(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年9月26日(26.09.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/181946 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/713 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/011464

(22) 国際出願日： 2019年3月19日(19.03.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2018-051338 2018年3月19日(19.03.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 Tokyo (JP).

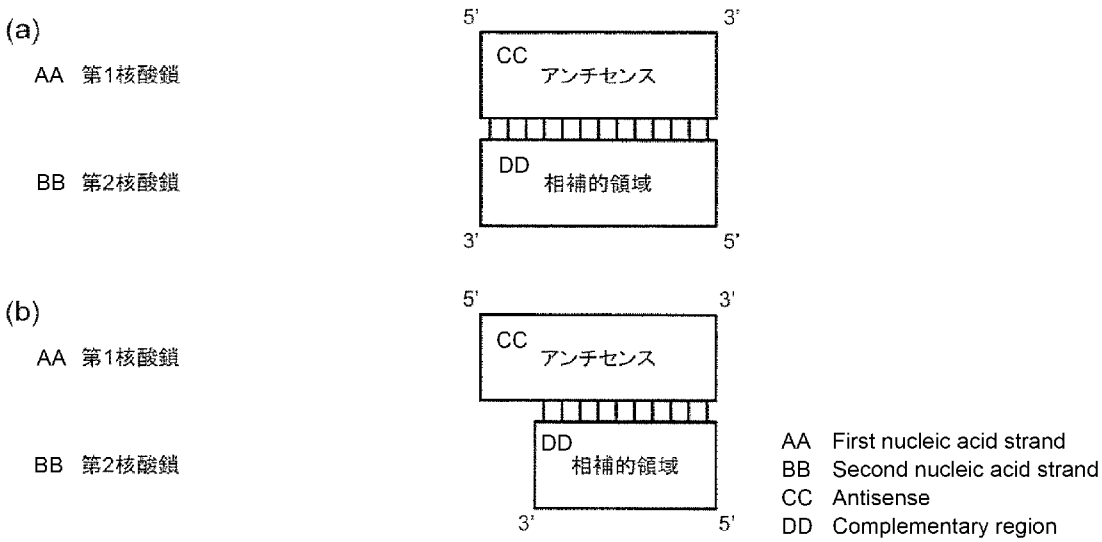
(72) 発明者: 横田 隆徳 (**YOKOTA Takanori**); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 永田 哲也(**NAGATA Tetsuya**); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 吉岡 耕太郎(**YOSHIOKA Kotaro**); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所(**HIRAKI & ASSOCIATES**); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目５－１ 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) **Title:** NUCLEIC ACID WITH REDUCED TOXICITY

(54) 発明の名称： 毒性が軽減した核酸



(57) **Abstract:** Provided is a low-toxicity antisense nucleic acid medicine that can adjust the expression of a target transcriptional product in the central nervous system and other sites in a subject. Provided is a low-toxicity composition that is for adjusting the expression of a target transcriptional product in a site such as the central nervous system of a subject, and includes a nucleic acid complex obtained by annealing a first nucleic acid strand and a second nucleic acid strand to one another, said first nucleic acid strand including an antisense oligonucleotide region with regard to the target transcriptional product, and said second nucleic acid strand including a complementary region that is complementary to at least one section of the first nucleic acid strand.

WO 2019/181946 A1

[続葉有]

MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: 被験体の中枢神経系および他の部位において標的転写産物の発現を調節することができる、低毒性のアンチセンス核酸医薬を提供する。 標的転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド領域を含む第1核酸鎖と、第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む第2核酸鎖とが互いにアニールしてなる核酸複合体を含む、被験体の中枢神経系等の部位において標的転写産物の発現を調節するための低毒性組成物を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 毒性が軽減した核酸

技術分野

[0001] 本発明は、標的転写産物の発現を調節することができる、低毒性のアンチセンス核酸医薬に関する。より具体的には、被験体の中枢神経系および他の部位において標的転写産物の発現を調節することができる、低毒性のアンチセンス核酸医薬に関する。

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等の点から考えて、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。アンチセンス法は、標的遺伝子のmRNA(センス鎖)の部分配列に相補的なオリゴヌクレオチド(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわちASO)を細胞に導入することにより、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を選択的に改変または阻害する方法を含む。同様に、アンチセンス法はまた、miRNAを標的とし、またこのようなmiRNAの活性を改変する働きをする。

[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および２)。本発明者らはまた、エクソンスキッピング効果を有する二本鎖アンチセンス核酸(特許文献２)、付加ヌクレオチドがギャップマー(アンチセンスオリゴヌクレオチド)の5'末端、3'末端、もしくは5'末端と3'末端の両方に付加されている短いギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチド(特許文献３)、および治療用オリゴヌクレオチドを送達するための二本鎖剤(ヘテロキメラ二本鎖オリゴヌクレオチド(hetero-chimera-duplex oligonucleotide、HCDO)を開発した(特許文献４)。

[0004] ヌシネルセン(Nusinersen)は、2016年12月に米国で承認された、脊髄性筋萎縮症の治療に用いられる髄腔内投与用アンチセンス核酸医薬である。ヌシネルセンは、核酸の糖部分の2'位が2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-MOE)で置き換えられた化学修飾型核酸である。脊髄性筋萎縮症は、生存運動ニューロン(survival motor neuron、SMN)タンパク質をコードするSMN1遺伝子の不活化変異が原因となっているが、ヌシネルセンは、SMN2遺伝子の選択的スプライシングを調節してSMN1遺伝子に変え、中枢神経系中の生存運動ニューロンタンパク質の量を増やすことによって、脊髄性筋萎縮症の症状を改善することができる(特許文献５)。しかし、ヌシネルセンは、髄腔内投与により、様々な神経毒性をはじめとする副作用を生じる場合がある。ヌシネルセンのように、髄腔内投与による神経疾患の治療のための化学修飾型核酸医薬の開発が今後の創薬の主流となることが予期されるが、そのためには中枢神経系投与の際に生じ得る副作用(毒性)を低下させ、安全性を高めることが必要である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2013/089283号

特許文献2：国際公開第2014/203518号

特許文献3：国際公開第2014/132671号

特許文献4：国際公開第2014/192310号

特許文献5：国際公開第2010/148249号

特許文献6：PCT/JP2017/035553

特許文献7：PCT/JP2017/034561

非特許文献

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

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

.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、被験体の中枢神経系および他の部位において標的転写産物の発現を調節することができる、低毒性のアンチセンス核酸医薬を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、二本鎖構造を有する核酸複合体の一部として被験体へ投与すると、中枢神経系や他の部位において低毒性でアンチセンス効果をもたらし、標的転写産物の発現を調節できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち本発明は以下を包含する。

[１]標的転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド領域を含む第1核酸鎖と、第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む第2核酸鎖とが互いにアニールしてなる核酸複合体を含む、被験体の中枢神経系において標的転写産物の発現を調節するための中枢神経系投与用低毒性組成物。

[２]毒性が、神経毒性である、[１]に記載の組成物。

[３]神経毒性が、死亡、呼吸異常、心血管異常、頭痛、嘔気もしくは嘔吐、無反応もしくは低反応、意識障害、精神障害、性格変化、幻覚、妄想、認知機能障害、姿勢異常、不随意運動、震え、けいれん、活動過剰、運動機能障害、麻痺、感覚障害および自律神経機能障害から選択される症状を引き起こす、[２]に記載の組成物。

[４]第1核酸鎖が、9～50塩基長である、[１]～[３]のいずれかに記載の組成物。

[５]第1核酸鎖中の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド領域が、7～20塩基長である、[１]～[４]のいずれかに記載の組成物。

[0010] [６]第2核酸鎖が、9～50塩基長である、[１]～[５]のいずれかに記載の組

成物。

［７］第2核酸鎖中の前記相補的領域が、第1核酸鎖中の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド領域の少なくとも一部に相補的である、［１］～［６］のいずれかに記載の組成物。

［８］第1核酸鎖が、（a）前記転写産物にハイブリダイズした際に、RNase Hによって認識される少なくとも4つの連続したDNAヌクレオチドもしくは修飾DNAヌクレオチドを含み、さらに（b）前記RNase Hにより認識される少なくとも4つの連続したDNAヌクレオチドもしくは修飾DNAヌクレオチドの5’末側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチドを含む5’ウイング領域、ならびに／または（c）前記RNase Hにより認識される少なくとも4つの連続したDNAヌクレオチドもしくは修飾DNAヌクレオチドの3’末側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチドを含む3’ウイング領域を含む核酸鎖である、［１］～［７］のいずれかに記載の組成物。

［９］第2核酸鎖が、（a）少なくとも4つの連続したRNAヌクレオシドと、さらに、（b）前記少なくとも4つの連続したRNAヌクレオシドの5’末側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチド、ならびに／または、（c）前記少なくとも4つの連続したRNAヌクレオシドの3’側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチドを含む核酸鎖である、［１］～［８］のいずれかに記載の組成物。

［１０］第2核酸鎖が、前記相補的領域の5’末端側および3’末端側の一方また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さらに含む、［７］～［９］のいずれかに記載の組成物。

[0011] ［１１］第2核酸鎖中のオーバーハング領域が、少なくとも5塩基長である、［１０］に記載の組成物。

［１２］第1核酸鎖が相補的RNA領域をさらに含み、該相補的RNA領域は、第1核酸鎖が第2核酸鎖にハイブリダイズしている場合にRNase Hにより認識され得る少なくとも2個の連続RNAヌクレオチドを有し、

第2核酸鎖中の前記相補的領域が相補的DNA領域であり、該相補的DNA領域は、第1核酸鎖の相補的RNA領域にハイブリダイズして、RNase Hによる第1核酸

鎖中の少なくとも2個の連続RNAヌクレオチドの認識を促進することができ、さらに

第1核酸鎖中の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、第2核酸鎖とハイブリダイズすることができない、[１]～[６]のいずれかに記載の組成物。

[１３]中枢神経系投与が、髄腔内投与または脳室内投与である、[１]～[１２]のいずれかに記載の組成物。

[１４]標的転写産物の発現調節が、標的転写産物量の低下である、[１]～[１３]のいずれかに記載の組成物。

[１５]中枢神経系疾患を治療するための、[１]～[１４]のいずれかに記載の組成物。

[0012] [１６]アンチセンスオリゴヌクレオチド領域が、ギャップマー型アンチセンスオリゴヌクレオチド領域またはミックスマー型アンチセンスオリゴヌクレオチド領域である、[１]～[１５]のいずれかに記載の組成物。

[１７]アンチセンスオリゴヌクレオチド領域が、LNAヌクレオシドを含む、[１]～[１６]のいずれかに記載の組成物。

[１８]アンチセンスオリゴヌクレオチドの毒性を低下させるための、該アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む核酸鎖の使用。

[１９][１]～[１７]のいずれかに記載の組成物を被験体の中枢神経系へ投与する工程を含む、被験体の中枢神経系へ低毒性アンチセンス核酸医薬を投与する方法。

[２０]被験体の中枢神経系疾患を治療する方法である、[１９]に記載の方法。

[0013] [２１]低毒性アンチセンス核酸医薬を製造する方法であって、(i)標的転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド領域を含む第1核酸鎖を用意する工程、(ii)第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む第2核酸鎖を用意する工程、(iii)第1核酸鎖と第2核酸鎖をアニールさせて、核酸複

合体を形成させる工程、および(iv)核酸複合体を含むアンチセンス核酸医薬を調製する工程を含む、方法。

[２２]標的転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド領域を含む第1核酸鎖と、第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む第2核酸鎖とが互いにアニールしてなる核酸複合体を含む、被験体において標的転写産物の発現を調節するための低毒性組成物。

[２３]毒性が、神経毒性または腎毒性である、[２２]に記載の組成物。

[２４]静脈内投与用または皮下投与用である、[２２]または[２３]に記載の組成物。

[0014] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2018-051338号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0015] 本発明により、被験体において標的転写産物の発現を調節することができる、低毒性のアンチセンス核酸医薬が提供される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1(a)、(b)は、いずれも本発明に係る核酸複合体の特定の実施形態の基本構成となる例を示す模式図である。

[図2]図2(a)～(c)は、いずれも本発明に係る核酸複合体の特定の実施形態で、第2核酸鎖が相補的領域とオーバーハング領域を含む例を示す模式図である。

[図3]図3(a)、(b)は、いずれも本発明に係る核酸複合体の特定の実施形態で、第1核酸鎖がアンチセンスオリゴヌクレオチド領域と相補的RNA領域を含む例を示す模式図である。

[図4]図4(a)、(b)は、いずれも機能性部分(「X」)を含む核酸複合体の一部の実施形態の例を示す模式図である。

[図5]図5は、アンチセンス法の一般的な機構の一例を示す図である。

[図6]図6は、様々な天然ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドの構造を示す図である。

[図7]図7は、実施例1で用いた核酸の構造の模式図である。

[図8]図8は、実施例2で用いた核酸の構造の模式図である。

[図9]図9は、核酸複合体が二本鎖を形成していることを確認した、実施例3に記載される実験の結果を示す写真である。

[図10]図10は、実施例4で用いた核酸の構造の模式図である。

[図11]図11は、核酸複合体による標的遺伝子(BACE1)発現抑制効果を比較した、実施例4に記載される実験の結果を示すグラフである。「**」は、$p<0.01$を示す。「*」は、$p<0.05$を示す。

[図12]図12は、実施例5で用いた核酸の構造の模式図である。

[図13]図13は、実施例6で用いた核酸の構造の模式図である。「†」は、アンチセンスオリゴヌクレオチド領域を示す。

[図14]図14は、実施例7および8で用いた核酸の構造の模式図である。「Toc」はトコフェロールを示す。

[図15]図15は、実施例9で用いた核酸の構造の模式図である。「Toc」はトコフェロールを示す。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を詳細に説明する。

＜核酸複合体＞

本発明は、第1核酸鎖と、第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む(またはそれからなる)第2核酸鎖が、相補的塩基対の水素結合を介してアニールしている核酸複合体を用いる。核酸複合体は、第1核酸鎖と第2核酸鎖のアニーリングにより生じた二本鎖構造を有する。第1核酸鎖の全部と第2核酸鎖の全部とがアニールしていることは必要ではなく、第1核酸鎖の一部と第2核酸鎖の全部がアニールしていてもよいし、第1核酸鎖の全部と第2核酸鎖の一部がアニールしていてもよい。または第1核酸鎖の一部と第2核酸鎖の一部がアニールしていてもよい。

[0018] 第1核酸鎖は、標的転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド領域を含むまたはそれからなる、ヌクレオチド鎖である。「アンチセンスオリゴ

ヌクレオチド」または「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。本発明では、第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域により、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。

[0019] 「アンチセンス効果」とは、標的転写産物(RNAセンス鎖)と、転写産物等の部分配列に相補的で、かつアンチセンス効果を引き起こすように設計された鎖(例えばDNA鎖)との、ハイブリダイゼーションの結果として生じる、標的転写産物の発現調節を意味する。標的転写産物の発現調節は、標的遺伝子の発現または標的転写産物のレベル(発現量)を抑制するまたは低下させること、または、特定の例においては、翻訳の阻害または核酸ー蛋白結合阻害効果、例えばスプライシング機能改変効果、例えばエクソンスキッピング、あるいは、転写産物の分解を含む(図5参照)。例えば、翻訳の阻害では、RNAを含むオリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)として細胞に導入されると、ASOは、標的遺伝子の転写産物(mRNA)に結合し、部分的二本鎖が形成される。この部分的二本鎖は、リボソームによる翻訳を妨げるためのカバーとしての役割を果たし、このため標的遺伝子によりコードされるタンパク質の発現が翻訳レベルで阻害される(図5破線外×印)。一方、DNAを含むオリゴヌクレオチドがASOとして細胞に導入されると、部分的DNA-RNAヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖構造がRNase Hによって認識され、その結果、標的遺伝子のmRNAが分解されるため、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現が発現レベルで阻害される(図5破線内)。これは、「RNase H依存性経路」と称される。さらに、特定の例において、アンチセンス効果は、mRNA前駆体のイントロンを標的化することによってもたらされ得る。アンチセンス効果はまた、miRNAを標的化することによってもたらされてもよく、この場合、当該miRNAの機能は阻害され、当該miRNAが通常発現を制御している遺伝子の発現は増加し得る。一実施形態では、標的転写産物の発現調節

は、標的転写産物量の低下であり得る。

[0020] アンチセンス効果によってその発現が調節(例えば、抑制、変更、または改変)される「標的遺伝子」は特に限定されないが、例えば、本発明に係る核酸複合体を導入する生物由来の遺伝子、例えば、様々な疾患においてその発現が増加する遺伝子が挙げられる。また、「標的遺伝子の転写産物」とは、標的遺伝子をコードするゲノムDNAから転写されるmRNAであり、さらにまた、塩基修飾を受けていないmRNA、プロセシングされていないmRNA前駆体などを含む。「標的転写産物」とは、mRNAだけでなく、miRNAなどのノンコーディングRNA(non-coding RNA、ncRNA)も含み得る。さらに一般的には、転写産物は、DNA依存性RNAポリメラーゼによって合成される任意のRNAであってよい。

[0021] 一実施形態では、「標的転写産物」は、例えば、β-セクレターゼ1(beta-secretase 1、BACE1) mRNA、微小管関連タンパク質タウ(microtubule-associated protein tau、Tau) mRNA、転移関連肺腺癌転写産物1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1、MALAT1)ノンコーディングRNAまたはジストロフィン(dystrophin) mRNAであってもよい。マウスおよびヒトBACE1 mRNAの塩基配列を、それぞれ配列番号1および2に示す(但し、mRNAの塩基配列をDNAの塩基配列として示す)。また、マウスおよびヒトTau mRNAの塩基配列を、それぞれ配列番号3および4に示す(但し、mRNAの塩基配列をDNAの塩基配列として示す)。さらに、マウスおよびヒトMALAT1ノンコーディングRNAの塩基配列を、それぞれ配列番号5および6に示す(但し、RNAの塩基配列をDNAの塩基配列として示す)。遺伝子および転写産物の塩基配列は、例えばNCBI(米国国立生物工学情報センター)データベースなどの公のデータベースから入手できる。

[0022] 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、標的転写産物の少なくとも一部(例えば、任意の標的領域)にハイブリダイズし得る塩基配列を含む。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、翻訳終結領域または他の核酸領域を含んでよい。標的転写産物の標的領域は、例えばマウスBACE1 mRNAの場合は配列番号1の1569～1581位、

マウスTau mRNAの場合は配列番号3の3339～3354位、マウスMALAT1ノンコーディングRNAの場合は配列番号5の1316～1331位の塩基配列を含んでもよい。

[0023] 本明細書中で使用される用語「核酸」または「核酸分子」は、モノマーのヌクレオチドまた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い。用語「核酸鎖」または「鎖」もまた、本明細書中ではオリゴヌクレオチドを指すために使用される。核酸鎖は、化学的合成法により(例えば自動合成装置を使用して)、または酵素的工程(例えば、限定するものではないが、ポリメラーゼ、リガーゼ、または制限反応)により、全長鎖または部分鎖を作製することができる。

[0024] 本明細書中で使用される用語「核酸塩基」または「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、およびウラシルが知られる。

[0025] 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)または非ワトソン-クリック塩基対(フーグスティーン型塩基対など)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%、または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%、または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プログラムなど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本の鎖がアニールまた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。

[0026] 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および高ストリンジェントな条件などの様々なストリンジェントな条件であってもよい。低ストリンジェントな条件は、比較的低温で、かつ高塩濃度の条件、例えば、30℃、2×SSC、0.1%SDSであってよい。高ストリンジェントな条件は、比較的高温で、かつ低塩濃度の条件、例えば、65℃、0.1×SSC、0.1%SDSであってよい。温度および塩濃度などの条件を変えることによって、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを調整できる。ここで、1×SSCは、150mM塩化ナトリウムおよび15mMクエン酸ナトリウムを含む。

[0027] 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、通常、少なくとも7塩基長、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、または少なくとも13塩基長であってよいが、特に限定されない。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、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塩基長以下または16塩基長以下であってよい。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、例えば、7～35塩基長、7～30塩基長、7～25塩基長、7～20塩基長、8～20塩基長、9～20塩基長、10～20塩基長、11～18塩基長もしくは12～16塩基長であってもよい。

[0028] 第1核酸鎖は、特に限定されないが、少なくとも7塩基長、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塩基長または少なくとも13塩基長であってよい。第1核酸鎖は、50塩基長以下、45塩基長以下、40塩基長以下、35塩基長以下、30塩基長以下、28塩

基長以下、26塩基長以下、24塩基長以下、22塩基長以下、20塩基長以下、18塩基長以下、または16塩基長以下であってよい。第1核酸鎖は、例えば、9～50塩基長、10～40塩基長、11～35塩基長、または12～30塩基長であってもよい。

[0029] 第2核酸鎖中の相補的領域は、通常、少なくとも7塩基長、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、または少なくとも13塩基長であってよいが、特に限定されない。第2核酸鎖中の相補的領域は、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塩基長以下または16塩基長以下であってよい。第2核酸鎖中の相補的領域は、例えば、9～35塩基長、9～30塩基長、10～25塩基長、10～20塩基長、11～18塩基長もしくは12～16塩基長であってもよい。

[0030] 第2核酸鎖は、特に限定されないが、少なくとも7塩基長、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塩基長または少なくとも13塩基長であってよい。第2核酸鎖は、50塩基長以下、45塩基長以下、40塩基長以下、35塩基長以下、30塩基長以下、28塩基長以下、26塩基長以下、24塩基長以下、22塩基長以下、20塩基長以下、18塩基長以下、または16塩基長以下であってよい。第2核酸鎖は、例えば、9～50塩基長、10～40塩基長、11～35塩基長、または12～30塩基長であってもよい。長さの選択は、一般的に、例えば費用、合成収率などの他の因子の中でも特に、アンチセンス効果の強度と標的に対する核酸鎖の特異性とのバランスによって決まる。

第2核酸鎖は、第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む、またはそれからなる。

[0031] 一実施形態では、第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域の少なくとも一部に相補的であり得る。第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域全部

に相補的であってもよい。第2核酸鎖中の相補的領域は、第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域に加えて、それ以外の部分に相補的であってもよい。本実施形態の一例としては、国際公開第2013/089283号に開示されるヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド(heteroduplex oligonucleotide、HDO)がある。

[0032] 一実施形態では、相補的領域からなる第2核酸鎖は、アンチセンスオリゴヌクレオチド領域からなる第1核酸鎖と同じ長さでもよく(図1(a))、または第1核酸鎖より短く(例えば、3塩基長、2塩基長または1塩基長短く)てもよい(図1(b))。

[0033] さらなる実施形態では、第2核酸鎖は、相補的領域の5'末端側および3'末端側の一方また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さらに含み得る。本実施形態の一例は、PCT/JP2017/035553に記載される。「オーバーハング領域」とは、相補的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'末端を超えて伸長する、および/または第2核酸鎖の3'末端が第1核酸鎖の5'末端を超えて伸長する、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(図2(a))、3'末端側に位置してもよい(図2(b))。第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、相補的領域の5'末端側および3'末端側に位置してもよい(図2(c))。

[0034] 一実施形態では、第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、第1核酸鎖に相補的な塩基配列を含まない。オーバーハング領域は、第1核酸鎖の塩基配列と50%以下、40%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下または0%の相補性を有する塩基配列を含んでよい。

[0035] 一実施形態では、第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、細胞内の転写産物に実質的にハイブリダイズする能力を持たず、遺伝子発現には影響を及ぼさないことが好ましい。例えば、オーバーハング領域は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA阻害薬(antimiR)、スプライススイッチングオリ

ゴヌクレオチド、一本鎖siRNA、マイクロRNA、プレ-マイクロRNAなどの治療用オリゴヌクレオチドを含まないことが好ましい。

[0036] オーバーハング領域の塩基配列は、例えば、配列番号7～11のいずれかに示される塩基配列またはそれらの塩基配列において少なくとも一部のTがUに置換された塩基配列、に少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも98%、または100%の同一性を有する塩基配列を含んでもよい。オーバーハング領域は、上記の塩基配列を含む、天然ヌクレオチドおよび/または非天然ヌクレオチドを含んでよい。

本発明に係る核酸複合体におけるオーバーハング領域は、好ましくは一本鎖領域である。

[0037] 第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、少なくとも5塩基長、少なくとも6塩基長、少なくとも7塩基長、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、または少なくとも13塩基長であってよいが、特に限定されない。オーバーハング領域は、30塩基長以下、29塩基長以下、28塩基長以下、27塩基長以下、26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、16塩基長以下、15塩基長以下または14塩基長以下であってもよい。オーバーハング領域は、例えば、5～20塩基長、6～18塩基長、7～17塩基長、8～12塩基長、または9～15塩基長であってよい。相補的領域の5'末端側と3'末端側の双方にオーバーハング領域がある場合、それぞれのオーバーハング領域の長さは同じでも、異なってもよい。

[0038] 一般に、「ヌクレオシド」は、塩基および糖の組み合わせである。ヌクレオシドの核酸塩基(塩基としても知られる)部分は、通常は、複素環式塩基部分である。「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基をさらに含む。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドでは、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシル部分に連結可能である。オリゴヌク

レオチドは、互いに隣接するヌクレオシドの共有結合によって形成され、直鎖ポリマーオリゴヌクレオチドを形成する。オリゴヌクレオチド構造の内部で、リン酸基は、一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合を形成するとみなされている。

[0039] 核酸鎖は、天然ヌクレオチドおよび/または非天然ヌクレオチドを含み得る。「天然ヌクレオチド」は、DNA中に見られるデオキシリボヌクレオチドおよびRNA中に見られるリボヌクレオチドを含む。「デオキシリボヌクレオチド」および「リボヌクレオチド」は、それぞれ、「DNAヌクレオチド」および「RNAヌクレオチド」と称することもある。

[0040] 同様に、「天然ヌクレオシド」は、DNA中に見られるデオキシリボヌクレオシドおよびRNA中に見られるリボヌクレオシドを含む。「デオキシリボヌクレオシド」および「リボヌクレオシド」は、それぞれ、「DNAヌクレオシド」および「RNAヌクレオシド」と称することもある。

[0041] 「非天然ヌクレオチド」は、天然ヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドを指し、修飾ヌクレオチドおよびヌクレオチド模倣体を含む。同様に、「非天然ヌクレオシド」は、天然ヌクレオシド以外の任意のヌクレオシドを指し、修飾ヌクレオシドおよびヌクレオシド模倣体を含む。「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、およ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。「修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分および/または修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。非天然オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的への親和性の強化、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増加、または阻害活性の増加等の望ましい特性により、天然型よりも好ましい。

[0042] 「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)からの置換また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、およ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、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、およ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。リン含有および非リン含有結合の調製方法は周知である。修飾ヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性が天然に存在するヌクレオシド間結合よりも高い結合であることが好ましい。

[0043] 「修飾核酸塩基」または「修飾塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、また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」または「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)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)、およびウラシル(U)を意味する。修飾核酸塩基の例としては、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシンまたはN4-メチルシトシン； N6-メチルアデニンまたは8-ブロモアデニン；ならびにN2-メチルグアニンまたは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。

[0044] 「修飾糖」とは、天然糖部分(すなわち、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)中に認められる糖部分)からの置換および/または任意の変化を有する糖を指す。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。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、また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'および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)、またはC(R1)(R2)(R、R1およびR2は、それぞれ独立して、H、C_1-C_{12}アルキル、また

は保護基を表す)での置換、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

[0045] 修飾糖部分を有するヌクレオシドの例としては、限定するものではないが、5'-ビニル、5'-メチル(RまたはS)、4'-S、2'-F(2'-フルオロ基)、2'-OCH_3(2'-OMe基もしくは2'-O-メチル基)、および2'-$O(CH_2)_2OCH_3$置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、-O-アリル、-O-C_1-C_{10}アルキル、-OCF_3、-$O(CH_2)_2SCH_3$、-$O(CH_2)_2$-O-N(Rm)(Rn)、および-O-CH_2-C(=O)-N(Rm)(Rn)から選択することができ、各RmおよびRnは、独立して、Hまたは置換もしくは非置換C_1-C_{10}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。

[0046] 「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」と称することもある。

[0047] 二環式糖は、2'位の炭素原子および4'位の炭素原子が2つ以上の原子によって架橋されている糖であってよい。二環式糖の例は当業者に公知である。二環式糖を含む核酸(BNA)の1つのサブグループは、4'-$(CH_2)_p$-O-2'、4'-$(CH_2)_p$-CH_2-2'、4'-$(CH_2)_p$-S-2'、4'-$(CH_2)_p$-OCO-2'、4'-$(CH_2)_n$-N(R_3)-O-$(CH_2)_m$-2'[式中、p、mおよびnは、それぞれ1～4の整数、0～2の整数、および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、およびユニット置換基(蛍光も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、細胞内または核内局在化シグナルペプチド等)を表す]により架橋された2'位の炭素原子と4'位の炭素原子を有すると説明することができる。さらに、特定の実施形態によるBNAに関し、3'位の炭素原子上のOR_2置換基および5'位の炭素原子上のOR_1置換基において、R_1およびR_2は、典型的には水素原子であるが、互いに同一であっても異なっていてもよく、さらにまた、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合

成のための保護基によって保護されているリン酸基、または-P(R_4)R_5[ここで、R_4およびR_5は、互いに同一であっても異なっていてもよく、それぞれヒドロキシル基、核酸合成のための保護基によって保護されているヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基によって保護されているメルカプト基、アミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基、1～5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、1～6個の炭素原子を有するシアノアルコキシ基、または1～5個の炭素原子を有するアルキル基で置換されているアミノ基を表す]であってもよい。このようなBNAの非限定的な例としては、メチレンオキシ(4'-CH_2-O-2')BNA(LNA(Locked Nucleic Acid(登録商標)、2',4'-BNAとしても知られている)、例えば、α-L-メチレンオキシ(4'-CH_2-O-2')BNAもしくはβ-D-メチレンオキシ(4'-CH_2-O-2')BNA、エチレンオキシ(4'-$(CH_2)_2$-O-2')BNA(ENAとしても知られている)、β-D-チオ(4'-CH_2-S-2')BNA、アミノオキシ(4'-CH_2-O-N(R_3)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH_2-N(R_3)-O-2')BNA(2',4'-BNA^{NC}としても知られている)、2',4'-BNA^{coc}、3'-アミノ-2',4'-BNA、5'-メチルBNA、(4'-CH(CH_3)-O-2')BNA(cEt BNAとしても知られている)、(4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2')BNA(cMOE BNAとしても知られている)、アミドBNA(4'-C(O)-N(R)-2')BNA(R=H、Me)(AmNAとしても知られている)、2'-O,4'-C-スピロシクロプロピレン架橋型核酸(scpBNAとしても知られている)および当業者に公知の他のBNAが挙げられる。

メチレンオキシ(4'-CH_2-O-2')架橋を有する二環式ヌクレオシドを、LNAヌクレオシドと称することもある。

[0048] 修飾糖の調製方法は、当業者に周知である。修飾糖部分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分(天然、修飾、またはそれらの組み合わせ)は、適切な核酸標的とのハイブリダイゼーションのために維持されてよい。

[0049] 「ヌクレオシド模倣体」は、オリゴマー化合物の1つ以上の位置において糖または糖および塩基、ならびに必ずではないが結合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、核酸分子の少なくともある領域に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、二環式または三環式糖模倣体、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。「ヌクレオチド模倣体」は、オリゴマー化合物の1つ以上の位置において、ヌクレオシドおよ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、ペプチド核酸またはモルホリノ核酸(-N(H)-C(=O)-O-または他の非ホスホジエステル結合によって結合されるモルホリノ)が挙げられる。ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid、PNA)は、糖の代わりにN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合した主鎖を有するヌクレオチド模倣体である。モルホリノ核酸の構造の一例は、図6に示される。「模倣体」とは、糖、核酸塩基、およびヌクレオシド間結合の1つ以上を置換する基を指す。一般に、模倣体は、糖、または糖および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。

[0050] 一般的には、修飾は、同一鎖中のヌクレオチドが独立して異なる修飾を受けることができるように実施することができる。また、酵素的切断に対する抵抗性を与えるため、同一のヌクレオチドが、修飾ヌクレオシド間結合(例えば、ホスホロチオエート結合)を有し、さらに、修飾糖(例えば、2'-O-メチル修飾糖または二環式糖)を有することができる。同一のヌクレオチドはまた、修飾核酸塩基(例えば、5-メチルシトシン)を有し、さらに、修飾糖(例えば、2'-O-メチル修飾糖または二環式糖)を有することができる。

[0051] 核酸鎖における非天然ヌクレオチドの数、種類および位置は、核酸複合体によって提供されるアンチセンス効果などに影響を及ぼし得る。修飾の選択は、標的遺伝子など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、および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%以上または90%以上である場合)、関連修飾を評価することができる。

[0052] アンチセンス効果の測定は、例えば、被験核酸化合物を被験体(例えばマウス)に投与し、例えば数日後～数ヶ月後(例えば2～7日後または1ヶ月後)に、被験核酸化合物によって提供されるアンチセンス効果により発現が調節される標的遺伝子の発現量または標的転写産物のレベル(量)(例えば、mRNA量もしくはマイクロRNAなどのRNA量、cDNA量、タンパク質量など)を測定することによって、実施することができる。

[0053] 例えば、測定された標的遺伝子の発現量また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%、または少なくとも40%減少している場合に、被験核酸化合物がアンチセンス効果(標的転写産物量の低下)をもたらし得ることが示される。

第1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および/または修飾ヌクレオシド間結合であってよい。

[0054] 第1核酸鎖の5'末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ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1核酸鎖の3'末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ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。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、これに隣接し、かつ核酸鎖の末端とは反対方向に位置するヌクレオシド間結合とを指す。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または阻害できるために、好ましい。

[0055] 修飾ヌクレオシド間結合は、第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域のヌクレオシド間結合の少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも98

%、または100%であってよい。修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であってよい。

[0056] 第1核酸鎖におけるヌクレオシドは、天然ヌクレオシド(デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはその両者を含む)および/または非天然ヌクレオシドであってよい。

[0057] 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、ギャップマー型のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域(ギャップマー型アンチセンスオリゴヌクレオチド領域)であり得る。「ギャップマー(gapmer)型」とは、少なくとも4個の連続デオキシリボヌクレオシドを含む中央領域(DNAギャップ領域)と、その5'末端側および3'末端側に配置された非天然ヌクレオシドを含む領域(5'ウイング領域および3'ウイング領域)からなる、ヌクレオシド組成を指す。非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドで構成されるギャップマーを、特に「BNA/DNAギャップマー」と称する。DNAギャップ領域の長さは、4～20塩基長、5～18塩基長、6～16塩基長、7～14塩基長または8～12塩基長であってもよい。5'ウイング領域および3'ウイング領域の長さは、独立して、通常、1～10塩基長、1～7塩基長、2～5塩基長または2～3塩基長であってよい。5'ウイング領域および3'ウイング領域は、非天然ヌクレオシドを少なくとも1種含んでいればよく、天然ヌクレオシドをさらに含んでいてもよい。ギャップマー型アンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、2もしくは3個の架橋ヌクレオシドを含む5'ウイング領域、2もしくは3個の架橋ヌクレオシドを含む3'ウイング領域、およびそれらの間のDNAギャップ領域を含むBNA/DNAギャップマー型のヌクレオシド組成を有してもよい。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)を含んでもよい。また、ギャップマーは、架橋ヌクレオシドがLNAヌクレオシドで構成される「LNA/DNAギャップマー」であってもよい。

[0058] 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、ミックスマー型のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域(ミックスマー型アンチセンスオリゴヌクレオチド領域)であり得る。本明細書において「ミックスマー(mixmer)」と

は、周期的または無作為セグメント長の交互型の天然ヌクレオシドおよ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およびリボヌクレオシドを含まない核酸鎖をいう。ミックスマーにおいて、前記非天然ヌクレオシドが架橋ヌクレオシドであり、かつ天然ヌクレオシドがデオキシリボヌクレオシドであるミックスマーを特に「BNA／DNAミックスマー」と称する。ミックスマーは、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、天然もしくは修飾のヌクレオシドまたはヌクレオシド模倣体であるか否かに関わらず、任意の数の種類のヌクレオシドを含むことができる。例えば、架橋ヌクレオシド(例えば、LNAヌクレオシド)により分離された1または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。

[0059] 第1核酸鎖は、全部又は一部にヌクレオシド模倣体また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、ペプチド核酸および/またはモルホリノ核酸であってもよい。第1核酸鎖は、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含んでもよい。修飾ヌクレオシドは、2'-修飾糖を含んでよい。2'-修飾糖は、2'-O-メチル基を含む糖であってもよい。

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および/または修飾ヌクレオシド間結合であってよい。

[0060] 第2核酸鎖の全てのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であってもよい。あるいは、第2核酸鎖の全てのヌクレオシド間結合は、天然ヌクレオシド間結合であってもよい。

[0061] 第2核酸鎖の5'末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ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つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ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。

[0062] 第2核酸鎖がオーバーハング領域を含む実施形態において、第2核酸鎖中のオーバーハング領域の遊離末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または

少なくとも3つ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。本明細書において、「オーバーハング領域の遊離末端」とは、オーバーハング領域において相補的領域に結合していない側の末端を指す。例えば、図2(a)に示されるように相補的領域の5'末端側にオーバーハング領域が位置する実施形態では、オーバーハング領域の3'末端が相補的領域に結合しているので、オーバーハング領域の遊離末端は、第2核酸鎖の5'末端を指す。逆に、図2(b)に示されるように相補的領域の3'末端側にオーバーハング領域が位置する実施形態では、オーバーハング領域の遊離末端は、第2核酸鎖の3'末端を指す。また、図2(c)に示されるように相補的領域の5'末端側および3'末端側の両方にオーバーハング領域が位置する実施形態では、オーバーハング領域の遊離末端は、第2核酸鎖の両端(5'末端および3'末端)を指す。例えば、第2核酸鎖中のオーバーハング領域の遊離末端から2つのヌクレオシド間結合という場合は、第2核酸鎖中のオーバーハング領域の遊離末端に最も近接するヌクレオシド間結合と、これに隣接する、遊離末端とは反対方向に位置するヌクレオシド間結合とを指す。このような末端における修飾ヌクレオシド間結合は、オーバーハング領域の望ましくない分解を抑制又は阻害することができるために好ましい。修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であってよい。

[0063] 修飾ヌクレオシド間結合は、第2核酸鎖中のオーバーハング領域におけるヌクレオシド間結合の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%(例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%)、または好ましくは100%であってもよい。第2核酸鎖中のオーバーハング領域におけるヌクレオシド間結合は、オーバーハング領域を構成するヌクレオシド間の結合を指し、第2核酸鎖中のオーバーハング領域と相補的領域との間のヌクレオシド間結合を含まない。例えば、オーバーハング領域が10個のヌクレオシドからなる場合、当該領域におけるヌクレオシド間結合の数は9個である。しかしながら、オーバーハング領域と相補的領域との間の

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く、または天然ヌクレオシド間結合であってもよい。修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であってよい。

[0064] 第2核酸鎖がオーバーハング領域を含む実施形態において、第2核酸鎖中の相補的領域の遊離末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ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。「相補的領域の遊離末端」とは、相補的領域において、オーバーハング領域に結合していない側の末端を指す。例えば、図2(a)に示されるように相補的領域の5'末端側にオーバーハング領域が位置する実施形態では、相補的領域の遊離末端は、第2核酸鎖の3'末端を指す。逆に、図2(b)に示されるように相補的領域の3'末端側にオーバーハング領域が位置する実施形態では、相補的領域の遊離末端は、第2核酸鎖の5'末端を指す。一方、図2(c)に示されるように相補的領域の5'末端側および3'末端側の両方にオーバーハング領域が位置する実施形態では、相補的領域の遊離末端は、存在しない。修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であってよい。

[0065] 好ましい実施形態では、第2核酸鎖中のオーバーハング領域における全てのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合であり、かつ、相補的領域の遊離末端から少なくとも2つのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

[0066] 第2核酸鎖におけるヌクレオシドは、天然ヌクレオシド(デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはその両者を含む)および/または非天然ヌクレオシドであってよい。

[0067] 第2核酸鎖中の相補的領域は、天然ヌクレオシド(デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはその両者を含む)および/または非天然ヌクレオシドを含み得る。

[0068] 一実施形態では、第2核酸鎖中の相補的領域は、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個または少なくとも5個の連続したリボヌクレオシドを含み得る。このような連続したリボヌクレオシドは、第1核酸鎖中のギャップマ

一型オリゴヌクレオチド領域のDNAギャップ領域と二本鎖を形成し得る。該二本鎖は、RNase Hによって認識され、RNase Hによる第2核酸鎖の切断を促進し得る。連続したリボヌクレオシドは、ホスホジエステル結合で連結されてもよい。第2核酸鎖中の相補的領域のヌクレオシドは、リボヌクレオシドからなってもよい。

[0069] 別の実施形態では、第2核酸鎖中の相補的領域は、少なくとも2個の連続したリボヌクレオシドを含まないものであってよい。第2核酸鎖中の相補的領域のヌクレオシドは、デオキシリボヌクレオシドからなってもよい。

[0070] 第2核酸鎖中の相補的領域は、5'末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つの修飾ヌクレオシドを含んでもよい。第2核酸鎖中の相補的領域は、3'末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つの修飾ヌクレオシドを含んでもよい。第2核酸鎖中の相補的領域は、5'末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つの修飾ヌクレオシドを含み、かつ、3'末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つの修飾ヌクレオシドを含んでもよい。修飾ヌクレオシドは、修飾糖および/または修飾核酸塩基を含んでよい。修飾糖は、二環式糖または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-メチルシトシンであってよい。

[0071] 第2核酸鎖がオーバーハング領域を含む実施形態において、相補的領域の遊離末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つのヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドであってもよい。具体的には、相補的領域の遊離末端から1～3個のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシド(例えば、2'-O-メチル基を含む糖のような2'-修飾糖を含むヌクレオシド)であり、かつ、相補的領域の他のヌクレオシドは、天然ヌクレオシド(デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはその両者を含む)であってよい。

[0072] 一実施形態では、第2核酸鎖中の相補的領域の遊離末端から1～3個のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシド(例えば、2'-O-メチル基を含む糖のような2'-修飾糖を含むヌクレオシド)であり、かつ、相補的領域の他のヌクレオシドは、

デオキシリボヌクレオシドであってよい。別の実施形態では、第2核酸鎖中の相補的領域のヌクレオシドの少なくとも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%、または少なくとも95%が、天然ヌクレオシドであってもよい。

[0073] 第2核酸鎖がオーバーハング領域を含む実施形態において、第2核酸鎖中のオーバーハング領域は、天然ヌクレオシド(デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはその両者を含む)および/または非天然ヌクレオシドを含み得る。

[0074] 一実施形態では、オーバーハング領域のヌクレオシドは、デオキシリボヌクレオシドを含んでよく、またはデオキシリボヌクレオシドからなってよい。別の実施形態では、オーバーハング領域の遊離末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ、より具体的には1～3個のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドであってもよい。さらに、オーバーハング領域の結合末端から少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つ、より具体的には1～3個)のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドであってもよい。本明細書において、「オーバーハング領域の結合末端」とは、相補的領域に結合している、オーバーハング領域の末端を指す。修飾ヌクレオシドは、修飾糖および/または修飾核酸塩基を含んでよい。修飾糖は、二環式糖(例えば、4'-CH_2-O-2'基を含む糖)であってよい。修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンであってよい。

[0075] 一実施形態では、オーバーハング領域の遊離末端から少なくとも2つのヌクレオシドは、修飾ヌクレオシド(例えば、4'-CH_2-O-2'基を含む糖のような二環式糖を含むヌクレオシド)であり得る。オーバーハング領域に二環式糖が含まれる場合は、オーバーハング領域の鎖長は、例えば、9～12塩基であり得る。

また、一実施形態では、オーバーハング領域のヌクレオシドは、二環式糖を含まないものとされ得る。

[0076] さらに、他の一実施形態では、オーバーハング領域のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシドを含まず、天然のデオキシリボヌクレオシドおよび/またはリ

ボヌクレオシドからなり得る。天然のデオキシリボヌクレオシドおよび/またはリボヌクレオシドの使用は、合成コストの面で有利となり得る。また、天然のデオキシリボヌクレオシドおよび/またはリボヌクレオシドの使用は、望ましくない転写産物とのハイブリダイゼーションを避ける上でも有利となり得る。オーバーハング領域に二環式糖が含まれない場合は、オーバーハング領域の鎖長は、例えば、9～17塩基であり得る。

第1核酸鎖および第2核酸鎖は、上記の修飾ヌクレオシド間結合および修飾ヌクレオシドの任意の組み合わせを含んでよい。

[0077] 別の特定の実施形態では、第1核酸鎖が相補的RNA領域をさらに含み、該相補的RNA領域は、第1核酸鎖が第2核酸鎖にハイブリダイズしている場合にRNase Hにより認識され得る少なくとも2個の連続RNAヌクレオチドを有し、第2核酸鎖中の相補的領域が相補的DNA領域であり、該相補的DNA領域は、第1核酸鎖の相補的RNA領域にハイブリダイズして、RNase Hによる第1核酸鎖中の少なくとも2個の連続RNAヌクレオチドの認識を促進することができ、さらに第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、第2核酸鎖とハイブリダイズすることができない。本実施形態の一例としては、国際公開第2014/192310号に開示されるヘテロキメラ二本鎖オリゴヌクレオチド(hetero-chimera-duplex oligonucleotide、HCDO)がある。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、相補的RNA領域の5'末端側に位置していてもよいし(図3(a))、相補的RNA領域の3'末端側に位置していてもよい(図3(b))。本実施形態の核酸複合体は、細胞内に導入されると、相補的RNA領域がRNase Hによって切断され、アンチセンスオリゴヌクレオチドを放出し、その後、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、転写産物の活性または機能を改変するように作用することができる(国際公開第2014/192310号を参照のこと)。

[0078] 相補的DNA領域は、相補的RNA領域の一部または全部に対して相補的であり、さらに場合によりアンチセンスオリゴヌクレオチド領域の一部に対して相補的であってもよい。しかし、相補的RNA領域が、相補的DNA領域に対して完全に相補的であるか、または相補的DNA領域と同数の塩基を有することは必要

とされない。

[0079] 相補的RNA領域は、場合により片側または両側が修飾RNAヌクレオチドにより隣接されていてよい2、3、4もしくは5個またはそれ以上、例えば、5～20個、5～16個、または5～12個の連続したRNAヌクレオチド(天然RNA)を含んでもよい。

相補的DNA領域は、本明細書中他の箇所に記載したような、ギャップマー型のヌクレオシド組成を有してもよい。

[0080] 相補的RNA領域または相補的DNA領域の長さは特に限定されないが、通常、少なくとも8塩基、少なくとも10塩基、少なくとも12塩基、または少なくとも13塩基である。相補的RNA領域または相補的DNA領域の長さは、20塩基以下、25塩基以下もしくは35塩基以下であってよい。

[0081] 一実施形態では、第2核酸鎖は、ポリヌクレオチドに結合された少なくとも1つの機能性部分を含み得る。機能性部分は、図4中で「X」で示すように、第2核酸鎖の5'末端に連結されていてよく(図4(a))、または3'末端に連結されていてもよい(図4(b))。あるいは、機能性部分は、ポリヌクレオチドの内部のヌクレオチドに連結されていてもよい。他の実施形態において、第2核酸鎖は、2つ以上の機能性部分を含み、これらはポリヌクレオチドの複数の位置に連結されていてもよく、および/またはポリヌクレオチドの1つの位置に一群として連結されていてもよい。

[0082] 第2核酸鎖と機能性部分との間の結合は、直接結合であってもよいし、別の物質によって介在される間接結合であってもよい。しかし、特定の実施形態においては、機能性部分が、共有結合、イオン性結合、水素結合などを介して第2核酸鎖に直接結合されていることが好ましく、またより安定した結合を得ることができるという点から考えると、共有結合がより好ましい。機能性部分はまた、切断可能な連結基を介して第2核酸鎖に結合されていてもよい。例えば、機能性部分は、ジスルフィド結合を介して連結されていてもよい。

[0083] 機能性部分が、核酸複合体および/または機能性部分が結合している鎖に所望の機能を与える限り、特定の実施形態による「機能性部分」の構造につい

て特定の限定はない。所望の機能としては、標識機能、精製機能、および送達機能が挙げられる。標識機能を与える部分の例としては、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどの化合物が挙げられる。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タグペプチドなどの化合物が挙げられる。

[0084] 一部の実施形態において、機能性部分は、細胞または細胞核への輸送を増強する役割を果たす。例えば、特定のペプチドタグは、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされると、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増強することが示されている。例としては、HaiFang Yinら、Human Molecular Genetics, Vol. 17(24), 3909-3918 (2008年)およびその参考文献中に開示されるアルギニンリッチペプチドP007およびBペプチドが挙げられる。核内輸送は、m3G-CAP(Pedro M. D. Morenoら、Nucleic Acids Res., Vol. 37, 1925-1935 (2009年)を参照)などの部分をオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることによって増強することができる。

[0085] さらに、核酸複合体を体内の標的部位または標的領域に高特異性および高効率で送達し、これにより関連核酸による標的転写産物(例えば、標的遺伝子)の発現を極めて効果的に抑制するという観点から、本発明の一部の実施形態の核酸複合体を体内の「標的部位」に送達する活性を有する分子が、機能性部分として第2核酸鎖に結合していることが好ましい。

[0086] 「標的送達機能」を有する部分は、例えば、脂質であってよい。このような脂質の例としては、コレステロールおよび脂肪酸などの脂質(例えば、ビタミンE(トコフェロール、トコトリエノール)、ビタミンA、およびビタミンD);ビタミンKなどの脂溶性ビタミン(例えば、アシルカルニチン);アシル-CoAなどの中間代謝産物;糖脂質、グリセリド、およびそれらの誘導体もしくは類縁体が挙げられる。しかし、これらの中でも、より高い安全性を有するという点から考えて、特定の実施形態において、コレステロールおよびビタミンE(トコフェロールおよびトコトリエノール)が使用される。しかしながら、本発明の特定の実施形態の核酸複合体は、脂質と結合していないものであっ

てもよい。

[0087] また、様々な臓器の細胞表面上に存在する様々なタンパク質に結合することにより核酸複合体を様々な臓器に高特異性および高効率で送達し得るという観点から、特定の実施形態による「機能性部分」の例として、ペプチドまたはタンパク質(例えば、受容体リガンドならびに抗体および/またはそのフラグメント)が挙げられる。

[0088] 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、核酸複合体を構成する第1核酸鎖および第2核酸鎖を製造することができる。例えば、核酸は、標的転写産物の塩基配列(または、一部の例においては、標的遺伝子の塩基配列)の情報に基づいて核酸のそれぞれの塩基配列を設計し、市販の自動核酸合成装置(アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems, Inc.)の製品、ベックマン・コールター社(Beckman Coulter, Inc.)の製品など)を使用することによって核酸を合成し、その後、結果として得られたオリゴヌクレオチドを逆相カラムなどを使用して精製することにより製造することができる。この方法で製造した核酸を適切な緩衝溶液中で混合し、約90℃～98℃で数分間(例えば5分間)変性させ、その後核酸を約30℃～70℃で約1～8時間アニールし、このようにして核酸複合体を製造することができる。アニールした核酸複合体の作製は、このような時間および温度プロトコルに限定されない。鎖のアニーリングを促進するのに適した条件は、当技術分野において周知である。さらに、機能性部分が結合している核酸複合体は、機能性部分が予め結合された核酸種を使用し、上記の合成、精製およびアニーリングを実施することによって製造することができる。機能性部分を核酸に連結するための多数の方法が、当技術分野において周知である。あるいは、核酸鎖は、塩基配列ならびに修飾部位もしくは種類を指定して、製造業者(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。

[0089] ＜中枢神経系投与用組成物＞

上記の核酸複合体を含む、被験体の中枢神経系において標的転写産物の発現を調節するための中枢神経系投与用組成物が提供される。本組成物は、核

酸の被験体の中枢神経系への投与に伴う毒性(副作用)が低下している(または毒性がない)ことを特徴とする。

[0090] 「毒性」とは、例えば、死、痛み、振戦、けいれん、運動障害、認知機能障害、意識障害、全身倦怠感、疲労感、嘔気もしくは嘔吐、めまい、しびれ、ふらつきなど、被験体に好ましくない他覚的もしくは自覚的症状または機能異常を引き起こす作用をいう。毒性は、いずれかの臓器での毒性であってもよい。毒性は、神経毒性であってもよい。「神経毒性」とは、中枢神経組織(ニューロンを含む)および末梢神経組織を含む神経組織に損傷を引き起こし、神経系の正常な活動を妨げる作用を指す。神経毒性は、死亡、呼吸異常、心血管異常、頭痛、嘔気もしくは嘔吐、無反応もしくは低反応、意識障害、精神障害、性格変化、幻覚、妄想、認知機能障害、姿勢異常、不随意運動、震え、けいれん、活動過剰運動機能障害、麻痺、感覚障害または自律神経機能障害から選択される症状を引き起こし得る。神経毒性は、急性神経毒性であってもよい。急性神経毒性は、投与から1、3、6、9、12、24または48時間以内に生じる神経毒性であり得る。毒性は、例えば、後述の実施例に記載するように、急性期忍容性スコア、副作用イベント率または死亡率などによって評価することができる。

[0091] 本組成物は、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを被験体の中枢神経系へ投与した場合に比べて、低下した毒性を示し得る。ここで言う「一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、本発明の核酸複合体を構成する第1核酸鎖中のアンチセンスオリゴヌクレオチド領域のみからなるヌクレオチド鎖をいう。

[0092] 本組成物は、被験体の中枢神経系投与用である。中枢神経系への投与は、中枢神経系のいずれかの組織または体液中に本組成物を投与できる任意の投与経路による投与であってよい。例えば、髄腔内投与または脳室内投与であってよい。

[0093] 被験体は、ヒトを含む動物であってよい。しかし、ヒトを除く動物には特定の限定はない。哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、および無顎類など

の脊椎動物や、節足動物、軟体動物、および棘皮動物などの無脊椎動物のいずれであってもよい。例えば、様々な家畜、家禽、ペット、実験動物などが被験体となり得る。被験体は、中枢神経系において標的転写産物の発現を調節することが必要な被験体であってもよい。また被験体は、中枢神経系疾患の治療が必要な被験体であってもよい。

本組成物は、公知の製薬法により製剤化することができる。例えば、組成物は、注射剤、経口剤、または外用剤とすることができる。

[0094] 本組成物には、薬学的に許容可能な担体、具体的には界面活性剤、pH調整剤、安定化剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、希釈剤、等張化剤、鎮静剤、緩衝剤、および他の添加剤や、薬学的に許容可能な溶媒、具体的には滅菌水、および生理食塩水、緩衝液(リン酸バッファーなどを含む)、および他の溶媒を適切に組み込むことができる。

[0095] 本組成物の投与量は、被験体の年齢、体重、症状および健康状態、剤形などに従って適切に選択することができる。しかし、本組成物の用量は、例えば、核酸複合体0.0000001mg/kg/日～1000000mg/kg/日、0.00001mg/kg/日～10000mg/kg/日または0.001mg/kg/日～100mg/kg/日であってもよい。

本組成物は医薬組成物であってもよい。本組成物は、中枢神経系疾患を治療するためのものであってよい。

[0096] 本組成物はまた、例えば、遺伝子異常(例えば遺伝子変異、遺伝子欠失、遺伝子挿入、遺伝子変換または反復配列数の異常)、または例えば、標的遺伝子の発現の異常(増加、減少、遺伝子バリアントの異常)に関連する疾患(変性疾患、血管障害、免疫疾患、内分泌代謝疾患、腫瘍および感染症など)を治療または予防するための医薬組成物であってもよい。

一実施形態では、医薬組成物は、中枢神経系疾患および髄腔内の神経根もしくは後根神経節が障害される疾患を治療または予防するためものであってよい。

[0097] 一実施形態において、中枢神経系投与用組成物に含まれる核酸複合体は、ビタミンE(トコフェロール、トコトリエノール)およびコレステロールなどの

脂質を結合していないものであり得る。

[0098] 本組成物の治療対象の疾患は、遺伝子異常に関連する神経系疾患であり得る。神経系は、中枢神経系および末梢神経系に分けられるが、本組成物の治療対象疾患は、主に中枢神経系疾患であり得る。中枢神経系は、脳および脊髄からなる。脳は大脳(大脳皮質、大脳白質、大脳基底核)、間脳(視床、視床下核)、小脳(小脳皮質、小脳核)および脳幹(中脳、黒質、橋、延髄)を含む。脊髄は、頸髄、胸髄、腰髄、仙髄および尾髄を含む。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、大脳皮質(前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉)、小脳、線条体、淡蒼球、前障、海馬、海馬傍回、脳幹、頸髄、胸髄または腰髄であり得る。末梢神経は、脳神経、脊髄神経からなる。よって、治療対象疾患は髄腔内の神経根や馬尾および後根神経節が障害される疾患(例えば、がん性髄膜炎)であり得る。

[0099] 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。例えば、アルツハイマー病の治療においては、海馬および/また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、側頭葉および黒質の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。レビー小体型認知症(DLB)、パーキンソン病認知症の治療においては、後頭葉、黒質および線条体の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。パーキンソン病の治療においては、黒質および/または線条体への薬剤送達が有効となり得る。皮質基底核変性症(CBD)の治療においては、前頭葉、頭頂葉、大脳基底核および黒質の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。進行性核上性麻痺(PSP)の治療においては、前頭葉、大脳基底核および黒質の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症の治療においては、前頭葉、頭頂葉、黒質、大脳基底核および脊髄の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。脊髄小脳変性症(SCD)SCA1型～SCA34型までの治療においては、脳幹および/または小脳への薬剤送達が有効とな

り得る。歯状核赤核淡蒼球ルイ体変性症(DRPLA)の治療においては、脳幹、大脳基底核および小脳の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。球脊髄性萎縮症(SBMA)の治療においては、骨格筋、脳幹および脊髄の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。フリードライヒ失調症(FA)の治療においては、脳幹および/または小脳への薬剤送達が有効となり得る。ハンチントン病の治療においては、線条体、前頭葉、頭頂葉および大脳基底核の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。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、大脳基底核および黒質の1つ以上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。特に進行性多巣性白質脳症の治療に有効となりうる。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が有効となり得る。代謝性脳症、中毒性脳症、栄養障害性脳症の治療においては、脳全体への薬剤送達が有効となり得る。脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、もやもや病、無酸素脳症の治療においては、脳全体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、視神経および脊髄の1つ以上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、大脳皮質および大脳白質の1つ以上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、頭頂葉および/また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、大脳皮質および大脳白質の1つ以上への薬剤送達が有効となり得る。DLBの治療においては、前頭葉および/また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、前頭葉および側頭葉の1つ以上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。

[0100] 神経根や馬尾を対象とする疾患としては、特に限定されないがギランバレー症候群、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、頚椎症性脊髄根症があり得る。また、後根神経節を対象とする神経疾患は末梢神経性疼痛疾患、シェーグレン症候群、傍腫瘍症候群があり得る。

[0101] したがって、上記の各疾患を治療するための組成物、またはそのような組成物を投与することを含む治療方法が提供される。また、上記の各部位において標的転写産物の発現を調節する(例えば、転写産物の発現量を低下させる)ための組成物が提供される。

[0102] また、被験体の中枢神経系へ低毒性アンチセンス核酸医薬を投与する方法であって、上記の組成物を被験体の中枢神経系へ投与する工程を含む、方法が提供される。この方法は、被験体の中枢神経系疾患を治療する方法であってもよい。

[0103] また、(ギャップマー型やミックスマー型などの)アンチセンスオリゴヌクレオチドの毒性を低下させるための、(ギャップマー型やミックスマー型などの)アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む核酸鎖の使用が提供される。

[0104] さらに、低毒性アンチセンス核酸医薬を製造する方法であって、

(i)標的転写産物に対する(ギャップマー型、ミックスマー型などの)アンチセンスオリゴヌクレオチド領域を含む第1核酸鎖を用意する工程、

(ii)第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む第2核酸鎖を用意する工程、(iii)第1核酸鎖と第2核酸鎖をアニールさせて、核酸複合体を形成させる工程、および

(iv)核酸複合体を含むアンチセンス核酸医薬を調製する工程

を含む、方法が提供される。

[0105] ＜低毒性組成物＞

上記の核酸複合体を含む、被験体において標的転写産物の発現を調節するための低毒性組成物が提供される。本組成物は、一本鎖アンチセンスオリゴ

ヌクレオチドを被験体へ投与した場合に比べて、低下した毒性を示し得る。

[0106] このような組成物の投与は、例えば、非経口経路または経口経路のいずれかによって行うことができる。例えば、非経口投与の具体例として、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、気管／気管支投与、直腸投与、および筋肉内投与、ならびに輸血による投与が挙げられる。投与は、静脈内投与または皮下投与であってもよいが、これらに限定はされない。筋肉内注射投与、静脈内点滴投与、または埋め込み型持続皮下投与で投与することもできる。皮下投与は、患者自身による自己注射が可能であるので好適である。また、静脈内投与の場合、組成物1回の投与量中に含まれる核酸複合体の量、すなわち核酸複合体の単回投与量は、例えば、0.001mg/kg以上、0.005mg/kg以上、0.01mg/kg以上、00.25mg/kg以上、0.5mg/kg以上、1mg/kg以上、2.5mg/kg以上、5mg/kg以上、10mg/kg以上、20mg/kg以上、30mg/kg以上、40mg/kg以上、50mg/kg以上、75mg/kg以上、100mg/kg以上、150mg/kg以上、200mg/kg以上、300mg/kg以上、400mg/kg以上、もしくは500mg/kg以上とすることができる。例えば、0.001～500mg/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、もしくは200mg/kg)を適宜選択することができる。このような低毒性組成物により軽減され得る毒性は例えば、神経毒性または腎毒性であり得る。腎毒性とは、腎臓に機能異常および/または機能低下を生じさせる性質をいう。腎機能の評価は、当業者に公知の任意の手法、例えば血清生化学的検査などにより行うことができる。

実施例

[0107] 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。

[実施例1]

一実施形態による二本鎖核酸剤の脳室内投与による中枢神経系での副作用を検証するin vivo実験を行った。

[0108] 本実施例では、ヘテロ二本鎖オリゴヌクレオチド(heteroduplex oligonucl

eotide、以下「HDO」と称する；国際公開第2013/089283号を参照)の形態を有する、図7(b)～(e)で示す4種類の二本鎖剤を、図7(a)で示す一本鎖LNA/DNAギャップマー型のアンチセンスオリゴヌクレオチド(以下「ASO」と称する)を対照として用いて、中枢神経系での副作用について評価した。

[0109] (核酸剤の調製)

対照として用いる一本鎖ASOは、5'末端から2個および3'末端から3個のLNAヌクレオシド、ならびにそれらの間の8個のDNAヌクレオシドを含む、13merのLNA/DNAギャップマーとした(表1のASO(BACE1) 13mer、図7(a))。このLNA/DNAギャップマーは、マウスのβ-セクレターゼ1(beta-secretase 1、BACE1) mRNA(配列番号1)の1569～1581位に相補的である。LNA/DNAギャップマー(第1鎖)を相補鎖(第2鎖)とアニールさせることにより、以下の4種の二本鎖剤HDOを調製した。

・二本鎖剤(HDO cRNA all PO、図7(b))：第1鎖と、13個のRNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された第2鎖(cRNA (BACE1) all PO)とからなる。

・二本鎖剤(HDO cRNA all PS、図7(c))：第1鎖と、13個のRNAヌクレオシドがホスホロチオエート結合で連結された第2鎖(cRNA (BACE1) all PS)とからなる。

・二本鎖剤(HDO cDNA all PO、図7(d))：第1鎖と、13個のDNAヌクレオシドがホスホジエステル結合で連結された第2鎖(cDNA (BACE1) all PO)とからなる。

・二本鎖剤(HDO cDNA all PS、図7(e))：第1鎖と、13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第2鎖(cDNA (BACE1) all PS)とからなる。

[0110] 実施例1で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表1および図7に示す。

[表1]

実施例１で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO(BACE1) 13mer	G(L)^T(L)^a^t^t^g^c^t^g^a^G(L)^G(L)^A(L)	12
cRNA (BACE1) all PO	UCCUCAGCAAUAC	13
cRNA (BACE1) all PS	U^C^C^U^C^A^G^C^A^A^U^A^C	13
cDNA (BACE1) all PO	tcctcagcaatac	14
cDNA (BACE1) all PS	t^c^c^t^c^a^g^c^a^a^t^a^c	14

大文字(L): LNA　小文字: DNA　大文字: RNA　^: ホスホロチオエート結合

[0111] 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。上記の二本鎖剤を調製するために、第1鎖と第2鎖とを等モル量で混合し、溶液を95℃で5分間加熱し、その後37℃に冷却して1時間保持し、これにより核酸鎖をアニールした。アニールした核酸を4℃または氷上で保存した。

[0112] (in vivo実験)

7週齢雌のICRマウスを、2.5～4%イソフルレン麻酔下にて脳定位固定装置に固定した。その後、耳間に前後2～3cmで皮膚を切開し、ブレグマ(bregma)の1mm左方かつ0.2mm後方に1mm径ドリルで穿孔した。ハミルトン(Hamilton)シリンジ内に核酸剤を充填した。穿孔部より針を3mm程度刺入し、2～3μl/分の速度で、マウス1匹あたり12μmolの用量で核酸剤を左側脳室内投与し(n=4～7)、ナイロン糸で皮膚縫合した。PBS(陰性対照)を、同様の方法でマウスに脳室内投与した。

[0113] 投与の1、3、および6時間後に、中枢神経系における副作用(忍容性)を、以下の11個の行動評価項目によって評価した。

(1) 機敏で、元気があり、敏感である(Alert, bright and responsive)

(2) 刺激なしで立つまたは背を丸める(Standing or hunching without stimuli)

(3) 刺激なしで動きを示す(Shows movements without stimuli)

(4) 持ち上げられた後、前方への動きを示す(Shows forward movement after being lifted up)

(5) 持ち上げられた後、何らかの動きを示す(Shows any movements after being lifted up)

(6) 尾をつまむことに反応する(Responds to tail pinch)

(7) 規則的な呼吸(Regular breathing)

(8) 活動過剰なし(No hyperactivity)

(9) 運動機能障害および運動失調なし(No motor dysfunction and ataxia)

(10) 正常な姿勢(Normal posture)

(11) 震え/けいれんなし(No tremors/convulsions)

[0114] マウスを、それぞれの項目について、「異常あり」(1点)または「正常」(0点)でスコアリングし、11項目の合計点(0～11点)を算出し、急性期忍容性スコアとした。さらに、上記の11項目のいずれか1項目で異常が見られたマウスの比率を、副作用イベント率(%)として算出した。また、投与後1日内に死亡したマウスの数を記録した。各群の結果を比較し、さらに有意差をボンフェローニ検定によって評価した。

[0115] (結果)

実施例1の結果を、表2～4に示す。

[表2]

急性期忍容性スコア

	1時間	3時間	6時間
PBS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
ASO	7.4 ± 0.9	6.0 ± 0.7	2.4 ± 2.9
HDO cRNA all PO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
HDO cRNA all PS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
HDO cDNA all PO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
HDO cDNA all PS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

(n = 4、平均値 ± SD)

[0116]

[表3]

副作用イベント率(%)

	1時間	3時間	6時間
PBS	0	0	0
ASO	100	100	100
HDO cRNA all PO	0	0	0
HDO cRNA all PS	0	0	0
HDO cDNA all PO	0	0	0
HDO cDNA all PS	0	0	0

[0117] [表4]

	死亡数/投与数
PBS	0 / 4
ASO	2 / 6
HDO cRNA all PO	0 / 4
HDO cRNA all PS	0 / 4
HDO cDNA all PO	0 / 4
HDO cDNA all PS	0 / 4

[0118] 表2で示す急性期忍容性スコアは、数値が大きいほど忍容性が低い薬物であることを示す。急性期忍容性スコアは、ASO投与群では投与1時間後に上昇が見られ、その後、徐々に減少するものの6時間後まで上昇が見られた。一方で、PBS投与群(陰性対照)および4種の二本鎖剤HDO投与群では全て、急性期忍容性スコアは上昇しなかった。

[0119] 表3で示す副作用イベント率では、ASO投与群の副作用イベント率が100%となり、全てのマウスで副作用が見られたのに対して、PBS投与群(陰性対照)および4種の二本鎖剤HDO投与群では副作用イベント率が0%で、副作用は見られなかった。

[0120] ASO投与群では6匹中2匹のマウスが死亡したのに対して、PBS投与群(陰性対照)および4種の二本鎖剤HDO投与群ではいずれのマウスも死亡しなかった(表4)。

[0121] これらの結果から、二本鎖剤であるHDOは、一本鎖剤に見られる中枢神経系

の副作用(毒性)を回避することが示された。その回避効果は、HDO中の相補鎖(第2鎖)が有する核酸種(RNAまたはDNA)およびヌクレオシド間結合の種類に関係なく見られた。

[0122] [実施例2]

様々な長さの相補鎖(第2鎖)を有する、一実施形態による二本鎖核酸剤の脳室内投与による中枢神経系での副作用を検証するin vivo実験を行った。

[0123] (核酸剤の調製)

標的は実施例1と同じBACE1 mRNAとした。対照(ASO)も実施例1と同じ一本鎖LNA/DNAギャップマーとした(表5のASO(BACE1) 13mer、図8(a))。LNA/DNAギャップマー(第1鎖)を相補鎖(第2鎖)とアニールさせることにより、以下の4種の二本鎖剤HDOを調製した。

・二本鎖剤(HDO 13mer、図8(b)):第1鎖と第2鎖(cRNA (BACE1) 13mer)とからなり、ここで、第2鎖は13個のRNAヌクレオシドを含み、第2鎖のヌクレオシド間結合は、5'末端から2個のホスホロチオエート結合、8個のホスホジエステル結合および2個のホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤(HDO 12mer、図8(c)):第1鎖と第2鎖(cRNA (BACE1) 12mer)とからなり、ここで、第2鎖は12個のRNAヌクレオシドを含み、第2鎖のヌクレオシド間結合は、5'末端から2個のホスホロチオエート結合、7個のホスホジエステル結合および2個のホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤(HDO 11mer、図8(d)):第1鎖と第2鎖(cRNA (BACE1) 11mer)とからなり、ここで、第2鎖は11個のRNAヌクレオシドを含み、第2鎖のヌクレオシド間結合は、5'末端から2個のホスホロチオエート結合、6個のホスホジエステル結合および2個のホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤(HDO 10mer、図8(e)):第1鎖と第2鎖(cRNA (BACE1) 10mer)とからなり、ここで、第2鎖は10個のRNAヌクレオシドを含み、第2鎖のヌクレオシド間結合は、5'末端から2個のホスホロチオエート結合、5個のホスホジエステル結合および2個のホスホロチオエート結合である。

[0124] 実施例2で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表5

および図8に示す。二本鎖剤は実施例1と同様に調製した。

[表5]

実施例2で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO(BACE1) 13mer	G(L)^T(L)^a^t^t^g^c^t^g^a^G(L)^G(L)^A(L)	12
cRNA (BACE1) 13mer	U^C^CUCAGCAAU^A^C	13
cRNA (BACE1) 12mer	U^C^CUCAGCAA^U^A	15
cRNA (BACE1) 11mer	U^C^CUCAGCA^A^U	16
cRNA (BACE1) 10mer	U^C^CUCAGC^A^A	17

大文字(L): LNA 小文字: DNA 大文字: RNA ^: ホスホロチオエート結合

[0125] (in vivo実験)

核酸剤を、マウスに12μmol/匹の量(n=4～5)で左側脳室内投与した。用いたマウス、投与方法および副作用の解析方法は実施例1に記載したとおりである。

[0126] (結果)

実施例2の結果を、表6～8に示す。

[表6]

急性期忍容性スコア

	1時間	3時間	6時間
PBS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
ASO	6.0 ± 0.8	5.0 ± 1.9	2.4 ± 2.9
HDO 13mer	2.3 ± 1.5	1.0 ± 0.8	0.5 ± 2.9
HDO 12mer	0.3 ± 0.5	0 ± 0	0 ± 0
HDO 11mer	0.3 ± 0.5	0 ± 0	0 ± 0
HDO 10mer	0.3 ± 0.5	0 ± 0	0 ± 0

(n = 4、平均値 ± SD)

[0127]

[表7]

副作用イベント率(%)

	1時間	3時間	6時間
PBS	0	0	0
ASO	100	100	50
HDO 13mer	75	75	75
HDO 12mer	25	0	0
HDO 11mer	25	0	0
HDO 10mer	0	0	0

[0128] [表8]

	死亡数/投与数
PBS	0 / 4
ASO	1 / 5
HDO 13mer	0 / 4
HDO 12mer	0 / 4
HDO 11mer	0 / 4
HDO 10mer	0 / 4

[0129] 表6で示す急性期忍容性スコアは、ASO投与群では投与1時間後に上昇が見られ、その後、徐々に減少するものの6時間後まで上昇が見られた。一方で、4種の二本鎖剤HDO投与群では、急性期忍容性スコアは上昇したものの、ASO投与群より低かった。

[0130] 表7で示す副作用イベント率も、二本鎖剤HDO投与群では、ASO投与群より低い傾向が見られた。

[0131] 表8で示す投与数と死亡数の関係は、ASO投与群では5匹中1匹のマウスが死亡したのに対して、PBS投与群(陰性対照)および4種の二本鎖剤HDO投与群ではいずれのマウスも死亡しなかった。

[0132] これらの結果から、二本鎖剤HDOにおける副作用の低下は、相補鎖(第2鎖)が、アンチセンスオリゴヌクレオチド(第1鎖)よりも短い場合でも見られることが示された。

[0133] [実施例3]

実施例1および2で用いた二本鎖剤HDOが、実際に二本鎖を形成していることを確かめる実験を行った。

実施例1および2で用いた一本鎖ASOおよび二本鎖剤HDOを、15%アクリルアミド非変性ゲルを用いて、トリス-ホウ酸-EDTAバッファー中で電気泳動(100V、60分)した。ゲルをGelRed(和光純薬工業株式会社)で染色し、ChemiDoc Touchイメージングシステム(バイオ・ラッド社(BIO RAD))を用いて紫外線下で検出した。

[0134] 実施例3の結果を図9に示す。図9は、一本鎖ASO(第1レーン)、HDO cRNA all PO(第2レーン)、HDO cRNA all PS(第3レーン)、HDO cDNA all PO(第4レーン)、HDO cDNA all PS(第5レーン)、HDO 10mer(第6レーン)、HDO 11mer(第7レーン)、HDO 12mer(第8レーン)およびHDO 13mer(第9レーン)の結果を示す。二本鎖を形成している場合、染色剤による染色(輝度)が増強する。実施例1および2で用いたHDOは、ASOより輝度が上昇し、実際に二本鎖を形成していることが示された。

[0135] [実施例4]

オーバーハング領域を有する、一実施形態による二本鎖核酸剤の脳室内投与による中枢神経系での副作用を検証するin vivo実験を行った。

[0136] (核酸剤の調製)

標的は実施例1と同じBACE1 mRNAとした。対照(ASO)も実施例1と同じ一本鎖LNA/DNAギャップマーとした(表9のASO(BACE1) 13mer、図10(a))。LNA/DNAギャップマー(第1鎖)を第2鎖とアニールさせることにより、オーバーハング二本鎖オリゴヌクレオチド(overhanging-duplex oligonucleotide、以下「Overhang」または「OH」と称する;PCT/JP2017/035553に記載)の形態の、以下の6種の二本鎖剤を調製した。

・二本鎖剤(OH 26mer、図10(b)):第1鎖と、第2鎖(overhanging cRNA (BACE1) Gapmer 26mer)とからなり、ここで、第2鎖は、第1鎖と相補的な領域(13塩基長)と、その5'末端側のオーバーハング領域(13塩基長)とからなり、オーバーハング領域は、5'末端側から2個のLNAヌクレオシド、8個のDNAヌクレオ

シド、および3個のLNAヌクレオシドを含み、オーバーハング領域のヌクレオシド間結合は全てホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤(OH 26mer PS-4、図10(c))：第1鎖と、第2鎖(overhanging cRNA（BACE1）Gapmer 26mer PS-4)とからなり、ここで、第2鎖は、上記オリゴヌクレチドoverhanging cRNA（BACE1）Gapmer 26merのオーバーハング領域において、5'末端から6個および3'末端から2個のホスホロチオエート結合以外の4個のホスホロチオエート結合をホスホジエステル結合に置換した鎖である。

・二本鎖剤(OH 26mer PS-8、図10(d))：第1鎖と、第2鎖(overhanging cRNA（BACE1）Gapmer 26mer PS-8)とからなり、ここで、第2鎖は、上記オリゴヌクレチドoverhanging cRNA（BACE1）Gapmer 26merのオーバーハング領域において、5'末端から2個および3'末端から2個のホスホロチオエート結合以外の8個のホスホロチオエート結合をホスホジエステル結合に置換した鎖である。

・二本鎖剤(OH 30mer、図10(e))：第1鎖と、第2鎖(overhanging cRNA（BACE1）Gapmer 30mer)とからなり、ここで、第2鎖は、第1鎖と相補的な領域(13塩基長)と、その5'末端側のオーバーハング領域(17塩基長)とからなり、オーバーハング領域は、5'末端から2個のLNAヌクレオシド、12個のDNAヌクレオシド、および3個のLNAヌクレオシドを含み、オーバーハング領域のヌクレオシド間結合は全てホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤(OH 22mer、図10(f))：第1鎖と、第2鎖(overhanging cRNA（BACE1）Gapmer 22mer)とからなり、ここで、第2鎖は、第1鎖と相補的な領域(13塩基長)と、その5'末端側のオーバーハング領域(9塩基長)とからなり、オーバーハング領域は、5'末端から2個のLNAヌクレオシド、4個のDNAヌクレオシド、および3個のLNAヌクレオシドを含み、オーバーハング領域のヌクレオシド間結合は全てホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤(OH 18mer、図10(g))：第1鎖と、第2鎖(overhanging cRNA（BACE1）Gapmer 18mer)とからなり、ここで、第2鎖は、第1鎖と相補的な領域(13塩基長)と、その5'末端側のオーバーハング領域(5塩基長)とからなり、オーバーハング領域は、5個のLNAヌクレオシドを含み、オーバーハング領域のヌ

クレオシド間結合は全てホスホロチオエート結合である。

[0137] 実施例4で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表9および図10に示す。二本鎖剤は実施例1と同様に調製した。

[表9]

実施例4で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO(BACE1) 13mer	G(L)^T(L)^a^t^t^g^c^t^g^a^G(L)^G(L)^A(L)	12
overhanging cRNA (BACE1)Gapmer 26mer	C(L)^T(L)^a^g^g^t^c^a^t^g^C(L)^G(L)^T(L)UCCUCAGCAAU^A^C	18
overhanging cRNA (BACE1)Gapmer 26mer PS-4	C(L)^T(L)^a^g^g^t^catgC(L)^G(L)^T(L)UCCUCAGCAAU^A^C	18
overhanging cRNA (BACE1)Gapmer 26mer PS-8	C(L)^T(L)^aggtcatgC(L)^G(L)^T(L)UCCUCAGCAAU^A^C	18
overhanging cRNA (BACE1)Gapmer 30mer	C(L)^T(L)^a^g^g^t^c^a^t^g^t^t^t^C(L)^G(L)^T(L)UCCUCAGCAAU^A^C	19
overhanging cRNA (BACE1)Gapmer 22mer	C(L)^T(L)^a^g^g^t^C(L)^G(L)^T(L)UCCUCAGCAAU^A^C	20
overhanging cRNA (BACE1)Gapmer 18mer	C(L)^T(L)^C(L)^G(L)^T(L)UCCUCAGCAAU^A^C	21

大文字(L): LNA (C(L)は5-メチルシトシンLNAを表す)　小文字: DNA　大文字: RNA　^: ホスホロチオエート結合

[0138] (in vivo実験)

核酸剤を、マウスに12μmol/匹の量(n=4～5)で左側脳室内投与した。用いたマウス、投与方法および副作用の解析方法は実施例1に記載したとおりである。

[0139] (遺伝子抑制効果の評価)

注射の7日後、PBSをマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して左海馬を摘出した。RNAを、IsogenIキット(株式会社ジーンデザイン)を使用してプロトコルに従って抽出した。cDNAは、Transcriptor Universal cDNA Master, DNase (ロシュ・ダイアグノスティックス社(Roche Diagnostics))を使用してプロトコルに従って合成した。定量RT-PCRは、TaqMan(ロシュ・アプライドサイエンス社(Roche Applied Science))により実施した。定量RT-PCRにおいて使用したプライマーは、様々な遺伝子数に基づいて、サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社(Thermo Fisher Scientific、旧ライフ・テクノロジーズ社(Life Technologies Corp))によって設計および製造された製品であった。増幅条件(温度および時間)は以下のとおりであった：95℃で15秒、60℃で30秒、および72℃で1秒(1サイクル)を40サイクル繰り返した。このようにして得られた定量RT-PCRの結果に基づいて、BACE1の発現量/ACTB(内部標準遺伝子)の発現量をそれぞれ計算した。

[0140] (結果)

実施例4の結果を表10～12および図11に示す。

[表10]

急性期忍容性スコア

	1時間	3時間	6時間
PBS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
ASO	7.5 ± 0.9	5.5 ± 0.9	0.5 ± 2.3
OH 26mer	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OH 26mer PS-4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OH 26mer PS-8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OH 30mer	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OH 22mer	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OH 18mer	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

(n = 4～5、平均値 ± SD)

[0141] [表11]

副作用イベント率(%)

	1時間	3時間	6時間
PBS	0	0	0
ASO	100	100	50
OH 26mer	0	0	0
OH 26mer PS-4	0	0	0
OH 26mer PS-8	0	0	0
OH 30mer	0	0	0
OH 22mer	0	0	0
OH 18mer	0	0	0

[0142] [表12]

	死亡数/投与数
PBS	0 / 4
ASO	2 / 6
OH 26mer	0 / 4
OH 26mer PS-4	0 / 4
OH 26mer PS-8	0 / 4
OH 30mer	0 / 4
OH 22mer	0 / 4
OH 18mer	0 / 4

[0143] 表10で示す急性期忍容性スコアは、ASO投与群では投与1時間後に上昇が見られ、その後、徐々に減少するものの6時間後まで上昇が見られた。一方で、PBS投与群(陰性対照)および6種の二本鎖剤投与群では全て、急性期忍容性スコアは上昇しなかった。

[0144] 表11で示す副作用イベント率では、ASO投与群の多くのマウスで副作用が見られたのに対して、PBS投与群(陰性対照)および6種の二本鎖剤投与群のいずれのマウスでも副作用は見られなかった。

[0145] 表12で示す投与数と死亡数の関係は、ASO投与群では6匹中2匹のマウスが死亡したのに対して、PBS投与群(陰性対照)および6種の二本鎖剤投与群ではいずれのマウスも死亡しなかった。

[0146] また、オーバーハング領域を有する二本鎖剤はいずれも、ASOよりも高い標的遺伝子(BACE1)抑制効果を示す傾向が見られた(図11)。特に、オーバーハング領域の鎖長が長いほど遺伝子抑制効果は高く、ホスホロチオエート結合の数が多いほど遺伝子抑制効果は高くなる傾向があった。これらの傾向は、以前の出願(PCT/JP2017/035553)と一致する。

[0147] これらの結果から、オーバーハング領域を有する二本鎖剤では、一本鎖剤ASOと比べて、中枢神経系の副作用が改善すること、および遺伝子抑制効果が増強することが示された。

[0148] [実施例5]

実施例1と異なる遺伝子を標的とする、一実施形態による二本鎖核酸剤の脳室内投与による中枢神経系での副作用を検証するin vivo実験を行った。

[0149] (核酸剤の調製)

対照として用いる一本鎖ASOは、5'末端から3個および3'末端から3個のLNAヌクレオシド、ならびにそれらの間の10個のDNAヌクレオシドを含む、16merのLNA/DNAギャップマーとした(表13のASO(Tau) 16mer、図12(a))。このLNA/DNAギャップマーは、マウスの微小管関連タンパク質タウ(microtubule-associated protein tau、Tau) mRNA(配列番号3)の3339～3354位に相補的である。LNA/DNAギャップマー(第1鎖)を第2鎖とアニールさせることにより、以下の二

本鎖剤HDOおよびOH(Overhang)を調製した。

・二本鎖剤HDO(図12(b))：第1鎖と第2鎖(HDO cRNA (Tau) 16mer)とからなり、ここで、第2鎖は16個のRNAヌクレオシドを含み、第2鎖のヌクレオシド間結合は、5'末端から2個のホスホロチオエート結合、11個のホスホジエステル結合および2個のホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤OH(図12(c))：第1鎖と、第2鎖(overhanging cRNA (Tau) DNA 29 mer)とからなり、ここで、第2鎖は、第1鎖と相補的な領域(16塩基長)と、その5'末端側のオーバーハング領域(13塩基長)とからなり、オーバーハング領域は、13個のDNAヌクレオシドを含み、オーバーハング領域のヌクレオシド間結合は全てホスホロチオエート結合である。

[0150] 実施例5で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表13および図12に示す。二本鎖剤は実施例1と同様に調製した。

[表13]

実施例5で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO (Tau) 16mer	A(L)^T(L)^A(L)^g^t^c^a^c^t^c^t^g^g^T(L)^G(L)^A(L)	22
HDO cRNA (Tau) 16mer	U^C^ACCAGAGUGACU^A^U	23
overhanging cRNA (Tau) DNA 29mer	g^t^a^g^g^t^c^a^t^g^c^g^tUCACCAGAGUGACU^A^U	24

大文字(L): LNA　小文字: DNA　大文字: RNA　^: ホスホロチオエート結合

[0151] (in vivo実験)

核酸剤を、マウスに6μmol/匹の量(n=4)で左側脳室内投与した。用いたマウス、投与方法および副作用の解析方法は実施例1に記載したとおりである。

[0152] (結果)

実施例5の結果を表14～16に示す。

[表14]

急性期忍容性スコア

	1時間	3時間	6時間
PBS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
ASO	3.5 ± 1.0	1.5 ± 1.7	0 ± 0
HDO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
OH	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

(n = 3～4、平均値 ± SD)

[0153] [表15]

副作用イベント率(%)

	1時間	3時間	6時間
PBS	0	0	0
ASO	100	50	0
HDO	0	0	0
OH	0	0	0

[0154] [表16]

	死亡数/投与数
PBS	0 / 4
ASO	1 / 4
HDO	0 / 4
OH	0 / 4

[0155] 表14で示す急性期忍容性スコアは、ASO投与群では投与1時間後に上昇が見られ、その後、徐々に減少して6時間後には改善した。一方で、PBS投与群(陰性対照)および2種の二本鎖剤(HDOおよびOH)投与群では全て、急性期忍容性スコアは上昇しなかった。

[0156] 表15で示す副作用イベント率では、ASO投与群の多くのマウスで副作用が見られたのに対して、PBS投与群(陰性対照)および2種の二本鎖剤投与群のいずれのマウスでも副作用は見られなかった。

[0157] 表16で示す投与数と死亡数の関係は、ASO投与群では4匹中1匹のマウスが死

亡したのに対して、PBS投与群(陰性対照)および2種の二本鎖剤投与群ではいずれのマウスも死亡しなかった。

[0158] これらの結果から、二本鎖剤による中枢神経系の副作用改善効果は標的遺伝子に依存せず、様々な標的遺伝子に対して適用できることが示された。

[0159] [実施例6]

実施例1～5と異なる一実施形態による二本鎖核酸剤の脳室内投与による中枢神経系での副作用を検証するin vivo実験を行った。

[0160] (核酸剤の調製)

標的は実施例1と同じBACE1 mRNAとした。対照(ASO)も実施例1と同じ一本鎖LNA/DNAギャップマーとした(表17のASO(BACE1) 13mer、図13(a))。LNA/DNAギャップマー(第1鎖)を第2鎖とアニールさせることにより、OH(Overhang)形態の二本鎖剤を調製した。さらに、LNA/DNAギャップマーの3'末端側に13塩基長の二本鎖核酸構造を有するヘテロキメラ二本鎖オリゴヌクレオチド(hetero-chimera-duplex oligonucleotide、以下「HCDO」と称する；国際公開第2014/192310号を参照)の形態の二本鎖剤も調製した。本実施例で用いたOH形態の二本鎖剤およびHCDO形態の二本鎖剤を以下に説明する。

・二本鎖剤OH(図13(b))：第1鎖(ASO(BACE1) 13mer)と、第2鎖(over cRNA (BACE1) OAT3-2 G 26mer)とからなり、ここで、第2鎖は、第1鎖と相補的な領域(13塩基長)と、その5'末端側のオーバーハング領域(13塩基長)とからなり、相補的な領域は、3'末端から2個の2'-O-メチル化RNAヌクレオシドを含み、オーバーハング領域は、5'末端から2個のLNAヌクレオシド、8個のDNAヌクレオシド、および3個のLNAヌクレオシドを含み、オーバーハング領域のヌクレオシド間結合は全てホスホロチオエート結合である。

・二本鎖剤HCDO(図13(c))：第1鎖(HCDO cRNA(OAT3 1-2) 26mer)と、第2鎖(OAT3-2 G 13mer)とからなる。このHCDOは、BACE1 mRNAに相補的なアンチセンスオリゴ領域(図13(c)の†で示される)の3'末端側に13塩基長の二本鎖核酸構造を有する。

[0161] 実施例6で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表17

および図13に示す。二本鎖剤は実施例1と同様に調製した。

[表17]

実施例6で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO(BACE1) 13mer	G(L)^T(L)^a^t^t^g^c^t^g^a^G(L)^G(L)^A(L)	12
over cRNA (BACE1) OAT3-2 G 26mer	G(L)^T(L)^a^g^g^t^c^a^t^g^C(L)^G(L)^T(L)UCCUCAGCAAU^A(M)^C(M)	25
OAT3-2 G 13mer	C(L)^T(L)^a^g^g^t^c^a^t^g^C(L)^G(L)^T(L)	26
HCDO cRNA(OAT3 1-2) 26mer	G(L)^T(L)^a^t^t^g^c^t^g^a^G(L)^G(L)^A(L)ACGCAUGACCU^A(M)^G(M)	27

大文字(L)：LNA (C(L)は5-メチルシトシンLNAを表す)　小文字：DNA　大文字：RNA　大文字(M)：2'-O-Me RNA

^：ホスホロチオエート結合

[0162] (in vivo実験)

核酸剤を、マウスに12μmol/匹の量(n=4～11)で左側脳室内投与した。副作用として、投与後1日内に死亡したマウスの数を記録した。用いたマウス、投与方法および解析方法は実施例1に記載したとおりである。

[0163] (結果)

実施例6の結果を表18に示す。

[表18]

	死亡数/投与数
PBS	0 / 4
ASO	6 /11
OH	0 / 5
HCDO	0 / 5

[0164] ASO投与群では11匹中6匹のマウスが死亡したのに対して、PBS投与群(陰性対照)および2種の二本鎖剤(OHおよびHCDO)投与群ではいずれのマウスも死亡しなかった(表18)。この結果から、オーバーハング領域を有する二本鎖剤、およびアンチセンスオリゴ領域の3'末端側に二本鎖核酸構造が結合した二本鎖剤では、一本鎖剤ASOと比べて、副作用が改善することが示された。

[0165] [実施例7]

一実施形態による二本鎖核酸剤の髄腔内投与による中枢神経系での副作用を検証するin vivo実験を行った。

[0166] (核酸剤の調製)

対照として用いる一本鎖ASOは、5'末端から3個および3'末端から3個のLNAヌクレオシド、ならびにそれらの間の10個のDNAヌクレオシドを含む、16merのLNA/DNAギャップマーとした(表19のASO(MALAT) 16mer、図14(a))。このLNA/DNAギャップマーは、マウスの転移関連肺腺癌転写産物1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1、MALAT1)ノンコーディングRNA(配列番号5)の1316～1331位に相補的である。LNA/DNAギャップマー(第1鎖)を、トコフェロールが結合した第2鎖(Tocopherol-cRNA (MALAT) 16mer)とアニー

ルさせることにより、二本鎖剤HD0(図14(b))を調製した。この第2鎖は5'末端から3個の2'-0-メチル化RNAヌクレオシド、10個のRNAヌクレオシド、および3個の2'-0-メチル化RNAヌクレオシドを含み、第2鎖のヌクレオシド間結合は、5'末端から3個のホスホロチオエート結合、9個のホスホジエステル結合および3個のホスホロチオエート結合である。

[0167] 実施例7で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表19および図14に示す。二本鎖剤は実施例1と同様に調製した。

[表19]

実施例7で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO(MALAT) 16mer	C(L)^T(L)^A(L)^g^t^t^c^a^c^t^g^a^a^T(L)^G(L)^C(L)	28
Tocopherol-cRNA (MALAT) 16mer	Toc-G(M)^C(M)^A(M)^UUCAGUGAAC^U(M)^A(M)^G(M)	29

大文字(L): LNA (C(L)は5-メチルシトシンLNAを表す) 小文字: DNA 大文字: RNA 大文字(M): 2'-O-Me RNA

^: ホスホロチオエート結合 Toc: トコフェロール

[0168] (in vivo実験)

核酸剤を、マウスに4mg/kgの量(n=4～9)で腰部で髄腔内投与した。副作用として、投与後1日内に死亡したマウスの数を記録した。用いたマウスおよび

解析方法は実施例1に記載したとおりである。

[0169] (結果)

実施例7の結果を表20に示す。

[表20]

	死亡数/投与数
PBS	0 / 4
ASO	4 / 9
HDO	0 / 5

[0170] ASO投与群では9匹中4匹のマウスが死亡したのに対して、PBS投与群(陰性対照)およびトコフェロール結合型二本鎖剤HDO投与群ではいずれのマウスも死亡しなかった(表20)。この結果から、髄腔内投与したトコフェロール結合型二本鎖剤HDOでは、一本鎖剤ASOと比べて、副作用が改善することが示された。

[0171] [実施例8]

一実施形態による二本鎖核酸剤の静脈内投与による副作用を霊長類で検証するin vivo実験を行った。

[0172] (核酸剤の調製)

対照として用いる一本鎖ASOは、5'末端から3個および3'末端から3個のLNAヌクレオシド、ならびにそれらの間の10個のDNAヌクレオシドを含む、16merのLNA/DNAギャップマーとした(表21のASO(mfMALAT1)、図14(a))。このLNA/DNAギャップマーはカニクイザルの MALAT1ノンコーディングRNAを標的とする。このLNA/DNAギャップマーの塩基配列はHung Gら(Characterization of Target mRNA Reduction Through In Situ RNA Hybridization in Multiple Organ Systems Following Systemic Antisense Treatment in Animal, Nucleic Acid Therapeutics. 23(6): 369-378 (2013))を参考にして設計した。このLNA/DNAギャップマー(第1鎖)を、トコフェロールが結合した第2鎖(Tocopherol-cRNA(mfMALAT1))とアニールさせることにより、二本鎖剤HDO(図14(b))を調製した。この第2鎖は5'末端から3個の2'-O-メチル化RNAヌクレオシド、10個のRNA

ヌクレオシド、および3個の2'-O-メチル化RNAヌクレオシドを含む。二本鎖剤は実施例1と同様に調製した。

[0173] 実施例8で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表21および図14に示す。

[表21]

実施例８で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO(mfMALAT1)	A(L)^G(L)^T(L)^a^c^t^a^t^a^g^c^a^t^C(L)^T(L)^G(L)	30
Tocopherol-cRNA(mfMALAT1)	Toc-C(M)^A(M)^G(M)^AUGCUAUAGU^A(M)^C(M)^U(M)	31

大文字(L): LNA (C(L)は5-メチルシトシンLNAを表す)　小文字: DNA　大文字: RNA　大文字(M): 2'-O-Me RNA

^: ホスホロチオエート結合　Toc: トコフェロール

[0174] (in vivo実験)

カニクイザルは、体重1.8kgの雄であった。実験は全て、n=1で実施した。核酸剤を、カニクイザルにそれぞれ伏在静脈を通じて50 mg/kgの量で静脈内

に注射した。また、陰性対照群として、PBSのみまたは第1鎖(ASO)を注射したカニクイザルも作製した。

[0175] 静脈内投与3日後に、血清生化学的検査によりBUN(尿素窒素)およびクレアチニン値(Cre)を測定した。これらの値は高いほど腎機能が低下していることを示す。

[0176] (結果)

静脈内投与後にASO投与個体では頻回の嘔吐が見られた一方で、HDO投与個体では嘔吐は見られなかった。

[0177] 静脈内投与3日後の血清生化学的検査での腎機能評価の結果を表22に示す。

[表22]

	BUN (mg/dl)		Cre (mg/dl)	
	投与前	投与後	投与前	投与後
PBS	15.5	20.2	0.5	0.5
ASO	18.9	178.8	0.5	8.5
HDO	20.6	23.3	0.5	0.6

[0178] 表22に示されるようにASO投与個体では投与後に尿素窒素(BUN)およびクレアチニン(Cre)が投与前と比較して上昇した。一方で、HDO投与個体では尿素窒素(BUN)およびクレアチニン(Cre)とも、投与後に明らかな上昇は見られなかった。

以上より、二本鎖HDOでは、一本鎖ASOで見られた、嘔吐および腎機能低下を回避することが示された。

[0179] [実施例9]

一実施形態による二本鎖核酸剤の静脈内投与または皮下投与による副作用を検証するin vivo実験を行った。

[0180] (核酸剤の調製)

対照として用いる一本鎖ASOは、1個のDNAヌクレオシドと1個のLNAヌクレオシドが交互に繰り返す、13merのLNA/DNAミックスマーとした(表23のASO (dystrophin) 13mer、図15(a))。このLNA/DNAミックスマーはマウスのジストロフ

ィン(dystrophin)mRNAを標的とする。このLNA/DNAミックスマー(第1鎖)を、トコフェロールが結合した第2鎖(Tocopherol-cRNA (dystrophin) 13mer)とアニールさせることにより、二本鎖剤HDO(図15(b))を調製した。この第2鎖は5'末端から3個の2'-O-メチル化RNAヌクレオシド、7個のRNAヌクレオシド、および3個の2'-O-メチル化RNAヌクレオシドを含む。二本鎖剤は実施例1と同様に調製した。

[0181] 実施例9で用いたオリゴヌクレオチドの配列、化学修飾および構造は、表23および図15に示す。

[表23]

実施例9で用いたオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名	配列(5'-3')	配列番号
ASO (dystrophin) 13mer	a^A(L)^c^C(L)^t^C(L)^g^G(L)^c^T(L)^t^A(L)^c	32
Tocopherol-cRNA (dystrophin) 13mer	Toc-G(M)^U(M)^A(M)^AGCCGAG^G(M)^U(M)^U(M)	33

大文字(L): LNA (C(L)は5-メチルシトシンLNAを表す) 小文字: DNA 大文字: RNA 大文字(M): 2'-O-Me RNA
^: ホスホロチオエート結合 Toc: トコフェロール

[0182] (in vivo実験)

マウスに、ASOを100mg/kgの量で静脈内投与するか、または25、50、もしくは100mg/kgの量で皮下投与した。また、マウスに、HDOを100mg/kgの量で静脈

内投与または皮下投与した。投与2週間以内での状態の変化が無いか観察した。

[0183] （結果）

実施例9の結果を表24に示す。

[表24]

核酸	投与方法	投与量	投与後の変化
ASO	iv	100mg/kg	投与 10 分弱で徐々に反応性低下。 時に全身痙攣あり。約 30 分で死亡。
ASO	sc	100mg/kg	同上
ASO	sc	50mg/kg	同上
ASO	sc	25mg/kg	活気低下および痙攣なく、死亡せず
HDO	iv	100mg/kg	反応性低下および痙攣なく、死亡せず
HDO	sc	100mg/kg	反応性低下および痙攣なく、死亡せず

[0184] 表24に示されるように、ASOを100mg/kgの量で静脈内投与(iv)、または50もしくは100mg/kgの量で皮下投与(sc)した個体で、10分以内に反応性低下および痙攣が生じ、これらの個体は30分前後で死亡した。一方で、HDOを100mg/kgの量で静脈内投与(iv)、または100mg/kgの量で皮下投与(sc)した個体では、投与後2週間でいずれも反応性低下や死亡は認められなかった。

[0185] 以上より、一本鎖ASOで見られる全身投与(静脈内投与、皮下投与)時の急性の毒性を、二本鎖HDOは回避したことが示された。

[0186] 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] 標的転写産物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド領域を含む第1核酸鎖と、第1核酸鎖の少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む第2核酸鎖とが互いにアニールしてなる核酸複合体を含む、被験体の中枢神経系において標的転写産物の発現を調節するための中枢神経系投与用低毒性組成物。

[請求項2] 毒性が、神経毒性である、請求項１に記載の組成物。

[請求項3] 神経毒性が、死亡、呼吸異常、心血管異常、頭痛、嘔気もしくは嘔吐、無反応もしくは低反応、意識障害、精神障害、性格変化、幻覚、妄想、認知機能障害、姿勢異常、不随意運動、震え、けいれん、活動過剰、運動機能障害、麻痺、感覚障害および自律神経機能障害から選択される症状を引き起こす、請求項２に記載の組成物。

[請求項4] 第1核酸鎖が、9～50塩基長である、請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項5] 第1核酸鎖中の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド領域が、7～20塩基長である、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項6] 第2核酸鎖が、9～50塩基長である、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項7] 第2核酸鎖中の前記相補的領域が、第1核酸鎖中の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド領域の少なくとも一部に相補的である、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] 第1核酸鎖が、

(a) 前記転写産物にハイブリダイズした際に、RNase Hによって認識される少なくとも4つの連続したDNAヌクレオチドもしくは修飾DNAヌクレオチドを含み、さらに

(b) 前記RNase Hにより認識される少なくとも4つの連続したDNAヌクレオチドもしくは修飾DNAヌクレオチドの5’末側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチドを含む5’ウイング領域、ならびに／また

は

（c）前記RNase Hにより認識される少なくとも4つの連続したDNAヌクレオチドもしくは修飾DNAヌクレオチドの3’末側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチドを含む3’ウイング領域

を含む核酸鎖である、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項9] 第2核酸鎖が、

（a）少なくとも4つの連続したRNAヌクレオシドと、さらに

（b）前記少なくとも4つの連続したRNAヌクレオシドの5’末側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチド、ならびに／または

（c）前記少なくとも4つの連続したRNAヌクレオシドの3’側に配置された1又は複数の修飾ヌクレオチド

を含む核酸鎖である、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項10] 第2核酸鎖が、前記相補的領域の5’末端側および3’末端側の一方また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さらに含む、請求項７～９のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項11] 第2核酸鎖中のオーバーハング領域が、少なくとも5塩基長である、請求項１０に記載の組成物。

[請求項12] 第1核酸鎖が相補的RNA領域をさらに含み、該相補的RNA領域は、第1核酸鎖が第2核酸鎖にハイブリダイズしている場合にRNase Hにより認識され得る少なくとも2個の連続RNAヌクレオチドを有し、

第2核酸鎖中の前記相補的領域が相補的DNA領域であり、該相補的DNA領域は、第1核酸鎖の相補的RNA領域にハイブリダイズして、RNase Hによる第1核酸鎖中の少なくとも2個の連続RNAヌクレオチドの認識を促進することができ、さらに

第1核酸鎖中の前記アンチセンスオリゴヌクレオチド領域は、第2核酸鎖とハイブリダイズすることができない、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項13] 中枢神経系投与が、髄腔内投与または脳室内投与である、請求項１

～１２のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項14] 標的転写産物の発現調節が、標的転写産物量の低下である、請求項１～１３のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項15] 中枢神経系疾患を治療するための、請求項１～１４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項16] アンチセンスオリゴヌクレオチド領域が、ギャップマー型アンチセンスオリゴヌクレオチド領域またはミックスマー型アンチセンスオリゴヌクレオチド領域である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項17] アンチセンスオリゴヌクレオチド領域が、LNAヌクレオシドを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の組成物。

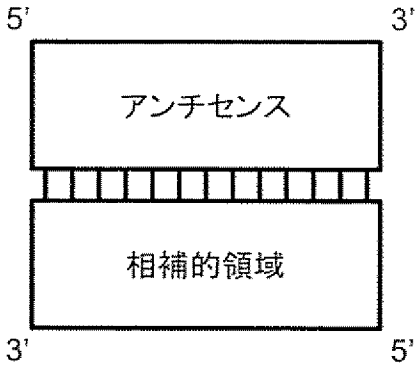
[請求項18] アンチセンスオリゴヌクレオチドの毒性を低下させるための、該アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に相補的な相補的領域を含む核酸鎖の使用。

[図1]

(a)

第1核酸鎖

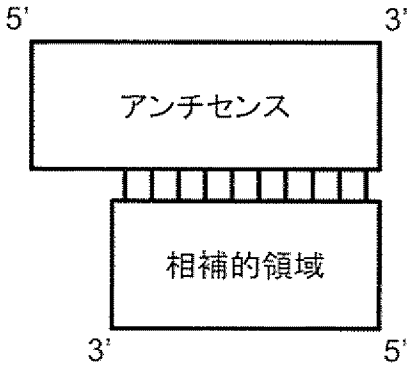
第2核酸鎖



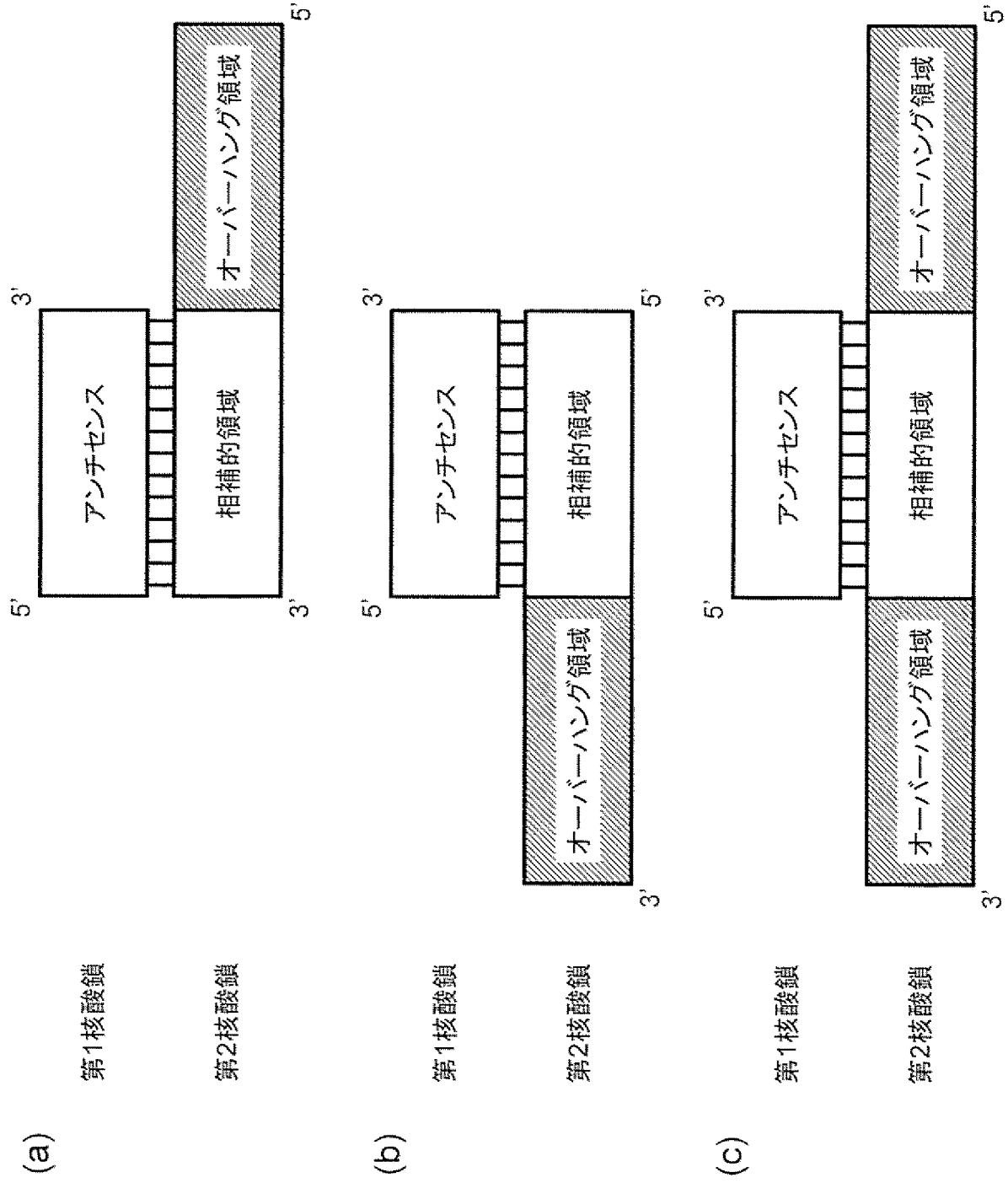
(b)

第1核酸鎖

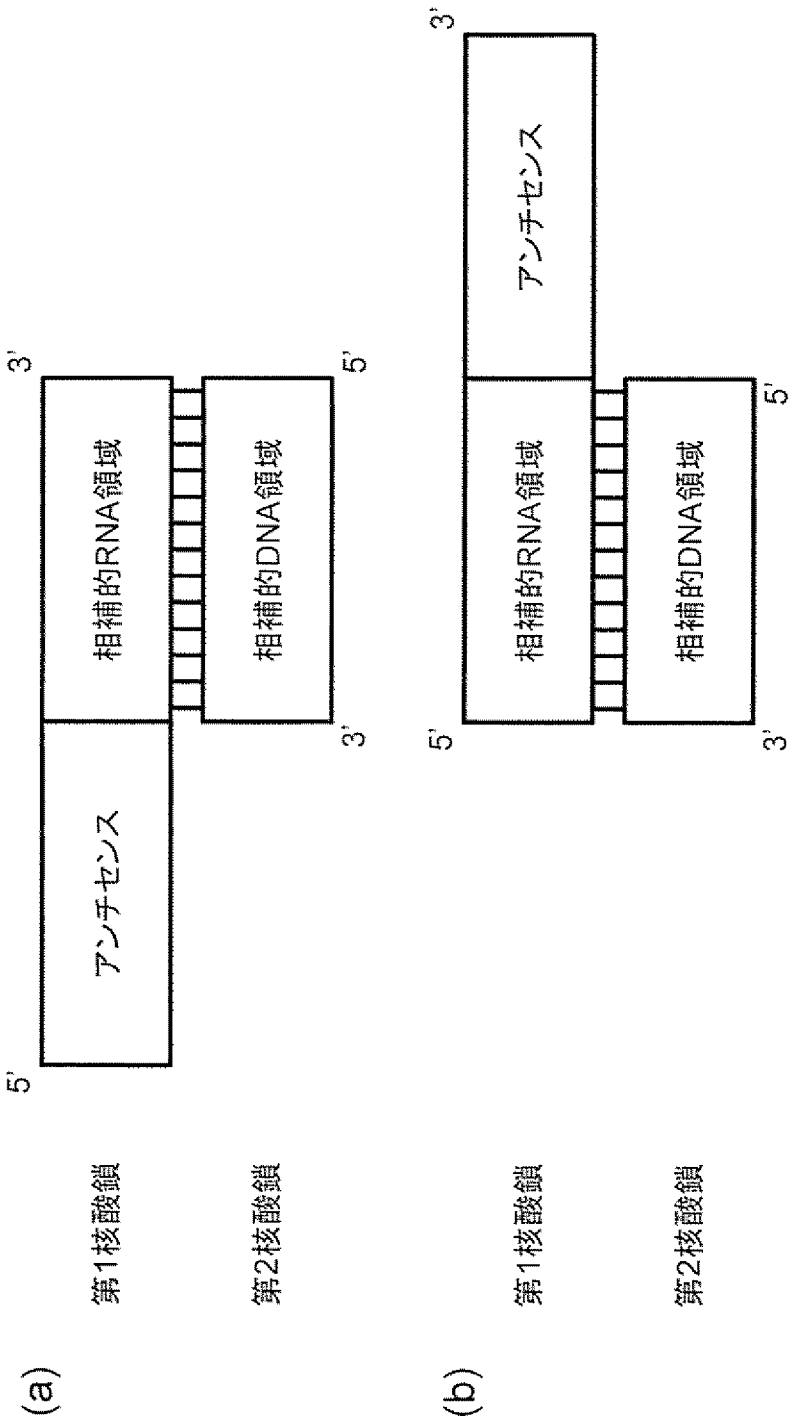
第2核酸鎖



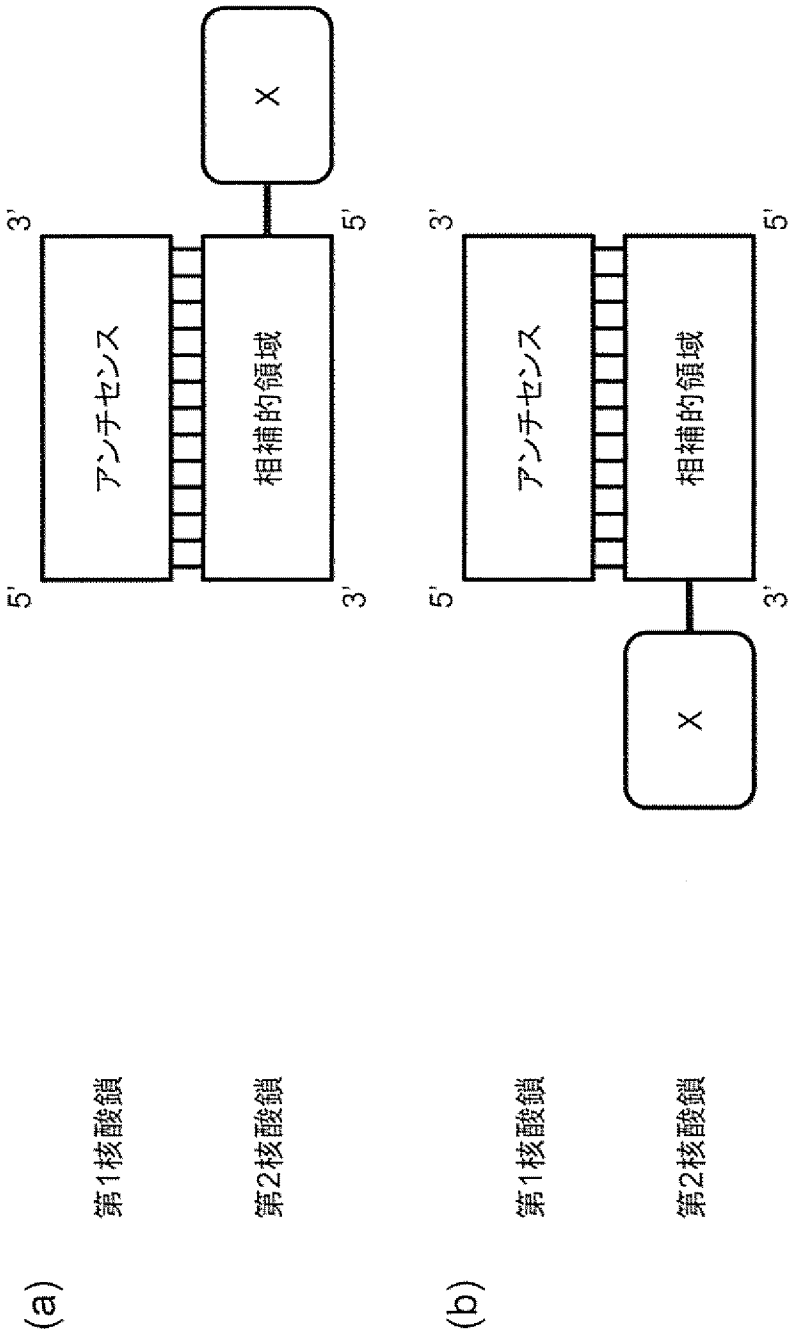
[図2]


(a)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
アンチセンス
相補的領域
オーバーハング領域
5'
3'
(b)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
アンチセンス
相補的領域
オーバーハング領域
5'
3'
(c)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
アンチセンス
相補的領域
オーバーハング領域
5'
3'

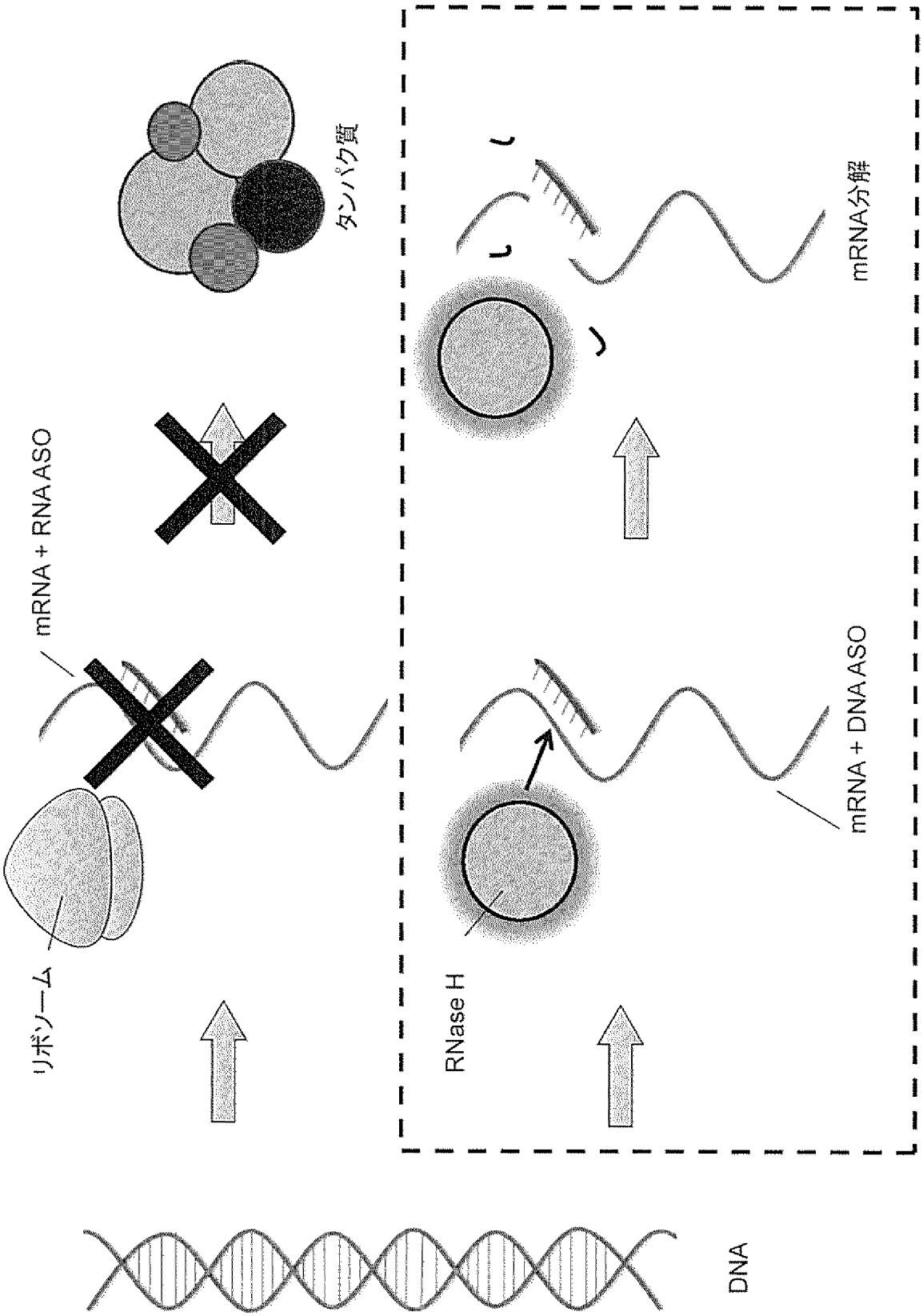
[図3]


(a)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
アンチセンス
相補的RNA領域
相補的DNA領域
5'
3'
3'
5'
(b)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
アンチセンス
相補的RNA領域
相補的DNA領域
3'
5'
5'
3'

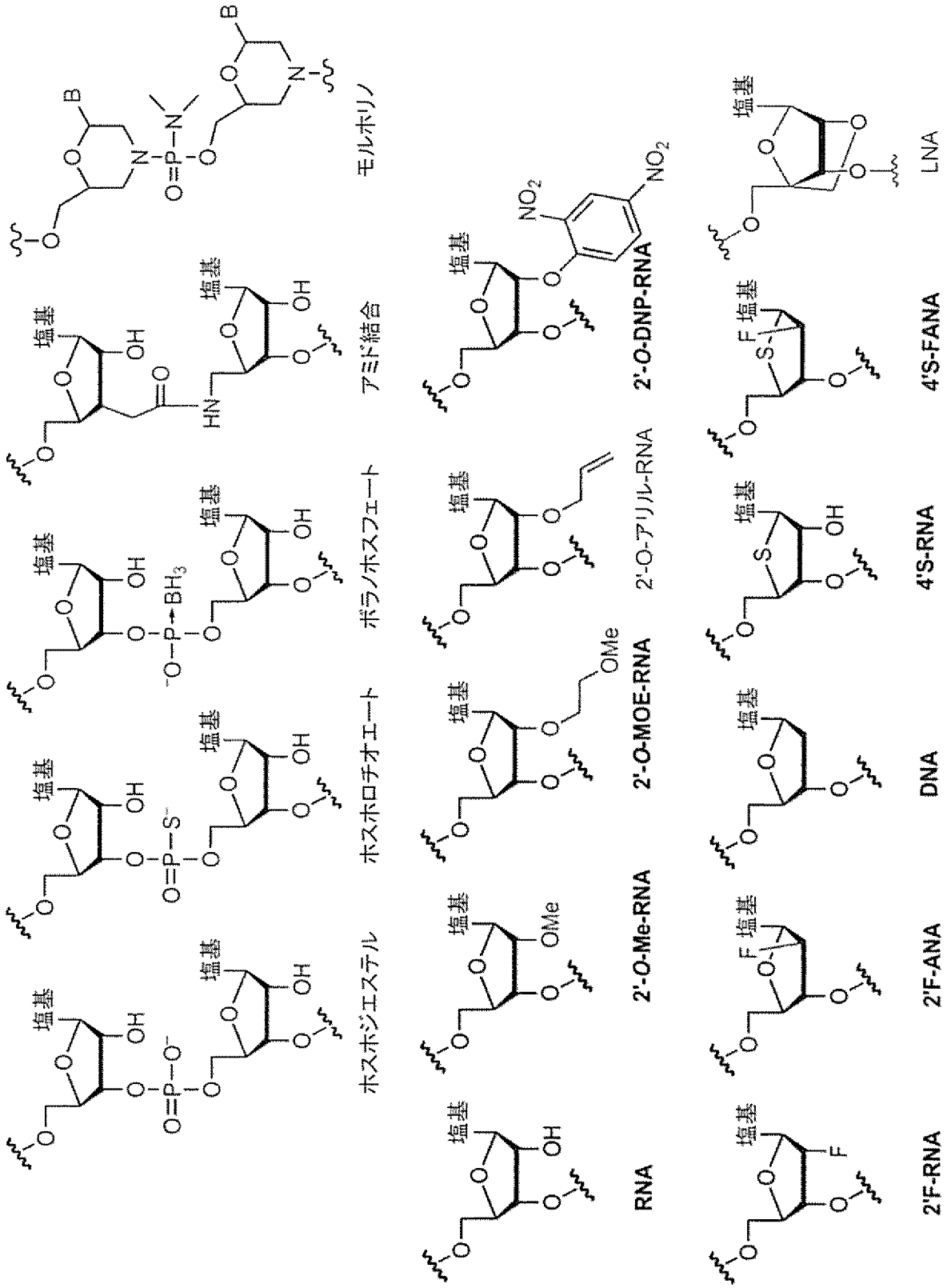
[図4]


(a)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
3'
5'
アンチセンス
相補的領域
X
(b)
第1核酸鎖
第2核酸鎖
5'
3'
アンチセンス
相補的領域
X

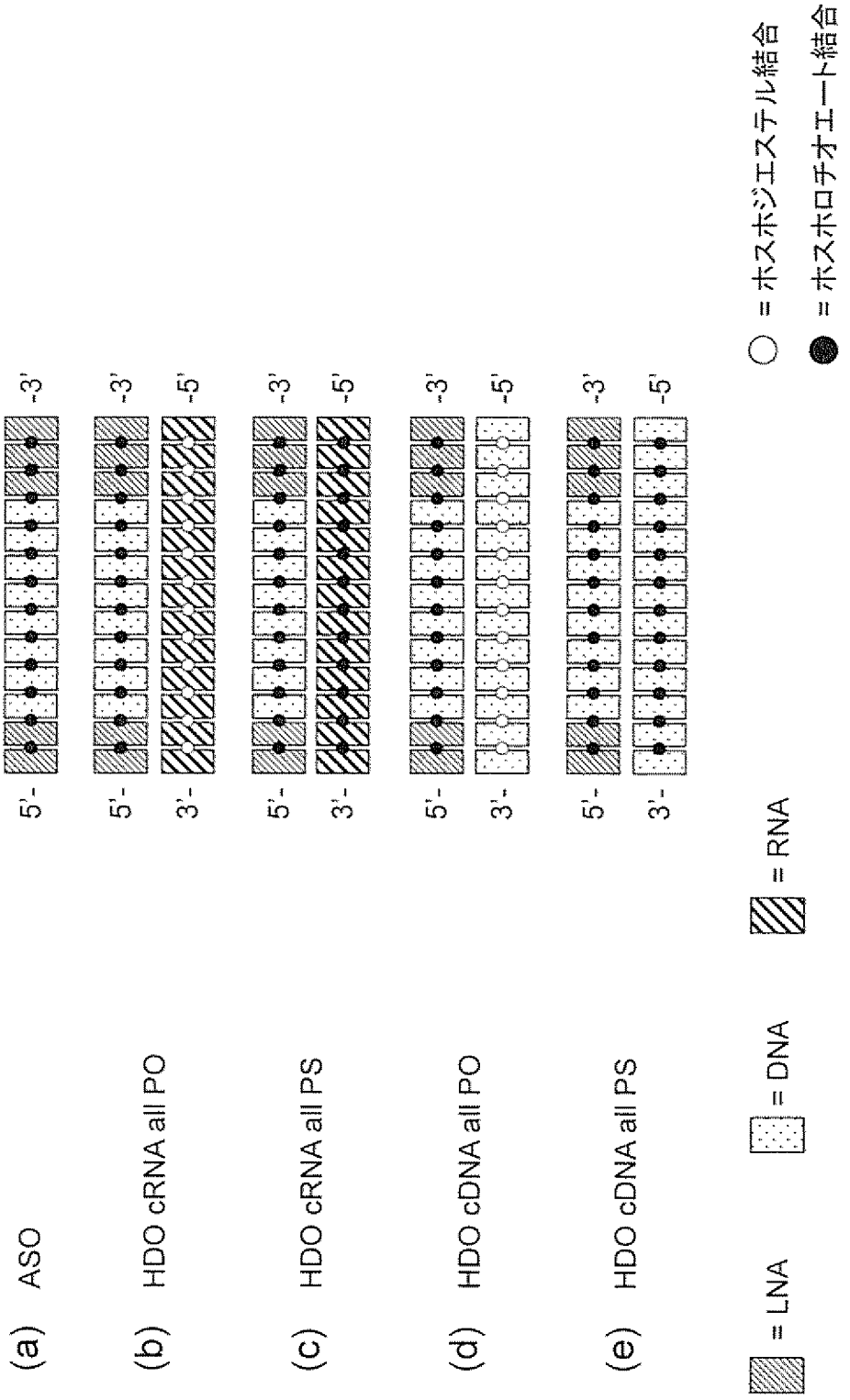
[図5]



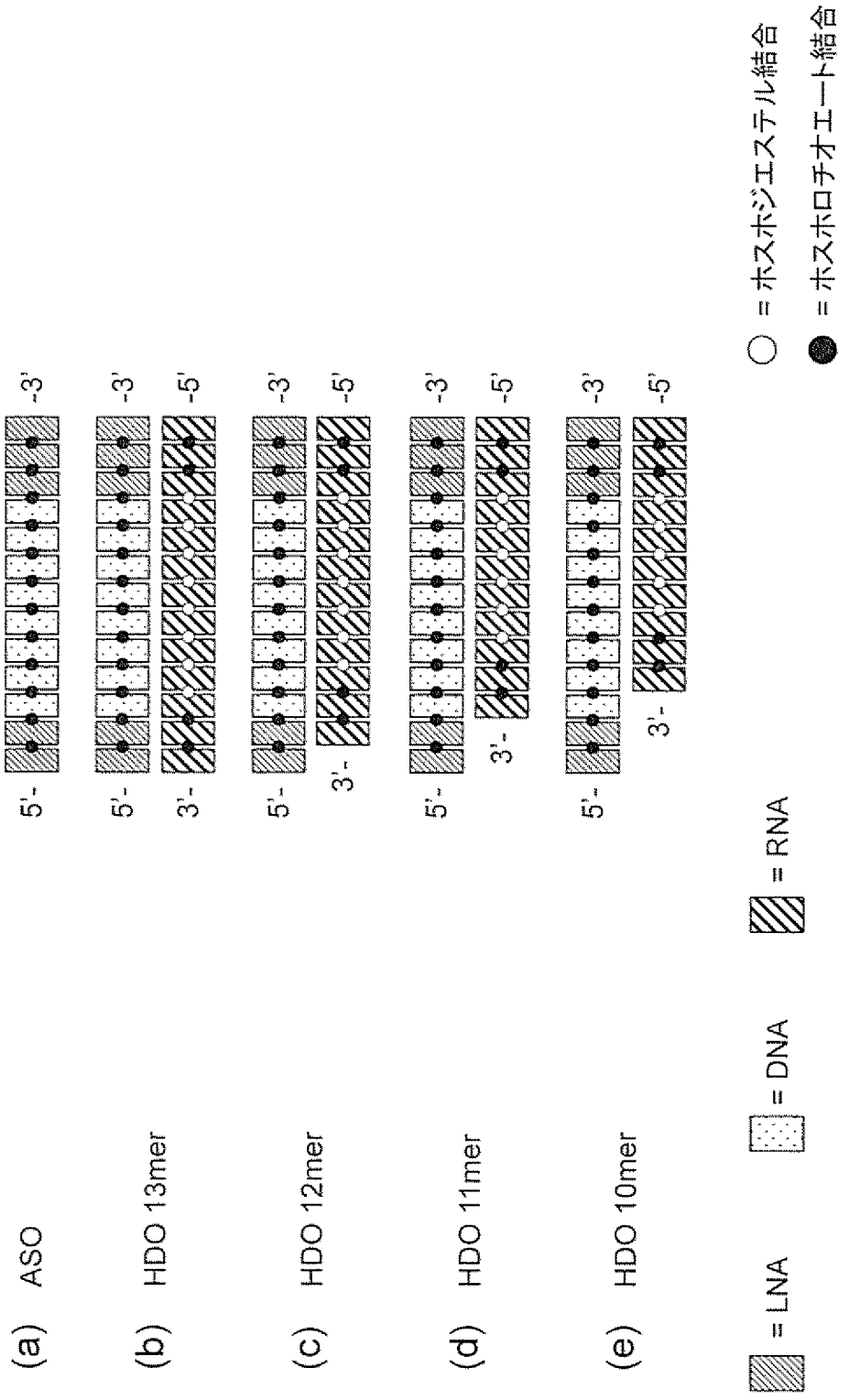
[図6]


モルホリノ
アミド結合
ボラノホスフェート
ホスホロチオエート
ホスホジエステル
2'-O-DNP-RNA
2'-O-アリル-RNA
2'-O-MOE-RNA
2'-O-Me-RNA
RNA
LNA
4'S-FANA
4'S-RNA
DNA
2'F-ANA
2'F-RNA
塩基
OH
OMe
F
S
NO2
BH3

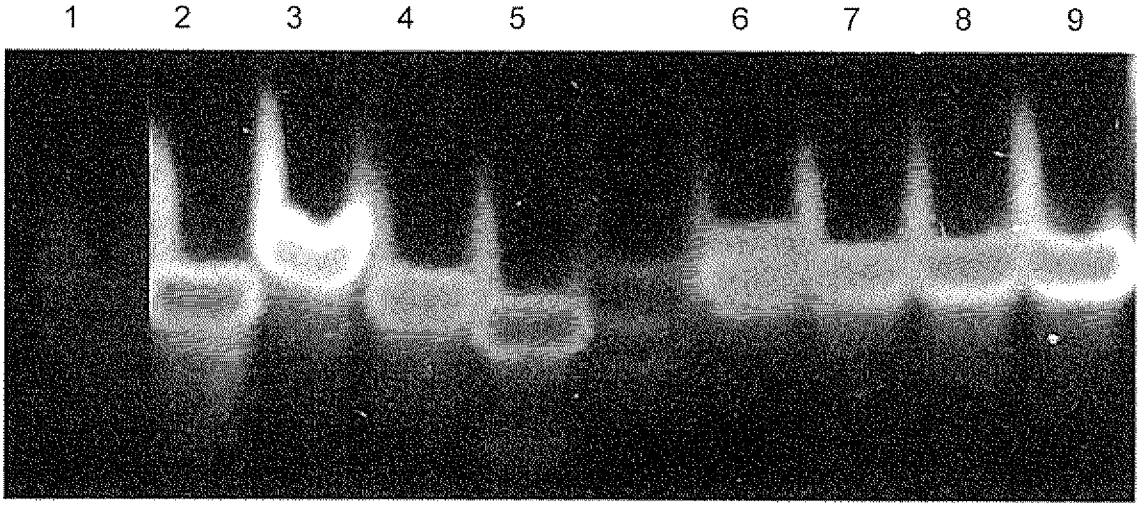
[図7]


(a) ASO
(b) HDO cRNA all PO
(c) HDO cRNA all PS
(d) HDO cDNA all PO
(e) HDO cDNA all PS
5'-
3'-
-3'
-5'
= LNA
= DNA
= RNA
○ = ホスホジエステル結合
● = ホスホロチオエート結合

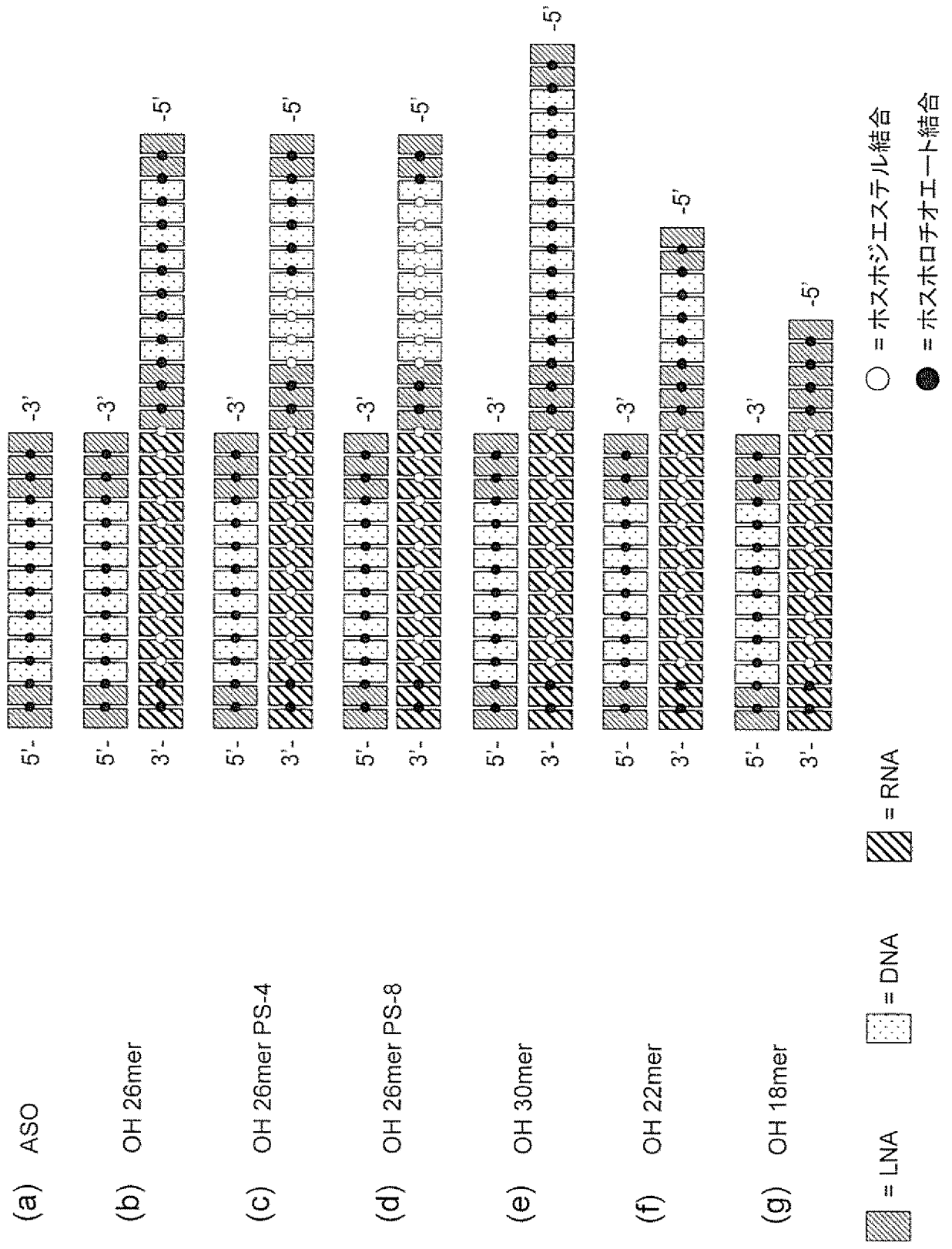
[図8]


(a) ASO
(b) HDO 13mer
(c) HDO 12mer
(d) HDO 11mer
(e) HDO 10mer
5'-
3'-
-3'
-5'
= LNA
= DNA
= RNA
○ = ホスホジエステル結合
● = ホスホロチオエート結合

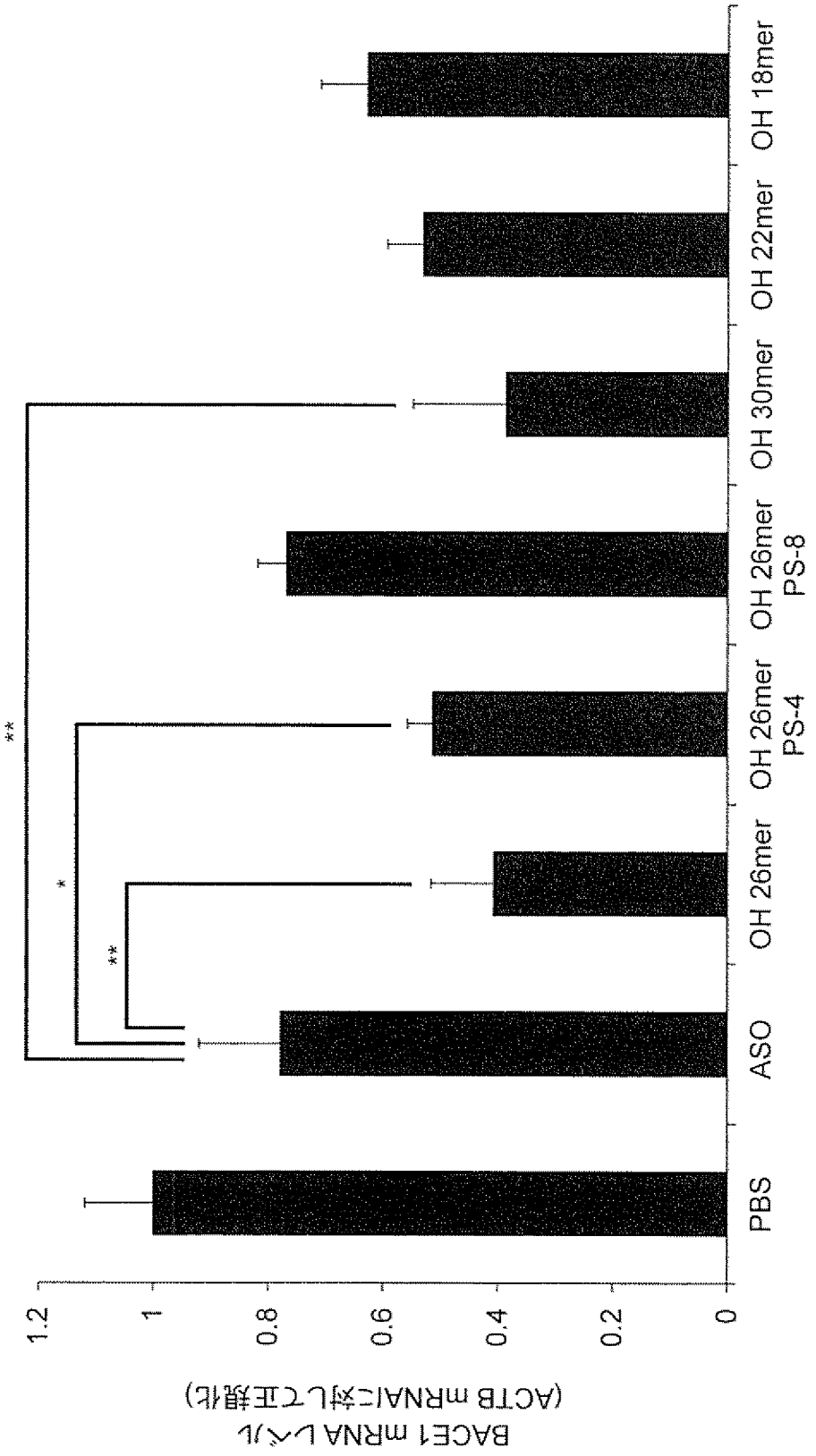
[図9]



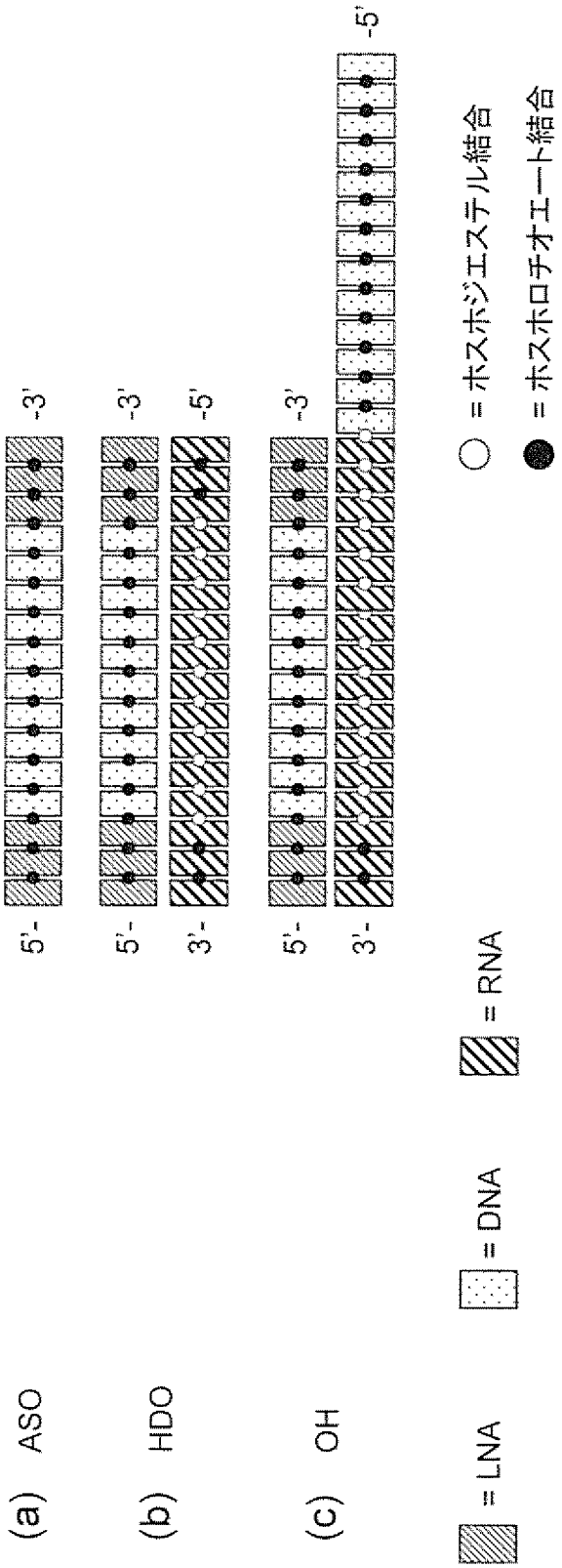
[図10]


(a) ASO
(b) OH 26mer
(c) OH 26mer PS-4
(d) OH 26mer PS-8
(e) OH 30mer
(f) OH 22mer
(g) OH 18mer
5'-
-3'
3'-
-5'
= LNA
= DNA
= RNA
○ = ホスホジエステル結合
● = ホスホロチオエート結合

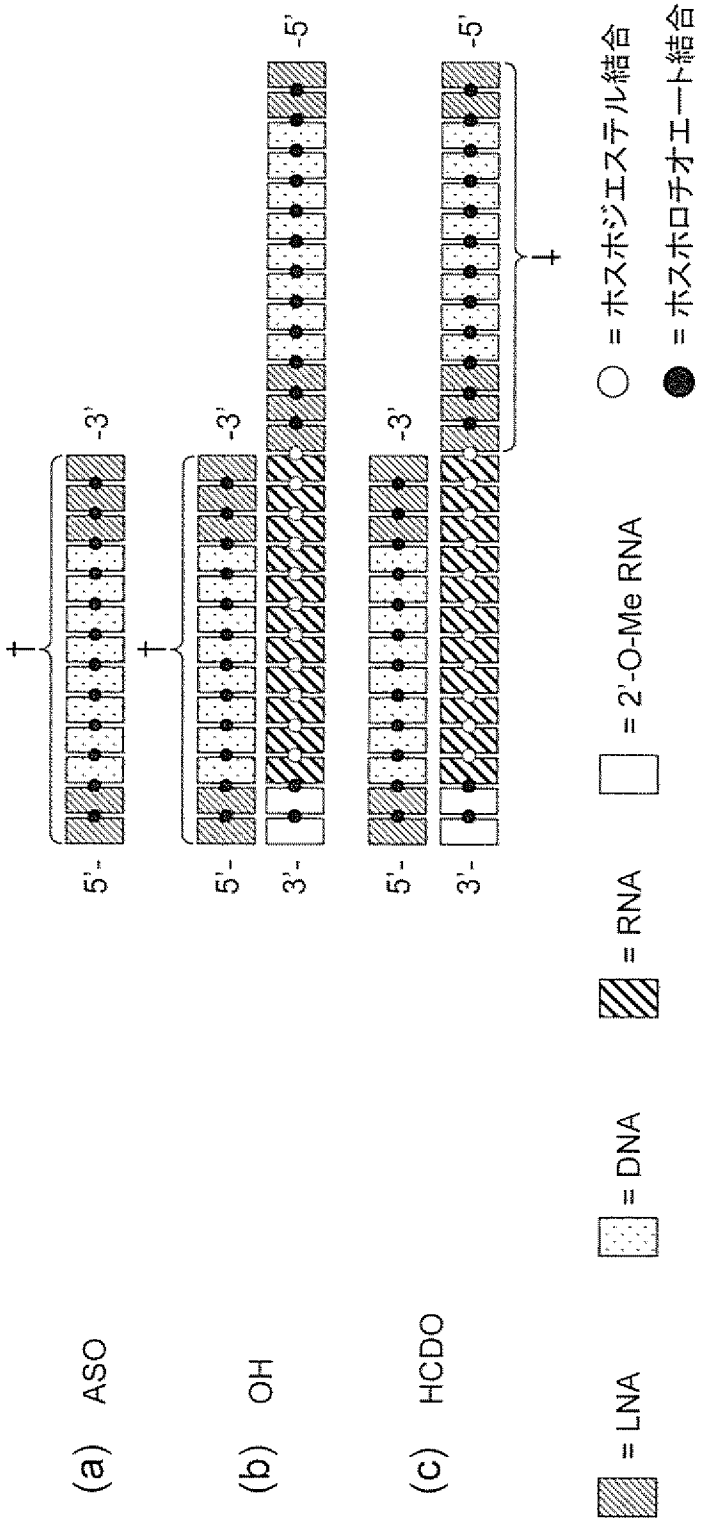
[図11]


BACE1 mRNA レベル
(ACTB mRNAに対して正規化)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PBS
ASO
OH 26mer
OH 26mer
PS-4
OH 26mer
PS-8
OH 30mer
OH 22mer
OH 18mer
**
*
**

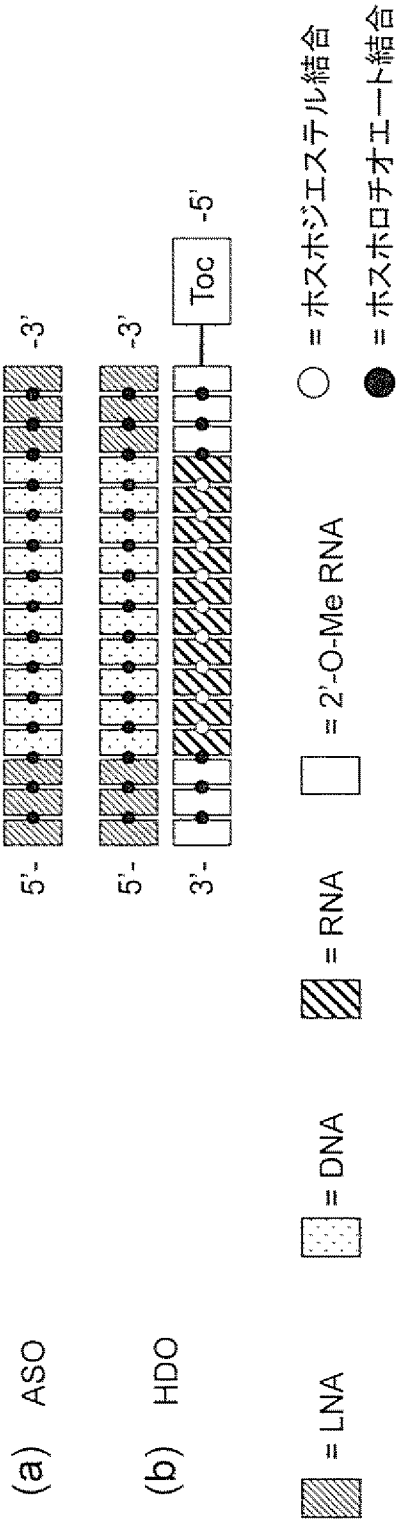
[図12]



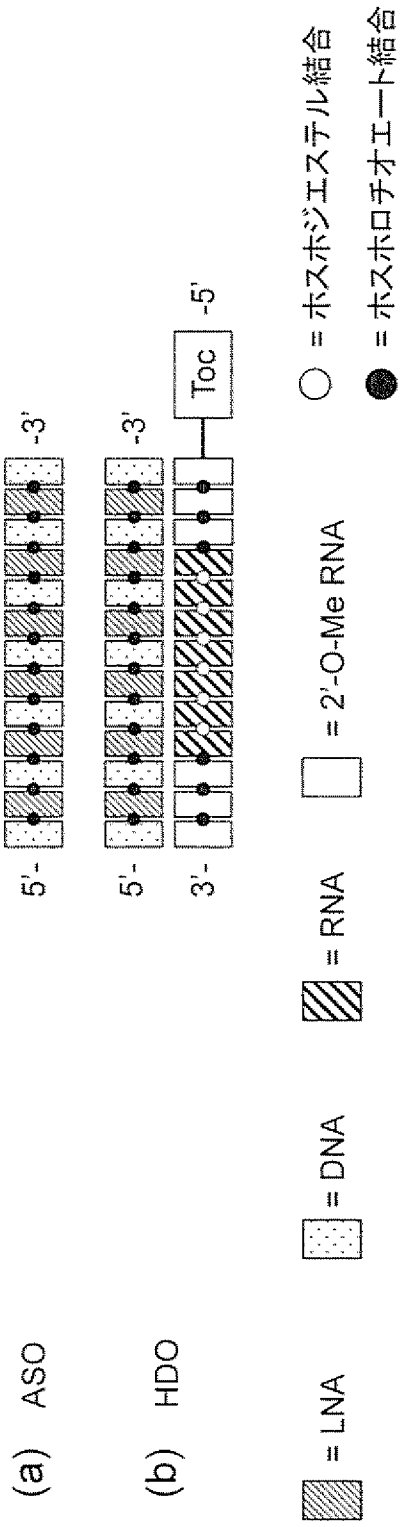
[図13]


(a) ASO
(b) OH
(c) HCDO
5'-
-3'
3'-
-5'
= LNA
= DNA
= RNA
= 2'-O-Me RNA
○ = ホスホジエステル結合
● = ホスホロチオエート結合

[図14]


(a) ASO
(b) HDO
5'-
3'-
Toc
-5'
= LNA
= DNA
= RNA
= 2'-O-Me RNA
= ホスホジエステル結合
= ホスホロチオエート結合

[図15]


(a) ASO
(b) HDO
5'-
-3'
3'-
Toc
-5'
= LNA
= DNA
= RNA
= 2'-O-Me RNA
○ = ホスホジエステル結合
● = ホスホロチオエート結合

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/011464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. A61K31/713(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. A61K31/713, A61P25/00, C12N15/09, 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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	大谷木正貴他，核酸医薬による神経変性疾患の治療，生体の科学, 15 August 2016, vol. 67, no. 4, pp. 349-353, page 350, drawings, page 350 "1. Antisense oligonucleotide", page 351, left column to right column "II. Oligonucleotide therapeutics delivery to the central nervous system", pp. 351-352 "III. Oligonucleotide therapeutics treatment in neurological degenerative diseases", page 349, table 1, (OHYAGI, Masaki et al., "Oligonucleotide therapeutics for treatment of neurological degenerative diseases", Seitai no Kagaku)	1-9,12-18 10,11

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 May 2019 (21.05.2019)	11 June 2019 (11.06.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/011464

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	KUWAHARA, H. et al., "Modulation of blood-brain barrier function by a heteroduplex oligonucleotide in vivo", SCIENTIFIC REPORTS, 12 March 2018, vol. 8, 4377, abstract, fig. 1, column "adverse effects of Toc-HDO"	1-9,12,14-18 10,11 13
Y	國枝泰希他, 新規の二本鎖核酸医薬：オーバーハングニ本鎖核酸, 日本核酸医薬学会第２回年会講演要旨集, 01 November 2016, p. 118, entire text, non-official translation (KUNIEDA, Taiki et al., "Novel double-stranded nucleic acid medicine: overhung double-stranded nucleic acid", Lecture abstracts of the 2nd annual conference of Nucleic Acids Therapeutics Society of Japan)	10,11
A	JP 2015-502134 A (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 22 January 2015 & US 2014/0302603 A1 & WO 2013/089283 A1 & EP 2791335 A1 & CN 104126010 A	1-18
PX	WO 2018/062510 A1 (TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 05 April 2018 (Family: none)	1-18

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０１１４６４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/713(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/713, A61P25/00, C12N15/09, C12N15/113

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

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

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	大谷木正貴他，核酸医薬による神経変性疾患の治療，生体の科学，2016.08.15，vol.67，no.4，pp.349-353，３５０ページ図、３５０ページ「１．アンチセンス核酸」，３５１ページ左欄－右欄「II．中枢神経系への核酸医薬デリバリー」、３５１－３５２ページ「III.神経変性疾患における核酸医薬治療」、３４９ページ表１	1-9，12-18 10,11

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

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２１．０５．２０１９	１１．０６．２０１９

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

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｕ　９２１７
山村　祥子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y A	KUWAHARA H. et al., Modulation of blood-brain barrier function by a heteroduplex oligonucleotide in vivo, SCIENTIFIC REPORTS, 2018.03.12, Vol.8, 4377, ABSTRACT、Figure.1、「Adverse effects of Toc-HDO」の欄	1-9,12,14-18 10,11 13
Y	國枝泰希他, 新規の二本鎖核酸医薬：オーバーハング二本鎖核酸, 日本核酸医薬学会第２回年会 講演要旨集, 2016.11.01, p.118, 全文	10,11
A	JP 2015-502134 A (国立大学法人　東京医科歯科大学) 2015.01.22, & US 2014/0302603 A1 & WO 2013/089283 A1 & EP 2791335 A1 & CN 104126010 A	1-18
PX	WO 2018/062510 A1 (国立大学法人東京医科歯科大学) 2018.04.05, (ファミリーなし)	1-18