知られている)、-D-チオ(4'-CH₂-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R₃)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH₂-N(R₃)-O-2')BNA(2',4'-BNA^{NC}としても知られている)、2',4'-BNA^{COO}、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH₃)-O-2')BNA(cEt BNAとしても知られている)、(4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2')BNA(cMOE BNAとしても知られている)、アミドBNA(4'-C(O)-N(R)-2')BNA(R=H、Me)(AmNAとしても知られている)、2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸(scPNA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。本明細書では、メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')架橋を有する二環式ヌクレオシドをしばしば「LNAヌクレオシド」と称する。

【0043】

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、修飾ヌクレオチド間結合、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

10

20

30

40

50

、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。

【0044】

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いう。修飾ヌクレオシド間結合には、リン原子を含むリン含有ヌクレオシド間結合とリン原子を含まない非リン含有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には、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、アルキルホスホネート結合、アルキルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、及びホスホロアミデート結合等が挙げられるが、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である。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は周知である。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。

【0045】

本明細書において「修飾核酸塩基」又は「修飾塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシル以外のあらゆる核酸塩基を意味する。修飾核酸塩基の例としては、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-プロモシトシン、5-ヨードシトシン、N4-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、8-プロモアデニン、N2-メチルグアニン、又は8-プロモグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。

【0046】

「非修飾核酸塩基」又は「非修飾塩基」とは、天然核酸塩基と同義であり、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。

【0047】

本明細書において「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す。本明細書において核酸鎖は、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。ヌクレオシドは、化学修飾リボフラノース環部分を含んでいてもよい。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、C₁-C₁₂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。本明細書において、修飾糖部分を有するヌクレオシドの例としては、限定するものではないが、5'-ビニル、5'-メチル(R又はS)、4'-S、2'-F(2'-フルオロ基)、2'-OCH₃(2'-OMe基若しくは2'-O-メチル基)、及び2'-O(CH₂)₂OCH₃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-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、-O(CH₂)₂SCH₃、-O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、及びO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)から選択することができ、各R_m及びR_nは、独立して、H又は置換若しくは非置換C₁-C₁₀アルキルである。本明細書において「2'-修飾糖」は、2'位で修飾されたフラノシル糖を意味する。

10

20

30

40

50

【0048】

一般的には、修飾は、同一鎖中のヌクレオチドが独立して異なる修飾を受けることができるように実施することができる。また、酵素的切断に対する抵抗性を与えるため、同一のヌクレオチドが、修飾ヌクレオチド間結合(例えば、ホスホロチオエート結合)を有し、さらに、修飾糖(例えば、2'-O-メチル修飾糖又は二環式糖)を有することができる。同一のヌクレオチドはまた、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)を有し、さらに、修飾糖(例えば、2'-O-メチル修飾糖又は二環式糖)を有することができる。

【0049】

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、本発明の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。

【0050】

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(フーグステイン型塩基対等)を形成し得る関係を意味する。本発明において、第1核酸鎖は、標的転写産物(例えば、標的遺伝子の転写産物)の全部又は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。同様に、第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖の全部又は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。

【0051】

本発明において「筋疾患」とは、筋肉が萎縮し、筋力低下を生じる疾患をいう。例えば、筋ジストロフィー、ミオパチー、炎症性筋疾患(多発性筋炎、皮膚筋炎を含む)、ダノン病、筋無力症候群、ミトコンドリア病、ミオグロビン尿症、糖原病、周期性四肢麻痺等が含まれる。本発明において、好ましい筋疾患は、筋ジストロフィーである。筋ジストロフィーには、デュシェンヌ型、ベッカー型、エメリ・ドレフュス型、肢帯型、顔面肩甲上腕型、眼咽頭型等の様々な病型が知られているが、本明細書における筋ジストロフィーは、いずれの病型であってもよい。同様に、ミオパチーには、先天性、遠位型、甲状腺機能低下性、ステロイドミオパチー等の病型が知られているが、本明細書におけるミオパチーは、いずれの病型であってもよい。

【0052】

本明細書において、「機能性部分」とは、二本鎖核酸複合体に結合することによって、二本鎖核酸複合体の骨格筋や心筋等への効率的な送達を可能とする部分である。機能性部分は、限定しないが、脂質リガンド、脂質誘導体リガンド、ペプチドリガンド、抗体リガンド、アプタマー、低分子リガンド、心筋・骨格筋に取り込まれるリガンド分子等である。例えば、機能性部分は、コレステロール又はその類縁体、トコフェロール又はその類縁体、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体、置換された若しくは置換されていないC1~30のアルキル基、置換された若しくは置換されていないC2~30のアルケニル基、及び、置換された若しくは置換されていないC1~30のアルコキシ基である。

【0053】

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

10

20

30

40

50

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。

【0054】

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、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、及び δ -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、 α -トコトリエノール、 β -トコトリエノール、 γ -トコトリエノール、 δ -トコトリエノール等が挙げられる。好ましくは、トコフェロールは、 α -トコフェロールである。

10

【0055】

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、セレプロステロール、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。

【0056】

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、生合成中間体、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。

20

【0057】

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、骨格筋又は心筋において、標的転写産物の発現量を減少させる必要がある個体や、筋疾患の治療又は予防が必要な個体であってもよい。

30

【0058】

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。

【0059】

第1核酸鎖は、標的遺伝子の転写産物の全部又は一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、標的転写産物に対してアンチセンス効果をもたらす一本鎖オリゴヌクレオチド鎖である。

【0060】

第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチド鎖である。第2核酸鎖は、コレステロール又はその類縁体と結合している。また、二本鎖核酸複合体において、第2核酸鎖は、相補的塩基対の水素結合を介して第1核酸鎖にアニールしている。

40

【0061】

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塩基長であればよい。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塩基長以下であればよい。第1核酸鎖及

50

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。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。

【0062】

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もよい。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に好ましい。一実施形態で、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の全て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。修飾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もよい。

10

【0063】

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。

20

【0064】

第2核酸鎖の5'末端及び3'末端において、コレステロール又はその類縁体が未結合の末端において、その末端から2～6個の塩基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）であってもよい。

【0065】

第2核酸鎖の3'末端から少なくとも1個（例えば3個）のヌクレオシドは、例えば、RNase耐性の高い2'-F-RNA、2'-OMe等の修飾ヌクレオシドであってもよい。第2核酸鎖の3'末端に2'-F-RNA、2'-OMe等の修飾ヌクレオシドを含む場合、二本鎖核酸複合体の遺伝子抑制活性が高まるために好ましい。

30

【0066】

第2核酸鎖の5'末端及び3'末端においてコレステロール又はその類縁体が未結合の末端において、その末端から1～5個のヌクレオシドは、例えば、RNase耐性の高い2'-F-RNA等の修飾ヌクレオシドであってもよい。

【0067】

第1核酸鎖及び第2核酸鎖におけるヌクレオシドは、天然ヌクレオシド(デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、若しくは両者)及び/又は非天然ヌクレオシドであってもよい。

【0068】

本明細書では、第1核酸鎖の塩基配列が標的転写産物の全部又は一部の塩基配列に相補的であることから標的転写産物にハイブリダイズ（又はアニール）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。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もできる。

40

【0069】

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

50

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、150 mM塩化ナトリウム及び15 mMクエン酸ナトリウムを含む。

【0070】

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当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。

10

【0071】

一実施形態では、第1核酸鎖の全長は、天然リボヌクレオシドのみで構成されてはいない。第1核酸鎖の天然リボヌクレオシドは、全長の半数以下であるか、又は含まないことが好ましい。

20

【0072】

一実施形態では、第2核酸鎖は、第1核酸鎖中の上記の少なくとも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、RNase H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。

【0073】

第2核酸鎖は、全てのヌクレオシドがリボヌクレオシド及び/又は修飾ヌクレオシドから構成されていてもよい。第2核酸鎖の全てのヌクレオシドが、デオキシリボヌクレオシド及び/又は修飾ヌクレオシドから構成されていてもよく、リボヌクレオシドを含まなくてもよい。一実施形態で、第2核酸鎖の全てのヌクレオシドが、デオキシリボヌクレオシド及び/又は修飾ヌクレオシドから構成されていてもよい。

30

【0074】

本発明の二本鎖核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、ギャップマー(gapmer)であってよい。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。ギャップマーにおける前記中央領域は少なくとも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個であってよい。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は、5'ウイング領域及び3'ウイ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'ウイング領域及び3'ウイング領域を構成する非天然ヌクレオシドが

40

50

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'ウイング領域及び3'ウイ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'ウイング領域及び3'ウイ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。5'ウイング領域及び3'ウイング領域は、非天然ヌクレオシドを少なくとも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。

【0075】

前記ギャップマーを構成する第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、5'末端から順に、2～7塩基長若しくは3～5塩基長の架橋ヌクレオシド、4～15塩基長若しくは8～12塩基長の

10

【0076】

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。

【0077】

本発明の二本鎖核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び/又は第2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。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)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。

20

30

【0078】

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、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。

【0079】

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。

40

【0080】

第1核酸鎖及び第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。第1核酸鎖は、修飾ヌクレオシドを少なくとも1つ含んでもよい。修飾

50

ヌクレオシドは、2'-修飾糖を含んでいてもよい。この2'-修飾糖は、2'-O-メチル基を含む糖であってもよい。よって、本発明の一実施態様は、第1核酸鎖が、標的遺伝子の転写産物の全部又は一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ前記転写産物に対してアンチセンス効果を有し、第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、前記第1核酸鎖が前記第2核酸鎖にアニールしており、前記第1核酸鎖が全部(100%)又は一部(例えば全体の80%以上)にモルホリノ核酸を含む、二本鎖核酸複合体に関する。

【0081】

第1核酸鎖及び第2核酸鎖は、上記の修飾ヌクレオシド間結合及び修飾ヌクレオシドの任意の組み合わせを含んでいてもよい。

【0082】

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。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。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、アルキレン等が挙げられる。具体的には、例えば、DNA、RNAといった天然のヌクレオチ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から構成されうる。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、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。一実施態様においては、第1核酸鎖は3'末端側にのみウイング領域を有するヘミギャップマーであり、第2核酸鎖は糖修飾ヌクレオシドを含まない核酸鎖である。

【0083】

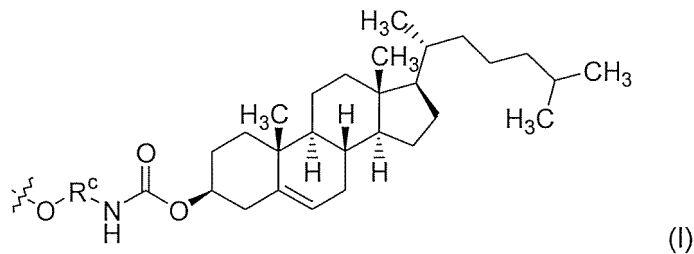
第2核酸鎖は、コレステロール又はその類縁体と結合している。

【0084】

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(I)で示される基を有してもよい。

【0085】

【化1】



[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)。]

【0086】

R^cは、限定されないが、-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CH(CH₂OH)-、又は-(CH₂)₆-であってもよい。

【0087】

上記一般式(I)又は(II)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。

【0088】

コレステロール又はその類縁体は、第2核酸鎖の5'末端、又は3'末端、ある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。限定はしないが、第2核酸鎖の5'末端に結合したコレステロール又はその類縁体は、特に好適である。

【0089】

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。

10

【0090】

第2核酸鎖とコレステロール又はその類縁体の結合は、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。

【0091】

第2核酸鎖とコレステロール又はその類縁体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。

20

【0092】

第2核酸鎖とコレステロール又はその類縁体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。

【0093】

「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。

30

【0094】

「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。

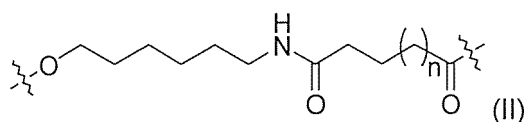
【0095】

前記リンカーの一具体例として、以下の一般式IIで表わされるリンカーが挙げられる。

40

【0096】

【化2】



[式中、nは0又は1を表す。]

【0097】

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

50

分をさらに含んでいてもよい。「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。機能性部分の第2核酸鎖における結合位置及び結合の種類は、コレステロール又はその類縁体と第2核酸鎖との結合について上に記載される通りである。

【0098】

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骨格筋又は心筋での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、ノーザンブロッティング、定量PCR、又はウェスタンブロッテ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。骨格筋細胞又は心筋細胞内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。前記判定の基準は、限定はしないが、標的遺伝子の発現量又は標的転写産物の測定値が、陰性対照(例えばビヒクル投与)の測定値と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、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、本発明の二本鎖核酸複合体が骨格筋又は心筋にアンチセンス効果をもたらしたと判定すればよい。

【0099】

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。

【0100】

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もできる。

【0101】

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。あるいは、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、後述するアニー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。

【0102】

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。この方法で製造した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一つを製造することができる。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

。上記アニール工程は、室温（約10 ～ 約35 ）に約5～60分間静置することで、行うことができる。第1核酸鎖及び第2核酸鎖をそれぞれ、約70 ～ 98 の緩衝液（例えばリン酸緩衝生理食塩水）又は水中で溶解し、得られた2つの溶液を混合し、混合液を約70 ～ 98 で数分間（例えば5分間）保持し、その後、混合液を約30 ～ 70 （又は30 ～ 50 ）で約1～8時間保持して、本発明の一部の実施形態の二本鎖核酸複合体を調製してもよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖はそれぞれ、室温（約10 ～ 約35 ）で緩衝液（例えばリン酸緩衝生理食塩水）又は水中で溶解することもできる。二本鎖核酸複合体の作製時におけるアニーリングの条件（時間及び温度）は、上記条件に限定されない。また、核酸鎖のアニーリングを促進するのに適した条件は、当該技術分野において周知である。

【0103】

1 - 5 . 効果

本発明の二本鎖核酸複合体は、被検体の骨格筋又は心筋に効率的に送達され、当該部位において、標的遺伝子に対してアンチセンス効果をもたらし、その発現を抑制することができる。したがって、この二本鎖核酸複合体を有効成分として用いることにより、被検体の骨格筋又は心筋における標的遺伝子の発現によって発症又は重篤化し得る、筋疾患のような疾患を治療又は予防することができる。

【0104】

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、及び/又は骨格筋又は心筋への薬剤送達分子として包含する。前記第1態様の二本鎖核酸複合体は、骨格筋又は心筋にて標的転写産物の発現量をアンチセンス効果によって調節することができる。したがって、本発明の医薬組成物を被検体に投与することで、二本鎖核酸複合体を被検体の骨格筋又は心筋に送達し、当該部位で発症し得る疾患、例えば、筋疾患を治療することができる。本発明の医薬組成物は、本質的に前記第1態様の二本鎖核酸複合体からなるものであってもよい。すなわち、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に加えて、担体等の補助的な成分をさらに含んでもよい。また、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のみからなるものであってもよい。

【0105】

2 - 2 . 構成

以下、本発明の医薬組成物は、有効成分及び担体を必須成分として包含し得る。各成分について具体的に説明をする。

【0106】

2 - 2 - 1 . 有効成分

有効成分は、本発明の医薬組成物における必須成分の構成成分である。本発明の医薬組成物は、有効成分として少なくとも前記第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、前記二本鎖核酸複合体を二種以上含むことができる。

【0107】

医薬組成物に含まれる前記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、送達すべき部位（骨格筋か心筋か）、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。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 8 】

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。

【 0 1 0 9 】

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。

10

【 0 1 1 0 】

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。

【 0 1 1 1 】

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、標的部位である骨格筋又は心筋にまで送達し、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。

20

【 0 1 1 2 】

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。

【 0 1 1 3 】

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。

30

【 0 1 1 4 】

投与方法が経口投与であれば、好ましい剤形は、固形剤（錠剤、カプセル剤、ドロップ剤、トローチ剤を含む）、顆粒剤、粉剤、散剤、液剤（内用水剤、乳剤、シロップ剤を含む）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。

40

【 0 1 1 5 】

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であればよく、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。

【 0 1 1 6 】

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）、気管/気管

50

支投与、及び直腸投与、並びに輸血による投与が挙げられる。本発明の適用対象部位が骨格筋又は心筋であることを鑑みれば、対象部位である筋肉内注射投与、静脈内点滴投与は好適である。

【0117】

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。

10

【0118】

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。

20

【0119】

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。

【0120】

2-4. 適用対象疾患

医薬組成物の適用対象となる疾患は、骨格筋又は心筋において標的遺伝子の発現に伴い発症し得る、又は重篤化し得る疾患である。例えば、限定はしないが、筋疾患が挙げられる。

30

【0121】

本発明において「筋疾患」とは、筋細胞（骨格筋細胞、又は心筋細胞を含む）が原因で、筋力低下を生じる疾患の総称である。例えば、筋ジストロフィー、ミオパチー、炎症性筋疾患（多発性筋炎、皮膚筋炎を含む）、ダノン病、筋無力症候群、ミトコンドリア病、ミオグロビン尿症、糖原病、周期性四肢麻痺、遺伝性心筋症、肥大型心筋症、拡張型心筋症、遺伝性を含めた不整脈等が含まれる。また、他臓器に一義的な原因があり、二次的に骨格筋又は心筋細胞に機能不全をきたし得る疾患も含まれる。例えば、神経変性疾患、サルコペニア、カヘキシア等が含まれる。

40

【0122】

2-5. 薬剤送達

本発明の医薬組成物は、有効成分として含有する第1態様の二本鎖核酸複合体が骨格筋又は心筋に効率的に送達され得ることを利用して、特定の薬剤を第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖に結合させることによって、その薬剤を骨格筋又は心筋に送達することができる。骨格筋又は心筋に送達される薬剤は、限定されないが、ペプチド、タンパク質又は核酸薬剤、あるいはその他の有機化合物等、例えば抗腫瘍薬、ホルモン薬、抗生物質、抗ウイルス剤、抗炎症薬等が挙げられる。好ましい薬剤は、小分子薬剤である。小分子薬剤は、当該技術分野において当業者に十分に理解されている。典型的には、1,000ダルトン未満の

50

分子量を有する薬剤を指す。薬剤は、親油性薬剤であってもよい。核酸薬剤としては、特に限定されないが、ASO、アンタゴmiR、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド、アプタマー、一本鎖siRNA、マイクロRNA、プレ-マイクロRNA等が挙げられる。薬剤の第2核酸鎖における結合位置及び結合の種類は、コレステロール又はその類縁体と第2核酸鎖との結合について上述の通りである。

【0123】

2-6. 効果

骨格筋又は心筋において、特定の遺伝子の発現によって発症し得る筋疾患等を治療又は予防することができる。

【0124】

本発明の医薬組成物は、以下の実施例で開示される通り、効率的に骨格筋又は心筋に送達され、該部位で標的遺伝子の発現又は標的転写産物のレベルを効果的に抑制することができる。したがって、被検体の骨格筋又は心筋において標的転写産物の発現量を減少させる方法であって、上記の二本鎖核酸複合体を含む医薬組成物を被検体に投与することを含む、方法が提供される。当該方法は、被検体の筋疾患を治療する方法であってもよい。また、被検体の骨格筋又は心筋に薬剤を送達する方法であって、上記の二本鎖核酸複合体を含む医薬組成物を被検体に投与することを含む、薬剤送達方法も提供される。

【実施例】

【0125】

<実施例1>

(目的)

SR-B1遺伝子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとトコフェロール又はコレステロール結合型相補鎖からなる二本鎖核酸複合体剤による組織内mRNA発現のin vivo阻害効果について検証する。

【0126】

(方法)

(1) 核酸の調製

標的遺伝子は、スカベンジャー受容体B1(scavenger receptor B1、SR-B1)とした。本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表1に示す。

【0127】

【表1】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mSR-B1)	<u>T</u> * <u>C</u> *a*g*t*c*a*t*g*a*c*t* <u>T</u> * <u>C</u>	7
第2核酸鎖	Toc#1-cRNA (mSR-B1)	Toc-g* <u>a</u> *AGUCAUGACU* <u>g</u> * <u>a</u>	8
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA (mSR-B1)	Chol-g* <u>a</u> *AGUCAUGACU* <u>g</u> * <u>a</u>	8

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシン LNA を表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Toc: トコフェロール; Chol: コレステロール

【0128】

上記第1核酸鎖は、マウスのSR-B1遺伝子を標的とし、その転写産物であるSR-B1 mRNA(GenBankアクセッション番号NM_016741、配列番号1)の2479~2492位に相補的な塩基配列を有する14merの一本鎖LNA/DNAギャップマーで構成される。より具体的には、このLNA/DNAギャップマーは、5'末端及び3'末端からそれぞれ2個がLNAヌクレオシドで構成され、それらの間の10個がDNAヌクレオシドからなる。

【0129】

上記第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な配列を有し、かつその5'末端にトコフェロー

10

20

30

40

50

ルを結合したトコフェロール結合型相補鎖RNA(Toc#1-cRNA(mSR-B1))又は、コレステロールを結合したコレステロール結合型相補鎖RNA(Chol#1-cRNA(mSR-B1))で構成されている。

【0130】

上記第1核酸鎖を2種の第2核酸鎖のいずれかとアニールさせることにより、本発明の二本鎖核酸複合体剤であるトコフェロール結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド(Tocopherol-conjugated heteroduplex oligonucleotide、以下「Toc-HDO」と表記する)又はコレステロール結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド(Cholesterol-conjugated heteroduplex oligonucleotide、以下「Chol-HDO」と表記する)を調製した。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上記の二本鎖核酸複合体剤を調製した。アニールした核酸を4℃又は氷上で保存した。調製後の二本鎖核酸複合体剤を「Toc#1HDO(mSR-B1)」又は「Chol#1HDO(mSR-B1)」と称する。

10

【0131】

二本鎖核酸複合体剤の比較対象には、従来的一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)(対照ASO)を用いた。この対照ASOは、前記二本鎖核酸複合体剤の第1核酸鎖と同じ構成を有する。調製後の一本鎖ASOを「ASO(mSR-B1)」とした。

【0132】

(2) in vivo実験

二本鎖核酸複合体剤等を投与するマウスは、体重20gの6~7週齢の雄のC57BL/6マウスを用いた。本実施例において、以降、マウスを使用する実験は、全てn=4で実施した。

20

二本鎖核酸複合体剤及び対照のASO(mSR-B1)を、それぞれ単回投与で、尾静脈を通じて50 mg/kgの量でマウスに静脈内注射した。さらに、陰性対照群としてPBSのみを単回投与で注射したマウスも作製した。

【0133】

(3) 発現解析

投与後72時間の時点でPBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、及び固有背筋を摘出した。続いて、ハイスループット全自動核酸抽出装置MagNA Pure 96(ロシュ・ライフサイエンス社)を使用して、各組織からmRNAをプロトコルに従って抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master(ロシュ・ライフサイエンス社)のプロトコルに従って合成した。定量RT-PCRは、TaqMan(ロシュ・ライフサイエンス社)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、様々な遺伝子数に基づいて、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社(Thermo Fisher Scientific)によって設計及び製造された製品を用いた。PCR条件(温度及び時間)は、95℃で15秒、60℃で30秒、及び72℃で1秒を1サイクルとして、40サイクルの繰り返しとした。得られた増幅産物を定量RT-PCRによって定量し、その結果に基づいて、mRNA(SR-B1)の発現量/mRNA(ACTB; 内部標準遺伝子)の発現量をそれぞれ計算し、相対的発現レベルを得た。相対的発現レベルの平均値及び標準誤差を算出した。また各群の結果を比較し、さらにt-検定によって結果を評価した。

30

【0134】

(結果)

図3に結果を示す。図3は、トコフェロール又はコレステロールが結合したSR-B1遺伝子を標的遺伝子とする本発明の二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mSR-B1)、及びChol#1HDO(mSR-B1))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的SR-B1遺伝子の発現抑制効果を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。

40

【0135】

Toc#1HDO(mSR-B1)及びChol#1HDO(mSR-B1)は、各種骨格筋及び心筋において、いずれも一本鎖の対照ASO(mSR-B1)と比較して著しい標的遺伝子の発現抑制効果が見られた。

50

【0136】

<実施例2>

(目的)

malat1遺伝子を標的とし、第2核酸鎖がトコフェロール又はコレステロール結合型相補鎖からなる二本鎖核酸複合体剤の単回投与により、組織内mRNA発現のin vivo阻害効果について検証した。

【0137】

(方法)

(1)核酸の調製

標的遺伝子は、転位関連肺腺癌転写産物(malat1)とした。本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表2に示す。

10

【0138】

【表2】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)	C* <u>T</u> A*g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> G*C	9
第2核酸鎖	Toc#1-cRNA(mMalat1)	Toc-g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> *a*g	10
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mMalat1)	Chol-g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> *a*g	10

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシンLNAを表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチルRNA; *: ホスホロチオエート結合(PS結合); Toc: トコフェロール; Chol:コレステロール

20

【0139】

上記第1核酸鎖は、マウスのmalat1遺伝子を標的とし、その転写産物であるmalat1ノンコーディングRNA(GenBankアクセッション番号NR_002847、配列番号3)を標的とする1316~1331位に相補的な塩基配列を有する16merの一本鎖LNA/DNAギャップマーで構成される。より具体的には、このLNA/DNAギャップマーは、5'末端及び3'末端からそれぞれ3個がLNAヌクレオシドで構成され、それらの間の10個がDNAヌクレオシドからなる。

30

【0140】

一方、第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な配列を有し、かつその5'末端にトコフェロールを結合したトコフェロール結合型相補鎖RNA(Toc#1-cRNA(mMalat1))又は、コレステロールを結合したコレステロール結合型相補鎖RNA(Chol#1-cRNA(mMalat1))で構成されている。

【0141】

上記第1核酸鎖を2種の第2核酸鎖のいずれかと等モル量で混合し、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2つの核酸鎖をアニールして上記の二本鎖核酸複合体剤を調製した。アニールした核酸は4℃又は氷上で保存した。調製後の二本鎖核酸複合体剤を「Toc#1HDO(mMalat1)」又は「Chol#1HDO(mMalat1)」と称する。

40

【0142】

二本鎖核酸複合体剤の比較対象には、従来的一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)(対照ASO)を用いた。この対照ASOは、前記二本鎖核酸複合体剤の第1核酸鎖と同じ構成を有する。調製後的一本鎖ASOを「ASO(mMalat1)」とした。

【0143】

(2)in vivo実験

二本鎖核酸複合体剤等を投与するマウスは、体重20gの6~7週齢の雄のC57BL/6マウスを用いた。

二本鎖核酸複合体剤及び対照ASOを、単回投与で、マウスにそれぞれ尾静脈を通じて50

50

mg/kgの量で静脈内注射した。さらに、陰性対照群としてPBSのみを単回投与で注射したマウスも作製した。

【0144】

(3) 発現解析

投与後72時間の時点でPBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、及び固有背筋を摘出した。続いて、ハイスループット全自動核酸抽出装置MagNA Pure 96(ロシュ・ライフサイエンス社)を使用して、各組織からmRNAをプロトコルに従って抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master(ロシュ・ライフサイエンス社)のプロトコルに従って合成した。定量RT-PCRは、TaqMan(ロシュ・ライフサイエンス社)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、様々な遺伝子数に基づいて、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社(Thermo Fisher Scientific)によって設計及び製造された製品を用いた。PCR条件(温度及び時間)は、95で15秒、60で30秒、及び72で1秒を1サイクルとして、40サイクルの繰り返しとした。得られた増幅産物を定量RT-PCRによって定量し、その結果に基づいて、mRNA(malal1)の発現量/mRNA(ACTB; 内部標準遺伝子)の発現量をそれぞれ計算し、相対的発現レベルを得た。相対的発現レベルの平均値及び標準誤差を算出した。また各群の結果を比較し、さらにt-検定によって結果を評価した。

10

【0145】

(結果)

図4に結果を示す。図4は、トコフェロール又はコレステロールが結合した二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mMalat1)、Chol#1HDO(mMalat1))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的Malat1遺伝子の発現抑制効果を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。

20

【0146】

Toc#1HDO(mMalat1)及びChol#1HDO(mMalat1)は、各種骨格筋及び心筋において、いずれも一本鎖の対照ASO(mMalat1)と比較して著しい標的遺伝子の発現抑制効果が見られた。

【0147】

<実施例3>

(目的)

DMPK遺伝子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとトコフェロール又はコレステロール結合型相補鎖からなる二本鎖核酸複合体剤の単回投与による組織内mRNA発現のin vivo阻害効果について実施例1及び2と同様に検証した。

30

【0148】

(方法)

(1) 核酸の調製

標的遺伝子は、DMPK(dystrophia myotonica-protein kinase)遺伝子とした。ミオトニンプロテインキナーゼをコードするDMPK遺伝子は、筋ジストロフィーの中でも成人で発症頻度が最も高い筋緊張性ジストロフィーの原因遺伝子として知られており、DMPK遺伝子の3'非翻訳領域に存在するCTG反復配列の異常な伸長が該疾患の原因とされている。

40

【0149】

本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表3に示す。

【0150】

【表 3】

	オリゴヌクレオチド名	配列 (5'-3')	配列番号
第 1 核酸鎖	ASO (mDMPK)	<u>A</u> * <u>C</u> * <u>A</u> * <u>a</u> * <u>t</u> * <u>a</u> * <u>a</u> * <u>t</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>c</u> * <u>g</u> * <u>A</u> * <u>G</u> * <u>G</u>	11
第 2 核酸鎖	Toc#1-cRNA (mDMPK)	Toc- <u>c</u> * <u>c</u> * <u>u</u> *CGGUUUUU <u>u</u> * <u>g</u> * <u>u</u>	12
第 2 核酸鎖	Chol#1-cRNA (mDMPK)	Chol- <u>c</u> * <u>c</u> * <u>u</u> *CGGUUUUU <u>u</u> * <u>g</u> * <u>u</u>	12

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシン LNA を表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Toc: トコフェロール; Chol: コレステロール

10

【0151】

上記第1核酸鎖は、マウスのDMPK遺伝子を標的とし、その転写産物であるDMPK mRNA (GenBankアクセッション番号NM_032418、配列番号5)を標的とする2682~2697位に相補的な塩基配列を有する16merの一本鎖LNA/DNAギャップマーで構成される。より具体的には、このLNA/DNAギャップマーは、5'末端及び3'末端からそれぞれ3個がLNAヌクレオチドで構成され、それらの間の10個がDNAヌクレオチドからなる。

【0152】

上記第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な配列を有し、かつその5'末端にトコフェロールを結合したトコフェロール結合型相補鎖RNA (Toc#1-cRNA (mDMPK)) 又は、コレステロールを結合したコレステロール結合型相補鎖RNA (Chol#1-cRNA (mDMPK)) で構成されている。

20

【0153】

上記第1核酸鎖を第2核酸鎖のいずれかとアニールさせることにより、本発明の二本鎖核酸複合体剤であるToc-HDO又はコレステロール結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド Chol-HDOを調製した。具体的には、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上記の二本鎖核酸複合体剤を調製した。アニールした核酸を室温、4℃又は氷上で保存した。調製後の二本鎖核酸複合体剤を「Toc#1HDO (mDMPK)」又は「Chol#1HDO (mDMPK)」と称する。

30

【0154】

二本鎖核酸複合体剤の比較対象には、従来的一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) (対照ASO) を用いた。この対照ASOは、前記二本鎖核酸複合体剤の第1核酸鎖と同じ構成を有する。調製後の一本鎖ASOを「ASO (mDMPK)」とした。

【0155】

(2) in vivo実験

二本鎖核酸複合体剤等を投与するマウスは、体重20gの6~7週齢の雄のC57BL/6マウスを用いた。

二本鎖核酸複合体剤及び対照ASOを、単回投与で、マウスにそれぞれ尾静脈を通じて12.5 mg/kg、25 mg/kg、又は50 mg/kgの量で静脈内注射した。さらに、陰性対照群としてPBSのみを単回投与で注射したマウスも作製した。

40

【0156】

(3) 発現解析

投与後72時間の時点でPBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋 (Heart)、大腿四頭筋 (Quadriceps)、横隔膜 (Diaphragm)、固有背筋 (Back)、前脛骨筋 (tibialis anterior: TA)、腓腹筋 (gastrocnemius: GC)、及び上腕三頭筋 (triceps brachii: TB) を摘出した。続いて、ハイスループット全自動核酸抽出装置 MagNA Pure 96 (ロシュ・ライフサイエンス社) を使用して、各組織からmRNAをプロトコルに従って抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master (ロシュ・ライフサイエンス社) のプロトコルに従って合成した。定量RT-PCRは、TaqMan (ロシュ・ライフサイ

50

エンス社)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、様々な遺伝子数に基づいて、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社(Thermo Fisher Scientific)によって設計及び製造された製品を用いた。PCR条件(温度及び時間)は、95 で15秒、60 で30秒、及び72 で1秒を1サイクルとして、40サイクルの繰り返しとした。得られた増幅産物を定量RT-PCRによって定量し、その結果に基づいて、mRNA(DMPK)の発現量/mRNA(ACTB ; 内部標準遺伝子)の発現量をそれぞれ計算し、相対的発現レベルを得た。相対的発現レベルの平均値及び標準誤差を算出した。また各群の結果を比較し、さらにt-検定によって結果を評価した。

【 0 1 5 7 】

(結果)

図5 ~ 7に結果を示す。図5、図6、及び図7は、それぞれトコフェロール又はコレステロールが結合した二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mDMPK)、及びChol#1HDO(mDMPK))を12.5mg/kg、25 mg/kg、そして50mg/kgで投与した時の腓腹筋(GC)、前脛骨筋(TA)、上腕三頭筋(TB)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)、及び心筋(Heart)における標的DMPK遺伝子の発現抑制効果を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。

10

【 0 1 5 8 】

Toc#1HDO(mDMPK)及びChol#1HDO(mDMPK)は、各種骨格筋及び心筋において、いずれも一本鎖の対照ASO(mDMPK)と比較して標的遺伝子に対する有意な発現抑制効果が見られた。特に、Chol#1HDO(mDMPK)ではその効果が量依存的に顕著であった。

20

【 0 1 5 9 】

< 実施例 4 : DNAのみ >

(目的)

第2核酸鎖がDNAで構成された二本鎖核酸複合体剤において、トコフェロール及びコレステロールが結合した二本鎖核酸複合体の単回投与による心筋及び骨格筋における標的遺伝子発現のin vivo阻害効果を検証した。

【 0 1 6 0 】

(方法)

(1) 核酸の調製

本実施例の二本鎖核酸複合体剤の基本構成は、第2核酸鎖で -トコフェロール及びコレステロールが結合している。第2核酸鎖が全てDNAで構成されている点で、実施例2とは異なる。本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表4に示す。

30

【 0 1 6 1 】

【 表 4 】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> * <u>g</u> * <u>t</u> * <u>t</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>c</u> * <u>t</u> * <u>g</u> * <u>a</u> * <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	9
第2核酸鎖	Toc#1-cDNA(mMalat1)	Toc- <u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>t</u> t <u>c</u> a <u>g</u> t <u>g</u> a <u>a</u> c* <u>t</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	13
第2核酸鎖	Chol#1-cDNA(mMalat1)	Chol- <u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> * <u>t</u> t <u>c</u> a <u>g</u> t <u>g</u> a <u>a</u> c* <u>t</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	13

40

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシン LNA を表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合(PS結合); Toc: トコフェロール; Chol: コレステロール

【 0 1 6 2 】

上記第1核酸鎖は、実施例2で調製した第1核酸鎖を用いた。

第2核酸鎖は、実施例2で調製した第2核酸鎖のコレステロール結合型相補鎖RNA(Chol#1-cRNA(mMalat1))と同様に、第1核酸鎖に相補的な配列を有し、かつその5'末端にコレステロールを結合しているが、実施例2の第2核酸鎖とは異なり全てDNAで構成されている。

50

【0163】

二本鎖核酸複合体剤の調製は、実施例2に記載の方法に準じた。第2核酸鎖として、Toc#1-cDNA(mMalat1)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Toc#1DNA/DNA」と、またChol#1-cDNA(mMalat1)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Chol#1DNA/DNA」と称する。また、二本鎖核酸複合体剤の比較対象には、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)(ASO(mMalat1))を用いた。

【0164】

(2) in vivo実験

基本的な手順は、実施例2に記載の方法に準じた。マウスに50 mg/kgで二本鎖核酸複合体剤を単回投与した。

【0165】

(3) 発現解析

最終投与の72時間後、PBSをマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜の各部位を別々に摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、定量RT-PCR、及びmalat1 mRNAの発現レベルの評価は、実施例2に準じた。

【0166】

(結果)

図8に結果を示す。図8は、コレステロールが結合した二本鎖核酸複合体Chol#1DNA/DNAによる心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)における標的malat1遺伝子の発現抑制効果を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。

【0167】

DNAのみで構成された第2核酸鎖に、コレステロールを結合させても、各種骨格筋及び心筋において、一本鎖の対照ASO(mMalat1)やトコフェロールと比較して、いずれも著しい標的遺伝子の発現抑制効果が確認された。

【0168】

<実施例5>

(目的)

実施例4と同様に、第2核酸鎖がDNAのみで構成され、かつ様々なヌクレオシド間結合の修飾パターンを有するコレステロール結合型相補鎖で構成された二本鎖核酸複合体の単回投与による心筋及び骨格筋における標的遺伝子発現のin vivo阻害効果を検証した。

【0169】

(方法)

(1) 核酸の調製

標的遺伝子は、malat1とした。本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表5に示す。

【0170】

【表5】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	9
第2核酸鎖	Chol#1-cDNA(mMalat1)	Chol-g*c*a*ttcagtgaa*c*t*a*g	29
第2核酸鎖	Chol#1-cDNA(mMalat1)(PS)	Chol-g*c*a* <u>t</u> *t*c*a*g*t*g*a*a*c*t*a*g	13
第2核酸鎖	Chol#1-cDNA(mMalat1)(PO)	Chol-gcattcagtgaa <u>cuag</u>	13

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシンLNAを表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチルRNA; *: ホスホロチオエート結合(PS結合); Chol:コレステロール

【0171】

Chol#1-cDNA(mMalat1)(PS)は、全ヌクレオシド間がホスホロチオエート結合であり、Chol#1-cDNA(mMalat1)(PO)は、全ヌクレオシド間がホスホジエステル結合である。

【0172】

二本鎖核酸複合体剤の調製は、実施例2に記載の方法に準じた。第2核酸鎖としてChol#1-cDNA(mMalat1)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Chol#1DNA/DNA」、Chol#1-cDNA(mMalat1)(PS)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Chol#1DNA/DNA-PS」、そしてChol#1-cDNA(mMalat1)(PO)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Chol#1DNA/DNA-PO」と称する。

【0173】

(2) in vivo実験

基本的な手順は、実施例2に記載の方法に準じた。マウスに50 mg/kgで二本鎖核酸複合体剤を単回投与した。

10

【0174】

(3) 発現解析

投与後72時間の時点、PBSをマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して心筋、横隔膜、固有背筋の各部位を別々に摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、定量RT-PCR、及びmalat1 mRNAの発現レベルの評価は、実施例2に準じた。

【0175】

(結果)

図9に結果を示す。図9から、第2核酸鎖がDNAのみで構成されている場合、全ヌクレオシド間が全てホスホロチオエート結合、又は全てホスホジエステル結合であっても各種骨格筋及び心筋において、実施例4と同様に、いずれも著しい標的遺伝子の発現抑制効果が確認された。

20

【0176】

<実施例6>

(目的)

第2核酸鎖が様々なヌクレオシド間結合の修飾パターンを有するコレステロール結合型相補鎖で構成された二本鎖核酸複合体を単回投与したときの心筋及び骨格筋におけるin vivo阻害効果を検証した。

【0177】

(方法)

(1) 核酸の調製

標的遺伝子は、malat1とした。本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表6に示す。

30

【0178】

【表6】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	9
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mMalat1)(PO)	Chol-gcaUUCAGUGAACuag	10
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mMalat1)(5'PS)	Chol-g*c*a*UUCAGUGAACuag	10
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mMalat1)(3'PS)	Chol-gcaUUCAGUGAAC*u*a*g	10

40

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシン LNAを表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS結合); Chol:コレステロール

【0179】

Chol#1-cRNA(mMalat1)(PO)は、ヌクレオシド間結合に修飾のないホスホロチオエート結合のみで構成され、Chol#1-cRNA(mMalat1)(5'PS)及びChol#1-cRNA(mMalat1)(3'PS)は、それぞれコレステロールが結合している5'末端及び3'末端から3ヌクレオシド間がホスホロチオエート結合(PS)で連結された構成を有する。

【0180】

二本鎖核酸複合体剤の調製は、実施例2に記載の方法に準じた。第1核酸鎖としてASO(

50

mMalat1)をまた第2核酸鎖としてChol#1-cRNA(mMalat1)(PO)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Chol#1HDO(PO)」、Chol#1-cRNA(mMalat1)(5'PS)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Chol#1HDO(5'PS)」、そしてChol#1-cRNA(mMalat1)(3'PS)を用いて調製した二本鎖核酸複合体剤を「Chol#1HDO(3'PS)」と称する。

【0181】

(2) in vivo実験

基本的な手順は、実施例2に記載の方法に準じた。マウスに50 mg/kgで二本鎖核酸複合体剤を単回投与した。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。

【0182】

(3) 発現解析

投与後72時間の時点、PBSをマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、固有背筋の各部位を別々に摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、定量RT-PCR、及びmalat1 mRNAの発現レベルの評価は、実施例2に準じた。

【0183】

(結果)

図10に結果を示す。図10は、コレステロールが結合した二本鎖核酸複合体Chol#1HDO(PO)、Chol#1HDO(5'PS)、そしてChol#1HDO(3'PS)による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的Malat1遺伝子の発現抑制効果を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。

【0184】

いずれの二本鎖核酸複合体もmalat1ノンコーディングRNAの発現を顕著に抑制することができた。特に、Chol#1HDO(3'PS)のように3'末端から修飾ヌクレオシド間結合を有する場合に発現阻害活性が増加する傾向が示された。

【0185】

<実施例7>

(目的)

malat1遺伝子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとトコフェロール又はコレステロール結合型相補鎖からなる二本鎖核酸複合体剤の複数回投与による組織内mRNA発現のin vivo阻害効果について検証した。

【0186】

(方法)

(1) 核酸の調製

二本鎖核酸複合体剤は、実施例2で調製したToc#1HDO(mMalat1)及びChol#1HDO(mMalat1)を、一本鎖の対照ASOはASO(mMalat1)を用いた。

【0187】

(2) in vivo実験

二本鎖核酸複合体剤等を投与するマウスは、体重20gの6~7週齢の雄のC57BL/6マウスを用いた。

二本鎖核酸複合体剤及び対照ASOを、1回の投与あたり50 mg/kgの量でマウスに尾静脈を通じて静脈内注射した。投与は、週1回行い、4週間にわたり計4回行った。さらに、陰性対照群としてPBSのみを単回投与で注射したマウスも作製した。

【0188】

(3) 発現解析

最終投与後72時間の時点でPBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、及び固有背筋を摘出した。続いて、ハイスループット全自動核酸抽出装置MagNA Pure 96(ロシュ・ライフサイエンス社)を使用して、各組織からmRNAをプロトコルに従って抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master(ロシュ・ライフサイエンス社)のプロトコルに従って合成した。定量RT-PCRは、TaqMan(ロシュ・ライフサイエンス社)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、様々な遺伝子数に基づいて、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社(Thermo F

10

20

30

40

50

isher Scientific)によって設計及び製造された製品を用いた。PCR条件(温度及び時間)は、95 で15秒、60 で30秒、及び72 で1秒を1サイクルとして、40サイクルの繰り返しとした。得られた増幅産物を定量RT-PCRによって定量し、その結果に基づいて、mRNA(malat1)の発現量/mRNA(ACTB ; 内部標準遺伝子)の発現量をそれぞれ計算し、相対的発現レベルを得た。相対的発現レベルの平均値及び標準誤差を算出した。また各群の結果を比較し、さらにt-検定によって結果を評価した。

【0189】

(結果)

図11に結果を示す。図11は、トコフェロール又はコレステロールが結合した二本鎖核酸複合体(それぞれToc#1HDO(mMalat1)、Chol#1HDO(mMalat1))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的Malat1遺伝子の発現抑制効果を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。

10

【0190】

Toc#1HDO(mMalat1)及びChol#1HDO(mMalat1)は、各種骨格筋及び心筋において、いずれも複数回の投与により標的遺伝子(malat1)発現抑制効果がさらに増強することが明らかとなった。

【0191】

<実施例8>

(目的)

DMPK遺伝子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとコレステロール結合型相補鎖からなる二本鎖核酸複合体剤の複数回投与による組織内mRNA発現のin vivo阻害効果について検証した。

20

【0192】

(方法)

(1) 核酸の調製

二本鎖核酸複合体剤は、実施例3で調製したChol#1HDO(mDMPK)を用いた。

【0193】

(2) in vivo実験

二本鎖核酸複合体剤等を投与するマウスは、体重20gの6~7週齢の雄のC57BL/6マウスを用いた。

30

二本鎖核酸複合体剤を、1回の投与あたり50 mg/kgの量でマウスに尾静脈を通じて静脈内注射した。投与は週2回で計4回行った。さらに、陰性対照群としてPBSのみを単回投与で注射したマウスも作製した。

【0194】

(3) 発現解析

最終投与後72時間の時点で、PBSをマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、固有背筋の各部位を別々に摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、定量RT-PCR、及びDMPK mRNAの発現レベルの評価は、実施例8に準じた。

【0195】

(結果)

図12に結果を示す。図12は、コレステロールが結合した二本鎖核酸複合体(Chol#1HDO(mDMPK))による心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、固有背筋(Back)における標的DMPK遺伝子の発現抑制効果を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。

40

【0196】

Chol#1HDO(mDMPK)は、各種骨格筋及び心筋において、陰性対照(PBSのみ)と比較して、いずれも複数回の投与により標的遺伝子(DMPK)発現抑制効果がさらに増強することが明らかとなった。

【0197】

50

< 実施例 9 >

(目的)

二本鎖核酸複合体剤の長期間にわたる心筋及び骨格筋の組織内におけるmRNA発現の単回投与によるin vivo阻害効果を評価する実験を検証した。

【 0 1 9 8 】

(方法)

(1) 核酸の調製

二本鎖核酸複合体剤は、実施例 2 で調製したChol#1HDO(mMalat1)を用いた。

【 0 1 9 9 】

(2) in vivo実験

二本鎖核酸複合体剤を実施例 2 と同様の方法でマウスに単回投与した。

【 0 2 0 0 】

(3) 発現解析

投与後3日、7日、14日、28日、56日、及び168日の時点でPBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、固有背筋、肝臓、腎臓、大腸、及び肺を摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、及び定量RT-PCR、及びmalat1ノンコーディングRNAの発現レベルの評価は、実施例 2 に記載の方法に準じた。

【 0 2 0 1 】

(結果)

図 1 3 及び 1 4 に結果を示す。

図 1 3 は、コレステロールが結合した二本鎖核酸複合体による心筋、及び骨格筋部位における標的遺伝子(malat1)の発現抑制効果を示すグラフである。縦軸はmalat1ノンコーディングRNAの相対発現量、横軸は投与後の経過期間(日)を示す。エラーバーは各々の標準誤差を示す。図 1 3 aは心筋(Heart)、図 1 3 bは固有背筋(Back)、図 1 3 cは大腿四頭筋(Quadriceps)、図 1 3 dは横隔膜(Diaphragm)である。

【 0 2 0 2 】

図 1 4 は、陰性対照(PBSのみ)と比較したときの、投与後8週間(56日)目の各組織におけるmalat1ノンコーディングRNAの相対発現量を示す。

【 0 2 0 3 】

図 1 3 及び 1 4 から、Chol#1HDO(mMalat1)は、陰性対照と比較して、心筋、大腿四頭筋、横隔膜、固有背筋のいずれにおいてもmalat1ノンコーディングRNAの発現を長期間にわたり顕著に抑制することが明らかとなった。また、その効果は、骨格筋では投与後8週間経過しても持続することも判明した。

【 0 2 0 4 】

< 実施例 1 0 >

(目的)

二本鎖核酸複合体を様々な用量で投与したときの心筋及び骨格筋の組織内におけるmRNA発現の単回投与によるin vivo阻害効果を検証した。

【 0 2 0 5 】

(方法)

(1) 核酸の調製

実施例 2 で調製した二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(mMalat1)を用いた。

【 0 2 0 6 】

(2) in vivo実験

二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(mMalat1)を、単回投与で、マウスに尾静脈を通じて12.5 mg/kg、25.0 mg/kg、50 mg/kg又は75 mg/kgの量で静脈内注射した。

【 0 2 0 7 】

(3) 発現解析

投与72時間後、PBSをマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、固有背筋の各部位を別々に摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合

10

20

30

40

50

成、定量RT-PCR、及びmalat1 mRNAの発現レベルの評価は、実施例 2 に準じた。

【 0 2 0 8 】

(結果)

結果を図 1 5 に示す。Chol#1HDO(mMalat1)は、心筋及び骨格筋のいずれにおいても、用量依存的にmalat1 ノンコーディングRNAの発現を抑制できることが明らかとなった。

【 0 2 0 9 】

< 実施例 1 1 >

(目的)

第2核酸鎖にコレステロールと飽和脂肪酸基が結合した二本鎖核酸複合体剤の心筋及び骨格筋の組織内におけるmRNA発現の単回投与によるin vivo阻害効果を検証した。

10

【 0 2 1 0 】

(方法)

(1) 核酸の調製

標的遺伝子は、実施例 2 と同様にmalat1とした。本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖は、実施例 2 に記載の第1核酸鎖、すなわちマウスのmalat1遺伝子の転写産物であるmalat1 ノンコーディングRNAを標的とする16merの一本鎖LNA/DNAギャップマーASO(mMalat1)を用いた。一方、第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な配列を有し、かつその5'末端又は3'末端に、コレステロールが結合した鎖であって、コレステロールと第2核酸鎖の末端との間に炭素数 6 個の飽和脂肪酸基 (ヘキシル基) からなるリンカー(C6)を介在させた構成を有する。第2核酸鎖のそれぞれ名称は表 7 の通りである。

20

【 0 2 1 1 】

【 表 7 】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)	C <u>I</u> *A*g*t*t*c*a*c*t*g*a*a*I <u>G</u> *C	9
第2核酸鎖	5' Chol (C6)-cRNA (mMalat1)	Chol (C6)-g <u>c</u> *a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> *a*g	10
第2核酸鎖	3' Chol (C6)-cRNA (mMalat1)	g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> *a*g-Chol (C6)	10

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシン LNA を表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Chol:コレステロール

30

【 0 2 1 2 】

上記第1核酸鎖を第2核酸鎖の5'Chol(C6)-cRNA(mMalat1)又は3'Chol(C6)-cRNA(mMalat1)のいずれかとアニールさせることにより、本発明の二本鎖核酸複合体剤を調製した。具体的な調製方法については、実施例 2 に準じた。調製した二本鎖核酸複合体剤を5'Chol(C6)HDO及び3'Chol(C6)HDOと称する。

【 0 2 1 3 】

(2) in vivo実験

基本的な手順は、実施例 2 に記載の方法に準じた。マウスに50 mg/kgで二本鎖核酸複合体剤を単回投与した。

【 0 2 1 4 】

40

(3) 発現解析

投与後72時間の時点でPBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋 (Heart)、大腿四頭筋 (Quadriceps)、横隔膜 (Diaphragm)、及び固有背筋 (Back) を摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、及び定量RT-PCR、及びmalat1の発現レベルの評価は、実施例 2 に記載の方法に準じた。

【 0 2 1 5 】

(結果)

図 1 6 に結果を示す。第2核酸鎖の末端とコレステロールとの間にC6リンカーを介在させた場合であっても、二本鎖核酸複合体剤の心筋及び骨格筋の組織内におけるmRNA発現の単回投与によるin vivo阻害効果は確認された。その効果は、5'末端側に結合させた方が

50

より強い効果を示した。

【0216】

<実施例12>

(目的)

標的遺伝子に対する長さが異なる二本鎖核酸複合体剤による組織内mRNA発現のin vivo阻害効果を検証した。

【0217】

(方法)

(1) 核酸の調製

標的遺伝子は、実施例2と同様にmalat1とした。本実施例で用いた二本鎖核酸複合体剤を構成する第1核酸鎖は、実施例2に記載の第1核酸鎖、すなわちマウスのmalat1遺伝子の転写産物であるmalat1ノンコーディングRNAを標的とする13mer及び16merの一本鎖LNA/DNAギャップマーASO(mMalat1)を用いた。第2核酸鎖は、各第1核酸鎖の相補鎖で、5'末端にコレステロールが結合した構成を有する。本実施例で用いた第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び配列を表8に示す。

【0218】

【表8】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)16mer	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	9
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mMalat1)16mer	Chol-g*c*a*UUCAGUGAAC*u*a*g	30
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)13mer	<u>G</u> * <u>T</u> * <u>T</u> *c*a*c*t*g*a*a*t* <u>G</u> * <u>C</u>	14
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mMalat1)13mer	Chol-g*c*a*UUCAGUGA*a*c	15

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシンLNAを表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチルRNA; *: ホスホロチオエート結合(PS結合); Chol: コレステロール

【0219】

調製した16mer及び13merの二本鎖核酸複合体剤をそれぞれ「16mer Chol-HDO」及び「13mer Chol-HDO」と称する。

【0220】

(2) in vivo実験

基本的な手順は、実施例2に記載の方法に準じた。マウスに50 mg/kgで二本鎖核酸複合体剤を単回投与した。

【0221】

(3) 発現解析

投与後72時間の時点でPBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、及び固有背筋(Back)を摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、及び定量RT-PCR、及びmalat1の発現レベルの評価は、実施例2に記載の方法に準じた。

【0222】

(結果)

図17に結果を示す。図17は、標的遺伝子に対する長さが異なる二本鎖核酸複合体剤による全身の心筋・骨格筋部位における標的遺伝子(malat1)発現抑制効果を示すグラフである。心筋、大腿四頭筋、横隔膜、固有背筋の結果を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

【0223】

13mer Chol-HDO及び16merChol-HDO共に、陰性対照のPBSと比較して著しい発現阻害効果が確認された。特に13mer Chol-HDOでは顕著な効果が見られた。

【0224】

<実施例13>

(目的)

二本鎖核酸複合体の単回皮下投与による長期in vivo発現阻害効果を検証した。

【0225】

(方法)

(1) 核酸の調製

実施例2で調製した二本鎖核酸複合体剤Chol#1 HDO (malat1)を用いた。

【0226】

(2) in vivo実験

基本的な手順は、実施例7に記載の方法に準じるが、本実施例では、50 mg/kgで二本鎖核酸複合体剤をマウスに単回で皮下投与した。

10

【0227】

(3) 発現解析

皮下投与後の7日、14日、及び28日の時点で、PBSをマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、及び横隔膜(Diaphragm)を摘出した。得られた各組織からのRNA抽出、cDNA合成、及び定量RT-PCR、及びmalat1の発現レベルの評価は、実施例2に記載の方法に準じた。

【0228】

(結果)

結果を図18に示す。図18は、二本鎖核酸複合体剤を皮下投与したときの心筋、大腿四頭筋、及び横隔膜における標的遺伝子(malat1)の発現抑制効果を示すグラフである。エラーバーは標準誤差を示す。

20

【0229】

本発明の二本鎖核酸複合体剤は、静注のみならず、皮下投与においても長期に渡り、標的遺伝子の発現抑制効果を維持できることが立証された。

【0230】

<実施例14>

(目的)

本発明のコレステロール結合型二本鎖核酸複合体、及びコレステロール結合型ASOの投与による生体への毒性について検証した。

【0231】

30

(方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いた一本鎖核酸複合体を構成する第1核酸鎖の名称及び塩基配列を表9に示す。

【0232】

【表9】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	ASO(mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	9
第1核酸鎖	5'-Chol-DNA-ASO(mMalat1)	Chol-cttc <u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	16
第1核酸鎖	3'-Chol-ASO(mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u> -Chol	9
第1核酸鎖	3'-Chol-DNA-ASO(mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u> ccttc-Chol	17
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mMalat1)	Chol-g*c*a*UUCAGUGAAC*u*a*g	10

40

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシンLNAを表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチルRNA; *: ホスホロチオエート結合(PS結合); Chol:コレステロール

【0233】

上記第1核酸鎖は、マウスのmalat1遺伝子を標的とする上述の実施例に記載のASO(mMalat1)において、その5'末端又は3'末端にDNAリンカー(ccttc)を介して、又は介さずに

50

コレステロールが結合した構成を有する。

【0234】

(2) in vivo実験

基本的な手順は、実施例2に記載の方法に準じた。マウスに50 mg/kgで二本鎖核酸複合体剤を皮下及び静脈に単回投与した。

【0235】

(3) 発現解析

投与後72時間の時点で各マウスから採血し、LSIメディエンス社に血算の測定を外注委託した。

【0236】

(結果)

結果を図19及び20に示す。図19は、上述の一本鎖核酸複合体剤、陽性対照用の二本鎖核酸複合体剤Chol#1HDO(mMalat1)及び陰性対照用のPBSによる心筋(Heart)、大腿四頭筋(Quadriceps)、横隔膜(Diaphragm)、及び固有背筋(Back)におけるmalat1遺伝子の発現抑制効果を示すグラフである。s.c.は皮下投与を示す。エラーバーは標準誤差を示す。Chol-HDO及びChol-HDOs.c.共に、陰性対照のPBSと比較して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、及び固有背筋のいずれでも標的遺伝子(malat1遺伝子)の著しい発現阻害効果が確認された。また、一本鎖核酸複合体(3'-Chol-DNA-ASO(mMalat1))と比較しても、本発明の二本鎖核酸複合体(Chol-HDO(mMalat1))は、有意に標的遺伝子の発現を抑制した。特に、一本鎖核酸複合体を皮下投与した場合(3'-Chol-DNA-ASO(mMalat1)s.c.)には、標的遺伝子の発現抑制は確認できなかったが、本発明の二本鎖核酸複合体を皮下投与した場合(Chol-HDO(mMalat1)s.c.)であれば、強い抑制効果が認められた。

【0237】

図20は、各核酸複合体投与後の血中の血小板数を示す図である。s.c.は皮下投与を、またi.v.は静脈投与を示す。コレステロールが末端に結合した一本鎖核酸複合体(5'-Chol-DNA-ASO(mMalat1)、3'-Chol-DNA-ASO(mMalat1))と比較して本発明の二本鎖核酸複合体(5'-Chol-HDO(mMalat1)i.v.、5'-Chol-HDO(mMalat1)s.c.)は血小板数の低下が見られなかった。この結果は、本発明の二本鎖核酸複合体が一本鎖核酸複合体と比較して生体に対する毒性が低いことを示唆している。

【0238】

<実施例15>

(目的)

mdxマウス(デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス)のエクソン23/イントロン23境界領域をエクソンスキッピングの標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(モルホリノオリゴマー)とトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体の複数回投与による、全身の筋肉におけるエクソンスキッピング効果とジストロフィン発現を評価することを目的とする。

【0239】

マウス・ジストロフィン遺伝子エクソン23/イントロン23を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸剤による組織内エクソンスキッピング発現誘導のin vivo効果とジストロフィンタンパク質の発現を評価する実験を行った。

【0240】

(方法)

(1) 核酸の調製

二本鎖核酸複合体剤を、従来的一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)対照と比較した。対照(ASO)は、マウス・ジストロフィン(dystrophin)遺伝子のpre-mRNAのエクソン23/イントロン23を標的とする25merの一本鎖モルホリノとした。このASOは25merすべてモルホリノで構成されている。このモルホリノは、マウスのジストロフィン pre-mRNA(GenBankアクセッション番号:NC_000086.7)の83803536~83803512位に相

10

20

30

40

50

補的な塩基配列を有する。このモルホリノ(第1鎖)を、トコフェロール結合型Toc#1-cRNA(mDystrophin)とアニールさせることにより、二本鎖核酸剤であるトコフェロール結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド(Tocopherol-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Toc-HDO)を調製した。第1鎖と第2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上記の二本鎖核酸剤を調製した。アニールした核酸を4℃又は氷上で保存した。調製した二本鎖核酸剤をToc#1HDOと称する。

【0241】

本実施例で用いた第1鎖及び第2鎖の名称及び塩基配列を表10に示す。

【0242】

【表10】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	PMO(mDystrophin)	<i>ggccaaacctcggcttacctgaaat</i>	18
第2核酸鎖	Toc#1-cRNA(mDystrophin)	Toc- <i>a<u>u</u>*<u>u</u>*UCAGGUAAGCCGAGGUUG*<u>g</u>*<u>c</u>*<u>c</u></i>	19

斜体小文字: モルホリノ; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Toc: トコフェロール

【0243】

(2) in vivo実験

マウスは、mdx体重20gの6~7週齢の雄のmdxマウスであった。マウスを使用する実験は全て、n=4で実施した。Toc#1HDOを、マウスに静脈を通じて100 mg/kgの量で静脈内注射した。週1回計5回投与した。さらに、陰性対照群として、Toc#1HDOに代えてPBSのみ、及びPMOを注射したマウスも作製した。

【0244】

(3) 発現解析

最終投与2週間後に、PBSをmdxマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、及び固有背筋を摘出した。続いて、mRNAを各組織からIsogenにて抽出した。抽出したtotal RNA 200ngに対し、Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen社製)を用いてOne-Step RT-PCRを行った。キットに添付のプロトコルに従って、反応液を調製した。サーマルサイクラーはLifeECO (Bioer Technology社製)を用いた。用いたRT-PCRのプログラムは、42℃にて30分間で逆転写反応を行った後、95℃にて15分間、熱変性を行い、続いて、[94℃で30秒間; 60℃で30秒間; 72℃で60秒間]を1サイクルとして35サイクルPCR増幅反応を行い、72℃にて7分間、最後の伸長反応を行った。

【0245】

RT-PCRに使用したフォワード(Fw)プライマーとリバース(Rv)プライマーの塩基配列は以下の通りである。

・Fwプライマー: 5'-ATCCAGCAGTCAGAAAGCAAA-3' (配列番号20)

・Rvプライマー: 5'-CAGCCATCCATTTCTGTAAGG-3' (配列番号21)

【0246】

上記RT-PCRの反応産物1µLをBioanalyzer2100 (Agilent社製)を使用して、Agilent DNA1000キットを用いて解析した。Bioanalyzer2100の電気泳動図を図21に示す。エクソン23がスキップされたバンド(矢印)のポリヌクレオチド量「A」と、エクソン23がスキップされなかったバンド(矢頭)のポリヌクレオチド量「B」を測定した。

【0247】

Mdxマウスでは、エクソン23に異常なストップコドンが存在する。そのため、エクソン23がスキップされなかったmRNA(B)では、それ以降のエクソンが翻訳されず、正常なジストロフィンが発現しない。一方、エクソン23がスキップされたmRNA(A)は、エクソン23を含まない分、短いmRNAとなるものの、正常なジストロフィンが発現する。これら「A」及び「B」の測定値に基づき、以下の式に従って、スキッピング効率を求めた。

10

20

30

40

50

【0248】

・スキッピング効率(%) = $A/(A+B) \times 100$

筋標本をクライオスタット(Leica CM3050 S)にて25 μ M \times 40枚でスライスした後、150 μ Lのバッファー(125mM Tris-HCl pH 6.4, 10% glycerol, 4% SDS, 4M urea, 10% mercaptoethanol, 0.005% BPB, H₂O)で溶解した。

【0249】

続いて、超音波破碎を行って、100 \times 3分で加温し、10000g \times 5分で遠心した後、上清を回収した。

【0250】

4-15% gradient 10well (Mini-PROTEAN(登録商標) TGX Precast Gels) を使用してタンパクを電気泳動した。メンブレンにトランスファーした後、一次抗体にウサギ抗ジストロフィン抗体(anti-Dystrophin antibody; Abcam ab15277-rabbit) を使用し、二次抗体にはHRP結合-ヤギ抗ウサギIgG抗体(HRP conjugated-Goat anti-Rabbit IgG; Jackson lab)を使用して、ウェスタンブロットングを行った。最終的にSuperSignal West Dura Extended Duration Substrate(Thermo fisher) ChemiDoc イメージングシステム(Biorad)で発光を評価した。

10

【0251】

続いて、筋標本をクライオスタット(Leica CM3050 S)にて10 μ M厚の薄層切片を作成し、カバースリップ(MAS-02 松浪工業)に載せた。-30 $^{\circ}$ Cで冷やしたアセトンにスライドグラスを10分間漬けて冷却した後、TBSを入れ、標本を浸漬して、なじませた。続いて、5% goat serumでブロッキングして、一次抗体溶液であるウサギ抗ジストロフィン抗体(anti-Dystrophin antibody; Abcam ab15277-rabbit) (1/400)/5% goat serum/0.25% Tween 20/TBSで処理し、一晚インキュベートした。一次抗体溶液を0.25% Tween 20/TBSで3回洗浄した後、二次抗体溶液であるヤギ抗ウサギIgG抗体(Invitrogen; Alexa Fluor 568) (1/1000)/5% goat serum/0.25% Tween 20/TBSで1時間インキュベートした。二次抗体溶液を0.25% Tween 20/TBSで3回洗浄し、VECTASHIELDで封入した後、キーエンス(BZ-X700)で観察して、免疫染色図の写真撮影を行った。

20

【0252】

(結果)

スキッピング率の結果を図22に、ウェスタンブロット図を図23に、そして免疫染色図を図24に示した。図22より、(a)心臓(Heart)では一本鎖核酸複合体剤(PMO)によるエクソンスキッピングはほとんど見られないが、本発明の二本鎖核酸複合体剤(Toc-HDO)では27%以上のエクソンスキッピングが観察された。また、図22(b)~(f)に示す他の骨格筋でも、本発明の二本鎖核酸複合体剤(Toc-HDO)では、一本鎖核酸複合体剤(PMO)の2から4倍ものエクソンスキッピングが観察された。図23のウェスタンブロットでも、(a)心臓及び(b)大腿四頭筋において、一本鎖核酸複合体剤(PMO)よりも二本鎖核酸複合体剤(Toc-HDO)でジストロフィンの発現が多く見られた。さらに、図24の免疫染色図でも、心臓(a)、(b)及び大腿四頭筋(c)、(d)において、図23と同様に、一本鎖核酸複合体剤(PMO)(a)、(c)よりも二本鎖核酸複合体剤(Toc-HDO)(b)、(d)でジストロフィンの発現が多く見られた。

30

40

【0253】

<実施例16>

(目的)

mdxマウスのエクソン23/イントロン23境界領域をエクソンスキッピングの標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(モルホリノオリゴマー)とコレステロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体(Chol-HDO)の単回投与による、全身の筋肉におけるエクソンスキッピング効果とジストロフィン発現を評価することを目的とする。基本的な評価方法は、実施例15に準ずる。

【0254】

(方法)

50

(1) 核酸の調製

使用した二本鎖核酸複合体剤の第1鎖は、実施例 1 5 で調製したものをを用いた。その第1鎖を、コレステロール結合型Chol#1-cRNA(mDystrophin)とアニールさせることにより、二本鎖核酸剤であるコレステロール結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド(cholesterol-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Chol-HDO)を調製した。第1鎖と第2鎖とを等モル量で混合し、溶液を95 °Cで5分間加熱し、その後37 °C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上記の二本鎖核酸剤を調製した。アニールした核酸を4 °C又は氷上で保存した。調製した二本鎖核酸剤をChol#1HDOと称する。

【 0 2 5 5 】

本実施例で用いた第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表 1 1 に示す。

10

【 0 2 5 6 】

【表 1 1】

	オリゴヌクレオチド名	配列 (5' -3')	配列番号
第1核酸鎖	PMO(mDystrophin)	<i>ggccaaacctcggcttacctgaaat</i>	18
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mDystrophin)	Chol- <u>a</u> * <u>u</u> *UCAGGUAAGCCGAGGUUG* <u>g</u> * <u>c</u> * <u>c</u>	19

斜体小文字: モルホリノ; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Chol: コレステロール

【 0 2 5 7 】

(2) in vivo 実験

マウスは、体重20gの6~7週齢の雄のmdxマウスを使用した。実験は全て、n=1で実施した。Chol#1HDOを、マウスに眼窩静脈を通じて100 mg/kgの量で静脈内注射した。投与回数は、単回投与とした。さらに、陰性対照群として、Chol#1HDOに代えてPBS、PMOのみ、及びToc-HDOを注射したマウスも比較対照として作製した。

20

【 0 2 5 8 】

(3) 発現解析

発現解析は、実施例 1 5 に記載の方法に準じた。

【 0 2 5 9 】

(結果)

結果を図 2 5 に示した。心臓(a)ではChol-HDOとToc-HDO効果に差がなかったが、骨格筋(b)~(e)では、Chol-HDOの方がToc-PMOよりもエクソンスキッピング効果が高かった。

30

【 0 2 6 0 】

< 実施例 1 7 >

(目的)

mdxマウスのエクソン23/イントロン23境界領域をエクソンスキッピングの標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(ミクスマーオリゴマー)とトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体の単回皮下投与による、全身の筋肉におけるエクソンスキッピング効果とジストロフィン発現を評価することを目的とする。基本的な評価方法は、実施例 1 5 に準ずる。

40

【 0 2 6 1 】

(方法)

(1) 核酸の調製

二本鎖核酸複合体剤を、従来的一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)対照と比較した。対照(ASO)は、マウス・ジストロフィン遺伝子のpre-mRNAのエクソン23/イントロン23を標的とする13 merの一本鎖ミクスマーとした。このASOはLNAとDNAで構成されており、マウスのジストロフィン pre-mRNA(GenBankアクセッション番号:NC_00086.7) に相補的な塩基配列を有する。前記ミクスマーを第1鎖として、トコフェロール結合型Toc#1-cRNA(mDystrophin)とアニールさせることにより、二本鎖核酸剤で

50

あるトコフェロール結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド(Tocopherol-conjugated heteroduplex oligonucleotide、Toc-HDO)を調製した。第1鎖と第2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上記の二本鎖核酸剤を調製した。アニールした核酸を4℃又は氷上で保存した。調製した二本鎖核酸剤をToc#2HDOと称する

本実施例で用いた第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び塩基配列を表12に示す。

【0262】

【表12】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	Mixer(mDystrophin)	a* <u>C</u> *c* <u>T</u> *c* <u>G</u> *g* <u>C</u> *t* <u>T</u> *a* <u>C</u> *c	22
第2核酸鎖	Toc#1-cRNA(mDystrophin)	Toc-g* <u>g</u> * <u>t</u> *AAGCCGA* <u>g</u> * <u>g</u> * <u>t</u>	23

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシン LNAを表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Toc: トコフェロール

【0263】

(2) in vivo実験

マウスは、mdx体重20gの6~7週齢の雄のmdxマウスを使用した。実験は全て、n=2で実施した。Toc#2HDOを、マウスに100 mg/kgの量で皮下注射した。投与回数は、1回とした。さらに、陰性対照群として、Toc#2HDOに代えて、PBSのみ、及び一本鎖ミックスマーを注射したマウスも作製した。

【0264】

(3) 発現解析

発現解析は、実施例17に記載の方法に準じた。

【0265】

(結果)

結果を図26に示した。心臓(a)をはじめ、骨格筋(b)~(e)においても、二本鎖ミックスマーであるToc#2HDO(Toc-Mixer)は、一本鎖ミックスマー(Mixer)と比較して、より高いエクソンスキッピング効果を有することが明らかとなった。

【0266】

<実施例18>

(目的)

malat1遺伝子を標的として、第2核酸鎖にコレステロールが結合した二本鎖核酸複合体からなる二本鎖核酸複合体剤(Chol#1HDO(mMalat1))と、第1核酸鎖とコレステロール結合型相補鎖をRNAリンカーで結合させた一本鎖核酸を自己アニールさせた核酸分子の単回投与により、組織内mRNA発現のin vivo阻害効果について検証した。

【0267】

(方法)

(1) 核酸の調製

標的遺伝子はmalat1とした。二本鎖核酸複合体剤は、実施例2で調製したChol#1HDO(mMalat1)を用いた。第1核酸鎖(ASO)と相補鎖(コレステロール結合cRNA) Chol#1-cRNA(mMalat1)をRNAリンカーで結合させた一本鎖核酸の名称及び塩基配列を表13に示す。この一本鎖核酸を図1cに記載のように自己アニールさせることによりChol#1sHDO(mMalat1)(又はChol#1-sHDO)を調製した。具体的には、Chol#1-sHDO(mMalat1)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自己アニールして調製した。アニールした核酸を室温、4℃又は氷上で保存した。調製後の核酸を「Chol#1sHDO(mMalat1)」と称する。

【0268】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

	オリゴヌクレオチド名	配列 (5' -3')	配列番号
第 1 核酸鎖	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	9
第 2 核酸鎖	Chol#1-cRNA (mMalat1)	Chol-g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> *g	10
一本鎖核酸鎖	Chol#1-sHDO (mMalat1)	Chol-g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> *gUUCAAGAGA <u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	24

下線付き大文字: LNA (C は 5-メチルシトシン LNA を表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Chol: コレステロール

10

【 0 2 6 9】

(2) in vivo 実験

基本的な手順は、実施例 2 に記載の方法に準じた。マウスに ASO 換算で 50 mg/kg で単回投与した。

【 0 2 7 0】

(3) 発現解析

投与後 72 時間の時点、PBS をマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して心筋、大腿四頭筋、横隔膜、固有背筋の各部位を別々に摘出した。得られた各組織からの RNA 抽出、cDNA 合成、定量 RT-PCR、及び malat1 mRNA の発現レベルの評価は、実施例 2 に準じた。

20

【 0 2 7 1】

(結果)

図 2 7 に結果を示す。図 2 7 から、第 1 核酸鎖と相補鎖 (コレステロール結合) を RNA リンカーで結合させた 1 本鎖核酸であっても各種骨格筋及び心筋において、コレステロール結合型相補鎖からなる二本鎖核酸複合体剤と同等に、いずれも著しい標的遺伝子の発現抑制効果が確認された。

【 0 2 7 2】

< 実施例 1 9 >

(目的)

malat1 遺伝子を標的とし、第 2 核酸鎖にコレステロールが結合した二本鎖核酸複合体からなる二本鎖核酸複合体剤 (Chol#1HDO (mMalat1)) と、第 2 核酸鎖は、第 1 核酸鎖に相補的な配列を有し、かつその 3' 末端に、コレステロールが結合した鎖であって、コレステロールと第 2 核酸鎖の末端との間にテトラエチレングリコールからなるリンカー (TEG) を介在させた構成を有する核酸 (3' Chol (TEG) HDO (mMalat1)) を単回投与する事により、組織内 mRNA 発現の in vivo 阻害効果について検証した。

30

【 0 2 7 3】

(1) 核酸の調製

標的遺伝子は、実施例 2 と同様に malat1 とした。実施例 2 で用いた二本鎖核酸複合体剤 (Chol#1HDO (mMalat1)) と第 1 核酸鎖は、実施例 2 に記載の第 1 核酸鎖、すなわちマウスの malat1 遺伝子の転写産物である malat1 ノンコーディング RNA を標的とする 16mer の一本鎖 LNA/DNA ギャップマー ASO (mMalat1) を用いた。一方、上記第 1 核酸鎖を第 2 核酸鎖の 3' Chol (TEG)-cRNA (mMalat1) とアニールさせることにより、本発明の二本鎖核酸複合体剤を調製した。具体的な調製方法については、実施例 2 に準じた。調製した二本鎖核酸複合体剤を「3' Chol (TEG) HDO」と称する。第 1 及び第 2 核酸鎖のそれぞれの名称及び塩基配列は表 1 4 の通りである。

40

【 0 2 7 4】

50

【表 1 4】

	オリゴヌクレオチド名	配列 (5' -3')	配列番号
第1 核酸鎖	ASO (mMalat1) 16mer	<u>C</u> * <u>T</u> <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	9
第2 核酸鎖	Chol#1-cRNA (mMalat1) 16mer	Chol-g*c*a*UUCAGUGAAC*u*a*g	10
第2 核酸鎖	Chol (TEG)#1-cRNA (mMalat1) 16mer	g*c*a*UUCAGUGAAC*u*a*g-Chol (TEG)	10

下線付き大文字: LNA (Cは5-メチルシトシン LNA を表す); 小文字: DNA; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Chol: コレステロール

10

【0 2 7 5】

(2) in vivo 実験

基本的な手順は、実施例 2 に記載の方法に準じた。マウスに 50 mg/kg で二本鎖核酸複合体剤を単回投与した。

【0 2 7 6】

(3) 発現解析

投与後 72 時間の時点で PBS をマウスに灌流させて、その後マウスを解剖して心筋 (Heart)、大腿四頭筋 (Quadriceps)、横隔膜 (Diaphragm)、及び固有背筋 (Back) を摘出した。得られた各組織からの RNA 抽出、cDNA 合成、及び定量 RT-PCR、及び malat1 の発現レベルの評価は、実施例 2 に記載の方法に準じた。

20

【0 2 7 7】

(結果)

図 2 8 に結果を示す。その効果は、3' 末端側に結合させた場合に効果が減弱され、5' 末端側につける事が重要である。

【0 2 7 8】

< 実施例 2 0 >

(目的)

mdx マウスのエクソン 23 / イントロン 23 境界領域をエクソンスキッピングの標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド (モルホリノオリゴマー) と、コレステロール結合型相補鎖又はトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体 (Chol-HDO 又は Toc-HDO) の複数回投与による、運動能力に対する影響を評価することを目的とする。

30

【0 2 7 9】

(方法)

(1) 核酸の調製

使用した二本鎖核酸複合体剤の第 1 鎖は、実施例 1 5 で調製したものをを用いた。その第 1 鎖を、コレステロール結合型 Chol#1-cRNA (mDystrophin) 又はトコフェロール結合型 Toc#1-cRNA (mDystrophin) とアニールさせることにより、二本鎖核酸剤であるコレステロール結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Chol-HDO) 及びトコフェロール結合型ヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド (Toc-HDO) を調製した。第 1 鎖と第 2 鎖とを等モル量で混合し、溶液を 95 °C で 5 分間加熱し、その後 37 °C 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上記の二本鎖核酸剤を調製した。アニールした核酸を 4 °C 又は氷上で保存した。調製した二本鎖核酸剤を Chol#1HDO 及び Toc#1HDO と称する。

40

【0 2 8 0】

本実施例で用いた第 1 核酸鎖及び第 2 核酸鎖の名称及び塩基配列を表 1 5 に示す。

【0 2 8 1】

50

【表 1 5】

	オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
第1核酸鎖	PMO(mDystrophin)	<i>ggccaaacctcggttacctgaaat</i>	18
第2核酸鎖	Chol#1-cRNA(mDystrophin)	Chol- <u>a</u> * <u>u</u> *UCAGGUAAGCCGAGGUUUG* <u>g</u> * <u>c</u> * <u>c</u>	19
第2核酸鎖	Toc#1-cRNA(mDystrophin)	Toc- <u>a</u> * <u>u</u> *UCAGGUAAGCCGAGGUUUG* <u>g</u> * <u>c</u> * <u>c</u>	19

斜体小文字: モルホリノ; 大文字: RNA; 下線付き小文字: 2'-O-メチル RNA; *: ホスホロチオエート結合 (PS 結合); Chol: コレステロール; Toc: トコフェロール

10

【0282】

(2) in vivo 実験

Chol#1HDO又はToc#1HDOを、マウスに静脈を通じて100 mg/kgの量で静脈内注射した。週1回計5回投与した。さらに、Chol#1HDO又はToc#1HDOに代えて、PBSのみ又はPMOを注射したマウスを陰性対照群とし、またB10(正常マウス)を陽性対照とした。

【0283】

(3) 運動負荷試験

5回目の最終投与から1週間以上後に、運動負荷試験を実施した。運動負荷試験は、ラット・マウス兼用型トレッドミル(ベルト式強制走行装置)(室町機械、MK-680S)を用いて、電気刺激有り及び傾斜角度無しの条件で行った。試験開始から5分間は5 m/minの速度で、その後1分間ごとに1 m/minずつ速度を増加させた際の走行継続時間を測定した。

20

【0284】

(結果)

結果を図29に示した。PBSのみを投与した陰性対照のmdxマウス(mdx、n=6)に対して、一本鎖核酸複合体剤(PMO)を投与したmdxマウス(n=3)では、わずかに走行継続時間が増加した。これに対して、二本鎖核酸複合体剤(Toc-HDO、n=4)又は二本鎖核酸複合体剤(Chol-HDO、n=6)を投与したmdxマウスでは走行継続時間が大きく上昇し、特に二本鎖核酸複合体剤(Chol-HDO)では陽性対照のB10(n=7)と同等なレベルまで運動能力が回復した。

【0285】

<実施例21>

(目的)

mdxマウスのエクソン23/イントロン23境界領域をエクソンスキッピングの標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(モルホリノオリゴマー)と、コレステロール結合型相補鎖又はトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体(Chol-HDO又はToc-HDO)の複数回投与による、握力及び運動能力に対する影響を評価することを目的とする。

【0286】

(方法)

(1) 核酸の調製

本実施例に使用した核酸複合体剤の調製方法は、実施例20に記載の方法に準じた。本実施例で用いた第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び配列も、表15に示した通りである。

40

【0287】

(2) in vivo 実験

本実施例に使用したマウス、及び核酸複合体剤の投与方法は、実施例20に準じた。

【0288】

(3) 握力測定試験

5回目の最終投与から1週間以上後に、握力測定試験を実施した。握力測定試験には、マウス用握力測定装置(室町機械、MK-380CM)、ステンレス網(室町機械、MK-380CM-F/MM)、及びデジタルフォースゲージ(IMADA、DS2-50N)を用いた。金網を前肢で掴んだマウスの尾部を引っ張り、マウスが金網を放すまでの張力を計測した。3回測定し

50

て平均を算出した。

【0289】

(4) ワイヤーハング試験

5回目の最終投与から1週間以上後に、ワイヤーハング試験を実施した。ワイヤーハング試験は、マウスを金網にしがみつかせた後に金網をひっくり返し、マウスが金網から落下するまでの時間(保持時間)を測定することで実施した。マウスの体重(g)と保持時間(s)の積を算出し、保持力積(Holding Impulse)(s*g)とした(Holding Impulse(s*g) = Body mass(g) × Hang Time(s))。2回測定した平均を算出した。

【0290】

(結果)

結果を図30に示した。PBSのみを投与した陰性対照のmdxマウス(mdx、n=7)に対して、一本鎖核酸複合体剤(PMO)を投与したmdxマウス(n=9)では、わずかに握力(grip power)及び保持力積が増加した。これに対して、二本鎖核酸複合体剤(Toc-HDO、n=9)又は二本鎖核酸複合体剤(Chol-HDO、n=6)を投与したmdxマウスでは、握力(grip power)及び保持力積(holding impulse)が大幅に上昇することが示された。なお、図30では、陽性対照としてn=6(握力)及びn=5(保持力積)のB10を用いた。

【0291】

<実施例22>

(目的)

mdxマウスの血液中では、筋肉に由来するクレアチンキナーゼ(CK)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、及びアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の濃度が上昇している。そこで、mdxマウスのエクソン23/イントロン23境界領域をエクソンスキッピングの標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(モルホリノオリゴマー)と、コレステロール結合型相補鎖又はトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体(Chol-HDO又はToc-HDO)の複数回投与後に、血清中のCK、AST、及びALTレベルを評価することを目的とする。

【0292】

(方法)

(1) 核酸の調製

本実施例に使用した核酸複合体剤の調製方法は、実施例20に記載の方法に準じた。本実施例で用いた第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び配列も、表15に示した通りである。

【0293】

(2) in vivo実験

本実施例に使用したマウス、及び核酸複合体剤の投与方法は、実施例20に準じた。

【0294】

(3) 血清分析

5回目の最終投与から1週間以上後に、マウスから採血し、血清を分離した。得られた血清を株式会社エスアールエルに送付して、CK、AST、及びALTの測定結果を得た。

【0295】

(結果)

結果を図31に示した。PBSのみを投与した陰性対照のmdxマウス(mdx、n=11)に対して、一本鎖核酸複合体剤(PMO)を投与したmdxマウス(n=7)では、わずかにCK、AST、及びALTの各値が減少した。これに対して、二本鎖核酸複合体剤(Toc-HDO、n=7)又は二本鎖核酸複合体剤(Chol-HDO、n=5又は6)を投与したmdxマウスではCK、AST、及びALTの各値が大幅に減少し、特にChol-HDOでは陽性対照のB10(n=8)と同等なレベルまで減少することが示された。

【0296】

<実施例23>

(目的)

mdxマウスのエクソン23/イントロン23境界領域をエクソンスキッピングの標的とする

10

20

30

40

50

アンチセンスオリゴヌクレオチド(モルホリノオリゴマー)と、コレステロール結合型相補鎖又はトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体 (Chol-HDO又はToc-HDO) の複数回投与による、心筋機能に対する影響を評価することを目的とする。

【0297】

(方法)

(1) 核酸の調製

本実施例に使用した核酸複合体剤の調製方法は、実施例20に記載の方法に準じた。本実施例で用いた第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び配列も、表15に示した通りである。

【0298】

(2) in vivo実験

本実施例に使用したマウス、及び核酸複合体剤の投与方法は、実施例20に準じた。

【0299】

(3) 心電図測定

5回目の最終投与から1週間以上後に、心電図測定を行った。心電図測定は、アナログ入力2チャンネルPowerLab 2/26 PL2602、及びHigh Performance Differential Bio Amplifier ML132を用いて、イソフルラン麻酔下で行った。QT時間をRR間隔で補正することによって、修正QT時間(QTc)を算出した。

【0300】

(結果)

結果を図32に示した。PBSのみを投与した陰性対照のmdxマウス (mdx、n=5) では、正常マウス(B10、n=5)に比べて、QTcが延長している。一本鎖核酸複合体剤 (PMO、n=5) を投与したmdxマウスでは、QTc延長がほとんど改善されないのに対して、二本鎖核酸複合体剤 (Toc-HDO、n=5) 又は二本鎖核酸複合体剤 (Chol-HDO、n=5) を投与したmdxマウスではQTc延長が大幅に改善することが示された。

【0301】

<実施例24>

(目的)

mdxマウスのエクソン23/イントロン23境界領域をエクソンスキッピングの標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド(モルホリノオリゴマー)と、コレステロール結合型相補鎖又はトコフェロール結合型相補鎖とからなる二本鎖核酸複合体 (Chol-HDO又はToc-HDO) の複数回投与による、心筋及び大腿四頭筋におけるジストロフィンタンパク質の発現を評価することを目的とする。

【0302】

(方法)

(1) 核酸の調製

本実施例に使用した核酸複合体剤の調製方法は、実施例20に記載の方法に準じた。本実施例で用いた第1核酸鎖及び第2核酸鎖の名称及び配列も、表15に示した通りである。

【0303】

(2) in vivo実験

本実施例に使用したマウス、及び核酸複合体剤の投与方法は、実施例20に準じた。

【0304】

(3) 発現解析

5回目の最終投与から1週間以上後にマウスを解剖して、ウェスタンブロット及び免疫染色による発現解析を行った。発現解析の方法については、実施例15に記載の方法に準じた。ただし、本実施例では、対照としてピンキュリンに対するウェスタンブロットも同時に行った。ピンキュリン抗体 (anti-Vinculin (hVIN-1) antibody ; Novus Biologicals, NB600-1293) は、1/1000で使用した。

【0305】

(結果)

結果を図33~3637に示した。一本鎖核酸複合体剤 (PMO) を投与したmdxマウス

10

20

30

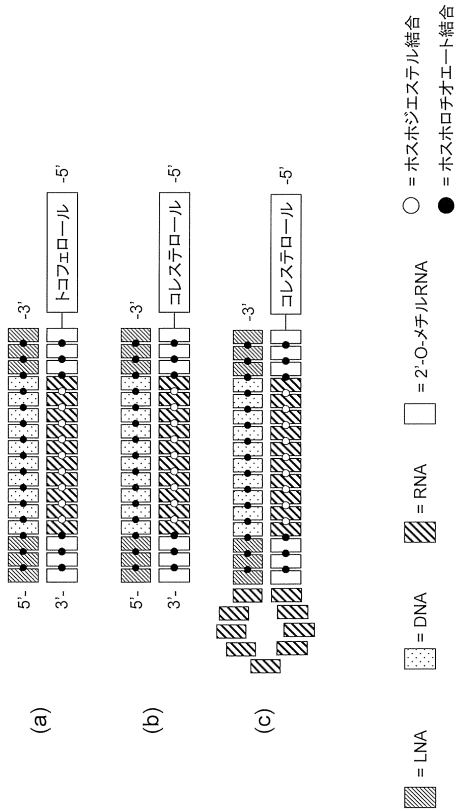
40

50

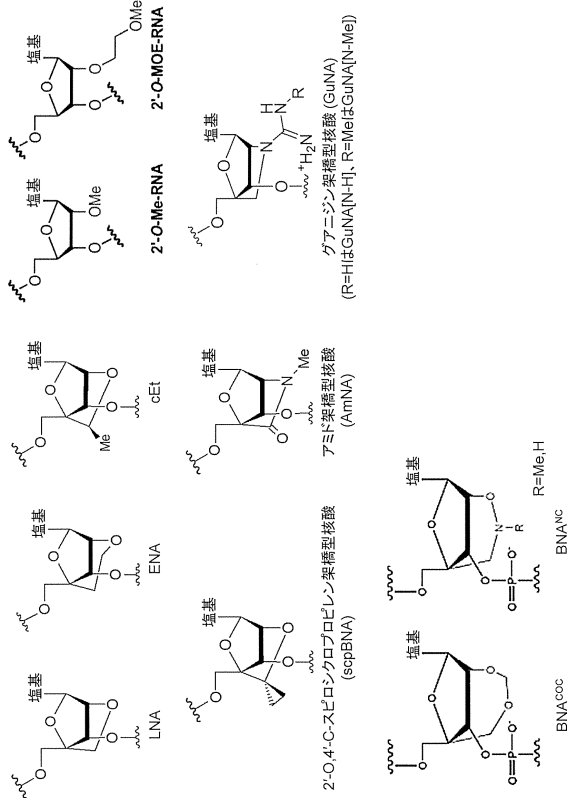
に比べて、二本鎖核酸複合体剤 (Toc-HDO) 又は二本鎖核酸複合体剤 (Chol-HDO) を投与したmdxマウスでは、心筋 (図 3 3) 及び大腿四頭筋 (図 3 4) において、ジストロフィンの発現が多く見られた。さらに、図 3 5 及び 3 6 の免疫染色図でも、一本鎖核酸複合体剤 (PMO) よりも二本鎖核酸複合体剤 (Toc-HDO) 又は二本鎖核酸複合体剤 (Chol-HDO) で、心筋 (図 3 5) 及び大腿四頭筋 (図 3 6) においてジストロフィンの発現が多く見られた。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

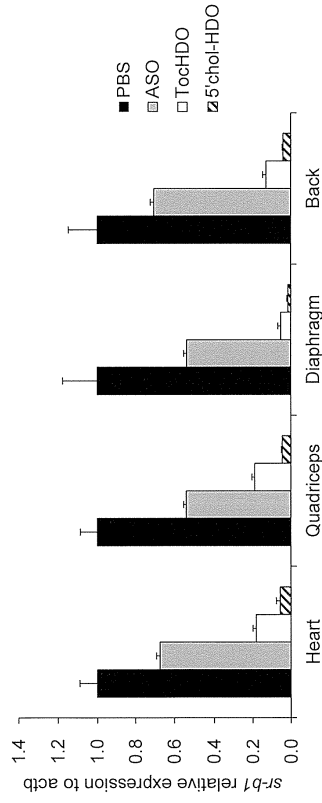
20

30

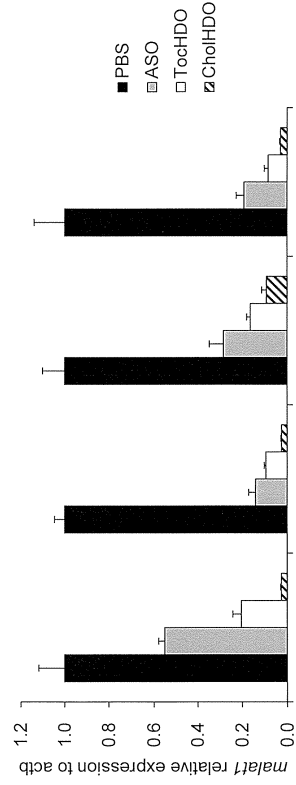
40

50

【 図 3 】



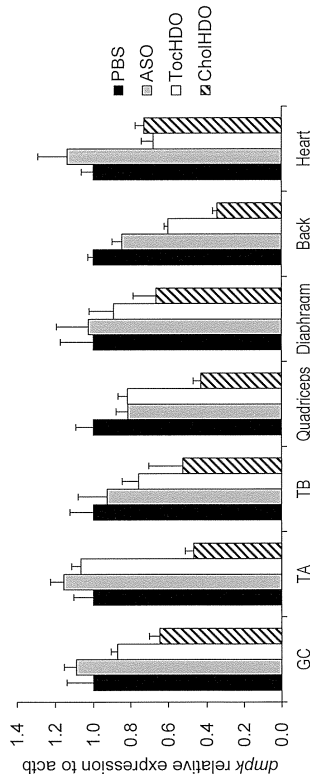
【 図 4 】



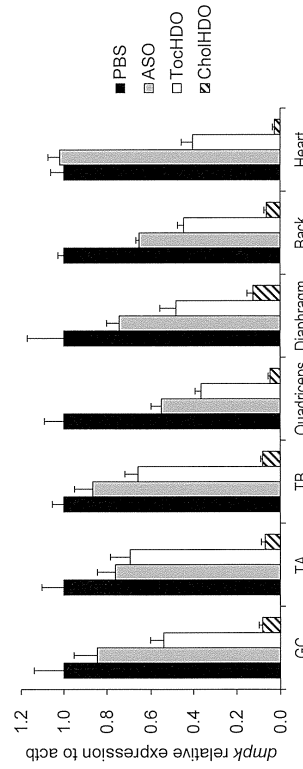
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

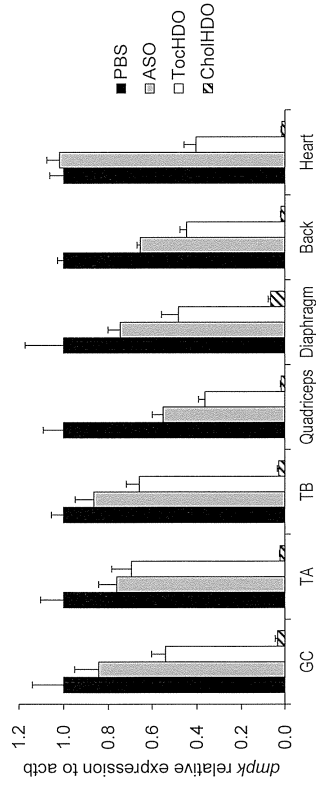


30

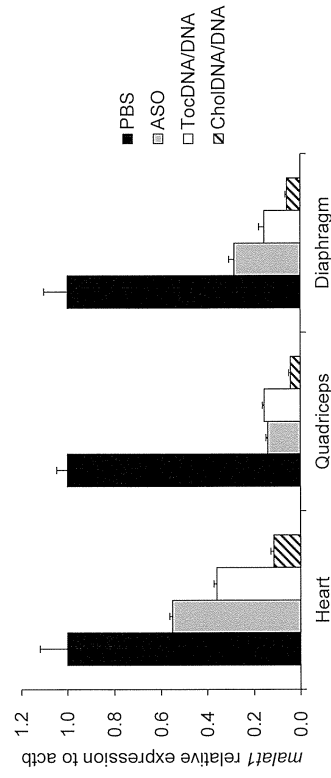
40

50

【 7 】



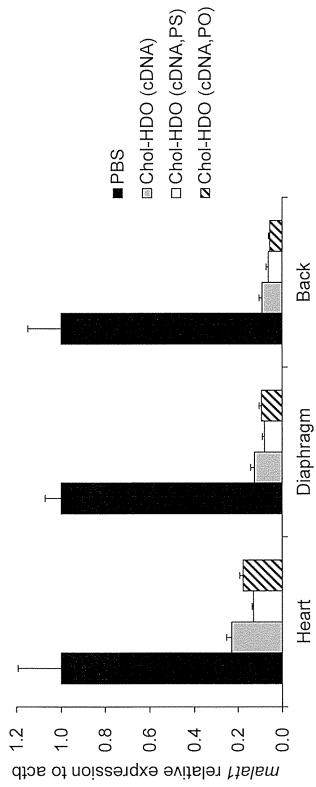
【 8 】



10

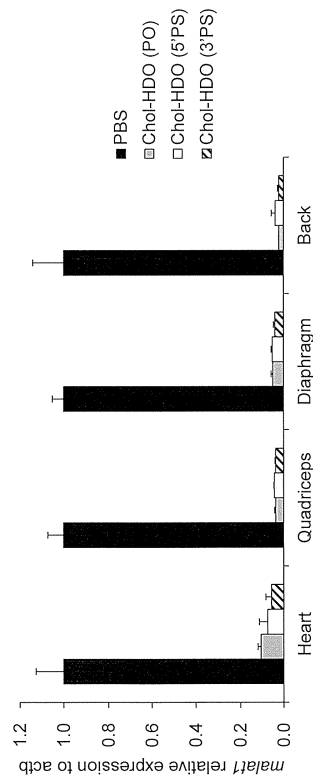
20

【 9 】



30

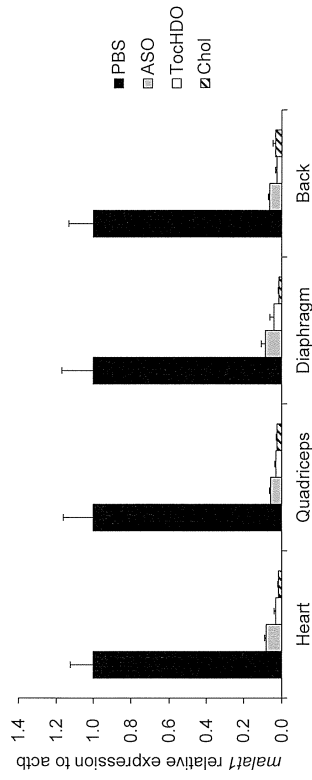
【 10 】



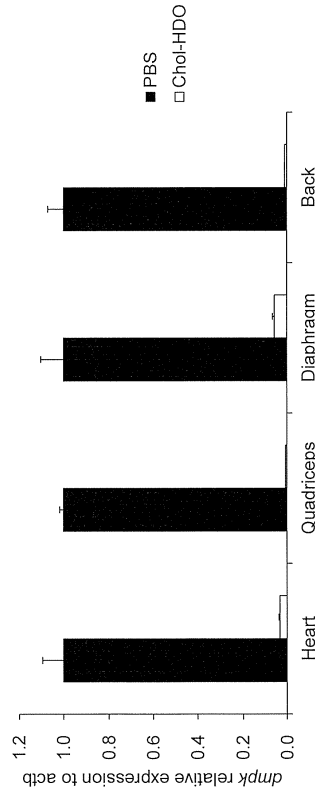
40

50

【 1 1 】



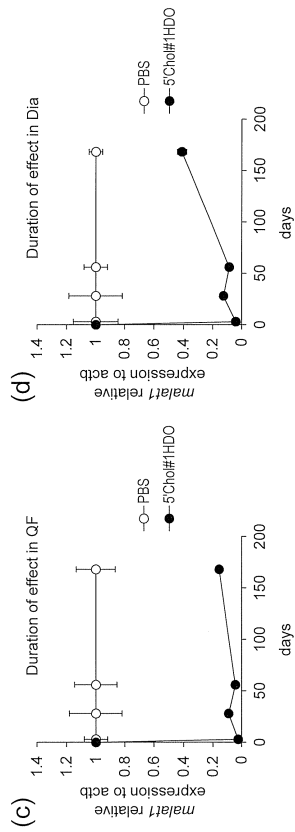
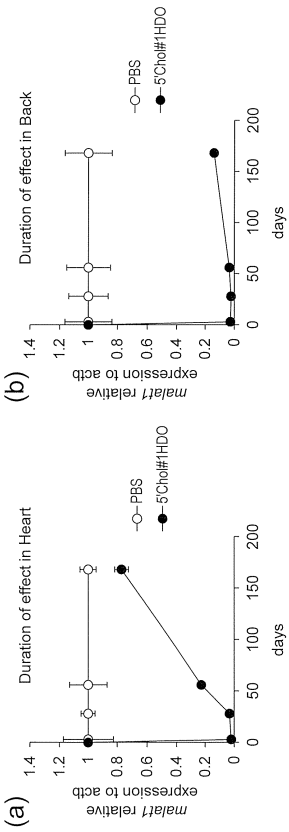
【 1 2 】



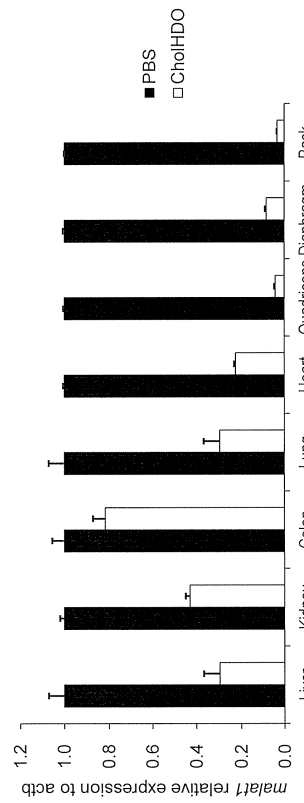
10

20

【 1 3 】



【 1 4 】

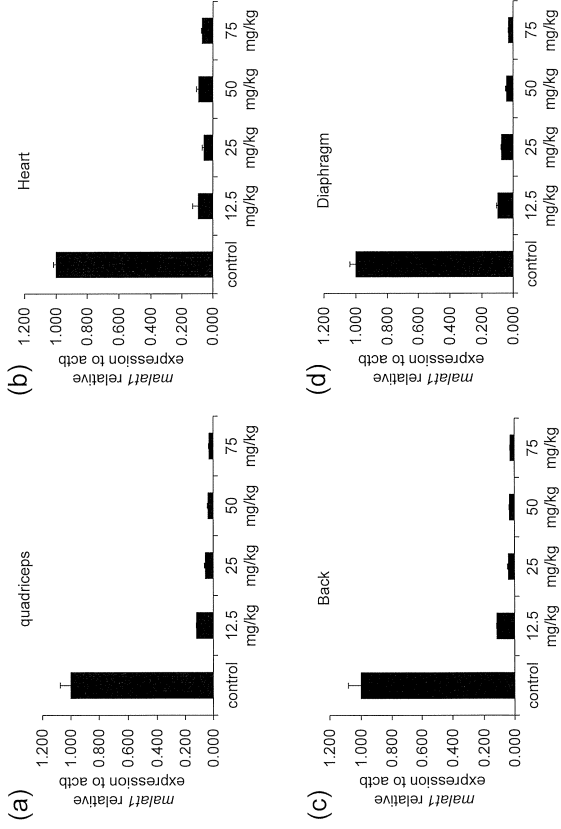


30

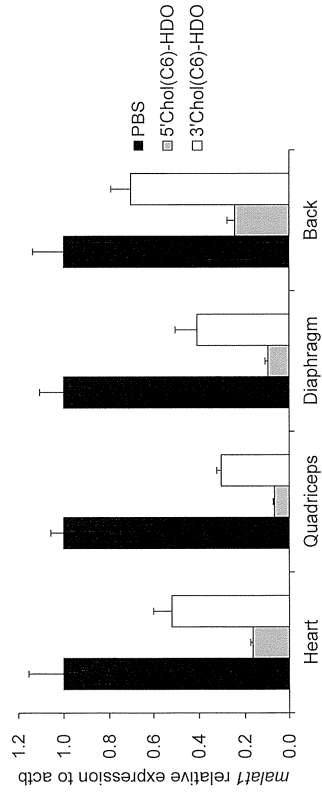
40

50

【 15 】



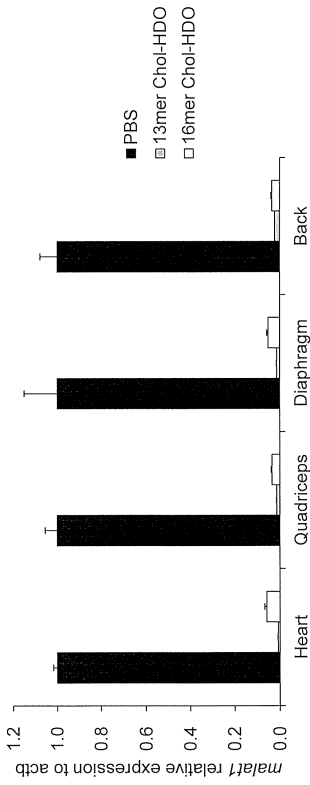
【 16 】



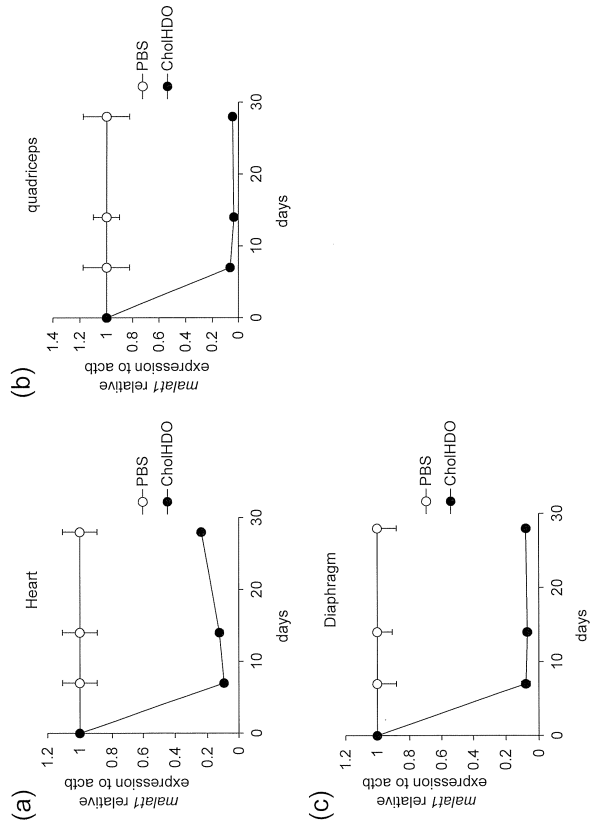
10

20

【 17 】



【 18 】

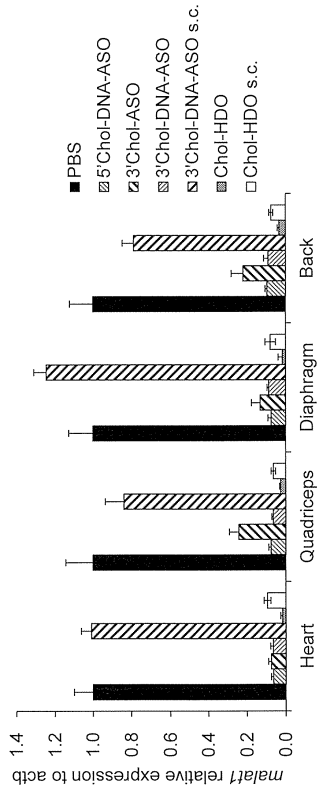


30

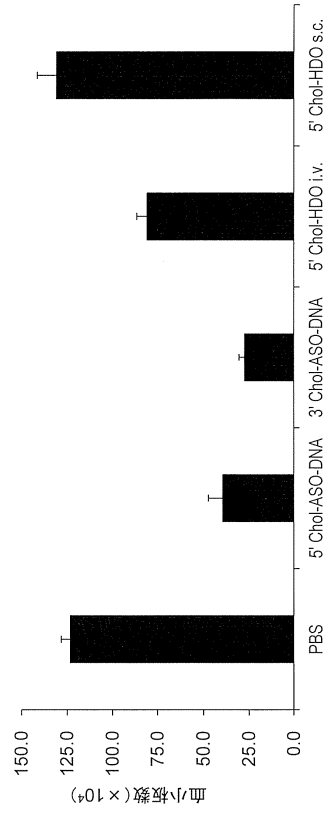
40

50

【 図 19 】



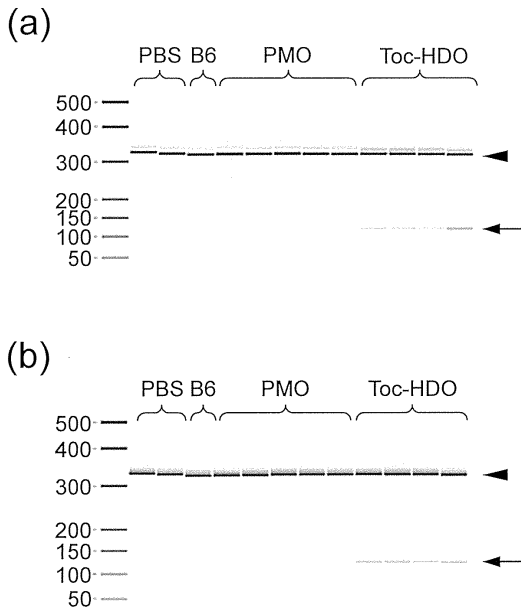
【 図 20 】



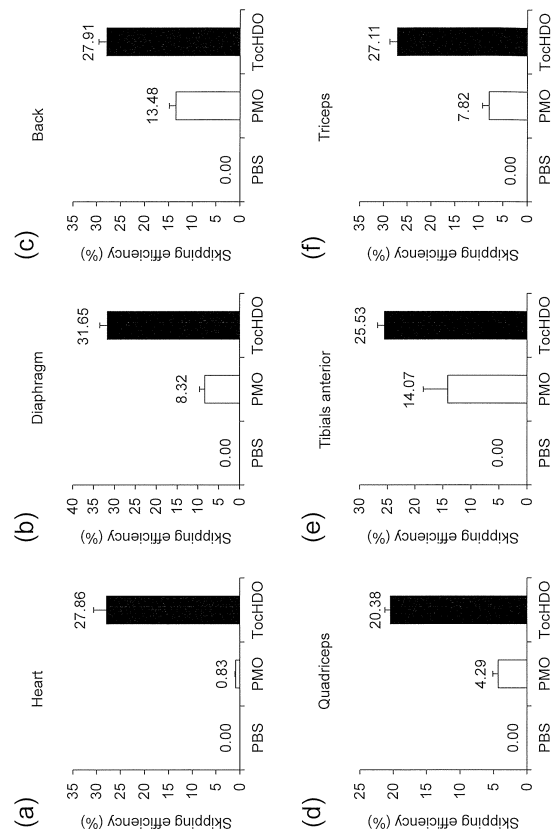
10

20

【 図 21 】



【 図 22 】

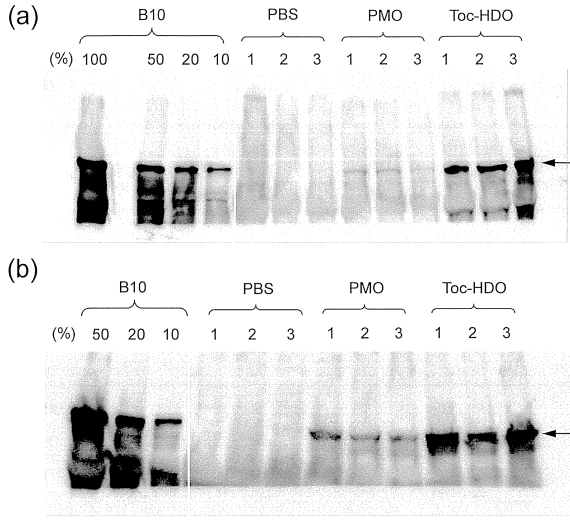


30

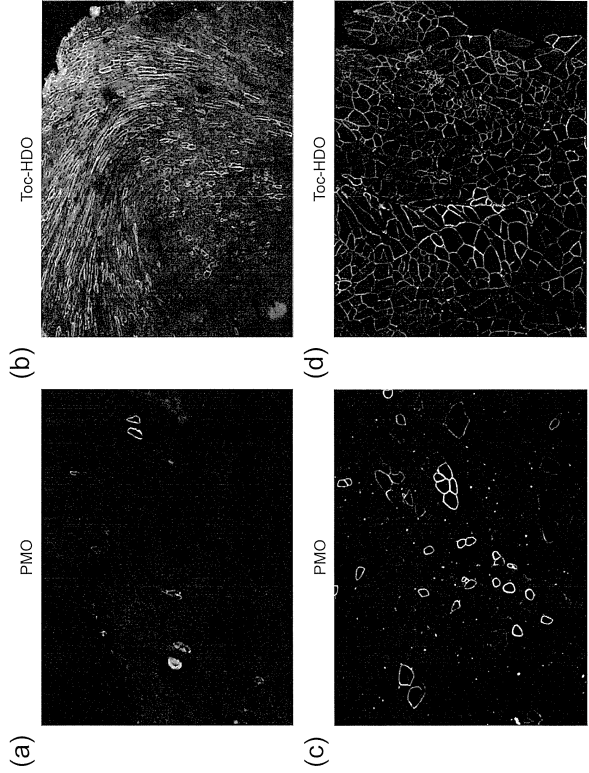
40

50

【 2 3 】



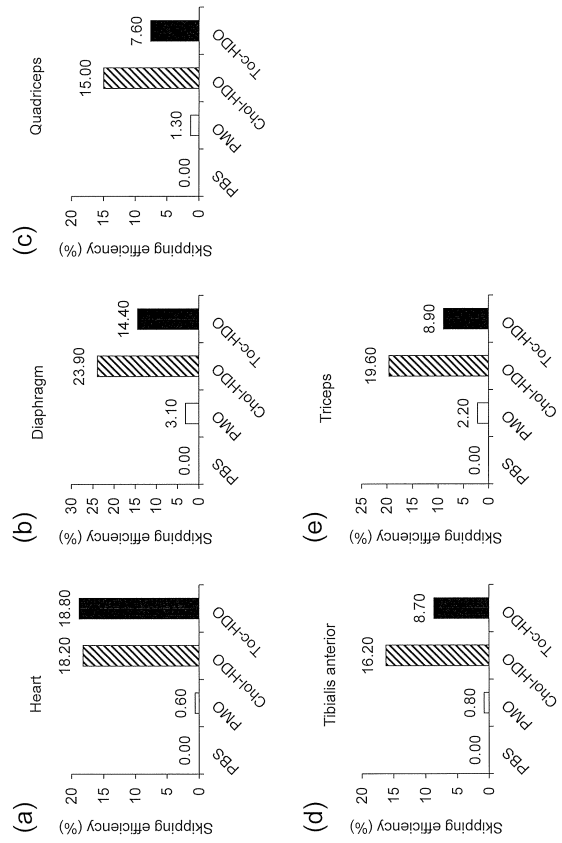
【 2 4 】



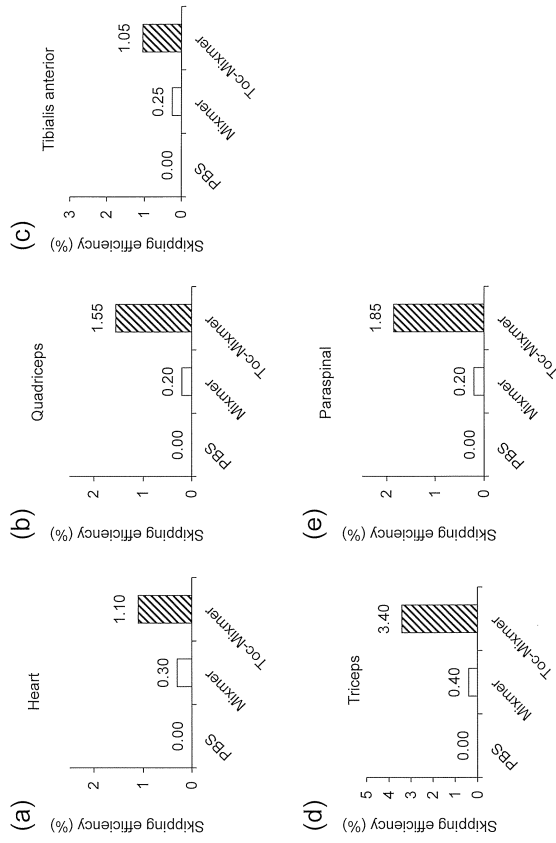
10

20

【 2 5 】



【 2 6 】

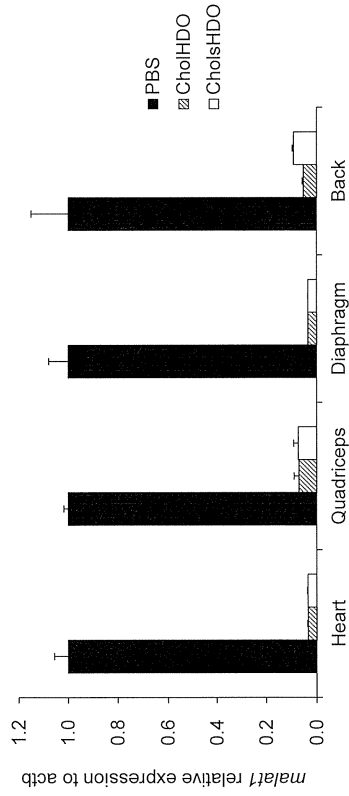


30

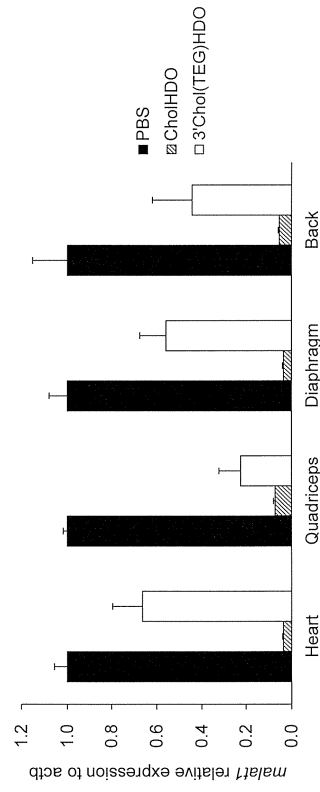
40

50

【 27 】



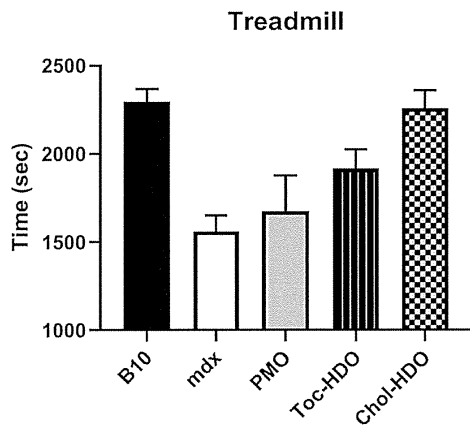
【 28 】



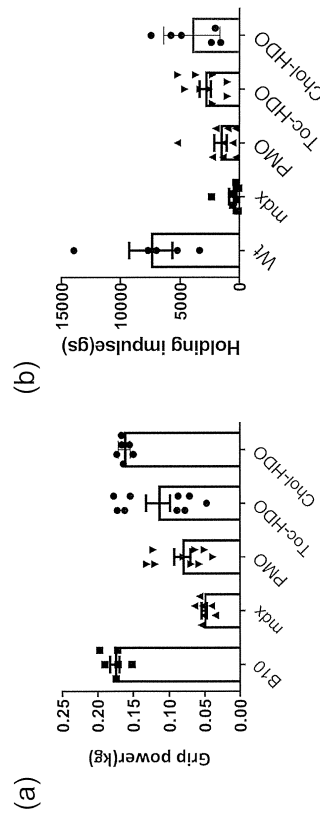
10

20

【 29 】



【 30 】

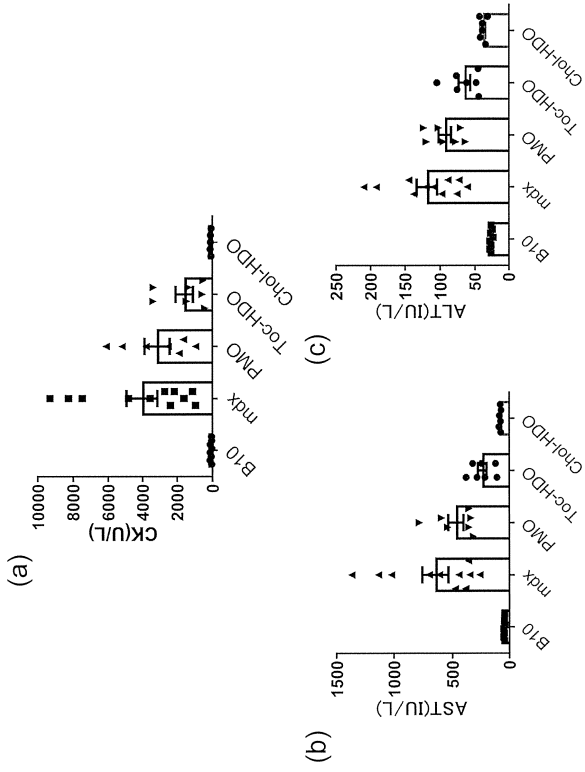


30

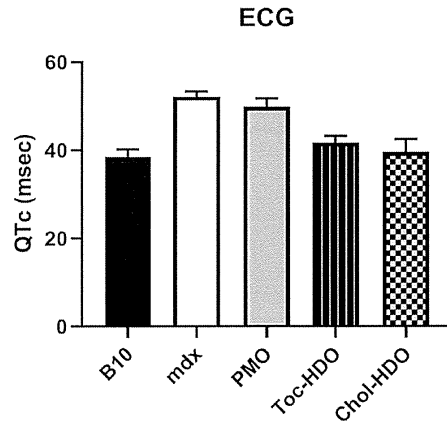
40

50

【 3 1 】



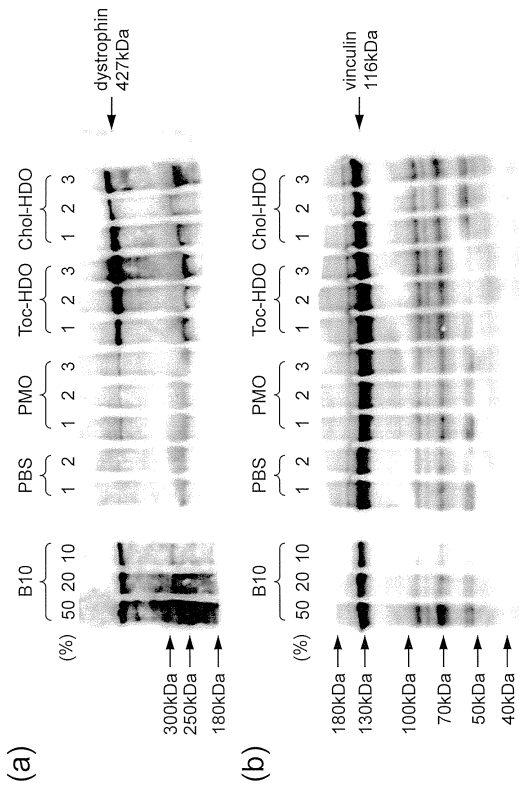
【 3 2 】



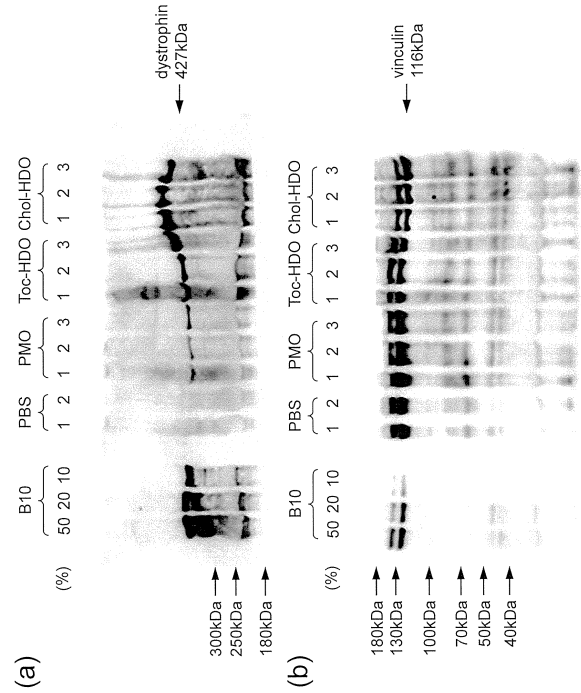
10

20

【 3 3 】



【 3 4 】

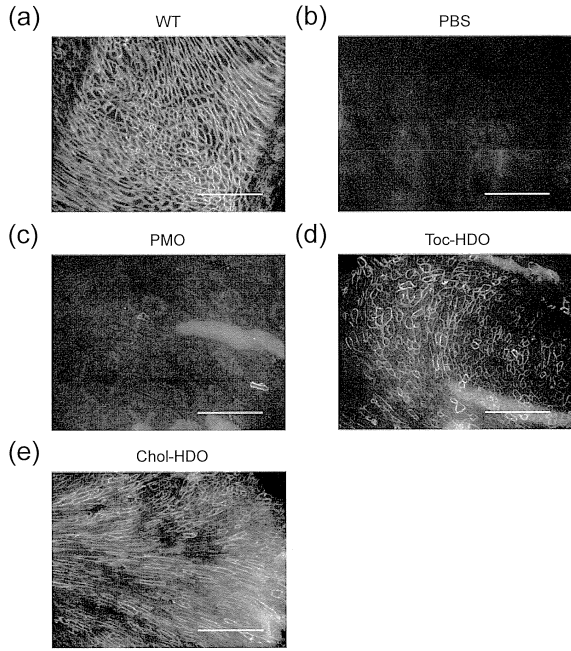


30

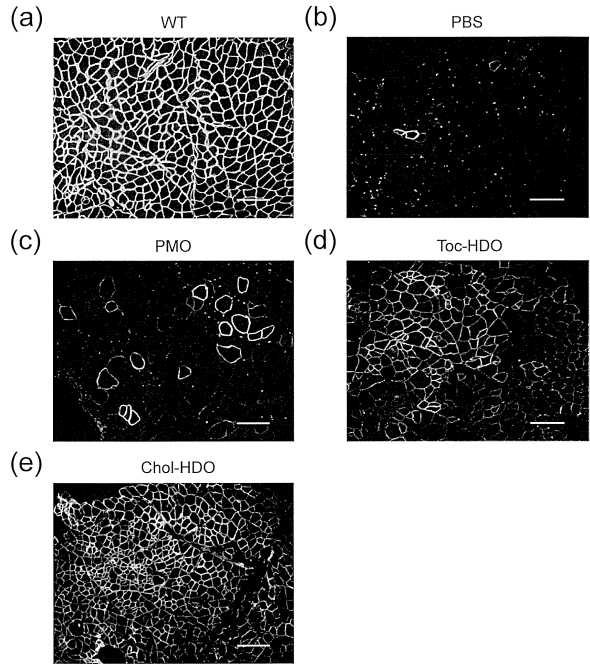
40

50

【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



10

20

【 配列表 】

[0007687682000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2018/056442 (WO, A1)
 特表2015-502134 (JP, A)
 特表2018-530560 (JP, A)
 特表2018-528783 (JP, A)
 国際公開第2017/068790 (WO, A1)
 特表2016-526529 (JP, A)
 国際公開第2018/062510 (WO, A1)
 国際公開第2018/134301 (WO, A1)
 NAGATA T. et al. , The effect of DNA/RNA heteroduplex oligonucleotides on muscle , Journal of the Neurological Sciences , 2017年 , Vol.381, Supplement , p.846, 2352 , DOI:10.1016/j.jns.2017.08.2383
 NAGATA Tetsuya , Recent progress of DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide , Clinical Neurology , 2018年 , Vol.58 , S47, HT-02-3 , DOI:10.5692/clinicalneuro.58-supplement-S1
 NISHINA Kazutaka et al. , DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing , Nature Communications , 2015年 , Vol.6 , Article No.7969 , DOI:10.1038/ncomms8969
 馬嶋貴正ら , ヘテロ核酸の現状 , 最新医学 , 2018年 , Vol.73, No.6 , p.781-786
 Molecular Therapy-Nucleic Acids , 2016年 , Vol.5 , e342 , doi:10.1038/mtna.2016.55
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)
 C12N 15 / 113
 A61K 48 / 00
 A61K 31 / 713
 JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
 Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)