(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
2019年9月19日(19.09.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/177061 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 47/54* (2017.01)
A61K 31/711 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/010392

(22) 国際出願日： 2019年3月13日(13.03.2019)

(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 2018-047294 2018年3月14日(14.03.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 Tokyo (JP). 武田薬品工業株式会社(**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目１番１号 Osaka (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４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 永田 哲也(**NAGATA Tetsuya**); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 古川 英紀(**FURUKAWA Hideki**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 中川 泰男(**NAKAGAWA Yasuo**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 余郷 能紀(**YOGO Takatoshi**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 得能 僚資(**TOKUNOH Ryosuke**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 佐々木 茂和(**SASAKI Shigekazu**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 日▲高▼ 功介(**HIDAKA Kosuke**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 関 倫宏(**SEKI Tomohiro**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 宮田 健一(**MIYATA Kenichi**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 内田 章夫(**UCHIDA Akio**); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目２６番地の１ 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP).

(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３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

(54) **Title:** NUCLEIC ACID COMPLEX

(54) 発明の名称： 核酸複合体

(57) **Abstract:** According to the present invention, there are developed and provided a nucleic acid agent that is delivered efficiently to the central nervous system where drug delivery is impeded by the blood-brain barrier mechanism and that provides an antisense effect on a target transcript at the delivery location, and a composition that contains the nucleic acid agent. Provided is a double-stranded nucleic acid complex obtained by annealing a first nucleic acid strand that hybridizes with a portion of a target transcript and has an antisense effect on the target transcript and a second nucleic acid strand that includes a base sequence complementary to the first nucleic acid strand and binds with phosphatidylethanolamine or an analog thereof.

(57) 要約：血液脳関門機構により薬剤送達が阻まれる中枢神経系へ効率的に送達され、かつその送達場所で標的転写産物に対してアンチセンス効果をもたらす核酸剤、及びそれを含む組成物を開発し、提供する。 標的転写産物の一部にハイブリダイズし、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有する第１核酸鎖と、第１核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合している第２核酸鎖がアニールしてなる二本鎖の核酸複合体を提供する。

WO 2019/177061 A1

［続葉有］

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ： 核酸複合体

技術分野

[0001] 本発明は、神経系、特に中枢神経系においてアンチセンス効果をもたらし得る核酸複合体又はその塩、及びそれを含む組成物等に関する。

[0002] （発明の背景）

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] 特許文献１では、第1オリゴマー化合物、及びコレステロール等の共役基を含む第2オリゴマー化合物からなり、肝外組織若しくは肝外細胞、又は肝組織若しくは肝細胞における標的核酸の量や活性を調節することのできる二本鎖核酸分子や、該二本鎖核酸分子からなるアンチセンス化合物が開示されている。

[0004] ところで、脳を含む中枢神経系においてアンチセンス効果を発揮させるためには前記ASO等の核酸剤を中枢神経系に送達させる必要がある。しかし、脳には、血液を介して脳へ移行される物質を選択し、制限する血液脳関門（Blood Brain Barrier：以下、本明細書ではしばしば「BBB」と表記する）と呼ばれる機構が存在する。このBBB機構は、有害物質から脳を保護する一方で、脳への薬剤送達の障壁にもなっている。それ故に脳を含む中枢神経系へASO等の核酸剤を送達する方法が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2017/053999号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、神経系、特にBBB機構により薬剤送達が阻まれる中枢神経系へ効率的に送達され、かつ送達場所で標的転写産物に対してアンチセンス効果をもたらす核酸剤、及びそれを含む組成物を提供することを課題とする。

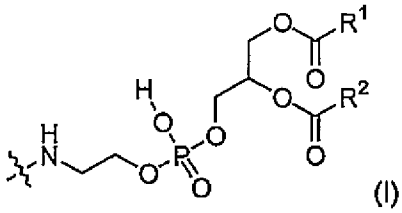
課題を解決するための手段

[0007] 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、ASOと、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体を結合させたASOの相補鎖とをアニールさせた核酸複合体が中枢神経系に効率的に送達され、そこで高いアンチセンス効果を示すことを見出した。これらの知見に基づき、本発明者らは本発明を完成するに至った。すなわち本発明は以下を包含する。

[0008] （１）第１核酸鎖と第２核酸鎖とを含む核酸複合体又はその塩（本明細書では、これらをまとめてしばしば「本発明の核酸複合体」と略記する場合がある）であって、該第１核酸鎖は標的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塩基配列を含み、かつ、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、該第２核酸鎖は該第１核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合しており、該第１核酸鎖は該第２核酸鎖にアニールしている前記核酸複合体又はその塩。

（２）前記ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が一般式Iで表される、（１）に記載の核酸複合体又はその塩。

[化1]



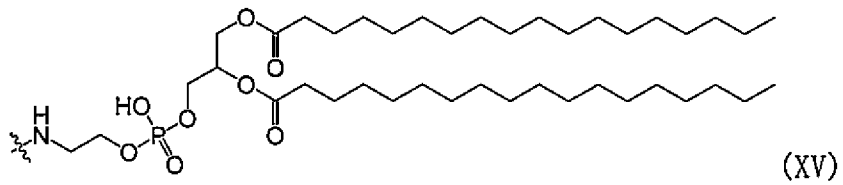
(I)

（式中、R^1及びR^2は、それぞれ独立に、置換された又は置換されていないC_5～C_{32}のアルキル基、又は置換された又は置換されていないC_5～C_{32}アルケニル基を表す）

（３）前記R^1及びR^2が、それぞれ独立に、C_{15}～C_{19}のアルキル基、又はC_{17}のアルケニル基である、（２）に記載の核酸複合体又はその塩。

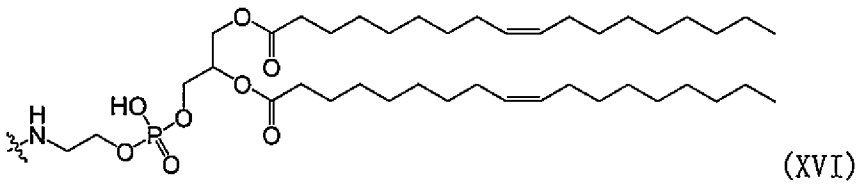
（４）前記ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が一般式XV～XXIIIで表される、（１）～（３）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩。

[化2]



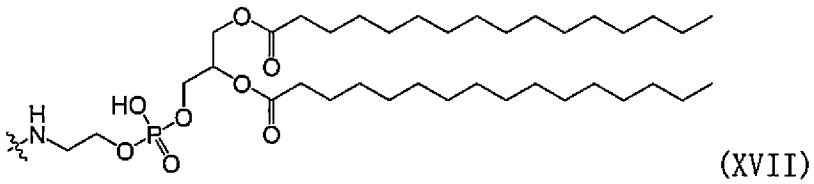
(XV)

[化3]



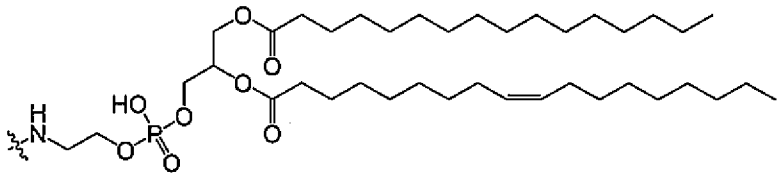
(XVI)

[化4]



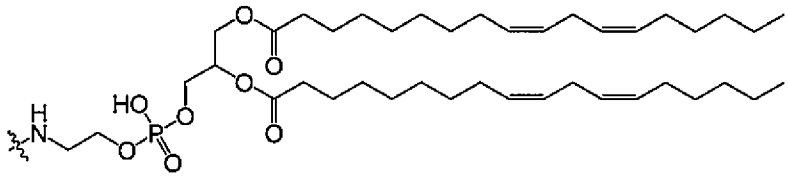
(XVII)

[化5]



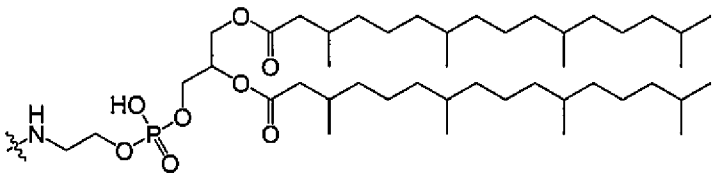
(XVIII)

[化6]



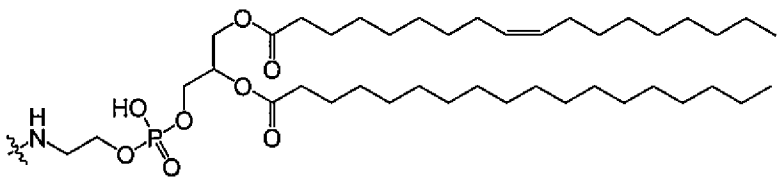
(XIX)

[化7]



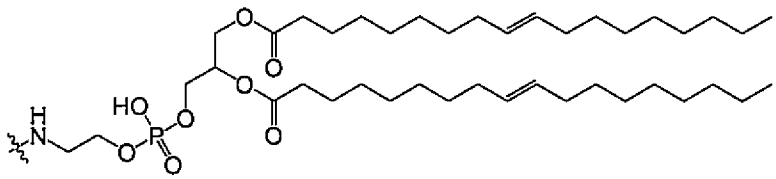
(XX)

[化8]



(XXI)

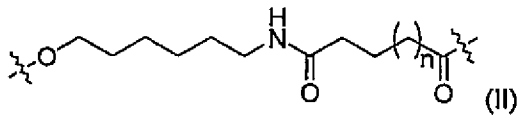
[化9]



(XXII)

（５）前記第２核酸鎖が一般式IIで表されるリンカーを介してホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合している、（１）～（４）に記載の核酸複合体又はその塩。

[化10]



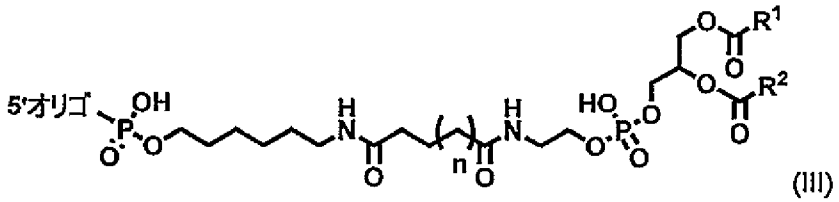
(II)

（式中、ｎは０又は１である）

（６）前記第２核酸鎖の５’末端に、前記リンカーを介してホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が結合している、（５）に記載の核酸複合体。

（７）前記リンカー結合された前記ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が一般式IIIで表される、（５）又は（６）に記載の核酸複合体又はその塩。

[化11]



(III)

（式中、5’オリゴは、オリゴヌクレオチドの5’末端を示す。また、式中、R^1及びR^2は、前記一般式Iに記載のR^1及びR^2と、及びｎは、前記一般式IIに記載のｎと、同義である。）

（８）前記第１核酸鎖が少なくとも４個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む、（１）～（７）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩。

（９）前記第１核酸鎖がギャップマーである、（１）～（８）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩。

（１０）前記ギャップマーがLNA／DNAギャップマーである、（９）に記載の核酸複合体又はその塩。

（１１）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核酸複合体又はその塩。

（１２）前記第１核酸鎖がミックスマーである、（１）～（７）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩。

（１３）前記第１核酸鎖が１３～２０塩基長である、（１）～（１２）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩。

（１４）前記第２核酸鎖が天然リボヌクレオシドを含まない、（１）～（１３）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩。

（１５）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成る、（１）～（１４）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩。

（１６）（１）～（１５）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩を含む、中枢神経系において標的転写産物の発現又は編集を調節するための組成物。

（１７）中枢神経系疾患治療用である、（１６）に記載の組成物。

（１８）（１）～（１５）のいずれかに記載の核酸複合体又はその塩を含む、中枢神経系薬剤送達用組成物。

（１９）前記中枢神経系が大脳皮質、大脳基底核、大脳白質、間脳、脳幹、小脳、及び脊髄からなる群から選択される、（１６）～（１８）のいずれかに記載の組成物。

（２０）前記中枢神経系が前頭葉、側頭葉、海馬、海馬傍回、頭頂葉、後頭葉、線条体、淡蒼球、前障、視床、視床下核、中脳、黒質、橋、延髄、小脳皮質、小脳核、頸髄、胸髄及び腰髄からなる群から選択される、（１６）～（１８）のいずれかに記載の組成物。

（２１）静脈内投与用又は皮下投与用である、（１６）～（２０）のいずれかに記載の組成物。

（２２）１回の投与量中に5mg/kg以上の前記核酸複合体又はその塩を含む、

（１６）～（２１）のいずれかに記載の組成物。

（２３）前記核酸複合体又はその塩がBBBを通過する、（１６）～（２２）のいずれかに記載の組成物。

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2018-047294号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0009] 本発明により、中枢神経系へ効率的に送達し、かつ送達場所でアンチセンス効果をもたらす核酸剤、及びそれを含む組成物を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、本発明の核酸複合体の基本構成を示す模式図である。この図では、第2核酸鎖におけるホスファチジルエタノールアミンの結合位置による2つの様式を示している。図1aは、第2核酸鎖の5'末端にホスファチジルエタノールアミンが結合している核酸複合体を示し、図1bは、第2核酸鎖の3'末端にホスファチジルエタノールアミンが結合している核酸複合体を示す。ここでは図示しないが、第2核酸鎖の5'末端及び3'末端の両端にホスファチジルエタノールアミンが結合していてもよい。

[図2]図2は、アンチセンス法の一般的な機構の一例を示す図である。図中、「X」は遺伝子の発現から翻訳までの工程で抑制又は阻害する箇所を示す。破線内の図は、ヘテロ二本鎖部分がRNase Hによって認識され、標的遺伝子のmRNAが分解される模式図である。

[図3]図3は、様々な架橋核酸の構造を示す図である。

[図4]図4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である。

[0011] （発明の詳細な説明）

１．核酸複合体

本発明の第１態様は、核酸複合体、より好ましくは血液脳関門通過型核酸複合体である。この核酸複合体は、第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む。第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含むヌクレオチド鎖である。核酸複合

体において、第1核酸鎖は、第2核酸鎖にアニールしている。一実施形態では、第2核酸鎖は、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合している。

[0012] 核酸複合体の代表的な模式図を図1に示す。図1aは、第2核酸鎖の5'末端にホスファチジルエタノールアミンが結合している核酸複合体を示す。図1bは、第2核酸鎖の3'末端にホスファチジルエタノールアミンが結合している核酸複合体を示す。ここでは図示しないが、第2核酸鎖の5'末端及び3'末端の両端にホスファチジルエタノールアミン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にホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が結合していてもよい。

[0013] 一実施形態において、第1核酸鎖は、標的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塩基配列を含むヌクレオチド鎖である。特定の実施形態において、第1核酸鎖は、標的遺伝子の転写産物又は標的転写産物に対してアンチセンス効果を有するヌクレオチド鎖である。

[0014] (用語の定義)

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標的となり得、かつDNA依存性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)を含み得る。

[0015] 本明細書において「標的遺伝子」は特に限定されないが、例えば、本発明の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。また、標的転写産物には、標的遺伝子をコードするゲノムDNAから転写されるmRNAであり、さらにまた、塩基修飾を受けていないmRNA、プロセシングされていないmRNA前駆体等を含む。「標的転写産物」は、mRNAだけでなく、miRNA等のノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)も含み得る。さらに一般的に「転写産物」は、DNA依存性RN

Aポリメラーゼによって合成される任意のRNAであってよい。一実施形態では、「標的転写産物」は、例えば、スカベンジャー受容体B1(scavenger receptor B1：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 mRNA」と表記する)又は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）ノンコーディングRNAであってもよい。配列番号３にマウスMalat1ノンコーディングRNAの塩基配列を、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。また、配列番号５にマウスSR-B1 mRNAの塩基配列を、配列番号６にヒトSR-B1 mRNAの塩基配列を示す。そして、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１～８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。

[0016] 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「アンチセンス核酸」とは、標的転写産物の少なくとも一部、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。

[0017] 「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、スプライシング機能改変効果（例えば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、図２で示すように、翻訳の阻害では、オリゴヌクレオチド(例、RNA)がASOとして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等に結合して部分的二本鎖が形成される。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タンパク質の発現が翻訳レベルで阻害される（図２破線外×印）。一方、DNAを含むオリゴヌクレオチドがASOとして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(図２破線内)。これは、「RNase H依存性経路」と称される。さらに、特定の例において、アンチセンス効果は、mRNA前駆体のイントロンを標的化することによってもたらされ得る。アンチセンス効果はまた、miRNAを標的化することによってもたらされてもよく、この場合、当該miRNAの機能は阻害され、当該miRNAが通常発現を制御している遺伝子の発現は増加し得る。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。

[0018] 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意味する。

[0019] 「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。

[0020] 「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。

[0021] 「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。

[0022] 本明細書中で使用される用語「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。

[0023] 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、それぞれ「DNAヌクレオシド」及び「RNAヌクレオシド」と称することもある。同様に、「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。

[0024] 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。

[0025] 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。「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。

[0026] 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３に架橋核酸を一部例示する。

[0027] 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'-$(CH_2)_p$-O-2'、4'-$(CH_2)_p$-CH_2-2'、4'-$(CH_2)_p$-S-2'、4'-$(CH_2)_p$-O CH_2O-2'、4'-$(CH_2)_n$-N(R_3)-O-$(CH_2)_m$-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に関し、3'位の炭素原子上のOR_2置換基及び5'位の炭素原子上のOR_1置換基において、R_1及び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いてもよく、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$P(R_4)R_5$[ここで、R_4及びR_5は、互いに同一であっても異なっていてもよく、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'-CH_2-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、α-L-メチレンオキシ(4'-CH_2-O-2')BNA若しくはβ-D-メチレンオキシ(4'-CH_2-O-2')BNA、エチレンオキシ(4'-$(CH_2)_2$-O-2')BNA(ENAとしても知られている)、β-D-チオ(4'-CH_2-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH_2-O-N(R_3)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH_2-N(R_3)-O-2')BNA(2',4'-BNA^{NC}としても知られている)、2',4'-BNA^{coc}、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH_3)-O-2')BNA(cEt BNAとしても知られている)、(4'-CH(CH_2OCH_3)-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(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。本明細書において、メチレンオキシ(4'-CH_2-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。

[0028] 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。

[0029] 「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。モルホリノ核酸の構造の一例を図４に示す。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。

[0030] 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。

[0031] 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-ブロモシトシン、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-ブロモアデニン、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。好ましい修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。「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。

[0032] 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、C_1-C_{12}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'-OCH_3(2'-OMe基若しくは2'-O-メチル基)、及び2'-$O(CH_2)_2OCH_3$置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、-O-アリル、-O-C_1-C_{10}アルキル、-OCF_3、-$O(CH_2)_2SCH_3$、-$O(CH_2)_2$-O-N(Rm)

(Rn)、及びO-CH_2-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_1-C_{10}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。

[0033] 修飾糖の調製方法は、当業者に周知である。修飾糖部分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分(天然、修飾、又はそれらの組み合わせ)は、適切な核酸標的とのハイブリダイゼーションのために維持されてよい。

[0034] 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、修飾ヌクレオシド間結合(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。

[0035] 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、修飾後の本発明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本発明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、修飾前の本発明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。

[0036] 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。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。

[0037] 本明細書において「アルキル」は、直鎖状または分岐状の、非環状飽和脂肪族炭化水素を意味する。例えば、炭素数1～32の直鎖状または分枝状のアルキルとしては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルプロピル、ヘキシル、イソヘキシル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、2-エチルブチル、オクチル、デシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、2,6,10-トリメチルウンデシル、ペンタデシル、3,7,11-トリメチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、6,10,14-トリメチルペンタデカン-2-イル、ノナデシル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル、イコシル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル、ヘニコシル、ドコシル、トリコシル、テトラコシル等があげられる。

[0038] 本明細書において「アルケニル」は、直鎖状または分岐状の、少なくとも１つの二重結合を含有するアルケニルを意味する。アルケニルには、シス異性体とトランス異性体の両方が含まれる。例えば、炭素数2～32の直鎖状または分枝状のアルケニルとしては、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-ヘキセニル、3-ヘキセニル、5-ヘキセニル、8-ヘプタデセニル、(E)-8-ヘプタデセニル、(Z)-8-ヘプタデセニル、ヘプタデサ-8,11-ジエニル、(8Z,11Z)-ヘプタデサ-8,11-ジエニル、(8E,11E)-ヘプタデサ-8,11-ジエニル、(8Z,11E)-ヘプタデサ-8,11-ジエニル、(8E,11Z)-ヘプタデサ-

8,11-ジエニル、テトラデカ-9-エニル、(Z)-テトラデカ-9-エニル、(Z)-ヘキサデカ-9-エニル、オクタデカ-6-エニル、(Z)-オクタデカ-6-エニル、オクタデカ-9-エニル、(Z)-オクタデカ-9-エニル、(E)-オクタデカ-9-エニル、オクタデカ-11-エニル、(Z)-オクタデカ-11-エニル、オクタデカ-9,12-ジエニル、(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル、オクタデカ-9,12,15-トリエニル、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエニル、イコサ-11-エニル、(Z)-イコサ-11-エニル、イコサ-11,14-ジエニル、(11Z,14Z)-イコサ-11,14-ジエニル、3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエニル、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデカ-2-エニル、ドコサ-13-エニル、(Z)-ドコサ-13-エニル等があげられる。

[0039] 本明細書中で使用される用語「血液脳関門（BBB）」は、前述のように、脳へ移行する物質を選択及び制限する機構であり、脳を有害物質から保護する役割を担っている。

[0040] 本明細書中で使用される用語「中枢神経系」とは、脳及び脊髄からなり、末梢神経系と共に神経系を構成する組織である。脳は、大脳(大脳皮質、大脳白質、大脳基底核)、間脳(視床、視床下核)、小脳(小脳皮質、小脳核)及び脳幹(中脳、黒質、橋、延髄)を含む。また、脊髄は、頸髄、胸髄、腰髄、仙髄及び尾髄を含む。本明細書における中枢神経系は、これらのいずれの領域であってもよいが、大脳皮質(前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉)、小脳、線条体、淡蒼球、前障、海馬、海馬傍回、脳幹、頸髄、胸髄又は腰髄が好ましい。

[0041] 本明細書において「その塩」とは、本発明の核酸複合体の塩であって、本発明の核酸複合体の生理学的におよび製薬上許容される塩、すなわち、当該核酸複合体の所望される生物学的な活性を保持し、そこで望まれない毒物学的効果を与えない塩のことをいう。そのような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような

無機塩；ｔ－オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル－フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩、ジオラミン塩、メグルミン塩のようなアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩；酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩が挙げられる。

[0042] 特定の実施形態において、本発明の核酸複合体は、核酸複合体の任意の薬学的に許容される塩、核酸複合体のエステル、または当該エステルの塩を包含する。好適な薬学的に許容される塩には、ナトリウム塩、カリウム塩及びメグルミン塩が挙げられるが、これらに限定されない。

[0043] （第1核酸鎖と第2核酸鎖の構成）

第1核酸鎖は、標的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。

[0044] 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、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合している。本発明の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。

[0045] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基長は、通常、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が、特に限定されない。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核酸鎖及び第2核酸鎖は、約100塩基長であってもよいし、又は、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。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、合成収率など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。

[0046] 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よい。

[0047] 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。

[0048] 第2核酸鎖の5'末端及び3'末端において、ホスファチジルエタノールアミン未結合の末端の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。

[0049] 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。

[0050] 第2核酸鎖の5'末端及び3'末端において、ホスファチジルエタノールアミン未結合の末端の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。

[0051] 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よい。

[0052] 本明細書では、第1核酸鎖の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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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、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。

[0057] 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。

[0058] 本発明の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)であってもよい。本明細書において「ギャップマー」とは、中央領域（DNAギャップ領域）と、その5'末端及び3'末端の両側に配置された5'ウイング領域及び3'ウイング領域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含む。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、2又は3個であってもよい。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「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。

[0059] 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塩基長の架橋ヌクレオシドから構成されていてもよい。

[0060] 本発明の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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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つ含んでもいてもよい。修飾ヌクレオシドは、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。

[0064] 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いてもでよい。

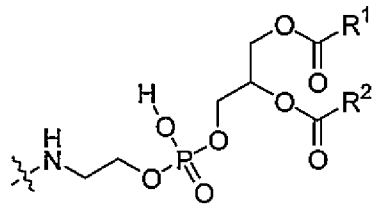
[0065] 第2核酸鎖は、ホスファチジルエタノールアミン（PhosphatidylEthanolamine：本明細書では、しばしば「PE」と表記する）又はその類縁体と結合している。

[0066] ホスファチジルエタノールアミン（PE)は、ホスファチジン酸のリン酸基にエタノールアミンがエステル結合した構造を有する中性リン脂質である。ホスファチジン酸は、グリセロールの1位及び2位の水酸基に様々なカルボキシル基（脂肪酸）がエステル結合し、また3位の水酸基にリン酸がエステル結合をしたグリセロリン脂質をいう。PEはセファリン（cephalin）とも呼ばれ、生物細胞膜の重要な構成成分であり、細胞膜の分裂や融合、維持及び膜タンパク質の安定化等に機能している。

[0067] 第2核酸鎖に結合するPE又はその類縁体から誘導される基（本明細書中、「PE基」と略記されることがある）は、以下の一般式Iで示される。

[0068]

[化12]

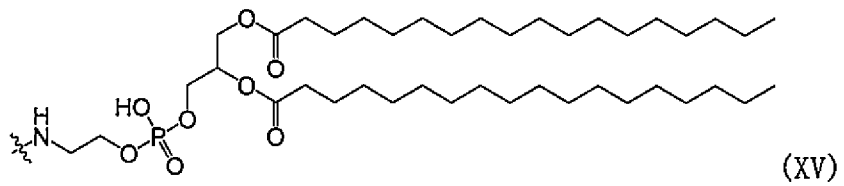


(I)

式中、R^1及びR^2は、それぞれ独立に、置換された又は置換されていないC_5～C_{32}、好ましくは$C_{15\sim19}$のアルキル基（例、ペンタデシル、ヘプタデシル、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル）、さらに好ましくはC_{17}のアルキル基（例、ヘプタデシル）又は置換された又は置換されていないC_5～C_{32}、好ましくはC_{17}のアルケニル基（例、ヘプタデセニル（例、8-ヘプタデセニル（例、(E)- 8-ヘプタデセニル、(Z)- 8-ヘプタデセニル）、ヘプタデサ-8,11-ジエニル（例、(8E,11E)-ヘプタデサ-8,11-ジエニル））を表す。

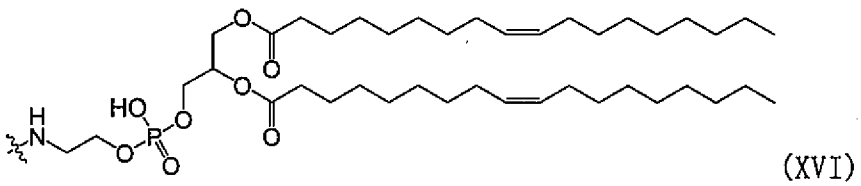
[0069] 一実施形態では、第2核酸鎖に結合するPE又はその類縁体から誘導される基は、以下の一般式XV～XXIIで示される。

[化13]



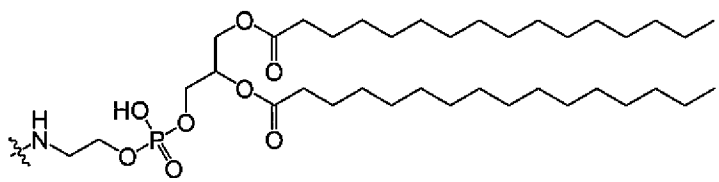
(XV)

[化14]



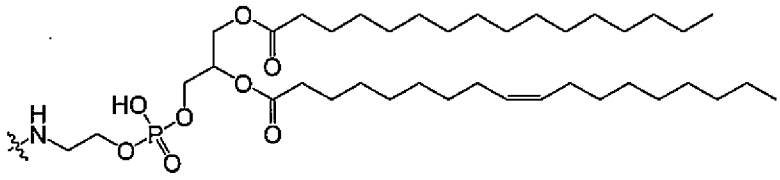
(XVI)

[化15]



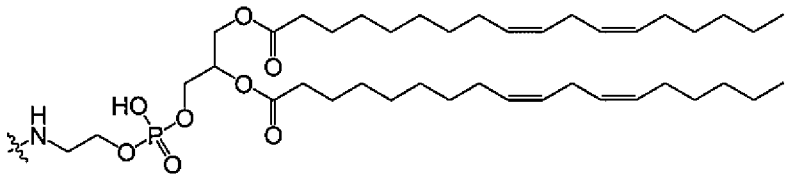
(XVII)

[化16]



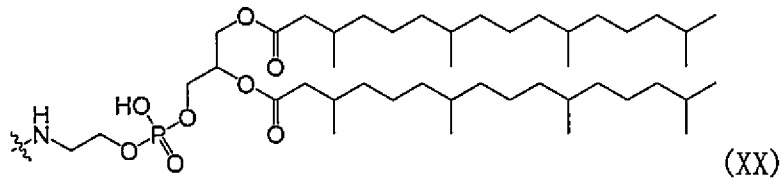
(XVIII)

[化17]



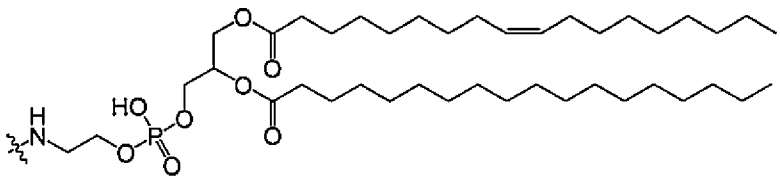
(XIX)

[化18]



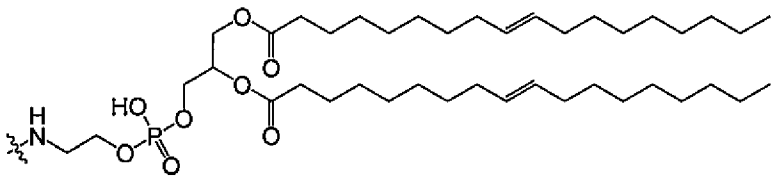
(XX)

[化19]



(XXI)

[化20]



(XXII)

[0070] 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、代謝産物等を含む。ある化合物が別の化合物の類縁体であるかどうかは、当業者であれば判定できる。PE又はその類縁体は、当業者であれば

自体公知の方法により製造することができる。

[0071] 第2核酸鎖は、PE又はその類縁体を1つ以上含む。第2核酸鎖がPE又はその類縁体を1つ含む場合、PE又はその類縁体は第2核酸鎖の5'末端、3'末端、又は第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに連結されている。好ましくは5'末端、又は3'末端である。また、第2核酸鎖がPE及び／又はその類縁体を2つ以上含む場合、それらは第2核酸鎖の複数の位置に連結されていてもよく、及び／又は第2核酸鎖の1つの位置に一群として連結されていてもよい。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いるのが好ましい。

[0072] 第2核酸鎖とPE又はその類縁体との結合は、直接結合及び間接結合を問わない。直接結合とは2つの分子が直接的に結合することをいう。間接結合とは、結合すべき2つの分子が別の物質を介在して結合することをいう。

[0073] 一実施形態において、第2核酸鎖とPE及び／又はその類縁体との結合は、第2核酸鎖の5'末端、3'末端、又は第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合していてもよい。

[0074] 一実施形態では、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合している。

[0075] 一実施形態では、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合を介して結合している。

[0076] 第2核酸鎖とPE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、第2核酸鎖の5'末端、3'末端、又は第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合していてもよい。

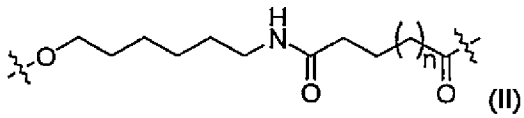
[0077] 一実施形態では、リンカーは、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合している。

[0078] 一実施形態では、リンカーは、第2核酸鎖の5'末端に、リン酸エステル結合を介して結合している。

[0079] 前記リンカーの一具体例として、以下の一般式IIで表されるリンカーが挙

げられる。

[0080] [化21]



(II)

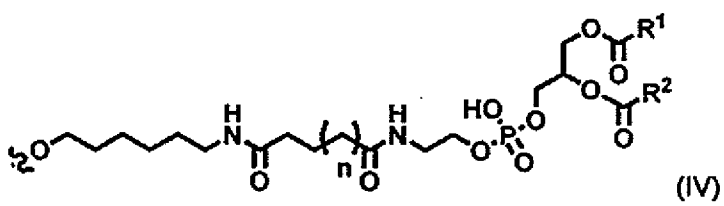
式中、ｎは０又は１を表す。

[0081] 第2核酸鎖とPE又はその類縁体が間接結合をする場合、両者は切断可能なリンカーを介して結合していてもよい。「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）で切断され得る連結基をいう。切断可能なリンカーは、ヌクレアーゼ、ペプチダーゼ等の内在性酵素、酸性条件、還元的環境下等によって選択的に切断されてもよい。そのような具体例として、例えば、アミド結合、エステル結合、リン酸エステル結合、ホスホジエステル結合の一方若しくは両方のエステル結合、カルバメート結合、及びジスルフィド結合、並びに天然DNAリンカー等のヌクレオチドリンカーが挙げられる。

[0082] 反対に、第2核酸鎖とPE又はその類縁体が間接結合をする場合、両者は非切断性（uncleavable）リンカーを介して結合していてもよい。「非切断性リンカー」は、生理学的条件下では切断されない連結基をいう。そのような非切断性リンカーとして、例えば、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又は非修飾のデオキシリボヌクレオシド、又は修飾又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。

[0083] 一実施形態では、第2核酸鎖とPE又はその類縁体が間接結合をする場合、リンカーと結合されたPE基は、以下の一般式IVで示される。

[0084] [化22]



(IV)

式中、R^1及びR^2は、前記一般式IのR^1及びR^2と同義であり、またｎは、前記一般式IIのｎと同義である。

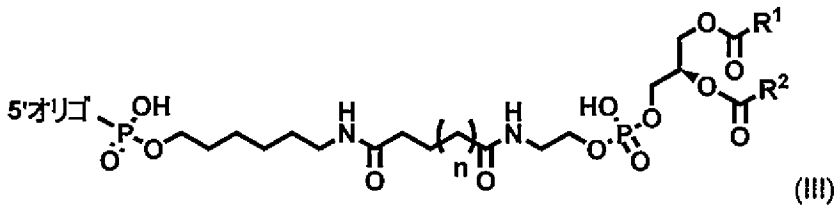
[0085] 第2核酸鎖と一般式IVで示す基との結合は、第2核酸鎖の5’末端、3’末端、又は第2核酸鎖の内部のヌクレオチドにリン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合していてもよい。

[0086] 一実施形態では、一般式IVで示す基は、第2核酸鎖の5’末端にリン酸エステル結合又はホスホロチオエート結合を介して結合している。

[0087] 一実施形態では、一般式IVで示す基は、第2核酸鎖の5’末端にリン酸エステル結合を介して結合している。

[0088] 一実施形態では、第2核酸鎖の5’末端にPE又はその類縁体が間接結合をする場合、リンカーと結合されたPE基は、以下の一般式IIIで示される。

[0089] [化23]



(III)

式中、5’オリゴは、結合するオリゴヌクレオチドの5’末端を示す。R^1及びR^2は、前記一般式IのR^1及びR^2と同義であり、またｎは、前記一般式IIのｎと同義である。

[0090] 切断可能なリンカー又は非切断性リンカーの鎖長は、DNA等の核酸又はオリゴヌクレオチドの場合、特に限定はされないが、通常は1～20塩基長、1～10塩基長又は1～6塩基長でよい。

[0091] 特定の実施形態において、本発明の核酸複合体が、光学異性体、立体異性体、位置異性体、回転異性体を含有する場合には、これらも本発明の核酸複合体として含有されるとともに、自体公知の合成手法、分離手法によりそれぞれを単品として得ることができる。例えば、本発明の核酸複合体に光学異性体が存在する場合には、該化合物から分割された光学異性体も本発明の核酸複合体に包含される。

[0092] 特定の実施形態において、本発明の核酸複合体は、プロドラッグ及び当該プロドラッグの薬学的に許容される塩を含む。本発明の核酸複合体のプロドラッグ及び当該プロドラッグの薬学的に許容される塩は、生体内における生理条件下で酵素、胃酸等による反応により本発明の核酸複合体に変換する化合物、すなわち酵素的に酸化、還元、加水分解等を起こして本発明の核酸複合体に変化する化合物、胃酸等により加水分解等を起こして本発明の核酸複合体に変化する化合物をいう。特定の実施形態において、本発明の核酸複合体のプロドラッグは、第1核酸鎖または第2核酸鎖に結合されたPE又はその類縁体を１つ以上含む。

[0093] 本発明の核酸複合体は、二本鎖核酸複合体の第2核酸鎖の末端にPE又はその類縁体を結合したときに、二本鎖核酸複合体が血液脳関門（BBB）を通過し、脳等の中枢神経系への送達効率が増大することは当該分野でも知られていなかった。本発明では、この予想外の知見に基づいている。

[0094] 本発明の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、本発明の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できる。具体的には、細胞内の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)がアンチセンス効果によって低下することを前述の公知技術を用いて検証すればよい。

[0095] 本発明の核酸複合体の中枢神経系におけるアンチセンス効果の測定、及び血液脳関門の通過の判定も当該分野で公知の方法で測定できる。限定はしないが、例えば、本発明の核酸複合体を被験体（例えばマウス）に投与し、数日後～数ヶ月後（例えば2～7日後又は1ヶ月後）に中枢神経系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が抑制されるか否かを測定することで前記判定が可能となる。前記判定の基準は、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、本発明の核酸複合体が血液脳関門を通過し、中枢神経系にアンチセンス効果をもたらしたと判定できる。また、血液脳関門の通過の判定は、本発明の核酸複合体を被験体(例えばマウス)に投与し、数日後～数ヶ月後（例えば2～7日後又は1ヶ月後）に、中枢神経系における本発明の核酸複合体の存在量(濃度)を測定することによって判定することができる。

[0096] 上記のように、本発明の核酸複合体の例示的実施形態について説明したが、本発明の核酸複合体は上記の例示的実施形態に限定されない。さらに、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、様々な実施形態による本発明の核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖を製造することができる。例えば、本発明の核酸分子は、標的転写産物の塩基配列（例えば、標的遺伝子の塩基配列）情報に基づいて各核酸分子を設計し、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核酸を合成し、その後、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により製造することができる。

[0097] 一実施形態では、機能性部分が結合している本発明の核酸複合体は、機能性部分が予め結合した核酸種を用いて、上記の合成、精製及びアニーリングを実施することによって製造することができる。例えば、PE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核酸鎖を製造することができる。

[0098] 一実施形態では、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、自体公知の方法によりPE又はその類縁体を結合させることができる。機能性部分を核酸に連結するための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。

[0099] 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、一部の実施形態の本発明の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。

[0100] ただし、本発明の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。

[0101] 本開示は、以下の非限定的な実施形態を提供する。

[0102] 実施形態１：

第１核酸鎖と第２核酸鎖とを含む核酸複合体又はその塩であって、

該第１核酸鎖は標的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塩基配列を含み、かつ、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、

該第２核酸鎖は該第１核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合しており、

該第１核酸鎖は該第２核酸鎖にアニールしている前記核酸複合体又はその塩。

[0103] 実施形態２：

第１核酸鎖と第２核酸鎖とを含む核酸複合体又はその塩であって、

該第１核酸鎖は

（１）13～20塩基長の塩基配列を含み、

（２）標的転写産物の少なくと一部にハイブリダイズすることができ、

（３）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、かつ、

（４）標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、

該第２核酸鎖は

（１）前記第１核酸鎖中の少なくとも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み、かつ、

（２）一般式I（好ましくは、一般式XV～XXII）で表される、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合しており、

該第１核酸鎖は該第２核酸鎖にアニールしている前記核酸複合体又はその塩。

[0104] 実施形態３：

第１核酸鎖と第２核酸鎖とを含む核酸複合体又はその塩であって、

該第１核酸鎖は

（１）ヌクレオシドと任意に非天然ヌクレオシドとを含み、該核酸鎖における該ヌクレオシド及び任意に含まれる該非天然ヌクレオシドの総数は13～20であり、

（２）標的転写産物の少なくと一部にハイブリダイズすることができ、

（３）RNaseHによって認識される少なくとも４個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み、

（４）前記４つの連続したヌクレオシドの５’及び／又は３’側に位置する１又は複数の糖修飾ヌクレオチドである非天然ヌクレオシドを含み、かつ

（５）標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、

該第２核酸鎖は

（１）前記第１核酸鎖中の少なくとも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み、

（２）前記少なくとも４つの連続したリボヌクレオシドの５’側に位置する１以上の非天然ヌクレオシドを含み、

（３）前記少なくとも４つの連続したリボヌクレオシドの３’側に位置する１以上の非天然ヌクレオシドを含み、かつ

（４）一般式I（好ましくは、一般式XV～XXII）で表される、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合しており、

該第１核酸鎖は該第２核酸鎖にアニールしている前記核酸複合体又はその塩。

[0105] 実施形態４：

第１核酸鎖と第２核酸鎖とを含む核酸複合体又はその塩であって、

該第１核酸鎖は

（１）ヌクレオシドと任意に非天然ヌクレオシドとを含み、該核酸鎖における該ヌクレオシド及び任意に含まれる該非天然ヌクレオシドの総数は13～20であり、

（２）標的転写産物の少なくと一部にハイブリダイズすることができ、

（３）RNaseHによって認識される少なくとも４個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み、

（４）前記４つの連続したヌクレオシドの５’及び／又は３’側に位置する１又は複数の糖修飾ヌクレオチドである非天然ヌクレオシドを含み、かつ

（５）標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、

該第２核酸鎖は

（１）前記第１核酸鎖中の少なくとも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み、

（２）前記少なくとも４つの連続したリボヌクレオシドの５’側に位置する１以上の非天然ヌクレオシドを含み、

（３）前記少なくとも４つの連続したリボヌクレオシドの３’側に位置する１以上の非天然ヌクレオシドを含み、

（４）一般式I（好ましくは、一般式XV～XXII）で表される、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合しており、かつ

（５）前記第２核酸鎖が、一般式IIで表されるリンカーを介して、（好まし

くは、前記第２核酸鎖の５’末端にて）ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合している、

該第１核酸鎖は該第２核酸鎖にアニールしている前記核酸複合体又はその塩。

[0106] （核酸複合体の効果）

本発明の核酸複合体は、被験体の中枢神経系において標的miRNAの効果を阻害することができる。例えば、具体的には、第1核酸鎖は、標的miRNAの少なくとも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、その標的miRNAに対してアンチセンス効果を有し、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、PE又はその類縁体と結合しており、第1核酸鎖と第2核酸鎖に互いにアニールしている核酸複合体が挙げられる。この核酸複合体によって標的miRNAの効果を阻害することにより、当該標的miRNAが通常ダウンレギュレートしている遺伝子の発現をアップレギュレートすることができる。

[0107] 本発明の核酸複合体は、被験体の中枢神経系において標的RNAの発現又は編集を調節することができる。例えば、具体的には、第1核酸鎖は、標的RNAの少なくとも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、標的RNAに対してアンチセンス効果を有し、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、PE又はその類縁体と結合しており、第1核酸鎖と第2核酸鎖は互いにアニールしている核酸複合体が挙げられる。ここで、「標的RNAの発現調節」とは、例えば、発現量の上方制御及び下方制御を含む。また「標的RNAの編集調節」とは、RNA編集によるスプライシングの調節、例えば、エクソンスキッピングやエクソンインクルージョンを含む。標的RNAは、ウイルス若しくは細菌のRNA、又は毒性のRNA(Toxic RNA)であってもよい。

[0108] 本発明の核酸複合体は、被験体の中枢神経系において標的mRNAの翻訳を阻害することができる。例えば、具体的には、第1核酸鎖は、標的mRNAの少なくとも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、標的mRNAに対してアンチセンス効果を有し、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、PE又はその類縁体と結合しており、第1核酸鎖と第2核酸鎖が互いにアニールしている核酸複合体が挙げられる。この核酸複合体によって第1核酸鎖が標的mRNAに結合することにより、ステリックブロックが生じ、mRNAの翻訳が阻害される。

[0109] ＜組成物＞

本発明の第２態様は組成物である。本発明の組成物は、前記第1態様の本発明の核酸複合体を有効成分として、及び／又は薬剤送達分子として包含する。前記第1態様の本発明の核酸複合体は、BBBを通過し、中枢神経系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(例えば、発現量を減少させる)ことができる。したがって、本発明の組成物は、被験体に投与することで、本発明の核酸複合体を送達し、被験体を治療する組成物であってもよく、また医薬組成物であってもよい。

[0110] また、本発明の一実施形態では、本発明の核酸複合体を含む組成物を投与することで各中枢神経系疾患を治療する治療方法に関する。

[0111] (製剤化)

本明細書において、組成物は自体公知の方法により製剤化することができる。例えば、本組成物は、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、微粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、解膠剤(peptizer)、バッカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、コーティング剤、軟膏、硬膏剤(plaster)、パップ剤(cataplasm)、経皮剤、ローション剤、吸入剤、エアロゾル剤、点眼剤、注射剤及び坐剤の形態で、経口的に又は非経口的に使用することができる。

[0112] これらの製剤の製剤化に関して、薬学的に許容可能な担体若しくは溶媒又は食品及び飲料品として許容可能な担体若しくは溶媒を適切に組み込むことができる。そのような担体又は溶媒として、具体的には滅菌水、生理食塩水、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。

[0113] （投与形態・投与量）

本明細書において、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、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、気管／気管支投与、直腸投与、及び筋肉内投与、並びに輸血による投与が挙げられる。筋肉内注射投与、静脈内点滴投与、又は埋め込み型持続皮下投与で投与することもできる。皮下投与は、患者自身による自己注射が可能であるので好適である。また、静脈内投与の場合、組成物1回の投与量中に含まれる本発明の核酸複合体の量、すなわち本発明の核酸複合体の単回投与量は、例えば、0.001mg/kg以上、0.005mg/kg以上、0.01mg/kg以上、00.25mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1mg/kg以上、2.5mg/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る。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。

[0114] （被検体・適用対象）

本明細書で「被検体」とは、本発明の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、本発明の組成物は、ヒトを含むあらゆる動物に適用することができる。ヒト以外の対象としては、例えば、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物等が適用対象となり得る。被験体は、中枢神経系で標的転写産物の発現量を減少させることが必要な個体や、中枢神経系疾患の治療が必要な個体であってもよい。

[0115] 本発明の組成物は、包含する第１態様の本発明の核酸複合体のBBB通過作用及びアンチセンス効果により、中枢神経系における標的転写産物の発現量を減少させることができる。

[0116] 本発明の組成物を中枢神経系疾患の治療用として適用する場合、適用対象疾患は、遺伝子発現の増加又は減少に関連する中枢神経系疾患、特に標的転写産物又は標的遺伝子の発現の増加に関連する疾患(腫瘍等)が好ましい。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。

[0117] 本発明の組成物の送達部位、より具体的には組成物中に含まれる有効成分の送達部位は、特に限定はしないが、各疾患に応じて適切な部位に送達されることで、より効果的な結果が得られ得る。具体例を挙げると、アルツハイマー病の治療では、海馬及び／又は頭頂葉への薬剤送達が有効となり得る。また、前頭側頭型認知症（FTD）（前頭側頭葉変性症（FTLD）、意味性認知症（SD）、進行性非流暢性失語（PNFA）等を含む）、及びピック病の治療では、前頭葉、側頭葉及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。さらに、パーキンソン病認知症の治療では、後頭葉、黒質及び／又は線条体への薬剤送達が有効となり得る。また、パーキンソン病の治療では、黒質及び／又は線条体への薬剤送達が有効となり得る。皮質基底核変性症（CBD）の治療では、前頭葉、頭頂葉、大脳基底核及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。進行性核上性麻痺（PSP）の治療では、前頭葉、大脳基底核及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。筋萎縮性側索硬化症の治療では、前頭葉、頭頂葉、大脳基底核及び／又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。脊髄小脳変性症（SCD）SCA1型～SCA34型までの治療では、脳幹及び／又は小脳への薬剤送達が有効となり得る。歯状核赤核淡蒼球ルイ体変性症（DRPLA）の治療では、大脳基底核、脳幹及び／又は小脳への薬剤送達が有効となり得る。球脊髄性萎縮症（SBMA）の治療においては、脳幹及び／又は脊髄への薬剤送達が有効となり得る。フリードライヒ失調症（FA）の治療では、脳幹及び/又は小脳への薬剤送達が有効となり得る。ハンチントン病の治療では、線条体、前頭葉、頭頂葉及び／又は大脳基底核への薬剤送達が有効となり得る。プリオン病(狂牛病、GSSを含む)の治療では、大脳皮質、大脳白質、大脳基底核及び/又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。大脳白質性脳症の治療では、

大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。脳炎（ウイルス性、細菌性、真菌性、結核性を含む）、髄膜炎（ウイルス性、細菌性、真菌性、結核性を含む）の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。代謝性脳症、中毒性脳症、栄養障害性脳症の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。大脳白質性脳症の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、もやもや病、無酸素脳症の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。大脳白質性脳症の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。びまん性軸索損傷（Diffuse axonal injury）の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。頭部外傷の治療では、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。多発性硬化症（MS）、視神経脊髄炎（NMO）の治療では、大脳白質、大脳皮質、視神経及び／又は脊髄への薬剤送達が有効となり得る。筋緊張型ジストロフィー症（DM1, DM2）の治療では、骨格筋、心筋、大脳皮質及び／又は大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。家族性痙性対麻痺（HSP）の治療では、頭頂葉及び／又は脊髄への薬剤送達が有効となり得る。福山型筋ジストロフィーの治療では、骨格筋、大脳皮質及び／又は大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。レビー小体型認知症（DLB）の治療では、黒質、線条体、後頭葉、前頭葉及び／又は頭頂葉への薬剤送達が有効となり得る。多系統萎縮症（MSA）の治療では、線条体、大脳基底核、小脳、黒質、前頭葉及び／又は側頭葉への薬剤送達が有効となり得る。アレキサンダー病の治療では、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。CADASIL、CARASILの治療においては、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。

[0118] 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、被験体の年齢（月齢、週齢を含む）、体重、症状及び健康状態、組成物の種類（医薬品、食品及び飲料品等）等に従って適切に選択すればよい。本発明の組成物の被検体への摂取有効量は、例えば、包含する本発明の核酸複合体が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。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。上記の本発明の核酸複合体の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、00.25mg/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。

[0119] 本発明の核酸複合体は、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、本発明の核酸複合体は、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、毒性を下げ、被検体への負荷を低減することができる。

[0120] 本発明の核酸複合体の単回投与によるBBB通過量、BNB通過量には制限（上限）があるが、反復投与でも抑制効果は細胞内において相加的に働くと考えられる。すなわち、BBB通過、BNB通過の制限以上の高用量（例えば25mg/kg以上）では1回の投与量の増量では有効性の増強は低減するが、ある程度の投与間隔（例えば、半日以上）をおいた反復投与により有効性を向上させることができると考えられる。

[0121] 特定の実施形態において、本発明の核酸複合体は、水、日本薬局方溶出試験第２液、また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）等の医薬品として優

れた性質も有する。

[0122] （薬剤送達）

本発明の組成物は、有効成分として含有する第1態様の本発明の核酸複合体がBBBを通過し、中枢神経系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、その薬剤を神経系、特に中枢神経系に送達することができる。神経系に送達される薬剤は、特に限定されないが、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。薬剤は、好ましくは、小分子薬剤である。「小分子薬剤」とは、当該技術分野において十分に理解されている。小分子薬剤は、典型的には、1,000ダルトン未満の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、ホスファチジルエタノールアミン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。

[0123] 本発明の組成物は、以下の実施例で開示される通り、高効率に中枢神経系に送達され、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改変又は抑制することができる。したがって、被験体の中枢神経系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、上記の本発明の核酸複合体を含む組成物を被験体に投与することを含む、方法が提供される。当該方法は、被験体の中枢神経系疾患を治療する方法であってもよい。また、被験体の中枢神経系に薬剤を送達する方法であって、上記の本発明の核酸複合体を含む組成物を被験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

[0124] 本発明は、更に以下の実施例によって詳しく説明されるが、これらは本発明を限定するものではなく、また本発明の範囲を逸脱しない範囲で変化させてもよい。

[0125] 以下の実施例中の「室温」は、通常、約10℃～約35℃を示す。混合溶媒において示した比は、特に断らない限り容量比を示す。％は、特に断らない限り重量％を示す。

分取HPLC（高速液体クロマトグラフィー）において、C18と記載した場合は、オクタデシル結合シリカゲルを用いた。溶出溶媒において示した比は、特に断らない限り容量比を示す。

[0126] 以下の実施例においては下記の略号を使用する。

・DIPEA：N,N-ジイソプロピルエチルアミン

・NMP：N-メチル-2-ピロリドン

・DMAP：4-ジメチルアミノピリジン

・HATU：O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロリン酸塩

・PBS：リン酸緩衝生理食塩水

・TEAA：トリエチルアミンアセタート

・THF：テトラヒドロフラン

[0127] 以下の実施例で用いるオリゴヌクレオチドの構造を表１にまとめて示す。実施例で用いるオリゴヌクレオチドのうちASO(Malat1)及びHA-cRNA(Malat1)は、株式会社ジーンデザイン（大阪、日本）によって合成された。

[0128]

[表1]

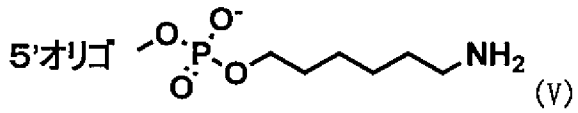
実施例で用いたオリゴヌクレオチド

二本鎖番号 (Duplex Number)	二本鎖核酸剤名	オリゴヌクレオチド名	配列（5’から3’）	配列番号
n/a	n/a	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
n/a	n/a	HA-cRNA(Malat1)	HA- G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
n/a	n/a	Glutaryl-cRNA(Malat1)	Glutaryl- G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
1	DSPE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		DSPE-cRNA(Malat1)	DSPE- G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
2	DOPE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		DOPE-cRNA(Malat1)	DOPE- G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
3	DPPE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		DPPE-cRNA(Malat1)	DPPE-G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
4	POPE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		POPE-cRNA(Malat1)	POPE-G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
5	18:1 (delta9-Trans) PE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		18:1 (delta9-Trans) PE-cRNA(Malat1)	18:1 (Δ9-Trans) PE-G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
6	18:0-18:1 PE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		18:0-18:1 PE-cRNA(Malat1)	18:0-18:1 PE-G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
7	18:2 PE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		18:2 PE-cRNA(Malat1)	18:2 PE-G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2
8	DPyPE-HDO	ASO(Malat1)	5(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^5(L)	1
		DPyPE-cRNA(Malat1)	DPyPE-G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	2

大文字(L)：LNA(5(L):5-メチルシトシンLNA)、小文字：DNA、大文字：RNA、大文字(M)：2’-OMe RNA、^：ホスホロチオエート結合

[0129] 表１において記載されるHAの構造を以下の式Vで示す。

[化24]

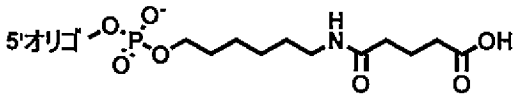


(V)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す。

[0130] 表１において記載されるGlutaryl-の構造を以下の式VIで示す。

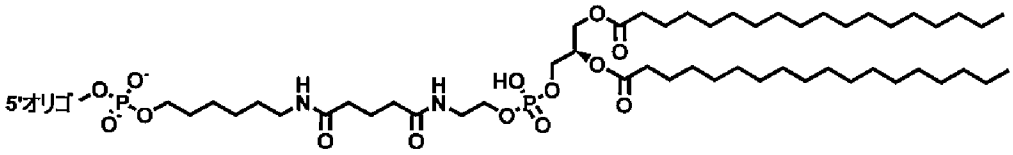
[化25]



(VI)

[0131] 表１において記載されるDSPE-の構造を以下の式VIIで示す。

[0132] [化26]

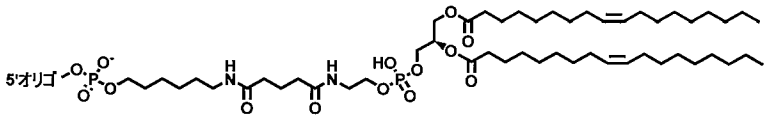


(VII)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す。

[0133] 表１において記載されるDOPE-の構造を以下の式VIIIで示す。

[0134] [化27]



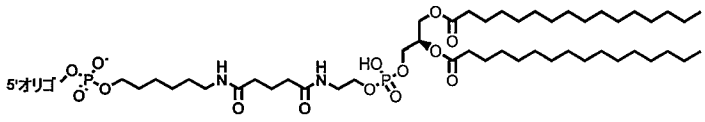
(VIII)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す。

[0135] 表１において記載されるDPPE-の構造を以下の式IXで示す。

[0136]

[化28]

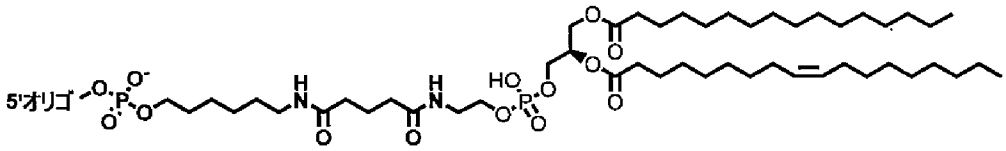


(IX)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す。

[0137] 表１において記載されるPOPE-の構造を以下の式Xで示す。

[0138] [化29]

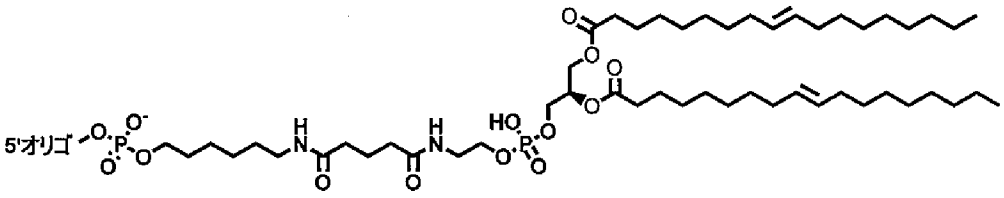


(X)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す。

[0139] 表１において記載される18:1 (delta9-Trans) PE-の構造を以下の式XIで示す。

[0140] [化30]

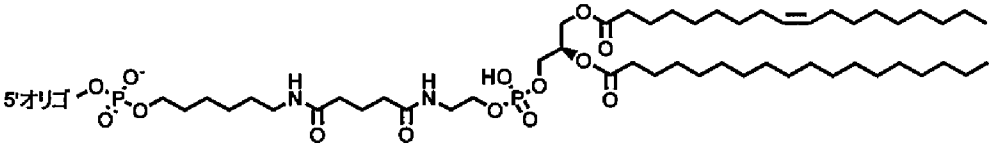


(XI)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す。

[0141] 表１において記載される18:0-18:1 PE-の構造を以下の式XIIで示す。

[0142] [化31]



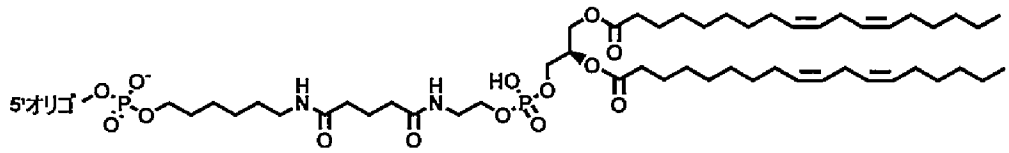
(XII)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す

。

[0143] 表１において記載される18:2 PE-の構造を以下の式XIIIで示す。

[0144] [化32]



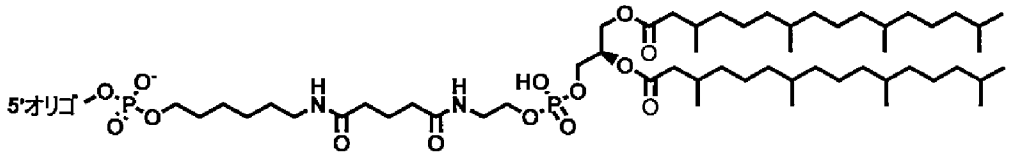
(XIII)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す

。

[0145] 表１において記載されるDPyPE-の構造を以下の式XIVで示す。

[0146] [化33]



(XIV)

式中、「5’オリゴ」という表示は、オリゴヌクレオチドの5’末端を表す

。

[0147] ＜実施例１＞

（工程１）DSPE-cRNA(Malat1)の合成

5’末端に、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1,2-Dioctadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine：DSPE）グルタリル基を結合させた転移関連肺腺癌転写産物（Malat1）のcRNA（DSPE-cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。なお、ASO(Malat1)及びHA-cRNA(Malat1)は、株式会社ジーンデザインに合成委託した。

[0148] 表1に示すRNA鎖（HA-cRNA(Malat1)）の水溶液（4000nmol）に市販のCOATSOME FE-8080SU5の50mM NMP溶液（800μL）、蒸留水（271μL）、NMP(7200μL)、×10PBS（1000μL）、DIPEA（125μL）の順にエッペン中で混合し、撹拌、沈降した後、70℃で2時間反応させた。サンプルをゲルろ過クロマトグラフィー（Sephadex G-25：GE製、移動層：蒸留水）を用いて溶媒交換した後、凍結乾燥した。残渣を分取HPLC（カラム: Xbridge OST C18 2.5μm、10mmID×50m

m：Waters製、移動相: TEAA/アセトニトリル）にて精製し、限外ろ過（Amicon ultra：メルクミリポア社製、蒸留水）により脱塩処理を行った。得られた溶液（300μL）に1M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過（Amicon ultra pore 3kDa：メルクミリポア社製、蒸留水）により脱塩処理を行った。最終物を0.20μmのメンブレンフィルターでろ過し、凍結乾燥後、標題化合物を5%ブドウ糖液として730nmolを得た。

[0149] （工程２）二本鎖核酸剤DSPE-HDOの合成

表１で示すASO(Malat1)は、Malat1ノンコーディングRNAを標的とする16merの一本鎖LNA/DNAギャップマーであり、5'末端の3個及び3'末端の3個のLNAヌクレオシド、並びにそれらの間の10個のDNAヌクレオシドを含む。このLNA/DNAギャップマーは、マウスの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）の1316～1331に相補的な塩基配列を有する。

[0150] ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例1の工程1で得られたDSPE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、溶液を70℃で7分加熱した後、室温に徐冷した。これにより両核酸鎖をアニールさせて、本発明の核酸複合体である「DSPEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（DSPE-conjugated heteroduplex oligonucleotide、DSPE-HDO）」を調製した。

[0151] ＜実施例２＞

（工程１）DOPE-cRNA(Malat1)の合成

5'末端に1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine：DOPE）グルタリル基を結合させたMalat1のcRNA（DOPE-cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。

[0152] 表1に示すRNA鎖(HA-cRNA(Malat1))の水溶液（4000nmol）を用いて、実施例１の工程1と同様の手順で5'末端にDOPEグルタリル基を結合させたcRNAとして

、DOPE-cRNA(Malat1)を合成し、5%ブドウ糖液として1050nmol得た。

[0153] （工程２）二本鎖核酸剤DOPE-HDOの合成

ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例2の工程1で得られたDOPE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、実施例1の工程2と同様にして、本発明の核酸複合体である「DOPEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（DOPE-conjugated heteroduplex oligonucleotide：DOPE-HDO）」を調製した。

[0154] ＜実施例３＞

（工程１）DPPE-cRNA(Malat1)の合成

[0155] 5'末端に1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine：DPPE）グルタリル基を結合させたMalat1のcRNA（DPPE-cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。

[0156] 表1に示すRNA鎖(HA-cRNA(Malat1))の水溶液（5500nmol）を用いて、実施例１の工程1と同様の手順で5'末端にDPPEグルタリル基を結合させたcRNAとして、DPPE-cRNA(Malat1)を合成し、5%ブドウ糖液として891nmol得た。

[0157] （工程２）二本鎖核酸剤DPPE-HDOの合成

ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例3の工程1で得られたDPPE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、実施例1の工程2と同様にして、本発明の核酸複合体である「DPPEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（DPPE-conjugated heteroduplex oligonucleotide：DPPE-HDO）」を調製した。

[0158] ＜実施例４＞

（工程１）POPE-cRNA(Malat1)の合成

5'末端に1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine：POPE）グルタリル基を結合させたMalat1のcRNA（POPE-cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。

[0159] 表1に示すRNA鎖(HA-cRNA(Malat1))の水溶液（4000nmol）を用いて、実施例１の工程1と同様の手順で5'末端にPOPEグルタリル基を結合させたcRNAとして、POPE-cRNA(Malat1)を合成し、5%ブドウ糖液として579nmol得た。

[0160] （工程２）二本鎖核酸剤POPE-HDOの合成

ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例4の工程1で得られたPOPE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、実施例1の工程2と同様にして、本発明の核酸複合体である「POPEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（POPE-conjugated heteroduplex oligonucleotide：POPE-HDO）」を調製した。

[0161] ＜実施例５＞

（工程１）Glutaryl-cRNA(Malat1)の合成

表1に示すRNA鎖（HA-cRNA(Malat1)）の水溶液（5000nmol）に市販のグルタル酸無水物の50mM NMP溶液（2000μL）、蒸留水（415μL）、NMP(6000μL)、×10PBS（1250μL）、市販のDMAP 50mM NMP溶液（2000μL）の順にエッペン中で混合し、撹拌、沈降した後、70℃で2時間反応させた。サンプルをゲルろ過クロマトグラフィー（Sephadex G-25：GE製、移動層：蒸留水）を用いて溶媒交換した後、凍結乾燥し標題化合物を4542nmol得た。

[0162] （工程２）18:1 (delta9-Trans) PE-cRNA(Malat1)の合成

5'末端に、1,2-ジエライドイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1,2-dielaidoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine：18:1 (delta9-Trans) PE）グルタリル基を結合させたMalat1のcRNA（18:1 (delta9-Trans) PE -cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。

[0163] 実施例5の工程１で合成したRNA鎖(Glutaryl-cRNA(Malat1))の水溶液（2300nmol）に、市販の18:1 (delta9-Trans) PEの25mM NMP/THF（1:1混合溶液)溶液（920μL）、蒸留水（18μL）、NMP(1668μL)、THF(2128μL)、DIPEA（72μL）、HATUの 75 mM NMP溶液（460μL）の順にエッペン中で混合し、撹拌、沈降した後、70℃で1時間反応させた。反応液をODSカラム(カラム: Purif-Pack（登録商標）-EX ODS-50 size 60、昭光サイエンス製、移動相: TEAA/アセ

トニトリル)にて精製し、限外ろ過（Amicon ultra、メルクミリポア社製、蒸留水）により脱塩処理行った。得られた溶液に1M メグルミンアセテートを10倍量加えてよく攪拌し、5分放置することでイオン交換を行った。その後、限外ろ過（Amicon ultra、メルクミリポア社製、蒸留水）により脱塩処理行った。最終物を0.20μmのメンブレンフィルターでろ過し、凍結乾燥後、標題化合物を1071 nmol得た。

[0164] （工程３）二本鎖核酸剤18:1 (delta9-Trans) PE－HDOの合成

ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例5工程2で得られた18:1 (delta9-Trans) PE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、実施例1の工程2と同様にして、本発明の核酸複合体である「18:1 (delta9-Trans) PEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（18:1 (delta9-Trans) PE -conjugated heteroduplex oligonucleotide：18:1 (delta9-Trans) PE -HDO）」を調製した。

[0165] ＜実施例６＞

（工程１）18:0-18:1 PE-cRNA(Malat1)の合成

5’末端に、1-ステアロイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine：18:0-18:1 PE）グルタリル基を結合させたMalat1のcRNA（18:0-18:1 PE-cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。

[0166] 実施例5の工程１と同様にして合成したRNA鎖(Glutaryl-cRNA(Malat1))の水溶液（2300nmol）を用いて、実施例5の工程2と同様の手順で、5’末端に18:0-18:1 PEグルタリル基を結合させたcRNAとして、18:0-18:1 PE-cRNA(Malat1)を合成し、5%ブドウ糖液として721nmol得た。

[0167] （工程２）二本鎖核酸剤18:0-18:1 PE－HDOの合成

ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例6の工程1で得られた18:0-18:1 PE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、実施例1の工程2と同様にして、本発明の核酸複合体である「18:0-18:1 PEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（18:0-18:1 PE-conjugated heter

oduplex oligonucleotide：18:0-18:1 PE-HDO）」を調製した。

[0168] ＜実施例７＞

（工程１）18:2 PE-cRNA(Malat1)の合成

5’末端に、1,2-ジリノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine：18:2 PE）グルタリル基を結合させたMalat1のcRNA（18:2 PE-cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。

[0169] 実施例5の工程1と同様にして合成したRNA鎖(Glutaryl-cRNA(Malat1))の水溶液（2500nmol）を用いて、実施例５の工程２と同様の手順で5’末端に18:2 PEグルタリル基を結合させたcRNAとして、18:2 PE-cRNA(Malat1)を合成し、5%ブドウ糖液として544nmol得た。

[0170] （工程２）二本鎖核酸剤18:2 PE－HDOの合成

ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例7の工程1で得られた18:2 PE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、実施例1の工程2と同様にして、本発明の核酸複合体である「18:2 PEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（18:2 PE-conjugated heteroduplex oligonucleotide：18:2 PE-HDO）」を調製した。

[0171] ＜実施例８＞

（工程１）DPyPE-cRNA(Malat1)の合成

5’末端に、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine：DPyPE）グルタリル基を結合させたMalat1のcRNA（DPyPE-cRNA(Malat1)）を以下の手順により合成した。

[0172] 実施例5の工程1で合成したRNA鎖(Glutaryl-cRNA(Malat1))の水溶液（2400nmol）を用いて、実施例5の工程2と同様の手順で5’末端にDPyPEグルタリル基を結合させたcRNAとして、DPyPE-cRNA(Malat1)を合成し、5%ブドウ糖液として961nmol得た。

[0173] （工程２）二本鎖核酸剤DPyPE－HDOの合成

ASO(Malat1)を第１核酸鎖とし、また実施例8の工程1で得られたDPyPE-cRNA(Malat1)を第２核酸鎖として、両核酸鎖を等モル量で混合し、実施例1の工程2と同様にして、本発明の核酸複合体である「DPyPEグルタリル結合型ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド（DPyPE-conjugated heteroduplex oligonucleotide：DPyPE-HDO）」を調製した。

[0174] ＜実施例９＞

（Ａ）in vivo実験

実験動物には、7週齢の雄性C57BL/6Jマウス（日本チャールズリバー）を使用し、一群あたり2匹を実験に供した。実験群では、核酸を含む溶液をマウスの尾静脈から5mL/kgの投与量で静脈内に単回投与した。また、比較対象群では、核酸溶液の調製に用いた溶媒（5%ブドウ糖液）を実験群と同様の手順でマウスに静脈内投与した。

[0175] （Ｂ）発現解析

核酸溶液を投与して72時間後に、ペントバルビタールを50mg/kgで前記マウスに腹腔内投与によって麻酔し、採血及び屠殺し、脳(大脳半球又は大脳皮質)を摘出した。脳組織からの全RNA抽出は、RNA抽出用試薬ISOGEN（ニッポン・ジーン社）を用いた。ISOGEN溶液中で摘出した脳組織を破砕した後、クロロホルムでRNA画分として分離した。その後に、核酸分離システムQuickGene RNA tissue kit SII(倉敷紡績社)で実施した。全RNAからのcDNA合成は、ReverTra Ace qPCR RT Kit（東洋紡社）を用い、THUNDERBIRD qPCR Mix（東洋紡社）による定量PCRを実施した。定量PCRには蛍光プローブ法を採用し、蛍光プローブにはマウスMalat1（Integrated DNA Technologies社）及びマウスGapdh（Thermo Fisher Scientific社）を用いた。定量PCRの遺伝子断片増幅反応条件は、上記THUNDERBIRD qPCR Mix（東洋紡社）のプロトコルに従った。マウスMalat1及びGapdh（内部標準遺伝子）の発現量を相対検量線によって算出し、相対発現レベルをMalat1/Gapdhとして計算した。一群あたり2匹のマウスの結果から、相対発現レベルの平均値を算出した。比較対象群の相対発現レベルの平均値を100%とした場合の実験群の相対発現レベルの平均値の割合を

、相対的Malat1 ncRNA発現レベルとして算出した。

[0176] （C）結果

実施例9の結果を表２に示す。表中、投与量はASO（Malat1）の量を示す。

二本鎖番号１のDSPE-HDO及び二本鎖番号2のDOPE-HDOは、いずれも大脳皮質におけるMalat1ノンコーディングRNAの発現を抑制した。また、二本鎖番号3のDPPE-HDO、二本鎖番号4のPOPE-HDO、二本鎖番号5の18:1（delta9-Trans）PE－HDO、二本鎖番号6の18:0-18:1 PE－HDO、二本鎖番号7の18:2 PE－HDOおよび二本鎖番号8のDPyPE-HDOは、いずれも大脳半球におけるMalat1ノンコーディングRNAの発現を抑制した。この結果から、ASOと、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が結合した相補鎖で構成される二本鎖の核酸複合体は、脳に送達され、そこでアンチセンス効果をもたらし得ることが立証された。

[0177] [表2]

二本鎖核酸剤の大脳皮質における Malat1 ncRNA の発現抑制効果

二本鎖 番号 (Duplex Number)	投与量	相対的 Malat1 ncRNA 発現レベル
1	50 mg/kg	64%
2	50 mg/kg	76%
3	50 mg/kg	75%
4	50 mg/kg	74%
5	50 mg/kg	78%
6	50 mg/kg	79%
7	50 mg/kg	73%
8	50 mg/kg	67%

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核酸鎖とを含む核酸複合体であって、

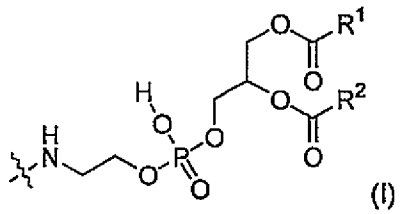
該第１核酸鎖は標的転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な塩基配列を含み、かつ、標的転写産物に対してアンチセンス効果を有し、

該第２核酸鎖は該第１核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ、ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合しており、

該第１核酸鎖は該第２核酸鎖にアニールしている前記核酸複合体。

[請求項2] 前記ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が一般式Iで表される、請求項１に記載の核酸複合体。

[化1]



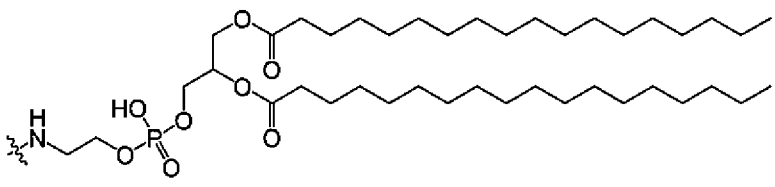
(I)

（式中、R^1及びR^2は、それぞれ独立に、置換された又は置換されていないC_5～C_{32}のアルキル基、又は置換された又は置換されていないC_5～C_{32}アルケニル基を表す）

[請求項3] R^1及びR^2が、それぞれ独立に、C_{15}～C_{19}のアルキル基、又はC_{17}のアルケニル基である、請求項２に記載の核酸複合体。

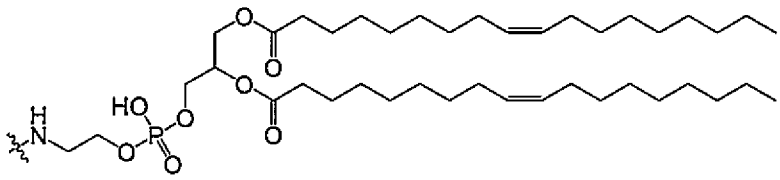
[請求項4] 前記ホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が一般式XV～XXIIで表される、請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[化2]



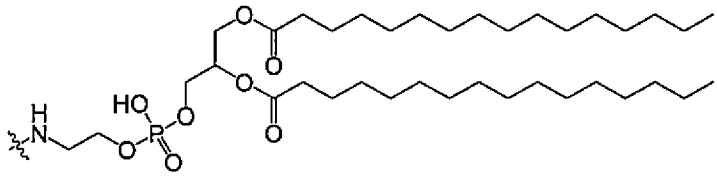
(XV)

[化3]



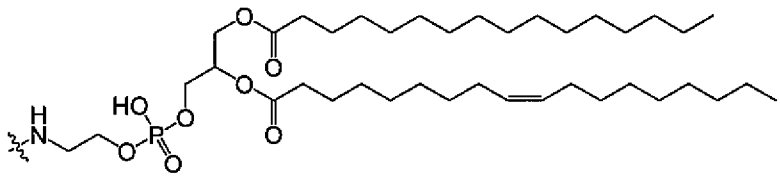
(XVI)

[化4]



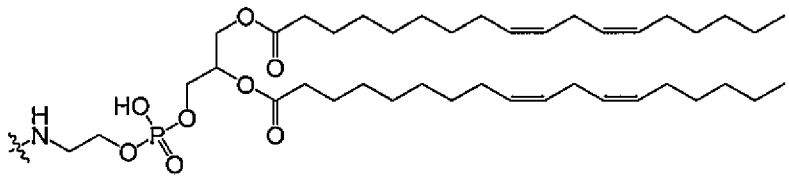
(XVII)

[化5]



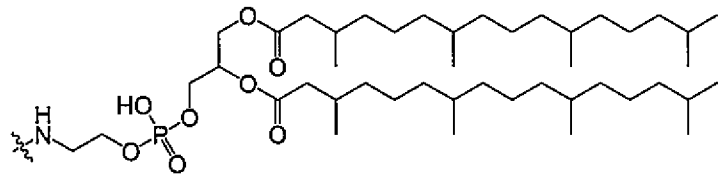
(XVIII)

[化6]



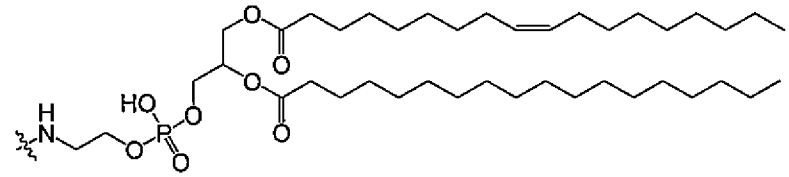
(XIX)

[化7]



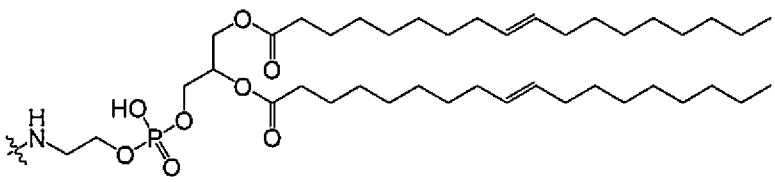
(XX)

[化8]



(XXI)

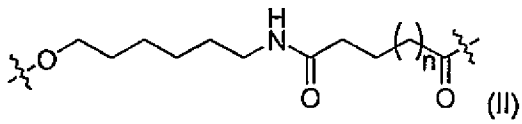
[化9]



(XXII)

[請求項5] 前記第２核酸鎖が、一般式IIで表されるリンカーを介してホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体と結合している、請求項１～４に記載の核酸複合体。

[化10]



(II)

[請求項6] 前記第２核酸鎖の５’末端に、前記リンカーを介してホスファチジルエタノールアミン又はその類縁体が結合している、請求項５に記載の核酸複合体。

（式中、ｎは０又は１である）

[請求項7] 前記第１核酸鎖が少なくとも４個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項8] 前記第１核酸鎖がギャップマーである、請求項１～７のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項9] 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７又は８に記載の核酸複合体。

[請求項10] 前記第１核酸鎖がミックスマーである、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項11] 前記第１核酸鎖が１３～２０塩基長である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項12] 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１～１１のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項13] 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成る、請求項１～１２のいずれか一項に記載の核酸複合体。

[請求項14] 請求項１～１３のいずれか一項に記載の核酸複合体を含む、中枢神経系において標的転写産物の発現又は編集を調節するための組成物。

[請求項15] 中枢神経系疾患治療用である、請求項１４に記載の組成物。

[請求項16] 請求項１～１３のいずれか一項に記載の核酸複合体を含む、中枢神経系薬剤送達用組成物。

[請求項17] 前記中枢神経系が大脳皮質、大脳基底核、大脳白質、間脳、脳幹、小脳、及び脊髄からなる群から選択される、請求項１４～１６のいずれか一項に記載の組成物。

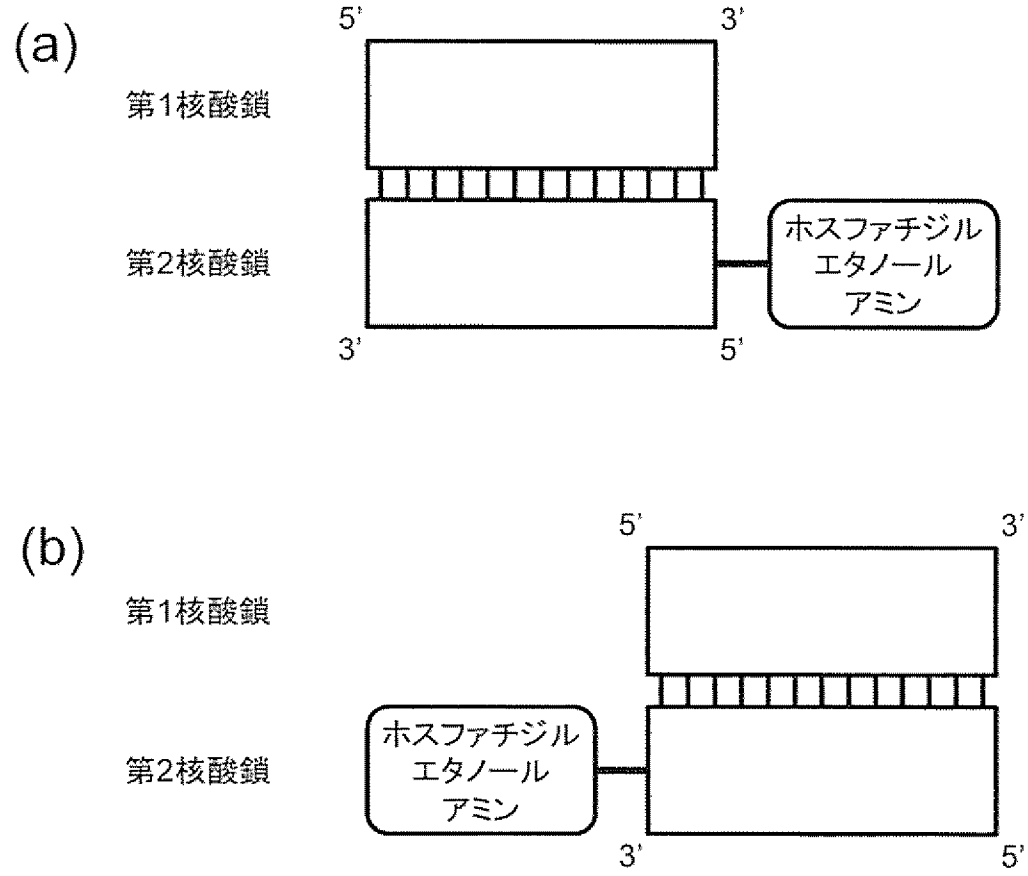
[請求項18] 前記中枢神経系が前頭葉、側頭葉、海馬、海馬傍回、頭頂葉、後頭葉、線条体、淡蒼球、前障、視床、視床下核、中脳、黒質、橋、延髄、小脳皮質、小脳核、頸髄、胸髄及び腰髄からなる群から選択される、請求項１４～１６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項19] 静脈内投与用又は皮下投与用である、請求項１４～１８のいずれか一項に記載の組成物。

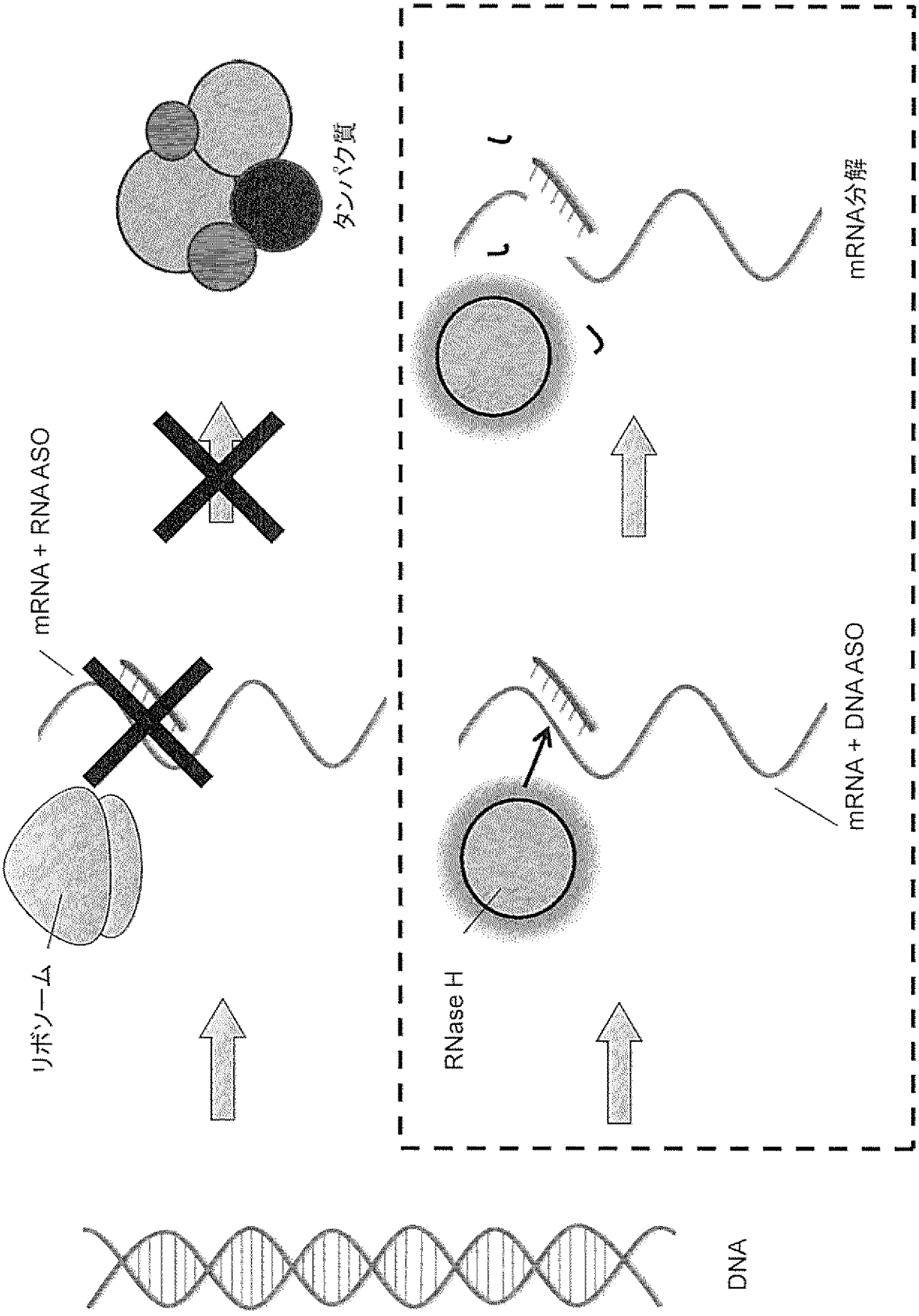
[請求項20] １回の投与量中に5mg/kg以上の前記核酸複合体を含む、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項21] 前記核酸複合体が血液脳関門（BBB）を通過する、請求項１４～２０のいずれか一項に記載の組成物。

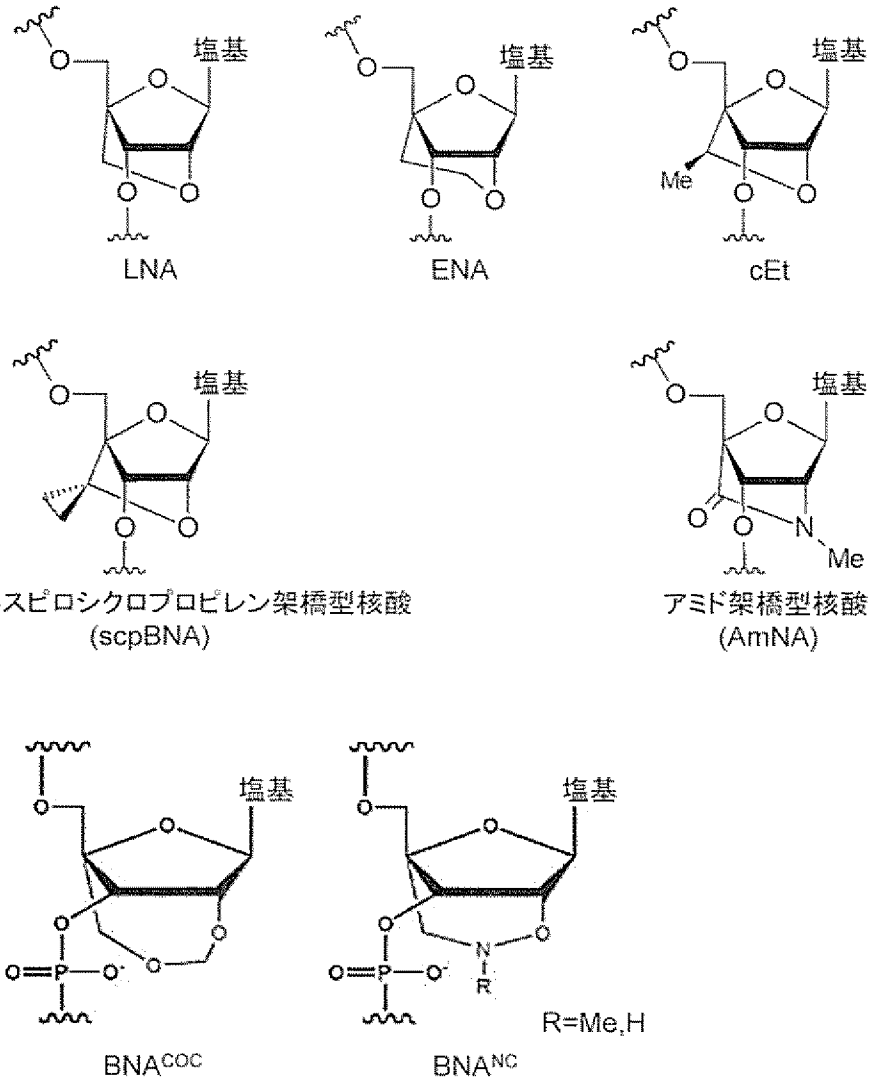
[図1]


(a)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
5'
3'
3'
5'
ホスファチジル
エタノール
アミン
(b)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
5'
3'
3'
5'
ホスファチジル
エタノール
アミン

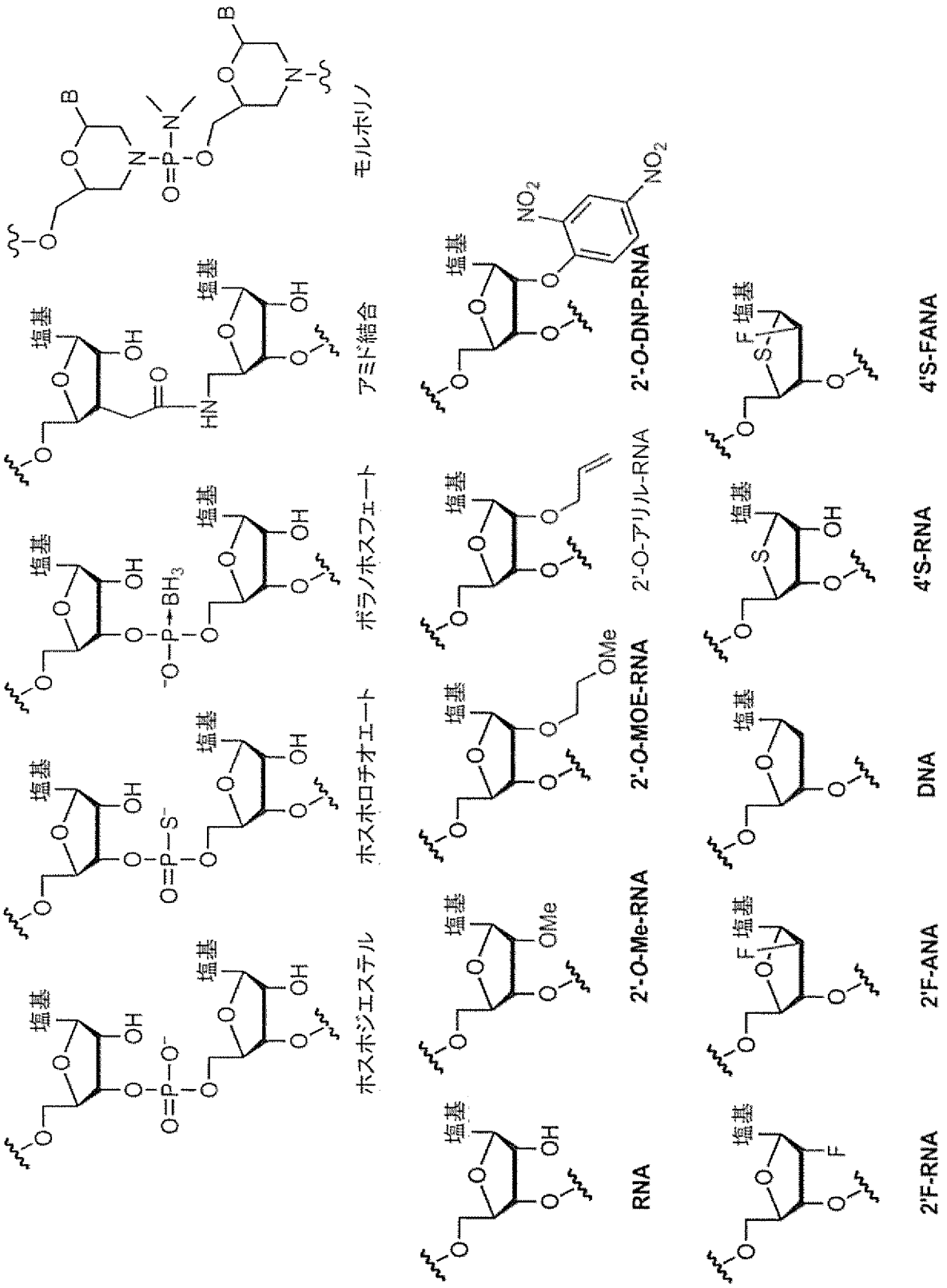
[図2]



[図3]


塩基
LNA
塩基
ENA
塩基
Me
cEt
塩基
2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸
(scpBNA)
塩基
N
Me
アミド架橋型核酸
(AmNA)
塩基
BNA^COC
塩基
N
R
R=Me,H
BNA^NC

[図4]


ホスホジエステル
ホスホロチオエート
ボラノホスフェート
アミド結合
モルホリノ
RNA
2'-O-Me-RNA
2'-O-MOE-RNA
2'-O-アリル-RNA
2'-O-DNP-RNA
2'F-RNA
2'F-ANA
DNA
4'S-RNA
4'S-FANA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/010392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K47/54(2017.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C12N15/113, A61K31/711, A61K31/713, A61K47/54, A61K48/00, A61P25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019
Registered utility model specifications of Japan 1996-2019
Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 2009/123185 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 08 October 2009, claims, paragraph [0028] & US 2011/0034545 A1, claims, paragraph [0045] & EP 2264167 A1 & CA 2719963 A & CN 101981185 A & RU 2010144531 A & KR 10-2010-0131509 A	1-6, 10-13 7-18, 20-21 19
X Y A	WO 2011/008857 A1 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 20 January 2011, claims, paragraphs [0018], [0077], [0125], [0126], fig. 1, examples & US 2012/0177723 A1	1, 10-21 7-21 2-6

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 June 2019 (03.06.2019)	11 June 2019 (11.06.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/010392

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2016-524588 A (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 18 August 2016, claims, etc. & US 2016/0145614 A1, claims, etc. & WO 2014/192310 A1 & EP 3004347 A1 & CA 2913499 A & AU 2014272526 A & CN 105264073 A	7-21
Y	JP 2016-526529 A (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 05 September 2016, claims, etc. & US 2016/0130583 A1, claims, etc. & WO 2014/203518 A1 & EP 3010514 A1 & CA 2915443 A & AU 2014282666 A & CN 105324119 A	7-21

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０１０３９２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/113(2010.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K47/54(2017.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/113, A61K31/711, A61K31/713, A61K47/54, A61K48/00, A61P25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y A	WO 2009/123185 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2009.10.8, 特許請求の範囲、[0028] & US 2011/0034545 A1、特許請求の範囲、[0045] & EP 2264167 A1 & CA 2719963 A & CN 101981185 A & RU 2010144531 A & KR 10-2010-0131509 A	1-6,10-13 7-18,20-21 19
X Y A	WO 2011/008857 A1 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 2011.01.20, 特許請求の範囲、[0018]、[0077]、[0125]、[0126]、図１、実施例 & US 2012/0177723 A1	1,10-21 7-21 2-6

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０３．０６．２０１９	１１．０６．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３６
飯室　里美
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2016-524588 A (国立大学法人　東京医科歯科大学) 2016.08.18, 特許請求の範囲等 & US 2016/0145614 A1、特許請求の範囲等 & WO 2014/192310 A1 & EP 3004347 A1 & CA 2913499 A & AU 2014272526 A & CN 105264073 A	7-21
Y	JP 2016-526529 A (国立大学法人　東京医科歯科大学) 2016.09.05, 特許請求の範囲等 & US 2016/0130583 A1、特許請求の範囲等 & WO 2014/203518 A1 & EP 3010514 A1 & CA 2915443 A & AU 2014282666 A & CN 105324119 A	7-21