(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-541701
(P2024-541701A)
(43)公表日　令和6年11月8日(2024.11.8)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｐ	*37/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全76頁）

(21)出願番号　特願2024-553275(P2024-553275)
(86)(22)出願日　令和4年9月22日(2022.9.22)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月29日(2024.5.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/044406
(87)国際公開番号　WO2023/049275
(87)国際公開日　令和5年3月30日(2023.3.30)
(31)優先権主張番号　63/247,556
(32)優先日　令和3年9月23日(2021.9.23)
(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　524203831
アルネイ サイエンシズ，エルエルシー
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州　０１５４５，シュルーズベリー，６１　ランプライター ドライブ
(74)代理人　110000855
弁理士法人浅村特許事務所
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　治療剤としての環状構造化オリゴヌクレオチド

(57)【要約】
本発明は、本明細書に記載される機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーセグメントを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（「ＣＳＯ」）と呼ばれるオリゴヌクレオチド、それを含む組成物、およびそれを使用する方法を提供する。環状オリゴヌクレオチドのこの設計は、それが標的ＲＮＡの存在下にあり、標的ＲＮＡとハイブリダイズするまで環状形態を維持する。

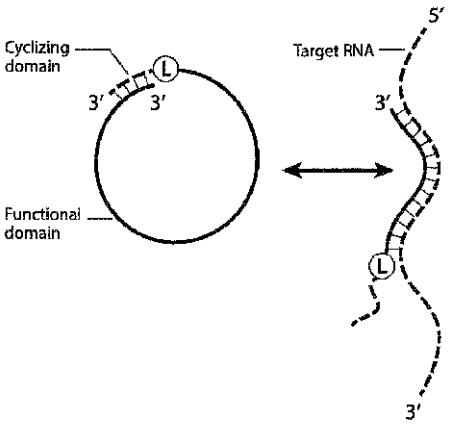


Fig. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインはそれらの５’末端で結合されており、前記環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、前記環化ドメインは、前記機能性ドメインとハイブリダイズし、それによって環状構造を形成し、前記機能性ドメインは、１７～２５ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡ配列の等しい長さの部分に相補的な少なくとも１２個の連続する核酸塩基を含み、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物は、３’ドメインと、前記３’ドメインと連続する５’ドメインとを含み、
前記３’ドメインは、１０～１２ヌクレオチド長であり、各ヌクレオチドは、独立して任意のデオキシリボヌクレオチドであり、隣接するデオキシリボヌクレオチド間の各ヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルもしくはホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはそれらの組み合わせであり、
前記５’ドメインは、５～１５ヌクレオチド長であり、前記５’ドメインは、修飾されていないデオキシリボヌクレオチド、修飾されていないリボヌクレオチド、修飾されたデオキシリボヌクレオチド、修飾されたリボヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含み、ただし、前記５’ドメインは、修飾された糖および／または骨格を含む少なくとも１つの修飾されたデオキシリボヌクレオチドまたは修飾されたリボヌクレオチドを含む、
環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。
【請求項２】
前記３’ドメインが１２ヌクレオチド長であり、前記３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、および１２の位置のヌクレオチドを含む、請求項１に記載のＣＳＯ。
【請求項３】
前記３’ドメインが１１ヌクレオチド長であり、前記３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、および１１の位置のヌクレオチドを含む、請求項１に記載のＣＳＯ。
【請求項４】
前記３’ドメインが１０ヌクレオチド長であり、前記３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、および１０の位置のヌクレオチドを含む、請求項１に記載のＣＳＯ。
【請求項５】
前記５’ドメインが、修飾された糖を含む少なくとも１つの修飾されたデオキシリボヌクレオチドまたは修飾されたリボヌクレオチドを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項６】
前記５’ドメインが、非リン系骨格を含む少なくとも１つの修飾されたデオキシリボヌクレオチドまたは修飾されたリボヌクレオチドを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項７】
前記５’ドメインのヌクレオチドの少なくとも３つが、修飾された糖および／または骨格を含む修飾されたデオキシリボヌクレオチドまたは修飾されたリボヌクレオチドである、請求項１～６のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項８】
前記５’ドメインの前記ヌクレオチドのすべてが、修飾された糖および／または骨格を含む修飾されたデオキシリボヌクレオチドまたは修飾されたリボヌクレオチドである、請求項１～６のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項９】

前記環化ドメインが、４～６ヌクレオチド長である、請求項１～８のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項１０】
前記環化ドメインの前記ヌクレオチドが、修飾されていないデオキシリボヌクレオチド、修飾されていないリボヌクレオチド、修飾されたデオキシリボヌクレオチド、修飾されたリボヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項１１】
前記環化の前記ヌクレオチドが、修飾されていないデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項１０に記載のＣＳＯ。
【請求項１２】
前記環化の前記ヌクレオチドが、修飾されたリボヌクレオチドを含む、請求項１０に記載のＣＳＯ。
【請求項１３】
前記修飾されたリボヌクレオチドが、２’－置換リボヌクレオチドを含む、請求項１２に記載のＣＳＯ。
【請求項１４】
前記２’－置換リボヌクレオチドが、２’－ＯＭｅリボヌクレオチドである、請求項１３に記載のＣＳＯ。
【請求項１５】
前記ＣＳＯの前記機能性ドメインおよび／または前記環化ドメインのオリゴヌクレオチドの前記ヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、ホスホジエステルヌクレオチド間結合、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項１６】
前記リンカーが直接結合である、請求項１～１５のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項１７】
前記環化ドメインが前記機能性ドメインとハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項１～１６のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項１８】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインはそれらの５’末端で連結されており、前記環化ドメインは、４～５０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、前記環化ドメインは、前記機能性ドメインとハイブリダイズし、それによって環状構造を形成し、前記機能性ドメインはｓｉＲＮＡを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。
【請求項１９】
前記環化ドメインが４～１２ヌクレオチド長である、請求項１８に記載のＣＳＯ。
【請求項２０】
前記環化ドメインが、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖の５’末端に結合している、請求項１８または１９に記載のＣＳＯ。
【請求項２１】
前記環化ドメインが、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端に結合している、請求項１８または１９に記載のＣＳＯ。
【請求項２２】
前記機能性ドメインが前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖であり、前記環化ドメインが前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖である、請求項１８に記載のＣＳＯ。
【請求項２３】
前記機能性ドメインが前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖であり、前記環化ドメインが前記ｓｉ

ＲＮＡのアンチセンス鎖である、請求項１８に記載のＣＳＯ。
【請求項２４】
前記環化ドメインの前記ヌクレオチドが、修飾されていないデオキシリボヌクレオチド、修飾されていないリボヌクレオチド、修飾されたデオキシリボヌクレオチド、修飾されたリボヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１８～２３のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項２５】
前記環化の前記ヌクレオチドが、修飾されていないデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項２４に記載のＣＳＯ。
【請求項２６】
前記環化の前記ヌクレオチドが、修飾されたリボヌクレオチドを含む、請求項２４に記載のＣＳＯ。
【請求項２７】
前記修飾されたリボヌクレオチドが、２’－置換リボヌクレオチドを含む、請求項２６に記載のＣＳＯ。
【請求項２８】
前記２’－置換リボヌクレオチドが、２’－ＯＭｅリボヌクレオチドである、請求項２７に記載のＣＳＯ。
【請求項２９】
前記ＣＳＯの前記機能性ドメインおよび／または環化ドメインのオリゴヌクレオチドの前記ヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、ホスホジエステルヌクレオチド間結合、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１８～２８のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項３０】
前記環化ドメインが前記機能性ドメインとハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項１８～２９のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項３１】
前記ｓｉＲＮＡが修飾されている、請求項１８～３０のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項３２】
前記リンカーセグメントが直接結合である、請求項１８～３１のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項３３】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインはそれらの３’末端で連結されており、前記環化ドメインは、４～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、前記環化ドメインは、前記機能性ドメインとハイブリダイズし、それによって環状構造を形成し、前記機能性ドメインは、免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは免疫阻害性オリゴヌクレオチドを含み、前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは前記免疫阻害性オリゴヌクレオチドは、１１～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。
【請求項３４】
前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、脊椎動物細胞においてインターフェロン応答を誘導することができる、請求項３３に記載のＣＳＯ。
【請求項３５】
前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは前記免疫阻害性オリゴヌクレオチドがアンチセンスオリゴヌクレオチドではなく、アンチセンス活性を有しない、請求項３３または３４に記載のＣＳＯ。
【請求項３６】

前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは前記免疫阻害性オリゴヌクレオチドが１７～４０ヌクレオチド長である、請求項３３～３５のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項３７】
前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは前記免疫阻害性オリゴヌクレオチドが２０～３０ヌクレオチド長である、請求項３６に記載のＣＳＯ。
【請求項３８】
前記環化ドメインが４～４０ヌクレオチド長である、請求項３３～３７のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項３９】
前記環化ドメインが４～３０ヌクレオチド長である、請求項３８に記載のＣＳＯ。
【請求項４０】
前記環化ドメインが、別の免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは前記免疫阻害性オリゴヌクレオチドであり、前記環化ドメインの前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは前記免疫阻害性オリゴヌクレオチドは、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメインのヌクレオチドの配列とは反対の極性を持つ、請求項３３～３９のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項４１】
前記機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが修飾されているか、前記環化ドメインのオリゴヌクレオチドが修飾されているか、または前記機能性ドメインのオリゴヌクレオチドおよび前記環化ドメインのオリゴヌクレオチドの両方が修飾されている、請求項３３～４０のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項４２】
前記リンカーセグメントが、直接結合、２～５ヌクレオチド長のモノヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである、請求項３３～４１のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項４３】
前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドが免疫賦活性オリゴヌクレオチドである、請求項３３～４２のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項４４】
前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドが免疫阻害性オリゴヌクレオチドである、請求項３３～４２のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項４５】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインが前記リンカーを介して互いに連結されており、前記機能性ドメインが１５～５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的であり、前記環化ドメインは、４～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持つ、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。
【請求項４６】
前記機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが修飾されている、請求項４５に記載のＣＳＯ。
【請求項４７】
前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインがそれらの５’末端で連結されている、請求項４５または４６に記載のＣＳＯ。
【請求項４８】
前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインがそれらの３’末端で連結されている、請求項４５または４６に記載のＣＳＯ。
【請求項４９】
前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの前記３’－末端

とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項４７に記載のＣＳＯ。
【請求項５０】
前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの前記５’末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項４８に記載のＣＳＯ。
【請求項５１】
前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドが、前記ヌクレオチド間結合、糖、複素環塩基、またはそれらの組み合わせの修飾を含む、請求項４６に記載のＣＳＯ。
【請求項５２】
前記リンカーセグメントが、直接結合、２～５ヌクレオチド長のモノヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである、請求項４５～５１のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項５３】
前記機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｓｉＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｅｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、ＣＲＩＳＰＲ系のシステム、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）システム、またはスプライシングオリゴヌクレオチドから選択される、請求項４５～５２のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項５４】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインがそれらの５’末端で連結されており、前記機能性ドメインが１５～４５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的であり、前記環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、前記機能性ドメインはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドは修飾されている、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。
【請求項５５】
前記環化ドメインが４～１０ヌクレオチド長である、請求項５４に記載のＣＳＯ。
【請求項５６】
前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの前記３’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項５４または５５に記載のＣＳＯ。
【請求項５７】
前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドが、前記ヌクレオチド間結合、糖、複素環塩基、またはそれらの組み合わせの修飾を含む、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項５８】
前記リンカーセグメントが、直接結合、２～５ヌクレオチド長のモノヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである、請求項５４～５７のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項５９】
前記機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｐｉＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｅｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはｌｎｃＲＮＡから選択される、請求項５４～５８のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項６０】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインがそれらの５’または３’末端で連結されており、前記機能性ドメインが１５～１００ヌクレオチド長のオリゴ

ヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的であり、前記環化ドメインは、４～１００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、前記機能性ドメインは、ｓｉＲＮＡを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。

【請求項６１】

前記環化ドメインが、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖の前記５’末端または前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の前記５’末端に結合している、請求項６０に記載のＣＳＯ。

【請求項６２】

前記機能性ドメインが前記ｓｉＲＮＡの前記アンチセンス鎖であり、前記環化ドメインが前記ｓｉＲＮＡの前記センス鎖であり、前記アンチセンス鎖の前記３’－末端または５’－末端のいずれかに結合している、請求項６０に記載のＣＳＯ。

【請求項６３】

前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記５’末端に結合している、請求項６２に記載のＣＳＯ。

【請求項６４】

前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記３’末端に結合している、請求項６２に記載のＣＳＯ。

【請求項６５】

前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの前記３’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項６０～６３のいずれか一項に記載のＣＳＯ。

【請求項６６】

前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの前記５’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項６０、６２または６４のいずれか一項に記載のＣＳＯ。

【請求項６７】

前記ｓｉＲＮＡが修飾されている、請求項６０～６６のいずれか一項に記載のＣＳＯ。

【請求項６８】

前記リンカーセグメントが、直接結合、２～５ヌクレオチド長のモノヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである、請求項６０～６７のいずれか一項に記載のＣＳＯ。

【請求項６９】

機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインがそれらの５’末端で連結されており、前記機能性ドメインが１５～４５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的であり、前記環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、前記機能性ドメインはスプライシングオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドは修飾されている、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。

【請求項７０】

前記環化ドメインが４～１０ヌクレオチド長である、請求項６９に記載のＣＳＯ。

【請求項７１】

前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの３’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項６９または７０に記載のＣＳＯ。

【請求項７２】

前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドが、前記ヌクレオチド間結合、糖、複素環塩基、またはそれらの組み合わせの修飾を含む、請求項６９～７１のいずれか一項に記

載のＣＳＯ。
【請求項７３】
前記リンカーセグメントが、直接結合、２～５ヌクレオチド長のモノヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである、請求項６９～７２のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項７４】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインがそれらの５’末端で連結されており、前記機能性ドメインが１５～５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的であり、前記環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインは、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）システムのアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはＣＲＩＳＰＲ系のシステムのアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはガイドＲＮＡを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。
【請求項７５】
前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの３’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項７４に記載のＣＳＯ。
【請求項７６】
前記リンカーセグメントが、直接結合、２～５ヌクレオチド長のモノヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである、請求項７４または７５に記載のＣＳＯ。
【請求項７７】
機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、前記機能性ドメインおよび前記環化ドメインがそれらの３’末端で連結されており、前記機能性ドメインが１１～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記環化ドメインは４～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、前記機能性ドメインは免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）。
【請求項７８】
前記環化ドメインが前記機能性ドメインの５’末端に結合している、請求項７７に記載のＣＳＯ。
【請求項７９】
前記環化ドメインが前記機能性ドメインの前記３’末端に結合している、請求項７７に記載のＣＳＯ。
【請求項８０】
前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの３’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項７７または７８に記載のＣＳＯ。
【請求項８１】
前記環化ドメインが、前記機能性ドメインの前記オリゴヌクレオチドの５’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する、請求項７７または７９に記載のＣＳＯ。
【請求項８２】
前記環化ドメインが別の免疫賦活性オリゴヌクレオチドであり、前記環化ドメインの前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが、前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である前記機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性である、請求項７７～８１のいずれか一項に記載のＣＳＯ。
【請求項８３】

前記機能性ドメインの前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが修飾されているか、前記環化ドメインの前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが修飾されているか、または前記機能性ドメインの前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが修飾されており、かつ前記環化ドメインの前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが修飾されていることの両方である、請求項７７～８２のいずれか一項に記載のＣＳＯ。

【請求項８４】

前記リンカーセグメントが、直接結合、２～５ヌクレオチド長のモノヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである、請求項７７～８３のいずれか一項に記載のＣＳＯ。

【請求項８５】

請求項１～８４のいずれか一項に記載のＣＳＯと薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物。

【請求項８６】

小分子、ペプチド、ワクチン、抗原、抗体、細胞傷害剤、キナーゼ阻害剤、アレルゲン、抗生物質、ｓｉＲＮＡ分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＴＬＲアンタゴニスト、化学療法剤、標的治療剤、活性化細胞、タンパク質、遺伝子治療ベクター、ペプチドワクチン、タンパク質ワクチン、ＤＮＡワクチン、アジュバント、および共刺激分子、またはそれらの組み合わせから選択される１つ以上の薬剤をさらに含む、請求項８５に記載の医薬組成物。

【請求項８７】

遺伝子発現を阻害する方法であって、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項８８】

対立遺伝子特異的遺伝子発現を阻害する方法であって、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項８９】

前記標的対立遺伝子が点突然変異を含む、請求項８８に記載の方法。

【請求項９０】

ＲＮＡプロセシングを調節する方法であって、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項９１】

少なくとも２つのｍＲＮＡ転写物を含む遺伝子の第１のｍＲＮＡ転写物を選択する方法であって、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項９２】

対象の疾患または障害を処置する方法であって、ＲＮＡプロセシングを調節することが前記対象を処置するのに有益であり、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項９３】

対象の疾患または障害を処置する方法であって、遺伝子発現を阻害することが前記対象を処置するのに有益であり、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項９４】

対象の疾患または障害を処置する方法であって、免疫応答を誘導することが前記対象を処置するのに有益であり、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項９５】
対象の疾患または障害を処置する方法であって、免疫応答を阻害することが前記対象を処置するのに有益であり、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。
【請求項９６】
標的ＲＮＡのナンセンス変異依存ｍＲＮＡ分解機構を誘導する方法であって、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。
【請求項９７】
タンパク質または機能性ｍＲＮＡをコードするｍＲＮＡのレベルを増加させ、前記タンパク質または前記機能性ｍＲＮＡの発現を増加させる方法であって、請求項１～８４のいずれか一項に記載の環状構造化オリゴヌクレオチドまたは請求項８５もしくは８６に記載の組成物を投与することを含む、方法。
【請求項９８】
遺伝子の調節発現が有益である疾患または障害を有する対象を処置するのに有用である、請求項８７～９３、９６または９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９】
前記疾患または障害が、細胞遺伝子の異常な発現または産物に起因する、請求項９８に記載の方法。
【請求項１００】
前記ＣＳＯが局所投与される、請求項８７～９９のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年９月２３日に出願された米国特許仮出願番号第６３／２４７，５５６号の出願日の３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９（ｅ）に基づく利益を主張する。上記出願の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
標的ＲＮＡのプロセシングおよび翻訳は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって複数の機構により調節され得る。これらには、ＲＮアーゼＨによる標的ＲＮＡの切断、異常スプライシングの調節、標的ＲＮＡのプロセシングおよび翻訳の増加、立体障害による翻訳の阻害などが含まれる。標的ＲＮＡはｍＲＮＡまたは非コードＲＮＡであり得る。他の機構では、二重鎖ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖をＡＧＯに組み込み、ｓｉＲＮＡ機構による翻訳を阻害することができる。ＡＤＡＲまたはＣＲＩＳＰＲ系のモデルのような他の機構では、アンチセンスはＲＮＡまたはＤＮＡを編集し、それによって翻訳およびプロセシングを調節することができる。
【０００３】
長年にわたり、アンチセンスハイブリダイゼーションおよび親和性が標的ＲＮＡの選択性に影響を及ぼすことが分かってきた。さらに、アンチセンス核酸を薬物として使用するためには、ヌクレオチド間結合、例えばホスホロチオエートの修飾によって提供されているヌクレアーゼ安定性が重要である。
【０００４】
ヌクレアーゼ安定性が効力にとって重要であると仮定され、アンチセンスの分解は３’－末端からであることが示されたため、３’－末端を修飾して分解を遅らせることに焦点が当てられた。これらの設計には、３’－末端にキャッピングすること、および３’－末端にヘアピンループを形成すること、３’－３’結合を含む二次構造を有するオリゴを作製すること、または３’末端に２つのアンチセンスオリゴヌクレオチドを結合させることが含まれる。これらのタイプのアンチセンスは、ヌクレアーゼ安定性の増加を示したが、アン

チセンス効力は改善されなかった。残念なことに、これらの修飾は炎症反応も増加させ、それによって治療指数を制限した。

【０００５】

ホスホロチオエートを含有するＤＮＡとＲＮＡおよび２’－置換ＲＮＡとの両方がアンチセンス剤として研究されており、異なる特徴を提供する。ＤＮＡホスホロチオエートアンチセンスは、ＲＮＡにハイブリダイズすると、ＲＮアーゼＨを活性化するが、ＲＮＡまたは２’－置換ＲＮＡアンチセンスは、より高い親和性でＲＮＡに結合し、ＲＮアーゼＨを活性化しない。アンチセンス特性をさらに改善するために、これらの２つの修飾の混合物がアンチセンスで用いられており、一般にハイブリッドまたはギャップマーアンチセンスと呼ばれる。最も研究されているギャップマーアンチセンスでは、修飾ＲＮＡセグメントは３’－末端および５’－末端の両方に配置されるのに対して、ＤＮＡは中央に配置される。ギャップマーアンチセンスは最も広く研究されているアンチセンスであり、この化学的性質を用いた薬物が承認されており、臨床開発中である。

【０００６】

ＤＮＡおよびＲＮＡホスホロチオエートの両方の副作用の１つは、タンパク質との相互作用、より具体的には、パターン認識受容体（ＰＲＲ）のファミリーとの相互作用に起因する。これらの相互作用は、免疫カスケードの誘導をもたらし、それによって標的外の作用機構および関連する安全シグナルを引き起こす。詳細な構造活性相関研究は、ＤＮＡおよびＲＮＡホスホロチオエートアンチセンスの５’末端へのアクセシビリティが免疫活性化に必要であることを示している。２つの５’末端を含有するＤＮＡおよびＲＮＡホスホロチオエートは、免疫賦活活性の増加を示した。対照的に、２つの３’－末端を含み（５’末端を欠く）ＤＮＡおよびＲＮＡホスホロチオエートは、最小の炎症応答を示すことが以前に示されている。

【０００７】

治療剤としてのＤＮＡおよび修飾ＲＮＡホスホロチオエートアンチセンスの性状を改善するための継続的な努力において、オリゴヌクレオチドの構造変化が検討された。例えば、以前の研究では、３’－末端にヘアピンループ領域を含むオリゴデオキシヌクレオチドホスホロチオエート（「ＰＳ－オリゴヌクレオチド」）がインビボヌクレアーゼ安定性の増加および生物学的活性の制限をもたらした自己安定化オリゴヌクレオチドが報告された。今日まで、ギャップマーアンチセンスを含む様々な修飾により３’－末端を修飾することによってアンチセンスの安定性を改善することに焦点が当てられてきた。

【０００８】

これまでの進歩にもかかわらず、治療剤としておよび診断用途に使用するための改善された性状を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを開発することが依然として望まれている。

【発明の概要】

【０００９】

本発明は、本明細書で「環状構造化オリゴヌクレオチド」（ＣＳＯ）または同等に「環状オリゴ」と呼ばれるオリゴヌクレオチドの構造クラスを提供する。ＣＳＯでは、２つのオリゴヌクレオチドが（直接またはリンカーセグメントを介して）互いに連結されている。「機能性ドメイン」と呼ばれる１つのオリゴヌクレオチドは、ＣＳＯに機能を提供し（例えば、機能性セグメントは、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは免疫賦活性オリゴヌクレオチドであり得る）、「環化ドメイン」と呼ばれる第２のオリゴヌクレオチドは、機能性ドメインの末端に相補的なヌクレオチド配列を含む（例えば、図１Ａ～図１Ｃ）。

【００１０】

ＣＳＯは、分子内二重鎖を形成する機能性ドメインと環化ドメインとの間の相補性の結果として分子内環状構造を採用する。この分子内二重鎖形成は、機能性ドメインの形状およびオリゴヌクレオチドの末端へのアクセシビリティの両方を変化させる。この構造は、最適なアンチセンスおよびオリゴヌクレオチドならびに核酸ベースの治療薬を作り出すために重要な属性を兼ね備えている。

【００１１】
遺伝子およびＲＮＡ発現調節では、この構造は５’末端をマスクし、それによってＰＲＲとの相互作用を減少させ、エンドソーム脱出を可能にする。細胞質または核内に入ると、環状構造は、機能性ドメインと標的ＲＮＡ配列との親和性が機能性ドメインと環化ドメインとの間の親和性よりも高いので、標的ＲＮＡの存在下で開く。ＣＳＯが分子内環状形態である場合、露出したホスホロチオエート架橋がより少ないため、ＰＳ－オリゴヌクレオチドで生じることが知られているポリアニオン関連副作用（例えば、補体活性化および部分トロンボプラスチン時間の延長）がより少ない可能性がある。また、ＣＳＯはタンパク質結合が低下している。

【００１２】
本発明によるＣＳＯは、構成オリゴヌクレオチドの合成のための標準的な技術を使用して作製することができ、機能性オリゴヌクレオチドおよび核酸が有用であるすべての目的に有用である。

【００１３】
上記は、本発明のある態様を単に要約しているにすぎず、本発明を限定するものとして意図しておらず、解釈されるべきでもない。本明細書に列挙されたすべての特許、特許出願、および他の刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【００１４】
【図１Ａ】本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの一実施形態を示す図である。破線は、環化ドメインを表す。実線は、機能性ドメインを表す。Ｌは、直接的なまたはリンカーを介した機能性ドメインと環化ドメインとの連結を表す。図１Ａに示すように、環状構造化オリゴヌクレオチドは、それが標的ＲＮＡの存在下にあり、標的ＲＮＡとハイブリダイズするまで環状形態を維持する。この実施形態において、機能性ドメインは、標的ＲＮＡに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドである。環状構造化オリゴヌクレオチドは、本明細書にさらに記載されるように、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドの性質に応じて様々な作用機序によって作用することができる。

【図１Ｂ】本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの一実施形態を示す図である。破線は、環化ドメインを表す。実線は、機能性ドメインを表す。Ｌは、直接的なまたはリンカーを介した機能性ドメインと環化ドメインとの連結を表す。図１Ｂは、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが本明細書に記載されるスプリットマー（ｓｐｌｉｔｍｅｒ）である、本発明によるＣＳＯの一実施形態を示す。

【図１Ｃ】本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの一実施形態を示す図である。破線は、環化ドメインを表す。実線は、機能性ドメインを表す。Ｌは、直接的なまたはリンカーを介した機能性ドメインと環化ドメインとの連結を表す。図１Ｃは、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが本明細書に記載されるスプライシングオリゴヌクレオチドである、本発明によるＣＳＯの一実施形態を示す。

【図２Ａ】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがｓｉＲＮＡである、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの一実施形態を示す図である。図２Ａは、環化ドメインがｓｉＲＮＡの一方の鎖の５’末端に結合している一実施形態を示す。環化ドメインは、ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖またはセンス鎖のいずれかに結合することができる。短い破線は、環化ドメインを表す。実線は、ｓｉＲＮＡのセンス鎖を表す。破線は、ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖を表す。Ｌは、リンカーを表す。

【図２Ｂ】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがｓｉＲＮＡである、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの一実施形態を示す図である。図２Ｂは、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖（破線）であり、環化ドメイン（実線）が５’末端に結合している、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの更なる実施形態を示す。この実施形態において、センス鎖はアンチセンス鎖に結合しており、環化ドメインとしても作用する。代替的に、図２Ｂの場合、機能性ドメインはｓｉＲＮＡのセンス鎖（破線）であり、環化ドメイン（実線）は５’末端に結合している。この実施形態にお

いて、アンチセンス鎖はセンス鎖に結合しており、環化ドメインとしても作用する。
【図３】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが遺伝子調節オリゴヌクレオチドである、本発明によるＣＳＯの送達、およびエンドソームから細胞質へのその放出を示す図である。
【図４Ａ】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含み、様々な長さの環化ドメインが３’末端に結合している、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの例示的な実施形態を示す図である。
【図４Ｂ】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含み、様々な長さの環化ドメインが３’末端に結合している、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの例示的な実施形態を示す図である。図４Ｂは、化合物番号５３および５４の例示的な環状構造を示す。
【図５】Ｈｅｐａ１－６細胞におけるＰＣＳＫ９のノックダウンを示す図である。
【図６Ａ】ＨｅｐＧ２細胞におけるＰＮＰＬＡ３のノックダウンを示す図である。
【図６Ｂ】ＨｅｐＧ２細胞におけるＰＮＰＬＡ３のノックダウンを示す図である。
【図６Ｃ】ＨｅｐＧ２細胞におけるＰＮＰＬＡ３のノックダウンを示す図である。
【図７】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが非環状ＴＬＲ９アゴニストと比較してＴＬＲ９アゴニストである、本発明によるＣＳＯの免疫賦活作用を示す図である。
【図８】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＴＬＲ９アゴニストである、本発明によるＣＳＯの免疫賦活作用に及ぼす異なるリンカー（すなわち、直接結合対トリエチレングリコール）の効果を示す図である。
【図９】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＴＬＲ９アゴニストである、本発明によるＣＳＯの免疫賦活作用に及ぼす異なる長さの環化ドメインの効果を示す図である。
【図１０】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＴＬＲ９アゴニストである、本発明によるＣＳＯの免疫賦活作用に及ぼす異なる長さおよび異なるリンカーの環化ドメインの効果を示す図である。
【図１１】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＴＬＲ９アゴニストである、本発明によるＣＳＯの免疫賦活作用に及ぼす機能性ドメインの５’または３’への環化ドメインの結合の効果を示す図である。
【図１２】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＴＬＲ９アゴニストである、本発明によるＣＳＯの免疫賦活作用に及ぼすホスホジエステルヌクレオチド間結合の効果を示す図である。
【図１３】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＴＬＲ９アンタゴニストである、本発明によるＣＳＯの活性を示す図である。図１３に示すように、これらの化合物は免疫応答を生じなかった。
【図１４】機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＴＬＲ９アゴニストの免疫賦活作用を遮断するＴＬＲ９アンタゴニストである、本発明によるＣＳＯの能力を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
前述の一般的な説明および以下の詳細な説明の両方は、例示的かつ説明的なものにすぎず、限定的ではないことを理解されたい。
【００１６】
本明細書では、特に明記しない限り、単数形の使用は複数形を含む。本明細書で使用される場合、「または」の使用は、特に明記しない限り、「および／または」を意味する。さらに、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ（含む）」という用語ならびに「ｉｎｃｌｕｄｅｓ（含む）」および「ｉｎｃｌｕｄｅｄ（含まれる）」などの他の形態の使用は限定的ではない。また、「要素」または「構成要素」などの用語は、特に明記しない限り、１つの単位を含む要素および構成要素と、２つ以上のサブユニットを含む要素および構成要素の両方を包含する。
【００１７】
本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のためだけであり、記載さ

れた主題を限定するものと解釈されるべきではない。特許、特許出願、論文、書籍、および論文を含むがこれらに限定されない、本出願で引用されたすべての文書、または文書の一部は、本明細書で説明された文書の部分およびその全体について、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【００１８】

特徴は、明確化および簡潔な説明のために、本発明の同じもしくは別個の態様または実施形態の一部として本明細書に記載され得る。本発明の範囲は、同じもしくは別個の実施形態の一部として本明細書に記載された特徴の全部または一部の組み合わせを有する実施形態を含み得ることが当業者には理解されよう。

【００１９】

本開示を通して、本発明の様々な態様を範囲形式で提示することができる。範囲形式での説明は、単に便宜上および簡潔さのためのものであり、本発明の範囲を厳格に限定するものとして解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、すべての可能な部分範囲ならびにその範囲内の個々の値を具体的に開示しているとみなされるべきである。例えば、１～６などの範囲の説明は、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６などの部分範囲、ならびにその範囲を有する個々の数、例えば１、２、２．７、３、４、５、５，３、および６を具体的に開示しているとみなされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【００２０】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、当業者によって理解され、それが使用される文脈上である程度変化する。量、時間的持続などの測定可能な値に言及するときに本明細書で使用される場合、「約」という用語は、規定値から±５％、±１％、および±０．１％を含む、±２０％または±１０％の変動を包含することを意味し、そのような変動は開示された方法を実行するのに適している。

【００２１】

本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーセグメントを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（「ＣＳＯ」）と呼ばれるオリゴヌクレオチドを提供する。特に明記しない限り、機能性ドメインと環化ドメインとは、５’－５’結合を介してそれらの５’末端で連結されている。代替的に、いくつかの実施形態において、機能性ドメインと環化ドメインとは、それらの３’末端において３’－３’結合を介して連結されている。

【００２２】

実施形態において、環化ドメインは、５’－５’結合で５’末端の機能性ドメインに結合している。この構成では、環化ドメインは、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドの３’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造（例えば、図１Ａ～図１Ｃ）を形成する。環状オリゴヌクレオチドのこの設計は、それが標的ＲＮＡの存在下にあり、機能性ドメインが標的ＲＮＡとハイブリダイズするまで環状形態を維持する。この構造は、特異性の増加を可能にする。

【００２３】

実施形態において、環化ドメインは、３’－３’結合で３’末端の機能性ドメインに結合している。この構成では、環化ドメインは、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドの５’末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成する。

【００２４】

機能性ドメインは、ＣＳＯに所望の機能を提供する。例えば、遺伝子発現調節のために、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは標的ＲＮＡに相補的である。

【００２５】

実施形態において、機能性ドメインおよび環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡもしくはＲＮＡまたはそれらの組み合わせである。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡもしくはＲＮＡまたはそれらの組み合わせである。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、ＤＮＡもしくはＲＮＡまたはそれらの組み合わせである。

【００２６】
いくつかの実施形態において、機能性ドメインおよび／または環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、修飾されていない。いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、修飾されていない。いくつかの実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、修飾されていない。いくつかの実施形態において、機能性ドメインおよび環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、修飾されていない。
【００２７】
実施形態において、機能性ドメインおよび／または環化ドメインのオリゴヌクレオチドの少なくとも１つのヌクレオチドが修飾されている。実施形態において、機能性ドメインおよび／または環化ドメインのオリゴヌクレオチドの２つ以上のヌクレオチドが修飾されている。
【００２８】
いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは修飾されている。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合、糖、複素環塩基、またはそれらの組み合わせの修飾を含む。これらの修飾は、機能性ドメインのオリゴヌクレオチド内の特定の位置に適切に配置することもできる。他の化学的性質および修飾は、本開示に従って容易に使用することができオリゴヌクレオチドの分野で知られており、本明細書においてオリゴヌクレオチドの文脈で使用される「修飾された」という用語に包含される。本明細書で使用される場合、「機能性ドメインのオリゴヌクレオチド」または「機能性ドメイン」という用語は互換的に使用される。
【００２９】
実施形態において、機能性ドメインは、１５～５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、１７および３００ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、１７および２００ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、１７および１００ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、１７および５０ヌクレオチド長である。
【００３０】
実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、５０および２５０ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、５０および１５０ヌクレオチド長である。
【００３１】
実施形態において、機能性ドメインは、１５～５０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、機能性ドメインは、１７～４０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、機能性ドメインは、１７～２５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、１７および２２ヌクレオチド長である。
【００３２】
実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、１７ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、１８ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、１９ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２０ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２１ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２２ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２３ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２４ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２５ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２６ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２７ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２８ヌクレオチ

ド長である。実施形態において、機能性ドメインは、２９ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３０ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３１ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３２ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３３ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３４ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３５ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３６ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３７ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３８ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、３９ヌクレオチド長である。実施形態において、機能性ドメインは、４０ヌクレオチド長である。

【００３３】

実施形態において、機能性ドメインには、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｓｉＲＮＡ、ｐｉＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｅｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ系のシステム、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）システム、またはスプライシングオリゴヌクレオチドから選択されるオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。実施形態において、機能性ドメインには、免疫賦活性オリゴヌクレオチドまたは免疫阻害性オリゴヌクレオチド（免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドとも呼ばれる）から選択されるオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【００３４】

機能性ドメインのオリゴヌクレオチドのヌクレオチドおよびヌクレオチド間結合に対する唯一の制限は、それらが（ａ）所望の条件下でＣＳＯの機能性ドメインとハイブリダイズして二重鎖を形成する環化ドメインの能力、および（ｂ）その意図された機能を実行する機能性ドメインの能力（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドである機能性ドメインの場合、生理学的条件下で相補的ＲＮＡセグメントとハイブリダイズして二重鎖を形成し、この二重鎖はＲＮアーゼＨの基質である）を排除しないことである。好ましいヌクレオチドおよびヌクレオチド間結合は、ヌクレアーゼおよび他の形態の化学分解に対するＣＳＯの安定性を増強し、かつ／またはその意図された機能を実行する機能性ドメインの能力を増強するものである。

【００３５】

実施形態において、機能性ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、ホスホジエステルヌクレオチド間結合またはそれらの組み合わせである。

【００３６】

環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持つ。

【００３７】

いくつかの実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは修飾されている。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合、糖、複素環塩基、またはそれらの組み合わせの修飾を含む。これらの修飾は、環化ドメインのオリゴヌクレオチド内の特定の位置に配置することもできる。本明細書で使用される場合、「環化ドメインのオリゴヌクレオチド」または「環化ドメイン」という用語は互換的に使用される。

【００３８】

実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、ホスホジエステルヌクレオチド間結合またはそれらの組み合わせである。

【００３９】

実施形態において、環化ドメインは、４～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～１００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～７５ヌクレオチド長のオリゴヌ

クレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～５０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～４０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～３０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～２５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～１０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、４～６ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。

【００４０】

実施形態において、環化ドメインは、５～８ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、４、５、６、７、８、９または１０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、４ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、５ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、６ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、７ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、８ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、９ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１０ヌクレオチド長である。

【００４１】

実施形態において、環化ドメインは、１５～４０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、１７～３０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、または４０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１５ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１６ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１７ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１８ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１９ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２１ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２２ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２３ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２４ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２５ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２６ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２７ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２８ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、２９ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３１ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３２ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３３ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３４ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３５ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３６ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３７ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３８ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、３９ヌクレオチド

長である。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、４０ヌクレオチド長である。

【００４２】

本明細書で使用される場合、「極性」という用語は、一次構造（例えば、ＤＮＡおよびＲＮＡの場合は３’→５’および５’→３’、またはＰＮＡの場合はＮ末端→Ｃ末端（もしくはその逆））における方向性の概念を指す。本発明のＣＳＯが、例えば、ワトソン－クリック塩基対合によって逆平行様式でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む場合、環化ドメインは５’→３’（または２’）配置にあり、機能性ドメインにおいて相補的であるヌクレオチドの配列は３’（または２’）→５’配置にあるＣＳＯの極性の変化は、環化ドメイン、および環化ドメインが相補的である機能性ドメインのヌクレオチド配列以外のＣＳＯのどこでも起こり得る。ＣＳＯがオリゴヌクレオチドを含む好ましい実施形態において、機能性ドメインと環化ドメインとが５’－５’結合を介して連結されるように、機能性ドメインは３’→５’配置にあり、環化ドメインは５’→３’配置にある。いくつかの実施形態において、機能性ドメインと環化ドメインとが３’－３’結合を介して連結されるように、機能性ドメインは５’→３’配置にあり、環化ドメインは３’→５’配置にある。

【００４３】

実施形態において、機能性ドメインおよび環化ドメインは、リンカーセグメントを介して互いに共有結合している。実施形態において、リンカーセグメントは、直接結合、２～５ヌクレオチド長のヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、または他の化学的部分、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、リンカーセグメントは切断可能であり得る。

【００４４】

リンカーセグメントに対する唯一の制限は、それがＣＳＯの本質的な機能、すなわち（ａ）目的の条件下で分子内環状構造を形成するＣＳＯの能力（例えば、生理学的条件）および（ｂ）その意図された機能を実行する機能性ドメインの能力を排除しないことである。好ましい「他の化学的部分」リンカーには、C_2～C_6アルキル、エチレングリコール、トリ（エチレングリコール）、テトラ（エチレングリコール）、ペンタ（エチレングリコール）、ヘキサ（エチレングリコール）および－ＮＨ（CH_2）$_n$ＮＨ－［式中、ｎは、２、３、４、５、または６である］が含まれるが、これらに限定されない。代替的に、リンカーセグメントは、上記の組み合わせであり得る。好ましい実施形態において、リンカーは直接結合であり、その場合、機能性ドメインと環化ドメインとは直接結合される。一実施形態において、リンカーは、エチレングリコールである。実施形態において、リンカーは、C_2～C_6アルキルである。実施形態において、リンカーは、C_2アルキルである。実施形態において、リンカーは、C_3アルキルである。実施形態において、リンカーは、C_4アルキルである。実施形態において、リンカーは、C_5アルキルである。実施形態において、リンカーは、C_6アルキルである。

【００４５】

機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、末端およびリンカー末端を有する。その名のとおり、リンカー末端は、リンカーセグメントを介して環化ドメインに連結されたオリゴヌクレオチドの末端である。一般に、ＣＳＯは、機能性ドメインの末端が環化ドメインと二重鎖を形成するように、すなわち、環化ドメインが機能性ドメインの末端に相補的であるように構築される。

【００４６】

本明細書で使用される場合、「相補的」という用語は、選択された（例えば、生理学的）条件下で他の複素環塩基よりも優先して水素が互いに結合する一対の核酸塩基（または単に「塩基」）（またはオリゴヌクレオチドの「相補性」を評価する場合に文脈上必要とされ得るように、そのある程度の相補性）を指す。核酸塩基が修飾または非修飾、天然または合成のプリンおよびピリミジンである場合、「相補的」という用語は、ワトソンクリックの意味で相補的であることを意味する。

【００４７】

核酸対の少なくとも１つの鎖中のすべての塩基が、その相補的な塩基対の反対側に見出される場合、そのような鎖は、他方の鎖中のその配列に対して完全に相補的であるとみなされる。そのような鎖の１つ、または複数の塩基が、その相補的な塩基対を除いて他の任意の塩基と対向する位置に見出される場合、その塩基は「ミスマッチ」とみなされ、その鎖は部分的に相補的であるとみなされる。したがって、鎖は、塩基が整列しなくなるまで、様々な程度の部分相補的（例えば、０％＜ｘ＜１００％相補的）であり得、整列していない時点で、それらは非相補的（例えば、０％相補的）である。当業者によって容易に理解および認識されるように、全面的な（すなわち、完全、１００％）相補性は、核酸（例えば、オリゴヌクレオチド、アンチセンスまたはその他）の鎖のハイブリダイゼーションに必要とされない。

【００４８】

実施形態において、標的ＲＮＡは、ｍＲＮＡ、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、またはマイクロＲＮＡであり得る。実施形態において、標的ＲＮＡは、ｍＲＮＡである。

【００４９】

実施形態において、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドは、薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物の一部である。

【００５０】

本発明の環状構造化オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物は、疾患または症状を処置または予防するのに有用な任意の他の薬剤または治療薬をさらに含んでもよく、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの遺伝子発現調節効果を低下させない。疾患または症状を処置または予防するのに有用な薬剤には、小分子、ペプチド、ワクチン、抗原、抗体、好ましくはモノクローナル抗体、細胞傷害剤、キナーゼ阻害剤、アレルゲン、抗生物質、ｓｉＲＮＡ分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＴＬＲアンタゴニスト（例えば、ＴＬＲ３および／またはＴＬＲ７のアンタゴニストおよび／またはＴＬＲ８のアンタゴニストおよび／またはＴＬＲ９のアンタゴニスト）、化学療法剤（従来の化学療法および最新の標的療法の両方）、標的化治療剤、活性化細胞、ペプチド、タンパク質、遺伝子治療ベクター、ペプチドワクチン、タンパク質ワクチン、ＤＮＡワクチン、アジュバント、および共刺激分子（例えば、サイトカイン、ケモカイン、タンパク質リガンド、トランス活性化因子、修飾されたアミノ酸を含むペプチドもしくはペプチド）、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。代替的に、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドを他の化合物と組み合わせて投与して（例えば、脂質またはリポソームと配合され、ペプチド、抗体または小分子とコンジュゲートされる）、本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドの遺伝子発現調節の特異性または規模を高めることができる。

【００５１】

実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。実施形態において、ヌクレオチド間結合の少なくとも半分は、ホスホロチオエートである。実施形態において、ヌクレオチド間結合のすべては、ホスホロチオエートである。

【００５２】

いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。

【００５３】

いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって、標的ＲＮＡの一部と少なくとも９０％相補的である。いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって、標的ＲＮＡの一部と少なくとも９５％相補的である。いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって、標的ＲＮＡの一部と少なくとも９７％相補的である。いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって、標的ＲＮＡの一部と少なくとも９８％相補的である。いくつかの実施形態にお

いて、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって、標的ＲＮＡの一部と少なくとも９９％相補的である。いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって、標的ＲＮＡの一部と少なくとも１００％相補的である。

【００５４】

機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがＣＲＩＳＰＲ系のシステムのオリゴヌクレオチドまたはＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）システムである実施形態において、標的ＲＮＡ（相補的ドメイン）に相補的であるオリゴヌクレオチドの部分は、その全長にわたって、標的ＲＮＡの部分に対して少なくとも９０％相補的であり、好ましくは少なくとも９５％相補的であり、好ましくは少なくとも９７％相補的であり、好ましくは少なくとも９８％相補的であり、好ましくは少なくとも９９％相補的であり、または好ましくは少なくとも１００％相補的である。

【００５５】

本明細書に記載される化合物、組成物、または方法のいずれにおいても、本発明のＣＳＯは、配列３’－ＣＧＧＴＣＡＣＴＣＣＴＣＣＧＴＧＣＧ－５’－５’－ＧＣＣＡＧＴ－３’，３’－ＣＧＧＴＣＡＣＴＣＣＴＣＣＧＴＧＣＧ－５’－５’－ＧＣＧＡＡＴ－３’，５’－ＧＣＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＣＴＧＧＣ－３’－３’－ＣＧＣＡＣＧ－５’，５’－ＧＣＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＣＧＧＣ－３’－３’－ＧＧＡＡＣＣ－５’，５’－ＧＣＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＣＴＧＧＣ－３’－３’－ＣＧＣＡＣ－５’，５’－ＧＣＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＣＴＧＧＣ－３’－３’－ＧＧＡＡＣＣＧ－５’，５’－ＧＣＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＣＴＧＧＣ－３’－３’－ＣＧＣＡＣＧＧＡ－５’，５’－ＧＣＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＣＴＧＧＣ－３’－３’－ＧＧＡＡＣ－５’、または５’－ＧＣＧＴＧＣＣＴＣＣＴＣＡＣＴＧＧＣ－３’－３’－ＧＧＡＡＣＡＧ－５’を有するオリゴヌクレオチドではない。

【００５６】

機能性ドメイン

様々な実施形態において、ＣＳＯの機能性ドメインは、以下にさらに記載されるようなオリゴヌクレオチドである。ＣＳＯの環化ドメインおよびリンカーは、特に断りのない限り、上記のとおりである。

【００５７】

遺伝子発現の阻害

実施形態において、本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、機能性ドメインおよび環化ドメインがそれらの５’末端で連結されており、機能性ドメインが１５～４５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的である、環状構造化オリゴヌクレオチドを提供し、環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインは、遺伝子調節オリゴヌクレオチドを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）を提供する。いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは修飾されている。

【００５８】

実施形態において、機能性ドメインの遺伝子調節オリゴヌクレオチド（すなわち、標的遺伝子の発現を調節することができるオリゴヌクレオチド）には、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、ｐｉＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｅｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、またはｌｎｃＲＮＡが含まれるが、これらに限定されない。

【００５９】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの修飾は、少なくとも１つの修飾された核酸塩基、糖および／またはヌクレオチド間結合を含む。

【００６０】

本明細書に示されるように、５’－５’結合を介して環化ドメインに連結したアンチセン

スオリゴヌクレオチドを含む本発明のＣＳＯは、驚くべきことに、増加した効力を示した。この観察は、安定性の増加（例えば、３’－３’連結オリゴヌクレオチド）が効力の増加につながるという以前の仮説とは完全に対照的であった。さらに、５’－末端が欠如している場合、ＣＳＯのアンチセンスオリゴヌクレオチドの炎症性は低くなる。この設計は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが線状構造に展開し、標的ＲＮＡが発現される細胞において活性であることを可能にする。

【００６１】

ＣＳＯがアンチセンスオリゴヌクレオチドである場合、それは相補的な標的ＲＮＡが存在するまで環状形態であり、そこで線状形態をとり、標的ＲＮＡに結合する。環状形態から線状形態への変化は、熱融解およびＲＮアーゼＨ切断研究によって確認することができた。線状形態では、機能性ドメインは（最低限、生理学的条件下で）相補的標的ＲＮＡとハイブリダイズして二重鎖を形成する。この二重鎖はＲＮアーゼＨの基質であり、ＲＮアーゼＨの存在下および適切な条件下（例えば、生理学的）では、二重鎖のＲＮＡ鎖はＲＮアーゼＨによって切断され、それによって発現が妨げられる。

【００６２】

アンチセンス機能性ドメインを含むＣＳＯは、細胞培養物中で活性を維持する。これらのＣＳＯで予想される利点は、分子内環状構造のそれらの形成により、非標的巨大分子（核酸およびタンパク質を含む）との相互作用を少なくすることが可能であり、ポリアニオン関連副作用が減少し、標的遺伝子またはＲＮＡのみの存在下で線状化することである。さらに、環状構造に起因して、これらのＣＳＯは、５’－末端の相互作用の欠如に起因してエンドソームから脱出することができる。

【００６３】

本発明のオリゴヌクレオチドは、単離されたオリゴヌクレオチドである。「単離された」という用語は、ヒトの介入によって天然の状態から変更または除去されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在するオリゴヌクレオチドは「単離」されないが、合成オリゴヌクレオチド、またはその天然状態の共存物質から部分的もしくは完全に分離されたオリゴヌクレオチドは「単離」される。単離されたオリゴヌクレオチドは、実質的に精製された形態で存在することができ、または例えばオリゴヌクレオチドが送達された細胞などの非天然環境に存在することができる。本発明のオリゴヌクレオチドは、部分的に精製されたＤＮＡおよび／またはＲＮＡ、実質的に純粋なＤＮＡおよび／またはＲＮＡ、合成ＤＮＡおよび／またはＲＮＡ、または組換え生産されたＤＮＡおよび／またはＲＮＡ、ならびに１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または改変によって天然に存在するＤＮＡおよび／またはＲＮＡとは異なる改変されたＤＮＡおよび／またはＲＮＡを含むことができる。そのような改変は、オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼ消化に耐性にする修飾を含む、オリゴヌクレオチドの末端またはオリゴヌクレオチドの１つ以上の内部ヌクレオチドなどへの非ヌクレオチド材料の付加を含み得る。

【００６４】

「マイクロＲＮＡ」、「ｍｉＲＮＡ」、および「ＭｉＲ」という用語は交換可能であり、遺伝子発現を調節することができる内因性または人工の非コードＲＮＡを指す。ｍｉＲＮＡはＲＮＡ干渉を介して機能すると考えられている。そのようなマイクロＲＮＡの設計は、当業者の技術の範囲内である。

【００６５】

「ｐｉＲＮＡ」および「Ｐｉｗｉ相互作用ＲＮＡ」という用語は交換可能であり、遺伝子サイレンシングに関与する低分子ＲＮＡのクラスを指す。ＰｉＲＮＡ分子は、通常、２６～３１ヌクレオチド長である。そのようなＰｉＲＮＡの設計は、当業者の技術の範囲内である。

【００６６】

実施形態において、機能性ドメインのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第２０２０／１９１１７７号に記載されているとおりである。実施形態において、機能性ドメインのアンチセンスオリゴヌクレオチド

は、１７～２５ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物を含むかもしくはそれからなる修飾されたオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物は、３’ドメインおよび５’ドメインを含み、３’ドメインは、１０～１２ヌクレオチド長であり、各ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドと、ホスホジエステルもしくはホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはそれらの組み合わせとを含み、５’ドメインは、５～１５ヌクレオチド長であり、５’ドメインは、修飾されていないデオキシリボヌクレオチド、修飾されていないリボヌクレオチド、修飾されたデオキシリボヌクレオチド、修飾されたリボヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含み、ただし、５’ドメインは、修飾された糖および／または骨格を含む少なくとも１つの修飾されたデオキシリボヌクレオチドまたは修飾されたリボヌクレオチドを含む。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、「スプリットマー（ｓｐｌｉｔｍｅｒ）」と呼ばれる。

【００６７】

実施形態において、機能性ドメインのスプリットマーは、標的ＲＮＡの等しい長さの部分に相補的な少なくとも１２個の隣り合う核酸塩基を有する１７～２５個の連結されたヌクレオチドを含む。

【００６８】

実施形態において、スプリットマーの修飾されたリボヌクレオチドは、２’－置換ヌクレオチドを含み、本明細書に記載されるとおりである。実施形態において、２’－置換ヌクレオチドは、２’Ｏ－メチルリボヌクレオチドまたは２’－ＭＯＥから選択される。

【００６９】

いくつかの実施形態において、３’ドメインは、３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、および１２の位置にヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、３’ドメインは、３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、および１１の位置にヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、３’ドメインは、３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、および１０の位置にヌクレオチドを含む。

【００７０】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの３’ドメインが１２ヌクレオチド長であるとき、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、式（Ｉ）：

５’－$N_m$$N_{14}$$N_{13}$$N_{12}$$N_{11}$$N_{10}$$N_9$$N_8$$N_7$$N_6$$N_5$$N_4$$N_3$$N_2$$N_1$－３’

によって表され、

式中、

Ｎは、任意のヌクレオチドであり、

N_{13}～N_mは、５’ドメインを含み、

N_1～N_{12}は、３’ドメインを含み、

ｍは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１から選択される。

【００７１】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの３’ドメインが１１ヌクレオチド長であるとき、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、式（Ｉａ）：

５’－$N_m$$N_{14}$$N_{13}$$N_{12}$$N_{11}$$N_{10}$$N_9$$N_8$$N_7$$N_6$$N_5$$N_4$$N_3$$N_2$$N_1$－３’

によって表され、

Ｎは、任意のヌクレオチドであり、

N_{12}～N_mは、５’ドメインを含み、

N_1～N_{11}は、３’ドメインを含み、

ｍは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１から選択される。

【００７２】

いくつかの実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、式（Ｉｂ）：

５’－$N_m$$N_{14}$$N_{13}$$N_{12}$$N_{11}$$N_{10}$$N_9$$N_8$$N_7$$N_6$$N_5$$N_4$$N_3$$N_2$$N_1$－３’

によって表され、

Ｎは、任意のヌクレオチドであり、
Ｎ１１～Ｎｍは、５’ドメインを含み、
Ｎ１～Ｎ１０は、３’ドメインを含み、
ｍは、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１から選択される。
【００７３】
いくつかの実施形態において、ｍは、０である。いくつかの実施形態において、ｍは、１、２、３、４、５、６、または７から選択される。いくつかの実施形態において、ｍは、１、２、３、４、５、または６から選択される。いくつかの実施形態において、ｍは、１、２、３、４、または５から選択される。いくつかの実施形態において、ｍは、１、２、３、または４から選択される。いくつかの実施形態において、ｍは、１、２、または３から選択される。いくつかの実施形態において、ｍは、１である。いくつかの実施形態において、ｍは、２である。いくつかの実施形態において、ｍは、３である。いくつかの実施形態において、ｍは、４である。いくつかの実施形態において、ｍは、５である。いくつかの実施形態において、ｍは、６である。いくつかの実施形態において、ｍは、７である。いくつかの実施形態において、ｍは、８である。いくつかの実施形態において、ｍは、９である。いくつかの実施形態において、ｍは、１０である。いくつかの実施形態において、ｍは、１１である。
【００７４】
いくつかの実施形態において、機能性ドメインのアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物は、標的ＲＮＡ配列の等しい長さの部分に相補的な少なくとも１２個の隣り合う核酸塩基を含む１７～２５ヌクレオチド長であり、アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物は、３’ドメインと、３’ドメインと隣り合う５’ドメインとを含み、３’ドメインは、１０～１２ヌクレオチド長であり、各ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドと、ホスホジエステルまたはホスホロチオエートインテムヌクレオチド結合またはそれらの組み合わせとを含み、かつ
５’ドメインは、５から１５ヌクレオチド長であり、５’ドメインは、修飾されていないデオキシリボヌクレオチド、修飾されていないリボヌクレオチド、修飾されたデオキシリボヌクレオチド、修飾されたリボヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含み、ただし、５’ドメインは、修飾された糖および／または骨格を含む少なくとも１つの修飾されたデオキシリボヌクレオチドまたは修飾されたリボヌクレオチドを含む。
【００７５】
実施形態において、３’ドメインは、１２ヌクレオチド長であり、３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、および１２の位置にヌクレオチドを含む（位置１は、３’末端である）。実施形態において、３’ドメインは１１ヌクレオチド長であり、３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、および１１の位置のヌクレオチドを含む。実施形態において、３’ドメインは、１２ヌクレオチド長であり、３’末端から１、２、３、４、５、６、７、８、９、および１０の位置にヌクレオチドを含む。
【００７６】
実施形態において、３’ドメインのヌクレオチドは、天然核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの３’ドメインのヌクレオチドの核酸塩基および糖は、修飾されていない。この点において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの３’ドメインのヌクレオチドの核酸塩基および糖は、天然に存在する。３’ドメインのヌクレオチドの各々は、デオキシリボヌクレオチドと、ホスホジエステルもしくはホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはそれらの組み合わせとを含む。３’ドメインのヌクレオチドは、天然のデオキシリボース糖と、ＲＮアーゼＨを活性化することが知られているホスホロチオエート、ホスホジエステルまたは他のリン系結合またはそれらの組み合わせとを含む。
【００７７】
実施形態において、３’ドメインのヌクレオチドの少なくとも１つは、修飾された核酸塩基を含む。

【００７８】
実施形態において、３’末端から９番目または１０番目の位置のヌクレオチドは、修飾されていない。実施形態において、３’末端から１１番目の位置のヌクレオチドは、修飾されていない。
【００７９】
実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。
【００８０】
実施形態において、ヌクレオチド間結合の少なくとも半分は、ホスホロチオエートである。
【００８１】
実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。
【００８２】
本明細書で使用される場合、「５’ドメイン」という用語は、３’ドメインに続く最初のヌクレオチドで始まり、５’末端に向かうヌクレオチドを指す。５’ドメインは標的ＲＮＡにハイブリダイズするが、ＲＮアーゼＨがこのドメイン中の標的ＲＮＡを切断することはできない。「５’ドメイン」という用語は、一般に２～１５ヌクレオチド長であり、３’ドメインの長さに応じて、３’末端から測定されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの１１番目～２５番目のヌクレオチド（１番目のヌクレオチドは３’末端である）、１２番目～２５番目のヌクレオチド、または１３番目～２５番目のヌクレオチドを指す。
【００８３】
例えば、１７ヌクレオチド長であるアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物は、１位～１０位の３’ドメインおよび１１位～１７位までの５’ドメインを含み得る。修飾されたヌクレオチドの指定は、ヌクレオチド特異的とは対照的に、位置特異的である。
【００８４】
５’ドメインは、ＲＮアーゼＨを活性化しない修飾された糖および／または修飾された骨格などの非ＲＮアーゼＨ活性化修飾を有するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、５’ドメインは、修飾された糖を含むヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格を含むヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、５’ドメインは、修飾された糖および修飾された骨格の両方を含むヌクレオチドを含む。実施形態において、修飾された骨格は、非リン系骨格である。
【００８５】
アンチセンスのこの設計は、３’ドメインの５’末端に向かう特定の部位での標的化ＲＮＡ切断を可能にする。
【００８６】
これらの実施形態のいずれにおいても、５’ドメインは、骨格の修飾もしくは置換および／または糖の修飾もしくは置換を有する少なくとも１つのヌクレオチドを含むことが企図される。いくつかの実施形態において、５’ドメイン内の１つの位置、５’ドメイン内のいくつかの位置、または５’ドメイン内のすべての位置のヌクレオチドは、骨格の修飾もしくは置換および／または糖の修飾もしくは置換を含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む１つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む少なくとも２つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む少なくとも３つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む少なくとも４つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む少なくとも５つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む少なくとも６つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む少なくとも７つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインは、修飾された骨格および／または糖を含む少なくとも

８つのヌクレオチドを含む。一実施形態において、５’ドメインのヌクレオチドのすべてが、修飾された骨格および／または糖を含むヌクレオチドである。

【００８７】

本明細書で論じられる実施形態は、特定のヌクレオチドおよび位置の文脈において、３’末端に対する位置に関して実施され得ることが特に企図される。例えば、位置１３に修飾されたヌクレオチドを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの３’末端から位置１３に修飾されたヌクレオチドを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。

【００８８】

いくつかの実施形態において、機能性ドメインのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって、標的ＲＮＡの一部と少なくとも９０％相補的である。

【００８９】

実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは「ギャップマー」である。本明細書で使用される場合、ギャップマーは、ＲＮアーゼＨ切断を誘導するのに十分な長さのデオキシヌクレオチドモノマーの中央ブロックを含むキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドである。通常、本発明のギャップマーは、標的ｍＲＮＡをコードする１つ以上のｍＲＮＡに対して指向されている。そのようなギャップマーの設計は、当業者の技術の範囲内である。

【００９０】

実施形態において、機能性ドメインのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、２つの外部領域または「ウィング」と中央もしくは内部領域または「ギャップ」とによって画定されるギャップマーモチーフを有する領域を含むかもしくはそれからなる修飾されたオリゴヌクレオチドである。ギャップマーモチーフ（５’－ウィング、ギャップ、および３’－ウィング）の３つの領域は、ウィングの各々のヌクレオシドの糖部分の少なくとも一部がギャップのヌクレオシドの糖部分の少なくとも一部とは異なるヌクレオシドの隣り合う配列を形成する。具体的には、ギャップに最も近い各ウィングのヌクレオシドの少なくとも糖部分（５’－ウィングの最も３’側のヌクレオシドおよび３’－ウィングの最も５’側のヌクレオシド）は、隣接するギャップヌクレオシドの糖部分とは異なり、したがってウィングとギャップとの間の境界を画定する（すなわち、ウィング／ギャップ接合）。ある実施形態において、ギャップ内の糖部分は互いに同じである。ある実施形態において、ギャップは、ギャップの１つ以上の他のヌクレオシドの糖部分とは異なる糖部分を有する１つ以上のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、２つのウィングの糖モチーフは、互いに同じである（対称ギャップマー）。ある実施形態において、５’－ウィングの糖モチーフは、３’－ウィングの糖モチーフとは異なる（非対称ギャップマー）。

【００９１】

ある実施形態において、ギャップマーのウィングは、独立して、１～６個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのウィングは、独立して、１～５個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのウィングは、同じ数のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのウィングは、４個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーの各ウィングの各ヌクレオシドは、修飾されたヌクレオシドである。

【００９２】

ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、７～２４個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、７～１８個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、９～１４個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、７～２３個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、９個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、１０個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、１１個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、１３個のヌクレオシドを含む。ある実施形態にお

いて、ギャップマーのギャップは、１４個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、１７個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップは、１８個のヌクレオシドを含む。ある実施形態において、ギャップマーのギャップの各ヌクレオシドは、修飾されていない２’－デオキシヌクレオシドである。

【００９３】

ある実施形態において、ギャップマーは、デオキシギャップマーである。いくつかの実施形態において、各々のウィング／ギャップ接合のギャップ側のヌクレオシドは、修飾されていない２’－デオキシヌクレオシドであり、各々のウィング／ギャップ接合のウィング側のヌクレオシドは、修飾されたヌクレオシドである。ある実施形態において、ギャップの各ヌクレオシドは、修飾されていない２’－デオキシヌクレオシドである。ある実施形態において、ギャップマーの各ウィングの各ヌクレオシドは、修飾されたヌクレオシドである。

【００９４】

ここで、ギャップマーの３つの領域の長さ（ヌクレオシドの数）は、表記［５’－ウィング中のヌクレオシドの数］－［ギャップ中のヌクレオシドの数］－［３’－ウィング中のヌクレオシドの数］を使用して提供され得る。したがって、５－１０－５ギャップマーは、各ウィング中の５個の連結されたヌクレオシドとギャップ中の１０個の連結されたヌクレオシドとからなる。そのような命名法の後に特定の修飾が続く場合、その修飾はウィングの修飾であり、ギャップヌクレオシドは修飾されていないデオキシヌクレオシド糖を含む。したがって、５－１１－５　ＭＯＥまたはＯＭｅギャップマーは、５’－ウィング中の５個の連結されたＭＯＥまたはＯＭｅ修飾されたヌクレオシドと、ギャップ中の１１個の連結されたデオキシヌクレオシドと、３’－ウィング中の５個の連結されたＭＯＥまたはＯＭｅヌクレオシドとからなる。

【００９５】

ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、４～１３～４　ＭＯＥまたはＯＭｅギャップマーである。ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、５～１１～５　ＭＯＥまたはＯＭＥギャップマーである。ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドが３～１５～３　ＢＮＡギャップマーである。ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、３～１５～３個のＬＮＡギャップマーである。

【００９６】

本明細書に記載されるいずれかの実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、完全に修飾された糖モチーフを有する領域を含むかまたはそれからなる。そのような実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドの完全に修飾された領域の各ヌクレオシドは、修飾された糖部分を含む。ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチド全体の各ヌクレオシドは、修飾された糖部分を含む。ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、完全に修飾された糖モチーフを有する領域を含むかまたはそれからなり、完全に修飾された領域内の各ヌクレオシドは、本明細書で均一に修飾された糖モチーフと呼ばれる同じ修飾された糖部分を含む。ある実施形態において、完全に修飾されたオリゴヌクレオチドは、均一に修飾されたオリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、均一に修飾されたヌクレオシドの各々は、同じ２’－修飾を含む。ある実施形態において、均一に修飾された糖モチーフは、１２～３０ヌクレオシド長である。ある実施形態において、均一に修飾された糖モチーフの各ヌクレオシドは、２’－置換ヌクレオシド、糖代用物、または二環式ヌクレオシドである。ある実施形態において、均一に修飾された糖モチーフの各ヌクレオシドは、２’－$OCH_2CH_2OCH_3$基または２’－OCH_3基のいずれかを含む。ある実施形態において、少なくとも１つの完全に修飾された糖モチーフを有する修飾されたオリゴヌクレオチドはまた、少なくとも１個、少なくとも２個、少なくとも３個、または少なくとも４個の２’－デオキシヌクレオシドを有し得る。

【００９７】

遺伝子サイレンシングに有用な環状構造化オリゴヌクレオチドの例としては、表１の環状構造化オリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。表１のオリゴヌクレオチド番号１～６は、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン９型（ＰＣＳＫ９）を標的とする。表１のオリゴヌクレオチド番号１５１２～１５２０、１５３６～１５４５および１６０５は、パタチン様ホスホリパーゼドメイン含有タンパク質３（ＰＮＰＬＡ３）を標的とする。対象となる任意の他の標的に向けられた機能性ドメインを有する環状構造化オリゴヌクレオチドは、十分に当業者の技術の範囲内である。すべてのヌクレオチド間結合は、特に断りのない限り、ホスホロチオエート結合である。

【表１】

表１

化合物番号	配列番号	配列
1	配列番号 146 &配列番号 1	3’ -$T_2C_2G_2T_2G_2$G-5’ -5’ -GGTCTCCTCCATCAGCACC-3’
2	配列番号 147 &配列番号 2	3’ -$T_2C_2G_2T_2G_2G_2$-5’ -5’ -$G_1G_1U_1$CTCCTCCATCAGC$A_1C_1C_1$-3’
3	配列番号 147 &配列番号 3	3’ -$T_2C_2G_2T_2G_2G_2$-5’ -5’ -$G_1G_1U_1C_1U_1C_1$CTCCATCAGCACC-3’
4	配列番号 4	5’ -GGTCTCCTCCATCAGCACC-3’
5	配列番号 5& 配列番号 148	5’ -GGTCTCCTCCATCAGCACC-3’ -3’ -$C_2C_2A_2G_2A_2$G-5’
6	配列番号 6& 配列番号 6	3’ -CCACGACTACCTCCTCTGG-5’ -5’ -GGTCTCCTCCATCAGCACC-3’
1605	配列番号 59& 配列番号 149	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>GAAGATG-5’ -5’ -CTGCTTC-3’
1512	配列番号 61& 配列番号 150	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>GAAGATG-5’ -5’ -CTGCTT-3’
1513	配列番号 62& 配列番号 151	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>GAAGATG-5’ -5’ -CTGCT-3’
1514	配列番号 63& 配列番号 152	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>GAAGATG-5’ -5’ -CTGC-3’
1515	配列番号 64& 配列番号 153	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>GAAGATG-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3’
1516	配列番号 65& 配列番号 154	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>GAAGATG-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2$-3’
1517	配列番号 66& 配列番号 153	3’ -GACGAAGTAGG$_1$<u>G</u>$_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3’
1518	配列番号 67& 配列番号 154	3’ -GACGAAGTAGG$_1$<u>G</u>$_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2$-3’
1519	配列番号 68& 配列番号 153	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>$_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3’
1520	配列番号 69& 配列番号 154	3’ -GACGAAGTAGG<u>G</u>$_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2$-3’
1536	配列番号 70& 配列番号 149	3’ -GACGAAGTACGGGAAGATG-5’ -5’ -CTGCTTC-3’
1537	配列番号 71& 配列番号 150	3’ -GACGAAGTACGGGAAGATG-5’ -5’ -CTGCTT-3’
1538	配列番号 72& 配列番号 151	3’ -GACGAAGTACGGGAAGATG-5’ -5’ -CTGCT-3’
1539	配列番号 73& 配列番号 152	3’ -GACGAAGTACGGGAAGATG-5’ -5’ -CTGC-3’
1540	配列番号 74& 配列番号 153	3’ -GACGAAGTACGGGAAGATG-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3’
1541	配列番号 75& 配列番号 154	3’ -GACGAAGTACGGGAAGATG-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2$-3’
1542	配列番号 76& 配列番号 153	3’ -GACGAAGTACG$_1G_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3’
1543	配列番号 77& 配列番号 154	3’ -GACGAAGTACG$_1G_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2$-3’
1544	配列番号 78& 配列番号 153	3’ -GACGAAGTACGG$_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3’
1545	配列番号 79&	3’ -GACGAAGTACGG$_1G_1A_1A_1G_1A_1T_1G_1$-5’ -5’ -$C_2T_2G_2C_2T_2$-3’

	配列番号154	
1546	配列番号130& 配列番号150	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCTT-3’
1547	配列番号131& 配列番号151	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCT-3’
1548	配列番号132& 配列番号150	3’-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCTT-3’
1549	配列番号133& 配列番号151	3’-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCT-3’
1550	配列番号134& 配列番号150	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCTT-3’
1551	配列番号135& 配列番号151	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCT-3’
1552	配列番号136& 配列番号150	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCTT-3’
1553	配列番号137& 配列番号151	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CTGCT-3’
1554	配列番号138& 配列番号156	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3’
1555	配列番号139& 配列番号157	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$T-3’
1556	配列番号140& 配列番号156	3’-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3’
1557	配列番号141& 配列番号157	3’-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$T-3’
1558	配列番号142& 配列番号156	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3’
1559	配列番号143& 配列番号157	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$T-3’
1560	配列番号144& 配列番号156	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$TT$_2$-3’
1561	配列番号145& 配列番号157	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -CT$_2$GC$_2$T-3’
1562	配列番号138& 配列番号213	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3’
1563	配列番号139& 配列番号214	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$-3’
1564	配列番号140& 配列番号213	3’-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3’
1565	配列番号141& 配列番号214	3’-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$-3’
1566	配列番号142& 配列番号213	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3’
1567	配列番号143& 配列番号214	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$-3’
1568	配列番号144& 配列番号213	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$T-3’
1569	配列番号145& 配列番号214	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_2$TG$_2$CT$_2$-3’
1570	配列番号138& 配列番号215	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-3’
1571	配列番号139& 配列番号216	3’-GACGAAGTAGG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-3’
1572	配列番号140&	3’-GACGAAGTAGGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-

	配列番号215	3’
1573	配列番号141& 配列番号216	3’-GACGAAGTAGG$G_1$$G_1$$A_1$$A_1$$G_1$$A_1$$T_1$$G_1$-5’ -5’ -$C_3$$T_3$$G_3$$C_3$$T_3$-3’
1574	配列番号142& 配列番号215	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-3’
1575	配列番号143& 配列番号216	3’-GACGAAGTACG$_1$G$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-3’
1576	配列番号144& 配列番号215	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$-3’
1577	配列番号145& 配列番号216	3’-GACGAAGTACGG$_1$G$_1$A$_1$A$_1$G$_1$A$_1$T$_1$G$_1$-5’ -5’ -C$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-3’

ＧＣＡＴ－ＤＮＡホスホロチオエート結合；G_1／C_1／A_1／U_1－２’ＯＭＥホスホロチオエート結合；A_2／T_2／C_2／G_2－ＤＮＡホスホジエステル結合；Ｇ＝７－デアザ－Ｇ；A_3／T_3／C_3／G_3－ＲＮＡホスホジエステル結合

【００９８】

ある実施形態において、標的核酸（標的ＲＮＡ）は、標的のマウス配列である。ある実施形態において、標的核酸（標的ＲＮＡ）は、標的のヒト配列である。

【００９９】

ある実施形態において、ＰＣＳＫ９核酸は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＮＭ＿１５３５６５．２（配列番号５７として本明細書に組み込まれる）に記載のマウス配列である。ある実施形態において、ＰＣＳＫ９核酸は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＮＭ＿１７４９３６．３（配列番号５８として本明細書に組み込まれる）に記載のヒト配列である。

【０１００】

ある実施形態において、ＰＮＰＬＡ３核酸は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＮＭ＿５４０８８．３（配列番号８０として本明細書に組み込まれる）に記載のマウス配列である。ある実施形態において、ＰＣＳＫ９核酸は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＮＭ＿２５２２５．２（配列番号８１として本明細書に組み込まれる）に記載のヒト配列である。ある実施形態において、ＰＣＳＫ９核酸は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＸＭ　１１０９１４４．３（配列番号８２として本明細書に組み込まれる）に記載のアカゲザル配列である。ある実施形態において、ＰＣＳＫ９核酸は、ＧＥＮＢＡＮＫアクセッション番号ＸＭ＿５５６７０５１．２（配列番号８３として本明細書に組み込まれる）に記載のカニクイザル配列である。

【０１０１】

ｓｉＲＮＡ

実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、ｓｉＲＮＡである。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡを標的とする、約１５～約５０ヌクレオチド長、好ましくは約１８～約３６ヌクレオチド長の短い二本鎖ＲＮＡを含む。

【０１０２】

実施形態において、本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、機能性ドメインおよび環化ドメインがそれらの５’または３’末端で連結されており、機能性ドメインが１５～５０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的である、環状構造化オリゴヌクレオチドを提供し、環化ドメインは、４～１００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインはｓｉＲＮＡを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）を提供する。

【０１０３】

実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインのｓｉＲＮＡの鎖の

配列と同じ長さである。実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインのｓｉＲＮＡの鎖の配列よりも長い。実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインのｓｉＲＮＡの鎖の配列よりも短い。

【０１０４】

実施形態において、環化ドメインは、４～５０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、１５～４５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、１５～４５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ヌクレオチド長である。

【０１０５】

実施形態において、環化ドメインは、４～１０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、６～１０ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインは、６～８ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、環化ドメインのオリゴヌクレオチドは、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチド長である。

【０１０６】

実施形態において、環化ドメインは、相補的であるｓｉＲＮＡの鎖に少なくとも９５％相補的である。実施形態において、環化ドメインは、相補的であるｓｉＲＮＡの鎖に少なくとも９７％相補的である。実施形態において、環化ドメインは、相補的であるｓｉＲＮＡの鎖に少なくとも９８％相補的である。実施形態において、環化ドメインは、相補的であるｓｉＲＮＡの鎖に少なくとも９９％相補的である。実施形態において、環化ドメインは、相補的であるｓｉＲＮＡの鎖に少なくとも１００％相補的である。

【０１０７】

「ｓｉＲＮＡ」および「低分子干渉ＲＮＡ」という用語は交換可能であり、ＲＮＡ干渉を誘導することができる一本鎖または二本鎖ＲＮＡ分子を指す。ｓｉＲＮＡ分子は、通常、１８～３６塩基対の長さの二重鎖領域を有する。そのようなｓｉＲＮＡの設計は、当業者の技術の範囲内である。

【０１０８】

一実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがｓｉＲＮＡである場合、環化ドメインは、リンカーセグメントを介してｓｉＲＮＡのセンス鎖の５’末端に結合している（図２Ａを参照されたい）。一実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがｓｉＲＮＡである場合、環化ドメインは、リンカーセグメントを介してｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端に結合している。

【０１０９】

別の実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドがｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖である場合、環化ドメインはｓｉＲＮＡのセンス鎖であり、アンチセンス鎖の３’－末端または５’－末端のいずれかに結合している（図２Ｂおよび図２Ｃを参照されたい）。換言すれば、この実施形態において、ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、環化ドメインとしても作用する。

【０１１０】

本発明のｓｉＲＮＡの一方または両方の鎖は、３’－オーバーハングも含み得る。「３’オーバーハング」とは、ＲＮＡ鎖の３’－末端から延びる少なくとも１つの不対ヌクレオチドを指す。したがって、一態様において、本発明のｓｉＲＮＡは、１～約６ヌクレオチド長（リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを含む）、好ましくは１～約５ヌクレオチド長、より好ましくは１～約４ヌクレオチド長、特に好ましくは約１～約２ヌクレオチド長の少なくとも１つの３’オーバーハングを含む。

【０１１１】

ｓｉＲＮＡ分子の両方の鎖が３’オーバーハングを含む場合、オーバーハングの長さは

各鎖について同じであっても異なっていてもよい。最も好ましい実施形態において、３’オーバーハングはｓｉＲＮＡの両鎖に存在し、２ヌクレオチド長である。本ｓｉＲＮＡの安定性を高めるために、３’オーバーハングを分解に対して安定化することもできる。一実施形態において、オーバーハングは、プリンヌクレオチド、例えばアデノシンまたはグアノシンヌクレオチドを含めることによって安定化される。

【０１１２】

代替的に、修飾された類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、３’オーバーハング中のウリジンヌクレオチドの２’－デオキシチミジンによる置換は許容され、ＲＮＡｉ分解の効率に影響を及ぼさない。特に、２’－デオキシチミジンに２’ヒドロキシルが存在しないことで、組織培養培地中の３’オーバーハングのヌクレアーゼ耐性が有意に増強される。

【０１１３】

本発明のｓｉＲＮＡは、標的ｍＲＮＡ配列の約１８～３０個、好ましくは１９～２５個の隣り合うヌクレオチドの任意のストレッチを標的とすることができる。ｓｉＲＮＡの標的配列を選択する技術は当該技術分野で周知である。したがって、本ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、標的ｍＲＮＡ中の約１８～約３０ヌクレオチドの任意の隣り合うストレッチと同一のヌクレオチド配列を含む。

【０１１４】

スプライシングオリゴヌクレオチド

実施形態において、本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、機能性ドメインおよび環化ドメインがそれらの５’末端で連結されており、機能性ドメインが１５～４５ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的であり、環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインはスプライシングオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは修飾されている、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）を提供する。

【０１１５】

本明細書で使用される場合、「スプライシングオリゴヌクレオチド」という用語は、スプライシングを調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。スプライス調節のために、アンチセンスは標的ＲＮＡに結合し、スプライシングを調節し、それによってタンパク質の発現を調節する。環状構造化オリゴヌクレオチドでは、環化ドメインは、３’末端または５’末端のいずれかに結合して環状構造を形成することができる。好ましい実施形態において、環化ドメインは、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドの５’末端に結合している。環状構造により、タンパク質結合が減少し、ポリアニオン特性が減少し、末端へのアクセシビリティが欠如することによりエンドソーム脱出が可能になり、パターン認識受容体との相互作用が緩和される。

【０１１６】

実施形態において、スプライシングを調節するためのオリゴヌクレオチドはｓｎＲＮＡである。「ｓｎＲＮＡ」および「核内低分子ＲＮＡ」という用語は交換可能であり、ＲＮＡスプライシングおよび転写因子の調節を含む様々な過程に関与する低分子ＲＮＡのクラスを指す。核小体低分子ＲＮＡ（ｓｎｏＲＮＡ）のサブクラスも含まれる。この用語はまた、人工ｓｎＲＮＡ、例えばｓｎＲＮＡのアンチセンス誘導体を含むことが意図される。そのようなｓｎＲＮＡの設計は、当業者の技術の範囲内である。

【０１１７】

いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、国際公開第２０２１／０５５０１１号（これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているとおりである。具体的には、いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、保持されたイントロンを含む標的ｐｒｅ－ｍＲＮＡに相補的な１４～３０個の連結されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含み、アンチセンス

オリゴヌクレオチドは、各々が独立して２～５個の連続するデオキシリボヌクレオチドを含む１～３個の領域を含み、残りのヌクレオチドは、２’－置換、非イオン性もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせである。スプライシングを調節するオリゴヌクレオチドを含む機能性ドメインを有するＣＳＯは、少なくとも２つのｍＲＮＡ転写物を含む遺伝子内の第一のｍＲＮＡ転写物を選択するのに有用であり、オリゴヌクレオチドは、標的ｐｒｅ－ｍＲＮＡの等しい長さの部分に相補的な少なくとも１２個の隣り合う核酸塩基を含み、オリゴヌクレオチドは、第２のｍＲＮＡ転写物に対するｐｒｅ－ｍＲＮＡのスプライス部位を標的とし、それによって第２のｍＲＮＡ転写物に対するスプライス部位を遮断し、ｐｒｅ－ｍＲＮＡの第１のｍＲＮＡ転写物へのスプライシングを指示する。実施形態において、２’－置換ヌクレオチドは、２’Ｏ－メチルリボヌクレオシドまたは２’－メトキシエチルリボヌクレオシド（ＭＯＥ）から選択される。

【０１１８】

実施形態において、スプライシングオリゴヌクレオチドは、２～５個の連続するデオキシリボヌクレオチドを含む１つの領域を含み、残りのヌクレオチドは、２’－置換、非イオン性もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせである。実施形態において、スプライシングオリゴヌクレオチドは、２～５個の連続するデオキシリボヌクレオチドを独立して含む２つの領域を含み、残りのヌクレオチドは、２’－置換、非イオン性、もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせである。実施形態において、スプライシングは、２～５個の連続するデオキシリボヌクレオチドを独立して含む３つの領域を含み、残りのヌクレオチドは、２’－置換、非イオン性、もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、２～４ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、４ヌクレオチド長である。

【０１１９】

実施形態において、スプライシングオリゴヌクレオチドの連続するデオキシリボヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端、スプライシングオリゴヌクレオチドの３’末端にあるか、または２’－置換、非イオン性、もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせに隣接している。実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、スプライシングオリゴヌクレオチドの５’末端にある。実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、スプライシングオリゴヌクレオチドの３’末端にある。実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、２’－置換、非イオン性、もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせに隣接する。

【０１２０】

いくつかの実施形態において、機能性ドメインのスプライシングオリゴヌクレオチドは、保持されたイントロンを含む標的ｐｒｅ－ｍＲＮＡの等しい長さの部分に相補的な少なくとも１２個の隣り合うる核酸塩基を有する１４～３０個の連結されたヌクレオチドを含み、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、２～５個の連続するデオキシリボヌクレオチドを各々独立して含む１～３個の領域を含み、残りのヌクレオチドは、２’－置換、非イオン性、もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせである。

【０１２１】

実施形態において、２’－置換ヌクレオチドは、本明細書に記載されるとおりである。実施形態において、２’－置換ヌクレオチドは、２’Ｏ－メチルリボヌクレオチドまたは２’－ＭＯＥから選択される。

【０１２２】

いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、２～５個の連続するデオキシリボヌクレオチドを含む１個の領域を含む。実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、スプライシングオリゴヌクレオチドの５’末端、アンチセンスオリゴヌクレオチドの３’末端にあり、２’－置換、非イオン性、もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせに隣接している。実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、スプライシングオリゴヌクレオチドの５’末端にある。

実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、スプライシングオリゴヌクレオチドの３’末端にある。

【０１２３】

実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、２～４ヌクレオチド長である。実施形態において、連続するデオキシリボヌクレオチドは、４ヌクレオチド長である。

【０１２４】

実施形態において、エクソンは、保持されたイントロンの５’スプライス部位に隣接する。実施形態において、エクソンは、保持されたイントロンの３’スプライス部位に隣接する。実施形態において、エクソンは、保持されたイントロンの５’スプライス部位に隣接し、エクソンは、保持されたイントロンの３’スプライス部位に隣接する。

【０１２５】

スプライシングに有用な環状オリゴヌクレオチドの例としては、表２の環状オリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。表２のオリゴヌクレオチドはＤＭＤを標的としている。対象となる任意の他の標的に向けられた機能性ドメインを有する環状オリゴヌクレオチドは、十分に当業者の技術の範囲内である。

【表２】

表２

化合物番号	配列番号	配列
7	配列番号 158& 配列番号 7	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5’ -5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’
8	配列番号 159& 配列番号 8	3’ -$A_2A_2T_2G_2G_2A_2$-5’ -5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’
9	配列番号 160& 配列番号 9	3’ -$A_1A_1U_1G_1G_1A_1$-5’ -5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’
10	配列番号 10&配列番号 161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’-3’ - $C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
11	配列番号 11&配列番号 162	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’-3’ - $C_2C_2G_2G_2T_2T_2$-5’
12	配列番号 12&配列番号 163	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’-3’ - $C_1C_1G_1G_1U_1U_1$-5’
13	配列番号 158& 配列番号 13	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’
14	配列番号 158& 配列番号 14	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’
15	配列番号 158& 配列番号 15	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’
16	配列番号 158& 配列番号 16	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2U_1A_1C_1C_1U_1$-3’
17	配列番号 158& 配列番号 17	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_1U_1$-3’
18	配列番号 158& 配列番号 18	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3’
19	配列番号 158& 配列番号 19	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_2G_2C_2C_2A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’
20	配列番号 158& 配列番号 20	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_2C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’
21	配列番号 158& 配列番号 21	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_2G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’
22	配列番号 158& 配列番号 22	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2T_2A_1C_1C_1U_1$-3’
23	配列番号 158& 配列番号 23	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_2T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3’
24	配列番号 158& 配列番号 24	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3’
25	配列番号 158& 配列番号 25	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1T_2A_2C_2C_2T_2$-3’
26	配列番号 158& 配列番号 26	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3’
27	配列番号 158& 配列番号 27	3’ - $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5-5’- $G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_2T_2$-3’
28	配列番号 28&配列番号 161	5’-$G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’-3’ - $C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
29	配列番号 29&配列番号 161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’-3’ - $C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
30	配列番号 30&配列番号 161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’-3’ - $C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
31	配列番号 31&配列番号 161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2U_1A_1C_1C_1U_1$-3’-3’ - $C_2C_2G_2G_2T_2$-5’

32	配列番号32&配列番号161	5’-$G_2G_2C_2C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_1U_1$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
33	配列番号33&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
34	配列番号34&配列番号161	5’-$G_2G_2C_2C_2A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
35	配列番号35&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_2A_2A_2C_2C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
36	配列番号36&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_2T_2C_2G_2G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_1U_1$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
37	配列番号37&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_2C_2T_2T_2A_1C_1C_1U_1$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
38	配列番号38&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_2T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
39	配列番号39&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1T_2T_2A_2C_2C_2T_2$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
40	配列番号40&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1T_2A_2C_2C_2T_2$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
41	配列番号41&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_2C_2T_2$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
42	配列番号42&配列番号161	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_1C_1C_2T_2$-3’-3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
43	配列番号164&配列番号43	3’- $A_1U_1G_1G_1A_1$ -5’-5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’
44	配列番号44&配列番号165	5’-$G_1G_1C_1C_1A_1A_1A_1C_1C_1U_1C_1G_1G_1C_1U_1U_1A_2C_2C_2T_2$-3’-3’-$C_1C_1G_1G_1U_1$-5’

G_1／C_1／A_1／U_1－２’ＯＭＥヌクレオチド；A_2／T_2／C_2／G_2－デオキシリボヌクレオチド

【０１２６】

ＡＤＡＲ

実施形態において、本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、機能性ドメインおよび環化ドメインがそれらの５’末端で連結されており、機能性ドメインが１５～５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的であり、環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインは、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）システムのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）を提供する。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、内因性転写物を編集するために内因性ＡＤＡＲ（ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ）酵素を動員するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。ＡＤＡＲは、ＲＮＡ編集として知られるプロセスにおいてアデノシン（Ａ’ｓ）のイノシン（Ｉ’ｓ）への変換を触媒する酵素の群である。ＡＤＡＲは様々なタイプのＲＮＡに作用することができるが、ｍＲＮＡのコード領域における編集イベントは、グアノシン（Ｇ）のようなＩの塩基対として特に興味深い。したがって、ＡＤＡＲによって触媒されるすべてのＡからＩへの変化は、翻訳中のＡからＧへの変化として読み取られ、タンパク質の配列および機能を潜在的に変化させる。再コード化するこの能力は、ＡＤＡＲをｍＲＮＡ内の遺伝子突然変異を修正するための魅力的な治療ツールにする。

【０１２８】

ＡＤＡＲシステムのオリゴヌクレオチド自体は、１つ以上のドメインを含む。相補的ドメインとして知られる１つのドメインは、標的ＲＮＡに相補的な連続ヌクレオチドの領域を含む。実施形態において、相補的ドメインは、約１５～約１２０ヌクレオチド長である。実施形態において、相補的ドメインは、約１７～約６０ヌクレオチド長である。動員ドメインとして知られる別のドメインは、ＡＤＡＲ酵素を動員するオリゴヌクレオチドの領域を含む。

【０１２９】

ＣＲＩＳＰＲ

実施形態において、本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、機能性ドメインおよび環化ドメインがそれらの５’末端で連結されており、機能性ドメインが１７～５００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡに相補的である、環状構造化オリゴヌクレオチドを提供し、環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインは、ＣＲＩＳＰＲ系のシステムのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）を提供する。

【０１３０】

機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは、ＣＲＩＳＰＲ系のシステムのためのガイドＲＮＡとして機能するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。「ｓｇＲＮＡ」および「ガイドＲＮＡ」という用語は交換可能であり、目的の標的ＤＮＡまたはＲＮＡ領域を認識し、編集のためにエンドヌクレアーゼをそこに向ける特定のＲＮＡ配列を指す。ｇＲＮＡは、通常、２つの部分：標的ＤＮＡに相補的な１７～３０ヌクレオチド配列であるｃｒｉｓｐｒ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）と、Ｃａｓヌクレアーゼの結合足場として働くｔｒａｃｒＲＮＡとで構成される。

【０１３１】

標的ＤＮＡまたはＲＮＡの認識に有効である限り、任意の適切な操作されたｓｇＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡを使用することができる。そのようなｓｇＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡの設計は、当業者の技術の範囲内である。

【０１３２】

免疫賦活性オリゴヌクレオチド

実施形態において、本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、機能性ドメインおよび環化ドメインがそれらの３’末端で連結されており、機能性ドメインが１１～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、環化ドメインは４～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインは免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）を提供する。

【０１３３】

実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、脊椎動物細胞においてインターフェロン応答を誘導することができる。

【０１３４】

実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、別のヌクレオチド配列、例えば標的ＲＮＡに相補的でなく、それに結合しない。この実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドではなく、アンチセンス活性を有しない。

【０１３５】

実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、１１～４０ヌクレオチド長である。実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、１５～２８ヌクレオチド長で

ある。実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、１７～２５ヌクレオチド長である。

【０１３６】

実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインの配列と同じ長さである。実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインの配列よりも長い。実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインの配列よりも短い。

【０１３７】

実施形態において、環化ドメインは、１１～４０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、１５～２８ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、１７～２５ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、４～１０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、４～８ヌクレオチド長である。

【０１３８】

実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート、ホスホジエステル、またはそれらの組み合わせである。

【０１３９】

実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。

【０１４０】

実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルである。

【０１４１】

実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合とホスホジエステルヌクレオチド間結合との組み合わせである。

【０１４２】

実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート、ホスホジエステル、またはそれらの組み合わせである。

【０１４３】

実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。

【０１４４】

実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルである。

【０１４５】

実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合とホスホジエステルヌクレオチド間結合との組み合わせである。

【０１４６】

いくつかの実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートであり、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルであり、またはその逆である。

【０１４７】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドには、エンドソームｔｏｌｌ様受容体、ＲＩＧ様受容体、ＳＴＩＮＧ、ｃＧＡＳおよびインフラマソームを介して免疫賦活を誘導するオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）は、潜在的な有害病原体を検出することによって自然免疫応答の開始に重要な役割を果たすパターン認識受容体（ＰＲＲ）である。各ＴＬＲは広範囲の特異性を有し、例えば、ＴＬＲ１、２、４および６は細菌脂質を認識し、ＴＬＲ３、７および８はウイルスＲＮＡを認識し、ＴＬＲ９はＣＧモチーフを含む細菌ＤＮＡを認識し、ＴＬＲ５および１０は細菌または寄生虫のタンパク質を認識する。そのような免疫賦活性オリゴヌクレオチドの設計は、当業者

の技術の範囲内である。

【０１４８】

実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドが免疫賦活性オリゴヌクレオチドである場合、環化ドメインは、リンカーセグメントを介して機能性ドメインの５’－末端または３’末端に結合している（例えば、図３を参照されたい）。いくつかの実施形態において、環化ドメインは、５’末端に結合している。いくつかの実施形態において、環化ドメインは、３’末端に結合している。

【０１４９】

別の実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは免疫賦活性オリゴヌクレオチドであり、環化ドメインは別の免疫賦活性オリゴヌクレオチドであり、環化ドメインの免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインの３’末端に結合している。換言すれば、この実施形態において、環化ドメインは、免疫賦活性オリゴヌクレオチドとしても作用する。

【０１５０】

免疫賦活に有用な環状オリゴヌクレオチドの例としては、表３の環状オリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。表３のオリゴヌクレオチドは、ＣｐＧジヌクレオチドを含み、Ｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ－９）を活性化する。対象となる任意の他のＰＲＲまたはＴＬＲに向けられた免疫賦活性オリゴヌクレオチドを含む機能性ドメインを有する環状オリゴヌクレオチドは、十分に当業者の技術の範囲内である。

【表３】

表３

化合物番号	配列番号	配列
45	配列番号 166&配列番号 45	3’ - TAGCA -5’ -5’ -TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3’
46	配列番号 167&配列番号 46	3’ -TTAGCA-5’ -5’ -TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3’ ’
47	配列番号 168&配列番号 47	3’ -ATGCT-5’ -5’ -ACGATTCGAATACGTAACGTTACGA-3’
48	配列番号 169&配列番号 48	3’ -AATGCT-5’ -5’ -ACGATTCGAATACGTAACGTTACGA-3’
49	配列番号 170&配列番号 49	5’ -TTACGA-3’ -3’ -TGCTAAGCTTATGCATTGCAATGCT-5’
50	配列番号 171&配列番号 50	5’ -TACGA-3’ -3’ -TGCTAAGCTTATGCATTGCAATGCT-5’
51	配列番号 172&配列番号 51	5’ -AATGCT -3’ -3’ -AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5’
52	配列番号 173&配列番号 52	5’ - ATGCT -3’ -3’ -AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5’
53	配列番号 53&配列番号 55	5’ -TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3’ -3’ - AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5’
54	配列番号 54&配列番号 56	3’ -AGCATTGCAATGCATAAGCTTAGCA-5’ -5’ - TCGTAACGTTACGTATTCGAATCGT-3’
55	配列番号 84&配列番号 85	5’ -$T_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2G_2T_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2C_2G_2T_2$-3’ - 3’ -$A_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2C_2A_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5’
1101	配列番号 86&配列番号 174	5’ -TCGTATCGTAACGTATTCGAATCGT-3’ -3’ - AGCATAGCATTGCATAAGCTTAGCA-5’
1102	配列番号 87&配列番号 175	5’ -$T_2C_2G_2T_2A_2T_2$CGTAACGTATTCGAATCGT-3’ -3’ - AGCATAGCATTGCATAAGC$T_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5’
1103	配列番号 88&配列番号 176	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3’ -3’ - AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
1104	配列番号 89&配列番号 177	5’ -TCGACUTGAACGATTCGAATACGTAAC-3’ -3’ - AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
1105	配列番号 90&配列番号 178	5’ -TCGACTTIAACGATTCGAATACGTAAC-3’ -3’ - AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
1106	配列番号 91&配列番号 179	5’ -$T_2C_2G_2A_2C_2T_2$TGAACGATTCGAATACGTAAC-3’ -3’ - AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT$G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5’
1107	配列番号 92&配列番号 180	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ -3’ - AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5’
1108	配列番号 93&配列番号 181	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ -3’ - AGCTGAACTTGCTAAGCT -5’
1109	配列番号 94&配列番号 182	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ -3’ - AGCTGAACTTGCT-5’
1110	配列番号 95&配列番号 183	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3’ -3’ -AGCTGA -5’
1111	配列番号 96&配列番号 184	5’ -$T_2C_2G_2A_2C_2T_2$TGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ -3’ - $A_2G_2C_2T_2G_2A_2$-5’
1112	配列番号 97	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’
1113	配列番号 98&配列番号 185	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3’ -L-3’ - AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
1114	配列番号 99&配列番号 186	5’ -$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3’ -L-3’ - $A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5’

1115	配列番号 100& 配列番号 187	5’ -TCGACTTGA$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’ -L-3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$ATGCATTG-5’
1116	配列番号 101& 配列番号 188	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ -L-3’ -AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5’
1117	配列番号 102& 配列番号 189	5’ -TCG ACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ -L-3’ -AGCTGAACTTGCTAAGCT -5’
1118	配列番号 103& 配列番号 190	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGT AAC -3’ -L-3’ -AGCTGAACTTGCT-5’
1119	配列番号 104& 配列番号 191	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGT AAC -3’ -L-3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$ -5’
1120	配列番号 105& 配列番号 192	5’ -TCG ACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ L-3’ -AGCTGA -5’
1121	配列番号 106	3’ -AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
1122	配列番号 107& 配列番号 193	3’ -AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’ -5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3’
1123	配列番号 108& 配列番号 194	3’ -AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’ -5’ - TCGACT-3’
1124	配列番号 109& 配列番号 195	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$T$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$C$_2$G$_2$T$_2$-3’ -3’ -A$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$A$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$G$_2$C$_2$A$_2$-5’
1125	配列番号 110 &配列番号 196	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’ -3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$T$_2$G$_2$-5’
1126	配列番号 111& 配列番号 197	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’ -3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$-5’
1127	配列番号 112& 配列番号 198	3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$T$_2$G$_2$-5’ -5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’
1128	配列番号 113& 配列番号 199	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’ -3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$T$_2$G$_2$-5’
1129	配列番号 114& 配列番号 200	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’ -3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$-5’
1130	配列番号 115& 配列番号 201	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’ -3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$G$_2$C$_2$A$_2$-5’
1131	配列番号 116	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’
1132	配列番号 117	3’ -A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$C$_2$T$_2$A$_2$A$_2$G$_2$C$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$G$_2$C$_2$A$_2$T$_2$T$_2$G$_2$-5’
1133	配列番号 118& 配列番号 202	5’ -T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$A$_2$T$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$-3’ -3’ -A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$G$_2$A$_2$A$_2$C$_2$T$_2$T$_2$C$_2$G$_2$T$_2$A$_2$A$_2$C$_2$G$_2$T$_2$T$_2$A$_2$T$_2$C$_2$G$_2$A$_2$T$_2$T$_2$G$_2$-5’
1134	配列番号 119& 配列番号 203	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3’ -L- 3’ -A$_3$G$_3$C$_3$T$_3$G$_3$A$_3$A$_3$C$_3$T$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$A$_3$A$_3$G$_3$C$_3$T$_3$T$_3$A$_3$T$_3$G$_3$C$_3$A$_3$T$_3$T$_3$G$_3$-5’
1135	配列番号 120& 配列番号 204	5’ -TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC -3’ -L-3’ -A$_3$G$_3$C$_3$T$_3$G$_3$A$_3$A$_3$C$_3$T$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$A$_3$A$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-5’
1136	配列番号 217& 配列番号 204	5’ -T$_3$C$_3$G$_3$A$_3$C$_3$T$_3$T$_3$G$_3$A$_3$A$_3$C$_3$G$_3$A$_3$T$_3$T$_3$C$_3$G$_3$A$_3$A$_3$T$_3$A$_3$C$_3$G$_3$T$_3$A$_3$A$_3$C$_3$-3’ -L-3’ -A$_3$G$_3$C$_3$T$_3$G$_3$A$_3$A$_3$C$_3$T$_3$T$_3$G$_3$C$_3$T$_3$A$_3$A$_3$G$_3$C$_3$T$_3$-5’

ＧＣＡＴ－ＤＮＡホスホロチオエート結合Ａ$_2$／Ｔ$_2$／Ｃ$_2$／Ｇ$_2$－ＤＮＡホスホジエステル結合；Ａ$_3$／Ｔ$_3$／Ｃ$_3$／Ｇ$_3$－ＲＮＡホスホジエステル結合；Ｕ＝デオキシウリジン；Ｉ＝デオキシイノシン；Ｌ＝トリエチレングリコール

【０１５１】

免疫アンタゴニスト

実施形態において、本発明は、機能性ドメイン、環化ドメイン、およびリンカーを含む環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）であって、機能性ドメインおよび環化ドメインがそれらの３’末端で連結されており、機能性ドメインが１１～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、環化ドメインは４～４００ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを含み、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインは免疫アンタゴニストを含む、環状構造化オリゴヌクレオチド（ＣＳＯ）を提供する。

【０１５２】
実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドは、脊椎動物細胞におけるインターフェロン応答を遮断することができる。
【０１５３】
実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、別のヌクレオチド配列、例えば標的ＲＮＡに相補的ではなく、それに結合しない。実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドではなく、アンチセンス活性を有しない。
【０１５４】
実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、１１～３０ヌクレオチド長である。実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、１５～２８ヌクレオチド長である。実施形態において、免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、１７～２５ヌクレオチド長である。
【０１５５】
実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインの配列と同じ長さである。実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインの配列よりも長い。実施形態において、環化ドメインは、相補的である機能性ドメインの配列よりも短い。
【０１５６】
実施形態において、環化ドメインは、１１～４０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、１５～２８ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、１７～２５ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、４～１２ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、４～１０ヌクレオチド長である。実施形態において、環化ドメインは、４～８ヌクレオチド長である。
【０１５７】
実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート、ホスホジエステルまたはそれらの組み合わせである。
【０１５８】
実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。
【０１５９】
実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルである。
【０１６０】
実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合とホスホジエステルヌクレオチド間結合との組み合わせである。
【０１６１】
実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート、ホスホジエステル、またはそれらの組み合わせである。
【０１６２】
実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。
【０１６３】
実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルである。
【０１６４】
実施形態において、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合とホスホジエステルヌクレオチド間結合との組み合わせである。
【０１６５】
実施形態において、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合は、

ホスホロチオエートであり、環化ドメインのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステルであり、またはその逆である。

【０１６６】

免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドには、エンドソームｔｏｌｌ様受容体、ＲＩＧ様受容体、ＳＴＩＮＧ、ｃＧＡＳおよびインフラマソームを介して免疫賦活を遮断するオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）は、潜在的な有害病原体を検出することによって自然免疫応答の開始に重要な役割を果たすパターン認識受容体（ＰＲＲ）である。各ＴＬＲは広範囲の特異性を有し、例えば、ＴＬＲ１、２、４および６は細菌脂質を認識し、ＴＬＲ３、７および８はウイルスＲＮＡを認識し、ＴＬＲ９はＣＧモチーフを含む細菌ＤＮＡを認識し、ＴＬＲ５および１０は細菌または寄生虫のタンパク質を認識する。そのような免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドの設計は、当業者の技術の範囲内である。

【０１６７】

別の実施形態において、機能性ドメインのオリゴヌクレオチドは免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドであり、環化ドメインは別の免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドであり、環化ドメインの免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドは、機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列に相補的であり、相補的である機能性ドメイン内のヌクレオチドの配列とは反対の極性を持ち、機能性ドメインの３’－末端に結合している（図３Ｂを参照されたい）。換言すれば、この実施形態において、環化ドメインは、免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドとしても作用する。

【０１６８】

免疫賦活に有用な環状オリゴヌクレオチドの例としては、表４の環状オリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。表４のオリゴヌクレオチドは、ＣｐＧジヌクレオチド内にメチル化Ｃを含み、Ｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ－９）の活性化を遮断する。対象となる任意の他のＰＲＲまたはＴＬＲに向けられた免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチドを含む機能性ドメインを有する環状オリゴヌクレオチドは、十分に当業者の技術の範囲内である。

【表４】

表４

化合物番号	配列番号	配列
1201	配列番号 121& 配列番号 205	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3’-3’-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$TTATGC$_m$ATTG-5’
1202	配列番号 122& 配列番号 206	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3’-3’-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$TTAT-5’
1203	配列番号 123& 配列番号 207	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3’-3’-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$T -5’
1204	配列番号 124& 配列番号 208	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3’-3’-AGC$_m$TGAACTTGC$_m$T -5’
1205	配列番号 125& 配列番号 209	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC-3’-3’-AGC$_m$TGA-5’
1206	配列番号 126	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC -3’
1207	配列番号 127& 配列番号 210	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC -3’-3’-AGCTGAACTTG -5’
1208	配列番号 128& 配列番号 211	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GT AAC -3’-3’-AGCTGAAC -5’
1209	配列番号 129& 配列番号 212	5’-TC$_m$GACTTGAAC$_m$GATTC$_m$GAATAC$_m$GTAAC -3’-3’-AGCTGA-5

Ｃ$_m$＝５’－メチル化Ｃ

【０１６９】

本明細書に記載される環状オリゴヌクレオチドに有用な環化ドメインの例としては、表５の環化ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。

【表５】

表５

配列番号	配列
配列番号 146	3’-$T_2C_2G_2T_2G_2G$-5’
配列番号 147	3’-$T_2C_2G_2T_2G_2G_2$-5’
配列番号 148	3’-$C_2C_2A_2G_2A_2G$-5’
配列番号 149	5’-CTGCTTC-3’
配列番号 150	5’-CTGCTT-3’
配列番号 151	5’-CTGCT-3’
配列番号 152	5’-CTGC-3’
配列番号 153	5’-$C_2T_2G_2C_2T_2T_2$-3’
配列番号 154	5’-$C_2T_2G_2C_2T_2$-3’
配列番号 155	5’-$C_2T_2G_2C_2$-3’
配列番号 156	5’-$CT_2GC_2TT_2$-3’
配列番号 157	5’-CT_2GC_2T-3’
配列番号 158	3’- $A_2T_2G_2G_2A_2$ -5’
配列番号 159	3’-$A_2A_2T_2G_2G_2A_2$-5’
配列番号 160	3’-$A_1A_1U_1G_1G_1A_1$-5’
配列番号 161	3’-$C_2C_2G_2G_2T_2$-5’
配列番号 162	3’-$C_2C_2G_2G_2T_2T_2$-5’
配列番号 163	3’-$C_1C_1G_1G_1U_1U_1$-5’
配列番号 164	3’- $A_1U_1G_1G_1A_1$ -5’
配列番号 165	3’-$C_1C_1G_1G_1U_1$-5’
配列番号 166	3’- TAGCA -5’
配列番号 167	3’-TTAGCA-5’
配列番号 168	3’-ATGCT-5’
配列番号 169	3’-AATGCT-5’
配列番号 170	5’-TTACGA-3’
配列番号 171	5’-TACGA-3’
配列番号 172	5’-AATGCT -3’
配列番号 173	5’- ATGCT -3’
配列番号 174	3’-AGCATAGCATTGCATAAGCTTAGCA-5’
配列番号 175	3’-AGCATAGCATTGCATAAGC$T_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5’
配列番号 176	3’-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
配列番号 177	3’-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
配列番号 178	3’-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
配列番号 179	3’-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATG$_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5’
配列番号 180	3’-AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5’
配列番号 181	3’-AGCTGAACTTGCTAAGCT -5’
配列番号 182	3’-AGCTGAACTTGCT-5’
配列番号 183	3’-AGCTGA -5’
配列番号 184	3’-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2$-5’
配列番号 185	3’-AGCTGAACTTGCTAAGCTTATGCATTG-5’
配列番号 186	3’-$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5’

配列番号 187	3’ -$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2$ATGCATTG-5’
配列番号 188	3’ -AGCTGAACTTGCTAAGCTTAT-5’
配列番号 189	3’ -AGCTGAACTTGCTAAGCT -5’
配列番号 190	3’ -AGCTGAACTTGCT-5’
配列番号 191	3’ -$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2$ -5’
配列番号 192	3’ -AGCTGA -5’
配列番号 193	5’ - TCGACTTGAACGATTCGAATACGTAAC-3’
配列番号 194	5’ - TCGACT-3’
配列番号 195	3’ -$A_2G_2C_2A_2T_2A_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2C_2A_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2G_2C_2A_2$-5’
配列番号 196	3’ -$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5’
配列番号 197	3’ -$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2$-5’
配列番号 198	5’ -$T_2C_2G_2A_2C_2T_2T_2G_2A_2A_2C_2G_2A_2T_2T_2C_2G_2A_2A_2T_2A_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2$-3’
配列番号 199	3’ -$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2T_2G_2$-5’
配列番号 200	3’ -$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2T_2$-5’
配列番号 201	3’ -$A_2G_2C_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2G_2C_2T_2A_2A_2G_2C_2T_2T_2A_2T_2G_2C_2A_2$-5’
配列番号 202	3’ -$A_2C_2G_2T_2G_2A_2A_2C_2T_2T_2C_2G_2T_2A_2A_2C_2G_2T_2T_2A_2T_2C_2G_2A_2T_2T_2G_2$-5’
配列番号 203	3’ -$A_3G_3C_3T_3G_3A_3A_3C_3T_3T_3G_3C_3T_3A_3A_3G_3C_3T_3T_3A_3T_3G_3C_3A_3T_3T_3G_3$-5’
配列番号 204	3’ -$A_3G_3C_3T_3G_3A_3A_3C_3T_3T_3G_3C_3T_3A_3A_3G_3C_3T_3$-5’
配列番号 205	3’ -AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$TTATGC$_m$ATTG-5’
配列番号 206	3’ -AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$TTAT-5’
配列番号 207	3’ -AGC$_m$TGAACTTGC$_m$TAAGC$_m$T -5’
配列番号 208	3’ -AGC$_m$TGAACTTGC$_m$T -5’
配列番号 209	3’ -AGC$_m$TGA -5’
配列番号 210	3’ -AGCTGAACTTG -5’
配列番号 211	3’ -AGCTGAAC -5’
配列番号 212	3’ -AGCTGA -5
配列番号 213	5’ -$C_2TG_2CT_2T$-3’
配列番号 214	5’ -$C_2TG_2CT_2$-3’
配列番号 215	5’ -$C_3T_3G_3C_3T_3T_3$-3’
配列番号 216	5’ -$C_3T_3G_3C_3T_3$-3’
配列番号 217	5’ -$T_3C_3G_3A_3C_3T_3T_3G_3A_3A_3C_3G_3A_3T_3T_3C_3G_3A_3A_3T_3A_3C_3G_3T_3A_3A_3C_3$ -3’

C_m＝５’－メチル化Ｃ；ＧＣＡＴ－ＤＮＡホスホロチオエート結合；G_1／C_1／A_1／U_1－２’ＯＭＥホスホロチオエート架橋；A_2／T_2／C_2／G_2－ＤＮＡホスホジエステル結合；A_3／T_3／C_3／G_3－ＲＮＡホスホジエステル結合

【０１７０】

医薬組成物

ある実施形態において、本明細書には、本発明の１つ以上のＣＳＯ化合物を含む医薬組成物が記載される。ある実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容され得る希釈剤または担体を含む。ある実施形態において、医薬組成物は、滅菌生理食塩水および１つ以上のＣＳＯ化合物を含む。ある実施形態において、医薬組成物は、滅菌生理食塩水および１つ以上のＣＳＯ化合物からなる。ある実施形態において、滅菌生理食塩水は、医薬品グレードの生理食塩水である。ある実施形態において、医薬組成物は、１つ以上のＣＳＯ化合物および滅菌水を含む。ある実施形態において、医薬組成物は、１つのＣＳＯ化合物および滅菌水からなる。ある実施形態において、滅菌水は、医薬品グレードの水である。ある実施形態において、医薬組成物は、１つ以上のＣＳＯ化合物およびリン酸緩衝生理食塩

水（ＰＢＳ）を含む。ある実施形態において、医薬組成物は、１つ以上のＣＳＯ化合物および滅菌ＰＢＳからなる。ある実施形態において、滅菌ＰＢＳは、医薬品グレードのＰＢＳである。

【０１７１】

ある実施形態において、医薬組成物は、１つ以上のＣＳＯ化合物および１つ以上の賦形剤を含む。ある実施形態において、賦形剤は、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミラーゼ、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロースおよびポリビニルピロリドンから選択される。

【０１７２】

ある実施形態において、本発明のＣＳＯ化合物は、医薬組成物または製剤の調製のために薬学的に許容され得る活性物質および／または不活性物質と混合され得る。医薬組成物を製剤化するための組成物および方法は、投与経路、疾患の程度、または投与される用量を含む多くの基準に依存するが、これらに限定されない。

【０１７３】

コンジュゲート基

ある実施形態において、本発明によるＣＳＯは、必要に応じて１つ以上のコンジュゲート基をさらに含む。コンジュゲート基は、１つ以上のコンジュゲート部分と、１つ以上のコンジュゲート部分をオリゴヌクレオチドに連結するコンジュゲートリンカーとからなる。コンジュゲート基は、オリゴヌクレオチドのいずれかまたは両方の末端および／または任意の内部位置に結合していてもよい。ある実施形態において、コンジュゲート基は、修飾されたオリゴヌクレオチドのヌクレオシドの２’位に結合している。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドのいずれかまたは両方の末端に結合しているコンジュゲート基は、末端基である。特定のそのような実施形態において、コンジュゲート基または末端基は、オリゴヌクレオチドの３’および／または５’末端に結合している。特定のそのような実施形態において、コンジュゲート基は、オリゴヌクレオチドの３’－末端に結合している。ある実施形態において、コンジュゲート基は、オリゴヌクレオチドの３’－末端付近に結合している。ある実施形態において、コンジュゲート基は、オリゴヌクレオチドの５’－末端に結合している。ある実施形態において、コンジュゲート基は、オリゴヌクレオチドの５’－末端付近に結合している。

【０１７４】

本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲート基は、１～３個のＧａｌＮＡｃリガンドを含むＧａｌＮＡｃクラスターを含む。

【０１７５】

本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲートリンカーは単結合からなる。

【０１７６】

本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲートリンカーは切断可能である。

【０１７７】

本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲートリンカーは、１～３個のリンカーヌクレオシドを含む。

【０１７８】

本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲート基は、機能性ドメインの５’末端でＣＳＯに結合している。本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲート基は、機能性ドメインの３’末端でＣＳＯに結合している。本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲート基は、環化ドメインの５’末端でＣＳＯに結合している。本明細書の任意の実施形態において、コンジュゲート基は、環化ドメインの３’末端でＣＳＯに結合している。

【０１７９】

ある実施形態において、ＣＳＯは、１つ以上のコンジュゲート基に共有結合している。ある実施形態において、コンジュゲート基は、薬力学、薬物動態、安定性、結合、吸収、

組織分布、細胞分布、細胞取り込み、電荷およびクリアランスを含むがこれらに限定されないＣＳＯの１つ以上の性状を改変する。ある実施形態において、コンジュゲート基は、ＣＳＯに新しい性状、例えば、オリゴヌクレオチドの検出を可能にするフルオロフォアまたはレポーター基を付与する。あるコンジュゲート基およびコンジュゲート部分、例えば、コレステロール部分（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８９，８６，６５５３－６５５６）、コール酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１９９４，４，１０５３－１０６０）、チオエーテル、例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１９９２，６６０，３０６－３０９；Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１９９３，３，２７６５－２７７０）、チオコレステロール（Ｏｂｅｒｈａｕｓｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９９２，２０，５３３－５３８）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基（Ｓａｉｓｏｎ－Ｂｅｈｍｏａｒａｓら、ＥＭＢＯ Ｊ．，１９９１，１０，１１１１－１１１８；Ｋａｂａｎｏｖら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，１９９０，２５９，３２７－３３０；Ｓｖｉｎａｒｃｈｕｋら、Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ，１９９３，７５，４９－５４）、リン脂質、例えば、ジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールもしくはトリエチル－アンモニウム１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロール－３－Ｈ－ホスホン酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，１９９５，３６，３６５１－３６５４；Ｓｈｅａら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１９９０，１８，３７７７－３７８３）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ＆Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，１９９５，１４，９６９－９７３）、またはアダマンタン酢酸、パルミチル部分（Ｍｉｓｈｒａら、Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１９９５，１２６４，２２９－２３７）、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Ｃｒｏｏｋｅら、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，１９９６，２７７，９２３－９３７）、トコフェロール基（Ｎｉｓｈｉｎａら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，２０１５，４，ｅ２２０；およびＮｉｓｈｉｎａら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，２００８，１６，７３４－７４０）、またはＧａｌＮＡｃクラスター（例えば、国際公開第２０１４／１７９６２０号）が以前に記載されている。

【０１８０】

コンジュゲート部分には、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、ビタミン部分、ポリエチレングリコール、チオエーテル、ポリエーテル、コレステロール、チオコレステロール、コール酸部分、葉酸塩、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アダマンタン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、フルオロフォア、および色素が含まれるが、これらに限定されない。

【０１８１】

ある実施形態において、コンジュゲート部分は、活性薬物物質、例えば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、（Ｓ）－（＋）－プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、２，３，５－トリヨード安息香酸、フィンゴリモド、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツレート、セファロスポリン、サルファ薬、抗糖尿病薬、抗菌薬または抗生物質を含む。

【０１８２】

コンジュゲート部分は、コンジュゲートリンカーを介してＣＳＯに結合している。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、単一の化学結合（すなわち、コンジュゲート部分は、単結合を介してＣＳＯに直接結合している）である。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、ヒドロカルビル鎖などの鎖構造、またはエチレングリコール、ヌクレオシド、もしくはアミノ酸単位などの反復単位のオリゴマーを含む。

【０１８３】
ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル、およびヒドロキシルアミノから選択される１つ以上の基を含む。特定のそのような実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル、アミノ、オキソ、アミドおよびエーテル基から選択される基を含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル基およびアミド基から選択される基を含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、アルキル基およびエーテル基から選択される基を含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、少なくとも１つのリン部分を含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、少なくとも１つのリン酸基を含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、少なくとも１つの中性連結基を含む。

【０１８４】
ある実施形態において、上記のコンジュゲートリンカーを含むコンジュゲートリンカーは、二官能性連結部分、例えば、本明細書に提供されるオリゴヌクレオチドなどの親化合物にコンジュゲート基を結合させるのに有用であることが当該技術分野で知られているものである。一般に、二官能性連結部分は、少なくとも２つの官能基を含む。官能基の一方は、ＣＳＯ上の特定の部位に結合するように選択され、他方はコンジュゲート基に結合するように選択される。二官能性連結部分に使用される官能基の例としては、求核基と反応するための求電子剤および求電子基と反応するための求核剤が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態において、二官能性連結部分は、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、アルキル、アルケニル、およびアルキニルから選択される１つ以上の基を含む。

【０１８５】
コンジュゲートリンカーの例としては、ピロリジン、８－アミノ－３，６－ジオキサオクタン酸（ＡＤＯ）、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）および６－アミノヘキサン酸（ＡＨＥＸまたはＡＨＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。他のコンジュゲートリンカーには、置換もしくは非置換C_1～C_{10}アルキル、置換もしくは非置換C_2～C_{10}アルケニルまたは置換もしくは非置換C_2～C_{10}アルキニルが含まれるが、これらに限定されず、好ましい置換基の非限定的なリストには、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８６】
ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、１～１０個のリンカー－ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、２～５個のリンカー－ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、正確に３個のリンカー－ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、ＴＣＡモチーフを含む。ある実施形態において、そのようなリンカー－ヌクレオシドは、修飾されたヌクレオシドである。ある実施形態において、そのようなリンカー－ヌクレオシドは、修飾された糖部分を含む。ある実施形態において、リンカー－ヌクレオシドは、修飾されていない。ある実施形態において、リンカー－ヌクレオシドは、プリン、置換プリン、ピリミジンまたは置換ピリミジンから選択される必要に応じて保護された複素環塩基を含む。ある実施形態において、切断可能な部分は、ウラシル、チミン、シトシン、４－Ｎ－ベンゾイルシトシン、５－メチルシトシン、４－Ｎ－ベンゾイル－５－メチルシトシン、アデニン、６－Ｎ－ベンゾイルアデニン、グアニンおよび２－Ｎ－イソブチリルグアニンから選択されるヌクレオシドである。リンカー－ヌクレオシドは、通常、それが標的組織に到達した後にオリゴマー化合物から切断されることが望ましい。したがって、リンカー－ヌクレオシドは、通常、切断可能な結合を介して互いにおよびオリゴマー化合物の残りの部分に連結される。ある実施形態において、そのような切断可能な結合は、ホスホジエステル結合である。

【０１８７】
本明細書で使用される場合、リンカー－ヌクレオシドは、一般にＣＳＯの一部、または特に環化ドメインもしくは機能性ドメインの一部とはみなされない。したがって、リンカー－ヌクレオシドのヌクレオチドは、ＣＳＯまたはそのドメインの長さに対してカウントされず、参照核酸に対するオリゴヌクレオチドの相補性パーセントの決定に使用されない。別段示されない限り、コンジュゲートリンカーは、１０個以下のリンカー－ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、５個以下のリンカー－ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、３個以下のリンカー－ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、２個以下のリンカー－ヌクレオシドを含む。ある実施形態において、コンジュゲートリンカーは、１個以下のリンカー－ヌクレオシドを含む。

【０１８８】
ある実施形態において、コンジュゲート基がＣＳＯから切断されることが望ましい。例えば、ある状況では、特定のコンジュゲート部分を含むＣＳＯは、特定の細胞型によってより良好に取り込まれるが、ＣＳＯが取り込まれると、コンジュゲート基が切断されて非コンジュゲートまたは親ＣＳＯを放出することが望ましい。したがって、あるコンジュゲートリンカーは、１つ以上の切断可能な部分を含み得る。ある実施形態において、切断可能な部分は、切断可能な結合である。ある実施形態において、切断可能な部分は、少なくとも１つの切断可能な結合を含む原子団である。ある実施形態において、切断可能な部分は、１個、２個、３個、４個または４個を超える切断可能な結合を有する原子団を含む。ある実施形態において、切断可能な部分は、リソソームなどの細胞または細胞内区画の内部で選択的に切断される。ある実施形態において、切断可能な部分は、ヌクレアーゼなどの内因性酵素によって選択的に切断される。

【０１８９】
ある実施形態において、切断可能な結合は、アミド、エステル、エーテル、ホスホジエステルの一方または両方のエステル、リン酸エステル、カルバメート、またはジスルフィドの中から選択される。ある実施形態において、切断可能な結合は、ホスホジエステルのエステルの一方または両方である。ある実施形態において、切断可能な部分は、リン酸またはホスホジエステルを含む。ある実施形態において、切断可能な部分は、オリゴヌクレオチドとコンジュゲート部分またはコンジュゲート基との間のリン酸架橋である。

【０１９０】
使用
環状構造化オリゴヌクレオチドは、様々な作用機序に有用であり得る。これらには、ｍＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡおよびスプライシングのためのアンチセンスが含まれる。また、二本鎖環状構造を使用してｓｉＲＮＡ構築物を送達することができる。さらに、環状構造は、ＡＤＡＲおよびＣＲＩＳＰＲ系の機構のためのアンチセンスを送達するための新規なアプローチを提供し得る。さらに、環状構造は、アンチセンスを送達してＲＮＡの構造を破壊して翻訳を増加させるための新規なアプローチを提供することができる。環状構造はまた、核酸に定義された構造を提供し、それによってＰＲＲとの様々な程度の相互作用および誘導された免疫カスケードを可能にする。

【０１９１】
例えば、機能性ドメインがアンチセンスオリゴヌクレオチドである場合、本発明によるＣＳＯは、遺伝子発現の阻害が望まれる治療アプローチにおいても有用である。これには、例えば、内因性遺伝子（例えば、癌遺伝子）または外因性遺伝子（例えば、病原体の成長および／または代謝に不可欠な遺伝子）の阻害が含まれ得る。

【０１９２】
実施形態において、本発明は、遺伝子発現を阻害する方法であって、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【０１９３】

実施形態において、本発明は、対立遺伝子特異的遺伝子発現を阻害する方法であって、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【０１９４】

本発明による方法は、疾患または障害を有する対象を処置するために有用であり、遺伝子の発現を阻害することが有益であろう。実施形態において、疾患または障害は、細胞遺伝子の異常な発現または産物に起因する。

【０１９５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物が局所投与される。

【０１９６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物が全身投与される。

【０１９７】

実施形態において、ＲＮＡプロセシングを調節する方法であって、本明細書に記載されるＣＳＯ化合物を投与することを含み、機能性ドメインが、標的ＲＮＡの等長部分に相補的な少なくとも１２個の隣り合う核酸塩基を有する１４～３０個の連結されたヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、各々独立して２～５個の連続するデオキシリボヌクレオチドを含む１～３個の領域を含み、残りのヌクレオチドが、２’－置換、非イオン性もしくは拘束された糖ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせである、方法。実施形態において、ＲＮＡのプロセシングは、スプライシングを含む。

【０１９８】

実施形態において、本発明は、少なくとも２つのｍＲＮＡ転写物を含む遺伝子内の第１のｍＲＮＡ転写物を選択する方法であって、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【０１９９】

実施形態において、本発明は、対象の疾患または障害を処置する方法であって、ＲＮＡプロセシングを調節することが対象を処置するのに有益であり、本方法は、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【０２００】

実施形態において、本発明は、標的ＲＮＡのナンセンス変異依存ｍＲＮＡ分解機構を誘導する方法であって、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【０２０１】

実施形態において、本発明は、タンパク質または機能性ｍＲＮＡをコードするｍＲＮＡのレベルを増加させ、タンパク質または機能性ｍＲＮＡの発現を増加させる方法であって、本明細書に記載される環状構造化オリゴヌクレオチドまたは環状構造化オリゴヌクレオチドを含む組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【０２０２】

本発明の環状構造化オリゴヌクレオチドは、単独でまたは任意の他の薬剤もしくは治療薬と組み合わせて投与することができる。薬剤または治療薬は、同時投与または連続して投与することができる。そのような薬剤または治療薬は、疾患または症状を処置または予防するために有用であり得、本発明による環状オリゴヌクレオチドの遺伝子発現調節効果を低下させない。疾患または症状を処置または予防するのに有用な薬剤には、小分子、ペプチド、ワクチン、抗原、抗体、好ましくはモノクローナル抗体、細胞傷害剤、キナーゼ阻害剤、アレルゲン、抗生物質、ｓｉＲＮＡ分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＴＬＲアンタゴニスト（例えば、ＴＬＲ３および／またはＴＬＲ７のアンタゴニストおよび

／またはＴＬＲ８のアンタゴニストおよび／またはＴＬＲ９のアンタゴニスト）、化学療法剤（従来の化学療法および最新の標的療法の両方）、標的化治療剤、活性化細胞、ペプチド、タンパク質、遺伝子治療ベクター、ペプチドワクチン、タンパク質ワクチン、ＤＮＡワクチン、アジュバント、および共刺激分子（例えば、サイトカイン、ケモカイン、タンパク質リガンド、トランス活性化因子、修飾されたアミノ酸を含むペプチドもしくはペプチド）、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。代替的に、本発明による環状オリゴヌクレオチドを他の化合物（例えば、脂質またはリポソーム）と組み合わせて投与して、本発明による環状オリゴヌクレオチドの遺伝子発現調節の特異性または規模を高めることができる。

【０２０３】

本発明の環状オリゴヌクレオチドは、非経口、粘膜送達、経口、舌下、経皮、局所、吸入、腫瘍内、静脈内、皮下、髄腔内、鼻腔内、エアロゾル、眼内、気管内、直腸内、膣内、遺伝子銃、皮膚パッチまたは点眼剤もしくは洗口剤の形態を含むがこれらに限定されない任意の適切な経路によって投与され得る。本発明による方法のいずれにおいても、本発明による環状オリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、膀胱、肝臓、肺または腎臓を含むがこれらに限定されない組織または器官に直接投与することができる。ある実施形態において、本発明による環状オリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、筋肉内投与によるものである。ある実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、粘膜投与によるものである。ある実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、経口投与によるものである。ある実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、直腸内投与によるものである。ある実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、髄腔内投与によるものである。ある実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、腫瘍内投与によるものである。ある実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、非経口投与によるものである。ある実施形態において、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを単独でまたは任意の他の薬剤と組み合わせて投与することは、皮下投与によるものである。

【０２０４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される任意の環状構造化オリゴヌクレオチドを、ＣＳＯの部位特異的送達を提供する部分とコンジュゲートさせることができる。実施形態において、そのようなコンジュゲートは、抗体、ペプチド、脂質、または小分子を含むが、これらに限定されない。

【０２０５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される任意の環状構造化オリゴヌクレオチドを、ＣＳＯの部位特異的送達を提供する部分でカプセル化することができる。実施形態において、ＣＳＯは、例えば、脂質、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）、またはペプチド大環状構造にカプセル化することができる。

【０２０６】

非経口、皮内、または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含むことができる：滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコール、メチルパラベン；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩および等張性を調整するための薬剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース。ｐＨは、酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムで調整することがで

きる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは多回投与バイアルに封入することができる。本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与は、疾患の症候または代用マーカーを減少させるのに有効な有効量および期間を使用して既知の手順を使用して実行することができる。例えば、疾患および／または障害を処置するための有効量の本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、症候を緩和もしくは軽減するため、または腫瘍、癌、または細菌、ウイルスもしくは真菌感染を遅延もしくは改善するために必要な量であり得る。遺伝子発現を調節する組成物を投与する文脈において、有効量の本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの非存在下での遺伝子発現と比較して所望の調節を達成するのに十分な量である。任意の特定の適用のための有効量は、処置される疾患もしくは症状、投与される特定のオリゴヌクレオチド、対象のサイズ、または疾患もしくは症状の重症度などの因子に応じて変化し得る。当業者は、過度の実験を必要とすることなく、有効量の特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドを経験的に決定することができる。

合成

【０２０７】

本明細書に記載されるＣＳＯは、Ｈ－ホスホネート化学、ホスホラミダイト化学、またはＨ－ホスホネート化学とホスホラミダイト化学との組み合わせ（すなわち、いくつかのサイクルではＨ－ホスホネート化学、他のサイクルではホスホラミダイト化学）を含むがこれらに限定されない任意の適切な当該技術分野で認識されている方法によって調製することができ、これは手動でまたは自動合成機によって実行することができる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた、それらの標的にハイブリダイズする能力を損なうことなく、多くの方法で修飾され得る（例えば、Ａｇｒａｗａｌ ａｎｄ Ｇａｉｔ，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，（２０１９）ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３９／９７８１７８８０１５７１４を参照されたい）。

【０２０８】

定義

具体的な定義が提供されない限り、本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医薬化学および製薬化学に関連して使用される命名法、ならびにその手順および技術は、当該技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。許可される場合、本開示全体を通して言及されるすべての特許、出願、公開出願および他の刊行物ならびに他のデータは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２０９】

別段示されない限り、以下の用語は以下の意味を有する：

本明細書で使用される場合、「２’－デオキシヌクレオシド」は、天然に存在するデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）に見られる２’－Ｈ（Ｈ）フラノシル糖部分を含むヌクレオシドを意味する。ある実施形態において、２’－デオキシヌクレオシドは、修飾された核酸塩基を含んでもよく、またはＲＮＡ核酸塩基（ウラシル）を含んでもよい。

【０２１０】

本明細書で使用される場合、「２’－置換ヌクレオシド」とは、２’－置換糖部分を含むヌクレオシドを意味する。本明細書で使用される場合、糖部分に関して「２’－置換」とは、ＨまたはＯＨ以外の少なくとも１つの２’－置換基を含む糖部分を意味する。

【０２１１】

本明細書において、「５－メチルシトシン」とは、５位にメチル基が結合した修飾されたシトシンを意味する。５－メチルシトシンは、修飾された核酸塩基である。

【０２１２】

本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈上他に明確に指示されない限り、単数および複数の指示対象の両方を含む。

【０２１３】

本明細書で使用される場合、「投与」とは、動物に医薬品を提供することを意味する。

【０２１４】
本明細書で使用される場合、「動物」とは、ヒトまたは非ヒト動物を意味する。
【０２１５】
本明細書で使用される場合、「～を必要とする個体」とは、そのような処置または治療を必要とする処置または治療のために選択されたヒトまたは非ヒト動物を指す。
【０２１６】
本明細書で使用される場合、「アンチセンス活性」とは、アンチセンス化合物のその標的核酸へのハイブリダイゼーションに起因し得る任意の検出可能および／または測定可能な変化を意味する。ある実施形態において、アンチセンス活性は、標的核酸またはそのような標的核酸によってコードされるタンパク質の量または発現が、アンチセンス化合物の非存在下での標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルと比較して減少する。ある実施形態において、アンチセンス活性は、標的核酸またはそのような標的核酸によってコードされるタンパク質の量または発現が、アンチセンス化合物の非存在下での標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルと比較して増加する。
【０２１７】
本明細書で使用される場合、「アンチセンス化合物」とは、少なくとも１つのアンチセンス活性を達成することができるオリゴマー化合物を意味する。
【０２１８】
本明細書で使用される場合、処置に関して「改善する」とは、処置の非存在下での同じ症候に対する少なくとも１つの症候の改善を意味する。ある実施形態において、改善は、症候の重症度もしくは頻度の減少、または症候の重症度もしくは頻度の発症の遅延もしくは進行の緩慢化である。ある実施形態において、症候または特徴は、運動失調、神経障害、および凝集体形成である。ある実施形態において、これらの症候の改善は、運動機能の改善、神経障害の減少、または凝集体の数の減少をもたらす。
【０２１９】
本明細書で使用される場合、「二環式ヌクレオシド」または「ＢＮＡ」とは、二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。本明細書で使用される場合、「二環式糖」または「二環式糖部分」とは、２つの環を含む修飾された糖部分を意味し、第２の環は、第１の環の原子の２つを接続する架橋を介して形成され、それによって二環式構造を形成する。ある実施形態において、二環式糖部分の第１の環は、フラノシル部分である。ある実施形態において、二環式糖部分は、フラノシル部分を含まない。
【０２２０】
本明細書で使用される場合、「キラル濃縮集団」とは、同一の分子式の複数の分子を意味し、特定のキラル中心が立体的に無作為である場合、特定のキラル中心に特定の立体化学配置を含む集団内の分子の数または割合は、集団内の同じ特定のキラル中心に同じ特定の立体化学配置を含むと予想される分子の数または割合よりも大きい。各分子内に複数のキラル中心を有する分子のキラル濃縮集団は、１つ以上の立体的に無作為なキラル中心を含み得る。ある実施形態において、分子は、修飾されたオリゴヌクレオチドである。ある実施形態において、分子は、修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物である。
【０２２１】
本明細書で使用される場合、「切断可能な部分」は、生理学的条件下、例えば、細胞、動物、またはヒトの内部で切断される結合または原子団を意味する。
【０２２２】
本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドに関して「相補的」とは、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列と他の核酸の核酸塩基配列とが反対の方向に整列している場合、オリゴヌクレオチドの核酸塩基またはその１つ以上の領域の少なくとも７０％と、別の核酸の核酸塩基またはその１つ以上の領域とが互いに水素結合することができることを意味する。相補的な核酸塩基とは、互いに水素結合を形成することができる核酸塩基を指す。
【０２２３】
相補的な核酸塩基対には、アデニン（Ａ）およびチミン（Ｔ）、アデニン（Ａ）および

ウラシル（Ｕ）、シトシン（Ｃ）およびグアニン（Ｇ）、５－メチルシトシン（ｍＣ）およびグアニン（Ｇ）が含まれる。相補的なオリゴヌクレオチドおよび／または核酸は、各ヌクレオシドにおいて核酸塩基相補性を有する必要はない。むしろ、いくつかのミスマッチは許容される。本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドに関して「完全に相補的」または「１００％相補的」とは、オリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドで別のオリゴヌクレオチドまたは核酸に相補的であることを意味する。

【０２２４】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲート基」とは、オリゴヌクレオチドに直接または間接的に結合している原子団を意味する。コンジュゲート基は、コンジュゲート部分と、コンジュゲート部分をオリゴヌクレオチドに結合させるコンジュゲートリンカーとを含む。

【０２２５】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲートリンカー」とは、コンジュゲート部分をオリゴヌクレオチドに接続する少なくとも１つの結合を含む原子団を意味する。

【０２２６】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲート部分」とは、コンジュゲートリンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合している原子団を意味する。

【０２２７】

本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドの文脈における「隣り合う」とは、互いに直接隣接するヌクレオシド、核酸塩基、糖部分、またはヌクレオシド間結合を指す。例えば、「隣り合う核酸塩基」とは、配列において互いに直接隣接する核酸塩基を意味する。

【０２２８】

本明細書で使用される場合、「リンカーヌクレオシド」とは、本発明のＣＳＯをコンジュゲート部分に直接的または間接的に連結するヌクレオシドを意味する。リンカー－ヌクレオシドは、コンジュゲートリンカー内に位置し、ＣＳＯと隣り合っていてもＣＳＯ化合物の一部とはみなされない。

【０２２９】

本明細書で使用される場合、「ギャップマー」は、１つ以上のヌクレオシドを有する外部領域の間に位置するＲＮアーゼＨ切断を支持する複数のヌクレオシドを有する内部領域を含む修飾されたオリゴヌクレオチドを意味し、内部領域を含むヌクレオシドは、外部領域を含むヌクレオシド（複数可）と化学的に異なる。内部領域を「ギャップ」と呼び、外部領域を「ウィング」と呼ぶことがある。別段示されない限り、「ギャップマー」とは、糖モチーフを指す。別段示されない限り、ギャップマーのギャップのヌクレオシドの糖部分は、修飾されていない２’－デオキシフラノシルである。したがって、「ＭＯＥギャップマー」という用語は、両ウィングに２’－ＭＯＥヌクレオシドの糖モチーフおよび２’－デオキシヌクレオシドのギャップを有するギャップマーを示す。別段示されない限り、ＭＯＥギャップマーは、１つ以上の修飾されたヌクレオシド間結合および／または修飾された核酸塩基を含み得、そのような修飾は、糖修飾のギャップマーパターンに必ずしも従わない。

【０２３０】

本明細書で使用される場合、「ホットスポット領域」は、本明細書の以下の実施例で実証されるように、標的核酸の量または活性を減少させるためのオリゴマー化合物に適した標的核酸上の核酸塩基の範囲である。

【０２３１】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイゼーション」は、相補的オリゴヌクレオチドおよび／または核酸の対合またはアニーリングを意味する。特定のメカニズムに限定されないが、ハイブリダイゼーションの最も一般的なメカニズムは、水素結合を伴い、これは相補的な核酸塩基間のワトソン－クリック、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン水素結合であってもよい。

【０２３２】
本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド間結合」という用語は、オリゴヌクレオチド中の隣接するヌクレオシド間の共有結合である。本明細書で使用される場合、「修飾されたヌクレオシド間結合」とは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合以外の任意のヌクレオシド間結合を意味する。「ホスホロチオエート架橋」は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合の非架橋酸素原子の１つが硫黄原子で置き換えられた修飾されたヌクレオシド間結合である。
【０２３３】
本明細書で使用される場合、「発現または活性の阻害」という語句は、未処置または対照サンプル中の活性の発現と比較して発現または活性の減少または遮断を指し、必ずしも発現または活性の完全な排除を示すものではない。
【０２３４】
本明細書で使用される場合、「リンカーヌクレオシド」とは、オリゴヌクレオチドをコンジュゲート部分に直接または間接的に連結するヌクレオシドを意味する。リンカー－ヌクレオシドは、オリゴマー化合物のコンジュゲートリンカー内に位置する。リンカー－ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドと隣り合っていても、オリゴマー化合物のオリゴヌクレオチド部分の一部とはみなされない。
【０２３５】
本明細書で使用される場合、「非二環式の修飾された糖部分」とは、第２の環を形成するために糖の２つの原子間に架橋を形成しない、修飾、例えば置換基を含む修飾された糖部分を意味する。
【０２３６】
本明細書で使用される場合、「ミスマッチ」または「非相補的」とは、第１および第２のオリゴマー化合物が整列している場合、第２のオリゴヌクレオチドまたは標的核酸の対応する核酸塩基と相補的ではない第１のオリゴヌクレオチドの核酸塩基を意味する。
【０２３７】
本明細書で使用される場合、「ＭＯＥ」は、メトキシエチルを意味する。「２’－ＭＯＥ」とは、リボシル糖部分の２’ＯＨ基の代わりに２’－$OCH_2CH_2OCH_3$基を意味する。
【０２３８】
本明細書で使用される場合、「モチーフ」とは、オリゴヌクレオチド中の修飾されていない糖部分および／または修飾された糖部分、核酸塩基、および／またはヌクレオシド間結合のパターンを意味する。
【０２３９】
本明細書で使用される場合、「ｍＲＮＡ」とは、特に明記しない限り、タンパク質をコードし、ｐｒｅ－ｍＲＮＡおよび成熟ｍＲＮＡを含むＲＮＡ転写物を意味する。
【０２４０】
本明細書で使用される場合、「核酸塩基」とは、修飾されていない核酸塩基または修飾された核酸塩基を意味する。本明細書で使用される場合、「修飾されていない核酸塩基」は、アデニン（Ａ）、チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）、ウラシル（Ｕ）、およびグアニン（Ｇ）である。本明細書で使用される場合、「修飾された核酸塩基」は、少なくとも１つの修飾されていない核酸塩基と対合することができる、修飾されていないＡ、Ｔ、Ｃ、Ｕ、またはＧ以外の原子団である。「５－メチルシトシン」は、修飾された核酸塩基の一例である。ユニバーサル塩基は、５つの修飾されていない核酸塩基のいずれか１つと対合することができる修飾された核酸塩基である。複素環塩基部分とも呼ばれる修飾された塩基には、他の核酸塩基、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、５－プロピニルウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン

塩基の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ（５－ブロモ、５－トリフルオロメチルおよび他の５－置換ウラシルおよびシトシンを含む）、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノアデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニン、３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニンが含まれる。

【０２４１】

ある実施形態において、修飾された核酸塩基は、本明細書で定義されるユニバーサル塩基、疎水性塩基、広域塩基（ｐｒｏｍｉｓｃｕｏｕｓ　ｂａｓｅｓ）、サイズ拡大塩基、およびフッ素化塩基から選択される。５置換ピリミジン、６－アザピリミジンならびにＮ－２、Ｎ－６およびＯ－６置換プリン（２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルを含む）；５－プロピニルシトシン；５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、ピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチルおよび他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニン、３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニン。更なる修飾された核酸塩基には、三環式ピリミジン、例えばフェノキサジンシチジン（［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、Ｇ－クランプ、例えば置換フェノキサジンシチジン（例えば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド［３’，２’：４，５］ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－２－オン）が含まれる。修飾された核酸塩基には、プリン塩基またはピリミジン塩基が他の複素環、例えば、７－デアザ－アデニン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジンおよび２－ピリドンで置き換えられたものも含まれ得る。ある実施形態において、修飾された核酸塩基は、５－メチルシトシンである。

【０２４２】

代表的な修飾された糖には、炭素環式または非環式糖、それらの２’、３’または４’位の１つ以上に置換基を有する糖、および糖の１つ以上の水素原子の代わりに置換基を有する糖が含まれる。ある実施形態において、糖は、２’位に置換基を有することによって修飾される。更なる実施形態において、糖は、３’位に置換基を有することによって修飾される。他の実施形態において、糖は、４’位に置換基を有することによって修飾される。糖は、それらの位置の２つ以上に修飾を有していてもよく、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、１つの位置に糖修飾を有する１つ以上のヌクレオチドを有していてもよく、異なる位置に糖修飾を有する１つ以上のヌクレオチドを有していてもよいことも企図される。

【０２４３】

オリゴヌクレオチドにおいて企図される糖修飾には、ＯＨ；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－またはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－またはＮ－アルケニル；Ｏ－、ＳまたはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキルから選択される糖置換基が挙げられるがこれらに限定されず、このアルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換もしくは非置換のC_1～C_{10}アルキルまたはC_2～C_{10}アルケニルおよびアルキニルであり得る。いくつかの実施形態に

おいて、これらの基は、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_x$ＯＣＨ$_3$、Ｏ（（ＣＨ$_2$）$_x$Ｏ）$_y$ＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_x$ＮＨ$_2$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_x$ＣＨ$_3$、Ｏ（ＣＨ$_2$）$_x$ＯＮＨ$_2$、およびＯ（ＣＨ$_2$）$_x$ＯＮ（（ＣＨ$_2$）$_x$ＣＨ$_3$）$_2$［式中、ｘおよびｙは、独立して１～１０である］から選択されてもよい。

【０２４４】

いくつかの実施形態において、修飾された糖は、以下：Ｃ$_1$～Ｃ$_{10}$低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、Ｏ－アルカリールまたはＯ－アラルキル、ＳＨ、ＳＣＨ$_3$、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、ＯＣＮ、ＣＦ$_3$、ＯＣＦ$_3$、ＳＯＣＨ$_3$、ＳＯ$_2$ＣＨ$_3$、ＯＮＯ$_2$、ＮＯ$_2$、Ｎ$_3$、ＮＨ$_2$、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、アンチセンスオリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための基、および同様の特性を有する他の置換基から選択される置換基を含む。一実施形態において、修飾は、２’－メトキシエトキシ（２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）または２’－ＭＯＥとしても知られている２’－Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_3$）（Ｍａｒｔｉｎら、１９９５）、すなわち、アルコキシアルコキシ基を含む。別の修飾には、２’－ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、２’－ＤＭＡＯＥとしても知られているＯ（ＣＨ$_2$）$_2$ＯＮ（ＣＨ$_3$）$_2$基および２’－ジメチルアミノエトキシエトキシ（２’－Ｏ－ジメチル－アミノ－エトキシ－エチルもしくは２’－ＤＭＡＥＯＥとしても知られている）、すなわち、２’－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｏ－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）$_2$が含まれる。

【０２４５】

追加の糖置換基には、アリル（－ＣＨ$_2$－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、－Ｏ－アリルＣＨ$_2$－ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、メトキシ（－Ｏ－ＣＨ$_3$）、アミノプロポキシ（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$）、およびフルオロ（Ｆ）が含まれる。２’位（２’－）の糖置換基は、アラビノ（上）位またはリボ（下）位にあり得る。１つの２’－アラビノ修飾は２’－Ｆである。オリゴマー化合物上の他の位置、特に３’末端ヌクレオシド上または２’－５’連結オリゴヌクレオチド中の糖の３’位および５’末端ヌクレオチドの５’位で他の同様の修飾を行うこともできる。オリゴマー化合物はまた、ペントフラノシル糖の代わりに、糖模倣物、例えばシクロブチル部分を有し得る。修飾された糖構造の調製を開示する米国特許の例としては、米国特許第４，９８１，９５７号明細書；同第５，１１８，８００号明細書；同第５，３１９，０８０号明細書；同第５，３５９，０４４号明細書；同第５，３９３，８７８号明細書；同第５，４４６，１３７号明細書；同第５，４６６，７８６号明細書；同第５，５１４，７８５号明細書；同第５，５１９，１３４号明細書；同第５，５６７，８１１号明細書；同第５，５７６，４２７号明細書；同第５，５９１，７２２号明細書；同第５，５９７，９０９号明細書；同第５，６１０，３００号明細書；同第５，６２７，０５３号明細書；同第５，６３９，８７３号明細書；同第５，６４６，２６５号明細書；同第５，６５８，８７３号明細書；同第５，６７０，６３３号明細書；同第５，７９２，７４７号明細書；および同第５，７００，９２０号明細書が挙げられるが、これらに限定されず、それらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２４６】

代表的な糖置換基には、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００５／０２６１２１８号明細書に記載されている基が含まれる。特定の実施形態において、糖修飾は、６’位の炭素に結合したカルボキシ基上の２’－Ｏ－Ｍｅ修飾、２’Ｆ修飾、２’Ｈ修飾、２’アミノ修飾、４’チオリボース修飾もしくはホスホロチオエート修飾、またはそれらの組み合わせである。

【０２４７】

ある実施形態において、２’－置換非二環式の修飾されたヌクレオシドは、Ｆ、ＯＣＨ$_3$、およびＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＯＣＨ$_3$から選択される非架橋２’－置換基を含む糖部分を含む。

【０２４８】

ある修飾された糖部分は、フラノシル環の２つの原子を架橋して第２の環を形成し、二環式糖部分をもたらす置換基を含む。そのようなある実施形態において、二環式糖部分は、４’と２’フラノース環原子との間に架橋を含む。そのような４’→２’への架橋糖置換基の例としては、４’－CH_2－２’、４’－（CH_2）$_2$－２’、４’－（CH_2）$_3$－２’、４’－CH_2－Ｏ－２’（「ＬＮＡ」）、４’－CH_2－Ｓ－２’、４’－（CH_2）$_2$－Ｏ－２’（「ＥＮＡ」）、４’－ＣＨ（CH_3）－Ｏ－２’（「拘束エチル」または「ｃＥｔ」と呼ばれる）、４’－CH_2－Ｏ－CH_2－２’、４’－CH_2－Ｎ（Ｒ）－２’、４’－ＣＨ（CH_2OCH_3）－Ｏ－２（「拘束ＭＯＥ」または「ｃＭＯＥ」）およびその類似体（例えば、Ｓｅｔｈら、米国特許第７，３９９，８４５号明細書、Ｂｈａｔら、米国特許第７，５６９，６８６号明細書、Ｓｗａｙｚｅら、米国特許第７，７４１，４５７号明細書、およびＳｗａｙｚｅら、米国特許第８，０２２，１９３号明細書を参照されたい）、４’－Ｃ（CH_3）（CH_3）－Ｏ－２’およびその類似体（例えば、Ｓｅｔｈら、米国特許第８，２７８，２８３号明細書を参照されたい）、４’－CH_2－Ｎ（ＯCH_3）－２’およびその類似体（例えば、Ｐｒａｋａｓｈら、米国特許第８，２７８，４２５号明細書を参照されたい）、４’－CH_2－Ｏ－Ｎ（CH_3）－２’（例えば、Ａｌｌｅｒｓｏｎら、米国特許第７，６９６，３４５号明細書およびＡｌｌｅｒｓｏｎら、米国特許第８，１２４，７４５号明細書を参照されたい）、４’－CH_2－Ｃ（Ｈ）（CH_3）－２’（例えば、Ｚｈｏｕら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，２００９，７４，１１８－１３４）、４’－CH_2－Ｃ（＝CH_2）－２’およびその類似体（例えば、Ｓｅｔｈら、米国特許第８，２７８，４２６号明細書を参照されたい）、４’－Ｃ（R_aR_b）－Ｎ（Ｒ）－Ｏ－２’、４－Ｃ（R_aR_b）－Ｏ－Ｎ（Ｒ）－２’、４’－CH_2－Ｏ－Ｎ（Ｒ）－２’、および４’－CH_2－Ｎ（Ｒ）－Ｏ－２’［式中、各Ｒ、R_aおよびR_bは、独立して、Ｈ、保護基、またはC_1～C_{12}アルキル（例えば、Ｉｍａｎｉｓｈｉら、米国特許第７，４２７，６７２号明細書を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４９】

ある実施形態において、そのような４’－２’架橋は、独立して、－［Ｃ（R_a）（R_b）］$_n$－、－［Ｃ（R_a）（R_b）］$_n$－Ｏ－、－Ｃ（R_a）＝Ｃ（R_b）－、－Ｃ（R_a）＝Ｎ－、－Ｃ（＝ＮR_a）－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｓ）－、－Ｏ－、－Ｓｉ（R_a）$_2$－、－Ｓ（＝Ｏ）$_x$－、および－Ｎ（R_a）－から独立して選択される１～４個の連結した基を含み、

式中、

ｘは、０、１、または２であり、

ｎは、１、２、３、または４であり、

各R_aおよびR_bは、独立して、Ｈ、保護基、ヒドロキシル、C_1～C_{12}アルキル、置換C_1～C_{12}アルキル、C_2～C_{12}アルケニル、置換C_2～C_{12}アルケニル、C_2～C_{12}アルキニル、置換C_2～C_{12}アルキニル、C_5～C_{20}アリール、置換C_5～C_{20}アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C_5～C_7脂環式ラジカル、置換C_5～C_7脂環式ラジカル、ハロゲン、OJ_1、NJ_1J_2、SJ_1、Ｎ３、$COOJ_1$、アシル（Ｃ（＝Ｏ）－Ｈ）、置換アシル、ＣＮ、スルホニル（Ｓ（＝Ｏ）$_2$－J_1）、またはスルホキシル（Ｓ（＝Ｏ）－J_1）であり、各J_1およびJ_2は、独立して、Ｈ、C_1～C_{12}アルキル、置換C_1～C_{12}アルキル、C_2～C_{12}アルケニル、置換C_2～C_{12}アルケニル、C_2～C_{12}アルキニル、置換C_2～C_{12}アルキニル、C_5～C_{20}アリール、置換C_5～C_{20}アリール、アシル（Ｃ（＝Ｏ）－Ｈ）、置換アシル、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、C_1～C_{12}アミノアルキル、置換C_1～C_{12}アミノアルキル、または保護基である。

【０２５０】

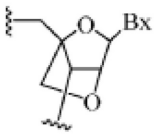
更なる二環式糖部分は当該技術分野で知られており、例えば、Ｆｒｅｉｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９７，２５（２２），４４２９～４４４３，Ａｌｂａｅｋら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，２００６，７１，７７３１－７７４０、Ｓｉｎｇｈら、Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１９９８，４，４５５－４５６；Ｋｏｓｈｋ

ｉｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，１９９８，５４，３６０７－３６３０；Ｋｕｍａｒら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１９９８，８，２２１９－２２２２；Ｓｉｎｇｈら、Ｊ Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，１９９８，６３，１００３５－１００３９；Ｓｒｉｖａｓｔａｖａら、Ｊ Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ，２００１７，１２９，８３６２－８３７９；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第７，０５３，２０７号明細書；Ｉｍａｎｉｓｈｉら、米国特許第６，２６８，４９０号明細書；Ｉｍａｎｉｓｈｉら、米国特許第６，７７０，７４８号明細書；Ｉｍａｎｉｓｈｉら、Ｕ．Ｓ．ＲＥ ４４、７７９；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第６，７９４，４９９号明細書；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第６，６７０，４６１号明細書；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第７，０３４，１３３号明細書；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第８，０８０，６４４号明細書；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第８，０３４，９０９号明細書；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第８号、同第１５３，３６５号明細書；Ｗｅｎｇｅｌら、米国特許第７，５７２，５８２号明細書；およびＲａｍａｓａｍｙら、米国特許第６，５２５，１９１号明細書；Ｔｏｒｓｔｅｎら、国際公開第２００４／１０６３５６号；Ｗｅｎｇｅｌら、国際公開第１９９９／０１４２２６号；Ｓｅｔｈら、国際公開第２００７／１３４１８１号；Ｓｅｔｈら、米国特許第７，５４７，６８４号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第７，６６６，８５４号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第８，０８８，７４６号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第７，７５０号、同第１３１号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第８，０３０，４６７号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第８，２６８，９８０号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第８，５４６，５５６号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第８，５３０，６４０号明細書；Ｍｉｇａｗａら、米国特許第９，０１２，４２１号明細書；Ｓｅｔｈら、米国特許第８，５０１，８０５号明細書；および米国特許出願公開第Ａｌｌｅｒｓｏｎら、米国特許出願公開第２００８／００３９６１８号およびＭｉｇａｗａら、米国特許出願公開第２０１５／０１９１７２７号明細書を参照されたい。

【０２５１】

ある実施形態において、二環式糖部分およびそのような二環式糖部分を組み込むヌクレオシドは、異性体構成によってさらに定義される。例えば、ＬＮＡヌクレオシド（本明細書に記載される）は、α－Ｌ配置またはβ－Ｄ配置であり得る。

【化１】



ＬＮＡ（β－Ｄ－配置）
架橋＝４’－ＣＨ２－Ｏ－２’



α－Ｌ－ＬＮＡ（α－Ｌ－配置）
架橋＝４’－ＣＨ２－Ｏ－２’

【０２５２】

α－Ｌ－メチレンオキシ（４’－ＣＨ２－０－２’）またはα－Ｌ－ＬＮＡ二環式ヌクレオシドは、アンチセンス活性を示したオリゴヌクレオチドに組み込まれている（フリーデンら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００３，２１，６３６５－６３７２）。本明細書において、二環式ヌクレオシドの一般的な説明は、両方の異性体構成を含む。特定の二環式ヌクレオシド（例えば、ＬＮＡまたはｃＥｔ）の位置が本明細書の例示される実施形態で特定される場合、特に明記しない限り、それらはβ－Ｄ配置である。

【０２５３】

ある実施形態において、修飾された糖部分は、１つ以上の非架橋糖置換基および１つ以上の架橋糖置換基（例えば、５’－置換および４’－２’架橋糖）を含む。

【０２５４】

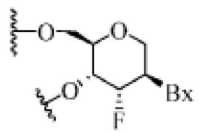
ある実施形態において、修飾された糖部分は、糖代用物である。そのようなある実施形態において、糖部分の酸素原子は、例えば、硫黄、炭素または窒素原子で置き換えられる。そのようなある実施形態において、そのように修飾された糖部分は、本明細書に記載さ

れる架橋および／または非架橋置換基も含む。例えば、ある糖代用物は、４’－硫黄原子ならびに２’位（例えば、Ｂｈａｔら、米国特許第７，８７５，７３３号明細書およびＢｈａｔら、米国特許第７，９３９，６７７号明細書を参照されたい）および／または５’位に置換を含む。

【０２５５】

ある実施形態において、糖代用物は、５個以外の原子を有する環を含む。例えば、ある実施形態において、糖代用物は、６員テトラヒドロピラン（「ＴＨＰ」）を含む。そのようなテトラヒドロピランは、さらに修飾または置換されていてもよい。そのような修飾されたテトラヒドロピランを含むヌクレオシドとしては、ヘキシトール核酸（「ＨＮＡ」、アニトール核酸（「ＡＮＡ」）、マンニトール核酸（「ＭＮＡ」）（例えば、Ｌｅｕｍａｎｎ，ＣＪ．Ｂｉｏｏｒｇ．＆Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００２，１０，８４１－８５４）、フルオロＨＮＡ：

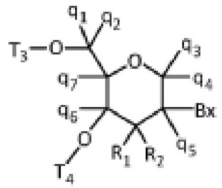
【化２】



F-HNA

（「Ｆ－ＨＮＡ」、例えば、Ｓｗａｙｚｅら、米国特許第８，０８８，９０４号明細書；Ｓｗａｙｚｅら、米国特許第８，４４０，８０３号明細書；Ｓｗａｙｚｅら、米国特許第８，７９６，４３７号明細書；およびＳｗａｙｚｅら、米国特許第９，００５，９０６号明細書を参照されたい；Ｆ－ＨＮＡは、Ｆ－ＴＨＰまたは３’－フルオロテトラヒドロピランとも呼ばれ得る）、および式：

【化３】



を有する追加の修飾されたＴＨＰを含むヌクレオシド

［式中、独立して、前述の修飾されたＴＨＰヌクレオシドの各々について、

Ｂｘは、核酸塩基部分であり、

Ｔ３およびＴ４は、各々独立して、修飾されたＴＨＰヌクレオシドをオリゴヌクレオチドの残部に連結するヌクレオシド間連結基であるか、またはＴ３およびＴ４の一方は、修飾されたＴＨＰヌクレオシドをオリゴヌクレオチドの残部に連結するヌクレオシド間連結基であり、Ｔ３およびＴ４の他方は、Ｈ、ヒドロキシル保護基、連結されたコンジュゲート基、または５’－もしくは３’－末端基であり、

q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6およびq_7は、各々独立して、Ｈ、C_1～C_6アルキル、置換C_1～C_6アルキル、C_2～C_6アルケニル、置換C_2～C_6アルケニル、C_2～C_6アルキニルまたは置換C_2～C_6アルキニルであり、R_1およびR_2の各々は、独立して、水素、ハロゲン、置換または非置換アルコキシ、NJ_1J_2、SJ_1、N_3、$OC(=X)J_1$、$OC(=X)NJ_1J_2$、$NJ_3C(=X)NJ_1J_2$およびＣＮの中から選択され、式中、Ｘは、Ｏ、ＳまたはＮJ_1であり、各J_1、J_2およびJ_3は、独立して、ＨまたはC_1～C_6アルキルである］が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５６】

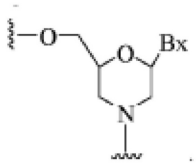
ある実施形態において、q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6およびq_7が各々Ｈであ

る修飾されたＴＨＰヌクレオシドが提供される。ある実施形態において、q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6およびq_7の少なくとも１つはＨ以外である。ある実施形態において、q_1、q_2、q_3、q_4、q_5、q_6およびq_7の少なくとも１つはメチルである。ある実施形態において、R_1およびR_2の一方がＦである修飾されたＴＨＰヌクレオシドが提供される。ある実施形態において、R_1はＦであり、R_2はＨであり、ある実施形態において、R_1はメトキシであり、R_2はＨであり、ある実施形態において、R_1はメトキシエトキシであり、R_2はＨである。

【０２５７】

ある実施形態において、糖代用物は、５個を超える原子および１個を超えるヘテロ原子を有する環を含む。例えば、モルホリノ糖部分を含むヌクレオシドおよびオリゴヌクレオチドにおけるそれらの使用が報告されている（例えば、Ｂｒａａｓｃｈら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２００２，４１，４５０３－４５１０およびＳｕｍｍｅｒｔｏｎら、米国特許第５，６９８，６８５号明細書；Ｓｕｍｍｅｒｔｏｎら、米国特許第５，１６６，３１５号明細書；Ｓｕｍｍｅｒｔｏｎら、米国特許第５，１８５，４４４号明細書；およびＳｕｍｍｅｒｔｏｎら、米国特許第５，０３４，５０６号明細書を参照されたい）。本明細書で使用される場合、「モルホリノ」という用語は、以下の構造を有する糖代用物を意味する：

【化４】



【０２５８】

ある実施形態において、モルホリノは、例えば、上記のモルホリノ構造から様々な置換基を付加または変更することによって修飾され得る。そのような糖代用物は、本明細書では「修飾されたモルホリノ」と呼ばれる。

【０２５９】

ある実施形態において、糖代用物は、非環式部分を含む。そのような非環式糖代用物を含むヌクレオシドおよびオリゴヌクレオチドの例としては、ペプチド核酸（「ＰＮＡ」、非環式ブチル核酸（例えば、Ｋｕｍａｒら、Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２０１３，１１，５８５３－５８６５を参照されたい）、ならびにＭａｎｏｈａｒａｎら、国際公開第２０１１／１３３８７６号に記載されているヌクレオシドおよびオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２６０】

修飾されたヌクレオシドに使用することができる他の多くの二環式および三環式の糖および糖代用物環系が当該技術分野で知られている。

【０２６１】

機能性ドメインまたは環化ドメインのオリゴヌクレオチドのヌクレオシド残基は、多数の既知のヌクレオシド間結合のいずれかによって互いにカップリングすることができる。ヌクレオシド間連結基の２つの主要なクラスは、リン原子の存在または非存在によって定義される。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル結合（「Ｐ＝Ｏ」）を含有するリン酸塩（修飾されていないまたは天然に存在する結合とも呼ばれる）、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、およびホスホロチオエート（「Ｐ＝Ｓ」）、およびホスホロジチオエート（「ＨＳ－Ｐ＝Ｓ」）が含まれるが、これらに限定されない。代表的な非リン含有ヌクレオシド間連結基には、メチレンメチルイミノ（－CH_2－Ｎ（CH_3）－Ｏ－CH_2－）、チオジエステル、チオノカルバメート（－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）（ＮＨ）－Ｓ－）；シロキサン（－Ｏ－ＳｉH_2－Ｏ－）；およびＮ，Ｎ’－ジメチルヒドラジン（CH_2－Ｎ（CH_3）－Ｎ（CH_3）－）が含まれるが

、これらに限定されない。リン含有ヌクレオシド間結合およびリン非含有ヌクレオシド間結合の調製方法は、当業者に周知である。

【０２６２】

そのようなヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、アルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、シロキサン、カーボネート、カルボアルコキシ、アセトアミデート、カルバメート、モルホリノ、ボラノ、チオエーテル、架橋ホスホルアミデート、架橋メチレンホスホネート、架橋ホスホロチオエート、およびスルホンヌクレオシド間結合が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の合成アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド間結合の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、本発明の合成アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合とホスホジエステルヌクレオチド間結合との組み合わせである。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド間結合の半分より多いが、全部より少ないのがホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド間結合の全部がホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。

【０２６３】

キラル中心を有するヌクレオシド間結合を含む修飾されたオリゴヌクレオチドは、立体的に無作為なヌクレオシド間結合を含む修飾されたオリゴヌクレオチドの集団として、またはホスホロチオエート結合、特に立体化学的配置を含む修飾されたオリゴヌクレオチドの集団として調製することができる。ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドの集団は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合のすべてが立体的に無作為である。そのような修飾されたオリゴヌクレオチドは、各ホスホロチオエート結合の立体化学的配置の無作為な選択をもたらす合成方法を使用して生成することができる。それにもかかわらず、当業者によって十分に理解されるように、各個々のオリゴヌクレオチド分子の各個々のホスホロチオエートは、定義された立体配置を有する。ある実施形態において、修飾されたオリゴヌクレオチドの集団は、特定の独立して選択される立体化学配置の１つ以上の特定のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む修飾されたオリゴヌクレオチドが濃縮されている。

【０２６４】

ある実施形態において、ホスホロチオエート結合は、ＲｐおよびＳｐエナンチオマーの混合物であってもよく、またはそれらは、ＲｐもしくはＳｐ形態のいずれかで立体規則性もしくは実質的に立体規則性にされてもよい。結合がＲｐおよびＳｐエナンチオマーの混合物である実施形態において、ＲｐおよびＳｐ形態は、オリゴヌクレオチド内の所定の場所にあってもよく、またはオリゴヌクレオチド全体にわたって無作為に配置されてもよい。

【０２６５】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基配列」とは、任意の糖またはヌクレオシド間結合修飾とは無関係の核酸またはオリゴヌクレオチド中の隣り合う核酸塩基の順序を意味する。

【０２６６】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」とは、核酸塩基および糖部分を含む化合物を意味する。核酸塩基および糖部分は、各々独立して、修飾されていないかまたは修飾されている。本明細書で使用される場合、「修飾されたヌクレオシド」とは、修飾された核酸塩基および／または修飾された糖部分を含むヌクレオシドを意味する。修飾されたヌクレオシドには、核酸塩基を欠く塩基性ヌクレオシドが含まれる。「連結されたヌクレオシド」は、連続した配列（すなわち、連結されたヌクレオシド間に追加のヌクレオシドは存在しない）で連結されたヌクレオシドである。

【０２６７】

本明細書で使用される場合、「オリゴマー化合物」とは、オリゴヌクレオチドと、必要

に応じて１つ以上の追加の特徴、例えばコンジュゲート基または末端基とを意味する。オリゴマー化合物は、第１のオリゴマー化合物に相補的な第２のオリゴマー化合物と対合していてもよく、または対合していなくてもよい。「一本鎖オリゴマー化合物」は、不対オリゴマー化合物である。

【０２６８】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオシド間結合を介して接続した連結されたヌクレオシドの鎖を意味し、各ヌクレオシド結合およびヌクレオシド間結合は修飾されていても修飾されていなくてもよい。別段示されない限り、オリゴヌクレオチドは、８～５０個の連結されたヌクレオシドからなる。

【０２６９】

本明細書で使用される場合、「修飾されたオリゴヌクレオチド」とは、少なくとも１個のヌクレオシド結合またはヌクレオシド間結合が修飾されているオリゴヌクレオチドを意味する。本明細書で使用される場合、「修飾されていないオリゴヌクレオチド」は、任意のヌクレオシド修飾またはヌクレオシド間修飾を含まないオリゴヌクレオチドを意味する。

【０２７０】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容され得る担体または希釈剤」とは、動物に投与する際の使用に適した任意の物質を意味する。そのようなある担体は、医薬組成物を、例えば、対象による経口摂取のための錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤およびロゼンジ剤として製剤化することを可能にする。ある実施形態において、薬学的に許容され得る担体または希釈剤は、滅菌水；滅菌生理食塩水；または滅菌緩衝液である。

【０２７１】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容され得る塩」とは、オリゴマー化合物などの化合物の生理学的および薬学的に許容され得る塩、すなわち親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒物学的効果を付与しない塩を意味する。

【０２７２】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」とは、対象に投与するのに適した物質の混合物を意味する。例えば、医薬組成物は、アンチセンス化合物および滅菌水溶液を含み得る。ある実施形態において、医薬組成物は、ある細胞株におけるｆｒｅｅ　ｕｐｔａｋｅアッセイにおいて活性を示す。

【０２７３】

本明細書で使用される場合、「リン部分」とは、リン原子を含む原子団を意味する。ある実施形態において、リン部分は、モノ－、ジ－もしくはトリ－リン酸塩、またはホスホロチオエートを含む。

【０２７４】

本明細書で使用される場合、「プロドラッグ」とは、動物またはその細胞内で異なる形態に変換される体外の形態の治療剤を意味する。通常、動物内のプロドラッグの変換は、細胞もしくは組織に存在する酵素（例えば、内因性もしくはウイルス性酵素）または化学物質の作用および／または生理学的条件によって促進される。

【０２７５】

本明細書で使用される場合、「ＯＭｅ」とは、メトキシを意味する。「２’－ＯＭｅ」とは、リボシル糖部分の２’ＯＨ基の代わりに２’－ＯＣH3基を意味する。

【０２７６】

端点による数値範囲の列挙は、それぞれの範囲内に包含されるすべての数および分数、ならびに列挙された端点を含む。

【０２７７】

本明細書で提供される範囲は、その範囲内のすべての値の省略表現であると理解される。例えば、１～５０の範囲は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、

２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０、ならびに例えば１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、および１．９などの前述の整数間のすべての介在する十進数値を含むと理解される。部分範囲に関して、範囲のいずれかの端点から延びる「入れ子状部分範囲」が特に企図される。例えば、１～５０の例示的な範囲の入れ子状部分範囲は、一方向に１～１０、１～２０、１～３０、および１～４０、または他の方向に５０～４０、５０～３０、５０～２０、および５０～１０を含むことができる。

【０２７８】

本明細書で使用される場合、「量または活性を低減または阻害すること」は、未処置または対照サンプル中の転写発現または活性と比較して転写発現または活性の減少または遮断を指し、必ずしも転写発現または活性の完全な排除を示すものではない。

【０２７９】

本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドに関して「自己相補的」とは、それ自体に少なくとも部分的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを意味する。

【０２８０】

本明細書で使用される場合、「標準細胞アッセイ」とは、実施例１に記載されるアッセイおよびその合理的な変形を意味する。

【０２８１】

本明細書で使用される場合、同一の分子式の分子集団の文脈における「立体的に無作為なキラル中心」は、無作為な立体化学配置を有するキラル中心を意味する。例えば、立体的に無作為なキラル中心を含む分子の集団において、立体的に無作為なキラル中心の（Ｓ）配置を有する分子の数は、立体的に無作為なキラル中心の（Ｒ）配置を有する分子の数と同じであり得るが、必ずしも同じではない。キラル中心の立体化学配置が無作為であるとみなされるのは、立体化学配置を制御するように設計されていない合成方法の結果である場合である。ある実施形態において、立体的に無作為なキラル中心は、立体的に無作為なホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【０２８２】

本明細書で使用される場合、「糖部分」とは、修飾されていない糖部分または修飾された糖部分を意味する。本明細書で使用される場合、「修飾されていない糖部分」は、ＲＮＡに見られるような２’－ＯＨ（Ｈ）フラノシル部分（「修飾されていないＲＮＡ糖部分」、またはＤＮＡに見られるような２’－Ｈ（Ｈ）部分（「修飾されていないＤＮＡ糖部分」を意味する。修飾されていない糖部分は、３’位および４’位の各々に１個の水素、３’位に酸素、および５’位に２個の水素を有する。本明細書で使用される場合、「修飾された糖部分」または「修飾された糖」とは、修飾されたフラノシル糖部分または糖代用物を意味する。本明細書で使用される場合、修飾されたフラノシル糖部分とは、修飾されていない糖部分の少なくとも１つの水素の代わりに非水素置換基を含むフラノシル糖を意味する。ある実施形態において、修飾されたフラノシル糖部分は、２’－置換糖部分である。そのような修飾フラノシル糖部分には、二環式糖および非二環式糖が含まれる。

【０２８３】

本明細書で使用される場合、「糖代用物」とは、核酸塩基を別の基、例えばオリゴヌクレオチド中のヌクレオシド間結合、コンジュゲート基または末端基に結合することができるフラノシル部分以外を有する修飾された糖部分を意味する。糖代用物を含む修飾されたヌクレオシドは、オリゴヌクレオチド内の１つ以上の位置に組み込むことができ、そのようなオリゴヌクレオチドは相補的オリゴマー化合物または核酸にハイブリダイズすることができる。

【０２８４】

本明細書で使用される場合、「標的核酸」および「標的ＲＮＡ」とは、アンチセンス化合物が影響を及ぼすように設計されている核酸を意味する。

【０２８５】

本明細書で使用される場合、「標的領域」とは、オリゴマー化合物がハイブリダイズするように設計されている標的核酸の一部を意味する。

【０２８６】

本明細書で使用される場合、「末端基」とは、オリゴヌクレオチドの末端に共有結合している化学基または原子団を意味する。

【０２８７】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」とは、動物に治療上の利益を提供する医薬品の量を意味する。例えば、治療有効量は、疾患の症候を改善する。

【０２８８】

本明細書で使用される場合、「処置する（ｔｒｅａｔ）」、「処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」または「処理する（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」とは、疾患、障害、または症状の変更または改善をもたらすために本明細書に記載される化合物を投与することを指す。

【０２８９】

「部分」とは、規定された数の隣り合う（すなわち、連結された）核酸の核酸塩基を意味する。ある実施形態において、部分は、規定された数の隣り合う標的核酸の核酸塩基である。ある実施形態において、部分は、規定された数の隣り合うアンチセンス化合物の核酸塩基である。

【０２９０】

「同時投与」または「同時投与される」という用語は、一般に、少なくとも２つの異なる物質の投与を指す。同時投与とは、単回用量または別個の用量のいずれかで、任意の順序で少なくとも２つの異なる物質を同時投与すること、ならびに数日までの時間的に離間した順序を指す。

【０２９１】

「組み合わせて」という用語は、一般に、本発明によるオリゴヌクレオチド系化合物と、患者を処置する過程で化合物の活性を失わない疾患または症状を処置するのに有用な別の薬剤とを投与することを意味する。そのような投与は、同時投与、ならびに数秒から数日離れた時間的に離間した順序を含む任意の順序で行うことができる。そのような併用処置はまた、本発明による化合物および／または独立して他の薬剤の２回以上の投与を含み得る。本発明による化合物および他の薬剤の投与は、同じまたは異なる経路によるものであり得る。

【０２９２】

「個体」または「対象」または「患者」という用語は、一般に、ヒトなどの哺乳動物を指す。「哺乳動物」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ウシ、ブタ、ヒツジおよびウサギを含むがこれらに限定されない温血脊椎動物を含むことが明確に意図されている。本明細書で使用される場合、「～を必要とする個体」とは、そのような処置または治療を必要とする処置または治療のために選択されたヒトまたは非ヒト動物を指す。本明細書で使用される場合、「発現または活性の阻害」とは、ＲＮＡまたはタンパク質の発現または活性の減少または遮断を指し、必ずしも発現または活性の完全な排除を示すものではない。

【０２９３】

実施例

アンチセンスオリゴヌクレオチド機能性ドメインを含むＣＳＯの合成

本発明による環状構造化オリゴヌクレオチドは、手動でまたは自動合成機によって実行することができるホスホルアミデートまたはＨ－ホスホネート化学などの当該技術分野で周知の手順によって合成することができる。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、線形合成アプローチによって合成することができる。

【０２９４】

本明細書で用いられる化合物は、ホスホラミダイト化学を使用して合成されている。これらのプロトコルは、例えば、ｐｕｂｓ．ｒｓｃ．ｏｒｇ／ｅｎ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｃｈａｐｔｅｒ／ｂｋ９７８１７８８０１２０９６－００４５３／９７８－１－７８８０１－

２０９－６に詳細に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【０２９５】

本発明のＣＳＯの融解温度

環化ドメインが機能性ドメインのオリゴヌクレオチドの３’－末端とハイブリダイズし、それによって環状構造を形成することを明確にするために、ＣＳＯ化合物の２μＭサンプルを１０ｍＭリン酸ナトリウム、１００ｎＭ塩化ナトリウム緩衝液（ｐＨ　７．２）中で混合した。サンプルを９５℃に５分間加熱し、次いで室温までゆっくり冷却した。サンプルを冷蔵庫で一晩保存した後、融解温度（Ｔｍ）を測定した。２０～９０℃の冷却曲線および加熱曲線を表６に示す。

【表６】

表６

化合物番号	Tm(℃)
1009	N/A
1010	N/A
1101	43
1102	50
1103	37
1104	39
1105	45
1106	49
1107	41
1108	39
1109	31
1110	N/A
1111	N/A
1112	N/A
1124	64
1125	65
1126	62
1201	50
1202	44
1203	44
1204	30
1205	N/A
1206	N/A
1207	31
1208	N/A
1209	N/A
53	45
54	46
55	64

【０２９６】

アンチセンスオリゴヌクレオチド機能性ドメインを含むＣＳＯによる標的ＲＮＡの阻害

ＰＣＳＫ９核酸を標的とする環状構造化オリゴヌクレオチドを設計し、インビトロでＰＣＳＫ９　ｍＲＮＡに及ぼすそれらの効果について試験した。

【０２９７】

Ｈｅｐａ　１－６細胞を、ＤＭＥＭ培地＋１０％ＦＢＳおよび１００Ｕ／ｍｌ　Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（ＡＴＣＣからの細胞）中で培養した。細胞を播種し、一晩インキュベートし、トランスフェクション時に約７０％コンフルエントになるようにした（約１００，０００細胞／ｍｌ／１２ウェルプレート）。細胞培地を交換し、９００μｌを各ウェルに添加した。オリゴヌクレオチドをＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地中でリポフェクタミンと混合し、脂質（１：１の比）に添加し、１５～２０分間インキュベートした。１００μｌを各ウェルに添加し、アンチセンス濃度を１００ｎＭにした。約１６～４８時間の処置期間の後、細胞をＲＮＡおよび／またはタンパク質分析のために採取した。

【０２９８】

培養上清をＡＫ放出細胞傷害性アッセイについてアッセイした。ｍＰＣＳＫ９およびＰＰＩＢまたはＨＰＲＴ１（ハウスキーピング対照）のためのＴａｑｍａｎプローブを使用した（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社によって提供されるプローブ）。各実験の結果を図５に示す。

【０２９９】

ＰＮＰＬＡ３核酸を標的とする環状構造化オリゴヌクレオチドを設計し、インビトロでＰＮＰＬＡ３　ｍＲＮＡに及ぼすそれらの効果について試験した。

【０３００】

ヒトＨｅｐＧ２細胞を、ＡＴＣＣ推奨条件および培地（１０％ＦＢＳを含むイーグル最小必須培地）に従って培養した。細胞をＰＤＬ被覆９６ウェルプレートに５０Ｋ／ウェル密度でプレーティングし、０．６μｌ／ウェルのＲＮＡｉＭａｘおよび指示濃度のオリゴヌクレオチド化合物でリバーストランスフェクトした。２４時間後、Ｃｅｌｌｓ　ｔｏ　ＣＴ溶解試薬（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　４３９１８５１Ｃ）を使用して細胞を採取する。ＲＴ試薬キット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ａ３９１１０）を使用して、ＲＮＡをｃＤＮＡ鋳型に逆転写した。定量的ＰＣＲを、ｑＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　４４４４９６４）を使用して行った。ＰＮＰＬＡ３発現レベルを、ＰＮＰＬＡ３－ＦＡＭプローブ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　４３５１３６８アッセイＩＤ：Ｈｓ００２２８７４７）を使用して定量し、ハウスキーピング遺伝子ＰＯＬＲ２Ａ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，４４４８４９１，Ａｓｓａｙ　ＩＤ：Ｈｓ０１１０８２９１）で正規化する。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍでデータを分析する。

【０３０１】

スプリットマーフォーマットの修飾ＲＮＡを用いた線状ＡＳＯの環化が更なる有効性を提供し得るかどうかを調べるために、異なるフォーマットおよび化学配置の同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用したＰＮＰＬＡ３ノックダウンのレベルを比較した：２００ｎＭ、１００ｎＭ、５０ｎＭ、２５ｎＭおよび１２．５ｎＭの濃度での修飾ＲＮＡＩＤを有しない線状ＡＳＯ　１５２１、線状ギャップマー１５２３、線状スプリットマー１５２７、１５２８、１５２９、および環状スプリットマーＡＳＯ　１５４２、１５４３、１５４４、および１５４５（図６Ａ）。図６Ｂおよび図６Ｃに示すように、第１世代フォーマットの線状ＡＳＯ　１５２１は、２００ｎＭのより高い濃度でさえも活性ではなく、線状ギャップマーＡＳＯ　１５２３は軽度に活性であり、２５２ｎＭのＩＣ５０で約５０％のノックアウトを達成することができ、線状スプリットマーフォーマットＡＳＯ　１５２７、１５２８、および１５２９は、ギャップマーフォーマットよりも良好なノックダウン活性を達成することができ、すべての環化されたスプリットマーＡＳＯ（ＣＳＯ　１５４２、１５４３、１５４４、および１５４５）は、トランスフェクション後２４時間でＰＮＰＬＡ３　ｍＲＮＡレベルを低下させるのに最も効果的であった。

【０３０２】

免疫賦活性オリゴヌクレオチド機能性ドメインを含むＣＳＯによる免疫応答の生成

マウス脾細胞再刺激アッセイ

Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスからの脾臓を、単細胞懸濁液に機械的に分散させ、塩化アンモニウム溶解緩衝液（カタログ番号４２０３０２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社、カリフォルニア州サンディエゴ）で赤血球を除去した。細胞生存率を、生体色素染色および自動細胞計数システム（Ｃｏｕｎｔｅｓｓ　３，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社、マサチューセッツ州ウォルサム）を使用して決定した。計数後、１×１０^{5}個の生存マウス脾細胞を、１０％ウシ胎児血清（カタログ番号Ｆ２４４２、ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ社、マサチューセッツ州バーリントン）を含有するＲＰＭＩ　１６４０（カタログ番号Ａ１０４９１０１、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社）中の９６ウェル平底滅菌組織培養処理プレート（カタログ番号３５９６、Ｃｏｒｎｉｎｇ社、アリゾナ州グレンデール）の各ウェルに播種した。

【０３０３】

Ｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ９）に対する免疫賦活性オリゴヌクレオチド（ＩＳＯ）アゴニストと、ＴＬＲ９免疫賦活性オリゴヌクレオチド（ＩＳＯ）機能性ドメインを含むＣＳＯとを、Ｓｙｎｇｅｎｉｓ社（オーストラリア国ベントレー）によって標準的な方法論を使用して合成し、凍結乾燥調製物として提供し、次いで、これをヒートブロックインキュベーションステップ（９５℃、５分）を使用してアニーリング緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５）中で再構成した。アニーリング後、サンプル濃度を、ＮａｎｏＤｒｏｐ分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社）を使用するオリゴヌクレオチド濃度決定のための吸光度法を使用して決定した。対照ＴＬＲ９アゴニストは、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ社（カリフォルニア州サンディエゴ）から入手した。指示用量のＣＳＯまたは対照アゴニストを指示濃度で指示ウェルに添加し、細胞を３７℃、５％　ＣＯ２インキュベータ内で２４時間刺激した。インキュベーション期間後、細胞培養上清を採取し、カスタムマルチプレックスサイトカイン／ケモカインアッセイキット（Ｕ－ＰＬＥＸカスタムバイオマーカーアッセイ、カタログ番号Ｋ１５０６９Ｍ－２、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ社、メリーランド州ロックビル）を使用して分析し、データ収集をＭＳＤ　Ｓ６００バイオアナライザ（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ社）で行い、生データ分析をＭＳＤ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｗｏｒｋｂｅｎｃｈ（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ社）で行った。結果を図７～図１２に示す。

【０３０４】

免疫アンタゴニストオリゴヌクレオチド機能性ドメインを含むＣＳＯの活性を評価するために、そのようなＣＳＯを単独でまたはＴＬＲ９アゴニストとともにインキュベートし、サイトカインを２４時間後に評価した。

【０３０５】

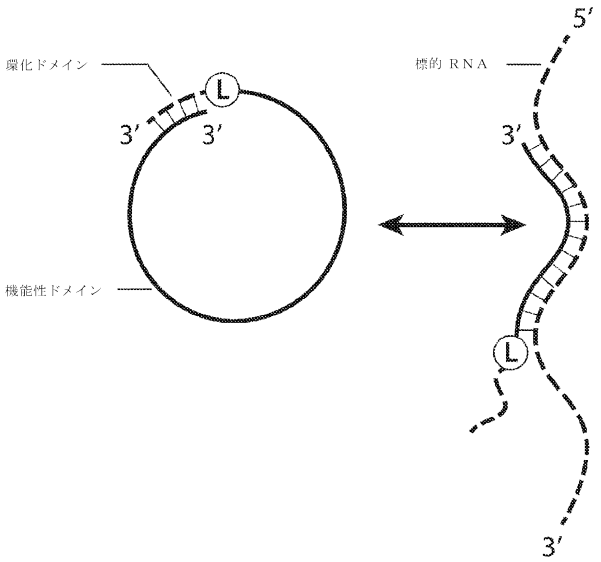
結果を図１３および図１４に示す。

【０３０６】

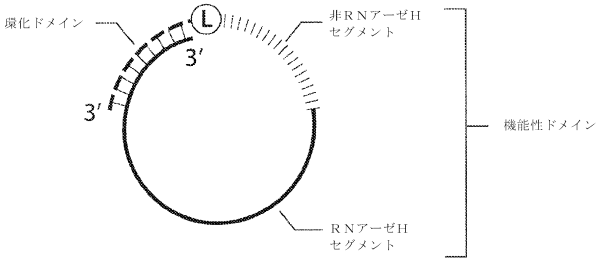
本発明は、その好ましい実施形態を参照して特に示され説明されてきたが、添付の特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲から逸脱することなく、形態および詳細の様々な変更がなされ得ることが当業者によって理解されるであろう。

【図面】

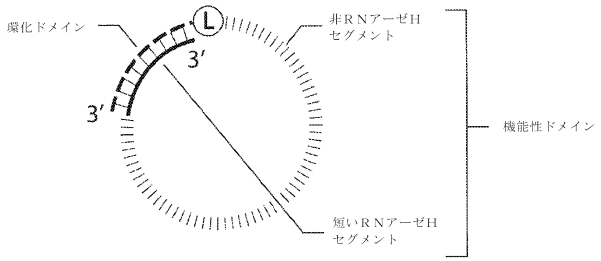
【図１Ａ】



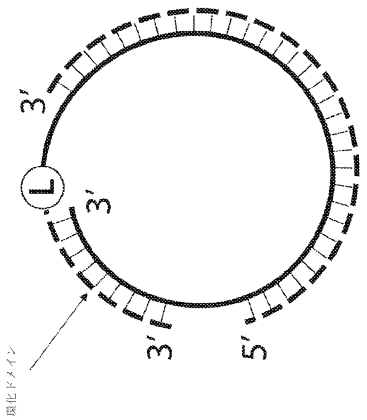
【図１Ｂ】



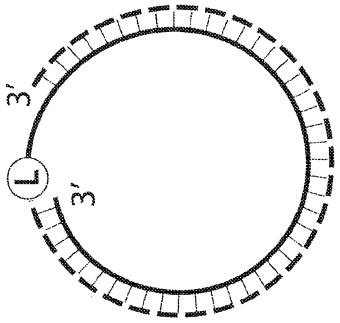
【図１Ｃ】



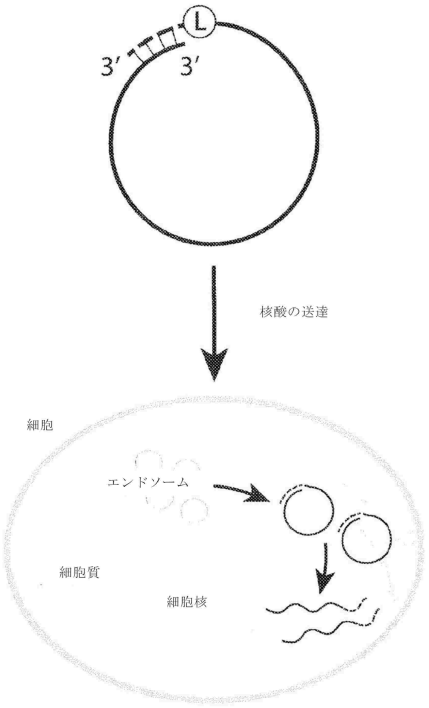
【図２Ａ】



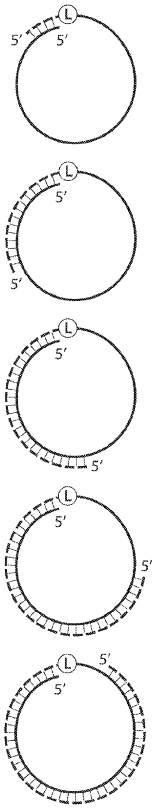
【図２Ｂ】



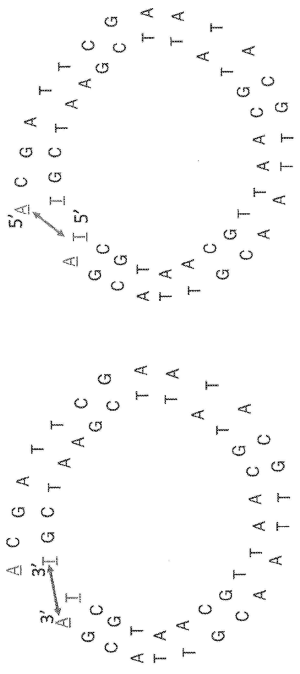
【図３】



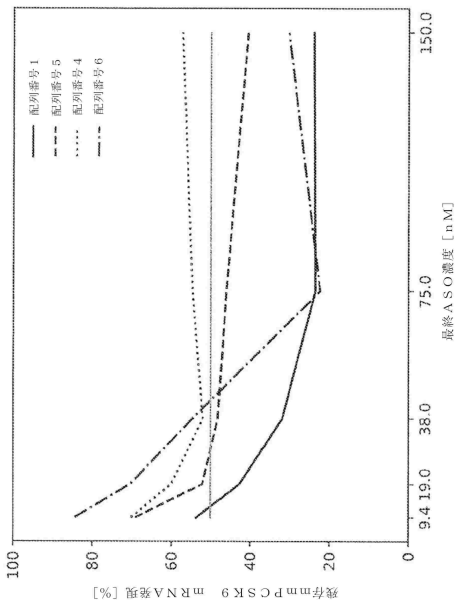
【図４Ａ】



【図４Ｂ】



【図５】



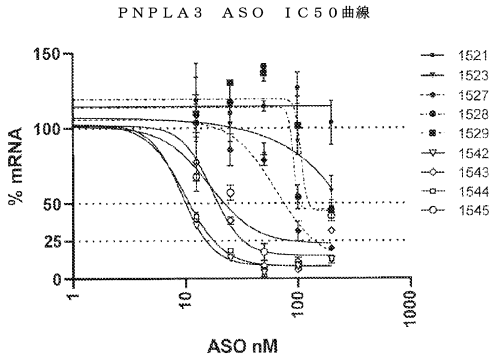
【図６Ａ】

標的mRNA領域5’－ .....TTCCTGCTTCATGCCCTTCTACAGT.....-3’

第一世代ASO	1521	3’-GACGAAGTACGGGAAGATG-5’
線状ギャップマー	1523	3’-**GACG**AAGTACGGGAA**GATG**-5
線状スプリットマー	1527	3’-GACGAAGTAC**GGGAAGATG**-5
	1528	3’-GACGAAGTACG**GGAAGATG**-5
	1529	3’-GACGAAGTACGG**GAAGATG**-5
環状スプリットマー	1542	3’-GACGAAGTAC**GGGAAGATG**-5’-5’-CTGCTT-3’
	1543	3’-GACGAAGTACG**GGAAGATG**-5’-5’-CTGCT-3’
	1544	3’-GACGAAGTACG**GGAAGATG**-5’-5’-CTGCTT-3’
	1545	3’-GACGAAGTACG**GGAAGATG**-5’-5’-CTGCT-3’

太字＝修飾ＲＮＡ、下線＝ＰＯ結合を除くＰＳ結合を有する全ＤＮＡ

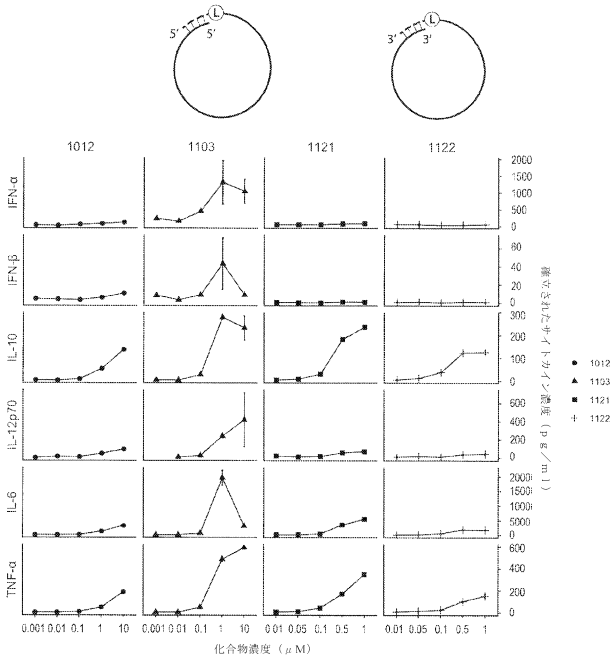
【図６Ｂ】



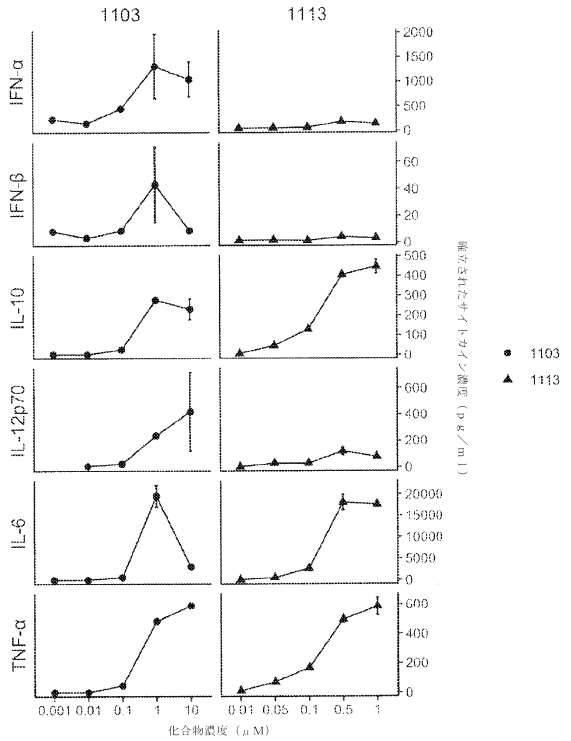
【図６Ｃ】

ASO ID	形状	形式	IC50 (nM)
1521	線状	第１世代	なし
1523	線状	ギャップマー	252
1527	線状	スプリットマー	64.2
1528	線状	スプリットマー	91.4
1529	線状	スプリットマー	105.1
1542	環状	スプリットマー	9.3
1543	環状	スプリットマー	17.2
1544	環状	スプリットマー	9.9
1545	環状	スプリットマー	16.4

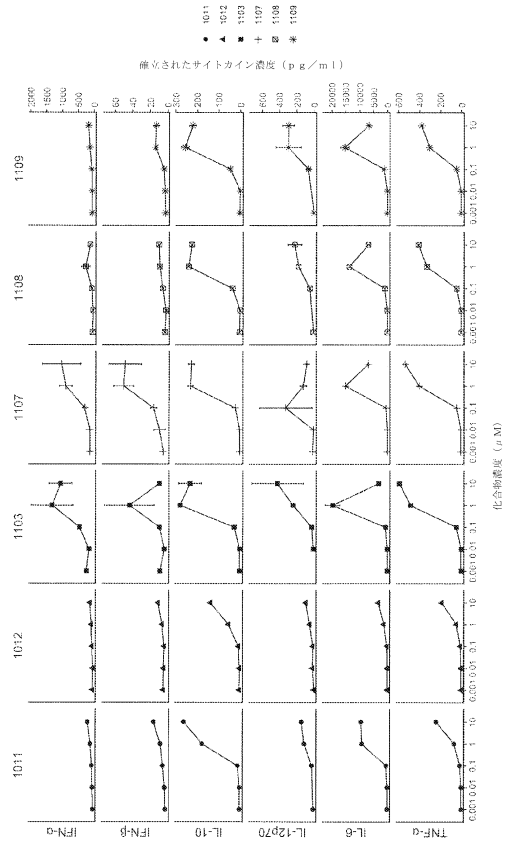
【図７】


5'
3'
L
1012
1103
1121
1122
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
確立されたサイトカイン濃度（pg／ml）
化合物濃度（μM）

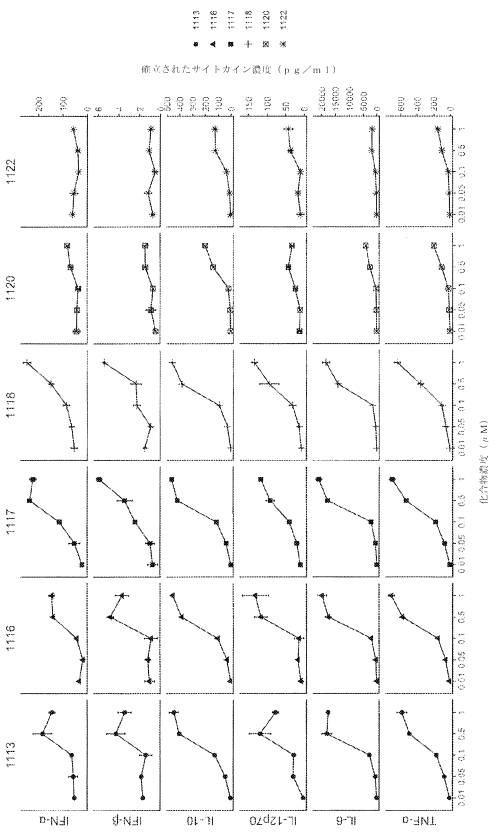
【図８】


1103
1113
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α
確立されたサイトカイン濃度（pg／ml）
化合物濃度（μM）

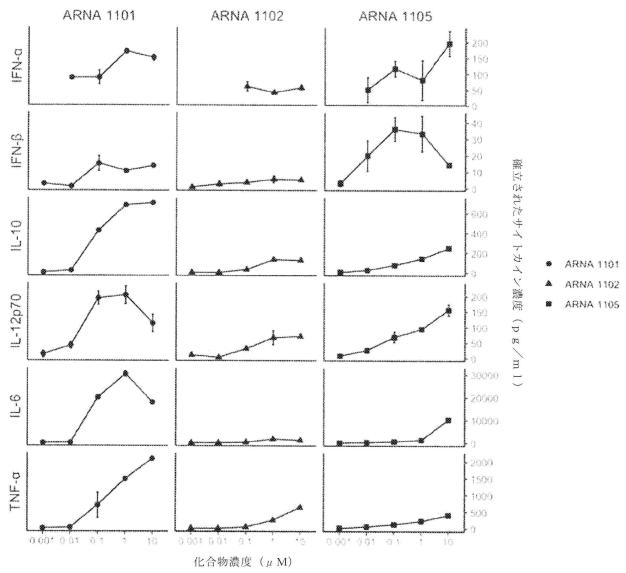
【図９】


確立されたサイトカイン濃度（pg／ml）
化合物濃度（μM）
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α

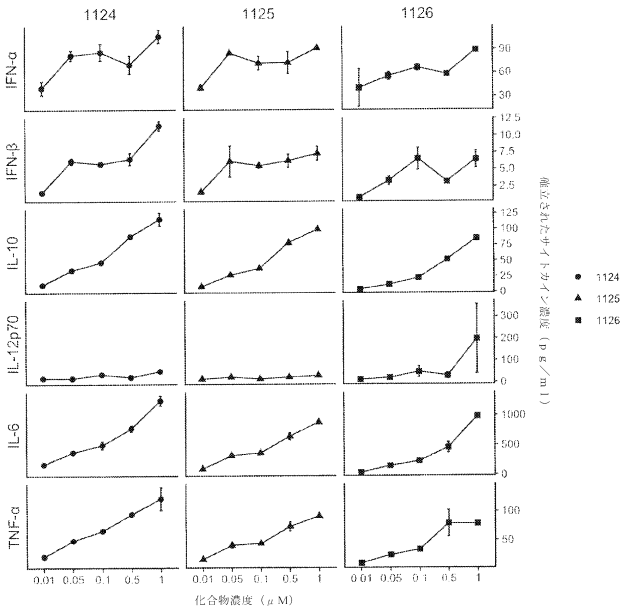
【図１０】


確立されたサイトカイン濃度（pg／ml）
化合物濃度（μM）
IFN-α
IFN-β
IL-10
IL-12p70
IL-6
TNF-α

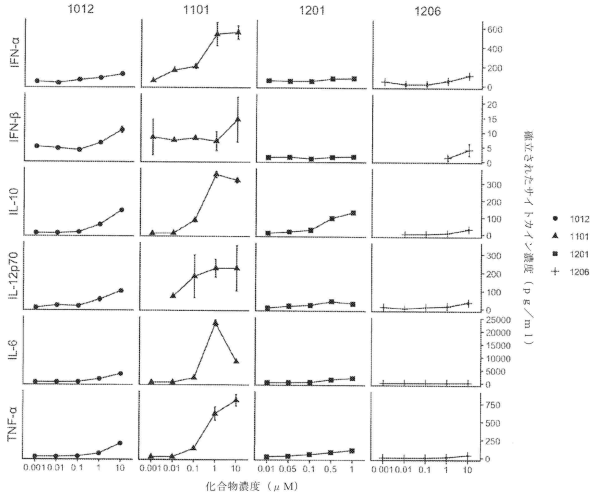
【図１１】



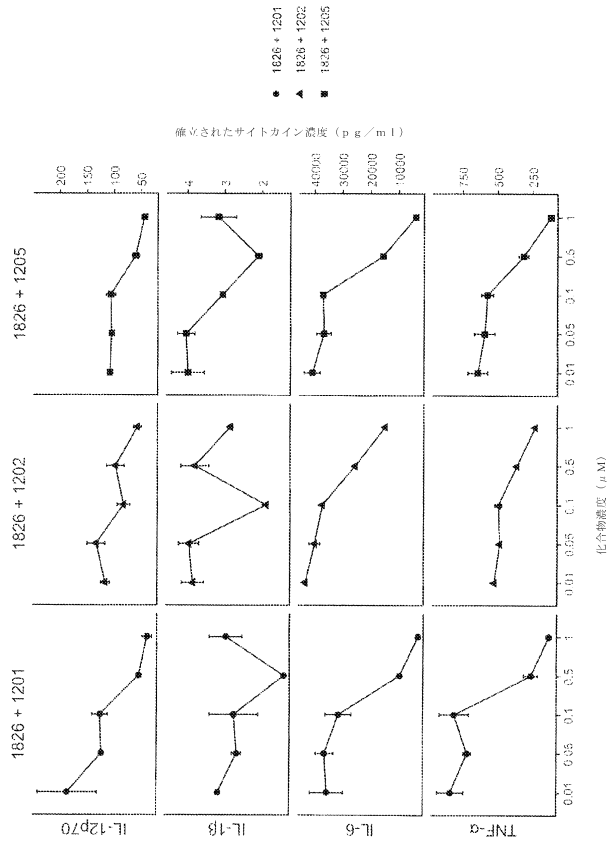
【図１２】



【図１３】



【図１４】



【手続補正書】
【提出日】令和６年６月１０日(２０２４.６.１０)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
２０２４５４１７０１０００００１.ｘｍｌ

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/044406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C12N 15/113; A61K 31/712; A61K 31/7125 (2023.01)
ADD. - C07H 21/00 (2023.01)

CPC - INV. - C12N 15/113; A61K 31/712; A61K 31/7125 (2023.02)

ADD. - C12N 2310/11; C12N 2310/14; C12N 2310/315; C12N 2310/32; C12N 2310/53 (2023.02)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2000/058330 A2 (HYBRIDON INC.) 05 October 2000 (05.10.2000) entire document	1-6, 45-51, 54-56, 74-76 --- 18-23, 33-35, 60-66, 69-71, 77-81
Y	WO 2010/084371 A1 (MITOPROD) 29 July 2010 (29.07.2010) entire document	18-23, 60-66
Y	US 2007/0179101 A1 (KITAGAWA et al) 02 August 2007 (02.08.2007) entire document	33-35, 77-81
Y	US 2014/0128449 A1 (LIU et al) 08 May 2014 (08.05.2014) entire document	69-71
A	WO 2012/102616 A1 (FLEXGEN B.V.) 02 August 2012 (02.08.2012) entire document	1-6, 18-23, 33-35, 45-51, 54-56, 60-66, 69-71, 74-81
A	US 6,153,742 A (PEDROSO et al) 28 November 2000 (28.11.2000) entire document	1-6, 18-23, 33-35, 45-51, 54-56, 60-66, 69-71, 74-81

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 March 2023	APR 17 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/044406

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-17, 24-32, 36-44, 52, 53, 57-59, 67, 68, 72, 73, 82-100
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

フロントページの続き

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

(74)代理人　100191086
弁理士　高橋 香元
(72)発明者　アグラワル，スディール
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０１５４５，シュルーズベリー，６１ ランプライター ドライブ

Ｆターム（参考）　4C084　AA13 MA55 NA05 NA14 ZB071 ZB072
4C086　AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA55 NA05 NA14 ZB07