

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7689552号

(P7689552)

(45)発行日 令和7年6月6日(2025.6.6)

(24)登録日 令和7年5月29日(2025.5.29)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z Z N A

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 16/00

請求項の数 14 外国語出願 (全202頁)

(21)出願番号 特願2023-147876(P2023-147876)
(22)出願日 令和5年9月12日(2023.9.12)
(62)分割の表示 特願2020-517456(P2020-517456)
の分割
原出願日 平成30年10月4日(2018.10.4)
(65)公開番号 特開2024-1021(P2024-1021A)
(43)公開日 令和6年1月9日(2024.1.9)
審査請求日 令和5年10月11日(2023.10.11)
(31)優先権主張番号 62/568,238
(32)優先日 平成29年10月4日(2017.10.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 518345192
アビディティ バイオサイエンス
、インク。
アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル
ニア州 サンディエゴ サイエンス・セン
ター・ドライブ 1 0 5 7 8 スイート
1 2 5
(74)代理人 110003797
弁理士法人清原国際特許事務所
(72)発明者
ギール、アンドリュウ ジョン
アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル
ニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・
パインズ・ロード 1 0 9 7 5 スイート
1 5 0
(72)発明者 ドパラブディ、ヴェンカタ ラマナ
最終頁に続く

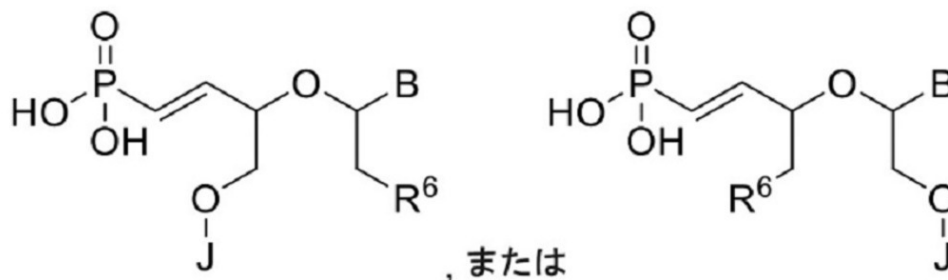
(54)【発明の名称】 核酸ポリペプチド組成物およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドを含むポリ
ヌクレオチド分子であって、
前記少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下
から選択され、

【化1】



Bは複素環式塩基部分であり、

R⁶は、水素、ハロゲン、アルキル、アルコキシ、あるいはアミノアルキルから選択され、および、

Jは、前記ポリヌクレオチド分子の隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である、ポリヌクレオチド分子。

【請求項2】

前記少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、前記ポリヌクレオチド分子の5'-末端に位置する、請求項1に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項3】

前記少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、2'-位置でさらに修飾される、請求項1または2に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項4】

2'-修飾は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)、2'-O-エチルオキシエチル(2'-O-EOE)、または2'-O-(2-N-メチルカルバモイルエチル)修飾されたヌクレオチドから選択される、請求項3に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項5】

少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分をさらに含む、請求項1から4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項6】

前記少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロジアミデート結合、メチルホスホネート結合、あるいはアミド結合を含む、請求項5に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項7】

前記少なくとも1つの逆脱塩基部分は少なくとも1つの末端である、請求項5に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項8】

前記ポリヌクレオチド分子は一本鎖ポリ核酸分子を含む、請求項1から7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項9】

前記ポリヌクレオチド分子は、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、前記第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む、請求項1から7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項10】

前記第1のポリヌクレオチドおよび前記第2のポリヌクレオチドはRNA分子である、請求項9に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項11】

請求項1から10のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド分子と、結合部分とを含むポリヌクレオチド抱合体分子。

【請求項12】

前記結合部分と前記ポリヌクレオチド分子は、単結合、C₁-C₆アルキル基、またはホモ二機能性リンカーもしくはC₁-C₆アルキル基に随意に結合したヘテロ二機能性リンカーによって結合される、請求項11に記載のポリヌクレオチド抱合体分子。

【請求項13】

前記結合部分は、ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメント、キメラ抗体またはその抗原結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、あるいはラクダ抗体もしくはその抗原結合フラグメントを含む、請求項11または12に記載のポリヌクレオチド抱合体分子。

【請求項 14】

前記結合部分はペプチドまたは小分子を含む、請求項 11 または 12 に記載のポリヌクレオチド抱合体分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

【0002】

本出願は、2017年10月4日に出願された米国仮特許出願第62／568,238号の利益を主張するものであり、これは全体として引用によって本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0003】

RNA誘導された遺伝子サイレンシングによる遺伝子抑制は複数のレベルの制御：転写不活性化、低分子干渉RNA (siRNA) 誘導mRNA低下、およびsiRNA誘導転写減衰を提供する。いくつかの例では、RNA干渉 (RNAi) は、複数の細胞分裂にわたって長い永続的な効果を与える。したがって、RNAiは、薬物標的の検証、遺伝子機能分析、経路分析、および疾患治療に役立つ実行可能な方法を表す。

【発明の概要】

【0004】

特定の実施形態では、ポリ核酸分子に結合した (conjugated) 結合部分とポリマーとを含む組成物と医薬製剤が本明細書に開示される。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子に結合した結合部分とポリマーとを含む組成物と医薬製剤を利用する、疾患または病気 (例えば、癌) を処置する方法も本明細書に記載される。

20

【0005】

特定の実施形態において、式 (I) :



式 I

の分子が本明細書で開示され、

式中、

Aは結合部分であり；

30

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；Xは単結合または第1のリンカーであり；および、

Yは単結合または第2のリンカーであり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。

【0006】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは一本鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは2以上の鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。

40

【0007】

いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsiRNA分子である。

【0008】

いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、または1215-1242に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの

50

実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、または1215-1242から選択された配列からなる。

【0009】

いくつかの実施形態において、第2のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、または1215-1242に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、または1215-1242から選択された配列からなる。

【0010】

いくつかの実施形態において、XとYは独立して単結合あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの実施形態において、Xは単結合である。いくつかの実施形態において、XはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの実施形態において、YはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの実施形態において、Xは、随意にC₁-C₆アルキル基に結合した、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、Yはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。

【0011】

いくつかの実施形態では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、抗EGFR抗体またはその結合フラグメントである。

【0012】

いくつかの実施形態では、Cはポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、Cは約5,000Daの分子量を有する。

【0013】

いくつかの実施形態において、A-XはBの5'末端に結合し、Y-CはBの3'末端に結合する。いくつかの実施形態において、Y-CはBの5'末端に結合し、A-XはBの3'末端に結合する。いくつかの実施形態において、A-X、Y-C、またはこれらの組み合わせは、ヌクレオチド間結合基に結合する。

【0014】

いくつかの実施形態では、分子はDをさらに含む。いくつかの実施形態において、DはCあるいはAに結合する。いくつかの実施形態において、Dは、式(II)に係る式(I)の分子に結合し、



式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；

Yは単結合または第2のリンカーであり；

Lは単結合または第3のリンカーであり；

Dはエンドソーム溶解性部分であり；および、

nは0と1の間の整数であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含み；および、Dは、A、B、またはCの任意の場所に結合する。

【0015】

いくつかの実施形態において、DはINF7またはメリチンである。

【0016】

いくつかの実施形態において、Dはエンドソーム溶解性ポリマーである。

【0017】

いくつかの実施形態では、LはC₁–C₆アルキル基である。いくつかの実施形態では、Lはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。

【0018】

いくつかの実施形態において、分子はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも第2の結合部分Aは、A、B、またはCに結合する。いくつかの実施形態では、少なくとも第2の結合部分Aはコレステロールである。

10

【0019】

いくつかの実施形態において、分子はさらに、少なくとも1つの追加のポリヌクレオチドBを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの追加のポリヌクレオチドBは、A、B、またはCに結合する。

【0020】

いくつかの実施形態では、分子はさらに、少なくとも1つの追加のポリマーCを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの追加のポリマーCは、A、B、またはCに結合する。

【0021】

20

特定の実施形態において、式(I)：A–X–B–Y–C (式I)の分子が本明細書で開示され、ここで、Aは抗体あるいはその結合フラグメントであり；Bはポリヌクレオチドであり；Cはポリマーであり；Xは単結合あるいは第1の非ポリマーリンカーであり；および、Yは単結合または第2のリンカーであり；ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'–ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含み；および、AとCは同じ末端でBに結合(attach)しない。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの逆脱塩基部分は少なくとも1つの末端にある。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは一本鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO：16–45、422–1173、1195–1214、または1215–1242に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、第2のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO：16–45、422–1173、1195–1214、または1215–1242に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、Yは非ポリマーリンカー基である。いくつかの実施形態において、Xは単結合である。いくつかの実施形態において、XはC₁–C₆アルキル基である。いくつかの実施形態において、YはC₁–C₆アルキル基である。いくつかの実施形態において、Xは、随意にC₁–C₆アルキル基に結合した、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、Yはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)

30

40

50

、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、Cはポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、Cは約1000Da、2000Da、あるいは5000Daの分子量を有する。いくつかの実施形態において、A-XはBの5'末端に結合し、Y-CはBの3'末端に結合する。いくつかの実施形態において、Y-CはBの5'末端に結合し、A-XはBの3'末端に結合する。いくつかの実施形態では、分子はDをさらに含む。いくつかの実施形態において、DはCあるいはAに結合する。いくつかの実施形態において、Dは、式(II)に係る式(I)の分子に結合し、 $(A-X-B-Y-C)_c-L-D$ (式II) ここで、Aは抗体あるいはその結合フラグメントであり；Bはポリヌクレオチドであり；Cはポリマーであり；Xは単結合あるいは第1の非ポリマーリンカーであり；Yは単結合または第2のリンカーであり；Lは単結合または第3のリンカーであり；Dはエンドソーム溶解性部分であり；および、cは0と1の間の整数であり；ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含み；AとCは同じ末端でBに結合せず；および、Dは、AまたはCの任意の場所で、あるいはBの末端に結合する。いくつかの実施形態では、DはINF7またはメリチンである。いくつかの実施形態において、Dはエンドソーム溶解ポリマーである。いくつかの実施形態では、LはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの実施形態では、Lはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、分子はさらに少なくとも第2の結合部分を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも第2の結合部分は、A、B、またはCに結合する。いくつかの実施形態において、少なくとも第2の結合部分Aはコレステロールである。いくつかの実施形態において、分子は少なくとも1つの追加のポリヌクレオチドBをさらに含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの追加のポリヌクレオチドBは、A、B、またはCに結合する。いくつかの実施形態において、分子は少なくとも1つの追加のポリマーCをさらに含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの追加のポリマーCは、A、B、またはCに結合する。

【0022】

特定の実施形態において、上に記載された分子と薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物が本明細書に開示される。いくつかの実施形態において、医薬組成物はナノ粒子製剤として製剤される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、非経口投与、経口投与、鼻腔内投与、パッカル投与、直腸投与、または経皮投与のために製剤される。

【0023】

特定の実施形態において、上記の分子を含む組成物を患者に投与する工程を含む、患者の疾患または疾病を処置する方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、疾患または疾病は癌である。いくつかの実施形態では、癌は固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態において、癌は、KRASに関連する癌、EGFRに関連する癌、ARに関連する癌、β-カテニンに関連する癌、PIK3Cに関連する癌、あるいはMYCに関連する癌を含む。いくつかの実施形態において、癌は、膀胱癌、乳癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、多形神経膠芽腫、頭頸部癌、腎癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、あるいは甲状腺癌を含む。いくつかの実施形態において、癌は急性骨髄性白血病、CLL、DLBCL、あるいは多発性骨髄腫を含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、免疫腫瘍学的治療である。

【0024】

特定の実施形態では、患者の初代細胞中の標的遺伝子の発現を阻害する方法であって、初代細胞に上記の分子を投与する工程を含む、方法が本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、方法はインビボの方法である。いくつかの実施形態では、患者はヒトである。

【0025】

特定の実施形態では、患者の疾患または疾病の処置のための蒸気分子を含む免疫腫瘍学的治療が本明細書で開示される。

10

20

30

40

50

【0026】

特定の実施形態において、上記の分子を含むキットが本明細書で開示されている。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】分子生物学の実施例10で記載されるように、相補性の19の塩基と3'ジヌクレオチドオーバーハングを有する、21量体の二重鎖の構造の絵による表現を示す。

【図1B】分子生物学の実施例10で記載されるように、相補性の19の塩基と1つの3'ジヌクレオチドオーバーハングを有する平滑末端の二重鎖の構造の絵による表現を示す。

【図2】分子生物学の実施例11で記載されるように、HPRT siRNAを用いるHCTトランスフェクションに対する対数(nMでのsiRNA)対相対的なHPRT mRNA(%)のプロットを示す。

10

【図3】分子生物学の実施例12で記載されるように、MSTN siRNAを用いるSJCRH30トランスフェクションに対する対数(nMでのsiRNA)対相対的なMSTN mRNAレベル(未処理の対照の%)のプロットを示す。

【図4】分子生物学の実施例13で記載されるように、抗体siRNAの抱合体のIV投与後の、腓腹筋におけるインビボのMSTNとHPRT mRNAのダウンレギュレーションを示す。

【図5】分子生物学の実施例14で記載されるように、抗体siRNAの抱合体のIV投与後の、(A)腓腹筋、(B)大腿四頭筋、および(C)心筋におけるインビボのMSTN mRNAダウンレギュレーションを示す。

20

【図6】分子生物学の実施例15で記載されるように、抗体siRNAの抱合体のIV投与後の、(A)腓腹筋と(B)肝臓におけるインビボのMSTN mRNAダウンレギュレーションを示す。

【図7】分子生物学の実施例16で記載されるような濃度対%SSB mRNA(nM)のプロットを示す。

【図8】分子生物学の実施例17で記載されるように、SJCRH30トランスフェクションのためのsiRNA濃度(nM)対相対的なMSTN(図8A)とSSB(図8B)のmRNA発現のプロットを示す。

【図9】分子生物学の実施例18で記載されるように、SJCRH30のためのsiRNA濃度(nM)対相対的なMSTN(図8A)とSSB(図8B)のmRNA発現のプロットを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

核酸(例えば、RNAi)治療は高い選択率と特異性を誇る標的療法である。しかしながら、いくつかの例では、核酸治療も、脆弱な細胞内取り込み、限定的な血液安定性、および非特異的な免疫刺激によって妨害される。こうした諸問題に対応するために、核酸組成物の様々な修飾、例えば、より優れた安定化および／またはより低い毒性のための新規なリンカー、増加した標的特異性および／または標的送達用の結合部分の最適化、ならびに、安定性の増加および／または的外れの効果の減少のための核酸ポリマー修飾などが探求されている。

40

【0029】

いくつかの実施形態において、核酸組成物を構成する様々な成分の構成または順序はさらに、細胞内取り込み、安定性、毒性、有効性、および／または非特異的な免疫刺激をもたらす。例えば、核酸成分が結合部分、ポリマー、およびポリ核酸分子(あるいは、ポリヌクレオチド)を含む場合、結合部分、ポリマー、および／または、ポリ核酸分子(あるいは、ポリヌクレオチド)の順序または構成(例えば、結合部分ポリ核酸分子ポリマー、結合部分ポリマーポリ核酸分子、あるいはポリマー結合部分ポリ核酸分子)はさらに、細胞内取り込み、安定性、毒性、有効性、および／または非特異的な免疫刺激をもたらす。

【0030】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される核酸成分の構成の分子は、細胞内

50

取り込み、安定性、毒性、有効性、および／または非特異的な免疫刺激をもたらす。いくつかの例では、分子はポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む。いくつかの実施形態において、分子は式 (I) : $A-X-B-Y-C$; の分子を含み、式中、Aは結合部分であり、Bは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり、Cはポリマーであり、Xは単結合または第1のリンカーであり、および、Yは単結合または第2のリンカーである。いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの例では、式 (I) の分子は、D、エンドソーム溶解性部分を含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む分子は、細胞内取り込み、安定性、および／または有効性を増強する。いくつかの例では、本明細書に記載されるように配されたポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む分子は、毒性および／または非特異的な免疫刺激を減少させる。場合によっては、分子は式 (I) : $A-X-B-Y-C$; の分子を含み、式中、Aは結合部分であり、Bは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり、Cはポリマーであり、Xは単結合または第1のリンカーであり、および、Yは単結合または第2のリンカーである。いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの例では、式 (I) の分子は、D、エンドソーム溶解性部分を含む。

【0032】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子はさらに、疾患または疾病を処置するために使用される。いくつかの例では、疾患または疾病の処置のための分子は、式 (I) : $A-X-B-Y-C$; の分子であり、式中、Aは結合部分であり、Bは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり、Cはポリマーであり、Xは単結合または第1のリンカーであり、および、Yは単結合または第2のリンカーである。いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの例では、式 (I) の分子は、D、エンドソーム溶解性部分を含む。

【0033】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子はさらに、患者の初代細胞中の標的遺伝子の発現を阻害するために使用される。そのような例では、そのような使用のための分子は、式 (I) : $A-X-B-Y-C$; の分子であり、式中、Aは結合部分であり、Bは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり、Cはポリマーであり、Xは単結合または第1のリンカーであり、および、Yは単結合または第2のリンカーである。いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含む。いくつかの例では、式 (I) の分子は、D、エンドソーム溶解性部分を含む。

【0034】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された分子はさらに、疾患または疾病の処置のための免疫腫瘍学的治療として使用される。いくつかの例において、分子は式 (I) : $A-X-B-Y-C$; の分子であり、式中、Aは結合部分であり、Bは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであり、Cはポリマーであり、Xは単結合または第1のリンカーであり、および、Yは単結合または第2のリンカーである。いくつかの例では、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含む。いくつかの例では、式 (I) の分子は、D、エンドソーム溶解性部分を含む。

【0035】

追加の実施形態において、本明細書に記載される分子の1つ以上を含むキットが本明細

10

20

30

40

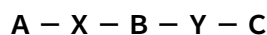
50

書に記載される。

【0036】

治療用分子プラットフォーム

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された分子（例えば、治療用分子）は、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドおよびポリマーを含むポリ核酸分子に結合した結合部分を含む。いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、式（I）：



式 I

の分子を含み、

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；および、

Yは単結合または第2のリンカーであり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。

【0037】

いくつかの例では、式（I）の分子は、D、エンドソーム溶解性部分を含む。

【0038】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのAおよび／または少なくとも1つのCは、Bの5'末端、Bの3'末端、Bの内部部位、あるいはこれらの任意の組み合わせに結合する。いくつかの例では、少なくとも1つのAはBの1つの末端で結合し、その一方で、少なくとも1つのCはBの反対側の末端で結合する。いくつかの例では、Aの少なくとも1つは、Bの1つの末端で結合し、その一方で、Cの少なくとも1つはBの内部部位で結合する。

【0039】

場合によっては、AとCは同じ末端でBに結合（conjugatedあるいはattached）しない。場合によっては、AはBの第1の末端でBに結合する。場合によっては、CはBの第2の末端でBに結合し、および、Bの第2の末端は第1の末端とは異なる。場合によっては、AはBの5'末端でBに結合し、および、CはBの3'末端でBに結合する。他の場合には、AはBの3'末端でBに結合し、および、CはBの5'末端でBに結合する。

【0040】

いくつかの実施形態では、Aは抗体またはその結合フラグメントである。場合によっては、Cはポリマーである。場合によっては、AとCは同じ末端でBに結合しない。場合によっては、AはBの第1の末端でBに結合する。場合によっては、CはBの第2の末端でBに結合し、および、Bの第2の末端は第1の末端とは異なる。場合によっては、AはBの5'末端でBに結合し、および、CはBの3'末端でBに結合する。他の場合には、AはBの3'末端でBに結合し、および、CはBの5'末端でBに結合する。場合によっては、AをBに結合するXは単結合あるいは非ポリマーリンカーである。場合によっては、Xが非ペプチドリinker（あるいはアミノ酸残基を含まないリンカー）である。場合によっては、BをCに結合するYは単結合あるいは第2のリンカーである。いくつかの例では、XはBの5'末端にAを結合し、YはBの3'末端にCを結合する。他の例では、XはBの3'末端にAを結合し、YはBの5'末端にCを結合する。

【0041】

いくつかの実施形態において、X-Bは、AのN末端、C末端、定常領域、ヒンジ領域、あるいはFc領域に結合する。いくつかの例では、X-BはAのN末端に結合する。いくつかの例では、X-BはAのC末端に結合する。いくつかの例では、X-BはAのヒン

10

20

30

40

50

ジ領域に結合する。いくつかの例では、 $X-B$ はAの定常領域に結合する。いくつかの例では、 $X-B$ はAのFc領域に結合する。

【0042】

いくつかの例では、少なくとも1つのBおよび／または少なくとも1つのC、ならびに随意に少なくとも1つのDは、第1のAに結合する。いくつかの例では、少なくとも1つのBは、第1のAに末端（例えば、5'末端あるいは3'末端）で結合し、あるいは第1のAに内部部位を介して結合する。場合によっては、少なくとも1つのCは、第1のAに直接的に、あるいは2以上のBを介して間接的に結合する。2以上のBを介して間接的に結合する場合、2以上のCは、B上の第1のAと同じ末端で、第1のAから反対側の末端で、あるいは、独立して内部部位で結合する。いくつかの例では、少なくとも1つの追加のAはさらに、第1のA、B、あるいはCに結合する。さらなる例では、少なくとも1つのDは随意に、第1のA、少なくとも1つのB、あるいは少なくとも1つのCに、直接的あるいは間接的に結合する。直接的に第1のAに結合する場合、少なくとも1つのDもA-D-B抱合体を形成するために少なくとも1つのBに随意に結合し、あるいは、A-D-B-C抱合体を形成するために少なくとも1つのBと少なくとも1つのCに随意に結合する。場合によっては、少なくとも1つの追加のAは第1のAとは異なる。

10

【0043】

場合によっては、2以上のBおよび／または2以上のCは、第1のAに結合する。いくつかの例では、2以上のBは、第1のAに末端（例えば、5'末端あるいは3'末端）で結合し、あるいは第1のAに内部部位を介して結合する。いくつかの例では、2以上のCは、第1のAに直接的に、あるいは2以上のBを介して間接的に結合する。2以上のBを介して間接的に結合する場合、2以上のCは、B上の第1のAと同じ末端で、第1のAから反対側の末端で、あるいは、独立して内部部位で結合する。いくつかの例では、少なくとも1つの追加のAはさらに、第1のA、2以上のB、あるいは2以上のCに結合する。さらなる例では、少なくとも1つのDは随意に、第1のA、2以上のB、あるいは2以上のCに、直接的あるいは間接的に結合する。第1のAに間接的に結合する場合、少なくとも1つのDは、A-B-C-D型抱合体を形成するために、2以上のBによって、2以上のCによって、B-C配向によって、あるいはA-C-B-D型の抱合体を形成するために、C-B配向によって、第1のAに結合する。場合によっては、少なくとも1つの追加のAは第1のAとは異なる。場合によっては、2以上のBが異なる。他の場合には、2つ以上のBが同じである。いくつかの例では、2以上のCが異なる。他の例では、2つ以上のCが同じである。さらなる例では、2つ以上のDが異なる。さらなる例では、2つ以上のDが同じである。

20

30

【0044】

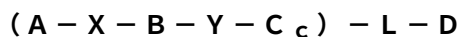
他の場合には、2以上のBおよび／または2以上のD、随意に2以上のCは第1のAに結合する。いくつかの例では、2以上のBは、第1のAに末端（例えば、5'末端あるいは3'末端）で結合し、あるいは第1のAに内部部位を介して結合する。いくつかの例では、2以上のDは、第1のAに直接的に、あるいは2以上のBを介して間接的に結合する。2以上のBを介して間接的に結合する場合、2以上のDは、B上の第1のAと同じ末端で、第1のAから反対側の末端で、あるいは、独立して内部部位で結合する。いくつかの例では、少なくとも1つの追加のAはさらに、第1のA、2以上のB、あるいは2以上のDに結合する。さらなる例では、2以上のCは随意に、第1のA、2以上のB、あるいは2以上のDに、直接的あるいは間接的に結合する。場合によっては、少なくとも1つの追加のAは第1のAとは異なる。場合によっては、2以上のBが異なる。他の場合には、2つ以上のBが同じである。いくつかの例では、2以上のCが異なる。他の例では、2つ以上のCが同じである。さらなる例では、2つ以上のDが異なる。さらなる例では、2つ以上のDが同じである。

40

【0045】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子（例えば、治療用分子）は、式(II)に係る分子を含み：

50



式 I I

式中、

A は結合部分であり；

B はポリヌクレオチドであり；

C はポリマーであり；

X は単結合または第 1 のリンカーであり；

Y は単結合または第 2 のリンカーであり；

L は単結合または第 3 のリンカーであり；

D はエンドソーム溶解性部分であり；および、

c は 0 と 1 の間の整数であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの 5' - ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含み；および、D は、A、B、または C の任意の場所に結合する。

【0046】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子（例えば、治療用分子）は、式（I I I）に係る分子を含み：



式 I I I

式中、

A は結合部分であり；

B はポリヌクレオチドであり；

C はポリマーであり；

D はエンドソーム溶解性部分であり；

X は単結合または第 1 のリンカーであり；

Y は単結合または第 2 のリンカーであり；

L は単結合または第 3 のリンカーであり；

a と b は独立して 1 - 3 の間の整数であり；

c は 0 と 3 の間の整数であり；および、

n は 0 と 10 の間の整数であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの 5' - ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含み；A は、B、C、あるいは D 上の任意の場所で結合し；B は、A、C、あるいは D 上の任意の場所で結合し；C は、A、B、あるいは D 上の任意の場所で結合し；および、D は、A、B、または C の任意の場所に結合する。

【0047】

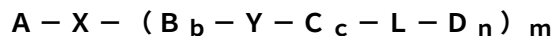
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子（例えば、治療用分子）は、式（I I I a）：A - X - B - L - D - Y - C に係る分子を含む。

【0048】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子（例えば、治療用分子）は、式（I I I b）：A_a - X - B_b - L - D_n に係る分子を含む。

【0049】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子（例えば、治療用分子）は、式（I V）に係る分子を含み：



式中、

A は結合部分であり；

B はポリヌクレオチドであり；

C はポリマーであり；

D はエンドソーム溶解性部分であり；

X は単結合または第 1 のリンカーであり；

Y は単結合または第 2 のリンカーであり；

Lは単結合または第3のリンカーであり；
 aとbは独立して1-3の間の整数であり；
 cは0と3の間の整数であり；
 nは0と10の間の整数であり；および、
 mは1-3の間の整数であり；および、
 ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチド
 を含み；CはBあるいはD上の任意の場所で結合し；および、DはBあるいはCの任意の
 場所に結合する。

【0050】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される分子（例えば、治療用分子）は、
 式（IVa）： $A-X-(B_b-L-D_n-Y-C_c)_m$ に係る分子を含む。

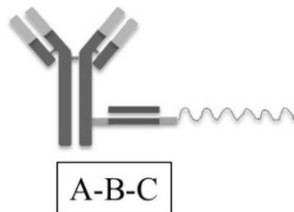
10

【0051】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子
 である：

【0052】

【化1】



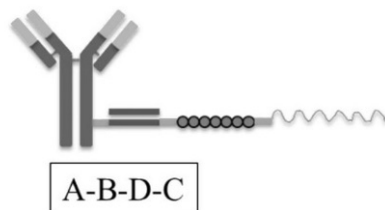
20

【0053】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子
 である：

【0054】

【化2】



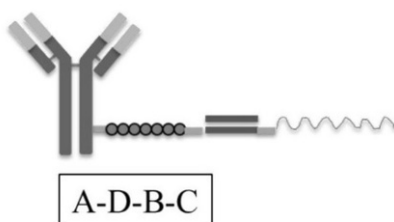
30

【0055】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子
 である：

【0056】

【化3】



40

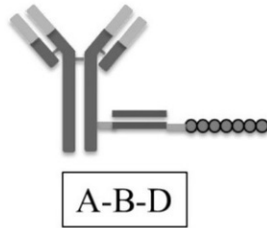
【0057】

50

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 5 8 】

【 化 4 】



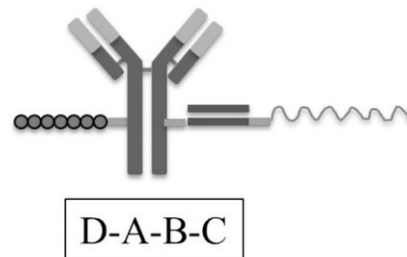
10

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 6 0 】

【 化 5 】



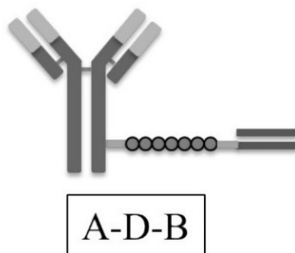
20

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 6 2 】

【 化 6 】



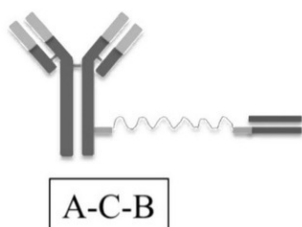
30

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 6 4 】

【 化 7 】



40

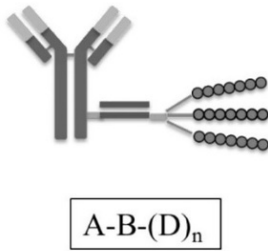
50

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 6 6 】

【化 8】



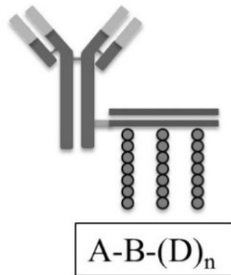
10

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 6 8 】

【化 9】



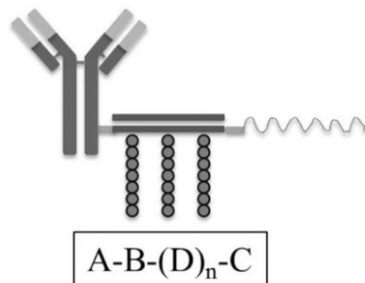
20

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 7 0 】

【化 1 0】



40

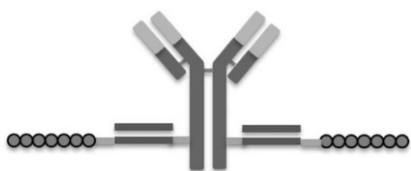
【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 7 2 】

50

【化 1 1】

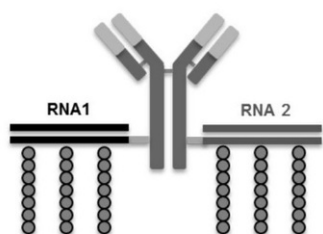


【 0 0 7 3】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 7 4】

【化 1 2】

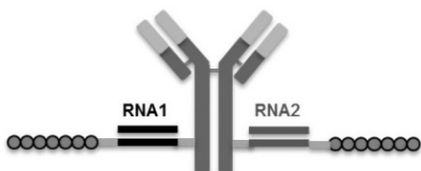


【 0 0 7 5】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 7 6】

【化 1 3】

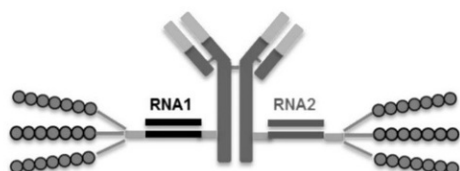


【 0 0 7 7】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 7 8】

【化 1 4】



【 0 0 7 9】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【 0 0 8 0】

10

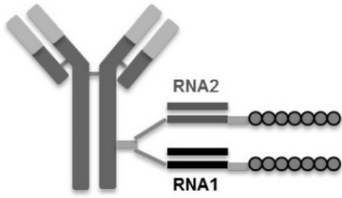
20

30

40

50

【化 1 5】

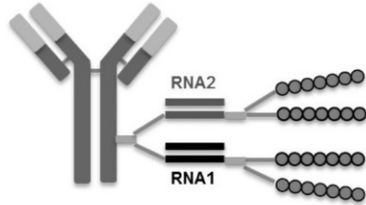


【0 0 8 1】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【0 0 8 2】

【化 1 6】

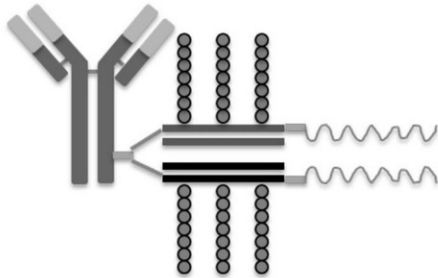


【0 0 8 3】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【0 0 8 4】

【化 1 7】

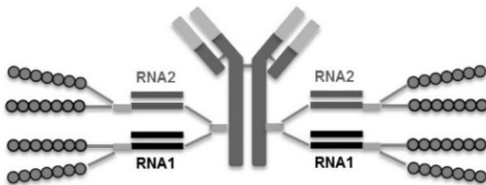


【0 0 8 5】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【0 0 8 6】

【化 1 8】



【0 0 8 7】

いくつかの実施形態において、分子（例えば、治療用分子）は、例示されるような分子である：

【0 0 8 8】

10

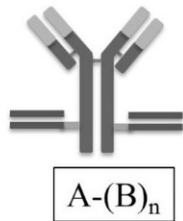
20

30

40

50

【化 19】



【0089】

10

【化 20】



は、例示目的のために過ぎず、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 Fab' 、二価 Fab_2 、一本鎖可変フラグメント ($scFv$)、ダイアボディ、ミニボディ ($minibody$)、ナノボディ、単ドメイン抗体 ($s dAb$)、あるいは、ラクダ抗体またはその結合フラグメントを包含する。

20

【0090】

ポリ核酸分子標的

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、癌遺伝子上の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子（あるいはポリヌクレオチド）である。いくつかの例では、癌遺伝子は、いくつかのカテゴリ：成長因子または分裂促進因子、受容体チロシンキナーゼ、細胞質チロシンキナーゼ、細胞質セリン／トレオニンキナーゼ、制御性GTPアーゼ、および転写因子にさらに分類される。例示的な成長因子は $c-Sis$ を含む。例示的な受容体チロシンキナーゼは、上皮増殖因子受容体 ($EGFR$)、血小板由来増殖因子受容体 ($PDGFR$)、血管内皮増殖因子受容体 ($VEGFR$)、および $HER2/neu$ を含む。例示的な細胞質チロシンキナーゼは、 Src ファミリーチロシンキナーゼ、チロシンキナーゼの $Syk-ZAP-70$ ファミリー、チロシンキナーゼの BTk ファミリー、および、 CML における AbI 遺伝子を含む。例示的な細胞質セリン／トレオニンキナーゼは Raf キナーゼおよびサイクリン依存性キナーゼを含む。例示的な制御性GTPアーゼは、 $KRAS$ などのタンパク質の Ras ファミリーを含む。例示的な転写因子は MYC 遺伝子を含む。いくつかの例では、本明細書に記載された癌遺伝子は、成長因子または分裂促進因子、受容体チロシンキナーゼ、細胞質チロシンキナーゼ、細胞質セリン／トレオニンキナーゼ、制御性GTPアーゼ、あるいは転写因子から選択された癌遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、成長因子または分裂促進因子、受容体チロシンキナーゼ、細胞質チロシンキナーゼ、細胞質セリン／トレオニンキナーゼ、制御性GTPアーゼ、あるいは転写因子から選択された癌遺伝子の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。

30

40

【0091】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された癌遺伝子は、 AbI 、 $AKT-2$ 、 ALK 、 $AML1$ （または、 $RUNX1$ ）、 AR 、 AXL 、 $BCL-2$ 、 3 、 6 、 $BRAF$ 、 $c-MYC$ 、 $EGFR$ 、 $ErbB-2$ ($Her2$ 、 Neu)、 Fms 、 FOS 、 $GLI1$ 、 $HPRT1$ 、 $IL-3$ 、 $INTS2$ 、 JUN 、 KIT 、 $KS3$ 、 $K-sam$ 、 LBC ($AKAP13$)、 LCK 、 $LMO1$ 、 $LMO2$ 、 $LYL1$ 、 $MAS1$ 、 $MDM2$ 、 MET 、 MLL ($KMT2A$)、 MOS 、 MYB 、 $MYH11/CBFB$ 、 $NOTCH1$

50

(TAN1)、NTRK1 (TRK)、OST (SLC51B)、PAX5、PIM1、PRAD-1、RAF、RAR/PML、HRAS、KRAS、NRAS、REL/NRG、RET、ROS、SKI、SRC、TIAM1、あるいはTSC2を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、Abl、AKT-2、ALK、AML1 (または、RUNX1)、AR、AXL、BCL-2、3、6、BRAF、c-MYC、EGFR、ErbB-2 (Her2、Neu)、Fms、FOS、GLI1、HPRT1、IL-3、INTS2、JUN、KIT、KS3、K-sam、LBC (AKAP13)、LC K、LMO1、LMO2、LYL1、MAS1、MDM2、MET、MLL (KMT2A)、MOS、MYB、MYH11/CBFB、NOTCH1 (TAN1)、NTRK1 (TRK)、OST (SLC51B)、PAX5、PIM1、PRAD-1、RAF、RAR/PML、HRAS、KRAS、NRAS、REL/NRG、RET、ROS、SKI、SRC、TIAM1、あるいはTSC2の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。

【0092】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された癌遺伝子は、KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1 (β-カテニン)、あるいはβ-カテニン関連遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1 (β-カテニン)、あるいはβ-カテニン関連遺伝子の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、KRASの標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、EGFRの標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、ARの標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、CNNTB1 (β-カテニン)の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、CNNTB1 (β-カテニン) 関連遺伝子の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの例では、β-カテニン関連遺伝子はPIK3CA、PIK3CB、およびMycを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子Bは、HPRT1の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。

【0093】

カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ (KRAS) を標的とするポリ核酸分子

カーステンラット肉腫ウイルスの癌遺伝子ホモログ (GTPアーゼKRas、V-Ki-rasカーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ、あるいはKRASとしても知られている) は、細胞分裂の調節に関与する。K-Rasタンパク質はRasスーパーファミリーに属するGTPアーゼである。いくつかの例では、K-Rasは細胞周期進行を調節し、様々な環境トリガー (例えば、細胞ストレス、紫外線、熱ショック、あるいはイオン化放射線照射) の下で、成長停止、アポトーシス、および複製老化を誘導する。場合によっては、野生型KRAS遺伝子は様々なタイプの癌における腫瘍進行中に頻繁に失われることが示されているが、KRAS遺伝子の突然変異は癌の発生に関連している。いくつかの例では、KRASの増幅も、癌の発生に関連している (例えば、Valtorta et al. “KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy,” Int. J. Cancer 133: 1259-1266 (2013) を参照)。そのような場合、癌は、患者が特定の阻害剤あるいは阻害剤のクラスに対して耐性を獲得した難治性の癌に関連する。

【0094】

いくつかの実施形態において、KRAS遺伝子は野生型であるか、あるいは突然変異を含む。いくつかの例では、KRAS mRNAは野生型であるか、あるいは突然変異を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、野生型のKRAS DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、突然変異 (例えば、置換、欠失、あるいは追加) を含む、KRAS DNAあるいはRN

Aの標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。

【0095】

いくつかの実施形態において、KRAS DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、KRAS DNAあるいはRNAは、エクソン1のコドン12あるいは13で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、KRAS DNAあるいはRNAは、コドン61、63、117、119、あるいは146において1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、KRAS DNAあるいはRNAは、KRASポリペプチドのアミノ酸残基12、13、18、19、20、22、24、26、36、59、61、63、64、68、110、116、117、119、146、147、158、164、176、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、KRAS DNAあるいはRNAは、KRASポリペプチドのG12V、G12D、G12C、G12A、G12S、G12F、G13C、G13D、G13V、A18D、L19F、T20R、Q22K、I24N、N26K、I36L、I36M、A59G、A59E、Q61K、Q61H、Q61L、Q61R、E63K、Y64D、Y64N、R68S、P110S、K117N、C118S、A146T、A146P、A146V、K147N、T158A、R164Q、K176Q、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置に1つ以上の突然変異を含む。

10

【0096】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むKRAS DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン1中のコドン12あるいは13の1つ以上の突然変異を含むKRAS DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、コドン61、63、117、119、あるいは146の1つ以上の突然変異を含むKRAS DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、KRASポリペプチドのアミノ酸残基12、13、18、19、20、22、24、26、36、59、61、63、64、68、110、116、117、119、146、147、158、164、176、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置に1つ以上の突然変異を含むKRAS DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、KRASポリペプチドのG12V、G12D、G12C、G12A、G12S、G12F、G13C、G13D、G13V、A18D、L19F、T20R、Q22K、I24N、N26K、I36L、I36M、A59G、A59E、Q61K、Q61H、Q61L、Q61R、E63K、Y64D、Y64N、R68S、P110S、K117N、C118S、A146T、A146P、A146V、K147N、T158A、R164Q、K176Q、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置に1つ以上の突然変異を含むKRAS DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

20

30

【0097】

上皮増殖因子受容体（EGFR）を標的とするポリ核酸分子

40

上皮増殖因子受容体（EGFR、ErbB-1、あるいはHER1）は、膜貫通チロシンキナーゼ受容体および受容体のErbBファミリーのメンバーであり、これはさらにHER2/c-neu（ErbB-2）、Her3（ErbB-3）、およびHer4（ErbB-4）を含む。いくつかの例では、EGFR突然変異は、RAS/RAF/MAPK、PI3K/AKT、および/またはJAK/STAT経路の下流の活性化を駆り立て、有糸分裂、細胞増殖、アポトーシスの抑制を引き起こす。加えて、野生型のEGFR遺伝子の増幅は、などの癌の発生に巻き込まれた、膠芽腫および非小細胞肺癌などの癌の発生に関与している（Talasila, et al., “EGFR Wild-type Amplification and Activation Promote Invasion and Development of Glioblastoma Inde

50

pendent of Angiogenesis,” *Acta Neuropathol.* 125 (5) : 683–698 (2013) ; Bell et al., “Epidermal Growth Factor Receptor Mutations and Gene Amplification in Non-Small-Cell Lung Cancer: Molecular Analysis of the IDEAL/INTACT Gefitinib Trials,” *J. Clinical Oncology* 23 (31) : 8081–8092 (2005))

【0098】

いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、野生型EGFR、あるいは突然変異を含むEGFRである。いくつかの例では、EGFRは野生型EGFRである。いくつかの例では、EGFR DNAあるいはRNAは突然変異を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、野生型EGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、突然変異（例えば、置換、欠失、あるいは追加）を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0099】

いくつかの例では、EGFR DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、1つ以上のエクソン内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、1つ以上のエクソンは、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、あるいはエクソン22を含む。いくつかの例では、EGFR DNAあるいはRNAは、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、エクソン22、あるいはこれらの組み合わせにおいて1つ以上の突然変異を含む。

【0100】

いくつかの例では、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基34、38、45、62、63、77、78、108、114、120、140、148、149、160、177、178、189、191、198、220、222、223、229、237、240、244、252、254、255、256、263、270、273、276、282、288、289、301、303、304、309、314、326、331、354、363、373、337、380、384、393、427、428、437、441、447、465、475、515、526、527、531、536、541、546、571、588、589、596、596、598、602、614、620、628、636、641、645、651、671、689、694、700、709、712、714、715、716、719、720、721、731、733、739–744、742、746–750、746–752、746、747、747–749、747–751、747–753、751、752、754、752–759、750、761–762、761、763、765、767–768、767–769、768、769、769–770、770–771、772、773–774、773、774、774–775、776、779、783、784、786、790、792、794、798、803、805、807、810、826、827、831、832、833、835、837、838、839、842、843、847、850、851、853、854、856、858、861、863、894、917、967、1006、1019、1042、1100、1129、1141、1153、1164、1167、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置における1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基747、761、790、854、858、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基761、790、858、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基747に対応する位置で突然変異を含む。いくつかの実施形態に

において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基761に対応する位置で突然変異を含む。いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基790に対応する位置で突然変異を含む。いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基854に対応する位置で突然変異を含む。いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基858に対応する位置で突然変異を含む。

【0101】

いくつかの実施形態において、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのT34M、L38V、E45Q、L62R、G63R、G63K、S77F、F78L、R108K、R108G、E114K、A120P、L140V、V148M、R149W、E160K、S177P、M178I、K189T、D191N、S198R、S220P、R222L、R222C、S223Y、S229C、A237Y、C240Y、R244G、R252C、R252P、F254I、R255（ナンセンス突然変異）、D256Y、T263P、Y270C、T273A、Q276（ナンセンス）、E282K、G288（フレームシフト）、A289D、A289V、A289T、A289N、A289D、V301（欠失）、D303H、H304Y、R309Q、D314N、C326R、G331R、T354M、T363I、P373Q、R337S、S380（フレームシフト）、T384S、D393Y、R427L、G428S、S437Y、V441I、S447Y、G465R、I475V、C515S、C526S、R527L、R531（ナンセンス）、V536M、L541I、P546Q、C571S、G588S、P589L、P596L、P596S、P596R、P596L、G598V、G598A、E602G、G614D、C620Y、C620W、C628Y、C628F、C636Y、T638M、P641H、S645C、V651M、R671C、V689M、P694S、N700D、E709A、E709K、E709Q、E709K、F712L、K714N、I715S、K716R、G719A、G719C、G719D、G719S、S720C、S720F、G721V、W731Stop、P733L、K739-I744（挿入）、V742I、V742A、E746-A750（欠失）、E746K、L747S、L747-E749（欠失）、L747-T751（欠失）、L747-P753（欠失）、G746-S752（欠失）、T751I、S752Y、K754（欠失）、S752-I759（欠失）、A750P、D761-E762（例えば、残基EAFQ挿入（SEQ ID NO: 2110））、D761N、D761Y、A763V、V765A、A767-S768（例えば、残基TLA挿入）、A767-V769（例えば、残基ASV挿入）、S768I、S768T、V769L、V769M、V769-D770（例えば、残基Y挿入）、770-771（例えば、残基GL挿入）、770-771（例えば、残基G挿入）、770-771（例えば、残基CV挿入）、770-771（例えば、残基SVD挿入）、P772R、773-774（例えば、残基NPH挿入）、H773R、H773L、V774M、774-775（例えば、残基HV挿入）、R776H、R776C、G779F、T783A、T784F、T854A、V786L、T790M、L792P、P794H、L798F、R803W、H805R、D807H、G810S、N826S、Y827（ナンセンス）、R831H、R832C、R832H、L833F、L833V、H835L、D837V、L838M、L838P、A839V、N842H、V843L、T847K、T847I、H850N、V851A、I853T、F856L、L858R、L858M、L861Q、L861R、G863D、Q894L、G917A、E967A、D1006Y、P1019L、S1042N、R1100S、H1129Y、T1141S、S1153I、Q1164R、L1167M、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の突然変異を含む。

【0102】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むEGFR DNAある

10

20

30

40

50

いはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン18、エクソン19、エクソン20、エクソン21、エクソン22、あるいはこれらの組み合わせ中の1つ以上の突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0103】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基34、38、45、62、63、77、78、108、114、120、140、148、149、160、177、178、189、191、198、220、222、223、229、237、240、244、252、254、255、256、263、270、273、276、282、288、289、301、303、304、309、314、326、331、354、363、373、337、380、384、393、427、428、437、441、447、465、475、515、526、527、531、536、541、546、571、588、589、596、596、598、602、614、620、628、636、641、645、651、671、689、694、700、709、712、714、715、716、719、720、721、731、733、739-744、742、746-750、746-752、746、747、747-749、747-751、747-753、751、752、754、752-759、750、761-762、761、763、765、767-768、767-769、768、769、769-770、770-771、772、773-774、773、774、774-775、776、779、783、784、786、790、792、794、798、803、805、807、810、826、827、831、832、833、835、837、838、839、842、843、847、850、851、853、854、856、858、861、863、894、917、967、1006、1019、1042、1100、1129、1141、1153、1164、1167、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置に1つ以上の突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFR DNAあるいはRNAは、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基747、761、790、854、858、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基747に対応する位置で突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基761に対応する位置で突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基790に対応する位置で突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基854に対応する位置で突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFRポリペプチドのアミノ酸残基858に対応する位置で突然変異を含むEGFR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0104】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、EGFRポリペプチドのT34M、L38V、E45Q、L62R、G63R、G63K、S77F、F78L、R108K、R108G、E114K、A120P、L140V、V148M、R149W、E160K、S177P、M178I、K189T、D191N、S198R、S220P、R222L、R222C、S223Y、S229C、A237Y、C240Y、R244G、

R 2 5 2 C、R 2 5 2 P、F 2 5 4 I、R 2 5 5（ナンセンス突然変異）、D 2 5 6 Y、
T 2 6 3 P、Y 2 7 0 C、T 2 7 3 A、Q 2 7 6（ナンセンス）、E 2 8 2 K、G 2 8 8
（フレームシフト）、A 2 8 9 D、A 2 8 9 V、A 2 8 9 T、A 2 8 9 N、A 2 8 9 D、
V 3 0 1（欠失）、D 3 0 3 H、H 3 0 4 Y、R 3 0 9 Q、D 3 1 4 N、C 3 2 6 R、G
3 3 1 R、T 3 5 4 M、T 3 6 3 I、P 3 7 3 Q、R 3 3 7 S、S 3 8 0（フレームシフ
ト）、T 3 8 4 S、D 3 9 3 Y、R 4 2 7 L、G 4 2 8 S、S 4 3 7 Y、V 4 4 1 I、S
4 4 7 Y、G 4 6 5 R、I 4 7 5 V、C 5 1 5 S、C 5 2 6 S、R 5 2 7 L、R 5 3 1（
ナンセンス）、V 5 3 6 M、L 5 4 1 I、P 5 4 6 Q、C 5 7 1 S、G 5 8 8 S、P 5 8
9 L、P 5 9 6 L、P 5 9 6 S、P 5 9 6 R、P 5 9 6 L、G 5 9 8 V、G 5 9 8 A、E
6 0 2 G、G 6 1 4 D、C 6 2 0 Y、C 6 2 0 W、C 6 2 8 Y、C 6 2 8 F、C 6 3 6 Y
、T 6 3 8 M、P 6 4 1 H、S 6 4 5 C、V 6 5 1 M、R 6 7 1 C、V 6 8 9 M、P 6 9
4 S、N 7 0 0 D、E 7 0 9 A、E 7 0 9 K、E 7 0 9 Q、E 7 0 9 K、F 7 1 2 L、K
7 1 4 N、I 7 1 5 S、K 7 1 6 R、G 7 1 9 A、G 7 1 9 C、G 7 1 9 D、G 7 1 9 S
、S 7 2 0 C、S 7 2 0 F、G 7 2 1 V、W 7 3 1 S t o p、P 7 3 3 L、K 7 3 9 - I
7 4 4（挿入）、V 7 4 2 I、V 7 4 2 A、E 7 4 6 - A 7 5 0（欠失）、E 7 4 6 K、
L 7 4 7 S、L 7 4 7 - E 7 4 9（欠失）、L 7 4 7 - T 7 5 1（欠失）、L 7 4 7 - P
7 5 3（欠失）、G 7 4 6 - S 7 5 2（欠失）、T 7 5 1 I、S 7 5 2 Y、K 7 5 4（欠
失）、S 7 5 2 - I 7 5 9（欠失）、A 7 5 0 P、D 7 6 1 - E 7 6 2（例えば、残基 E
A F Q 挿入（S E Q I D N O： 2 1 1 0））、D 7 6 1 N、D 7 6 1 Y、A 7 6 3 V
、V 7 6 5 A、A 7 6 7 - S 7 6 8（例えば、残基 T L A 挿入）、A 7 6 7 - V 7 6 9（
例えば、残基 A S V 挿入）、S 7 6 8 I、S 7 6 8 T、V 7 6 9 L、V 7 6 9 M、V 7 6
9 - D 7 7 0（例えば、残基 Y 挿入）、7 7 0 - 7 7 1（例えば、残基 G L 挿入）、7 7
0 - 7 7 1（例えば、残基 G 挿入）、7 7 0 - 7 7 1（例えば、残基 C V 挿入）、7 7 0
- 7 7 1（例えば、残基 S V D 挿入）、P 7 7 2 R、7 7 3 - 7 7 4（例えば、残基 N P
H 挿入）、H 7 7 3 R、H 7 7 3 L、V 7 7 4 M、7 7 4 - 7 7 5（例えば、残基 H V 挿
入）、R 7 7 6 H、R 7 7 6 C、G 7 7 9 F、T 7 8 3 A、T 7 8 4 F、T 8 5 4 A、V
7 8 6 L、T 7 9 0 M、L 7 9 2 P、P 7 9 4 H、L 7 9 8 F、R 8 0 3 W、H 8 0 5 R
、D 8 0 7 H、G 8 1 0 S、N 8 2 6 S、Y 8 2 7（ナンセンス）、R 8 3 1 H、R 8 3
2 C、R 8 3 2 H、L 8 3 3 F、L 8 3 3 V、H 8 3 5 L、D 8 3 7 V、L 8 3 8 M、L
8 3 8 P、A 8 3 9 V、N 8 4 2 H、V 8 4 3 L、T 8 4 7 K、T 8 4 7 I、H 8 5 0 N
、V 8 5 1 A、I 8 5 3 T、F 8 5 6 L、L 8 5 8 R、L 8 5 8 M、L 8 6 1 Q、L 8 6
1 R、G 8 6 3 D、Q 8 9 4 L、G 9 1 7 A、E 9 6 7 A、D 1 0 0 6 Y、P 1 0 1 9 L
、S 1 0 4 2 N、R 1 1 0 0 S、H 1 1 2 9 Y、T 1 1 4 1 S、S 1 1 5 3 I、Q 1 1 6
4 R、L 1 1 6 7 M、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の突然変異を
含む E G F R DNA あるいは R N A の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施
形態において、ポリ核酸分子は、E G F R ポリペプチドの L 7 4 7 S、D 7 6 1 Y、T 7
9 0 M、T 8 5 4 A、L 8 5 8 R、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の
突然変異を含む E G F R DNA あるいは R N A の標的領域にハイブリダイズする。い
くつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、E G F R ポリペプチドの D 7 6 1 Y、T 7
9 0 M、L 8 5 8 R、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の突然変異を
含む E G F R DNA あるいは R N A の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施
形態において、ポリ核酸分子は、E G F R ポリペプチドの突然変異 L 7 4 7 S を含む E G
F R DNA あるいは R N A の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態にお
いて、ポリ核酸分子は、E G F R ポリペプチドの突然変異 D 7 6 1 Y を含む E G F R D
NA あるいは R N A の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポ
リ核酸分子は、E G F R ポリペプチドの突然変異 T 7 9 0 M を含む E G F R DNA ある
いは R N A の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分
子は、E G F R ポリペプチドの突然変異 T 8 5 4 A を含む E G F R DNA あるいは R N
A の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、E
G F R ポリペプチドの突然変異 L 8 5 8 R を含む E G F R DNA あるいは R N A の標的

10

20

30

40

50

領域にハイブリダイズする。

【0105】

アンドロゲン受容体（AR）を標的とするポリ核酸分子

アンドロゲン受容体（AR）（NR3C4、核受容体サブファミリー3、群C、遺伝子4としても知られている）は、関連するメンバー：エストロゲン受容体（ER）、グルココルチコイド受容体（GR）、プロゲステロン受容体（PR）、およびミネラルコルチコイド受容体（MR）と共に、核受容体スーパーファミリーのステロイドホルモン群に属する。アンドロゲンあるいはステロイドホルモンは、アンドロゲン受容体によってタンパク質合成と組織リモデリングを調節する。ARタンパク質は、標的遺伝子発現を調節するリガンド誘導可能なジンクフィンガー転写因子である。AR遺伝子中の突然変異の存在は、いくつかのタイプの癌（例えば、前立腺癌、乳癌、膀胱癌、あるいは食道癌）で観察され、いくつかの例では、転移の進行に関与していた。

10

【0106】

いくつかの実施形態において、AR DNAあるいはRNAは野生型であるか、あるいは、1つ以上の突然変異および／またはスプライス変異体を含む。いくつかの例では、AR DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、AR DNAあるいはRNAは、限定されないが、AR1/2/2b、ARV2、ARV3、ARV4、AR1/2/3/2b、ARV5、ARV6、ARV7、ARV9、ARV10、ARV11、ARV12、ARV13、ARV14、ARV15、ARV16、およびARV（v567es）を含むARスプライス変異体から選択された1つ以上のスプライス変異体を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、突然変異（例えば、置換、欠失、あるいは追加）あるいはスプライス変異体を含む、AR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

20

【0107】

いくつかの実施形態において、AR DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、AR DNAあるいはRNAは、1つ以上のエクソン内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、1つ以上のエクソンは、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、あるいはエクソン8を含む。いくつかの実施形態において、AR DNAあるいはRNAは、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、あるいはこれらの組み合わせ内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、AR DNAあるいはRNAは、ARポリペプチドのアミノ酸残基2、14、16、29、45、54、57、64、106、112、176、180、184、194、198、204、214、221、222、233、243、252、255、266、269、287、288、334、335、340、363、368、369、390、403、443、491、505、513、524、524、528、533、547、548、564、567、568、574、547、559、568、571、573、575、576、577、578、579、580、581、582、585、586、587、596、597、599、601、604、607、608、609、610、611、615、616、617、619、622、629、630、638、645、647、653、662、664、670、671、672、674、677、681、682、683、684、687、688、689、690、695、700、701、702、703、705、706、707、708、710、711、712、715、717、720、721、722、723、724、725、726、727、728、730、732、733、737、739、741、742、743、744、745、746、748、749、750、751、752、754、755、756、757、758、759、762、763、764、765、766、767、768、771、772、774、777、779、786、795、780、782、784、787、788、790、791、793、794、798、802、803、804、806、807、812、813、814、819、820、821、824、827、828

30

40

50

、 830、831、834、840、841、842、846、854、855、856
、 863、864、866、869、870、871、874、875、877、879
、 880、881、886、888、889、891、892、895、896、897
、 898、902、903、904、907、909、910、911、913、916
、 919、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつ
の実施形態において、AR DNAあるいはRNAは、ARポリペプチドのE2K
、 P14Q、K16N、V29M、S45T、L54S、L57Q、Q64R、Y106
C、Q112H、S176S、K180R、L184P、Q194R、E198G、G2
04S、G214R、K221N、N222D、D233K、S243L、A252V、
L255P、M266T、P269S、A287D、E288K、S334P、S335
T、P340L、Y363N、L368V、A369P、P390R、P390S、P3
90L、A403V、Q443R、G491S、G505D、P513S、G524D、
G524S、D528G、P533S、L547F、P548S、D564Y、S567
F、G568W、L574P、L547F、C559Y、G568W、G568V、Y5
71C、Y571H、A573D、T575A、C576R、C576F、G577R、
S578T、C579Y、C579F、K580R、V581F、F582Y、F582
S、R585K、A586V、A587S、A596T、A596S、S597G、S5
97I、N599Y、C601F、D604Y、R607Q、R608K、K609N、
D610T、C611Y、R615H、R615P、R615G、R616C、L616
R、L616P、R617P、C619Y、A622V、R629W、R629Q、K6
30T、L638M、A645D、S647N、E653K、S662（ナンセンス）、
I664N、Q670L、Q670R、P671H、I672T、L674P、L677
P、E681L、P682T、G683A、V684I、V684A、A687V、G6
88Q、H689P、D690V、D695N、D695V、D695H、L700M、
L701P、L701I、H701H、S702A、S703G、N705S、N705
Y、E706（ナンセンス）、L707R、G708A、R710T、Q711E、L7
12F、V715M、K717Q、K720E、A721T、L722F、P723S、
G724S、G724D、G724N、F725L、R726L、N727K、L728
S、L728I、V730M、D732N、D732Y、D732E、Q733H、I7
37T、Y739D、W741R、M742V、M742I、G743R、G743V、
L744F、M745T、V746M、A748D、A748V、A748T、M749
V、M749I、G750S、G750D、W751R、R752Q、F754V、F7
54L、T755A、N756S、N756D、V757A、N758T、S759F、
S759P、L762F、Y763H、Y763C、F764L、A765T、A765
V、P766A、P766S、D767E、L768P、L768M、N771H、E7
72G、E772A、R774H、R774C、K777T、R779W、R786Q、
G795V、M780I、S782N、C784Y、M787V、R788S、L790
F、S791P、E793D、F794S、Q798E、Q802R、G803L、F8
04L、C806Y、M807V、M807R、M807I、L812P、F813V、
S814N、N819Q、G820A、L821V、Q824L、Q824R、F827
L、F827V、D828H、L830V、L830P、R831Q、R831L、Y8
34C、R840C、R840H、I841S、I842T、R846G、R854K、
R855C、R855H、F856L、L863R、D864N、D864E、D864
G、V866L、V866M、V866E、I869M、A870G、A870V、R8
71G、H874Y、H874R、Q875K、T877S、T877A、D879T、
D879G、L880Q、L881V、M886V、S888L、V889M、F891
L、P892L、M895T、A896T、E897D、I898T、Q902R、V9
03M、P904S、P904H、L907F、G909R、G909E、K910R、
V911L、P913S、F916L、Q919R、あるいはこれらの組み合わせから選
択されたアミノ酸残基に対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。

10

20

30

40

50

【0108】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むAR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸は、1つ以上のARスプライス変異体にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸は、限定されないが、AR1/2/2b、ARV2、ARV3、ARV4、AR1/2/3/2b、ARV5、ARV6、ARV7、ARV9、ARV10、ARV11、ARV12、ARV13、ARV14、ARV15、ARV16、およびARV(v567es)を含む1つ以上のスプライス変異体を含むAR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン1、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、あるいはこれらの組み合わせ内に1つ以上の突然変異を含むAR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、アミノ酸残基2、14、16、29、45、54、57、64、106、112、176、180、184、194、198、204、214、221、222、233、243、252、255、266、269、287、288、334、335、340、363、368、369、390、403、443、491、505、513、524、524、528、533、547、548、564、567、568、574、547、559、568、571、573、575、576、577、578、579、580、581、582、585、586、587、596、597、599、601、604、607、608、609、610、611、615、616、617、619、622、629、630、638、645、647、653、662、664、670、671、672、674、677、681、682、683、684、687、688、689、690、695、700、701、702、703、705、706、707、708、710、711、712、715、717、720、721、722、723、724、725、726、727、728、730、732、733、737、739、741、742、743、744、745、746、748、749、750、751、752、754、755、756、757、758、759、762、763、764、765、766、767、768、771、772、774、777、779、786、795、780、782、784、787、788、790、791、793、794、798、802、803、804、806、807、812、813、814、819、820、821、824、827、828、830、831、834、840、841、842、846、854、855、856、863、864、866、869、870、871、874、875、877、879、880、881、886、888、889、891、892、895、896、897、898、902、903、904、907、909、910、911、913、916、919、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含むAR DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、ARポリペプチドのE2K、P14Q、K16N、V29M、S45T、L54S、L57Q、Q64R、Y106C、Q112H、S176S、K180R、L184P、Q194R、E198G、G204S、G214R、K221N、N222D、D233K、S243L、A252V、L255P、M266T、P269S、A287D、E288K、S334P、S335T、P340L、Y363N、L368V、A369P、P390R、P390S、P390L、A403V、Q443R、G491S、G505D、P513S、G524D、G524S、D528G、P533S、L547F、P548S、D564Y、S567F、G568W、L574P、L547F、C559Y、G568W、G568V、Y571C、Y571H、A573D、T575A、C576R、C576F、G577R、S578T、C579Y、C579F、K580R、V581F、F582Y、F582S、R585K、A586V、A587S、A596T、A596S、S597G、S597I、N599Y、C601F、D604Y、R607Q、R608K、K609N、D610T、C611Y、R615H、R615P、R615G、R616C、L616R、

10

20

30

40

50

L 6 1 6 P、R 6 1 7 P、C 6 1 9 Y、A 6 2 2 V、R 6 2 9 W、R 6 2 9 Q、K 6 3 0 T、L 6 3 8 M、A 6 4 5 D、S 6 4 7 N、E 6 5 3 K、S 6 6 2 (ナンセンス)、I 6 6 4 N、Q 6 7 0 L、Q 6 7 0 R、P 6 7 1 H、I 6 7 2 T、L 6 7 4 P、L 6 7 7 P、E 6 8 1 L、P 6 8 2 T、G 6 8 3 A、V 6 8 4 I、V 6 8 4 A、A 6 8 7 V、G 6 8 8 Q、H 6 8 9 P、D 6 9 0 V、D 6 9 5 N、D 6 9 5 V、D 6 9 5 H、L 7 0 0 M、L 7 0 1 P、L 7 0 1 I、H 7 0 1 H、S 7 0 2 A、S 7 0 3 G、N 7 0 5 S、N 7 0 5 Y、E 7 0 6 (ナンセンス)、L 7 0 7 R、G 7 0 8 A、R 7 1 0 T、Q 7 1 1 E、L 7 1 2 F、V 7 1 5 M、K 7 1 7 Q、K 7 2 0 E、A 7 2 1 T、L 7 2 2 F、P 7 2 3 S、G 7 2 4 S、G 7 2 4 D、G 7 2 4 N、F 7 2 5 L、R 7 2 6 L、N 7 2 7 K、L 7 2 8 S、L 7 2 8 I、V 7 3 0 M、D 7 3 2 N、D 7 3 2 Y、D 7 3 2 E、Q 7 3 3 H、I 7 3 7 T、Y 7 3 9 D、W 7 4 1 R、M 7 4 2 V、M 7 4 2 I、G 7 4 3 R、G 7 4 3 V、L 7 4 4 F、M 7 4 5 T、V 7 4 6 M、A 7 4 8 D、A 7 4 8 V、A 7 4 8 T、M 7 4 9 V、M 7 4 9 I、G 7 5 0 S、G 7 5 0 D、W 7 5 1 R、R 7 5 2 Q、F 7 5 4 V、F 7 5 4 L、T 7 5 5 A、N 7 5 6 S、N 7 5 6 D、V 7 5 7 A、N 7 5 8 T、S 7 5 9 F、S 7 5 9 P、L 7 6 2 F、Y 7 6 3 H、Y 7 6 3 C、F 7 6 4 L、A 7 6 5 T、A 7 6 5 V、P 7 6 6 A、P 7 6 6 S、D 7 6 7 E、L 7 6 8 P、L 7 6 8 M、N 7 7 1 H、E 7 7 2 G、E 7 7 2 A、R 7 7 4 H、R 7 7 4 C、K 7 7 7 T、R 7 7 9 W、R 7 8 6 Q、G 7 9 5 V、M 7 8 0 I、S 7 8 2 N、C 7 8 4 Y、M 7 8 7 V、R 7 8 8 S、L 7 9 0 F、S 7 9 1 P、E 7 9 3 D、F 7 9 4 S、Q 7 9 8 E、Q 8 0 2 R、G 8 0 3 L、F 8 0 4 L、C 8 0 6 Y、M 8 0 7 V、M 8 0 7 R、M 8 0 7 I、L 8 1 2 P、F 8 1 3 V、S 8 1 4 N、N 8 1 9 Q、G 8 2 0 A、L 8 2 1 V、Q 8 2 4 L、Q 8 2 4 R、F 8 2 7 L、F 8 2 7 V、D 8 2 8 H、L 8 3 0 V、L 8 3 0 P、R 8 3 1 Q、R 8 3 1 L、Y 8 3 4 C、R 8 4 0 C、R 8 4 0 H、I 8 4 1 S、I 8 4 2 T、R 8 4 6 G、R 8 5 4 K、R 8 5 5 C、R 8 5 5 H、F 8 5 6 L、L 8 6 3 R、D 8 6 4 N、D 8 6 4 E、D 8 6 4 G、V 8 6 6 L、V 8 6 6 M、V 8 6 6 E、I 8 6 9 M、A 8 7 0 G、A 8 7 0 V、R 8 7 1 G、H 8 7 4 Y、H 8 7 4 R、Q 8 7 5 K、T 8 7 7 S、T 8 7 7 A、D 8 7 9 T、D 8 7 9 G、L 8 8 0 Q、L 8 8 1 V、M 8 8 6 V、S 8 8 8 L、V 8 8 9 M、F 8 9 1 L、P 8 9 2 L、M 8 9 5 T、A 8 9 6 T、E 8 9 7 D、I 8 9 8 T、Q 9 0 2 R、V 9 0 3 M、P 9 0 4 S、P 9 0 4 H、L 9 0 7 F、G 9 0 9 R、G 9 0 9 E、K 9 1 0 R、V 9 1 1 L、P 9 1 3 S、F 9 1 6 L、Q 9 1 9 R、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の突然変異を含むA R D N AあるいはR N Aの標的領域にハイブリダイズする。

【0109】

B-カテニンおよびB-カテニン関連遺伝子を標的とするポリ核酸分子

カテニン β -1 (CTNNB1、 β -カテニンあるいはベーターカテニンとしても知られている)は、カテニタンパク質ファミリーのメンバーである。ヒトでは、それはCTNNB1遺伝子によってコードされ、その二元機能—細胞間癒着と遺伝子転写—が知られている。ベーターカテニンはカドヘリンベースの接着結合の不可欠な構成成分であり、細胞間の細胞成長と接着を調節し、アクチン細胞骨格を固定する。いくつかの例において、ベーターカテニンは、上皮のシートが完成すると細胞に分割を停止させる接触阻害シグナルを送信することに関与する。ベーターカテニンはWntシグナル伝達経路の鍵となる核エフェクターでもある。いくつかの例では、ベーターカテニンの構造的なシグナル伝達特性の不均衡は、様々な疾患と、癌などの悪性病変に関係する無秩序な成長を引き起こす。例えば、ベーターカテニンの過剰発現は、胃癌などの癌に関連している (Suriano, et al., "Beta-catenin (CTNNB1) gene amplification: a new mechanism of protein overexpression in cancer," *Genes Chromosomes Cancer* 42 (3): 238-246 (2005))。場合によっては、CTNNB1遺伝子中の突然変異は、癌の発生 (例えば、結腸癌、黒色腫、肝細胞癌、卵巣癌、子宮内膜癌、髄芽腫毛母腫、あるいは前立腺癌) に関与しており、いくつかの例では、転移の進行

に關与している。さらなる場合には、CTNNB1 遺伝子中の突然変異は、外部刺激なくベータ-カテニンを核に移動させ、その標的遺伝子の転写を連続的に駆動させる。場合によっては、影響を受けた細胞の以前の上皮表現型を、浸潤性の間葉様のタイプに変化させるベータ-カテニンの可能性は、転移形成に寄与する。

【0110】

いくつかの実施形態において、CTNNB1 遺伝子は、野生型CTNNB1、あるいは1つ以上の突然変異を含むCTNNB1である。いくつかの例では、CTNNB1は野生型CTNNB1である。いくつかの例では、CTNNB1は1つ以上の突然変異を含むCTNNB1である。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、野生型のCTNNB1の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、突然変異（例えば、置換、欠失、あるいは追加）を含む、CTNNB1の標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。

【0111】

いくつかの実施形態において、CTNNB1 DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、CTNNB1 DNAあるいはRNAは、1つ以上のエクソン内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例において、1つ以上のエクソンはエクソン3を含む。いくつかの例では、CTNNB1 DNAあるいはRNAは、コドン32、33、34、37、41、45、183、245、287、あるいはこれらの組み合わせで1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、CTNNB1 DNAあるいはRNAは、CTNNB1ポリペプチドのアミノ酸残基25、31、32、33、34、35、36、37、41、45、140、162、170、199、213、215、257、303、322、334、354、367、373、383、387、402、426、453、474、486、515、517、535、553、555、582、587、619、623、641、646、688、703、710、712、714、724、738、777、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、CTNNB1 DNAあるいはRNAは、CTNNB1ポリペプチドのW25（ナンセンス突然変異）、L31M、D32A、D32N、D32Y、D32G、D32H、S33C、S33Y、S33F、S33P、G34R、G34E、G34V、I35S、H36Y、S37F、S37P、S37C、S37A、T41N、T41A、T41I、S45Y、S45F、S45C、I140T、D162E、K170M、V199I、C213F、A215T、T257I、I303M、Q322K、E334K、K354T、G367V、P373S、W383G、N387K、L402F、N426D、R453L、R453Q、R474（ナンセンス突然変異）、R486C、R515Q、L517F、R535（ナンセンス突然変異）、R535Q、M553V、G555A、R582Q、R587Q、C619Y、Q623E、T641（フレームシフト）、S646F、M688T、Q703H、R710H、D712N、P714R、Y724H、E738K、F777S、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸に対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。

【0112】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むCTNNB1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン3内の1つ以上の突然変異を含むCTNNB1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、コドン32、33、34、37、41、45、183、245、287、あるいはこれらの組み合わせで1つ以上の突然変異を含むCTNNB1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、CTNNB1 DNAあるいはRNAは、CTNNB1ポリペプチドのアミノ酸残基25、31、32、33、34、35、36、37、41、45、140、162、170、199、213、215、257、303、322、334、354、367、373、383、387、402、426、453、474、486、515、517、535、553、

555、582、587、619、623、641、646、688、703、710、712、714、724、738、777、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含むCTNNB1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、CTNNB1ポリペプチドのW25（ナンセンス突然変異）、L31M、D32A、D32N、D32Y、D32G、D32H、S33C、S33Y、S33F、S33P、G34R、G34E、G34V、I35S、H36Y、S37F、S37P、S37C、S37A、T41N、T41A、T41I、S45Y、S45F、S45C、I140T、D162E、K170M、V199I、C213F、A215T、T257I、I303M、Q322K、E334K、K354T、G367V、P373S、W383G、N387K、L402F、N426D、R453L、R453Q、R474（ナンセンス突然変異）、R486C、R515Q、L517F、R535（ナンセンス突然変異）、R535Q、M553V、G555A、R582Q、R587Q、C619Y、Q623E、T641（フレームシフト）、S646F、M688T、Q703H、R710H、D712N、P714R、Y724H、E738K、F777S、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の突然変異を含むCTNNB1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0113】

いくつかの実施形態において、ベータ-カテニン関連遺伝子はさらに、PIK3CA、PIK3CB、およびMYCを含む。いくつかの実施形態において、ベータ-カテニン関連遺伝子はさらに、PIK3CA DNAあるいはRNAを含む。PIK3CA（ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスホスフェート3-キナーゼ、触媒サブユニットαあるいはp110αタンパク質）は、ホスファチジルイノシトールをリン酸化するためにATPを使用するクラスiのPI3キナーゼ触媒サブユニットである。いくつかの実施形態において、PIK3CA遺伝子は野生型PIK3CA、あるいは1つ以上の突然変異を含むPIK3CAである。いくつかの例では、PIK3CA DNAあるいはRNAは、野生型PIK3CAである。いくつかの例では、PIK3CA DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、野生型PIK3CA DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、突然変異（例えば、置換、欠失、あるいは追加）を含むPIK3CA DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0114】

いくつかの実施形態において、PIK3CA DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、PIK3CA DNAあるいはRNAは、1つ以上のエクソン内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、PIK3CA DNAあるいはRNAは、エクソン9および／または20内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、PIK3CA DNAあるいはRNAは、PIK3CAポリペプチドのアミノ酸残基1、4、10-16、11-18、11、12、38、39、65、72、75、79、81、83、88、90、93、102、103、103-104、103-106、104、105-108、106、106-107、106-108、107、108、109-112、110、111、113、115、137、170、258、272、279、320、328、335、342、344、345、350、357、359、363、364、365、366、378、398、401、417、420、447-455、449、449-457、451、453、454、455、455-460、463-465、471、495、522、538、539、542、545、546、547、576、604、614、617、629、643、663、682、725、726、777、791、818、866、901、909、939、951、958、970、971、975、992、1004、1007、1016、1017、1021、1025、1029、1037、1040、1043、1044、1045、1047、1048、1049、1052、1065、1069、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、

PIK3CA DNAあるいはRNAは、PIK3CAポリペプチドのM1V、R4（ナンセンス突然変異）、L10-M16（欠失）、W11-P18（欠失）、W11L、G12D、R38L、R38H、R38C、R38S、E39K、E39G、E65K、S72G、Q75E、R79M、E81K、E81（欠失）、F83Y、R88Q、C90Y、C90G、R93Q、R93W、I102（欠失）、E103G、E103-P104（欠失）、E103-G106（欠失）、P104L、V105-R108（欠失）、G106V、G106-N107（欠失）、G106-R108（欠失）、G106R、N107S、R108L、R108H、E109-I112（欠失）、E110（欠失）、K111E、K111R、K111N、K111（欠失）、L113（欠失）、R115L、Q137L、N170S、D258N、Y272（ナンセンス突然変異）、L279I、G320V、W328S、R335G、T342S、V344G、V344M、V344A、N345K、N345I、N345T、D350N、D350G、R357Q、G359R、G363A、G364R、E365K、E365V、P366R、C378R、C378Y、R398H、R401Q、E417K、C420R、C420G、P447-L455（欠失）、P449L、P449-N457（欠失）、G451R、G451V、E453K、E453Q、E453D、D454Y、L455（frame shift insertion）、L455-G460（欠失）、G463-N465（欠失）、P471L、P471A、H495L、H495Y、E522A、D538N、P539R、E542K、E542V、E542G、E542Q、E542A、E545K、E545A、E545G、E545Q、E545D、Q546K、Q546R、Q546P、E547D、S576Y、C604R、F614I、A617W、S629C、Q643H、I663S、Q682（欠失）、D725N、W726K、R777M、E791Q、R818C、L866W、C901F、F909L、D939G、R951C、Q958R、E970K、C971R、R975S、R992P、M1004I、G1007R、F1016C、D1017H、Y1021H、Y1021C、T1025A、T1025S、D1029H、E1037K、M1040V、M1043V、M1043I、N1044K、N1044Y、D1045V、H1047R、H1047L、H1047Y、H1047Q、H1048R、G1049R、T1052K、H1065L、1069W（ノンストップ変異）、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。

【0115】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むPIK3CA DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン内の1つ以上の突然変異を含むPIK3CA DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン9またはエクソン20内の1つ以上の突然変異を含むPIK3CA DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、PIK3CAポリペプチドのアミノ酸残基1、4、10-16、11-18、11、12、38、39、65、72、75、79、81、83、88、90、93、102、103、103-104、103-106、104、105-108、106、106-107、106-108、107、108、109-112、110、111、113、115、137、170、258、272、279、320、328、335、342、344、345、350、357、359、363、364、365、366、378、398、401、417、420、447-455、449、449-457、451、453、454、455、455-460、463-465、471、495、522、538、539、542、545、546、547、576、604、614、617、629、643、663、682、725、726、777、791、818、866、901、909、939、951、958、970、971、975、992、1004、1007、1016、1017、1021、1025、1029、1037、1040、1043、1044、1045、1047、1048、1049、1052、10

10

20

30

40

50

65、1069、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含むPIK3CA DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、PIK3CAポリペプチドのM1V、R4（ナンセンス突然変異）、L10-M16（欠失）、W11-P18（欠失）、W11L、G12D、R38L、R38H、R38C、R38S、E39K、E39G、E65K、S72G、Q75E、R79M、E81K、E81（欠失）、F83Y、R88Q、C90Y、C90G、R93Q、R93W、I102（欠失）、E103G、E103-P104（欠失）、E103-G106（欠失）、P104L、V105-R108（欠失）、G106V、G106-N107（欠失）、G106-R108（欠失）、G106R、N107S、R108L、R108H、E109-I112（欠失）、E110（欠失）、K111E、K111R、K111N、K111（欠失）、L113（欠失）、R115L、Q137L、N170S、D258N、Y272（ナンセンス突然変異）、L279I、G320V、W328S、R335G、T342S、V344G、V344M、V344A、N345K、N345I、N345T、D350N、D350G、R357Q、G359R、G363A、G364R、E365K、E365V、P366R、C378R、C378Y、R398H、R401Q、E417K、C420R、C420G、P447-L455（欠失）、P449L、P449-N457（欠失）、G451R、G451V、E453K、E453Q、E453D、D454Y、L455（frame shift insertion）、L455-G460（欠失）、G463-N465（欠失）、P471L、P471A、H495L、H495Y、E522A、D538N、P539R、E542K、E542V、E542G、E542Q、E542A、E545K、E545A、E545G、E545Q、E545D、Q546K、Q546R、Q546P、E547D、S576Y、C604R、F614I、A617W、S629C、Q643H、I663S、Q682（欠失）、D725N、W726K、R777M、E791Q、R818C、L866W、C901F、F909L、D939G、R951C、Q958R、E970K、C971R、R975S、R992P、M1004I、G1007R、F1016C、D1017H、Y1021H、Y1021C、T1025A、T1025S、D1029H、E1037K、M1040V、M1043V、M1043I、N1044K、N1044Y、D1045V、H1047R、H1047L、H1047Y、H1047Q、H1048R、G1049R、T1052K、H1065L、1069W（ノンストップ変異）、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置で1つ以上の突然変異を含むPIK3CA DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。

【0116】

いくつかの実施形態において、ベーターカテニン関連遺伝子はさらにPIK3CBを含む。いくつかの実施形態において、PIK3CB遺伝子は野生型であるか、あるいは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、PIK3CB DNAあるいはRNAは野生型PIK3CB DNAあるいはRNAである。いくつかの例では、PIK3CB DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、野生型PIK3CB DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、突然変異（例えば、置換、欠失、あるいは追加）を含むPIK3CB DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0117】

いくつかの実施形態において、PIK3CB DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、PIK3CB DNAあるいはRNAは、1つ以上のエクソン内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、PIK3CB DNAあるいはRNAは、PIK3CBポリペプチドのアミノ酸残基18、19、21、28、50、61、68、103、135、140、167、252、270、290、301、304、321、369、417、442、470、497、507、512、540、551、552、554、562、567、593、595、619、628、6

68、768、805、824、830、887、967、992、1005、1020、1036、1046、1047、1048、1049、1051、1055、1067、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、PIK3CB DNAあるいはRNAは、PIK3CBポリペプチドのW18（ナンセンス突然変異）、A19V、D21H、G28S、A50P、K61T、M68I、R103K、H135N、L140S、S167C、G252W、R270W、K290N、E301V、I304R、R321Q、V369I、T417M、N442K、E470K、E497D、P507S、I512M、E540（ナンセンス突然変異）、C551R、E552K、E554K、R562（ナンセンス突然変異）、E567D、A593V、L595P、V619A、R628（ナンセンス突然変異）、R668W、L768F、K805E、D824E、A830T、E887（ナンセンス突然変異）、V967A、I992T、A1005V、D1020H、E1036K、D1046N、E1047K、A1048V、L1049R、E1051K、T1055A、D1067V、D1067A、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。

【0118】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むPIK3CB DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン内の1つ以上の突然変異を含むPIK3CB DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、PIK3CBポリペプチドのアミノ酸残基18、19、21、28、50、61、68、103、135、140、167、252、270、290、301、304、321、369、417、442、470、497、507、512、540、551、552、554、562、567、593、595、619、628、668、768、805、824、830、887、967、992、1005、1020、1036、1046、1047、1048、1049、1051、1055、1067、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含むPIK3CB DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、PIK3CBポリペプチドのW18（ナンセンス突然変異）、A19V、D21H、G28S、A50P、K61T、M68I、R103K、H135N、L140S、S167C、G252W、R270W、K290N、E301V、I304R、R321Q、V369I、T417M、N442K、E470K、E497D、P507S、I512M、E540（ナンセンス突然変異）、C551R、E552K、E554K、R562（ナンセンス突然変異）、E567D、A593V、L595P、V619A、R628（ナンセンス突然変異）、R668W、L768F、K805E、D824E、A830T、E887（ナンセンス突然変異）、V967A、I992T、A1005V、D1020H、E1036K、D1046N、E1047K、A1048V、L1049R、E1051K、T1055A、D1067V、D1067A、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置で1つ以上の突然変異を含むPIK3CB DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0119】

いくつかの実施形態において、ベーターカテニン関連遺伝子はさらにMYCを含む。いくつかの実施形態において、MYC遺伝子は野生型MYC、あるいは1つ以上の突然変異を含むMYCである。いくつかの例では、MYCは野生型MYC DNAあるいはRNAである。いくつかの例では、MYC DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、野生型MYC DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、突然変異（例えば、置換、欠失、あるいは追加）を含む、MYC DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズするポリ核酸分子である。

【0120】

いくつかの実施形態において、MYC DNAあるいはRNAは1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、MYC DNAあるいはRNAは、1つ以上のエクソン内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、MYC DNAあるいはRNAは、エクソン2またはエクソン3内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、MYC DNAあるいはRNAは、MYCポリペプチドのアミノ酸残基2、7、17、20、32、44、58、59、76、115、138、141、145、146、169、175、188、200、202、203、248、251、298、321、340、369、373、374、389、395、404、419、431、439、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、MYC DNAあるいはRNAは、P2L、F7L、D17N、Q20E、Y32N、A44V、A44T、T58I、P59L、A76V、F115L、F138S、A141S、V145I、S146L、S169C、S175N、C188F、N200S、S202N、S203T、T248S、D251E、S298Y、Q321E、V340D、V369D、T373K、H374R、F389L、Q395H、K404N、L419M、E431K、R439Q、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。

【0121】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むMYC DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン内の1つ以上の突然変異を含むMYC DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン2またはエクソン3内に1つ以上の突然変異を含むMYC DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、MYCポリペプチドのアミノ酸残基2、7、17、20、32、44、58、59、76、115、138、141、145、146、169、175、188、200、202、203、248、251、298、321、340、369、373、374、389、395、404、419、431、439、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含むMYC DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、MYCポリペプチドのP2L、F7L、D17N、Q20E、Y32N、A44V、A44T、T58I、P59L、A76V、F115L、F138S、A141S、V145I、S146L、S169C、S175N、C188F、N200S、S202N、S203T、T248S、D251E、S298Y、Q321E、V340D、V369D、T373K、H374R、F389L、Q395H、K404N、L419M、E431K、R439Q、あるいはこれらの組み合わせから選択されたアミノ酸残基に対応する位置で1つ以上の突然変異を含むMYC DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0122】

ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPRT1）を標的とするポリ核酸分子

ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）は、ヒポキサンチンのイノシンーリン酸への、および、グアニンのグアノシンーリン酸への転換を触媒するトランスフェラーゼである。HGPRTはヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPRT1）遺伝子によってコードされる。

【0123】

いくつかの実施形態において、HPRT1 DNAあるいはRNAは野生型であるか、あるいは、1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、HPRT1 DNAあるいはRNAは、1つ以上のエクソン内に1つ以上の突然変異を含む。いくつかの例では、1つ以上のエクソンは、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン6、エクソン8、あるいはエクソン9を含む。いくつかの例では、HPRT1 DNAあるいはRNAは、HPRT1ポリペプチドのアミノ酸残基35、48、56、74、87、129、154、

162、195、200、210、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、HPRT1ポリペプチドのV35M、R48H、E56D、F74L、R87I、N129（スプライス部位突然変異）、N154H、S162（スプライス部位突然変異）、Y195C、Y195N、R200M、E210K、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の突然変異を含むHPRT1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0124】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の突然変異を含むHPRT1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン6、エクソン8、あるいはエクソン9内の1つ以上の突然変異を含むHPRT1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、HPRT1ポリペプチドのアミノ酸残基35、48、56、74、87、129、154、162、195、200、210、あるいはこれらの組み合わせに対応する位置で1つ以上の突然変異を含むHPRT1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、HPRT1ポリペプチドのV35M、R48H、E56D、F74L、R87I、N129（スプライス部位突然変異）、N154H、S162（スプライス部位突然変異）、Y195C、Y195N、R200M、E210K、あるいはこれらの組み合わせから選択された1つ以上の突然変異を含むHPRT1 DNAあるいはRNAの標的領域にハイブリダイズする。

【0125】

ポリ核酸分子配列

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、表1、3、5、6、あるいは7に例示される標的配列にハイブリダイズする配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はBである。いくつかの例では、ポリ核酸分子Bは、表1に例示される標的配列（KRAS標的配列）にハイブリダイズする配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子Bは、表3に例示される標的配列（EGFR標的配列）にハイブリダイズする配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子Bは、表5に例示される標的配列（AR標的配列）にハイブリダイズする配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子Bは、表6に例示される標的配列（β-カテニン標的配列）にハイブリダイズする配列を含む。追加の例では、ポリ核酸分子Bは、表7に例示される標的配列（PIK3CAとPIK3CBの標的配列）にハイブリダイズする配列を含む。

【0126】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、表2で列挙される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 165-45に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも50%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも60%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも85%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも90

%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも96%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも97%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45からなる。

10

【0127】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第1のポリヌクレオチドと、SEQ ID NO: 16-45に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第2のポリヌクレオチドを含む。

20

【0128】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、表4で列挙される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも50%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも60%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも85%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも96%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも97%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対

30

40

50

して少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173からなる。

【0129】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第1のポリヌクレオチドと、SEQ ID NO: 422-1173に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第2のポリヌクレオチドを含む。

【0130】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、表8で列挙される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも50%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも60%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも85%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも96%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも97%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214に対して少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1195-1214からなる。

【0131】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは第1のポリヌクレオチドと第2のポリ

ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 1195-1214に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 1195-1214に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列に相補的である配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1195-1214に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第1のポリヌクレオチドと、SEQ ID NO : 1195-1214に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列に相補的である第2のポリヌクレオチドを含む。

【0132】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは、表9で列挙される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも60%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも85%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも96%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも97%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1215-1242からなる。

【0133】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO : 1215-1242に対して少なくとも50%、55%、60%、

65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1215-1242に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第1のポリヌクレオチドと、SEQ ID NO: 1215-1242に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第2のポリヌクレオチドを含む。

【0134】

ポリ核酸分子

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子はRNAまたはDNAを含む。場合によっては、ポリ核酸分子はRNAを含む。いくつかの例では、RNAは低分子干渉RNA (siRNA)、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、二本鎖RNA (dsRNA)、転移RNA (tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、またはヘテロ核RNA (hnRNA)を含む。いくつかの例では、RNAはshRNAを含む。いくつかの例では、RNAはmiRNAを含む。いくつかの例では、RNAはdsRNAを含む。いくつかの例では、RNAはtRNAを含む。いくつかの例では、RNAはrRNAを含む。いくつかの例では、RNAはhnRNAを含む。いくつかの例では、RNAはsiRNAを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はsiRNAを含む。場合によっては、BはsiRNAを含む。

【0135】

いくつかの実施形態では、核酸ポリマーは、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、約10から約30、約15から約30、約18から約25、約18から約24、約19から約23、あるいは約20から約22ヌクレオチド長さである。

【0136】

いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約19ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約18ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約17ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約16ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約15ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約14ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約13ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約12ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約11ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約15から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約15から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約12から約30ヌクレオチド長さである。

【0137】

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

のポリヌクレオチドは、約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約19ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約18ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約17ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約16ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約15ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約14ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約13ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約12ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約11ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約15から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約15から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約12から約30ヌクレオチド長さである。

【0142】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はさらに平滑末端、オーバーハングあるいはその組み合わせを含む。いくつかの例では、平滑末端は、5'平滑末端、3'平滑末端、あるいはその両方である。場合によっては、オーバーハングは5'オーバーハング、3'オーバーハング、またはその両方である。場合によっては、オーバーハングは1、2、3、4、5、6、7、8、9、あるいは10の非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは1、2、3、4、5、あるいは6の非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは1、2、3、あるいは4の非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは1つの非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは2つの非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは3つの非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは4つの非塩基対ヌクレオチドを含む。

【0143】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は、本明細書に記載された標的配列に対して、少なくとも40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、あるいは99.5%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも50%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも60%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも70%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも80%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも90%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも95%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも99%相補的である。いくつかの例では、ポリ核酸分子の配列は本明細書に

記載された標的配列に 100% 相補的である。

【0144】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 5 つ以下のミスマッチを有する。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 4 つ以下のミスマッチを有する。場合によっては、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 3 つ以下のミスマッチを有し得る。場合によっては、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 2 つ以下のミスマッチを有し得る。場合によっては、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 1 つ以下のミスマッチを有し得る。

【0145】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された標的配列にハイブリダイズするポリ核酸分子の特異性は、標的配列に対するポリ核酸分子の 95%、98%、99%、99.5%、あるいは 100% の配列相補性である。いくつかの例では、ハイブリダイゼーションは高いストリンジェントなハイブリダイゼーション状態である。

【0146】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、あるいはそれ以上の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 8 つの隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 9 つの隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 10 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 11 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 12 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 13 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 14 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 15 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 16 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 17 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 18 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 19 の隣接する塩基にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載される標的配列の少なくとも 20 の隣接する塩基にハイブリダイズする。

【0147】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はオフターゲット効果を減少させた。いくつかの例において、「オフターゲット」あるいは「オフターゲット効果」とは、所定の標的に対するポリ核酸ポリマーが、別の mRNA 配列、DNA 配列、あるいは細胞タンパク質またはその他の部分を直接的あるいは間接的に相互作用することによって意図しない効果を引き起こすあらゆる例を指す。いくつかの例では、その他の転写産物とポリ核酸分子のセンスおよび／またはアンチセンス鎖との間の部分的な相同性あるいは相補性によって他の転写産物の同時の分解がある場合に、「オフターゲット効果」が生じる。

【0148】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、天然、合成、または人工ヌクレオチドアナログまたは塩基を含む。場合によっては、ポリ核酸分子は、DNA、RNA、および／またはヌクレオチドアナログの組み合わせを含む。いくつかの例では、合成または人工

10

20

30

40

50

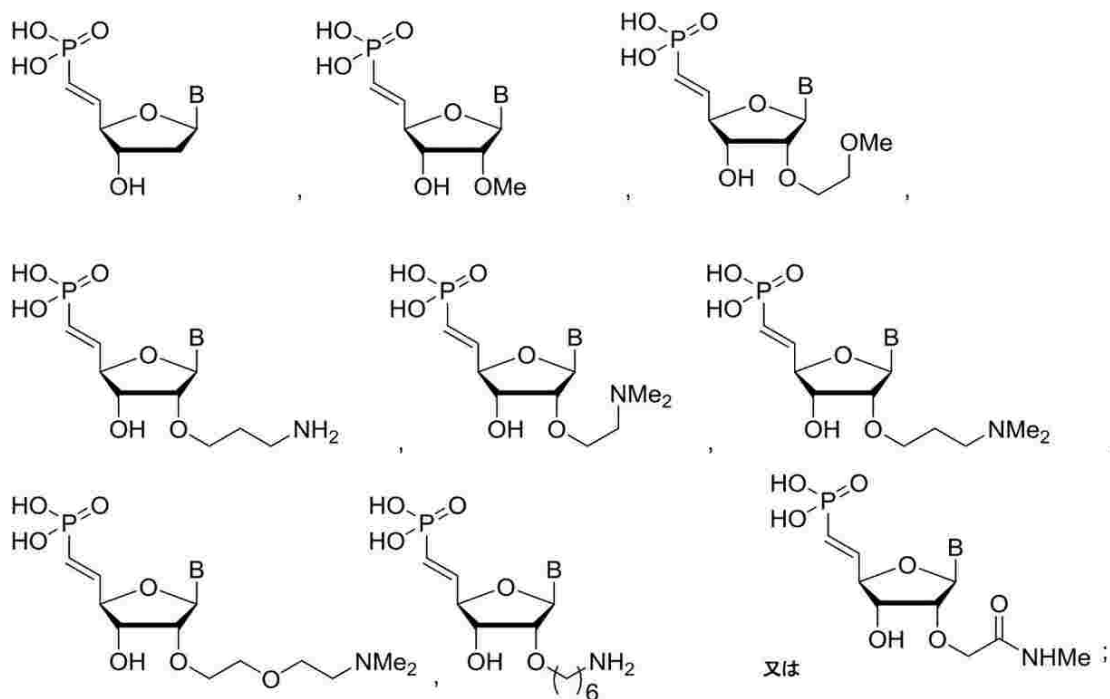
ヌクレオチドアナログまたは塩基は、リボース部分、リン酸塩部分、ヌクレオシド部分、あるいはその組み合わせの1つ以上で修飾を含む。

【0149】

いくつかの実施形態において、上記のヌクレオチドアナログあるいは人工のヌクレオチド塩基は、リボース部分の5'ヒドロキシル基における修飾を有する5'-ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド核酸を含む。いくつかの実施形態において、5'-ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドは、以下から提供されたヌクレオチドから選択される。

【0150】

【化21】



【0151】

いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基の修飾は、プロピルリンカーを含む伸長したアミン基がアミン基を2'酸素に結合させる、2'-O-アミノプロピル修飾である。いくつかの例では、この修飾は、1糖当たりアミン基から1つの正電荷を導入することによってオリゴヌクレオチド分子のリン酸塩由来の全体的な負電荷を中和し、それによって、その双性イオン特性による細胞取り込み特性を改善する。

【0152】

いくつかの例では、5'-ビニルホスホネートはロックドまたは架橋リボース修飾（例えば、ロックド核酸またはLNA）でさらに修飾され、ここで、2'炭素で結合された酸素分子はメチレン基によって4'炭素に結合され、それにより、2'-C、4'-C-オキシメチレン結合二環式リボヌクレオチド単量体を形成する。5'-ビニルホスホネート修飾されたLNAの化学構造の例示的な表現が以下に例示され、ここで、Jはヌクレオチド間結合である。

【0153】

10

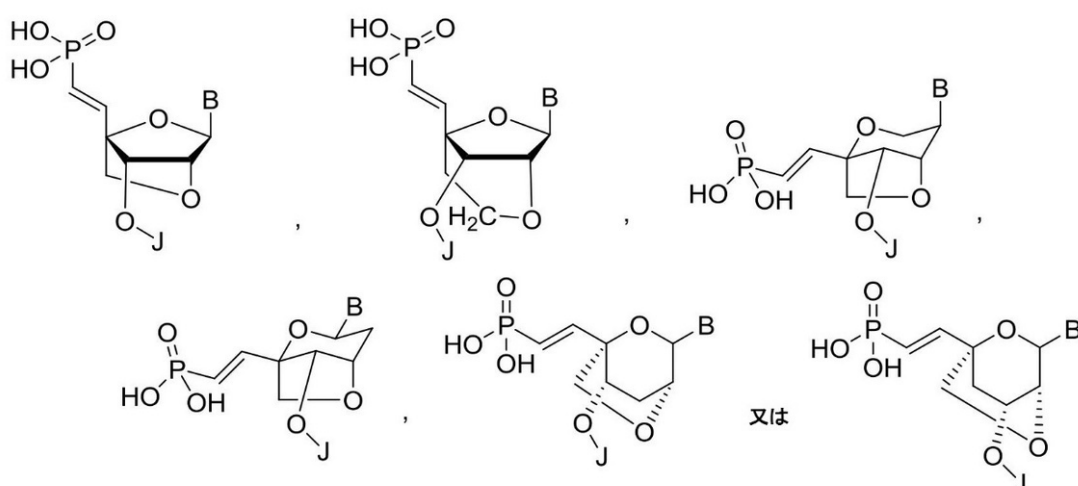
20

30

40

50

【化 2 2】



LNA (ロックド核酸)

【0154】

いくつかの実施形態では、2' ヒドロキシル基での追加の修飾は、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) を含む。

【0155】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、修飾塩基、例えば、限定されないが、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N, N, -ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、1-メチルイノシン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジン、および、5位置に修飾を有する他のヌクレオチド、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2, 2-ジメチルグアノシン、5-メチルアミノエチルウリジン、5-メトキシウリジン、デアザヌクレオチド (7-デアザアデノシン、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、あるいは6-アゾチミジンなど)、5-メチル-2-チオウリジン、他のチオ塩基 (2-チオウリジン、4-チオウリジン、および2-チオシチジンなど)、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチルおよび置換されたナフチル基、O-およびN-アルキル化プリンおよびピリミジン、例えば、N6-メチルアデノシン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン、5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニルおよび修飾フェニル基、例えば、アミノフェノールまたは2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、Gクランプヌクレオチドとして作用する修飾されたシトシン、8-置換されたアデニンおよびグアニン、5-置換されたウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアリルヌクレオチド、カルボキシアリルアミノアリルヌクレオチド、および、アルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドを含む。5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドはさらに、リボシルではない糖あるいはそのアナログを有する5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドと同様に、糖部に対して修飾されるこれらヌクレオチドを含む。例えば、場合によっては、糖部は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、および、その他の糖類、複素環、あるいは炭素環であるか、または、これらがベースである。ヌクレオチドとの用語はさらに、普遍的な塩基として当技術分野で知られているものを含む。一例とし

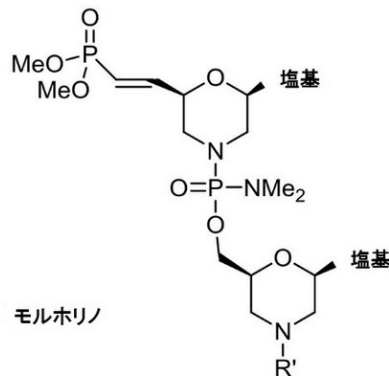
て、普遍的な塩基は、限定されないが、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネブラリンを含む。

【0156】

いくつかの実施形態において、5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドアナログはさらに、モルホリノ、ペプチド核酸（PNA）、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'ホスホラミダイト、あるいは1', 5'-アンヒドロヘキシトール核酸（HNA）を含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴ（PMO）は合成分子を含み、その構造は、天然の核酸構造を模倣しているが、正常な糖とリン酸塩の構造からは逸脱している。いくつかの例では、5員のリボース環は、4つの炭素、1つの窒素、および1つの酸素を含有している6員のモルホリノ環で置換される。いくつかの場合では、リボース単量体は、リン酸基の代わりにホスホロジアミデート基によって結合される。場合によっては、骨格の変質は、荷電オリゴヌクレオチドによって使用されるような細胞送達剤（cellular delivery agents）の助けを借りることなく細胞膜を横断することができるモルホリノ中性分子を作るすべての正および負の電荷を除去する。5'-ビニルホスホネート修飾されたモルホリノオリゴヌクレオチドの非限定的な例が以下に例示される。

【0157】

【化23】



【0158】

いくつかの実施形態において、上に記載された5'-ビニルホスホネート修飾されたモルホリノまたはPMOは、正電荷またはカチオン電荷を含むPMOである。いくつかの例では、PMOはPMO plus（Sarepta）である。PMO plusは、任意の数の（1-ピペラジノ）ホスフィニリデンデオキシ（phosphinyldeneoxy）、（1-（4-（オメガ-グアニジノ-アルカノイル））-ピペラジノ）ホスフィニリデンデオキシ結合（例えば、PCT国際公開第WO2008/036127に記載されるものなど）を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーを指す。いくつかの例では、PMOは、米国特許第7943762号に記載されるPMOである。

【0159】

いくつかの実施形態において、上に記載されたモルホリノまたはPMOはPMO-X（Sarepta）である。場合によっては、PMO-Xは、PCT国際公開第WO2011/150408と米国公報2012/0065169に記載されるものなどの、開示された末端修飾の少なくとも1つの結合あるいは少なくとも1つを含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーを指す。

【0160】

いくつかの実施形態において、上に記載されたモルホリノまたはPMOは、米国公開公報2014/0296321号の表5に記載されるようなPMOである。

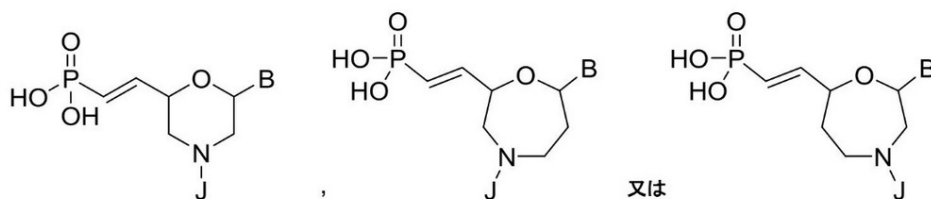
【0161】

5'-ビニルホスホネート修飾された核酸の化学構造の例示的な表現が以下に例示され、

ここで、Jはヌクレオチド間結合である。

【0162】

【化24】



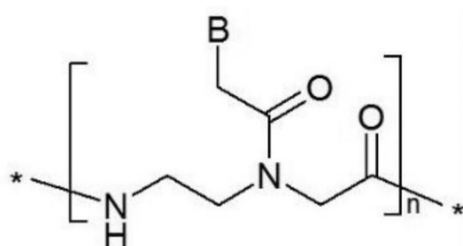
10

【0163】

いくつかの実施形態において、ペプチド核酸（PNA）は、糖骨格環もリン酸塩結合を含まず、塩基は結合し、オリゴグリシン様分子によって適切に間隔を置かれ、ゆえに、骨格電荷を除去する。

【0164】

【化25】



PNA

20

【0165】

いくつかの実施形態において、5'-ビニルホスホネート修飾されたオリゴヌクレオチドの1つ以上の修飾は、ヌクレオチド間結合で随意に生じる。いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合は、限定されないが、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；5'-アルキレンホスホネート；5'-メチルホスホネート；3'-アルキレンホスホネート；三フッ化ホウ素；3'-5'結合あるいは2'-5'結合のボラノリン酸エステルとセレノホスフェート；ホスホトリエステル；チオノアルキルホスホトリエステル；水素ホスホネート結合；アルキルホスホネート；アルキルホスホノチオエート；アリールホスホノチオエート；ホスホロセレノアート；ホスホロジセレノアート；ホスフィネート；ホスホルアミデート；3'-アルキルホスホルアミデート；アミノアルキルホスホルアミデート；チオノホスホルアミデート；ホスホロピペラジデート；ホスホロアニロチオエート；ホスホロアニリデート；ケトン；スルホン；スルホンアミド；カーボネート；カルバマート；メチレンヒドラゾ；メチレンジメチルヒドラゾ；ホルムアセタール；チオホルムアセタール；オキシム；メチレンイミノ；メチレンメチルイミノ；チオアミデート；リボアセチル基との結合；アミノエチルグリシン；シリルまたはシロキサン結合；例えば、飽和あるいは不飽和であり、および／またはヘテロ原子を含有している、1～10の炭素のヘテロ原子を用いるあるいは用いないアルキルまたはシクロアルキル結合；塩基が骨格のアザ窒素に直接的あるいは間接的に結合しているモルホリノ構造、アミド、またはポリアミドとの結合；および、これらの組み合わせを含む。

【0166】

いくつかの例では、修飾は、メチルホスホネートあるいはチオールホスホネート修飾などのメチルまたはチオール修飾である。典型的なチオールホスホネートヌクレオチド（左）、ホスホロジチオエート（中）、およびメチルホスホネートヌクレオチド（右）が、以

30

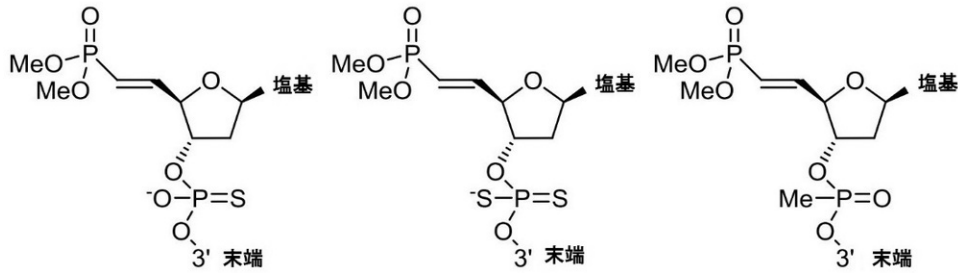
40

50

下に例証される。

【0167】

【化26】



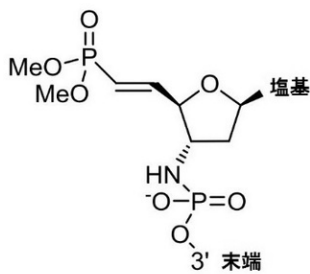
10

【0168】

いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドは、限定されないが、以下として例示されるホスホラミダイトを含む。

【0169】

【化27】



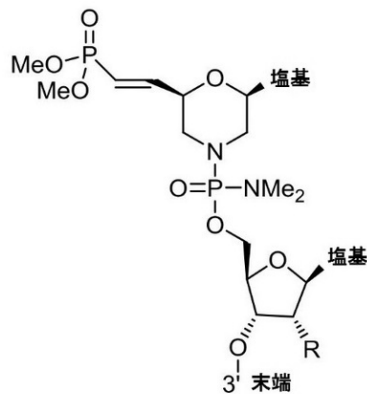
20

【0170】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合はホスホロジアミデート結合である。モルホリノ系を用いるホスホロジアミデート結合の非限定的な例が以下に示される。

【0171】

【化28】



40

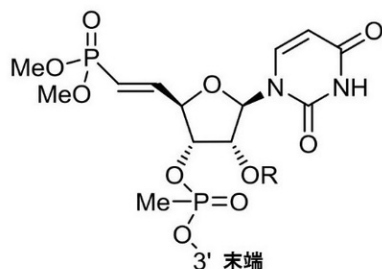
【0172】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合はメチルホスホネート結合である。メチルホスホネート結合の非限定的な例が以下に示される。

【0173】

50

【化 29】



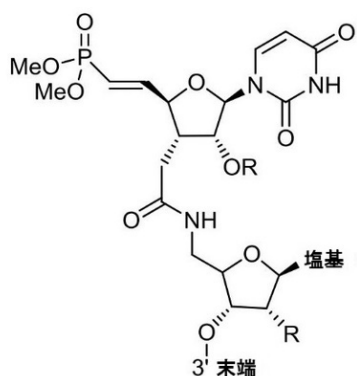
10

【0174】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合はアミド結合である。アミド結合の非限定的な例が以下に示される。

【0175】

【化 30】



20

【0176】

いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドは、限定されないが、以下に例示される修飾された核酸を含む。

【0177】

いくつかの実施形態において、1つ以上の修飾は、修飾が中性または無荷電の骨格を生成する、修飾されたホスフェート骨格を含む。いくつかの例では、ホスフェート骨格は、無荷電または中性のホスフェート骨格を生成するアルキル化によって修飾される。本明細書で使用されるように、アルキル化は、メチル化、エチル化、およびプロピル化を含む。場合によっては、アルキル基は、アルキル化の文脈において本明細書で使用されるように、1～6の炭素原子を含有している直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素基を指す。いくつかの例では、例示的なアルキル基としては、限定されないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、1,1-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、3,3-ジメチルブチル、および2-エチルブチルの基が挙げられる。場合によっては、修飾されたホスフェートは、米国特許第9481905号に記載されるホスフェート基である。

40

【0178】

いくつかの実施形態において、追加の修飾されたホスフェート骨格は、メチルホスホネート、エチルホスホネート、メチルチオホスホネート、あるいはメトキシホスホネートを含む。場合によっては、修飾されたホスフェートはメチルホスホネートである。場合によっては、修飾されたホスフェートはエチルホスホネートである。場合によっては、修飾されたホスフェートはメチルチオホスホネートである。場合によっては、修飾されたホスフェートはメトキシホスホネートである。

【0179】

50

いくつかの実施形態において、1つ以上の修飾はさらに、リボース部分、ホスフェート骨格、およびヌクレオシドの修飾、あるいは3'または5'末端のヌクレオチドアナログの修飾を含む。例えば、3'末端は随意に3'カチオン基を含み、あるいは、3'-3'結合を含む3'-末端でヌクレオシドを反転させる。別の代替物では、3'-末端は随意に、アミノアルキル基、例えば、3'-C5-アミノアルキルdTと結合する。追加の代替物では、3'-末端は随意に、脱塩基部位、例えば、アプリン酸またはアピリミジン酸部位と結合する。

【0180】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、1つ以上の本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、あるいはそれ以上の本明細書に記載される5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、人工的な5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドアナログは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾されたLNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせを含む。いくつかの例では、5'-ビニルホスホネートは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾されたLNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせから選択された、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、17、18、20、25、あるいはそれ以上の人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、あるいはそれ以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、あるいはそれ以上の2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、あるいはそれ以上のチオールホスホネートヌクレオチドを含む。

【0181】

いくつかの実施形態では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、あるいは1215-1242のポリ核酸分子である。

【0182】

いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約1

10

20

30

40

50

3、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、あるいは1215-1242のポリ核酸分子である。

【0183】

いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、以下の少なくとも1つを含む：約5%から約100%の修飾、約10%から約100%の修飾、約20%から約100%の修飾、約30%から約100%の修飾、約40%から約100%の修飾、約50%から約100%の修飾、約60%から約100%の修飾、約70%から約100%の修飾、約80%から約100%の修飾、および、約90%から約100%の修飾。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、あるいは1215-1242のポリ核酸分子である。

10

【0184】

いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子の約5から約100%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、あるいは1215-1242のポリ核酸分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、SEQ ID NO: 16-45のポリ核酸分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、SEQ ID NO: 422-1173のポリ核酸分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、SEQ ID NO: 1195-1214のポリ核酸分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、SEQ ID NO: 1215-1242のポリ核酸分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態では、人工ヌクレオチドアナログは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、あるいは、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾されたLNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、-メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせを含む。

20

30

40

【0185】

場合によっては、本明細書に記載される人工の5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドアナログの1つ以上は、天然のポリ核酸分子と比較して、例えば、RNaseHなどのリボヌクレアーゼ、DNaseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または、5'-3'エキソヌクレアーゼや3'-5'エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼなどのヌク

50

レアーゼに対する耐性を有する。いくつかの例では、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、あるいは、2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) 修飾されたLNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、-メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、あるいは、これらの組み合わせを含む人工ヌクレオチドアナログは、RNaseHなどのリボヌクレアーゼ、DNaseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または、5'-3'エキソヌクレアーゼや3'-5'エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼなどのヌクレアーゼに対する耐性を有する。10

いくつかの例では、2'-O-メチル修飾されたポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE) 修飾されたポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'-O-アミノプロピル修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'-デオキシ修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、T-デオキシ-2'-O-フルオロ修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP) 修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE) 修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP) 修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE) 修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) 修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、LNA-修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、ENA-修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、HNA-修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。モルホリノは、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、PNA-修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼに対する耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、メチルホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseH、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、チオ 50

ホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNase H、DNase、5'－3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'－5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、2'－フルオロN3－P5'－ホスホラミダイトを含むポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNase H、DNase、5'－3'エキソヌクレアーゼ、あるいは3'－5'エキソヌクレアーゼ耐性）を有する。いくつかの例では、本明細書に記載された5'抱合体は5'－3'エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。いくつかの例では、本明細書に記載された3'抱合体は3'－5'エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。

【0186】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された人工の5'－ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドアナログの1つ以上は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。2'－O－メチル、2'－O－メトキシエチル（2'－O－MOE）、2'－O－アミノプロピル、2'－デオキシ、T－デオキシ－2'－フルオロ、2'－O－アミノプロピル（2'－O－AP）、2'－O－ジメチルアミノエチル（2'－O－DMAOE）、2'－O－ジメチルアミノプロピル（2'－O－DMAP）、T－O－ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'－O－DMAEOE）、または、2'－O－N－メチルアセトアミド（2'－O－NMA）修飾されたLNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'－フルオロN3－P5'ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせを含む人工ヌクレオチドアナログの1つ以上は、同等の天然のポリ核酸分子と比較してそのmRNAへの増大した結合親和性を有することができる。いくつかの例では、2'－O－メチル修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－O－メトキシエチル（2'－O－MOE）修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－O－アミノプロピル修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－デオキシ修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、T－デオキシ－2'－フルオロ修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－O－アミノプロピル（2'－O－AP）修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－O－ジメチルアミノエチル（2'－O－DMAOE）修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－O－ジメチルアミノプロピル（2'－O－DMAP）修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－O－ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'－O－DMAEOE）修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'－O－N－メチルアセトアミド（2'－O－NMA）修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、LNA－修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、ENA－修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、PNA－修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、HNA－修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、モルホリノ－修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、メチルホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、その

mRNA 標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、チオールホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、その mRNA 標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-フルオロ N3-P5'-ホスホラミダイトを含むポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比較して、その mRNA 標的に対する結合親和性を増大させた。場合によっては、増加した親和性は、低 Kd、高融解温度 (Tm)、あるいはその組み合わせで例証される。

【0187】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された 5'-ビニルホスホネート修飾されたポリ核酸分子は、キラル純粋 (あるいはステレオ純粋) なポリ核酸分子、あるいは単一のエナンチオマーを含むポリ核酸分子である。いくつかの例では、ポリ核酸分子は L-ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は D-ヌクレオチドを含む。いくつかの例において、ポリ核酸分子組成物は、その鏡像異性体の 30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下を含む。場合によっては、ポリ核酸分子組成物は、ラセミ混合物の 30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、米国特許出願公開第: 2014/194610号と 2015/211006号; WO 2015/107425 に記載されるポリ核酸分子である。

【0188】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、アプタマー結合部分を含めるようにさらに修飾される。いくつかの例では、アプタマー結合部分は DNA アプタマー結合部分である。いくつかの例では、アプタマー結合部分は、Alpha mer (Centauri Therapeutics) であり、これは、特定の細胞表面標的を認識するアプタマー部分と、循環抗体に結合するための特定のエピトープを示す部分とを含んでいる。いくつかの例において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、米国特許第 8,604,184 号、第 8,591,910 号、および第 7,850,975 号に記載されるようなアプタマー結合部分を含めるようにさらに修飾される。

【0189】

追加の実施形態では、本明細書に記載されるポリ核酸分子はその安定性を増大させるために修飾される。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は RNA (例えば、siRNA) であり、ポリ核酸分子はその安定性を増大させるために修飾される。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、その安定性を増大させるために上に記載された修飾の 1 つ以上によって修飾されている。場合によっては、ポリ核酸分子は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) 修飾、あるいは、ロックドまたは架橋リボース構造 (例えば、LNA または ENA) によるなどして、2'ヒドロキシル位置で修飾される。場合によっては、ポリ核酸分子は 2'-O-メチルおよび/または 2'-O-メトキシエチルリボースによって修飾される。場合によっては、ポリ核酸分子はさらに、その安定性を増大させるために、モルホリノ、PNA、HNA、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、および/または 2'-フルオロ N3-P5'-ホスホラミダイトを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はキラル純粋な (あるいはステレオ純粋な) ポリ核酸分子である。いくつかの例では、キラル純粋な (あるいはステレオ純粋な) ポリ核酸分子はその安定性を増大させるために修飾されている。送達の安定性を増大させるための RNA の適切な修飾は当業者には明らかである。

【0190】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、上記の遺伝子によってコードされた RNA の発現を調節する RNAi 活性を有する。いくつかの例では、本明細書にされるポリ核酸分子は遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖 siRNA

A分子であり、ここで、二本鎖*siRNA*分子の鎖の1つは、遺伝子、または遺伝子あるいはその一部によってコードされたRNAのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、および、二本鎖*siRNA*分子の第2の鎖は、遺伝子、または遺伝子あるいはその一部によってコードされたRNAのヌクレオチド配列に実質的に似ているヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本明細書にされるポリ核酸分子は遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖*siRNA*分子であり、ここで、*siRNA*分子のそれぞれの鎖は、約15～25、18～24、あるいは19～約23のヌクレオチドを含み、および、それぞれの鎖は、別の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約14、17、あるいは19のヌクレオチドを含む。場合によっては、本明細書にされるポリ核酸分子は遺伝子の発現をダウンレギュレートする二本鎖*siRNA*分子であり、ここで、*siRNA*分子のそれぞれの鎖は約19～約23のヌクレオチドを含み、および、それぞれの鎖は、別の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19のヌクレオチドを含む。いくつかの例では、遺伝子は、KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1（β-カテニン）、あるいはβ-カテニン関連遺伝子である。

【0191】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、当該技術分野で知られている手順を用いて、化学合成および／または酵素ライゲーション反応を用いて構築される。例えば、ポリ核酸分子は、自然発生のヌクレオチドを使用して、あるいは、分子の生体安定性を増大させるために、または、ポリ核酸分子と標的核酸との間で形成された二重鎖の物理安定度を増大させるために設計されたさまざまな修飾ヌクレオチドを用いて、化学合成される。例示的な方法は、以下に記載されるものを含む：米国特許第5,142,047号；第5,185,444号；第5,889,136号；第6,008,400号；および、第6,111,086号；PCT国際公開第WO2009099942号；あるいは、欧州特許公開第1579015号。追加の例示的な方法は、以下に記載されるものを含む：Griffey et al., “2'-O-aminopropyl ribonucleotides: a zwitterionic modification that enhances the exonuclease resistance and biological activity of antisense oligonucleotides,” J. Med. Chem. 39 (26): 5100-5109 (1997)；Obika, et al. “Synthesis of 2'-O, 4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar pucker.” Tetrahedron Letters 38 (50): 8735 1997；Koizumi, M. “ENA oligonucleotides as therapeutics”. Current opinion in molecular therapeutics 8 (2): 144-149 (2006)；and Abramova et al., “Novel oligonucleotide analogues based on morpholino nucleoside subunits-antisense technologies: new chemical possibilities,” Indian Journal of Chemistry 48B: 1721-1726 (2009)。代替的に、ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子がアンチセンス配向にサブクローン化された発現ベクターを用いて生物学的に生成される（つまり、挿入されたポリ核酸分子の転写されたRNAは所望の標的ポリ核酸分子に対してアンチセンス配向になる）。

【0192】

1つの実施形態は、式（I）：



式I

の分子を提供し、

式中、

10

20

30

40

50

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；

Xは単結合あるいは第1の非ポリマーリンカーであり；および、

Yは単結合または第2のリンカーであり；

ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然ヌクレオチドを含み；および、AとCは同じ末端でBに結合しない。

【0193】

別の実施形態は、式(I)の分子を提供し：ここで、ポリヌクレオチドは随意に、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含む。

10

【0194】

別の実施形態は、式(I)の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの5'-末端に位置する。

【0195】

別の実施形態は、式(I)の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド間結合に位置する。

【0196】

別の実施形態は、式(I)の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、2'-位置でさらに修飾される。

20

【0197】

別の実施形態は、式(I)の分子を提供し：2'-修飾は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾されたヌクレオチドから選択される。

【0198】

別の実施形態は、式(I)の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

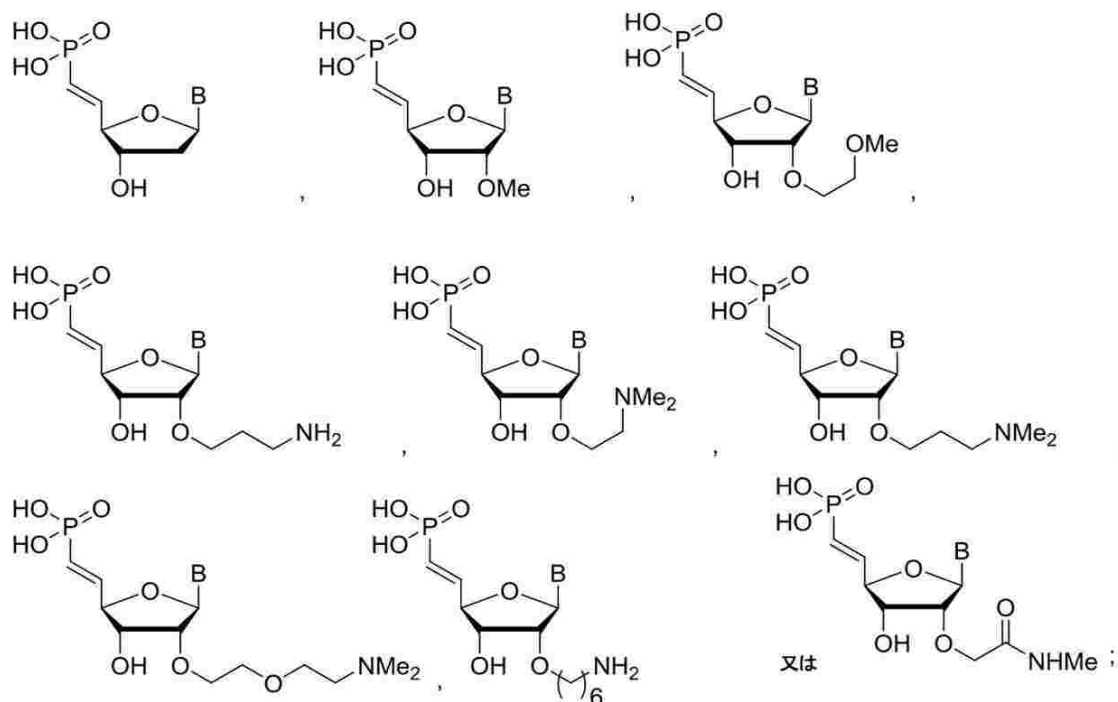
30

【0199】

40

50

【化 3 1】



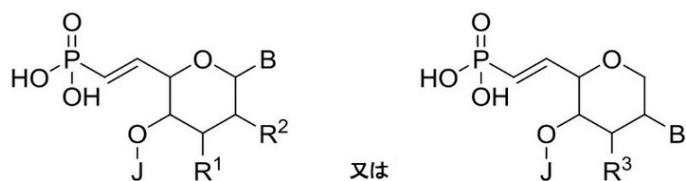
Bは複素環式塩基部分である。

【 0 2 0 0 】

別の実施形態は、式 (I) の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【 0 2 0 1 】

【化 3 2】



Bは複素環式塩基部分であり；

R 1、R 2、および R 3 は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアルコキシから独立して選択され；および、

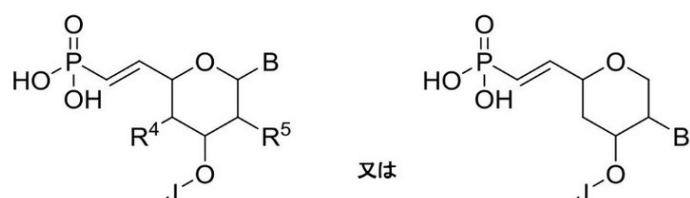
Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【 0 2 0 2 】

別の実施形態は、式 (I) の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【 0 2 0 3 】

【化 3 3】



Bは複素環式塩基部分であり；

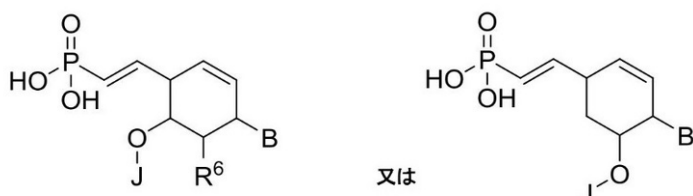
R 4およびR 5は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアルコキシから独立して選択され；および、Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0204】

別の実施形態は、式（I）の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0205】

【化34】



10

Bは複素環式塩基部分であり；

R 6は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアシルから選択され；および、

Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0206】

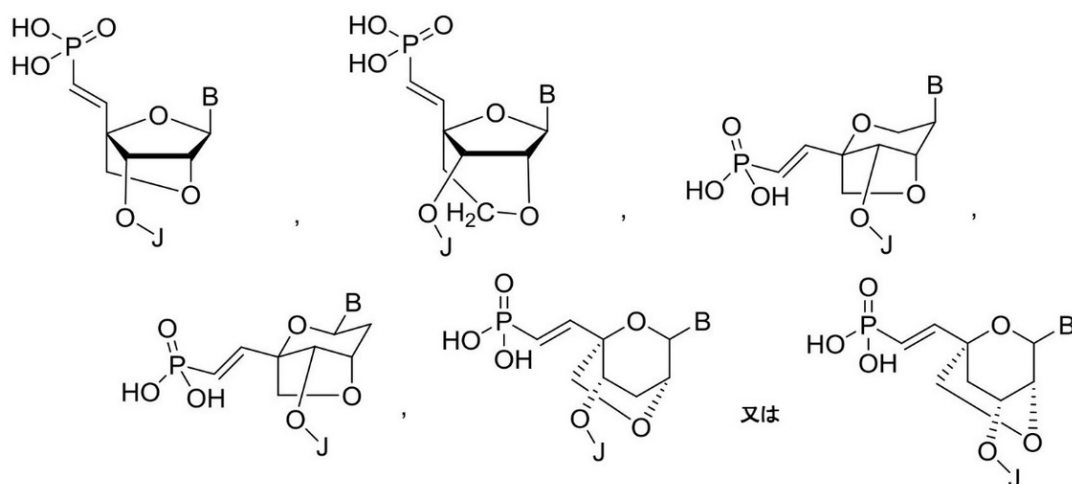
別の実施形態は、式（I）の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ロックド核酸（LNA）またはエチレン核酸（ENA）から選択される。

【0207】

別の実施形態は、式（I）の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0208】

【化35】



30

Bは複素環式塩基部分であり；および、

Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

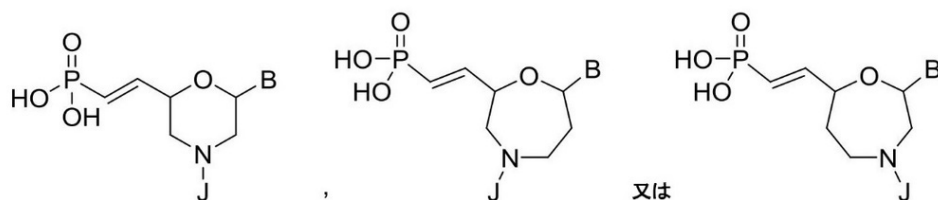
【0209】

別の実施形態は、式（I）の分子を提供し：少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0210】

50

【化 3 6】



B は複素環式塩基部分であり；および、

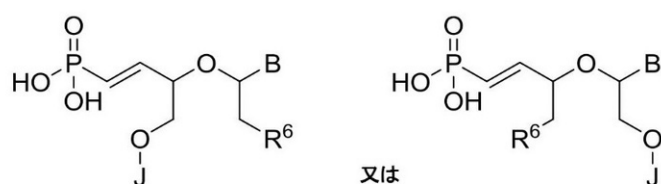
J は、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0 2 1 1】

別の実施形態は、式 (I) の分子を提供し：少なくとも 1 つの 5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下であり：

【0 2 1 2】

【化 3 7】



B は複素環式塩基部分であり；

R 6 は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアシルから選択され；および、

J は、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0 2 1 3】

別の実施形態は、式 (I) の分子を提供し：少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロジアミデート結合、メチルホスホネート結合、あるいはアミド結合を含む。

【0 2 1 4】

別の実施形態は、式 (I) の分子を提供し：少なくとも 1 つの逆脱塩基部分は少なくとも 1 つの末端である。

【0 2 1 5】

1 つの実施形態は、式 (II) のオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの 5'-ビニルホスホネート修飾された非天然ヌクレオチドを含む。

【0 2 1 6】

別の実施形態は、式 (II) のオリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチドはさらに、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも 1 つの逆脱塩基部分を含む。

【0 2 1 7】

別の実施形態は、式 (II) のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも 1 つの 5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの 5'-末端に位置する。

【0 2 1 8】

別の実施形態は、式 (II) のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも 1 つの 5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド間結合に位置する。

【0 2 1 9】

別の実施形態は、式 (II) のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも 1 つの 5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、2'-位置でさらに修飾される。別

10

20

30

40

50

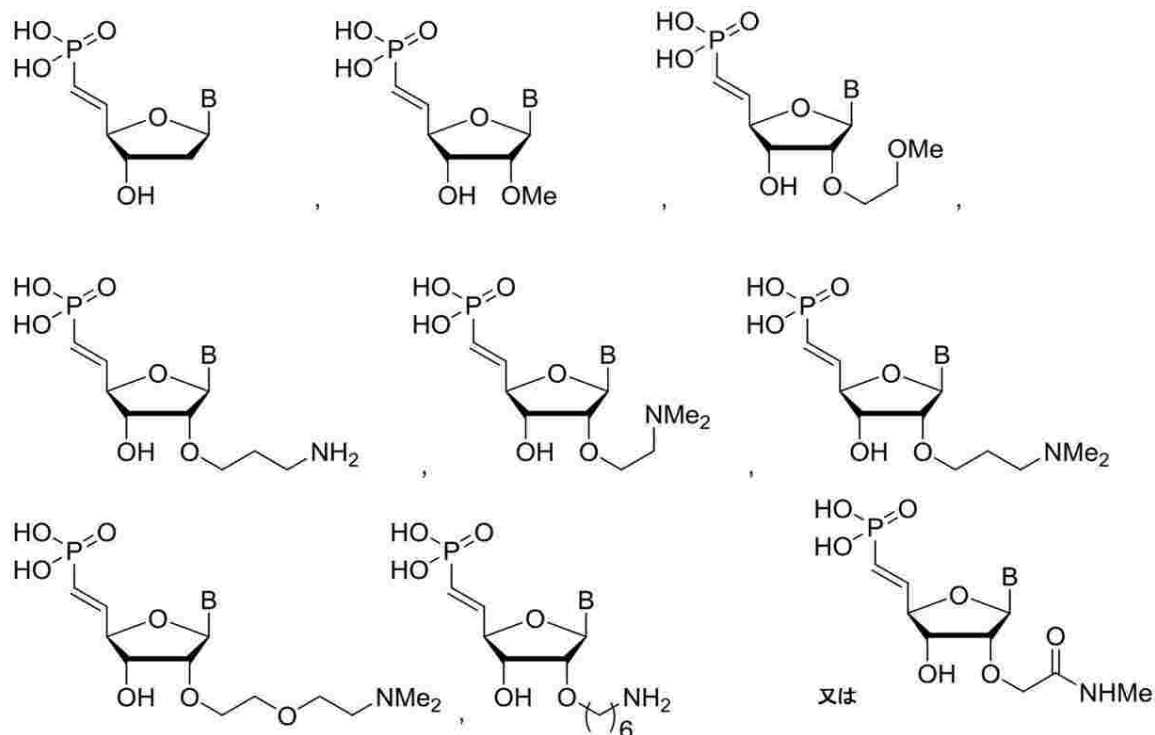
の実施形態は、式 (I I) のオリゴヌクレオチドを提供し、2'-修飾は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) 修飾されたヌクレオチドから選択される。

【0220】

別の実施形態は、式 (I I) のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0221】

【化38】



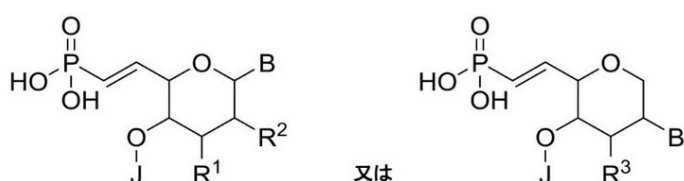
Bは複素環式塩基部分である。

【0222】

別の実施形態は、式 (I I) のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0223】

【化39】



Bは複素環式塩基部分であり；

R1、R2、およびR3は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアルコキシから独立して選択され；および、

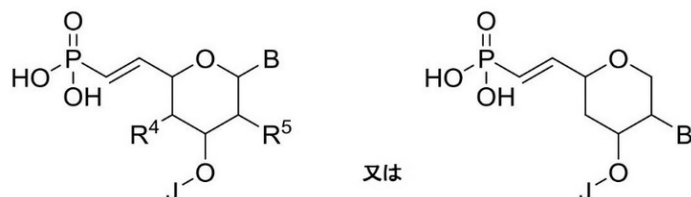
Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0224】

別の実施形態は、式（ⅠⅠ）のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0225】

【化40】



10

Bは複素環式塩基部分であり；

R4およびR5は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアルコキシから独立して選択され；および、

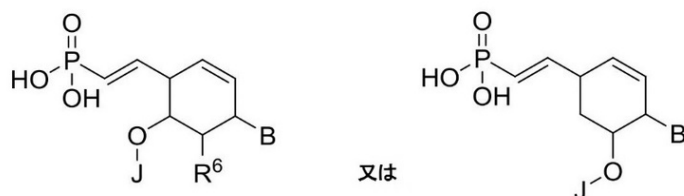
Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0226】

別の実施形態は、式（ⅠⅠ）のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0227】

【化41】



20

Bは複素環式塩基部分であり；

R6は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアシルから選択され；および、

Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

30

【0228】

別の実施形態は、式（ⅠⅠ）のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ロックド核酸（LNA）またはエチレン核酸（ENA）から選択される。

【0229】

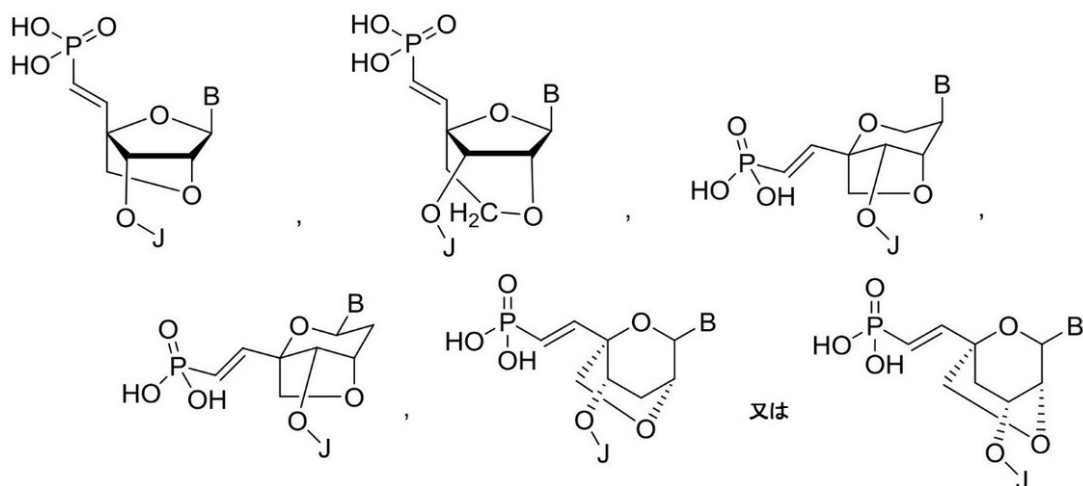
別の実施形態は、式（ⅠⅠ）のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

【0230】

40

50

【化 4 2】



10

Bは複素環式塩基部分であり；および、

Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

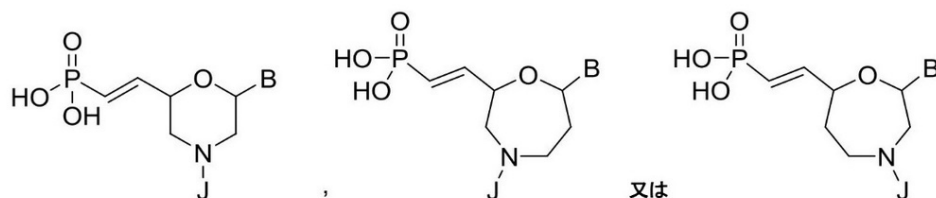
【0 2 3 1】

別の実施形態は、式（I I）のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下から選択され：

20

【0 2 3 2】

【化 4 3】



30

Bは複素環式塩基部分であり；および、

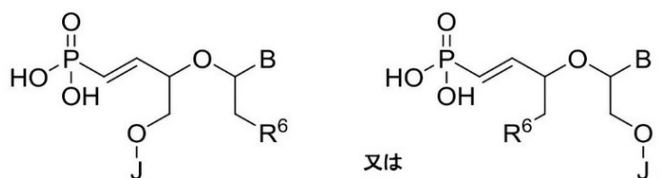
Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0 2 3 3】

別の実施形態は、式（I I）のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、以下からされ：

【0 2 3 4】

【化 4 4】



40

Bは複素環式塩基部分であり；

R 6は、水素、ハロゲン、アルキル、あるいはアシルから選択され；および、

Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0 2 3 5】

別の実施形態は、式（I I）のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホス

50

ホロジアミデート結合、メチルホスホネート結合、あるいはアミド結合を含む。

【0236】

別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、少なくとも1つの逆脱塩基部分は少なくとも1つの末端である。

【0237】

別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは単鎖である。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは二本鎖である。

【0238】

別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約100残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約90残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約80残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約70残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約60残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約50残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約40残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約30残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約20残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは2～約10残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは8～約30残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは10～約30残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは14～約30残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは18～約30残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは22～約30残基長さである。別の実施形態は、式(II)のオリゴヌクレオチドを提供し、オリゴヌクレオチドは26～約30残基長さである。

【0239】

1つの実施形態は、以下の群から選択されたオリゴヌクレオチドの合成に適している化合物を提供し：

【0240】

10

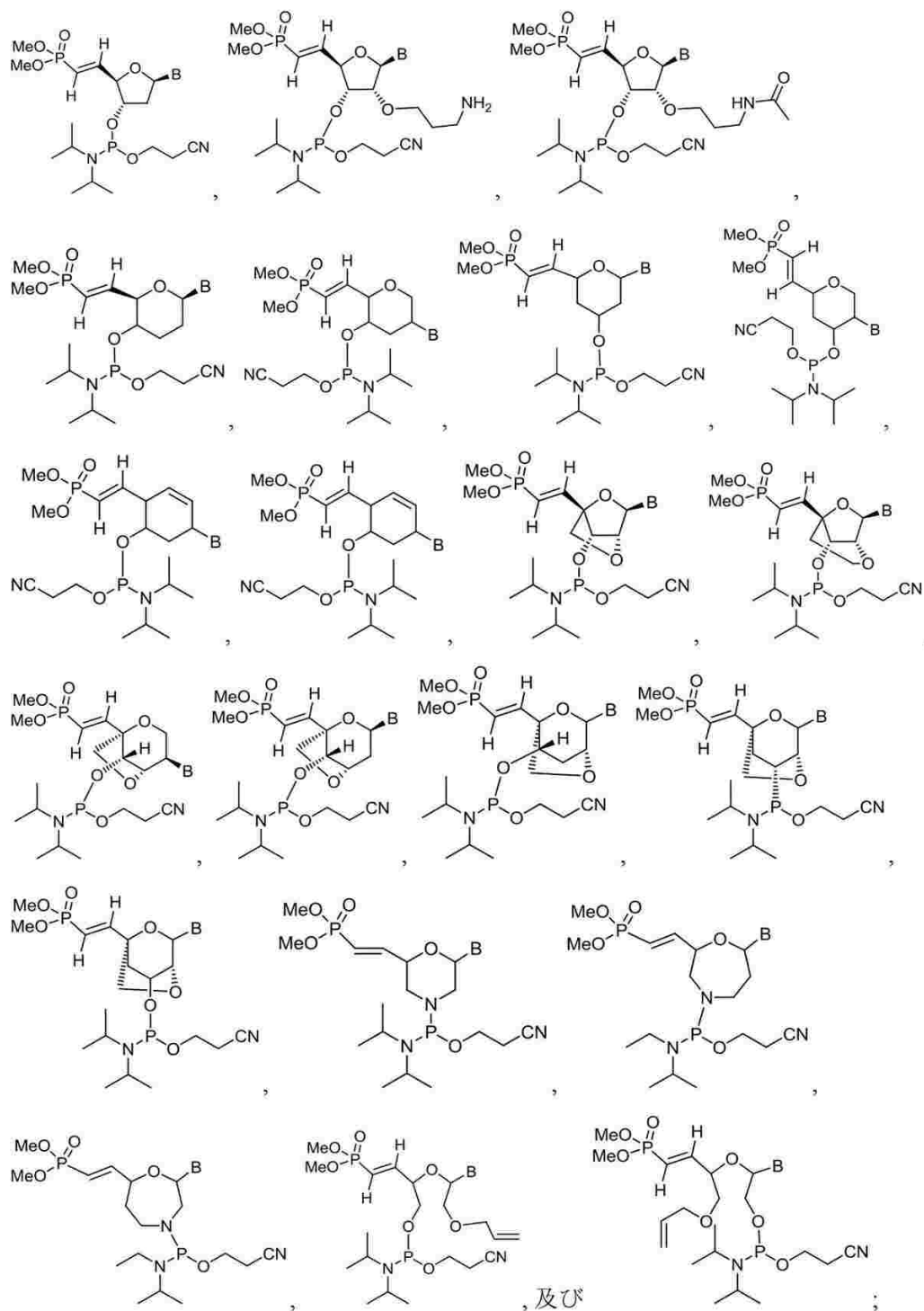
20

30

40

50

【化 4 5】



Bは複素環式塩基部分である。

【0241】

結合化学

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は結合部分に結合する。いくつかの例では、結合部分はアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗原、毒素、ホルモン、脂質、ヌクレオチド、ヌクレオシド、糖類、炭水化物、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールなどのポリマー、同様に、これらのクラスの物質のすべてのアナログあるいは誘導体を含む。結合部分の追加の例はさらに、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロールおよびトリアシルグリセロール、脂肪酸、炭化水素（例えば、飽

和、不飽和、または、置換を含む)、酵素基質、ビオチン、ジゴキシゲニン、および多糖類などのステロイドを含む。いくつかの例では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、ポリ核酸分子はさらにポリマーに結合し、随意にエンドソーム溶解性部分に結合する。

【0242】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は化学的なライゲーションプロセスによって結合部分に結合する。いくつかの例では、ポリ核酸分子は天然のライゲーションによって結合部分に結合する。いくつかの例では、結合は、Dawson, et al. "Synthesis of proteins by native chemical ligation," Science 1994, 266, 776-779; Dawson, et al. "Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives," J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 4325-4329; Hackeng, et al. "Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 10068-10073; or Wu, et al. "Building complex glycopeptides: Development of a cysteine-free native chemical ligation protocol," Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 4116-4125. に記載されるとおりである。いくつかの例では、結合は米国特許第8,936,910号に記載されるとおりである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、天然のライゲーション化学を介して、結合部分に部位特異的あるいは非特異的に結合する。

【0243】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、「トレースレス (traceless)」カップリング技術 (PhiloChem) を利用する部位指定的な方法によって結合部分に結合する。いくつかの例では、「トレースレス」カップリング技術は、アルデヒド基を含むポリ核酸分子とその後結合される結合部分のN末端 1, 2-アミノチオール基を利用する。(Casi et al., "Site-specific traceless coupling of potent cytotoxic drugs to recombinant antibodies for pharmacodelivery," JACS 134 (13): 5887-5892 (2012) を参照)

【0244】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、結合部分に導入された非天然のアミノ酸を利用する部位指定的な方法によって結合部分に結合する。いくつかの例では、非天然アミノ酸はp-アセチルフェニルアラニン (pAcPhe) を含む。いくつかの例では、pAcPheのケト基は、オキシム結合を形成するために、アルコキシーアミン由来の結合部分に選択的に結合される。(Axup et al., "Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids," PNAS 109 (40): 16101-16106 (2012) を参照)。

【0245】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、酵素触媒プロセスを利用する部位指定的な方法によって結合部分に結合する。いくつかの例では、部位指定的な方法はSMARTag (商標) 技術 (Redwood) を利用する。いくつかの例では、SMARTag (商標) 技術は、アルデヒドタグの存在下での酸化プロセスを介するホルミルグリシン生成酵素 (FGE) によるシステインからのホルミルグリシン (FGly) 残留物の生成、および、ヒドラジノーPictet-Spengler (HIPS) ライゲーションを介するアルキルヒドラジン機能化ポリ核酸分子へのFGlyのその後の結合を含む。(Wu et al

. , “ Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag , ” PNAS 106 (9) : 3000-3005 (2009) ; Agarwal , et al . , “ A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification , ” PNAS 110 (1) : 46-51 (2013) を参照)

【0246】

いくつかの例では、酵素触媒プロセスは、微生物トランスグルタミナーゼ (mTG) を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、微生物トランスグルタミナーゼ触媒プロセスを用いて結合部分に結合されるいくつかの例では、mTGは、認識配列内のグルタミンのアミド側鎖と機能化されたポリ核酸分子の一級アミンとの間の共有結合の形成を触媒する。いくつかの例では、mTGはストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobarensis*) から産生される。(Strop et al . , “ Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates , ” Chemistry and Biology 20 (2) 161-167 (2013) を参照)

【0247】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、配列特異的なトランスペプチダーゼを利用するPCT国際公開公報第WO2014/140317号に記載されるような方法によって結合部分に結合する。

【0248】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、米国特許公開公報第2015/0105539号および第2015/0105540号に記載されるような方法によって結合部分に結合する。

【0249】

結合部分

いくつかの実施形態において、結合部分Aはポリペプチドである。いくつかの例では、ポリペプチドは、抗体またはそのそのフラグメントである。場合によっては、フラグメントは結合フラグメントである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、マウス抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、F(ab)₃フラグメント、単鎖可変フラグメント(scFv)、ビス-scFv(scFv)₂、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、三重特異性抗体、四重特異性抗体、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(dsFv)、単ドメイン抗体(sdAb)、IgNAR、ラクダ科抗体またはその結合フラグメント、二重特異性抗体またはその結合フラグメント、あるいはその化学修飾された誘導体を含む。

【0250】

いくつかの例では、Aは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、Aは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、マウス抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、F(ab)₃フラグメント、単鎖可変フラグメント(scFv)、ビス-scFv(scFv)₂、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、三重特異性抗体、四重特異性抗体、ジスルフィド安定化Fvタンパク質(「dsFv」)、単ドメイン抗体(sdAb)、IgNAR、ラクダ科抗体またはその結合フラグメント、二重特異性抗体またはその結合フラグメント、あるいはその化学修飾された誘導体である。いくつかの例では、Aはヒト化抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、Aはマウス抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、Aはキメラ抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、Aはモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、Aは一価Fab'である。いくつかの例では、Aは二価Fab₂である。いくつかの例では、Aは単鎖可変フラグメント(scFv)である。

【0251】

いくつかの実施形態では、結合部分Aは、二重特異性抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、二重特異性抗体は三機能性抗体あるいは二重特異性ミニ抗体である。場合によっては、二重特異性抗体は三機能性抗体である。いくつかの例では、三機能性抗体は、2つの異なる抗原のための結合部位を含む完全長のモノクローナル抗体である。例示的な三機能性抗体は、カツマキソマブ(EpCAMとCD3を標的とする; Fresenius Biotech/Trion Pharma)、エルツマキソマブ(HER2/neu/CD3を標的とする; Fresenius Biotech/Trion Pharm)、リンフォムン(lymphomun)FBTA05(CD20/CD3を標的とする; Fresenius Biotech/Trion Pharm)、RG7221(RO5520985; アンジオポエチン2/VEGFを標的とする; Roche)、RG7597(Her1/Her3を標的とする; Genentech/Roche)、MM141(IGF1R/Her3を標的とする; Merrimack)、ABT122(TNFα/IL17を標的とする; Abbvie)、ABT981(IL1α/IL1βを標的とする; Abbott)、LY3164530(Her1/cMETを標的とする; Eli Lilly)、および、TRBS07(エクトマブ(Ektomab); GD2/CD3を標的とする; Trion Research GmbH)を含む。さらなる例示的な三機能性抗体は、F-star Biotechnology Ltd. からのmAb²を含む。いくつかの例では、Aは二重特異性三機能性抗体である。いくつかの実施形態において、Aは以下から選択された二重特異性三機能性抗体である: カツマキソマブ(EpCAMとCD3を標的とする; Fresenius Biotech/Trion Pharma)、エルツマキソマブ(HER2/neu/CD3を標的とする; Fresenius Biotech/Trion Pharm)、リンフォムン(lymphomun)FBTA05(CD20/CD3を標的とする; Fresenius Biotech/Trion Pharm)、RG7221(RO5520985; アンジオポエチン2/VEGFを標的とする; Roche)、RG7597(Her1/Her3を標的とする; Genentech/Roche)、MM141(IGF1R/Her3を標的とする; Merrimack)、ABT122(TNFα/IL17を標的とする; Abbvie)、ABT981(IL1α/IL1βを標的とする; Abbott)、LY3164530(Her1/cMETを標的とする; Eli Lilly)、TRBS07(エクトマブ(Ektomab); GD2/CD3を標的とする; Trion Research GmbH)、および、F-star Biotechnology Ltd. からのmAb²。

【0252】

場合によっては、二重特異性抗体は二重特異性ミニ抗体である。いくつかの例では、二重特異性ミニ抗体は、二価Fab₂、F(ab)₃フラグメント、ビス-scFv(scFv)₂、ダイアボディ、ミニボディ、三重特異性抗体、四重特異性抗体、あるいは二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)を含む。いくつかの実施形態において、二重特異性T細胞エンゲージャーは、2つのscFvsが2つの異なる抗原のエピトープを標的とする2つの単鎖可変フラグメント(scFvs)を含む融合タンパク質である。例示的な二重特異性ミニ抗体は、限定されないが、以下を含む: DART(二重親和性再標的プラットフォーム; MacroGenics)、ブリナツモマブ(MT103あるいはAMG103; CD19/CD3を標的とする; Micromet)、MT111(CEA/CD3を標的とする; Micromet/Amegen)、MT112(BAY2010112; PSMA/CD3を標的とする; Micromet/Bayer)、MT110(AMG 110; EPCAM/CD3を標的とする; Amgen/Micromet)、MGD006(CD123/CD3を標的とする; MacroGenics)、MGD

10

20

30

40

50

007 (GPA33/CD3を標的とする; MacroGenics)、BI1034020 (β -アミロイド上の2つの異なるエピトープを標的とする; Ablynx)、ALX0761 (IL17A/IL17Fを標的とする; Ablynx)、TF2 (CEA/ヘプテンを標的とする; Immunomedics)、IL-17/IL-34 biAb (BMS)、AFM13 (CD30/CD16を標的とする; Affimed)、AFM11 (CD19/CD3を標的とする; Affimed)、およびドメイン抗体 (Domantis/GSKからのdAbs)。

【0253】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは二重特異性ミニ抗体である。いくつかの例では、Aは二重特異性Fab2である。いくつかの例では、Aは二重特異性F(ab)₂フラグメントである。場合によっては、Aは二重特異性bis-scFvである。場合によっては、Aは二重特異性(scFv)であるいくつかの実施形態では、Aは二重特異性ダイアボディである。いくつかの実施形態では、Aは二重特異性ミニボディである。いくつかの実施形態では、Aは二重特異性の三重特異性抗体である。他の実施形態では、Aは二重特異性の四重特異性抗体である。他の実施形態では、Aは二重特異性のT細胞エンゲージャー(BiTE)である。さらなる実施形態において、Aは以下から選択された二重特異性ミニ抗体である: DART (二重親和性再標的プラットフォーム; MacroGenics)、ブリナツモマブ (MT103あるいはAMG103; CD19/CD3を標的とする; Micromet)、MT111 (CEA/CD3を標的とする; Micromet/Amegon)、MT112 (BAY2010112; PSMA/CD3を標的とする; Micromet/Bayer)、MT110 (AMG 110; EPCAM/CD3を標的とする; Amgen/Micromet)、MGD006 (CD123/CD3を標的とする; MacroGenics)、MGD007 (GPA33/CD3を標的とする; MacroGenics)、BI1034020 (β -アミロイド上の2つの異なるエピトープを標的とする; Ablynx)、ALX0761 (IL17A/IL17Fを標的とする; Ablynx)、TF2 (CEA/ヘプテンを標的とする; Immunomedics)、IL-17/IL-34 biAb (BMS)、AFM13 (CD30/CD16を標的とする; Affimed)、AFM11 (CD19/CD3を標的とする; Affimed)、およびドメイン抗体 (Domantis/GSKからのdAbs)。

【0254】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは三重特異性抗体である。いくつかの例では、三重特異性抗体はF(ab)₂フラグメントあるいは三重特異性抗体を含む。いくつかの例では、Aは三重特異性F(ab)₂フラグメントである。場合によっては、Aは三重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、Aは、Dimas, et al., "Development of a trispecific antibody designed to simultaneously and efficiently target three different antigens on tumor cells," Mol. Pharmaceuticals, 12 (9): 3490-3501 (2015)に記載されるような三重特異性抗体である。

【0255】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、細胞表面タンパク質を認識する抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、細胞表面タンパク質は癌細胞によって発現される抗原である。例示的な癌抗原は、限定されないが、アルファフェトプロテイン、ASLG659、B7-H3、BAFF-R、プレビカン、CA125 (MUC16)、CA15-3、CA19-9、癌胎児抗原 (CEA)、CA242、CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形癌由来成長因子)、CTLA-4、CXCR5、E16 (LAT1、SLC7A5)、FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1a)、SPAP1B、SPAP1C)、上皮成長因子、ETBR、Fc受容体様タンパク質 (F

CRH1)、GEDA、HLA-DOB (MHCクラスII分子 (Ia抗原) のβサブユニット)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ICOS、IL-2受容体、IL20Rα、免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転座関連2 (IRTA2)、L6、Lewis Y、Lewis X、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE 4、MART1、メソテリン、MDP、MPF (SMR、MSLN)、MCP1 (CCL2)、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、MPG、MSG783、ムチン、MUC1-KLH、Napi3b (SLC34A2)、ネクチン-4、Neu癌遺伝子産物、NCA、胎盤アルカリホスファターゼ、前立腺特異的膜抗原 (PMSA)、前立腺酸性ホスファターゼ、PSCA hlg、p97、プリン受容体P2Xリガンド開口型イオンチャネル5 (P2X5)、LY64 (リンパ球抗原96 (RP105)、gp100、P21、前立腺の6つの膜貫通上皮抗原 (STEAP1)、STEAP2、Sema 5b、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72)、TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一過性受容体電位陽イオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4) などを含む。

【0256】

いくつかの例では、細胞表面タンパク質は、分化 (CD) 細胞表面マーカーのクラスタを含む。例示的なCD細胞表面マーカーは限定されないが、CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L (L-セレクトリン)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79 (例えば、CD79a、CD79b)、CD90、CD95 (Fas)、CD103、CD104、CD125 (IL5RA)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD152 (CTLA-4)、CD221、CD274、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、CD326 (EpCAM) などを含む。

【0257】

いくつかの例では、結合部分Aは、癌抗原を認識する抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、結合部分Aは、アルファフェトプロテイン、ASLG659、B7-H3、BAFF-R、プレビカン、CA125 (MUC16)、CA15-3、CA19-9、癌胎児抗原 (CEA)、CA242、CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形癌由来成長因子)、CTLA-4、CXCR5、E16 (LAT1、SLC7A5)、FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1a)、SPAP1B、SPAP1C)、上皮成長因子、ETBR、Fc受容体様タンパク質 (FCRH1)、GEDA、HLA-DOB (MHCクラスII分子 (Ia抗原) のβサブユニット)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ICOS、IL-2受容体、IL20Rα、免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転座関連2 (IRTA2)、L6、Lewis Y、Lewis X、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE 4、MART1、メソテリン、MCP1 (CCL2)、MDP、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、MPF (SMR、MSLN)、MPG、MSG783、ムチン、MUC1-KLH、Napi3b (SLC34A2)、ネクチン-4、Neu癌遺伝子産物、NCA、胎盤アルカリホスファターゼ、前立腺特異的膜抗原 (PMSA)、前立腺酸性ホスファターゼ、PSCA hlg、p97、プリン受容体P2Xリガンド開口型イオンチャネル5 (P2X5)、LY64 (

リンパ球抗原 96 (RP105)、gp100、P21、前立腺の6つの膜貫通上皮抗原 (STEAP1)、STEAP2、Sema 5b、腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72)、TrpM4 (BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一過性受容体電位陽イオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4)、あるいはこれらの組み合わせを認識する、抗体またはその結合フラグメントである。

【0258】

いくつかの例では、結合部分Aは、CD細胞表面マーカーを認識する、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、結合部分Aは、CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L (L-セレクトリン)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79 (例えば、CD79a、CD79b)、CD90、CD95 (Fas)、CD103、CD104、CD125 (IL5RA)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD152 (CTLA-4)、CD221、CD274、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、CD326 (EpCAM)、またはこれらの組み合わせを認識する、抗体またはその結合フラグメントである、

【0259】

いくつかの実施形態において、その抗体または結合フラグメントは、ザルツムマブ (HuMax-EFGr、Genmab)、アバゴボマブ (Menarini)、アビツズマ (Merck)、アデカツムマブ (MT201)、アラシズマブペゴール、アレムツズマブ (Campath (登録商標)、MabCampathあるいはCampath-1H; Leukosite)、AlloMune (BioTransplant)、アマツキシマブ (Morphotek Inc.)、抗VEGF (Genentech)、アナツモマブマフェナトックス、apolizumab (hu1D10)、アスクリンバクマブ (Pfizer Inc.)、アテゾリズマブ (MPDL3280A; Genentech/Roche)、B43.13 (OvaRex、AltaRex Corporation)、バシリキシマブ (Simulect (登録商標)、Novartis)、ベリムマブ (Benlysta (登録商標)、GlaxoSmithKline)、ベバシズマブ (Avastin (登録商標)、Genentech)、ブリナツモマブ (Blinxto、AMG103; Amgen)、BEC2 (ImGlone Systems Inc.)、カルルマブ (Janssen Biotech)、カツマキシマブ (Removab、Trion Pharma)、CEAcide (Immunomedics)、セツキシマブ (Erbix (登録商標)、ImClone)、シタツズマブ・ボガトックス (VB6-845)、シズツムマブ (IMC-A12、ImClone Systems Inc.)、コナツムマブ (AMG 655、Amgen)、ダセツズマブ (SGN-40、huS2C6; Seattle Genetics, Inc.)、ダラツムマブ (Darzalex (登録商標)、Janssen Biotech)、デツモマブ、ドロジツムマブ (Genentech)、デュルバルマブ (MedImmune)、デュシギツムマブ (dusigitumab) (MedImmune)、エドレコロマブ (MAb171A、Panorex、Glaxo Wellcome)、エロツズマブ (Emplixiti (商標)、Bristol-Myers Squibb)、エミベツズマブ (Eli Lilly)、エナバツズマブ (Facet Biotech Corp.)、エン

10

20

30

40

50

フォルツマブベドチン (Seattle Genetics, Inc.)、エノブリツズマブ (MGA271, MacroGenics, Inc.)、エンシツズマブ (ensituxumab) (Neogenix Oncology, Inc.)、エブラツズマブ (LymphoCide, Immunomedics, Inc.)、エルツマキシマブ (Rexomun (登録商標)、Trion Pharma)、エタラシズマブ (Abeirin, MedImmune)、ファーレッツズマブ (MORAb-003, Morphotek Inc.)、FBTA05 (Lymphomun, Trion Pharma)、フィクラツズマブ (AVEO Pharmaceuticals)、フィギツムマブ (CP-751871, Pfizer)、フランボツマブ (ImClone Systems)、フレゾリムマブ (GC1008, Anofi-Aventis)、フツキシマブ、グラキシマブ (glaximab)、ガニツマブ (Amgen)、ジレンツキシマブ (Rencarex (登録商標)、Willex AG)、IMAB362 (Claudiximab, Ganymed Pharmaceuticals AG)、イマルマブ (Baxalta)、IMC-1C11 (ImClone Systems)、IMC-C225 (ImClone Systems Inc.)、イムガツズマブ (Genentech/Roche)、インテツムマブ (Centocor社)、イピリムマブ (Yervoy (登録商標)、Bristol-Myers Squibb)、イラツムマブ (Medarex, Inc.)、イサツキシマブ (SAR650984, Sanofi-Aventis)、ラベツズマブ (CEA-CIDE, Immunomedics)、レクサツムマブ (ETR2-ST01, Cambridge Antibody Technology)、リンツズマブ (SGN-33, Seattle Genetics)、lucatumumab (Novartis)、ルミリキシマブ、マパツズマブ (HGS-ETR1, Human Genome Sciences)、マツズマブ (EMD 72000, Merck)、ミラツズマブ (hLL1, Immunomedics, Inc.)、ミツモマブ (BEC-2, ImClone Systems)、ナルナツマブ (narnatumaab) (ImClone Systems)、ネシツムマブ (Portrazza (商標)、Eli Lilly)、ネスバクマブ (Regeneron Pharmaceuticals)、nimotuzumab (h-R3, BIOMAb EGFR, TheraCIM, Theraloc、あるいはCIMAher; Biotech Pharmaceutical Co.)、ニボルマブ (Opdivo (登録商標)、Bristol-Myers Squibb)、オビヌツズマブ (GazyvaまたはGazyvaro; Hoffmann-La Roche)、オカラツズマブ (AME-133v, LY2469298; Mentrisk Biotech, LLC)、オフアツムマブ (Arzerra (登録商標)、Genmab)、オナルツズマブ (Genentech)、オンツキシマブ (Ontuxizumab) (Morphotek Inc.)、オレゴボマブ (OvaRex (登録商標) (AltaRex, Corp.)、オトレルツズマブ (otlertuzumab) (Emergent BioSolutions)、パニツムマブ (ABX-EGF, Amgen)、パンコマブ (pankomab) (Glycotop GmbH)、パルサツズマブ (parsatuzumab) (Genentech)、パトリツマブ、ペンブロリズマブ (Keytruda (登録商標)、Merck)、ペムツモマブ (pemtumomab) (Theragyn, Antisoma)、ペルツズマブ (Perjeta, Genentech)、ピディリズマブ (CT-011, Medivation)、ポラツズマブベドチン (Genentech/Roche)、プリツムマブ、ラコツモマブ (Vaxira (登録商標)、Recombio)、ラムシルマブ (Cyramza (登録商標)、ImClone Systems Inc.)、リツキシマブ (Rituxan (登録商標)、Genentech)、ロバツムマブ (Schering-Plough)、セリバントマブ (Sanofi/Merrimack Pharmaceuticals, Inc.)、シブロツズマブ (sibrotuzumab)、シルツキシマブ (Sylvant (商標)、Janssen Biotech)、Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc.)、Smar

10

20

30

40

50

t ID10 (Protein Design Labs, Inc.)、タバルマブ (LY2127399, Eli Lilly)、タプリツモマブペプトクス、テナツモマブ (tenatumomab)、テプロツムマブ (Roche)、テツロマブ (tetulo mab)、TGN1412 (CD28-SuperMABあるいはTAB08)、ティガ ツズマブ (CD-1008, Daiichi Sankyo)、トシツモマブ、トラスト ズマブ (Herceptin (登録商標))、トレメリマブ (CP-672, 206; Pfizer)、ツコツズマブセルモロイキン (EMD Pharmaceutical s)、ウブリツキシマブ、ウレルマブ (BMS-663513, Bristol-Mye rs Squibb)、ボロキシマブ (M200, Biogen Idec)、ザツキシ マブ (zatuximab) などを含む。

10

【0260】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、ザルツムマブ (HuMax-EFGr、Genmab)、アバゴボマブ (Menarini)、アビツズマ (Merck)、アデ カツムマブ (MT201)、アラシズマブペゴール、アレムツズマブ (Campath (登録商標)、MabCampathあるいはCampath-1H; Leukosite)、AlloMune (BioTransplant)、アマツキシマブ (Morpho tek Inc.)、抗VEGF (Genetech)、アナツモマブマフェナトックス、apolizumab (hu1D10)、アスクリンバクマブ (Pfizer Inc .)、アテゾリズマブ (MPDL3280A; Genentech/Roche)、B 43.13 (OvaRex, AltaRex Corporation)、バシリキシマ 20 ブ (Simulect (登録商標)、Novartis)、ベリムマブ (Benlyst a (登録商標)、GlaxoSmithKline)、ベバシズマブ (Avastin (登録商標)、Genentech)、ブリナツモマブ (Blinicyto、AMG103 ; Amgen)、BEC2 (ImClone Systems Inc.)、カルルマブ (Janssen Biotech)、カツムキソマブ (Removab, Trion P harma)、CEAcide (Immunomedics)、セツキシマブ (Erbi tux (登録商標)、ImClone)、シタツズマブ・ボガトクス (VB6-845)、シズツムマブ (IMC-A12, ImClone Systems Inc.)、コナツ ムマブ (AMG 655, Amgen)、ダセツズマブ (SGN-40, huS2C6; Seattle Genetics, Inc.)、ダラツムマブ (Darzalex (登録商標)、Janssen Biotech)、デツモマブ、ドロジツムマブ (Genen tech)、デュルバルマブ (MedImmune)、デュシギツムマブ (dusigit umab) (MedImmune)、エドレコロマブ (MAb171A, Panorex、Glaxo Wellcome)、エロツズマブ (Empliciti (商標)、Br istol-Myers Squibb)、エミベツズマブ (Eli Lilly)、エナ バツズマブ (Facet Biotech Corp.)、エンフォルツムマブベドチン (S eattle Genetics, Inc.)、エノブリツズマブ (MGA271, Ma croGenics, Inc.)、エンシツズマブ (ensituxumab) (Neo genix Oncology, Inc.)、エブラツズマブ (LymphoCide、Immunomedics, Inc.)、エルツムキソマブ (Rexomun (登録商標) 40)、Trion Pharma)、エタラシズマブ (Abegrin, MedImmun e)、ファーレツズマブ (MORAb-003, Morphotek Inc.)、FB TA05 (Lymphomun, Trion Pharma)、フィクラツズマブ (AV EO Pharmaceuticals)、フィギツムマブ (CP-751871, Pf izer)、フランボツムマブ (ImClone Systems)、フレゾリムマブ (G C1008, Aanolife-Aventis)、フツキシマブ、グラキシマブ (glax imab)、ガニツムマブ (Amgen)、ジレンツキシマブ (Rencarex (登録商 標)、Willex AG)、IMAB362 (Claudiximab, Ganymed Pharmaceutical s AG)、イマルマブ (Baxalta)、IMC-1 C11 (ImClone Systems)、IMC-C225 (ImClone Sys 50

tems Inc.)、イムガツズマブ (Genentech/Roche)、インテツムマブ (Centocor社)、イピリムマブ (Yervoy (登録商標)、Bristol-Myers Squibb)、イラツムマブ (Medarex, Inc.)、イサツキシマブ (SAR650984、Sanofi-Aventis)、ラベツズマブ (CEA-CIDE、Immunomedics)、レクサツムマブ (ETR2-ST01、Cambridge Antibody Technology)、リンツズマブ (SGN-33、Seattle Genetics)、lucatumumab (Novartis)、ルミリキシマブ、マバツズマブ (HGS-ETR1、Human Genome Sciences)、マツズマブ (EMD 72000、Merck)、ミラツズマブ (hLL1、Immunomedics, Inc.)、ミツモマブ (BEC-2、ImClone Systems)、ナルナツマブ (narnatumab) (ImClone Systems)、ネシツムマブ (Portrazza (商標)、Eli Lilly)、ネスバクマブ (Regeneron Pharmaceuticals)、nimotuzumab (h-R3、BIOMAb EGFR、TheraCIM、Theraloc、あるいはCIMAher; Biotech Pharmaceutical Co.)、ニボルマブ (Opdivo (登録商標)、Bristol-Myers Squibb)、オビヌツズマブ (GazyvaまたはGazyvaro; Hoffmann-La Roche)、オカラツズマブ (AME-133v、LY2469298; Mentrisk Biotech, LLC)、オフアツムマブ (Arzerra (登録商標)、Genmab)、オナルツズマブ (Genentech)、オンツキシズマブ (Ontuxizumab) (Morphotek Inc.)、オレゴボマブ (OvaRex (登録商標) (AltaRex, Corp.)、オトレルツズマブ (otlertuzumab) (Emergent BioSolutions)、パニツムマブ (ABX-EGF、Amgen)、パンコマブ (pankomab) (Glycotope GMBH)、パルサツズマブ (parsatuzumab) (Genentech)、パトリツマブ、ペンブロリズマブ (Keytruda (登録商標)、Merck)、ペムツモマブ (pemtumomab) (Theragyn、Antisoma)、ペルツズマブ (Perjeta、Genentech)、ピディリズマブ (CT-011、Medivation)、ポラツズマブベドチン (Genentech/Roche)、プリツムマブ、ラコツモマブ (Vaxira (登録商標)、Recombio)、ラムシルマブ (Cyramza (登録商標)、ImClone Systems Inc.)、リツキシマブ (Rituxan (登録商標)、Genentech)、ロバツムマブ (Schering-Plough)、セリバントマブ (Sanofi/Merrimack Pharmaceuticals, Inc.)、シブロツズマブ (sibrotuzumab)、シルツキシマブ (Sylvant (商標)、Janssen Biotech)、Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc.)、Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc.)、タバルマブ (LY2127399、Eli Lilly)、タブリツモマブペプトクス、テナツモマブ (tenatumomab)、テプロツムマブ (Roche)、テツロマブ (tetulomab)、TGN1412 (CD28-SuperMABあるいはTAB08)、ティガツズマブ (CD-1008、Daiichi Sankyo)、トシツモマブ、トラスツズマブ (Herceptin (登録商標))、トレメリムマブ (CP-672, 206; Pfizer)、ツコツズマブセルモロイキン (EMD Pharmaceuticals)、ウブリツキシマブ、ウレルマブ (BMS-663513、Bristol-Myers Squibb)、ボロキシマブ (M200、Biogen Idec)、あるいはザツキシマブ (zatuximab) を含む。いくつかの実施形態において、結合部分Aはザルツムマブ (GenmabによるHuMax-EGFR) である。

【0261】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、式(I)に従ってポリ核酸分子(B)に、およびポリマー(C)に、ならびに、随意に、本明細書に記載される式(II)に従つ

10

20

30

40

50

て、エンドソーム溶解性部分（D）に結合する。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、表2、4、8、あるいは9で列挙される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、あるいは1215-1242に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 16-45、422-1173、1195-1214、あるいは1215-1242から選択された配列を有する。いくつかの例では、ポリマーCはポリアルキレンオキシド（例えば、ポリエチレングリコール）を含む。いくつかの実施形態において、エンドソーム溶解性部分Dは、INF7またはメリチン、あるいはそれぞれの誘導体を含む。

10

【0262】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、ポリ核酸分子（B）およびポリマー（C）に、ならびに、随意にエンドソーム溶解性部分（D）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、抗体またはその結合フラグメントである。

【0263】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、ポリ核酸分子（B）に非特異的に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、リシン残基またはシステイン残基を介してポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、リシン残基を介してポリ核酸分子（B）に結合する。場合によっては、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、システイン残基を介してポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、抗体またはその結合フラグメントである。

20

【0264】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、ポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、リシン残基、システイン残基を介して、5'-末端で、3'-末端で、非天然アミノ酸、あるいは酵素修飾または酵素触媒された残留物で、ポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、リシン残基を介してポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、システイン残基を介してポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、5'-末端でポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、3'-末端でポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、非天然アミノ酸を介してポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で酵素修飾または酵素触媒された残留物を介してポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aは、抗体またはその結合フラグメントである。

30

【0265】

いくつかの実施形態において、結合部分A（例えば、抗体またはその結合フラグメント）の1つ以上の領域は、ポリ核酸分子（B）に結合する。いくつかの例では、結合部分Aの1つ以上の領域は、結合部分Aの定常領域内、ヒンジ領域、あるいはFc領域に、N末端、C末端を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子（B）は、結合部分AのN末端（例えば、抗体またはその結合フラグメントのN末端）に結合する。いくつかの例では、ポリ核酸分子（B）は、結合部分AのC末端（例えば、抗体またはその結合フラグメントのN末端）に結合する。いくつかの例では、ポリ核酸分子（B）は、結合部分Aの定常領域（例えば、抗体またはその結合フラグメントの定常領域）に結合する。いくつかの例では、ポリ核酸分子（B）は、結合部分Aのヒンジ領域（例えば、抗体またはその結合フラグメントの定常領域）に結合する。いくつかの例では、ポリ核酸分子（B）は、結合部分Aの

40

50

Fc領域（例えば、抗体またはその結合フラグメントの定常領域）に結合する。

【0266】

いくつかの実施形態において、1つ以上のポリ核酸分子（B）は結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上のポリ核酸分子は、1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約1のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約2のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約3のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約4のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約5のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約6のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約7のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約8のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約9のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約10のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約11のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約12のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約13のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約14のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約15のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。いくつかの例では、約16のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに結合する。場合によっては、1つ以上のポリ核酸分子が同じである。他の例では、1つ以上のポリ核酸分子が異なる。いくつかの例では、結合部分Aは、抗体またはその結合フラグメントである。

【0267】

いくつかの実施形態において、結合部分A（例えば、抗体またはその結合フラグメント）に結合するポリ核酸分子（B）の数は、ある比率を形成する。いくつかの例では、比率はDAR（薬物対抗体の）比率と呼ばれ、本明細書で言及されるような薬物はポリ核酸分子（B）である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約1以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約2以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約3以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約4以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約5以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約6以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約7以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約8以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約9以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約10以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約11以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約12以上である。

【0268】

いくつかの例では、結合部分A（例えば、抗体またはその結合フラグメント）に対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約1である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約2である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約3である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約4である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子（B）のDAR比率は、約5である。いくつかの例では、結合部

分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 6 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 7 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 8 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 9 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 10 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 11 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 12 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 13 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 14 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 15 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、約 16 である。

10

【0269】

いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または 16 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、1 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、2 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、4 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、6 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、8 である。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、12 である。

20

【0270】

いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、単独であるいは組み合わせて、当該技術分野で知られている従来の技術を使用して、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、追加を用いることによって、および／または、組換え、ならびに／あるいは、当該技術分野で知られている他の修飾（例えば、グリコシル化とリン酸化などの翻訳後および化学的な修飾）によって、さらに修飾される。いくつかの例では、修飾は、Fc 受容体との相互作用を調節するための修飾をさらに含む。いくつかの例では、1つ以上の修飾は、例えば、国際公開第 WO 97 / 34631 に記載されるものを含み、当該文献は Fc ドメインと FcRn 受容体との間の相互作用に関与するアミノ酸残基を開示している。抗体またはその結合フラグメントのアミノ酸配列の基礎となる核酸配列にそのような修飾を導入する方法は、当業者に周知である。

30

【0271】

いくつかの例では、抗体結合フラグメントはさらにその誘導体を包含し、少なくとも 1 つの C D R を含むポリペプチド配列を含んでいる。

【0272】

いくつかの例では、本明細書に記載されるような「単鎖」との用語は、二重特異性の単鎖構築物の第 1 と第 2 のドメインが、好ましくは、単一核酸分子によってコードすることができる共線状アミノ酸配列 (co-linear amino acid sequence) の形態で共有結合されるということを意味する。

40

【0273】

いくつかの例では、二重特異性単鎖抗体構築物は、2 つの抗体由来の結合ドメインを含む構築物に関する。そのような実施形態では、二重特異性の単鎖抗体構築物はタンデム bisFcV あるいはダイアボディである。いくつかの例では、scFv は、リンカーペプチドによって接続された V H と V L のドメインを含む。いくつかの例では、リンカーは、第 1 と第 2 のドメインのそれぞれが、互いから独立して、その差次的な結合特異性を保持することができる十分な長さで配列である。

【0274】

いくつかの実施形態において、本明細書で使用されるように、～との結合または～によ

50

る相互作用とは、互いに少なくとも2つの抗原相互作用部位の結合／相互作用を定義する。いくつかの例では、抗原相互作用部位は、特異性抗原または抗原の特異的な群との特定の相互作用の能力を示すポリペプチドのモチーフを定義する。場合によっては、結合／相互作用は特定の認識を定義すると理解される。そのような場合、特定の認識は、抗体あるいはその結合フラグメントが、標的分子の各々の少なくとも2つのアミノ酸に特異的に相互作用および／または結合することができるということを指す。例えば、特定の認識は、抗体分子の特異性、あるいは標的分子の特定の範囲を区別するその能力に関する。追加の例では、抗原相互作用部位のその特異性抗原との特定の相互作用は、例えば、抗原の立体配座の変化、抗原のオリゴマー化などの誘導による、シグナルの開始をもたらす。さらなる実施形態では、結合は「鍵と鍵穴の原則 (key-lock-principle)」の特異性によって例証される。したがって、いくつかの例では、抗原相互作用部位および抗原のアミノ酸配列における特定のモチーフは、上記構造の第2の修飾の結果と同様に、その1次、2次、または3次構造の結果として互いに結合する。そのような場合、抗原相互作用部位のその特異性抗原との特定の相互作用は、その部位の抗原への簡単な結合をもたらす。

【0275】

いくつかの例では、特異的な相互作用はさらに、抗体またはその結合フラグメントの減少した交差反応性、あるいは減少したオフターゲット効果を指す。例えば、所望のポリペプチド／タンパク質に結合するが、他のポリペプチドのいずれにも本質的には結合しない抗体あるいはその結合フラグメントは、所望のポリペプチド／タンパク質に対して特異的であるとみなされる。抗原相互作用部位の特異性抗原との特定の相互作用の例は、リガンドのその受容体との特異性、例えば、抗原決定基群（エピトープ）の、抗体の抗原結合部位との相互作用を含む。

【0276】

追加の結合部分

いくつかの実施形態において、結合部分Aは血漿タンパク質である。いくつかの例では、血漿タンパク質はアルブミンを含む。いくつかの例では、結合部分Aはアルブミンである。いくつかの例では、アルブミンは、本明細書に記載される結合化学の1つ以上によって、ポリ核酸分子に変化する。いくつかの例では、アルブミンは、天然のライゲーション化学によってポリ核酸分子に結合する。いくつかの例では、アルブミンは、リジン結合によってポリ核酸分子に結合する。

【0277】

いくつかの例では、結合部分Aはステロイドである。例示的なステロイドは、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロールおよびトリアシルグリセロール、脂肪酸、飽和であり、不飽和であり、置換を含む炭化水素、あるいはこれらの組み合わせを含む。いくつかの例では、ステロイドはコレステロールである。いくつかの例では、結合部分はコレステロールである。いくつかの例では、コレステロールは、本明細書に記載される結合化学の1つ以上によってポリ核酸分子に結合する。いくつかの例では、コレステロールは、天然のライゲーション化学によってポリ核酸分子に結合する。いくつかの例では、コレステロールは、リジン結合によってポリ核酸分子に結合する。

【0278】

いくつかの例では、結合部分は、限定されないが、細胞上の特定の表面マーカーに結合するポリ核酸分子アプタマーを含むポリマーである。この例では、結合部分は、標的遺伝子またはmRNAにハイブリダイズしないが、その代わりに、細胞表面マーカーのその特定のエピトープに結合する抗体に類似する細胞表面マーカーに選択的に結合することができるポリ核酸である。

【0279】

いくつかの例では、結合部分Aはペプチドである。場合によっては、ペプチドは約1～約3 kDaを含む。場合によっては、ペプチドは約1.2～約2.8 kDa、約1.5～約2.5 kDa、あるいは約1.5～約2 kDaを含む。いくつかの例では、ペプチドは

10

20

30

40

50

二環式ペプチドである。場合によっては、二環式ペプチドは抑制された二環式ペプチドである。いくつかの例では、結合部分は二環式ペプチド（例えば、Bicycle Therapeuticsからの二環）である。

【0280】

さらなる場合には、結合部分は小分子である。いくつかの例では、小分子は抗体補充小分子である。場合によっては、抗体補充小分子は、標的結合末端および抗体結合末端を含み、ここで、標的結合末端は細胞表面受容体を認識して細胞表面受容体と相互作用することができる。例えば、いくつかの例では、グルタミン酸塩尿素化合物を含む標的結合末端は、PSMAとの相互作用を可能にし、それによって、PSMAを発現する細胞（例えば、癌細胞）との抗体相互作用を増強する。いくつかの例では、結合部分は、Zhang et al., “A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules,” J Am Chem Soc. 132 (36): 12711-12716 (2010); あるいはMcEnaney, et al., “Antibody-recruiting molecules: an emerging paradigm for engaging immune function in treating human disease,” ACS Chem Biol. 7 (7): 1139-1151 (2012) に記載される小分子である。

【0281】

抗体あるいはその結合フラグメントの産生

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、抗体とその結合フラグメント）は、とりわけ、化学合成によって、あるいは組換え発現によって、ポリペプチド（例えば、抗体）の合成に役立つように、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して生成され、および、好ましくは組換え発現技術によって生成される。

【0282】

いくつかの例では、抗体あるいはその結合フラグメントは組換え発現され、抗体またはその結合フラグメントをコードする核酸は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチド（例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17: 242に記載されるような）から組み立てられ、これは、抗体をコードする配列の一部を含有する重複するオリゴヌクレオチドの合成、オリゴヌクレオチドのアニーリングとライゲーション、および、その後のPCRによるライゲートされたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0283】

代替的に、抗体をコードする核酸分子は、配列の3'と5'の末端へハイブリダイズすることができる合成プライマーを使用するPCR増幅によって、あるいは特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用してクローンを作ることによって、適切なソース（例えば、抗体cDNAライブラリ、あるいは免疫グロブリンを発現する任意の組織あるいは細胞から生成されたcDNAライブラリ）から随意に生成される。

【0284】

いくつかの例では、抗体またはその結合は、ポリクローナル抗体を生成するためにウサギなどの動物を免疫化することにより、あるいは、より好ましくは、例えば、KohlerおよびMilstein (1975, Nature 256: 495-497) によって記載されるように、あるいは、Kozborら (1983, Immunology Today 4: 72) またはColeら (1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) によって記載されるように、モノクローナル抗体を生成することによって、随意に生成される。代替的に、少なくとも抗体のFab部分をコードするクローンは、特異性抗原に結合するFabフラグメントのクローンのためにFab発現ライブラリ（例えば、Huse et al., 1989, Science 246:

1275-1281に記載されるように)をスクリーニングすることにより、あるいは抗体ライブラリ(Clackson et al., 1991, Nature 352: 624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937を参照)をスクリーニングにより、随意に得られる。

【0285】

いくつかの実施形態において、適切な生物学的活性のヒト抗体分子からの遺伝子と一緒に、適切な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることにより、「キメラ抗体」(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454)の産生のために開発された技術が使用される。キメラ抗体は、異なる部分が、マウスのモノクローナル抗体に由来する可変領域、およびヒト免疫グロブリン定常領域(例えば、ヒト化抗体)を有する動物種などの様々な動物種に由来する分子である。

【0286】

いくつかの実施形態において、単鎖抗体の産生について記載された技術(U. S. Pat. No. 4,694,778; Bird, 1988, Science 242: 423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334: 544-54)は、単鎖抗体を産生するのに適している。単鎖抗体は、アミノ酸ブリッジによってFv領域の重鎖または軽鎖のフラグメントを結合することによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じさせる。大腸菌中の機能的なFvフラグメントの組み立てのための技術も随意に使用される(Skerra et al., 1988, Science 242: 1038-1041)。

【0287】

いくつかの実施形態において、抗体のヌクレオチド配列を含む発現ベクターあるいは抗体のヌクレオチド配列は、従来の技術(例えば、エレクトロポレーション、リボソームトランスフェクション、および、リン酸カルシウム沈澱反応)によって宿主細胞に導入され、トランスフェクトされた細胞はその後、抗体を生成するために従来の技術によって培養される。特定の実施形態では、抗体の発現は、構成的、誘導可能、あるいは組織特異的なプロモーターによって調節される。

【0288】

いくつかの実施形態において、様々な宿主発現ベクター系は、本明細書に記載される抗体またはその結合フラグメントを発現するために利用される。そのような宿主発現系は、抗体のコード配列が生成され、その後精製されるビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列で変形されるかトランスフェクトされるときに、抗体またはその結合フラグメントをインサイチュで発現する細胞を表す。これらは、限定されないが、組み換え体バクテリオファージDNA、プラスミドDNA、あるいは抗体またはその結合フラグメントコード配列を含むコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌と枯草菌)などの微生物;抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロミセス・ピキア);抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組換えウイルス発現ベクターに感染した昆虫細胞系(例えばバキュロウィルス);組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)およびタバコモザイクウイルス(TMV))に感染した、または、抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;あるいは、哺乳動物細胞(例えば、メタロチオネイン・プロモーター)のゲノム、あるいは、哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を保護する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BH、293、293T、3T3細胞)を含む。

【0289】

組換えタンパク質の長期的かつ高収率の生成のためには、安定した発現が好ましい。いくつかの例では、安定して抗体を発現する細胞株が随意に任意に操作される。ウイルスの複製開始点を含む発現ベクターを使用するのではなく、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）と選択可能なマーカーによって制御されたDNAで形質転換される。外来性DNAの導入後に、細胞を操作して栄養強化培地で1-2日間成長させ、その後、選択培地に切り替える。組換えプラスミド中の選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を与え、細胞に、プラスミドをその染色体へと安定的に統合させ、クローン化されて細胞株へと拡張するフォーカスを形成するように成長させる。この方法は、抗体またはその結合フラグメントを有利に発現する細胞株を操作するために有利に使用可能である。

10

【0290】

いくつかの例では、限定されないが、それぞれtk⁻、hgprt⁻、あるいはaprt⁻細胞で採用される単純疱疹ウイルス・チミジンキナーゼ (Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 遺伝子を含む、多くの選択系が使用される。同様に、代謝拮抗薬の耐性は、以下の遺伝子のための選定基準として使用される：メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); ミコフェノール酸に対する耐性を与えるgpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); アミノグリコシドG-418に対する耐性を与えるneo (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215)、および、ヒグロマイシンに対する耐性を与えるhygro (Santerre et al., 1984, Gene 30:147)。使用可能な組換えDNA技術の当該技術分野で知られている既知の方法は一般に、Ausubel et al. (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberrre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) に記載される。

20

30

40

【0291】

いくつかの例では、抗体の発現レベルは、ベクター増幅によって増大する（検討のために、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987を参照)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可

50

能であるとき、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルの増大は、標識遺伝子のコピーの数を増大させる。増幅された領域が抗体のヌクレオチド配列に関連しているため、抗体の産生も増加する (Crouse et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3: 257)。

【0292】

いくつかの例では、抗体の精製のための当該技術分野で知られている任意の方法が、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、とりわけ、プロテインAの後の特異性抗原への親和性、および、サイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差次的溶解性、あるいはタンパク質の精製のための他の標準的な技術によって使用される。

【0293】

ポリマー結合部分

いくつかの実施形態において、ポリマー部分Cはさらに、本明細書に記載されるポリ核酸分子、本明細書に記載される結合部分、あるいはこれらの組み合わせに結合する。いくつかの例では、ポリマー部分Cはポリ核酸分子に結合する。場合によっては、ポリマー部分Cは結合部分に結合する。他の場合には、ポリマー部分Cはポリ核酸分子結合部分分子に結合する。さらなる場合には、ポリマー部分Cは結合し、および、治療用分子プラットフォームの段落で議論されたとおりである。

【0294】

いくつかの例では、ポリマー部分Cは分枝したあるいは分枝していない単量体、および／または、二次元または三次元の単量体の架橋したネットワークの長鎖からなる、天然または合成のポリマーである。いくつかの例では、ポリマー部分Cは多糖、リグニン、ゴム、あるいはポリアルキレンオキシド（例えば、ポリエチレングリコール）を含む。いくつかの例では、少なくとも1つのポリマー部分Cは、限定されないが、アルファ、オメガ、ジヒドロキシポリエチレングリコール、生物分解性ラクトンベースのポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリラクチド酸 (PLA)、ポリ(グリコール酸) (PGA)、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート (PET、PETG)、ポリエチレン・テレフタレート (PETE)、ポリテトラメチレン・グリコール (PTG)、あるいはポリウレタン、およびこれらの混合物を含む。本明細書で使用されるように、混合物は、ブロックコポリマーに関連する場合と同様に、同じ化合物内の様々なポリマーの使用を指す。場合によっては、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも1つの部分が別のポリマーの単量体から構築されるポリマーである。いくつかの例では、ポリマー部分Cはポリアルキレンオキシドを含む。いくつかの例では、ポリマー部分CはPEGを含む。いくつかの例では、ポリマー部分Cはポリエチレン・イミド (PEI) またはヒドロキシエチルデンプン (HES) を含む。

【0295】

いくつかの例では、CはPEG部分である。いくつかの例では、PEG部分はポリ核酸分子の5'末端で結合するが、結合部分はポリ核酸分子の3'末端で結合する。いくつかの例では、PEG部分はポリ核酸分子の3'末端で結合するが、結合部分はポリ核酸分子の5'末端で結合する。いくつかの例では、PEG部分はポリ核酸分子の内部部位に結合する。いくつかの例では、PEG部分、結合部分、あるいはその組み合わせは、ポリ核酸分子の内部部位に結合する。いくつかの例において、抱合体は直接抱合体である。いくつかの例では、結合は天然のライゲーションを介するものである。

【0296】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は多分散または単分散の化合物である。いくつかの例では、多分散材料は、平均重量（重量平均）サイズおよび分散度を特徴とする、異なる分子量の材料の分散した分布を含む。いくつかの例では、単分散のPEGは1つのサイズの分子を含む。いくつかの実施形態において、Cは多分散または単分散のポリアルキレンオキシド（例えばPEG）であり、示された分子量は、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）分子の分子量の平均を表わす。

10

20

30

40

50

【0297】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）の分子量は、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daである。

10

【0298】

いくつかの実施形態において、Cはポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの実施形態において、CはPEGであり、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの例では、Cの分子量は約200 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約300 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約400 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約600 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約700 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約800 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約900 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1100 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1200 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1300 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1400 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1450 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1600 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1700 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1800 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1900 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2100 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2200 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2300 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2400 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2600 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2700 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2800 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2900 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3250 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3350 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3750 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4250 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4600 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4750 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約5000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約5500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約6000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約6500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約7000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約7500 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約8000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約10,000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約12,000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約20,000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約35,000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約40,000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約50,000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約60,000 Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約100,000 Daである。

20

30

40

50

、Cの分子量は約4250Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4600Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4750Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約5000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約5500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約6000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約6500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約7000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約7500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約8000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約10000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約12000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約20000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約35000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約40000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約50000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約60000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約100000Daである。

【0299】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、分散PEGであり、分散PEGは、1を超える繰り返しエチレンオキシド単位以上を含むポリマーPEGである。いくつかの例では、分散PEG（dPEG）は、2～60、2～50、あるいは2～48の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50、またはそれ以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約2以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約3以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約4以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約5以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約6以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約7以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約8以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約9以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約10以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約11以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約12以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約13以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約14以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約15以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約16以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約17以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約18以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約19以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約20以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約22以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約24以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約26以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約28以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約30以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約35以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約40以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約42以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約48以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約50以上の繰り返しエチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、段階的なやりかたで純粋な（例えば、約95%、98%、99%、あるいは99.5%）出発材料から単一の分子量化合物として合成される。

10

20

30

40

50

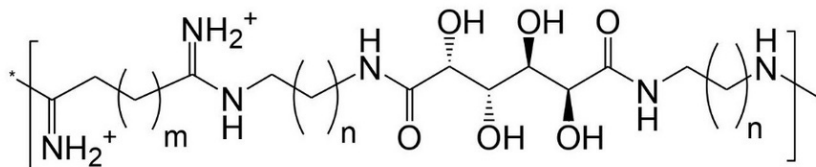
場合によっては、d P E Gは平均分子量よりもむしろ特定分子量を有する。場合によっては、本明細書に記載されるd P E Gは、Q u a n t a B i o d e s i g n, L M Dからのd P E Gである。

【0300】

いくつかの実施形態において、ポリマー部分Cはカチオン性ムチン酸ベースのポリマー(c M A P)を含む。いくつかの例では、c M P Aは少なくとも1つの繰り返しサブユニットの1つ以上のサブユニットを含み、サブユニット構造は式(III)として表され：

【0301】

【化46】



式 III

【0302】

ここで、mは、各出現時、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10であり、好ましくは、4-6、または5であり；および、nは、各出現時、独立して、0、1、2、3、4、または5である。いくつかの実施形態において、mとnは、例えば、約10である。

【0303】

いくつかの例では、c M A PはさらにP E G部分に結合し、c M A P-P E Gコポリマー、m P E G-c M A P-P E Gmトリブロックポリマー、あるいはc M A P-P E G-c M A Pトリブロックポリマーを生成する。いくつかの例では、P E G部分は約500 Da~約50,000 Daまでの範囲である。いくつかの例では、P E G部分は、約500 Daから約1000 Da、1000 Da以上~約5000 Da、5000 Da以上~約10,000 Da、10,000 Da以上~約25,000 Da、25,000 Da以上~約50,000 Da、あるいはこれらの範囲の2以上の任意の組み合わせである。

【0304】

いくつかの例では、ポリマー部分Cは、c M A P-P E Gコポリマー、m P E G-c M A P-P E Gmトリブロックポリマー、あるいはc M A P-P E G-c M A Pトリブロックポリマーである。場合によっては、ポリマー部分Cはc M A P-P E Gコポリマーである。他の場合には、ポリマー部分Cはm P E G-c M A P-P E Gmトリブロックポリマーである。さらなる場合には、ポリマー部分Cはc M A P-P E G-c M A Pトリブロックポリマーである。

【0305】

いくつかの実施形態において、ポリマー部分Cは、ポリ核酸分子、結合部分、および、随意にエンドソーム溶解性部分に結合する。

【0306】

エンドソーム溶解性部分

いくつかの実施形態において、式(I)の分子、A-X-B-Y-Cはさらに、追加の結合部分を含む。いくつかの例では、追加の結合部分はエンドソーム溶解性部分である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、エンドソーム、リソソーム、小胞体(E R)、ゴルジ体、微小管、ペルオキシソーム、あるいは細胞を有する他の小胞体などの、当該技術分野で知られている細胞の区分のいずれかから放出することができる化合物などの細胞区画放出成分である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、エンドソーム溶解性ポリペプチド、エンドソーム溶解性ポリマー、エンドソーム溶解性脂質、あるいはエンドソーム溶解性小分子を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリペプチドを含む。他の場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶

10

20

30

40

50

解性ポリマーを含む。

【0307】

エンドソーム溶解性ポリペプチド

いくつかの実施形態において、式 (I) : A-X-B-Y-C の分子はさらに、エンドソーム溶解性ポリペプチドに結合する。場合によっては、エンドソーム溶解性ポリペプチドは pH 依存性膜活性ペプチドである。場合によっては、エンドソーム溶解性ポリペプチドは両親媒性ポリペプチドである。追加の場合には、エンドソーム溶解性ポリペプチドはペプチド模倣薬である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、INF、メリチン、ムチン (meucin)、あるいはそのそれぞれの誘導体を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリペプチドは INF またはそのそれぞれの誘導体を含む。他の場合には、エンドソーム溶解性ポリペプチドはメリチンまたはそのそれぞれの誘導体を含む。さらなる場合には、エンドソーム溶解性ポリペプチドはムチンまたはそのそれぞれの誘導体を含む。

10

【0308】

いくつかの例では、INF7 は 24 残基ポリペプチドであり、これらの配列は、CGIFGEIEELIEEGLENLIDWGNA (SEQ ID NO: 1243)、あるいは GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC (SEQ ID NO: 1244) を含む。いくつかの例では、INF7 またはその誘導体は、以下の配列を含む：GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYGS GSCG (SEQ ID NO: 1245)、GLFEAIEGFIENGWEGMIDG WYG- (PEG) 6-NH₂ (SEQ ID NO: 1246)、または、GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG-SGSC-K (GalNAc)₂ (SEQ ID NO: 1247)。

20

【0309】

場合によっては、メリチンは 26 残基ポリペプチドであり、この配列は、CLIGA ILKVLATGLPTLISWIKNKRKQ (SEQ ID NO: 1248)、あるいは、GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO: 1249) を含む。いくつかの例では、メリチンは米国特許第 8,501,930 号に記載されるポリペプチド配列を含む。

【0310】

いくつかの例では、ムチンは、サソリ (Mesobuthus eupeus) の毒液腺に由来する抗菌ペプチド (AMP) である。いくつかの例では、ムチンはムチン-13 から構成され、これらの配列は、IFGAIAGLLKNIF-NH₂ (SEQ ID NO: 1250) を含み、ムチン-18 配列は、FFGHLFKLATKIIPSLFQ (SEQ ID NO: 1251) を含む。

30

【0311】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、その配列が INF7 あるいはその誘導体、メリチンあるいはその誘導体、または、ムチンあるいはその誘導体に対して少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、あるいは 99% の配列同一性であるポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、INF7 またはその誘導体、メリチンまたはその誘導体、あるいはムチンまたはその誘導体を含む。

40

【0312】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は INF7 またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1243-1247 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1243 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は

50

、SEQ ID NO: 1244-1247に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1244-1247を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1244-1247からなる。

【0313】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1248または1249に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1248に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1249に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1249を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1249からなる。

【0314】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はムチンまたはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1250または1251に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1250に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1251に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1250を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1251を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1250からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1251からなる。

【0315】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は表10で例証されるような配列を含む。

【0316】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

名称	起源	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	タイプ
Pep-I	シミアンウイルス40 ラージ抗原からの NLSとHIVの逆転写酵 素	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	1252	一次両親媒 性
pVEC	VE-カドヘリン	LLIILRRRRIRKQAHASK	1253	一次両親媒 性
VT5	合成ペプチド	DPKGDPPKGVTVTVTVTVTGKDP KPD	1254	β-シート 両 親媒性
C105Y	1-アンチトリプシン	CSIPPEVKFNKPFVYLI	1255	-
トランスポ ータータン	ガラニンと マストバ ラン	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALA KKIL	1256	一次両親媒 性
TP10	ガラニンとマストバ ラン	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	1257	一次両親媒 性
MPG	HIV gp41の融合配列 からの疎水性ドメイ ンとSV40 T抗原のNLS	GALFLGFLGAAGSTMGA	1258	β-シート 両 親媒性
gH625	I型 HSV の糖タンパ ク質 gH	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	1259	二次両親媒 性 α-ヘリカ ル
CADY	PPTG1 ペプチド	GLWRALWRLRLSLWRLWRA	1260	二次両親媒 性 α-ヘリカ ル
GALA	合成ペプチド	WEAALAEALAEALAEHLAEALAE ALEALAA	1261	二次両親媒 性 α-ヘリカ ル
INF	インフルエンザ HA2 融合ペプチド	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC	1262	二次両親媒 性 α-ヘリカ ル/pH-依存 性膜活性ペ プチド
HA2E5- TAT	インフルエンザウイ ルス X31 菌株融合タ ンパク質のインフル エンザ HA2 サブユニ ット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	1263	二次両親媒 性 α-ヘリカ ル/pH-依存 性膜活性ペ プチド
HA2- ペネトラチ ン	インフルエンザウイ ルス X31 菌株融合タ ンパク質のインフル エンザ HA2 サブユニ ット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKI WFQNRMMKW KK-amide	1264	pH-依存性 膜活性ペプ チド
HA-K4	インフルエンザウイ ルス X31 菌株融合タ ンパク質のインフル エンザ HA2 サブユニ ット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG- SSKSKK	1265	pH-依存性 膜活性ペプ チド

【 0 3 1 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

HA2E4	インフルエンザウイルス X31 菌株融合タンパク質のインフルエンザ HA2 サブユニット	GLFEAIAAGFIENGWEGMIDGGGYC	1266	pH-依存性膜活性ペプチド
H5WYG	HA2 アナログ	GLFHAIAHFIHGGWH GLIHGWYG	1267	pH-依存性膜活性ペプチド
GALA-INF3-(PEG)6-NH	INF3 融合タンパク質	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEAL EALAA-(PEG)6-NH2	1268	pH-依存性膜活性ペプチド
CM18-TAT11	セクロピン-A-メリチン ₂₋₁₂ (CM18) 融合タンパク質	KWKLFKKIGAVLKVLTTG- YGRKKRRQRRR	1269	pH-依存性膜活性ペプチド

10

20

【0318】

場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、Bcl-2 および／または Bcl-xL などの抑制因子標的の拮抗を介してアポトーシスを誘発する Bak BH3 ポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、Albarran, et al., "Efficient intracellular delivery of a pro-apoptotic peptide with a pH-responsive carrier," *Reactive & Functional Polymers* 71: 261-265 (2011) に記載される Bak BH3 ポリペプチドを含む。

30

【0319】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、PCT 国際公開第 WO2013/166155 号または WO2015/069587 号に記載されるようなポリペプチド（例えば、細胞透過性ポリペプチド）を含む。

【0320】

エンドソーム溶解性ポリマー

40

いくつかの実施形態において、式 (I) : A-X-B-Y-C の分子は、さらにエンドソーム溶解性ポリマーと結合する。本明細書で使用されるように、エンドソーム溶解性ポリマーは、線形、分岐ネットワーク、星形、くし型、あるいはハシゴ型のポリマーを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリマーは、ホモポリマー、あるいは 2 以上の異なるタイプの単量体を含むコポリマーである。場合によっては、エンドソーム溶解性ポリマーはポリカチオンポリマーである。その他の場合において、エンドソーム溶解性ポリマーはポリアニオンポリマーである。

【0321】

いくつかの例では、ポリカチオンポリマーは、電荷が正、電荷が中性、または電荷が負であるモノマー単位からなり、正味の電荷は正である。その他の場合において、ポリカチ

50

オンポリマーは、2つ以上の正電荷を含有する、非ポリマー分子を含む。例示的なカチオンポリマーとしては、限定されないが、ポリ（L-リジン）（PLL）、ポリ（L-アルギニン）（PLA）、ポリエチレンイミン（PEI）、ポリ[α -（4-アミノブチル）-L-グリコール酸]（PAGA）、2-（ジメチルアミノ）エチルメタクリレート（DMAEMA）、あるいはN，N-ジエチルアミノエチルメタクリレート（DEAEMA）が挙げられる。

【0322】

場合によっては、ポリアニオンポリマーは、電荷が正、電荷が中性、または電荷が負であるモノマー単位からなり、正味の電荷は負である。その他の場合において、ポリアニオンポリマーは、2つ以上の負電荷を含有する、非ポリマー分子を含む。例示的なアニオンポリマーは、p（アルキルアクリレート）（例えば、ポリ（プロピルアクリル酸）（PPAA））あるいはポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（NIPAM）を含む。追加の例としては、Khormaei, et al., "Edosomolytic anionic polymer for the cytoplasmic delivery of siRNAs in localized in vivo applications," *Advanced Functional Materials* 23: 565-574 (2013) に記載されるPP75、L-フェニルアラニン-ポリ（L-リジンイソフタルアミド）ポリマーが挙げられる。

【0323】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性ポリマーは、pH反応性のエンドソーム溶解性ポリマーである。pH反応性のポリマーは、サイズを増大させる（膨潤させる）か、環境のpHに依存して崩壊する、ポリマーを含む。ポリアクリル酸とキトサンはpH反応性のポリマーの例である。

【0324】

いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分は、膜破壊的なポリマーである。場合によっては、膜破壊的なポリマーは、カチオンポリマー、中性または疎水性のポリマー、あるいはアニオンポリマーを含む。いくつかの事例では、膜破壊的なポリマーは親水性ポリマーである。

【0325】

いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分は、膜破壊的なポリマーである。例示的なpH反応性の膜破壊的なポリマーは、p（アルキルアクリル酸）、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（NIPAM）コポリマー、スクシニル化p（グリシドール）、およびp（ β -リンゴ酸）ポリマーを含む。

【0326】

いくつかの例では、p（アルキルアクリル酸）は、ポリ（プロピルアクリル酸（polyPAA）、ポリ（メタクリル酸（PMAA））、ポリ（エチルアクリル酸（PEAA））、および、ポリ（プロピルアクリル酸）（PPAA）を含む。いくつかの例では、p（アルキルアクリル酸）は、Jones, et al., *Biochemistry Journal* 372: 65-75 (2003) に記載されるp（アルキルアクリル酸）を含む。

【0327】

いくつかの実施形態において、pH反応性の膜破壊的なポリマーは、p（ブチルアクリレート-co-メタクリル酸）を含む。（Bulmus, et al., *Journal of Controlled Release* 93: 105-120 (2003); and Yessine, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1613: 28-38 (2003) を参照）

【0328】

いくつかの実施形態において、pH反応性の膜破壊的なポリマーは、p（スチレン-alt-無水マレイン酸）を含む。（例えば、Henry, et al., *Biomacromolecules* 7: 2407-2414 (2006) を参照）

【0329】

いくつかの実施形態において、pH反応性の膜破壊性ポリマーは、ポリ(MAA-co-PDSA)、ポリ(EAA-co-PDSA)、ポリ(PAA-co-PDSA)、ポリ(MAA-co-BA-co-PDSA)、ポリ(EAA-co-BA-co-PDSA)、あるいはポリ(PAA-co-BA-co-PDSA)ポリマーなどのポリジルスルフィドアクリレート(PDSA)ポリマーを含む(El-Sayed, et al., "Rational design of composition and activity correlations for pH-responsive and glutathione-reactive polymer therapeutics," Journal of Controlled Release 104: 417-427 (2005); or Flanary et al., "Antigen delivery with poly(propylacrylic acid) conjugation enhanced MHC-1 presentation and T-cell activation," Bioconjugate Chem. 20: 241-248 (2009)を参照)

10

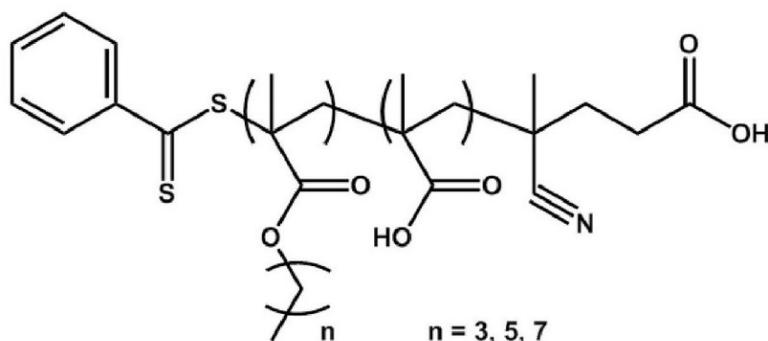
【0330】

いくつかの実施形態において、pH反応性の膜破壊性ポリマーは、以下の塩基構造を含む細胞溶解のポリマーを含む：

【0331】

【化47】

20



30

【0332】

いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分はさらに、追加の抱合体例えば、ポリマー(例えば、PEG)、あるいは修飾されたポリマー(例えば、コレステロール修飾されたポリマー)に結合する。

【0333】

いくつかの例では、追加の抱合体は界面活性剤(例えば、トリトンX-100)を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分は、界面活性剤(例えば、トリトンX-100)と結合したポリマー(例えば、ポリ(アミドアミン))を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分は、ポリ(アミドアミン)-トリトンX-100を含む(Duncan, et al., "A polymer-Triton X-100 conjugate capable of pH-dependent red blood cell lysis: a model system illustrating the possibility of drug delivery within acidic intracellular compartments," Journal of Drug Targeting 2: 341-347 (1994))。

40

【0334】

エンドソーム溶解性脂質

いくつかの実施形態において、エンドソーム溶解性部分は脂質(例えば、融合性脂質)である。いくつかの実施形態において、式(I): A-X-B-Y-Cの分子はさらに、

50

エンドソーム溶解性脂質（例えば、融合性脂質）と結合する。例示的な融合性脂質は、1, 2-ジレオイル (d i l e o y l) - s n-3-ホスホエタノールアミン (D O P E)、ホスファチジルエタノールアミン (P O P E)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (P O P C)、(6 Z, 9 Z, 28 Z, 31 Z)-ヘプタトリアコンター-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-オール (ジ- L i n)、N-メチル (2, 2-ジ (9 Z, 12 Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)-1, 3-ジオキソラン-4-イル) メタンアミン (D L i n-k-DMA)、および、N-メチル-2- (2, 2-ジ (9 Z, 12 Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)-1, 3-ジオキソラン-4-イル) エタンアミン (X T C) を含む。

【0335】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、P C T 国際公開第 W O 0 9 / 1 2 6, 9 3 3 に記載される脂質（例えば、融合性脂質）である。

【0336】

エンドソーム溶解性小分子

いくつかの実施形態では、エンドソーム溶解性部分は小分子である。いくつかの実施形態において、式 (I) : A-X-B-Y-C の分子はさらにエンドソーム溶解性小分子と結合する。エンドソーム溶解性部分として適切な例示的な小分子は、限定されないが、キニーネ、クロロキン、水酸化クロロキン、アモジアキン (カルノキン (c a r n o q u i n e s))、アモピロキン、プリマキン、メフロキン、ニバキン (n i v a q u i n e s)、ハロファントリン、キノニンイミン、あるいはこれらの組み合わせを含む。いくつかの例では、キノリンエンドソーム溶解性部分は、限定されないが、7-クロロ-4- (4-ジエチルアミノ-1-メチルブチル-アミノ) キノリン (クロロキン) ; 7-クロロ-4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチル-アミノ) キノリン (ヒドロキシクロロキン) ; 7-フルオロ-4- (4-ジエチルアミノ-1-メチルブチル-アミノ) キノリン ; 4- (4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 7-ヒドロキシ-4- (4-ジエチル-アミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 7-クロロ-4- (4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ) キノリン (デスメチルクロロキン) ; 7-フルオロ-4- (4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 4- (4-ジエチル-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-ヒドロキシ-4- (4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-クロロ-4- (1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-フルオロ-4- (1-カルボキシ-4-ジエチル-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 4- (1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-ヒドロキシ-4- (1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-クロロ-4- (1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 7-フルオロ-4- (1-カルボキシ-4-ジエチル-アミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 4- (1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 7-ヒドロキシ-4- (1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 7-フルオロ-4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; 7-ヒドロキシ-4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ) キノリン ; ヒドロキシクロロキンホスフェート ; 7-クロロ-4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル-1)-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン (デスメチルヒドロキシクロロキン) ; 7-フルオロ-4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-ヒドロキシ-4- (4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-クロロ-4- (1-カルボキシ-4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 7-フルオロ-4- (1-カルボキシ-4-エチル- (2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-ブチルアミノ) キノリン ; 4- (1-カル

10

20

30

40

50

ボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-ブチルアミノ)キノリン;
7-ヒドロキシ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-ア
ミノ-1-ブチルアミノ)キノリン;7-クロロ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-
(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン;7-フルオロ
-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチル
ブチルアミノ)キノリン;4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル
)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン;7-ヒドロキシ-4-(1-カルボキ
シ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリ
ン;8-[(4-アミノペンチル)アミノ-6-メトキシジヒドロクロリドキノリン;1
-アセチル-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン;8-[(4-アミノペンチル)ア
ミノ]-6-メトキシキノリンジヒドロクロリド;1-ブチリル-1,2,3,4-テト
ラヒドロキノリン;3-クロロ-4-(4-ヒドロキシ-アルファ,アルファ'-ビス(2
-メチル-1-ピロリジニル)-2,5-キシリジノキノリン、4-[(4-ジエチル-
アミノ)-1-メチルブチル-アミノ]-6-メトキシキノリン;3-フルオロ-4-(
4-ヒドロキシ-アルファ,αアルファ'-ビス(2-メチル-1-ピロリジニル)-2,
5-キシリジノキノリン、4-[(4-ジエチルアミノ)-1-メチルブチル-アミノ]
-6-メトキシキノリン;4-(4-ヒドロキシ-アルファ,アルファ'-ビス(2-メチ
ル-1-ピロリジニル)-2,5-キシリジノキノリン;4-[(4-ジエチルアミノ)
-1-メチルブチル-アミノ]-6-メトキシキノリン;3,4-ジヒドロ-1-(2H
)-キノリンカルボキシアルデヒド;1,1'-ペンタメチレンジキノリニウムヨード (
diquinoleinium diiodide);8-キノリノールスルフェート、
および、アミノ、アルデヒド、カルボン酸、ヒドロキシル、ハロゲン、ケト、スルフヒド
リル、およびビニル誘導体またはそのアナログを含む。いくつかの例では、エンドソーム
溶解性部分は、Naissbittら(1997, J Pharmacol Exp Th
erapy 280:884-893)と米国特許第5,736,557号に記載される
小分子である。

10

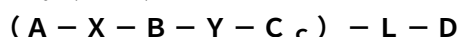
20

【0337】

式(I)分子-エンドソーム溶解性部分抱合体

いくつかの実施形態において、1つ以上のエンドソーム溶解性部分は、少なくとも1つ
の結合部分、少なくとも1つのポリヌクレオチド、少なくとも1つのポリマー、あるいは
これらの任意の組み合わせを含む分子に結合する。いくつかの例では、エンドソーム溶解
性部分は、式(II)：

30



式II

に結合し、

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；

40

Yは単結合または第2のリンカーであり；

Lは単結合または第3のリンカーであり；

Dはエンドソーム溶解部分であり；および、

cは0と1の間の整数であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチド
を含み；および、Dは、A、B、またはCの任意の場所に結合する。

【0338】

いくつかの実施形態では、AとCは同じ末端でBに結合しない。

【0339】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル

50

、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)あるいはエチレン核酸(ENA)を含む。場合によっては、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsiRNA分子である。いくつかの実施形態において、X、Y、およびLは、独立して単結合あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの例では、Aは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。場合によっては、Cはポリエチレングリコールである。

【0340】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、ポリペプチド、ポリマー、脂質、あるいは小分子を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリペプチドである。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリマーである。他の場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性脂質である。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性小分子である。

【0341】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はINF7またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1243に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243からなる。

【0342】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1248に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248からなる。

【0343】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は表10で例証されるような配列である。

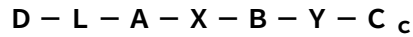
【0344】

さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、例えば、pH反応性のエンドソーム溶解性ポリマー、膜破壊的なポリマー、ポリカチオンポリマー、ポリアニオンポリマー、pH反応性の膜破壊的なポリマー、あるいはこれらの組み合わせなどのエンドソーム溶解性ポリマーである。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、p(アルキルアクリル酸)ポリマー、p(ブチルアクリレート-co-メタクリル酸)ポリマー、p(スチレン-アルト-無水マレイン酸)ポリマー、ピリジルジスルフィドアクリレート(PDSA)

ポリマー、ポリマー－PEG抱合体、ポリマー－界面活性剤抱合体、あるいはこれらの組み合わせを含む。

【0345】

いくつかの実施形態において、エンドソーム溶解性部分抱合体は、式(I Ia)によるものであり：



式 I I a

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；

Yは単結合または第2のリンカーであり；

Lは単結合または第3のリンカーであり；

Dはエンドソーム溶解部分であり；および、

cは1の整数であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。

【0346】

いくつかの実施形態では、AとCは同じ末端でBに結合しない。

【0347】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)あるいはエチレン核酸(ENA)を含む。場合によっては、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsiRNA分子である。いくつかの実施形態において、X、Y、およびLは、独立して単結合あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの例では、Aは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。場合によっては、Cはポリエチレングリコールである。

【0348】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、ポリペプチド、ポリマー、脂質、あるいは小分子を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリペプチドである。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリマーである。他の場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性脂質である。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性小分子である。

【0349】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は I N F 7 またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 1 2 4 3 に対して少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 1 2 4 3 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 1 2 4 3 からなる。

【0350】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 1 2 4 8 に対して少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 1 2 4 8 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 1 2 4 8 からなる。

【0351】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は表 1 0 で例証されるような配列である。

【0352】

さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、例えば、p H 反応性のエンドソーム溶解性ポリマー、膜破壊的なポリマー、ポリカチオンポリマー、ポリアニオンポリマー、p H 反応性の膜破壊的なポリマー、あるいはこれらの組み合わせなどのエンドソーム溶解性ポリマーである。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、p (アルキルアクリル酸) ポリマー、p (ブチルアクリレート-c o -メタクリル酸) ポリマー、p (スチレン-アルト-無水マレイン酸) ポリマー、ピリジルジスルフィドアクリレート (P D S A) ポリマー、ポリマー-P E G 抱合体、ポリマー-界面活性剤抱合体、あるいはこれらの組み合わせを含む。

【0353】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分抱合体は、式 (I I b) によるものであり：



式 I I b

式中、

A は結合部分であり；

B はポリヌクレオチドであり；

X は単結合または第 1 のリンカーであり；

L は単結合または第 3 のリンカーであり；および、

D はエンドソーム溶解性部分であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つの 5' -ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。

【0354】

いくつかの実施形態では、A と C は同じ末端で B に結合しない。

【0355】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、2' -O -メチル、2' -O -メトキシエチル (2' -O -M O E)、2' -O -アミノプロピル、2' -デオキシ、T -デオキシ-2' -フルオロ、2' -O -アミノプロピル (2' -O -A P)、2' -O -ジメチルアミノエチル (2' -O -D M A O E)、2' -O -ジメチルアミノプロピル (2' -O -D M A P)、T -O -ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' -O -D M A E O E)、または、2' -O -N -メチルアセトアミド (2' -O -N M A) 修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸 (L N A) あるいはエチレン核酸 (E N A) を含む。場合によっては、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第 1 のポリヌクレオチドと、第 1 のポリヌクレオチドにハイブリダイズ

10

20

30

40

50

された第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsiRNA分子である。いくつかの実施形態において、XおよびLは、独立して単結合あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの例では、Aは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。場合によっては、Cはポリエチレングリコールである。

【0356】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、ポリペプチド、ポリマー、脂質、あるいは小分子を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリペプチドである。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリマーである。他の場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性脂質である。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性小分子である。

【0357】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はINF7またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1243に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243からなる。

【0358】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1248に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248からなる。

【0359】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は表10で例証されるような配列である。

【0360】

さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、例えば、pH反応性のエンドソーム溶解性ポリマー、膜破壊的なポリマー、ポリカチオンポリマー、ポリアニオンポリマー、pH反応性の膜破壊的なポリマー、あるいはこれらの組み合わせなどのエンドソーム溶解性ポリマーである。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、p(アルキルアクリル酸)ポリマー、p(ブチルアクリレート-co-メタクリル酸)ポリマー、p(スチレン-アルト-無水マレイン酸)ポリマー、ピリジルジスルフィドアクリレート(PDSA)ポリマー、ポリマー-PEG抱合体、ポリマー-界面活性剤抱合体、あるいはこれらの組み合わせを含む。

【0361】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分抱合体は、式(IIc)によるものであり：



式IIc

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；

10

20

30

40

50

Xは単結合または第1のリンカーであり；
 Yは単結合または第2のリンカーであり；
 Lは単結合または第3のリンカーであり；
 Dはエンドソーム溶解部分であり；および、
 cは1の整数であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。

【0362】

いくつかの実施形態では、AとCは同じ末端でBに結合しない。

【0363】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)あるいはエチレン核酸(ENA)を含む。場合によっては、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsiRNA分子である。いくつかの実施形態において、X、Y、およびLは、独立して単結合あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの例では、Aは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂、一本鎖可変フラグメント(scFv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、単ドメイン抗体(sdAb)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。場合によっては、Cはポリエチレングリコールである。

【0364】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、ポリペプチド、ポリマー、脂質、あるいは小分子を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリペプチドである。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリマーである。他の場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性脂質である。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性小分子である。

【0365】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はINF7またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1243に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1243からなる。

【0366】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1248に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチ

10

20

30

40

50

ドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1248からなる。

【0367】

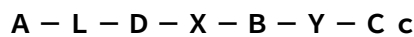
いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は表10で例証されるような配列である。

【0368】

さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、例えば、pH反応性のエンドソーム溶解性ポリマー、膜破壊的なポリマー、ポリカチオンポリマー、ポリアニオンポリマー、pH反応性の膜破壊的なポリマー、あるいはこれらの組み合わせなどのエンドソーム溶解性ポリマーである。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、p（アルキルアクリル酸）ポリマー、p（ブチルアクリレート-*c o*-メタクリル酸）ポリマー、p（スチレン-アルト-無水マレイン酸）ポリマー、ピリジルジスルフィドアクリレート（PD SA）ポリマー、ポリマー-PEG 抱合体、ポリマー-界面活性剤抱合体、あるいはこれらの組み合わせを含む。

【0369】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分抱合体は、式（I I d）によるものであり：



式 I I d

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cはポリマーであり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；

Yは単結合または第2のリンカーであり；

Lは単結合または第3のリンカーであり；

Dはエンドソーム溶解部分であり；および、

cは1の整数であり；および、

ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドを含む。

【0370】

いくつかの実施形態では、AとCは同じ末端でBに結合しない。

【0371】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）、または、2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸（LNA）あるいはエチレン核酸（ENA）を含む。場合によっては、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。場合によっては、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsiRNA分子である。いくつかの実施形態において、X、Y、およびLは、独立して単結合あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの例では、Aは抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab₂

10

20

30

40

50

、一本鎖可変フラグメント (s c F v)、ダイアボディ、ミニボディ (m i n i b o d y)、ナノボディ、単ドメイン抗体 (s d A b)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。場合によっては、Cはポリエチレングリコールである。

【0372】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、ポリペプチド、ポリマー、脂質、あるいは小分子を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリペプチドである。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリマーである。他の場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性脂質である。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性小分子である。

【0373】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はI N F 7またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 1 2 4 3に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 1 2 4 3を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 1 2 4 3からなる。

【0374】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 1 2 4 8に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 1 2 4 8を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 1 2 4 8からなる。

【0375】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は表10で例証されるような配列である。

【0376】

さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、例えば、pH反応性のエンドソーム溶解性ポリマー、膜破壊的なポリマー、ポリカチオンポリマー、ポリアニオンポリマー、pH反応性の膜破壊的なポリマー、あるいはこれらの組み合わせなどのエンドソーム溶解性ポリマーである。さらなる場合には、エンドソーム溶解性部分は、p (アルキルアクリル酸) ポリマー、p (ブチルアクリレート-c o -メタクリル酸) ポリマー、p (スチレン-アルト-無水マレイン酸) ポリマー、ピリジルジスルフィドアクリレート (P D S A) ポリマー、ポリマー-P E G 抱合体、ポリマー-界面活性剤抱合体、あるいはこれらの組み合わせを含む。

【0377】

リンカー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるリンカーは、切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーである。いくつかの例では、リンカーは切断可能なリンカーである。いくつかの例では、リンカーは酸切断可能なリンカーである。いくつかの例では、リンカーは切断不可能なリンカーである。いくつかの例では、リンカーはC₁-C₆アルキル基 (例えば、C₅、C₄、C₃、C₂、あるいはC₁アルキル基) を含む。いくつかの例では、リンカーはホモ二機能性架橋リンカー、ヘテロ二機能性架橋リンカーなどを含む。いくつかの例では、リンカーはトレースレスリンカー (あるいは、長さがゼロのリンカー) である。いくつかの例では、リンカーは非ポリマーリンカーである。場合によっては、リンカーは非ペプチドリンカーあるいはアミノ酸残基を含まないリンカーである。

【0378】

いくつかの例では、リンカーはホモ二機能性リンカーを含む。例示的なホモ二機能性リンカーは、限定されないが、L o m a n t の試薬ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) D S P、3'3'-ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) (D T S S P)、ジスクシンイミジルスベレート (D S S)、ビス (スルホスクシンイミジル)

10

20

30

40

50

スベレート (BS)、ジスクシンイミジルタルトレート (DST)、ジスルホスクシンイミジルタルトレート (スルホDST)、エチレングリコビス (スクシンイミジルスクシネート) (EGS)、ジスクシンイミジルグルタレート (DSG)、N、N'-ジスクシンイミジルカーボネート (DSC)、ジメチルアジブイミデート (DMA)、ジメチルピメリミデートピメリミデート (DMP)、ジメチルスベリミデート (DMS)、ジメチル-3, 3'-ジチオビスプロピオンイミデート (DTBP)、1, 4-ジ-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド)ブタン (DPDPB)、ビスマレイミドヘキサン (BMH)、例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン、1, 3-ジフルオロ-4, 6-ジニトロベンゼンなどのハロゲン化アリール含有化合物 (DFDNB)、4, 4'-ジフルオロ-3, 3'-ジニトロフェニルスルホン (DFDNPS)、ビス-[β-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド (BASED)、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、1, 4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、o-トルイジン、3, 3'-ジメチルベンジジン、ベンジジン、α, α'-p-ジアミノジフェニル、ジヨード-p-キシレンスルホン酸、N, N'-エチレンビス (ヨードアセトアミド)、あるいは、N, N'-ヘキサメチレンビス (ヨードアセトアミド)を含む。

【0379】

いくつかの実施形態では、リンカーはヘテロ二機能性リンカーを含む。例示的なヘテロ二機能性リンカーは、限定されないが、アミン反応のおよびスルフヒドリル架橋リンカー、例えば、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (sPDP)、長鎖N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (LC-sPDP)、水溶性の長鎖N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (スルホ-LC-sPDP)、スクシンイミジルオキシカルボニル-α-メチル-α-(2-ピリジルジチオ)トルエン (sMPT)、スルホスクシンイミジル-6-[α-メチル-α-(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート (スルホLC-sMPT)、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)、スルホスクシンイミジル-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 (スルホ-sMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBs)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル (スルホ-MB)、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート (sIAB)、スルホスクシンイミジル (4-iodoacetyl)アミノベンゾエート (スルホ-sIAB)、スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート (sMPB)、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート (スルホ-sMPB)、N-(γ-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステル (GMB)、N-(γ-マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル (スルホ-GMB)、スクシンイミジル 6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノエート (sIAX)、スクシンイミジル 6-[6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノイル)アミノ]ヘキサノエート (sIAXX)、スクシンイミジル 4-(((ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (sIAC)、スクシンイミジル 6-((((4-ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボニル)アミノ)ヘキサノエート (sIACX)、p-ニトロフェニルヨードアセテート (NPiA)、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド (MPBH)、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシルヒドラジド-8 (M2C2H)、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド (PDPH)などのカルボニル反応のおよびスルフヒドリル反応的な架橋リンカー、アミン反応のおよび光反応性の架橋リンカー、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸 (NH-AsA)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸 (スルホ-NH-AsA)、スルホスクシンイミジル-(4-アジドサリチルアミド)ヘキサノエート (スルホ-NH-LC-AsA)、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1, 3'-ジチオプロピオ

10

20

30

40

50

ネート (s A s D)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (H s A B)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (スルホ-H s A B)、N-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (s A N P A H)、スルホスクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (スルホ-s A N P A H)、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキスクシンイミド (A N B-N O s)、スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド)-エチル-1,3'-ジチオプロピオネート (s A N D)、N-スクシンイミジル-4(4-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオネート (s A D P)、N-スルホスクシンイミジル(4-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオネート (スルホ-s A D P)、スルホスクシンイミジル 4-(p-アジドフェニル)ブチレート (スルホ-s A P B)、スルホスクシンイミジル 2-(7-アジド-4-メチルクマリナー-3-アセトアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート (s A E D)、スルホスクシンイミジル 7-アジド-4-メチルクマリナー-3-アセテート (スルホ-s A M C A)、p-ニトロフェニル・ジアゾピルバート (p N P D P)、p-ニトロフェニル-2-ジアゾ-3,3,3-トリフルオロプロピオネート (P N P-D T P)、スルフヒドリル反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、1-(p-アジドサリチルアミド)-4-(ヨードアセトアミド)ブタン (A s I B)、N-[4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル]-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド (A P D P)、ベンゾフェノン-4-ヨードアセトアミド、ベンゾフェノン-4-マレイミドカルボニル反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、p-アジドベンゾイルヒドラジド (A B H)、カルボキシレート反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、4-(p-アジドサリチルアミド)ブチルアミン (A s B A)、および、アルギニン反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、p-アジドフェニルグリオキサール (A P G)を含む。

【0380】

いくつかの例では、リンカーは反応性官能基を含む。場合によっては、反応性官能基は、結合部分に存在する求電子基に反応的な求核基を含む。例示的な求電子基は、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、エノン、ハロゲン化アシル、または酸無水物などのカルボニル基を含む。いくつかの実施形態において、反応性官能基はアルデヒドである。例示的な求核基は、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドを含む。

【0381】

いくつかの実施形態では、リンカーはマレイミド基を含む。いくつかの例では、マレイミド基はマレイミドスペーサーとも呼ばれる。いくつかの例では、マレイミド基はさらにカプロン酸を包含し、マレイミドカプロイル (m c) を形成する。場合によっては、リンカーはマレイミドカプロイル (m c) を含む。場合によっては、リンカーはマレイミドカプロイル (m c) である。他の例では、マレイミド基は、上に記載されたスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサナー-1-カルボキシレート (s M C C)、あるいは、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサナー-1-カルボキシレート (スルホ-s M C C) などのマレイミドメチル基を含む。

【0382】

いくつかの実施形態において、マレイミド基は自己安定化マレイミドである。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、チオスクシンイミド環加水分解の分子内の触媒作用をもたらすために、マレイミドに隣接する塩基性アミノ基を取り込むべくジアミノプロピオン酸 (D P R) を利用し、それによって、マレイミドがレトロマイケル反応による脱離反応を経験することのないようにする。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、L y o n, e t a l., "S e l f-h y d r o l y z i n g m a l e i m i d e s i m p r o v e t h e s t a b i l i t y a n d p h a r m a c o l o g i c a l p r o p e r t i e s o f a n t i b o d y-d r u g c o n j u g a t e s," N a t. B i o t e c h n o l. 32 (10):1059-1062 (2014) に記載

10

20

30

40

50

されるマレイミド基である。いくつかの例では、リンカーは自己安定化マレイミドを含む。いくつかの例では、リンカーは自己安定化マレイミドである。

【0383】

いくつかの実施形態では、リンカーはペプチド部分を含む。いくつかの例では、ペプチドは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上のアミノ酸残基を。いくつかの例では、ペプチド部分は切断可能なペプチド部分（例えば、酵素的または化学的に）である。いくつかの例では、ペプチド部分は切断不可能なペプチド部分である。いくつかの例では、ペプチド部分は、Val-Cit（バリン-シトルリン）、Gly-Gly-Phe-Gly（SEQ ID NO: 2111）、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu（SEQ ID NO: 2112）、またはGly-Phe-Leu-Gly（SEQ ID NO: 2113）を含む。いくつかの例では、リンカーは、などのペプチド部分を含む：Val-Cit（バリン-シトルリン）、Gly-Gly-Phe-Gly（SEQ ID NO: 2111）、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu（SEQ ID NO: 2112）、またはGly-Phe-Leu-Gly（SEQ ID NO: 2113）。場合によっては、リンカーはVal-Citを含む。場合によっては、リンカーはVal-Citである。

【0384】

いくつかの実施形態において、リンカーは安息香酸基あるいはその誘導体を含む。いくつかの例では、安息香酸基あるいはその誘導体はパラアミノ安息香酸（PABA）を含む。いくつかの例では、安息香酸基あるいはその誘導体はγ-アミノ酪酸（GABA）を含む。

【0385】

いくつかの実施形態において、リンカーは、任意の組み合わせにおける、マレイミド基、ペプチド部分、および／または、安息香酸基の1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、マレイミド基、ペプチド部分、および／または、安息香酸基の組み合わせを含む。いくつかの例では、マレイミド基はマレイミドカプロイル（mc）である。いくつかの例では、ペプチド基はval-citである。いくつかの例では、安息香酸基はPABAである。いくつかの例では、リンカーはmc-val-cit基を含む。場合によっては、リンカーはval-cit-PABA基を含む。さらなる場合には、リンカーはmc-val-cit-PABA基を含む。

【0386】

いくつかの実施形態において、リンカーは自壊性リンカーあるいは自己排除リンカーである。場合によっては、リンカーは自壊性リンカーである。他の場合には、リンカーは自己排除リンカー（例えば環化自己排除リンカー）である。いくつかの例では、リンカーは、米国特許第9,089,614号あるいはPCT国際公開第WO2015038426に記載されるリンカーを含む。

【0387】

いくつかの実施形態において、リンカーは樹状型リンカーである。いくつかの例では、樹状型リンカーは分岐した多機能リンカー部分を含む。いくつかの例では、樹状型リンカーはポリヌクレオチドB対結合部分Aのモル比を増加させるために使用される。いくつかの例では、樹状型リンカーはPAMAMデンドリマーを含む。

【0388】

いくつかの実施形態において、リンカーは、トレースレスリンカーであるか、または、切断後に、結合部分A、ポリヌクレオチドB、ポリマーC、あるいはエンドソーム溶解性部分Dに対するリンカー部分（例えば、原子あるいはリンカー基）を残さないリンカーで

10

20

30

40

50

ある。例示的なトレースレスリンカーは、限定されないが、ゲルマニウムリンカー、ケイ素リンカー、硫黄リンカー、セレンリンカー、窒素リンカー、リンリンカー、ホウ素リンカー、クロムリンカー、あるいはフェニルヒドラジドリンカーを含む。場合によっては、リンカーは、Hejlesen, et al., "A traceless aryl-triazene linker for DNA-directed chemistry," *Org. Biomol. Chem.* 11 (15): 2493-2497 (2013)に記載されるようなトレースレスアリアルトリアゼンリンカーである。いくつかの例では、リンカーは、Blaney, et al., "Traceless solid-phase organic synthesis," *Chem. Rev.* 102:2607-2024 (2002)に記載されるトレースレスリンカーである。いくつかの例では、リンカーは米国特許第6,821,783号に記載されるトレースレスリンカーである。

10

【0389】

いくつかの例では、リンカーは、リンカーと抱合部分（例えば、本明細書に記載されるA、B、C、あるいはD）の結合部位で立体障害（steric hindrance）を及ぼす官能基を含む。いくつかの例では、立体障害はジスルフィド結合のまわりの立体障害である。立体障害を示す例示的なリンカーは、上に記載されるヘテロ二官能性リンカーなどのヘテロ二官能性リンカーを含む。場合によっては、立体障害を示すリンカーはSMCCおよびSPDBを含む。

【0390】

いくつかの例では、リンカーは酸切断可能リンカーである。いくつかの例では、酸切断可能リンカーは、加水切断を受けやすいヒドラゾン結合を含む。場合によっては、酸切断可能リンカーは、チオマレアミド酸（thiomaleamic acid）リンカーを含む。場合によっては、酸切断可能リンカーは、"Acid-cleavable thiomaleamic acid linker for homogeneous antibody-drug conjugation," *Chem. Commun.* 49:8187-8189 (2013)に記載されるチオマレアミド酸リンカーである。

20

【0391】

いくつかの例では、リンカーは、米国特許第6,884,869号；第7,498,298号；第8,288,352号；第8,609,105号；あるいは、第8,697,688号；米国特許公開第2014/0127239号；第2013/028919号；第2014/286970号；第2013/0309256号；第2015/037360号；あるいは、第2014/0294851号；あるいはPCT公開公報WO2015057699；WO2014080251；WO2014197854；WO2014145090；あるいは、WO2014177042に記載されるリンカーである。

30

【0392】

いくつかの実施形態において、X、Y、およびLは独立して単結合またはリンカーである。いくつかの例では、X、Y、およびLは独立して単結合である。場合によっては、X、Y、およびLは独立してリンカーである。

【0393】

いくつかの例では、Xは単結合またはリンカーである。いくつかの例では、Xは単結合である。いくつかの例では、Xはリンカーである。いくつかの例では、リンカーはC₁-C₆アルキル基である。場合によっては、Xは、例えば、C₅、C₄、C₃、C₂、あるいはC₁アルキル基などのC₁-C₆アルキル基である。場合によっては、C₁-C₆アルキル基は非置換のC₁-C₆アルキル基である。リンカーの文脈において、とりわけ、Xの文脈において使用されるように、アルキルは最大で6つの炭素原子を含む飽和した直鎖または分岐鎖の炭化水素ラジカルを意味する。いくつかの例では、Xは非ポリマーリンカーである。いくつかの例では、Xは上に記載されるホモ二官能性リンカーあるいはヘテロ二官能性リンカーを含む。場合によっては、Xはヘテロ二官能性リンカーを含む。場合によっては、XはSMCCを含む。他の例では、Xは、C₁-C₆アルキル基に随意に結合したヘテロ二官能性リンカーを含む。他の例では、XはC₁-C₆アルキル基に随意に結合

40

50

した s M C C を含む。さらなる例では、X は、上に記載されるホモ二官能性リンカーあるいはヘテロ二官能性リンカーを含まない。

【0394】

いくつかの例では、Y は単結合またはリンカーである。いくつかの例では、Y は単結合である。他の場合には、Y はリンカーである。いくつかの実施形態において、Y は C₁ - C₆ アルキル基である。いくつかの例では、Y は上に記載されるホモ二官能性あるいはヘテロ二官能性リンカーである。いくつかの例では、Y は上に記載されるホモ二官能性リンカーである。いくつかの例では、Y は上に記載されるヘテロ二官能性リンカーである。いくつかの例では、Y は、上に記載されるマレイミドカプロイル (mc) などのマレイミド基、あるいは自己安定化マレイミド基を含む。いくつかの例では、Y は V a l - C i t などのペプチド部分を含む。いくつかの例では、Y は P A B A などの安息香酸基を含む。さらなる例では、Y は、マレイミド基、ペプチド部分、および／または、安息香酸基の組み合わせを含む。追加の例では、Y は mc 基を含む。追加の例では、Y は mc - v a l - c i t 基を含む。追加の例では、Y は v a l - c i t - P A B A 基を含む。追加の例では、Y は mc - v a l - c i t - P A B A 基を含む。

【0395】

いくつかの例では、L は単結合またはリンカーである。場合によっては、L は単結合である。場合によっては、L はリンカーである。いくつかの実施形態では、L は C₁ - C₆ アルキル基である。いくつかの例では、L は上に記載されるホモ二官能性あるいはヘテロ二官能性リンカーである。いくつかの例では、L は上に記載されるホモ二官能性リンカーである。いくつかの例では、L は上に記載されるヘテロ二官能性リンカーである。いくつかの例では、L は、上に記載されるマレイミドカプロイル (mc) などのマレイミド基、あるいは自己安定化マレイミド基を含む。いくつかの例では、L は V a l - C i t などのペプチド部分を含む。いくつかの例では、L は P A B A などの安息香酸基を含む。さらなる例では、L は、マレイミド基、ペプチド部分、および／または、安息香酸基の組み合わせを含む。追加の例では、L は mc 基を含む。追加の例では、L は mc - v a l - c i t 基を含む。追加の例では、L は v a l - c i t - P A B A 基を含む。追加の例では、L は mc - v a l - c i t - P A B A 基を含む。

【0396】

使用の方法

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む、本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、疾患または疾病の処置に使用される。幾つかの例では、疾患または疾病は癌である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物または医薬製剤は、疾患または疾病の処置のための免疫療法として使用される。いくつかの例では、免疫療法はがん免疫療法である。

【0397】

癌

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物または医薬製剤は、癌の処置に使用される。いくつかの実施形態では、癌は固形腫瘍である。いくつかの例では、癌は血液悪性腫瘍である。幾つかの例において、癌は再発性あるいは難治性の癌、または転移性癌である。いくつかの例では、固形腫瘍は、再発性あるいは難治性の固形腫瘍、あるいは転移性の固形腫瘍である。場合によっては、血液悪性腫瘍は、再発性あるいは難治性の血液系悪性腫瘍、あるいは転移性の血液悪性腫瘍である。

【0398】

いくつかの実施形態では、癌は固形腫瘍である。例示的な固形腫瘍としては、限定されないが、肛門癌、虫垂癌、胆管癌（すなわち、肝内胆管癌）、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、原発不明癌（CUP）、食道癌、眼癌、ファロピウス管癌、消化器癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、髄芽腫、黒色腫、口腔癌、卵巣癌、脾臓癌、副甲状腺疾患、陰茎癌、下垂体腫瘍、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、胃癌、睾丸癌、喉頭癌、甲状腺癌、子宮癌、膣癌、あるいは外陰癌が挙げられる。

【0399】

いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、固形腫瘍の処置に使用される。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、肛門癌、虫垂癌、胆管癌（すなわち、肝内胆管癌）、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、原発不明癌（CUP）、食道癌、眼癌、ファロピウス管癌、消化器癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、髄芽腫、黒色腫、口腔癌、卵巣癌、脾臓癌、副甲状腺疾患、陰茎癌、下垂体腫瘍、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、胃癌、睾丸癌、喉頭癌、甲状腺癌、子宮癌、膣癌、あるいは外陰癌の処置に使用される。いくつかの例では、固形腫瘍は、再発性あるいは難治性の固形腫瘍、または転移性の固形腫瘍である。

10

【0400】

いくつかの例では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、あるいはホジキンリンパ腫である。幾つかの例において、血液悪性腫瘍は、慢性リンパ球性白血病（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、ハイリスクのCLL、非CLL/SLLリンパ腫、前リンパ球性白血病（PLL）、濾胞性リンパ腫（FL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、多発性骨髄腫、結節外辺縁帯B細胞リンパ腫、結節性辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高度B細胞リンパ腫、原発性縦隔洞B細胞リンパ腫（PMBL）、免疫芽細胞性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾臓周辺帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、縦隔洞（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性体腔性リンパ腫、あるいはリンパ腫様肉芽腫症を含む。

20

【0401】

いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、血液悪性腫瘍の処置に使用される。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、またはホジキンリンパ腫の処置に使用される。幾つかの例において、血液悪性腫瘍は、慢性リンパ球性白血病（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、ハイリスクのCLL、非CLL/SLLリンパ腫、前リンパ球性白血病（PLL）、濾胞性リンパ腫（FL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、多発性骨髄腫、結節外辺縁帯B細胞リンパ腫、結節性辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高度B細胞リンパ腫、原発性縦隔洞B細胞リンパ腫（PMBL）、免疫芽細胞性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾臓周辺帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、縦隔洞（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性体腔性リンパ腫、あるいはリンパ腫様肉芽腫症を含む。場合によっては、血液悪性腫瘍は、再発性あるいは難治性の血液系悪性腫瘍、あるいは転移性の血液悪性腫瘍である。

30

40

【0402】

いくつかの例では、癌は、KRAS関連、EGFR関連、AR関連の癌、HPRT1関連癌あるいはβ-カテニン関連癌である。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、KRAS関連、EGFR関連、AR関連の癌、HPRT1関連癌あるいはβ-カテニン関連癌の処置に使用される。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、KRAS関連癌の処置に使用される。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、EGFR関連癌の処置に使用される。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される

50

組成物あるいは医薬製剤は、A R 関連癌の処置に使用される。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、H P R T 1 関連癌の処置に使用される。いくつかの例では、ポリ核酸分子およびポリマーに結合した結合部分を含む本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、β-カテニン関連癌の処置に使用される。いくつかの例では、癌は固形腫瘍である。いくつかの例では、癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの例では、固形腫瘍は、再発性あるいは難治性の固形腫瘍、または転移性の固形腫瘍である。場合によっては、血液悪性腫瘍は、再発性あるいは難治性の血液系悪性腫瘍、または転移性の血液悪性腫瘍である。いくつかの例では、癌は、膀胱癌、乳癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、多形神経膠芽腫、頭頸部癌、腎癌、肺癌、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、急性骨髄性白血病、C L L、D L B C L、あるいは多発性骨髄腫を含む。いくつかの例では、β-カテニン関連癌は、P I K 3 C 関連癌および／またはM Y C 関連の癌をさらに含む。

10

【0403】

免疫療法

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、疾患または疾病の処置のための免疫療法として使用される。いくつかの例では、免疫療法はがん免疫療法である。いくつかの例では、がん免疫療法は、能動的、受動的、あるいは組み合わせ（能動および受動）方法に分類される。能動がん免疫療法では、例えば、腫瘍関連抗原（T A A）が免疫系に提示され、これらのT A Aを提示する癌細胞への攻撃を引き起こす。いくつかの例では、能動がん免疫療法は、腫瘍標的化および／または免疫標的化剤（例えば、モノクローナル抗体などのチェックポイント阻害剤）、および／または、ワクチン、例えば、インサイチュワクチン接種および／または細胞ベースあるいは非細胞ベース（例えば、樹状細胞ベース、腫瘍細胞ベース、抗原、抗イディオタイプ、DNA、あるいはベクターベース）のワクチンを含む。いくつかの例では、細胞ベースのワクチンは、患者自身の免疫系から得られ、その後、患者自身の癌によって活性化される、活性化免疫細胞を使用して生成されるワクチンである。いくつかの例では、能動がん免疫療法は、非特異的能動免疫療法および特異的能動免疫療法にさらに細分化される。いくつかの例では、非特異的能動免疫療法は、一般的な免疫系応答を誘発するために、サイトカインおよび／または他の細胞シグナル伝達成分を利用する。場合によっては、特異的能動免疫療法は、免疫応答を誘発するために特定のT A Aを利用する。

20

30

【0404】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物または医薬製剤は、疾患あるいは疾病（例えば、癌）の処置のための能動がん免疫療法として使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物または医薬製剤は腫瘍標的化剤を含む。いくつかの例では、腫瘍標的化剤は結合部分Aによって包含される。他の例では、腫瘍標的化剤は、式（I）の分子と組み合わせて使用される追加の薬剤である。いくつかの例では、腫瘍標的化剤は、腫瘍指向性ポリペプチド（例えば、腫瘍指向性抗体）である。いくつかの例では、腫瘍標的化剤は、直接殺傷（例えば、シグナル伝達誘導性アポトーシス）、補体依存細胞毒性（C D C）、および／または抗体依存性細胞性細胞毒性（A D C C）などのメカニズムにより、その抗腫瘍活性を発揮する腫瘍指向性抗体である。さらなる例では、腫瘍標的化剤は、抗腫瘍T細胞を誘導して、適応免疫反応を誘発する。

40

【0405】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、腫瘍指向性ポリペプチド（例えば、腫瘍指向性抗体）である。いくつかの例では、結合部分Aは、直接殺傷（例えば、シグナル伝達誘導性アポトーシス）、補体依存細胞毒性（C D C）、および／または抗体依存性細胞性細胞毒性（A D C C）などのメカニズムによりその抗腫瘍活性を発揮する腫瘍指向性抗体である。さらなる例では、結合部分Aは、抗腫瘍T細胞を誘導して、適応免疫反応を誘発する。

【0406】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物または医薬製剤は、免疫標

50

的化剤を含む。いくつかの例では、免疫標的化剤は結合部分Aによって包含される。他の例では、免疫標的化剤は、式(I)の分子と組み合わせて使用される追加の薬剤である。いくつかの例では、免疫標的化剤は、サイトカイン、チェックポイント阻害剤、あるいはそれらの組み合わせを含む。

【0407】

いくつかの実施形態において、免疫標的化剤はチェックポイント阻害剤である。場合によっては、免疫チェックポイント分子は、CD4および／またはCD8T細胞の細胞表面上で提示される分子である。例示的な免疫チェックポイント分子としては、限定されないが、プログラム死ーリガンド1(PD-L1、さらにB7-H1、CD274として知られる)、プログラム死1(PD-1)、CTLA-4、B7H1、B7H4、OX-40、CD137、CD40、2B4、IDO1、IDO2、VISTA、CD27、CD28、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、CD80、CD86、PDL2、B7H3、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2aR、MARCO(コラーゲン構造を有するマクロファージ受容体)、PS(ホスファチジルセリン)、ICOS(誘発性T細胞補助刺激分子)、HAVCR2、CD276、VTCN1、CD70、およびCD160が挙げられる。

【0408】

いくつかの例では、免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント分子の活性を調節あるいは阻害する任意の分子を指す。いくつかの例では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗体、抗体誘導体(例えば、Fabフラグメント、scFvs、ミニボディ(minobodies)、ダイアボディ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アプタマー、あるいはペプチドを含む。いくつかの実施形態では免疫チェックポイント阻害剤が、プログラム死ーリガンド1(PD-L、さらにB7-H1、CD274として知られる)、プログラム死1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(誘発性T細胞補助刺激分子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(コラーゲン構造を有するマクロファージ受容体)、PS(ホスファチジルセリン)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1、またはそれらの任意の組み合わせの阻害剤である。

【0409】

いくつかの実施形態において、例示的なチェックポイント阻害剤は以下ものを含む：

【0410】

PD-L1阻害剤、例えば、GenentechのMPDL3280A(RG7446)、BioXcellの抗マウスPD-L1抗体クローン10F.9G2(Cat# BE0101)、Bristol-Myers Squibbの抗-PD-L1モノクローナル抗体MDX-1105(BMS-936559)およびBMS-935559、MSB0010718C、マウス抗-PD-L1クローン29E.2A3およびAstrazenecaのMEDI4736；

【0411】

PD-L2阻害剤、例えば、GlaxoSmithKlineのAMP-224(Amplimmune)、およびrHlgM12B7；

【0412】

PD-1阻害剤、例えば、BioXcellの抗マウスPD-1抗体クローンJ43(Cat# BE0033-2)、BioXcellの抗マウスPD-1抗体クローンRMP1-14(Cat# BE0146)、マウス抗-PD-1抗体クローンEH12、MerckのMK-3475抗マウスPD-1抗体(キイトルーダ、ペンブロリズマブ、ランブロリズマブ)、ANB011として知られるAnaptysBioの抗-PD-1抗体、抗体MDX-1106(ONO-4538)、Bristol-Myers Squ

i b bのヒトIgG4モノクローナル抗体ニボルマブ（Opdivo（登録商標）、BMS-936558、MDX1106、AstraZenecaのAMP-514およびAMP-224、ならびにCureTech Ltdのビディリズマブ（CT-011）；
【0413】

CTLA-4阻害剤、例えば、Bristol Meyers Squibbの抗-CTLA-4抗体イピリムマブ（Yervoy（登録商標）、MDX-010、BMS-734016およびMDX-101としても知られる）、抗CTLA4抗体、Milliporeのクローン9H10、Pfizerのトレメリマブ（CP-675, 206、チシリマブ）、ならびにAbcamの抗CTLA4抗体クローンBNI3；
【0414】

LAG3阻害剤、例えば、eBioscienceの抗-Lag-3抗体クローンeBioC9B7W（C9B7W）、LifeSpan Biosciencesの抗-Lag3抗体LS-B2237、ImmutepのIMP321（ImmuFact）、抗-Lag3抗体BMS-986016およびLAG-3キメラ抗体A9H12；
【0415】

B7-H3阻害剤、例えば、MGA271；

【0416】

KIR阻害剤、例えば、Lirilumab（IPH2101）；

【0417】

CD137（41BB）阻害剤、例えば、ウレルマブ（urelumab）（BMS-663513Bristol-Myers Squibb）、PF-05082566（抗4-1BB、PF-2566、Pfizer）、またはXmAb-5592（Xencor）；

【0418】

PS阻害剤、例えば、Bavituximab；

【0419】

ならびに、阻害剤、例えば、抗体あるいはその断片（例えば、モノクローナル抗体、ヒト、ヒト化あるいはキメラ抗体）、RNAi分子、またはTIM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40（CD134）、GITR、イコサ、BTLA（CD272）、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2、あるいはSLAMに対する小分子。

【0420】

いくつかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤を含む結合部分Aは、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、結合部分Aは、免疫チェックポイント阻害剤を含む二重特異性抗体あるいはその結合フラグメントである。いくつかの例では、プログラム死-リガンド1（PD-L1、さらにB7-H1、CD274として知られる）、プログラム死1（PD-1）、CTLA-4、PD-L2（B7-DC、CD273）、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS（誘発性T細胞補助刺激分子）、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO（コラーゲン構造を有するマクロファージ受容体）、PS（ホスファチジルセリン）、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1、またはそれらの任意の組み合わせの阻害剤を含む結合部分Aは、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。

【0421】

いくつかの実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせた式（I）の分子は、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、免疫チェックポイント阻害剤は、プログラム死-リガンド1（PD-L1、さらにB7-H1、CD274として知られる）、プログラム死1（PD-1）、CTLA-4、PD-L2

10

20

30

40

50

(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS（誘発性T細胞補助刺激分子）、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO（コラーゲン構造を有するマクロファージ受容体）、PS（ホスファチジルセリン）、OX-40、SLAMF、TIGIT、VISTA、VTCN1、またはそれらの任意の組み合わせの阻害剤を含む。場合によっては、式（I）の分子は、疾患または疾病（例えば、癌）の処置のために、イピリマブ、トレメリマブ、ニボルマブ、ペンブロリズマブ（pembrolizumab）、ピディリズマブ、MPDL3280A、MED14736、MSB0010718C、MK-3475、あるいはBMS-936559と組み合わせて使用される。

【0422】

いくつかの実施形態において、免疫標的化剤はサイトカインである。場合によっては、サイトカインが、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、および腫瘍壊死因子へと、さらに小群に分けられる。いくつかの実施形態において、ケモカインは、細胞の遊走を導く化学誘引剤としての役割を果たし、4つのサブファミリー：CXC、CC、CX3C、およびXCに分類される。例示的なケモカインは、CCサブファミリー：CCL1、CCL2（MCP-1）、CCL3、CCL4、CCL5（RANTES）、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9（あるいはCCL10）、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、およびCCL28；CXCサブファミリー：CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16とCXCL17；XCサブファミリー：XCL1およびXCL2；ならびにCX3CサブファミリーCX3CL1のケモカインを含む。

【0423】

インターフェロン（IFN）は、I型インターフェロン（例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、およびIFN- ω ）、II型インターフェロン（例えばIFN- γ ）、ならびにIII型インターフェロンを含む。いくつかの実施形態において、IFN- α は、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17、およびIFNA21を含む、約13のサブタイプにさらに分類される。

【0424】

インターロイキンは、白血球または白血球細胞によって発現され、TおよびBリンパ球および造血細胞の発生および分化を促進する。例示的なインターロイキンは、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8（CXCL8）、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL14、IL15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35、およびIL-36を含む。

【0425】

腫瘍壊死因子（TNF）はアポトーシスを調節するサイトカインの群である。いくつかの例では、TNFファミリー内に約19のメンバーがあり、制限されないが、TNF α 、リンフォトキシン- α （LT- α ）およびリンフォトキシン- β （LT- β ）T細胞抗原gp39（CD40L）、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L、および腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）を含む。

【0426】

いくつかの実施形態において、サイトカインと組み合わせた式（I）の分子が、疾患ま

たは疾病（例えば、癌）の処置に使用される。場合によっては、ケモカインと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。場合によっては、インターフェロンと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。場合によっては、インターロイキンと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。場合によっては、腫瘍壊死因子と組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば癌）の処置に使用される。いくつかの例では、IL-1 β 、IL-2、IL-7、IL-8、IL15、MCP-1（CCL2）、MIP-1 α 、RANTES、MCP-3、MIP5、CCL19、CCL21、CXCL2、CXCL9、CXCL10、あるいはCXCL11と組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。

10

【0427】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物または医薬製剤はワクチンを含む。いくつかの例では、ワクチンはインサイチュのワクチン接種である。いくつかの例では、ワクチンは細胞ベースのワクチンである。いくつかの例では、ワクチンは非細胞ベースのワクチンである。いくつかの例では、樹状細胞ベースのワクチンと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、腫瘍細胞ベースのワクチンと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、抗原ワクチンと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、抗イディオタイプワクチンと組み合わせた式（I）の分子は、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、DNAワクチンと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、ベクターベースのワクチンと組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。

20

【0428】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物または医薬製剤は、疾患あるいは疾病（例えば、癌）の処置のための受動がん免疫療法として使用される。いくつかの例では、受動方法は、適応免疫系成分、例えば、T細胞（ナチュラルキラー（NK）T細胞）、および／または外因的に生成されたキメラ抗原受容体（CAR）T細胞を利用して癌細胞を攻撃する。

30

【0429】

いくつかの実施形態において、T細胞ベースの治療剤と組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。場合によっては、T細胞ベースの治療剤は、上に記載されるCD細胞表面マーカーの1つ以上を認識する活性化T細胞剤である。いくつかの例では、T細胞ベースの治療剤は、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD27、CD28、CD80、CD134、CD137、CD152、CD154、CD160、CD200R、CD223、CD226、CD244、CD258、CD267、CD272、CD274、CD278、CD279、あるいはCD357の1つ以上を認識する活性化T細胞剤を含む。いくつかの例では、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD27、CD28、CD80、CD134、CD137、CD152、CD154、CD160、CD200R、CD223、CD226、CD244、CD258、CD267、CD272、CD274、CD278、CD279、あるいはCD357の1つ以上を認識する活性化T細胞剤と組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。

40

【0430】

いくつかの実施形態において、ナチュラルキラー（NK）のT細胞ベースの治療剤と組み合わせた式（I）の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの例では、NKベースの治療剤は、上に記載されるCD細胞表面マーカーの1つ以上を認識する活性化NK剤である。場合によっては、NKベースの治療剤が、CD11a、CD11b、CD16、CD56、CD58、Cd62L、CD85j、CD1

50

58a/b、CD158c、CD158e/f/k、CD158h/j、CD159a、CD162、CD226、CD314、CD335、CD337、CD244、あるいはCD319の1つ以上を認識する活性化NK剤である。いくつかの例では、CD2、CD11a、CD11b、CD16、CD56、CD58、Cd62L、CD85j、CD158a/b、CD158c、CD158e/f/k、CD158h/j、CD159a、CD162、CD226、CD314、CD335、CD337、CD244、あるいはCD319の1つ以上を認識する活性化NK剤と組み合わせた式(I)の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。

【0431】

いくつかの実施形態において、CAR-T細胞ベースの治療剤と組み合わせた式(I)の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。

10

【0432】

いくつかの実施形態において、エンドソーム膜を不安定にする（あるいは、エンドソーム-リソソームの膜輸送を妨害する）追加の薬剤と組み合わせた式(I)の分子が、疾患または疾病（例えば、癌）の処置に使用される。いくつかの実施形態において、追加の薬剤は有糸分裂阻害剤を含む。例示的な有糸分裂阻害剤としては、限定されないが、パクリタキセルおよびドセタキセルなどのタキサン；ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、およびビノレルビンなどのビンカアルカロイド；カバジタキセル；コルヒチン；エリブリン；エストラムスチン；エトポシド；イクサベピロン；ポドフィロトキシン；テニポシド；あるいは、グリセオフルビンが挙げられる。いくつかの例では、追加の薬剤は、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ビンデシン、カバジタキセル、コルヒチン、エリブリン、エストラムスチン、エトポシド、イクサベピロン、ポドフィロトキシン、テニポシド、あるいはグリセオフルビンを含む。いくつかの例では、追加の薬剤はタキソールを含む。いくつかの例では、追加の薬剤はパクリタキセルを含む。いくつかの例では、追加の薬剤はエトポシドを含む。他の例では、追加の薬剤はビタミンK3を含む。

20

【0433】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される組成物あるいは医薬製剤は、疾患または疾病（例えば、癌）の処置における組み合わせ方法（能動および受動の両方の方法を含む）として使用される。

30

【0434】

医薬製剤

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される医薬製剤は、限定されないが、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内）、経口、鼻腔内、頬側、直腸、または経皮の投与経路を含む、複数の投与経路によって被験体に投与される。幾つかの例において、本明細書に記載される医薬組成物は、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内）投与のために製剤化される。他の例において、本明細書に記載される医薬組成物は、経口投与のために製剤化される。また他の例において、本明細書に記載される医薬組成物は、経鼻投与のために製剤化される。

【0435】

いくつかの実施形態において、医薬組成物としては、限定されないが、水性分散液、自己乳化分散液、固溶体、リポソーム分散液、エアロゾル、固形剤形、粉末、即時放性製剤、制御放出製剤、速溶製剤、錠剤、カプセル、丸剤、遅延放出製剤、拡張放出製剤、パルス放出製剤、多粒子製剤（例えば、ナノ粒子製剤）、および、即時放出と制御放出の混合製剤が挙げられる。

40

【0436】

いくつかの例では、医薬製剤は多粒子製剤を含む。いくつかの例では、医薬製剤はナノ粒子製剤を含む。いくつかの例では、ナノ粒子は、cMAP、シクロデキストリン、あるいは脂質を含む。場合によっては、ナノ粒子は、固体脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、自己乳化ナノ粒子、リポソーム、マイクロエマルジョン、あるいはミセル溶液を含む。さ

50

らなる例示的なナノ粒子は、限定されないが、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合した金属キレートを含むものなど）、ナノファイバー、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、および量子ドットを含む。いくつかの例では、ナノ粒子は、金属ナノ粒子、例えば、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、ガドリニウム、アルミニウム、ガリウム、インジウム、スズ、タリウム、鉛、ビスマス、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、バリウム、リチウム、ナトリウム、カリウム、ホウ素、シリコン、リン、ゲルマニウム、ヒ素、アンチモン、およびこれらの組み合わせ、その合金またはオキシドのナノ粒子である。

10

【0437】

いくつかの例では、ナノ粒子は、コア、あるいは、コアシェルナノ粒子のようなコアとシェルを含む。

【0438】

いくつかの例では、ナノ粒子は、機能要素の結合のために分子（例えば、本明細書に記載されたポリ核酸分子または結合部分の1つ以上）でさらにコーティングされる。いくつかの例では、コーティングは、硫酸コンドロイチン、硫酸デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、アルギン酸、ペクチン、カラギーナン、フコイダン、アガロペクチン、ポルフィラン、カラヤゴム、ジェランゴム、キサンタンゴム、ヒアルロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、キチン（あるいはキトサン）、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、リゾチーム、チトクロムC、リボヌクレアーゼ、トリブシノゲン、キモトリブシノゲン、 α -キモトリプシン、ポリリシン、ポリアルギニン、ヒストン、プロタミン、オバルブミン、デキストリン、あるいはシクロデキストリンを含む。いくつかの例では、ナノ粒子は、グラフェンでコーティングされたナノ粒子を含む。

20

【0439】

場合によっては、ナノ粒子は、約500 nm、400 nm、300 nm、200 nm、あるいは100 nm未満の少なくとも1つの寸法を有する。

【0440】

いくつかの例では、ナノ粒子製剤は、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合した金属キレートを含むものなど）、ナノファイバー、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、または量子ドットを含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子あるいは結合部分は、ナノ粒子に直接的あるいは間接的に結合する。いくつかの例では、本明細書に記載される少なくとも1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、あるいは100以上のポリ核酸分子あるいは結合部分は、ナノ粒子に直接的あるいは間接的に結合する。

30

【0441】

いくつかの実施形態では、医薬製剤は、本明細書に開示される組成物との互換性および所望の剤形の放出プロファイル特質に基づいて選択される、担体またはキャリア材料を含む。模範的な担体材料としては、例えば、結合剤、懸濁剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定化剤、滑沢剤、加湿剤、希釈剤などが挙げられる。薬学的に適合可能な担体材料は、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン（PVP）、コレステロール、コレステロールエステル、カゼイン酸ナトリウム、大豆レシチン、タウロコール酸、ホスファチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロース抱合体、糖ステアロイル乳酸ナトリウム（sugars sodium stearyl lactylate）、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、 α 化デンプンなどを含むが、これらに限定されない。例えば、Remington: The Science and Prac

40

50

tice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa. : Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N. Y., 1980; および, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999) を参照。

10

【0442】

いくつかの例では、医薬製剤は、酢酸、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸、および、塩酸などの酸；水酸化ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、およびトリスヒドロキシメチルアミノメタンなどの塩基、ならびに、クエン酸塩／デキストロース、重炭酸ナトリウム、および塩化アンモニウムなどの緩衝剤を含むpH調節剤または緩衝剤をさらに含む。このような酸、塩基、および緩衝液は、組成物のpHを許容可能な範囲で維持するのに必要な量で含まれる。

【0443】

いくつかの例では、医薬製剤は、組成物の浸透圧を許容可能な範囲にするのに必要な量の1つ以上の塩を含む。こうした塩は、ナトリウム、カリウム、またはアンモニウムのカチオン、ならびに塩化物、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸水素塩、硫酸塩、チオ硫酸塩、または重亜硫酸塩のアニオンを含み、適切な塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、および、硫酸アンモニウムを含む。

20

【0444】

いくつかの例では、希釈液がより安定した環境を提供することができることから、医薬製剤は、化合物を安定化させるために使用される希釈液をさらに含む。緩衝液（pHの制御または維持をもたらす得る）中に溶解した塩は、限定されないが、リン酸緩衝生理食塩溶液を含む当該技術分野の希釈剤として利用される。ある例では、希釈液は、組成物の容積を増大させて、圧縮を促進するか、あるいはカプセル剤充填のための均質ブレンドに十分な容積を作り出す。そのような化合物は、例えば、ラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、Avicel（登録商標）などの微結晶性セルロース；リン酸水素カルシウム、リン酸カルシウム二水和物；リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム；無水乳糖、噴霧乾燥したラクトース；α化デンプン、Dierpac（登録商標）（Amstar）などの圧縮可能な糖；マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース・アセタート・ステアラート、スクロース系の希釈剤、粉砂糖；一塩基の硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物；乳酸カルシウム三水和物、デキストラート（dextrates）；加水分解したシリアル固形物、アミロース；粉末セルロース、炭酸カルシウム；グリシン、カオリン；マンニトール、塩化ナトリウム；イノシトール、ベントナイトなどを含むことができる。

30

40

【0445】

場合によっては、医薬製剤は、物質の分解または崩壊を促進する崩壊剤（disintegration agents or disintegrants）を含む。用語「分解する」は、胃腸液と接触した際の剤形の溶解と分散の両方を含む。崩壊剤の例は、デンプン、例えば天然のデンプン、例えばトウモロコシデンプンまたはジャガイモデンプン、α化デンプン、例えばNational 1551またはAmijel（登録商標）、またはナトリウムデンプングリコラート、例えばPromogel（登録商標）またはExploTab（登録商標）、セルロース、例えば木製品、メチル結晶セルロース、例えばAvicel（登録商標）、Avicel（登録商標）PH101、Avicel（登録商標）PH102、Avicel（登録商標）PH105、Elcema（登録商標）P

50

100、Emcocel（登録商標）、Vivacel（登録商標）、Min Tia（登録商標）、およびSolka-Floc（登録商標）、メチルセルロース、クロスカルメロース、または架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（Ac-Di-Sol（登録商標））などの架橋セルロース、架橋カルボキシメチルセルロース、または架橋クロスカルメロースナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウムなどの架橋デンプン、クロスポビドンなどの架橋ポリマー、架橋ポリビニルピロリドン、アルギン酸などのアルギン酸塩またはアルギン酸ナトリウムなどのアルギン酸の塩、Vee gum（登録商標）HV（ケイ酸アルミニウムマグネシウム）などの粘土、ゴム（寒天、グアー、ローカストビーン、カラヤ、ペクチン、またはトラガカントなど）、ナトリウムデンプングリコラート、ベントナイト、天然のスポンジ、界面活性剤、陽イオン交換樹脂などの樹脂、柑橘類のパルプ、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプンを組み合わせたラウリル硫酸ナトリウムなど、を含む。

10

【0446】

いくつかの例では、医薬製剤は、ラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、第二リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶性セルロース、セルロース粉末、デキストロース、デキストラート、デキストラン、デンプン、α化デンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコールなどの充填剤を含む。

【0447】

潤滑剤と滑剤も、材料の癒着あるいは摩擦を防ぐか、減少させるか、あるいは阻害するために、本明細書に記載される医薬製剤に随意に含まれる。例示的な潤滑剤としては、例えば、ステアリン酸、水酸化カルシウム、タルク、ステアリルフマル酸ナトリウム、鉱油などの炭化水素、または水素化大豆油（Sterotex（登録商標））などの水素化植物油、高級脂肪酸およびそれらのアルカリ金属ならびにアルミニウムなどのアルカリ土類金属塩、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセロール、タルク、ワックス、Stearowet（登録商標）、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレングリコール（例えば、PEG-4000）またはCarbowax（商標）などのメトキシポリエチレングリコール、オレイン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレングリコール、マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウム、Sylolid（商標）、キャブ-O-Sil（登録商標）などのコロイダルシリカ、トウモロコシデンプンなどのデンプン、シリコン油、サーファクタントなどが挙げられる。

20

30

【0448】

可塑剤は、マイクロカプセル化材料またはフィルムコーティングを軟化することでそれらの脆性を抑えるために使用される化合物を含む。適切な可塑剤は、例えば、PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350、およびPEG 800などのポリエチレングリコール、ステアリン酸、プロピレングリコール、オレイン酸、トリエチルセルロース、トリアセチンを含む。可塑剤は、分散剤または湿潤剤としてさらに機能し得る。

【0449】

可溶化剤は、トリアセチン、クエン酸トリエチル、オレイン酸エチル、カプリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクサートナトリウム、ビタミンE TPGS、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、N-ヒドロキシエチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、エタノール、n-ブタノール、イソプロピルアルコール、コレステロール、胆汁塩、ポリエチレングリコール200-600、グリコフロール、トランスクトール、プロピレングリコール、およびジメチルイソソルビドなどの化合物を含む。

40

【0450】

安定化剤は、任意の抗酸化剤、緩衝剤、酸、防腐剤などの混合物を含む。

【0451】

50

懸濁化剤は、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30などのポリビニルピロリドン、ビニルピロリドン／酢酸ビニル共重合体（S630）、ポリエチレングリコール（例えば、ポリエチレングリコールは約300～約6000、約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有する）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース酢酸ステアリン酸、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、例えばトラガカントゴムおよびアラビアゴムなどのゴム、グアーゴム、キサンタンガムを含むキサンタン、糖類、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース化合物、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、ヒドロキシポリエトキシ化ソルビタンモノラウレート、ヒドロキシポリエトキシ化ソルビタンモノラウレート、ポビドンなどの化合物を含む。

【0452】

サーファクタントは、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクセートナトリウム、またはTween 60または80、トリアセチン、ビタミンE TPGS、ソルビタンモノオレアート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート（polyoxyethylene sorbitan monooleate）、ポリソルベート、ポロキサマー（polaxomers）、胆汁酸塩、モノステアリン酸グリセリン、エチレンオキシドおよびプロピレンオキシドのコポリマー（例えば、Pluronic（登録商標））（BASF）などの化合物を含む。付加的な界面活性剤は、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリドおよび植物油（例えば、ポリオキシエチレン（60）水素化ヒマシ油）；および、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール10、オクトキシノール40などを含む。しばしば、界面活性剤は、物理的安定性を高めるために、または他の目的のために含まれる。

【0453】

粘度増強剤は、例えば、メチルセルロース、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートステアレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、カルボマー、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩、アカシア、キトサン、およびこれらの組み合わせを含む。

【0454】

湿潤剤は、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ドクセートナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドキュセートナトリウム、トリアセチン、Tween 80、ビタミンE TPGS、アンモニウム塩などの化合物を含む。

【0455】

治療レジメン

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は治療用途のために投与される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、1日に一回、1日に2回、1日に3回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、毎日、1日おき、週5日、週1日、1週おき、月2週間、月3週間、月1回、月2回、月3回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、少なくとも1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、18か月、2年、3年、またはそれ以上の間投与される。

【0456】

いくつかの実施形態では、1以上の医薬組成物は、同時に、連続して、またはある時間間隔で投与される。いくつかの実施形態では、1以上の医薬組成物は同時に投与される。場合によっては、1つ以上の医薬組成物は連続して投与される。さらなる場合には、1以

10

20

30

40

50

上の医薬組成物は、ある時間間隔で投与される（例えば、第1の医薬組成物の第1の投与は1日目であり、その後、少なくとも第2の医薬組成物の投与前に少なくとも1、2、3、4、5日またはそれ以上の間隔を空ける）。

【0457】

いくつかの実施形態において、2つ以上の様々な医薬組成物は同時投与される。いくつかの例では、2以上の異なる医薬組成物が同時に投与される。場合によっては、2つ以上の異なる医薬組成物が、投与間の間隔なしに連続して同時投与される。他の場合には、2つ以上の異なる医薬組成物は、投与間に約0.5時間、1時間、2時間、3時間、12時間、1日、2日の間隔において連続して投与される。

【0458】

患者の状態が改善する場合、医者の裁量により組成物の投与が継続的に行われ；代替的に、投与されている組成物の用量は、一時的に減少されるか、または特定の期間一時的に中断される（つまり、「休薬期間」）。いくつかの例では、休薬期間の長さは、ほんの一例として、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日、15日、20日、28日、35日、50日、70日、100日、120日、150日、180日、200日、250日、280日、300日、320日、350日、または365日を含む、2日～1年の間で変わる。休薬日中の投与量の減少は、ほんの一例として、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、あるいは100%を含む、10%～100%である。

【0459】

いったん患者の状態が改善すると、必要に応じて維持量が投与される。その後、投与量または投与頻度、あるいはその両方は、症状に応じて、改善された疾患、疾病、または病気が保持されるレベルにまで随意に減少可能である。

【0460】

いくつかの実施形態では、そのような量に相当する所定の薬剤の量は、特定の化合物、疾患の重症度、処置を必要としている被験体または宿主の性質（例えば、体重）などの要因に左右されるが、それにもかかわらず、例えば、投与されている特定の薬剤、投与経路、および処置されている被験体または宿主を含む、症例を取り巻く特定の環境に従って、当該技術分野で既知の方法で日常的に判定される。いくつかの例では、所望の投与量は一回量で、あるいは、例えば、1日当たり2、3、あるいは4以上の下位用量として、同時に（または短時間にわたって）あるいは適切なインターバルを置いて投与された分割量として都合よく提示される。

【0461】

個々の処置レジメンに関する変数の数が大きいこと、前述の範囲は単なる示唆的なものに過ぎず、これらの推奨値からかなり逸脱することは珍しいことではない。そのような投与量は、限定されないが、使用される化合物の活性、処置される疾患または疾病、投与の様式、個々の被験体の必要条件、処置されている疾患または疾病の重症度、および医師の判断を含む、多くの変数に依存して変更される。

【0462】

いくつかの実施形態では、こうした治療レジメンの毒性と治療の有効性は、限定されないが、LD50（集団の50%までの致死投与量）と、ED50（集団の50%に治療上有効な投与量）の決定を含む、細胞培養または実験動物における標準的な製薬手順によって決定される。毒性と治療効果との間の用量比が治療指数であり、これは、LD50とED50との間の比率として表される。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイと動物研究から得られたデータは、ヒトで使用される一連の投与量を製剤するのに使用される。こうした化合物の投与量は、最小限の毒性を備えるED50を含む一連の循環濃度内に位置するのが好ましい。投与量は、使用される剤形と利用される投与経路に応じて、この範囲内で変わる。

【0463】

キット／製品

ある実施形態において、本明細書に記載される1つ以上の組成物および方法とともに使用されるキットおよび製品が本明細書で開示される。このようなキットは、バイアル、チューブなどの1つ以上の容器を収容するために仕切られた運搬装置、包装または容器を含み、各容器は、本明細書中に記載されている方法を使用するための別個の要素の1つを備える。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管を含む。一実施形態において、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成される。

【0464】

本明細書で提供される製品は包装材料を含む。製薬用包装材料の例としては、限定されないが、プリスターパック、瓶、チューブ、バッグ、容器、瓶、および選択された製剤と意図した投与および処置のモードに適する任意の包装材料が挙げられる。

【0465】

例えば、容器は、本明細書に開示されるエンドソーム溶解性部分Dに随意に結合する、式(I)： $A-X-B-Y-C$ の分子を含む。そのようなキットは、識別用の記載またはラベル、あるいは本明細書に記載される方法における使用に関する説明書を随意に含む。

【0466】

キットは典型的には、内容物および／または使用説明書を列挙するラベルと、使用説明書を備えた添付文書とを含んでいる。1セットの説明書も典型的に含まれる。

【0467】

一実施形態において、ラベルが容器上にあるか容器に付随する。一実施形態において、ラベルを形成する文字、数字、または他の表示が、容器自体に貼り付けられるか、成形されるか、あるいは刻まれている場合は、ラベルは容器上に取付けられる。ラベルは、例えば、添付文書として容器を保持するレセプタクルまたは運搬装置内に存在するとき、容器に付随する。一実施形態において、ラベルは、内容物が特定の治療用途に用いられるべきものであるということを示すために使用される。ラベルは、例えば、本明細書に記載の方法で、内容物の使用方法も示している。

【0468】

ある実施形態では、医薬組成物は、本明細書で提供される化合物を含む1以上の単位剤形を含有するパックまたはディスペンサーデバイスで提示される。例えば、パックは、プリスターパックなどの金属またはプラスチックホイルを含む。一実施形態において、パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が添付してある。一実施形態において、パックまたはディスペンサーには、医薬品の製造、使用または販売を制御する政府機関によって規定された形態の容器に付属の通知書が添付してあり、この通知書は、ヒトまたは動物の投与のための薬物の形態についての、政府機関の承認を反映するものである。このような通知書は、例えば、処方薬または承認された添付文書に関して、米国食品医薬品局により承認されたラベルである。一実施形態において、適合する製薬担体で製剤化される本明細書で提供される化合物を含む組成物も調製され、適切な容器に入れられ、示された疾病の処置のためにラベル付けされる。

【0469】

特定の用語

別段の定めのない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、主題が属する当該技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。前述の一般的な記載および以下の詳細な記載が典型的かつ説明的なものに過ぎず、いかなる本願の主題を限定するものではないことが理解されよう。本出願では、単数の使用は、特別に別記しない限り複数を含む。明細書および添付の請求項内で用いられる場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、その文脈が明確に他のことを定めていない限り、複数の指示対象を含む。本出願において、「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、用語「含む(including)」の使用は、「含む(include)」、「含む(includes)」、および「含まれる(include)」といった他の形態と同じく、限定的なものではない。

【0470】

本明細書で使用される場合、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表現可能である。「約」は正確な量も含んでいる。したがって、「約5 μ L」は、「約5 μ L」と「5 μ L」も意味する。一般に、用語「約」は、実験誤差内にあると予想される量を含んでいる。

【0471】

本明細書に使用される段落の見出しは、組織化するためのものに過ぎず、記載される主題を制限するものと解釈されてはならない。

【0472】

本明細書で使用される場合、用語「個体」、「被験体」、および「患者」は、任意の哺乳動物を意味する。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、哺乳動物は非ヒトである。いかなる用語も、保健従事者（例えば、医者、正看護師、臨床看護師、医師助手、看護助手、あるいはホスピスの職員）の監督（例えば、常時または断続的）を特徴とする状況に制限されない。

【実施例】

【0473】

これらの実施例は説明目的のみのために提供され、請求項の範囲を制限するものではない。

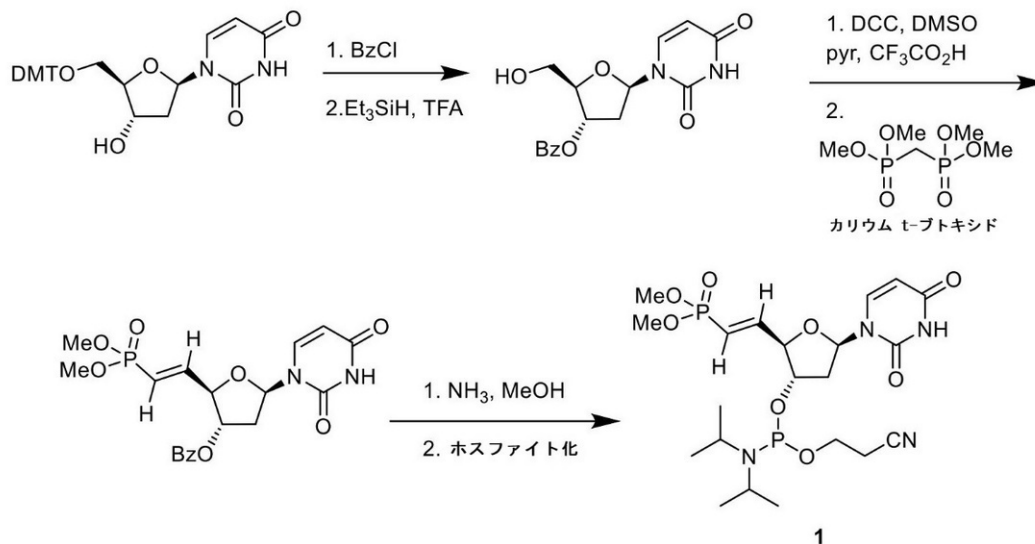
【0474】

化学合成の実施例

実施例1．化合物1－3、および5－8の調製

【0475】

【化48】



【0476】

あるいは以下の通りである：

【0477】

10

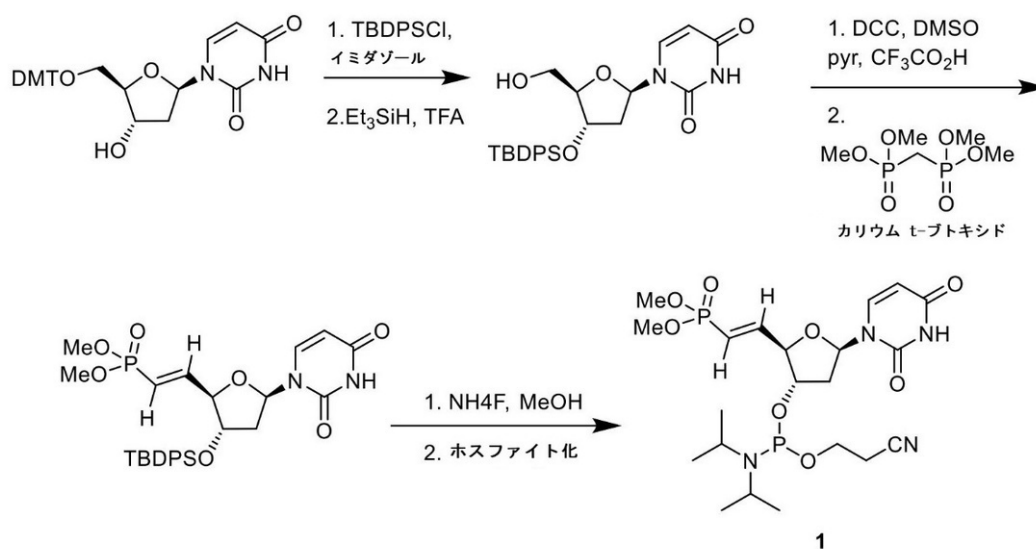
20

30

40

50

【化 4 9】



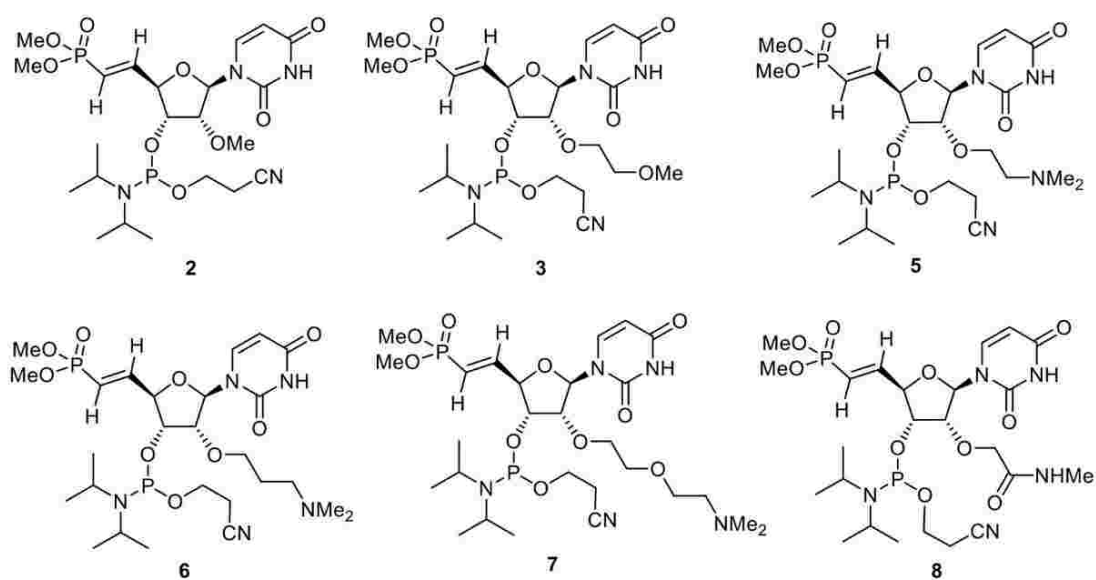
10

化合物 2、3、および 5 - 8 を実施例 1 で例示される手順に従って調製した。

【 0 4 7 8】

20

【化 5 0】



30

【 0 4 7 9】

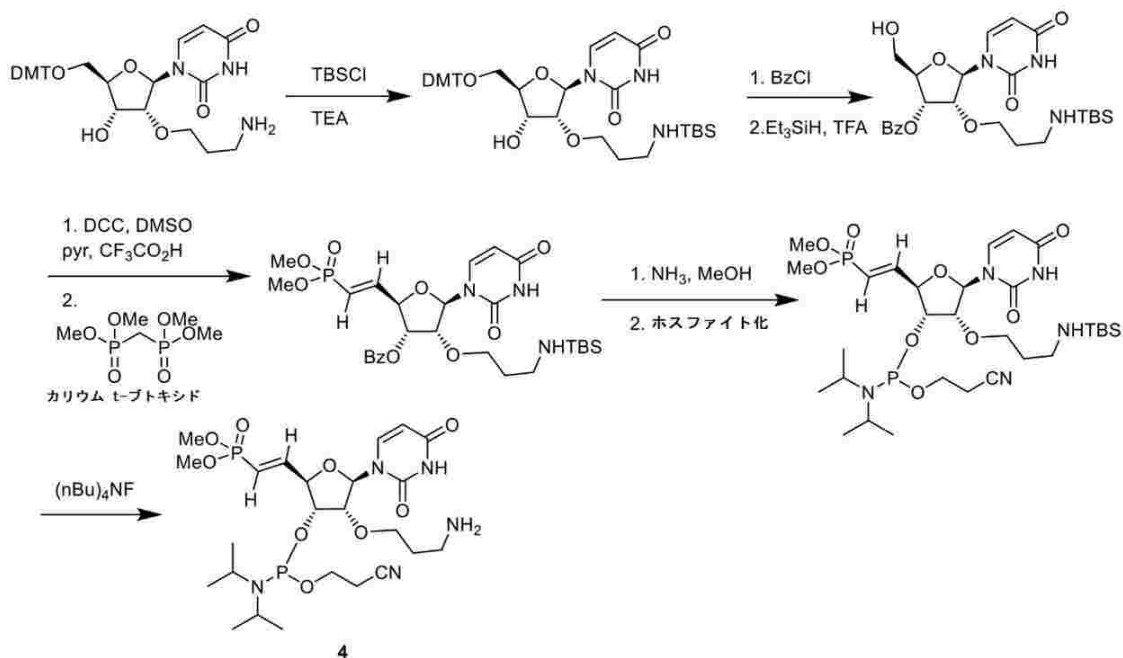
実施例 2：化合物 4 の調製

40

【 0 4 8 0】

50

【化 5 1】



10

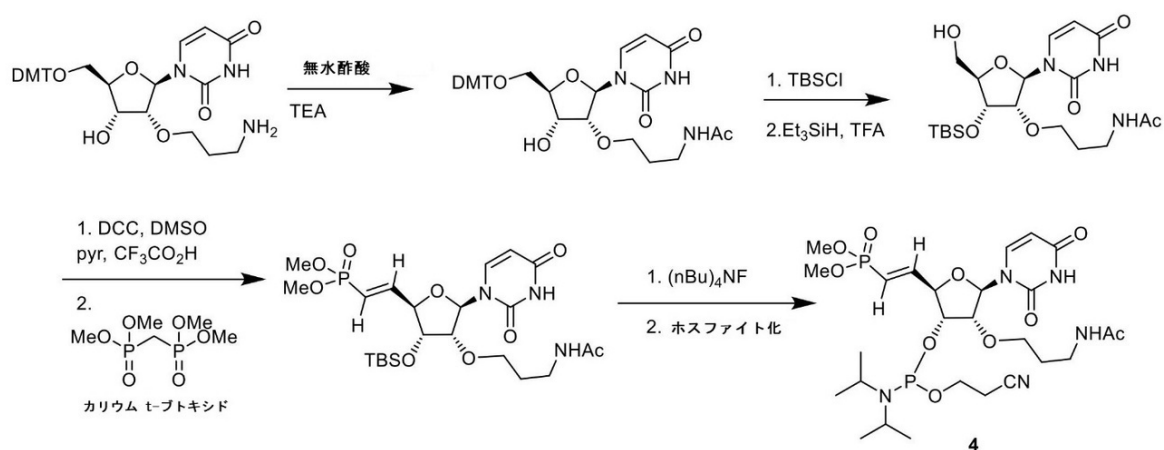
20

【 0 4 8 1】

あるいは以下の通りである：

【 0 4 8 2】

【化 5 2】



30

【 0 4 8 3】

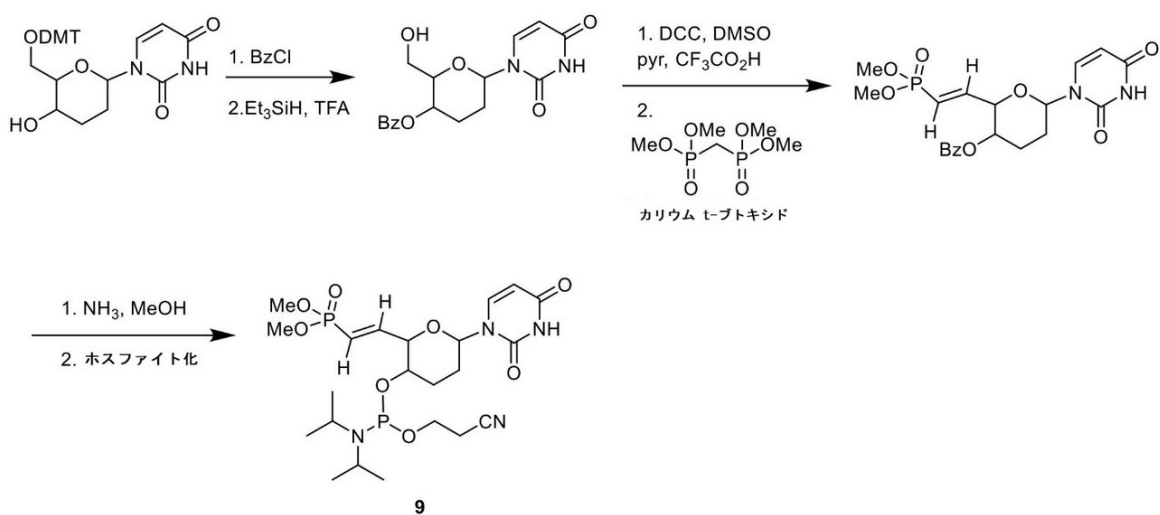
実施例 3：化合物 9 の調製

【 0 4 8 4】

40

50

【化 5 3】



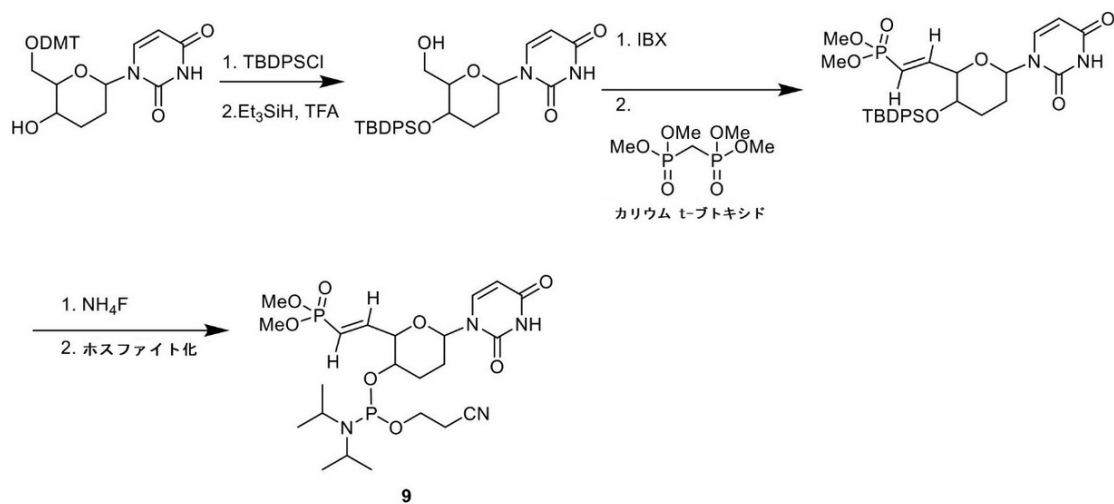
10

【 0 4 8 5】

あるいは以下の通りである：

【 0 4 8 6】

【化 5 4】



20

30

【 0 4 8 7】

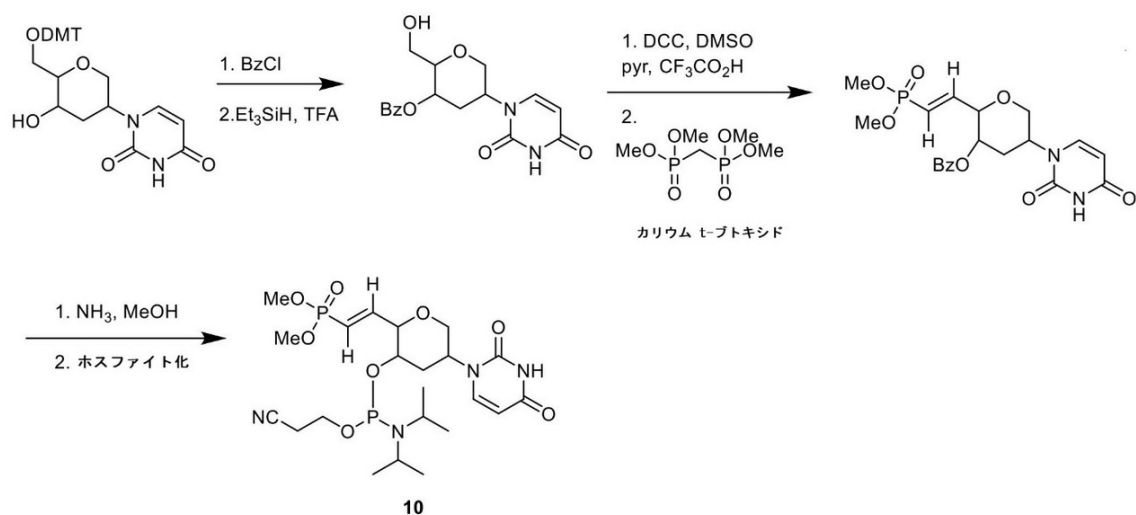
実施例 4：化合物 10 の調製

【 0 4 8 8】

40

50

【化 5 5】



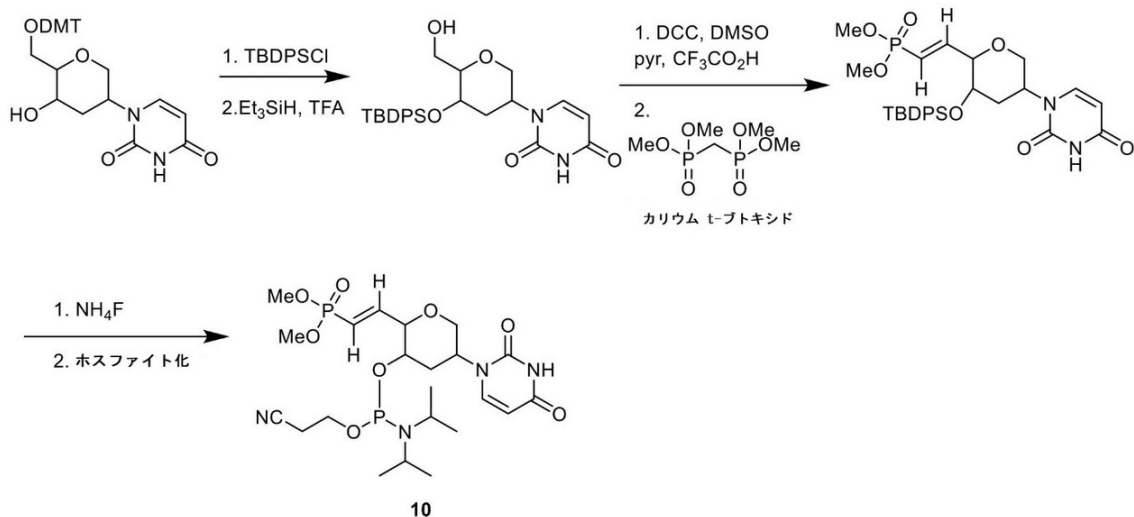
10

【 0 4 8 9】

あるいは以下の通りである：

【 0 4 9 0】

【化 5 6】



30

【 0 4 9 1】

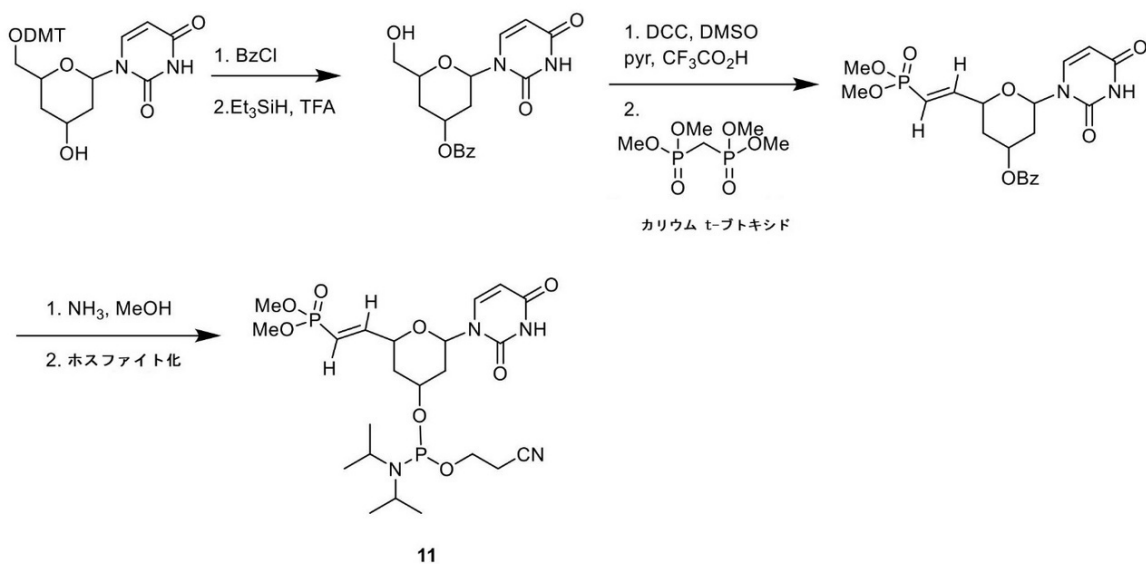
実施例 5．化合物 1 1 の調製

【 0 4 9 2】

40

50

【化 5 7】



10

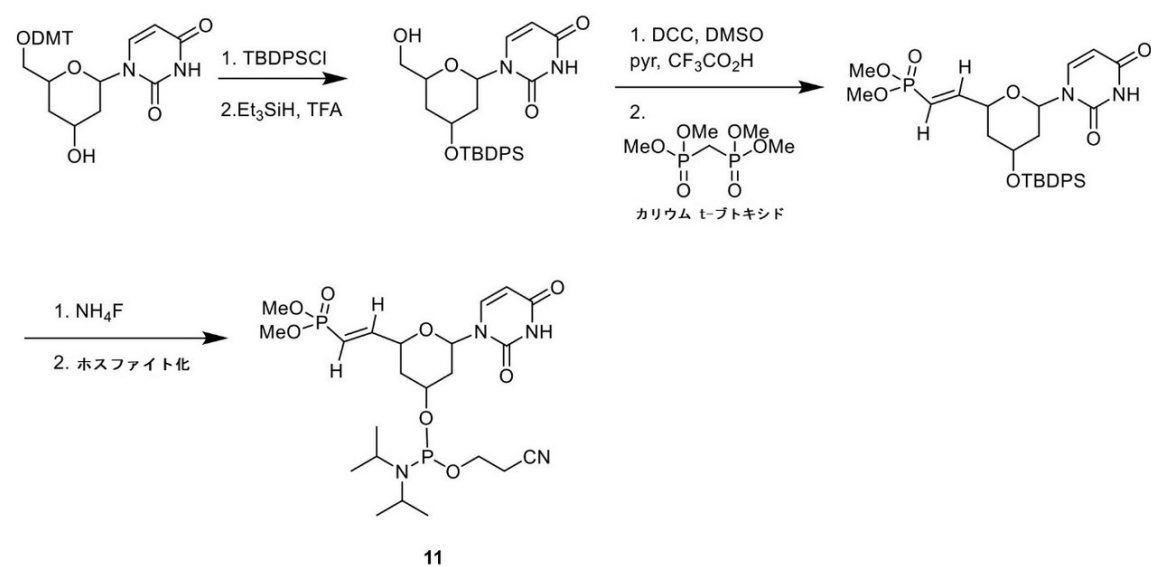
【 0 4 9 3】

あるいは以下の通りである：

20

【 0 4 9 4】

【化 5 8】



30

【 0 4 9 5】

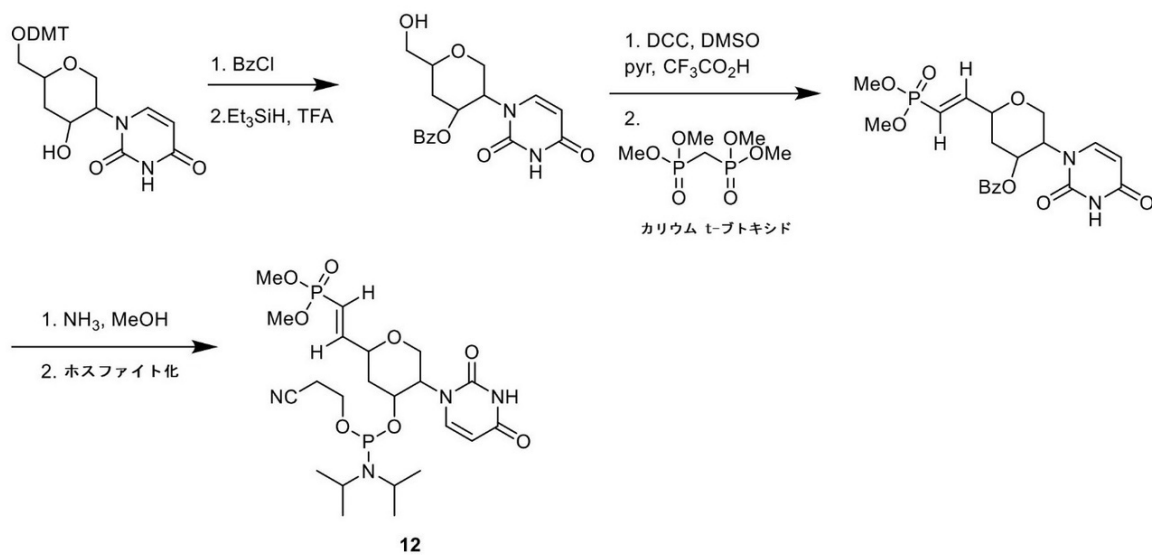
実施例 6 . 化合物 1 2 の調製

40

【 0 4 9 6】

50

【化 5 9】



10

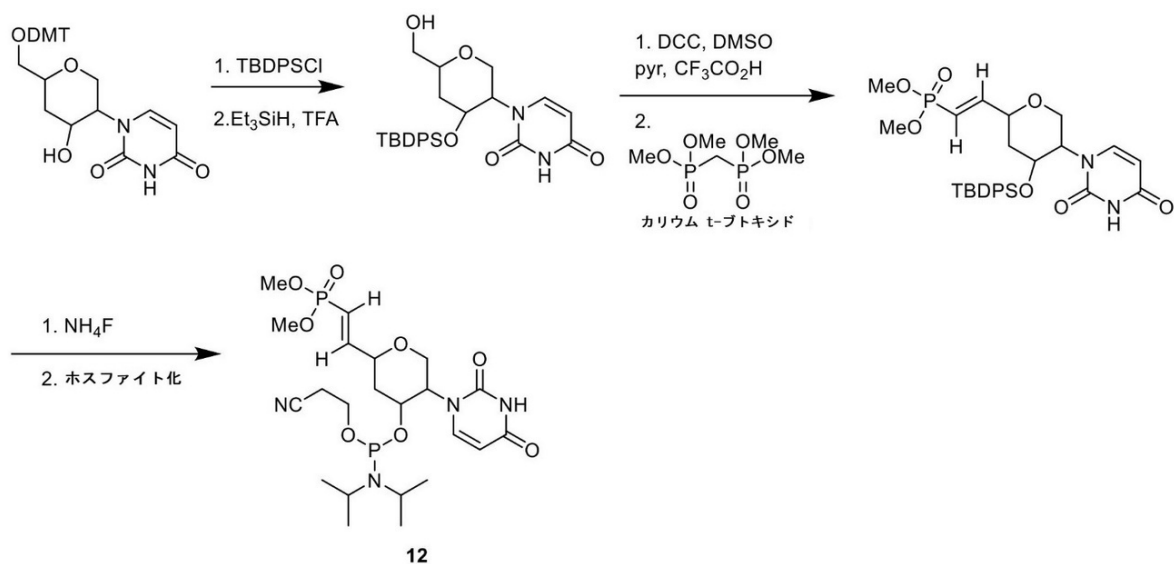
【 0 4 9 7】

あるいは以下の通りである：

20

【 0 4 9 8】

【化 6 0】



30

【 0 4 9 9】

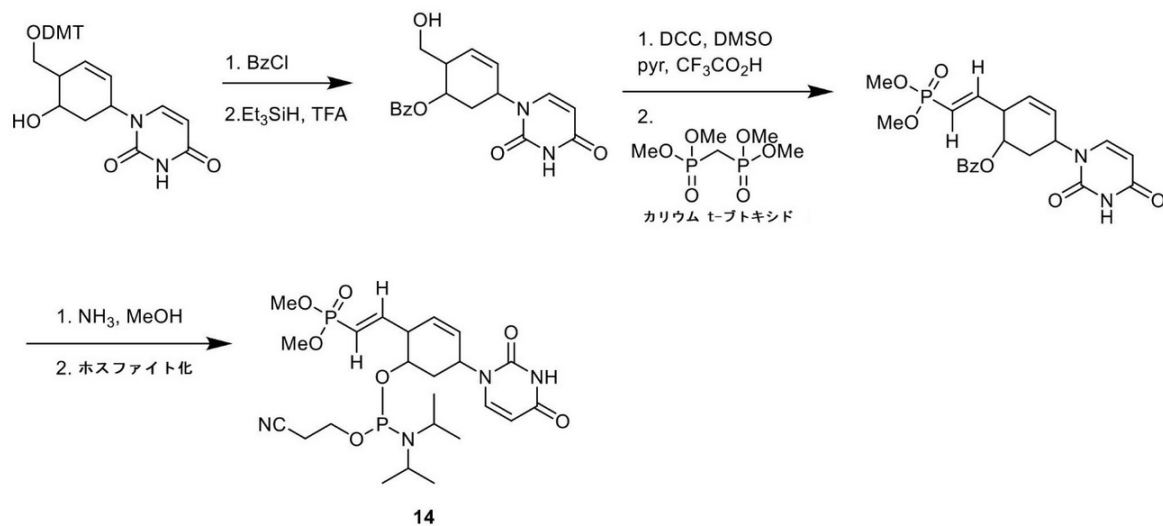
実施例 7 . 化合物 1 4 の調製

40

【 0 5 0 0】

50

【化 6 1】



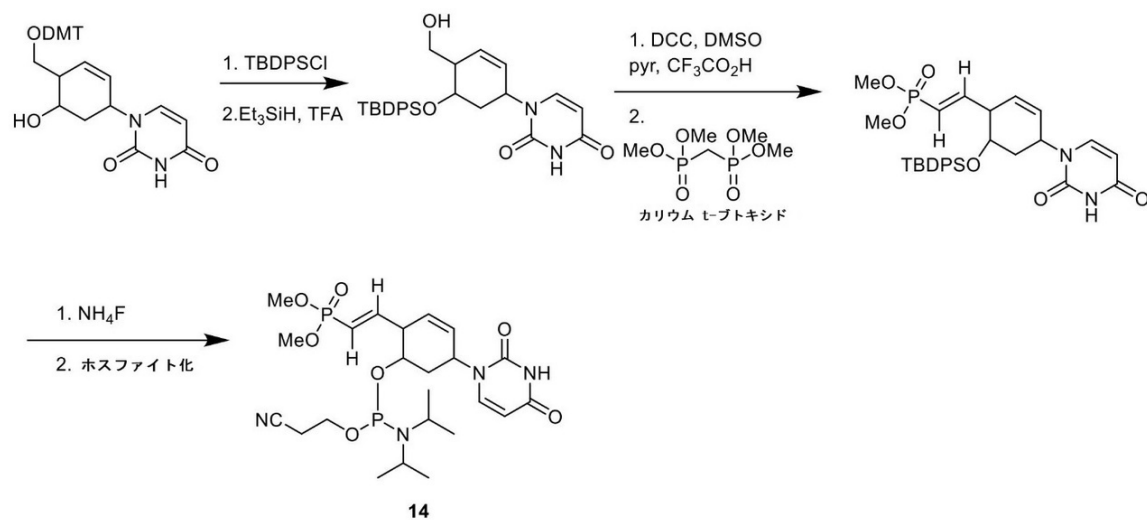
10

【 0 5 0 1】

あるいは以下の通りである：

【 0 5 0 2】

【化 6 2】



20

30

【 0 5 0 3】

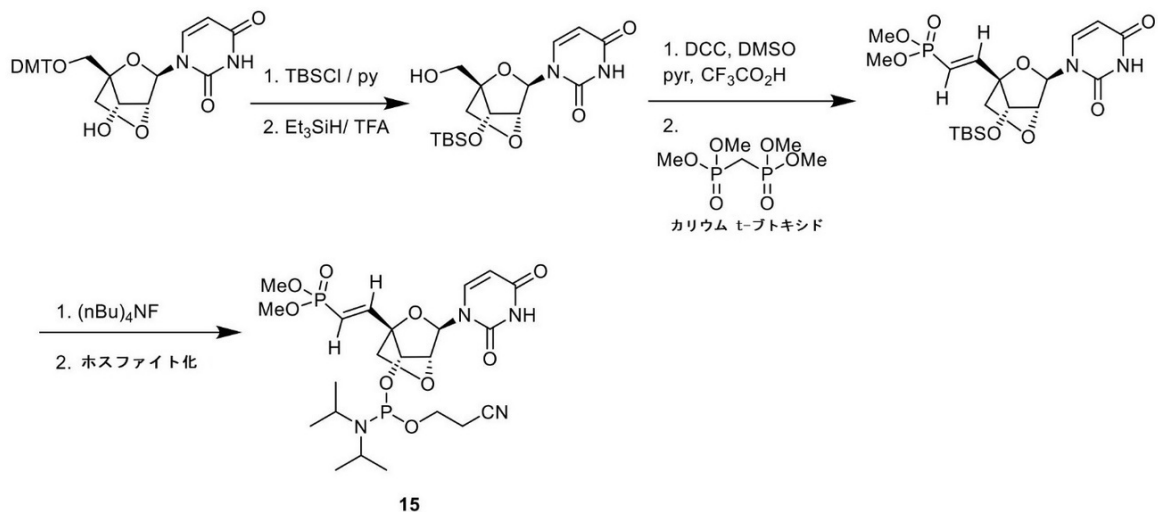
実施例 8：化合物 15 の調製

【 0 5 0 4】

40

50

【化 6 3】



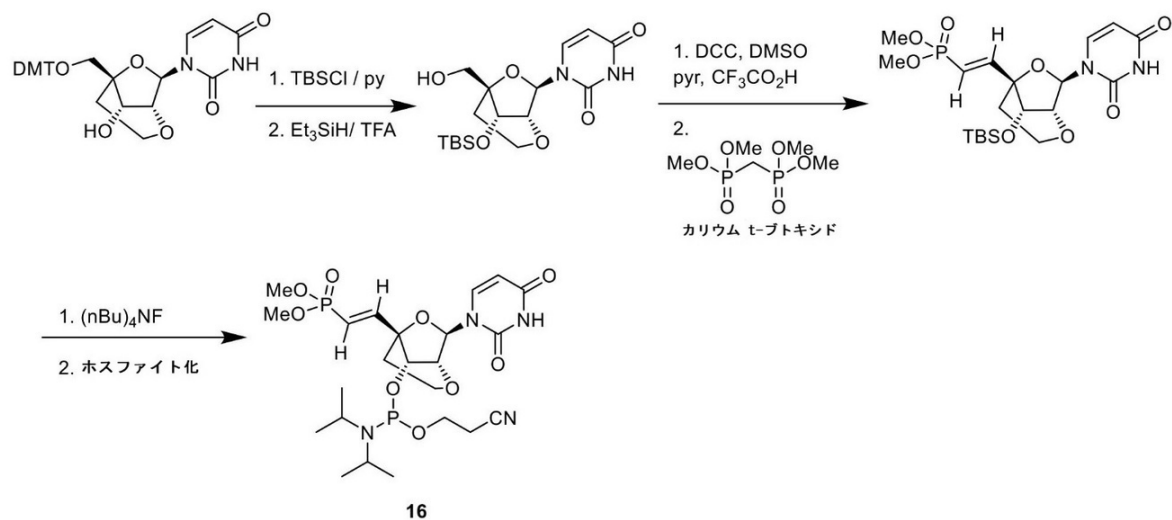
10

【 0 5 0 5】

実施例 9 . 化合物 1 6 の調製

【 0 5 0 6】

【化 6 4】



20

30

【 0 5 0 7】

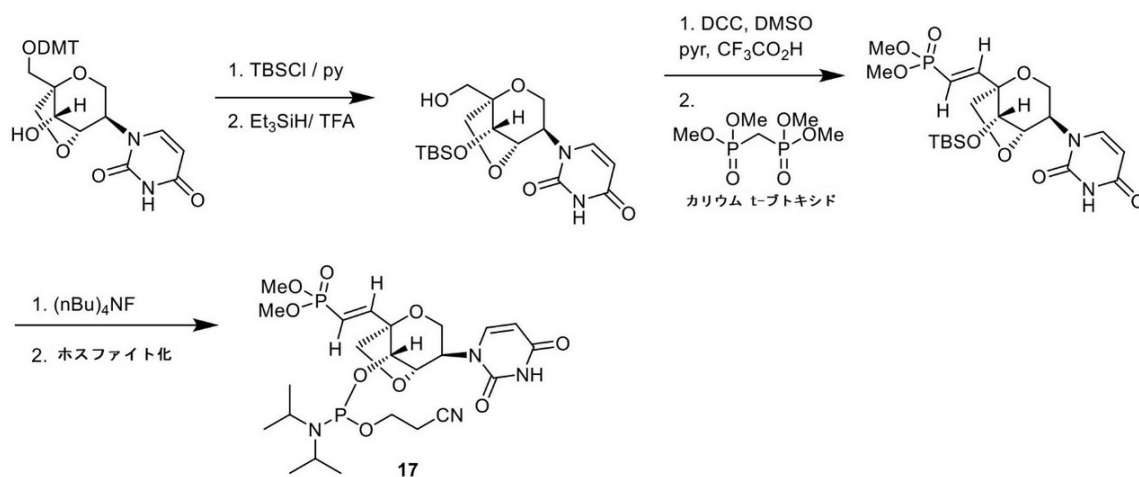
実施例 1 0 . 化合物 1 7 の調製

【 0 5 0 8】

40

50

【化 6 5】



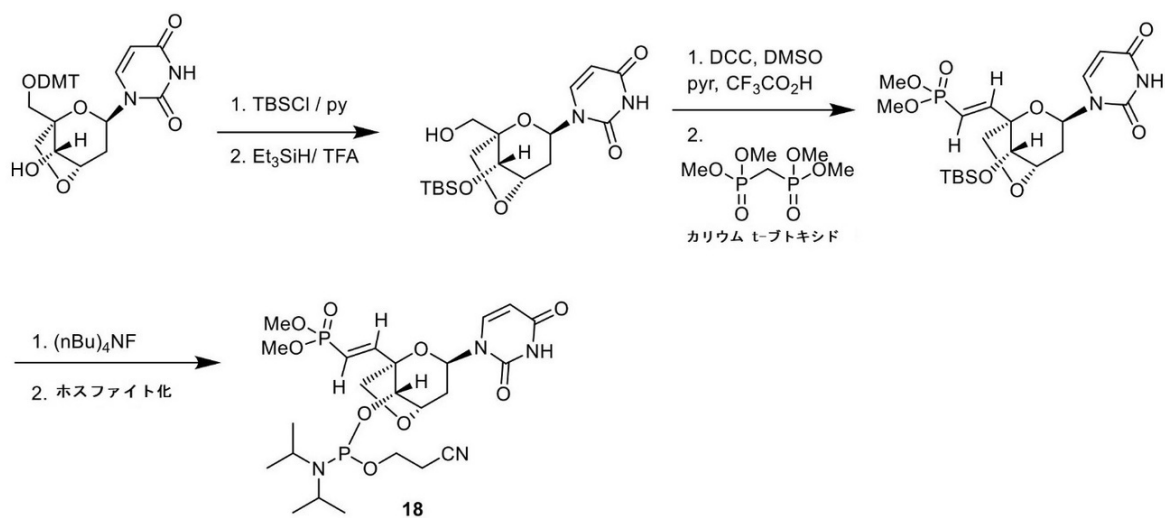
10

【 0 5 0 9】

実施例 11 . 化合物 18 の調製

【 0 5 1 0】

【化 6 6】



20

30

【 0 5 1 1】

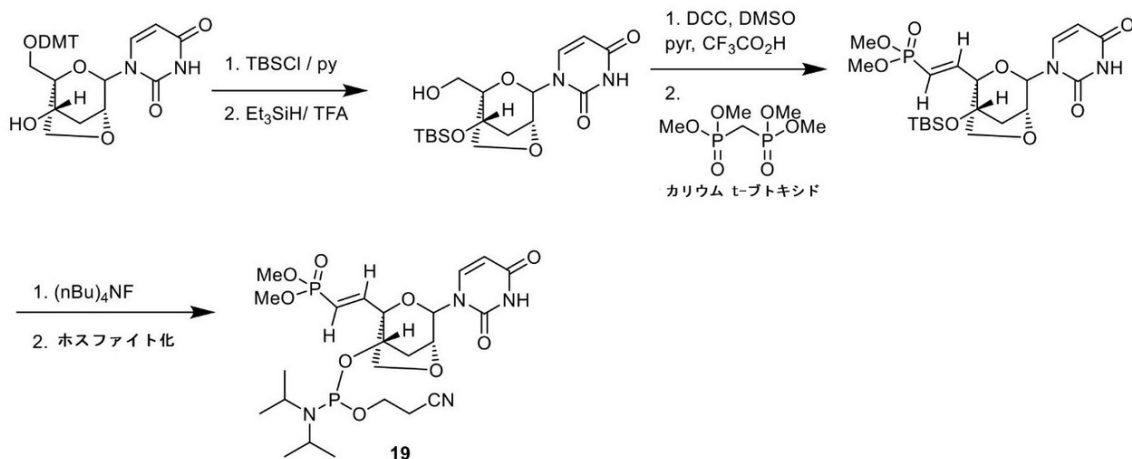
実施例 12 . 化合物 19 の調製

【 0 5 1 2】

40

50

【化 6 7】



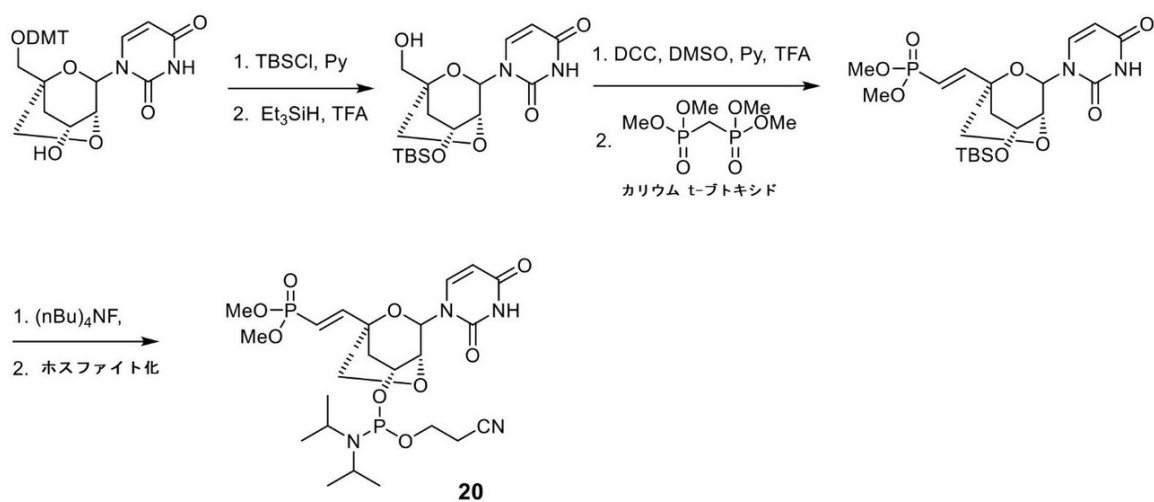
10

【 0 5 1 3】

実施例 13．化合物 20 の調製

【 0 5 1 4】

【化 6 8】



20

30

【 0 5 1 5】

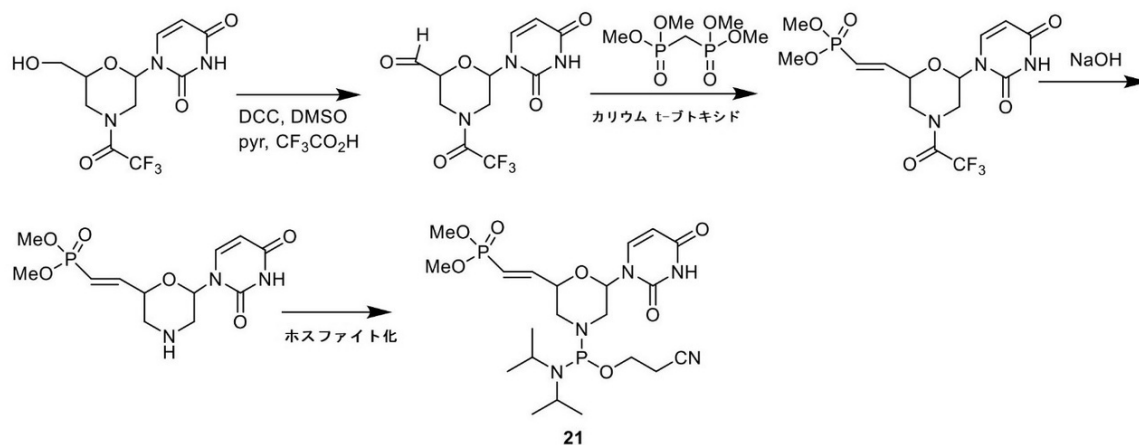
実施例 14．化合物 21 の調製

【 0 5 1 6】

40

50

【化 6 9】



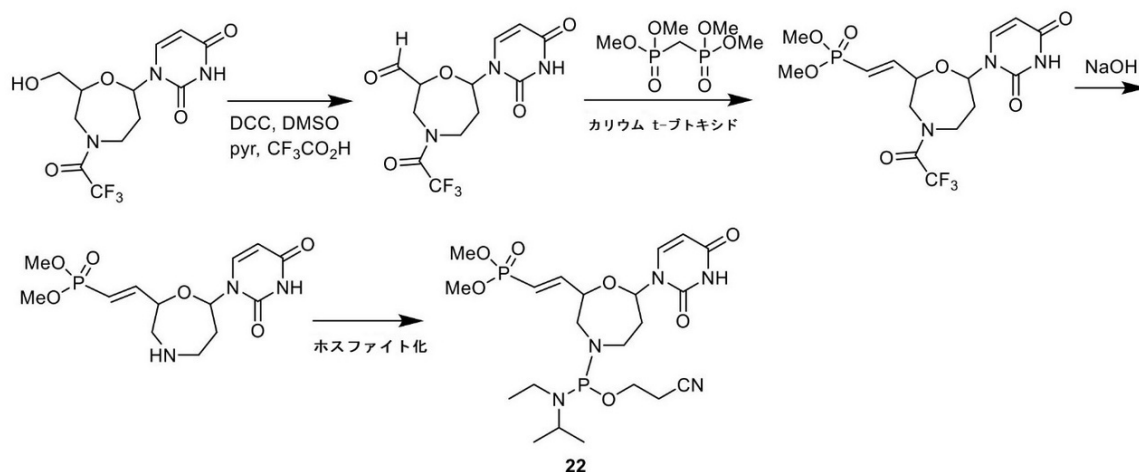
10

【 0 5 1 7】

実施例 15 . 化合物 22 の調製

【 0 5 1 8】

【化 7 0】



20

30

【 0 5 1 9】

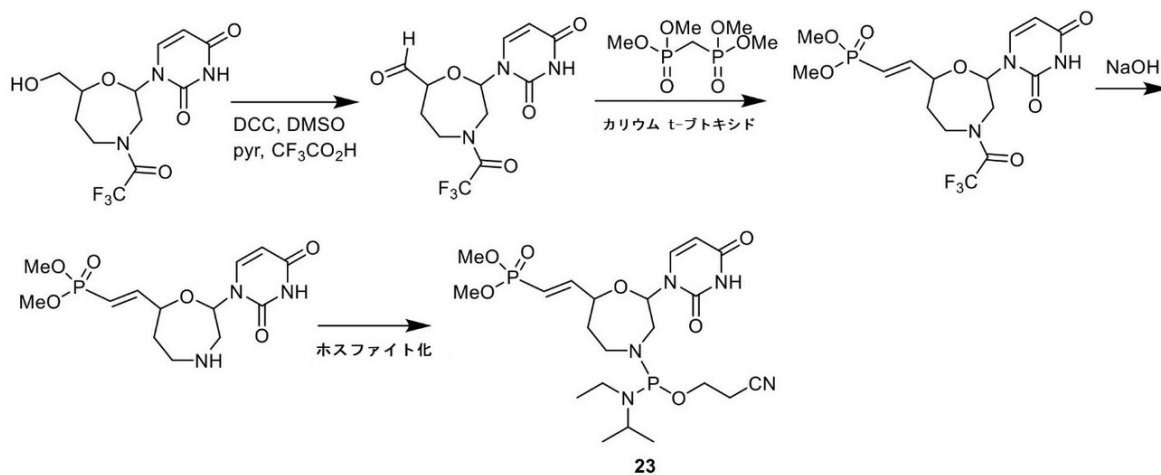
実施例 16 . 化合物 23 の調製

【 0 5 2 0】

40

50

【化 7 1】



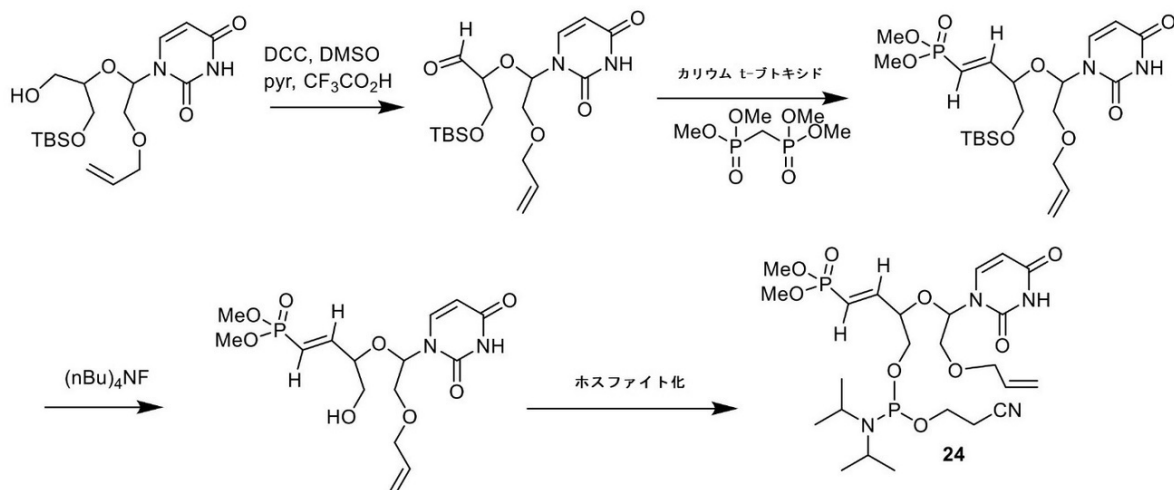
10

【 0 5 2 1】

実施例 17．化合物 24 の調製

【 0 5 2 2】

【化 7 2】



30

【 0 5 2 3】

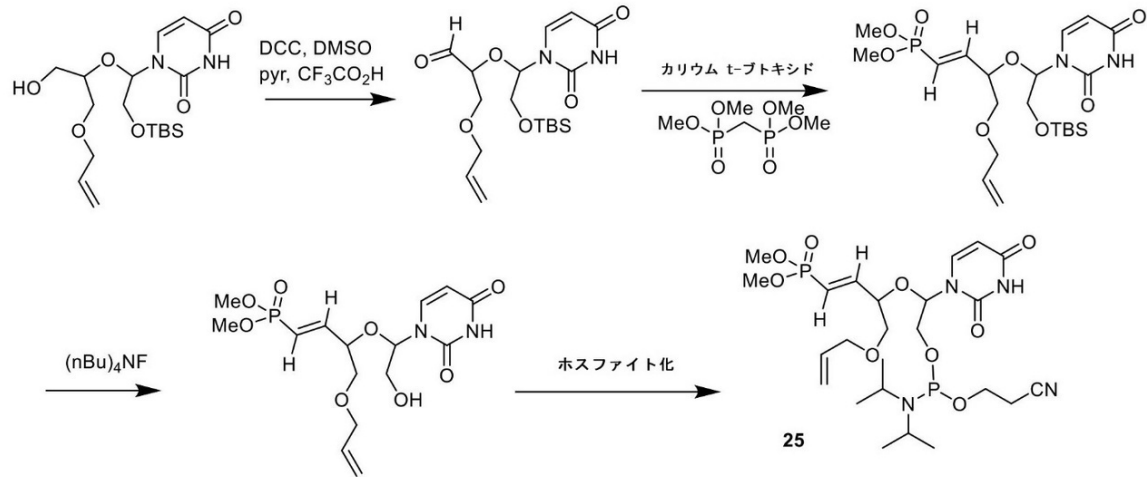
実施例 18．化合物 25 の調製

【 0 5 2 4】

40

50

【化 7 3】



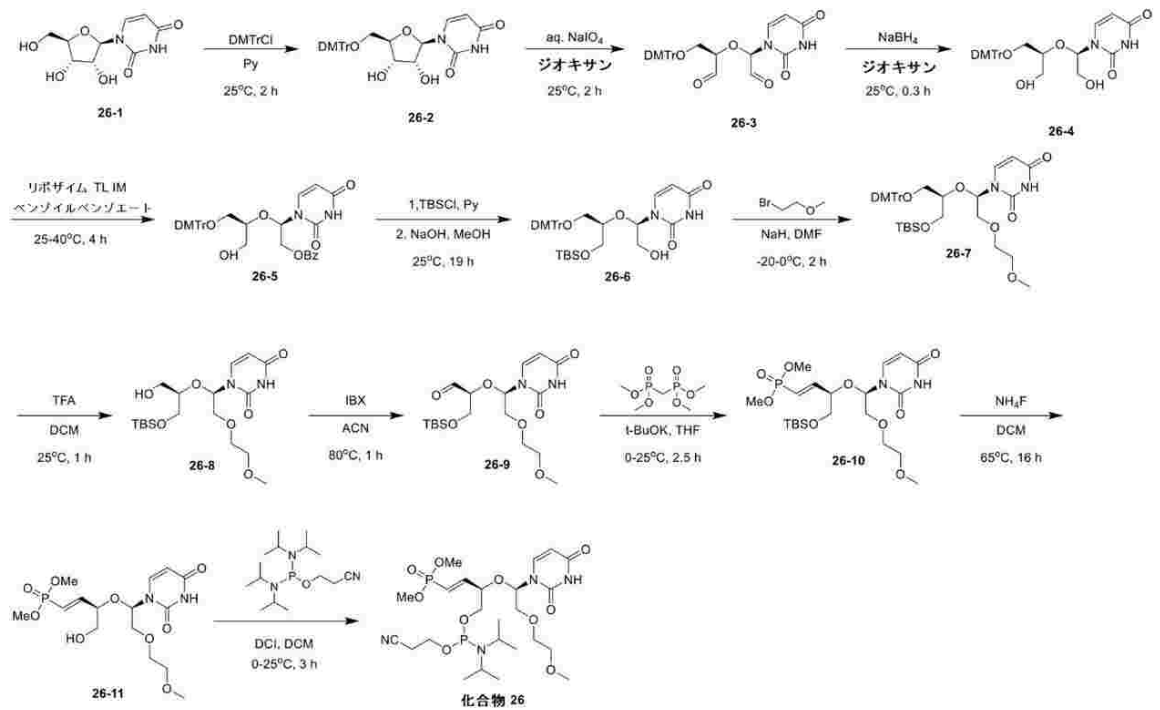
10

【 5 2 5】

実施例 19 . 化合物 26 の調製

【 5 2 6】

【化 7 4】



20

30

40

【 5 2 7】

化合物 26 の調製のための合成手順

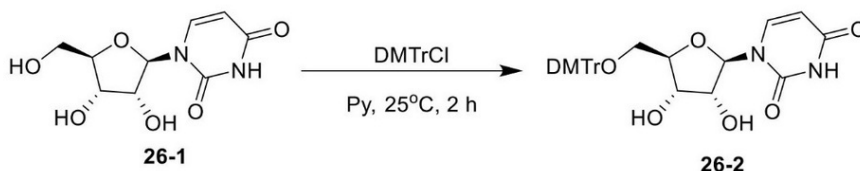
【 5 2 8】

化合物 26 - 2

【 5 2 9】

50

【化 7 5】



【0 5 3 0】

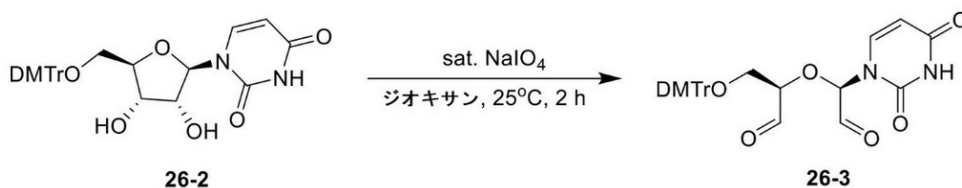
Py (3500 mL) 中の化合物の 26-1 (500 g、2.05 mol、1.00 eq) の溶液に、DMTrCl (763 g、2.25 mol、1.10 eq) を加えた。混合物を 25 °C で 2 時間攪拌した。TLC (DCM/MeOH=10/1、化合物 26-2 : $R_f=0.60$) は、化合物 26-1 が完全に消費されたことを示した。反応混合物を DCM (5.000 L) で希釈し、 NaHCO_3 (2.00 L x 2) で洗浄した。組み合わせた有機質層を、ブライン (2.00 L) で洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。残留物を、カラムクロマトグラフィー (SiO_2 、石油エーテル/酢酸エチル/TEA=50/1/0.5%~0/1/0.5%) によって精製した。白色固形物として化合物 26-2 (700 g、56.3% の収率、90.0% の純度) を得た。 ^1H NMR : 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ δ ppm 11.35 (s, 1 H), 7.72 (d, $J=8.0$ Hz, 1 H), 7.36-7.41 (m, 2 H), 7.32 (t, $J=7.6$ Hz, 2 H), 7.20-7.28 (m, 5 H), 6.90 (d, $J=8.6$ Hz, 4 H), 5.48 (d, $J=4.8$ Hz, 1 H), 5.31 (d, $J=8.0$ Hz, 1 H), 5.14 (d, $J=5.6$ Hz, 1 H), 4.09 (q, $J=5.4$ Hz, 2 H), 3.92-3.99 (m, 1 H), 3.70-3.78 (m, 6 H), 3.18-3.30 (m, 2 H).

【0 5 3 1】

化合物 26-3

【0 5 3 2】

【化 7 6】



【0 5 3 3】

ジオキサン (2500 mL) 中の化合物 26-2 (250 g、457 mmol、1.00 eq) 溶液に、飽和 NaIO_4 (103 g、484 mmol、4.85 mL、1.06 eq) 溶液を加えた。混合物を 25 °C で 2 時間攪拌した。TLC (DCM/MeOH=10/1、化合物 26-3 : $R_f=0.49$) は、化合物 26-2 が完全に消費されたことを示した。反応混合物を濾過した。無色の油として粗製生成物化合物 26-3 (250 g) を得て、それをさらに精製することなく次の工程で使用した。

【0 5 3 4】

化合物 26-4

【0 5 3 5】

10

20

30

40

50

10

20

化合物 26-5

30

26-4

 リボザイム TL IM
 ベンゾイルベンゾエート
 トルエン, 25-40°C, 4 h

 26-5

40

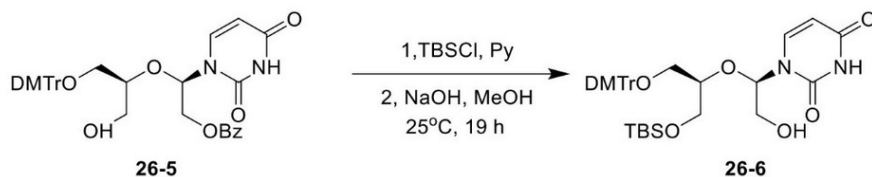
50

【 0 5 4 0 】

化合物 26-6

【0541】

【化79】



10

【0542】

Py (1700 mL) 中の化合物 26-5 (340 g、520 mmol、1.00 eq) の溶液に、TBSCl (157 g、1.04 mol、127 mL、2.00 eq) を 25 °C 以下で加えた。混合物を 25 °C で 19 時間攪拌した。TLC (DCM/MeOH = 20/1、化合物 26-6: R_f = 0.37) は、化合物 26-5 が完全に消費されたことを示した。水 (340 mL) を反応混合物に加えた。ヌクレオシドを含有する結果として生じる混合物を、MeOH (1.00 L) に溶解し、その後、0 °C で MeOH (1.00 L、pH = 10) 中の NaOH を滴下で加え、次に、0 °C で 2.5 時間攪拌した。混合物を減圧下で濃縮して、残留物を得た。飽和水性 NH₄Cl (1.00 L) を混合物に加え、10 分間攪拌した。水 (1.00 L) を加えて、混合物を DCM (1.00 L) で抽出し、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、ろ過し、減圧下で濃縮することで残留物を得て、それをカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル/TEA = 10/1/0.5% ~ 0/1/0.5%) により精製した。白色固形物として化合物 26-6 (250 g、339 mmol、65.2% の収率、90.0% の純度) を得た。¹H NMR: 400 MHz, DMSO-d₆ δ ppm 11.35 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.24-7.33 (m, 4H), 7.14-7.22 (m, 5H), 6.82-6.88 (m, 4H), 5.83 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.47-5.57 (m, 1H), 5.11 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 3.72 (d, J = 0.8 Hz, 6H), 3.57-3.67 (m, 4H), 3.46-3.55 (m, 1H), 2.94-3.00 (m, 2H), 0.72-0.78 (m, 9H), -0.04 (d, J = 8.2 Hz, 5H)

20

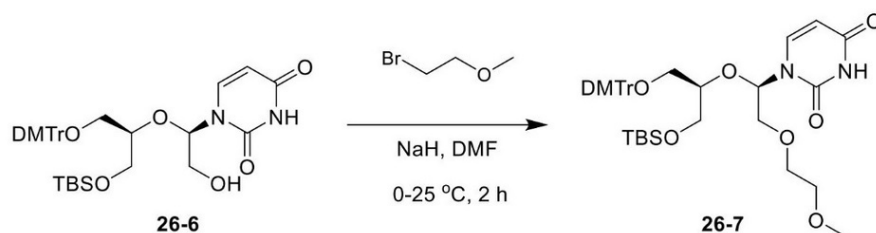
30

【0543】

化合物 26-7

【0544】

【化80】



40

【0545】

DMF (500 mL) 中の化合物 26-6 (50.0 g、75.4 mmol、1.00 eq) の溶液に、NaH (9.96 g、248. mmol、1.81 uL、60% の純度、3.30 eq) を -20 °C で加え、-20 °C で 0.5 時間攪拌した。その後、アルコキシプロミド (15.7 g、113. mmol、10.6 mL、1.50 eq) を反応

50

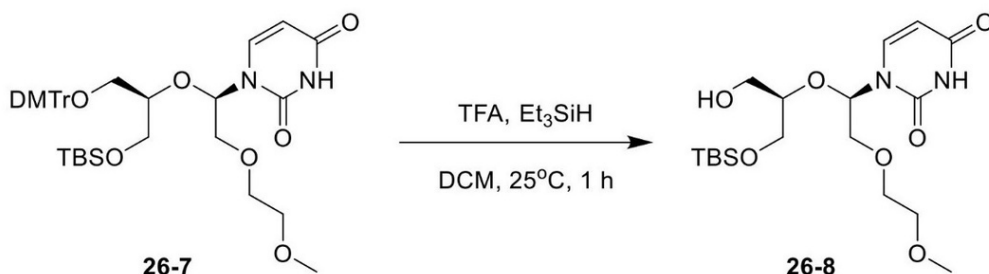
物に加えた。混合物を 0 ° C で 1 . 5 時間攪拌した。T L C (石油エーテル／酢酸エチル = 1 / 2、化合物 7 : $R_f = 0.43$) は、化合物 26-6 が完全に消費されたことを示した。反応混合物を 25 ° C の NH_4Cl (1.00 L x 2) の添加によってクエンチし、その後、酢酸エチル (500 mL) で希釈し、水 (500 mL) で洗浄した。組み合わせた有機質層を、ブライン (500 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮することで、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 、石油エーテル／酢酸エチル／TEA = 10 / 1 / 0.5 % ~ 0 / 1 / 0.5 %) により精製した。無色の油として、化合物 26-7 (34.0 g、47.1 mmol、62.5 % の収率) を得た。 ^1H NMR : 400 MHz DMSO- d_6 δ ppm 11.40 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.24-7.33 (m, 5H), 7.14-7.22 (m, 5H), 6.81-6.88 (m, 4H), 5.96-6.02 (m, 1H), 5.55 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 3.73 (d, $J = 0.8$ Hz, 6H), 3.70 (dd, $J = 6.0, 2.2$ Hz, 2H), 3.62-3.66 (m, 2H), 3.53-3.57 (m, 2H), 3.50-3.53 (m, 1H), 3.38-3.42 (m, 2H), 3.20-3.22 (m, 3H), 2.94-3.00 (m, 2H), 0.72-0.82 (m, 9H), -0.04 (d, $J = 7.4$ Hz, 5H)

【0546】

化合物 26-8

【0547】

【化81】



【0548】

DCM (468 mL) 中の化合物 26-7 (46.8 g、64.9 mmol、1.00 eq) の溶液に、TFA (43.1 g、378 mmol、28.0 mL、5.83 eq) および Et_3SiH (15.1 g、129 mmol、20.7 mL、2.00 eq) を加えた。混合物を 25 ° C で 1 時間攪拌した。T L C (石油エーテル／酢酸エチル = 0 / 1、化合物 26-8 : $R_f = 0.43$) は、化合物 26-7 が完全に消費されたことを示した。反応混合物を DCM (500 mL) で希釈し、 H_2O (500 mL) で洗浄した。組み合わせた有機質層を、 NaHCO_3 (1500 mL x 3) およびブライン (500 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮することで、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 、石油エーテル／酢酸エチル = 10 / 1 ~ 0 / 1) により精製した。無色の油として化合物 26-8 (17.0 g、36.5 mmol、56.3 % の収率、90.0 % の純度) を得た。 ^1H NMR : 400 MHz, DMSO- d_6 δ ppm 11.87 (s, 1H), 8.17 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.75-7.87 (m, 4H), 7.63-7.74 (m, 5H), 7.36 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 4H), 6.34 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.62 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.24 (s, 6H), 4.09-4.20 (m, 4H), 4.02 (d, $J = 4.6$ Hz

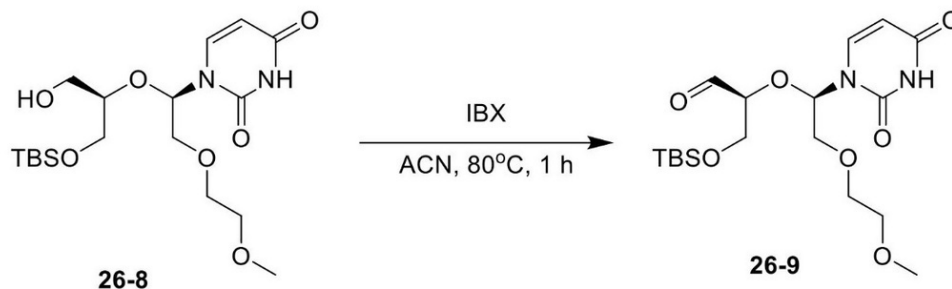
, 1 H), 3.83 (s, 1 H), 2.95–3.09 (m, 4 H), 1.28 (s, 9 H), 0.48 (d, J = 8.2 Hz, 6 H).

【0549】

化合物26-9

【0550】

【化82】



10

【0551】

ACN (170 mL) 中の化合物26-8 (17.0 g、40.6 mmol、1.00 eq) の溶液に、IBX (17.1 g、60.9 mmol、1.50 eq) を加えた。混合物を80°Cで1時間攪拌した。LC-MSは、化合物26-8が完全に消費されたことを示した。反応混合物をろ過し、減圧下で濃縮して、残留物を得た。無色の油として粗生成物化合物26-9 (17.0 g、粗製) を得て、それをさらに精製することなく次の工程で使用した。

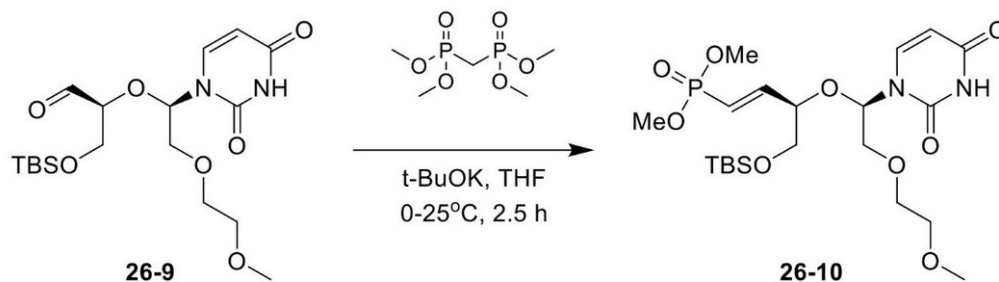
20

【0552】

化合物26-10

【0553】

【化83】



30

【0554】

THF (100 mL) 中の化合物テトラメチルメチレンジホスホネート (15.1 g、65.3 mmol、1.60 eq) の溶液に、t-BuOK (6.87 g、61.2 mmol、1.50 eq) を0°Cで滴下で加え、混合物を25°Cで0.5時間攪拌した。その後、混合物をTHF (70.0 mL) 中の化合物26-9 (17.0 g、40.8 mmol、1.00 eq) に滴下で加え、0°Cで1時間攪拌し、25°Cに到達させ、25°Cで1時間攪拌した。TLC (石油エーテル/酢酸エチル=0/1、化合物10: R_f=0.07) は、化合物26-9が完全に消費されたことを示した。反応混合物を、NH₄Cl (500 mL) の添加によってクエンチし、その後、酢酸エチル (200 mL) で希釈し、抽出した。組み合わせた有機質層を、ブライン (200 mL) で洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮することで、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル=10/1~0/1) により精製した。白色固形物として化合物26-10 (11.4 g、16.3 mmol、40.1%の収率、75.0%の純度) を得た。¹H NMR: 400 MHz, CDCl₃

40

50

$^3\delta$ ppm 9.19 (s, 1H), 7.43 (d, $J = 8.16$ Hz, 1H), 6.51–6.67 (m, 1H), 6.13 (t, $J = 4.78$ Hz, 1H), 5.82–5.95 (m, 1H), 5.72 (dd, $J = 8.04, 1.88$ Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.63–3.78 (m, 12H), 3.45–3.54 (m, 2H), 3.31–3.37 (m, 3H), 0.82–0.94 (m, 9H), 0.00–0.10 (m, 6H).

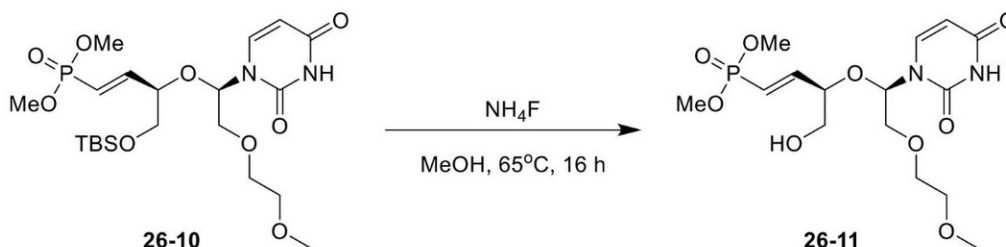
【0555】

化合物 26-11

【0556】

【化84】

10



20

【0557】

メタノール (114 mL) 中の化合物 26-10 (11.4 g、21. mmol、1.00 eq) の溶液に、 NH_4F (6.46 g、174 mmol、8.00 eq) を加えた。混合物を 65°C で 16 時間攪拌した。TLC (DCM/MeOH = 20/1、化合物 10: $R_f = 0.28$) は、化合物 26-10 が完全に消費されたことを示した。反応混合物を減圧下で濃縮して、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 、酢酸エチル/MeOH = 100/1 ~ 10/1) により精製した。無色の油として化合物 26-11 (5.90 g、13.0 mmol、59.6% の収率、90.0% の純度) を得た。 ^1H NMR: 400 MHz DMSO- d_6 , δ ppm 11.29 (s, 1H) 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H) 6.42–6.62 (m, 1H) 5.90–5.98 (m, 2H) 5.62 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H) 5.01 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H) 4.18 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H) 4.10 (q, $J = 5.2$ Hz, 1H) 3.70–3.76 (m, 2H) 3.50–3.58 (m, 8H) 3.43–3.49 (m, 1H) 3.36–3.41 (m, 2H) 3.21 (s, 3H) 3.17 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H) 1.91 (s, 1H)

30

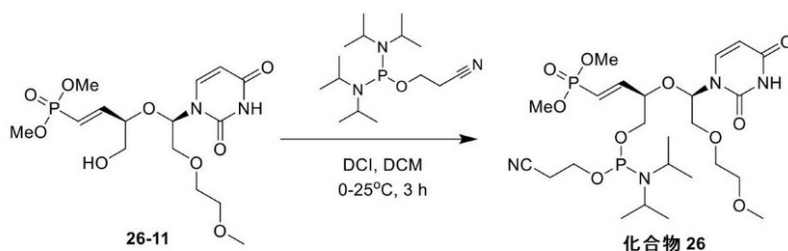
【0558】

化合物 26

【0559】

【化85】

40



【0560】

DCM (49.0 mL) 中の化合物 26-11 (4.90 g、12.0 mmol、1.

50

0.0 eq) の溶液に、DCI (2.27 g、19.2 mmol、1.60 eq) および 2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (tetra isopropylphosphorodiamidite) (6.51 g、21.6 mmol、6.86 mL、1.80 eq) を 0 °C で加えた。混合物を 25 °C で 3 時間攪拌した。TLC (DCM/MeOH=10/1、化合物 26: R_f=0.58) は、化合物 26-11 が完全に消費されたことを示した。反応混合物を DCM (50.0 mL) で希釈し、水性 NaHCO₃ (50.0 mL x 2) で洗浄した。組み合わせた有機質層を、ブライン (50.0 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮することで、残留物を得た。残留物をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル/TEA=100/1/0.5%~0/1/0.5%) により精製した。無色の油として化合物 26 (5.40 g、8.52 mmol、70.9% の収率、96.0% の純度) を得た。

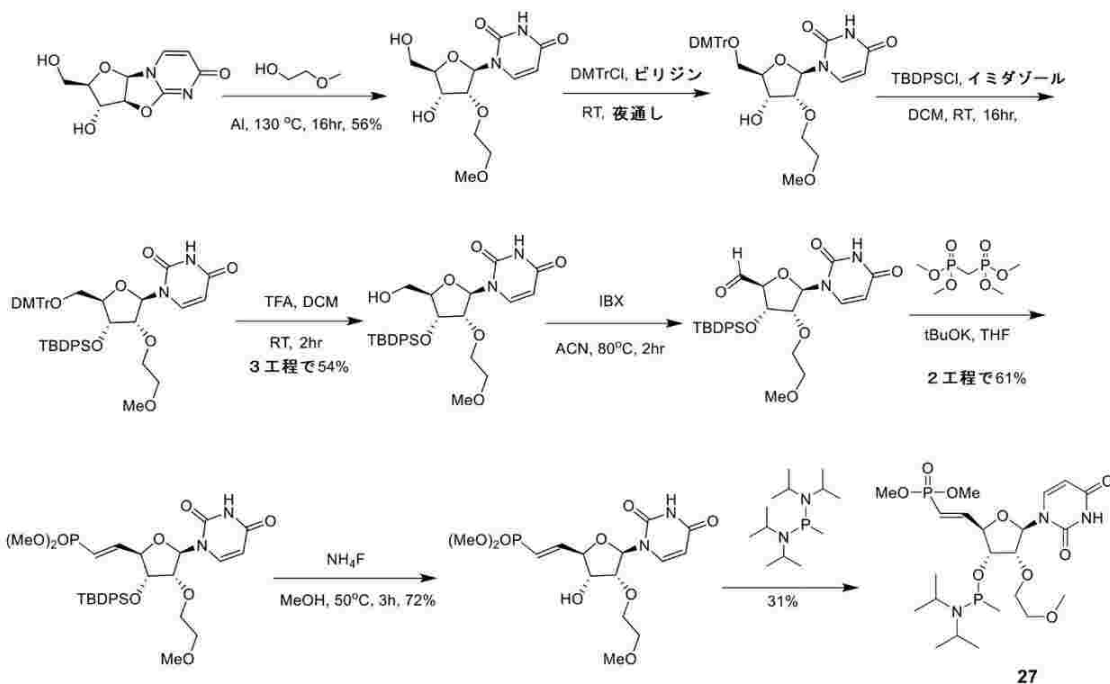
³¹P decoupled ¹H NMR: (400 MHz, CD₃CN): δ 7.42–7.45 (dd, J = 8 Hz, 1H), δ 6.42–6.47 (dd, J = 17.2 Hz, 1H), 5.97–5.84 (m, 2H), 5.54–5.52 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.27–4.23 (m, 1H), 3.75–3.50 (br, 12 H), 3.36–3.30 (br, 2H), 3.18 (s, 3H), 2.60–2.57 (m, 2H), 1.10–1.09 (d, 12 H)
³¹P NMR (400 MHz, CD₃CN) δ 148.6, 148.4, 19.24, 19.22 MS (ESI) calculated for C₂₄H₄₂N₄O₁₀P₂ (M-H) - m/z = 607.2, found 607.2

[0561]

実施例 20. 化合物 27 の調製

[0562]

[化 86]



[0563]

実施例 21. 化合物 28 の調製

[0564]

10

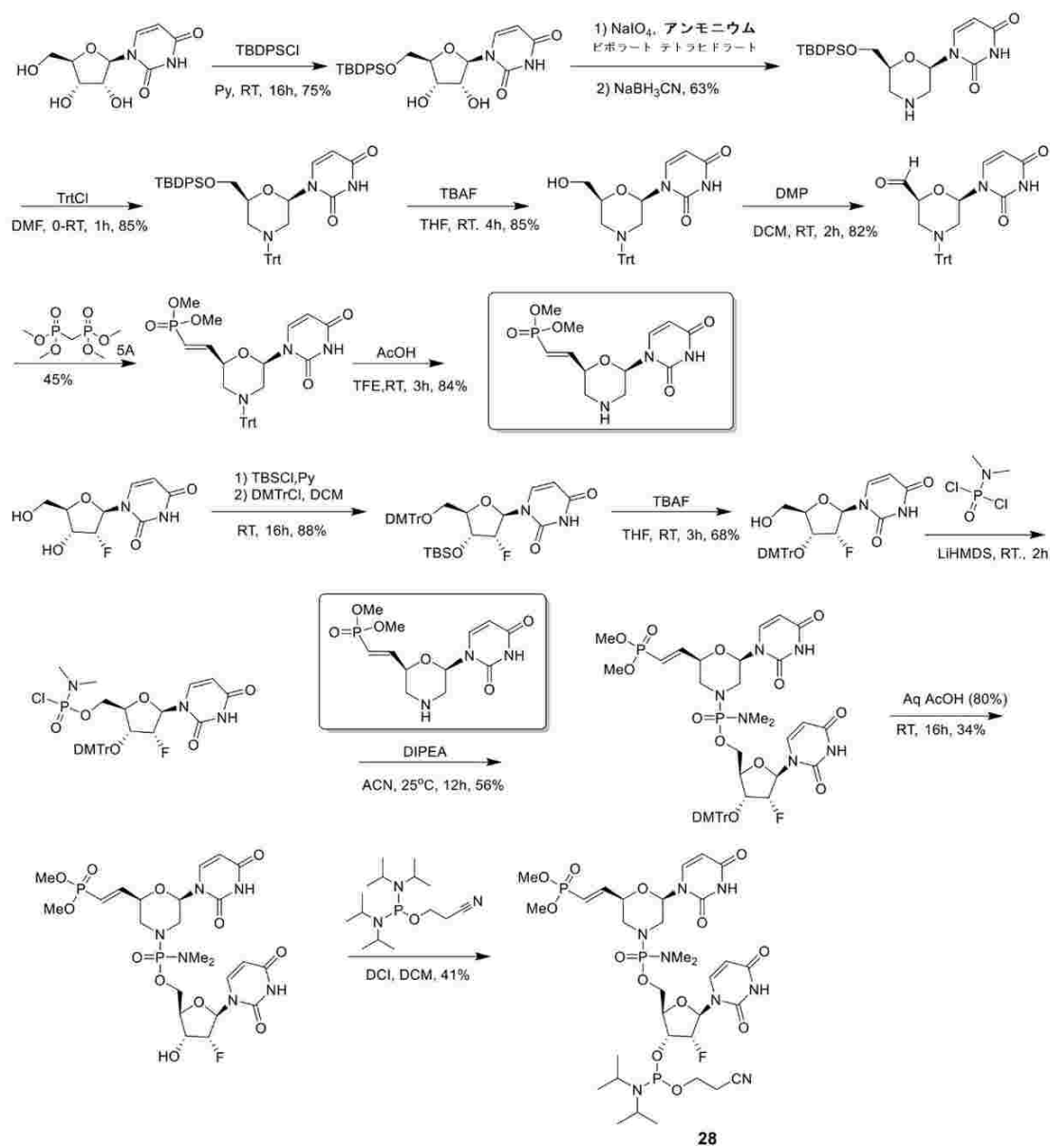
20

30

40

50

【化 8 7】



10

20

30

【 0 5 6 5】

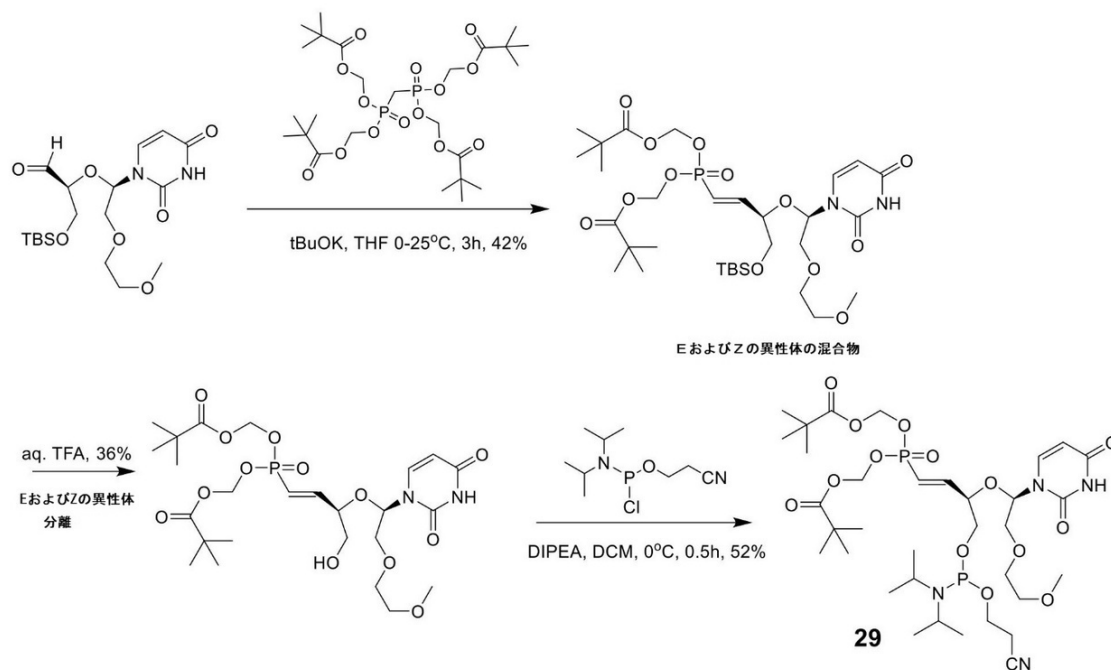
実施例 22．化合物 29 の調製

【 0 5 6 6】

40

50

【化 8 8】



10

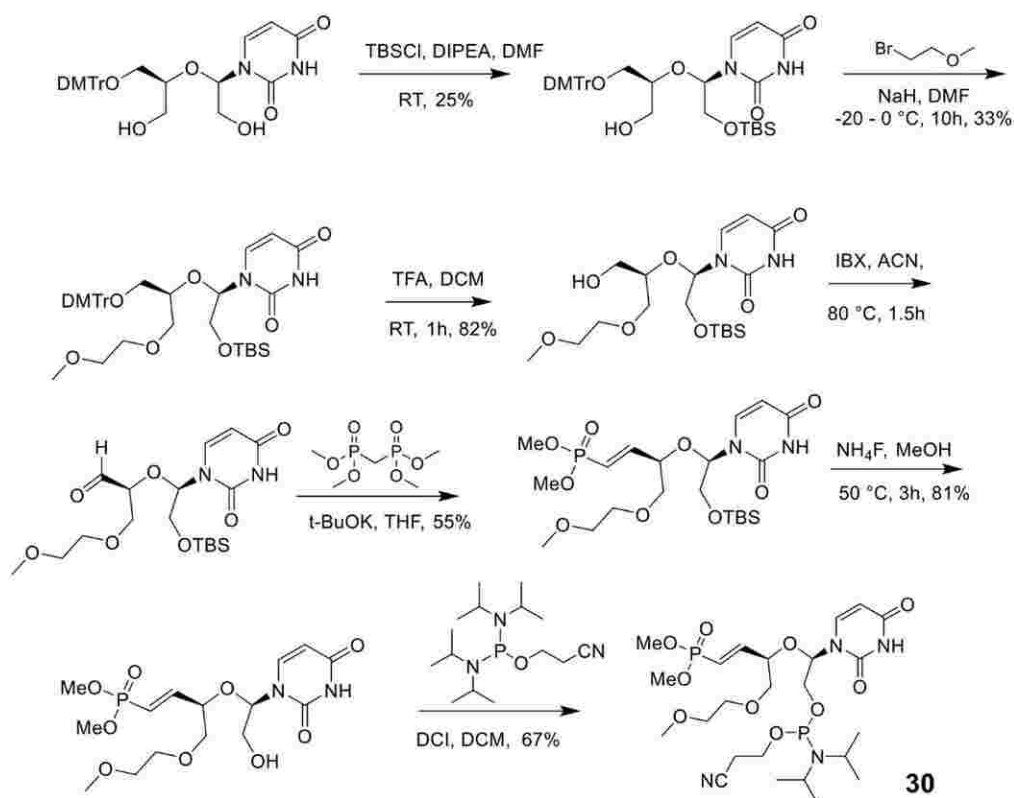
20

【 0 5 6 7】

実施例 23．化合物 30 の調製

【 0 5 6 8】

【化 8 9】



30

40

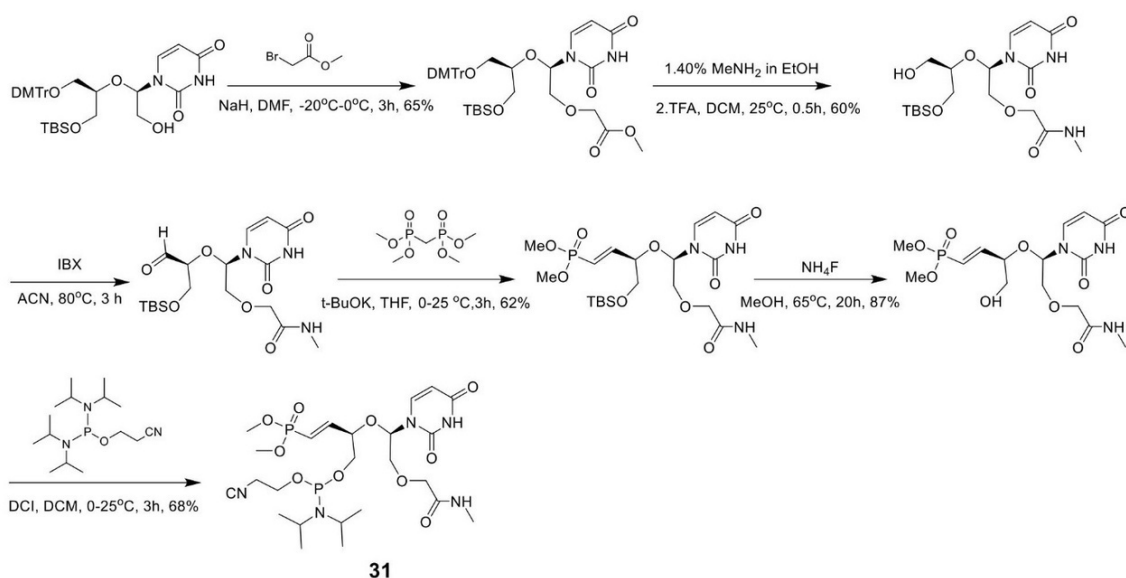
【 0 5 6 9】

実施例 24．化合物 31 の調製

50

【 0 5 7 0 】

【 化 9 0 】



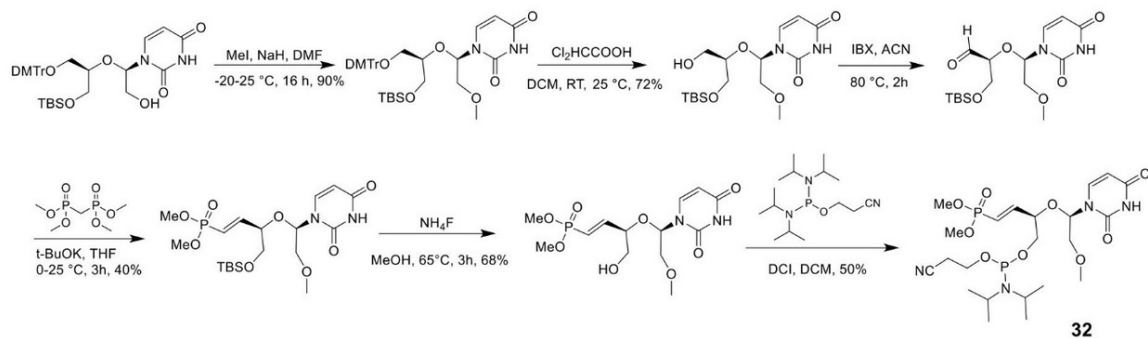
10

【 0 5 7 1 】

実施例 25 . 化合物 32 の調製

【 0 5 7 2 】

【 化 9 1 】



30

【 0 5 7 3 】

実施例 26 . 分析データ

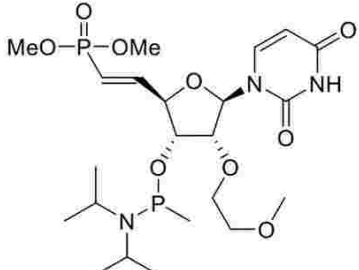
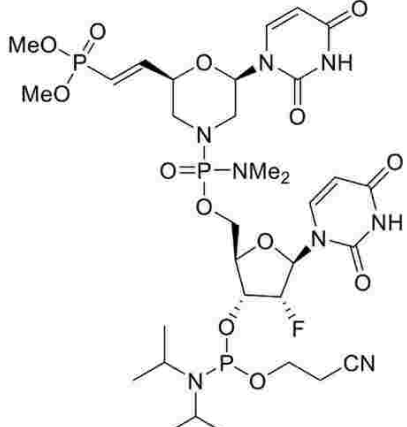
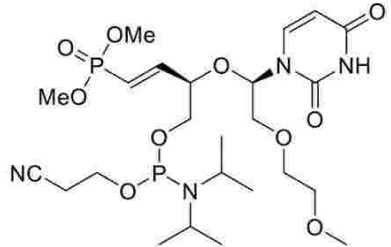
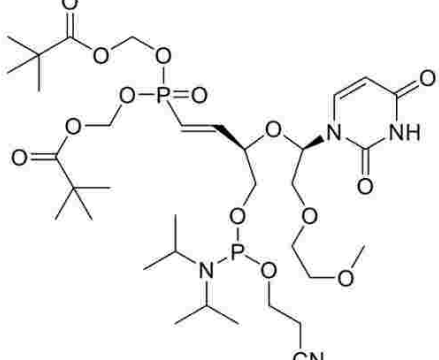
本明細書に記載される様々な化合物の ^{31}P decoupled ^1H NMR、 ^{31}P NMRおよびMS (ESI) データが以下に示される：

【 0 5 7 4 】

40

50

【表 1 - 3】

化学構造	分析 (NMR および MS) データ
	³¹ P decoupled ¹ H NMR (400MHz, CD ₃ CN): δ 7.39-7.35(dd, J=7.6Hz, 1H), δ 6.77(m, 1H), 6.0(m, 1H), 5.82-5.78(dd, J=3.6, 14Hz, 1H), 5.66-5.63(dd, J=4, 8Hz, 1H), 4.52-4.46(m, 1H), 4.16-4.01(m, 2H), 3.73-3.47(br, 12 H), 3.28(s, 3H), 1.26(d, J=6.4Hz, 3H), 1.18-1.16(d, J=6.4Hz, 6H), 1.09-1.08(d, J=6.4Hz, 6H) ³¹ P NMR (400 MHz, CD ₃ CN) δ 125.7, 125.5, 19.09, 18.95 MS (ESI) calculated for C ₂₄ H ₄₂ N ₄ O ₁₀ P ₂ (M+H) ⁺ m/z = 652.2, found 652.2
	³¹ P decoupled ¹ H NMR (400MHz, CD ₃ CN): δ 7.70-7.61(m, 1H), δ 7.55-7.48(m, 1H), 7.08-6.73(br, 1H), 6.01(br, 1H), 5.69(br, 4H), 5.3 (m, 1H), 4.78-4.49(m, 2H), 4.11(br, 3H), 3.90-3.48(br, 14H), 2.83-2.59(Br, 10H), 1.35-1.20(m, 12H) ³¹ P NMR (400 MHz, CD ₃ CN) δ 150.75, 150.71, 150.05, 149.99, 20.54, 20.44, 15.39, 15.29 MS (ESI) calculated for C ₃₂ H ₅₀ FN ₈ O ₁₃ P ₃ (M-H) ⁻ m/z = 865.2, found 865.2
	³¹ P decoupled ¹ H NMR (400MHz, CD ₃ CN): δ 7.42-7.45(dd, J=8Hz, 1H), δ 6.42-6.47(dd, J=17.2 Hz, 1H), 5.97-5.84(m, 2H), 5.54-5.52(d, J=8Hz, 1H), 4.27-4.23(m, 1H), 3.75-3.50(br, 12 H), 3.36-3.30(br, 2H), 3.18(s, 3H), 2.60-2.57(m, 2H), 1.10-1.09(d, 12H) ³¹ P NMR (400 MHz, CD ₃ CN) δ 148.6, 148.4, 19.24, 19.22 MS (ESI) calculated for C ₂₄ H ₄₂ N ₄ O ₁₀ P ₂ (M-H) ⁻ m/z = 607.2, found 607.2
	³¹ P decoupled ¹ H NMR (400MHz, CD ₃ CN): δ 7.55 (dd, J=8Hz, 1H), δ 6.58-6.69 (m, J=17.2 Hz, 1H), 6.11-6.02 (m, 2H), 5.66-5.47 (m, 5H), 4.36-4.38 (m, 1H), 3.88-3.60 (m, 9 H), 3.46-3.44 (br, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.69 (dt, J=1.6Hz, 6Hz, 2H), 1.20 (m, 30H) ³¹ P NMR (400 MHz, CD ₃ CN) δ 148.69, 148.49, 16.79 MS (ESI) calculated for C ₃₄ H ₅₈ N ₄ O ₁₄ P ₂ (M-H) ⁻ m/z = 807.3, found 807.3

【 0 5 7 5 】

10

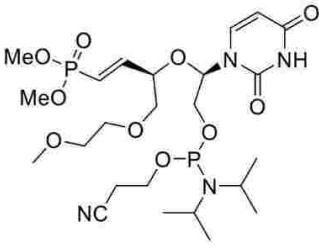
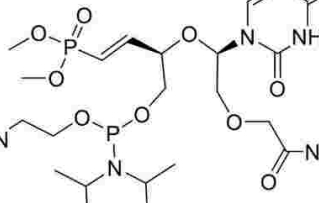
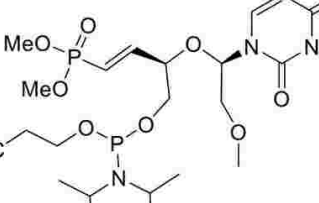
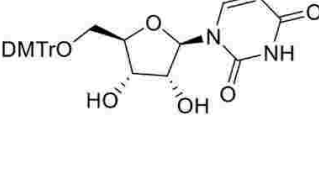
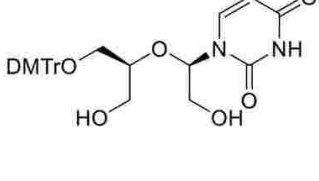
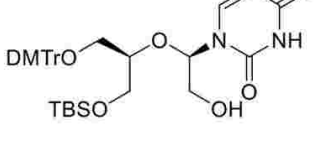
20

30

40

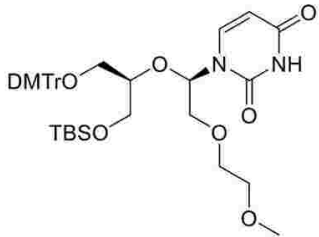
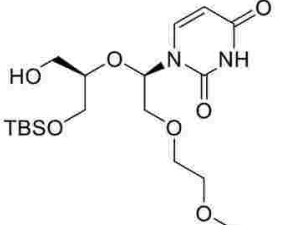
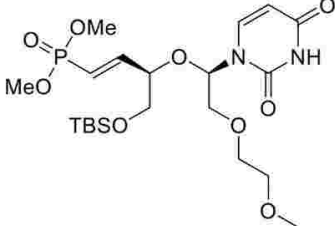
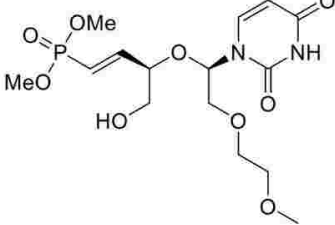
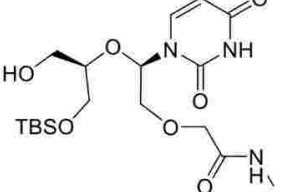
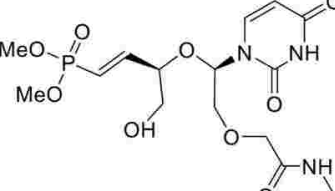
50

【表 1 - 4】

	³¹ P decoupled ¹ H NMR (400MHz, CD ₃ CN): δ 7.55-7.52(dd, J=8Hz, 1H), δ 6.58-6.52(dd, J=17.2 Hz, 1H), 6.08-5.94(m, 2H), 5.67-5.64(d, J=8Hz, 1H), 4.39-4.35(m, 1H), 3.95-3.79(br, 4 H), 3.75-3.58 (br, 12H), 3.57-3.49(br, 2H), 3.33(br, 3H), 2.68-2.65(t, 2H), 1.18-1.13(m, 12H) ³¹ P NMR (400 MHz, CD ₃ CN) δ149.05, 148.82, 19.41, 19.38 MS (ESI) calculated for C ₂₄ H ₄₂ N ₄ O ₁₀ P ₂ (M-H) ⁻ m/z = 607.2, found 607.2
	¹ H NMR (400MHz, CD ₃ CN): δ7.55 (d, J=8Hz, 1H), 6.83 (br, 1H) δ6.57 (ddd, J=5.2, 17.2, 39.2 Hz, 1H), 6.12-5.95 (m, 2H), 5.68(d, J=8Hz, 1H), 4.4 (br, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.88-3.52 (br, 14H), 2.35-2.68 (br, 5H), 1.20 (d, J=6.8Hz, 12H) ³¹ P NMR (400 MHz, CD ₃ CN) δ148.6, 148.4, 19.28 MS (ESI) calculated for chemical formula: C ₂₄ H ₄₁ N ₅ O ₁₀ P ₂ (M-H) ⁻ m/z = 620.2, found 620.2
	¹ H NMR (400MHz, CD ₃ CN): δ9.02, (br, 1H), δ7.51 (d, J=8Hz, 1H), 6.53 (br, 1H) δ6.06 (br, 2H), 5.68(d, J=8Hz, 1H), 4.37 (m, 1H), 3.87-3.7 (m, 4H), 3.69-3.63 (m, 10H), 3.35 (s, 3H), 2.70 (m, 2H), 1.22 (m, 12H) ³¹ P NMR (400 MHz, CD ₃ CN) δ148.7, 148.4, 19.19, 19.15 MS (ESI) calculated for chemical formula: C ₂₂ H ₃₈ N ₄ O ₉ P ₂ (M-H) ⁻ m/z = 563.2, found 563.2
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ δ ppm 11.35 (s, 1 H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.36-7.41 (m, 2H), 7.32 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.20-7.28 (m, 5H), 6.90 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 5.48 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.14 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 5.4 Hz, 2H), 3.92-3.99 (m, 1H), 3.70-3.78 (m, 6H), 3.18-3.30 (m, 2H).
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ δ ppm 11.35 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.28-7.33 (m, 4H), 7.17-7.21 (m, 5H), 6.86 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 5.83 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.13 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.75 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 3.76 (s, 6H), 3.68-3.73 (m, 1H), 3.60-3.64 (m, 2H), 3.42 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 2.96-3.02 (m, 2H)
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ δ ppm 11.35 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.24-7.33 (m, 4H), 7.14-7.22 (m, 5H), 6.82-6.88 (m, 4H), 5.83 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.47-5.57 (m, 1H), 5.11 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 3.72 (d, J = 0.8 Hz, 6H), 3.57-3.67 (m, 4H), 3.46-3.55 (m, 1H), 2.94-3.00 (m, 2H), 0.72-0.78 (m, 9H), -0.04 (d, J = 8.2 Hz, 5H)

【 0 5 7 6 】

【表 1 - 5】

	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ δ ppm 11.40 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 7.68 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.24-7.33 (m, 5H), 7.14-7.22 (m, 5H), 6.81-6.88 (m, 4H), 5.96-6.02 (m, 1H), 5.55 (dd, <i>J</i> = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 3.73 (d, <i>J</i> = 0.8 Hz, 6H), 3.70 (dd, <i>J</i> = 6.0, 2.2 Hz, 2H), 3.62-3.66 (m, 2H), 3.53-3.57 (m, 2H), 3.50-3.53 (m, 1H), 3.38-3.42 (m, 2H), 3.20-3.22 (m, 3H), 2.94-3.00 (m, 2H), 0.72-0.82 (m, 9H), -0.04 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 5H)
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ δ ppm 11.87 (s, 1H), 8.17 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.75-7.87 (m, 4H), 7.63-7.74 (m, 5H), 7.36 (dd, <i>J</i> = 9.0, 2.6 Hz, 4H), 6.34 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 6.05 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 5.62 (t, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 4.24 (s, 6H), 4.09-4.20 (m, 4H), 4.02 (d, <i>J</i> = 4.6 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 2.95-3.09 (m, 4H), 1.28 (s, 9H), 0.48 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 6H).
	¹ H NMR: 400 MHz, CDCl ₃ δ ppm 9.19 (s, 1H), 7.43 (d, <i>J</i> = 8.16 Hz, 1H), 6.51-6.67 (m, 1H), 6.13 (t, <i>J</i> = 4.78 Hz, 1H), 5.82-5.95 (m, 1H), 5.72 (dd, <i>J</i> = 8.04, 1.88 Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.63-3.78 (m, 12H), 3.45-3.54 (m, 2H), 3.31-3.37 (m, 3H), 0.82-0.94 (m, 9H), 0.00-0.10 (m, 6H).
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ δ ppm 11.29 (s, 1H) 7.74 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H) 6.42-6.62 (m, 1H) 5.90-5.98 (m, 2H) 5.62 (dd, <i>J</i> = 8.0, 1.2 Hz, 1H) 5.01 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H) 4.18 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H) 4.10 (q, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H) 3.70-3.76 (m, 2H) 3.50-3.58 (m, 8H) 3.43-3.49 (m, 1H) 3.36-3.41 (m, 2H) 3.21 (s, 3H) 3.17 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H) 1.91 (s, 1H)
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ δ 11.30 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 7.67 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.61 (br d, <i>J</i> = 4.3 Hz, 1H), 6.03 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H), 5.61 (dd, <i>J</i> = 2.0, 8.0 Hz, 1H), 4.66 (br s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.73-3.57 (m, 4H), 3.49-3.43 (m, 1H), 3.34-3.25 (m, 2H), 2.60 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.05 (s, 6H)
	¹ H NMR: 400 MHz CD ₃ CN δ 7.52 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 6.98 (br s, 1H), 6.61-6.47 (m, 1H), 6.06-5.86 (m, 2H), 5.65 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 4.28-4.20 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.80-3.51 (m, 10H), 2.73-2.67 (m, 4H) ³¹ P NMR: 162 MHz CD ₃ CN, δ 19.71 (s, 1P)

10

20

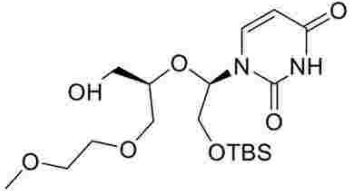
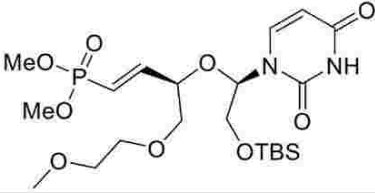
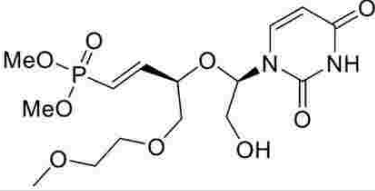
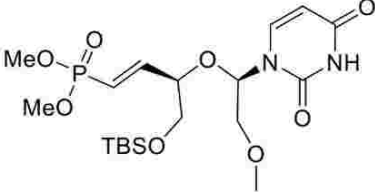
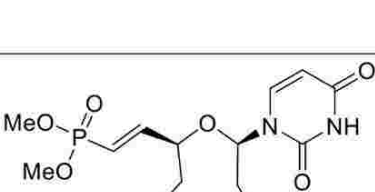
30

40

【 0 5 7 7 】

50

【表 1 - 6】

	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO d ₆ 11.23 (s, 1H), 7.63 (d, <i>J</i> = 8.02 Hz, 1H), 5.85 (dd, <i>J</i> = 6.56, 4.98 Hz, 1H), 5.60 (dd, <i>J</i> = 7.92, 1.66 Hz, 1H), 4.65 (t, <i>J</i> = 5.58 Hz, 1H), 3.63-3.84 (m, 2H), 3.40-3.60 (m, 7H), 3.26 (s, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.01 (d, <i>J</i> = 6.66 Hz, 5H).
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO d ₆ 7.72 (d, <i>J</i> = 8.22 Hz, 1H), 6.38-6.61 (m, 1H), 5.76-6.09 (m, 2H), 5.61 (dd, <i>J</i> = 8.02, 2.16 Hz, 1H), 4.29-4.43 (m, 1H), 3.66-3.92 (m, 2H), 3.41-3.63 (m, 12H), 3.17-3.26 (m, 3H), 0.73-0.87 (m, 10H), 0.01 (d, <i>J</i> = 7.04 Hz, 7H).
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO d ₆ 11.26 (d, <i>J</i> = 1.52 Hz, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 8.04 Hz, 1H), 6.43-6.58 (m, 1H), 5.88-6.06 (m, 1H), 5.75-5.85 (m, 1H), 5.61 (dd, <i>J</i> = 7.96, 2.08 Hz, 1H), 5.14 (t, <i>J</i> = 6.02 Hz, 1H), 4.34 (br d, <i>J</i> = 1.52 Hz, 1H), 3.42-3.70 (m, 14H), 3.26 (s, 3H)
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 11.31 (s, 1H), 7.72-7.77 (m, 1H), 6.45-6.56 (m, 1H), 5.91-6.03 (m, 2H), 5.62 (dd, <i>J</i> = 8.40, 2.40 Hz, 1 H), 4.24 (br s, 1H), 3.72-3.76 (m, 1 H), 3.61-3.69 (m, 3H), 3.52-3.59 (m, 6 H), 3.26 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.06 (d, <i>J</i> = 1.60 Hz, 6H). ³¹ P NMR: 162 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 19.93 (s, 1P)
	¹ H NMR: 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 11.31 (s, 1H), 7.74 (d, <i>J</i> = 8.00 Hz, 1H), 6.47-6.58 (m, 1H), 5.87-5.99 (m, 2H), 5.63 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.10-4.19 (m, 2H), 3.66 (d, <i>J</i> = 6.00 Hz, 2H), 3.56 (dd, <i>J</i> = 11.2, 4.40 Hz, 6H), 3.43-3.48 (m, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.17-3.18 (m, 2H). ³¹ P NMR: 162 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ 20.04 (s, 1P).

10

20

30

【0578】

分子生物学の実施例

実施例 1. 配列

表 1、3、5、6、および 7 は、本明細書に記載される標的配列を示す。表 2、4、8、および 9 は、本明細書に記載されるポリ核酸分子配列を示す。

【0579】

40

50

【表 2】

表 1. KRAS 標的配列

Id #	NM_033360.2 における配列位置	NM_033360.2 における標的部位	SEQ ID NO:
182	182-200	AAAUGACUGAAUAUAAACUUGUG	1
183	183-201	AAUGACUGAAUAUAAACUUGUGG	2
197	197-215	AACUUGUGGUAGUUGGAGCUGGU	3
224	224-242	UAGGCAAGAGUGCCUUGACGAUA	4
226	226-244	GGCAAGAGUGCCUUGACGAUACA	5
227	227-245	GCAAGAGUGCCUUGACGAUACAG	6
228	228-246	CAAGAGUGCCUUGACGAUACAGC	7
232	232-250	AGUGCCUUGACGAUACAGCUAAU	8
233	233-251	GUGCCUUGACGAUACAGCUAAUU	9
236	236-254	CCUUGACGAUACAGCUAAUUCAG	10
237	237-255	CUUGACGAUACAGCUAAUUCAGA	11
245	245-263	UACAGCUAAUUCAGAAUCAUUUU	12
266	266-284	UUGUGGACGAAUAUGAUCCAACA	13
269	269-287	UGGACGAAUAUGAUCCAACAAUA	14
270	270-288	GGACGAAUAUGAUCCAACAAUAG	15

【 0 5 8 0 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 2. KRAS siRNA 配列

Id #	NM_033360. 2 における 配列位置	センス鎖配列 (5'-3')	SEQ ID NO:	アンチセンス鎖配列 (5'-3')	SEQ ID NO:
182	182-200	AUGACUGAAUAUAAACU UGTT	16	CAAGUUUAUAUUCAG UCAUTT	17
183	183-201	UGACUGAAUAUAAACUU GUTT	18	ACAAGUUUAUAUUCA GUCATT	19
197	197-215	CUUGUGGUAGUUGGAGC UGTT	20	CAGCUCCAACUACCA CAAGTT	21
224	224-242	GGCAAGAGUGCCUUGAC GATT	22	UCGUCAAGGCACUCU UGCCTT	23
226	226-244	CAAGAGUGCCUUGACGA UATT	24	UAUCGUCAAGGCACU CUUGTT	25
227	227-245	AAGAGUGCCUUGACGAU ACTT	26	GUAUCGUCAAGGCAC UCUUTT	27
228	228-246	AGAGUGCCUUGACGAUA CATT	28	UGUAUCGUCAAGGCA CUCUTT	29
232	232-250	UGCCUUGACGAUACAGC UATT	30	UAGCUGUAUCGUCAA GGCATT	31
233	233-251	GCCUUGACGAUACAGCU AATT	32	UUAGCUGUAUCGUCA AGGCTT	33
236	236-254	UUGACGAUACAGCUAAU UCTT	34	GAAUUAGCUGUAUCG UCAATT	35
237	237-255	UGACGAUACAGCUAAUU CATT	36	UGAAUUAGCUGUAUC GUCATT	37
245	245-263	CAGCUAAUUCAGAAUCA UUTT	38	AAUGAUUCUGAAUUA GCUGTT	39
266	266-284	GUGGACGAAUAUGAUCC AATT	40	UUGGAUCAUAUUCGU CCACTT	41
269	269-287	GACGAAUAUGAUCCAAC AATT	42	UUGUUGGAUCAUAU CGUCTT	43
270	270-288	ACGAAUAUGAUCCAACA AUTT	44	AUUGUUGGAUCAUAU UCGUTT	45

【 0 5 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 3. EGFR 標的配列

hs Id #	NM_005228.3 における 19量体の位置	NM_005228.3 における総 23量体の標的 部位の配列	SEQ ID NO:
68	68-86	GGCGGCCGGAGUCCCCGAGCUAGC	46
71	71-89	GGCCGGAGUCCCCGAGCUAGCCCC	47
72	72-90	GCCGGAGUCCCCGAGCUAGCCCCG	48
73	73-91	CCGGAGUCCCCGAGCUAGCCCCGG	49
74	74-92	CGGAGUCCCCGAGCUAGCCCCGGC	50
75	75-93	GGAGUCCCCGAGCUAGCCCCGGCG	51
76	76-94	GAGUCCCCGAGCUAGCCCCGGCGG	52
78	78-96	GUCCCGAGCUAGCCCCGGCGGCC	53
114	114-132	CCGGACGACAGGCCACCUCGUCG	54
115	115-133	CGGACGACAGGCCACCUCGUCGG	55
116	116-134	GGACGACAGGCCACCUCGUCGGC	56
117	117-135	GACGACAGGCCACCUCGUCGGCG	57
118	118-136	ACGACAGGCCACCUCGUCGGCGU	58
120	120-138	GACAGGCCACCUCGUCGGCGUCC	59
121	121-139	ACAGGCCACCUCGUCGGCGUCCG	60
122	122-140	CAGGCCACCUCGUCGGCGUCCGC	61
123	123-141	AGGCCACCUCGUCGGCGUCCGCC	62
124	124-142	GGCCACCUCGUCGGCGUCCGCC	63
125	125-143	GCCACCUCGUCGGCGUCCGCCCG	64
126	126-144	CCACCUCGUCGGCGUCCGCCCGA	65
127	127-145	CACCUCGUCGGCGUCCGCCCGAG	66
128	128-146	ACCUCGUCGGCGUCCGCCCGAGU	67
129	129-147	CCUCGUCGGCGUCCGCCCGAGUC	68
130	130-148	CUCGUCGGCGUCCGCCCGAGUCC	69
131	131-149	UCGUCGGCGUCCGCCCGAGUCCC	70
132	132-150	CGUCGGCGUCCGCCCGAGUCCCC	71
135	135-153	CGGCGUCCGCCCGAGUCCCCGCC	72
136	136-154	GGCGUCCGCCCGAGUCCCCGCCU	73
141	141-159	CCGCCCGAGUCCCCGCCUCGCCG	74
164	164-182	CCAACGCCACAACCACCGCGCAC	75
165	165-183	CAACGCCACAACCACCGCGCACG	76
166	166-184	AACGCCACAACCACCGCGCACGG	77
168	168-186	CGCCACAACCACCGCGCACGGCC	78
169	169-187	GCCACAACCACCGCGCACGGCCC	79
170	170-188	CCACAACCACCGCGCACGGCCCC	80
247	247-265	CGAUGCGACCCUCCGGGACGGCC	81
248	248-266	GAUGCGACCCUCCGGGACGGCCG	82
249	249-267	AUGCGACCCUCCGGGACGGCCGG	83
251	251-269	GCGACCCUCCGGGACGGCCGGGG	84
252	252-270	CGACCCUCCGGGACGGCCGGGGC	85
254	254-272	ACCCUCCGGGACGGCCGGGGCAG	86
329	329-347	AAAGAAAGUUUGCCAAGGCACGA	87
330	330-348	AAGAAAGUUUGCCAAGGCACGAG	88
332	332-350	GAAAGUUUGCCAAGGCACGAGUA	89
333	333-351	AAAGUUUGCCAAGGCACGAGUAA	90
334	334-352	AAGUUUGCCAAGGCACGAGUAAC	91
335	335-353	AGUUUGCCAAGGCACGAGUAACA	92

【 0 5 8 2】

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

336	336-354	GUUUGCCAAGGCACGAGUAACAA	93
337	337-355	UUUGCCAAGGCACGAGUAACAAG	94
338	338-356	UUGCCAAGGCACGAGUAACAAGC	95
361	361-379	UCACGCAGUUGGGCACUUUUGAA	96
362	362-380	CACGCAGUUGGGCACUUUUGAAG	97
363	363-381	ACGCAGUUGGGCACUUUUGAAGA	98
364	364-382	CGCAGUUGGGCACUUUUGAAGAU	99
365	365-383	GCAGUUGGGCACUUUUGAAGAUC	100
366	366-384	CAGUUGGGCACUUUUGAAGAUCA	101
367	367-385	AGUUGGGCACUUUUGAAGAUCAU	102
368	368-386	GUUGGGCACUUUUGAAGAUCAUU	103
369	369-387	UUGGGCACUUUUGAAGAUCAUUU	104
377	377-395	UUUUGAAGAUCAUUUUCUCAGCC	105
379	379-397	UUGAAGAUCAUUUUCUCAGCCUC	106
380	380-398	UGAAGAUCAUUUUCUCAGCCUCC	107
385	385-403	AUCAUUUUCUCAGCCUCCAGAGG	108
394	394-412	UCAGCCUCCAGAGGAUGUCAAU	109
396	396-414	AGCCUCCAGAGGAUGUCAAUAA	110
397	397-415	GCCUCCAGAGGAUGUCAAUAAC	111
401	401-419	CCAGAGGAUGUCAAUAACUGUG	112
403	403-421	AGAGGAUGUCAAUAACUGUGAG	113
407	407-425	GAUGUCAAUAACUGUGAGGUGG	114
409	409-427	UGUCAAUAACUGUGAGGUGGUC	115
410	410-428	GUUCAAUAACUGUGAGGUGGUCC	116
411	411-429	UUCAAUAACUGUGAGGUGGUCCU	117
412	412-430	UCAAUAACUGUGAGGUGGUCCUU	118
413	413-431	CAUAUAACUGUGAGGUGGUCCUUG	119
414	414-432	AAUAACUGUGAGGUGGUCCUUGG	120
416	416-434	UAACUGUGAGGUGGUCCUUGGGA	121
418	418-436	ACUGUGAGGUGGUCCUUGGGAAU	122
419	419-437	CUGUGAGGUGGUCCUUGGGAAUU	123
425	425-443	GGUGGUCCUUGGGAAUUUGGAAA	124
431	431-449	CCUUGGGAAUUUGGAAAUUACCU	125
432	432-450	CUUGGGAAUUUGGAAAUUACCUA	126
433	433-451	UUGGGAAUUUGGAAAUUACCUAU	127
434	434-452	UGGGAAUUUGGAAAUUACCUAUG	128
458	458-476	GCAGAGGAAUUAUGAUCUUUCCU	129
459	459-477	CAGAGGAAUUAUGAUCUUUCCUU	130
463	463-481	GGAAUUAUGAUCUUUCCUUCUUA	131
464	464-482	GAAUUAUGAUCUUUCCUUCUUA	132
466	466-484	AUUAUGAUCUUUCCUUCUUAAG	133
468	468-486	UAUGAUCUUUCCUUCUUAAGAC	134
471	471-489	GAUCUUUCCUUCUUAAGACCAU	135
476	476-494	UUCUUCUUAAGACCAUCCAGG	136
477	477-495	UCCUUCUUAAGACCAUCCAGGA	137
479	479-497	CUUCUUAAGACCAUCCAGGAGG	138
481	481-499	UCUUAAGACCAUCCAGGAGGUG	139
482	482-500	CUUAAGACCAUCCAGGAGGUGG	140
492	492-510	AUCCAGGAGGUGGCUGGUUAUGU	141
493	493-511	UCCAGGAGGUGGCUGGUUAUGUC	142
494	494-512	CCAGGAGGUGGCUGGUUAUGUCC	143
495	495-513	CAGGAGGUGGCUGGUUAUGUCCU	144
496	496-514	AGGAGGUGGCUGGUUAUGUCCUC	145

【 0 5 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

497	497-515	GGAGGUGGCUGGUUAUGUCCUCA	146
499	499-517	AGGUGGCUGGUUAUGUCCUCAUU	147
520	520-538	UUGCCCUC AACACAGUGGAGCGA	148
542	542-560	AAUUCUUUGGAAAACUGCAGA	149
543	543-561	AUUCUUUGGAAAACUGCAGAU	150
550	550-568	UGGAAAACUGCAGAUCAUCAGA	151
551	551-569	GGAAAACUGCAGAUCAUCAGAG	152
553	553-571	AAAACUGCAGAUCAUCAGAGGA	153
556	556-574	ACCUGCAGAUCAUCAGAGGAAAU	154
586	586-604	ACGAAAAUCCUAUGCCUUAGCA	155
587	587-605	CGAAAAUCCUAUGCCUUAGCAG	156
589	589-607	AAAAUCCUAUGCCUUAGCAGUC	157
592	592-610	AUUCUAUGCCUUAGCAGUCUUA	158
593	593-611	UUCUAUGCCUUAGCAGUCUUAU	159
594	594-612	UCCUAUGCCUUAGCAGUCUUAUC	160
596	596-614	CUAUGCCUUAGCAGUCUUAUCUA	161
597	597-615	UAUGCCUUAGCAGUCUUAUCUAA	162
598	598-616	AUGCCUUAGCAGUCUUAUCUAAAC	163
599	599-617	UGCCUUAGCAGUCUUAUCUAAACU	164
600	600-618	GCCUUAGCAGUCUUAUCUAAACUA	165
601	601-619	CCUUAGCAGUCUUAUCUAAACUUAU	166
602	602-620	CUUAGCAGUCUUAUCUAAACUAUG	167
603	603-621	UUAGCAGUCUUAUCUAAACUAUGA	168
604	604-622	UAGCAGUCUUAUCUAAACUAUGAU	169
605	605-623	AGCAGUCUUAUCUAAACUAUGAUG	170
608	608-626	AGUCUUAUCUAAACUAUGAUGCAA	171
609	609-627	GUCUUAUCUAAACUAUGAUGCAAA	172
610	610-628	UCUUAUCUAAACUAUGAUGCAAAU	173
611	611-629	CUUAUCUAAACUAUGAUGCAAAUA	174
612	612-630	UUAUCUAAACUAUGAUGCAAAUAA	175
613	613-631	UAUCUAAACUAUGAUGCAAAUAAA	176
614	614-632	AUCUAAACUAUGAUGCAAAUAAAA	177
616	616-634	CUAAACUAUGAUGCAAAUAAAAACC	178
622	622-640	AUGAUGCAAAUAAAAACCGGACUG	179
623	623-641	UGAUGCAAAUAAAAACCGGACUGA	180
624	624-642	GAUGCAAAUAAAAACCGGACUGAA	181
626	626-644	UGCAAAUAAAAACCGGACUGAAGG	182
627	627-645	GCAAAUAAAAACCGGACUGAAGGA	183
628	628-646	CAAAUAAAAACCGGACUGAAGGAG	184
630	630-648	AAUAAAAACCGGACUGAAGGAGCU	185
631	631-649	AUAAAAACCGGACUGAAGGAGCUG	186
632	632-650	UAAAAACCGGACUGAAGGAGCUGC	187
633	633-651	AAAAACCGGACUGAAGGAGCUGCC	188
644	644-662	GAAGGAGCUGCCCAUGAGAAAUU	189
665	665-683	UUUACAGGAAAUCCUGCAUGGCG	190
668	668-686	ACAGGAAAUCCUGCAUGGCGCCG	191
669	669-687	CAGGAAAUCCUGCAUGGCGCCGCU	192
670	670-688	AGGAAAUCCUGCAUGGCGCCGUG	193
671	671-689	GGAAAUCCUGCAUGGCGCCGUGC	194
672	672-690	GAAAUCCUGCAUGGCGCCGUGCG	195
674	674-692	AAUCCUGCAUGGCGCCGUGCGGU	196
676	676-694	UCCUGCAUGGCGCCGUGCGGUUC	197
677	677-695	CCUGCAUGGCGCCGUGCGGUUCA	198

【 0 5 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

678	678-696	CUGCAUGGCGCCGUGCGGUUCAG	199
680	680-698	GCAUGGCGCCGUGCGGUUCAGCA	200
681	681-699	CAUGGCGCCGUGCGGUUCAGCAA	201
682	682-700	AUGGCGCCGUGCGGUUCAGCAAC	202
683	683-701	UGGCGCCGUGCGGUUCAGCAACA	203
684	684-702	GGCGCCGUGCGGUUCAGCAACAA	204
685	685-703	GCGCCGUGCGGUUCAGCAACAAC	205
686	686-704	CGCCGUGCGGUUCAGCAACAACC	206
688	688-706	CCGUGCGGUUCAGCAACAACCCU	207
690	690-708	GUGCGGUUCAGCAACAACCCUGC	208
692	692-710	GCGGUUCAGCAACAACCCUGCCC	209
698	698-716	CAGCAACAACCCUGCCCUGUGCA	210
700	700-718	GCAACAACCCUGCCCUGUGCAAC	211
719	719-737	CAACGUGGAGAGCAUCCAGUGGC	212
720	720-738	AACGUGGAGAGCAUCCAGUGGCG	213
721	721-739	ACGUGGAGAGCAUCCAGUGGCGG	214
724	724-742	UGGAGAGCAUCCAGUGGCGGGAC	215
725	725-743	GGAGAGCAUCCAGUGGCGGGACA	216
726	726-744	GAGAGCAUCCAGUGGCGGGACAU	217
733	733-751	UCCAGUGGCGGGACAUAGUCAGC	218
734	734-752	CCAGUGGCGGGACAUAGUCAGCA	219
736	736-754	AGUGGCGGGACAUAGUCAGCAGU	220
737	737-755	GUGGCGGGACAUAGUCAGCAGUG	221
763	763-781	UUCUCAGCAACAUGUCGAUGGAC	222
765	765-783	CUCAGCAACAUGUCGAUGGACUU	223
766	766-784	UCAGCAACAUGUCGAUGGACUUC	224
767	767-785	CAGCAACAUGUCGAUGGACUUC	225
769	769-787	GCAACAUGUCGAUGGACUUCCAG	226
770	770-788	CAACAUGUCGAUGGACUUCCAGA	227
771	771-789	AACAUGUCGAUGGACUUCCAGAA	228
772	772-790	ACAUGUCGAUGGACUUCCAGAAC	229
775	775-793	UGUCGAUGGACUUCCAGAACCCAC	230
789	789-807	CAGAACCAACUGGGCAGCUGCCA	231
798	798-816	CUGGGCAGCUGCCAAAAGUGUGA	232
800	800-818	GGGCAGCUGCCAAAAGUGUGAUC	233
805	805-823	GCUGCCAAAAGUGUGAUCCAAGC	234
806	806-824	CUGCCAAAAGUGUGAUCCAAGCU	235
807	807-825	UGCCAAAAGUGUGAUCCAAGCUG	236
810	810-828	CAAAAAGUGUGAUCCAAGCUGUCC	237
814	814-832	AGUGUGAUCCAAGCUGUCCCAAU	238
815	815-833	GUGUGAUCCAAGCUGUCCCAAUG	239
817	817-835	GUGAUCCAAGCUGUCCCAAUGGG	240
818	818-836	UGAUCCAAGCUGUCCCAAUGGGA	241
819	819-837	GAUCCAAGCUGUCCCAAUGGGAG	242
820	820-838	AUCCAAGCUGUCCCAAUGGGAGC	243
821	821-839	UCCAAGCUGUCCCAAUGGGAGCU	244
823	823-841	CAAGCUGUCCCAAUGGGAGCUGC	245
826	826-844	GCUGUCCCAAUGGGAGCUGCUGG	246
847	847-865	GGGGUGCAGGAGAGGAGAACUGC	247
871	871-889	AGAAACUGACCAAAAUCAUCUGU	248
872	872-890	GAAACUGACCAAAAUCAUCUGUG	249
873	873-891	AAACUGACCAAAAUCAUCUGUGC	250
877	877-895	UGACCAAAAUCAUCUGUGCCCAG	251

【 0 5 8 5 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

878	878-896	GACCAAAUCAUCUGUGCCCAGC	252
881	881-899	CAAAAUCAUCUGUGCCCAGCAGU	253
890	890-908	CUGUGCCCAGCAGUGCUCCGGGC	254
892	892-910	GUGCCCAGCAGUGCUCCGGGCGC	255
929	929-947	CCCCAGUGACUGCUGCCACAACC	256
930	930-948	CCCAGUGACUGCUGCCACAACCA	257
979	979-997	GGGAGAGCGACUGCCUGGUCUGC	258
980	980-998	GGAGAGCGACUGCCUGGUCUGCC	259
981	981-999	GAGAGCGACUGCCUGGUCUGCCG	260
982	982-1000	AGAGCGACUGCCUGGUCUGCCGC	261
983	983-1001	GAGCGACUGCCUGGUCUGCCGCA	262
984	984-1002	ACGACUGCCUGGUCUGCCGCAA	263
989	989-1007	CUGCCUGGUCUGCCGCAAAUUCC	264
990	990-1008	UGCCUGGUCUGCCGCAAAUUCCG	265
991	991-1009	GCCUGGUCUGCCGCAAAUUCCGA	266
992	992-1010	CCUGGUCUGCCGCAAAUUCCGAG	267
994	994-1012	UGGUCUGCCGCAAAUUCCGAGAC	268
995	995-1013	GGUCUGCCGCAAAUUCCGAGACG	269
996	996-1014	GUCUGCCGCAAAUUCCGAGACGA	270
997	997-1015	UCUGCCGCAAAUUCCGAGACGAA	271
999	999-1017	UGCCGCAAAUUCCGAGACGAAGC	272
1004	1004-1022	CAAAUUCCGAGACGAAGCCACGU	273
1005	1005-1023	AAAUUCCGAGACGAAGCCACGUG	274
1006	1006-1024	AAUUCCGAGACGAAGCCACGUGC	275
1007	1007-1025	AUUCCGAGACGAAGCCACGUGCA	276
1008	1008-1026	UUCGAGACGAAGCCACGUGCAA	277
1010	1010-1028	CCGAGACGAAGCCACGUGCAAGG	278
1013	1013-1031	AGACGAAGCCACGUGCAAGGACA	279
1014	1014-1032	GACGAAGCCACGUGCAAGGACAC	280
1015	1015-1033	ACGAAGCCACGUGCAAGGACACC	281
1016	1016-1034	CGAAGCCACGUGCAAGGACACCU	282
1040	1040-1058	CCCCCACUCAUGCUCUACAACC	283
1042	1042-1060	CCCCACUCAUGCUCUACAACCCC	284
1044	1044-1062	CCACUCAUGCUCUACAACCCAC	285
1047	1047-1065	CUCAUGCUCUACAACCCACCAC	286
1071	1071-1089	UACCAGAUUGGAUGUGAACCCCGA	287
1073	1073-1091	CCAGAUUGGAUGUGAACCCCGAGG	288
1074	1074-1092	CAGAUUGGAUGUGAACCCCGAGGG	289
1075	1075-1093	AGAUGGAUGUGAACCCCGAGGGC	290
1077	1077-1095	AUGGAUGUGAACCCCGAGGGCAA	291
1078	1078-1096	UGGAUGUGAACCCCGAGGGCAAA	292
1080	1080-1098	GAUGUGAACCCCGAGGGCAAAUA	293
1084	1084-1102	UGAACCCCGAGGGCAAAUACAGC	294
1085	1085-1103	GAACCCCGAGGGCAAAUACAGCU	295
1087	1087-1105	ACCCCGAGGGCAAAUACAGCUUU	296
1088	1088-1106	CCCGAGGGCAAAUACAGCUUUG	297
1089	1089-1107	CCCGAGGGCAAAUACAGCUUUGG	298
1096	1096-1114	GCAAAUACAGCUUUGGUGCCACC	299
1097	1097-1115	CAAAUACAGCUUUGGUGCCACCU	300
1098	1098-1116	AAAUACAGCUUUGGUGCCACCUG	301
1104	1104-1122	AGCUUUGGUGCCACCUGCGUGAA	302
1106	1106-1124	CUUUGGUGCCACCUGCGUGAAGA	303
1112	1112-1130	UGCCACCUGCGUGAAGAAGUGUC	304

【 0 5 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

1116	1116-1134	ACCU GCGUGAAGAAGUGUCCCCG	305
1117	1117-1135	CCUGCGUGAAGAAGUGUCCCCGU	306
1118	1118-1136	CUGCGUGAAGAAGUGUCCCCGUA	307
1119	1119-1137	UGCGUGAAGAAGUGUCCCCGUAA	308
1120	1120-1138	GCGUGAAGAAGUGUCCCCGUAAU	309
1121	1121-1139	CGUGAAGAAGUGUCCCCGUAAUU	310
1122	1122-1140	GUGAAGAAGUGUCCCCGUAAUUA	311
1123	1123-1141	UGAAGAAGUGUCCCCGUAAUUUAU	312
1124	1124-1142	GAAGAAGUGUCCCCGUAAUUUAUG	313
1125	1125-1143	AAGAAGUGUCCCCGUAAUUUAUGU	314
1126	1126-1144	AGAAGUGUCCCCGUAAUUUAUGUG	315
1127	1127-1145	AAGUGUCCCCGUAAUUUAUGUGG	316
1128	1128-1146	AAGUGUCCCCGUAAUUUAUGUGGU	317
1129	1129-1147	AGUGUCCCCGUAAUUUAUGUGGUG	318
1130	1130-1148	GUGUCCCCGUAAUUUAUGUGGUGA	319
1132	1132-1150	GUCCCCGUAAUUUAUGUGGUGACA	320
1134	1134-1152	CCCCGUAAUUUAUGUGGUGACAGA	321
1136	1136-1154	CCGUAAUUUAUGUGGUGACAGAU	322
1137	1137-1155	CGUAAUUUAUGUGGUGACAGAUCA	323
1138	1138-1156	GUAAUUUAUGUGGUGACAGAUAC	324
1139	1139-1157	UAAUUUAUGUGGUGACAGAUACG	325
1140	1140-1158	AAUUUAUGUGGUGACAGAUACGG	326
1142	1142-1160	UUAUGUGGUGACAGAUACGGCU	327
1145	1145-1163	UGUGGUGACAGAUACGGCUCGU	328
1147	1147-1165	UGGUGACAGAUACGGCUCGUGC	329
1148	1148-1166	GGUGACAGAUACGGCUCGUGCG	330
1149	1149-1167	GUGACAGAUACGGCUCGUGCGU	331
1150	1150-1168	UGACAGAUACGGCUCGUGCGUC	332
1151	1151-1169	GACAGAUACGGCUCGUGCGUCC	333
1152	1152-1170	ACAGAUACGGCUCGUGCGUCCG	334
1153	1153-1171	CAGAUACGGCUCGUGCGUCCGA	335
1154	1154-1172	AGAUACGGCUCGUGCGUCCGAG	336
1155	1155-1173	GAUACGGCUCGUGCGUCCGAGC	337
1156	1156-1174	AUACGGCUCGUGCGUCCGAGCC	338
1157	1157-1175	UCACGGCUCGUGCGUCCGAGCCU	339
1160	1160-1178	CGGCUCGUGCGUCCGAGCCUGUG	340
1200	1200-1218	AUGGAGGAAGACGGCGUCCGCAA	341
1201	1201-1219	UGGAGGAAGACGGCGUCCGCAAG	342
1203	1203-1221	GAGGAAGACGGCGUCCGCAAGUG	343
1204	1204-1222	AGGAAGACGGCGUCCGCAAGUGU	344
1205	1205-1223	GGAAGACGGCGUCCGCAAGUGUA	345
1207	1207-1225	AAGACGGCGUCCGCAAGUGUAAG	346
1208	1208-1226	AGACGGCGUCCGCAAGUGUAAGA	347
1211	1211-1229	CGGCGUCCGCAAGUGUAAGAAGU	348
1212	1212-1230	GGCGUCCGCAAGUGUAAGAAGUG	349
1213	1213-1231	GCGUCCGCAAGUGUAAGAAGUGC	350
1214	1214-1232	CGUCCGCAAGUGUAAGAAGUGCG	351
1215	1215-1233	GUCCGCAAGUGUAAGAAGUGCGA	352
1216	1216-1234	UCCGCAAGUGUAAGAAGUGCGAA	353
1217	1217-1235	CCGCAAGUGUAAGAAGUGCGAAG	354
1219	1219-1237	GCAAGUGUAAGAAGUGCGAAGGG	355
1220	1220-1238	CAAGUGUAAGAAGUGCGAAGGGC	356
1221	1221-1239	AAGUGUAAGAAGUGCGAAGGGCC	357

10

20

30

40

【 0 5 8 7 】

50

【表 4 - 7】

1222	1222-1240	AGUGUAAGAAGUGCGAAGGGCCU	358
1223	1223-1241	GUGUAAGAAGUGCGAAGGGCCUU	359
1224	1224-1242	UGUAAGAAGUGCGAAGGGCCUUG	360
1225	1225-1243	GUAAGAAGUGCGAAGGGCCUUGC	361
1226	1226-1244	UAAGAAGUGCGAAGGGCCUUGCC	362
1229	1229-1247	GAAGUGCGAAGGGCCUUGCCGCA	363
1230	1230-1248	AAGUGCGAAGGGCCUUGCCGCAA	364
1231	1231-1249	AGUGCGAAGGGCCUUGCCGCAA	365
1232	1232-1250	GUGCGAAGGGCCUUGCCGCAAAG	366
1233	1233-1251	UGCGAAGGGCCUUGCCGCAAAGU	367
1235	1235-1253	CGAAGGGCCUUGCCGCAAAGUGU	368
1236	1236-1254	GAAGGGCCUUGCCGCAAAGUGUG	369
1237	1237-1255	AAGGGCCUUGCCGCAAAGUGUGU	370
1238	1238-1256	AGGGCCUUGCCGCAAAGUGUGUA	371
1239	1239-1257	GGGCCUUGCCGCAAAGUGUGUAA	372
1241	1241-1259	GCCUUGCCGCAAAGUGUGUAAACG	373
1261	1261-1279	ACGGAAUAGGUAUUGGUGAAUUU	374
1262	1262-1280	CGGAAUAGGUAUUGGUGAAUUUA	375
1263	1263-1281	GGAAUAGGUAUUGGUGAAUUUAA	376
1264	1264-1282	GAAUAGGUAUUGGUGAAUUUAAA	377
1266	1266-1284	AUAGGUAUUGGUGAAUUUAAAAGA	378
1267	1267-1285	UAGGUAUUGGUGAAUUUAAAAGAC	379
1289	1289-1307	CUCACUCUCCAUAUUAUGCUACGA	380
1313	1313-1331	UAUUAAAACACUUCAAAAACUGCA	381
1320	1320-1338	CACUUCAAAAACUGCACCUCUCAU	382
1321	1321-1339	ACUUCAAAAACUGCACCUCUCAUC	383
1322	1322-1340	CUUCAAAAACUGCACCUCUCAUCA	384
1323	1323-1341	UUCAAAAACUGCACCUCUCAUCAG	385
1324	1324-1342	UCAAAAAACUGCACCUCUCAUCAGU	386
1328	1328-1346	AAACUGCACCUCUCAUCAGUGGCG	387
1332	1332-1350	UGCACCUCUCAUCAGUGGCGAUCU	388
1333	1333-1351	GCACCUCUCAUCAGUGGCGAUCUC	389
1335	1335-1353	ACCUCUCAUCAGUGGCGAUCUCCA	390
1338	1338-1356	UCCAUCAUCAGUGGCGAUCUCCACAU	391
1344	1344-1362	AGUGGCGAUCUCCACAUCUCCUGCC	392
1345	1345-1363	GUGGCGAUCUCCACAUCUCCUGCCG	393
1346	1346-1364	UGGCGAUCUCCACAUCUCCUGCCGG	394
1347	1347-1365	GGCGAUCUCCACAUCUCCUGCCGGU	395
1348	1348-1366	GCGAUCUCCACAUCUCCUGCCGGUG	396
1353	1353-1371	CUCCACAUCUCCUGCCGGUGGCAUU	397
1354	1354-1372	UCCACAUCUCCUGCCGGUGGCAUUU	398
1355	1355-1373	CCACAUCUCCUGCCGGUGGCAUUUA	399
1357	1357-1375	ACAUCUCCUGCCGGUGGCAUUUAGG	400
1360	1360-1378	UCCUGCCGGUGGCAUUUAGGGGU	401
1361	1361-1379	CCUGCCGGUGGCAUUUAGGGGUG	402
1362	1362-1380	CUGCCGGUGGCAUUUAGGGGUGA	403
1363	1363-1381	UGCCGGUGGCAUUUAGGGGUGAC	404
1366	1366-1384	CGGUGGCAUUUAGGGGUGACUCC	405
1369	1369-1387	UGGCAUUUAGGGGUGACUCCUUC	406
1370	1370-1388	GGCAUUUAGGGGUGACUCCUUCAC	407
1371	1371-1389	GCAUUUAGGGGUGACUCCUUCAC	408
1372	1372-1390	CAUUUAGGGGUGACUCCUUCACA	409
1373	1373-1391	AUUUAGGGGUGACUCCUUCACAC	410

【 0 5 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

1374	1374-1392	UUUAGGGGUGACUCCUUCACACA	411
1404	1404-1422	CCUCUGGAUCCACAGGAACUGGA	412
1408	1408-1426	UGGAUCCACAGGAACUGGAUUAU	413
1409	1409-1427	GGAUCCACAGGAACUGGAUUAUUC	414
1411	1411-1429	AUCCACAGGAACUGGAUUAUUCUG	415
1412	1412-1430	UCCACAGGAACUGGAUUAUUCUGA	416
1419	1419-1437	GAACUGGAUUAUUCUGAAAACCGU	417
1426	1426-1444	AUAUUCUGAAAACCGUAAAGGAA	418
1427	1427-1445	UAUUCUGAAAACCGUAAAGGAAA	419
1430	1430-1448	UCUGAAAACCGUAAAGGAAAUCA	420
1431	1431-1449	CUGAAAACCGUAAAGGAAAUAC	421

【 0 5 8 9】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 4. EGFR siRNA 配列

hs Id #	NM_00522 8.3 における配列位置	センス鎖配列 (5'-3')	SE Q ID NO :	アンチセンス鎖配列 (5'-3')	SE Q ID NO :
68	68-86	CGGCCGAGUCCCGAGCU ATT	422	UAGCUCGGGACUCCGGCC GTT	423
71	71-89	CCGGAGUCCCGAGCUAGC CTT	424	GGCUAGCUCGGGACUCCG GTT	425
72	72-90	CGGAGUCCCGAGCUAGCC CTT	426	GGGCUAGCUCGGGACUCC GTT	427
73	73-91	GGAGUCCCGAGCUAGCCC CTT	428	GGGGCUAGCUCGGGACUC CTT	429
74	74-92	GAGUCCCGAGCUAGCCCC GTT	430	CGGGGCUAGCUCGGGACU CTT	431
75	75-93	AGUCCCGAGCUAGCCCCG GTT	432	CCGGGGCUAGCUCGGGAC UTT	433
76	76-94	GUCCCGAGCUAGCCCCGG CTT	434	GCCGGGGCUAGCUCGGGA CTT	435
78	78-96	CCCGAGCUAGCCCCGGCG GTT	436	CCGCCGGGGCUAGCUCGG GTT	437
114	114-132	GGACGACAGGCCACCUCG UTT	438	ACGAGGUGGCCUGUCGUC CTT	439
115	115-133	GACGACAGGCCACCUCGU CTT	440	GACGAGGUGGCCUGUCGU CTT	441
116	116-134	ACGACAGGCCACCUCGUC GTT	442	CGACGAGGUGGCCUGUCG UTT	443
117	117-135	CGACAGGCCACCUCGUCG GTT	444	CCGACGAGGUGGCCUGUC GTT	445
118	118-136	GACAGGCCACCUCGUCGG CTT	446	GCCGACGAGGUGGCCUGU CTT	447
120	120-138	CAGGCCACCUCGUCGGCG UTT	448	ACGCCGACGAGGUGGCCU GTT	449
121	121-139	AGGCCACCUCGUCGGCGU CTT	450	GACGCCGACGAGGUGGCC UTT	451
122	122-140	GGCCACCUCGUCGGCGUC CTT	452	GGACGCCGACGAGGUGGC CTT	453
123	123-141	GCCACCUCGUCGGCGUCC GTT	454	CGGACGCCGACGAGGUGG CTT	455
124	124-142	CCACCUCGUCGGCGUCCG CTT	456	GCGGACGCCGACGAGGUG GTT	457
125	125-143	CACCUCGUCGGCGUCCGC CTT	458	GGCGGACGCCGACGAGGU GTT	459
126	126-144	ACCUCGUCGGCGUCCGCC CTT	460	GGGCGGACGCCGACGAGG UTT	461
127	127-145	CCUCGUCGGCGUCCGCC GTT	462	CGGGCGGACGCCGACGAG GTT	463
128	128-146	CUCGUCGGCGUCCGCCCG ATT	464	UCGGGCGGACGCCGACGA GTT	465
129	129-147	UCGUCGGCGUCCGCCCGA GTT	466	CUCGGGCGGACGCCGACG ATT	467
130	130-148	CGUCGGCGUCCGCCCGAG UTT	468	ACUCGGGCGGACGCCGAC GTT	469

【 0 5 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

131	131-149	GUCGGCGUCCGCCCGAGU CTT	470	GACUCGGGCGGACGCCGA CTT	471
132	132-150	UCGGCGUCCGCCCGAGUC CTT	472	GGACUCGGGCGGACGCCG ATT	473
135	135-153	GCGUCCGCCCGAGUCCCC GTT	474	CGGGGACUCGGGCGGACG CTT	475
136	136-154	CGUCCGCCCGAGUCCCCG CTT	476	GCGGGGACUCGGGCGGAC GTT	477
141	141-159	GCCCGAGUCCCCGCCUCG CTT	478	GCGAGGCGGGGACUCGGG CTT	479
164	164-182	AACGCCACAACCACCGCG CTT	480	GCGCGGUGGUUGUGGCGU UTT	481
165	165-183	ACGCCACAACCACCGCGC ATT	482	UGCGCGGUGGUUGUGGCG UTT	483
166	166-184	CGCCACAACCACCGCGCA CTT	484	GUGCGCGGUGGUUGUGGC GTT	485
168	168-186	CCACAACCACCGCGCACG GTT	486	CCGUGCGCGGUGGUUGUG GTT	487
169	169-187	CACAACCACCGCGCACGG CTT	488	GCCGUGCGCGGUGGUUGU GTT	489
170	170-188	ACAACCACCGCGCACGGC CTT	490	GGCCGUGCGCGGUGGUUG UTT	491
247	247-265	AUGCGACCCUCCGGGACG GTT	492	CCGUCCCGGAGGGUCGCA UTT	493
248	248-266	UGCGACCCUCCGGGACGG CTT	494	GCCGUCCCGGAGGGUCGC ATT	495
249	249-267	GCGACCCUCCGGGACGGC CTT	496	GGCCGUCCCGGAGGGUCG CTT	497
251	251-269	GACCCUCCGGGACGGCCG GTT	498	CCGGCCGUCCCGGAGGGU CTT	499
252	252-270	ACCCUCCGGGACGGCCGG GTT	500	CCCGGCCGUCCCGGAGGG UTT	501
254	254-272	CCUCCGGGACGGCCGGGG CTT	502	GCCCCGGCCGUCCCGGAG GTT	503
329	329-347	AGAAAGUUUGCCAAGGCA CTT	504	GUGCCUUGGCAAACUUUC UTT	505
330	330-348	GAAAGUUUGCCAAGGCAC GTT	506	CGUGCCUUGGCAAACUUU CTT	507
332	332-350	AAGUUUGCCAAGGCACGA GTT	508	CUCGUGCCUUGGCAAACU UTT	509
333	333-351	AGUUUGCCAAGGCACGAG UTT	510	ACUCGUGCCUUGGCAAAC UTT	511
334	334-352	GUUUGCCAAGGCACGAGU ATT	512	UACUCGUGCCUUGGCAAA CTT	513
335	335-353	UUUGCCAAGGCACGAGUA ATT	514	UUACUCGUGCCUUGGCAA ATT	515
336	336-354	UUGCCAAGGCACGAGUAA CTT	516	GUUACUCGUGCCUUGGCA ATT	517
337	337-355	UGCCAAGGCACGAGUAAC ATT	518	UGUUACUCGUGCCUUGGC ATT	519
338	338-356	GCCAAGGCACGAGUAACA ATT	520	UUGUUACUCGUGCCUUGG CTT	521
361	361-379	ACGCAGUUGGGCACUUUU GTT	522	CAAAAGUGCCCAACUGCG UTT	523

【 0 5 9 1】

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

362	362-380	CGCAGUUGGGCACUUUUG ATT	524	UCAAAAAGUGCCCAACUGC GTT	525
363	363-381	GCAGUUGGGCACUUUUGA ATT	526	UUCAAAAGUGCCCAACUG CTT	527
364	364-382	CAGUUGGGCACUUUUGAA GTT	528	CUUCAAAAAGUGCCCAACU GTT	529
365	365-383	AGUUGGGCACUUUUGAAG ATT	530	UCUUCAAAAAGUGCCCAAC UTT	531
366	366-384	GUUGGGCACUUUUGAAGA UTT	532	AUCUUCAAAAAGUGCCCAA CTT	533
367	367-385	UUGGGCACUUUUGAAGAU CTT	534	GAUCUUCAAAAAGUGCCCA ATT	535
368	368-386	UGGGCACUUUUGAAGAUC ATT	536	UGAUCUUCAAAAAGUGCCC ATT	537
369	369-387	GGGCACUUUUGAAGAUC UTT	538	AUGAUCUUCAAAAAGUGCC CTT	539
377	377-395	UUGAAGAUCAUUUUCUCA GTT	540	CUGAGAAAAUGAUCUUCA ATT	541
379	379-397	GAAGAUCAUUUUCUCAGC CTT	542	GGCUGAGAAAAUGAUCU UCTT	543
380	380-398	AAGAUCAUUUUCUCAGCC UTT	544	AGGCUGAGAAAAUGAUC UUTT	545
385	385-403	CAUUUUCUCAGCCUCCAG ATT	546	UCUGGAGGCUGAGAAAA UGTT	547
394	394-412	AGCCUCCAGAGGAUGUUC ATT	548	UGAACAUCCUCUGGAGGC UTT	549
396	396-414	CCUCCAGAGGAUGUUCAA UTT	550	AUUGAACAUCCUCUGGAG GTT	551
397	397-415	CUCCAGAGGAUGUUCAAU ATT	552	UAUUGAACAUCCUCUGGA GTT	553
401	401-419	AGAGGAUGUUCAAUAACU GTT	554	CAGUUAUUGAACAUCCUC UTT	555
403	403-421	AGGAUGUUCAAUAACUGU GTT	556	CACAGUUAUUGAACAUCC UTT	557
407	407-425	UGUUCAAUAACUGUGAGG UTT	558	ACCUCACAGUUAUUGAAC ATT	559
409	409-427	UUCAAUAACUGUGAGGUG GTT	560	CCACCUCACAGUUAUUGA ATT	561
410	410-428	UCAAAUAACUGUGAGGUGG UTT	562	ACCACCUCACAGUUAUUG ATT	563
411	411-429	CAAUAACUGUGAGGUGGU CTT	564	GACCACCUCACAGUUAU GTT	565
412	412-430	AAUAACUGUGAGGUGGUC CTT	566	GGACCACCUCACAGUUAU UTT	567
413	413-431	AUAACUGUGAGGUGGUCC UTT	568	AGGACCACCUCACAGUUA UTT	569
414	414-432	UAACUGUGAGGUGGUCCU UTT	570	AAGGACCACCUCACAGUU ATT	571
416	416-434	ACUGUGAGGUGGUCCUUG GTT	572	CCAAGGACCACCUCACAG UTT	573
418	418-436	UGUGAGGUGGUCCUUGGG ATT	574	UCCCAAGGACCACCUCAC ATT	575
419	419-437	GUGAGGUGGUCCUUGGGA ATT	576	UUCCCAAGGACCACCUCA CTT	577

【 0 5 9 2 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

425	425-443	UGGUCCUUGGGAAUUUGG ATT	578	UCCAAAUUCCCAAGGACC ATT	579
431	431-449	UUGGGAAUUUGGAAAUU ACTT	580	GUAUUUCCAAAUUCCCA ATT	581
432	432-450	UGGGAAUUUGGAAAUUA CCTT	582	GGUAAUUUCCAAAUUCCC ATT	583
433	433-451	GGGAAUUUUGGAAAUUACC UTT	584	AGGUAAUUUCCAAAUUCC CTT	585
434	434-452	GGAAUUUUGGAAAUUACCU ATT	586	UAGGUAAUUUCCAAAUUC CTT	587
458	458-476	AGAGGAAUUAUGAUCUU UCTT	588	GAAAGAUCAUAAUUCCUC UTT	589
459	459-477	GAGGAAUUAUGAUCUUUC CTT	590	GGAAAGAUCAUAAUUCCU CTT	591
463	463-481	AAUUAUGAUCUUUCCUUC UTT	592	AGAAGGAAAGAUCAUAA UUTT	593
464	464-482	AUUAUGAUCUUUCCUUCU UTT	594	AAGAAGGAAAGAUCAUA AUTT	595
466	466-484	UAUGAUCUUUCCUUCUUA ATT	596	UUAAGAAGGAAAGAUCA UATT	597
468	468-486	UGAUCUUUCCUUCUAAA GTT	598	CUUUAAGAAGGAAAGAU CATT	599
471	471-489	UCUUUCCUUCUAAAAGAC CTT	600	GGUCUUUAAGAAGGAAA GATT	601
476	476-494	CCUUCUAAAAGACCAUCC ATT	602	UGGAUGGUCUUUAAGAA GGTT	603
477	477-495	CUUCUAAAAGACCAUCCA GTT	604	CUGGAUGGUCUUUAAGA AGTT	605
479	479-497	UCUAAAAGACCAUCCAGG ATT	606	UCCUGGAUGGUCUUUAAG ATT	607
481	481-499	UAAAAGACCAUCCAGGAG GTT	608	CCUCCUGGAUGGUCUUUA ATT	609
482	482-500	UAAAGACCAUCCAGGAGG UTT	610	ACCUCCUGGAUGGUCUUU ATT	611
492	492-510	CCAGGAGGUGGCUGGUUA UTT	612	AUAACCAGCCACCUCUG GTT	613
493	493-511	CAGGAGGUGGCUGGUUAU GTT	614	CAUAACCAGCCACCUCU GTT	615
494	494-512	AGGAGGUGGCUGGUUAU GUTT	616	ACAUACCAGCCACCUCU UTT	617
495	495-513	GGAGGUGGCUGGUUAUG UCTT	618	GACAUACCAGCCACCUC CTT	619
496	496-514	GAGGUGGCUGGUUAUGUC CTT	620	GGACAUACCAGCCACCU CTT	621
497	497-515	AGGUGGCUGGUUAUGUCC UTT	622	AGGACAUACCAGCCACC UTT	623
499	499-517	GUGGCUGGUUAUGUCCUC ATT	624	UGAGGACAUACCAGCCA CTT	625
520	520-538	GCCCUCAACACAGUGGAG CTT	626	GCUCCACUGUGUUGAGGG CTT	627
542	542-560	UCCUUUGGAAAACCUGC ATT	628	UGCAGGUUUUCCAAAGGA ATT	629
543	543-561	UCCUUUGGAAAACCUGCA GTT	630	CUGCAGGUUUUCCAAAGG ATT	631

【 0 5 9 3 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

550	550-568	GAAAACCUGCAGAUCAUC ATT	632	UGAUGAUCUGCAGGUUU UCTT	633
551	551-569	AAAACCUGCAGAUCAUCA GTT	634	CUGAUGAUCUGCAGGUUU UTT	635
553	553-571	AACCUGCAGAUCAUCAGA GTT	636	CUCUGAUGAUCUGCAGGU UTT	637
556	556-574	CUGCAGAUCAUCAGAGGA ATT	638	UUCCUCUGAUGAUCUGCA GTT	639
586	586-604	GAAAAUCCUAUGCCUUA GTT	640	CUAAGGCAUAGGAAUUU UCTT	641
587	587-605	AAAAUCCUAUGCCUUA CTT	642	GCUAAGGCAUAGGAAUU UUTT	643
589	589-607	AAUUCCUAUGCCUUA GTT	644	CUGCUAAGGCAUAGGAAU UTT	645
592	592-610	UCCUAUGCCUUAAGCAGUC UTT	646	AGACUGCUAAGGCAUAGG ATT	647
593	593-611	CCUAUGCCUUAAGCAGUCU UTT	648	AAGACUGCUAAGGCAUAG GTT	649
594	594-612	CUAUGCCUUAAGCAGUCUU ATT	650	UAAGACUGCUAAGGCAUA GTT	651
596	596-614	AUGCCUUAAGCAGUCUUAU CTT	652	GAUAAGACUGCUAAGGCA UTT	653
597	597-615	UGCCUUAAGCAGUCUUAUC UTT	654	AGAUAAAGACUGCUAAGGC ATT	655
598	598-616	GCCUUAAGCAGUCUUAUCU ATT	656	UAGAUAAAGACUGCUAAG GCTT	657
599	599-617	CCUUAAGCAGUCUUAUCUA ATT	658	UUAGAUAAAGACUGCUAA GGTT	659
600	600-618	CUUAGCAGUCUUAUCUAA CTT	660	GUUAGAUAAAGACUGCUA AGTT	661
601	601-619	UUAGCAGUCUUAUCUAA UTT	662	AGUUAGAUAAAGACUGCU AATT	663
602	602-620	UAGCAGUCUUAUCUAA ATT	664	UAGUUAGAUAAAGACUGC UATT	665
603	603-621	AGCAGUCUUAUCUAA UTT	666	AUAGUUAGAUAAAGACUG CUTT	667
604	604-622	GCAGUCUUAUCUAA GTT	668	CAUAGUUAGAUAAAGACU GCTT	669
605	605-623	CAGUCUUAUCUAA ATT	670	UCAUAGUUAGAUAAAGAC UGTT	671
608	608-626	UCUUAUCUAA CTT	672	GCAUCAUAGUUAGAUAA GATT	673
609	609-627	CUUAUCUAA ATT	674	UGCAUCAUAGUUAGAU AGTT	675
610	610-628	UUAUCUAA ATT	676	UUGCAUCAUAGUUAGAU AATT	677
611	611-629	UAUCUAA ATT	678	UUUGCAUCAUAGUUAGA UATT	679
612	612-630	AUCUAA UTT	680	AUUUGCAUCAUAGUUAG AUTT	681
613	613-631	UCUAA ATT	682	UAUUUGCAUCAUAGUUA GATT	683
614	614-632	CUAA ATT	684	UUAUUUGCAUCAUAGUU AGTT	685

10

20

30

40

【 0 5 9 4】

50

【表 5 - 6】

616	616-634	AACUAUGAUGCAAAUAAA ATT	686	UUUUAUUUGCAUCAUAG UUTT	687
622	622-640	GAUGCAAAUAAAACCGGA CTT	688	GUCCGGUUUUUAAUUUGCAU CTT	689
623	623-641	AUGCAAAUAAAACCGGAC UTT	690	AGUCCGGUUUUUAAUUUGCA UTT	691
624	624-642	UGCAAAUAAAACCGGACU GTT	692	CAGUCCGGUUUUUAAUUUGC ATT	693
626	626-644	CAAAUAAAACCGGACUGA ATT	694	UUCAGUCCGGUUUUUAAUUU GTT	695
627	627-645	AAAUAAAACCGGACUGAA GTT	696	CUUCAGUCCGGUUUUUAAUU UTT	697
628	628-646	AAUAAAACCGGACUGAAG GTT	698	CCUUCAGUCCGGUUUUUAU UTT	699
630	630-648	UAAAACCGGACUGAAGGA GTT	700	CUCCUUCAGUCCGGUUUUU ATT	701
631	631-649	AAAACCGGACUGAAGGAG CTT	702	GCUCUUCAGUCCGGUUUU UTT	703
632	632-650	AAACCGGACUGAAGGAGC UTT	704	AGCUCCUUCAGUCCGGUU UTT	705
633	633-651	AACCGGACUGAAGGAGCU GTT	706	CAGCUCCUUCAGUCCGGU UTT	707
644	644-662	AGGAGCUGCCCAUGAGAA ATT	708	UUUCUCAUGGGCAGCUCC UTT	709
665	665-683	UACAGGAAAUCCUGCAUG GTT	710	CCAUGCAGGAUUUCCUGU ATT	711
668	668-686	AGGAAAUCCUGCAUGGCG CTT	712	GCGCCAUGCAGGAUUUCC UTT	713
669	669-687	GGAAAUCCUGCAUGGCGC CTT	714	GGCGCCAUGCAGGAUUUC CTT	715
670	670-688	GAAAUCCUGCAUGGCGCC GTT	716	CGGCGCCAUGCAGGAUUU CTT	717
671	671-689	AAAUCCUGCAUGGCGCCG UTT	718	ACGGCGCCAUGCAGGAUU UTT	719
672	672-690	AAUCCUGCAUGGCGCCGU GTT	720	CACGGCGCCAUGCAGGAU UTT	721
674	674-692	UCCUGCAUGGCGCCGUGC GTT	722	CGCACGGCGCCAUGCAGG ATT	723
676	676-694	CUGCAUGGCGCCGUGCGG UTT	724	ACCGCACGGCGCCAUGCA GTT	725
677	677-695	UGCAUGGCGCCGUGCGGU UTT	726	AACCGCACGGCGCCAUGC ATT	727
678	678-696	GCAUGGCGCCGUGCGGUU CTT	728	GAACCGCACGGCGCCAUG CTT	729
680	680-698	AUGGCGCCGUGCGGUUCA GTT	730	CUGAACCGCACGGCGCCA UTT	731
681	681-699	UGGCGCCGUGCGGUUCAG CTT	732	GCUGAACCGCACGGCGCC ATT	733
682	682-700	GGCGCCGUGCGGUUCAGC ATT	734	UGCUGAACCGCACGGCGC CTT	735
683	683-701	GCGCCGUGCGGUUCAGCA ATT	736	UUGCUGAACCGCACGGCG CTT	737
684	684-702	CGCCGUGCGGUUCAGCAA CTT	738	GUUGCUGAACCGCACGGC GTT	739

【 0 5 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

685	685-703	GCCGUGCGGUUCAGCAAC ATT	740	UGUUGCUGAACCGCACGG CTT	741
686	686-704	CCGUGCGGUUCAGCAACA ATT	742	UUGUUGCUGAACCGCACG GTT	743
688	688-706	GUGCGGUUCAGCAACAAC CTT	744	GGUUGUUGCUGAACCGCA CTT	745
690	690-708	GCGGUUCAGCAACAACCC UTT	746	AGGGUUGUUGCUGAACCG CTT	747
692	692-710	GGUUCAGCAACAACCCUG CTT	748	GCAGGGUUGUUGCUGAAC CTT	749
698	698-716	GCAACAACCCUGCCCUGU GTT	750	CACAGGGCAGGGUUGUUG CTT	751
700	700-718	AACAACCCUGCCCUGUGC ATT	752	UGCACAGGGCAGGGUUGU UTT	753
719	719-737	ACGUGGAGAGCAUCCAGU GTT	754	CACUGGAUGCUCUCCACG UTT	755
720	720-738	CGUGGAGAGCAUCCAGUG GTT	756	CCACUGGAUGCUCUCCAC GTT	757
721	721-739	GUGGAGAGCAUCCAGUGG CTT	758	GCCACUGGAUGCUCUCCA CTT	759
724	724-742	GAGAGCAUCCAGUGGCGG GTT	760	CCCGCCACUGGAUGCUCU CTT	761
725	725-743	AGAGCAUCCAGUGGCGGG ATT	762	UCCCGCCACUGGAUGCUC UTT	763
726	726-744	GAGCAUCCAGUGGCGGGA CTT	764	GUCCCGCCACUGGAUGC CTT	765
733	733-751	CAGUGGCGGGACAUAGUC ATT	766	UGACUAUGUCCCGCCACU GTT	767
734	734-752	AGUGGCGGGACAUAGUCA GTT	768	CUGACUAUGUCCCGCCAC UTT	769
736	736-754	UGGCGGGACAUAGUCAGC ATT	770	UGCUGACUAUGUCCCGCC ATT	771
737	737-755	GGCGGGACAUAGUCAGCA GTT	772	CUGCUGACUAUGUCCCGC CTT	773
763	763-781	CUCAGCAACAUGUCGAUG GTT	774	CCAUCGACAUGUUGCUGA GTT	775
765	765-783	CAGCAACAUGUCGAUGGA CTT	776	GUCCAUCGACAUGUUGCU GTT	777
766	766-784	AGCAACAUGUCGAUGGAC UTT	778	AGUCCAUCGACAUGUUGC UTT	779
767	767-785	GCAACAUGUCGAUGGACU UTT	780	AAGUCCAUCGACAUGUUG CTT	781
769	769-787	AACAUGUCGAUGGACUUC CTT	782	GGAAGUCCAUCGACAUGU UTT	783
770	770-788	ACAUGUCGAUGGACUUC ATT	784	UGGAAGUCCAUCGACAUG UTT	785
771	771-789	CAUGUCGAUGGACUCCA GTT	786	CUGGAAGUCCAUCGACAU GTT	787
772	772-790	AUGUCGAUGGACUCCAG ATT	788	UCUGGAAGUCCAUCGACA UTT	789
775	775-793	UCGAUGGACUCCAGAAC CTT	790	GGUUCUGGAAGUCCAUCG ATT	791
789	789-807	GAACCACCGGGCAGCUG CTT	792	GCAGCUGCCCAGGUGGUU CTT	793

【 0 5 9 6 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

798	798-816	GGGCAGCUGCCAAAAGUG UTT	794	ACACUUUUGGCAGCUGCC CTT	795
800	800-818	GCAGCUGCCAAAAGUGUG ATT	796	UCACACUUUUGGCAGCUG CTT	797
805	805-823	UGCCAAAAGUGUGAUCCA ATT	798	UUGGAUCACACUUUUGGC ATT	799
806	806-824	GCCAAAAGUGUGAUCCAA GTT	800	CUUGGAUCACACUUUUGG CTT	801
807	807-825	CCAAAAGUGUGAUCCAAG CTT	802	GCUUGGAUCACACUUUUG GTT	803
810	810-828	AAAGUGUGAUCCAAGCUG UTT	804	ACAGCUUGGAUCACACUU UTT	805
814	814-832	UGUGAUCCAAGCUGUCCC ATT	806	UGGGACAGCUUGGAUCAC ATT	807
815	815-833	GUGAUCCAAGCUGUCCCA ATT	808	UUGGGACAGCUUGGAUCA CTT	809
817	817-835	GAUCCAAGCUGUCCCAAU GTT	810	CAUUGGGACAGCUUGGAU CTT	811
818	818-836	AUCCAAGCUGUCCCAAUG GTT	812	CCAUUGGGACAGCUUGGA UTT	813
819	819-837	UCCAAGCUGUCCCAAUGG GTT	814	CCCAUUGGGACAGCUUGG ATT	815
820	820-838	CCAAGCUGUCCCAAUGGG ATT	816	UCCCAUUGGGACAGCUUG GTT	817
821	821-839	CAAGCUGUCCCAAUGGGA GTT	818	CUCCCAUUGGGACAGCUU GTT	819
823	823-841	AGCUGUCCCAAUGGGAGC UTT	820	AGCUCCCAUUGGGACAGC UTT	821
826	826-844	UGUCCCAAUGGGAGCUGC UTT	822	AGCAGCUCCCAUUGGGAC ATT	823
847	847-865	GGUGCAGGAGAGGAGAAC UTT	824	AGUUCUCCUCUCCUGCAC CTT	825
871	871-889	AAACUGACCAAAAUCAUC UTT	826	AGAUGAUUUUGGUCAGU UUTT	827
872	872-890	AACUGACCAAAAUCAUCU GTT	828	CAGAUGAUUUUGGUCAG UUTT	829
873	873-891	ACUGACCAAAAUCAUCUG UTT	830	ACAGAUGAUUUUGGUCA GUTT	831
877	877-895	ACCAAAAUCAUCUGUGCC CTT	832	GGGCACAGAUGAUUUUG GUTT	833
878	878-896	CCAAAUCAUCUGUGCCC ATT	834	UGGGCACAGAUGAUUUU GGTT	835
881	881-899	AAAUCAUCUGUGCCCAGC ATT	836	UGCUGGGCACAGAUGAUU UTT	837
890	890-908	GUGCCCAGCAGUGCUCCG GTT	838	CCGGAGCACUGCUGGGCA CTT	839
892	892-910	GCCCAGCAGUGCUCCGGG CTT	840	GCCCGGAGCACUGCUGGG CTT	841
929	929-947	CCAGUGACUGCUGCCACA ATT	842	UUGUGGCAGCAGUCACUG GTT	843
930	930-948	CAGUGACUGCUGCCACAA CTT	844	GUUGUGGCAGCAGUCACU GTT	845
979	979-997	GAGAGCGACUGCCUGGUC UTT	846	AGACCAGGCAGUCGCUCU CTT	847

【 0 5 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

980	980-998	AGAGCGACUGCCUGGUCU GTT	848	CAGACCAGGCAGUCGCUC UTT	849
981	981-999	GAGCGACUGCCUGGUCUG CTT	850	GCAGACCAGGCAGUCGCU CTT	851
982	982-1000	AGCGACUGCCUGGUCUGC CTT	852	GGCAGACCAGGCAGUCGC UTT	853
983	983-1001	GCGACUGCCUGGUCUGCC GTT	854	CGGCAGACCAGGCAGUCG CTT	855
984	984-1002	CGACUGCCUGGUCUGCCG CTT	856	GCGGCAGACCAGGCAGUC GTT	857
989	989-1007	GCCUGGUCUGCCGCAAAU UTT	858	AAUUUGCGGCAGACCAGG CTT	859
990	990-1008	CCUGGUCUGCCGCAAAU CTT	860	GAAUUUGCGGCAGACCAG GTT	861
991	991-1009	CUGGUCUGCCGCAAAUUC CTT	862	GGAAUUUGCGGCAGACCA GTT	863
992	992-1010	UGGUCUGCCGCAAAUCC GTT	864	CGGAAUUUGCGGCAGACC ATT	865
994	994-1012	GUCUGCCGCAAAUCCGA GTT	866	CUCGGAUUUGCGGCAGA CTT	867
995	995-1013	UCUGCCGCAAAUCCGAG ATT	868	UCUCGGAUUUGCGGCAG ATT	869
996	996-1014	CUGCCGCAAAUCCGAGA CTT	870	GUCUCGGAUUUGCGGCA GTT	871
997	997-1015	UGCCGCAAAUCCGAGAC GTT	872	CGUCUCGGAUUUGCGGC ATT	873
999	999-1017	CCGCAAAUCCGAGACGA ATT	874	UUCGUCUCGGAUUUGCG GTT	875
1004	1004-1022	AAUCCGAGACGAAGCCA CTT	876	GUGGCUUCGUCUCGGAU UTT	877
1005	1005-1023	AUCCGAGACGAAGCCAC GTT	878	CGUGGCUUCGUCUCGGA UTT	879
1006	1006-1024	UUCCGAGACGAAGCCACG UTT	880	ACGUGGCUUCGUCUCGGA ATT	881
1007	1007-1025	UCCGAGACGAAGCCACGU GTT	882	CACGUGGCUUCGUCUCGG ATT	883
1008	1008-1026	CCGAGACGAAGCCACGUG CTT	884	GCACGUGGCUUCGUCUCG GTT	885
1010	1010-1028	GAGACGAAGCCACGUGCA ATT	886	UUGCACGUGGCUUCGUCU CTT	887
1013	1013-1031	ACGAAGCCACGUGCAAGG ATT	888	UCCUUGCACGUGGCUUCG UTT	889
1014	1014-1032	CGAAGCCACGUGCAAGGA CTT	890	GUCCUUGCACGUGGCUUC GTT	891
1015	1015-1033	GAAGCCACGUGCAAGGAC ATT	892	UGUCCUUGCACGUGGCUU CTT	893
1016	1016-1034	AAGCCACGUGCAAGGACA CTT	894	GUGUCCUUGCACGUGGCU UTT	895
1040	1040-1058	CCCCACUAUGCUCUACA ATT	896	UUGUAGAGCAUGAGUGG GGTT	897
1042	1042-1060	CCACUAUGCUCUACAAC CTT	898	GGUUGUAGAGCAUGAGU GGTT	899
1044	1044-1062	ACUAUGCUCUACAACCC CTT	900	GGGUUGUAGAGCAUGA GUTT	901

【 0 5 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 10】

1047	1047-1065	CAUGCUCUACAACCCAC CTT	902	GGUGGGGUUGUAGAGCA UGTT	903
1071	1071-1089	CCAGAUGGAUGUGAACCC CTT	904	GGGGUUCACAUCCAUCUG GTT	905
1073	1073-1091	AGAUGGAUGUGAACCCCG ATT	906	UCGGGGUUCACAUCCAUC UTT	907
1074	1074-1092	GAUGGAUGUGAACCCCGA GTT	908	CUCGGGGUUCACAUCCA CTT	909
1075	1075-1093	AUGGAUGUGAACCCCGAG GTT	910	CCUCGGGGUUCACAUCCA UTT	911
1077	1077-1095	GGAUGUGAACCCCGAGGG CTT	912	GCCCUCGGGGUUCACAUC CTT	913
1078	1078-1096	GAUGUGAACCCCGAGGGC ATT	914	UGCCCUCGGGGUUCACA CTT	915
1080	1080-1098	UGUGAACCCCGAGGGCAA ATT	916	UUUGCCCUCGGGGUUCAC ATT	917
1084	1084-1102	AACCCCGAGGGCAAAUAC ATT	918	UGUAUUUGCCCUCGGGGU UTT	919
1085	1085-1103	ACCCCGAGGGCAAAUACA GTT	920	CUGUAUUUGCCCUCGGGG UTT	921
1087	1087-1105	CCCGAGGGCAAAUACAGC UTT	922	AGCUGUAUUUGCCCUCGG GTT	923
1088	1088-1106	CCGAGGGCAAAUACAGCU UTT	924	AAGCUGUAUUUGCCCUCG GTT	925
1089	1089-1107	CGAGGGCAAAUACAGCUU UTT	926	AAAGCUGUAUUUGCCCUC GTT	927
1096	1096-1114	AAAUACAGCUUUGGUGCC ATT	928	UGGCACCAAAGCUGUAUU UTT	929
1097	1097-1115	AAUACAGCUUUGGUGCCA CTT	930	GUGGCACCAAAGCUGUAU UTT	931
1098	1098-1116	AUACAGCUUUGGUGCCAC CTT	932	GGUGGCACCAAAGCUGUA UTT	933
1104	1104-1122	CUUUGGUGGCCACCUGCGU GTT	934	CACGCAGGUGGCACCAAA GTT	935
1106	1106-1124	UUGGUGGCCACCUGCGUGA ATT	936	UUCACGCAGGUGGCACCA ATT	937
1112	1112-1130	CCACCUGCGUGAAGAAGU GTT	938	CACUUCUUCACGCAGGUG GTT	939
1116	1116-1134	CUGCGUGAAGAAGUGUCC CTT	940	GGGACACUUCUUCACGCA GTT	941
1117	1117-1135	UGCGUGAAGAAGUGUCCC CTT	942	GGGGACACUUCUUCACGC ATT	943
1118	1118-1136	GCGUGAAGAAGUGUCCCC GTT	944	CGGGGACACUUCUUCACG CTT	945
1119	1119-1137	CGUGAAGAAGUGUCCCCG UTT	946	ACGGGGACACUUCUUCAC GTT	947
1120	1120-1138	GUGAAGAAGUGUCCCCGU ATT	948	UACGGGGACACUUCUUCA CTT	949
1121	1121-1139	UGAAGAAGUGUCCCCGUA ATT	950	UUACGGGGACACUUCUUC ATT	951
1122	1122-1140	GAAGAAGUGUCCCCGUAA UTT	952	AUUACGGGGACACUUCU CTT	953
1123	1123-1141	AAGAAGUGUCCCCGUAAU UTT	954	AAUUACGGGGACACUUCU UTT	955

【0599】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 1】

1124	1124-1142	AGAAGUGUCCCCGUAUU ATT	956	UAAUUACGGGGACACUUC UTT	957
1125	1125-1143	GAAGUGUCCCCGUAUUUA UTT	958	AUAAUUACGGGGACACUU CTT	959
1126	1126-1144	AAGUGUCCCCGUAUUUAU GTT	960	CAUAAUUACGGGGACACU UTT	961
1127	1127-1145	AGUGUCCCCGUAUUUAUG UTT	962	ACAUAUUACGGGGACAC UTT	963
1128	1128-1146	GUGUCCCCGUAUUUAUGU GTT	964	CACAUAAUUACGGGGACA CTT	965
1129	1129-1147	UGUCCCCGUAUUUAUGUG GTT	966	CCACAUAAUUACGGGGAC ATT	967
1130	1130-1148	GUCCCCGUAUUUAUGUGG UTT	968	ACCACAUAAUUACGGGGA CTT	969
1132	1132-1150	CCCCGUAUUUAUGUGGUG ATT	970	UCACCACAUAAUUACGGG GTT	971
1134	1134-1152	CCGUAUUUAUGUGGUGAC ATT	972	UGUCACCACAUAAUUACG GTT	973
1136	1136-1154	GUAAUUUAUGUGGUGACA GATT	974	UCUGUCACCACAUAAUUA CTT	975
1137	1137-1155	UAAUUUAUGUGGUGACAG AUTT	976	AUCUGUCACCACAUAAUU ATT	977
1138	1138-1156	AAUUUAUGUGGUGACAGA UCTT	978	GAUCUGUCACCACAUAAU UTT	979
1139	1139-1157	AUUUAUGUGGUGACAGAU ATT	980	UGAUCUGUCACCACAUAA UTT	981
1140	1140-1158	UUUAUGUGGUGACAGAUCA CTT	982	GUGAUCUGUCACCACAUAA ATT	983
1142	1142-1160	AUGUGGUGACAGAUACG GTT	984	CCGUGAUCUGUCACCACA UTT	985
1145	1145-1163	UGGUGACAGAUACGGCU CTT	986	GAGCCGUGAUCUGUCACC ATT	987
1147	1147-1165	GUGACAGAUACGGCUCG UTT	988	ACGAGCCGUGAUCUGUCA CTT	989
1148	1148-1166	UGACAGAUACGGCUCGU GTT	990	CACGAGCCGUGAUCUGUC ATT	991
1149	1149-1167	GACAGAUACGGCUCGUG CTT	992	GCACGAGCCGUGAUCUGU CTT	993
1150	1150-1168	ACAGAUACGGCUCGUGC GTT	994	CGCACGAGCCGUGAUCUG UTT	995
1151	1151-1169	CAGAUACGGCUCGUGCG UTT	996	ACGCACGAGCCGUGAUCU GTT	997
1152	1152-1170	AGAUACGGCUCGUGCGU CTT	998	GACGCACGAGCCGUGAUC UTT	999
1153	1153-1171	GAUCACGGCUCGUGCGUC CTT	1000	GGACGCACGAGCCGUGAU CTT	1001
1154	1154-1172	AUCACGGCUCGUGCGUCC GTT	1002	CGGACGCACGAGCCGUGA UTT	1003
1155	1155-1173	UCACGGCUCGUGCGUCCG ATT	1004	UCGGACGCACGAGCCGUG ATT	1005
1156	1156-1174	CACGGCUCGUGCGUCCGA GTT	1006	CUCGGACGCACGAGCCGU GTT	1007
1157	1157-1175	ACGGCUCGUGCGUCCGAG CTT	1008	GCUCGGACGCACGAGCCG UTT	1009

【 0 6 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 2】

1160	1160-1178	GCUCGUGCGUCCGAGCCU GTT	101 0	CAGGCUCGGACGCACGAG CTT	101 1
1200	1200-1218	GGAGGAAGACGGCGUCCG CTT	101 2	GCGGACGCCGUCUCCUC CTT	101 3
1201	1201-1219	GAGGAAGACGGCGUCCGC ATT	101 4	UGCAGGACGCCGUCUCCU CTT	101 5
1203	1203-1221	GGAAGACGGCGUCCGCAA GTT	101 6	CUUGCAGGACGCCGUCUUC CTT	101 7
1204	1204-1222	GAAGACGGCGUCCGCAAG UTT	101 8	ACUUGCAGGACGCCGUCUU CTT	101 9
1205	1205-1223	AAGACGGCGUCCGCAAGU GTT	102 0	CACUUGCAGGACGCCGUCU UTT	102 1
1207	1207-1225	GACGGCGUCCGCAAGUGU ATT	102 2	UACACUUGCAGGACGCCGU CTT	102 3
1208	1208-1226	ACGGCGUCCGCAAGUGUA ATT	102 4	UUACACUUGCAGGACGCCG UTT	102 5
1211	1211-1229	GCGUCCGCAAGUGUAAGA ATT	102 6	UUCUACACUUGCAGGACG CTT	102 7
1212	1212-1230	CGUCCGCAAGUGUAAGAA GTT	102 8	CUUCUACACUUGCAGGAC GTT	102 9
1213	1213-1231	GUCCGCAAGUGUAAGAAG UTT	103 0	ACUUCUACACUUGCAGGA CTT	103 1
1214	1214-1232	UCCGCAAGUGUAAGAAGU GTT	103 2	CACUUCUACACUUGCAGG ATT	103 3
1215	1215-1233	CCGCAAGUGUAAGAAGUG CTT	103 4	GCACUUCUACACUUGCAG GTT	103 5
1216	1216-1234	CGCAAGUGUAAGAAGUGC GTT	103 6	CGCACUUCUACACUUGC GTT	103 7
1217	1217-1235	GCAAGUGUAAGAAGUGCG ATT	103 8	UCGCACUUCUACACUUG CTT	103 9
1219	1219-1237	AAGUGUAAGAAGUGCGA AGTT	104 0	CUUCGCACUUCUACACU UTT	104 1
1220	1220-1238	AGUGUAAGAAGUGCGAA GGTT	104 2	CCUUCGCACUUCUACAC UTT	104 3
1221	1221-1239	GUGUAAGAAGUGCGAAG GGTT	104 4	CCCUCGCACUUCUACAC CTT	104 5
1222	1222-1240	UGUAAGAAGUGCGAAGG GCTT	104 6	GCCCUUCGCACUUCUAC ATT	104 7
1223	1223-1241	GUAAGAAGUGCGAAGGGC CTT	104 8	GGCCCUUCGCACUUCUUA CTT	104 9
1224	1224-1242	UAAGAAGUGCGAAGGGCC UTT	105 0	AGGCCCUUCGCACUUCU ATT	105 1
1225	1225-1243	AAGAAGUGCGAAGGGCCU UTT	105 2	AAGGCCCUUCGCACUUCU UTT	105 3
1226	1226-1244	AGAAGUGCGAAGGGCCUU GTT	105 4	CAAGGCCCUUCGCACUUC UTT	105 5
1229	1229-1247	AGUGCGAAGGGCCUUGCC GTT	105 6	CGGCAAGGCCCUUCGCAC UTT	105 7
1230	1230-1248	GUGCGAAGGGCCUUGCCG CTT	105 8	GCGGCAAGGCCCUUCGCA CTT	105 9
1231	1231-1249	UGCGAAGGGCCUUGCCGC ATT	106 0	UGCAGGCAAGGCCCUUCGC ATT	106 1
1232	1232-1250	GCGAAGGGCCUUGCCGCA ATT	106 2	UUGCAGGCAAGGCCCUUCG CTT	106 3

【 0 6 0 1】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 3】

1233	1233-1251	CGAAGGGCCUUGCCGCAA ATT	106 4	UUUGCGGCAAGGCCCUUC GTT	106 5
1235	1235-1253	AAGGGCCUUGCCGCAAAG UTT	106 6	ACUUUGCGGCAAGGCCCU UTT	106 7
1236	1236-1254	AGGGCCUUGCCGCAAAGU GTT	106 8	CACUUUGCGGCAAGGCC UTT	106 9
1237	1237-1255	GGGCCUUGCCGCAAAGUG UTT	107 0	ACACUUUGCGGCAAGGCC CTT	107 1
1238	1238-1256	GGCCUUGCCGCAAAGUGU GTT	107 2	CACACUUUGCGGCAAGGC CTT	107 3
1239	1239-1257	GCCUUGCCGCAAAGUGUG UTT	107 4	ACACACUUUGCGGCAAGG CTT	107 5
1241	1241-1259	CUUGCCGCAAAGUGUGUA ATT	107 6	UUACACACUUUGCGGCAA GTT	107 7
1261	1261-1279	GGAAUAGGUAUUGGUGA AUTT	107 8	AUUCACCAAUACCUAUUC CTT	107 9
1262	1262-1280	GAAUAGGUAUUGGUGAA UUTT	108 0	AAUUCACCAAUACCUAUU CTT	108 1
1263	1263-1281	AAUAGGUAUUGGUGAAU UUTT	108 2	AAAUUCACCAAUACCUAU UTT	108 3
1264	1264-1282	AUAGGUAUUGGUGAAUU UATT	108 4	UAAAUUCACCAAUACCUA UTT	108 5
1266	1266-1284	AGGUAUUGGUGAAUUUA AATT	108 6	UUUAAAUUCACCAAUACC UTT	108 7
1267	1267-1285	GGUAUUGGUGAAUUUAA AGTT	108 8	CUUUAAAUUCACCAAUAC CTT	108 9
1289	1289-1307	CACUCUCCAUAUAAUGCUA CTT	109 0	GUAGCAUUUAUGGAGAG UGTT	109 1
1313	1313-1331	UUAAACACUUCAAAAACU GTT	109 2	CAGUUUUUGAAGUGUUU AATT	109 3
1320	1320-1338	CUUCAAAAAACUGCACCUC CTT	109 4	GGAGGUGCAGUUUUUGA AGTT	109 5
1321	1321-1339	UUCAAAAAACUGCACCUC ATT	109 6	UGGAGGUGCAGUUUUUG AATT	109 7
1322	1322-1340	UCAAAAAACUGCACCUC UTT	109 8	AUGGAGGUGCAGUUUUU GATT	109 9
1323	1323-1341	CAAAAAACUGCACCUC CTT	110 0	GAUGGAGGUGCAGUUUU UGTT	110 1
1324	1324-1342	AAAAACUGCACCUC ATT	110 2	UGAUGGAGGUGCAGUUU UUTT	110 3
1328	1328-1346	ACUGCACCUCACAGUG GTT	110 4	CCACUGAUGGAGGUGCAG UTT	110 5
1332	1332-1350	CACCUCCAUCAGUGGCGA UTT	110 6	AUCGCCACUGAUGGAGGU GTT	110 7
1333	1333-1351	ACCUCCAUCAGUGGCGAU CTT	110 8	GAUCGCCACUGAUGGAGG UTT	110 9
1335	1335-1353	CUCCAUCAGUGGCGAUCU CTT	111 0	GAGAUCGCCACUGAUGGA GTT	111 1
1338	1338-1356	CAUCAGUGGCGAUCUCCA CTT	111 2	GUGGAGAUCGCCACUGAU GTT	111 3
1344	1344-1362	UGGCGAUCUCCACAUCU GTT	111 4	CAGGAUGUGGAGAUCGCC ATT	111 5
1345	1345-1363	GGCGAUCUCCACAUCUG CTT	111 6	GCAGGAUGUGGAGAUCGC CTT	111 7

【 0 6 0 2】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 4】

1346	1346-1364	GCGAUCUCCACAUCUGC CTT	111 8	GGCAGGAUGUGGAGAUC GCTT	111 9
1347	1347-1365	CGAUCUCCACAUCUGCC GTT	112 0	CGGCAGGAUGUGGAGAUC GTT	112 1
1348	1348-1366	GAUCUCCACAUCUGCCG GTT	112 2	CCGGCAGGAUGUGGAGAU CTT	112 3
1353	1353-1371	CCACAUCUGCCGGUGGC ATT	112 4	UGCCACCGGCAGGAUGUG GTT	112 5
1354	1354-1372	CACAUCUGCCGGUGGCA UTT	112 6	AUGCCACCGGCAGGAUGU GTT	112 7
1355	1355-1373	ACAUCUGCCGGUGGCAU UTT	112 8	AAUGCCACCGGCAGGAUG UTT	112 9
1357	1357-1375	AUCUGCCGGUGGCAUUU ATT	113 0	UAAAUGCCACCGGCAGGA UTT	113 1
1360	1360-1378	CUGCCGGUGGCAUUUAGG GTT	113 2	CCCUAAAUGCCACCGGCA GTT	113 3
1361	1361-1379	UGCCGGUGGCAUUUAGGG GTT	113 4	CCCCAAAUGCCACCGGC ATT	113 5
1362	1362-1380	GCCGGUGGCAUUUAGGGG UTT	113 6	ACCCCUAAAUGCCACCGG CTT	113 7
1363	1363-1381	CCGGUGGCAUUUAGGGGU GTT	113 8	CACCCUAAAUGCCACCG GTT	113 9
1366	1366-1384	GUGGCAUUUAGGGGUGAC UTT	114 0	AGUCACCCCUAAAUGCCA CTT	114 1
1369	1369-1387	GCAUUUAGGGGUGACUCC UTT	114 2	AGGAGUCACCCCUAAAUG CTT	114 3
1370	1370-1388	CAUUUAGGGGUGACUCCU UTT	114 4	AAGGAGUCACCCCUAAA GTT	114 5
1371	1371-1389	AUUUAGGGGUGACUCCUU CTT	114 6	GAAGGAGUCACCCCUAAA UTT	114 7
1372	1372-1390	UUUAGGGGUGACUCCUUC ATT	114 8	UGAAGGAGUCACCCCUAA ATT	114 9
1373	1373-1391	UUAGGGGUGACUCCUUCA CTT	115 0	GUGAAGGAGUCACCCCUA ATT	115 1
1374	1374-1392	UAGGGGUGACUCCUUCAC ATT	115 2	UGUGAAGGAGUCACCCCU ATT	115 3
1404	1404-1422	UCUGGAUCCACAGGAACU GTT	115 4	CAGUCCUGUGGAUCCAG ATT	115 5
1408	1408-1426	GAUCCACAGGAACUGGAU ATT	115 6	UAUCCAGUCCUGUGGAU CTT	115 7
1409	1409-1427	AUCCACAGGAACUGGAUA UTT	115 8	AUAUCCAGUCCUGUGGA UTT	115 9
1411	1411-1429	CCACAGGAACUGGAUAUU CTT	116 0	GAAUAUCCAGUCCUGUG GTT	116 1
1412	1412-1430	CACAGGAACUGGAUAUUC UTT	116 2	AGAAUAUCCAGUCCUGU GTT	116 3
1419	1419-1437	ACUGGAUAUUCUGAAAAC CTT	116 4	GGUUUUCAGAAUAUCCAG UTT	116 5
1426	1426-1444	AUUCUGAAAACCGUAAAG GTT	116 6	CCUUUACGGUUUUCAGAA UTT	116 7
1427	1427-1445	UUCUGAAAACCGUAAAGG ATT	116 8	UCCUUUACGGUUUUCAGA ATT	116 9
1430	1430-1448	UGAAAACCGUAAAGGAAA UTT	117 0	AUUUCCUUUACGGUUUUC ATT	117 1

【0 6 0 3】

【表 5 - 1 5】

1431	1431-1449	GAAAACCGUAAAGGAAAU CTT	117 2	GAUUUCCUUUACGGUUUU CTT	117 3
------	-----------	---------------------------	----------	---------------------------	----------

【0 6 0 4】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5. AR 標的配列

ID	コード	標的配列	SEQ ID NO:	NM_000044.3	エクソン	種
XD-01817K1	17	CAAAGGUUCUCUGCUAGACGACA	1174	1987-2005	1	h
XD-01827K1	27	UCUGGGUGUCACUAUGGAGCUCU	1175	2819-2837	2	h
XD-01828K1	28	CUGGGUGUCACUAUGGAGCUCUC	1176	2820-2838	2	h
XD-01829K1	29	GGGUGUCACUAUGGAGCUCUCAC	1177	2822-2840	2	h
XD-01821K1	21	UACUACAACUUUCCACUGGCUCU	1178	2207-2225	1	h
XD-01825K1	25	AAGCUUCUGGGUGUCACUAUGGA	1179	2814-2832	2	h, m
XD-01826K1	26	CUUCUGGGUGUCACUAUGGAGCU	1180	2817-2835	2	h

10

【0605】

20

【表 7】

表 6. β -カテニン 標的配列

R #	一般名	遺伝子	標的配列			
R-1146	1797mf m	CTNNB1	CUGUUGGAUUGAU UCGAAAUU	SEQ ID NO: 1181	UUUCGAAUCAAUCCA ACAGUU	SEQ ID NO: 1182
R-1147	1870mf m	CTNNB1	ACGACUAGUUCAG UUGCUUUU	SEQ ID NO: 1183	AAGCAACUGAACUA GUCGUUU	SEQ ID NO: 1184

30

【0606】

40

50

【表 8】

表 7. PIK3CA* および PIK3CB* 標的配列

遺伝子 記号	遺伝 子 ID	名称	標的配列 (97-量体)	SEQ ID NO:
PIK3C A	5290	PIK3CA _1746	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGCTCAAAGCAATT TCTACATAGTGAAGCCACAGATGTATGTAGAAAT TGCTTTGAGCTGTTGCCTACTGCCTCGGA	1185
PIK3C A	5290	PIK3CA _2328	TGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGGATGAAACACAA AAGGTATAGTGAAGCCACAGATGTATACCTTTTG TGTTTCATCCTTCTGCCTACTGCCTCGGA	1186
PIK3C A	5290	PIK3CA _2522	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCATGTCAGAGTTACT GTTTCATAGTGAAGCCACAGATGTATGAAACAGT AACTCTGACATGATGCCTACTGCCTCGGA	1187
PIK3C A	5290	PIK3CA _3555	TGCTGTTGACAGTGAGCGCAACTAGTTCATTTCAA AATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATTTTGAA ATGAACTAGTTTTGCCTACTGCCTCGGA	1188
PIK3C A	5290	PIK3CA _3484	TGCTGTTGACAGTGAGCGCACAGCAAGAACAGAA ATAAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTTATTTCT GTTCTTGCTGTATGCCTACTGCCTCGGA	1189
PIK3CB	5291	PIK3CB _862	TGCTGTTGACAGTGAGCGACAAGATCAAGAAAAT GTATGATAGTGAAGCCACAGATGTATCATACATT TTCTTGATCTTGCTGCCTACTGCCTCGGA	1190
PIK3CB	5291	PIK3CB _183	TGCTGTTGACAGTGAGCGCAGCAAGTTCACAATT ACCCAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGGGTAAT TGTGAACTTGCTTTGCCTACTGCCTCGGA	1191
PIK3CB	5291	PIK3CB _1520	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCCTTCGATAAGATT ATTGAATAGTGAAGCCACAGATGTATTCAATAAT CTTATCGAAGGGATGCCTACTGCCTCGGA	1192
PIK3CB	5291	PIK3CB _272	TGCTGTTGACAGTGAGCGAGAGCTTGAAGATGAA ACACGATAGTGAAGCCACAGATGTATCGTGTTC ATCTTCAAGCTCCTGCCTACTGCCTCGGA	1193
PIK3CB	5291	PIK3CB _948	TGCTGTTGACAGTGAGCGACACCAAAGAAAACAC GAATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATTCGTG TTTTCTTTGGTGGTGCCTACTGCCTCGGA	1194

*種はヒトである。

【 0 6 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 8. PIK3CA および PIK3CB siRNA 配列

遺伝子 記号	遺伝 子 ID	名称	siRNA ガイド	SEQ ID NO:	siRNA パッセンジャー	SEQ ID NO:
PIK3CA	5290	PIK3CA_ 1746	UGUAGAAAUUGCUU UGAGCUGU	1195	AGCUCAAAGCAAUU UCUACAUA	1196
PIK3CA	5290	PIK3CA_ 2328	UACCUUUUGUGUUU CAUCCUUC	1197	AGGAUGAAACACAA AAGGUUAU	1198
PIK3CA	5290	PIK3CA_ 2522	UGAAACAGUAAACUC UGACAUGA	1199	AUGUCAGAGUUACU GUUUCAUA	1200
PIK3CA	5290	PIK3CA_ 3555	UAAUUUUGAAAUGA ACUAGUUU	1201	ACUAGUUCAUUUCA AAAUUAUA	1202
PIK3CA	5290	PIK3CA_ 3484	UUUUUUUUCUGUUC UUGCUGUA	1203	CAGCAAGAACAGAA AUAAAAUA	1204
PIK3CB	5291	PIK3CB_ 862	UCAUACAUUUUCUU GAUCUUGC	1205	AAGAUCAAGAAAAU GUAUGAUA	1206
PIK3CB	5291	PIK3CB_ 183	UUGGGUAAUUGUGA ACUUGCUU	1207	GCAAGUUCACAAUU ACCCAAUA	1208
PIK3CB	5291	PIK3CB_ 1520	UUCAAUAAUCUUAU CGAAGGGA	1209	CCUUCGAUAAGAUU AUUGAAUA	1210
PIK3CB	5291	PIK3CB_ 272	UCGUGUUUCAUCUU CAAGCUCC	1211	AGCUUGAAGAUGAA ACACGAUA	1212
PIK3CB	5291	PIK3CB_ 948	UAAUUCGUGUUUUC UUUGGUGG	1213	ACCAAAGAAAACAC GAAUUUAUA	1214

【 0 6 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 9. 追加のポリ核酸分子配列

	塩基開始位置	ガイド鎖	SEQ ID NO:	パッセンジャー鎖	SEQ ID NO:
EGFR R1246	333	ACUCGUGCCUUGGCAA ACUUU	1215	AGUUUGCCAAGGCACGA GUUU	1216
EGFR R1195	333	ACUCGUGCCUUGGCAA ACUUU	1217	AGUUUGCCAAGGCACGA GUUU	1218
EGFR R1449	333	ACUCGUGCCUUGGCAA ACUUU	1219	AGUUUGCCAAGGCACGA GUUU	1220
KRAS R1450	237	UGAAUUAGCUGUAUC GUCAUU	1221	TGACGAUACAGCUAAUU CAUU	1222
KRAS R1443	237	UGAAUUAGCUGUAUC GUCAUU	1223	UGACGAUACAGCUAAUU CAUU	1224
KRAS R1194	237	UGAAUUAGCUGUAUC GUCAUU	1225	UGACGAUACAGCUAAUU CAUU	1226
CTNNB1 R1442	1248	UAAGUAUAGGUCCUC AUUAUU	1227	UAAUGAGGACCUAUACU UAUU	1228
CTNNB1 R1404	1797	TUUCGAAUCAAUCCAA CAGUU	1229	CUGUUGGAUUGAUUCGA AAUU	1230
CTNNB1 R1441	1797	UUUCGAAUCAAUCCAA CAGUU	1231	CUGUUGGAUUGAUUCGA AAUU	1232
CTNNB1 R1523	1797	UUUCGAAUCAAUCCAA CAGUU	1233	CUGUUGGAUUGAUUCGA AAUU	1234
HPRT R1492	425	AUAAAAUCUACAGUC AUAGUU	1235	CUAUGACUGUAGAUUUU AUUU	1236
HPRT R1526	425	UUAAAAUCUACAGUC AUAGUU	1237	CUAUGACUGUAGAUUUU AAUU	1238
HPRT R1527	425	UUAAAAUCUACAGUC AUAGUU	1239	CUAUGACUGUAGAUUUU AAUU	1240
AR R1245	2822	GAGAGCUCCAUAUGUG ACACUU	1241	GUGUCACUAUGGAGCUC UCUU	1242

【0609】

実施例 2. 一般的な実験プロトコル

s i R N A の定量化のためのステムループ q P C R アッセイ

【0610】

血漿サンプルを T E 緩衝液において直接希釈する。50 mg の組織断片を、F a s t P r e p - 2 4 組織ホモジナイザー (M P B i o m e d i c a l s) を使用して、1 mL の T r i z o l において均質化し、その後、T E 緩衝液で希釈した。未処置の動物の血漿あるいは均質化された組織へと s i R N A をスパイクし、その後、連続的に T E 緩衝液で希釈することによって、標準曲線を生成する。s i R N A のアンチセンス鎖を、25 nM の配列に特異的なステムループ R T プライマーを用いる T a q M a n M i c r o R N A 逆転写キットを使用して、逆転写した。R T 工程からの c D N A を、1.5 μM のフォワードプライマー、0.75 μM のリバースプライマー、および 0.2 μM のプローブを有する T a q M a n F a s t A d v a n c e d M a s t e r M i x (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用したリアルタイム P C R に利用する。V i i a 7 リアルタイム P C R システム (L i f e T e c h n o l o g i e s) で標準的サイクリング条件を使用して、定量的 P C R 反応を実施する。標準曲線から導出された一次方程式を使用して、C t 値を血漿または組織中濃度に変換する。

【0611】

m R N A ノックダウンの決定のための比較 q P C R アッセイ

【0612】

組織サンプルを上に記載されるようにTrizolにおいて均質化する。RNeasy RNA単離96ウェルプレート (Qiagen) を使用して全RNAを単離し、その後、High Capacity RNA to cDNA kit (ThermoFisher) を用いて500ngのRNAを逆転写する。ViiA 7リアルタイムPCRシステムを用いて実行されたTaqMan qPCR分析によって、KRAS、EGFR、CTNNB1、およびPPIBのmRNAの量を定量化する。EGFRおよびCTNNB1のTaqManプライマーならびにプローブを、事前検証済みの遺伝子発現アッセイとしてApplied Biosystemsから購入する。PPIB (ハウスキーピング遺伝子) を内部RNAローディングコントロールとして使用し、PPIBのためのすべてのTaqManプライマーおよびプローブは、事前検証済みの遺伝子発現アッセイとしてApplied Biosystemsから購入した。比較Ct方法によって結果を計算し、ここで、標的遺伝子 (KRAS、CTNNB1、あるいはEGFR) のCt値とPPIBのCt値 (ΔCt) の間の差を計算し、その後、第2の差 ($\Delta \Delta Ct$) をとることによって、PBS対照群に対してさらに正規化する。

【0613】

動物

【0614】

動物研究は、USDA Animal Welfare Actならびに“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”で概説された規則を厳守する、Explora BioLabsのInstitutional Animal Care and Use Committee (IACUC) に基づくプロトコルに従って行われた。マウスはすべてCharles River LaboratoriesまたはHarlan Laboratoriesのいずれかから入手した。

【0615】

H358、HCC827、およびHep-3B2の1-7の皮下側腹部腫瘍モデル

【0616】

H358皮下側腹部腫瘍モデルについては、腫瘍細胞を接種させ、腫瘍を以下の方法に従って確立する。雌のNCr nu/nuマウスを細胞注射の前日に耳標によって識別する。接種前にマウスの体重を測る。H358細胞を10%のFBS/RPMI培地を用いて培養し、0.05%のトリプシンおよびCell Stripper (Mediatech) で収集した。Matrigel (1:1) を有する0.05mlのハンス液 (HBSS) 中の500万のH358細胞を、各マウスの右上腹部に皮下注射する (SC)。接種後7日目から開始して、平均腫瘍体積が $>100 \text{ mm}^3$ に達するまで週2回、デジタルキャリパーを使用した腫瘍体積測定によって、腫瘍成長をモニタリングする。腫瘍が所望の体積 (平均 $100 \sim 300 \text{ mm}^3$) になると、動物を無作為化し、非常に大きいまたは小さい腫瘍を有するマウスを選別する。マウスを必要な群に分けて、腫瘍体積によって無作為化する。その後、個々の実験で記載されるようにマウスを処置する。

【0617】

Hep3Bの直交異方性肝腫瘍モデルについては、腫瘍細胞を接種させ、腫瘍を以下の方法で確立する。前日に雌のNCr nu/nuマウスを耳標によって識別し、イソフルランを用いて麻酔をかける。その後、マウスを、体温を維持するために水循環加熱パッド上に置いた。胸骨下に小さな横切開を行い、肝臓を露出させる。28のゲージ針を使用して、肝臓の左上葉に癌細胞をゆっくり注入する。細胞を30度の角度で肝臓に注入し、それにより、細胞の透明な水疱を肝臓カプセルを通して見ることができる。冷たいPBS ($0.1 - 5 \times 10^6$ 細胞) を懸濁し、希釈したマトリゲル (PBS中30x) と混合することにより、Hep3B2.1-7細胞を調製する。30-50ulの細胞/マトリゲルを接種させる。注射後、滅菌ガーゼの小さな1片を注入箇所置き、出血を防ぐために1分間軽く圧を加えた。その後、腹部を6-0絹縫合で閉じる。腫瘍細胞の移植後に、動物を暖かいケージに入れ、1-2時間観察し、麻酔から完全に回復した後に動物飼育室に戻

す。腫瘍移植の7-10日後に動物を無作為化し、必要な群に分け、その後、個々の実験で記載されるように処置した。

【0618】

LNCaPの皮下側腹部腫瘍モデル

【0619】

LNCaP細胞(ATCC(登録商標)CRL-1740(商標))を、約80%の培養密度まで、非必須アミノ酸およびピルビン酸ナトリウムで捕捉されたRPMI+10%のFBSにおいて成長させる。細胞をマトリゲルと1:1で混合し、 $5-7 \times 10^6$ 細胞を雄のSCIDマウス(6-8週齢)に皮下注射した。腫瘍は、通常、3-5週間内に100-350mm³のサイズに成長する。この範囲内の腫瘍を有する動物を無作為化し、尾静脈への注射によりASCで処置する。PD試験のために、動物を注射の96時間後に

10

殺し、臓器の断片を収集して、重さを測り、液体窒素で冷凍する。RNA単離のために、臓器サンプルをTrizolにおいて均質化し、メーカーの説明書に従って、Qiagen RNeasy 96 Plus kitを使用してRNAを調製する。RNA濃度を分光学的に決定する。ΔΔCT方法および検証済みTaqmanアッセイ(Thermo fisher)を使用したqPCRによって定量化された特異的標的の逆転写および発現により、RNAをcDNAに変換する。サンプルを、PPIBの発現レベルに標準化する。

【0620】

ペプチド合成

【0621】

標準Fmoc化学を使用して、ペプチドを固体相上で合成する。両方のペプチドはN末端にシステインを有しており、および、切断されたペプチドをHPLCにより精製し、質量分析法で確認する。INF7ペプチドは、SEQ ID NO: 2055に示される通りである。メリチンペプチドは、SEQ ID NO: 2060に示される通りである。

20

【0622】

抗EGFR抗体

【0623】

抗EGFR抗体は、ヒト表皮成長因子受容体(EGFR)に対する完全なヒトIgG1κモノクローナル抗体である。これは、チャイニーズハムスター卵巢細胞株DJT33において産出され、ハイブリドーマ細胞株(2F8)を産出するヒト抗EGFR抗体由来の抗体遺伝子を運ぶGSベクターでのトランスフェクションによって、CHO細胞株CHO-K1SVから導かれたものである。標準の哺乳動物細胞の培養および精製の技術が、抗EGFR抗体の製造に利用される。

30

【0624】

グリカンのない抗EGFR抗体の理論上の分子量(MW)は146.6kDaである。上記抗体の主要なグリコシル化されたアイソフォームの実験的なMWは、質量分析法によって判定されるように149kDaである。還元条件下でSDS-PAGEを使用することにより、軽鎖のMWがおよそ25kDaであり、重鎖のMWがおよそ50kDaであることが分かった。重鎖は2つの鎖間のジスルフィド結合によって互いに結合され、1つの軽鎖は単一の鎖間のジスルフィド結合によって各重鎖に付けられる。軽鎖には2つの鎖間のジスルフィド結合があり、重鎖には4つの鎖間のジスルフィド結合がある。上記抗体は、N-アセチルグルコサミン、マンノース、フコース、およびガラクトースから成るグリカンを持つ重鎖のAsn305にて、N-結合されてグリコシル化される。存在する主なグリカンは、末端ガラクトース残基を1つも含まないか、あるいは1つを含んでいる、フコシル化された二分岐の構造である。

40

【0625】

IgG1κ抗体の荷電されたアイソフォームパターンを、画像化されたキャピラリーIEF、アガロースIEF、および分析的陽イオン交換HPLCを使用して調べた。多数の荷電されたアイソフォームが見られ、主なアイソフォームはおよそ8.7の等電点を持つ。

【0626】

50

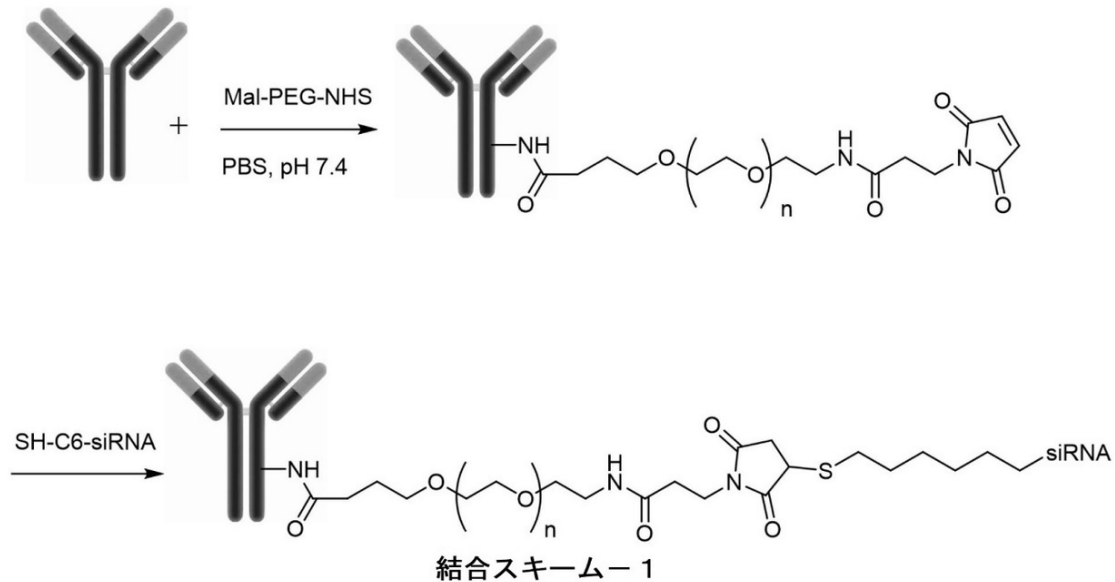
抗EGFR抗体は、EGFRリン酸化の濃縮依存性阻害である。加えて、低い抗体濃度での抗体依存性細胞性細胞毒性（ADCC）の誘導を、前臨床的細胞のインビトロでの研究において観察した。

【0627】

実施例3：抗体-PEG-EGFRおよび抗体-EGFR抱合体の合成、精製、ならびに分析。

【0628】

【化92】



【0629】

工程1：マレイミド-PEG-NHSとの抗体結合、その後の、SH-EGFRとの抗体結合

【0630】

抗EGFR抗体（EGFR-Ab）を、1Xリン酸緩衝液（pH 7.4）と交換し、最大で5mg/mlの濃度にする。この溶液に、2当量のSMCCリンカーあるいはマレイミド-PEGxkDa-NHS（x=1、5、10、20）を加え、室温で4時間回転させる。未反応のマレイミド-PEGを、50kDa MWCO AmiconスピンフィルターおよびPBS pH 7.4を使用する回転濾過によって除去する。抗体-PEGMal抱合体を集めて、反応容器に移す。SH-C6-EGFR（2当量）をPBS中の抗体-PEGマレイミドに室温で加え、夜通し回転させた。反応混合物を分析的SAXカラムクロマトグラフィーにより分析し、未反応の抗体およびsiRNAと共に抱合体が見られる。

【0631】

工程2：精製

【0632】

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-1を使用するAKTA explorer FPLCによって精製する。抗体-PEG-EGFR抱合体を含む画分をプールし、濃縮し、PBS（pH 7.4）と緩衝液交換する。SMCCリンカー、PEG 1kDa、PEG 5kDa、およびPEG 10kDaを含む抗体siRNA抱合体を、siRNA負荷に基づいて分離する。

【0633】

工程3：精製された抱合体の分析。単離した抱合体を、質量スペクトルまたはSDS-PAGEのいずれかによって特徴付ける。抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフ

イー法－２または陰イオン交換クロマトグラフィー法－３の何れかを使用する分析的ＨＰＬＣによって評価する。

【０６３４】

陰イオン交換クロマトグラフィー法－１。

１． カラム：Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＴＳＫ Ｇｅｌ Ｓｕｐｅｒ Ｑ－５ Ｐ
Ｗ， ２１．５ ｍｍ ＩＤ × １５ ｃｍ， １３ ｕｍ

２． 溶媒Ａ：２０ ｍＭのＴＲＩＳ緩衝液、ｐＨ ８．０；溶媒Ｂ：２０ ｍＭのＴＲＩＳ
、１．５ ＭのＮａＣｌ、ｐＨ ８．０；流速：６．０ ｍｌ／分

３． 勾配：

a.	% A	% B	カラム体積
b.	１００	０	１．００
c.	６０	４０	１８．００
d.	４０	６０	２．００
e.	４０	６０	５．００
f.	０	１００	２．００
g.	１００	０	２．００

10

【０６３５】

陰イオン交換クロマトグラフィー法－２

１． カラム：Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ＰｒｏＰａｃ（商標） ＳＡＸ－
１０， Ｂｉｏ ＬＣ（商標）， ４ × ２５０ ｍｍ

20

２． 溶媒Ａ：８０％、１０ ｍＭのＴＲＩＳ、ｐＨ ８、２０％のエタノール；溶媒Ｂ：
８０％、１０ ｍＭのＴＲＩＳ、ｐＨ ８、２０％のエタノール、１．５ ＭのＮａＣｌ；流速
：１．０ ｍｌ／分

３． 勾配：

a.	時間	% A	% B
b.	０．０	９０	１０
c.	３．００	９０	１０
d.	１１．００	４０	６０
e.	１３．００	４０	６０
f.	１５．００	９０	１０
g.	２０．００	９０	１０

30

【０６３６】

陰イオン交換クロマトグラフィー法－３

１． カラム：Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ， ＰｒｏＰａｃ（商標） ＳＡＸ
－１０， Ｂｉｏ ＬＣ（商標）， ４ × ２５０ ｍｍ

２． 溶媒Ａ：８０％、１０ ｍＭのＴＲＩＳ、ｐＨ ８、２０％のエタノール；溶媒Ｂ：
８０％、１０ ｍＭのＴＲＩＳ、ｐＨ ８、２０％のエタノール、１．５ ＭのＮａＣｌ

３． 流速：０．７５ ｍｌ／分

４． 勾配：

a.	時間	% A	% B
b.	０．０	９０	１０
c.	３．００	９０	１０
d.	１１．００	４０	６０
e.	２３．００	４０	６０
f.	２５．００	９０	１０
g.	３０．００	９０	１０

40

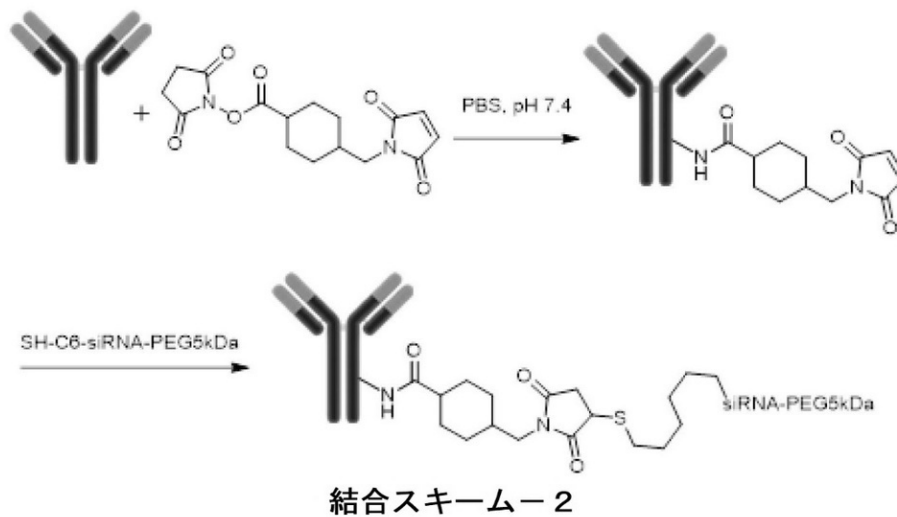
【０６３７】

実施例４：抗体－ｓｉＲＮＡ－ＰＥＧ抱合体の合成、精製、および分析

【０６３８】

50

【化 9 3】



10

【 0 6 3 9】

工程 1：SMCC リンカーとの、その後の SH-KRAS-PEG 5 kDa との抗体抱合

20

【 0 6 4 0】

抗 EGFR 抗体を 1 X リン酸緩衝液 (pH 7.4) と交換し、最大で 5 mg/ml の濃度にする。この溶液に、2 当量の SMCC リンカー (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-カルキシレート) を加え、室温で 4 時間回転させる。未反応の SMCC リンカーを、50 kDa MWCO Amicon スピニフィルターおよび PBS 緩衝液 (pH 7.4) を使用する回転濾過によって除去する。残余分を集めて、2 当量の SH-C6-KRAS-PEG 5 kDa を室温で加え、夜通し回転させる。反応混合物を分析的 SAX カラムクロマトグラフィーによって分析する。

【 0 6 4 1】

工程 2：精製

30

【 0 6 4 2】

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-1 を使用する AKTA explorer FPLC によって精製する。抗体-KRAS-PEG 抱合体を含む画分をプールし、濃縮し、PBS (pH 7.4) と緩衝液交換した。

【 0 6 4 3】

工程 3：精製された抱合体の分析

単離した抱合体を、質量スペクトルまたは SDS-PAGE のいずれかによって特徴付ける。抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-3 (実施例 1 に記載される) を使用する分析的 HPLC によって評価する。

【 0 6 4 4】

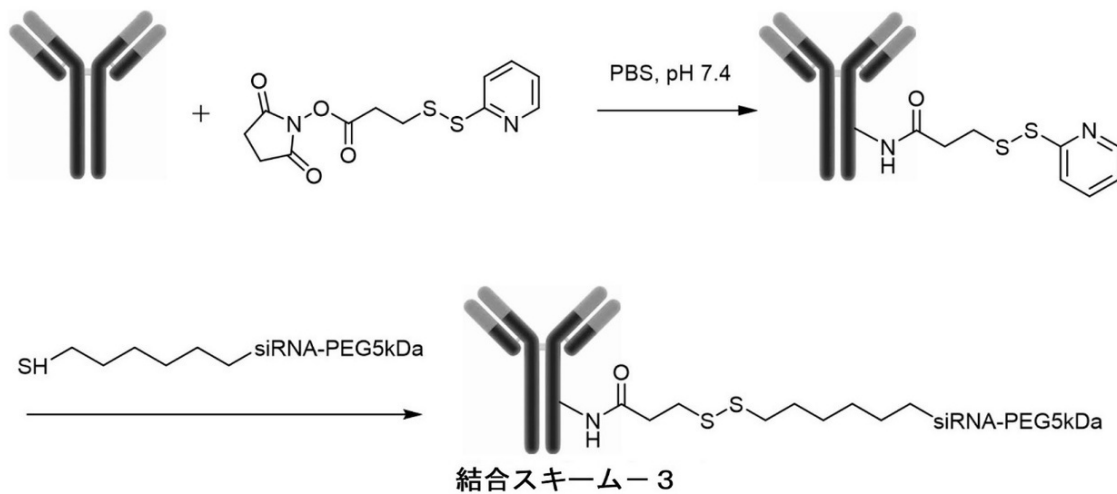
40

実施例 5：抗体-S-S-siRNA-PEG 抱合体の合成、精製、および分析

【 0 6 4 5】

50

【化 9 4】



10

【0 6 4 6】

工程 1：SPDP リンカーとの、その後の SH-siRNA-PEG5kDa との抗体
 抱合

20

【0 6 4 7】

抗EGFR抗体を1Xリン酸緩衝液(pH7.4)と交換し、最大で5mg/mlの濃度にする。この溶液に、2当量のSPDPリンカー(スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート)を加え、室温で4時間回転させる。未反応のSPDPリンカーを、50kDaのMWCO AmiconスピンフィルターおよびpH7.4のPBS緩衝液を使用する回転濾過によって除去する。残余分を集めて、2当量のSH-C6-siRNA-PEG5kDaを室温に加え、夜通し回転させる。反応混合物を分析的SAXカラムクロマトグラフィーによって分析し、未反応の抗体と共に結合することが判定された。

30

【0 6 4 8】

工程 2：精製

【0 6 4 9】

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-1を使用するAKTA explorer FPLCによって精製する。抗体-PEG-siRNA抱合体を含む画分をプールし、濃縮し、PBS(pH7.4)と緩衝液交換する。

【0 6 5 0】

工程 3：精製された抱合体の分析

単離した抱合体を、質量スペクトルまたはSDS-PAGEのいずれかによって特徴付ける。抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-2を使用する分析的HPLCによって評価する。

40

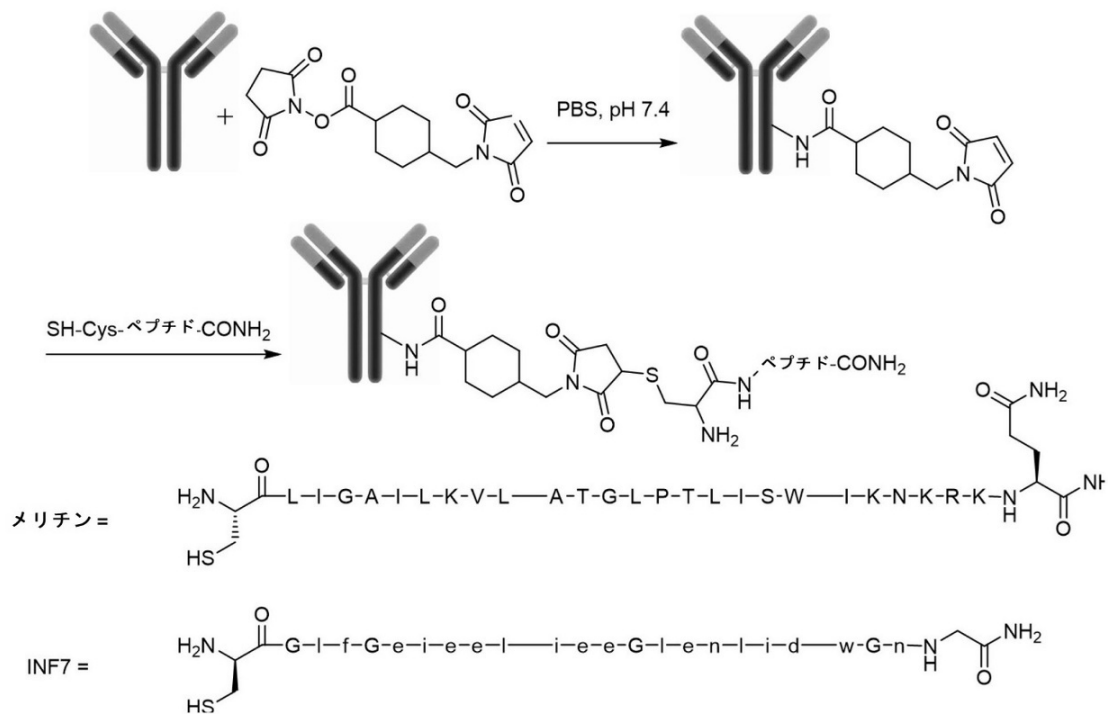
【0 6 5 1】

実施例 6：抗体-SMCC-エンドソームエスケープペプチド抱合体の合成、精製、および分析

【0 6 5 2】

50

【化 9 5】



結合スキームー 4

【0653】

工程 1：SMCC リンカーあるいはマレイミド-PEG-NHS との、その後の SH-Cys-ペプチド-CONH₂ との抗体結合

【0654】

抗 EGF R 抗体を 1 X リン酸緩衝液 (pH 7.4) と交換し、最大で 10 mg/ml の濃度にする。この溶液に、3 当量の SMCC リンカー (スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサノン-1-カルボキシレート) あるいはマレイミド-PEG 1 kDa-NHS を加え、室温で 1.5 時間回転させる。未反応の SMCC リンカーあるいは PEG リンカーを、50 kDa MWCO Amicon スピンフィルターおよび pH 7.4 の PBS 緩衝液 (メリチン抱合体の場合、25 mM の MES pH=6.1) を使用して、回転濾過によって除去する。残余分を集めて、3 当量の SH-Cys-ペプチド-CONH₂ を室温で加え、夜通し回転させる。その後、反応混合物を HIC クロマトグラフィーあるいは陽イオン交換クロマトグラフィーのいずれかによって精製して、抗 EGF R 抗体ペプチドあるいは抗 EGF R 抗体 PEG 1 k ペプチドを単離する。

【0655】

工程 2：精製

【0656】

粗製反応混合物を、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 法-1 あるいは陽イオン交換クロマトグラフィー法-1 のいずれかを使用した AKTA explorer FPLC により精製する。抗体ペプチド抱合体を含有している画分をプールし、濃縮し、および pH 7.4 の PBS (メリチン抱合体の 10 mM のアセテートの場合、pH=6.0) と緩衝液交換する。

【0657】

工程 3：精製された抱合体の分析

単離した抱合体を、質量スペクトルまたは SDS-PAGE のいずれかによって特徴付ける。純度およびペプチド負荷を、HIC 法-2 あるいは陽イオン交換クロマトグラフィー

一法－２のいずれかを使用した分析的ＨＰＬＣによって評価する。

【０６５８】

陽イオン交換クロマトグラフィー法－１

- １． カラム：ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＨｉＰｒｅｐ　ＳＰ　ＨＰ　１６／１０
- ２． 溶媒Ａ：５０ｍＭ　ＭＥＳ　ｐＨ＝６．０；溶媒Ｂ：５０ｍＭのＭＥＳ＋０．５ＭのＮａＣｌ　ｐＨ＝６．０；流速：２．０ｍｌ／分

３． 勾配：

- | a. | % A | % B | カラム体積 |
|----|-----|-----|-----------------|
| b. | 100 | 0 | 0.1 |
| c. | 100 | 0 | Flush loop 12ml |
| d. | 100 | 0 | 2.5 |
| e. | 0 | 100 | 15 |
| f. | 0 | 100 | 5 |
| g. | 100 | 0 | 0.5 |
| h. | 100 | 0 | 5 |

10

【０６５９】

陽イオン交換クロマトグラフィー法－２

- １． カラム：Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，　ＭＡＢＰａｃ（商標）　ＳＣＸ－１０，　Ｂｉｏ　ＬＣ（商標），　４　×　２５０　ｍｍ　（製品＃０７４６２５）
- ２． 溶媒Ａ：２０ｍＭのＭＥＳ　ｐＨ＝５．５；溶媒Ｂ：２０ｍＭのＭＥＳ＋０．３ＭのＮａＣｌ　ｐＨ＝５．５；流速：０．５ｍｌ／分

20

３． 勾配：

- | a. | 時間 | % A | % B |
|----|-----|-----|-----|
| b. | 0.0 | 100 | 0 |
| c. | 5 | 100 | 0 |
| d. | 50 | 0 | 100 |
| e. | 80 | 0 | 100 |
| f. | 85 | 100 | 0 |
| g. | 90 | 100 | 0 |

【０６６０】

疎水性相互作用クロマトグラフィー法－１（ＨＩＣ法－１）

- １． カラム：ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　Ｈｉｇｈ　Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ　（１７－５４３２－０２）　２００ｍｌ
- ２． 溶媒Ａ：５０ｍＭのリン酸ナトリウム＋０．８Ｍの硫酸アンモニウム（ｐＨ＝７．０）；溶媒Ｂ：８０％、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ＝７．０）、２０％のＩＰＡ；流速：３．０ｍｌ／分

３． 勾配：

- | a. | % A | % B | カラム体積 |
|----|-----|-----|-------|
| b. | 100 | 0 | 0.1 |
| c. | 0 | 100 | 3 |
| d. | 0 | 100 | 1.35 |
| e. | 100 | 0 | 0.1 |
| f. | 100 | 0 | 0.5 |

40

【０６６１】

疎水性相互作用クロマトグラフィー法－２（ＨＩＣ方法－２）

- １． カラム：Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ＴＳＫｇｅｌ　Ｂｕｔｙｌ－ＮＰＲ　４．６ｍｍ　ＩＤ　×　１０ｃｍ　２．５　μｍ
- ２． 溶媒Ａ：１００ｍＭのリン酸ナトリウム＋１．８Ｍの硫酸アンモニウム（ｐＨ＝７．０）；溶媒Ｂ：８０％、１００ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ＝７．０）、２０％のＩＰＡ；流速：０．５ｍｌ／分

50

3. 勾配:

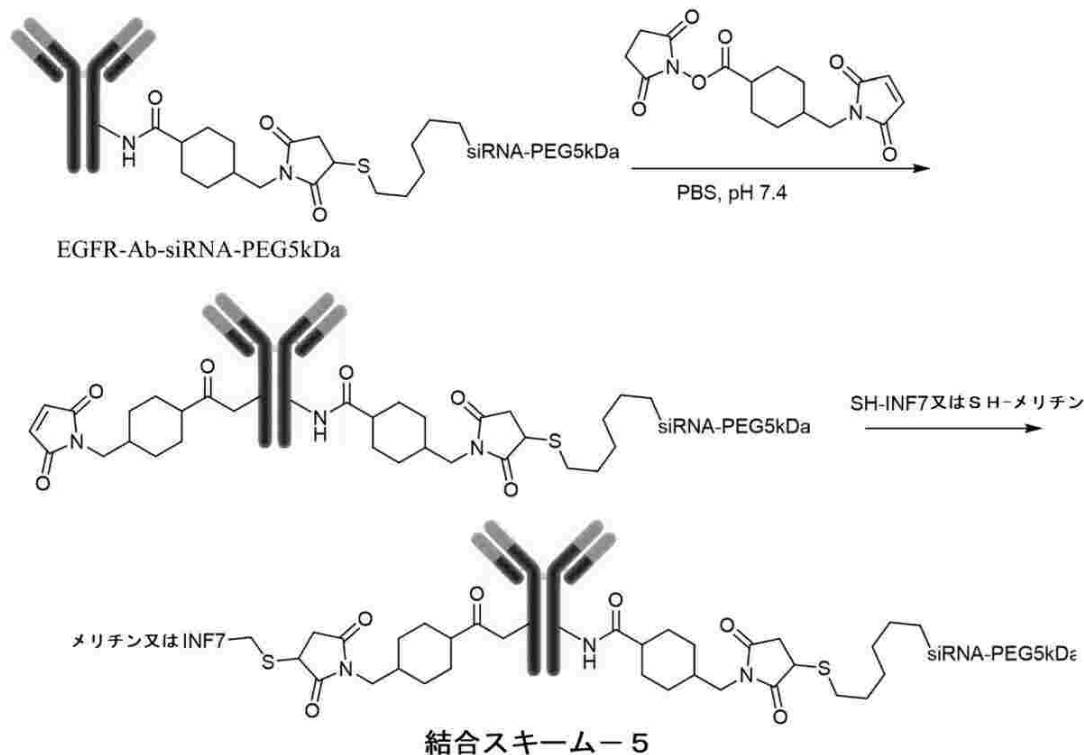
a. 時間	% A	% B
b. 0	100	0
c. 3	50	50
d. 21	0	100
e. 23	0	100
f. 25	100	0

【0662】

実施例7: EEP-抗体-siRNA-PEG抱合体の合成、精製、および分析。

【0663】

【化96】



【0664】

工程1: PEG24リンカーの結合と、その後のSH-Cys-ペプチド-CONH₂のEGFR-Ab-siRNA-PEGへの結合

【0665】

siRNAローディングが1のEGFR-Ab-siRNA-PEG抱合体は、pH7.4のPBS緩衝液中の4当量のPEG1kリンカー（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）と結合し、室温で1.5時間回転させる。未反応のPEG1kリンカーを、50kDa MWCO AmiconスピンフィルターおよびpH7.4のPBS緩衝液を使用する回転濾過によって除去する。残余分を集めて、4当量のSH-Cys-ペプチド-CONH₂を室温に加え、夜通し回転させる。

【0666】

工程2: 精製

【0667】

その後、HPLCによってモニタリングされるように、未反応のペプチドが除去されるまで、pH7.4のPBS緩衝液および50のkDa Amiconスピンフィルターを

使用する回転濾過を繰り返すことによって、反応混合物を精製する。生成物は、0、1、2、3、あるいはそれ以上のペプチドが抗体骨格と結合した抱合体の混合物を含有する。

【0668】

工程3：精製された抱合体の分析

単離した抱合体を、質量スペクトルまたはSDS-PAGEのいずれかによって特徴付ける。抱合体の純度およびペプチド負荷を、HIC法-2あるいは陽イオン交換クロマトグラフィー法-2のいずれかを使用した分析的HPLCによって評価する。

【0669】

実施例8：腫瘍のPK/PD研究

皮下側腹部H358腫瘍を有するメスのNCr nu/nuマウスに、0.5mg/kgでEGFR抗体-siRNA-EEPの抱合体を投与する（siRNAに基づく）。多数のEEP（エンドモリティック部分）を使用して、最適なエンドソームエスケープを示すペプチド配列を判定し、それにより、対照に比べて最良の標的遺伝子のノックダウンがもたらされる。

【0670】

実施例9：ナノ粒子でのABC抱合体の製剤

典型的なABC抱合体を、シクロデキストリンポリマー（10kDa）、および過剰の抱合されていないsiRNA（ED40-60nm、PDI0.1-0.2）を使用して、自己組織化したナノ粒子に包装する。これら粒子において、典型的なABC抱合体は、抗体標的と相互に作用する自身の能力を維持する。インビボでの循環における粒子の安定性および標的結合能力を、包装siRNAの修飾により調節する。

【0671】

ナノ粒子の形成

【0672】

ナノ粒子を、1.6mg/mLの最終のsiRNA濃度で調製する。1:20の比率でCY5-siRNAを含むsiRNAを、水中で2xの最終濃度へと最初に希釈する。シクロデキストリンポリマー（CDP）を、中性のpHの10mMのリン酸緩衝液において3:1の窒素対リンの比率（N:P）を達成するのに必要な2xの最終濃度に希釈する。CDPをsiRNAに素早く加え、ピペッティングによって更に混合する。投与または分析の前に、粒子を少なくとも15分間インキュベートする。

【0673】

インビトロのEGFR結合

【0674】

様々な量の典型的なABC抱合体を含むナノ粒子を、10nMの最終濃度に達するまでウシ胎仔血清に希釈し、150nMの精製されたEGFR-Fcタンパク質（Sino Biological）を充填したプロテインG Dynabeads（ThermoFisher）を用いて室温で1時間インキュベートする。ビーズに結合されたナノ粒子を、0.01%のTween20および100ug/mLのヘパリンを含む水で分裂する前に、0.01%のTween20および0.05%のBSAを含むPBSでビーズを2回洗浄する。インプット（input）、結合されていない分画、洗浄剤、およびビーズ溶出液に含まれるCY5-siRNAの量を、TECAN Infinite M200 Pro（励起635nm；発光675nm）を使用した蛍光によって定量化する。

【0675】

実施例10：siRNA合成

siRNA一本鎖を全て、標準のホスホロアミダイト（phosphoramidite）化学を使用して固相上で完全に組み立てて、HPLCを用いて精製した。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。

【0676】

例11-15で使用されたビニルホスホネート修飾ヌクレオチド（化合物3、15、2

10

20

30

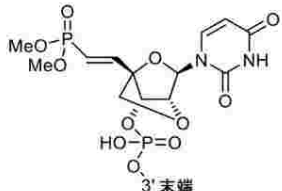
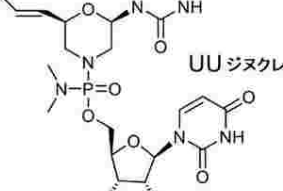
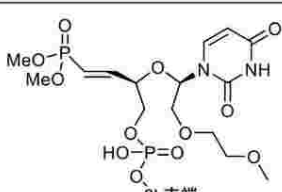
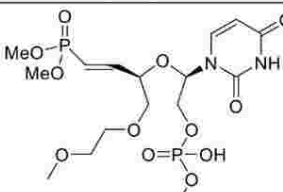
40

50

6、27および28)は以下の表に示される。

【0677】

【表11】

構造	Cmpd #	構造	Cmpd #
	3		28
	15		30
	26		32

【0678】

比較目的のために、化合物3を基準として使用した。

【0679】

化合物15、26、27、28、30および32は、個々のガイド鎖に組み込まれた。

【0680】

化合物28は、ジヌクレオチドとして固相合成中にパッセンジャーの5'末端に組み込まれた。

【0681】

s i R N Aパッセンジャー鎖はすべて、5'末端上にC6-NH₂結合ハンドルを含んでいた。

【0682】

19塩基の相補性および3'ジヌクレオチドオーバーハングを有する21量体の二本鎖の場合、結合ハンドルは、逆脱塩基ホスホジエステルを介してs i R N Aパッセンジャー鎖に結合された(図1Aを参照)。

【0683】

19塩基の相補性および1つの3'ジヌクレオチドオーバーハングを有する平滑末端二本鎖の場合、結合ハンドルは、末端塩基上のホスホジエステルを介してs i R N Aパッセンジャー鎖に結合された(図1Bを参照)。

【0684】

精製された一本鎖を二重にし、二本鎖 *siRNA* を得た。

【0685】

実施例 11. HCT116 細胞におけるビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造のインビトロの活性

siRNA の設計および合成：21 量体の HPRT ガイド鎖はマウス HPRT に対して設計された。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、UUAAAAUCUACAGUCAUAGUUであった。

【0686】

ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造（化合物 3、15 と 27）を組み込む 3 つのバージョンを調製した。ガイド鎖および完全に相補的な RNA パッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLC 上で精製した。RNAi の分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製した一本鎖を二重にし、図 1B に記載される二本鎖の *siRNA* を得た。

【0687】

インビトロの試験：様々な *siRNA* を、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、0.001 nM、および 0.0001 nM の最終濃度で、ヒト結腸直腸癌 HCT116 細胞にトランスフェクトした。メーカーの「フォワードトランスフェクション（forward transfection）」の説明書に従って、*siRNA* を市販のトランスフェクション試薬、Lipofectamine RNAiMAX（Life Technologies）を用いて製剤化した。トランスフェクションの 24 時間前に、細胞を、1 つのウェル当たり 50000 の細胞で 24 のウェル組織培養プレート上に 3 回繰り返し蒔いた。トランスフェクションの 48 時間後に、細胞を PBS で洗浄し、TRIzol（登録商標）試薬（Life Technologies）を用いて収集した。メーカーの説明に従って、RNA を Direct-zol-96 RNA Kit（Zymo Research）を使用して単離した。メーカーの説明に従って、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems）を使用して、10 μl の RNA を cDNA に逆転写した。cDNA サンプルを、TaqMan（登録商標）Fast Advanced Master Mix（Applied Biosystems）を使用して、HPRT 特異的および PPIB 特異的な TaqMan 遺伝子発現プローブ（Thermo Fisher）を用いる qPCR によって評価した。HPRT 値を、各サンプル内で PPIB 遺伝子発現に正規化した。HPRT ダウンレギュレーションの定量化を基準 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法を使用して実施した。全ての実験を 3 回繰り返して実行した。

【0688】

図 2 は、二本鎖のインビトロのトランスフェクション後の、HPRT *siRNA* のガイド鎖上の新規なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を RISC にロードし、標的の HPRT 遺伝子の配列特異的ダウンレギュレーションを媒介することができることを実証する、用量反応曲線を示す。アナログ（化合物 15 および 27）の活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド（化合物 3）に匹敵した。

【0689】

実施例 12. 横紋筋肉腫細胞におけるビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造のインビトロの活性

siRNA の設計および合成：21 量体のミオスタチン（MSTN）ガイド鎖をヒト MSTN に対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、UUUUUUUUUGUUCUUUGCCUUであった。様々な構造（化合物 3、15、26、27 および 28）を組み込む 5 つのバージョンを調製した。ガイド鎖および完全に相補的な RNA パッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLC 上で精製した。RNAi の分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製した一

本鎖を二重にし、図1Aに記載される二本鎖のsiRNAを得た。

【0690】

インビトロの試験：siRNAの活性を、トランスフェクトされたヒト横紋筋肉腫細胞（SJCRH30、ATCC CRL-2061）において評価した。10%の熱不活性化FBS（Gibco）および10mMのHEPESならびに1mMのピルビン酸ナトリウムで補充したRPMI-1640において、細胞を成長させた。siRNAトランスフェクションについては、24ウェルプレート上に20,000の細胞／ウェルの密度で細胞を蒔き、および、メーカーの「フォワードトランスフェクション（forward transfection）」の説明に従って、Lipofectamine RNAiMAX（Life Technologies）を使用して、様々な濃度のsiRNA（0.0001-100nMの最終濃度）でトランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後に細胞をPBSで洗浄し、300の μ l／ウェルのTRIzol（登録商標）試薬（Life Technologies）を用いて収集した。メーカーの説明に従って、Direct-zol-96 RNA Kit（Zymo Research）を使用してRNAを単離した。メーカーの説明に従って、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems）を使用して、10 μ lのRNAをcDNAに逆転写した。cDNAサンプルを、TaqMan（登録商標）Fast Advanced Master Mix（Applied Biosystems）および $\Delta\Delta C_t$ 方法を使用して、MSTN特異的およびPPIB特異的なTaqMan遺伝子発現プローブ（Thermo Fisher）を用いるqPCRによって評価した。個々の実験を2回あるいは3回実施した。

【0691】

下記の表は、アナログ（化合物15、26、27および28）の最大阻害濃度の半分、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドと比較して達成される最大ノックダウンを示す（化合物3）。

【0692】

【表12】

GSの5'末端上の化合物	3	28	26	15	27
IC50 (pM)	74.0	55.7	86.5	80.3	16.2
Max KD (% 未処置の対照)	87.77	86.51	84.61	85.47	87.24

【0693】

図3は、二本鎖のインビトロのトランスフェクション後の、MSTN siRNAのガイド鎖上の新規なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が、RISCにロードし、標的のMSTN遺伝子の配列特異的ダウンレギュレーションを媒介することができることを示す用量反応曲線を示す。アナログ（化合物15、26、27および28）の活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド（化合物3）に匹敵した。

【0694】

実施例13. 2017-PK-407-WT：siRNAのインビボのトランスフェリンmAb抱合体送達

群1-4については、21量体のHPRTガイド鎖をマウスHPRTに対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、UUAAAUCUACAGUCAUAAGUUであった。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLC上で精製した。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、上記の二本鎖siRNAを得た。ガイド鎖は、化合物3ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を利用した。パッセンジャー鎖は、逆脱塩基ホスホジエステル結合を介して5'末端上に結合ハ

ンドルを有していた（図 1 A を参照）。

【0695】

群 5-8 については、21 量体の H P R T ガイド鎖をマウス H P R T に対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、U U A A A A U C U A C A G U C A U A G U U であった。ガイドおよび完全に相補的な RNA パッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、H P L C 上で精製した。RNA i の分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製した一本鎖を二重にし、図 C に記載される二本鎖の s i RNA を得た。ガイド鎖は、化合物 15 ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を利用した。パッセンジャー鎖は、末端塩基上のホスホジエステル結合を介して 5' 末端上に結合ハンドルを有していた（図 1 B を参照）。

10

【0696】

群 9-12 については、21 量体の H P R T ガイド鎖をマウス H P R T に対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、U U A A A A U C U A C A G U C A U A G U U であった。ガイド鎖および完全に相補的な RNA パッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、H P L C 上で精製した。RNA i の分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、二本鎖 s i RNA を得た。ガイド鎖は、化合物 27 ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を利用した。パッセンジャー鎖は、末端塩基上のホスホジエステル結合を介して 5' 末端上に結合ハンドルを有していた（図 1 B を参照）。

20

【0697】

群 13-16 については、21 量体の M S T N ガイド鎖をヒト M S T N に対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、U U A U U A U U U G U U C U U U G C C U U であった。ガイド鎖および完全に相補的な RNA パッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、H P L C 上で精製した。RNA i の分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、二本鎖 s i RNA を得た。ガイド鎖は、化合物 28 ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を利用した。パッセンジャー鎖は、逆脱塩基ホスホジエステル結合を介して 5' 末端上に結合ハンドルを有していた（図 1 A を参照）。

30

【0698】

群 17-20 については、21 量体の M S T N ガイド鎖をヒト M S T N に対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、U U A U U A U U U G U U C U U U G C C U U であった。ガイド鎖および完全に相補的な RNA パッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、H P L C 上で精製した。RNA i の分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、二本鎖 s i RNA を得た。ガイド鎖は、化合物 3 ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を利用した。パッセンジャー鎖は、逆脱塩基ホスホジエステル結合を介して 5' 末端上に結合ハンドルを有していた（図 1 A を参照）。

40

【0699】

ビスマレイミド（B i s M a l）リンカーを使用する抗体 s i RNA 抱合体の合成

【0700】

工程 1：T C E P での抗体の還元

抗体を、1 mM の D T P A を有する 25 mM のホウ酸塩緩衝液（p H 8）で緩衝液交換し、最大 10 mg / m l の濃度にした。この溶液に、同じホウ酸塩緩衝液中の 4 当量の T C E P を加え、37 ° C で 2 時間インキュベートした。結果として生じた反応混合物を、室温で p H 6.0 の 10 mM の酢酸緩衝液中の B i s M a l - s i RNA（1.25 当量）の溶液と組み合わせて、4 ° C で夜通し維持した。分析的 S A X カラムクロマトグラフ

50

ィーによる反応混合物の分析は、未反応の抗体および s i R N A と共に抗体 s i R N A 抱合体を示した。反応混合物を、10 E Q の N - エチルマレイミド (10 m g / m L の D M S O 中) で処理して、あらゆる残っている遊離システイン残基をキャップする。

【0701】

工程2：精製

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 法-1を使用するAKTA Pure FPLCによって精製した。DAR21およびDAR2 Fab-s i R N A の抱合体を含む分画を単離し、濃縮し、pH7.4のPBSで緩衝液交換した。

陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 法-1

1. カラム：Tosoh Bioscience, TSK Gel Super Q-5PW, 21.5mm ID X 15cm, 13um

2. 溶媒A：20mMのTRIS緩衝液、pH8.0；溶媒B：20mMのTRIS、1.5MのNaCl、pH8.0；流速：6.0ml/分

3. 勾配：

a.	% A	% B	カラム体積
b.	100	0	1
c.	81	19	0.5
d.	50	50	13
e.	40	60	0.5
f.	0	100	0.5
g.	100	0	2

陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 法-2

1. カラム：Thermo Scientific, ProPac (商標) SAX-10, Bio LC (商標), 4 X 250mm

2. 溶媒A：80%、10mMのTRIS、pH8、20%のエタノール；溶媒B：80%、10mMのTRIS、pH8、20%のエタノール、1.5MのNaCl；流速：0.75ml/分

3. 勾配：

a.	時間	% A	% B
b.	0.0		90 10
c.	3.00	90	10
d.	11.00	40	60
e.	14.00	40	60
f.	15.00	20	80
g.	16.00	90	10
h.	20.00	90	10

【0702】

工程3：精製された抱合体の分析

抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-2を使用する分析的HPLCによって評価した。

【0703】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

抱合体	SAX 保持時間 (分)	%純度 (ピーク領域)
TfR-mAb-化合物 3-HPRT DAR 1	9.41	99
TfR-mAb-化合物 15-HPRT DAR 1	8.83	99
TfR-mAb-化合物 27-HPRT DAR 1	8.54	99
TfR-mAb-化合物 28-MSTN DAR 1	8.96	99
TfR-mAb-化合物 3-MSTN DAR 1	9.39	99

【0704】

インビボの試験

インビボの実験（野生型CD-1マウス）で、骨格筋におけるミオスタチン（MSTN）およびHPRTのmRNAダウンレギュレーションを媒介する能力について抱合体を評価した。PBSビヒクル対照および示されたASCならびに用量を、静脈内（iv）注射によりマウスに投与した（下記の表を参照）。168時間後、腓腹筋（gastroc）組織を採取し、液体窒素中で急速冷凍した。比較qPCRアッセイを使用して、標的組織におけるmRNAノックダウンを決定した。総RNAを組織から抽出し、逆転写して、mRNAのレベルを、適切に設計されたプライマーおよびプローブを用いるTaqMan qPCRを使用して定量化した。PPIB（ハウスキープ遺伝子）を内部RNAローディングコントロールとして使用して、比較Ct方法により結果を算出し、ここで、標的遺伝子Ct値とPPIB Ct値（ ΔCt ）との間の差を算出し、その後、第2の差（ $\Delta \Delta Ct$ ）を得ることによってPBSの対照群に対して更に正規化する。

【0705】

【表 1 4】

群	試験物	N	siRNA 用量 (mg/kg)	用量体 積 (mL/kg)	収集時 間 (h)
1	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	3	5.0	168
2	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
3	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
4	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
5	TfR1-mAb-化合物 15-HPRT DAR1	4	3.0	5.0	168
6	TfR1-mAb-化合物 15-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
7	TfR1-mAb-化合物 15-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
8	TfR1-mAb-化合物 15-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
9	TfR1-mAb-化合物 27-HPRT DAR1	4	0.5	5.0	168
10	TfR1-mAb-化合物 27-HPRT DAR1	4	0.5	5.0	168
11	TfR1-mAb-化合物 27-HPRT DAR1	4	0.5	5.0	168
12	TfR1-mAb-化合物 27-HPRT DAR1	4	0.5	5.0	168
13	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
14	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
15	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
16	TfR1-mAb-化合物 28-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
17	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
18	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
19	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
20	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
21	PBS 対照	5		5.0	168

【0706】

図4は、トランスフェリン受容体を標的とする抗TfR mAbに結合した時に、siRNAガイド鎖上のビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が腓腹筋における標的遺伝子の用量依存的ダウンレギュレーションを示したことを示す。アナログの活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造に匹敵した。

【0707】

実施例14. 2017-PK-421-WT: siRNAのインビボのトランスフェリンmAb抱合体送達

【0708】

群1-12については、21量体のMSTNガイド鎖をヒト/マウスMSTNに対して

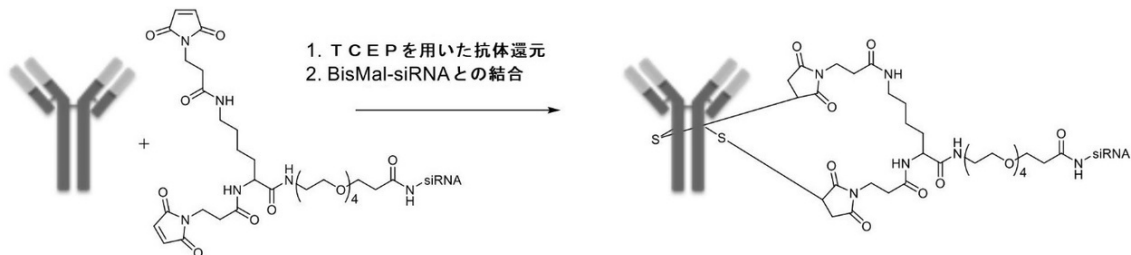
設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUUであった。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLC上で精製した。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、二本鎖siRNAを得た。3つのガイド鎖を5'末端（化合物3、15および26）において3つの様々なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造で生成した。パッセンジャー鎖は、逆脱塩基ホスホジエステル結合を介して5'末端上に結合ハンドルを有していた。

【0709】

以下に記載されるように抗TfR1 mAb-MSTN DAR1抱合体を合成した：

【0710】

【化97】



【0711】

工程1：TCEPでの抗体の還元

抗体を、1mMのDTPAを有する25mMのホウ酸塩緩衝液（pH8）で緩衝液交換し、最大10mg/mlの濃度にした。この溶液に、同じホウ酸塩緩衝液中の4当量のTCEPを加え、37°Cで2時間インキュベートした。結果として生じた反応混合物を、室温での10mMの酢酸緩衝液（pH6）中のBisMal-siRNA（1.25当量）の溶液と組み合わせて、4°Cで夜通し維持した。分析的SAXカラムクロマトグラフィーによる反応混合物の分析は、未反応の抗体およびsiRNAと共に抗体siRNA抱合体を示した。反応混合物を、10EQのN-エチルマレイミド（10mg/mLのDMF中）で処理して、あらゆる残っている遊離システイン残基をキャップした。

【0712】

工程2：精製

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィー（SAX）法-1を使用するAKTA Pure FPLCによって精製した。DAR21およびDAR2 Fab-siRNAの抱合体を含む分画を単離し、濃縮し、pH7.4のPBSで緩衝液交換した。

陰イオン交換クロマトグラフィー（SAX）法-1

1. カラム：Tosoh Bioscience, TSK Gel Super Q-5PW, 21.5mm ID X 15cm, 13um

2. 溶媒A：20mMのTRIS緩衝液、pH8.0；溶媒B：20mMのTRIS、1.5MのNaCl、pH8.0；流速：6.0ml/分

3. 勾配：

a.	% A	% B	カラム体積
b.	100	0	1
c.	81	19	0.5
d.	50	50	13
e.	40	60	0.5
f.	0	100	0.5
g.	100	0	2

陰イオン交換クロマトグラフィー（SAX）法-2

1. カラム：Thermo Scientific, ProPac (商標) SAX-10, Bio LC (商標), 4 X 250mm

2. 溶媒A：80%、10mMのTRIS、pH8、20%のエタノール；溶媒B：80%、10mMのTRIS、pH8、20%のエタノール、1.5MのNaCl；流速：0.75ml/分

3. 勾配：

a. 時間	% A	% B
b. 0.0	90	10
c. 3.00	90	10
d. 11.00	40	60
e. 14.00	40	60
f. 15.00	20	80
g. 16.00	90	10
h. 20.00	90	10

【0713】

工程3：精製された抱合体の分析抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-2を使用する分析的HPLCによって評価した。

【0714】

【表15】

抱合体	SAX 保持時間 (分)	%純度 (ピーク領域)
TfR-化合物 3-MSTN.mff3s DAR 1	8.99	99
TfR-化合物 15-MSTN DAR 1	9.12	99
TfR-化合物 26-MSTN DAR 1	9.09	99

【0715】

インビボの試験

インビボの実験（野生型CD-1マウス）で、骨格筋におけるミオスタチン（MSTN）のmRNAダウンレギュレーションを媒介する能力について抱合体を評価した。下記の表に記載されるように、PBSビヒクル対照および示されたASCならびに用量を、静脈内（iv）注射によりマウスに投与した。168時間後、腓腹筋（gastroc）、大腿四頭筋（quad）および心筋の組織を、液体窒素中で収集し、急速冷凍した。標的組織中のmRNAのノックダウンを、方法のセクションに記載されるように比較qPCRアッセイを使用して判定した。総RNAを組織から抽出し、逆転写して、mRNAのレベルを、適切に設計されたプライマーおよびプローブを用いるTaqMan qPCRを使用して定量化した。PPIB（ハウスキーピング遺伝子）を内部RNAローディングコントロールとして使用して、比較Ct方法により結果を算出し、ここで、標的遺伝子Ct値とPPIB Ct値（ ΔCt ）との間の差を算出し、その後、第2の差（ $\Delta \Delta Ct$ ）を得ることによってPBSの対照群に対して更に正規化する。

【0716】

10

20

30

40

50

【表 16】

群	試験物	N	siRNA 用量 (mg/kg)	用量体 積 (mL/kg)	収集時 間 (h)
1	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	3	5.0	168
2	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	1	5.0	168
3	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	0.3	5.0	168
4	TfR1-mAb-化合物 26-MSTN DAR1	4	0.1	5.0	168
5	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	3.0	5.0	168
6	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	1	5.0	168
7	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	0.3	5.0	168
8	TfR1-mAb-化合物 15-MSTN DAR1	4	0.1	5.0	168
9	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
10	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
11	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
12	TfR1-mAb-化合物 3-MSTN DAR1	4	0.5	5.0	168
13	PBS 対照	5		5.0	168

【0717】

図5は、ガイド鎖の5'末端上に様々なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を含有している抗体siRNA抱合体を用いた腓腹筋(gastroc)、大腿四頭筋(quad)および心筋の組織腓腹筋、大腿四頭筋および心筋の組織におけるMSTN mRNAダウンレギュレーションを実証する。アナログの活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造に匹敵した。

【0718】

実施例15. 2017-PK-422-WT: siRNAのインビボのトランスフェリンmAb抱合体送達

【0719】

群1-4および9-12については、21量体のHPRTガイド鎖をマウスHPRTに対して設計した。ガイド/アンチセンス鎖の配列(5'~3')は、UUAAAAUCUACAGUCAUAGUUであった。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLC上で精製した。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、二本鎖siRNAを得た。ガイド鎖を5'末端において化合物3ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造で生成した。パッセンジャー鎖は、ホスホロチオエート逆脱塩基ホスホジエステルリンカーを介して、5'末端上に結合ハンドルを有していた(図1Aを参照)。

【0720】

群5-8および13-16aについては、21量体のHPRTガイド鎖をマウスHPRTに対して設計した。ガイド/アンチセンス鎖の配列(5'~3')は、UUAAAAUCUACAGUCAUAGUUであった。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジ

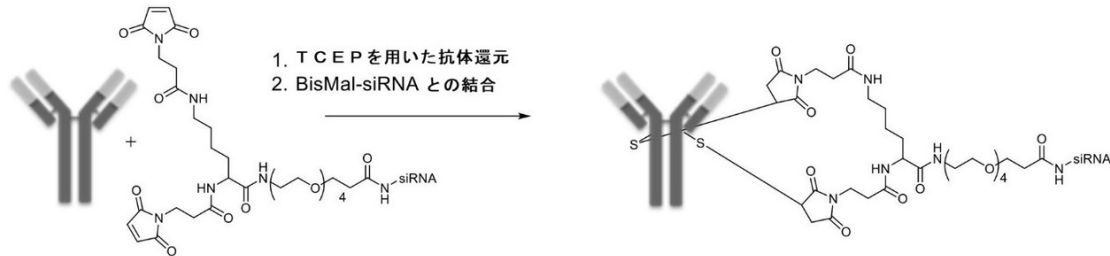
ヤー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLC上で精製した。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、二本鎖siRNAを得た。ガイド鎖を5'末端において化合物26ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造で生成した。パッセンジャー鎖は、末端ホスホロチオエート介して、5'末端上に結合ハンドルを有していた（図1Bを参照）。

【0721】

以下に記載されるように抗TfR1 mAb-HPRT DAR1抱合体を合成した：

【0722】

【化98】



【0723】

工程1：TCEPでの抗体の還元

抗体を、1mMのDTPAを有する25mMのホウ酸塩緩衝液（pH8）で緩衝液交換し、最大10mg/mlの濃度にした。この溶液に、同じホウ酸塩緩衝液中の4当量のTCEPを加え、37°Cで2時間インキュベートした。結果として生じる反応混合物を、室温での10mMの酢酸緩衝液（pH6）中のBisMal-siRNA（1.25当量）の溶液と組み合わせて、4°Cで夜通し維持した。分析的SAXカラムクロマトグラフィーによる反応混合物の分析は、未反応の抗体およびsiRNAと共に抗体siRNA抱合体を示した。10EQのN-エチルマレイミド（10mg/mLのDMSO中）で反応混合物を処理して、あらゆる残っている遊離システイン残基をキャップする。

【0724】

工程2：精製

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィー（SAX）法-1を使用するAKTA Pure FPLCによって精製した。DAR21およびDAR2 Fab-siRNAの抱合体を含む分画を単離し、濃縮し、pH7.4のPBSで緩衝液交換した。陰イオン交換クロマトグラフィー（SAX）法-1

1. カラム：Tosoh Bioscience, TSKGel SuperQ-5PW, 21.5mm ID X 15cm, 13um

2. 溶媒A：20mMのTRIS緩衝液、pH8.0；溶媒B：20mMのTRIS、1.5MのNaCl、pH8.0；流速：6.0ml/分

3. 勾配：

a.	% A	% B	カラム体積
b.	100	0	1
c.	81	19	0.5
d.	50	50	13
e.	40	60	0.5
f.	0	100	0.5

g. 100 0 2

陰イオン交換クロマトグラフィー（SAX）法-2

1. カラム：Thermo Scientific, ProPac（商標）SAX-10, Bio LC（商標），4 X 250mm

10

20

30

40

50

2. 溶媒 A : 80%、10mMのTRIS、pH8、20%のエタノール；溶媒 B : 80%、10mMのTRIS、pH8、20%のエタノール、1.5MのNaCl；流速：0.75ml/分

3. 勾配：

a. 時間	% A	% B
b. 0.0	90	10
c. 3.00	90	10
d. 11.00	40	60
e. 14.00	40	60
f. 15.00	20	80
g. 16.00	90	10
h. 20.00	90	10

【0725】

工程3：精製された抱合体の分析

抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフィー法-2を使用する分析的HPLCによって評価した。

【0726】

【表17】

抱合体	SAX 保持時間 (分)	% 純度 (ピーク領域)
TfR-化合物 3-HPRT DAR 1	9.14	99
TfR-化合物 26-HPRT DAR 1	8.54	99
ASGR-化合物 3-HPRT DAR 1	9.3	99
ASGR-化合物 26-MSTN DAR 1	8.62	99

【0727】

インビボの試験

インビボの実験（野生型CD-1マウス）で、筋肉および肝臓におけるHPRTのmRNAダウンレギュレーションを媒介する能力について抱合体を評価した。下記の表に記載される、PBSビヒクル対照および示されたASCならびに用量を、静脈内（iv）注射によりマウスに投与した。168時間後、腓腹筋（gastroc）組織および肝組織を採取し、液体窒素中で急速冷凍した。標的組織中のmRNAのノックダウンを、方法のセクションに記載されるように比較qPCRアッセイを使用して判定した。総RNAを組織から抽出し、逆転写して、適切に設計されたプライマーおよびプローブを用いるTaqMan qPCRを使用して、mRNAのレベルを定量化した。PPIB（ハウスキーピング遺伝子）を内部RNAローディングコントロールとして使用して、比較Ct方法により結果を算出し、ここで、標的遺伝子Ct値とPPIB Ct値（ ΔCt ）との間の差を算出し、その後、第2の差（ $\Delta \Delta Ct$ ）を得ることによってPBSの対照群に対して更に正規化する。

【0728】

10

20

30

40

50

【表 18】

群	試験物	N	siRNA 用量 (mg/kg)	用量体 積 (mL/kg)	収集時 間 (時間)
1	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
2	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
3	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
4	TfR1-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168
5	TfR1-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
6	TfR1-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
7	TfR1-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
8	TfR1-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168
9	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
10	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
11	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
12	ASGR-mAb-化合物 3-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168
13	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	1	5.0	168
14	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.3	5.0	168
15	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.1	5.0	168
16	ASGR-mAb-化合物 26-HPRT DAR1	4	0.03	5.0	168
17	PBS 対照	5		5.0	168

【0729】

図6は、siRNAガイド鎖上の修飾されたビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が、マウスへのIV投与後に、マウスの肝臓および腓腹筋においてHPRT標的遺伝子の用量依存的なダウンレギュレーションを媒介することができたことを示す。筋肉のトランスフェリン受容体を標的とする抗TfR mAbに結合すると、siRNAは、筋肉におけるHPRTダウンレギュレーションを媒介することができた。肝臓肝細胞のASGR受容体を標的とする抗ASGR mAbに結合すると、siRNAは、肝臓においてHPRT

【0730】

実施例16. HCT116細胞におけるビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造のインビトロの活性

【0731】

siRNAの設計および合成：21量体のSSBガイド鎖をマウスSSBに対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列（5'～3'）は、UUACAUAUAAGUCUGUUGUUUであった。ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造（化合物3、30および32）を組み込む3つのバージョンを作った。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HP

LC上で精製した。ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を、図A3に記載されるアミダイトを使用して組み込んだ。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、上記の二本鎖siRNAを得た。

【0732】

インビトロの試験：様々なsiRNAを、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、0.001nM、および0.0001nMの最終濃度で、ヒト結腸直腸癌HCT116細胞にトランスフェクトした。メーカーの「フォワードトランスフェクション (forward transfection)」の説明書に従って、siRNAsを市販のトランスフェクション試薬、Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いて製剤化した。トランスフェクションの24時間前に、細胞を、1つのウェル当たり50000の細胞で24のウェル組織培養プレート上に3回繰り返し蒔いた。トランスフェクションの48時間後に、細胞をPBSで洗浄し、TRIzol (登録商標) 試薬 (Life Technologies) を用いて収集した。メーカーの説明に従って、RNAをDirect-zol-96 RNA Kit (Zymo Research) を使用して単離した。メーカーの説明に従って、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用して、10μlのRNAをcDNAに逆転写した。cDNAサンプルを、TaqMan (登録商標) Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) を使用して、HPRT特異的およびPPIB特異的なTaqMan遺伝子発現プローブ (Thermo Fisher) を用いるqPCRによって評価した。HPRT値を、各サンプル内でPPIB遺伝子発現に正規化した。HPRTダウンレギュレーションの定量化を基準 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法を使用して実施した。全ての実験を3回繰り返して実行した。

【0733】

EC₅₀値は以下の通りであった：

【0734】

【表19】

サンプル	EC50 (pM)
化合物 3-SSB	4.00
化合物 30-SSB	0.44
化合物 32-SSB	1.46

【0735】

図7は、二本鎖のインビトロのトランスフェクション後の、SSB siRNAのガイド鎖の5'末端上の新規なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が、RISCにロードし、標的のSSB遺伝子の配列特異的ダウンレギュレーションを媒介することができることを実証する、用量反応曲線を示す。アナログ（化合物30および32）の活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造（化合物3）に匹敵した。

【0736】

実施例17．横紋筋肉腫細胞におけるビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造のインビトロの活性

【0737】

siRNAの設計および合成：21量体のミオスタチン (MSTN) ガイド鎖をマウスおよびヒトMSTNに対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列 (5'～3') は、UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUUであった。様々な構造（化合物3、26、

30および32)を組み込む4つのバージョンを調製した。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLCを用いて精製した。ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を、上記のようにアミダイトを使用して組み込んだ。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、上記の二本鎖siRNAを得た。

【0738】

さらに、21量体のSSBガイド鎖をマウスSSBに対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列(5'~3')は、UUACAUUAAAGUCUGUUGUUUであった。異なるビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造(化合物3、30および32)で3つのバージョンを作った。ガイドおよび完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、HPLC上で精製した。ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を、本明細書に記載されるアミダイトを使用して組み込んだ。RNAiの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、上記の二本鎖siRNAを得た。

【0739】

インビトロの試験：siRNAの活性を、トランスフェクトされたヒト横紋筋肉腫細胞(SJCRH30、ATCC CRL-2061)において評価した。10%の熱不活性化FBS(Gibco)および10mMのHEPESならびに1mMのピルビン酸ナトリウムで補充したRPMI-1640において、細胞を成長させた。siRNAトランスフェクションについては、細胞を24ウェルプレート上に20,000の細胞／ウェルの密度で蒔き、および、メーカーの「フォワードトランスフェクション(forward transfection)」の説明に従って、Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies)を使用して、様々な濃度のsiRNA(0.0001-100nMの最終濃度)でトランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後に細胞をPBSで洗浄し、300ul／ウェルのTRIzol(登録商標)試薬(Life Technologies)を用いて収集した。メーカーの説明に従って、RNAをDirect-zol-96 RNA Kit(Zymo Research)を使用して単離した。メーカーの説明に従って、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)を使用して、10ulのRNAをcDNAに逆転写した。cDNAサンプルを、TaqMan(登録商標) Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)およびΔΔCt方法を使用して、MSTN特異的およびPPIB特異的なTaqMan遺伝子発現プローブ(Thermo Fisher)を用いるqPCRによって評価した。個々の実験を2回あるいは3回実施した。

【0740】

図8Aは、二本鎖のインビトロのトランスフェクション後の、MSTN siRNAのガイド鎖の上の新規なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が、RISCにロードし、標的のMSTN遺伝子の配列特異的ダウンレギュレーションを媒介することができることを実証する、用量反応曲線を示す。アナログ(化合物26、30および32)の活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド(化合物3)に匹敵した。

【0741】

図8Bは、二本鎖のインビトロのトランスフェクション後の、SSB siRNAのガイド鎖の上の新規なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が、RISCにロードし、標的のSSB遺伝子の配列特異的ダウンレギュレーションを媒介することができることを示す、用量反応曲線を示す。アナログ(30および32)の活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド(化合物3)に匹敵した。

【0742】

実施例18．ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造のインビトロの活性を、明らか

10

20

30

40

50

に健康なヒト由来の不死化骨格筋芽細胞 (MB) :

【0743】

s i R N A の設計および合成: 21量体のミオスタチン (M S T N) ガイド鎖をマウスおよびヒトM S T Nに対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列 (5' ~ 3') は、U U A U U A U U U G U U C U U U G C C U Uであった。様々なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造 (化合物3、26、30および32) を組み込む4つのバージョンを調製した。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、H P L Cを用いて精製した。ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を、本明細書に記載されるアミダイトを使用して組み込んだ。RNA iの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、上記の二本鎖s i R N Aを得た。

10

【0744】

さらに、21量体のS S Bガイド鎖をマウスS S Bに対して設計した。ガイド／アンチセンス鎖の配列 (5' ~ 3') は、U U A C A U U A A A G U C U G U U G U U Uであった。異なるビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造 (化合物3、30および32) を組み込む3つのバージョンを調製した。ガイド鎖および完全に相補的なRNAパッセンジャー鎖を、標準のホスホロアミダイト化学を使用して固体相上で組み立て、H P L C上で精製した。ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造を、本明細書に記載されるアミダイトを使用して組み込んだ。RNA iの分野で十分に説明されている塩基、糖、およびホスフェートの修飾を使用して、二本鎖の潜在能を最適化し、免疫原性を減らした。精製された一本鎖を二重にし、上記の二本鎖s i R N Aを得た。

20

【0745】

インビトロの試験: s i R N Aの活性を、明らかに健康なヒト由来の不死化骨格筋芽細胞 (MB) (D e n i s F u r l i n g , I n s t i t u t d e M y o l o g i e , F r a n c eから入手) において評価した。MB細胞を完全な骨格筋細胞増殖培地 (P r o m o C e l l) 中で成長させた。トランスフェクションの24時間前に、細胞を、1つのウェル当たり4000 (MB) の細胞で96のウェル組織培養プレート上に3回繰り返し蒔いた。s i R N Aを、50 nM、5.5556 nM、0.6173 nM、0.0686 nM、0.0076 nM、0.0008 nM、および0.0001 nMの最終濃度で、細胞にトランスフェクトした。メーカーの「フォワードトランスフェクション」のプロトコルの説明に従って、s i R N Aを市販のトランスフェクション試薬、L i p o f e c t a m i n e R N A i M A X (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いて製剤化した。トランスフェクションの48時間後に、細胞をP B Sで洗浄し、T R I z o l (登録商標) 試薬 (L i f e T e c h n o l o g i e s) を用いて収集した。メーカーの説明に従って、RNAをD i r e c t - z o l - 96 R N A K i t (Z y m o R e s e a r c h) を使用して単離した。メーカーの説明に従って、H i g h C a p a c i t y c D N A R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n K i t (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用して、10 μ lのRNAをcDNAに逆転写した。cDNAサンプルを、T a q M a n (登録商標) F a s t A d v a n c e d M a s t e r M i x (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用して、S S B特異的、M S T N特異的、およびP P I B特異的なT a q M a n遺伝子発現プローブ (T h e r m o F i s h e r) を用いるq P C Rによって評価した。S S BおよびM S T Nの発現値を、各サンプル内でP P I B遺伝子発現に正規化した。S S BおよびM S T Nダウンレギュレーションの定量化を、基準2 - $\Delta \Delta C t$ 法を使用して実施した。全ての実験を3回繰り返して実行した。

30

40

【0746】

図9Aは、二本鎖のインビトロのトランスフェクション後の、M S T N s i R N Aのガイド鎖の上の新規なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が、R I S Cにロードし、標的のM S T N遺伝子の配列特異的ダウンレギュレーションを媒介することができるこ

50

とを実証する、用量反応曲線を示す。アナログ（化合物 26、30 および 32）の活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド（化合物 3）に匹敵した。

【0747】

図 9B は、二本鎖のインビトロのトランスフェクション後の、SSB siRNA のガイド鎖上の新規なビニルホスホネート修飾ヌクレオチド構造が、RISC にロードし、標的の SSB 遺伝子の配列特異的ダウンレギュレーションを媒介することができることを実証する、用量反応曲線を示す。アナログ（30 および 32）の活性は、標準ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド（化合物 3）に匹敵した。

【0748】

本開示の好ましい実施形態が本明細書中で示され、記載されてきたが、このような実施形態はほんの一例として提供されているに過ぎないということは、当業者に明らかであろう。多くの変形、変更、および置き換えは、本開示から逸脱することなく、当業者によって想到されるものである。本明細書に記載される開示の実施形態の様々な代案が、本開示の実施において利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を定義するものであり、ならびに、この特許請求の範囲およびその同等物の範囲内の方法および構造はそれによって包含されることが、意図されている。

10

20

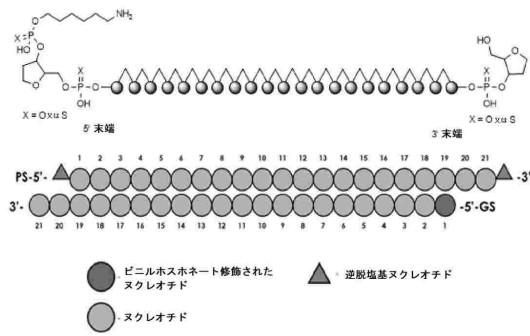
30

40

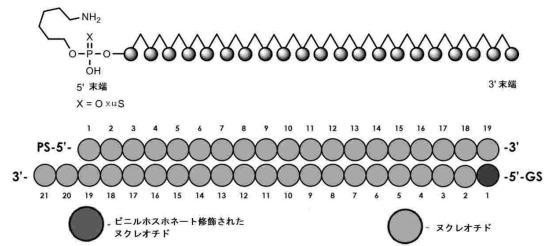
50

【図面】

【図 1 A】

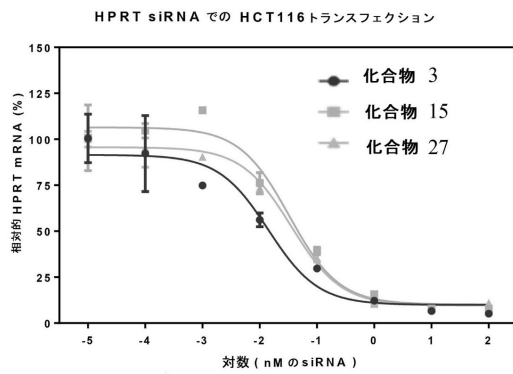


【図 1 B】

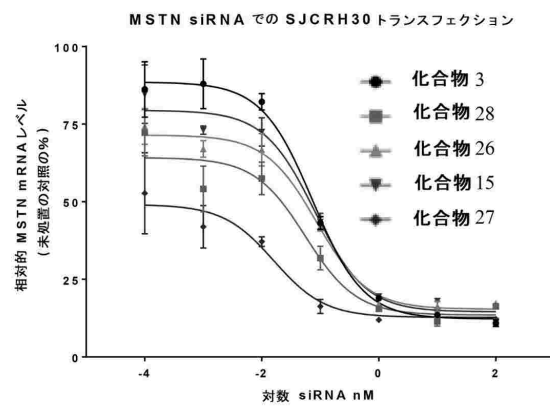


10

【図 2】



【図 3】



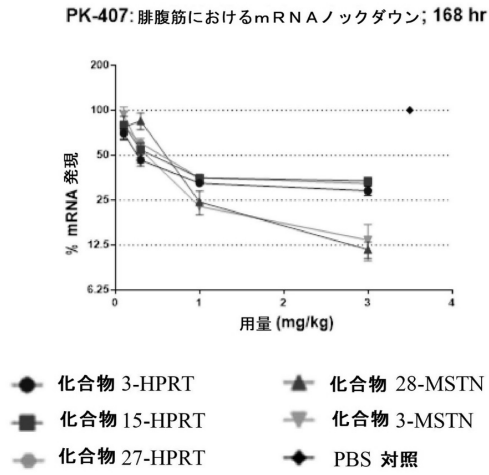
20

30

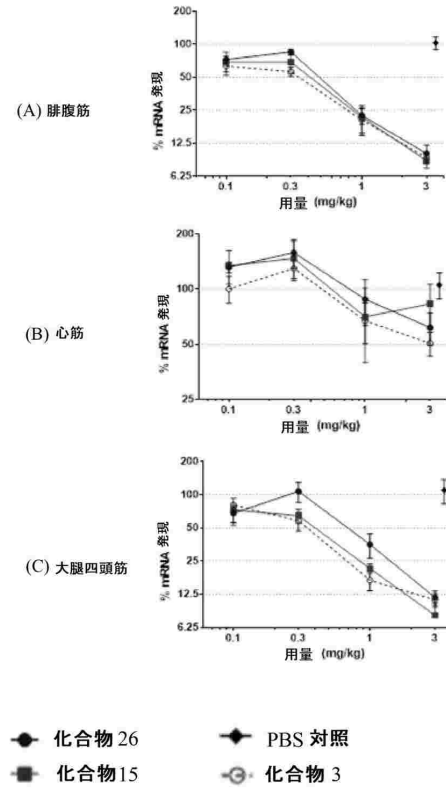
40

50

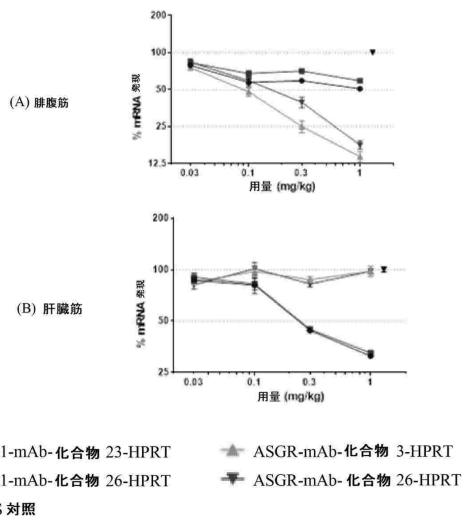
【図 4】



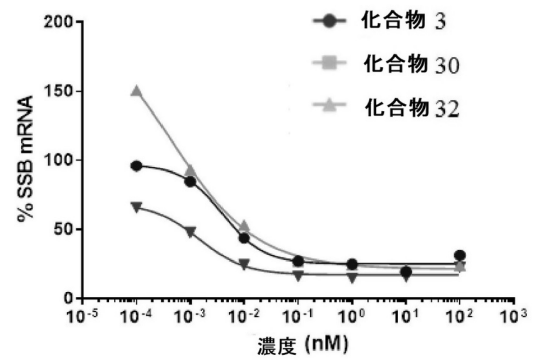
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

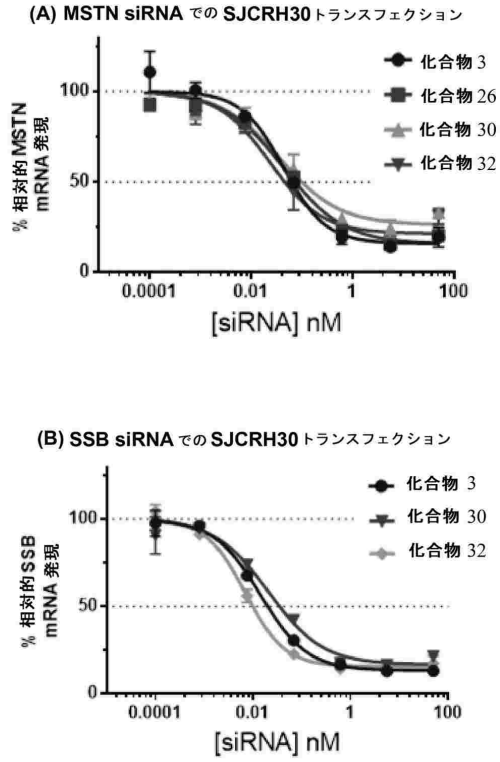
20

30

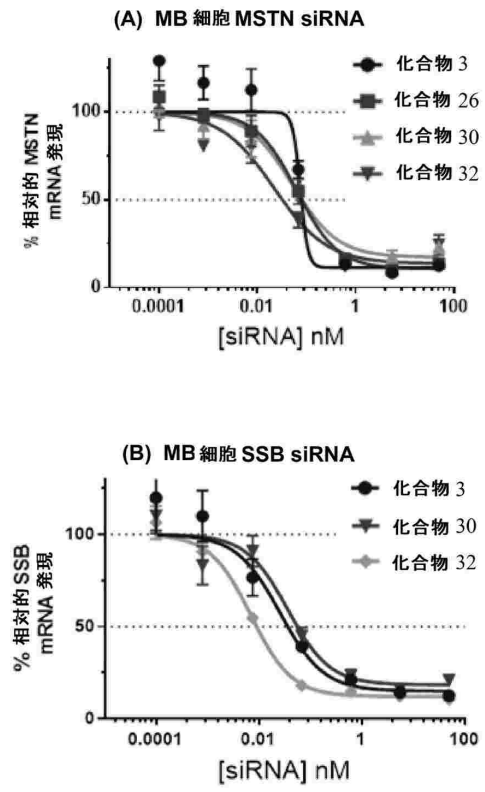
40

50

【図 8】



【図 9】



【配列表】

[0007689552000001.xml](#)

フロントページの続き

- アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
10975 スイート 150
- (72)発明者 アリアス, ジョエル ダニエル
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
10975 スイート 150
- (72)発明者 チュウ, デイヴィッド サイーホ
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
10975 スイート 150
- (72)発明者 コ克蘭, マイケル カラミアン
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
10975 スイート 150
- (72)発明者 バーク, ロブ
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
10975 スイート 150
- (72)発明者 コヴァッチ, フィリップ
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
10975
- (72)発明者 マレコヴァ, バルボラ
アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
10975 スイート 150
- 審査官 坂井田 京
- (56)参考文献 特表2013-532122 (JP, A)
特表2017-525705 (JP, A)
米国特許出願公開第2017/0035796 (US, A1)
米国特許出願公開第2007/0004665 (US, A1)
特表2015-536927 (JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07H 1/00-99/00
CAplus/REGISTRY (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)