

(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
2017年4月27日(27.04.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/068791 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/004657
- (22) 国際出願日: 2016年10月21日(21.10.2016)
- (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 2015-209207 2015年10月23日(23.10.2015) JP
- (71) 出願人: レナセラピューティクス株式会社(RENA THERAPEUTICS INC.) [JP/JP]; 〒1010062 東京都千代田区神田駿河台二丁目3番地10 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 矢野 純一(YANO, Junichi); 〒1010062 東京都千代田区神田駿河台二丁目3番地10 レナセラピューティクス株式会社内 Tokyo (JP). 谷川 万顕(TANIGAWARA, Kazuaki); 〒1010062 東京都千代田区神田駿河台二丁目3番地10 レナセラピューティクス株式会社内 Tokyo (JP). 横田 隆徳(YOKOTA, Takanori); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 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 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 江崎 光史, 外(ESAKI, Koushi et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目8番1号虎の門電気ビル 江崎特許事務所 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, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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



WO 2017/068791 A1

(54) Title: NUCLEIC ACID COMPLEX HAVING AT LEAST ONE BULGE STRUCTURE

(54) 発明の名称: 少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸複合体

(57) Abstract: [Problem] To provide a nucleic acid complex, preferably a double-stranded nucleic acid complex, that has an excellent inhibitory action against target gene expression. [Solution] The present invention solves this problem using a nucleic acid complex, preferably a double-stranded nucleic acid complex, comprising: an active moiety that comprises an antisense nucleic acid which is complementary to a transcript, for example a transcript of a target gene; and a carrier moiety that comprises a nucleic acid which is complementary to the aforementioned nucleic acid and which has at least one bulge structure.

(57) 要約: 【課題】 優れた標的遺伝子発現抑制効果を有する核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体を提供すること。【解決手段】 転写産物、例えば標的遺伝子の転写産物に相補的なアンチセンス核酸を含む活性部分と、該核酸に相補的であり、かつ、少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸を含むキャリアー部分とを含む核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体を用いることにより、上記課題は解決される。

明 細 書

発明の名称：少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸複合体 技術分野

[0001] 本発明は、例えばアンチセンス効果によって、標的遺伝子の発現を抑制する活性を有する核酸、好ましくは二本鎖核酸に関し、より詳しくは、標的遺伝子の転写産物に相補的なアンチセンス核酸と、該核酸に相補的な核酸とを含み、この相補的核酸が少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸、好ましくは二本鎖核酸に関する。

背景技術

[0002] 近年、オリゴヌクレオチドは、核酸医薬と称される医薬品としての開発が進められており、特に標的遺伝子の選択性の高さや低毒性の観点から、アンチセンス法を利用した核酸医薬の開発が精力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（アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO））を細胞内に導入することにより、標的遺伝子がコードするタンパク質の発現を選択的に阻害する方法である。

[0003] ASOとしてRNAからなるオリゴヌクレオチドを細胞に導入した場合には、標的遺伝子の転写産物（mRNA）と当該ASOとが結合して、部分的に二本鎖が形成される。そして、この二本鎖が蓋の役割をして、リボソームによる翻訳を生じさせず、標的遺伝子がコードするタンパク質の発現が阻害されることが知られている。

[0004] 一方、ASOとしてDNAからなるオリゴヌクレオチドを細胞に導入した場合には、部分的にDNA-RNAのヘテロオリゴヌクレオチドが形成される。そして、RNase Hによってこの部分が認識され、標的遺伝子のmRNAが分解されるため、標的遺伝子がコードするタンパク質の発現が阻害される。また、ASOとしてDNAを用いた方（RNase H依存経路）がRNAを用いるよりも、多くの場合において遺伝子発現の抑制効果が高いこ

とも明らかになっている。

[0005] ASOとしてDNAを用いた場合のアンチセンス効果に関連して、特許文献1には、LNA/DNAギャップマーとそれに対するRNAからなる相補鎖とをアニーリングさせた二本鎖核酸複合体が開示されている。ここでは、当該二本鎖核酸のアンチセンス効果が、一本鎖のLNA/DNAギャップマーのそれと概して変わらないことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表2015-502134号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、優れた標的遺伝子発現抑制効果を有する核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体を提供することである。

[0008] 本発明のさらに別の目的は、優れた特異性と効率で、標的部位に送達可能な核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体を提供することである。

[0009] 本発明の他の目的は、以下の記載から明らかとなる。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者等は、転写産物、例えば標的遺伝子の転写産物に相補的なアンチセンス核酸を含む活性部分と、該核酸に相補的であり、かつ、少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸を含むキャリア一部分とを含む核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体を用いることにより、該転写産物の発現を著しく抑制できることを見出した。

[0011] 従って、本発明は以下に関する：

1. (i) デオキシリボヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドを含む活性部分、および

(ii) ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオ

チドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記（i）活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、

を含む核酸複合体であって、上記（ii）キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含む、核酸複合体。

2. 二本鎖核酸複合体である、上記1に記載の核酸複合体。

3. 上記（ii）キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが1～3つのバルジを含む、上記1または2に記載の核酸複合体。

4. 上記（i）活性部分のポリヌクレオチドにおけるデオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されている、上記1～3のいずれか1つに記載の核酸複合体。

5. 上記（i）活性部分におけるポリヌクレオチドが1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、上記1～4のいずれか1つに記載の核酸複合体。

6. 上記（i）活性部分におけるポリヌクレオチドが、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドを含み、そして

当該ポリヌクレオチドが、

（a）上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む5'ウィング領域、および／または、

（b）上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む3'ウィング領域、

を含む、

上記1～5のいずれか1つに記載の核酸複合体。

7. 上記（i）活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記（a）5'ウィング領域および（b）3'ウィング領域を含み、該5'ウィング領域は少なくとも2つの修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み

、該3' ウィング領域は、少なくとも2つの修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、上記6に記載の核酸複合体。

8. 上記5' ウィング領域が2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み、上記3' ウィング領域が2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、上記7に記載の核酸複合体。

9. 上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが1つまたは複数のヌクレオチドアナログを有し、該ヌクレオチドアナログの少なくとも1つが修飾されている、上記1～8のいずれか1つに記載の核酸複合体。

10. 上記(ii) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、1つまたは複数のヌクレオチドアナログを有し、該ヌクレオチドアナログの少なくとも1つが修飾されている、上記1～9のいずれか1つに記載の核酸複合体。

11. 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドが、ホスホロチオエート化されている、上記6～10のいずれか1つに記載の核酸複合体。

12. 上記5' ウィング領域および3' ウィング領域が、修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとして架橋化ヌクレオチドを含む、上記7～11のいずれか1つに記載の核酸複合体。

13. 上記架橋化ヌクレオチドが、LNA、cEt-BNA、アミドBNA (AmNA) 及びcMOE-BNAからなる群から選択される、上記12に記載の核酸複合体。

14. 上記架橋化ヌクレオチドがホスホロチオエート化されている、上記12または13に記載の核酸複合体。

15. 上記(ii) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含む、上記1～14のいずれか1つに記載の核酸複合体。

16. 上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドの長さが8～100塩基である、上記1～15のいずれか1つに記載の核酸複合体。

17. 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さが、8～100塩基である、上記1～16のいずれか1つに記載の核酸複合体。

18. 上記 (i i) キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドと同じ長さを有する、上記1～17のいずれか1つに記載の核酸複合体。

19. 上記 (i i) キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドの長さが、上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さとは異なる、上記1～18のいずれか1つに記載の核酸複合体。

20. 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、構成単位のヌクレオチドとして、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドを含む、上記1～19のいずれか1つに記載の核酸複合体。

21. 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドを含まない、上記1～9、11～20のいずれか1つに記載の核酸複合体。

22. 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、ヌクレオチドアナログを含まない、上記1～9、11～21のいずれか1つに記載の核酸複合体。

23. バルジが、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドから形成される、上記1～22のいずれか1つに記載の核酸複合体。

24. バルジが、リボヌクレオチドから形成される、上記23に記載の核酸複合体。

25. 上記 (i i) キャリアー部分が、標識機能、精製機能及び標的への送達機能から選択される機能を有する機能性部分をさらに含む、上記1～24のいずれか1つに記載の核酸複合体。

26. 上記機能性部分が、脂質、ペプチド及びタンパク質から選択される分子である、上記25に記載の核酸複合体。

27. 哺乳動物において標的遺伝子の発現を減少させるための、上記1～26のいずれか1つに記載の核酸複合体。

28. 活性部分におけるポリヌクレオチドが、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、上記27に記載の核酸複合体。

29. 上記1～28のいずれか1つに記載の核酸複合体と、任意に薬理的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

30. 上記1～26のいずれか1つに記載の核酸複合体を細胞と接触させる工程を含む、細胞内の転写産物レベルを低減する方法であって、

活性部分におけるポリヌクレオチドが該転写産物のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、方法。

31. 上記転写産物が、タンパク質をコードするmRNA転写産物である、上記30に記載の方法。

32. 上記転写産物が、タンパク質をコードしない転写産物である、上記30に記載の方法。

33. 哺乳動物において標的遺伝子の発現を低減させるための、上記1～26のいずれか1つに記載の核酸複合体の使用。

34. 哺乳動物において標的遺伝子の発現を低減させるための薬剤を製造するための、上記1～26のいずれか1つに記載の核酸複合体の使用。

35. 上記1～26のいずれか1つに記載の核酸複合体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において標的遺伝子の発現レベルを低減する方法であって、

活性部分におけるポリヌクレオチドが、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、方法。

36. 上記投与が経腸管的投与である、上記35に記載の方法。

37. 上記投与が非経腸管的投与である、上記35に記載の方法。

38. 上記核酸複合体の投与量が、 $0.001\text{ mg/kg/day} \sim 50\text{ mg/kg/day}$ である、上記35～37のいずれか1つに記載の方法。

39. 上記哺乳動物がヒトある、上記35～38のいずれか1つに記載の方

法。

[0012] また、本発明はさらなる態様として以下も包含し得る：

1. (i) デオキシリボヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドを含む活性部分、および

(ii) ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、を含む核酸複合体であって、上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含む、核酸複合体。

2. 二本鎖核酸複合体である、上記1に記載の核酸複合体。

3. 上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが1～3つのバルジを含む、上記1または2に記載の核酸複合体。

4. 上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが1つのバルジを含む、上記3に記載の核酸複合体。

5. 上記(i)活性部分のポリヌクレオチドにおけるデオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されている、上記1～4のいずれか1つに記載の核酸複合体。

6. 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、上記1～5のいずれか1つに記載の核酸複合体。

7. 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが1つまたは複数のヌクレオチドアナログを含み、該ヌクレオチドアナログの少なくとも1つが修飾されていてもよい、上記1～6のいずれか1つに記載の核酸複合体。

8. 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドを含み、そして

当該ポリヌクレオチドが、

(a) 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む5'ウィング領域、および／または、

(b) 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む3'ウィング領域、

を含む、

上記1～7のいずれか1つに記載の核酸複合体。

9. 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(a)5'ウィング領域および(b)3'ウィング領域を含む、上記8に記載の核酸複合体。

10. 上記5'ウィング領域が2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み、上記3'ウィング領域が2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、上記8または9に記載の核酸複合体。

11. 上記5'ウィング領域が1個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み、上記3'ウィング領域が1個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、上記8または9に記載の核酸複合体。

12. 上記5'ウィング領域および3'ウィング領域が、糖修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとして架橋化ヌクレオチドを含む、上記8～11のいずれか1つに記載の核酸複合体。

13. 上記架橋化ヌクレオチドが、LNA、cEt-BNA、アミドBNA (AmNA) 及びcMOE-BNAからなる群から選択される、上記12に記載の核酸複合体。

14. 上記架橋化ヌクレオチドがホスホロチオエート化されている、上記13に記載の核酸複合体。

15. 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドが、ホスホ

ロチオエート化されている、上記 8～14 のいずれか 1 つに記載の核酸複合体。

16. 上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、ホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる 5' ウィング領域、ホスホロチオエート化されているデオキシリボヌクレオチドおよびホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる 3' ウィング領域からなる、上記 8～15 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

17. 上記 5' ウィング領域が 1～5 個の糖修飾リボヌクレオチドからなり、上記 3' ウィング領域が 1～5 個の糖修飾リボヌクレオチドからなり、そして、糖修飾リボヌクレオチドはさらにホスホロチオエート化されていてもよい、上記 8 または 9 に記載の核酸複合体。

18. 上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、ホスホロチオエート化された糖修飾リボヌクレオチドからなる 5' ウィング領域、ホスホロチオエート化されている少なくとも 4 つの連続したデオキシリボヌクレオチドおよびホスホロチオエート化された糖修飾リボヌクレオチドからなる 3' ウィング領域からなる、上記 17 に記載の核酸複合体。

19. 上記糖修飾が、2' -O-メチル化、2' -O-メトキシエチル (MOE) 化、2' -O-アミノプロピル (AP) 化および 2' -フルオロ化からなる群から選択される、上記 17 または 18 に記載の核酸複合体。

20. 上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、ホスホロチオエート化された少なくとも 4 つの連続したデオキシリボヌクレオチドからなる、上記 1～5 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

21. 上記 (ii) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、構成単位としてデオキシリボヌクレオチドを含む、上記 1～20 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

22. 上記 (ii) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチドからなる、上記 21 に記載の核酸複合体。

23. 上記 (ii) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、構成単位

としてリボヌクレオチドを含む、上記 1～21 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

24. 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドからなる、上記 21 または 23 に記載の核酸複合体。

25. 上記リボヌクレオチドが修飾されていない、上記 23 または 24 に記載の核酸複合体。

26. 上記デオキシリボヌクレオチドが修飾されていない、上記 21～25 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

27. 上記デオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されている、上記 21～25 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

28. 上記修飾デオキシリボヌクレオチドが、塩基修飾デオキシリボヌクレオチドである、上記 27 に記載の核酸複合体。

29. 上記塩基修飾デオキシリボヌクレオチドが、脱塩基デオキシリボヌクレオチドである、上記 28 に記載の核酸複合体。

30. 上記修飾デオキシリボヌクレオチドが塩基修飾以外の修飾を受けていない、上記 27～29 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

31. バルジが、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドから形成される、上記 1～30 のいずれか一つに記載の核酸複合体。

32. バルジが、デオキシリボヌクレオチドから形成される、上記 31 に記載の核酸複合体。

33. バルジが、修飾されていないデオキシリボヌクレオチドから形成される、上記 32 に記載の核酸複合体。

34. バルジが、塩基修飾デオキシリボヌクレオチドから形成される、上記 32 に記載の核酸複合体。

35. バルジが、リボヌクレオチドから形成される、上記 31 に記載の核酸複合体。

36. バルジが、修飾されていないリボヌクレオチドから形成される、上記

35に記載の核酸複合体。

37. 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドに対しておよび／または標的転写産物に対して少なくとも1つのミスマッチを含む、上記1～36のいずれか1つに記載の核酸複合体。

38. 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドに対するおよび／または標的転写産物に対するミスマッチを含まない、上記1～36のいずれか1つに記載の核酸複合体。

39. 上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含む、上記1～38のいずれか1つに記載の核酸複合体。

40. 上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対するミスマッチを含まない、上記1～38のいずれか1つに記載の核酸複合体。

41. 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドの長さが8～100塩基である、上記1～40のいずれか1つに記載の核酸複合体。

42. 上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さが、8～100塩基である、上記1～41のいずれか1つに記載の核酸複合体。

43. 上記(ii)キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドと同じ長さを有する、上記1～42のいずれか1つに記載の核酸複合体。

44. 上記(ii)キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドの長さが、上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さとは異なる、上記1～42のいずれか1つに記載の核酸複合体。

45. 上記(ii)キャリアー部分が、標識機能、精製機能及び標的への送

達機能から選択される機能を有する機能性部分をさらに含む、上記1～44のいずれか1つに記載の核酸複合体。

46. 上記(i i) キャリアー部分が標的への送達機能を有する機能性部分を含み、当該機能性部分が、脂質、ペプチド、タンパク質、糖鎖、低分子および生体分子/生体活性分子からなる群から選択される分子である、上記45に記載の核酸複合体。

47. 上記機能性部分が、環状アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)配列含有ペプチド、N-アセチルガラクトサミン、コレステロール、ビタミンE(トコフェロール)、ステアリン酸、ドコサン酸、アニスアミド、葉酸、アナンダミドまたはスペルミンである、上記46に記載の核酸複合体。

48. 上記(i i) キャリアー部分が標的への送達機能を有する機能性部分を含まない、上記1～44のいずれか一つに記載の核酸複合体。

49. (i) ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチド、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、2～5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5'ウィング領域および上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、2～5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3'ウィング領域を構成単位として含むポリヌクレオチドを含む活性部分、ならびに

(i i) 構成単位としての修飾されていないリボヌクレオチドおよび修飾されていないデオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリアー部分、を含む、二本鎖核酸複合体であって、

上記(i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含み、当該バルジは修飾されていないリボヌクレオチドから形成され、

上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記 (i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対するおよび／または標的転写産物に対するミスマッチを含まず、かつ

上記 (i i) キャリア一部分が標的への送達機能を有する機能性部分を含まない、二本鎖核酸複合体。

50. 哺乳動物において標的遺伝子の発現を減少させるための、上記 1～49のいずれか 1 つに記載の核酸複合体。

51. 活性部分におけるポリヌクレオチドが、標的遺伝子 mRNA のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、上記 50 に記載の核酸複合体。

52. 哺乳動物においてタンパク質をコードしない転写産物の発現を減少させるための、上記 1～49のいずれか 1 つに記載の核酸複合体。

53. 活性部分におけるポリヌクレオチドが、転写産物のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、上記 52 に記載の核酸複合体。

54. 上記 1～49のいずれか 1 つに記載の核酸複合体と、任意に薬理学的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

55. 上記 1～49のいずれか 1 つに記載の核酸複合体を細胞と接触させる工程を含む、細胞内の転写産物レベルを低減する方法であって、

活性部分におけるポリヌクレオチドが該転写産物のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、方法。

56. 上記転写産物が、タンパク質をコードする mRNA 転写産物である、上記 55 に記載の方法。

57. 上記転写産物が、タンパク質をコードしない転写産物である、上記 55 に記載の方法。

58. 哺乳動物において標的遺伝子の発現を低減させるための、上記 1～49のいずれか 1 つに記載の核酸複合体の使用。

59. 哺乳動物において標的遺伝子の発現を低減させるための薬剤を製造するための、上記 1～49のいずれか 1 つに記載の核酸複合体の使用。

60. 上記 1～49のいずれか 1 つに記載の核酸複合体を哺乳動物に投与す

る工程を含む、哺乳動物において標的遺伝子の発現レベルを低減する方法であって、

活性部分におけるポリヌクレオチドが、標的遺伝子 mRNA のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、方法。

61. 上記投与が経腸管的投与である、上記60に記載の方法。

62. 上記投与が非経腸管的投与である、上記60に記載の方法。

63. 上記核酸複合体の投与量が、 $0.001\text{ mg/kg/day} \sim 50\text{ mg/kg/day}$ である、上記60～62のいずれか1つに記載の方法。

64. 上記哺乳動物がヒトある、上記60～63のいずれか1つに記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明の少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体を用いることにより、標的転写産物、典型的には標的遺伝子の転写産物または標的ノンコーディングRNAの発現を極めて特異的かつ効率的に抑制することが可能である。また、当該核酸複合体に機能性部分を結合させることにより、生体の標的部位に極めて選択的かつ効率的に送達することが可能である。

[0014] 本発明では、DNAをベースとする核酸と、それに相補的な核酸とを含む二本鎖核酸複合体に少なくとも1つのバルジ構造を導入することにより、より優れたアンチセンス効果を達成できること、例えば、実施例でも実証されているように、動物組織内において一本鎖構造を有するASOよりも非常に優れた標的RNA発現阻害効果を示すことが見出された。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、A431細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする二本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図2]図2は、AsPC-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする二本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図3]図3は、A549細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的と

する2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図4]図4は、HCT116細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図5]図5は、A431細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性試験の結果を示す。

[図6]図6は、AsPC-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性試験の結果を示す。

[図7]図7は、A549細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性試験の結果を示す。

[図8]図8は、HCT116細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性試験の結果を示す。

[図9]図9は、PANC-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図10]図10は、Capan-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図11]図11は、Ls174T細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図12]図12は、HPAC細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図13]図13は、AsPC-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図14]図14は、HCT116細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図15]図15は、A549細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図16]図16は、A431細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図17]図17は、PANC-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子

を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図18]図18は、A549細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図19]図19は、A431細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図20]図20は、AsPC-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図21]図21は、HCT116細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図22]図22は、Caki-1細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図23]図23は、MCF-7細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図24]図24は、DU145細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図25]図25は、LNCaP細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図26]図26は、PC-3細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図27]図27は、HGC27細胞株を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図28]図28は、MKN-45細胞を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図29]図29は、OVCAR-3細胞を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図30]図30は、HepG2細胞を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図31]図31は、T24細胞を用いた場合の、ヒトBCL2遺伝子を標的と

する 2 本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験の結果を示す。

[図32]図 3 2 は、A 5 4 9 細胞株を用いた場合の、ヒト B C L 2 遺伝子を標的とする 2 本鎖核酸の m R N A 発現抑制活性試験の結果を示す。

[図33]図 3 3 は、D N A -バルジを基本骨格とする 2 本鎖核酸の膵癌細胞株肝臓転移マウスモデルにおける薬効評価結果を示す。

[図34]図 3 4 は、D N A -バルジ構造を基本骨格とする 2 本鎖核酸のマウス肝臓における M A L A T 1 遺伝子ノックダウン効果の検証結果を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 上述のように、本発明の核酸複合体は、(i) アンチセンス核酸 (D N A をベースとする核酸) を含む活性部分と (i i) 少なくとも 1 つのバルジ構造を有し、かつ、該アンチセンス核酸に少なくとも一部が相補的な核酸を含むキャリア部分とを含む核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体であり、本発明の 1 つの実施態様において、上記核酸複合体は、精製又は単離された核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体である。当該核酸複合体は、標的遺伝子の発現や転写産物 (タンパク質をコードする m R N A 転写産物またはタンパク質をコードしない転写産物) のレベルをアンチセンス効果によって抑制する活性を有する。

[0017] ここで、「活性部分」とは、上記核酸複合体の構成要素の 1 つであって、上記核酸複合体に関して意図する主要な効果、すなわち、標的遺伝子や標的転写産物 (以下、両者をまとめて「標的転写産物」とも呼ぶ) の発現を抑制する効果を達成するための機能を主として担うと考えられる部分、換言すると、標的転写産物の発現抑制活性を有する部分である。

[0018] 上記活性部分は、標的転写産物に対するアンチセンス核酸としてのポリヌクレオチドを含む。本発明の 1 つの実施態様において、上記活性部分はポリヌクレオチドであり、すなわち、ポリヌクレオチドのみからなる。

[0019] また、活性部分におけるポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび/またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含む。本発明の 1 つの実施態様において、活性部分にお

けるポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログのみを構成単位として含む。

[0020] 本発明において、「キャリアー部分」とは、上記核酸複合体の構成要素の1つであって、上記活性部分が標的転写産物に到達するまでの適切な期間、当該活性部分のキャリアーとしての機能を有すると考えられる部分である。

[0021] 上記キャリアー部分は、活性部分のポリヌクレオチドに対して少なくとも一部が相補的なポリヌクレオチドを含む。このような相補性により、当該キャリアー部分は、そこにおけるポリヌクレオチドが上記活性部分のポリヌクレオチドと二本鎖を形成し、それによってキャリアーとしての機能を果たす。本発明の1つの実施態様において、上記キャリアー部分はポリヌクレオチドであり、すなわち、ポリヌクレオチドのみからなる。

[0022] また、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含む。本発明の1つの実施態様において、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログのみを構成単位として含む。

[0023] 上記核酸複合体は、上記核酸複合体の所望の機能に応じて、上記の活性部分やキャリアー部分とは別のさらなる部分（例えば、機能性部分）を含むこともできる。上記核酸複合体は、このようなさらなる部分を、活性部分やキャリアー部分とは別の独立した部分として含むことも可能であり、あるいは、活性部分またはキャリアー部分に組み込む形で含むことも可能である。

[0024] 1つの実施態様において、上記核酸複合体は、活性部分およびキャリアー部分のみからなる。

[0025] 「アンチセンス効果」とは、標的転写産物（RNAセンス鎖）と、例えば、その部分配列に相補的なDNA鎖、又は通常アンチセンス効果が生じるように設計された鎖等とがハイブリダイズすることによって生じる、標的遺伝子の発現又は標的転写産物レベルの抑制を意味する。ある場合において、ハイブリダイゼーション産物により前記転写産物を被覆することによって生じ

得る翻訳の阻害又はエキソスキッピング等のスプライシング機能変換効果、及び／又は、ハイブリダイズした部分が認識されることにより生じ得る前記転写産物の分解によって生じる、前記抑制を意味する。

[0026] アンチセンス効果によって発現が抑制される「標的遺伝子」又は「標的転写産物」としては、特に制限はなく、例えば、各種疾患において発現が亢進してい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から転写されたmRNAのことであり、塩基の修飾を受けていないmRNAや、スプライシングを受けていないmRNA前駆体等も含まれる。通常、「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、いかなるRNAでもよく、例えばノンコーディングRNAも含まれる。

[0027] 「精製又は単離された核酸複合体」という文言は、ここでは少なくとも2のポリヌクレオチド鎖を含む核酸複合体であって、天然では生じないもの、および／または、天然に生じる核酸物質を実質的に含まないものを意味する。

[0028] 本発明の1つの態様において、上記核酸複合体は二本鎖核酸複合体である。

[0029] 「相補的」という文言は、ヌクレオチドの塩基が他のヌクレオチドの塩基と、水素結合を介して、いわゆるワトソン-クリック型塩基対（天然型塩基対）や非ワトソン-クリック型塩基対（フーグスティーン型塩基対等）を形成できる関係のことを意味する。例えば、DNAにおいては、アデニン（A）がチミジン（T）に対して相補的であり、RNAにおいては、アデニン（A）はウラシル（U）に対して相補的である。

[0030] 例えば、活性部分のポリヌクレオチドのある位置のヌクレオチドが、標的遺伝子の転写産物のある位置のヌクレオチドと水素結合を介して塩基対を形成できる場合、上記ポリヌクレオチドと上記転写産物は、当該水素結合の位置において相補的であると考えられる。

[0031] あるポリヌクレオチドが他のポリヌクレオチドとハイブリダイズもしくは

アニーリング（本明細書では、これらの語を互換的に使用する）するためには、両ポリヌクレオチドは、塩基配列の全ての位置において相補的である必要はない。そして、本発明に関しても、核酸複合体が機能を発揮するためには、塩基配列の全ての位置において相補的である必要はなく、一部の位置におけるミスマッチが許容される。

[0032] 例えば、標的転写産物の塩基配列と、上記（i）活性部分におけるポリヌクレオチドの塩基配列とは、完全に相補的である必要はなく、すなわち、両者は全ての位置で相補的である必要はない。

[0033] 本発明では、活性部分におけるポリヌクレオチドは、その少なくとも一部が、標的転写産物に対して相補的である。本発明の1つの実施態様において、標的転写産物の塩基配列と活性部分におけるポリヌクレオチドの塩基配列は、その少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上、または100%）が相補的であればよい。例えば、70%のヌクレオチドが相補的な場合、両者は70%の「相補性」を有する。本発明の好ましい1つの実施態様において、両者は完全に相補的であり、すなわち、100%の相補性を有する。

[0034] なお、2つのポリヌクレオチドの相補性（例えば、標的転写産物と活性部分のポリヌクレオチドとの相補性）は、両者が異なる長さを有する場合には、二本鎖形成領域（ミスマッチを含む場合にはそれらを含めた二本鎖形成領域全体）における相補性として算出することができる。

[0035] 配列の相補性は、BLASTプログラム等を利用することにより決定することができる。そして、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。

[0036] 本発明では、活性部分におけるポリヌクレオチドとキャリア一部分におけるポリヌクレオチドが、上述の相補性に基づいて「アニーリング」し、二本鎖を形成することができる。当業者であれば、2本の核酸鎖がアニーリング

できる条件（温度、塩濃度等）を容易に決定することができる。

[0037] ここでは、「核酸」とはモノマーヌクレオチドを意味する場合もあり、複数のモノマーから構成されるオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドを意味する場合もある。「核酸鎖」という文言は、ここではオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドを称するためにも用いられる。核酸鎖は、その全部又は一部を、自動合成機の使用といった化学合成法によって調製してもよく、ポリメラーゼ、ライゲース又は制限酵素反応に限定されるわけではないが、酵素処理により調製してもよい。

[0038] 本発明では、活性部分におけるポリヌクレオチドは「デオキシリボヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ」を構成単位として少なくとも含む。この文言は、上記ポリヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチドを有し、また任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを更に有していてもよいということの意味する。

[0039] キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、「ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ」を構成単位として少なくとも含む。この文言は、上記ポリヌクレオチドが、ヌクレオチドを有し、また任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを更に有していてもよいということの意味する。ここで、必須の構成単位である上記ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドであっても、リボヌクレオチドであっても、これらの組み合わせであってもよい。また、当該ヌクレオチドはそれぞれ独立に、修飾されていても、修飾されていなくてもよい。

[0040] 活性部分におけるポリヌクレオチドの長さは特に制限はないが、好ましくは少なくとも8塩基であり、少なくとも10塩基であり、少なくとも12塩基であり、少なくとも13塩基であり、少なくとも14塩基であり、又は少なくとも15塩基である。前記長さは、好ましくは100塩基以下、35塩基以下、25塩基以下、20塩基以下、19塩基以下、18塩基以下または17塩基以下であることができる。前記長さの範囲は、好ましくは10～35塩基であり、より好ましくは12～25塩基であり、さらに好ましくは1

3～20塩基である。通常、前記標的に対する核酸鎖によるアンチセンス効果の強さや、費用、合成収率等の他の要素に応じて、前記長さは選択される。

[0041] 本発明の1つの実施形態において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、標的転写産物に少なくとも一部が相補的なアンチセンスポリヌクレオチドであって、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドを含む領域を有するポリヌクレオチドであることができる。

[0042] 「少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチド」は、4～20塩基の連続したデオキシリボヌクレオチドを含む領域であることができ、好ましくは5～16塩基の連続したデオキシリボヌクレオチドを含む領域であり、より好ましくは6～14塩基、例えば7～13塩基の連続したデオキシリボヌクレオチドを含む領域である。この領域には、天然型DNAのような、リボヌクレオチドにハイブリダイズした際に、RNA鎖を切断するRNase Hによって認識されるヌクレオチドを用いることができる。また、本発明の1つの実施態様において、上記デオキシリボヌクレオチドにおいて、各ヌクレオチドは互いに独立に修飾されていてもよく、デオキシリボヌクレオチドに関して利用可能な修飾はこの分野において知られている。

[0043] 本明細書において、「ヌクレオチド」とはヌクレオシドの糖部分がリン酸とエステルをつくっている化合物を意味し、ここで「ヌクレオシド」とは、プリン塩基またはピリミジン塩基のような窒素を含む有機塩基と糖の還元基とがグリコシド結合によって結合した配糖体化合物を意味する。

[0044] また、「デオキシリボヌクレオチド」は、糖部分がD-2-デオキシリボースからなるヌクレオチドであり、「リボヌクレオチド」は、糖部分がD-リボースからなるヌクレオチドである。

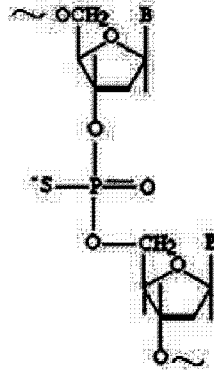
[0045] 「ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドを基本単位とし、リン酸が各ヌクレオチド間で糖の3'と5'位炭素の間にジエステル結合の橋をつくって結ばれた、複数のヌクレオチドが重合した鎖状の物質を意味する。これは、

いわゆるオリゴヌクレオチドも包含する。なお、本明細書では、このようなポリヌクレオチドにその構成単位として含まれるヌクレオチド（重合した状態にある）についても同様に「ヌクレオチド」と呼ぶ。

[0046] ここで、上記「デオキシリボヌクレオチド」は、天然に存在するデオキシリボヌクレオチド、又はその塩基、糖若しくはリン酸塩結合のサブユニットが修飾されているデオキシリボヌクレオチドを意味する。同様に、「リボヌクレオチド」は、天然に存在するリボヌクレオチド、又はその塩基、糖若しくはリン酸塩結合のサブユニットが修飾されているリボヌクレオチドを意味する。塩基、糖又はリン酸塩結合のサブユニットの修飾とは、1の置換基の付加、又は、サブユニット内における1の置換のことであり、サブユニット全体を異なる化学基に置換することではない。DNA分解酵素等に対する耐性が高いという観点から、デオキシリボヌクレオチドからなる領域はその一部または全部が修飾されたヌクレオチドであってもよい。このような修飾としては、例えば、シトシンの5-メチル化、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、N4-メチル化、チミジンの5-デメチル化、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、アデニンのN6-メチル化、8-ブロモ化、グアニンのN2-メチル化、8-ブロモ化、ホスホロチオエート化、メチルホスホネート化、メチルチオホスホネート化、キラル-メチルホスホネート化、ホスホロジチオエート化、ホスホロアミデート化、2'-O-メチル化、2'-メトキシエチル(MOE)化、2'-アミノプロピル(AP)化、2'-フルオロ化が挙げられるが、体内動態に優れているという観点から、ホスホロチオエート化が好ましい(チオリン酸結合)。なお、ホスホロチオエート化結合は、天然の核酸間結合であるホスホジエステル結合と、リン酸基の酸素原子の一つを硫黄原子に置換した構造を有し、以下の式で表される(この式中、Bは塩基を表す)：

[0047]

[化1]



[0048] また、同様の効果を奏するために、本発明では、ポリヌクレオチドがリボヌクレオチドを含む場合、リボヌクレオチドに同様の修飾を施してもよい。なお、天然に存在するリボヌクレオチド／デオキシリボヌクレオチドとしては、通常、アデニン、グアニン、シトシン及びウラシルのいずれかの塩基を有するリボヌクレオチドが連結したRNA、アデニン、グアニン、シトシン及びチミンのいずれかの塩基を有するデオキシリボヌクレオチドが連結したDNAが該当するが、本発明におけるリボヌクレオチド／デオキシリボヌクレオチドは、上記の塩基以外の塩基、例えばイノシンやデオキシイノシンを塩基として有することもできる。

[0049] 従って、本発明の1つの実施態様において、上記活性部分におけるポリヌクレオチドは、塩基としてイノシンを有するリボヌクレオチドまたはデオキシイノシンを有するデオキシリボヌクレオチドを少なくとも1つ、好ましくは1～6個、例えば1つ、含むことができる。同様に、上記キャリアー部分におけるポリヌクレオチドも、塩基としてイノシンを有するリボヌクレオチドまたはデオキシイノシンを有するデオキシリボヌクレオチドを少なくとも1つ、好ましくは1～6個、例えば3～5個、含むことができる。

[0050] 本発明のさらなる実施態様において、上記活性部分におけるポリヌクレオチドは、塩基としてイノシンを有するリボヌクレオチドも、デオキシイノシンを有するデオキシリボヌクレオチドも含まない。本発明の別の実施態様において、上記キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、塩基としてイノシンを有するリボヌクレオチドも、デオキシイノシンを有するデオキシリボ

ヌクレオチドも含まない。

[0051] 当業者であれば、ヌクレオチドの種類（例えば、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド）に応じて、適宜、それぞれにおいて可能な修飾を選択して施すことが可能である。

[0052] さらに、かかる修飾は同一のヌクレオチドに対して、複数種組み合わせて施されていてもよい。

[0053] 通常、上記のような修飾は、塩基対形成には影響を及ぼさず、従って、ヌクレオチド間の相補性やポリヌクレオチド間の相補性には影響を及ぼさないと考えられる。すなわち、通常、相補的な2つのヌクレオチドは、修飾された後も塩基対を形成する能力を維持することができ、従って依然として相補的であることができる。

[0054] しかしながら、ある場合において、修飾の数や位置によっては、ここで開示する二本鎖核酸が奏するアンチセンス効果等に影響を与えることになるかもしれない。これらの態様は、標的遺伝子の配列等によっても異なるため、一概には言えないが、当業者であれば、前記アンチセンス法に関する文献の記載を参酌しながら、決定することができる。また、修飾後の核酸複合体が有するアンチセンス効果を測定し、得られた測定値が、修飾前の核酸複合体のそれよりも有意に低下していなければ（例えば、修飾後の核酸複合体の測定値が修飾前の核酸複合体の測定値の30%以上であれば）、当該修飾は評価することができる。アンチセンス効果の測定は、例えば、後述の実施例において示されているように、細胞等に被検核酸化合物を導入し、該被検核酸化合物が奏するアンチセンス効果によって抑制された該細胞等における標的遺伝子の発現量（mRNA量、cDNA量、タンパク質量等）を、ノザンブロットティング、定量的PCR、ウェスタンブロットティング等の公知の手法を適宜利用することによって行うことができる。

[0055] ここで「ヌクレオチドアナログ」は天然には存在しないヌクレオチドを意味し、ヌクレオチドの塩基、糖若しくはリン酸塩結合のサブユニットにおいて、2以上の置換基が付加されており、若しくは、サブユニット内が2以上

置換されており、又はサブユニット全体を異なる化学基に置換されていることを意味する。2以上の置換を伴うアナログの例としては、架橋化核酸が挙げられる。架橋化核酸は、糖環における2箇所の置換に基づいて架橋ユニットが付加されるヌクレオチドアナログであり、典型的には、2'位の炭素と4'位の炭素とが結合しているヌクレオチドアナログが挙げられる。ある実施形態における活性部分におけるポリヌクレオチドにおいては、標的遺伝子の転写産物の部分配列に対する親和性及び／又は核酸分解酵素に対する耐性が増大させるという観点から、活性部分におけるポリヌクレオチドはヌクレオチドアナログをさらに含む。「ヌクレオチドアナログ」としては、上記定義を満たし、修飾（架橋、置換等）により、標的遺伝子の転写産物の部分配列に対する親和性及び／又は核酸分解酵素に対する耐性が増大されているヌクレオチドであればよく、例えば、特開平10-304889号公報国際公開第2005/021570号、特開平10-195098号公報、特表2002-521310号公報、国際公開第2007/143315号、国際公開第2008/043753号、国際公開第2008/029619号、国際公開第2008/049085号（以下、これら文献を「アンチセンス法に関する文献」とも称する）において、アンチセンス法に好適に用いられるとして開示されている核酸が挙げられる。すなわち、前記文献に開示されている核酸：ヘキシトール核酸（HNA）、シクロヘキセン核酸（CeNA）、ペプチド核酸（PNA）、グリコール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、モルホリノ核酸、トリシクロ-DNA（tcDNA）、2'-O-メチル化核酸、2'-MOE（2'-O-メトキシエチル）化核酸、2'-AP（2'-O-アミノプロピル）化核酸、2'-フルオロ化核酸、2'-F-アラビノ核酸（2'-F-ANA）、BNA（架橋化核酸（Bridged Nucleic Acid））が挙げられる。本明細書では、これらについても「修飾」または「修飾ヌクレオチド」と称することがある。

[0056] BNA（本明細書では、「架橋化ヌクレオチド」とも呼ぶ）としては、例えば、2'位の炭素と4'位の炭素とが、2以上の原子によって架橋されて

いるリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを使用することができる。架橋化核酸の例は当業者に知られている。このようなBNAの一のサブグループとしては、2'位の炭素と4'位の炭素とが、 $4' - (CH_2)_p - O - 2'$ 、 $4' - (CH_2)_p - S - 2'$ 、 $4' - (CH_2)_p - OCO - 2'$ 、 $4' - (CH_2)_n - N(R^3) - O - (CH_2)_m - 2'$ によって架橋されているBNAを挙げることができる（ここで、p、m及びnは、各々1~4、0~2及び1~3の整数である。R³は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、及びユニット置換基（蛍光あるいは化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、又は細胞内若しくは核内移行シグナルペプチド等）を示す）。さらに、本発明のさらなる1つの実施態様におけるBNAにおいて、3'位の炭素における置換基： OR^2 及び5'位の炭素における置換基： OR^1 のR¹及びR²は、典型的には水素原子であるが、同一又は異なってもよく、核酸合成の水酸基の保護基、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、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、又は、 $-P(R^4)R^5$ （式中、R⁴及びR⁵は、同一又は異なってもよく、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1~5のアルコキシ基、炭素数1~5のアルキルチオ基、炭素数1~6のシアノアルコキシ基、又は、炭素数1~5のアルキル基で置換されたアミノ基を示す）であってもよい。このようなBNAとしては、例えば、LNA（ロックド核酸（Locked Nucleic Acid（登録商標）、2', 4'-BNA）とも称される、 α -L-メチレンオキシ（ $4' - CH_2 - O - 2'$ ）BNA）又は β -D-メチレンオキシ（ $4' - CH_2 - O - 2'$ ）BNA、ENAとも称されるエチレンオキシ（ $4' - (CH_2)_2 - O - 2'$ ）BNA）、 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、2', 4'-BNANCとも称されるオキシアミノ（ $4' - CH_2 - N(R^3) - O - 2'$

') BNA、2' , 4' -BNACOC、3' アミノ-2' , 4' -BNA、5' -メチルBNA、cEt-BNAとも称される(4' -CH(CH₃)-O-2') BNA、cMOE-BNAとも称される(4' -CH(CH₂OCH₃)-O-2') BNA、AmNAとも称されるアミドBNA(4' -C(O)-N(R)-2') BNA(R=H、Me)、当業者に知られた他のBNAが挙げられる。

[0057] 本発明の1つの実施態様において、修飾ヌクレオチドは、塩基部位が修飾されていてもよい。塩基部位の修飾としては、例えば、シトシンの5-メチル化、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、N4-メチル化、チミジンの5-デメチル化、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、アデニンのN6-メチル化、8-ブロモ化、グアニンのN2-メチル化、8-ブロモ化が挙げられる。さらにまた、ある実施態様における修飾ヌクレオチドにおいては、リン酸ジエステル結合部位が修飾されていてもよい。リン酸ジエステル結合部位の修飾としては、例えば、ホスホロチオエート化、メチルホスホネート化、メチルチオホスホネート化、キラル-メチルホスホネート化、ホスホロジチオエート化、ホスホロアミデート化が挙げられるが、体内動態に優れているという観点から、ホスホロチオエート化が好ましい。また、このような塩基部位の修飾やリン酸ジエステル結合部位の修飾は同一のヌクレオチドに対して、複数種組み合わせて施されていてもよい。

[0058] 本発明の1つの実施態様では、ヌクレオチドアナログが、デオキシリボヌクレオチドの修飾に関して上述したような修飾(または修飾の組み合わせ)を、受けていてもよい。

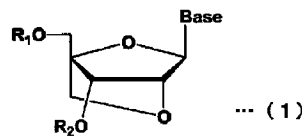
[0059] 当業者であれば、ヌクレオチドアナログの種類に応じて、適宜、それぞれにおいて可能な修飾を選択して施すことが可能である。

[0060] 修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドアナログは、ここで例示したものに限定されるわけではない。多数の修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドアナログが当該分野では知られており、例えば、Tachasらの米国特許第8299039号明細書の記載、特に17~2

2欄の記載を、本願の実施態様として利用することもできる。

[0061] 当業者であれば、このような修飾ヌクレオチドやヌクレオチドアナログの中から、アンチセンス効果、標的遺伝子の転写産物の部分配列に対する親和性、核酸分解酵素に対する耐性等の観点を考慮し、適宜修飾ヌクレオチドやヌクレオチドアナログを選択して利用することができる。ある実施形態において、下記式(1)で表わされるLNAが用いられる。

[0062] [化2]



[0063] [式(1)中、Baseは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基若しくは芳香族炭化水素環基、例えば、天然型ヌクレオシドの塩基部位(プリン塩基、ピリミジン塩基)又は非天然型(修飾)ヌクレオシドの塩基部位を示す。なお、塩基部位の修飾の例は、前述の通りである。R₁、R₂は、同一又は異なってもよく、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、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、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、又は、-P(R⁴)R⁵(ここで、R⁴及びR⁵は、同一又は異なってもよく、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1~5のアルコキシ基、炭素数1~5のアルキルチオ基、炭素数1~6のシアノアルコキシ基又は炭素数1~5のアルキル基で置換されたアミノ基を示す)を示す]。

[0064] なお、前記化学式において示されている化合物はヌクレオシドであるが、ある実施形態における「LNA」及び通常BNAには、当該ヌクレオシドにリン酸基が結合した形態(ヌクレオチド)も含まれる。すなわち、LNAといったBNAは、ポリヌクレオチド中に、ヌクレオチドとして組み込まれる。

- [0065] 本発明の1つの実施態様において、「1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含むウィング領域」は、前記少なくとも4つ以上の連続したデオキシリボヌクレオチドを含む領域（以下「DNAギャップ領域」とも称する）の5'末側及び／又は3'末側に配置されるものである。
- [0066] 本発明の1つの実施態様において、該DNAギャップ領域の5'末端に配置された修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む領域（以下「5'ウィング領域」とも称する）、及び該DNAギャップ領域の3'末端に配置された修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む領域（以下「3'ウィング領域」とも称する）は、それぞれ独立したものであり、前記アンチセンス法に関する文献に挙げられている修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを少なくとも1種含んでいればよく、さらに、かかる修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ以外に天然型のヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド）も含まれていてもよい。また、5'ウィング領域及び3'ウィング領域の鎖長は独立的に、通常1～10塩基であることができ、好ましくは1～7塩基、又は2～5塩基、例えば2～4塩基である。
- [0067] さらに、5'ウィング領域及び3'ウィング領域における修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ及び天然型のヌクレオチドの種類や数や位置については、ある実施形態における核酸複合体が奏するアンチセンス効果等に影響を与える場合もあるため、好ましい態様は、配列等によっても変わり得る。一概には言えないが、当業者であれば、前記アンチセンス法に関する文献の記載を参酌しながら、好ましい態様を決定することができる。また、前記「少なくとも4つ以上の連続したデオキシリボヌクレオチド」を含む領域同様に、修飾後の核酸、好ましくは二本鎖核酸が有するアンチセンス効果を測定し、得られた測定値が、修飾前の核酸、好ましくは二本鎖核酸のそれよりも有意に低下していなければ、当該修飾は好ましい態様であると評価することができる。

[0068] なお、特許文献1に記載されているように、従前から試みられているRNAやLNAのみからなるアンチセンス法は、標的となるmRNAと結合することで翻訳を抑制したが、その効果は概して不十分であった。一方DNAのみからなるアンチセンス法では、標的遺伝子と結合するとDNAとRNAからなる二本鎖構造となるため、RNaseHの標的となることでmRNAが切断されることにより強い標的遺伝子発現抑制効果が期待できたが、標的遺伝子との結合自体が弱いため実際の効果はやはり不十分だった。従って、活性部分におけるポリヌクレオチドにおいて、中央に少なくとも4塩基以上の鎖長のDNAが配置され、さらにRNA（すなわち、標的転写産物）と強い結合能力を持つLNA（又は他のBNA）が両端に配置されることによって、このような複合鎖は、RNaseHによる標的RNAの切断を促進することとなる。

[0069] よって、上記5'ウィング領域および3'ウィング領域はそれぞれ、修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含んでいることが望ましい。本発明の1つの実施態様において、上記5'ウィング領域および3'ウィング領域はそれぞれ、修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログからなる。上記5'ウィング領域および3'ウィング領域はそれぞれ、BNAを含んでいてもよく、例えばLNAを含んでいてもよい。

[0070] 本発明の1つの実施態様において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドからなる。

[0071] 本発明の他の実施態様において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドならびに修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログからなる。

[0072] 本発明のさらなる実施態様において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドとその5'側に位置する5'ウィング領域および3'側に位置する3'ウィング領域とからなる。この態様において、上記デオキシリボヌクレオチドはその一部または全部が修飾されていてもよい。

[0073] 本発明の1つの実施態様において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドを含まない。

[0074] 上述のように、本発明は、

(i) デオキシリボヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドを含む活性部分、および

(ii) ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、を含む核酸複合体であって、上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含む、核酸複合体に関する。

[0075] 本発明の1つの実施態様において、上記(i)活性部分のポリヌクレオチドにおけるデオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されている。

[0076] また、本発明のさらなる実施態様において、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドは1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む。

[0077] 本発明の1つの実施態様において、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドは1つまたは複数のヌクレオチドアナログを含み、該ヌクレオチドアナログの少なくとも1つは修飾されていてもよい。

[0078] 本発明のさらなる実施態様において、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドは、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドを含み、そして

当該ポリヌクレオチドは、

(a) 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む5'ウィング領域、および／または、

(b) 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に

位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む3' ウィング領域、

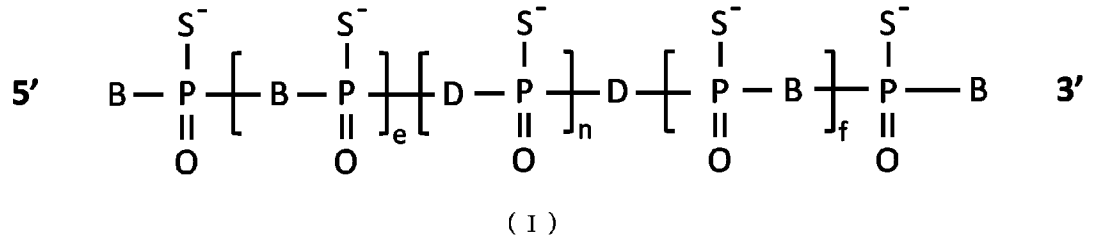
を含む。ここで、上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドは、上記(a) 5' ウィング領域および(b) 3' ウィング領域を含むことができる。

[0079] 本発明の1つの実施態様において、上記5' ウィング領域は2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み、上記3' ウィング領域は2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む。また、本発明の別の実施態様において、上記5' ウィング領域は1個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み、上記3' ウィング領域は1個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む。ここで、上記5' ウィング領域および3' ウィング領域は、糖修飾ヌクレオチド（すなわち、糖サブユニットが修飾されているヌクレオチド）および／またはヌクレオチドアナログとして架橋化ヌクレオチドを含むことができる。また、上記架橋化ヌクレオチドは、LNA、cEt-BNA、アミドBNA (AmNA) 及びcMOE-BNAからなる群から選択されてもよい。さらに、上記架橋化ヌクレオチドはホスホロチオエート化されていてもよい。また、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドは、ホスホロチオエート化されていてもよい。

[0080] 例えば、上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドは、ホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5' ウィング領域、ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドおよびホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3' ウィング領域からなる。両ウィング領域が2～5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる場合、上記ポリヌクレオチドは、以下の式(1)で表すことができる：

[0081]

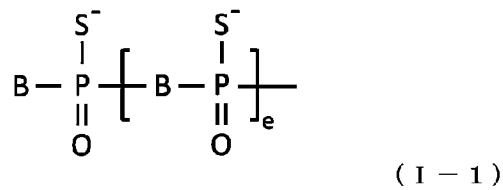
[化3]



[0082] [式中、Bは独立に架橋化ヌクレオシドを表し、Dは独立にデオキシリボヌクレオシドを表し、eは1～4の整数、fは1～4の整数、nは3以上の整数、好ましくは3～19の整数、より好ましくは4～15の整数、さらに好ましくは5～13の整数、例えば6～12の整数を表す]。

[0083] 上記式(I)において、下記の部分(I-1)：

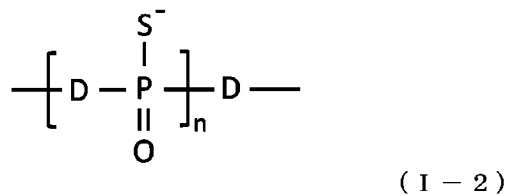
[0084] [化4]



[0085] が5' ウィング領域に相当し、

下記の部分(I-2)：

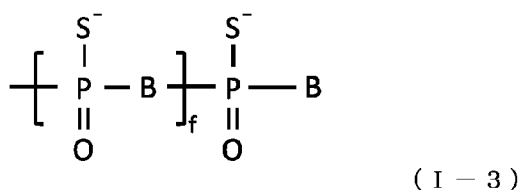
[0086] [化5]



[0087] がホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドに相当し、そして、

下記の部分(I-3)：

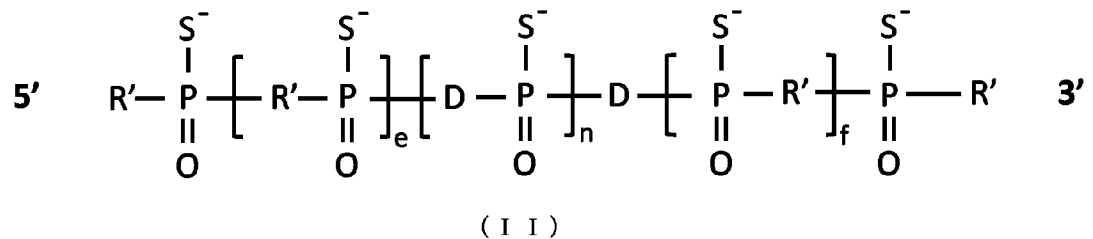
[0088] [化6]



[0089] が3' ウィング領域に相当する。なお、下記の式(11)においても同様に、それぞれ対応する部分が、5' ウィング領域、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドおよび3' ウィング領域である。

[0090] 本発明のさらなる実施態様において、上記5' ウィング領域は1~5個の糖修飾リボヌクレオチドからなり、上記3' ウィング領域は1~5個の糖修飾リボヌクレオチドからなり、そして、糖修飾リボヌクレオチドはさらにホスホロチオエート化されている。例えば、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドは、ホスホロチオエート化された糖修飾リボヌクレオチドからなる5' ウィング領域、ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドおよびホスホロチオエート化された糖修飾リボヌクレオチドからなる3' ウィング領域からなり、以下の式(11)で表すことができる：

[0091] [化7]



[0092] [式中、R'は独立に糖修飾リボヌクレオチドを表し、Dは独立にデオキシリボヌクレオチドを表し、eは0~4の整数、fは0~4の整数、nは3以上の整数、好ましくは3~19の整数、より好ましくは4~15の整数、さらに好ましくは5~13の整数、例えば6~12の整数を表す]。

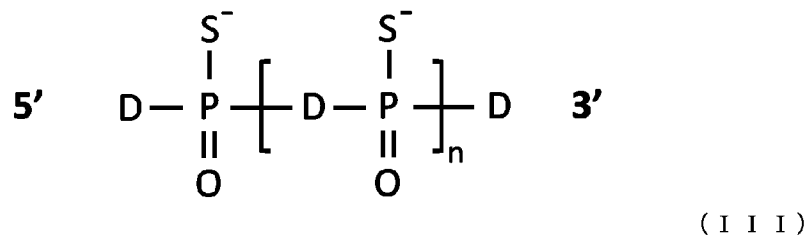
ここで、上記糖修飾は、2'-O-メチル化、2'-O-メトキシエチル(MOE)化、2'-O-アミノプロピル(AP)化および2'-フルオロ化からなる群から選択されてもよい。

[0093] なお、5' ウィング領域を構成するヌクレオチドの数と3' ウィング領域を構成するヌクレオチドの数は同一であっても、または異なってもよい。従って、例えば上記式(1)および(11)では、eとfは同一であっても、異なってもよい。例えば、上記式(1)および/または(11)に

において、 $e = 0$ かつ $f = 0$ （式（I I）の場合）、 $e = 1$ かつ $f = 1$ 、 $e = 2$ かつ $f = 2$ 、または $e = 3$ かつ $f = 3$ であることができ、あるいは、 $e = 1$ かつ $f = 2$ 、または $e = 2$ かつ $f = 1$ であることができる。

[0094] 本発明の他の実施態様において、上記（i）活性部分におけるポリヌクレオチドは、ホスホロチオエート化された少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドからなる。すなわち、当該態様において、上記ポリヌクレオチドは、以下の式（I I I）で表すことができる：

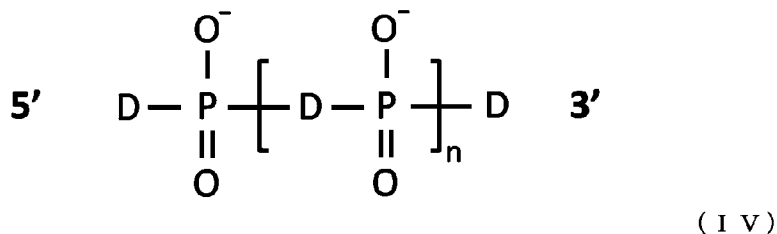
[0095] [化8]



[0096] [式中、Dは独立にデオキシリボヌクレオチドを表し、nは2以上の整数、好ましくは2～18の整数、より好ましくは3～14の整数、さらに好ましくは4～12の整数、例えば5～11の整数を表す]。

[0097] 本発明のさらなる実施態様において、上記（i）活性部分におけるポリヌクレオチドは、修飾されていない少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドからなる。すなわち、当該態様において、上記ポリヌクレオチドは、以下の式（I V）で表すことができる：

[0098] [化9]



[0099] [式中、Dは独立にデオキシリボヌクレオチドを表し、nは2以上の整数、好ましくは2～18の整数、より好ましくは3～14の整数、さらに好ましくは4～12の整数、例えば5～11の整数を表す]。

[0100] 本発明の1つの好ましい実施態様において、上記活性部分において、上記

5' ウィング領域はポリヌクレオチドの5' 末端に位置し、すなわち、ポリヌクレオチドの5' 末端に位置する構成単位を含む。本発明のさらなる好ましい実施態様において、上記活性部分において、上記3' ウィング領域はポリヌクレオチドの3' 末端に位置し、すなわち、ポリヌクレオチドの3' 末端に位置する構成単位を含む。

[0101] 上述のように、本発明において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、前述の活性部分におけるポリヌクレオチドと少なくとも一部が相補的なポリヌクレオチドである。キャリア一部分におけるポリヌクレオチドの塩基配列と活性部分におけるポリヌクレオチドの塩基配列とは、両者が少なくとも部分的に二本鎖を形成することが可能であれば、完全に相補的である必要はなく、例えば、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上）の相補性を有していればよい。なお、当該相補性は、上述のように二本鎖形成領域全体における相補性として算出されるが、キャリア一部分のポリヌクレオチドはバルジ構造部分を含むため、上記相補性は、バルジ構造部分を二本鎖形成領域から除いた後に算出する。すなわち、上記相補性の算出の際、バルジ構造部分は二本鎖形成領域に含めない。

[0102] 本発明の1つの好ましい実施態様において、両ポリヌクレオチドは100%の相補性を有する。ここで、相補性は上記のようにバルジ構造部分を除いた二本鎖形成領域（二本鎖形成領域全体）における相補性として算出する。この態様では、例えば、キャリア一部分のポリヌクレオチド（バルジ形成部分を除く）の長さが、活性部分のポリヌクレオチドの長さより長い場合には、活性部分のポリヌクレオチド全体がキャリア一部分のポリヌクレオチドの一部と完全に相補的であり（バルジ形成部分を除く）、その完全に相補的な部分が二本鎖形成領域となる。また、キャリア一部分のポリヌクレオチド（バルジ形成部分を除く）の長さが、活性部分のポリヌクレオチドより短い場合には、キャリア一部分のポリヌクレオチド全体（バルジ形成部分を除く）が活性部分のポリヌクレオチドの一部と完全に相補的であり、その完全

に相補的な部分が二本鎖形成領域となる。そして、活性部分のポリヌクレオチドとキャリアー部分のポリヌクレオチド（バルジ形成部分を除く）が同じ長さを有する場合には、バルジ構造部分を除いて両ポリヌクレオチドは全体にわたって完全に相補的である。

[0103] キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、上述のように、ヌクレオチドと、任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを含み、そしてさらに、少なくとも1つのバルジを含む。ここで、当該ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドとして、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の1つの実施態様において、当該ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドとして、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含むことができる。

[0104] RNA分解酵素等の核酸分解酵素に対する耐性が高いという観点から、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドにおいても、上記ヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチド）は、活性部分におけるポリヌクレオチドに関して述べたような修飾を受けていてもよい。

[0105] また、キャリアー部分のポリヌクレオチドが特定の細胞の核内に送達されるまで、RNase A等のRNA分解酵素による分解を抑制しつつも、特定の細胞内においてはRNase Hにより該ポリヌクレオチドが分解されることにより、アンチセンス効果を発揮し易いという観点から、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分におけるポリヌクレオチドに関して述べたような修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含んでいてもよい。

[0106] なお、活性部分におけるポリヌクレオチドの場合と同様に、ヌクレオチドアナログを含む場合には当該ヌクレオチドアナログは修飾を受けていてもよい。

[0107] 修飾の数や位置は、ある実施形態における核酸複合体が奏するアンチセンス効果等に影響を与える場合もあるため、キャリアー部分のポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドアナログの数及び修飾の位置には好ましい態様が存

在する。この好ましい態様は、修飾対象となる核酸の種類、配列等によっても異なるため、一概には言えないが、前述の活性部分におけるポリヌクレオチド同様に、修飾後の核酸複合体が有するアンチセンス効果を測定することにより特定することができる。

[0108] 本発明の1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分のポリヌクレオチドの5' ウィング領域及び／又は3' ウィング領域に対して相補的な領域に、修飾デオキシリボヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを有する。この場合、これらの修飾および／またはアナログがRNA分解酵素等の酵素による分解を抑制する効果を有すると期待される。本発明のさらなる1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分のポリヌクレオチドのヌクレオチドアナログを含む領域に相補的な領域の全てが修飾されており、活性部分のポリヌクレオチドの修飾核酸を含む領域に相補的な領域の一部が修飾されている。この場合に、キャリア一部分のポリヌクレオチドにおいて修飾されている領域は、該一部を含む限り、活性部分のポリヌクレオチドにおける修飾核酸を含む領域よりも長くなっていてもよく、短くなっていてもよく、または同じ長さを有していてもよい。

[0109] キャリア一部分におけるポリヌクレオチドの長さは特に制限されないが、少なくとも8塩基であり、少なくとも10塩基であり、少なくとも12塩基であり、少なくとも13塩基であり、少なくとも14塩基であり、少なくとも15塩基、または少なくとも16塩基である。前記長さは、好ましくは100塩基以下、45塩基以下、35塩基以下、30塩基以下、25塩基以下、24塩基以下、23塩基以下、22塩基以下、21塩基以下または20塩基以下であることができる。前記長さの範囲は、好ましくは10～35塩基であり、より好ましくは12～25塩基であり、さらに好ましくは13～22塩基である。通常、標的部位への送達に及ぼす効果や、バルジの大きさや数、費用、合成収率等の他の要素に応じて、長さは選択される。

[0110] 本発明の1つの実施形態において、キャリア一部分のポリヌクレオチドが

らバルジ部分を除いて比較した場合に、活性部分におけるポリヌクレオチドの長さキャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さは同一であってもよく、異なってもよい。

[0111] 本発明の1つの実施形態において、キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、活性部分におけるポリヌクレオチドの長さは、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さよりも大きい。

[0112] 本発明の他の実施形態において、キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、活性部分におけるポリヌクレオチドの長さは、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さよりも小さい。

[0113] 上述のように、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、少なくとも1つのバルジを含む。ここで、「バルジ」とは、活性部分のポリヌクレオチドとキャリアー部分のポリヌクレオチドとの間のアニーリングによって形成された二本鎖領域（以下、単に「二本鎖領域」とも呼ぶ）内で、後者に対応する1個の塩基または連続する2個以上の塩基が前者に不足していることにより生じる、塩基対を形成せずに二本鎖核酸から外部に飛び出した後者ポリヌクレオチド内のヌクレオチド（および／または修飾ヌクレオチド／ヌクレオチドアナログ）から形成されるふくらみ構造を意味する。

[0114] バルジの数は、二本鎖の形成が可能な範囲内であれば特に制限はされない。本発明の1つの実施態様では、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは1～4つのバルジ、例えば、1～3つまたは2～3つのバルジを含むことができる。本発明のさらなる1つの実施態様において、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、1、2、3または4つのバルジを含む。

[0115] バルジの位置は、バルジ構造を形成できる位置であれば特に制限はされない。例えば、活性部分のポリヌクレオチドおよびキャリアー部分のポリヌクレオチドがそれぞれ10～35塩基の長さを有する場合には、例えば、二本鎖形成領域の5'末端（活性部分のポリヌクレオチドの上記領域の5'末端）から数えて、2～15番目の位置に、例えば6～11番目（例えば6、7、8、9、10または11番目）の位置になるように、キャリアー部分のポ

リヌクレオチドの対応の位置にバルジを導入することができる。また、キャリア一部分のポリヌクレオチドが複数のバルジを有する場合には、例えば、二本鎖形成領域の5'末端（活性部分のポリヌクレオチドの上記領域の5'末端）から数えて2～15番目の位置、例えば6～11番目の位置になるように、キャリア一部分のポリヌクレオチドの対応の位置に第1のバルジを導入し、第1のバルジの位置から1～数个置き、例えば、1～3個置きまたは1～2個置きに、他のバルジを導入することができる。

[0116] バルジを構成するヌクレオチド等の数（活性部分のポリヌクレオチドと塩基対を形成していないヌクレオチドの数）は、バルジ構造を形成できる数であれば特に制限はされない。本発明の1つの実施態様において、上記バルジは、1つのバルジあたり1～7つ、例えば、1～5つまたは2～4つ（例えば3つ）のヌクレオチド等で構成されることができる。

[0117] 複数のバルジを有する場合、各バルジは、同一の数のヌクレオチド等で構成されていても、あるいは、各バルジはそれぞれ独立に異なる数のヌクレオチド等で構成されていてもよい。

[0118] 本発明の1つの実施態様において、上記バルジは、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログから構成される。

[0119] 本発明のさらなる1つの実施態様において、上記バルジを構成するヌクレオチドとしては、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチド（いずれも修飾されていても、修飾されていなくてもよい）が使用される。

[0120] 当業者であれば、活性部分におけるポリヌクレオチドの種類や塩基配列に応じて、バルジが形成されるように、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドの構成単位を適宜選択することが可能である。

[0121] 本発明の1つの好ましい実施態様において、上記バルジを構成するヌクレオチドは、その一部または全部がリボヌクレオチド、好ましくはウラシル（U）である。

[0122] キャリア一部分におけるポリヌクレオチドがバルジを含む本発明の核酸複

合体（好ましくは二本鎖核酸複合体）は、バルジ構造の部分（すなわち、二本鎖が形成されていない部分）において、DNaseまたはRNaseの攻撃を適度に受けるため、細胞内または生体内において、標的mRNAに送達される頃までの間に、当該キャリア一部分のみが適度に切断されて（キャリア一部分のポリヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはこれらの組み合わせのいずれの場合であっても）、活性部分のポリヌクレオチドのみとなり、当該活性部分のポリヌクレオチドが標的mRNAと良好に二本鎖を形成するのを促進すると考えられる。この場合、活性部分のポリヌクレオチドと標的mRNAとの二本鎖がRNaseHによって認識され、効率的に標的mRNAが切断されるので、より強力な発現抑制効果が達成されることが考えられる。

[0123] 本発明の1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含む。

[0124] 「ミスマッチ」とは、活性部分におけるポリヌクレオチドとキャリア一部分におけるポリヌクレオチドとの間のアニーリングによって形成された二本鎖形成領域（以下、単に「二本鎖形成領域」とも呼ぶ）内のある位置において、両ポリヌクレオチド鎖のヌクレオチド間でワトソン-クリック型塩基対が形成されないことをいう。

[0125] ただし、ここでいうミスマッチは、活性部分のポリヌクレオチドとキャリア一部分のポリヌクレオチドが二本鎖形成領域内で同一の数のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ（以下、まとめて「ヌクレオチド等」とも呼ぶ）を有し、上記位置を除く全ての位置において塩基対を形成しているにもかかわらず、当該位置でのみ塩基対が形成されないことを意味する。従って、これは、オーバーハングや、二本鎖形成領域内の両ポリヌクレオチドの長さの相違に起因して生じるバルジのような構造は含まない。なおこれは、ミスマッチとオーバーハングやバルジとを区別することを意図するものであり、本発明の核酸複合体、好ましくは二本鎖核酸複合体において、ミ

スマッチとバルジ（および／またはオーバーハング）が同時に存在することを妨げるものではない。

[0126] 従って、「キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが、活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含む」とは、活性部分のポリヌクレオチドとキャリア一部分のポリヌクレオチドがバルジ構造部分を除く二本鎖形成領域内において同一の長さを有し、かつ、後者が、両ポリヌクレオチド間でワトソン-クリック型塩基対を形成しないようなヌクレオチド等を当該二本鎖形成領域内において少なくとも1つ含むことを意味する。ミスマッチの例としては、A対G、C対A、U対C、A対A、G対G、C対C等や、リボヌクレオチドを用いたU対G、U対C、U対T等が挙げられるが、同様に、例えば、I対Gや、非塩基残基対ヌクレオチド等、非環状残基対ヌクレオチド等も含まれる。広い意味において、ここで用いられるミスマッチには、特定の位置における二本鎖の熱力学的安定性がその位置におけるワトソン-クリック型塩基対の熱力学的安定性よりも低くなるように、その位置またはその近傍での熱力学的安定性を減少させる、その位置での任意の変換も含まれる。

[0127] 本発明において、核酸複合体は、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが、活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含んでいてもよい。同様に、活性部分におけるポリヌクレオチドも、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対しておよび／または標的転写産物（具体的には、活性部分のポリヌクレオチドと二本鎖を形成する領域）に対して、少なくとも1つのミスマッチを含むことができる。特に、活性部分におけるポリヌクレオチドは、標的転写産物に対して、少なくとも1つのミスマッチを含むことができる。ミスマッチの数は、二本鎖核酸の形成が妨げられない範囲内であれば特に制限はされず、ミスマッチを複数個含む場合には、各ミスマッチは互いに離れて存在していてもよく、または連続して存在していても、両者が組み合わされて存在していてもよい。本発明の1つの実施態様では、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分にお

けるポリヌクレオチドに対して1～7つのミスマッチ、例えば、1～5つ、1～4つまたは2～3つのミスマッチを含むことができる。本発明のさらなる1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分におけるポリヌクレオチドに対して1、2、3、4、5、6または7つのミスマッチを含む。また、活性部分におけるポリヌクレオチドは、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対しておよび／または標的転写産物（具体的には、活性部分のポリヌクレオチドと二本鎖を形成する領域）に対して1～7つのミスマッチ、例えば、1～5つ、1～4つまたは2～3つのミスマッチを含むことができる。本発明のさらなる1つの実施態様において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対しておよび／または標的転写産物（具体的には、活性部分のポリヌクレオチドと二本鎖を形成する領域）に対して1、2、3、4、5、6または7つのミスマッチを含む。キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが、活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含み、それと同時に、活性部分におけるポリヌクレオチドも、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対しておよび／または標的転写産物（具体的には、活性部分のポリヌクレオチドと二本鎖を形成する領域）に対して少なくとも1つのミスマッチを含むことも可能である。

[0128] 本発明の1つの実施態様において、上記キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、上記活性部分におけるポリヌクレオチドに対するミスマッチを含まない。本発明のさらなる実施態様において、上記活性部分におけるポリヌクレオチドは、上記キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対するおよび／または標的転写産物に対するミスマッチを含まず、特に標的転写産物に対するミスマッチを含まない。

[0129] ミスマッチの位置は、バルジの形成を妨げずにミスマッチ構造を形成できる位置であれば特に制限はされない。

[0130] 例えば、活性部分のポリヌクレオチドおよびキャリア一部分のポリヌクレオチドがそれぞれ10～35塩基の長さを有する場合には、例えば、二本鎖

形成領域の5'末端（活性部分のポリヌクレオチドの上記領域内の5'末端）から数えて、2～15番目の位置に、例えば6～11番目（例えば6、7、8、9、10または11番目）の位置にミスマッチを導入することができる。また、キャリア一部分のポリヌクレオチドおよび／または活性部分におけるポリヌクレオチドがそれぞれ独立にまたは合計で複数のミスマッチを有する場合には、例えば、二本鎖形成領域の5'末端（活性部分のポリヌクレオチドの上記領域内の5'末端）から数えて2～15番目の位置、例えば6～11番目（例えば6、7、8、9、10または11番目）の位置に第1のミスマッチを導入し、第1のミスマッチの位置から1～2個置きにまたは連続的に、またはこれらを組み合わせて、他のミスマッチを導入することができる。

[0131] 例えば、本発明の核酸複合体が少なくとも1つのミスマッチを有する場合、ミスマッチの部分、すなわち、二本鎖が形成されていない部分において、DNaseまたはRNaseの攻撃を適度に受けるため、細胞内または生体内において、標的mRNAに送達される頃までの間に、当該キャリア一部分のみが適度に切断されて（キャリア一部分のポリヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたはこれらの組み合わせのいずれの場合であっても）、活性部分のポリヌクレオチドのみとなり、当該活性部分のポリヌクレオチドが標的mRNAと良好に二本鎖を形成するのを促進すると考えられる。この場合、活性部分のポリヌクレオチドと標的mRNAとの二本鎖がRNaseHによって認識され、効率的に標的mRNAが切断されるので、より強力な発現抑制効果が達成されると考えられる。

[0132] 上記のようなミスマッチを有する場合、活性部分におけるポリヌクレオチドとキャリア一部分におけるポリヌクレオチド（バルジ部分は除く）は完全に相補的ではなくなるが、上記のように、本発明ではこのように両者が完全に相補的でなくてもよい。本発明の1つの好ましい態様では、キャリア一部分のポリヌクレオチドがミスマッチを含む場合、両ポリヌクレオチドは、ミ

スマッチ部分とバルジ部分を除く二本鎖形成領域において、100%の相補性を有する。このことは、活性部分のポリヌクレオチドが標的転写産物に対して少なくとも1つのミスマッチを有する場合にも当てはまる。

[0133] また、本発明の1つの態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、少なくとも1つのバルジと少なくとも1つのミスマッチを含む。

[0134] 本発明の別の実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、ミスマッチを含まない。

[0135] また、例えばキャリア一部分におけるポリヌクレオチドを適度に切断するという観点から、上記のようなミスマッチを形成させる代わりに、または、ミスマッチ形成に加えて、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに上述のように、少なくとも1つのリボヌクレオチドを含ませることも可能である。リボヌクレオチドは概して、デオキシリボヌクレオチド（修飾デオキシリボヌクレオチドを含む）やヌクレオチドアナログよりも核酸分解酵素に対する耐性が弱いため、キャリア一部分においてリボヌクレオチド導入部位を起点としたポリヌクレオチドの切断が適度に促進されると考えられる。

[0136] 従って、本発明の1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、構成単位としてリボヌクレオチドを含む。

[0137] 本発明のさらなる実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含み、かつ、構成単位としてリボヌクレオチドを含む。

[0138] 本発明のさらに1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含み、かつ、リボヌクレオチドを構成単位として含み、かつ、当該リボヌクレオチドの少なくとも1つ、例えば、1、2、3または4つが、当該ミスマッチを形成する。

[0139] キャリア一部分のポリヌクレオチドに含まれるリボヌクレオチドの数は、特に制限はされない。キャリア一部分のポリヌクレオチドは、例えば、当該ポリヌクレオチドの総ヌクレオチド数に対して、1~90%、好ましくは5

～70%、10～50%の数のリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の1つの実施態様において、キャリア一部分のポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドの総ヌクレオチド数に対して、例えば10、20、30、40、50、60、70、80または90%の数のリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の別の実施態様において、キャリア一部分のポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドのみからなる。

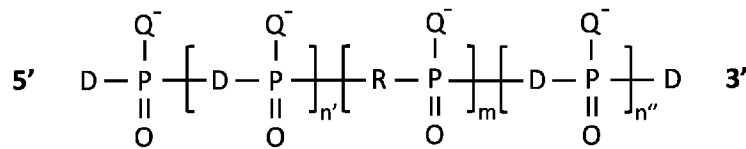
[0140] また、本発明のさらなる実施態様では、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、1～12個のリボヌクレオチド、例えば、2～10個、3～8個または4～7個のリボヌクレオチドを含むことができる。本発明のさらなる1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のリボヌクレオチドを含む。

[0141] リボヌクレオチドを複数個含む場合には、各リボヌクレオチドは互いに離れて存在していてもよく、または連続して存在していても、両者が組み合わされて存在していてもよい。本発明の1つの態様において、キャリア一部分のポリヌクレオチドはリボヌクレオチドを複数個含み、リボヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドと交互にまたはほぼ交互に存在する。この場合に、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドは、1個ずつ、2個ずつ、3個ずつ、4個ずつ、5個ずつまたは6個ずつ、交互に（またはほぼ交互に）存在していてもよい。

[0142] キャリア一部分のポリヌクレオチドにおけるリボヌクレオチドの位置は、特に制限はされない。上記ポリヌクレオチドが10～35塩基の長さを有する場合には、5'末端から数えて、1～35番目、例えば2～30番目、3～25番目、4～20番目、5～15番目、6～11番目（例えば、6、7、8、9、10または11番目）の位置にリボヌクレオチドを含むことができる。また、キャリア一部分のポリヌクレオチドが複数のリボヌクレオチドを含む場合には、例えば、5'末端から数えて1～15番目の位置、例えば6～11番目（例えば、6、7、8、9、10または11番目）の位置に第

1のリボヌクレオチドを導入し、第1のリボヌクレオチドの位置から1～2個置きにまたは連続的に、またはこれらを組み合わせて、他のリボヌクレオチドを含ませることができる。例えば、複数のリボヌクレオチドを連続的に含む場合に、上記ポリヌクレオチドは以下の式(V)により表すことができる：

[0143] [化10]



(V)

[0144] [式中、Dは独立にデオキシリボヌクレオチドを表し、Rは独立にリボヌクレオチドを表し、Qは独立にSまたはOを表し、 n' は0以上の整数、 n'' は1以上の整数、 m は2以上の整数を表す。ここで、 $n' + n'' + m$ の合計は、好ましくは8～33、より好ましくは10～23、さらに好ましくは11～18の整数である]。

ここで、 $n' = 4 \sim 9$ の場合が、上記で挙げた6～11番目の位置に第1のリボヌクレオチドを導入する態様に該当する。 m は例えば2～6の整数であることができる。また、 n' は例えば、3～15、4～10または5～8の整数であることができる。 n'' は例えば、3～15、4～10または5～8の整数であることができる。なお、 $m = 1$ の場合、すなわち、上記ポリヌクレオチドが1つのリボヌクレオチドを含む場合も、上記のように、本発明の1つの態様である。

[0145] 例えば、例1の配列番号2で表されるポリヌクレオチドは、17塩基の長さを有し、1個のリボヌクレオチドを含み、5'末端から数えて9番目の位置にリボヌクレオチドを含むものであり、上記式(V) (式中、 $Q = O$ 、 $n' = 7$ 、 $m = 1$ 、 $n'' = 7$)に相当する。また、配列番号3～5で表されるポリヌクレオチドは、それぞれ、18～20塩基の長さを有し、2～4個のリボヌクレオチドを含み、いずれも5'末端から数えて9番目の位置に第

1のリボヌクレオチドを有し、そこから連続的に他のリボヌクレオチドを含むものである。これらはそれぞれ、

配列番号3：上記式(V) (式中、 $Q=0$ 、 $n'=7$ 、 $m=2$ 、 $n''=7$) ;

配列番号4：上記式(V) (式中、 $Q=0$ 、 $n'=7$ 、 $m=3$ 、 $n''=7$) ;

配列番号5：上記式(V) (式中、 $Q=0$ 、 $n'=7$ 、 $m=4$ 、 $n''=7$) ;

で表される。

[0146] また、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドがリボヌクレオチドを含み、かつ当該リボヌクレオチドの少なくとも1つが上記のミスマッチを生じさせる場合にも、上記ポリヌクレオチドは、同様の位置にリボヌクレオチドを含むことができる。

[0147] さらに、本発明の1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、上記のようにバルジ部分にリボヌクレオチドを含むこともできる。

[0148] リボヌクレオチドの数が多い場合（特に連続したリボヌクレオチドの数が多い場合）、活性部分のポリヌクレオチドとキャリア一部分のポリヌクレオチドとの間である程度の長さを有するDNA/RNA二本鎖が形成され、RNAseHによって認識によって認識されやすくなるため、細胞内または生体内において、標的mRNAに送達される頃までの間に適切に切断されるという効果も期待できる。

[0149] なお、切断の程度を調節するために、上記リボヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドに関して記載したような修飾が施されていてもよい。

[0150] また、本発明の1つの実施態様において、上記核酸複合体はオーバーハングを有することができる。

[0151] ここで、「オーバーハング」とは、一方の鎖が二本鎖を形成する相補性の他鎖の末端を超えて伸びる1本鎖領域から生じる、末端塩基対非形成型ヌク

レオチド（修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ）のことをいう。各オーバーハングは、少なくとも1つのヌクレオチド（修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ）を含む。好ましくは、各オーバーハングは、2ヌクレオチドオーバーハングである。オーバーハングを構成するヌクレオチドは任意に選択することができる。オーバーハングのヌクレオチドは、標的転写産物と塩基対を形成してもしなくてもよい。上記2ヌクレオチドオーバーハングの例としては、UU、TT、AA、GG、CC、AC、CA、AG、GA、GCおよびCGが挙げられるが、これらに限定はされない。

[0152] オーバーハングの位置としては、活性部分におけるポリヌクレオチドの5'末端、活性部分におけるポリヌクレオチドの3'末端、活性部分におけるポリヌクレオチドの5'末端および3'末端、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの5'末端、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの3'末端、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの5'末端および3'末端、活性部分のポリヌクレオチドの5'末端およびキャリアー部分のポリヌクレオチドの5'末端、または活性部分のポリヌクレオチドの3'末端およびキャリアー部分のポリヌクレオチドの3'末端が可能である。

[0153] 本発明の他の実施態様において、上記核酸複合体はオーバーハングを含まない。

[0154] また、本発明の別の実施態様において、キャリアー部分のポリヌクレオチドは、活性部分のポリヌクレオチドに関して記載したように、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドを含み、その5'側に位置する5'ウィング領域、および／またはその3'側に位置する3'ウィング領域を含むことができる。

[0155] 本発明の1つの実施態様において、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドのみからなるか、あるいは、キャリアー部分におけるポリヌクレオチドのバルジを除く部分は、デオキシリボヌクレオチドのみからなる。この態様の場合でも、上記核酸複合体は標的転写産物

のレベルを良好に抑制できるが、これは以下の機構によるものと考えられる：
：活性部分におけるポリヌクレオチドとキャリア一部分におけるポリヌクレオチドにより形成されたDNA-DNA二本鎖が標的転写産物に送達されるまでの間にDNaseに認識され、当該DNaseによってキャリア一部分におけるポリヌクレオチドが分解される。その後、残った活性部分におけるポリヌクレオチドが標的転写産物とDNA-RNA二本鎖を形成し、RNaseHによってこの部分が認識され、分解される。

[0156] 本発明の他の実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドのみからなる。本発明の別の実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドならびに修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログのみからなるか、リボヌクレオチドならびに修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログのみからなるか、あるいは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド並びに修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログのみからなる。

[0157] 本発明のさらなる実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドとその5'側に位置する5'ウィング領域および3'側に位置する3'ウィング領域とからなる。

[0158] 本発明のさらなる実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドとその5'側に位置する5'ウィング領域および3'側に位置する3'ウィング領域とリボヌクレオチドからなり、該リボヌクレオチドは、5'ウィング領域および／または3'ウィング領域に存在してもよく、ここで、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドのいくつかはリボヌクレオチドに置き換えられていてもよい。

[0159] 本発明の1つの実施態様において、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドを含まない。

[0160] 本発明の別の実施態様において、キャリア一部分のポリヌクレオチドにおけるデオキシリボヌクレオチドは修飾されていない。

[0161] 本発明のさらに別の実施態様において、キャリア一部分のポリヌクレオチドにおけるリボヌクレオチドは修飾されていない。

[0162] 上述のように、本発明の核酸複合体は、

(i i) ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、
を含み、かつ上記(i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含むが、本発明の1つの実施態様において、上記(i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、構成単位としてデオキシリボヌクレオチドを含むことができる。ここで、上記ポリヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドからなることもできる。また、上記ポリヌクレオチドは構成単位としてリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の1つの実施態様において、上記ポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドからなる。これらの態様において、上記リボヌクレオチドの一部または全部が修飾されていてもよく、またはリボヌクレオチドは修飾されていなくてもよい。同様に、上記デオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されていてもよく、または上記デオキシリボヌクレオチドは修飾されていなくてもよい。例えば、修飾デオキシリボヌクレオチドは、塩基修飾ヌクレオチド（すなわち、塩基サブユニットが修飾されているヌクレオチド）であることができ、好ましくは脱塩基ヌクレオチド（これは上述の「非塩基残基」に相当し得る）であることができる。ここで、1つの態様では、上記修飾デオキシリボヌクレオチドは、塩基修飾以外の修飾を受けていない。

[0163] 本発明の1つの実施態様において、上記バルジは、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドから形成される。

- [0164] 例えば、上記バルジはデオキシリボヌクレオチドから形成される。この場合、デオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されていてもよいし、または上記デオキシリボヌクレオチドは修飾されていなくてもよい。本発明の1つの好ましい実施態様において、上記バルジは修飾デオキシリボヌクレオチド、好ましくは塩基修飾デオキシリボヌクレオチド、特に脱塩基デオキシリボヌクレオチドから構成される。例えば、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが修飾されていないデオキシリボヌクレオチドと修飾されたデオキシリボヌクレオチドからなり、当該修飾デオキシリボヌクレオチド（好ましくは、少なくとも2つの、例えば3、4、5または6つの連続した修飾デオキシリボヌクレオチド）がバルジを構成する。ここで上記修飾デオキシリボヌクレオチドは、好ましくは、塩基修飾デオキシリボヌクレオチド、より好ましくは脱塩基デオキシリボヌクレオチドであり、特に好ましくは、上記修飾デオキシリボヌクレオチドは塩基修飾以外の修飾を受けていない。
- [0165] 本発明の別の好ましい実施態様において、上記バルジは修飾されていないデオキシリボヌクレオチド（例えば、デオキシイノシンまたはチミジン）から、好ましくは、同一の塩基配列（例えば、デオキシイノシンまたはチミジン）を有する少なくとも2つの、例えば3、4、5または6つの連続した非修飾デオキシリボヌクレオチドから構成される。
- [0166] また、上記バルジはリボヌクレオチドから形成されていてもよい。この場合、リボヌクレオチドの一部または全部が修飾されていてもよいし、または上記リボヌクレオチドは修飾されていなくてもよい。本発明の1つの好ましい実施態様において、上記バルジは修飾されていないリボヌクレオチドから構成される。例えば、キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが修飾されていないデオキシリボヌクレオチドと修飾されていないリボヌクレオチドからなり、当該非修飾リボヌクレオチド（例えば、イノシンまたはウラシル）が、好ましくは同一の塩基配列（例えば、デオキシイノシンまたはチミジン）を有する少なくとも2つの、例えば3、4、5または6つの連続した非修飾リボヌクレオチドがバルジを構成する。

[0167] 本発明の1つの好ましい態様において、本発明は、

(i) ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチド、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5'ウィング領域および上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3'ウィング領域を構成単位として含むポリヌクレオチドを含む活性部分、ならびに

(ii) 構成単位としての修飾されていないデオキシリボヌクレオチドからなるか、または構成単位としての修飾されていないリボヌクレオチドおよび修飾されていないデオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、を含む、二本鎖核酸複合体であって、上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含む二本鎖核酸複合体に関する。

[0168] 本発明の他の好ましい態様において、本発明は、

(i) ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチド、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5'ウィング領域および上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3'ウィング領域を構成単位として含むポリヌクレオチドを含む活性部分、ならびに

(ii) 構成単位としての修飾されていないリボヌクレオチドおよび修飾されていないデオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、

を含む、二本鎖核酸複合体であって、上記 (i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含み、当該バルジは修飾されていないリボヌクレオチドから形成される二本鎖核酸複合体に関する。

[0169] さらに、本発明はまた、

(i) ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチド、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5'ウィング領域および上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3'ウィング領域を構成単位として含むポリヌクレオチドを含む活性部分、ならびに

(i i) 構成単位としての修飾されていないリボヌクレオチドおよび修飾されていないデオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、を含む、二本鎖核酸複合体であって、

上記 (i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含み、当該バルジは修飾されていないリボヌクレオチドから形成され、かつ

上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記 (i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対するおよび/または標的転写産物に対するミスマッチを含まない二本鎖核酸複合体に関する。

[0170] 本発明の1つの好ましい実施態様において、上記キャリア一部分のポリペプチドにおいて、上記5'ウィング領域はポリヌクレオチドの5'末端に位置し、すなわち、ポリヌクレオチドの5'末端に位置する構成単位を含む。本発明のさらなる好ましい実施態様において、上記キャリア一部分において、上記3'ウィング領域はポリヌクレオチドの3'末端に位置し、すなわち、ポリヌクレオチドの3'末端に位置する構成単位を含む。

- [0171] 本発明においては、活性部分のポリヌクレオチドに関する上述の態様と、キャリアー部分のポリヌクレオチドに関する上述の態様を、適宜組み合わせることにより、種々の態様の核酸複合体、好ましくは二本鎖複合体を作製することができる。
- [0172] 本発明の1つの実施態様において、上記核酸複合体は、細胞または哺乳動物において標的転写産物、例えば標的遺伝子の発現を減少させるための核酸複合体である。
- [0173] 本発明のさらなる1つの実施態様において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、標的遺伝子 mRNA のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である。本発明の1つの実施態様において、上記標的遺伝子は、ヒト bcl-2 または ヒト STAT3 である。本発明の別の実施態様において、活性部分におけるポリヌクレオチドは、標的としてのタンパク質をコードしない転写産物、例えば標的ノンコーディング RNA のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である。本発明の1つの実施態様において、標的ノンコーディング RNA は、ヒトまたはマウスの転位関連肺腺癌転写産物 (MALAT1) である。
- [0174] 本発明の1つの実施態様において、上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドは、以下の (a) ~ (d) から選択されるポリヌクレオチドである：
- (a) 配列番号 1、6 ~ 12 または 21 のいずれか1つで示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、
 - (b) 上記 (a) のポリヌクレオチドと 70% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド、
 - (c) 上記 (a) のポリヌクレオチドのうちの少数のヌクレオチドが置換し、欠失し、付加し及び／又は挿入されたポリヌクレオチド、
 - (d) 上記 (a) ~ (c) のいずれかのポリヌクレオチドを部分配列として含むポリヌクレオチド。
- [0175] 上記 (b) のポリヌクレオチドは、上記 (a) のポリヌクレオチドの塩基

配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、例えば96%以上、97%以上、98%以上、99%以上又は99.5%以上の配列同一性を有する。好ましくは、上記(b)のポリヌクレオチドは、標的転写産物の発現抑制活性を有する。

[0176] 上記(c)のポリヌクレオチドは、上記(a)のポリヌクレオチドのうちの少数の、好ましくは、1個~数個、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドが置換し、欠失し、付加し及び/又は挿入されたポリヌクレオチドであることができる。好ましくは、上記(c)のポリヌクレオチドは、標的転写産物の発現抑制活性を有する。

[0177] 上記(d)のポリヌクレオチドは、上記(a)~(c)のいずれかのポリヌクレオチドを部分配列として含むポリヌクレオチドであり、好ましくは標的転写産物の発現抑制活性を有する。本発明の1つの実施態様において、上記(d)のポリヌクレオチドの長さは8~100塩基である。好ましくは、前記長さは、少なくとも10塩基であり、少なくとも12塩基であり、又は少なくとも13塩基である。前記長さは、好ましくは100塩基以下、35塩基以下、25塩基以下または20塩基以下であることができる。

[0178] 本明細書において、塩基配列に関する「配列同一性」とは、比較すべき2つ塩基配列の塩基ができるだけ多く一致するように両塩基配列を整列させ、一致した塩基数を全塩基数で除したものを百分率(%)で表したものである。上記整列の際には、必要に応じ、比較する2つの配列の一方又は双方に適宜ギャップを挿入する。このような配列の整列化は、例えばBLAST、FASTA、CLUSTAL W等の周知のプログラムを用いて行なうことができる(Karlin及びAltschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87:2264-2268, 1993; Altschulら, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997)。ギャップが挿入される場合、上記全塩基数は、1つのギャップを1つの塩基として数えた塩基数となる。こ

のようにして数えた全塩基数が、比較する2つの配列間で異なる場合には、同一性(%)は、長い方の配列の全塩基数で、一致した塩基数を除いて算出される。

[0179] 通常、上述の修飾やヌクレオチドアナログの存在は、上記の配列同一性に影響を及ぼさない。

[0180] 本発明の1つの実施態様において、上記(i i)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドは、以下の(a')～(d')から選択されるポリヌクレオチドである：

(a') 配列番号2～5、13～20または22のいずれか1つで示される塩基配列を有するポリヌクレオチド、(b') 上記(a')のポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

(c') 上記(a')のポリヌクレオチドのうちの少数のヌクレオチドが置換し、欠失し、付加し及び／又は挿入されたポリヌクレオチド、

(d') 上記(a')～(c')のいずれか1つのポリヌクレオチドを部分配列として含むポリヌクレオチド。

[0181] 上記(b')のポリヌクレオチドは、上記(a')のポリヌクレオチドの塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、例えば96%以上、97%以上、98%以上、99%以上又は99.5%以上の配列同一性を有する。好ましくは、上記(b')のポリヌクレオチドは、活性部分のキャリアーとしての機能を有する。

[0182] 上記(c')のポリヌクレオチドは、上記(a')のポリヌクレオチドのうちの少数の、好ましくは、1個～数個、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドが置換し、欠失し、付加し及び／又は挿入されたポリヌクレオチドであることができる。好ましくは、上記(c')のポリヌクレオチドは、活性部分のキャリアーとしての機能を有する。

[0183] 上記(d')のポリヌクレオチドは、上記(a')～(c')のいずれかのポリヌクレオチドを部分配列として含むポリヌクレオチドであり、好まし

くは活性部分のキャリアーとしての機能を有する。本発明の1つの実施態様において、上記(d')のポリヌクレオチドの長さは8~100塩基である。好ましくは、前記長さは、少なくとも10塩基であり、少なくとも12塩基であり、少なくとも13塩基であり、少なくとも14塩基であり、少なくとも15塩基、または少なくとも16塩基である。前記長さは、好ましくは100塩基以下、45塩基以下、35塩基以下、30塩基以下、25塩基以下、24塩基以下、23塩基以下、22塩基以下、21塩基以下または20塩基以下であることができる。

[0184] 本発明の1つの実施態様において、核酸複合体は、好ましくはキャリアー部分に、機能性部分を含む。本発明の1つの実施態様において、機能性部分は、キャリアー部分に、好ましくは、キャリアー部分のポリヌクレオチドに結合していてもよい。本発明の1つの実施態様において、機能性部分は、バルジに結合していてもよい。当該ポリヌクレオチド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、水素結合等でキャリアー部分におけるポリヌクレオチド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。

[0185] ある実施形態において、「機能性部分」の構造上、特に制限はなく、それを含むまたはそれと結合する核酸複合体、キャリアー部分及び／又はキャリアー部分のポリヌクレオチドに所望の機能を付与する。所望の機能としては、標識機能、精製機能及び標的への送達機能が挙げられる。標識機能を付与す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。精製機能を付与す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。

[0186] また、本発明の1つの実施態様において、活性部分を特異性高く効率的に標的部位に送達し、かつ当該活性部分によって標的遺伝子の発現を非常に効

果的に抑制するという観点から、上記核酸複合体は、当該複合体を標的部位に送達させる活性を有する分子を機能性部分として含むことができる。好ましくは、キャリア一部分が当該分子を含み、好ましくは、当該分子はキャリア一部分のポリヌクレオチド、好ましいバルジ構造に結合している。

[0187] 「標的への送達機能」を有する部分として、例えば、肝臓等に特異性高く効率的にある実施形態における核酸複合体を送達できるという観点から、脂質が挙げられる。このような脂質としては、コレステロール、脂肪酸等の脂質（例えば、ビタミンE（トコフェロール類、トコトリエノール類）、ビタミンA、ビタミンD）、ビタミンK等の脂溶性ビタミン（例えば、アシルカルニチン）、アシルCoA等の中間代謝物、糖脂質、グリセリド、並びにそれらの誘導体等を例示することができるが、これらの中では、より安全性が高いという観点から、ある実施形態において、コレステロール、ビタミンE（トコフェロール類、トコトリエノール類）を利用することが好ましい。また、脳に特異性高く効率的に本発明の核酸を送達できるという観点から、ある実施形態における「機能性部分」としては、糖（例えば、グルコース、スクロース）が挙げられる。さらに、低分子および生体分子／生体活性分子（以下、「低分子リガンド」とも呼ぶ。例えばアニスアミド、チロフィバン、および2-ピロリジン-1-イル-N-[4-[4-(2-ピロリジン-1-イル-アセチルアミノ)-ベンジル]-フェニル]-アセトアミド)を挙げることできる。また、各臓器の細胞表面にある各種タンパク質に結合することにより、当該臓器に特異性高く効率的にある実施形態における核酸複合体を送達できるという観点から、受容体のリガンドや抗体、及び／又はそれらの断片等のペプチド又はタンパク質、葉酸が、ある実施形態における「機能性部分」として挙げられる。「ペプチド」とは、2分子以上のアミノ酸がペプチド結合で連結した物質であり、本明細書においては、100残基未満のアミノ酸が連結した物質を指す。本発明においては、好ましくは、60残基以下のアミノ酸、例えば50残基以下、40残基以下、30残基以下、20残基以下、または10残基以下のアミノ酸、例えば9残基以下、8残基

以下、7残基以下、6残基以下、5残基以下のアミノ酸が連結したペプチドが標的への送達機能を有する部分（送達機能部分）として使用される。送達機能部分として使用されるペプチド（以下、「ペプチドリガンド」とも呼ぶ）は、特に限定されないが、その例としては、環状RGD配列含有ペプチド、インスリン、グルカゴン様ペプチド-1、バソプレシン、オキシトシンが挙げられる。

[0188] ここで、「環状RGD配列含有ペプチド」（以後、「cRGD」、「cRGDペプチド」とも呼ぶ）は、少なくとも1つのアルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）配列を有し、環状構造を形成するペプチドである。RGD配列は、細胞表面上の細胞接着分子であるインテグリン分子（特に $\alpha_v\beta_3$ や $\alpha_v\beta_5$ 等）に結合してこれを活性化することや、細胞側のエンドサイトーシスを誘導することが知られており、RGDペプチドの腫瘍標的リガンドとしての使用も知られている。本発明では、斯かるRGD配列を有し、環状構造を形成するペプチドであれば、任意のcRGDペプチドを使用することが可能である。cRGDペプチドの配列長は特に制限されないが、環状構造を形成する観点から、アミノ酸数が通常3以上、例えば、4～15または5～10であることが好ましい。

[0189] 本発明においては、「ペプチドリガンド」と同様に、送達性機能を有する上記の脂質、タンパク質、糖鎖、低分子および生体分子／生体活性分子についてもそれぞれ、「脂質リガンド」「タンパク質リガンド」「糖鎖リガンド」「低分子リガンド」「生体分子／生体活性分子リガンド」と呼ぶことがあり、これらをまとめて単に「リガンド」とも呼ぶこともある。

[0190] 本発明の1つの実施態様において、上記（i i）キャリアー部分は、標的への送達機能を有する機能性部分（送達機能部分）を含み、当該送達機能部分は、好ましくは、脂質、ペプチド、タンパク質、糖鎖、低分子および生体分子／生体活性分子からなる群から選択される分子であり、例えば、環状アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）配列含有ペプチド、N-アセチルガラクトサミン、コレステロール、ビタミンE（トコフェロール）、

ステアリン酸、ドコサン酸、アニスアミド、葉酸、アナンダミドまたはスベルミンである。

[0191] 本発明の1つの実施態様において、上記(i i) キャリアー部分は、ポリヌクレオチドと機能性部分、特に送達機能部分とからなる。

[0192] 本発明の1つのさらなる実施態様において、上記(i i) キャリアー部分は機能性部分を含まず、特に送達機能部分を含まない。

[0193] 本発明の他の態様において、本発明は、

(i) ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチド、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5'ウィング領域および上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、2~5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3'ウィング領域を構成単位として含むポリヌクレオチドを含む活性部分、ならびに

(i i) 構成単位としての修飾されていないリボヌクレオチドおよび修飾されていないデオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリアー部分、を含む、二本鎖核酸複合体であって、

上記(i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含み、当該バルジは修飾されていないリボヌクレオチドから形成され、

上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドに対するおよび/または標的転写産物に対するミスマッチを含まず、かつ

上記(i i) キャリアー部分が標的への送達機能を有する機能性部分を含まない、二本鎖核酸複合体に関する。

[0194] 例えば、上記のようなりガンドを有する本発明の核酸複合体は、上記リガ

ンドが特異的に結合可能なレセプターを有する細胞や組織（例えばそれらの表面に有する）を標的細胞または標的組織とすることができる。標的細胞や標的組織の種類は特に限定されず、目的などに応じて適宜の細胞や組織を標的とすることができる。例えば、標的細胞は組織や臓器を形成する細胞であってもよい。あるいは、標的細胞は、白血病細胞のように単独で存在する細胞であってもよく、固形がん細胞のように組織に腫瘍を形成している細胞やリンパ組織や他の組織に浸潤している細胞などであってもよい（以下、これらの細胞をまとめて単に「癌細胞」とも呼ぶ）。

[0195] 本発明の1つの実施態様において、上記リガンドは、上記核酸複合体に、好ましくは上記キャリア一部分に、より好ましくは上記キャリア一部分のポリヌクレオチドに、直接結合していても、リンカーを介して間接的に結合していてもよい。例えば、上記リガンドは、上記ポリヌクレオチドの5'末端または3'末端に、好ましくは5'末端に、直接またはリンカーを介して結合させることができる。上記のようなリガンドを、任意選択的にリンカーを介して、ポリヌクレオチドに結合させる方法は当業者によく知られている。当業者は、使用するリガンドやリンカーの種類に応じて適宜適切な公知の方法を選択することにより、上記結合を達成することが可能である。

[0196] 1つの実施態様において、上記送達機能部分は、リガンドのみからなる。本発明のさらなる実施態様において、上記送達機能部分は、リガンドおよびリンカーのみからなる。

[0197] 一般的に、化合物を経腸投与（経口投与等）した場合には、その化合物は血管ではなく、リンパ管を通して生体内に拡散されていく。しかしながら、リンパ管に達するためには、化合物の分子量は11000~17000ダルトン以上であることが必要となる。さらに、経腸投与した化合物は、腸管内のRNase Aに曝露されることになるため、リボヌクレオチドを含有する核酸医薬は、当該リボヌクレオチドの部分を全て2'-O-メチル化等にて修飾しておくことも好ましい。従って、本発明の1つの実施態様において、上記核酸複合体がリボヌクレオチドや構造化学的にRNA構造を有する修飾

ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ、例えばLNAを含む場合、これらは全て2'-O-メチル化されている。

[0198] 以上、いくつかの実施態様において、核酸複合体の好適な典型例について説明したが、いくつかの実施態様における核酸複合体は上記典型例に限定されるものではない。また、いくつかの実施形態において、活性部分のポリヌクレオチドおよびキャリア一部分のポリヌクレオチドは、当業者であれば公知の方法を適宜選択することにより調製することができる。例えば、標的転写産物の塩基配列（又は、いくつかの場合においては標的遺伝子の塩基配列）の情報に基づいて、核酸の塩基配列を設計し、市販の核酸自動合成機（アプライドバイオシステムズ社製、ベックマン社製等）を用いて合成し、次いで、得られるポリヌクレオチドを逆相カラム等を用いて精製することにより、核酸を調製することができる。そして、このようにして調製した核酸を適当な緩衝液中にて混合し、約90～98℃にて数分間（例えば、5分間）かけて変性させた後、約30～70℃にて約1～8時間かけてアニーリングさせることにより、いくつかの実施形態における核酸複合体を調製することができる。また、機能性部分が結合している核酸複合体は、予め機能性部分を結合させた核酸種を用いて、前記の通り、合成、精製及びアニーリングすることにより、調製することができる。機能性部分と核酸とを結合させるための多くの方法は、当該分野においてよく知られている。

[0199] なお、上述のように、本発明の核酸複合体は、主にRNaseH依存的な経路により、そのアンチセンス効果を発揮するものと考えられる。しかしながら、本発明のさらなる実施態様において、本発明の核酸複合体は、RNaseH非依存的アンチセンス効果を有し得る。「RNaseH非依存的アンチセンス効果」とは、標的遺伝子の転写産物（RNAセンス鎖）と、その部分配列に相補的な核酸鎖とがハイブリダイズすることによる翻訳の阻害やエキソスキッピング等のスプライシング機能変換効果によって生じる標的遺伝子の発現を抑制する活性のことを意味する。

[0200] <標的遺伝子の発現又は標的転写産物を抑制するための組成物>

いくつかの実施形態における核酸複合体は、特異性高く効率良く標的部位に送達され、かつ、後述の実施例において示す通り、標的遺伝子の発現又は標的転写産物レベルを非常に効果的に抑制することができる。従って、いくつかの実施形態における核酸複合体を有効成分として含有する、例えば、標的遺伝子の発現をアンチセンス効果によって抑制するための組成物を、本発明は提供することができる。特に、いくつかの実施形態における核酸複合体は、低濃度の投与により高い薬効を得ることができ、かつアンチセンス核酸の送達標的領域以外の臓器における分布を抑制することにより、副作用も低減できるため、代謝性疾患、腫瘍、感染症といった標的遺伝子の発現亢進に伴う疾患を治療、予防するための医薬組成物も、いくつかの実施形態において提供することができる。

[0201] 従って、本発明の1つの実施態様において、本発明は、上記核酸複合体と、任意に薬理的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物に関する。

[0202] また、本発明の別の実施態様において、本発明は、医薬組成物を製造するための、上記核酸複合体の使用に関する。

[0203] さらに別の実施態様において、本発明は、上記核酸複合体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において癌を治療する方法に関する。

[0204] 上記医薬組成物は、癌細胞の増殖を抑制するための医薬組成物であることができ、または、癌治療用および／または予防用医薬組成物であることができる。

[0205] 上記癌は、例えば、脳腫瘍；頭、首、肺、子宮又は食道の扁平上皮癌；メラノーマ；肺又は子宮の腺癌；腎癌；悪性混合腫瘍；肝細胞癌；基底細胞癌；筋細胞腫様歯肉腫；口腔内腫瘤；肛門周囲腺癌；肛門嚢腫瘍；肛門嚢アポクリン腺癌；セルトリ細胞腫；膣前庭癌；皮脂腺癌；皮脂腺上皮腫；脂腺腺腫；汗腺癌；鼻腔内腺癌；鼻腺癌；甲状腺癌；大腸癌；気管支腺癌；腺癌；腺管癌；乳腺癌；複合型乳腺癌；乳腺悪性混合腫瘍；乳管内乳頭状腺癌；線維肉腫；血管周皮腫；肉腫；骨肉腫；軟骨肉腫；軟部組織肉腫；組織球肉腫；粘液肉腫；未分化肉腫；肺癌；肥満細胞腫；皮膚平滑筋腫；腹腔内平滑筋

腫；平滑筋腫；慢性型リンパ球性白血病；リンパ腫；消化管型リンパ腫；消化器型リンパ腫；小～中細胞型リンパ腫；副腎髓質腫瘍；顆粒膜細胞腫；褐色細胞腫；頭頸部癌；乳癌；肺癌；結腸癌；卵巣癌；前立腺癌；神経膠腫；神経膠芽腫；星状細胞腫；多形神経膠芽腫；炎症性乳癌；ウィルムス腫瘍；ユーイング肉腫；横紋筋肉腫；上衣腫；髓芽腫；腎癌；肝癌；黒色腫；脾臓癌；骨巨細胞腫；甲状腺癌；リンパ芽球性T細胞白血病；慢性骨髓性白血病；慢性リンパ球性白血病；ヘアリー細胞白血病；急性リンパ芽球性白血病；急性骨髓性白血病；AML；慢性好中球性白血病；急性リンパ芽球性T細胞白血病；形質細胞腫；免疫芽球性大細胞型白血病；マンツル細胞白血病；多発性骨髓腫；巨核芽球性白血病；急性巨核球性白血病；前骨髓球性白血病；赤白血病；ホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫；リンパ芽球性T細胞リンパ腫；バーキットリンパ腫；濾胞性リンパ腫；神経芽細胞腫；膀胱癌；尿路上皮癌；外陰癌；子宮頸癌；子宮内膜癌；中皮腫；食道癌；唾液腺癌；肝細胞癌；胃癌；上咽頭癌；頬癌；口腔癌GIST（消化管間葉性腫瘍）；上皮様細胞癌；肺胞基底上皮腺癌および精巣癌からなる群から選択される。

- [0206] 本発明のさらなる実施態様において、本発明は、上記核酸複合体を細胞と接触させる工程を含む、細胞内の転写産物レベルを低減する方法に関する。
- [0207] 本発明の別の実施態様において、本発明は、上記核酸複合体を細胞、好ましくは癌細胞と接触させる工程を含む、当該細胞の増殖を抑制する方法に関する。
- [0208] 本発明の別の実施態様において、本発明は、哺乳動物において標的遺伝子またはタンパク質をコードしない転写産物、例えばノンコーディングRNAの発現を低減させるための、上記核酸複合体の使用に関する。
- [0209] 本発明の別の実施態様において、本発明は、哺乳動物において、好ましくは標的組織・標的部位における、標的細胞、好ましくは癌細胞の増殖を抑制するための、上記核酸複合体の使用に関する。
- [0210] 本発明はさらに、哺乳動物において標的遺伝子またはタンパク質をコードしない転写産物（例えばノンコーディングRNA）の発現を低減させるため

の薬剤を製造するための、上記核酸複合体の使用に関する。本発明はまた、哺乳動物において、好ましくは標的組織・標的部位における、標的細胞、好ましくは癌細胞の増殖を抑制するための薬剤を製造するための、上記核酸複合体の使用に関する。

[0211] さらに実施態様において、本発明は、上記核酸複合体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において標的遺伝子またはタンパク質をコードしない転写産物（例えばノンコーディングRNA）の発現レベルを低減する方法に関する。本発明の別の実施態様において、本発明は、上記核酸複合体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において、好ましくは標的組織・標的部位における、標的細胞、好ましくは癌細胞の増殖を抑制する方法に関する。上記の態様では、好ましくは、活性部分のポリヌクレオチドは、転写産物、例えば標的遺伝子mRNAやタンパク質をコードしない転写産物（例えばノンコーディングRNA）のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である。

[0212] 1つの実施態様において、上記転写産物は、タンパク質をコードするmRNA転写産物である。好ましくは、上記タンパク質はヒトBCL2またはヒトSTAT3である。他の実施態様において、上記転写産物は、タンパク質をコードしない転写産物、例えばマウスの転位関連肺腺癌転写産物（MALAT1）ノンコーディングRNA（GenBank Accession番号NR_002847）である。

[0213] また、本発明の1つの実施態様において、上記標的遺伝子は、ヒトbcl-2またはヒトSTAT3である。

[0214] 1つの好ましい実施態様において、上記哺乳動物はヒトである。

[0215] 核酸複合体を含む上記組成物や薬剤は、公知の製剤学的方法により製剤化することができ、例えば所望の投与形態や剤形に製剤化することができる。例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、咀嚼剤、バッカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、塗布剤、軟膏剤、

硬膏剤、パップ剤、経皮吸収型製剤、ローション剤、吸引剤、エアゾール剤、注射剤、坐剤等として、経腸管的（経口的等）又は非経腸管的に使用することができる。

[0216] これら製剤化においては、薬理学上もしくは飲食品として許容可能な担体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、溶剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、pH調節剤、安定剤、香味剤、芳香剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等と適宜組み合わせることができる。

[0217] 製剤化等の際し、「Kazutaka Nishinara, Molecular Therapy, 2008年、16巻、734~740ページ」に示されるように、機能性部分として脂質が結合している、いくつかの実施形態における二本鎖核酸複合体においては、カイロミクロンやカイロミクロンレムナント等のリポタンパク質との複合体を形成させてもよい。さらに、経腸投与の効率を高めるという観点から、前記リポタンパク質に加え、大腸粘膜上皮透過性亢進作用を有する物質（例えば、中鎖脂肪酸、長鎖不飽和脂肪酸又はそれらの誘導體（塩、エステル体又はエーテル体））及び界面活性剤（非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤）との複合体（混合ミセル、エマルジョン）であってもよい。

[0218] 上記組成物または薬剤の好ましい投与形態としては特に制限はなく、経腸管的（経口的等）又は非経腸管的、より具体的には、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、気道内投与、直腸投与及び筋肉内投与、輸液による投与が挙げられる。

[0219] 各実施形態において核酸複合体や組成物は、ヒトを含む動物を対象として使用することができ、すなわち、ヒトおよびヒト以外の動物を対象とすることができる。ヒト以外の動物としては特に制限はなく、種々の家畜、家禽、ペット、実験用動物等を対象とすることができる。

[0220] いくつかの実施形態における組成物を投与又は摂取する場合、その投与量

又は摂取量は、対象の年齢、体重、症状、健康状態、組成物の種類（医薬品、飲食品など）等に応じて、適宜選択されるが、ある実施形態にかかる組成物の有効摂取量は、ヌクレオチド換算で0.001mg/kg/日～50mg/kg/日であることが好ましい。

[0221] 本発明の二本鎖核酸は、特異性高く効率的に標的部位に送達され、かつ後述の実施例において示す通り標的遺伝子の発現又は標的転写産物レベルを非常に効果的に抑制することができ、さらに抗腫瘍効果を発揮することができる。従って、本発明の1つの実施態様では、対象に対して、上記核酸複合体を投与し、標的遺伝子の発現又は標的転写産物をアンチセンス効果によって抑制する方法を提供することができる。また、本発明の組成物を対象に投与することによって、標的遺伝子の発現亢進等を伴う各種疾患を治療、予防するための方法をも提供することができる。

実施例

[0222] 以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、実施形態は以下の実施例に限定されるものではない。

[0223] 例1

[2本鎖核酸の合成]

ヒトBCL2遺伝子の配列に基づいて、該遺伝子を標的とするDNA-バルジ型DNAを基本骨格とする2本鎖核酸を設計した。BCL2遺伝子に対する2本鎖核酸の具体例としては、アンチセンス鎖ヌクレオチドの配列（16mer）を配列番号1に、相補鎖ヌクレオチド配列を配列番号2～5に示す。各々の遺伝子配列においてアンチセンス鎖とそれぞれの相補鎖をアニーリングさせることで2本鎖核酸を形成する。配列番号1と2から形成される2本鎖核酸をBRDB-1、配列番号1と3から形成される2本鎖核酸をBRDB-2、配列番号1と4から形成される2本鎖核酸をBRDB-3、配列番号1と5から形成される2本鎖核酸をBRDB-4とする。これらの2本鎖核酸は株式会社ジーンデザイン社に合成を委託した。配列表記として下線で示すヌクレオチドはRNA、

[0224] [化11]

\boxed{N}

[0225] は L N A、それ以外は D N A を表す。また、ヌクレオチドの結合様式として p s はチオリン酸結合、p o はホスホジエステル結合を示す。

[0226] [表1]

配列番号1:

5'- $\boxed{CpsTpsCpsCpsCpsApsGpsCpsGpsTpsGpsCpsGpsCpsCpsA}$ -3'

配列番号2:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoUpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号3:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoUpoUpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号4:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoUpoUpoUpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号5:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoUpoUpoUpoUpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

[0227] 例2

[細胞培養]

後述の実験に用いるヒト癌由来細胞株は、以下の方法で維持した細胞株を用いた。

[0228] ヒト上皮様細胞癌由来細胞株（A431細胞株：JCRB細胞バンクより購入、細胞番号：JCRB0004）は、10質量%のウシ胎児血清、100ユニット/mlのペニシリン及び100 μ gのストレプトマイシンを添加した成長培地（DMEM：GIBCO社製）を用い、ヒト膵臓癌由来細胞株（AsPC-1細胞株：ATCC細胞バンクより購入、細胞番号：CRL-1682）は、10質量%のウシ胎児血清、100ユニット/mlのペニシリン及び100 μ gのストレプトマイシンを添加した成長培地（RPMI1640：GIBCO社製）を用いて、37 $^{\circ}$ C、5質量%CO₂条件下にて維持した。

また、ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株（A549細胞株：JCRB細胞バンクより購入、細胞番号：JCRB0076）及びヒト大腸癌由来細胞株（HCT116細胞株：ATCC細胞バンクより購入、細胞番号：CCL-2

47) は、10質量%のウシ胎児血清、MEM用非必須アミノ酸 (NEAA)、100ユニット/mlのペニシリン及び100 μ gのストレプトマイシンを添加した成長培地 (MEM: GIBCO社) を用い、37 $^{\circ}$ C、5質量% CO₂条件下にて維持した。

[0229] 例3

[細胞増殖アッセイ]

後述の実験で行った細胞増殖アッセイは、特に断りのない限り、以下の方法で行った。96穴マイクロプレートを用い、加湿条件下 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)、100 μ l/ウェルの培地で細胞を培養した。細胞増殖アッセイには細胞増殖試薬 WST-1 (ロッシュ社製) を1ウェルに対し10 μ l添加し、マイクロプレートリーダー (Bio Rad社製) を用いて吸光度を測定した。

[0230] 例4

[定量RT-PCR]

後述の実験で行った定量RT-PCRは、特に断りのない限り、以下の方法で行った。Rneasy Mini Kit (QIAGEN社) を用いて、培養細胞からトータルRNAを抽出した。上記トータルRNAを用いた定量RT-PCRはQuant-Fast Probe RT-PCR Kit (QIAGEN社製) を使用し、推奨される条件で行った。プライマーはApplied Biosystem社製 TaqMan Gene Expression Assays Probeを使用した。内因性コントロールプライマーには同社製 β -Actinを用いた。上記定量RT-PCRの増幅は、ROTOR-Gene Q (QIAGEN社製) を用いて行った。mRNA発現量はDelta-Delta CT法により算出した。

[0231] 例5

[ヒトbcl2遺伝子を標的とする2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験]

上記のヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のインビトロにおける細

胞増殖抑制活性を調べるために、以下の実験を行った。まず、配列番号1と配列番号2～5をアニーリングさせた2本鎖核酸（計4本）を用意した。次いで、リポフェクトアミン2000（インビトロジェン社）を用いて、A431、AsPC-1、A549、HCT116細胞株に10nMの上記2本鎖核酸をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞株を、トランスフェクトから72時間培養し、上述の例3に記載の細胞増殖アッセイ法により2本鎖核酸の細胞増殖抑制活性を測定した。

[0232] また、上記の2本鎖核酸に代えて、非標的遺伝子（GL3）に対する2本鎖核酸を用いて、同様の細胞増殖アッセイを行った。

[0233] その結果をA431細胞株は図1、AsPC-1細胞株は図2、A549細胞株は図3、HCT116細胞株は図4に示す。図1～4から分かるように、DNA-バルジ型を基本骨格とする2本鎖核酸はヒトBCL2遺伝子を標的とすることで各種癌細胞株に対する増殖抑制活性を示した。

[0234] 例6

[ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性試験]

上記のヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のインビトロにおけるmRNA発現抑制活性を調べるために、以下の実験を行った。まず、配列番号1と配列番号5をアニーリングさせた2本鎖核酸を用意した。次いで、リポフェクトアミン2000（インビトロジェン社）を用いて、A431、AsPC-1、A549、HCT116細胞株に10nMの上記2本鎖核酸をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞株を、トランスフェクトから24時間培養し、上述の例4に記載の定量RT-PCR法により2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性を定量した。

[0235] また、上記の2本鎖核酸に代えて、非標的遺伝子（GL3）に対する2本鎖核酸を用いて、同様のmRNA発現抑制活性を定量した。

[0236] その結果をA431細胞株は図5、AsPC-1細胞株は図6、A549細胞株は図7、HCT116細胞株は図8に示す。図5～8より分かる通り

、DNA-バルジ型を基本骨格とする2本鎖核酸はヒトBCL2遺伝子を標的とすることで各種癌細胞株に対するmRNA発現抑制活性を示した。

[0237] 例7

[2本鎖核酸の合成]

ヒトBCL2及びMALAT1遺伝子の配列に基づいて、該遺伝子を標的とするDNA-バルジ型を基本骨格とする2本鎖核酸を設計した。具体例としては、BCL2遺伝子に対するアンチセンス鎖ヌクレオチドの配列を配列番号6～12、MALAT1遺伝子に対するアンチセンス鎖ヌクレオチドの配列を21に、相補鎖ヌクレオチドのBCL2遺伝子に対する配列を配列番号13～20、MALAT1遺伝子に対する配列を22に示す(表2)。各々の遺伝子配列においてアンチセンス鎖とそれぞれの相補鎖をアニーリングさせることで2本鎖核酸を形成する。配列番号1と13から形成される2本鎖核酸をBRDB-5、配列番号1と14から形成される2本鎖核酸をBRDB-6、配列番号1と15から形成される2本鎖核酸をBRDB-7、配列番号1と16から形成される2本鎖核酸をBRDB-8、配列番号1と17から形成される2本鎖核酸をBRDB-9、配列番号1と18から形成される2本鎖核酸をBRDB-10、配列番号1と19から形成される2本鎖核酸をBRDB-11とする。配列番号6と2～5及び13、14から形成される2本鎖核酸をBRD-12～17、配列番号7と2～5及び13、14から形成される2本鎖核酸をBRD-18～23、配列番号8～12と5から形成される2本鎖核酸をBRD-24～28、配列番号1と20から形成される2本鎖核酸をBRD-29、配列番号21と22から形成される2本鎖核酸をBRD-30とする。

[0238] 尚、配列番号20、22の5'末端には、

[0239] [化12]

TOC

[0240] で表示している5'-Octyl-tochopherol(Link Technology社製)を結合させた。これらの2本鎖核酸は株式会社ジ

ーンデザイン社に合成を委託した。

[0241] 配列表記として I は *inosine* または *deoxy inosine*、
下線で示すヌクレオチドは RNA、

[0242] [化13]

N

[0243] は LNA、それ以外は DNA を表す。また、ヌクレオチドの結合様式として
ps はチオリン酸結合、po はホスホジエステル結合を示し、N(f) は 2'
-F 修飾ヌクレオチド、X は 1, 2-Dideoxy-B-D-ribose-3-CEP (Chemgene 社製 Cat No. ANP-7058) を示す。

[0244]

[表2]

配列番号 6:

5'- $\boxed{\text{Cps}}\boxed{\text{Tps}}\text{CpsCpsCpsApsApsCpsGpsTpsGpsCpsGpsCps}\boxed{\text{CpsA}}$ -3'

配列番号 7:

5'- $\boxed{\text{Cps}}\boxed{\text{Tps}}\text{CpsCpsCpsApsIpsCpsGpsTpsGpsCpsGpsCps}\boxed{\text{CpsA}}$ -3'

配列番号 8:

5'- CpsTpsCpsCpsCpsApsApsCpsGpsTpsGpsCpsGpsCpsCpsA -3'

配列番号 9:

5'- C (f) psTpsCpsCpsCpsApsApsCpsGpsTpsGpsCpsGps
Cps CpsA (f) -3'

配列番号 10:

5'- C (f) psU(f)psCpsCpsCpsApsApsCpsGpsTpsGpsCpsGps
Cps C (f) psA (f) -3'

配列番号 11:

5'- C (f) psU(f)psC (f) psCpsCpsApsApsCpsGpsTpsGpsCpsGps
C (f) ps C (f) psA (f) -3'

配列番号 12:

5'- C (f) psU(f)psC (f) ps C (f) psCpsApsApsCpsGpsTpsGpsCpsG (f) ps
C (f) ps C (f) psA (f) -3'

配列番号 13:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoUpoUpoUpoUpoUpoGpoCpoTpoGpoGpo
GpoApoG -3'

配列番号 14:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoUpoUpoUpoUpoUpoUpoGpoCpoTpoGpo
GpoGpoApoG -3'

配列番号 15:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoIpoIpoIpoIpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号 16:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoIpoIpoIpoIpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号 17:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoTpoTpoTpoTpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号 18:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoXpoXpoXpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号 19:

5'- TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoXpoXpoXpoXpoGpoCpoTpoGpoGpoGpoApoG -3'

配列番号 20:

5'- $\boxed{\text{TOC}}$ TpoGpoGpoCpoGpoCpoApoCpoUpoUpoUpoUpoGpoCpoTpoGpoGpo
GpoApoG -3'

配列番号 21:

5'- $\boxed{\text{Cps}}\boxed{\text{Tps}}\boxed{\text{Aps}}\text{GpsTpsTpsCpsApsCpsTpsGpsApsAps}\boxed{\text{Tps}}\boxed{\text{Cps}}\boxed{\text{C}}$ -3'

配列番号 22:

5'- $\boxed{\text{TOC}}$ GpoCpoApoTpoTpoCpoApoGpoUpoUpoUpoUpoTpoGpoApoApoCpo
TpoApoG -3'

[0245] 例 8

[細胞培養]

後述の実験に用いるヒト癌由来細胞株は、以下の方法で維持した細胞株を用いた。

[0246] ヒト肝癌由来細胞株（HepG2細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB1886）及びヒト膵臓癌由来細胞株（HPAC細胞株：ATCC細胞バンクより購入、細胞番号：CRL-2119）は、10質量%のウシ胎児血清、100ユニット/mlのペニシリン及び100 μ gのストレプトマイシンを添加した成長培地（DMEM：GIBCO社製）を用い、ヒト胃癌由来細胞株（MKN45細胞株：JCRB細胞バンクより購入、細胞番号：JCRB0254）、ヒト膵臓癌由来細胞株（PANC-1細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB2095）、ヒト前立腺癌由来細胞株（DU145細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB2143）、ヒト前立腺癌由来細胞株（LNCaP細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB2144）、ヒト前立腺癌由来細胞株（PC-3細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB2145）、及びヒト卵巣癌由来細胞株（OVCAR-3細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB2135）は、10質量%のウシ胎児血清、100ユニット/mlのペニシリン及び100 μ gのストレプトマイシンを添加した成長培地（RPMI1640：GIBCO社製）を用い、ヒト腎癌由来細胞株（Caki-1細胞株：JCRB細胞バンクより購入、細胞番号：JCRB0801）、ヒト胃癌由来細胞株（HGC-27細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB0500）、及びヒト膀胱癌由来細胞株（T24細胞株：理研セルバンクより購入、細胞番号：RBRC-RCB2536）、ヒト大腸癌由来細胞株（LS174T細胞株：ATCC細胞バンクより購入、細胞番号：CRL-188）は、10質量%のウシ胎児血清、MEM用非必須アミノ酸（NEAA）、100ユニット/mlのペニシリン及び100 μ gのストレプトマイシンを添加した成長培地（MEM：GIBCO社）を用い、ヒト乳癌由来細胞株（MCF-7細胞株：JCRB細胞バンクより購入、細胞番号：JCRB0134）は、10質量%のウシ胎児血清、1mMピルビン酸ナトリウム、10 μ g/ml インスリン、MEM用非必須ア

ミノ酸 (NEAA)、100 ユニット/ ml のペニシリン及び 100 μ g のストレプトマイシンを添加した成長培地 (MEM: GIBCO 社) を用い、ヒト膵臓癌由来細胞株 (Capan-1 細胞株: ATCC 細胞バンクより購入、細胞番号: HTB-79) は、20 質量% のウシ胎児血清、100 ユニット/ ml のペニシリン及び 100 μ g のストレプトマイシンを添加した成長培地 (IMDM: GIBCO 社製) を用い、37 $^{\circ}$ C、5 質量% CO₂ 条件下にて維持した。

[0247] 例 9

[ヒト BCL2 遺伝子を標的とする 2 本鎖核酸の細胞増殖抑制活性試験]

上記のヒト BCL2 遺伝子を標的とする 2 本鎖核酸のインビトロにおける細胞増殖抑制活性を調べるために、以下の実験を行った。まず、2 本鎖核酸 BRDB-1~28 (計 28 本) を用意した。次いで、リポフェクトアミン 2000 (インビトロジェン社) を用いて、上述の例 2 及び 8 に示したヒト癌由来細胞株に 10 nM の 2 本鎖核酸をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞株を、トランスフェクトから 72 時間培養し、上述の例 3 に記載の細胞増殖アッセイ法により 2 本鎖核酸の細胞増殖抑制活性を測定した。

[0248] また、上記の 2 本鎖核酸に代えて、非標的遺伝子 (GL3) に対する 2 本鎖核酸を用いて、同様の細胞増殖アッセイを行った。

[0249] BRDB-1~4 の様々な細胞株に対する増殖抑制活性作用の結果を PANC-1 細胞株は図 9、Capan-1 細胞株は図 10、Ls174T 細胞株は図 11、HPAC 細胞株は図 12 に示す。

[0250] BRDB-5~23 の様々な細胞株に対する増殖抑制活性作用の結果を AsPC-1 細胞株は図 13、HCT116 細胞株は図 14、A549 細胞株は図 15、A431 細胞株は図 16 に、PANC-1 細胞株は図 17 示す。

[0251] BRDB-24~28 の様々な細胞株に対する増殖抑制活性作用の結果を A549 細胞株は図 18、A431 細胞株は図 19、AsPC-1 細胞株は図 20、HCT116 細胞株は図 21 示す。

[0252] BRDB-4、15、21の様々な細胞株に対する増殖抑制活性作用の結果をCaki-1細胞株は図22、MCF-7細胞株は図23、DU145細胞株は図24、LNCaP細胞株は図25、PC-3細胞株は図26、HGC27細胞株は図27、MKN-45細胞は図28、OVCAR-3細胞は図29、HepG2細胞は図30、T24細胞は図31に示す。

[0253] 図9～31より分かる通り、DNA-バルジ型を基本骨格とする様々な構造の2本鎖核酸はヒトBCL2遺伝子を標的とすることで各種癌細胞株に対する増殖抑制活性を示した。

[0254] 例10

[ヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性試験]

上記のヒトBCL2遺伝子を標的とする2本鎖核酸のインビトロにおけるmRNA発現抑制活性を調べるために、以下の実験を行った。まず、2本鎖核酸BRDB-4、15、21を用意した。次いで、リポフェクトアミン2000（インビトロジェン社）を用いて、上述の例2に示したA549細胞株に10nMの2本鎖核酸をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞株を、トランスフェクトから24時間培養し、上述の例4に記載の定量RT-PCR法により2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性を定量した。

[0255] また、上記の2本鎖核酸に代えて、非標的遺伝子（GL3）に対する2本鎖核酸を用いて、同様のmRNA発現抑制活性を定量した。

[0256] BRDB-4、15、21のA549細胞株に対するmRNA発現抑制活性の結果を図32に示す。

[0257] 図32より分かる通り、DNA-バルジ型を基本骨格とする構造の2本鎖核酸はヒトBCL2遺伝子を標的とすることでA549細胞株に対するmRNA発現抑制活性を示した。

[0258] 例11

[DNA-バルジを基本骨格とする2本鎖核酸の膵癌細胞株肝臓転移マウスモデルにおける薬効評価]

上記のDNA-バルジ構造を基本骨格とするBCL2遺伝子を標的とした2本鎖核酸の膵癌細胞株肝臓転移マウスモデルにおける抗腫瘍効果を検証するため、以下の実験を行った。

[0259] 飼育環境下で数日間馴化したBALB/cA Jcl-nu/nuマウス（6週令：雄、日本クレア株式会社より購入）に三種混合麻酔薬（ドミツール0.3mg/kg + ドルミカム4mg/kg + ベトルファール5mg/kg）をマウス体重10gあたり80 μ l、腹腔内投与して全身麻酔を施した後、1匹あたり1 \times 10⁶個のヒト膵臓癌細胞株（AsPC-1）を脾臓に注入し、脾注肝転移モデルマウスを作製した（ShamとしてPBSを注入するマウスも作製した）。尚、移植翌日から毎日（午後）体重を測定し、人道的エンドポイントから急激な体重減少（数日間で20%以上）、自力歩行不能かつ摂食・摂水不能な重篤状態に陥ったマウスには安楽死処置を施すこととした。癌細胞移植4日後（day 4）、体重を指標に群分けを行い、Saline、非標的遺伝子（GL3）に対する2本鎖核酸及びBRDB-29を1、3mg/kgの用量で尾静脈より投与した。投与期間及び回数は1日1回（day 4, 6, 8, 12, 15, 18, 20, 22, 25）の合計9回実施した。体重測定等で経過を観察し、癌細胞移植から26日後、頸椎脱臼にて安楽死させた後、肝臓を摘出した。抗腫瘍効果を評価するため、摘出した肝臓重量を測定し、マウス体重で補正することで肝重量比を算出した。その結果を図33に示す。図33から分かる通り、DNA-バルジを基本骨格とするBCL2遺伝子を標的とした2本鎖核酸は、膵癌細胞株肝臓転移マウスモデルにおいて統計学的に有意な抗腫瘍効果を示した。

[0260] 例12

[DNA-バルジ構造を基本骨格とする2本鎖核酸のマウス肝臓におけるMALAT1遺伝子ノックダウン効果の検証]

転位関連肺腺癌転写産物（metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1、MALAT1）ノンコーディングRNAを標的とした一実施形態による二本

鎖核酸剤の有用性を検証する *in vivo* 実験を行った。対照 (ASO) は、16merの1本鎖LNA/DNAギャップマーとした (配列番号21)。このASOは、5'末端の3個および3'末端の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。このASOギャップマーは、マウスの転位関連肺腺癌転写産物 (MALAT1) ノンコーディングRNA (GenBankアクセッション番号NR_002847) の1316~1331位に相補的である。

[0261] 体重20~25gの7週齢の雌のC57BL/6 マウスを使用した。PBS、1本鎖アンチセンス核酸 (ASO: 配列番号21) 及びRBDB-30を、マウスにそれぞれ尾静脈を通じて69.2nmol/kgの量 (n=5) で静脈内投与した。投与72時間後、PBSをマウスに灌流させ、その後マウスを解剖して肝臓を摘出した。摘出した肝臓からTotal RNAを抽出し、上述の例4に記載の定量RT-PCR法により2本鎖核酸のmRNA発現抑制活性を定量した。

[0262] その結果は、図34のグラフに示される。1本鎖ASO、RBDB-30の2つの核酸試薬は全て、陰性対照 (PBSのみ) と比較して、MALAT1 RNAの発現の阻害を示した。しかし、RBDB-30によって得られた阻害度は、1本鎖ASOによって得られた阻害度よりも大きく、その差は統計的に有意であった。

産業上の利用可能性

[0263] 以上説明したように、本発明の少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸複合体を用いることによって、アンチセンス核酸を特異性高く効率的に特定の臓器 (細胞) に送達し、当該核酸によって標的遺伝子の発現又は標的転写産物レベルを非常に効果的に抑制することが可能となる。また、上記核酸複合体には、特定の臓器に送達させるための機能性分子として、脂質 (例えば、トコフェロール、コレステロール)、糖 (例えば、グルコース、スクロース)、タンパク質、ペプチド、抗体等の多種多様な分子を適用できるため、上記核酸複合体は、様々な臓器、組織、細胞を標的とすることができる。さ

らには、本発明の核酸複合体における二本鎖核酸に、RNase等に対する耐性を付与するための修飾を施しても、そのアンチセンス効果は低減することはないため、上記核酸複合体は、経腸投与の態様でも利用できる。

[0264] そして、本発明では、DNAをベースとする核酸と、それに相補的な核酸とを含む二本鎖核酸複合体に少なくとも1つのバルジ構造を導入することにより、より優れたアンチセンス効果を達成できること、例えば、実施例でも実証されているように、動物組織内において一本鎖構造を有するASOよりも非常に優れた標的RNA発現阻害効果を示すことが見出された。

[0265] 従って、本発明の少なくとも1つのバルジ構造を有する核酸複合体は、低濃度の投与により高い薬効を得ることができ、かつアンチセンス核酸の標的以外の臓器における分布を抑制することにより、副作用も低減できるという点に優れているため、代謝性疾患、腫瘍、感染症等の、標的遺伝子の発現亢進及び／又は転写産物レベル亢進に伴う疾患を治療、予防するための医薬組成物等として有用である。

請求の範囲

- [請求項1] (i) デオキシリボヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドを含む活性部分、および
- (ii) ヌクレオチドと任意に修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとを構成単位として少なくとも含むポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、
- を含む核酸複合体であって、上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含む、核酸複合体。
- [請求項2] 二本鎖核酸複合体である、請求項1に記載の核酸複合体。
- [請求項3] 上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが1～3つのバルジを含む、請求項1または2に記載の核酸複合体。
- [請求項4] 上記(ii)キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが1つのバルジを含む、請求項3に記載の核酸複合体。
- [請求項5] 上記(i)活性部分のポリヌクレオチドにおけるデオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されている、請求項1～4のいずれか1つに記載の核酸複合体。
- [請求項6] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、請求項1～5のいずれか1つに記載の核酸複合体。
- [請求項7] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが1つまたは複数のヌクレオチドアナログを含み、該ヌクレオチドアナログの少なくとも1つが修飾されていてもよい、請求項1～6のいずれか1つに記載の核酸複合体。
- [請求項8] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドを含み、そして

当該ポリヌクレオチドが、

(a) 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む5'ウィング領域、および／または、

(b) 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、1つまたは複数の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む3'ウィング領域、

を含む、

請求項1～7のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項9] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(a)5'ウィング領域および(b)3'ウィング領域を含む、請求項8に記載の核酸複合体。

[請求項10] 上記5'ウィング領域が2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み、上記3'ウィング領域が2～5個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、請求項8または9に記載の核酸複合体。

[請求項11] 上記5'ウィング領域が1個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含み、上記3'ウィング領域が1個の修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む、請求項8または9に記載の核酸複合体。

[請求項12] 上記5'ウィング領域および3'ウィング領域が、糖修飾ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログとして架橋化ヌクレオチドを含む、請求項8～11のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項13] 上記架橋化ヌクレオチドが、LNA、cEt-BNA、アミドBNA (AmNA) 及びcMOE-BNAからなる群から選択される、請求項12に記載の核酸複合体。

[請求項14] 上記架橋化ヌクレオチドがホスホロチオエート化されている、請求項13に記載の核酸複合体。

- [請求項15] 上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドが、ホスホロチオエート化されている、請求項8～14のいずれか1つに記載の核酸複合体。
- [請求項16] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、ホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5'ウィング領域、ホスホロチオエート化されているデオキシリボヌクレオチドおよびホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3'ウィング領域からなる、請求項8～15のいずれか一つに記載の核酸複合体。
- [請求項17] 上記5'ウィング領域が1～5個の糖修飾リボヌクレオチドからなり、上記3'ウィング領域が1～5個の糖修飾リボヌクレオチドからなり、そして、糖修飾リボヌクレオチドはさらにホスホロチオエート化されていてもよい、請求項8または9に記載の核酸複合体。
- [請求項18] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、ホスホロチオエート化された糖修飾リボヌクレオチドからなる5'ウィング領域、ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドおよびホスホロチオエート化された糖修飾リボヌクレオチドからなる3'ウィング領域からなる、請求項17に記載の核酸複合体。
- [請求項19] 上記糖修飾が、2'-O-メチル化、2'-O-メトキシエチル(MOE)化、2'-O-アミノプロピル(AP)化および2'-フルオロ化からなる群から選択される、請求項17または18に記載の核酸複合体。
- [請求項20] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、ホスホロチオエート化された少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドからなる、請求項1～5のいずれか一つに記載の核酸複合体。
- [請求項21] 上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、構成単位としてデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1～20のいずれか一つに記載の核酸複合体。

- [請求項22] 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項 2 1 に記載の核酸複合体。
- [請求項23] 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、構成単位としてリボヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一つに記載の核酸複合体。
- [請求項24] 上記 (i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドからなる、請求項 2 1 または 2 3 に記載の核酸複合体。
- [請求項25] 上記リボヌクレオチドが修飾されていない、請求項 2 3 または 2 4 に記載の核酸複合体。
- [請求項26] 上記デオキシリボヌクレオチドが修飾されていない、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一つに記載の核酸複合体。
- [請求項27] 上記デオキシリボヌクレオチドの一部または全部が修飾されている、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一つに記載の核酸複合体。
- [請求項28] 上記修飾デオキシリボヌクレオチドが、塩基修飾デオキシリボヌクレオチドである、請求項 2 7 に記載の核酸複合体。
- [請求項29] 上記塩基修飾デオキシリボヌクレオチドが、脱塩基デオキシリボヌクレオチドである、請求項 2 8 に記載の核酸複合体。
- [請求項30] 上記修飾デオキシリボヌクレオチドが塩基修飾以外の修飾を受けていない、請求項 2 7 ~ 2 9 のいずれか一つに記載の核酸複合体。
- [請求項31] バルジが、デオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドから形成される、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一つに記載の核酸複合体。
- [請求項32] バルジが、デオキシリボヌクレオチドから形成される、請求項 3 1 に記載の核酸複合体。
- [請求項33] バルジが、修飾されていないデオキシリボヌクレオチドから形成される、請求項 3 2 に記載の核酸複合体。
- [請求項34] バルジが、塩基修飾デオキシリボヌクレオチドから形成される、請

求項32に記載の核酸複合体。

[請求項35] バルジが、リボヌクレオチドから形成される、請求項31に記載の核酸複合体。

[請求項36] バルジが、修飾されていないリボヌクレオチドから形成される、請求項35に記載の核酸複合体。

[請求項37] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドに対しておよび／または標的転写産物に対して少なくとも1つのミスマッチを含む、請求項1～36のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項38] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドに対するおよび／または標的転写産物に対するミスマッチを含まない、請求項1～36のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項39] 上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対して少なくとも1つのミスマッチを含む、請求項1～38のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項40] 上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドが、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドに対するミスマッチを含まない、請求項1～38のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項41] 上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドの長さが8～100塩基である、請求項1～40のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項42] 上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さが、8～100塩基である、請求項1～41のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項43] 上記(ii)キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、上記(i)活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記(ii)キャリアー部分におけるポリヌクレオチドと同じ

長さを有する、請求項1～42のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項44] 上記(i i) キャリアー部分のポリヌクレオチドからバルジ部分を除いて比較した場合に、上記(i) 活性部分におけるポリヌクレオチドの長さが、上記(i i) キャリアー部分におけるポリヌクレオチドの長さとは異なる、請求項1～42のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項45] 上記(i i) キャリアー部分が、標識機能、精製機能及び標的への送達機能から選択される機能を有する機能性部分をさらに含む、請求項1～44のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項46] 上記(i i) キャリアー部分が標的への送達機能を有する機能性部分を含み、当該機能性部分が、脂質、ペプチド、タンパク質、糖鎖、低分子および生体分子／生体活性分子からなる群から選択される分子である、請求項45に記載の核酸複合体。

[請求項47] 上記機能性部分が、環状アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)配列含有ペプチド、N-アセチルガラクトサミン、コレステロール、ビタミンE(トコフェロール)、ステアリン酸、ドコサン酸、アニスアミド、葉酸、アナンダミドまたはスペルミンである、請求項46に記載の核酸複合体。

[請求項48] 上記(i i) キャリアー部分が標的への送達機能を有する機能性部分を含まない、請求項1～44のいずれか一つに記載の核酸複合体。

[請求項49] (i) ホスホロチオエート化されている少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチド、上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの5'側に位置し、2～5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる5'ウィング領域および上記少なくとも4つの連続したデオキシリボヌクレオチドの3'側に位置し、2～5個のホスホロチオエート化された架橋化ヌクレオチドからなる3'ウィング領域を構成単位として含むポリヌクレオチドを含む活性部分、ならびに

(i i) 構成単位としての修飾されていないリボヌクレオチドおよび修飾されていないデオキシリボヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであって、少なくとも一部が上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチドを含む、キャリア一部分、

を含む、二本鎖核酸複合体であって、

上記 (i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドが少なくとも1つのバルジを含み、当該バルジは修飾されていないリボヌクレオチドから形成され、

上記 (i) 活性部分におけるポリヌクレオチドが、上記 (i i) キャリア一部分におけるポリヌクレオチドに対するおよび／または標的転写産物に対するミスマッチを含まず、かつ

上記 (i i) キャリア一部分が標的への送達機能を有する機能性部分を含まない、二本鎖核酸複合体。

[請求項50] 哺乳動物において標的遺伝子の発現を減少させるための、請求項1～49のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項51] 活性部分におけるポリヌクレオチドが、標的遺伝子 mRNA のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、請求項50に記載の核酸複合体。

[請求項52] 哺乳動物においてタンパク質をコードしない転写産物の発現を減少させるための、請求項1～49のいずれか1つに記載の核酸複合体。

[請求項53] 活性部分におけるポリヌクレオチドが、転写産物のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、請求項52に記載の核酸複合体。

[請求項54] 請求項1～49のいずれか1つに記載の核酸複合体と、任意に薬理的に許容可能な担体とを含む、医薬組成物。

[請求項55] 請求項1～49のいずれか1つに記載の核酸複合体を細胞と接触させる工程を含む、細胞内の転写産物レベルを低減する方法であって、活性部分におけるポリヌクレオチドが該転写産物のいずれかの領域

に相補的なアンチセンス鎖である、方法。

[請求項56] 上記転写産物が、タンパク質をコードする mRNA 転写産物である、請求項55に記載の方法。

[請求項57] 上記転写産物が、タンパク質をコードしない転写産物である、請求項55に記載の方法。

[請求項58] 哺乳動物において標的遺伝子の発現を低減させるための、請求項1～49のいずれか1つに記載の核酸複合体の使用。

[請求項59] 哺乳動物において標的遺伝子の発現を低減させるための薬剤を製造するための、請求項1～49のいずれか1つに記載の核酸複合体の使用。

[請求項60] 請求項1～49のいずれか1つに記載の核酸複合体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において標的遺伝子の発現レベルを低減する方法であって、

活性部分におけるポリヌクレオチドが、標的遺伝子 mRNA のいずれかの領域に相補的なアンチセンス鎖である、方法。

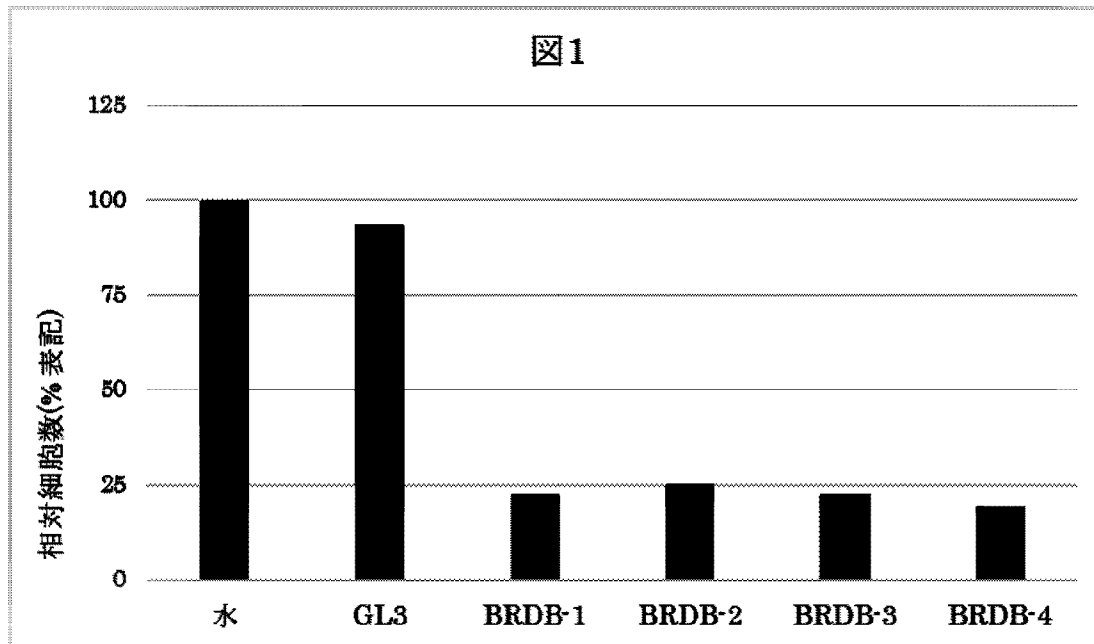
[請求項61] 上記投与が経腸管的投与である、請求項60に記載の方法。

[請求項62] 上記投与が非経腸管的投与である、請求項60に記載の方法。

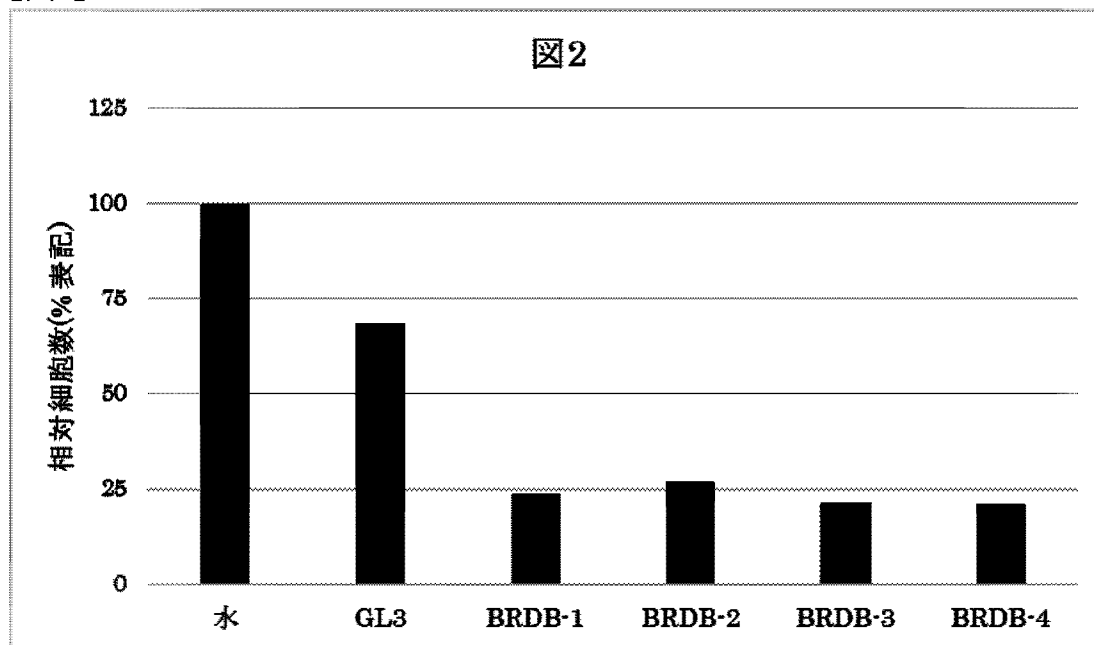
[請求項63] 上記核酸複合体の投与量が、 $0.001\text{ mg/kg/day} \sim 50\text{ mg/kg/day}$ である、請求項60～62のいずれか1つに記載の方法。

[請求項64] 上記哺乳動物がヒトある、請求項60～63のいずれか1つに記載の方法。

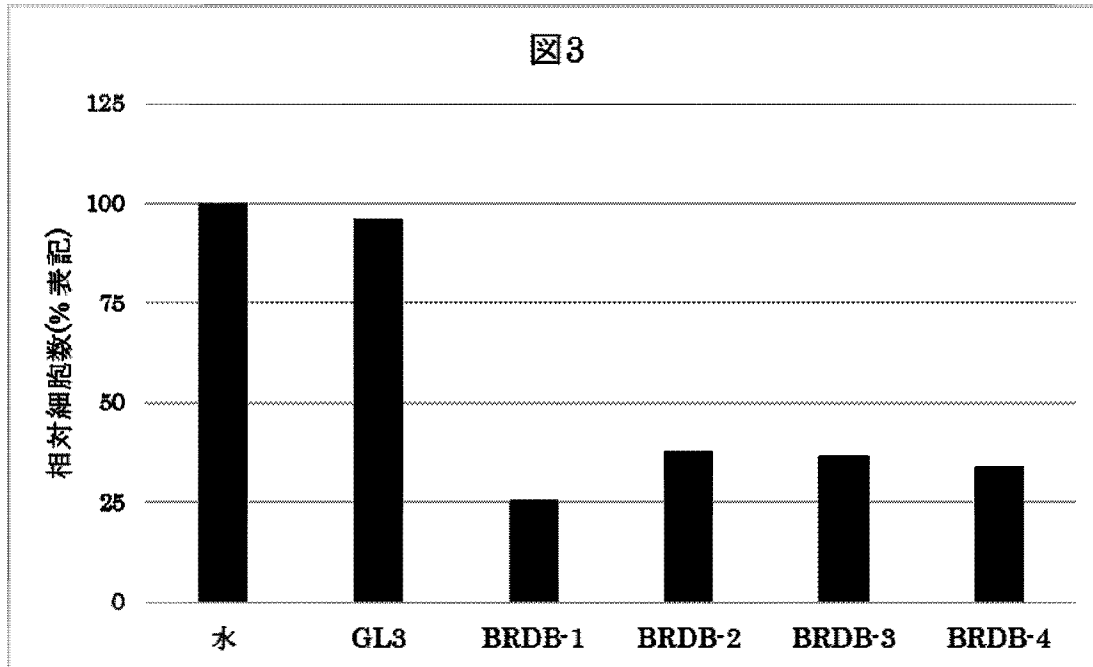
[図1]



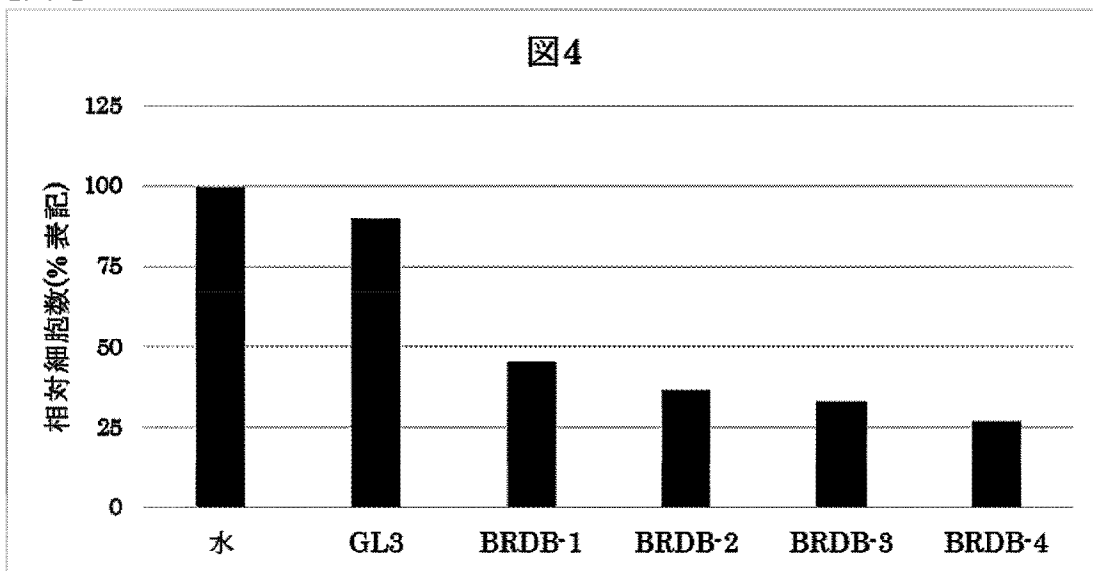
[図2]



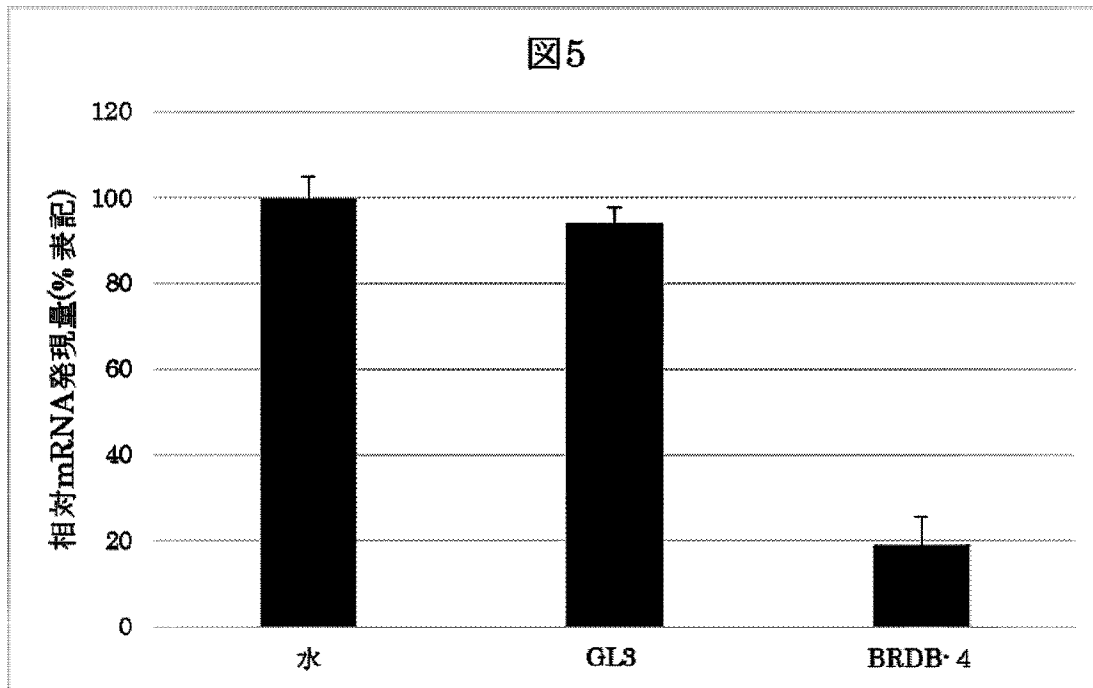
[図3]



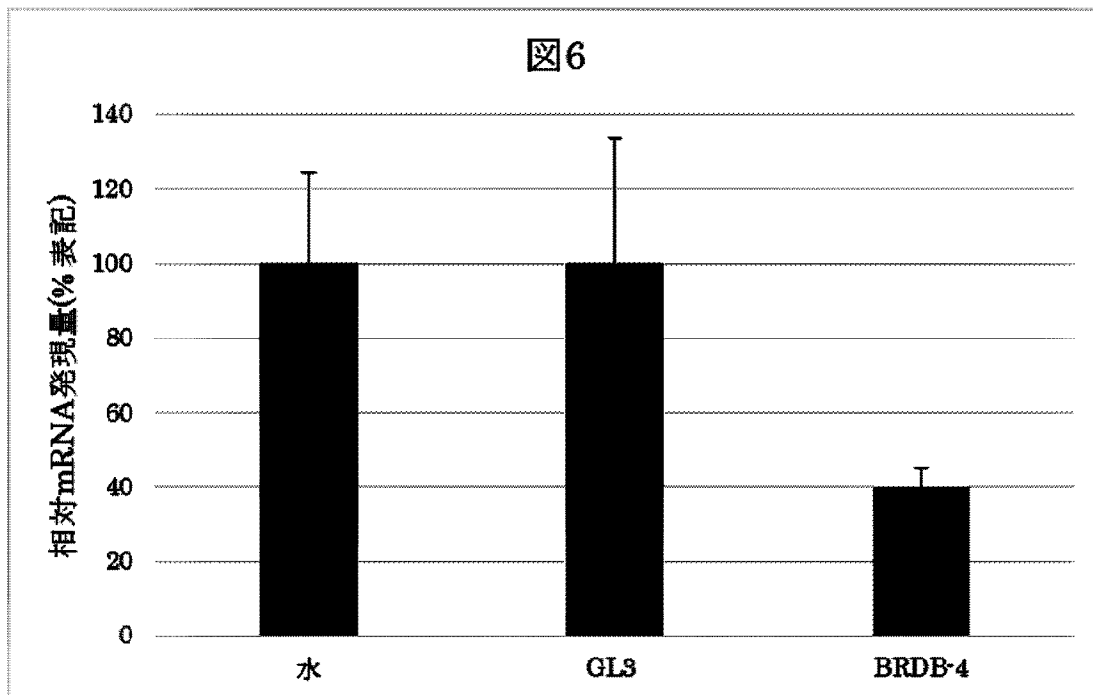
[図4]



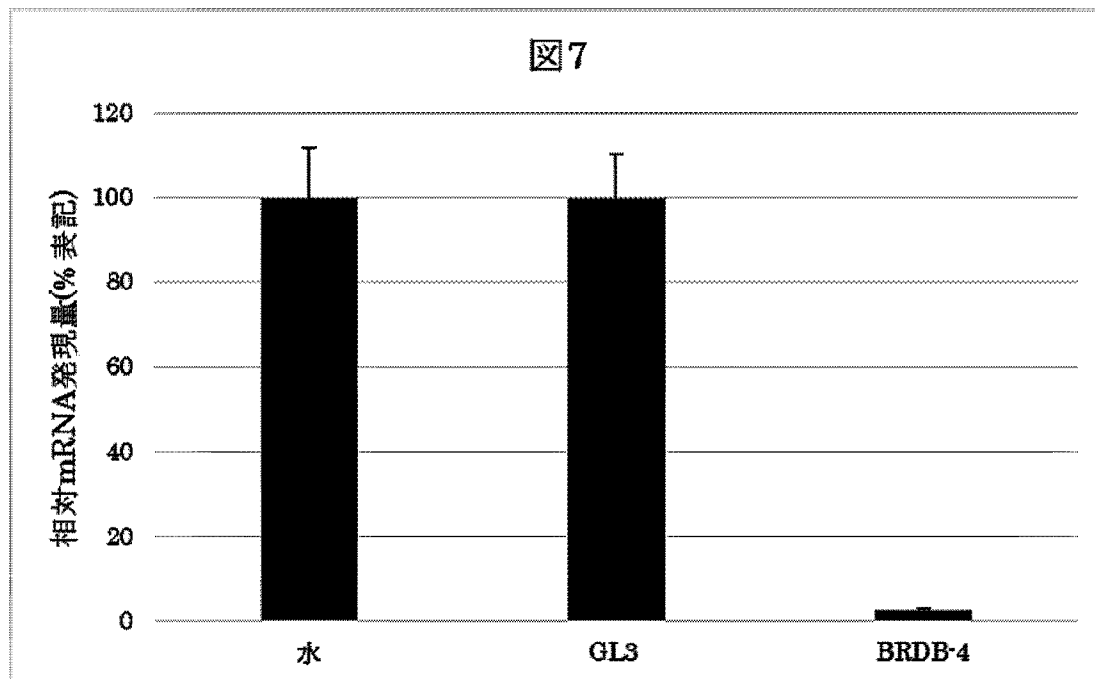
[図5]



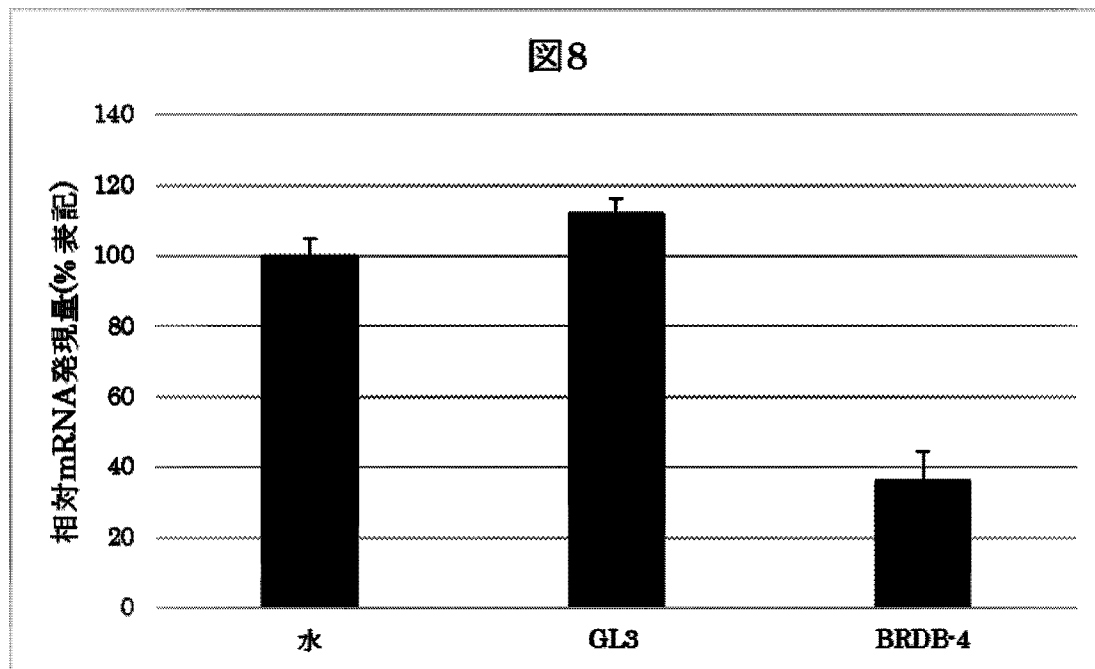
[図6]



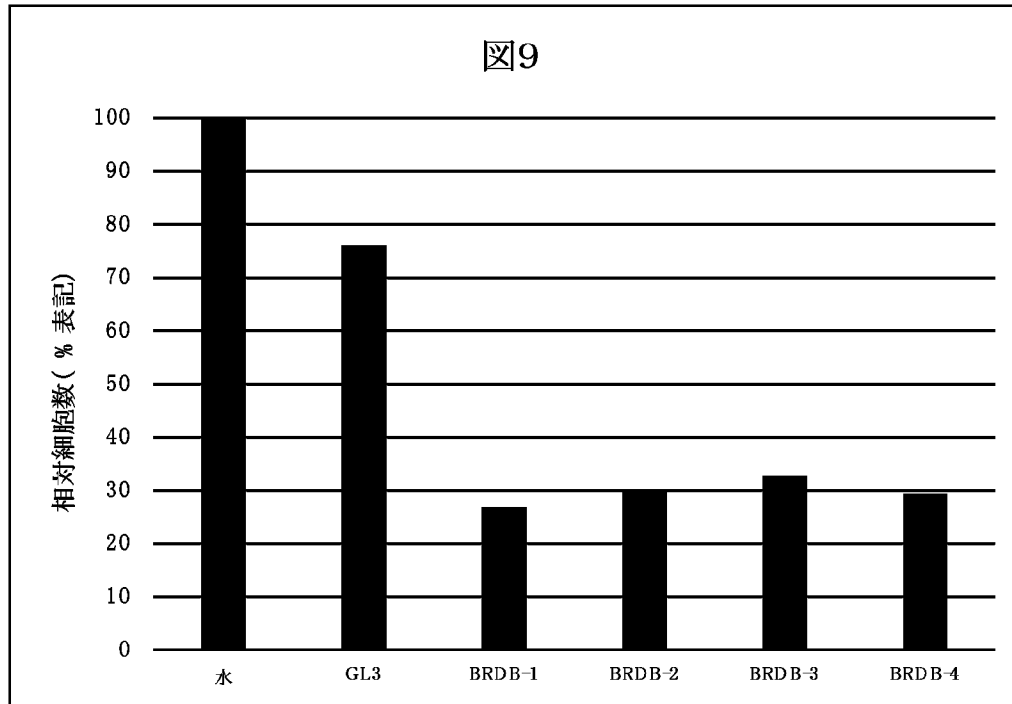
[図7]



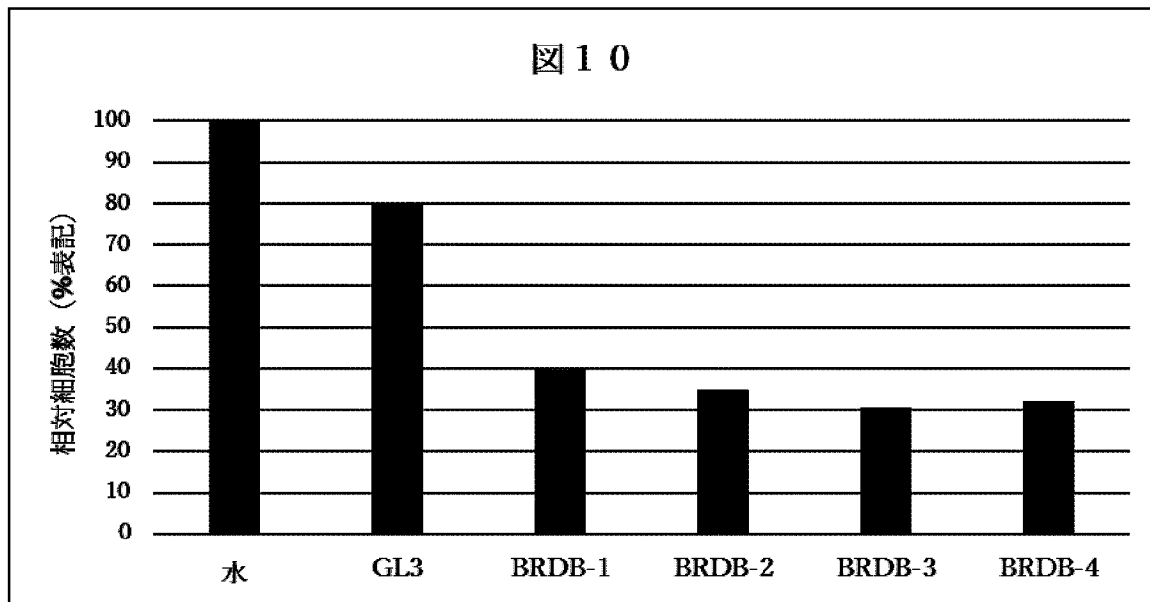
[図8]



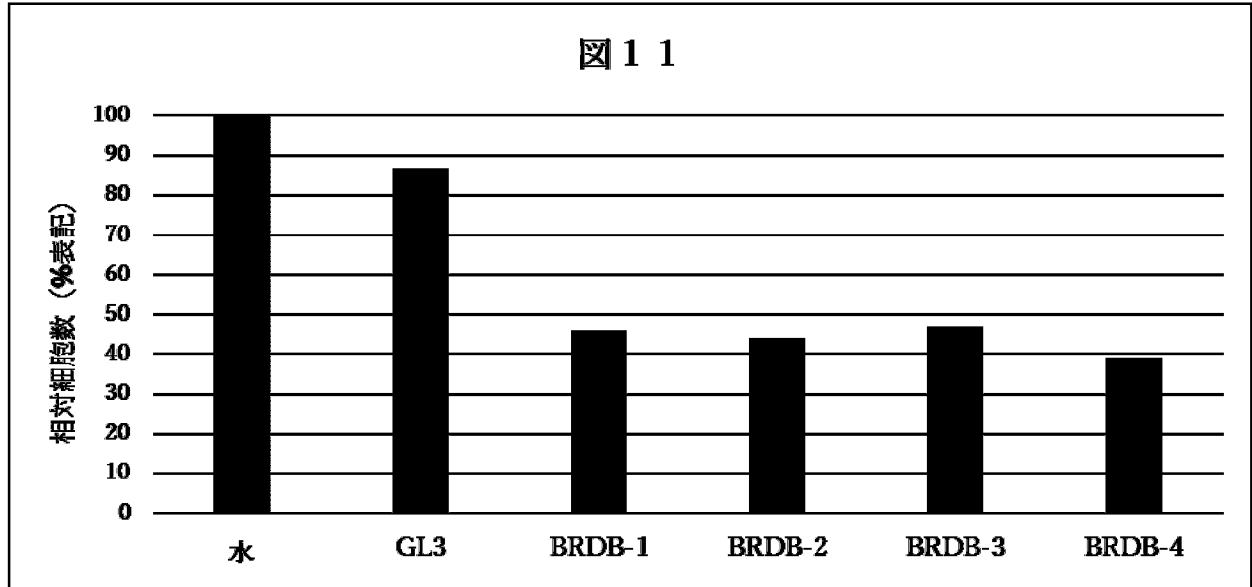
[図9]



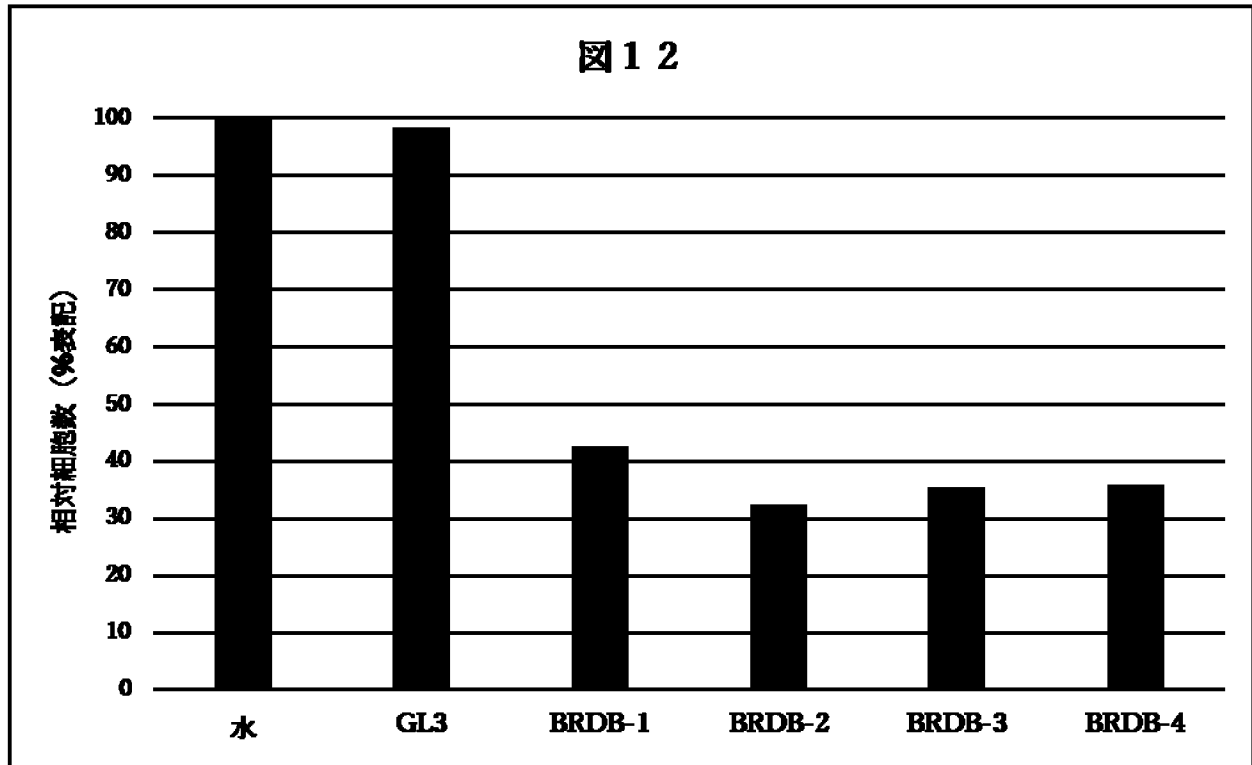
[図10]



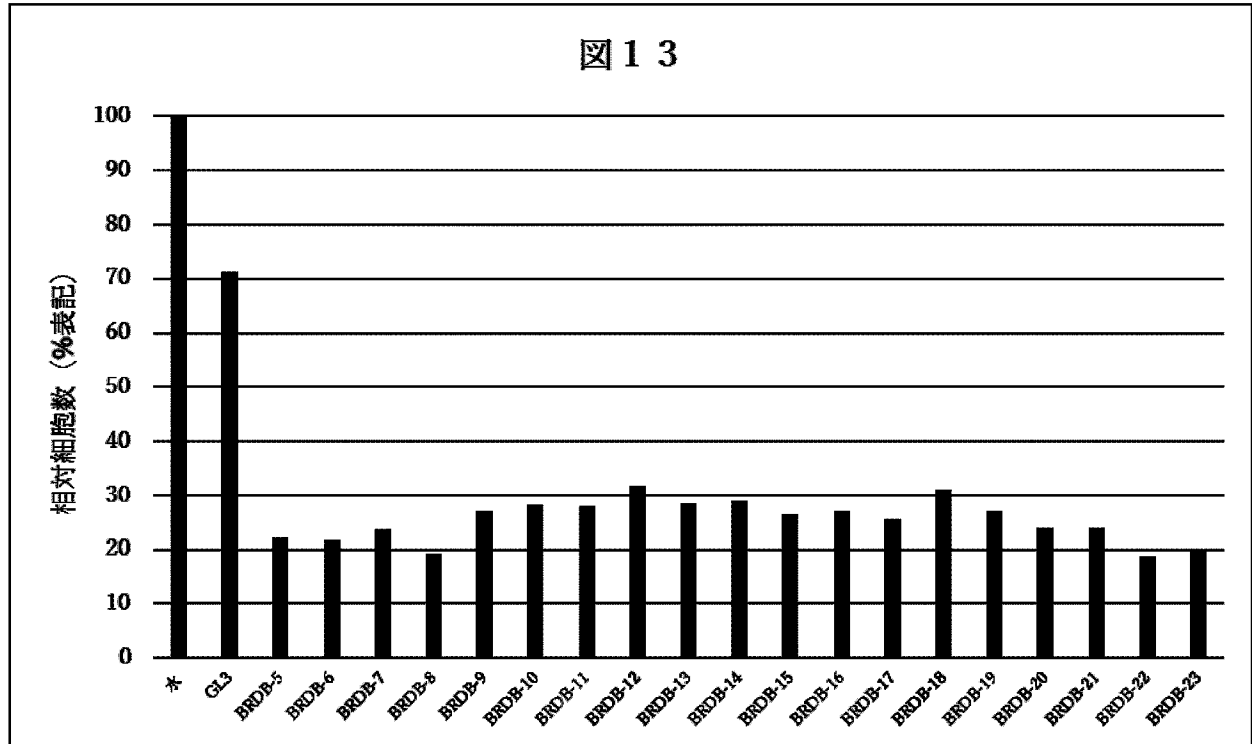
[図11]



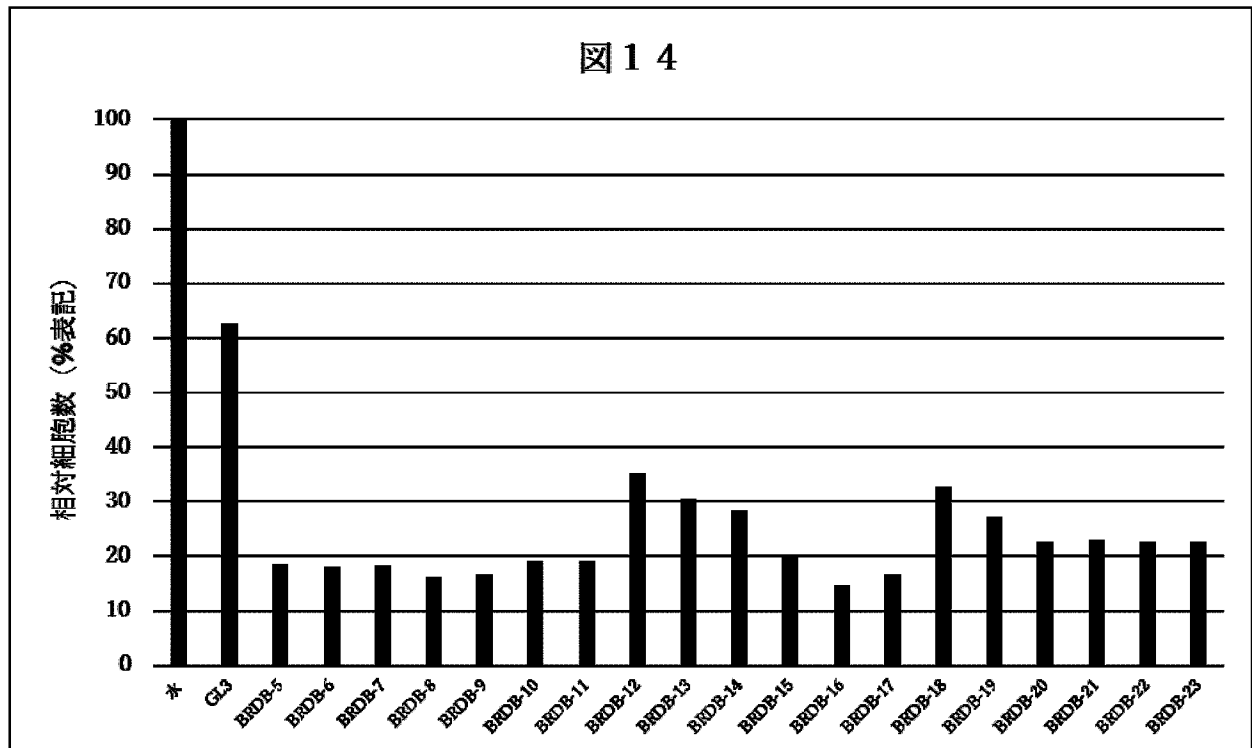
[図12]



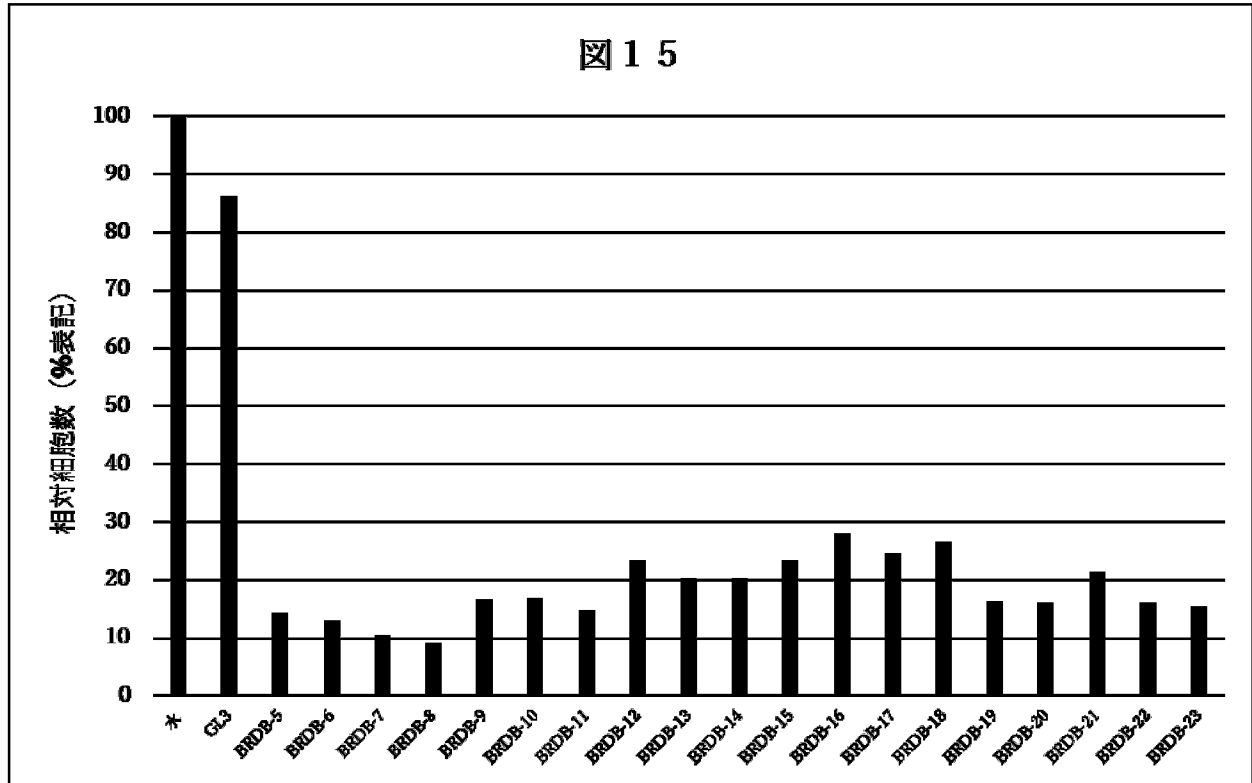
[図13]



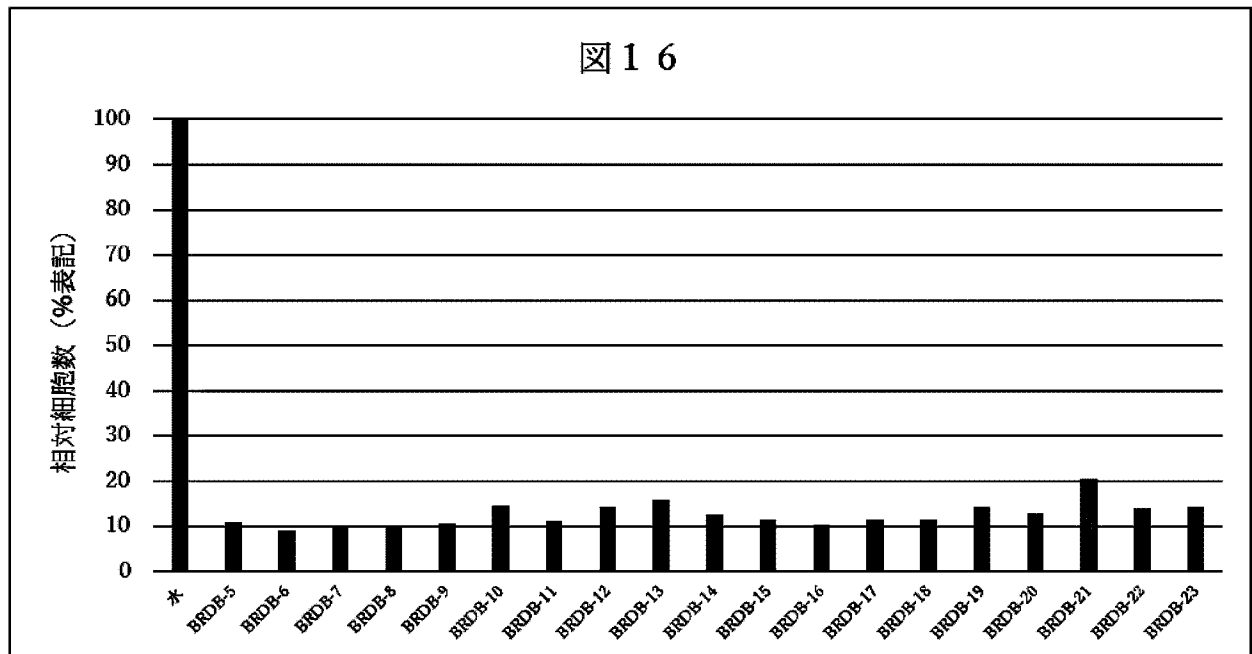
[図14]



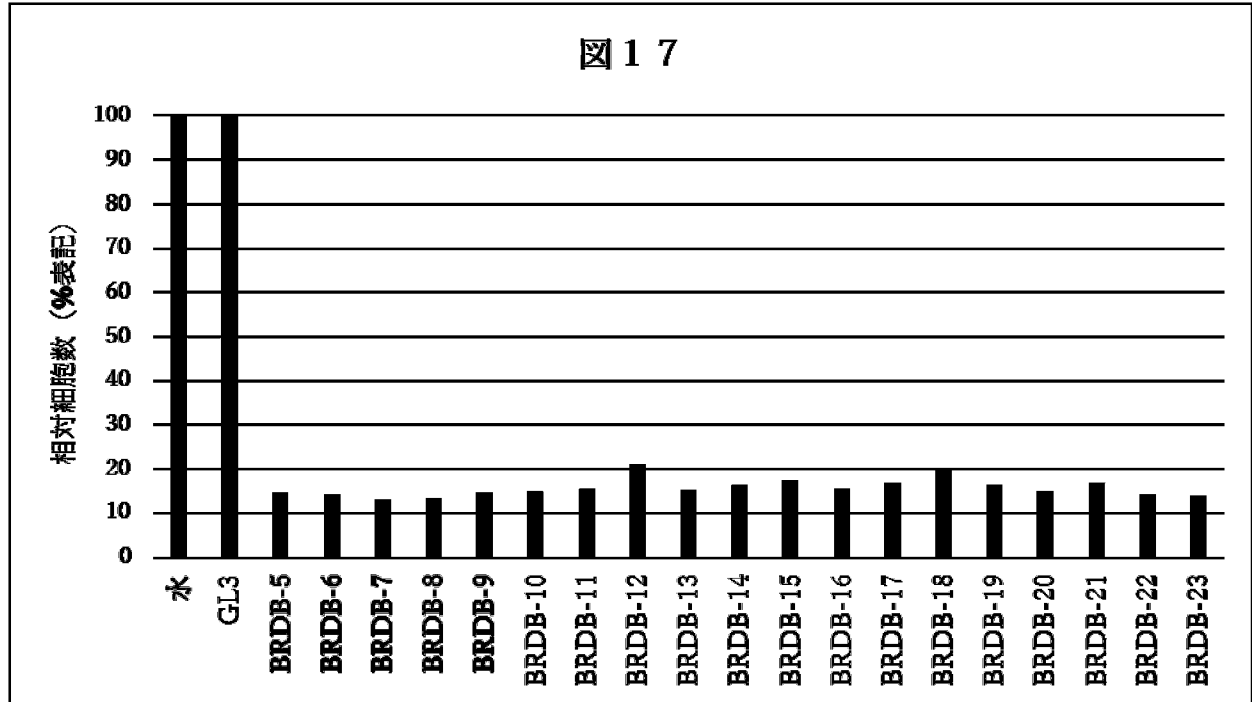
[図15]



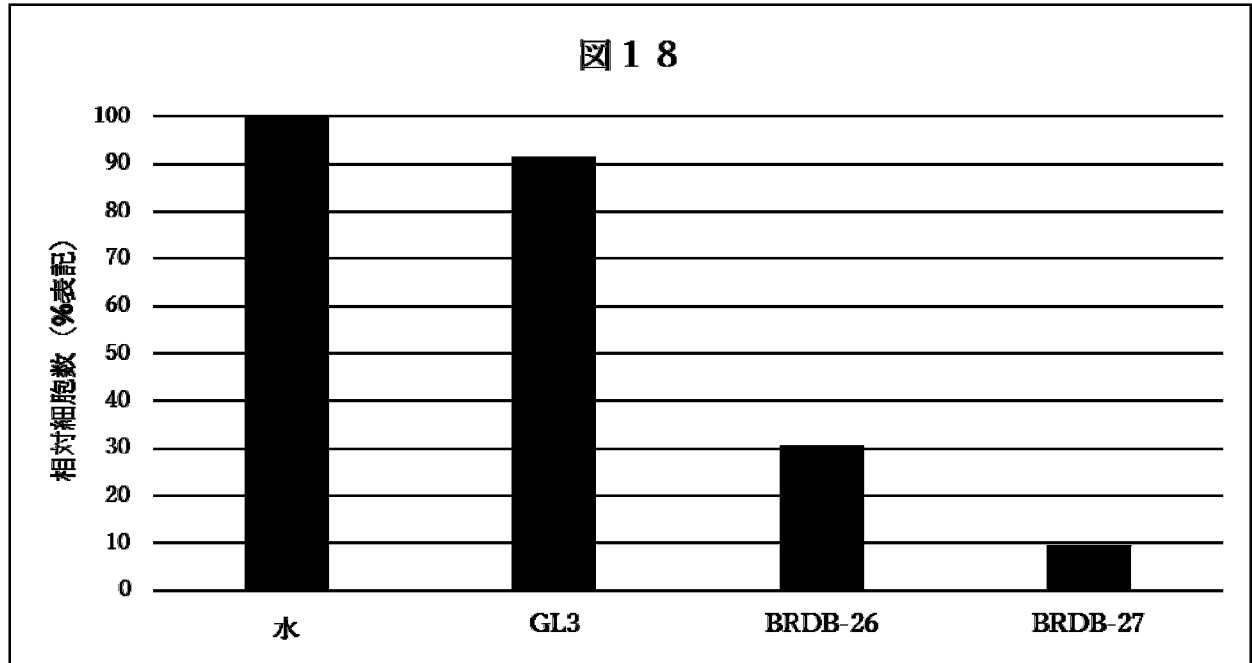
[図16]



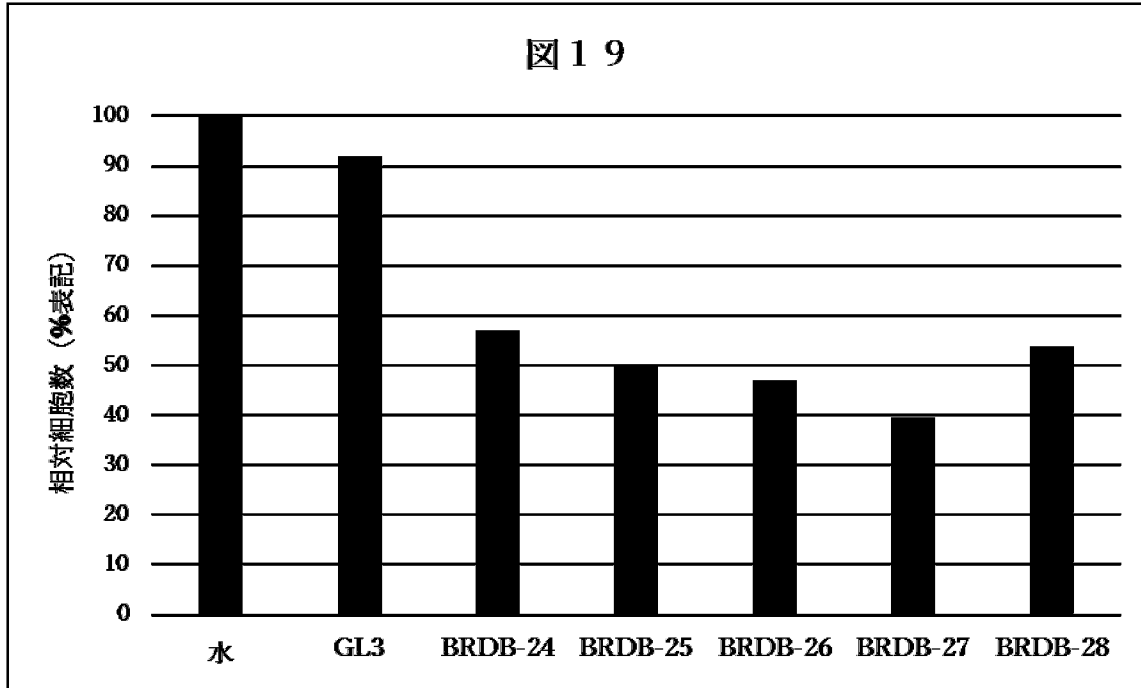
[図17]



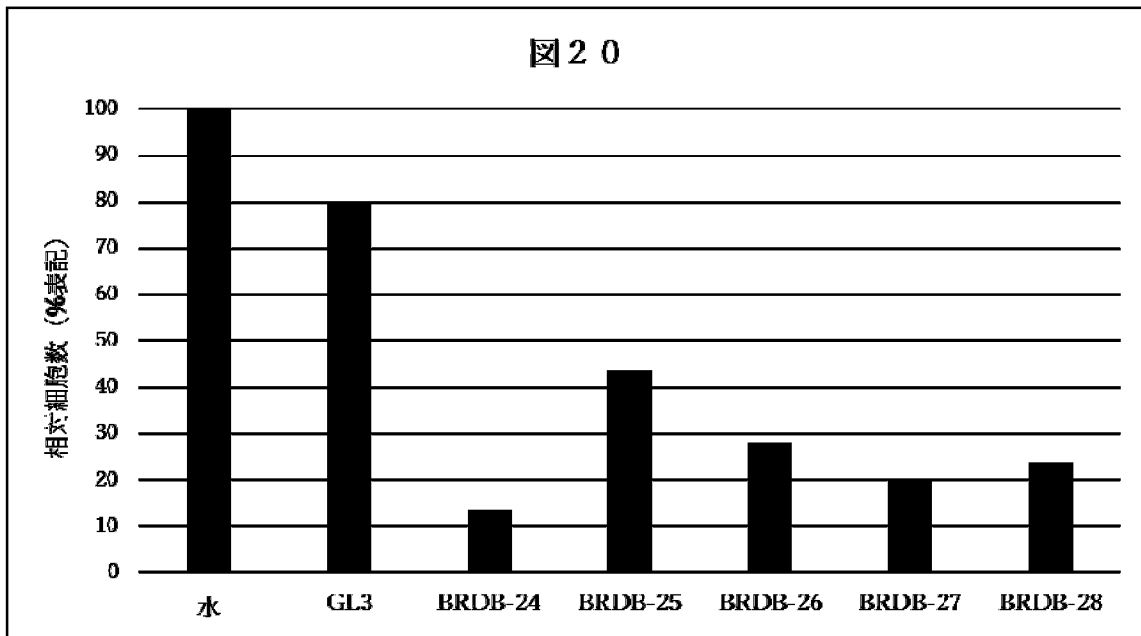
[図18]



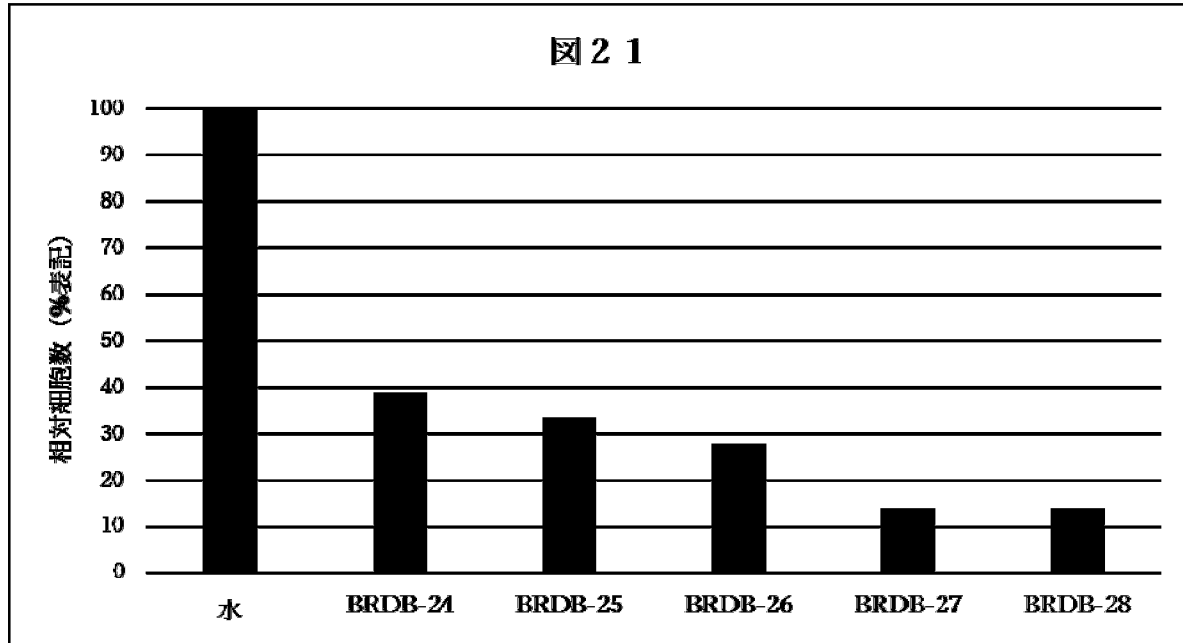
[図19]



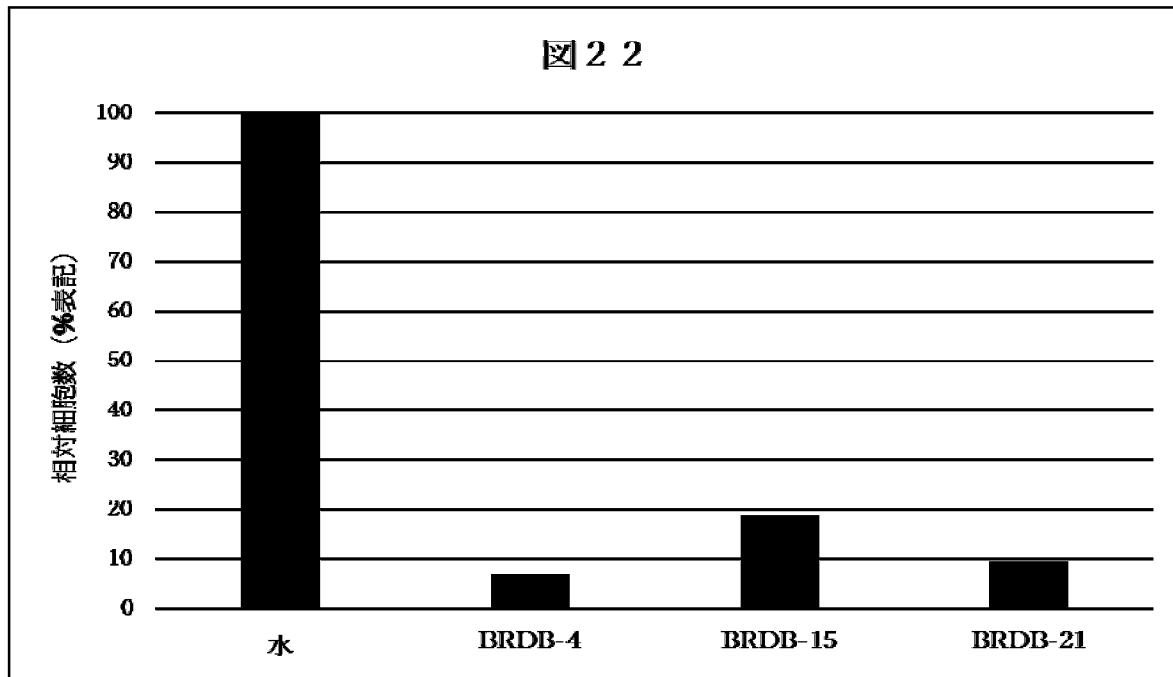
[図20]



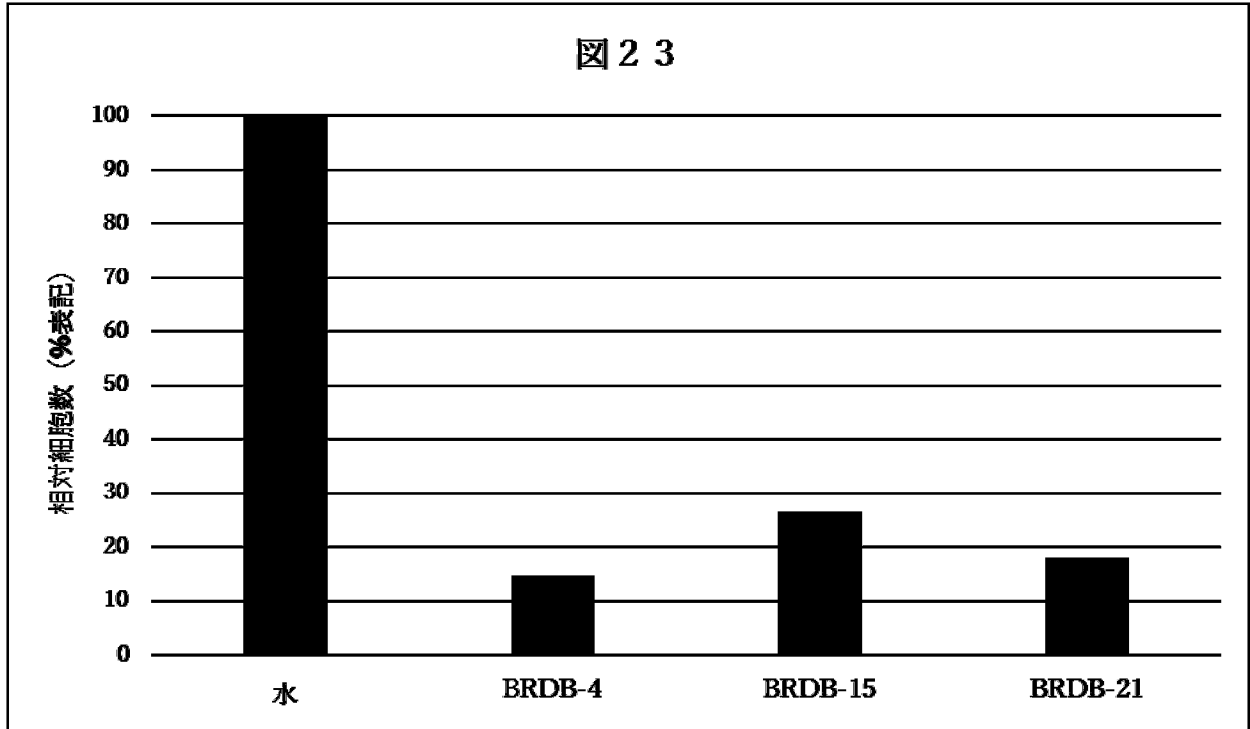
[図21]



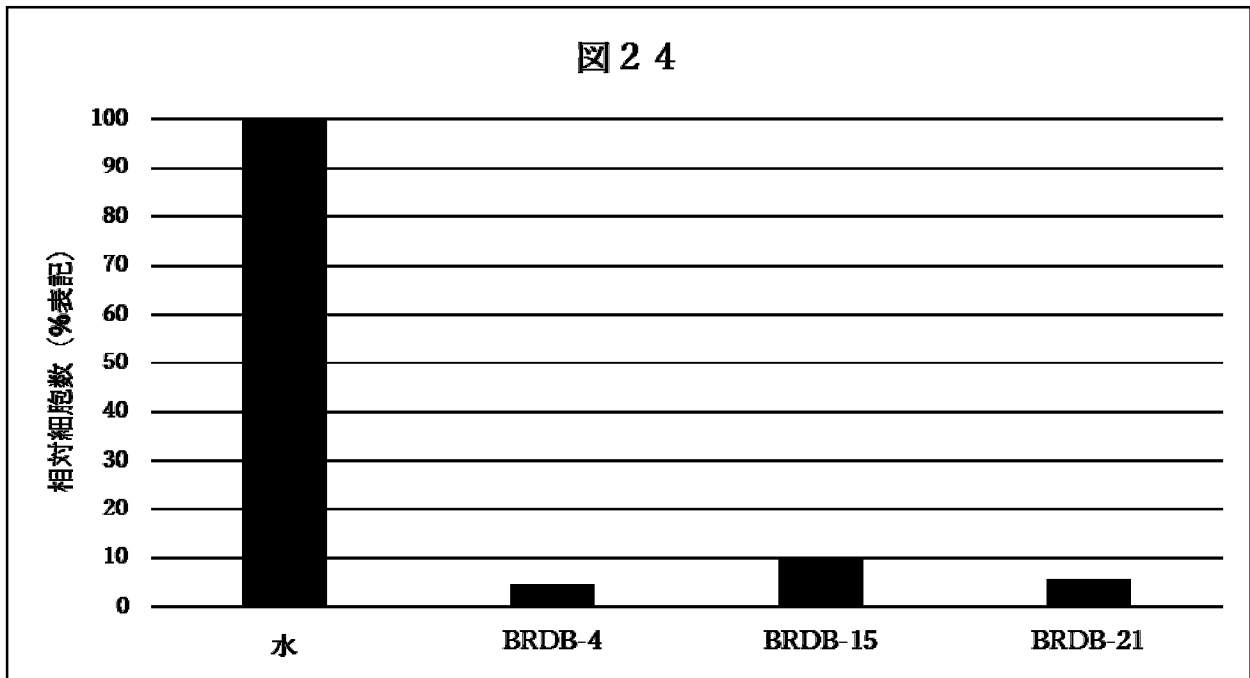
[図22]



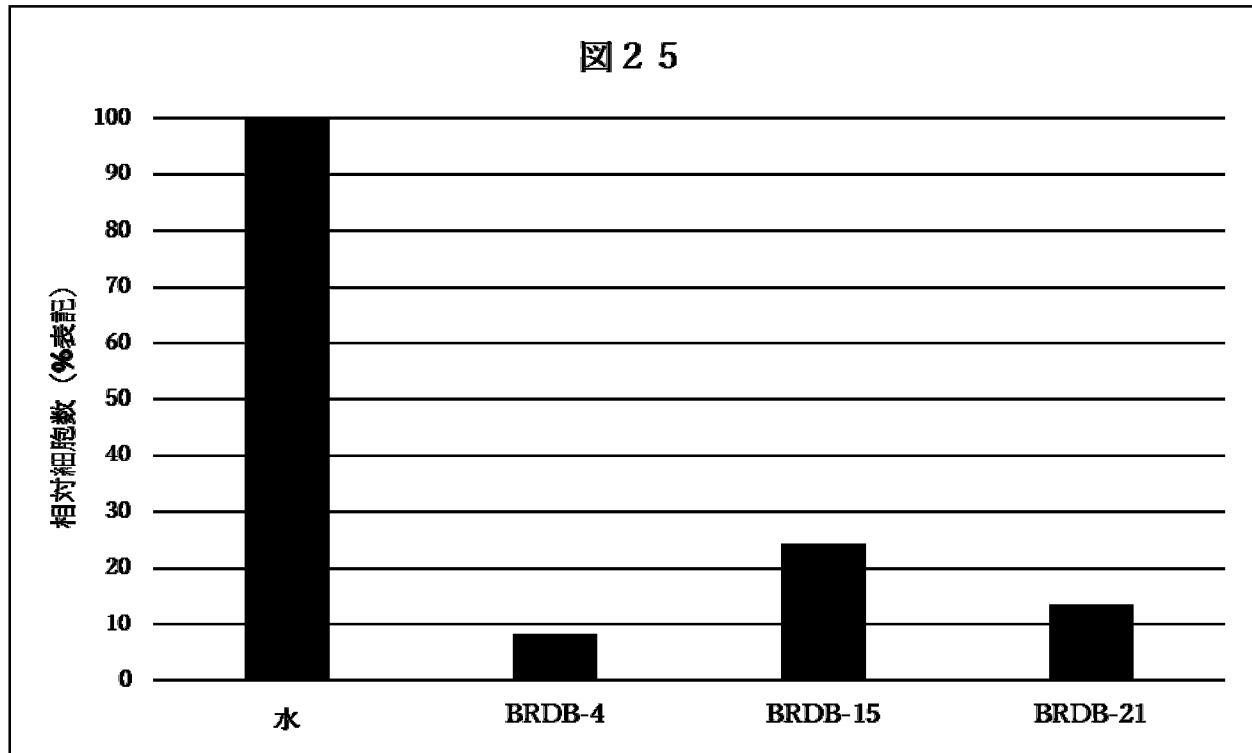
[図23]



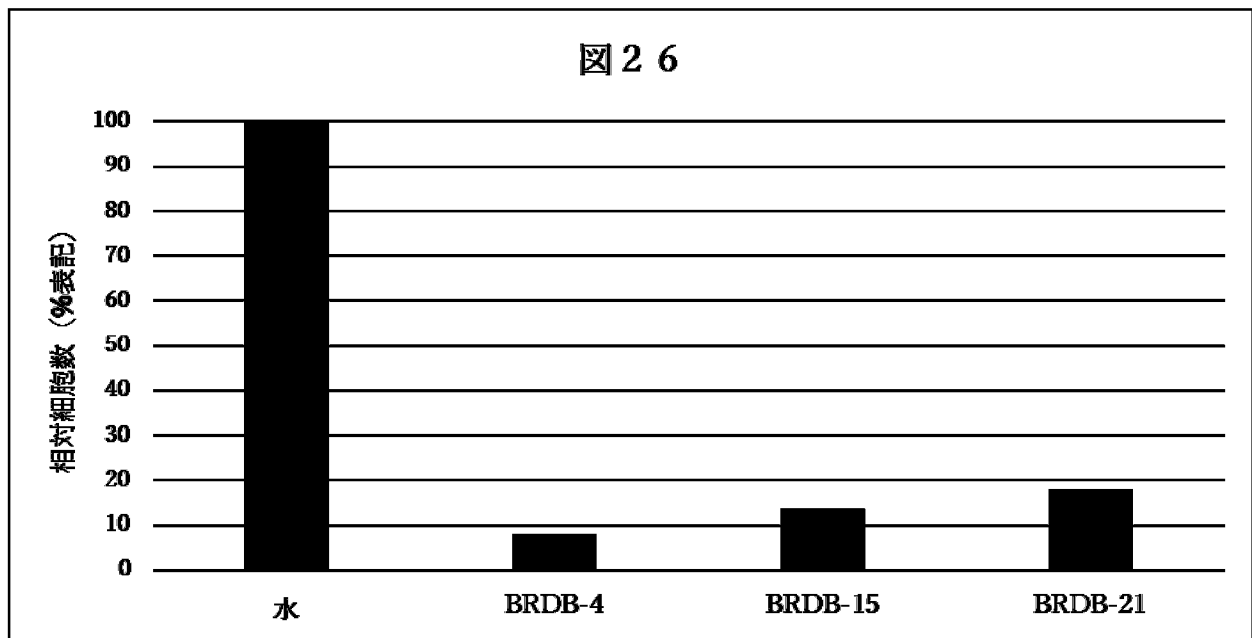
[図24]



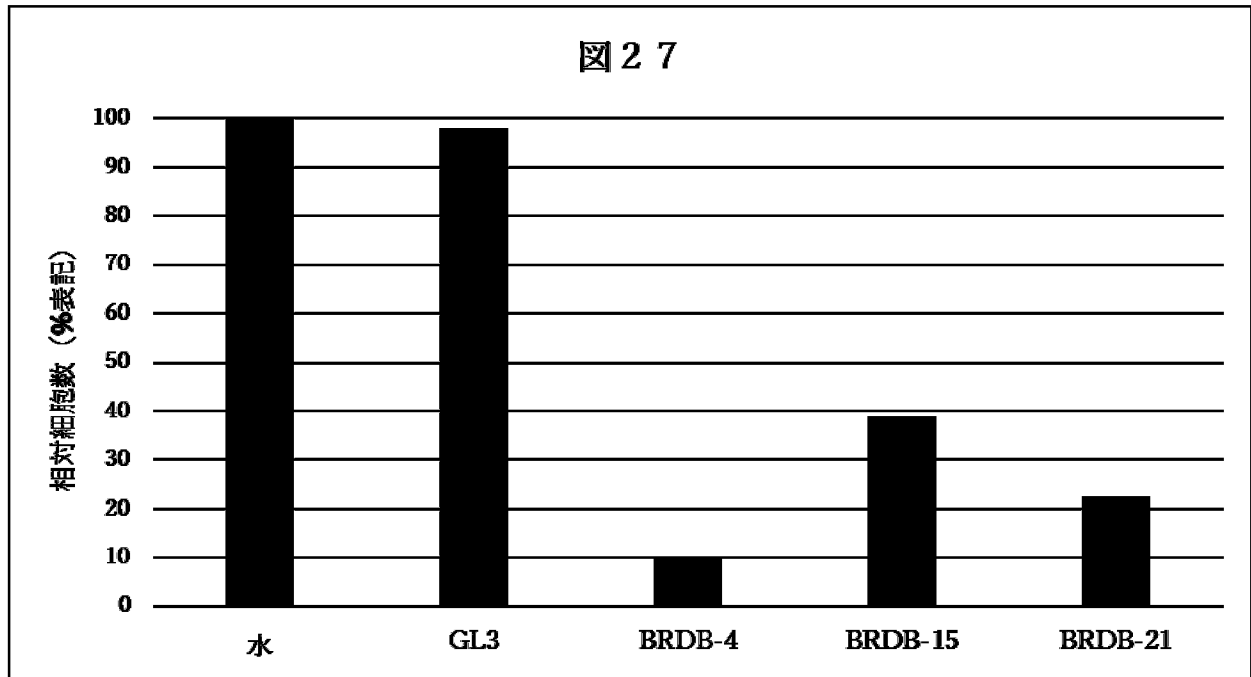
[図25]



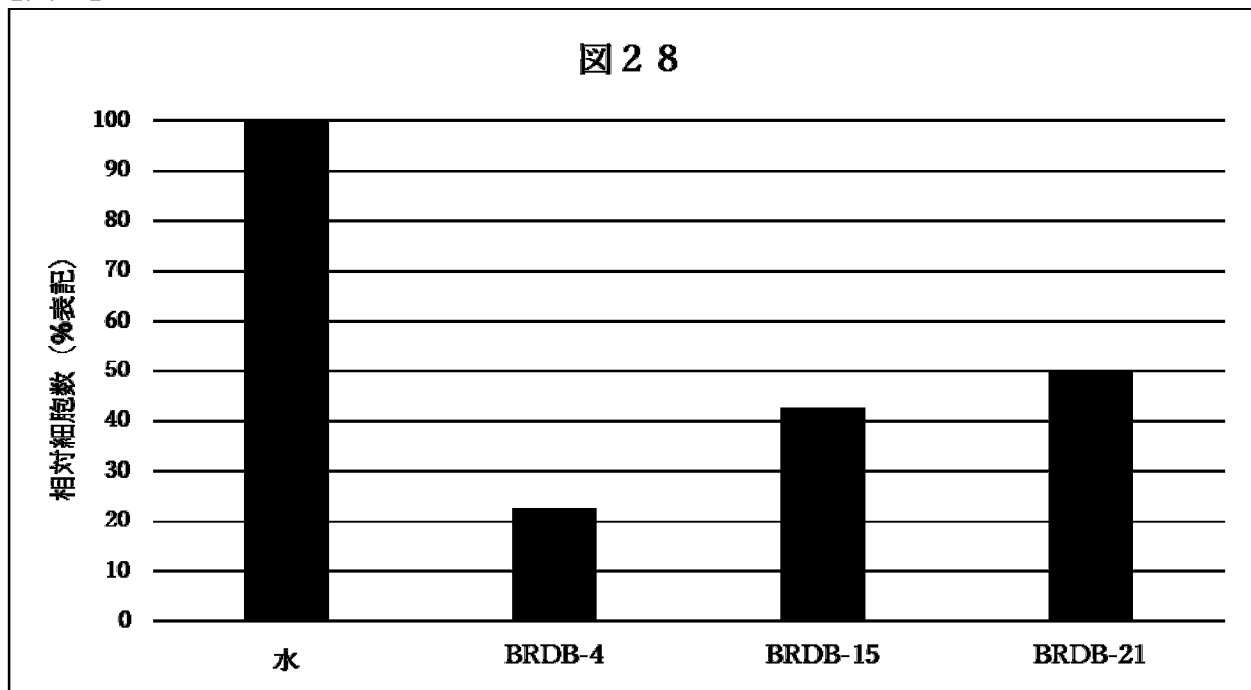
[図26]



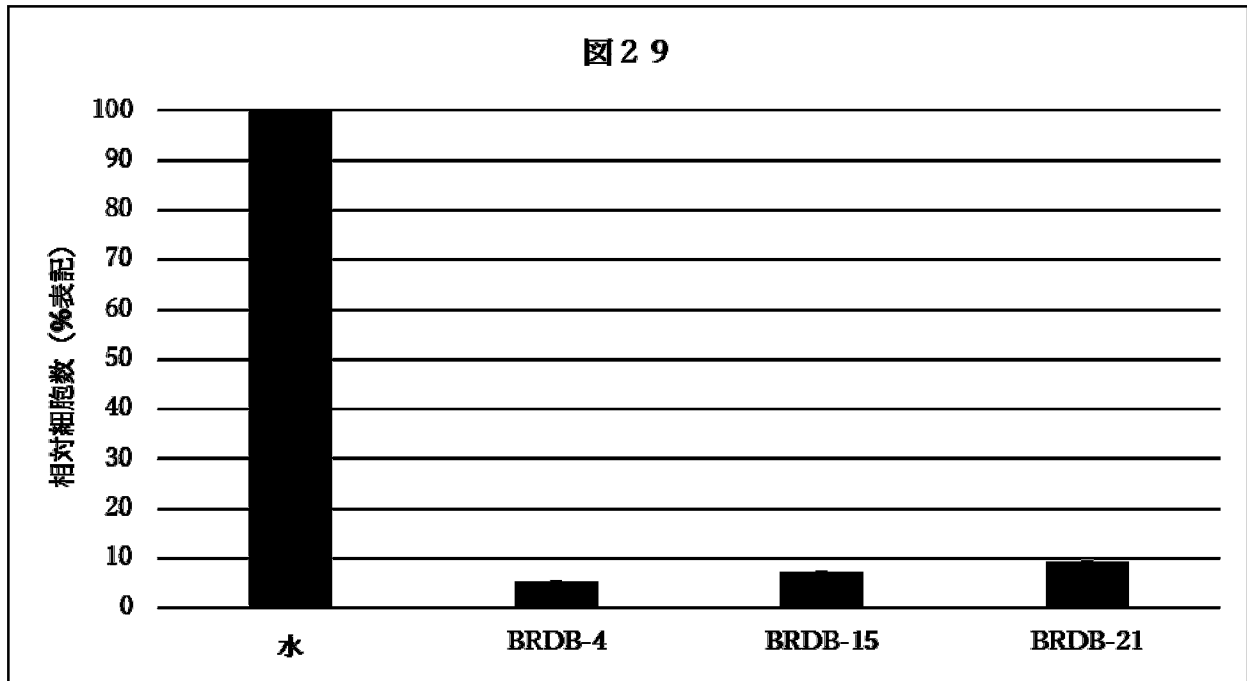
[図27]



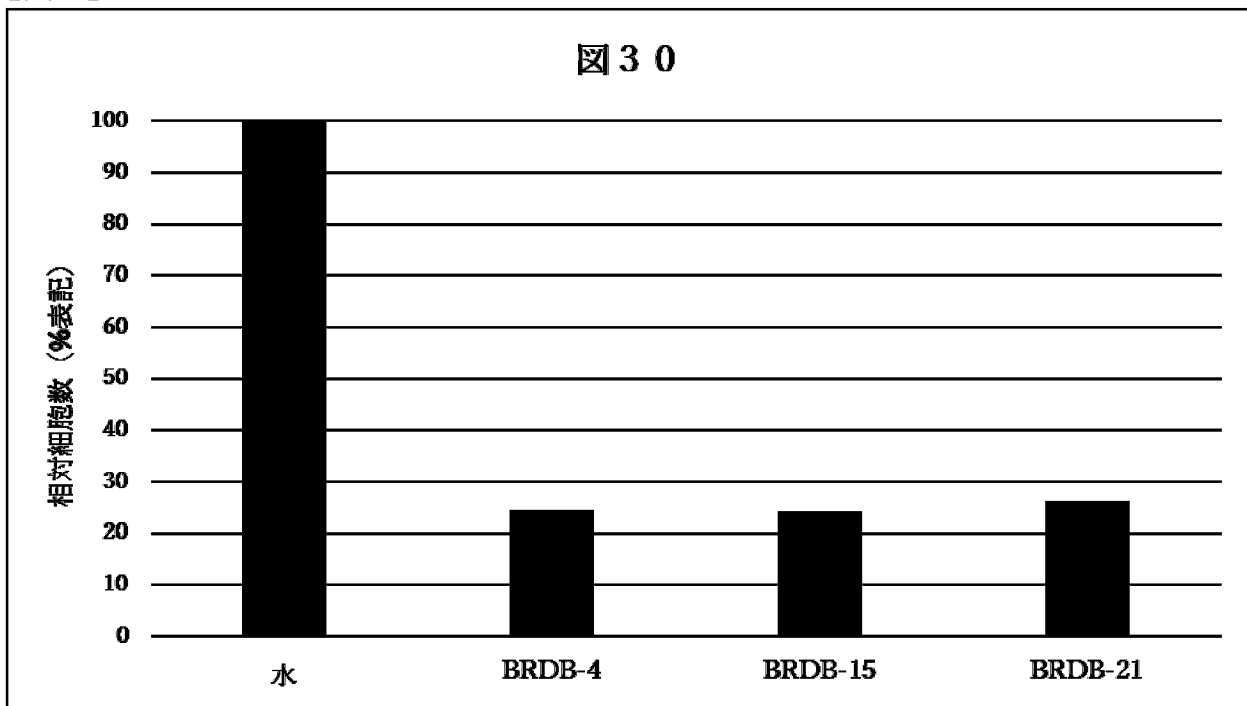
[図28]



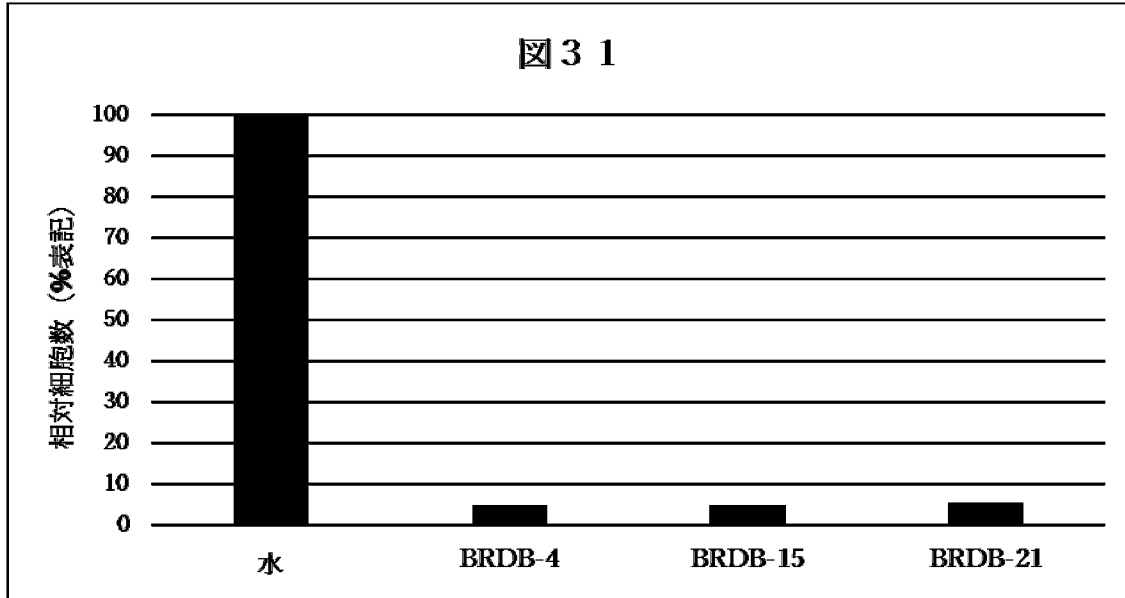
[図29]



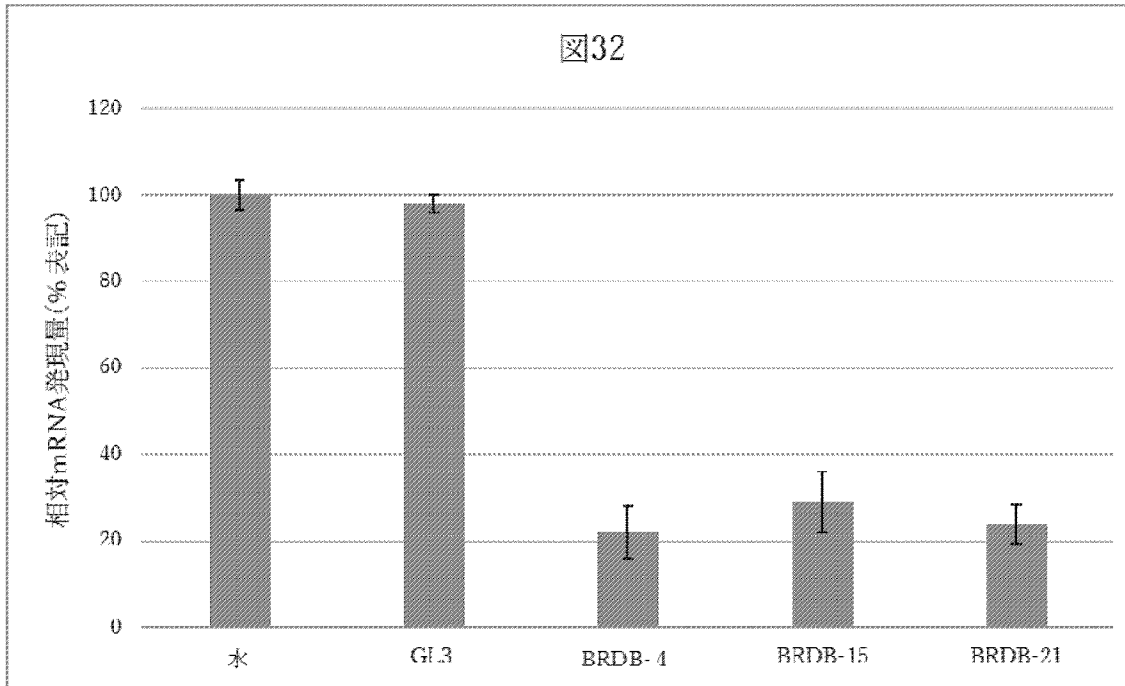
[図30]



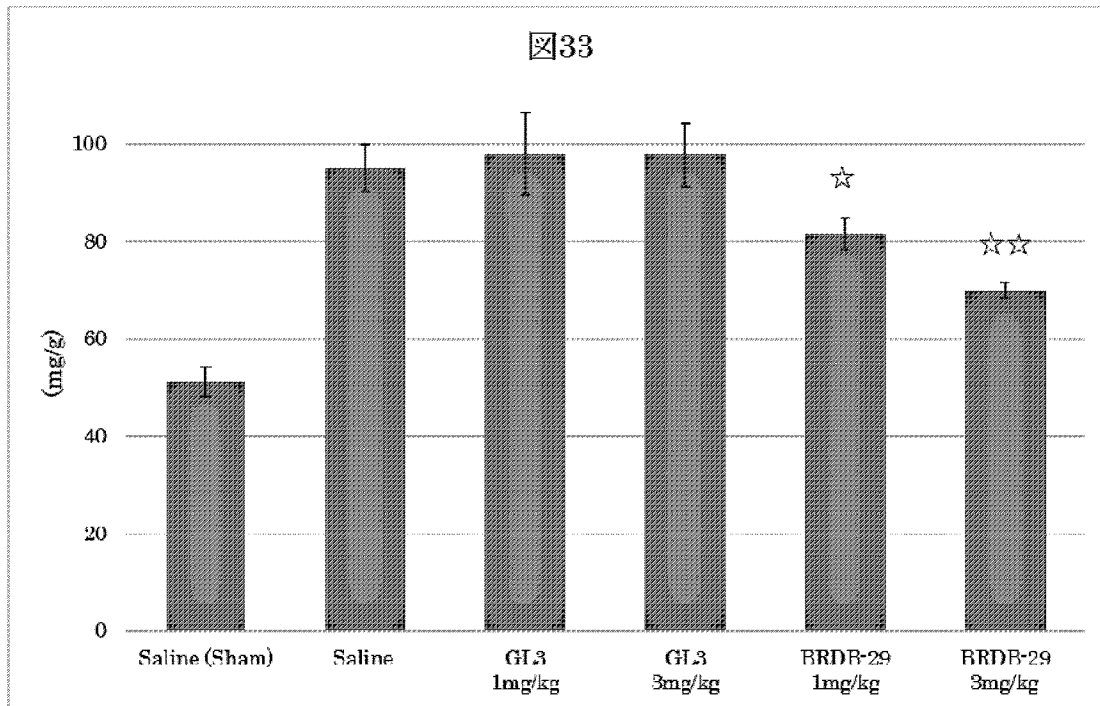
[図31]



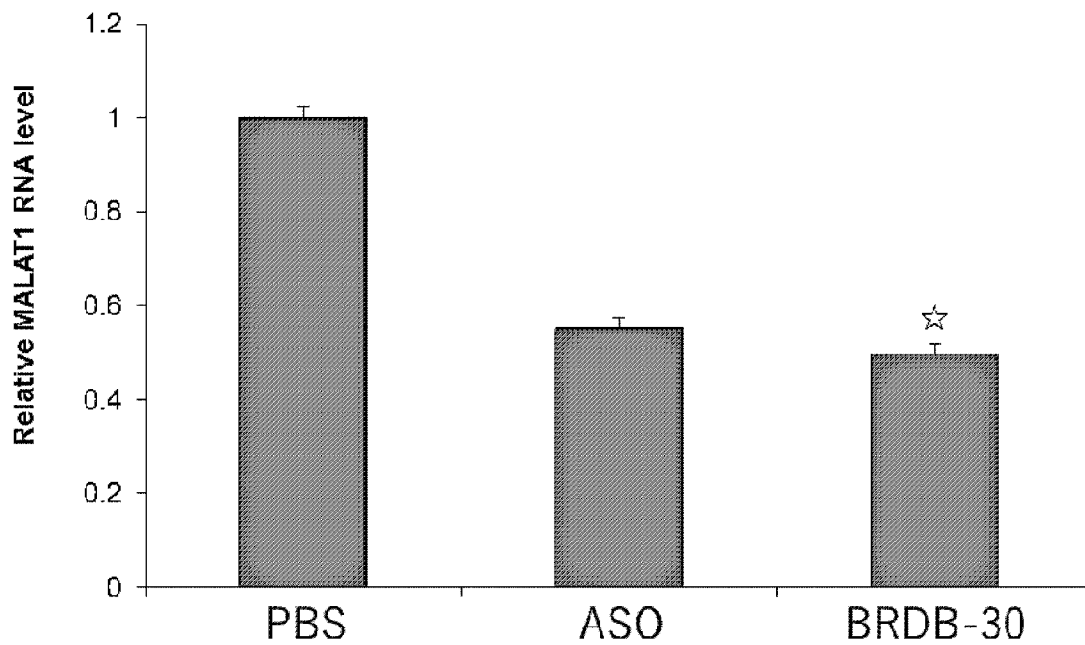
[図32]



[図33]

☆☆ : $p < 0.01$ vs Saline(t-test)☆ : $p < 0.05$ vs Saline(t-test)

[図34]

☆ : $p < 0.05$ vs ASO(ボンフェローニ検定)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/004657

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/113(2010.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/113, A61K31/713, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2013-514089 A (Dicerna Pharmaceuticals Inc.), 25 April 2013 (25.04.2013), claims 1, 2, 26, 81 to 84; paragraphs [0047] to [0050], [0066], [0102] & US 2010/0173974 A1 claims 1, 2, 26, 81 to 84; paragraphs [0102] to [0106], [0120], [0151] & WO 2011/075188 A1	1-7, 21, 23-24, 31, 39-44, 50-60, <u>64</u> 1-64

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 11 January 2017 (11.01.17)	Date of mailing of the international search report 24 January 2017 (24.01.17)
---	--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/004657

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-502134 A (Tokyo Medical and Dental University), 22 January 2015 (22.01.2015), claims 1 to 4, 10, 16, 18, 22, 28, 34, 37, 39, 45 to 55, 58 to 60; paragraphs [0013], [0029] to [0033], [0045] to [0049] & US 2014/0302603 A1 claims 1 to 4, 10, 16, 18, 22, 28, 34, 37, 39, 45 to 55, 58 to 60; paragraphs [0017], [0115] to [0119], [0131] to [0136] & WO 2013/089283 A1 & CN 104126010 A	1-64
Y	WO 2014/132671 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY), 04 September 2014 (04.09.2014), claims 1, 5, 31; paragraphs [0025], [0044] to [0064], [0069] to [0079], [0093] to [0095] & JP 2016-509837 A & US 2016/0108395 A1 & AU 2014222150 A & CA 2901983 A & CN 105008533 A	1-64
Y	JP 2006-512902 A (The Regents of the University of California), 20 April 2006 (20.04.2006), paragraphs [0035] to [0046] & WO 2004/022771 A2 [00034] to [00045] & US 2004/0053289 A1 & US 2006/0287269 A1 & EP 1576176 A2 & KR 10-2005-0057290 A & CN 101405390 A	1-64
Y	LAMBERTON J. S., et al., Varying the Nucleic Acid Composition of siRNA Molecules Dramatically Varies the Duration and Degree of Gene Silencing, Molecular Biothechnology, 2003, Vol.24, p.111-119, summary, page 112, left column, 3rd paragraph to right column, 1st paragraph, Fig. 3(B)	1-64
Y	WO 2006/044663 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 27 April 2006 (27.04.2006), claims 2, 43 to 45; page 4, 2nd paragraph; page 13, 3rd paragraph to page 14, 1st paragraph; page 9, 3rd paragraph & US 2006/0172925 A1 & CA 2502610 A	1-64
Y	EP 2031061 A2 (MOLLING, Karin), 04 March 2009 (04.03.2009), paragraphs [0017] to [0020], [0027] & US 2009/0117179 A1	1-64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/004657

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2175023 A1 (THE UNIVERSITY OF ZURICH), 14 April 2010 (14.04.2010), paragraphs [0016] to [0017]; fig. 6 (Family: none)	1-64
Y	MOELLING K., et al., Silencing of HIV by hairpin-loop-structured DNA oligonucleotide, FEBS Letters, 2006, Vol.580, p.3545-3550, Fig. 1	1-64
A	JP 2012-512651 A (Dicerna Pharmaceuticals Inc.), 07 June 2012 (07.06.2012), & US 2010/0173973 A1 & WO 2010/080129 A2 & EP 2756845 A1	1-64

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i</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>Int.Cl. C12N15/113, A61K31/713, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09</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 style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">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>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2017年											
日本国実用新案登録公報	1996-2017年											
日本国登録実用新案公報	1994-2017年											
<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), PubMed</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</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										
X Y	<p>JP 2013-514089 A (ダイセルナ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 2013.04.25,</p> <p>請求項 1, 2, 26, 81-84, [0047]-[0050], [0066], [0102]</p> <p>& US 2010/0173974 A1, 請求項 1, 2, 26, 81-84, [0102]-[0106], [0120], [0151]</p> <p>& WO 2011/075188 A1</p>	<p>1-7, 21, 23-24, 31, 39-44, 50-60, 64</p> <p>1-64</p>										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input 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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">11.01.2017</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">24.01.2017</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p style="text-align:center;">郵便番号 100-8915</p> <p style="text-align:center;">東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%;">特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td style="width:10%; text-align:center;">4B</td> <td style="width:40%; text-align:center;">3644</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">伊藤 良子</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101 内線</td> <td colspan="2" style="text-align:center;">3448</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	3644	伊藤 良子			電話番号 03-3581-1101 内線	3448	
特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	3644										
伊藤 良子												
電話番号 03-3581-1101 内線	3448											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2015-502134 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2015. 01. 22, 請求項 1-4, 10, 16, 18, 22, 28, 34, 37, 39, 45-55, 58-60, [0013], [0029]- [0033], [0045]-[0049] & US 2014/0302603 A1, 請求項 1-4, 10, 16, 18, 22, 28, 34, 37, 39, 45- 55, 58-60, [0017], [0115]-[0119], [0131]-[0136] & WO 2013/089283 A1 & CN 104126010 A	1-64
Y	WO 2014/132671 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) 2014. 09. 04, 請求項 1, 5, 31, [0025], [0044]-[0064], [0069]-[0079], [0093]- [0095] & JP 2016-509837 A & US 2016/0108395 A1 & AU 2014222150 A & CA 2901983 A & CN 105008533 A	1-64
Y	JP 2006-512902 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシテ ィー オブ カリフォルニア) 2006. 04. 20, [0035]-[0046] & WO 2004/022771 A2, [00034]-[00045] & US 2004/0053289 A1 & US 2006/0287269 A1 & EP 1576176 A2 & KR 10-2005-0057290 A & CN 101405390 A	1-64
Y	LAMBERTON J. S., et al., Varying the Nucleic Acid Composition of siRNA Molecules Dramatically Varies the Duration and Degree of Gene Silencing, Molecular Biothechnology, 2003, Vol.24, p. 111-119, 要旨, 第 112 頁左欄第 3 段落～右欄第 1 段落, Fig. 3(B)	1-64
Y	WO 2006/044663 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2006. 04. 27, 請求項 2, 43-45 第 4 頁第 2 段落第 13 頁第 3 段落～第 14 頁第 1 段落 第 9 頁第 3 段落 & US 2006/0172925 A1 & CA 2502610 A	1-64
Y	EP 2031061 A2 (MOLLING, Karin) 2009. 03. 04, [0017]-[0020], [0027] & US 2009/0117179 A1	1-64
Y	EP 2175023 A1 (THE UNIVERSITY OF ZURICH) 2010. 04. 14, [0016]-[0017], 図 6 (ファミリーなし)	1-64
Y	MOELLING K., et al., Silencing of HIV by hairpin-loop-structed DNA oligonucleotide, FEBS Letters, 2006, Vol.580, p. 3545-3550, Fig. 1	1-64

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
A	JP 2012-512651 A (ダイセルナ ファーマシューティカルズ, イン コーポレイテッド) 2012.06.07, & US 2010/0173973 A1 & WO 2010/080129 A2 & EP 2756845 A1	1-64