

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年5月23日(23.05.2024)



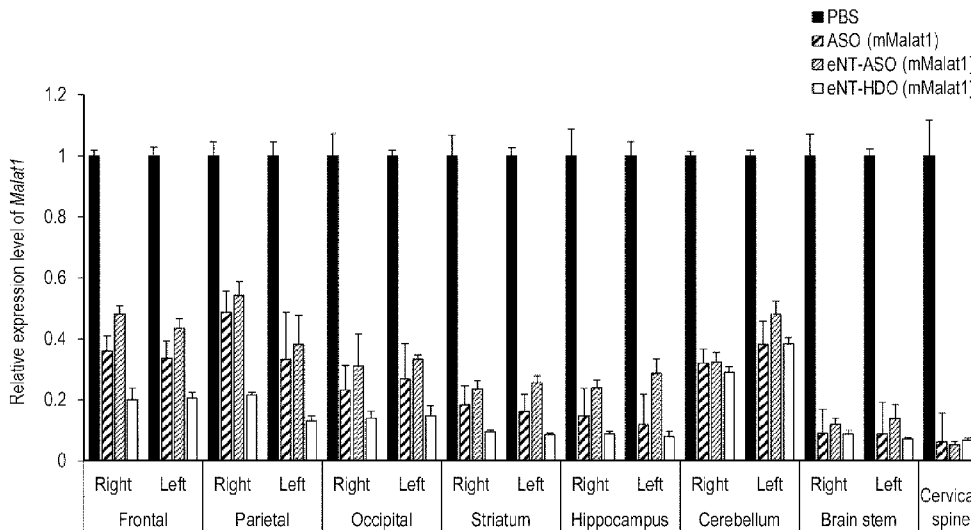
(10) 国際公開番号
WO 2024/106545 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01) A61K 47/64 (2017.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01) C12N 15/113 (2010.01)
A61K 47/61 (2017.01)
- (71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 横田 隆徳 (YOKOTA Takanori); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 永田 哲也(NAGATA Tetsuya); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/041677
- (22) 国際出願日: 2023年11月20日(20.11.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-184714 2022年11月18日(18.11.2022) JP

(54) Title: HETERO-DUPLEX OLIGONUCLEOTIDE FOR INTRATHECAL ADMINISTRATION

(54) 発明の名称: 髄腔内投与のためのヘテロ核酸

[図7]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel double-stranded oligonucleotide complex capable of generating an excellent antisense effect in the central nervous system when intrathecally administered. Provided is a composition for intrathecal administration that comprises a double-stranded oligonucleotide complex containing a first oligonucleotide strand and a second oligonucleotide strand, wherein: the first oligonucleotide strand is hybridizable to at least a part of a target gene or a transcript thereof and can induce steric blocking, exon skipping and/or exon inclusion



WO 2024/106545 A1

港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ
MOR I タワー3 2階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

in the central nervous system for the target gene or a transcript thereof; and the second oligonucleotide strand is bound to at least one target binding molecule that contains a complementary base sequence to the first oligonucleotide strand and is capable of binding to a target molecule expressed on the cell surface in the central nervous system, the target binding molecule being a ligand molecule, an antibody or a fragment thereof, or an oligonucleotide aptamer.

(57) 要約: 髄腔内投与により中枢神経系で優れたアンチセンス効果を生じ得る新たな二本鎖核酸複合体を提供することを課題とする。第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む二本鎖核酸複合体を含む、髄腔内投与用の組成物であって、前記第1核酸鎖は、目的の遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、前記目的の遺伝子又はその転写産物に対して中枢神経系においてステリックブロッキング、エクソンスキッピング、及び/又はエクソンインクルージョンを誘導することができ、前記第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ中枢神経系において細胞表面に発現する標的分子に結合することが可能な少なくとも1個の標的結合分子と結合しており、前記標的結合分子が、リガンド分子、抗体若しくはその断片、又は核酸アプタマーである、前記組成物を提供する。

明 細 書

発明の名称： 髄腔内投与のためのヘテロ核酸

技術分野

[0001] 本発明は、髄腔内投与用の二本鎖核酸複合体及び組成物等に関する。

背景技術

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

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

[0004] さらに本発明者らは、二本鎖核酸複合体の薬剤送達を制御するために、相補鎖の末端にコレステロール等の脂質リガンドを結合させた二本鎖核酸複合体を開発した(特許文献3)。この二本鎖核酸複合体は、血液脳関門を通過する優れた性質を示し、静脈内投与によって中枢神経系に効率的に送達される。それ故、中枢神経系において優れたアンチセンス効果を提供することができる。

[0005] 一方、髄腔内投与では、リガンド結合型による有利な効果は見出されていない。例えば、特許文献4の比較例1及び図9では、脂質リガンドを結合した

二本鎖核酸複合体を脳室内投与した結果、中枢神経系でのアンチセンス効果がむしろ低下する傾向を示したことが開示されている。それ故、髄腔内投与では、静脈内投与とは異なり、リガンド結合型が有利であるとは考えられていない。

したがって、髄腔内投与により中枢神経系で優れたアンチセンス効果を生じ得る新たな二本鎖核酸複合体が必要とされている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開第2013/089283号
- 特許文献2：国際公開第2014/192310号
- 特許文献3：国際公開第2018/056442号
- 特許文献4：国際公開第2021/187392号

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Nishina K, et. al., "DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing", Nature Communications, 2015, 6:7969.
- 非特許文献2：Asami Y, et al., "Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides", Drug Discoveries & Therapeutics. 2016; 10(5):256-262

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 髄腔内投与により中枢神経系で優れたアンチセンス効果を生じ得る新たな二本鎖核酸複合体を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0009] 二本鎖核酸複合体を静脈内投与する場合には相補鎖（第2核酸鎖）への脂質リガンドの結合が優れた効果を奏する一方、髄腔内投与では脂質リガンドの結合によりアンチセンス効果が増強されないことが知られている（図3A及び

図3B)。

[0010] 本発明者らは、二本鎖核酸複合体の相補鎖に新たな標的結合分子を結合し、これをマウスの脳室内に投与した。その結果、従来の技術常識に反して、様々な脳部位を含む中枢神経系においてアンチセンス効果が増強されることを見出した(図3C)。対照的に、一本鎖のアンチセンスオリゴヌクレオチドでは、標的結合分子の結合によりアンチセンス効果がむしろ低下する傾向を示した。よって、標的結合分子に基づくアンチセンス効果の増強効果は、二本鎖核酸複合体にユニークな効果であると考えられる。本発明は上記知見に基づくものであって、以下を提供する。

[0011] (1) 第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む二本鎖核酸複合体を含む、髄腔内投与用の組成物であって、

前記第1核酸鎖は、目的の遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、かつ前記目的の遺伝子又はその転写産物に対して中枢神経系においてステリックブロッキング、エクソスキッピング、及び/又はエクソンインクルージョンを誘導することができ、

前記第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ中枢神経系において細胞表面に発現する標的分子に結合することが可能な少なくとも1個の標的結合分子と結合しており、

前記標的結合分子が、リガンド分子、抗体若しくはその断片、又は核酸アプタマーである、前記組成物。

(2) 前記リガンド分子が、ペプチド、糖鎖、又は低分子である、(1)に記載の組成物。

(3) 前記ペプチドが、

(a) ニューロテンシン若しくはそのD体レトロインベルソペプチド、

(b) トランスフェリン受容体結合ペプチド若しくはそのD体レトロインベルソペプチド、

(c) 狂犬病ウイルスのグリコプロテイン若しくはその断片、又は

(d) 配列番号31~34のいずれかで示すアミノ酸配列からなる環状ペプチ

ド

である、(2)に記載の組成物。

(4) 前記ニューロテンシンが配列番号5、22、又は23で示すアミノ酸配列からなる、(3)に記載の組成物。

(5) 前記トランスフェリン受容体結合ペプチドが、配列番号14、16、又は27で示すアミノ酸配列からなる、(3)に記載の組成物。

(6) 前記第1核酸鎖がミックスマーである、(1)～(5)のいずれかに記載の組成物。

(7) 前記第1核酸鎖がギャップマーである、(1)～(5)のいずれかに記載の組成物。

(8) 前記第1核酸鎖が、

(i)少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む中央領域、

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

(iii)前記中央領域の3'末端側に配置された、非天然ヌクレオシドを含む3'ウイング領域

を含む、(7)に記載の組成物。

(9) 前記第1核酸鎖が、モルホリノ核酸、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド、トリシクロDNA、ペプチド核酸、又は2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]修飾ヌクレオシドのいずれか1以上を含む、(1)～(8)のいずれかに記載の組成物。

(10) 前記第1核酸鎖中の核酸がモルホリノ核酸からなる、(1)～(8)のいずれかに記載の二本鎖核酸複合体。

(11) 前記第2核酸鎖が少なくとも8塩基長である、(1)～(10)のいずれかに記載の組成物。

(12) 前記第2核酸鎖が、デオキシリボヌクレオシド、2'修飾ヌクレオシド、5'修飾ヌクレオシド、及び架橋型ヌクレオシドからなる群から選択されるいずれか1以上を含む、(1)～(11)のいずれかに記載の組成物。

(13) 前記2'修飾ヌクレオシドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド、及び2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]修飾ヌクレオシドからなる群から選択される、(12)に記載の組成物。

(14) 前記5'修飾ヌクレオシドが、5'-cp修飾ヌクレオシド、5'-メチル修飾ヌクレオシド、又は5'-ジメチル修飾ヌクレオシドである、(12)に記載の組成物。

(15) 前記架橋型ヌクレオシドが、LNAヌクレオシド、2',4'-BNAN^Cヌクレオシド、cEt BNAヌクレオシド、ENAヌクレオシド、AmNAヌクレオシド、GuNAヌクレオシド、scpBNAヌクレオシド、scpBNA2ヌクレオシド、及びBANA3ヌクレオシドからなる群から選択される、(12)に記載の組成物。

(16) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に対して、非相補的塩基、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、(1)～(15)のいずれかに記載の組成物。

(17) 前記第2核酸鎖が、前記非相補的塩基を1～3個含む、(16)に記載の組成物。

(18) 前記挿入配列が1～8塩基からなる、(16)に記載の組成物。

(19) 前記欠失が連続する1～4塩基からなる、(16)に記載の組成物。

(20) 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域の5'末端側及び／又は3'末端側に位置する少なくとも1つのオーバーハング領域を含む、(1)～(19)のいずれかに記載の組成物。

(21) 前記オーバーハング領域が1～20塩基長である、(20)に記載の組成物。

(22) 前記標的結合分子が、前記第2核酸鎖の5'末端及び／又は3'末端に結合している、(1)～(21)のいずれかに記載の組成物。

(23) 前記第2核酸鎖が第1のリンカーを介して前記標的結合分子と結合している、(1)～(22)のいずれかに記載の組成物。

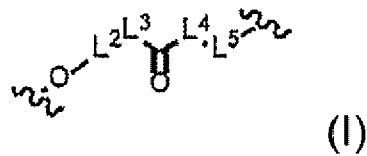
(24) 前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖とが第2のリンカーを介して結合して

いる、(1) ~ (23) のいずれかに記載の組成物。

(25) 前記第1のリンカー及び/又は前記第2のリンカーが、切断性 (cleavable) 又は非切断性 (uncleavable) のリンカーである、(23) 又は (24) に記載の組成物。

(26) 前記第1のリンカー及び/又は前記第2のリンカーが、以下の式 (I) で表される基を含む、(23) 又は (24) に記載の組成物。

[化1]



(式中、

L^2 は、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_3\sim C_8$ シクロアルキレン基、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ を表し、

L^3 は、 $-NH-$ 又は結合を表し、

L^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_{1\sim 12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_3\sim C_8$ のシクロアルキレン基、 $-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_2]_m-$ 、又は結合を表し、ここで、 m は1~25の整数を表し、

L^5 は、 $-NH-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、又は結合を表す)

(27) 前記第1のリンカー及び/又は前記第2のリンカーが、核酸、ポリエーテル基、並びに/又はアルキルアミノ基を含む、(23) 又は (24) に記載の組成物。

(28) 前記核酸が、1個、又はヌクレオシド間結合により連結された2~10個のヌクレオシド及び/若しくは非天然ヌクレオシドからなる、(27) に

記載の組成物。

(29) 前記ポリエーテル基が、ポリエチレングリコール基又はトリエチレングリコール基である、(27)に記載の組成物。

(30) 前記アルキルアミノ基が、ヘキシルアミノ基である、(27)に記載の組成物。

(31) 前記第1核酸鎖及び／又は前記第2核酸鎖のヌクレオシド間結合の全部又は一部が修飾ヌクレオシド間結合である、(1)～(30)のいずれかに記載の組成物。

(32) 前記修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、(31)に記載の組成物。

(33) 前記中枢神経系が、大脳皮質、大脳基底核、大脳白質、間脳、脳幹、小脳、及び脊髄からなる群から選択される、(1)～(32)のいずれかに記載の組成物。

(34) 前記中枢神経系が、前頭葉、側頭葉、海馬、海馬傍回、頭頂葉、後頭葉、線条体、淡蒼球、前障、視床、視床下核、中脳、黒質、橋、延髄、小脳皮質、小脳核、頸髄、胸髄、及び腰髄からなる群から選択される、(1)～(32)のいずれかに記載の組成物。

(35) 被検体の中枢神経系疾患を治療するための、(1)～(34)のいずれかに記載の組成物。

(36) 前記髄腔内投与が脳室内投与、後頭窩穿刺、又は腰椎穿刺である、(1)～(35)のいずれかに記載の組成物。

(37) シヤント、留置カテーテル、又は皮下ポートを用いて投与される、(1)～(36)のいずれかに記載の組成物。

(38) 前記二本鎖核酸複合体が0.1mg～200mg投与される、(1)～(37)のいずれかに記載の組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2022-184714号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、髄腔内投与により中枢神経系で優れたアンチセンス効果を生じ得る新たな二本鎖核酸複合体が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、様々な天然ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチドの構造を示す。

[図2]図2は、様々な架橋核酸の構造を示す。

[図3]図3は、様々な二本鎖核酸複合体を静脈内投与又は髄腔内投与した場合の中枢神経系でのアンチセンス効果を示す図である。図3Aは、脂質結合型及び脂質非結合型の二本鎖核酸複合体を静脈内投与した場合の中枢神経系でのアンチセンス効果を示す。図3Bは、脂質結合型及び脂質非結合型の二本鎖核酸複合体を髄腔内投与した場合の中枢神経系でのアンチセンス効果を示す。図3Cは、本発明の一実施形態においてペプチド結合型の二本鎖核酸複合体を髄腔内投与した場合の中枢神経系でのアンチセンス効果を示す。

[図4]図4は、eNT-HD0 (mMalat1)又はLT7-HD0 (mMalat1)の第2核酸鎖 (eNT-cRNA又はLT7-cRNA) において、cRNAとペプチドとの間の連結部分を示す図である。cRNAとペプチドとの間のリンカーは、アルキレン基 (炭素数6)、ポリエチレングリコール (PEG)、及びシクロオクチン誘導体を含む。

[図5]図5は、実施例で用いた様々な核酸の構造を示す。図5Aは、Malat1遺伝子を標的とするAS0 (mMalat1)の構造を示す。図5Bは、eNT-AS0(mMalat1)及びLT7-AS0 (mMalat1)の構造を示す。図5Cは、eNT-HD0 (mMalat1)、KNT-HD0 (mMalat1)、LT7-HD0 (mMalat1)、及びLT12-HD0 (mMalat1)の構造を示す。

[図6]図6は、各種核酸剤を脳室内に5 μ g投与したマウスにおいて、投与から1週間後の左右の前頭皮質 (frontal cortex)、頭頂皮質 (parietal cortex)、後頭皮質 (occipital cortex)、線条体 (striatum)、海馬 (hippocampus)、小脳 (Cerebellum)、脳幹 (Brain stem)、及び頸椎 (Cervical spine) におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図7]図7は、各種核酸剤を脳室内に25 μ g投与したマウスにおいて、投与から1週間後の左右の前頭皮質 (frontal cortex)、頭頂皮質 (parietal cortex)

)、後頭皮質 (occipital cortex)、線条体 (striatum)、海馬 (hippocampus)、小脳 (Cerebellum)、脳幹 (Brain stem)、及び頸椎 (Cervical spine) におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図8]図8は、各種核酸剤を異なる用量 (5 μ g、10 μ g、25 μ g、又は50 μ g) で脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後のMalat1発現レベルを示す。図8Aは前頭皮質 (frontal cortex) におけるMalat1発現レベルを示す。

図8Bは頭頂皮質 (parietal cortex) におけるMalat1発現レベルを示す。図8Cは後頭皮質 (occipital cortex) におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図9]図9は、各種核酸剤を異なる用量 (5 μ g、10 μ g、25 μ g、又は50 μ g) で脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後のMalat1発現レベルを示す。図9Aは線条体 (striatum) におけるMalat1発現レベルを示す。図9Bは海馬 (hippocampus) におけるMalat1発現レベルを示す。図9Cは脳幹 (Brain stem) におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図10]図10は、9 μ gの各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の左右の前頭皮質 (frontal cortex)、頭頂皮質 (parietal cortex)、後頭皮質 (occipital cortex)、線条体 (striatum)、海馬 (hippocampus)、小脳 (Cerebellum)、脳幹 (Brain stem)、頸椎 (Cervical spine)、及び腰椎 (Lumbar spine) におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図11]図11は、25 μ gの各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の左右の前頭皮質 (frontal cortex)、頭頂皮質 (parietal cortex)、後頭皮質 (occipital cortex)、線条体 (striatum)、海馬 (hippocampus)、及び小脳 (Cerebellum) におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図12]図12は、25 μ gの各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の左右の頭頂皮質 (parietal cortex) 及び後頭皮質 (occipital cortex) におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図13]図13は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の左右の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図14]図14は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の左右の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図15]図15は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図16]図16は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図17]図17は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図18]図18は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図19]図19は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図20]図20は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図21]図21は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図22]図22は、各種核酸剤を脳室内に投与したマウスにおいて、投与から1週間

間後の各脳部位におけるMalat1発現レベルを示す。エラーバーは標準誤差を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 1. 二本鎖核酸複合体

1-1. 概要

本発明の第1態様は、髄腔内投与のための二本鎖核酸複合体である。本発明の二本鎖核酸複合体は第1核酸鎖及び第2核酸鎖を含み、第2核酸鎖は少なくとも1個の標的結合分子と結合している。本発明の二本鎖核酸複合体は、髄腔内投与により中枢神経系で優れたアンチセンス効果を有する。

[0015] 1-2. 用語の定義

本明細書において、標的遺伝子の「転写産物」とは、本発明の二本鎖核酸複合体の直接的な標的となり、かつRNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAをいう。具体的には、標的遺伝子から転写されるmRNA（成熟mRNA、mRNA前駆体、塩基修飾を受けていないmRNA等を含む）、miRNA等のノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)、ロングノンコーディングRNA(lncRNA)、ナチュラルアンチセンスRNAを含み得る。

[0016] 本明細書において「標的遺伝子」とは、本発明の二本鎖核酸複合体のアンチセンス効果により、その転写産物又は翻訳産物の発現量が抑制若しくは亢進され得る、その転写産物又は翻訳産物の機能が阻害され得る、又はステリックブロッキング、スプライシングスイッチ、RNA編集、エクソンスキッピング若しくはエクソンインクルージョンが誘導され得る遺伝子である。なお、本明細書においては、場合により標的遺伝子を「目的の遺伝子」と呼ぶ。標的遺伝子の種類は、中枢神経系等の生体内で発現する限り特に限定されないが、例えば、本発明に係る二本鎖核酸複合体を導入する生物由来の遺伝子、例えば、様々な疾患（例えば中枢神経系疾患）において、その発現が増加する遺伝子が挙げられる。例えば、スカベンジャー受容体B1(scavenger receptor B1: 本明細書では、しばしば「SR-B1」と表記する) 遺伝子、転移関連肺腺癌転写産物1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1

: 本明細書では、しばしば「Malat1」と表記する) 遺伝子、微小管結合タンパク質タウ (microtubule-associated protein tau: 本明細書では、しばしば「Mapt」と表記する) 遺伝子、 β -セクレターゼ1(beta-secretase 1: 本明細書では、しばしば「BACE1」と表記する) 遺伝子、DMPK(dystrophia myotonica-protein kinase) 遺伝子、及びジストロフィン遺伝子等が挙げられる。標的遺伝子は、中枢神経系で発現している遺伝子であることが好ましい。

[0017] 本明細書において「標的転写産物」とは、本発明の核酸複合体の直接的な標的となり、かつRNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAをいう。一般的には「標的遺伝子の転写産物」が該当する。具体的には、標的遺伝子から転写されるmRNA (成熟mRNA、mRNA前駆体、塩基修飾を受けていないmRNA等を含む)、miRNA等のノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)、ロングノンコーディングRNA (lncRNA)、ナチュラルアンチセンスRNAを含み得る。標的遺伝子の転写産物として、例えば、SR-B1遺伝子の転写産物であるSR-B1 mRNA、Mapt遺伝子の転写産物であるMapt mRNA、BACE1遺伝子の転写産物であるBACE1 mRNA、Malat1遺伝子の転写産物であるMalat1ノンコーディングRNA、DMPK遺伝子の転写産物であるDMPK mRNA、及びジストロフィン遺伝子の転写産物であるジストロフィン mRNA又はその前駆体 (pre-mRNA) が挙げられる。

[0018] 標的転写産物の具体例として、Dystrophin pre-mRNA (GenBankアクセッション番号: NC_000086.7) のエクソン23/イントロン23境界領域、例えば83803482位~83803566位、例えば83803512~83803536位が挙げられる。標的転写産物の別の具体例として、配列番号18にマウスDMPK mRNAの塩基配列を、配列番号19にヒトDMPK mRNAの塩基配列を示す。なお、配列番号18~19は、いずれもmRNAの塩基配列をDNAの塩基配列に置き換えている。これらの遺伝子及び転写産物の塩基配列情報は、例えばNCBI (米国国立生物工学情報センター) データベース等の公知のデータベースから入手できる。

[0019] 本明細書において「アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)」又は「アンチセンス核酸」とは、標的転写産物 (主として標的遺伝子の転写産物) の少なくとも一部にハイブリダイズすることが可能な (すなわち、相補的な) 塩基配

列を含み、標的転写産物にアンチセンス効果をもたらすことができる、一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。本発明の二本鎖核酸複合体では、第1核酸鎖がASOとして機能し、その標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、又は他のいずれの核酸領域を含んでいてもよい。標的転写産物の標的領域は、少なくとも8塩基長、例えば、10~35塩基長、12~25塩基長、13~20塩基長、14~19塩基長、若しくは15~18塩基長、又は13~22塩基長、16~22塩基長、若しくは16~20塩基長とすることができる。

[0020] 「アンチセンス効果」とは、ASOが標的転写産物（例えばRNAセンス鎖）にハイブリダイズすることによって、その標的転写産物にもたらされる発現又は編集を調節する効果をいう。「標的転写産物の発現又は編集を調節する」とは、標的遺伝子の発現又は標的転写産物の発現量（本明細書では、「標的転写産物の発現量」をしばしば「標的転写産物のレベル」と表記する）の抑制又は低下、翻訳の阻害、RNA編集、塩基編集、スプライシング制御若しくはスプライシング機能改変効果（例えばスプライシングスイッチ、エクソンインクルージョン、エクソンスキッピング等）、ステリックブロッキング、又は転写産物の分解をいう。例えば、標的遺伝子の転写後阻害では、ASOとしてRNAオリゴヌクレオチドが細胞に導入されると、ASOは標的遺伝子の転写産物であるmRNAとアニーリングによって部分的二本鎖を形成する。この部分的二本鎖はリボソームによる翻訳を妨げるためのカバーとしての役割を果たし、それによって標的遺伝子にコードされた標的タンパク質の発現が翻訳レベルで阻害される（ステリックブロッキング）。一方、ASOとしてDNAを含むオリゴヌクレオチドが細胞に導入されると、部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖構造がRNase Hによって認識される結果、標的遺伝子のmRNAが分解され、標的遺伝子にコードされたタンパク質の発現が発現レベルで阻害される。さらに、アンチセンス効果は、mRNA前駆体におけるイントロンを標的としてももたらされ得る。さらに、アンチセンス効果は、miRNAを標的としてももたらされ得る。この場合、そのmiRNAの機能阻害により、当該

miRNAが通常発現を制御している遺伝子の発現が増加し得る。一実施形態で、標的転写産物の発現調節は、標的転写産物量の低下であってもよい。

[0021] アンチセンス効果の測定は、例えば、被検核酸化合物を被検体(例えばマウス)に投与し、例えば数日後(例えば2~7日後)に、被検核酸化合物によって提供されるアンチセンス効果により発現が調節される標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベル(量)(例えば、mRNA量若しくはマイクロRNA等のRNA量、cDNA量、タンパク質量等)を測定することによって、実施することができる。

[0022] 例えば、測定された標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベルが、陰性対照(例えばビヒクル投与)と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、又は少なくとも40%減少している場合に、被検核酸化合物がアンチセンス効果(例えば、標的転写産物量の低下)をもたらし得ることが示される。

[0023] 核酸鎖における非天然ヌクレオチドの数、種類及び位置は、核酸複合体によって提供されるアンチセンス効果等に影響を及ぼし得る。修飾の選択は、標的遺伝子等の配列によって異なり得るが、当業者であれば、アンチセンス法に関連する文献(例えば、WO 2007/143315、WO 2008/043753、及びWO 2008/049085)の説明を参照することによって好適な実施形態を決定することができる。さらに、修飾後の核酸複合体が有するアンチセンス効果が測定される場合、このようにして得られた測定値が修飾前の核酸複合体の測定値と比較して有意に低くない場合(例えば、修飾後に得られた測定値が、修飾前の核酸複合体の測定値の70%以上、80%以上又は90%以上である場合)、関連修飾を評価することができる。

[0024] 本明細書において「標的遺伝子の翻訳産物」とは、本発明の核酸複合体の直接的な標的となる前記標的転写産物又は標的遺伝子の転写産物の翻訳によって合成される任意のポリペプチド又はタンパク質をいう。

[0025] 本明細書において、「アプタマー」(「核酸アプタマー」とも表記する)とは、細胞内、細胞膜上、又は細胞外、例えば細胞膜上又は細胞外の特定の標的分子と特異的に結合する核酸分子をいう。アプタマーは、当該分野で公

知の方法、例えば、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法を用いた試験管内選別法により作製することができる。

[0026] 本明細書において、「デコイ」とは、転写因子（例えばNF- κ B）の結合部位の配列又は類似の配列を有する核酸を指し、これらを「おとり」として細胞内に導入することによって転写因子の作用を抑制（転写活性化因子であれば転写を抑制、転写抑制因子であれば転写を促進）するものをいう。デコイ核酸は、標的となる転写因子の結合配列の情報に基づいて容易に設計することができる。

[0027] 本明細書において、「bait(ベイト)」とは、細胞内で特定の標的分子と特異的に結合する核酸分子であって、標的分子の機能を修飾するものをいう。baitと相互作用する標的を、「prey(プレイ)」ともいう。

[0028] 本明細書中で使用される用語「核酸」又は「核酸分子」は、モノマーのヌクレオチド又はヌクレオシドを指してもよいし、複数のモノマーからなるオリゴヌクレオチドを意味してもよく、またポリマーであればポリヌクレオチドを意味する。「天然核酸」とは、自然界に存在する核酸をいう。天然核酸には後述の天然ヌクレオシドや天然ヌクレオチド等が含まれる。「非天然核酸」又は「人工核酸」とは、天然核酸以外の任意の核酸を指す。非天然核酸又は人工核酸には、後述の非天然ヌクレオシドや非天然ヌクレオチド等が含まれる。

[0029] 本明細書において「核酸鎖」又は単なる「鎖」とは、ヌクレオシド間結合によって連結された2以上のヌクレオシドを意味し、例えばオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであってもよい。核酸鎖は、例えば自動合成装置を使用した化学的合成法により、又はポリメラーゼ、リガーゼ、又は制限反応による酵素的工程により全長鎖又は部分鎖を作製することができる。核酸鎖は、天然ヌクレオチド及び／又は非天然ヌクレオチドを含み得る。

[0030] 「ヌクレオシド」とは、一般に塩基及び糖の組み合わせからなる分子をいう。ヌクレオシドの糖部分は、限定はしないが、通常、ペントフラノシル糖で構成され、その具体例としてリボースやデオキシリボースが挙げられる。

ヌクレオシドの塩基部分（核酸塩基）は、通常は、複素環式塩基部分である。限定はしないが、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシルや、それ以外の修飾核酸塩基（修飾塩基）が挙げられる。

[0031] 「ヌクレオチド」とは、前記ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。ペントフラノシル糖を含むヌクレオチドの場合、通常、糖の2'位、3'位、又は5'位のヒドロキシル基にリン酸基が連結されている。

[0032] 「オリゴヌクレオチド」とは、隣接するヌクレオチド間で糖部分のヒドロキシル基とリン酸基が共有結合によって数個～数十個連結することによって形成される直鎖状のオリゴマーをいう。また「ポリヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチドよりも多数のヌクレオチドが前記共有結合によって数十個以上、好ましくは数百個以上連結することによって形成される直鎖状のポリマーをいう。オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構造の内部で、リン酸基は、一般にヌクレオシド間結合を形成するとみなされる。

[0033] 本明細書において「天然ヌクレオシド」とは、自然界に存在するヌクレオシドをいう。例えば、リボースと前記アデニン、シトシン、グアニン、又はウラシル等の塩基からなるリボヌクレオシドや、デオキシリボースと前記アデニン、シトシン、グアニン、又はチミン等の塩基からなるデオキシリボヌクレオシドが挙げられる。なお、RNA中に見られるリボヌクレオシド、及びDNA中に見られるデオキシリボヌクレオシドを、本明細書では、しばしば、それぞれ「DNAヌクレオシド」及び「RNAヌクレオシド」と称する。

[0034] 本明細書において「天然ヌクレオチド」とは、自然界に存在するヌクレオチドで、前記天然ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合した分子をいう。例えば、リボヌクレオシドにリン酸基が結合した、RNAの構成単位として知られるリボヌクレオチド、及びデオキシリボヌクレオシドにリン酸基が結合した、DNAの構成単位として知られるデオキシリボヌクレオチドが挙げられる。

[0035] 本明細書において「非天然ヌクレオチド」とは、天然ヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドを指し、修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド模倣体を含

む。本明細書において「修飾ヌクレオチド」とは、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、及び修飾核酸塩基のいずれか1つ以上を有するヌクレオチドを意味する。ここでいう「ヌクレオチド模倣体」とは、オリゴマー化合物の一以上の位置において、ヌクレオシド及び結合を置換するために使用される構造体を含む。ヌクレオチド模倣体としては、例えば、ペプチド核酸又はモルホリノ核酸(-N(H)-C(=O)-O-又は他の非ホスホジエステル結合によって結合されるモルホリノ)が挙げられる。ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid、PNA)は、糖の代わりにN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合した主鎖を有するヌクレオチド模倣体である。本明細書において非天然オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増加、又は阻害活性の増加等の望ましい特性を有する。したがって、天然ヌクレオチドよりも好ましい。

[0036] 本明細書において「非天然ヌクレオシド」とは、天然ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドをいう。例えば、修飾ヌクレオシド及びヌクレオシド模倣体を含む。本明細書において「修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分及び／又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

[0037] 本明細書において「模倣体」とは、糖、核酸塩基、及び／又はヌクレオシド間結合を置換する官能基を指す。一般に、模倣体は、糖又は糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせの代わりに使用され、核酸塩基は、選択される標的に対するハイブリダイゼーションのために維持される。ここでいう「ヌクレオシド模倣体」とは、オリゴマー化合物の一以上の位置において糖を置換するために、又は糖及び塩基を置換するために、又はオリゴマー化合物を構成するモノマーサブユニット間の結合等を置換するために使用される構造体を含む。「オリゴマー化合物」とは、核酸分子のある領域に少なくともハイブリダイズ可能な連結したモノマーサブユニットのポリマーを意味する。ヌクレオシド模倣体としては、例えば、モルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、二環式又は三環式糖模倣体、例えば、非

フラノース糖単位を有するヌクレオシド模倣体が挙げられる。

[0038] 「修飾糖」とは、天然糖部分(すなわち、DNA(2'-H)又はRNA(2'-OH)中に認められる糖部分)からの置換及び/又は任意の変化を有する糖を指し、「糖修飾」とは、天然糖部分からの置換及び/又は任意の変化をいう。核酸鎖は、場合により、修飾糖を含む1つ以上の修飾ヌクレオシドを含んでもよい。「糖修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分を有するヌクレオシドをいう。かかる糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の強化、結合親和性の増加、又は他の何らかの有益な生物学的特性を核酸鎖に付与し得る。特定の実施形態では、ヌクレオシドは、化学修飾リボフラノース環部分を含む。化学修飾リボフラノース環の例としては、限定するものではないが、置換基(5'及び2'置換基を含む)の付加、非ジェミナル環原子の架橋形成による二環式核酸(架橋核酸、BNA)の形成、リボシル環酸素原子のS、N(R)、又はC(R1)(R2)(R、R1及びR2は、それぞれ独立して、H、C₁-C₁₂アルキル、又は保護基を表す)での置換、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

[0039] 糖修飾ヌクレオシドの例としては、限定するものではないが、5'-ビニル、5'-メチル(R又はS)、5'-アリル(R又はS)、4'-S、2'-F(2'-フルオロ基)、2'-OCH₃(2'-O-Me基若しくは2'-O-メチル基)、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル](2'-O-MCE基)、及び2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE若しくは2-(CH₂)₂OCH₃)置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、-O-アリル、-O-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、-O(CH₂)₂SCH₃、-O(CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn)、及びO-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn)から選択することができ、各Rm及びRnは、独立して、H又は置換若しくは非置換C₁-C₁₀アルキルである。「2'-修飾糖」は、2'位で修飾されたフラノシル糖を意味する。2'-修飾糖を含むヌクレオシドを「2'-修飾ヌクレオシド」又は「2'-糖修飾ヌクレオシド」と称することもある。

[0040] 「二環式ヌクレオシド」は、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す。二環式糖部分を含む核酸は、一般に架橋核酸(bridged nucleic acid、BNA)と称される。二環式糖部分を含むヌクレオシドは、「架橋ヌクレオシド」、

「架橋型の非天然ヌクレオシド」、又は「BNAヌクレオシド」と称することもある。図2に架橋核酸を一部例示する。

[0041] 二環式糖は、2'位の炭素原子及び4'位の炭素原子が2つ以上の原子によって架橋されている糖であってよい。二環式糖の例は当業者に公知である。二環式糖を含む核酸(BNA)又はBNAヌクレオシドの1つのサブグループは、 $4'-(\text{CH}_2)_p-0-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p-\text{CH}_2-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p-\text{S}-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_p-\text{OCO}-2'$ 、 $4'-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{R}_3)-0-(\text{CH}_2)_m-2'$ [式中、 p 、 m 及び n は、それぞれ1~4の整数、0~2の整数、及び1~3の整数を表し；また R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及びユニット置換基(蛍光若しくは化学発光標識分子、核酸切断活性を有する機能性基、細胞内又は核内局在化シグナルペプチド等)を表す]により架橋された2'位の炭素原子と4'位の炭素原子を有すると説明することができる。さらに、特定の実施形態によるBNA又はBNAヌクレオシドに関し、3'位の炭素原子上の OR_2 置換基及び5'位の炭素原子上の OR_1 置換基において、 R_1 及び R_2 は、典型的には水素原子であるが、互いに同一であっても異なってもよく、さらにまた、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基によって保護されているリン酸基、又は $\text{P}(\text{R}_4)\text{R}_5$ [ここで、 R_4 及び R_5 は、互いに同一であっても異なってもよく、それぞれヒドロキシル基、核酸合成のための保護基によって保護されているヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基によって保護されているメルカプト基、アミノ基、1~5個の炭素原子を有するアルコキシ基、1~5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、1~6個の炭素原子を有するシアノアルコキシ基、又は1~5個の炭素原子を有するアルキル基で置換されているアミノ基を表す]であってもよい。このようなBNAの非限定的な例としては、メチレンオキシ($4'-\text{CH}_2-0-2'$)BNA(LNA(Locked Nucleic Acid(登録商標)、2',4'-BNAとしても知られている)(例えば、 α -L-メチレンオキシ($4'-\text{CH}_2-0-2'$)BNA若しくは β -D-メチレンオキシ($4'-\text{CH}_2-0-2'$)BNA)、エチレンオ

キシ(4'-(CH₂)₂-0-2')BNA(ENAとしても知られている)、β-D-チオ(4'-CH₂-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH₂-0-N(R₃)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH₂-N(R₃)-0-2')BNA(2',4'-BNA^{NC}としても知られている；R=Hは2',4'-BNA^{NC}[N-H]、R=Meは2',4'-BNA^{NC}[N-Me])、2',4'-BNA^{CC}、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH₃)-0-2')BNA(cEt BNAとしても知られている)、(4'-CH(CH₂OCH₃)-0-2')BNA(cMOE BNAとしても知られている)、アミドBNA(アミド架橋型核酸)若しくは(4'-C(=O)-N(R)-2')BNA(R=H、Me)(AmNAとしても知られている；図2のR=HはAmNA[N-H]、R=MeはAmNA[N-Me])、グアニジンBNA(GuNA(例、図2のR=HはGuNA[N-H]、R=MeはGuNA[N-Me]))としても知られる)、アミンBNA(2'-Amino-LNAとしても知られている)(例、3-(Bis(3-アミノプロピル)アミノ)プロパノイル置換体)、2'-0,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸(scPbNAとしても知られている)及び当業者に公知の他のBNAが挙げられる。このようなBNAヌクレオシドの非限定的な例としては、メチレンオキシ(4'-CH₂-0-2')BNAヌクレオシド(LNAヌクレオシド、2',4'-BNAヌクレオシドとしても知られている)(例、α-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-0-2')BNAヌクレオシド、β-D-メチレンオキシ(4'-CH₂-0-2')BNAヌクレオシド)、エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-0-2')BNAヌクレオシド(ENAヌクレオシドとしても知られている)、β-D-チオ(4'-CH₂-S-2')BNAヌクレオシド、アミノオキシ(4'-CH₂-0-N(R₃)-2')BNAヌクレオシド、オキシアミノ(4'-CH₂-N(R₃)-0-2')BNAヌクレオシド(2',4'-BNA^{NC}ヌクレオシドとしても知られている；R=Hは2',4'-BNA^{NC}[N-H]ヌクレオシド、R=Meは2',4'-BNA^{NC}[N-Me]ヌクレオシド)、2',4'-BNA^{CC}ヌクレオシド、3'-アミノ-2',4'-BNAヌクレオシド、5'-メチルBNAヌクレオシド、(4'-CH(CH₃)-0-2')BNAヌクレオシド(cEtヌクレオシドとしても知られている)、(4'-CH(CH₂OCH₃)-0-2')BNAヌクレオシド(cMOEヌクレオシドとしても知られている)、アミドBNAヌクレオシド若しくは(4'-C(=O)-N(R)-2')BNAヌクレオシド(R=H、Me)(AmNAヌクレオシドとしても知られている；図2のR=HはAmNA[N-H]ヌクレオシド、R=MeはAmNA[N-Me]ヌクレオシド)、グアニジンBNAヌクレオシド(GuNAヌクレオシド(例、図2のR=HはGuNA[N-H]ヌクレオシド、R=MeはGuNA[N-Me]ヌクレオシド))としても知られる)、アミンBNAヌク

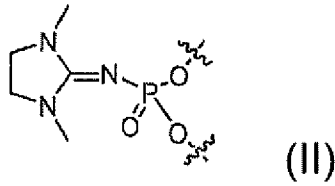
レオシド(2'-Amino-LNAヌクレオシドとしても知られている)(例、3-(Bis(3-アミノプロピル)アミノ)プロパノイル置換ヌクレオシド)、2'-0,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋ヌクレオシド(scxBNAヌクレオシドとしても知られている)及び当業者に公知の他のBNAヌクレオシドが挙げられる。

[0042] 本明細書において、「カチオン性ヌクレオシド」は、あるpH(例えば、ヒトの生理学的pH(約7.4)、送達部位(例えば、オルガネラ、細胞、組織、臓器、生物体等)のpH等)において、中性形態(リボヌクレオシドの中性形態等)と比較して、カチオン形態として存在する修飾ヌクレオシドである。カチオン性ヌクレオシドはヌクレオシドの任意の位置に1つ以上のカチオン性修飾基を含んでもよい。一実施形態では、カチオン性ヌクレオシドは、2'-Amino-LNAヌクレオシド(例、3-(Bis(3-アミノプロピル)アミノ)プロパノイル置換ヌクレオシド)、アミノアルキル修飾ヌクレオシド(例、2'-0-メチル及び4'-CH₂CH₂CH₂NH₂置換ヌクレオシド)、GuNAヌクレオシド(例、図2のR=HはGuNA[N-H]ヌクレオシド、R=MeはGuNA[N-Me]ヌクレオシド)等である。メチレンオキシ(4'-CH₂-0-2')架橋を有する二環式ヌクレオシドを、LNAヌクレオシドと称することもある。

[0043] 本明細書において「修飾ヌクレオシド間結合」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合(すなわち、ホスホジエステル結合)からの置換又は任意の変化を有するヌクレオシド間結合を指す。修飾ヌクレオシド間結合には、リン原子を含むヌクレオシド間結合、及びリン原子を含まないヌクレオシド間結合が含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホトリエステル結合(米国特許登録番号5,955,599記載のメチルホスホトリエステル結合、エチルホスホトリエステル結合)、アルキルホスホネート結合(例、米国特許登録番号5,264,423及び5,286,717記載のメチルホスホネート結合、国際公開第2015/168172号記載のメトキシプロピルホスホネート結合)、アルキルチオホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、環状グアニジン部分を含むヌクレオシド間結合(例、以下の式(

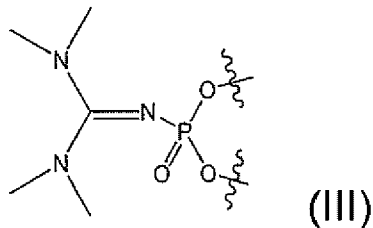
II)で表される部分構造：

[化2]



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

[化3]



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

[0044] ヌクレオシド間結合がキラル中心を有する場合、ヌクレオシド間結合はキラル制御されたものであってもよい。「キラル制御された」とは、キラル中心、例えばキラル結合リンに関して単一のジアステレオマーで存在することを意図する。キラル制御されたヌクレオシド間結合は、完全にキラル純粋なものであってもよいし、キラル純度が高いもの、例えば90%de、95%de、98%de、99%de、99.5%de、99.8%de、99.9%de、又はそれ以上のキラル純度を有するものであってもよい。本明細書において「キラル純度」は、ジアステ

レオマーの混合物中の1つのジアステレオマーの割合を指し、ジアステレオマー過剰率(%de)として表され、(対象のジアステレオマー—その他のジアステレオマー)/(総ジアステレオマー) \times 100(%)として定義される。

[0045] 例えば、ヌクレオシド間結合は、Rp配置又はSp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合、1～4個のC_{1~6}のアルキル基で置換されたグアニジン部分(例えば、テトラメチルグアニジン(TMG)部分;例えばAlexander A. Lomzov et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2019, 513(4), 807-811を参照のこと)を含むヌクレオシド間結合、及び/又は環状グアニジン部分を含むヌクレオシド間結合であってよい。キラル制御されたヌクレオシド間結合の調製方法は公知であり、例えばRp配置又はSp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合は、Naoki Iwamoto et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009, 48(3), 496-9、Natsuhisa Oka et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8307-8317、Natsuhisa Oka et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 16031-16037、Yohei Nukaga et al., *J. Org. Chem.* 2016, 81, 2753-2762、Yohei Nukaga et al., *J. Org. Chem.* 2012, 77, 7913-7922に記載の方法に従って合成することができる。Rp配置又はSp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合も公知であり、例えばNaoki Iwamoto et al., *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35(9), 845-851、Anastasia Khvorova et al., *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35(3), 238-248に記載されるような効果を奏することが知られている。例えば、一実施形態において、Sp配置にキラル制御されたホスホロチオエート結合は、Rp配置のものよりも安定であり、及び/又はSp配置にキラル制御されたAS0は、RNase H1による標的RNA切断を促進し、生体内でより持続的な応答をもたらす。1～4個のC_{1~6}のアルキル基で置換されたグアニジン部分(例えば、TMG部分)を含むヌクレオシド間結合の調製方法は公知であり、例えばAlexander A. Lomzov et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2019, 513(4), 807-811に記載の方法に従って合成することができる。

[0046] 本明細書中で使用される用語「核酸塩基」又は「塩基」とは、核酸を構成する塩基成分(複素環部分)であって、主としてアデニン、グアニン、シトシ

ン、チミン、及びウラシルが知られる。本明細書において「核酸塩基」又は「塩基」は、特に断りのない場合、修飾又は非修飾の核酸塩基（塩基）のいずれをも包含する。したがって、特に断りのない場合、プリン塩基は修飾又は非修飾のプリン塩基のいずれであってもよい。また、特に断りのない場合、ピリミジン塩基は修飾又は非修飾のピリミジン塩基のいずれであってもよい。

[0047] 「修飾核酸塩基」又は「修飾塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、又はウラシル以外のあらゆる核酸塩基を意味する。「非修飾核酸塩基」又は「非修飾塩基」（天然核酸塩基）とは、プリン塩基であるアデニン(A)及びグアニン(G)、並びにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)、及びウラシル(U)を意味する。修飾核酸塩基の例としては、ヒポキサンチン、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシン又はN4-メチルシトシン；N6-メチルアデニン又は8-ブロモアデニン；2-チオ-チミン；並びにN2-メチルグアニン又は8-ブロモグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。修飾核酸塩基は、好ましくは、5-メチルシトシンである。

[0048] 本明細書において「標準アミノ酸」とは、通常タンパク質を構成する20種類のL-アミノ酸をいう。具体的には、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、アルギニン、システイン、グルタミン、グリシン、プロリン、チロシン、アラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、及びセリンが挙げられる。

[0049] 本明細書において「非標準アミノ酸」とは、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸をいう。非標準アミノ酸の例として、セレノシステイン、 θ -ホスホセリン、N-ホルミルメチオニン、ピロリシン、ピログルタミン酸、ピロロイシン、セレノメチオニン、ヒドロキシプロリン、及び γ -カルボキシグルタミン酸が挙げられる。非標準アミノ酸のさらなる例として、D-アミノ酸も挙げられる。

- [0050] 本明細書において、「抗体」は、抗原に対して免疫応答性を示すタンパク質を意味する。本明細書では特に断りのない限りモノクローナル抗体を指すものとする。抗体の由来生物種は、特に限定しない。好ましくは鳥類及び哺乳動物由来の抗体である。例えば、ニワトリ、ダチョウ、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、又はヒト等が挙げられる。
- [0051] また、本明細書において「モノクローナル抗体」とは、フレームワーク領域 (Framework region: 以下、「FR」と表記する) 及び相補性決定領域 (Complementarity determining region: 以下、「CDR」と表記する) を含み、抗原に特異的に結合し、かつそれを認識することのできる単一種の免疫グロブリン、又は免疫グロブリンに含まれる少なくとも1組の軽鎖可変領域 (V_L 領域) 及び重鎖可変領域 (V_H 領域) を包含する組換え抗体又は合成抗体をいう。
- [0052] 抗体が免疫グロブリン分子で構成される場合、免疫グロブリンは任意のクラス (例えば、IgG、IgE、IgM、IgA、IgD、及びIgY)、又は任意のサブクラス (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2) とすることができる。
- [0053] 「組換え抗体」とは、キメラ抗体、又はヒト化抗体をいう。「キメラ抗体」とは、異なる動物由来の抗体のアミノ酸配列を組み合わせて作製される抗体で、ある抗体の定常領域 (C領域) を他の抗体のC領域で置換した抗体である。例えば、ラットモノクローナル抗体のC領域をヒト抗体のC領域と置き換えた抗体が該当する。具体的な例を挙げると、任意の抗原に対するヒト抗体の重鎖可変領域を目的の抗原に対する抗体の重鎖可変領域と置換し、またヒト抗体の軽鎖可変領域を目的の抗原に対する抗体の軽鎖可変領域と置換してなる抗体が挙げられる。これによりヒト体内における当該抗体に対する免疫反応を軽減し得る。「ヒト化抗体」とは、ヒト抗体におけるCDRをヒト以外の哺乳動物由来の抗体におけるCDRと置換したモザイク抗体である。免疫グロブリン分子の可変領域 (V領域) は、4つのFR (FR1、FR2、FR3及びFR4) と3つのCDR (CDR1、CDR2及びCDR3) がN末端側からFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

の順序で連結されて構成されている。このうちFRは可変領域の骨格を構成する相対的に保存された領域であり、CDRが抗体の抗原結合特異性に直接寄与する。ヒト化抗体は、例えば、目的の抗原に対する抗体の軽鎖又は重鎖における一組のCDR1、CDR2及びCDR3を任意の抗原に対するヒト抗体の軽鎖又は重鎖における一組のCDR1、CDR2、及びCDR3とそれぞれ置換することによって、目的の抗原に対する抗体の抗原結合特異性を受け継いだヒト抗体として構築することができる。このようなヒト化抗体は、CDR以外はヒト抗体由来であることからヒト体内における当該抗体に対する免疫反応をキメラ抗体以上に軽減し得る。

[0054] 「合成抗体」とは、化学的に又は組換えDNA法を用いることによって合成した抗体をいう。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体が挙げられる。具体的には、例えば、scFv (single chain Fragment of variable region : 単鎖抗体) が挙げられる。免疫グロブリン分子において、機能的な抗原結合部位を形成する一組の可変領域 (軽鎖可変領域 V_L 及び重鎖可変領域 V_H) は、軽鎖と重鎖という別々のポリペプチド鎖上に位置する。scFvは、免疫グロブリン分子において、 V_L 及び V_H を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖に包含した構造を有する分子量約35 kDa以下の合成抗体である。scFv内において1組の可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。scFvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてベクターに組み込み、発現させることで得ることができる。

[0055] 抗体は、修飾することもできる。ここでいう「修飾」とは、グリコシル化のような抗原特異的結合活性に必要な機能上の修飾や抗体検出に必要な標識上の修飾を含む。

[0056] 抗体上のグリコシル化修飾は、標的である抗原に対する抗体の親和性を調整するために行われる。具体的には、例えば、抗体のFRにおいて、グリコシル化を構成するアミノ酸残基に置換を導入してグリコシル化部位を除去することで、その部位のグリコシル化を喪失させる改変等が挙げられる。

[0057] 抗体は、抗原との解離定数が、 10^{-7} M以下であることが好ましく、例えば 10^{-8} M以下の高い親和性を有することが好ましく、より好ましくは 10^{-9} M以下、特に好ましくは 10^{-10} M以下である。上記解離定数は、当該分野で公知の技術を用いて測定することができる。例えば、Biacoreシステム（GE Healthcare社）により速度評価キットソフトウェアを用いて測定してもよい。

[0058] 本明細書において抗体の「断片」とは、抗体の一部からなり、かつ抗体と同様に抗原に対して免疫応答性を示す抗体断片であり、抗原結合性断片である。例えば、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fvフラグメント、ジスルフィド結合により安定化したFvフラグメント（dsFv）、 $(dsFv)_2$ 、二重特異性dsFv（dsFv-dsFv'）、ジスルフィド結合により安定化したディアボディ（dsディアボディ）、単鎖抗体分子（scFv）、二量体scFv（2価ディアボディ）、多重特異性抗体、ラクダ化シングルドメイン抗体（ラクダ化抗体；VHH抗体）等の重鎖抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、及び2価ドメイン抗体等が該当する。Fabは、IgG分子がパパインによってヒンジ部のジスルフィド結合よりもN末端側で切断されて生じる抗体断片であって、H鎖定常領域（重鎖定常領域：以下 C_H と表記する）を構成する3つのドメイン（ C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} ）のうち V_H に隣接する C_{H1} と V_H 、及び完全長のL鎖から構成される。Fab'は、Fabよりもヒンジ部を含む分だけH鎖が若干長いが実質的にはFabと同等の構造を有する。Fab'は、IgG分子がペプシンによってヒンジ部のジスルフィド結合よりもC末端側で切断されて生じるFab'の二量体（ $F(ab')_2$ ）をマイルドな条件下で還元し、ヒンジ領域のジスルフィド連結を切断することによって得ることができる。これらの抗体断片は、いずれも抗原結合部位を包含していることから、抗原エピトープと特異的に結合する能力を有している。

[0059] 本明細書において「糖」は、単糖、2以上の糖を含む糖分子、及び糖鎖のいずれも包含する。本明細書において「糖鎖」とは、直鎖又は分岐したオリゴ糖又は多糖を意味する。単糖の例として、酸性糖（例：シアル酸、ウロン酸）、アミノ糖（例：N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc））、及び中性糖（例：グルコース、マンノース、ガラクトース、フコ

ース)を挙げることができる。糖鎖は、タンパク質との結合様式によって、アスパラギン残基と結合するN-グリコシド結合糖鎖、及びセリン/スレオニン等と結合するO-グリコシド結合糖鎖に大別される。糖鎖に含まれる単糖として、上述の単糖を例示することができる。

[0060] 本明細書中で使用される用語「相補的」とは、核酸塩基が水素結合を介して、いわゆるワトソン-クリック塩基対(天然型塩基対)又は非ワトソン-クリック塩基対(フーグスティーン型塩基対等)を形成し得る関係を意味する。本発明において、第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、標的転写産物(例えば、標的遺伝子の転写産物)の少なくとも一部と完全に相補的であることは必ずしも必要ではなく、塩基配列が少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)の相補性を有していれば許容される。第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、塩基配列が相補的である場合に(典型的には、塩基配列が標的転写産物の少なくとも一部の塩基配列に相補的である場合に)、標的転写産物にハイブリダイズすることができる。同様に、第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖の少なくとも一部と完全に相補的であることは必ずしも必要ではなく、塩基配列が少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%(例えば、95%、96%、97%、98%、又は99%以上)の相補性を有していれば許容される。第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖の少なくとも一部と塩基配列が相補的である場合に、アニールすることができる。塩基配列の相補性は、BLASTプログラム等を使用することによって決定することができる。当業者であれば、鎖間の相補度を考慮して、2本の鎖がアニール又はハイブリダイズし得る条件(温度、塩濃度等)を容易に決定することができる。またさらに、当業者であれば、例えば標的遺伝子の塩基配列の情報に基づいて、標的転写産物に相補的なアンチセンス核酸を容易に設計することができる。

[0061] ハイブリダイゼーション条件は、例えば、低ストリンジェントな条件及び高ストリンジェントな条件等の様々なストリンジェントな条件であってもよ

い。低ストリンジेंटな条件は、比較的低温で、かつ高塩濃度の条件、例えば、30℃、2×SSC、0.1%SDSであってよい。高ストリンジेंटな条件は、比較的高温で、かつ低塩濃度の条件、例えば、65℃、0.1×SSC、0.1%SDSであってよい。温度及び塩濃度等の条件を変えることによって、ハイブリダイゼーションのストリンジエンスを調整できる。ここで、1×SSCは、150mM塩化ナトリウム及び15mMクエン酸ナトリウムを含む。

[0062] 本明細書で「被検体」とは、本発明の二本鎖核酸複合体又は組成物を適用する対象をいう。被検体は、個体の他、器官、組織、及び細胞を含む。被検体が個体の場合、ヒトを含むあらゆる動物が該当し得る。例えば、ヒト以外では、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物等が挙げられる。限定はしないが、被検体は、標的転写産物の発現量を減少させる必要がある個体や、中枢神経系疾患等の疾患の治療又は予防が必要な個体であってもよい。

[0063] 本明細書において「複数個」とは、2以上の整数、例えば、2～10個、2～7個、2～5個、2～4個又は2～3個の整数をいう。

[0064] 本明細書において「変異型ペプチド」とは、野生型ペプチドのアミノ酸配列に由来し、かつ野生型ペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する任意のタンパク質をいう。変異型ペプチドの例として、スプライシングバリエーション、SNPs等に基づく突然変異体、ペプチドの活性断片等が挙げられる。変異型ペプチドには、野生型ペプチドのアミノ酸配列に基づいて作製された、野生型ペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する人工ペプチドも含まれ得る。

[0065] 本明細書において「活性断片」とは、ペプチド等のタンパク質の一部領域を含み、かつその断片が全長ペプチド又は全長タンパク質の活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、又は同等以上を保持するペプチド断片又はポリペプチド断片をいう。活性断片のアミノ酸長は、ペプチド又はタンパク質の活性を保持する限り特に制限しない。

[0066] 本明細書において「アミノ酸同一性」とは、比較する2つのペプチド又はポ

リペプチドのアミノ酸配列において、アミノ酸残基の一致数が最大となるように、必要に応じて一方又は双方に適宜ギャップを挿入して整列化（アラインメント）したときに、全アミノ酸残基数における一致アミノ酸残基数の割合（％）をいう。

[0067] 本明細書において「(アミノ酸の)置換」とは、天然のペプチド又はタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間において、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保存的アミノ酸群内での置換をいう。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群 (Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr)、分枝鎖アミノ酸群 (Leu, Val, Ile)、中性アミノ酸群 (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群 (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys)、酸性アミノ酸群 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸群 (Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸群 (Phe, Tyr, Trp) 内での置換が挙げられる。これらの群内でのアミノ酸置換であれば、ポリペプチドの性質に変化を生じにくいことが知られているため好ましい。

[0068] 1-3. 構成

本発明の二本鎖核酸複合体は、第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含み、髄腔内投与することができる。各核酸鎖の具体的な構成を以下に示す。

[0069] 本発明の二本鎖核酸複合体において、第1核酸鎖は、目的の遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、中枢神経系において目的の遺伝子又はその転写産物に対してステリックブロッキング、エクソスキッピング、及び／又はエクソンインクルージョンを誘導することができる。第2核酸鎖は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ少なくとも1個の標的結合分子と結合している。

[0070] 本明細書において「標的結合分子」とは、中枢神経系において細胞表面に発現する標的分子に結合することができる任意の分子をいう。具体的には、標的結合分子は、リガンド分子、抗体若しくはその断片、又は核酸アプタマーである。

[0071] 本明細書において「中枢神経系において細胞表面に発現する標的分子」は

、中枢神経の任意の細胞において細胞膜上に発現し、標的結合分子が結合可能な分子をいう。標的分子は、例えば細胞膜上のタンパク質、脂質分子、又は糖鎖である。細胞膜上のタンパク質は、特に限定せず、内在性膜タンパク質、表在性膜タンパク質、又は脂質アンカー型タンパク質であってもよく、具体例として受容体タンパク質や輸送タンパク質（トランスポーター）等が挙げられる。

[0072] 本明細書において「リガンド分子」は、標的分子と結合し得る分子であれば限定しない。例えば、ペプチド、単糖や糖鎖等の糖、核酸、低分子等が挙げられる。また、リガンド分子は、生体内に天然に存在し、標的分子と結合するリガンド（天然リガンド）、又はそれ以外のリガンド（非天然リガンド又は人工リガンド）のいずれであってもよい。

[0073] 本明細書において「ペプチド」とは、1つ以上のペプチド結合を有するアミノ酸ポリマーをいう。「ペプチド」は、ペプチドに含まれるアミノ酸残基の数によって限定されない。したがって、「ペプチド」には、ジペプチドやトリペプチド等の数個のアミノ酸残基を含むオリゴペプチドから、多数のアミノ酸残基を含むポリペプチド（タンパク質）までが包含される。ペプチドは直鎖状、分岐状又は環状のペプチドであり得る。本明細書において、第2核酸鎖に結合しているペプチドを特に「ペプチドリガンド」という場合がある。

[0074] 本発明の二本鎖核酸複合体において第2核酸鎖に結合しているペプチドは、天然ペプチド又は非天然ペプチドのいずれであってもよい。本明細書において「天然ペプチド」とは、自然界に天然に存在し得るペプチドをいう。天然ペプチドとしては、標準アミノ酸からなる天然ペプチドの他、セレノシステインやD-アミノ酸等の非標準アミノ酸を含む天然ペプチドも挙げられる。本明細書において「非天然ペプチド」とは、天然ペプチド以外の任意のペプチドを意味する。非天然ペプチドは、人工ペプチドと呼ぶこともできる。非天然ペプチドとしては、標準アミノ酸からなるペプチドの他、セレノシステインやD-アミノ酸等の非標準アミノ酸を含むペプチドも挙げられる。また、ペプチドは、直鎖状ペプチド、分岐状ペプチド、又は環状ペプチドのいずれで

あってもよい。ペプチドの結合標的となり得る膜タンパク質の例としては、ニューロペプチド受容体（ソルチリン1等）、マクロファージスカベンジャー受容体1（MSR1又はSR-A1；class A scavenger receptor）、CD22（Siglec-2）等のシアル酸結合免疫グロブリン-タイプレクチン（Siglec）、Stabilin-1/2等のStabilin（class H scavenger receptor）、アシアロ糖タンパク質レセプター（ASGPR；class E scavenger receptor）、上皮成長因子受容体（EGFR）、マンノース受容体C型1（MRC1）、Lymphocyte antigen 27（DEC-205）、インテグリンCD11b/CD1（Mac-1）、Receptor for advanced glycation end product（RAGE）、Membrane-associated nucleic acid-binding protein（MNAB）、グルカゴン様ペプチド1（GLP1）受容体、トランスフェリン受容体（TfR）1、葉酸受容体（Folate receptor）、及び神経伝達物質受容体（例：アセチルコリン受容体）等が挙げられる。標的分子に結合し得るペプチドの具体例として、ニューロペプチド及びその活性断片、糖鎖結合ペプチド、ウイルスタンパク質、並びに人工ペプチドが挙げられる。ニューロペプチドの具体例として、ニューロテンシン等が挙げられる。ウイルスタンパク質の例として、狂犬病ウイルスのグリコプロテイン又はその断片が挙げられる。人工ペプチドの具体例として、T7ペプチドやT12ペプチド等のトランスフェリン受容体結合ペプチドや、上記いずれかのペプチドのD体レトロインベルソペプチドが挙げられる。人工ペプチドのさらなる例として、過去の文献（Fan X., et al., Pharm Res., 2007, 24(5): 868-79.）においてBBB通過リガンドとしてファージディスプレイで同定された、配列番号31で示すアミノ酸配列（CAGALCY）、又は配列番号30で示すアミノ酸配列（LGDPNSCAGALCY）からなる環状ペプチドや、別の文献（Pleiko K., et al., Nucleic Acids Research, 2021, 49(7): e38.）においてBBB通過リガンドとして同定された、配列番号32で示すアミノ酸配列（CLNSNKTNC）からなる環状ペプチド及び配列番号33で示すアミノ酸配列（CWRENKAKC）からなる環状ペプチドも挙げられる。なお、これらの環状ペプチドは、前述のアミノ酸配列中の2つのCys残基がジスルフィド結合を形成することにより環状化していることが好ましい。ペプチドのさら

なる例としてGLP1ペプチド等も挙げられる。

[0075] 本明細書において「ニューロテンシン」(Neurotensin;本明細書においてしばしば「NT」と表記する)とは、脳において発現が見られる約10個以上のアミノ酸からなるニューロペプチドである。ニューロテンシンは中枢神経系において広く発現し、神経伝達物質やホルモンとして機能し得るニューロペプチドである。ニューロテンシンの具体的機能としては、鎮痛、運動能力の向上、及びドーパミン経路の調節が知られている。また、ニューロテンシンの受容体として、ソルチリン1 (Sortilin 1) が知られている。ニューロテンシンを結合させたアンチセンスオリゴヌクレオチドでは細胞への取り込みが向上することが知られている (Nikan M. et al., J Med Chem., 2020, 63(15):8471-8484.)。ニューロテンシンの由来生物種は問わず、例えば、ヒト、ウシ、ラット、マウスに由来してもよい。ヒト、ウシ、ラット、及びマウス由来の野生型ニューロテンシンとして、配列番号5で示すアミノ酸配列 (LYENKPRRPYIL) が挙げられる。また、配列番号5で示すアミノ酸配列のN末端側にピログルタミン酸 (pyroGlu) が付加した配列番号22で示すアミノ酸配列 (pyroGlu-LYENKPRRPYIL)、及びピロロイシン (pyroLeu) が付加した配列番号23で示すアミノ酸配列 (pyroLeu-LYENKPRRPYIL) も、ニューロテンシンのさらなる例として挙げられる。さらに、配列番号5、22、若しくは23で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、ヒト野生型ニューロテンシンと同等以上の活性を有する変異型ニューロテンシン;又は配列番号5、22、若しくは23で示すアミノ酸配列と80%以上、85%以上、好ましくは90%以上、95%以上、より好ましくは96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、ヒト野生型ニューロテンシンと同等以上の活性を有する変異型ニューロテンシンも挙げられる。また、ニューロテンシンをコードする遺伝子の例として、配列番号24で示す塩基配列からなるヒトニューロテンシン遺伝子、配列番号25で示す塩基配列からなるマウスニューロテンシン遺伝子、及び配列番号26で示す塩基配列からなるウシニューロテンシン遺伝子が挙

げられる。

[0076] 「狂犬病ウイルスのグリコプロテイン」(Rabies Virus Glycoprotein;本明細書においてしばしば「RVG」と表記する)は、狂犬病ウイルスのウイルス表面に見出される膜糖タンパク質である。RVGは、狂犬病ウイルスの哺乳動物細胞への感染に必要であることが知られており、神経細胞によって発現されるアセチルコリン受容体に結合することができる。本明細書において狂犬病ウイルスのグリコプロテインの「その断片」とは、RVGの一部からなる活性断片であり、そのアミノ酸長は制限しない。RVGの「その断片」の具体例としては、配列番号30で示すアミノ酸配列(YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG)、又は配列番号30で示すアミノ酸配列を含むペプチド断片が挙げられる。

[0077] 本明細書において「トランスフェリン受容体結合ペプチド」は、トランスフェリン受容体(TfR)に結合するペプチドであれば、標準アミノ酸からなる天然若しくは非天然ペプチド、又は非標準アミノ酸を含む天然若しくは非天然ペプチドのいずれであってもよい。トランスフェリン受容体結合ペプチドの例として、トランスフェリン、T7ペプチド、及びT12ペプチドが挙げられる。

[0078] 「トランスフェリン」は、鉄イオンの輸送を担う糖タンパク質であり、主に血漿中に含まれることが知られている。トランスフェリンの由来生物種は、特に限定しない。トランスフェリンの具体例として、配列番号27で示すアミノ酸配列からなるヒトトランスフェリン、配列番号27に対して80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上のアミノ酸同一性を有するペプチド、配列番号27において1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。

[0079] 本明細書において「T7ペプチド」とは、ヒトトランスフェリン受容体(hTfR)に対するファージディスプレイによって取得された7アミノ酸からなるペプチド及びその関連ペプチドをいう。T7ペプチドとトランスフェリンとは、トランスフェリン受容体に対する結合部位が異なっており、競合しないこと

が知られている (Lee, J.H., et al, Eur J Biochem., 2001, 268(7):2004-12.)。T7ペプチドの具体例として、配列番号20で示すアミノ酸配列 (HAIYPRH) からなるペプチドや、配列番号14で示すアミノ酸配列 (CHAIYPRH) からなるペプチド；配列番号20又は14で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、T7ペプチドと同等以上の活性を有するペプチド；又は配列番号20又は14で示すアミノ酸配列と80%以上、85%以上、好ましくは90%以上、95%以上、より好ましくは96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、T7ペプチドと同等以上の活性を有するペプチドが挙げられる。本明細書においてL体アミノ酸残基から構成されるT7ペプチドを特に「LT7」と呼び、特に断りのない場合には、T7ペプチドはL体アミノ酸残基から構成されるLT7を意味するものとする。

[0080] 本明細書において「T12ペプチド」とは、ヒトトランスフェリン受容体 (hTFR) に対するファージディスプレイによって取得された12アミノ酸からなるペプチド及びその関連ペプチドである。T12ペプチドとトランスフェリンとは、トランスフェリン受容体に対する結合部位が異なっており、競合しないことが知られている (Lee, J.H., et al, Eur J Biochem., 2001, 268(7):2004-12.)。T12ペプチドの具体例として、配列番号16で示すアミノ酸配列 (THRP PMWSPVWP) からなるペプチド；配列番号16で示すアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、T12ペプチドと同等以上の活性を有するペプチド；又は配列番号16で示すアミノ酸配列と80%以上、85%以上、好ましくは90%以上、95%以上、より好ましくは96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、T12ペプチドと同等以上の活性を有するペプチドが挙げられる。本明細書においてL体アミノ酸残基から構成されるT12ペプチドを特に「LT12」と呼び、特に断りのない場合には、T12ペプチドはL体アミノ酸残基から構成されるLT12を意味するものとする。

[0081] 本明細書において「D体レトロインベルソペプチド (D-retro-inverso-pept

ide) 」とは、L体アミノ酸残基から構成される通常のペプチドに対して、ペプチドを構成するアミノ酸残基のすべてがD体アミノ酸残基に置換されたペプチドであって、アミノ酸配列を逆向きに並べ替えたアミノ酸配列からなるものをいう。D体レトロインベルソペプチドでは、側鎖の元の空間配置及びキラリティーは実質的には変化せず、標的に対する結合は維持されるか又は増大し得ると考えられている。また、D体アミノ酸残基から構成されるためにプロテアーゼ耐性を有することも知られている。D体レトロインベルソペプチドの具体例として、ニューロテンシンのD体レトロインベルソペプチド（例えば、配列番号28で示すアミノ酸配列hrpyiahcからなり、D体アミノ酸残基からなるDT7ペプチド）や、トランスフェリン受容体結合ペプチドのD体レトロインベルソペプチド（例えば、配列番号29で示すアミノ酸配列pwvpswmprrhtからなり、D体アミノ酸残基からなるDT12ペプチド）が挙げられる。なお、本明細書中に記載のアミノ酸配列において小文字で表記したアミノ酸残基はD体アミノ酸残基を示すものとし、大文字表記のL体アミノ酸残基から区別する。また、特に断りのない限り、本明細書中に記載するアミノ酸配列はN末端側からC末端側に向かう方向で記載するものとする。

[0082] 抗体は、中枢神経系において細胞表面に発現する標的分子に結合することができるものであれば限定しない。例えば、抗ソルチリン1抗体、抗MSR1抗体、及び抗Siglec抗体（例えば、抗CD22抗体又は抗Siglec-2抗体、抗CD33抗体又は抗Siglec-3抗体、抗MAG抗体又は抗Siglec-4抗体、又は抗Siglec-11抗体）、抗Stabilin抗体、抗ASGPR抗体、抗Lymphocyte antigen 27抗体、抗インテグリンCD11b/CD1抗体、抗RAGE抗体、抗MNAB抗体、抗GLP1受容体抗体、抗TfR抗体（抗TfR Fab）、抗葉酸受容体抗体等が挙げられ。さらなる抗体の例として、アセチルコリン受容体、グルタミン酸受容体、GABA受容体等の神経伝達物質受容体に結合する抗体（例えば抗アセチルコリン受容体抗体）も挙げられる。

[0083] 標的結合分子として第2核酸鎖と結合することができる糖は、単糖又は糖鎖のいずれであってもよい。単糖の例として、GalNAcやマンノースや例示され

る。N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) は上述のアシアロ糖タンパク質レセプターの高親和性リガンドとして、マンノースはMRC1等のマンノース受容体のリガンドとして知られている。

[0084] 標的結合分子として第2核酸鎖と結合することができる低分子の例として、葉酸が挙げられる。葉酸は、がん細胞等に発現する葉酸受容体 (Folate receptor) に結合することが知られている。

[0085] 第2核酸鎖と結合している標的結合分子の数は、少なくとも1個であり、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、又は6個以上であってもよい。

[0086] 標的結合分子は、第2核酸鎖の5'末端、又は3'末端、或いは両端のいずれに結合していてもよい。また、標的結合分子は第2核酸鎖の内部のヌクレオチド又はヌクレオシドに結合していてもよい。標的結合分子は第2核酸鎖の内部に結合している場合、標的結合分子は塩基部分又は糖部分 (例えば2'位) に結合していてもよい。

[0087] 第2核酸鎖と標的結合分子との結合は、直接結合であってもよいし、他の物質によって介在される間接結合であってもよい。

[0088] 第2核酸鎖と標的結合分子が直接結合をする場合、例えば、共有結合、イオン性結合、水素結合等を介して第2核酸鎖に結合されていればよい。より安定した結合を得ることができるという点を鑑みれば、共有結合が好ましい。

[0089] 第2核酸鎖と標的結合分子が間接結合をする場合、連結基 (本明細書では、しばしば「リンカー」と表記する。なお、後述の第1核酸鎖と第2核酸鎖と結合し得るリンカーと区別するために、第2核酸鎖と標的結合分子とを結合し得るリンカーを「第1のリンカー」と呼ぶ場合がある) を介して結合していてもよい。リンカーは切断可能な (cleavable) リンカー又は非切断 (uncleavable) リンカーにいずれであってもよい。

[0090] 「切断可能なリンカー」とは、生理学的条件下、例えば、細胞内又は動物体内 (例えば、ヒト体内) で切断され得るリンカーを意味する。切断可能なリンカーは、ヌクレアーゼ等の内在性酵素によって選択的に切断される。切断可能なリンカーは、限定はしないが、アミド、エステル、ホスホジエステル

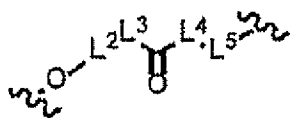
の一方若しくは両方のエステル、リン酸エステル、カルバメート、及びジスルフィド結合、並びに天然DNAリンカー（例えば、1~50塩基長、2~10塩基長、又は3~5塩基長）が挙げられる。一例として、標的結合分子がジスルフィド結合を介して連結されていてもよい。

[0091] 「非切断性リンカー」とは、生理学的条件下、例えば、細胞内又は動物体内(例えば、ヒト体内)で切断されないリンカーを意味する。非切断性リンカーは、限定はしないが、ホスホロチオエート結合、及びホスホロチオエート結合で連結された修飾若しくは非修飾のデオキシリボヌクレオシド又は修飾若しくは非修飾のリボヌクレオシドからなるリンカー等が挙げられる。リンカーがDNA等の核酸又はオリゴヌクレオチドの場合、鎖長は、特に限定はされないが、通常は2~20塩基長、3~10塩基長、又は4~6塩基長であればよい。

[0092] リンカーの具体的な構成は、限定せず、例えばアルキル基、アミノ基、オキソ基、アミド基、及び／又はエーテル基を含んでもよい。リンカーの一例として、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸スクシンイミジル(SMCC)及び6-アミノヘキサン酸(AHEX又はAHA)を挙げることができる。リンカーの他の例として、任意に置換されていてもよいC₁~C₁₀アルキル、任意に置換されていてもよいC₂~C₁₀アルケニル、又は任意に置換されていてもよいC₂~C₁₀アルキニルが挙げられる。置換基は、ヒドロキシル基、アミノ基、アルコキシ基、カルボキシ基、ベンジル基、フェニル基、ニトロ基、チオール基、チオアルコキシ基、ハロゲン基、アルキル基、アリール基、アルケニル基、及び／又はアルキニル基であってもよい。

[0093] リンカーの一例として、以下の式(IV)で表される基を含むリンカーが挙げられる。

[0094] [化4]



(IV)

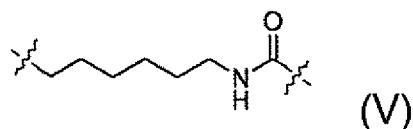
[式中、 L^2 は、置換された若しくは置換されていない $C_1\sim C_{12}$ のアルキレン基（例、プロピレン、ヘキシレン、ドデシレン）、置換された若しくは置換されていない $C_3\sim C_8$ シクロアルキレン基（例、シクロヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ を表し、 L^3 は、 $-NH-$ 又は結合を表し、 L^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_1\sim C_{12}$ のアルキレン基（例、エチレン、ペンチレン、ヘプチレン、アンデシレン）、置換された若しくは置換されていない $C_3\sim C_8$ のシクロアルキレン基（例、シクロヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_2]_m-$ 、又は結合を表し、ここで、 m は1~25の整数を表し、 L^5 は、 $-NH-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、又は結合を表す（ここで、該置換は、好ましくはハロゲン原子によりなされる）。]

[0095] 一実施形態において、式(IV)で表される基は、 L^2 が、置換されていない $C_3\sim C_6$ のアルキレン基（例、プロピレン、ヘキシレン）、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ であり、 L^3 が、 $-NH-$ であり、 L^4 及び L^5 が、結合である。

[0096] 一実施形態において、リンカーは、核酸、ポリエーテル基、及び／又はアルキルアミノ基を含む。核酸は、例えば、1個、又はヌクレオシド間結合により連結された2~10個のヌクレオシド及び／若しくは非天然ヌクレオシドからなるものであってもよい。また、ポリエーテル基の例として、ポリエチレングリコール基又はトリエチレングリコール基が挙げられる。アルキルアミノ基の例として、ヘキシルアミノ基が挙げられる。

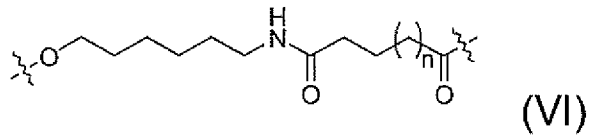
[0097] また、リンカーのさらなる例として、以下の式(V)又は式(VI)で表わされる基を含むリンカーが挙げられる。

[0098] [化5]



[0099]

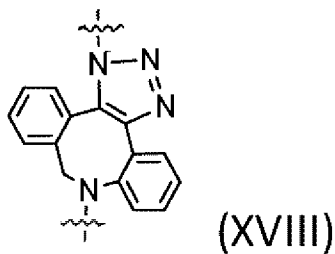
[化6]



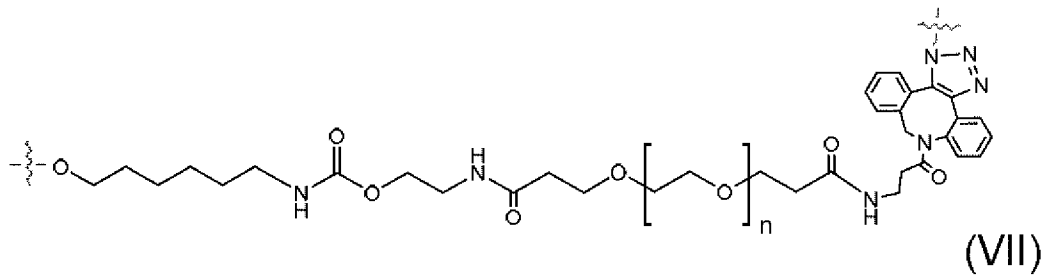
[式中、nは0又は1を表す。]

[0100] さらなる具体例として、リンカーは、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim C_{12}$ のアルキレン基（例、エチレン、ペンチレン、ヘプチレン、アンデシレン）、ポリエチレングリコール等のポリエーテル、及びシクロオクチン誘導体を含む。シクロオクチン誘導体を含むリンカーの例としては、ジベンゾシクロオクチン（DBC0）誘導体を含むリンカー（本明細書において「DBC0リンカー」という）及びビスシクロノニン（BCN）誘導体を含むリンカー（本明細書において「BCNリンカー」という）が挙げられる。DBC0リンカー及びBCNリンカーはクリック反応による連結反応に利用することができ、様々な種類のリンカーが当該分野で知られている。例えば、DBC0リンカーの具体例として、以下の式(XVIII)で表わされるリンカー（例：以下の式(VII)で表わされるリンカー）を挙げることができ、BCNリンカーの具体例として、以下の式(XIX)で表わされるリンカー（例：以下の式(XVII)で表わされるリンカー）を挙げることができる。

[0101] [化7]

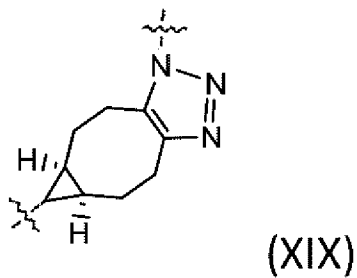


[化8]

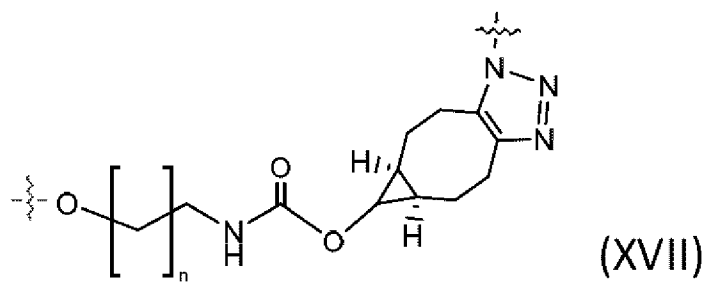


[式中、nは1～10を表し、例えば4であってもよい。]

[化9]



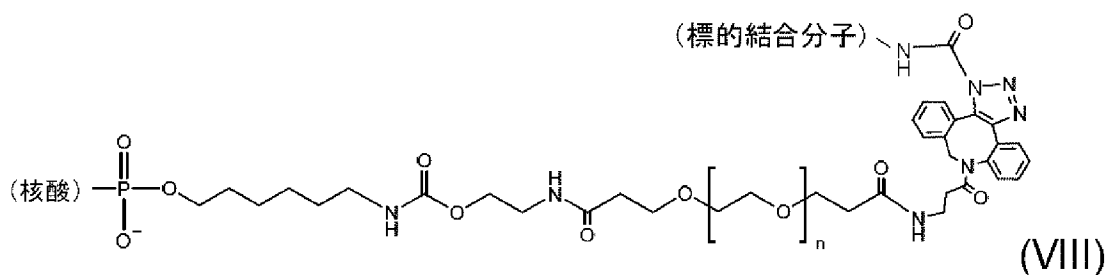
[化10]



[式中、nは1～10を表し、例えば5であってもよい。]

[0102] 一実施形態において、上記式(VII)で表されるリンカーは、以下の式(VIII)で表されるリンカーであってもよい。

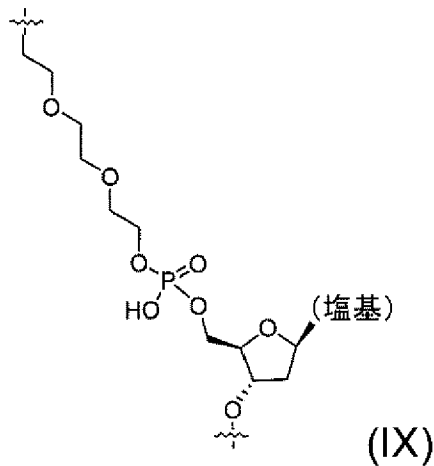
[0103] [化11]



[式中、nは1～10を表し、例えば4であってもよい。]

[0104] また、リンカーのさらなる例として、以下の式(IX)で表わされる基を含むリンカーが挙げられる。

[0105] [化12]



[0106] さらなるリンカーの具体例は、当該技術分野で核酸やペプチド等の標的結合分子との連結に使用可能な公知のリンカーから適宜選択することができる。例えば、Nikan M. et al., J Med Chem., 2020, 63(15):8471-8484.に記載のリンカーを用いることができる。また、リンカーの合成方法やリンカーを介した核酸とペプチド等の標的結合分子の連結方法についても当該技術分野で公知であり、上記文献等を参照することができる。

[0107] 標的結合分子とリンカーとの間の連結は、直接的な連結であってもよく、或いはスペーサーを介した間接的な連結であってもよい。スペーサーを介した間接的な連結では、核酸とペプチドとの間の分子内相互作用を抑制できるため好ましい場合がある。スペーサーは、1つのアミノ酸残基であっても、2以上のアミノ酸残基（この場合、スペーサーペプチドという）であってもよい。スペーサーペプチドの例として、配列番号4で示すアミノ酸配列 (KPPPAGSSPG) からなるペプチドが挙げられる。

[0108] 本発明の二本鎖核酸複合体において、第1核酸鎖はギャップマー (gapmer) であってもよい。本明細書において「ギャップマー」とは、原則として、中央領域 (DNAギャップ領域) と、その5'末端及び3'末端に直接配置されたウイ

ング領域（それぞれ、5' ウィング領域及び3' ウィング領域と称する）からなる一本鎖核酸をいう。DNAギャップ領域の長さは、13~22塩基長、16~22塩基長、若しくは16~20塩基長、又は2~20塩基長、4~20塩基長、5~18塩基長、6~16塩基長、7~14塩基長、若しくは8~12塩基長であってもよい。ギャップマーにおける前記中央領域は少なくとも2個、例えば少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み、前記ウィング領域は少なくとも1つの非天然ヌクレオシドを含む。限定はしないが、ウィング領域に含まれる非天然ヌクレオシドは、通常、天然ヌクレオシドよりもRNAとの結合力が高く、核酸分解酵素(ヌクレアーゼ等)に対する耐性の高い性質を有する。ウィング領域を構成する非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドを含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「BNA/DNAギャップマー」と称する。5' ウィング領域及び3' ウィング領域に含まれる架橋ヌクレオシドの数は、少なくとも1個であり、例えば、2又は3個であってもよい。5' ウィング領域及び3' ウィング領域に含まれる架橋ヌクレオシドは、5' ウィング領域及び3' ウィング領域内に連続又は非連続に存在していてもよい。架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)をさらに含むことができる。架橋ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである場合、前記ギャップマーを「LNA/DNAギャップマー」と称する。5' ウィング領域及び3' ウィング領域を構成する非天然ヌクレオシドがペプチド核酸を含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「ペプチド核酸ギャップマー」と称する。5' ウィング領域及び3' ウィング領域を構成する非天然ヌクレオシドがモルホリノ核酸を含む、又はそれからなる場合、前記ギャップマーを特に「モルホリノ核酸ギャップマー」と称する。5' ウィング領域及び3' ウィング領域の塩基長は、それぞれ独立して、少なくとも2塩基長、例えば、2~10塩基長、2~7塩基長、又は3~5塩基長であればよい。一実施形態において、5' ウィング領域及び/又は3' ウィング領域は、非天然ヌクレオシドを少なくとも1種含んでいればよく、天然ヌクレオシドをさらに含んでいてもよい。5' ウィング領域及び3' ウィング領域は、例えば、ホスホロチオエート結合等の修飾ヌクレオシド間結合で連結さ

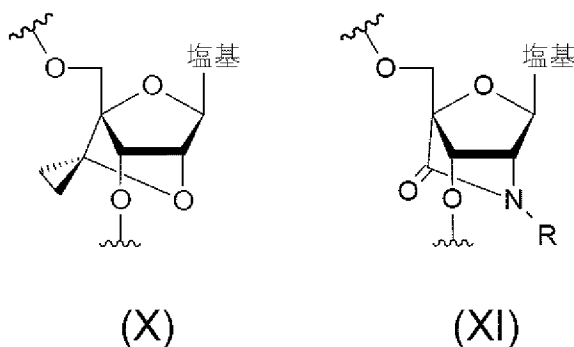
れた非天然ヌクレオシド、例えばLNAヌクレオシド等の架橋ヌクレオシドや、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド等の2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0109] 前記ギャップマーを構成する第1核酸鎖は、5'末端から順に、2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の架橋ヌクレオシド、4~15塩基長若しくは8~12塩基長（例えば8又は10塩基長）のリボヌクレオシド又はデオキシリボヌクレオシド、及び2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の架橋ヌクレオシドから構成されていてもよい。

[0110] なお、ウイング領域を5'末端側又は3'末端側のいずれか一方にのみ有する核酸鎖は、当該分野では「ヘミギャップマー」と呼ばれるが、本明細書においては、ヘミギャップマーもギャップマーに包含されるものとする。

[0111] 本発明の二本鎖核酸複合体において第1核酸鎖は、ミックスマー (mixmer) であってもよい。本明細書において「ミックスマー」とは、周期的又は無作為セグメント長の交互型の天然ヌクレオシド及び非天然ヌクレオシドを含み、かつ4個以上の連続するデオキシリボヌクレオシド及びリボヌクレオシドを含まない核酸鎖をいう。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドであり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「BNA/DNAミックスマー」と称する。前記架橋ヌクレオシドは、以下の式 (X) で示される scpBNAヌクレオシド、又は以下の式 (XI) で示される AmNAヌクレオシドであってもよい。

[0112] [化13]



(式中、Rは水素原子又はメチル基を示す。)

[0113] 上記式 (X) で示される架橋型の非天然ヌクレオシドは、 $2'-0,4'-C$ -スピロシクロプロピレン架橋型核酸であり、本明細書では主として「scpBNA」と表記する。また、上記式 (XI) で示される架橋型の非天然ヌクレオシドは、アミドBNA (アミド架橋型核酸) であり、 $(4'-C(O)-N(R)-2')$ BNA ($R=H, Me$) と表記することもできるが、本明細書では主として「AmNA」と表記する。上記式 (XI) 中、Rは水素原子又はメチル基のいずれであってもよい。本明細書において、特に断りのない場合、Rは水素原子又はメチル基のいずれであってもよいが、両者を区別する場合には、Rが水素原子の場合にはAmNA[N-H]、Rがメチル基の場合にはAmNA[N-Me]と表記することもできる。

[0114] また、ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドがペプチド核酸であり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「ペプチド核酸/DNAミックスマー」と称する。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドがモルホリノ核酸であり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「モルホリノ核酸/DNAミックスマー」と称する。ミックスマーは、2種のヌクレオシドのみを含むようには制限されない。ミックスマーは、天然若しくは修飾のヌクレオシド又はヌクレオシド模倣体であるか否かに関わらず、任意の数の種類のヌクレオシドを含むことができる。例えば、架橋ヌクレオシド(例えば、LNAヌクレオシドや上記式 (X) 又は式 (XI) で示される架橋型の非天然ヌクレオシド)により分離された1又は2個の連続するデオキシリボヌクレオシドを有してもよい。架橋ヌクレオシドは、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)をさらに含んでもよい。

[0115] さらに実施形態において、本発明の二本鎖核酸複合体において第1核酸鎖は、モルホリノ核酸、 $2'-0$ -メチル修飾ヌクレオシド、 $2'-0$ -メトキシエチル修飾ヌクレオシド、トリシクロDNA、ペプチド核酸、又は $2'-0$ -[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]修飾ヌクレオシドのいずれか1以上を含む。例えば、第1核酸鎖中の核酸は、モルホリノ核酸からなるものであってもよい。

[0116] 一実施形態では、第2核酸鎖は、第1核酸鎖の中央領域における上記の少な

くとも2個（例えば少なくとも3個又は4個）の連続するヌクレオシド（例えばデオキシリボヌクレオシド）に相補的な、少なくとも2個（例えば少なくとも3個又は4個）の連続するリボヌクレオシドを含んでいてもよい。第2核酸鎖が、第1核酸鎖と部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖を形成し、RNaseHによって認識され切断されるようにするためである。第2核酸鎖中の少なくとも2個（例えば少なくとも3個又は4個）の連続するリボヌクレオシドは、好ましくは、天然に存在するヌクレオシド間結合、すなわちホスホジエステル結合によって連結される。

[0117] さらに実施形態では、第2核酸鎖は、上記の少なくとも2個（例えば少なくとも3個又は4個）の連続するリボヌクレオシドに加えて、少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドをさらに含んでもよい。当該少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドは、第1核酸鎖に相補的であり、第1核酸鎖の中央領域に相補的な領域に含まれてもよい。当該少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドは、上記の少なくとも4個（例えば少なくとも3個又は4個）の連続するリボヌクレオシドの5'側又は3'側のいずれに位置してもよく、5'側及び3'側の両方に位置してもよい。また、当該少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドは、2個、3個、4個、5個、又は6個以上の連続するデオキシリボヌクレオシドであってもよい。

[0118] 第2核酸鎖の末端（5'末端、3'末端、又は両末端）から少なくとも1個、少なくとも2個（例えば2個）、少なくとも3個、又は少なくとも4個のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドであってもよい。修飾ヌクレオシドは、修飾糖及び／又は修飾核酸塩基を含んでいてもよい。修飾糖は、2'-修飾糖（例えば、2'-O-メチル基を含む糖）であってもよい。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンとすることもできる。

[0119] 第2核酸鎖は、5'末端から順に、2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の修飾ヌクレオシド（例えば、2'-修飾糖を含む修飾ヌクレオシド）、4~15塩基長若しくは8~12塩基長（例えば8又は10塩基長）の（場合により、修飾ヌクレオシド間結合で連結された）リボヌクレオシド又はデオキ

シリボヌクレオシド、及び2~7塩基長若しくは3~5塩基長（例えば2又は3塩基長）の修飾ヌクレオシド（例えば、2'-修飾糖を含む修飾ヌクレオシド）から構成されていてもよい。この場合、第1核酸鎖は、ギャップマーであってもよい。

[0120] 第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖は、全部又は一部にヌクレオシド模倣体又はヌクレオチド模倣体を含んでもよい。ヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸及び／又はモルホリノ核酸であってもよい。

[0121] 一実施形態において、第2核酸鎖は、デオキシリボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド、5'修飾ヌクレオシド、及び架橋型ヌクレオシドからなる群から選択されるいずれか1以上を含む。2'修飾ヌクレオシドは、例えば2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド、又は2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]修飾ヌクレオシドであってもよい。5'修飾ヌクレオシドは、例えば5'-cp修飾ヌクレオシド、5'-メチル修飾ヌクレオシド、又は5'-ジメチル修飾ヌクレオシドであってもよい。架橋型ヌクレオシドは、例えばLNAヌクレオシド、2',4'-BNA^{NC}ヌクレオシド、cEt BNAヌクレオシド、ENAヌクレオシド、AmNAヌクレオシド、GuNAヌクレオシド、scpBNAヌクレオシド、scpBNA2ヌクレオシド、又はBANA3ヌクレオシドであってもよい。第2核酸鎖に含まれる、デオキシリボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド、5'修飾ヌクレオシド、又は架橋型ヌクレオシドの数は少なくとも1個であってもよく、第2核酸鎖を構成する全てのヌクレオシドの数（すなわち、第2核酸鎖の塩基長）以下であってもよい。第2核酸鎖に含まれる、デオキシリボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド、5'修飾ヌクレオシド、及び／又は架橋型ヌクレオシドの具体的な数は、例えば2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、又は10個以上であってもよく、30個以下、25個以下、20個以下、15個以下、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、又は2個以下であってもよい。例えば、第2核酸鎖において、デオキシリボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド、5'修飾ヌクレオシド、及び／又は架橋型ヌクレオシドの数は、1~30個、1~25

個、1~24個、1~23個、1~22個、1~21個、1~20個、1~19個、1~18個、1~17個、1~16個、1~15個、1~14個、1~13個、1~12個、1~11個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、又は1~6個であってもよい。例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個であってもよい。

[0122] 一実施形態において、第2核酸鎖は、5'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む。本明細書において「連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む」とは、任意のヌクレオシド間結合で連結された複数の2'-修飾ヌクレオシドを含むことを意味する。例えば、第2核酸鎖は、5'末端に位置する1個、又は連続する2~12個、2~10個、2~8個、2~6個、2~5個、2~4個、若しくは2~3個、例えば2個、3個、若しくは4個の2'-修飾ヌクレオシドを含んでもよい。

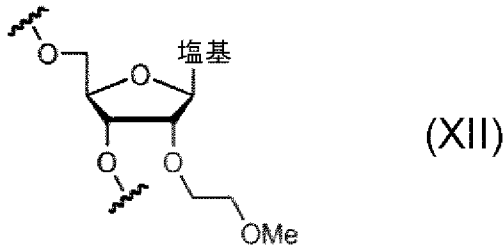
[0123] 一実施形態において、第2核酸鎖は、3'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む。例えば、第2核酸鎖は、3'末端に位置する1個、又は連続する2~12個、2~10個、2~8個、2~6個、2~5個、2~4個、若しくは2~3個、例えば2個、3個、若しくは4個の2'-修飾ヌクレオシドを含んでもよい。

[0124] さらに実施形態では、第2核酸鎖は、5'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシド、及び3'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシドを含む。

[0125] 一実施形態において、第2核酸鎖は、5'末端及び3'末端以外の位置に2'-修飾ヌクレオシドを含む。本明細書において、第2核酸鎖が「5'末端及び3'末端以外の位置に2'-修飾ヌクレオシドを含む」とは、上述の5'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシド、及び3'末端に位置する1個又は連続する複数の2'-修飾ヌクレオシド以外の位置に2'-修飾ヌクレオシドを含むことを意味する。例えば、第2核酸鎖は、5'末端及び3'末端以外の位置に1~30個、1~25個、1~20個、1~15個、1~12個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、又は1~3個、例えば1個又は2個の2'-修飾ヌクレオシドを含む。

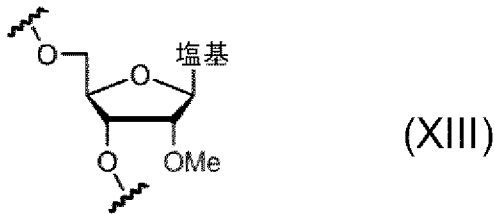
[0126] 一実施形態において、2'-修飾ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド及び／又は2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである。2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドは、以下の式 (XII) :

[化14]



で示される。また、2'-O-メチル修飾ヌクレオシドは、以下の式 (XIII) :

[化15]



で示される。

[0127] 一実施形態において、第1核酸鎖では、ヌクレオシドの全てが非天然ヌクレオシド又は修飾ヌクレオシドであってもよい。さらなる実施形態において、第1核酸鎖では、ヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。なおさらなる実施形態では、第1核酸鎖において、ヌクレオシドの全てが2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0128] 第1核酸鎖は、標的転写産物にハイブリダイズしている場合に、RNase Hによって認識される少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、又は少なくとも7個の連続するヌクレオシドを含むことができる。通常、2~20塩基、4~20塩基、5~16塩基、又は6~12塩基の連続するヌクレオシドを含む領域であればよい。RNase Hによって認識されるヌクレオシドとして、例えば天然型デオキシリボヌクレオシドを用いることができる。修飾されたデオキシリボヌクレオシド、及び他の塩基を含む好適な

ヌクレオシドは、当該分野において周知である。また、リボヌクレオシド等の、2'位にヒドロキシ基を有するヌクレオシドが、前記ヌクレオシドとして不適当であることも知られている。「少なくとも2個の連続するヌクレオシド」を含むこの領域への利用に関し、ヌクレオシドの適合性を容易に決定することができる。一実施形態で、第1核酸鎖は、少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み得る。別の実施形態で、第1核酸鎖は、少なくとも4個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含み得る。

[0129] 一実施形態において、第1核酸鎖のヌクレオシドは、デオキシリボヌクレオシドを含むか又はこれからなり、例えば第1核酸鎖のヌクレオシドの70%以上、80%以上、90%以上、又は95%以上がデオキシリボヌクレオシドである。

[0130] 一実施形態において、第2核酸鎖は、第1核酸鎖の5'ウイング領域及び/又は3'ウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域に2'-修飾ヌクレオシドを含む。さらなる実施形態では、第2核酸鎖は、第1核酸鎖の5'ウイング領域及び/又は3'ウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドであり得る。

[0131] 一実施形態において、(i)第1核酸鎖における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、(ii)当該グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、(iii)当該グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は(iv)上記(i)~(iii)の任意の組合せに相補的である第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。さらなる実施形態では、(i)第1核酸鎖における全てのグアノシンヌクレオシド、(ii)当該グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、(iii)当該グアノシンヌクレオシドの3'末端側に隣接するヌクレオシド、又は(iv)上記(i)~(iii)の任意の組合せに相補的である第2核酸鎖におけるヌクレオシドが、2'-修飾ヌクレオシドであってもよい。

[0132] 一実施形態では、(i)第1核酸鎖の3'ウイング領域及び/又は5'ウイング領域における少なくとも1個のグアノシンヌクレオシド、(ii)当該グアノシンヌクレオシドの5'末端側に隣接するヌクレオシド、(iii)当該グアノシンヌクレ

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

[0133] 一実施形態では、第2核酸鎖において、第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドは、(a)デオキシリボヌクレオシド、(b)デオキシリボヌクレオシド及びリボヌクレオシド、(c)デオキシリボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、又は(d)リボヌクレオシド及び2'-修飾ヌクレオシド、又は(e)デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、及び2'-修飾ヌクレオシドである。

[0134] 一実施形態では、第1核酸鎖の5'ウイング領域及び3'ウイング領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドが2'-修飾ヌクレオシドであり、かつ第1核酸鎖の中央領域に相補的な塩基配列からなる領域の全てのヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであり得る。

[0135] 一実施形態では、第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの少なくとも1個が2'-修飾ヌクレオシド及び/又はデオキシリボヌクレオシドであってもよい。さらなる実施形態では、第2核酸鎖はピリミジン塩基を含む天然リボヌクレオシドを含まず、例えば第2核酸鎖においてピリミジン塩基を含むヌクレオシドの全てが2'-修飾ヌクレオシド及び/又はデオキシリボヌクレオシドであってもよい。

[0136] 一実施形態では、第2核酸鎖は、2'-修飾ヌクレオシドに加えて、2'-修飾ヌクレオシド以外の修飾ヌクレオシドを含んでもよい。例えば、第2核酸鎖は、上記式(X)で示されるscpBNAヌクレオシド、上記式(XI)で示されるAmNAヌクレオシド、又はオキシアミノ(4'-CH₂-N(R₃)-O-2')BNAヌクレオシド(2',4'-B

NAN^{nc}ヌクレオシドとしても知られている；R=Hは2',4'-BNAN^{nc}[N-H]ヌクレオシド、R=Meは2',4'-BNAN^{nc}[N-Me]ヌクレオシド)を少なくとも1個含んでもよい。

[0137] 一実施形態において、第2核酸鎖は、第1核酸鎖に対して、非相補的塩基、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含み得る。第2核酸鎖における非相補的塩基の数は、限定しないが、例えば1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、又は1個又は2個であってもよい。非相補的塩基からなる配列は後述のバルジ構造を形成していてもよい。第2核酸鎖における挿入配列の塩基長数は、限定しないが、例えば1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、又は1個又は2個であってもよい。挿入配列は後述のバルジ構造を形成する配列であってもよい。第2核酸鎖における欠失の連続する塩基長は、限定しないが、例えば1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、又は1個又は2個であってもよい。第2核酸鎖は、欠失位置に後述のバルジ構造を含んでもよい。

[0138] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基長は、特に限定されないが、少なくとも8塩基長、少なくとも9塩基長、少なくとも10塩基長、少なくとも11塩基長、少なくとも12塩基長、少なくとも13塩基長、少なくとも14塩基長、又は少なくとも15塩基長であってもよい。また、第1核酸鎖及び第2核酸鎖の塩基長は、35塩基長以下、30塩基長以下、25塩基長以下、24塩基長以下、23塩基長以下、22塩基長以下、21塩基長以下、20塩基長以下、19塩基長以下、18塩基長以下、17塩基長以下、又は16塩基長以下であってもよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖は、同じ長さであっても、異なる長さ（例えば、いずれか一方が1～3塩基短い又は長い長さ）であってもよい。一実施形態において、第2核酸鎖の長さは第1核酸鎖より短い。この場合、第2核酸鎖が第1核酸鎖と結合し得る位置は問わない。例えば、第1核酸鎖中の5'側の領域、中央の領域、又は3'側の領域のいずれと結合し得るものであってもよい。一実施形態において、第2核酸鎖が少なくとも8塩基長であってもよい。第1核酸鎖及び第2核酸鎖が形成する二本鎖構造は、バルジを含んでいてもよい。長さの選択は、例えば費用、合成収

率等の他の因子の中でも特に、アンチセンス効果の強度と標的に対する核酸鎖の特異性とのバランスによって決定することができる。

[0139] 一実施形態において、第2核酸鎖は、その5'末端側及び3'末端側の一方又は両方に位置する少なくとも1つのオーバーハング領域を含み得る。「オーバーハング領域」とは、第2核酸鎖において第1核酸鎖に相補的な領域に隣接する領域で、第1核酸鎖と第2核酸鎖がアニールして二本鎖構造を形成した場合、第2核酸鎖の5'末端が第1核酸鎖の3'末端を越えて伸長する、及び／又は第2核酸鎖の3'末端が第1核酸鎖の5'末端を越えて伸長する、つまり、二本鎖構造から突出した第2核酸鎖中のヌクレオチド領域を指す。第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、相補的領域の5'末端側に位置してもよく、3'末端側に位置してもよい。第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、相補的領域の5'末端側及び3'末端側に位置してもよい。

[0140] オーバーハング領域の長さは、限定しないが、1~20塩基長であってもよく、例えば2~15塩基長、2~12塩基長、2~10塩基長、2~8塩基長、2~6塩基長、2~5塩基長、2~4塩基長、又は2~3塩基長であってもよい。また、オーバーハング領域を構成するヌクレオシドの種類は限定しない。例えば、天然ヌクレオシド（例えばデオキシリボヌクレオシド）又は非天然ヌクレオシド（例えばLNAヌクレオシド等の架橋ヌクレオシド）で構成されていてもよい。また、オーバーハング領域のヌクレオシド間結合の全部又は一部は修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。修飾ヌクレオシド間結合は、例えばホスホロチオエート結合であってもよい。オーバーハング領域は、タンパク質結合性、脂溶性、及び／又はヌクレアーゼ耐性を有することが好ましく、例えばホスホロチオエート結合により連結されたデオキシリボヌクレオシド又はLNAヌクレオシドで構成されていてもよい。なお、オーバーハング領域の塩基配列は標的遺伝子の塩基配列と関係しない配列であってもよい。

[0141] 第2核酸鎖の末端（5'末端、3'末端、又は両末端）から少なくとも1個、少なくとも2個（例えば2個）、少なくとも3個、又は少なくとも4個のヌクレオシドは、非天然ヌクレオシド（修飾ヌクレオシド）であってもよい。修飾ヌ

クレオシドは、修飾糖及び／又は修飾核酸塩基を含んでいてもよい。修飾糖は、2'-修飾糖（例えば、2'-O-メチル基を含む糖）であってよい。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンとすることもできる。

[0142] 一実施形態において、第2核酸鎖は、第1核酸鎖との二本鎖形成が可能である限り、第1核酸鎖に対して1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、又は1~3個（例えば、1~2個、又は1個）の非相補的塩基、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、又は1~3個（例えば、1~2個、又は1個）の欠失塩基、及び／又は1~20個（例えば、1~15個、1~12個、1~10個、1~8個、1~6個、1~4個、1~3個、又は1個）の挿入塩基を有していてもよい。挿入塩基からなる配列領域はバルジ構造を形成してもよい。

[0143] 一実施形態において、第2核酸鎖は、第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を少なくとも1つ含む。本明細書において「バルジ構造」とは、二本鎖核酸において、二本鎖を構成するいずれかの核酸鎖の一部の核酸が塩基対合せずに二本鎖構造から突き出した部分をいう。バルジ構造の塩基長は、限定しない。例えば、1~50塩基長、1~40塩基長、1~30塩基長、1~20塩基長、1~15塩基長、好ましくは1~10塩基長である。

[0144] 第1核酸鎖及び第2核酸鎖におけるヌクレオシド間結合は、天然に存在するヌクレオシド間結合及び／又は修飾ヌクレオシド間結合であってよい。限定はしないが、第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖の末端（5'末端、3'末端若しくは両端）から少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合であることが好ましい。ここで、例えば核酸鎖の末端から2つのヌクレオシド間結合とは、核酸鎖の末端に最も近接するヌクレオシド間結合と、それに隣接し、かつ末端とは反対側に位置するヌクレオシド間結合を意味する。核酸鎖の末端領域における修飾ヌクレオシド間結合は、核酸鎖の望ましくない分解を抑制又は阻害できるため好ましい。

[0145] 一実施形態で、第1核酸鎖及び／又は第2核酸鎖の全部又は一部のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。一実施形態では、

第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、修飾ヌクレオシド間結合を1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、又はそれ以上含んでいてもよい。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、修飾ヌクレオシド間結合を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも98%、又は100%含んでいてもよい。一実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合又はボラノホスフェート結合であってよい。一実施形態において第1核酸鎖中の核酸がモルホリノ核酸からなる場合、第1核酸鎖中の全部又は一部のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であってもよい。

[0146] 一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、キラル制御されたヌクレオシド間結合を1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、又はそれ以上含んでいてもよい。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、キラル制御されたヌクレオシド間結合を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又はそれ以上含んでいてもよい。

[0147] 一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、非負荷電ヌクレオシド間結合（好ましくは、中性のヌクレオシド間結合）を1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、又はそれ以上含んでいてもよい。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、それぞれ、非負

荷電ヌクレオシド間結合を少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又はそれ以上含んでいてもよい。

[0148] 一実施形態では、第2核酸鎖の5'末端から少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。第2核酸鎖の3'末端から少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合、例えばホスホロチオエート結合、1~4個のC_{1~6}のアルキル基で置換されたグアニジン部分（例えば、TMG部分）を含むヌクレオシド間結合及び/又は環状グアニジン部分を含むヌクレオシド間結合であってもよい。修飾ヌクレオシド間結合は、R_p配置又はS_p配置にキラル制御されていてもよい。

[0149] 第2核酸鎖の3'末端から少なくとも1個（例えば3個）のヌクレオシド間結合は、RNase耐性の高いホスホロチオエート結合のような修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。第2核酸鎖の3'末端にホスホロチオエート修飾等の修飾ヌクレオシド間結合を含む場合、二本鎖核酸複合体の遺伝子抑制活性が向上するので好ましい。

[0150] 一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の修飾ヌクレオシド間結合は、あるpH（例えば、ヒトの生理学的pH（約7.4）、送達部位（例えば、オルガネラ、細胞、組織、臓器、生物体等）のpH等）において、当該修飾ヌクレオシド間結合が、アニオン形態（例えば、 $-O-P(0)(O^-)-O^-$ （天然リン酸結合のアニオン形態）、 $-O-P(0)(S^-)-O^-$ （ホスホロチオエート結合のアニオン形態）等）と比較して、中性形態又はカチオン形態として存在する非負荷電（それぞれ中性又はカチオン性の）ヌクレオシド間結合を含む。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の修飾ヌクレオシド間結合は、中性のヌクレオシド間結合を含む。一実施形態では、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖の修飾ヌクレオシド間結合は、カチオン性のヌクレオシド間結合を含む。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合（例えば、中性のヌクレオシド間結合）

は、その中性形態をとるとき、pKaが8未満、9未満、10未満、11未満、12未満、13未満、又は14未満の部分をも有さない。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合は、例えば、米国特許登録番号5,264,423及び5,286,717記載のメチルホスホネート結合、米国特許登録番号5,955,599記載のメチルホスホトリエステル結合、エチルホスホトリエステル結合、国際公開第2015/168172号記載のメトキシプロピルホスホネート結合、国際公開第2016/081600号記載の自己中和核酸(ZON)に用いられるヌクレオシド間結合等である。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合は、トリアゾール部分又はアルキン部分を含む。一実施形態では、非負荷電ヌクレオシド間結合は、環状グアニジン部分及び/又は1~4個のC_{1~6}のアルキル基で置換されたグアニジン部分（好ましくは、TMG部分）を含む。一実施形態では、環状グアニジン部分を含む修飾ヌクレオシド間結合は、式(II)で表される部分構造を有する。一実施形態では、1~4個のC_{1~6}のアルキル基で置換されたグアニジン部分は、式(III)で表される部分構造を有する。一実施形態では、環状グアニジン部分及び/又は1~4個のC_{1~6}のアルキル基で置換されたグアニジン部分を含む中性のヌクレオシド間結合は、キラル制御される。一実施形態では、本開示は、少なくとも1つの中性のヌクレオシド間結合及び少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。いずれかの特定の理論によって拘束されることを望むものではないが、少なくともいくつかの場合では、中性のヌクレオチド間結合は、中性のヌクレオチド間結合を含まない同等の核酸と比較して特性及び/又は活性を改善することができ、例えば、送達を改善し、エキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼに対する耐性を改善し、細胞取り込みを改善し、エンドソーム脱出を改善し、及び/又は核取り込みを改善等する。

[0151] 一実施形態において、第2核酸鎖は、標的結合分子に加えて、標的結合分子以外のさらなる分子と結合していてもよい。さらなる分子は、低分子、中分子、又は高分子のいずれであってもよく、例えば脂質分子が挙げられる。

[0152] 脂質分子は、トコフェロール、コレステロール、脂肪酸、リン脂質及びそ

これらの類縁体；葉酸、ビタミンC、ビタミンB1、ビタミンB2；エストラジオール、アンドロスタン及びこれらの類縁体；ステロイド及びその類縁体；LDLR、SRBI又はLRP1/2のリガンド；FK-506、及びシクロスポリン；W02019/182109、W02019/177061及びW02021054370に記載の脂質等が挙げられるが、これらに限定されない。また、脂質分子は、トコフェロール又はその類縁体及び/又はコレステロール又はその類縁体、置換された若しくは置換されていないC₁～₃₀のアルキル基、置換された若しくは置換されていないC₂～₃₀のアルケニル基、若しくは置換された若しくは置換されていないC₁～₃₀のアルコキシ基であってもよい。

[0153] 本明細書において「トコフェロール」は、トコロールのメチル化誘導体で、クロマンと呼ばれる環状構造を有する脂溶性ビタミン（ビタミンE）である。トコロールは、強い抗酸化作用を有しており、それ故に、生体内では、抗酸化物質として、代謝によって生じるフリーラジカルを消失させ、細胞を傷害から保護する機能を有する。

[0154] トコフェロールは、クロマンに結合するメチル基の位置に基づき、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、 γ -トコフェロール、及び δ -トコフェロールからなる複数の異なる型が知られている。本明細書におけるトコフェロールは、いずれのトコフェロールであってもよい。また、トコフェロールの類縁体としては、トコフェロールの種々の不飽和類縁体、例えば、 α -トコトリエノール、 β -トコトリエノール、 γ -トコトリエノール、 δ -トコトリエノール等が挙げられる。好ましくは、トコフェロールは、 α -トコフェロールである。

[0155] 本明細書において「コレステロール」とは、ステロイドアルコールとも呼ばれるステロールの1種であり、特に動物において多く存在する。コレステロールは、生体内における代謝過程で重要な機能を果たしている他、動物細胞では、リン脂質と共に細胞の膜系を構成する主要な構成成分でもある。また、コレステロールの類縁体は、ステロール骨格を有するアルコールである、種々のコレステロール代謝産物及び類縁体等を指し、限定されるものではない。

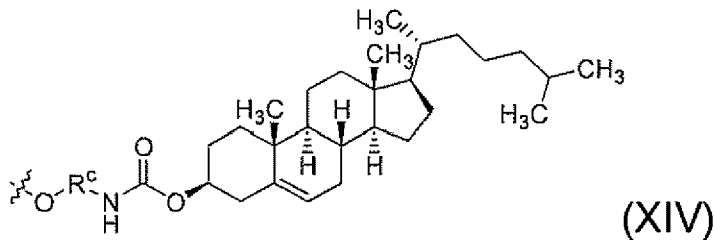
いが、コレスタノール、ラノステロール、セレブロステロール、デヒドロコレステロール、及びコプロスタノール等を含む。

[0156] 本明細書において「類縁体(analog)」とは、同一又は類似の基本骨格を有する類似した構造及び性質を有する化合物を指す。類縁体は、例えば、生合成中間体、代謝産物、置換基を有する化合物等を含む。ある化合物が他の化合物の類縁体であるか否かは、当業者であれば技術常識に基づき判定できる。

[0157] コレステロールの類縁体は、ステロール骨格を有するアルコールである、種々のコレステロール代謝産物及び類縁体等を指し、限定されるものではないが、コレスタノール、ラノステロール、セレブロステロール、デヒドロコレステロール、及びコプロスタノール等を含む。

[0158] コレステロール又はその類縁体と結合した第2核酸鎖は、以下の一般式(XIV)で示される基を有してもよい。

[0159] [化16]



[式中、R^cは、置換基を有していてもよい炭素数4~18個、好ましくは炭素数5~16個のアルキレン基を表す(ここで、該置換基はハロゲン原子、又はヒドロキシ基で置換されていてもよい炭素数1~3個のアルキル基、例えばヒドロキシメチル基であり、該アルキレン基は相隣接しない炭素原子が酸素原子で置換されていてもよい)。]

[0160] R^cは、限定されないが、-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CH(CH₂OH)-、又は-(CH₂)₆-であってもよい。

[0161] 上記一般式(XIV)で示される基は、第2核酸鎖の5'末端又は3'末端にリン酸

エステル結合を介して結合することができる。

- [0162] コレステロール又はその類縁体等のさらなる分子は、第2核酸鎖の5'末端、又は3'末端、のいずれに結合していてもよい。また、コレステロール又はその類縁体等のさらなる分子は、第2核酸鎖の内部のヌクレオチドに結合していてもよい。
- [0163] 第2核酸鎖が、コレステロール又はその類縁体を複数含む場合、それらは同一であってもよいし、異なってもよい。結合位置に関して、コレステロール又はその類縁体は、第2核酸鎖の複数の位置に結合していてもよく、及び/又は1つの位置に一群として結合していてもよい。
- [0164] 第2核酸鎖と、さらなる分子との結合は、直接結合であってもよいし、他の物質によって介在される間接結合であってもよい。具体的な結合様式については、標的結合分子との結合について上述したリンカー（第1のリンカー）の例に準じるものとする。
- [0165] 一実施形態において、第2核酸鎖は、ペプチド等の標的結合分子以外のさらなる分子とは結合していない。本明細書において「標的結合分子以外のさらなる分子とは結合していない」とは、例えばトコフェロールやコレステロール等のさらなる分子が結合していないことをいう。さらなる実施形態では、本発明の二本鎖核酸複合体はペプチド等の標的結合分子以外のさらなる分子と結合していない、すなわち第1核酸鎖及び第2核酸鎖のいずれも当該さらなる分子と結合していない。
- [0166] 第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖は、核酸鎖を構成するポリヌクレオチドに結合した少なくとも1つの機能性部分をさらに含んでもよい。「機能性部分」とは、二本鎖核酸複合体及び/又は当該機能性部分が結合している核酸鎖に所望の機能を付与する部分をいう。所望の機能には、例えば、標識機能、又は精製機能等が挙げられる。標識機能を与える部分の例としては、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ等の化合物が挙げられる。また、精製機能を与える部分の例としては、ビオチン、アビジン、Hisタグペプチド、GSTタグペプチド、FLAGタグペプチド等の化合物が挙げられる。機能性部分の具体例として

、脂質、アプタマー、上記ペプチド以外の抗体や受容体リガンド等が挙げられる。一実施形態において、第1核酸鎖及び/又は第2核酸鎖（好ましくは第2核酸鎖）は、機能性部分と結合している。第2核酸鎖と機能性部分との結合は、直接的な結合であってもよく、他の物質を介した間接的な結合であってもよいが、ある実施形態において、共有結合、イオン結合、水素結合等で第2核酸鎖と機能性部分とが直接的に結合していることが好ましく、より安定した結合が得られるという観点から、共有結合がより好ましい。

[0167] 第1核酸鎖と第2核酸鎖は、リンカーを介して結合していてもよい。この場合、第1核酸鎖と第2核酸鎖は、リンカーを介して連結され、一本鎖を形成しうる。なお、上述の第1のリンカーと区別する目的で、本明細書において第1核酸鎖と第2核酸鎖とを結合し得るリンカーを「第2のリンカー」と表記する場合がある。この場合の二本鎖核酸複合体は、ヒンジ核酸、一本鎖HD0、又はssHD0等と呼ぶことができる。しかし、その場合も機能領域は二本鎖核酸複合体と同じ構成であることから、本明細書では、このような一本鎖核酸も本発明の二本鎖核酸複合体の一実施形態として包含する。

[0168] 一実施形態において、第2のリンカーは第1核酸鎖の5'末端と第2核酸鎖の3'末端とを結合する。別の実施形態において、第2のリンカーは第1核酸鎖の3'末端と前記第2核酸鎖の5'末端とを結合する。さらなる実施形態において、第2のリンカーは第1核酸鎖の5'末端と第2核酸鎖の3'末端とを結合し、かつ第1核酸鎖の3'末端と前記第2核酸鎖の5'末端とを結合する。この場合、二本鎖核酸複合体は環状構造となる。

[0169] 第2のリンカーは、任意のポリマーでありうる。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アルキレン等に加えて、上述のように第2核酸鎖と標的結合分子とを連結するリンカー（すなわち、第1のリンカーとして上で説明したリンカー）を用いることもできる。具体的には、例えば、DNA、RNAといった天然のヌクレオチドやヌクレオシド、又はペプチド核酸、モルホリノ核酸といった非天然のヌクレオチドやヌクレオシドから構成されうる。また、ポリエチレングリコール等のポリエーテルから構成されていてもよい。第2のリンカ

ーが核酸からなる場合、リンカーの鎖長は少なくとも1塩基、例えば、2~50塩基、2~40塩基、2~30塩基、2~20塩基、2~15塩基、2~12塩基、3~10塩基又は4~6塩基の鎖長をとりうる。好ましくは4塩基の鎖長である。第2のリンカーの位置は、第1核酸鎖の5'側でも3'側のいずれでも可能であるが、例えば、第2核酸鎖の5'側に標的結合分子を結合させた構成の場合には、第1核酸鎖の5'末端と第2核酸鎖の3'末端とが第2のリンカーを介して連結されることになる。第2のリンカーは切断性 (cleavable) 又は非切断性 (uncleavable) のいずれであってもよい。

[0170] さらに実施形態では、第1核酸鎖と第2核酸鎖はリンカーを介して結合しており、かつ第2核酸鎖は第1核酸鎖に対して非相補的な塩基配列からなるバルジ構造を少なくとも1つ含むことができる。

[0171] 本発明の二本鎖核酸複合体において、第1核酸鎖が有する標的転写産物に対するアンチセンス効果は、当該分野で公知の方法で測定できる。例えば、二本鎖核酸複合体を細胞等に導入した後、ノーザンブロットティング、定量PCR、又はウェスタンブロットティング等の公知技術を使用することにより測定すればよい。特定の組織における標的遺伝子の発現量又は標的転写産物のレベル(例えば、mRNA量若しくはマイクロRNA等のRNA量、cDNA量、タンパク質量等)を測定することで、それらの部位において二本鎖核酸複合体によって標的遺伝子発現が抑制されるか否かを判定できる。また例えばエクソンスキッピングであれば、エクソンスキッピングで生じる産物と、エクソンスキッピングがない場合の産物を比較することにより、その効果を判定できる。

[0172] 上記のように、本発明の二本鎖核酸複合体の例示的实施形態について説明したが、本発明の二本鎖核酸複合体は上記の例示的实施形態に限定されない。

[0173] 1-4. 二本鎖核酸複合体の製造方法

本発明の二本鎖核酸複合体は、当業者であれば、公知の方法を適切に選択することによって製造することができる。限定はしないが、通常は、まず二本鎖核酸複合体を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖のそれぞれを設計し、製

造するところから始まる。例えば、標的転写産物の塩基配列（例えば、標的遺伝子の塩基配列）情報に基づいて第1核酸鎖を設計し、その相補鎖として第2核酸鎖を設計する。続いて、設計した塩基配列情報に基づいて、それぞれの核酸鎖を、例えば、GE Healthcare社、Thermo Fisher Scientific社、Beckman Coulter社等の市販の自動核酸合成装置を使用して合成すればよい。その後は、得られたオリゴヌクレオチドに逆相カラム等を使用して精製することもできる。

[0174] ペプチド等の標的結合分子や機能性部分が結合した第2核酸鎖は、限定しないが、標的結合分子や機能性部分が予め結合した核酸種を用いて、上記の合成、及び精製を行い、製造することができる。例えば、標的結合分子が予め結合された核酸種を用いて、上記の合成及び精製を実施することによって第2核酸鎖を製造してもよい。或いは、上記の合成及び精製を実施することによって製造された第2核酸鎖に、公知の方法により標的結合分子を結合させてもよい。リンカーがシクロオクチン誘導体を含む場合、アジドとのクリック反応によりペプチド等の標的結合分子をシクロオクチン誘導体に結合することができる。

[0175] 各核酸鎖を製造後、第1核酸鎖と第2核酸鎖に対して、アニーリングを実施することによって目的とする機能性部分が結合した二本鎖核酸複合体製造することができる。具体的には、核酸を適切な緩衝溶液中で混合し、約90°C～98°Cで数分間（例えば5分間）変性させ、その後核酸を約30°C～70°Cで約1～8時間アニールして、本発明の二本鎖核酸複合体の1つを製造することができる。また、核酸鎖は、塩基配列並びに修飾部位及び種類を指定して、各種メーカー（例えば、株式会社ジーンデザイン）に注文し、入手することもできる。

[0176] 1-5. 二本鎖核酸複合体の用途

本発明の二本鎖核酸複合体は、髄腔内投与される。その結果、中枢神経系において以下のいずれか1つ又は複数の作用を発揮することができる。

[0177] 一実施形態において、本発明の二本鎖核酸複合体は、以下の少なくとも一つの作用：標的遺伝子の転写産物又は翻訳産物の発現量を抑制若しくは亢進

する作用、標的遺伝子の転写産物又は翻訳産物の機能を阻害する作用、RNAスプライシングを制御する作用、及び標的遺伝子のタンパク質への結合を阻害する作用を用途とするもの、例えばエクソスキッピングのためのものであってもよい。例えば、本発明の二本鎖核酸複合体は、以下の少なくとも一つの作用：エクソスキッピング、エクソンインクルージョン、ステリックブロック、及びRNA発現亢進のためのものであってもよい。

[0178] 1-6. 効果

本発明の二本鎖核酸複合体によれば、髄腔内投与で中枢神経系において優れたアンチセンス効果をもたらすことができる。この効果は、脂質分子結合型の二本鎖核酸複合体の脳室内投与で中枢神経系でのアンチセンス効果が十分に得られなかった国際公開第2021/187392号に開示された結果から予想外であった。

[0179] 本発明によれば、上記のいずれかの二本鎖核酸複合体をヒト等の被検体に投与することを含む、中枢神経系疾患等の疾患の治療及び／又は予防方法もまた提供される。

[0180] また、本発明によれば、ヒト等の被検体における中枢神経系疾患等の治療及び／又は予防における使用のための、上記のいずれかの二本鎖核酸複合体もまた提供される。

[0181] 本発明によれば、疾患を治療及び／又は予防するための医薬の製造における、上記のいずれかの二本鎖核酸複合体の使用もまた提供される。

[0182] 2. 組成物

2-1. 概要

本発明の第2態様は髄腔内投与用の組成物である。本発明の組成物は、具体的には医薬組成物であり、前記第1態様の二本鎖核酸複合体を有効成分として含む。本発明の組成物は、髄腔内投与で中枢神経系において優れたアンチセンス効果を示すことができる。

以下、本発明の組成物が包含し得る各成分について具体的に説明をする。

[0183] 2-2. 構成

2-2-1. 有効成分

本発明の組成物は、有効成分として少なくとも第1態様に記載の二本鎖核酸複合体を包含する。本発明の組成物は、二本鎖核酸複合体を1つ又は2つ以上含んでもよい。

[0184] 本発明の組成物に含まれる二本鎖核酸複合体の量（含有量）は、二本鎖核酸複合体の種類、送達部位、組成物の剤形、組成物の投与量、並びに後述する担体の種類によって異なる。したがって、それぞれの条件を勘案して適宜定めればよい。通常は、単回投与量の組成物に有効量の二本鎖核酸複合体が包含されるように調整する。「有効量」とは、二本鎖核酸複合体が有効成分としての機能を発揮する上で必要な量であって、かつそれを適用する生体に対して有害な副作用をほとんど又は全く付与しない量をいう。この有効量は、被検体の情報、投与経路、及び投与回数等の様々な条件によって変化し得る。最終的には医師、獣医師又は薬剤師等の判断によって決定される。「被検体の情報」とは、組成物を適用する生体の様々な個体情報である。例えば、被検体がヒトであれば、年齢、体重、性別、食生活、健康状態、疾患の進行度や重症度、薬剤感受性、併用薬物の有無等を含む。

[0185] 2-2-2. 担体

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

[0186] 溶媒には、例えば、水若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る水溶液、又は薬学的に許容される有機溶剤のいずれであってもよい。水溶液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液が挙げられる。補助剤としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム、その他にも

低濃度の非イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。

[0187] 上記担体は、有効成分である二本鎖核酸複合体の生体内での酵素等による分解を回避又は抑制する他、製剤化や投与方法を容易にし、剤形及び薬効を維持するために用いられるものであり、必要に応じて適宜使用すればよい。

[0188] 2-2-3. 剤形

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

[0189] 本発明の組成物は髄腔内投与されることから、具体的な剤形は髄腔内投与に適した剤形にすればよい。

[0190] 好ましい剤形は、髄腔内投与が可能な液剤である。液剤の例としては、注射剤が挙げられる。注射剤は、前記賦形剤、エリキシル剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、pH調節剤等と適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。

[0191] なお、上記各剤形の具体的な形状、大きさについては、いずれもそれぞれの剤形において当該分野で公知の剤形の範囲内であればよく、特に限定はしない。本発明の組成物の製造方法については、当該技術分野の常法に従って製剤化すればよい。

[0192] 特定の実施形態において、本発明の二本鎖核酸複合体は、水、日本薬局方溶出試験第2液、又は日本薬局方崩壊試験第2液に対する溶解性に優れ、体内動態（例、血中薬物半減期、脳内移行性、代謝安定性、CYP阻害）に優れ、毒性が低く（例えば、急性毒性、慢性毒性、遺伝毒性、生殖毒性、心毒性、薬物相互作用、癌原性、光毒性等の点から医薬として、より優れている）、かつ副作用も少ない（例えば、過沈静（sedation）の抑制、層状壊死の回避）等の医薬品として優れた性質も有する。

[0193] 2-3. 投与形態及び投与量

本発明の組成物は、髄腔内投与される。髄腔内投与は、例えば脳室内投与、後頭窩穿刺、又は腰椎穿刺である。また、髄腔内投与では、シャント、留置カテーテル、又は皮下ポートを用いて本発明の組成物を投与してもよい。

[0194] 本発明の組成物を髄腔内投与する場合、サルやヒトの場合、二本鎖核酸複合体を0.01mg以上、0.1mg以上、又は1mg以上、例えば、2mg以上、3mg以上、4mg以上、5mg以上、10mg以上、20mg以上、30mg以上、40mg以上、50mg以上、75mg以上、100mg以上、200mg以上、300mg以上、400mg以上、又は500mg以上投与してもよく、0.01mg~1000mg、0.1mg~200mg、又は1mg~20mg投与してもよく、マウスの場合には1 μ g以上投与してもよい。

[0195] 組成物の投与量は、例えば、包含する二本鎖核酸複合体が0.00001mg/kg/日~10000mg/kg/日、又は0.001mg/kg/日~100mg/kg/日となるようにすればよい。組成物の投与は、単回投与でも、複数回投与であってもよい。複数回投与の場合、毎日若しくは適当な時間間隔で（例えば1日、2日、3日、1週間、2週間、1ヶ月の間隔で）、例えば2~20回投与することもできる。上記の二本鎖核酸複合体の1回の投与量は、例えば、0.001mg/kg以上、0.005mg/kg以上、0.01mg/kg以上、0.25mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1.0mg/kg以上、2.0mg/kg以上、3.0mg/kg以上、4.0mg/kg以上、5mg/kg以上、10mg/kg以上、20mg/kg以上、30mg/kg以上、40mg/kg以上、50mg/kg以上、75mg/kg以上、100mg/kg以上、150mg/kg以上、200mg/kg以上、300mg/kg以上、400mg/kg以上、若しくは500mg/kg以上とすることができ、例えば、0.001mg/kg~500mg/kgの範囲に含まれる任意の量（例えば、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、若しくは200mg/kg）を適宜選択することができる。

[0196] 本発明の二本鎖核酸複合体は、0.01~10mg/kg（例えば約6.25mg/kg）の用量で週2回の頻度で4回投与してもよい。また、二本鎖核酸複合体は、0.05~30mg/kg（例えば約25mg/kg）の用量で週1~2回の頻度で2~4回、例えば週2回の頻度で2回投与してもよい。このような投与レジメン（分割投与）の採用に

より、より高用量の単回投与に比べて、毒性（例えば血小板の減少を回避する）を下げ、被検体への負荷を低減することができる。

[0197] 医薬組成物は反復投与でも細胞内において抑制効果が相加的に働く。また、反復投与する場合、ある程度の投与間隔（例えば、半日以上）をおいた方が有効性を向上させることができる。

[0198] 2 - 4. 適用対象疾患

医薬組成物の適用対象となる疾患は、例えば中枢神経系疾患である。本発明の二本鎖核酸複合体のアンチセンス効果により、その転写産物又は翻訳産物の発現量が抑制若しくは亢進され得る、その転写産物又は翻訳産物の機能が阻害され得る、又はステリックブロッキング、スプライシングスイッチ、RNA編集、エクソンスキッピング若しくはエクソンインクルージョンが誘導され得る遺伝子が関係し得る疾患を対象とすることができる。

[0199] 組成物は、被検体としてヒトを含む動物に使用することができる。しかし、ヒトを除く動物には特定の限定はなく、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物などが一部の実施形態の被検体となり得る。被検体は、中枢神経系において標的転写産物の発現量を減少させることが必要な被検体であってもよい。また被検体は、中枢神経系疾患の治療が必要な被検体であってもよい。

[0200] 治療対象の疾患は、遺伝子発現の増加又は減少に関連する中枢神経系疾患、特に標的転写産物又は標的遺伝子の発現の増加に関連する疾患（腫瘍等）であり得る。中枢神経系疾患としては、特に限定されないが、例えば、脳腫瘍、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、ハンチントン病などが挙げられる。

[0201] 神経系は、中枢神経系及び末梢神経系に分けられる。中枢神経系は、脳及び脊髄からなる。脳は大腦（大腦皮質、大腦白質、大腦基底核）、間脳（視床、視床下核）、小脳（小脳皮質、小脳核）及び脳幹（中脳、黒質、橋、延髄）を含む。脊髄は、頸髄、胸髄、腰髄、仙髄及び尾髄を含む。本明細書における中枢神経系は、これらのいずれの領域であってもよいが、特に、大腦皮質（前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉）、間脳、小脳、線条体、淡蒼球、前障、海馬、

海馬傍回、脳幹、頸髄、胸髄又は腰髄であり得る。末梢神経は、脳神経及び脊髄神経からなる。

[0202] 例えば、アルツハイマー病の治療においては、海馬及び/又は頭頂葉への薬剤送達が有効となり得る。前頭側頭型認知症(FTD)(前頭側頭葉変性症(FTLD)、意味性認知症(SD)、進行性非流暢性失語(PNFA))、ピック病の治療においては、前頭葉、側頭葉及び/又は黒質への薬剤送達が有効となり得る。パーキンソン病認知症の治療においては、後頭葉、黒質及び/又は線条体への薬剤送達有効となり得る。パーキンソン病の治療においては、黒質及び/又は線条体への薬剤送達有効となり得る。皮質基底核変性症(CBD)の治療においては、前頭葉、頭頂葉、大脳基底核及び/又は黒質への薬剤送達有効となり得る。進行性核上性麻痺(PSP)の治療においては、前頭葉、大脳基底核及び/又は黒質への薬剤送達有効となり得る。筋萎縮性側索硬化症の治療においては、前頭葉、頭頂葉、大脳基底核及び/又は黒質への薬剤送達有効となり得る。脊髄小脳変性症(SCD)SCA1型～SCA34型までの治療においては、脳幹及び/又は小脳への薬剤送達有効となり得る。歯状核赤核淡蒼球ルイ体変性症(DRPLA)の治療においては、大脳基底核、脳幹及び/又は小脳への薬剤送達有効となり得る。球脊髄性萎縮症(SBMA)の治療においては、脳幹及び/又は脊髄への薬剤送達有効となり得る。フリードライヒ失調症(FA)の治療においては、脳幹及び/又は小脳への薬剤送達有効となり得る。ハンチントン病の治療においては、線条体、前頭葉、頭頂葉及び/又は大脳基底核への薬剤送達有効となり得る。プリオン病(狂牛病、GSS)の治療においては、大脳皮質、大脳白質、大脳基底核及び/又は黒質への薬剤送達有効となり得る。大脳白質性脳症の治療においては、大脳白質への薬剤送達有効となり得る。脳炎(ウイルス性、細菌性、真菌性、結核性)、髄膜炎(ウイルス性、細菌性、真菌性、結核性)の治療においては、脳全体への薬剤送達有効となり得る。代謝性脳症、中毒性脳症、栄養障害性脳症の治療においては、脳全体への薬剤送達有効となり得る。大脳白質性脳症の治療においては、大脳白質への薬剤送達有効となり得る。脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、もやもや病、無酸素脳症の

治療においては、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。大脳白質性脳症の治療においては、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。びまん性軸索損傷(Diffuse axonal injury)の治療においては、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。頭部外傷の治療においては、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。多発性硬化症(MS)、視神経脊髄炎(NMO)の治療においては、大脳白質、大脳皮質、視神経及び/又は脊髄への薬剤送達が有効となり得る。筋緊張型ジストロフィー症(DM1, DM2)の治療においては、骨格筋、心筋、大脳皮質及び/又は大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。家族性痙性対麻痺(HSP)の治療においては、頭頂葉及び/又は脊髄への薬剤送達が有効となり得る。福山型筋ジストロフィーの治療においては、骨格筋、大脳皮質及び/又は大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。レビー小体型認知症(DLB)の治療においては、黒質、線条体、後頭葉、前頭葉及び/又は頭頂葉への薬剤送達が有効となり得る。多系統萎縮症(MSA)の治療においては、線条体、大脳基底核、小脳、黒質、前頭葉及び/又は側頭葉への薬剤送達が有効となり得る。アレキサンダー病の治療においては、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。CADASIL、CARASILの治療においては、大脳白質への薬剤送達が有効となり得る。

[0203] 2-5. 効果

本発明の組成物は、髄腔内投与により中枢神経系疾患の予防効果又は治療効果を達成することができる。

[0204] 本発明によれば、上記の組成物をヒト等の被検体に投与することを含む、中枢神経系疾患等の疾患の治療及び/又は予防方法もまた提供される。

実施例

[0205] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0206] <実施例1：eNT結合型ヘテロ核酸>

(目的)

マウスMalat1 (mMalat1) ノンコーディングRNAを標的とする16merの一本鎖LNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸 (以下、「ASO(mMalat1)」) と称する

) からなる第1核酸鎖、及び第1核酸鎖に相補的な塩基配列を有する第2核酸鎖を含むヘテロ二重鎖オリゴヌクレオチド（以下、「HD0」と称する）において、第2核酸鎖の5'末端にリンカーを介してペプチドを連結する。このペプチド結合型HD0を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果を *in vivo* 実験により検証する。

[0207] 本実施例では、第2核酸鎖の5'末端側に連結するペプチドとして、配列番号4で示すアミノ酸配列 (KPPPAGSSPG) からなるスペーサーペプチドと、ヒトやマウスで共通する配列番号5で示すアミノ酸配列 (LYENKRRPYIL) からなるニューロテンシンとを連結してなる配列番号6で示すアミノ酸配列 (KPPPAGSSPG LYENKRRPYIL) からなるeNTペプチド（以下、単に「eNT」と表記する）を用いる。なお、スペーサーペプチドは、ASO (mMalat1) とリガンドとの間の分子内相互作用を抑制することを目的としてeNTに含まれている。

[0208] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたASO、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表1及び図5に示す。また、eNT-ASO (mMalat1)、又はeNT-HD0 (mMalat1) の第2核酸鎖 (eNT-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び以下の式(XV)に示す。

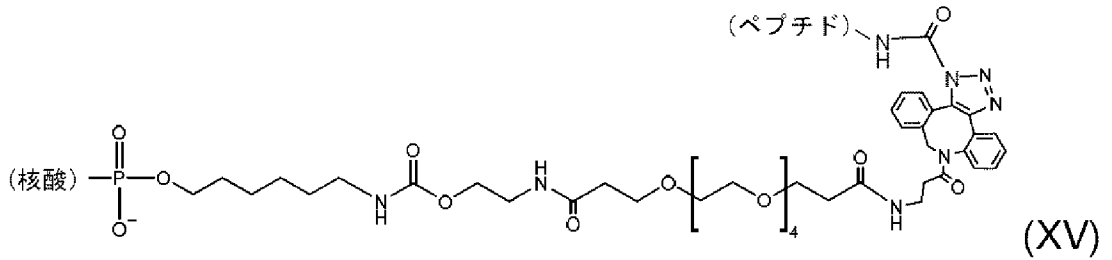
[0209] [表1]

表1: mMalat1 遺伝子を標的とする ASO (mMalat1)、eNT-ASO (mMalat1)、及び eNT-HD0 (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
ASO (mMalat1)		<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
eNT-ASO (mMalat1)		eNT-linker- tca <u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	2
eNT-HD0 (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	eNT-cRNA	eNT-linker- <u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> *UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである); 下線付小文字:2'-O-Me-RNA; *:ホスホロチオエート結合 (PS 結合); linker:式 (XV) で示すリンカー

[0210] [化17]



[0211] 本実施例で用いたAS0 (mMalat1)は、マウスの転移関連肺腺癌転写産物1 (metastasis associated lungadenocarcinoma transcript 1、Malat1) ノンコーディングRNA (Malat1 ncRNA) を標的とするLNA/DNAギャップマー型アンチセンス核酸であり、Malat1 ncRNAの一部に相補的な塩基配列を有し、5' 末端の3個のLNAヌクレオシド、3' 末端の3個のLNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のDNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された構造を有する (図5A)。

[0212] eNT-AS0 (mMalat1)は、上記のAS0 (mMalat1)の5' 末端側にホスホジエステル結合で連結された3個のDNAヌクレオシドを有し、そのさらに5' 末端に配列番号5で示すアミノ酸配列からなるヒトニューロテンシンを含む配列番号6で示すアミノ酸配列からなるeNTペプチドがリンカー部分を介して結合している (図5B)。リンカー部分は、シクロオクチン誘導体、ポリエチレングリコール (PEG)、及びアルキレン基 (炭素数6) で構成されている (図4及び上記式 (XV))。

[0213] 本実施例で用いたeNT-HD0 (mMalat1)は、上記AS0 (mMalat1)を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖 (eNT-cRNA) は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。第2核酸鎖 (eNT-cRNA) は、5' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のRNAヌクレオシドを含み、5' 末端及び3' 末端の各々3個のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、中央の9個のヌクレオシド間結合はホスホジエステル結合である。eNT-cRNAの5' 末端側には、配列番号5で示すアミノ酸配列からなるヒトニューロテンシンを含む配列番号6で示すアミノ酸配列からなるeNTペプチド

ドがリンカー部分を介して結合している（図5C）。リンカー部分は、シクロオクチン誘導体、ポリエチレングリコール（PEG）、及びアルキレン基（炭素数6）で構成されている（図4及び上記式(XV)）。

[0214] 表1に記載されるeNT-AS0 (mMalat1)及びeNT-cRNAは、以下の方法で合成した。配列番号6で示すアミノ酸配列 (KPPPAGSSPGLYENKPRRPYIL) からなるeNTペプチドのN末端側にアジドアセチル基を付加した。このアジドアセチル基と、5'末端のリン酸基にアルキレン基及びPEGを介してジベンジルオクチル (DBC0) 基を有するAS0 (DBC0-AS0) 又はcRNA (DBC0-cRNA) とをクリック反応により連結させた。

[0215] 表1に記載される二本鎖核酸複合体 (eNT-HD0 (mMalat1)) を調製するために、粉末状の第2核酸鎖(eNT-cRNA)をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に添加して溶解させた後、95°Cに加熱した等モル量の第1核酸鎖の溶液と混合し、得られた混合液を95°Cで5分間保持し、その後37°Cに冷却して1時間保持し、これにより核酸鎖をアニールして二本鎖核酸複合体を調製した。アニールした核酸を4°C又は氷上で保存した。全てのオリゴヌクレオチドは株式会社ジーンデザイン(Gene Design)(大阪、日本)によって委託合成された。

[0216] (2) *in vivo*実験

6~7週齢のマウス(体重20~25g)を、2.5~4%イソフルレン麻酔下にて脳定位固定装置に固定した。その後、耳間に前後2~3cmで皮膚を切開し、ブレグマ(bregma)の1mm左方かつ0.2mm後方に1mm径ドリルで穿孔した。ハミルトン(Hamilton)シリンジ内に各種核酸剤又は陰性対照としてのPBSを充填した。穿孔部より針を3mm程度刺入し、2~3 μ l/分の速度で、マウス1匹当たり10 μ Lの溶液を左側脳室内に投与し、ナイロン糸で皮膚縫合した。各種核酸剤のマウスへの投与量は、AS0換算量で5 μ g、10 μ g、25 μ g、又は50 μ gとした。マウスを使用する実験は全てn=3~5で実施した。

[0217] (3) 遺伝子抑制効果の評価

各種核酸剤投与から1週間後、マウスを解剖して脳及び脊椎を摘出した。大脳(前頭皮質(frontal cortex)、頭頂皮質(parietal cortex)、後頭皮質

(occipital cortex))、小脳 (Cerebellum)、線条体 (striatum)、海馬 (hippocampus)、脳幹 (brain stem)、及び頸椎 (cervical spine) を別々に採取した。ハイスループット全自動核酸抽出装置MagNA Pure 96(ロシュ・ライフサイエンス社)を使用して、抽出した各部位からプロトコルに従ってRNAを抽出した。cDNAは、PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ社)を使用してプロトコルに従って合成した。

[0218] 次に、得られたcDNAを鋳型として定量RT-PCRを行うことにより、Malat1 ncRNA及びActb mRNA (内部標準遺伝子)の発現量を測定した。定量RT-PCRは、LightCycler 480 Probe Master (ロシュ・ライフサイエンス社)により実施した。Malat1を対象とする定量RT-PCRにおいて使用したプライマー及びプローブは、Mm_Malat1_Foward primer (TGGGTTAGAGAAGGCGTGTACTG、配列番号7)、Mm_Malat1_Reverse primer (TCAGCGGCAACTGGGAAA、配列番号8)、及びMalat1 probe (FAM-TGTTGGCAGCAGACCTTCAGGGACT-MGB、配列番号9)を用いた。Actbを対象とする定量RT-PCRにおいて使用したプライマー及びプローブは、Mm_Actb_Foward primer (CGCGAGCACAGCTTCTTTG、配列番号10)、Mm_Actb_Reverse primer (CATGCCGGAGCCGTTGTC、配列番号11)、及びActin probe (FAM-CACACC GCCACCAGTTCGCCATG-MBG、配列番号12)を用いた。増幅条件(温度及び時間)は以下の通りであった：95℃で15秒、60℃で30秒、及び72℃で1秒(1サイクル)を40サイクル繰り返した。

[0219] Actb mRNA(内部標準遺伝子)の発現量に対するMalat1 ncRNAの発現量の比率を計算し、PBS投与群の値に対して標準化した値を相対的Malat1発現レベルとした。

[0220] (結果)

各種核酸剤を5 μ g投与した結果を図6に示す。前頭皮質 (frontal cortex)、頭頂皮質 (parietal cortex)、線条体 (striatum)、脳幹 (brain stem)、及び頸椎 (Cervical spine) 等において、第2核酸鎖にニューロテンシンを結合したHD0であるeNT-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)及びeNT-AS0 (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増大を示した (図6)。

[0221] 次に、各種核酸剤を25 μ g投与した結果を図7に示す。前頭皮質 (frontal cortex)、頭頂皮質 (parietal cortex)、後頭皮質 (occipital cortex)、線条体 (striatum)、及び海馬 (hippocampus) 等において、eNT-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)及びeNT-AS0 (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増大を示した (図7)。一方、eNT-AS0 (mMalat1)は、ペプチド非結合型のAS0 (mMalat1)と比較して同等以下の遺伝子抑制効果を示した。

[0222] 各部位においてeNT結合型ヘテロ核酸の用量依存的効果を評価した結果を図8～図9に示す。eNT-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)及びeNT-AS0 (mMalat1)と比較して、幅広い用量範囲に渡って強い遺伝子抑制効果を示した。一方、eNT-AS0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)と比較して強い遺伝子抑制効果を示さず、むしろ減弱を示した。

[0223] したがって、1本鎖核酸剤の脳室内投与では、ニューロテンシン結合型AS0は、ペプチド非結合型AS0と比較して強い遺伝子抑制効果を示さない一方、第2核酸鎖にニューロテンシンを結合したHD0の脳室内投与では、遺伝子抑制効果が向上することが明らかとなった。

[0224] <実施例2：KNT結合型ヘテロ核酸>

(目的)

第2核酸鎖の5'末端側にニューロテンシンを連結したHD0を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果をin vivo実験により検証する。

[0225] 本実施例では、第2核酸鎖の5'末端側に連結するペプチドはスペーサーペプチドを含まず、配列番号5で示すアミノ酸配列 (LYENKPRRPYIL) からなるヒトニューロテンシンのN末端側にリジン (K) 残基を付加した配列番号13で示すアミノ酸配列 (KLYENKPRRPYIL) からなるKNTペプチド (以下、単に「KNT」と表記する) を用いる。

[0226] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表2及び図5に示す。また、KNT-HD0 (mMalat1)の第2核酸鎖 (KNT-cRNA)

において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び上記式(XV)に示す。

[0227] [表2]

表 2: mMalat1 遺伝子を標的とする ASO (mMalat1)及び KNT-HDO (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
ASO (mMalat1)		<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
KNT-HDO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	KNT-cRNA	KNT-linker- <u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> *UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである); 下線付小文字:2'-O-Me-RNA; * :ホスホロチオエート結合 (PS 結合); linker:式(XV)に示すリンカー

[0228] 本実施例で用いたASO (mMalat1)は、実施例1と同様である。

本実施例で用いたKNT-HDO (mMalat1)は、ASO (mMalat1)を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖 (KNT-cRNA) は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。第2核酸鎖 (KNT-cRNA) は、5' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のRNAヌクレオシドを含み、5' 末端及び3' 末端の各々3個のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、中央の9個のヌクレオシド間結合はホスホジエステル結合である。KNT-cRNAの5' 末端側には、配列番号5で示すアミノ酸配列からなるヒトニューロテンシンを含む配列番号13で示すアミノ酸配列からなるKNTペプチドがリンカー部分を介して結合している (図5C)。リンカー部分は、シクロオクチン誘導体、ポリエチレングリコール (PEG)、及びアルキレン基 (炭素数6) で構成されている (図4及び上記式(XV))。

ASO (mMalat1)及びKNT-HDO (mMalat1)は、実施例1と同様の方法により調製した。

[0229] (2) in vivo実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤を投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、ASO換算量で9µgとした。マウスを使用する実験は全てn=3で実施した。

[0230] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により各脳部位並びに頸椎及び腰椎を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PCRを行うことによって、遺伝子抑制効果を評価した。

[0231] (結果)

結果を図10に示す。KNT-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増大を示した(図10)。特に、頭頂皮質 (parietal cortex)、線条体 (striatum)、及び海馬 (Hippocampus) 等で遺伝子抑制効果が顕著に増大した。

[0232] <実施例3 : LT7結合型ヘテロ核酸>

(目的)

ペプチド結合型HD0を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果を *in vivo* 実験により検証する。

[0233] 本実施例では、HD0における第2核酸鎖の末端に連結するペプチドとして、配列番号14で示すアミノ酸配列 (CHAIYPRH) からなるトランスフェリン受容体結合ペプチド (以下、「LT7」と表記する) を用いる。

[0234] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表3及び図5に示す。また、LT7-HD0の第2核酸鎖 (LT7-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び上記式(XV)に示す。

[0235] [表3]

表 3: Malat1 遺伝子を標的とする AS0 (mMalat1)及び LT7-HD0 (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
AS0 (mMalat1)	AS0 (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
LT7-HD0 (mMalat1)	AS0 (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	LT7-cRNA	LT7-linker-g* <u>c</u> * <u>a</u> *UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである); 下線付小文字:2'-O-Me-RNA; *:ホスホロチオエート結合 (PS 結合);

linker:式(XV)に示すリンカー

[0236] 本実施例で用いたAS0 (mMalat1)は、実施例1と同様である。

本実施例で用いたLT7-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖 (LT7-cRNA) は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、LT7-HD0 (mMalat1)の第2核酸鎖 (LT7-cRNA) は、5' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のRNAヌクレオシドを含み、5' 末端及び3' 末端の各々3個のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、中央の9個のヌクレオシド間結合はホスホジエステル結合である。LT7-cRNAの5' 末端には、配列番号14で示すアミノ酸配列からなるトランスフェリン受容体結合ペプチド (LT7) がリンカー部分を介して結合している (図5C)。リンカー部分は、シクロオクチン誘導体、ポリエチレングリコール (PEG)、及びアルキレン基 (炭素数6) で構成されている (図4及び式(XV))。

LT7-cRNAは、配列番号14で示すアミノ酸配列 (CHAIYPRH) のN末端側にアジドアセチル基を付加し、実施例1と同様の方法でcRNAとの連結反応を行うことによって合成した。

[0237] (2) *in vivo*実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤を投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、AS0換算量で25 μ gとした。マウスを使用する実験は全てn=4で実施した。

[0238] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により各脳部位を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PCRを行うことによって、遺伝子抑制効果を評価した。

[0239] (結果)

結果を図11に示す。頭頂皮質 (parietal cortex) 及び後頭皮質 (occipital cortex) 等においてLT7-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増強を示した。したがって、第2核酸鎖にトランスフェリン受容体結合ペプチドが結合したHD0では脳室内投与による遺伝子抑制効果が向上することが明らかとなった。

[0240] <実施例4：LT12結合型ヘテロ核酸>

(目的)

ペプチド結合型HD0を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果を *in vivo* 実験により検証する。

[0241] 本実施例では、HD0における第2核酸鎖の末端に連結するペプチドとして、配列番号16で示すアミノ酸配列 (THRPPMWSPVWP) からなるトランスフェリン受容体結合ペプチド (以下、「LT12」と表記する) を用いる。

[0242] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表4及び図5に示す。また、LT12-HD0の第2核酸鎖 (LT12-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び上記式 (XV) に示す。

[0243] [表4]

表 4: Malat1 遺伝子を標的とする AS0 (mMalat1) 及び LT12-HDO (mMalat1)

		配列 (5'-3')	配列番号
AS0 (mMalat1)	AS0 (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
LT12-HDO (mMalat1)	AS0 (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	LT12-cRNA	LT12-linker- <u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> *UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである); 下線付小文字:2'-O-Me-RNA; *:ホスホロチオエート結合 (PS 結合); linker:式 (XV) に示すリンカー

[0244] 本実施例で用いたAS0 (mMalat1)は、実施例1と同様である。

本実施例で用いたLT12-HDO (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖 (LT12-cRNA) は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。具体的には、LT12-HDO (mMalat1)の第2核酸鎖 (LT12-cRNA) は、5' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、3' 末端の3個の2'-O-Me-RNAヌクレオシド、及びそれらの間の10個のRNAヌクレオシドを含み、5' 末端及び3' 末端の各々3個のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、中央の9個のヌクレオシド間結合はホスホジエステル結合である。LT12-cRNAの5' 末端には、配列番

号16で示すアミノ酸配列からなるトランスフェリン受容体結合ペプチド (LT12) がリンカー部分を介して結合している (図5C)。リンカー部分は、シクロオクチン誘導体、ポリエチレングリコール (PEG)、及びアルキレン基 (炭素数6) で構成されている (図4及び上記式(XV))。

LT12-cRNAは、配列番号16で示すアミノ酸配列 (THRPPMWSPVWP) のN末端側にアジドアセチル基を付加し、実施例1と同様の方法でcRNAとの連結反応を行うことによって合成した。

[0245] (2) *in vivo*実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤を投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、AS0換算量で25 μ gとした。マウスを使用する実験は全てn=4で実施した。

[0246] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により各脳部位を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PCRを行うことによって、遺伝子抑制効果を評価した。

[0247] (結果)

結果を図12に示す。頭頂皮質 (parietal cortex) 及び後頭皮質 (occipital cortex) において、LT12-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増強を示した。したがって、第2核酸鎖にトランスフェリン受容体結合ペプチドが結合したHD0では、遺伝子抑制効果が向上することが明らかとなった。

[0248] <実施例5 : DT7結合型ヘテロ核酸>

(目的)

LT7のD体レトロインベルソペプチド (以下、「DT7」と表記する) を結合させたHD0 (以下、「DT7-HD0 (mMalat1)」と称する) を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果を *in vivo*実験により検証する。

[0249] 「D体レトロインベルソペプチド (D-retro-inverso-peptide)」とは、L体アミノ酸残基から構成される通常のペプチドに対して、ペプチドを構成するアミノ酸残基のすべてがD体アミノ酸残基に置換されたペプチドであって、ア

ミノ酸配列を逆向きに並べ替えたアミノ酸配列からなるものをいう。D体レトロインベルソペプチドでは、側鎖の元の空間配置及びキラリティーは変化せず、標的に対する結合は維持されるか又は増大し得ると考えられる。また、D体アミノ酸残基から構成されるためにプロテアーゼ耐性を示すことが知られている。

[0250] LT7のD体レトロインベルソペプチドであるDT7は、上記LT7を構成するアミノ酸残基のすべてがD体アミノ酸残基に置換されたペプチドであって、LT7のアミノ酸配列を逆向きに並べ替えたアミノ酸配列からなるペプチドであり、配列番号28で示すアミノ酸配列 (hrpyiahc) からなる。なお、本明細書において、小文字表記のアミノ酸残基はD体アミノ酸残基を示すものとし、大文字表記のL体アミノ酸残基から区別される。

[0251] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたDT7-HD0 (mMalat1)を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表5及び図5に示す。また、DT7-HD0 (mMalat1)の第2核酸鎖 (DT7-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び上記式 (XV)に示す。本実施例で用いたDT7-HD0 (mMalat1)は、LT7-HD0 (mMalat1)のLT7をDT7で置換した構造を有する。DT7-cRNAは、配列番号28で示すアミノ酸配列 (hrpyiahc) のC末端側にアジドアセチル基を付加し、実施例1と同様の方法でcRNAとの連結反応を行うことによって合成した。なお、本実施例で用いたAS0 (mMalat1)及びLT7-HD0 (mMalat1)は、上述の実施例3と同じものを使用した。

[表5]

表 5 : Malat1 遺伝子を標的とする DT7-HD0 (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
DT7-HD0 (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	DT7-cRNA	DT7-linker- g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> *a*g	3

小文字:DNA ; 大文字:RNA ; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである) ; 下線付小文字:2'-O-Me-RNA ; * :ホスホロチオエート結合 (PS 結合) ; linker:式 (XV) に示すリンカー

[0252] (2) in vivo実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤を投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、AS0換算量で25 μgとした。マウスを使用する実験は全てn=4で実施した。

[0253] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により各脳部位を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PCRを行うことによって、遺伝子抑制効果の評価した。

[0254] (結果)

結果を図13に示す。頭頂皮質 (parietal cortex) 及び後頭皮質 (occipital cortex) 等においてDT7-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増強を示した。したがって、第2核酸鎖にトランスフェリン受容体結合ペプチドのD体レトロインベルソペプチドが結合したHD0では脳室内投与による遺伝子抑制効果が向上することが明らかになった。

[0255] <実施例6 : DT12結合型ヘテロ核酸>

(目的)

LT12のD体レトロインベルソペプチド (以下、「DT12」と表記する) を結合させたHD0 (以下、「DT12-HD0 (mMalat1)」と称する) を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果を in vivo実験により検証する。

[0256] DT12は、上記LT12を構成するアミノ酸残基のすべてをD体アミノ酸残基に置換したペプチドであって、LT12のアミノ酸配列を逆向きに並べ替えたアミノ

酸配列からなるペプチドであり、配列番号29で示すアミノ酸配列 (pwvpswmpprht ; 小文字表記のアミノ酸残基はD体アミノ酸残基を示す) からなる。

[0257] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたDT12-HD0 (mMalat1)を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表6及び図5に示す。また、DT12-HD0 (mMalat1)の第2核酸鎖 (DT12-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び上記式(XV)に示す。本実施例で用いたDT12-HD0 (mMalat1)は、LT12-HD0 (mMalat1)のLT12をDT12で置換した構造を有する。DT12-cRNAは、配列番号29で示すアミノ酸配列 (pwvpswmpprht) のC末端側にアジドアセチル基を付加し、実施例1と同様の方法でcRNAとの連結反応を行うことによって合成した。なお、本実施例で用いたAS0 (mMalat1)及びLT12-HD0 (mMalat1)は、上述の実施例4と同じものを使用した。

[表6]

表 6 : Malat1 遺伝子を標的とする DT12-HD0 (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
DT12-HD0 (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	DT12-cRNA	DT12-linker- g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3

小文字:DNA ; 大文字:RNA ; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである) ; 下線付小文字:2'-O-Me-RNA ; *:ホスホロチオエート結合 (PS 結合) ; linker:式 (XV) に示すリンカー

[0258] (2) in vivo実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤を投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、AS0換算量で25µgとした。マウスを使用する実験は全てn=4で実施した。

[0259] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により各脳部位を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PC

Rを行うことによって、遺伝子抑制効果を評価した。

[0260] (結果)

結果を図14に示す。頭頂皮質 (parietal cortex) 及び後頭皮質 (occipital cortex) において、DT12-HD0 (mMalat1)は、AS0 (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増強を示した。したがって、第2核酸鎖にトランスフェリン受容体結合ペプチドのD体レトロインベルソペプチドが結合したHD0では、遺伝子抑制効果が向上することが明らかになった。

[0261] <実施例7：RVG結合型ヘテロ核酸>

(目的)

狂犬病ウイルスのグリコプロテイン (以下、「RVG」と表記する) に由来するペプチドを結合させたHD0 (以下、「RVG-HD0 (mMalat1)」と称する) を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果を *in vivo* 実験により検証する。このペプチドは、29アミノ酸残基のアミノ酸配列 (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG、配列番号30) からなり、神経細胞上のアセチルコリン受容体に結合することが知られている (Ren, M., et al., *Int J Mol Sci.*, 2023, 24(6): 5851)。

(方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表7及び図5に示す。また、RVG-HD0の第2核酸鎖 (RVG-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び上記式 (XV) に示す。

[0262]

[表7]

表 7: Malat1 遺伝子を標的とする ASO (mMalat1)及び RVG-HDO (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
ASO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
RVG-HDO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	RVG-cRNA	RVG-linker- <u>g</u> * <u>c</u> * <u>a</u> *UUUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである); 下線付小文字:2'-O-Me-RNA; *:ホスホロチオエート結合 (PS 結合); linker:式(XV)に示すリンカー

[0263] 本実施例で用いたASO (mMalat1)は、実施例1と同様である。

本実施例で用いたRVG-HDO (mMalat1)は、ASO (mMalat1)を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖 (RVG-cRNA) は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。RVG-cRNAの5' 末端には、配列番号30で示すアミノ酸配列からなるRVG由来のペプチドがリンカー部分を介して結合している (図5C)。リンカー部分は、シクロオクチン誘導体、ポリエチレングリコール (PEG)、及びアルキレン基 (炭素数6) で構成されている (図4及び式(XV))。

[0264] RVG-cRNAは、配列番号30で示すアミノ酸配列 (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKR ASNG) のC末端側にアジドアセチル基を付加し、実施例1と同様の方法でcRNAとの連結反応を行うことによって合成した。

[0265] (2) in vivo実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤、又は対照としてPBSを投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、ASO換算量で1 μg又は5 μgとした。マウスを使用する実験は全てn=4で実施した。

[0266] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により投与位置と同側の各脳部位を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PCRを行うことによって、遺伝子抑制効果を評価した。

[0267] (結果)

1 μ g及び5 μ gを投与した結果をそれぞれ図15及び図16に示す。RVG-HD0は、後頭葉、海馬、脳幹、頸髄等で強い遺伝子抑制効果を示した。したがって、第2核酸鎖にRVG由来のペプチドが結合したHD0では脳室内投与による遺伝子抑制効果が向上することが明らかになった。

[0268] <実施例8：環状ペプチド結合型ヘテロ核酸>

(目的)

過去にBBBを通過するリガンドとしてファージディスプレイで同定された3種類のペプチド（以下、「BB1」～「BB3」と呼ぶ）を結合させたHD0（以下、「BB1-HD0 (mMalat1)」～「BB3-HD0 (mMalat1)」と称する）を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果を*in vivo*実験により検証する。

[0269] BB1は、文献 (Fan X., et al., Pharm Res., 2007, 24(5): 868-79.) で同定された配列に基づき、配列番号31で示すアミノ酸配列 (LGDPNSCAGALCY) からなる。BB1では、配列番号32で示すアミノ酸配列 (CAGALCY) が2つのCys残基がジスルフィド結合を形成することにより環状化した構造を有する。BB2及びBB3は、文献 (Pleiko K., et al., Nucleic Acids Research, 2021, 49(7): e38.) で同定された配列に基づき、それぞれ配列番号33で示すアミノ酸配列 (CLNSNKTNC) 及び配列番号34で示すアミノ酸配列 (CWRENKAKC) からなる。BB2及びBB3も、2つのCys残基がジスルフィド結合を形成することにより環状化した構造を有する。

[0270] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたAS0、並びにHD0を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表8及び図5に示す。また、BB1-HD0 (mMalat1)～BB3-HD0 (mMalat1)の第2核酸鎖において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーの構造を図4及び上記式(XV)に示す。

[表8]

表 8: Malat1 遺伝子を標的とする ASO (mMalat1)及び BB1-HDO (mMalat1)～BB3-HDO (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
ASO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
BB1-HDO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	BB1-cRNA	BB1-linker- g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3
BB2-HDO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	BB2-cRNA	BB2-linker- g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3
BB3-HDO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	BB3-cRNA	BB3-linker- g*c*a*UUCAGUGAAC* <u>u</u> * <u>a</u> * <u>g</u>	3

小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:LNA (LNA の C の核酸塩基は、5-メチルシトシンである); 下線付小文字:2'-O-Me-RNA; *:ホスホロチオエート結合 (PS 結合); linker:式(XV)に示すリンカー

[0271] 本実施例で用いたASO (mMalat1)は、実施例1と同様である。

本実施例で用いたBB1-HDO (mMalat1)～BB3-HDO (mMalat1)は、ASO (mMalat1)を第1核酸鎖として含み、第2核酸鎖 (BB1-cRNA、BB2-cRNA、又はBB3-cRNA) は第1核酸鎖に相補的な配列を有する。BB1-cRNA～BB3-cRNAの5' 末端には、配列番号31、33、及び34で示すアミノ酸配列からなるBB1～BB3の各ペプチドがリンカー部分を介して結合している (図5C)。リンカー部分は、シクロオクチン誘導体、ポリエチレングリコール (PEG)、及びアルキレン基 (炭素数6) で構成されている (図4及び式(XV))。

[0272] BB1-cRNA～BB3-cRNAは、配列番号31、33、及び34で示すアミノ酸配列のN末端に位置するアミノ酸残基のアミノ基に、アミノヘキシル基を介してアジドアセチル基を付加し、実施例1と同様の方法でcRNAとの連結反応を行うことによって合成した。

[0273] (2) in vivo実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤、又は対照としてPBSを投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、BB1-HD0 (mMalat1)及びBB3-HD0 (mMalat1)の実験はAS0換算量で10 μ g、BB2-HD0 (mMalat1)の実験はAS0換算量で1 μ g、5 μ g、及び10 μ gとした。マウスを使用する実験は全てn=4で実施した。

[0274] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により投与位置と各脳部位を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PCRを行うことによって、遺伝子抑制効果を評価した。

[0275] (結果)

BB1-HD0 (mMalat1)投与 (投与量10 μ g) の結果を図17に示す。BB1-HD0 (mMalat1)は、特に皮質 (頭頂葉及び後頭葉) で顕著な遺伝子抑制効果を示した。

[0276] BB2-HD0 (mMalat1)を1 μ g、5 μ g、及び10 μ g投与した結果をそれぞれ図18～図20に示す。特に皮質、海馬、視床、及び小脳で有意な遺伝子抑制効果が認められた。

[0277] BB3-HD0 (mMalat1)投与 (投与量10 μ g) の結果を図21に示す。特に皮質、海馬、視床、及び小脳で顕著な遺伝子抑制効果が認められた。

[0278] 以上の結果から、BB1、BB2、及びBB3を第2核酸鎖に結合させたHD0では、脳室内投与による遺伝子抑制効果が向上することが明らかになった。

[0279] <実施例9 : DBC0リンカーとBCNリンカーの比較>

(目的)

eNTペプチドをジベンゾシクロオクチン (DBC0) 誘導体を含むリンカー (以下、「DBC0リンカー」という) を介して結合させたHD0 (以下、「eNT-DBC0-HD0 (mMalat1)」という)、及びeNTペプチドをビスクロノニン (BCN) 誘導体を含むリンカー (以下、「BCNリンカー」という) を介して結合させたHD0 (以下、「eNT-BCN-HD0 (mMalat1)」という) を脳室内に単回投与した際の遺伝子発現抑制効果をin vivo実験により検証し、リンカーの種類について検討す

る。

[0280] (方法)

(1) 核酸の調製

本実施例で用いたeNT-DBCO-HDO (mMalat1)及びeNT-BCN-HDO (mMalat1)を構成する第1核酸鎖及び第2核酸鎖の構成を表9及び図5に示す。

[表9]

表 9 : eNT-DBCO-HDO (mMalat1) 及び eNT-BCN-HDO (mMalat1)

		配列(5'-3')	配列番号
ASO (mMalat1)		<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
eNT-DBCO-HDO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	eNT-DBCO-cRNA	eNT-linker (DBCO) - g*c*a*UUCAGUGAAC*u*a*g	3
eNT-BCN-HDO (mMalat1)	ASO (mMalat1)	<u>C</u> * <u>T</u> * <u>A</u> *g*t*t*c*a*c*t*g*a*a* <u>T</u> * <u>G</u> * <u>C</u>	1
	eNT-BCN-cRNA	eNT-linker (BCN) - g*c*a*UUCAGUGAAC*u*a*g	3

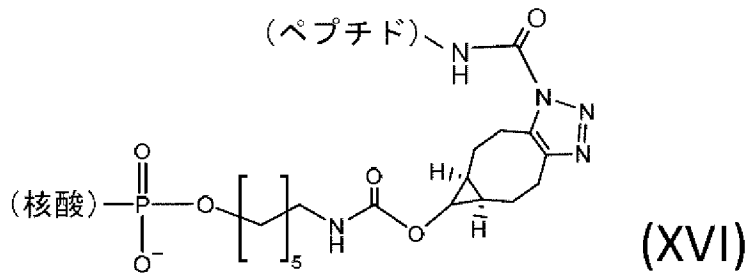
小文字:DNA; 大文字:RNA; 下線付大文字:LNA (LNAのCの核酸塩基は、5-メチルシトシンである); 下線付小文字:2'-O-Me-RNA; *:ホスホロチオエート結合 (PS 結合); linker (DBCO):式 (XV) に示すリンカー; linker (BCN):式 (XVI) に示すリンカー

[0281] 本実施例で用いたeNT-DBCO-HDO (mMalat1)の構成は、実施例1におけるeNT-HDO (mMalat1)と同一であり、その第2核酸鎖 (eNT-DBCO-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーは、上記式 (XV) で示す構造を有する。

[0282] 一方、eNT-BCN-HDO (mMalat1)では、その第2核酸鎖 (eNT-BCN-cRNA) において核酸部分とペプチドとを連結するリンカーは、以下の式 (XVI) に示す構造を有する。

[0283]

[化18]

(2) *in vivo*実験

実施例1と同様の方法によりマウスの脳室内に各種核酸剤を投与した。但し、本実施例における各種核酸剤のマウスへの投与量は、ASO換算量で $10\mu\text{g}$ とした。マウスを使用する実験は全て $n=4$ で実施した。

[0284] (3) 遺伝子抑制効果の評価

実施例1と同様の方法により各脳部位を採取して、RNAを抽出し、定量RT-PCRを行うことによって、遺伝子抑制効果を評価した。

[0285] (結果)

結果を図22に示す。eNT-DBC0-HD0 (mMalat1)とeNT-BCN-HD0 (mMalat1)は、ASO (mMalat1)と比較して遺伝子抑制効果の増強を示した。DBC0リンカー及びBCNリンカーを使用した場合の遺伝子抑制効果は同等であった。この結果は、第2核酸鎖においてペプチドと核酸部分とを連結するリンカーの種類に依らず、eNTペプチドをHD0に結合させることによって脳室内投与による遺伝子抑制効果を増強できることを示している。

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

請求の範囲

- [請求項1] 第1核酸鎖と第2核酸鎖とを含む二本鎖核酸複合体を含む、髄腔内投与用の組成物であって、
- 前記第1核酸鎖は、目的の遺伝子又はその転写産物の少なくとも一部にハイブリダイズすることができ、かつ前記目的の遺伝子又はその転写産物に対して中枢神経系においてステリックブロッキング、エクソンスキッピング、及び／又はエクソンインクルージョンを誘導することができ、
- 前記第2核酸鎖は、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含み、かつ中枢神経系において細胞表面に発現する標的分子に結合することが可能な少なくとも1個の標的結合分子と結合しており、
- 前記標的結合分子が、リガンド分子、抗体若しくはその断片、又は核酸アプタマーである、前記組成物。
- [請求項2] 前記リガンド分子が、ペプチド、糖、又は低分子である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記ペプチドが、
- (a) ニューロテンシン若しくはそのD体レトロインベルソペプチド、
 - (b) トランスフェリン受容体結合ペプチド若しくはそのD体レトロインベルソペプチド、
 - (c) 狂犬病ウイルスのグリコプロテイン若しくはその断片、又は
 - (d) 配列番号31～34のいずれかで示すアミノ酸配列からなる環状ペプチド
- である、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記ニューロテンシンが配列番号5、22、又は23で示すアミノ酸配列からなる、請求項3に記載の組成物。
- [請求項5] 前記トランスフェリン受容体結合ペプチドが、配列番号14、16、又は27で示すアミノ酸配列からなる、請求項3に記載の組成物。

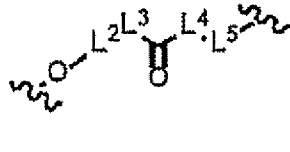
- [請求項6] 前記第1核酸鎖がミックスマーである、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項7] 前記第1核酸鎖がギャップマーである、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項8] 前記第1核酸鎖が、
(1)少なくとも2個の連続するデオキシリボヌクレオシドを含む中央領域、
(2)前記中央領域の5'末端側に配置された、非天然ヌクレオシドを含む5'ウイング領域、及び
(3)前記中央領域の3'末端側に配置された、非天然ヌクレオシドを含む3'ウイング領域を含む、請求項7に記載の組成物。
- [請求項9] 前記第1核酸鎖が、モルホリノ核酸、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド、トリシクロDNA、ペプチド核酸、又は2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]修飾ヌクレオシドのいずれか1以上を含む、請求項1に記載の組成物。
- [請求項10] 前記第1核酸鎖中の核酸がモルホリノ核酸からなる、請求項1に記載の組成物。
- [請求項11] 前記第2核酸鎖が少なくとも8塩基長である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項12] 前記第2核酸鎖が、デオキシリボヌクレオシド、2'修飾ヌクレオシド、5'修飾ヌクレオシド、及び架橋型ヌクレオシドからなる群から選択されるいずれか1以上を含む、請求項1に記載の組成物。
- [請求項13] 前記2'修飾ヌクレオシドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオシド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド、及び2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]修飾ヌクレオシドからなる群から選択される、請求項12に記載の組成物。
- [請求項14] 前記5'修飾ヌクレオシドが、5'-cp修飾ヌクレオシド、5'-メチル修飾ヌクレオシド、又は5'-ジメチル修飾ヌクレオシドである、請求項

1 2 に記載の組成物。

- [請求項15] 前記架橋型ヌクレオシドが、LNAヌクレオシド、2',4'-BNA^{NC}ヌクレオシド、cEt BNAヌクレオシド、ENAヌクレオシド、AmNAヌクレオシド、GuNAヌクレオシド、scpBNAヌクレオシド、scpBNA2ヌクレオシド、及びBANA3ヌクレオシドからなる群から選択される、請求項1 2 に記載の組成物。
- [請求項16] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に対して、非相補的塩基、及び／又は1塩基以上の、挿入配列及び／又は欠失を含む、請求項1 に記載の組成物。
- [請求項17] 前記第2核酸鎖が、前記非相補的塩基を1～3個含む、請求項1 6 に記載の組成物。
- [請求項18] 前記挿入配列が1～8塩基からなる、請求項1 6 に記載の組成物。
- [請求項19] 前記欠失が連続する1～4塩基からなる、請求項1 6 に記載の組成物。
- [請求項20] 前記第2核酸鎖が、前記第1核酸鎖に相補的な塩基配列からなる領域の5'末端側及び／又は3'末端側に位置する少なくとも1つのオーバーハング領域を含む、請求項1 に記載の組成物。
- [請求項21] 前記オーバーハング領域が1～20塩基長である、請求項2 0 に記載の組成物。
- [請求項22] 前記標的結合分子が、前記第2核酸鎖の5'末端及び／又は3'末端に結合している、請求項1 に記載の組成物。
- [請求項23] 前記第2核酸鎖が第1のリンカーを介して前記標的結合分子と結合している、請求項1 に記載の組成物。
- [請求項24] 前記第1核酸鎖と前記第2核酸鎖とが第2のリンカーを介して結合している、請求項1 に記載の組成物。
- [請求項25] 前記第1のリンカー又は前記第2のリンカーが、切断性 (cleavable) 又は非切断性 (uncleavable) のリンカーである、請求項2 3 又は2 4 に記載の組成物。

[請求項26] 前記第1のリンカー又は前記第2のリンカーが、以下の式 (I) で表される基を含む、請求項 23 又は 24 に記載の組成物。

[化1]



(式中、

L^2 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim C_{12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_3 \sim C_8$ シクロアルキレン基、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ 、又は $CH(CH_2-OH)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$ を表し、

L^3 は、 $-NH-$ 又は結合を表し、

L^4 は、置換された若しくは置換されていない $C_1 \sim C_{12}$ のアルキレン基、置換された若しくは置換されていない $C_3 \sim C_8$ のシクロアルキレン基、 $-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_2]_m-$ 、又は結合を表し、ここで、 m は1～25の整数を表し、

L^5 は、 $-NH-(C=O)-$ 、 $-(C=O)-$ 、又は結合を表す)

[請求項27] 前記第1のリンカー及び／又は前記第2のリンカーが、核酸、ポリエーテル基、並びに／又はアルキルアミノ基を含む、請求項 23 又は 24 に記載の組成物。

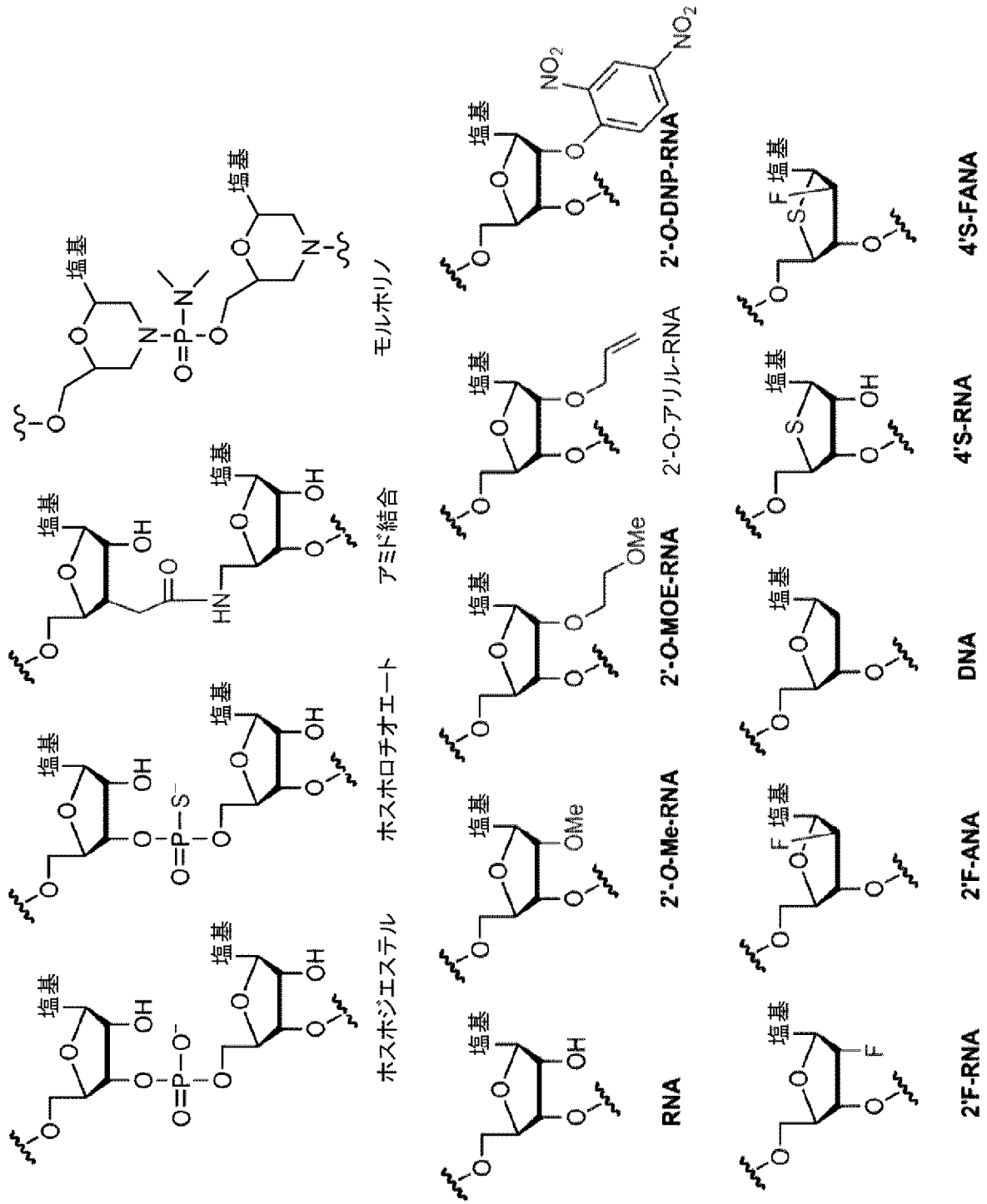
[請求項28] 前記核酸が、1個、又はヌクレオシド間結合により連結された2～10個のヌクレオシド及び／若しくは非天然ヌクレオシドからなる、請求項 27 に記載の組成物。

[請求項29] 前記ポリエーテル基が、ポリエチレングリコール基又はトリエチレングリコール基である、請求項 27 に記載の組成物。

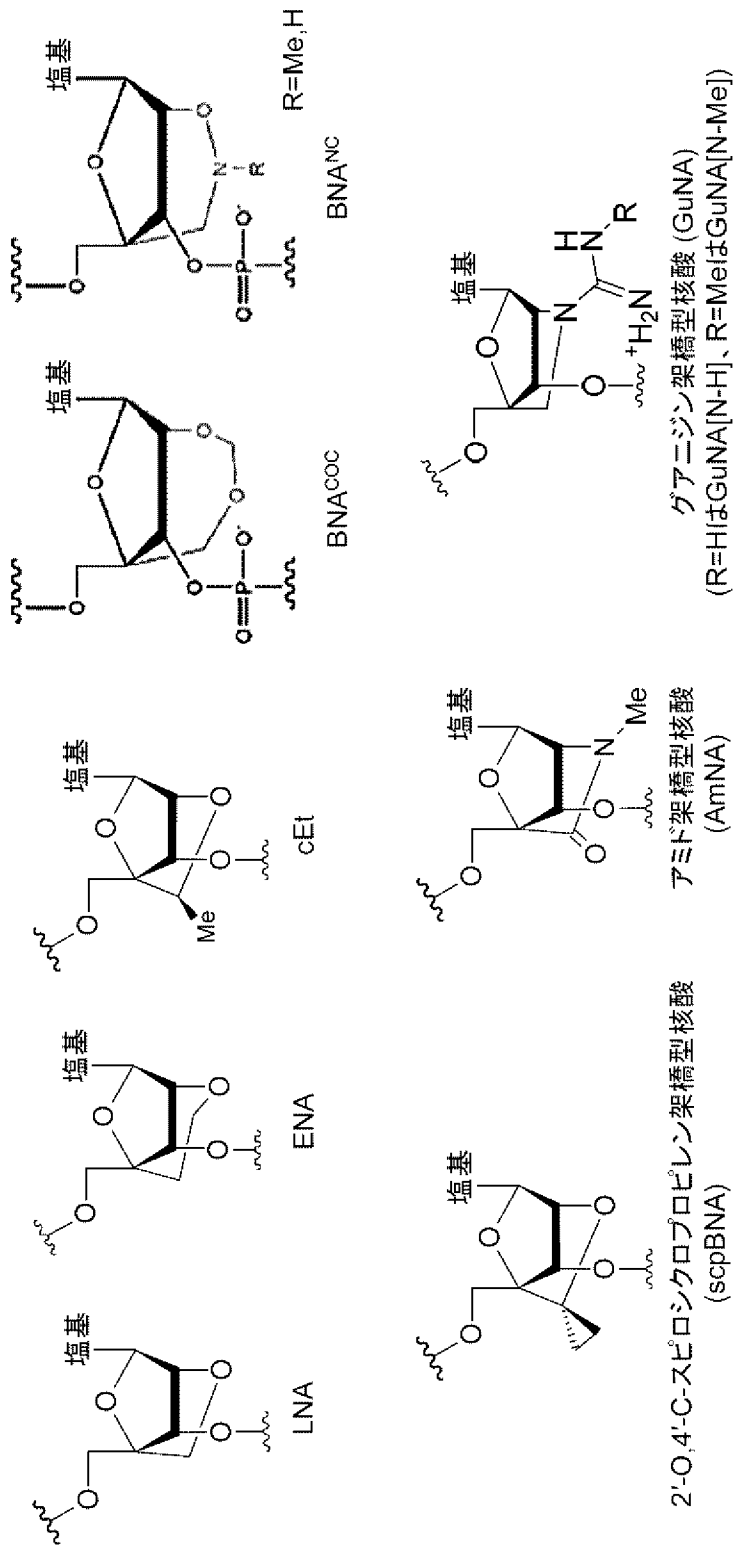
[請求項30] 前記アルキルアミノ基が、ヘキシルアミノ基である、請求項 27 に記載の組成物。

- [請求項31] 前記第1核酸鎖及び／又は前記第2核酸鎖のヌクレオシド間結合の全部又は一部が修飾ヌクレオシド間結合である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項32] 前記修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、請求項31に記載の組成物。
- [請求項33] 前記中枢神経系が、大脳皮質、大脳基底核、大脳白質、間脳、脳幹、小脳、及び脊髄からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項34] 前記中枢神経系が、前頭葉、側頭葉、海馬、海馬傍回、頭頂葉、後頭葉、線条体、淡蒼球、前障、視床、視床下核、中脳、黒質、橋、延髄、小脳皮質、小脳核、頸髄、胸髄、及び腰髄からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項35] 被検体の中枢神経系疾患を治療するための、請求項1に記載の組成物。
- [請求項36] 前記髄腔内投与が脳室内投与、後頭窩穿刺、又は腰椎穿刺である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項37] シヤント、留置カテーテル、又は皮下ポートを用いて投与される、請求項1に記載の組成物。
- [請求項38] 前記二本鎖核酸複合体が0.1mg～200mg投与される、請求項1に記載の組成物。

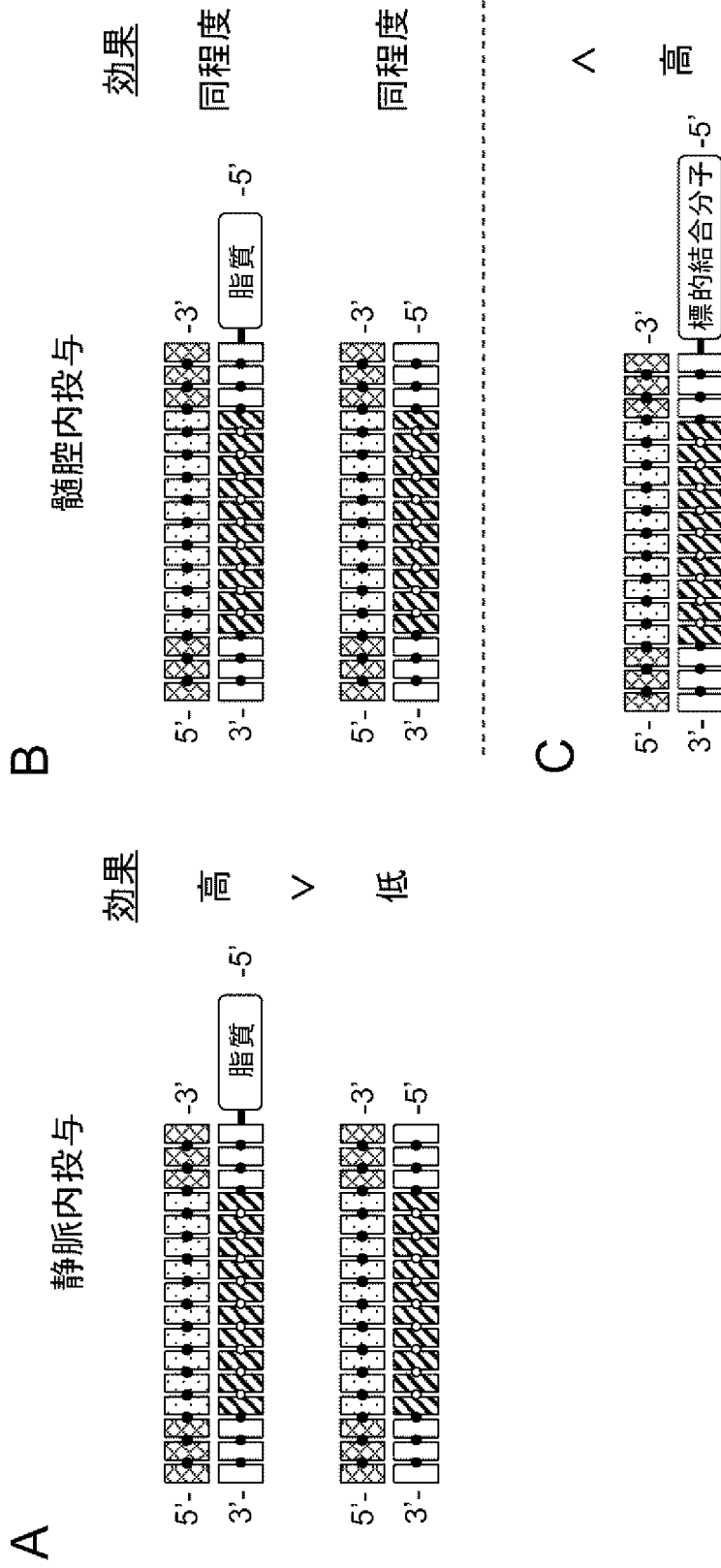
[図1]



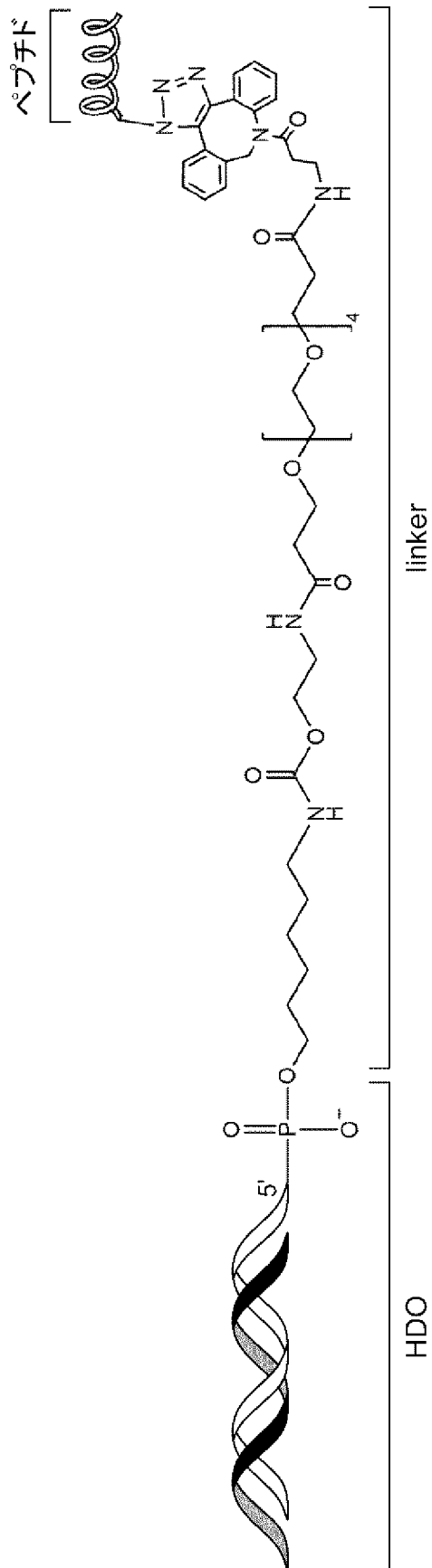
[図2]



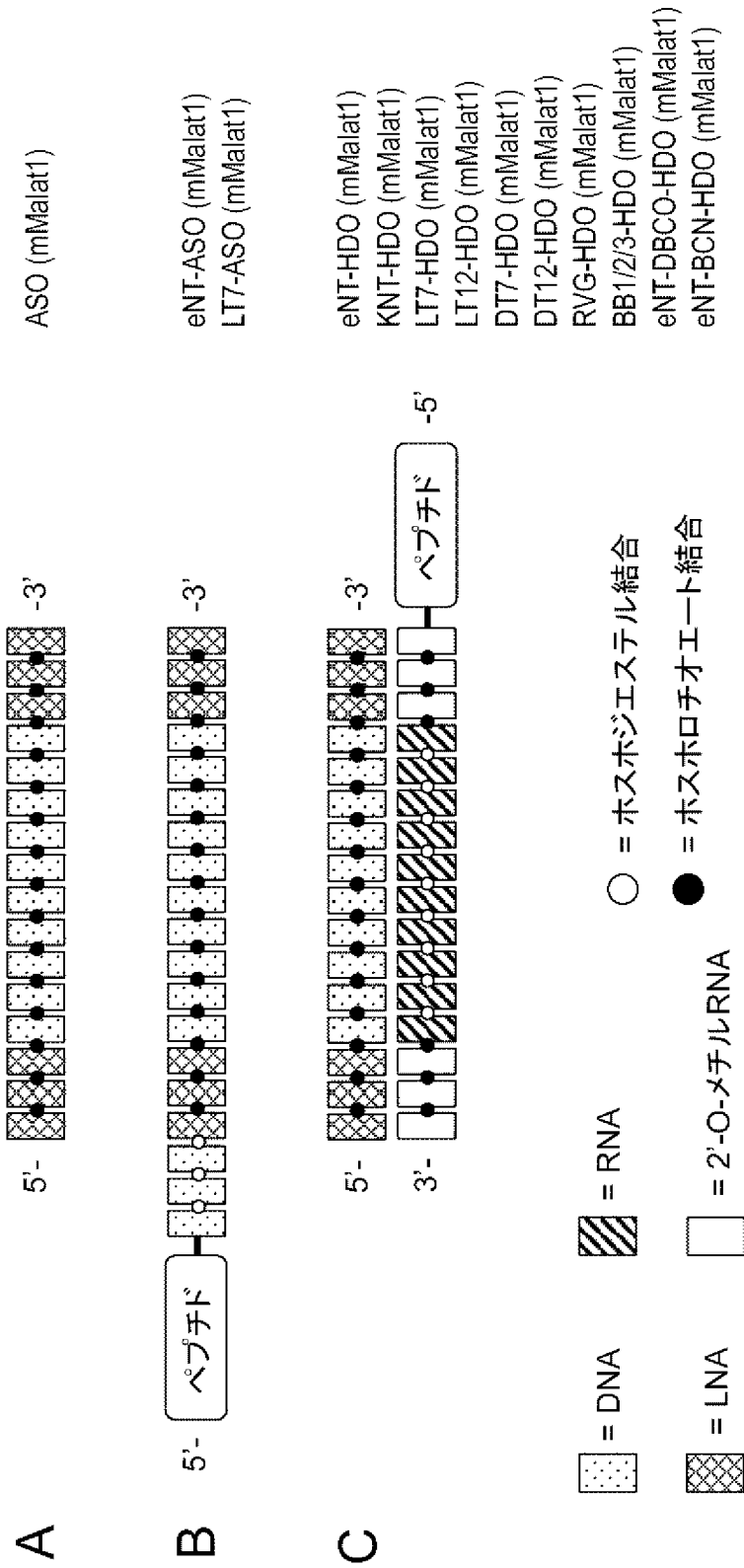
[图3]



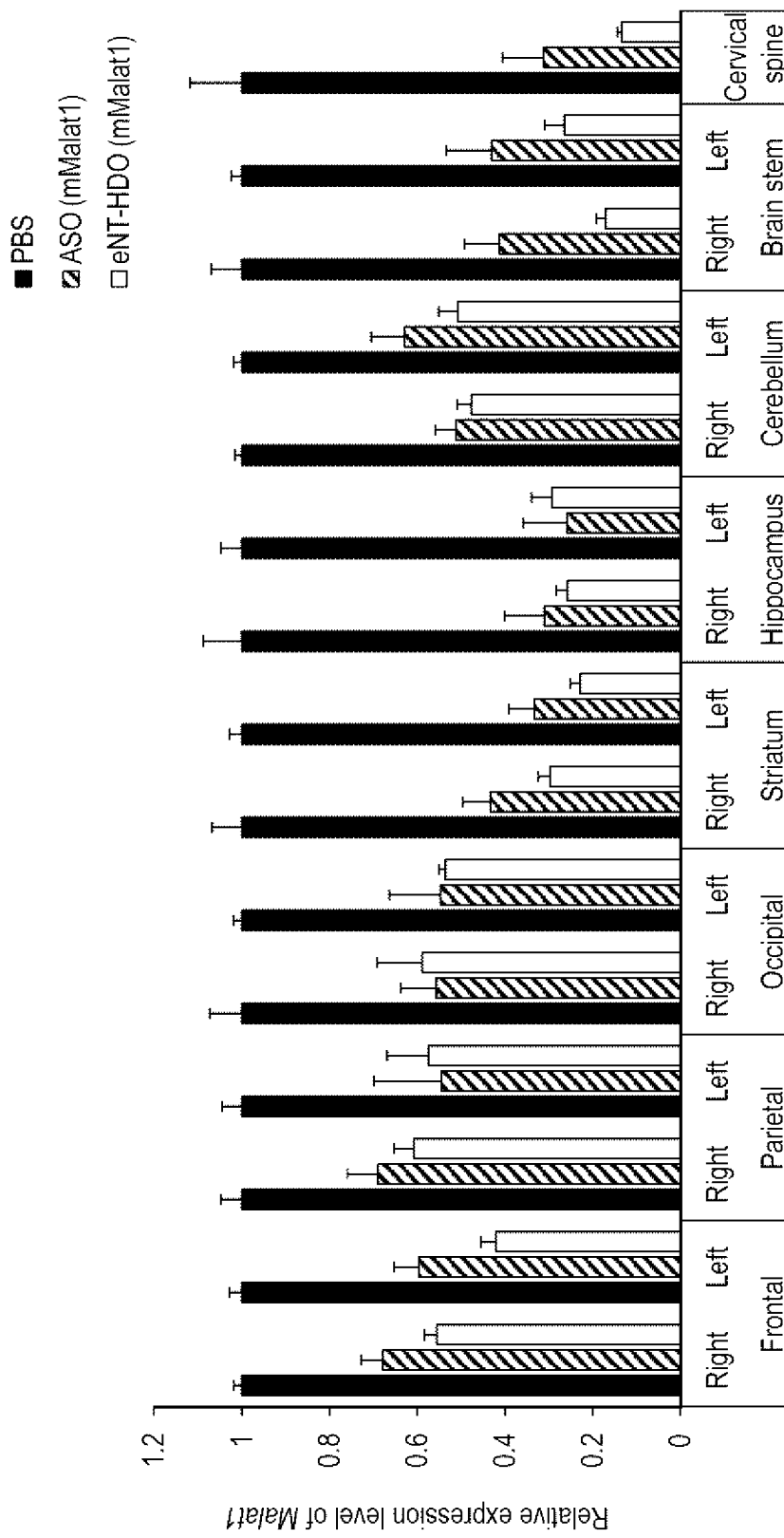
[図4]



[図5]



[6]



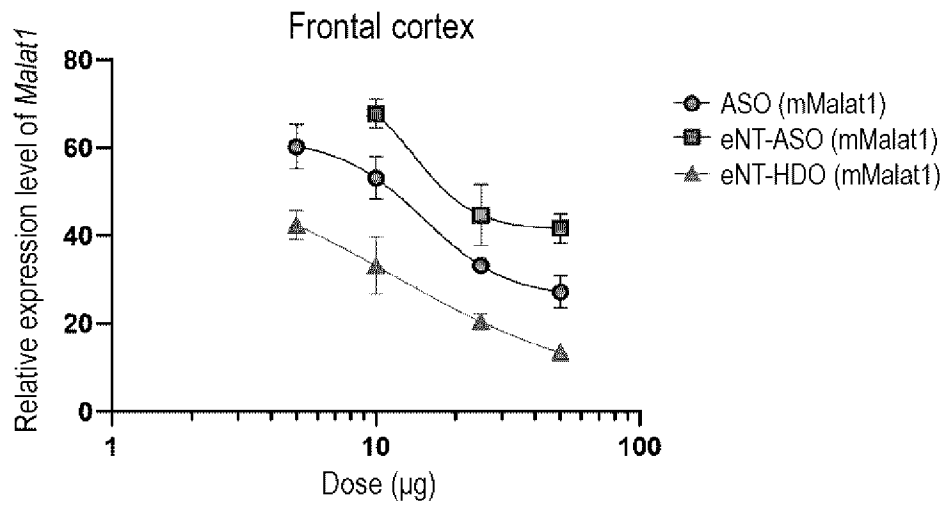
[7]

- PBS
- ▨ ASO (mMalat1)
- ▩ eNT-ASO (mMalat1)
- eNT-HDO (mMalat1)

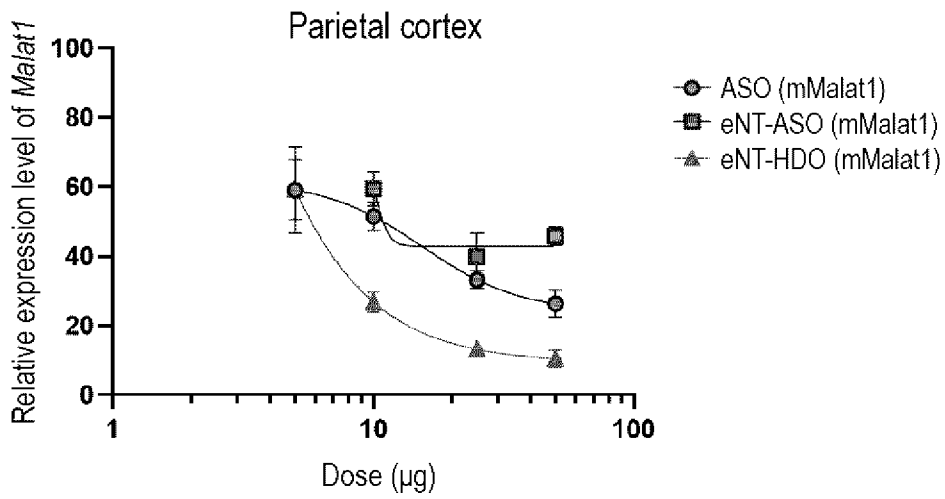


[図8]

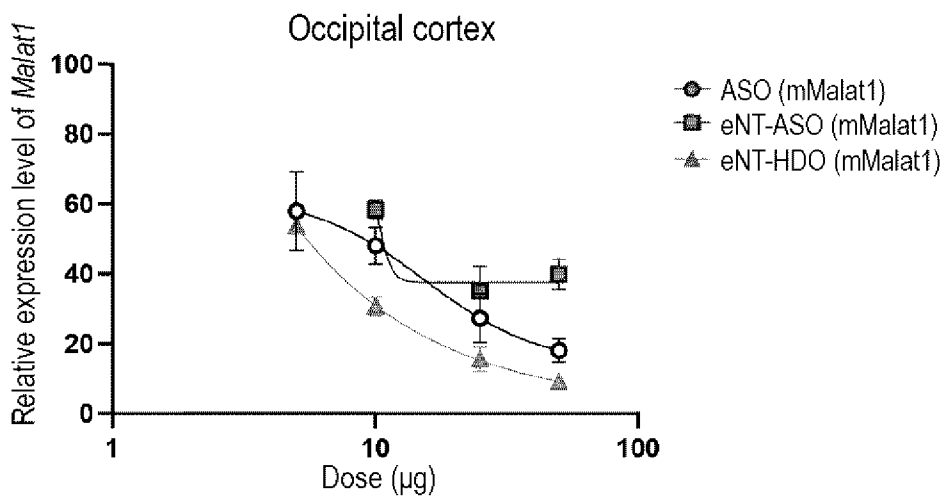
A



B

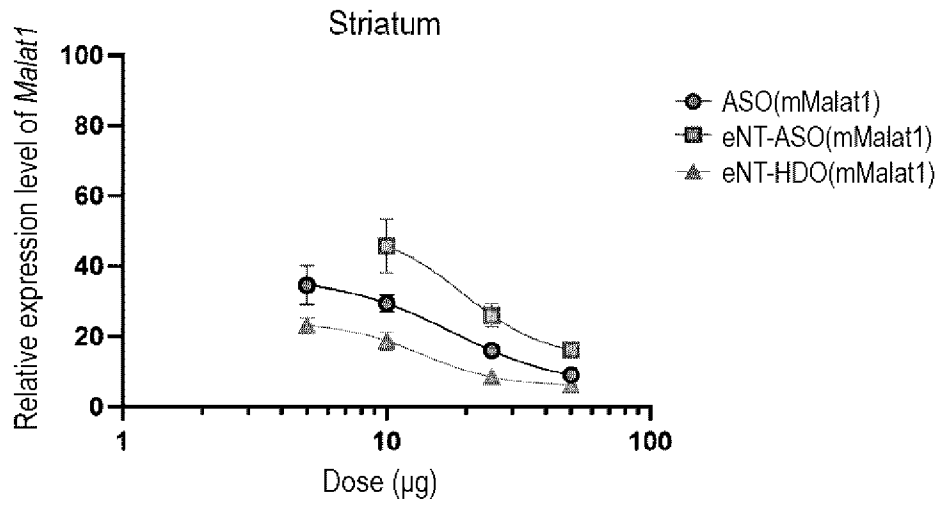


C

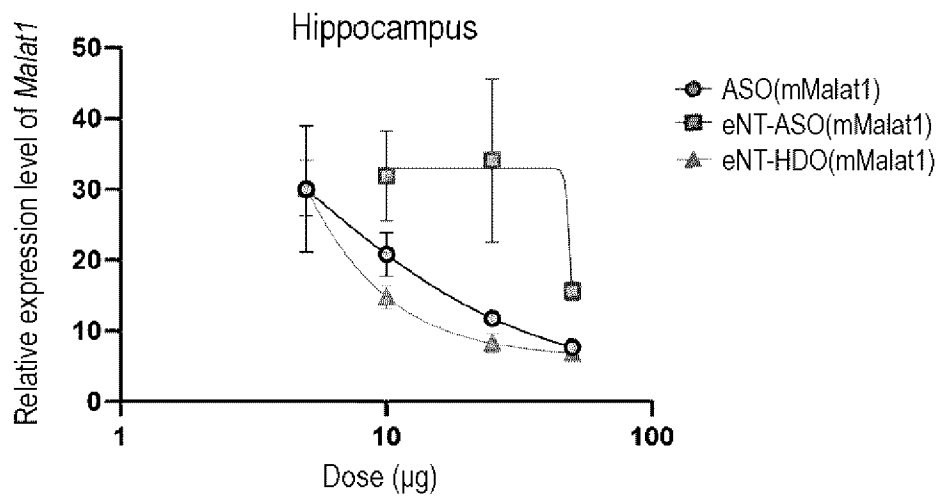


[9]

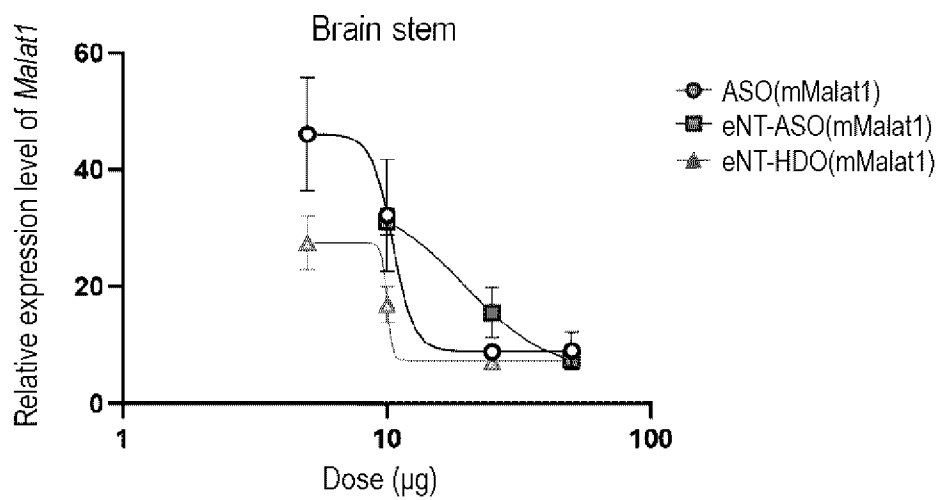
A



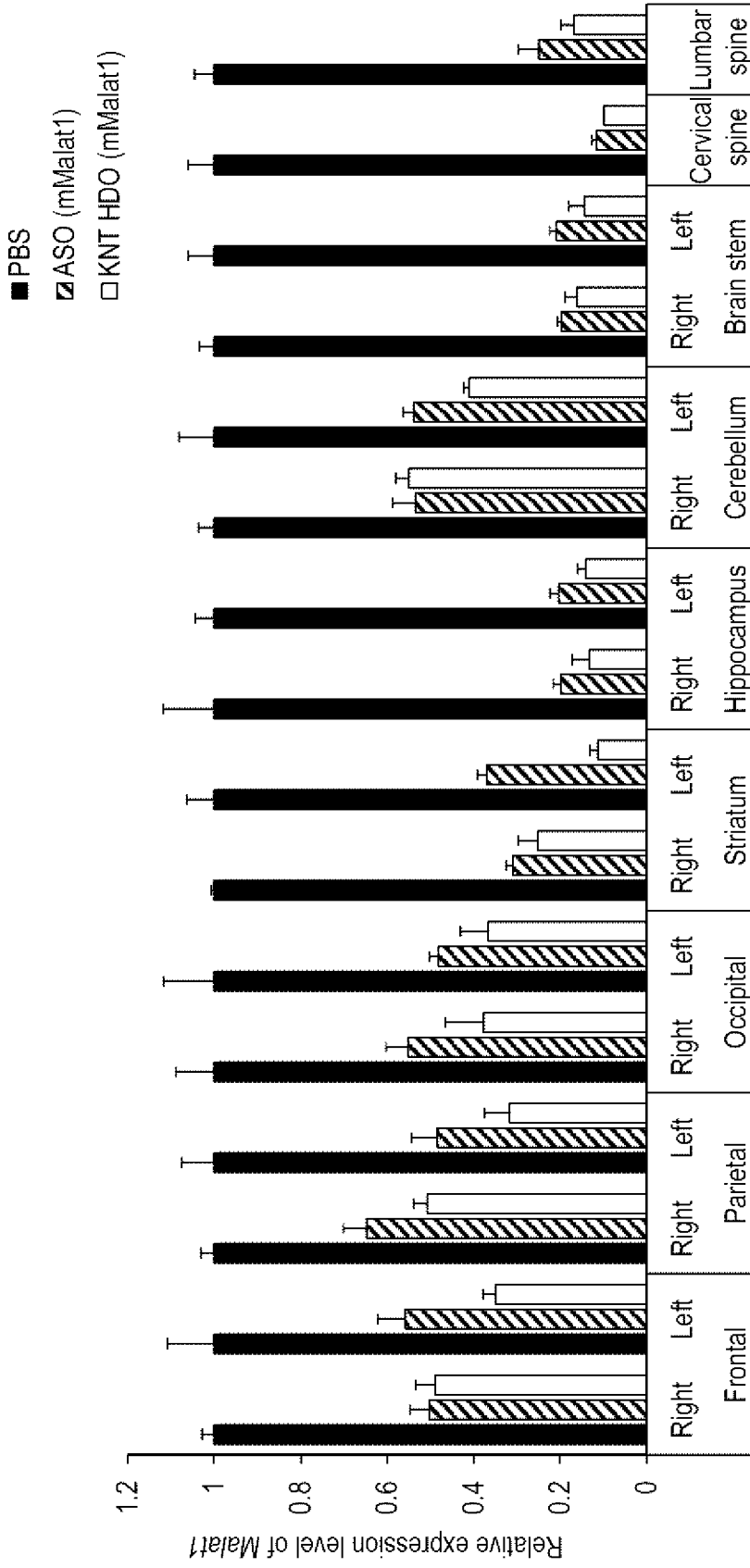
B



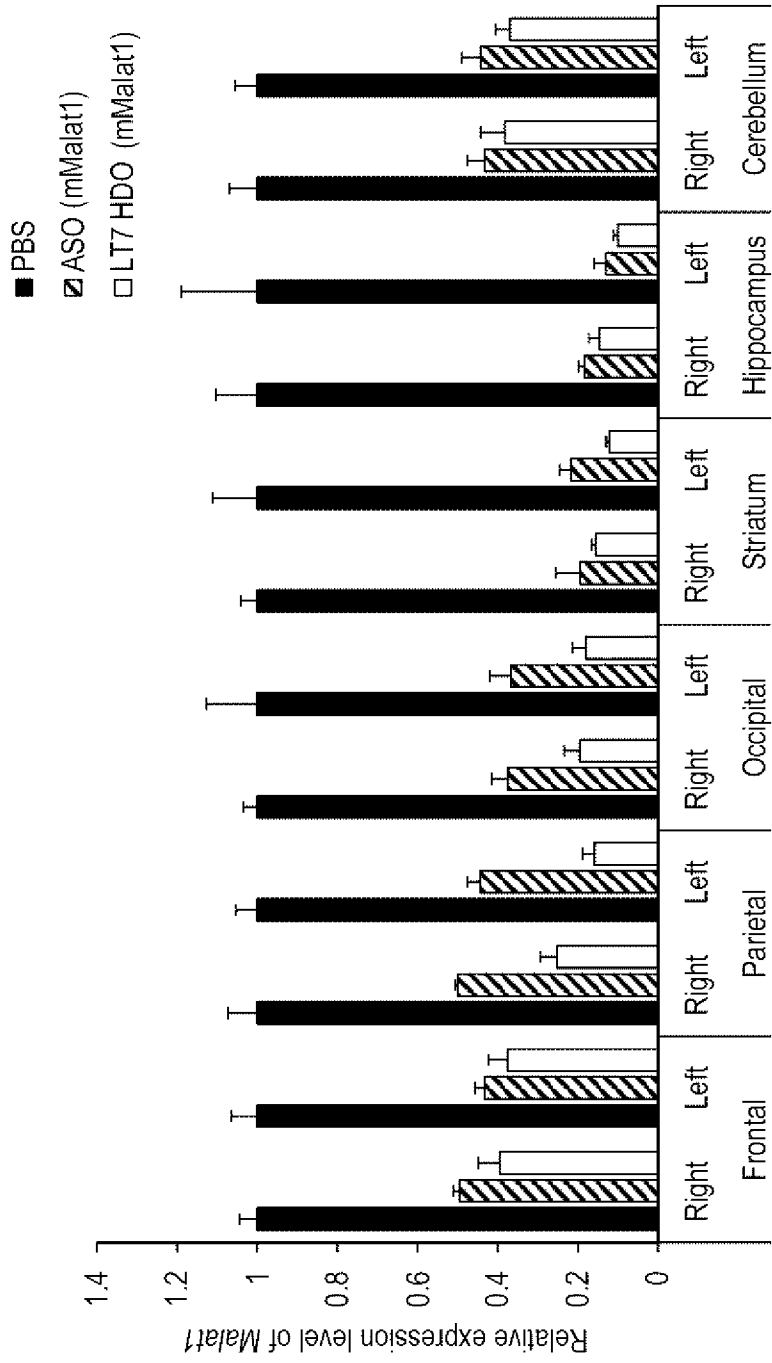
C



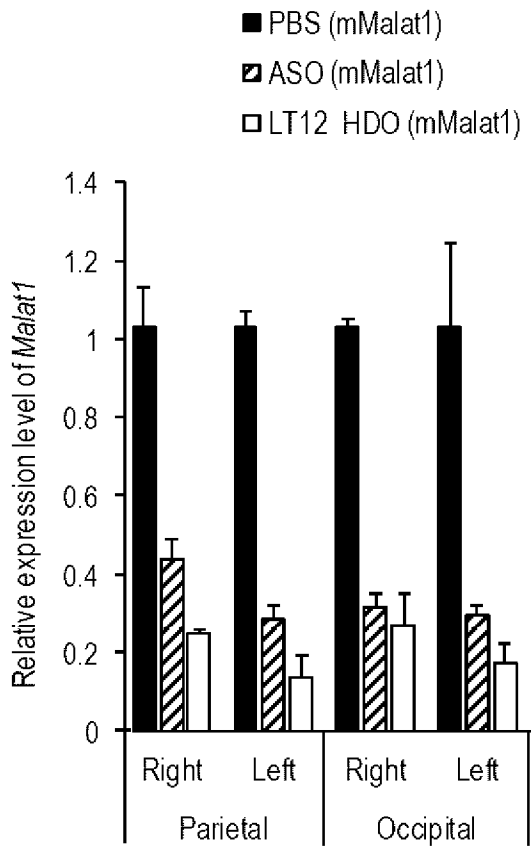
[10]



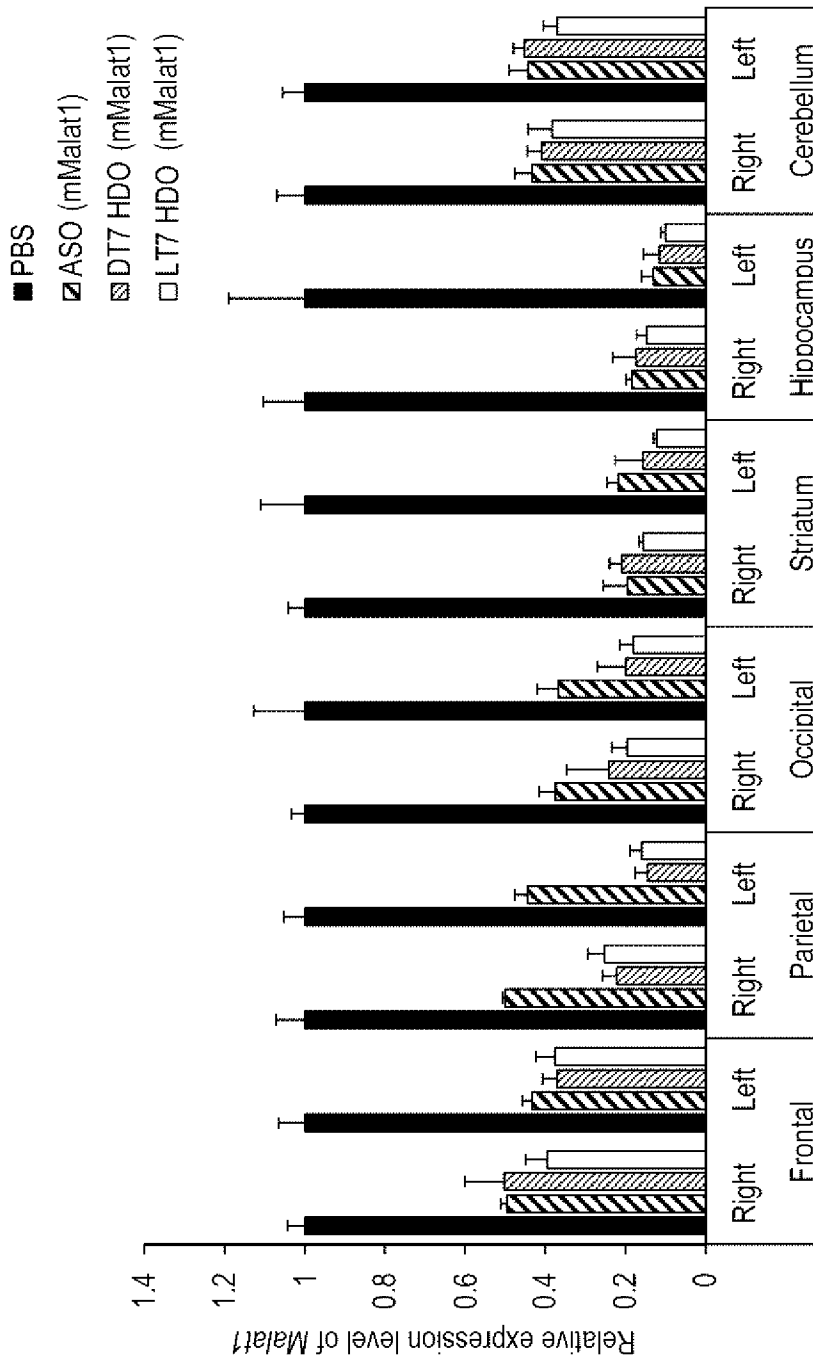
[11]



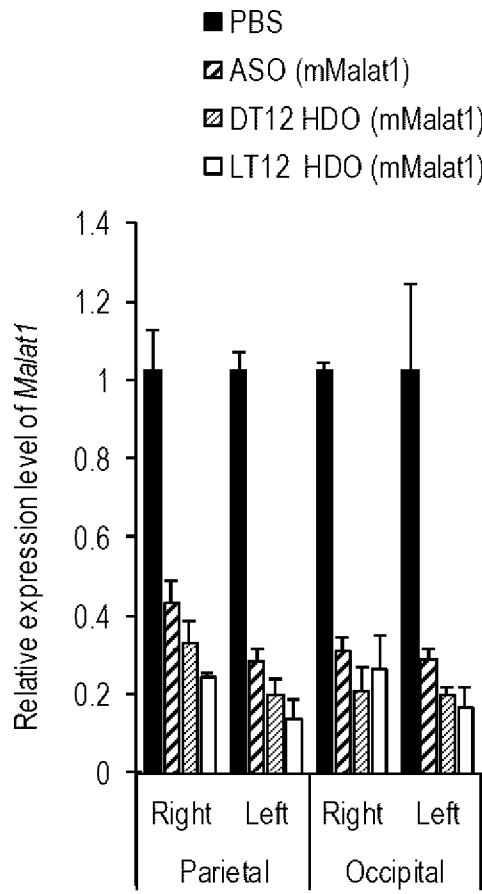
[12]



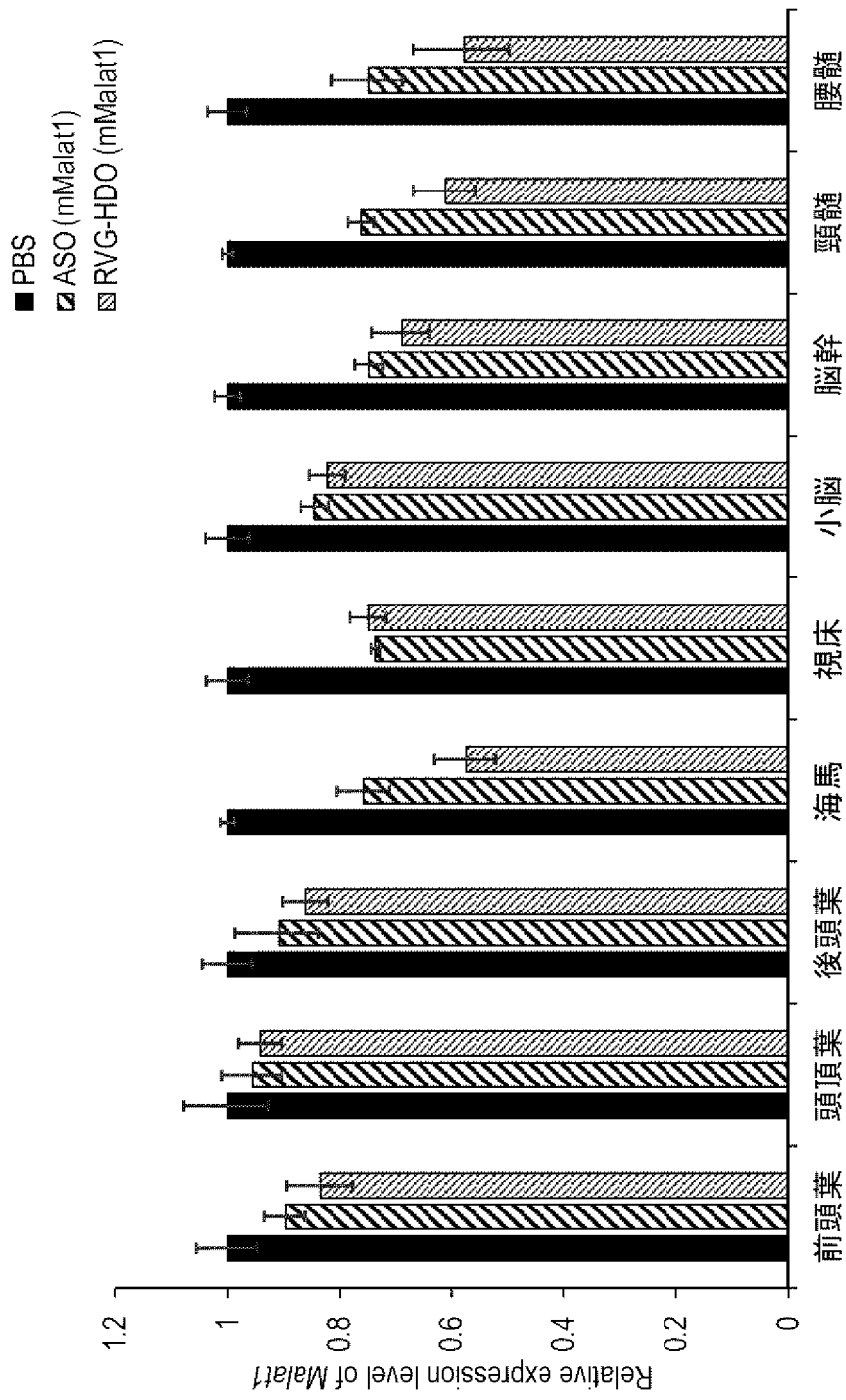
[13]



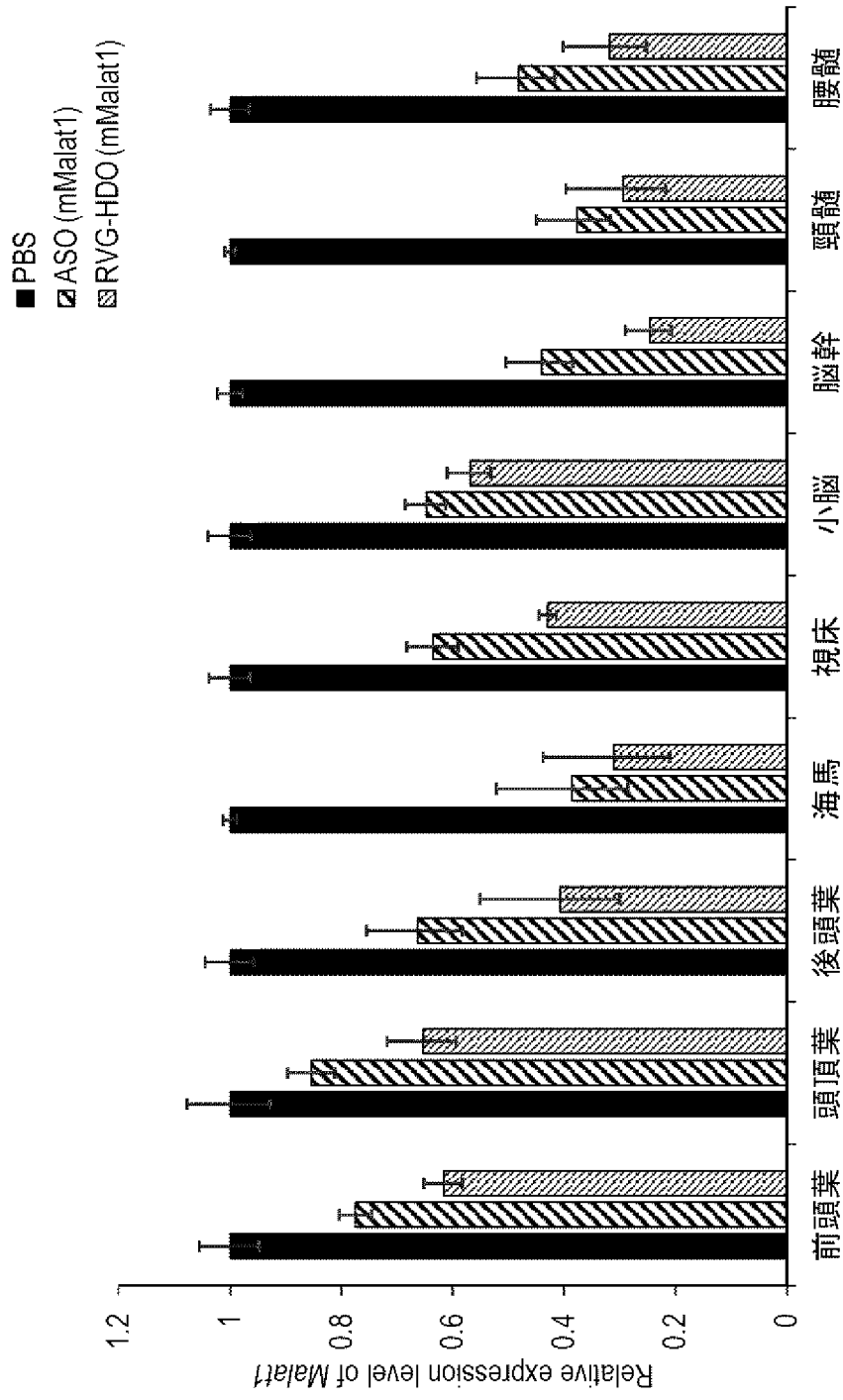
[14]



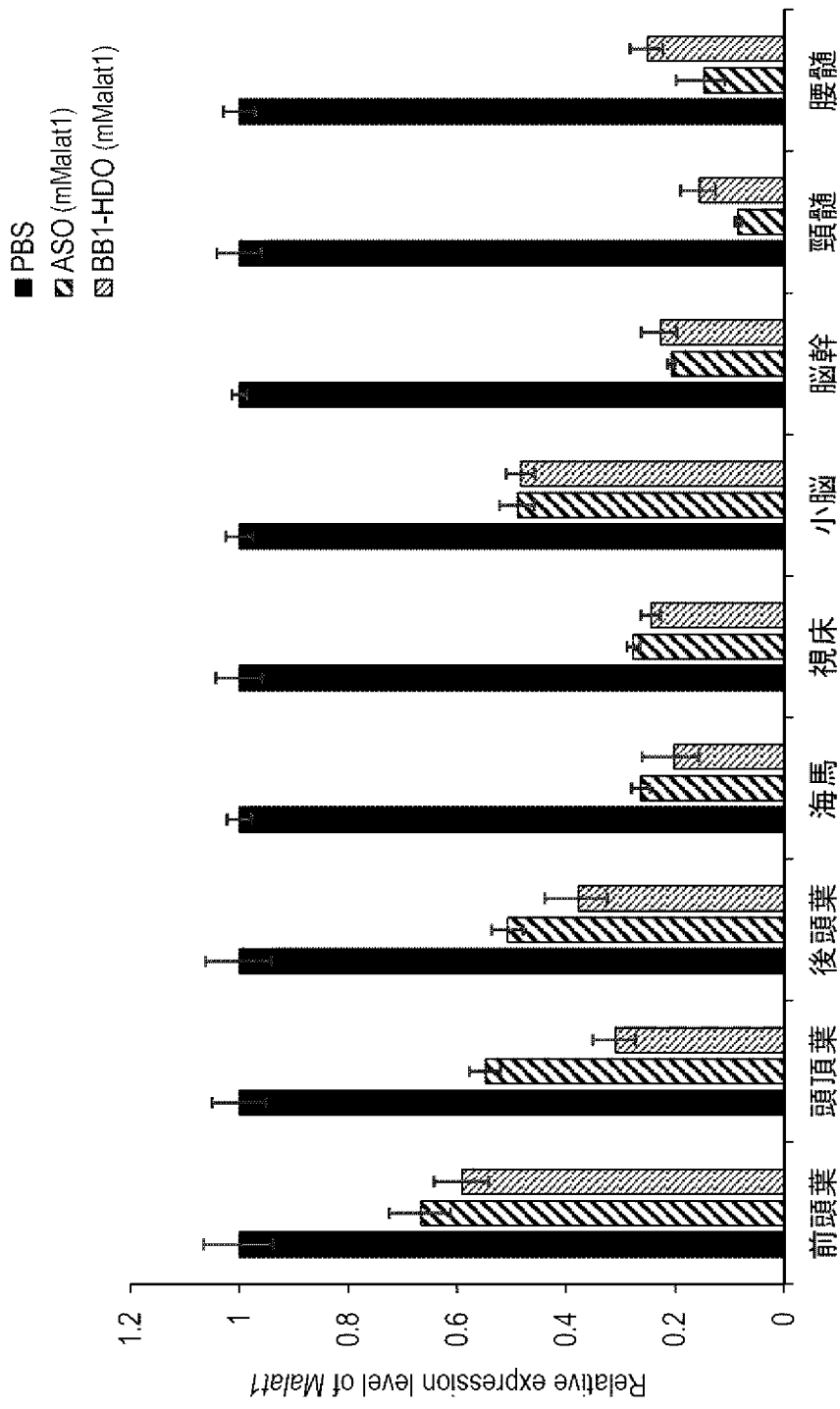
[図15]



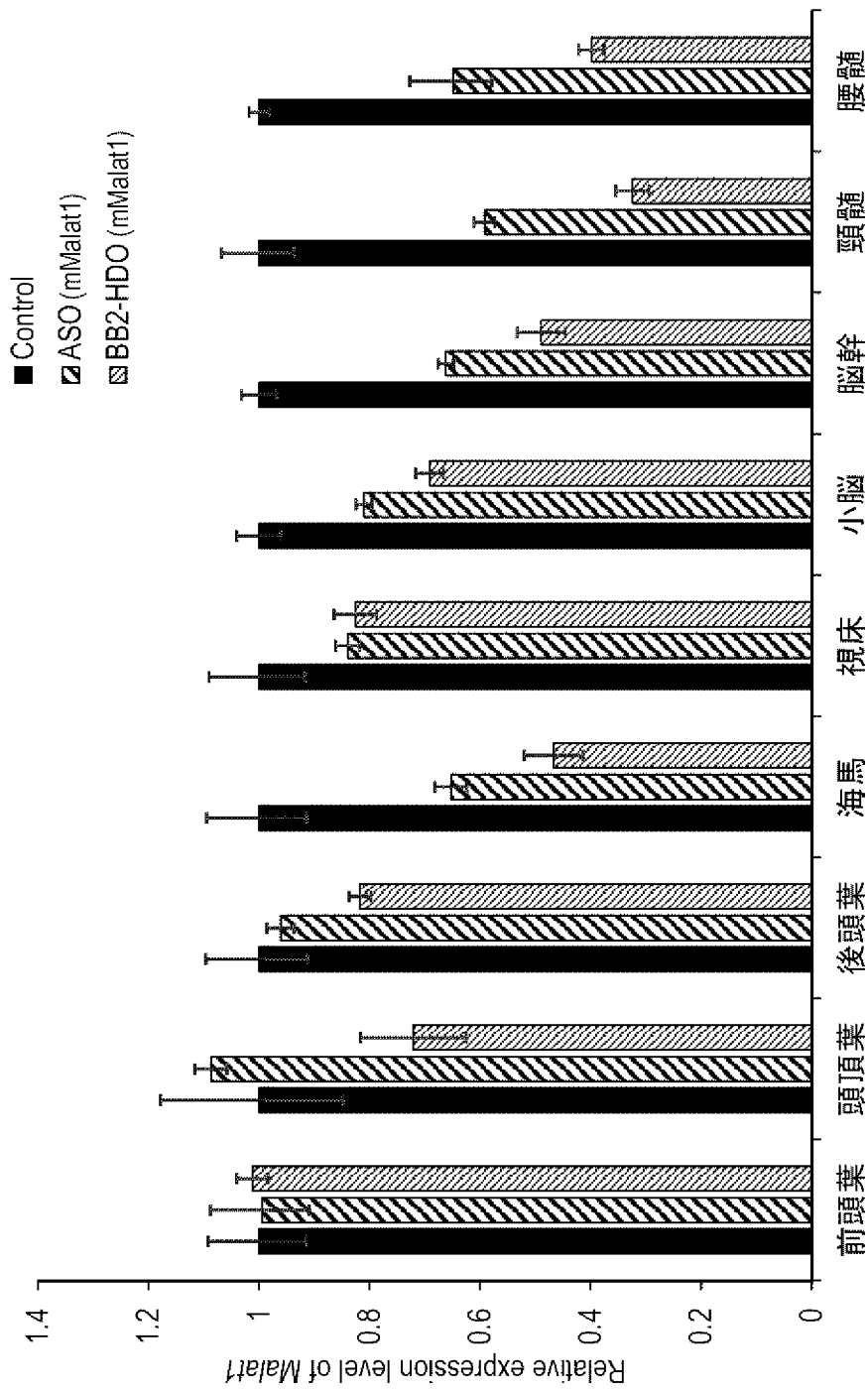
[図16]



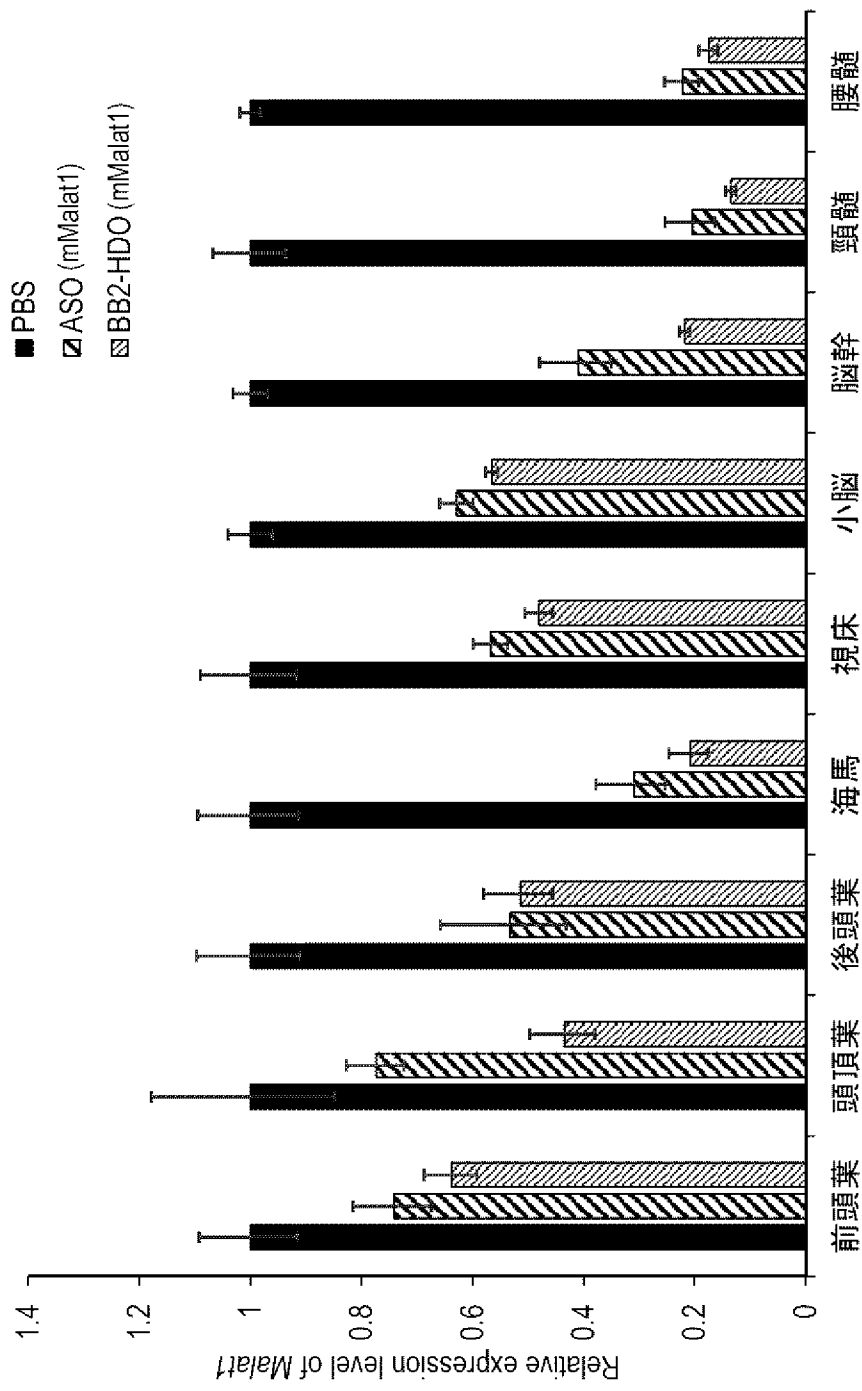
[図17]



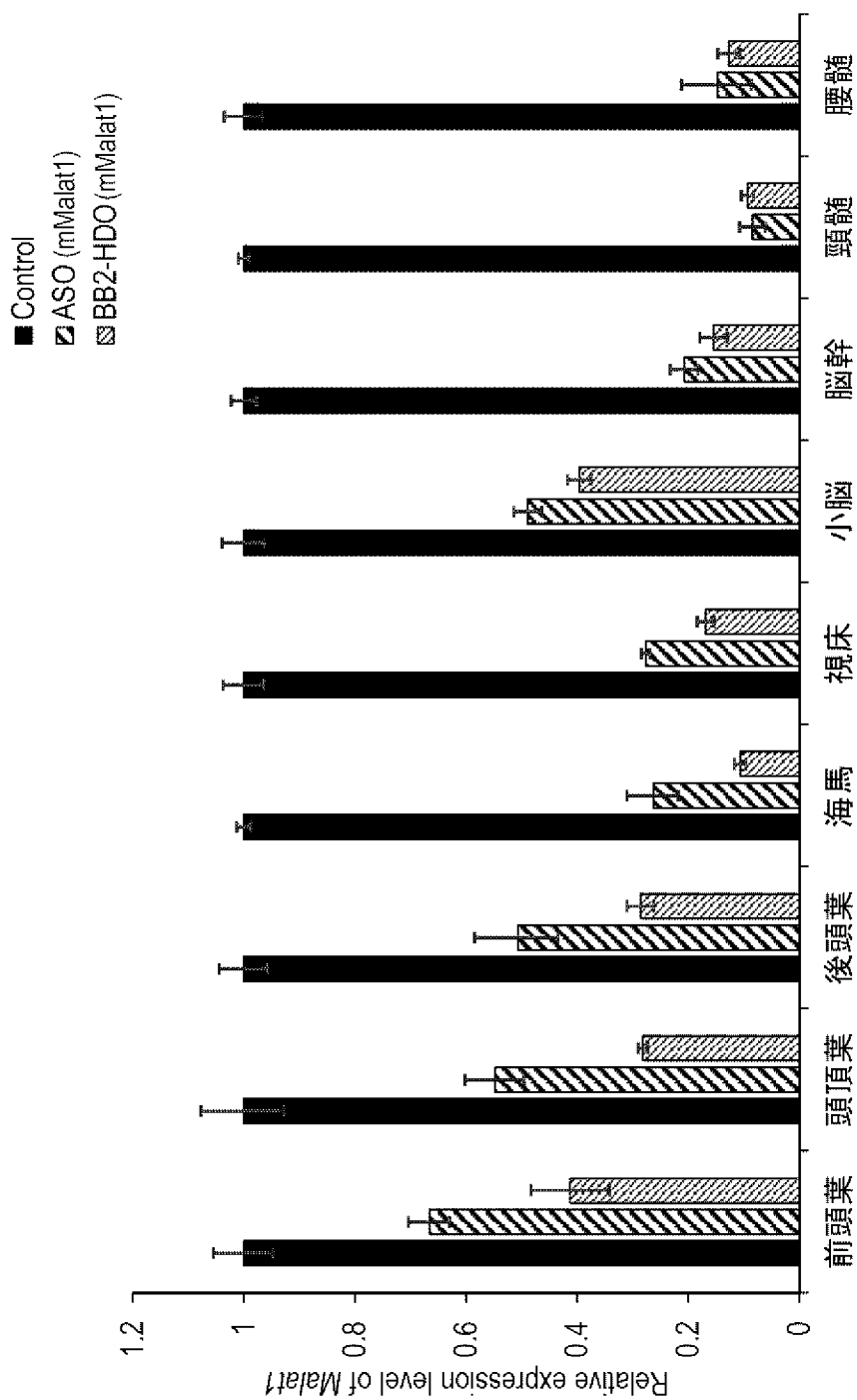
[図18]



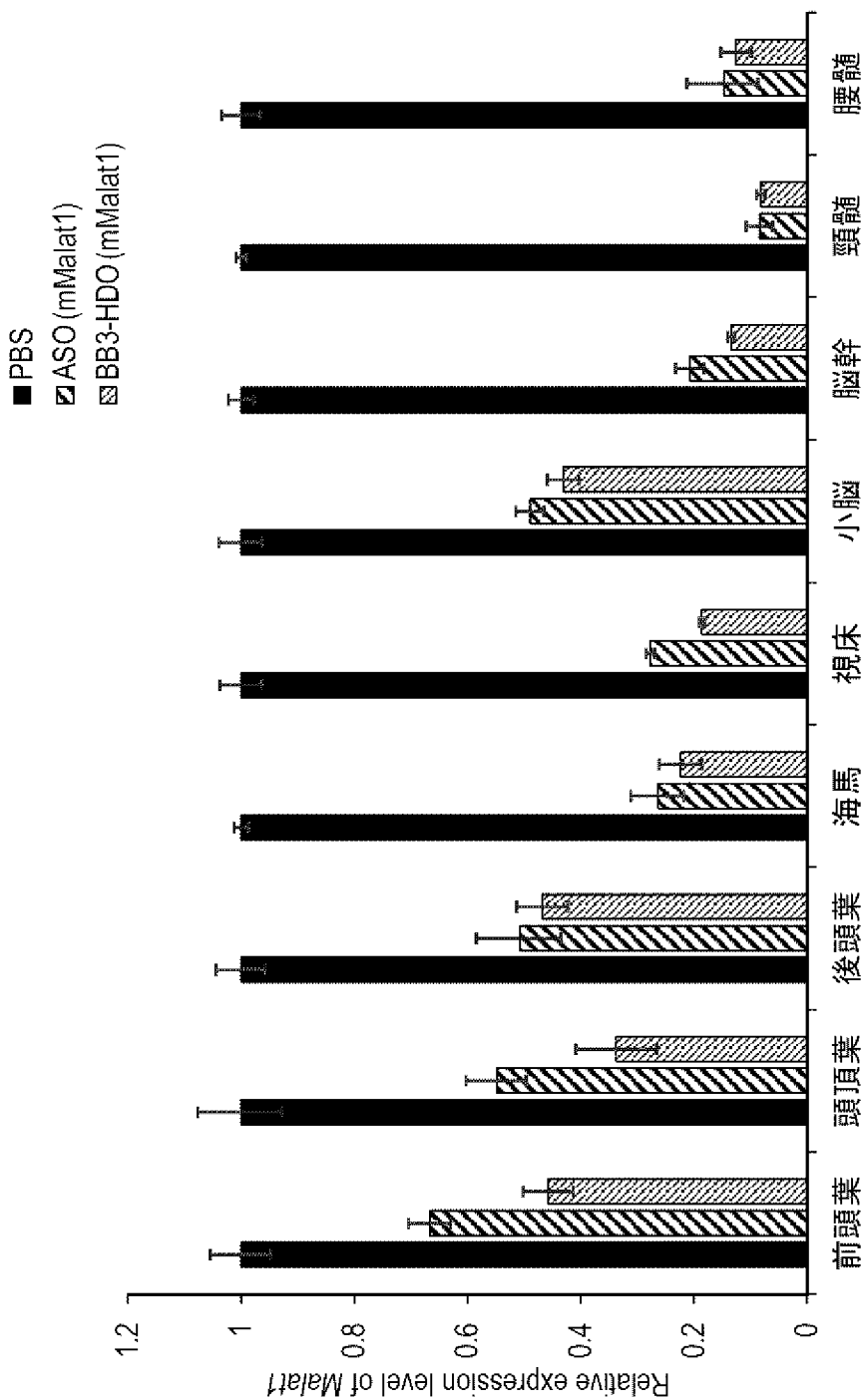
[図19]



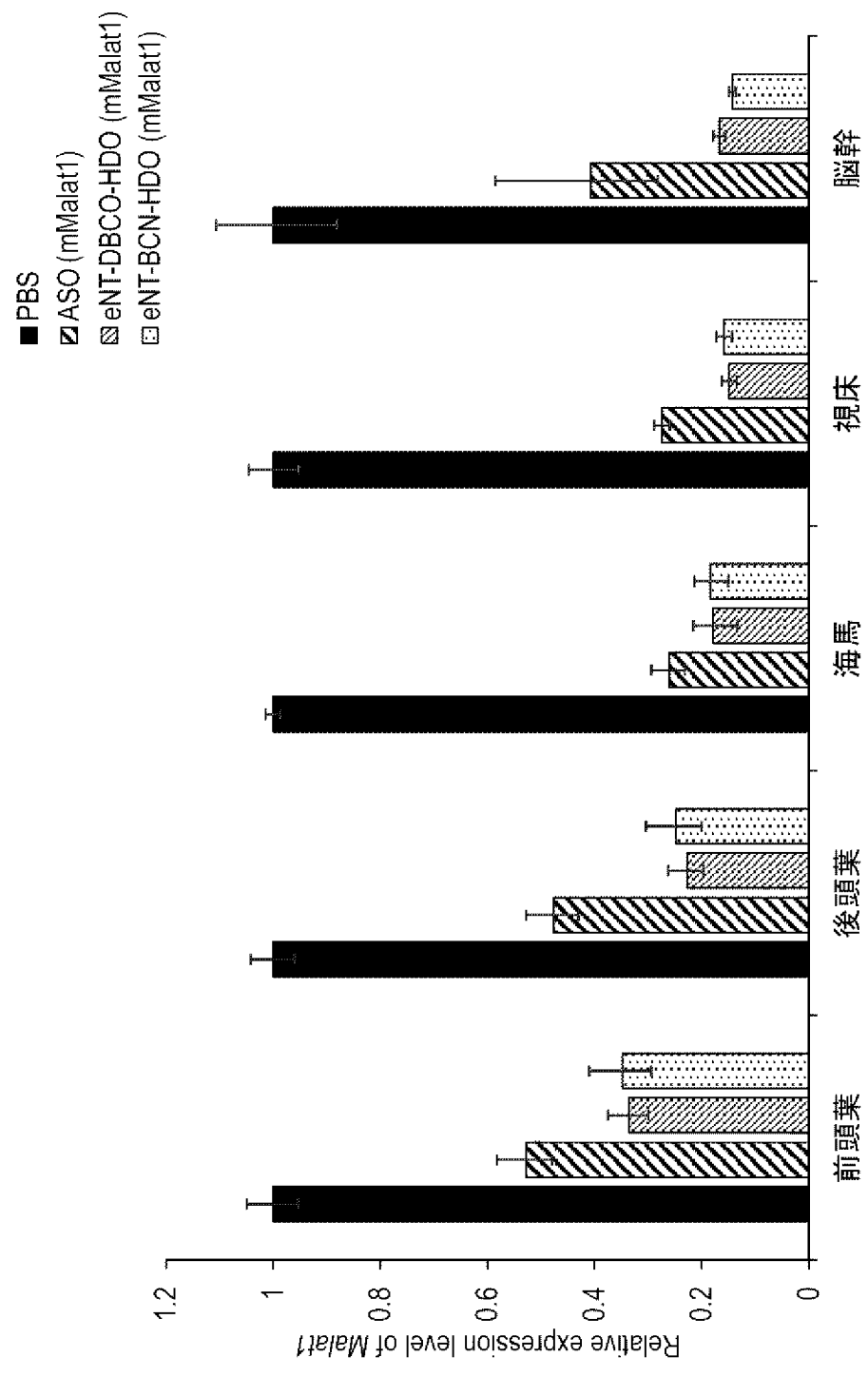
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/041677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 47/61(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i FI: A61K48/00; A61K47/64; A61K47/54; A61P25/00; A61P43/00 105; A61K31/713; A61K47/61; A61K39/395 L; C12N15/113 Z ZNA</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K48/00; A61K31/713; A61K39/395; A61K47/54; A61K47/61; A61K47/64; A61P25/00; A61P43/00; C12N15/113		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/187392 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 23 September 2021 (2021-09-23) claims, fig. 2, paragraphs [0007]-[0011], [0074]-[0077], [0084]-[0088], [0094], [0095], example 2	1-38
Y	NIKAN, M., et al. Targeted Delivery of Antisense Oligonucleotides Using Neurotensin Peptides. Journal of Medicinal Chemistry. 2020, vol. 63, pp. 8471-8484 abstract, fig. 3, p. 8475	1-38
Y	横田隆徳. ヘテロ核酸の免疫介在性神経疾患治療における核酸医薬の可能性. 実験医学. 2021, vol. 39, no. 15, pp. 179-185, (YOKOTA, Takanori. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for neuro-immunological diseases. Experimental Medicine.) abstract, p. 179, right column to p. 180, fig. 1, 2	1-38
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 24 January 2024		Date of mailing of the international search report 06 February 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/041677

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAGATA, T. BBB-penetrating heteroduplex oligonucleotide. 臨床神経学. 2020, vol. 60, supplement, p. S255, (Clinical Neurology.) p. S255, section HT-17-2	1-38
Y	横田隆徳ほか. 核酸医薬を用いた遺伝子治療の展望. 神経治療. 2016, vol. 33, no. 3, pp. 303-306, (YOKOTA, Takanori et al. Gene therapy with therapeutic oligonucleotides. Neurological Therapeutics.) p. 305, right column, second paragraph	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/041677

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/041677

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/187392 A1	23 September 2021	US 2023/0174981 A1 claims, fig. 2, paragraphs [0010]-[0036], [0099]-[0102], [0109]-[0119], example 2 EP 4123023 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 47/61(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i FI: A61K48/00; A61K47/64; A61K47/54; A61P25/00; A61P43/00 105; A61K31/713; A61K47/61; A61K39/395 L; C12N15/113 Z ZNA</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K48/00; A61K31/713; A61K39/395; A61K47/54; A61K47/61; A61K47/64; A61P25/00; A61P43/00; C12N15/113</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2024年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2024年	日本国実用新案登録公報	1996-2024年	日本国登録実用新案公報	1994-2024年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2024年																
日本国実用新案登録公報	1996-2024年																
日本国登録実用新案公報	1994-2024年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2021/187392 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 23.09.2021 (2021-09-23) 請求の範囲、図2、[0007]-[0011]、[0074]-[0077]、[0084]-[0088]、[0094]-[0095]、実施例2</td> <td>1-38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NIKAN, M., et al., Targeted Delivery of Antisense Oligonucleotides Using Neurotensin Peptides, Journal of Medicinal Chemistry, 2020, Vol.63, pp.8471-8484 Abstract, Fig.3, 第8475頁</td> <td>1-38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>横田隆徳, ヘテロ核酸の免疫介在性神経疾患治療における核酸医薬の可能性, 実験医学, 2021, Vol.39, No.15, pp.179-185 要約, 第179頁右欄-第180頁, 図1, 図2</td> <td>1-38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NAGATA, T., BBB-penetrating heteroduplex oligonucleotide, 臨床神経学, 2020, 第60巻別冊, p.S255 S255頁HT-17-2欄</td> <td>1-38</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献</p>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	WO 2021/187392 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 23.09.2021 (2021-09-23) 請求の範囲、図2、[0007]-[0011]、[0074]-[0077]、[0084]-[0088]、[0094]-[0095]、実施例2	1-38	Y	NIKAN, M., et al., Targeted Delivery of Antisense Oligonucleotides Using Neurotensin Peptides, Journal of Medicinal Chemistry, 2020, Vol.63, pp.8471-8484 Abstract, Fig.3, 第8475頁	1-38	Y	横田隆徳, ヘテロ核酸の免疫介在性神経疾患治療における核酸医薬の可能性, 実験医学, 2021, Vol.39, No.15, pp.179-185 要約, 第179頁右欄-第180頁, 図1, 図2	1-38	Y	NAGATA, T., BBB-penetrating heteroduplex oligonucleotide, 臨床神経学, 2020, 第60巻別冊, p.S255 S255頁HT-17-2欄	1-38
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
Y	WO 2021/187392 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 23.09.2021 (2021-09-23) 請求の範囲、図2、[0007]-[0011]、[0074]-[0077]、[0084]-[0088]、[0094]-[0095]、実施例2	1-38															
Y	NIKAN, M., et al., Targeted Delivery of Antisense Oligonucleotides Using Neurotensin Peptides, Journal of Medicinal Chemistry, 2020, Vol.63, pp.8471-8484 Abstract, Fig.3, 第8475頁	1-38															
Y	横田隆徳, ヘテロ核酸の免疫介在性神経疾患治療における核酸医薬の可能性, 実験医学, 2021, Vol.39, No.15, pp.179-185 要約, 第179頁右欄-第180頁, 図1, 図2	1-38															
Y	NAGATA, T., BBB-penetrating heteroduplex oligonucleotide, 臨床神経学, 2020, 第60巻別冊, p.S255 S255頁HT-17-2欄	1-38															
<p>国際調査を完了した日</p> <p>24.01.2024</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.02.2024</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>佐々木 大輔 4U 3962</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>																

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	横田隆徳 ほか, 核酸医薬を用いた遺伝子治療の展望, 神経治療, 2016, Vol. 33, No. 3, pp. 303-306 第305頁右欄第2段落	1-38

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a))
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/041677

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/187392 A1	23.09.2021	US 2023/0174981 A1 Claims, Fig. 2, [0010]– [0036], [0099]–[0102], [0109]–[0119], Example2 EP 4123023 A1	