

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-512651
(P2022-512651A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/117 (2010.01)	C 1 2 N	15/117	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/078 (2010.01)	C 1 2 N	5/078		4 C 0 8 4
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/04		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全47頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-519660(P2021-519660)		(71)出願人	503469393	
(86)(22)出願日	令和1年10月9日(2019.10.9)			イエール ユニバーシティ	
(85)翻訳文提出日	令和3年5月25日(2021.5.25)			アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/055394			ヘブン トゥ ホイットニー アベニュー	
(87)国際公開番号	WO2020/076948		(74)代理人	100102978	
(87)国際公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)			弁理士 清水 初志	
(31)優先権主張番号	62/743,387		(74)代理人	100102118	
(32)優先日	平成30年10月9日(2018.10.9)			弁理士 春名 雅夫	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		(74)代理人	100160923	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			弁理士 山口 裕孝	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		(74)代理人	100119507	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			弁理士 刑部 俊	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		(74)代理人	100142929	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			弁理士 井上 隆一	
	最終頁に続く		(74)代理人	100148699	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 R I G－Iアゴニストおよびそれを使用する方法

(57)【要約】

本発明は、RIG-Iアゴニストを提供する。ある特定の態様では、本発明のアゴニストを、細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導するために使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

インターフェロン応答を誘導することが可能なポリリボ核酸（RNA）分子であって、
該RNA分子が、一本鎖であり、かつ、リンカーの一端に5'端がコンジュゲートされている第1のヌクレオチド配列を含み、
該リンカーのもう一方の端が、第2のヌクレオチド配列の3'端にコンジュゲートされており、
該リンカーが、ヌクレオシド、ヌクレオチド、デオキシヌクレオシドもしくはデオキシヌクレオチド、またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まず、
第1のヌクレオチド配列が、第2のヌクレオチド配列に実質的に相補的であり、
第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列が、ハイブリダイズして二本鎖セクションを形成することができ、
該二本鎖セクション中の塩基対の数が、8～20の範囲の整数であり、
それによって、該RNA分子がヘアピン構造を形成する、
前記RNA分子。

10

【請求項2】

リンカーが、リン酸骨格またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まない、請求項1記載の分子。

【請求項3】

リンカーが、エチレングリコール基、アミノ酸およびアルキレン鎖からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項1記載の分子。

20

【請求項4】

リンカーが、 $-(OCH_2CH_2)_n-$ を含み、式中、 n は、1～10の範囲の整数である、請求項1記載の分子。

【請求項5】

ヘアピンが、平滑末端を有する、請求項1記載の分子。

【請求項6】

ヘアピンが、3'-オーバーハングを有する、請求項1記載の分子。

【請求項7】

前記オーバーハングが、1個、2個または3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む、請求項6記載の分子。

30

【請求項8】

5'-三リン酸および5'-二リン酸からなる群より選択される5'末端基を含む、請求項1記載の分子。

【請求項9】

修飾ホスホジエステル骨格を含む、請求項1記載の分子。

【請求項10】

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドを含む、請求項1記載の分子。

【請求項11】

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドが、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）、および2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）からなる群より選択される修飾を含む、請求項10記載の分子。

40

【請求項12】

少なくとも1つの修飾リン酸基を含む、請求項1記載の分子。

【請求項13】

少なくとも1つの修飾塩基を含む、請求項1記載の分子。

【請求項14】

50

二本鎖セクションが、1つまたは複数の誤対合した塩基を含む、請求項1記載の分子。

【請求項15】

少なくとも1つの脱塩基ヌクレオチドを含む、請求項1記載の分子。

【請求項16】

インターフェロン応答を誘導することが可能なポリリボ核酸（RNA）分子であって、該RNA分子が、一本鎖であり、かつ、ループおよびリンカーからなる群より選択されるエレメントの一端に5'端がコンジュゲートされている第1のヌクレオチド配列を含み、該エレメントのもう一方の端が、第2のヌクレオチド配列の3'端にコンジュゲートされており、

第1のヌクレオチド配列が、第2のヌクレオチド配列に実質的に相補的であり、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列が、ハイブリダイズして二本鎖セクションを形成することができ、

該二本鎖セクション中の塩基対の数が、8～20の範囲の整数であり、それによって、該RNA分子が、3'-オーバーハングを有するヘアピン構造を形成する、前記RNA分子。

10

【請求項17】

前記オーバーハングが、1個、2個または3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む、請求項16記載の分子。

【請求項18】

リンカーが、リン酸骨格またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まない、請求項16記載の分子。

20

【請求項19】

リンカーが、エチレングリコール基、アミノ酸およびアルキレン鎖からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項16記載の分子。

【請求項20】

リンカーが、 $-(OCH_2CH_2)_n-$ を含み、式中、 n は、1～10の範囲の整数である、請求項16記載の分子。

【請求項21】

5'-三リン酸および5'-二リン酸からなる群より選択される5'末端基を含む、請求項16記載の分子。

30

【請求項22】

修飾ホスホジエステル骨格を含む、請求項16記載の分子。

【請求項23】

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドを含む、請求項16記載の分子。

【請求項24】

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドが、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）、および2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）からなる群より選択される修飾を含む、請求項23記載の分子。

40

【請求項25】

少なくとも1つの修飾リン酸基を含む、請求項16記載の分子。

【請求項26】

少なくとも1つの修飾塩基を含む、請求項16記載の分子。

【請求項27】

二本鎖セクションが、1つまたは複数の誤対合した塩基を含む、請求項16記載の分子。

【請求項28】

少なくとも1つの脱塩基ヌクレオチドを含む、請求項16記載の分子。

【請求項29】

50

請求項1または16記載の少なくとも1つの分子を含む、薬学的組成物。

【請求項30】

免疫刺激剤、抗原、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、レチノイン酸、IFN- α およびIFN- β からなる群より選択される少なくとも1つの作用物質をさらに含む、請求項29記載の薬学的組成物。

【請求項31】

請求項1または16記載の少なくとも1つの分子に細胞を接触させる工程を含む、細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導するための方法。

【請求項32】

前記細胞が、対象内の細胞である、請求項31記載の方法。

10

【請求項33】

その必要のある対象の細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導することによる、該対象における疾患または障害を処置するための方法であって、請求項1または16記載の少なくとも1つの分子に該細胞を接触させる工程を含む、前記方法。

【請求項34】

疾患または障害が、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染、がん、自己免疫疾患、炎症性障害および呼吸器障害からなる群より選択される、請求項33記載の方法。

【請求項35】

がんが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病および肺がんからなる群より選択される少なくとも1つである、請求項34記載の方法。

20

【請求項36】

前記分子が、対象に腫瘍内投与される、請求項35記載の方法。

【請求項37】

対象が哺乳動物である、請求項32記載の方法。

【請求項38】

対象が哺乳動物である、請求項33記載の方法。

【請求項39】

哺乳動物がヒトである、請求項38記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)項(35 U.S.C. § 119(e))の下、2018年10月9日に出願された米国仮出願第62/743,387号に対する優先権を主張するものであり、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

レチノイン酸誘導性遺伝子1 (retinoic acid-inducible gene 1) (RIG-I)、黒色腫分化関連遺伝子5 (melanoma differentiation-associated gene 5) (MDA5)、およびlaboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)は、細胞内パターン認識受容体 (PRR) のRIG-I様受容体 (RLR) クラスを構成している。この受容体は、細胞質において外来RNAを認識し、炎症誘発性サイトカインおよびI型インターフェロンの産生を通じて自然免疫応答を誘発することによって、細菌およびウイルスによる感染を防ぐ。

40

【0003】

RIG-Iは、プラス鎖およびマイナス鎖RNAウイルスを含む自己と非自己の両方のRNA、エプスタイン・バー・ウイルスのようなDNAウイルスまたはATに富んだ二本鎖DNA鑄型のいずれかからRNAポリメラーゼIIIによって産生されるRNA断片、抗ウイルス性エン

50

ドリボヌクレアーゼRNAse LのRNA切断産物、合成ポリI:C、さらには5'-三リン酸を欠いたRNAアプタマーを認識する。RIG-Iの識別可能な病原体関連分子パターン(PAMP)は、5'-三リン酸部分を含有する二重鎖RNAとして定義されるが、二重鎖RNAだけがRIG-I認識に不可欠なようである。

【0004】

依然として、新規RIG-Iアゴニストの必要性が当技術分野において存在する。ある特定の態様では、そのような化合物を、細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導するために使用することができる。他の態様では、そのような化合物を、限定されないが細菌、ウイルスもしくは寄生虫感染、がん、自己免疫疾患、炎症性障害および/または呼吸器障害などの疾患または障害を処置するために使用することができる。本発明は、当技術分野におけるこの必要性に応える。

10

【発明の概要】

【0005】

発明の簡単な概要

本発明は、インターフェロン応答を誘導することが可能なポリリボ核酸(RNA)分子を提供する。ある特定の態様では、RNA分子は、一本鎖であり、かつ、リンカーの一端に5'端がコンジュゲートされている第1のヌクレオチド配列を含む。ある特定の態様では、リンカーのもう一方の端は、第2のヌクレオチド配列の3'端にコンジュゲートされている。ある特定の態様では、リンカーは、ヌクレオシド、ヌクレオチド、デオキシヌクレオシドもしくはデオキシヌクレオチド、またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まない。ある特定の態様では、第1のヌクレオチド配列は、第2のヌクレオチド配列に実質的に相補的である。ある特定の態様では、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列は、ハイブリダイズして二本鎖セクションを形成することができる。ある特定の態様では、二本鎖セクション中の塩基対の数は、8~20の範囲の整数である。ある特定の態様では、RNA分子は、ヘアピン構造を形成する。

20

【0006】

本発明はさらに、インターフェロン応答を誘導することが可能なポリリボ核酸(RNA)分子を提供する。ある特定の態様では、RNA分子は、一本鎖であり、かつ、ループおよびリンカーからなる群より選択されるエレメントの一端に5'端がコンジュゲートされている第1のヌクレオチド配列を含む。ある特定の態様では、エレメントのもう一方の端は、第2のヌクレオチド配列の3'端にコンジュゲートされている。ある特定の態様では、第1のヌクレオチド配列は、第2のヌクレオチド配列に実質的に相補的である。ある特定の態様では、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列は、ハイブリダイズして二本鎖セクションを形成することができる。ある特定の態様では、二本鎖セクション中の塩基対の数は、8~20の範囲の整数である。ある特定の態様では、RNA分子は、3'-オーバーハングを有するヘアピン構造を形成する。

30

【0007】

本発明はさらに、本発明において想定される少なくとも1つの分子を含む薬学的組成物を提供する。

【0008】

本発明はさらに、細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導するための方法を提供する。ある特定の態様では、本方法は、本発明において想定される少なくとも1つの分子に細胞を接触させる工程を含む。

40

【0009】

本発明はさらに、その必要のある対象の細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導することによる、該対象における疾患または障害を処置するための方法を提供する。ある特定の態様では、本方法は、本発明において想定される少なくとも1つの分子に細胞を接触させる工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0010】

50

以下の本発明の例示的な態様の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことでよりよく理解されよう。本発明を例証する目的で、図面には非限定的な態様が示される。しかしながら、本発明が図面に示される態様の正確な配置および手段に限定されないことが、理解されるべきである。

【0011】

【図1】図1は、ヒト細胞株（293Tが示される）でのルシフェラーゼレポーター系におけるインターフェロン誘導を例証する棒グラフを含む。

【図2】図2は、ある特定の合成SLRが全動物において大規模なIFN応答を誘導し、付随してRIG-I特異的サイトカインの誘導が起こることを例証するグラフを含む。X軸は、凡例に示すような様々なRNAアゴニストで処置した異なるマウス群を表す。

10

【図3】図3は、本発明の選択されたSLRと接触させたHEK-293T細胞におけるインターフェロン応答を例証するグラフである。

【図4】図4A～4Bは、RIG-Iの結合およびシグナル伝達に及ぼすボトム鎖上の3'-オーバーハングの効果を例証する一連のグラフである。図4A：FL RIG-Iと5'-ppp/OH平滑末端およびボトム鎖上の3'-オーバーハングのRNAとの電気泳動移動度シフトアッセイ（EMSA）についての適合曲線。図4B：SLR-10およびボトム鎖上に3'-オーバーハングを担持するそのバリエーションを用いたIFN- β 誘導アッセイ。両パネルに示されるRNA配列において、N=0、1、2、3または5。

【図5A】図5A～5Dは、RIG-Iの結合およびシグナル伝達に及ぼすトップ鎖上の5'-オーバーハングの効果を例証する一連のグラフおよびスキームである。図5A：EMSAアッセイにおいて使用した5'-オーバーハングを有するRNA二重鎖の例証。N=0、1、2、3および5。

20

【図5B】図5B：FL RIG-Iと5'-ppp平滑末端およびトップ鎖上の5'-オーバーハングのRNAとのEMSAアッセイについての適合曲線。

【図5C】図5C：RIG-I- Δ CARDと5'-ppp平滑末端およびトップ鎖上の5'-オーバーハングのRNAとのEMSAアッセイについての適合曲線。

【図5D】図5D：SLR-10およびトップ鎖上に5'-オーバーハングを担持するそのバリエーションを用いたIFN- β 誘導アッセイ。OH-SLR-10は、5'-ppp基のないヘアピンRNAである。

【発明を実施するための形態】

30

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導するための組成物および方法を提供する。一局面では、本発明は、ある特定のRIG-Iアゴニスト、例えば限定されないがStem Loop RNA (SLR)を提供する。ある特定の態様では、そのような化合物を、限定されないが細菌、ウイルスもしくは寄生虫感染、がん、自己免疫疾患、炎症性障害および/または呼吸器障害などの疾患または障害を処置するために使用することができる。

【0013】

ある特定の態様では、本発明のRIG-Iアゴニストは、RIG-I自然免疫センサーを選択的に活性化する。他の態様では、本発明のRIG-Iアゴニストは、Stem Loop RNAである。

40

国際特許出願公開番号WO/2014/159990および米国特許出願公開番号US2016/0046942の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0014】

本明細書に記載される組成物および方法は、限定されないがPRRのRIG-I様受容体（RLR）クラス（RIG-I、MDA5およびLGP2を含む）；NOD様受容体（NLR）、C型レクチン受容体（CLR）およびtoll様受容体（TLR）を含む、任意のPRRを活性化することができる。

【0015】

ある特定の態様では、本発明は、核酸分子を提供する。本開示において使用するための例示的な核酸は、リボ核酸（RNA）、デオキシリボ核酸（DNA）、ペプチド核酸（PNA）

50

、トレオース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、ロックド核酸（LNA）、またはそれらのハイブリッドを含む。本明細書に記載されるように、本発明の核酸分子は、特定のヌクレオチド配列に依存しない。むしろ、本明細書に記載される核酸分子の構造を形成する能力を有するならば、どんなヌクレオチド配列を使用してもよい。

【0016】

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、二本鎖領域を含む。例えば、ある特定の態様では、核酸分子は、二本鎖の二重鎖である。他の態様では、本発明の核酸分子は、分子の第1の領域が分子の第2の領域にハイブリダイズして二重鎖を形成している、一本鎖である。さらに他の態様では、核酸分子のヘアピン構造は、二重鎖の安定性を向上させる。

【0017】

ある特定の態様では、核酸分子は、平滑末端を含む。

【0018】

ある特定の態様では、核酸分子は、少なくとも1つの3'-オーバーハングを有する。他の態様では、3'-オーバーハングは、1個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、3'-オーバーハングは、2個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、3'-オーバーハングは、3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、3'-オーバーハングは、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個または10個を超える非塩基対合ヌクレオチドを含む。

【0019】

ある特定の態様では、核酸分子は、少なくとも1つの5'-オーバーハングを有する。他の態様では、分子内構造は、5'-オーバーハングを生み出す。さらに他の態様では、5'-オーバーハングは、1個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、5'-オーバーハングは、2個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、5'-オーバーハングは、3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、5'-オーバーハングは、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個または10個を超える非塩基対合ヌクレオチドを含む。

【0020】

他の態様では、核酸分子は、5'-三リン酸基または5'-二リン酸基を含む。さらに他の態様では、1つまたは複数の5'-三リン酸基または5'-二リン酸基の存在は、核酸分子のRIG-Iへの結合親和性を向上させる。

【0021】

ある特定の態様では、SLRのヌクレアーゼ耐性は、骨格修飾（例えば、ホスホロチオアート）ならびに5'末端修飾および/または3'末端修飾により増強することができる。他の態様では、SLRは、例えば、フルオロフォア、同位体などのトレーサーで標識することができ、これらは、固相合成によって末端ループに容易に組み込まれる。

【0022】

ある特定の態様では、SLRは、その安定性および/または標的指向性を向上させる送達ビヒクルを使用してインビボ送達することができる。他の態様では、SLRは、腫瘍内に送達される。さらに他の態様では、SLRは、全身に送達される。

【0023】

本発明のSLRは、RIG-Iを強く活性化し、細胞において堅牢なIFN応答を刺激する。非限定例として、図1は、ヒト細胞株（293Tが示される）でのルシフェラーゼレポーター系におけるインターフェロン誘導を例証する。

【0024】

さらに、合成SLRは、全動物において大規模なIFN応答を誘導し、付随してRIG-I特異的サイトカインの誘導が起こる（図2を参照のこと）。ノックアウトおよびノックダウン実験は、RIG-I特異性を示している。重要なことに、SLRは、広い炎症作用または毒性を誘導しないが、このことは、低いTNF活性化を示している。

【0025】

インビボ研究は、SLR14（SEQ ID NO：7）が単剤として強力な抗腫瘍効果を有するこ

10

20

30

40

50

とを示した（図3を参照のこと）。

5'pppGGAUCGAUCGAUCG^{UU} SLR14
CCUAGCUAGCUAGCG^C

【0026】

当業者は、本発明が、本明細書において考察される例示的な療法に限定されないことを理解するだろう。さらに、当業者は、1つまたは複数の療法を単独でまたは任意の組み合わせで投与することができることを理解するだろう。なおさらには、当業者は、1つまたは複数の療法を、化学療法を含めた任意の他の種類の療法と組み合わせて投与することができることを理解するだろう。

10

【0027】

定義

別途定義のない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等な任意の方法および材料を本発明の実施および試験において使用することができるが、選択された方法および材料が記載される。

【0028】

本明細書において使用される場合、以下の用語の各々は、このセクションにおけるそれと関連する意味を有する。

20

【0029】

「1つの(a)」および「1つの(an)」という冠詞は、本明細書において、その冠詞の文法的目的語の1つまたは複数（すなわち、少なくとも1つ）を指すために使用される。例として、「1つのエレメント」は、1つのエレメントまたは複数のエレメントを意味する。

【0030】

本明細書において使用される場合、「約」は、例えば、量、時間的持続期間などの測定可能な値に関与するとき、規定値から±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらにより好ましくは±1%、なおより好ましくは±0.1%の変動を包含することを意味するが、これはそのような変動が、開示される方法を実施する上で妥当なためである。

30

【0031】

「がん」という用語は、本明細書において使用される場合、異常な細胞の急速かつ制御されない増殖を特徴とする疾患として定義される。がん細胞は、局所的に広がるかまたは血流およびリンパ系を通じて身体他の部分に広がることができる。様々ながんの例は、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がんなどを含むが、それらに限定されない。

【0032】

「相補的」は、二本の核酸鎖の領域間または同じ核酸鎖の2つの領域間の配列相補性の広い概念のことを指す。第1の核酸領域のアデニン残基は、その第1の領域と逆行する第2の核酸領域の残基と、その残基がチミンまたはウラシルである場合に、特異的な水素結合を形成（「塩基対合」）可能であることが知られている。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基は、その第1の鎖と逆行する第2の核酸鎖の残基と、その残基がグアニンである場合に、塩基対合可能であることが知られている。核酸の第1の領域は、同じまたは異なる核酸の第2の領域と、その2つの領域が逆行する様式で配置されたとき、第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基が第2の領域の残基と塩基対合可能である場合に、相補的である。ある特定の態様では、第1の領域は、第1の部分を含み、かつ、第2の領域は、第2の部分を含み、それによって、第1の部分と第2の部分が逆行する様式で配置されるとき、第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、第2の部分中のヌクレオチド残

40

50

基と塩基対合可能である。ある特定の態様では、第1の部分のすべてのヌクレオチド残基が、第2の部分中のヌクレオチド残基と塩基対合可能である。

【0033】

「コードする」は、規定のヌクレオチド（すなわち、rRNA、tRNAおよびmRNA）配列または規定のアミノ酸配列のいずれかを有する、生物学的プロセスにおいて他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として働く、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中の特定のヌクレオチド配列の固有の特性、ならびにそれに起因する生物学的特性のことを指す。したがって、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が、細胞または他の生物学的システムにおいてタンパク質を産生する場合、その遺伝子はタンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり通常は配列表に提供されるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として使用される非コード鎖は共に、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると呼ぶことができる。別途指定のない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重型でありかつ同じアミノ酸配列をコードする、すべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質およびRNAをコードするヌクレオチド配列は、イントロンを含み得る。

10

【0034】

本明細書において使用される場合、「断片」という用語は、核酸に適用される場合、より大きい核酸の部分配列のことを指す。核酸の「断片」は、少なくとも約5ヌクレオチド長；例えば、少なくとも約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチド；少なくとも約100～約500ヌクレオチド、少なくとも約500～約1000ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチド～約1500ヌクレオチド；または約1500ヌクレオチド～約2500ヌクレオチド；または約2500ヌクレオチド（およびそれらの間の任意の整数値）であることができる。

20

【0035】

「相同の、相同性」または「同一の、同一性」は、本明細書において使用される場合、アミノ酸配列間および核酸配列間の比較のことを指す。核酸分子に関するとき、「相同性」、「同一性」または「同一パーセント」は、配列解析プログラムによって同一のヌクレオチドと一致している対象核酸配列のヌクレオチドのパーセントのことを指す。相同性は、公知の方法によって容易に計算することができる。核酸配列およびアミノ酸配列は、核酸またはアミノ酸の類似した配列をアライメントさせることでその差を定義するコンピュータープログラムを使用して、比較することができる。好ましい方法論では、BLASTプログラム（NCBI）およびその中で使用されるパラメーターが利用され、ゲノムDNA配列の配列断片をアライメントさせるためにExPaSyが使用される。しかしながら、任意の標準アライメントソフトウェアを使用することで、同等なアライメント評価を得ることができる。

30

【0036】

本明細書において使用される場合、「相同の」は、2つのポリマー分子間、例えば、2つの核酸分子、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子間、または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列類似性のことを指す。2つの分子の両方におけるサブユニット位置が同じサブユニットによって占有されているとき、例えば、2つのDNA分子の各々における位置がアデニンによって占有されている場合、それらはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、一致している位置または相同の位置の数の一次関数であり、例えば、2つの化合物配列中の位置の半分（例えば、長さが10サブユニットのポリマー中の5つの位置）が相同である場合、2つの配列は50%相同であり、位置の90%（例えば、10中9）が一致しているまたは相同である場合、2つの配列は90%の相同性を共有する。例として、DNA配列5'-ATTG-3'および5'-AATC-3'は、50%の相同性を共有する。

40

【0037】

「ハイブリダイゼーションプローブ」は、核酸の相補鎖に塩基特異的な様式で結合可能なオリゴヌクレオチドである。そのようなプローブは、Nielsen et al., 1991, Science

50

254:1497-1500に記載されているようなペプチド核酸、ならびに他の核酸類似体および核酸模倣体（米国特許第6,156,501号を参照のこと）を含む。

【0038】

「ハイブリダイゼーション」という用語は、2つの一本鎖核酸が非共有結合して二本鎖核酸を形成する過程のことを指す；三本鎖ハイブリダイゼーションも理論上可能である。核酸中の相補配列は互いに対合して、二重らせんを形成する。生じた二本鎖核酸は、「ハイブリッド」である。ハイブリダイゼーションは、例えば、2つの相補的または部分的に相補な配列間であり得る。ハイブリッドは、二本鎖領域および一本鎖領域を有し得る。ハイブリッドは、例えば、DNA：DNA、RNA：DNAまたはDNA：RNAであり得る。ハイブリッドはまた、修飾核酸間でも形成され得る。核酸の一方または両方を、固体支持体上に固定化してよい。ハイブリダイゼーション技法を、特異的な配列を検出および単離する、相同性を測定する、または一方もしくは両方の鎖の他の特徴を定義するために使用してよい。

10

【0039】

ハイブリッドの安定性は、相補性の長さ、相補的領域内のミスマッチの存在、反応中の温度および塩濃度を含む、多種多様な要因に依存する。ハイブリダイゼーションは、通常、ストリンジェントな条件下、例えば、1M以下の塩濃度および少なくとも25℃の温度で実施される。例えば、5×SSPE（750mM NaCl、50mM リン酸Na、5mM EDTA、pH 7.4）または100mM MES、1M NaCl、20mM EDTA、0.01% Tween-20および25～50℃の温度の条件が、アレル特異的プローブハイブリダイゼーションに好適である。特に好ましい態様では、ハイブリダイゼーションは、40～50℃で実施される。アセチル化BSAおよびニシン精子DNAをハイブリダイゼーション反応に加えてよい。マイクロアレイに好適なハイブリダイゼーション条件は、Affymetrix（Santa Clara, CA）から入手可能なGene Expression Technical ManualおよびGeneChip Mapping Assay Manualに記載されている。

20

【0040】

第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドは、少なくとも約75%、好ましくは、少なくとも約90%または少なくとも約95%相補的なオリゴヌクレオチドのみが互いにアニールする条件下で2つのオリゴヌクレオチドがアニールする場合に、「高ストリンジェンシー」でアニールする。2つのオリゴヌクレオチドをアニールさせるために使用される条件のストリンジェンシーは、数ある要因の中でも特に、温度、アニーリング培地のイオン強度、インキュベーション期間、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドのG-C含量、および2つのオリゴヌクレオチド間の予測される非相同性の程度（分かれば）と相関している。アニーリング条件のストリンジェンシーを調整する方法は公知である（例えば、Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照のこと）。

30

【0041】

本明細書において使用される場合、「説明資料」は、本明細書に列記される様々な疾患または障害の軽減を達成するためのキット中の本発明の化合物、組成物、ベクターまたは送達系の有用性を伝えるために使用できる、出版物、記録、図表、または任意の他の表現媒体を含む。任意で、または代替的に、説明資料は、哺乳動物の細胞または組織における疾患または障害を軽減する1つまたは複数の方法を記載することができる。本発明のキットの説明資料は、例えば、特定された本発明の化合物、組成物、ベクターまたは送達系を含有する容器に添付されても、特定された化合物、組成物、ベクターまたは送達系を含有する容器と一緒に出荷されてもよい。あるいは、説明資料および化合物がレシピエントによって協調的に使用されることを意図して、説明資料は容器とは別に出荷されてもよい。

40

【0042】

本明細書において使用される場合、「単離する」は、個体から得られた、または個体から得られた試料から得られた、核酸に関連する。核酸は、得られた後の任意の時点（例えば

50

、培養検査の前またはその後、増幅の前またはその後）に分析してよい。

【0043】

「標識」という用語は、本明細書において使用される場合、発光標識、光散乱標識または放射性標識のことを指す。蛍光標識は、Fluoreprime (Pharmacia)、Fluoredate (Millipore) およびFAM (ABI) などの市販のフルオレセインホスホロアミダートを含むが、それらに限定されない。米国特許第6,287,778号を参照されたい。

【0044】

「ミスマッチ」、「ミスマッチ対照」または「ミスマッチプローブ」という用語は、配列が特定の標的配列に完全に相補的でない核酸のことを指す。ミスマッチは、1つまたは複数の塩基を含み得る。本明細書において使用される場合、「核酸」という用語は、DNA およびRNAなどの天然に存在する分子だけでなく、様々な誘導体および類似体のことも指す。一般に、本技法のプローブ、ヘアピンリンカーおよび標的ポリヌクレオチドは、核酸であり、典型的には、DNAを含む。当業者によって認識されるように、追加の誘導体および類似体を用いることもできる。

【0045】

「ヌクレオチド塩基」という用語は、本明細書において使用される場合、置換または非置換の芳香族環（1つまたは複数）のことを指す。ある特定の態様では、芳香族環（1つまたは複数）は、少なくとも1つの窒素原子を含有する。ある特定の態様では、ヌクレオチド塩基は、適切に相補的なヌクレオチド塩基とワトソン-クリックおよび/またはフーグスティーン水素結合を形成可能である。例示的なヌクレオチド塩基およびその類似体は、天然に存在するヌクレオチド塩基アデニン、グアニン、シトシン、6-メチル-シトシン、ウラシル、チミン、および天然に存在するヌクレオチド塩基の類似体、例えば、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、7-デアザ-8-アザアデニン、N⁶-デルタ 2-イソペンテニルアデニン (6iA)、N⁶-デルタ 2-イソペンテニル-2-メチルチオアデニン (2 ms6iA)、N²-ジメチルグアニン (dmG)、7-メチルグアニン (7mG)、イノシン、ネブラリン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、シュードウリジン、シュードシトシン、シュードイソシトシン、5-プロピニルシトシン、イソシトシン、イソグアニン、7-デアザグアニン、2-チオピリミジン、6-チオグアニン、4-チオチミン、4-チオウラシル、O⁶-メチルグアニン、N⁶-メチルアデニン、O⁴-メチルチミン、5,6-ジヒドロチミン、5,6-ジヒドロウラシル、ピラゾロ[3,4-D]ピリミジン（例えば、米国特許第6,143,877号および第6,127,121号ならびにPCT出願公開WO 01/38584を参照のこと）、エテノアデニン、ニトロインドールおよび4-メチルインドールなどのインドール、ならびにニトロピロールなどのピロールを含むが、それらに限定されない。ある特定の例示的なヌクレオチド塩基は、例えば、Fasman, 1989, Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla., およびその中で引用されている参考文献に見いだすことができる。

【0046】

「ヌクレオチド」という用語は、本明細書において使用される場合、リボース、アラビノース、キシロースおよびピラノース、ならびにそれらの糖類似体などの糖のC-1'炭素に連結されたヌクレオチド塩基を含む化合物のことを指す。ヌクレオチドという用語はまた、ヌクレオチド類似体も包含する。糖は、置換されていても非置換であってもよい。置換リボース糖は、炭素原子の1つまたは複数、例えば2'-炭素原子が同じまたは異なるCl、F、-R、-OR、-NR₂（式中、各Rは、独立して、H、C₁-C₆アルキルまたはC₅-C₁₄アリールである）またはハロゲン基の1つまたは複数で置換されているリボースを含むが、それらに限定されない。例示的なリボースは、2'-(C_6)アルコキシリボース、2'-(C_5 -C₁₄)アリールオキシリボース、2',3'-ジデヒドロリボース、2'-デオキシ-3'-ハロリボース、2'-デオキシ-3'-フルオリボース、2'-デオキシ-3'-クロロリボース、2'-デオキシ-3'-アミノリボース、2'-デオキシ-3'- C_6 アルキルリボース、2'-デオキシ-3'- C_5 -C₁₄アリールオキシリボースおよび2'-デオキシ-3'- C_5 -C₁₄アリールオキシリボース、リ

10

20

30

40

50

ボース、2'-デオキシリボース、2',3'-ジデオキシリボース、2'-ハロリボース、2'-フルオロリボース、2'-クロロリボース、ならびに2'-アルキルリボース、例えば、2'-O-メチル、4'-アノマーヌクレオチド、1'-アノマーヌクレオチド、2'-4'-および3'-4'-連結ならびに他の「ロックド」または「LNA」二環式糖修飾を含むが、それらに限定されない（例えば、PCT出願公開番号WO 98/22489、WO 98/39352；およびWO 99/14226を参照のこと）。「核酸」という用語は、典型的には、大きなポリヌクレオチドのことを指す。

【0047】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、典型的には、短いポリヌクレオチド、一般に、約50以下のヌクレオチドのことを指す。ヌクレオチド配列がDNA配列（すなわち、A、T、G、C）によって表されるとき、これはまた、「U」が「T」と置き換わったRNA配列（すなわち、A、U、G、C）も含むことが理解されよう。

10

【0048】

「オーバーハング」という用語は、本明細書において使用される場合、第1の鎖または領域と二重鎖を形成する相補鎖の末端を超えて伸長する1つの鎖または領域から生じる、末端にある1つまたは複数の非塩基対合ヌクレオチドのことを指す。水素結合を通じて二重鎖を形成可能である1つまたは複数のポリヌクレオチドが、オーバーハングを有することができる。二重鎖の3'末端を超えて伸長する一本鎖領域をオーバーハングと呼ぶ。

【0049】

PRRと略される「パターン認識受容体」という用語は、本明細書において使用される場合、病原体関連分子パターンを典型的に認識するタンパク質ファミリーのことを指す。PRRは、RIG-I様受容体（RLR）ファミリー、NOD様受容体（NLR）ファミリー、C型レクチン受容体（CLR）ファミリー、またはtoll様受容体（TLR）ファミリーのメンバーを含み得る。ある特定の態様では、本明細書に記載の核酸分子は、PRRに結合し、それによって、インターフェロン応答をもたらす。PRRは、任意のPRR断片、バリエーション、スプライスバリエーション、突然変異体などを含むことが理解されるべきである。ある特定の態様では、PRRは、RIG-Iである。

20

【0050】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において使用される場合、ヌクレオチドの鎖として定義される。その上、核酸は、ヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書において使用される場合の核酸およびポリヌクレオチドは、互換可能である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、それが単量体「ヌクレオチド」に加水分解され得るという一般知識を有する。単量体ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解され得る。本明細書において使用される場合、ポリヌクレオチドは、非限定的に、組換え手段、すなわち、通常のクローニングおよび増幅技術などを使用した組換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含む、当技術分野において利用可能な任意の手段によって、ならびに合成手段によって得られるすべての核酸配列を含むが、それらに限定されない。「オリゴヌクレオチド」は、本明細書において使用される場合、短いポリヌクレオチド、典型的には、100未満の塩基長のポリヌクレオチドのことを指す。

30

【0051】

本明細書ではポリヌクレオチド配列を記述するために従来の表記法が使用される：一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側末端は、5'末端である。mRNAと同じ配列を有するDNA鎖は、「コード鎖」と呼ばれる；DNA上の参照点に対して5'側に位置するDNA鎖上の配列は、「上流配列」と呼ばれる；DNA上の参照点に対して3'側にあるDNA鎖上の配列は、「下流配列」と呼ばれる。

40

【0052】

当業者は、本明細書全体を通して順配向で示されるすべての核酸配列がまた、逆配向でも、順および逆の相補的配向でも、本発明の組成物および方法において有用であること、そして、これらが、あたかも本明細書に明確に示されたかのように本明細書に記載されることを理解するだろう。

50

【0053】

「プライマー」は、指定のポリヌクレオチド鑄型に特異的にハイブリダイズし、相補的ポリヌクレオチドの合成のための開始点を提供可能であるポリヌクレオチドのことを指す。そのような合成は、ポリヌクレオチドプライマーが、合成が誘導される条件下、例えば、ヌクレオチド、相補的ポリヌクレオチド鑄型、およびDNAポリメラーゼなどの重合のための作用物質の存在下に置かれたときに行われる。プライマーは、典型的には一本鎖であるが、二本鎖であってもよい。プライマーは、典型的にはデオキシリボ核酸であるが、多種多様な合成プライマーおよび天然に存在するプライマーが多く用途に有用である。プライマーは、鑄型に対して相補的であり、合成の開始部位として役立つよう鑄型にハイブリダイズするように設計されているが、鑄型の正確な配列を反映する必要はない。そのような場合、鑄型に対するプライマーの特異的ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに依存する。プライマーは、検出可能な標識、例えば、発色性部分、放射性部分または蛍光部分で標識して、検出可能部分として使用することができる。蛍光部分の例は、希土類キレート（ユウロピウムキレート）、Texas Red、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、フィコクリセリン（phycocrytherin）、フィコシアニン、スペクトラムオレンジ、スペクトラムグリーン、および/または上記のいずれか1つもしくは複数の誘導体を含むが、それらに限定されない。他の検出可能部分は、ジゴキシンゲンおよびビオチンを含む。

10

【0054】

本明細書において使用される場合、「プローブ」は、相補配列の標的核酸に、1つまたは複数の種類の化学結合を通じて、通常は相補的塩基対合を通じて、通常は水素結合形成を通じて結合可能な核酸として定義される。本明細書において使用される場合、プローブは、天然塩基（すなわち、A、G、U、CまたはT）または修飾塩基（7-デアザグアノシン、イノシンなど）を含み得る。加えて、ハイブリダイゼーションを妨害しない限り、ホスホジエステル結合以外の連結も、プローブ中の塩基と接合し得る。したがって、プローブは、構成塩基がホスホジエステル連結ではなくペプチド結合によって接合されているペプチド核酸であり得る。「一致」、「完全一致」、「完全一致プローブ」または「完全一致対照」という用語は、特定の標的配列に完全に相補的である配列を有する核酸のことを指す。核酸は、典型的には、標的配列の部分（部分配列）に完全に相補的である。完全一致（PM）プローブは、「試験プローブ」、「正規化対照」プローブ、発現レベル対照プローブなどであることができる。しかしながら、完全一致対照または完全一致は、「ミスマッチ」または「ミスマッチプローブ」と区別される。

20

30

【0055】

「リボヌクレオチド」という用語および「リボ核酸」（RNA）という語句は、本明細書において使用される場合、少なくとも1つのリボヌクレオチド単位を含む、修飾または未修飾のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのことを指す。リボヌクレオチド単位は、リボシル部分の1'位でN-グリコシド連結で付着した窒素性塩基を有するリボシル部分の2'位に付着した酸素、および別のヌクレオチドへの連結を可能にするかまたは連結が起きないようにする部分を含む。

【0056】

「標的」という用語は、本明細書において使用される場合、所与の分子に対して親和性を有する分子のことを指す。標的は、天然に存在する分子であっても人工の分子であってもよい。また、これらは、未変化の状態または他の種との凝集体として利用することもできる。標的は、共有結合または非共有結合で、結合メンバーに、直接的または特異的結合物質を介して付着され得る。本発明で利用できる標的の例は、タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチドおよび核酸を含むが、それらに制限されない。

40

【0057】

「バリエーション」は、この用語が本明細書において使用される場合、参照核酸配列またはペプチド配列と配列が異なるが参照分子の本質的な特性を保持している、核酸配列またはペプチド配列である。核酸バリエーションの配列の変化は、参照核酸によってコードされるペプ

50

チドのアミノ酸配列を改変しない場合も、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合および切断をもたらす場合もある。核酸またはペプチドのバリエーションは、アレルバリエーションなどの天然に存在するものであっても、天然に存在するか知られていないバリエーションであってもよい。核酸およびペプチドの天然に存在しないバリエーションは、突然変異誘発技法によってまたは直接合成によって製造してよい。

【0058】

範囲：本開示全体を通して、本発明の様々な局面は、範囲の形式で提示することができる。範囲の形式の記述は、単に便宜および簡略化のためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限と解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、範囲の記述は、可能なすべての部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したものと同みなされるべきである。例えば、1～6のような範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を具体的に開示したものとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

10

【0059】

化合物および組成物

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、20塩基対、19塩基対、18塩基対、17塩基対、16塩基対、15塩基対、14塩基対、13塩基対、12塩基対、11塩基対、10塩基対、9塩基対、8塩基対、7塩基対または6塩基対の二本鎖セクションを有する。ある特定の態様では、二本鎖セクションは、1つまたは複数の誤対合した塩基を含む。すなわち、ありとあらゆるヌクレオチド対においてワトソン-クリック塩基対合が必要とされるわけではない。ある特定の態様では、二本鎖セクションは、約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20塩基対を含む。

20

【0060】

ある特定の態様では、核酸分子は、どんな配列のものであってもよく、ヘアピン構造および平滑末端を含み、この場合のヘアピンは、約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20塩基対の二本鎖セクションを含む。

【0061】

本発明の核酸分子は、任意の供給源の核酸を含む。本発明の文脈における核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ペプチド核酸（PNA）、トレオース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、ロックド核酸（LNA）またはそれらのハイブリッドを含むが、それらに限定されない。

30

【0062】

インアクセシブルRNAとしばしば呼ばれるLNAは、修飾RNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は、2' 酸素と4' 炭素とを結び付ける特別な架橋で修飾される。この架橋は、A型二重鎖において見られることの多い3' エンド（North）配座のリボースを「ロックする」。LNAヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド中のDNA残基またはRNA残基と所望であればいつでも混合することができ、ワトソン-クリック塩基対合則に従ってDNAまたはRNAとハイブリダイズすることができる。そのようなオリゴマーは、化学合成することができ、市販されている。ロックドリボース配座は、塩基スタッキングおよび骨格の事前編成を増強する。

40

【0063】

LNAは、4～6個の環員を有する炭素もしくはヘテロ脂環式環（例えば、フィラノース（firanose）環）または他の脂環式環構造（例えば、シクロペンチル、シクロヘプチル、テトラヒドロピラニル、オキセパニル、テトラヒドロチオフエニル、ピロリジニル、チアニル（thianyl）、チエパニル（thiepanyl）、ピペリジニルなど）を有する、核酸単位を含む。ある特定の態様では、炭素またはヘテロ脂環式基の少なくとも1個の環原子は、さらなる環式連結を形成するようになり、それによって多環式基を提供する。環式連結は、炭素またはヘテロ脂環式基の1個または複数個、典型的には2個の原子を含むことができる。環式連結はまた、置換基であるが環員ではない炭素またはヘテロ脂環式基の1個

50

または複数の原子を含むことができる。例示的なLNA単位は、フラノシル型環および以下の連結の1つまたは複数を含むものを含む：C-1', C-2' ; C-2', C-3' ; C-2', C-4' ; またはC-2', C-5' 連結。C-2', C-4' が特に望ましい。他の態様では、LNA単位は、North (または単に略してN) 配座と通常呼ばれるC3' エンド配座を好む、中心の糖部分 (例えば、リボースまたはキシロース) の2' 位に置換基を有する化合物、またはそれらの誘導体である。例示的なLNA単位は、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アリル、および2'-O-メトキシエトキシ誘導体を含む。他の望ましいLNA単位は、国際特許公開WO 99/14226、WO 00/56746およびWO 00/66604においてさらに考察されており、それらはすべて、その全体が本明細書に含まれる。

【0064】

10

DNAおよびRNAは、生物中に天然に存在するが、これらは生体外に存在する場合もあり、生物に組み込まれる場合もある。核酸は、任意の起源、例えば、ウイルス、細菌、古細菌、真菌、リボソーム性、真核性または原核性の核酸であり得る。それは、任意の生物学的試料および任意の生物、組織、細胞または細胞内コンパートメント由来の核酸であり得る。それは、任意の生物由来の核酸であり得る。核酸は、定量の前に、例えば、単離、精製または修飾によって事前処理されてよい。また、人工核酸または合成核酸を使用してもよい。核酸の長さは、変動し得る。核酸は、修飾されてよく、例えば、1つまたは複数の修飾核酸塩基または修飾糖部分 (例えば、メトキシ基を含む) を含み得る。核酸の骨格は、ペプチド核酸 (PNA) のように1つまたは複数のペプチド結合を含み得る。核酸は、非プリンもしくは非ピリミジン類似体またはヌクレオチド類似体などの塩基類似体を含み得る。それはまた、タンパク質、ペプチドおよび/またはアミノ酸などの追加の付着物も含み得る。

20

【0065】

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、分子内構造、すなわち、ヘアピン構造を形成する、一本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0066】

ある特定の態様では、ヘアピン核酸分子は、平滑末端を形成する。ある特定の態様では、平滑末端は、例えば、二重鎖の少なくとも一端が、5' 鎖と3' 鎖の両方の末端が合わさる、すなわち、平坦であるかまたは本明細書において呼ぶように平滑であるように、任意のオーバーハング、例えば、3'-ジヌクレオチドオーバーハングを欠いている、RNA二重鎖のことを指す。本発明の分子は、少なくとも1個の平滑末端を有することができる。他の態様では、分子内構造は、3'-オーバーハングを生み出す。ある特定の場、3'-オーバーハングは、1個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。他の態様では、3'-オーバーハングは、2個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、3'-オーバーハングは、3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、3'-オーバーハングは、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、または10個を超える非塩基対合ヌクレオチドを含む。ある特定の場、分子内構造は、5'-オーバーハングを生み出す。ある特定の態様では、5'-オーバーハングは、1個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。他の態様では、5'-オーバーハングは、2個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、5'-オーバーハングは、3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む。さらに他の態様では、5'-オーバーハングは、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、または10個を超える非塩基対合ヌクレオチドを含む。

30

40

【0067】

ある特定の場、本発明の短鎖ヘアピン核酸分子は、ほどけた後に再アニールする能力があるので理想的な刺激物質であるが、ヘアピンではないより短いパルンドローム二重鎖は、二重鎖が融解したらすぐIFN産生を刺激する能力を失う可能性が高い。しかしながら、本明細書において短い二本鎖の二重鎖がPRRに結合してインターフェロン応答を刺激する能力を示すことが実証されているので、本発明は、ヘアピン構造に限定されない。

【0068】

いくつかの場合に、本発明の短鎖ヘアピン核酸分子は、いくつかの条件において、ステム

50

構造が折り畳まれていない場合に分子内ステム構造が低減された安定性を有するように設計される。このように、ステム構造がその分子内塩基対合から解放されて線形分子と似た状態となることができるように、ステム構造を設計することができる。

【0069】

本発明によれば、ステム構造を形成する伸長した相補配列を含有する所定のステムオリゴヌクレオチド配列が提供される。ある特定の態様では、ステムは、これらの相補的伸長鎖がアニールしてヘアピン構造を提供するように、20塩基対、19塩基対、18塩基対、17塩基対、16塩基対、15塩基対、14塩基対、13塩基対、12塩基対、11塩基対、10塩基対、9塩基対、8塩基対、7塩基対、または6塩基対を含む二本鎖セクションを含む。ある特定の態様では、二本鎖セクションは、1つまたは複数の塩基誤対合を含む。すなわち、二本鎖セクションは、ヘアピン構造を生み出すためにありとあらゆる塩基対にワトソン-クリック塩基対合を含む必要はない。

10

【0070】

ある特定の態様では、本発明の短鎖ヘアピン核酸分子は、アンチセンス配列およびセンス配列（センス配列は、アンチセンス配列に実質的に相補的である）と；アンチセンス配列とセンス配列を接続するループ領域またはリンカーとを含む。

【0071】

ある特定の局面では、本発明は、短鎖ヘアピンRNAなどの単分子RNAを含むポリヌクレオチドを含む。短鎖ヘアピンRNAは、センス配列と、ループ領域またはリンカーと、ヘアピンループ構造と一緒に形成するアンチセンス配列とを含む、単分子RNAであることができる。好ましくは、アンチセンス配列およびセンス配列は、もう一方と実質的に相補的（約80%以上相補的）であり、ある特定の態様では、アンチセンス配列およびセンス配列は、互いに100%相補的である。ある特定の態様では、アンチセンス配列およびセンス配列は各々、20塩基対、19塩基対、18塩基対、17塩基対、16塩基対、15塩基対、14塩基対、13塩基対、12塩基対、11塩基対、10塩基対、9塩基対、8塩基対、7塩基対、または6塩基対を含む。加えて、本発明の単分子RNA内のアンチセンス配列およびセンス配列は、同じ長さであっても、長さが異なってもよい。ループは、任意の長さ、例えば、0、1以上、2以上、4以上、5以上、8以上、10以上、15以上、20以上、40以上、または100以上のヌクレオチド長の長さであることができる。

20

【0072】

ある特定の局面では、リンカーは、ヌクレオシド、ヌクレオチド、デオキシヌクレオシド、もしくはデオキシヌクレオチド、またはそれらの任意の代用物もしくは修飾物を含まない。ある特定の態様では、リンカーは、リン酸骨格、またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まない。

30

【0073】

当技術分野において公知のあらゆるリンカーが本明細書において想定される。リンカーの非限定例は、エチレングリコール（ $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ）、ペプチド、ペプチド核酸（PNA）、アルキレン鎖（二価のアルカン系基）、アミド、エステル、エーテルなど、およびそれらの任意の組み合わせを含む。

【0074】

ある特定の態様では、リンカーは、少なくとも1個のエチレングリコール基を含む。他の態様では、リンカーは、1個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、2個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、3個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、4個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、5個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、6個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、7個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、8個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、9個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、10個のエチレングリコール基を含む。さらに他の態様では、リンカーは、10個を超えるエチレングリコール基を

40

50

含む。さらに他の態様では、リンカーは、 $(OCH_2CH_2)_n$ （式中、 n は、1～10の範囲の整数である）を含む。さらに他の態様では、 n は、1である。さらに他の態様では、 n は、2である。さらに他の態様では、 n は、3である。さらに他の態様では、 n は、4である。さらに他の態様では、 n は、5である。さらに他の態様では、 n は、6である。さらに他の態様では、 n は、7である。さらに他の態様では、 n は、8である。さらに他の態様では、 n は、9である。さらに他の態様では、 n は、10である。

【0075】

ある特定の態様では、リンカーは、少なくとも1個のアミノ酸、少なくとも2個のアミノ酸、少なくとも3個のアミノ酸、少なくとも4個のアミノ酸、少なくとも5個のアミノ酸、少なくとも6個のアミノ酸、少なくとも7個のアミノ酸、少なくとも8個のアミノ酸、少なくとも9個のアミノ酸、少なくとも10個のアミノ酸、または10個を超えるアミノ酸を含む。

10

【0076】

ある特定の態様では、リンカーは、 C_1-C_6 アルキル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 アルキル、 C_3-C_8 シクロアルキル、 C_1-C_6 アルコキシ、 $-OH$ 、ハロ、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_6$ アルキル)、 $-N(C_1-C_6$ アルキル)(C_1-C_6 アルキル)、 $-C(=O)OH$ 、 $-C(=O)O(C_1-C_6$ アルキル)、および $-C(=O)O(C_3-C_8$ シクロアルキル)からなる群より選択される少なくとも1つの置換基で置換されていてもよい、限定されないが C_1-C_{50} アルキレン鎖などのアルキレン鎖を含み、ここで、アルキルまたはシクロアルキルは、 C_1-C_6 アルキル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 アルキル、 C_3-C_8 シクロアルキル、 C_1-C_6 アルコキシ、 $-OH$ 、ハロ、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_6$ アルキル)、 $-N(C_1-C_6$ アルキル)(C_1-C_6 アルキル)、 $-C(=O)OH$ 、 $-C(=O)O(C_1-C_6$ アルキル)、および $-C(=O)O(C_3-C_8$ シクロアルキル)からなる群より選択される少なくとも1つで置換されていてもよい。他の態様では、リンカーは、 $-(CH_2)-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 、 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_7-$ 、 $-(CH_2)_8-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{11}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{13}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{15}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{17}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{19}-$ 、および $-(CH_2)_{20}-$ からなる群より選択され、その各々は、本明細書の他の箇所に記載しているように独立して置換されていてもよい。

20

【0077】

核酸修飾

細胞培養用の血清中または成長培地中での安定性を向上させるために、本発明の核酸分子を修飾することができる。安定性を増強するために、3'残基を分解に対して安定化させてよく、例えば、これらがプリンヌクレオチド、特にアデノシンまたはグアノシンヌクレオチドから構成されるように、これらを選択してよい。あるいは、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、2'-デオキシチミジンによるウリジンの置換が許容され、この置換は、分子の機能に影響を及ぼさない。

30

【0078】

ある特定の態様では、核酸分子は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド類似体を含有してよい。例えば、修飾ヌクレオチド類似体を組み込むことによって、その末端を安定化させてよい。

40

【0079】

ヌクレオチド類似体の非限定例は、糖および/または骨格修飾リボヌクレオチドを含む（すなわち、リン酸-糖骨格に対する修飾を含む）。例えば、天然RNAのホスホジエステル連結は、窒素または硫黄ヘテロ原子の少なくとも1つを含むように修飾されてよい。ある特定の骨格修飾リボヌクレオチドでは、隣接するリボヌクレオチドに接続しているホスホエステル基が、例えば、ホスホロチオアート基の修飾基で置換される。ある特定の糖修飾リボヌクレオチドでは、2'OH基が、H、OR、R、ハロ、SH、SR、 NH_2 、NHR、 NR_2 およびON（式中、Rは、 C_1-C_6 アルキル、アルケニル、またはアルキニルであり、ハロは、F、Cl、Br、またはIである）からなる群より選択される基で置換される。

【0080】

50

修飾の他の例は、核酸塩基修飾リボヌクレオチド、すなわち、天然に存在する核酸塩基の代わりに少なくとも1つの天然に存在しない核酸塩基を含有するリボヌクレオチドである。塩基は、アデノシンデアミナーゼの活性を遮断するように修飾されてよい。例示的な修飾核酸塩基は、限定されないが、5位で修飾されているウリジンおよび/またはシチジン、例えば、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ブロモウリジン；8位で修飾されているアデノシンおよび/またはグアノシン、例えば、8-ブロモグアノシン；デアザヌクレオチド、例えば、7-デアザ-アデノシン；0-およびN-アルキル化ヌクレオチド、例えば、N⁶-メチルアデノシンを含み、かつ、好適である。上記の修飾は組み合わせられてもよいことに留意すべきである。

【0081】

10

本発明の短鎖ヘアピン核酸分子の安定性、機能性および/または特異性を増強するため、かつ、その免疫賦活性を最小限に抑えるため、修飾を加えることができる。例えば、オーバーハングは、未修飾であっても、1つもしくは複数の特異性もしくは安定化修飾（2'位のハロゲンもしくは0-アルキル修飾など）、またはヌクレオチド間修飾（ホスホロチオアート修飾など）を含有してもよい。オーバーハングは、リボ核酸、デオキシリボ核酸、またはリボ核酸とデオキシリボ核酸の組み合わせであることができる。

【0082】

いくつかの場合に、核酸分子は、以下の化学修飾の少なくとも1つを含む：1つまたは複数のヌクレオチドの2'-H、2'-O-メチル、または2'-OH修飾；骨格の1つまたは複数のホスホロチオアート修飾；および非ヌクレオチド部分；ここで、少なくとも1つの化学修飾は、化学修飾を有していない対応する短鎖ヘアピン核酸分子と比べて低減された免疫賦活性、増加した血清安定性、または両方を付与する。

20

【0083】

ある特定の態様では、ピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドおよび/または2'-デオキシ-ピリミジンヌクレオチドを含む。

【0084】

ある特定の態様では、プリンヌクレオチドの一部または全部は、2'-O-メチルプリンヌクレオチドおよび/または2'-デオキシ-プリンヌクレオチドを含むことができる。

【0085】

ある特定の態様では、化学修飾は、本発明の核酸分子の3'末端および/または5'末端の近位にあるヌクレオチド中に存在する。

30

【0086】

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼに対する増強された耐性を有することができる。ヌクレアーゼ耐性を増加させるために、核酸分子は、例えば、2'修飾リボース単位および/またはホスホロチオアート連結を含むことができる。例えば、2'-ヒドロキシル基(OH)を多数の異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾または置換することができる。

【0087】

ヌクレアーゼ耐性を増加させるために、本発明の核酸分子は、2'-O-メチル、2'-フッ素、2'-O-メトキシエチル、2'-O-アミノプロピル、2'-アミノ、および/またはホスホロチオアート連結を含むことができる。また、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、例えば、2'-4'-エチレン架橋核酸、およびある特定の核酸塩基修飾(2-アミノ-A、2-チオ(例えば、2-チオ-U)、G-クランプ修飾など)の組み込みも、標的に対する結合親和性を増加させることができる。

40

【0088】

ある特定の態様では、核酸分子は、2'-修飾ヌクレオチド、例えば、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)を含む。ある特定の

50

態様では、核酸分子は、少なくとも1つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、いくつかの態様では、核酸分子のヌクレオチドはすべて、2'-O-メチル修飾を含む。

【0089】

「オキシ」-2'-ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリアルオキシ（OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアルまたは糖）；ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ；「ロックド」核酸（LNA）（2'-ヒドロキシルが、例えば、メチレン架橋によって、同じリボース糖の4'炭素に接続されている）；アミン、O-AMINEおよびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_nAMINE$ （例えば、AMINE= NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）を含む。メトキシエチル基（MOE）（ $OCH_2CH_2OCH_3$ 、PEG誘導体）のみを含有するオリゴヌクレオチドは、堅牢なホスホロチオアート修飾で修飾されているものと同等なヌクレアーゼ安定性を示す。

10

【0090】

「デオキシ」修飾は、水素（すなわち、デオキシリボース糖）；ハロ（例えば、フルオロ）；アミノ（例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、ジヘテロアリアルアミノ、またはアミノ酸）； $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINE$ （AMINE= NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリルアミノ、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ）、 $-NHC(O)R$ （R=アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアル、または糖）、シアノ；メルカプト；アルキル-チオ-アルキル；チオアルコキシ；ならびにアルキル、シクロアルキル、アリアル、アルケニルおよびアルキニル（これらは、例えば、アミノ官能基で置換されていてもよい）を含む。

20

【0091】

好ましい置換基は、2'-メトキシエチル、2'-O- CH_3 、2'-O-アリル、2'-C-アリル、および2'-フルオロである。

【0092】

耐性を増加させる1つの方法は、開裂部位を特定し、開裂を阻害するようにそのような部位を修飾することである。例えば、ジヌクレオチド5'-UA-3'、5'-UG-3'、5'-CA-3'、5'-UU-3'、または5'-CC-3'は、開裂部位として役立ち得る。それゆえ、ヌクレアーゼ耐性の増強は、5'-ヌクレオチドを修飾することによって達成することができ、その結果、例えば、少なくとも1個の5'-ウリジン-アデニン-3'（5'-UA-3'）ジヌクレオチド（ここで、ウリジンは、2'-修飾ヌクレオチドである）；少なくとも1個の5'-ウリジン-グアニン-3'（5'-UG-3'）ジヌクレオチド（ここで、5'-ウリジンは、2'-修飾ヌクレオチドである）；少なくとも1個の5'-シチジン-アデニン-3'（5'-CA-3'）ジヌクレオチド（ここで、5'-シチジンは、2'-修飾ヌクレオチドである）；少なくとも1個の5'-ウリジン-ウリジン-3'（5'-UU-3'）ジヌクレオチド（ここで、5'-ウリジンは、2'-修飾ヌクレオチドである）；または少なくとも1個の5'-シチジン-シチジン-3'（5'-CC-3'）ジヌクレオチド（ここで、5'-シチジンは、2'-修飾ヌクレオチドである）が得られる。オリゴヌクレオチド分子は、そのようなジヌクレオチドの少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個または少なくとも5個を含むことができる。ある特定の態様では、核酸分子のピリミジンのすべてが2'修飾を保有し、それゆえ、核酸分子がエンドヌクレアーゼに対する増強された耐性を有する。

40

【0093】

RNase活性に対する保護を増加させるのに役立つホスホロチオアート連結に関して、核酸分子は、ヌクレオチド配列の5'末端または3'末端にある少なくとも第1、第2、または第3のヌクレオチド間連結中にホスホロチオアートを含むことができる。ヌクレアーゼ耐性を最大限に高めるために、2'修飾を、1つまたは複数のリン酸リンカー修飾（例えば、ホスホロチオアート）と組み合わせて使用することができる。

50

【0094】

ある特定の態様では、核酸骨格中へのピラノース糖の組み込みもまた、エンドヌクレアーゼによる開裂を減少させることができる。ある特定の態様では、核酸骨格へのフラノース糖の組み込みもまた、エンドヌクレアーゼによる開裂を減少させることができる。

【0095】

ある特定の態様では、5'末端を、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アルキルアミノ置換基で遮断することができる。他の5'-コンジュゲートは、5'から3'のエキソヌクレアーゼによる開裂を阻害することができる。理論に束縛されるものではないが、5'-コンジュゲートは、エキソヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドの5'末端に結合するのを立体的に遮断することによって、エキソヌクレアーゼによる開裂を阻害し得る。小さなアルキル鎖、アリール基、または複素環式コンジュゲートまたは修飾糖（D-リボース、デオキシリボース、グルコースなど）であっても、5'-3-エキソヌクレアーゼを遮断することができる。

10

【0096】

したがって、核酸分子は、例えば、対象の体内に見いだされる、ヌクレアーゼ、例えば、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼによる分解を阻害するために、修飾を含むことができる。これらのモノマーは、本明細書においてNRM、またはヌクレアーゼ耐性促進モノマーと呼ばれ、対応する修飾はNRM修飾と呼ばれる。多くの場合に、これらの修飾は、オリゴヌクレオチド分子の他の特性、例えば、タンパク質、例えば、輸送タンパク質、例えば、血清アルブミンと相互作用する能力も調節する。

20

【0097】

1つまたは複数の異なるNRM修飾を、核酸分子にまたは核酸分子の配列に導入することができる。NRM修飾は、配列中または核酸分子中に1を超える回数で使用するすることができる。

【0098】

NRM修飾は、末端にのみ配置可能なものと任意の位置で可能なものを含む。ハイブリダイゼーションを阻害することができるいくつかのNRM修飾は、末端領域でのみ使用されることが好ましく、核酸分子の開裂部位または開裂領域において使用されないことがより好ましい。

【0099】

そのような修飾を、対象における配列を標的とする配列または標的としない配列の末端領域に、例えば、末端位置にまたは末端の2位、3位、4位もしくは5位に導入することができる。

30

【0100】

ある特定の態様では、核酸分子は、標的指向性を改善する修飾、例えば、本明細書に記載の標的指向性修飾を含む。核酸分子を特定の細胞タイプに標的指向させる修飾の例は、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、マンノースなどの炭水化物糖；葉酸などのビタミン類；RGDおよびRGD模倣体などの他のリガンド；ならびにナプロキセン、イブプロフェンまたは他の公知のタンパク質結合分子を含む低分子を含む。

【0101】

核酸分子は、当技術分野において公知の手順を使用した化学合成および/または酵素ライゲーション反応を使用して構築することができる。例えば、核酸分子は、分子の生物学的安定性を増加させるようにまたは核酸分子と標的との間の結合の物理的安定性を増加させるように設計されている天然に存在するヌクレオチドまたは様々に修飾されたヌクレオチドを使用して化学合成することができ、例えば、ホスホロチオアート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。他の適切な核酸修飾は、本明細書に記載されている。あるいは、発現ベクターを使用して核酸分子を生物学的に生産することもできる。

40

【0102】

説明を容易にするために、ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドという用語は、本明細書

50

において、オリゴヌクレオチド剤の1つまたは複数の単量体サブユニットに関して使用されることがある。本明細書における「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語の使用は、修飾RNAまたはヌクレオチド代用物の場合はまた、1つまたは複数の位置での、修飾ヌクレオチド、または代用物置換部分のことを指すこともできることが本明細書において理解されよう。

【0103】

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、好ましくは、以下の特性の1つまたは複数を含む：

- (1) 1つもしくは複数のリン酸基またはリン酸基の1つもしくは複数の類似体を含む、5'修飾；
- (2) 修飾にかかわらず、塩基の大多数に至るまで、特異的に塩基対合して二本鎖領域と二重鎖構造を形成する；
- (3) 修飾にかかわらず、ヌクレオシドの大多数またはすべてに至るまで、「RNA様」特性をなお有する、すなわち、リボヌクレオチドベースの内容物に限られないとしても、または、部分的であっても、RNA分子の構造的、化学的および物理的特性の全体を保有する。例えば、ヌクレオチド糖のすべてが、2'-ヒドロキシルの代わりに、例えば、2'-OMe、2'-フルオロを含むことができる。このデオキシリボヌクレオチドを含む作用物質は、なおRNA様特性を示すと期待され得る。理論に束縛されることを望むものではないが、電気陰性のフッ素は、リボースのC2'位に付着したときに軸配向を優先する。フッ素のこの空間的優先傾向は、次に、糖にC3'エンドパッカーを取ることを強制することができる。これは、RNA分子に観察されるものと同じパッカリング様式であり、RNAに特徴的なAファミリー型ヘリックスを生じる。さらに、フッ素は、良好な水素結合アクセプターであるため、RNA構造を安定化することが知られている水分子との同じ水素結合相互作用に関与することができる。一般に、2'糖位置での修飾部分は、デオキシリボヌクレオチドの2'-H部分よりもリボヌクレオチドの2'-OH部分に特徴的である水素結合に侵入することができることが好ましい。ある特定の態様では、オリゴヌクレオチド分子は、糖の全部、または少なくとも50、75、80、85、90もしくは95%においてC3'エンドパッカーを示す；RNAに特徴的なAファミリー型ヘリックスを生じることができる十分な量の糖においてC3'エンドパッカーを示す；C3'エンドパッカー構造でない糖を20個以下、10個以下、5個以下、4個以下、3個以下、2個以下、または1個以下しか有さない。

【0104】

C3'エンド糖パッカーを有する2'修飾は、2'-OH、2'-O-Me、2'-O-メトキシエチル、2'-O-アミノプロピル、2'-F、2'-O₂C₆H₄O-NHMe、2'-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-N(Me)₂、およびLNAを含む。C2'エンド糖パッカーを有する2'修飾は、2'-H、2'-Me、2'-S-Me、2'-エチニル、および2'-アラ-Fを含む。糖修飾はまた、L-糖および2'-5'連結糖を含むことができる。

【0105】

本明細書において考察される核酸剤は、それ以外の未修飾RNAおよびDNAに加え、例えば有効性を改善するように修飾されているRNAおよびDNA、ならびにヌクレオシド代用物のポリマーも含む。未修飾RNAは、核酸の成分、すなわち糖、塩基およびリン酸部分が、天然に存在するもの、好ましくはヒトの体内において天然に存在するものと同じまたは本質的に同じである、分子のことを指す。当技術分野では、稀であるまたは通常とは異なるが天然に存在するRNAを修飾RNAと呼んでおり、例えば、Limbach et al., Nucl. Acids Res. 1994, 22:2183-2196を参照されたい。修飾RNAと呼ばれることの多いそのような稀であるまたは通常とは異なるRNAは、典型的には、転写後修飾の結果であり、本明細書において使用される場合の未修飾RNAという用語の範囲内である。修飾RNAは、本明細書において使用される場合、核酸の成分、すなわち糖、塩基およびリン酸部分の1つまたは複数、天然に存在するものと異なる、好ましくはヒトの体内に存在するものと異なる、分子のことを指す。これらは「修飾RNA」と呼ばれるが、当然ながら、修飾されているので、厳密に言えばRNAではない分子を含むだろう。ヌクレオシ

ド代用物は、ハイブリダイゼーションがリボリン酸骨格の場合に見られるものと実質的に類似するように正しい空間的關係性で塩基が提示されることを可能にする非リボリン酸構築物（例えば、リボリン酸骨格の非荷電模倣体）でリボリン酸骨格が置換されている、分子のことである。上記のすべての例が本明細書において考察される。

【0106】

核酸はサブユニットのポリマーまたはモノマーであるので、下記の修飾の多くは、核酸内で繰り返される位置において生じる（例えば、塩基、またはリン酸部分、またはリン酸部分の非連結Oの修飾）。修飾が核酸中の対象の位置のすべてで生じる場合もあるが、多くの場合、実際にはほとんどの場合、そうではない。例として、修飾は、3'末端位置または5'末端位置で、末端領域において、例えば、末端ヌクレオチド上の位置でまたは鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10ヌクレオチドにおいてのみ生じ得る。リガンドは、3'末端、5'末端、または内部位置に、またはこれらの位置の組み合わせに付着することができる。例えば、リガンドは、3'末端にかつ5'末端に；3'末端にかつ1つもしくは複数の内部位置に；5'末端にかつ1つもしくは複数の内部位置に；または3'末端、5'末端に、かつ1つもしくは複数の内部位置にあることができる。例えば、非連結O位置でのホスホロチオアート修飾は、一方もしくは両方の末端で生じ得るか、または、末端領域において、例えば、末端ヌクレオチド上の位置でもしくは核酸の最後の2、3、4、5もしくは10ヌクレオチドにおいてのみ生じ得る。5'末端をリン酸化することができる。

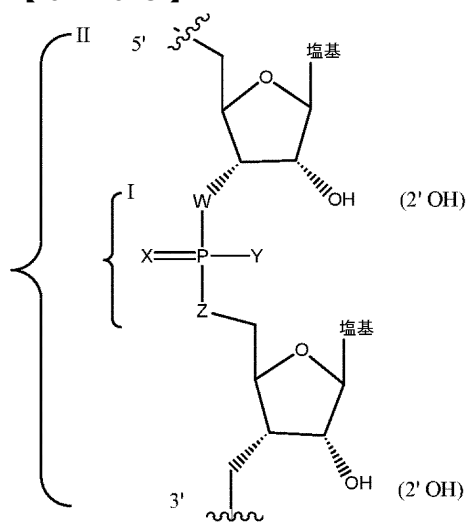
10

【0107】

修飾およびヌクレオチド代用物は、以下で考察される。

20

【0108】



30

式1

式1で上に提示されるスキュフォールドは、リボ核酸の一部分を表す。塩基性成分は、リボース糖、塩基、末端リン酸、およびリン酸ヌクレオチド間リンカーである。塩基が天然に存在する塩基、例えば、アデニン、ウラシル、グアニンまたはシトシンである場合、糖は、未修飾の2'ヒドロキシリボース糖（描写の通り）であり、W、X、Y、およびZはすべてOであり、式1は、天然に存在する未修飾オリゴリボヌクレオチドを表す。

40

【0109】

未修飾オリゴリボヌクレオチドは、いくつかの用途では最適とは言えない場合があり、例えば、未修飾オリゴリボヌクレオチドは、例えば、細胞ヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。ヌクレアーゼは、核酸のホスホジエステル結合を加水分解することができる。しかしながら、上記RNA成分の1つまたは複数に対する化学修飾は、改善された特性を付与することができ、例えば、ヌクレアーゼに対してオリゴリボヌクレオチドをより安定にすることができる。未修飾オリゴリボヌクレオチドはまた、リガンドまたは他の

50

部分を核酸剤に付着させるためのテザリングポイントを提供するという点で最適とは言えない場合がある。

【0110】

修飾核酸およびヌクレオチド代用物は、以下の1つまたは複数を含むことができる：

(i) 非連結(XおよびY)リン酸酸素の一方もしくは両方のおよび/または連結(WおよびZ)リン酸酸素の1つもしくは複数の改変、例えば、置換。リン酸が末端位置にあるとき、位置WまたはZの一方は、天然に存在するリボ核酸中ではリン酸を追加の元素に結合しない。しかしながら、用語を単純化するために、別途注記される場合を除き、核酸の5'末端でのW位置および核酸の3'末端での末端Z位置は、本明細書において使用される場合の「連結リン酸酸素」という用語の範囲内である；

(ii) リボース糖の構成成分、例えば、リボース糖上の2'ヒドロキシルの改変、例えば、置換、またはリボース以外の構造(例えば、本明細書に記載のような)によるリボース糖の大規模置換；

(iii) 「デホスホ」リンカーによるリン酸部分(括弧I)の大規模置換；

(iv) 天然に存在する塩基の修飾または置換；

(v) リボース-リン酸骨格(括弧II)の置換または修飾；

(vi) RNAの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾または置換、あるいは、RNAの3'末端または5'末端のいずれかへの蛍光標識部分などの部分のコンジュゲーション。

【0111】

置換、修飾、改変などの用語は、この文脈で使用される場合、プロセスに関する制限を暗示するものではなく、例えば、修飾とは、参照リボ核酸または天然に存在するリボ核酸から始めて、それを、修飾リボ核酸を生産するように修飾しなければならないことを意味するものではなく、むしろ、修飾されるとは、単に、天然に存在する分子との違いを示すものである。

【0112】

いくつかの化学実体の実際の電子構造は、ただ1つの標準的な型(すなわち、ルイス構造)によって十分に表すことはできないことが理解される。理論に束縛されることを望むものではないが、実際の構造は、その代わりに、共鳴型または共鳴構造と総称される2つ以上の標準的な型のあるハイブリッドまたは加重平均であることができる。共鳴構造は、別個の化学実体ではなく、紙の上でのみ存在する。これらは、特定の化学実体に関して結合電子および非結合電子の配置または「局在」という点においてのみ相互に異なる。1つの共鳴構造が他のものよりも高い程度でハイブリッドに寄与することが可能である。したがって、記載および図示された本発明の態様の説明は、特定の種に関する主要な共鳴型として当技術分野で認識されているものに関してなされる。例えば、任意のホスホロアミダート(窒素による非連結酸素の置換)は、上図においてX=OおよびY=Nによって表されるであろう。

【0113】

リン酸基

リン酸基は、負に荷電した種である。電荷は、2個の非連結酸素原子(すなわち、上記式1におけるXおよびY)にわたって均等に分布している。しかしながら、酸素の少なくとも1つを異なる置換基で置換することによって、リン酸基を修飾することができる。RNAリン酸骨格に対するこの修飾の1つの結果は、ヌクレアーゼ切断に対するオリゴリボヌクレオチドの耐性の増加であることができる。したがって、理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの態様では、非荷電リンカーまたは非対称の電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかを生じさせる改変を導入することが望ましい可能性がある。

【0114】

修飾リン酸基の例は、ホスホロチオアート、ホスホロセレナート、ボラノホスファート、ボラノホスファートエステル、ホスホン酸水素、ホスホロアミダート、アルキルまたはアリールホスホナートおよびホスホトリエステルを含む。ホスホロジチオアートは、両方の

非連結酸素が硫黄によって置換されている。XまたはYのうちの1つだけが改変される状況とは異なり、ホスホロジチオアートにおけるリン中心は、オリゴリボヌクレオチドのジアステレオマーの形成を妨害するアキラルである。ジアステレオマー形成は、個々のジアステレオマーがヌクレアーゼに対して様々な耐性を示す調製物を生じ得る。さらに、キラルリン酸基を含有するRNAのハイブリダイゼーション親和性は、対応する未修飾のRNA種と比べてより低い可能性がある。したがって、理論に束縛されることを望むものではないが、ジアステレオマー混合物を生み出すことができないという点で、キラル中心を排除するXとYの両方に対する修飾、例えば、ホスホロジチオアート形成が望ましい場合がある。したがって、Xは、S、Se、B、C、H、N、またはOR（Rは、アルキルまたはアリールである）のいずれか1つであることができる。したがって、Yは、S、Se、B、C、H、N、またはOR（Rは、アルキルまたはアリールである）のいずれか1つであることができる。Xおよび/またはYを硫黄で置換することが好ましい。

10

【0115】

リン酸リンカーはまた、連結酸素（すなわち、式1におけるWまたはZ）を窒素（架橋ホスホロアミダート）、硫黄（架橋ホスホロチオアート）および炭素（架橋メチレンホスホナート）で置換することによって修飾することもできる。置換は、末端酸素（位置W(3')または位置Z(5'))で起こり得る。Wを炭素でまたはZを窒素で置換することが好ましい。

【0116】

糖基

修飾RNAは、リボ核酸の糖基の全部または一部の修飾を含むことができる。例えば、2'-ヒドロキシル基(OH)を、多数の異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基で修飾または置換することができる。理論に束縛されるものではないが、ヒドロキシルは、2'-アルコキシドイオンを形成するように脱プロトン化されることがもはやできないので、安定性の増強が期待される。2'アルコキシドは、リンカーのリン原子への分子内求核攻撃による分解を触媒し得る。理論に束縛されることを望むものではないが、2'位でのアルコキシド形成が可能でない改変を導入することが、いくつかの態様に対して望ましい可能性がある。

20

【0117】

「オキシ」-2'-ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリールオキシ(OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリールまたは糖)；ポリエチレングリコール(PEG)、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ；「ロックド」核酸(LNA)（2'-ヒドロキシルが、例えば、メチレン架橋またはエチレン架橋（例えば、2'-4'-エチレン架橋核酸(ENA)）によって、同じリボース糖の4'炭素に接続されている）；アミノ、O-AMINE (AMINE= NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)およびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_nAMINE$ （例えば、AMINE= NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)を含む。メトキシエチル基(MOE) ($OCH_2CH_2OCH_3$ 、PEG誘導体)のみを含有するオリゴヌクレオチドが、堅牢なホスホロチオアート修飾で修飾されたものと同等なヌクレアーゼ安定性を示すことは注目すべきことである。

30

40

【0118】

「デオキシ」修飾は、水素（すなわち、デオキシリボース糖）；ハロ（例えば、フルオロ）；アミノ（例えば、 NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸）； $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINE$ (AMINE= NH_2 ；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ)、 $-NHC(O)R$ (R=アルキル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリール、または糖)、シアノ；メルカプト；

50

アルキル-チオ-アルキル；チオアルコキシ；ならびにアルキル、シクロアルキル、アリー
ル、アルケニルおよびアルキニル（これらは、例えば、アミノ官能基で置換されていても
よい）を含む。好ましい置換基は、2'-メトキシエチル、2'-OGH 2'-O-アリル、2'-C
-アリル、および2'-フルオロである。

【0119】

糖基はまた、リボース中の対応する炭素の立体化学的配置とは反対の立体化学的配置を有
する1つまたは複数の炭素を含有することもできる。したがって、修飾RNAは、例えば、
糖としてアラビノースを含有するヌクレオチドを含むことができる。

【0120】

修飾RNAはまた、C-1'に核酸塩基を欠いた「脱塩基」糖を含むことができる。これらの
脱塩基糖はまた、構成成分の糖原子の1つまたは複数の修飾を含有することもできる。

10

【0121】

ヌクレアーゼ耐性を最大限に高めるために、2'修飾を、1つまたは複数のリン酸リンカー
修飾（例えば、ホスホロチオアート）と組み合わせて使用することができる。いわゆる「
キメラ」オリゴヌクレオチドは、2つ以上の異なる修飾を含有するものである。

【0122】

修飾はまた、核酸剤中の1つまたは複数の部位でリボース構造を別の実体（SRMS）で大
規模置換することを包含することもできる。

【0123】

リン酸基の置換

20

リン酸基を、リン以外のものを含有する接続部に置換することができる（上記式1におけ
る括弧Iと比較されたい）。理論に束縛されることを望むものではないが、荷電したホス
ホジエステル基はヌクレアーゼ分解における反応中心なので、これを中性の構造模倣物で
置換することは、ヌクレアーゼ安定性の増強を付与するはずであると考えられている。同
じく、理論に束縛されることを望むものではないが、一部の態様では、荷電リン酸基が中
性部分に置換される改変を導入することが望ましい可能性がある。

【0124】

リン酸基を置換することができる部分の例は、シロキサン、カルボナート、カルボキシメ
チル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホナート
、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミ
ノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチ
レンオキシメチルイミノを含む。好ましい置換は、メチレンカルボニルアミノおよびメチ
レンメチルイミノ基を含む。

30

【0125】

リボリン酸骨格の置換

また、リン酸リンカーおよびリボース糖がヌクレアーゼ耐性のヌクレオシドまたはヌクレ
オチド代用物に置換されている、オリゴヌクレオチド模倣スキャフォールドを構築するこ
ともできる（上記式1における括弧IIを参照されたい）。理論に束縛されることを望むも
のではないが、繰り返し荷電された骨格が存在しなければ、ポリアニオンを認識するタン
パク質（例えば、ヌクレアーゼ）への結合が減少すると考えられている。同じく、理論に
束縛されることを望むものではないが、一部の態様では、塩基を中性の代用骨格で繋ぐ改
変を導入することが望ましい可能性がある。

40

【0126】

例は、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（PNA）ヌクレオ
シド代用物を含む。好ましい代用物は、PNA代用物である。

【0127】

末端修飾

オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端を修飾することができる。そのような修飾は
、分子の3'末端、5'末端または両末端であることができる。これらは、末端リン酸全体
のまたはリン酸基の原子の1つもしくは複数の修飾または置換を含むことができる。例え

50

ば、オリゴヌクレオチドの3'末端および5'末端を、標識部分、例えば、フルオロフォア（例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3またはCy5色素）または保護基（例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素もしくはエステルをベースにしたもの）などの他の官能性分子実体にコンジュゲートすることができる。官能性分子実体を、リン酸基および/またはスパーサーを通じて、糖に付着させることができる。スパーサーの末端原子を、リン酸基の連結原子または糖のC-3'-もしくはC-5'-O基、N基、S基もしくはC基に接続するか、またはこれらに置換することができる。あるいは、スパーサーを、ヌクレオチド代用物（例えば、PNA）の末端原子に接続するか、またはこれに置換することができる。これらのスパーサーまたはリンカーは、例えば、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_nN-$ 、 $-(CH_2)_nO-$ 、 $-(CH_2)_nS-$ 、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ （例えば、 $n=3$ または6）、脱塩基糖、アミド、カルボキシ、アミン、オキシアミン、オキシイミン、チオエーテル、ジスルフィド、チオ尿素、スルホンアミド、もしくはモルホリノ、またはビオチンおよびフルオレセイン試薬を含むことができる。理論に束縛されることを望むものではないが、ある特定の部分のコンジュゲーションは、輸送特性、ハイブリダイゼーション特性、および特異性を改善することができると考えられている。理論に束縛されることを望むものではないが、ヌクレアーゼ耐性を改善する末端改変を導入することが望ましい場合がある。他の末端修飾の例は、色素、インターカレート剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、プソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サッフイリン）、多環芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性担体（例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、 O^3 -(オレオイル)リトコール酸、 O^3 -(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）、およびペプチドコンジュゲート（例えば、アンテナペディペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカ、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送/吸収促進物質（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザマクロ環のEu³⁺錯体）を含む。

10

20

30

【0128】

末端修飾は、本明細書の他の箇所で考察されているような、活性を調節するためまたは分解に対する耐性を調節するためを含む、多数の理由で加えることができる。好ましい修飾は、3'最末端連結でのメチルリン酸；3'-C5-アミノアルキル-dT；3'-カチオン性基；または3'-5'-エキソヌクレアーゼ分解を阻害する別の3'-コンジュゲートの付加を含む。

【0129】

活性を調節するために有用な末端修飾は、5'末端をリン酸またはリン酸類似体で修飾することを含む。例えば、ある特定の態様では、オリゴヌクレオチド剤は、5'-リン酸化されるかまたは5'末端でのホスホリル類似体を含む。好適な修飾は、5'-一リン酸（(H₂O)P-O-5'）；5'-二リン酸（(H₂O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）；5'-三リン酸（(HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化）（7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）；5'-アデノシンキャップ（Appp）、および任意の修飾または未修飾ヌクレオチドキャップ構造（N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'）；5'-モノチオリン酸（ホスホロチオアート；(HO)₂(S)P-O-5'）；5'-モノジチオリン酸（ホスホロジチオアート；(HO)(HS)(S)P-O-5'）；5'-ホスホロチオレート（(H₂O)P-S-5'）；酸素/硫黄で置換されている一リン酸、二リン酸および三リン酸の任意の追加の組み合わせ（例えば、5'-アルファ-チオ三リン酸、5'-ガンマ-チオ三リン酸など）、5'-ホスホロアミダート（(HO)₂(O)P-NH-5'、(HO)(NH₂)(O)P-O-5'）、5'-アルキルホスホナート（R=アルキル

40

50

=メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば $RP(OH)(O)-O-5'$ 、 $(OH_2(O)P-5'-CH_2-)$ 、 $5'$ -アルキルエーテルホスホナート (R =アルキルエーテル、例えばメトキシメチル ($MeOCH_2-$)、エトキシメチルなど、例えば $RP(OH)(O)-O-5'$)を含む。

【0130】

末端修飾はまた、分布をモニタリングするためにも有用であり得るが、そのような場合、付加される好ましい基は、フルオロフォア、例えば、フルオレセインまたはAlexa dye、例えば、Alexa 488を含む。末端修飾はまた、取り込みを増強するためにも有用であり得るが、このために有用な修飾は、コレステロールを含む。末端修飾または、アンタゴミル (anantagomir) を別の部分に架橋するためにも有用であり得る；このための有用な修飾は、マイトマイシンCを含む。

10

【0131】

塩基

アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルは、RNAに見られる最も一般的な塩基である。改善された特性を有するRNAを提供するために、これらの塩基を修飾または置換することができる。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴリボヌクレオチドは、これらの塩基を用いて、または合成および天然の核酸塩基 (例えば、イノシン、チミン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン (nubularine)、イソグアニシン (isoguanisine)、またはツベルシジン) ならびに上記修飾のいずれか1つを用いて調製することができる。あるいは、上記塩基のいずれかの置換または修飾類似体、例えば、本明細書に記載の「通常とは異なる塩基」および「ユニバーサル塩基」を用いることができる。例は、非限定的に、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル (シュードウラシル)、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-(2-アミノプロピル)ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシルおよび他の8置換アデニンおよびグアニン、5-トリフルオロメチルおよび他の5置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニン、5置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびにN-2、N-6およびO-6置換プリン (2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、N⁶,N⁶-ジメチルアデニン、2,6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N³-メチルウラシル、置換1,2,4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3カルボキシプロピル)ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁴-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N⁶-メチルアデニン、N⁶-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン、N-メチルグアニン、またはO-アルキル化塩基を含む)を含む。さらなるプリンおよびピリミジンは、米国特許第3,687,808号に開示されているもの、Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、およびEnglisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されているものを含む。

20

30

40

【0132】

方法

本発明は、細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導するための組成物および方法を提供する。本発明はさらに、限定されないが細菌、ウイルスもしくは寄生虫感染、がん、自己免疫疾患、炎症性障害および/または呼吸器障害などの疾患または障害を処置するための組成物および方法を提供する。

50

【0133】

ある特定の態様では、上記方法は、本発明のRIG-Iアゴニストの治療有効量を対象に投与する工程を含む。

【0134】

本発明は、核酸、ベクターおよび宿主細胞を対象に導入する方法を含む。核酸を導入する物理的方法は、核酸分子を含有する溶液の注射、核酸分子によって被覆されている粒子による衝突、核酸分子の溶液中への細胞または生物の浸漬、あるいは核酸分子の存在下での細胞膜の電気穿孔法を含む。ウイルス粒子にパッケージングされたウイルス構築物は、発現構築物の細胞への効率的な導入と発現構築物によってコードされたRNAの転写の両方を達成するだろう。核酸を細胞に導入するための当技術分野において公知の他の方法、例えば、脂質媒介担体輸送、化学媒介輸送、例えばリン酸カルシウムなどを使用してよい。したがって、核酸は、以下の行為の1つまたは複数を遂行する成分と一緒に導入してよい：細胞による核酸の取り込みを増強する、二重鎖を安定化する、またはそれ以外の核酸分子の活性を増加させる。

10

【0135】

核酸を細胞に導入する方法は、当技術分野において公知である。本発明の核酸分子は、当技術分野における任意の方法によって、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母または昆虫の細胞に容易に導入することができる。例えば、核酸分子は、物理的、化学的または生物学的な手段によって宿主細胞に移送することができる。

【0136】

核酸を宿主細胞に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、電気穿孔法などを含む。ベクターおよび/または外因性核酸を含む細胞を生産するための方法は、当技術分野において周知である。例えば、Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) を参照されたい。

20

【0137】

核酸を宿主細胞に導入するための生物学的方法は、DNAベクターおよびRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、とりわけレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物、例えば、ヒト細胞に挿入するための最も広範に使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどに由来することができる。例えば、米国特許第5,350,674号および第5,585,362号を参照されたい。

30

【0138】

核酸を宿主細胞に導入するための化学的手段は、コロイド分散系、例えば、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および脂質系（水中油エマルション、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む）を含む。インビトロおよびインビボで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工の膜小胞）である。

【0139】

ある特定の場、核酸は、ポリマー送達ビヒクルを介して送達される。例えば、核酸分子を、ポリマー系のミセル、カプセル、微粒子、ナノ粒子などと複合体化させてよい。次いで、複合体を、インビボ、インビトロまたはエクスビボで細胞に接触させ、それによって、核酸分子を細胞に導入してよい。例示的なポリマー送達系は、当技術分野において周知である（例えば、米国特許第6,013,240号を参照のこと）。Polyplus-transfection Inc (New York, NY) から入手可能な例示的な試薬を含め、ポリマー送達試薬は、市販されている。

40

【0140】

非ウイルス送達系が利用される場合、例示的な送達ビヒクルは、リポソームである。宿主細胞への核酸の導入（インビトロ、エクスビボまたはインビボ）のために、脂質製剤の使用が想定される。別の局面では、核酸を脂質と会合させてよい。脂質と会合させた核酸を

50

、リボソームの水性内部に封入させる、リボソームの脂質二重層内に散在させる、リボソームとオリゴヌクレオチドの両方と会合する連結分子を介してリボソームに付着させる、リボソームに封入させる、リボソームと複合体化させる、脂質を含有する溶液に分散させる、脂質と混合させる、脂質と組み合わせる、脂質中の懸濁液として含有させる、ミセルと共に含有もしくはそれと複合体化させる、またはそれ以外の方法で脂質と会合させてよい。脂質、脂質/DNAまたは脂質/発現ベクターと会合させた組成物は、溶液中で任意の特定の構造に限定されない。例えば、これらは、二重層構造中に、ミセルとして、または「崩壊した」構造で存在してよい。また、これらを単純に溶液中に散在させると、おそらく、サイズまたは形状が均一ではない凝集体を形成し得る。脂質は、天然に存在する脂質であっても合成脂質であってもよい脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質中で天然に存在する脂肪液滴だけでなく、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドなどの長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含有する化合物のクラスも含む。

10

【0141】

使用に好適な脂質は、商業的供給元から入手することができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, MOから入手することができる；リン酸ジセチル（「DCP」）は、K & K Laboratories (Plainview, NY)から入手することができる；コレステロール（「Chol」）は、Calbiochem-Behringから入手することができる；ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)から入手してよい。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質の原液は、約-20℃で保存することができる。クロロホルムは、メタノールよりも容易に蒸発するので、唯一の溶媒として使用される。「リボソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の生成によって形成される多種多様な単一および多重膜脂質ビヒクルを包含する総称である。リボソームは、リン脂質二重層膜と内部水性媒体とを伴う小胞構造を有するとして特徴付けることができる。多重膜リボソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質が過剰の水溶液中に懸濁されると、自発的に形成される。脂質成分は、自己再配置を受け、その後閉鎖構造が形成され、脂質二重層間に水および溶解した溶質が捕捉される (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5:505-10)。しかしながら、溶液中に通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、ミセル構造を取り得るか、または単に脂質分子の不均一な凝集体として存在し得る。また、リボフェクタミン-核酸複合体も想定される。

20

30

【0142】

使用される方法が核酸分子を宿主細胞に導入するものであるかそれ以外の細胞を本発明の分子に曝露させるものであるかにかかわらず、宿主細胞内での核酸の存在を確認するために、多種多様なアッセイを実施してよい。そのようなアッセイは、例えば、サザンおよびノザンプロットティング、RT-PCRならびにPCRなどの当業者に周知の「分子生物学的」アッセイを含む。

【0143】

本発明の核酸分子は、細胞に直接（すなわち、細胞内に）導入しても；または空洞、間質腔、生物の循環に細胞外から導入しても、経口的に導入してもよく、または核酸分子を含有する溶液中に細胞もしくは生物を浸すことによって導入してもよい。血管または血管外循環、血液またはリンパ系、および脳脊髄液が、核酸分子を導入してよい部位である。

40

【0144】

あるいは、本発明の核酸分子をコードするベクター、例えば、導入遺伝子を、当技術分野において認識されている技法を使用して宿主細胞またはトランスジェニック動物内で操作することができる。

【0145】

本発明は、細胞においてIFN応答を誘導する方法を提供する。例えば、ある特定の態様では、該方法は、I型IFN応答を誘導する。I型IFNは、例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- κ

50

、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN- ω 、およびIFN- ζ を含む。本出願はまた、腫瘍細胞のアポトーシスをインビトロで誘導するための少なくとも1つの核酸分子の使用を提供する。

【0146】

本発明は、細胞と本発明の少なくとも1つの核酸分子とを接触させることを含む、細胞におけるIFN応答（例えば、I型IFN応答を含む）を刺激するためのインビトロ法を提供する。

【0147】

細胞は、PRRを内因的におよび/または外因性核酸（RNAまたはDNA）から外因的に発現し得る。外因性DNAは、プラスミドDNA、ウイルスベクター、またはそれらの部分であり得る。外因性DNAは、細胞のゲノムに組み込まれてもよく、または染色体外に存在してもよい。細胞は、初代免疫細胞、初代非免疫細胞、および細胞株を含むが、それらに限定されない。免疫細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、形質細胞様樹状細胞（PDC）、骨髄樹状細胞（MDC）、マクロファージ、単球、B細胞、ナチュラルキラー細胞、顆粒球、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、およびNKT細胞を含むが、それらに限定されない。非免疫細胞は、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、および腫瘍細胞を含むが、それらに限定されない。細胞株は、免疫細胞または非免疫細胞に由来し得る。

【0148】

本発明は、腫瘍細胞と本発明の少なくとも1つの核酸分子とを接触させることを含む、腫瘍細胞のアポトーシスおよび/または死を誘導するためのインビトロ法を提供する。腫瘍細胞は、腫瘍または腫瘍細胞株を有する脊椎動物から新たに単離された初代腫瘍細胞であり得る。

【0149】

ある特定の態様では、本発明は、患者においてIFN応答を誘導する予防的方法および治療的方法の両方を提供する。「処置」または「処置する」は、本明細書において使用される場合、疾患または障害、疾患または障害の症状あるいは疾患に対する素因を治癒、回復、軽減、緩和、変更、救済、改善、向上または影響を及ぼす目的での、疾患または障害、疾患または障害の症状あるいは疾患または障害に対する素因を有する患者への治療剤（例えば、核酸分子）の適用または投与、あるいは患者由来の単離組織または細胞株への治療剤の適用または投与として定義されると理解される。

【0150】

ある特定の態様では、本出願は、本発明の核酸分子のインビボ使用を提供する。ある特定の態様では、本出願は、脊椎動物（特に、哺乳動物）においてIFN応答（例えば、I型IFN応答を含む）を誘導するための本発明の少なくとも1つの核酸分子を提供する。本出願はさらに、脊椎動物（特に、哺乳動物）において腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するための本発明の少なくとも1つの核酸分子を提供する。本出願は、加えて、脊椎動物（特に、哺乳動物）における疾患および/または障害を医学的および/または獣医学的行為で予防および/または治療するための本発明の少なくとも1つの核酸分子を提供する。本発明はまた、ワクチンアジュバントとして使用するための本発明の少なくとも1つの核酸分子を提供する。

【0151】

その上、本出願は、脊椎動物（特に、哺乳動物）においてIFN応答（例えば、I型IFN応答を含む）を誘導するための薬学的組成物の調製のための本発明の少なくとも1つの核酸分子の使用を提供する。本出願はさらに、脊椎動物（特に、哺乳動物）において腫瘍細胞のアポトーシスおよび/または死を誘導するための薬学的組成物の調製のための本発明の少なくとも1つの核酸分子の使用を提供する。本出願は、加えて、脊椎動物（特に、哺乳動物）における疾患および/または障害を医学的および/または獣医学的行為で予防および/または治療するための薬学的組成物の調製のための本発明の少なくとも1つの核酸分子の使用を提供する。

【0152】

10

20

30

40

50

本発明は、IFN産生を誘導することが有益であろう、任意の疾患、障害、または病態を予防および/または治療するための核酸分子の使用を包含する。例えば、本発明の核酸分子によるIFN産生の増加は、がんなどを非限定的に含む多種多様な障害を予防または治療するために有益である可能性がある。

【0153】

腫瘍は、良性と悪性の両方の腫瘍（すなわち、がん）を含む。がんは、胆道がん、脳がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、結腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、上皮内新生物、白血病、リンパ腫、肝臓がん、肺がん、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、直腸がん、肉腫、皮膚がん、精巣がん、甲状腺がんおよび腎臓がんを含むが、それらに限定されない。

10

【0154】

ある特定の態様では、がんは、有毛細胞白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞性白血病、慢性骨髄白血病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平細胞がん腫、腎細胞がん腫、前立腺がん腫、膀胱細胞がん腫、乳がん腫、卵巣がん腫、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、肝細胞がん腫、基底細胞がん（basaliom）、結腸がん腫、子宮頸部異形成、およびカポジ肉腫（AIDS関連および非AIDS関連）から選択される。

【0155】

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、免疫賦活剤、抗ウイルス剤、抗生物質、抗真菌剤、抗寄生虫剤、抗腫瘍剤、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、抗血管新生因子、化学療法剤、抗体および遺伝子サイレンシング剤などの1つまたは複数の薬学的に活性な作用物質と組み合わせて使用される。好ましくは、薬学的に活性な作用物質は、免疫賦活剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、および抗腫瘍剤からなる群より選択される。2つ以上の薬学的に活性な作用物質は、同じカテゴリーのものまたは異なるカテゴリーのものであり得る。

20

【0156】

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、抗原、および/または抗腫瘍ワクチンと組み合わせて使用され、ここで、ワクチンは、予防的および/または治療的であることができる。核酸分子は、アジュバントとして役立ち得る。

【0157】

別の態様では、核酸は、レチノイン酸および/またはI型IFN（IFN- α および/またはIFN- β ）と組み合わせて使用される。いかなる理論にも束縛されるものではないが、レチノイン酸、IFN- α および/またはIFN- β は、おそらくはPRR発現のアップレギュレーションを通じて、IFN- β 産生について細胞を感作することが可能である。

30

【0158】

ある特定の態様では、本発明の核酸分子は、腫瘍などの疾患および/または障害の1つまたは複数の予防的および/または治療的処置と組み合わせて使用するためのものである。処置は、薬理学的および/または身体的（例えば、外科手術、放射線）であり得る。

【0159】

脊椎動物は、魚類、両生類、鳥類、および哺乳動物を含むが、それらに限定されない。哺乳動物は、ラット、マウス、ネコ、イヌ、ウマ、ヒツジ、ウシ（cattle、cows）、ブタ、ウサギ、ヒト以外の霊長類、およびヒトを含むが、それらに限定されない。好ましい態様では、哺乳動物は、ヒトである。

40

【0160】

投与/投与量

投与のレジメンは、有効な量を構成しているものに影響を及ぼし得る。治療用製剤は、疾患の診断の前または後のいずれかに対象に投与してよい。さらに、数回の分割投与量、ならびに時差投与量を、毎日または逐次的に投与してもよく、あるいは、その用量を持続注入してもよく、またはボーラス注射であってもよい。さらに、治療用製剤の投与量を、治療状況または予防状況の緊急性による適応に応じて、比例的に増加または減少させてよい

50

。

【0161】

本発明の組成物の、対象、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトへの投与は、公知の手順を使用して、疾患を予防または治療するのに有効な投与量で、有効な期間にわたることができる。治療効果を達成するのに必要な治療用化合物の有効量は、使用する特定の化合物の活性；投与時間；該化合物の排出率；処置期間；該化合物と併用される他の薬物、化合物または物質；処置される対象の疾患または障害の状態、年齢、性別、体重、体調、全体的な健康状態および過去の病歴、ならびに医学分野で周知の同様の要因など、諸要因に応じて変動し得る。投薬レジメンは、最適な治療応答が得られるように調整されてよい。例えば、数回の分割用量を毎日投与してもよく、または治療状況の緊急性による適応に応じてその用量を比例的に減少させてもよい。本発明の治療用化合物についての有効用量範囲の非限定例は、約1～5,000mg/kg体重/日である。当業者は、過度の実験をすることなく、関連する要因を検討して、治療用化合物の有効量に関する決定を下すことができる。

10

【0162】

化合物は、1日に数回程度の頻度で対象に投与してもよいし、あるいは、より少ない頻度で、例えば1日1回、1週間に1回、2週毎に1回、1ヶ月に1回、またはさらに少ない頻度で、例えば数ヶ月毎に1回、さらには年に1回以下で、投与してもよい。非限定例として、化合物の一日投薬量を、毎日、隔日、2日毎、3日毎、4日毎、または5日毎に投与してよいことが理解される。例えば、隔日の投与では、1日当たり用量5mgを月曜日に開始し、次に1日当たり用量5mgを水曜日に投与し、続いて1日当たり用量5mgを金曜日に投与してよい（等々）。投薬の頻度は、当業者には容易に明らかであり、非限定的に処置される疾患の種類および重症度、動物の種類および年齢などのいくつかの要因に依存する。

20

【0163】

本発明の薬学的組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは、対象に毒性を示すことなく、特定の対象、組成物および投与様式に対して所望の治療応答を達成するのに有効な有効成分の量を得るように、変動させてよい。

【0164】

当技術分野における通常の技能を有する医師、例えば臨床医または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定して処方することができる。例えば、臨床医または獣医師は、薬学的組成物中に使用される本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも少ないレベルで開始し、所望の効果が達成されるまでその投与量を徐々に増加させることができる。

30

【0165】

特定の態様では、投与の容易さおよび投与量の均一性のために、該化合物を投与単位剤形に製剤化することが特に有利である。投与単位剤形は、本明細書において使用される場合、処置されるべき患者にとって単一の投与量として適した物理的に個別の単位のことを指す；各単位は、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の治療用化合物を、必要な薬学的ビヒクルと組み合わせて含有する。本発明の投与単位剤形は、（a）治療用化合物の固有の特性および達成されるべき特定の治療効果、ならびに（b）対象における疾患の処置のためにそのような治療用化合物を調合/製剤化する当技術分野に内在している制限によって決まり、かつそれらに直接左右される。

40

【0166】

投与のための本発明の化合物は、約1mg～約10,000mg、約20mg～約9,500mg、約40mg～約9,000mg、約75mg～約8,500mg、約150mg～約7,500mg、約200mg～約7,000mg、約3050mg～約6,000mg、約500mg～約5,000mg、約750mg～約4,000mg、約1mg～約3,000mg、約10mg～約2,500mg、約20mg～約2,000mg、約25mg～約1,500mg、約50mg～約1,000mg、約75mg～約900mg、約100mg～約800mg、約250mg～約750mg、約300mg～約600mg、約400mg～約500mgの範囲、およびそれらの間のあらゆる全体的または部分的増分であり得る。

50

【0167】

いくつかの態様では、本発明の化合物の用量は、約1mg～約2,500mgである。いくつかの態様では、本明細書に記載の組成物において使用される本発明の化合物の用量は、約10,000mg未満、または約8,000mg未満、または約6,000mg未満、または約5,000mg未満、または約3,000mg未満、または約2,000mg未満、または約1,000mg未満、または約500mg未満、または約200mg未満、または約50mg未満である。同様に、いくつかの態様では、本明細書に記載のような第2の化合物（すなわち、本発明の組成物によって処置されるものと同じまたは別の疾患を処置するために使用される薬物）の用量は、約1,000mg未満、または約800mg未満、または約600mg未満、または約500mg未満、または約400mg未満、または約300mg未満、または約200mg未満、または約100mg未満、または約50mg未満、または約40mg未満、または約30mg未満、または約25mg未満、または約20mg未満、または約15mg未満、または約10mg未満、または約5mg未満、または約2mg未満、または約1mg未満、または約0.5mg未満、およびそのあらゆる全体的または部分的増分である。

10

【0168】

ある特定の態様では、本発明は、本発明の化合物またはコンジュゲートの治療有効量を、単独でまたは第2の薬剤と組み合わせて収容する容器と；対象における疾患の1つまたは複数の症状を治療、予防または軽減するために該化合物またはコンジュゲートを使用するための説明書とを含む、パッケージングされた薬学的組成物を対象とする。

20

【0169】

「容器」という用語は、薬学的組成物を収容するための任意の入れ物を含む。例えば、ある特定の態様では、容器は、薬学的組成物を含有するパッケージである。他の態様では、容器は、薬学的組成物を含有するパッケージではなく、すなわち、容器は、パッケージングされた薬学的組成物またはパッケージングされていない薬学的組成物とその薬学的組成物の使用説明書とを含有する、箱またはバイアルなどの入れ物である。さらに、パッケージング技法は、当技術分野において周知である。薬学的組成物の使用説明書は、薬学的組成物を含有するパッケージ上に含有されてよく、これにより、その使用説明書は、パッケージングされた製品とより一層の機能的関係を築くことが理解されるべきである。しかしながら、説明書は、化合物の意図された機能を果たす能力、例えば、対象における疾患を治療もしくは予防する能力、または造影剤もしくは診断剤を対象に送達する能力に関する情報を含有してよいことが理解されるべきである。

30

【0170】

薬学的組成物

本発明は、本発明の少なくとも1つの核酸分子と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬理学の分野において公知のまたは今後開発される任意の方法によって調製されてよい。一般に、そのような調製法は、有効成分を担体または1つもしくは複数の他の補助成分と混合し、その後、必要ならばまたは望ましいならば、その製品を所望の単回または複数回の投薬単位に成形またはパッケージングする工程を含む。

【0171】

本明細書に提供される薬学的組成物の説明は、ヒトへの倫理的投与に好適である薬学的組成物を主に対象としているが、そのような組成物は、一般に、あらゆる動物への投与に好適であることが当業者によって理解されよう。ヒトへの投与に好適な薬学的組成物を様々な動物への投与に好適なものにするための改変は、十分に理解されており、通常の技能を有する獣医薬理学者は、そのような改変を、たとえあったとしても通常の実験だけで、設計および実施することができる。本発明の薬学的組成物の投与が想定される対象は、ヒトおよび他の霊長類、ヒト以外の霊長類、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコおよびイヌなどの商業的に関連する哺乳動物を含めた哺乳動物を含むが、それらに限定されない。

40

【0172】

本発明の方法において有用である薬学的組成物は、眼、経口、直腸、膺、非経口、局所、

50

肺、鼻腔内、頬、または別の投与経路に好適な製剤で調製、パッケージング、または販売されてよい。他の想定される製剤は、発射ナノ粒子、リポソーム調製物、有効成分を含む再封赤血球、および免疫学的製剤を含む。

【0173】

本発明の薬学的組成物は、バルクで、単回の単位用量として、または複数の単回の単位用量として調製、パッケージングまたは販売されてよい。本明細書において使用される場合、「単位用量」は、所定量の有効成分を含む薬学的組成物の分割量である。有効成分の量は、一般に、対象に投与されるであろう有効成分の投与量に等しいか、または、そのような投与量の便利な分量、例えばそのような投与量の2分の1もしくは3分の1に等しい。

【0174】

本発明の薬学的組成物中の有効成分、薬学的に許容される担体、および任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の同一性、サイズおよび体調に応じて、さらには組成物が投与されるべき経路に応じて、変動するだろう。例として、組成物は、0.1%~100% (w/w) の間の有効成分を含んでよい。

【0175】

有効成分に加えて、本発明の薬学的組成物は、1つまたは複数の追加の薬学的に活性な作用物質をさらに含んでよい。本発明において有用な他の活性剤は、コルチコステロイドを含む抗炎症薬、および免疫抑制剤、化学療法剤、抗生物質、抗ウイルス薬、抗真菌薬などを含む。

【0176】

本発明の薬学的組成物の制御または持続放出製剤を、従来の技術を使用して、例えば、pH感受性ドメインまたはプロテアーゼ開裂性断片を備えたタンパク質を使用して製造してよい。いくつかの場合に、使用されるべき剤形は、例えば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透過性の膜、浸透システム、多層コーティング、微粒子、リポソームもしくはミクロスフェアまたは様々な割合で所望の放出プロファイルを提供するそれらの組み合わせを使用した、その中の1つまたは複数の有効成分の緩徐または制御放出として提供することができる。本発明の薬学的組成物と共に使用するために、本明細書に記載のものを含め当業者に公知の好適な制御放出製剤を容易に選択することができる。したがって、制御放出に適している錠剤、カプセル剤、ジェルキャップおよびカプレットなどの経口投与に好適な単回の単位剤形が本発明に包含される。

【0177】

ある特定の態様では、本発明の製剤は、短期間、急速オフセット (rapid-offset)、ならびに制御、例えば、持続放出、遅延放出およびパルス放出製剤であり得るが、それらに限定されない。

【0178】

持続放出という用語は、その従来の意味で使用され、長時間にわたる薬物の徐放を提供し、かつ、必ずしも必要ではないが、長時間にわたって実質的に一定の血中薬物濃度をもたらし得る、薬物製剤のことを指す。時間は、1ヶ月以上もの長さであり得、同量の薬剤がボラス形態で投与されたときよりも長い放出であるべきである。

【0179】

持続放出のために、化合物は、その化合物に持続放出特性を与える好適なポリマーまたは疎水性材料を用いて製剤化されてよい。このようにして、本発明の方法において使用するための化合物は、微粒子の形態で、例えば、注射によって、またはウエハーもしくはディスクの形態で埋め込みによって、投与してよい。

【0180】

本発明の好ましい態様では、本発明の化合物は、単独でまたは別の薬剤との組み合わせで、持続放出製剤を使用して、対象に投与される。

【0181】

遅延放出という用語は、本明細書においてその従来の意味で使用され、薬物の投与後に若干遅れて薬物の初期放出をもたらす、かつ、必ずしも必要ではないが、約10分から最大

10

20

30

40

50

約12時間の遅延を含み得る、薬物製剤のことを指す。

【0182】

パルス放出という用語は、本明細書においてその従来の意味で使用され、薬物の投与後に薬物のパルス血漿プロファイルを生じるような方法で薬物の放出をもたらす、薬物製剤のことを指す。

【0183】

即時放出という用語は、その従来の意味で使用され、薬物投与の直後に薬物の放出をもたらす薬物製剤のことを指す。

【0184】

本明細書において使用される場合、短期間は、薬物投与後の約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約40分、約20分、または約10分までの任意の時間、およびそれらのあらゆる全体的または部分的増分のことを指す。

10

【0185】

本明細書において使用される場合、急速オフセットは、薬物投与後の約8時間、約7時間、約6時間、約5時間、約4時間、約3時間、約2時間、約1時間、約40分、約20分、または約10分までの任意の時間、およびそれらのあらゆる全体的または部分的増分のことを指す。

【0186】

本明細書において使用される場合、「追加成分」は、以下の1つまたは複数を含むが、それらに限定されない：賦形剤；界面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒および崩壊剤；結合剤；平滑剤；甘味料；香味剤；着色剤；保存料；ゼラチンなどの生理学的に分解可能な組成物；水性のビヒクルおよび溶剤；油性のビヒクルおよび溶剤；懸濁化剤；分散または湿潤剤；乳化剤、粘滑剤；緩衝剤；塩類；増粘剤；充填剤；乳化剤；酸化防止剤；抗生物質；抗真菌剤；安定化剤；および薬学的に許容されるポリマーまたは疎水性物質。本発明の薬学的組成物に含まれ得る他の「追加成分」は、当技術分野において公知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA) に記載されており、それは、参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0187】

本発明の組成物のいずれかの投与経路は、経口、鼻腔、直腸、非経口、舌下、経皮、経粘膜（例えば、舌下、舌、（経）頬、（経）尿道、膣（例えば、経膣および膣周囲）、鼻腔（内）、および（経）直腸）、膀胱内、肺内、十二指腸内、胃内、髄腔内、皮下、筋肉内、皮内、動脈内、静脈内、気管支内、吸入、および局所投与を含む。

30

【0188】

好適な組成物および剤形は、例えば、錠剤、カプセル剤、カプレット剤、丸剤、ジェルキャップ、トローチ、分散剤、懸濁剤、液剤、シロップ、顆粒剤、ビーズ、経皮パッチ、ゲル、粉末剤、ペレット、マグマ、ロゼンジ、クリーム、ペースト、プラスター、ローション、ディスク、坐剤、鼻腔または経口投与用の液体スプレー、吸入用の乾燥粉末またはエアロゾル化製剤、膀胱内投与用の組成物および製剤などを含む。本発明において有用であろう製剤および組成物は、本明細書に記載される特定の製剤および組成物に限定されない。

40

【0189】

本明細書において使用される場合、薬学的組成物の「非経口投与」は、対象の組織の物理的破損によって特徴付けられる任意の投与経路、および組織の裂け目からの薬学的組成物の投与を含む。したがって、非経口投与は、薬学的組成物の注射、外科的切開部を通じての組成物の適用、組織を貫通する非外科的創傷を通じての組成物の適用などによる、薬学的組成物の投与を含むが、それらに限定されない。特に、非経口投与は、限定されないが、眼内、硝子体内、皮下、腹腔内、筋肉内、胸骨内注射、腫瘍内、および腎臓透析注入技術を含むことが想定される。

【0190】

50

非経口投与に好適な薬学的組成物の製剤は、滅菌水または滅菌等張食塩水などの薬学的に許容される担体と組み合わせられた有効成分を含む。そのような製剤は、ボーラス投与または連続投与に好適な形態で調製、パッケージング、または販売されてよい。注射用製剤は、アンプルまたは防腐剤を含む複数回投与用の容器などの単位剤形で調製、パッケージング、または販売されてよい。非経口投与用の製剤は、懸濁剤、液剤、油性もしくは水性ビヒクル中のエマルション、ペースト、および埋め込み可能な持続放出製剤または生分解性製剤を含むが、それらに限定されない。そのような製剤はさらに、懸濁化剤、安定化剤、または分散化剤を非限定的に含む1つまたは複数の追加成分を含んでよい。非経口投与用の製剤のある特定の態様では、有効成分は、再構成済み組成物の非経口投与の前に好適なビヒクル（例えば、発熱物質除去蒸留水）を加えて再構成するための、乾燥（すなわち、粉末または顆粒）形態で提供される。

10

【0191】

キット

本発明はまた、本明細書の他の箇所に記載されているようなPRR活性を刺激する、IFN応答を誘導するおよび/またはがんを処置する、キットを提供する。ある特定の態様では、キットは、本明細書の他の箇所に記載されているような核酸分子および別の治療剤を含む組成物とその使用説明書とを含む。説明書は、一般に、PRR活性の刺激および/またはがんの処置のためのキット中の組成物の使用に関する情報を含む。説明書は、キット内の容器（存在する場合）上に直接印刷されていても、またはラベルとして容器に貼り付けられていても、または容器内もしくはそれと共に別個のシート、パンフレット、カードもしくはホルダーとして供給されていてもよい。

20

【0192】

本発明はまた、IFN産生が有益であろう、疾患、障害または状態の治療または予防のためのキットを提供する。ある特定の態様では、キットは、本明細書の他の箇所に記載されているような核酸分子および別の治療剤を含む組成物（例えば、薬学的組成物）とその使用説明書とを含む。使用説明書は、一般に、疾患もしくは障害またはその症状の治療または予防のためのキット中の組成物の使用に関する情報を含む。説明書は、キット内の容器（存在する場合）上に直接印刷されていても、またはラベルとして容器に貼り付けられていても、または容器内もしくはそれと共に別個のシート、パンフレット、カードもしくはホルダーとして供給されていてもよい。

30

【0193】

当業者は、本明細書に記載の具体的な手順、態様、請求項および実施例に対する多数の等価物を認識するか、または慣例的な実験だけを使用して確かめることができるであろう。そのような等価物は、本発明の範囲内にあるとみなされ、添付の特許請求の範囲に包含される。例えば、反応および/または処置条件における、当技術分野で認識されている代替物によるおよび慣例的な実験だけを使用した変更は、本出願の範囲内であることが理解されるべきである。

【実施例】

【0194】

実験例

本発明はさらに、以下の実験例を参照することによって詳細に説明される。これらの実施例は、例証を目的としてのみ提供されるものであって、具体的に示されない限り限定を意図しているわけではない。したがって、本発明は、決して、以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書に提供される教示の結果として明白なあらゆる変形例を包含すると解釈されるべきである。

40

【0195】

さらなる説明がなくとも、当業者は、前述の説明および以下の例証的な実施例を使用して、本発明の化合物を製造および利用し、特許請求される方法を実施することができると考えられる。それゆえ、以下の実施例は、本発明の好ましい態様を具体的に指摘しているものであって、決して、本開示の残りの部分を限定するものとして解釈されるべきではない

50

。

【 0 1 9 6 】

国際特許出願公開番号 W O / 2 0 1 4 / 1 5 9 9 9 0 および米国特許出願公開番号 U S 2 0 1 6 / 0 0 4 6 9 4 2 の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【 0 1 9 7 】

実施例 1 :

インターフェロン応答を誘導する SLR の能力における塩基配列、二本鎖セクションの長さ（すなわち、塩基対数）、およびループ同一性の効果を調査した。以下の SLR を調製し、RIG-I 活性を阻害するその能力について試験した。選択した SLR を用いた HEK-293T 細胞におけるインターフェロン応答を図 3 に例証する。

10

【 0 1 9 8 】

説明	配列 (推定ループ残基に下線)
親分子 - 5'-ppp8L SEQ ID NO:1	5' ppp-GGCG CGGC <u>UUCG</u> GCCG CGCC-3
SLR-8GC SEQ ID NO:2	5' ppp-GGCG CGGG <u>UUCG</u> CCCG CGCC
SLR-9GC SEQ ID NO:3	5' ppp-G GCGC CGGG <u>UUCG</u> CCCG GCGC C
親分子 - SLR-10 SEQ ID NO:4	5' ppp-GG ACGU ACGU <u>UUCG</u> ACGU ACGU CC
SLR-8 SEQ ID NO:5	5' ppp-GGCG ACGU <u>UUCG</u> ACGU CGCC
SLR-9 SEQ ID NO:6	5' ppp-G GCGU ACGU <u>UUCG</u> ACGU ACGC C
親分子 SLR-14 SEQ ID NO:7	5'-ppp-GG AUCG AUCG AUCG <u>UUCG</u> CGAU CGAU CGAU CC
SLR-14T1 SEQ ID NO:8	5'-ppp-GG AUCG AUCG AUCG <u>GAAC</u> CGAU CGAU CGAU CC
SLR-14T2 SEQ ID NO:9	5'-ppp-GG AUCG AUCG AUCG <u>CUUG</u> CGAU CGAU CGAU CC
SLR-14U5 SEQ ID NO:10	5'-ppp-GG AUCG AUCG AUCG <u>UUUUU</u> CGAU CGAU CGAU CC
SLR-14PH SEQ ID NO:11	5'-ppp-GG AUCG AUCG AUCG <u>ACAAUGC</u> CGAU CGAU CGAU CC
SLR-14Ab5 SEQ ID NO:12	5'-ppp-GG AUCG AUCG AUCG <u>AbAbAbAbAb</u> CGAU CGAU CGAU CC, Ab = リボ脱塩基ヌクレオチド
SLR-14S18 SEQ ID NO:13-(OCH ₂ CH ₂) ₆ - SEQ ID NO:14	5'-ppp-GG AUCG AUCG AUCG <u>U(OCH₂CH₂)₆G</u> CGAU CGAU CGAU CC

20

30

40

【 0 1 9 9 】

50

図3において実証するように、より短い二本鎖セクションを有するSLR（8塩基対；SLR-8）は、対照分子（SLR-14）と比較して低いが検出可能な活性を有しており、9塩基対SLR（SLR-9）は、SLR-14と比較して低減されたが測定可能な活性を有していた。

【0200】

また、SLRの活性が、二本鎖セクションにおける塩基の同一性および配列に依存することも観察された（例えば、SLR-9GC対SLR-9、およびSLR-8GC対SLR-8を参照のこと）。

【0201】

さらに、実験は、ループを、活性の有意な喪失なく、脱塩基ヌクレオチドリンカーまたは非リン酸リンカー（ポリエチレングリコールなど）で置換することができたことを示した（例えば、それぞれSLR-14Ab5およびSLR14S18対SLR-14を参照のこと）。ある特定の態様では、そのようなリンカーは、ヌクレアーゼに対する基質ではなく、したがって、インビトロまたはインビボでより安定である。

【0202】

実施例2：

インターフェロン応答を誘導するSLRの能力における3'-オーバーハングまたは5'-オーバーハングの存在の効果を調査した。図4A～4Bおよび5A～5Dにおいて実証するように、いずれの長さであれ5'-オーバーハングを有するSLRは、本質的に不活性であった。しかしながら、単一の3'-オーバーハングヌクレオチド残基を有するSLRは活性であり、多数の3'-オーバーハングヌクレオチドを有するSLRは、低減されたが有意なレベルの活性を有していた。

【0203】

態様の列挙：

以下の例示的な態様を提供するが、その番号付けが重要性のレベルを示すものと解釈されるべきではない。

【0204】

態様1は、以下を提供する：

インターフェロン応答を誘導することが可能なポリリボ核酸（RNA）分子であって、該RNA分子が、一本鎖であり、かつ、リンカーの一端に5'端がコンジュゲートされている第1のヌクレオチド配列を含み、

該リンカーのもう一方の端が、第2のヌクレオチド配列の3'端にコンジュゲートされており、

該リンカーが、ヌクレオシド、ヌクレオチド、デオキシヌクレオシドもしくはデオキシヌクレオチド、またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まず、

第1のヌクレオチド配列が、第2のヌクレオチド配列に実質的に相補的であり、

第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列が、ハイブリダイズして二本鎖セクションを形成することができ、

該二本鎖セクション中の塩基対の数が、8～20の範囲の整数であり、

それによって、該RNA分子がヘアピン構造を形成する、

前記RNA分子。

【0205】

態様2は、以下を提供する：

リンカーが、リン酸骨格またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まない、態様1の分子。

【0206】

態様3は、以下を提供する：

リンカーが、エチレングリコール基、アミノ酸およびアルキレン鎖からなる群より選択される少なくとも1つを含む、態様1～2のいずれかの分子。

【0207】

態様4は、以下を提供する：

リンカーが、 $-(OCH_2CH_2)_n-$ を含み、式中、 n は、1～10の範囲の整数である、態様1

10

20

30

40

50

～3のいずれかの分子。

【0208】

態様5は、以下を提供する：

ヘアピンが、平滑末端を有する、態様1～4のいずれかの分子。

【0209】

態様6は、以下を提供する：

ヘアピンが、3'-オーバーハングを有する、態様1～4のいずれかの分子。

【0210】

態様7は、以下を提供する：

前記オーバーハングが、1個、2個または3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む、態様6の分子。

10

【0211】

態様8は、以下を提供する：

5'-三リン酸および5'-二リン酸からなる群より選択される5'末端基を含む、態様1～7のいずれかの分子。

【0212】

態様9は、以下を提供する：

修飾ホスホジエステル骨格を含む、態様1～8のいずれかの分子。

【0213】

態様10は、以下を提供する：

20

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドを含む、態様1～9のいずれかの分子。

【0214】

態様11は、以下を提供する：

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドが、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、および2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) からなる群より選択される修飾を含む、態様10の分子。

【0215】

30

態様12は、以下を提供する：

少なくとも1つの修飾リン酸基を含む、態様1～11のいずれかの分子。

【0216】

態様13は、以下を提供する：

少なくとも1つの修飾塩基を含む、態様1～12のいずれかの分子。

【0217】

態様14は、以下を提供する：

二本鎖セクションが、1つまたは複数の誤対合した塩基を含む、態様1～13のいずれかの分子。

【0218】

40

態様15は、以下を提供する：

少なくとも1つの脱塩基ヌクレオチドを含む、態様1～14のいずれかの分子。

【0219】

態様16は、以下を提供する：

インターフェロン応答を誘導することが可能なポリリボ核酸 (RNA) 分子であって、該RNA分子が、一本鎖であり、かつ、ループおよびリンカーからなる群より選択されるエレメントの一端に5'端がコンジュゲートされている第1のヌクレオチド配列を含み、該エレメントのもう一方の端が、第2のヌクレオチド配列の3'端にコンジュゲートされており、

第1のヌクレオチド配列が、第2のヌクレオチド配列に実質的に相補的であり、

50

第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列が、ハイブリダイズして二本鎖セクションを形成することができ、

該二本鎖セクション中の塩基対の数が、8～20の範囲の整数であり、それによって、該RNA分子が、3'-オーバーハングを有するヘアピン構造を形成する、前記RNA分子。

【0220】

態様17は、以下を提供する：

前記オーバーハングが、1個、2個または3個の非塩基対合ヌクレオチドを含む、態様16の分子。

【0221】

態様18は、以下を提供する：

リンカーが、リン酸骨格またはその任意の代用物もしくは修飾物を含まない、態様16～17のいずれかの分子。

【0222】

態様19は、以下を提供する：

リンカーが、エチレングリコール基、アミノ酸およびアルキレン鎖からなる群より選択される少なくとも1つを含む、態様16～18のいずれかの分子。

【0223】

態様20は、以下を提供する：

リンカーが、 $-(OCH_2CH_2)_n-$ を含み、式中、 n は、1～10の範囲の整数である、態様16～19のいずれかの分子。

【0224】

態様21は、以下を提供する：

5'-三リン酸および5'-二リン酸からなる群より選択される5'末端基を含む、態様16～20のいずれかの分子。

【0225】

態様22は、以下を提供する：

修飾ホスホジエステル骨格を含む、態様16～21のいずれかの分子。

【0226】

態様23は、以下を提供する：

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドを含む、態様16～22のいずれかの分子。

【0227】

態様24は、以下を提供する：

少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオチドが、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、および2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) からなる群より選択される修飾を含む、態様23の分子。

【0228】

態様25は、以下を提供する：

少なくとも1つの修飾リン酸基を含む、態様16～24のいずれかの分子。

【0229】

態様26は、以下を提供する：

少なくとも1つの修飾塩基を含む、態様16～25のいずれかの分子。

【0230】

態様27は、以下を提供する：

二本鎖セクションが、1つまたは複数の誤対合した塩基を含む、態様16～26のいずれかの分子。

【0231】

10

20

30

40

50

態様28は、以下を提供する：

少なくとも1つの脱塩基ヌクレオチドを含む、態様16～27のいずれかの分子。

【0232】

態様29は、以下を提供する：

態様1～28のいずれかの少なくとも1つの分子を含む、薬学的組成物。

【0233】

態様30は、以下を提供する：

免疫刺激剤、抗原、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗腫瘍剤、レチノイン酸、IFN- α およびIFN- β からなる群より選択される少なくとも1つの作用物質をさらに含む、態様29の薬学的組成物。

【0234】

態様31は、以下を提供する：

態様1～28のいずれかの少なくとも1つの分子および/または態様29～30のいずれかの少なくとも1つの薬学的組成物に細胞を接触させる工程を含む、細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導するための方法。

【0235】

態様32は、以下を提供する：

前記細胞が、対象内の細胞である、態様31の方法。

【0236】

態様33は、以下を提供する：

その必要のある対象の細胞におけるI型インターフェロン応答を誘導することによる、該対象における疾患または障害を処置するための方法であって、態様1～28のいずれかの少なくとも1つの分子および/または態様29～30のいずれかの少なくとも1つの薬学的組成物に該細胞を接触させる工程を含む、前記方法。

【0237】

態様34は、以下を提供する：

疾患または障害が、細菌感染、ウイルス感染、寄生虫感染、がん、自己免疫疾患、炎症性障害および呼吸器障害からなる群より選択される、態様33の方法。

【0238】

態様35は、以下を提供する：

がんが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病および肺がんからなる群より選択される少なくとも1つである、態様34の方法。

【0239】

態様36は、以下を提供する：

前記分子が、対象に腫瘍内投与される、態様32～35のいずれかの方法。

【0240】

態様37は、以下を提供する：

対象が哺乳動物である、態様32～36のいずれかの方法。

【0241】

態様38は、以下を提供する：

対象が哺乳動物である、態様32～37のいずれかの方法。

【0242】

態様39は、以下を提供する：

対象が哺乳動物である、態様37～38のいずれかの方法。

【0243】

本明細書において引用されているありとあらゆる特許、特許出願および刊行物の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本発明は具体的な態様に関して開示されているが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の他の態様および変形物が当業者により考案され得ることが明白である。添付の特許請求の範囲は、その

10

20

30

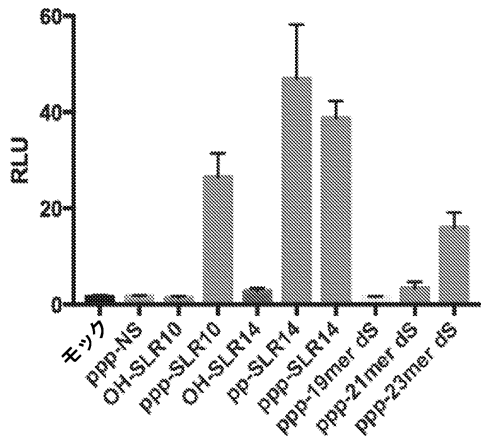
40

50

ような態様および同等の変形物のすべてを含むと解釈されるように意図される。

【図面】

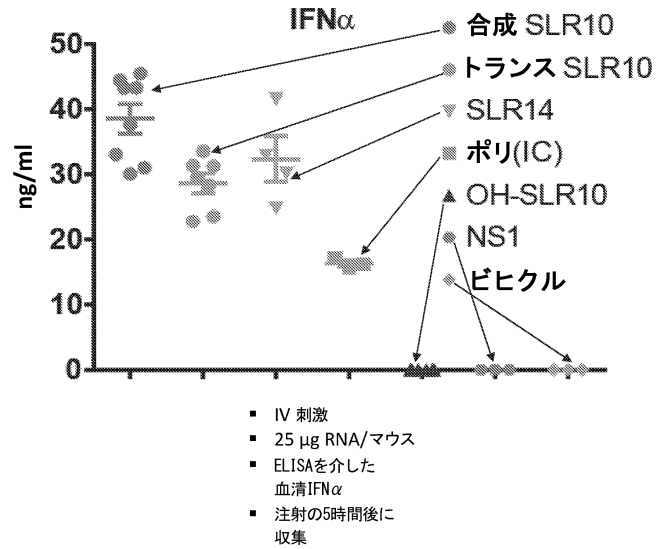
【図 1】



5'pppGGAUCGAUCGAUCGUU
CCUAGCUAGCUAGCGC SLR14

5'pppGGACGUACGUU
CCUGCAUGCAGC SLR10

【図 2】

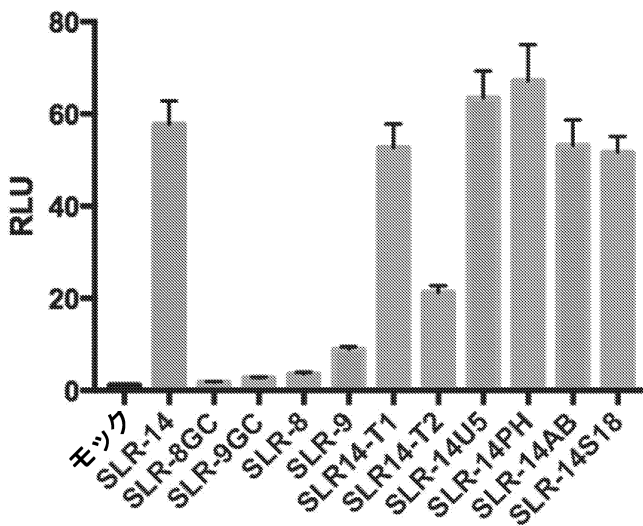


- IV 刺激
- 25 μg RNA/マウス
- ELISAを介した血清IFNα
- 注射の5時間後に収集

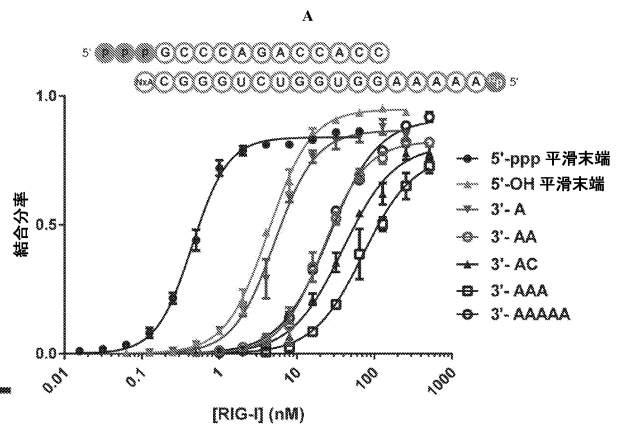
10

20

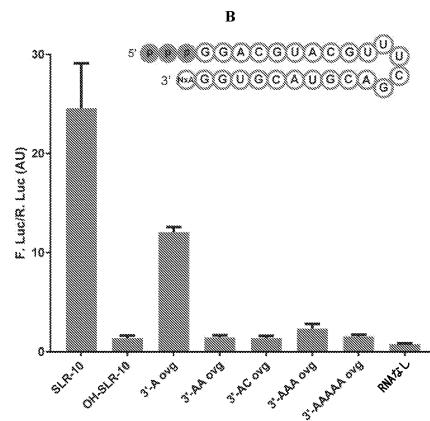
【図 3】



【図 4】



30



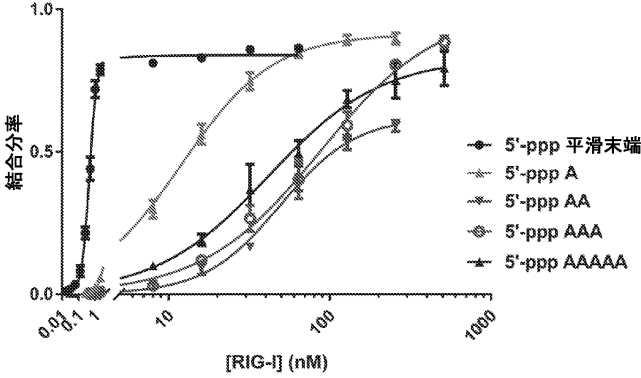
40

50

【図 5 A】

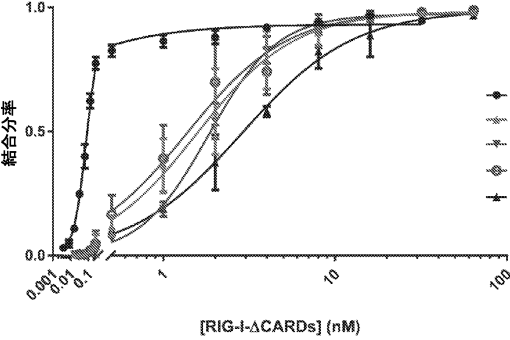


【図 5 B】

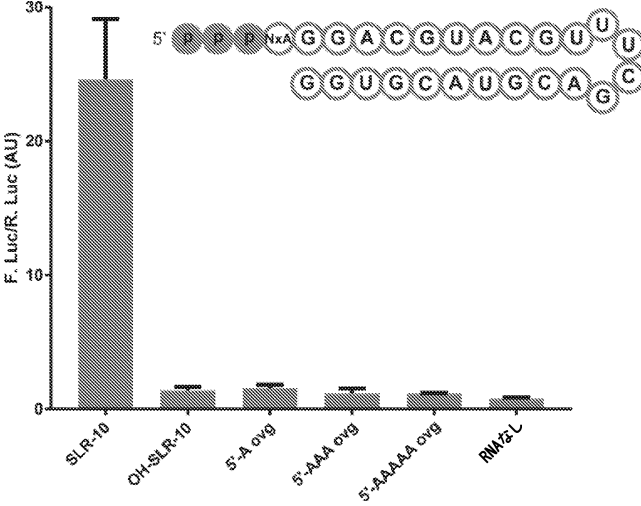


10

【図 5 C】



【図 5 D】



20

【配列表】

2022512651000001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/55394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 45/06, C12N 15/11 (2019.01) CPC - C12N 15/115, A61K 31/713, A61K 38/212, A61K 38/215, C12N 2310/531, C12N 2320/30, C12N 2310/351, C12N 2310/14, C12N 15/113, C12N 15/111, C12N 2310/315, C12N 2310/321, C12N 2310/3231, C12N 2330/30 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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0046943 A1 (YALE UNIVERSITY) 18 February 2016 (18.02.2016) Abstract; Claim 1; Claim 2; Claim 4; Claim 6; Claim 7; Claim 8; Claim 9; Claim 10; Claim 11; Claim 36; Claim 40; para [0160]; para [0163]; para [0171]; para [0176]; para [0184]; para [0187]; para [0190]	1-5, 8-15, 29-30
A	US 2015/0148530 A1 (SIRNA THERAPEUTICS, INC.) 28 May 2015 (28.05.2015) Abstract	1-5, 8-15, 29-30
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 January 2020		Date of mailing of the international search report 10 FEB 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/55394

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

---Please see continuation in first extra sheet -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 8-15, 29, 30, limited to hairpin with 8 base pair double stranded stem, with blunt end

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 19/55394

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-30, directed to a polyribonucleic acid (RNA) molecule capable of inducing an interferon response. The RNA will be searched to the extent that the RNA encompasses a double stranded section of 8 base pairs that comprise a hairpin structure, connected via a linker, wherein the hairpin has a blunt end (note, this is the first claimed number of base pairs for the double stranded section of the claimed RNA). It is believed that claims 1-5, 8-15, 29, 30 encompass this first named invention (because these claims are drawn to a hairpin with a blunt end), and thus these claims will be searched without fee to the extent that the RNA has a double stranded section of 8 base pairs and forms a hairpin structure with a blunt end. Additional RNA(s) with longer double-stranded sections and/or a hairpin without a blunt end, will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected RNA(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a RNA comprising a double stranded section of 8 base pairs forming a hairpin structure via a loop, and further possessing a 3'-overhang (claims 1-4, 6-30).

Group II, claims 31-39, directed to a method for inducing a type I Interferon response in a cell and for treating a disease or disorder in a subject.

The inventions listed as Group I+ and Group II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I+ has the special technical feature of a matter of composition comprising RNA, that is not required by the method of Group II.

Group II has the special technical feature of a method, that is not required by Group I+.

Additionally, the inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique RNA sequence. Each RNA comprises a unique nucleic acid sequence, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

No technical features are shared between the nucleic acid sequences of RNAs of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ and II were considered to share the technical features of including:

polyribonucleic acid (RNA) molecule capable of inducing an interferon response, wherein the RNA molecule is single stranded and comprises a first nucleotide sequence, which 5'-end is conjugated to one end of a linker or a loop, wherein the other end of the element is conjugated to the 3'-end of a second nucleotide sequence, wherein the first nucleotide sequence is substantially complementary to the second nucleotide sequence, wherein the first nucleotide sequence and the second nucleotide sequence can hybridize to form a double-stranded section, wherein the number of base pairs in the double stranded section is an integer ranging from 8 to 20, whereby the RNA molecule forms a hairpin structure; these shared technical features are previously disclosed by US 2016/0046943 A1 to Yale University, (hereinafter "Yale Univ").

Yale Univ teaches a polyribonucleic acid (RNA) molecule capable of inducing an interferon response, wherein the RNA molecule is single stranded and comprises a first nucleotide sequence that forms a double-stranded section of less than 19 base pairs via a loop, creating a hairpin structure (Abstract - "The present invention provides a small hairpin nucleic acid molecule that is capable of stimulating interferon production. The nucleic acid molecule of the present invention has a double-stranded section of less than 19 base pairs and at least one blunt end. In certain embodiments, the molecule comprises a 5' triphosphate or a 5' diphosphate."; Claim 2 - "The composition of claim 1, wherein the nucleic acid molecule comprises a single strand nucleic acid molecule which forms a hairpin structure comprising the double-stranded section and a loop."; para [0018] - "GC10 is a palindromic RNA duplex of repeating ?eGC?f with a 5'hydroxyl."). Yale Univ does not expressly teach the two strands forming a double-stranded region are connected via a linker. However, since Yale Univ teaches use of spacers and linkers connected to nucleotides (para [0190] - "Alternatively, the spacer can connect to or replace the terminal atom of a nucleotide surrogate (e.g., PNAs). These spacers or linkers can include e.g., -(CH₂)_n-, -(CH₂)_nN-, -(CH₂)_nO-, -(CH₂)_nS-, O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OH (e.g., n=3 or 6), abasic sugars, amide, carboxy, amine, oxyamine, oxymine, thioether, disulfide, thiourea, sulfonamide, or morpholino, or biotin and fluorescein reagents."), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the two strands could be connected via a linker instead of a loop formed by the RNA sequence, for enhanced functionality.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ and II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	33/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	33/00
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/713
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
C 0 7 K	14/555 (2006.01)	A 6 1 K	38/21
		C 0 7 K	14/555

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 パイル アナ マリー

アメリカ合衆国 0 6 4 3 7 コネチカット州 ギルフォード ゴールデン ヒル ドライブ 9 1

(72)発明者 フェドロヴァ オルガ

アメリカ合衆国 0 6 5 1 8 コネチカット州 ハムデン バーノン ストリート 5 5

F ターム (参考)

4B065 AA94X AC14 AC15 CA60
4C084 AA01 AA02 AA03 AA19 DA22 DA23 MA02 MA13 MA16 MA17
MA21 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55
MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 ZB081 ZB082 ZB092 ZB111 ZB112
ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372 ZC021
ZC022 ZC751
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA13 MA16 MA17
MA21 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55
MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB08 ZB11 ZB26 ZB27
ZB33 ZB35 ZB37 ZC02 ZC75
4H045 AA50 DA15