(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7663873号
(P7663873)

(45)発行日　令和7年4月17日(2025.4.17)

(24)登録日　令和7年4月9日(2025.4.9)

(51)国際特許分類

		FI		
Ｃ１２Ｎ　15/113(2010.01)		Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ ＺＮＡ
Ａ６１Ｐ　21/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	21/00	
Ａ６１Ｐ　25/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｋ　31/7088(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｋ　31/7105(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/7105	

請求項の数　17　外国語出願　（全72頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-84942(P2023-84942)
(22)出願日　令和5年5月23日(2023.5.23)
(65)公開番号　特開2023-172954(P2023-172954A)
(43)公開日　令和5年12月6日(2023.12.6)
審査請求日　令和7年1月17日(2025.1.17)
(31)優先権主張番号　22382493
(32)優先日　令和4年5月23日(2022.5.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
早期審査対象出願

(73)特許権者　519098394
ウニベルシタ デ バレンシア
スペイン国 ４６０１０ バレンシア ア ベニダ ブラスコ イバニェス １３
(73)特許権者　523192864
アルテックス バイオテック エセ．エレ．
ＡＲＴＨＥＸ ＢＩＯＴＥＣＨ Ｓ．Ｌ．
スペイン国 ４６９８０ パテルナ セ／ カテドラティコ アウグスティン エスカルディノ ９
Ｃ／ Ｃａｔｅｄｒａｔｉｃｏ Ａｇｕｓｔｉｎ Ｅｓｃａｒｄｉｎｏ ９，４６９８０ Ｐａｔｅｒｎａ，Ｓｐａｉｎ
(74)代理人　110000796
弁理士法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　オレイン酸にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチド及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号２２（ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ）、２３（ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ３’Ｏｌ）又は２５（２１８　ＭＯＥオレイン酸３’）のみからなるオリゴヌクレオチド分子であって、前記配列番号２２、２３又は２５の３’末端はそれぞれスペーサー分子にコンジュゲートしており、前記スペーサー分子はオレイン酸にコンジュゲートしており、前記スペーサー分子は、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６及びトレオニノールからなる群より選択される、オリゴヌクレオチド分子。

【請求項２】

配列番号３（ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ）のみからなる、請求項１に記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項３】

配列番号４（ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　３’Ｏｌ）のみからなる、請求項１に記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項４】

配列番号７（２１８　ＭＯＥオレイン酸３’）のみからなる、請求項１に記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項５】

請求項１に定義される１種又は二種以上のオリゴヌクレオチド分子と、薬学的に許容される担体若しくは賦形剤、又はそれらの組合せとを含む、医薬組成物。

【請求項６】
配列番号３のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項７】
配列番号４のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項８】
配列番号７のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項９】
１型筋強直性ジストロフィー治療薬である、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
配列番号３のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項９に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
配列番号４のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項９に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
配列番号７のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項９に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記オリゴヌクレオチド分子がａｎｔｉｍｉＲである、請求項１に記載のオリゴヌクレオチド分子。
【請求項１４】
筋肉及び／又はＣＮＳに送達するように用いられる、請求項５に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
配列番号３のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項１４に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
配列番号４のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項１４に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
配列番号７のみからなるオリゴヌクレオチド分子を含む、請求項１４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、医学の分野に関する。より具体的には、本発明は、オレイン酸にコンジュゲートされた内因性マイクロＲＮＡ、特にｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのオリゴヌクレオチドアンタゴニスト及びその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
筋強直性ジストロフィー１型（ＤＭ１）は、現在有効な治療法がない稀な遺伝性疾患である。ＤＭ１は、多くの異なる患者系及び組織にわたって障害をもたらす実質的な疾患負荷に関連する。筋力低下及び疲労が２つの最も一般的な疾患症状発現を構成し、それぞれ患者の９３％及び９０％によって報告され、続いて筋係止（７３％）が報告される。他の表現型には、心機能不全、白内障、インスリン抵抗性及び認知障害が含まれる。ＤＭ１疾患は、病原性ｍＲＮＡに転写されるＤＭ１プロテインキナーゼ（ＤＭＰＫ）遺伝子において生じるＣＴＧリピート伸長に基づく。ＣＵＧ増殖が筋肉盲様（ＭＢＮＬ１、２、及び３）ファミリーのタンパク質に高親和性で結合し、それによってそれらの正常な機能を阻害することは現在十分に確立されているが、他の変化がＭＢＮＬ１及びＭＢＮＬ２の枯渇に寄与し得る。骨格筋及び脳では、それぞれＭＢＮＬ１及びＭＢＮＬ２が優先的に発現されるのに対して、ＭＢＮＬ３は主に胚発生及び成体組織再生中に発現される。
【０００３】
ＭＢＮＬ１及びＭＢＮＬ２タンパク質は、特に胎児パターンから成体パターンへのシフトを引き起こすことによって、いくつかの転写物の選択的スプライシング及びポリアデニ

ル化を制御し、スプライス調節においてＣＵＧＢＰ　Ｅｌａｖ様ファミリーメンバー１（ＣＥＬＦ）タンパク質に拮抗的に作用し、これはＤＭ１において上方制御され、誤って配置されていることが見出される。更に、一方のみの欠失が他方の上方制御及び標的ＲＮＡにおけるその結合部位の占有をもたらしたので、ＭＢＮＬ１遺伝子と２遺伝子との間に遺伝的冗長性があることが示されている（Ｌｅｅ　２０１３．Ｃｏｍｐｏｕｎｄ　ｌｏｓｓ　ｏｆ　ｍｕｓｃｌｅｂｌｉｎｄ－ｌｉｋｅ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｉｎ　ｍｙｏｔｏｎｉｃ　ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ．ＥＭＢＯ　Ｍｏｌ　Ｍｅｄ　５：１８８７－９００．を参照されたい）。ＭＢＮＬ１タンパク質機能の枯渇は、疾患の経過における重要な因子であることが示されている。実際、ＭＢＮＬ１の機能喪失は、ミススプライシング事象の８０％超及び発現欠損のほぼ７０％を占める。ＤＭ１マウス及び患者由来線維芽細胞におけるＭＢＮＬ遺伝子及び／又はＭＢＮＬタンパク質のアップレギュレーションは忍容性が高く、筋緊張症及びミススプライシング事象等のいくつかの症状を救済し、病巣形成の減少をもたらし、これらの遺伝子の発現を増加させることを目的とした治療アプローチの開発の道を開く。ＭＢＮＬ１及びＭＢＮＬ２の枯渇はまた、いくつかの他の遺伝子発現プロセスに影響を及ぼし、例えば、膜結合ｍＲＮＡの輸送又はｍｉＲＮＡ生合成を損なう。

【０００４】

マイクロＲＮＡ（本明細書では「ｍｉＲＮＡ」又は「ｍｉＲ」とも呼ばれる）は、遺伝子発現の調節、特に遺伝子サイレンシングにおいて重要な役割を果たす小さな非コードＲＮＡのクラスである。ヒト細胞では、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐの発現は、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって直接的にＭＢＮＬ１及びＭＢＮＬ２転写物を調節することが示されている（Ｃｅｒｒｏ－Ｈｅｒｒｅｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．２０１８　Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．９，２４８２）。ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのサイレンシングは、哺乳類モデルにおいて、Ｍｕｓｃｌｅｂｌｉｎｄ様タンパク質発現を増加させ、筋強直性ジストロフィー表現型を緩和する。一方、ａｎｔｉｍｉＲは、特にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）分子において、マイクロＲＮＡ等の他の分子がＲＮＡ上の標的部位に結合するのを妨げるオリゴヌクレオチドのクラスである。治療分子としての通常のａｎｔｉｍｉＲの使用は、細胞環境における分解による短寿命、細胞外培地からの不十分な細胞摂取、及び比が高いほど良好である化合物が毒性及び有効性の中央値（ＴＣ５０／ＥＣ５０）に達する濃度の比として表される限られた治療域を含む、薬物候補としてのそれらの開発に限界がある。したがって、他の薬理学的パラメータの中でも、ａｎｔｉｍｉＲの安定性、効力、組織特異的取込み、及び治療域を増大させることを目的とする方法は、ａｎｔｉｍｉＲの標的ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐを阻害する際のａｎｔｉｍｉＲの可能性を最大限に活用するために、更に開発する必要がある。

【０００５】

一方で、アルブミンは、血漿中で最も豊富なタンパク質の１つであり、脂肪酸、薬物、イオン及び他の代謝産物の輸送を提供する。オリゴヌクレオチドと脂肪酸とのコンジュゲーションは、オリゴヌクレオチドのアルブミン結合親和性を高め、内皮バリアを越える能力を高め、筋肉への機能的取り込みを改善し、それによってインビボでのオリゴヌクレオチド効力を高め得る。しかしながら、それらの構造が異なる多種多様な飽和及び不飽和脂肪酸は、今度は、脂肪酸コンジュゲートのタンパク質結合又は活性に影響を及ぼす可能性があり、オリゴヌクレオチド効力を増強するための最適な脂肪酸が何であるかは不明である。

【０００６】

一方、他の化学修飾をオリゴヌクレオチドに含めて、それらの薬理学的パラメータを増加させることができる。当該修飾の中でも、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合は、第１世代のアンチセンスオリゴとして有望な結果を示し続けているが、完全に修飾された（完全なＰＳ）治療用オリゴヌクレオチドの開発を依然として妨げている重要な制限を提示している。当該制限には、マウス、ラット、サル及びヒトにおけるいくつかの研究で報告されたＰＳ－オリゴの毒性が含まれる。マウス及びラットでは、これらの副作用には、血小板

減少症、肝臓トランスアミナーゼの上昇、様々な臓器における細網内皮細胞の過形成、及び腎尿細管変化が含まれる（ＵＭ Ｓａｒｍｉｅｎｔｏ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ ｖｉｖｏ ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｒｅｌ Ａ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅｓ ｉｎ ＣＤ－１ ｍｉｃｅ．Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓ Ｄｅｖ．１９９４ Ｓｕｍｍｅｒ；４（２）：９９－１０７．ｄｏｉ：１０．１０８９／ａｒｄ．１９９４．４．９９．ＰＭＩＤ：７９５０３０６；Ｓ Ａｇｒａｗａｌ ｅｔ ａｌ．Ｍｉｘｅｄ－ｂａｃｋｂｏｎｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ ｓｅｃｏｎｄ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ：Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ ｓｔｕｄｉｅｓ．Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｍａｒ １９９７，９４（６）２６２０－２６２５；ＤＯＩ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．９４．６．２６２０）。サルにおいて、観察された副作用は、補体の活性化（Ａｇｒａｗａｌ，Ｓｕｄｈｉｒ，ｅｔ ａｌ．‘‘Ｎｏｖｅｌ ｅｎｚｙｍａｔｉｃ ａｎｄ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｔｏ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ．’’Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ ｌｅｔｔｅｒｓ ８２（１９９５）：４３１－４３４．）及び活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）の延長である。硫酸デキストランの投与後に同様の副作用が観察されているので、これらの副作用はＰＳ－オリゴのポリアニオン性によって引き起こされ、ヌクレオチド配列特異的ではないと推測される。したがって、毒性は低いが安定性が高いオリゴヌクレオチドを開発する必要がある。

【０００７】

本発明は、オレイン酸にコンジュゲートした改善されたａｎｔｉｍｉＲを提供することによってこれらの制限を克服する。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

【図１】ＤＭ１細胞に対する毒性及び有効性の評価の図である。（Ａ）ＭＤ２３ｂ－２、（Ｂ）５’－２３ｂ－オレイン酸、（Ｃ）非コンジュゲート２３ｂ又は（Ｄ）２１８－Ｄ／ＬＮＡ２を５つの異なる濃度（ＭＤ２３ｂ－２、５’－２３ｂ－オレイン酸及び非コンジュゲート－２３ｂについて：１０ｎＭ、５０ｎＭ、２００ｎＭ、１μＭ及び５μＭ；並びに２１８－Ｄ／ＬＮＡ２の場合：０．０８ｎＭ、０．４ｎＭ、２ｎＭ、１０ｎＭ及び５０ｎＭ）で用いたリポフェクション後のＤＭ１筋管に対する毒性（細胞増殖阻害率、黒色）及び有効性（ｍｏｃｋをトランスフェクトした細胞と比較したＭＢＮＬ１発現の増加率、灰色）の提示。点線はＴＣ５０及びＥＣ５０レベルを示す。各濃度を三連で試験した。エラーバー＝平均の標準誤差（ＳＥＭ）。Ｇｒａｐｈｐａｄの式「ベル形の用量反応」を使用して、用量反応曲線を当てはめた。

【図２】示された処置の注射の５日後のＨＳＡ^{LR}マウスにおける機能的有効性アッセイの図である。（Ａ）力／体重及び（Ｂ）筋強直グレードを、３ｍｇ／Ｋｇでの異なるａｎｔｉｍｉＲの単回注射（ＡＩ）の５日後に分析した。Ａのデータを、ＰＢＳ（ＰＢＳ）で処置したＨＳＡ^{LR}マウスと比較して、対応のないスチューデントのｔ検定によって分析した。ｐ値：ｎｓ＝有意でない、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１。データポイントは個々のマウス値を表す。エラーバー＝平均の標準誤差（ＳＥＭ）。

【図３】筋組織上のｍｉＲＮＡレベルの図である。Ｕ１及びＵ６ｓｎＲＮＡ内因性対照と比較した、（Ａ）ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及び（Ｂ）ｍｉＲ－２１８－５ｐ発現レベルを、腓腹筋（ｇｔ）及び四頭筋（ｑｄ）に対するｑＲＴ－ＰＣＲによって定量した。ＨＳＡ^{LR}マウスに、ＰＢＳ又は異なるａｎｔｉｍｉＲのいずれかを、全て同じ濃度（３ｍｇ／Ｋｇ）で尾静脈にＩＶ注射した。注射の５日後にマウスを　殺し、筋肉を解剖し、ＲＮＡ抽出のために処置した。統計的比較は全て、スチューデントのｔ検定を用いてＰＢＳ処置ＨＳＡ^{LR}値に対して行った。ｐ値：ｎｓ＝有意ではない、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。データポイントは個々のマウス値を表す。エラーバー＝平均の標準誤差（ＳＥＭ）。

【図４】処置されたＨＳＡ^{LR}マウスの骨格筋におけるＭｂｎｌ１及びＭｂｎｌ２の発現

の図である。（Ａ）Ｍｂｎｌ１及び（Ｂ）Ｍｂｎｌ２転写物レベルを、腓腹筋（ｇｔ）及び四頭筋（ｑｄ）上のＧａｐｄｈ内因性コントロールに対してｑＲＴ－ＰＣＲによって定量化した。（Ｃ）定量的ドットブロットを使用した内因性チューブリン対照と比較したＭｂｎｌ１タンパク質レベル。ＨＳＡ^{LR}マウスに、ＰＢＳ又は異なるａｎｔｉｍｉＲを、全て同じ濃度（３ｍｇ／Ｋｇ）で尾静脈にＩＶ注射した。注射の５日後に腓腹筋及び四頭筋を切開し、ＲＮＡ及びタンパク質分析のために組織を処理した。統計的比較は全て、スチューデントのｔ検定を用いてＰＢＳ処置ＨＳＡ^{LR}値に対して行った。ｐ値：ｎｓ＝有意ではない、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。データポイントは個々のマウス値を表す。エラーバー＝平均の標準誤差（ＳＥＭ）。

【図５】ａｎｔｉｍｉＲは、転写物のＭｂｎｌ依存性ミススプライシングを改善したことを示す図である。ＨＳＡ^{LR}マウスに、ＰＢＳ又は異なるａｎｔｉｍｉＲを、全て同じ濃度（３ｍｇ／Ｋｇ）で尾静脈にＩＶ注射した。注射の５日後に腓腹筋及び四頭筋を切開し、組織をＲＮＡ抽出のために処置した。（Ａ）腓腹筋（ｇｔ）及び四頭筋（ｑｄ）における（Ａ）Ａｔｐ２ａ１エクソン２２、（Ｂ）Ｎｆｉｘエクソン７、（Ｃ）Ｍｂｎｌ１エクソン５及び（Ｄ）Ｃｌｃｎ１エクソン７ａのスプライシングのＲＴ－ＰＣＲ半定量的分析の図である。健康な対照マウス（ＦＶＢ）のエクソン封入レベルも比較のために含める。統計的比較は全て、スチューデントのｔ検定を用いてＰＢＳ処置ＨＳＡ^{LR}値に対して行った。ｐ値：ｎｓ＝有意ではない、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。データポイントは個々のマウス値を表す。エラーバー＝平均の標準誤差（ＳＥＭ）。

【図６】腓腹筋及び四頭筋におけるＡｔｐ２ａ１、Ｃｌｃｎ１、Ｎｆｉｘ及びＭｂｎｌ１転写物の図５に要約された定量化に使用された代表的なアガロースゲルの図である。ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ（Ａ、Ｂ）及びｍｉＲ－２１８－５ｐ（Ｃ、Ｄ）に対する示されたオリゴヌクレオチドによる処理の効果。野生型マウス（ＦＶＢ）及びＰＢＳ処置ＨＳＡ^{LR}マウスのスプライシングパターンも比較のために示す。

【図７】ＨＳＡ^{LR}マウスにおけるいくつかのＤＭ１関連分子又は機能的表現型に対する示された処置の効果を示すスパイダーグラフである。示されている値は回復指数（ＲＩ）であり、処置されたＨＳＡ^{LR}マウスの異なる値が、１として表されるＦＶＢ対照のパラメータとどれだけ近いかを測定する（黒実線）。パネル（Ａ）は、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐに対するａｎｔｉｍｉＲについてのＲＩをまとめており、一方、パネル（Ｂ）は、ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するａｎｔｉｍｉＲについてのＲＩに焦点を当てている。表現のより詳細については、「材料及び方法」セクションの「レーダーチャート」を参照されたい。

【図８】ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２オリゴとオレイン酸を連結するために使用される異なるリンカーの化学構造の図である。オリゴヌクレオチド成分を除いて、得られた分子全体の図をＣｈｅｍＤｒａｗソフトウェアで生成した。

【図９】図８に描かれた異なるリンカーを使用して、３’中のオレイン酸にコンジュゲートした示された濃度のオリゴＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２で処理したＤＭ１細胞中のＭＢＮＬ１タンパク質の定量の図である。タンパク質レベルを定量ドットブロット分析（ＱＤＢ）によって定量し、内因性ＧＡＰＤＨに対して正規化した。トランスフェクション試薬のみ（ＤＭ１）で処理したＤＭ１細胞から得られたタンパク質レベルに１の値を与え、残りのデータをそれに応じて正規化した。示された統計的比較は全て、スチューデントのｔ検定によってトランスフェクション試薬で処理したＤＭ１細胞に対して行った。ｐ値：ｎｓ＝有意ではない、＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１、及び＊＊＊ｐ＜０．００１。エラーバー＝平均の標準誤差（ＳＥＭ）。

【図１０】Ａ）ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌオリゴの化学構造の図である。ＣｈｅｍＤｒａｗソフトウェアを用いて完全な分子の図を生成した。Ｂ）ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　３’Ｏｌオリゴの化学構造の図である。ＣｈｅｍＤｒａｗソフトウェアを用いて、完全な分子の図を生成した。Ｃ）２１８　ＭＯＥオレイン酸３’オリゴの化学構造の図である。ＣｈｅｍＤｒａｗソフトウェアを用いて完全な分子の図を生成した。

【図１１】ＥＬＩＳＡによる脳、腓腹筋、四頭筋、腎臓及び肝臓におけるＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ及びＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２（ｎｇ／ｇ）の決定の図である。特定の組織についてのＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’ＯｌとＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２との間の統計的比較を、スチューデントのｔ検定を用いて行った。統計学的有意性をｐ＜０．０５（＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊ｐ＜０．００１）に設定した。エラーバー＝ＳＥＭ。
【図１２】ＭＢＮＬ１相対レベルを示す図である。第Ｉ相及び第ＩＩ相。ＮＨＰの脳からのタンパク質抽出物中のウエスタンブロットによるＭＢＮＬ１レベルの定量化。最後の投与の２週間後の第Ｉ相及び最後の投与の３週間後の第ＩＩ相からの脳ＮＨＰにおけるＭＢＮＬ１タンパク質レベルの比較。ウエスタンブロットでは、ＧＡＰＤＨレベルを内部標準として使用し、データを、１の値が与えられたＰＢＳ処理ＮＨＰ（群２）におけるＭＢＮＬ１タンパク質レベルに対して正規化した。データは平均±ＳＥＭである。
【発明の概要】
【０００９】
一態様では、本発明は、オリゴヌクレオチド分子、又は当該分子の２つ以上の混合物に関し、当該オリゴヌクレオチド分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子は、ホスホロチオエート結合によって化学的に連結された少なくとも２つのヌクレオチドを含み、当該オリゴヌクレオチド分子は、その３’及び／又は５’末端で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートされている。好ましくは、分子はマイクロＲＮＡのアンタゴニストであり、より好ましくは、マイクロＲＮＡはヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐである。
【００１０】
一実施形態において、第１の態様のオリゴヌクレオチド分子は、１５～３０ヌクレオチド長を含み、ホスホジエステル結合によって連結された少なくとも２つのヌクレオチドを含み、ホスホロチオエート結合によって化学的に連結されたヌクレオチドの数は、ホスホジエステル結合によって化学的に連結されたヌクレオチドの数より多い。
【００１１】
一実施形態では、第１の態様によるオリゴヌクレオチド分子は、１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子はまた、配列番号１（ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐ）若しくは２（ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）、又は配列番号５２～１１０に存在する領域の配列と少なくとも８０％同一であるヌクレオチドの少なくとも１５個の連続する窒素塩基で構成される断片を含む。
【００１２】
一実施形態では、第１の態様によるオリゴヌクレオチド分子は、１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子はまた、配列番号１（ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐ）若しくは２（ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）に存在する領域の配列と同一であるヌクレオチドの少なくとも１５個の連続する窒素塩基で構成される断片を含む。
【００１３】
一実施形態において、第１の態様によるオリゴヌクレオチド分子は、少なくとも１つの化学修飾を含み、化学修飾は、
ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ）、
ｉｉ）２’－Ｏ－メトキシエチル（２’ＭＯＥ）、及び／又は
ｉｉｉ）２’酸素と４’炭素（ＬＮＡ）とを接続する追加の架橋
からなる群のみ選択される。
【００１４】
一実施形態では、第１の態様のオリゴヌクレオチド分子は、１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子は、配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０若しくは５１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂのアンタゴニスト）又は配列番号７、８、９、１４、２５、２６、２７若しくは２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト）に存在する領域の配列と少なくとも８０％同一であるヌクレオチドの少なくとも１５個の連続する窒素塩基で構成される断片も含む。

【００１５】
一実施形態では、第１の態様のオリゴヌクレオチド分子は、１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０若しくは５１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂのアンタゴニスト）又は配列番号７、８、９、１４、２５、２６、２７若しくは２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト）のみからなる。
【００１６】
別の態様では、本発明は、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されたオリゴヌクレオチド分子、又はそれらの２つ以上の混合物を少なくとも含み、場合により担体及び／又は１つ以上の薬学的に許容される賦形剤を更に含む組成物、好ましくは医薬組成物に関する。
【００１７】
別の態様では、本発明は、療法に使用するための、第２の態様又はその実施形態のいずれかで定義される組成物に関する。
【００１８】
別の態様では、本発明は、筋細胞の標的化を必要とする対象において筋細胞を標的化するのに使用するための、第２の態様又はその実施形態のいずれかで定義される組成物に関する。
【００１９】
別の態様では、本発明は、筋疾患の予防若しくは治療又はＲＮＡｏｐａｔｈｉｅｓの予防若しくは治療に使用するための、第２の態様又はその実施形態のいずれかで定義される組成物に関する。
【００２０】
好ましくは、疾患は筋強直性ジストロフィーであり、より好ましくは、筋強直性ジストロフィーは１型である。
【発明の詳細な説明】
【００２１】
一般的な定義
本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈が別のことを明らかに示さない限り、複数の指示対象を含むことに留意されるべきである。更に、別段の指示がない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、一連の要素の全ての要素を指すと理解されるべきである。当業者は、日常的な実験のみを使用して、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、又は確認することができるであろう。そのような等価物は、本発明に包含されることが意図される。
【００２２】
所与の量又は量に言及する場合の「約」という用語は、数がその示された値を中心に±２０％の間で変化し得ることを示す。好ましくは、「約」は、その値の前後±１０％を意味し、より好ましくは、「約」は、その値の前後±１０、８、６、５、４、３、２％を意味し、又は更に「約」は、その値の前後±１％を意味する。
【００２３】
本明細書で使用される場合、複数の列挙された要素間の連言用語「及び／又は」は、個々の選択肢と組み合わせた選択肢の両方を包含すると理解される。例えば、２つの要素が「及び／又は」によって結合される場合、第１の選択肢は、第２の要素を伴わない第１の要素の適用可能性を指す。第２の選択肢は、第１の要素なしの第２の要素の適用可能性を指す。第３の選択肢は、第１及び第２の要素を一緒に適用可能であることを指す。これらの選択肢のいずれか１つは、その意味の範囲内にあり、したがって、本明細書で使用される「及び／又は」という用語の要件を満たすと理解される。２つ以上の選択肢の同時適用性も、その意味の範囲内に含まれ、したがって「及び／又は」という用語の要件を満たすと理解される。

【００２４】
本明細書及び以下の特許請求の範囲を通して、文脈上別段の要求がない限り、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」という単語、並びに「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」及び「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」等の変形は、記載された整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を含むが、任意の他の整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を除外しないことを意味すると理解される。本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語は、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」又は「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語で置き換えることができ、又は時には、本明細書で使用される場合、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」という用語で置き換えることができる。前述の用語（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ、ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ、ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ、ｈａｖｉｎｇ）のいずれも、本発明の態様又は実施形態の文脈において本明細書で使用される場合はいつでも、「のみからなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」という用語で置き換えることができるが、あまり好ましくない。

【００２５】
本明細書で使用される場合、「のみからなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」は、特許請求の範囲の要素で指定されていない要素、工程、又は成分を除外する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない材料又は工程を排除しない。

【００２６】
本明細書で使用される場合、マウス遺伝子に言及する名前は、大文字の後に全て小文字が続くイタリック体でタイプ分けされる。マウスタンパク質表記は、マウス遺伝子記号と同じ規則に従うが、イタリック体ではない。ヒトの遺伝子又はタンパク質を指す場合、大文字が常に使用され、遺伝子の場合はイタリック体である。それにもかかわらず、当業者は、本明細書の技術的文脈から生体分子（タンパク質、遺伝子、転写物）及び種の正確な性質を推測することができるであろう。

【００２７】
本明細書で言及される「オリゴヌクレオチド」とは、天然及び合成ヌクレオチドの両方を含む、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はＤＮＡ／ＲＮＡの任意の短いセグメントを意味する。本発明で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド分子」は、オリゴヌクレオチド自体と「オリゴヌクレオチド類似体」の両方を含む。「オリゴヌクレオチド類似体」は、リン酸基、ペントース又は窒素塩基の１つのいずれかにおいて、それらを形成するヌクレオチド単位の少なくとも１つに何らかの化学修飾を組み込む、それに由来する分子であり、５’末端及び／又は３’末端における非ヌクレオチド基の付加のみからなる修飾も含まれ、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー、ペプチド核酸（ＰＮＡ；デオキシリボースのリン酸骨格が核酸塩基が連結された擬似ペプチドポリマーで置き換えられたＤＮＡの模倣物）等も含まれる。更に、本発明の目的のために、及び本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド分子」及び「オリゴヌクレオチド類似体」又は「オリゴヌクレオチド類似体分子」という用語はまた、マイクロＲＮＡ又はマイクロＲＮＡスポンジのスポンジも含み、これは、それらの主成分がオリゴヌクレオチドのタンデムリピートであると考えることができ、これらのオリゴヌクレオチドのそれぞれがそれ自体であるか又は目的のマイクロＲＮＡの結合部位を含有することを特徴とする。明確にするために、本明細書に開示され、「配列番号」として番号付けされたオリゴヌクレオチド配列は、存在する場合、化学修飾及び／又は脂肪酸コンジュゲーションと共に核酸塩基配列を含むことが言及される。例えば、配列番号３は、とりわけ、ＬＮＡ、ホスホロチオエート結合、及び５－メチル－２’－Ｏ－メチルシチジン、修飾と共に、核酸塩基配列「ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ」を指す。したがって、この配列は、本明細書では配列番号３：ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓ－ＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（ＮＨＣ６）（オレイン酸）として表される。

【００２８】

「アンタゴニストオリゴヌクレオチド」とは、本明細書では、分子、この場合はマイクロＲＮＡの天然の機能を遮断又は阻害することができるオリゴヌクレオチドを指す。したがって、本発明のアンタゴニストオリゴヌクレオチドは、それらが結合するａｎｔｉｍｉＲの活性化、安定性又は機能を回避する阻害剤分子である。本発明の文脈において、「アンタゴニスト」は「阻害剤」と同義であり、したがって互換的に使用することができる。例えば、「ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニストオリゴヌクレオチド」は、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能を阻害するオリゴヌクレオチド分子を指す。

【００２９】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドの「配列同一性の割合」は、２つの最適にアラインメントされた配列を比較ウィンドウにわたって比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の部分は、２つの配列の最適なアラインメントのために、参照配列（付加又は欠失を含まない）と比較して付加又は欠失（すなわち、隙間）を含み得る。パーセンテージは、両方の配列において同じ核酸塩基又はアミノ酸残基が生じる位置の数を決定してマッチした位置の数を得、マッチした位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除算し、結果に１００を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。比較のための配列の最適なアラインメントは、既知のアルゴリズム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓの国立バイオテクノロジー情報センターの資源におけるＢＬＡＳＴ、欧州バイオインフォマティクス研究所の資源におけるＣＬＵＳＴＡＬ、ＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ及びＴＦＡＳＴＡ）のコンピュータ化された実装によって、又は検査によって行われ得る。本明細書で使用される「同一性の割合」は、局所アラインメントの文脈で決定される、すなわち、２つの配列をそれらの全スパンにわたってアラインメントすることを目的とする全体的アラインメントとは対照的に、核酸塩基配列間の局所的類似性の領域のアラインメントに基づくことに留意されたい。したがって、本発明の文脈において、同一性パーセントは、好ましくは局所アライメント比較アルゴリズムのみに基づいて計算される。

【００３０】

多くの場合、特にａｎｔｉｍｉＲの場合、主にリボース部分及び／又はホスファートに影響を及ぼす対応するヌクレオチド単位に化学修飾が組み込まれ、所与の位置に存在するヌクレオチドがその一部である窒素塩基の略語によって同定されるヌクレオチド配列の通常の表現では描写することが困難な修飾が組み込まれる。したがって、本発明では、２つの分子又は配列断片が、それぞれの場合にヌクレオチドに含まれ得る異なる化学修飾とは無関係に、同じ元の基本ヌクレオチド配列から設計されているかどうかを示すものであるため、これらの単位に存在するヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基又は核酸塩基の配列間の同一性の割合を指すマイクロＲＮＡアンタゴニストの分子が比較される。

【００３１】

本明細書で使用される場合、ヌクレオチド分子の２本の鎖は、５’－３’センスで読み取られる一方のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体配列が、３’－５’センスで読み取られる他方の配列のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の窒素塩基と対合する窒素塩基を提示するヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の配列である場合、１００％相補的であると理解される。すなわち、配列５’－ＵＡＧＣ－３’は、配列３’－ＡＵＣＧ－５’及び３’－ＡＴＣＧ－５’と相補的であり、これらはそれぞれ、５’－３’センスで読み取られる配列５’－ＧＣＵＡ－３’及び５’－ＧＣＴＡ－３’である。一実施形態では、アンタゴニスト分子は、その配列中に、少なくとも窒素塩基の相補性に関して、拮抗されるマイクロＲＮＡのシード領域の相補配列と同一の断片を含むことが好ましい。

【００３２】

本明細書で使用される場合、「ａｎｔｉｍｉＲ」は、それらの標的であるマイクロＲＮＡ、好ましくは成熟マイクロＲＮＡに相補的であり、それを阻害する大きな親和性で結合

するオリゴヌクレオチド、好ましくはオリゴリボヌクレオチドを指す。したがって、ａｎｔｉｍｉＲは、ヌクレオチド単位のみから構成される対応するオリゴマーに対して通常化学的に修飾され、相補的であり、したがって標的マイクロＲＮＡの阻害剤であるオリゴヌクレオチドを指す。本発明の特定の場合において、本明細書中に記載されるａｎｔｉｍｉＲは、好ましくは、ヒトマイクロＲＮＡｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐに少なくとも部分的に相補的である。

【００３３】

本明細書で使用される場合、「マイクロＲＮＡスポンジ」は、通常、それらが相補的な七量体又は八量体断片（シード領域）を有するマイクロＲＮＡを阻害するように設計されて、単一のスポンジ構築物を使用して、同じモチーフを共有するマイクロＲＮＡのファミリー全体をブロックすることができるが、それらはまた、それを特異的にするために、特定のマイクロＲＮＡの標的配列全体又はシード領域を欠くｍｉＲＮＡ特異的領域のみを含み得る。

【００３４】

「薬学的に許容される」又は「薬理学的に許容される」という表現は、動物又はヒトに投与した場合に有害なアレルギー又は他の反応を生じない分子実体及び組成物を指す。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容され得るビヒクル」は、溶媒、緩衝液、溶液、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、脂肪酸、例えばオレイン酸、並びに製剤医薬品、例えばヒトへの投与に適した医薬品に使用するための同様の許容される薬剤を含む。

【００３５】

「予防する」、「予防すること」、又は「予防」には、症状、障害、状態、又は疾患のリスクを減少、低減、又は改善すること、並びに動物を症状、障害、状態、又は疾患から保護することが含まれるが、これらに限定されない。予防は予防的に適用又は投与され得る。

【００３６】

「治療する」、「治療すること」、又は「治療」には、限定するものではないが、既存の症状、臨床徴候、障害、状態、又は疾患の進行又は重症度を抑制、減速、停止、低減、改善、又は逆転させることが含まれる。治療は、治療的に適用又は投与され得る。

【００３７】

「ＴＣ５０」又は「最大半量阻害濃度」とは、本明細書では、所与の期間に曝露された生物又は細胞株の集団の５０％において毒性作用を生じる試験生物又は試験細胞株に投与される阻害剤の濃度を指す。

【００３８】

「ＥＣ５０」又は「最大半量有効濃度」とは、本明細書では、所与の期間中にベースラインと最大値との中間の応答を得るために必要なアンタゴニスト又は阻害剤の濃度を指す。すなわち、ＥＣ５０は、処理によって引き起こされる効果の５０％を得るために必要な濃度である。

【００３９】

「Ｅｍａｘ」とは、本明細書では、適用又は投与された薬剤、この場合はアンタゴニスト分子から達成可能な最大応答と呼ばれる。Ｅｍａｘは、モック（ビヒクルでトランスフェクトされた又はトランスフェクトされていない）と比較した、特定のａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐでトランスフェクションした後に得られた標的タンパク質、例えばＭＢＮＬ１タンパク質の最大倍率変化として測定される。

【００４０】

「Ｔｉｎｄｅｘ」又は「治療指数／比」は、薬物の相対安全性の定量的測定値である。本発明において、Ｔｉｎｄｅｘは、５０％の毒性を引き起こす治療剤の量（ＴＣ５０）と治療効果の５０％を引き起こす量（ＥＣ５０）との比に達成可能な最大応答を乗じたものとして定義される。

Ｔｉｎｄｅｘ＝（ＴＣ５０／ＥＣ５０）＊Ｅｍａｘ

【００４１】
本明細書で使用される「３’末端」という用語は、末端の糖環に第３の炭素のヒドロキシル基を有するヌクレオチド鎖の末端を指す。本明細書で使用される「５’末端」という用語は、末端の糖環に第５の炭素を有するヌクレオチド鎖の末端を指す。
【００４２】
上記のように、毒性が少なくなるが治療効果が高まる化学修飾を含む改良されたオリゴヌクレオチドを開発する必要がある。したがって、２つの主な目的が本発明によってカバーされた。一方で、本発明の目的は、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートさせるのに最良の脂肪酸が何であるかを評価し、分子に有益な効果を提供するが、インビボ投与には毒性が強すぎることなく、最大許容量のＰＳ結合を有するオリゴヌクレオチドを設計することであった。一方、本発明はまた、筋強直性ジストロフィー（ＤＭ）、好ましくは筋強直性ジストロフィー１（ＤＭ１）を有する患者におけるｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐの過剰発現に部分的に由来する、ＭＢＮＬ（Ｍｕｓｃｌｅｂｌｉｎｄ様）タンパク質の不十分な機能を修正することを目的とした特定のマイクロＲＮＡ阻害剤、特にオリゴヌクレオチド分子又はその類似体を提供する。
【００４３】
最初に、本発明者等は、以前に公開されたａｎｔａｇｏｍｉＲ－２３ｂ及びａｎｔａｇｏｍｉＲ－２１８オリゴヌクレオチド（Ｃｅｒｒｏ－Ｈｅｒｒｅｒｏｓ ｅｔ ａｌ．２０１８ Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．９，２４８２）を、毒性、有効性（ＭＢＮＬ１タンパク質のレベル）及び治療指数（Ｔｉｎｄｅｘ）に関して異なる疎水性部分（脂質及び脂肪酸を含む）とコンジュゲートする効果をインビトロで試験した（表１）。この研究で使用されたａｎｔａｇｏｍｉＲ配列は、全ての２’ＯＭＥ修飾ヌクレオチド、並びにホスホロチオエート（ＰＳ）結合及びホスホジエステル（ＰＯ）結合の混合物を含んでいた。驚くべきことに、ａｎｔａｇｏｍｉＲ－２３ｂ及びａｎｔａｇｏｍｉＲ－２１８オリゴヌクレオチドの両方について、オレイン酸とのコンジュゲーションがＴｉｎｄｅｘの最も重要な改善をもたらすことが見出された。
【００４４】
次に、本発明者等は、オレイン酸が担体として作用する能力を試験し、図１１及び実施例９に示す実験は、オレイン酸が筋肉及び中枢神経系（ＣＮＳ）等の組織にオリゴヌクレオチドを送達するための優れた担体又はビヒクルであることを実証した。更に、図１２～図１３及び実施例１０は、オレイン酸によるオリゴヌクレオチド分子のビヒクル化が、ＤＭ１表現型を有する動物モデルにおいてだけでなく、健康な動物（この場合、サル）においても起こることを実証している。これらの結果は、特に、オレイン酸がオリゴヌクレオチドの送達を増強した主要な組織の２つである筋肉及び／又はＣＮＳに影響を及ぼす疾患の状況において、オリゴヌクレオチド分子にコンジュゲートした場合の担体としてのオレイン酸の治療的使用のための道を開く。
【００４５】
ＤＭ１は、筋肉組織だけでなく中枢神経系にも影響を及ぼす神経筋疾患である。したがって、本発明者等は、ＬＮＡ、２’ＯＭＥ及び２’ＭＯＥ等の異なる化学修飾を有するヌクレオチドを含む、１５～２２ヌクレオチドの範囲の長さを有するａｎｔｉｍｉＲのプールの中で、ＤＭ１細胞において最良のＴｉｎｄｅｘを有するａｎｔｉｍｉＲ配列をスクリーニングした。この研究におけるヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの最も成績の良いアンタゴニストはＭＤ２３ｂ－２であり、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストについての最も良いＴｉｎｄｅｘを有するオリゴは２１８－Ｄ／ＬＮＡ２であった（表２及び表３、図１を参照されたい）。これらの２つの分子のそれぞれの改変バージョンをオレイン酸と組み合わせ、得られた分子をＤＭ１のマウスモデル（ＨＳＡ^{ＬＲ}マウス）及びＤＭ１細胞（ＭＤ２３－ｂ２の改変バージョンのみ）において試験した。これらの試験の結果は、ＰＳ／ＰＯの混合物を含むオリゴヌクレオチドへのオレイン酸のコンジュゲーションが、当該オリゴヌクレオチドの治療効果を増加させることを明らかにした（表４、表５及び表６を参照されたい。）。全体として、本研究で得られた結果により、著者らは

、ＤＭ１細胞及び疾患のマウスモデルにおいてＭＢＮＬ１のレベルを改善するためにオリゴヌクレオチド分子にコンジュゲートさせるのに最良の脂肪酸はオレイン酸であり、このコンジュゲーションは、ＰＳ／ＰＯ結合の混合物が分子中に存在する場合にオリゴヌクレオチドの治療指数を改善すると結論付けた。

【００４６】

これらの結果を考慮して、第１の態様では、本発明は、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子、又は当該分子の２つ以上の混合物に関し、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、当該オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子の３’末端及び／又は５’末端で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートしている。好ましくは、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、マイクロＲＮＡのアンタゴニストである。好ましくは、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐからなる群より選択されるマイクロＲＮＡのアンタゴニストである。

【００４７】

マイクロＲＮＡｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐは、他の遺伝子転写物の中でも、ＭＢＮＬ遺伝子の発現の抑制因子であり、したがって、そのアンタゴニストの存在によって減少するのはそれらの抑制能である。本発明の文脈において、阻害剤、サイレンサー又はブロッカーは、当該ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐの内因活性の低下を生じさせることができる化合物であり、したがって、これらの３つの用語は、「アンタゴニスト」の名称の下に含まれている。厳密に言えば、「サイレンシング」という用語は、そのような活性の絶対的な無効化として解釈することができるが、そのような無効化又は抑制活性の非絶対的減少の差は、使用される化合物の濃度に依存し得るので、化合物がマイクロＲＮＡの抑制活性の減少をもたらし、阻害剤、サイレンサー、遮断薬、又は要するにそのアンタゴニストと見なされるのに十分であろう。加えて、成熟マイクロＲＮＡ、前駆体マイクロＲＮＡ（プレマイクロＲＮＡ又はプレｍｉＲＮＡ）又は一次マイクロＲＮＡ（プリマイクロＲＮＡ又はプリｍｉＲＮＡ）を標的化することによってマイクロＲＮＡ機能を阻害する可能性に関する知識を考慮すると、化合物は、成熟マイクロＲＮＡを標的化する場合だけでなく、前駆体マイクロＲＮＡ又は一次マイクロＲＮＡ転写物を標的化する場合であっても、当該マイクロＲＮＡの内因活性を低下させることができるならば、本発明によるマイクロＲＮＡ阻害剤、サイレンサー、ブロッカー又はアンタゴニストと見なすことができる。したがって、本明細書で使用される場合、４つの用語（阻害剤、サイレンサー、ブロッカー又はアンタゴニスト）は、本明細書では同義語として使用される。

【００４８】

本発明のアンタゴニストのヌクレオチド配列に関して、それらが結合しなければならない内因性分子との十分な相補性があるべきであることに留意することが重要である。当該内因性分子は、好ましくはマイクロＲＮＡ分子、より好ましくはｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ分子である。ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐは、アンタゴニストの配列及びそれらのマイクロＲＮＡ結合部位の設計を考慮しなければならないヌクレオチドの配列が異なる。「マイクロＲＮＡ結合部位」は、その標的マイクロＲＮＡの少なくとも一部に相補的又は部分的に相補的であるアンタゴニストに含まれるヌクレオチド配列である。好ましくは、本明細書で定義されるアンタゴニストのマイクロＲＮＡ結合部位は、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐの少なくとも一部に対して相補的又は部分的に相補的である。結合部位の配列は完全に一致し得、これはマイクロＲＮＡに対して完全な相補性を有することを意味する。あるいは、配列は部分的に相補的であり得、これは、マイクロＲＮＡがアンタゴニストの結合部位と塩基対合した場合に１つ以上のミスマッチが起こり得ることを意味する。重要なことに、アンタゴニストが標的マイクロＲＮＡ（好ましくは、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ）に部分的に相補的

である場合、その結合部位は、好ましくは、標的マイクロＲＮＡ（好ましくは、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ）のシード領域に対する完全又はほぼ完全な相補性（９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は好ましくは１００％相補的）を含む。マイクロＲＮＡの「シード領域」は、通常、マイクロＲＮＡの５’末端からのヌクレオチド２～ヌクレオチド７を含むか又はこれのみからなる。

【００４９】

したがって、本発明のａｎｔｉｍｉＲの設計において、標的マイクロＲＮＡの成熟型の配列及びそれらのシード領域を考慮することができる。以下に、それらの成熟型の配列を示し、ここで、それらの各々のシード領域が太字で表され、それらのアクセスコード（Ｍｉｍａｔ）がｍｉＲｂａｓｅデータベース（ｗｗｗ．ｍｉｒｂａｓｅ．ｏｒｇ）で示される。

Ｈｓａ（ｈｏｍｏｓａｐｉｅｎｓ）－ｍｉＲ－２１８－５ｐ（ＭＩＭＡＴ０００００２７５）：５’－ＵＵＧＵＧＣＵＵＧＡＵＣＵＡＡＣＣＡＵＧＵ－３’（配列番号：１０）；シード領域：ＵＧＵＧＣＵ（配列番号：１２）

ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ（ＭＩＭＡＴ０００００４１８）：５’－ＡＵＣＡＣＡＵＵＧＣＣＡＧＧＧＡＵＵＡＣＣＡＣ－３’（配列番号：１１）；シード領域：ＵＣＡＣＡＵ（配列番号：１３）

【００５０】

一実施形態では、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、ａｎｔｉｍｉＲ及びマイクロＲＮＡスポンジとして公知の種類の阻害剤、遮断剤又はアンタゴニストである。好ましくは、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はその類似体は、ａｎｔｉｍｉＲ、より好ましくは、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのａｎｔｉｍｉＲである。

【００５１】

一実施形態では、オリゴヌクレオチド及び／又はその類似体は、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５ヌクレオチド長である。一実施形態では、オリゴヌクレオチド及び／又はその類似体は、１０～５０ヌクレオチド長、より好ましくは１０～３０又は１５～２５ヌクレオチド長である。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、その配列が、配列番号１０（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ）又は１１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）に存在する領域の相補的配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６個の連続する窒素塩基で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれから本質的になるａｎｔｉｍｉＲである。より好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の配列は、配列番号１０（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ）又は１１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）の相補配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一である。

【００５２】

一実施形態では、アンタゴニストはａｎｔｉｍｉＲであり、その配列は、少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続から構成される断片を含み、当該ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の配列は、配列番号１３に示されるｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのシード領域の相補的配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である。好ましくは、当該ａｎｔｉｍｉＲは、配列番号１３に示されるシード領域に１００％相補的な少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続のみからなる断片を含む。一実施形態では、アンタゴニストは、配列が第１の断片及び第２の

断片を含むａｎｔｉｍｉＲであり、第１の断片は、少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続から構成され、当該第１の断片の窒素塩基の配列は、配列番号１３に示されるｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのシード領域の相補的配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であり、第２の断片は、第１の断片に隣接し（すなわち、第１の断片の上流及び／又は下流に位置する）、配列番号１１に存在する領域の相補配列に対して、少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続した窒素塩基の連続から構成される。「隣接する」とは、本明細書では、第１の断片のすぐ隣、すなわち第１の断片と第２の断片との間にヌクレオチドがないことを指す。いくつかの代替的な実施形態では、第２の断片は、第１の断片の６、７、８、９、１０、又は１１ヌクレオチド上流及び／又は下流に位置する。より好ましくは、第２の断片は、第１の断片の１、２、３、４又は５ヌクレオチド上流及び／又は下流に位置する。

【００５３】

一実施形態では、アンタゴニストはａｎｔｉｍｉＲであり、その配列は、少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続から構成される断片を含み、当該ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の配列は、配列番号１２に示されるｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのシード領域の相補的配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である。好ましくは、当該ａｎｔｉｍｉＲは、配列番号１２に示されるシード領域に１００％相補的な少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続のみからなる断片を含む。一実施形態では、アンタゴニストは、配列が第１の断片及び第２の断片を含むａｎｔｉｍｉＲであり、第１の断片は、少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続から構成され、当該第１の断片の窒素塩基の配列は、配列番号１２に示されるｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのシード領域の相補的配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であり、第２の断片は、第１の断片に隣接し（すなわち、第１の断片の上流及び／又は下流に位置する）、配列番号１０に存在する領域の相補配列に対して、少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続した窒素塩基の連続から構成される。「隣接する」とは、本明細書では、第１の断片のすぐ続いて、すなわち第１の断片と第２の断片との間にヌクレオチドがないことを指す。いくつかの代替的な実施形態では、第２の断片は、第１の断片の６、７、８、９、１０、又は１１ヌクレオチド上流及び／又は下流に位置する。より好ましくは、第２の断片は、第１の断片の１、２、３、４又は５ヌクレオチド上流及び／又は下流に位置する。

【００５４】

また、本発明の目的に有用なオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子の概念内に含まれ、その範囲内に含まれるのは、プリマイクロＲＮＡ又はプレマイクロＲＮＡに作用し、通常はマイクロＲＮＡ生合成を変化させ、利用可能な活性マイクロＲＮＡの減少に主に起因してマイクロＲＮＡ活性に対して負の効果を有するマイクロＲＮＡ阻害剤、遮断剤又はアンタゴニストである。動物細胞では、未熟なｐｒｉ－ｍｉＲＮＡは、核内のマイクロプロセッサ複合体によってｐｒｅ－ｍｉＲＮＡにプロセシングされた後、細胞質に輸送されて、成熟ｍｉＲＮＡに更にプロセシングされる。したがって、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのプリマイクロＲＮＡ及び／又はプレマイクロＲＮＡを標的として、当該マイクロＲＮＡのレベルが低下するようにそれらの生合成を変化させることも、それらの活性の低下をもたらすはずであることを理解

しなければならない。したがって、本発明の目的のために、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニスト又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストは、成熟形態に作用することができる分子だけでなく、プリマイクロＲＮＡ又はプレマイクロＲＮＡに作用し、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐの成熟形態のレベルを低下させることができる分子も含むと理解されなければならない。それらを設計するために、以下を考慮に入れなければならない。

－ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの主要なマイクロＲＮＡ（ｐｒｉ－マイクロＲＮＡ）は、遺伝子ＡＯＰＥＰ（ＥＮＳＧ００００００１４８１２０；ｃｈｒ９：９７４８８９８３－９７８４９４４１）の転写物である。

－ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのマイクロＲＮＡ前駆体（プレマイクロＲＮＡ）は、ゲノム位置ｈｇ１９ｃｈｒ９：９７８４７４９０－９７８４７５８６［＋］及び配列：ＣＵＣＡＧＧＵＧＣＵＣＵＧＧＣＵＧＣＵＵＧＧＧＵＵＣＣＵＧＧＣＡＵＧＣＵＧＡＵＵＵＧＵＧＡＣＵＵＡＡＧＡＵＵＡＡＡＡＵＣＡＣＡＵＵＧＣＣＡＧＧＧＡＵＵＡＣＣＡＣＧＣＡＡＣＣＡＣＧＡＣＣＵＵＧＧＣ（配列番号１９）に対応する。この配列はｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐよりも長いため、プレマイクロＲＮＡに特異的なアンタゴニストを設計することが可能である。

－ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐは、それをコードする２つのゲノム位置と、２つの前駆体プレマイクロＲＮＡ、Ｐｒｅ－ｈｓａ－ｍｉｒ－２１８－１（ｃｈｒ４：２０５２９８９８－２０５３０００７）：ＧＵＧＡＵＡＡＵＧＵＡＧＣＧＡＧＡＵＵＵＵＣＵＧＵＵＧＵＧＣＵＵＧＡＵＣＵＡＡＣＣＡＵＧＵＧＧＵＵＧＣＧＡＧＧＵＡＵＧＡＧＵＡＡＡＡＣＡＵＧＧＵＵＣＣＧＵＣＡＡＧＣＡＣＣＡＵＧＧＡＡＣＧＵＣＡＣＧＣＡＧＣＵＵＵＣＵＡＣＡ（配列番号：２０）及びＰｒｅ－ｍｉｒ－２１８－２（ｃｈｒ５：１６８１９５１ＳＩ－１６８１９５２６０）：ＧＡＣＣＡＧＵＣＧＣＵＧＣＧＧＧＧＣＵＵＵＣＣＵＵＵＧＵＧＣＵＵＧＡＵＣＵＡＡＣＣＡＵＧＵＧＧＵＧＧＡＡＣＧＡＵＧＧＡＡＡＣＧＧＡＡＣＡＵＧＧＵＵＣＵＧＵＣＡＡＧＣＡＣＣＧＣＧＧＡＡＡＧＣＡＣＣＧＵＧＣＵＣＵＣＣＵＧＣＡ（配列番号：２１）とを有する。両方の前駆体をアンタゴニストの設計に使用することができる。

－ｐｒｅ－ｈｓａ－ｍｉｒ－２１８－１は、遺伝子ＳＬＩＴ２（ＥＮＳＧ００００００１４５１４７：ｃｈｒ４：２０２５４８８３－２０６２１２８４）の転写物の内側に位置する分子内ヘアピン構造に由来し、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ－２は、遺伝子ＳＬＩＴ３（ＥＮＳＧ００００００１８４３４７，ｃｈｒ５：ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ－２の１６８０８８７４５－１６８７２８１３３）に由来し、それぞれｐｒｉ－ｍｉＲＮＡとみなすことができる。他の成熟マイクロＲＮＡは、同じクラスターの一部ではない。次いで、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐの場合、プレ－ｍｉＲＮＡ又はプリ－ｍｉＲＮＡの両方を、成熟型ｍｉＲＮＡを減少させ、ＭＢＮＬタンパク質レベルを増大させるためのアンタゴニストの標的として想定することができた。

【００５５】

以下の実施例、特に表１及び表４に示すように、本発明の著者らは、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するいくつかのａｎｔｉｍｉＲを開発及び最適化し、そのＴｉｎｄｅｘはオレイン酸の添加により大幅に改善された。これらの中で、配列番号１（ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト）及び配列番号２（ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニスト）を含むａｎｔｉｍｉＲの特異的配列は、実施例の節に示されるように、ＤＭ１細胞におけるそれらの最適な特徴及び効率のために特に言及される。

【００５６】

更に、配列番号１又は２の機能的等価物も本明細書で企図され、特定の核酸塩基の特定の変化は分子を有意に不安定化させず、したがってその治療効果は維持される。当該機能的等価配列は、配列番号５２～７９（配列番号２のａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価物）及び配列番号８０～１１０（配列番号１のａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価物）に示されている。「機能的等価物」とは、本明細書では、配列番号１又は２

の核酸塩基配列とは異なるが、配列番号１又は２と同じ機能を果たし、同じ有用性又は技術的効果を提供する他のオリゴヌクレオチドを指す。

【００５７】

したがって、一実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストであり、配列番号１（ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ）又は配列番号８０～１１０に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になる。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号１又は配列番号８０～１１０のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一である。

【００５８】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニストであり、配列番号２（ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ）又は配列番号５２～７９に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になる。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号２又は配列番号５２～７９のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一である。

【００５９】

本発明によるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体では、オリゴヌクレオチド分子及び／又は類似体の全長内の各ウラシル塩基及びチミン塩基、好ましくはシード領域内の各ウラシル塩基及びチミン塩基は、場合により、それぞれチミン又はウラシル塩基で置き換えることができることに留意されたい。これは、配列番号５２～１１０を除いて、本明細書に開示される全てのオリゴヌクレオチドに含まれる全ての「Ｔ」核酸塩基に適用され、特定の位置では、「Ｔ」の代わりに「Ｕ」が好ましい。したがって、当該特定の位置には、ＴではなくＵが含まれる。

【００６０】

同様に、オリゴヌクレオチド分子及び／又は類似体の全長内の各グアノシン塩基、好ましくはシード領域内の各グアノシンは、場合によりそれぞれヒポキサンチン塩基によって置換され得る。これは、本明細書に開示される全てのオリゴヌクレオチドに適用される。

【００６１】

一実施形態では、アンタゴニストヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐであるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、ＭＢＮＬタンパク質、好ましくはＭＢＮＬ１及び／又はＭＢＮＬ２タンパク質の内因性レベルを増加させることができる。好ましくは、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、配列番号１（ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐ）又は２（ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）、又は配列番号５２～１１０に存在する領域の配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、ＭＢＮＬタンパク質、好ましくはＭＢＮＬ１及び／又はＭＢＮＬ２タンパク質の内因性レベルを増加さ

せることができる。好ましくは、ＭＢＮＬタンパク質の内因性レベルの増加は、未処理細胞又は未処理組織と比較して統計学的に有意な増加であり、好ましくは、統計学的比較は、スチューデントのｔ検定を用いて行われる（例えば、図４を参照のこと）。最も好ましくは、ＭＢＮＬタンパク質の内因性レベルの増加、好ましくは統計学的に有意な増加は、筋肉組織の未処理細胞と比較して、筋肉組織の処理細胞（より好ましくは四頭筋及び腓腹筋）の少なくとも１．２倍、１．３倍、１．４倍又は１．５倍の変化である。好ましくは、処理された細胞又は組織におけるＭＢＮＬタンパク質の内因性レベルの増加は、未処理の細胞又は組織と比較した場合、少なくとも１５％、２０％、３０％、４０％、５０％又はそれ以上である。「未処理の細胞又は組織」とは、本明細書では、健康であるか又はＤＭ１表現型を提示し、第１の態様又はその実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体で処理されていない、マウス等の動物全体を含む１つ以上の細胞又は組織を指す。好ましくは、未処理細胞は筋細胞であり、未処理組織は筋組織である。

【００６２】

配列番号１又は２で定義されるものを含む本発明のａｎｔｉｍｉＲは、それらのインビボ安定性及び有効性を改善するために更に最適化することができる。そのために、それらの化学構造におけるいくつかの改変が記載されている（総説については、Ｍｃｋｅｎｚｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｃｅｎｔ ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ｎｏｎ－ｎａｔｉｖｅ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．，２０２１，５０，５１２６－５１６４を参照されたい）。これらの修飾は、ペントースにおいて（オリゴヌクレオチドがオリゴリボヌクレオチドである好ましい実施形態では、修飾はリボース内にあり得る）、ヌクレオチド間結合、又は核酸塩基、又はそれらの組み合わせにおいて行うことができる。本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴリボヌクレオチドが化学的に修飾されている場合、それらは、本発明の文脈において、それぞれオリゴヌクレオチド類似体又はオリゴリボヌクレオチド類似体と見なされる。一実施形態では、ａｎｔｉｍｉＲはオリゴヌクレオチド類似体であり、分子全体に沿って少なくとも６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の化学修飾を含む。一実施形態では、ａｎｔｉｍｉＲは、その全てのヌクレオチドが化学修飾されたオリゴリボヌクレオチド類似体である。

【００６３】

ヌクレオチド間結合における修飾：本発明のオリゴヌクレオチド類似体を生じさせる可能な修飾に含まれると考えられ、ホスホロチオエート結合を生じさせる修飾は、ポリヌクレオチド鎖の「骨格」の一部であるリン酸基に影響を及ぼし、ヌクレオチド間の架橋として作用していないリン酸基の酸素原子の置換において硫黄原子の導入を生じさせる修飾であり、これらの修飾は、ヌクレオチド間の結合を、他の望ましい薬理学的特性に加えて、ヌクレアーゼによる分解に耐性にするので、エキソヌクレアーゼによる分解を阻害するためにオリゴヌクレオチドの５’末端又は３’末端の最後の３～５ヌクレオチドの間に一般に挿入され、それらの安定性を高める。

【００６４】

好ましい実施形態では、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子に含まれるヌクレオチドの少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、又は１５個超が、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合している。好ましくは、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合された少なくとも２つのヌクレオチドを含み、当該オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、その３’末端及び／又は５’末端で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートされている。更により好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、ＰＳ及びホスホジエステル（ＰＯ）結合の混合物を含み、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドは、ホスホロ

チオエート結合によって化学的に結合され、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって結合される。更に好ましい実施形態では、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数は、ホスホジエステル結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数よりも多い。一実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、１３～１７ヌクレオチド長であり、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合によって化学的に結合した少なくとも７、８、９、又は１０ヌクレオチドを含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体中のＰＳ：ＰＯの比は、１．２：１、１．５：１、１．７：１、２：１、２．２：１、２．５：１、２．７：１、３：１である。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体中の比ＰＳ：ＰＳは、１．２：１～２．７：１、より好ましくは１．５：１又は２．５：１である。「比ＰＳ：ＰＯ」とは、本明細書では、ＰＯ結合当たりのＰＳ結合の数と呼ばれる。例えば、オリゴヌクレオチド分子が１５個のヌクレオチドからなり、１０個のＰＳ結合及び４個のＰＯ結合を有する場合（例えば、配列番号７を参照のこと）、当該分子は２．５：１の比ＰＳ：ＰＯを有すると言われる。一実施形態において、ヌクレオチド間の結合の５０％、５５％、好ましくは６０％、７０％又は７５％超がＰＳ結合である。

【００６５】

一実施形態において、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子に含まれる全てのヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合している。上記のように、好ましくは、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、マイクロＲＮＡ（すなわち、ａｎｔｉｍｉＲ）のアンタゴニストである。

【００６６】

ペントース、好ましくはリボースにおける修飾：最も広く使用されている糖修飾は、２’位のＯＨ基に位置するものである。これらの中で、本発明の文脈において最も重要なものは、２’フルオロ（２’Ｆ：リボース２’位へのフッ素原子の導入）、２’－Ｏ－メトキシエチル（ＭＯＥ）、又は２’Ｏ－メチル（ＯＭｅ）修飾である。したがって、一実施形態では、本発明によるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子、好ましくは、ａｎｔｉｍｉＲは、以下の修飾：２’フルオロ（２’Ｆ：リボース２’位へのフッ素原子の導入）、２’－Ｏ－メトキシエチル（ＭＯＥ）、及び／又は２’Ｏ－メチル（ＯＭｅ）のうちの１つを有する少なくとも１つのペントースを含むように化学修飾される。一実施形態において、オリゴヌクレオチド分子中の全てのヌクレオチドは、２’ＯＭＥ修飾ヌクレオチドである。

【００６７】

本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子、好ましくはａｎｔｉｍｉＲにおいて行うことができる別の修飾は、二環式２’－４’修飾の形成である。２’酸素と４’位置との間に架橋を有する二環式構造の形成によって炭水化物環を３’－エンド配座に固定する様々なリボース誘導体が存在する。一実施形態において、２’酸素と４’炭素との間の架橋の形成は、３’エンド配座のリボースをロックし、ロックド核酸又はＬＮＡと呼ばれる修飾をもたらす。ＬＮＡ修飾の導入は、ａｎｔｉｍｉＲ－標的ｍｉＲＮＡハイブリッドの安定性を非常に増大させ、それにより、ａｎｔｉｍｉＲ－標的ｍｉＲＮＡハイブリッドを著しくより熱力学的に安定にし、分解に対して抵抗性にし、これは、特に、当該修飾が分子の末端に配置されるときに起こる。一実施形態では、３’領域から始まる第１のヌクレオチドは、ＬＮＡ修飾を含む。別の実施形態において、５’領域から出発する２つの第１のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、ＬＮＡ修飾を含む。二環式ヌクレオチドの更なる修飾としては、標的配列に対する様々な親和性を有する架橋核酸、エチル架橋（ＥＮＡ）、拘束エチル（ｃＥｔ）核酸、二環式（二環式ＤＮＡ）及び三環式（三環式ＤＮＡ）構造並びに立体配座制限ヌクレオチド（ＣＲＮ）が挙げられる。

【００６８】

更なる修飾には、いわゆるＰＭＯ（リボースがモルホリノ基によって置換されている核酸）が含まれる。「モルホリノ」とは、ホスホロジアミデート基を介して結合したメチレ

ンモルホリン環の骨格に結合した塩基として理解される。別の骨格修飾は、いわゆるＰＮＡ（「ペプチド核酸」：ヌクレオチド類似体の骨格がペプチド結合で連結されたＮ－（２－アミノエチル）－グリシンの繰り返し単位の構造となるようにリボース－リン酸基がアミノ酸部分で置換されたペプチド核酸）である。

【００６９】

一実施形態では、本発明によるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子、好ましくは、ａｎｔｉｍｉＲは、ａｎｔｉｍｉＲを形成するヌクレオチドの少なくとも１つのペントースを含むように化学修飾され、モルホリノ核酸（ＰＭＯ）又はペプチド核酸（ＰＮＡ）を含む。

【００７０】

核酸塩基における修飾：その頻繁な使用のために、オリゴヌクレオチド、好ましくは本発明のオリゴリボヌクレオチド類似体、好ましくはａｎｔｉｍｉＲを生じさせる化学修飾の中にも含まれるのは、窒素塩基シトシン（Ｃ）の５メチル化であり、これは免疫系によるオリゴヌクレオチド類似体の検出を減少させる。したがって、一実施形態において、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子、好ましくはａｎｔｉｍｉＲに含まれるヌクレオチドのうちの少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、又は５つを超えるヌクレオチドは、メチル化シトシンを含む。好ましい実施形態では、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子、好ましくはａｎｔｉｍｉＲ中の全てのシトシンがメチル化されている。

【００７１】

別の可能な修飾は、追加のＨ結合を有するチミジン又はウリジンと塩基対を形成することができる２，６ジアミノプリンである（天然のＡ：Ｔ塩基対に存在する２の代わりに３個のＨ結合）。したがって、一実施形態において、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子に含まれるヌクレオチドの少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、又は５個超は、２，６－ジアミノプリンを含む。

【００７２】

「オリゴヌクレオチド分子」の定義及び「オリゴヌクレオチド類似体」の定義から推論できるように、オリゴヌクレオチド類似体の定義には、いくつかの単位が修飾を提示し、他の単位が修飾を提示しないハイブリッド分子、並びに核酸及びペプチドの類似体の間のハイブリッド、又はヌクレオチド単位の一部がヌクレオチド（又はその類似体）であり、他の単位がデオキシヌクレオチド（糖がデオキシリボースであるヌクレオチド）であるハイブリッド分子、並びに後者の類似体、すなわちＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド及びその類似体も含まれる。他の化学修飾も可能であり、既知であり、オリゴヌクレオチド類似体を生じる可能な修飾内に含まれる。

【００７３】

オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子に含まれる可能な化学修飾に関して、この用語は、特に分子生物学の当業者に知られている通常の修飾の１つ以上の場合、基礎研究の観点から、特にこれらの分子の治療用途の探索において適用される。このような変更に関する情報は、一般的な共通知識に見出すことができる。

【００７４】

オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子の他の非ヌクレオチド分子による修飾。

【００７５】

上述のように、本発明の第１の態様は、好ましくはａｎｔｉｍｉＲ、より好ましくはヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ若しくはヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト、又は当該分子の２つ以上の混合物であるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子を提供し、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、当該オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子の３’末端及

び／又は５’末端で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートしている。したがって、本発明に含まれる全てのオリゴヌクレオチドは、それらの３’及び／又は５’で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートされる。

【００７６】

いくつかの実施形態では、有機化合物等の他の非ヌクレオチド分子も、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子の３’及び／又は５’末端でコンジュゲートすることができる。当該コンジュゲーションは、直接コンジュゲーション又はスペーサー分子によるものであり得る。「スペーサー分子」とは、本明細書では、一方ではオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体と、他方では非ヌクレオチド分子、好ましくはオレイン酸とを接続する任意の１つ以上の分子を指す。１つ以上のスペーサー分子は、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体の３’又は５’末端で連結され得る。好ましくは、スペーサー分子は、当該オリゴヌクレオチドに共有結合している。好ましくは、スペーサー分子（複数可）は、例えば図８に示されるように、スペーサー上の末端炭素とオリゴヌクレオチドの３’末端リン酸基中の酸素基との間の結合を介して一方の末端に結合され、リンカー上の末端窒素基との間の結合によって他方の末端に結合され、これはオレイン酸のカルボキシ基とアミド結合を形成する。

【００７７】

好ましい実施形態では、スペーサー分子は、３－アミノプロピル（ＮＨＣ３）、５－アミノペンチル（ＮＨＣ５）、６－アミノヘキシル（ＮＨＣ６）、トレオニノール又はそれらの誘導体からなる群より選択される。他の実施形態では、１又は複数のスペーサー分子は、チオール修飾剤Ｃ６Ｓ－Ｓ（Ｃ６ＳＳＣ６）を含み得る。更なる実施形態では、スペーサーは、オリゴヌクレオチドに直接結合したチオール修飾剤Ｃ６Ｓ－Ｓ（Ｃ６ＳＳＣ６）と、それに続く３－アミノプロピル（ＮＨＣ３）、６－アミノヘキシル（ＮＨＣ６）、トレオニノール又はその誘導体とを含み得る（図８参照）。

【００７８】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはプロドラッグとして提供されてもよく、自己犠牲基を含む又はそれのみからなるスペーサー分子を含んでもよい。「自己犠牲」基とは、本明細書では、それがコンジュゲートされている分子、この場合はオリゴヌクレオチドから自発的かつ不可逆的に分解する分子を指す。一実施形態では、自己犠牲基は、グルタチオン等の天然に存在するチオールによって細胞内で還元され、オリゴヌクレオチドの放出をもたらすジスルフィド結合である。

【００７９】

スペーサーは、脂肪族線状又は分岐状炭化水素鎖、シクロヘキシルフェニル及び他の芳香族スペーサー、並びにエチレングリコール、グリセロール、アミノ酸、ペプチド、又は炭水化物の１つ又はいくつかの単位に基づく極性スペーサーであってもよい。いくつかの場合、オレイル誘導体は、アミド結合によってアミノ基に共有結合するか、又はアミン結合を有する核酸塩基並びにリン酸オレイルとしてのリン酸結合に直接結合することができる。

【００８０】

好ましくは、オレイン酸は、その３’末端でオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされる。より好ましくは、オレイン酸は、図８に示すように、スペーサー分子、好ましくはＮＨＣ６、トレオニノール又はＮＨＣ３によってコンジュゲートされる。オリゴヌクレオチドとオレイン酸との間のコネクターとしてのスペーサー分子の付加は必須ではないことに留意されたく、例えば、配列番号５１を参照されたい。ここで、オレイン酸は、直接コンジュゲーションによってオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子の５’末端でコンジュゲートされる。

【００８１】

好ましくは、本発明に開示される全てのオリゴヌクレオチド分子は、それらの３’及び／又は５’末端で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートされ、オリゴヌクレオチド分子は、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合した少なくとも２つのヌクレオ

チドを更に含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子は、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合した少なくとも２つのヌクレオチドを更に含み、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって結合している。より好ましくは、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数は、ホスホジエステル（ＰＯ）結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数よりも多い。

【００８２】

本発明のオリゴヌクレオチドを調製するために、当技術分野で公知の異なる手段を使用することができる。特に、オリゴヌクレオチドは、固相法又は液相法によって合成され得る。スペーサー分子で官能化されたオリゴヌクレオチド及びオレイルオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、固相オリゴヌクレオチド合成プロトコルを用いて調製され得る。この方法論では、制御細孔ガラス（ＣＰＧ）等の固体支持体がオリゴヌクレオチド配列の３’末端の第１のヌクレオチドで官能化され、オリゴヌクレオチドは通常３’から５’方向に合成される。５’位へのスペーサー分子の導入は、オリゴヌクレオチドの５’位へのリン酸結合を介してスペーサー分子を導入するスペーサー分子のホスホラミダイト誘導体を使用することによって行われる。スペーサー分子を３’位に導入するには、ヌクレオチドを支持体に結合させるために使用される分子であるリンカー分子で官能化された固体支持体の調製が必要である。リンカー分子の例は、フタルイミド又はスクシニルリンカー等の不安定な化合物である。注目すべきことに、スペーサーはオリゴヌクレオチド分子にコンジュゲートされ、それにコンジュゲートされたままであるが、リンカーは、固相法を用いて合成されているときにオリゴヌクレオチドの固定化を目的とする一時的なコンジュゲーションである。

【００８３】

液相調製法の場合、固相法で規定された種類のリンカーの代わりに、ベンゾイル又はアセチル等の保護基を使用してもよい。

【００８４】

本発明の文脈において開示される全てのオリゴヌクレオチドの中で、修飾及び修飾の組合わせを含む以下の実施形態が好ましいと考えられる。

【００８５】

一実施形態では、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、ａｎｔｉｍｉＲ型オリゴヌクレオチド類似体であり、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホロチオエート結合によって化学的に結合しており、分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホジエステル結合によって結合しており、好ましくはホスホロチオエート結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数が、ホスホジエステル結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数よりも多く、

ａ．ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体のモノマー単位の窒素塩基の配列は、それらが結合しなければならない内因性分子（好ましくはマイクロＲＮＡ分子、より好ましくは配列番号１１のｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又は配列番号１０のｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ）に対して少なくとも８５％、９０％、９３％、９５％、９８％、又は１００％相補的であり、

ｂ．これは、５’末端及び／又は３’末端において、好ましくはスペーサー分子によって、少なくとも１つのオレイン酸分子とコンジュゲートされる。

【００８６】

一実施形態では、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、ａｎｔｉｍｉＲ型オリゴヌクレオチド類似体であり、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホロチオエート結合によって化学的に結合しており、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホジエステル結合によって結合しており、好ましくはホスホロチオエート結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数が、ホスホジエステル結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数よりも多く、

ａ．オリゴヌクレオチドの配列は、第１の断片及び第２の断片を含み、第１の断片は、配列番号１３に示されるｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのシード領域の相補的配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続から構成され、第２の断片は、第１の断片に隣接し（すなわち、第１の断片の上流及び／又は下流に位置する）、配列番号１１に存在する領域の相補的配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続から構成され、

ｂ．これは、５’末端及び／又は３’末端において、好ましくはスペーサー分子によって、少なくとも１つのオレイン酸分子とコンジュゲートされる。

【００８７】

一実施形態では、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、ａｎｔｉｍｉＲ型オリゴヌクレオチド類似体であり、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホロチオエート結合によって化学的に結合しており、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホジエステル結合によって結合しており、好ましくはホスホロチオエート結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数が、ホスホジエステル結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数よりも多く、

ａ．オリゴヌクレオチドの配列は、第１の断片及び第２の断片を含み、第１の断片は、配列番号１２に示されるｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのシード領域の相補的配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一である少なくとも５～８個のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の連続から構成され、第２の断片は、第１の断片に隣接し（すなわち、第１の断片の上流及び／又は下流に位置する）、配列番号１０に存在する領域の相補的配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続から構成され、

ｂ．これは、５’末端及び／又は３’末端において、好ましくはスペーサー分子によって、少なくとも１つのオレイン酸分子とコンジュゲートされる。

【００８８】

一実施形態において、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、式中、

ａ．当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドが、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合しており、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって結合しており、好ましくは、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数が、ホスホジエステル結合によって化学的に結合しているヌクレオチドの数よりも多く、

ｂ．その配列は、配列番号１若しくは２又は配列番号５２～１１０に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、

ｃ．これは、５’末端及び／又は３’末端において、好ましくはスペーサー分子によって、少なくとも１つのオレイン酸分子とコンジュゲートされる。

【００８９】

一実施形態では、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド及

び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホロチオエート結合によって化学的に結合され、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホジエステル結合によって結合されている、ａｎｔｉｍｉＲ型オリゴヌクレオチド類似体であり、好ましくはホスホロチオエート結合によって化学的に結合されているヌクレオチドの数は、ホスホジエステル結合によって化学的に結合されているヌクレオチドの数よりも多く、

ａ．モノマー単位の少なくとも１つは、ペントース部分、好ましくはリボース、ヌクレオチド間結合、窒素塩基、又はそれらの全てにおいて１つ以上の化学修飾を示すヌクレオチド類似体であり、

ｂ．ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体のモノマー単位の窒素塩基の配列は、配列番号１のオリゴヌクレオチド若しくは配列番号２のオリゴヌクレオチドの、又はそれらの機能的等価物である配列番号５２～１１０のヌクレオチドのモノマー単位の窒素塩基の配列と少なくとも８５％、９０％、９３％、９５％、９８％、又は１００％同一であり、

ｃ．これは、５’末端及び／又は３’末端において、好ましくはスペーサー分子によって、少なくとも１つのオレイン酸分子とコンジュゲートされる。

【００９０】

好ましい実施形態では、第１の態様又はその実施形態のいずれかによるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子に含まれるヌクレオチドの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５個、又は１５個超が、ロックド核酸、２’－メトキシ、２’－Ｏ－メトキシエチル－、２’フルオロ、ＢＮＡ、ＰＭＯ、ＰＮＡ、ＣＲＮ、２，６－ジアミノプリン、メチル化シトシン及び／又はそれらの任意の組み合わせを含むか又はそれらからなる群より選択される少なくとも１種の修飾を含む。

【００９１】

好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストであり、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合した少なくとも２つのヌクレオチド及びホスホジエステル結合によって化学的に結合した少なくとも２つのヌクレオチドを含み、好ましくは、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合したヌクレオチドの数は、ホスホジエステル結合によって化学的に結合したヌクレオチドの数よりも多く、当該オリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートしており、当該１つのオレイン酸分子は、当該オリゴヌクレオチド及び／又はその類似体の３’末端及び／又は５’末端にコンジュゲートしている。好ましくは、その３’末端及び／又は５’末端でオレイン酸の少なくとも１分子にコンジュゲートされ、ＰＯ結合よりも多くのＰＳ結合を含む当該オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、配列の少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％が配列番号１（ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐ）若しくは配列番号２（ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）又は配列番号５２～１１０のそれらの機能的等価物のいずれかに存在する領域と同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも１５個の連続する窒素塩基の連続から構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になる。

【００９２】

好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子に含まれるヌクレオチドの少なくとも３、４、５、６、７、８、又は８超が化学的に修飾され、当該化学修飾は、ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ）、ｉｉ）２’－Ｏ－メトキシエチル（２’ＭＯＥ）、及び／又はｉｉｉ）２’酸素と４’炭素（ＬＮＡ）を接続する余分な架橋、及び／又はそれらの任意の組合わせの群から選択される。更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体分子に含まれるヌクレオチドは、少なくともオリゴヌクレオチドの３’及び５’末端に位置するヌクレオチドの２’酸素及び４’炭素（ＬＮＡ）を接続する余分な

架橋を含むように化学的に修飾される。より好ましくは、ＬＮＡ修飾は、オリゴヌクレオチドの３’末端及び５’末端に位置する少なくとも４番目のヌクレオチド、３番目のヌクレオチド、好ましくは２番目のヌクレオチド又は最後のヌクレオチドに導入される。また、好ましくは、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子に含まれるヌクレオチドの少なくとも１つは、２，６－ジアミノプリン及び／又は少なくともメチル化シトシンである。

【００９３】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニストであり、配列番号３又は配列番号２２（ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号３又は配列番号２２（ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号３又は配列番号２２のみからなる。

【００９４】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニストであり、配列番号４又は配列番号２３（ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯ　３’Ｏｌ）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号４又は配列番号２３（ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯ　３’Ｏｌ）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号４又は配列番号２３のみからなる。

【００９５】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニストであり、配列番号５又は配列番号２４又は配列番号５１（ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯ　５’Ｏｌ）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、５’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子

及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号５又は配列番号２４又は配列番号５１（ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯ５’Ｏｌ）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、５’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号５又は配列番号２４又は配列番号５１のみからなる。

【００９６】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニストであり、配列番号４９又は配列番号５０（Ｃ６ＳＳＣ６を有するＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号４９又は配列番号５０（Ｃ６ＳＳＣ６を有するＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、５’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号４９又は配列番号５０（Ｃ６ＳＳＣ６を有するＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ）のみからなる。

【００９７】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストであり、配列番号７又は配列番号２５（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＭＯＥオレイン酸３’）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号７又は配列番号２５（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＭＯＥオレイン酸３’）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号７又は配列番号２５のみからなる。

【００９８】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストであり、配列番号８又は配列番号２６（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＭＯＥ　ＤＤオレイン酸３’）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は

１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号８又は配列番号２６（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＭＯＥＤＤオレイン酸３’）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号８又は配列番号２６のみからなる。

【００９９】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストであり、配列番号９又は配列番号２７（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号９又は配列番号２７（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号９又は配列番号２７のみからなる。

【０１００】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストであり、配列番号１４又は配列番号２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’２）に存在する領域の配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の少なくとも７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含むか、それのみからなるか、又はそれのみから本質的になり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端にコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体に含まれるヌクレオチド又はヌクレオチド類似体単位の窒素塩基の全長配列は、配列番号１４又は配列番号２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’２）中のオリゴヌクレオチドの窒素塩基の全長配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％、又は１００％同一であり、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、３’末端でコンジュゲートされた少なくともオレイン酸を含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号１４又は配列番号２８のみからなる。

【０１０１】

好ましくは、第１の態様のオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０若しくは５１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂのア

ンタゴニスト）又は配列番号７、８、９、１４、２５、２６、２７若しくは２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト）、又は配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０、５１、７、８、９、１４、２５、２６、２７若しくは２８と８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含むか、又はそれらのみからなる。

【０１０２】

好ましくは、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体は、配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０、５１、７、８、９、１４、２５、２６、２７又は２８のいずれか、好ましくは配列番号３、４、７、２２、２３又は２５と少なくとも８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は９９．５％又は１００％同一であり、未処理の細胞又は組織と比較してＭＢＮＬタンパク質、好ましくはＭＢＮＬ１及び／又はＭＢＮＬ２タンパク質の内因性レベルを増加させることができる、好ましくは統計的に増加させることができる。最も好ましくは、第１の態様のオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０、５１、７、８、９、１４、２５、２６、２７又は２８のみからなる。本発明の文脈において、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体が特定の配列番号から特異的になると言われる場合、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体もまた、当該配列番号に示される化学修飾、スペーサー分子、及びオレイン酸コンジュゲーションのみからなることが理解されることに留意されたい。例えば、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体が配列番号３、４、又は７のみからなる場合、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、配列番号３、４、又は７で定義されるヌクレオチド配列、並びに配列番号３、４、又は７で定義される化学修飾、スペーサー、及びオレイン酸コンジュゲーションのみからなると解釈される。各配列番号に含まれる化学修飾の詳細な説明は、「配列表」の項に含まれる。

【０１０３】

更に、プロドラッグの形態、すなわち、完全に活性ではないが、投与すると体内で変換又は代謝されて、本明細書に記載の完全に薬理学的に活性なオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を生じる形態又は性質のオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体等の化合物も本発明に含まれる。

【０１０４】

阻害されるマイクロＲＮＡの細胞発現も考慮されるべきである。ｍｉＲＧａｔｏｒ ｖ３．０によれば（ｍｉＲＧａｔｏｒ ｖ３．０：ａ ｍｉｃｒｏＲＮＡ ｐｏｒｔａｌ ｆｏｒ ｄｅｅｐ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ，ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ ａｎｄ ｍＲＮＡ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ．Ｓｏｏｙｏｕｎｇ Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅ ４１，Ｉｓｓｕｅ Ｄ１，１ Ｊａｎｕａｒｙ ２０１３，Ｐａｇｅｓ Ｄ２５２－Ｄ２５７，ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｓ１１６８）、ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐは、脂肪組織、脳、中枢神経系、腎臓、心臓、肝臓及び胆管系、肺、咽頭、鼻咽頭、鼻、胎盤、脾臓、幹細胞、精巣、子宮及び関節で発現される。一方、ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐは、中枢神経系、消化管、脂肪組織、乳房、膀胱、心臓、ケラチノサイト、腎臓、肝臓及び胆管系、肺、リンパ系細胞、鼻、咽頭、胎盤、前立腺、皮膚、脾臓、幹細胞、精巣、甲状腺及び子宮で発現される。したがって、考えられる本発明の可能な実施形態は、好ましくはａｎｔｉｍｉＲ、より好ましくはｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ若しくはｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニスト、又は当該分子の２つ以上の混合物であり、標的ｍｉＲＮＡが、脳、小脳、海馬又は中枢神経系、骨格筋、心臓、脂肪組織、腎臓、肝臓及び胆管系、肺、咽頭、鼻咽頭、鼻、胎盤、脾臓、精巣、子宮、消化管、乳房、膀胱、前立腺、皮膚、ケラチノサイト及びリンパ球系の群から選択される少なくとも１つ以上の器官において、又はそれらの器官の１つからの初代培養物の１つ以上の細胞において、又はそれらの器官の１つに由来する確立された細胞株（頭字語ＩＰＳＣによって知られている

人工多能性幹細胞を含む）あるいはこれらの器官の１つからの幹細胞において発現される、オリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子である。拮抗されるべき特異的マイクロＲＮＡの選択、特に、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐｐの間の特異的な選択もまた、拮抗作用が発揮され得る組織の範囲を決定する。

【０１０５】

第２の態様では、本発明は、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されたオリゴヌクレオチド、又はそれらの２つ以上の混合物を少なくとも含み、場合により担体及び／又は１つ以上の薬学的に許容される賦形剤を更に含む組成物、好ましくは医薬組成物に関する。好ましくは、組成物は、第１の態様又はその実施形態のいずれかにおいて定義されるようなａｎｔｉｍｉＲ、より好ましくはヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニストを含む。一実施形態では、これらの抗マイクロＲＮＡの１つ又はそれらの混合物、並びにヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ若しくはヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はそれらの混合物に対する任意の他の抗マイクロＲＮＡ、又は一般に、これらのマイクロＲＮＡの１つ又はヒト遺伝子ＭＢＮＬ１及び／又はＭＢＮＬ２の発現をダウンレギュレートする別のマイクロＲＮＡの阻害剤である任意のオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子を含む組成物は、薬学的に許容される担体及び／又は賦形剤も含む組成物を含む。

【０１０６】

１つの可能な実施形態において、医薬組成物は、第１の態様又はその実施形態のいずれかにおいて定義されるような、ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ若しくはヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐｐ又はそれらの混合物の阻害剤又はアンタゴニスト、好ましくはａｎｔｉｍｉＲ、より好ましくはアンタゴニストの有効量を含む。好ましくは、組成物中に存在するヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐの阻害剤／アンタゴニストは、配列番号１によって表される本発明の実施例で使用されるａｎｔｉｍｉＲ型阻害剤、又は配列番号８０～１１０のその機能的等価物、及び組成物中に存在するヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの阻害剤／アンタゴニストは、配列番号２によって表されるａｎｔｉｍｉＲ型阻害剤又は配列番号５２～７９のその機能的等価物であり、ここで、阻害剤は、その３’末端及び／又は５’末端において、少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートされている。より好ましくは、組成物に含まれる阻害剤（複数可）／アンタゴニスト（複数可）は、治療有効用量の投与を可能にする濃度で存在する。

【０１０７】

「有効量」又は「治療有効用量」は、有益な又は所望の臨床転帰を達成するのに十分な量である。マイクロＲＮＡの阻害剤／アンタゴニストの有効量は、他のマイクロＲＮＡに対する分子で得られた以前の結果によると、マウスでは約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、好ましくは約１．５ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ、又はラットでは約０．７５ｍｇ／ｋｇ～５０ｍｇ／ｋｇであり得る。しかしながら、ヒトにおける有効用量と考えられるものの正確な決定は、サイズ、年齢、及び阻害剤又はアンタゴニストの性質（例えば、それが発現構築物である場合、ａｎｔｉｍｉＲ又はオリゴヌクレオチド類似体等）を含む各患者の個々の因子に基づき得る。それにもかかわらず、投与量は、この説明及び当業者の知識に基づいて当業者によって容易に決定され得る。

【０１０８】

その臨床用途のために、本発明の使用による組成物は、その後、本発明の医薬組成物と見なされ、それらは、所望の用途のための適切な形態で調製され得る。特定の治療期間中に対象に複数回用量を投与し、毎日、毎週、毎月、２ヶ月ごと、３ヶ月ごと又は６ヶ月ごとに用量を投与することが必要又は簡便であり得る。ある特定の実施形態において、対象は、最初に、１つ以上のその後の用量又は維持用量よりも大きい初期用量を受ける。特定の実施形態では、対象は、特にＤＭ１等の慢性疾患の治療の場合、周期的又は慢性的に投与を受ける。

【０１０９】

本発明の医薬組成物が形成される本発明の阻害剤／アンタゴニストの投与ビヒクルとして、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、パール、及び水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、他のオリゴヌクレオチド系送達ビヒクル、及びリポソームを含む脂質系等のコロイド分散系を使用することができる。別の可能性は、投与ビヒクルを安定にし、標的細胞による捕捉を補助するために、適切な塩及び緩衝液を使用して本発明の医薬組成物を調製することである。本発明の組成物は、有効量の投与ビヒクルを含み、薬学的に許容される担体又は水性媒体に溶解又は分散された、本発明のオリゴヌクレオチド分子、独立して又はリポソーム若しくは他の複合体若しくはその発現ベクターを含む水性組成物であり得る。

【０１１０】

本発明の分子又はそれらの発現ベクターを不活性化しない限り、追加の活性成分も組成物に組み込むことができる。

【０１１１】

遊離塩基又は薬理学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤と適切に混合された水中で調製することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中及び油中で調製することもできる。通常の貯蔵及び使用条件下では、これらの調製物は一般に、微生物の増殖を防ぐために保存剤を含有する。オリゴヌクレオチドは、リン酸緩衝生理食塩水及び塩化ナトリウムの溶液中で調製することもできる。例えば、オリゴヌクレオチドは、６．５～８のｐＨ、好ましくは約６．８－７のｐＨのリン酸緩衝生理食塩水及び約１５０ｍＭの濃度の塩化ナトリウム中で調製することができる。

【０１１２】

本発明の組成物は、通常、中性形態又は塩形態で製剤化することができる。薬学的に許容され得る塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸又はリン酸）又は有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸）等から誘導される酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基で形成される）が挙げられる。タンパク質の遊離カルボキシル基で形成された塩は、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム又は水酸化第二鉄）又は有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等）から誘導することもできる。

【０１１３】

第３の態様では、本発明は、療法に使用するための、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド、あるいは第２の態様又はその実施形態のいずれかで定義される組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。好ましくは、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートされたオレイン酸は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉及び／又はＣＮＳ等の関連組織に送達するためのビヒクルとして作用する。したがって、第１の態様によるオリゴヌクレオチド分子又はその類似体であって、その３’及び／又は５’末端で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチド分子又はその類似体は、治療を必要とするヒト対象における療法による治療方法での使用のためのものであり得、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、療法による当該治療の活性成分であり、当該オレイン酸分子は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体の薬学的に許容されるビヒクル又は担体として使用される。「活性成分」という用語は、薬学的に活性であり、治療効果を担う物質を指すために本発明で使用される。ａｎｔｉｍｉＲのアンタゴニストの場合、活性成分は、内因性ｍｉＲを標的とする分子、好ましくはオリゴヌクレオチド分子である。最も好ましくは、「活性成分」という用語は、本発明の第１の態様で定義されるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を指すために本明細書で使用される。

【０１１４】

第４の態様において、本発明は、脳及び／又はＣＮＳの他の組織における構造的及び／又は機能的変化を伴う、筋肉及び／又は神経系疾患、好ましくは筋肉組織の衰弱及び消耗を伴う筋疾患、特に筋力低下、障害の増加及び変形を伴う筋疾患、及び／又は好ましくは

神経系疾患の予防又は治療に使用するための、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されたオリゴヌクレオチド、あるいは第２の態様又はその実施形態のいずれかで定義された組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。好ましくは、筋疾患は筋ジストロフィー疾患である。好ましくは、筋ジストロフィー疾患は、ベッカー型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー及び咽頭型筋ジストロフィーからなる群より選択される。好ましくは、筋疾患は、好ましくは１型及び／又は２型の筋強直性ジストロフィーである。好ましくは、第４の態様による使用は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉等の関連組織及び／又はＣＮＳに送達するためにオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートさせた場合のビヒクルとしての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用を含む。

【０１１５】

代替の第４の態様では、本発明は、それを必要とする対象におけるＭＢＮＬ遺伝子及び／又はタンパク質の量又は機能が不十分であることを特徴とする疾患の予防又は治療に使用するための、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド、又は第２の態様又はその実施形態のいずれかで定義される組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。好ましくは、当該使用は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉等の関連組織及び／又はＣＮＳに送達するためにオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートさせた場合のビヒクルとしての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用を含む。「ＭＢＮＬ遺伝子及び／又はタンパク質の不十分な量又は機能」とは、本明細書では、健康な対象と比較して、ＭＢＮＬ遺伝子及び／又はタンパク質の統計的に有意により低い量又は機能を指す。更なる代替の第４の態様では、本発明は、第１の態様若しくはその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド、又は第２の態様若しくはその実施形態のいずれかで定義される組成物、好ましくは医薬組成物を、それを必要とする対象の筋肉及び／又はＣＮＳ細胞、好ましくはＤＭ又はＤＭ１に罹患している対象の筋肉細胞を標的化する際に使用するために提供する。「筋肉及び／又はＣＮＳ細胞を標的とする」とは、本明細書では、当該細胞中のＭＢＮＬタンパク質及び／又は遺伝子の不十分な量を増加させることを指す。ＣＮＳ細胞には、好ましくはニューロンが含まれるが、グリア細胞（星状膠細胞、乏突起膠細胞、上衣細胞及びミクログリア）、脈絡叢細胞、血管及び被覆物に関連する細胞も含まれる。筋細胞には、平滑細胞、好ましくは骨格細胞及び心臓細胞が含まれる。好ましくは、増加は、好ましくは対照細胞又は未処理細胞と比較して、統計学的に有意な増加である。

【０１１６】

更なる代替の第４の態様では、本発明は、毒性ＲＮＡの発現を特徴とする疾患（ＲＮＡｏｐａｔｈｉｅｓ又はＲＮＡ媒介／ＲＮＡ優性疾患とも呼ばれる）の予防又は治療に使用するための、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド、又は第２の態様又はその実施形態のいずれかで定義される組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。好ましくは、当該使用は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉等の関連組織及び／又はＣＮＳに送達するためにオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートさせた場合のビヒクルとしての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用を含む。当該疾患は、通常、異常な突然変異機序によって引き起こされる不安定なマイクロサテライト反復の拡大を特徴とし、反復エレメントの拡大の発現は、他の機序の中でもとりわけ、核当たりの標的ＲＮＡの質量を増加させることによって、及び各突然変異体転写物中の結合部位の局所濃度が高いためにＲＮＡ－タンパク質相互作用のアビディティーを増加させることによってＲＮＡ結合タンパク質のシンクを作り出す。好ましくは、ＲＮＡｏｐａｔｈｉｅｓ又はＲＮＡ媒介／ＲＮＡ優性疾患は、神経筋疾患又は神経変性疾患であり、より好ましくはＤＭ１型（ＯＲＰＨＡ：２７３）又は２型（ＯＲＰＨＡ：６０６）；脆弱Ｘ関連振戦／運動失調症候群（オルファ：９３２５６；ＦＸＴＡＳ）；Ｃ９ＯＲＦ７２筋萎縮性側索硬化症及び／又は前頭側頭型認知症（オルファ：２７５

８７２；ＡＬＳ／ＦＴＤ）；脊髄小脳失調症（ＳＣＡ）又は良性成人家族性ミオクローヌスてんかん（ＢＡＦＭＥ）からなる群より選択される。

【０１１７】

更なる代替の第４の態様において、本発明は、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及び／又はｍｉＲ－２１８－５ｐの量又は機能の過剰を特徴とする疾患の予防又は処置において使用するための、第１の態様又はその実施形態のいずれかにおいて定義されるようなオリゴヌクレオチド、あるいは、第２の態様又はその実施形態のいずれかにおいて定義されるような組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。「ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及び／又はｍｉＲ－２１８－５ｐの過剰な量又は機能」とは、本明細書中では、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及び／又はｍｉＲ－２１８－５ｐの統計学的に有意により高い量又は機能を健康な対象における量又は機能と比較していう。好ましくは、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ及び／又はｍｉＲ－２１８－５ｐの量又は機能の過剰を特徴とする疾患は、筋強直性ジストロフィー、好ましくは１型及び／又は２型である。好ましくは、当該使用は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉等の関連組織及び／又はＣＮＳに送達するためにオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートさせた場合のビヒクルとしての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用を含む。

【０１１８】

好ましくは、第３又は第４の態様に従って使用するための、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、それぞれ配列番号１又は２を有するヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの阻害剤、あるいは配列番号１又は２と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の配列同一性を有する配列である。好ましくは、第３又は第４の態様に従って使用するための、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、それぞれ配列番号８０～１１０又は配列番号５２～７９を有するヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの阻害剤、あるいは配列番号８０～１１０又は配列番号５２～７９と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％の配列同一性を有する配列である。

【０１１９】

より好ましくは、第３又は第４の態様に従って使用するための第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、配列番号３、４、若しくは５（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）又は配列番号７、８、９、若しくは１４（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）、又は配列番号３、４、若しくは５（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）又は配列番号７、８、９、若しくは１４（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含むか、又はそれのみからなるアンタゴニストである。より好ましくは、第３又は第４の態様に従って使用するための第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体分子は、配列番号２２、２３、２４、４９、５０、若しくは５１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）又は配列番号２５、２６、２７、若しくは２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）、又は配列番号３、４、若しくは５（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）又は配列番号７、８、９、若しくは１４（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するａｎｔｉｍｉＲ）と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含むか、又はそれのみからなるアンタゴニストである。第１の態様で上述したように、第３

及び第４の態様による使用のためのオリゴヌクレオチド又はその類似体はまた、それらの３’及び／又は５’末端でコンジュゲートされた少なくとも１つのオレイン酸分子を含む。

【０１２０】

第４の態様の一実施形態において、処置は、筋強直性ジストロフィー１型及び／又は２型の１つ以上の症状の緩和的処置、あるいは筋強直性ジストロフィー１型及び／又は２型の症状の一部である筋障害の１つ以上の緩和的処置である。第４の態様の好ましい一実施形態において、処置は慢性筋強直性ジストロフィー１型及び／又は２型に対するものである。好ましい実施形態では、治療は治療的処置である。好ましくは、当該使用は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉等の関連組織及び／又はＣＮＳに送達するためにオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートさせた場合のビヒクルとしての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用を含む。

【０１２１】

第３及び第４の態様の一実施形態では、それを必要とする対象は、哺乳動物、好ましくはヒト、より好ましくはＤＭ、好ましくはＤＭ１に罹患しているヒトである。

【０１２２】

その可能な発現ベクターを介したアンタゴニストの投与は、基本ベクター自体の指向性に従って、及び／又は特定の組織においてのみそれらに連結されたコード配列の発現を生じさせる制御要素を選択することによって、組織又は特定の組織群に発現を導くことを可能にする。更に、いくつかの特定の剤形は、１つ又は他の器官へのより大きなアクセスを支持し得る。したがって、治療的適用をより直接的に参照する本発明の第３及び第４の態様の任意の他のものと組み合わせ可能な可能な実施形態もまた、脳、小脳、海馬又は他の中枢神経系器官、骨格筋、心臓、脂肪組織、腎臓、肝臓及び胆管系、肺、咽頭、鼻咽頭、鼻、胎盤、脾臓、子宮、胃腸管、乳房、膀胱、前立腺、皮膚、皮膚、これらの器官の１つ以上に由来するケラチノサイト及びリンパ系細胞又は幹細胞の群から選択される少なくとも１つ以上の器官におけるヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ又はｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの作用の阻害又は拮抗作用によって筋強直性ジストロフィー１型を治療するための医薬品を製造するための、本発明のオリゴヌクレオチド及び／又はオリゴヌクレオチド類似体分子の１つ、それらの２つ以上の混合物、又は当該分子の少なくとも１つを含む組成物の使用として定義することができる。本発明のオリゴヌクレオチドによって同様に標的化され得る他の器官は、脳、小脳、海馬又は中枢神経系の別の器官、骨格筋、心臓、脂肪組織、腎臓、肝臓及び胆管系、肺、咽頭、鼻咽頭、鼻、胎盤、脾臓、精巣及び子宮、胃腸管、乳房、膀胱、前立腺、皮膚、又はこれらの器官の１つ若しくは複数からのケラチノサイト及びリンパ球系細胞又は幹細胞、あるいはそれらの組合わせの群から所望又は適切に選択される。

【０１２３】

ａｎｔｉｍｉＲの安定性を考慮すると、哺乳動物、好ましくはヒトへの直接投与は、例えば皮下又は全身経路、好ましくは静脈内又は髄腔内経路を介して、例えば薬学的に許容される担体、例えば水又は水溶液、例えば生理食塩水若しくはリン酸緩衝液、又は関節内送達に溶解又は懸濁させて考慮することができる。それらが投与される組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含有し得る。

【０１２４】

本発明の活性組成物は、標的組織がその経路を通して利用可能である限り、共通の経路のいずれかによって投与することができる。これには、経口経路、経鼻経路、髄腔内経路又は口腔経路が含まれ、好ましくは、投与は、皮内経路、経皮経路、皮下経路、筋肉内経路、腹腔内経路又は静脈内経路を介してもよい。前述のように、ａｎｔｉｍｉＲを含む組成物が静脈内又は皮下投与のために製剤化されることが一般的である。しかしながら、オレイン酸は、投与が静脈内である場合、筋肉及び／又はＣＮＳ細胞へのオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体の送達を増強するので（実施例９及び１０を参照のこと）、投与が静脈内、動脈内又は皮下であることが好ましい実施形態である。更に、当該静脈内投与、動脈内投与又は皮下投与が慢性投与であることも好ましく、これは、それが定期的

に行われる（それを必要とする患者の全寿命を延ばす）ことを意味する。
【０１２５】
製剤化後、溶液は、好ましくは、投与製剤と適合する形態で、治療的に有効であるような量で投与される。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセル等の様々な剤形で容易に投与することができる。
【０１２６】
更なる態様は、ＤＭ、好ましくはＤＭ１を、必要とする対象において処置する方法であって、本発明のオリゴヌクレオチド又は医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、治療有効用量の投与を可能にする濃度で存在する。好ましくは、当該処置方法は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉等の関連組織及び／又はＣＮＳに送達するためにオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートさせた場合のビヒクルとしての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用を含む。
【０１２７】
上記で説明したように、実施例は、オレイン酸がどのようにして筋肉及び脳等の標的問題への送達を増加させることができるかについての証拠を提供する。これにより、オレイン酸は、ＰＯに対してより多量のＰＳが分子中に含まれる場合に毒性を低下させることができるだけでなく、オレイン酸は、筋肉及び／又はＣＮＳ等の標的組織にオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を輸送するための効率的なビヒクルであるという結論に至る。これを考慮して、本発明の第５の態様は、少なくとも１つのオレイン酸がオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートされ、好ましくは当該オリゴヌクレオチド分子及び／又は類似体の３’又は５’にコンジュゲートされる場合の、薬学的に許容されるビヒクル又は担体としての当該オレイン酸分子の使用に関する。重要なことに、薬学的に許容されるビヒクル又は担体としての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用は、オレイン酸分子が、それがコンジュゲートされるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体の、特定の標的組織、好ましくは筋肉及び／又はＣＮＳ組織への輸送、送達、運搬を担う使用を指す。これに関連して、「ビヒクル」及び「担体」は同義語と見なされ、したがって互換的に使用される。
【０１２８】
当業者は、オレイン酸が、それがコンジュゲートされるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体のためのビヒクルとして作用しているかどうかを試験する方法を知っている。例えば、ビヒクルとして少なくとも１つのオレイン酸が使用されているかどうかを評価する方法は、静脈内、動脈内又は皮下投与後に標的組織（好ましくはＣＮＳ及び／又は筋肉組織）に到達するオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体の量を測定し、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体が少なくとも１つのオレイン酸とコンジュゲートしていない状態で投与された場合の当該組織中に存在する量を、当該量と比較することによるものである。
【０１２９】
好ましくは、オレイン酸がコンジュゲートされるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、本発明の第１の態様又はその実施形態のいずれかにおいて定義されるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体である。したがって、第５の態様の好ましい実施形態は、第１の態様で定義されたオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体の３’末端又は５’末端にコンジュゲートした当該オレイン酸が、好ましくは、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体が、本発明の第３若しくは第４の態様又はそれらの実施形態のいずれかで定義される療法による治療方法の活性成分である場合の、薬学的に許容されるビヒクル又は担体としての少なくとも１つのオレイン酸分子の使用を指す。オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体間のコンジュゲーションは、本発明の第１の態様に記載されるように、スペーサー分子全体にわたる直接コンジュゲーション又はコンジュゲーションであり得ることに留意されたい。好ましくは、ビヒクルとして使用されるオレイン酸は、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール及びその誘導体からなる群より選

択されるスペーサー分子を介してオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートされる。

【０１３０】

第５の態様の一実施形態では、ただ１つのオレイン酸分子が、第１の態様又はその実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体の５’末端又は３’末端にコンジュゲートされ、その結果、単一のオレイン酸分子が、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体のビヒクルとして作用する。第５の態様の一実施形態では、１つのオレイン酸分子のみが第１の態様又はその実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートされ、その結果、単一のオレイン酸分子は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体のビヒクルとして作用し、第１の態様で定義されるオリゴヌクレオチド分子ｏ及び／又はその類似体は、第３又は第４の態様で定義される療法による治療方法の活性成分として作用する。

【０１３１】

好ましい実施形態では、本発明の第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体にコンジュゲートされた少なくとも１つのオレイン酸分子は、実施例９又は１０に示すように、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体がオレイン酸にコンジュゲートされていない場合よりも効率的に、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体を筋肉及び／又はＣＮＳ等の目的の組織に輸送することができる。したがって、オレイン酸分子は、活性成分送達ビヒクルとして使用され、活性成分成分は、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体である。

【０１３２】

一実施形態では、少なくとも１つのオレイン酸分子は、第１の態様又はその実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド分子及び／又は類似体の３’末端又は５’末端にコンジュゲートされた場合、薬学的に許容されるビヒクル又は担体として使用され、オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、ヌクレオチドを化学的に結合するホスホロチオエート結合とホスホジエステル結合との混合物を含み、好ましくは、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合されているヌクレオチドの数は、ホスホジエステル結合によって化学的に結合されているヌクレオチドの数よりも多い。

【０１３３】

一実施形態では、少なくとも１つのオレイン酸分子は、第１の態様又はその実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド分子及び／又は類似体の３’末端又は５’末端にコンジュゲートされた場合、薬学的に許容されるビヒクル又は担体として使用され、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、マイクロＲＮＡのアンタゴニスト、好ましくはヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニストである。

【０１３４】

一実施形態では、少なくとも１つのオレイン酸分子は、第１の態様又はその実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド分子及び／又は類似体の３’末端又は５’末端にコンジュゲートされた場合、薬学的に許容されるビヒクル又は担体として使用され、ビヒクルとして使用されるオレイン酸は、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体が静脈内、動脈内又は皮下経路を介して投与される場合、筋肉及び／又はＣＮＳ細胞にオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体をそれを必要とする対象において送達する。

【０１３５】

一実施形態では、少なくとも１つのオレイン酸分子は、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体の３’末端又は５’末端にコンジュゲートされた場合、薬学的に許容されるビヒクル又は担体として使用され、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、筋疾患、神経系疾患、及び／又はＲＮＡｏｐａｔｈｉｅｓの予防又は治療を含む療法による治療方法の活性成分である。

【０１３６】

一実施形態では、少なくとも１つのオレイン酸分子は、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド分子又はその類似体の３’末端又は５’末端にコンジュゲートしている場合、薬学的に許容されるビヒクル又は担体として使用され、当該オリゴヌクレオチド分子及び／又はその類似体は、筋強直性ジストロフィー、好ましくは筋強直性ジストロフィー１型の予防又は治療を含む療法による治療方法の活性成分である。

【０１３７】

第５の態様では、本発明はまた、第１の態様又はその実施形態のいずれかで定義されるオリゴヌクレオチド分子又はその類似体の３’末端又は５’末端にコンジュゲートした少なくとも１つのオレイン酸のみからなるコンジュゲートを提供し、当該オリゴヌクレオチド分子又はその類似体は、第３又は第４の態様又はそれらの実施形態のいずれかで定義される療法による治療方法における活性成分として使用され、少なくとも１つのオレイン酸は、当該オリゴヌクレオチド分子又はその類似体を標的組織、例えばＣＮＳ及び／又は筋肉組織に送達するための薬学的に許容されるビヒクルとして使用される。

【０１３８】

以下の条項も本発明に含まれる。

１．オリゴヌクレオチド分子、又は当該分子の２つ以上の混合物であって、当該オリゴヌクレオチド分子は、１０～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子は、ホスホロチオエート結合によって化学的に連結された少なくとも２つのヌクレオチドを含み、当該オリゴヌクレオチド分子は、その３’及び／又は５’末端で少なくとも１つのオレイン酸分子にコンジュゲートされている、オリゴヌクレオチド分子、又は当該分子の２つ以上の混合物。

２．分子がマイクロＲＮＡのアンタゴニストである、条項１に記載のオリゴヌクレオチド分子。

３．マイクロＲＮＡがヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐである、条項２に記載のオリゴヌクレオチド分子。

４．当該オリゴヌクレオチド分子が１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該分子の少なくとも２つのヌクレオチドがホスホジエステル結合によって結合されており、ホスホロチオエート結合によって化学的に結合されているヌクレオチドの数が、ホスホジエステル結合によって化学的に結合されているヌクレオチドの数よりも多い、条項１～３のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド分子。

５．当該オリゴヌクレオチド分子が、１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子が、配列番号１（ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐ）若しくは２（ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）、又は配列番号５２～１１０に存在する領域の配列と少なくとも８０％同一であるヌクレオチドの少なくとも１５個の連続する窒素塩基の連続から構成される断片を含む、条項１～４のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド分子。

６．当該オリゴヌクレオチド分子が、１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子が、配列番号１（ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐ）又は２（ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ）に存在する領域の配列と同一であるヌクレオチドの少なくとも１５個の連続する窒素塩基の連続から構成される断片を含む、条項１～５のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド分子。

７．少なくとも１つの化学修飾を含み、化学修飾が、

ｉ）２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ）、

ｉｉ）２’－Ｏ－メトキシエチル（２’ＭＯＥ）、及び／又は

ｉｉｉ）２’酸素と４’炭素（ＬＮＡ）とを接続する追加の架橋

からなる群より選択される、条項１～６のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド分子。

８．当該オリゴヌクレオチド分子が１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチド分子が、配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０若しくは５１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂのアンタゴニスト）又は配列番号７、８、９、１４、２５、２６、２７若しくは２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト）に存在する領域の

配列と少なくとも８０％同一であるヌクレオチドの少なくとも１５個の連続する窒素塩基の連続で構成される断片を含む、条項１～７のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド分子。

９．当該オリゴヌクレオチド分子が１５～３０ヌクレオチド長を含み、当該オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列が、配列番号３、４、５、２２、２３、２４、４９、５０若しくは５１（ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂのアンタゴニスト）又は配列番号７、８、９、１４、２５、２６、２７若しくは２８（ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト）のみからなる、条項１～８のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド分子。

１０．場合により担体及び／又は１つ以上の薬学的に許容される賦形剤を更に含む、少なくとも条項１～９のいずれか一項に定義されるオリゴヌクレオチド分子、又はそれらの２つ以上の混合物を含む、組成物、好ましくは医薬組成物。

１１．療法における使用のための、場合により担体及び／又は１つ以上の薬学的に許容される賦形剤を更に含む、少なくとも条項１～９のいずれか一項に定義されるオリゴヌクレオチド分子、又はそれらの２つ以上の混合物を含む、組成物、好ましくは医薬組成物。

１２．筋細胞の標的化を必要とする対象において筋細胞を標的化するのに使用するための、場合により担体及び／又は１つ以上の薬学的に許容される賦形剤を更に含む、少なくとも条項１～９のいずれか一項に定義されるオリゴヌクレオチド、又はそれらの２つ以上の混合物を含む、組成物、好ましくは医薬組成物。

１３．筋疾患の予防若しくは治療又はＲＮＡｏｐａｔｈｉｅｓの予防若しくは治療に使用するための、場合により担体及び／又は１つ以上の薬学的に許容される賦形剤を更に含む、少なくとも条項１～９のいずれか一項に定義されるオリゴヌクレオチド、又はそれらの２つ以上の混合物を含む、組成物、好ましくは医薬組成物。

１４．疾患が筋強直性ジストロフィーである、条項１３に記載の使用のための組成物、好ましくは医薬組成物。

１５．筋強直性ジストロフィーが１型である、条項１４に記載の使用のための組成物、好ましくは医薬組成物。

【０１３９】

配列表（５’から３’方向）

上記のように、以下に列挙され、本出願全体を通して言及される配列番号は、核酸塩基配列、並びにそれらの天然の化学的性質から逸脱するオリゴヌクレオチドのものについては、それらの化学修飾及び／又は脂肪酸コンジュゲーションも含む。本明細書全体を通して、本明細書に開示される配列番号に含まれる化学修飾を定義するために、以下の命名法が使用されている。

－ＬＮＡヌクレオチドは、大文字と小文字の組み合わせ：Ａｂ、Ｇｂ、Ｔｂ、Ｃｂで示される。

－ホスホロチオエート結合は、小さい「ｓ」文字で示される。

－２’－Ｏ－ＭＯＥ　ＲＮＡヌクレオチドは、大文字と小文字との組合わせ：Ａｍ、Ｃｍ、Ｇｍ、Ｔｍで示される。

－２’－Ｏ－メチル－ヌクレオチドは、小さい文字：ａ、ｇ、ｃ、ｕで示される。

－２’－フルオロＲＮＡヌクレオチドは、大文字と小文字との組合わせ：Ａｆ、Ｃｆ、Ｇｆ、Ｔｆで示される。

－２’－Ｏ－メチル－２，６－ジアミノプリン修飾は、式（ｄａｐ）で示される。

－デオキシヌクレオチドは、小文字と大文字との組み合わせ：ｄＡ、ｄＣ、ｄＧ、ｄＴで示される。

－２’－ＯＭｅ－５－メチルウリジン又は２’－ＯＭｅ－リボチミジンは、小さい「ｔ」文字によって表される。

－５－メチル－２’－Ｏ－メチルシチジンは、式（５Ｍｃ）によって表される。

－（オレイン酸）という表現は、オリゴヌクレオチドがオレイン酸にコンジュゲートされていることを意味する。

－（パルミチン酸）という表現は、オリゴヌクレオチドがパルミチン酸にコンジュゲー

トされていることを意味する。
－（スペーサー分子）は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される。好ましくは、スペーサー分子はＮＨＣ６又はＮＨＣ３である。
－「Ｙ」は任意のピリミジン（Ｃ又はＵ／Ｔ）に使用される。
－「Ｉ」は、ヒポキサンチンがイノシンの核酸塩基であるので、ヒポキサンチンに使用される。
配列番号１：ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのアンタゴニスト：ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号２：ヒトｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのアンタゴニスト：ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号３：ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ：ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（ＮＨＣ６）（オレイン酸）
配列番号４：ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　３’Ｏｌ：ＡｂｓＴｍｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）（５Ｍｃ）Ｔｂｇｓｇｓ（５Ｍｃ）ｓＡｂＡｍＴｂＧｂｓＴｍｓＧｂｓＡｂ（ＮＨＣ６）（オレイン酸）
配列番号５：ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　５’Ｏｌ：（オレイン酸）（ＮＨＣ６）ＡｂｓＴｍｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）（５Ｍｃ）Ｔｂｇｓｇｓ（５Ｍｃ）ｓＡｂＡｍＴｂＧｂｓＴｍｓＧｂｓＡｂ
配列番号：６：ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ：ＡｂｓＴｍｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）（５Ｍｃ）Ｔｂｇｓｇｓ（５Ｍｃ）ｓＡｂＡｍＴｂＧｂｓＴｍｓＧｂｓＡｂ
配列番号７：２１８　ＭＯＥオレイン酸３’：ＴｂｓＴｂｓＡｍｓＧｂｓＡｍｓＴｍｓＣｂＡｍｓＡｍＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓＡｂｓＡｂ（ＮＨＣ６）（オレイン酸）
配列番号：８：２１８　ＭＯＥ　ＤＤオレイン酸３’：ＴｂｓＴｂｓＡｍｓＧｂｓＡｍｓＴｍｓＣｂＡｍｓＡｍｓＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓ（ｄａｐ）ｓ（ｄａｐ）（ＮＨＣ６）（オレイン酸）
配列番号：９：２１８　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’：ＴｂｓＴｍｓａｓＧｂｓａｓｔｓＣｂＡｍｓＡｍＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓＡｍｓＡｂ（ＮＨＣ６）（オレイン酸）
配列番号：１０：ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ：ＵＵＧＵＧＣＵＵＧＡＵＣＵＡＡＣＣＡＵＧＵ
配列番号：１１：ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ：ＡＵＣＡＣＡＵＵＧＣＣＡＧＧＧＡＵＵＡＣＣＡＣ
配列番号：１２：ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐのシード領域：ＵＧＵＧＣＵ
配列番号：１３：ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのシード領域：ＵＣＡＣＡＵ
配列番号１４：２１８　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’２：ＴｂｓＴｂｓａｓＧｂｓａｓｔｓＣｂＡｍｓＡｍＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓＡｍｓＡｂ（ＮＨＣ６）（オレイン酸）
配列番号：１５：２１８　ＭＯＥ：
ＴｂｓＴｂｓＡｍｓＧｂｓＡｍｓＴｍｓＣｂＡｍｓＡｍＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓＡｂｓＡｂ
配列番号：１６ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｐａｌ：ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（ＮＨＣ６）（パルミチン酸）
配列番号：１７：ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２：ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ
配列番号：１８：ＭＤ２３ＭＯＥ：ＡｂｓＴｂｓＣｍｓＣｍＣｍｓＴｍｓＧｍＧｍｓＣｍＡｍＡｍｓＴｂＧｍｓＴｍＧｂｓＡｂ
配列番号：１９：ｈｓａ－ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐのマイクロＲＮＡ前駆体（プレマイクロＲＮＡ）：
ＣＵＣＡＧＧＵＧＣＵＣＵＧＧＣＵＧＣＵＵＧＧＧＵＵＣＣＵＧＧＣＡＵＧＣＵＧＡＵＵＵＧＵＧＡＣＵＵＡＡＧＡＵＵＡＡＡＡＵＣＡＣＡＵＵＧＣＣＡＧＧＧＡＵＵＡＣＣＡＣＧＣＡＡＣＣＡＣＧＡＣＣＵＵＧＧＣ

配列番号：２０：Ｐｒｅ－ｈｓａ－ｍｉＲ－２１８－５ｐ－１（ｃｈｒ４：２０５２９８９８－２０５３０００７）：
ＧＵＧＡＵＡＡＵＧＵＡＧＣＧＡＧＡＵＵＵＵＣＵＧＵＵＧＵＧＣＵＵＧＡＵＣＵＡＡＣＣＡＵＧＵＧＧＵＵＧＣＧＡＧＧＵＡＵＧＡＧＵＡＡＡＡＣＡＵＧＧＵＵＣＣＧＵＣＡＡＧＣＡＣＣＡＵＧＧＡＡＣＧＵＣＡＣＧＣＡＧＣＵＵＵＣＵＡＣＡ

配列番号：２１：Ｐｒｅ－ｍｉＲ－２１８－２（ｃｈｒ５：１６８１９５１ＳＩ－１６８１９５２６０）：
ＧＡＣＣＡＧＵＣＧＣＵＧＣＧＧＧＧＣＵＵＵＣＣＵＵＵＧＵＧＣＵＵＧＡＵＣＵＡＡＣＣＡＵＧＵＧＧＵＧＧＡＡＣＧＡＵＧＧＡＡＡＣＧＧＡＡＣＡＵＧＧＵＵＣＵＧＵＣＡＡＧＣＡＣＣＧＣＧＧＡＡＡＧＣＡＣＣＧＵＧＣＵＣＵＣＣＵＧＣＡ

配列番号２２：特異的スペーサー分子を有さないＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ：ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（スペーサー分子）（オレイン酸）（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号２３：特定のスペーサー分子を有さないＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　３’Ｏｌ：ＡｂｓＴｍｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）（５Ｍｃ）Ｔｂｇｓｇｓ（５Ｍｃ）ｓＡｂＡｍＴｂＧｂｓＴｍｓＧｂｓＡｂ（スペーサー分子）（オレイン酸）（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号２４：特異的スペーサー分子を有さないＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　５’Ｏｌ：（オレイン酸）（スペーサー分子）ＡｂｓＴｍｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）（５Ｍｃ）Ｔｂｇｓｇｓ（５Ｍｃ）ｓＡｂＡｍＴｂＧｂｓＴｍｓＧｂｓＡｂ（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号２５：特定のスペーサー分子を有さない２１８　ＭＯＥオレイン酸３’：ＴｂｓＴｂｓＡｍｓＧｂｓＡｍｓＴｍｓＣｂＡｍｓＡｍＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓＡｂｓＡｂ（スペーサー分子）（オレイン酸）（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号２６：特定のスペーサー分子を有さない２１８　ＭＯＥ　ＤＤ　オレイン酸３’：ＴｂｓＴｂｓＡｍｓＧｂｓＡｍｓＴｍｓＣｂＡｍｓＡｍｓＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓ（ｄａｐ）ｓ（ｄａｐ）（スペーサー分子）（オレイン酸）（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号２７：特定のスペーサー分子を有さない２１８　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’：ＴｂｓＴｍｓａｓＧｂｓａｓｔｓＣｂＡｍｓＡｍＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓＡｍｓＡｂ（スペーサー分子）（オレイン酸）（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号２８：特定のスペーサー分子を有さない２１８　ＯＭＥ／ＭＯＥオレイン酸３’２：ＴｂｓＴｂｓａｓＧｂｓａｓｔｓＣｂＡｍｓＡｍＧｂＣｍＡｂｓＣｍｓＡｍｓＡｂ（スペーサー分子）（オレイン酸）（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号２９：特異的スペーサー分子を有さないＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｐａｌ：ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（スペーサー分子）（パルミチン酸）（式中、スペーサー分子は、好ましくは、ＮＨＣ３、ＮＨＣ５、ＮＨＣ６、トレオニノール、又はそれらの誘導体からなる群より選択される）。

配列番号４９：Ｃ６ＳＳＣ６及びＮＨＣ６を有するＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ
ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（Ｃ６ＳＳＣ６）（ＮＨＣ６）（オレイン酸）

配列番号５０：Ｃ６ＳＳＣ６及びＮＨＣ３を有するＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ
ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（Ｃ６ＳＳＣ６）（ＮＨＣ３）（オレイン酸）
配列番号５１：スペーサー分子を含まないＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　５’Ｏｌ：（オレイン酸）ＡｂｓＴｍｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）（５Ｍｃ）Ｔｂｇｓｇｓ（５Ｍｃ）ｓＡｂＡｍＴｂＧｂｓＴｍｓＧｂｓＡｂ．
配列番号５２：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＹＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号５３：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＹＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号５４：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＹＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号５５：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＹＡＴＧＴＧＡ
配列番号５６：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＹＴＧＴＧＡ
配列番号５７：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＹＴＧＡ
配列番号５８：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＹＡ
配列番号５９：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＹ
配列番号６０：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＧＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号６１：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＵＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号６２：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＵＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号６３：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＵＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号６４：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＵＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号６５：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＧＡＴＧＴＧＡ
配列番号６６：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＧＴＧＴＧＡ
配列番号６７：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＧ
配列番号６８：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＩＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号６９：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＩＡＴＧＴＧＡ
配列番号７０：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＩＴＧＴＧＡ
配列番号７１：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＩ
配列番号７２：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＩＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号７３：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＩＧＧＣＡＡＴＧＴＧＡ

配列番号７４：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＩＧＴＧＡ
配列番号７５：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＩＧＡ
配列番号７６：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＩＧＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号７７：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＩＣＡＡＴＧＴＧＡ
配列番号７８：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＩＴＧＡ
配列番号７９：ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの機能的等価配列：
ＡＴＣＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＴＩＡ
配列番号８０：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＹＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号８１：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＹＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号８２：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＹＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号８３：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＹＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号８４：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＹＧＣＡＣＡＡ
配列番号８５：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＹＣＡＣＡＡ
配列番号８６：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＹＣＡＡ
配列番号８７：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＹＡ
配列番号８８：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＹ
配列番号８９：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＧＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号９０：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＧＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号９１：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＵＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号９２：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＧＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号９３：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＧＧＣＡＣＡＡ
配列番号９４：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＵＡＣＡＡ
配列番号９５：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＧＣＡＡ
配列番号９６：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＵＡＡ
配列番号９７：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＧＡ
配列番号９８：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＧ

配列番号９９：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＩＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号１００：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＩＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号１０１：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＩＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号１０２：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＩＧＣＡＣＡＡ
配列番号１０３：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＩＣＡＡ
配列番号１０４：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＩＡ
配列番号１０５：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＩ
配列番号１０６：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＩＴＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号１０７：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＩＡＧＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号１０８：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＩＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号１０９：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＩＡＴＣＡＡＧＣＡＣＡＡ
配列番号１１０：ａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐの機能的等価配列：
ＴＴＡＧＡＴＣＡＡＩＣＡＣＡＡ
配列番号１１１：ＴｂｓＣｓＡｓＣｂｓＡｓＴｓＴｂｓＧｓＣｓＣｂｓＡｓＧｓＧｂｓＧｓＡｓＴｂ－ジゴキシゲニンＮＨＳエステル
【０１４０】
以下の実施例は、本発明を例示するにすぎない。
【実施例】
【０１４１】
材料及び方法
細胞培養実験
不死化ＭｙｏＤ誘導性（ドキシサイクリン）ＤＭ１及び対照線維芽細胞（（Ａｒａｎｄｅｌ Ｌ．，ｅｔ ａｌ．（２０１７）．‘‘Ｉｍｍｏｒｔａｌｉｚｅｄ ｈｕｍａｎ ｍｙｏｔｏｎｉｃ ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ ｍｕｓｃｌｅ ｃｅｌｌ ｌｉｎｅｓ ｔｏ ａｓｓｅｓｓ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ．’’ Ｄｉｓ Ｍｏｄｅｌ Ｍｅｃｈ １０（４）：４８７－４９７．））を、４．５ｇ／Ｌグルコース、１％Ｐ／Ｓ及び１０％ＦＢＳ（Ｓｉｇｍａ，ＳａｉｎｔＬｏｕｉｓ，Ｍｉｓｕｒｉ）を含むＤＭＥＭで増殖させた。筋管への線維芽細胞分化転換は（Ｃｅｒｒｏ－Ｈｅｒｒｅｒｏｓ ｅｔ ａｌ．（２０１８）．‘‘ｍｉＲ－２３ｂ ａｎｄ ｍｉＲ－２１８ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ ｉｎｃｒｅａｓｅ Ｍｕｓｃｌｅｂｌｉｎｄ－ｌｉｋｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ ａｌｌｅｖｉａｔｅ ｍｙｏｔｏｎｉｃ ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅｓ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｍｏｄｅｌｓ’’．Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．９，２４８２）に従った。０日目に分化転換を誘導し、試験化合物を異なる濃度（ＭＤ２３ｂ－２、ＭＤ２３ｂ－８、ＭＤ２３ｂ－４、ＭＤ２３ｂ－１３、ＭＤ２３ｂ－７、ＭＤ２３ｂ－１４、ＭＤ－２３ｂ－１、２３－ＬＮＡ４、ＭＤ２３ｂ－１０、ＭＤ２３ｂ－３、ＡｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ、ＭＤ２３ｂ－６、ＭＤ２３ｂ－１２、ＭＤ２３ｂ－９、ＭＤ２３ｂ－５、ＭＤ２３ｂ－１１、２３－ＬＮＡ６、非コンジュゲート２３ｂ、５’－２３ｂ－オレイン酸、５’－２３ｂ－リノール酸、５’－２３ｂ－ＭｅＴｏｃ、５’－２３ｂ－ＭｅＣｈｏｌ、５’－２３ｂ－ＭｅＰａｌ、５’－２３ｂ－エライジン酸、５’－２３ｂ－エステアリン酸、ＯＬ－ＭＤ２３ｂ－２

、ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ、ＭＤ２３ｂ－２－ＰＳ／ＰＯ　５’Ｏｌ、非コンジュゲート２１８、Ａｘ－２１８、５’－２１８－オレイン酸、５’－２１８－ＭｅＣｈｏｌ、５’－２１８－リノール酸、５’－２１８－ＭｅＰａｌ、５’－２１８－ＭｅＴｏｃ、Ｓｃ－オレイン酸、ＭＤ２１８－１２、ＭＤ２１８－６、ＭＤ２１８－１１、非コンジュゲート２１８、ＭＤ２１８－１３、ＭＤ２１８－５、ＭＤ２１８－４、ＭＤ２１８－１５、ＭＤ２１８－１０、ＭＤ２１８－３については、１０ｎＭ、５０ｎＭ、２００ｎＭ、１μＭ及び５μＭ；２３－ＬＮＡ８、ＡＸ－２３ｂ、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ（Ｃ６ＳＳＣ６）（ＮＨＣ６）、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ（Ｃ６ＳＳＣ６）（ＮＨＣ３）及びＭＤ２３ｂ－２Ｖ　２　３’Ｏｌ（トレオニノール）については、２ｎＭ、１０ｎＭ、５０ｎＭ、２００ｎＭ及び１μＭ；２３－Ｄ／ＬＮＡ１、２３－Ｄ／ＬＮＡ２及び２１８－２Ｆ／ＬＮＡ１：０．４ｎＭ、２ｎＭ、１０ｎＭ、５０ｎＭ及び２００ｎＭ）；並びに２１８－Ｄ／ＬＮＡ２、２１８－２Ｆ／ＭＯＥについては、０．０８ｎＭ、０．４ｎＭ、２ｎＭ、１０ｎＭ及び５０ｎＭ）でＸ－ｔｒｅｍｅＧＥＮＥ（商標）ＨＰ（Ｒｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により、リポフェクションにより、細胞培養培地に添加し、４時間後に新鮮な分化培地と交換した。細胞を分化培地に４日目に収集し、タンパク質抽出のために処理した。

【０１４２】

細胞増殖アッセイ

９６ウェルプレートに10^5細胞／ｍｌで播種した細胞を、先に説明したように２４時間後にａｎｔｉｍｉＲでトランスフェクトし、９６時間後、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ９６（登録商標）Ａｑｕｅｏｕｓ　Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ　Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）を用いて細胞増殖を測定した。ＴＣ５０を非線形最小二乗回帰を用いて計算し、吸光度レベルをＩｎｆｉｎｉｔｅＭ２００　ＰＲＯプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ，Ｍａｎｎｅｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて決定した。

【０１４３】

定量的ドットブロット（ＱＤＢ）アッセイ

活性アッセイのために、細胞を６ウェルプレートに８×10^4細胞／ウェルの密度で播種し、先に説明したように、２４時間後にａｎｔｉｍｉＲをトランスフェクトした。総タンパク質抽出のために、マウス筋肉（腓腹筋及び四頭筋）をプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤カクテル（（Ｒｏｃｈｅ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｐｅｎｚｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を補充したＰｉｅｒｃｅ（登録商標）ＲＩＰＡ緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）中でホモジナイズしながら、ヒト筋肉細胞を超音波処理した。総タンパク質の定量は、標準としてウシ血清アルブミンを使用して、Ｐｉｅｒｃｅ（登録商標）ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）を用いて行った。免疫検出アッセイのために、１μｇ／ウェルの細胞試料及び２μｇ／ウェルのマウス試料を変性させ（１００℃で５分間）、ＱＤＢプレートに負荷した（Ｑｕａｎｔｉｃｉｓｉｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｉｎｃ，Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｔｒｉａｎｇｌｅ　Ｐａｒｋ，Ｎｏｒｔｈ　Ｃａｒｏｌｉｎａ）。各細胞試料を２つの異なるプレートに四連で負荷し、一方をＭＢＮＬ１の検出に使用し、他方をＧＡＰＤＨについて使用し、これをここでは内因性対照として使用した。マウス試料の場合、各試料を３つの異なるプレートに四連で負荷し、１つはＭＢＮＬ１の検出用であり、１つは内因性対照として使用したチューブリン用であり、もう１つはバックグラウンドを差し引くための陰性対照としての抗マウスＩｇＧ二次抗体用であった。ＱＤＢプロトコルの場合、タンパク質は２μｇ／ウェルで調製される。各試料を２つの異なるプレートに四連で負荷し、一方をＭＢＮＬ１の検出に使用し、他方をＧＡＰＤＨに使用し、これをここでは内因性対照として使用する。試料混合物（ピペッティング誤差を考慮するために１０試料に十分）の調製のために、タンパク質抽出物を指示される濃度に入れ、１０．４μｌのローディングバッファー４Ｘを添加し、最後に５０μｌのｄｄＨ２Ｏまで完了させる。試料が調製されたら、それを水

中で５分間沸騰させ、タンパク質変性後、氷上に放置する。試料を装填するには、ＱＤＢプレート（Ｑｕａｎｔｉｃｉｓｉｏｎ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｃ）を上下逆にして置く。各メンブレンサークルに、先に調製したタンパク質ミックスを５μｌ入れる。ロードしたＱＤＢプレートを、十分に換気された空間において室温で３０分間乾燥させて、膜を完全に乾燥させる。乾燥後、ＱＤＢプレートを転写緩衝液（０．０３９Ｍグリシン、０．０４８Ｍトリス、０．３７％ＳＤＳ、２０％メチルアルコール）に浸し、プレートを１分間穏やかに振盪する。プレートをＴＢＳＴ（１３７ｍＭのＮａＣｌ、２．７ｍＭのＫＣｌ、２０ｍＭのＴｒｉｓ、ｐＨ７．４＋０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０）で３回すすぎ、１つの容器中のブロッキング緩衝液（ＴＢＳＴ中５％脱脂乳）でブロットした。プレートを初代マウス抗ＭＢＮＬ１（１：１０００、ａｂ７７０１７、Ａｂｃａｍ）又はマウス抗ＧＡＰＤＨ（１：５００、クローンＧ－９、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）と４℃で一晩９６ウェルプレート中でインキュベートした。プレートをＴＢＳＴで３回洗浄し、二次抗体抗マウス－ＰＯＤ（１：２００、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）と２時間再度インキュベートした後、プレートをＴＢＳＴで３回再度洗浄した。プレートを、１００μＬ／ウェルのＥＣＬ基質（Ｐｉｅｒｃｅ）溶液を負荷した９６ウェルプレートに１分間挿入した後、Ｔｅｃａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｉ２００プロマイクロプレートリーダーを使用して化学発光シグナル定量化のために白色９６ウェルプレートに挿入し、選択肢「カバー付きプレート」をユーザインターフェースで選択した。

【０１４４】

プレートを、初代マウス抗ＭＢＮＬ１（１：２００、ＭＢ１ａ（４Ａ８）、（ＤＳＨＢ，Ｉｏｗａ　Ｃｉｔｙ，Ｉｏｗａ）及びウサギ抗α－チューブリン（１：１０００、ＰＡ５－１６８９１、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）抗体と４℃で一晩インキュベートした。一次抗体を、ヤギ西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）コンジュゲート化抗マウスＩｇＧ及び抗ウサギＩｇＧ二次抗体（１：３５００、（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓａｉｎｔ　Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）をそれぞれ使用して検出した。Ｐｉｅｒｃｅ（商標）ＥＣＬ　Ｗｅｓｔｅｒｎ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）を用いて免疫反応を検出し、Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　Ｍ２００ＰＲＯプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ，Ｍａｎｎｅｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を用いて発光を取得した。

【０１４５】

ＲＮＡ抽出、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）及びリアルタイム定量逆転写ＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）

マウス腓腹筋及び四頭筋由来の全ＲＮＡを、ｍｉＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を製造者の説明書に従って使用して単離した。１マイクログラムのＲＮＡをＤＮａｓｅ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で消化し、ランダムヘキサヌクレオチドを用いてＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）で逆転写した。その後のＰＣＲ反応のために、２０ｎｇのｃＤＮＡをＧｏＴａｑポリメラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）と共に使用した。特異的プライマーを使用して、マウス試料（両方の筋肉）におけるＡｔｐ２ａ１、Ｎｆｉｘ、Ｍｂｎｌ１及びＣｌｃｎ１の選択的スプライシングを分析した。Ｇａｐｄｈレベルは、０．２ｎｇのｃＤＮＡを使用して内因性基準レベルを確立した。ＰＣＲ産物を２％アガロースゲルで分離し、ＩｍａｇｅＪソフトウェア（ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）を使用して定量した。スプライス回収率（ＰＳＲ）は、値％$_{ＳＩ}$マイナスＸ％$_{ＤＳＩ}$をＸ％$_{ＤＳＩ}$マイナスＸ％$_{ＨＳＩ}$で割ったものとして定義した（ＳＩ：各試料のスプライシング包含；ＤＳＩ：疾患スプライシング包含；ＨＳＩ：健康スプライシング封入；全ての場合において、スプライシングとは、示された選択的エクソンが含まれることを指す）。この比は、ＡＴＰ２Ａ１、ＮＦＩＸ、ＭＢＮＬ１及びＣＬＣＮ１について計算した。分析されるプライマー配列及びエクソンは、（Ｃｅｒｒｏ－Ｈｅｒｒｅｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．２０１８　２０１８　Ｊｕｎ　２６；９（１）：２４８２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１

４６７－０１８－０４８９２－４．）において入手可能であり、以下に再現される。
配列番号：３０：ＧａｐｄｈＦｗｄ：ＡＴＣＡＡＣＧＧＧＡＡＧＣＣＣＡＴＣＡＣ
配列番号：３１：ＧａｐｄｈＲｖ：ＣＴＴＣＣＡＣＡＡＴＧＣＣＡＡＡＧＴＴＧＴ
配列番号：３２：Ａｔｐ２ａＦｗｄ：ＧＣＴＣＡＴＧＧＴＣＣＴＣＡＡＧＡＴＣＴＣＡＣ
配列番号：３３：Ａｔｐ２ａＲｖ：ＧＧＧＴＣＡＧＴＧＣＣＴＣＡＧＣＴＴＴＧ
配列番号：３４：Ｃｌｃｎ１Ｆｗｄ：ＧＴＣＣＴＣＡＧＣＡＡＧＴＴＴＡＴＧＴＣＣ
配列番号：３５：Ｃｌｃｎ１Ｒｖ：ＧＡＡＴＣＣＴＣＧＣＣＡＧＴＡＡＴＴＣＣ
配列番号：３６：ＮｆｉｘＦｗｄ：ＴＣＧＡＣＧＡＣＡＧＴＧＡＧＡＴＧＧＡＧ
配列番号：３７：ＮｆｉｘＲｖ：ＣＡＡＡＣＴＣＣＴＴＣＡＧＣＧＡＧＴＣＣ
配列番号：３８：Ｍｂｎｌ１　ｅｘ５Ｆ：
ＡＧＧＧＧＡＧＡＴＧＣＴＣＴＣＧＧＧＡＡＡＡＧＴＧ
配列番号：３９：Ｍｂｎｌ１　ｅｘ５Ｒ：
ＧＴＴＧＧＣＴＡＧＡＧＣＣＴＧＴＴＧＧＴＡＴＴＧＧＡＡＡＡＴＡＣ

【０１４６】

ＱｕａｎｔｉＦａｓｔ　Ｐｒｏｂｅ　ＰＣＲ　Ｋｉｔ試薬を用いたマルチプレックスｑＲＴ－ＰＣＲの鋳型としてマウス組織ｃＤＮＡ１ｎｇを用いた。市販のＴａｑＭａｎプローブ（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）をマウス（ＭＢＮＬ１及びＭＢＮＬ２；ＦＡＭ標識プローブ）及び参照（ＧＡＰＤＨ；ＭＡＸ標識プローブ）遺伝子に使用した。結果をＧａｐｄｈ内因性遺伝子発現に対して正規化した。使用されるプライマーは以下の通りである。

配列番号：４０：プローブＭｂｎｌ１：／５６－ＦＡＭ／ＴＣＧＣＡＡＡＴＣＡＧＣＴＧＴＧＡＧＧＡＧＡＴＴＣＣＣＴ／３ＩＡｂＲＱＳｐ／
配列番号：４１：Ｍｂｎｌ１　Ｆ：ＴＡＣＣＧＡＴＴＧＣＡＣＣＡＣＣＡＡＡＣ
配列番号：４２：Ｍｂｎｌ１　Ｒ：ＧＣＴＧＣＴＴＴＣＡＧＣＡＡＡＧＴＴＧＴＣ
配列番号：４３：Ｍｂｎｌ２プローブ：／５６－ＦＡＭ／ＣＣＣＧＧＣＡＧＡＣＡＧＣＡＣＣＡＴＧＡＴＣＧＡ／３ＩＡｂＲＱＳｐ／
配列番号：４４：Ｍｂｎｌ２　Ｆ：ＧＡＧＡＣＡＧＡＣＴＧＣＣＧＣＴＴＴＧ
配列番号：４５：Ｍｂｎｌ２　Ｒ：ＧＧＴＴＡＣＧＧＴＧＴＴＧＴＣＧＴＴＴＧＴ
配列番号：４６：Ｇａｐｄｈプローブ：／５ＭＡＸＮ／－ＣＧＣＣＴＧＧＴＣＡＣＣＡＧＧＧＣＴＧＣＴ－／３ＢＨＱ＿１／
配列番号：４７：Ｇａｐｄｈ＿Ｆｏｒ：ＣＡＡＣＧＧＡＴＴＴＧＧＴＣＧＴＡＴＴＧＧ
配列番号：４８：Ｇａｐｄｈ＿Ｒｅｖ：ＴＧＡＴＧＧＣＡＡＣＡＡＴＡＴＣＣＡＣＴＴＴＡＣＣ

【０１４７】

筋組織におけるｍｉＲＮＡ発現を、特異的なｍｉＲＣＵＲＹ（商標）ロックド核酸マイクロＲＮＡ　ＰＣＲプライマー（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を製造者の説明書に従って使用して定量した。相対遺伝子発現をＵ１（ＹＰ００２０３９０９）及びＵ６（ＹＰ００２０３９０７）のｓｎＲＮＡに対して正規化した。

【０１４８】

発現レベルを、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ５リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）を使用して測定した。内因性遺伝子及び対照群に対する発現を、$2^{-\Delta\Delta Ct}$法を用いて計算した。試料のペアを、必要に応じてＷｅｌｃｈの補正を適用して両側ｔ検定（α＝０．０５）を使用して比較した。統計的差異を、正規化データに対するスチューデントのｔ検定（ｐ＜０．０５）によって推定した。

【０１４９】

動物実験及びオリゴヌクレオチド投与

マウスの取り扱い及び実験手順は、実験動物の管理及び実験に関する欧州の法律（２００３／６５／Ｃ．Ｅ．）に従い、Ｃｏｎｓｅｌｌｅｒｉａ　ｄｅ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａ，Ｇｅｎｅｒａｌｉｔａｔ　Ｖａｌｅｎｃｉａｎａによって承認された。ホモ接合トラン

スジェニックＨＳＡＬＲ（系統２０ｂ）マウスＭａｎｋｏｄｉ ｅｔ ａｌ．２０００ Ｓｃｉｅｎｃｅ：２８９（５４８５）：１７６９－７３．ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｅｎｃｅ．２８９．５４８５．１７６９は、Ｐｒｏｆ．Ｃ．Ｔｈｏｒｎｔｏｎ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ，ＵＳＡ）によって提供された。実験群は、全ての実験オリゴヌクレオチドで処理したＨＳＡＬＲマウスに加えて、正常対照ＩとしてＦＶＢ、陰性対照としてＰＢＳで処理したＨＳＡＬＲであった。試料サイズは、処置群当たり４匹のマウス、ＰＢＳについては１２匹のマウス、ＦＶＢ群については１８匹のマウスであった。全ての群に、１５０μｌの１ｘＰＢＳ（ビヒクル）又は特異的オリゴヌクレオチド（図２～図５参照）を３ｍｇ／ｋｇの単回用量で静脈内（尾静脈）注射した。注射の４日後、マウスを　殺し、分子アッセイのために目的の組織を液体窒素中で凍結した。

【０１５０】

筋電図検査

筋電図検査は、以前に記載されたように（Ｋａｎａｄｉａ ｅｔ ａｌ．２００６ Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００６ Ａｕｇ １；１０３（３１）：１１７４８－５３．ｄｏｉ：１０．１０７３／ｐｎａｓ．０６０４９７０１０３）、治療前及び全身麻酔下での犠牲時に行った。決定は、バイアスを排除するために盲目的に行われた。両後肢の各四頭筋に５針挿入を行い、筋緊張性放電を以下の５段階評価した。０、筋緊張性なし；１、針挿入の５０％以下における時折筋緊張性放電；２、挿入の＞５０％における筋緊張性放電；３、挿入のほぼ全てにおける筋緊張性放電；及び４．全ての挿入における筋緊張性放電。

【０１５１】

前肢握力試験

前肢握力は握力計（ＢＩＯ－ＧＳ３；Ｂｉｏｓｅｂ，Ｐｉｎｅｌｌａｓ Ｐａｒｋ，Ｆｌｏｒｉｄａ）で測定した。マウスが棒を把持したときのピーク引張力（グラムで測定）をデジタル力変換器で記録した。力変換器のゲージを各測定後に０ｇにリセットした。マウスが前足を棒から離したときの張力をゲージによって記録した。本発明者等は、３０秒間隔で３回の連続測定を行った。体重測定は並行して行った。最終値は、把持力の平均値をマウスの体重で除した値である。体重測定は並行して実施し、実験バイアスを排除するためにコードによって識別された動物を用いて実験を実施した。

【０１５２】

レーダーチャート

得られた値を回復指数（ＲＩ）として表し、それは、処置されたＨＳＡ^{ＬＲ}マウスで得られた異なるパラメータ値がＦＶＢ対照のものにどれだけ近いかを測定する。このＲＩは、この式：値％ＭＴ－Ｘ％ＭＮＴ、Ｘ％ＭＨ－Ｘ％ＭＮＴで割ったもの（（式中、ＭＴは処置した各マウス（ＰＢＳ又はオリゴヌクレオチド）の値であり、ＭＮＴはＰＢＳ（ＰＢＳ）で処置したＨＳＡ^{ＬＲ}マウスであり、ＭＨは健康マウスの値（ＦＶＢ）である））による処置後の各マウスの異なるパラメータ（Ｍｂｎｌ１タンパク質、Ｍｂｎｌ１／２発現量、スプライシング回収率、Ｍｂｎｌ１　ｅｘ５封入体回収率及び機能的回収率）について得られる。これらの値は０～１の範囲であり、０は未処置マウス（ＨＳＡ^{ＬＲ}－ＰＢＳ）であり、１は健康なマウス（ＦＶＢ）である。

【０１５３】

Ｍｂｎｌ１タンパク質は、各処置群の両方の筋肉（四頭筋及び腓腹筋）の定量ドットブロットによって得られた値の平均を指す。

【０１５４】

Ｍｂｎｌ１／２発現レベルは、両筋肉（四頭筋及び腓腹筋）及び前式を適用した各処置群においてリアルタイムＰＣＲによって得られた遺伝子Ｍｂｎｌ１及びＭｂｎｌ２のｍＲＮＡ値の平均を指す。

【０１５５】

スプライシング回復は、各群の処置の両方の筋肉のＮｆｉｘエクソン７、Ａｔｐ２ａ１

エクソン２２及びＣｌｃｎ１エクソン７ａに対する封入の平均パーセンテージを指す。
【０１５６】
Ｍｂｎｌ１　ｅｘ５封入体の回復は、各群の処置の両方の筋肉のＭｂｎｌ１エクソン５に対する封入体の割合を指す。
【０１５７】
機能的回復とは、処置後の各マウスの力／体重及び各群処置の筋緊張性放電のグレードによって得られた値の平均を指す。前肢握力試験を使用して力を取得し、筋電図検査を使用して筋緊張性放電のグレードを取得した。
【０１５８】
実施例１
本発明者等は以前に、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｍｉＲ－２１８－５ｐを阻害することが、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ（ＡＸ－２３ｂ）又はｍｉＲ－２１８－５ｐ（ＡＸ－２１８）に対するａｎｔａｇｏｍｉＲ構造を有する市販のａｎｔｉｍｉＲを使用することによって筋強直性ジストロフィーにおいて治療的であり得ることを示した（Ｃｅｒｒｏ－Ｈｅｒｒｅｒｏｓ　ｅｔ　ａｌ．２０１８　Ｎａｔ．Ｃｏｍｍｕｎ．２６；９（１）：２４８２．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓ４１４６７－０１８－０４８９２－４．）。ヒトＤＭ１細胞のこれらのａｎｔａｇｏｍｉＲによるトランスフェクション及び疾患のマウスモデルにおけるそれらの注射は、標的ｍｉＲＮＡ発現のダウンレギュレーション及びそれらの直接標的であるＭＢＮＬ１の同時のアップレギュレーションをもたらした。使用したａｎｔａｇｏｍｉＲは、長鎖（２２ｎｔ）であり、ｍｉＲＮＡに対する相補配列をほぼ全て含み、全て２’ＯＭＥヌクレオチドから構成されていた。それらは、分子のヌクレオチド部分の安定性を改善するために３’及び５’末端のヌクレオチド間にホスホロチオエート架橋を担持し、薬物動態学的挙動及び細胞内移行を増強するための担体として３’中のコレステロールに結合した。最も効果的で安全な担体を探すために、本発明者等は、ステロールコレステロール及びトコフェロール；及び脂肪酸パルミトイル酸、ステアリン酸、エライジン酸、リノール酸及びオレイン酸（表１の分子のリスト）を含む、分子の３’又は５’末端のいずれかで、Ａｘ－２３ｂのポリヌクレオチド部分（配列名：表１の非結合－２３ｂ）を異なる脂質担体と組み合わせた。本発明者等は、ヒトＤＭ１細胞でスクリーニングを行った（Ａｒａｎｄｅｌ　Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．（２０１７）．Ｄｉｓ　Ｍｏｄｅｌ　Ｍｅｃｈ　１０（４）：４８７－４９７．）。‘‘Ｉｍｍｏｒｔａｌｉｚｅｄ　ｈｕｍａｎ　ｍｙｏｔｏｎｉｃ　ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ　ｍｕｓｃｌｅ　ｃｅｌｌ　ｌｉｎｅｓ　ｔｏ　ａｓｓｅｓｓ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ．’’ Ｄｉｓ　Ｍｏｄｅｌ　Ｍｅｃｈ　１０（４）：４８７－４９７．）をこれらのコンジュゲート型ａｎｔａｇｏｍｉＲでトランスフェクトし、毒性（細胞生存率研究）及びＭＢＮＬ１タンパク質レベルに対するそれらの効果を調べた。
【０１５９】
これらの分子の各々を５つの異なる濃度の範囲でＤＭ１ヒト筋管にトランスフェクトし、細胞生存率及びＭＢＮＬ１タンパク質のレベルを定量した。本発明者等は、以下のように定義される治療指数（ＴＩ）に従ってａｎｔｉｍｉＲをランク付けした：
ＴＩ＝（ＴＣ５０／ＥＣ５０）＊Ｅｍａｘ
ここで、
ＴＣ５０は、細胞生存率をモックの５０％に低下させる化合物の濃度であり、
ＥＣ５０は、Ｅｍａｘの５０％をもたらす化合物の濃度である。
【０１６０】
Ｅｍａｘは、モック（ビヒクルでトランスフェクトした）と比較した、特定のａｎｔｉｍｉＲでトランスフェクションした後に得られたＭＢＮＬ１タンパク質の最大倍率変化である。
【０１６１】
これらの実験から、本発明者等は以下のように結論付けた：
－オレイン酸（１８個の炭素原子を有するシス－モノ不飽和脂肪酸）とのコンジュゲー

ションは、最も高いＴｉｎｄｅｘを産生したものであった（表１参照）。「非コンジュゲート－２３ｂ」及び「５’－２３ｂ－オレイン酸」と命名された分子の毒性及び有効性（ＭＢＮＬ１タンパク質のレベル）の曲線を、直接比較のために図１Ｃ及びＢに示す。重要なことに、オレイン酸にコンジュゲートされたスクランブルオリゴの低いＴｉｎｄｅｘ（「Ｓｃ－オレイン酸」）は、オレイン酸自体がＴｉｎｄｅｘに影響を及ぼさないことを示す。

－リノール酸（１８個の炭素原子を有するシス多価不飽和脂肪酸）が２番目に有効な担体であった。驚くべきことに、エライジン酸（オレイン酸のトランス異性体）、パルミチン酸（１６個の炭素原子を有する飽和非エステル化脂肪酸）、及びステアリン酸（１８個の炭素原子を有する炭素鎖を有する飽和脂肪酸）を用いて得られたＴｉｎｄｅｘ結果は、有意に低かった。したがって、本発明者等のデータは、シス不飽和脂肪酸が本発明者等のＤＭ１細胞におけるａｎｔｉｍｉＲのより良好な担体であることを示す。

－コレステロールは、２つの異なる位置３’及び５’でコンジュゲートした試験した担体の唯一のものであった。本発明者等のデータによれば、３’におけるコンジュゲートは５’よりも効率的に機能したようであった。トコフェロールとしてのコレステロール誘導体の使用は、Ｔｉｎｄｅｘを改善しなかった。

【０１６２】

本発明者等は、異なる脂質担体とＡｘ－２１８（配列名：表１の非コンジュゲート－２１８）のヌクレオチド部分をコンジュゲートする同じ実験を行った（表１）。オレイン酸は、試験した全ての脂肪酸の中で最良の担体として確認され、コレステロールは５’よりも３’で良好に機能した。しかしながら、たとえ回復期間後に肝臓の変化が可逆的になり得るとしても、コレステロールはマウスの肝臓における毒性に関連していることに留意されたい（ｈｔｔｐｓ：／／ｅｃｈａ．ｅｕｒｏｐａ．ｅｕ／ｅｓ／ｒｅｇｉｓｔｒａｔｉｏｎ－ｄｏｓｓｉｅｒ／－／ｒｅｇｉｓｔｅｒｅｄ－ｄｏｓｓｉｅｒ／１１０３１／７／６／１＃で入手可能なＣｈｏｌｅｓｔｅｒｏｌ Ｒｅｇｉｓｔｒａｔｉｏｎ Ｄｏｓｓｉｅｒ ＥＣＨＡ，Ａｐｒｉｌ ４，２０１７を参照のこと）。しかしながら、オリゴヌクレオチドの治療的ポジソロジーは、慢性的な処置であることが意図されているので、リンカーとしてのコレステロールは、肝臓における毒性のリスクを高め得る。対照的に、オレイン酸は良好な安全性プロファイルを有し、ヒトにおいて有益な効果を有する食品添加物として使用されてきた（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｆｏｏｄ／ｃｆｓａｎ－ｃｏｎｓｔｉｔｕｅｎｔ－ｕｐｄａｔｅｓ／ｆｄａ－ｃｏｍｐｌｅｔｅｓ－ｒｅｖｉｅｗ－ｑｕａｌｉｆｉｅｄ－ｈｅａｌｔｈ－ｃｌａｉｍ－ｐｅｔｉｔｉｏｎ－ｏｌｅｉｃ－ａｃｉｄ－ａｎｄ－ｒｉｓｋ－ｃｏｒｏｎａｒｙ－ｈｅａｒｔ－ｄｉｓｅａｓｅで入手可能なＦＤＡ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｌｅｔｔｅｒ ｔｏ ｔｈｅ Ｈｅａｌｔｈ Ｃｌａｉｍ Ｐｅｔｉｔｉｏｎ Ｃｏｎｃｅｒｎｉｎｇ Ｏｌｅｉｃ Ａｃｉｄ，Ｎｏｖｅｍｂｅｒ １９，２０１８を参照されたい）。

【０１６３】

本発明者等が適切な担体を見出したら、本発明者等の次の工程は、担体にコンジュゲートされるａｎｔｉｍｉＲ分子に含まれる配列及び化学修飾を最適化することであった。したがって、本発明者等は、ＤＭ１細胞における非コンジュゲート（非コンジュゲート）ａｎｔｉｍｉＲのＴｉｎｄｅｘを改善する最も効果的な配列及び化学修飾を探して、同じインビトロスクリーニングも行った。本発明者等は、ヒトｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ又はｍｉＲ－２１８－５ｐの異なる部分に相補的な一群の異なる一本鎖分子（１６ヌクレオチド～２２ヌクレオチドの範囲の長さ）を作製した。このスクリーニングに含まれる分子は、ＬＮＡ、２’ＯＭＥ及び２’ＭＯＥオリゴヌクレオチドを含む異なる化学修飾を有し、ヌクレオチド間の全ての結合はホスホロチオエート（ＰＳ）であった（表２及び３で試験した分子のリスト）。

【０１６４】

ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐに対するより良好なＴｉｎｄｅｘスコアを有する分子はＭＤ２３ｂ－２であり、ｍｉＲ－２１８－５ｐを阻害するように設計されたａｎｔｉｍｉＲ分子の場合、最良のスコアリング分子は２１８－Ｄ／ＬＮＡ２であった（表２及び３を参照のこ

と）。重要なことに、ＭＤ２３ｂ－２は、２１８－Ｄ／ＬＮＡ２よりもＭＢＮＬ１レベル（Ｅｍａｘ）及びＴｉｎｄｅｘに対して有意に高い効果を示した。これらの分子の毒性及び有効性（ＭＢＮＬ１タンパク質のレベル）の曲線を図１Ａ及びＤに示す。

【０１６５】

次に、最良スコアリングａｎｔｉｍｉＲ配列ＭＤ２３ｂ－２に対するオレイン酸の抱合の効果を試験した（表４）。驚くべきことに、コンジュゲート分子（Ｏｌ－ＭＤ２３ｂ－２）は、ＭＤ２３ｂ－２と比較して低下したＴｉｎｄｅｘを示した。一方、本発明者等は、ＰＳ／ＰＯの混合物を有するオリゴヌクレオチドへのオレイン酸コンジュゲーションがそれらのＴｉｎｄｅｘを増加させることを観察した（表４）。このデータは、混合ＰＳ／ＰＯオリゴヌクレオチドにおいて、Ｔｉｎｄｅｘ中のオレイン酸の効果が驚くほど顕著であることを裏付けている。

【表１】

表1

名称	配列	TC50 (μM)	EC50 (μM)	Emax (最大倍数変化)	Tindex
非コンジュゲート23b	gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	1.704	0.22	1.100	8.5
5'-23b-オレイン酸	(オレイン酸)(NHC5)gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	4.040	0.010	2.726	1101.4
5'-23b-リノール酸	(リノール酸)(NHC5)gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	40.630	0.186	1.835	400.077
5'-23b-Me Toc	(トコフェノール)(オクチル)gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	3.460	0.100	2.211	76.617
5'-23b-MeChol	(コレステロール)(Pro)gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	1.027	1.136	13.654	12.3
5'-23b-MePal	(パルミチン酸)gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	2.156	0.460	1.497	7.0
5'-23b-エライジン酸	(エライジン酸)gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	0.700	1.148	1.840	0.7
5'-23b-エステアリン酸	(エステアリン酸)gsgsuaaucccuggcaaugusgsasu	0.432	1.178	1.304	0.8
Ax-23b	gsgsuaaucccuggcaaugusgsasus(Teg)(コレステロール)	1.301	0.007	1.674	302.0
非コンジュゲート-218	ascsaugguuagaucaagcascsasa	0.953	0.06	2.525	40.1054
Ax-218	ascsaugguuagaucaagcascsasa(Teg)(コレステロール)	2.704	0.025	3.133	334.178
5'-23b-オレイン酸	(オレイン酸)(NHC5)ascsaugguuagaucaagcascsasa	14.230	0.137	1.613	167.61
5'-23b-MeChol	(コレステロール)(Pro)ascsaugguuagaucaagcascsasa	1.143	0.075	8.264	125.094
5'-23b-リノール酸	(リノール酸)(NHC5)ascsaugguuagaucaagcascsasa	1.533	0.045	2.272	77.374
5'-23b-MePal	(パルミチン酸)ascsaugguuagaucaagcascsasa	3.508	0.244	3.8567	55.373
5'-23b-Me Toc	(トコフェノール)(オクチル)ascsaugguuagaucaagcascsasa	2.56	0.210	2.453	29.846
Sc-オレイン酸	(オレイン酸)(NHC6)csasguacuuuuguguascsasa	7.69	_	1.2	_

注：（Ｐｒｏ）（Ｃｈｏｌ）は、ヒドロキシプロリノールＣ５－アルキルコレステロールを表す。（Ｔｅｇ）（Ｃｈｏｌ）は、使用されるスペーサーに応じて１５原子トリエチレングリコールコレステロールを表す。

【表２】

表2

名称	配列	TC50 (μM)	EC50 (μM)	Emax（最大倍数変化）	Tindex
MD23b-2	AbsTmscscscsTbsgsgscsAbsAmsTbsGbsTmsGbsAb	14.000	0.010	3.173	4442.2
23-LNA8	CbscscsTbsgsgsCbsasasTbsgsusGbsasTb	0.471	0.002	2.916	686.3
23-D/LNA1	CbsdCsdCsdTsdGsdGsCbsdAsAbsdTsdGsdTsGbsdAsTb	0.098	0.001	1.654	201.7
MD23b-8	AbsTbscscscsTbsgsgscsAbsAmsTbsGbstsGmsAbsTb	1.510	0.030	1.762	88.3
MD23b-13	TbsdAsdAsTbsdCsdCsCbsdTsGbsdGsdCsAbsAbsdTsdGsTbsdGsAbsTb	2.271	0.068	2.246	75.3
23-D/LNA2	CbsdCsdCsTbsdGsdGsCbsdAsdAsTbsdGsdTsGbsdAsTb	0.598	0.020	1.636	50.1
MD23b-7	AbsTmsdCsdCsCmsdTsGmsdGsdCsAbsdAsTbsdGsTbsGmsAmsTb	0.263	0.019	2.342	32.4
MD23b-14	TmsAmsasdTscscscsdTsgsgsdCsAbsAbsdTsgsTbsgsAbst	1.604	0.235	3.563	24.3
23-LNA4	CbscscsusgsgsCbsasAbsusgsusGbsasTb	0.122	0.010	1.465	17.9
MD23b-10	TbsAmsdAtsCsdCscstsdGgsCsAbsdATbsGmsdTGbsAb	0.128	0.021	2.497	15.5
AntimiR-23b	CbscscsusgsgsCbsasAbsusgsusGbsasTb	0.116	0.043	4.193	11.4
MD23b-6	AbsTbsdCsdCsdCsTbsdGsdGsdCsAbsdAsTbsGbsdTsdGsAbsTb	0.117	0.026	2.191	9.9
MD23b-12	AbsAbsdTsCbsdCsdCsTbsdGsdGsdCsAbsasTbsGbstsgsasTb	0.481	0.154	2.701	8.5
MD23b-9	AbsAbsdTsCbsdCsdCsTbsdGsdGsdCsAbsAbsdTsGbsdTsdGsAbsTb	0.370	0.357	4.078	4.2
MD23b-5	AbsTbsdCsdCsdCsTbsdGsdGsdCsdAsAbsTbsdGsTbsdGsAbsTb	0.175	0.112	1.208	1.9
MD23b-11	TbsAmsdAstscsdCscstsdGsgscsAmsdAsTmsGbsdTsGbsAb	0.110	0.102	1.473	1.6
23-LNA6	GbsgsusasasusCbscscsusgsgsCbsasAbsusgsusGbsasTb	0.078	0.255	2.153	0.7

【表３】

表3

名称	配列	TC50 (μM)	EC50 (μM)	Emax（最大倍数変化）	Tindex
218-D/LNA2	TbsdTsdAsGbsbdAsdTsCbsdAsdAsGbsdCsAbsdCsdAsAbs	0.008	0.0008	2.536	250.319
218-2F/LNA1	TbsTbsAfsGfsAfsTfsCfsAfsAfsGfsCfsAfsCfsAbsAbs	0.149	0.002	2.049	139.270
MD218-12	TbsGbsdGsTbsdTsdAsGbsdAsdTsdCsAbsAmsGbsCbsdAsCmsAmsAbs	0.282	0.010	2.977	83.832
MD218-6	GbsGbsdTsdTsdAsGbsdAsdTsdCsAbsdAsGbsCbsdAsdCsAbsAbs	0.300	0.010	1.893	56.695
MD218-11	AbsTmsdGsgstsdTsasgsdAstscsAmsdAsGmsCbsdAsCbsAbs	0.193	0.010	2.378	45.777
MD218-13	AbsdTsdGsGbsdTsdTsAbsdGsAbsdTsdCsAbsAbsdGsdCsAbsdCsAbsAbs	0.124	0.010	3.151	39.009
218-2F/MOE	AmsCmsAfsTfsGfsGfsTfsTfsAfsGfsAfsTfsCfsAfsAfsGfsCfsCfsCfsAmsAms	0.012	0.0004	1.399	38.334
MD218-5	GbsGbsdTsdTsdAsGbsdAsdTsdCsdAsAbsGbsdCsAbsdCsAbsAbs	0.350	0.024	2.117	30.264
MD218-4	GbsGmsdTsdTsAbsdGsAmsTmsdCsAbsAbsdGsCbsdAsCbsAbs	0.299	0.024	2.380	29.850
MD218-15	AbsTmsgsgststsasgsastsdCsAmsAbsGbsCmsAbsCbsAmsAbs	0.318	0.016	1.498	28.949
MD218-10	AbsTmsdGsgstsdTsagdAstscsAbsdAsGbsCmsdAsCbsAbs	0.546	0.051	1.893	20.295
MD218-3	GbsdTsdTsdAsGbsdAsdTsdCsAbsAbsdGsCbsdAsdCsAbsAbs	0.461	0.038	1.649	20.182

【表４】

表4

名称	配列	TC50 (μM)	EC50 (μM)	Emax (最大倍数変化)	Tindex
MD23b-2	AbsTmscscscsTbsgsgscsAbsAmsTbsGbsTmsGbsAb	14.000	0.010	3.173	4442.2
OL-MD23b-2	(オレイン酸)(NHC6) AbsTmscscscsTbsgsgscsAbsAmsTbsGbsTmsGbsAb	9.257	0.020	2.053	950.2
MD23b-2-PS/PO	AbsTms(5Mc)s(5Mc)(5Mc)Tbgsgs(5Mc)sAbAmTbGbsTmsGbsAb	1.635	0.047	1.913	66.5
MD23b-2-PS/PO 5'Ol	(OleicAcid)(NHC6)AbsTms(5Mc)s(5Mc)(5Mc)Tbgsgs(5Mc)sAbAmTbGbsTmsGbsAb	2.920	0.010	2.202	643.0

【０１６６】

実施例２

次に、本発明者等は、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ（ＭＤ２３ｂ－２）及びｍｉＲ－２１８－５ｐ（２１８－Ｄ／ＬＮＡ２）に対してインビトロで最良に機能するオリゴを採取し、ＤＭ１のマウスモデル（ＨＳＡ^{LR}）におけるそれらのインビボ治療可能性を評価するために、それらのＡＤＭＥＴ（吸収、分布、代謝、排泄及び毒性）特性を改善するためにこれらの分子にいくつかの改変を適用した。導入された改変の背後にある理論的根拠は以下の通りであった。

（１）シトシンのメチル化は、アンチセンスオリゴによるインビボ処理によって免疫系活性化を阻害する周知の方法である（Ｊｏｓｅｐｈ Ｊ．Ｓｅｎｎ，ｅｔ ａｌ．Ｎｏｎ－ＣｐＧ－Ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ２’－Ｍｅｔｈｏｘｙｅｔｈｙｌ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ Ａｃｔｉｖａｔｅ ａ Ｐｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｏｆ Ｔｏｌｌ－Ｌｉｋｅ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ９ ｏｒ Ｍｙｅｌｏｉｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ Ｆａｃｔｏｒ ８８．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ １，２００５，３１４（３）９７２－９７９；ＤＯＩ：ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１２４／ｊｐｅｔ．１０５．０８４００４）。

（２）ＬＮＡ及び２’ＭＯＥ修飾型の化学修飾ヌクレオチドは、標準的なＲＮＡ、ＤＮＡ又は２’ＯＭＥ修飾オリゴよりも安定であることが知られている（Ｗ．Ｂｒａｄ Ｗａｎ ａｎｄ Ｐｕｎｉｔ Ｐ．Ｓｅｔｈ．２０１６．Ｔｈｅ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ）。

（３）インビトロで試験した全ての分子において、ヌクレオチド間のホスホジエステル（ＰＯ）結合は、それらの安定性及び有効性を高めるためにホスホロチオエート（ＰＳ）結合によって置換されている。完全修飾ＰＳオリゴは、インビトロ研究で広く使用されて

いる。しかしながら、単一分子内の過剰なＰＳ結合に関連するいくつかのインビボ毒性が以前に報告されており（例えば、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｚａｉｎ．２０１９．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ：Ｓｔａｔｅ ｏｆ ｔｈｅ Ａｒｔ．Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ，ａｎｄ Ｈｕ ｅｔ ａｌ．２０２０．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｓｉＲＮＡ：ｓｔａｔｅ ｏｆ ｔｈｅ ａｒｔ．Ｓｉｇｎａｌ ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｔｈｅｒａｐｙ）、混合オリゴＰＳ／ＰＯはインビボでより安定であることが証明されている（Ｚｈａｎｇ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎ ｖｉｖｏ ｓｔａｂｉｌｉｔｙ，ｄｉｓｐｏｓｉｔｉｏｎ ａｎｄ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ ｏｆ ａ ‘‘ｈｙｂｒｉｄ’’ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ ｉｎ ｒａｔｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ．Ｖｏｌｕｍｅ ５０，Ｉｓｓｕｅ ４，１９９５，Ｐａｇｅｓ ５４５－５５６，ＩＳＳＮ ０００６－２９５２，ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／０００６－２９５２（９５）００１５９－Ｗ）。したがって、インビボモデルにおいて試験することができるアンチセンスオリゴを設計するために、本発明者等は、その後のインビボ研究においてＰＳ結合の量を減少させることにした。

【０１６７】

これら３つの基準を考慮して、本発明者等は４つのアンチセンスオリゴを生成した。

－ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯは、ＭＤ２３ｂ－２に見られる同じ化学修飾を保存するが、より低いＰＳ含有量及び全てのシトシンがメチル化されている。

－ＭＤ２３ｂ－２ Ｖ２は、ＭＤ２３ｂ－２と同じ配列を有するが、２’中のいくつかのＯＭＥ修飾がＭＯＥで置換されており、ＰＳ含有量がより低く、全てのシトシンがメチル化されている。

－２１８ ＭＯＥは、２１８－Ｄ／ＬＮＡ２の配列、２’ＭＯＥで置換された全天然ＤＮＡヌクレオチド、全てメチル化されたシトシン、及びより低いＰＳ含有量を有する。

－２１８ ＯＭＥ／ＭＯＥは、２１８－Ｄ／ＬＮＡ２の配列、２’ＭＯＥ又は２’ＭＯＥで置換された全天然ＤＮＡヌクレオチド、全てメチル化されたシトシン、及びより低いＰＳ含有量を有する。

【０１６８】

ＨＳＡ^{ＬＲ}マウスにおける治療可能性を評価するために、これらの分子を非コンジュゲート化（２１８ ＯＭＥ／ＭＯＥを除く）及びオレイン酸とコンジュゲート化して使用した（ＤＭ１のモデル、Ｍａｎｋｏｄｉ，Ａ．，ｅｔ ａｌ．（２０００）．‘‘Ｍｙｏｔｏｎｉｃ ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ ｉｎ ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ ｍｉｃｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｎｇ ａｎ ｅｘｐａｎｄｅｄ ＣＵＧ ｒｅｐｅａｔ．’’ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８９（５４８５）：１７６９－１７７３．を参照されたい）。具体的には；治療効果に対するオレイン酸とのコンジュゲーション部位の効果を評価するために、ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯを非コンジュゲート、３’でオレイン酸とコンジュゲート（ＭＤ２３ｂ２ＰＳ／ＰＯ ３’Ｏｌ）、及び５’でオレイン酸とコンジュゲート（ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯ ５’Ｏｌ）を使用した。ＭＤ２３ｂ－２ Ｖ２を非コンジュゲート化、３’でオレイン酸にコンジュゲート化し（ＭＤ２３ｂ－２ Ｖ２ ３’Ｏｌ）、及び３’でパルミチン酸とコンジュゲート化（ＭＤ２３ｂ－２ Ｖ２ ３’Ｐａｌｍ）で使用して、オレイン酸とのコンジュゲート化が、同様にインビボでパルミチン酸とのコンジュゲート化よりも強いａｎｔｉｍｉＲの効果をもたらすかどうかを確認した。ｍｉＲ－２１８－５ｐに対する２つのａｎｔｉｍｉＲは、両方とも３’においてオレイン酸とコンジュゲート化された。

【０１６９】

これらの分子は全て、３～５月齢のＨＳＡ^{ＬＲ}マウスの尾静脈に３ｍｇ／Ｋｇの濃度で静脈内注射した。これらのマウスの強度及び筋緊張症を、注射の直前及び単回注射の５日後の　殺の直前に評価した。図２は、マウスの　殺直前に測定した体重（Ａ）及び筋緊張症（Ｂ）レベルに対して正規化した握力の結果を示す。ａｎｔｉｍｉＲで処置した全てのマウスにおいて、強度はＰＢＳ注射マウスと比較して改善されたが、この差は一部のａｎ

ｔｉｍｉＲについてのみ統計学的に有意であった。同様に、ａｎｔｉｍｉＲ処置マウスでは筋強直が減少した。筋緊張症の最も重要な減少は、分子ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ及び２１８　ＭＯＥ　オレイン酸３’によって達成された。両方の分子について、オレイン酸コンジュゲート分子は、非コンジュゲートバージョンよりも強い救済をもたらし、３’でコンジュゲートした場合により強い効果をもたらす。

【０１７０】

実施例３

殺の瞬間に、本発明者等は、マウスの後肢の四頭筋及び腓腹筋を解剖し、タンパク質及びＲＮＡ抽出のためにそれらを処理した。ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐ（図３Ａ）又はｍｉＲ－２１８－５ｐ（図３Ｂ）のレベルを検出するための特異的プローブを用いた、抽出されたＲＮＡの逆転写後のｑＰＣＲは、全てのａｎｔｉｍｉＲがその対応するｍｉＲＮＡのレベルを効率的に低下させたことを示した。重要なことに、ａｎｔｉｍｉＲの非コンジュゲート型は、コンジュゲート型よりも効率が低い傾向があった。ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するａｎｔｉｍｉＲの場合、２１８　ＭＯＥが最も効果的でなかった。

【０１７１】

実施例４

ｑＲＴ－ＰＣＲを使用して、四頭筋及び腓腹筋におけるＭｂｎｌ１（図４Ａ）及びＭｂｎｌ２（図４Ｂ）転写物の発現レベルを定量し、これらの筋肉から抽出された総タンパク質を、定量的ドットブロット分析（図４Ｃ）によるタンパク質Ｍｂｎｌ１検出のために処理した。Ｍｂｎｌ１転写物のレベルに関して、ａｎｔｉｍｉＲ－２３ｂ－３ｐとａｎｔｉｍｉＲ－２１８－５ｐとの間に小さな差が検出されたが、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｂ　ａｎｔｉｍｉＲはＭｂｎｌタンパク質に対してより強い効果を有していた。重要なことに、本発明者等は、オレイン酸担体を分子ＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯの３’又は５’のいずれかに配置することの間に差は観察されず、分子ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２の場合、非コンジュゲート型はオレイン酸又はパルミトイル酸とのコンジュゲート型よりも明らかに効率が低く、オレイン酸は、特にＭｂｎｌ２転写物及びＭｂｎｌ１タンパク質レベルに対してより強い効果を有した。

【０１７２】

実施例５

また、全ＲＮＡを使用して、Ａｔｐ２ａ１エクソン２２、Ｎｅｘｉｘエクソン７、Ｍｂｎｌ１エクソン５及び塩化物チャネル（Ｃｌｃｎ１）エクソン７ａ（図５及び図６）等のＭｂｎｌ１タンパク質によって調節される転写物のミススプライシングを分析した。

【０１７３】

Ｎｆｉｘ、Ｃｌｃｎ１、Ａｔｐ２ａ１及びＭｂｎｌ１転写物は、それぞれ、ＨＳＡ^{LR}マウスにおいてエクソン７、７ａ、２２及び５の異常に増加した包含を示したが、ＭＤ２３－ｂ　Ｖ２　３’Ｏｌ及び他の同様の分子で３ｍｇ／ｋｇで処理した後、筋肉における正常値の３０％～５０％の間で回復した。

【０１７４】

実施例６

本発明者等がモデルマウスにおいて測定した全てのＤＭ１関連の機能的及び分子的表現型を分析するために、本発明者等は、この次式：

【数１】

$$RIm = \frac{値_{MT} \quad / \bar{X}_{MNT}}{\bar{X}_{MH} / \bar{X}_{MNT}}$$

（式中、$Value_{MT}$は各処置（ＰＢＳ又はオリゴヌクレオチド注射）マウスの個体値であり、$\bar{X}_{MNT}$は非処置疾患マウス（ＰＢＳ注射）の平均値であり、$\bar{X}_{MH}$は健康なマウ

ス群（ＦＶＢ）の平均値である）
による処置後の各マウスの異なるパラメータ（Ｍｂｎｌ１タンパク質、Ｍｂｎｌ１／２発現量、スプライシング回収率、Ｍｂｎｌ１　ｅｘ５封入体回収率及び機能的回収率）に対する各個々のマウス（Ｒｌｍ）の回復指数を計算するためのスパイダーグラフ（図７）を生成した。次に個々のＲＩ値（ＲＩｍ）を平均して、図７に示す全体的なＲＩ値を生成した。

【０１７５】

これらの値は０～１の範囲であり、０は未処置マウス（ＨＳＡ^{ＬＲ}－ＰＢＳ）であり、１は健康なマウス（ＦＶＢ）である。Ｍｂｎｌ１タンパク質は、各処置群の両方の筋肉（四頭筋及び腓腹筋）の定量ドットブロットによって得られた値の平均を指す。Ｍｂｎｌ１／２発現レベルは、前式を適用した各群処置の筋肉（四頭筋及び腓腹筋）及び遺伝子（Ｍｂｎｌ１及びＭｂｎｌ２）の両方のリアルタイムＰＣＲによって得られた値の平均を指す。スプライシング回復は、各群の処置の両方の筋肉のＮｆｉｘエクソン７、Ａｔｐ２ａ１エクソン２２及びＣｌｃｎ１エクソン７ａに対する封入の平均パーセンテージを指す。Ｍｂｎｌ１　ｅｘ５封入体の回復は、各群の処置の両方の筋肉のＭｂｎｌ１エクソン５に対する封入体の割合を指す。機能的回復とは、処置後の各マウスの力／体重及び各群処置の筋緊張性放電のグレードによって得られた値の平均を指す。

【０１７６】

図７並びに表５及び表６におけるこれらのグラフの表示は、ＭＤ２３ｂ－２Ｖ　２３’Ｏｌが、試験した全ての表現型の最も強い救済をもたらしたａｎｔｉｍｉＲ分子であったことを示している。注目すべきことに、この同じａｎｔｉｍｉＲ配列が非コンジュゲート化又はパルミチン酸とコンジュゲート化された場合の有効性の違いは、インビトロ研究における本発明者等の驚くべき結果を裏付け、オレイン酸とコンジュゲート化された場合の分子に対する明らかにより強力な治療効果を確認する。２番目に性能の良い分子はＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯ　３’Ｏｌであり、これはＭＤ２３ｂ－２ＰＳ／ＰＯ　５’Ｏｌよりわずかに良好であった。これらのデータはまた、コレステロールのコンジュゲーションを用いてインビトロで得られた結果を裏付けており、３’における担体のコンジュゲーションが有益であることが確認される。インビトロで観察されたように、ｍｉＲ－２１８－５ｐに対するａｎｔｉｍｉＲは、より低い表現型救済をもたらした。データは、ｍｉＲ－２１８－５ｐの阻害（図７Ｂ及び表６）と比較して、ｍｉＲ－２３ｂ－３ｐの阻害（図７Ｂ及び表５）のより強い治療効果を裏付けている。分子２１８　ＭＯＥ（図７Ｂ）の場合、オレイン酸とのコンジュゲート化もインビボでその活性を改善する。したがって、インビボでの治療効果に対するオレイン酸抱合の効果は、特定の窒素塩基配列に限定されず、より一般的に適用されることが確認される。

【表５】

表5

処置	FVB	PBS	MD23b-2 PS/PO 5'Ol	MD23b-2 PS/PO	MD23b PS/PO 3'Ol	MD23b-2 V2 3'Ol	MD23b-2 V2	MD23b-2 V2 3'Pal
機能的回復	1.00	0.00	0.88	0.80	0.90	0.93	0.62	0.53
Mbnl1エクソン5封入回復	1.00	0.00	0.09	0.04	0.16	0.23	0.00	0.05
スプライシング回復	1.00	0.00	0.16	0.05	0.24	0.32	0.10	0.13
Mbnl1/2発現レベル	1.00	0.00	0.65	0.56	0.51	0.88	0.29	0.45
Mbnl1タンパク質レベル	1.00	0.00	1.18	1.24	1.24	1.31	0.36	0.73

【表６】

表6

処置	FVB	PBS	218-D/LNA2	218-MOE	218-MOEオレイン酸3’	218-OME/MOEオレイン酸3’
機能的回復	1.00	0.00	0.67	0.71	0.80	0.44
Mbnl1エクソン5封入回復	1.00	0.00	0.43	0.14	0.09	0.07
スプライシング回復	1.00	0.00	0.41	0.10	0.18	0.13
Mbnl1/2発現レベル	1.00	0.00	0.52	0.61	0.85	0.58
Mbnl1タンパク質レベル	1.00	0.00	2.16	0.39	0.79	0.49

【０１７７】

実施例７

試験した全てのａｎｔｉｍｉＲにおいて、本発明者等は、オレイン酸とオリゴヌクレオチドとの間にアミド結合を形成するためにアミノ基を含有するスペーサーを使用して、常に３’又は５’のいずれかでコンジュゲートオレイン酸を使用している。第１のスペーサーは、３’末端及び５’末端の両方に導入された６－アミノヘキシル基（ＮＨＣ６スペーサー）であった。次に、本発明者等は、他のタイプのスペーサー（ＮＨＣ６、ＮＨＣ３又はトレオニノール）及びオリゴ配列ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２とオレイン酸との間の異なるサイズ（３又は６個の炭素原子のいずれか）のスペーサーの添加（図８）が、ＭＢＮＬ１タンパク質のレベルに対するコンジュゲートした結果として生じる分子の効果を改善し得るかどうかを試験した。本発明者等は、生成された全てのａｎｔｉｍｉＲ（表７、表８及び図９の合計４）がＭＢＮＬ１タンパク質のアップレギュレーションをもたらすことができることを観察した。注目すべきことに、トレオニノールを使用してコンジュゲートさせた分子は、最も低い濃度でＥＣ５０に達したので最も活性であったが、６個の炭素のスペーサーを有する分子（ＮＨＣ６）は、タンパク質の最も堅固な最大上方制御をもたらす分子であった。このデータは、スペーサーにおける修飾が、本発明のオレイン酸コンジュゲート化ａｎｔｉｍｉＲの有効性及び薬力学を更に調節し得ることを実証している。

【表７】

表7

名称	配列
MD23b-2 V2 3’OI	AbsTbs(5Mc)s(5Mc)sCmTbGmsgsCmsAbAmTbGbTmsGbsAb(NHC6)（オレイン酸）
MD23b-2 V2 3’OI（トレオニノール）	AbsTbs(5Mc)s(5Mc)sCmTbGmsgsCmsAbAmTbGbTmsGbsAb（トレオニノール)(オレイン酸）
MD23b-2 V2 3’OI (C6SSC6) (NHC6)	AbsTbs(5Mc)s(5Mc)sCmTbGmsgsCmsAbAmTbGbTmsGbsAb(C6SSC6)(NHC6) (オレイン酸）
MD23b-2 V2 3’OI (C6SSC6) (NHC3)	AbsTbs(5Mc)s(5Mc)sCmTbGmsgsCmsAbAmTbGbTmsGbsAb(C6SSC6)(NHC3) (オレイン酸）

【表８】
表8

ASO	EC50 (μM)	Emax(最大倍数変化)
MD23b-2 V2 3´Ol	0.062	2.30
MD23b-2 V2 3´Ol (C6SSC6) (NHC3)	0.217	1.96
MD23b-2 V2 3´Ol (C6SSC6) (NHC6)	0.164	3.05
MD23b-2 V2 3´Ol(トレオニノール)	0.007	1.98

【０１７８】
実施例８
オリゴヌクレオチドの合成方法は当技術分野で広く知られているが、本発明者等は、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌの合成の例を本明細書で提供し、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌは、ホスホジエステル又はホスホロチオエート結合によって結合されたＬＮＡ、２’－Ｏ－ＭＯＥ及び２’－Ｏ－Ｍｅ修飾構成要素のみからなる１６ｎｔ長のオリゴヌクレオチドである。その３’末端はオレイン酸部分で修飾されている（図１０）。このオレイン酸は、前駆体オリゴヌクレオチドの３’末端で活性化カルボン酸をヘキシルアミノスペーサーにカップリングすることによって導入される。ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌの合成は、ビルディングブロック及びスペーサー－ＧＰＧを使用した固相合成に基づく。このプロセスは、２つの主要な工程のみからなる。
【０１７９】
最初に、配列ＡｂｓＴｂｓ（５Ｍｃ）ｓ（５Ｍｃ）ｓＣｍＴｂＧｍｓｇｓＣｍｓＡｂＡｍＴｂＧｂＴｍｓＧｂｓＡｂ（ＮＨ２Ｃ６）．を有する非コンジュゲートオリゴヌクレオチド（前駆体）の合成。鎖の構成要素と考えられる第１のホスホラミダイトは、触媒縮合反応によって固体表面に結合する。この工程は、最終配列のヌクレオチドの長さと同じ回数繰り返される。この場合、１６回である。固相合成が完了すると、製造は以下の工程：開裂及び脱保護、精製、脱塩を含む。
【０１８０】
第２に、オレイン酸がコンジュゲートされる。最後の工程からの脱塩された非コンジュゲートオリゴヌクレオチドがオレイン酸とコンジュゲートされると、それは精製され、脱塩され、凍結乾燥される。
【０１８１】
実施例９
１．１　ＥＬＩＳＡによるＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌの定量
ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２及びＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌを使用した。１２ｍｇ／ｋｇの用量の化合物をＨＳＡ^{LR}マウスに静脈内投与した。１４日後、全てのマウスを安楽死させ、脳、腎臓、肝臓、腓腹筋及び四頭筋を取り出し、秤量し、更なる処理のために凍結した。実験は、群割当てを知らない調査者によって盲検様式で行われた。脳、筋肉（四頭筋及び腓腹筋）、腎臓及び肝臓からの試料を、全ての実験群から剖検手順中に収集した。試料は、収集時にグラム単位で最小小数点３桁まで秤量した。各片をＲＮａｓｅフリーチューブに入れ、急速凍結した（例えば、２ｍｌエッペンドルフチューブＲＮａｓｅフリー）。
【０１８２】
１．１．１　試料調製
１）組織を取り出し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。
２）吸収紙で組織を乾燥させ、秤量する（組織当たり２０ｍｇ；脳の場合、組織当たり３０ｍｇを取得する）。

３）ＰｈｏｓＳＴＯＰ ＥＡＳＹｐａｃｋ及びＣｏｍｐｌｅｔｅ ＵＬＴＲＡ Ｔａｂｌｅｔｓ，Ｍｉｎｉ，ＥＡＳＹｐａｃｋを補充したＲＩＰＡ緩衝液１００μＬ（ＲＩＰＡ緩衝液１０ｍＬ当たりそれぞれ１錠）を組織１０ｍｇごとに添加する。

４）組織が完全に均質化されるまで、２ｍｌエッペンドルフチューブ中で組織溶解器を使用して組織を２０秒間、５０００ＲＰＭで４回均質化する。

５）ホモジネートを５５℃で一晩インキュベートする。

６）ホモジネートを１５０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、上清を一定分量に分け、分析の準備ができた状態で－２０℃で保存する。

【０１８３】

筋肉溶解物には、オリゴヌクレオチド希釈緩衝液中の実際のホモジネートの１／１０を使用した。試料が定量限界を超えている場合、１：４０の希釈液を適用した。

【０１８４】

脳については１／５希釈を使用し、肝臓及び腎臓については１：４００希釈を使用した。

【０１８５】

１．１．２ 検量線のためのストック調製

検量線のためのストック調製の場合。最初に、２０μＭのＭＤ２３ｂ－２ Ｖ２ ３’Ｏｌのストックを作製した。検量線作成には１μＭ濃度を用いた。そのため、２０μＭストックを最終体積１μＭの水で希釈し、異なる一定分量で保存した。各実験について、検量線を新鮮にし、このためには、１μＭストックを毎回６５℃で１５分間加熱する必要がある。一方、組織ホモジネートを調製した後、５５μＬのホモジネートを５４４５μＬの化合物希釈緩衝液中に添加して、対照組織ホモジネートとした。

【０１８６】

１．１．３ 検量線作成

このためには、標準希釈物を調製するために対照組織ホモジネートが必要である。次いで、段階希釈液を調製するために、１μＭの所望の化合物を６５℃で１５分間変性させ、少なくとも３０秒間ボルテックスした。次いで、この変性化合物３２μＬを対照ホモジネート９６８μＬに希釈した。これが検量線の最初の点（３２０００ｐＭ）である。次いで、次の点のために、５００μＬの３２０００ｐＭを５００μＬの化合物希釈緩衝液（１６０００ｐＭ）で希釈した。この同様の様式により、８０００ｐＭ、４０００ｐＭ、２０００ｐＭ及び１０００ｐＭを作製した。

表９：ＥＬＩＳＡ設計

【表９】

表9:ELISA設計

スパイキング溶液	スパイキング溶液の体積 (μL)	希釈緩衝液の体積 (μL)	濃度	標準
ストック	32	968	32000 pM	STD 1
STD 1	500 μL	500 μL	16000 pM	STD 2
STD 2	500 μL	500 μL	8000 pM	STD 3
STD 3	500 μL	500 μL	4000 pM	STD 4
STD 4	500 μL	500 μL	2000 pM	STD 5
STD 5	500 μL	500 μL	1000 pM	STD 6
-	-	500 μL	-	ブランク

【０１８７】

１．１．４ ＱＣ

各実行で３回ずつの３つのＱＣレベル（Ｌ、Ｍ、Ｈ）

合否判定基準：

・ＱＣの≧６７％は、公称（理論）値の±３０％であるべきである。

【０１８８】

１．１．５　ＥＬＩＳＡプロトコル

－プローブｍｉＲ－２３ｂのＴｂｓＣｓＡｓＣｂｓＡｓＴｓＴｂｓＧｓＣｓＣｂｓＡｓＧｓＧｂｓＧｓＡｓＴｂ－ジゴキシゲニンＮＨＳエステル（ストックは水中で１００μＭであり、水中でこのストックのために１ｕＭを調製する）を６５℃で１５分間加熱し、３０秒間ボルテックスする必要がある。

－実験を開始する前に、試料ホモジネート及びオリゴヌクレオチド段階希釈を調製する。

－プローブ（１μＭ）を０．５ｎＭの濃度でハイブリダイゼーション緩衝液中で希釈する。

－所望の化合物の各希釈物７０μＬを三連で添加し、試料ホモジネートの場合、それらを二連で添加する。次いで、７０μＬのプローブを０．５ｎＭ濃度で添加する。

－プレートをＰＣＲフィルムで密封し、３７℃で３０分間インキュベートする（プローブと化合物とのハイブリダイゼーションのための重要な工程！）－この工程まで、通常の透明な９６ウェルプレートで行うことができる。

－次いで、ハイブリダイズした溶液１００μＬを黒色ニュートラアビジンコーティングプレートに直ちに移す。

－次いで、プレートをＰＣＲフィルムで再び密封し、３７℃で３０分間インキュベートする（ビオチンをアビジンコーティングプレートと結合させるための重要な工程）。

－インキュベーション工程中に、ミクロコッカスヌクレアーゼ希釈緩衝液（１．６μＬのヌクレアーゼ＋１６ｍｌの緩衝液）中でミクロコッカスヌクレアーゼを調製する。この計算は、プレート全体について行われる。

－最初に液体を取り出し、プレートを１００μＬの洗浄緩衝液で６回洗浄し、次いで、プレートを逆さにしておき、吸収紙を使用してプレートを乾燥させ、ウェル当たり１５０μＬのミクロコッカスヌクレアーゼを添加する（最終量は３０Ｕ／ウェル）。

－ミクロコッカスヌクレアーゼを添加した後、プレートをＰＣＲフィルムで密封し、プレートを３７℃で１時間インキュベートする（この工程は、一本鎖プローブの少なくとも９９％を切断するのに十分である）。

－０．２５％のＴｗｅｅｎ２０及び抗体（抗ジゴキシゲニン抗体、Ｒｏｃｈｅ＃１１０９３２７４９１０）を含むＴＢＳ緩衝液を調製し、それらを十分にボルテックスし、それらをＲＴに残す。必要としない残りの量については、小分けにして冷凍庫に保管することができる。

－最初に液体を取り出し、次いでプレートを１００μＬの洗浄緩衝液で６回洗浄し、プレートを乾燥させ、ＴＢＳ緩衝液（０．２５％ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ２０を含む）中の１／５，０００希釈で１５０μＬの抗ジゴキシゲニン抗体（アルカリホスファターゼとコンジュゲートした）を添加する。

－プレートをＰＣＲフィルムで密封し、３７℃で３０分間インキュベートする。

－Ａｔｔｏｐｈｏｓ基質を調製するために、Ａｔｔｏｐｈｏｓ緩衝液６０ｍｌを添加することによって３６ｍｇの粉末（ボトルに入っていたもの）を希釈し、光から保護された冷蔵庫内に保管する（好ましくはアルミニウム箔で包む）。

－液体を取り出し、プレートを１００μＬの洗浄緩衝液で６回洗浄し、プレートを乾燥させ、１５０μＬのＡｔｔｏｐｈｏｓ基質（Ａｔｔｏｐｈｏｓ緩衝液で１：１の比率に希釈）を添加する。

－プレートをＰＣＲフィルムで密封し、次いでアルミニウム箔で包み、室温（ＲＴ）で４０分間インキュベートする。次いで、蛍光強度を決定するために、Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｈ１（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用した。４４４ｎｍの励起及び５５５ｎｍの発光を使用した。ウェル当たり１秒の遅延で６０、７０、８０、及び９０分で連続読み取りを行う。

表１０：脳、腓腹筋、四頭筋、腎臓及び肝臓におけるＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ及びＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２の平均値（ｎｇ／ｇ）。

【表１０】

表10:脳、腓腹筋、四頭筋、腎臓及び肝臓におけるMD23b-2 V2 3’OI及び MD23b-2 V2の平均値(ng/g)。

試験項目	処置時間(日)	用量(mg/kg)	組織	化合物(ng/g)
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	脳	289,9
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	腓腹筋	25657,9
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	四頭筋	15827,7
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	腎臓	74971,6
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	肝臓	183881,1
MD23b-2 V2	14	12	脳	0,0
MD23b-2 V2	14	12	腓腹筋	2705,2
MD23b-2 V2	14	12	四頭筋	1790,2
MD23b-2 V2	14	12	腎臓	18840,3
MD23b-2 V2	14	12	肝臓	39570,1

【表１１】

表11:送達効率MD23b-2 V2 3’OI対MD23b-2 V2の倍数変化

試験項目	処置時間(日)	用量 (mg/kg)	組織	MD23B-2 V2 3’OL対MD23b-2 V2送達有効性の倍数変化*
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	脳	290
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	腓腹筋	9,5
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	四頭筋	8,8
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	腎臓	4,0
MD23b-2 V2 3’OI	14	12	肝臓	4,6

＊化合物ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２の量に対する倍数変化を計算した。

【０１８９】

結果及び図１１

本発明者等は、投与の１４日後に筋肉（腓腹筋及び四頭筋）並びに肝臓及び腎臓における両化合物の存在を観察した。全ての組織において、対照群は定量限界未満であった。一方、化合物ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌは、脳に到達することができる唯一の化合物である。組織送達に関して、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ化合物は、腓腹筋、四頭筋、肝臓、腎臓、及び脳を含む全ての組織に、より効率的に到達することができるため、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２よりも優れている。本発明者等は、全ての組織においてより多量のＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌを検出したが、腓腹筋及び四頭筋へのその送達は、ＭＤ２３ｂ－２Ｖ２と比較してそれぞれ９．５倍及び８．８倍高い。対照的に、腎臓及び肝臓への送達は、それぞれわずか４倍及び４．５倍であり、疾患の関連性の低い組織と比較して筋肉への

送達が増強されていることを示している。ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌは脳に到達するが、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２は脳に到達せず、これは、オレイン酸とのコンジュゲーションがこの組織への到達に有利であることを示している。これにより、本発明者等は、オレイン酸が本発明者等の化合物の送達を改善し、とりわけ、病理に関与する筋肉及び脳等の組織への送達を改善すると結論付ける。

【０１９０】

実施例１０：非ヒト一次脳におけるＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ及びＭＢＮＬ１タンパク質レベルの決定

この研究の目的は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を使用して、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌで処置した動物の脳の曝露の決定であった。更に、処置動物の脳への標的関与を、非ヒト霊長類の脳からのＭｕｓｃｌｅｂｌｉｎｄ様１型（ＭＢＮＬ１）タンパク質レベルの定量化によって測定した。

【０１９１】

１．実験設計

１．１　実験群及び投薬

これらの目的のために、およそ２４ヶ月～５０ヶ月の合計８匹のカニクイザル（雄４匹及び雌４匹）を３つの群実験群に分配し、第１相（最大耐量（ＭＴＤ）群割当て）及び第２相（固定用量（ＦＤ）群割当て）に更に割り当てた。第１相（最大耐量［ＭＴＤ］相）の間に、アジア起源の１匹の雄及び１匹の雌のカニクイザルを第１群に割り当て、漸増用量設計で５ｍＬ／ｋｇの用量体積でＭＴＤ相の第１、１５、２９、及び４３日目に、５、１０、１５、及び２０ｍｇ／ｋｇで、非絶食条件下で単回用量のＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌを静脈内投与した（ゆっくりボーラス［１０分］）。

【０１９２】

ＭＴＤ相の終了後、アジア起源の３匹の雄及び３匹の雌のカニクイザルを相２の群２及び３に割り当て（固定用量相）、相２の第１及び２２日目に、非絶食条件下で、５ｍＬ／ｋｇの用量体積でビヒクル（リン酸緩衝液［ＰＢＳ、ｐＨ：７．４］）又は２０ｍｇ／ｋｇＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌを静脈内投与した（ゆっくりボーラス［１０分］）。

【０１９３】

殺日に、剖検手順中に脳から試料を採取した。

【０１９４】

群割当て及び用量レベル

表１２：相１：最大耐量（ＭＴＤ）群割当て

【表１２】

表12:相1:最大耐量(MTD)群割当て

群の番号	群の説明	投与日数	用量レベル (mg/kg)	用量体積[a] (mL/kg)	動物/群		剖検
					雄	雌	57日目
1	低	1	5.0	5	1	1	1M/1F
	中央	15	10	5			
	中間	29	15	5			
	高	43	20	5			
a 直近の個々の体重に基づく							

【表１３】

表13:相2:固定用量(FD)群割当て

群の番号	群の説明	用量レベル (mg/kg)	用量体積[a] (mL/kg)	動物/群		剖検
				雄	雌	43日目
2	対照	0	5	1	1	1M/1F
3	高	20	5	2	2	2M/2F
a 直近の個々の体重に基づく						

【０１９５】

２．実験データ

２．１　実験手順

２．１．１　試料採取

ＥＬＩＳＡ定量、ＭＢＮＬ１調査及び潜在的なオフターゲットの決定のために、群１～３の全ての動物の脳を採取した。動物に対する第１相からの最後の投与の２週間後及び動物に対する第２相からの治療期間の終了の３週間後。各片を別々のＲＮａｓｅフリーエッペンドルフチューブに入れ、液体窒素で凍結し、（－８０±１０℃）で保存した。合計８つの脳試料を生成した。

【０１９６】

２．１．２　ＥＬＩＳＡ定量

２．１．２．１　試料調製

１）組織を取り出し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。

２）吸収紙で組織を乾燥させ、それらを秤量する（組織当たり２０ｍｇ）。

３）ＰｈｏｓＳＴＯＰ　ＥＡＳＹｐａｃｋ及びＣｏｍｐｌｅｔｅ　ＵＬＴＲＡ　Ｔａｂｌｅｔｓ，Ｍｉｎｉ，ＥＡＳＹｐａｃｋを補充したＲＩＰＡ緩衝液１００μＬ（ＲＩＰＡ緩衝液１０ｍＬ当たりそれぞれ１錠）を組織１０ｍｇごとに添加する。

４）組織が完全に均質化されるまで、２ｍｌエッペンドルフチューブ中で組織溶解器を使用して組織を２０秒間、５０００ＲＰＭで４回均質化する。

５）ホモジネートを５５℃で一晩インキュベートする。

６）ホモジネートを１５０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、上清を一定分量に分け、分析の準備ができた状態で－２０℃で保存する。

【０１９７】

脳溶解物には、実際のホモジネートの１／５希釈物（８０μＬ＋３２０μＬのオリゴヌクレオチド希釈緩衝液）を使用した。

【０１９８】

２．１．２．２検量線のストック調製

検量線のためのストック調製の場合。最初に、２０μＭのＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌのストックを作製する。これを－２０℃でより長期間保存することができる。この２０μＭストックから、必要に応じていくつかの希釈を行うことができる。検量線の調製には、１μＭが必要である。そのため、２０μＭストックを最終体積１μＭの水で希釈し、異なる一定分量で保存した。各実験について、検量線を新鮮にする必要があり、そのためには、１μＭストックを毎回６５℃で１５分間加熱する必要がある。一方、組織ホモジネートを調製した後、５５μＬを５４４５化合物希釈緩衝液に添加して、対照組織ホモジネートを得る。

【０１９９】

２．１．２．３　検量線の作成

このためには、標準希釈物を調製するために対照組織ホモジネートが必要である。次いで、段階希釈を調製するために、最初に１μＭの所望の化合物を取り、６５℃で１５分間変性させ、少なくとも３０秒間ボルテックスする。次いで、この変性化合物１６μＬを取

り、対照ホモジネート９８４μＬに希釈する。これが検量線の最初の点（１６０００ｐＭ）である。次いで、次の点について、５００μＬの１６０００ｐＭを取り、５００μＬのＰＭＯ希釈緩衝液（８０００ｐＭ）で希釈する。この同様の様式により、４０００ｐＭ、２０００ｐＭ、１０００ｐＭ及び５００ｐＭが作製される

【表１４】

表14:

スパイキング溶液	スパイキング溶液の体積（μＬ）	希釈緩衝液の体積 (μL)	濃度	標準
ストック	16	984	16000 pM	STD 1
STD 1	500 μL	500 μL	8000 pM	STD 2
STD 2	500 μL	500 μL	4000 pM	STD 3
STD 3	500 μL	500 μL	2000 pM	STD 4
STD 4	500 μL	500 μL	1000 pM	STD 5
STD 5	500 μL	500 μL	500 pM	STD 6
-	-	500 μL	-	ブランク

【０２００】

２．１．２．４　ＱＣ

各実行で３回ずつの３つのＱＣレベル（Ｌ、Ｍ、Ｈ）。合否判定基準：

・ＱＣの≧６７％は公称（理論）値の±２０％であるべきであり、レベル当たりのＱＣの≧５０％はそれらの公称濃度の±２０％であるべきである。

【０２０１】

２．１．２．５　ＥＬＩＳＡプロトコル

－プローブｍｉＲ－２３ｂのＴｂｓＣｓＡｓＣｂｓＡｓＴｓＴｂｓＧｓＣｓＣｂｓＡｓＧｓＧｂｓＧｓＡｓＴｂ－ジゴキシゲニンＮＨＳエステル（ストックは水中で１００μＭであり、水中でこのストックのために１ｕＭを調製する）を６５℃で１５分間加熱し、３０秒間ボルテックスする必要がある。

－実験を開始する前に、試料ホモジネート及びオリゴヌクレオチド段階希釈を調製する

－プローブ（１ｕＭ）を０．５ｎＭの濃度でハイブリダイゼーション緩衝液中で希釈する

－所望の化合物の各希釈物７０μＬを三連で添加し、試料ホモジネートの場合、それらを二連で添加する。次いで、７０μＬのプローブを０．５ｎＭ濃度で添加する。

－プレートをＰＣＲフィルムで密封し、３７℃で３０分間インキュベートする（プローブと化合物とのハイブリダイゼーションのための重要な工程！）－この工程まで、通常の透明な９６ウェルプレートで行うことができる

－次いで、ハイブリダイズした溶液１００μＬを黒色ニュートラアビジンコーティングプレートに直ちに移す

－次いで、プレートをＰＣＲフィルムで再び密封し、３７℃で３０分間インキュベートする（ビオチンをアビジンコーティングプレートと結合させるための重要な工程！）

－インキュベーション工程中に、ミクロコッカスヌクレアーゼ希釈緩衝液（１．６μＬのヌクレアーゼ＋１６ｍｌの緩衝液）中でミクロコッカスヌクレアーゼを調製する。この計算は、プレート全体について行われる。

－最初に液体を取り出し、プレートを１００μＬの洗浄緩衝液で６回洗浄し、次いで、プレートを逆さにしておき、吸収紙を使用してプレートを乾燥させ、ウェル当たり１５０μＬのミクロコッカスヌクレアーゼを添加する（最終量は３０Ｕ／ウェル）

－ミクロコッカスヌクレアーゼを添加した後、プレートをＰＣＲフィルムで密封し、プレートを３７℃で１時間インキュベートする（この工程は、一本鎖プローブの少なくとも９９％を切断するのに十分である）

－０．２５％Ｔｗｅｅｎ２０及び抗体を含むＴＢＳ緩衝液を調製し、それらを十分にボルテックスし、それらをＲＴに放置する。必要のない残りの量については、それらを一定分量で冷凍庫に保存することができる。

－最初に液体を取り出し、次いでプレートを１００μＬの洗浄緩衝液で６回洗浄し、プレートを乾燥させ、ＴＢＳ緩衝液（０．２５％ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ２０を含む）中の１／５，０００希釈で１５０μＬの抗ジゴキシゲニン抗体（アルカリホスファターゼとコンジュゲートした）を添加する。

－プレートをＰＣＲフィルムで密封し、３７℃で３０分間インキュベートする。

－Ａｔｔｏｐｈｏｓ基質を調製するために、Ａｔｔｏｐｈｏｓ緩衝液６０ｍｌを添加することによって３６ｍｇの粉末（ボトルに入っていたもの）を希釈し、光から保護された冷蔵庫内にそれらを保管する（好ましくはアルミニウム箔で包む）。

－液体を取り出し、プレートを１００μＬの洗浄緩衝液で６回洗浄し、プレートを乾燥させ、１５０ｕｌのＡｔｔｏｐｈｏｓ基質（Ａｔｔｏｐｈｏｓ緩衝液で１：１の比率に希釈）を添加する。

－プレートをＰＣＲフィルムで密封し、次いでアルミニウム箔で包み、室温（ＲＴ）で４０分間インキュベートする。次いで、蛍光強度を決定するために、Ｓｙｎｅｒｇｙ Ｈ１（Ｂｉｏｔｅｋ）を使用した。４４４ｎｍの励起及び５５５ｎｍの発光を使用した。ウェル当たり１秒の遅延で４０、５０、６０、７０、８０、及び９０分で連続読み取りを行う。

【０２０２】

２．１．２．６ ＥＬＩＳＡアッセイの許容基準

分析方法の精度は、分析の真値（濃度）に対する方法によって得られた平均試験結果の近さを表す。精度は、測定の相対誤差（ＲＥ％）によって推定される。両方のＥＬＩＳＡアッセイについての参照対照の真値は、計算のみに基づく理論濃度に対応しなかった。したがって、対照の公称濃度は、全ての分析バッチからの各濃度レベルの全ての参照のプールの平均として計算される。

【数２】

$$RE(\%) = \frac{(\text{計算された平均濃度} - \text{理論上の濃度})}{\text{理論上の濃度}} * 100$$

【０２０３】

分析方法の精度は、手順が単一の均一な体積の生物学的マトリックスの複数の一定分量に繰り返し適用される場合の分析物の個々の測定値の近さを表す。精度は変動係数（ＣＶ％）によって推定される。

【数３】

$$CV(\%) = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均}} * 100$$

【表１５】
表15:

許容可能な基準	
検量線	$R^2 \geq 0.95$ 非ゼロ標準は、標準物質が 各検証実行において公称濃度の ±30%であるべきLLOQ及びULOQを 除いて、公称(理論上)濃度の±25% であるべきである。 ・75%及び5つの非ゼロ標準レベル の最小は、各定量実行において 上記の基準を満たすべきである。
定量の下限	500 pM
参照レベルのCV	3つのQCレベルの少なくとも 2つにおけるCV≦30%
試料のCV	CV ≤30%
各レベルにおける回復率(RE)	3つのQCレベルの少なくとも 2つにおける70～130%

【０２０４】
２．１．３　ＭＢＮＬの決定
２．１．３．１　タンパク質抽出
ＮＨＰ脳試料をＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ　ＩＩ（ＱＩＡＧＥＮ）で機械的に脱凝集し、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号１１８７３５８００１及び４９０６８４５００１）を補充したＲＩＰＡ緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号８９９００号）中でホモジナイズした。総タンパク質を、標準としてウシ血清アルブミンを使用してＰｉｅｒｃｅ（商標）ＢＣＡタンパク質アッセイキット（カタログ番号２３２２５）を用いて定量した。
【０２０５】
２．１．３．２　ウエスタンブロット：
ＭＢＮＬ１及びＧＡＰＤＨ（正規化のための内部対照）タンパク質の免疫検出のために、各動物試料について１５μｇの総タンパク質を１００℃で５分間の熱処理によって変性させ、１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で電気泳動によって分離し、続いて０．４５μｍニトロセルロースメンブラン（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に転写した。
【０２０６】
ＰＢＳ－Ｔ（８ｍＭ　Ｎａ２ＨＰＯ４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＫＨ２ＰＯ４、３ｍＭ　ＫＣｌ、１％Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ７．４）中５％スキムミルクを使用して膜を１時間ブロッキングした。ブロッキング後、膜を一次抗ＭＢＮＬ１マウス抗体（１：２００、ＭＢ１ａ（４Ａ８）（ＤＳＨＢ，ＩｏｗａＣｉｔｙ，Ｉｏｗａ））と４℃で一晩イン

キュベートした。一次抗体とのインキュベーションに続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲート化された抗マウス二次抗体（１：３５００、（ＨＲＰ）－コンジュゲート抗マウスＩｇＧ二次抗体、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓａｉｎｔ　Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）とのインキュベーションを室温で１時間行った。最後に、増強された化学発光基質（ＥＣＬ，Ｐｉｅｒｃｅ）を用いて可視化を行い、ＩｍａｇｅＱｕａｎｔ８００　Ａｍｅｒｓｈａｍ装置（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて画像を取得した。

【０２０７】

ＭＢＮＬ１に対応する免疫反応性バンドを検出した後、膜を除去してこれまでに使用した抗体を除去し、正規化剤として使用したＧＡＰＤＨタンパク質に対応するバンドを検出した。この検出は、ブロッキング後にＨＲＰ（１：３５００、クローンＧ－９、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）とコンジュゲートした抗ＧＡＰＤＨ抗体を用いて行った（上記のように行った）。ＨＲＰコンジュゲート抗ＧＡＰＤＨ抗体の場合、インキュベーション時間は１時間続き、室温で行った。分析は２連で行った。

【０２０８】

２．１．３．３　定量：

全ての画像を、分析ソフトウェアＩｍａｇｅＪを使用して定量化した。ＭＢＮＬ１タンパク質の量についての結果を、全ての試料についてＧＡＰＤＨに対して最初に正規化し、この比を未処置動物の平均比（相対タンパク質レベル）に対して正規化した。

【０２０９】

３．結果

３．１　ＮＨＰ脳からのＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌの決定。

表１６：最後の処置の１４日後（群１）及び２１日後（群２及び３）のカニクイザル脳におけるＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌ（ｎＭ、ｎｇ／ｍｇ、ｎｇ／ｇ）の濃度

【表１６】

表16:最後の処置の14日後(群1)及び21日後(群2及び3)のカニクイザル脳における MD23b-2 V2 3’Ol(nM、ng/mg、ng/g)の濃度

組織	群割当て	用量レベル	濃度ng/g
脳	相Ⅰ(MTD)	5, 10, 15, 20 mg/kg	2917.70
脳	相Ⅱ(FD)	対照	BLQ
脳	相Ⅱ(FD)	20 mg/kg	740.50

【０２１０】

ＥＬＩＳＡによるＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌの決定のために、８匹の動物からの８つの試料を１回の分析実行で１つのプレートに分析した。全ての試料を３連で測定した。分析実行は合格基準を満たした。

【０２１１】

第Ｉ相及び第ＩＩ相からの全ての処置動物は、分析中にいくつかのレベルの試験項目を示した。対照群の動物は、脳内に定量可能なレベルのＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌを有していなかった。

【０２１２】

固定用量中に２０ｍｇ／ｋｇで処置した全ての動物は、試験した全ての脳において試験項目のレベルを示した。ＭＴＤ由来の動物に関して、雄（Ｐ０００１）は定量限界を超えるレベルを示した。

【０２１３】

３．２　ＭＢＮＬ１相対レベル

表１７：ＭＢＮＬ１相対レベル。平均値第Ｉ相及び第ＩＩ相。

【表１７】

表17:MBNL1相対レベル。平均値第I相及び第II相。

組織	群割当て	用量レベル	相対的MBNL1 タンパク質レベル	SD
脳	相Ⅰ(MTD)	5, 10, 15, 20 mg/kg	1.796	0.238
脳	相Ⅱ(FD)	対照	1.000	0.231
脳	相Ⅱ(FD)	20 mg/kg	2.139	0.328

【０２１４】

群１からのＭＢＮＬ１タンパク質レベルを、最後の投与の２週間後に収集した試料において定量した。結果は、未処置動物由来の試料と比較して、試験した脳においてより高いＭＢＮＬ１タンパク質レベルを示した（表１８、図１２）。脳内のタンパク質レベルは、対照群よりも２倍高かった。試験項目は、未処置動物と比較した場合にＭＢＮＬタンパク質の増加をもたらした脳における薬理学的効果を生じ、増加は投与の２週間後及び３週間後に依然として存在した。結果は、雄及び雌で同様であった。

【０２１５】

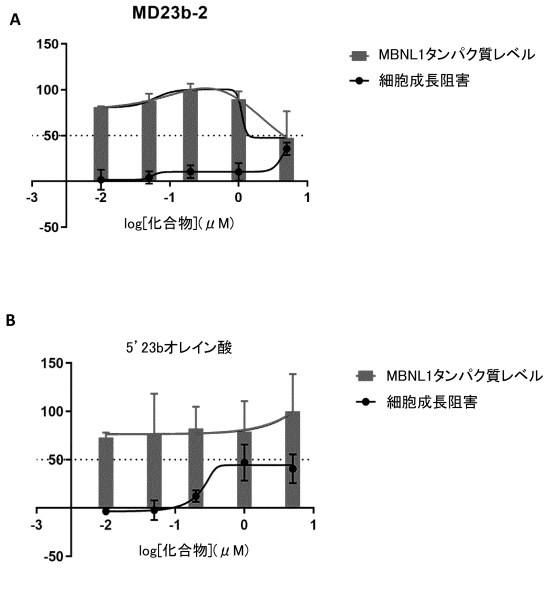
４．考察及び結論

ＥＬＩＳＡによる定量化の結果は、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌの最後の静脈内投与の２週間後及び３週間後に、処置群（群１及び３）が脳内で定量可能なレベルのＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌを有することを示した。更に、処置動物は、最後の投与の２週間後及び３週間後に、未処置動物と比較して脳内のより高いＭＢＮＬ１タンパク質レベルを有する。これらの結果は、ＭＤ２３ｂ－２　Ｖ２　３’Ｏｌで処置した動物の脳における試験項目の存在及び活性の証拠を示した。

【図面】

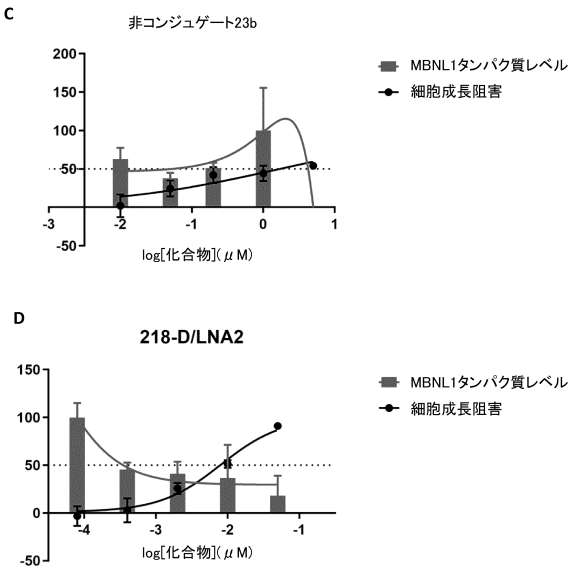
【図１－１】

図1



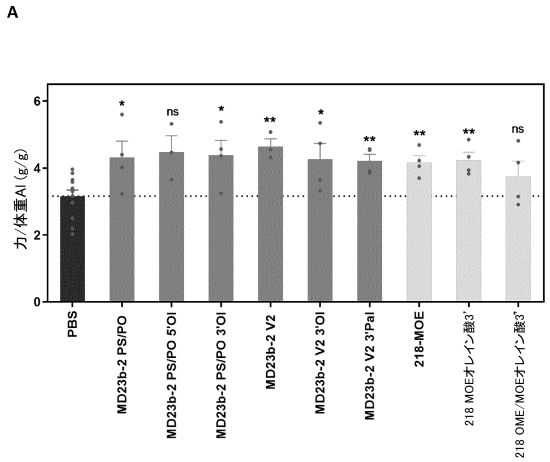
【図１－２】

図1(続き)



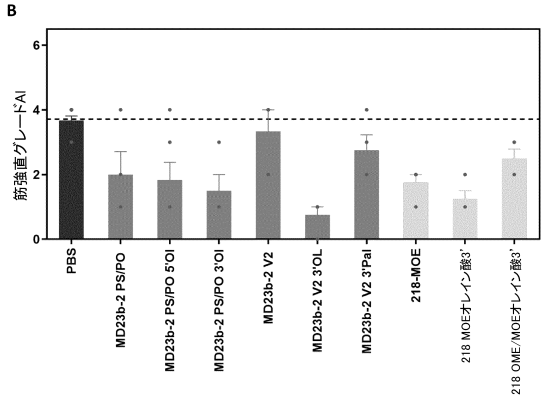
【図２－１】

図2



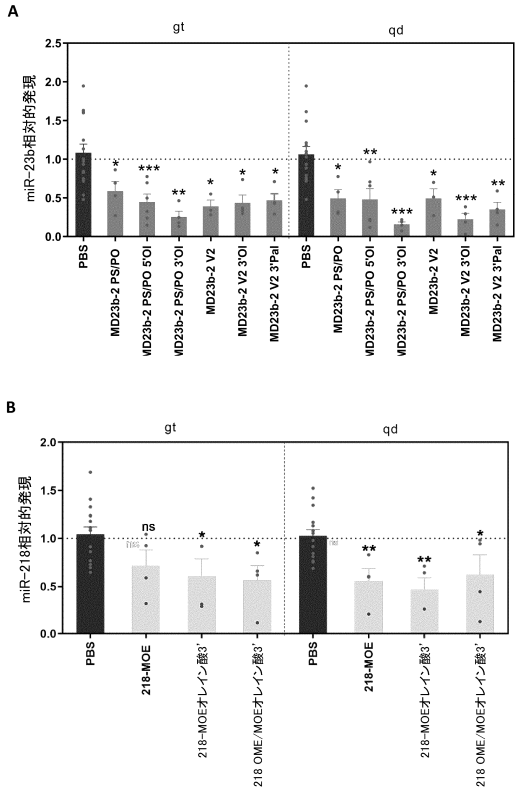
【図２－２】

図2(続き)



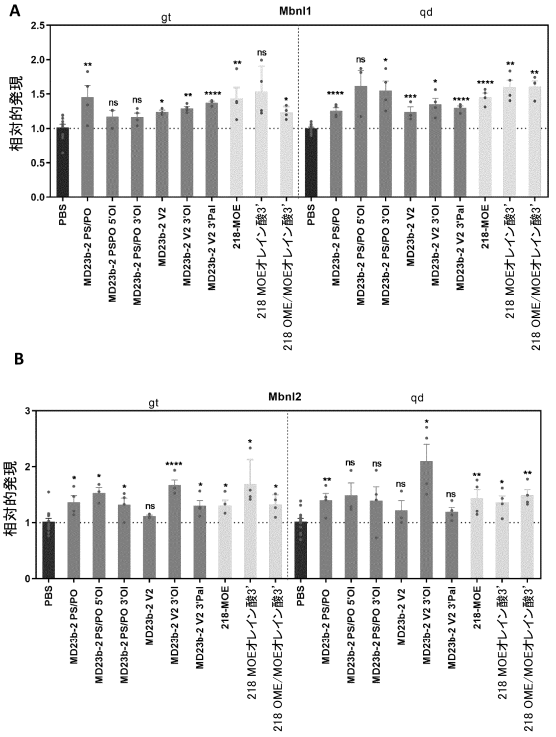
【図３】

図3



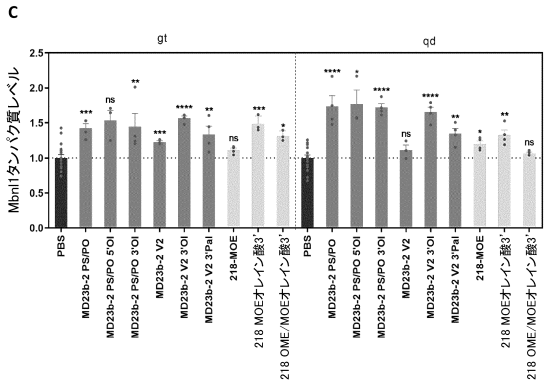
【図４－１】

図4



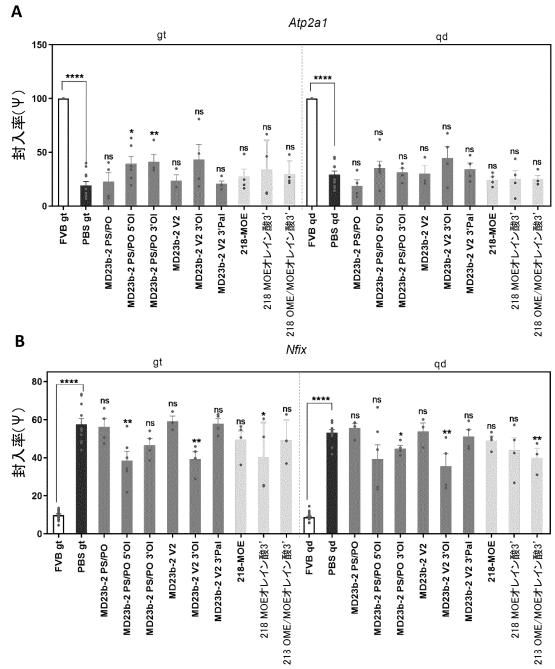
【図４－２】

図4(続き)



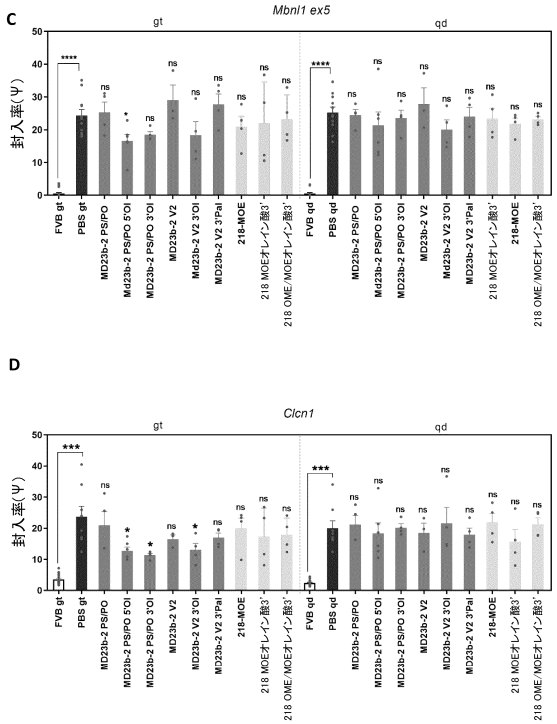
【図５－１】

図5



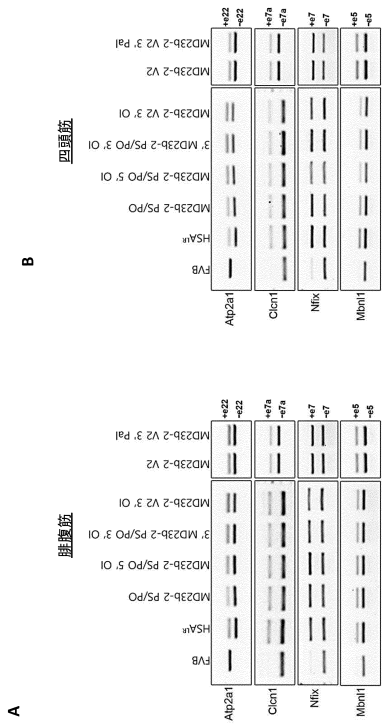
【図５－２】

図5(続き)



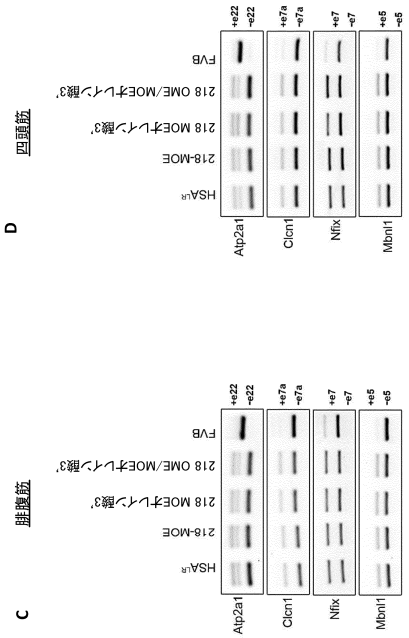
【図６－１】

図6



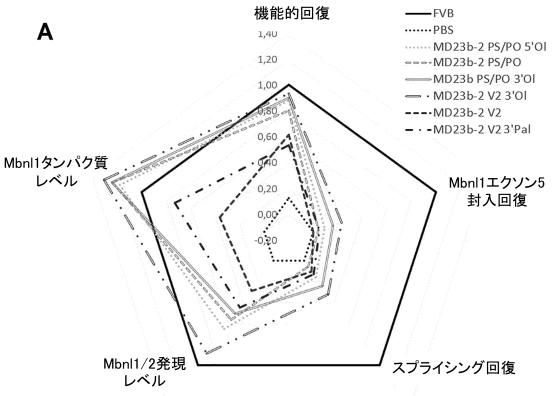
【図６－２】

図6(続き)



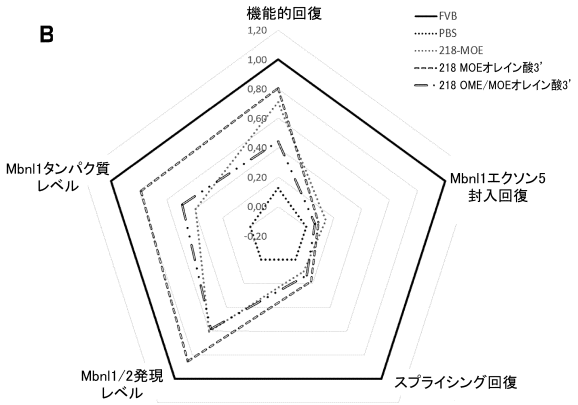
【図７－１】

図7



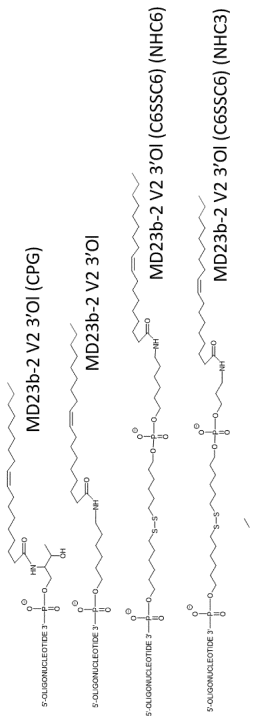
【図７－２】

図7（続き）



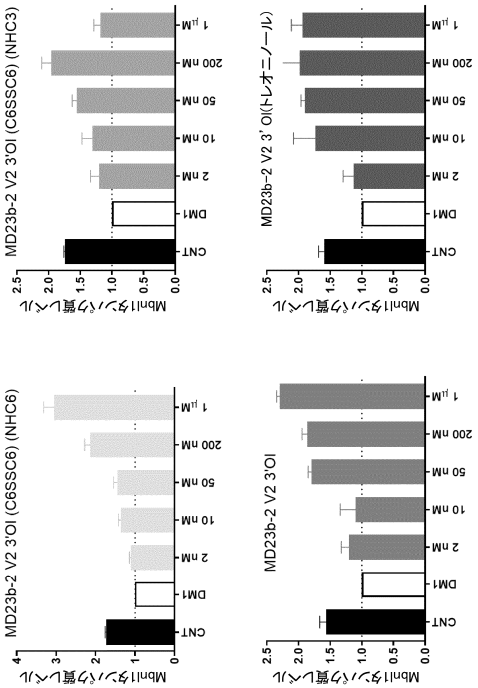
【図８】

図8



【図９】

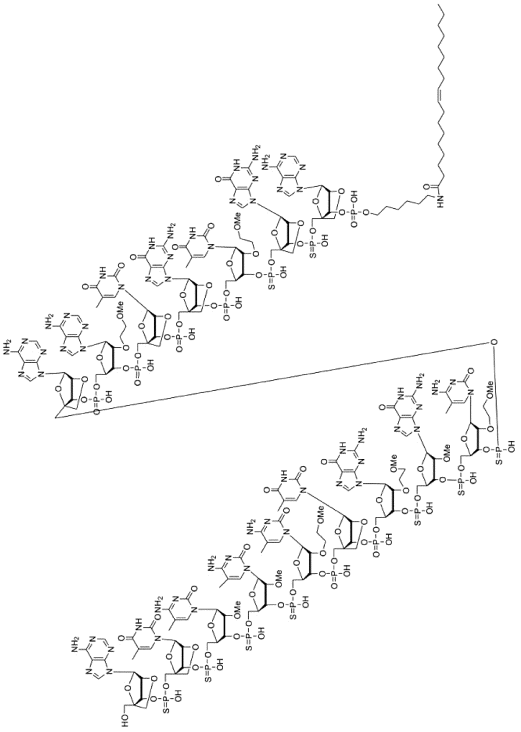
図9



【図１０－１】

図10

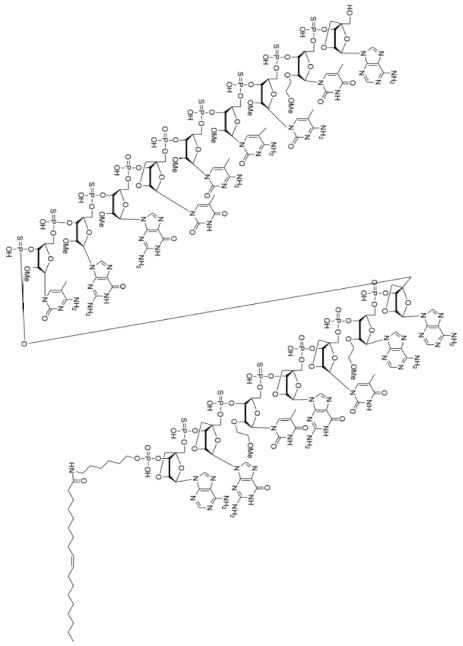
a)



【図１０－２】

図10（続き）

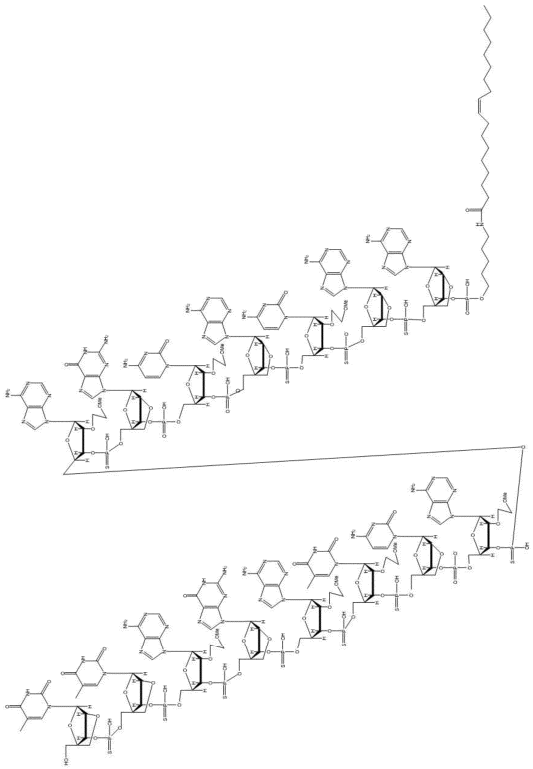
b)



【図１０－３】

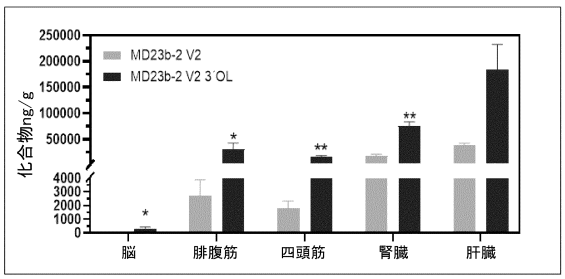
図10（続き）

c)



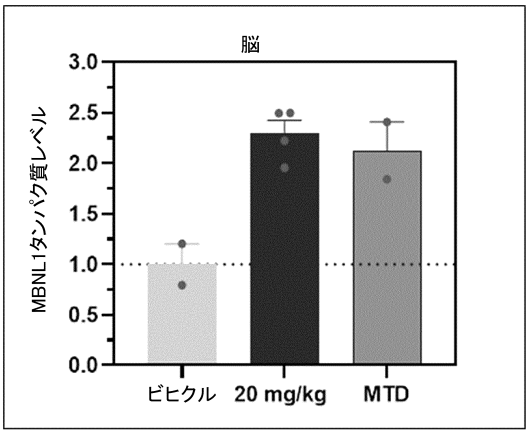
【図１１】

図11



【図１２】

図12



【配列表】
0007663873000001.xml

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI	
A61K	*31/7125(2006.01)*	A61K	31/7125
A61K	*47/54 (2017.01)*	A61K	47/54
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	48/00

(72)発明者 アルテロ アジェプス ルーベン
スペイン国 ４６０１０ バレンシア アベニダ ブラスコ イバニェス １３ ウニベルシタ デ バレンシア
(72)発明者 モレノ セルベラ ネレア
スペイン国 ４６０１０ バレンシア アベニダ ブラスコ イバニェス １３ ウニベルシタ デ バレンシア
(72)発明者 ゴンザレス マルティネス イレネ
スペイン国 ４６０１０ バレンシア アベニダ ブラスコ イバニェス １３ ウニベルシタ デ バレンシア
(72)発明者 セロ エレロス エステファニア
スペイン国 ４６０１０ バレンシア アベニダ ブラスコ イバニェス １３ ウニベルシタ デ バレンシア
(72)発明者 マーカッソン エリック ジー.
アメリカ合衆国 ９４１０７ カリフォルニア サンフランシスコ ブラナン ストリート ２３９ ナンバー８ジェイ
(72)発明者 ジャムシ トロイシ マリア ベアトリス
スペイン国 ４６９８０ パテルナ セ／カテドラティコ アウグスティン エスカルディノ ９ アルテックス バイオテック エセ．エレ．

審査官 中村 勇介

(56)参考文献 国際公開第２０２１／１３３９４１（WO，Ａ１）
特表２０１９－５３１０９２（ＪＰ，Ａ）
Sarah L. DeVos and Timothy M.Miller，Antisense Oligonucleotides: Treating Neurodegeneration at the Level of RNA，Neurotherapeutics，2013年，Volume 10, Issue 3，p.486-497

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ１５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＰｕｂＭｅｄ