(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-529025
(P2024-529025A)
(43)公表日　令和6年8月1日(2024.8.1)

| (51)国際特許分類 | | FI | | テーマコード（参考） | |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/113 (2010.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/113 | ＺＺＮＡ | ４Ｂ０６５ |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/10 (2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | | ４Ｃ０８６ |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/713 (2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/713 | | ４Ｃ０８７ |
| *Ａ６１Ｋ* | *35/17 (2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/17 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *35/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/00 | | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全84頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-506919(P2024-506919)
(86)(22)出願日　令和4年8月4日(2022.8.4)
(85)翻訳文提出日　令和6年4月3日(2024.4.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/074555
(87)国際公開番号　WO2023/015265
(87)国際公開日　令和5年2月9日(2023.2.9)
(31)優先権主張番号　63/229,438
(32)優先日　令和3年8月4日(2021.8.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　311001370
フィオ ファーマシューティカルズ コーポレーション
Ｐｈｉｏ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ Ｃｏｒｐ．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０１７５２、マールボロ、シマラーノ ドライブ ２５７、スイート １０１
(74)代理人　110003971
弁理士法人葛和国際特許事務所
(72)発明者　マックスウェル，メリッサ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０１５１０、クリントン、プレザント ストリート ８３
(72)発明者　カルディア，ジェームズ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　化学修飾されたオリゴヌクレオチド

(57)【要約】
本開示は、いくつかの側面において、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている、化学修飾された二本鎖核酸分子に関する。

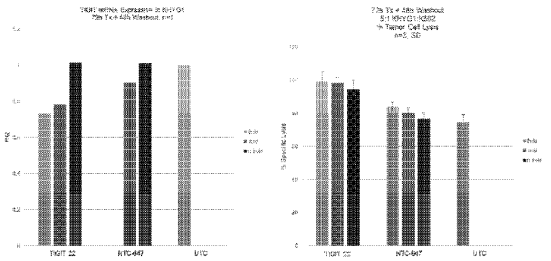


FIG. 2

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子であって、ここで化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号１～６および２７から選択される配列の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む、前記化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項２】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号１～６および２７から選択される配列を含む、請求項１に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項３】
ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子であって、化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号２８の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている、前記化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項４】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号２８に対して向けられている、請求項３に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項５】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項６】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、疎水的に修飾されている、請求項１～５のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項７】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、１以上の疎水性抱合体に連結している、請求項１～５のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項８】
疎水性抱合体が、コレステロールである、請求項７に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項９】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、少なくとも１つの２'-Ｏ-メチル修飾および/または少なくとも１つの２'-Ｏ-フルオロ修飾、および少なくとも１つのホスホロチオアート修飾を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項１０】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、ＴＩＧＩＴ２２(配列番号１～２)、ＴＩＧＩＴ２３(配列番号３～４)、およびＴＩＧＩＴ２４(配列番号５～６)から選択される配列を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項１１】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号１に記載の配列を有するセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２２センス鎖)および/または配列番号２に記載の配列を有するアンチセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２２アンチセンス鎖)を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項１２】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号３に記載の配列を有するセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２３センス鎖)および/または配列番号４に記載の配列を有するアンチセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２３アンチセンス鎖)を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項１３】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号５に記載の配列を有するセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２４センス鎖)および/または配列番号６に記載の配列を有するアンチセンス鎖(ＴＩ

ＧＩＴ２４アンチセンス鎖)を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。
【請求項１４】
請求項１～１３のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子および薬学的に許容し得る賦形剤を含む、組成物。
【請求項１５】
配列番号１～６および２７の少なくとも１２個の連続ヌクレオチドを含む化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物であって、ここで宿主細胞が、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される、前記免疫原性組成物。
【請求項１６】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号１～６および２７から選択される配列を含む、請求項１５に記載の免疫原性組成物。
【請求項１７】
ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物であって、ここで化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号２８の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられており、ならびにここで宿主細胞が、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される、前記免疫原性組成物。
【請求項１８】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、配列番号２８に対して向けられている、請求項１７に記載の免疫原性組成物。
【請求項１９】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)である、請求項１５～１８のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項２０】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、疎水的に修飾されている、請求項１５～１９のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項２１】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、１以上の疎水性抱合体に連結している、請求項１５～２０のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項２２】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、少なくとも１つの２'-Ｏ-メチル修飾および/または少なくとも１つの２'-Ｏ-フルオロ修飾、および少なくとも１つのホスホロチオアート修飾を含む、請求項１５～２１のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項２３】
宿主細胞が、Ｔ細胞である、請求項１５～１９のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項２４】
Ｔ細胞が、高親和性Ｔ細胞受容体(ＴＣＲ)および/またはキメラの抗体受容体(ＣＡＲ)を発現する１以上の導入遺伝子を含む、請求項２３に記載の免疫原性組成物。
【請求項２５】
宿主細胞が、健康なドナーに由来する、請求項１５～２４のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項２６】
化学修飾された二本鎖核酸分子が、宿主細胞においてＴＩＧＩＴの少なくとも５０％の阻害を誘導する、請求項１５～２５のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
【請求項２７】

免疫原性組成物を生産する方法であって、方法が、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を宿主細胞に導入することを含み、前記分子の少なくとも１つが、配列番号１～６および２７の少なくとも１２個の連続ヌクレオチドを含み、ここで１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子が、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)を標的とし、それによって宿主細胞を生産し、ならびにここで宿主細胞が、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される、前記方法。

【請求項２８】

１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子の少なくとも１つが、配列番号１～６および２７から選択される配列を含む、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

免疫原性組成物を生産する方法であって、方法が、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を宿主細胞に導入することを含み、前記分子の少なくとも１つが、配列番号２８の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられており、ここで１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子が、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)を標的とし、それによって宿主細胞を生産し、ならびにここで宿主細胞が、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される、前記方法。

【請求項３０】

１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子の少なくとも１つが、配列番号２８に対して向けられている、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

免疫原性組成物を生産する方法であって、方法が、請求項１～１３に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子を宿主細胞に導入することを含み、ここで宿主細胞が、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される、前記方法。

【請求項３２】

細胞が、Ｔ細胞である、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

Ｔ細胞が、高親和性Ｔ細胞受容体(ＴＣＲ)および/またはキメラの抗体受容体(ＣＡＲ)を発現する１以上の導入遺伝子を含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

細胞が、健康なドナーに由来する、請求項２７～３３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５】

宿主細胞を、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない洗浄培地中に、２４時間から６日間再懸濁することをさらに含む、請求項２７～３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３６】

宿主細胞が、洗浄培地中に、２４時間から９６時間再懸濁される、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

宿主細胞が、洗浄培地中に、４８時間再懸濁される、請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

宿主細胞が、洗浄培地中に、９６時間再懸濁される、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】

宿主細胞が、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない洗浄培地中に、再懸濁されない、請求項２７～３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４０】

増殖性疾患または感染性疾患を患う対象を処置するための方法であって、方法が、請求項１４に記載の組成物または請求項１５～２６のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を

対象へ投与すること含む、前記方法。
【請求項４１】
増殖性疾患が、がんである、請求項４０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、2021年8月4日に出願された「CHEMICALLY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES」と題する米国仮出願第63/229,438号の利益を、35 U.S.C.§119(e)の下に主張し、その全開示は参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。
【０００２】
電子配列リストへの言及
電子配列リスト(R065970058WO00-SEQ-JXV.xml;サイズ:103,856バイト;および作成日:2022年8月4日)の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００３】
分野
いくつかの側面において、本開示は、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている、化学修飾された二本鎖核酸分子に関する。
【背景技術】
【０００４】
背景
免疫系の生理学的な機能は、新生物細胞を認識および排除することである。したがって、腫瘍進行の側面は、免疫抵抗性メカニズムの発達である。これらの耐性メカニズムは、一度発達すると、自然免疫系が腫瘍成長に影響することを防ぐのみならず、がんに対する免疫治療的アプローチの有効性を制限する。免疫抵抗性メカニズムには、しばしば免疫チェックポイントと称される免疫阻害経路が含まれる。免疫阻害経路は、腫瘍細胞とＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球との間の相互作用において特に重要な役割を果たし、養子細胞移植(ＡＣＴ)治療剤を含む。
【０００５】
養子細胞移植(ＡＣＴ)の様々な方法は、血液または腫瘍材料などの患者の試料から回収された細胞のex vivo処置を含む。細胞ベースの処置の調製に含まれる共通のステップは、主な供給源(例として、末梢血)からの細胞の単離、遺伝子編集(例として、キメラ抗原受容体(ＣＡＲ)Ｔ細胞の操作または操作されたＴ細胞受容体(ＴＣＲ)細胞)、活性化、および拡大である。
【０００６】
ex vivoプロセシングの間、細胞は、中でも、腫瘍への輸送、in vivoでの増殖能力と寿命、および免疫抑制環境におけるそれらの有効性などの、それらの治療特性に影響を与える可能性がある特定の表現型の変化を経る。例えば、Ｔ細胞分化および成熟の状態は、典型的には、サブタイプの以下のシーケンスを通じて進行する:ナイーブ(ＴＮ)-幹細胞メモリー(ＴＳＣＭ)-セントラルメモリー(ＴＣＭ)-エフェクターメモリー(ＴＥＭ)-最終分化エフェクターＴ細胞(ＴＥＦＦ)。ＣＤ８＋Ｔ細胞の中でも初期メモリーＴ細胞(ＴＳＣＭ/ＴＣＭ)の表現的および機能的属性は、より分化したエフェクター細胞(例として、ＴＥＭ、ＴＥＦＦ等々)よりも優れたin vivoでの拡大、存続、および抗腫瘍有効性を実証することが観察されている。
【０００７】
がんの免疫治療は、臨床診療においてますます重要になってきている。免疫応答を誘発または増幅するために設計された免疫治療は、活性化免疫治療として分類され得る一方、免疫応答を低減または抑制する免疫治療は、抑制免疫治療として分類され得る。１つのがんの免疫抵抗性メカニズムに対抗するための活性化免疫治療戦略は、宿主の免疫応答を刺

激または維持するために、免疫チェックポイントを阻害する(例として、チェックポイントを標的とするモノクローナル抗体を使用することによって)ことである。

【０００８】

しかしながら、がん免疫治療剤をチェックポイント阻害剤と組み合わせて使用することには多くの欠点がある。例えば、免疫チェックポイントを遮断することは、免疫自己寛容を破壊し、それによって、「免疫関連有害事象」と呼ばれている自己免疫/自己炎症性副作用の新規の症候群を引き起こすことにつながり得る。加えて、チェックポイント阻害剤の毒性プロファイルは、他のクラスの腫瘍製剤について報告されている毒性プロファイルとは報告によれば異なり、皮膚、消化管、内分泌、肺、肝、眼、および神経系を含む複数の臓器系において炎症事象を誘発することもある。

【発明の概要】

【０００９】

概要

本開示は、いくつかの側面において、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を提供し、ここで化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１～６および２７から選択される配列の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む。

【００１０】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１～６および２７から選択される配列を含む。

本開示の別の側面は、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を提供し、ここで化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号２８の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号２８に対して向けられている。

【００１１】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、疎水的に修飾されている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、１以上の疎水性抱合体へ連結している。いくつかの態様において、疎水性抱合体は、コレステロールである。いくつかの側面において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、少なくとも１つの２'-Ｏ-メチル修飾および/または少なくとも１つの２'-Ｏ-フルオロ修飾、および少なくとも１つのホスホロチオアート修飾を含む。

【００１２】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＴＩＧＩＴ２２(配列番号１～２)、ＴＩＧＩＴ２３(配列番号３～４)、およびＴＩＧＩＴ２４(配列番号５～６)から選択される配列を含む。

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１に記載の配列を有するセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２２センス鎖)および/または配列番号２に記載の配列を有するアンチセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２２アンチセンス鎖)を含む。

【００１３】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号３に記載の配列を有するセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２３センス鎖)および/または配列番号４に記載の配列を有するアンチセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２３アンチセンス鎖)を含む。

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号５に記載の配列を有するセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２４センス鎖)および/または配列番号６に記載の配列を有するアンチセンス鎖(ＴＩＧＩＴ２４アンチセンス鎖)を含む。

【００１４】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子

および薬学的に許容し得る賦形剤を含む組成物を提供する。
本開示の側面は、配列番号１～６および２７の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで宿主細胞は、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される。
いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１～６および２７から選択される配列を含む。
本開示の側面は、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号２８の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられており、かつここで、宿主細胞は、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される。
【００１５】
いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号２８に対して向けられている。
いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、疎水的に修飾されている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、１以上の疎水性抱合体に連結している。いくつかの態様において、疎水性抱合体は、コレステロールである。いくつかの側面において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、少なくとも１つの２'-Ｏ-メチル修飾および/または少なくとも１つの２'-Ｏ-フルオロ修飾、および少なくとも１つのホスホロチオアート修飾を含む。
【００１６】
いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、疎水的に修飾されている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、１以上の疎水性抱合体に連結している。いくつかの態様において、疎水性抱合体は、コレステロールである。いくつかの側面において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、少なくとも１つの２'-Ｏ-メチル修飾および/または少なくとも１つの２'-Ｏ-フルオロ修飾、および少なくとも１つのホスホロチオアート修飾を含む。
【００１７】
いくつかの態様において、宿主細胞は、Ｔ細胞である。いくつかの態様において、Ｔ細胞は、高親和性Ｔ細胞受容体(ＴＣＲ)および/またはキメラの抗体受容体(ＣＡＲ)を発現する１以上の導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、宿主細胞は、健康なドナーに由来する。
【００１８】
いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子が、宿主細胞において少なくとも５０％のＴＩＧＩＴの阻害を誘導する。
本開示は、別の側面において、免疫原性組成物を生産する方法を提供し、方法は１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を宿主細胞に導入することを含み、その少なくとも１つは、配列番号１～６および２７の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含み、ここで、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)を標的とし、それによって宿主細胞を生産し、かつここで、宿主細胞は、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される。
【００１９】
いくつかの態様において、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子の少なくとも１つが、配列番号１～６および２７から選択される配列を含む。
本開示の別の側面は、免疫原性組成物を生産する方法を提供し、方法は１つ以上の化学

修飾された二本鎖核酸分子を宿主細胞に導入することを含み、その少なくとも１つは、配列番号２８の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられており、ここで１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体(ＴＩＧＩＴ)を標的とし、それによって宿主細胞を生産し、かつここで、宿主細胞は、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される。

【００２０】

いくつかの態様において、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子の少なくとも１つが、配列番号２８に対して向けられている。

本開示の側面は、免疫原性組成物を生産する方法に関し、本明細書に記載される化学修飾された二本鎖核酸分子を宿主細胞に導入することを含み、ここで宿主細胞は、Ｔ細胞、抗原提示細胞(ＡＰＣ)、樹状細胞(ＤＣ)、幹細胞(ＳＣ)、誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)、および幹細胞メモリーＴ細胞からなる群から選択される、方法が提供される。

いくつかの態様において、細胞はＴ細胞である。いくつかの態様において、Ｔ細胞は、高親和性Ｔ細胞受容体(ＴＣＲ)および/またはキメラの抗体受容体(ＣＡＲ)を発現する１以上の導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、細胞は、健康なドナーに由来する。

【００２１】

いくつかの態様において、本明細書中で提供される方法は、宿主細胞を、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない洗浄培地中で、２４時間から６日間再懸濁することをさらに含む。いくつかの態様において、宿主細胞は、洗浄培地中で２４時間から９６時間再懸濁される。いくつかの態様において、宿主細胞は、洗浄培地中で４８時間再懸濁される。いくつかの態様において、宿主細胞は、洗浄培地中で９６時間再懸濁される。

【００２２】

いくつかの態様において、宿主細胞は、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない洗浄培地中で、再懸濁されない。

本開示の側面は、増殖性疾患または感染性疾患を患う対象を処置するための方法に関し、方法は、本明細書に記載の組成物または免疫原性組成物を対象へ投与することを含む。

【００２３】

いくつかの態様において、増殖性疾患は、がんである。

本発明の限定の各々は、本発明の多様な態様を包含し得る。したがって、いずれか１の要素または要素の組み合わせを伴う本発明の限定の各々は、本発明の各側面に含まれ得ると考えられる。本発明はその適用において、以下の説明に記載されるまたは図面に例示される、解釈の詳細および構成要素の配置に限定されない。本発明は他の態様も可能であり、多様なやり方において実践または実行されることが可能である。

【００２４】

また、本書で使用される専門用語(phraseology)および用語(terminology)は、説明を目的としたものであり、限定的なものと見なされるべきではない。本明細書における「含む(including)」、「含む(comprising)」、または「有する(having)」、「含有する(containing)」、「含む(involving)」およびそれらの変形の使用は、その後に列挙される項目およびその同等物ならびに追加の項目を包含することを意味する。

【図面の簡単な説明】

【００２５】

図面の簡潔な説明

添付の図面は一定の縮尺で描かれることを意図していない。図面において、多様な図に例示されている同一またはほぼ同一の構成要素は、同様な番号で表されている。明確性の目的のために、すべての図面にすべての構成要素は標識され得ない。

【００２６】

【図１】図１は、ＴＩＧＩＴを標的とするＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物のＮＫ細胞の活性を増強する能力を試験するために利用された、実験構成の概要を提供する。

【図２】図２は、ＴＩＧＩＴを標的とするＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて処理した

ＮＫ細胞による腫瘍細胞の死滅を示す。ＴＩＧＩＴ ｍＲＮＡレベルを左側に、特異的溶解率を右側に示す。

【００２７】

【図３】図３は、９６時間の洗浄期間の後、ＴＩＧＩＴを標的とするＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて処理したＮＫ細胞による腫瘍細胞の死滅を示す。ＴＩＧＩＴ表面タンパク質の発現を左側に、特異的溶解率を右側に示す。ＵＴＣ＝トランスフェクトされていない対照、ＮＴＣ＝非標的化対照。

【図４】図４は、６日の洗浄期間の後、ＴＩＧＩＴを標的とするＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて処理したＮＫ細胞による腫瘍細胞の死滅を示す。ＴＩＧＩＴ表面タンパク質の発現を左側に、特異的溶解率を右側に示す。ＵＴＣ＝トランスフェクトされていない対照、ＮＴＣ＝非標的化対照。

【発明を実施するための形態】

【００２８】

詳細な説明

いくつかの側面において、本開示は、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体を標的とする、化学修飾された二本鎖核酸分子(例として、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標))に関する。本明細書に開示される化学修飾された二本鎖核酸分子は、免疫治療に使用され得る。

【００２９】

ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)技術は、宿主細胞(例として、Ｔ細胞)などの免疫治療を目的とした遺伝子を調節するのに特に好適である。ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)のいくつかの利点は以下を含む:(ｉ)ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)は、短期間で開発され、「非ドラッガブルな(non-druggable)」標的、例として小分子による阻害が難しいもの、例として転写因子などを含む、実質的にはあらゆる標的をサイレンシングすることができる;(ii)代替のex vivo ｓｉＲＮＡトランスフェクション技法(例として、脂質を媒介したトランスフェクションまたはエレクトロポレーション)と比較して、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)は、高い細胞生存率を保持しながら、高トランスフェクション効率で、Ｔ細胞を含む様々な細胞型をトランスフェクションすることができる;(iii)初期拡大段階において細胞培養培地に添加される場合、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物は、８～１０分裂サイクルの間に、目的の標的の一過的なサイレンシングを提供する;(iv)ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)を組み合わせて使用して、複数の標的を同時にサイレンシングできるため、したがって、様々な種類の細胞処理プロトコルでの使用にかなりの柔軟性を提供する。

ＴＩＧＩＴへ向けられているＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を、本明細書に記載する。

【００３０】

本明細書に使用されるとき、「核酸分子」は、これらに限定されないが、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)、ｓｄ-ｒｘＲＮＡ、ｒｘＲＮＡｏｒｉ、オリゴヌクレオチド、ＡＳＯ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｃｐ-ｌａｓｉＲＮＡ、ａｉＲＮＡ、一本鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、ＲＮＡおよびＤＮＡを含む。いくつかの態様において、核酸分子は、化学修飾されたオリゴヌクレオチドなどの化学修飾された核酸分子である。いくつかの態様において、核酸分子は、二本鎖である。いくつかの態様において、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)(ｓｄ-ｒｘＲＮＡとしても知られている)分子である。

【００３１】

ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)(ｓｄ-ｒｘＲＮＡ)分子

本発明の側面は、ＴＩＧＩＴを標的とするＩＮＴＡＳＹＬ(商標)分子に関する。いくつかの態様において、本明細書に記載のＩＮＴＡＳＹＬ(商標)分子は、表１に記載の配列またはそれらのフラグメントを含むか、またはそれらからなる、またはそれらを標的とするか、またはそれらに対して向けられている。

【００３２】

本明細書に使用されるとき、「ｓｄ-ｒｘＲＮＡ」または「ｓｄ-ｒｘＲＮＡ分子」また

は「ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)」または「ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)分子」または「ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物」とは、2014年8月5日に付与された、「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題する米国特許第8,796,443号、2015年7月14日に付与された、「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題する米国特許第9,080,171号、2015年11月3日に付与された「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題する米国特許第9,175,289号、2019年3月26日に付与された、「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題する米国特許第10,240,149号、2020年9月15日に付与された、「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題する米国特許第10,774,330号、2021年9月14日に付与された、「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題する米国特許第11,118,178号、2009年9月22日に出願された、「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題するPCT公開番号WO2010/033247(出願番号PCT/US2009/005247)、および2011年3月24日に出願された、「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」と題するPCT公開番号WO2011/119852(出願番号PCT/US2011/029824)において記載され、これらから本明細書に参照により組み込まれるもののような、自己送達型ＲＮＡ分子を指す。簡単に述べると、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)(ｓｄ-ｒｘＲＮＡ$^{ナノ}$とも呼ばれる)は、最小長が１６ヌクレオチドのガイド鎖および８～１８ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む、単離された非対称二本鎖核酸分子であって、ここで二本鎖核酸分子は二本鎖領域および一本鎖領域を有し、一本鎖領域は４～１２ヌクレオチド長を有し、かつ、少なくとも３つのヌクレオチド骨格修飾を有する。好ましい態様において、二本鎖核酸分子は、平滑である１末端を有するか、または、１つもしくは２つのヌクレオチド突出を含む。ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)分子は、化学修飾を通じて、いくつかの例において疎水性抱合体の付着を通じて、最適化され得る。上記の参照された特許および刊行物の各々は、それらの全体において参照により本明細書に組み込まれる。

【００３３】

いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を含み、ここで二本鎖である分子の領域は８～１５ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖の一本鎖領域は３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも４０％は修飾されている。

【００３４】

いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を含み、ここで二本鎖である分子の領域は８～１５ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖の一本鎖領域は３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも４０％は修飾されており、ここで１つの鎖は鎖の３'または５'末端にてコレステロールへ抱合されている。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖は、鎖の５'または３'末端にてコレステロールへ抱合されている。

【００３５】

いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を含み、ここで二本鎖である分子の領域は８～１５ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖の一本鎖領域は３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも４０％は修飾されており、ここで１つの鎖(例として、パッセンジャー鎖)は、パッセンジャー鎖の３'末端にて抱合されている疎水性部分を含有し、ここで疎水性部分はコレステロールである。

【００３６】
本開示に関連する核酸分子は、本明細書において、本発明の単離された二本鎖またはデュプレックス核酸、化学修飾された二本鎖またはデュプレックス核酸、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ナノ分子、ナノＲＮＡ、ｓｄ-ｒｘＲＮＡ$^{ナノ}$、ｓｄ-ｒｘＲＮＡ、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)またはＲＮＡ分子と呼ばれる。
【００３７】
ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)分子は、従来のｓｉＲＮＡと比較して、はるかに効果的に細胞によって取り込まれる。これらの分子は、標的遺伝子のサイレンシングにおいて高度に効率的であって、血清の存在下における高活性、効率的な自己送達、多様なリンカーとの適合性、および、毒性に関連する化学修飾の存在の減少または完全な欠如を含む、先に記載されたＲＮＡｉ分子を凌駕する大きな利点を与える。
【００３８】
一本鎖ポリヌクレオチドとは対照的に、デュプレックスポリヌクレオチドは伝統的に細胞への送達が困難であったが、それは、これらが強固な構造および多数の負の電荷を有するために、その膜輸送が困難になっているからである。しかしながら、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)分子は、部分的に二本鎖であるにも拘わらず、in vivoで一本鎖として認識され、したがって、細胞膜を超えて効率的に送達されることが可能である。その結果、本発明のポリヌクレオチドは、多くの例において自己送達が可能である。よって、本発明のポリヌクレオチドは、従来のＲＮＡｉ剤と同様の様式において製剤化されても、あるいは、細胞または対象へ単独で(または非送達型キャリアとともに)送達されてもよく、自己送達を可能にする。本発明の一態様において、分子の一部分が従来のＲＮＡデュプレックスに類似し、分子の第２の部分が一本鎖である、自己送達型非対称二本鎖ＲＮＡ分子が提供される。
【００３９】
本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの側面において、二本鎖領域と５ヌクレオチドまたはそれより長い一本鎖領域とを含む非対称構造と、具体的な化学修飾パターンとの組み合わせを有し、親油性または疎水性の分子に抱合される。いくつかの態様において、このクラスのＲＮＡｉ様化合物は、in vitroおよびin vivoで優れた効力を有する。強固なデュプレックス領域のサイズの低減が、一本鎖領域へ適用されるホスホロチオアート修飾と組み合わせられると、観察される優れた効力に寄与すると考えられる。
【００４０】
いくつかの態様において、本発明のＲＮＡｉ化合物は、８～１５塩基長のデュプレックス領域(効率的なＲＩＳＣ侵入に必要とされる)および４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を含む非対称化合物を含む。いくつかの態様において、デュプレックス領域は、１３または１４ヌクレオチド長であり、いくつかの態様において、一本鎖領域は６～７ヌクレオチド長である。ＲＮＡｉ化合物(例として、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)分子)の一本鎖領域はまた、２～１２個のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部(ホスホロチオアート修飾と呼ばれる)を含む。いくつかの態様において、一本鎖領域は、６～８個のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部を含む。さらに、本発明のＲＮＡｉ化合物はまた、安定性を提供し、ＲＩＳＣ侵入と適合するユニークな化学修飾パターンを含む。いくつかの態様において、これらの要素の組み合わせは、in vitroおよびin vivoでのＲＮＡｉ試薬の送達に非常に有用であるという予期せぬ特性をもたらす。
【００４１】
安定性を提供し、かつ、ＲＩＳＣ侵入に適合する、化学修飾されたパターンは、センス鎖またはパッセンジャー鎖ならびにアンチセンス鎖またはガイド鎖への修飾を含む。例として、パッセンジャー鎖は、安定性を確実にし、かつ、活性に干渉しない、いずれの化学的実体によっても、修飾され得る。かかる修飾は、２'リボ修飾(Ｏ-メチル、２'Ｆ、２デオキシ等)およびホスホロチオアート修飾などの骨格修飾を含む。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖における化学修飾パターンは、パッセンジャー鎖内のＣおよびＵヌクレオチドのＯメチル修飾を含む。代わりに、パッセンジャー鎖は完全にＯメチル修飾さ

れてもよい。

【００４２】

ガイド鎖はまた、いくつかの態様において、ＲＩＳＣ侵入に干渉せずに、安定性を確実にするいずれの化学修飾によっても修飾されてもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖における化学修飾パターンは、ＣおよびＵヌクレオチドの大多数が２'Ｆ修飾され、かつ、５'末端がリン酸化されているものを含む。いくつかの態様において、ガイド鎖における化学修飾パターンは、１位と１１～１８位のＣ/Ｕとの２'Ｏメチル修飾および５'末端の化学的リン酸化を含む。いくつかの態様において、ガイド鎖における化学修飾パターンは、１位と１１～１８位のＣ/Ｕとの２'Ｏメチル修飾および５'末端の化学的リン酸化ならびに２～１０位におけるＣ/Ｕの２'Ｆ修飾を含む。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖は、少なくとも１つの５-メチルＣまたはＵ修飾を含有する。

【００４３】

いくつかの態様において、ｓｄ-ｒｘＲＮＡ(例として、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物)中のヌクレオチドのうち少なくとも３０％が修飾されている。例えば、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物中のヌクレオチドのうち少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％が修飾されている。いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物中のヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【００４４】

本発明のオリゴヌクレオチドの上記の化学修飾パターンは、良好な耐性を示し、非対称ＲＮＡｉ化合物の効力を改善する。いくつかの態様において、記載された構成要素(ガイド鎖の安定化、ホスホロチオアートの伸長、センス鎖の安定化、疎水性抱合体、および/またはターゲティングリガンド)のいずれかの排除、またはサイズの増加は、最適以下の効力を、いくつかの例においては、効力の完全な喪失をもたらし得る。要素の組み合わせは、細胞への受動的送達の後であっても十分に活性がある化合物の開発をもたらす。

【００４５】

ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)は、いくつかの例において、新規の型の化学的性質(chemistries)を使用して化合物の疎水性を改善することにより、さらに改善され得る。例えば、１つの化学的性質は、疎水性塩基修飾の使用に関する。あらゆる位置におけるあらゆる塩基が、修飾が塩基の分配係数の増大をもたらす限りにおいて、修飾されてもよい。修飾の化学的性質のための好ましい位置は、ピリミジンの４位および５位である。これらの位置の主要な利点は、(ａ)合成の容易性、および、(ｂ)ＲＩＳＣ複合体のローディングおよび標的認識のために必須である、塩基対形成およびＡ型らせん(A form helix)形成への干渉がないこと、である。いくつかの態様において、複数のデオキシウリジンが全体的な化合物の効力に干渉せずに存在するＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物が使用される。加えて、組織分布および細胞取り込みにおける主要な改善は、疎水性抱合体の構造を修飾することにより得られ得る。いくつかの態様において、ステロールの構造は、Ｃ１７に付着された鎖(C17 attached chain)を変える(増大する/減少する)ように修飾される。この型の修飾は、in vivoでの細胞取り込みの大きな増大を、および、組織取り込み成功率(prosperities)の改善をもたらす。

【００４６】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、センスおよびアンチセンス鎖のそれぞれの３'-突出の有無にかかわらず約１３～２２塩基対の二本鎖領域、および約２～９ヌクレオチドのアンチセンス鎖上の３'一本鎖尾部を含む、疎水的に修飾された

ｓｉＲＮＡアンチセンスハイブリッド分子である。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、少なくとも１つの２'-Ｏ-メチル修飾、少なくとも１つの２'-フルオロ修飾、および少なくとも１つのホスホロチオアート修飾、ならびに、ステロール、コレステロール、ビタミンＤ、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、フェニル等から選択される少なくとも１つの疎水的修飾、疎水性修飾剤を含有する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、複数のかかる修飾を含む。

【００４７】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＴＩＧＩＴをコードする遺伝子を標的とする。本明細書に使用されるとき、「ＴＩＧＩＴ」とは、ＩｇおよびＩＴＩＭドメインを持つＴ細胞免疫受容体を指し、それはＣＤ２２６/ＴＩＧＩＴ-ＰＶＲ経路を介して、例えばインターロイキン１０(ＩＬ-１０)の生産を増大させることによって、Ｔ細胞を媒介した免疫をダウンレギュレートする免疫受容体である。いくつかの態様において、ＴＩＧＩＴは、ＮＣＢＩ参照配列番号NM_173799.3で表される核酸配列によってコードされる。本開示の化学修飾された二本鎖核酸分子により標的とされてもよいＴＩＧＩＴ配列の非限定例は、表１～２に列挙される。いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)などの化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号２８～４８のいずれか１つ、またはその一部を標的とする。

【００４８】

いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)などの化学修飾された二本鎖核酸分子は、表１または２内の配列の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)などの化学修飾された二本鎖核酸分子は、表１または２内の配列の少なくとも１つの配列を含む。いくつかの態様において、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)などの化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１～４８から選択される配列の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１～２７から選択される配列の少なくとも１２個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１～４８から選択される配列を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号１に記載の配列を有するセンス鎖、および/または配列番号２に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号３に記載の配列を有するセンス鎖、および/または配列番号４に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、配列番号５に記載の配列を有するセンス鎖、および/または配列番号６に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。

【００４９】

したがって、本発明の側面は、ガイド(アンチセンス)鎖およびパッセンジャー(センス)鎖を含む、単離された二本鎖核酸分子に関する。本明細書に使用される用語「二本鎖」は、ヌクレオモノマーの少なくとも一部が相補的であり、二本鎖領域を形成するように水素結合されている、１以上の核酸分子を指す。いくつかの態様において、ガイド鎖の長さは、１６～２９ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、ガイド鎖は、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８または２９ヌクレオチド長である。ガイド鎖は標的遺伝子に対して相補性を有する。ガイド鎖と標的遺伝子との間の相補性は、ガイド鎖のいずれの部分にわたっても存在することができる。本明細書に使用される相補性は、ガイド鎖が標的に対してＲＮＡｉを媒介できるように十分に相補的である限りにおいて、完全な相補性であっても、より不完全な相補性であってもよい。いくつかの態様において、相補性とは、ガイド鎖と標的との間の、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、４％、３％、２％または１％未満のミスマッチを指す。完全な相補性とは、１００％の相補性を指す。いくつかの態様において、標的配列と比較して挿入、欠失および単一の点変異を有するｓｉＲＮＡもまた、阻害について有効であることが見出されている。さらに、ｓｉＲＮＡの全ての部位が標的の認識について同等に寄与するわ

けではない。ｓｉＲＮＡの中心におけるミスマッチは最も重要であり、本質的に(essentially)標的ＲＮＡの切断を無効化する。アンチセンス鎖に関して、中心の上流または切断部位の上流におけるミスマッチは、耐性を示すが、標的ＲＮＡの切断を著しく低減する。アンチセンス鎖に関して、中心または切断部位の下流におけるミスマッチ、好ましくはアンチセンス鎖の３'末端の付近、例えばアンチセンス鎖の３'末端から１、２、３、４、５または６ヌクレオチドに位置するものは、耐性を示し、標的ＲＮＡの切断をごく僅かしか低減しない。

【００５０】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書に記載の二本鎖核酸分子のいくつかの態様において、ガイド鎖は、少なくとも１６ヌクレオチドの長さであり、ＲＩＳＣ中でアルゴノートタンパク質をアンカーする。いくつかの態様において、ガイド鎖がＲＩＳＣ中へロードするとき、これは明確なシード領域を有し、標的ｍＲＮＡの切断は、ガイド鎖の１０～１１位にわたって行われる。いくつかの態様において、ガイド鎖の５'末端は、リン酸化されているかまたはリン酸化されることができる。本明細書に記載される核酸分子は、最短トリガーＲＮＡ(minimum trigger RNA)として言及される場合もある。

【００５１】

本明細書に記載の二本鎖核酸分子のいくつかの態様において、パッセンジャー鎖の長さは、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。本明細書に記載の二本鎖核酸分子のいくつかの態様において、パッセンジャー鎖の長さは、８～１６ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、パッセンジャー鎖は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５または１６ヌクレオチド長である。パッセンジャー鎖は、ガイド鎖に対して相補性を有する。パッセンジャー鎖とガイド鎖との間の相補性は、パッセンジャーまたはガイド鎖のいずれの部位にわたっても存在してもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間には、分子の二本鎖領域内に１００％の相補性が存在する。

【００５２】

本発明の側面は、最小二本鎖領域を有する二本鎖核酸分子に関する。いくつかの態様において、分子の二本鎖である領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの態様において、分子の二本鎖である領域は、８～１６ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、分子の二本鎖である領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５または１６ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖領域は、１３または１４ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖である分子の領域は、１３～２２ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖である分子の領域は、１６、１７、１８、１９、２０、２１または２２ヌクレオチド長である。

【００５３】

ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性が存在してもよく、または、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１以上のミスマッチが存在してもよい。いくつかの態様において、二本鎖分子の一方の末端において、分子は、平滑末端であるかまたは１ヌクレオチドの突出を有する。分子の一本鎖領域は、いくつかの態様において、４～１２ヌクレオチド長である。例えば、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であってよい。しかしながら、ある態様において、一本鎖領域はまた、４ヌクレオチド長未満であっても、または、１２ヌクレオチド長より長くてもよい。ある態様において、一本鎖領域は少なくとも６または少なくとも７ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、一本鎖領域は２または３ヌクレオチド長を含む、２～９ヌクレオチド長である。

【００５４】

本発明に関連するＲＮＡｉコンストラクトは、-１３ｋｋａｌ/ｍｏｌ未満の熱力学的安定性(ΔＧ)を有することができる。いくつかの態様において、熱力学的安定性(ΔＧ)は、-２０ｋｋａｌ/ｍｏｌ未満である。いくつかの態様において、(ΔＧ)が-２１ｋｋａｌ/ｍｏｌ未満となったとき、効力の喪失が存在する。いくつかの態様において、-１３ｋｋ

ａｌ/ｍｏｌより高い(ΔＧ)値は、本発明の側面に適合性である。いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの態様において、相対的に高い(ΔＧ)値を有する分子は、相対的に高い濃度において活性になる場合があり、一方、相対的に低い(ΔＧ)値を有する分子は、相対的に低い濃度において活性になる場合がある。いくつかの態様において、(ΔＧ)値は、-９ｋｋｃａｌ/ｍｏｌよりも高くてもよい。最小二本鎖領域を有する本発明に関連するＲＮＡｉコンストラクトにより媒介される遺伝子サイレンシング効果は予測できないが、それは、ほぼ同一の設計であるが熱力学的安定性がより低い分子は、不活性であることが示されているからである(Rana et al. 2004)。

【００５５】

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書に記載の結果は、ｄｓＲＮＡまたはｄｓＤＮＡの８～１０ｂｐの伸長が、ＲＩＳＣのタンパク質構成要素またはＲＩＳＣのコファクターにより構造的に認識されるであろうことを示唆する。さらに、タンパク質構成要素により感受され得るか、および/または、かかる構成要素と相互作用するために十分に安定であり得、その結果アルゴノートタンパク質中へロードされ得る、トリガー化合物(triggering compound)のためのフリーエネルギー要求が存在する。許容される熱力学が存在して、好ましくは少なくとも８ヌクレオチドである二本鎖部分が存在する場合、デュプレックスは認識され、ＲＮＡｉ機構中にロードされるであろう。

【００５６】

いくつかの態様において、熱力学的安定性は、ＬＮＡ塩基の使用を通して増大する。いくつかの態様において、追加の化学修飾が導入される。化学修飾の数個の非限定的例は、5'ホスファート、5'ホスホナート、5'ビニルホスホナート、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロ、リボチミジン、C-5プロピニル-dC(pdC)およびC-5プロピニル-dU(pdU);C-5プロピニル-C(pC)およびC-5プロピニル-U(pU);5-メチルC、5-メチルU、5-メチルdC、5-メチルdUメトキシ、(2,6-ジアミノプリン)、5'-ジメトキシトリチル-Ｎ４-エチル-2'-デオキシシチジンおよびＭＧＢ(副溝結合剤)を含む。同一分子内で１つより多くの化学修飾が組み合わせられ得ることが、理解されるべきである。

【００５７】

いくつかの態様において、本開示に関連する分子は、効力の増大および/または毒性の低減のために、最適化される。例えば、ガイドおよび/またはパッセンジャー鎖のヌクレオチドの長さ、および/または、ガイドおよび/またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオアート修飾の数は、いくつかの側面においてＲＮＡ分子の効力に影響を及ぼし、一方、2'-フルオロ(2'Ｆ)修飾を2'-O-メチル(2'ＯＭｅ)修飾により置き換えることは、いくつかの側面において分子の毒性に影響を及ぼす。具体的には、分子の2'Ｆ含有物の低減は、分子の毒性を低下させると予測される。さらに、ＲＮＡ分子中のホスホロチオアート修飾の数は、細胞内への分子の取り込み、例えば細胞内への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。本明細書に記載される分子の好ましい態様は、2'Ｆ修飾を有さず、なお細胞取り込みおよび組織への浸透における同等の効力により特徴づけられる。かかる分子は、2'Ｆの大量使用により重度に修飾されたAccellおよびWolfrumにより記載される分子などの先行技術に対して、顕著な改善を表す。

【００５８】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、およそ１８～２０ヌクレオチドの長さであり、およそ２～１４のホスファート修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、ホスファート修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１４より多くのヌクレオチドを含有し得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣ侵入に干渉せずに安定性を増大させる１以上の修飾を含有してもよい。ホスホロチオアート修飾ヌクレオチドなどのホスファート修飾ヌクレオチドは、3'末端にあっても、5'末端にあっても、または、ガイド鎖全体に広がっていてもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖の3'末端の１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０のホスホロチオアート修飾ヌクレオチドを含有する。ガイド鎖はまた、2'Ｆおよび/または2'ＯＭｅ修飾も含有する

ことができ、これは、分子全体に位置することができる。いくつかの態様において、ガイド鎖の１位のヌクレオチド(ガイド鎖の最も５'の位置におけるヌクレオチド)は、２'ＯＭｅ修飾されているか、および/または、リン酸化されているか、および/または、ビニルホスホナートを含有している。ガイド鎖中のＣおよびＵヌクレオチドは、２'Ｆ修飾され得る。例えば、２０ヌクレオチドのガイド鎖の２～１０位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるＣおよびＵヌクレオチドは、２'Ｆ修飾され得る。ガイド鎖中のＣおよびＵヌクレオチドもまた、２'ＯＭｅ修飾され得る。例えば、１９ヌクレオチドのガイド鎖の１１～１８位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるＣおよびＵヌクレオチドは、２'ＯＭｅ修飾され得る。いくつかの態様において、ガイド鎖の最も３'末端におけるヌクレオチドは、未修飾である。ある態様において、ガイド鎖中のＣおよびＵの大部分は、２'Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５'末端はリン酸化されている。他の態様において、１位、および、１１～１８位におけるＣまたはＵは、２'ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５'末端はリン酸化されている。他の態様において、１位、および、１１～１８位におけるＣまたはＵは、２'ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５'末端はリン酸化されており、２～１０位におけるＣまたはＵは２'Ｆ修飾されている。

【００５９】

いくつかの側面において、パッセンジャー鎖は、およそ１１～１４ヌクレオチドの長さである。パッセンジャー鎖は、安定性を増大させる修飾を含有してもよい。パッセンジャー鎖における１以上のヌクレオチドは、２'ＯＭｅ修飾され得る。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖における１以上のＣおよび/またはＵヌクレオチドが２'ＯＭｅ修飾されているか、または、パッセンジャー鎖におけるＣおよびＵヌクレオチドの全てが２'ＯＭｅ修飾されている。ある態様において、パッセンジャー鎖における全てのヌクレオチドが２'ＯＭｅ修飾されている。パッセンジャー鎖上の１以上のヌクレオチドはまた、ホスホロチオアート修飾などのホスファート修飾もなされ得る。パッセンジャー鎖はまた、２'リボ、２'Ｆおよび２デオキシ修飾、または、上のいずれの組み合わせをも含有し得る。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との両方における化学修飾パターンは、良好に耐容され得、化学修飾の組み合わせは、ＲＮＡ分子の効力および自己送達の増大をもたらし得る。

【００６０】

本発明の側面は、ＲＮＡｉについて先に使用されてきた分子と比較した場合、二本鎖領域に対して相対的に長い一本鎖領域を有するＲＮＡｉコンストラクトに関する。分子の一本鎖領域は、細胞取り込みまたは遺伝子サイレンシングを促進するために修飾されていてもよい。いくつかの態様において、一本鎖領域のホスホロチオアート修飾は、細胞取り込みおよび/または遺伝子サイレンシングに影響を及ぼす。ガイド鎖のホスホロチオアート修飾されている領域は、分子の一本鎖および二本鎖の両領域内にヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、一本鎖領域は、２～１２のホスホロチオアート修飾を含む。例えば、一本鎖領域は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２のホスホロチオアート修飾を含み得る。いくつかの例において、一本鎖領域は、６～８のホスホロチオアート修飾を含む。

【００６１】

本発明に関連する分子はまた、細胞取り込みのためにも設計される。本明細書に記載されるＲＮＡ分子において、ガイド鎖および/またはパッセンジャー鎖は、抱合体に付着され得る。ある態様において、抱合体は疎水性である。疎水性抱合体は、１０より高い分配係数を有する低分子であり得る。抱合体は、コレステロールなどのステロール型分子であっても、または、Ｃ１７に付着した長さが増大したポリ炭素鎖を有する分子であってもよく、抱合体の存在は、脂質トランスフェクション試薬の有無に関らずＲＮＡ分子が細胞に取り込まれる能力に影響を及ぼし得る。抱合体は、疎水性リンカーを通して、パッセンジャー鎖またはガイド鎖に付着され得る。いくつかの態様において、疎水性リンカーは５～１２Ｃの長さであり、および/または、ヒドロキシピロリジンをベースとする。いくつかの態様において、疎水性抱合体はパッセンジャー鎖に付着し、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のいずれかのＣＵ残基は、修飾されている。いくつかの態様において、パ

ッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のＣＵ残基の少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％は、修飾されている。いくつかの側面において、本発明に関連する分子は、自己送達性(ｓｄ)である。本明細書において用いられる場合、「自己送達(self-delivery)」とは、分子が、トランスフェクション試薬などの追加の送達ビヒクルを必要とせずに細胞へ送達される能力を指す。

【００６２】

本発明に関連する分子は、肝臓への標的送達用に設計されている。本明細書に記載されるＲＮＡ分子において、ガイド鎖および/またはパッセンジャー鎖は、抱合体に付着され得る。ある態様において、抱合体はターゲティングリガンドである。ターゲティングリガンド抱合体は、N-アセチルガラクトサミン(ＧａｌＮａｃ)部分およびその誘導体などの糖類であり得る。ＲＮＡ分子は、いくつかの態様においては、１、２、３、４、５またはそれ以上のＧａｌＮａｃ部分を含むこともある。ターゲティングリガンド抱合体(単数または複数)は、リンカーを介してパッセンジャー鎖またはガイド鎖に付着され得るか、または、例えばホスホロアミダイトとしてパッセンジャー鎖またはガイド鎖に組み込まれ得る。

【００６３】

本発明の側面は、ＲＮＡｉにおける使用のために分子を選択することに関する。いくつかの態様において、８～１５ヌクレオチドの二本鎖領域を有する分子は、ＲＮＡｉにおける使用のために選択され得る。いくつかの態様において、分子は、その熱力学的安定性(ΔＧ)に基づいて選択される。いくつかの態様において、-１３ｋｋａｌ/ｍｏｌ未満の(ΔＧ)を有する分子が選択されるであろう。例えば、(ΔＧ)値は、-１３、-１４、-１５、-１６、-１７、-１８、-１９、-２１、-２２または-２２ｋｋａｌ/ｍｏｌ未満であってもよい。他の態様において、(ΔＧ)値は、-１３ｋｋａｌ/ｍｏｌより高くてもよい。例えば、(ΔＧ)値は、-１２、-１１、-１０、-９、-８、-７または-７ｋｋａｌ/ｍｏｌより高くてもよい。ΔＧは、当該技術分野において知られているいずれの方法をも使用して計算され得ることが理解されるべきである。いくつかの態様において、ΔＧは、Mfoldインターネットサイト(mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-for m1.cgi)を通して利用可能なMfoldを使用して計算される。ΔＧを計算するための方法は、以下の参考文献において記載され、それらから参照により組み込まれる:Zuker,M.(2003)Nucleic Acids Res.,31(13):3406-15;Mathews,D.H.,Sabina,J.,Zuker,M.and Turner,D.H.(1999)J.Mol.Biol.288:911-940;Mathews,D.H.,Disney,M.D.,Childs,J.L.,Schroeder,S.J.,Zuker,M.,and Turner,D.H.(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.101:7287-7292;Duan,S.,Mathews,D.H.,and Turner,D.H.(2006)Biochemistry 45:9819-9832;Wuchty,S.,Fontana,W.,Hofacker,I.L.,and Schuster,P.(1999)Biopolymers 49:145-165。

【００６４】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、５'および/または３'末端の突出を含有する。ポリヌクレオチドの一端におけるヌクレオチド突出の数および/または配列は、ポリヌクレオチドの他端と同じであっても異なっていてもよい。ある態様において、突出ヌクレオチドの１以上は、ホスホロチオアートまたは２'-ＯＭｅ修飾などの化学修飾(単数または複数)を含有してもよい。

【００６５】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、未修飾である。他の態様において、少なくとも１つのヌクレオチドが修飾されている。さらなる態様において、修飾は、ガイド配列の５'末端から２つ目のヌクレオチドにおいて、２'-Ｈまたは２'-修飾されたリボース糖を含む。「２つ目のヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドの５'末端から２つ目のヌクレオチドとして定義される。

【００６６】

本明細書に使用される「２'修飾されたリボース糖」は、２'-ＯＨ基を有さないリボース糖を含む。「２'修飾されたリボース糖」は、(未修飾の基準のＤＮＡヌクレオチドにお

いて見出される)2'-デオキシリボースを含まない。例えば、2'修飾されているリボース糖は、2'-O-アルキルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチドまたはこれらの組み合わせであってもよい。

【００６７】

ある態様において、2'修飾されているヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチド(例として、C/U)である。2'-O-アルキルヌクレオチドの例は、2'-O-メチルヌクレオチドまたは2'-O-アリルヌクレオチドを含む。

【００６８】

ある態様において、上述の5'末端修飾を持つ本発明のｓｄ-ｒｘＲＮＡポリヌクレオチドは、特定された5'末端修飾がない類似のコンストラクトと比較したとき、有意に(例えば、少なくとも約２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％またはそれを超えて)より低い「オフ・ターゲット(off-target)」遺伝子サイレンシングを呈し、よって、ＲＮＡｉ試薬または治療の全体的な特異性を大きく改善する。

【００６９】

本明細書に使用される「オフ・ターゲット」遺伝子サイレンシングは、例えばアンチセンス(ガイド)配列と、意図しない標的ｍＲＮＡ配列との間の偽の配列相同性に起因する、意図しない遺伝子サイレンシングを指す。

本発明のこの側面に従うと、あるガイド鎖修飾は、ＲＮＡｉ活性を有意に低下させることなく(またはＲＮＡｉ活性を全く低下させずに)、ヌクレアーゼ安定性をさらに増大させ、および/または、インターフェロン誘導を低下させる。

【００７０】

ある修飾の組み合わせは、標的遺伝子の発現を阻害する能力の増強、血清安定性の増強、および/または、標的特異性の増大などにより部分的に表わされる、さらなる予想外の利点をもたらしてもよい。

ある態様において、ガイド鎖は、ガイド鎖の5'末端における2番目のヌクレオチドにて、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含み、かつ、他の修飾ヌクレオチドを含まない。

【００７１】

他の側面において、本発明の化学修飾された二本鎖核酸分子構造は、マイクロＲＮＡ機構によって、配列依存的な遺伝子サイレンシングを媒介する。本明細書に使用される用語「マイクロＲＮＡ」(「ｍｉＲＮＡ」)はまた、当該技術分野において、「小分子ＲＮＡ(small temporal RNA)」(「ｓｔＲＮＡ」)としても言及され、遺伝子的に(例えば、ウイルス、哺乳動物または植物ゲノムにより)コードされる小さい(１０～５０ヌクレオチドの)ＲＮＡであって、ＲＮＡサイレンシングを指向または媒介することができるものを指す。「ｍｉＲＮＡ障害」は、ｍｉＲＮＡの異常な発現または活性により特徴づけられる疾患または障害を指すべきである。

【００７２】

マイクロＲＮＡは、マウス、線虫および哺乳動物において、発生またはがんなどの重要な経路において標的遺伝子を下方制御することに関与する。マイクロＲＮＡ機構を通した遺伝子サイレンシングは、ｍｉＲＮＡとその標的メッセンジャーＲＮＡ(ｍＲＮＡ)との特異的であるがなお不完全な塩基対形成により、達成される。標的ｍＲＮＡ発現のマイクロＲＮＡ媒介性の下方制御において、多様な機構が使用されてもよい。

【００７３】

ｍｉＲＮＡは、およそ２２ヌクレオチドの非コードＲＮＡであって、植物および動物の発生の間中、転写後または翻訳後のレベルにて、遺伝子発現を制御し得る。ｍｉＲＮＡの１つの共通の特徴は、それらがプレｍｉＲＮＡ(pre-miRNA)と称されるおよそ７０ヌクレオチドの前駆体ＲＮＡステムループから、恐らくはＲＮａｓｅＩＩＩ型酵素であるダイサーまたはそのホモログによって、切り取られることである。天然に存在するｍｉＲＮＡは、in vivoで内因性遺伝子により発現され、ヘアピンまたはステムループ前駆体(プレｍｉＲＮＡまたはプリｍｉＲＮＡ(pri-miRNA))から、ダイサーまたは他のＲＮＡｓｅに

よりプロセッシングされる。ｍｉＲＮＡは、in vivoで二本鎖デュプレックス(doublestranded duplex)として一過性に存在し得るが、一方の鎖のみが遺伝子サイレンシングを指揮するためにＲＩＳＣ複合体に取り込まれる。

【００７４】

いくつかの態様において、細胞取り込みおよびｍｉＲＮＡ活性の阻害において有効な化学修飾された二本鎖核酸分子化合物のバージョンが記載される。化合物は本質的に、ＲＩＳＣ侵入性のバージョンに類似するが、大きな鎖の化学修飾パターンは、切断を遮断してＲＩＳＣ作用の効果的な阻害剤として作用する。例えば、化合物は、先に記載のホスホロチオアート含有物で完全にまたはほとんどにおいてO-メチル修飾されていてもよい。これらの型の化合物について、いくつかの態様においては、５'リン酸化は必要でない。二本鎖領域の存在は、細胞取り込みおよび効率的なＲＩＳＣローディングを促進するので、好ましい。

【００７５】

低分子ＲＮＡを配列特異的レギュレーターとして使用する別の経路は、ＲＮＡ干渉(ＲＮＡｉ)経路であり、これは、細胞における二本鎖ＲＮＡ(ｄｓＲＮＡ)の存在に対する、進化的に保存された応答である。ｄｓＲＮＡは、ダイサーにより、～２０塩基対(ｂｐ)デュプレックスの低分子干渉ＲＮＡ(ｓｉＲＮＡ)へと切断される。これらの低分子ＲＮＡは、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体(ＲＩＳＣ)と称される多タンパク質エフェクター複合体へと集合させられる。ｓｉＲＮＡは次いで、完璧な相補性を持つ標的ｍＲＮＡの切断をガイドする。

【００７６】

バイオジェネシス、タンパク質複合体および機能のいくつかの側面は、ｓｉＲＮＡ経路とｍｉＲＮＡ経路との間で共有される。一本鎖ポリヌクレオチドは、ｓｉＲＮＡ機構においてｄｓＲＮＡを模倣しても、または、ｍｉＲＮＡ機構においてマイクロＲＮＡを模倣してもよい。

【００７７】

ある態様において、修飾ＲＮＡｉコンストラクトは、同じ配列を有する未修飾ＲＮＡｉコンストラクトと比較して、改善された血清および/または脳脊髄液中の安定性を有してもよい。

【００７８】

ある態様において、ＲＮＡｉコンストラクトの構造は、ヒト、マウスおよび他のげっ歯類ならびに他の非ヒト哺乳動物からの初代細胞を含む哺乳動物の初代細胞などの初代細胞において、インターフェロン応答を誘導しない。ある態様において、ＲＮＡｉコンストラクトはまた、無脊椎生物において標的遺伝子の発現を阻害するためにも使用されてもよい。

【００７９】

対象となるコンストラクトのin vivoでの安定性をさらに増大させるために、構造の３'末端は、保護基(単数または複数)により遮断されてもよい。例えば反転(inverted)ヌクレオチド、反転脱塩基部分またはアミノ末端修飾ヌクレオチドなどの保護基が使用されてもよい。反転ヌクレオチドは、反転デオキシヌクレオチドを含んでもよい。反転脱塩基部分は、３',３'連結または５',５'連結されたデオキシ脱塩基部分などの、反転デオキシ脱塩基部分を含んでもよい。

【００８０】

本発明のＲＮＡｉコンストラクトは、標的遺伝子(単数または複数)によりコードされるあらゆる標的タンパク質の合成を阻害することができる。本発明は、細胞において、in vitroまたはin vivoのいずれかで、標的遺伝子の発現を阻害する方法を含む。したがって、本発明のＲＮＡｉコンストラクトは、標的遺伝子の過剰発現により特徴づけられる疾患を持つ患者を処置するのに有用である。

【００８１】

標的遺伝子は、細胞にとって内因性であっても外因性(例えば、ウイルスにより、また

は、組み換えＤＮＡ技術を使用して、細胞に導入されたもの)であってもよい。かかる方法は、標的遺伝子の発現を阻害するために十分な量でのＲＮＡの細胞内への導入を含んでもよい。例えば、かかるＲＮＡ分子は、組成物が標的遺伝子の発現を阻害するように、標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的なガイド鎖を有してもよい。

【００８２】

本発明はまた、本発明の核酸を発現するベクター、および、かかるベクターまたは核酸を含む細胞にも関する。細胞は、in vivoのまたは培養中の、ヒト細胞などの哺乳動物細胞であり得る。

本発明はさらに、対象となるＲＮＡｉコンストラクトと薬学的に許容し得るキャリアまたは希釈剤とを含む、組成物に関する。

方法は、in vitroで、ex vivoで、または、in vivoで、例えば、培養中のヒト細胞などの培養中の哺乳動物細胞において行ってもよい。

【００８３】

標的細胞(例えば哺乳動物細胞)は、脂質(例えばカチオン性脂質)またはリポソームなどの送達試薬の存在下において、接触させられてもよい。

本発明の別の側面は、哺乳動物細胞を、対象となるＲＮＡｉコンストラクトを発現するベクターと接触させることを含む、哺乳動物細胞において標的遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。

【００８４】

本発明の一側面において、約１６～約３０ヌクレオチドの範囲のサイズである第１のポリヌクレオチドと、約２６～約４６ヌクレオチドの範囲のサイズである第２のポリヌクレオチドとを含む、より長いデュプレックスポリヌクレオチドが提供され、ここで、第１のポリヌクレオチド(アンチセンス鎖)は、第２のポリヌクレオチド(センス鎖)および標的遺伝子の両方に対して相補的であり、両方のポリヌクレオチドは、デュプレックスを形成し、ここで、第１のポリヌクレオチドは、長さが６塩基より長い一本鎖領域を含有し、別の化学修飾パターンにより修飾されており、および/または、細胞送達を容易にする抱合体部分を含む。この態様において、パッセンジャー鎖のヌクレオチドの約４０～約９０％、ガイド鎖のヌクレオチドの約４０～約９０％、第１のポリヌクレオチドの一本鎖領域のヌクレオチドの約４０～約９０％が、化学修飾ヌクレオチドである。

【００８５】

一態様において、ポリヌクレオチドデュプレックス中の化学修飾ヌクレオチドは、上で詳細に議論されたものなどの、当該技術分野において知られているいずれの化学修飾ヌクレオチドであってもよい。特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、２'Ｆ修飾ヌクレオチド、２'-Ｏ-メチル修飾されたものおよび２'デオキシヌクレオチドからなる群より選択される。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド塩基の「疎水性修飾」から生じる。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドはホスホロチオアートである。さらなる別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオアート、２'-Ｏ-メチル、２'デオキシ、疎水性修飾およびホスホロチオアートの組み合わせである。これらの群の修飾が、リボース環、骨格およびヌクレオチドの修飾を指すなら、いくつかの修飾ヌクレオチドが、３つの修飾の型全ての組み合わせを持つことも実行可能である。

【００８６】

別の態様において、化学修飾は、デュプレックスの多様な領域にわたって同一ではない。特定の態様において、第１のポリヌクレオチド(パッセンジャー鎖)は、多数の多様な化学修飾を、多様な部位において有する。このポリヌクレオチドについて、ヌクレオチドの９０％までが化学修飾されていてもよく、および/または、導入されたミスマッチを有していてもよい。

【００８７】

別の態様において、第１のまたは第２のポリヌクレオチドの化学修飾は、これらに限定されないが、５'位のウリジンおよびシトシンの修飾(４-ピリジル、２-ピリジル、インド

リル、フェニル(C6H5OH);トリプトファニル(C8H6N)CH2CH(NH2)CO)、イソブチル、ブチル、アミノベンジル;フェニル;ナフチルなど)を含み、ここで、化学修飾は、ヌクレオチドの塩基対形成能力を変化させる場合がある。ガイド鎖について、本発明のこの側面の重要な特徴は、アンチセンスの5'末端に対する化学修飾の位置および配列である。例えば、ガイド鎖の5'末端の化学的リン酸化は通常、効力のために有益である。センス鎖のシード領域(5'末端に対して2～7位)におけるO-メチル修飾は、一般に良好な耐性を示さないが、一方、2'Fおよびデオキシは、良好な耐性を示す。ガイド鎖の中間部分およびガイド鎖の3'末端は、適用される化学修飾の型において、より許容的である。デオキシ修飾は、ガイド鎖の3'末端においては、耐性を示さない。

【００８８】

本発明のこの側面のユニークな特徴は、塩基に対する疎水性の修飾の使用を伴う。一態様において、疎水性修飾は好ましくは、ガイド鎖の5'末端付近に位置し、他の態様においては、それらはガイド鎖の中間に局在し、他の態様においては、それらはガイド鎖の3'末端に局在し、さらに別の態様において、それらは、ポリヌクレオチドの全長を通して分布する。同じ型のパターンが、デュプレックスのパッセンジャー鎖に適用可能である。

分子の他方の部分は、一本鎖領域である。一本鎖領域は、７から４０までのヌクレオチドの範囲であると予測される。

【００８９】

一態様において、第１のポリヌクレオチドの一本鎖領域は、４０％～９０％の疎水性塩基修飾、４０％～９０％のホスホロチオアート、４０％～９０％のリボース部分の修飾、および、前述のもののあらゆる組み合わせからなる群より選択される修飾を含有する。

ガイド鎖(第１のポリヌクレオチド)のＲＩＳＣ複合体中へのローディングの効率は、重度に修飾されたポリヌクレオチドについて変わる場合があるので、一態様においては、効率的なガイド鎖のローディングを促進するために、デュプレックスポリヌクレオチドは、ガイド鎖(第１のポリヌクレオチド)上のヌクレオチド９、１１、１２、１３または１４と、センス鎖(第２のポリヌクレオチド)上の反対のヌクレオチドとの間のミスマッチを含む。

【００９０】

デュプレックスの特徴

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、２つの別々の相補的な核酸鎖により形成されてもよい。デュプレックス形成は、標的遺伝子を含有する細胞の内側または外側のいずれかで生じ得る。

【００９１】

本明細書に使用される用語「デュプレックス(duplex)」は、相補的な配列に水素結合している二本鎖(double-stranded)核酸分子(単数または複数)の領域を含む。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子に対してセンスであるヌクレオチド配列、および、標的遺伝子に対してアンチセンスである相補配列を含んでもよい。センスおよびアンチセンスヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列に対応し、例えば、標的遺伝子配列と同一であるかまたは標的遺伝子の阻害をもたらすために十分に同一(例えば、ほぼ少なくとも約９８％同一、９６％同一、９４％、９０％同一、８５％同一または８０％同一)である。

【００９２】

ある態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子のいずれの末端においても突出する一本鎖配列を有さない、すなわち、平滑末端である。他の態様において、個々の核酸分子は、異なる長さであってもよい。言い換えると、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖でない。例として、２つの別々の核酸分子が使用されるとき、分子の一方、例えばアンチセンス配列を含む第１の分子は、それにハイブリダイズする第２の分子より長くてもよい(分子の一部を一本鎖とする)。同様に、単一の核酸分子が使用されるとき、分子のいずれかの末端の部分が一本鎖のままであり得る。

【００９３】
一態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチおよび/またはループまたはバルジを含有するが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。ある態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５個までのミスマッチを含有する。

【００９４】
修飾
本発明のヌクレオチドは、糖部分、ホスホジエステル連結部および/または塩基を含む、多様な位置において修飾されてもよい。

【００９５】
いくつかの態様において、ヌクレオシドの塩基部分は修飾されてもよい。例えば、ピリミジン塩基はピリミジン環の２、３、４、５、および/または６位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、シトシンの環外アミンが修飾されてもよい。プリン塩基もまた修飾されてもよい。例えば、プリン塩基は、１、２、３、６、７または８位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、アデニンの環外アミンが修飾されてもよい。いくつかのケースにおいて、塩基部分の環の窒素原子は、例えば炭素などの別の原子で置換されてもよい。塩基部分への修飾は、いずれの好適な修飾でもあってもよい。修飾の例は当業者に知られている。いくつかの態様において、塩基の修飾は、アルキル化プリンまたはピリミジン、アシル化プリンまたはピリミジン、または、その他のヘテロ環を含む。

【００９６】
いくつかの態様において、ピリミジンは５位において修飾されてもよい。例えばピリミジンの５位は、アルキル基、アルキニル基、アルケニル基、アシル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。他の例において、ピリミジンの５位は、ヒドロキシル基またはアルコキシル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。また、ピリミジンのＮ$^4$位をアルキル化してもよい。さらに他の例において、ピリミジン５-６結合は飽和されていてもよく、ピリミジン環内の窒素原子は炭素原子により置換されてもよく、および/または、Ｏ$^2$またはＯ$^4$原子は、硫黄原子により置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

【００９７】
他の例において、プリンのＮ$^7$位および/またはＮ$^2$および/またはＮ$^3$位は、アルキル基またはその置換誘導体により修飾されてもよい。さらなる例において、第３環はプリン二環系に縮合されてもよく、および/または、プリン環系内の窒素原子は炭素原子で置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。
５位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5591843号、米国特許第7,205,297号、米国特許第6,432,963号および米国特許第6,020,483号に開示されており;Ｎ$^4$位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5,580,731号に開示されており;８位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第6,355,787号および米国特許第5,580,972号に開示されており;Ｎ$^6$位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,853,386号、米国特許第5,789,416号および米国特許第7,041,824号に開示されており;ならびに２位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,201,860号および米国特許第5,587,469号に開示されており;これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

【００９８】

修飾塩基の非限定的例は、$N^4$,$N^4$-エタノシトシン、7-デアザキサントシン、7-デアザグアノシン、8-オキソ-$N^6$-メチルアデニン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、$N^6$-イソペンテニル-アデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、$N^6$-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-$N^6$-イソペンテニルアデニン、プソイドウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、2-チオシトシンおよび2,6-ジアミノプリンを含む。いくつかの態様において、塩基部分はプリンまたはピリミジン以外のヘテロ環式塩基であってもよい。ヘテロ環式塩基は任意に修飾および/または置換されてもよい。

【００９９】

糖部分は、天然の未修飾糖、例えば単糖(ペントース、例えばリボース、デオキシリボース)、修飾糖および糖アナログを含む。一般に、可能なヌクレオモノマーの修飾、特に糖部分のものは、例えば、１以上のヒドロキシル基のハロゲン、ヘテロ原子、脂肪族基での置き換え、または、ヒドロキシル基の、エーテル、アミン、チオールなどとしての官能化を含む。

【０１００】

修飾ヌクレオモノマーの有用な一群は、2'-O-メチルヌクレオチドである。かかる2'-O-メチルヌクレオチドは、「メチル化されている」として言及されてもよく、対応するヌクレオチドは、非メチル化ヌクレオチドからアルキル化により、または直接的にメチル化ヌクレオチド試薬から、作られる。修飾ヌクレオモノマーは、未修飾ヌクレオモノマーと組み合わせて使用されてもよい。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、メチル化および非メチル化ヌクレオモノマーの両方を含有してもよい。

【０１０１】

いくつかの例示的な修飾ヌクレオモノマーは、糖または骨格(backbone)が修飾されたリボヌクレオチドを含む。修飾リボヌクレオチドは、5'位で修飾されたウリジンまたはシチジン、例えば5'-(2-アミノ)プロピルウリジンおよび5'-ブロモウリジン;8位で修飾されたアデノシンおよびグアノシン、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;ならびにN-アルキル化ヌクレオチド、例えばＮ６-メチルアデノシンなどの、天然に存在しない塩基を(天然に存在する塩基の代わりに)含有してもよい。また、糖修飾リボヌクレオチドは、Ｈ、アルコキシ(もしくはＯＲ)、Ｒもしくはアルキル、ハロゲン、ＳＨ、ＳＲ、アミノ($NH_2$、ＮＨＲ、$NR_2$など)またはＣＮ基で置き換えられた2'-ＯＨ基をも有していてもよく、ここで、Ｒは、低級アルキル、アルケニルまたはアルキニルである。

【０１０２】

修飾リボヌクレオチドはまた、修飾基、例えばホスホロチオアート基により置き換えられた、隣接するリボヌクレオチドに繋げられたホスホジエステル基をも有してもよい。より一般的には、多様なヌクレオチド修飾が組み合わされてもよい。

【０１０３】

アンチセンス(ガイド)鎖は、標的遺伝子(単数または複数)の少なくとも一部に対して実質的に同一であってもよいが、少なくとも塩基対形成特性に関連して、配列は、有用であるため、例えば標的遺伝子の表現型の発現を阻害するために、完全に同一である必要はない。一般により高い相同性は、より短いアンチセンス遺伝子の使用を埋め合わせるために使用され得る。いくつかのケースにおいて、アンチセンス鎖は、一般に、標的遺伝子に対して(アンチセンス方向において)実質的に同一であろう。

2'-O-メチル修飾ＲＮＡの使用はまた、細胞ストレス応答を最少化することが望ましい状況においても有益であり得る。2'-O-メチルヌクレオモノマーを有するＲＮＡは、

未修飾ＲＮＡを認識すると考えられる細胞機構によって認識され得ない。２'-Ｏ-メチル化されたかまたは部分的に２'-Ｏ-メチル化されたＲＮＡは、標的ＲＮＡ阻害を維持しつつ、二本鎖核酸に対するインターフェロン応答を回避し得る。これは、例えば、インターフェロンまたは他の細胞ストレス応答を回避するために、インターフェロン応答を誘導する短いＲＮＡｉ(例えばｓｉＲＮＡ)配列、および、インターフェロン応答を誘導し得るより長いＲＮＡｉ配列の両方において、有用であり得る。

【０１０４】

全体として、修飾糖は、Ｄ-リボース、２'-Ｏ-アルキル(２'-Ｏ-メチルおよび２'-Ｏ-エチルを含む)、すなわち、２'-アルコキシ、２'-アミノ、２'-Ｓ-アルキル、２'-ハロ(２'-フルオロを含む)、２'-メトキシエトキシ、２'-アリルオキシ(-ＯＣＨ$_2$ＣＨ=ＣＨ$_2$)、２'-プロパルギル、２'-プロピル、エチニル、エテニル、プロペニルならびにシアノなどを含む。一態様において、糖部分は、記載されるように(Augustyns,K.,et al.,Nucl.Acids.Res.18:4711(1992))、ヘキソースであってもよく、オリゴヌクレオチド中に組み込まれてもよい。例示的なヌクレオモノマーは、例えば米国特許第5,849,902号において見出され得、これは本明細書に参照により組み込まれる。

具体的な官能基の定義および化学用語は、以下にさらに詳細に記載される。本発明の目的のために、化学元素はCAS versionのHandbook of Chemistry and Physics,75th Ed.の内表紙の元素周期表に従って同定され、具体的な官能基はこれに記載のようにして一般的に定義される。さらに、有機化学の一般原理ならびに具体的な官能部分および反応性は、Organic Chemistry,Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999に記載され、この内容の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【０１０５】

本発明のある化合物は、特定の幾何学的形態または立体異性形態で存在してもよい。本発明は全てのかかる化合物を考慮し、これにはｃｉｓ-およびｔｒａｎｓ-異性体、Ｒ-およびＳ-鏡像異性体、ジアステレオマー、(Ｄ)-異性体、(Ｌ)-異性体、これらのラセミ混合物、および、これらのその他の混合物を、本発明の範囲内であるとして含む。追加の不斉炭素原子が、アルキル基などの置換基中に存在してよい。全てのかかる異性体およびこれらの混合物は、本発明に含むことが意図される。

【０１０６】

種々の異性体比のいずれかを含有する異性体混合物は、本発明に従って利用されてもよい。例えば、２種の異性体のみが組み合わせられるとき、５０:５０、６０:４０、７０:３０、８０:２０、９０:１０、９５:５、９６:４、９７:３、９８:２、９９:１または１００:０の異性体比を含有する混合物は全て、本発明に企図される。当業者は容易に、さらに複雑な異性体混合物について類似の比率が企図されることを理解するであろう。

【０１０７】

例として、本発明の化合物の特定のエナンチオマーが所望される場合、これは不斉合成により、または、キラル補助基による誘導体化により調製されてもよく、ここで得られたジアステレオマー混合物は分離され、補助基が切断されて、純粋な所望のエナンチオマーが提供される。代わりに、分子がアミノなどの塩基性官能基を含有する場合またはカルボキシルなどの酸性官能基を含有する場合、ジアステレオマー塩が、適切な光学活性酸または塩基により形成され、次いでこうして形成されたジアステレオマーが、当該技術分野において周知の分別結晶化またはクロマトグラフィー手段により分割され、続いて純粋なエナンチオマーが回収される。

【０１０８】

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、３'および５'終端(termini)を含む(環状オリゴヌクレオチドを除く)。一態様において、オリゴヌクレオチドの３'および５'終端は、例えば３'または５'結合を修飾することにより、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る(例えば米国特許第5,849,902号およびWO98/13526)。例えば、オリゴヌクレオチドは「ブロック基(blocking group)」を含めることにより抵抗性になされ得る。本明細書に使用される用語「ブロック基」は、合成のための保護基または結合基の

どちらかとしてオリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに付着され得る、置換基(例えばＯＨ基以外のもの)を指す(例えば、ＦＩＴＣ、プロピル(ＣＨ$_2$-ＣＨ$_2$-ＣＨ$_3$)、グリコール(-Ｏ-ＣＨ$_2$-ＣＨ$_2$-Ｏ-)ホスファート(ＰＯ$_3^{2-}$)、ホスホン酸水素またはホスホロアミダイト)。「ブロック基」はまた、「末端ブロック基」または「エキソヌクレアーゼブロック基」をも含み、これらは、修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ抵抗性構造を含む、オリゴヌクレオチドの、３'および５'終端を保護する。

【０１０９】

例示の末端ブロック基は、キャップ構造(例えば７-メチルグアノシンキャップ)、反転(inverted)ヌクレオモノマー、例えば３'-３'または５'-５'末端反転を有するもの(例えばOrtiagao et al.1992.Antisense Res.Dev.2:129を参照)、メチルホスホナート、ホスホロアミダイト、非ヌクレオチド基(例えば、非ヌクレオチドリンカー、アミノリンカー、抱合体)などを含む。３'末端ヌクレオモノマーは、修飾糖部分を含み得る。３'末端ヌクレオモノマーは、オリゴヌクレオチドの３'-エキソヌクレアーゼ分解を防ぐブロック基により任意に置換され得る３'-Ｏを含む。例えば、３'-ヒドロキシルは、３'→３'ヌクレオチド間連結物を介してヌクレオチドにエステル化され得る。例えば、アルキルオキシラジカルは、メトキシ、エトキシまたはイソプロポキシであり得、好ましくはエトキシである。任意に、３'末端における３'→３'結合ヌクレオチドは、代替連結により連結され得る。ヌクレアーゼ分解を低減するために、最も５'の３'→５'連結部は、修飾連結部、例えばホスホロチオアートまたはＰ-アルキルオキシホスホトリエステル連結部であることができる。好ましくは、２つの最も５'の３'→５'連結物は、修飾連結部である。任意に、５'末端ヒドロキシ部分は、リン含有部分、例えば、ホスファート、ホスホロチオアートまたはＰ-エトキシホスファートで、エステル化され得る。

【０１１０】

合成方法が、本明細書に記載のとおり、種々の保護基を利用することを、当業者は理解するであろう。本明細書で使用される用語「保護基」は、特定の官能部分、例えばＯ、ＳまたはＮを一時的に遮断して、多官能性化合物における別の反応部位にて反応が選択的に行われ得ることを意味する。ある態様において、保護基は良好な収率で選択的に反応して、計画された反応に対して安定である、保護された基質を与える;保護基は、容易に利用可能で好ましくは非毒性の、他の官能基を攻撃しない試薬により、良好な収率で選択的に除去可能であるべきである;保護基は、容易に分離可能な誘導体を(より好ましくは、新しい立体中心の生成なしに)形成する;および、保護基は、さらなる反応部位を有することを回避するために最小限の追加の官能性を有する。

【０１１１】

本明細書に詳述されるとおり、酸素、硫黄、窒素および炭素の保護基が利用されてもよい。

ヒドロキシル保護基は以下を含む:メチル、メトキシルメチル(ＭＯＭ)、メチルチオメチル(ＭＴＭ)、ｔ-ブチルチオメチル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチル(ＳＭＯＭ)、ベンジルオキシメチル(ＢＯＭ)、ｐ-メトキシベンジルオキシメチル(ＰＭＢＭ)、(４-メトキシフェノキシ)メチル(ｐ-ＡＯＭ)、グアイアコルメチル(ＧＵＭ)、ｔ-ブトキシメチル、４-ペンテニルオキシメチル(ＰＯＭ)、シロキシメチル、２-メトキシエトキシメチル(ＭＥＭ)、２,２,２-トリクロロエトキシメチル、ビス(２-クロロエトキシ)メチル、２-(トリメチルシリル)エトキシメチル(ＳＥＭＯＲ)、テトラヒドロピラニル(ＴＨＰ)、３-ブロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、１-メトキシシクロヘキシル、４-メトキシテトラヒドロピラニル(ＭＴＨＰ)、４-メトキシテトラヒドロチオピラニル、４-メトキシテトラヒドロチオピラニルＳ,Ｓ-ジオキシド、１-［(２-クロロ-４-メチル)フェニル］-４-メトキシピペリジン-４-イル(ＣＴＭＰ)、１,４-ジオキサン-２-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、２,３,３ａ,４,５,６,７,７ａ-オクタヒドロ-７,８,８-トリメチル-４,７-メタノベンゾフラン-２-イル、

【０１１２】

１-エトキシエチル、１-(２-クロロエトキシ)エチル、１-メチル-１-メトキシエチル、１

-メチル-１-ベンジルオキシエチル、１-メチル-１-ベンジルオキシ-２-フルオロエチル、２,２,２-トリクロロエチル、２-トリメチルシリルエチル、２-(フェニルセレニル)エチル、ｔ-ブチル、アリル、ｐ-クロロフェニル、ｐ-メトキシフェニル、２,４-ジニトロフェニル、ベンジル、ｐ-メトキシベンジル、３,４-ジメトキシベンジル、ｏ-ニトロベンジル、ｐ-ニトロベンジル、ｐ-ハロベンジル、２,６-ジクロロベンジル、ｐ-シアノベンジル、ｐ-フェニルベンジル、２-ピコリル、４-ピコリル、３-メチル-２-ピコリルＮ-オキシド、ジフェニルメチル、ｐ,ｐ'-ジニトロベンズヒドリル、５-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、α-ナフチルジフェニルメチル、ｐ-メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ(ｐ-メトキシフェニル)フェニルメチル、トリ(ｐ-メトキシフェニル)メチル、４-(４'-ブロモフェナシルオキシフェニル)ジフェニルメチル、４,４',４''-トリス(４,５-ジクロロフタルイミドフェニル)メチル、４,４',４''-トリス(レブリノイルオキシフェニル)メチル、４,４',４''-トリス(ベンゾイルオキシフェニル)メチル、３-(イミダゾール-１-イル)ビス(４',４''-ジメトキシフェニル)メチル、１,１-ビス(４-メトキシフェニル)-１'-ピレニルメチル、９-アントリル、９-(９-フェニル)キサンテニル、９-(９-フェニル-１０-オキソ)アントリル、１,３-ベンゾジチオラン-２-イル、ベンズイソチアゾリルＳ,Ｓ-ジオキシド、

【０１１３】

トリメチルシリル(ＴＭＳ)、トリエチルシリル(ＴＥＳ)、トリイソプロピルシリル(ＴＩＰＳ)、ジメチルイソプロピルシリル(ＩＰＤＭＳ)、ジエチルイソプロピルシリル(ＤＥＩＰＳ)、ジメチルテキシルシリル(dimethylthexylsilyl)、ｔ-ブチルジメチルシリル(ＴＢＤＭＳ)、ｔ-ブチルジフェニルシリル(ＴＢＤＰＳ)、トリベンジルシリル、トリ-ｐ-キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル(ＤＰＭＳ)、ｔ-ブチルメトキシフェニルシリル(ＴＢＭＰＳ)、ホルマート、ベンゾイルホルマート、アセタート、クロロアセタート、ジクロロアセタート、トリクロロアセタート、トリフルオロアセタート、メトキシアセタート、トリフェニルメトキシアセタート、フェノキシアセタート、ｐ-クロロフェノキシアセタート、３-フェニルプロピオナート、４-オキソペンタノアート(レブリナート)、４,４-(エチレンジチオ)ペンタノアート(レブリノイルジチオアセタール)、ピバロアート、アダマントアート、クロトナート、４-メトキシクロトナート、ベンゾアート、ｐ-フェニルベンゾアート、２,４,６-トリメチルベンゾアート(メシトアート)、

【０１１４】

アルキルメチルカルボナート、９-フルオレニルメチルカルボナート(Ｆｍｏｃ)、アルキルエチルカルボナート、アルキル２,２,２-トリクロロエチルカルボナート(Ｔｒｏｃ)、２-(トリメチルシリル)エチルカルボナート(ＴＭＳＥＣ)、２-(フェニルスルホニル)エチルカルボナート(Ｐｓｅｃ)、２-(トリフェニルホスホニオ)エチルカルボナート(Ｐｅｏｃ)、アルキルイソブチルカルボナート、アルキルビニルカルボナートアルキルアリルカルボナート、アルキルｐ-ニトロフェニルカルボナート、アルキルベンジルカルボナート、アルキルｐ-メトキシベンジルカルボナート、アルキル３,４-ジメトキシベンジルカルボナート、アルキルｏ-ニトロベンジルカルボナート、アルキルｐ-ニトロベンジルカルボナート、アルキルＳ-ベンジルチオカルボナート、４-エトキシ-１-ナフチルカルボナート、メチルジチオカルボナート、

【０１１５】

２-ヨードベンゾアート、４-アジドブチラート、４-ニトロ-４-メチルペンタノアート、ｏ-(ジブロモメチル)ベンゾアート、２-フォルミルベンゼンスルホナート、２-(メチルチオメトキシ)エチル、４-(メチルチオメトキシ)ブチラート、２-(メチルチオメトキシメチル)ベンゾアート、２,６-ジクロロ-４-メチルフェノキシアセタート、２,６-ジクロロ-４-(１,１,３,３-テトラメチルブチル)フェノキシアセタート、２,４-ビス(１,１-ジメチルプロピル)フェノキシアセタート、クロロジフェニルアセタート、イソブチラート、モノスクシノアート、(Ｅ)-２-メチル-２-ブテノアート、ｏ-(メトキシカルボニル)ベンゾアート、α-ナフトアート、ニトラート、アルキルＮ,Ｎ,Ｎ',Ｎ'-テトラメチルホスホロジアミダート、アルキルＮ-フェニルカルバマート、ボラート、ジメチルホスフィノチオイル、

アルキル２,４-ジニトロフェニルスルフェナート(dinitrophenylsulfenate)、スルファート、メタンスルホナート(メシラート)、ベンジルスルホナートおよびトシラート(Ｔｓ)。

【０１１６】

１,２-または１,３-ジオールを保護するためには、保護基は以下を含む:メチレンアセタール、エチリデンアセタール、１-ｔ-ブチルエチリデンケタール、１-フェニルエチリデンケタール、(４-メトキシフェニル)エチリデンアセタール、２,２,２-トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、ｐ-メトキシベンジリデンアセタール、２,４-ジメトキシベンジリデンケタール、３,４-ジメトキシベンジリデンアセタール、２-ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルトエステル、１-メトキシエチリデンオルトエステル、１-エトキシエチリデンオルトエステル、１,２-ジメトキシエチリデンオルトエステル、α-メトキシベンジリデンオルトエステル、１-(Ｎ,Ｎ-ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、α-(Ｎ,Ｎ'-ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、２-オキサシクロペンチリデンオルトエステル、ジ-ｔ-ブチルシリレン基(ＤＴＢＳ)、１,３-(１,１,３,３-テトライソプロピルジシロキサニリデン)誘導体(ＴＩＰＤＳ)、テトラ-ｔ-ブトキシジシロキサン-１,３-ジイリデン誘導体(ＴＢＤＳ)、環状カルボナート、環状ボロナート、エチルボロナートおよびフェニルボロナート。

【０１１７】

アミノ保護基は、以下を含む:メチルカルバマート、エチルカルバマート、９-フルオレニルメチルカルバマート(Ｆｍｏｃ)、９-(２-スルホ)フルオレニルメチル(fluoro enyl methyl)カルバマート、９-(２,７-ジブロモ)フルオレニルメチルカルバマート、２,７-ジ-ｔ-ブチル-［９-(１０,１０-ジオキソ-１０,１０,１０,１０-テトラヒドロチオキサンチル)］メチルカルバマート(ＤＢＤ-Ｔｍｏｃ)、４-メトキシフェナシルカルバマート(Ｐｈｅｎｏｃ)、２,２,２-トリクロロエチルカルバマート(Ｔｒｏｃ)、２-トリメチルシリルエチルカルバマート(Ｔｅｏｃ)、２-フェニルエチルカルバマート(ｈＺ)、１-(１-アダマンチル)-１-メチルエチルカルバマート(Ａｄｐｏｃ)、１,１-ジメチル-２-ハロエチルカルバマート、１,１-ジメチル-２,２-ジブロモエチルカルバマート(ＤＢ-ｔ-ＢＯＣ)、１,１-ジメチル-２,２,２-トリクロロエチルカルバマート(ＴＣＢＯＣ)、１-メチル-１-(４-ビフェニルイル)エチルカルバマート(Ｂｐｏｃ)、１-(３,５-ジ-ｔ-ブチルフェニル)-１-メチルエチルカルバマート(ｔ-Ｂｕｍｅｏｃ)、２-(２'-および４'-ピリジル)エチルカルバマート(Ｐｙｏｃ)、

【０１１８】

２-(Ｎ,Ｎ-ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチルカルバマート、ｔ-ブチルカルバマート(ＢＯＣ)、１-アダマンチルカルバマート(Ａｄｏｃ)、ビニルカルバマート(Ｖｏｃ)、アリルカルバマート(Ａｌｌｏｃ)、１-イソプロピルアリルカルバマート(Ｉｐａｏｃ)、シンナミルカルバマート(Ｃｏｃ)、４-ニトロシンナミルカルバマート(Ｎｏｃ)、８-キノリルカルバマート、Ｎ-ヒドロキシピペリジニルカルバマート、アルキルジチオカルバマート、ベンジルカルバマート(Ｃｂｚ)、ｐ-メトキシベンジルカルバマート(Ｍｏｚ)、ｐ-ニトロベンジルカルバマート、ｐ-ブロモベンジルカルバマート、ｐ-クロロベンジルカルバマート、２,４-ジクロロベンジルカルバマート、４-メチルスルフィニルベンジルカルバマート(Ｍｓｚ)、９-アントリルメチルカルバマート、ジフェニルメチルカルバマート、２-メチルチオエチルカルバマート、２-メチルスルホニルエチルカルバマート、

【０１１９】

２-(ｐ-トルエンスルホニル)エチルカルバマート、［２-(１,３-ジチアニル)］メチルカルバマート(Ｄｍｏｃ)、４-メチルチオフェニルカルバマート(Ｍｔｐｃ)、２,４-ジメチルチオフェニルカルバマート(Ｂｍｐｃ)、２-ホスホニオエチルカルバマート(Ｐｅｏｃ)、２-トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバマート(Ｐｐｏｃ)、１,１-ジメチル-２-シアノエチルカルバマート、ｍ-クロロ-ｐ-アシルオキシベンジルカルバマート、ｐ-(ジ

ヒドロキシボリル)ベンジルカルバマート、５-ベンズイソキサゾリルメチルカルバマート、２-(トリフルオロメチル)-６-クロモニルメチルカルバマート(Ｔｃｒｏｃ)、ｍ-ニトロフェニルカルバマート、３,５-ジメトキシベンジルカルバマート、ｏ-ニトロベンジルカルバマート、３,４-ジメトキシ-６-ニトロベンジルカルバマート、フェニル(ｏ-ニトロフェニル)メチルカルバマート、フェノチアジニル-(１０)-カルボニル誘導体、Ｎ'-ｐ-トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、Ｎ'-フェニルアミノチオカルボニル誘導体、

【０１２０】

ｔ-アミルカルバマート、Ｓ-ベンジルチオカルバマート、ｐ-シアノベンジルカルバマート、シクロブチルカルバマート、シクロヘキシルカルバマート、シクロペンチルカルバマート、シクロプロピルメチルカルバマート、ｐ-デシルオキシベンジルカルバマート、２,２-ジメトキシカルボニルビニルカルバマート、ｏ-(Ｎ,Ｎ-ジメチルカルボキサミド)ベンジルカルバマート、１,１-ジメチル-３-(Ｎ,Ｎ-ジメチルカルボキサミド)プロピルカルバマート、１,１-ジメチルプロピニルカルバマート、ジ(２-ピリジル)メチルカルバマート、２-フラニルメチルカルバマート、２-ヨードエチルカルバマート、イソボルニルカルバマート、イソブチルカルバマート、イソニコチニルカルバマート、ｐ-(ｐ'-メトキシフェニルアゾ)ベンジルカルバマート、１-メチルシクロブチルカルバマート、１-メチルシクロヘキシルカルバマート、１-メチル-１-シクロプロピルメチルカルバマート、１-メチル-１-(３,５-ジメトキシフェニル)エチルカルバマート、１-メチル-１-(ｐ-フェニルアゾフェニル)エチルカルバマート、１-メチル-１-フェニルエチルカルバマート、１-メチル-１-(４-ピリジル)エチルカルバマート、

【０１２１】

フェニルカルバマート、ｐ-(フェニルアゾ)ベンジルカルバマート、２,４,６-トリ-ｔ-ブチルフェニルカルバマート、４-(トリメチルアンモニウム)ベンジルカルバマート、２,４,６-トリメチルベンジルカルバマート、ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、３-フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、３-ピリジルカルボキサミド、Ｎ-ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、

【０１２２】

ベンズアミド、ｐ-フェニルベンズアミド、ｏ-ニトロフェニルアセトアミド、ｏ-ニトロフェノキシアセトアミド、アセトアセトアミド、(Ｎ'-ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ)アセトアミド、３-(ｐ-ヒドロキシフェニル)プロパンアミド、３-(ｏ-ニトロフェニル)プロパンアミド、２-メチル-２-(ｏ-ニトロフェノキシ)プロパンアミド、２-メチル-２-(ｏ-フェニルアゾフェノキシ)プロパンアミド、４-クロロブタンアミド、３-メチル-３-ニトロブタンアミド、ｏ-ニトロシンナミド、Ｎ-アセチルメチオニン誘導体、ｏ-ニトロベンズアミド、ｏ-(ベンゾイルオキシメチル)ベンズアミド、４,５-ジフェニル-３-オキサゾリン-２-オン、Ｎ-フタルイミド、Ｎ-ジチアスクシンイミド(Ｄｔｓ)、Ｎ-２,３-ジフェニルマレイミド、Ｎ-２,５-ジメチルピロール、Ｎ-１,１,４,４-テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物(ＳＴＡＢＡＳＥ)、

【０１２３】

５-置換１,３-ジメチル-１,３,５-トリアザシクロヘキサン-２-オン、５-置換１,３-ジベンジル-１,３,５-トリアザシクロヘキサン-２-オン、１-置換３,５-ジニトロ-４-ピリドン、Ｎ-メチルアミン、Ｎ-アリルアミン、Ｎ-［２-(トリメチルシリル)エトキシ］メチルアミン(ＳＥＭ)、Ｎ-３-アセトキシプロピルアミン、Ｎ-(１-イソプロピル-４-ニトロ-２-オキソ-３-ピロリン-３-イル)アミン、四級アンモニウム塩、Ｎ-ベンジルアミン、Ｎ-ジ(４-メトキシフェニル)メチルアミン、Ｎ-５-ジベンゾスベリルアミン、Ｎ-トリフェニルメチルアミン(Ｔｒ)、Ｎ-［(４-メトキシフェニル)ジフェニルメチル］アミン(ＭＭＴｒ)、Ｎ-９-フェニルフルオレニルアミン(ＰｈＦ)、Ｎ-２,７-ジクロロ-９-フルオレニルメチレンアミン、Ｎ-フェロセニルメチルアミノ(Ｆｃｍ)、Ｎ-２-ピコリルアミノＮ'-オキシド、Ｎ-１,１-ジメチルチオメチレンアミン、Ｎ-ベンジリデンアミン、Ｎ-ｐ-メトキシベンジリデンアミン、Ｎ-ジフェニルメチレンアミン、Ｎ-［(２-ピリジル)メシチル］メチ

レンアミン、N-(N',N'-ジメチルアミノメチレン)アミン、N,N'-イソプロピリデンジアミン、N-p-ニトロベンジリデンアミン、N-サリシリデンアミン、N-5-クロロサリシリデンアミン、N-(5-クロロ-2-ヒドロキシフェニル)フェニルメチレンアミン、N-シクロヘキシリデンアミン、N-(5,5-ジメチル-3-オキソ-1-シクロヘキセニル)アミン、

【0124】

N-ボラン誘導体、N-ジフェニルボリン酸誘導体、N-［フェニル(ペンタカルボニルクロム-またはタングステン)カルボニル］アミン、N-銅キレート、N-亜鉛キレート、N-ニトロアミン、N-ニトロソアミン、アミンN-オキシド、ジフェニルホスフィンアミド(Dpp)、ジメチルチオホスフィンアミド(Mpt)、ジフェニルチオホスフィンアミド(Ppt)、ジアルキルホスホルアミダート、ジベンジルホスホルアミダート、ジフェニルホスホルアミダート、ベンゼンスルフェンアミド、o-ニトロベンゼンスルフェンアミド(Nps)、2,4-ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、3-ニトロピリジンスルフェンアミド(Npys)、

【0125】

p-トルエンスルホンアミド(Ts)、ベンゼンスルホンアミド、2,3,6-トリメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mtr)、2,4,6-トリメトキシベンゼンスルホンアミド(Mtb)、2,6-ジメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Pme)、2,3,5,6-テトラメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mte)、4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mbs)、2,4,6-トリメチルベンゼンスルホンアミド(Mts)、2,6-ジメトキシ-4-メチルベンゼンスルホンアミド(iMds)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホンアミド(Pmc)、メタンスルホンアミド(Ms)、β-トリメチルシリルエタンスルホンアミド(SES)、9-アントラセンスルホンアミド、4-(4',8'-ジメトキシナフチルメチル)ベンゼンスルホンアミド(DNMBS)、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミドおよびフェナシルスルホンアミド。

【0126】

例示の保護基は本明細書に詳述される。しかしながら本発明は、これらの保護基に限定されることを意図せず、むしろ、種々の追加の等価な保護基が上の基準を使用して容易に同定され、本発明の方法において利用され得る。加えて、種々の保護基についてはProtective Groups in Organic Synthesis,Third Ed.Greene,T.W. and Wuts,P.G.,Eds.,John Wiley & Sons,New York:1999に記載されており、この内容の全体は本明細書に参照により組み込まれる。

【0127】

本明細書に記載のとおり、化合物は、あらゆる数の置換基または官能部分により置換されてよいことが理解される。一般に、用語「任意に」が先行するかどうかに関わらず、用語「置換された」およびこの発明の式中に含まれる置換基は、所与の構造中の水素ラジカルの、特定置換基のラジカルによる置き換えを指す。任意の所与の構造中の1つより多くの位置が、特定群から選択された1より多くの置換基により置換されてもよい場合、置換基は各位置において同一であっても異なっていてもよい。本明細書に使用される用語「置換された」は、有機化合物の全ての許容し得る置換基を含むことが企図される。広い見地からは、許容し得る置換基は、有機化合物の、非環式および環式、分枝および非分枝、炭素環式およびヘテロ環式、芳香族および非芳香族置換基を含む。窒素などのヘテロ原子は、水素置換基および/またはヘテロ原子の原子価を満たす、本明細書に記載の有機化合物のいずれの許容し得る置換基を有してよい。その上、本発明は、いかなる様式においても、有機化合物の許容し得る置換基によって限定されることを意図しない。本発明により想定される置換基および変数の組み合わせは、好ましくは、例えば感染症または増殖性疾患などの処置に有用な安定な化合物の形成をもたらすものである。用語「安定な」とは、好ましくは、本明細書において、製造を可能とするのに十分な安定性を有し、検出されるのに十分な時間の間化合物の完全性を維持し、好ましくは本明細書に詳述される目的のため

に十分な時間有用であるような、化合物を指す。

【０１２８】

本明細書に使用される用語「脂肪族」は、飽和および不飽和両方の、直鎖(すなわち非分枝)、分枝、非環式、環式または多環式の脂肪族炭化水素であって、任意に１以上の官能基により置換されているものを含む。当業者に理解されるとおり、本明細書において「脂肪族」は、これらに限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニルおよびシクロアルキニル部分を含むことを意図する。よって、本明細書に使用される用語「アルキル」は、直鎖、分枝および環式アルキル基を含む。類似の慣例がその他の一般的用語、例えば「アルケニル」、「アルキニル」などにも適用される。その上、本明細書に使用される用語「アルキル」、「アルケニル」、「アルキニル」などは、置換および非置換基の両方を包含する。ある態様において、本明細書で使用される場合「低級アルキル」は、１～６個の炭素原子を有するアルキル基(環式、非環式、置換、非置換、分枝または非分枝)を示すために使用される。

【０１２９】

ある態様において、本発明に採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、１～２０個の脂肪族炭素原子を含有する。ある態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、１～１０個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、１～８個の脂肪族炭素原子を含有する。さらなる他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、１～６個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、１～４個の脂肪族炭素原子を含有する。

【０１３０】

よって例示の脂肪族基は、これらに限定されないが、例えばメチル、エチル、ｎ-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、-ＣＨ$_2$-シクロプロピル、ビニル、アリル、ｎ-ブチル、ｓｅｃ-ブチル、イソブチル、ｔｅｒｔ-ブチル、シクロブチル、-ＣＨ$_2$-シクロブチル、ｎ-ペンチル、ｓｅｃ-ペンチル、イソペンチル、ｔｅｒｔ-ペンチル、シクロペンチル、-ＣＨ$_2$-シクロペンチル、ｎ-ヘキシル、ｓｅｃ-ヘキシル、シクロヘキシル、-ＣＨ$_2$-シクロヘキシル部分等を含み、これは重ねて、１以上の置換基を有してもよい。アルケニル基は、これらに限定されないが、例えばエテニル、プロペニル、ブテニル、１-メチル-２-ブテン-１-イルなどを含む。代表的なアルキニル基は、これらに限定されないが、エチニル、２-プロピニル(プロパルギル)、１-プロピニルなどを含む。

【０１３１】

本発明の化合物の、上記の脂肪族(およびその他の)部分の置換基のいくつかの例は、これらに限定されないが以下を含む:脂肪族;ヘテロ脂肪族;アリール;ヘテロアリール;アリールアルキル;ヘテロアリールアルキル;アルコキシ;アリールオキシ;ヘテロアルコキシ;ヘテロアリールオキシ;アルキルチオ;アリールチオ;ヘテロアルキルチオ;ヘテロアリールチオ;-Ｆ;-Ｃｌ;-Ｂｒ;-Ｉ;-ＯＨ;-ＮＯ$_2$;-ＣＮ;-ＣＦ$_3$;-ＣＨ$_2$ＣＦ$_3$;-ＣＨＣｌ$_2$;-ＣＨ$_2$ＯＨ;-ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＨ;-ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$;-ＣＨ$_2$ＳＯ$_2$ＣＨ$_3$;-Ｃ(Ｏ)Ｒ$_x$;-ＣＯ$_2$(Ｒ$_x$);-ＣＯＮ(Ｒ$_x$)$_2$;-ＯＣ(Ｏ)Ｒ$_x$;-ＯＣＯ$_2$Ｒ$_x$;-ＯＣＯＮ(Ｒ$_x$)$_2$;-Ｎ(Ｒ$_x$)$_2$;-Ｓ(Ｏ)$_2$Ｒ$_x$;-ＮＲ$_x$(ＣＯ)Ｒ$_x$;ここでＲｘの出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

【０１３２】

本明細書に使用される用語「ヘテロ脂肪族」は、例えば炭素原子の代わりに、１以上の酸素、硫黄、窒素、リンまたはケイ素原子を含む脂肪族部分を指す。ヘテロ脂肪族部分は

分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、モルホリノ、ピロリジニルなどの飽和および不飽和のヘテロ環を含んでもよい。ある態様において、ヘテロ脂肪族部分は、それ上にある１以上の水素原子の、下記を含むがこれらに限定はされない１以上の部分による独立した置き換えによって置換される:脂肪族;ヘテロ脂肪族;アリール;ヘテロアリール;アリールアルキル;ヘテロアリールアルキル;アルコキシ;アリールオキシ;ヘテロアルコキシ;ヘテロアリールオキシ;アルキルチオ;アリールチオ;ヘテロアルキルチオ;ヘテロアリールチオ;-Ｆ;-Ｃｌ;-Ｂｒ;-Ｉ;-ＯＨ;-ＮＯ$_2$;-ＣＮ;-ＣＦ$_3$;-ＣＨ$_2$ＣＦ$_3$;-ＣＨＣｌ$_2$;-ＣＨ$_2$ＯＨ;-ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＨ;-ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$;-ＣＨ$_2$ＳＯ$_2$ＣＨ$_3$;-Ｃ(Ｏ)Ｒ$_x$;-ＣＯ$_2$(Ｒ$_x$);-ＣＯＮ(Ｒ$_x$)$_2$;-ＯＣ(Ｏ)Ｒ$_x$;-ＯＣＯ$_2$Ｒ$_x$;-ＯＣＯＮ(Ｒ$_x$)$_2$;-Ｎ(Ｒ$_x$)$_2$;-Ｓ(Ｏ)$_2$Ｒ$_x$;-ＮＲ$_x$(ＣＯ)Ｒ$_x$;

【０１３３】

ここでＲ$_x$の出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

本明細書に使用される用語「ハロ」および「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選択される原子を指す。

【０１３４】

用語「アルキル」は、飽和脂肪族基を含み、これは、直鎖アルキル基(例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなど)、分枝鎖アルキル基(イソプロピル、ｔｅｒｔ-ブチル、イソブチルなど)、シクロアルキル(脂環式)基(シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル)、アルキル置換シクロアルキル基およびシクロアルキル置換アルキル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキルは、６個以下(例えば直鎖についてはＣ$_1$～Ｃ$_6$、分枝鎖についてはＣ$_3$～Ｃ$_6$)、より好ましくは４個以下の炭素原子をその骨格中に有する。同様に、好ましいシクロアルキルは、３～８個の炭素原子をその環構造中に有し、より好ましくは５または６個の炭素を環構造中に有する。用語Ｃ$_1$～Ｃ$_6$は、１～６個の炭素原子を含むアルキル基を含有する。

【０１３５】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキルは、「非置換のアルキル」および「置換アルキル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の１以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルキル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ(アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、およびアルキルアリールアミノを含む)、アシルアミノ(アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む)、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。シクロアルキルは、例えば上記の置換基により、さらに置換されてもよい。「アルキルアリール」または「アリールアルキル」部分は、アリールで置換されたアルキル(例えばフェニルメチル(ベンジル))である。用語「アルキル」はまた、天然または非天然のアミノ酸の側鎖をも含む。用語「ｎ-アルキル」は、直鎖(すな

わち、非分枝)の非置換のアルキル基を意味する。

【０１３６】

用語「アルケニル」は、上記のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも１つの二重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルケニル」は、直鎖アルケニル基(例えばエチレニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニルなど)、分枝鎖アルケニル基、シクロアルケニル(脂環式)基(シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル)、アルキルまたはアルケニル置換シクロアルケニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルケニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルケニル基は、６個以下の炭素原子をその骨格中に有する(例えば直鎖についてはＣ$_2$～Ｃ$_6$、分枝鎖についてＣ$_3$～Ｃ$_6$)。同様に、シクロアルケニル基は、その環構造中に３～８個の炭素原子、より好ましくは環構造中に５または６個の炭素を有してもよい。用語Ｃ$_2$～Ｃ$_6$は、２～６個の炭素原子を含むアルケニル基を含有する。

【０１３７】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルケニルは、「非置換のアルケニル」および「置換アルケニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の１以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルケニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ(アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む)、アシルアミノ(アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む)、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

【０１３８】

用語「アルキニル」は、上記のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも１つの三重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルキニル」は、直鎖アルキニル基(例えばエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニルなど)、分枝鎖アルキニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルキニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキニル基は、６個以下の炭素原子をその骨格中に有する(例えば直鎖についてはＣ$_2$～Ｃ$_6$、分枝鎖についてＣ$_3$～Ｃ$_6$)。用語Ｃ$_2$～Ｃ$_6$は、２～６個の炭素原子を含むアルキニル基を含有する。

【０１３９】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキニルは、「非置換のアルキニル」および「置換アルキニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の１以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有するアルキニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ(アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む)、アシルアミノ(アルキルカルボニル

アミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む)、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

【０１４０】

炭素の数が他に特定されない限りにおいて、「低級アルキル」は、本明細書に使用されるとおり、上で定義されるが、１～５個の炭素原子をその骨格構造中に有するアルキル基を意味する。「低級アルケニル」および「低級アルキニル」は、例えば２～５個の炭素原子の鎖長を有する。

【０１４１】

用語「アルコキシ」は、酸素原子に共有結合している置換および非置換のアルキル、アルケニルおよびアルキニル基を含む。アルコキシ基の例は、メトキシ、エトキシ、イソプロピルオキシ、プロポキシ、ブトキシおよびペントキシ基を含む。置換アルコキシ基の例は、ハロゲン化アルコキシ基を含む。アルコキシ基は、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ(アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む)、アシルアミノ(アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む)、アミジノ、イミノ、スルフフィドリル(sulffydryl)、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフミル(slkylsulfmyl)、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分などの、独立して選択される基により置換されていてもよい。ハロゲン置換アルコキシ基の例は、これらに限定されないが、フルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、クロロメトキシ、ジクロロメトキシ、トリクロロメトキシなどを含む。

【０１４２】

用語「ヘテロ原子」は、炭素または水素以外のあらゆる元素の原子を含む。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、硫黄およびリンである。

用語「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」は、(適切なカウンターイオンとともに)-ＯＨまたは-Ｏ-を持つ基を含む。

用語「ハロゲン」は、フッ素、臭素、塩素、ヨウ素などを含む。用語「過ハロゲン化」は一般に、全ての水素がハロゲン原子により置き換えられている部分を指す。

【０１４３】

用語「置換される」は、当該部分に配置され得、当該分子がその意図する機能を行うことを可能にする、独立して選択される置換基を含む。置換基の例は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、$(CR'R'')_{0\sim3}NR'R''$、$(CR'R'')_{0\sim3}CN$、$NO_2$、ハロゲン、$(CR'R'')_{0\sim3}C(ハロゲン)_3$、$(CR'R'')_{0\sim3}CH(ハロゲン)_2$、$(CR'R'')_{0\sim3}CH_2(ハロゲン)$、$(CR'R'')_{0\sim3}CONR'R''$、$(CR'R'')_{0\sim3}S(O)_{1\sim2}NR'R''$、$(CR'R'')_{0\sim3}CHO$、$(CR'R'')_{0\sim3}O(CR'R'')_{0\sim3}H$、$(CR'R'')_{0\sim3}S(O)_{0\sim2}R'$、$(CR'R'')_{0\sim3}O(CR'R'')_{0\sim3}H$、$(CR'R'')_{0\sim3}COR'$、$(CR'R'')_{0\sim3}CO_2R'$、または$(CR'R'')_{0\sim3}OR'$基;ここで各R'およびR''は、各々独立して、水素、$C_1\sim C_5$アルキル、$C_2\sim C_5$アルケニル、$C_2\sim C_5$アルキニルもしくはアリール基であるか、または、R'およびR''は、一緒になって、ベンジリデン基もしくは-$(CH_2)_2O(CH_2)_2$-基である、を含む。

【０１４４】

用語「アミン」または「アミノ」は、窒素原子が少なくとも１個の炭素またはヘテロ原子に共有結合している化合物または部分を含む。用語「アルキルアミノ」は、窒素が少なくとも１つのさらなるアルキル基に結合している基および化合物を含む。用語「ジアルキルアミノ」は、窒素原子が、少なくとも２つの追加のアルキル基に結合している基を含む。

用語「エーテル」は、２個の異なる炭素原子またはヘテロ原子に結合した酸素を含有する化合物または部分を含む。例えば、この用語は、「アルコキシアルキル」を含み、これは、別のアルキル基に共有結合した酸素原子に共有結合しているアルキル、アルケニルまたはアルキニル基を指す。

【０１４５】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」および「オリゴヌクレオチド」は、２以上のヌクレオチドのポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ、ＲＮＡまたはこれらの誘導体もしくは修飾バージョンであり得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において修飾され得、例えば分子の安定性、そのハイブリダイゼーションパラメータなどが改善される。ポリヌクレオチドは、限定することなく以下を含む群から選択される修飾塩基部分を含んでもよい:５-フルオロウラシル、５-ブロモウラシル、５-クロロウラシル、５-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４-アセチルシトシン、５-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、５-カルボキシメチルアミノメチル-２-チオウリジン、５-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-Ｄ-ガラクトシルクエオシン(galactosylqueosine)、

【０１４６】

イノシン、Ｎ６-イソペンテニルアデニン、１-メチルグアニン、１-メチルイノシン、２,２-ジメチルグアニン、２-メチルアデニン、２-メチルグアニン、３-メチルシトシン、５-メチルシトシン、Ｎ６-アデニン、７-メチルグアニン、５-メチルアミノメチルウラシル、５-メトキシアミノメチル-２-チオウラシル、ベータ-Ｄ-マンノシルクエオシン、５'-メトキシカルボキシメチルウラシル、５-メトキシウラシル、２-メチルチオ-Ｎ６-イソペンテニルアデニン、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、クエオシン、２-チオシトシン、５-メチル-２-チオウラシル、２-チオウラシル、４-チオウラシル、５-メチルウラシル、ウラシル-５-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-５-オキシ酢酸、５-メチル-２-チオウラシル、３-(３-アミノ-３-Ｎ-２-カルボキシプロピル)ウラシルおよび２,６-ジアミノプリン。

【０１４７】

ポリヌクレオチドは、修飾糖部分(例えば２'-フルオロリボース、リボース、２'-デオキシリボース、２'-Ｏ-メチルシチジン、アラビノースおよびヘキソース)および/または修飾リン酸部分(例えばホスホロチオアートおよび５'-Ｎ-ホスホロアミダイト結合)を含んでもよい。ヌクレオチド配列は典型的には、タンパク質および酵素を作るために細胞機構によって使用される情報を含む、遺伝情報を持つ。これらの用語は、二本鎖または一本鎖のゲノムおよびｃＤＮＡ、ＲＮＡ、あらゆる合成のおよび遺伝子操作のポリヌクレオチド、および、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これは、一本鎖および二本鎖分子、すなわちＤＮＡ-ＤＮＡ、ＤＮＡ-ＲＮＡ、およびＲＮＡ-ＲＮＡハイブリッド、ならびに、アミノ酸骨格に塩基を抱合させることにより形成された「タンパク質核酸」(ＰＮＡ)を含む。

【０１４８】

用語「ターゲティング部分」または「ターゲティングリガンド」は、これらに限定されないが、Ｎ-アセチルグルコサミンまたはＮ-アセチルガラクトサミン(ＧａｌＮａｃ)を含む。

用語「塩基」は、知られているプリンおよびピリミジンヘテロ環式塩基、デアザプリンならびにそのアナログ(ヘテロ環置換アナログ、例えばアミノエトキシフェノキサジンを含む)、誘導体(例えば１-アルキル-、１-アルケニル-、ヘテロ芳香族-および１-アルキニ

ル誘導体)およびそれらの互変異性体を含む。プリンの例は、アデニン、グアニン、イノシン、ジアミノプリンおよびキサンチンならびにそのアナログ(例えば８-オキソ-Ｎ$^{6}$-メチルアデニンまたは７-ジアザキサンチン)、およびそれらの誘導体を含む。ピリミジンは、例えばチミン、ウラシルおよびシトシンならびにそれらのアナログ(例えば５-メチルシトシン、５-メチルウラシル、５-(１-プロピニル)ウラシル、５-(１-プロピニル)シトシンおよび４,４-エタノシトシン)を含む。好適な塩基の他の例は、２-アミノピリジンおよびトリアジン類などの非プリニルおよび非ピリミジニル塩基を含む。

【０１４９】

いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、ＲＮＡヌクレオチドである。別の好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、修飾ＲＮＡヌクレオチドである。よって、オリゴヌクレオチドは、修飾ＲＮＡヌクレオチドを含有する。

用語「ヌクレオシド」は、糖部分、好ましくはリボースまたはデオキシリボースに共有結合した塩基を含む。好ましいヌクレオシドの例は、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを含む。ヌクレオシドはまた、遊離カルボキシル基、遊離アミノ基または保護基を含んでもよいアミノ酸またはアミノ酸アナログに連結した塩基をも含む。好適な保護基は当該技術分野において周知である(Ｐ.Ｇ.Ｍ.ＷutsおよびＴ.Ｗ.Ｇreene、「Ｐrotective Ｇroups in Ｏrganic Ｓynthesis」、第２版、Ｗiley-Ｉnterscience、Ｎew Ｙork、１９９９年を参照)。

用語「ヌクレオチド」は、ホスファート基またはホスファートアナログをさらに含むヌクレオシドを含む。

【０１５０】

核酸分子は、分子の細胞への標的化および/または送達のために、疎水性部分と結びついてもよい。ある態様において、疎水性部分はリンカーを介して核酸分子と結びつく。ある態様において、結びつきは非共有結合性相互作用を介する。他の態様において、結びつきは共有結合を介する。核酸分子は、分子の細胞への標的化および/または送達のために、ターゲティングリガンド部分と結びついてもよい。ある態様において、ターゲティングリガンド部分は、ホスホロアミダイトとして、または代替的にリンカーを介して核酸分子と結びつく。ある態様において、結びつきは非共有結合性相互作用を介する。他の態様において、結びつきは共有結合を介する。当該技術分野において知られているいずれのリンカーも、核酸を疎水性部分に結びつけるために使用されてもよい。当該技術分野において知られているリンカーは、公開された国際ＰＣＴ出願:ＷＯ９２/０３４６４、ＷＯ９５/２３１６２、ＷＯ２００８/０２１１５７、ＷＯ２００９/０２１１５７、ＷＯ２００９/１３４４８７、ＷＯ２００９/１２６９３３、米国特許出願公開第２００５/０１０７３２５号、米国特許第５,４１４,０７７号、米国特許第５,４１９,９６６号、米国特許第５,５１２,６６７号、米国特許第５,６４６,１２６号および米国特許第５,６５２,３５９号に記載されており、これらは本明細書に参照により組み込まれる。

【０１５１】

リンカーは、多原子リンカーに対する共有結合程度に単純であってもよい。リンカーは環式または非環式であってもよい。リンカーは、任意に置換されていてもよい。ある態様において、リンカーは核酸から切断されることができる。ある態様において、リンカーは、生理学的条件下で加水分解されることができる。ある態様において、リンカーは、酵素(例えばエステラーゼまたはホスホジエステラーゼ)により切断されることができる。ある態様において、リンカーは、核酸を疎水性部分から分離するスペーサー要素を含む。スペーサー要素は１～３０個の炭素またはヘテロ原子を含んでもよい。

【０１５２】

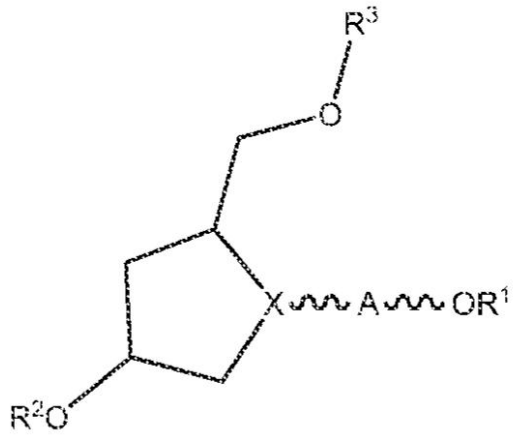
ある態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素はプロトン化可能な官能基を含む。かかるプロトン化可能な官能基は、核酸分子のエンドソーム脱出を促進してもよい。プロトン化可能な官能基はまた、核酸の細胞への送達を支援することもでき、例えば分子の全体の電荷を中性化する。他の態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素は、生物学的に不活性である(すなわち、もたらされる核酸分子に対して生物学的活

性または機能を付与しない)。

【０１５３】

ある態様において、ターゲティング部分および/またはリンカー、ならびに疎水性部分を持つ核酸分子は、本明細書に記載された式のものである。ある態様において、核酸分子は、式:

【化１】




式中、

Ｘは、ＮまたはＣＨであり;

Ａは、結合;置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族;または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり;

Ｒ$^{1}$は、疎水性部分であり;

Ｒ$^{2}$は、水素;酸素保護基;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族;置換または非置換、分枝または非分枝のアシル;置換または非置換、分枝または非分枝のアリール;置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり;および

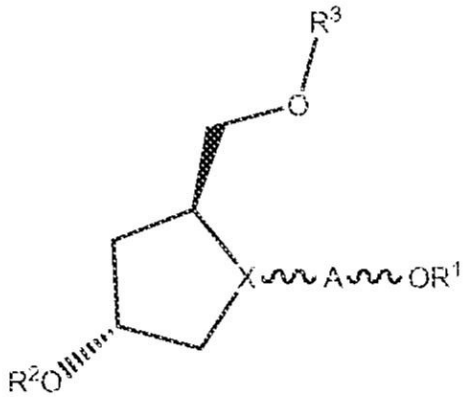
Ｒ$^{3}$は、核酸である、

で表される。

【０１５４】

ある態様において、分子は、式:

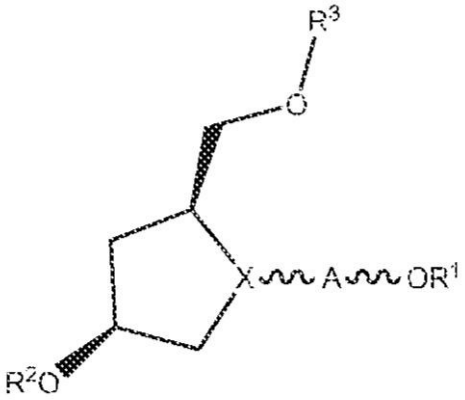
【化２】




で表される。

ある態様において、分子は、式:

【化３】

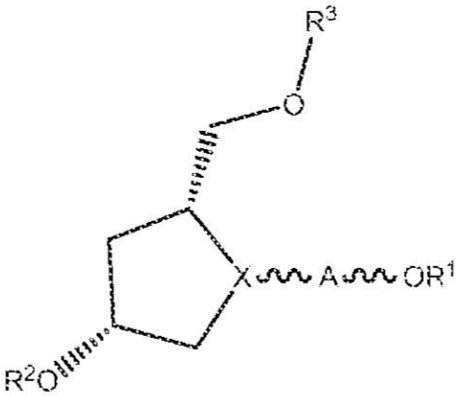


で表される。

【０１５５】

ある態様において、分子は、式:

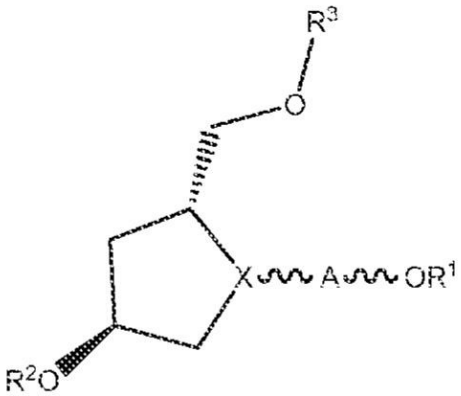
【化４】



で表される。

ある態様において、分子は、式:

【化５】



で表される。

【０１５６】

ある態様において、ＸはＮである。ある態様において、ＸはＣＨである。

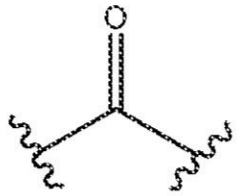
ある態様において、Ａは結合である。ある態様において、Ａは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Ａは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Ａは、非環式

、置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝の脂肪族である。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝のアルキルである。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝のＣ１～２０アルキルである。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝のＣ１～１２アルキルである。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝のＣ１～１０アルキルである。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝のＣ１～８アルキルである。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝のＣ１～６アルキルである。ある態様において、Ａは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Ａは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Ａは、非環式、置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Ａは、非環式、置換、非分枝のヘテロ脂肪族である。

【０１５７】

ある態様において、Ａは、式:

【化６】

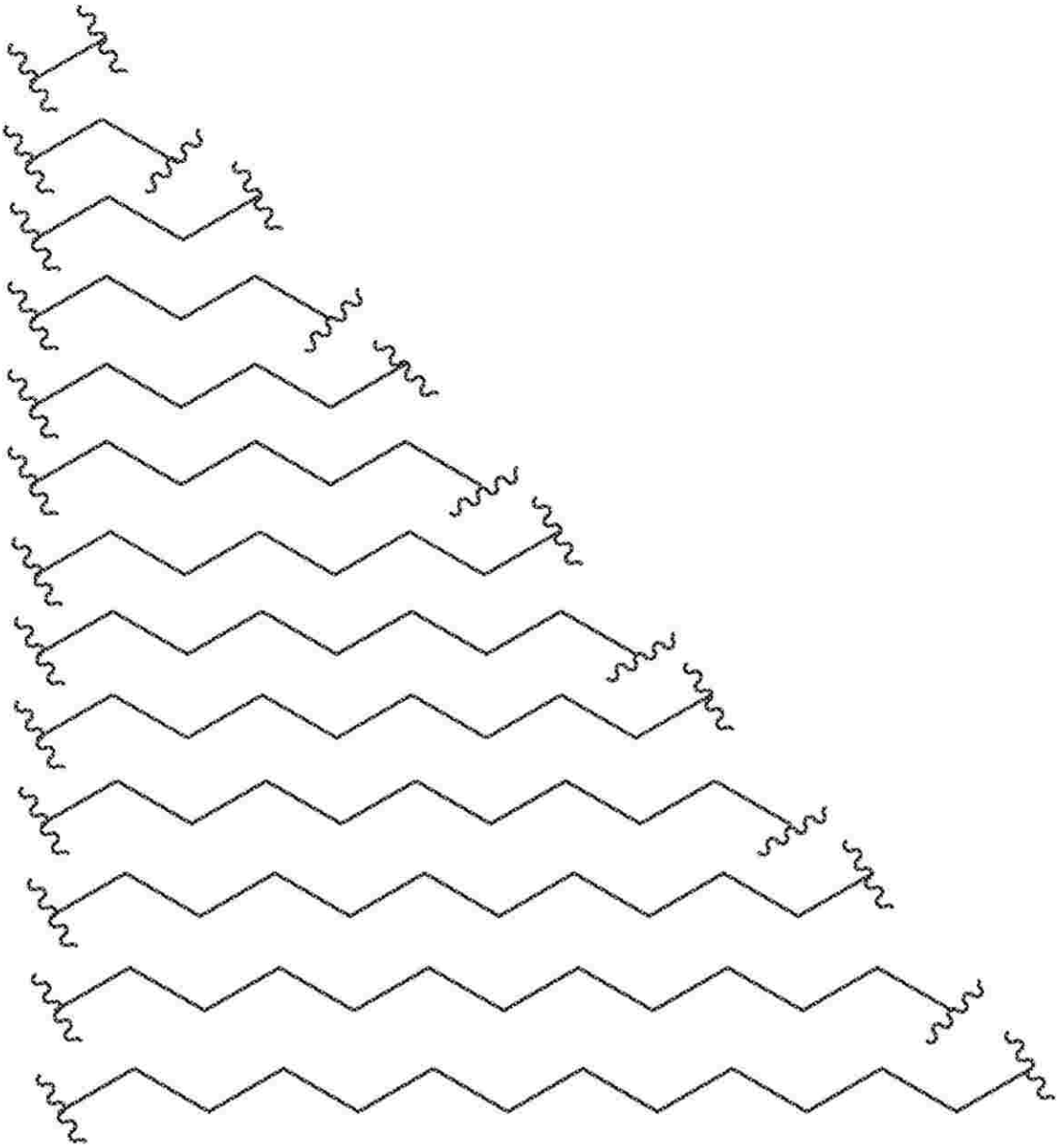


で表される。

【０１５８】

ある態様において、Ａは、式:

【化７】

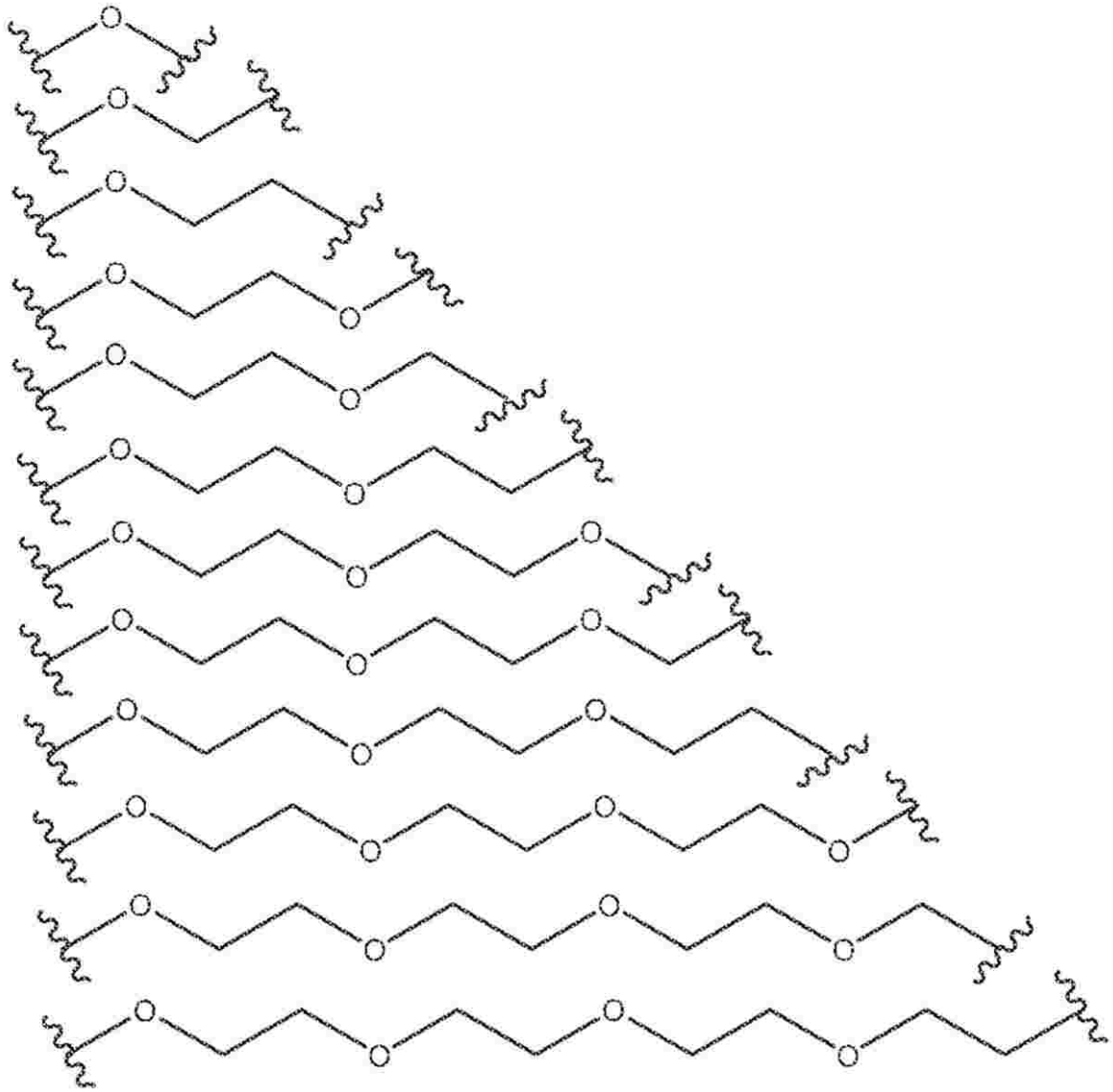


の１つで表される。

【０１５９】

ある態様において、Ａは、式:

【化８】

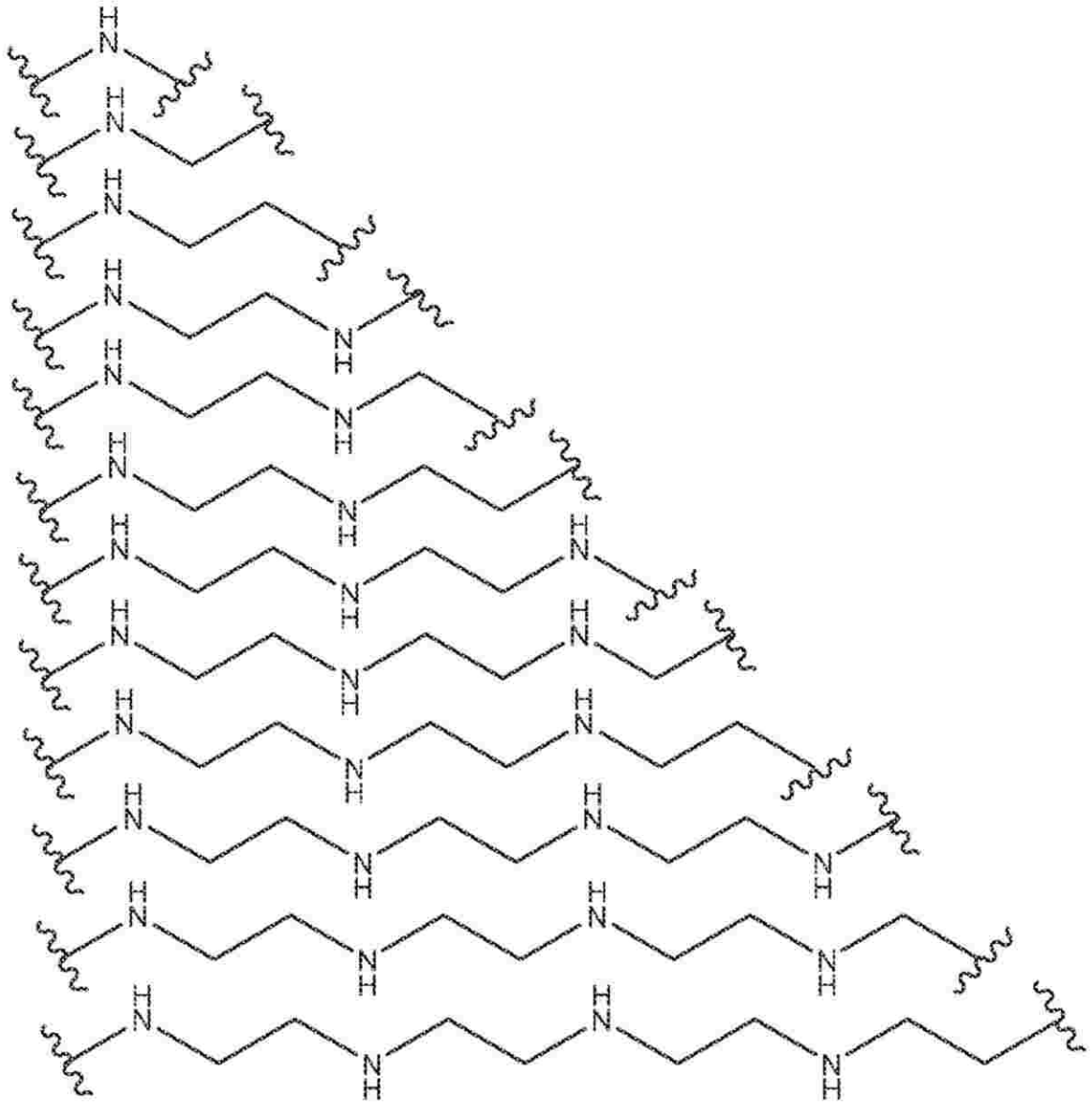


の１つで表される。

【０１６０】

ある態様において、Ａは、式:

【化９】



の１つで表される。

【０１６１】

ある態様において、Ａは、式:

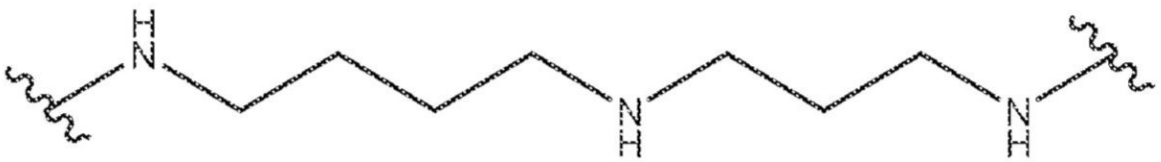
【化１０】



で表される。

ある態様において、Ａは、式:

【化１１】

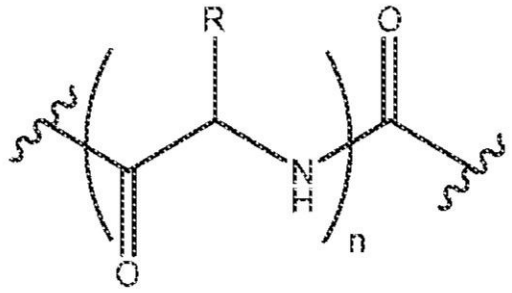


で表される。

【０１６２】

ある態様において、Ａは、式:

【化１２】



式中、

Ｒの出現の各々は、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり;および

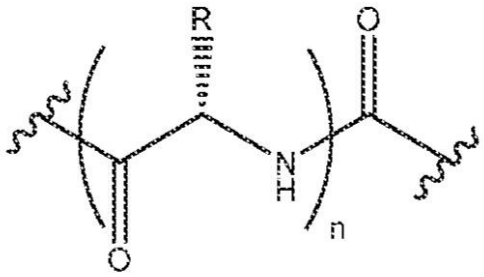
ｎは、１から２０までの整数である(境界を含む)、

で表される。

【０１６３】

ある態様において、Ａは、式:

【化１３】



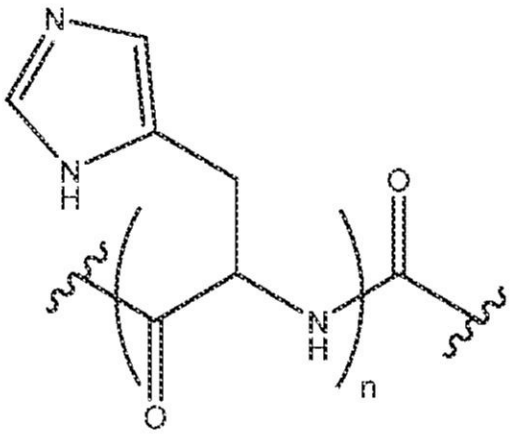
で表される。

ある態様において、Ｒの出現の各々は、独立して、天然のアミノ酸の側鎖である。ある態様において、ｎは、１から１５までの整数である(境界を含む)。ある態様において、ｎは、１から１０までの整数である(境界を含む)。ある態様において、ｎは、１から５までの整数である(境界を含む)。

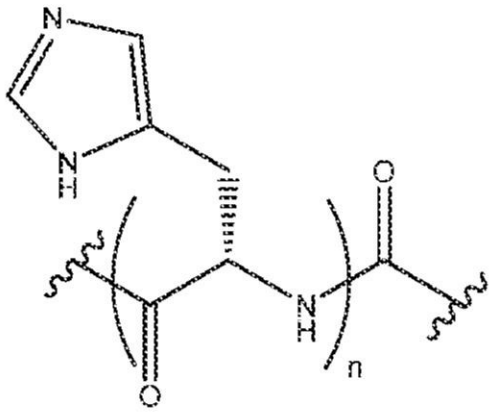
【０１６４】

ある態様において、Ａは、式:

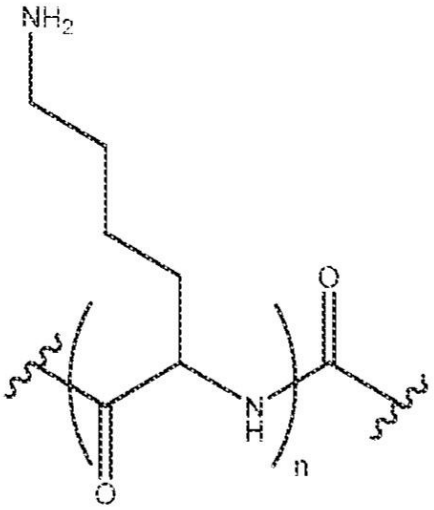
【化１４】



式中、ｎは、１から２０までの整数である(境界を含む)、
で表される。
【０１６５】
ある態様において、Ａは、式:
【化１５】

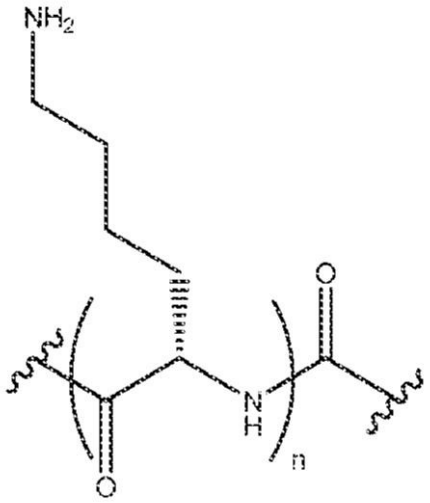


で表される。
ある態様において、ｎは、１から１５までの整数である(境界を含む)。ある態様において、ｎは、１から１０までの整数である(境界を含む)。ある態様において、ｎは、１から５までの整数である(境界を含む)。
【０１６６】
ある態様において、Ａは、式:
【化１６】



式中、ｎは、１から２０までの整数である(境界を含む)、
で表される。
【０１６７】
ある態様において、Ａは、式:

【化１７】



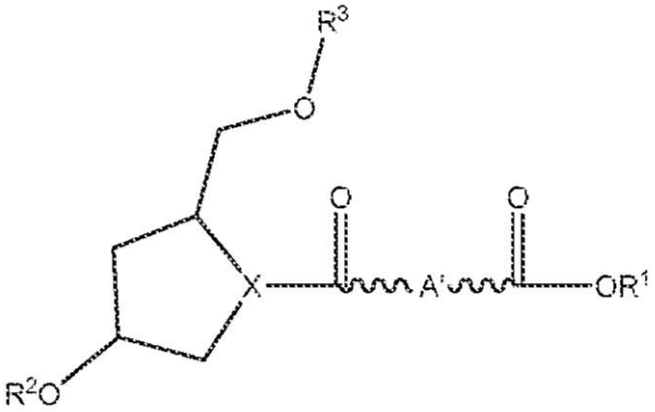
で表される。

ある態様において、ｎは、１から１５までの整数である(境界を含む)。ある態様において、ｎは、１から１０までの整数である(境界を含む)。ある態様において、ｎは、１から５までの整数である(境界を含む)。

【０１６８】

ある態様において、分子は、式:

【化１８】



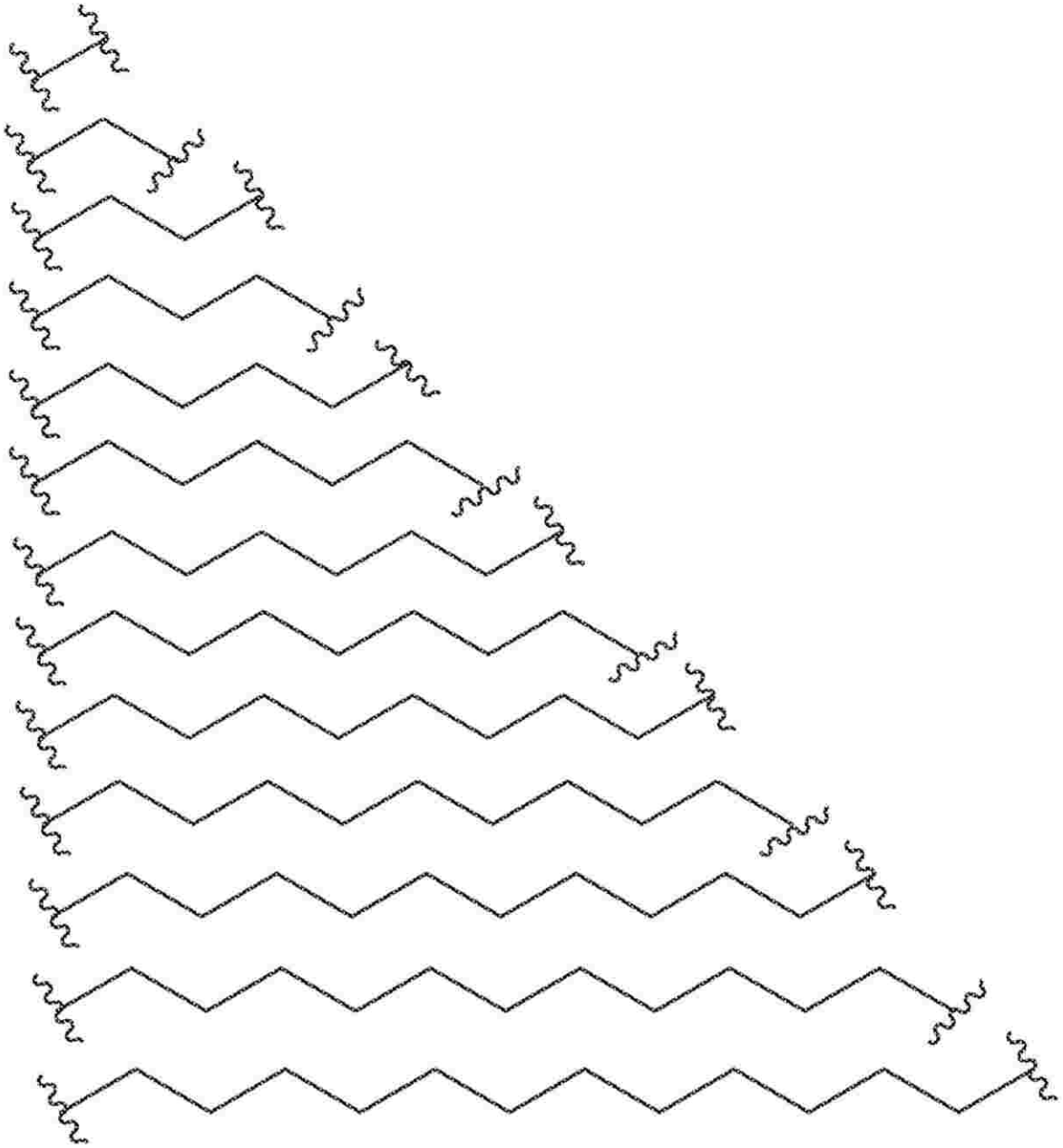
式中、Ｘ、Ｒ$^{1}$、Ｒ$^{2}$およびＲ$^{3}$は、本明細書に定義された通りであり;および

Ａ'は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか;または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、で表される。

【０１６９】

ある態様において、Ａ'は、式:

【化１９】

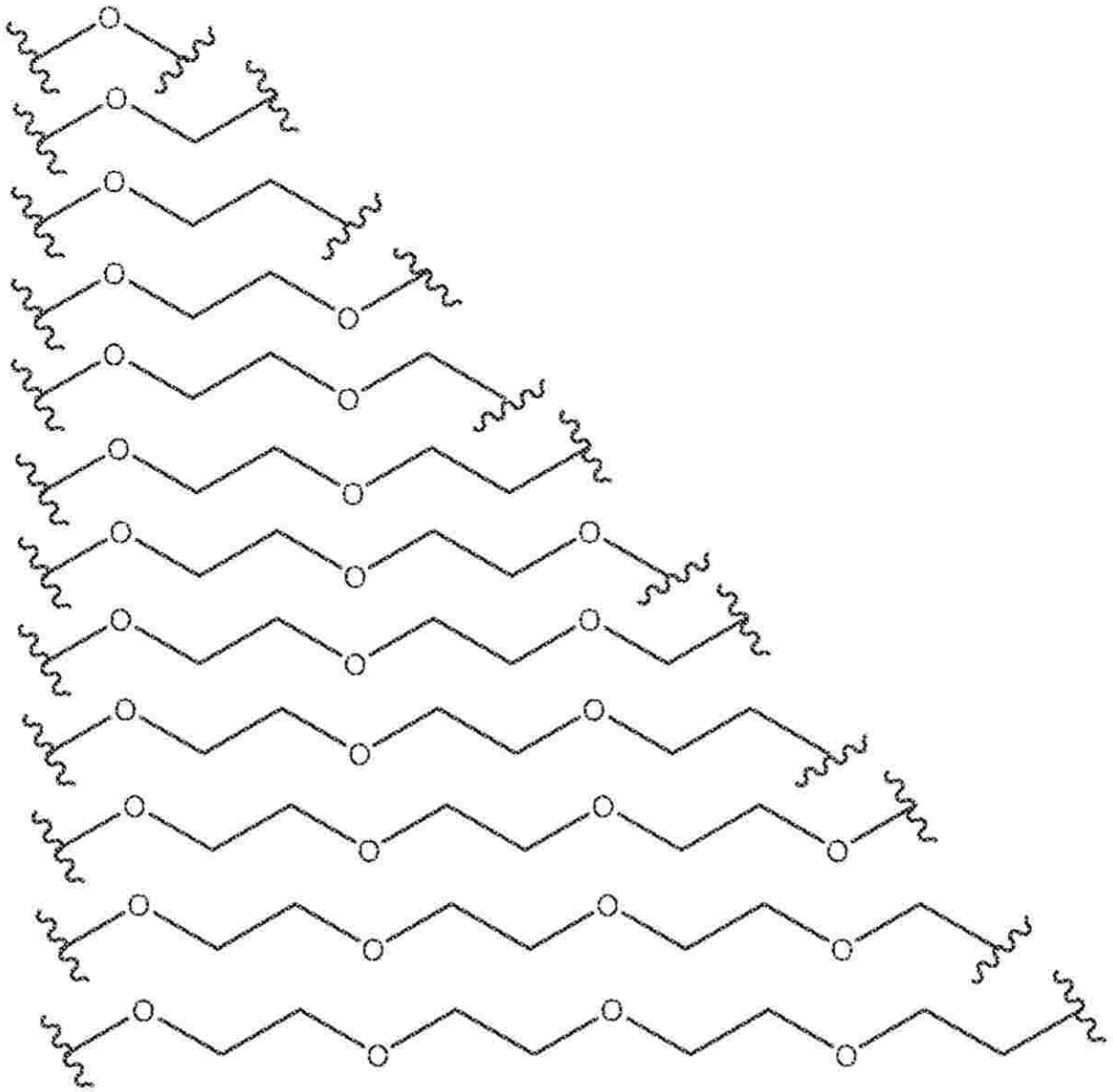


の１つで表される。

【０１７０】

ある態様において、Ａは、式:

【化２０】

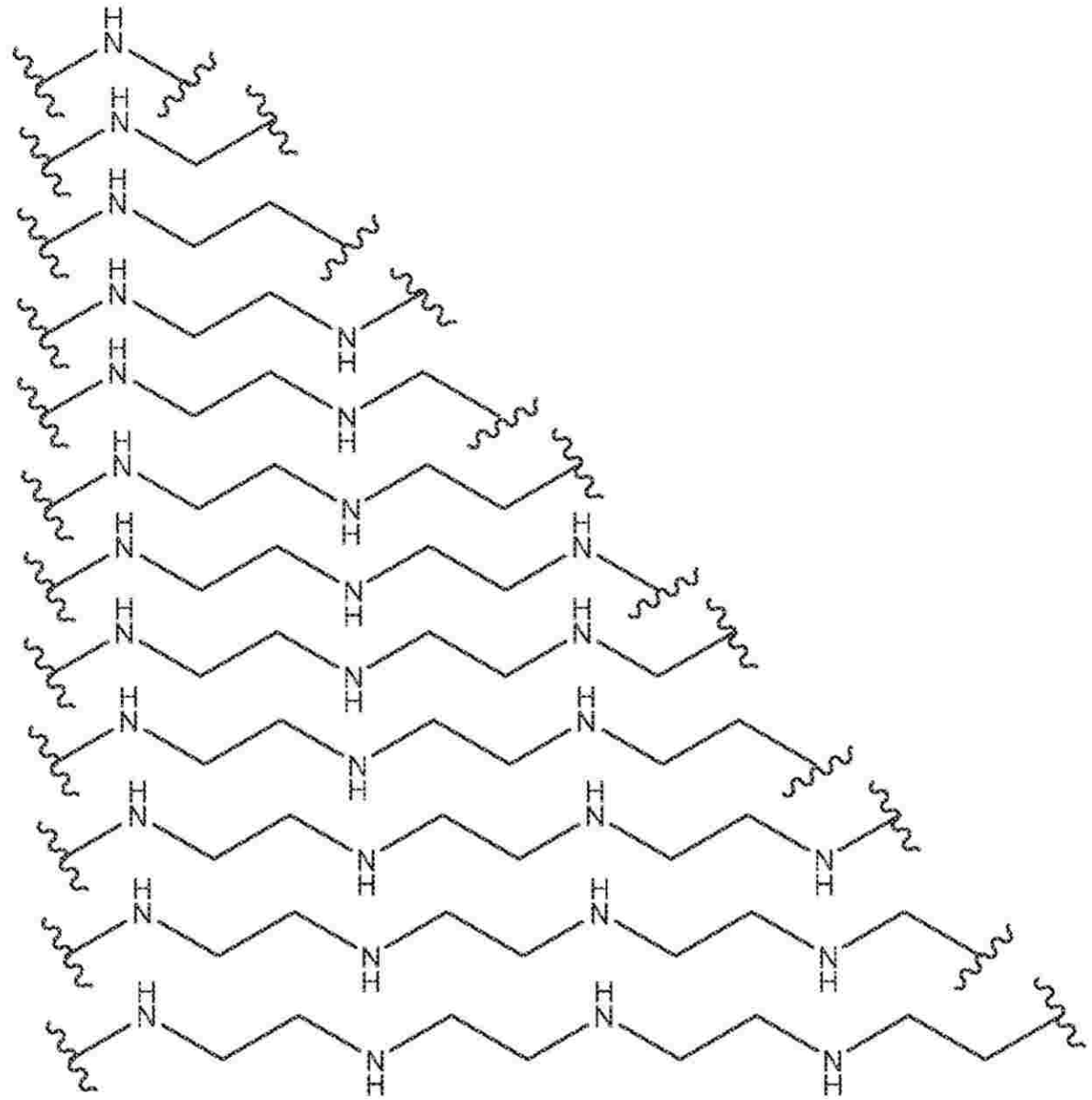


の１つで表される。

【０１７１】

ある態様において、Ａは、式:

【化２１】



の１つで表される。

【０１７２】

ある態様において、Ａは、式:

【化２２】

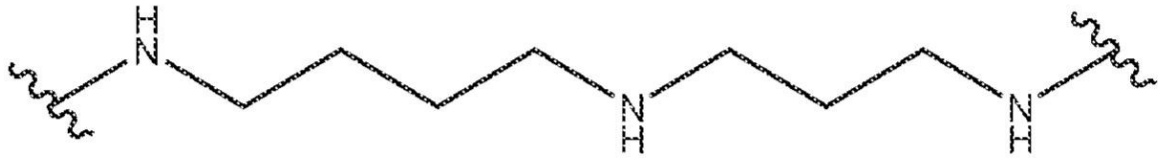


で表される。

【０１７３】

ある態様において、Ａは、式:

【化２３】



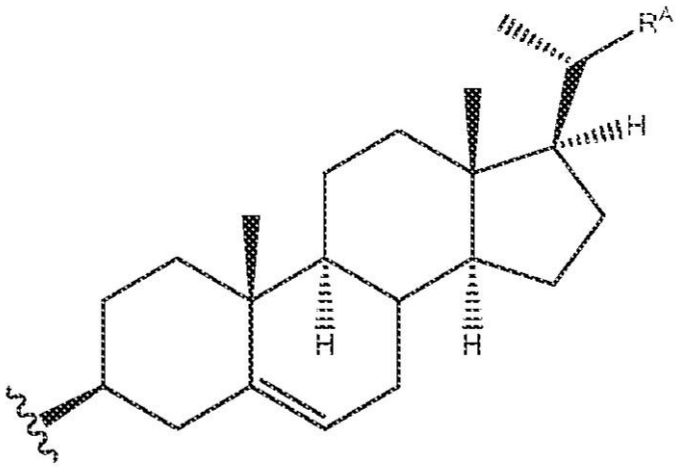
で表される。

ある態様において、Ｒ$^{1}$はステロイドである。ある態様において、Ｒ$^{1}$はコレステロールである。ある態様において、Ｒ$^{1}$は親油性ビタミンである。ある態様において、Ｒ$^{1}$はビタミンＡである。ある態様において、Ｒ$^{1}$はビタミンＥである。

【０１７４】

ある態様において、Ｒ$^{1}$は、式:

【化２４】



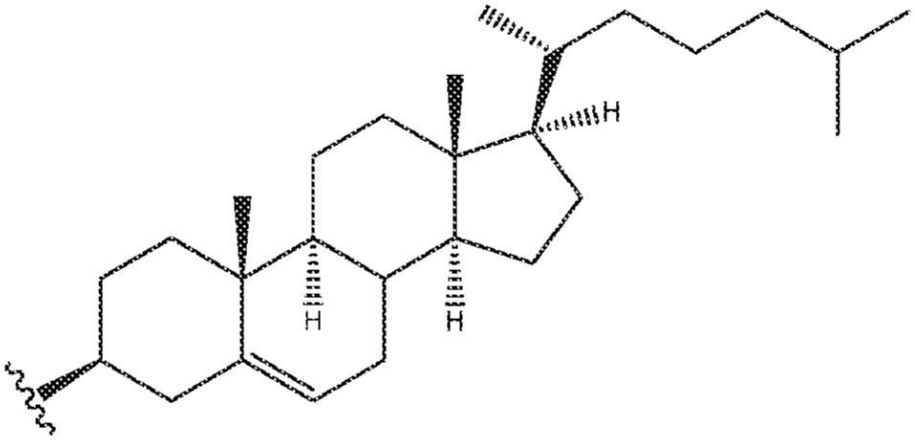
式中、Ｒ$^{A}$は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか;または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、

で表される。

【０１７５】

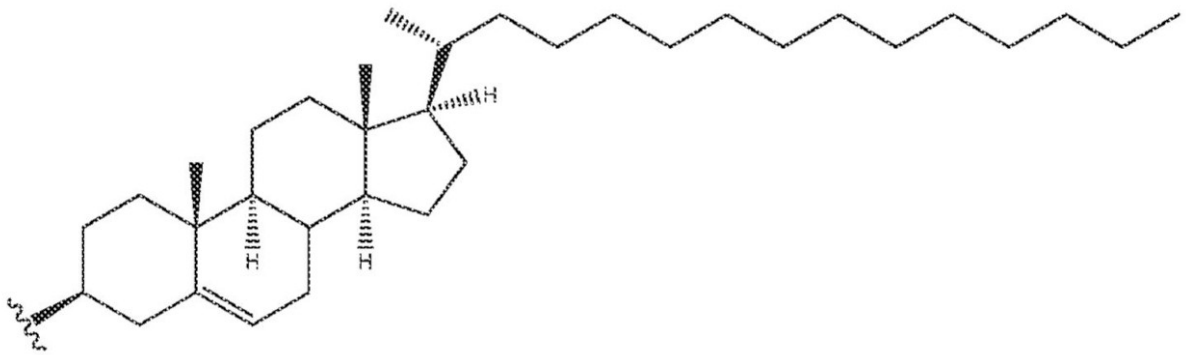
ある態様において、Ｒ$^{1}$は、式:

【化２５】

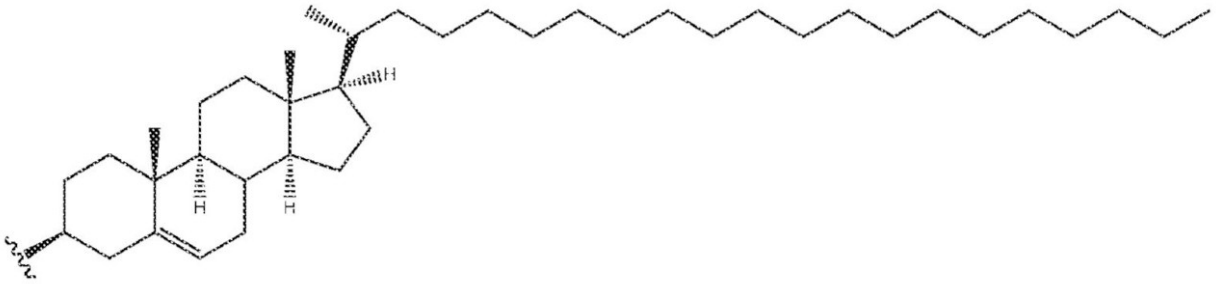


で表される。

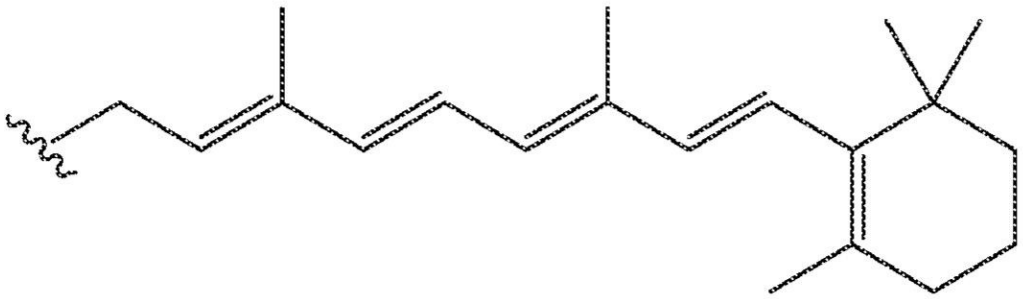
【０１７６】
ある態様において、$R^1$は、式:
【化２６】



で表される。
【０１７７】
ある態様において、$R^1$は、式:
【化２７】

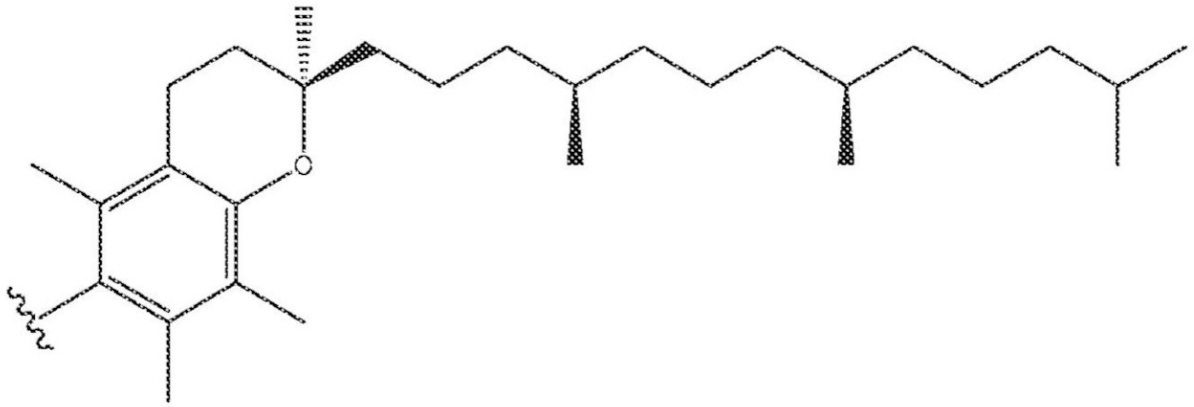


で表される。
【０１７８】
ある態様において、$R^1$は、式:
【化２８】



で表される。
【０１７９】
ある態様において、$R^1$は、式:

【化２９】

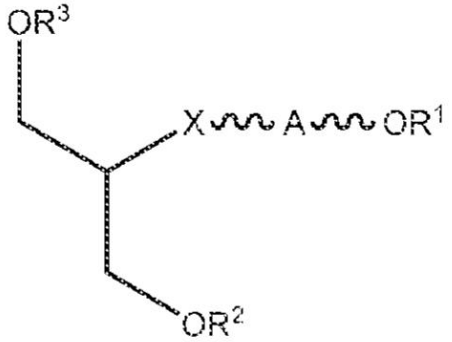


で表される。

【０１８０】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化３０】




式中、

Ｘは、ＮまたはＣＨであり;

Ａは、結合;置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族;または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり;

Ｒ$^{1}$は、疎水性部分であり;

Ｒ$^{2}$は、水素;酸素保護基;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族;置換または非置換、分枝または非分枝のアシル;置換または非置換、分枝または非分枝のアリール;置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり;および

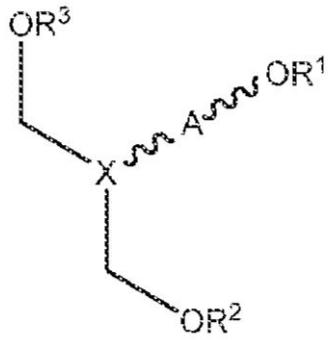
Ｒ$^{3}$は、核酸である、

で表される。

【０１８１】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化３１】

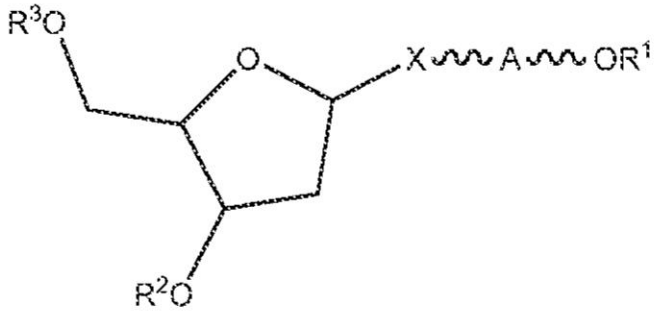



式中、
Ｘは、ＮまたはＣＨであり;
Ａは、結合;置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族;または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり;
Ｒ$^{1}$は、疎水性部分であり;
Ｒ$^{2}$は、水素;酸素保護基;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族;置換または非置換、分枝または非分枝のアシル;置換または非置換、分枝または非分枝のアリール;置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり;および
Ｒ$^{3}$は、核酸である、
で表される。

【０１８２】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化３２】

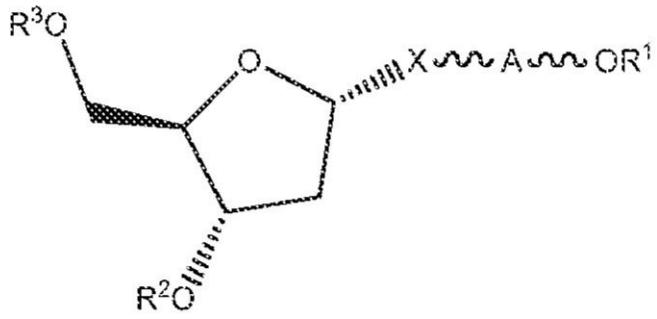



式中、
Ｘは、ＮまたはＣＨであり;
Ａは、結合;置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族;または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり;
Ｒ$^{1}$は、疎水性部分であり;
Ｒ$^{2}$は、水素;酸素保護基;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族;環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族;置換または非置換、分枝または非分枝のアシル;置換または非置換、分枝または非分枝のアリール;置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり;および
Ｒ$^{3}$は、核酸である、
で表される。

【０１８３】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化３３】

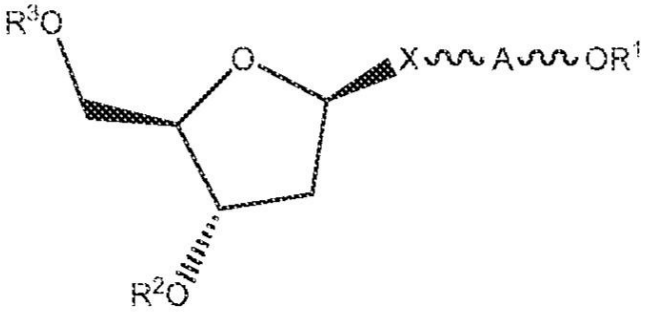


で表される。

【０１８４】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化３４】

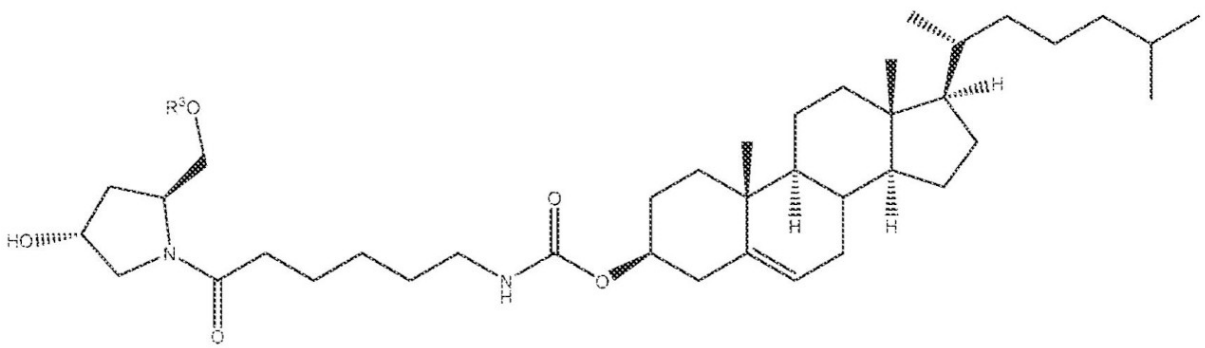


で表される。

【０１８５】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化３５】



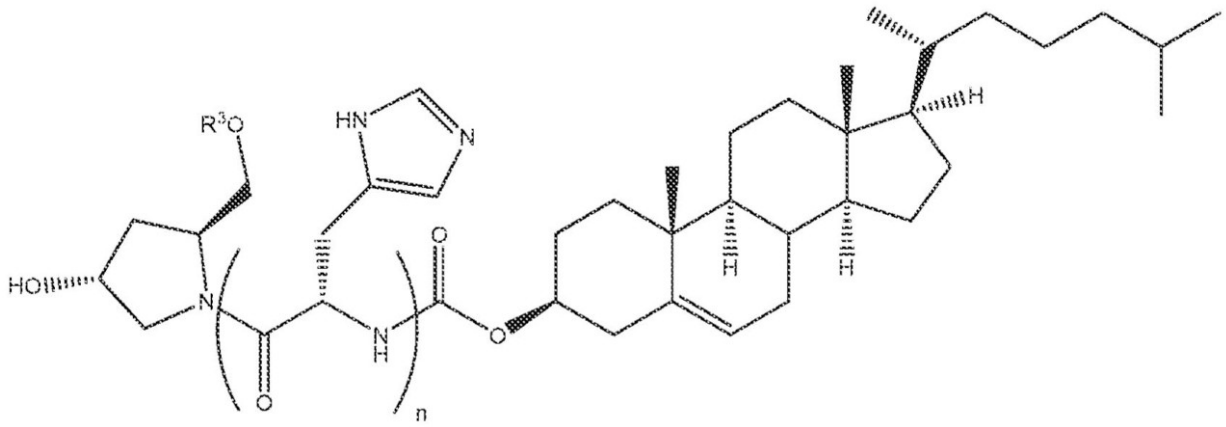
式中、$R^3$は、核酸である、

で表される。

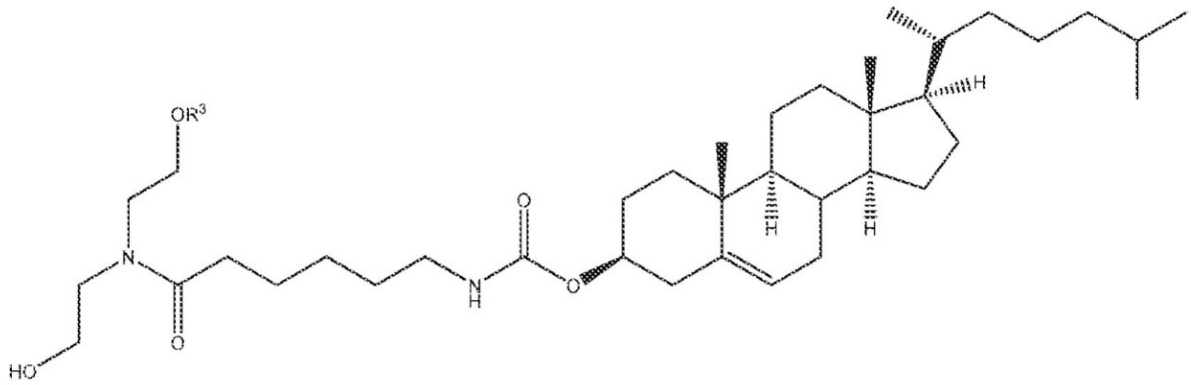
【０１８６】

ある態様において、核酸分子は、式:

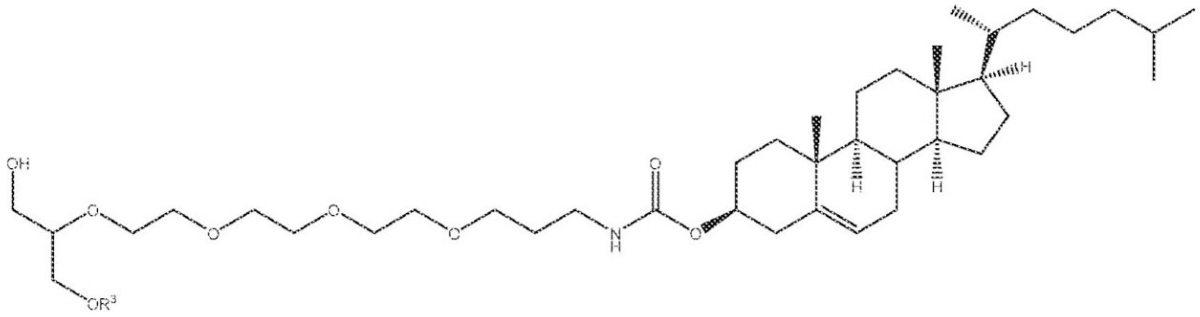
【化３６】



式中、Ｒ$^{3}$は、核酸であり;および
ｎは、１から２０までの整数(境界を含む)である、
で表される。
【０１８７】
ある態様において、核酸分子は、式:
【化３７】

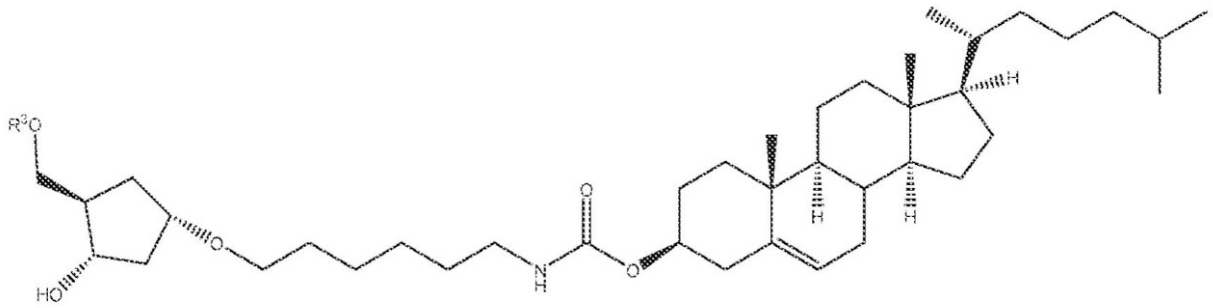


で表される。
【０１８８】
ある態様において、核酸分子は、式:
【化３８】



で表される。
【０１８９】
ある態様において、核酸分子は、式:

【化３９】

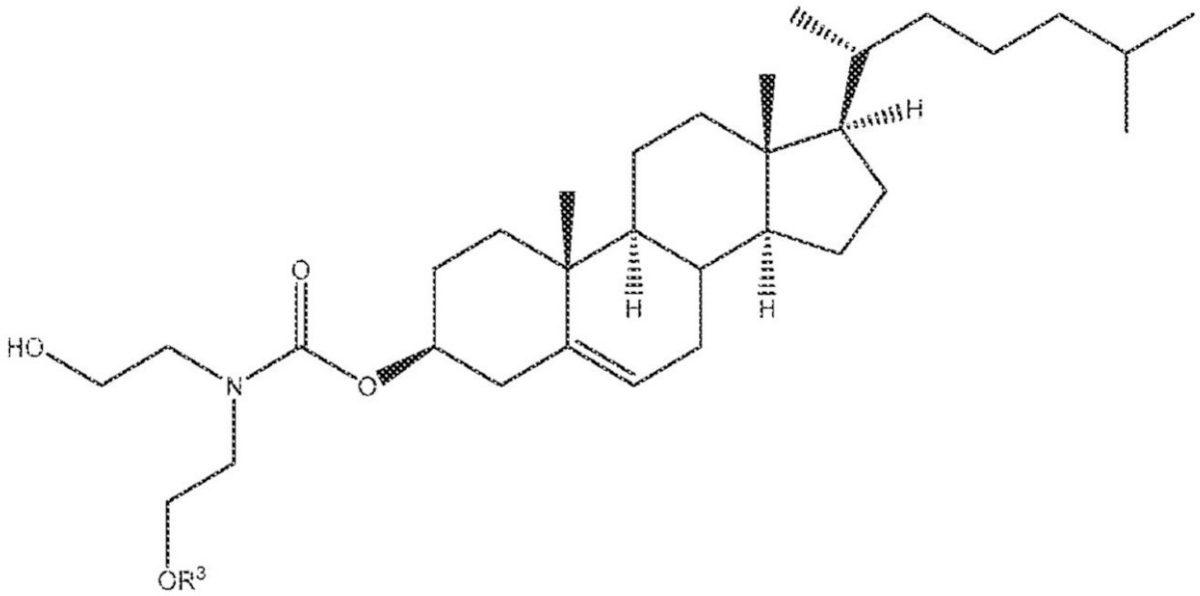


で表される。

【０１９０】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化４０】

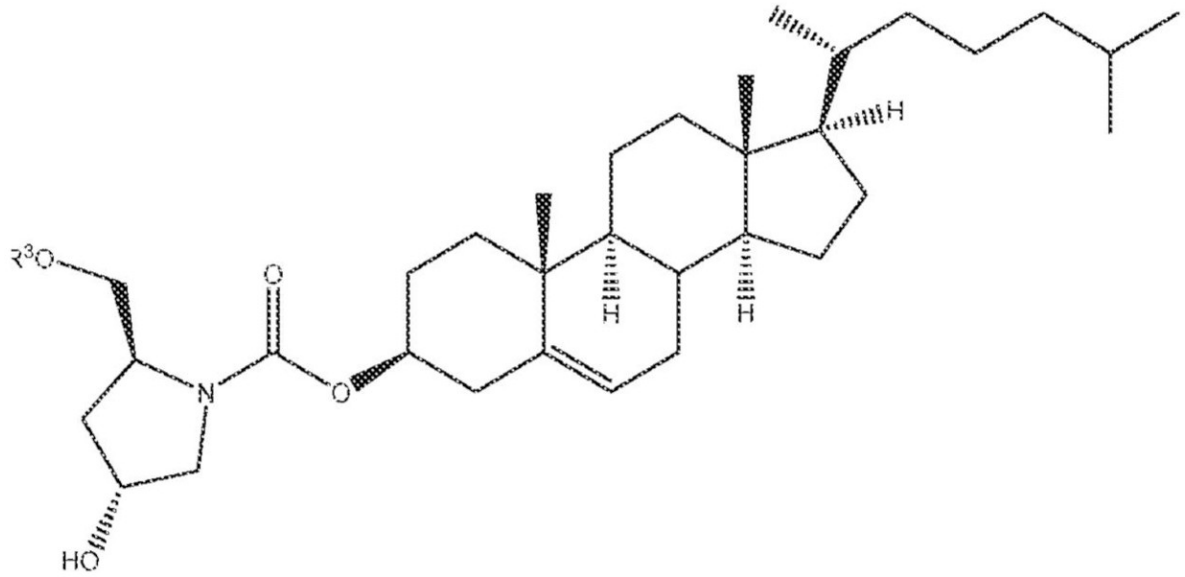


で表される。

【０１９１】

ある態様において、核酸分子は、式:

【化４１】



で表される。

【０１９２】

本明細書に使用される用語「連結部(linkage)」は、天然に存在する、隣接するヌクレオモノマーに共有結合する未修飾ホスホジエステル部分(-O-(ＰＯ$^{2-}$)-O-)を含む。本明細書に使用される用語「置換連結部(substitute linkage)」は、ネイティブなホスホジエステル基の、隣接するヌクレオモノマーに共有結合するあらゆるアナログまたは誘導体を含む。置換連結部は、ホスホジエステルアナログ、例えばホスホロチオアート、ホスホロジチオアートおよびＰ-エチオキシホスホジエステル(P-ethyoxyphospho diester)、Ｐ-エトキシホスホジエステル、Ｐ-アルキルオキシホスホジエステル、メチルホスホナートおよびリンを含有しない結合、例えばアセタールおよびアミドを含む。かかる置換連結部は、当該技術分野において知られている(例として、Bjergarde et al.1991.Nucleic Acids Res.19:5843;Caruthers et al.1991.Nucleosides Nucleotides.10:47)。ある態様において、ホスホロチオアート連結部などの非加水分解性連結部が好ましい。

【０１９３】

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、疎水的に修飾されたヌクレオチドまたは「疎水性修飾」を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾」は、(１)塩基の全体的な疎水性が著しく増大し、および/または、(２)塩基がなお通常のワトソン-クリック相互作用に類似するものを形成することができるように修飾された塩基を指す。いくつかの非限定的な塩基修飾の例は、５位のウリジンおよびシチジン修飾、例えばフェニル、4-ピリジル、２-ピリジル、インドリル、および、イソブチル、フェニル($C_6H_5OH$);トリプトファニル($C_8H_6N$)$CH_2CH(NH_2)CO$)、イソブチル、ブチル、アミノベンジル;フェニル;およびナフチルを含む。

化学修飾された二本鎖核酸分子の末端(３'または５'末端)、ループ領域、または他のいずれの部分にも付着し得る他の型の抱合体は、ステロール、ステロール型分子、ペプチド、低分子、タンパク質などを含む。いくつかの態様において、ｓｄ-ｒｘＲＮＡ(ＩＮＴＡＳＹＬ(商標))などの化学修飾された二本鎖核酸分子は、１つより多い抱合体(同じまたは異なる化学的性質のもの)を含んでもよい。いくつかの態様において、抱合体は、コレステロールである。代替的に、いくつかの態様において、抱合体は、ＧａｌＮａｃである。

【０１９４】

いくつかの態様において、ガイド鎖の５'端に対する第１のヌクレオチドは、２'-O-メチル修飾を有し、ここで任意に、２'-O-メチル修飾は、５Ｐ-２'O-メチルＵ修飾、また

は５'ビニルホスホナート２'-Ｏ-メチルＵ修飾である。標的遺伝子特異性を増大させるかまたはオフ・ターゲットサイレンシング作用を低減するための別の方法は、ガイド配列の５'末端の２番目のヌクレオチドに対応する位置にて、２'修飾(２'-Ｏ-メチル修飾など)を導入することである。本発明のアンチセンス(ガイド)配列は、ＲＮＡ様およびＤＮＡ様の領域を含む「キメラオリゴヌクレオチド」であり得る。

【０１９５】

語「ＲＮａｓｅ Ｈ活性化領域」は、オリゴヌクレオチド、例えばキメラオリゴヌクレオチドの、当該オリゴヌクレオチドが結合する標的ＲＮＡ鎖を切断するＲＮａｓｅ Ｈを動員することができる領域を含む。典型的には、ＲＮａｓｅ Ｈ活性化領域は、ＤＮＡまたはＤＮＡ様ヌクレオモノマーの(少なくとも約３～５、典型的には約３～１２、より典型的には約５～１２、より好ましくは約５～１０の、連続したヌクレオモノマーの)最小コアを含む(例えば米国特許第5,849,902号を参照)。好ましくは、ＲＮａｓｅ Ｈ活性化領域は、約９個の連続したデオキシリボース含有ヌクレオモノマーを含む。

【０１９６】

語「非活性化領域」は、アンチセンス配列、例えばキメラオリゴヌクレオチドの領域であって、ＲＮａｓｅ Ｈを動員または活性化しないものを含む。好ましくは、非活性化領域は、ホスホロチオアートＤＮＡを含まない。本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つの非活性化領域を含む。一態様において、非活性化領域は、ヌクレアーゼに対して安定であることができるか、または、標的に対して相補的であることおよびオリゴヌクレオチドにより結合される標的核酸分子と水素結合を形成することにより、標的に対する特異性を提供し得る。

【０１９７】

一態様において、連続したポリヌクレオチドの少なくとも一部は、置換連結部、例えばホスホロチオアート連結部により連結されている。

ある態様において、ガイド配列を超えるヌクレオチドの殆どまたは全ては(２'修飾されていようがいまいが)ホスホロチオアート連結部により連結されている。かかるコンストラクトは、その血清タンパク質に対するより高いアフィニティーに起因して、薬物動態が改善されている傾向がある。ポリヌクレオチドの非ガイド配列部分におけるホスホロチオアート連結部は一般に、一旦ガイド鎖がＲＩＳＣにロードされた後は、ガイド鎖の活性に干渉しない。いくつかの態様において、高レベルのホスホロチオアート修飾が送達の改善をもたらし得る。いくつかの態様において、ガイドおよび/パッセンジャー鎖は、完全にホスホロチオアート化されている。

【０１９８】

本発明のアンチセンス(ガイド)配列は、「モルホリノオリゴヌクレオチド」を含んでもよい。モルホリノオリゴヌクレオチドは非イオン性であり、ＲＮａｓｅ Ｈ非依存的機構により機能する。モルホリノオリゴヌクレオチドの４つの遺伝子塩基(アデニン、シトシン、グアニンおよびチミン/ウラシル)は、６員のモルホリン環に連結されている。モルホリノオリゴヌクレオチドは、例えば非イオン性ホスホロジアミダート(phosphorodiamidate)サブユニット間連結部によって、４つの異なるサブユニット型を結合することにより作られる。モルホリノオリゴヌクレオチドは、以下を含む多数の利点を有する:ヌクレアーゼに対する完全な耐性(Antisense & Nucl.Acid Drug Dev.1996.6:267);予測可能な標的化(Biochemica Biophysica Acta.1999.1489:141);細胞における確実な活性(Antisense & Nucl.Acid Drug Dev.1997.7:63);優れた配列特異性(Antisense & Nucl.Acid Drug Dev.1997.7:151);最小限の非アンチセンス活性(Biochemica Biophysica Acta.1999.1489:141);および簡便な浸透圧または掻爬による送達(Antisense & Nucl.Acid Drug Dev.1997.7:291)。モルホリノオリゴヌクレオチドはまた、高用量におけるその非毒性のために好ましい。モルホリノオリゴヌクレオチドの調製の議論は、Antisence & Nucl.Acid Drug Dev.1997.7:187において見出され得る。

【０１９９】

本明細書に記載の化学修飾は、一本鎖ポリヌクレオチドのＲＩＳＣ中へのローディングを促進すると考えられる。一本鎖ポリヌクレオチドは、ＲＩＳＣ中へのローディングおよび遺伝子サイレンシングの誘導において活性であることが示されている。しかしながら、一本鎖ポリヌクレオチドについての活性のレベルは、デュプレックスポリヌクレオチドと比較したとき、２～４桁の規模でより低いと考えられる。

【０２００】

本発明は、(ａ)一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(ｂ)ポリヌクレオチドのＲＩＳＣ複合体への効率的なローディングを促進し、および(ｃ)一本鎖ヌクレオチドの細胞による取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組み合せを含んでもよい。加えて、態様のいくつかにおいて、単一のポリヌクレオチドの５'末端は、化学的にリン酸化されていてもよい。

【０２０１】

さらに別の態様において、本発明は、ＲＩＳＣ阻害性ポリヌクレオチドの機能を改善する化学修飾パターンの説明を提供する。一本鎖ポリヌクレオチドは、基質競合機構を通して、予めロードされたＲＩＳＣ複合体の活性を阻害することが示されている。通常アンタゴマー(antagomer)と称されるこれらの型の分子について、活性には、通常、高濃度が必要であり、in vivoでの送達はあまり効果的ではない。本発明は、(ａ)一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(ｂ)ＲＩＳＣによるポリヌクレオチドの基質としての効率的な認識を促進し、および/または、(ｃ)細胞による一本鎖ヌクレオチドの取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組み合せを含んでもよい。

【０２０２】

本発明により提供される修飾は、全てのポリヌクレオチドに対して適用可能である。これは、一本鎖ＲＩＳＣ侵入性ポリヌクレオチド、一本鎖ＲＩＳＣ阻害性ポリヌクレオチド、多様な長さ(１５～４０ｂｐ)の従来のデュプレックス化ポリヌクレオチド、非対称性デュプレックス化ポリヌクレオチドなどを含む。ポリヌクレオチドは、５'末端修飾、リボース修飾、骨格修飾および疎水性ヌクレオシド修飾を含む、多様な化学修飾パターンにより修飾されていてもよい。

【０２０３】

合成

本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られているいずれの方法によっても、例えば酵素による合成および/または化学合成を使用して、合成され得る。オリゴヌクレオチドは、in vitroで(例えば酵素による合成および化学合成を使用して)、またはin vivoで(当該技術分野において周知の組み換えＤＮＡ技術を使用して)合成され得る。

【０２０４】

いくつかの態様において、化学合成は、修飾ポリヌクレオチドのために使用される。直鎖オリゴヌクレオチドの化学合成は、当該技術分野において周知であり、溶液または固相の技術により達成され得る。好ましくは、合成は、固相方法によるものである。オリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト、亜リン酸トリエステル、Ｈ-ホスホナートおよびホスホトリエステル方法を含む、いくつかの異なる合成手順のいずれかにより、典型的には自動合成方法により、作られてもよい。

【０２０５】

オリゴヌクレオチドの合成プロトコルは当該技術分野において周知であり、例として、米国特許第5,830,653号;WO98/13526;Stec et al.1984.J.Am.Chem.Soc.106:6077;Stec et al.1985.J.Org.Chem.50:3908;Stec et al.J.Chromatog.1985.326:263;LaPlanche et al.1986.Nucl.Acid.Res.1986.14:9081;Fasman G.D.,1989.Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology.1989.CRC Press,Boca Raton,Fla.;Lamone.1993.Biochem.Soc.Trans.21:1;米国特許第5,0

13,830号;米国特許第5,214,135号;米国特許第5,525,719号;Kawasaki et al.1993.J.Med.Chem.36:831;WO 92/03568;米国特許第5,276,019号;および米国特許第5,264,423号において見出され得る。

【０２０６】

選択される合成方法は、所望のオリゴヌクレオチドの長さに依存し得、かかる選択は、当業者の技術の範囲内である。例えば、ホスホロアミダイトおよび亜リン酸トリエステル法により、１７５またはそれより多いヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを生成し得、一方、H-ホスホナート法は、１００ヌクレオチド未満のオリゴヌクレオチドのために良好に機能する。修飾塩基がオリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、および特に、修飾ホスホジエステル連結部が使用される場合、合成手順は、必要に応じて、公知の手順に従って変えられる。このことに関して、Uhlmannら(1990, Chemical Reviews 90:543-584)は、修飾塩基および修飾ホスホジエステル連結部を有するオリゴヌクレオチドを作製するための参考文献および概略手順を提供する。オリゴヌクレオチドを作製するための他の例示的な方法は、Sonveaux.1994.「Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis」;Agrawal.Methods in Molecular Biology 26:1において教示される。例示的な合成方法はまた、「Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach」(Gait,M.J.IR L Press at Oxford University Press.1984)においても教示される。その上、修飾ヌクレオチドを持ついくつかの配列を含む規定の配列の直鎖オリゴヌクレオチドは、数個の商業的供給源から容易に入手可能である。

【０２０７】

オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、または、ゲルクロマトグラフィーおよび高圧液体クロマトグラフィーを含む多数のクロマトグラフィー的方法のいずれにより、精製されてもよい。ヌクレオチド配列、特に未修飾ヌクレオチド配列を確認するために、オリゴヌクレオチドは、マクサム・ギルバートシークエンシング、サンガーシークエンシング、キャピラリー電気泳動シークエンシング、ワンダーリングスポット(wandering spot)シークエンシングの手順を含む、知られている手順のいずれかにより、またはHybond紙に結合させたオリゴヌクレオチドの選択的化学分解を使用することにより、ＤＮＡシークエンシングに供されてもよい。短いオリゴヌクレオチドの配列はまた、レーザー脱離質量分析または高速原子衝撃によっても分析され得る(McNeal,et al.,1982,J.Am.Chem.Soc.104:976;Viari,et al.,1987,Biomed.Environ.Mass Spectrom.14:83;Grotjahn et al.,1982,Nuc.Acid Res.10:4671)。シークエンシング方法はまた、ＲＮＡオリゴヌクレオチドについても利用可能である。

【０２０８】

合成されたオリゴヌクレオチドの品質は、オリゴヌクレオチドを、例えばBergot and Egan.1992.J.Chrom.599:35の方法を使用して、キャピラリー電気泳動および分解性強アニオンＨＰＬＣ(denaturing strong anion HPLC:SAX-HPLC)により試験することにより、確認され得る。

【０２０９】

他の例示的な合成技術は、当該技術分野において周知である(例えばSambrook et al.,Molecular Cloning:a Laboratory Manual,Second Edition(1989);DNA Cloning,Volumes I and II(DN Glover Ed.1985);Oligonucleotide Synthesis(M J Gait Ed,1984;Nucleic Acid Hybridisation(B D Hames and S J Higgins eds.1984);A PracticalGuide to Molecular Cloning (1984);またはシリーズであるMethods in Enzymology(Academic Press,Inc.)を参照)。

【０２１０】

ある態様において、対象とするＲＮＡｉコンストラクトまたは少なくともその一部は、対象とするコンストラクトをコードする発現ベクターから転写される。この目的のために、当該技術分野において認識されるいずれのベクターも使用されてもよい。転写されたＲＮＡｉコンストラクトは、所望の修飾(未修飾センス鎖を修飾されたものにより置き換えることなど)が行われる前に、単離、精製されてもよい。

【０２１１】
送達/キャリア
いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、発明者は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子(例えば、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標))のパッセンジャー鎖およびガイド鎖上の修飾の特定のパターンが、ガイド鎖の核への侵入を容易にし、ガイド鎖が遺伝子サイレンシング(例えば、ＴＩＧＩＴなどの標的遺伝子のサイレンシング)を媒介すると考える。
いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの潜在的な作用機構がこの活性を説明することができるであろう。例えば、いくつかの態様において、核酸分子(例えば、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標))のガイド鎖(例えば、アンチセンス鎖)は、パッセンジャー鎖から解離して、一本鎖として核に入ることができる。いったん核内に入ると、一本鎖のガイド鎖は、ＲＮＡｓｅ Ｈまたは別のリボヌクレアーゼと結合し、標的(例えば、ＴＩＧＩＴ)を切断する(「アンチセンス作用機構」)。いくつかの態様において、核酸分子(例えば、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標))のガイド鎖(例えば、アンチセンス鎖)は、細胞質中または核外でアルゴノート(Ａｇｏ)タンパク質と結合し、ロードされたＡｇｏ複合体を形成し得る。このロードされたＡｇｏ複合体は、核に移動し、次いで標的(例えば、ＴＩＧＩＴ)を切断し得る。いくつかの態様において、核酸分子(例えば、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標))の両方の鎖(例えば、デュプレックス)は核に入り得、ガイド鎖は、ＲＮＡｓｅ Ｈ、Ａｇｏタンパク質または別のリボヌクレアーゼと結合し得、標的(例えば、ＴＩＧＩＴ)を切断する。
【０２１２】
当業者は、本明細書に記載の二本鎖分子のセンス鎖(例えば、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)のセンス鎖)は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子のガイド鎖の送達に限定されないことを理解する。むしろ、いくつかの態様において、本明細書に記載のパッセンジャー鎖は、他の分子(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＡＳＯ)を細胞の核に対して標的化する目的で、同分子に結合(例えば、共有結合、非共有結合、抱合、相補性の領域を介したハイブリダイズなど)される。いくつかの態様において、本明細書に記載のセンス鎖に結合した分子は、合成アンチセンスオリゴヌクレオチド(ＡＳＯ)である。いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合したセンス鎖は、８～１５ヌクレオチド長であり、化学修飾され、疎水性抱合体を含む。
【０２１３】
いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、ＡＳＯは、水素結合によって相補的なパッセンジャー鎖に結合され得る。したがって、いくつかの側面において、本開示は、単離された核酸分子を細胞に投与することを含む、核酸分子を細胞に送達する方法を提供し、ここで、単離された核酸はアンチセンスオリゴヌクレオチド(ＡＳＯ)に対して相補的であるセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は８～１５ヌクレオチド長であり、少なくとも２個のホスホロチオアート修飾を含み、センス鎖中のピリミジンの少なくとも５０％が修飾され、ここで、同分子は疎水性抱合体を含む。
【０２１４】
細胞によるオリゴヌクレオチドの取り込み
オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物は、１以上の細胞または細胞ライセートと接触させられて(すなわち、接触させられるか、または、本明細書においては投与または送達されるとして言及される)、これに取り込まれる。用語「細胞」は、原核および真核細胞、好ましくは脊椎動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞を含む。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は細菌細胞と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は真核細胞(例えば、植物細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞などの節足動物細胞)と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は幹細胞と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は肝細胞(hepatocytes)などの肝臓の細胞(liver cells)と接触させられ、受容体媒介取り込みを介して取り込まれる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、ヒト細胞(例として、好中球、T

細胞、Ｂ細胞、単球/マクロファージ、およびそれらの組み合わせ)、またはヒト細胞株(例として、Ｊｕｒｋａｔ細胞などのＴ細胞株)と接触させられる。

【０２１５】

本発明のオリゴヌクレオチド組成物を、in vitroで、例えば試験管または培養ディッシュ中で(対象中へ導入されても、されなくてもよく)、またはin vivoで、例えば哺乳動物対象などの対象において、またはex vivoで、細胞と接触させてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、局所的に、またはエレクトロポレーションを通して投与される。オリゴヌクレオチドは、エンドサイトーシスによって遅い速度で細胞に取り込まれるが、エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドは、一般に隔絶され、例えば標的核酸分子へのハイブリダイゼーションのために利用可能ではない。一態様において、細胞による取り込みを、エレクトロポレーションまたはリン酸カルシウム沈殿により容易になされ得る。しかしながら、これらの手順はin vitroまたはex vivoの態様でのみ有用であり、便利ではなく、いくつかのケースにおいては細胞毒性と関連する。

【０２１６】

別の態様において、細胞中へのオリゴヌクレオチドの送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な、当該技術分野において認識される方法により、または、トランスフェクションにより、例えばカチオン性、アニオン性または中性脂質組成物もしくはリポソームを使用して、当該技術分野において知られている方法を使用して(例えばWO90/14074;WO91/16024;WO91/17424;米国特許第4,897,355号;Bergan et al.1993.Nucleic Acid Research.21:3567を参照)、増強され得る。増強されたオリゴヌクレオチドの送達はまた、ベクター(例えばShi,Y.2003.Trends Genet 2003 Jan.19:9;Reichhart J M et al.Genesis.2002.34(1-2):1604,Yu et al.2002.Proc.Natl.Acad Sci.USA 99:6047;Sui et al.2002.Proc.Natl.Acad Sci.USA 99:5515を参照)、ウイルス、ポリアミンまたはポリリジン、プロタミンもしくはＮｉ、Ｎ１２-ビス(エチル)スペルミンなどの化合物を使用するポリカチオン抱合体(例えばBartzatt,R. et al.1989.Biotechnol.Appl.Biochem.11:133;Wagner E.et al.1992.Proc.Natl.Acad.Sci.88:4255を参照)の使用によっても媒介され得る。

【０２１７】

オリゴヌクレオチドの取り込みのために使用されるプロトコルは、多数の因子に依存するであろうが、最も重要なのは、使用される細胞の型である。取り込みにおいて重要な他の因子は、これらに限定されないが、オリゴヌクレオチドの性質および濃度、細胞のコンフルエンス、細胞を入れる培養の種類(例えば懸濁培養であるかまたはプレート培養であるか)および細胞を培養する培地の種類を含む。

【０２１８】

免疫原性組成物およびそれを生産する方法

いくつかの態様において、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子は、免疫原性組成物を生産するのに有用である。本明細書に使用されるとき、「免疫原性組成物」とは、本明細書に記載の化学修飾された核酸分子を含む宿主細胞、および任意に１つ以上の薬学的に許容し得る賦形剤または担体を含む組成物である。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、本開示によって記載されるような免疫原性組成物は、１つ以上の免疫チェックポイントタンパク質(例として、ＴＩＧＩＴ)の発現または活性の減少(例として、阻害)によって特徴付けられ、したがって、いくつかの態様において、対象の免疫応答を刺激するのに有用である。

【０２１９】

本明細書に使用されるとき、「宿主細胞」は、１以上の化学修飾された二本鎖核酸分子が導入されている細胞である。典型的には、宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、ブタ細胞等々である。しかしながら、いくつかの態様において、宿主細胞は、非哺乳動物細胞、例えば原核生物細胞(例として、細菌細胞)、酵母細胞、昆虫細胞等々である。一般に、宿主細胞は、健康なドナーなどのドナー由来である(例

として、化学修飾された二本鎖核酸が導入される細胞は、健康なドナーなどのドナーから採取される)。例えば、細胞は、健康なドナーなどのドナーから得られる、骨髄または血液などの生体試料から単離されてもよい。本明細書に使用されるとき「健康なドナー」は、増殖性障害または感染性疾患(例として、細菌感染症、ウイルス感染症、または寄生生物感染症)を有していない、または有している疑いのない対象を指す。しかしながら、いくつかの態様において、宿主細胞は、例えば自家細胞治療の文脈において、増殖性疾患または感染性疾患を有する(または有している疑いのある)対象に由来する。

【０２２０】

いくつかの態様において、細胞(例として、宿主細胞)は、免疫細胞、例えばＴ細胞、Ｂ細胞、樹状細胞(ＤＣ)、顆粒球、マクロファージ等々である。いくつかの態様において、細胞(例として、宿主細胞)は、幹細胞(ＳＣ)または誘導多能性幹細胞(ｉＰＳＣ)などの免疫細胞に分化することができる細胞である。いくつかの態様において、細胞(例として、宿主細胞)は、幹細胞メモリーＴ細胞であり、例えばGattinoni et al.(2017)Nature Medicine 23;18-27に記載されており、それから参照により組み込まれる。

【０２２１】

いくつかの態様において、細胞(例として、宿主細胞)は、キラーＴ細胞、ヘルパーＴ細胞、または制御性Ｔ細胞、などのＴ細胞である。いくつかの態様においてＴ細胞は、キラーＴ細胞(例として、ＣＤ８＋Ｔ細胞)である。いくつかの態様において、Ｔ細胞は、ヘルパーＴ細胞(例として、ＣＤ４＋Ｔ細胞)である。いくつかの態様において、Ｔ細胞は、活性化Ｔ細胞(例として、抗原提示細胞上のＭＨＣクラスＩＩ分子によりペプチド抗原が提示されているＴ細胞)である。

いくつかの態様において、Ｔ細胞は、高親和性Ｔ細胞受容体(ＴＣＲ)および/またはキメラの抗体受容体(ＣＡＲ)を発現する１以上の導入遺伝子を含む。

【０２２２】

いくつかの側面において、本開示は、宿主細胞を生産するために、本開示の１以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を細胞(例として、ドナーから得られる免疫細胞)に導入することが、宿主細胞において免疫チェックポイントタンパク質(例として、ＴＩＧＩＴ)の発現または活性の有意な減少をもたらすという発見に関する。いくつかの態様において、宿主細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない細胞(例として、同じ細胞型の免疫細胞)と比べて、約５％～約５０％減少した免疫チェックポイントタンパク質の発現により特徴づけられる。いくつかの態様において、宿主細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない細胞(例として、同じ細胞型の免疫細胞)(例として、増殖性疾患または感染性疾患を有している、または有している疑いのある対象の免疫細胞)と比べて５０％超(例として、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、１００％、または５１％～１００％の間の任意のパーセンテージについて)減少した免疫チェックポイントタンパク質の発現により特徴づけられる。

【０２２３】

いくつかの態様において、本開示により記載される免疫原性組成物は、多数の宿主細胞を含む。いくつかの態様において、多数の宿主細胞は、約１０,０００宿主細胞(例として、１０,０００宿主細胞/対象のｋｇ)、約５０,０００宿主細胞(例として、５０,０００宿主細胞/対象のｋｇ)、約１００,０００宿主細胞(例として、１００,０００宿主細胞/対象のｋｇ)、約２５０,０００宿主細胞(例として、２５０,０００宿主細胞/対象のｋｇ)、約５００,０００宿主細胞(例として、５００,０００宿主細胞/対象のｋｇ)、約$1 \times 10^6$宿主細胞(例として、約$1 \times 10^6$宿主細胞/対象のｋｇ)、約$5 \times 10^6$宿主細胞(例として、$5 \times 10^6$宿主細胞/対象のｋｇ)、約$1 \times 10^7$宿主細胞(例として、$1 \times 10^7$宿主細胞/対象のｋｇ)、約$1 \times 10^8$宿主細胞(例として、$1 \times 10^8$宿主細胞/対象のｋｇ)、約$1 \times 10^9$宿主細胞(例として、$1 \times 10^9$宿主細胞/対象のｋｇ)、または$1 \times 10^9$を超える宿主細胞(例として、$1 \times 10^9$を超える宿主細胞/対象のｋｇ)である。いくつかの態様において、多数の宿主細胞は、約$1 \times 10^5$と$1 \times 10^{14}$宿主細胞との間(

例として、１ｘ１０$^{5}$と１ｘ１０$^{14}$宿主細胞/対象のｋｇとの間)である。
【０２２４】
いくつかの側面において、本開示は、本開示に記載される免疫原性組成物を生産する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、１以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を細胞に導入することを含み、ここで１以上の化学修飾された二本鎖核酸分子は、ＴＩＧＩＴを標的とし、それにより宿主細胞を生産する。
免疫原性組成物を生産する(例として、宿主細胞を生産する)方法は、in vitro、ex vivo、またはin vivoで、例えば、培養物中のヒト細胞などの、培養物中の哺乳動物細胞において、実施されてもよい。いくつかの態様において、標的細胞(例として、ドナーから得られた細胞)は、本開示の他の箇所でさらに詳細に説明されているように、化学修飾された二本鎖核酸分子の細胞への侵入を促進するための脂質(例として、カチオン性脂質)またはリポソームなどの送達試薬の存在下で接触させてもよい。
【０２２５】
いくつかの態様において、免疫原性組成物を生産する(例として、宿主細胞を生産する)方法は、宿主細胞(例として、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含む細胞)を洗浄期間に供することをさらに含んでもよい。本明細書に使用されるとき、「洗浄期間」とは、宿主細胞が洗浄培地(１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない培地)中で懸濁される期間を指す。いくつかの態様において、洗浄期間は２４時間～６日間(例として、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間、８４時間、９６時間、１０８時間、１２０時間、１３６時間、または１４４時間)である。いくつかの態様において、洗浄期間は２４時間である。いくつかの態様において、洗浄期間は４８時間である。いくつかの態様において、洗浄期間は９６時間である。いくつかの態様において、洗浄期間は６日である。
いくつかの態様において、免疫原性組成物を生産する(例として、宿主細胞を生産する)方法は、宿主細胞(例として、１つ以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含む細胞)を洗浄期間に供することを含まない。
【０２２６】
担体および複合体化剤
本開示は、さらには、本明細書に記載のＲＮＡｉコンストラクトおよび薬学的に許容し得る担体または希釈剤を含む組成物に関する。いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載のＲＮＡｉコンストラクトおよび薬学的に許容し得る担体を含む免疫原性組成物に関する。
本明細書に使用されるとき、「薬学的に許容し得る担体」は、適切な溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。医薬活性物質のためのかかる媒体および剤の使用は、当該技術分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性成分と不相溶性である場合を除いて、それを治療組成物に使用することができる。補助的な活性成分もまた、組成物に組み込むことができる。
【０２２７】
例えば、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、非経口投与のために、リポソーム、またはポリエチレングリコールで修飾された、もしくはカチオン性脂質と混合されたリポソームに組み込まれてもよい。リポソームへの追加の物質、例えば、特定の標的細胞に見出される膜タンパク質に対して反応性の抗体の組み込みは、オリゴヌクレオチドを特定の細胞型(例えば、ＮＫ細胞などの免疫細胞)に標的化するのに役立ち得る。
カプセル化剤は、ベシクル内にオリゴヌクレオチドを捕捉する。本発明の別の態様において、オリゴヌクレオチドは、キャリアまたはビヒクル、例えばリポソームまたはミセルと結びついてもよいが、他のキャリアを使用され得ることは、当業者により理解される通りである。リポソームは、生体膜と類似する構造を有する脂質二重層からなるベシクルである。かかるキャリアは、細胞による取り込みを促進するため、または、オリゴヌクレオチドを標的化するため、または、オリゴヌクレオチドの薬物動態または毒性学的特性を改善するために、使用される。

【０２２８】
例えば、本発明のオリゴヌクレオチドはまた、その中に活性成分が分散してまたは脂質層に接着した水性濃縮層からなる小体中に多様に存在して含有される医薬組成物であるリポソーム中にカプセル化されても、投与されてもよい。オリゴヌクレオチドは、溶解性に依存して、水性層および脂質層の両方に存在しても、一般にリポソーム懸濁液(liposomic suspension)と称されるものの中に存在してもよい。疎水性層は一般に、必ずではないが、レシチンおよびスフィンゴミエリンなどのリン脂質、コレステロールなどのステロイド、リン酸ジアセチルなどの多かれ少なかれイオン性の界面活性剤、ステアリルアミンまたはホスファチジル酸または疎水性の性質の他の材料を含む。リポソームの直径は一般に、およそ１５ｎｍから約５ミクロンまでの範囲である。

【０２２９】
薬物送達ビヒクルとしてのリポソームの使用は、幾つかの利点を与える。リポソームは、細胞内安定性を増大し、取り込み効率を増大し、生物学的活性を改善する。リポソームは、細胞膜を構成する脂質と類似の様式において配置された脂質からなる、中空の球体ベシクルである。これらは、水溶性化合物を封入する内部の水性の空間を有し、直径０.０５から数ミクロンまでの範囲のサイズである。数個の研究から、リポソームが核酸を細胞へ送達し得ること、および、核酸が生物学的に活性であり続けることが示される。例えば、リポフェクチンまたはLIPOFECTAMINE(商標)2000などの本来は研究用ツールとして設計された脂質送達ビヒクルは、無傷の(intact)核酸分子を細胞へ送達し得る。
リポソームを使用することの具体的な利点は以下を含む:それらは組成物において非毒性であり生分解性であること;それらは長期の循環半減期を呈すこと;および、認識分子が、組織へ標的化するために、それらの表面へ容易に付着され得ること。最後に、液体懸濁液または凍結乾燥製品のいずれにおいても、リポソームベースの医薬のコスト効率の良い製造は、受容可能な薬物送達システムとしてのこの技術のバイアビリティを実証している。

【０２３０】
いくつかの側面において、本発明に関連する製剤は、天然に存在するかまたは化学的に合成されたかまたは修飾された、飽和および不飽和の脂肪酸残基のクラスについて選択されてもよい。脂肪酸は、トリグリセリド、ジグリセリドまたは個別の脂肪酸の形態で存在し得る。別の態様において、非経口栄養のために薬理学において現在使用されている脂肪酸および/または脂質のエマルジョンの、よく検証された混合物の使用が利用されてもよい。
リポソームベースの製剤は、オリゴヌクレオチドの送達のために広範に使用される。しかしながら、市販の脂質またはリポソーム製剤の殆どは、少なくとも１つの正に荷電した脂質(例として、カチオン性脂質)を含有する。この正に荷電した脂質の存在は、高レベルのオリゴヌクレオチドのローディングを得るために、および、リポソームの膜融合特性を増強するために、必須であると考えられている。機能的に正に荷電した脂質の化合物を同定するための、数個の方法が実施され、公開されている。しかしながら、カチオン性脂質を含有する市販のリポソーム製剤は、高レベルの毒性によって特徴づけられる。in vivoでの限定された治療インデックスにより、正に荷電した脂質を含有するリポソーム製剤が、ＲＮＡサイレンシングを達成するために必要とされる濃度よりもごく僅かに高い濃度において、毒性(例として、肝臓の酵素の増大)と関連することが明らかとなっている。

【０２３１】
本発明に関連する核酸は、疎水的に修飾され得、中性ナノトランスポーターに包含され得る。中性ナノトランスポーターのさらなる説明は、2009年9月22日に出願されたPCT出願PCT/US2009/005251、表題「中性ナノトランスポーター」から参照により組み込まれる。かかる粒子は、非荷電の脂質混合物中へのオリゴヌクレオチドの定量的な組み込みを可能にする。かかる中性ナノトランスポーター組成物においてカチオン性脂質が毒性レベルを欠いていることは、重要な特性である。

【０２３２】

PCT/US2009/005251に実証されているとおり、オリゴヌクレオチドは、カチオン性脂質を有さない脂質混合物中に効率的に組み込まれ得、かかる組成物は、治療用オリゴヌクレオチドを機能的な様式で細胞に効果的に送達し得る。例えば、脂質混合物が、ホスファチジルコリンベースの脂肪酸およびコレステロールなどのステロールから構成されたとき、高レベルの活性が観察された。例として、中性脂質混合物の１つの好ましい製剤は、少なくとも２０％のＤＯＰＣまたはＤＳＰＣおよび少なくとも２０％のコレステロールなどのステロールから構成される。1:5の脂質対オリゴヌクレオチド比率という低さでも、オリゴヌクレオチドの非荷電製剤中での完全なカプセル化を得るのに充分であることが示された。

【０２３３】

中性ナノトランスポーター組成物は、オリゴヌクレオチドの中性脂質製剤中への効率的なローディングを可能にする。組成物は、分子の疎水性が増大するような様式において修飾されている(例えば、疎水性分子が、疎水性分子に、オリゴヌクレオチド末端または末端でないヌクレオチド、塩基、糖もしくは骨格上で、(共有結合的にまたは非共有結合的に)付着されている)オリゴヌクレオチドを含み、修飾オリゴヌクレオチドは、中性脂質製剤と混合されている(例えば、少なくとも２５％のコレステロールおよび２５％のＤＯＰＣまたはそのアナログを含有する)。別の脂質などのカーゴ分子もまた、組成物中に含まれ得る。この組成物は、製剤の一部がオリゴヌクレオチド自体中に構築される場合、中性脂質粒子中におけるオリゴヌクレオチドの効率的なカプセル化を可能にする。

【０２３４】

いくつかの側面において、５０から１４０ｎｍまでの範囲のサイズの安定な粒子は、疎水性オリゴヌクレオチドを好ましい製剤と複合体化することにより形成され得る。製剤は、それ自体では典型的には小さい粒子を形成せず、むしろ集塊物を形成し、これは疎水性修飾オリゴヌクレオチドを付加することにより、安定な５０～１２０ｎｍの粒子へと転換される。

いくつかの態様において、中性ナノトランスポーター組成物は、疎水性修飾ポリヌクレオチド、中性脂質混合物および任意にカーゴ分子を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの修飾の前よりも疎水性にする少なくとも１つの修飾を有する、本発明のポリヌクレオチド(例として、ｓｄ-ｒｘＲＮＡ)である。修飾は、疎水性分子をポリヌクレオチドに付着(共有結合的または非共有結合的に)することにより達成されてもよい。いくつかの例において、疎水性分子は、親油性基であるかまたは親油性基を含む。

【０２３５】

用語「親油性基」は、水に対するアフィニティーよりも高い、脂質に対するアフィニティーを有する基を意味する。親油性基の例は、これらに限定されないが、コレステロール、コレステリルまたは修飾コレステリル残基、アダマンチン、ジヒドロテステロン(dihydrotesterone)、長鎖アルキル、長鎖アルケニル、長鎖アルキニル、オレイル-リトコール酸、コレン酸、オレオイル-コレン酸、パルミチル酸、ヘプタデシル酸、ミリスチル酸、胆汁酸、コール酸またはタウロコール酸、デオキシコール酸、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド類、ビタミンＥなどのビタミン類、飽和または不飽和のいずれかの脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル類、ピレン類、ポルフィリン類、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン類、ビオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、Texas-Red、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、ｔ-ブチルジメチルシリル、ｔ-ブチルジフェニルシリル、シアニン色素(例えばＣｙ３またはＣｙ５)、Hoechst 33258色素、ソラレンまたはイブプロフェンを含む。コレステロール部分は還元されても(例えばコレスタン中のように)、または、置換されても(例えばハロゲンにより)よい。１分子における異なる親油性基の組み合わせもまた可能である。

【０２３６】

疎水性分子は、ポリヌクレオチドの多様な位置において付着されてもよい。上記のとお

り、疎水性分子は、ポリヌクレオチドの３'または５'末端などのポリヌクレオチドの末端の残基に連結されていてもよい。代わりに、これは、ポリヌクレオチドの内部のヌクレオチドまたは枝上のヌクレオチドに連結されていてもよい。疎水性分子は、例として、ヌクレオチドの２'位に付着されていてもよい。疎水性分子はまた、ポリヌクレオチドのヌクレオチドの複素環式塩基、糖または骨格にも連結されていてもよい。

【０２３７】

疎水性分子は、リンカー部分によりポリヌクレオチドに繋げられていてもよい。任意に、リンカー部分は、非ヌクレオチド性のリンカー部分である。非ヌクレオチド性のリンカーは、例えば、脱塩基残基(ｄスペーサー)、トリエチレングリコール(スペーサー９)もしくはヘキサエチレングリコール(スペーサー１８)などのオリゴエチレングリコール、またはブタンジオールなどのアルカンジオールである。スペーサーユニットは、好ましくは、ホスホジエステルまたはホスホロチオアート結合により連結されている。リンカーユニットは、分子中に１回のみ現れても、または、例えばホスホジエステル、ホスホロチオアート、メチルホスホナートまたはアミン連結部などを介して、数回組み込まれてもよい。

【０２３８】

典型的な抱合プロトコルは、配列の１以上の位置においてアミノリンカーを保有するポリヌクレオチドの合成を含むが、しかしながらリンカーは必要ではない。アミノ基は、次いで、適切なカップリングまたは活性化試薬を使用して、抱合される分子と反応させられる。抱合反応は、まだ固体支持体に結合しているポリヌクレオチドを用いて、または、溶液相中でのポリヌクレオチドの切断に続いて、実施されてもよい。ＨＰＬＣによる修飾ポリヌクレオチドの精製は、典型的には、結果として純粋な材料を生じる。

【０２３９】

いくつかの態様において、疎水性分子は、ミセル中へ組み込まれるために充分な疎水性を提供する、ステロール型抱合体、フィトステロール抱合体、コレステロール抱合体、側鎖の長さが変えられたステロール型抱合体、脂肪酸抱合体、任意の他の疎水性基抱合体、および/または内部ヌクレオシドの疎水性修飾である。

【０２４０】

本発明の目的のために、用語「ステロール」またはステロイドアルコール類は、Ａ環の３位においてヒドロキシル基を持つステロイドの下位群を指す。これらは、アセチル-コエンザイムＡからＨＭＧ-ＣｏＡレダクターゼ経路を介して合成される両親媒性脂質である。全体的な分子は、極めて扁平である。Ａ環上のヒドロキシル基は、極性である。脂肪族鎖の残りは、非極性である。通常、ステロールは、１７位において８炭素鎖を有すると考えられる。

【０２４１】

本発明の目的のために、用語「ステロール型分子」は、ステロイドアルコール類を指し、これは、ステロールと構造が類似する。主要な差異は、環の構造および２１位に結合する側鎖の炭素の数である。

本発明の目的のために、用語「フィトステロール」(また植物ステロールとも称される)は、植物において天然に存在する植物化学物質である、一群のステロイドアルコール類である。２００種を超えるフィトステロールが知られている。

【０２４２】

本発明の目的のために、用語「ステロールの側鎖」は、ステロール型分子の１７位にて付着する側鎖の化学組成を指す。標準的な定義において、ステロールは、８炭素鎖を１７位に保有する４環構造に限定される。本発明において、従来のものよりも長いおよび短い側鎖を持つステロール型分子が記載される。側鎖は、分枝であってもよいし、二重の骨格を含有していてもよい。

よって、本発明に有用なステロールは、例えば、コレステロール、ならびに、１７位に２～７個または９個の炭素より長い側鎖が結合しているユニークなステロールを含む。いくつかの態様において、ポリ炭素テイルの長さは、５～９個の炭素の間で変動する。かかる抱合体は、特に肝臓への送達において、有意により良好なin vivo効力を有してもよい

。これらの型の分子は、従来のコレステロールに抱合されたオリゴヌクレオチドよりも５～９倍低い濃度にて働くことが期待される。

【０２４３】

代わりに、ポリヌクレオチドは、タンパク質、ペプチド、または、疎水性分子として機能する正に荷電した化学物質に結合していてもよい。タンパク質は、プロタミン、ｄｓＲＮＡ結合ドメインおよびアルギニンリッチペプチドからなる群から選択されてもよい。例示的な正に荷電した化学物質は、スペルミン、スペルミジン、カダベリンおよびプトレシンを含む。

別の態様において、疎水性分子抱合体は、疎水性修飾、ホスホロチオアート修飾および2'リボ修飾を含むがこれらに限定されないポリヌクレオチドの特定の化学修飾パターンと組み合わされたとき(本明細書に詳細に記載されるとおり)、さらに高い効力を実証し得る。

【０２４４】

別の態様において、ステロール型分子は、天然に存在するフィトステロールであってもよい。ポリ炭素鎖は、９個より長くても、直鎖であっても、分枝鎖であっても、および/または、二重結合を含有していてもよい。ポリヌクレオチド抱合体を含有するいくつかのフィトステロールは、多様な組織へのポリヌクレオチドの送達において、有意により強力かつ活性であり得る。いくつかのフィトステロールは組織選択性を実証し得ることから、ＲＮＡｉを特異的に特定の組織へ送達するための手段として使用され得る。

【０２４５】

疎水性修飾ポリヌクレオチドは、中性脂肪酸混合物と混合されて、ミセルを形成する。中性脂肪酸混合物は、疎水性修飾ポリヌクレオチドとともにミセルを形成し得る生理学的ｐＨにおいてまたはその付近において、正味の中性または僅かに正味の負の電荷を有する、脂質の混合物である。本発明の目的のために、用語「ミセル」は、非荷電性脂肪酸とリン脂質との混合物により形成される、小さいナノ粒子を指す。中性脂肪酸混合物は、毒性を引き起こさない量で存在する限りにおいて、カチオン性脂質を含んでもよい。いくつかの態様において、中性脂肪酸混合物は、カチオン性脂質を含まない。カチオン性脂質を含まない混合物は、全脂質のうちの１％未満、好ましくは０％が、カチオン性脂質であるものである。用語「カチオン性脂質」は、生理学的ｐＨにおいてまたはその付近において、正味の正の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。用語「アニオン性脂質」は、生理学的ｐＨにおいてまたはその付近において、正味の負の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。

【０２４６】

中性脂質は、強力であるが共有結合ではない引力(例えば静電気、ファンデルワールス、パイ・スタッキング(pi-stacking)などの相互作用)により、本発明のオリゴヌクレオチドに結合する。

中性脂質混合物は、天然に存在するかまたは化学合成された、または、修飾された、飽和および不飽和脂肪酸残基のクラスから選択される製剤を含んでもよい。脂肪酸は、トリグリセリド、ジグリセリドまたは個別の脂肪酸の形態で存在し得る。別の態様において、薬理学において非経口栄養のために現在使用されている脂肪酸のよく確認された混合物および/または脂質エマルジョンが利用されてもよい。

【０２４７】

中性脂肪酸混合物は、好ましくは、コリンをベースとする脂肪酸およびステロールの混合物である。コリンをベースとする脂肪酸は、例として、ＤＤＰＣ、ＤＬＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＳＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣおよびＤＥＰＣなどの合成のホスホコリン誘導体を含む。ＤＯＰＣ(化合物登録番号4235-95-4)は、ジオレオイルホスファチジルコリンである(ジエライドイルホスファチジルコリン、ジオレオイル-ＰＣ、ジオレオイルホスホコリン、ジオレオイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホコリン、ジオレイルホスファチジルコリンとしても知られる)。ＤＳＰＣ(化合物登録番号816-94-4は、ジステアロイルホスファチジルコリンである(１,２-ジステアロイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホコリンとして

も知られる)。

【０２４８】

中性脂肪酸混合物中のステロールは、例として、コレステロールであってもよい。中性脂肪酸混合物は、完全にコリンベースの脂肪酸およびステロールからなっても、または、これは任意にカーゴ分子を含んでもよい。例として、中性脂肪酸混合物は、少なくとも２０％または２５％の脂肪酸および２０％または２５％のステロールを有してもよい。

【０２４９】

本発明の目的のために、用語「脂肪酸」は、脂肪酸の従来の説明に関する。これらは、個別の実体またはジグリセリドおよびトリグリセリドの形態において存在し得る。本発明の目的のために、用語「脂質エマルジョン」は、食事から十分な脂質を得ることができない対象へ静脈内に与えられる安全な脂質製剤を指す。これは、大豆油(または他の天然に存在するオイル)と卵のリン脂質とのエマルジョンである。脂質エマルジョンは、いくつかの不溶性麻酔剤の製剤のために使用されている。本開示において、脂質エマルジョンは、イントラリピッド(Intralipid)、リポシン(Liposyn)、ニュートリピッド(Nutrilipid)などの市販の製剤の一部、特定の脂肪酸が濃縮されている改変された市販の製剤、または、全く新たに処方された脂肪酸とリン脂質との組合せであってもよい。

【０２５０】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物と接触させられる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例えば上記の脂質または脂質組成物の１つなどの脂質を含む混合物と、約１２時間～約２４時間接触させられる。別の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の１つを含む混合物と、約１～約５日間接触させられる。一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約３日間～約３０日間までもの長さにわたり接触させられる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約５～約２０日間、接触状態に置かれる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約７～約１５日間接触させたままで置かれる。

【０２５１】

製剤の５０％～６０％は、任意に、他のいずれの脂質または分子であってもよい。かかる脂質または分子は、本明細書において、カーゴ脂質またはカーゴ分子として言及される。カーゴ分子は、これらに限定されずに、イントラリピッド(intralipid)、低分子、膜融合ペプチドもしくは脂質を含むか、または、他の低分子が、細胞取り込み、エンドソームによる放出または組織分布特性を変えるために添加されてもよい。かかる特性が望ましい場合、カーゴ分子に耐性を示す能力は、これらの粒子の特性の改変のために重要である。例として、いくつかの組織特異的代謝物の存在は、組織分布プロフィールを大幅に変える場合がある。例えば、多様な飽和レベルを有するより短いまたはより長い脂質鎖が濃縮されているイントラリピッド(intralipid)型製剤の使用は、これらの型の製剤の組織分布プロフィール(およびそれらのローディング)に影響を及ぼす。

【０２５２】

本発明に従い有用なカーゴ脂質の例は、膜融合脂質である。例として、双性イオン脂質ＤＯＰＥ(化合物登録番号4004-5-1、１,2-ジオレオイル-ｓｎ-グリセロ-３-ホスホエタノールアミン)は、好ましいカーゴ脂質である。

イントラリピッド(Intralipid)は、以下の組成から構成され得る:１０００ｍＬが以下を含有する:精製大豆油９０ｇ、精製卵リン脂質１２ｇ、無水グリセロール２２ｇ、注射用水(１０００ｍＬへの十分量)。ｐＨは、水酸化ナトリウムで、約ｐＨ８に調整される。エネルギー含量/Ｌ:４.６ＭＪ(１９０ｋｃａｌ)。浸透圧(およそ):３００ｍＯｓｍ/水１ｋｇ。別の態様において、脂質エマルジョンは、５％のベニバナ油、５％の大豆油、乳化剤として添加される最大１.２％までの卵リン脂質および注射用水中の２.５％のグリセリンを含有する、リポシン(Liposyn)である。これはまた、ｐＨ調整のために水酸化ナトリウムを含有してもよい。ｐＨ８.０(６.０～９.０)。リポシンは、２７６ｍＯｓｍｏｌ/

リットル(実測値)の浸透圧を有する。

【０２５３】

カーゴ脂質のアイデンティティー、量および比率のバリエーションは、これらの化合物の細胞による取り込みおよび組織分布の特徴に影響を及ぼす。例えば、脂質テイルの長さおよび飽和性のレベルは、肝臓、肺、脂肪および心筋細胞への異なる取り込みに影響を及ぼす。ビタミン類または異なる形態のステロールなどの特別な疎水性分子の添加は、特定の化合物の代謝に関与する特別な組織への分布に有利に働き得る。いくつかの態様において、ビタミンＡまたはＥが用いられる。複合体は、異なるオリゴヌクレオチド濃度にて形成され、より高い濃度は、より効率的な複合体形成に有利に働く。

【０２５４】

別の態様において、脂質エマルジョンは、脂質の混合物に基づく。かかる脂質は、天然の化合物、化学合成された化合物、精製脂肪酸または他のいずれの脂質をも含んでもよい。さらに別の態様において、脂質エマルジョンの組成は、完全に人工的なものである。特定の態様において、脂質エマルジョンは、７０％を超えて、リノール酸である。さらに別の特定の態様において、脂質エマルジョンは、少なくとも１％のカルジオリピンである。リノール酸(ＬＡ)は、不飽和オメガ-６脂肪酸である。これは、１８-炭素鎖および２個のシス二重結合を有するカルボン酸からなる無色の液体である。

本発明のさらに別の態様において、疎水的に修飾されているポリヌクレオチドの組織分布を変えるための手段として、脂質エマルジョンの組成の変更が使用される。この方法論は、特定の組織へのポリヌクレオチドの特異的送達をもたらす。

【０２５５】

別の態様において、カーゴ分子の脂質エマルジョンは、７０％を超えるリノール酸($C_{18}H_{32}O_2$)および/またはカルジオリピンを含む。

イントラリピッド(intralipid)などの脂質エマルジョンは、いくつかの非水溶性薬物(プロポフォール(Propofol)(Diprivanとして再処方されている)など)のための送達用製剤として、前から使用されてきた。本発明のユニークな特徴は、(ａ)修飾ポリヌクレオチドを１以上の疎水性化合物(単数または複数)と組み合わせ、それによりこれが脂質ミセル中に組み込まれ得るというコンセプト、および(ｂ)可逆性キャリアを提供するためにこれを脂質エマルジョンと混合すること、を含む。血流中への注射の後で、ミセルは通常、アルブミン、ＨＤＬ、ＬＤＬおよびその他の血清タンパク質と結合する。この結合は可逆性であり、最終的に脂質は細胞により吸収される。ミセルの一部として組み込まれるポリヌクレオチドは、次いで、細胞の表面近くに送達されるであろう。その後、ステロール型送達を含むがこれらに限定されない多様な機構を通して、細胞による取り込みが起こり得る。

【０２５６】

複合体化剤は、強力であるが共有結合ではない引力(例えば静電気、ファンデルワールス、パイ・スタッキングなどの相互作用)により、本発明のオリゴヌクレオチドに結合する。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの細胞による取り込みを増大するために、複合体化剤と複合体化され得る。複合体化剤の例は、カチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞へ送達するために使用され得る。しかしながら、上記のとおり、カチオン性脂質を含まない製剤が、いくつかの態様において好ましい。

【０２５７】

用語「カチオン性脂質」は、極性および非極性ドメインの両方を有する脂質および合成脂質であって、生理学的ｐＨまたはその付近において正に荷電することができ、核酸などのポリアニオンに結合して核酸の細胞中への送達を促進するものを含む。一般に、カチオン性脂質は、飽和および不飽和アルキル、ならびに、脂環式のエーテル類およびアミンのエステル類、アミド類、または、これらの誘導体を含む。カチオン性脂質の直鎖および分枝アルキルおよびアルケニル基は、例えば、１から約２５個の炭素原子を含有し得る。好ましい直鎖または分枝アルキルまたはアルケン基は、６個以上の炭素原子を有する。脂環

式基は、コレステロールおよび他のステロイド基を含む。カチオン性脂質は、例えばＣｌ⁻、Ｂｒ⁻、Ｉ⁻、Ｆ⁻、アセタート、トリフルオロ酢酸、スルファート、亜硝酸化合物(nitrite)およびニトラートを含む多様な対イオン(アニオン)とともに調製され得る。

【０２５８】

カチオン性脂質の例は、ポリエチレンイミン、ポリアミドアミン(ＰＡＭＡＭ)スターバーストデンドリマー、リポフェクチン(ＤＯＴＭＡとＤＯＰＥとの組合せ)、リポフェクターゼ(Lipofectase)、LIPOFECTAMINE(商標)(例えば、LIPOFECTAMINE(商標)2000)、ＤＯＰＥ、サイトフェクチン(Cytofectin)(Gilead Sciences,Foster City,Calif.)、およびユーフェクチン(Eufectins)(JBL,San Luis Obispo,Calif.)を含む。

【０２５９】

例示的なカチオン性リポソームは、N-［１-(２,３-ジオレオロキシ)-プロピル］-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(ＤＯＴＭＡ)、N-［１-(２,３-ジオレオロキシ)-プロピル］-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルファート(ＤＯＴＡＰ)、３β-［N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル］コレステロール(ＤＣ-Ｃｈｏｌ)、２,３,-ジオレイルオキシ-N-［２(スペルミンカルボキサミド)エチル］-N,N-ジメチル-１-プロパンアミニウムトリフルオロアセタート(ＤＯＳＰＡ)、１,２-ジミリスチルオキシプロピル-３-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド;およびジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(ＤＤＡＢ)から製造され得る。例えばカチオン性脂質N-(１-(２,３-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(ＤＯＴＭＡ)は、ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドのアンチセンス効果を１０００倍増大することが見出された(Vlassov et al., 1994, Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。オリゴヌクレオチドはまた、例えばポリ(Ｌ-リジン)またはアビジンと複合体化されてもよく、脂質は、この混合物中、例えばステリル-ポリ(Ｌ-リジン)に含まれても含まれなくてもよい。

【０２６０】

カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞に送達するために当該技術分野において使用されてきた(例えば米国特許第5,855,910号;同第5,851,548号;同第5,830,430号;同第5,780,053号;同第5,767,099号;Lewis et al.1996.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:3176;Hope et al.1998.Molecular Membrane Biology 15:1を参照)。今回のオリゴヌクレオチドの取り込みを容易にするために使用され得る他の脂質組成物は、クレームされる方法と組み合わせて使用され得る。上で列記されるものに加えて、例えば米国特許第4,235,871号;米国特許第4,501,728号;同第4,837,028号;同第4,737,323号において教示されるものを含む他の脂質組成物もまた、当該技術分野において知られている。

一態様において、脂質組成物は、剤、例えばウイルスタンパク質を、オリゴヌクレオチドの脂質媒介性トランスフェクションを増強するためにさらに含み得る(Kamata,et al.,1994.Nucl.Acids.Res.22:536)。別の態様において、オリゴヌクレオチドは、例えば米国特許第5,736,392号に教示されるとおりのオリゴヌクレオチド、ペプチドおよび脂質を含む組成物の一部として、細胞と接触させられる。血清耐性である改善された脂質もまた記載されている(Lewis,et al.,1996.Proc.Natl.Acad.Sci.93:3176)。カチオン性脂質および他の複合体化剤は、エンドサイトーシスを通して細胞中へ運搬されるオリゴヌクレオチドの数を増大するために作用する。

【０２６１】

別の態様において、オリゴヌクレオチドの取り込みを改善するために、N-置換グリシンオリゴヌクレオチド(ペプトイド)が使用され得る。ペプトイドは、トランスフェクションのためのカチオン性脂質様化合物を作製するために使用されてきた(Murphy,et al.,1998.Proc.Natl.Acad.Sci.95:1517)。ペプトイドは、標準的な方法(例えばR.N.,et al.1992.J.Am.Chem.Soc.114:10646;Zuckermann,R.N.,et al.1992.Int.J.Peptide Protein Res.40:497)を使用して合成され得る。カチオン性脂質とペプトイドとの組合せであるリプトイド(liptoid)もまた、目的のオリゴヌクレオチドの取り込みを改

善するために使用され得る(Hunag,et al.,1998.Chemistry and Biology.5:345)。リプトイドは、ペプトイドオリゴヌクレオチドを産生して、アミノ末端のサブモノマーをそのアミノ基を介して脂質にカップリングすることにより合成され得る(Hunag,et al.,1998.Chemistry and Biology.5:345)。

【０２６２】

正に荷電したアミノ酸を、高活性カチオン性脂質を作製するために使用され得ることは、当該技術分野において知られている(Lewis et al.1996.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93:3176)。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、親油性部分に結合した多数のアルギニン、リジン、ヒスチジンまたはオルニチン残基を含む(例えば米国特許第5,777,153号を参照)。

【０２６３】

別の態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、約１～約４個の塩基性残基を有するペプチドを含む。これらの塩基性残基は、例えばペプチドのアミノ末端、Ｃ末端または内部領域に位置され得る。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されてきた。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖(例えばグリシン(これはまた非極性であるとも考えられる)、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ-分枝側鎖(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を持つアミノ酸を含む。塩基性アミノ酸の他にも、ペプチドの他の残基の大多数または全てが、非塩基性アミノ酸から、例えばリジン、アルギニンまたはヒスチジン以外のアミノ酸から選択され得る。好ましくは、長い中性の側鎖を有する中性アミノ酸が優位に使用される。

【０２６４】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、１以上のガンマカルボキシグルタミン酸残基またはγ-Ｇｌａ残基を有する天然または合成のポリペプチドを含む。これらのガンマカルボキシグルタミン酸残基により、ポリペプチドが、互いにおよび膜表面に、結合することが可能になる。言い換えると、一連のγ-Ｇｌａを有するポリペプチドは、ＲＮＡｉコンストラクトが、それが接触した膜が何であれそれに固着することを助けるための汎用送達モダリティーとして使用され得る。これは、ＲＮＡｉコンストラクトが血流からクリアランスされることを遅延し、それらが標的にホーミングするチャンスを増強し得る。

【０２６５】

ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、天然のタンパク質中に存在してもよい(例えばプロトロンビンは１０個のγ-Ｇｌａ残基を有する)。代わりに、これらは、精製された、組み換え的に作製された、または、化学合成されたポリペプチド中に、カルボキシル化により、例えばビタミンＫ依存性カルボキシラーゼを使用して、導入され得る。ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、連続的であっても非連続的であってもよく、ポリペプチド中のかかるガンマカルボキシグルタミン酸残基の総数および位置は、ポリヌクレオチドの異なるレベルの「固着性(stickiness)」を達成するために制御/微調整され得る。

【０２６６】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物と接触させられる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例えば上記の脂質または脂質組成物の１つなどの脂質を含む混合物と、約１２時間～約２４時間接触させられる。別の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の１つを含む混合物と、約１～約５日間接触させられる。一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約３日間～約３０日間までもの長さにわたり接触させられる。別の態様において、脂質を含む

混合物は、細胞と、少なくとも約５～約２０日間、接触状態に置かれる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約７～約１５日間接触させたままで置かれる。

【０２６７】

例えば、一態様において、オリゴヌクレオチド組成物は、サイトフェクチンＣＳまたはＧＳＶ(Glen Research; Sterling, Va.から入手可能)、ＧＳ３８１５、ＧＳ２８８８などの脂質の存在下において、本明細書に記載されるとおり、長期のインキュベーション期間にわたって細胞と接触させられてもよい。

【０２６８】

一態様において、細胞の、脂質およびオリゴヌクレオチド組成物を含む混合物とのインキュベーションは、細胞のバイアビリティを低下させない。好ましくは、トランスフェクション期間の後で、細胞は実質的に生存している。一態様において、トランスフェクションの後で、細胞は、少なくとも約７０％～少なくとも約１００％生存している。別の態様において、細胞は、少なくとも約８０％～少なくとも約９５％生存している。さらに別の態様において、細胞は、少なくとも約８５％～少なくとも約９０％生存している。

一態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書において「輸送ペプチド」として言及される、オリゴヌクレオチドを細胞中へ輸送するペプチド配列を付着させることにより修飾される。一態様において、組成物は、タンパク質をコードする標的核酸分子に対して相補的であるオリゴヌクレオチドおよび共有結合で付着している輸送ペプチドを含む。

【０２６９】

語「輸送ペプチド」は、オリゴヌクレオチドの細胞中への輸送を容易にさせるアミノ酸配列を含む。それが連結されている部分の細胞中への輸送を容易にさせる例示的なペプチドは、当該技術分野において知られており、例えばＨＩＶ ＴＡＴ転写因子、ラクトフェリン、ヘルペスＶＰ２２タンパク質および線維芽細胞増殖因子２を含む(Pooga et al.1998.Nature Biotechnology.16:857;およびDerossi et al.1998.Trends in Cell Biology.8:84;Elliott and O'Hare.1997.Cell 88:223)。

オリゴヌクレオチドは、知られている技術(例えばProchiantz,A.1996.Curr.Opin.Neurobiol.6:629;Derossi et al.1998.Trends Cell Biol.8:84;Troy et al.1996.J.Neurosci.16:253、Vives et al.1997.J.Biol.Chem.272:16010)を使用して輸送ペプチドに付着させ得る。例えば、一態様において、活性化チオール基を保有するオリゴヌクレオチドは、そのチオール基を介して、輸送ペプチド中に存在するシステインに(例えばDerossi et al.1998.Trends Cell Biol.8:84;Prochiantz.1996.Current Opinion in Neurobiol.6:629;Allinquant et al.1995.J Cell Biol.128:919において教示されるとおり、例えばアンテナペディアホメオドメインの第２と第３とのヘリックスの間のβターン中に存在するシステインに)連結させる。別の態様において、Ｂｏｃ-Ｃｙｓ-(Ｎｐｙｓ)ＯＨ基は、最後の(Ｎ末端)アミノ酸およびＳＨ基を保有するオリゴヌクレオチドがペプチドにカップリングされ得るように、輸送ペプチドにカップリングされ得る(Troy et al.1996.J.Neurosci.16:253)。

【０２７０】

一態様において、連結基(linking group)はヌクレオモノマーに付着され得、輸送ペプチドはリンカーへ共有結合で付着させられ得る。一態様において、リンカーは、輸送ペプチドについての結合部位として、および、ヌクレアーゼに対する安定性を提供し得るものの両方として、機能し得る。好適なリンカーの例は、置換または非置換の$C_1$～$C_{20}$アルキル鎖、$C_2$～$C_{20}$アルケニル鎖、$C_2$～$C_{20}$アルキニル鎖、ペプチドおよびヘテロ原子(例えばＳ、Ｏ、ＮＨなど)を含む。他の例示的なリンカーは、スルホスクシンイミジル-４-(マレイミドフェニル)-酪酸(ＳＭＰＢ)(例えばSmith et al.Bioch em J 1991.276:417-2を参照)などの二官能性架橋剤を含む。

【０２７１】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、受容体により媒介されるエンドサイトーシス機構を遺伝子の細胞中への送達のために利用する、分子抱合体として合成される

(例えばBunnell et al.1992.Somatic Cell and Molecular Genetics.18:559およびこれにおいて引用される参考文献を参照)。

in vitroおよび/またはin vivoでのＲＮＡｉ試薬の送達のための他の担体は、当該技術分野において知られており、目的のＲＮＡｉコンストラクトを(例として、Ｔ細胞などの宿主細胞へ)送達するために使用され得る。例えば、数例を挙げると、米国特許出願公開第20080152661号、同第20080112916号、同第20080107694号、同第20080038296号、同第20070231392号、同第20060240093号、同第20060178327号、同第20060008910号、同第20050265957号、同第20050064595号、同第20050042227号、同第20050037496号、同第20050026286号、同第20040162235号、同第20040072785号、同第20040063654号、同第20030157030号、WO2008/036825、WO04/065601およびAU2004206255B2を参照(全て参照により組み込まれる)。

【０２７２】

治療方法

いくつかの側面において、本開示は、本開示に記載される免疫原性組成物を対象(例として、増殖性疾患または感染性疾患を有している、または有している疑いのある対象)に投与することにより増殖性疾患または感染性疾患を処置する方法を提供する。いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書に記載される免疫原性組成物は、いくつかの態様において、免疫チェックポイントタンパク質の発現の減少によって特徴付けられ、したがって、免疫チェックポイントタンパク質の発現の増大によって特徴付けられる特定の増殖性疾患または感染性疾患を有する対象の免疫系を刺激するのに有用である。

【０２７３】

本明細書に使用されるとき、「増殖性疾患」は、がん、アテローム性動脈硬化、リウマチ性関節炎、乾癬、特発性肺線維症、強皮症、肝臓の硬変等々を含む、過度の、細胞の増殖および細胞マトリックスのターンオーバーにより特徴づけられる疾患および障害を指す。がんの例は、これらに限定されないが、小細胞肺がん、結腸がん、乳房がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、黒色腫、慢性骨髄性白血病(ＣＭＬ)などの血液悪性腫瘍等を含む。

対象の例は、哺乳動物、例として、ヒトおよび他の霊長目の動物;ウシ、ブタ、ウマ、および畜産用(farming)(農業用(agricultural))動物;イヌ、ネコ、および他の飼い慣らされた愛玩動物(domesticated pets);マウス、ラット、およびトランスジェニック非ヒト動物を含む。

【０２７４】

いくつかの態様において、本開示に記載される免疫原性組成物は、養子細胞移植(ＡＣＴ)治療方法により対象に投与される。ＡＣＴモダリティーの例は、これらに限定されないが、自家細胞治療(例として、対象自身の細胞が取り出され、遺伝子的に操作され、対象に戻される)、および他家細胞治療(例として、細胞はドナーから取り出され、遺伝子的に操作され、レシピエントに置かれる)を含む。いくつかの態様において、ＡＣＴはヒト細胞株(例として、Ｊｕｒｋａｔ細胞)で行われる。いくつかの態様において、ＡＣＴ治療方法に利用される細胞は、選択的された抗体部分に基づく標的抗原に対して特異性をディスプレイする操作された細胞受容体である、キメラ抗原受容体(ＣＡＲ)を発現するように遺伝子的に操作されていてもよい。結果的に、いくつかの態様において、ＣＡＲ Ｔ細胞(例としてＣＡＲＴ)は、ＡＣＴ治療の目的のために、本明細書に記載の方法を用いて、化学修飾された二本鎖核酸でトランスフェクトされてもよい。好中球、Ｂ細胞、単球/マクロファージ、およびそれらの組み合わせなどの他の免疫細胞が、Ｔ細胞に加えて、またはＴ細胞の代わりに、本明細書に開示されるＡＣＴ治療に使用されてもよい。

【０２７５】

in vivoでの適用に関して、本発明の製剤を、選択した投与の経路(例えば、非経口、経口または腹腔内)に適応した種々の形態で患者に投与することができる。好ましい非経

口投与は、以下の経路による投与を含む:静脈内;筋肉内;腫瘍内(intratumorally);間質内(interstitially);動脈内;皮下;眼内;滑膜内(intrasynovial);経皮を含む経上皮;吸入を介した肺;眼(ophthalmic);舌下および口腔内;眼(ophthalmic)を含む局所;経皮;眼(ocular);直腸;ならびに送気を介した経鼻吸入。

【０２７６】

非経口投与用の医薬製剤は、水溶性または水分散性の形態での活性化合物の水性溶液を含む。加えて、好適な油性注射用懸濁液としての活性化合物の懸濁液も、投与されてもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルは、脂肪油、例えばゴマ油、または、合成脂肪酸エステル類、例えばオレイン酸エチルまたはトリグリセリドを含む。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘性を増大させる物質を含有してもよく、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどを含み、任意に、懸濁液はまた、安定化剤を含んでもよい。本発明のオリゴヌクレオチドは、液体の溶液、好ましくはハンクス溶液またはリンガー溶液などの生理学的に適合性の緩衝液中で処方されてもよい。さらに、オリゴヌクレオチドは、固体の形態において処方されて、使用の直前に再溶解されるか懸濁されてもよい。凍結乾燥形態もまた、本発明において含まれる。

【０２７７】

薬物送達ビヒクルは、例えばin vitroでの投与のため、全身投与のために、選ばれ得る。これらのビヒクルは、遅延放出リザーバとして機能するように、または、この含有物を標的細胞に直接的に送達するように、設計され得る。いくつかの直接送達用薬物ビヒクルを使用する利点は、１回の取り込みごとに複数の分子が送達されることである。かかるビヒクルは、さもなければ血流から急速にクリアランスされるであろう薬物の循環半減期を延長することが示されている。このカテゴリーに分類されるかかる特殊化された薬物送達ビヒクルのいくつかの例は、リポソーム、ハイドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルおよび生体粘着性ミクロスフィアである。

【０２７８】

本発明のオリゴヌクレオチドの活性量の投与は、所望の結果を達成するために必要な投与量および時間において、有効量として定義される。例えば、オリゴヌクレオチドの活性量は、細胞の型、使用されるオリゴヌクレオチド、ならびに、in vivoでの使用については疾患の状態、個体の年齢、性別および体重、ならびに、個体において所望の応答を惹起するオリゴヌクレオチドの能力などの因子に従って変動してもよい。細胞中でのオリゴヌクレオチドの治療的レベルの確立は、取り込みの速度と流出または分解の速度に依存する。分解の度合いを低下させることは、オリゴヌクレオチドの細胞内半減期を延長する。よって、化学修飾されたオリゴヌクレオチド、例えばリン酸骨格の修飾を持つものは、異なる用量を必要とする場合がある。

【０２７９】

免疫原性組成物の正確な投薬量および投与される用量の回数は、実験的におよび臨床試験において生み出されるデータに依存するであろう。所望の効果、送達ビヒクル、疾患の兆候および投与の経路などの数個の因子が、投薬量に影響を及ぼすであろう。投薬量は当業者により容易に決定され得、対象とする医薬組成物中へ製剤化される。好ましくは、処置の期間は、少なくとも疾患の症状の経過全体に及ぶであろう。

【０２８０】

投薬レジメンは、最適治療応答を提供するために調整されてもよい。例えば、免疫原性組成物は、繰り返して投与されてもよく、例えば数回の用量が毎日投与してもよく、または、その用量が、治療状況の要件に従って比例的に低減させてもよい。化学修飾された二本鎖核酸分子または免疫原性組成物が細胞へ投与されるかまたは対象へ投与されるかに関わらず、当業者は、対象とするそれらの適切な用量および投与のスケジュールを容易に決定することができるであろう。

皮内注射または皮下送達などを通じた免疫原性組成物の投与は、投薬レジメンの試験を通じて最適化され得る。いくつかの態様において、単一の投与は十分である。投与された免疫原性組成物の効果をさらに延長するために、当業者によく知られているように、組成

物は、徐放性製剤またはデバイスで投与され得る。

【０２８１】

他の態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子または免疫原性組成物は複数回投与される。いくつかの例において、これは、毎日、週２回、毎週、２週間毎、３週間毎、毎月、２カ月毎、３カ月毎、４カ月毎、５カ月毎、６カ月毎または６カ月に１回未満、投与される。いくつかの例において、これは、１日、１週間、１カ月および/または１年あたり、複数回投与される。例えば、これは、およそ１時間毎、２時間毎、３時間毎、４時間毎、５時間毎、６時間毎、７時間毎、８時間毎、９時間毎、１０時間毎、１２時間毎、または１２時間よりも長い時間毎に、投与することができる。これは、１日あたり１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１０回よりも多い回数、投与することができる。

【０２８２】

本発明の側面は、免疫原性組成物を対象へ投与することに関する。いくつかの例において、対象は患者であり、免疫原性組成物の投与には、組成物を医院で投与することが関与する。

いくつかの態様において、１種より多くの免疫原性組成物が同時に投与される。例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０種または１０種より多くの異なる組成物を含む組成物が投与されてもよい。ある態様において、組成物は２または３種の異なる免疫原性組成物を含む。

【０２８３】

自己送達ＲＮＡｉ免疫治療剤

その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第10,934,550号に記載されているように、免疫治療剤は、免疫抑制メカニズムに関与する特定の遺伝子を標的化およびノックダウンするように設計された特定のＩＮＴＡＳＹＬ(商標)剤で細胞を処理することにより生産された。いくつかの細胞および細胞株は、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物で首尾よく処理され、特定のヒト細胞における標的とされた遺伝子発現の少なくとも７０％をノックダウンすることが示された。

これらの研究は、通常トランスフェクションに極めて耐性のある細胞における標的遺伝子の発現を抑制するこれらの免疫原性剤の有用性を実証し、この剤があらゆる細胞型の標的細胞の発現を減少させることができることを示唆した。

【０２８４】

本発明の目的のために、範囲は、本明細書において、「約」１つの特定の値から、および/または「約」別の特定の値までとして表現されてもよい。かかる範囲が表現される場合、別の態様は、１つの特定の値から、および/または他の特定の値までを含む。同様に、先行詞「約」の使用により値が近似値として表現される場合、特定の値が別の態様を形成することが理解されるだろう。各範囲の終点は、他の終点に関連して、および他の終点とは独立して、共に重要であることがさらに理解されるだろう。

さらに、本発明の目的のために、用語「a」または「an」の存在は、１以上のその存在を指し;例えば、「タンパク質(a protein)」または「核酸分子(a nucleic acid molecule)」は、１以上のこれらの化合物または少なくとも１つの化合物を指す。したがって、用語「a」(または「an」)、「１つ以上の(one or more)」および「少なくとも１つの(at least one)」は、本明細書で互換的に使用することができる。また、用語「含む(comprising)」、「含む(including)」、「有する(having)」は互換的に使用することができることに留意されたい。さらに、「からなる群から選択される」化合物は、２つ以上の化合物の混合物(すなわち、組み合わせ)を含む、その後に続くリスト中の１つ以上の化合物を指す。

【０２８５】

本発明に従って、単離された、または生物学的に純粋なタンパク質または核酸分子は、その自然環境から取り出された化合物である。したがって、「単離された」および「生物学的に純粋」は、化合物が精製されている程度を必ずしも反映しない。本発明の単離され

た化合物は、その自然の供給源から得ることができ、分子生物学的技法を使用して生産することができ、または化学合成により生産することができる。

本明細書に記載の組成物および方法は、以下の例によってさらに例証されるが、これらは決して、さらに限定するものとして解釈されるべきではない。本出願を通して引用された全ての参考資料(参考文献、交付済み特許、公開された特許出願および同時係属の特許出願を含む)のすべての全体の内容は、参照によりここに明示的に組み込まれる。

【０２８６】

例

例１:自己送達ＲＮＡｉ免疫治療剤

ＴＩＧＩＴ(NCBI GenBank Accession No.NM_173799)をコードする遺伝子を独自のアルゴリズムを使用して分析し、好ましいＩＮＴＡＳＹＬ(商標)標的配列および標的領域を同定した。(表１)

Ｔｉｇｉｔ１～Ｔｉｇｉｔ２０の配列は、米国特許公開番号2020/0215113において先に開示されており、ならびにそれから参照により組み込まれ、特許公開全体が参照により本明細書に組み込まれる。

Ｔｉｇｉｔ２１は、本明細書において追加の好ましいＩＮＴＡＳＹＬ(商標)標的配列として同定された。

【０２８７】

表１　ＴＩＧＩＴ標的配列および遺伝子領域

【表１－１】

| | TIGIT | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| オリゴID | | 配列 | 配列番号: | 遺伝子領域 | 配列番号: |
| Tigit 1 | TIGIT_NM_173799 human_840 | CUUUUGUCUUUGCUAUUAUA | 7 | CTTCTGGAAGATACACTTTTGTCTTTGCTATTATAGATGAATATA | 28 |
| Tigit 2 | TIGIT_NM_173799 human_2827 | UAAUUGGUAUAAGCAUAAAA | 8 | CAAGATGTGCTGTTATAATTGGTATAAGCATAAAATCACACTAGA | 29 |
| Tigit 3 | TIGIT_NM_173799 human_2436 | CAAAUUGGAAGUGAACUAAA | 9 | ATAGAACACAATTCACAAATTGGAAGTGAACTAAAATGTAATGAC | 30 |

【表１－２】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tigit 4 | TIGIT_NM_173799_human_2364 | GUUUGCUGUGGCAGUUUACA | 10 | CGTAAAAATGTTGTTGTTTGCTGTGGCAGTTTACAGCATTTTTCT | 31 |
| Tigit 5 | TIGIT_NM_173799_human_1039 | GAUCAUAAAUGCAAAAUUAA | 11 | AGTAACGTGGATCTTGATCATAAATGCAAAATTAAAAAATATCTT | 32 |
| Tigit 6 | TIGIT_NM_173799_human_559 | CGCGUUGACUAGAAAGAAGA | 12 | AGTCATCGTGGTGGTCGCGTTGACTAGAAAGAAGAAAGCCCTCAG | 33 |
| Tigit 7 | TIGIT_NM_173799_human_2666 | UUUAAAUAGAACUCACUGAA | 13 | TTTGAAAAAAATTTTTTTAAATAGAACTCACTGAACTAGATTCTC | 34 |
| Tigit 8 | TIGIT_NM_173799_human_2406 | GCAAAUCUGUUGGAAAUAGA | 14 | TCTTGCAAAATTAGTGCAAATCTGTTGGAAATAGAACACAATTCA | 35 |
| Tigit 9 | TIGIT_NM_173799_human_2391 | UCUUGCAAAAUUAGUGCAAA | 15 | AGTTTACAGCATTTTTCTTGCAAAATTAGTGCAAATCTGTTGGAA | 36 |
| Tigit 10 | TIGIT_NM_173799_human_2284 | ACAUAGGAAGAAUGAACUGA | 16 | TCTACCAAATGGGTTACATAGGAAGAATGAACTGAAATCTGTCCA | 37 |
| Tigit 11 | TIGIT_NM_173799_human_2262 | UCACUUUUCUACCAAAUGGG | 17 | ATTATTATTATTTTTTCACTTTTCTACCAAATGGGTTACATAGGA | 38 |
| Tigit 12 | TIGIT_NM_173799_human_2531 | GUGUUAUUUAACAUAAUUAU | 18 | TGGACTGAGAGTTGGGTGTTATTTAACATAATTATGGTAATTGGG | 39 |
| Tigit 13 | TIGIT_NM_173799_human_924 | UGUGUGUUCAGUUGAGUGAA | 19 | GTGTGTGTATGTGTGTGTGTGTTCAGTTGAGTGAATAAATGTCAT | 40 |
| Tigit 14 | TIGIT_NM_173799_human_847 | CUUUGCUAUUAUAGAUGAAU | 20 | AAGATACACTTTTGTCTTTGCTATTATAGATGAATATATAAGCAG | 41 |
| Tigit 15 | TIGIT_NM_173799_human_2637 | GAAAUGGGAUUCAAUUUGAA | 21 | ATGGGTCAGGTTACTGAAATGGGATTCAATTTGAAAAAAATTTTT | 42 |
| Tigit 16 | TIGIT_NM_173799_human_2453 | AAAAUGUAAUGACGAAAAGG | 22 | AATTGGAAGTGAACTAAAATGTAATGACGAAAAGGGAGTAGTGTT | 43 |
| Tigit 17 | TIGIT_NM_173799_human_2280 | GGUUACAUAGGAAGAAUGAA | 23 | CTTTTCTACCAAATGGGTTACATAGGAAGAATGAACTGAAATCTG | 44 |
| Tigit 18 | TIGIT_NM_173799_human_2206 | UUUAGCAACAAGACAAUUCA | 24 | GGGGTTGACAATTGTTTTAGCAACAAGACAATTCAACTATTTCTC | 45 |
| Tigit 19 | TIGIT_NM_173799_human_850 | UGCUAUUAUAGAUGAAUAUA | 25 | ATACACTTTTGTCTTTGCTATTATAGATGAATATATAAGCAGCTG | 46 |
| Tigit 20 | TIGIT_NM_173799_human_2862 | GAGAUUUAAUAUGAAUAAUA | 26 | TCACACTAGATTCTGGAGATTTAATATGAATAATAAGAATACTAT | 47 |
| Tigit 21 | TIGIT_NM_173799_human_171 | UCUAUCAUCUUACAAUGUCA | 27 | GCAGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTTACAATGTCACCTCTCCTCC | 48 |

【０２８８】

例２:評価したＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物の化学修飾および構造

ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を、全身投与後の肝臓における遺伝子発現レベルを低減させる能力を評価するために設計および合成した。ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)配列の非限定例を表２に示す。

表２．ＴＩＧＩＴ ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)配列(パッセンジャー鎖/センス鎖;ガイド鎖/アンチセンス鎖)

【０２８９】

【表２】

| デュプレックスID | 鎖ID | 配列 | 配列番号: |
|---|---|---|---|
| Tigit 22 | 22915 | fC.mA.fU.mC.fU.mU.fA.mC.fA.mA.fU.mG.fU*mC*fA.TEG-Chl | 1 |
| | 22916 | P.mU.fG.mA.fC.mA.fU.mU.fG.mU.fA.mA.fG.mA.fU*mG*fA*mU*fA*mG*fA | 2 |
| Tigit 23 | 22915 | fC.mA.fU.mC.fU.mU.fA.mC.fA.mA.fU.mG.fU*mC*fA.TEG-Chl | 3 |
| | 22917 | VP.mU.fG.mA.fC.mA.fU.mU.fG.mU.fA.mA.fG.mA.fU*mG*fA*mU*fA*mG*fA | 4 |
| Tigit 24 | 27384 | fU.mG.fA.mC.fU.mA.fG.mA.fA.mA.fG.mA.fA*mG*fA.TEG-Chl | 5 |
| | 27380 | P.mU.fC.mU.fU.mC.fU.mU.fU.mC.fU.mA.fG.mU.fC*mA*fA*mC*fG*mC*fG | 6 |

符号

Ａ＝アデノシン

G＝グアノシン
U＝ウリジン
C＝シトジン
m＝2'-O-メチルヌクレオチド
f＝2'フルオロヌクレオチド
Y＝５メチルウリジン
X＝５メチルシトジン
*＝ホスホロチオアート連結
.＝ホスホジエステル連結
TEG-Chl＝コレステロール-ＴＥＧ-グリセリル
P＝５'無機ホスファート
VP-５'ビニルホスホナート

【０２９０】

例３:フローサイトメトリーによるＫＨＹＧ-１細胞におけるＴＩＧＩＴタンパク質のサイレンシング

ＫＨＹＧ１細胞を、ＲＰＭＩ＋１０％ＦＢＳ＋１００ＩＵ/ｍＬ ｒｈＩＬ-２(Peprotech)中で培養した。培養液中０.３ｅ６細胞/ｍＬの密度にて、トランスフェクションのために細胞を回収した。最終濃度２μＭ、１μＭ、０.５μＭ、および０.２５μＭとなるように、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を含有する２４ウェルプレートに細胞を直接添加した。細胞および化合物を完全に混合することを確実にするように、プレートを静かに揺すった。トランスフェクションは、各条件において２度行った。実験期間中、細胞を３７℃および５％$CO_2$にて保った。９６時間後、細胞を回収し、フローサイトメトリーによって表面ＴＩＧＩＴタンパク質を分析した。

【０２９１】

フローサイトメトリー分析のため、細胞を９６ウェルＶボトムプレートに回収し、製造業者の指示に従って４℃にて染色した。簡単に述べると、各条件に対する３０μＬの細胞懸濁液を、９６ウェルＶボトムプレートにおいてペレット化した。細胞を、ＴＩＧＩＴ-ＡＰＣ抗体(R&D Systems)を含有する細胞染色バッファー中で再懸濁し、ならびに氷上で１時間インキュベートした。細胞を、細胞染色バッファーを用いて２回洗浄し、ならびに最終容量８０μＬに再懸濁した。細胞をＮｏｖｏＣｙｔｅフローサイトメーター(ACEA)を使用して分析し、ＮｏｖｏＥｘｐｒｅｓｓソフトウェア(ACEA)を使用して分析した。各試料について２５μＬの細胞懸濁液を回収した。

図１に示すように、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)-Ｔｉｇｉｔを用いたインキュベーション後、ＫＨＹＧ-１細胞では、ＴＩＧＩＴの発現がダウンレギュレートした(ＵＴＣは、未処置の対照を表す)。

【０２９２】

例４:ＴＩＧＩＴで処置したナチュラルキラー細胞による腫瘍細胞の死滅の増強

ＫＨＹＧ１ナチュラルキラー(ＮＫ)細胞を、ＴＩＧＩＴ-２２ ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて７２時間培養した。７２時間後、細胞をペレット化し、追加の４８時間、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物の非存在下において新しい培地中で再懸濁した。次に、ＫＨＹＧ１細胞をＴＩＧＩＴ ｍＲＮＡレベルについて分析し(図２、左のグラフ)、ならびにＤＥＬＦＩＡ細胞傷害性アッセイを使用して(５:１のＥ:Ｔ比にて)、それらの腫瘍死滅活性(Ｋ５６２細胞)を決定した(図２、右のグラフ)。ＴＩＧＩＴ-２２ ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて処置したＫＨＹＧ１細胞は、対照と比較して腫瘍細胞活性の増強を実証した。

【０２９３】

ＫＨＹＧ１ ＮＫ細胞をＴＩＧＩＴ２２ ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて４８時間培養した。４８時間後、細胞をペレット化し、洗浄期間(９６時間または６日間)、ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物の非存在下において新しい培地中で再懸濁した。洗浄期間後、ＴＩＧＩＴ２２ ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて処置したＫＨＹＧ１細胞を、表面ＴＩ

ＧＩＴタンパク質レベルについて分析し(図３および４、左のグラフ)、ならびにＤＥＬＦＩＡ細胞傷害性アッセイを使用して(５:１のＥ:Ｔ比)、それらの腫瘍死滅活性(Ｋ５６２細胞)を決定した(図３および４、右のグラフ)。ＴＩＧＩＴ２２ ＩＮＴＡＳＹＬ(商標)化合物を用いて処置したＫＨＹＧ１細胞は、対照と比較して腫瘍細胞死滅活性の増強を実証した。

【０２９４】

等価物

当業者は、慣用的な実験のみを使用して、本明細書に記載される本発明の具体的な態様についての多数の均等物を理解するかまたはそれに気付くことができるであろう。かかる均等物は、以下のクレームによって包含されることが意図される。特許文献を含むすべての参考文献は、それらの全体において参照により組み込まれる。

【図面】

【図１】

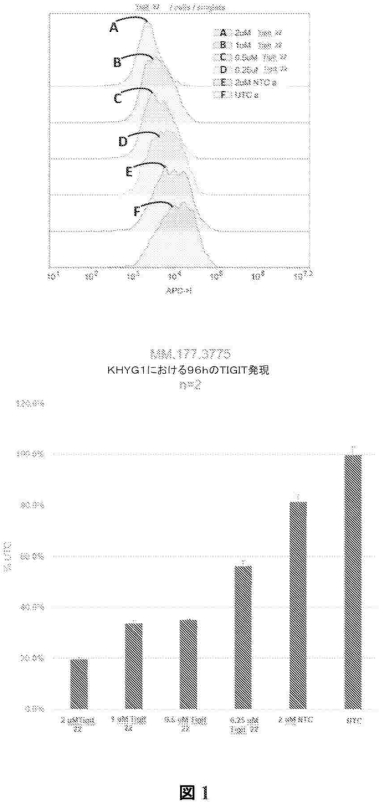



図１

【図２】

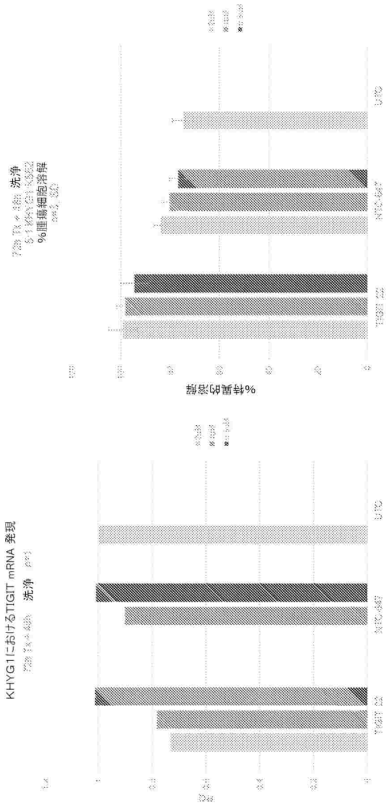



図２

【図３】

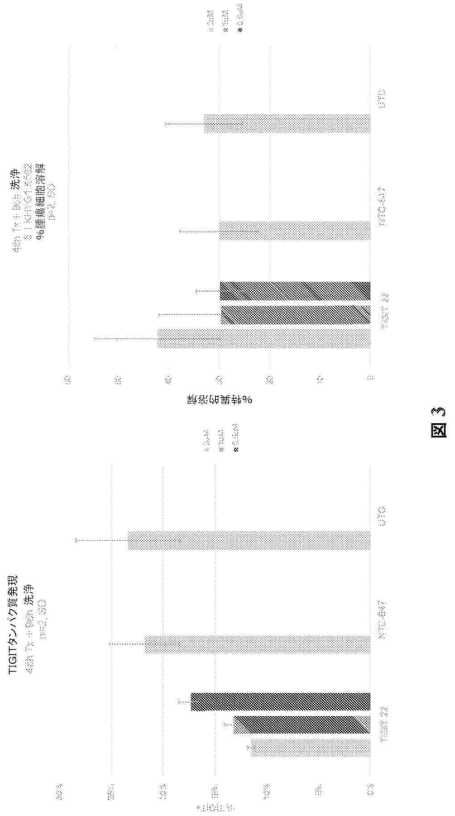


図３

【図４】

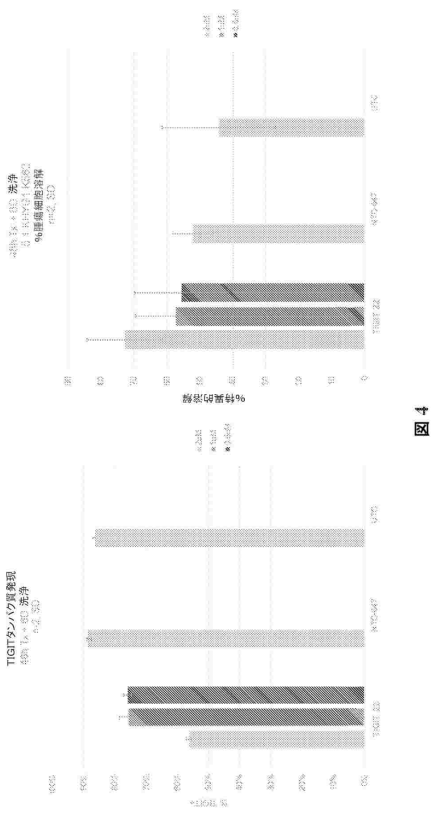


図４

【配列表】

<u>2024529025000001.xml</u>

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/074555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/713 A61K31/7125 A61K31/712
ADD. A61K47/54 C07H21/02 A61P35/00

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)
C12N A61K C07H

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 2019/032619 A1 (PHIO PHARM CORP [US])<br>14 February 2019 (2019-02-14)<br>cited in the application<br>the whole document<br>----- | 1-10,<br>13-34,<br>40,41 |
| A | "33rd Annual Meeting & Pre-Conference Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2018)",<br>JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER,<br>vol. 6, no. 1, SUPPL. 1,<br>6 November 2018 (2018-11-06), pages 1-205,<br>XP021262326,<br>DOI: 10.1186/S40425-018-0422-Y<br>Abstract P258;<br>page 132<br>-----<br>-/-- | 1-41 |

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

* Special categories of cited documents :

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

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 7 June 2023 | 19/06/2023 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Andres, Serge |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/074555

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | DISPERSYN G ET AL: "Intratumoral use of self-delivering RNAi to reprogram the tumor microenvironment and boost the antitumor response", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, [Online] vol. 38, no. 15 supplement, 25 May 2020 (2020-05-25), page e15206, XP009525072, ISSN: 1527-7755 Retrieved from the Internet: URL:https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e15206> the whole document | 1-41 |
| A | WO 2020/163222 A1 (PROMAB BIOTECHNOLOGIES INC [US]; FOREVERTEK BIOTECHNOLOGY CO LTD [CN]) 13 August 2020 (2020-08-13) the whole document | 1,2, 10-12 |
| E | WO 2023/015264 A1 (PHIO PHARM CORP [US]; MAASTRICHT UNIV [NL]) 9 February 2023 (2023-02-09) the whole document | 1-41 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US2022/074555

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/074555

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2019032619 A1 | 14-02-2019 | AU 2018313149 A1 | 05-03-2020 |
| | | CA 3070747 A1 | 14-02-2019 |
| | | CN 111201024 A | 26-05-2020 |
| | | EP 3664817 A1 | 17-06-2020 |
| | | JP 2020532955 A | 19-11-2020 |
| | | US 2020215113 A1 | 09-07-2020 |
| | | WO 2019032619 A1 | 14-02-2019 |
| WO 2020163222 A1 | 13-08-2020 | CN 113710253 A | 26-11-2021 |
| | | WO 2020163222 A1 | 13-08-2020 |
| WO 2023015264 A1 | 09-02-2023 | NONE | |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

| (51)国際特許分類 | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｐ* | *37/04 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/04 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *43/00 (2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １０５ | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/0783(2010.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/0783 | | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *5/0789(2010.01)* | Ｃ１２Ｎ | 5/0789 | | |

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,NE,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２０３８、フランクリン、ビーコン ストリート １１

(72)発明者 フリッカー，シモン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０１７５２、マールボロ、シマラーノ ドライブ ２５７、スイート １０１

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA44

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB02 ZB09 ZB21 ZB26

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 NA05 NA14 ZB02 ZB09 ZB26