(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-527584
(P2024-527584A)
(43)公表日　令和6年7月25日(2024.7.25)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	ＺＺＮＡ　４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*47/61 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/61	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*47/55 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/55	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*47/54 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/54	
Ａ６１Ｋ	*47/62 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/62	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全326頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-500514(P2024-500514)
(86)(22)出願日　令和4年7月8日(2022.7.8)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月7日(2024.3.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/036455
(87)国際公開番号　WO2023/283403
(87)国際公開日　令和5年1月12日(2023.1.12)
(31)優先権主張番号　63/219,930
(32)優先日　令和3年7月9日(2021.7.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/220,232
(32)優先日　令和3年7月9日(2021.7.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　505369158
アルナイラム ファーマシューティカルズ， インコーポレイテッド
ＡＬＮＹＬＡＭ ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ， ＩＮＣ．
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田 憲史
(74)代理人　100170520
弁理士　笹倉 真奈美
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＮＳ送達のためのＢｉｓ－ＲＮＡｉ化合物

(57)【要約】
本発明の一つの態様は、二つ以上の標的核酸配列を標的とし、接触時に対象のＣＮＳの組織において有効性を示す分子に関する。本発明の別の態様は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するための環状低分子干渉ＲＮＡ（ｓｃｉＲＮＡ）に関する。本発明の他の態様は、対象のＣＮＳにおいて、一つ以上の標的ｍＲＮＡの発現を阻害するための医薬組成物、方法、ならびに当該分子およびｓｃｉＲＮＡを使用して、対象においてＣＮＳの疾患もしくは障害を治療または予防するための方法に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を含む、一つ以上の標的ＲＮＡを調節するための核酸組成物であって、前記核酸組成物は、第一の二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子、および一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子を含み、
前記第一のｄｓＲＮＡ分子、および前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子が、リンカーによって一緒に接続され、および互いに重複せず、
前記第一のｄｓＲＮＡが、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、
前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子が、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、
前記核酸組成物の前記第一のｄｓＲＮＡ分子、および前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子はそれぞれ、前記対象のＣＮＳ組織において、適切な対照と比較して、一つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を少なくとも１５％調節することができる、核酸組成物。
【請求項２】
前記リンカーによって一緒に接続される前記第一のｄｓＲＮＡ分子および前記第二のｄｓＲＮＡ分子を含む、請求項１に記載の核酸組成物。
【請求項３】
少なくとも一つの親油性部分は、飽和または不飽和のＣ$_4$－Ｃ$_{30}$炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、およびアルキンからなる群から選択される任意選択的な官能基、を含有する、請求項１～２のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項４】
各親油性部分が、飽和または不飽和のＣ$_{16}$またはＣ$_{22}$炭化水素鎖を含有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項５】
前記第一のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖が、前記第二のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖に共有結合される、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項６】
前記第一および第二のｄｓＲＮＡ分子のうちの一つ以上が、存在する場合、各ｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の５’末端から数えて、各ｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の６位に独立してコンジュゲートされる親油性部分を含有する、請求項１～５のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項７】
前記第一および第二のｄｓＲＮＡ分子のうちの一つ以上が、存在する場合、以下の非末端位置：各鎖の５’末端を１位として数えて、センス鎖の５位、６位、７位、１５位、および１７位、ならびにアンチセンス鎖の１５位および１７位、のうちの一つ以上に独立してコンジュゲートされる一つ以上の親油性部分を含有する、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項８】
前記第一および第二のｄｓＲＮＡ分子のうちの一つ以上が、存在する場合、１９～３０ヌクレオチドの長さのセンス鎖、および１９～３０ヌクレオチドの長さのアンチセンス鎖、を含有する、請求項１～７のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項９】
前記第一のｄｓＲＮＡ分子および前記第二のｄｓＲＮＡ分子のそれぞれが、存在する場合、２１～２５ヌクレオチドの長さのセンス鎖、および２１～２５ヌクレオチドの長さのアンチセンス鎖、を有する、請求項１～８のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項１０】
前記核酸組成物の各ｄｓＲＮＡ分子が、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）を含むヌクレオチド、およびビニルホ

スホネートを含むヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも一つの修飾ヌクレオチド、を含有する、請求項１～９のいずれか一項に記載の核酸組成物。

【請求項１１】

各ｄｓＲＮＡ分子が、２～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合を含有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載の核酸組成物。

【請求項１２】

各ｄｓＲＮＡ分子のヌクレオチドの全て、または実質的に全てが、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－フルオロ修飾、および２’－Ｃ－Ｃ１８炭化水素鎖修飾からなる群から選択される修飾を含有する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の核酸組成物。

【請求項１３】

前記核酸組成物が、二つの核酸ｄｓＲＮＡ分子を含有し、各ｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖が、２１ヌクレオチドの長さであり、各ｄｓＲＮＡ分子のアンチセンス鎖が、２３ヌクレオチドの長さであり、前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続する前記リンカーが、各ｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖を接続する三ヌクレオチドの長さの核酸リンカーであり、および前記親油性部分が、各ｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の６位にコンジュゲートされる、請求項１～１２のいずれか一項に記載の核酸組成物。

【請求項１４】

前記リンカーが、生切断性リンカーである、請求項１に記載の核酸組成物。

【請求項１５】

前記リンカーが、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、およびガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖またはオリゴ糖、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される部分を含有する、請求項１に記載の核酸組成物。

【請求項１６】

前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続する前記リンカーが、１～１５ヌクレオチドの長さの核酸リンカーである、請求項１～１５のいずれか一項に記載の核酸組成物。

【請求項１７】

前記リンカーが、三ヌクレオチドの長さである、請求項１６に記載の核酸組成物。

【請求項１８】

前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続する前記リンカーが、２’－Ｏ－メチルヌクレオチド、２’－フルオロヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド（ｄＮＴＰ）、およびリボヌクレオチドからなる群から選択される一つ以上のヌクレオチドを含有する核酸リンカーである、請求項１～１７のいずれか一項に記載の核酸組成物。

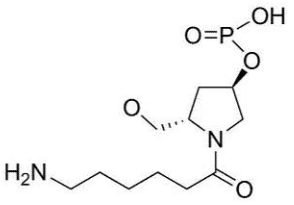
【請求項１９】

前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続する前記リンカーが、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド修飾、２’－フルオロ－リボヌクレオチド修飾、異なる３’－修飾（３’－リボ、３’－Ｏ－メチル、３’－デオキシ、３’－フルオロ）を有する２’－５’－結合ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）修飾、ロックド核酸（ＬＮＡ）修飾、ヘキサノール核酸（ＨＮＡ）修飾、脱塩基リボース修飾、脱塩基デオキシリボース修飾、および脱塩基ヒドロキシプロリノール修飾、からなる群から選択される一つ以上の修飾を含有するポリヌクレオチドである、請求項１～１８のいずれか一項に記載の核酸組成物。

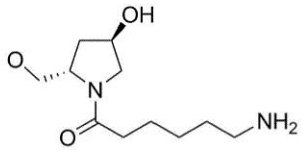
【請求項２０】

前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーが、以下からなる群から選択される、請求項１～１９のいずれか一項に記載の核酸組成物：

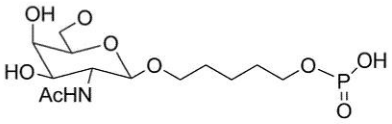
【化１】



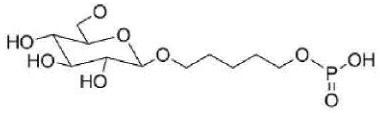
（Ｑ８）、



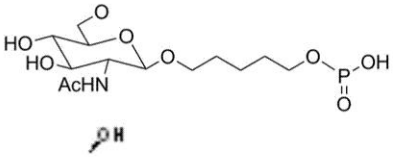
（Ｌ８）、



（Ｑ３０４）、



（Ｑ３１５）、

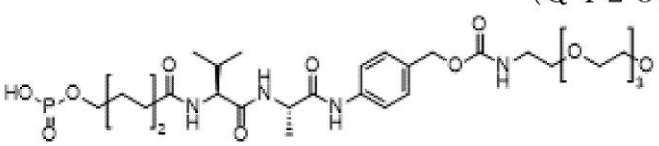


（Ｑ３１７）、

（Ｑ４２６）、

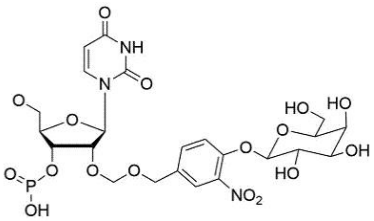
（Ｑ４２７）、

（Ｑ４２８）、



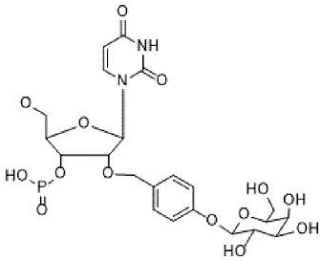
（Ｑ４２９）、

【化２】



（Ｙ１９５）、および

【化３】



（Ｙ２５４）。

【請求項２１】

前記核酸組成物が、前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子が一緒に接続されない場合と比較して、少なくとも二つの標的核酸の遺伝子発現を各々少なくとも７５％調節する、請求項１～２０のいずれか一項に記載の核酸組成物。

【請求項２２】

前記第一のｄｓＲＮＡ分子が、第一の標的核酸の遺伝子発現を調節し、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子が、第二の核酸の遺伝子発現を調節する、請求項１～２１のいずれか一項に記載の核酸組成物。

【請求項２３】

対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の別個のＲＮＡ配列を含む一つ以上の標的ＲＮＡを調節するための方法であって、前記方法は、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを含有する核酸組成物と、前記対象のＣＮＳ細胞を接触させることを含み、前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子は、リンカーにより一緒に接続され、互いに重複せず、前記第一のｄｓＲＮＡ分子および前記第二のｄｓＲＮＡ分子のそれぞれは、存在する場合、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、前記核酸組成物は、前記対象のＣＮＳ細胞において、前記一つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して各々少なくとも１５％阻害し、それによって前記対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を含む前記一つ以上の標的ＲＮＡを調節する、方法。

【請求項２４】

対象のＣＮＳの疾患もしくは障害を治療または予防するための方法であって、前記方法は、前記対象に注射剤を投与することを含み、前記注射剤は、少なくとも第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを含有する核酸組成物を含有し、前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子は、リンカーにより一緒に接続され、互いに重複せず、前記少なくとも第一のｄｓＲＮＡ分子および前記第二のｄｓＲＮＡ分子のそれぞれは、存在する場合、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、前記核酸組成物は、前記対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を含む一つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して各々少なくとも１５％阻害し、それによって前記対象の前記ＣＮＳの疾患もしくは障害を治療または予防する、方法。

【請求項２５】

前記注射剤が、ＩＣＶ注射剤または髄腔内注射剤である、請求項２４に記載の方法。

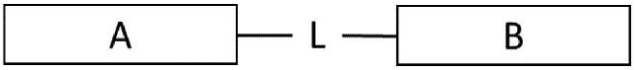
【請求項２６】

ＣＮＳの疾患または障害に関連する一つ以上の標的遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物であって、前記医薬組成物は、対象のＣＮＳへの投与用に製剤化され、ならびに少なくとも第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを含有する核酸組成物、および薬学的に許容可能な担体を含み、前記第一のｄｓＲＮＡ分子と、前記一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子は、リンカーにより一緒に接続され、互いに重複せず、前記少なくとも第一のｄｓＲＮＡ分子および前記第二のｄｓＲＮＡ分子のそれぞれは、存在する場合、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、前記核酸組成物は、前記対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を含む一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して各々少なくとも１５％阻害することができる、医薬組成物。

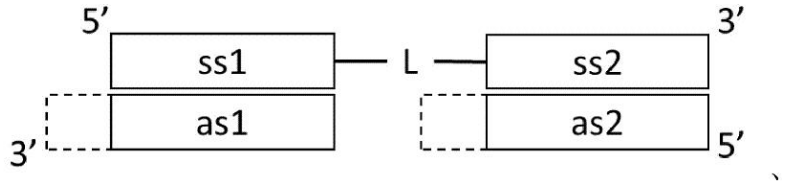
【請求項２７】

以下の式に従う、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を含む一つ以上の別個の標的ＲＮＡを調節するための核酸組成物であって、

【化４】

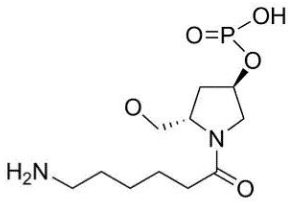


式中、
Ａは、第一の二本鎖ＲＮＡ分子（ｄｓＲＮＡ）であり、
Ｂは、第二の二本鎖ＲＮＡ分子（ｄｓＲＮＡ）であり、および
Ｌは、リンカーであり、
式中、
ＡおよびＢは互いに重複せず、ＡおよびＢの各々は独立して、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含む、核酸組成物。
【請求項２８】
以下の式に従い：
【化５】

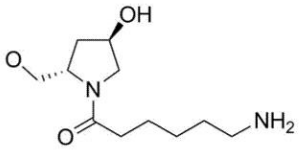


式中、
ｓｓ１は、前記第一のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖であり、
ａｓ１は、前記第一のｄｓＲＮＡ分子のアンチセンス鎖であり、
ｓｓ２は、前記第二のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖であり、
ａｓ２は、前記第二のｄｓＲＮＡ分子のアンチセンス鎖であり、および
点線のボックスは、それぞれａｓ１およびａｓ２の任意選択的な３’オーバーハング領域を示す、請求項２７に記載の核酸組成物。
【請求項２９】
Ｌは、－（ｎｔ１）（ｎｔ２）（ｎｔ３）－により表され、式中、ｎｔ１、ｎｔ２および
ｎｔ３のそれぞれは独立して、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドであり、
ｎｔ１は、ｓｓ１に結合され、および
ｎｔ３は、ｓｓ２に結合される、請求項２８に記載の核酸組成物。
【請求項３０】
ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３が集合的に、表１に定義されるように、ｄＴｄＴｄＴ、ＵＵＵ、ｕｕｕ、およびＵｆＵｆＵｆのうちの一つである、請求項２９に記載の核酸組成物。
【請求項３１】
ａｓ１およびａｓ２がそれぞれ、独立した二ヌクレオチド３’オーバーハングを含む、請求項２７～３０のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項３２】
Ｌが、以下からなる群から選択される、請求項２７～３１のいずれか一項に記載の核酸組成物：

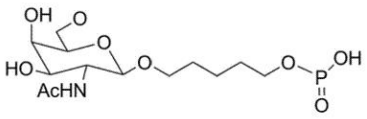
【化６】



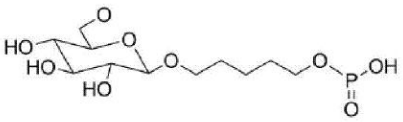
（Ｑ８）、



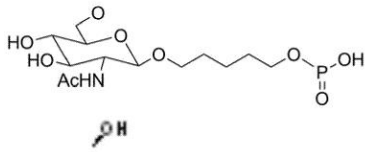
（Ｌ８）、



（Ｑ３０４）、



（Ｑ３１５）、

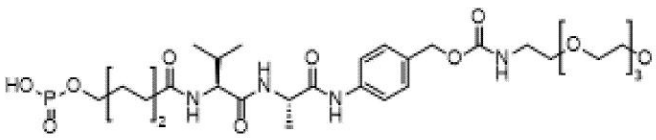


（Ｑ３１７）、

（Ｑ４２６）、

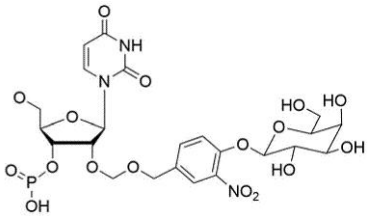
（Ｑ４２７）、

（Ｑ４２８）、



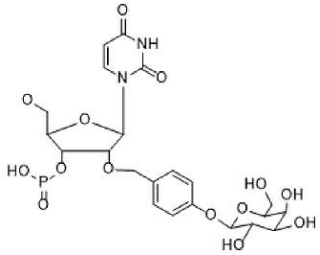
（Ｑ４２９）、

【化７】



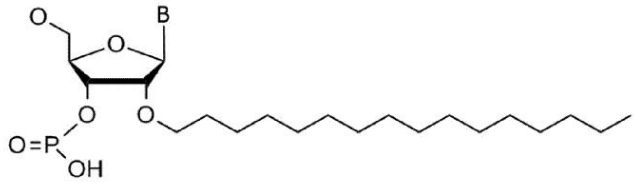
（Ｙ１９５）、および

【化８】

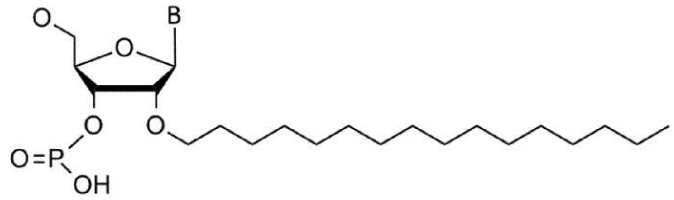


（Ｙ２５４）。

【請求項３３】
前記第一のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置、および前記第二のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置は独立して、以下の構造を有し：
【化９】



、
式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、ｎ－ヘキサデシル鎖は、前記親油性部分である、請求項２７～３２のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項３４】
前記第一のセンス鎖の非末端ヌクレオチド位置の一つのみ、および前記第二のセンス鎖の非末端ヌクレオチド位置の一つのみが独立して、以下の構造を有し：
【化１０】



、
式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、ｎ－ヘキサデシル鎖は、前記親油性部分である、請求項２７～３２のいずれか一項に記載の核酸組成物。
【請求項３５】
前記第一のセンス鎖の前記一つの非末端ヌクレオチド位置が、前記第一のセンス鎖の４位～８位、１５位、および１７位からなる群から選択され、および
前記第二のセンス鎖の前記一つの非末端ヌクレオチド位置が、前記第二のセンス鎖の４位～８位、１５位、および１７位からなる群から選択され、
前記位置は独立して、それぞれ前記第一および第二のセンス鎖の５’－末端から開始してカウントされる、請求項３４に記載の核酸組成物。
【請求項３６】
前記第一のｄｓＲＮＡ分子であるｄｓＲＮＡ１が、第一の標的ＲＮＡ配列を標的とし、前記第二のｄｓＲＮＡ分子であるｄｓＲＮＡ２が、第二の異なる標的ＲＮＡ配列を標的とし、および
前記核酸組成物が、式ｄｓＲＮＡ１－Ｌ－ｄｓＲＮＡ２、またはｄｓＲＮＡ２－Ｌ－ｄｓＲＮＡ１に従い、式中、Ｌが、ｄｓＲＮＡ１をｄｓＲＮＡ２に接続する前記リンカーであるか、またはｄｓＲＮＡ２をｄｓＲＮＡ１に接続する前記リンカーである、請求項２に記載の核酸組成物。
【請求項３７】
前記核酸組成物が、以下の式に従い、
５’　ｓｓ１－Ｌ－ｓｓ２　３’
３’　ａｓ１　ａｓ２　５’、または
５’　ｓｓ２－Ｌ－ｓｓ１　３’
３’　ａｓ２　ａｓ１　５’、
式中、
ｓｓ１が、ｄｓＲＮＡ１のセンス鎖であり、
ａｓ１が、ｄｓＲＮＡ１のアンチセンス鎖であり、
ｓｓ２が、ｄｓＲＮＡ２のセンス鎖であり、

ａｓ２が、ｄｓＲＮＡ２のアンチセンス鎖であり、

Ｌが、ｓｓ１の３’末端をｓｓ２の５’末端に接続する前記リンカー、またはｓｓ２の３’末端をｓｓ１の５’末端に接続する前記リンカーである、請求項３６に記載の核酸組成物。

【請求項３８】

対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するための環状低分子干渉ＲＮＡ（ｓｃｉＲＮＡ）であって、

少なくとも４０ヌクレオチドの長さを有し、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列を有する第一の鎖であって、各ヌクレオチド配列は約１８～約２８ヌクレオチドの長さを有する、第一の鎖、および

前記第一の鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つとアニーリングされ、約１９～約２３ヌクレオチドの長さを有する、少なくとも一つの第二の鎖ヌクレオチド配列、を含み、

式中、

前記第一の鎖は、環状または実質的に環状の構造を有し、

前記第一の鎖ヌクレオチド配列と、前記第二の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、少なくとも一つの核酸修飾を含み、ならびに

前記第一の鎖ヌクレオチド配列または前記第二の鎖ヌクレオチド配列は、一つ以上のリガンドを含む、ｓｃｉＲＮＡ。

【請求項３９】

前記ｂｉｓ－リンカーが、１～１５ヌクレオチドの長さの核酸リンカーである、請求項３８に記載のｓｃｉＲＮＡ。

【請求項４０】

前記ｂｉｓ－リンカーが、３ヌクレオチドの長さである、請求項３９に記載のｓｃｉＲＮＡ。

【請求項４１】

前記ｂｉｓ－リンカーが、ＵＵＵ、２’－Ｏ－メチル－ＵＵＵ（ｕｕｕ）、２’－フルオロ－ＵＵＵ（ＵｆＵｆＵｆ）、および（ｄＴ）ｎからなる群から選択される一つ以上の配列を含み、式中、ｎが、１～２０である、請求項３９に記載のｓｃｉＲＮＡ。

【請求項４２】

前記ｓｃｉＲＮＡが、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ、２’－フルオロ、２’$_6$—ＣＣ$_{18}$炭化水素鎖、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも一つの２’－修飾を含有する、請求項３８に記載のｓｃｉＲＮＡ。

【請求項４３】

前記リガンドのうちの一つ以上が、飽和または不飽和のＣ$_4$－Ｃ$_{30}$炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、およびアルキンからなる群から選択される任意選択的な官能基、とを含有する、親油性部分である、請求項３８に記載のｓｃｉＲＮＡ。

【請求項４４】

前記親油性部分が、飽和または不飽和のＣ$_{16}$またはＣ$_{22}$炭化水素鎖を含有する、請求項４３に記載のｓｃｉＲＮＡ。

【請求項４５】

前記アンチセンス鎖ヌクレオチド配列が、５’－ホスホロチオエート（５’－ＰＳ）、５’－ホスホロジチオエート（５’－Ｐ$_2$Ｓ）、５’－ビニルホスホネート（５’－ＶＰ）、５’－メチルホスホネート（５’－ＭｅＰｈｏｓ）、および５’－デオキシ－５’－Ｃ－マロニルからなる群から選択される、５’－末端のリン酸模倣体を含有する、請求項３８に記載のｓｃｉＲＮＡ。

【請求項４６】

前記第一の鎖は、ｓｓ１およびｓｓ２の二つのヌクレオチド配列を有するセンス鎖であり、ｓｓ１の３’末端は、ｂｉｓ－リンカーによってｓｓ２の５’末端に接続され、

ｓｓ１は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とアニーリングされ、
ｓｓ２は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ２とアニーリングされ、
ａｓ１およびａｓ２はそれぞれ、２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを含み、および／または
ａｓ１およびａｓ２はそれぞれ、１ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを含み、ならびに
ｓｓ１、ｓｓ２、ａｓ１、およびａｓ２の全ヌクレオチドが修飾され、
前記ｓｃｉＲＮＡは、二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾の少なくとも二個のブロックを含有し、
ａｓ１およびａｓ２の一方または両方が、５’－ホスホロチオエート（５’－ＰＳ）、５’－ホスホロジチオエート（５’－PS_2）、５’－ビニルホスホネート（５’－ＶＰ）、５’－メチルホスホネート（５’－ＭｅＰｈｏｓ）、および５’－デオキシ－５’－Ｃ－マロニルからなる群から選択される、５’－末端のリン酸模倣体を含み、ならびに
ｓｓ１およびｓｓ２の一方または両方が、一つ以上のリガンドを含む、請求項３８に記載のｓｃｉＲＮＡ。
【請求項４７】
ｓｓ１とｓｓ２の間の前記ｂｉｓ－リンカーは、３ヌクレオチドの長さの核酸リンカーであり、
ｓｓ１、ｓｓ２、ａｓ１およびａｓ２の全ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル修飾または２’－フルオロ修飾で修飾され、
ａｓ１およびａｓ２のそれぞれが、ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の１８位～２３位内に少なくとも二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を含み、ｓｓ１およびｓｓ２のそれぞれが、ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の１位～５位内に少なくとも二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を含み、および
ｓｓ１およびｓｓ２の一方または両方が、
ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の６位にコンジュゲートされる一つ以上の親油性部分、または
ヌクレオチド配列の３’末端にコンジュゲートされる少なくとも一つの炭水化物系のリガンド、を含む、請求項４６に記載のｓｃｉＲＮＡ。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年７月９日に出願された米国仮特許出願第６３／２１９，９３０号、および２０２１年７月９日に出願された米国仮特許出願第６３／２２０，２３２号に対する優先権の利益を主張するものであり、それらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本発明は概して、ｂｉｓ－ＲＮＡｉ化合物を用いたＲＮＡ干渉の分野に関するものであり、本発明は特に中枢神経系（ＣＮＳ）の細胞および組織における、複数の標的の遺伝子発現の調節に有用である。
【背景技術】
【０００３】
核酸塩基、リボース糖、およびリン酸骨格の化学修飾を使用して、治療用オリゴヌクレオチドの薬剤様の性能を改善し、前臨床開発および臨床開発において、ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡコンジュゲートに好ましい薬理的性能を付与した。
【０００４】
しかし、ｓｉＲＮＡの三次元構造のレベルで行われている改変は相対的に少ない。上記のＲＮＡｉ構造に関し、わずかな例が報告されており、ヘアピンｓｉＲＮＡ（Ｙｕ　ｅｔ

al.,“RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells,”99：6047-52（2002））、ダンベル型ナノ環状siRNA（Abe et al.,“Dumbbell-shaped nanocircular RNAs for RNA interference,”J. Am. Chem. Soc.,129：15108-09（2007））、siRNAナノシート（Kim et al.,“Generation of siRNA Nanosheets for Efficient RNA Interference,”Sci. Rep.,6：25146（2016））、分岐型siRNA（Avino et al.,“Branched RNA：A new architecture for RNA interference,”J. Nucleic Acids,2011：586935（2011））、遺伝子発現の光調節（photomodulation）を目的としたケージ型環状siRNA（Zhang et al.,“Caged circular siRNAs for photomodulation of gene expression in cells and mice,”Chem. Sci.,9：44-51（2018））、siRNA前駆体としての環状一本鎖RNA（Kimura et al.,“Intracellular build-up RNAi with single-strand circular RNAs as siRNA precursors,”Chem. Commun.,10.1039／C1039CC04872C（2019））、およびオフターゲット効果が低下した環状siRNA（Abe et al.,“Synthesis and characterization of small circular double-stranded RNAs,”Chem. Commun.,47：2125-2127（2011）；Zhang et al.,“Circular siRNAs for reducing off-target effects and enhancing long-term gene silencing in cells and mice,”Mol. Ther.- Nucleic Acids,10：237-44（2018））が挙げられる。

【0005】

しかしこれらの報告は、天然リボヌクレオチドとホスホジエステル結合に基づいており、治療上関連性のあるsiRNA化学修飾を利用しておらず、例えばペプチドカップリングまたはT4ライゲーション法などの非効率的な環化戦略を採用しており、および／またはわずかな成果が達成されたのみである。さらに、これらの報告のうちのいくつかは、アンチセンス（ガイド）鎖を環状siRNAに環化させることによってサイレンシング活性が消失してしまうと指摘している（例えば、Zhang et al.,“Caged circular siRNAs for photomodulation of gene expression in cells and mice,”Chem. Sci.,9：44-51（2018）を参照のこと）。これはおそらく、環状アンチセンス鎖は、Argonaute 2（Ago2）タンパク質に搭載されることができず、RNA干渉介在性のmRNAサイレンシングの駆動要素である活性型のRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）の形成が起こらないためである。さらにこれらの報告のうちのいくつかは、例えば2’OMeRNA、ロックド核酸、アンロックド（unlocked）ヌクレオシドアナログ、5-ニトロインドール修飾ヌクレオチド、末端メチル化、骨格ホスホチオエートなどの化学修飾も推奨しておらず、これらの修飾が、siRNAのオフターゲット効果を低下させるためのセンス鎖RNAの搭載とプロセッシングを阻害する可能性があると示唆している（例えば、Zhang et al.,“Circular siRNAs for reducing off-target effects and enhancing long-term gene silencing in cells and mice,”Mol. Ther.- Nucleic Acids,10：237-44（2018）を参照のこと）。インビボ応用について記載する報告では、全身投与や、外来性遺伝子発現の標的化については記載されておらず、局所投与され

る高用量ｓｉＲＮＡに使用される治療上関連性のある送達試薬についても同様である。
【０００６】
したがって、ＲＮＡｉ剤、特に複数の標的核酸の遺伝子発現を調節しながら、一つ以上の組織、特に中枢神経系（ＣＮＳ）の細胞や組織において効率的な送達と有効性を実現することができる分子の治療的能力、例えば効力の向上、代謝安定性およびオフターゲット性能を実現し、向上させる、三次元ｓｉＲＮＡ二本鎖構造に関する新規で改善された設計に対する継続的なニーズが存在する。また当分野において、複数の標的核酸を標的としながら、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）の一つ以上の組織において、効率的な送達および有効性を実現することができる分子に対するニーズも存在する。
【発明の概要】
【０００７】
本開示は、複数の標的核酸を標的とする、または同じ剤内で二回以上同じ標的核酸を標的とする、または一つ以上の標的核酸内の二つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を標的とするように設計され、接触時に対象のＣＮＳ組織への送達と、驚くべき有効性を呈する分子を提供する。医薬組成物、方法、および他の関連する態様も、提供される。
【０００８】
本発明の一つの態様は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の別個のＲＮＡ配列を含む一つ以上の標的ＲＮＡを調節するための核酸組成物を提供するものであり、当該核酸組成物は、第一の二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子を有し、当該第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子は、リンカーにより一緒に接続され、互いに重複せず、当該第一のｄｓＲＮＡは、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、存在する場合には当該第二のｄｓＲＮＡ分子は、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、当該核酸組成物の第一のｄｓＲＮＡ分子と一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子のそれぞれが、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、少なくとも１５％まで調節することができる。
【０００９】
特定の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、第二のｄｓＲＮＡ分子は、リンカーにより一緒に接続される。
【００１０】
特定の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤は、リンカーにより一緒に接続される。
【００１１】
特定の実施形態では、一本鎖核酸剤は、阻害性一本鎖オリゴヌクレオチドまたは一本鎖低分子干渉ＲＮＡ（ｓｓ－ｓｉＲＮＡ）である。
【００１２】
特定の実施形態では、核酸組成物は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を阻害することができる。任意選択的に、核酸組成物は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を阻害する。
【００１３】
一部の実施形態では、核酸組成物は、対象のＣＮＳ組織において、二つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を阻害することができる。任意選択的に、核酸組成物は、対象のＣＮＳ組織において、二つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を阻害する。
【００１４】
特定の実施形態では、一本鎖核酸剤は、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含む。
【００１５】
一部の実施形態では、複数標的分子は、二つの異なるメカニズムによって遺伝子発現を調節しない。
【００１６】

特定の実施形態では、複数標的分子中の各核酸系エフェクター分子は、標的核酸の遺伝子発現を調節することができる。限定されないが、複数標的分子中の各エフェクター分子は、同じ標的遺伝子、異なる標的遺伝子、同じ標的遺伝子内の異なる位置、または同じ標的遺伝子の異なる転写物に指向されることができる。さらに、本明細書に開示される複数標的分子中に含まれる当該エフェクター分子は、本明細書に記載される、または当分野で公知の核酸修飾、モチーフまたは構造のいずれかを含むことができる。

【００１７】

さらに、本明細書に記載の複数標的分子中に含まれるエフェクター分子は、当該エフェクター分子が、複数標的分子の一部ではないときの遺伝子発現調節活性と比較して、同等の遺伝子発現調節活性を有している。言い換えると、エフェクター分子は、本明細書に開示される複数標的分子の一部であるとき、複数標的分子の一部ではない時と比較して、同様の遺伝子発現調節活性を有している。一部の実施形態では、本明細書に記載される複数標的分子中に含まれるエフェクター分子は、独立して、複数標的分子の一部ではないときの遺伝子発現調節と比較して、各標的核酸の遺伝子発現を少なくとも１５％、任意選択的に少なくとも２０％、任意選択的に少なくとも２５％、任意選択的に少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、または少なくとも５０％（例えば、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％またはそれ以上）調節することができる。一部の実施形態では、複数標的分子中のエフェクター分子のうちの一つは、当該複数標的分子中の他のエフェクター分子と比較して、高レベルで遺伝子発現を調節する。一部の実施形態では、当該複数標的分子中の少なくとも二つのエフェクター分子は、同様のレベル（例えば、互いに１０％、７．５％、５％、２．５％またはそれ以下）で遺伝子発現を調節する。

【００１８】

一部の実施形態では、本開示の複数標的分子の各エフェクター分子は、適切な対照と比較して（例えば、未処置対象またはプラセボ処置対象と比較して。または例えば、複数標的分子を用いた処置が行われる前に測定された、処置対象中の標的のｍＲＮＡまたはタンパク質のレベルを含む参照値と比較して）、対象のＣＮＳにおいて、標的ｍＲＮＡの発現を少なくとも１５％阻害することができる。関連する実施形態では、本開示の複数標的分子は、適切な対照と比較して、対象のＣＮＳにおいて、標的ｍＲＮＡの発現を、少なくとも２０％、任意選択的に少なくとも２５％、任意選択的に少なくとも３０％、任意選択的に少なくとも３５％、任意選択的に少なくとも４０％、任意選択的に少なくとも４５％、任意選択的に少なくとも５０％、任意選択的に少なくとも５５％、任意選択的に少なくとも６０％、任意選択的に少なくとも６５％、任意選択的に少なくとも７０％、任意選択的に少なくとも７５％、任意選択的に少なくとも８０％、任意選択的に少なくとも８５％、任意選択的に少なくとも９０％、任意選択的に少なくとも９５％阻害することができる。

【００１９】

一部の実施形態では、複数標的分子は、エフェクター分子が一緒に接続されていないときと比較して、少なくとも二つの標的核酸の遺伝子発現をそれぞれ少なくとも７５％調節する。

【００２０】

一部の実施形態では、少なくとも二つのエフェクター分子のうちの一つは、第一の標的核酸の遺伝子発現を調節し、少なくとも二つのエフェクター分子のうちのもう一つは、第二の核酸の遺伝子発現を調節する。特定の実施形態では、第一の標的核酸と第二の標的核酸は、異なる転写物、または互いに異なる遺伝子に位置している。一部の実施形態では、第一の標的核酸と第二の標的核酸は、同じ核酸中に位置している。

【００２１】

関連する実施形態では、複数標的分子は、対象のＣＮＳ全体の標的ｍＲＮＡ、または対象のＣＮＳ内の位置内の標的ｍＲＮＡの発現を阻害することができる。特定の実施形態では、複数標的分子は、以下の対象のＣＮＳ位置のうちの一つ以上において、標的ｍＲＮＡの発現を阻害することができる：右半球、左半球、小脳、線条体、脳幹、および脊髄。一

部の実施形態では、特にニューロン、乏突起膠細胞、小膠細胞、および星状細胞を含むＣＮＳの細胞型が標的とされる。

【００２２】

本明細書において、各エフェクター分子／構成要素で少なくとも一つの親油性リガンドとコンジュゲートされた複数標的分子は特に、遺伝子発現の調節に有効であることが見出された。したがって、一部の実施形態では、少なくとも二つの親油性リガンドが、（各エフェクター分子／構成要素に少なくとも一つの親油性リガンドが配置される分布で）複数標的分子とコンジュゲートされる。二つのリガンドは独立して、複数標的分子中の任意の位置でコンジュゲートされてもよいが、ただし各エフェクター分子／構成要素は、親油性リガンドを担持するものとする。かかる実施形態では、複数標的分子中の少なくとも二つのエフェクター分子が、自身に少なくとも一つの親油性リガンドを付加させている。したがって、少なくとも二つの親油性リガンドにコンジュゲートされた複数標的分子は、本明細書において「コンジュゲート化複数標的分子」とも呼称される。限定されないが、各リガンドは、エフェクター分子および／または複数標的分子の任意の位置で存在し得る。例えば、各リガンドは、エフェクター分子の５’末端、３’末端、内部（非末端）位置で、または複数標的分子中のそれらの組み合わせの位置でコンジュゲートされ得る。当該少なくとも二つのリガンドは、同一であってもよく、異なってもよく、または同一と異なるものの任意の組み合わせであってもよい。理論に束縛されることを望むものではないが、驚くべきことに、各エフェクター分子／構成要素に少なくとも一つの親油性リガンドを含めることで、対象のＣＮＳに投与されたときに、コンジュゲート化複数標的分子の送達プロファイルまたは薬物動態プロファイルが改善されることが確認されたが、一方でただ一つの親油性リガンドのみを保有する複数標的分子の試験では、エフェクター分子が効果的であるとは確認されなかった。

【００２３】

一部の実施形態では、本明細書において、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において二つ以上の別個の標的ＲＮＡを調節するための複数標的分子が提供され、当該複数標的分子は、第一の二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子と、第二の二本鎖ＲＮＡ分子を有し、この場合において：当該第一のｄｓＲＮＡ分子と当該第二のｄｓＲＮＡ分子は、リンカーによって一緒に接続され、互いに重複しておらず、当該第一のｄｓＲＮＡと当該第二のｄｓＲＮＡはそれぞれ少なくとも一つのコンジュゲートされた親油性部分を含み、当該複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、二つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも１５％阻害することができる。

【００２４】

特定の実施形態では、各親油性部分の親油性は、ｌｏｇＫｏｗで測定されて、０を超える。

【００２５】

一つの実施形態では、複数標的分子の疎水性が、当該複数標的分子の血漿タンパク質結合アッセイにおける非結合画分によって測定され、０．２を超える。

【００２６】

一部の実施形態では、各親油性部分は、脂質、コレステロール、レチノイン酸、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－ｂｉｓ－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキサノール、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、１，３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジンのうちの一つ以上である。

【００２７】

特定の実施形態では、少なくとも一つの親油性部分が、飽和または不飽和のＣ$_4$－Ｃ$_{30}$炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、またはアルキンである任意選択的な官能基を含有する。任意選択的に少なくとも一つの親油性部分が、飽和または不飽和のＣ$_6$－Ｃ$_{18}$炭化水素鎖を含む。任意選択

的に少なくとも一つの親油性部分が、飽和または不飽和のＣ１６またはＣ２２炭化水素鎖を含む。

【００２８】

一部の実施形態では、各親油性部分が、飽和または不飽和のＣ４－Ｃ３０炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、またはアルキンである任意選択的な官能基を含有する。任意選択的に各親油性部分が、飽和または不飽和のＣ６－Ｃ１８炭化水素鎖を含む。任意選択的に各親油性部分が、飽和または不飽和のＣ１６またはＣ２２炭化水素鎖を含む。

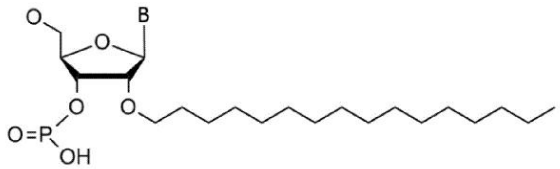
【００２９】

一部の実施形態では、少なくとも一つの親油性部分が、一価のリンカー、または分岐状の二価もしくは三価のリンカーを介して複数標的分子にコンジュゲートされる。

【００３０】

一つの実施形態では、少なくとも一つの親油性部分が、以下の式（Ｉ）に示されるように、複数標的分子内の一つ以上のヌクレオチドにコンジュゲートされる：

【化１】



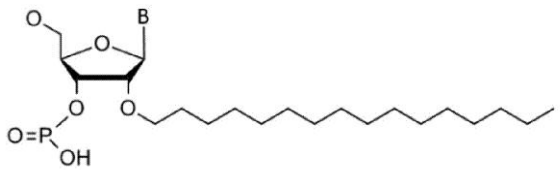
（Ｉ）、

式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、ｎ－ヘキサデシル鎖（Ｃ１６リガンド）は、親油性部分であり、任意選択的にＢは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルである。式（Ｉ）に示される修飾は、本明細書において、「２’－Ｃ１６」と呼称される。

【００３１】

一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡおよび第二のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチドの位置が、式（Ｉ）の２’－Ｃ１６構造を有しており、式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、任意選択的に、Ｂは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルであり、ｎ－ヘキサデシル鎖は、親油性部分である。任意選択的に、第一のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチドの位置、および第二のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチドの位置が、存在する場合には、以下の構造を有する：

【化２】



、

式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、任意選択的にＢは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルであり、ｎ－ヘキサデシル鎖は、親油性部分である。

【００３２】

一部の実施形態では、複数標的分子は、ＲＮＡｉ剤である第一のエフェクター分子と、ＲＮＡｉ剤である第二のエフェクター分子とを含む。特定の実施形態では、第一のエフェクター分子は、第一のｄｓＲＮＡであり、第二のエフェクター分子は、第二のｄｓＲＮＡである。任意選択的に、第一のエフェクター分子は、第一の二本鎖ｓｉＲＮＡ分子であり、第二のエフェクター分子は、第二の二本鎖ｓｉＲＮＡ分子である。

【００３３】

一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡのセンス鎖は、第二のｄｓＲＮＡのセンス鎖に共有結合している。あるいは、第一のｄｓＲＮＡのセンス鎖は、第二のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合している。さらに、第一のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、第二のｄｓＲＮＡのセンス鎖に共有結合している。

【００３４】

特定の実施形態では、各ｄｓＲＮＡは、親油性リガンド、例えば、Ｃ１６リガンド（本明細書において、上記のとおり、「２’－Ｃ１６」とも呼称される）を含み、当該リガンドは、ｄｓＲＮＡのセンス鎖の５’末端から六ヌクレオチドである残基にコンジュゲートされる（すなわち、センス鎖の５’末端からヌクレオチド残基を数える場合、５’末端ヌクレオチドは、ヌクレオチド番号一であり、親油性リガンドは、ヌクレオチド番号六に付加される）。代替的な実施形態では、親油性リガンドは、任意選択的に、一価リンカー、または分岐状の二価もしくは三価のリンカーを介して、センス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。親油性リガンドは、本出願において提供される複数標的分子のヌクレオチド位置のいずれかに含まれ得るか、またはそれらにコンジュゲートされ得ることが具体的に予期される。

【００３５】

特定の実施形態では、少なくとも一つの親油性部分／リガンドが、脂肪族化合物、脂環式化合物、または多脂環式の化合物である。任意で、親油性部分は、脂質、コレステロール、レチノイン酸、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－ｂｉｓ－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキサノール（ｇｅｒａｎｙｌｏｘｙｈｅｘｙａｎｏｌ）、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、１，３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸（（ｏｌｅｏｙｌ）ｃｈｏｌｅｎｉｃ ａｃｉｄ）、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジンである。

【００３６】

一部の実施形態では、親油性部分は、飽和または不飽和のＣ４－Ｃ３０炭化水素鎖と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、またはアルキンである任意選択的な官能基とを含有する。

【００３７】

特定の実施形態では、少なくとも一つの親油性部分／リガンドが、飽和または不飽和のＣ６－Ｃ１８炭化水素鎖を含有する。任意選択的に親油性部分／リガンドは、飽和または不飽和のＣ１６炭化水素鎖を含有する。関連の実施形態では、少なくとも一つの親油性部分／リガンドは、複数標的分子の一つ以上のヌクレオチドを置換する担体を介してコンジュゲートされる。特定の実施形態では、キャリアは、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、［１，３］ジオキソラニル、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフラニル、もしくはデカリニルである環状基であるか、またはセリノール骨格またはジエタノールアミン骨格系の非環状部分である。

【００３８】

一部の実施形態では、親油性部分は独立して、各ｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の５’末端から数えて、各ｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の６番目の位置にコンジュゲートされ、任意選択的に当該親油性部分は、飽和または不飽和のＣ１６またはＣ２２炭化水素鎖を含み、任意選択的に当該親油性部分は、飽和または不飽和のＣ１６またはＣ２２炭化水素鎖である。

【００３９】

一部の実施形態では、親油性部分は、生切断性（ｂｉｏ－ｃｌｅａｖａｌｅ）のリンカーを介してコンジュゲートされる。任意選択的に、生切断性リンカーは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖もしくはオリゴ糖、またはそれらの組み合わせであるか、

またはそれらを含む。
【００４０】
一部の実施形態では、飽和または不飽和のＣ１６炭化水素鎖は、鎖の５’末端から数えて６番目の位置にコンジュゲートされる。
【００４１】
特定の実施形態では、少なくとも二つのｄｓＲＮＡのうちの少なくとも一つのセンス鎖は、２１ヌクレオチドの長さである。
【００４２】
一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡおよび第二のｄｓＲＮＡの各々は、１９～３０ヌクレオチドの長さのセンス鎖を有する。任意選択的に、第一のｄｓＲＮＡおよび第二のｄｓＲＮＡの各々は、２１～２５ヌクレオチドの長さのセンス鎖を有する。任意選択的に、第一のｄｓＲＮＡおよび第二のｄｓＲＮＡの各々は、２１ヌクレオチドの長さのセンス鎖を有する。
【００４３】
一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡおよび第二のｄｓＲＮＡの各々は、１９～３０ヌクレオチドの長さのアンチセンス鎖を有する。任意選択的に、第一のｄｓＲＮＡおよび第二のｄｓＲＮＡの各々は、２１～２５ヌクレオチドの長さのアンチセンス鎖を有する。任意選択的に、第一のｄｓＲＮＡおよび第二のｄｓＲＮＡの各々は、２３ヌクレオチドの長さのアンチセンス鎖を有する。任意選択的に、アンチセンス鎖の３’末端は、センス鎖の５’末端に対し、二ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを形成する。
【００４４】
一部の実施形態では、一つ以上の親油性部分が、一つまたは複数のｄｓＲＮＡの以下の内部（非末端）位置のうちの一つ以上にコンジュゲートされる：センス鎖の９～１２位を除く非末端位置、およびアンチセンス鎖のすべての非末端位置。任意選択的に、一つ以上の親油性部分が、一つまたは複数のｄｓＲＮＡの以下の内部（非末端）位置のうちの一つ以上にコンジュゲートされる：各鎖の５’末端から数えて、センス鎖の４～８位および１３～１８位、ならびにアンチセンス鎖の６～１０位および１５～１８位。任意選択的に、一つ以上の親油性部分が、以下の非末端位置のうちの一つ以上にコンジュゲートされる：各鎖の５’末端から数えて、センス鎖の５、６、７、１５および１７位、ならびにアンチセンス鎖の１５位および１７位。特定の実施形態では、センス鎖は２１ヌクレオチドの長さであり、アンチセンス鎖は２３ヌクレオチドの長さである。
【００４５】
任意選択的に、親油性部分は、センス鎖の２１位、２０位、１５位、７位、６位、もしくは２位、またはアンチセンス鎖の１６位にコンジュゲートされる。
【００４６】
特定の実施形態では、親油性部分は、センス鎖の２１位、２０位、１５位、または６位にコンジュゲートされる。
【００４７】
一部の実施形態では、親油性部分は、センス鎖の２１位、２０位または１５位にコンジュゲートされる。
【００４８】
一部の実施形態では、親油性部分は、センス鎖の２０位または１５位にコンジュゲートされる。
【００４９】
一部の実施形態では、親油性部分は、各センス鎖の６位にコンジュゲートされる。
【００５０】
一部の実施形態では、親油性部分は、アンチセンス鎖の１６位にコンジュゲートされる。
【００５１】
一部の実施形態では、親油性部分は、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン

、アミド、マレイミド－チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド結合、クリック反応の生成物、またはカルバミン酸塩を含有するリンカーを介して、複数標的分子のｄｓＲＮＡにコンジュゲートされる。

【００５２】

一つの実施形態では、親油性部分／リガンドは、核酸塩基、糖部分、またはヌクレオシド間結合にコンジュゲートされる。

【００５３】

一つの実施形態では、複数標的分子は、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）を含むヌクレオチド、またはビニルホスホネートを含むヌクレオチドである少なくとも一つの修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、複数標的分子、または複数標的分子の各ｄｓＲＮＡは、以下の各修飾のうちの少なくとも一つを含む：２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）を含むヌクレオチド、およびビニルホスホネートを含むヌクレオチド。

【００５４】

関連実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）を含むヌクレオチド、またはビニルホスホネートを含むヌクレオチドである少なくとも一つの修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、複数標的分子は、以下の各修飾のうちの少なくとも一つを含む：２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、２’－Ｃ１６部分、およびホスホロチオエートヌクレオシド間結合。

【００５５】

一部の実施形態では、各ｄｓＲＮＡは、少なくとも一つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合をさらに含む。任意選択的に、各ｄｓＲＮＡは、二から八個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合を含む。任意選択的に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合は、各ｄｓＲＮＡにおいて、以下の位置のうちの一つ以上で、最後および最後から二番目のヌクレオシド間連結に位置する：センス鎖の５’－末端、センス鎖の３’－末端、アンチセンス鎖の５’－末端、アンチセンス鎖の３’－末端、およびそれらの組み合わせ。任意選択的に、各ｄｓＲＮＡは、センス鎖の５’－末端、センス鎖の３’－末端、およびアンチセンス鎖の３’－末端の最後ならびに最後から二番目のヌクレオシド間結合に位置する六個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合を含む。

【００５６】

特定の実施形態では、各ｄｓＲＮＡのヌクレオチドの全て、または実質的に全ては、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－フルオロ修飾、または２’$_{6}$∈Ｃ$_{18}$炭化水素鎖修飾である修飾を少なくとも一つ含む。

【００５７】

別の実施形態では、複数標的分子は、本明細書に提供される修飾ヌクレオチドのパターン（例えば、図３Ａ、４Ａ、５Ａ、６Ａ、７Ａ、８Ａおよび９Ａ）を含み、任意選択的に、２’－Ｃ１６（または他の親油性部分／リガンド）、２’－Ｏ－メチル、ホスホロチオエート、および２’－フルオロ修飾の位置は、提示されるＲＮＡｉ剤の個々のヌクレオチド塩基配列とは無関係である。

【００５８】

一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡのセンス鎖は、５’末端を有し、その３’末端でリンカーに接続され、当該リンカーは、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子の５’末端に接続する。任意選択的に、リンカーは、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖の５’末端に接続する。

【００５９】

特定の実施形態では、ｄｓＲＮＡのセンス鎖は、２１ヌクレオチドの長さであり、リン

カーによって接続される。

【００６０】

一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーは、核酸リンカー、または炭水化物リンカーもしくは他の有機ポリマーリンカーである。任意選択的に、リンカーは切断可能である。

【００６１】

特定の実施形態では、エフェクター分子を接続するリンカーは、以下のうちの一つ以上を含む：

・－（ＣＨ$_2$）$_{12}$－（「Ｃ１２リンカー」または「Ｑ５０」），

・－（ＣＨ$_2$）$_6$－Ｓ－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_6$－（「Ｃ６－Ｓ－Ｓ－Ｃ６リンカー」または「Ｑ５１」）、

・Ｑ１５１、

・Ｑ１７３、

・－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－、式中、ｎは、０または１～２０であり；

・－（ＣＨ$_2$）$_9$－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＨ$_2$－、式中、ｎは、０または１～２０であり；

・任意選択的にリガンドとコンジュゲートされた、モノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－プロリノール；または

・任意選択的にリガンドとコンジュゲートされたモノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ（例えば、モノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－［４－ヒドロキシプロリノール］）。

【００６２】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ、または第一のｄｓＲＮＡと一本鎖核酸剤）を接続するリンカーは、例えば脂肪族の飽和または不飽和のアルキル鎖、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラ－、ペンタ－、ヘキサ－、ヘプタ－、オクタ－、ノナ－、および／またはデカ－エチレングリコールを含む（ポリ）エチレングリコール鎖などの有機ポリマーリンカーである。

【００６３】

特定の実施形態では、リンカーは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、もしくはマンノースの官能化された単糖またはオリゴ糖、またはそれらの組み合わせであるか、またはそれらを含む生切断性リンカーである。一部の実施形態では、生切断性リンカーは、例えば、脂肪族の飽和もしくは不飽和のアルキル鎖、（ポリ）エチレングリコール鎖（ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラ－、ペンタ－、ヘキサ－、ヘプタ－、オクタ－、ノナ－、および／またはデカ－エチレングリコールを含む）などの有機ポリマーリンカーの組み合わせであり、および／またはＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、もしくはマンノースの官能化された単糖またはオリゴ糖、またはそれらの組み合わせを含む。

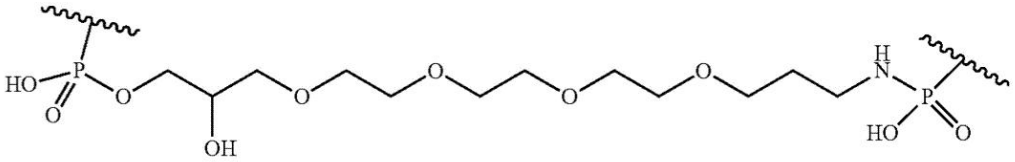
【００６４】

特定の実施形態では、有機ポリマーリンカーは、以下のうちの一つ以上を含む：脂肪族の飽和または不飽和のアルキル鎖、ならびにジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラ－、ペンタ－、ヘキサ－、ヘプタ－、オクタ－、ノナ－、デカ－エチレングリコール、およびグリセロール、ならびに／またはそれらのアミノアルキルエーテル。

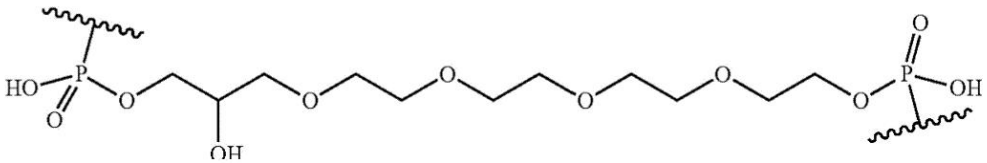
【００６５】

特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、以下からなる群から選択される部分を含む。

【化３】



、および



【００６６】

一部の実施形態では、有機ポリマーリンカーは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、もしくはマンノースの官能化された単糖またはオリゴ糖、またはそれらの組み合わせを含む。

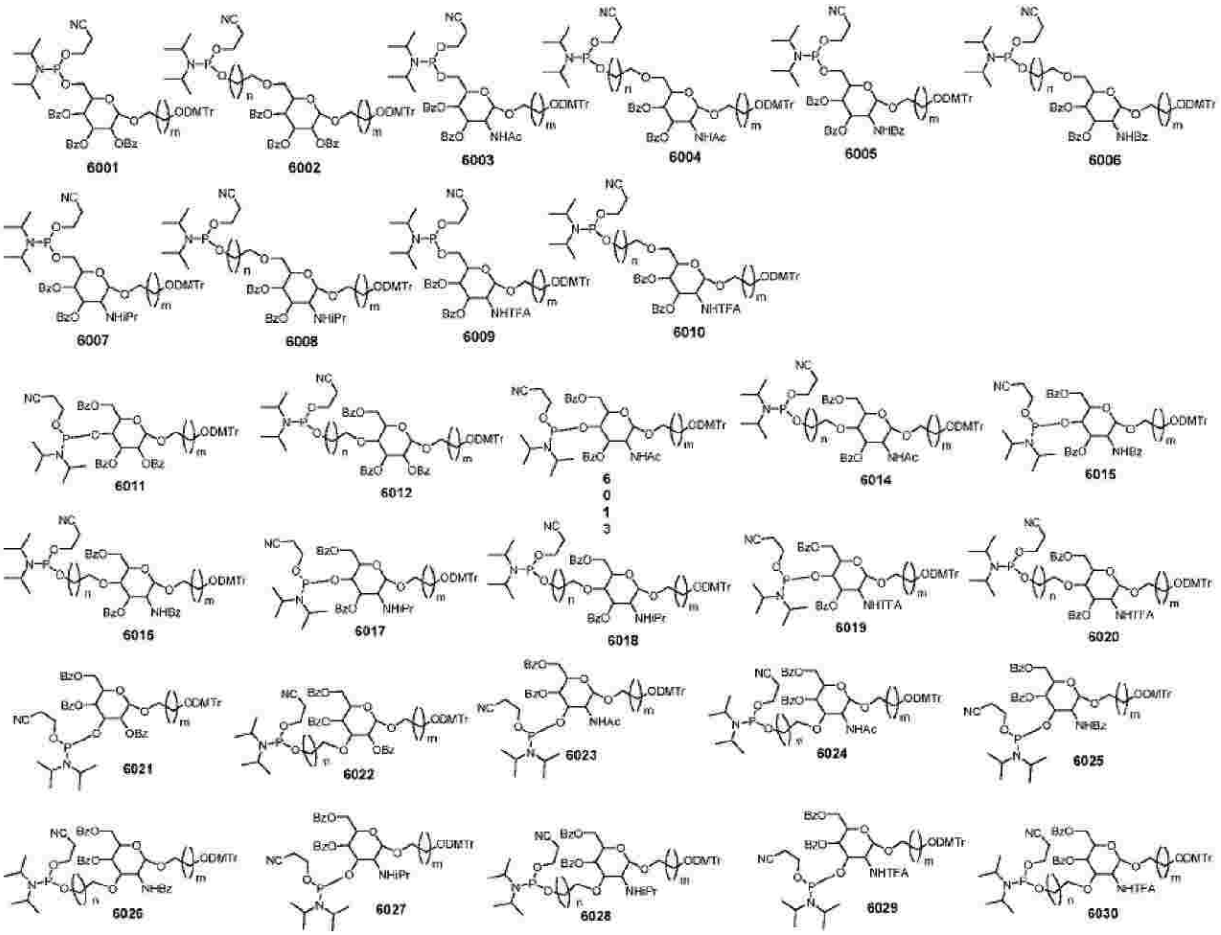
【００６７】

特定の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーは、以下から選択される：－（ＣＨ$_2$）$_{12}$－（Ｃ１２リンカーまたはＱ５０）、－（ＣＨ$_2$）$_6$－Ｓ－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_6$－（Ｃ６－Ｓ－Ｓ－Ｃ６リンカーまたはＱ５１）、Ｑ１５１、Ｑ１７３、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－、式中、ｎは、０または１～２０であり；－（ＣＨ$_2$）$_9$－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＨ$_2$－、式中、ｎは、０または１～２０であり；任意選択的にリガンドにコンジュゲートされるモノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－プロリノール；任意選択的にリガンドにコンジュゲートされるモノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－ヒドロキシプロリノール。

【００６８】

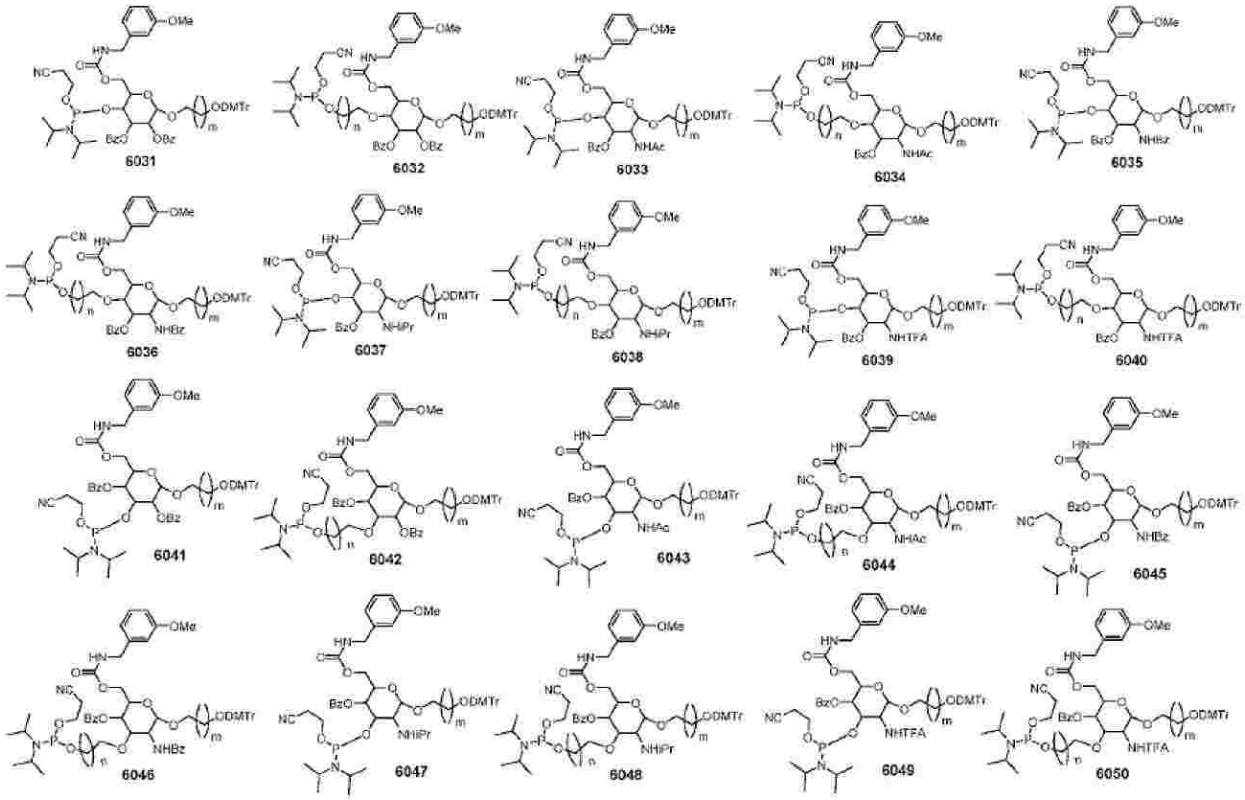
一部の実施形態では、生切断性リンカーは、以下から選択される：

【化４】



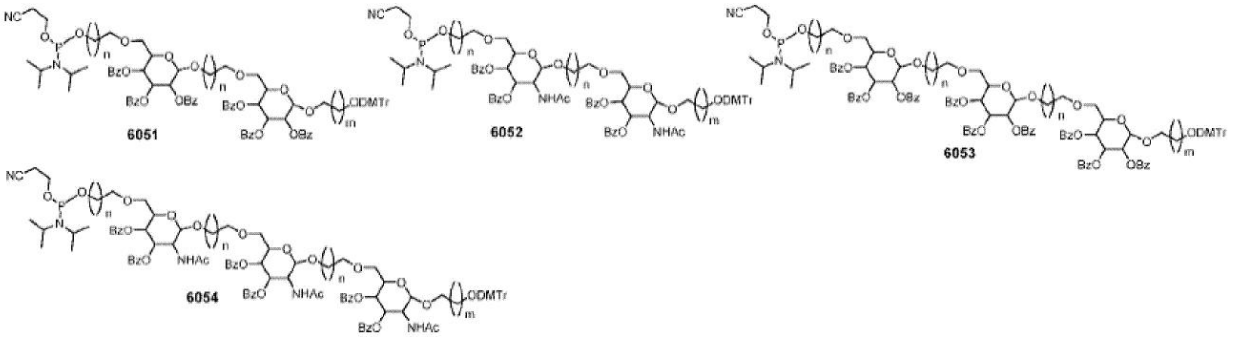
式中、ｎ＝１～１２およびｍ＝１～１２の場合、様々な炭水化物（ガラクトース、ガラクトサミン、グルコース、グルコサミン、マンノース、マンノサミン誘導体、またはペントース誘導体）。

【化５】



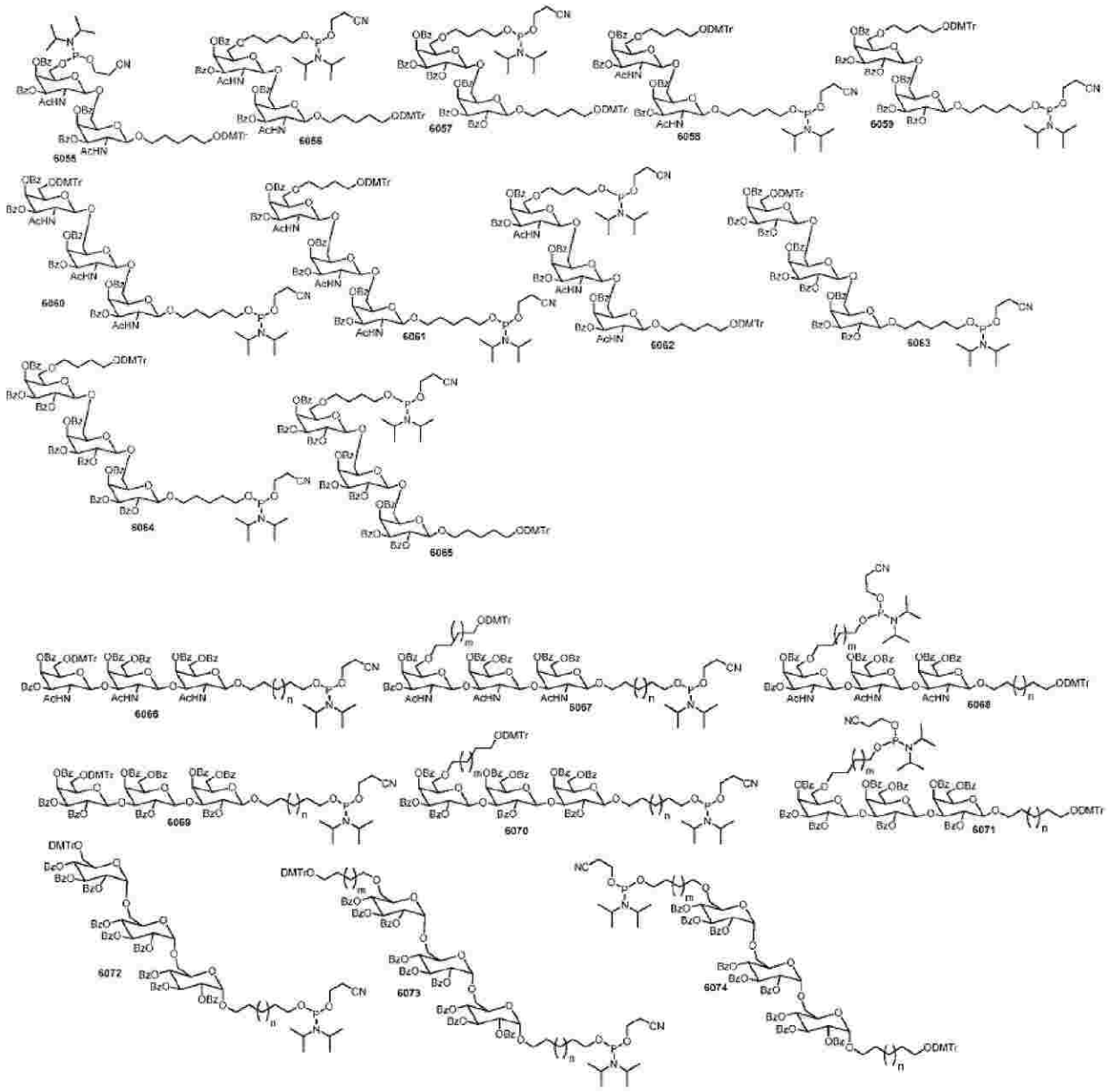
式中、ｎ＝１～１２およびｍ＝１～１２の場合、様々な改変炭水化物（ガラクトース、ガラクトサミン、グルコース、グルコサミン、マンノース、マンノサミン誘導体、またはペントース誘導体）。

【化６】



式中、ｎ＝１～１２およびｍ＝１～１２の場合、様々な改変炭水化物（ガラクトース、ガラクトサミン、グルコース、グルコサミン、マンノース、マンノサミン誘導体の二糖または三糖）。

【化７】



式中、ｎ＝１～１２およびｍ＝１～１２の場合、様々な改変炭水化物（ガラクトース、ガラクトサミン、グルコース、グルコサミン、マンノース、マンノサミン誘導体の二糖または三糖）。

【００６９】

特定の実施形態では、リンカーは、ポリヌクレオチドである。任意選択的に、リンカーは、デオキシリボヌクレオチド配列、リボヌクレオチド配列、またはその両方を含むポリヌクレオチドである。任意選択的に、リンカーは、修飾リボヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドである。任意選択的に、リンカーは、以下の修飾のうちの一つ以上を有するポリヌクレオチドである：２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチドまたは２’－フルオロ－リボヌクレオチド；３’－修飾（３’－リボ、３’－Ｏ－メチル、３’－デオキシ、３’－フルオロ）を有する２’－５’－結合ヌクレオチド。任意選択的に、リンカーは、以下の修飾のうちの一つ以上を有するポリヌクレオチドである：グリコール核酸（ＧＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ヘキサノール核酸（ＨＮＡ）、脱塩基性リボース、脱塩基性デオキシリボース、脱塩基性ヒドロキシプロリノール。任意選択的に、すべての核酸リンカーヌクレオチドは、同じタイプのヌクレオチドである。任意選択的に、リンカーは、完全に２’－Ｏ－メチルヌクレオチドを含み、完全に２’－フルオロヌクレオチドを含み、または完全にデオキシリボヌクレオチドを含む。

【００７０】
一部の実施形態では、リンカーは、ｎヌクレオチドの長さのリンカーである。任意選択的に、複数標的分子の最も長い鎖（すなわち、第一の鎖、例えば、それぞれのｄｓＲＮＡの組み合わされた／結合されたセンス鎖）の長さは、第一のｄｓＲＮＡの長さ＋ｎ＋第二のｄｓＲＮＡの長さと等しい。任意選択的に、二つのｄｓＲＮＡのみが存在し、それぞれが２１ヌクレオチドの長さのセンス鎖を有し、ｎヌクレオチドの長さのポリヌクレオチドリンカーにより結合される場合、複数標的分子の最も長い鎖（すなわち、第一の鎖）の全長は、４２＋ｎヌクレオチドである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドリンカーは、二ヌクレオチド以上の長さである。任意選択的に、ポリヌクレオチドリンカーは、三ヌクレオチド以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０ヌクレオチド以上）の長さである。特定の実施形態では、ｄｓＲＮＡを接続するリンカーは、１～１５ヌクレオチドの長さの核酸リンカーである。任意選択的に、リンカーは、二から五ヌクレオチドの長さである。任意選択的に、リンカーは、三または四ヌクレオチドの長さである。任意選択的に、リンカーは、三ヌクレオチドの長さである。関連の実施形態では、複数標的分子の最も長い鎖（すなわち、第一の鎖）の全長は、４５ヌクレオチドである。

【００７１】
特定の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーは、以下の配列のうちの一つ以上を含む：ＵＵＵ、２’－Ｏ－メチル－ＵＵＵ（ｕｕｕ）、および２’－フルオロ－ＵＵＵ（ＵｆＵｆＵｆ）、および（ｄＴ）ｎ、式中、ｎは、１～２０であり、例えば、ｄＴｄＴｄＴである。

【００７２】
一部の実施形態では、複数標的分子は、二つの核酸ｄｓＲＮＡを含み、各ｄｓＲＮＡのセンス鎖は、２１ヌクレオチドの長さであり、各ｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、２３ヌクレオチドの長さであり、ｄｓＲＮＡを接続するリンカーは、各ｄｓＲＮＡのセンス鎖を接続する三ヌクレオチドの長さの核酸リンカーであり、親油性部分は、各ｄｓＲＮＡのセンス鎖の６位にコンジュゲートされる。

【００７３】
一部の実施形態では、二つのｓｉＲＮＡを接続するリンカーは、ヌクレオチド配列ＵＵＵまたは（ｄＴ）ｎを含み、式中、ｎは１～２０である。特定の実施形態では、ｄｓＲＮＡを接続するリンカーは、以下の配列のうちの一つ以上を含む：ｄＴｄＴｄＴ、ＵＵＵ、２’－Ｏ－メチル－ＵＵＵ（ｕｕｕ）、および２’－フルオロ－ＵＵＵ（ＵｆＵｆＵｆ）。

【００７４】
特定の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーは、修飾リボヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドである。任意選択的に、リンカーは、以下の修飾のうちの一つ以上を有するポリヌクレオチドである：２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド修飾、２’－フルオロ－リボヌクレオチド修飾、異なる３’－修飾（３’－リボ、３’－Ｏ－メチル、３’－デオキシ、３’－フルオロ）を有する２’－５’－結合ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）修飾、ロックド核酸（ＬＮＡ）修飾、ヘキサノール核酸（ＨＮＡ）修飾、脱塩基リボース修飾、脱塩基デオキシリボース修飾、および脱塩基ヒドロキシプロリノール修飾。

【００７５】
一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーのすべての核酸ヌクレオチドは、同じタイプのヌクレオチドである。任意選択的に、リンカーは、完全に２’－Ｏ－メチルヌクレオチドを含み、完全に２’－フルオロヌクレオチドを含み、または完全にデオキシリボヌクレオチドを含む。

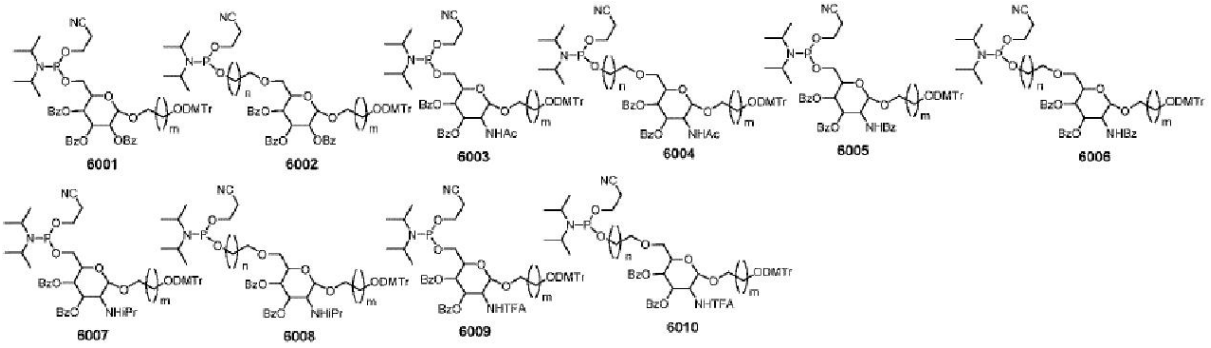
【００７６】
一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーは、エンドソーム切断リンカーまたはプロテアーゼ切断リンカーである。任意選択的に、リンカーは、炭水化物リンカーであり、リンカーは、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）と比較して

、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）、少なくとも１．２５倍速く切断される。

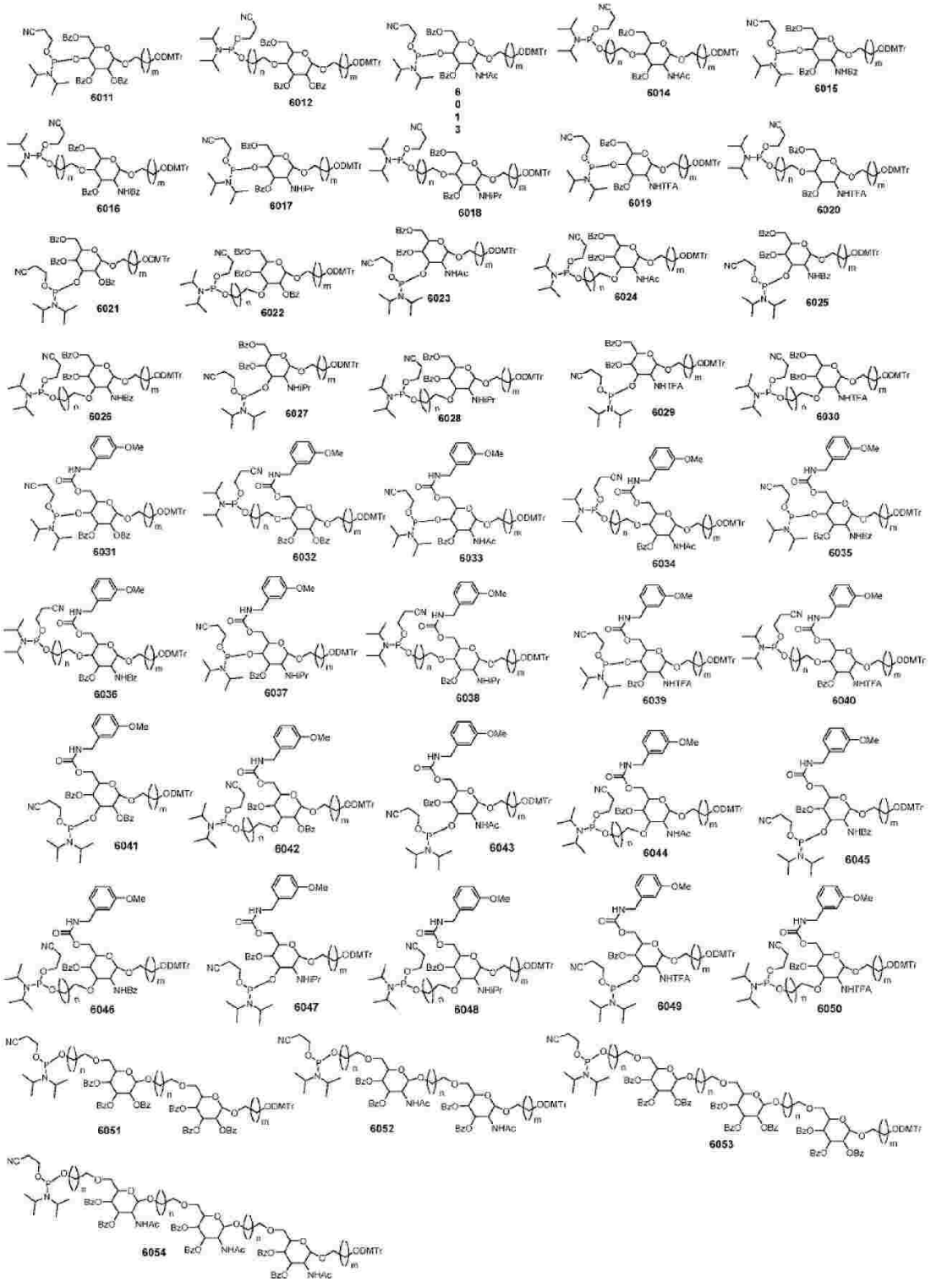
【００７７】

一部の実施形態では、第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子とを接続するリンカーは、以下から選択される：

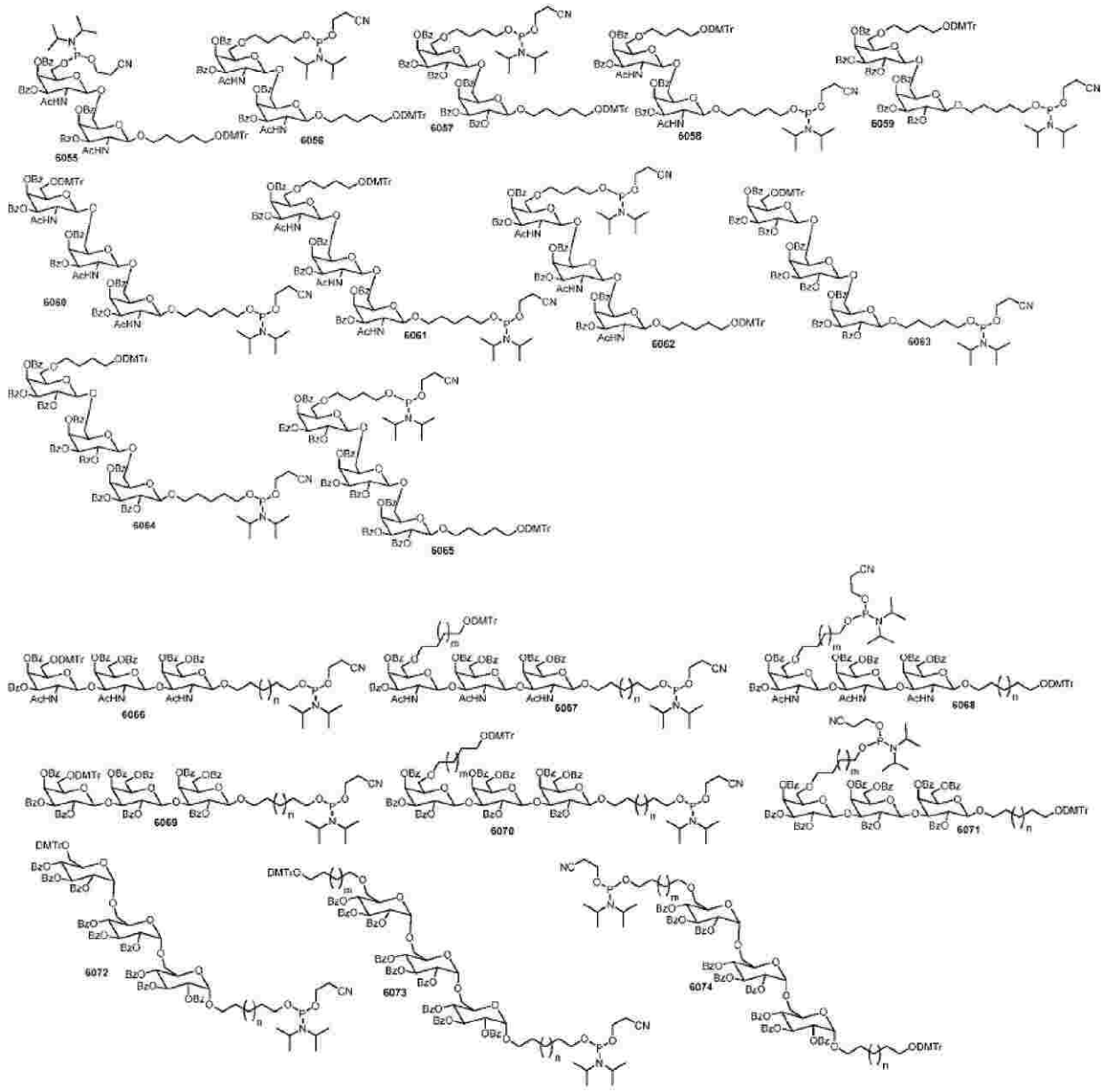
【化８】



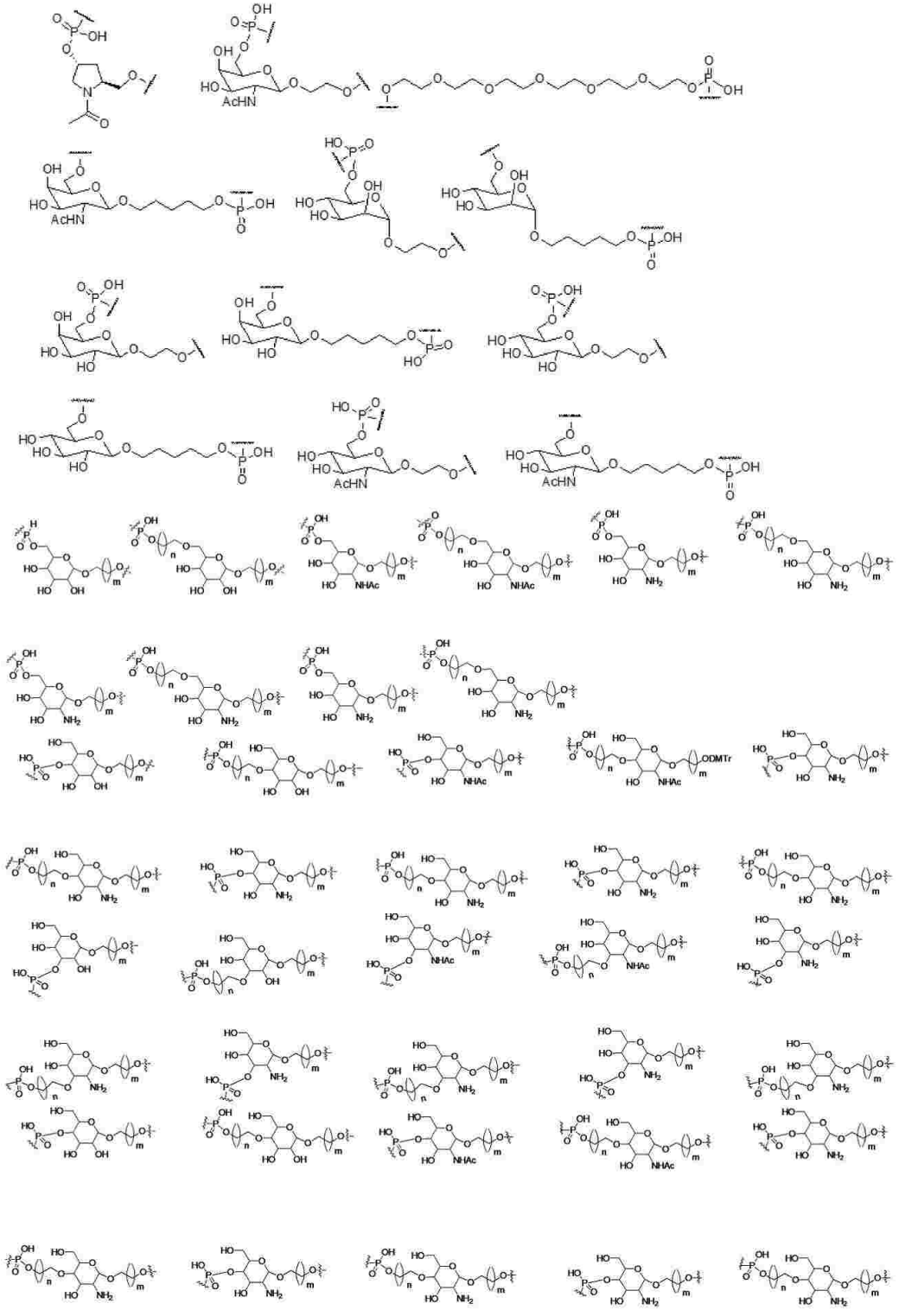
【化９】


6011
6012
6013
6014
6015
6016
6017
6018
6019
6020
6021
6022
6023
6024
6025
6026
6027
6028
6029
6030
6031
6032
6033
6034
6035
6036
6037
6038
6039
6040
6041
6042
6043
6044
6045
6046
6047
6048
6049
6050
6051
6052
6053
6054

【化１０】

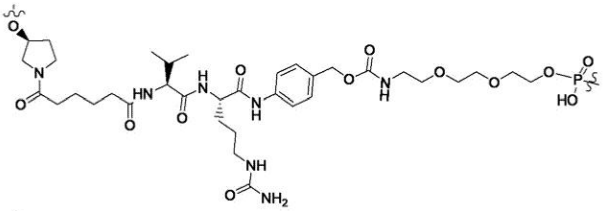

6055
6056
6057
6058
6059
6060
6061
6062
6063
6064
6065
6066
6067
6068
6069
6070
6071
6072
6073
6074

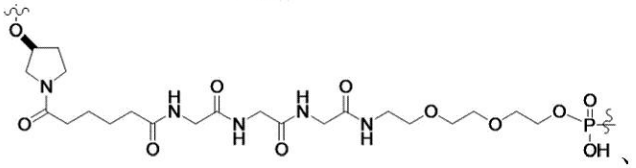
【化１１】



【化１２】

【化１３】

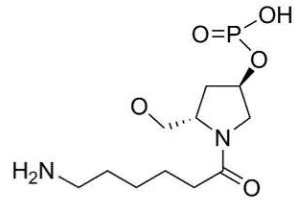




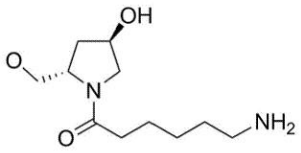
、

式中、ｎ＝１～１２、およびｍ＝１～１２であり；

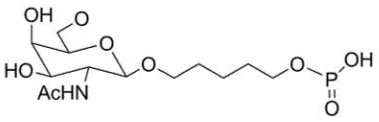
【化１４】



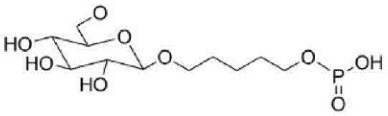
（Ｑ８）、



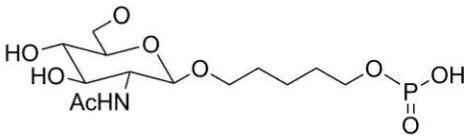
（Ｌ８）、



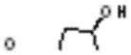
（Ｑ３０４）、



（Ｑ３１５）、



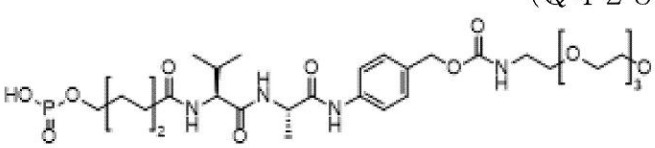
（Ｑ３１７）、



（Ｑ４２６）、

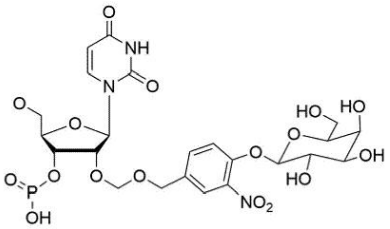
（Ｑ４２７）、

（Ｑ４２８）、



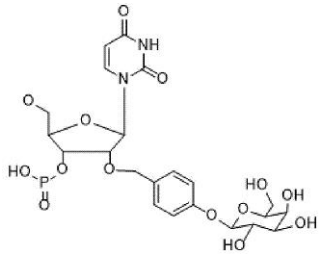
（Ｑ４２９）、

【化１５】



（Ｙ１９５）、および

【化１６】



（Ｙ２５４）。

【００７８】

特定の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、リン酸ジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続される。

【００７９】

一部の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、リン酸トリエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続される。

【００８０】

特定の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、リン酸トリエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続され、結合リン原子は、Ｒｐ立体配置またはＳｐ立体配置のいずれかにある。

【００８１】

一部の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、ホスホロチオエートジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続される。

【００８２】

特定の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、ホスホロチオエートジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続され、結合リン原子は、Ｒｐ立体配置またはＳｐ立体配置のいずれかにある。

【００８３】

一部の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、ホスホロアミダートジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続される。

【００８４】

特定の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、ホスホロアミダートジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続され、結合リン原子は、Ｒｐ立体配置またはＳｐ立体配置のいずれかにある。

【００８５】

一部の実施形態では、ヌクレオチドリンカーおよび／または非ヌクレオチドリンカーは、ジスルフィド結合を介してオリゴヌクレオチド鎖と接続される。

【００８６】

特定の実施形態では、少なくとも一つのｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、２３ヌクレオチドの長さである。任意選択的に、ｄｓＲＮＡの各々のアンチセンス鎖は、２３ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の３’－末端の最後のヌクレオ

チドおよび最後から二番目のヌクレオチドは、センス鎖オリゴヌクレオチドと塩基対形成をせず、任意選択的に、対応するセンス鎖ｄｓＲＮＡの５’末端に対して３’オーバーハングを形成する。

【００８７】

別の実施形態では、複数標的分子、または複数標的分子のエフェクターは、アンチセンス鎖の５’末端で、リン酸またはリン酸模倣体をさらに含む。任意選択的に、リン酸模倣体は、５’－ビニルホスホネート（ＶＰ）である。

【００８８】

一部の実施形態では、複数標的分子は、ＣＮＳ組織への送達を介在する受容体を標的とする、例えば疎水性リガンドなどの標的化リガンドを含む。特定の実施形態では、標的化リガンドは、Ｃ１６リガンドである。

【００８９】

一部の実施形態では、複数標的分子は、例えば線条体などの脳組織を標的とする標的化リガンドを含む。

【００９０】

特定の実施形態では、対象のＣＮＳの組織は、右半球、左半球、小脳、線条体、脳幹、および／または脊髄である。

【００９１】

一つの実施形態では、親油性部分または標的化リガンドは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖もしくはオリゴ糖、またはそれらの組み合わせである生切断性リンカーを介してコンジュゲートされる。

【００９２】

一部の実施形態では、一つ以上の親油性部分が、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン、アミド、マレイミド－チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド結合、クリック反応の生成物、またはカルバミン酸塩からなる群から選択される化合物を含有するリンカーによって、核酸組成物にコンジュゲートされる。

【００９３】

一部の実施形態では、一つ以上の親油性部分が、核酸塩基、糖部分、およびヌクレオチド間結合からなる群から選択される核酸組成物中の位置にコンジュゲートされる。

【００９４】

特定の実施形態では、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも２０％阻害することができる。任意選択的に、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも２５％阻害することができる。任意選択的に、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも３０％阻害することができる。任意選択的に、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも３５％阻害することができる。任意選択的に、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも４０％阻害することができる。任意選択的に、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも４５％阻害することができる。任意選択的に、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、それぞれ少なくとも５０％阻害することができる。

【００９５】

関連の実施形態では、適切な対照は、未処置の対象である。

【００９６】

一部の実施形態では、適切な対照は、基準値である。任意選択的に、基準値は、対象へ

の複数標的分子の投与を行うまえに、対象について取得された値である。
【００９７】
特定の実施形態では、複数標的分子は、脳室内（ＩＣＶ）投与用に製剤化される。
【００９８】
一部の実施形態では、一つ以上の別個の標的ＲＮＡは、ｍＲＮＡである。任意選択的に、二つ以上の別個の標的ＲＮＡは、ｍＲＮＡである。
【００９９】
一部の実施形態では、一つ以上の別個の標的ＲＮＡは、ＣＮＳの疾患または障害に関連する遺伝子の転写物である。任意選択的に、二つ以上の別個の標的ＲＮＡは、ＣＮＳの疾患または障害に関連する遺伝子の転写物である。
【０１００】
一部の実施形態では、複数標的分子のセンス鎖の３’末端は、アミンを有する環状基であるエンドキャップを介して保護され、当該環状基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、［１，３］ジオキソラニル、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフラニル、またはデカリニルである。
【０１０１】
一部の実施形態では、複数標的分子は、以下をさらに含む：Ｓｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；Ｒｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；またはＲｐ立体配置もしくはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾。
【０１０２】
一部の実施形態では、複数標的分子は、以下をさらに含む：Ｓｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端の第一および第二のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；Ｒｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；またはＲｐ立体配置もしくはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾。
【０１０３】
特定の実施形態では、複数標的分子は、以下をさらに含む：Ｓｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端の第一、第二および第三のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；Ｒｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；またはＲｐ立体配置もしくはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾。
【０１０４】
一部の実施形態では、複数標的分子は、以下をさらに含む：Ｓｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端の第一および第二のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；Ｒｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端の第三のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；Ｒｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；またはＲｐ立体配置もしくはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾。

【０１０５】
一部の実施形態では、複数標的分子は、以下をさらに含む：Ｓｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端の第一および第二のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；Ｒｐ立体配置の連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端の第一および第二のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾；またはＲｐ立体配置もしくはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を有する、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖の５’末端の第一のヌクレオチド間結合にある末端キラル修飾。
【０１０６】
特定の実施形態では、核酸組成物は、三つ以上の結合されたｄｓＲＮＡ、一本鎖核酸剤、またはそれらの組み合わせを含む。
【０１０７】
本開示の別の態様は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を有する一つ以上の標的ＲＮＡを調節する方法を提供するものであり、当該方法は、当該対象のＣＮＳ細胞と、少なくとも二つの核酸系エフェクター分子（少なくとも一つはｄｓＲＮＡである）を有する複数標的分子とを接触させることを含み、当該エフェクター分子は、リンカーにより一緒に接続され、互いに重複せず、ｄｓＲＮＡである少なくとも二つのエフェクター分子の各々は、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、当該複数標的分子は、対象のＣＮＳにおいて一つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、少なくとも１５％阻害する。
【０１０８】
本開示のさらなる態様は、ＣＮＳの疾患または障害を有するか、または発症するリスクがある対象において、ＣＮＳの疾患もしくは障害を治療または予防するための方法を提供するものであり、当該方法は、本明細書に開示される複数標的分子を、対象のＣＮＳに投与し、それによって対象を治療することを含む。
【０１０９】
本開示の組成物または方法を使用して治療または予防され得るＣＮＳの疾患または障害の例としては、限定されないが、神経変性障害（例えば、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病、早発型家族性アルツハイマー病（ＥＯＦＡＤ）、脳アミロイド血管症（ＣＡＡ）、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）、アンジェルマン症候群、神経系の運動失調／神経変性障害（例えば、フリードライヒ失調症）、ハンチントン病（ハンチントン舞踏病）、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ））、鬱病、ダウン症候群、精神病、統合失調症、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、レビー小体型認知症（ＬＢＤ）、純粋自律神経失調症（ＰＡＦ）、ピック病、進行性核上麻痺、ボクサー認知症、第１７番染色体に関連するパーキンソン病、Ｌｙｔｉｃｏ－Ｂｏｄｉｇ病、神経原線維変化優位型認知症（ｔａｎｇｌｅ ｐｒｅｄｏｍｉｎａｎｔ ｄｅｍｅｎｔｉａ）、嗜銀顆粒性疾患、神経節膠腫、神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節硬化症、ハレルフォルデン－スパッツ病、リボフスチン症、大脳皮質基底核変性症、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、血管障害（例えば、脳卒中、一過性虚血性発作（ＴＩＡ）、くも膜下出血、硬膜下の出血および血腫、ならびに硬膜外出血）、感染症（例えば、髄膜炎、脳炎、ポリオ、硬膜外膿瘍）、構造的障害（例えば、脳や脊髄の損傷、ベル麻痺、頸部脊椎症、手根管症候群、脳や脊髄の腫瘍、末梢神経障害、ギランバレー症候群）、および機能的障害（例えば、頭痛、てんかん、めまい、神経痛）が挙げられる。本開示の組成物または方法を使用して治療または予防され得るＣＮＳのその他の疾患または障害としては限定されないが、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）、アンジェルマン症候群、および神経系の運動失調／神経変性障害（例えば、フリードライヒ失調症）が挙げられる。
【０１１０】
一つの実施形態では、治療には、疾患または障害の少なくとも一つの兆候または症状の改善が含まれる。
【０１１１】

特定の実施形態では、治療には、疾患または障害の進行の予防が含まれる。

【０１１２】

本発明の一つの態様は、一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を有する一つ以上の標的遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物を提供するものであり、少なくとも一つの標的遺伝子は、ＣＮＳの疾患または障害に関連し、医薬組成物は、対象のＣＮＳへの投与用に製剤化され、本開示の複数標的分子と薬学的に許容可能な担体を含む。

【０１１３】

一部の実施形態では、本開示は、本開示の医薬組成物を含む、ＣＮＳ送達用に製剤化された注射剤を提供する。

【０１１４】

本開示のさらなる態様は、ＣＮＳ細胞において、ＣＮＳの疾患または障害に関連する標的遺伝子の発現を阻害する方法を提供するものであり、当該方法は、（ａ）細胞を、本開示の複数標的分子剤または本開示の医薬組成物と接触させること、および（ｂ）工程（ａ）で生成された細胞を、ＣＮＳの疾患または障害に関連した標的遺伝子のｍＲＮＡ転写物が分解されるのに充分な時間、維持し、それによって細胞において、ＣＮＳの疾患または障害に関連した標的遺伝子の発現を阻害することを含む。

【０１１５】

一つの実施形態では、細胞は、対象内にある。任意選択的に、対象は、ヒトである。

【０１１６】

特定の実施形態では、対象は、哺乳動物である。任意選択的に、対象は、アカゲザル、カニクイザル、マウス、またはラットである。

【０１１７】

一部の実施形態では、ＣＮＳの疾患または障害に関連する各標的遺伝子の発現は、少なくとも１５％、任意選択的に少なくとも２０％、任意選択的に少なくとも２５％、任意選択的に少なくとも３０％、任意選択的に少なくとも３５％、任意選択的に少なくとも４０％、任意選択的に少なくとも４５％、任意選択的に少なくとも５０％阻害される。

【０１１８】

特定の実施形態では、対象は、ＣＮＳの疾患または障害に関し、少なくとも一つの診断基準を満たす。

【０１１９】

特定の実施形態では、ヒト対象は、神経変性障害（例えば、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病、早発型家族性アルツハイマー病（ＥＯＦＡＤ）、脳アミロイド血管症（ＣＡＡ）、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）、アンジェルマン症候群、神経系の運動失調／神経変性障害（例えば、フリードライヒ失調症）、ハンチントン病（ハンチントン舞踏病）、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ））、鬱病、ダウン症候群、精神病、統合失調症、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、レビー小体型認知症（ＬＢＤ）、純粋自律神経失調症（ＰＡＦ）、ピック病、進行性核上麻痺、ボクサー認知症、第１７番染色体に関連するパーキンソン病、Ｌｙｔｉｃｏ－Ｂｏｄｉｇ病、神経原線維変化優位型認知症（ｔａｎｇｌｅ　ｐｒｅｄｏｍｉｎａｎｔ　ｄｅｍｅｎｔｉａ）、嗜銀顆粒性疾患、神経節膠腫、神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節硬化症、ハレルフォルデン－スパッツ病、リボフスチン症、大脳皮質基底核変性症、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、血管障害（例えば、脳卒中、一過性虚血性発作（ＴＩＡ）、くも膜下出血、硬膜下の出血および血腫、ならびに硬膜外出血）、感染症（例えば、髄膜炎、脳炎、ポリオ、硬膜外膿瘍）、構造的障害（例えば、脳や脊髄の損傷、ベル麻痺、頚部脊椎症、手根管症候群、脳や脊髄の腫瘍、末梢神経障害、ギランバレー症候群）、および機能的障害（例えば、頭痛、てんかん、めまい、神経痛）からなる群から選択される疾患と診断されている、またはそれに罹患している。

【０１２０】

一部の実施形態では、接触工程は、対象に、髄腔内注射剤、または脳室内（ＩＣＶ）注射剤を投与することを含む。

【０１２１】
特定の実施形態では、方法は、追加の治療剤または療法を対象に投与することをさらに含む。例示的な追加の治療薬および治療としては、例えば、鎮静薬、抗うつ薬、クロナゼパム、バルプロ酸ナトリウム、鎮痛剤、抗てんかん薬、コリンエステラーゼ阻害剤、メマンチン、ベンゾジアゼピン、レボドパ、ＣＯＭＴ阻害剤（例えば、トルカポンおよびエンタカポン）、ドーパミン作動薬（例えば、ブロモクリプチン、ペルゴリド、プラミペキソール、ロピニロール、ピリベジル、カベルゴリン、アポモルヒネおよびリスリド）、ＭＡＯ－Ｂ阻害剤（例えば、サフィナミド、セレギリンおよびラサギリン）、外科手術、アマンタジン、抗コリン薬、モダフィニル、ピマバンセリン、ドキセピン、ラサグリン（ｒａｓａｇｌｉｎｅ）、抗精神病薬、非定型抗精神病薬（例えば、アミスルプリド、オランザピン、リスペリドン、およびクロザピン）、リルゾール、エダラボン、脳深部の刺激、非侵襲的換気（ＮＩＶ）、侵襲的換気理学療法、作業療法、発話療法、食事の変化と嚥下法、栄養チューブ、ＰＥＧチューブ、プロバイオティクス、および心理療法が挙げられる。

【０１２２】
特定の実施形態では、本開示の複数標的分子は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。

【０１２３】
一部の実施形態では、本開示の複数標的分子は、対象に髄腔内投与される。

【０１２４】
一つの実施形態では、方法は、脳（例えば、線条体）または脊椎の組織におけるＣＮＳの執権または障害に関連した標的遺伝子の発現を低下させる。任意選択的に、脳または脊椎の組織は、線条体、皮質、小脳、頚椎、腰椎、または胸椎である。

【０１２５】
一部の実施形態では、複数標的分子は、少なくとも一つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合をさらに含む。関連する実施形態では、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合は、一つの鎖の３’－末端にあるか、または任意選択的に、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡの少なくとも一つの鎖の３’－末端にある。任意選択的に、当該鎖は、アンチセンス鎖である。別の実施形態では、当該鎖は、センス鎖である。関連する実施形態では、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合は、一つの鎖の５’－末端にあるか、または任意選択的に、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡの少なくとも一つの鎖の５’－末端にある。任意選択的に、当該鎖は、アンチセンス鎖である。別の実施形態では、当該鎖は、センス鎖である。

【０１２６】
別の実施形態では、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのヌクレオチド間結合は、一つの鎖の５’－末端と３’－末端の両方にあるか、または任意選択的に、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡの少なくとも一つの鎖の５’－末端と３’－末端の両方にある。任意選択的に、当該鎖は、アンチセンス鎖である。別の実施形態では、当該鎖は、センス鎖である。

【０１２７】
追加の実施形態では、複数標的分子、または複数標的分子のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端の１位の塩基対は、Ａ：Ｕ塩基対である。

【０１２８】
本開示の追加的な態様は、標的遺伝子の発現を阻害するための複数標的分子を提供するものであり、標的遺伝子を標的とする一つ以上のｄｓＲＮＡ（複数標的分子の各ｄｓＲＮＡは、同じ遺伝子の異なる部分、または異なる遺伝子を標的とする）は、二本鎖領域を形成するセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、当該センス鎖は、ｄｓＲＮＡの標的遺伝子のヌクレオチド配列、またはｄｓＲＮＡの標的遺伝子の全ヌクレオチド配列に対して少なくとも９０％のヌクレオチド配列同一性、例えば、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９

６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有するヌクレオチド配列、のいずれか一つとは３ヌクレオチド以下異なる（すなわち、３、２、１または０ヌクレオチド異なる）、少なくとも１５個連続するヌクレオチドを含み、当該アンチセンス鎖は、ｄｓＲＮＡの標的遺伝子のヌクレオチド配列のいずれか一つの相補鎖、またはｄｓＲＮＡの標的遺伝子の全ヌクレオチド配列の相補鎖に対して少なくとも９０％のヌクレオチド配列同一性、例えば、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有するヌクレオチド配列、のいずれか一つとは３ヌクレオチド以下異なる（すなわち、３、２、１または０ヌクレオチド異なる）、少なくとも１５個連続するヌクレオチドを含み、ｄｓＲＮＡの標的遺伝子の配列中のいずれかチミンとウラシルの置換（アライメント配列と比較した場合）は、ｄｓＲＮＡの標的ヌクレオチド配列に提供される、相補的ヌクレオチド配列のいずれか一つとは３ヌクレオチド以下異なることに寄与する差異としてはカウントされず、任意選択的に、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖のヌクレオチドの実質的にすべてが、２’－Ｏ－メチル修飾、ＧＮＡまたは２’－フルオロ修飾である修飾を含み、任意選択的に、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖は、二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を５’末端に含み、任意選択的に、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖のヌクレオチドの実質的にすべてが、２’－Ｏ－メチル修飾と２’－フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、任意選択的に、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、５’末端に二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合と、３’末端に二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、任意選択的に、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖は、例えばＣ１６などの一つ以上の親油性リガンドにコンジュゲートされる。特定の実施形態では、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖は、少なくとも一つの３’末端デオキシチミジンヌクレオチド（ｄＴ）を含み、任意選択的に、一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、少なくとも一つの３’末端デオキシチミジンヌクレオチド（ｄＴ）を含む。

【０１２９】

一つの実施形態では、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドであり、任意選択的に、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである。

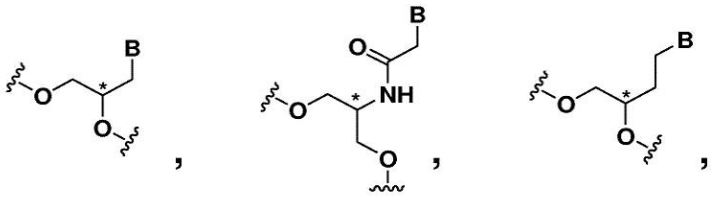
【０１３０】

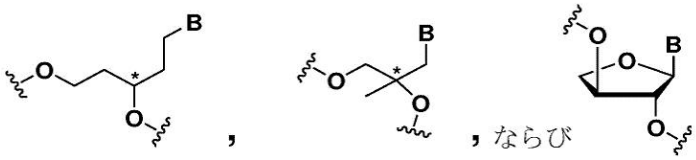
別の実施形態では、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡの各鎖はそれぞれ、１９～３０ヌクレオチドを有する。

【０１３１】

特定の実施形態では、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、５’領域またはその前駆体の最初の９ヌクレオチド位の以内に、二本鎖を熱不安定化させる修飾を少なくとも一つ含む。任意選択的に、二本鎖を熱不安定化させる修飾は、以下のうちの一つ以上である：

【化１７】





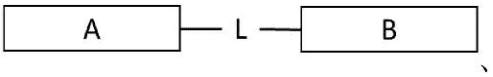
，ならび

式中、Ｂは、核酸塩基である。

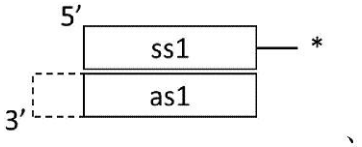
【０１３２】
本開示の別の態様は、本開示の複数標的分子を含有する細胞を提供するものである。任意選択的に、細胞は、対象のＣＮＳ組織の細胞である。
【０１３３】
本開示の追加的な態様は、本開示の複数標的分子を含む、標的遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物を提供するものである。
【０１３４】
一つの実施形態では、複数標的分子は、非緩衝溶液中で投与される。任意選択的に、非緩衝溶液は、生理食塩水または水である。
【０１３５】
別の実施形態では、複数標的分子は、緩衝溶液中で投与される。任意選択的に、緩衝溶液は、酢酸塩、クエン酸塩、プロラミン、炭酸塩、もしくはリン酸塩、またはそれらの任意の組み合わせを含む。別の実施形態では、緩衝溶液は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）である。
【０１３６】
本開示の別の態様は、本開示の複数標的分子および脂質製剤を含む医薬組成物を提供するものである。
【０１３７】
一つの実施形態では、脂質製剤は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む。
【０１３８】
本開示の別の態様は、本開示の方法を実施するためのキットを提供するものであり、当該キットは、ａ）本開示の複数標的分子、およびｂ）使用説明書、およびｃ）任意選択的に、対象に複数標的分子を投与するためのデバイス、を含む。
【０１３９】
本開示の追加的な態様は、以下の修飾のうちの一つ以上を、任意選択的に各ｄｓＲＮＡ内に含む、複数標的分子を提供するものである：２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、２’－アルキル－修飾ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）を含むヌクレオチド、ホスホロチオエート（ＰＳ）、およびビニルホスホネート（ＶＰ）。任意選択的に、ＲＮＡｉ剤は、以下の各修飾のうちの少なくとも一つを含む：２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、２’－アルキル－修飾ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）を含むヌクレオチド、ホスホロチオエート、およびビニルホスホネート（ＶＰ）。
【０１４０】
別の実施形態では、複数標的分子、または複数標的分子のｄｓＲＮＡは、四個以上のＰＳ修飾、任意選択的に６～１６個のＰＳ修飾、任意選択的に８～１４個のＰＳ修飾、任意選択的に１０～１２個のＰＳ修飾、任意選択的にｄｓＲＮＡ中に六個の修飾、任意選択的に複数標的分子中に１２個の修飾を含む。
【０１４１】
追加の実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖は、５’末端と３’末端（リンカーは検討から除外される）を保有し、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、以下の最後のヌクレオチド間結合と最後から二番目のヌクレオチド間結合のそれぞれの位置に六個のＰＳ修飾を含む：複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖の５’末端と３’末端、および複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端。
【０１４２】
さらなる実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖は、５’末端と３’末端（リンカーは検討から除外される）を保有し、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、複数標的分子のセンス鎖とアンチセンス鎖のそれぞれの各３’末端と５’末端の最後のヌクレオチド間結合と最後から二番目のヌクレオチド間結合のそれぞれの位置に八個のＰＳ修飾を含む。

【０１４３】
別の実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の各々は、５’－末端と３’－末端（リンカーは検討から除外される）を保有し、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、ＧＮＡを含むヌクレオチドを一つのみ含む。任意で、ＧＮＡを含むヌクレオチドは、アンチセンス鎖の５’－末端から七番目の核酸塩基残基で、アンチセンス鎖上に位置付けられる。
【０１４４】
追加の実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の各々は、５’－末端と３’－末端（リンカーは検討から除外される）を保有し、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、一から四個の２’－アルキル－修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、２’－アルキル－修飾ヌクレオチドは、２’－C_{1-6} －修飾ヌクレオチドである。任意選択的に、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡの各々は、一つの２’－アルキル、例えば、C_{1-6}修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、一つの２’－アルキル、例えば、C_{1-6}－修飾ヌクレオチドは、センス鎖の５’－末端から六番目の核酸塩基の位置で、センス鎖上に位置付けられる。
【０１４５】
別の実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の各々は、５’－末端と３’－末端（リンカーは検討から除外される）を保有し、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、二個以上の２’－フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の各々は、二個以上の２’－フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドは、センス鎖上ではセンス鎖の５’－末端から７、９、１０、および１１位の核酸塩基に位置し、アンチセンス鎖上ではアンチセンス鎖の５’－末端から２、１４、および１６位の核酸塩基に位置する。特定の実施形態では、各ｄｓＲＮＡのアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の５’－末端から６、８、および９位の核酸塩基のうちの一つ以上に、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドをさらに含む。関連する実施形態では、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドは、センス鎖上ではセンス鎖の５’－末端から７、９、１０、および１１位の核酸塩基に位置し、アンチセンス鎖上ではアンチセンス鎖の５’－末端から２、６、８、９、１４、および１６位の核酸塩基に位置する。
【０１４６】
追加の実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の各々は、５’－末端と３’－末端（リンカーは検討から除外される）を保有し、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、一個以上のＶＰ修飾を含む。任意選択的に、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、アンチセンス鎖の５’末端に、一つのＶＰ修飾を含む。
【０１４７】
別の実施形態では、複数標的分子の各ｄｓＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の各々は、５’－末端と３’－末端（リンカーは検討から除外される）を保有し、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、二個以上の２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、複数標的分子の一つまたは複数のｄｓＲＮＡは、２’－フルオロ、２’－アルキル、またはグリコール核酸（ＧＮＡ）によって修飾されていない全ての核酸塩基位置で、２’－Ｏ－ メチル修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、二つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドは、センス鎖の５’末端から１、２、３、４、５、８、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、および２１位、ならびにアンチセンス鎖の５’末端から１、３、４、５、６、８、９、１０、１１、１２、１３、１５、１７、１８、１９、２０、２１、２２、および２３位に位置する。あるいは、二つ以上の２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドは、センス鎖の５’末端から１、２、３、４、５、８、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、および２１位、ならびにアンチセンス鎖の５’末端から１、３、４、５、７、１０、１１、１２、１３、１５、１７、１８、１９、２０、２１、２２、および２３位に位置する。

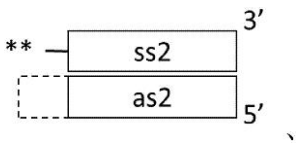
【０１４８】
本発明の別の態様は、少なくとも第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子を含む核酸組成物を含む、対象のＣＮＳ組織の細胞を提供するものであり、当該第一のｄｓＲＮＡ分子と、一本鎖核酸剤または第二のｄｓＲＮＡ分子は、リンカーにより一緒に接続され、互いに重複せず、当該第一のｄｓＲＮＡと、一本鎖核酸分子または第二のｄｓＲＮＡ分子の各々は、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、当該核酸組成物は、対象のＣＮＳの細胞または組織において、一つ以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、少なくとも１５％阻害する。
【０１４９】
一部の実施形態では、細胞は、ニューロン、乏突起膠細胞、小膠細胞、および星状細胞からなる群から選択される細胞型の細胞である。
【０１５０】
本発明の別の態様は、以下の式に従う、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、二個以上の別個の標的ＲＮＡを調節するための複数標的分子を提供するものである：
【化１８】



式中、Ａは、第一の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、　ｄｓＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ））分子であり、Ｂは、第二の二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、ｄｓＲＮＡ）分子であり、Ｌは、リンカーである。ＡおよびＢは、互いに重複せず、ＡとＢのそれぞれは独立して、少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を含み、複数標的分子は、対象のＣＮＳ組織において、二個以上の別個の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、少なくとも１５％阻害することができる。
【０１５１】
特定の実施形態では、ＡおよびＢはそれぞれ、第一および第二の二本鎖ＲＮＡ分子（ｄｓＲＮＡ）である。
【０１５２】
一つの実施形態では、Ａは、以下の式に従い：
【化１９】



式中、ｓｓ１は、第一のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖であり、ａｓ１は、第一のｄｓＲＮＡ分子のアンチセンス鎖であり、＊は、ｓｓ１とＬの間の結合を表し、点線のボックスは、任意選択的なａｓ１の３’オーバーハング領域を示す。
【０１５３】
別の実施形態では、Ａは、以下の式に従い：
【化２０】



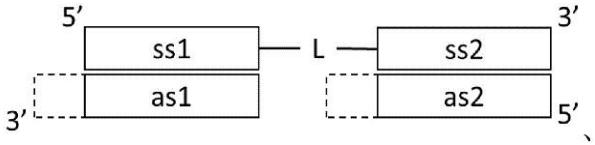
式中、ｓｓ２は、第二のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖であり、ａｓ２は、第二のｄｓＲＮＡ分子のアンチセンス鎖であり、＊＊は、ｓｓ２とＬの間の結合を表し、点線のボックスは、任意選択的なａｓ２の３’オーバーハング領域を示す。
【０１５４】

関連する実施形態では、Ｌは、－（ｎｔ１）（ｎｔ２）（ｎｔ３）－により表され、ｎｔ１、ｎｔ２およびｎｔ３のそれぞれは独立して、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドであり、ｎｔ１は、第一のｄｓＲＮＡ分子に結合され、ｎｔ３は、第二のｄｓＲＮＡ分子に結合される。

【０１５５】

別の実施形態では、複数標的分子は、以下の式を有し：

【化２１】



式中、ｓｓ１は、第一のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖であり、ａｓ１は、第一のｄｓＲＮＡ分子のアンチセンス鎖であり、ｓｓ２は、第二のｄｓＲＮＡ分子のセンス鎖であり、ａｓ２は、第二のｄｓＲＮＡ分子のアンチセンス鎖であり、点線のボックスは、それぞれ、任意選択的なａｓ１とａｓ２の３’オーバーハング領域を示す。

【０１５６】

一部の実施形態では、Ｌは、－（ｎｔ１）（ｎｔ２）（ｎｔ３）－により表され、ｎｔ１、ｎｔ２およびｎｔ３のそれぞれは独立して、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドであり、ｎｔ１は、第一のｄｓＲＮＡ分子に結合され、ｎｔ３は、第二のｄｓＲＮＡ分子に結合される。

【０１５７】

一部の実施形態では、Ｌは、－（ｎｔ１）（ｎｔ２）（ｎｔ３）－により表され、ｎｔ１、ｎｔ２およびｎｔ３のそれぞれは独立して、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドであり、ｎｔ１は、ｓｓ１に結合され、ｎｔ３は、ｓｓ２に結合される。関連の実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３はそれぞれ独立して、以下から選択される：表１に定義される、Ａ、Ｔ、Ｕ、Ｇ、Ｃ、ｄＡ、ｄＴ、ｄＵ、ｄＧ、ｄＣ、ａ、ｔ、ｕ、ｇ、ｃ、Ａｆ、Ｔｆ、Ｕｆ、ＧｆおよびＣｆ。

【０１５８】

別の実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３はそれぞれ独立して、表１に定義される、Ａ、Ｔ、Ｕ、Ｇ、またはＣである。

【０１５９】

さらなる実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３はそれぞれ独立して、表１に定義される、ｄＡ、ｄＴ、ｄＵ、ｄＧ、またはｄＣである。

【０１６０】

一部の実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３はそれぞれ独立して、表１に定義される、ａ、ｔ、ｕ、ｇ、またはｃである。

【０１６１】

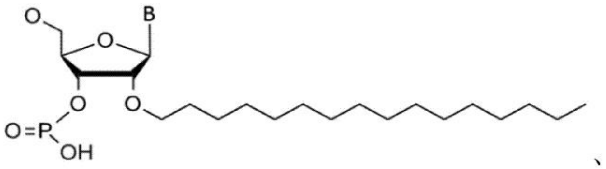
特定の実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３はそれぞれ独立して、表１に定義される、Ａｆ、Ｔｆ、Ｕｆ、Ｇｆ、またはＣｆである。

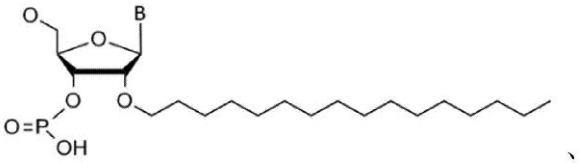
【０１６２】

一部の実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３はまとめて、以下のうちの一つである：表１に定義される、ｄＴｄＴｄＴ、ＵＵＵ、ｕｕｕ、およびＵｆＵｆＵｆ。

【０１６３】

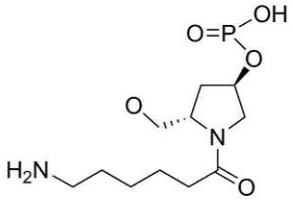
一部の実施形態では、ａｓ１およびａｓ２はそれぞれ、独立した二ヌクレオチドの３’オーバーハングを含む。関連する実施形態では、ａｓ２の二ヌクレオチドの３’オーバーハングは、リンカーに対して相補的である。特定の実施形態では、ａｓ２の二ヌクレオチドの３’オーバーハングは、リンカーに対して一個のミスマッチを有する。別の実施形態では、ａｓ２の二ヌクレオチドの３’オーバーハングは、リンカーに対して二個のミスマッチを有する。

【０１６４】
一部の実施形態では、各親油性部分は、ヘキサデシル基である。
【０１６５】
特定の実施形態では、第一のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置（例えば、６位）、および第二のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置は独立して、以下の構造を有する。
【化２２】


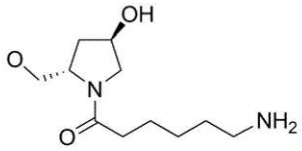
式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、任意選択的にＢは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルであり、ｎ－ヘキサデシル鎖は、親油性部分である。
【０１６６】
一部の実施形態では、第一のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置は、第一のセンス鎖の２～８位および１３～２０位からなる群から選択され、任意選択的に４～８位および１３～１８位からなる群から選択され、任意選択的に非末端ヌクレオチド位置は、第一のセンス鎖の４、６、７および８位であるか、または５、６、７、１５および１７位であり、第二のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置は、第一のセンス鎖の２～８位および１３～２０位からなる群から選択され、任意選択的に４～８位および１３～１８位からなる群から選択され、任意選択的に非末端ヌクレオチド位置は、第二のセンス鎖の４、６、７および８位であるか、または５、６、７、１５および１７位であり、当該位置は独立して、それぞれ第一および第二のセンス鎖の５’末端からカウントされる。
【０１６７】
特定の実施形態では、第一のセンス鎖の非末端ヌクレオチド位置の一つのみ、および第二のセンス鎖の非末端ヌクレオチド位置の一つのみが独立して、以下の構造を有する。
【化２３】


式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、任意選択的にＢは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルであり、ｎ－ヘキサデシル鎖は、親油性部分である。
【０１６８】
一部の実施形態では、第一のセンス鎖の一つの非末端ヌクレオチド位置は、第一のセンス鎖の２～８位および１３～２０位からなる群から選択され、任意選択的に４～８位および１３～１８位からなる群から選択され、任意選択的に第一のセンス鎖の４～８、１５および１７位からなる群から選択され、第二のセンス鎖の一つの非末端ヌクレオチド位置は、第一のセンス鎖の２～８位および１３～２０位からなる群から選択され、任意選択的に４～８位および１３～１８位からなる群から選択され、任意選択的に第二のセンス鎖の４～８、１５および１７位からなる群から選択され、当該位置は独立して、それぞれ第一および第二のセンス鎖の５’末端からカウントされる。
【０１６９】
特定の実施形態では、Ｌは、生切断性リンカーである。上記の態様または実施形態における生切断性リンカーに関するすべての説明は、本明細書において、Ｌに適用され得る。特定の実施形態では、Ｌは、

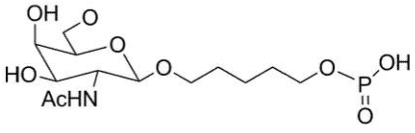
【化２４】



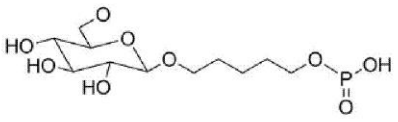
（Ｑ８）、



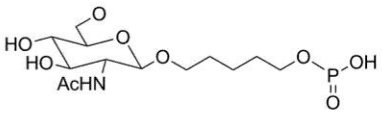
（Ｌ８）、



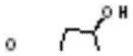
（Ｑ３０４）、



（Ｑ３１５）、



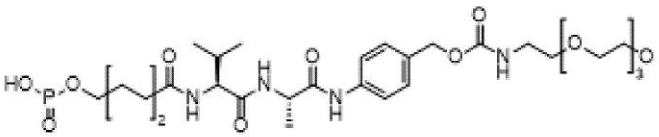
（Ｑ３１７）、



（Ｑ４２６）、

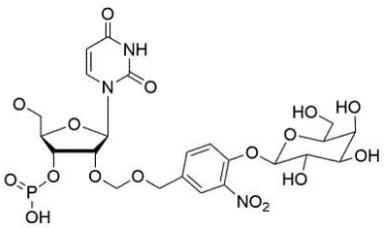
（Ｑ４２７）、

（Ｑ４２８）、



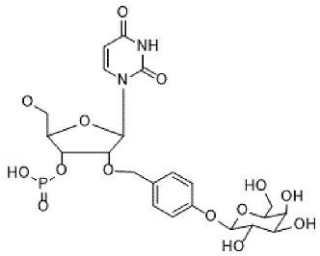
（Ｑ４２９）、

【化２５】



（Ｙ１９５）、および

【化２６】



（Ｙ２５４）。

【０１７０】

特定の実施形態では、Ｌは、酸化還元切断性の結合基である。任意選択的に、Ｌは、－Ｓ－Ｓ－または－Ｃ（Ｒ）$_2$－Ｓ－Ｓ－であるか、またはそれを含み、式中、Ｒは、ＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであり、少なくとも一つのＲは、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、任意選択的にＣＨ$_3$またはＣＨ$_2$ＣＨ$_3$である。

【０１７１】

一部の実施形態では、Ｌは、リン酸系切断性結合基である。任意選択的に、Ｌは、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＲ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＨ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（０Ｈ）－Ｏ、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｓ－または－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｓ－であるか、またはそれを含み、式中、Ｒは、任意選択的に置換された直鎖または分岐鎖のＣ$_1$－Ｃ$_{10}$アルキルである。

【０１７２】

特定の実施形態では、Ｌは、酸切断性結合基である。任意選択的に、Ｌは、ヒドラゾン、エステル、アミノ酸のエステル、－Ｃ＝ＮＮ－、または－ＯＣ（Ｏ）－であるか、またはそれを含む。

【０１７３】

一部の実施形態では、Ｌは、エステル系切断性結合基である。任意選択的に、Ｌは、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－であるか、またはそれを含む。

【０１７４】

特定の実施形態では、Ｌは、ペプチド系切断性結合基である。任意選択的に、Ｌは、細胞酵素によって切断される結合基であるか、またはそれを含む。任意選択的に、細胞酵素はペプチダーゼまたはプロテアーゼである。任意選択的に、Ｌは、－ＮＨＣＨＲ^{A}Ｃ（Ｏ）ＮＨＣＨＲ^{B}Ｃ（Ｏ）－であるか、またはこれを含み、式中、Ｒ^{A}およびＲ^{B}は、二つの隣接するアミノ酸のＲ基である。

【０１７５】

一部の実施形態では、本開示の核酸組成物または医薬組成物は、二つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を含む、一つ以上の標的ＲＮＡを標的とする。

【０１７６】

各ｄｓＲＮＡ分子にコンジュゲートされた親油性部分を少なくとも一つ含む、本開示の複数標的分子について、特にＣＮＳ組織においてかかる分子の驚くべき安定性の送達および阻害有効性が観察され、これは本開示の分子が、ＰＣＴ出願　ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４２４９８に記載される複数標的単一コンジュゲートとは一線を画すものである。

【０１７７】
本発明の別の態様は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するための低分子環状干渉ＲＮＡ（ｓｃｉＲＮＡ）に関するものであり、当該ｓｃｉＲＮＡは、少なくとも４０ヌクレオチドの長さを有し、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列（各ヌクレオチド配列は約１８～約２８ヌクレオチドの長さを有する）を有する第一の鎖、および約１９～２３ヌクレオチドの長さを有し、第一の鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つとアニーリングされる第二の鎖ヌクレオチド配列を少なくとも一つ、含む。第一の鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。第一の鎖ヌクレオチド配列と、第二の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、少なくとも一つの核酸修飾を含む。第一の鎖ヌクレオチド配列または第二の鎖ヌクレオチド配列は、一つ以上のリガンドを含む。

【０１７８】
一部の実施形態では、第一の鎖ヌクレオチド配列および第二の鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０ヌクレオチドの長さである。第一の鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、約１８～約２８ヌクレオチド、例えば約１９～２５ヌクレオチドの長さ、約１９～２３ヌクレオチドの長さ、または約２０～２１ヌクレオチドの長さを有してもよい。第二の鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、約１９～約２５ヌクレオチド、約１９～２３ヌクレオチドの長さ、または約２１～２３ヌクレオチドの長さを有してもよい。

【０１７９】
一部の実施形態では、第一の鎖は、アンチセンス鎖であり、第二の鎖ヌクレオチド配列は、センス鎖ヌクレオチド配列である。したがって、アンチセンス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有し、少なくとも二個のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列が、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される。アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つは、センス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされる。一つの実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、同じ、または異なるセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされる。

【０１８０】
一部の実施形態では、第一の鎖は、センス鎖であり、第二の鎖ヌクレオチド配列は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列である。したがって、センス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有し、少なくとも二個のセンス鎖ヌクレオチド配列が、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される。センス鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つは、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされる。一つの実施形態では、センス鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、同じ、または異なるアンチセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされる。

【０１８１】
一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０ヌクレオチドの長さである。一つの実施形態では、センス鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、約１９～２３ヌクレオチドの長さ、または約２０～２１ヌクレオチドの長さである。

【０１８２】
一部の実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０ヌクレオチドの長さである。一つの実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のそれぞれは、約２１～２３ヌクレオチドの長さ、または２

３ヌクレオチドの長さである。
【０１８３】
アンチセンス鎖ヌクレオチド配列は、環状または実質的に環状のセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされる。一部の実施形態では、一つ以上のセンスヌクレオチド配列は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされる。一部の実施形態では、センスヌクレオチド配列のそれぞれは、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされる。一部の実施形態では、少なくとも一つのセンスヌクレオチド配列は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされない。
【０１８４】
一部の実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされないセンスヌクレオチド配列は、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ａｎｔｉｍｉＲ（アンタゴミル（ａｎｔａｇｏｍｉｒ））オリゴヌクレオチド、または一本鎖ｓｉＲＮＡ（ｓｓ－ｓｉＲＮＡ）オリゴヌクレオチドなどの阻害性一本鎖オリゴヌクレオチドであり得る。
【０１８５】
一部の実施形態では、二本鎖領域は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列の少なくともシード領域中で、センス鎖ヌクレオチド配列とアンチセンス鎖ヌクレオチドとの間に形成される。
【０１８６】
特定の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、少なくとも二つの対称的なセンスヌクレオチド配列を含み、それぞれ、約１９～約２３ヌクレオチドの長さを有する。一つの実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、少なくとも二つの対称的なセンスヌクレオチド配列を含み、それぞれ、約２０～約２１ヌクレオチドの長さを有する。「対称的」とは、同じアンチセンスヌクレオチド配列が、当該二つのセンスヌクレオチド配列のいずれかでアニーリングすることができることを意味する。一つの実施形態では、センス鎖ヌクレオチド配列は、少なくとも二つの同一のアンチセンスヌクレオチド配列とアニーリングし、当該アンチセンスヌクレオチド配列はそれぞれ、２３ヌクレオチドの長さを有し、同じｍＲＮＡ転写物ヌクレオチド配列を標的とする。したがって、ｓｃｉＲＮＡ（ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）は、対象のＣＮＳ組織において、少なくとも一つの標的ｍＲＮＡ転写物の活性または発現を阻害することができる。
【０１８７】
特定の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、少なくとも二つの非対称的なセンスヌクレオチド配列を含み、それぞれ、約１９～約２３ヌクレオチドの長さを有する。一つの実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、少なくとも二つの非対称的なセンスヌクレオチド配列を含み、それぞれ、約２０～約２１ヌクレオチドの長さを有する。「非対称的」とは、当該少なくとも二つのセンスヌクレオチド配列とアニーリングされ得るアンチセンスヌクレオチド配列が、異なることを意味する。一つの実施形態では、センス鎖ヌクレオチド配列は、少なくとも二つの異なるアンチセンスヌクレオチド配列とアニーリングし、当該アンチセンスヌクレオチド配列はそれぞれ、２３ヌクレオチドの長さを有し、少なくとも二つの異なるｍＲＮＡ転写物ヌクレオチド配列を標的とする。したがって、ｓｃｉＲＮＡ（ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）は、対象のＣＮＳ組織において、二つ以上の別個の標的ｍＲＮＡ転写物の活性または発現を阻害することができる。一つの実施形態では、当該二つ以上の別個の標的ｍＲＮＡは、同じ核酸中に位置する。
【０１８８】
一部の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、有機ポリマーリンカーである。有機ポリマーリンカーは、生切断性リンカーであってもよい。
【０１８９】
一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、ヌクレオチド系のリンカ

ー（テザー）を含有する。一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、非ヌクレオチド系のリンカー（テザー）を含有する。一つの実施形態では、センスヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系のリンカー（テザー）である。

【０１９０】

一部の実施形態では、環状または実質的に環状のアンチセンス鎖は、ヌクレオチド系のリンカー（テザー）を含有する。一部の実施形態では、環状または実質的に環状のアンチセンス鎖は、非ヌクレオチド系のリンカー（テザー）を含有する。一つの実施形態では、アンチセンスヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系のリンカー（テザー）である。

【０１９１】

特定の実施形態では、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系のリンカー（テザー）は、生体液中で安定である安定的リンカー（テザー）である。例えば、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系の安定的リンカー（テザー）は、血漿または人工脳脊髄液中で安定である。

【０１９２】

特定の実施形態では、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系のリンカー（テザー）は、切断性リンカー（テザー）である。例えば、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系の切断性リンカー（テザー）は、肝臓ホモジネート、肝臓トリトソーム（ｔｒｉｔｏｓｏｍｅｓ）、肝臓リソソーム、肝臓サイトゾル、脳ホモジネート、脳トリトソーム、脳リソソーム、または脳サイトゾルにおいて、切断可能であってもよい。

【０１９３】

特定の実施形態では、切断性リンカー（テザー）は、酸化還元切断性リンカー（例えば、還元的に切断可能なリンカー、例えば、ジスルフィド基など）、酸切断性リンカー（例えば、ヒドラゾン基、エステル基、アセタール基、またはケタール基など）、エステラーゼ切断性リンカー（例えば、エステル基など）、ホスファターゼ切断性リンカー（例えば、リン酸基など）、またはペプチダーゼ切断性リンカー（例えば、ペプチド結合など）である。

【０１９４】

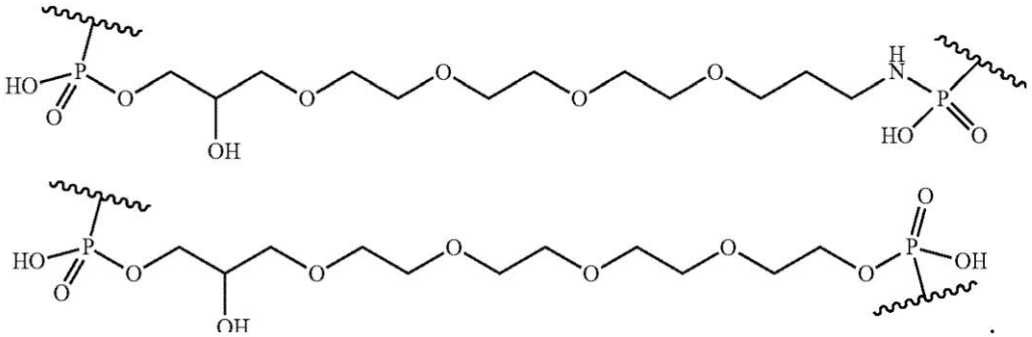
特定の実施形態では、切断性リンカーは、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホン酸水素、ホスホン酸アルキルまたはホスホン酸アリール、ホスホロアミデート、ホスホロチオエート、メチレンメチルイミノ、チオジエステル、チオノカルバメート、Ｎ、Ｎ’－ジメチルヒドラジン、ホスホロセレネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、アミド、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、ジアルキルシロキサン、カルボキサミド、炭酸塩、カルボキシメチル、カルバミン酸塩、カルボン酸エステル、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、硫化物、スルホン酸塩、スルホンアミド、スルホン酸エステル、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンカルボニルアミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、メチレンオキシメチルイミノ、エーテル、チオアセトアミド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される修飾ヌクレオチド間結合を少なくとも一つ含む。

【０１９５】

一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖中のｂｉｓ－リンカーは、ＤＩＣＥＲにより切断可能なヌクレオチド系の切断性リンカー（テザー）を含有する。一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、ＤＩＣＥＲによって切断可能な基質を含む。

【０１９６】

一部の実施形態では、環状または実質的に環状のアンチセンス鎖中のｂｉｓ－リンカーは、ＤＩＣＥＲにより切断可能なヌクレオチド系の切断性リンカーを含有する。一部の実施形態では、環状または実質的に環状のアンチセンス鎖は、ＤＩＣＥＲによって切断可能な基質を含む。

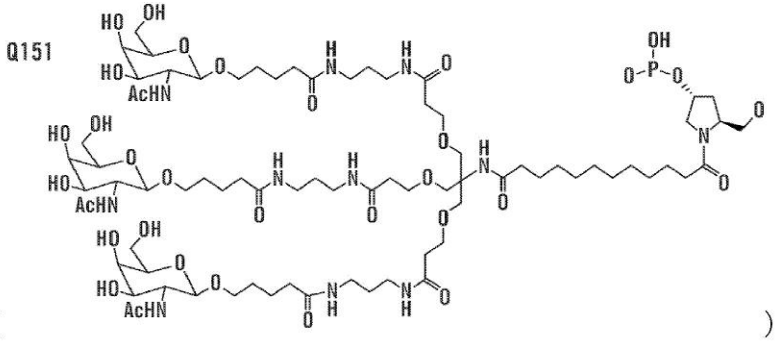
【０１９７】
特定の実施形態では、アンチセンス鎖は、環状または実質的に環状の構造を形成し、当該アンチセンス鎖のアンチセンスヌクレオチド配列で、５’－一リン酸の代謝物を生成することができる切断性リンカー（ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド）を含有する。環状または実質的に環状のアンチセンス鎖は、切断されて、アンチセンス鎖のアンチセンスヌクレオチド配列で、５’－一リン酸の代謝物を含有する直鎖状構造となることができる。
【０１９８】
一部の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖またはオリゴ糖、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される生切断性リンカーを含有する。
【０１９９】
一部の実施形態では、ｂｉｓ－リンカーは、エンドソーム切断性リンカーまたはプロテアーゼ切断性リンカー、例えば、炭水化物リンカーであり、この場合において当該リンカーは、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）、少なくとも１．２５倍速く切断される。
【０２００】
特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、脂肪族の飽和または不飽和のアルキル鎖；リン酸塩、ホスホン酸塩、ホスホロアミデート、ホスホジエステル、ホスホトリエステルやホスホロチオエートをはじめとするリン含有結合；ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、オクタ、ノナまたはデカエチレングリコールをはじめとする（ポリ）エチレングリコール鎖；グリセロールまたはグリセロールエステル；アミノアルキル；およびそれらの組み合わせからなる群から選択される部分を含有する。
【０２０１】
特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、以下からなる群から選択される部分を含む。
【化２７】

、および

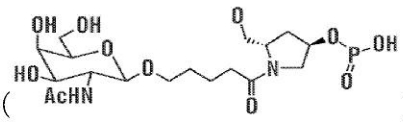
.

【０２０２】
特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、以下から選択される部分を含有する：
－（ＣＨ$_2$）$_{12}$－（Ｃ１２リンカーまたはＱ５０）、
－（ＣＨ$_2$）$_6$－Ｓ－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_6$－（Ｃ６－Ｓ－Ｓ－Ｃ６リンカーまたはＱ５１）、

【化２８】

Q151

Ｑ１５１（  ）、

Ｑ１７３（  ）、

－ＣＨ２ＣＨ２Ｏ－（ＣＨ２ＣＨ２）ｎ－ＣＨ２ＣＨ２Ｏ－ＣＨ２ＣＨ２Ｏ－、式中、ｎは、０または１～２０であり；

－（ＣＨ２）９－（ＣＨ２）ｎ－ＣＨ２－、式中、ｎは、０または１～２０であり；

任意選択的にリガンドとコンジュゲートされた、モノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－プロリノール；

任意選択的にリガンドとコンジュゲートされた、モノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－ヒドロキシプロリノール。

【０２０３】

特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、１～１５ヌクレオチドの長さの核酸リンカーを含む。例えば、核酸リンカーは、２～５ヌクレオチド、３～４ヌクレオチド、または３ヌクレオチドの長さであってもよい。

【０２０４】

特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、ＵＵＵ、２’－Ｏ－メチル－ＵＵＵ（ｕｕｕ）、２’－フルオロ－ＵＵＵ（ＵｆＵｆＵｆ）、および（ｄＴ）ｎからなる群から選択される一つ以上の配列を含み、式中、ｎは、１～２０である（例えば、ｄＴｄＴｄＴ）。

【０２０５】

特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、２’－Ｏ－メチルヌクレオチド、２’－フルオロヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドからなる群から選択される一つ以上のヌクレオチドを含む核酸リンカーを含む。一つの実施形態では、すべての核酸リンカーヌクレオチドが、同じタイプのヌクレオチドである。一つの実施形態では、核酸リンカーは、完全に２’－Ｏ－メチルヌクレオチドを含み、完全２’－フルオロヌクレオチドを含み、または完全にデオキシリボヌクレオチドを含む。

【０２０６】

特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、修飾されたリボヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、任意選択的に、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド修飾、２’－フルオロ－リボヌクレオチド修飾、異なる３’－修飾（３’－リボ、３’－Ｏ－メチル、３’－デオキシ、３’－フルオロ）を含む２’－５’－結合ヌクレオチド、グリコール核酸（ＧＮＡ）修飾、ロックド核酸（ＬＮＡ）修飾、ヘキサノール核酸（ＨＮＡ）修飾、脱塩基リボース修飾、脱塩基デオキシリボース修飾、および脱塩基ヒドロキシプロリノール修飾からなる群から選択される一つ以上の修飾を含むポリ

ヌクレオチドを含む。

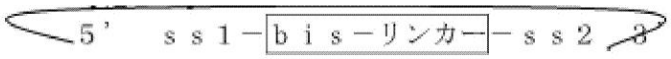
【０２０７】

特定の実施形態では、第一の鎖（環状もしくは実質的に環状のセンス鎖、または環状もしくは実質的に環状のアンチセンス鎖）のヌクレオチド配列を接続するｂｉｓ－リンカーは、リン酸ジエステル結合、リン酸トリエステル結合（任意選択的に、Ｒｐ立体配置またはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を含有する）、ホスホロチオエートジエステル結合（任意選択的に、Ｒｐ立体配置またはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を含有する）、ホスホロアミデートジエステル結合（任意選択的に、Ｒｐ立体配置またはＳｐ立体配置のいずれかの連結リン原子を含有する）、およびジスルフィド結合からなる群から選択される一つ以上の部分を含む。

【０２０８】

特定の実施形態では、環状もしくは実質的に環状のセンス鎖は、ｓｓ１およびｓｓ２の二つのヌクレオチド配列を有し、ｓｓ１の３’末端は、ｂｉｓ－リンカーによってｓｓ２の５’末端に接続される。

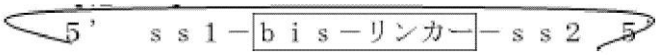
【化２９】



【０２０９】

他の実施形態では、環状もしくは実質的に環状のセンス鎖は、ｓｓ１およびｓｓ２の二つのヌクレオチド配列を有し、ｓｓ１の３’末端は、ｂｉｓ－リンカーによってｓｓ２の３’末端に接続される。

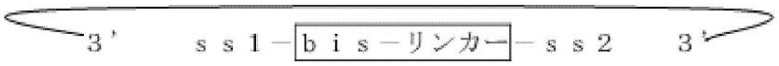
【化３０】



【０２１０】

他の実施形態では、環状もしくは実質的に環状のセンス鎖は、ｓｓ１およびｓｓ２の二つのヌクレオチド配列を有し、ｓｓ１の５’末端は、ｂｉｓ－リンカーによってｓｓ２の５’末端に接続される。

【化３１】



【０２１１】

一つの実施形態では、ｓｓ１は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とアニーリングされる。ａｓ１の３’末端は、ｓｓ１の５’末端に対して、１～２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを形成してもよい。ａｓ１の５’末端は、ｓｓ１の３’末端に対して、１～２ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを形成してもよい。

【０２１２】

一つの実施形態では、ｓｓ２は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ２とアニーリングされる。ａｓ２の３’末端は、ｓｓ２の５’末端に対して、１～２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを形成してもよい。ａｓ２の５’末端は、ｓｓ２の３’末端に対して、１～２ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを形成してもよい。

【０２１３】

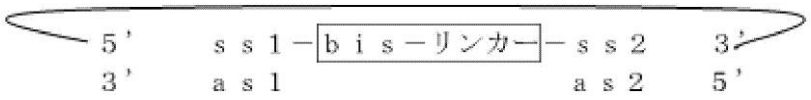
特定の実施形態では、ｓｓ１とｓｓ２との間のｂｉｓ－リンカーは、－（ｎｔ１）（ｎｔ２）（ｎｔ３）－によって表され、式中、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３のそれぞれは独立して、ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドである。一部の実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３はそれぞれ独立して、Ａ、Ｔ、Ｕ、Ｇ、Ｃ、およびそれらの様々な修飾体からなる群から選択される。Ａ、Ｔ、Ｕ、Ｇ、Ｃのそれぞれは、２’－Ｏ－メチルヌクレオチド、２’－フルオロヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、およびリボヌ

クレオチドからなる群から選択されるヌクレオチドの形態であってもよい。一つの実施形態では、ｎｔ１、ｎｔ２、およびｎｔ３は、以下のうちの一つである：ＵＵＵ、２’－Ｏ－メチル－ＵＵＵ（ｕｕｕ）、２’－フルオロ－ＵＵＵ（ＵｆＵｆＵｆ）、またはｄＴｄＴｄＴｄＴ。

【０２１４】

一つの実施形態では、ｓｓ１は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とアニーリングされ、ｓｓ２は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ２とアニーリングされる。

【化３２】



アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを含んでもよい。アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、１～２ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを含んでもよい。

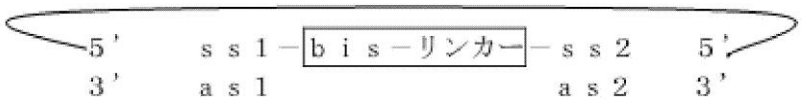
【０２１５】

一部の実施形態では、ｓｓ１とｓｓ２の間のｂｉｓ－リンカーは、３ヌクレオチドの長さの核酸リンカーであり、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを含む。一つの実施形態では、ａｓ２の３’オーバーハングの二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して相補的である。一つの実施形態では、ａｓ２の３’オーバーハングの二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して一つのミスマッチを有する。一つの実施形態では、ａｓ２の３’オーバーハングの二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して二つのミスマッチを有する。

【０２１６】

別の実施形態では、ｓｓ１は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とアニーリングされ、ｓｓ２は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ２とアニーリングされる。

【化３３】



アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを含んでもよい。アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、１～２ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを含んでもよい。

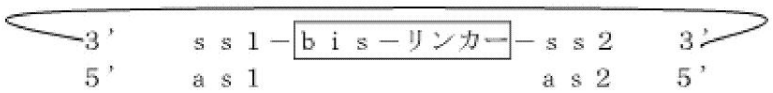
【０２１７】

一部の実施形態では、ｓｓ１とｓｓ２の間のｂｉｓ－リンカーは、３ヌクレオチドの長さの核酸リンカーであり、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、１～２ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを含む。一つの実施形態では、ａｓ２またはａｓ１の５’オーバーハングの一または二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して相補的である。一つの実施形態では、ａｓ２またはａｓ１の５’オーバーハングの一または二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して一つのミスマッチを有する。一つの実施形態では、ａｓ２またはａｓ１の５’オーバーハングの二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して二つのミスマッチを有する。

【０２１８】

別の実施形態では、ｓｓ１は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とアニーリングされ、ｓｓ２は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ２とアニーリングされる。

【化３４】



アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、１～２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを含んでもよい。アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、１～２ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを含んでもよい。

【０２１９】

一部の実施形態では、ｓｓ１とｓｓ２の間のｂｉｓ－リンカーは、３ヌクレオチドの長さの核酸リンカーであり、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１とａｓ２はそれぞれ、１～２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを含む。一つの実施形態では、ａｓ２またはａｓ１の３’オーバーハングの一または二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して相補的である。一つの実施形態では、ａｓ２またはａｓ１の３’オーバーハングの一または二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して一つのミスマッチを有する。一つの実施形態では、ａｓ２またはａｓ１の３’オーバーハングの二ヌクレオチドは、ｂｉｓ－リンカーのヌクレオチドに対して二つのミスマッチを有する。

【０２２０】

一部の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、少なくとも一つの化学修飾を含む。化学修飾は、ヌクレオシド間結合修飾、核酸塩基修飾、糖修飾、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。

【０２２１】

特定の実施形態では、化学修飾は、ＬＮＡ、ＥＮＡ、ＨＮＡ、ＣｅＮＡ、２’－Ｏ－メトキシアルキル（例えば、２’－Ｏ－メトキシメチル、２’－Ｏ－メトキシエチル、または２’－Ｏ－２－メトキシプロパニル）、２’－Ｏ－アルキル、２’－Ｏ－アリル、２’－Ｃ－アリル、２’－フルオロ、２’－デオキシ、２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエトキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－アラ－Ｆ、Ｌ－ヌクレオシド修飾（例えば、２’－修飾Ｌ－ヌクレオシド、例えば、２’－デオキシ－Ｌ－ヌクレオシド）、ＢＮＡ脱塩基糖、脱塩基環状およびオープン－鎖アルキル、ならびにそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【０２２２】

特定の実施形態では、化学修飾は、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ、２’－フルオロ、２’－C_6－C_{18}炭化水素鎖、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される２’－修飾である。

【０２２３】

特定の実施形態では、化学修飾は、２’－Ｏ－メチル、２’－デオキシ、２’－フルオロ、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される２’－修飾である。

【０２２４】

一部の実施形態では、全ヌクレオチドの約１００％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、または３０％が修飾される。例えば、全ヌクレオチドの５０％が修飾される場合、ｓｃｉＲＮＡ中に存在する全ヌクレオチドの５０％が、本明細書に記載される修飾を含有する。

【０２２５】

一部の実施形態では、第一の鎖（例えば、センス鎖）ヌクレオチド配列中の全ヌクレオチドが修飾される。

【０２２６】

一部の実施形態では、第二の鎖（例えば、アンチセンス鎖）ヌクレオチド配列中の全ヌクレオチドが修飾される。

【０２２７】

一つの実施形態では、ｓｃｉＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも５０％が独立して、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－アリル、２’－デオキシ、または２’－フルオロで修飾される。

【０２２８】

ｓｃｉＲＮＡは、一つ以上のリガンドを含む。

【０２２９】

一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖は、一つ以上のリガンドを含んでもよい。一つの実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖の各センスヌクレオチド配列は、少なくとも一つのリガンドを含み、当該リガンドは特に、遺伝子発現の調節に有効であり得る。したがって、少なくとも二つのリガンド（例えば、親油性リガンド）は、複数標的ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ分子とコンジュゲートされる。

【０２３０】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列は、一つ以上のリガンドを含む。一つの実施形態では、各アンチセンスヌクレオチド配列は、少なくとも一つのリガンドを含み、当該リガンドは特に、遺伝子発現の調節に有効であり得る。したがって、少なくとも二つのリガンド（例えば、親油性リガンド）は、複数標的ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ分子とコンジュゲートされる。

【０２３１】

特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有する鎖にコンジュゲートされる。特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有さない鎖にコンジュゲートされる。一つの実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有する鎖にコンジュゲートされ、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有さない鎖にコンジュゲートされる。

【０２３２】

特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、センス鎖のセンスヌクレオチド配列とコンジュゲートされる。リガンドのうちの少なくとも一つは、センスヌクレオチド配列の３’末端、５’末端、または内側の位置でコンジュゲートされてもよい。一つの実施形態では、コンジュゲートされるセンス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。一つの実施形態では、コンジュゲートされるセンス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有さない。

【０２３３】

特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、アンチセンス鎖のアンチセンスヌクレオチド配列とコンジュゲートされる。リガンドのうちの少なくとも一つは、アンチセンスヌクレオチド配列の３’末端、５’末端、または内側の位置でコンジュゲートされてもよい。一つの実施形態では、コンジュゲートされるアンチセンス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。一つの実施形態では、コンジュゲートされるアンチセンス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有さない。

【０２３４】

一部の実施形態では、リガンドは、ｓｃｉＲＮＡのリボ糖への直接付加によって、ｓｃｉＲＮＡにコンジュゲートされてもよい。あるいはリガンドは、一つ以上のリンカー（テザー）および／または担体を介してｓｃｉＲＮＡにコンジュゲートされてもよい。

【０２３５】

一部の実施形態では、リガンドは、一価、または分岐状の二価もしくは三価のリンカーを介してｓｃｉＲＮＡ分子にコンジュゲートされてもよい。

【０２３６】

一部の実施形態では、リガンドは、一つ以上のヌクレオチドを置換する担体を介して、ｓｃｉＲＮＡにコンジュゲートされてもよい。担体は、環状基または非環状基であってもよい。一つの実施形態では、環状基は、シクロヘキシル、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、［１，３］ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾ

リジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフラニル、およびデカリニルからなる群から選択される。一つの実施形態では、非環状基は、セリノール骨格またはジエタノールアミン骨格に基づく部分である。

【０２３７】

特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、親油性部分である。

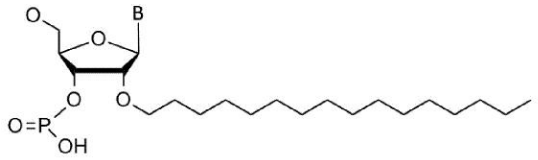
【０２３８】

一つの実施形態では、親油性部分は、脂質、コレステロール、レチノイン酸、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－ｂｉｓ－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキサノール（ｇｅｒａｎｙｌｏｘｙｈｅｘｙａｎｏｌ）、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、１，３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸（（ｏｌｅｏｙｌ）ｃｈｏｌｅｎｉｃ ａｃｉｄ）、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジンである。

【０２３９】

一部の実施形態では、親油性部分は、飽和または不飽和のＣ４－Ｃ３０炭化水素鎖（例えば、Ｃ４－Ｃ３０アルキルまたはアルケニル）と、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、およびアルキンからなる群から選択される任意選択の官能基を含有する。一つの実施形態では、親油性部分は、飽和または不飽和のＣ６－Ｃ１８炭化水素鎖（例えば、直鎖状Ｃ６－Ｃ１８アルキルまたはアルケニル）、例えば、飽和もしくは不飽和のＣ１６またはＣ２２炭化水素鎖（例えば、直鎖状のＣ１６もしくはＣ２２のアルキルまたはアルケニル）を含有する。例えば、センス鎖ヌクレオチド配列の一つ以上の非末端位置は、以下の構造を有してもよい：

【化３５】



（１）、

式中、Ｂは、天然ヌクレオチド塩基または修飾ヌクレオチド塩基（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、もしくはウラシル、またはそれらの修飾誘導体）であり、ｎ－ヘキサデシル鎖は、親油性部分である。式（１）に示される修飾は、本明細書において、「２’－Ｃ１６」と呼称される。似たような、ｎ－ヘキサデシル鎖をＣ4－Ｃ３０炭化水素鎖で置換する修飾は、「２’－Ｃ4－Ｃ３０炭化水素鎖」と呼称される（または、Ｃ６－Ｃ１８炭化水素鎖との置換は、「２’－Ｃ6－Ｃ１８炭化水素鎖」と呼称される）。

【０２４０】

関連する実施形態では、センス鎖ヌクレオチド配列またはアンチセンス鎖ヌクレオチド配列のセンス鎖の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置は、式（１）の２’－Ｃ4－Ｃ３０炭化水素鎖構造、２’－Ｃ6－Ｃ１８炭化水素鎖構造、または２’－Ｃ１６構造を有する。

【０２４１】

一つの実施形態では、すべてのセンス鎖ヌクレオチド配列の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置は、式（１）の２’－Ｃ4－Ｃ３０炭化水素鎖構造、２’－Ｃ6－Ｃ１８炭化水素鎖構造、または２’－Ｃ１６構造を有する。

【０２４２】

一つの実施形態では、すべてのアンチセンス鎖ヌクレオチド配列の一つ以上の非末端ヌクレオチド位置は、式（１）の２’－Ｃ4－Ｃ３０炭化水素鎖構造、２’－Ｃ6－Ｃ１８炭化水素鎖構造、または２’－Ｃ１６構造を有する。

【０２４３】

一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖ヌクレオチド配列のうちの一つ以上は、センス鎖ヌクレオチド配列の９～１２位以外の非末端位置のうちの一つ以上、例えば、センス鎖ヌクレオチド配列の５’末端を１位として数えて、センス鎖ヌクレオチ

ド配列の４～８位および１３～１８位、センス鎖ヌクレオチド配列の５、６、７、１５および１７位、またはセンス鎖ヌクレオチド配列の４、６、７および８位に独立してコンジュゲートされた一つ以上の親油性部分を含む。

【０２４４】

一部の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス鎖ヌクレオチド配列うちの一つ以上は、ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の６位に独立してコンジュゲートされた一つ以上の親油性部分を含む。一つの実施形態では、各センス鎖ヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の６位にコンジュゲートされた親油性部分を含み、任意選択的に、親油性部分は、飽和または不飽和のＣ$_{6}$－Ｃ$_{18}$炭化水素鎖を含み、任意選択的に、親油性部分は、飽和または不飽和のＣ$_{16}$炭化水素鎖を含む。

【０２４５】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のうちの一つ以上は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列の非末端位置のうちの一つ以上、例えば、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列の５’末端を１位として数えて、センス鎖ヌクレオチド配列の４～８位および１３～１８位、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列の６～１０位および１５～１８位、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列の１５位および１７位に独立してコンジュゲートされた一つ以上の親油性部分を含む。

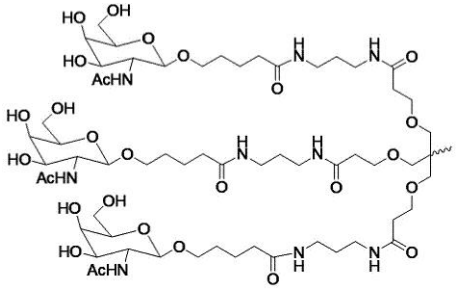
【０２４６】

特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、炭水化物系のリガンドである。炭水化物系のリガンドは、Ｄ－ガラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）、多価ＧａｌＮＡｃ、Ｄ－マンノース、多価マンノース、多価ラクトース、Ｎ－アセチル－グルコサミン、グルコース、多価グルコース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、またはレクチンであってもよい。

【０２４７】

特定の実施形態では、炭水化物系のリガンドは、ＡＳＧＰＲリガンドである。例えば、ＡＳＧＰＲリガンドは、二価または三価の分岐状リンカー、例えば、

【化３６】



を介して付加された一つ以上のＧａｌＮＡｃ誘導体である。

【０２４８】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列の５’末端に、リン酸塩またはリン酸塩模倣体を含む。一つの実施形態では、少なくとも一つのリン酸塩模倣体は、各アンチセンスヌクレオチド配列の５’末端にある。

【０２４９】

リン酸塩模倣体は、５’末端ホスホロチオエート（５’－ＰＳ）、５’末端ホスホロジチオエート（５’－ＰＳ２）、５’末端ビニルホスホネート（５’－ＶＰ）、５’末端メチルホスホネート（ＭｅＰｈｏｓ）、または５’－デオキシ－５’－Ｃ－マロニルであってもよい。一つの実施形態では、リン酸塩模倣体は、５’－ビニルホスホネート（ＶＰ）である。５’－ＶＰは、５’－Ｅ－ＶＰ異性体（すなわち、トランス－ビニルホスフェート）、５’－Ｚ－ＶＰ異性体（すなわち、シス－ビニルホスフェート）、またはそれらの混合物のいずれかであってもよい。

【０２５０】

一つの実施形態では、ホスフェート模倣体は、５’－ビニルホスホネート（ＶＰ）である。

【０２５１】

一部の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、少なくとも一つの末端キラルリン原子をさらに含む。

【０２５２】

ヌクレオチド間結合に対する部位特異的なキラル修飾は、センスヌクレオチド配列またはアンチセンスヌクレオチド配列の５’末端、３’末端、または５’末端と３’末端の両端にあってもよい。これは本明細書において、「末端」キラル修飾と称される。末端修飾は、末端領域内の３’末端または５’末端の位置であってもよく、例えば、センスヌクレオチド配列またはアンチセンスヌクレオチド配列の末端ヌクレオチドの位置、または最後の２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０ヌクレオチド以内であってもよい。キラル修飾は、センス鎖ヌクレオチド配列、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列、またはセンス鎖とアンチセンス鎖のヌクレオチド配列の両方にあってもよい。キラル純粋なリン原子のそれぞれは、Ｒｐ立体配置またはＳｐ立体配置のいずれかであってもよく、およびそれらの組み合わせであってもよい。キラル修飾およびキラル修飾ｄｓＲＮＡ剤に関する詳細は、ＷＯ２０１９／１２６６５１Ａ１に見出すことができ、当該文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２５３】

一部の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾の少なくとも二個のブロックを含有する。

【０２５４】

一部の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列の最初の五ヌクレオチド（５’末端から数える）に少なくとも二個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する。

【０２５５】

一部の実施形態では、アンチセンスヌクレオチド配列は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８個のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離された、一つ、二つ、または三つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合の二つのブロックを含有する。

【０２５６】

一つの実施形態では、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列は、アンチセンスヌクレオチド配列の５’末端から数えて、アンチセンスヌクレオチド配列の１８位～２３位内に少なくとも二個の連続するホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を含む。センス鎖ヌクレオチド配列は、センスヌクレオチド配列の５’末端から数えて、センスヌクレオチド配列の１位～５位内に少なくとも二個の連続するホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を含む。

【０２５７】

一部の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡのヌクレオチド配列のそれぞれは、二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾の少なくとも二個のブロックを含有する。一つの実施形態では、ｓｃｉＲＮＡのヌクレオチド配列のそれぞれは、ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の１８位～２３位内に少なくとも二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾、およびヌクレオチド配列の１位～５位内に少なくとも二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を含む。

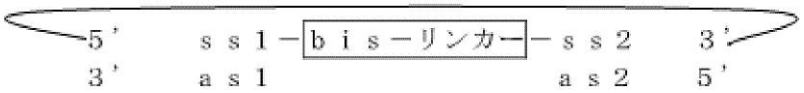
【０２５８】

一部の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、以下の特徴を備える：

環状または実質的に環状のセンス鎖は、ｓｓ１およびｓｓ２の二つのヌクレオチド配列を有し、ｓｓ１の３’末端は、ｂｉｓ－リンカーによってｓｓ２の５’末端に接続され、ｓｓ１は、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ１にアニーリングされ、ｓｓ２は、アン

チセンス鎖ヌクレオチド配列のａｓ２にアニーリングされる。

【化３７】



ａｓ１およびａｓ２はそれぞれ、２ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングを含み、および／または

ａｓ１およびａｓ２はそれぞれ、１ヌクレオチドの長さの５’オーバーハングを含み、

ｓｓ１、ｓｓ２、ａｓ１、およびａｓ２の全ヌクレオチドが修飾され、

ｓｃｉＲＮＡは、二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾の少なくとも二個のブロックを含有し、

ａｓ１およびａｓ２の一方または両方が、５’－ホスホロチオエート（５’－ＰＳ）、５’－ホスホロジチオエート（５’－PS_2）、５’－ビニルホスホネート（５’－ＶＰ）、５’－メチルホスホネート（５’－ＭｅＰｈｏｓ）、および５’－デオキシ－５’－Ｃ－マロニルからなる群から選択される、５’－末端のリン酸模倣体を含み、ならびに

ｓｓ１およびｓｓ２の一方または両方が、一つ以上のリガンドを含む。

【０２５９】

一つの実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、以下の特徴を備える：

ｓｓ１とｓｓ２の間のｂｉｓ－リンカーは、３ヌクレオチドの長さの核酸リンカーであり、

ｓｓ１、ｓｓ２、ａｓ１およびａｓ２の全ヌクレオチドが、２’－Ｏ－メチル修飾または２’－フルオロ修飾で修飾され、

ａｓ１およびａｓ２のそれぞれが、ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の１８位～２３位内に少なくとも二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を含み、ｓｓ１およびｓｓ２のそれぞれが、ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の１位～５位内に少なくとも二個の連続的なホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾を含み、および

ｓｓ１およびｓｓ２の一方または両方が、

ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、ヌクレオチド配列の６位にコンジュゲートされる一つ以上の親油性部分、または

ヌクレオチド配列の３’末端にコンジュゲートされる少なくとも一つの炭水化物系のリガンド、を含む。

【０２６０】

一部の実施形態では、センス鎖は、センス鎖の一方の末端をセンス鎖の他方の末端に接続する環化結合部分（ｃｙｃｌｉｎｇ　ｌｉｎｋｉｎｇ　ｍｏｉｅｔｙ）を介して、環状または実質的に環状の構造を形成する。

【０２６１】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の一方の末端をアンチセンス鎖の他方の末端に接続する環化結合部分を介して、環状または実質的に環状の構造を形成する。

【０２６２】

特定の実施形態では、環化結合部分は、トリアゾール結合、アミド結合、スルフィド結合またはジスルフィド結合、リン酸結合、オキシム結合、ヒドラゾ結合、Ｎ、Ｎ’－ジアルキレンヒドラゾ結合、メチレンイミノ結合、メチレンカルボニルアミノ結合、メチレンメチルイミノ結合、メチレンヒドラゾ結合、メチレンジメチルヒドラゾ結合、メチレンオキシメチルイミノ結合、ヒドロキシルアミノ結合、ホルムアセタール結合、アルキル結合またはアリール結合、ＰＥＧ結合、エーテル結合、チオエーテル結合、チオジエステル結合、チオノカルバメート結合、チオアセトアミド結合、スルホン酸結合、スルホンアミド結合、スルホン酸エステル結合、チオホルムアセタール結合、尿素結合、炭酸結合、アミン結合、マレイミド－チオエーテル結合、ホスホジエステル結合、ホスホトリエステル結

合、ホスホン酸水素結合、ホスホン酸アルキル結合またはホスホン酸アリール結合、ホスホロアミデート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロセレン酸結合、ボラノリン酸結合、ボラノリン酸エステル結合、スルホンアミド結合、カルバミン酸結合、カルボキサミド結合、カルボキシメチル結合、カルボン酸エステル結合、シロキサン結合、ジアルキルシロキサン結合、エチレンオキシド結合、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される一つ以上の結合を含有してもよい。

【０２６３】

特定の実施形態では、環化結合部分は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、［１，３］ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフラニル、およびデカリニルからなる群から選択される一つ以上の環状基を含有してもよい。

【０２６４】

特定の実施形態では、環化結合部分は、リガンドを担持し、リガンドをｓｃｉＲＮＡに接続させる担体としての機能も果たす。

【０２６５】

本発明の別の態様は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するためのｓｃｉＲＮＡ、および薬学的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物に関する。ｓｃｉＲＮＡは、少なくとも４０ヌクレオチドの長さを有し、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列（各ヌクレオチド配列は約１８～約２８ヌクレオチドの長さを有する）を有する第一の鎖、および約１９～２３ヌクレオチドの長さを有し、第一の鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つとアニーリングされる第二の鎖ヌクレオチド配列を少なくとも一つ、含む。第一の鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。第一の鎖ヌクレオチド配列と、第二の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、少なくとも一つの核酸修飾を含む。第一の鎖ヌクレオチド配列または第二の鎖ヌクレオチド配列は、一つ以上のリガンドを含む。

【０２６６】

対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するためのｓｃｉＲＮＡに関する本発明の第一の態様において開示される、第一の鎖、第一の鎖ヌクレオチド配列、第二の鎖ヌクレオチド配列、センス鎖、センス鎖ヌクレオチド配列、アンチセンス鎖、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列、センス鎖ヌクレオチド配列とアンチセンス鎖ヌクレオチド配列の化学修飾、ｂｉｓ－リンカー、ヌクレオチド系リンカーおよび非ヌクレオチド系リンカー、リガンドおよびリガンドコンジュゲーション、ならびに環化結合部分に関する上記の実施形態のすべてが、医薬組成物に関する本発明の本態様に好適である。

【０２６７】

本発明の別の態様は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において一つ以上の標的ｍＲＮＡの発現を阻害するための方法に関するものであり、当該方法は、対象のＣＮＳ細胞と、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するためのｓｃｉＲＮＡを、対象のＣＮＳ細胞において一つ以上の標的ｍＲＮＡの活性または発現を阻害するのに充分な量で、接触させることを含む。ｓｃｉＲＮＡは、少なくとも４０ヌクレオチドの長さを有し、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列（各ヌクレオチド配列は約１８～約２８ヌクレオチドの長さを有する）を有する第一の鎖、および約１９～２３ヌクレオチドの長さを有し、第一の鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つとアニーリングされる第二の鎖ヌクレオチド配列を少なくとも一つ、含む。第一の鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。第一の鎖ヌクレオチド配列と、第二の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、少なくとも一つの核酸修飾を含む。第一の鎖ヌクレオチド配列または第二の鎖ヌクレオチド配列は、一つ以上のリガンドを含む。

【０２６８】

対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するためのｓｃｉＲＮＡに関する本発明の第一の態様において開示される、第一の鎖、第一の鎖ヌクレオチ

ド配列、第二の鎖ヌクレオチド配列、センス鎖、センス鎖ヌクレオチド配列、アンチセンス鎖、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列、センス鎖ヌクレオチド配列とアンチセンス鎖ヌクレオチド配列の化学修飾、ｂｉｓ－リンカー、ヌクレオチド系リンカーおよび非ヌクレオチド系リンカー、リガンドおよびリガンドコンジュゲーション、ならびに環化結合部分に関する上記の実施形態のすべてが、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において一つ以上の標的ｍＲＮＡの発現を阻害するための方法に関する本発明の本態様に好適である。

【０２６９】

一部の実施形態では、細胞は、対象内にある。一つの実施形態では、対象は、ヒトである。一つの実施形態では、対象は、アカゲザル、カニクイザル、マウス、またはラットなどの非ヒト哺乳動物である。

【０２７０】

本発明の別の態様は、対象においてＣＮＳの疾患もしくは障害を治療または予防する方法に関し、当該方法は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するためのｓｃｉＲＮＡの治療有効量を、対象に投与し、それによって対象において、ＣＮＳの疾患もしくは障害を治療または予防することを含む。ｓｃｉＲＮＡは、少なくとも４０ヌクレオチドの長さを有し、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列（各ヌクレオチド配列は約１８～約２８ヌクレオチドの長さを有する）を有する第一の鎖、および約１９～２３ヌクレオチドの長さを有し、第一の鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つとアニーリングされる第二の鎖ヌクレオチド配列を少なくとも一つ、含む。第一の鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。第一の鎖ヌクレオチド配列と、第二の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、少なくとも一つの核酸修飾を含む。第一の鎖ヌクレオチド配列または第二の鎖ヌクレオチド配列は、一つ以上のリガンドを含む。

【０２７１】

対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するためのｓｃｉＲＮＡに関する本発明の第一の態様において開示される、第一の鎖、第一の鎖ヌクレオチド配列、第二の鎖ヌクレオチド配列、センス鎖、センス鎖ヌクレオチド配列、アンチセンス鎖、アンチセンス鎖ヌクレオチド配列、センス鎖ヌクレオチド配列とアンチセンス鎖ヌクレオチド配列の化学修飾、ｂｉｓ－リンカー、ヌクレオチド系リンカーおよび非ヌクレオチド系リンカー、リガンドおよびリガンドコンジュゲーション、ならびに環化結合部分に関する上記の実施形態のすべてが、対象においてＣＮＳの疾患もしくは障害を治療または予防するための方法に関する本発明の本態様に好適である。

【０２７２】

本発明の上記態様のすべてにおいて、ｓｃｉＲＮＡは、対象のＣＮＳ組織において一つ以上の標的ｍＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して（例えば、未処置対象もしくはプラセボ処置対象と比較して、または例えばｓｃｉＲＮＡを用いた治療が行われる前に測定された処置対象の標的ｍＲＮＡレベルまたはタンパク質レベルなどを含む基準値と比較して）、それぞれ少なくとも１５％、適切な対照と比較してそれぞれ任意選択的に少なくとも２０％，ａｔ　ｌｅａｓｔ　２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％阻害することができる。一つの実施形態では、適切な対照は、未処置の対象である。一つの実施形態では、適切な対照は、例えば、対象にｓｃｉＲＮＡを投与する前に対象に関して取得された値などの基準値である。

【０２７３】

関連する実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、対象のＣＮＳ全体の標的ｍＲＮＡ、または対象のＣＮＳ内の位置内の標的ｍＲＮＡの発現を阻害することができる。特定の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、以下の対象のＣＮＳ位置のうちの一つ以上において、標的ｍＲＮＡの発現を阻害することができる：右半球、左半球、小脳、線条体、脳幹、および脊髄。標

的とされるＣＮＳの細胞型としては限定されないが、特にニューロン、乏突起膠細胞、小膠細胞、および星状細胞が挙げられる。

【０２７４】

特定の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡは、髄腔内投与または脳室内（ＩＣＶ）投与用に製剤化されてもよい。特定の実施形態では、本明細書に記載される方法において、接触工程または投与工程は、対象に、髄腔内注射剤、または脳室内（ＩＣＶ）注射剤を投与することを含む。

【０２７５】

特定の実施形態では、二つ以上の別個の標的ＲＮＡが、ＣＮＳの疾患または障害に関連する遺伝子の転写物である。

【０２７６】

ＣＮＳの疾患または障害の例としては、神経変性障害（例えば、パーキンソン病（ＰＤ）、アルツハイマー病、早発型家族性アルツハイマー病（ＥＯＦＡＤ）、脳アミロイド血管症（ＣＡＡ）、脊髄性筋萎縮症（ＳＭＡ）、アンジェルマン症候群、神経系の運動失調／神経変性障害（例えば、フリードライヒ失調症）、ハンチントン病（ハンチントン舞踏病）、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ））、鬱病、ダウン症候群、精神病、統合失調症、クロイツフェルト・ヤコブ病、多系統萎縮症、レビー小体型認知症（ＬＢＤ）、純粋自律神経失調症（ＰＡＦ）、ピック病、進行性核上麻痺、ボクサー認知症、第１７番染色体に関連するパーキンソン病、Ｌｙｔｉｃｏ－Ｂｏｄｉｇ病、神経原線維変化優位型認知症（ｔａｎｇｌｅ　ｐｒｅｄｏｍｉｎａｎｔ　ｄｅｍｅｎｔｉａ）、嗜銀顆粒性疾患、神経節膠腫、神経節細胞腫、髄膜血管腫症、亜急性硬化性全脳炎、鉛脳症、結節硬化症、ハレルフォルデン－スパッツ病、リボフスチン症、大脳皮質基底核変性症、前頭側頭型認知症、前頭側頭葉変性症、血管障害（例えば、脳卒中、一過性虚血性発作（ＴＩＡ）、くも膜下出血、硬膜下の出血および血腫、ならびに硬膜外出血）、感染症（例えば、髄膜炎、脳炎、ポリオ、硬膜外膿瘍）、構造的障害（例えば、脳や脊髄の損傷、ベル麻痺、頚部脊椎症、手根管症候群、脳や脊髄の腫瘍、末梢神経障害、ギランバレー症候群）、および機能的障害（例えば、頭痛、てんかん、めまい、神経痛）が挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【０２７７】

【図１】図１Ａおよび１Ｂは、本明細書に例示されるｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体を形成するように結合された二つのｓｉＲＮＡ分子の構造、およびそれぞれのＣＮＳ指向性阻害効率（混合ｓｉＲＮＡとしてマウスにＩＣＶ注射により投与された場合）を示す。図１Ａは、ＳＯＤ標的化ｓｉＲＮＡ（上、センス鎖配列５’－ＣＡＵＵＵＵＡＡＵＣＣＵＣＡＣＵＣＵＡＡＡ－３’（配列番号１）およびアンチセンス鎖配列５’－ＵＵＵＡＧＡＧＵＧＡＧＧＡＵＵＡＡＡＡＵＧＡＧ－３’（配列番号２）を含む）、およびＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ（下、センス鎖配列５’－ＵＡＣＵＧＵＵＧＧＡＵＵＧＡＵＵＣＧＡＡＡ－３’（配列番号３）、およびアンチセンス鎖配列５’－ＵＵＵＣＧＡＡＵＣＡＡＵＣＣＡＡＣＡＧＵＡＧＣ－３’（配列番号４））の配列、構造および修飾パターンを示す。図１Ｂは、二つのｓｉＲＮＡ分子が、１００μｇの混合物としてマウスにＩＣＶ注射によって投与された場合に観察されたＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のそれぞれの阻害効率を示す。脳内の右半球、小脳、および脳幹、ならびに肝臓において２１日目に測定された阻害レベルである。マウス番号８は、注射失敗と識別された。

【０２７８】

【図２－１】図２Ａ～２Ｄは、ｍＣＴＮＮＢ１およびｍＳＯＤ１のタンデム阻害のために、本明細書において作製および試験されたｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の例を示す。図２Ａは、例示的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体、ならびに対照の混合二本鎖に関する二本鎖識別子、センス鎖識別子、リンカー、および構成パターンを要約する。すべてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体には、二セットの２１ｍｅｒのセンス鎖と２３ｍｅｒのアンチセンス鎖が含まれ、両方のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、三ヌクレオチドの一本鎖リンカーを含むことで連続的に作製されており、一方でｓｉＲＮＡ二本鎖の各アンチセンス鎖は、非連続的な独立

した鎖である。示される二本鎖の構成パターンには、ＲＮＡｉ標的二本鎖の順序、および各ｂｉｓ複合体のＣ１６修飾の数が含まれる。試験されたコホートのマウスの数、標的阻害性評価の日、採用された用量、および得られた読み取り値の位置も示す。図２Ｂは、示されるように、各ｂｉｓ複合体のリンカーを含む、様々な異なるｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の完全なセンス鎖を示す（上から、本明細書の表３に示される配列番号５～１２、本明細書の表２の配列番号１７～２４として列挙される、これらの配列の修飾型も記載）。提示される各オリゴヌクレオチド配列上に存在する修飾は、ＤＮＡヌクレオチドに対する「ＤＮＡ」、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびC$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、各鎖の右の凡例を参照しながら示されている。図２Ｃは、本開示の各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ二本鎖に使用された構成パターンおよびリンカーを要約する。図２Ｄは、独立したアンチセンス鎖（上が配列番号４、下が配列番号２、本明細書の表３に要約される）を示しており、それぞれ結合されたＣＴＮＮＢ１センス鎖とＳＯＤ１センス鎖に相補的であり、示される二つの各アンチセンス鎖配列の複合体は、図２Ｂの融合センス鎖配列にハイブリダイズされて、本明細書で試験される様々なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体型を形成する。

【図２－２】同上。

【０２７９】

【図３Ａ】図３Ａ～３Ｃは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が３ヌクレオチドＤＮＡリンカー（ｄＴｄＴｄＴ）によって結合された、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびに当該構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。図３Ａは、ＤＮＡヌクレオチドに対する「ＤＮＡ」、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびC$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、ＤＮＡ（ｄＴｄＴｄＴ）リンカーを有するＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の配列および修飾を示す。示されるそれぞれの配列は、融合センス鎖配列の配列番号　１７、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４である。図３Ｂは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓）において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子を１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１（上）およびＣＴＮＮＢ１（下）の割合を、五匹の動物のコホートについて示す（注：三匹の動物の番号９、１０、および１１は、注射失敗を示しており、これらデータは特定の分析から除外された）。図３Ｃは、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓で測定された、１００μｇのＩＣＶ注射後、２１日目に残存して観察されたＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のそれぞれの総割合を示している。結果は、五匹の注射された動物すべてがまとめられて解析され（上）、または注射が成功した二匹の動物のみがまとめられて解析された（下）。

【図３Ｂ】同上。

【図３Ｃ】同上。

【０２８０】

【図４－１】図４Ａ～４Ｃは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が三ヌクレオチド２’－Ｏ－メチルリンカー（ｕｕｕ）によって結合された、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびに当該構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。図４Ａは、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびC$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、２’Ｏ－メチルリンカー（ｕｕｕ）を有するＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の配列および修飾を示す。示されるそれぞれの配列は、融合センス鎖配列の配

列番号　１８、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４である。図４Ｂは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓）において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子を１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１（上）およびＣＴＮＮＢ１（下）の割合を、四匹の動物のコホートについて示す。図４Ｃは、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓で測定された、１００μｇのＩＣＶ注射後、２１日目に残存して観察されたＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のそれぞれの総割合を示している。結果は、四匹の注射された動物すべてがまとめられて解析された。

【図４－２】同上。

【０２８１】

【図５－１】図５Ａ～５Ｃは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が三ヌクレオチドＲＮＡリンカー（ＵＵＵ）によって結合された、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびに当該構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。図５Ａは、非修飾リボヌクレオチドに対する「ＲＮＡ」、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびＣ$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、ＲＮＡリンカー（ＵＵＵ）を有するＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の配列および修飾を示す。示されるそれぞれの配列は、融合センス鎖配列の配列番号　１９、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４である。図５Ｂは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓）において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子を１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１（上）およびＣＴＮＮＢ１（下）の割合を、四匹の動物のコホートについて示す。図５Ｃは、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓で測定された、１００μｇのＩＣＶ注射後、２１日目に残存して観察されたＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のそれぞれの総割合を示している。結果は、四匹の注射された動物すべてがまとめられて解析された。

【図５－２】同上。

【０２８２】

【図６－１】図６Ａ～６Ｃは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が三ヌクレオチドの２’－フルオロリンカー（ＵｆＵｆＵｆ）によって結合された、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびに当該構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。図６Ａは、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびＣ$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、２’－フルオロリンカー（ＵｆＵｆＵｆ）を有するＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の配列および修飾を示す。示されるそれぞれの配列は、融合センス鎖配列の配列番号　２０、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４である。図６Ｂは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓）において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子を１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１（上）およびＣＴＮＮＢ１（下）の割合を、四匹の動物のコホートについて示す。図６Ｃは、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓で測定された、１００μｇのＩＣＶ注射後、２１日目に残存して観察されたＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のそれぞれの総割合を示している。結果は、四匹の注射された動物すべてがまとめられて解析された。

【図６－２】同上。

【０２８３】
【図７－１】図７Ａ～７Ｃは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が三ヌクレオチドＤＮＡリンカー（ｄＴｄＴｄＴ）によって結合された、ＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびに当該構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。図７Ａは、ＤＮＡヌクレオチドに対する「ＤＮＡ」、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびＣ$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、ＤＮＡ（ｄＴｄＴｄＴ）リンカーを有するＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の配列および修飾を示す。示されるそれぞれの配列は、融合センス鎖配列の配列番号　２２、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４である。図７Ｂは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓）において、ＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子を１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１（上）およびＣＴＮＮＢ１（下）の割合を、四匹の動物のコホートについて示す（注：一匹の動物の番号３０は、注射失敗を示しており、当該データはその後に続く特定の分析から除外された）。図７Ｃは、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓で測定された、１００μｇのＩＣＶ注射後、２１日目に残存して観察されたＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のそれぞれの総割合を示している。結果は、四匹の注射された動物すべてがまとめられて解析され（上）、または注射が成功した三匹の動物のみがまとめられて解析された（下）。
【図７－２】同上。
【０２８４】
【図８－１】図８Ａ～８Ｃは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が三ヌクレオチド２’－Ｏ－メチルリンカー（ｕｕｕ）によって結合された、ＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびに当該構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。図８Ａは、２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびＣ$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、２’Ｏ－メチルリンカー（ｕｕｕ）を有するＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の配列および修飾を示す。示されるそれぞれの配列は、融合センス鎖配列の配列番号　２３、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４である。図８Ｂは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓）において、ＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子を１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１（上）およびＣＴＮＮＢ１（下）の割合を、四匹の動物のコホートについて示す。図８Ｃは、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓で測定された、１００μｇのＩＣＶ注射後、２１日目に残存して観察されたＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のそれぞれの総割合を示している。結果は、四匹の注射された動物すべてがまとめられて解析された。
【図８－２】同上。
【０２８５】
【図９Ａ】図９Ａおよび図９Ｂは、ＣＴＮＮＢ１－ＳＯＤ１（Ｃ１６）およびＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１のｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子のそれぞれの構造を示したものであり、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖は三ヌクレオチドＤＮＡリンカー（ｄＴｄＴｄＴ）により結合され、各複数標的分子内のただ一つのエフェクター分子のみが、Ｃ$_{16}$修飾ヌクレオチド（示されるように、個々のエフェクター分子内に位置する）を保有する。これら構築物を注射されたマウスにおいて観察されたｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルも示される。図９Ａは、ＤＮＡヌクレオチドに対する「ＤＮＡ」、２

’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドに対する「２’ＯＭｅ」、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドに対する「Ｆ」、３’ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドに対する「ＰＳ」、およびＣ$_{16}$修飾ヌクレオチドに対する「２－Ｃ１６」を含む、ＤＮＡ（ｄＴｄＴｄＴ）リンカーを有するＣＴＮＮＢ１－ＳＯＤ１（Ｃ１６）およびＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１のｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体それぞれの配列および修飾を示す。示されている各配列は、上がＣＴＮＮＢ１－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体で、配列番号　２１の融合センス鎖配列、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４であり、下がＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１　ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体で、配列番号　２４の融合センス鎖配列、ＣＴＮＮＢ１アンチセンス鎖配列の配列番号１６、およびＳＯＤ１アンチセンス鎖配列の配列番号１４である。図９Ｂは、それぞれ四匹の動物の各コホートから取得された、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓）において、ＣＴＮＮＢ１－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（左）およびＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１　ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（右）を１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の実測値を示す。

【図９Ｂ】同上。

【０２８６】

【図１０－１】図１０Ａ～１０Ｅは、上記の図３Ａ～３Ｃ、４Ａ～４Ｃ、５Ａ～５Ｃ、６Ａ～６Ｃ、７Ａ～７Ｃ、８Ａ～８Ｃ、９Ａおよび９Ｂの各二本鎖を含む、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１を標的とする本明細書に開示の様々なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体について観察された標的遺伝子の阻害効率を、すべての分析されたＣＮＳ組織（右半球、左半球、小脳、および脳幹）で、混合ｓｉＲＮＡ送達形式に対して比較したものである。図１０Ａは、指定されるｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（それぞれ上記の図３Ａ、４Ａ、５Ａおよび６Ａに示される）のそれぞれを用いた処置から２１日後に残存するとして観測された、ＳＯＤ１（左）およびＣＴＮＮＢ１（右）のレベルを示すものであり、脳の右半球、脳の左半球、小脳、および脳幹で測定され、これらも混合ｓｉＲＮＡ処置形式に対して比較されている。特に、ＤＮＡ（ｄＴｄＴｄＴ）リンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体で、最良の阻害活性が観察された。図１０Ｂは、指定されるｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（それぞれ上記の図３Ａ、４Ａ、７Ａおよび８Ａに示される）のそれぞれを用いた処置から２１日後に残存するとして観測された、ＳＯＤ１（左）およびＣＴＮＮＢ１（右）のレベルを示すものであり、脳の右半球、脳の左半球、小脳、および脳幹で測定され、これらも混合ｓｉＲＮＡ処置形式に対して比較されている。特に、複数標的分子内のＣＴＮＮＢ１エフェクター分子とＳＯＤ１エフェクター分子の位置を反転させることによって、ＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）構成を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体について活性の低下が生じた。図１０Ｃは、ｓｉＲＮＡの混合物、ＤＮＡリンカー（ｄＴｄＴｄＴ）を有する安定的な有効性のＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ二本鎖で観察されたＳＯＤ１（左）およびＣＴＮＮＢ１（右）阻害レベルを示し、驚くべきことに二つのエフェクター分子のうちの一つにのみ修飾Ｃ$_{16}$修飾を有する二つの各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ二本鎖、すなわちＣＴＮＮＢ１－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡエフェクター分子にのみＣ$_{16}$修飾を有する）およびＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１　ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（ＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡエフェクター分子にのみＣ$_{16}$修飾を有する）では阻害が認められなかったことを示す。脳の右半球、脳の左半球、小脳および脳幹で評価された。図１０Ｄは、試験されたすべてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子、ならびに混合ｓｉＲＮＡ対照で観察された、ＳＯＤ１（左）およびＣＴＮＮＢ１（右）のレベルに対する効果の比較を示したものであり、標的遺伝子ごとに分けられ、試験されたすべての脳組織において測定された（脳の右半球、脳の左半球、小脳および脳幹）。図１０Ｅは、試験されたすべてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子、ならびに混合ｓｉＲＮＡ対照で観察された、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のレベルに対する効果の比較を示したものであり、位置によって分類されている（上側の左は脳の右半球、上側の右は脳の左半球、下側の右は小脳、および下側の左は脳幹）。図１０Ｄ

および図１０Ｅで使用された参照識別子および関連する構造を示す凡例も示される。
【図１０－２】同上。
【図１０－３】同上。
【０２８７】
【図１１】図１１は、０、４、または２４時間インキュベーションした後、または対照としてＰＢＳで２４時間インキュベーションした後のラットのＣＳＦにおける、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計ＡＭ－１８３～ＡＭ－１９０　の分解を示す。
【０２８８】
【図１２】図１２は、上述のように、ＭＳを介して分析されたラット脳ホモジネートにおける、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計ＡＭ－１８３～ＡＭ－１９０の２４時間のインキュベーション後に観察されたセンス鎖代謝物の性質を示す。
【０２８９】
【図１３】図１３は、親ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ　ＡＤ－４０１８２４の構造の概略図を示し、配列番号２９（上鎖）および３１（下鎖）の存在を示している。
【０２９０】
【図１４】図１４Ａおよび１４Ｂは、一連の初期型ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の試験に関する試験デザイン情報を提示する。図１４Ａは、親ｓｉＲＮＡおよび適切なＣＳＦ対照と比較した、三種の異なる結合がされたｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の試験デザインを示す。図１４Ｂは、ＡＭ－１８２　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計で使用された「Ｑ３１５」リンカーの構造を示す。
【０２９１】
【図１５Ａ】図１５Ａおよび１５Ｂは、フルオロ結合ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ　ＡＭ－１７８で得られた結果を示す。図１５Ａは、フルオロ結合ＡＭ－１７８　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の概略を示す。図１５Ｂは、７日目および２８日目の時点での親ｓｉＲＮＡ　ＡＤ－４０１８２４と比較した、ＡＭ－１７８　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡのＩＴ注射後の組織分布を示す。
【図１５Ｂ】同上。
【０２９２】
【図１６Ａ】図１６Ａおよび１６Ｂは、ＤＮＡ結合ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ　ＡＭ－１８１で得られた結果を示す。図１６Ａは、ＤＮＡ結合ＡＭ－１８１　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の概略を示す。図１６Ｂは、７日目および２８日目の時点での親ｓｉＲＮＡ　ＡＤ－４０１８２４と比較した、ＡＭ－１８１　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡのＩＴ注射後の組織分布を示す。
【図１６Ｂ】同上。
【０２９３】
【図１７Ａ】図１７Ａおよび１７Ｂは、３ｘ　Ｑ３１５結合ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ　ＡＭ－１８２で得られた結果を示す。図１７Ａは、３ｘ　Ｑ３１５結合ＡＭ－１８２　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の概略を示す。図１７Ｂは、７日目および２８日目の時点での親ｓｉＲＮＡ　ＡＤ－４０１８２４と比較した、ＡＭ－１８２　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡのＩＴ注射後の組織分布を示す。
【図１７Ｂ】同上。
【０２９４】
【図１８】図１８Ａおよび１８Ｂは、７日目および２８日目に評価された、末端ＣＳＦにおける親ｓｉＲＮＡおよびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の送達レベルを示す。図１８Ａは、すべての試験された動物について得られた結果を示す。図１８Ｂは、上記の図１８Ａと比較して、以下の二匹の動物が除去されたチャートを示す：動物＃１１（７日目のＡＭ－１８１）および＃１９（２８日目のＡＤ－４０１８２４親ｓｉＲＮＡ）。特に、動物＃３０、２８日目のＡＭ－１８２投与動物からＣＳＦが得られず、投与された剤のＣＳＦ濃度に有意差は観察されなかった。
【０２９５】
【図１９】図１９Ａおよび１９Ｂは、７日目に評価された、血漿における親ｓｉＲＮＡお

よびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の実測値を示す。図１９Ａは、すべての試験された動物について得られた結果を示す。図１９Ｂは、上記の図１９Ａと比較して、動物＃１１（７日目のＡＭ－１８１）が除去されたチャートを示す。低レベルのＡＭ－１８２が、７日目に特異的に観察された。

【０２９６】

【図２０】図２０Ａおよび２０Ｂは、２８日目に評価された、血漿における親ｓｉＲＮＡおよびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の実測値を示す。具体的には、２８日目までの長期的な薬物動態に有意差は観察されなかった。図２０Ａは、すべての試験された動物について得られた結果を示す。図２０Ｂは、上記の図２０Ａと比較して、動物（＃１９、２８日目のＡＤ－４０１８２４）が除去されたチャートを示す。

【０２９７】

【図２１】図２１Ａおよび図２１Ｂは、ｂｉｓ－センス鎖の定量結果を示す。図２１Ａは、ＩＴ注射後、インタクトなＡＭ－１７８およびＡＭ－１８１　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡが投与から３０分で血漿中にて検出されたことを示す。図２１Ｂは、ｂｉｓ－センス鎖の定量によって、インタクトなＡＭ－１７８が、７日目および２８日目のＣＳＦ中にて検出されたが、ＡＭ－１８１は検出されなかったことも明らかになった。

【０２９８】

【図２２－１】図２２Ａ～２２Ｈは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が三ヌクレオチドＤＮＡリンカーによって結合された、例示的なＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびにこれら構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。試験されたすべての例示的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を、図２Ａに示す。図２２Ａは、ＳＯＤ標的化ｓｉＲＮＡおよびＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡの配列、構造、および修飾パターンを示す。配列は、図１Ａに示す配列と同じであり、修飾パターンは、図２Ｂに示すパターンと同じである。図２２Ｂは、使用された例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ二本鎖に使用されｔａ構成パターンおよびリンカーを要約する。図２２Ｃは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、および脳幹）において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を、４匹の動物のコホートについて示す。図２２Ｄは、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、および脳幹）において、１００μｇＩＣＶ注射後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合の結果を、４匹の動物のコホートについてそれぞれ示したものであり、混合二本鎖送達（図２Ａおよび表２に示される、ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４１３７０９のｓｉＲＮＡ、およびＣＴＮＮＢ１を標的とするＡＤ－３２０６５０のｓｉＲＮＡの混合物）と、いくつかのＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（図２Ａおよび表２に示される、ＡＭ－１８３、ＡＭ－１８４、ＡＭ－１８５、およびＡＭ－１８６）を比較している。図２２Ｅは、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、および脳幹）において、１００μｇＩＣＶ注射後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合の結果を、４匹の動物のコホートについてそれぞれ示したものであり、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ（ＳＯＤ１－Ｃ１６）またはＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ（ＣＴＮＮＢ１－Ｃ１６）に一つのC_{16}修飾を保有するｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体と、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡとＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡの両方に二つのC_{16}修飾を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（２Ｃ１６またはＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６））、および混合二本鎖送達（図２Ａおよび表２に示される、ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４１３７０９のｓｉＲＮＡ、およびＣＴＮＮＢ１を標的とするＡＤ－３２０６５０のｓｉＲＮＡの混合物）とを比較している。図２２Ｆは、指定される各組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、および脳幹）において、マウスでの１００μｇＩＣＶ注射後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合の結果を、４匹の動物のコホートについてそれぞれ示したものであり、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体内の各ｓｉＲＮＡエフェクターの位置を変えて、いくつ

かの様々なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（図２Ａおよび表２に示される、ＡＭ－１８３、ＡＭ－１８４、ＡＭ－１８８、およびＡＭ－１８９）を比較したものである。図２２Ｇは、投与された個々の各マウスについて、肝臓において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を、４匹の動物のコホートについて示す。図２２Ｈは、４匹の動物のコホートについて、様々な用量（５０μｇ、１５０μｇ、または３００μｇ）で親ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ　ＡＤ－４０１８２４（表４）を注射した後、２１日目に肝臓に残存するＳＯＤ１の割合を示す。

【図２２－２】同上。

【図２２－３】同上。

【図２２－４】同上。

【０２９９】

【図２３－１】図２３Ａ～２３Ｅは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が炭水化物系リンカーによって結合された、例示的なＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびにこれら構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。試験されたすべての例示的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を、図２３Ａに示す。図２３Ａに例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）も図示される。図２３Ａは、二本鎖ＩＤ、センス鎖ＩＤ、標的、およびリンカー、ならびに対照混合二本鎖について要約する。試験されたコホートのマウスの数、標的阻害性評価の日、採用された用量、および得られた読み取り値の位置も示す。すべてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体には、二セットの２１ｍｅｒのセンス鎖と２３ｍｅｒのアンチセンス鎖が含まれ、両方のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、リンカーを含むことで連続的に作製されており、一方でｓｉＲＮＡ二本鎖の各アンチセンス鎖は、非連続的な独立した鎖である。図２３Ｂは、図２３Ａで使用される例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体中の様々な炭水化物系のリンカーの構造を示す。図２３Ｃは、例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ二本鎖に使用される配列、構造、構成パターン、およびリンカー、ならびに図２３Ａで使用される例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）を要約する。図２３Ｄは、投与された個々の各マウスについて、脳において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子ならびに例示的な環状ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）のそれぞれを１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を、４匹の動物のコホートについて示したものであり、三－炭水化物系リンカー（ＡＭ－２０３、ＡＭ２０４、ＡＭ２０５）を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を、三－ヌクレオチドリンカー（ＡＭ１８３、ＡＭ２０２）を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体に対して、および混合二本鎖送達（ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４０１８２４のｓｉＲＮＡと、ＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－５０３８０１のｓｉＲＮＡの混合物、図２３Ｃに示される）に対して比較している。図２３Ｅは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織（肝臓、心臓）において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子ならびに例示的な環状ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）のそれぞれを１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を、４匹の動物のコホートについて示したものであり、三－炭水化物系リンカー（ＡＭ－２０３、ＡＭ２０４、ＡＭ２０５）を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を、三－ヌクレオチドリンカー（ＡＭ１８３、ＡＭ２０２）を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体に対して、および混合二本鎖送達（ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４０１８２４のｓｉＲＮＡと、ＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－５０３８０１のｓｉＲＮＡの混合物、図２３Ｃに示される）に対して比較している。

【図２３－２】同上。

【図２３－３】同上。

【図２３－４】同上。

【０３００】

【図２４－１】図２４Ａ～２４Ｄは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が様々なリ

ンカーによって結合された、およびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ中に様々な化学修飾を有する、例示的なＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびにこれら構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。試験されたすべての例示的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を、図２４Ａに示す。図２４Ａに例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）も図示される。図２４Ａは、二本鎖ＩＤ、リンカー、および化学物質、ならびに対照混合二本鎖について要約する。試験されたコホートのラットの数、標的阻害性評価の期間、採用された用量、および得られた読み取り値の位置も示す。すべてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体には、二セットの２１ｍｅｒのセンス鎖と２３ｍｅｒのアンチセンス鎖が含まれ、両方のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、三ヌクレオチドの一本鎖リンカーを含むことで連続的に作製されており、一方でｓｉＲＮＡ二本鎖の各アンチセンス鎖は、非連続的な独立した鎖である。図２４Ｂは、図２４Ａで使用される例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体、および例示的な環状ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ中の様々なリンカーの構造を示す。図２４Ｃは、図２４Ａで使用される例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ二本鎖に使用される配列、構造、構成パターン、およびリンカーを要約する。図２４Ｄは、投与された個々の各マウスについて、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（図２４Ａ～２４Ｃに示されるように、様々なリンカーが個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）の各センス鎖を結合し、およびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ分子中に様々な化学修飾を含有する）ならびに例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）のそれぞれの髄腔内（ＩＴ）投与（０．３ｍｇ）をt_0で行った後、指定される各組織（胸髄、前頭葉、海馬および線条体）において、４匹の動物のコホートについて、それぞれ１５日目および２９日目で残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を示すものであり、混合二本鎖送達（図２３Ｃに示されるように、ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４０１８２４のｓｉＲＮＡと、ＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－５０３８０１のｓｉＲＮＡの混合物）に対して比較している。

【図２４－２】同上。

【図２４－３】同上。

【０３０１】

【図２５Ａ】図２５Ａ～２５Ｄは、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖が様々なリンカーによって結合された、例示的なＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子の構造を示し、ならびにこれら構築物が注射されたマウスで観察された各ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害レベルを示す。試験されたすべての例示的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を、図２５Ａに示す。図２５Ａは、二本鎖ＩＤ、リンカー、化学物質、ならびに対照混合二本鎖について要約する。試験されたコホートのラットの数、標的阻害性評価の期間、採用された用量、および得られた読み取り値の位置も示す。すべてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体には、二セットの２１ｍｅｒのセンス鎖と２３ｍｅｒのアンチセンス鎖が含まれ、両方のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、三ヌクレオチドの一本鎖リンカーを含むことで連続的に作製されており、一方でｓｉＲＮＡ二本鎖の各アンチセンス鎖は、非連続的な独立した鎖である。図２５Ｂは、図２５Ａで使用される例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体中の様々なリンカーの構造を示す。図２５Ｃは、図２５Ａで使用される例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ二本鎖に使用される配列、構造、構成パターン、およびリンカーを要約する。図２５Ｄは、投与された個々の各マウスについて、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（図２５Ａ～２５Ｃに示されるように、個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）の各センス鎖を結合する様々なリンカーを含有する）のそれぞれの髄腔内（ＩＴ）投与（０．６ｍｇ）をt_0で行った後、指定される各組織（胸髄、小脳、前頭葉、海馬および線条体）において、４匹の動物のコホートについて、１５日目で残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を示すものであり、混合二本鎖送達（図２３Ｃに示されるように、ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４０１８２４のｓｉＲＮＡと、ＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－５０３８０１のｓｉＲＮＡの混合物）に対して比較している。

【図２５Ｂ】同上。
【図２５Ｃ】同上。
【図２５Ｄ】同上。
【０３０２】
【図２６Ａ】図２６Ａ～２６Ｄは、ＬＣ－ＭＳを使用して測定された、ラット脳ホモジネート中で分子をインキュベーションした後の例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡおよび／または環状ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡのインビボ安定性を示す概要である。図２６Ａは、ラット脳ホモジネートにおける、様々なリンカー化学物質を有する例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１８３～ＡＭ－１８６）の安定性を示す。図２６Ｂは、ラット脳ホモジネートにおける、様々な方向性の例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１８３、ＡＭ－１８４、ＡＭ－１８８、およびＡＭ－１８９）の安定性を示す。図２６Ｃは、ラット脳ホモジネートにおける、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡまたはＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡで一つのC_{16}修飾を保有する例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１９０およびＡＭ－１８７）の安定性、およびＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡとＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡの両方で二つのC_{16}修飾を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（ＡＭ－１８３）の安定性を、二本鎖混合物（ＡＤ－３２０６５０およびＡＤ－４１３７０９）に対して比較して示している。図２６Ｄは、ＣＮＳ標的化（ＡＭ－１８３、ＡＭ－２０２、ＡＭ－２０３、ＡＭ－２０４、ＡＭ－２０５、およびＡＭ－２０６）および肝臓標的化（ＡＭ－１９１、ＡＭ－２０７、ＡＭ－２０８、ＡＭ－２０９、ＡＭ－２１０、およびＡＭ－２１１）に関する、ラット脳ホモジネートにおける例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡおよび例示的な環状ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡの代謝傾向を示す。
【図２６Ｂ】同上。
【図２６Ｃ】同上。
【図２６Ｄ】同上。
【０３０３】
【図２７】図２７Ａは、例示的なＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡ二本鎖の概略図である。図２７Ｂは、例示的なＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡ二本鎖で使用された化学修飾を示す。
【０３０４】
【図２８－１】図２８Ａ～２８Ｄは、３’－エキソヌクレアーゼ（図２８Ａおよび図２８Ｂ）および５’－エキソヌクレアーゼ（図２８Ｃおよび図２８Ｄ）のいずれかを使用してインビトロアッセイにおける、一本鎖ポリ２’－デオキシの直鎖および環状オリゴヌクレオチド（それぞれ、ＯＮ－３およびＯＮ－４）ならびに一本鎖完全２’－修飾の直鎖および環状オリゴヌクレオチド（それぞれ、ＯＮ－５およびＯＮ－６）を使用した、酵素消化の減衰曲線のグラフである。
【図２８－２】同上。
【０３０５】
【図２９】図２９Ａ～２９Ｂは、ＬＣ－ＭＳを使用して測定された、血漿および肝臓ホモジネートにおける、二本鎖のインキュベーション後の完全長センス鎖の安定性を示すグラフである。図２９Ａは、ラット血漿中に残存するセンス鎖の割合の平均自然対数を示す。図２９Ｂは、ラット肝臓ホモジネート中に残存するセンス鎖の割合の平均自然対数を示す。平均がプロットされている。エラーバーは、時点当たり三回繰り返した標準偏差である。
【０３０６】
【図３０】図３０は、直鎖状構造のＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ（表９、ｓｉ－１、ｓｉ－２、ｓｉ－３およびｓｉ－６）および環状構造のＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡ二本鎖（表９、ｓｉ－４およびｓｉ－５）の１Ｄ　^{1}H　ＮＭＲスペクトルのイミノ領域を示すグラフである。ワトソン・クリック塩基対に係合したイミノプロトンは、δ１２～１４ｐｐｍの範囲で化学シフト値を示す。
【０３０７】
【図３１】図３１Ａ～３１Ｂは、マウスにおける、直鎖状ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ（表

９、ｓｉ－１、ｓｉ－２、およびｓｉ－６）および環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡ（表９、ｓｉ－４、ｓｉ－５、およびｓｉ－７）コンジュゲートの単回皮下投与後の薬理プロファイルのグラフである。各コンジュゲート（３ｍｇ／ｋｇ）の単回用量を０日目にマウスに投与し、血清を、０日目（投与前）、３日目、７日目、および１４日目に採取した。ＴＴＲ（図３１Ａ）およびＣ５（図３１Ｂ）のために、循環血清タンパク質レベルを、適切なＥＬＩＳＡキットを使用して、ＰＢＳ対照と比較して決定した。エラーバーは、ＳＤである（ｎ＝３）。

【０３０８】

【図３２】図３２Ａ～３２Ｂは、マウスにおける、直鎖状ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ（表９、ｓｉ－１、ｓｉ－２、およびｓｉ－３）および環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡ（表９、ｓｉ－４およびｓｉ－５）コンジュゲートのアンチセンス鎖の全肝レベルおよびＡｇｏ２レベルを示すグラフである。図３２Ａは、マウス肝臓全体から単離され、および測定されたアンチセンス鎖の肝臓レベルを示す。図３２Ｂは、マウス肝臓全体からの免疫沈降したＡｇｏ２から単離され、および測定された、アンチセンス鎖のレベルを示す。各コンジュゲート（３ｍｇ／ｋｇ）の単回用量を０日目にマウスに投与し、肝臓を、７日目に採取した。レベルは、ＳＬ－ＲＴ　ＱＰＣＲを使用して、ＰＢＳ対照と比較して決定された。エラーバーは、ＳＤである（ｎ＝３）。

【０３０９】

【図３３】図３３は、シード領域のペア形成を伴い二本鎖ＲＮＡに結合したＡｇｏ２の結晶構造に基づく、ｓｃｉＲＮＡ：Ａｇｏ２複合体のモデルを示す。Ｚリンカー炭素が、強調表示されている。Ａｇｏ２　ＰＩＷＩドメインおよびＭＩＤドメインならびにＬ２リンカー領域の選択された側鎖が標識される。この図は、シード領域二本鎖の主溝（ｍａｊｏｒ　ｇｒｏｏｖｅ）（上）および副溝（ｍｉｎｏｒ　ｇｒｏｏｖｅ）（下）の横断である。

【発明を実施するための形態】

【０３１０】

本開示は、少なくとも部分的に、二つ以上の標的核酸を標的とし、当該複数標的分子のＣＮＳ指向性投与後に、対象のＣＮＳ組織において安定的で驚くべき有効性を示す分子の発見に基づくものである。当該複数標的分子のＣＮＳ指向性送達および有効性は、本明細書において、複数標的分子の各エフェクター分子が少なくとも一つの親油性部分を含んだ場合に安定的であると特定され、送達および有効性は、各エフェクター分子にコンジュゲートされた親油性部分を少なくとも一つ担持していない複数標的分子では、ＣＮＳ組織において有意に低下することが観察された。医薬組成物、注射剤、方法（治療方法を含む）、および他の関連する態様も本明細書に記載される。

【０３１１】

Ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ化合物（ｂｉｓ－リンカーによって接続された二つのエフェクター分子）

一つの態様では、本明細書において、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ化合物に基づく複数標的分子が提供される。

【０３１２】

概して、複数標的分子は、少なくとも二つの核酸系エフェクター分子を含み、当該少なくとも二つの核酸系エフェクター分子は、互いに共有結合され、または非共有結合される。限定されないが、標的の遺伝子発現を調節することができる任意の核酸系エフェクター分子が、本明細書に開示される複数標的分子に含まれ得る。

【０３１３】

複数標的分子は、本明細書に記載されるリンカー部分（例えば、核酸配列、一つ以上の炭水化物部分、または他の有機ポリマー、任意選択的に当該リンカー部分の切断可能な形態を含む）によって互いに結合される少なくとも二つの核酸系エフェクター分子を含む。複数標的分子の少なくとも二つの核酸系エフェクター分子はそれぞれ、親油性部分（例えば、飽和または不飽和のC_{16}炭化水素鎖）を担持し、それによって、複数標的分子の各分子標的の有効なＣＮＳ標的化が促進される。限定されないが、標的の遺伝子発現を調節

することができる任意の核酸系エフェクター分子が、本明細書に開示される複数標的分子に含まれ得る。

【０３１４】

したがって特定の態様において、本開示は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）中の一つ以上の標的ＲＮＡ中の一つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を調節するための複数標的分子を提供するものであり、当該複数標的分子は、少なくとも二つの核酸系エフェクター分子を含み、当該エフェクター分子は、リンカーにより一緒に接続され、そして互いに重複せず、当該少なくとも二つのエフェクター分子はそれぞれ少なくとも一つのコンジュゲート化親油性部分を有し、当該複数標的分子は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）に送達され、対象ＣＮＳ組織において一つ以上の標的ＲＮＡの活性または発現を、適切な対照と比較して、少なくとも１５％阻害することができる。

【０３１５】

一つの標的ＲＮＡ内にある二つの標的ＲＮＡ配列は、当該標的ＲＮＡ配列が互いに重複しない場合、「別個の」とみなされる。

【０３１６】

特定の実施形態では、二つの核酸系エフェクター分子は両方とも同じ標的ＲＮＡ配列を標的とする。かかる実施形態では、複数標的分子は、「対称性」設計を有してもよい（例えば、リンカーは、二つの同一のｓｉＲＮＡのセンス鎖３’末端または５’末端を接続してもよい）。特定の実施形態では、二つの核酸系エフェクター分子は、異なる標的ＲＮＡ配列を標的とする。かかる実施形態では、複数標的分子は、「非対称性」の設計を有する。後者の場合、同じ標的ＲＮＡであるが、「別個の」標的ＲＮＡ配列を標的とする場合、両核酸系エフェクター分子は、「非対称性」でもあり得る。

【０３１７】

本明細書で使用される場合、「適切な対照」とは、関連する活性剤を含むが、当該活性剤は欠いている組成物と他は同一である組成物、または関連する標的核酸を標的としない活性剤（例えば、オリゴヌクレオチド）を含む組成物のいずれかを指す。活性剤を欠く他は同一の組成物は、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）または人工脳脊髄液（ａＣＳＦ）などの非経口投与に使用される緩衝液を含んでもよい。ａＣＳＦは、約７．２のｐＨと、以下のイオン濃度（ｍＭ）を有する滅菌水性組成物を含み得る：Na^{+}１５０、K^{+}３．０、Ca^{2+}１．４、Mg^{2+}０．８、Ｐ　１．０、およびCl^{-}１５５。関連する標的核酸を標的としないオリゴヌクレオチドとしては、例えば、ＡＤ－７７７４８（表２および３を参照）などのポリアデノシド系オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【０３１８】

「核酸系エフェクター分子」とは、標的核酸の発現活性を調節することができる、修飾もしくは非修飾の一本鎖または二本鎖の核酸分子を意味する。一部の実施形態では、核酸系エフェクター分子は、標的核酸の遺伝子発現を調節することができる、修飾もしくは非修飾の一本鎖または二本鎖の核酸分子である。標的遺伝子の遺伝子発現を調節することができる核酸系エフェクター分子の例としては、限定されないが、二本鎖および一本鎖のＲＮＡ干渉剤（例えば、ｓｉＲＮＡおよびｓｈＲＮＡなど。本明細書においてｄｓＲＮＡ剤とも呼称される）、リボザイム、三本鎖形成オリゴヌクレオチド、デコイオリゴヌクレオチド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、ＲＮＡ活性化剤、Ｕ１アダプター、ＣＲＩＳＰＲＣａｓのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、それらの組み合わせなどが挙げられる。特定の実施形態では、エフェクター分子の一本鎖または二本鎖の核酸分子はそれぞれ、少なくとも一つの修飾ヌクレオチド、または少なくとも一つの修飾ヌクレオチド間結合を含有する。

【０３１９】

少なくとも二つのエフェクター分子が、二つの分離されたエフェクター分子であることに留意されたい。言い換えると、少なくとも二つのエフェクター分子は、互いに重複していない。このように、本明細書に開示される複数標的分子は、一つのエフェクター分子が二つの異なる標的に指向される分子とは異なっている。例えば、各鎖が異なる標的に指向される二本鎖エフェクター分子とは異なっており、または少なくとも配列の一部が二つの

異なる標的配列に対して相補的であるか、またはハイブリダイズすることができる配列を含むエフェクター分子とは異なっている。

【０３２０】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つの異なるｓｉＲＮＡ分子から組み立てられ、当該ｓｉＲＮＡのうちの少なくとも一つは、自身に結合するリガンドを少なくとも一つ有する。一部の他の実施形態では、複数標的分子は、二つの異なるｓｉＲＮＡ分子から組み立てられ、各ｓｉＲＮＡは、自身に結合するリガンドを少なくとも一つ有する。

【０３２１】

複数標的分子の様々な実施形態において、少なくとも二つのｓｉＲＮＡは各々少なくとも一つのリガンドを有し、互いに結合され、当該少なくとも二つのリガンドは、同じであってもよく、または異なってもよい。さらに、当該少なくともリガンドは、それぞれのｓｉＲＮＡの任意の位置で、独立してコンジュゲートされてもよい。例えば、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖に結合されてもよく、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖に結合されてもよい。または一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖に結合されてもよく、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に結合されてもよい。または一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に結合されてもよく、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に結合されてもよい。限定されないが、第一のリガンドは独立して、第一のｓｉＲＮＡの一方の鎖（センスまたはアンチセンス）の５’末端、３’末端、または内部（非末端）の位置で、結合されてもよい。同様に、第二のリガンドは独立して、第二のｓｉＲＮＡの一方の鎖（センスまたはアンチセンス）の５’末端、３’末端、または内部（非末端）の位置で、結合されてもよい。

【０３２２】

一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。

【０３２３】

一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。

【０３２４】

一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方

のリガンドは、第二のセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のアンチセンス鎖の３’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のアンチセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のアンチセンス鎖の５’末端にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のアンチセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、一方のリガンドは、第一のアンチセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされ、他方のリガンドは、第二のアンチセンス鎖の内部（非末端）の位置にコンジュゲートされる。

【０３２５】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖に共有結合される。限定されないが、二つのセンス鎖は、任意の方向で互いに結合され得る。例えば、第一のセンス鎖の３’末端は、第二のセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。第一のセンス鎖の３’末端は、第二のセンス鎖の３’末端に結合されてもよい。または第一のセンス鎖の５’末端は、第二のセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。

【０３２６】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合される。限定されないが、二つのアンチセンス鎖は、任意の方向で互いに結合され得る。例えば、第一のアンチセンス鎖の３’末端は、第二のアンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。第一のアンチセンス鎖の３’末端は、第二のアンチセンス鎖の３’末端に結合されてもよい。または第一のアンチセンス鎖の５’末端は、第二のアンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。

【０３２７】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合される。限定されないが、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、任意の方向で、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に結合され得る。例えば、センス鎖の３’末端は、アンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。センス鎖の３’末端は、アンチセンス鎖の３’末端に結合されてもよい。またはセンス鎖の５’末端は、アンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。

【０３２８】

一部の実施形態では、複数標的分子は、中枢神経系（ＣＮＳ）において、二つ以上の別個の標的ＲＮＡを調節し、当該複数標的分子は、二つ以上の別個の標的ＲＮＡを標的とする二つの二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）から組み立てられ、それらを接続するリンカーに関し、当該二つのｄｓＲＮＡの方向は、変化してもよい。

【０３２９】

一部の実施形態では、複数標的分子は、以下の式に従い、二つのｄｓＲＮＡから組み立てられる：

ｄｓＲＮＡ１－Ｌ－ｄｓＲＮＡ２、

式中、ｄｓＲＮＡ１は、第一の標的ＲＮＡ配列を標的とする第一のｄｓＲＮＡであり、ｄｓＲＮＡ２は、第二の異なる標的ＲＮＡ配列を標的とする第二のｄｓＲＮＡであり、Ｌは、ｄｓＲＮＡ１をｄｓＲＮＡ２に接続するリンカーである。Ｌは、ｄｓＲＮＡ１のセンス鎖の３’末端をｄｓＲＮＡ２に接続し、および／またはｄｓＲＮＡ１のアンチセンス鎖の５’末端をｄｓＲＮＡ２に接続する。

一つの実施形態では、複数標的分子は、以下によって表される：

５’　ｓｓ１－Ｌ－　ｓｓ２　３’

３’　ａｓ１　　ａｓ２　５’、

式中、ｓｓ１は、ｄｓＲＮＡ１のセンス鎖であり、ａｓ１は、ｄｓＲＮＡ１のアンチセンス鎖であり、ｓｓ２は、ｄｓＲＮＡ２のセンス鎖であり、ａｓ２は、ｄｓＲＮＡ２のアンチセンス鎖であり、Ｌは、ｓｓ１の３’－末端をｓｓ２の５’－末端に接続する。

【０３３０】

一部の実施形態では、複数標的分子は、以下の式に従い、二つのｄｓＲＮＡから組み立てられる：

ｄｓＲＮＡ２－Ｌ－ｄｓＲＮＡ１、

式中、ｄｓＲＮＡ１は、第一の標的ＲＮＡ配列を標的とする第一のｄｓＲＮＡであり、ｄｓＲＮＡ２は、第二の異なる標的ＲＮＡ配列を標的とする第二のｄｓＲＮＡであり、Ｌは、ｄｓＲＮＡ２をｄｓＲＮＡ１に接続するリンカーである。Ｌは、ｄｓＲＮＡ２のセンス鎖の３’末端をｄｓＲＮＡ１に接続し、および／またはｄｓＲＮＡ２のアンチセンス鎖の５’末端をｄｓＲＮＡ１に接続する。

一つの実施形態では、複数標的分子は、以下によって表される：

５’　ｓｓ２－Ｌ－ｓｓ１　３’

３’　ａｓ２　ａｓ１　５’、

式中、ｓｓ２は、ｄｓＲＮＡ２のセンス鎖であり、ａｓ２は、ｄｓＲＮＡ２のアンチセンス鎖であり、ｓｓ１は、ｄｓＲＮＡ１のセンス鎖であり、ａｓ１は、ｄｓＲＮＡ１のアンチセンス鎖であり、Ｌは、ｓｓ２の３’－末端をｓｓ１の５’－末端に接続する。

【０３３１】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖に共有結合され、第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合される。

【０３３２】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖に共有結合され、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合される。

【０３３３】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、リボザイムである。一部の実施形態では、複数標的分子は、少なくとも二つのリボザイムを含む。限定されないが、リボザイムは、同一でも異なっていてもよい。

【０３３４】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、ｓｉＲＮＡであり、エフェクター分子のうちの少なくとも一つは、リボザイムである。

【０３３５】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、アプタマーである。一部の実施形態では、複数標的分子は、少なくとも二つのアプタマーを含む。限定されないが、アプタマーは、同一でも異なっていてもよい。

【０３３６】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、ｓｉＲＮＡであり、エフェクター分子のうちの少なくとも一つは、アプタマーである。

【０３３７】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、デコイオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、複数標的分子は、少なくとも二つのデコイオリゴヌクレオチドを含む。限定されないが、デコイオリゴヌクレオチドは、同一であっても異なってもよい。

【０３３８】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、ｓｉＲＮＡであり、エフェクター分子のうちの少なくとも一つは、デコイオリゴヌクレオチドである。

【０３３９】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、Ｕ１アプタマーである。一部の実施形態では、複数標的分子は、少なくとも二つのＵ１アプタマーを含む。限定されないが、Ｕ１アプタマーは、同一でも異なっていてもよい。

【０３４０】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、ｓｉＲＮＡであり、エフェクター分子のうちの少なくとも一つは、Ｕ１アプタマーである。

【０３４１】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、活性化アプタマーである。一部の実施形態では、複数標的分子は、少なくとも二つの活性化ＲＮＡを含む。限定されないが、活性化ＲＮＡは、同一でも異なっていてもよい。

【０３４２】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、ｓｉＲＮＡであり、エフェクター分子のうちの少なくとも一つは、活性化ＲＮＡである。

【０３４３】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、三本鎖形成オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、複数標的分子は、少なくとも二つの三本鎖形成オリゴヌクレオチドを含む。限定されないが、三本鎖形成オリゴヌクレオチドは、同一であっても異なってもよい。

【０３４４】

一部の実施形態では、本明細書に開示される複数標的分子中のエフェクター分子のうちの少なくとも一つは、ｓｉＲＮＡであり、エフェクター分子のうちの少なくとも一つは、三本鎖形成オリゴヌクレオチドである。

【０３４５】

親油性部分

本開示の特定の態様は、複数標的分子にコンジュゲートされた親油性部分を特徴とする。親油性部分／リガンドは、核酸治療に関し、ＣＮＳ送達を実現させ、ＣＮＳにおける標的ＲＮＡの有効なノックダウンを実現するのに特に有用であるとして特定された。本明細書での使用を目的とした親油性部分の例としては限定されないが、脂質、コレステロール、レチノイン酸、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－ｂｉｓ－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキサノール（ｇｅｒａｎｙｌｏｘｙｈｅｘｙａｎｏｌ）、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メンソール、１，３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸（（ｏｌｅｏｙｌ）ｃｈｏｌｅｎｉｃ　ａｃｉｄ）、ジメトキシトリチル、およびフェノキサジンが挙げられる。

【０３４６】

親油性部分は、飽和または不飽和のＣ４－Ｃ３０炭化水素鎖、ならびに例えばヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、またはアルキンなどの任意選択的な官能基と、を含有する。任意選択的に、本開示の親油性部分は、飽和または不飽和のＣ６－Ｃ１８炭化水素鎖を含んでもよい。任意選択的に、本開示の親油性部分は、飽和または不飽和のＣ１６炭化水素鎖を含んでもよい。

【０３４７】

特定の実施形態では、各親油性部分は、飽和または不飽和のＣ６、Ｃ８、Ｃ１０、Ｃ１２、Ｃ１４、Ｃ１６、Ｃ１８、Ｃ２０、およびＣ２２炭化水素鎖から独立して選択され得る。

【０３４８】

特定の実施形態では、各親油性部分は、直鎖状であり、および飽和または不飽和のＣ６、Ｃ８、Ｃ１０、Ｃ１２、Ｃ１４、Ｃ１６、Ｃ１８、Ｃ２０、およびＣ２２炭化水素鎖から独立して選択され得る。

【０３４９】

特定の実施形態では、各親油性部分は、直鎖状の飽和Ｃ６、Ｃ８、Ｃ１０、Ｃ１２、Ｃ１４、Ｃ１６、Ｃ１８、Ｃ２０、およびＣ２２炭化水素鎖から独立して選択され得る。

【０３５０】

本明細書に記載されるように、親油性部分は、一価、または分岐状の二価もしくは三価のリンカーを介して、本開示の複数標的分子にコンジュゲートされ得る。

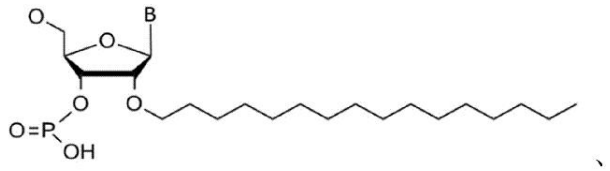
【０３５１】

複数の実施形態では、少なくとも一つの親油性部分が、一価のリンカー、または分岐状の二価もしくは三価のリンカーを介して複数標的分子にコンジュゲートされる。

【０３５２】

特定の実施形態は、親油性分子の具体的な例示される形態として、以下のＣ１６炭化水素鎖分子を特徴とする：

【化３８】



式中、Ｂは、ヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログであり、任意選択的にＢは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルである。

【０３５３】

リンカー

特定の実施形態では、リンカーは、本開示の複数標的分子のエフェクター分子を接続するために採用される。ある範囲の具体的に予期されるリンカーが、本開示の複数標的分子のエフェクター分子のコンジュゲートに利用可能であり、限定されないが、ＤＮＡ、ＲＮ

Ａ、ジスルフィド、アミド、ガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、マンノースの官能化された単糖もしくはオリゴ糖、または他の有機ポリマーリンカー、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【０３５４】

一部の実施形態では、本開示の複数標的分子中の少なくとも二つの核酸系エフェクター分子は、当分野で一般的に公知（例えば、ＷＯ２０１７／０５１０９およびＷＯ２０１８／１３６６２０を参照のこと。当該文献はそれぞれ、その全体で参照により本明細書に組み込まれる）および本明細書に記載されるヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカーを介して互いに共有結合されることができる。したがって一部の実施形態では、複数標的分子中の少なくとも二つのエフェクター分子は、ヌクレオチド系リンカーを介して結合される。一部の他の実施形態では、少なくとも二つのエフェクター分子は、非ヌクレオチド系リンカーを介して結合される。

【０３５５】

ヌクレオチド系リンカーは、一緒に接続されるエフェクター分子の一方または両方の一部を形成し得ることに留意されたい。つまり、リンカーのヌクレオチド配列の少なくとも一部は、エフェクター分子のうちの一つの機能に必要とされる。特定の実施形態では、リンカーのヌクレオチド配列は、エフェクター分子の一部を形成しない。言い換えれば、エフェクター分子のいずれかは、遺伝子発現を調節するためにリンカーヌクレオチド配列のいずれの部分も必要としない。例えば、リンカー配列がエフェクター分子から除去される場合、エフェクター分子は、リンカーが存在したときと同様のレベル（例えば、９５％以内）で、依然として遺伝子発現を調節することができる。エフェクター分子が活性的であるために標的遺伝子との相補性を必要とする場合、リンカーは、標的配列との相補性に必要なエフェクター分子の一部となる場合もあるが、ならない場合もある。一部の実施形態では、リンカーは、標的配列との相補性（例えば、５％未満の相補性）を有さず、または標的配列にハイブリダイズしない。

【０３５６】

核酸リンカーについては、任意の長さおよび修飾パターンのオリゴヌクレオチドを採用することができ、任意選択的なリンカー長の例としては限定されないが、１～３０ヌクレオチドの長さが挙げられる。任意選択的に、リンカー長は、２～２０ヌクレオチド、任意選択的に２～１５ヌクレオチド、任意選択的に２～１０ヌクレオチド、任意選択的に２～５ヌクレオチド、任意選択的に２、３、または４ヌクレオチドの長さである。

【０３５７】

ヌクレオチドリンカーは、一本鎖または二本鎖であってもよい。一部の実施形態では、二つのエフェクター分子を接続する二本鎖ヌクレオチド系リンカーの第一の鎖は、当該二本鎖ヌクレオチド系リンカーの第二の鎖に対して実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、リンカーの第一の鎖は、リンカーの第二の鎖の核酸塩基配列に対して、少なくとも７５％（例えば、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、またはそれ以上）相補的である核酸塩基配列を含む。一部の実施形態では、リンカーの第一の鎖は、二つのエフェクター分子を接続するリンカーの第二の鎖の核酸塩基配列に対して、完全に相補的である核酸塩基配列を含む。

【０３５８】

限定されないが、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、全てのＤＮＡ、全てのＲＮＡ、またはＤＮＡとＲＮＡの混合物であり得る。一部の実施形態では、二つのエフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、全てＤＮＡである。ＲＮＡおよびＤＮＡは、天然であってもよく、修飾されてもよい。したがって一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、以下から選択される修飾を少なくとも一つ含む：修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基、修飾糖、およびそれらの任意の組み合わせ。リンカーの修飾の例としては限定されないが、ロックド核酸（例えば、ＬＮＡ、ＥＮＡおよびＢＮＡ）、２’－Ｏ－アルキルヌクレオシド、２’－ハロヌクレオシド（例えば、２’－Ｆヌクレオチド）、２’－アミノヌクレオシド、２’－Ｓ－アルキル

ヌクレオシド、脱塩基性ヌクレオシド、２’－シアノヌクレオシド、２’－メルカプトヌクレオシド；２’－ＭＯＥヌクレオシド、非環状ヌクレオシド、（Ｓ）－ｃＥｔモノマーおよび修飾ヌクレオチド間結合（例えば、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホン酸水素、ホスホン酸アルキルまたはホスホン酸アリール、ホスホロアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチレンメチルイミノ、チオジエステル、チオノカルバマート、Ｎ，Ｎ’－ジメチルヒドラジン、ホスホロセレン酸塩、ボラノリン酸塩、ボラノリン酸エステル、アミド、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、ジアルキルシロキサン、カルボキサミド、炭酸塩、カルボキシメチル、カルバミン酸塩、カルボン酸エステル、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルフィド、スルホン酸塩、スルホンアミド、スルホン酸エステル、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチケンカルボニルアミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、メチレンオキシメチルイミノ、エーテル、チオエーテル、およびチオアセトアミド）が挙げられる。そのような修飾は、本開示の複数標的分子の非リンカー要素にも存在し得る。核酸修飾は、本開示の別段において、より詳細に説明される。

【０３５９】

一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するリンカーとエフェクター分子の間のヌクレオシド間結合のうちの少なくとも一つは、修飾ヌクレオシド間結合である。一部の実施形態では、リンカーの５’－末端をエフェクター分子のうちの一つの３’－末端に接続するヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。一部の実施形態では、リンカーの３’－末端をエフェクター分子のうちの一つの５’－末端に接続するヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

【０３６０】

一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するリンカーの５’末端および／または３’末端の最初（例えば、最初、二番目、三番目、四番目または五番目）のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。一部の実施形態において、リンカーの５’末端および／または３’末端から一個、二個、三個、四個、五個、またはそれ以上のヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

【０３６１】

一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するリンカーは、リンカーの内部（非末端）の位置に、少なくとも一つ（例えば、一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、六つまたはそれ以上）の修飾ヌクレオシド間結合を含む。

【０３６２】

限定されないが、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、任意の所望の長さであり得る。例えば、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０またはそれ以上のヌクレオチド長であってもよい。一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、１ヌクレオチド～５ヌクレオチドの長さの範囲であってもよい。特定の実施形態では、二つのエフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、４ヌクレオチドの長さである。

【０３６３】

エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーが核酸修飾を含む場合、当該修飾は、リンカーの任意の位置に配置され得る。例えば、修飾は、リンカーの５’－ヌクレオチド、３’－ヌクレオチド、または内部（非末端）ヌクレオチドにあり得る。一部の実施形態では、リンカーの５’末端および／または３’末端の最初（例えば、最初、二番目、三番目、四番目または五番目）のヌクレオチドは、核酸修飾を含む。一部の実施形態では、リンカーの５’末端および／または３’末端から一、二、三、四、五ヌクレオチドまたはそれ以上のヌクレオチドは、核酸修飾を含む。一部の実施形態では、リンカーの一個、二個、三個、四個、五個またはそれ以上の内部（非末端）ヌクレオチドは、核酸修飾を含む。一部の実施形態では、リンカーの内部（非末端）ヌクレオチドは、センス鎖上にすべてのＤＮＡを含む。別の実施形態では、リンカーの内部（非末端）ヌクレオチドは、アンチセ

ンス鎖上にＤＮＡと２’－Ｏアルキル修飾の混合を含む。
【０３６４】
エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、一つまたは二つの核酸鎖を含んでもよく、および一本鎖、二本鎖であってもよく、または一本鎖と二本鎖の領域を含んでもよい。一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、二本鎖構造を形成しない二つの核酸鎖を含む。言い換えれば、ヌクレオチド系リンカーは、互いにハイブリダイズしない二つの鎖を含む。
【０３６５】
一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、二つの核酸鎖を含み、この場合において当該リンカーの第一の鎖のヌクレオチド配列は、当該リンカーの第二の鎖のヌクレオチド配列と少なくとも一つ（例えば、一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、またはそれ以上）のヌクレオチドミスマッチを含む。一部の実施形態では、リンカー鎖のうちの少なくとも一つは、バルジまたはループを含む。例えば、リンカー鎖のうちの少なくとも一つは、他のリンカー鎖と非相補的な核酸塩基を少なくとも一つ（例えば、一つ、二つ、三つ、四つ、五つまたはそれ以上で連続的または非連続的）含む。
【０３６６】
限定されないが、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、本明細書に開示される一つ以上の核酸修飾を含み得る。エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーが二つの核酸鎖を含む場合、各鎖は独立して非修飾であってもよく、または本明細書に開示される一つ以上の核酸修飾を含んでもよい。したがって、一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、二つの核酸鎖を含み、当該鎖のそれぞれが非修飾である。一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、二つの核酸鎖を含み、この場合において一方の鎖は非修飾であり、他方の鎖は、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基、修飾糖、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される修飾を少なくとも一つ含む。一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、二つの核酸鎖を含み、両方の鎖が、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基、修飾糖、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から独立して選択される修飾を少なくとも一つ含む。
【０３６７】
一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、二つの核酸鎖を含み、この場合において当該鎖のうちの一つは、全てのＤＮＡを含み、他方の鎖は、ＤＮＡと２’－Ｏアルキル修飾の混合を含む。
【０３６８】
エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、一本鎖ヌクレアーゼまたは二本鎖ヌクレアーゼによる分解または切断に対して抵抗性であり得る。あるいは、エフェクター分子を接続するヌクレオチド系リンカーは、切断可能なリンカーであり得る。例えば、エフェクター分子を接続するリンカーは、一本鎖ヌクレアーゼまたは二本鎖ヌクレアーゼによる切断を受け得る。
【０３６９】
本明細書に記載されるように、複数標的分子中のエフェクター分子を接続するリンカーは、非ヌクレオチド系リンカーであってもよい。一部の実施形態では、二つのオリゴヌクレオチドを接続する非ヌクレオチド系リンカーは、切断可能な基を含む。
【０３７０】
一部の実施形態では、二つのオリゴヌクレオチドを接続する非ヌクレオチド系リンカーは、少なくとも一つのジスルフィド結合を含む。
【０３７１】
特定の実施形態では、複数標的分子中の少なくとも二つのエフェクター分子は、ヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカーを介して互いに共有結合され、複数標的分子は、少なくとも一つのリガンドとさらにコンジュゲートされる。限定されないが、リガンドは、複数標的分子の任意の場所に存在し得る。例えば、リガンドは、リンカーに

よって共有結合された少なくとも二つのエフェクター分子のうちの一つの一方の末端に存在してもよく、リンカーによって共有結合された少なくとも二つのエフェクター分子のうちの一つの内部（非末端）位置に存在してもよく、またはリンカー内の位置に存在してもよい。

【０３７２】

一部の実施形態では、共有結合された少なくとも二つのエフェクター分子を含む複数標的分子は、少なくとも一つのリガンドとコンジュゲートされる。限定されないが、リガンドは、同一であってもよく、または異なっていてもよい。二つのリガンドは、複数標的分子の任意の位置で独立してコンジュゲートされ得る。例えば第一のリガンドは、第一のエフェクター分子中に存在し、そして第二のリガンドは、第一のエフェクター分子と第二のエフェクター分子に接続するリンカー中に存在してもよく、または第一のリガンドは、第一のエフェクター分子中に存在し、そして第二のリガンドは、第一のエフェクター分子に共有結合された第二のエフェクター分子中に存在してもよく、または両方のリガンドが、同じエフェクター分子中に存在してもよく、または両方のリガンドが、エフェクター分子を接続するリンカー中に存在してもよい。

【０３７３】

一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するリンカーは、リガンドを含む。限定されないが、リガンドは、リンカー内の任意の位置に存在し得る。例えば、リガンドは、リンカーの中ほどの位置、またはリンカーの中ほどの１、２、もしくは３個の単量体または単位の内にコンジュゲートされ得る。

【０３７４】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において当該二つのｓｉＲＮＡは、ヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカーを介して互いに共有結合される。一部の実施形態では、二つのｓｉＲＮＡを接続するリンカーは、ヌクレオチド配列のＵＵＵまたは（ｄＴ）ｎを含み、式中、ｎは１～２０である。一部の実施形態では、エフェクター分子を接続するリンカーは、以下からなる群から選択される分子を含む：

・－（ＣＨ$_2$）$_{12}$－（「Ｃ１２リンカー」または「Ｑ５０」），

・－（ＣＨ$_2$）$_6$－Ｓ－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_6$－（「Ｃ６－Ｓ－Ｓ－Ｃ６リンカー」または「Ｑ５１」）、

・Ｑ１５１、

・Ｑ１７３、

・－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ－、式中、ｎは、０または１～２０であり；

・－（ＣＨ$_2$）$_9$－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＣＨ$_2$－、式中、ｎは０または１～２０であり；

・任意選択的にリガンドとコンジュゲートされた、モノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－プロリノール；および

・任意選択的にリガンドとコンジュゲートされた、モノ－、ジ－、トリ－、テトラ－、ペンタ－、またはポリ－ヒドロキシプロリノール（例えば、ポリ［４－ヒドロキシプロリノール］）。

【０３７５】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖に共有結合される。限定されないが、二つのセンス鎖は、任意の方向で互いに結合され得る。例えば、第一のセンス鎖の３’末端は、第二のセンス鎖の５’末端に結合されてもよく、第一のセンス鎖の３’末端は、第二のセンス鎖の３’末端に結合されてもよく、または第一のセンス鎖の５’末端は、第二のセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。

【０３７６】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共

有結合される。限定されないが、二つのアンチセンス鎖は、任意の方向で互いに結合され得る。例えば、第一のアンチセンス鎖の３’末端は、第二のアンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよく、第一のアンチセンス鎖の３’末端は、第二のアンチセンス鎖の３’末端に結合されてもよく、または第一のアンチセンス鎖の５’末端は、第二のアンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。

【０３７７】

一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合される。限定されないが、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、任意の方向で、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に結合され得る。例えば、センス鎖の３’末端は、アンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよく、センス鎖の３’末端は、アンチセンス鎖の３’末端に結合されてもよく、またはセンス鎖の５’末端は、アンチセンス鎖の５’末端に結合されてもよい。

【０３７８】

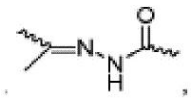
一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖に共有結合され、第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合される。一部の実施形態では、複数標的分子は、二つのｓｉＲＮＡから組み立てられ、この場合において第一のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのセンス鎖に共有結合され、第一のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、第二のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に共有結合される。

【０３７９】

一部の実施形態では、リンカーは、－［（Ｐ－Ｑ”－Ｒ）$_q$－Ｘ－（Ｐ’－Ｑ’－Ｒ’）’］$_q$”－Ｔ－であり、式中、

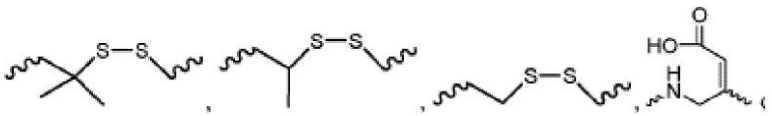
Ｐ、Ｒ、Ｔ、Ｐ’、Ｒ’およびＴは、それぞれの存在について各々独立して、存在しない、ＣＯ、ＮＨ、Ｏ、Ｓ、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（Ｏ）、CH_2、CH_2NH、CH_2O；ＮＨＣＨ（Ｒ^a）Ｃ（Ｏ）、－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ（Ｒ^a）－ＮＨ－、ＣＨ＝Ｎ－Ｏ、

【化３９】



またはヘテロシクリル；

【化４０】



であり；

Ｑ’’およびＱ’’’は、それぞれの存在について各々独立して、存在しない、－$_2$()ＣＨ$_n$－、－Ｃ（Ｒ^1）（Ｒ^2）（CH_2）$_n$－、－（CH_2）$_n$Ｃ（Ｒ^1）（Ｒ^2）－、－（CH_2CH_2O）$_m$$CH_2CH_2$－、または－（$CH_2CH_2O$）$_m$$CH_2CH_2NH$－であり；

Ｘは、存在しない、または切断可能な結合基であり；

Ｒ^{a}は、Ｈまたはアミノ酸側鎖であり；

Ｒ^{1}およびＲ^{2}はそれぞれの存在について各々独立して、Ｈ、CH_3、ＯＨ、ＳＨ、またはＮ（Ｒ^N）$_2$であり；

Ｒ^{N}はそれぞれの存在について独立して、Ｈ、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり；

ｑ、ｑ’、およびｑ’’はそれぞれの存在について各々独立して、０～２０であり、反復

単位は、同一であっても、異なってもよく；
ｎはそれぞれの存在について独立して、１～２０であり；
ｍはそれぞれの存在について独立して、０～５０である。
【０３８０】
一部の実施形態では、リンカーは、少なくとも一つの切断可能な結合基を含む。
【０３８１】
一部の実施形態では、リンカーは、分岐型リンカーである。分岐型リンカーの分岐点は、少なくとも三価であってもよいが、四価、五価、もしくは六価の原子、またはそのような複数価を呈する基であってもよい。一部の実施形態では、分岐点は、－Ｎ、－Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－Ｏ－Ｃ、－Ｓ－Ｃ、－ＳＳ－Ｃ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）－Ｃ、または－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃであり、式中、Ｑはそれぞれの存在について独立して、Ｈまたは任意で置換されるアルキルである。一部の実施形態では、分岐点は、グリセロールまたはその誘導体である。
【０３８２】
切断可能な結合基とは、細胞の外部で充分に安定であるが、標的細胞内に入ると切断されて、リンカーが一緒に保持している二つの部分を放出する基である。特定の実施形態では、切断可能な結合基は、対象の血液もしくは血清中、または第二の参照条件下（例えば、血液または血清中で見られる条件を模倣または表すように選択され得る）よりも、標的細胞中または第一の参照条件下（例えば、細胞内条件を模倣または表すように選択され得る）において、少なくとも１０倍以上、好ましくは少なくとも１００倍以上速い速度で切断される。
【０３８３】
切断可能な結合基は、切断剤、例えば、ｐＨ、酸化還元電位、または分解性分子の存在、の影響を受け易い。概して切断剤は、血清または血液中においてよりも、細胞の内部で、より広範に広がっているかまたはより高いレベルもしくは活性で見られる。そのような分解剤の例としては、特定の基質に対して選択される、または基質特異性を有さない酸化還元剤、例えば還元によって酸化還元切断可能な結合基を分解することができる、細胞中に存在する、例えば、メルカプタンなどの酸化酵素または還元酵素または還元剤；エステラーゼ；アミダーゼ；エンドソーム、または酸性環境を作出できる剤、例えば、５以下のｐＨをもたらす剤；一般的な酸、ペプチダーゼ（基質特異的であってもよい）およびプロテアーゼ、およびホスファターゼとして作用することによって酸切断可能な結合基を加水分解もしくは分解できる酵素が挙げられる。
【０３８４】
リンカーは、特定の酵素によって切断可能である切断可能な結合基を含み得る。リンカー中に組み込まれる切断可能な結合基の種類は、標的にする細胞に左右され得る。例えば、ＣＮＳ中の細胞を標的とするｉＲＮＡ剤は、シアル酸（ＳＡ）を含むテザーにコンジュゲートされ得る。ＣＮＳ細胞は、ノイラミダーゼ酵素（例えば、ノイラミダーゼ１（ＮＥＵ１）、ノイラミダーゼ２（ＮＥＵ２）、ノイラミダーゼ３（ＮＥＵ３）、ノイラミダーゼ４（ＮＥＵ４）など）が豊富である。特に、ＮＥＵ３はＣＮＳの細胞で豊富であり、核エンベロープの内膜に局在している。一方でＮＥＵ１は核エンベロープの外膜、ならびに細胞膜に局在している（例えば、Ｌｅｄｅｅｎ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｎｅｗ ｆｉｎｄｉｎｇｓ ｏｎ ｎｕｃｌｅａｒ ｇａｎｇｌｉｏｓｉｄｅｓ：ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｎ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎ．１１６（５）：７１４－７２０を参照のこと）。ＮＥＵ３は、末端２，３および２，６結合型ＳＡを切断する（例えば、米国特許第１０，９０７，１７６号を参照）。
【０３８５】
一部の実施形態では、切断可能な結合基は、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）と比較して、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）、少なくとも１．２５、１．５、１．７５、２、３、４、５、１０、２５、５０または１００倍速く切断される。一部の実施

形態では、切断可能な結合基は、細胞（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、血液（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）において、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、または１％未満まで切断される。

【０３８６】

切断可能な結合基の例としては限定されないが、酸化還元切断可能な結合基（例えば、－Ｓ－Ｓ－および－Ｃ（Ｒ）$_2$－Ｓ－Ｓ－、式中、ＲはＨまたはＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであり、少なくとも一つのＲはＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルであり、例えば、ＣＨ$_3$やＣＨ$_2$ＣＨ$_3$である）；リン酸系の切断可能な結合基（例えば、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＲ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｒ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＨ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（０Ｈ）－Ｏ、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｓ－、および－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｓ－、式中、Ｒは任意選択的に置換された直鎖または分岐鎖のＣ$_1$－Ｃ$_{10}$アルキルである）；酸の切断可能な結合基（例えば、ヒドラゾン、エステル、およびアミノ酸のエステル、－Ｃ＝ＮＮ－および－ＯＣ（Ｏ）－）；エステル系の切断可能な結合基（例えば、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－）；ペプチド系の切断可能な結合基（例えば、細胞中でペプチダーゼやプロテアーゼなどの酵素により切断される結合基、例えば、－ＮＨＣＨＲ^{A}Ｃ（Ｏ）ＮＨＣＨＲ^{B}Ｃ（Ｏ）－、式中、Ｒ^{A}およびＲ^{B}は、二つの隣接するアミノ酸のＲ基である）が挙げられる。ペプチド系の切断可能な結合基は、二つ以上のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、ペプチド系の切断可能な結合は、細胞中に存在するペプチダーゼやプロテアーゼの基質であるアミノ酸配列を含む。

【０３８７】

追加の例示的な切断可能な結合基としては、本明細書に以下に記載される、全ての例示的なエンドソーム切断可能なリンカーならびにホスホロアミダイトが挙げられる。

【０３８８】

切断可能なリンカー

特定の態様では、切断可能なリンカー、例えばエンドソーム切断可能および／またはプロテアーゼ切断可能なリンカーが本明細書に提供される。一部の実施形態では、本明細書に記載される切断可能なリンカーは、より大きなリンカー中に含まれ得る。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）と比較して、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）、少なくとも１．２５、１．５、１．７５、２、３、４、５、１０、２５、５０または１００倍速く切断される炭水化物リンカーである。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、細胞（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、血液（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）において、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、または１％未満まで切断される。一部の実施形態では、リンカーは、対象の血液もしくは血清中、または第二の参照条件下（例えば、血液または血清中で見られる条件を模倣または表すように選択され得る）よりも、標的細胞中または第一の参照条件下（例えば、細胞内条件を模倣または表すように選択され得る）において、少なくとも１０倍以上、好ましくは少なくとも１００倍速い速度で切断される。

【０３８９】

本明細書に記載される、および当分野に公知の切断可能なリンカーは、エンド－リソソ

ーム区画での開裂に有用であろう任意の分子に使用されてもよい。本明細書に記載される、および当分野で公知の切断可能なリンカーは、特に疎水性コンジュゲート、エンドソーム切断可能な剤、またはエンド－リソソーム区画で活性化または遊離する必要があり得る任意の他の薬剤のためのプロドラッグ法において特に有用であり得る。

【０３９０】

複数標的分子のエフェクター分子の具体的なリンカーの例としては限定されないが、本明細書に以下に開示される全てのエンドソーム切断可能なリンカーならびにホスホロアミダイトが挙げられる。

【０３９１】

エフェクター分子

当業者は、約２０～２３塩基対、具体的には２１塩基対の二本鎖構造を備えた二本鎖オリゴヌクレオチドが、ＲＮＡ干渉の誘導において特に有効であると認められていることを認識している（Ｅｌｂａｓｈｉｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　２００１，２０：６８７７－６８８８）。しかしながら、他方で、より短い、またはより長い二本鎖オリゴヌクレオチドも同様に有効であり得ることが判明している。

【０３９２】

本明細書で使用される場合、「ｓｉＲＮＡ」という用語は、ＲＮＡ転写物の標的切断を介在する剤を指す。これらの剤は、ＲＮＡｉ誘導型サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）として知られる細胞質の複数タンパク質の複合体と会合する。ＲＮＡ干渉の誘導に有効な剤は、本明細書においてｓｉＲＮＡ、ＲＮＡｉ剤、またはｉＲＮＡ剤とも称される。本明細書で使用される場合、「ｓｉＲＮＡ活性」および「ＲＮＡｉ活性」という用語は、ｓｉＲＮＡによる遺伝子サイレンシングを指す。

【０３９３】

二本鎖オリゴヌクレオチドは、二つのオリゴヌクレオチド鎖を含み、当該鎖は、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成するのに充分な相補性がある。概して、二本鎖構造は、１５～３５、より一般的には１８～２５、更により一般的には１９～２４、最も一般的には１９～２１塩基対の長さである。一部の実施形態では、２５～３０塩基対の長さのより長い二本鎖オリゴヌクレオチドが好ましい。一部の実施形態では、１０～１５塩基対の長さのより短い二本鎖オリゴヌクレオチドが好ましい。別の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも２１ヌクレオチドの長さである。

【０３９４】

一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、センス鎖とアンチセンス鎖を含み、この場合において当該アンチセンスＲＮＡ鎖は、標的配列の少なくとも一部と相補的な相補性領域を有し、二本鎖領域は、１４～３０ヌクレオチドの長さである。同様に、標的配列に対する相補性領域は、１４～３０、より一般的には１８～２５、さらにより一般的には１９～２４、最も一般的には１９～２１ヌクレオチドの長さである。

【０３９５】

一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二本鎖領域は、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０ヌクレオチド対、またはそれ以上のヌクレオチド対の長さである。

【０３９６】

一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖は、少なくとも１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、もしくは４０ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドの長さである。

【０３９７】

一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドのセンス鎖は、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、

２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドの長さである。

【０３９８】

一部の実施形態では、一方の鎖は、二本鎖領域において、１～１０ヌクレオチドの一本鎖の伸長を少なくとも一つ有する。「二本鎖領域における一本鎖ヌクレオチドの伸長」とは、二本鎖領域において、別のヌクレオチドと塩基対形成されていないヌクレオチドが少なくとも一つ存在することを意味する。一本鎖ヌクレオチドの伸長が、二本鎖領域において内部（非末端）に存在する場合、少なくとも１ヌクレオチドの塩基対が、一本鎖の伸長の各末端に存在し得る。二本鎖領域の末端に存在する場合、一本鎖ヌクレオチドの伸長は、一本鎖オーバーハングであり得る。二本鎖領域における一本鎖ヌクレオチドの伸長は、バルジの形態であってもよく、または一つ以上のミスマッチヌクレオチドであってもよい。一部の実施形態では、両方の鎖は、二本鎖領域において１～５（例えば、１、２、３、４、または５）ヌクレオチドの一本鎖の伸長を少なくとも一つ有する。二本鎖領域において、両方の鎖が１～５（例えば、１、２、３、４、または５）ヌクレオチドの一本鎖の伸長を有する場合、当該一本鎖ヌクレオチドは、互いに対向してもよく（例えば、ミスマッチの伸長）、または第二の鎖が、第一の鎖の一本鎖オリゴヌクレオチドに対向する非塩基対形成ヌクレオチドを有さないように配置されてもよく、その逆もまた然りである（例えば、一本鎖ループ）。一部の実施形態では、一本鎖ヌクレオチドは、いずれかの末端から８ヌクレオチド以内、例えば、二つの鎖の相補性の領域の５’末端または３’末端のいずれかから８、７、６、５、４、３、または２ヌクレオチド以内に存在する。

【０３９９】

ヘアピン型およびダンベル型のオリゴヌクレオチドは、少なくとも１４、１５、１５、１６、１７、１８、１９、２９、２１、２２、２３、２４、もしくは２５ヌクレオチド対またはそれと等しいヌクレオチド対の二本鎖領域を有する。二本鎖領域は、長さが２００、１００、または５０以下であり得る。一部の実施形態では、二本鎖領域の範囲は、長さが１５～３０、１７～２３、１９～２３、および１９～２１ヌクレオチド対である。
一部の実施形態では、核酸系エフェクター分子は、一部の実施形態では３’末端に、一部の実施形態ではヘアピンのアンチセンス側に、一本鎖オーバーハングまたは末端非対形成領域を有し得る、一部の実施形態では、オーバーハングは、長さが１～４ヌクレオチド、より広くは２～３ヌクレオチドである。ＲＮＡ干渉を誘導し得るヘアピンオリゴヌクレオチドは、本明細書において「ｓｈＲＮＡ」とも称する。

【０４００】

特定の実施形態では、二つのオリゴヌクレオチド鎖は、特異的結合が望ましい条件下、すなわち、インビボアッセイや治療的処置の場合の生理学的条件下で、およびインビトロアッセイの場合にはアッセイが実施される条件下で、アンチセンス化合物と非標的核酸配列の非特異的結合を回避するのに充分な程度の相補性がある場合、特異的にハイブリダイズする。

【０４０１】

本明細書で使用される場合、「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」は、そのもとでアンチセンス化合物がその標的配列にハイブリダイズするが、他の配列には最小数でハイブリダイズすることとなる条件を指す。厳しい条件は、配列依存性であり、異なる状況では異なり、アンチセンス化合物が標的配列にハイブリダイズする「厳しい条件」は、アンチセンス化合物の性質および組成、ならびにそれらが調査されているアッセイによって決定される。

【０４０２】

当分野において、ヌクレオチドアフィニティの改変を取り込むことで、非改変化合物と比較してより多くのミスマッチが可能となり得ると理解されている。同様に、特定のオリゴヌクレオチド配列は、他のオリゴヌクレオチド配列よりもミスマッチに対して寛容である場合がある。当業者であれば、例えば融解温度（Ｔｍ）を決定することによって、オリゴヌクレオチド間、またはオリゴヌクレオチドと標的核酸との間の適切な数のミスマッチ

を決定することができる。ＴｍまたはΔＴｍは、当業者に公知の技術により計算することができる。例えば、Ｆｒｅｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９７，２５，２２：４４２９－４４４３）に記載される技術によって、当業者であれば、ＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖、およびＲＮＡ：ＲＮＡ二本鎖の融解温度を高める能力について、ヌクレオチド改変を評価することができる。

【０４０３】

環状ｓｃｉＲＮＡ構造設計

本開示において、本発明者らは、化学修飾されたヌクレオチドを使用し、アンチセンス鎖の核酸の先端を接続して、５’末端および３’末端がブロックされた環状センス構築物を作製する、低分子環状干渉ＲＮＡ（ｓｃｉＲＮＡ）を作製するための新規方法も設計した。例えば例示的なｓｃｉＲＮＡは、「クリック」化学を使用して作製される、三価ＧａｌＮＡｃリガンドを担持する５’－３’環化センス鎖にアニーリングされたアンチセンス鎖を用いて合成され、これらｓｃｉＲＮＡ、特にアンチセンスヌクレオチド配列の５’末端に、例えば５’－ホスホロチオエート（５’－ＰＳ）、５’－ホスホロジチオエート（５’－ＰＳ$_2$）、５’－ビニルホスホネート（５’－ＶＰ）、５’－メチルホスホネート（５’－ＭｅＰｈｏｓ）、および５’－デオキシ－５’－Ｃ－マロニル修飾などのリン酸模倣修飾を有するｓｃｉＲＮＡで、インビトロおよびインビボにおいて強力な遺伝子発現のサイレンシングが観察された。

【０４０４】

また、ｂｉｓ－リンカー（例えば、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系の切断可能なリンカー）によって一緒に接続された二つのセンスヌクレオチド配列を有する例示的なｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡも合成されており、一方のセンスヌクレオチド配列の５’末端は、「クリック」化学を使用して他方のセンスヌクレオチド配列の３’末端で環化され、ｂｉｓ－センスヌクレオチド配列を有する環化センス鎖が形成されている。センスヌクレオチド配列のうちの一つまたは二つは、センスヌクレオチド配列の非末端位置に親油性部分（および／または三価ＧａｌＮＡｃリガンド）を担持する。一つまたは二つのアンチセンス鎖ヌクレオチド配列は、５’－３’環化センス鎖の対応するセンスヌクレオチド配列にアニーリングされる。

【０４０５】

したがって、本発明の一つの態様は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む低分子環状干渉ＲＮＡ（ｓｃｉＲＮＡ）に関する。センス鎖およびアンチセンス鎖はそれぞれ、少なくとも一つの核酸修飾を含む。

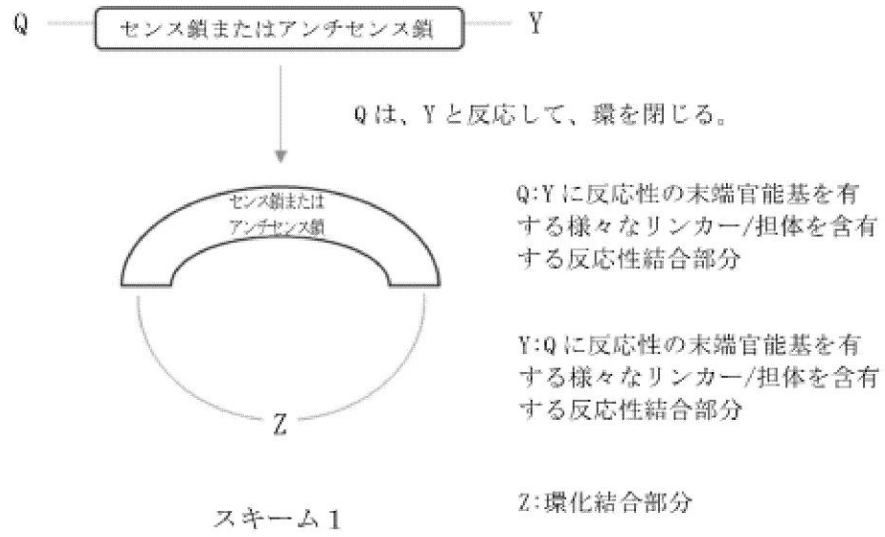
【０４０６】

一部の実施形態では、センス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。

【０４０７】

センス鎖またはアンチセンス鎖は、センス（またはアンチセンス）鎖の一方の末端をセンス（またはアンチセンス）鎖の他方の末端に接続する環化結合部分を介して、環状または実質的に環状の構造を形成することができる。センス鎖もしくはアンチセンス鎖の環状または実質的に環状の構造は、スキーム１に示される環化手順によって形成され得る。スキーム１に示されるように、反応性結合部分Ｑが、センス（またはアンチセンス）鎖の一方の末端に付加され、別の反応性結合部分Ｙが、センス（またはアンチセンス）鎖の他方の末端に付加される。ＱおよびＹはそれぞれ、リガンドを担持し得る、様々なリンカー（テザー）および担体を含有してもよく、それぞれ、互いに反応性である末端官能基を含有する。次いで、付加反応を介してＱとＹの間で反応を活性化することによって、環化結合部分であるＺが形成され、環が閉じられて、環状または実質的に環状の構造が形成される。クリック化学を介した環化手順（例えば、アジド－アルキン付加環化からトリアゾールを形成する）の例を、実施例１２のスキームＩに示す。

【化４１】



スキーム１

【０４０８】

センス鎖（またはアンチセンス鎖）の環化に使用される反応、および反応性結合部分のＱとＹに含有されるリンカー／環状基に応じて、環状のセンス鎖（またはアンチセンス鎖）中の環化結合部分Ｚは、トリアゾール結合、アミド結合、スルフィド結合またはジスルフィド結合、リン酸結合、オキシム結合、ヒドラゾ結合、Ｎ、Ｎ’－ジアルキレンヒドラゾ結合、メチレンイミノ結合、メチレンカルボニルアミノ結合、メチレンメチルイミノ結合、メチレンヒドラゾ結合、メチレンジメチルヒドラゾ結合、メチレンオキシメチルイミノ結合、ヒドロキシルアミノ結合、ホルムアセタール結合、アルキル結合またはアリール結合、ＰＥＧ結合、エーテル結合、チオエーテル結合、チオジエステル結合、チオノカルバメート結合、チオアセトアミド結合、スルホン酸結合、スルホンアミド結合、スルホン酸エステル結合、チオホルムアセタール結合、尿素結合、炭酸結合、アミン結合、マレイミド－チオエーテル結合、ホスホジエステル結合、ホスホトリエステル結合、ホスホン酸水素結合、ホスホン酸アルキル結合またはホスホン酸アリール結合、ホスホロアミデート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロセレン酸結合、ボラノリン酸結合、ボラノリン酸エステル結合、スルホンアミド結合、カルバミン酸結合、カルボキサミド結合、カルボキシメチル結合、カルボン酸エステル結合、シロキサン結合、ジアルキルシロキサン結合、エチレンオキシド結合、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される一つ以上の結合を含有してもよい。

【０４０９】

一つの実施形態では、環状センス鎖（アンチセンス鎖）中の環化結合部分Ｚは、トリアゾール結合、アミド結合、ジスルフィド結合、リン酸結合、オキシム結合、アルキル結合、ＰＥＧ結合、エーテル結合、チオエーテル結合、尿素結合、炭酸結合、アミン結合、マレイミド－チオエーテル結合、ホスホジエステル結合、スルホンアミド結合、カルバミン酸結合、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される一つ以上の結合を含んでもよい。

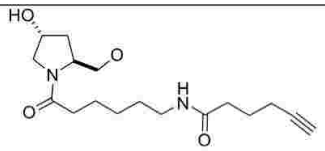
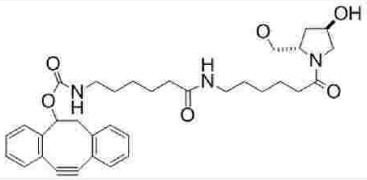
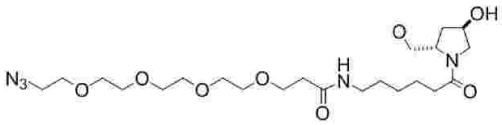
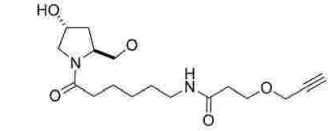
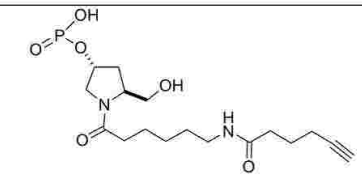
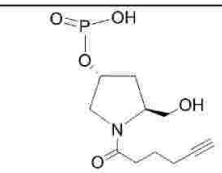
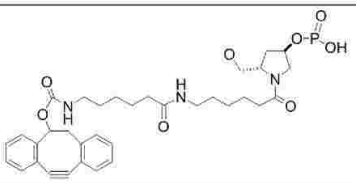
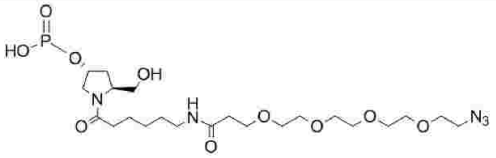
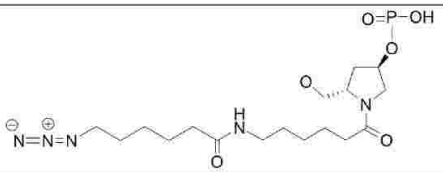
【０４１０】

特定の実施形態では、環化結合部分は、リガンドをｓｃｉＲＮＡに接続する役割を果たし得る担体を一つ以上さらに含有してもよい。担体は、環状基または非環状基であってもよい。一つの実施形態では、環状基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、［１，３］ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフラニル、およびデカリニルからなる群から選択される。一つの実施形態では、非環状基は、セリノール骨格またはジエタノールアミン骨格に基づく部分である。

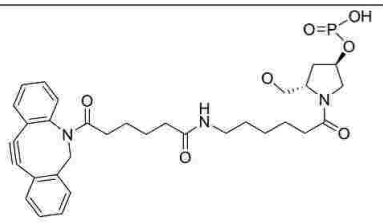
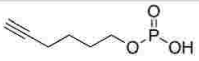
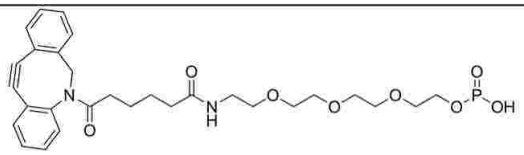
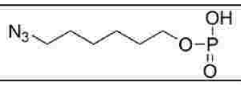
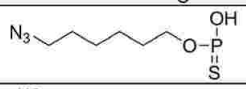
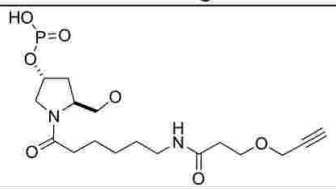
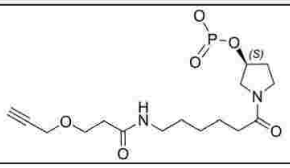
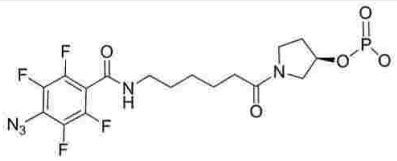
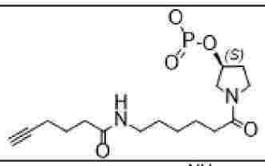
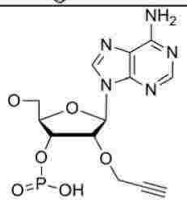
【０４１１】

一つの例示的な環化結合部分は、クリック化学を介した環化手順により（例えば、アジド－アルキン付加環化から）形成されたトリアゾール結合を含有する。スキーム１で上述されたように、環化は、反応性結合部分Ｑを、センス鎖（またはアンチセンス鎖）の一方の末端に付加し、別の反応性結合部分Ｙを、センス鎖（またはアンチセンス鎖）の他方の末端に付加し、ＱとＹの間の反応を活性化することによって形成され得る。この場合、Ｑ／Ｙペアは、アジド／アルキンのペアである。反応性結合部分Ｑ／Ｙ（この場合、アジド／アルキン官能基）を含有する分子の非限定的な例を以下に示す。

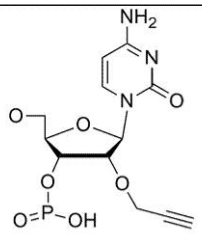
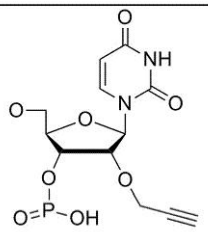
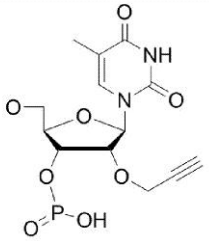
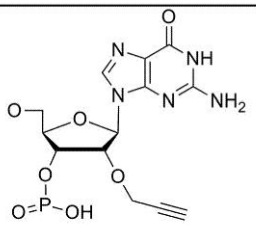
【表１】

L123 N-(ヘキシニルカルボキサミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-ヘキシニル)	
L146 N-(ベンゾシクロオクチニル-カルボキサミドカプロイルアミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-C6-オクチニル)	
L177 N-(アジド-PEG4-カルボキサミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-PEG4-N3)	
L347 N-(プロパルギル エーテル カルボキサミドカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール	
Q44 N-(ヘキシニルカルボキサミドカプロイル)-プロリノール-4-リン酸塩(Hyp-ヘキシニル)	
Q84 N-(ヘキシニル)-プロリノール-4-リン酸塩(Hyp-ヘキシニル) L124 N-(ヘキシニル)-4-ヒドロキシプロリノール	
Q99 N-(ベンゾシクロオクチニル-カルボキサミドカプロイルアミドカプロイル)-プロリノール-4-リン酸塩(Hyp-C6-C6-オクチニル)	
Q127 N-(アジド-PEG4-カルボキサミドカプロイル)-プロリノール-4-リン酸塩(Hyp-C6-PEG4-N3)	
Q136 N-(6-アジドヘキシルカルボキサミドカプロイル)-プロリノール-4-リン酸塩(Hyp-C6-C6-アジド)	

【表２】

Q325 C6-DBCOを伴うQ8	
Q186 5-ヘキシン-1イル-リン酸塩	
Q187 10-(6-オキソ-6-(ジベンゾ[b,f]アザシクロオクタ-4-イン-1-イル)-カプロアミド-N-エチル)-O-トリエチレングリコール-1-リン酸塩(DBCO-TEG-(10-1941))	
Q301 6-アジドヘキシルリン酸塩	
Q301S 6-アジドヘキシルホスホロチオエート	
Q396 N-(アミノカプロイル-プロパルギルエーテル) プロリノール-4-リン酸塩	
Q397 N-(アミノカプロイル-プロパルギルエーテル)-(S)-ピロリジン-3-オール-リン酸塩	
Q399 2,3,5,6-テトラフルオロ-4-アジド-ベンゾイル-N-アミノカプロイル-(S)-ピロリジン-3-オール-リン酸塩	
Q422 N-(ヘキシニルカルボキサミドカプロイル)-(S)-ピロリジン-3-オール-リン酸塩	
Apy 2'-O-プロピニル-アデノシン-3'-リン酸塩	

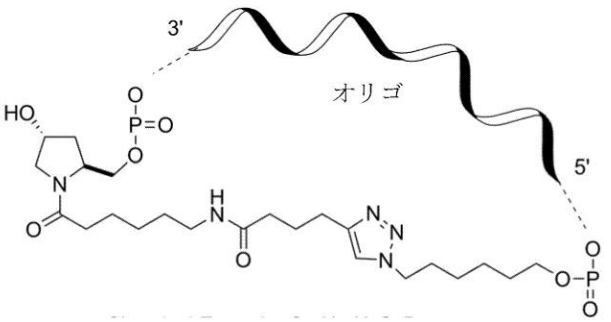
【表３】

Cpy 2’-O-プロピニル-シチジン-3’-リン酸塩	
Upy 2’-O-プロピニル-ウリジン-3’-リン酸塩	
Tpy 2’-O-プロピニル-5-メチル-ウリジン-3’-リン酸塩	
Gpy 2’-O-プロピニル-グアノシン-3’-リン酸塩	

【０４１２】

上述のように、これらの例示的な分子は、例えばリン酸塩を介して、オリゴヌクレオチド鎖の末端に付加されてもよい。Ｑ／Ｙペアの間の反応性結合部分の間でクリック化学を活性化することによって、環化されたオリゴヌクレオチド鎖が形成される。例えば、リン酸塩を介してオリゴヌクレオチド鎖の各末端にＬ１２３およびＱ３０１（上記の表に図示）を付加し、Ｌ１２３とＱ３０１のアジド／アルキンのペアのクリック化学を活性化させることによって、

【化４２】

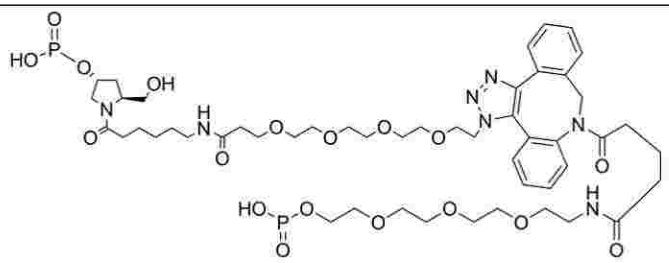
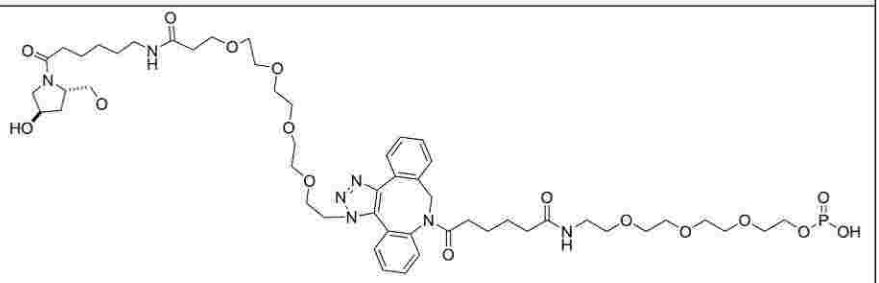
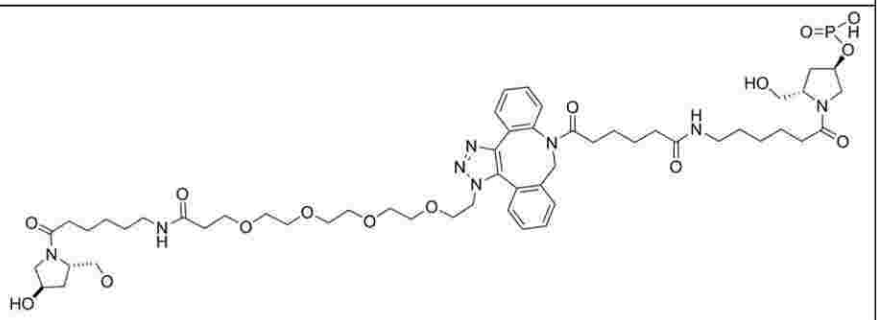
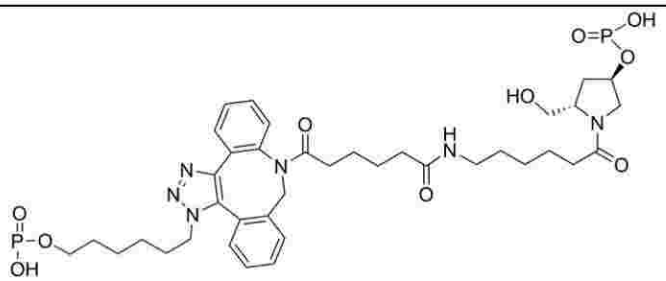
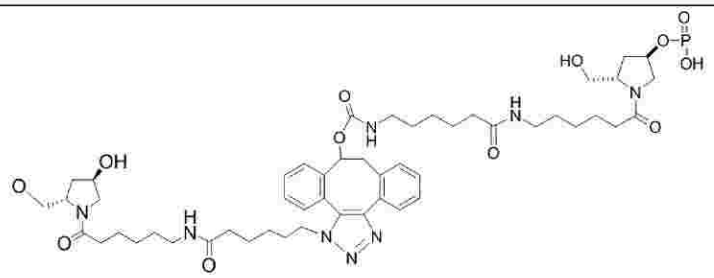


が形成される（Ｚ４９－３’－リン酸－Ｈｙｐ－Ｃ９－１，４－トリアゾール－Ｃ６－５’－リン酸塩のクリック反応を活性化させることにより環化）

【０４１３】

上上記の反応性結合部分Ｑ／Ｙペアのクリック反応を活性化することにより形成される環化結合部分Ｚの非限定的な追加例を、以下に示す。

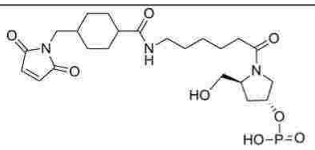
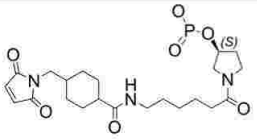
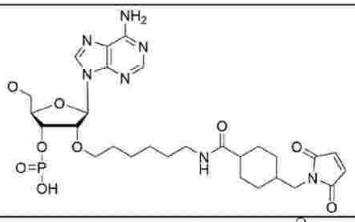
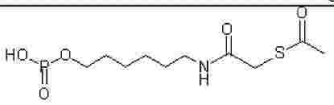
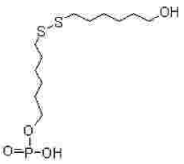
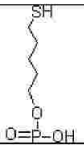
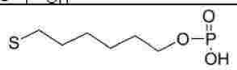
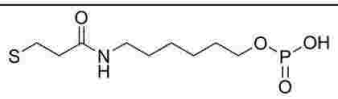
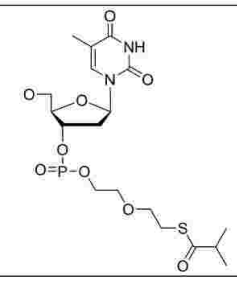
【表４】

Q310	Q187とQ127のクリック反応	
Q324（DBCO-アジド5'-3'結合）	Q187とL177のクリック反応	
Q327（DBCO-アジド5'-3'結合（Q8に基づく））	Q325とL177のクリック反応	
Q328（DBCO-アジド5'-5'結合（Q8に基づく））	Q325とQ301のクリック反応	
Q138 Q8-C6-ジフェニルシクロオクタ(1,2,3トリアゾール)-C6-C6-Hyp	Q99とQ136のクリック反応	

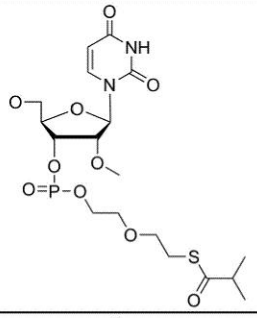
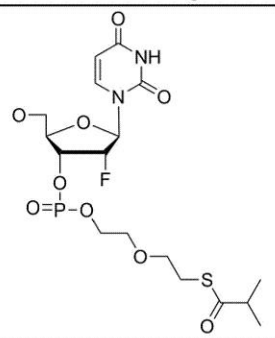
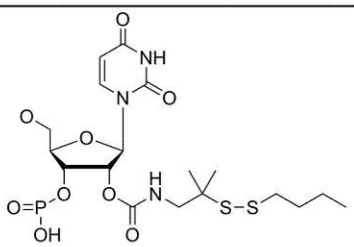
【０４１４】

一つの例示的な環化結合部分は、チオール－マレイミド付加反応からのクリック化学反応を介した環化手順によって形成されたマレイミド－チオエーテル結合（またはチオスクシンイミド結合）を含有する。スキーム１で上述されたように、環化は、反応性結合部分Ｑを、センス鎖（またはアンチセンス鎖）の一方の末端に付加し、別の反応性結合部分Ｙを、センス鎖（またはアンチセンス鎖）の他方の末端に付加し、ＱとＹの間の反応を活性化することによって形成され得る。この場合、Ｑ／Ｙペアは、チオール／マレイミドのペアである。反応性結合部分Ｑ／Ｙ（この場合、チオール／マレイミド官能基）を含有する分子の非限定的な例を以下に示す。

【表５】

Q157 N-[4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキサミドカプロイル)プロリノール-4-リン酸塩(Hyp-C6-マレイミド)	
Q385 N-[4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキサミドカプロイル)-(S)-ピロリジン-3-オール-リン酸塩(Q358-マレイミド)	
Y224 2'マレイミド アデノシン-3'リン酸塩((Aah)を介して付加)	
Q5 6-(2-メルカプト-アセチルアミノ)-ヘキシルリン酸塩	
Q51 6-ヒドロキシヘキシルジチオヘキシルリン酸塩（チオール修飾因子 C6 S-S Glen Res. 10-1936)	
Q66 6-メルカプトヘキシルリン酸塩（Glen Res. 10-1936)	
Q82 1-チオヘキシルリン酸塩（チオール修飾因子C6 S-Sの切断後 Glen Res. 10-1936)	
Q332 6-(3-メルカプトプロパンアミド）ヘキシルリン酸塩（コンジュゲーション用のチオールを含む5'-アミノ修飾因子)	
(dTbm) S-イソブチリル-(2-メルカプトエチルグリコール)-2'-デオキシチミジン-3'-ホスホトリエステル(dT-BMEG)	

【表６】

(ubm) S-イソブチリル-(2-メルカプトエチルグリコール)-2'O-メチルウリジン-3'-ホスホトリエステル(u-BMEG)	
(Ufbm) S-イソブチリル-(2-メルカプトエチルグリコール)-2'-フルオロウリジン-3'-ホスホトリエステル(fU-BMEG)	
Y138 2'-O-[{2-(ブチルジスルファンイル)-2-メチルプロピル}カルバメート]-ウリジン-3'-リン酸塩	

【０４１５】

センス鎖は、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０ヌクレオチドの長さであってもよい。一つの実施形態では、センス鎖は、少なくとも２０ヌクレオチドの長さである。一つの実施形態では、センス鎖は、少なくとも４０ヌクレオチドの長さである。

【０４１６】

アンチセンス鎖は、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０ヌクレオチドの長さであってもよい。

【０４１７】

アンチセンス鎖は、センス鎖にアニーリングされて、少なくとも部分的に二本鎖の領域を形成する。一部の実施形態では、一つ以上のセンスヌクレオチド配列は、アンチセンス鎖にアニーリングされる。一部の実施形態では、少なくとも一つのセンスヌクレオチド配列は、アンチセンス鎖にアニーリングされない。

【０４１８】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖にアニーリングされないセンスヌクレオチド配列は、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）、ａｎｔｉｍｉＲ（アンタゴミル）オリゴヌクレオチド、または一本鎖ｓｉＲＮＡ（ｓｓ－ｓｉＲＮＡ）オリゴヌクレオチドなどの一本鎖オリゴヌクレオチドであり得る。

【０４１９】

一部の実施形態では、二本鎖領域は、アンチセンス鎖の少なくともシード領域（すなわち、アンチセンスヌクレオチド配列の５’末端の２～８位）で、センス鎖とアンチセンス鎖の間に形成される。

【０４２０】
センス鎖の長さを増加させる、すなわち二本鎖領域の長さを増加させると、ｓｃｉＲＮＡの融解温度に影響を与えることができ、ｓｃｉＲＮＡ二本鎖の熱安定性を増加させることができる。
【０４２１】
センス鎖の長さの増加は、単一のセンスヌクレオチド配列を使用することによって、またはセンス鎖に二つ以上のセンスヌクレオチド配列をもたせることによって実現することができる。
【０４２２】
一部の実施形態では、センス鎖は、少なくとも２０ヌクレオチドの長さ、少なくとも２５ヌクレオチドの長さ、または少なくとも３０ヌクレオチドの長さを有する、例えば、２０～４５ヌクレオチドの長さ、または３０～４５ヌクレオチドの長さを有する、長い環状センスヌクレオチド配列を有し得る。
【０４２３】
一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、少なくとも一つのアンチセンスヌクレオチド配列を含む。少なくとも一つのアンチセンスヌクレオチド配列は、約２０～約４５ヌクレオチドの長さを有する。
【０４２４】
一つの実施形態では、長い環状センスヌクレオチド配列は、標的ｍＲＮＡ転写物のヌクレオチド配列に対して相補的な、約１９～約２３ヌクレオチドの長さを有するアンチセンス鎖にアニーリングされる。一つの実施形態では、長い環状センスヌクレオチド配列は、二つ以上の標的ｍＲＮＡ転写物のヌクレオチド配列に対して相補的な、約１９～約２３ヌクレオチドの長さを有する二つ以上のアンチセンスヌクレオチド配列にアニーリングされる。
【０４２５】
長い環状センスヌクレオチド配列は、ＤＩＣＥＲによって切断可能な基質であってもよい。
【０４２６】
ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ化合物の構造設計
本発明のさらなる態様は、対象の中枢神経系（ＣＮＳ）において、一つ以上の標的ｍＲＮＡを調節するための低分子環状干渉ＲＮＡ（ｓｃｉＲＮＡ）に関するものであり、当該ｓｃｉＲＮＡは、少なくとも４０ヌクレオチドの長さを有し、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列（各ヌクレオチド配列は約１８～約２８ヌクレオチドの長さを有する）を有する第一の鎖、および約１９～２３ヌクレオチドの長さを有し、第一の鎖ヌクレオチド配列のうちの少なくとも一つとアニーリングされる第二の鎖ヌクレオチド配列を少なくとも一つ、含む。第一の鎖は、環状または実質的に環状の構造を有する。第一の鎖ヌクレオチド配列と、第二の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、少なくとも一つの核酸修飾を含む。第一の鎖ヌクレオチド配列または第二の鎖ヌクレオチド配列は、一つ以上のリガンドを含む。
【０４２７】
ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡの第一の鎖は、ｂｉｓ－リンカーによって一緒に接続される二つ以上のヌクレオチド配列を含み、本明細書において「ｂｉｓ－鎖」（例えば、ｂｉｓ－センス鎖またはｂｉｓ－アンチセンス鎖）と呼称される場合がある。
【０４２８】
さらに、ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡの第一の鎖は、環状または実質的に環状の構造を有し、本明細書において、「環状または実質的に環状の鎖」と呼称される場合がある。第一の鎖は、少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列を含み、当該少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列を、ｂｉｓ－リンカーと接続することによって形成される。当該少なくとも二つの第一の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、同じまたは異なる第二の鎖ヌクレオチド配列とアニーリングされ得る。第一／第二の鎖ヌクレオチド配列はそれぞれ、同一また

は異なるＲＮＡ分子を標的とし得る。したがって、ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ分子は、一つ以上の標的ｍＲＮＡを標的とし得る。

【０４２９】

ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ分子は、複数標的分子であり得る。複数標的分子は、少なくとも二つの核酸系エフェクター分子を含み、当該エフェクター分子は、本明細書に記載されるｂｉｓ－リンカー部分によって互いに結合される。「核酸系エフェクター分子」とは、標的核酸（例えば、標的ｍＲＮＡ）の発現活性を調節することができる、修飾もしくは非修飾の核酸分子を意味する。少なくとも二つのエフェクター分子が、二つの分離されたエフェクター分子であることに留意されたい。言い換えると、少なくとも二つのエフェクター分子は、互いに重複していない。したがって本明細書において、一つ以上の標的核酸、または一つ以上の標的核酸内の二つ以上の別個の標的ＲＮＡ配列を標的とするように設計され、接触時に対象のＣＮＳ組織における送達と驚くべき有効性を呈するｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ分子が提供される。一つの標的ＲＮＡ内にある二つの標的ＲＮＡ配列は、当該標的ＲＮＡ配列が互いに重複しない場合、「別個の」とみなされる。

【０４３０】

したがって、本明細書に開示される複数標的分子は、一つのエフェクター分子が二つの異なる標的に指向される分子とは異なっている。例えば、各鎖が異なる標的に指向される二本鎖エフェクター分子とは異なっており、または少なくとも配列の一部が二つの異なる標的配列に対して相補的であるか、またはハイブリダイズすることができる配列を含むエフェクター分子とは異なっている。

【０４３１】

例えば、環状または実質的に環状のセンス鎖は、ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡを形成する二つのセンスヌクレオチド配列を含有してもよい。環状または実質的に環状のセンス鎖は、二つの対称的なヌクレオチド配列、または二つの非対称的なヌクレオチド配列を含み得る。対称的である場合、環状または実質的に環状のセンス鎖のセンスヌクレオチド配列はそれぞれ（例えば、各センスヌクレオチド配列は、約１９～約２３ヌクレオチドの長さを有してもよく、例えば２０～２１ヌクレオチドの長さを有してもよい）、同じｍＲＮＡ転写物のヌクレオチド配列を標的とする、二つの同一のアンチセンスヌクレオチド配列（例えば、それぞれ２１ヌクレオチドの長さを有してもよい）にアニーリングされ得る。非対称的である場合、環状または実質的に環状のセンス鎖のセンスヌクレオチド配列はそれぞれ（例えば、各センスヌクレオチド配列は、約１９～約２３ヌクレオチドの長さを有してもよく、例えば２０～２１ヌクレオチドの長さを有してもよい）、二つの異なるｍＲＮＡ転写物のヌクレオチド配列を標的とする、二つの異なるアンチセンスヌクレオチド配列（例えば、それぞれ２３ヌクレオチドの長さを有してもよい）にアニーリングされ得る。

【０４３２】

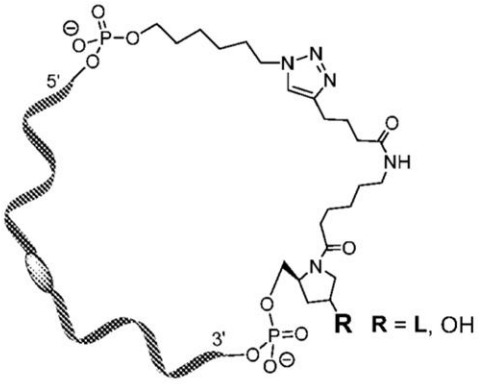
例示的な環状または実質的に環状のセンス鎖（またはｂｉｓ－センス鎖）、および環状のｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）を、スキーム１Ａ～１Ｃに示す。スキーム１Ａおよび１Ｂはそれぞれ、二つの対称的（スキーム１Ａ）または非対称的（スキーム１Ｂ）なセンスヌクレオチド配列（４２～４５ヌクレオチドのｂｉｓ－センス鎖の全長を有する）を含有する環状または実質的に環状のセンス鎖を示す。二つのセンスヌクレオチド配列は、ｂｉｓ－結合される（例えば、ヌクレオチド系または非ヌクレオチド系のリンカー（テザー））ことによって、接続される。スキーム１Ｃは、短いアンチセンスヌクレオチド配列（例えば、１９～２３ヌクレオチド）にアニーリングされた、長いｄｉｃｅｒ切断可能なセンスヌクレオチド配列（例えば、３０～４５ヌクレオチド）を含有する環状または実質的に環状のセンス鎖を示す。

【０４３３】

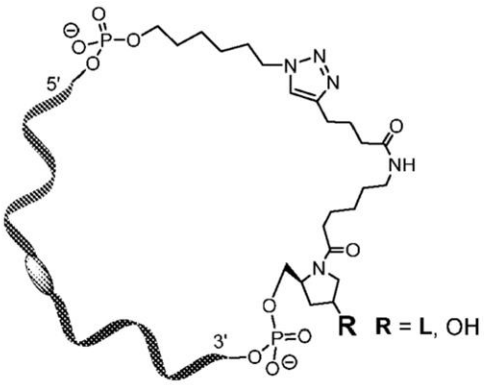
センス鎖またはｂｉｓ－センス鎖の環状または実質的に環状の構造は、上述のスキーム１に示されるのと同じ反応機構によるクリック化学によって形成されてもよい。ｂｉｓ－センス鎖の場合、ｂｉｓ－センス鎖の環状または実質的に環状の構造は、一方のセンスヌクレオチド配列の５’末端を他方のセンスヌクレオチド配列の３’末端とクリック化学反応

を起こすことにより形成されてもよい。環化結合部分Ｚは、リン酸結合、アルキル結合、トリアゾール結合、アミド結合、およびピロリジニル環状基のうちの一つ以上の組み合わせを、環状基によって担持されるリガンド（Ｌ）の有無に関わらず含有する。

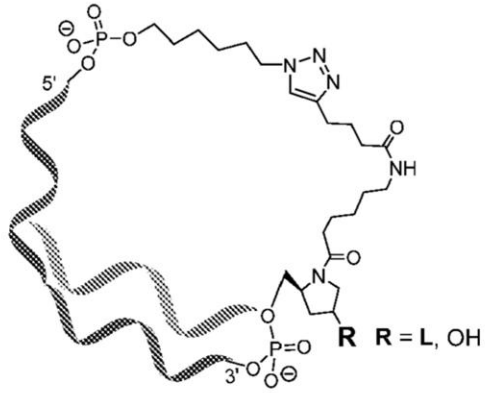
【化４３】



スキーム１Ａ



スキーム１Ｂ

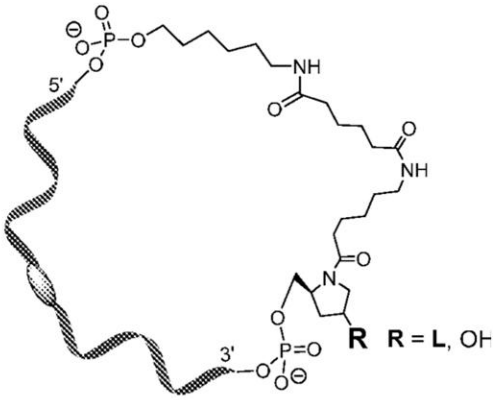


スキーム１Ｃ

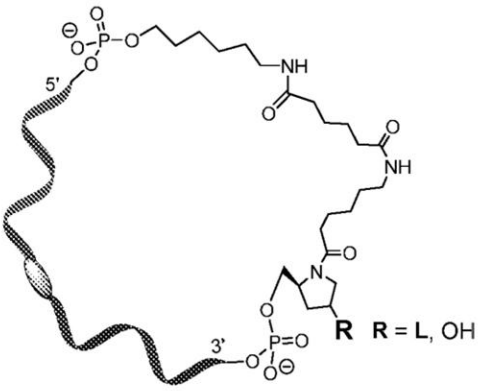
【０４３４】

追加の例示的な環状または実質的に環状のセンス鎖（またはｂｉｓ－センス鎖）および環状のｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）を、スキーム２Ａ～２Ｃ、スキーム３Ａ～３Ｃ、スキーム４Ａ～４Ｃ、スキーム５Ａ～５Ｃ、スキーム６Ａ～６Ｃ、スキーム７Ａ～７Ｃ、およびスキーム８Ａ～８Ｃに示し、様々な環化反応および環化結合部分が図示される。これらのスキームにおけるセンスヌクレオチド配列およびアンチセンス鎖ヌクレオチド配列は、スキーム１Ａ～１Ｃの配列を反映している。これらのスキームにおける環化反応は、スキーム１Ａ～１Ｃの反応とは異なる。例えば、スキーム２Ａ～２Ｃでは、環化はアミド形成による。環化結合部分Ｚは、リン酸結合、アルキル結合、アミド結合、およびピロリジニル環状基のうちの一つ以上の組み合わせを、環状基によって担持されるリガンド（Ｌ）の有無に関わらず含有する。スキーム３Ａ～３Ｃでは、環化は、ジスルフィド形成による。環化結合部分Ｚは、リン酸結合、アルキル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、およびピロリジニル環状基のうちの一つ以上の組み合わせを、環状基によって担持されるリガンド（Ｌ）の有無に関わらず含有する。スキーム４Ａ～４Ｃでは、環化は、クリック化学による。環化結合部分Ｚは、リン酸結合、アルキル結合、トリアゾール結合、アミド結合、およびＰＥＧ結合のうちの一つ以上の組み合わせを含む。スキーム５Ａ～５Ｃおよび６Ａ～６Ｃでは、環化は、オキシム形成による。環化結合部分Ｚは、リン酸結合、アルキル結合、オキシム結合（アルドキシムまたはケトキシム）、アミド結合、およびピロリジニル環状基のうちの一つ以上の組み合わせを、環状基によって担持されるリガンド（Ｌ）の有無に関わらず含有する。スキーム７Ａ～７Ｃおよび８Ａ～８Ｃでは、環化は、ヒドラゾン形成による。環化結合部分Ｚは、リン酸結合、アルキル結合、ヒドラゾ結合、アミド結合、およびピロリジニル環状基のうちの一つ以上の組み合わせを、環状基によって担持されるリガンド（Ｌ）の有無に関わらず含有する。

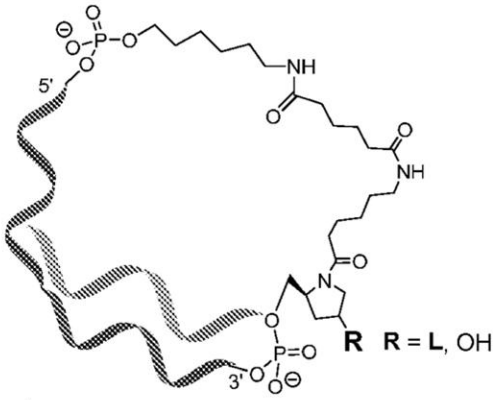
【化４４】



スキーム２Ａ

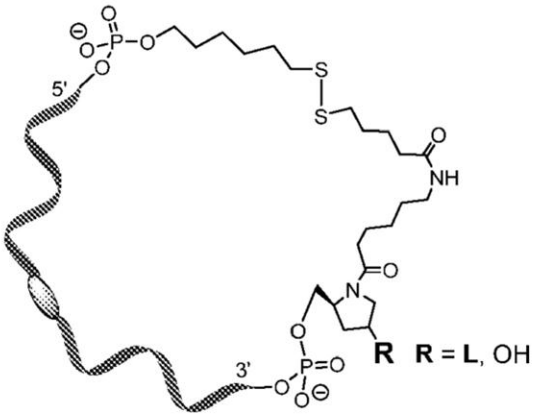


スキーム２Ｂ

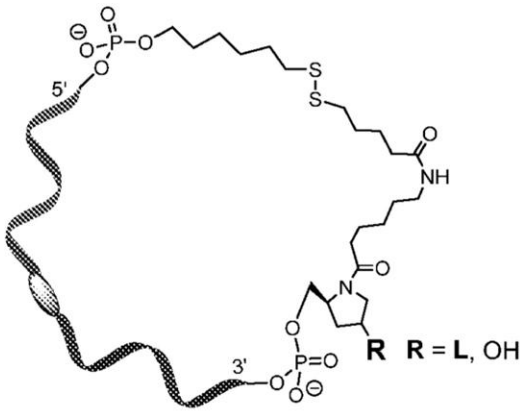


スキーム２Ｃ

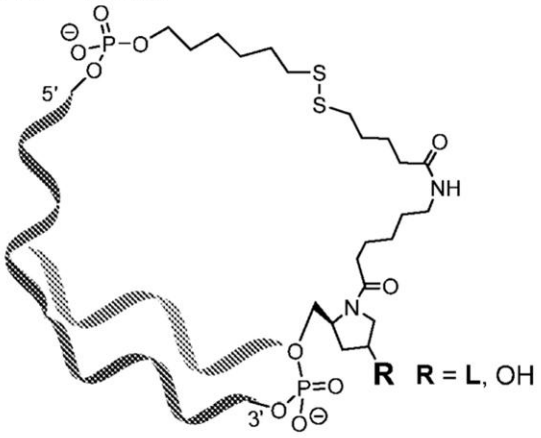
【化４５】



スキーム３Ａ

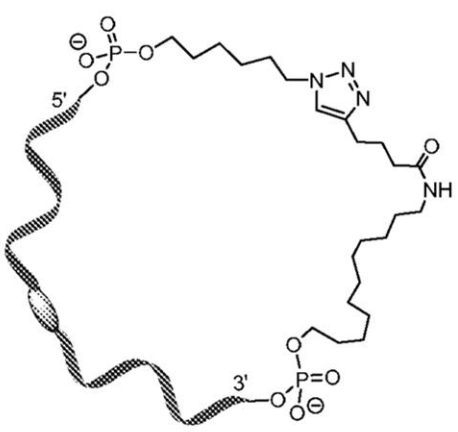


スキーム３Ｂ

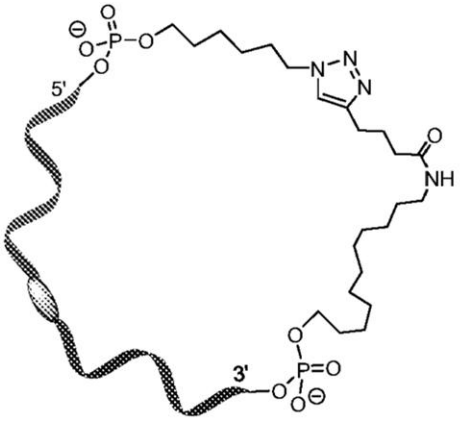


スキーム３Ｃ

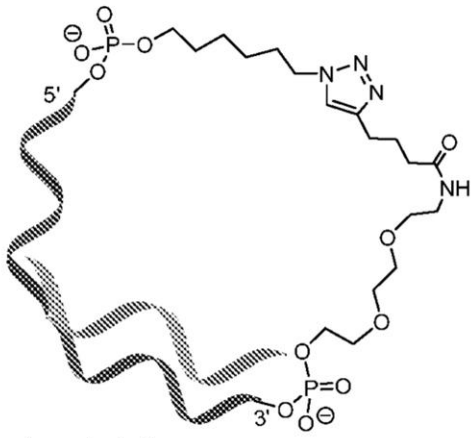
【化４６】



スキーム４Ａ

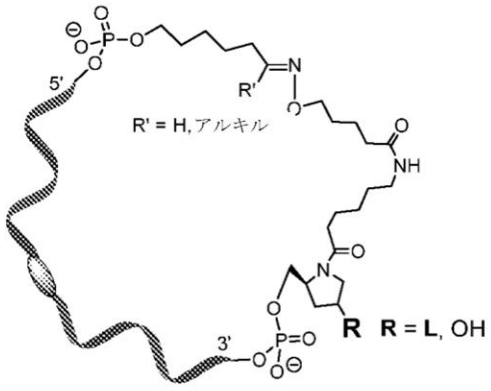


スキーム４Ｂ

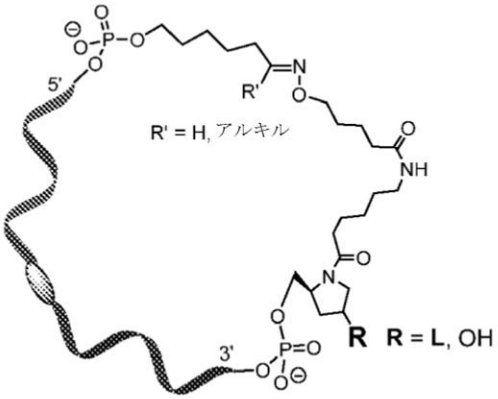


スキーム４Ｃ

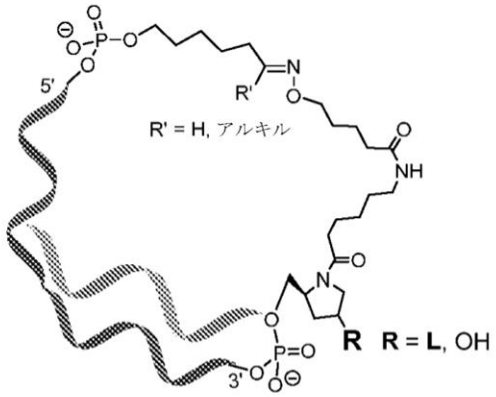
【化４７】



スキーム５Ａ

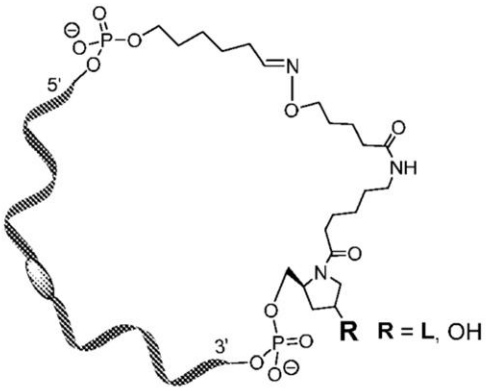


スキーム５Ｂ

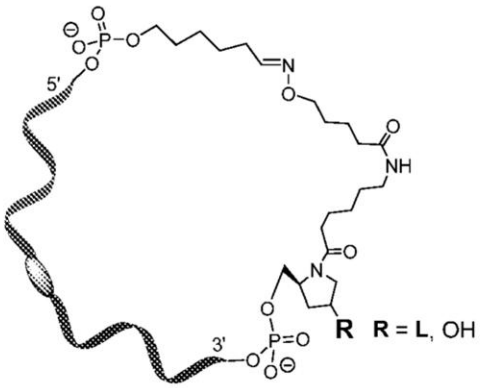


スキーム５Ｃ

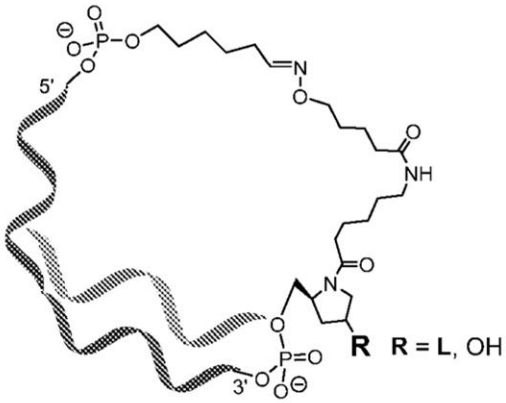
【化４８】



スキーム６Ａ

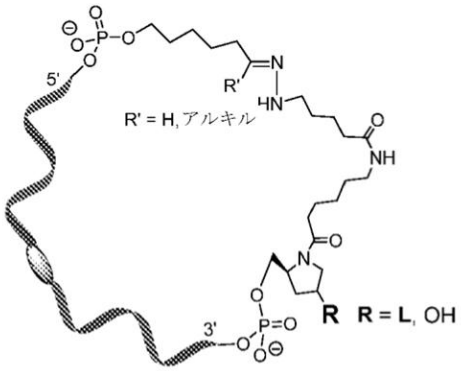


スキーム６Ｂ

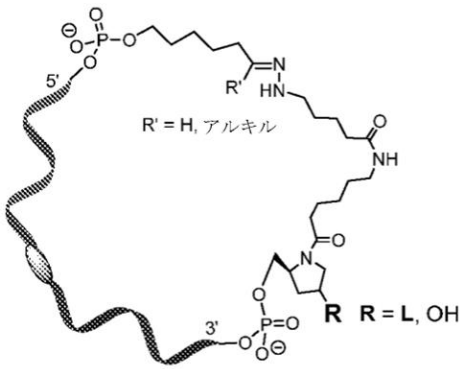


スキーム６Ｃ

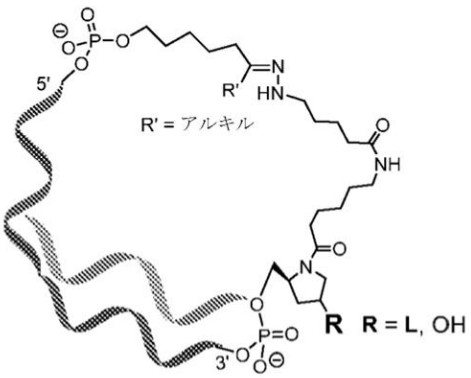
【化４９】



スキーム７Ａ

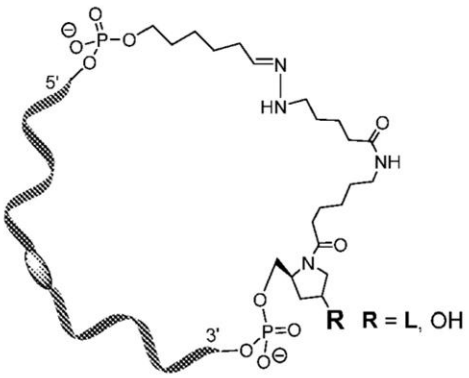


スキーム７Ｂ

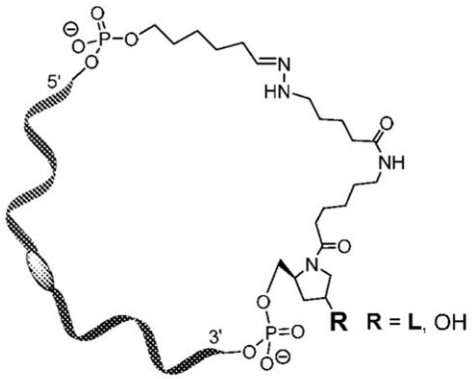


スキーム７Ｃ

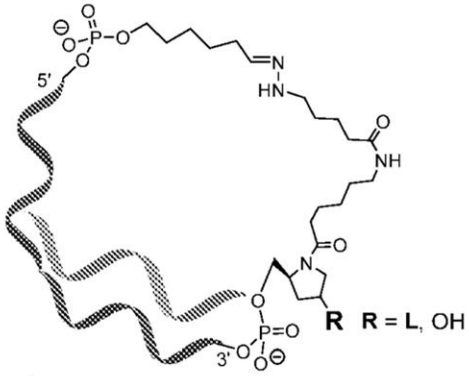
【化５０】



スキーム８Ａ



スキーム８Ｂ



スキーム８Ｃ

【０４３５】

追加の例示的なｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ設計には、実施例１３に示されるｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡが含まれており、この場合、環状または実質的に環状のセンス鎖は、二つの非対称的なセンスヌクレオチド配列（各センスヌクレオチド配列は、２０～２１ヌクレオチドの長さを有する）を含有する。二つのセンスヌクレオチド配列は、ｂｉｓ－結合型（例えば、３ヌクレオチドの長さ）によって接続される。各センスヌクレオチド配列は、より長く、異なるアンチセンスヌクレオチド配列（それぞれ２３ヌクレオチドの長さを有する）にアニーリングされる。環化結合部分Ｚは、リン酸結合、アルキル結合、およびトリアゾール結合のうちの一つ以上の組み合わせを含む。

【０４３６】

スキーム１Ａ～１ＣからスキームＡ～８Ｃ、および実施例１３に示す実施例は、例示のみを目的としている。センス鎖（またはｂｉｓ－センス鎖）のセンスヌクレオチド配列の環化に関して示されている環化反応および環化結合部分は、アンチセンス鎖（またはｂｉｓ－アンチセンス鎖）のアンチセンスヌクレオチド配列の環化にも適用可能である。

【０４３７】

リンカー／テザー

リンカー／テザーは、ｂｉｓ－リンカーの一部としてｂｉｓ－センス鎖またはｂｉｓ－アンチセンス鎖に含有され、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）の二つのセンスヌクレオチド配列（ｂｉｓ－センス鎖を形成する）またはアンチセンスヌクレオチド配列（ｂｉｓ－アンチセンス鎖を形成する）を接続する。

【０４３８】

リンカー／テザーは、ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の環状または実質的に環状のセンス鎖（または環状もしくは実質的に環状のｂｉｓ－センス鎖）の環化結合部分の一部として含有されてもよい。

【０４３９】

リンカー／テザーを使用して、リガンドを、例えば担体を介して、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｒｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）に接続することができる。

【０４４０】

「リンカー」、「結合」、「結合基」、「テザー」という用語は、相互交換可能に使用され得る。

【０４４１】

センス鎖（またはｂｉｓ－センス鎖）またはアンチセンス鎖（またはｂｉｓ－アンチセンス鎖）中のリンカーは、ヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカーであってもよい。リンカーは、生体液（例えば、血漿または人工脳脊髄液）中で安定である、安定的リンカーであってもよい。あるいは、リンカーは、切断可能なリンカー（例えば、生切断性リンカー）であってもよい。

【０４４２】

リンカー／テザーは、「テザリング結合点（ＴＡＰ）」で、リガンドに接続されてもよい。リンカー／テザーは、任意のＣ１－Ｃ１００炭素含有部分（例えば、Ｃ１－Ｃ７５、Ｃ１－Ｃ５０、Ｃ１－Ｃ２０、Ｃ１－Ｃ１０、Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８、Ｃ９、またはＣ１０）を含んでもよく、少なくとも一つの窒素原子を有してもよい。特定の実施形態では、窒素原子は、リンカー／テザー上の末端アミノ基またはアミド基（ＮＨＣ（Ｏ）－）の一部を形成し、これがリガンドの接続点としての役割を果たし得る。リンカー／テザー（下線部分）の非限定的な例としては、ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎＮＨ－；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ２）ｎＮＨ－；ＴＡＰ－ＮＲ’’’’（Ｃ２Ｏ）ｎＮＨ－，ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）－；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ－；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ－；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）－；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）Ｏ－；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ－；またはＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）－が挙げられ、式中、ｎは、１～２０（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０）であり、Ｒ’’’’は、Ｈ、Ｃ１－Ｃ６アルキルである。好ましくは、Ｎは、５、６、または１１である。他の実施形態では、窒素は、末端オキシアミノ基、例えば、－ＯＮＨ２、またはヒドラジノ基、－ＮＨＮＨ２の一部を形成してもよい。リンカー／テザーは、任意選択的に、例えば、ヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキルで置換されてもよく、および／または一つ以上の追加的なヘテロ原子、例えば、Ｎ、ＯまたはＳを挿入されてもよい。好ましいテザー化リガンドとしては、例えば、ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎＮＨ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ２）ｎＮＨ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－ＮＲ’’’’（Ｃ２Ｏ）ｎＮＨ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎＯＮＨ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ２）ｎＯＮＨ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－ＮＲ’’’’（Ｃ２Ｏ）ｎＯＮＨ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎＮＨＮＨ２（ＬＩＧＡＮＤ），ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ２）ｎＮＨＮＨ２（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－ＮＲ’’’’（Ｃ２Ｏ）ｎＮＨＮＨ２（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）Ｏ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－Ｏ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ２）ｎ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ－Ｃ（Ｏ）Ｏ（ＬＩＧＡＮＤ）；ＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ（ＬＩＧＡＮＤ）；またはＴＡＰ－（ＣＨ２）ｎ－ＮＨ－Ｃ（Ｏ）（ＬＩＧＡＮＤ）が挙げられる。一部の実施形態では、アミノ末端リンカー／テザー（例えば、ＮＨ２、ＯＮＨ２、ＮＨ２ＮＨ２）は、リガンドとイミノ結合（すなわち、Ｃ＝Ｎ）を形成し得る。一部の実施形態では、アミノ末端リンカー／テザー（例えば、ＮＨ２、ＯＮＨ２、ＮＨ２ＮＨ２）は、例えば、Ｃ（Ｏ）ＣＦ３でアシル化され得る。

【０４４３】

一部の実施形態では、リンカー／テザーは、メルカプト基（すなわち、ＳＨ）またはオレフィン（例えば、ＣＨ＝ＣＨ$_2$）で終結し得る。例えば、テザーは、ＴＡＰ－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＳＨ、ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$ＳＨ、ＴＡＰ－（ＣＨ$_2$）$_n$－（ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、またはＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$（ＣＨ＝ＣＨ$_2$）であってもよく、式中、ｎは、別段に記載される通りであり得る。テザーは、例えば、ヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキルで任意選択的に置換されていてもよく、および／または任意選択的に一つ以上の追加的なヘテロ原子、例えば、Ｎ、Ｏ、またはＳが挿入されてもよい。二重結合は、シスまたはトランスまたはＥまたはＺであり得る。

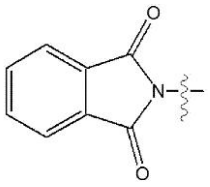
【０４４４】

他の実施形態では、リンカー／テザーは、好ましくはリンカー／テザーの末端位置で、求電子性部分を含んでもよい。例示的な求電子性部分としては、例えば、アルデヒド、ハロゲン化アルキル、メシレート、トシレート、ノシレート、もしくはブロシレート、または活性化カルボン酸エステル、例えば、ＮＨＳエステル、もしくはペンタフルオロフェニルエステルが挙げられる。好ましいリンカー／テザー（下線部分）としては、ＴＡＰ－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨＯ；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨＯ；もしくはＴＡＰ－ＮＲ’’’’（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨＯが挙げられ、式中、ｎは、１～６であり、Ｒ’’’’は$_1$、－Ｃ$_6$アルキルであり；またはＴＡＰ－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（Ｏ）ＯＮＨＳ；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（Ｏ）ＯＮＨＳ；もしくはＴＡＰ－ＮＲ’’’’ $_2$Ｏ$_h$Ｃ（Ｏ）ＯＮＨＳが挙げられ、式中、ｎは、１～６であり、Ｒ’’’’は$_1$、－Ｃ$_6$アルキルであり；ＴＡＰ－（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（Ｏ）ＯＣ$_6$Ｆ$_5$；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$Ｃ（Ｏ）ＯＣ$_6$Ｆ$_5$；もしくはＴＡＰ－ＮＲ’’’’ $_2$Ｏ$_h$Ｃ（Ｏ）ＯＣ$_6$Ｆ$_5$が挙げられ、式中、ｎは、１～１１であり、Ｒ’’’’は$_1$、－Ｃ$_6$アルキルであり；または－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ$_2$ＬＧ；ＴＡＰ－Ｃ（Ｏ）（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ$_2$ＬＧ；もしくはＴＡＰ－ＮＲ’’’’ $_2$Ｏ$_h$ＣＨ$_2$ＬＧが挙げられ、式中、ｎは、別段に記載される通りであり得、Ｒ’’’’は$_1$、－Ｃ$_6$アルキルである（ＬＧは、脱離基、例えば、ハロゲン化物、メシル酸塩、トシル酸塩、ノシル酸塩（ｎｏｓｙｌａｔｅ）、ブロシル酸塩（ｂｒｏｓｙｌａｔｅ）であり得る）。テザリングは、リガンドの求核基、例えばチオール基またはアミノ基をテザー上の求電子基と結合することによって実行することができる。

【０４４５】

他の実施形態では、単量体がリンカー／テザーの末端位置でフタルイミド基（Ｋ）を含むことが望ましいことがあり得る。

【化５１】



Ｋ

【０４４６】

他の実施形態では、他の保護されたアミノ基は、リンカー／テザーの末端位置であってもよく、例えば、アロック基、モノメトキシトリチル（ＭＭＴ）、トリフルオロアセチル、Ｆｍｏｃ、またはアリールスルホニルであってもよい（例えば、アリール部分は、オルト－ニトロフェニルまたはオルト、パラ－ジニトロフェニルであってもよい）。

【０４４７】

本明細書に記載されるリンカー／テザーのいずれかは、一つ以上の追加的な結合基、例えば、－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_n$－、－（ＣＨ$_2$）$_n$－ＳＳ－、－（ＣＨ$_2$）$_n$－、または－（ＣＨ＝ＣＨ）－をさらに含んでもよい。

【０４４８】

切断可能なリンカー／テザー

一部の実施形態では、リンカー／テザーのうちの少なくとも一つは、酸化還元切断可能

なリンカー、酸切断可能なリンカー、エステラーゼ切断可能なリンカー、ホスファターゼ切断可能なリンカー、またはペプチダーゼ切断可能なリンカーであってもよい。

【０４４９】

一つの実施形態では、リンカー／テザーのうちの少なくとも一つは、還元的に切断可能なリンカー（例えば、ジスルフィド基）であってもよい。

【０４５０】

一つの実施形態では、リンカー／テザーのうちの少なくとも一つは、酸切断可能なリンカー（例えば、ヒドラゾン基、エステル基、アセタール基、またはケタール基）であってもよい。

【０４５１】

一つの実施形態では、リンカー／テザーのうちの少なくとも一つは、エステラーゼ切断可能なリンカー（例えば、エステル基）であってもよい。

【０４５２】

一つの実施形態では、リンカー／テザーのうちの少なくとも一つは、ホスファターゼ切断可能なリンカー（例えば、リン酸基）であってもよい。

【０４５３】

一つの実施形態では、リンカー／テザーのうちの少なくとも一つは、ペプチダーゼ切断可能なリンカー（例えば、ペプチド結合）であってもよい。

【０４５４】

切断可能な結合基は、切断剤、例えば、ｐＨ、酸化還元電位、または分解性分子の存在、の影響を受け易い。概して切断剤は、血清または血液中においてよりも、細胞の内部で、より広範に広がっているかまたはより高いレベルもしくは活性で見られる。そのような分解剤の例としては、特定の基質に対して選択される、または基質特異性を有さない酸化還元剤、例えば還元によって酸化還元切断可能な結合基を分解することができる、細胞中に存在する、例えば、メルカプタンなどの酸化酵素または還元酵素または還元剤；エステラーゼ；エンドソーム、または酸性環境を作出できる剤、例えば、５以下のｐＨをもたらす剤；一般的な酸、ペプチダーゼ（基質特異的であってもよい）およびホスファターゼとして作用することによって酸切断可能な結合基を加水分解もしくは分解できる酵素が挙げられる。

【０４５５】

切断可能な連結基、例えばジスルフィド結合などは、ｐＨの影響を受け易い場合がある。ヒト血清のｐＨは７．４であるが、平均細胞内ｐＨはわずかに低く、約７．１～７．３の範囲である。エンドソームは、５．５～６．０の範囲のより酸性のｐＨであり、またリソソームは、およそ５．０のさらにより酸性のｐＨである。一部のテザーは、好ましいｐＨで切断される結合基を有し、それによって、リガンド（例えば、コレステロールなどの標的化リガンドまたは細胞透過性リガンド）から細胞内に、または細胞の所望の区画内に、ｉＲＮＡ剤を放出する。

【０４５６】

リガンドをｉＲＮＡ剤に結合する化学接合部（例えば、結合基）は、ジスルフィド結合を含んでもよい。ｉＲＮＡ剤／リガンド複合体がエンドサイトーシスによって細胞の中へと取り込まれると、エンドソームの酸性環境によってジスルフィド結合が切断され、リガンドからｉＲＮＡ剤が放出される（Ｑｕｉｎｔａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．１９：１３１０－１３１６、２００２、Ｐａｔｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．６：４６６－４７１、２００２）。リガンドは、ｉＲＮＡ剤の治療効果を補完し得る標的化リガンドまたは第二の治療剤であってもよい。

【０４５７】

テザーは、特定の酵素によって切断可能である結合基を含んでもよい。テザーに組み込まれる結合基のタイプは、ｉＲＮＡ剤によって標的化される細胞に依存し得る。例えば、肝細胞内のｍＲＮＡを標的とするｉＲＮＡ剤は、エステル基を含むテザーにコンジュゲートされてもよい。肝細胞は、エステラーゼが豊富であり、肝細胞内において、テザーは、

エステラーゼが豊富ではない細胞型よりも効率的に切断される。テザーが切断されると、テザーの遠位端に結合されたリガンドからｉＲＮＡ剤が放出され、それによってｉＲＮＡ剤のサイレンシング活性が潜在的に強化される。エステラーゼが豊富な他の細胞型としては、肺、腎皮質および精巣の細胞が挙げられる。

【０４５８】

ペプチド結合を含有するテザーを、例えば肝細胞や滑膜細胞などのペプチダーゼが豊富な細胞型を標的とするｉＲＮＡ剤にコンジュゲートしてもよい。例えば、炎症性疾患（例えば、関節リウマチ）の治療を目的として、滑膜細胞を標的とするｉＲＮＡ剤を、ペプチド結合を含有するテザーにコンジュゲートしてもよい。

【０４５９】

概して、候補の切断可能な結合基の適合性は、分解剤が候補結合基を切断する能力（または条件）を試験することによって評価可能である。また、血液中での、または他の非標的組織、例えば、対象に投与されたときにｉＲＮＡ剤が曝されることになる組織と接触する場合の切断抵抗能について候補の切断可能な結合基を試験することも望ましい。したがって、第一および第二の条件の間で、切断に対する相対的な感受性を決定してもよく、この場合において第一の条件は、標的細胞において切断を示すように選択され、第二の条件は、他の組織または生体液中で、例えば、血液や血清中で、切断を示すように選択される。評価は、無細胞系において、細胞において、細胞培養液において、臓器または組織の培養液において、または動物全身において、実施され得る。無細胞条件または培養条件において最初の評価を行うこと、および動物全身において更に評価することによって確認することが、有用であり得る。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）と比較して、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）、少なくとも約２、４、１０、または１００倍速く切断される。

【０４６０】

切断可能なリンカーは、様々な組織および細胞構造、例えば、肝臓ホモジネート、肝臓トリトソーム、肝臓リソソーム、肝臓サイトゾル、脳ホモジネート、脳トリトソーム、脳リソソーム、または脳サイトゾルにおいて切断可能であってもよい。

【０４６１】

酸化還元切断可能な結合基

切断可能な結合基の一種は、還元または酸化で切断される酸化還元切断性の結合基である。還元的に切断可能な結合基の例は、ジスルフィド結合基（－Ｓ－Ｓ－）である。候補の切断可能な結合基が、適した「還元的に切断可能な結合基」であるか、または例えば、特定のｉＲＮＡ部分および特定のターゲティング剤とともに使用するのに適しているか否かを決定するために、本明細書において記載する方法に目を向けることができる。例えば、細胞中であって、例えば、標的細胞中で観察されるであろう切断の速度を模倣する、当技術分野で公知の試薬を使用してジチオスレイトール（ＤＴＴ）又は他の還元剤とともにインキュベートすることによって、候補を評価することができる。候補はまた、血液または血清条件を模倣するように選択された条件下で評価することもできる。好ましい実施形態では、候補化合物は、血液中で最大で１０％切断される。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）と比較して、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）、少なくとも約２、４、１０、または１００倍速く分解される。候補化合物の切断の速度は、細胞内媒体を模倣するように選択された条件下での標準酵素動態アッセイを用いて決定され、細胞外媒体を模倣するように選択された条件と比較され得る。

【０４６２】

リン酸系で切断可能な結合基

リン酸系の結合基は、リン酸基を分解または加水分解する剤により切断される。細胞中でリン酸基を切断する剤の例としては、細胞中のホスファターゼなどの酵素がある。リン酸系結合基の例は、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｏ－

、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＲｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（ＯＲｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｒｋ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｒｋ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｒｋ）－Ｓ－である。好ましい実施形態は、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＳＨ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（ＯＨ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｏ－、－Ｓ－Ｐ（Ｏ）（Ｈ）－Ｓ－、－Ｏ－Ｐ（Ｓ）（Ｈ）－Ｓ－である。好ましい実施形態は、－Ｏ－Ｐ（Ｏ）（ＯＨ）－Ｏ－である。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

【０４６３】

酸で切断可能な結合基

酸切断可能な結合基は、酸性条件下で切断される結合基である。好ましい実施形態では、酸切断可能な結合基は、ｐＨが約６．５以下である酸性環境（例えば、約６．０、５．５、５．０以下）において、または一般的な酸として作用できる酵素などの剤によって、切断される。細胞においては、特定の低ｐＨオルガネラ、例えばエンドソームおよびリソソームは、酸切断可能な結合基のための切断環境をもたらすことができる。酸切断可能な結合基の例としては、ヒドラゾン、ケタール、アセタール、エステル、およびアミノ酸のエステルが挙げられるが、これらに限定されない。酸切断可能な基は、一般式－Ｃ＝ＮＮ－、Ｃ（Ｏ）Ｏ、または－ＯＣ（Ｏ）を有し得る。好ましい実施形態では、エステル（アルコキシ基）の酸素に結合する炭素は、アリール基、置換アルキル基または第三級アルキル基、例えばジメチルペンチルもしくはｔ－ブチルである。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

【０４６４】

エステル系の結合基

エステル系の結合基は、細胞内でエステラーゼやアミダーゼなどの酵素によって切断される。エステル系の切断可能な結合基の例としては、これに限定されないが、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基のエステルが挙げられる。エステルの切断可能な結合基は、一般式－Ｃ（Ｏ）Ｏ－または－ＯＣ（Ｏ）－を有する。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

【０４６５】

ペプチド系切断基

ペプチド系の結合基は、細胞内で例えばペプチダーゼやプロテアーゼなどの酵素によって切断される。ペプチド系の切断可能な結合基は、アミノ酸の間で形成されるペプチド結合であり、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）およびポリペプチドを創出する。ペプチド系の切断可能な基は、アミド基（－Ｃ（Ｏ）ＮＨ－）を含まない。アミド基は、任意のアルキレン、アルケニレンまたはアルキネレンの間で形成され得る。ペプチド結合は、アミノ酸の間で形成されるアミド結合の特殊なタイプであり、ペプチドおよびタンパク質を創出する。ペプチド系の切断基は、概して、アミノ酸の間で形成されてペプチド及びタンパク質が得られるペプチド結合（すなわち、アミド結合）に限定され、全てのアミド官能基を含むものではない。ペプチドの切断可能な結合基は、一般式－ＮＨＣＨＲ^{1}Ｃ（Ｏ）ＮＨＣＨＲ^{2}Ｃ（Ｏ）－を有するものであり、式中、Ｒ^{1}およびＲ^{2}は、二つの隣接するアミノ酸のＲ基である。これら候補は、上述のものと類似した方法を使用して評価することができる。

【０４６６】

生切断性（ｂｉｏｃｌｅａｖａｂｌｅ）リンカー／テザー

リンカーは、分子の二つの部分を接続するヌクレオチドリンカーおよび非ヌクレオチドリンカー、またはその組み合わせである生切断性リンカーも含み得る。例えば、生切断性

リンカーは、二つの個々のｓｉＲＮＡ分子の一方の鎖または両方の鎖を接続して、ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）を生成してもよい。一部の実施形態では、二つの個々のｓｉＲＮＡ間の単なる静電相互作用またはスタッキング相互作用でも、リンカーを表すことができる。

【０４６７】

非ヌクレオチドリンカーとしては、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、およびそれらの誘導体、脂肪族、脂環式、複素環式、ならびにそれらの組み合わせに由来するテザーまたはリンカーが挙げられる。

【０４６８】

一部の実施形態では、リンカー（テザー）の少なくとも一つは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ジスルフィド、アミド、およびガラクトサミン、グルコサミン、グルコース、ガラクトース、およびマンノースの官能化された単糖またはオリゴ糖、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される生切断性リンカーである。

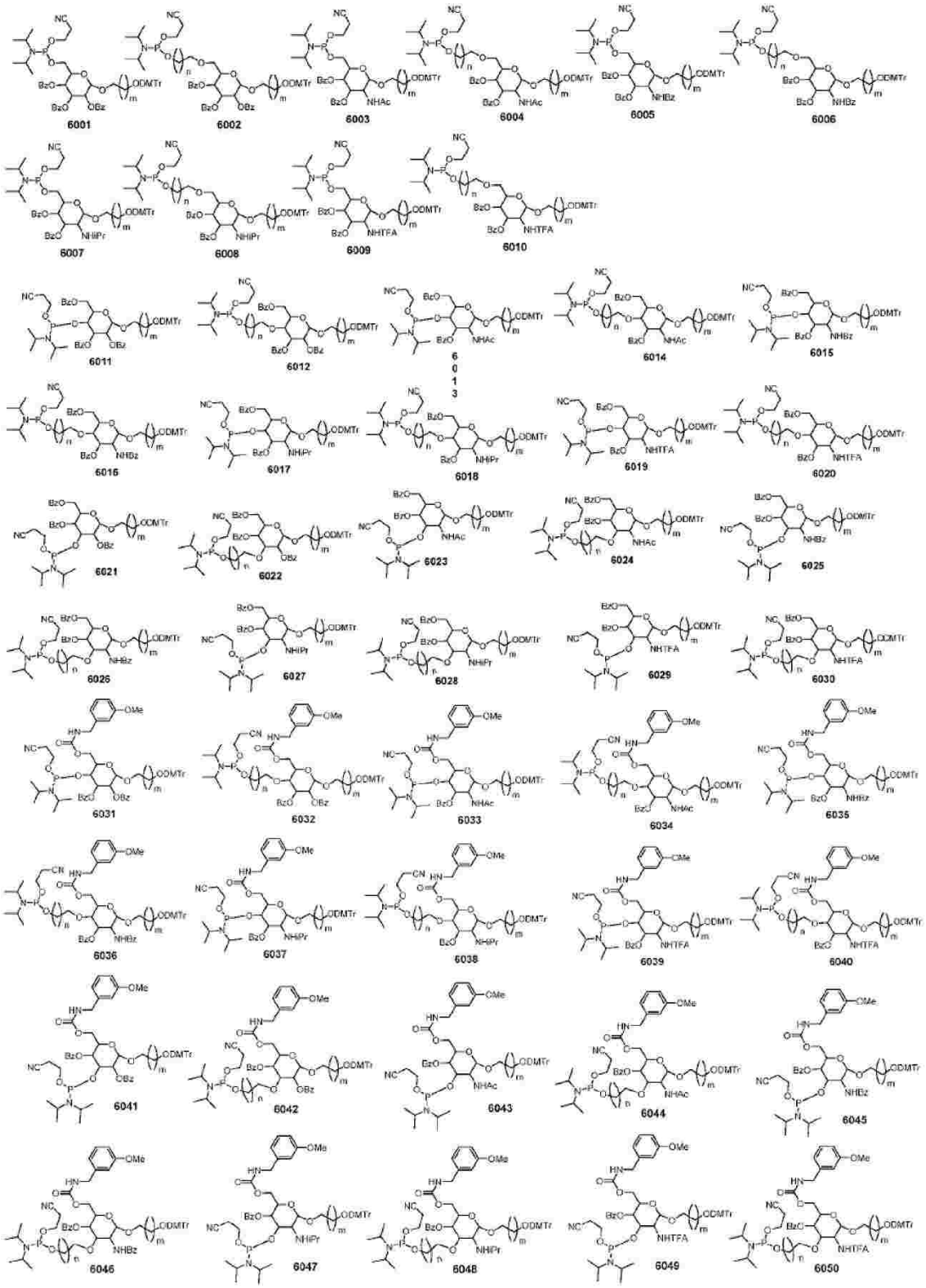
【０４６９】

一つの実施形態では、生切断性炭水化物リンカーは、１～１０個の糖単位を有してもよく、当該単位は、二つのｓｉＲＮＡ単位を接続することができるアノマー結合を少なくとも一つ有する。二つ以上の糖類が存在する場合、これらの単位は、１～３個、１～４個、もしくは１～６個の糖結合を介して、またはアルキル鎖を介して、結合され得る。

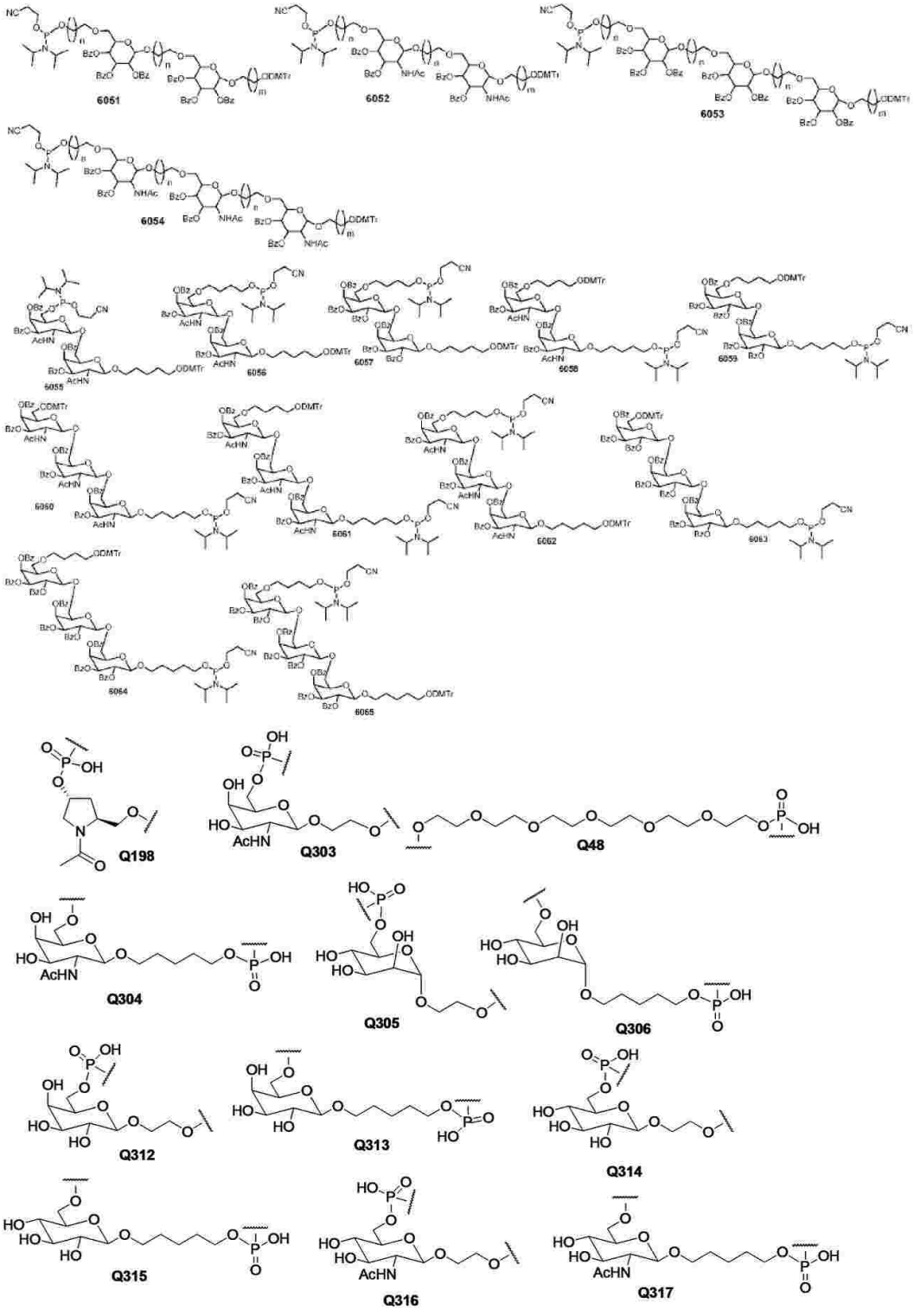
【０４７０】

例示的な生切断性リンカーとしては、限定されないが、以下のエンドソーム切断可能なリンカーならびにホスホロアミダイトが挙げられる：

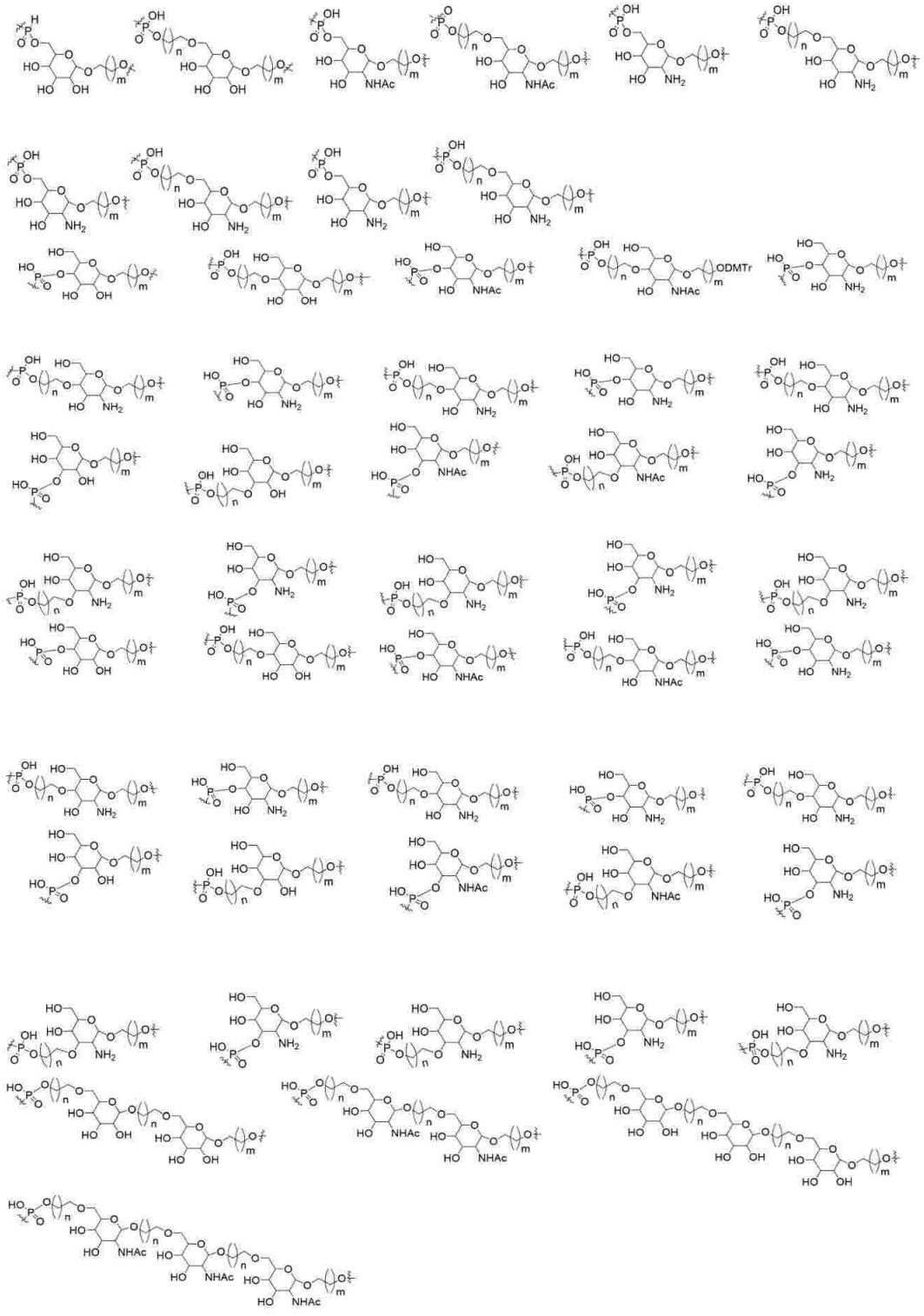
【化５２】


6001
6002
6003
6004
6005
6006
6007
6008
6009
6010
6011
6012
6013
6014
6015
6016
6017
6018
6019
6020
6021
6022
6023
6024
6025
6026
6027
6028
6029
6030
6031
6032
6033
6034
6035
6036
6037
6038
6039
6040
6041
6042
6043
6044
6045
6046
6047
6048
6049
6050

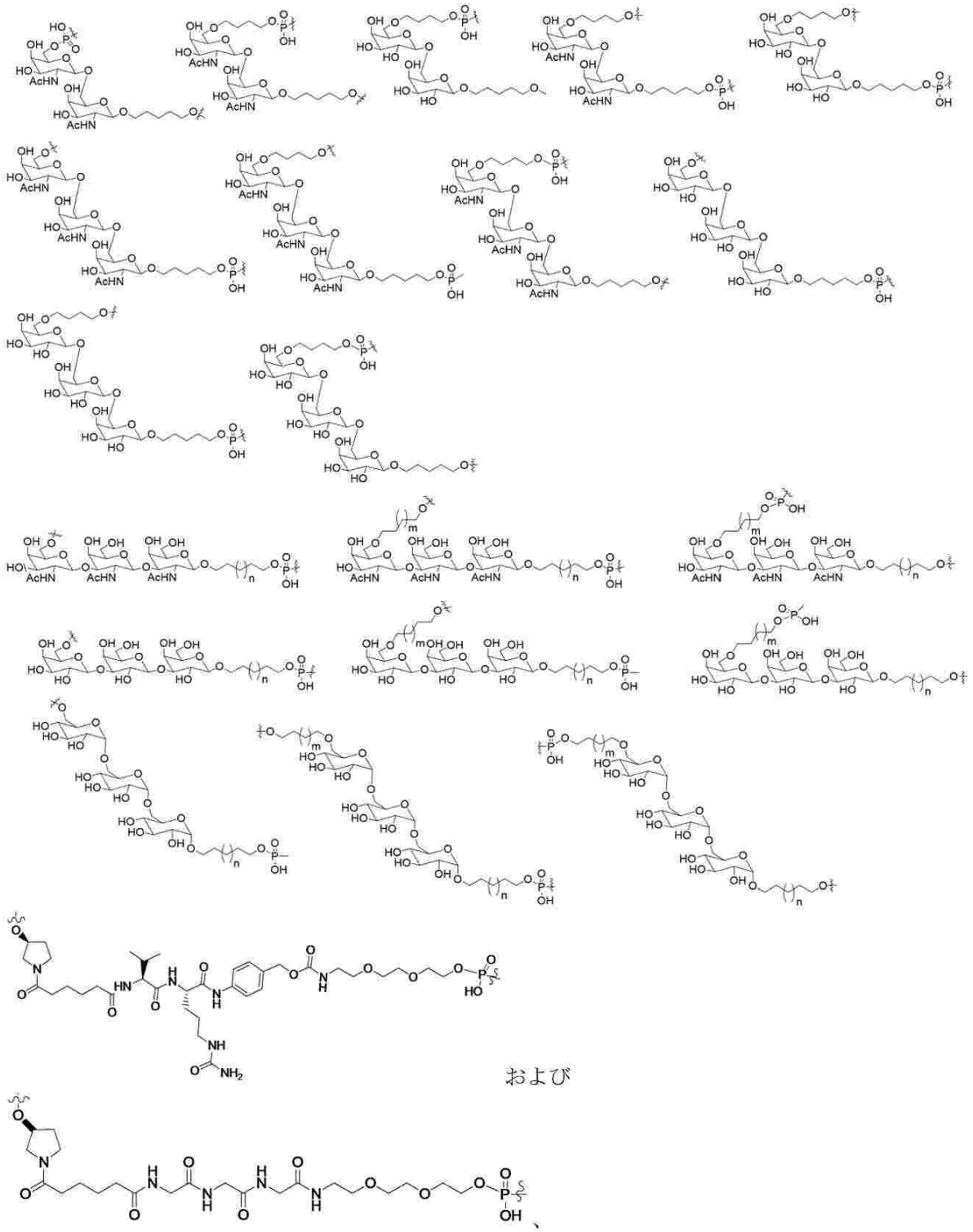
【化５３】


6051
6052
6053
6054
6055
6056
6057
6058
6059
6060
6061
6062
6063
6064
6065
Q198
Q303
Q48
Q304
Q305
Q306
Q312
Q313
Q314
Q315
Q316
Q317

【化５４】



【化５５】



および

、

式中、ｎ＝１～１２およびｍ＝１～１２である。

【０４７１】

生切断性リンカーに関するさらなる検討は、ＷＯ２０１８１３６６２０に見出され得る。当該内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４７２】

担体

特定の実施形態では、環状または実質的に環状のセンス（またはアンチセンス）鎖の環化結合部分は、一つ以上の担体を含有し、当該担体は、一つ以上のリガンドを担持し、リガンドをｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）にコンジュゲートする機能を果た

す。

【０４７３】

特定の実施形態では、一つ以上のリガンドは、環化結合部分の一部としてではなく、担体を介して、ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）にコンジュゲートされ得る。

【０４７４】

特定の実施形態では、一つ以上のリガンドは、担体を介してエフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ化合物）にコンジュゲートされ得る。

【０４７５】

一部の実施形態では、担体は、一つ以上のヌクレオチドを置換し得る。

【０４７６】

担体は、環状基または非環状基であってもよい。一つの実施形態では、環状基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、［１，３］ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフリル、およびデカリニルからなる群から選択される。一つの実施形態では、非環状基は、セリノール骨格またはジエタノールアミン骨格に基づく部分である。

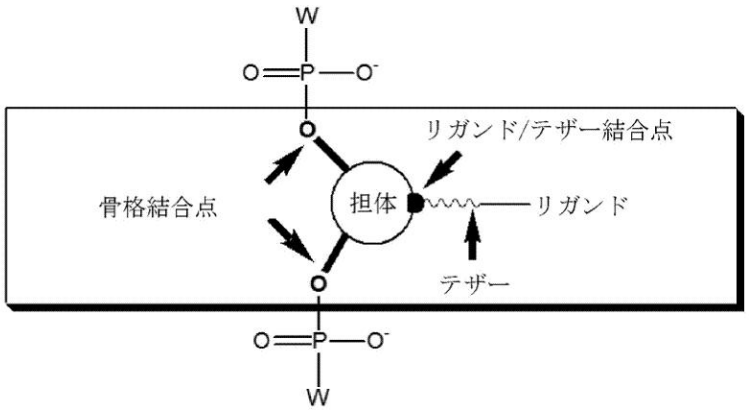
【０４７７】

一部の実施形態では、担体は、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の内部の位置において、一つ以上のヌクレオチドを置換する。

【０４７８】

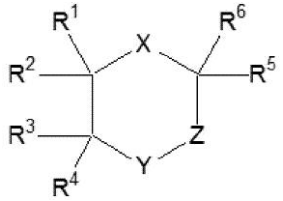
リボヌクレオチドのサブユニットは、サブユニットのリボース糖がそのように置換されており、本明細書において、リボース置換修飾サブユニット（ＲＲＭＳ）と称される。担体は、環状部分または非環状部分であってもよく、二つの「骨格結合点」（例えば、ヒドロキシル基）およびリガンドを含んでもよい。リガンドは、上述のように、担体に直接的に結合されてもよく、または介在するリンカー／テザーによって担体に間接的に結合されてもよい。

【化５６】



【０４７９】

リガンド－コンジュゲート単量体サブユニットは、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ分子の５’末端サブユニットまたは３’末端サブユニットであってもよい。すなわち、二つの「Ｗ」基のうちの一方はヒドロキシル基であってもよく、他方の「Ｗ」基は、二つ以上の非修飾リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチドの鎖であってもよい。あるいは、リガンド－コンジュゲート単量体サブユニットは、内部位置を占めてもよく、両方の「Ｗ」基は、一つ以上の非修飾リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチドであってもよい。ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤に、二つ以上のリガンド－コンジュゲート単量体サブユニットが存在してもよい。

【０４８０】
糖置換系の単量体、例えば、リガンド－コンジュゲート単量体（環状）
環状糖置換系の単量体、例えば、糖置換系のリガンド－コンジュゲート単量体は、本明細書では、ＲＲＭＳ単量体化合物とも呼ばれる。担体は、以下に提供される一般式（ＬＣＭ－２）を有してもよい（当該構造において、好ましい骨格結合点は、R^1もしくはR^2；R^3もしくはR^4；またはＹがCR^9R^{10}である場合、R^9およびR^{10}から選択され得る（二つの位置は、二つの骨格結合点、例えば、R^1およびR^4、またはR^4およびR^9）が得られるように選択される）。好ましいテザリング結合点としては、R^7；ＸがCH_2である場合、R^5またはR^6が挙げられる。担体は、全体として以下に記載され、鎖に組み込まれ得る。したがって、当該構造は、結合点のうちの一つ（末端の位置の場合）または二つ（内部一の場合）、例えばR^1もしくはR^2；R^3もしくはR^4；またはR^9もしくはR^{10}（Ｙが、CR^9R^{10}である場合）が、リン酸または修飾リン酸、例えば硫黄含有骨格に結合される場合も包含することが理解される。例えば、上述のＲ基のうちの一つは、－CH_2－であってもよく、この場合において一つの結合は、担体に結合され、一つは、骨格原子、例えば、結合酸素または中央リン原子に結合される。
【化５７】


（ＬＣＭ－２）
式中、
Ｘは、Ｎ（ＣＯ）R^7、NR^7、またはCH_2であり；
Ｙは、NR^8、Ｏ、Ｓ、CR^9R^{10}であり；
Ｚは、$CR^{11}R^{12}$であるか、または存在せず；
R^1、R^2、R^3、R^4、R^9、およびR^{10}の各々は独立して、Ｈ、OR^a、または（CH_2）$_n$$OR^b$であるが、ただし、$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^9$、および$R^{10}$のうちの少なくとも二つは、$OR^a$および／または（$CH_2$）$_n$$OR^b$であり；
R^5、R^6、R^{11}、およびR^{12}の各々は独立して、リガンド、Ｈ、１～３個のR^{13}で任意選択的に置換されるC_1－C_6アルキル、またはＣ（Ｏ）ＮＨR^7であり；またはR^5およびR^{11}が一緒に、R^{14}で任意選択的に置換されるC_3－C_8シクロアルキルであり；
R^7は、リガンドであってもよく、例えば、R^7は、R^dであってもよく、またはR^7は、例えば、NR^c　R^dで置換されるC_1－C_{20}アルキル；またはＮＨＣ（Ｏ）R^dで置換されるC_1－C_{20}アルキルなど、テザリング部分を通して担体に間接的に係留されるリガンドであってもよく；
R^8は、ＨまたはC_1－C_6アルキルであり；
R^{13}は、ヒドロキシ、C_1－C_4アルコキシ、またはハロであり；
R^{14}は、NR^cR^7であり；
R^{15}は、任意選択的にシアノで置換されるC_1－C_6アルキル、またはC_2－C_6アルケニルであり；
R^{16}は、C_1－C_{10}アルキルであり；
R^{17}は、液体または固相の支持試薬であり；
Ｌは、－Ｃ（Ｏ）（CH_2）$_q$Ｃ（Ｏ）－、または－Ｃ（Ｏ）（CH_2）$_q$Ｓ－であり；
R^aは、保護基、例えば、CAr_3（例えば、ジメトキシトリチル基）またはＳｉ（X^5’）（X^5”）（X^5’’’）であり、式中、（X^5’）、（X^5”）、および（X^5’’’）は、別段に記載されるとおりである。

R^bは、P（O）（O^-）H、P（OR^{15}）N（R^{16}）$_2$、または$L-R^{17}$であり；
R^cは、HまたはC_1-C_6アルキルであり；
R^dは、Hまたはリガンドであり；
各Arは独立して、C_1-C_4アルコキシで任意選択的に置換されるC_6-C_{10}アリールであり；
nは、1～4であり、qは0～4である。

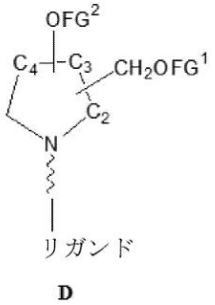
【0481】

例示的な担体としては、例えば、XがN（CO）R^7もしくはNR^7であり、YがCR^9R^{10}であり、およびZが存在しないもの；またはXがN（CO）R^7もしくはNR^7であり、YがCR^9R^{10}であり、およびZが$CR^{11}R^{12}$であるもの；またはXがN（CO）R^7もしくはNR^7であり、YがNR^8であり、およびZが$CR^{11}R^{12}$であるもの；またはXがN（CO）R^7もしくはNR^7であり、YがOであり、およびZが$CR^{11}R^{12}$であるもの；またはXがCH_2であり、YがCR^9R^{10}であり、Zが$CR^{11}R^{12}$であり、およびR^5およびR^{11}が一緒にC_6シクロアルキル（H、z＝2）を形成するもの、またはインダン環系、例えば、XがCH_2、YがCR^9R^{10}、Zが$CR^{11}R^{12}$であり、R^5およびR^{11}がいっしょにC_5シクロアルキル（H、z＝1）を形成するものが挙げられる。

【0482】

特定の実施形態では、担体は、ピロリン環系または4－ヒドロキシプロリン環系に基づいてもよく、例えば、Xは、N（CO）R^7またはNR^7であり、Yは、CR^9R^{10}であり、Zは存在しない（D）。

【化58】

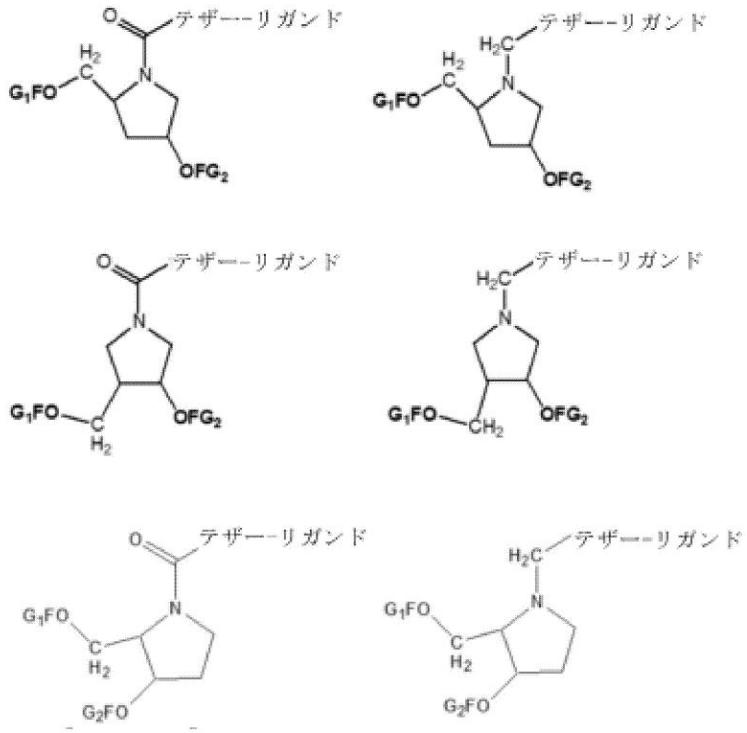


D

OFG^1は、好ましくは、五員環中の炭素のうちの一つに接続された、一級炭素、例えば、環外アルキレン基、例えば、メチレン基に結合される（Dの$-CH_2OFG^1$）。OFG^2は、好ましくは、五員環中の炭素のうちの一つに直接結合される（Dの$-OFG^2$）。ピロリン系担体については、$-CH_2OFG^1$は、C－2に結合され、OFG^2は、C－3に結合されてもよく；または$-CH_2OFG^1$は、C－3に結合され、OFG^2は、C－4に結合されてもよい。特定の実施形態では、CH_2OFG^1およびOFG^2は、上述の炭素のうちの一つにジェミナルに置換されてもよい。3－ヒドロキシプロリン系担体については、$-CH_2OFG^1$は、C－2に結合されてもよく、OFG^2は、C－4に結合されてもよい。したがって、ピロリン系単量体および4－ヒドロキシプロリン系単量体は、結合（例えば、炭素－炭素結合）を含有してもよく、この場合において結合回転は、その特定の結合に制限され、例えば、環の存在からもたらされる制限について制限される。したがって、CH_2OFG^1およびOFG^2は、上述のペア形成のいずれにおいても互いにシスまたはトランスであってもよい。したがって、全てのシス／トランスの異性体が明示的に含まれる。単量体は、一つ以上の不斉中心を含有してもよく、したがって、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一エナンチオマー、個々のジアステレオマー、およびジアステレオマー混合物としてあってもよい。単量体のこうした異性体型はすべて明示的に含まれる（例えば、CH_2OFG^1やOFG^2を担持する中心は両方ともR立体配置を有することができ；または両方ともS立体配置を有することができ；または一方の中心はR

立体配置を有し、他方の中心はＳ立体配置を有することができる。逆もまた然りである）。テザリング結合点は、窒素であることが好ましい。担体Ｄの好ましい例としては、以下が挙げられる。

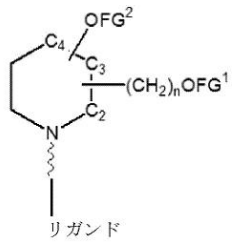
【化５９】



【０４８３】

特定の実施形態では、担体は、ピペリジン環系（Ｅ）に基づいてもよい。例えば、Ｘは、Ｎ（ＣＯ）Ｒ^{7}またはＮＲ^{7}であり、Ｙは、ＣＲ^{9}Ｒ^{10}であり、Ｚは、ＣＲ^{11}Ｒ^{12}である。

【化６０】



Ｅ

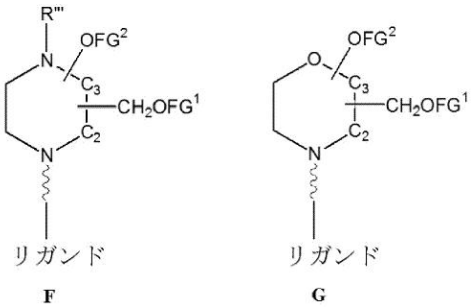
ＯＦＧ^{1}は、好ましくは、六員環の炭素のうちの一つに接続された、一級炭素、例えば、環外アルキレン基、例えば、メチレン基（ｎ＝１）またはエチレン基（ｎ＝２）に結合される［Ｅの－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}］。ＯＦＧ^{2}は、好ましくは、六員環中の炭素のうちの一つに直接結合される（Ｅの－ＯＦＧ^{2}）。－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}およびＯＦＧ^{2}は、環上にジェミナルに配置されてもよい。すなわち、両方の基は、例えば、Ｃ－２、Ｃ－３またはＣ－４などの同じ炭素に結合されてもよい。あるいは、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}およびＯＦＧ^{2}は、環上にビシナルで配置されてもよい。すなわち、両方の基は、隣接する環炭素原子に結合されてもよく、例えば、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－２に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－３に結合されてもよく；－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－３に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－２に結合されてもよく；－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－３に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－４に結合されてもよく；または－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－４に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－３に結合されてもよい。したがって、ピペリジン系単量体は、結合（例えば、炭

素－炭素結合）を含有してもよく、この場合において結合回転は、その特定の結合に制限され、例えば、環の存在からもたらされる制限について制限される。したがって、－（CH_2）$_n$$OFG^1$および$OFG^2$は、上述のペア形成のいずれかにおいて、互いに対してシスまたはトランスであってもよい。したがって、全てのシス／トランス異性体が、明示的に含まれる。単量体は、一つ以上の不斉中心を含有してもよく、したがって、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一エナンチオマー、個々のジアステレオマー、およびジアステレオマー混合物としてあってもよい。単量体のこうした異性体型はすべて明示的に含まれる（例えば、CH_2OFG^1やOFG^2を担持する中心は両方ともR立体配置を有することができ；または両方ともS立体配置を有することができ；または一方の中心はR立体配置を有し、他方の中心はS立体配置を有することができる。逆もまた然りである）。テザリング結合点は、窒素であることが好ましい。

【０４８４】

特定の実施形態では、担体は、ピペラジン環系（Ｆ）に基づいてもよく、例えば、Ｘは、Ｎ（ＣＯ）R^7またはNR^7であり、Ｙは、NR^8であり、そしてＺは、$CR^{11}R^{12}$であり、またはモルホリン環系（Ｇ）に基づいてもよく、例えば、Ｘは、Ｎ（ＣＯ）R^7またはNR^7であり、Ｙは、Ｏであり、そしてＺは、$CR^{11}R^{12}$である。

【化６１】



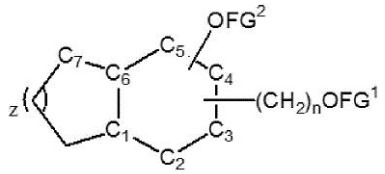
OFG^1は、好ましくは、六員環中の炭素のうちの一つに接続された、一級炭素、例えば、環外アルキレン基、例えば、メチレン基に結合される（ＦまたはＧの－CH_2OFG^1）。OFG^2は、好ましくは、六員環中の炭素のうちの一つに直接結合される（ＦまたはＧの－OFG^2）。ＦおよびＧの両方について、－CH_2OFG^1は、Ｃ－２に結合されてもよく、OFG^2は、Ｃ－３に結合されてもよく、逆もまた然りである。特定の実施形態では、CH_2OFG^1およびOFG^2は、上述の炭素のうちの一つにジェミナルに置換されてもよい。したがって、ピペリジン系単量体およびモルホリン系単量体は、結合（例えば、炭素－炭素結合）を含有してもよく、この場合において結合回転は、その特定の結合に制限され、例えば、環の存在からもたらされる制限について制限される。したがって、CH_2OFG^1およびOFG^2は、上述のペア形成のいずれかにおいて互いに対してシスまたはトランスであってもよい。したがって、全てのシス／トランス異性体が、明示的に含まれる。単量体は、一つ以上の不斉中心を含有してもよく、したがって、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一エナンチオマー、個々のジアステレオマー、およびジアステレオマー混合物としてあってもよい。単量体のこうした異性体型はすべて明示的に含まれる（例えば、CH_2OFG^1やOFG^2を担持する中心は両方ともR立体配置を有することができ；または両方ともS立体配置を有することができ；または一方の中心はR立体配置を有し、他方の中心はS立体配置を有することができる。逆もまた然りである）。テザリング結合点は、ＦおよびＧの両方において、窒素であることが好ましい。

【０４８５】

特定の実施形態では、担体は、デカリン環系に基づいてもよく、例えば、Ｘは、CH_2であり、Ｙは、CR^9R^{10}であり、Ｚは、$CR^{11}R^{12}$であり、そしてR^5とR^{11}は一緒になってC_6シクロアルキルを形成し（Ｈ、ｚ＝２）、またはインダン環系に基づいてもよく、例えば、Ｘは、CH_2であり、Ｙは、CR^9R^{10}であり、Ｚは、$CR^{11}R^{12}$であり、そしてR^5とR^{11}は一緒になってC_5シクロアルキルを形成する（Ｈ、ｚ

＝１）。

【化６２】



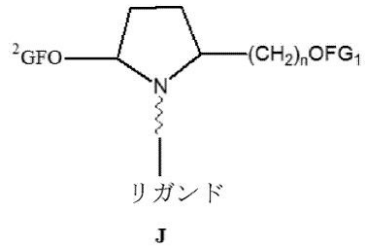
H

ＯＦＧ^{1}は、例えば、Ｃ－２、Ｃ－３、Ｃ－４またはＣ－５のうちの一つに接続された、一級炭素、例えば環外メチレン基（ｎ＝１）またはエチレン基（ｎ＝２）に結合されることが好ましい［Ｈの－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}］。ＯＦＧ^{2}は、Ｃ－２、Ｃ－３、Ｃ－４またはＣ－５のいずれか一つに直接結合されることが好ましい（Ｈの－ＯＦＧ^{2}）。－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}およびＯＦＧ^{2}は、環上にジェミナルに配置されてもよい。すなわち、両方の基は、例えば、Ｃ－２、Ｃ－３、Ｃ－４またはＣ－５などの同じ炭素に結合されてもよい。あるいは、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}およびＯＦＧ^{2}は、環上にビシナルで配置されてもよい。すなわち、両方の基は、隣接する環炭素原子に結合されてもよく、例えば、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－２に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－３に結合されてもよく；－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－３に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－２に結合されてもよく；－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－３に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－４に結合されてもよく；または－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－４に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－３に結合されてもよく；－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－４に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－５に結合されてもよく；または－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}は、Ｃ－５に結合されてもよく、そしてＯＦＧ^{2}は、Ｃ－４に結合されてもよい。したがって、デカリン系単量体またはインダン系単量体は、結合（例えば、炭素－炭素結合）を含有してもよく、この場合において結合回転は、その特定の結合に制限され、例えば、環の存在からもたらされる制限について制限される。したがって、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}およびＯＦＧ^{2}は、上述のペア形成のいずれかにおいて、互いに対してシスまたはトランスであってもよい。したがって、全てのシス／トランス異性体が、明示的に含まれる。単量体は、一つ以上の不斉中心を含有してもよく、したがって、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一エナンチオマー、個々のジアステレオマー、およびジアステレオマー混合物としてあってもよい。単量体のこうした異性体型はすべて明示的に含まれる（例えば、ＣＨ$_{2}$ＯＦＧ^{1}やＯＦＧ^{2}を担持する中心は両方ともＲ立体配置を有することができ；または両方ともＳ立体配置を有することができ；または一方の中心はＲ立体配置を有し、他方の中心はＳ立体配置を有することができる。逆もまた然りである）。好ましい実施形態では、Ｃ－１およびＣ－６の置換基は、互いに対してトランスである。テザリング結合点は、Ｃ－６またはＣ－７であることが好ましい。

【０４８６】

他の担体としては、３－ヒドロキシプロリン（Ｊ）に基づく担体が挙げられる。

【化６３】



J

したがって、－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$ＯＦＧ^{1}およびＯＦＧ^{2}は、互いに対してシスまたはトランスであってもよい。したがって、全てのシス／トランス異性体が、明示的に含まれる。単量体は、一つ以上の不斉中心を含有してもよく、したがって、ラセミ化合物およびラセミ混合物、単一エナンチオマー、個々のジアステレオマー、およびジアステレオマー混合物

としてあってもよい。単量体のこうした異性体型はすべて明示的に含まれる（例えば、CH_2OFG^1やOFG^2を担持する中心は両方ともR立体配置を有することができ；または両方ともS立体配置を有することができ；または一方の中心はR立体配置を有し、他方の中心はS立体配置を有することができる。逆もまた然りである）。テザリング結合点は、窒素であることが好ましい。

【０４８７】

より代表的な環状の糖置換系担体に関する詳細は、米国特許第７，７４５，６０８号および同第８，０１７，７６２号に見出すことができ、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０４８８】

糖置換系単量体（非環状）

非環状糖置換系の単量体、例えば、糖置換系のリガンド－コンジュゲート単量体は、本明細書では、リボース置換単量体サブユニット（ＲＲＭＳ）単量体化合物とも呼ばれる。好ましい非環状担体は、以下の式ＬＣＭ－３または式ＬＣＭ－４を有し得る。

【化６４】

【０４８９】

一部の実施形態では、ｘ、ｙ、およびｚの各々は、互いに独立して、０、１、２、または３であり得る。式ＬＣＭ－３において、ｙとｚが異なる場合、三級炭素は、ＲまたはＳのいずれかの立体配置を有し得る。好ましい実施形態では、ｘは、ゼロであり、ｙおよびｚはそれぞれ式ＬＣＭ－３において１であり（例えば、セリノールに基づく）、ｙおよびｚはそれぞれ式ＬＣＭ－３において１である。以下の式ＬＣＭ－３またはＬＣＭ－４はそれぞれ、任意選択的に例えば、ヒドロキシ、アルコキシ、ペルハロアルキルで置換され得る。

【０４９０】

より代表的な非環状の糖置換系担体に関する詳細は、米国特許第７，７４５，６０８号および同第８，０１７，７６２号に見出すことができ、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

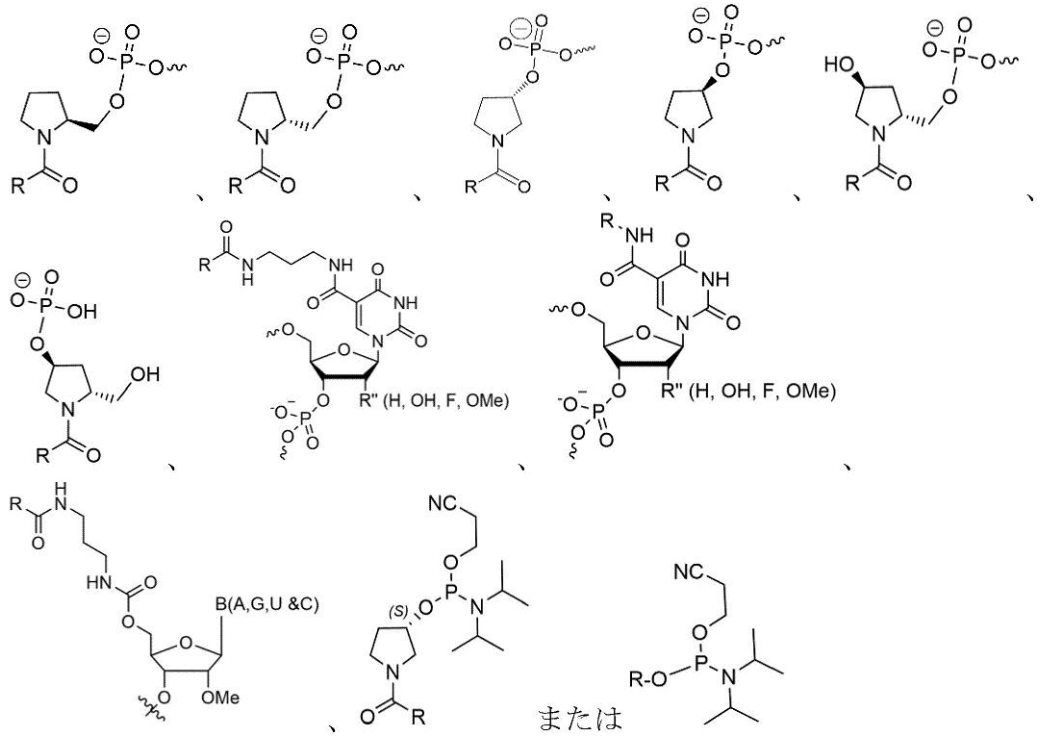
【０４９１】

一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、センスヌクレオチド配列の５’末端、またはアンチセンスヌクレオチド配列の５’末端にコンジュゲートされた一つ以上のリガンドを含む。

【０４９２】

特定の実施形態では、リガンドは、担体および／またはリンカーを介してヌクレオチド配列の５’末端にコンジュゲートされる。一つの実施形態では、リガンドは、以下の式の担体を介して、ヌクレオチド配列の５’末端にコンジュゲートされる。

【化６５】



Ｒは、リガンドである。

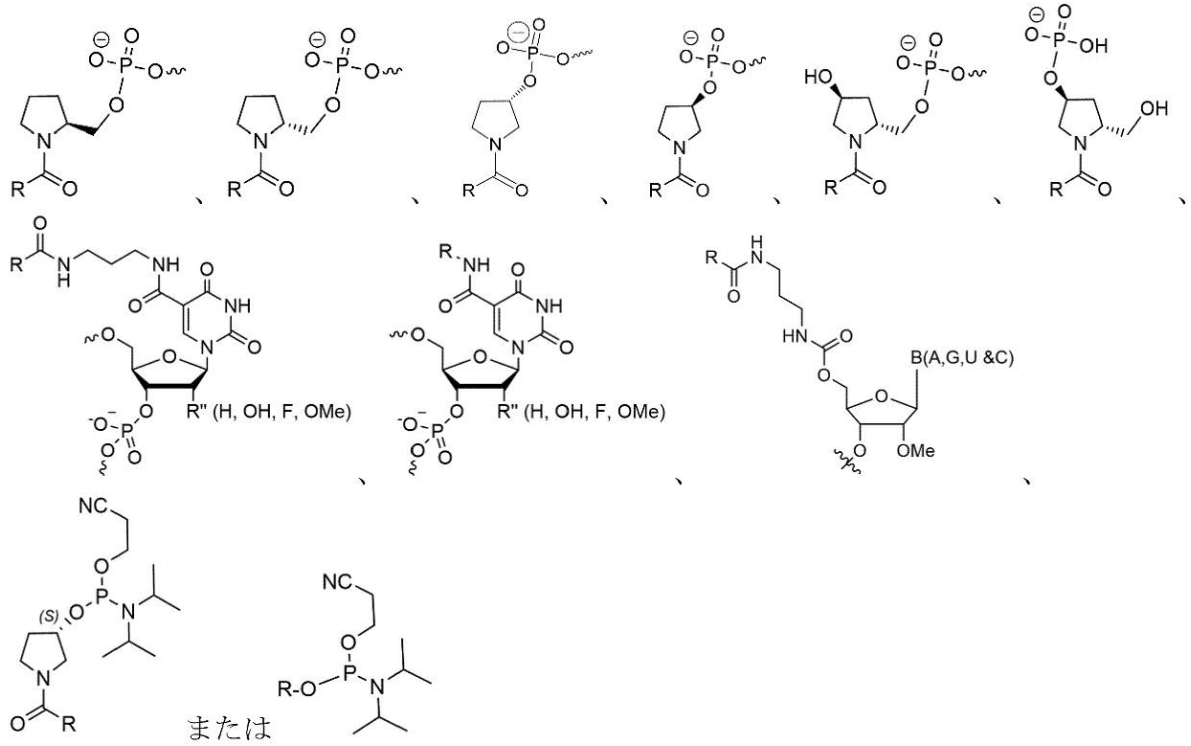
【０４９３】

一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、センスヌクレオチド配列の３’末端、またはアンチセンスヌクレオチド配列の３’末端にコンジュゲートされた一つ以上のリガンドを含む。

【０４９４】

特定の実施形態では、リガンドは、担体および／またはリンカーを介してヌクレオチド配列の３’末端にコンジュゲートされる。一つの実施形態では、リガンドは、以下の式の担体を介して、鎖のヌクレオチド配列の３’末端にコンジュゲートされる。

【化６６】



Ｒは、リガンドである。

【０４９５】

特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有する鎖にコンジュゲートされる。特定の実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有さない鎖にコンジュゲートされる。一つの実施形態では、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有する鎖にコンジュゲートされ、リガンドのうちの少なくとも一つは、環状または実質的に環状の構造を有さない鎖にコンジュゲートされる。

【０４９６】

一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、センスヌクレオチド配列の両末端にコンジュゲートされた一つ以上のリガンドを含む。一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、アンチセンスヌクレオチド配列の両末端にコンジュゲートされた一つ以上のリガンドを含む。

【０４９７】

一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、センスヌクレオチド配列の５’末端または３’末端にコンジュゲートされた一つ以上のリガンドを含むか、またはアンチセンスヌクレオチド配列の５’末端または３’末端にコンジュゲートされた一つ以上のリガンドを含む。

【０４９８】

一部の実施形態では、リガンドは、一つ以上のリンカー（テザー）および／または担体を介して、鎖にコンジュゲートされる。一つの実施形態では、リガンドは、一つ以上のリンカー（テザー）を介して、鎖にコンジュゲートされる。

【０４９９】

一つの実施形態では、リガンドは、任意選択的に一つ以上の介在リンカー（テザー）を介して、環状担体によりセンスヌクレオチド配列もしくはアンチセンスヌクレオチド配列の５’末端または３’末端にコンジュゲートされる。

【０５００】
一部の実施形態では、リガンドは、少なくとも一つのヌクレオチド配列で、一つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。ヌクレオチド配列の内部位置は、ヌクレオチド配列の３’末端および５’末端からの末端位置を除く（例えば、３’末端から数えて１位および５’末端から数えて１位の２つの位置を除く）、ヌクレオチド配列の任意の位置上のヌクレオチドを指す。
【０５０１】
一つの実施形態では、リガンドは、少なくとも一つのヌクレオチド配列上の一つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。当該内部位置は、ヌクレオチド配列の各末端からの最後の二つの位置を除くすべての位置を含む（例えば、３’末端から数えて１位および２位、ならびに５’末端から数えて１位および２位の４つの位置を除く）。一つの実施形態では、親油性部分は、少なくとも一つのヌクレオチド配列上の一つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。当該内部位置は、ヌクレオチド配列の各末端からの最後の三つの位置を除くすべての位置を含む（例えば、３’末端から数えて１位、２位、および３位、ならびに５’末端から数えて１位、２位および３位の６つの位置を除く）。
【０５０２】
一つの実施形態では、リガンドは、センスヌクレオチド配列の切断部位の領域を除く、少なくとも一つのヌクレオチド配列上の一つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。例えば、リガンドは、センスヌクレオチド配列の５’末端から数えて９～１２位にコンジュゲートされない。例えば、リガンドは、センスヌクレオチド配列の５’末端から数えて９～１１位にコンジュゲートされない。あるいは、内部位置は、センスヌクレオチド配列の３’末端から数えて１１位～１３位を除く。
【０５０３】
一つの実施形態では、リガンドは、アンチセンスヌクレオチド配列の切断部位の領域を除く、少なくとも一つのヌクレオチド配列上の一つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。例えば、内部位置は、アンチセンスヌクレオチド配列の５’末端から数えて１２位～１４位を除く。
【０５０４】
一つの実施形態では、リガンドは、センスヌクレオチド配列の３’末端から数えて１１～１３位、アンチセンスヌクレオチド配列の５’末端から数えて１２～１４位を除く、少なくとも一つのヌクレオチド配列上の一つ以上の内部位置にコンジュゲートされる。
【０５０５】
一つの実施形態では、一つ以上のリガンドは、以下の内部位置のうちの一つ以上にコンジュゲートされる：各ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、センスヌクレオチド配列の４～８位および１３～１８位、アンチセンスヌクレオチド配列の６～１０位および１５～１８位。
【０５０６】
一つの実施形態では、一つ以上のリガンドは、以下の内部位置のうちの一つ以上にコンジュゲートされる：各ヌクレオチド配列の５’末端から数えて、センスヌクレオチド配列の５、６、７、１５および１７位、ならびにアンチセンス配列の１５位および１７位。
【０５０７】
一部の実施形態では、リガンドは、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）の核酸塩基、糖部分、またはヌクレオチド間結合にコンジュゲートされる。
【０５０８】
<u>リガンド</u>
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ剤（またはｂｉｓ－ｓｃｒｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）は、一つ以上のコンジュゲート基の共有結合によってさらに修飾される。概して、コンジュゲート基は、限定されないが、薬理、薬物動態、結合、吸収、細胞分布、細胞取り込み、電荷、およびクリアラ

ンスをはじめとする、結合したエフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ剤（またはｂｉｓ－ｓｃｒｉＲＮＡ）の一つ以上の性能を改変する。コンジュゲート基は、化学分野で日常的に使用されており、例えばオリゴマー化合物などの親化合物に直接、または任意選択的な結合部分もしくは結合基を介して結合される。コンジュゲート基の好ましいリストとしては、挿入剤、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、チオエーテル、ポリエーテル、コレステロール、チオコレステロール、コール酸部分、葉酸、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アダマンタン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および染料が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５０９】

一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、特定のＣＮＳ組織への送達を介在する受容体を標的とする標的化リガンドをさらに含む。これらの標的化リガンドは、特定の髄腔内送達および全身送達を可能とする親油性部分と組み合わせてコンジュゲートされ得る。

【０５１０】

ＣＮＳ組織への受容体介在性送達を標的とする標的化リガンドの例は、例えば、Ａｎｇｉｏｐｅｐ－２、リポタンパク質受容体関連タンパク質（ＬＲＰ）リガンド、ｂＥｎｄ．３細胞結合リガンド；トランスフェリン受容体（ＴｆＲ）リガンド（脳内の鉄輸送系および脳実質中へのカーゴ輸送を利用することができる）；マンノース受容体リガンド（嗅神経鞘細胞、グリア細胞を標的とする）、グルコース輸送タンパク質、およびＬＤＬ受容体リガンドなどのペプチドリガンドである。

【０５１１】

一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、特定の眼組織への送達を介在する受容体を標的とする標的化リガンドをさらに含む。これらの標的化リガンドは、特定の硝子体内送達および全身送達を可能とする親油性部分と組み合わせてコンジュゲートされ得る。眼組織への受容体介在性送達を標的とする標的化リガンドの例は、例えば、オールトランスレチノール（レチノイン酸受容体を標的とする）；ＲＧＤペプチド（網膜色素上皮細胞を標的とする）、例えばＨ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｓｅｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｃｙｓ－ＯＨまたはＣｙｃｌｏ（－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｄ－Ｐｈｅ－Ｃｙｓ；ＬＤＬ受容体リガンド；および炭水化物系リガンド（後眼の内皮細胞を標的とする）である。

【０５１２】

本発明に適している好ましいコンジュゲート基としては、例えば、コレステロール部分（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８９，８６，６５５３）、コール酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１９９４，４，１０５３）、チオエーテル、例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１９９２，６６０，３０６、Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．，１９９３，３，２７６５）、チオコレステロール（Ｏｂｅｒｈａｕｓｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１９９２，２０，５３３）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基（Ｓａｉｓｏｎ－Ｂｅｈｍｏａｒａｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ．，１９９１，１０，１１１、Ｋａｂａｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，１９９０，２５９，３２７、Ｓｖｉｎａｒｃｈｕｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ，１９９３，７５，４９）、リン脂質、例えば、ジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム－１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３－Ｈ－ホスホネート（Ｍａｎｏｈａｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔ．，１９９５，３６，３６５１、Ｓｈｅａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ

．，１９９０，１８，３７７７）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，１９９５，１４，９６９）、アダマンタン酢酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，１９９５，３６，３６５１）、パルミチル部分（Ｍｉｓｈｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ，１９９５，１２６４，２２９）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Ｃｒｏｏｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．，１９９６，２７７，９２３）などの脂質部分が挙げられる。

【０５１３】

本明細書で使用される場合、「標的化リガンド」という用語は、選択された標的、例えば、細胞、細胞型、組織、器官、身体の領域、または例えば細胞区画、組織区画、もしくは器官区画などの区画に対するアフィニティの強化を提供する任意の分子を指す。例えば、ＣＮＳの標的化リガンドとしては、例えば、Ｃ１６－修飾などの本明細書の親油性リガンドが挙げられる。

【０５１４】

概して、多種多様な実体、例えば、リガンドを、本明細書に記載されるオリゴマー化合物に結合することができる。リガンドは、天然分子、または組換え分子もしくは合成分子を含み得る。例示的なリガンドとしては、限定されないが、ポリリジン（ＰＬＬ）、ポリＬ－アスパラギン酸、ポリＬ－グルタミン酸、スチレン－マレイン酸無水物コポリマー、ポリ（Ｌ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル－無水マレイン酸コポリマー、Ｎ－（２－ヒドロキシルプロピル）メタクリルアミドコポリマー（ＨＭＰＡ）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ、例えば、ＰＥＧ－２Ｋ、ＰＥＧ－５Ｋ、ＰＥＧ－１０Ｋ、ＰＥＧ－１２Ｋ、ＰＥＧ－１５Ｋ、ＰＥＧ－２０Ｋ、ＰＥＧ－４０Ｋ）、ＭＰＥＧ、［ＭＰＥＧ］$_2$、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリウレタン、ポリ（２－エチルアクリル酸）、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドポリマー、ポリホスファジン、ポリエチレンイミン、カチオン性基、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド－ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの四級塩、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤プロテインＡ、ムチン、グリコシル化ポリアミノ酸、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパラギン酸塩、アプタマー、アシアロフェツイン、ヒアルロナン、プロコラーゲン、免疫グロブリン（例えば、抗体）、インスリン、トランスフェリン、アルブミン、糖－アルブミンコンジュゲート、インターカレーション剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラレン、マイトマイシンＣ）、ポルフィリン（例えば、ＴＰＰＣ４、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、ＥＤＴＡ）、親油性分子（例えば、ステロイド、胆汁酸、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－Ｂｉｓ－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゼラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、１，３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）、ペプチド（例えば、アルファらせんペプチド、両親媒性ペプチド、ＲＧＤペプチド、細胞透過ペプチド、エンドソーム溶解性（ｅｎｄｏｓｏｍｏｌｙｔｉｃ）／融合ペプチド）、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射線標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えば、ナプロキセン、アスピリン、ビタミンＥ、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン－イミダゾールコンジュゲート、テトラアザマクロサイクルのＥｕ３＋複合体）、ジニトロフェニル、ＨＲＰ、ＡＰ、抗体、ホルモンおよびホルモン受容体、レクチン、炭水化物、多価炭水化物、ビタミン（例えば、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビタミンＫ、ビタミン

Ｂ、例えば、葉酸、Ｂ１２、リボフラビン、ビオチン、およびピリドキサール）、ビタミン補因子、リポ多糖、ｐ３８　ＭＡＰキナーゼの活性化因子、ＮＦ－κＢの活性化因子、タキソン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャプラキノリド（ｊａｐｌａｋｉｎｏｌｉｄｅ）、ラトルンクリンＡ（ｌａｔｒｕｎｃｕｌｉｎＡ）、ファロイジン、スウィンホリドＡ（ｓｗｉｎｈｏｌｉｄｅ　Ａ）、インダノシン、ミオセルビン（ｍｙｏｓｅｒｖｉｎ）、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦアルファ）、インターロイキン－１ベータ、ガンマインターフェロン、天然または組換え低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）、天然または組換え高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）、ならびに細胞透過剤（例えば、らせん状細胞透過剤）が挙げられる。

【０５１５】

ペプチドおよびペプチド模倣リガンドには、天然ペプチドまたは改変ペプチドを有するものが挙げられ、例えば、ＤもしくはＬペプチド；α、β、もしくはγペプチド；Ｎ－メチルペプチド；アザペプチド；一つ以上のアミドを有するペプチド、すなわち一つ以上の尿素、チオ尿素、カルバミン酸塩もしくはスルホニル尿素結合で置換されたペプチド結合を有するペプチド；または環状ペプチドを有するものが挙げられる。ペプチド模倣体（本明細書においてオリゴペプチド模倣体とも称する）は、天然ペプチドと類似する規定された三次元構造にフォールディング可能な分子である。ペプチドまたはペプチド模倣リガンドは、約５～５０アミノ酸の長さ、例えば、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０アミノ酸の長さである。

【０５１６】

例示的な両親媒性ペプチドとしては限定されないが、セクロピン（ｃｅｃｒｏｐｉｎｓ）、リコトキシン（ｌｙｃｏｔｏｘｉｎｓ）、パラダキシン（ｐａｒａｄａｘｉｎｓ）、ブフォリン、ＣＰＦ、ボンビニン様ペプチド（ＢＬＰ：ｂｏｍｂｉｎｉｎ－ｌｉｋｅ　ｐｅｐｔｉｄｅ）、カテリシジン（ｃａｔｈｅｌｉｃｉｄｉｎｓ）、セラトトキシン（ｃｅｒａｔｏｔｏｘｉｎｓ）、Ｓ．ｃｌａｖａペプチド、ｈａｇｆｉｓｈ腸管抗菌ペプチド（ＨＦＩＡＰ：ｈａｇｆｉｓｈ　ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ　ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ）、マガイニン（ｍａｇａｉｎｉｎｅｓ）、ブレビニン－２（ｂｒｅｖｉｎｉｎｓ－２）、デルマセプチン（ｄｅｒｍａｓｅｐｔｉｎｓ）、メリチン、プレウロシジン（ｐｌｅｕｒｏｃｉｄｉｎ）、H_2Aペプチド、Ｘｅｎｏｐｕｓペプチド、エスクレンティニス－１（ｅｓｃｕｌｅｎｔｉｎｉｓ－１）、およびカエリン（ｃａｅｒｉｎｓ）が挙げられる。

【０５１７】

本明細書で使用される場合、「エンドソーム分解性リガンド」という用語は、エンドソーム分解性特性を有する分子を指す。エンドソーム溶解性リガンドは、細胞内の例えばエンドソーム、リソソーム、小胞体（ＥＲ）、ゴルジ装置、微小管、ペルオキシソーム、または他の小胞などの細胞区画から、細胞の細胞質への本発明の組成物もしくはその構成要素の溶解および／または輸送を促進する。一部の例示的なエンドソーム溶解性リガンドとしては限定されないが、イミダゾール、ポリまたはオリゴイミダゾール、直鎖または分岐鎖ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）、直鎖および分岐鎖ポリアミン、例えば、スペルミン、カチオン性直鎖および分岐鎖ポリアミン、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、マスクされたオリゴもしくはポリカチオンまたはアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール／ポリケタール、オルトエステル、マスクされた、もしくはマスクされていないカチオン電荷またはアニオン電荷を有する直鎖または分岐鎖ポリマー、マスクされた、もしくはマスクされていないカチオン電荷またはアニオン電荷を有するデンドリマー、ポリアニオン性ペプチド、ポリアニオン性ペプチド模倣物、ｐＨ感受性ペプチド、天然および合成の融合性脂質、天然および合成のカチオン性脂質が挙げられる。

【０５１８】

例示的なエンドソーム溶解性／融合ペプチドとしては、限定されないが、ＡＡＬＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＥＡＡＡＡＧＧＣ（ＧＡＬＡ）；ＡＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＡＡＡＧＧＣ（ＥＡＬＡ）；ＡＬＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡ

ＥＡ；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＷＤＹＧ（ＩＮＦ－７）；ＧＬＦＧＡＩＡＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＷＹＧ（Ｉｎｆ　ＨＡ－２）；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＷＹＧＣＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤ　ＧＷＹＧＣ（ｄｉＩＮＦ－７）；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＧＣＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＧＣ（ｄｉＩＮＦ－３）；ＧＬＦＧＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＨＬＡＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＡＧＧＳＣ（ＧＬＦ）；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＬＡＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＡＧＧＳＣ（ＧＡＬＡ－ＩＮＦ３）；ＧＬＦ　ＥＡＩ　ＥＧＦＩ　ＥＮＧＷ　ＥＧｎＩ　ＤＧ　Ｋ　ＧＬＦ　ＥＡＩ　ＥＧＦＩ　ＥＮＧＷ　ＥＧｎＩ　ＤＧ（ＩＮＦ－５、ｎはノルロイシンである）；ＬＦＥＡＬＬＥＬＬＥＳＬＷＥＬＬＬＥＡ（ＪＴＳ－１）；ＧＬＦＫＡＬＬＫＬＬＫＳＬＷＫＬＬＬＫＡ（ｐｐＴＧ１）；ＧＬＦＲＡＬＬＲＬＬＲＳＬＷＲＬＬＬＲＡ（ｐｐＴＧ２０）；ＷＥＡＫＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡＫＨＬＡＫＡＬＡＫＡＬＫＡＣＥＡ（ＫＡＬＡ）；ＧＬＦＦＥＡＩＡＥＦＩＥＧＧＷＥＧＬＩＥＧＣ（ＨＡ）；ＧＩＧＡＶＬＫＶＬＴＴＧＬＰＡＬＩＳＷＩＫＲＫＲＱＱ（メリチン（Ｍｅｌｉｔｔｉｎ））；H_5WYG；およびCHK_6HCが挙げられる。

【０５１９】

理論に拘束されることは望まないが、融合性脂質は、膜と融合し、その結果、膜を不安定化する。融合性脂質は通常、小さな頭部基と不飽和アシル鎖を有する。例示的な融合性脂質としては、限定されないが、１，２－ジレオイル－ｓｎ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３１Ｚ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３１－テトラエン－１９－オール（Ｄｉ－Ｌｉｎ）、Ｎ－メチル（２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－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（ＤＬｉｎ－ｋ－ＤＭＡ）、およびＮ－メチル－２－（２，２－ジ（（９Ｚ，１２Ｚ）－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（本明細書ではＸＴＣとも呼称される）が挙げられる。

【０５２０】

本発明に適したエンドソーム溶解活性を有する合成ポリマーは、米国特許出願公開第２００９／００４８４１０号、第２００９／００２３８９０号、第２００８／０２８７６３０号、第２００８／０２８７６２８号、第２００８／０２８１０４４号、第２００８／０２８１０４１号、第２００８／０２６９４５０号、第２００７／０１０５８０４号、第２００７００３６８６５号、および第２００４／０１９８６８７号に記載される。それら文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０５２１】

例示的な細胞透過ペプチドとしては限定されないが、ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎ）；ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＣ（Ｔａｔ断片の４８－６０）；ＧＡＬＦＬＧＷＬＧＡＡＧＳＴＭＧＡＷＳＱＰＫＫＫＲＫＶ（シグナル配列を基にしたペプチド）；ＬＬＩＩＬＲＲＲＩＲＫＱＡＨＡＨＳＫ（ＰＶＥＣ）；ＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（トランスポータン）；ＫＬＡＬＫＬＡＬＫＡＬＫＡＡＬＫＬＡ（両親媒性モデルペプチド）；ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（Ａｒｇ９）；ＫＦＦＫＦＦＫＦＦＫ（細菌細胞壁透過ペプチド）；ＬＬＧＤＦＦＲＫＳＫＥＫＩＧＫＥＦＫＲＩＶＱＲＩＫＤＦＬＲＮＬＶＰＲＴＥＳ（ＬＬ－３７）；ＳＷＬＳＫＴＡＫＫＬＥＮＳＡＫＫＲＩＳＥＧＩＡＩＡＩＱＧＧＰＲ（セクロピンＰ１）；ＡＣＹＣＲＩＰＡＣＩＡＧＥＲＲＹＧＴＣＩＹＱＧＲＬＷＡＦＣＣ（α－ディフェンシン）；ＤＨＹＮＣＶＳＳＧＧＱＣＬＹＳＡＣＰＩＦＴＫＩＱＧＴＣＹＲＧＫＡＫＣＣＫ（β－ディフェンシン）；ＲＲＲＰＲＰＰＹＬＰＲＰＲＰＰＰＦＦＰＰＲＬＰＰＲＩＰＰＧＦＰＰＲＦＰＰＲＦＰＧＫＲ－ＮＨ２（ＰＲ－３９）；ＩＬＰＷＫＷＰＷＷＰＷＲＲ－ＮＨ２（インドリシジン）；ＡＡＶＡＬＬＰＡＶＬＬＡＬＬＡＰ（ＲＦＧＦ）；ＡＡＬＬＰＶＬＬＡＡＰ（ＲＦＧＦアナログ）；およびＲＫＣＲＩＶＶＩＲＶＣＲ（バクテネシン）が挙げられる。

【０５２２】

例示的なカチオン性基としては、限定されないが、例えば、Ｏ－アミン（アミン＝ＮＨ

$_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノまたはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）に由来するプロトン化アミノ基；アミノアルコキシ、例えば、O（CH_2）$_n$アミン（例えば、アミン＝NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ）；アミノ（例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノまたはアミノ酸）；および$NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$－アミン（アミン＝NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ）が挙げられる。

【０５２３】

本明細書で使用される場合、「標的化リガンド」という用語は、選択された標的、例えば、細胞、細胞型、組織、器官、身体の領域、または例えば細胞区画、組織区画、もしくは器官区画などの区画に対するアフィニティの強化を提供する任意の分子を指す。一部の例示的な標的化リガンドには、抗体、抗原、フォレート、受容体リガンド、炭水化物、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、ＰＳＭＡ、エンドテリン、ＧＣＰＩＩ、ソマトスタチン、ＬＤＬ、およびＨＤＬリガンドが含まれるが、これらに限定されない。例えば、ＣＮＳの標的化リガンドとしては、例えば、Ｃ１６－修飾などの本明細書の親油性リガンドが挙げられる。

【０５２４】

炭水化物系標的化リガンドとしては限定されないが、Ｄ－ガラクトース、多価ガラクトース、Ｎ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）、多価ＧａｌＮＡｃ、例えば、$GalNAc_2$および$GalNAc_3$（ＧａｌＮＡｃおよび多価ＧａｌＮＡｃは、本明細書において全体としてＧａｌＮＡｃコンジュゲートを指す）；Ｄ－マンノース、多価マンノース、多価ラクトース、Ｎ－アセチル－グルコサミン、グルコース、多価グルコース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、およびレクチンが挙げられる。多価という用語は、複数の単糖単位が存在することを示す。こうした単糖サブユニットは、グリコシド結合を介して互いに結合されてもよく、またはスキャホールド分子に結合されてもよい。

【０５２５】

リガンドとして本発明に適した多数の葉酸および葉酸アナログは、米国特許　第２，８１６，１１０号、第５，５５２，５４５号、第６，３３５，４３４号および第７，１２８，８９３号に記載される。それらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０５２６】

本明細書で使用される場合、「ＰＫ調節リガンド」および「ＰＫ調節因子」という用語は、組成物の薬物動態を調節することができる分子を指す。一部の例示的なＰＫ調節因子としては限定されないが、親油性分子、胆汁酸、ステロール、リン脂質アナログ、ペプチド、タンパク質結合剤、ビタミン、脂肪酸、フェノキサジン、アスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、スプロフェン、ケトプロフェン、（Ｓ）－（＋）－プラノプロフェン、カルプロフェン、ＰＥＧ、ビオチン、およびトランスサイレチン－結合リガンド（例えば、テトライイドチロ酢酸（ｔｅｔｒａｉｉｄｏｔｈｙｒｏａｃｅｔｉｃ　ａｃｉｄ）、２，４，６－トリヨードフェノール、およびフルフェナム酸）が挙げられる。多数のホスホロチオエート糖間結合を含むオリゴマー化合物も、血清タンパク質と結合することが知られている。したがって、短いオリゴマー化合物、例えば、約５～３０ヌクレオチド（例えば、５～２５ヌクレオチド、好ましくは５～２０ヌクレオチド、例えば、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０ヌクレオチド）を含み、骨格中に複数のホスホロチオエート結合を含むオリゴヌクレオチド

も、リガンドとして（例えば、ＰＫ調節リガンドとして）、本発明に適している。ＰＫ調節オリゴヌクレオチドは、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、またはそれ以上のホスホロチオエート結合および／またはホスホロジチオエート結合を含み得る。一部の実施形態では、ＰＫ調節オリゴヌクレオチド内のすべてのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合および／またはホスホロジチオエート結合である。更に、血清成分（例えば、血清タンパク質）に結合するアプタマーも、ＰＫ調節リガンドとして本発明に適している。血清成分（例えば、血清タンパク質）との結合は、Ｏｒａｖｃｏｖａ，ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ｂ（１９９６），６７７：１－２７に記載されるアッセイなどのアルブミン結合アッセイから予測可能である。

【０５２７】

二つ以上のリガンドが存在する場合、リガンドは、全て同じ性能を有するか、全て異なる特性を有するか、または一部のリガンドが同じ特性を有し、他のリガンドが異なる特性を有する。例えば、リガンドは、標的化特性を有するか、エンドソーム溶解活性を有するか、またはＰＫ調節特性を有し得る。好ましい実施形態では、全てのリガンドは、異なる特性を有する。

【０５２８】

リガンドまたは係留されたリガンドは、当該モノマーがエフェクター分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の構成要素に組み込まる場合に、単量体に存在し得る。一部の実施形態では、リガンドは、当該「前駆体」単量体が、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の構成要素に組み込まれた後、「前駆体」単量体へのカップリングを介して組み込まれ得る。例えば、アミノ末端テザーを有する（すなわち、関連リガンドを有しない）単量体、例えば、単量体－リンカー－NH_2は、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の構成要素に組み込まれ得る。その後の動作、すなわち、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の構成要素に前駆体単量体が組み込まれた後、求電子基を有するリガンド、例えば、ペンタフルオロフェニルエステルまたはアルデヒド基を有するリガンドは続いて、リガンドの求電子基を前駆体単量体のテザーの末端求核基をカップリングすることによって、前駆体単量体へと結合され得る。

【０５２９】

別の例では、クリック化学反応に関与するのに好適な化学基を有する単量体、例えば、アジド末端またはアルキン末端テザー／リンカーを組み込むことができる。その後の動作、すなわち、前駆体単量体を鎖に組み込んだ後、アルキンおよびアジドを一緒にカップリングすることによって、相補的な化学基、例えば、アルキンまたはアジドを有するリガンドを、前駆体単量体へと結合させることができる。

【０５３０】

一部の実施形態では、リガンドは、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の核酸塩基、糖部分、またはヌクレオシド間結合にコンジュゲートされてもよい。プリン核酸塩基またはその誘導体へのコンジュゲーションは、環内原子および環外原子を含む、任意の位置で発生し得る。一部の実施形態では、プリン核酸塩基の２位、６位、７位、または８位は、コンジュゲート部分へと結合される。ピリミジン核酸塩基またはその誘導体へのコンジュゲーションは、任意の位置で発生することもできる。一部の実施形態では、ピリミジン核酸塩基の２位、５位、および６位は、コンジュゲート部分で置換され得る。リガンドが核酸塩基にコンジュゲートされる場合、好ましい位置は、ハイブリダイゼーションに干渉しない位置、すなわち、塩基対形成に必要な水素結合相互作用に干渉しない位置である。

【０５３１】

ヌクレオシドの糖部分へのコンジュゲーションは、任意の炭素原子で発生し得る。コン

ジュゲート部分に結合することができる糖部分の例示の炭素原子の例としては、２’、３’、および５’の炭素原子が挙げられる。１’位も、例えば非塩基性残基などのコンジュゲート部分に結合され得る。ヌクレオシド間結合は、コンジュゲート部分も担うことができる。リン含有結合（例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデート、およびこれに類するもの）については、コンジュゲート部分は、リン原子に直接的に、またはリン原子に結合されたＯ、Ｎ、もしくはＳ原子に結合することができる。アミンまたはアミドを含有するヌクレオシド間結合（例えば、ＰＮＡ）については、コンジュゲート部分は、アミンまたはアミドの窒素原子に、または隣接する炭素原子に結合してもよい。

【０５３２】

オリゴヌクレオチドのコンジュゲートの作製について、多数の方法がある。一般的に、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの反応基（例えば、ＯＨ、ＳＨ、アミン、カルボキシル、アルデヒドなど）を、コンジュゲート部分の反応基と接触させることによって、コンジュゲート部分に結合される。一部の実施形態では、一方の反応基は求電子性であり、もう一方は求核性である。

【０５３３】

例えば、求電子基はカルボニル含有官能基であってもよく、求核基はアミンまたはチオールであってもよい。結合基の有無にかかわらず、核酸および関連するオリゴマー化合物のコンジュゲーション方法は、例えば、Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｃｒｏｏｋｅ ａｎｄ ＬｅＢｌｅｕ，ｅｄｓ．，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａ．，１９９３，Ｃｈａｐｔｅｒ １７などの文献中に記載されており、当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。

【０５３４】

核酸コンジュゲートの作製を教示する代表的な米国特許としては、限定されないが、米国特許 第４，８２８，９７９号、４，９４８，８８２；５，２１８，１０５；５，５２５，４６５；５，５４１，３１３；５，５４５，７３０；５，５５２，５３８；５，５７８，７１７，５，５８０，７３１；５，５８０，７３１；５，５９１，５８４；５，１０９，１２４；５，１１８，８０２；５，１３８，０４５；５，４１４，０７７；５，４８６，６０３；５，５１２，４３９；５，５７８，７１８；５，６０８，０４６；４，５８７，０４４；４，６０５，７３５；４，６６７，０２５；４，７６２，７７９；４，７８９，７３７；４，８２４，９４１；４，８３５，２６３；４，８７６，３３５；４，９０４，５８２；４，９５８，０１３；５，０８２，８３０；５，１１２，９６３；５，２１４，１３６；５，０８２，８３０；５，１１２，９６３；５，１４９，７８２；５，２１４，１３６；５，２４５，０２２；５，２５４，４６９；５，２５８，５０６；５，２６２，５３６；５，２７２，２５０；５，２９２，８７３；５，３１７，０９８；５，３７１，２４１，５，３９１，７２３；５，４１６，２０３，５，４５１，４６３；５，５１０，４７５；５，５１２，６６７；５，５１４，７８５；５，５６５，５５２；５，５６７，８１０；５，５７４，１４２；５，５８５，４８１；５，５８７，３７１；５，５９５，７２６；５，５９７，６９６；５，５９９，９２３；５，５９９，９２８；５，６７２，６６２；５，６８８，９４１；５，７１４，１６６；６，１５３，７３７；６，１７２，２０８；６，３００，３１９；６，３３５，４３４；６，３３５，４３７；６，３９５，４３７；６，４４４，８０６；６，４８６，３０８；６，５２５，０３１；６，５２８，６３１；第６，５５９，２７９号がある。それらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０５３５】

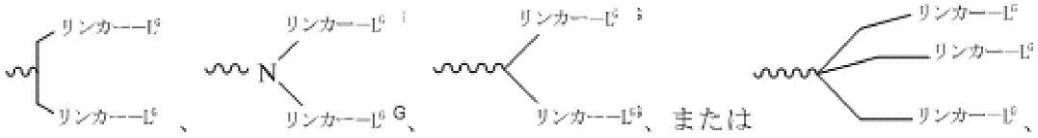
一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、肝臓組織を標的とする一つ以上の標的化リガンドをさらに含む。一部の実施形態では、標的化リガンドのうちの少なくとも一つは、炭水化物系のリガンドである。一部の実施形態では、炭水化物系のリ

ガンドは、ＡＳＧＰＲリガンドである。一つの実施形態では、標的化リガンドのうちの少なくとも一つは、ＧａｌＮＡｃ系のコンジュゲートである。

【０５３６】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下に示される構造を有するリガンドをさらに含む：

【化６７】



式中、

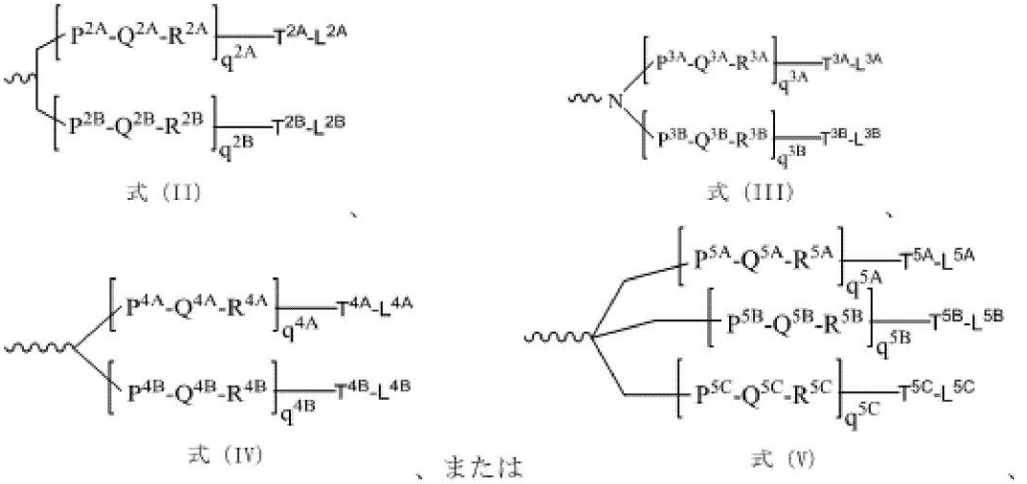
L^Gは、それぞれの存在について独立して、リガンド、例えば、炭水化物、例えば、単糖類、二糖類、三糖類、四糖類、多糖類であり；および

Ｚ’、Ｚ”、Ｚ’’’、およびＺ’’’’はそれぞれの存在について独立して、ＯまたはＳである。

【０５３７】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、式（ＩＩ）、（ＩＩＩ）、（ＩＶ）または（Ｖ）のリガンドを含む：

【化６８】



式中、

q^{2A}、q^{2B}、q^{3A}、q^{3B}、q^{4A}、q^{4B}、q^{5A}、q^{5B}、およびq^{5C}は、各存在について独立して、０～２０を表し、繰り返し単位は、同一であり得るか、または異なり得；

ＱおよびＱ’は、各存在について独立して、存在しない、－（$P^7-Q^7-R^7$）$_p$－T^7－、または－$T^7-Q^7-T^{7\prime}$－Ｂ－$T^{8\prime}$－Q^8-T^8であり；

P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、P^7、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C}、T^7、$T^{7\prime}$、T^8、および$T^{8\prime}$は、各存在について独立して、存在しない、ＣＯ、ＮＨ、Ｏ、Ｓ、ＯＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（Ｏ）、CH_2、CH_2NH、またはCH_2Oであり；

Ｂは、－CH_2－Ｎ（B^L）－CH_2－であり；

B^Lは、－$T^B-Q^B-T^{B\prime}$－R^xであり；

Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C}、Q^7、Q^8、およびQ^Bは、各存在について独立して、存在しない、アルキレン、置換アルキレンであり、一つ以上のメチレンは、Ｏ、Ｓ、Ｓ（Ｏ）、SO_2、Ｎ（R^N）、Ｃ（Ｒ’）＝Ｃ

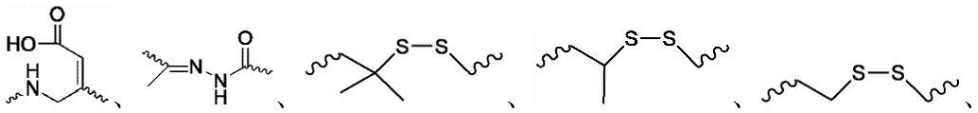
（Ｒ’）、Ｃ≡Ｃ、またはＣ（Ｏ）のうちの一つ以上によって中断または終結されてもよく；

T^Bおよび$T^{B'}$は各存在について独立して、存在しない、ＣＯ、ＮＨ、Ｏ、Ｓ、ＯＣ（Ｏ）、ＯＣ（Ｏ）Ｏ、ＮＨＣ（Ｏ）、ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ、ＮＨＣ（Ｏ）Ｏ、CH_2、CH_2NH、またはCH_2Oであり；

R^xは、親油性物質、（例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－Ｂｉｓ－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、１，３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）、ビタミン（例えば、葉酸、ビタミンＡ、ビタミンＥ、ビオチン、ピリドキサール）、ペプチド、炭水化物（例えば、単糖類、二糖類、三糖類、四糖類、オリゴ糖、多糖類）、エンドソーム溶解性構成成分、ステロイド（例えば、ウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン）、テルペン（例えば、トリテルペン、例えば、サルササポゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸）、またはカチオン性脂質であり；

R^1、R^2、R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}、R^7は各存在について独立して、存在しない、ＮＨ、Ｏ、Ｓ、CH_2、Ｃ（Ｏ）Ｏ、Ｃ（Ｏ）ＮＨ、ＮＨＣＨ（R^a）Ｃ（Ｏ）、－Ｃ（Ｏ）－ＣＨ（R^a）－ＮＨ－、ＣＯ、ＣＨ＝Ｎ－Ｏ、

【化６９】



またはヘテロシクリルであり；

L^1、L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B}、およびL^{5C}は各存在について独立して、炭水化物、例えば、単糖類、二糖類、三糖類、四糖類、オリゴ糖類、および多糖類であり；

Ｒ’およびＲ”は、各々独立して、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、ＯＨ、ＳＨ、または$N(R^N)_2$であり；

R^Nはそれぞれの存在について独立して、Ｈ、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはベンジルであり；

R^aは、Ｈまたはアミノ酸側鎖であり；

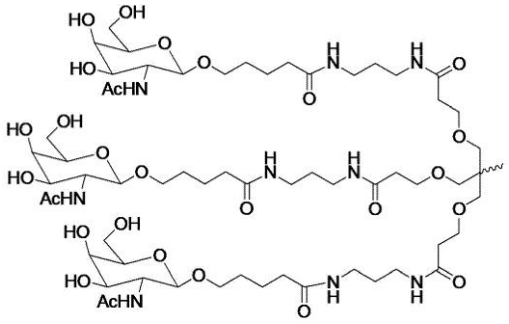
Ｚ’、Ｚ”、Ｚ’’’、およびＺ’’’’はそれぞれの存在について独立して、ＯまたはＳであり；

ｐは、各存在について独立して、０～２０を表す。

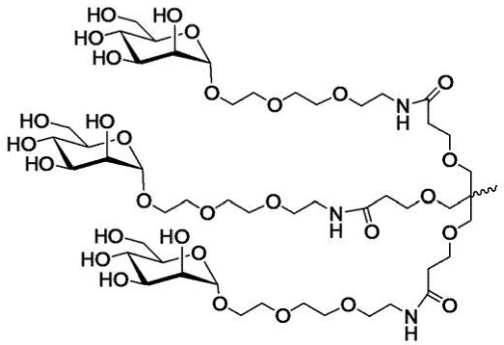
【０５３８】

上記で検討されたように、リガンドはリンカーまたは担体を介してエフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤にコンジュゲートされ得るため、そしてリンカーまたは担体は、分枝リンカーを含有し得るため、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、その後、担体との同じ骨格結合点または異なる骨格結合点を介して、または分枝リンカーを介して、複数のリガンドを含有し得る。例えば、分岐リンカーの分岐点は、二価、三価、四価、五価、もしくは六価の原子、またはそのような複数の原子価を呈する基であってもよい。特定の実施形態では、分岐点は、－Ｎ、－Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－Ｏ－Ｃ、－Ｓ－Ｃ、－ＳＳ－Ｃ、－Ｃ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｑ）－Ｃ、－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）－Ｃ、または－Ｎ（Ｑ）Ｃ（Ｏ）Ｏ－Ｃであり、式中、Ｑはそれぞれの存在について独立して、Ｈまたは任意で置換されるアルキルである。他の実施形態では、分岐点は、グリセロールまたはグリセロール誘導体である。

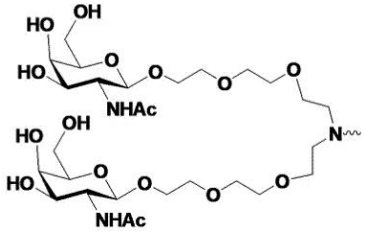
【０５３９】
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）にコンジュゲートされるＡＳＧＰＲリガンドは、二価または三価の分岐リンカーを介して結合される一つ以上のＧａｌＮＡｃ誘導体である。
【０５４０】
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。
【化７０】



【０５４１】
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。
【化７１】

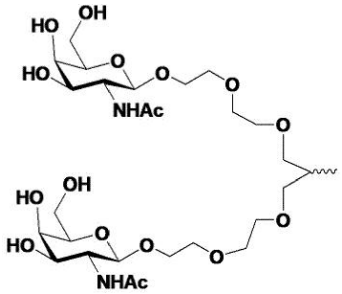


【０５４２】
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。
【化７２】



【０５４３】
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

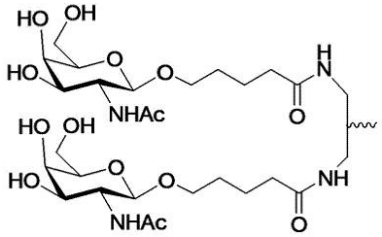
【化７３】



【０５４４】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

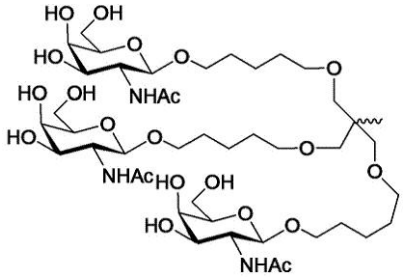
【化７４】



【０５４５】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

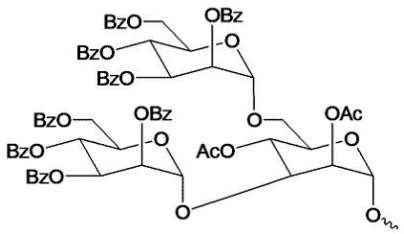
【化７５】



【０５４６】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

【化７６】

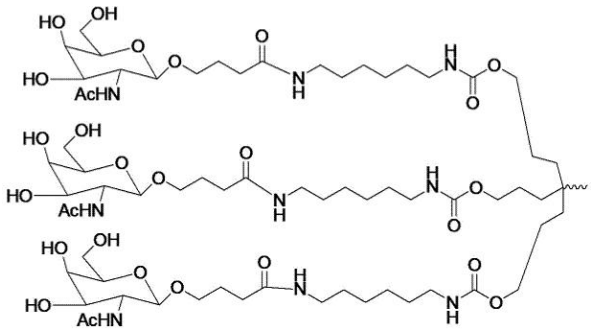


【０５４７】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンド

を含む。

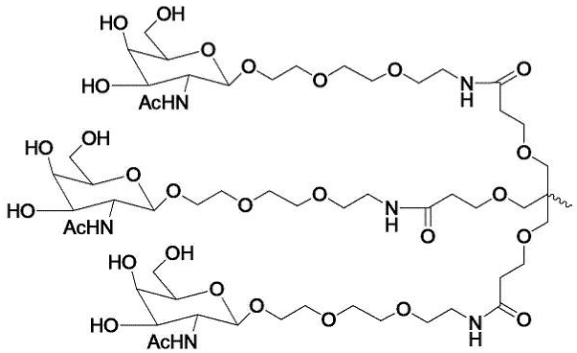
【化７７】



【０５４８】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

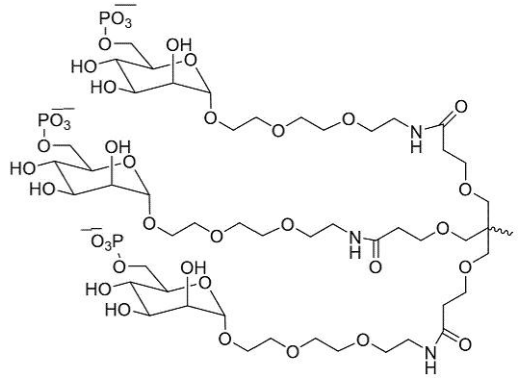
【化７８】



【０５４９】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

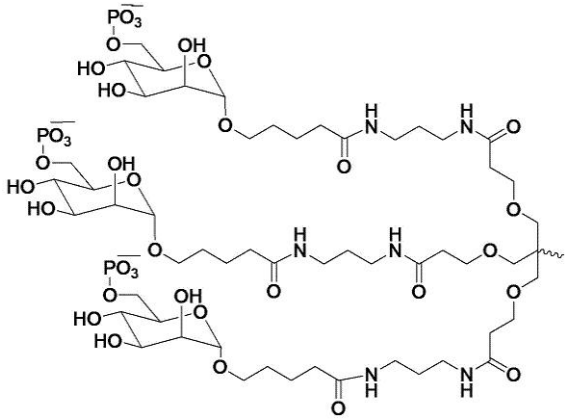
【化７９】



【０５５０】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

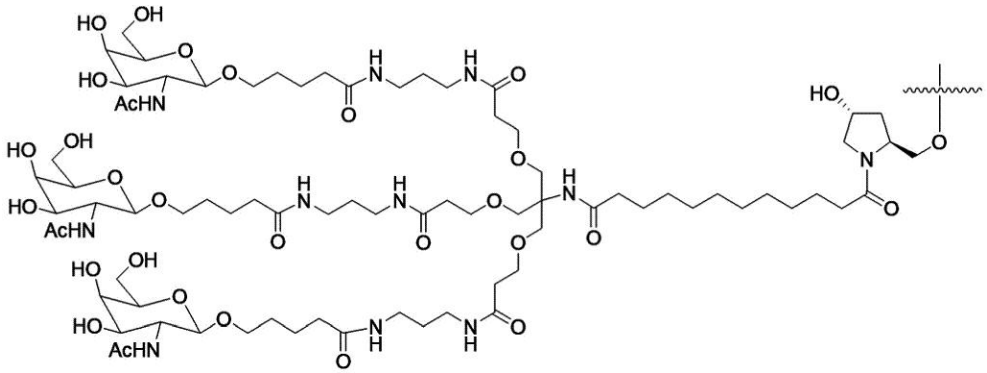
【化８０】



【０５５１】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

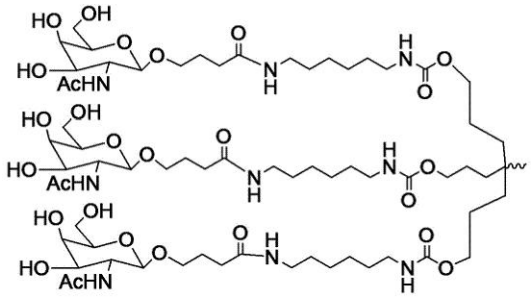
【化８１】



【０５５２】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

【化８２】

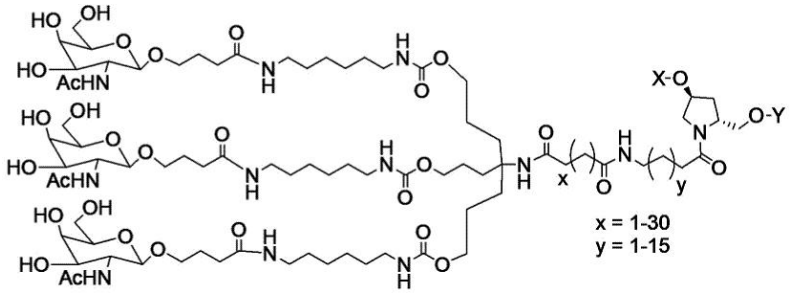


【０５５３】

例示的なリガンド単量体

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

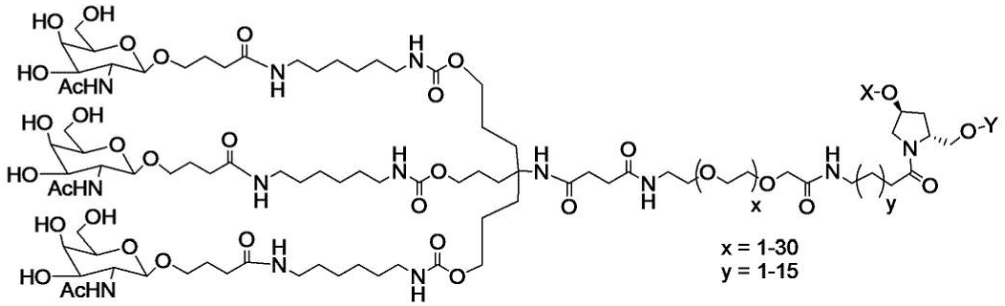
【化８３】



【０５５４】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

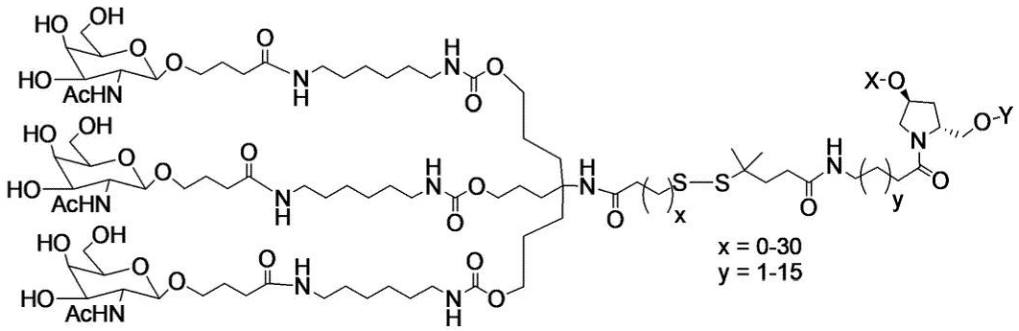
【化８４】



【０５５５】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

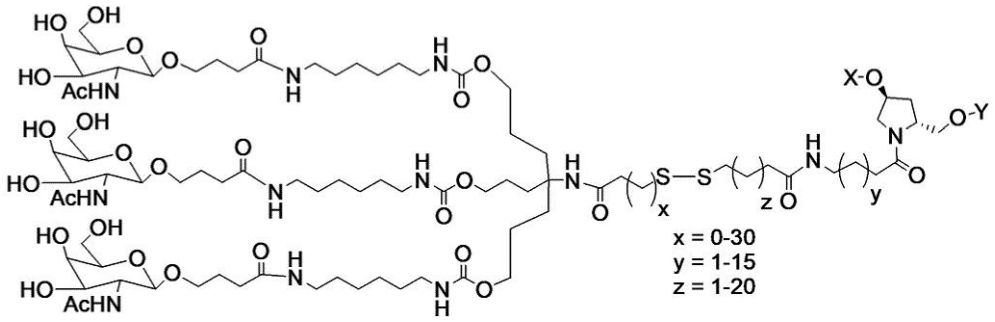
【化８５】



【０５５６】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

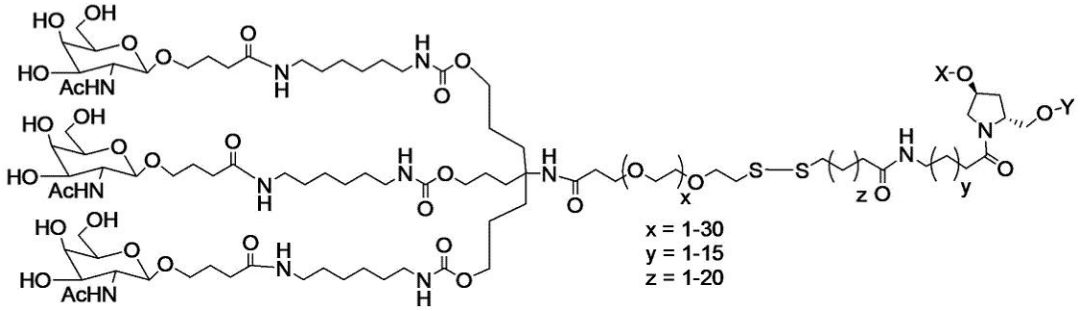
【化８６】



【０５５７】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

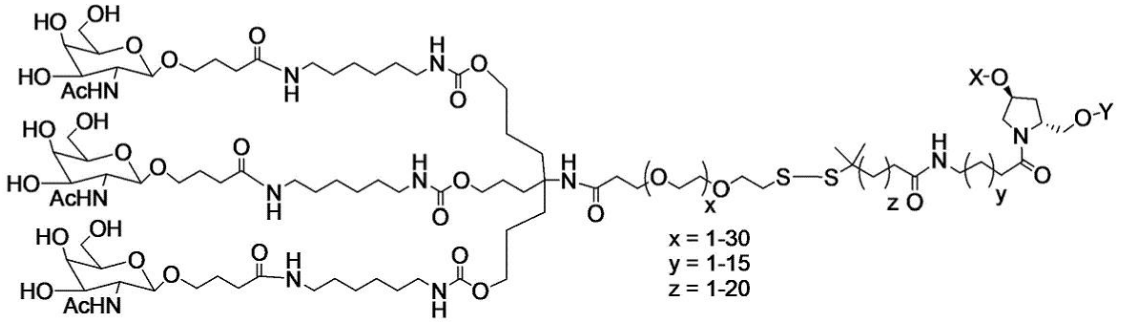
【化８７】



【０５５８】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

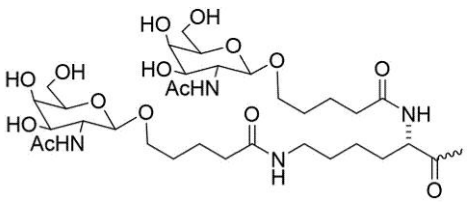
【化８８】



【０５５９】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

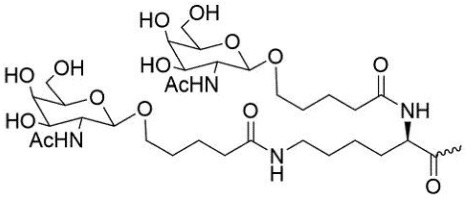
【化８９】



【０５６０】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

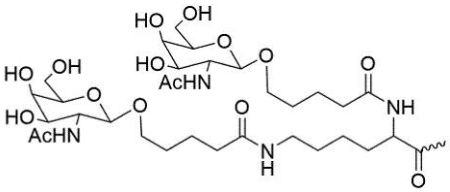
【化９０】



【０５６１】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

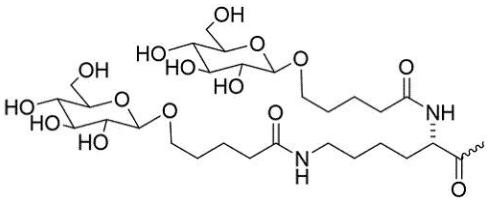
【化９１】



【０５６２】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

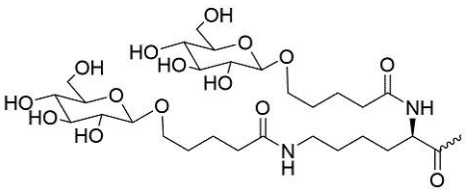
【化９２】



【０５６３】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

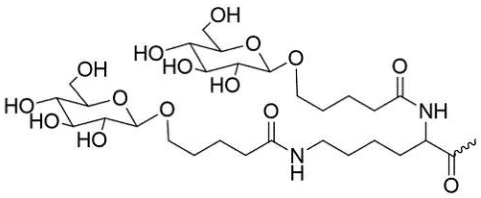
【化９３】



【０５６４】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

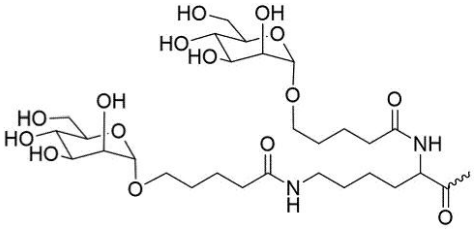
【化９４】



【０５６５】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

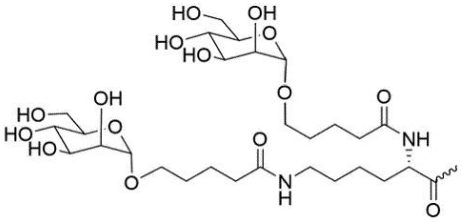
【化９５】



【０５６６】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

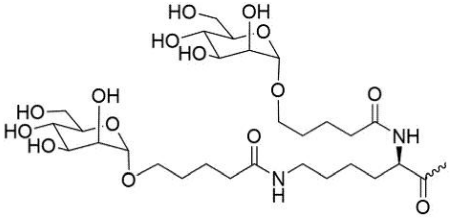
【化９６】



【０５６７】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

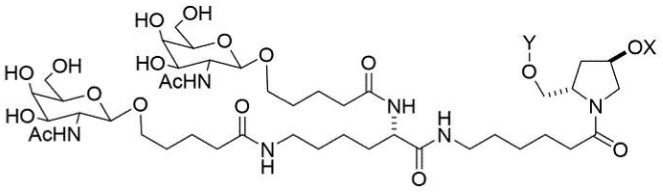
【化９７】



【０５６８】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

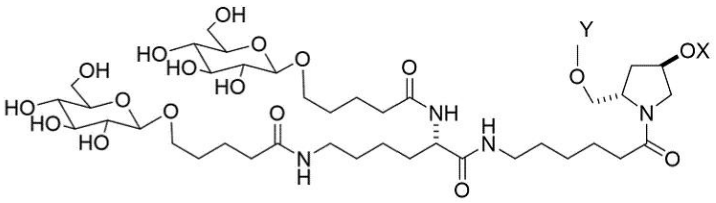
【化９８】



【０５６９】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

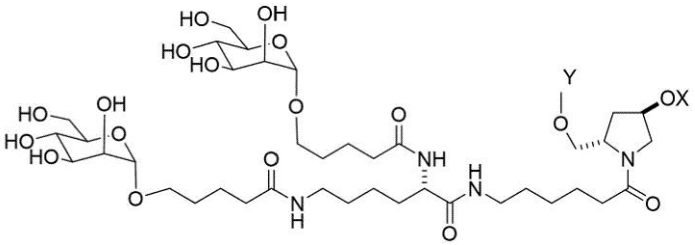
【化９９】



【０５７０】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

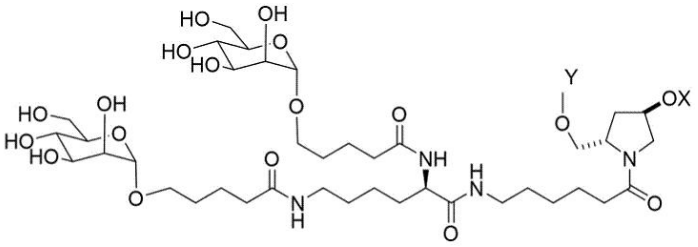
【化１００】



【０５７１】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

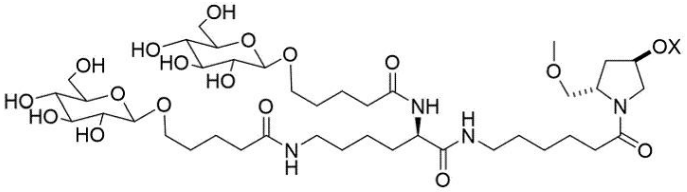
【化１０１】



【０５７２】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

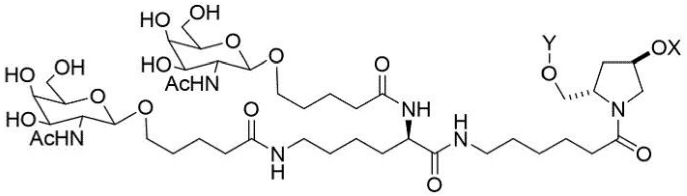
【化１０２】



【０５７３】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

【化１０３】



【０５７４】

一部の実施形態では、L^{2A}およびL^{2B}は両方とも同じである。一部の実施形態では、L^{2A}およびL^{2B}は両方とも異なる。

【０５７５】

一部の実施形態では、L^{3A}およびL^{3B}は両方とも同じである。一部の実施形態では、L^{3A}およびL^{3B}は両方とも異なる。

【０５７６】

一部の実施形態では、L^{4A}およびL^{4B}は両方とも同じである。一部の実施形態では、L^{4A}およびL^{4B}は両方とも異なる。

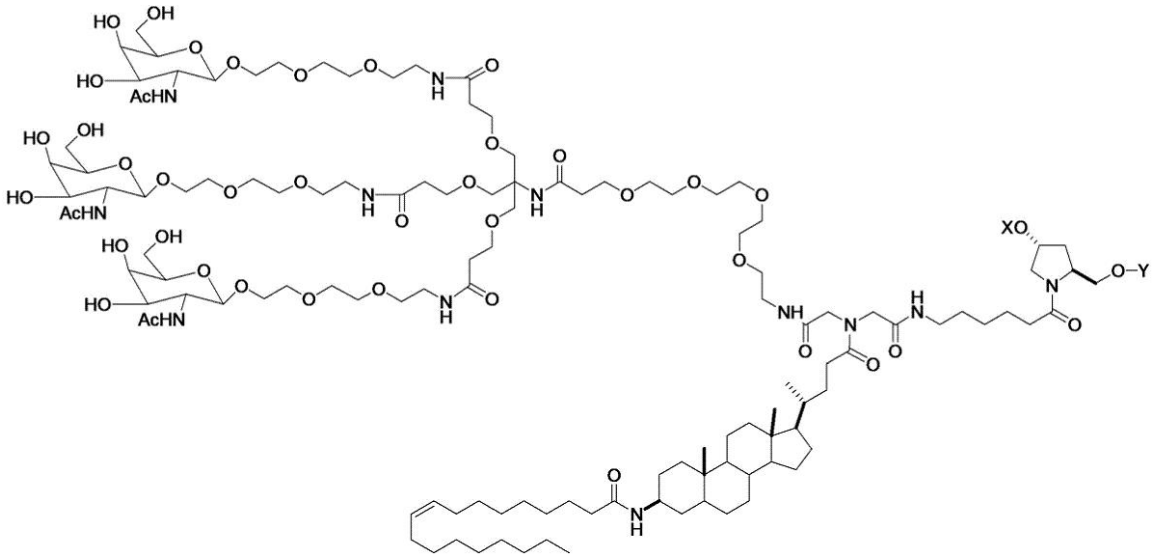
【０５７７】

一部の実施形態では、L^{5A}、L^{5B}、およびL^{5C}は全て同じである。一部の実施形態では、L^{5A}、L^{5B}、およびL^{5C}のうち二つは同じである。一部の実施形態では、L^{5A}およびL^{5B}は、同じである。一部の実施形態では、L^{5A}およびL^{5C}は、同じである。一部の実施形態では、L^{5B}およびL^{5C}は、同じである。

【０５７８】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

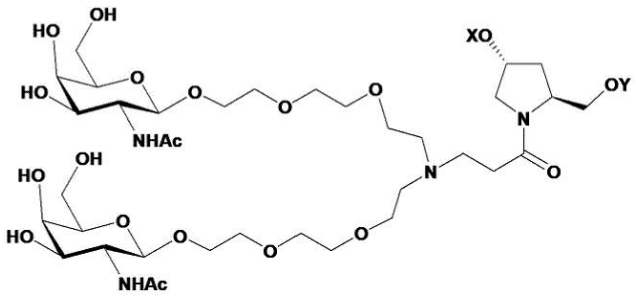
【化１０４】



【０５７９】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

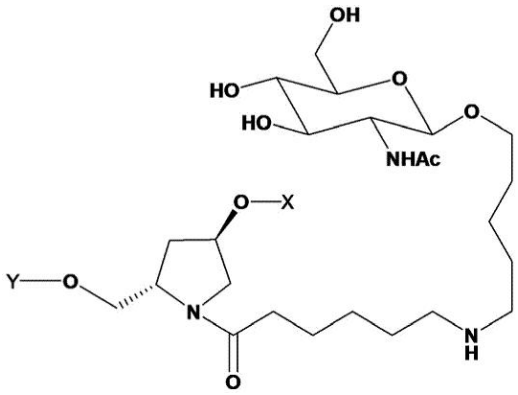
【化１０５】



【０５８０】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

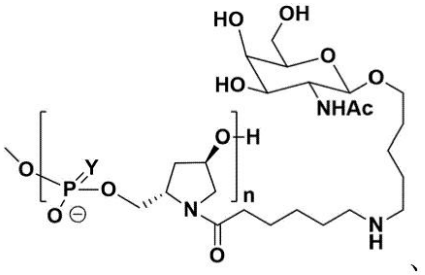
【化１０６】



【０５８１】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１０７】

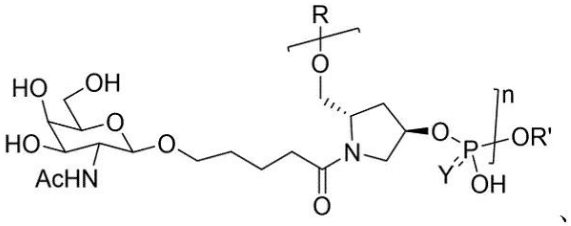


式中、Ｙは、ＯまたはＳであり、ｎは、１～６である。

【０５８２】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１０８】

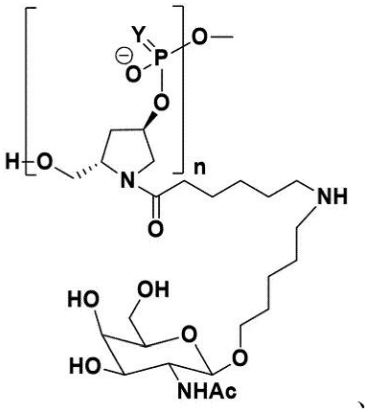


式中、Ｙは、ＯまたはＳであり、ｎは、１～６であり、Ｒは、水素または核酸であり、Ｒ’は核酸である。

【０５８３】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１０９】

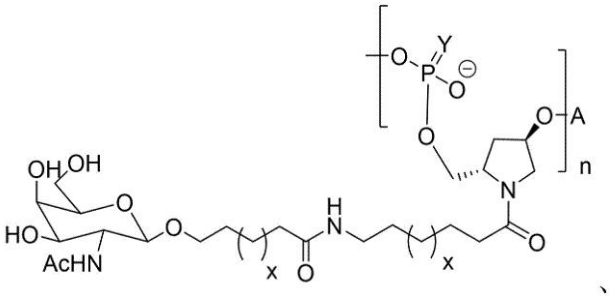


式中、Ｙは、ＯまたはＳであり、ｎは、１～６である。

【０５８４】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１０】

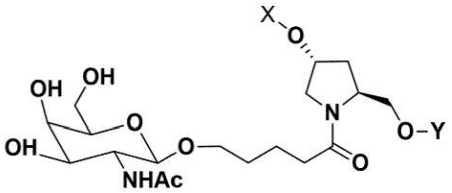


式中、Ｙは、ＯまたはＳであり、ｎは、２～６であり、ｘは、１～６であり、およびＡは、Ｈまたはリン酸結合である。

【０５８５】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、少なくとも１、２、３、または４個の以下の構造の単量体を含む。

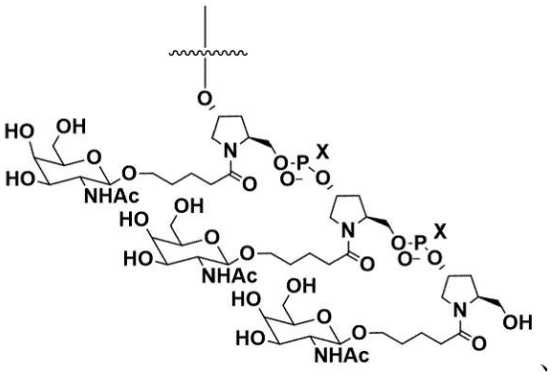
【化１１１】



【０５８６】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１２】

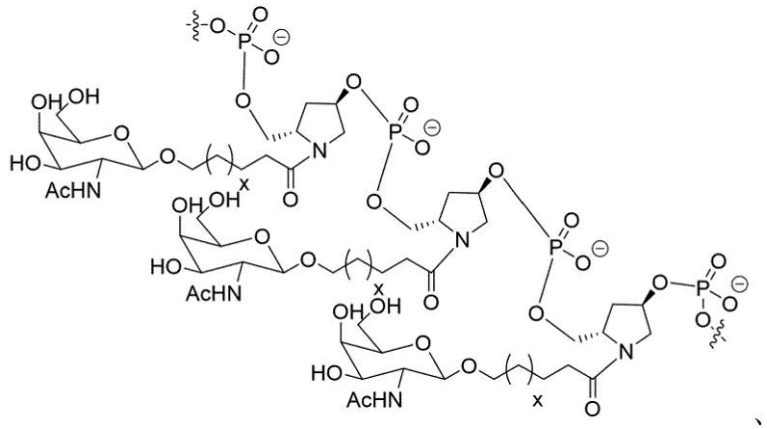


式中、Ｘは、ＯまたはＳである。

【０５８７】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１３】

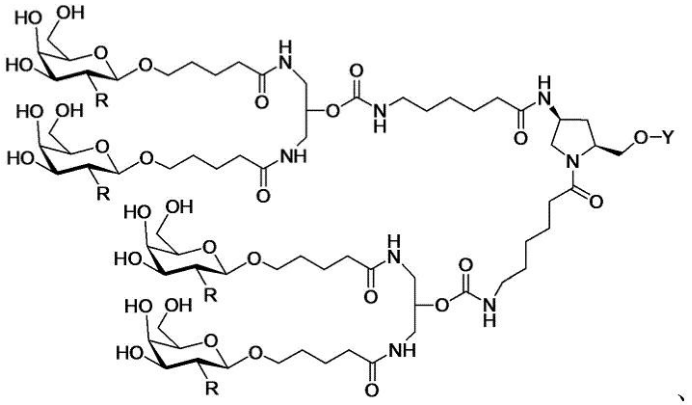


式中、ｘは、１～１２である。

【０５８８】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１４】

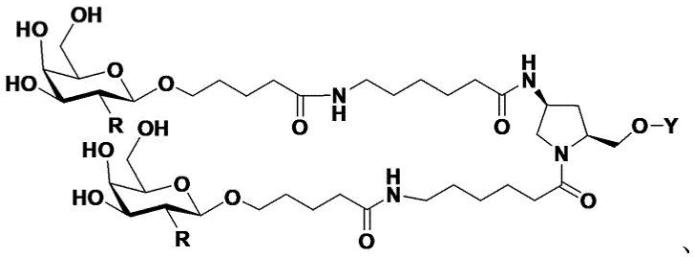


式中、Ｒは、ＯＨまたはＮＨＣＯＣＨ$_3$である。

【０５８９】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１５】

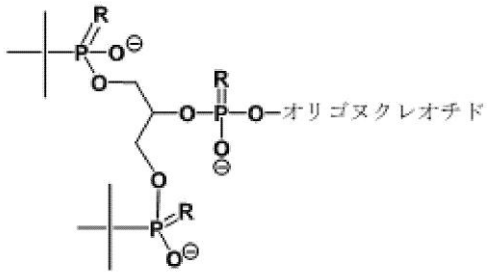


式中、Ｒは、ＯＨまたはＮＨＣＯＣＨ$_3$である。

【０５９０】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１６】



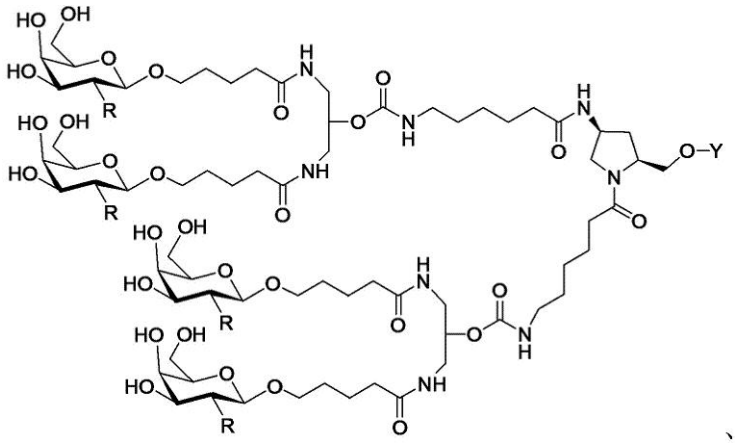
式(VII)

式中、Ｒは、ＯまたはＳである。

【０５９１】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１７】

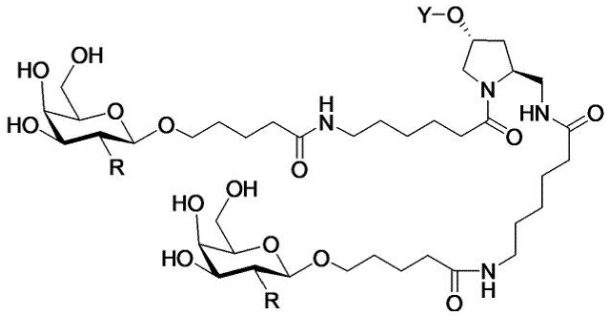


式中、Ｒは、ＯＨまたはＮＨＣＯＣＨ$_3$である。

【０５９２】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

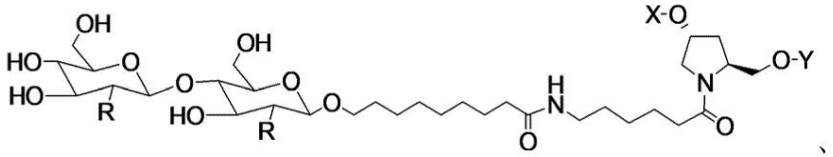
【化１１８】



【０５９３】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１１９】

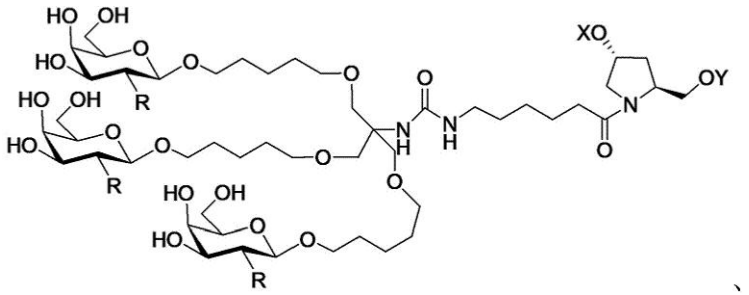


式中、Ｒは、ＯＨまたはＮＨＣＯＣＨ３である。

【０５９４】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１２０】

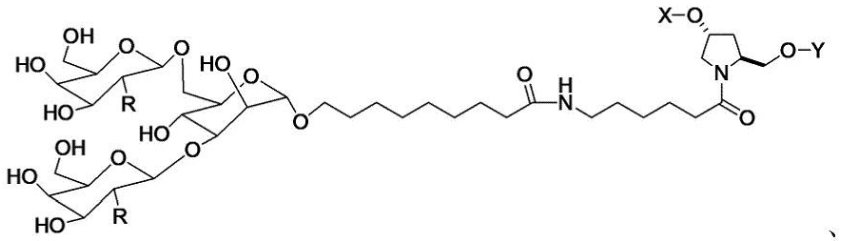


式中、Ｒは、ＯＨまたはＮＨＣＯＣＨ３である。

【０５９５】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１２１】

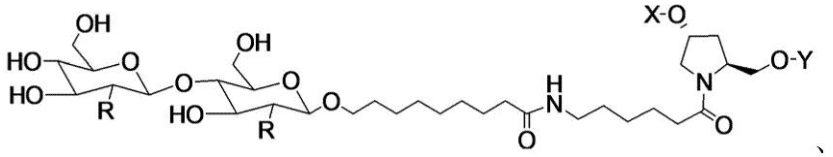


式中、Ｒは、ＯＨまたはＮＨＣＯＣＨ３である。

【０５９６】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む：

【化１２２】

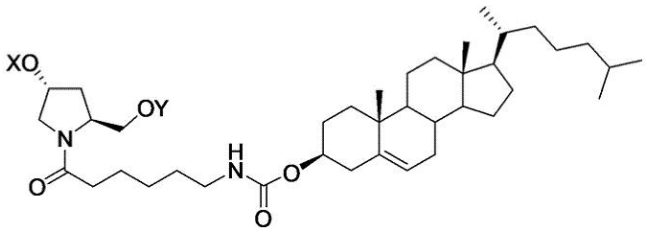


式中、Ｒは、ＯＨまたはＮＨＣＯＣＨ３である。

【０５９７】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を含む。

【化１２３】



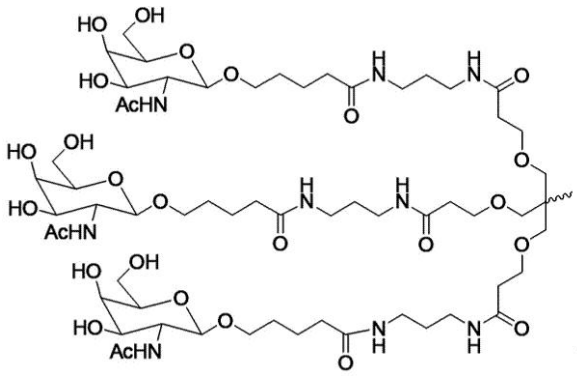
【０５９８】

上述の単量体において、ＸおよびＹは各存在についてそれぞれ独立して、Ｈ、保護基、リン酸基、ホスホジエステル基、活性化リン酸基、活性化亜リン酸塩基、ホスホロアミダイト、固形支持体、－Ｐ（Ｚ’）（Ｚ”）Ｏ－ヌクレオシド、－Ｐ（Ｚ’）（Ｚ”）Ｏ－オリゴヌクレオチド、脂質、ＰＥＧ、ステロイド、ポリマー、ヌクレオチド、ヌクレオシド、またはオリゴヌクレオチドであり、Ｚ’およびＺ”は各存在についてそれぞれ独立して、ＯまたはＳである。

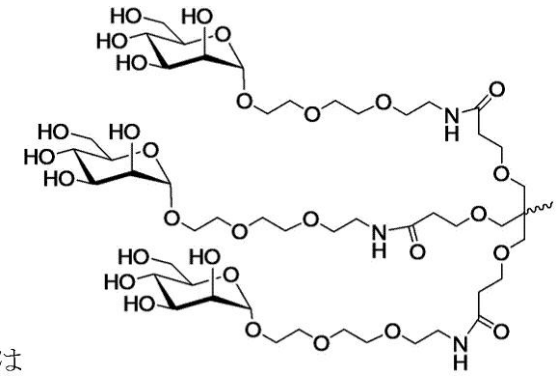
【０５９９】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドにコンジュゲートされる。

【化１２４】



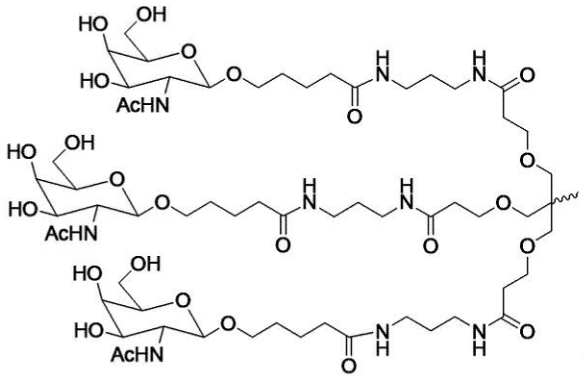
または



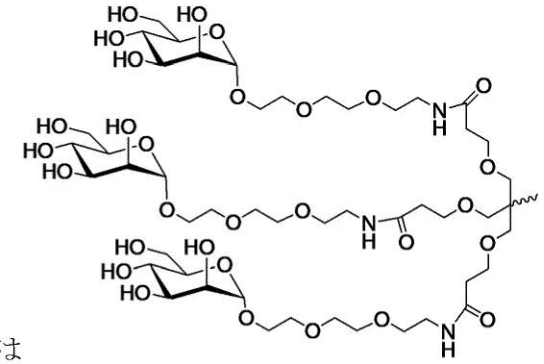
【０６００】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造のリガンドを含む。

【化１２５】



または

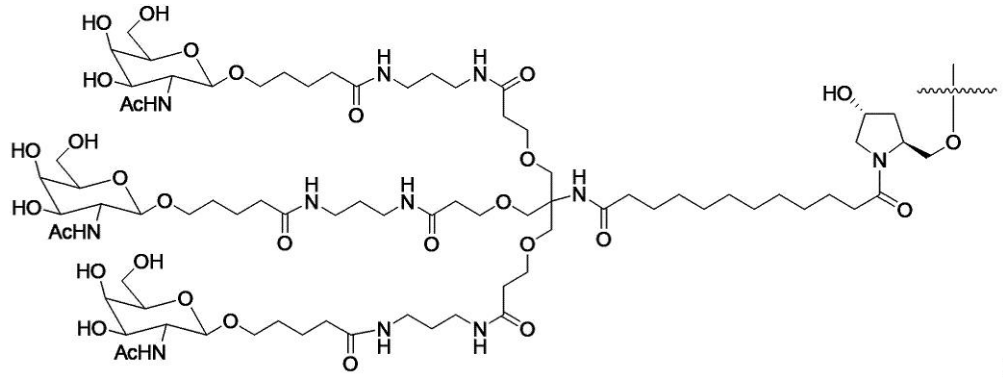


【０６０１】

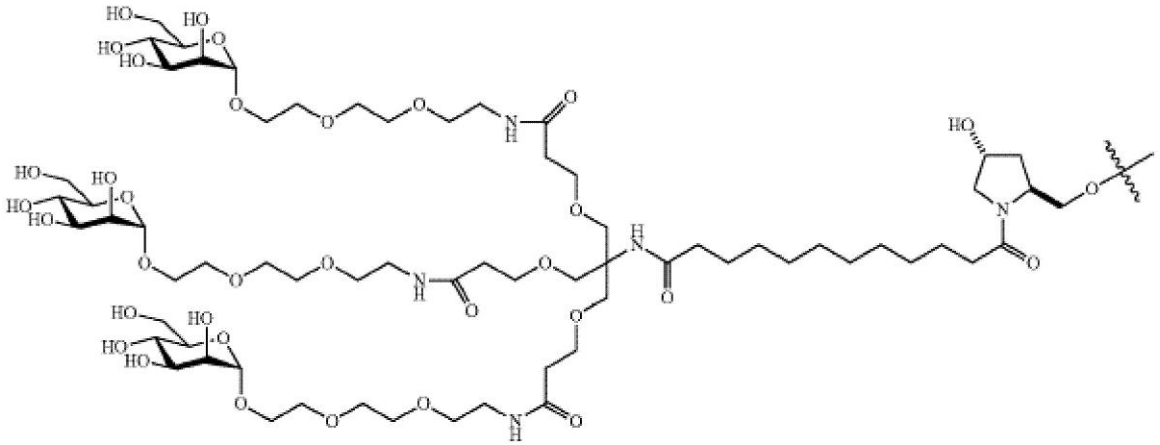
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、以下の構造の単量体を

含む：

【化１２６】



または



上述のリガンドおよび単量体の合成は、例えば、米国特許第８，１０６，０２２号に記述されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０６０２】

特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）にコンジュゲートされるリガンドのうち少なくとも一つは、親油性部分である。

【０６０３】

「脂溶性」または「親油性部分」という用語は、脂質に対して親和性を有する任意の化合物または化学部分を広く意味する。親油性部分の親油性を特徴付ける方法の一つは、オクタノール－水分配係数ｌｏｇＫｏｗによるものであり、この場合Ｋｏｗは、平衡状態にある二相系のうちの水相の化学物質の濃度に対するオクタノール相の化学物質の濃度の比である。オクタノール－水分配係数は、物質の実験室測定される特性である。しかしながら、それは、第一原理または経験的方法を使用して算出される化学物質の構造成分に起因する係数を使用することによっても予想され得る（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｔｅｔｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｆ．Ｃｏｍｐｕｔ．Ｓｃｉ．４１：１４０７－２１（２００１）を参照）。これは、水よりもむしろ非水性又は油性環境を好む物質の傾向の熱力学的尺度（すなわち、その親水性／親油性バランス）をもたらす。原則として、化学物質は、そのｌｏｇＫｏｗが０を超える場合、性質が親油性である。典型的には、親油性部分は、１を超える、１．５を超える、２を超える、３を超える、４を超える、５を超える、または１０を超える、ｌｏｇＫｏｗをもつ。例えば、６－アミノヘキサノールのｌｏｇＫｏｗは、例えばおよそ０．７であると予測される。同じ方法を使用することにより、Ｎ－（ヘキサン－６－オール）カルバミン酸コレステリルのｌｏｇＫｏｗは、１０．７であると予測される。

【０６０４】

分子の親油性は、分子が有する官能基に応じて変化し得る。例えば、親油性部分の末端にヒドロキシル基又はアミン基を付加することにより、親油性部分の分配係数（例えば、

ｌｏｇＫｏｗ）の値が増加又は減少し得る。

【０６０５】

あるいは、一つ以上の親油性部分にコンジュゲートされる複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）の疎水性は、そのタンパク質結合特性によって測定され得る。例えば、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の血漿タンパク質結合アッセイにおける非結合画分は、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の相対的な疎水性に正に相関すると決定することができる。つまり、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤のサイレンシング活性に正に相関し得る。

【０６０６】

一つの実施形態では、決定される血漿タンパク質結合アッセイは、ヒト血清アルブミンタンパク質を使用する電気泳動移動度シフトアッセイ（ＥＭＳＡ）である。エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の疎水性は、結合アッセイにおいて、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の非結合画分によって測定され、０．１５を超え、０．２を超え、０．２５を超え、０．３を超え、０．３５を超え、０．４を超え、０．４５を超え、または０．５を超えて、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）のインビボでの送達が強化される。

【０６０７】

したがって、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）の内部位置に親油性部分をコンジュゲートすることによって、最適な疎水性が提供され、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）のインビボ送達が強化される。

【０６０８】

特定の実施形態では、親油性部分は、脂肪族、環式、例えば脂環式、または多環式、例えば、多脂環式化合物、例えばステロイド（例えば、ステロール）または直鎖状もしくは分枝状の脂肪族炭化水素である。親油性部分は一般に、環状または非環状であり得る炭化水素鎖を含み得る。炭化水素鎖は、様々な置換基、および／または酸素もしくは窒素原子などの一つ以上のヘテロ原子を含んでもよい。そのような親油性脂肪族部分としては限定されないが、飽和または不飽和のＣ４－Ｃ３０炭化水素（例えば、Ｃ６－Ｃ１８炭化水素）、飽和または不飽和の脂肪酸、ワックス（例えば、脂肪酸の一価アルコールエステルおよび脂肪酸ジアミド）、テルペン（例えば、Ｃ１０テルペン、Ｃ１５セスキテルペン、Ｃ２０ジテルペン、Ｃ３０トリテルペン、およびＣ４０テトラテルペン）、ならびに他の多脂環式炭化水素が挙げられる。例えば、親油性部分は、Ｃ４－Ｃ３０炭化水素鎖（例えば、Ｃ４－Ｃ３０アルキルまたはアルケニル）を含有してもよい。一部の実施形態では、親油性部分は、飽和または不飽和のＣ６－Ｃ１８炭化水素鎖（例えば、直鎖Ｃ６－Ｃ１８アルキルまたはアルケニル）を含有する。一つの実施形態では、親油性部分は、飽和または不飽和のＣ１６炭化水素鎖（例えば、直鎖Ｃ１６アルキルまたはアルケニル）を含有する。

【０６０９】

親油性部分は、例えば、ヒドロキシ基（例えば、－ＣＯ－ＣＨ２－ＯＨ）など、親油性部分に既に存在する官能基、またはまたはエフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）もしくはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤に導入される官能基を介するなど、当分野に公知の任意の方法により、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤に結合され得る。親油性部分に既に存在する官能基、またはエフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）もし

くはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤に導入される官能基としては限定されないが、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、スルホン酸塩、リン酸塩、チオール、アジド、およびアルキンが挙げられる。

【０６１０】

エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤と親油性部分のコンジュゲーションは、例えば、ヒドロキシとアルキル基Ｒ－、アルカノイル基ＲＣＯ－、または置換カルバモイル基ＲＮＨＣＯ－との間のエーテルまたはカルボン酸またはカルバモイルのエステル結合の形成を介して生じ得る。アルキル基Ｒは、環式（例えば、シクロヘキシル）または非環式（例えば、直鎖または分枝鎖、および飽和または不飽和）であってもよい。アルキル基Ｒは、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、またはオクタデシル基などであってもよい。

【０６１１】

一部の実施形態では、親油性部分は、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン、アミド、マレイミド－チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド結合、クリック反応の生成物（例えば、アジド－アルキン付加環化からのトリアゾール）、またはカルバミン酸塩を含有するリンカーを介して、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤にコンジュゲートされる。

【０６１２】

別の実施形態では、親油性部分はステロイド、例えばステロールである。ステロイドは、ペルヒドロ－１，２－シクロペンタノフェナントレン環系を含有する多環式化合物である。ステロイドには、胆汁酸（例えば、コール酸、デオキシコール酸、およびデヒドロコール酸）、コルチゾン、ジゴキシゲニン、テステステロン、コレステロール、およびコルチゾンなどのカチオン性ステロイドが含まれるが、これらに限定されない。「コレステロール誘導体」は、例えば、置換基の置換、付加、または除去による、コレステロールに由来する化合物を指す。

【０６１３】

別の実施形態では、親油性部分は芳香族部分である。この文脈では、「芳香族」という用語は、単芳香族および多芳香族炭化水素を広く指す。芳香族基としては、一から三個の芳香族環を含むＣ$_6$－Ｃ$_{14}$アリール部分であって、随意に置換されていてもよいＣ$_6$－Ｃ$_{14}$アリール部分と、アルキル基に共有結合されたアリール基を含む「アラルキル」または「アリールアルキル」基であって、そのいずれもが独立して随意に置換されていても置換されていなくてもよい「アラルキル」または「アリールアルキル」基と、および「ヘテロアリール」基と、が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」という用語は、５～１４個の環原子、好ましくは５、６、９、または１０個の環原子を有する基、環状配列で共有される６、１０、または１４πの電子を有する基、および炭素原子に加えて、窒素（Ｎ）、酸素（Ｏ）、および硫黄（Ｓ）からなる群から選択される一から約三個のヘテロ原子を有する基を指す。

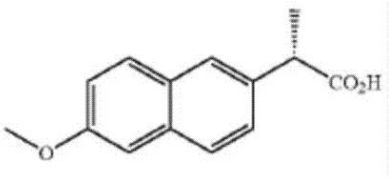
【０６１４】

本明細書で用いられる場合、「置換」アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、または複素環式基は、一から約四個、好ましくは一から約三個、より好ましくは一または二個の非水素置換基を有するものである。好適な置換基としては、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、ハロアルキル、アルキル、アルカリル、アリール、アラルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アミノ、アシルアミノ、アルキルカルバモイル、アリールカルバモイル、アミノアルキル、アルコキシカルボニル、カルボキシ、ヒドロキシアルキル、アルカンスルホニル、アレーンスルホニル、アルカンスルホンアミド、アレーンスルホンアミド、アラルキルスルホンアミド、アルキルカルボニル、アシルオキシ、シアノ、およびウレイド基が挙げられるが、これらに限定されない。

【０６１５】
一部の実施形態では、親油性部分は、アラルキル基、例えば、２－アリールプロパノイル部分である。アラルキル基の構造的特徴は、親油性部分がインビボで少なくとも一つのタンパク質に結合するように選択される。特定の実施形態では、アラルキル基の構造的特徴は、親油性部分が血清、血管、または細胞タンパク質に結合するように選択される。特定の実施形態では、アラルキル基の構造的特徴は、アルブミン、免疫グロブリン、リポタンパク質、α－２－マクログルブリン、またはα－１－糖タンパク質への結合を促進する。

【０６１６】
特定の実施形態では、リガンドは、ナプロキセンまたはナプロキセンの構造誘導体である。ナプロキセンの合成手順は、米国特許第３，９０４，６８２号、および米国特許　第４，００９，１９７号に見出すことができ、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ナプロキセンは、化学名（Ｓ）－６－メトキシ－α－メチル－２－ナフタレン酢酸を有し、構造は、

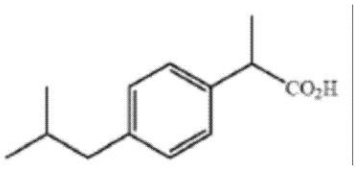
【化１２７】



である。

【０６１７】
特定の実施形態では、リガンドは、イブプロフェンまたはイブプロフェンの構造誘導体である。イブプロフェンの合成手順は、米国特許第　第３，２２８，８３１号に見出すことができ、当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。イブプロフェンの構造は

【化１２８】



である。

【０６１８】
追加の例示的なアラルキル基は、米国特許第７，６２６，０１４号に示されており、当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。

【０６１９】
別の実施形態では、好適な親油性部分は、脂質、コレステロール、レチノイン酸、コール酸、アダマンタン酢酸、１－ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、１，３－ｂｉｓ－Ｏ（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキサノール（ｇｅｒａｎｙｌｏｘｙｈｅｘｙａｎｏｌ）、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、１，３－プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、Ｏ３－（オレオイル）リトコール酸、Ｏ３－（オレオイル）コレン酸（（ｏｌｅｏｙｌ）ｃｈｏｌｅｎｉｃ　ａｃｉｄ）イブプロフェン、ナプロキセン、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジンを含む。

【０６２０】
一部の実施形態では、前記親油性部分は、Ｃ６－Ｃ３０酸（例えば、ヘキサン酸、ヘプタン酸、オクタン酸、ノナン酸、デカン酸、ウンデカン酸、ドデカン酸、トリデカン酸、テトラデカン酸、ペンタデカン酸、ヘキサデカン酸、ヘプタデカン酸、オクタデカン酸、

オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、シス－４，７，１０，１３，１６，１９－ドコサヘキサン酸、ビタミンＡ、ビタミンＥ、コレステロールなど）またはC_6－C_{30}アルコール（例えば、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドドカノール、トリデカノール、テトラデカノール、ペンタデカノール、ヘキサデカノール、ヘプタデカノール、オクタデカノール、オレイルアルコール、リノレイルアルコール、アラキドン酸アルコール、シス－４，７，１０，１３，１６，１９－ドコサヘキサノール、レチノール、ビタミンＥ、コレステロールなど）である。一例では、親油性部分は、ドコサヘキサエン酸である。

【０６２１】

特定の実施形態では、特に親油性部分の親油性が低い場合、または疎水性が低い場合、複数の親油性部分を、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）に組み込んでもよい。一つの実施形態では、二つ以上の親油性部分が、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の同じ鎖に組み込まれる。一つの実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の各鎖は、組み込まれた一つ以上の親油性部分を有する。一つの実施形態では、二つ以上の親油性部分は、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の同じ位置（すなわち、同じ核酸塩基、同じ糖部分、または同じヌクレオシド間結合）に組み込まれる。これは、例えば、担体を介して二つ以上の親油性部分をコンジュゲートすること、および／または分岐リンカーを介して二つ以上の親油性部分をコンジュゲートすること、および／または一つ以上のリンカーを介して二つ以上の親油性部分と、親油性部分を連続的に結合する一つ以上のリンカーとをコンジュゲートすること、によって達成することができる。

【０６２２】

親油性部分は、ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤のリボ糖への直接結合を介して、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤にコンジュゲートされてもよい。あるいは、親油性部分は、リンカーまたは担体を介して、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤にコンジュゲートされてもよい。

【０６２３】

特定の実施形態では、親油性部分は、一つ以上のリンカー（テザー）を介して、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤にコンジュゲートされてもよい。

【０６２４】

一つの実施形態では、親油性部分は、エーテル、チオエーテル、尿素、炭酸塩、アミン、アミド、マレイミド－チオエーテル、ジスルフィド、ホスホジエステル、スルホンアミド結合、クリック反応の生成物（例えば、アジド－アルキン付加環化からのトリアゾール）、またはカルバミン酸塩を含有するリンカーを介して、エフェクター分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤にコンジュゲートされる。

【０６２５】

定義

特定の定義が提供されない限り、本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに医薬および薬化学に関連して使用される技術用語、ならびにそれらの手順および技術は、当分野で公知であり、一般的に使用されるものである。標準的な技術は、化学合成および化学分析に使用され得る。特定のかかる技術および手順は、例えば、ＳａｎｇｖｉおよびＰｏｎｇｖｉによって編集された“Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ　ｉｎ　Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ”、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，１９９４；“Ｒｅｍ

ｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，”Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１８ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９０；ならびにＳｔａｎｌｅｙ Ｔ．Ｃｒｏｏｋｅにより編集された“Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｄｒｕｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ，ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ”、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａ．；ならびにＳａｍｂｒｏｏｋらによる“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，”2nd Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９に見出され得る。それら文献は、すべての目的に対し、参照により本明細書に組み込まれる。許容される場合、本開示全体を通して参照されるすべての特許、出願、公開出願、ならびに他の刊行物および他のデータは、参照によりその全体が組み込まれる。

【０６２６】

別段の示唆がない限り、以下の用語は、以下の意味を有する。

【０６２７】

本明細書で使用される場合、「標的核酸」という用語は、その発現または活性がｓｉＲＮＡ化合物によって調節され得る任意の核酸分子を指す。標的核酸としては限定されないが、標的タンパク質をコードするＤＮＡから転写されたＲＮＡ（限定されないが、ｐｒｅ－ｍＲＮＡおよびｍＲＮＡまたはその一部を含む）、ならびにかかるＲＮＡに由来するｃＤＮＡ、およびｍｉＲＮＡが挙げられる。例えば、標的核酸は、その発現が特定の障害または疾患状態と関連している細胞遺伝子（または遺伝子から転写されたｍＲＮＡ）であってもよい。一部の実施形態では、標的核酸は、感染性病原体由来の核酸分子であってもよい。

【０６２８】

本明細書で使用される場合、「標的配列」または「標的ＲＮＡ配列」という用語は、一次転写産物のＲＮＡプロセシングの産物であるｍＲＮＡを含む、標的遺伝子または他の制御因子の転写中に形成されるＲＮＡ分子のヌクレオチド配列の連続的な部分を指す。一つの実施形態においては、配列の標的部分は、少なくとも、標的遺伝子の転写中に形成されるｍＲＮＡ分子のヌクレオチド配列の一部で、またはその近傍で、ＲＮＡｉ指向性切断のための基質としての機能を果たすのに充分な長さである。一つの実施形態では、標的配列は、標的遺伝子のタンパク質コード領域内にある。別の実施形態では、標的配列は、標的遺伝子の３’ＵＴＲ以内にある。

【０６２９】

標的配列は、長さが約９～３６ヌクレオチド、例えば、長さが約１５～３０ヌクレオチドであり得る。例えば、標的配列は、約１５～３０ヌクレオチド、１５～２９、１５～２８、１５～２７、１５～２６、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１８～３０、１８～２９、１８～２８、１８～２７、１８～２６、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１９～３０、１９～２９、１９～２８、１９～２７、１９～２６、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～３０、２０～２９、２０～２８、２０～２７、２０～２６、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～３０、２１～２９、２１～２８、２１～２７、２１～２６、２１～２５、２１～２４、２１～２３、または２１～２２ヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態では、標的配列は、長さが約１９～約３０ヌクレオチドである。他の実施形態では、標的配列は、長さが約１９～約２５ヌクレオチドである。さらに他の実施形態では、標的配列は、長さが約１９～約２３ヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的配列は、長さが約２１～約２３ヌクレオチドである。上記に列記した範囲および長さの間に存在する範囲および長さもまた、本開示の一部であることを意図している。

【０６３０】

本明細書において使用する場合、用語「配列を含む鎖」は、標準的なヌクレオチドの用

語体系を使用して言及される配列によって説明するヌクレオチドの鎖を含むオリゴヌクレオチドを指す。

【０６３１】

「Ｇ」、「Ｃ」、「Ａ」、「Ｔ」、および「Ｕ」はそれぞれ、概して、修飾ヌクレオチドまたは未修飾ヌクレオチドの文脈において、それぞれ、塩基としてのグアニン、シトシン、アデニン、チミジン、およびウラシルを含むヌクレオチドを表す。しかしながら、「リボヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」という用語は、以下においてより詳述されるような修飾ヌクレオチド、又は代替置換部分（例えば、表１を参照）も指し得ることが理解されよう。当業者であれば、グアニン、シトシン、アデニン、チミジン、及びウラシルが、そのような置換部分を担持するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対合特性を実質的に改変することなく、他の部分で代置できることを十分に認識する。例えば、これらに限定されるものではないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシンまたはウラシルを含むヌクレオチドと塩基対合することができる。したがって、ウラシル、グアニン、またはアデニンを含むヌクレオチドは、本開示において取り上げるｄｓＲＮＡのヌクレオチド配列において、例えばイノシンを含むヌクレオチドで置換することができる。別の実施例では、オリゴヌクレオチド内のいずれの場所にあるアデニン及びシトシンも、標的ｍＲＮＡと塩基対合するＧ－Ｕ　Ｗｏｂｂｌｅを形成するために、それぞれグアニン及びウラシルで代置することができる。そのような置換部分を含む配列は、本開示において取り上げる組成物及び方法にとって好適である。

【０６３２】

本明細書で使用される場合、「ｉＲＮＡ」という用語は、ＲＮＡ転写物の標的切断を介在する剤を指す。これらの剤は、ＲＮＡｉ誘導型サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）として知られる細胞質の複数タンパク質の複合体と会合する。ＲＮＡ干渉の誘導に有効な剤は、本明細書においてｓｉＲＮＡ、ＲＮＡｉ剤、またはｉＲＮＡ剤とも称される。したがって、これらの用語は、本明細書において相互交換可能に使用され得る。本明細書で使用される場合、ｉＲＮＡという用語は、マイクロＲＮＡおよびｐｒｅ－マイクロＲＮＡを含む。さらに、本明細書で使用される場合、化合物とは、ｉＲＮＡ剤も指し、ｉＲＮＡ剤と相互交換可能に使用され得る。

【０６３３】

ｉＲＮＡ剤は、標的遺伝子に対して充分に相同な領域を含まなければならず、およびヌクレオチドに関して充分な長さでなければならず、それによって、ｉＲＮＡ剤またはその断片は、標的遺伝子の下方制御を介在することができる。（説明を容易にするために、ヌクレオチドまたはリボヌクレオチドという用語は、本明細書において、ｉＲＮＡ剤の一つ以上の単量体サブユニットに関連して使用される場合がある。本明細書では、「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語の使用は、修飾ＲＮＡまたはヌクレオチド代理物の場合において、修飾ヌクレオチド、または一つ以上の位置での代理置換部分をも指し得ることが理解される）。したがって、ｉＲＮＡ剤は、標的ＲＮＡに対して少なくとも部分的に、および一部の実施形態では完全に相補的である領域であるか、またはそれを含む。ｉＲＮＡ剤と標的との間に完全な相補性がある必要はないが、一致は、例えば、ｍＲＮＡなどの標的ＲＮＡのＲＮＡｉ切断による配列特異的なサイレンシングをｉＲＮＡ剤またはその切断産物が誘導するのに充分でなければならない。標的鎖との相補性、または相同性の程度は、アンチセンス鎖において最も重要である。特にアンチセンス鎖において、完全な相補性が望ましいことが多いが、一部の実施形態では、特にアンチセンス鎖において、一つ以上、または例えば、６、５、４、３、２、またはより少ないミスマッチ（標的ＲＮＡに対して）を含み得る。センス鎖は、アンチセンス鎖と充分に相補的であるだけで、分子の全体の二本鎖特性が維持される。

【０６３４】

ｉＲＮＡ剤としては、インターフェロン応答を誘導するのに充分な長さ（Ｄｉｃｅｒによって切断され得る（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．２００１．Ｎａｔｕｒｅ，４０９：３６３－３６６）であり、ＲＩＳＣ（ＲＮＡｉ誘導性サイレンシング複合体）に入る

分子；ならびに充分に短く、インターフェロン応答を誘導しない分子（その分子も、Ｄｉｃｅｒによって切断され、および／またはＲＩＳＣに入ることができる）、例えば、Ｄｉｃｅｒ切断産物に似た分子など、ＲＩＳＣに入ることができるサイズの分子、が挙げられる。充分に短く、インターフェロン応答を誘導しない分子は、本明細書において、ｓｉＲＮＡ剤または短いｉＲＮＡ剤と呼ばれる。本明細書において使用される場合、「ｓｉＲＮＡ剤または短いｉＲＮＡ剤」とは、充分に短く、ヒト細胞において有害なインターフェロン応答を誘導しない、例えば、６０、５０、４０、または３０ヌクレオチド対未満の二本鎖領域を有する、二本鎖ＲＮＡ剤または一本鎖剤などのｉＲＮＡ剤を指す。ｓｉＲＮＡ薬剤またはその切断産物は、例えば、標的ＲＮＡに対してＲＮＡｉを誘導することによって、標的遺伝子を下方調節することができ、この場合において標的は、内因性または病原性の標的ＲＮＡを含んでもよい。

【０６３５】

本明細書で使用される場合、「一本鎖ｉＲＮＡ剤」は、一つの分子から構成されるｉＲＮＡ剤である。一本鎖ｉＲＮＡ剤は、鎖内での対形成により形成される二本鎖領域を含んでもよく、例えば、ヘアピン構造またはパン－ハンドル構造であってもよく、またはそれを含んでもよい。一本鎖ｉＲＮＡ剤は、標的分子に対してアンチセンスであってもよい。一本鎖ｉＲＮＡ剤は、ＲＩＳＣに進入し、標的ｍＲＮＡのＲＩＳＣ介在性切断に関与することができるほどに充分に長くてもよい。一本鎖ｉＲＮＡ剤は、少なくとも１４、他の実施形態では、少なくとも１５、２０、２５、２９、３５、４０、または５０ヌクレオチドの長さである。特定の実施形態では、一本鎖ｉＲＮＡ剤は、２００、１００、または６０ヌクレオチド未満の長さである。

【０６３６】

ループとは、ｉＲＮＡ鎖のある区分が、別の鎖と、または同じ鎖の別の区分と塩基対形成する場合、二本鎖の対向するヌクレオチドと対形成しないｉＲＮＡ鎖の領域を指す。

【０６３７】

ヘアピンｉＲＮＡ剤は、少なくとも１７、１８、１９、２９、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド対、またはそれと等しい二本鎖領域を有する。二本鎖領域は、長さが２００、１００、または５０以下であってもよい。特定の実施形態では、二本鎖領域の範囲は、１５～３０、１７～２３、１９～２３、および１９～２１ヌクレオチド対の長さである。ヘアピンは、一部の実施形態では３’に、特定の実施形態ではヘアピンのアンチセンス側上に、一本鎖のオーバーハング、または末端非対形成領域を有してもよい。一部の実施形態では、オーバーハングは、２～３ヌクレオチドの長さである。

【０６３８】

本明細書で使用される場合、「二本鎖（ｄｓ）ｉＲＮＡ剤」は、二つ以上の、一部の例では二つの鎖を含むｉＲＮＡ剤であり、当該鎖では、鎖間ハイブリダイゼーションによって二本鎖構造の領域が形成され得る。

【０６３９】

本明細書で使用される場合、「ｓｉＲＮＡ活性」および「ＲＮＡｉ活性」という用語は、ｓｉＲＮＡによる遺伝子サイレンシングを指す。

【０６４０】

一つの実施形態では、本開示のＲＮＡｉ剤は、一つ以上の一本鎖ＲＮＡｉ分子（例えば、エフェクター分子）を含み、当該分子のそれぞれが、例えば標的ｍＲＮＡ配列などの標的ＲＮＡ配列と相互作用して、標的ＲＮＡの切断を誘導する。理論に拘束されることを望むものではないが、細胞内に導入される長い二本鎖ＲＮＡは、Ｄｉｃｅｒとして知られるＩＩＩ型エンドヌクレアーゼによって、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）へと分解されると考えられている（Ｓｈａｒｐ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．１５：４８５）。ＤｉｃｅｒであるリボヌクレアーゼＩＩＩ様酵素は、これらｄｓＲＮＡを、特徴的な二つの塩基の３’オーバーハングを有する１９～２３塩基対の低分子干渉ＲＮＡへとプロセシングする（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ，ｅｔ　ａｌ．，（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　４０９：３６３）。その後これらｓｉＲＮＡ

は、ＲＮＡ誘導型サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）に組み込まれ、そこで一つ以上のヘリカーゼがｓｉＲＮＡ二本鎖を解き、それによって相補的アンチセンス鎖に対して標的認識を誘導することが可能になる（Ｎｙｋａｎｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，（２００１）Ｃｅｌｌ　１０７：３０９）。適切な標的ｍＲＮＡに結合すると、ＲＩＳＣ内の一つ以上のエンドヌクレアーゼは、標的を切断してサイレンシングを誘導する（Ｅｌｂａｓｈｉｒ，ｅｔ　ａｌ．，（２００１）Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．１５：１８８）。すなわち、一態様では、本開示は、細胞内において生成されて、かつＲＩＳＣ複合体の形成を促進して標的遺伝子のサイレンシングを行うものである、一本鎖ＲＮＡ（ｓｓＲＮＡ）（ｓｉＲＮＡ二本鎖のアンチセンス鎖）に関する。したがって、用語「ｓｉＲＮＡ」は、上記において説明したＲＮＡｉも意味するために本明細書において使用される。特定の実施形態では、本開示の複数標的分子の一つ以上のｄｓＲＮＡは、個別のｓｉＲＮＡである（例えば、本開示の複数標的分子の個別のｄｓＲＮＡを一緒に結合する、リンカーの非存在下、またはリンカーの切断後）。

【０６４１】

別の実施形態では、ＲＮＡｉ剤は、標的ｍＲＮＡを阻害するために細胞又は有機体に導入された一本鎖ＲＮＡであってもよい。一本鎖ＲＮＡｉ剤は、ＲＩＳＣエンドヌクレアーゼであるアルゴノート２に結合し、それは次いで、標的ｍＲＮＡを切断する。一本鎖ｓｉＲＮＡは、概して、１５～３０ヌクレオチドであり、化学的に修飾されている。一本鎖ＲＮＡの設計および試験は、米国特許第８，１０１，３４８号およびＬｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１２）Ｃｅｌｌ　１５０：８８３－８９４に記載されており、そのそれぞれの内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において記載するアンチセンスヌクレオチド配列はいずれも、本明細書において記載する一本鎖ｓｉＲＮＡとして、又はＬｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１２）Ｃｅｌｌ　１５０：８８３－８９４に記載される方法によって化学的に修飾されるような一本鎖ｓｉＲＮＡとして使用されてもよい。特定の実施形態では、本開示の複数標的分子の一つ以上のｄｓＲＮＡは、個別の一本鎖ＲＮＡである（例えば、本開示の複数標的分子の個別のｄｓＲＮＡを一緒に結合する、リンカーの非存在下、またはリンカーの切断後）。

【０６４２】

本明細書で使用される場合、「ｓｃｉＲＮＡ」という用語は、小さな環状ｉＲＮＡ剤を指し、環状または実質的に環状の構造を有する少なくとも一つの鎖（例えば、センス鎖）を有し、一方で他方の鎖（例えば、アンチセンス鎖）は、直鎖構造を有し得、環状または実質的に環状の構造を有する鎖にアニーリングされる。あるいは、ｓｃｉＲＮＡは、環状または実質的に環状のアンチセンス鎖と、環状または実質的に環状のアンチセンス鎖にアニーリングされる直鎖状のセンス鎖とを有し得る。また、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方が、環状または実質的に環状の構造を有することも可能である。

【０６４３】

「ｓｃｉＲＮＡ」、「ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ」、および「複数標的ｓｃｉＲＮＡ分子」という用語は、本開示のｓｃｉＲＮＡを指すために、本明細書において相互交換可能に使用され得る。

【０６４４】

本明細書で使用される場合、ＲＮＡ干渉分子による「遺伝子サイレンシング」とは、標的遺伝子に関し、細胞において、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、および１００％以下、ならびにｍＲＮＡまたはＲＮＡ干渉分子の非存在下での細胞において存在するｍＲＮＡレベルの間の任意の整数を含む、ｍＲＮＡレベルの減少を指す。好ましい一つの実施形態では、ｍＲＮＡレベルは、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、および１００％以下、ならびに５％～１００％の任意の整数まで減少する。

【０６４５】

本明細書で使用される場合、「遺伝子発現を調節する」という用語は、遺伝子の発現、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードするＲＮＡ分子または同等のＲＮＡ分子のレベルが上方制御または下方制御され、それによって発現、レベル、または活性が、調節因子の非存在下で観察されるレベルよりも高い、または低いことを意味する。例えば、「調節する」という用語は、「阻害する」という意味でもあり得るが、「調節する」という文言の使用は、この定義に限定されない。

【０６４６】

本明細書で使用される場合、遺伝子発現調節は、遺伝子の発現、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードするＲＮＡ分子または同等のＲＮＡ分子のレベルが、ｓｉＲＮＡの非存在下で観察されるレベルとは少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、またはそれ以上異なる場合に発生する。％および／または倍率の差は、対照または非対照に対して計算することができ、例えば、以下である：

$$\text{差異\%} = \frac{[\text{siRNAを用いた発現} - \text{siRNAを用いない発現}]}{\text{siRNA伴わない発現}}$$

または

$$\text{差異\%} = \frac{[\text{siRNAを用いた発現} - \text{siRNAを用いない発現}]}{\text{siRNA伴わない発現}}$$

【０６４７】

本明細書で使用される場合、遺伝子排出に関連して、「阻害する」、「下方制御する」または「低下する」という用語は、遺伝子の発現、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードするＲＮＡ分子のレベルまたは同等のＲＮＡ分子のレベル、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの活性が、調節因子の非存在下で観察されるレベルよりも低いことを意味する。遺伝子発現は、遺伝子の発現、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードするＲＮＡ分子または同等のＲＮＡ分子のレベル、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの活性が、対応する非調節の対照と比較して、少なくとも１０％低い場合、好ましくは少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、または最も好ましくは１００％（すなわち、遺伝子発現なし）低い場合に、下方制御される。

【０６４８】

本明細書で使用される場合、遺伝子排出に関連して、「増加する」または「上方制御する」という用語は、遺伝子の発現、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードするＲＮＡ分子のレベルまたは同等のＲＮＡ分子のレベル、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの活性が、調節因子の非存在下で観察されるレベルよりも増加していることを意味する。遺伝子発現は、遺伝子の発現、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットをコードするＲＮＡ分子または同等のＲＮＡ分子のレベル、または一つ以上のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの活性が、対応する非調節の対照と比較して、少なくとも１０％増加している場合、好ましくは少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、１００％、１．１倍、１．２５倍、１．５倍、１．７５倍、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、５０倍、１００倍、またはそれ以上増加している場合に、上方制御される。

【０６４９】

「増加した」または「増加する」という用語は概して、本明細書において使用される場合、統計的に有意な量までの増加を意味し、疑義を回避するためには、「増加した」とは、基準レベルと比較して少なくとも１０％の増加、例えば、基準レベルと比較して少なくとも約２０％、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少

なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％、もしくは１００％までの増加、もしくは１０～１００％の間の任意の増加、または基準レベルと比較して少なくとも約２倍、もしくは少なくとも約３倍、もしくは少なくとも約４倍、もしくは少なくとも約５倍、もしくは少なくとも約１０倍の増加、または２倍～１０倍以上の間の任意の増加を意味する。

【０６５０】

本明細書で使用される場合、「低下した」または「低下する」という用語は、統計的に有意な量までの減少を意味する。しかしながら、疑義を回避するためには、「低下した」とは、基準レベルと比較して少なくとも１０％の減少を意味し、例えば、基準レベルと比較して少なくとも約２０％、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％、もしくは１００％の減少（すなわち、基準サンプルと比較して、存在しないレベル）、または１０～１００％の任意の減少を意味する。

【０６５１】

「オフターゲット」という用語および「オフターゲット効果」という語句は、所与の標的に対するエフェクター分子が、別の標的配列、ＤＮＡ配列、もしくは細胞タンパク質、または他の部分と直接的、または間接的に相互作用することによって、意図しない影響を引き起こす任意の事例を指す。例えば、「オフターゲット効果」は、他の転写物と、ｓｉＲＮＡのセンス鎖および／またはアンチセンス鎖との間に部分的な相同性または相補性があるために、他の転写物が同時に分解される場合に発生し得る。

【０６５２】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」という用語は、核酸塩基および糖を含むグリコシルアミンを意味する。ヌクレオシドとしては、限定されないが、天然起源ヌクレオシド、非塩基ヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、ならびに模倣塩基および／または糖基を有するヌクレオシドが挙げられる。

【０６５３】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、核酸塩基と、糖に共有結合されたリン酸基を有する糖、を含む、グリコシルアミンを指す。ヌクレオチドは、様々な置換基のいずれを用いて修飾されてもよい。

【０６５４】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基：という用語は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの塩基部分を指す。核酸塩基は、別の核酸の塩基に水素結合することができる任意の原子または原子群を含んでもよい。

【０６５５】

本明細書で使用される場合、「複素環式塩基部分」という用語は、複素環を含む核酸塩基を指す。

【０６５６】

本明細書で使用される場合、「オリゴマー化合物」という用語は、二つ以上の下位構造を含み、核酸分子の領域にハイブリダイズすることができるポリマー構造を指す。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオシドである。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、アンチセンス化合物である。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、解毒（ａｎｔｉｄｏｔｅ）化合物である。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、コンジュゲート基を含む。

【０６５７】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオシド」とは、ヌクレオシド間結合がリン原子を含まないオリゴヌクレオチドを指す。

【０６５８】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、複数の結合ヌクレオシドを含むオリゴマー化合物を指す。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの一個以上のヌクレオチドが、修飾される。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リボ核酸（ＲＮＡ）またはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、天然および／または非天然の核酸塩基、糖、ならびに共有結合性のヌクレオシド間結合から構成され、さらに非核酸コンジュゲートを含んでもよい。

【０６５９】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド間結合」とは、隣接するヌクレオシド間の共有結合を指す。

【０６６０】

本明細書で使用される場合、「天然に存在するヌクレオシド間結合」とは、３’～５’ホスホジエステル結合を指す。

【０６６１】

本明細書で使用される場合、「ｓｉＲＮＡ活性の検出」または「ｓｉＲＮＡ活性の測定」という用語は、ｓｉＲＮＡ活性を検出または測定するための試験が、特定の試料で実施され、対照試料のそれと比較されることを意味する。そのような検出および／または測定は、ゼロの値を含み得る。したがって、ｓｉＲＮＡ活性を検出するための試験の結果が、ｓｉＲＮＡ活性がないという所見（ｓｉＲＮＡ活性はゼロ）であった場合でも、「ｓｉＲＮＡ活性を検出する」工程は実施されたこととなる。

【０６６２】

本明細書で使用される場合、「対照試料」という用語は、被験化合物またはレポーターオリゴマー化合物と接触していない試料を指す。

【０６６３】

本明細書で使用される場合、「モチーフ」という用語は、オリゴマー化合物中の非修飾ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドのパターンを指す。

【０６６４】

本明細書で使用される場合、「キメラオリゴマー」という用語は、同じオリゴマー化合物内の少なくとも他の糖、核酸塩基、またはヌクレオシド間結合と比較して、異なる修飾がされた糖、核酸塩基、またはヌクレオシド間結合を少なくとも一つ有するオリゴマー化合物を指す。糖、核酸塩基、およびヌクレオシド間結合の残りの部分は独立して、修飾されてもよく、または修飾されなくてもよく、同一であっても異なっていてもよい。

【０６６５】

本明細書で使用される場合、「キメラオリゴヌクレオチド」という用語は、同じオリゴヌクレオチド内の少なくとも他の糖、核酸塩基、またはヌクレオシド間結合と比較して、異なる修飾がされた糖、核酸塩基、またはヌクレオシド間結合を少なくとも一つ有するオリゴヌクレオチドを指す。糖、核酸塩基、およびヌクレオシド間結合の残りの部分は独立して、修飾されてもよく、または修飾されなくてもよく、同一であっても異なっていてもよい。

【０６６６】

本明細書で使用される場合、「混合型骨格オリゴマー化合物」という用語は、オリゴマー化合物の少なくとも一つのヌクレオシド間結合が、当該オリゴマー化合物の少なくとも一つの他のヌクレオシド間結合とは異なっているオリゴマー化合物を指す。

【０６６７】

本明細書で使用される場合、「標的タンパク質」という用語は、その調節が望まれているタンパク質を指す。

【０６６８】

本明細書で使用される場合、「標的遺伝子」という用語は、標的タンパク質をコードする遺伝子を指す。

【０６６９】

本明細書で使用される場合、「標的化」または「～を標的とする」という用語は、本明

細書に開示される複数標的分子のエフェクター分子（例えば、ｓｉＲＮＡエフェクター分子）のアンチセンス鎖と、特定の標的核酸分子、または標的核酸分子内の特定のヌクレオチド領域との関連付けを指す。

【０６７０】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基の相補性」という用語は、別の核酸塩基と塩基対形成することができる核酸塩基を指す。例えば、ＤＮＡでは、アデニン（Ａ）は、チミン（Ｔ）に対して相補的である。例えば、ＲＮＡでは、アデニン（Ａ）は、ウラシル（Ｕ）に対して相補的である。特定の実施形態では、相補的な核酸塩基とは、その標的核酸の核酸塩基と塩基対形成することができるアンチセンス化合物の核酸塩基を指す。例えば、アンチセンス化合物の特定の位置の核酸塩基が、標的核酸の特定の位置の核酸塩基と水素結合することができる場合、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の水素結合の位置は、その核酸塩基対で相補的であるとみなされる。

【０６７１】

複数標的分子（例えば、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡは、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成するのに充分に相補的である二つのオリゴヌクレオチド鎖を含む。概して、二本鎖構造は、１５～３０、より一般的には１８～２５、更により一般的には１９～２４、最も一般的には１９～２１塩基対の長さである。一部の実施形態では、２５～３０塩基対の長さのより長い二本鎖ｉＲＮＡが好ましい。一部の実施形態では、１０～１５塩基対の長さのより短い二本鎖ｉＲＮＡが好ましい。別の実施形態では、二本鎖ｉＲＮＡは、少なくとも２１ヌクレオチドの長さである。

【０６７２】

一部の実施形態では、ｓｃｉＲＮＡのエフェクター分子は、センス鎖とアンチセンス鎖を含み、この場合において当該アンチセンス鎖は、標的配列の少なくとも一部に対して相補的な相補性領域を有し、二本鎖領域は、１４～３０ヌクレオチドの長さである。同様に、標的配列に対する相補性領域は、１４～３０、より一般的には１８～２５、さらにより一般的には１９～２４、最も一般的には１９～２１ヌクレオチドの長さである。

【０６７３】

本明細書で使用される場合、「アンチセンス鎖」という語句は、対象の標的配列に対して実質、または１００％相補的であるオリゴマー化合物を指す。「アンチセンス鎖」という語句は、二つの別れた鎖から形成されるオリゴマー化合物の両方のアンチセンス領域、ならびにヘアピン構造またはダンベル型構造を形成することができる単分子オリゴマー化合物のアンチセンス領域を含む。「アンチセンス鎖」および「ガイド鎖」という用語は、本明細書において相互交換可能に使用される。

【０６７４】

「センス鎖」という語句は、メッセンジャーＲＮＡ、またはＤＮＡ配列などの標的配列と、全体的または部分的に同じヌクレオシド配列を有するオリゴマー化合物を指す。「センス鎖」および「パッセンジャー鎖」という用語は、本明細書において相互交換可能に使用される。

【０６７５】

「特異的にハイブリダイズ可能である」および「相補的」とは、核酸が、従来のワトソンクリックまたは他の新しい型のいずれかによって、別の核酸配列と水素結合を形成し得ることを意味する。本発明の核酸分子に関して、核酸分子とその相補的配列の結合自由エネルギーは、核酸の関連機能、例えば、ＲＮＡｉ活性の進行が可能なほど充分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は、当分野で公知である（例えば、Ｔｕｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ，１９８７，ＣＳＨ　Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．ＬＩＩ　ｐｐ．１２３－１３３、Ｆｒｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８６，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８３：９３７３－９３７７、Ｔｕｒｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７，／．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０９：３７８３－３７８５を参照のこと）。相補性パーセントは、第二の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン－クリック塩基対形成）を形成することができる核酸分子中の連続残基のパーセンテージを示す（例えば、１０個中５、６、７、

８、９、１０個で、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、および１００％の相補性である）。「完全に相補的」または１００％の相補性とは、核酸配列の全ての連続残基が、第二の核酸配列中の同数の連続残基と水素結合することを意味する。完全な相補性未満とは、二つの鎖のうちの全てではなく一部のヌクレオシド単位が互いに水素結合し得る状況を指す。「実質的な相補性」とは、非相補的であるように選択された、例えばオーバーハングなどのポリヌクレオチド鎖領域を除き、９０％以上の相補性を呈するポリヌクレオチド鎖を指す。特異的結合には、特異的結合が望ましい条件下で、すなわち、インビボアッセイまたは治療的処置の場合には生理学的条件下、またはインビトロアッセイの場合には、当該アッセイが実施される条件下での、非標的配列とオリゴマー化合物の非特異的結合を回避するのに充分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は、典型的には、少なくとも５ヌクレオチド異なる。

【０６７６】

本明細書において使用する場合、別段の示唆が無い限り、「相補性」という用語は、第二のヌクレオチド配列との関連において第一のヌクレオチド配列を記載するために使用される場合には、当業者によって理解されるように、第二のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと特定の条件下で、核酸塩基の相補性を介してハイブリダイズし、二重鎖構造を形成する、第一のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの能力を指す。かかる条件は、例えば、ストリンジェントな条件であってもよく、ストリンジェントな条件は、４００ｍＭのＮａＣｌ、４０ｍＭのＰＩＰＥＳ　ｐＨ　６．４、１ｍＭのＥＤＴＡ、５０℃または７０℃で１２～１６時間の後の洗浄、を含み得る（例えば、“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓを参照）。有機体内で遭遇し得るような生理学的に関連のある条件などの他の条件を適用することができる。当業者は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的な用途に応じて、二つの配列の相補性の試験に最も適切な条件の組を決定することができる。

【０６７７】

特定の実施形態では、オリゴマー化合物およびその標的は、各分子中の充分な数の対応する位置が、アンチセンス化合物と標的との間の安定的な会合を可能にするほど互いに結合し得る核酸塩基によって占められている場合、互いに相補的である。当業者であれば、オリゴマー化合物が会合状態を維持する能力を排除することなく、ミスマッチの含有が可能であると認識する。したがって、本明細書において、ミスマッチである（すなわち、標的の対応するヌクレオチドに対して相補的な核酸塩基ではない）ヌクレオチドを最大で約２０％含み得る、オリゴマー化合物（例えば、ｓｉＲＮＡなどを含むエフェクター分子などの複数標的分子）が記載される。任意選択的に、例えば、本開示の複数標的分子のエフェクターｓｉＲＮＡ分子などのオリゴマー化合物は、約１５％以下、より好ましくは約１０％以下、最も好ましくは５％以下のミスマッチを含有し、またはミスマッチを含有しない。残りのヌクレオチドは、相補的な核酸塩基であるか、またはそうでなければハイブリダイゼーションを妨害しない（例えば、ユニバーサル塩基）。当業者であれば、本明細書に提供される化合物が、標的核酸に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％相補的であることを認識するであろう。

【０６７８】

エフェクター分子または複数標的分子、例えば本明細書に記載される複数標的分子内の相補的な配列は、一方または両方のヌクレオチド配列の長さ全体にわたって、第一のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと、第二のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの塩基対形成を含む。そのような配列は、本明細書において、互いに対して「完全に相補的」であると称される場合がある。しかしながら、本明細書において、第一の配列が第二の配列に対して「実質的に相補的」であるという場合、この二つの配列は、完全に相補的であり得るか、又はそれらはその

最終的な用途に、例えばＲＩＳＣ経路を経た遺伝子発現の阻害に最も関連した条件下でハイブリダイズする能力を維持しつつ、最大３０塩基対の二本鎖についてのハイブリダイゼーションの際に、一つ以上であるが、概して５、４、３、又は２つ以下である、ミスマッチ塩基対を形成し得る。しかしながら、二つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーションの際に一つ以上の一本鎖のオーバーハングを形成するように設計される場合には、かかるオーバーハングは、相補性の判定に関してミスマッチとはみなさないものとする。例えば、長さが２１ヌクレオチドである一方のオリゴヌクレオチドと長さが２３ヌクレオチドであるもう一方のオリゴヌクレオチドとを含む本開示のｄｓＲＮＡエフェクター分子であって、この場合において長い方のオリゴヌクレオチドは、短い方のオリゴヌクレオチドに対して完全に相補的である２１ヌクレオチドの配列を含むようなｄｓＲＮＡエフェクター分子でも、本明細書において記載する目的に関し、「完全に相補的」と称され得る。

【０６７９】

「相補的」配列は、本明細書において使用する場合、ハイブリダイズするそれらの能力に関する上記の要件を満たす限り、非ワトソン・クリック塩基対、または非天然の修飾ヌクレオチドから形成された塩基対も含み得るか、または全体的にそれらから形成され得る。かかる非ワトソン・クリック塩基対としては、これらに限定されるものではないが、Ｇ：Ｕゆらぎ塩基対またはフーグスティーン塩基対が挙げられる。

【０６８０】

本明細書で使用される場合、「非相補的な核酸塩基」という用語は、互いに水素結合を形成しない、またはそうでなければハイブリダイゼーションを支持しない、一対の核酸塩基を指す。

【０６８１】

本明細書において、「相補的」、「完全に相補的」および「実質的に相補的」という用語は、それらの使用の文脈から理解されるとおり、本開示のエフェクター分子ｄｓＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖の間の塩基合致、または本開示のエフェクター分子のアンチセンス鎖と標的配列の間の塩基合致に関連して使用され得る。

【０６８２】

本明細書において使用する場合、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）「の少なくとも一部に対して実質的に相補的」であるポリヌクレオチドは、目的のｍＲＮＡ（例えば、標的タンパク質をコードするｍＲＮＡ）の連続する部分に対して実質的に相補的であるポリヌクレオチド　を指す。例えば、ポリヌクレオチドは、配列が、標的タンパク質をコードするｍＲＮＡの中断されない部分に対して実質的に相補的である場合、標的　ｍＲＮＡの少なくとも一部に対して相補的である。

【０６８３】

したがって、一部の実施形態においては、本明細書において開示するアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、標的ｍＲＮＡ配列に対して完全に相補的である。

【０６８４】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、標的ＲＮＡ配列に対して実質的に相補的であり、および標的ＲＮＡ、または標的ＲＮＡの断片のヌクレオチド配列の同等領域に対し、その全長にわたって、少なくとも約８０％相補的である、例えば、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。

【０６８５】

一つの実施形態では、本開示の複数標的分子のＲＮＡｉ剤であるエフェクター分子は、つまり標的ＲＮＡ配列と同じであるアンチセンスポリヌクレオチドに対して実質的に相補的であるセンス鎖を含み、この場合において当該センス鎖ポリヌクレオチドは、標的ＲＮＡ配列または標的ＲＮＡ配列の断片のヌクレオチド配列の同等領域に対し、その全長にわたって、少なくとも約８０％相補的である、例えば、約８５％、約８６％、約８７％、約８８％、約８９％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約

９６％、約９７％、約９８％、または約９９％相補的である連続するヌクレオチド配列を含む。

【０６８６】

一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の二本鎖領域は、長さが少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０またはそれ以上のヌクレオチド対であるか、またはそれと等しい。

【０６８７】

一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、少なくとも１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０ヌクレオチドの長さであるか、またはそれと等しい。

【０６８８】

一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡのセンス鎖は、少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０ヌクレオチドの長さであるか、またはそれと等しい。

【０６８９】

一つの実施形態においては、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖はそれぞれ、１５～３０ヌクレオチドの長さである。

【０６９０】

一つの実施形態においては、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖はそれぞれ、１９～２５ヌクレオチドの長さである。

【０６９１】

一つの実施形態においては、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖はそれぞれ、２１～２３ヌクレオチドの長さである。

【０６９２】

一部の実施形態では、一方の鎖は、二本鎖領域において、１～５ヌクレオチドの一本鎖の伸長を少なくとも一つ有する。「二本鎖領域における一本鎖ヌクレオチドの伸長」とは、一本鎖の伸長の両末端に、少なくとも一つのヌクレオチド塩基対が存在していることを意味する。一部の実施形態では、両方の鎖は、二本鎖領域において１～５（例えば、１、２、３、４、または５）ヌクレオチドの一本鎖の伸長を少なくとも一つ有する。二本鎖領域において、両方の鎖が１～５（例えば、１、２、３、４、または５）ヌクレオチドの一本鎖の伸長を有する場合、当該一本鎖ヌクレオチドは、互いに対向してもよく（例えば、ミスマッチの伸長）、または第二の鎖が、第一の鎖の一本鎖ｉＲＮＡに対向する一本鎖ヌクレオチドを有さないように配置されてもよく、その逆もまた然りである（例えば、一本鎖ループ）。一部の実施形態では、一本鎖ヌクレオチドは、いずれかの末端から８ヌクレオチド以内、例えば、二つの鎖の間の相補性の領域の５’末端または３’末端のいずれかから８、７、６、５、４、３、または２ヌクレオチド以内に存在する。

【０６９３】

一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡは、末端のうちの少なくとも一つに、一本鎖オーバーハングを含む。一つの実施形態では、一本鎖オーバーハングは、１、２、または３ヌクレオチドの長さである。

【０６９４】

一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡのセンス鎖は、２１ヌクレオチドの長さであり、アンチセンス鎖は、２３ヌクレオチドの長さであり、当該鎖は、３’末端に２ヌクレオチドの長さの一本鎖のオーバーハングを有する２１の連続する塩基対の二本鎖領域を形成する。

【０６９５】

一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡの各鎖は、例えば、ＰＣＴ

公開第２００４０８０４０６号に記載されるものなどのＺＸＹ構造を有する。当該文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０６９６】

特定の実施形態では、二つのヌクレオチド配列は、一緒に結合して、長鎖を形成してもよい。二つのヌクレオチド配列は、限定されないが、（Ｎ）$_n$を含む、オリゴヌクレオチドリンカーによって一緒に結合されてもよく、式中、Ｎは独立して、修飾ヌクレオチドまたは未修飾ヌクレオチドであり、ｎは、３～２３である。一部の実施形態においては、ｎは３～１０であり、例えば３、４、５、６、７、８、９、または１０である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドリンカーは、ＧＮＲＡ、（Ｇ）$_4$、（Ｕ）$_4$、および（ｄＴ）$_4$からなる群から選択されるものであり、式中Ｎは、修飾ヌクレオチドまたは未修飾ヌクレオチドであり、またＲは、修飾プリンヌクレオチドまたは未修飾プリンヌクレオチドである。リンカー中のヌクレオチドの一部は、リンカー中の他のヌクレオチドとの塩基対相互作用に関与し得る。二つのヌクレオチド配列は、例えば、本明細書に記載するリンカーなどの非ヌクレオチド系リンカーによっても一緒に結合され得る。当業者であれば、本明細書に記載するいずれかのオリゴヌクレオチドの化学修飾またはバリエーションを、オリゴヌクレオチドリンカーで使用できることを理解するであろう。

【０６９７】

特定の実施形態では、二つの鎖は、特異的結合が望ましい条件下、すなわち、インビボアッセイや治療的処置の場合の生理学的条件下で、およびインビトロアッセイの場合にはアッセイが実施される条件下で、アンチセンス化合物と非標的核酸配列の非特異的結合を回避するのに充分な程度の相補性がある場合に、特異的にハイブリダイズする。

【０６９８】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイゼーション」とは、相補的なオリゴマー化合物（例えば、ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖とその標的核酸、またはｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖とセンス鎖）の対形成を意味する。特定の機構に限定されないが、対形成の最も一般的な機構は、水素結合を含み、これは相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基（核酸塩基）間のワトソンクリック、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン水素結合であってもよい。例えば、天然塩基アデニンは、天然核酸塩基のチミジンおよびウラシルに対して相補的な核酸塩基であり、水素結合の形成を通して対形成する。天然塩基グアニンは、天然塩基シトシンおよび５－メチルシトシンに対して相補的な核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは、様々な状況下で起こり得る。

【０６９９】

本明細書で使用される場合、「特異的にハイブリダイズする」という用語は、オリゴマー化合物が、一つの核酸部位に、別の核酸部位にハイブリダイズするよりも高いアフィニティでハイブリダイズする能力を指す。特定の実施形態では、ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、二つ以上の標的部位に特異的にハイブリダイズする。

【０７００】

本明細書で使用される場合、「設計すること」または「～のために設計される」とは、選択された核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴマー化合物を設計するプロセスを指す。

【０７０１】

本明細書で使用される場合、「調節」という用語は、調節を行う前の機能または活性のレベルと比較したときの機能または活性の摂動を指す。例えば、調節には、遺伝子発現における増加（刺激または誘導）または減少（阻害または低下）のいずれかの変化が含まれる。さらなる例として、発現の調節は、ｐｒｅ－ｍＲＮＡプロセシングのスプライシング部位の選択の摂動を含み得る。

【０７０２】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、遺伝子にコード化された情報が、細胞内に存在し、動作する構造に変換される、全ての機能および工程を指す。そのような構造としては限定されないが、転写および翻訳の産物が挙げられる。

【０７０３】
本明細書で使用される場合、「バリアント」とは、ＤＮＡの同じゲノム領域から産生され得る別のＲＮＡ転写物を指す。バリアントとしては限定されないが、開始位置または停止位置のいずれかが同じゲノムＤＮＡから産生される他の転写物とは異なっているが、イントロン配列およびエクソン配列の両方を含有する、同じゲノムＤＮＡから産生される転写物である「ｐｒｅ－ｍＲＮＡバリアント」が挙げられる。バリアントとしては限定されないが、代替的なスプライシング接合部、または代替的な開始コドンおよび終始コドンを有するバリアントが挙げられる。
【０７０４】
本明細書で使用される場合、「２’－修飾」または「２’－置換」という用語は、ＨまたはＯＨ以外の２’位に置換基を含む糖を意味する。２’修飾単量体としては限定されないが、例えば、アリル、アミノ、アジド、チオ、Ｏ－アリル、Ｏ－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキル、－ＯＣＦ$_{3}$、Ｏ－（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$－Ｏ－ＣＨ$_{3}$、２’－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$ＳＣＨ$_{3}$、Ｏ－（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$－Ｏ－Ｎ（Ｒ^{m}）（Ｒ^{n}）、またはＯ－ＣＨ$_{2}$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ^{m}）（Ｒ^{n}）などの２’－置換基を有するＢＮＡおよび単量体（例えば、ヌクレオシドおよびヌクレオチド）が挙げられ、式中、各Ｒ^{m}およびＲ^{n}は独立して、Ｈ、または置換もしくは非置換のＣ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルキルである。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、式２’－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$Ｈを有しない２’修飾単量体を含み、式中、ｎは、１～６である。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、式２’－ＯＣＨ$_{3}$を有しない２’修飾単量体を含む。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、式あるいは２’－Ｏ（ＣＨ$_{2}$）$_{2}$ＯＣＨ$_{3}$を有しない２’修飾単量体を含む。
【０７０５】
本明細書で使用される場合、「ロックド核酸」または「ＬＮＡ」または「ロックドヌクレオシド」または「ロックドヌクレオチド」という用語は、ヌクレオシドのフラノース部分が、フラノース環上で二つの炭素原子を接続する架橋を含み、それによって、二環式環系が形成されるヌクレオシドまたはヌクレオチドを指す。ロックド核酸は、二環式核酸（ＢＮＡ）とも称される。
【０７０６】
本明細書で使用される場合、別段の示唆がない限り、「メチレンオキシＬＮＡ」という用語は、β－Ｄ－メチレンオキシＬＮＡを指す。
【０７０７】
本明細書で使用される場合、「ＭＯＥ」という用語は、２’－Ｏ－メトキシエチル置換基を指す。
【０７０８】
本明細書で使用される場合、「ギャップマー」という用語は、中央領域（ギャップ）、および中央領域の両側の領域（ウイング）を含むキメラオリゴマー化合物を指し、この場合において当該ギャップは、各ウイングの修飾とは異なる修飾を少なくとも一つ含む。そのような修飾としては、核酸塩基、単量体結合、および糖の修飾、ならびに修飾の非存在（非修飾）が挙げられる。したがって、特定の実施形態では、各ウイングのヌクレオチド結合は、ギャップのヌクレオチド結合とは異なる。特定の実施形態では、各ウイングは、高アフィニティ修飾を有するヌクレオチドを含み、ギャップは、当該修飾を含まないヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ギャップ中のヌクレオチド、およびウイング中のヌクレオチドは全て、高アフィニティ修飾を含むが、ギャップ中の高アフィニティ修飾は、ウイング中の高アフィニティ修飾とは異なる。特定の実施形態では、ウイング中の修飾は、互いに同一である。特定の実施形態では、ウイング中の修飾は、互いに異なる。特定の実施形態では、ギャップ中のヌクレオチドは、修飾されず、ウイング中のヌクレオチドは、修飾される。特定の実施形態では、各ウイング中の修飾は、同一である。特定の実施形態では、一方のウイング中の修飾は、他方のウイング中の修飾とは異なる。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、ギャップ中に２’－デオキシヌクレオチドを有し、ウィング中に高アフィニティ修飾を有するヌクレオチドを有するギャップマーである。

【０７０９】
本明細書で使用される場合、「プロドラッグ」という用語は、不活性型で調製される治療剤を指し、内因性酵素の作用、または他の化学物質および／もしくは状態の作用によって、身体内またはその細胞内で活性形態（すなわち、薬剤）に変換される。
【０７１０】
本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な塩」という用語は、活性化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒性作用を与えない活性化合物の塩を指す。
【０７１１】
本明細書で使用される場合、「キャップ構造」または「末端キャップ部分」という用語は、アンチセンス化合物のいずれかの末端に組み込まれる化学修飾を指す。
【０７１２】
「置換」という用語は、所与の構造内の一つまたは複数の水素ラジカルの、次のような特定の置換基のラジカルでの置換を指し、以下に限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリル、ハロ、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルキル、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアルキル、アリールスルホニルアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ（ａｒａｌｋｏｘｙ）、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アリールアミノアルキル、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル（ａｒａｌｋｏｘｙｃａｒｂｏｎｙｌ）、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、複素環式、および脂肪族である。置換基はさらに置換され得ることが理解される。
【０７１３】
「アルキル」という用語は、Ｎ、Ｏ、またはＳが任意選択的に挿入され得る、指定の炭素原子数（限定されないが、プロピル、アリル、またはプロパルギルを含む）を含有する、直鎖または分岐鎖であり得る飽和、および不飽和の非芳香族炭化水素鎖を指す。例えば、Ｃ１－Ｃ１０とは、当該基が、１～１０個（１および１０を含む）の炭素原子を有し得ることを示す。特定の実施形態では、本開示の親油性部分は、C_6－C_{18}アルキル炭化水素鎖を含み得る。「アルコキシ」という用語は、－Ｏ－アルキルラジカルを指す。「アルキレン」という用語は、二価アルキル（すなわち、－Ｒ－）を指す。「アルキレンジオキソ」という用語は、構造－Ｏ－Ｒ－Ｏ－の二価種を指し、式中、Ｒはアルキレンを表す。「アミノアルキル」という用語は、任意の位置で、通常の原子価によって許容される一つ以上のアミノ基で置換された、上記に定義されるアルキル基を指す。アミノ基は、非置換、一置換、または二置換であってもよい。
【０７１４】
「メルカプト」という用語は、－ＳＨラジカルを指す。「チオアルコキシ」という用語は、－Ｓ－アルキルラジカルを指す。
【０７１５】
「ハロ」という用語は、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素の任意のラジカルを指す。
【０７１６】
本明細書で使用される場合、「シクロアルキル」という用語は、別段の指定がない限り、３～１４個の炭素原子を有する飽和または不飽和非芳香族炭化水素環基を意味する。シクロアルキル基の例としては、シクロプロピル、メチル－シクロプロピル、２，２－ジメチル－シクロブチル、２－エチル－シクロペンチル、シクロヘキシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。シクロアルキルは、複数のスピロ環または縮合環を含み得る。シクロアルキル基は、随意に、通常の原子価によって許容される任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換される。
【０７１７】

本明細書で使用される場合、「アルケニル」という用語は、特に明記されない限り、少なくとも一つの炭素－炭素二重結合を含有し、２～１０個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖の非芳香族炭化水素ラジカルを指す。このような基には、最大五個の炭素－炭素二重結合が存在し得る。例えば、「Ｃ２－Ｃ６」アルケニルは、２～６個の炭素原子を有するアルケニルラジカルとして定義される。アルケニル基の例としては、エテニル、プロペニル、ブテニル、およびシクロヘキセニルが挙げられるが、これらに限定されない。アルケニル基の直鎖、分枝鎖、または環状部分は、二重結合を含有してもよく、随意に、通常の原子価によって許容される任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換される。「シクロアルケニル」という用語は、指定された数の炭素原子および少なくとも一つの炭素－炭素二重結合を有する単環式炭化水素基を意味する。

【０７１８】

本明細書で使用される場合、「アルケニル」という用語は、特に明記されない限り、２～１０個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖の炭化水素ラジカルを指し、少なくとも一つの炭素－炭素二重結合を含有する。最大５個の炭素－炭素三重結合が存在し得る。したがって、「Ｃ２－Ｃ６アルキニル」は、２～６個の炭素原子を有するアルキニルラジカルを意味する。アルキニル基の例としては、エチニル、２－プロピニル、および２－ブチニルが挙げられるが、これらに限定されない。アルケニル基の直鎖、または分枝鎖部分は、通常の原子価によって許容される三重結合を含有してもよく、随意に、通常の原子価によって許容される任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換されてもよい。

【０７１９】

本明細書で使用される場合、「アルコキシル」または「アルコキシ」は、酸素架橋を介して結合される炭素原子の示される数を有する上記に定義されるアルキル基を指す。Ｃ１－Ｃ６アルコキシは、Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、およびＣ６アルコキシ基を含むことが意図される。Ｃ１－Ｃ８アルコキシは、Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７およびＣ８アルコキシ基を含むことが意図される。アルコキシの例としては、メトキシ、エトキシ、ｎ－プロポキシ、ｉ－プロポキシ、ｎ－ブトキシ、ｓ－ブトキシ、ｔ－ブトキシ、ｎ－ペントキシ、ｓ－ペントキシ、ｎ－ヘプトキシ、およびｎ－オクトキシが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７２０】

本明細書で使用される場合、「アリール」または「芳香族」は、各環において最大７個の原子の任意の安定した単環式または多環式炭素環を意味し、少なくとも一個の環は芳香族である。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、アントラセニル、テトラヒドロナフチル、インダニル、およびビフェニルが挙げられるが、これらに限定されない。アリール置換基が二環式であり、一つの環が非芳香族である場合、結合は芳香族環を介することが理解される。アリール基は、随意に、通常の原子価によって許容される任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換される。「アリールアルキル」という用語または「アラルキル」という用語は、アリールで置換されたアルキルを指す。「アリールアルコキシ」という用語は、アリールで置換されたアルコキシを指す。

【０７２１】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」という用語は、各環において最大７個の原子の安定した単環式または多環式環を表し、少なくとも一つの環は、芳香族であり、Ｏ、ＮおよびＳからなる群から選択される１～４個のヘテロ原子を含む。ヘテロアリール基の例としては、以下に限定されないが、アクリジニル、カルバゾリル、シンノリニル、キノキサリニル、ピラゾリル、インドリル、ベンゾトリアゾリル、フラニル、チエニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ベンズイミダゾロニル、ベンゾオキサゾロニル（ｂｅｎｚｏｘａｚｏｌｏｎｙｌ）、キノリニル、イソキノリニル、ジヒドロイソインドロニル、イミダゾピリジニル、イソインドロニル、インダゾリル、オキサゾリル、オキサジアゾリル、イソキサゾリル、インドリル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、テトラヒドロキノリンが挙げられる。「ヘテロアリール」はまた、任意

の窒素含有ヘテロアリールのＮ－オキシド誘導体を含むと理解される。ヘテロアリール置換基が二環式であり、一つの環が非芳香族である、またはヘテロ原子を含まない場合、結合は芳香族環またはヘテロ原子を含む環を介することが理解される。ヘテロアリール基は、随意に、通常の原子価によって許容される任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換される。

【０７２２】

本明細書で使用される場合、「複素環」、「複素環」、または「ヘテロシクリル」という用語は、多環式基を含む、Ｏ、ＮおよびＳからなる群から選択される１～４個のヘテロ原子を含有する３～１４員の芳香族または非芳香族複素環を意味する。本明細書で使用される場合、「複素環」という用語はまた、「複素環」という用語および「ヘテロシクリル」という用語と同義であるとみなされ、また本明細書に記載される同じ定義を有するものと理解される。「ヘテロシクリル」は、上述のヘテロアリール、ならびにそのジヒドロおよびテトラヒドロ類似体を含む。ヘテロシクリル基の例としては、以下に限定されないが、アゼチジニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾフラザニル、ベンゾピラゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチオフェニル、ベンゾキサゾリル、カルバゾリル、カルボリニル、シンノリニル、フラニル、イミダゾリル、インドリニル、インドリル、インドラジニル、インダゾリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ナフトピリジニル（ｎａｐｈｔｈｐｙｒｉｄｉｎｙｌ）、オキサジアゾリル、オキソオキサゾリジニル、オキサゾリル、オキサゾリン、オキソピペラジニル、オキソピロリジニル、オキソモルホリニル、イソキサゾリン、オキセタニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドピリジニル（ｐｙｒｉｄｏｐｙｒｉｄｉｎｙｌ）、ピリダジニル、ピリジル、ピリジノニル、ピリミジル、ピリミジノニル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル（ｑｕｉｎｏｘａｌｉｎｙｌ）、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロイソキノリニル（ｔｅｔｒａｈｙｄｒｏｉｓｏｑｕｉｎｏｌｉｎｙｌ）、テトラゾリル、テトラゾロピリジル、　チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、１，４－ジオキサニル、ヘキサヒドロアゼピニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピリジン－２－オニル、ピロリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ジヒドロベンゾイミダゾリル、ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾチオフェニル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロフラニル、ジヒドロイミダゾリル、ジヒドロインドリル、ジヒドロイソオキサゾリル、ジヒドロイソチアゾリル、ジヒドロオキサジアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、ジヒドロピラジニル、ジヒドロピラゾリル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロピリミジニル、ジヒドロピロリル、ジヒドロキノリニル（ｄｉｈｙｄｒｏｑｕｉｎｏｌｉｎｙｌ）、ジヒドロテトラゾリル、ジヒドロチアジアゾリル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロチエニル、ジヒドロトリアゾリル、ジヒドロアゼチジニル、ジオキシドチオモルホリニル、メチレンジオキシベンゾイル、テトラヒドロフラニル、およびテトラヒドロチエニル、ならびにそのＮ－オキシドを含む。ヘテロシクリル置換基の結合は、炭素原子を介して、またはヘテロ原子を介して生じ得る。ヘテロシクリル基は、随意に、通常の原子価によって許容される任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換、または五置換される。

【０７２３】

「ヘテロシクロアルキル」は、炭素のうちの一から四個が酸素、窒素、または硫黄などのヘテロ原子によって置換されるシクロアルキル残基を指す。ラジカルがヘテロシクリル基である複素環の例としては、テトラヒドロピラン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、チアゾリジン、オキサゾール、オキサゾリン、イソオキサゾール、ジオキサン、テトラヒドロフランなどが挙げられる。

【０７２４】

「ヘテロアリール」という用語は、単環式の場合は１～３個のヘテロ原子、二環式の場合は１～６個のヘテロ原子、または三環式の場合は１～９個のヘテロ原子を有する芳香族５～８員単環式、８～１２員二環式、または１１～１４員三環式環系を指し、当該ヘテロ原子は、Ｏ、Ｎ、またはＳ（例えば、炭素原子および単環式、二環式、または三環式の場

合はそれぞれＮ、Ｏ、またはＳの１～３個、１～６個、または１～９個のヘテロ原子）から選択され、各環の０、１、２、３、または４個の原子は、置換基で置換されてもよい。ヘテロアリール基の例としては、ピリジル、フリル、またはフラニル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チオフェニル、またはチエニル、キノリニル、インドリル、チアゾリルなどが挙げられる。「ヘテロアリールアルキル」という用語または「ヘテロアラルキル」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルキルを指す。「ヘテロアリールアルコキシ」という用語は、ヘテロアリールで置換されたアルコキシを指す。

【０７２５】

本明細書で用いられる場合、「シクロアルキル」という用語は、３～１２個の炭素、例えば３～８個の炭素、および例えば３～６個の炭素を有する飽和および部分不飽和の環状炭化水素基を含み、シクロアルキル基はさらに、随意に置換されてもよい。シクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７２６】

「ヘテロシクリル」という用語は、単環式の場合は１～３個のヘテロ原子、二環式の場合は１～６個のヘテロ原子、または三環式の場合は１～９個のヘテロ原子を有する非芳香族５～８員単環式、８～１２員二環式、または１１～１４員三環式の環系を指し、当該ヘテロ原子は、Ｏ、Ｎ、またはＳから選択される（例えば、単環式、二環式、または三環式の場合はそれぞれ、炭素原子と、Ｎ、ＯもしくはＳの１～３個、１～６個、または１～９個のヘテロ原子）、各環の０、１、２、または３個の原子は、置換基で置換されてもよい。ヘテロシクリル基の例としては、トリゾリル、テトラゾリル、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル、モルホリニル、テトラヒドロフラニルなどが挙げられる。

【０７２７】

「アシル」という用語は、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、またはヘテロアリールカルボニル置換基を指し、そのいずれもが置換基によってさらに置換され得る。

【０７２８】

本明細書で使用される場合、「ケト」は、カルボニル架橋を介して結合された本明細書で定義される任意のアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、またはアリール基を指す。

【０７２９】

ケト基の例としては、アルカノイル（例えば、アセチル、プロピオニル、ブタノイル、ペンタノイル、ヘキサノイル）、アルケノイル（例えば、アクリロイル）アルキノイル（例えば、エチノイル、プロピノイル、ブチノイル、ペンチノイル、ヘキシノイル）、アリーロイル（ａｒｙｌｏｙｌ）（例えば、ベンゾイル）、ヘテロアリーロイル（ｈｅｔｅｒｏａｒｙｌｏｙｌ）（例えば、ピロロイル、イミダゾロイル、キノリノイル、ピリジノイル）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０７３０】

本明細書で使用される場合、「アルコキシカルボニル」は、カルボニル架橋（すなわち、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－アルキル）を介して上記に定義される任意のアルコキシ基を指す。アルコキシカルボニル基の例としては、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソ－プロポキシカルボニル、ｎ－プロポキシカルボニル、ｔ－ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、またはｎ－ペントキシカルボニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７３１】

本明細書で使用される場合、「アリールオキシカルボニル」は、オキシカルボニル架橋（すなわち、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－アリール）を介して結合された本明細書で定義される任意のアリール基を指す。アリールオキシカルボニル基の例としては、フェノキシカルボニルおよびナフチルオキシカルボニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０７３２】
本明細書で使用される場合、「ヘテロアリールオキシカルボニル」は、オキシカルボニル架橋（すなわち、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－ヘテロアリール）を介して結合された本明細書で定義される任意のヘテロアリール基を指す。ヘテロアリールオキシカルボニル基の例としては、２－ピリジルオキシカルボニル、２－オキサゾリルオキシカルボニル、４－チアゾリルオキシカルボニル、またはピリミジニルオキシカルボニルが挙げられるが、これらに限定されない。
【０７３３】
「オキソ」という用語は、炭素に結合したときにカルボニルを、窒素に結合したときにＮ－オキシドを、および硫黄に結合したときにスルホキシドまたはスルホンを形成する酸素原子を指す。
【０７３４】
当業者であれば、本明細書に開示される化合物および組成物が、化合物または組成物が置かれる環境に応じて、プロトン化または脱プロトン化状態にある特定の原子（例えば、Ｎ、Ｏ、またはＳ原子）を有し得ることを容易に理解および理解するであろう。したがって、本明細書で使用される場合、本明細書に開示される構造は、例えば、ＯＨ、ＳＨ、またはＮＨなどの特定の官能基がプロトン化または脱プロトン化され得ることを想定する。本明細書の開示は、当業者によって容易に理解されるように、環境のｐＨに基づくプロトン化の状態にかかわらず、開示された化合物および組成物を網羅することを意図する。
【０７３５】
本明細書で使用される場合、「予防」という用語は、数時間～数日、好ましくは数週間～数か月の期間、状態または疾患の発生もしくは発症を遅延または防ぐことを指す。したがって、本明細書において、「予防」または「予防すること」は、標的遺伝子の発現の低下、または標的遺伝子タンパク質の産生の低下から利益を受けるであろう対象において、例えば、遺伝的素因または年齢などを起因として、標的遺伝子に関連した障害に感受性のある対象において、疾患または障害に関連して使用され得、この場合において当該対象は、当該標的遺伝子に関連した障害の診断基準をまだ満たしていない。本明細書において使用する場合、予防は、標的遺伝子に関連した障害の診断基準をまだ満たしていない対象へ剤を投与して、当該対象が、当該標的遺伝子に関連した障害を発症する可能性を遅延または低下させることと理解され得る。剤は薬品であるため、投与は通常、標的遺伝子に関連した障害の診断基準をまだ満たしていない対象を、標的遺伝子に関連した障害を発症しやすいと特定することができる、医療従事者の指示下にあることが理解される。
【０７３６】
本明細書で使用される場合、「改善」という用語は、状態または疾患の重症度の少なくとも一つの活性または一つの指標の低減を指す。重症度の指標は、当業者に公知の主観的または客観的な尺度によって決定され得る。
【０７３７】
本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、本開示の組成物を投与して、疾患または状態の変化または改善に影響を与えることを指す。予防、改善、および／または治療は、定期的に、または疾患もしくは状態が発生する前に、複数用量を投与して、疾患または状態の経過を変化させることを必要とする場合がある。さらに、状態または疾患の予防、改善、および治療のそれぞれのために、単一の個体において、連続的または同時に単剤が使用されてもよい。したがって、「治療すること」または「治療」という用語は、限定されないが、例えば、ＣＮＳの疾患または障害などを有する対象にて、ニューロンの機能障害または死が増加した領域で標的遺伝子の発現または活性を低下させることにより、標的遺伝子発現または標的遺伝子タンパク質の産生に関連した一つ以上の兆候または症状、例えば、本明細書において別段に記載される標的遺伝子に関連したＣＮＳの疾患もしくは障害の緩和または改善を含む、有益な結果または望ましい結果を指す。「治療」はまた、治療が行われない場合に予想される生存時間と比較して、生存時間を延ばすことも意味し得る。

【０７３８】
本明細書で使用される場合、「薬品」という用語は、対象に投与されたときに治療的な利益を提供する物質を指す。特定の実施形態では、薬品は、薬品の有効成分である。特定の実施形態では、薬品は、プロドラッグである。
【０７３９】
本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、動物に治療的な利益を提供する薬品の量を指す。
【０７４０】
本明細書で使用される場合、「投与すること」とは、動物に薬品を提供することを意味し、医療専門家による投与および自己投与を含むが、これらに限定されない。
【０７４１】
本明細書で使用される場合、「同時投与」という用語は、動物に二つ以上の薬品を提供することを意味する。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、一緒に投与される。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、別々に投与される。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、同時に投与される。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、異なるときに投与される。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、同じ投与経路を介して投与される。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、異なる投与経路を介して投与される。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、同じ医薬製剤中に含有される。特定の実施形態では、そのような二つ以上の薬品は、別の製剤中に含有される。
【０７４２】
本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、個体に投与するのに好適な物質の混合物を指す。例えば、医薬組成物は、本明細書に記載される複数標的分子と、滅菌水溶液を含んでもよい。特定の実施形態では、医薬組成物は、薬品、ならびに希釈剤および／または担体を含む。
【０７４３】
本明細書で使用される場合、「インビトロ」という用語は、生物（例えば、動物または植物）内ではなく、人工的な環境、例えば、試験管または反応容器内、細胞培養などにおいて発生する事象を指す。本明細書で使用される場合、「エクスビボ」という用語は、生存している生物から取り出され、生物体の外側（例えば、試験管内）で培養された細胞を指す。本明細書で使用される場合、「インビボ」という用語は、生物体（例えば、動物、植物、および／又は微生物）内で発生する事象を指す。
【０７４４】
本明細書で使用される場合、「対象」または「患者」という用語は、本明細書に開示される組成物が、例えば、実験、診断、および／または治療の目的のために投与され得る任意の生物を指す。典型的な対象としては、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒトなどの哺乳動物）および／または植物が挙げられる。通常、動物は、例えば、霊長類、齧歯類、家畜、または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルが挙げられる。齧歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターが挙げられる。家畜および狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えば、家ネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚、例えば、マス、ナマズ、およびサケが挙げられる。患者または対象には、上記の任意のサブセット、例えば、ヒト、霊長類または齧歯類などの一つ以上の群または種を除外した、上述の全てが含まれる。本明細書に記載される態様の特定の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。「患者」および「対象」という用語は、本明細書において相互交換可能に使用される。対象は、男性または女性であってもよい。
【０７４５】
対象は、哺乳動物であることが好ましい。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、

ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、ヒト疾患及び障害の動物モデルを表す対象として有利に使用され得る。さらに、本明細書に記載される化合物、組成物および方法は、家畜動物および／またはペットに使用することができる。

【０７４６】

一部の実施形態では、対象は、ヒトである。別の実施形態では、対象は、実験動物、または疾患モデルとして代替される動物である。当該用語は、特定の年齢または性別を意味しない。したがって、成人および新生児の対象、ならびに胎児は、男性または女性にかかわらず、範囲内にあることが意図される。対象の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、およびマウスが挙げられる。対象という用語は、トランスジェニック種を含むことがさらに意図される。一部の実施形態では、対象は、ヨーロッパ系であってもよい。一部の実施形態では、対象は、アフリカ系、アメリカ系であってもよい。一部の実施形態では、対象は、アジア系であってもよい。

【０７４７】

人体に実施される方法の特許化を禁止している地域では、ヒト対象に組成物を「投与すること」の意味は、ヒト対象が任意の技術（例えば、経口、吸入、局所適用、注射、挿入など）によって自己投与する、制御下にある物質を処方することに限定されるものとする。特許性のある主題を定義する法律または規制と一致する、最も広範で合理的な解釈が意図される。人体に実施される方法の特許化を禁止しない地域では、組成物を「投与すること」は、人体に実施される方法および前述の活動の両方を含む。

【０７４８】

本明細書で使用される場合、「非経口投与」という用語は、注射または点滴による投与を指す。非経口投与には限定されないが、皮下投与、静脈内投与、または筋肉内投与が含まれる。

【０７４９】

本明細書で使用される場合、「皮下投与」という用語は、皮膚のすぐ下への投与を指す。「静脈内投与」とは、静脈内への投与を意味する。

【０７５０】

本明細書で使用される場合、「脳室内注射」または「ＩＣＶ注射」または「ＩＣＶ投与」という用語は、脳室の脳脊髄液に物質を直接投与し、血液脳関門（ＢＢＢ）をバイパスする注射技術を指す。

【０７５１】

本明細書で使用される場合、「髄腔内投与」または「髄腔内注射」という用語は、脊柱管またはクモ膜下腔内への注射を介した、薬剤の投与経路を指し、これによって、薬剤は、脊髄麻酔、化学療法、疼痛管理用途、ならびに特定の感染症、特に神経外科手術後の治療に一般的に有用である脳脊髄液（ＣＳＦ）に到達する。

【０７５２】

本明細書で使用される場合、「用量」という用語は、単回投与で提供される薬剤の特定の量を指す。特定の実施形態では、用量は、二回以上のボーラス、錠剤、または注射で投与されてもよい。例えば、皮下投与が望ましい特定の実施形態では、所望の用量は、単回注射では容易に収容されない体積を必要とする。こうした実施形態では、二回以上の注射を使用して、所望の用量を達成してもよい。特定の実施形態では、用量は、個体の注射部位反応を最小化するために、二回以上の注射で投与されてもよい。

【０７５３】

本明細書で使用される場合、「用量単位」という用語は、薬品が提供される形態を指す。特定の実施形態では、単位用量は、本明細書に記載される凍結乾燥された複数標的分子を含むバイアルである。特定の実施形態では、単位用量は、本明細書に記載される再構成された複数標的分子を含むバイアルである。

【０７５４】

本明細書で使用される場合、「薬品有効成分」という用語は、所望の効果を提供する医

薬組成物中の物質を指す。

【０７５５】

本明細書で使用される場合、「副作用」という用語は、所望の効果以外の治療に起因する生理学的応答を指す。特定の実施形態では、副作用としては限定されないが、注射部位反応、肝機能検査異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常、およびミオパチーが挙げられる。例えば、血清中のアミノトランスフェラーゼ値の増加は、肝毒性または肝機能異常を示す場合がある。例えば、ビリルビンの増加は、肝毒性または肝機能異常を示す場合がある。

【０７５６】

「ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）」および「ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ」という用語は、本明細書において相互交換可能に使用され、共有結合され、または非共有結合されて、インビトロまたはインビボでＲＮＡｉ活性を惹起させ得る単一の化学物質を形成する二つのｓｉＲＮＡを指す。ＲＮＡｉ介在遺伝子サイレンシングを惹起させるために、二つの結合したｓｉＲＮＡは、異なる部位の同じ標的遺伝子を標的としてもよく、または二つの結合したｓｉＲＮＡはそれぞれ、二つの異なる遺伝子（ｍＲＮＡ）中の部位を標的としてもよい。

【０７５７】

明確にするために、ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）中のｓｉＲＮＡのうちの一つは、第一の標的核酸の遺伝子発現を調節してもよく、ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）中の他方のｓｉＲＮＡは、第二の標的核酸の遺伝子発現を調節してもよい。一部の実施形態では、第一および第二の標的核酸は、同一である。

【０７５８】

一部の他の実施形態では、ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）中のｓｉＲＮＡのうちの一つは、第一の標的核酸の遺伝子発現を調節してもよく、ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）中の他方のｓｉＲＮＡは、第二の標的核酸の遺伝子発現を調節してもよく、この場合において、第一および第二の標的核酸は、異なる遺伝子である。

【０７５９】

本明細書で使用される場合、「リンカー」には、ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）を生成するために、分子の二つの部分、例えば、二つの個々のｓｉＲＮＡ分子の一方または両方の鎖を接続する、ヌクレオチド系リンカーおよび非ヌクレオチド系リンカー、またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、二つの個々のｓｉＲＮＡ間の単なる静電相互作用またはスタッキング相互作用でも、リンカーを表すことができる。非ヌクレオチドリンカーとしては、単糖類、二糖類、オリゴ糖およびそれらの誘導体、脂肪族、脂環式、複素環式ならびにそれらの組み合わせに由来するテザーまたはリンカーが含まれる。特定の実施形態では、「リンカー」という用語は、化合物の二つの部分を接続する有機部分を意味し、例えば、二つのオリゴヌクレオチド分子を接続する有機部分を意味する。リンカーは、典型的には、例えば、酸素または硫黄などの原子、例えば、NR^1、Ｃ（Ｏ）、Ｃ（Ｏ）ＮＨ、ＳＯ、SO_2、SO_2NHなどの単位、または例えば、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のアルケニル、置換または非置換のアルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシ

クリルアルキル、

【０７６０】

アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリールなどの原子鎖を含み、一つ以上のメチレンは、Ｏ、Ｓ、Ｓ（Ｏ）、SO_2、$N(R^1)_2$、Ｃ（Ｏ）、切断可能な結合基、置換または非置換のアリール、置換または非置換のヘテロアリール、置換または非置換の複素環により中断または集結され得、R^1は、水素、アシル、脂肪族、または置換脂肪族である。

【０７６１】

切断可能なリンカーは、切断剤、例えば、ｐＨ、酸化還元電位、または分解性分子の存在の影響を受け易い。概して切断剤は、血清または血液中においてよりも、細胞の内部で、より広範に広がっているかまたはより高いレベルもしくは活性で見られる。そのような分解剤の例としては、特定の基質に対して選択される、または基質特異性を有さない酸化還元剤、例えば還元によって酸化還元切断可能なリンカーを分解することができる、細胞中に存在する、例えば、メルカプタンなどの酸化酵素または還元酵素または還元剤；エステラーゼ；アミダーゼ；エンドソーム、または酸性環境を作出できる剤、例えば、５以下のｐＨをもたらす剤；一般的な酸、ペプチダーゼ（基質特異的であってもよい）およびプロテアーゼ、およびホスファターゼとして作用することによって酸切断可能な結合基を加水分解もしくは分解できる酵素が挙げられる。例えば、リンカーは、インビトロおよび／またはインビボで、代謝酵素によって切断され得る。代謝酵素の例としては限定されないが、ある種のヌクレアーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、グリコシラーゼ、グリコシダーゼ、加水分解酵素、オキシダーゼなどが挙げられる。

【０７６２】

概して、本明細書に記載される複数標的分子は、リボヌクレオチドを含むが、本明細書において詳細に記載されるように、それぞれの鎖または両方の鎖は、一つ以上の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドを含んでもよい。さらに、本明細書において使用される場合、本開示の複数標的分子は、化学修飾を有するリボヌクレオチドを含んでもよい。本開示の複数標的分子は、本明細書においてさらに詳細に記載されるように、複数のヌクレオチドで相当な修飾を含んでもよい。

【０７６３】

本明細書において使用する場合、「修飾ヌクレオチド」という用語は、修飾糖部分、修飾ヌクレオチド間結合または修飾核酸塩基を独立して有するヌクレオチドを指す。このため、修飾ヌクレオチドという用語は、ヌクレオシド間結合、糖部分または核酸塩基に対する、例えば、官能基もしくは原子などの置換、付加または除去を包含する。本開示の薬剤における使用に好適な修飾は、本明細書において開示する修飾または当分野で公知の修飾の全ての型を含む。ｓｉＲＮＡ型分子（例えば、本開示の複数標的分子のエフェクター分子）において使用される、またはオリゴヌクレオチドリンカー組成物において使用される場合、そのような任意の修飾は、本明細書および特許請求の範囲の目的に対し、「複数標的分子」に包含される。

【０７６４】

本開示の特定の実施形態では、ヌクレオチドの天然型として認識されているデオキシ－ヌクレオチドの包含が、本開示の複数標的分子内に存在する場合（例えば、本明細書に記載される複数標的分子のＲＮＡｉエフェクター分子またはオリゴヌクレオチドリンカーにおいて存在する場合）、修飾ヌクレオチドを構成していると見なすことができる。

【０７６５】

本開示の複数標的分子のエフェクター分子の二本鎖領域は、ＲＩＳＣ経路を介した所望の標的ＲＮＡの特異的分解を可能にする任意の長さであってもよく、約９～３６塩基対の長さ、例えば、約１５～３０塩基対の長さ、例えば、約９、１０、１１、１２、１３、１

４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、または３６塩基対の長さ、例えば、約１５～３０、１５～２９、１５～２８、１５～２７、１５～２６、１５～２５、１５～２４、１５～２３、１５～２２、１５～２１、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１８～３０、１８～２９、１８～２８、１８～２７、１８～２６、１８～２５、１８～２４、１８～２３、１８～２２、１８～２１、１８～２０、１９～３０、１９～２９、１９～２８、１９～２７、１９～２６、１９～２５、１９～２４、１９～２３、１９～２２、１９～２１、１９～２０、２０～３０、２０～２９、２０～２８、２０～２７、２０～２６、２０～２５、２０～２４、２０～２３、２０～２２、２０～２１、２１～３０、２１～２９、２１～２８、２１～２７、２１～２６、２１～２５、２１～２４、２１～２３、または２１～２２塩基対の長さの範囲であってもよい。上記に列記された範囲および長さの間の範囲および長さもまた、本開示の一部であることが予期される。

【０７６６】

二本鎖である個々のエフェクター分子（特定の実施形態では、二本鎖ではないエフェクター分子が本開示の複数標的分子に含まれ得ることにも留意されたい）内で、二本鎖構造を形成する二つの鎖は、一つの長いＲＮＡ分子の異なる部分であってもよく、または別個のＲＮＡ分子であってもよい。二本の鎖が、一つの大きい分子の一部であり、そのために二重鎖構造を形成する一方の鎖の３’末端とその他方の鎖の５’末端との間にある中断されないヌクレオチド鎖で接続されている場合、その接続しているＲＮＡ鎖は、「ヘアピンループ」と呼ばれる。ヘアピンループは、少なくとも一つの不対のヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、ヘアピンループは、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも２３またはそれ以上の、不対のヌクレオチドまたはｄｓＲＮＡの標的部位に向けられないヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、ヘアピンループは、１０ヌクレオチド以下であり得る。一部の実施形態では、ヘアピンループは、対形成していない８ヌクレオチド以下であり得る。一部の実施形態では、ヘアピンループは、対形成していない４～１０ヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、ヘアピンループは、４～８ヌクレオチドであり得る。

【０７６７】

特定の実施形態では、本開示の複数標的分子の個々のエフェクター分子内で、エフェクター分子の二本鎖オリゴマー化合物の二つの鎖は、一緒に結合され得る（そのような実施形態では、当該リンカーは、個々のエフェクター分子を互いに結合するために本明細書で予期されるリンカーとは別個であり、離れている）。この二本の鎖は、両端において、または一端のみにおいて、互いに結合し得る。一端で結合するということは、第一の鎖の５’末端が第二の鎖の３’末端に結合されること、または第一の鎖の３’末端が第二の鎖の５’末端に結合されることを意味する。二つの鎖は、限定されないが、（Ｎ）ｎを含む、オリゴヌクレオチドリンカーによって一緒に結合されてもよく、式中、Ｎは独立して、修飾ヌクレオチドまたは未修飾ヌクレオチドであり、ｎは、３～２３である。一部の実施形態では、ｎは３～１０であり、例えば、３、４、５、６、７、８、９、または１０である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドリンカーは、ＧＮＲＡ、（Ｇ）４、（Ｕ）４、および（ｄＴ）４からなる群から選択されるものであり、式中Ｎは、修飾ヌクレオチドまたは未修飾ヌクレオチドであり、またＲは、修飾プリンヌクレオチドまたは未修飾プリンヌクレオチドである。リンカー中のヌクレオチドの一部は、リンカー中の他のヌクレオチドとの塩基対相互作用に関与し得る。二つの鎖は、非ヌクレオシドのリンカーによって、例えば本明細書に記載するリンカーによって、一緒に結合され得る。当業者であれば、本明細書に記載するいずれかのオリゴヌクレオチドの化学修飾またはバリエーションを、オリゴヌクレオチドリンカーで使用できることを理解するであろう。

【０７６８】

個々のエフェクター分子が、ヘアピン型オリゴマー化合物またはダンベル型オリゴマー化合物である実施形態では、当該分子は、少なくとも１４、１５、１５、１６、１７、１

８、１９、２９、２１、２２、２３、２４、もしくは２５ヌクレオチド対、またはそれに等しい二本鎖領域を有する。二本鎖領域は、長さが２００、１００、または５０以下であり得る。一部の実施形態では、二本鎖領域の範囲は、長さが１５～３０、１７～２３、１９～２３、および１９～２１ヌクレオチド対である。

【０７６９】

当該実施形態では、ヘアピンオリゴマー化合物は、一部の実施形態では３’末端に、および一部の実施形態ではヘアピンのアンチセンス側に、一本鎖オーバーハングまたは末端非対形成領域を有し得る、一部の実施形態では、オーバーハングは、長さが１～４ヌクレオチド、より広くは２～３ヌクレオチドである。ＲＮＡ干渉を誘発することができるヘアピンオリゴマー化合物は、本明細書では「ｓｈＲＮＡ」とも称する。

【０７７０】

ｄｓＲＮＡの実質的に相補的な二本の鎖が、別個のＲＮＡ分子で構成される場合、それら分子は必ずしもそうではないが、共有結合で結合することができる。二本の鎖が、二本鎖構造を形成する一方の鎖の３’末端とそれに対応するもう一方の鎖の５’末端との間にある中断されないヌクレオチドの鎖とは異なる手段で共有結合によりつながっている場合、その接続している構造を「リンカー」と称する。ＲＮＡ鎖は、同数または異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、ｄｓＲＮＡの最も短い鎖にあるヌクレオチドの数から二重鎖内に存在するあらゆるオーバーハングを引いた数である。二重鎖構造に加えて、エフェクター分子は、一つ以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。

【０７７１】

一つの実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子は、ｄｓＲＮＡであり、その各鎖は、２４～３０ヌクレオチドの長さであり、標的ＲＮＡ配列と相互作用して、標的ＲＮＡの切断を誘導する。

【０７７２】

別の実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子は、ｄｓＲＮＡ剤であり、その各鎖は、１９～２３ヌクレオチドを含み、標的ＲＮＡ配列と相互作用して、標的ＲＮＡの切断を誘導する。

【０７７３】

本明細書において使用する場合、「ヌクレオチドオーバーハング」という用語は、二本鎖核酸（ｄｓＮＡ）の二重鎖構造から突出する少なくとも一つの不対ヌクレオチドを指す。例えば、ｄｓＮＡの一方の鎖の３’末端が、もう一方の鎖の５’末端を越えて延びる場合、またはその逆の場合も同様に、ヌクレオチドオーバーハングが存在する。ｄｓＮＡは、少なくとも一つのヌクレオチドのオーバーハングを含んでもよく、あるいはオーバーハングは、少なくとも二つのヌクレオチド、少なくとも三つのヌクレオチド、少なくとも四つのヌクレオチド、少なくとも五つのヌクレオチド、またはそれ以上を含んでもよい。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドを含む、ヌクレオチド／ヌクレオシドのアナログを含み得るか、またはそれらからなり得る。オーバーハングは、センス鎖上、アンチセンス鎖上、またはそれらのいずれかの組合せ上にあってもよい。さらに、オーバーハングのヌクレオチドは、ｄｓＮＡのアンチセンス鎖またはセンス鎖のいずれかの５’末端、３’末端、または両末端上に存在してもよい。特定の実施形態では、エフェクター分子の一つの鎖の一つ以上の末端ヌクレオチドが、リンカー分子の対応する一つ以上のヌクレオチドと塩基対形成をしない場合（例えば、エフェクター分子を結合する複数標的分子のリンカー分子が、個々のエフェクター分子の構造部分とみなされない場合）に、ヌクレオチドオーバーハングが存在し得ることが具体的に予期される。

【０７７４】

一つの実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子の少なくとも一つの鎖は、少なくとも１ヌクレオチドの３’オーバーハングを含む。別の実施形態では、少なくとも一方の鎖が、少なくとも２ヌクレオチド、例えば、２、３、４、５、６、７、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチドの、３’オーバーハングを含む。他の実施形態では、複数標的分子のエフェクター分子の少なくとも一つの鎖は、少なくと

も１ヌクレオチドの５’オーバーハングを含む。特定の実施形態では、少なくとも一つの鎖が、少なくとも２ヌクレオチド、例えば、２、３、４、５、６、７、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチドの５’オーバーハングを含む。さらに他の実施形態では、複数標的分子のエフェクター分子の一つの鎖の３’末端と５’末端の両方が、少なくとも１ヌクレオチドのオーバーハングを含む。

【０７７５】

一つの実施形態では、本開示のエフェクター分子のアンチセンス鎖は、３’末端、５’末端、または両端で１～１０ヌクレオチド、例えば、０～３、１～３、２～４、２～５、４～１０、５～１０、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドのオーバーハングを有するか、またはいずれの末端にも含まない。一つの実施形態では、本開示のエフェクター分子のセンス鎖は、３’末端、５’末端、または両端で１～１０ヌクレオチド、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドのオーバーハングを有するか、またはいずれの末端にも含まない。別の実施形態では、オーバーハング内のヌクレオチドの一つ以上が、ヌクレオシドチオホスフェートで置換される。

【０７７６】

特定の実施形態では、センス鎖もしくはアンチセンス鎖、またはその両方の上のオーバーハングは、１０ヌクレオチドより長い伸長した長さを含み得、例えば、長さが１～３０ヌクレオチド、２～３０ヌクレオチド、１０～３０ヌクレオチド、または１０～１５ヌクレオチドである。特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二本鎖のセンス鎖上にある。特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二重鎖のセンス鎖の３’末端上に存在する。特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二重鎖のセンス鎖の５’末端上に存在する。特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二重鎖のアンチセンス鎖上にある。特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二重鎖のアンチセンス鎖の３’末端上に存在する。特定の実施形態では、伸長したオーバーハングは、二重鎖のアンチセンス鎖の５’末端上に存在する。特定の実施形態では、オーバーハングにおけるヌクレオチドの一つまたは複数は、ヌクレオシドチオホスフェートで置換される。特定の実施形態では、オーバーハングは、自己相補的な部分を含み、それによってオーバーハングは、生理学的条件下で安定なヘアピン構造を形成することができる。

【０７７７】

「平滑」または「平滑末端」という用語は、本開示の複数標的分子のエフェクター分子に関連して本明細書で使用される場合、ｄｓＲＮＡの所与の末端で対形成しないヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを有さない構造、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングが有さない構造を指す。ｄｓＲＮＡの一方の末端または両末端が、平滑であってもよい。ｄｓＲＮＡの両末端が平滑である場合、ｄｓＲＮＡは、平滑末端であると言う。明瞭にするため、「平滑末端」のｄｓＲＮＡは、両末端が平滑であるｄｓＲＮＡであり、すなわち、分子のどちらの末端にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないｄｓＲＮＡである。複数の実施形態において、かかる分子は、その全長にわたって二本鎖となる。

【０７７８】

「アンチセンス鎖」または「ガイド鎖」という用語は、標的ｍＲＮＡなどの標的配列に対して実質的に相補的な領域を含む、例えばｄｓＲＮＡなどのＲＮＡｉ剤であるエフェクター分子の鎖を指す。

【０７７９】

本明細書において使用される場合、「相補性の領域」という用語は、本明細書において定義されるように、例えば標的配列などの配列に対して実質的に相補的であるアンチセンス鎖上の領域を指す。相補的な領域が、標的配列に対して完全に相補的ではない場合、ミスマッチは、分子の内部（非末端）領域または末端領域内にあってもよい。概して、本開示の多重標的化分子のエフェクター分子内の最も許容性のあるミスマッチは、末端領域にあり、例えば、個々のエフェクター分子の５’末端または３’末端の５、４、３、または２ヌクレオチド以内にある。

【０７８０】
一部の実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子は、アンチセンス鎖中にヌクレオチドミスマッチを含む。
【０７８１】
一部の実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子のアンチセンス鎖は、標的ｍＲＮＡと４個以下のミスマッチを含み、例えばアンチセンス鎖は、標的ｍＲＮＡと４、３、２、１、または０個のミスマッチを含む。一部の実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子のアンチセンス鎖は、センス鎖と４個以下のミスマッチを含み、例えばアンチセンス鎖は、センス鎖と４、３、２、１、または０個のミスマッチを含む。一部の実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子は、センス鎖中にヌクレオチドミスマッチを含む。一部の実施形態では、本開示の複数標的分子のエフェクター分子のセンス鎖は、アンチセンス鎖と４個以下のミスマッチを含み、例えばセンス鎖は、アンチセンス鎖と４、３、２、１、または０個のミスマッチを含む。一部の実施形態では、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、本開示の複数標的分子の個々のエフェクター分子の３’末端から５、４、３ヌクレオチド以内にある。別の実施形態では、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、ｉＲＮＡ剤であるエフェクター分子の３’末端ヌクレオチド内にある。一部の実施形態では、ミスマッチは、シード領域にはない。
【０７８２】
したがって、本明細書に記載の複数標的分子のエフェクター分子は、エフェクター分子の標的配列に対し、一つ以上のミスマッチを含んでもよい。一つの実施形態では、本明細書において記載される複数標的分子のエフェクター分子は、３個以下のミスマッチ（すなわち、３、２、１、または０個のミスマッチ）を含有する。一つの実施形態では、本明細書において記載される複数標的分子のエフェクター分子は、２個以下のミスマッチを含有する。一つの実施形態では、本明細書において記載される複数標的分子のエフェクター分子は、１個以下のミスマッチを含有する。一つの実施形態では、本明細書において記載される複数標的分子のエフェクター分子は、０個のミスマッチを含有する。特定の実施形態では、本明細書に記載される複数標的分子のエフェクター分子のアンチセンス鎖が、標的配列に対してミスマッチを含有する場合、当該ミスマッチは、任意選択的に、相補性領域の５’末端または３’末端のいずれかから最後の５ヌクレオチドの範囲内にあるように制限されてもよい。例えば、そのような実施形態では、本明細書に記載される複数標的分子の２３ヌクレオチドのエフェクター分子の鎖については、標的遺伝子の領域に対して相補的な鎖は、概して、中央の１３ヌクレオチドの範囲内にいかなるミスマッチも含まない。本明細書において記載する方法、または当分野で公知の方法を使用して、標的配列に対するミスマッチを含有するエフェクター分子が、標的遺伝子の発現阻害において効果的であるかを決定することができる。特に標的遺伝子の特定の相補性領域が、集団内での多形配列バリエーションを有することが判明している場合には、標的遺伝子の発現阻害において、ミスマッチを有するエフェクター分子の有効性を検討することが重要である。
【０７８３】
「センス鎖」または「パッセンジャー鎖」という用語は、本明細書において使用される場合、エフェクター分子の鎖を指し、この場合、エフェクター分子はｉＲＮＡ剤であり、当該用語が本明細書において定義されるように、アンチセンス鎖の領域に対して実質的に相補的である領域を含む。
【０７８４】
本明細書で使用される場合、「ヌクレオチドの実質的に全てが修飾されている」とは、広く修飾されているが全体は修飾されていない、５、４、３、２、または１以下の非修飾ヌクレオチドを含み得るエフェクター分子または複数標的分子を指す。
【０７８５】
本明細書において使用される場合、「切断領域」という用語は、切断部位に直接隣接して位置する領域を指す。切断部位は、切断が生じる箇所である標的上の部位である。一部の実施形態では、切断領域は、切断部位のいずれかの末端上における、および切断部位に

直接隣接している三つの塩基を含む。一部の実施形態では、切断領域は、切断部位のいずれかの末端上における、および切断部位に直接隣接している二つの塩基を含む。一部の実施形態では、切断部位は、アンチセンス鎖のヌクレオチド１０および１１によって結合される部位で特異的に生じ、またこの切断領域は、ヌクレオチド１１、１２、および１３を含む。

【０７８６】

一部の実施形態では、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子の二本鎖領域は、長さが少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０またはそれ以上のヌクレオチド対であるか、またはそれと等しい。

【０７８７】

一部の実施形態では、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子のアンチセンス鎖は、長さが少なくとも１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０ヌクレオチドであるか、またはそれと等しい。

【０７８８】

一部の実施形態では、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子のセンス鎖は、長さが少なくとも１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０ヌクレオチドであるか、またはそれと等しい。

【０７８９】

一つの実施形態では、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、各々、１５～３０ヌクレオチドの長さである。

【０７９０】

一つの実施形態では、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、各々、１９～２５ヌクレオチドの長さである。

【０７９１】

一つの実施形態では、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、各々、２１～２３ヌクレオチドの長さである。

【０７９２】

一つの実施形態では、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子のセンス鎖は、２１ヌクレオチドの長さであり、アンチセンス鎖は、２３ヌクレオチドの長さであり、当該鎖は、３’末端に２ヌクレオチドの長さの一本鎖のオーバーハングを有する２１の連続する塩基対の二本鎖領域を形成する。

【０７９３】

一部の実施形態では、各鎖のヌクレオチドの大部分は、リボヌクレオチドであるが、本明細書において詳細に記載されるように、各鎖または両鎖は、一つ以上の非リボヌクレオチド、例えばデオキシリボヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドも含み得る。さらに、二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子は、化学修飾を含むリボヌクレオチドを含んでもよい。かかる修飾は、本明細書に開示される、または当分野で公知の全てのタイプの修飾を含んでもよい。二本鎖核酸（例えば、二本鎖ｉＲＮＡ剤）であるエフェクター分子で使用される場合、任意のかかる修飾は、本明細書および特許請求の範囲の目的に対し、本明細書に開示される複数標的分子の「エフェクター分子」に包含される。

【０７９４】

本明細書で使用される場合、「複数標的分子と細胞を接触させること」という文言は、任意の可能な手段で細胞を接触させることを含む。複数標的分子と細胞を接触させることは、インビトロで細胞を複数標的分子と接触させること、またはインビボで細胞を複数標的分子と接触させることを含む。接触させることは、直接的または間接的に行われてもよい。このため、例えば、複数標的分子は、方法を個別に実施することによって、細胞と

物理的に接触させ得るか、あるいはＲＮＡｉ剤は、その後に細胞と接触することを可能にし得る、または引き起こし得るような状況に置かれてもよい。

【０７９５】

細胞をインビトロで接触させることは、例えば、細胞を複数標的分子と共にインキュベートすることによってなされてもよい。細胞をインビボで接触させることは、例えば、複数標的分子を、細胞が位置している組織中もしくはその近傍に注入することによって為されてもよく、または複数標的分子を別の領域に、例えばＣＮＳに、任意選択的に髄腔内注入、硝子体内注入、もしくは他の注入を行い、または血流中もしくは皮下空間に注入し、その後に当該剤が、接触される細胞が位置する組織へと到達することによって為されてもよい。例えば、複数標的分子は、以下に記載され、および例えばＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０３１１７０に詳述される親油性部分などのリガンドを含有してもよく、またはリガンドに結合されてもよい。当該文献は、参照により本明細書に組み込まれる。当該リガンドは、例えばＣＮＳなどの対象部位に、複数標的分子を誘導するか、または別手段により安定化する。インビトロおよびインビボでの接触方法の組合せもまた可能である。例えば細胞をインビトロで複数標的分子と接触させ、続いて対象に移植してもよい。

【０７９６】

一つの実施形態では、細胞と複数標的分子を接触させることは、細胞内への取り込みもしくは吸収を促進または実施することによって、「導入すること」または「複数標的分子を細胞内に送達すること」を含む。複数標的分子の吸収または取り込みは、自発性の拡散もしくは能動的な細胞内プロセスを通じて、または補助の薬剤もしくはデバイスによって、生じ得る。複数標的分子を細胞内に導入することは、インビトロまたはインビボであってもよい。例えば、インビボでの導入の場合、複数標的分子は、組織部位に注入され得るかまたは全身的に投与される。インビトロでの細胞内への導入としては、当技術分野で公知の方法、例えばエレクトロポレーション法およびリポフェクション法などが挙げられる。さらなるアプローチは、本明細書の下記において説明されるか、または当技術分野で公知である。

【０７９７】

「脂溶性」または「親油性部分」という用語は、脂質に対して親和性を有する任意の化合物または化学部分を広く意味する。親油性部分の親油性を特徴付ける方法の一つは、オクタノール－水分配係数ｌｏｇＫｏｗによるものであり、この場合Ｋｏｗは、平衡状態にある二相系のうちの水相の化学物質の濃度に対するオクタノール相の化学物質の濃度の比である。オクタノール－水分配係数は、物質の実験室測定される特性である。しかしながら、それは、第一原理または経験的方法を使用して算出される化学物質の構造成分に起因する係数を使用することによっても予想され得る（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｔｅｔｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｆ．Ｃｏｍｐｕｔ．Ｓｃｉ．４１：１４０７－２１（２００１）を参照）。これは、水よりもむしろ非水性又は油性環境を好む物質の傾向の熱力学的尺度（すなわち、その親水性／親油性バランス）をもたらす。原則として、化学物質は、そのｌｏｇＫｏｗが０を超える場合、性質が親油性である。典型的には、親油性部分は、１を超える、１．５を超える、２を超える、３を超える、４を超える、５を超える、または１０を超える、ｌｏｇＫｏｗをもつ。例えば、６－アミノヘキサノールのｌｏｇＫｏｗは、例えばおよそ０．７であると予測される。同じ方法を使用することにより、Ｎ－（ヘキサン－６－オール）カルバミン酸コレステリルのｌｏｇＫｏｗは、１０．７であると予測される。

【０７９８】

分子の親油性は、分子が有する官能基に応じて変化し得る。例えば、親油性部分の末端にヒドロキシル基又はアミン基を付加することにより、親油性部分の分配係数（例えば、ｌｏｇＫｏｗ）の値が増加又は減少し得る。

【０７９９】

あるいは、複数の親油性部分を保有する／複数の親油性部分にコンジュゲートされた、本開示の複数標的分子の疎水性は、そのタンパク質結合特性によって測定することができ

る。例えば、特定の実施形態では、複数標的分子の血漿タンパク質結合アッセイの非結合型分画は、複数標的分子の相対的な疎水性に対して正に相関すると決定された場合、すなわち複数標的分子のサイレンシング活性に対して正に相関することとなる。

【０８００】

一つの実施形態では、疎水性を決定するための血漿タンパク質結合アッセイは、ヒト血清アルブミンタンパク質を使用する電気泳動移動度シフトアッセイ（ＥＭＳＡ）である。この結合アッセイの例示的プロトコルは、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０３１１７０号において詳細に説明される。複数標的分子の疎水性は、結合アッセイにおける非結合の複数標的分子の分画によって測定され、複数標的分子のインビボ送達の強化については、０．１５を超える、０．２を超える、０．２５を超える、０．３を超える、０．３５を超える、０．４を超える、０．４５を超える、または０．５を超える。

【０８０１】

したがって、本開示の複数標的分子のエフェクター分子の内部（非末端）の位置に、親油性部分をコンジュゲートすることによって、最適な疎水性が提供され、複数標的分子のインビボ送達が強化される。

【０８０２】

「脂質ナノ粒子」または「ＬＮＰ」という用語は、薬学的に活性な分子、例えば核酸分子、例えば、複数標的分子、または複数標的分子の転写元のプラスミドなどを封入する脂質層を含む小胞を指す。ＬＮＰは、例えば米国特許第６，８５８，２２５号、第６，８１５，４３２、第８，１５８，６０１号、および第８，０５８，０６９号に記載されており、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０８０３】

対象における標的遺伝子のレベル、または疾患マーカー、または症状の文脈での「低下させる（ｌｏｗｅｒ）」という用語は、こうしたレベルの統計的に有意な減少を指す。減少は、例えば、少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、またはそれ以上であり得る。特定の実施形態では、減少は、少なくとも２０％である。特定の実施形態では、減少は、疾患マーカーにおいて、例えば、タンパク質レベルまたは遺伝子発現レベルにおいて、少なくとも５０％である。対象における標的遺伝子のレベルの文脈で、「低下させる」は、任意選択的に、当該障害のない個体に対して正常範囲内として受け入れられるレベルまで下げることである。特定の実施形態では、「低下させる」は、疾患に罹患する対象について、マーカーまたは症状のレベルと、個体の正常範囲内として受け入れられるレベルとの間の差異における減少であり、運動速度の低下（運動緩慢）のレベル、パーキンソン病を有する個体とパーキンソン病を有さない個体、または正常範囲内にある症状を有する個体における、姿勢とバランスの制御能力のレベルがある。

【０８０４】

「治療有効量」は、本明細書において使用される場合、標的遺伝子に関連する疾患を有する対象に投与されたときに、（例えば、既存の疾患または疾患の一つ以上の症状を減少、改善、または維持することによって）、疾患の治療を行うのに充分な複数標的分子の量を含むことが意図される。「治療有効量」は、複数標的分子、当該剤の投与方法、疾患およびその重症度、ならびに病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、ある場合には先行する、または併用する治療の種類、ならびに治療しようとする対象の他の個人的特徴、に応じて変動し得る。

【０８０５】

「予防有効量」は、本明細書において使用される場合、標的遺伝子に関連する障害を有する対象に投与されたときに、疾患、または疾患の一つ以上の症状を予防または改善するのに充分である、複数標的分子の量を含むことが意図される。疾患の改善は、疾患の経過を鈍化させること、またはこれから発症する疾患の重症度を減少させることを含む。「予防的有効量」は、複数標的分子、当該剤の投与方法、疾患のリスクの程度、および病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、ある場合には先行する、または併用する治療の種類、

ならびに治療しようとする患者の他の個人的特徴、に応じて変動し得る。

【０８０６】

「治療有効量」または「予防有効量」は、任意の処置に適用可能で合理的な利益／リスク比で、いくつかの望ましい局所作用または全身作用を生じさせる複数標的分子の量も含む。本開示の方法において採用される複数標的分子は、こうした処置に適用可能で合理的な利益／リスク比を生じるのに充分な量で投与され得る。

【０８０７】

「薬学的に許容される」という語句は、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、合理的なベネフィット／リスク比に見合う、健全な医学的判断の範囲内でのヒト対象および動物対象の組織との接触での使用に好適であるそれら化合物、材料、組成物または剤形を指す。

【０８０８】

「薬学的に許容される担体」という語句は、本明細書において使用する場合、一つの臓器又は身体の部分から、別の臓器又は身体の部分への主題化合物の運搬又は輸送に関与する、薬学的に許容される材料、組成物、又はビヒクルであって、例えば液体若しくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、潤滑剤、タルク　マグネシウム、ステアリン酸カルシウム若しくはステアリン酸亜鉛、又はステアリン酸）、又は溶媒封入材料など、を意味する。各担体は、製剤の他の原材料に対して適合性であり、かつ治療される対象に対して有害であってはならないという意味において「許容可能」であるものでなければならない。薬学的に許容可能な担体として役立ち得る材料のいくつかの例には、以下が含まれる：（１）糖類、例えば乳糖、グルコースおよびショ糖など、（２）デンプン、例えばトウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなど、（３）セルロース、およびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなど、（４）トラガカント末、（５）モルト、（６）ゼラチン、（７）潤滑剤、例えばマグネシウムステート（ｍａｇｎｅｓｉｕｍ　ｓｔａｔｅ）、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなど、（８）賦形剤、例えばココアバターおよび座薬ワックスなど、（９）オイル、例えばピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブオイル、トウモロコシ油および大豆油など、（１０）グリコール、例えばプロピレングリコールなど、（１１）ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなど、（１２）エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなど、（１３）寒天、（１４）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなど、（１５）アルギニン酸、（１６）発熱因子なしの水、（１７）等張生理食塩水、（１８）リンゲル溶液、（１９）エチルアルコール、（２０）ｐＨ緩衝溶液、（２１）ポリエステル、ポリカーボネート、またはポリ酸無水物、（２２）充填剤、例えばポリペプチド、およびアミノ酸など、（２３）血清成分、例えば血清アルブミン、ＨＤＬおよびＬＤＬなど、ならびに（２２）医薬品製剤に採用される他の非毒性の適合性物質。

【０８０９】

用語「試料」は、本明細書において使用する場合、対象から単離された同様の体液、細胞、または組織、および対象内に存在する体液、細胞、または組織の採取物を包含する。生体液の例としては、血液、血清、および漿液、血漿、髄液、眼液、リンパ液、尿、唾液などが挙げられる。組織試料は、組織、臓器、または局所領域からの試料を含み得る。例えば、試料は、特定の臓器、臓器の部分、またはそれら臓器内の体液もしくは細胞に由来するものであり得る。ある特定の実施形態では、試料は、脳（例えば全脳若しくは脳の特定のセグメント、例えば線条体、又は脳内の特定の型の細胞、例えばニューロン及びグリア細胞（星状細胞、乏突起膠細胞、小グリア細胞））から得られてもよい。他の実施形態では、「対象から得られた試料」は、対象から得られた肝組織（またはその副成分）を指す。一部の実施形態では、「対象から得られた試料」は、対象から得られた血液またはそれらから得られた血漿もしくは血清を指す。さらなる実施形態では、「対象から得られた試料」は、対象から得られた脳組織（またはその副成分）または網膜組織（またはその副成分）を指す。

【０８１０】
複数標的分子の配列設計
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、１９ｎｔの長さの二重平滑末端を含み、この場合において当該センス鎖は、５’末端から７、８、９位の三つの連続するヌクレオチド上に、三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。アンチセンス鎖は、５’末端から１１、１２、１３位の三つの連続するヌクレオチド上に、三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。
【０８１１】
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、２０ｎｔの長さの二重平滑末端を含み、この場合において当該センス鎖は、５’末端から８、９、１０位の三つの連続するヌクレオチド上に、三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。アンチセンス鎖は、５’末端から１１、１２、１３位の三つの連続するヌクレオチド上に、三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。
【０８１２】
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、２１ｎｔの長さの二重平滑末端を含み、この場合において当該センス鎖は、５’末端から９、１０、１１位の三つの連続するヌクレオチド上に、三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。アンチセンス鎖は、５’末端から１１、１２、１３位の三つの連続するヌクレオチド上に、三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。
【０８１３】
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、２１ヌクレオチド（ｎｔ）のセンス鎖および２３ヌクレオチド（ｎｔ）のアンチセンスを含み、この場合において当該センス鎖は、５’末端から９、１０、１１位の三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有し、当該アンチセンス鎖は、５’末端から１１、１２、１３位の三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有し、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡの一方の末端は、平滑であり、もう一方の末端は、２ｎｔのオーバーハングを含む。好ましくは、２ｎｔのオーバーハングは、アンチセンス鎖の３’末端にある。任意選択的に、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、リガンド（例えば、ＧａｌＮＡｃ$_3$）をさらに含む。
【０８１４】
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、このセンス鎖は、２５～３０ヌクレオチド残基の長さであり、５’末端ヌクレオチド（１位）から開始して、当該第一の鎖の１位～２３位は、少なくとも８リボヌクレオチドを含み；アンチセンス鎖は、３６～６６ヌクレオチド残基の長さであり、また３’末端ヌクレオチドから開始して、センス鎖の１～２３位と対合した位置において少なくとも８リボヌクレオチドを含んで二重鎖を形成し；アンチセンス鎖の少なくとも３’末端ヌクレオチドはセンス鎖と対合せず、また最大６個の連続する３’末端ヌクレオチドはセンス鎖と対合せず、それによって１～６ヌクレオチドの３’の一本鎖オーバーハングを形成し；アンチセンス鎖の５’末端は、センス鎖と対合しない１０～３０個の連続するヌクレオチドを含み、それによって１０～３０ヌクレオチドの一本鎖の５’オーバーハングを形成し；少なくともセンス鎖５’末端および３’末端ヌクレオチドは、センス鎖およびアンチセンス鎖が最大の相補性でアライメントされる場合にアンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対形成し、それによってセンス鎖とアンチセンス鎖の間の実質的に二重鎖の領域を形成し；またアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖長の少なくとも１９リボヌクレオチドに沿って標的ＲＮＡに対して充分に相補的であり、二本鎖核酸が哺乳類細胞に導入されたときに標的遺伝子発現を低減させ；またセンス鎖は、三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有し、モチーフのうちの少なくとも一つは、切断部位で、切断部位の近傍で生じる。アンチセンス鎖は、切断部位においてまたはその近傍で三つの連続するヌクレオチド上の三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。

【０８１５】
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、当該エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、少なくとも２５ヌクレオチドであり、かつ最大でも２９ヌクレオチドである長さを有する第一の鎖と、５’末端から１１、１２、１３位の三つの連続するヌクレオチド上の三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを有する最大でも３０ヌクレオチドの長さの第二の鎖とを含み；当該第一の鎖の当該３’末端および当該第二の鎖の当該５’末端は平滑末端を形成し、また第二の鎖は、その３’末端で、第一の鎖よりも１～４ヌクレオチド長く、二重鎖領域は少なくとも２５ヌクレオチドの長さであり、また当該第二の鎖は、当該第二の鎖の長さの少なくとも１９ｎｔに沿って標的ｍＲＮＡに対して充分に相補的であり、当該エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤が哺乳類細胞へと導入されたときに標的遺伝子発現を低減し、また当該エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤のｄｉｃｅｒ切断は、優先的に、当該第二の鎖の当該３’末端を含むｓｉＲＮＡを生じさせ、それによって哺乳動物において標的遺伝子の発現が低減する。任意選択的に、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、リガンド（例えば、ＧａｌＮＡｃ$_3$）をさらに含む。

【０８１６】
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤のセンス鎖は、三つの連続するヌクレオチドの三つの同一の修飾の少なくとも一つのモチーフを含み、当該モチーフのうちの一つは、センス鎖内の切断部位に生じる。例えば、センス鎖は、５’末端から７～１５位内の三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有してもよい。

【０８１７】
一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤のアンチセンス鎖も、三つの連続するヌクレオチド上の三つの同一の修飾の少なくとも一つのモチーフを含有してもよく、当該モチーフのうちの一つは、アンチセンス鎖内の切断部位に、またはその近傍に生じる。例えば、アンチセンス鎖は、５’末端から９～１５位内の三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有してもよい。

【０８１８】
１７～２３ｎｔの長さの二重鎖領域を有するエフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤について、アンチセンス鎖の切断部位は、典型的には、５’末端からおおよそ１０、１１、および１２位である。したがって、三つの同一の修飾のモチーフは、アンチセンス鎖の９、１０、１１位、１０、１１、１２位、１１、１２、１３位、１２、１３、１４位、または１３、１４、１５位にあってもよく、この数字はアンチセンス鎖の５’末端の１番目のヌクレオチドから開始し、またはこの数字はアンチセンス鎖の５’末端から二重鎖領域内の１番目の対形成ヌクレオチドから開始する。アンチセンス鎖内の切断部位も、５’末端からのエフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡの二重鎖領域の長さに応じて変化し得る。

【０８１９】
一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、各々が１４～３０ヌクレオチドを有するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、三つの連続するヌクレオチド上に三つの同一の修飾の少なくとも二つのモチーフを含有し、モチーフのうちの少なくとも一つは、鎖内の切断部位において、またはその近くに存在し、およびモチーフのうちの少なくとも一つは、切断部位のモチーフから少なくとも１ヌクレオチド離れた、鎖の別の部分に存在する。一つの実施形態では、アンチセンス鎖も、三つの連続するヌクレオチド上の三つの同一の修飾の少なくとも一つのモチーフを含有し、モチーフのうちの少なくとも一つは、鎖内の切断部位に、またはその近傍に存在する。センス鎖内の切断部位に、またはその近傍に存在するモチーフの修飾は、アンチセンス鎖内の切断部位に、またはその近傍に存在するモチーフでの修飾とは異なる。

【０８２０】
一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、各々が１４～３０ヌクレオチドを有するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、三つの連続する

ヌクレオチド上に三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有し、モチーフのうちの少なくとも一つは、鎖内の切断部位に、またはその近傍に存在する。一つの実施形態では、アンチセンス鎖も、切断部位に、またはその近傍に三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。

【０８２１】

一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、各々が１４～３０ヌクレオチドを有するセンス鎖およびアンチセンスを含み、センス鎖は、５’末端から９、１０、１１位の三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｆ修飾の少なくとも一つのモチーフを含有し、アンチセンス鎖は、５’末端から１１、１２、１３位の三つの連続するヌクレオチド上に三つの２’－Ｏ－メチル修飾の少なくとも一つのモチーフを含有する。

【０８２２】

一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、標的とのミスマッチ、二本鎖内のミスマッチ、またはそれらの組み合わせを含む。ミスマッチは、オーバーハング領域、または二本鎖領域に存在し得る。塩基対は、解離又は融解を促進するそれらがもつ傾向に基づいて格付けされ得る（例えば、特定の対合の会合又は解離の自由エネルギーに基づくものであり、最も単純なアプローチとしては、個々の対ごとに対を調べることであるが、隣り合う又は類似した分析も使用可能である）。解離の促進の点では、Ａ：ＵはＧ：Ｃより好ましく、Ｇ：ＵはＧ：Ｃより好ましく、またＩ：ＣはＧ：Ｃより好ましい（Ｉ＝イノシン）。ミスマッチ、例えば、非標準の対合又は標準以外の対合（本明細書において別の箇所に記載される）が、標準（Ａ：Ｔ、Ａ：Ｕ、Ｇ：Ｃ）の対合より好ましく、ユニバーサル塩基を含む対合が、標準の対合より好ましい。

【０８２３】

一つの実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ剤は、Ａ：Ｕ、Ｇ：Ｕ、Ｉ：Ｃの群から独立して選択され得る、アンチセンス鎖の５’末端から二本鎖領域内の最初の１、２、３、４、または５塩基対、およびミスマッチ対、例えば、非標準の対形成、または標準以外の対形成、またはユニバーサル塩基を含む対形成のうちの少なくとも一つを含み、二本鎖の５’末端で、アンチセンス鎖の解離を促進する。

【０８２４】

一実施形態では、アンチセンス鎖内の５’末端から二重鎖領域内の１位にあるヌクレオチドは、Ａ、ｄＡ、ｄＵ、ＵおよびｄＴからなる群から選択される。あるいは、アンチセンス鎖の５’末端から二重鎖領域内の最初の１、２または３の塩基対のうち少なくとも一つは、ＡＵ塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の５’末端から二重鎖領域内の最初の塩基対は、ＡＵ塩基対である。

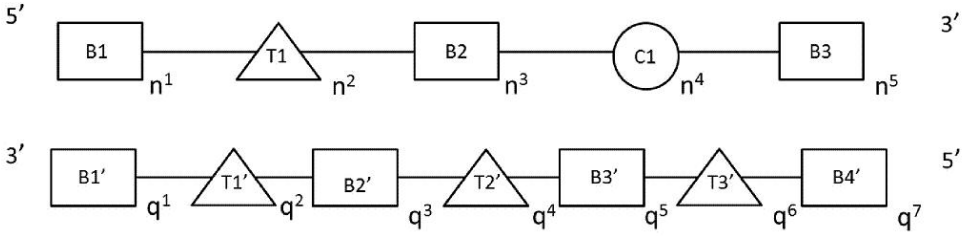
【０８２５】

一部の実施形態では、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤が、本明細書に提供される。エフェクター分子は、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）剤であり、すなわち、標的遺伝子の発現を阻害するためのｓｉＲＮＡである。ｄｓＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、オリゴヌクレオチドは、別段の記載がない限り、相互交換可能に使用され得ることを理解されたい。

【０８２６】

エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、各鎖は１４～４５ヌクレオチドを有する。エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、式（Ｉ）によって表される：

【化１２９】



（Ｉ）、

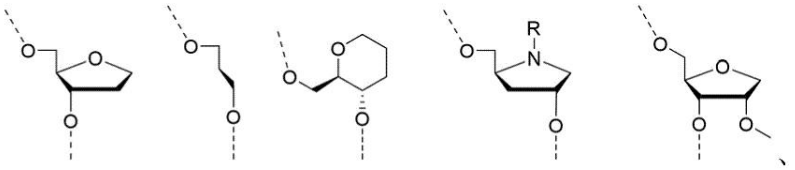
【０８２７】

式（Ｉ）中、Ｂ１、Ｂ２、Ｂ３、Ｂ１’、Ｂ２’、Ｂ３’、およびＢ４’は各々独立して、２’－Ｏ－アルキル、２’－置換アルコキシ、２’－置換アルキル、２’－ハロ、ＥＮＡ、およびＢＮＡ／ＬＮＡからなる群から選択される修飾を含有するヌクレオチドである。一実施形態では、Ｂ１、Ｂ２、Ｂ３、Ｂ１’、Ｂ２’、Ｂ３’、およびＢ４’はそれぞれ、２’－ＯＭｅ修飾を含有する。一実施形態では、Ｂ１、Ｂ２、Ｂ３、Ｂ１’、Ｂ２’、Ｂ３’、およびＢ４’はそれぞれ、２’－ＯＭｅ修飾または２’－Ｆ修飾を含有する。一実施形態では、Ｂ１、Ｂ２、Ｂ３、Ｂ１’、Ｂ２’、Ｂ３’、およびＢ４’のうちの少なくとも一つは、２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）修飾を含有する。

【０８２８】

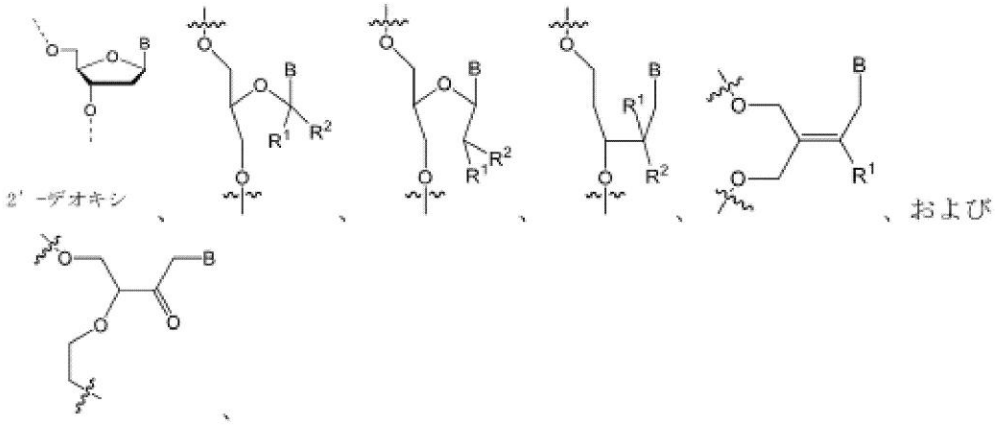
Ｃ１は、アンチセンス鎖のシード領域に対向する部位（すなわち、アンチセンス鎖の５’末端の２～８位）に配置された熱的不安定化ヌクレオチドである。例えば、Ｃ１は、アンチセンス鎖の５’末端の２～８位におけるヌクレオチドと対合するセンス鎖の位置にある。一実施例では、Ｃ１は、センス鎖の５’末端から１５位にある。Ｃ１ヌクレオチドは、脱塩基修飾、二重鎖における対向するヌクレオチドとのミスマッチ、および糖修飾、例えば２’－デオキシ修飾または非環式ヌクレオチド、例えばアンロック核酸（ＵＮＡ）またはグリセロール核酸（ＧＮＡ）など、を含み得る熱的不安定化修飾を保持する。一実施形態では、Ｃ１は、ｉ）アンチセンス鎖内の対向するヌクレオチドとのミスマッチ、ｉｉ）以下からなる群から選択される脱塩基修飾、

【化１３０】



およびｉｉｉ）以下からなる群から選択される糖修飾であって、

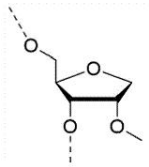
【化１３１】



式中、Ｂは、修飾または未修飾の核酸塩基であり、R^1およびR^2は独立に、Ｈ、ハロゲン、OR_3、またはアルキルであり、R_3はＨ、アルキル、シクロアルキル、アリール、

アラルキル、ヘテロアリール、または糖である糖修飾、からなる群から選択される熱的不安定化修飾を有する。一実施形態では、Ｃ１における熱的不安定化修飾は、Ｇ：Ｇ、Ｇ：Ａ、Ｇ：Ｕ、Ｇ：Ｔ、Ａ：Ａ、Ａ：Ｃ、Ｃ：Ｃ、Ｃ：Ｕ、Ｃ：Ｔ、Ｕ：Ｕ、Ｔ：Ｔ、およびＵ：Ｔからなる群から選択されるミスマッチであり、随意に、ミスマッチ対内の少なくとも一つの核酸塩基が、２’－デオキシ核酸塩基である。一実施例では、Ｃ１における熱的不安定化修飾は、ＧＮＡまたは

【化１３２】



である。

【０８２９】

Ｔ１、Ｔ１’、Ｔ２’、およびＴ３’はそれぞれ独立的に、２’－ＯＭｅ修飾の立体的嵩高さと等しいかまたはそれ以下の立体的嵩高さをヌクレオチドに提供する修飾を含むヌクレオチドを表す。立体的嵩高さは、修飾の立体効果の総和を指す。ヌクレオチドの修飾の立体効果を決定する方法は、当業者に公知である。修飾は、ヌクレオチドのリボース糖の２’位にあり得る、または非リボースヌクレオチド、非環式ヌクレオチド、もしくはリボース糖の２’位と類似もしくは同等であるヌクレオチドの骨格に対する修飾であり得、そしてヌクレオチドに、２’－ＯＭｅ修飾の立体的嵩高さ以下の立体的嵩高さを提供する。例えば、Ｔ１、Ｔ１’、Ｔ２’、およびＴ３’は、それぞれ独立的に、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＬＮＡ、２’－Ｆ、および２’－Ｆ－５’－メチルから選択される。一つの実施形態では、Ｔ１、Ｔ１’、Ｔ２’、およびＴ３’は、それぞれ独立して、２’－Ｆである。一つの実施形態では、Ｔ１は、ＤＮＡである。一実施形態では、Ｔ１’はＤＮＡ、ＲＮＡ、またはＬＮＡである。一実施形態では、Ｔ２’はＤＮＡ、またはＲＮＡである。一実施形態では、Ｔ３’はＤＮＡ、またはＲＮＡである。

【０８３０】

n^1、n^3、およびq^1は独立的に、４～１５ヌクレオチドの長さである。

【０８３１】

n^5、q^3、およびq^7は独立的に、１～６ヌクレオチドの長さである。

【０８３２】

n^4、q^2、およびq^6は独立的に、１～３ヌクレオチドの長さであり、あるいはn^4は０ヌクレオチドの長さである。
q^5は独立的に、０～１０ヌクレオチドの長さである。

【０８３３】

n^2、およびq^4は独立的に、０～３ヌクレオチドの長さである。

【０８３４】

あるいは、n^4は、０～３ヌクレオチドの長さである。

【０８３５】

一実施形態では、n^4は、０であり得る。一実施例では、n^4は０であり、またq^2およびq^6は１である。別の例では、n^4は０であり、またq^2およびq^6は１であり、これらはセンス鎖の１～５位（センス鎖の５’末端から数える）の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾と、アンチセンス鎖（アンチセンス鎖の５’末端から数える）の１位および２位における二つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾ならびに１８～２３位の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾とを伴う。

【０８３６】

一実施形態では、n^4、q^2、およびq^6はそれぞれ１である。

【０８３７】

一実施形態では、n^2、n^4、q^2、q^4、およびq^6はそれぞれ１である。

【０８３８】

一実施形態では、Ｃ１は、センス鎖が１９～２２ヌクレオチドの長さ、かつn^4が１であるとき、センス鎖の５’末端の１４～１７位にある。一実施形態では、Ｃ１は、センス鎖の５’末端の１５位にある。

【０８３９】

一実施形態では、Ｔ３’は、アンチセンス鎖の５’末端から２位において開始する。一実施例では、Ｔ３’は、アンチセンス鎖の５’末端から２位にあり、またq^6が１に等しい。

【０８４０】

一実施形態では、Ｔ１’は、アンチセンス鎖の５’末端から１４位において開始する。一実施例では、Ｔ１’は、アンチセンス鎖の５’末端から１４位にあり、またq^2が１に等しい。

【０８４１】

例示的な実施形態では、Ｔ３’は、アンチセンス鎖の５’末端から２位から開始し、またＴ１’は、アンチセンス鎖の５’末端から１４位から開始する。一実施例では、Ｔ３’はアンチセンス鎖の５’末端から２位から開始し、またq^6が１に等しく、またＴ１’はアンチセンス鎖の５’末端から１４位から開始し、またq^2が１に等しい。

【０８４２】

一実施形態では、Ｔ１’およびＴ３’は、１１ヌクレオチドの長さ（すなわち、Ｔ１’およびＴ３’ヌクレオチドは数えない）だけ分離される。

【０８４３】

一実施形態では、Ｔ１’は、アンチセンス鎖の５’末端から１４位にある。一実施例では、Ｔ１’は、アンチセンス鎖の５’末端から１４位にあり、またq^2が１に等しく、また非リボースの非環式または骨格における２’位にある修飾は、２’－ＯＭｅリボースよりも少ない立体的嵩高さである。

【０８４４】

一実施形態では、Ｔ３’は、アンチセンス鎖の５’末端から２位にある。一実施例では、Ｔ３’は、アンチセンス鎖の５’末端から２位にあり、またq^6が１に等しく、また非リボースの非環式または骨格における２’位における修飾は、２’－ＯＭｅリボースよりも少ないまたは同等の立体的嵩高さである。

【０８４５】

一実施形態では、Ｔ１はセンス鎖の切断部位にある。一実施例では、Ｔ１は、センス鎖が１９～２２ヌクレオチドの長さ、かつn^2が１であるとき、センス鎖の５’末端から１１位にある。例示的な実施形態では、Ｔ１は、センス鎖が１９～２２ヌクレオチドの長さ、かつn^2が１であるとき、センス鎖の５’末端から１１位にあるセンス鎖の切断部位にある。

【０８４６】

一実施形態では、Ｔ２’は、アンチセンス鎖の５’末端から６位において開始する。一実施例では、Ｔ２’は、アンチセンス鎖の５’末端から６～１０位にあり、またq^4が１である。

【０８４７】

例示的な実施形態では、Ｔ１は、センス鎖の切断部位にあり、例えばセンス鎖が１９～２２ヌクレオチドの長さ、かつn^2が１のとき、センス鎖の５’末端から１１位にあり、Ｔ１’は、アンチセンス鎖の５’末端から１４位にあり、またq^2が１に等しく、そしてＴ１’に対する修飾は、リボース糖の２’位、または２’－ＯＭｅリボースよりも立体的嵩高さが少ない非リボースの非環式または骨格内の位置にあり、Ｔ２’は、アンチセンス鎖の５’末端から６～１０位にあり、またq^4が１であり、ならびにＴ３’は、アンチセンス鎖の５’末端から２位にあり、またq^6が１に等しく、またＴ３’に対する修飾は、２’位にあるか、または２’－ＯＭｅリボースよりも立体的嵩高さが少ない非リボースの非環式または骨格内の位置にある。

【０８４８】
一実施形態では、Ｔ２’は、アンチセンス鎖の５’末端から８位において開始する。一実施例では、Ｔ２’は、アンチセンス鎖の５’末端から８位において開始し、また^{4}qが２である。
一実施形態では、Ｔ２’は、アンチセンス鎖の５’末端から９位において開始する。一実施例では、Ｔ２’は、アンチセンス鎖の５’末端から９位にあり、また^{4}qが１である。
【０８４９】
一つの実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^{1}nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^{2}が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^{3}が７であり、ｎ^{4}が０であり、Ｂ３が２’ＯＭｅであり、n^{5}が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、ｑ^{1}が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^{2}qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^{3}が４であり、Ｔ２’が２’－Ｆであり、^{4}qが２であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^{5}qが５であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^{6}qが１であり、Ｂ４’が２’－ＯＭｅであり、また^{7}qが１である。
【０８５０】
一部の実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^{1}nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^{2}が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^{3}が７であり、ｎ^{4}が０であり、Ｂ３が２’－ＯＭｅであり、n^{5}が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、ｑ^{1}が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^{2}qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^{3}が４であり、Ｔ２’が２’－Ｆであり、^{4}qが２であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^{5}qが５であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^{6}qが１であり、Ｂ４’が２’－ＯＭｅであり、また^{7}qが１であり、これらはセンス鎖の１～５位（センス鎖の５’末端から数えて）の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、アンチセンス鎖（アンチセンス鎖の５’末端から数えて）の１位および２位における二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾ならびに１８～２３位の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、を伴う。
【０８５１】
一部の実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^{1}nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^{2}が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^{3}が７であり、ｎ^{4}が０であり、Ｂ３が２’－ＯＭｅであり、n^{5}が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、ｑ^{1}が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^{2}qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^{3}が４であり、ｑ^{4}が０であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、ｑ^{5}が７であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^{6}qが１であり、Ｂ４’が２’－ＯＭｅであり、またｑ^{7}が１である。
【０８５２】
一部の実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^{1}nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^{2}が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^{3}が７であり、ｎ^{4}が０であり、Ｂ３が２’－ＯＭｅであり、n^{5}が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、ｑ^{1}が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^{2}qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^{3}が４であり、ｑ^{4}が０であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、ｑ^{5}が７であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^{6}qが１であり、Ｂ４’が２’－ＯＭｅであり、またｑ^{7}が１であり、これらはセンス鎖の１～５位（５’末端から数えて）の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、アンチセンス鎖（５’末端から数えて）の１位および２位における二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾ならびに１８～２３位の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、を伴う。
【０８５３】
一部の実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^{1}nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^{2}が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^{3}が７であり、ｎ^{4}が０であり、Ｂ３が２’ＯＭｅであり、n^{5}が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆで

あり、q^1が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^2qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^3が４であり、Ｔ２’が２’－Ｆであり、^4qが２であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^5qが５であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^6qが１であり、Ｂ４’が２’－Ｆであり、また^7qが１である。

【０８５４】

一部の実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^1nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^2が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^3が７であり、n^4が０であり、Ｂ３が２’－ＯＭｅであり、n^5が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^1が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^2qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^3が４であり、Ｔ２’が２’－Ｆであり、^4qが２であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^5qが５であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^6qが１であり、Ｂ４’が２’－Ｆであり、また^7qが１であり、これらはセンス鎖の１～５位（センス鎖の５’末端から数えて）の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、アンチセンス鎖（アンチセンス鎖の５’末端から数えて）の１位および２位における二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾ならびに１８～２３位の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、を伴う。

【０８５５】

一部の実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^1nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^2が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^3が７であり、n^4が０であり、Ｂ３が２’－ＯＭｅであり、n^5が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^1が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^2qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^3が４であり、q^4が０であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^5が７であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^6qが１であり、Ｂ４’が２’－Ｆであり、またq^7が１である。

【０８５６】

一部の実施形態では、Ｂ１が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、^1nが８であり、Ｔ１が２’Ｆであり、n^2が３であり、Ｂ２が２’－ＯＭｅであり、n^3が７であり、n^4が０であり、Ｂ３が２’－ＯＭｅであり、n^5が３であり、Ｂ１’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^1が９であり、Ｔ１’が２’－Ｆであり、^2qが１であり、Ｂ２’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^3が４であり、q^4が０であり、Ｂ３’が２’－ＯＭｅまたは２’－Ｆであり、q^5が７であり、Ｔ３’が２’－Ｆであり、^6qが１であり、Ｂ４’が２’－Ｆであり、またq^7が１であり、これらはセンス鎖の１～５位（センス鎖の５’末端から数えて）の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、アンチセンス鎖（アンチセンス鎖の５’末端から数えて）の１位および２位における二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾ならびに１８～２３位の範囲内にある二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾と、を伴う。

【０８５７】

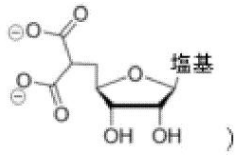
一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤のうちの１００％、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、または３０％が、修飾される。例えば、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤の５０％が修飾される場合、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤に存在するすべてのヌクレオチドの５０％が、本明細書に記載される修飾を含有する。

【０８５８】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖はそれぞれ独立して、非環式ヌクレオチド、ＬＮＡ、ＨＮＡ、ＣｅＮＡ、２’－メトキシエチル、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－アリル、２’－Ｃ－アリル、２’－デオキシ、２’－フルオロ、２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエトキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、または２’－アラ－Ｆで修飾される。

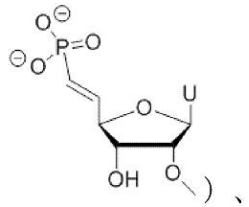
【０８５９】
一つの実施形態では、ｄｓＲＮＡ剤またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖はそれぞれ、少なくとも二つの異なる修飾を含有する。
【０８６０】
一つの実施形態では、式（Ｉ）のエフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、１～１０ヌクレオチドの長さの３’オーバーハングおよび／または５’オーバーハングをさらに含む。一つの例では、式（Ｉ）のエフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に３’オーバーハング、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を含む。別の例では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、センス鎖の５’末端に５’オーバーハングを有する。
【０８６１】
一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、いかなる２’－Ｆ修飾も含有しない。
【０８６２】
一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）もしくはｓｃｉＲＮＡ剤のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合の一つ以上のブロックを含む。一つの例では、センス鎖は、二個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合のブロックを一つ含む。一つの例では、アンチセンス鎖は、二個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合のブロックを二つ含む。例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合の二つのブロックは、１６～１８個のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離される。
【０８６３】
一つの実施形態では、二本鎖のアンチセンス鎖の５’末端の１位のヌクレオチドは、Ａ、ｄＡ、ｄＵ、Ｕ、およびｄＴからなる群から選択される。一つの実施形態では、アンチセンス鎖の５’－末端から一番目、二番目、および三番目の塩基対のうちの少なくとも一つは、ＡＵ塩基対である。
【０８６４】
一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤のアンチセンス鎖は、標的ＲＮＡと１００％相補的であり、標的ＲＮＡとハイブリダイズし、ＲＮＡ干渉を介してその発現を阻害する。別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤のアンチセンス鎖は、標的ＲＮＡに対して、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％、または少なくとも５０％相補的である。
【０８６５】
式（Ｉ）によって表されるエフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤の配列設計に関する追加的な例示的実施形態は、ＷＯ２０１６／０２８６４９に見出すことができ、当該文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０８６６】
エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、センスヌクレオチド配列またはアンチセンスヌクレオチド配列の５’末端にリン含有基を含み得る。５’末端のリン含有基は、５’末端ホスフェート（５’－Ｐ）、５’末端ホスホロチオエート（５’－ＰＳ）、５’末端ホスホロジチオエート（５’－PS_2）、５’末端ビニルホスホネート（５’－ＶＰ）、５’末端メチルホスホネート（ＭｅＰｈｏｓ）、または５’－デオキシ－５’－Ｃ－マロニル（

【化１３３】



であってもよい。５’末端リン含有基が、５’末端ビニルホスホネート（５’－ＶＰ）である場合、５’－ＶＰは、５’－Ｅ－ＶＰ異性体（すなわち、トランス－ビニルホスフェート、

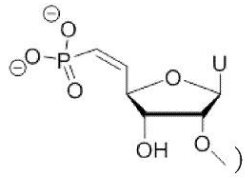
【化１３４】



、

５’－Ｚ－ＶＰ異性体（すなわち、シス－ビニルホスフェート、

【化１３５】



、

またはそれらの混合物のいずれかであってもよい。

【０８６７】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、センスヌクレオチド配列の５’末端に、リン含有基を含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンスヌクレオチド配列の５’末端に、リン含有基を含む。

【０８６８】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、５’－Ｐを含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンスヌクレオチド配列に、５’－Ｐを含む。

【０８６９】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、５’－ＰＳを含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンスヌクレオチド配列に、５’－ＰＳを含む。

【０８７０】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、５’－ＶＰを含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンスヌクレオチド配列に、５’－ＶＰを含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンスヌクレオチド配列に、５’－Ｅ－ＶＰを含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンスヌクレオチド配列に、５’－Ｚ－ＶＰを含む。

【０８７１】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、５’－PS_2を含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）は、アンチセンスヌクレオチド配列に、５’－PS_2を含む。

【０８７２】
一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、５’－PS_2を含む。一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）は、アンチセンスヌクレオチド配列に、５’－デオキシ－５’－Ｃ－マロニルを含む。
【０８７３】
一部の実施形態では、本開示は、標的遺伝子の発現を阻害することができる、本明細書に定義されるエフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤に関する。エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、各鎖は１４～４５ヌクレオチドを有する。センス鎖は、少なくとも一つの熱不安定化ヌクレオチドを含有し、当該熱不安定化ヌクレオチドのうちの少なくとも一つは、アンチセンス鎖のシード領域に対向する部位、またはその近傍に存在する（すなわち、アンチセンス鎖の５’末端の２～８位）。式（Ｉ）によって表されるエフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡに関し、本明細書に記載される実施形態および態様の各々は、熱不安定化ヌクレオチドを含有するエフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡにも適用され得る。
【０８７４】
熱不安定化ヌクレオチドは、例えば、センス鎖が２１ヌクレオチドの長さである場合、センス鎖の５’末端の１４位～１７位の間に存在し得る。アンチセンス鎖は、立体的に制限のある２’－ＯＭｅ修飾よりも小さい修飾核酸を少なくとも二つ含有する。好ましくは、立体的に制限のある２’－ＯＭｅよりも小さい二つの修飾核酸は、１１ヌクレオチドの長さで分離される。例えば、二つの修飾核酸は、アンチセンス鎖の５’末端の２位および１４位にある。
【０８７５】
例えば、本明細書で定義されるｄｓＲＮＡ剤またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、ｉ）センス鎖またはアンチセンス鎖の５’末端にリン含有基、ｉｉ）センス鎖の１～５位内（センス鎖の５’末端から数えて）に二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾、ならびにアンチセンス鎖の１位および２位（アンチセンス鎖の５’末端から数えて）に二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾、および１８～２３位内に二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合修飾、ｉｉｉ）センス鎖もしくはアンチセンス鎖の５’末端または３’末端に例えば、ＡＳＧＰＲリガンドなどのリガンド（例えば、一つ以上のＧａｌＮＡｃ誘導体）、を含み得る。例えば、リガンドは、センス鎖の３’末端にあってもよい。
【０８７６】
一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンスの５’末端から数えて７位、センス鎖の５’末端から数えて１５位、センス鎖の５’末端から数えて２１位、またはそれらの組み合わせで、熱不安定化修飾をさらに含む。
【０８７７】
一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤のセンス鎖は、センス鎖の切断部位に、エンドヌクレアーゼ感受性の修飾ヌクレオチドをさらに含む。一つの例では、エンドヌクレアーゼ感受性の修飾ヌクレオチドは、センス鎖の５’末端から１１位にある。
【０８７８】
一部の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；および

（ｉｉｉ）１位、３位、５位、７位、９位～１１位、１３位、１７位、１９位、および２１位に２’－Ｆ修飾、ならびに２位、４位、６位、８位、１２位、１４位～１６位、１８位、および２０位に２’－ＯＭｅ修飾（５’末端から数える）；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位、５位、９位、１１位～１３位、１５位、１７位、１９位、２１位および２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、４位、６位～８位、１０位、１４位、１６位、１８位、２０位および２２位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８７９】

別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１位、３位、５位、７位、９位～１１位、１３位、１５位、１７位、１９位、および２１位に２’－Ｆ修飾、ならびに２位、４位、６位、８位、１２位、１４位、１６位、１８位、および２０位に２’－ＯＭｅ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位、５位、７位、９位、１１位～１３位、１５位、１７位、１９位、および２１位～２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、４位、６位、８位、１０位、１４位、１６位、１８位、および２０位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８８０】

別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１位から６位、８位、１０位、および１２位から２１位に２’－ＯＭｅ修飾、７位および９位に２’－Ｆ修飾、ならびに１１位にデオキシ－ヌクレオチド（例えば

、ｄＴ）（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位、７位、９位、１１位、１３位、１５位、１７位、および１９位～２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、４位～６位、８位、１０位、１２位、１４位、１６位、および１８位２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８８１】

別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１～６位、８位、１０位、１２位、１４位、および１６～２１位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに７位、９位、１１位、１３位、および１５位に２’－Ｆ修飾；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、５位、７位、９位、１１位、１３位、１５位、１７位、１９位、および２１位～２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位～４位、６位、８位、１０位、１２位、１４位、１６位、１８位、および２０位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８８２】

別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１～９位、および１２～２１位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに１０位およ

び１１位に２’－Ｆ修飾；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位、５位、７位、９位、１１位～１３位、１５位、１７位、１９位、および２１位～２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、４位、６位、８位、１０位、１４位、１６位、１８位、および２０位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８８３】

別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１位、３位、５位、７位、９～１１位、および１３位に２’－Ｆ修飾、ならびに２位、４位、６位、８位、１２位、および１４～２１位に２’－ＯＭｅ修飾；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位、５位から７位、９位、１１位から１３位、１５位、１７位から１９位、および２１位から２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、４位、８位、１０位、１４位、１６位、および２０位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８８４】

別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１位、２位、４位、６位、８位、１２位、１４位、１５位、１７位、およ

び１９～２１位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに３位、５位、７位、９～１１位、１３位、１６位、および１８位に２’－Ｆ修飾；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２５ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、４位、６位、７位、９位、１１～１３位、１５位、１７位、および１９～２３位に２’－ＯＭｅ修飾、２位、３位、５位、８位、１０位、１４位、１６位、および１８位に２’－Ｆ修飾、ならびに２４位および２５位にデオキシ－ヌクレオチド（例えば、ｄＴ）（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に４ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。
【０８８５】
別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１～６位、８位、および１２～２１位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに７位、および９～１１位に２’－Ｆ修飾；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位から５位、７位、８位、１０位～１３位、１５位、および１７位～２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、６位、９位、１４位、および１６位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。
【０８８６】
別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１～６位、８位、および１２～２１位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに７位

、および９～１１位に２’－Ｆ修飾；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位から５位、７位、１０位～１３位、１５位、および１７位～２３位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、６位、８位、９位、１４位、および１６位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの２１位と２２位との間、およびヌクレオチドの２２位と２３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８８７】

別の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）１９ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）任意選択的に、３’末端に結合したＡＳＧＰＲリガンドであって、当該ＡＳＧＰＲリガンドは、三価分岐型リンカーを介して結合された三つのＧａｌＮＡｃ誘導体を含み；
（ｉｉｉ）１～４位、６位、および１０～１９位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに５位、および７～９位に２’－Ｆ修飾；ならびに
（ｉｖ）ヌクレオチドの１位と２位との間、およびヌクレオチドの２位と３位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）２１ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）１位、３位から５位、７位、１０位～１３位、１５位、および１７位～２１位に２’－ＯＭｅ修飾、ならびに２位、６位、８位、９位、１４位、および１６位に２’－Ｆ修飾（５’末端から数える）；ならびに
（ｉｉｉ）ヌクレオチドの１位と２位の間、ヌクレオチドの２位と３位との間、ヌクレオチドの１９位と２０位との間、およびヌクレオチドの２０位と２１位との間（５’末端から数える）に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合；
この場合において、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、アンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングを有し、およびアンチセンス鎖の５’末端に平滑末端を有する。

【０８８８】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：
（ａ）以下を有するセンス鎖：
（ｉ）１８～２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）７位～１５位に三つの連続的な２’－Ｆ修飾、を有する；ならびに
（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：
（ｉ）１８～２３ヌクレオチドの長さ；
（ｉｉ）鎖上のいずれかに少なくとも２’－Ｆ修飾；および
（ｉｉｉ）最初の五ヌクレオチド（５’末端から数える）に少なくとも二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合；

当該エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、少なくとも一つの鎖上の一つ以上の位置にコンジュゲートされた一つ以上の親油性部分を有し、およびアンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングと、アンチセンス鎖の５’末端に平滑末端、または二本鎖の両端に平滑末端のいずれかを有する。

【０８８９】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：

（ａ）以下を有するセンス鎖：

（ｉ）１８～２３ヌクレオチドの長さ；

（ｉｉ）四個未満の２’－Ｆ修飾；

（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：

（ｉ）１８～２３ヌクレオチドの長さ；

（ｉｉ）１２個未満の２’－Ｆ修飾；および

（ｉｉｉ）最初の五ヌクレオチド（５’末端から数える）に少なくとも二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合；

当該エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、少なくとも一つの鎖上の一つ以上の位置にコンジュゲートされた一つ以上の親油性部分を有し、およびアンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングと、アンチセンス鎖の５’末端に平滑末端、または二本鎖の両端に平滑末端のいずれかを有する。

【０８９０】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、以下を含む：

（ａ）以下を有するセンス鎖：

（ｉ）１９～３５ヌクレオチドの長さ；

（ｉｉ）四個未満の２’－Ｆ修飾；

（ｂ）以下を有するアンチセンス鎖：

（ｉ）１９～３５ヌクレオチドの長さ；

（ｉｉ）１２個未満の２’－Ｆ修飾；および

（ｉｉｉ）最初の五ヌクレオチド（５’末端から数える）に少なくとも二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合；

当該二本鎖領域は、１９～２５塩基対（好ましくは、１９、２０、２１または２２）であり；当該エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、少なくとも一つの鎖上の一つ以上の位置にコンジュゲートされた一つ以上の親油性部分を有し、およびアンチセンス鎖の３’末端に二ヌクレオチドのオーバーハングと、アンチセンス鎖の５’末端に平滑末端、または二本鎖の両端に平滑末端のいずれかを有する。

【０８９１】

本開示は、キメラ化合物であるエフェクター分子、および複数標的エフェクター分子（またはｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）分子も含む。本開示の文脈において、「キメラ化合物」または「キメラ」は、二つ以上の化学的に別個の領域を含む化合物であり、各領域は、少なくとも一つの単量体単位、例えばオリゴヌクレオチドの場合には修飾ヌクレオチドまたは非修飾ヌクレオチドから構成される。キメラ化合物は、特定のモチーフを有すると記載される場合がある。一部の実施形態では、モチーフとしては限定されないが、交互モチーフ、ギャップ化モチーフ、ヘミマーモチーフ、均一に完全に修飾されたモチーフ、および位置修飾モチーフが挙げられる。本明細書で使用される場合、「化学的に別個の領域」という語句は、化合物の他の場所には存在しない修飾を有することによって、または化合物の他の場所に存在する修飾を有しないことによって、他の領域とは異なる、複数標的分子の領域を指す。複数標的分子は、二つ以上の化学的に別個の領域を含むことができる。本明細書で使用される場合、修飾を含まない領域も、化学的に別個であるとみなされる。

【０８９２】

化学的に別個の領域は、複数標的分子化合物内で繰り返される場合がある。したがって、第一の化学的に別個の領域に続いて、一つ以上の第二の化学的に別個の領域が続くように、複数標的分子中に化学的に別個の領域のパターンを実現することができる。化学的に別個の領域のこのシーケンスは、一回以上繰り返すことができる。配列は複数回繰り返されることが好ましい。例えば、二本鎖エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の両方の鎖は、これらのシーケンスを含んでもよい。化学的に別個の領域はそれぞれ、実際にはわずか一つの単量体、例えばヌクレオチドしか含まなくてもよい。一部の実施形態では、化学的に別個の領域はそれぞれ、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８個の例えばヌクレオチドなどの単量体を含む。

【０８９３】

一部の実施形態では、交互ヌクレオチドは、同じ修飾を含む。例えば、鎖中の奇数ヌクレオチドの全てが同じ修飾を有し、および／または鎖中の偶数ヌクレオチドの全てが、第一の鎖と類似した修飾を有する。一部の実施形態では、二本鎖エフェクター分子または複数標的ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）分子中の奇数ヌクレオチドはすべてが同じ修飾を有し、偶数ヌクレオチドはすべてが、奇数ヌクレオチド中に存在しない修飾を有する。その逆もまた同様である。

【０８９４】

二本鎖分子の両鎖が交互修飾パターンを含む場合、一方の鎖のヌクレオチドは、同様に修飾された第二の鎖のヌクレオチドに対し、適所で相補的であり得る。代替的な実施形態では、第二の鎖の同様の修飾のパターンと比較して、第一の鎖のそれぞれの修飾パターンの間には、位相シフが存在する。シフトは、第一の鎖および第二の鎖の同様に修飾されたヌクレオチドが、互いに相補的な位置にないようなものであることが好ましい。

【０８９５】

一部の実施形態では、第一の鎖は、交互修飾パターンを有し、交互ヌクレオチドは、２’－修飾、例えば、２’－Ｏ－メチル修飾を含む。一部の実施形態では、第一の鎖は、交互の２’－Ｏ－メチル修飾を含み、第二の鎖は、交互の２’－フルオロ修飾を含む。他の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの両方の鎖は、交互の２’－Ｏ－メチル修飾を含む。

【０８９６】

二本鎖オリゴヌクレオチドの両方の鎖が、交互の２’－Ｏ－メチル修飾を含む場合、当該２’－修飾ヌクレオチドは、二本鎖領域において相補的な位置にあり得る。あるいは、当該２’－修飾ヌクレオチドは、二本鎖領域において相補的な位置になくてもよい。

【０８９７】

一部の実施形態では、複数標的分子中に存在するオリゴヌクレオチドは、二つの化学的に別個の領域を含み、各領域は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０ヌクレオチドの長さである。

【０８９８】

他の実施形態では、複数標的分子中に存在するオリゴヌクレオチドは、三つの化学的に別個の領域を含む。中間領域は、約５～１５（例えば、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５）ヌクレオチドの長さであり、各隣接領域またはウィング領域は独立して、１～１０（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０）ヌクレオチドの長さである。三つの領域すべてが異なる修飾を有してもよく、またはウィング領域は、互いに類似して修飾されてもよい。一部の実施形態では、ウィング領域は、等しい長さであり、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０ヌクレオチドの長さである。

【０８９９】

本明細書で使用される場合、「交互モチーフ」という用語は、結合された単量体サブユニットの連続するシーケンスを含む化合物を指し、この場合において当該単量体サブユニットは、原則として化合物の配列全体で交互になる二つの異なるタイプの糖基を有する。交互モチーフを有するオリゴヌクレオチドは、以下の式によって記載することができる：

５’－　Ａ（－Ｌ－Ｂ－Ｌ－Ａ）ｎ（－Ｌ－Ｂ）ｍ－３’、式中、ＡおよびＢは、異なる糖基を有する単量体サブユニットであり、各Ｌは、ヌクレオシド間結合基であり、ｎは、約４～約１２であり、ｍは、０または１である。これにより、約９～約２６個の単量体サブユニットの長さの交互モチーフを有する化合物が可能となる。この長さ範囲は、限定であることは意図されず、より長い化合物やより短い化合物も本開示に適している。一部の実施形態では、ＡおよびＢのうちの一つは、本明細書に提供される２’－修飾ヌクレオシドである。

【０９００】

本明細書で使用される場合、ヌクレオシド、またはヌクレオシドの「タイプ」に関し、「修飾のタイプ」とは、ヌクレオシドの修飾を指し、修飾ヌクレオシドと非修飾ヌクレオシドを含む。したがって、別段の示唆がない限り、「第一のタイプの修飾を有するヌクレオシド」は、非修飾ヌクレオシドであってもよい。

【０９０１】

本明細書で使用される場合、「タイプ領域」とは、化合物の一部を指し、この場合において当該領域中のヌクレオシドおよびヌクレオシド間結合はすべて、同じタイプの修飾を含み、任意の隣接部分のヌクレオシドおよび／またはヌクレオシド間結合は、異なるタイプの修飾を少なくとも一つ含む。本明細書で使用される場合、「均一に完全に修飾されたモチーフ」という用語は、それぞれが同じタイプの糖基を有する、結合された単量体サブユニットの連続するシーケンスを含むオリゴヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、均一に完全に修飾されたモチーフは、本開示のヌクレオシドの連続するシーケンスを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供されるヌクレオシドの連続するシーケンスの３’末端および５’末端の一方または両方は、例えば、一つ以上の非修飾ヌクレオシドなどの末端基を含有する。

【０９０２】

特定の実施形態では、例えば、複数標的ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）分子またはエフェクター分子などの化合物の５’末端単量体は、５’末端にリン部分を含む。特定の実施形態では、５’末端単量体は、２’－修飾を含む。特定のかかる実施形態では、５’末端単量体の２’－修飾は、カチオン性修飾である。特定の実施形態では、５’末端単量体は、５’－修飾を含む。特定の実施形態では、５’末端単量体は、２’－修飾と５’－修飾を含む。特定の実施形態では、５’末端単量体は、５’安定化ヌクレオシドである。特定の実施形態では、５’末端単量体の修飾は、５’－リン酸を安定化する。特定の実施形態では、５’末端単量体の修飾を含む化合物は、エクソヌクレアーゼに対して耐性である。特定の実施形態では、５’末端単量体の修飾を含む化合物は、遺伝子発現調節特性が改善されている。

【０９０３】

特定の実施形態では、５’末端単量体は、修飾結合を介して、化合物の残りの部分に結合される。特定のかかる実施形態では、５’末端単量体は、ホスホロチオエート結合によって、化合物の残りの部分に結合される。

【０９０４】

特定の実施形態では、本開示のオリゴマー化合物は、交互修飾の領域を一つ以上含む。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、交互ヌクレオシド修飾の領域を一つ以上含む。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、交互結合修飾の領域を一つ以上含む。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、交互ヌクレオシド修飾および交互結合修飾の領域を一つ以上含む。

【０９０５】

特定の実施形態では、本開示のオリゴマー化合物は、交互の２’－Ｆ修飾ヌクレオシド、および２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオシドの領域を一つ以上含む。特定のかかる実施形態では、交互の２’Ｆ修飾ヌクレオシドおよび２’ＯＭｅ修飾ヌクレオシドの当該領域は、交互結合も含む。特定のかかる実施形態では、２’－Ｆ修飾ヌクレオシドの３’末端の結合は、ホスホロチオエート結合である。特定のかかる実施形態では、２’ＯＭｅヌクレオシドの

３’末端の結合は、ホスホジエステル結合である。
【０９０６】
特定の実施形態では、かかる交互領域は、以下である：
（２’－Ｆ）－（ＰＳ）－（２’－ＯＭｅ）－（ＰＯ）
【０９０７】
特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１個のそうした交互領域を含む。かかる領域は、連続的であってもよく、または異なる修飾ヌクレオシドもしくは結合によって中断されてもよい。
【０９０８】
特定の実施形態では、交互モチーフ中の一つ以上の交互領域は、あるタイプのヌクレオシドを複数含む。例えば、本開示のオリゴマー化合物は、以下のヌクレオシドモチーフのうちのいずれかの領域を一つ以上含んでもよい：
ＡＢＡ；
ＡＢＢＡ；
ＡＡＢＡ；
ＡＡＢＢＡＡ；
ＡＢＢＡＢＢ；
ＡＡＢＡＡＢ；
ＡＢＢＡＢＡＡＢＢ；
ＡＢＡＢＡＡ；
ＡＡＢＡＢＡＢ；
ＡＢＡＢＡＡ；
ＡＢＢＡＡＢＢＡＢＡＢＡＡ；
ＢＡＢＢＡＡＢＢＡＢＡＢＡＡ；または
ＡＢＡＢＢＡＡＢＢＡＢＡＢＡＡ；
式中、Ａは、第一のタイプのヌクレオシドであり、Ｂは、第二のタイプのヌクレオシドである。特定の実施形態では、ＡおよびＢはそれぞれ、２’－Ｆ、２’－ＯＭｅ、ＬＮＡ、ＤＮＡおよびＭＯＥから選択される。
【０９０９】
特定の実施形態では、Ａは、ＤＮＡである。特定の実施形態では、Ｂは、ＤＮＡである。一部の実施形態では、Ａは、４’－CH_2Ｏ－２’－ＬＮＡである。特定の実施形態では、Ｂは、４’－CH_2Ｏ－２’－ＬＮＡである。特定の実施形態では、Ａは、ＤＮＡであり、Ｂは、４’－CH_2Ｏ－２’－ＬＮＡである。特定の実施形態では、Ａは、４’－C_2HＯ－２’－ＬＮＡであり、Ｂは、ＤＮＡである。
【０９１０】
特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅである。特定の実施形態では、Ｂは、２’－ＯＭｅである。特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅであり、Ｂは、４’－C_2HＯ－２’－ＬＮＡである。特定の実施形態では、Ａは、４’－C_2HＯ－２’－ＬＮＡであり、Ｂは、２’－ＯＭｅである。特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅであり、Ｂは、ＤＮＡである。特定の実施形態では、Ａは、ＤＮＡであり、Ｂは、２’－ＯＭｅである。
【０９１１】
特定の実施形態では、Ａは、（Ｓ）－ｃＥｔである。一部の実施形態では、Ｂは、（Ｓ）－ｃＥｔである。特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅであり、Ｂは、（Ｓ）－ｃＥｔである。特定の実施形態では、Ａは、（Ｓ）－ｃＥｔであり、Ｂは、２’－ＯＭｅである。特定の実施形態では、Ａは、ＤＮＡであり、Ｂは、（Ｓ）－ｃＥｔである。特定の実施形態では、Ａは、（Ｓ）－ｃＥｔであり、Ｂは、ＤＮＡである。
【０９１２】
特定の実施形態では、Ａは、２’－Ｆである。特定の実施形態では、Ｂは、２’－Ｆである。特定の実施形態では、Ａは、２’－Ｆであり、Ｂは、４’－C_2HＯ－２’－ＬＮＡである。特定の実施形態では、Ａは、４’－CH_2Ｏ－２’－ＬＮＡであり、Ｂは、２’－Ｆ

である。特定の実施形態では、Ａは、２’－Ｆであり、Ｂは、（Ｓ）－ｃＥｔである。特定の実施形態では、Ａは、（Ｓ）－ｃＥｔであり、Ｂは、２’－Ｆである。特定の実施形態では、Ａは、２’－Ｆであり、Ｂは、ＤＮＡである。特定の実施形態では、Ａは、ＤＮＡであり、Ｂは、２’－Ｆである。特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅであり、Ｂは、２’－Ｆである。特定の実施形態では、Ａは、ＤＮＡであり、Ｂは、２’－ＯＭｅである。特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅであり、Ｂは、ＤＮＡである。

【０９１３】

特定の実施形態では、こうした交互モチーフを有するオリゴマー化合物は、リン酸安定化修飾を含む５’末端ヌクレオシドも含む。特定の実施形態では、こうした交互モチーフを有するオリゴマー化合物は、２’カチオン性修飾を含む５’末端ヌクレオシドも含む。特定の実施形態では、こうした交互モチーフを有するオリゴマー化合物は、５’末端修飾も含む。

２－２－３モチーフ

【０９１４】

特定の実施形態では、複数標的分子中のオリゴヌクレオチドは、２－２－３モチーフを有する領域を含む。当該領域は、以下のモチーフを含む：

５’－（Ｅ）$_{w}$－（Ａ）$_{2}$－（Ｂ）$_{x}$－（Ａ）$_{2}$－（Ｃ）$_{y}$－（Ａ）$_{3}$－（Ｄ）$_{z}$

式中、Ａは、第一のタイプの修飾ヌクレオシドであり；

Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＥは、Ａとは異なる修飾がされたヌクレオシドであるが、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＥは、互いに同じ、または異なる修飾を有してもよく；

ｗおよびｚは、０～１５であり；

ｘおよびｙは、１～１５である。

【０９１５】

特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＥはすべて、２’－Ｆ修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、Ａは、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオシドであり、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＥはすべて、２’－Ｆ修飾ヌクレオシドである。

【０９１６】

特定の実施形態では、２－２－３モチーフの結合はすべて、修飾結合である。特定の実施形態では、結合は全て、ホスホロチオエート結合である。特定の実施形態では、第一のタイプの各修飾の３’末端の結合は、ホスホジエステルである。

【０９１７】

特定の実施形態では、Ｚは、０である。かかる実施形態では、第一のタイプの三ヌクレオシドの領域は、オリゴヌクレオチドの３’末端にある。特定の実施形態では、かかる領域は、オリゴマー化合物の３’末端にあり、第一のタイプの３ヌクレオシド領域の３’末端に、追加の基は付加されない。特定の実施形態では、Ｚが０であるオリゴヌクレオチドを含むオリゴマー化合物は、３’末端ヌクレオシドに結合した末端基を含んでもよい。かかる末端基は、追加のヌクレオシドを含んでもよい。かかる追加のヌクレオシドは、典型的には、ハイブリダイズしないヌクレオシドである。

【０９１８】

特定の実施形態では、Ｚは、１～３である。特定の実施形態では、Ｚは、２である。特定の実施形態では、Ｚのヌクレオシドは、２’－ＭＯＥヌクレオシドである。特定の実施形態では、Ｚは、ハイブリダイズしないヌクレオシドを表す。混乱を避けるために、そのようなハイブリダイズしないヌクレオシドは、Ｚ＝０の３’末端基として記載され得ることに留意されたい。

【０９１９】

一部の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡは、式（ＩＩ）によって表され得るセンス鎖配列を含有する：

５’ η_{p}－Ｎ$_{a}$－（ＸＸＸ）$_{i}$－Ｎ$_{b}$－ＹＹＹ－Ｎ$_{b}$－（ＺＺＺ）$_{j}$－Ｎ$_{a}$－n_{q} ３’

（ＩＩ）

式中、
ｉおよびｊは各々独立的に、０または１であり；
ｐおよびｑは各々独立的に、０～６であり；
各N_aは独立して、０～２５の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表すものであって、各配列は、少なくとも二つの異なる修飾ヌクレオチドを含み；
各N_bは独立して、１、２、３、４、５、または６の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；
各n_pおよびn_qは独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；
N_bおよびＹは、同一の修飾を有さず；
式中、ＸＸＸ、ＹＹＹおよびＺＺＺはそれぞれ独立して、三つの連続するヌクレオチド上の三つの同一修飾の一つのモチーフを表し；
エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、少なくとも一つの鎖上の一つ以上の位置にコンジュゲートされた、一つ以上の親油性部分を有し；および
エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡのアンチセンス鎖が、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、または１８個のリン酸ヌクレオチド間結合によって分離された、一つ、二つ、または三つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合の二つのブロックを含む。

【０９２０】

種々の刊行物に多量体ｓｉＲＮＡが記載されており、これらはすべて、ｄｓＲＮＡ剤またはｓｃｉＲＮＡとともに使用され得る。そのような刊行物としては、国際公開第２００７／０９１２６９号、米国特許第７８５８７６９号、国際公開第２０１０／１４１５１１号、第２００７／１１７６８６号、第２００９／０１４８８７号、および第２０１１／０３１５２０が挙げられ、これらは、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０９２１】

一部の実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、一、二、三、四、五、六、七、八、九、１０、１１、または１２個の２’－Ｆ修飾を含有する。一つの例では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、九個または１０個の２’－Ｆ修飾を含有する。

【０９２２】

エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ剤は、少なくとも一つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合をさらに含んでもよい。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合の修飾は、鎖の任意の位置において、センス鎖またはアンチセンス鎖または両鎖のいずれかのヌクレオチド上にあってもよい。例えば、ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上の全てのヌクレオチド上でも生じ得、各ヌヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上で交互パターンで生じ得、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターンで両方のヌクレオチド間結合修飾を含み得る。センス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一または異なり得、またセンス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンに対してシフトを有し得る。

【０９２３】

一つの実施形態では、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡは、オーバーハング領域に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合の修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、二つのヌクレオチドの間に、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合を有する二つのヌクレオチドを含有してもよい。ヌクレオチド間結合修飾は、オーバーハングヌクレオチドと、二本鎖領域内の末端の対形成ヌクレオチドを結合させるように行われてもよい。例えば、少なくとも２、３、４または全てのオーバーハングヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合によって結合されてもよく、任意選択的に、オーバーハングヌクレオチドと、当該オ

ーバーハングヌクレオチドと隣接する対形成ヌクレオチドを結合する、追加のホスホロチオエートヌクレオチド間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が存在してもよい。例えば、三つのヌクレオチドのうち二つがオーバーハングヌクレオチドであり、三番目は、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対形成ヌクレオチドである、末端の三ヌクレオチドの間に、少なくとも二つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合があってもよい。好ましくは、これら末端の三ヌクレオチドは、アンチセンス鎖の３’末端にあり得る。

【０９２４】

組み合わせモチーフ

上述のモチーフおよび修飾のうちの特定のものを組み合わせてもよいことを理解されたい。モチーフは数個のヌクレオチドのみを含んでもよく、そのため、特定のオリゴヌクレオチドは、二個以上のモチーフを含み得る。非限定的な例として、特定の実施形態では、複数標的分子中のオリゴヌクレオチドは、ＬＮＡ、ホスホロチオエート結合、２’－ＯＭｅ、コンジュゲート化リガンドから選択される二つ以上のヌクレオチドモチーフを有し得る。

【０９２５】

限定されないが、本明細書に記載される様々なヌクレオチドモチーフのいずれかを有する本開示の複数標的分子は、任意の結合モチーフも有し得る。例えば、複数標的分子中に存在するオリゴヌクレオチドにおいて、５’末端の最初の１、２、３、４、または５個の糖間結合は、修飾糖間結合であってもよく、３’末端の最初の４、５、６、７、または８個の糖間結合は、修飾糖間結合であってもよい。そのような修飾オリゴヌクレオチドの中央領域は、本明細書に記載される他のモチーフ、例えば、均一、交互、ヘミマー、ギャップマーなどのいずれかに基づく糖間結合を有し得る。一部の実施形態では、複数標的分子中に存在するオリゴヌクレオチドは、５’－末端で、第一の単量体と第二の単量体との間にホスホロチオエート結合を含み、中央領域に交互に並ぶホスホロチオエート／ホスホジエステル結合を含み、および３’－末端に６、７、または８個のホスホロチオエート結合を含む。

【０９２６】

ヌクレオチドモチーフにより規定される領域の長さと、結合モチーフの長さは同一である必要はないことに留意されたい。

【０９２７】

一部の実施形態では、一本鎖オリゴヌクレオチド、または二本鎖オリゴヌクレオチドの少なくとも一方の鎖は、以下のモチーフのうちの少なくとも一つを含む：

５’－ホスホロチオエートまたは５’－ホスホロジチオエート；

５’末端上のヌクレオチド１および２のカチオン性修飾であって、当該カチオン性修飾は、ピリミジンのＣ５位、およびプリンのＣ２、Ｃ６、Ｃ８、環外Ｎ２、または環外Ｎ６にあり；

５’末端の最初の二つの末端ヌクレオチドにおける、少なくとも一つのＧ－クランプヌクレオチド、およびカチオン性修飾を有する他のヌクレオチドであって、当該カチオン性修飾は、ピリミジンのＣ５位、またはプリンのＣ２、Ｃ６、Ｃ８、環外Ｎ２、もしくは環外Ｎ６位にあり；

核酸塩基塩基修飾を含む、少なくとも一つの２’－Ｆ修飾ヌクレオチド；

核酸塩基修飾を含む、少なくとも一つのｇｅｍ－２’－Ｏ－メチル／２’－Ｆ修飾ヌクレオチドであって、好ましくは、メチル置換基は、上向きの立体配置、例えばアラビノース立体配置にあり；

３’末端の５’－ＰｕＰｕ－３’ジヌクレオチドであって、両方のヌクレオチドが、米国特許出願公開第２０１３０１３０３７８号に記載されるように２’－位に修飾ＭＯＥを含み（当該文献の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）；

５’末端の５’－ＰｕＰｕ－３’ジヌクレオチドであって、両方のヌクレオチドが、米国特許出願公開第２０１３０１３０３７８号に記載されるように２’－位に修飾ＭＯＥを含

み；
米国特許出願公開第２０１３０１３０３７８号に記載されるように、２’－位に修飾ＭＯＥを有する５’末端のヌクレオチド；
３’－Ｆ修飾を有する、５’末端のヌクレオチド；
４’－置換基を含む５’末端ヌクレオチド；
Ｏ４’修飾を含む５’末端ヌクレオチド；
４’－置換基を含む３’末端ヌクレオチド；および
それらの組み合わせ。
【０９２８】
一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの両方の鎖は独立して、上述のモチーフのうちの少なくとも一つを含む。一部の他の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの両方の鎖は、上述のモチーフのうちの少なくとも一つを含み、当該モチーフは、同一であっても異なっていてもよく、または同じモチーフと異なるモチーフのいくつかの組み合わせであってもよい。
【０９２９】
上記の実施例は単に、記載されたモチーフがどのように組み合わせて使用され得るかを説明するためにのみ提供されており、本開示を、組み合わせの例示で使用された特定の組み合わせ、または特定の修飾に限定することは意図されない。さらに、限定されないが上記の表にあるものを含む、本明細書の具体的な例は、より一般的な実施形態を包含することが意図される。例えば、上の表の列Ａは、交互に並ぶ２’－ＯＭｅと２’－Ｆヌクレオシドの領域を例示する。したがって、同開示はまた、交互に並ぶ異なる２’－修飾の領域も例示している。また、交互に並ぶ２’－Ｏ－アルキルと２’－ハロゲンヌクレオシドの領域も例示している。また、交互に並ぶ、異なる修飾がされたヌクレオシドの領域も例示している。本明細書全体の例示はすべて、かかる一般的な解釈を予期するものである。
【０９３０】
例えば、複数標的分子中に存在するオリゴヌクレオチドなどの化合物の長さは、モチーフを破壊することなく、記載される領域のうちの一つ以上を伸長または短縮することによって容易に操作され得ることにも留意されたい。
【０９３１】
一部の実施形態では、エフェクター分子または複数標的分子中のオリゴヌクレオチドは、二つ以上の化学的に別個の領域を含み、２００９年３月２６日に出願された国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ０９／０３８４３３号に記載される構造を有する。当該文献の内容は、その全体が本明細書に組み込まれる。
【０９３２】
一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、リボザイムである。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特定の触媒ドメインを有するオリゴヌクレオチドである（Ｋｉｍ ａｎｄ Ｃｅｃｈ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９８７ Ｄｅｃ；８４（２４）：８７８８－９２；Ｆｏｒｓｔｅｒ ａｎｄ Ｓｙｍｏｎｓ，Ｃｅｌｌ．１９８７ Ａｐｒ ２４；４９（２）：２１１－２０）。天然型酵素のＲＮＡについて、少なくとも六種の塩基性バリアントが現在判明している。一般に、酵素核酸は、最初に標的ＲＮＡに結合することによって作用する。そのような結合は、酵素核酸の標的結合部分を介して発生し、当該標的結合部分は、分子の酵素部分に近接して保持され、標的ＲＮＡを切断するように作用する。したがって、酵素核酸は、相補性塩基対形成を介して標的ＲＮＡを最初に認識して、結合し、そして正しい部位に結合されると、標的ＲＮＡを切断するように酵素的に作用する。かかる標的ＲＮＡの戦略的切断によって、コードされたタンパク質の合成を誘導する能力が破壊される。酵素核酸は、そのＲＮＡ標的に結合して切断した後、ＲＮＡから放出されて、別の標的を探索し、新しい標的に繰り返し結合して切断することができる。
【０９３３】

任意の標的配列を標的とするリボザイムを作製する方法は、当分野で公知である。リボザイムは、国際特許出願公開ＷＯ９３／２３５６９、および国際特許出願公開ＷＯ９４／０２５９５に記載されるように設計することができ、本明細書に記載されるように合成されて、インビトロまたはインビボで試験されることができる。当該文献はそれぞれ、参照により具体的に本明細書に組み込まれる。

【０９３４】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、アプタマーである。アプタマーは、高いアフィニティおよび特異性で対象の特定の分子に結合する核酸またはペプチド分子である（Ｔｕｅｒｋ ａｎｄ Ｇｏｌｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：５０５（１９９０）；Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｓｚｏｓｔａｋ，Ｎａｔｕｒｅ ３４６：８１８（１９９０））。巨大なタンパク質から小さな有機分子まで、多くの様々な物質に結合するＤＮＡアプタマーまたはＲＮＡアプタマーの作製に成功している。Ｅａｔｏｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１：１０－１６（１９９７）、Ｆａｍｕｌｏｋ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．９：３２４－９（１９９９）、およびＨｅｒｍａｎｎ ａｎｄ Ｐａｔｅｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：８２０－５（２０００）を参照のこと。アプタマーは、ＲＮＡまたはＤＮＡをベースとしてもよい。概して、アプタマーは、インビトロ選択のラウンドを繰り返して操作され、または同様のＳＥＬＥＸ（ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ：指数関数的濃縮によるリガンドの体系的進化）によって操作されて、例えば、低分子、タンパク質、核酸、さらには細胞、組織、および生物体などの様々な分子標的に結合する。アプタマーは、合成、組み換え、および精製方法を含む任意の公知の方法によって作製することができ、単独で使用することも、同じ標的に特異的な他のアプタマーと組み合わせて使用することもできる。さらに、本明細書でより詳述されるように、「アプタマー」という用語は、所与の標的に対する二つ以上の公知のアプタマーを比較して得られるコンセンサス配列を含有する「二次アプタマー」も具体的に含有する。

【０９３５】

転写因子は比較的短い結合配列を認識するため、周囲のゲノムＤＮＡの非存在下であっても、特定の転写因子のコンセンサス結合配列を担持する短いオリゴヌクレオチドをツールとして使用して、生細胞における遺伝子発現を操作することができる。この戦略には、そのような「デコイオリゴヌクレオチド」を細胞内送達し、その後に標的因子に認識され、結合されることを含む。したがって一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、デコイオリゴヌクレオチドである。

【０９３６】

転写因子のＤＮＡ結合部位をデコイによって占有することによって、転写因子は、その後に標的遺伝子のプロモーター領域に結合することができなくなる。デコイは、転写因子によって活性化される遺伝子の発現を阻害する、または転写因子の結合によって抑制される遺伝子を上方制御するかのいずれかによって、デコイを治療剤として使用することができる。デコイオリゴヌクレオチドの利用の例は、Ｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，２０００，１０６：１０７１－１０７５に見出すことができる。当該文献は、その全体で本明細書に参照により明示的に組み込まれる。

【０９３７】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、Ｕ１アダプターである。Ｕ１アダプターは、ポリＡ部位を阻害し、標的遺伝子の末端エクソン中の部位に相補的な標的ドメインと、Ｕ１ｓｎＲＮＰのＵ１核内低分子ＲＮＡ（Ｕ１ ｓｍａｌｌｅｒ ｎｕｃｌｅａｒ ＲＮＡ）の構成要素に結合する「Ｕ１ドメイン」とを有する二機能性オリゴヌクレオチドである。例えば、Ｉｎｔ．特許出願公開ＷＯ２００８／１２１９６３およびＧｏｒａｃｚｎｉａｋ，ｅｔ ａｌ．，２００８，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２７（３），

２５７－２６３を参照のこと。それら文献は、その全体で本明細書に参照により明示的に組み込まれる。Ｕ１　ｓｎＲＮＰは、リボ核タンパク質複合体であり、主にｐｒｅ－ｍＲＮＡエクソン－イントロン境界に結合することによってスプライセオソーム形成の初期工程を誘導するように機能する。Ｂｒｏｗｎ　ａｎｄ　Ｓｉｍｐｓｏｎ，１９９８，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｐｌａｎｔ ＭｏＩ Ｂｉｏｌ ４９：７７－９５。

【０９３８】

一部の実施形態では、Ｕ１アダプターは、少なくとも一つのエフェクタードメイン（Ｕ１ドメイン）に結合された少なくとも一つのアニーリングドメイン（標的化ドメイン）を含み、当該アニーリングドメインは標的遺伝子配列にハイブリダイズし、エフェクタードメインはＵ１　ｓｎＲＮＰのＵ１　ｓｎＲＮＡにハイブリダイズする。一部の実施形態では、Ｕ１アダプターは、一つのアニーリングドメインを含む。一部の実施形態では、Ｕ１アダプターは、一つのエフェクタードメインを含む。

【０９３９】

理論に拘束されることを望むものではないが、アニーリングドメインは、典型的には、約１０～約５０ヌクレオチドの長さであり、より典型的には、約１０～約３０ヌクレオチド、または約１０～約２０ヌクレオチドの長さである。一部の好ましい実施形態では、アニーリングドメインは、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２１ヌクレオチドの長さである。アニーリングドメインは、標的遺伝子に対し、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、またはより好ましくは１００％相補的であってもよい。一部の実施形態では、アニーリングドメインは、ｐｒｅ－ｍＲＮＡの３’末端エクソン内の標的部位とハイブリダイズし、当該標的部位は、末端コード領域、および３’ＵＴＲ、およびポリアデニル化シグナル配列を含む（例えば、ポリアデニル化部位を介する）。別の実施形態では、標的配列は、ｐｒｅ－ｍＲＮＡのポリ（Ａ）シグナル配列から約５００塩基対以内、約２５０塩基対以内、約１００塩基対以内、または約５０塩基対以内にある。一部の実施形態では、アニーリングドメインは、標的遺伝子配列とのミスマッチを１、２、３、または４個含む。

【０９４０】

エフェクタードメインは、約８ヌクレオチド～約３０ヌクレオチド、約１０ヌクレオチド～約２０ヌクレオチド、または約１０～約１５ヌクレオチドの長さであってもよい。Ｕｌドメインは、Ｕｌ　ｓｎＲＮＡ、特に５’末端、より具体的にはヌクレオチド２～１１とハイブリダイズすることができる。別の実施形態では、Ｕｌドメインは、内因性Ｕｌ　ｓｎＲＮＡのヌクレオチド２～１１と完全に相補的である。一部の実施形態では、Ｕ１ドメインは、５’－ＧＣＣＡＧＧＵＡＡＧＵＡＵ－３’、５’－ＣＣＡＧＧＵＡＡＧＵＡＵ－３’、５’－ＣＡＧＧＵＡＡＧＵＡＵ－３’、５’－ＣＡＧＧＵＡＡＧＵＡＵ－３’、５’－ＣＡＧＧＵＡＡＧＵＡＵ－３’、５’－ＣＡＧＧＵＡＡＧ－３’、５’－ＣＡＧＧＵＡＡＧ－３’、および５’－ＣＡＧＧＵＡＡ－３’からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、Ｕ１ドメインは、ヌクレオチド配列５’－ＣＡＧＧＵＡＡＧＵＡ－３’を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、ステム１への塩基対形成および／またはＵｌ　ｓｎＲＮＡの１位への塩基対形成を含むようにＵｌドメインの長さを増加させることによって、Ｕｌ　ｓｎＲＮＰに対するＵｌアダプターのアフィニティが改善される。

【０９４１】

Ｕｌアダプターのアニーリングドメインとエフェクタードメインは、エフェクタードメインがアニーリングドメインの５’末端および／または３’末端にあるように結合されることができる。二つのドメインは、一方のドメインの３’末端が他方のドメインの５’末端に結合されるように、または一方のドメインの３’末端が他方のドメインの３’末端に結合されるように、または一方のドメインの５’末端が他方のドメインの５’末端に結合されるように、結合されることができる。アニーリングドメインとエフェクタードメインは、互いに直接結合されてもよく、またはヌクレオチド系リンカーもしくは非ヌクレオチド系リンカーによって結合されてもよい。リンカーがヌクレオチド系である場合、リンカーは、１

、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、最大１５、最大２０、または最大２５ヌクレオチドを含み得る。

【０９４２】

一部の実施形態では、アニーリングドメインとエフェクタードメインとの間のリンカーは、本明細書に記載される切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、アニーリングドメインとエフェクタードメインとの間のリンカーは、三価、四価または五価など、多価である。理論に拘束されることを望むものではないが、多価リンカーを使用して、一つのアニーリングドメインを複数のアダプタードメインに結合してもよい。

【０９４３】

Ｕ１アダプターは、本明細書に記載される任意のオリゴヌクレオチド修飾を含み得ることを理解されたい。Ｕ１アダプターの修飾例としては、アニーリングアフィニティ、特異性、細胞や生物体における生体利用効率、細胞輸送および／もしくは核輸送、安定性、ならびに／または分解耐性を高める修飾が挙げられる。

【０９４４】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、ｍｉＲＮＡ模倣体である。一つの設計では、ｍｉＲＮＡ模倣体は、二本鎖分子（例えば、約１６～約３１ヌクレオチドの長さの二本鎖領域を含む）であり、所与のｍｉＲＮＡの成熟鎖との同一性を有する一つ以上の配列を含有する。二本鎖ｍｉＲＮＡ模倣体は、二本鎖ｉＲＮＡについて上述した設計と同様の設計を有する。一部の実施形態では、ｍｉＲＮＡ模倣体は、１６～３１ヌクレオチドの二本鎖領域と、以下の化学修飾パターンのうちの一つ以上とを含む：センス鎖は、ヌクレオチド１および２、ならびにＣｓおよびＵｓのすべての２’－Ｏ－メチル修飾（センスオリゴヌクレオチドの５’末端から数えて）を含む；アンチセンス鎖修飾は、ＣｓおよびＵｓのすべての２’Ｆ修飾、オリゴヌクレオチドの５’末端のリン酸化、ならびに２ヌクレオチドの３’オーバーハングに関連付けられた安定化ヌクレオチド間結合を含むことができる。

【０９４５】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、ａｎｔｉｍｉｒである。一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、少なくとも二つのａｎｔｉｍｉｒを含み、当該ａｎｔｉｍｉｒは、ヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカー、例えば、本開示に記載されるリンカーを介して互いに共有結合され、または互いに非共有結合される。「ａｎｔｉｍｉｒ」、「ｍｉｃｒｏＲＮＡ阻害剤」、または「ｍｉＲ阻害剤」という用語は同義であり、特定のｍｉＲＮＡの活性に干渉するオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドを指す。阻害剤は、一本鎖、二本鎖（ＲＮＡ／ＲＮＡまたはＤＮＡ／ＲＮＡの二本鎖）、およびヘアピン設計を含む様々な構成を採用することができ、一般的には、ｍｉｃｒｏＲＮＡ阻害剤は、標的とされるｍｉＲＮＡの成熟鎖（または複数の鎖）と相補的な、または部分的に相補的な配列の一つ以上の配列または部分を含み、ｍｉＲＮＡ阻害剤は、成熟ｍｉＲＮＡの逆相補である配列の５’および３’に位置する追加的の配列も含むことができる。追加的な配列は、成熟ｍｉＲＮＡが誘導されるｐｒｉ－ｍｉＲＮＡにおいて、成熟ｍｉＲＮＡに隣接する配列の逆相補であってもよく、または追加的な配列は、任意の配列（Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｕ、またはｄＴの混合物を有する）であってもよい。一部の実施形態では、追加的な配列の一方または両方は、ヘアピンを形成することができる任意の配列である。したがって、一部の実施形態では、ｍｉＲＮＡの逆相補である配列は、ヘアピン構造によって、５’側および３’側の側面に位置する。ｍｉｃｒｏＲＮＡ阻害剤は、二本鎖の場合、対向する鎖のヌクレオチドとの間にミスマッチを含んでもよい。さらに、ｍｉｃｒｏＲＮＡ阻害剤は、細胞内への阻害剤の取り込みを促進するために、コンジュゲート部分に結合されてもよい。

【０９４６】

ヘアピンｍｉＲＮＡ阻害剤をはじめとするｍｉｃｒｏＲＮＡ阻害剤は、Ｖｅｒｍｅｕｌ

ｅｎ ｅｔ ａｌ．，”Ｄｏｕｂｌｅ－Ｓｔｒａｎｄｅｄ Ｒｅｇｉｏｎｓ Ａｒｅ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｄｅｓｉｇｎ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ Ｏｆ Ｐｏｔｅｎｔ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ ｏｆ ＲＩＳＣ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，”ＲＮＡ １３：７２３－７３０（２００７）、ならびにＷＯ２００７／０９５３８７およびＷＯ ２００８／０３６８２５に詳細に記載されている。これら文献は、その全体で本明細書に参照により組み込まれる。当業者であれば、望ましいｍｉＲＮＡについてデータベースから配列を選択することができ、および本明細書に開示の方法に有用な阻害剤を設計することができる。

【０９４７】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、アンタゴミル（ａｎｔａｇｏｍｉｒ）である。一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、少なくとも二つのアンタゴミルを含み、当該アンタゴミルは、ヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカー、例えば、本開示に記載されるリンカーを介して互いに共有結合され、または互いに非共有結合される。アンタゴミルは、ＲＮＡ様のオリゴヌクレオチドであり、ＲＮＡｓｅ防御、ならびに例えば組織および細胞の取り込みの強化などの薬理特性のための様々な修飾を有する。それらは、例えば、糖の完全な ２’－Ｏ－メチル化、ホスホロチオエート糖間結合、および例えば、３’末端のコレステロール部分などによって、通常のＲＮＡとは異なっている。好ましい実施形態では、アンタゴミルは、すべてのヌクレオチドに２’－Ｏ－メチル修飾、３’末端にコレステロール部分、５’末端の最初の二つの位置に二つのホスホロチオエート糖間結合、および分子の３’末端に四つのホスホロチオエート結合を含む。アンタゴミルを使用して、アンタゴミルと内因性ｍｉＲＮＡを含む二本鎖が形成され、ｍｉＲＮＡ誘導性の遺伝子サイレンシングが防止されることによって、内因性ｍｉＲＮＡを効率的にサイレンシングすることができる。アンタゴミル介在性のｍｉＲＮＡサイレンシングの例は、Ｋｒｕｔｚｆｅｌｄｔ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ，２００５，４３８：６８５－６８９に記載されるｍｉＲ－１２２のサイレンシングである。当該文献は、その全体で本明細書に参照により明示的に組み込まれる。

【０９４８】

最近の研究により、ｄｓＲＮＡは、遺伝子発現を活性化することもできることが見出されており、そのメカニズムは、「低分子ＲＮＡ誘導型遺伝子活性化（ｓｍａｌｌ ＲＮＡ－ｉｎｄｕｃｅｄ ｇｅｎｅ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）」またはＲＮＡａ（ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ ＲＮＡ）と呼ばれている。例えば、Ｌｉ，Ｌ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．（２００６），１０３（４６）：１７３３７－４２、およびＬｉ Ｌ．Ｃ．（２００８）”Ｓｍａｌｌ ＲＮＡ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｇｅｎｅ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ”．ＲＮＡ ａｎｄ ｔｈｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ Ｈｉｄｄｅｎ Ｌａｙｅｒ ｏｆ Ｃｏｍｐｌｅｘｉｔｙ．Ｃａｉｓｔｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ．ＩＳＢＮ ９７８－１－９０４４５５－２５－７を参照のこと。遺伝子プロモーターを標的とするｄｓＲＮＡは、関連遺伝子の強力な転写活性化を誘導することが示されている。ＲＮＡａを引き起こす内因性ｍｉＲＮＡも、ヒトにおいて発見されている。Ｅ．Ｎａｔｕｒｅ（２００７）４４８（７１５６）：８５５－８５８を確認のこと。

【０９４９】

もう一つの驚くべき実験結果は、ＲＮＡａによる遺伝子活性化は、長期間持続することである。遺伝子発現の誘導は、１０日間を超えて継続することが判明している。ＲＮＡａの長期的な効果は、ｄｓＲＮＡ標的部位でのエピジェネティックな変化に起因している可能性がある。一部の実施形態では、ＲＮＡ活性化因子は、遺伝子の発現を増加させ得る。一部の実施形態では、遺伝子発現の増加は、生存能力、成長発達、および／または繁殖を阻害する。

【０９５０】

したがって、一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）または

ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ＲＮＡである。一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、少なくとも二つのａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ＲＮＡを含み、当該ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ＲＮＡは、ヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカー、例えば、本開示に記載されるリンカーを介して互いに共有結合され、または互いに非共有結合される。

【０９５１】

したがって、一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、三本鎖形成オリゴヌクレオチド（ＴＦＯ：ｔｒｉｐｌｅｘ　ｆｏｒｍｉｎｇ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｏｔｉｄｅ）である。一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、少なくとも二つのＴＦＯを含み、当該ＴＦＯは、ヌクレオチド系リンカーまたは非ヌクレオチド系リンカー、例えば、本開示に記載されるリンカーを介して互いに共有結合され、または互いに非共有結合される。最近の研究によって、配列特異的な様式で、二本鎖らせん型ＤＮＡのポリプリン／ポリピリミジン領域を認識し、結合することができる三本鎖形成オリゴヌクレオチドが設計され得ることが示されている。これらの認識規則は、Ｍａｈｅｒ　ＩＩＩ，Ｌ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８９）ｖｏｌ．２４５，ｐｐ　７２５－７３０；Ｍｏｓｅｒ，Ｈ．Ｅ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８７）ｖｏｌ．２３８，ｐｐ　６４５－６３０；Ｂｅａｌ，Ｐ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９２）ｖｏｌ．２５１，ｐｐ　１３６０－１３６３；Ｃｏｎｎｅｙ，Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８）ｖｏｌ．２４１，ｐｐ　４５６－４５９　ａｎｄ　Ｈｏｇａｎ，Ｍ．Ｅ．，ｅｔ　ａｌ．，ＥＰ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　３７５４０８によって概説されている。例えば、挿入因子の挿入および糖間結合置換などのオリゴヌクレオチドの修飾、ならびに結合条件（ｐＨおよびカチオン濃度）の最適化は、電荷斥力や不安定性などのＴＦＯ活性に固有の障害を克服するのを補助するものであり、近年では、合成オリゴヌクレオチドを、特定の配列に標的化し得ることが示されている（最近の概説については、Ｓｅｉｄｍａｎ　ａｎｄ　Ｇｌａｚｅｒ，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　２００３；ｌ　１２：４８７－９４を参照のこと）。概して、三本鎖形成オリゴヌクレオチドは、以下の配列対応を有する：

オリゴ　３’－ＡＧＧＴ
二本鎖　５’－ＡＧＣＴ
二本鎖　３’－ＴＣＧＡ

【０９５２】

しかしながら、Ａ－ＡＴおよびＧ－ＧＣの三つ組みは、最も高い三重らせんの安定性を有することが示されている（Ｒｅｉｔｈｅｒ　ａｎｄ　Ｊｅｌｔｓｃｈ，ＢＭＣ　Ｂｉｏｃｈｅｍ，２００２，Ｓｅρｔｌ２，Ｅｐｕｂ）。同著者らによって、Ａ－ＡＴおよびＧ－ＧＣ規則に従い設計されたＴＦＯは、非特異的な三本鎖を形成しないことが示されており、このことから、三本鎖の形成は実際には配列特異的であることが示唆される。

【０９５３】

したがって、任意の所与の配列に対し、三本鎖形成配列を考案することができる。三本鎖形成オリゴヌクレオチドは、好ましくは少なくとも１５、より好ましくは２５、さらにより好ましくは３０ヌクレオチド以上の長さであり、最大で５０または１００ヌクレオチドの長さである。

【０９５４】

標的ＤＮＡと三本鎖らせん構造が形成されることにより、立体的および機能的な変化が誘導され、転写開始と伸長が阻害されて、内因性ＤＮＡに所望の配列変化が導入され、その結果、遺伝子発現の特異的な下方制御が生じる。ＴＦＯで処理された細胞における、遺伝子発現のそのような抑制の例としては、哺乳動物細胞におけるエピソームｓｕｐＦＧｌおよび内因性ＨＰＲＴ遺伝子のノックアウト（Ｖａｓｑｕｅｚ　ｅｔ　ａｌ．，ＮｕｃｌＡｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１９９９；２７：１１７６－８１，ａｎｄ　Ｐｕｒｉ，ｅｔ　ａｌ

，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，２００１；２７６：２８９９１－９８）、前立腺がんの病因で重要なＥｔｓ２転写因子の発現の配列特異的および標的特異的な下方制御（Ｃａｒｂｏｎｅ，ｅｔ　ａｌ，Ｎｕｃｌ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２００３　；３１：８３３－４３）、および炎症促進性ＩＣＡＭ－Ｉ遺伝子（Ｂｅｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，２００２；２７７：３２４７３－７９）が挙げられる。さらに、ＶｕｙｉｓｉｃｈおよびＢｅａｌは近年、配列特異的なＴＦＯは、ｄｓＲＮＡに結合して、例えばＲＮＡ依存性キナーゼなどのｄｓＲＮＡ依存性酵素の活性を阻害し得ることを示している（Ｖｕｙｉｓｉｃｈ　ａｎｄ　Ｂｅａｌ，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２０００；２８：２３６９－７４）。

【０９５５】

さらに、上述の原理に従って設計されたＴＦＯは、ＤＮＡ修復を行うことができる指向性突然変異を誘導することができ、したがって内因性遺伝子の発現の下方制御および上方制御の両方を提供することができる（Ｓｅｉｄｍａｎ　ａｎｄ　Ｇｌａｚｅｒ，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　２００３；１１２：４８７－９４）。有効なＴＦＯの設計、合成、および投与の詳細は、Ｆｒｏｅｈｌｅｒらの米国特許出願２００３　０１７０６８および２００３　００９６９８０、ならびにＥｍａｎｕｅｌｅらの２００２　０１２８２１８および２００２　０１２３４７６、ならびにＬａｗｎらの米国特許第５，７２１，１３８号に見出すことができる。それらの内容は、その全体が本明細書に組み込まれる。

【０９５６】

阻害性一本鎖オリゴヌクレオチドまたは一本鎖低分子干渉ＲＮＡ（ｓｓ－ｓｉＲＮＡ）への結合を介して、一つ以上のｄｓＲＮＡエフェクター分子（例えば、ｓｉＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤を組み合わせるようにＴＦＯを設計し得ることも予期される。

【０９５７】

<u>核酸修飾</u>

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、本明細書に記載される核酸修飾を少なくとも一つ含む。例えば、少なくとも一つの修飾は、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基、修飾糖、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。限定されないが、そのような修飾は、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤のいずれにも存在し得る。例えば、修飾は、ＲＮＡ分子のうちの一つに存在してもよく、あるいは、修飾は、複数標的分子の二つのエフェクター分子を接続するリンカー中に存在してもよく、または複数標的ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ分子の配列を接続するリンカー中に存在してもよい。

【０９５８】

<u>核酸修飾（核酸塩基）</u>

ヌクレオシドの天然型塩基部分は、典型的には、複素環式の塩基である。かかる複素環式塩基の最も一般的な二種は、プリンおよびピリミジンである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドについては、リン酸基は、糖の２’、３’、または５’ヒドロキシル部分に結合されてもよい。オリゴヌクレオチドの形成において、これらリン酸基は、隣接するヌクレオシドを互いに共有結合させて、直鎖状のポリマー化合物を形成させる。オリゴヌクレオチド内では、リン酸基は一般的に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成するものと呼ばれる。ＲＮＡおよびＤＮＡの天然型の結合または骨格は、３’～５’のホスホジエステル結合である。

【０９５９】

例えば、プリン核酸塩基のアデニン（Ａ）およびグアニン（Ｇ）、ならびにピリミジン核酸塩基のチミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）、およびウラシル（Ｕ）などの「未修飾」核酸塩基または「天然」の核酸塩基に加えて、当業者に公知の多くの修飾核酸塩基または核酸塩基模倣体が、本明細書に記述される化合物に適している。非修飾核酸塩基または天然核酸塩基を修飾または置換して、性能が改善されたｉＲＮＡを提供することができる。例え

ば、ヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドは、これらの塩基を用いて、または合成核酸塩基や天然核酸塩基（例えば、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン、イソグアニシン、またはツベルシジン）、ならびに本明細書に記述されるオリゴマー修飾のうちのいずれか一つを用いて作製することができる。あるいは、上記の塩基および「ユニバーサル塩基」のいずれかの置換アナログまたは修飾アナログを採用することもできる。天然塩基が非天然塩基および／またはユニバーサル塩基で置換される場合、ヌクレオチドは、本明細書において、修飾核酸塩基および／または核酸塩基修飾を含むと言われる。修飾核酸塩基および／または核酸塩基修飾は、例えば、本明細書に記述されるリガンドなどのコンジュゲート部分を含む、天然塩基、非天然塩基、およびユニバーサル塩基も含む。核酸塩基とのコンジュゲーションに好ましいコンジュゲート部分としては、アミド結合で、適切なアルキル、アルケニル、またはリンカーを介して核酸塩基にコンジュゲートすることができるカチオン性アミノ基が挙げられる。

【０９６０】

本明細書において使用する場合、「未修飾の（修飾されていない）」または「天然の」核酸塩基としては、プリン塩基のアデニン（Ａ）およびグアニン（Ｇ）、ならびにピリミジン塩基のチミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）およびウラシル（Ｕ）が挙げられる。修飾核酸塩基の例としては限定されないが、他の合成核酸塩基または天然核酸塩基、例えば、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン、イソグアニシン、ツベルシジン、２－（ハロ）アデニン、２－（アルキル）アデニン、２－（プロピル）アデニン、２－（アミノ）アデニン、２－（アミノアルキル）アデニン、２－（アミノプロピル）アデニン、２－（メチルチオ）－Ｎ^{6}－（イソペンテニル）アデニン、６－（アルキル）アデニン、６－（メチル）アデニン、７－（デアザ）アデニン、８－（アルケニル）アデニン、８－（アルキル）アデニン、８－（アルキニル）アデニン、８－（アミノ）アデニン、８－（ハロ）アデニン、８－（ヒドロキシル）アデニン、８－（チオアルキル）アデニン、８－（チオール）アデニン、Ｎ^{6}－（イソペンチル）アデニン、Ｎ^{6}－（メチル）アデニン、Ｎ^{6}，Ｎ^{6}－（ジメチル）アデニン、２－（アルキル）グアニン、２－（プロピル）グアニン、６－（アルキル）グアニン、６－（メチル）グアニン、７－（アルキル）グアニン、７－（メチル）グアニン、７－（デアザ）グアニン、８－（アルキル）グアニン、８－（アルケニル）グアニン、８－（アルキニル）グアニン、８－（アミノ）グアニン、８－（ハロ）グアニン、８－（ヒドロキシル）グアニン、８－（チオアルキル）グアニン、８－（チオール）グアニン、Ｎ－（メチル）グアニン、２－（チオ）シトシン、３－（デアザ）－５－（アザ）シトシン、３－（アルキル）シトシン、３－（メチル）シトシン、５－（アルキル）シトシン、５－（アルキニル）シトシン、５－（ハロ）シトシン、５－（メチル）シトシン、５－（プロピニル）シトシン、５－（プロピニル）シトシン、５－（トリフルオロメチル）シトシン、６－（アゾ）シトシン、Ｎ^{4}－（アセチル）シトシン、３－（３－アミノ－３－カルボキシプロピル）ウラシル、２－（チオ）ウラシル、５－（メチル）－２－（チオ）ウラシル、５－（メチルアミノメチル）－２－（チオ）ウラシル、４－（チオ）ウラシル、５－（メチル）－４－（チオ）ウラシル、５－（メチルアミノメチル）－４－（チオ）ウラシル、５－（メチル）－２，４－（ジチオ）ウラシル、５－（メチルアミノメチル）－２，４－（ジチオ）ウラシル、５－（２－アミノプロピル）ウラシル、５－（アルキル）ウラシル、５－（アルキニル）ウラシル、５－（アリルアミノ）ウラシル、５－（アミノアリル）ウラシル、５－（アミノアルキル）ウラシル、５－（グアニジニウムアルキル）ウラシル、５－（１，３－ジアゾール－１－アルキル）ウラシル、５－（シアノアルキル）ウラシル、５－（ジアルキルアミノアルキル）ウラシル、５－（ジメチルアミノアルキル）ウラシル、５－（ハロ）ウラシル、５－（メトキシ）ウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸、５－（メトキシカルボニルメチル）－２－（チオ）ウラシル、５－（メトキシカルボニル－メチル）ウラシル、５－（プロピニル）ウラシル、５－（プロピニル）ウラシル、５－（トリフルオロメチル）ウラシル、６－（アゾ）ウラシル、ジヒドロウラシル、Ｎ^{3}－（メチル）ウラシル、５－ウラシル（すなわち、シュードウラシル）、２－（チオ）シュードウラシル、４－（チオ）シュードウラシル、２，４－

（ジチオ）シュードウラシル、５－（アルキル）シュードウラシル、５－（メチル）シュードウラシル、５－（アルキル）－２－（チオ）シュードウラシル、５－（メチル）－２－（チオ）シュードウラシル、５－（アルキル）－４－（チオ）シュードウラシル、５－（メチル）－４－（チオ）シュードウラシル、５－（アルキル）－２，４－（ジチオ）シュードウラシル、５－（メチル）－２，４－（ジチオ）シュードウラシル、１－置換シュードウラシル、１－置換２（チオ）－シュードウラシル、１－置換４－（チオ）シュードウラシル、１－置換２，４－（ジチオ）シュードウラシル、１－（アミノカルボニルエチルエニル）－シュードウラシル、１－（アミノカルボニルエチルエニル）－２（チオ）－シュードウラシル、１－（アミノカルボニルエチルエニル）－４－（チオ）シュードウラシル、１－（アミノカルボニルエチルエニル）－２，４－（ジチオ）シュードウラシル、１－（アミノアルキルアミノカルボニルエチルエニル）－シュードウラシル、１－（アミノアルキルアミノ－カルボニルエチルエニル）－２（チオ）－シュードウラシル、１－（アミノアルキルアミノカルボニルエチルエニル）－４－（チオ）シュードウラシル、１－（アミノアルキルアミノカルボニルエチルエニル）－２，４－（ジチオ）シュードウラシル、１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル、１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェンチアジン－１－イル、１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェンチアジン－１－イル、７－置換１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、７－置換１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル、７－置換１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェンチアジン－１－イル、７－置換１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェンチアジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェンチアジン－１－イル、７－（アミノアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェンチアジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェノキサジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェノキサジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキル－ヒドロキシ）－１，３－（ジアザ）－２－（オキソ）－フェンチアジン－１－イル、７－（グアニジニウムアルキルヒドロキシ）－１－（アザ）－２－（チオ）－３－（アザ）－フェンチアジン－１－イル、１，３，５－（トリアザ）－２，６－（ジオキサ）－ナフタレン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン、ツベルシジン、イソグアニシン、イノシニル、２－アザ－イノシニル、７－デアザ－イノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンズイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドリル、ピロロピリミジニル、３－（メチル）イソカルボスチリルイル、５－（メチル）イソカルボスチリルイル、３－（メチル）－７－（プロピニル）イソカルボスチリルイル、７－（アザ）インドリル、６－（メチル）－７－（アザ）インドリル、イミジゾピリジニル、９－（メチル）－イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリルイル、７－（プロピニル）イソカルボスチリルイル、プロピニル－７－（アザ）インドリル、２，４，５－（トリメチル）フェニル、４－（メチル）インドリル、４，６－（ジメチル）インドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニル、ジフルオロトリル、４－（フルオロ）－６－（メチル）ベンズイミダゾール、４－（メチル）ベンズイミダゾール、６－（アゾ）チミン、２－ピリジノン、５－ニトロインドール、３－ニトロピロール、６－（アザ）ピリミジン、２－（アミノ）プリン、２，６－（ジアミノ）プリン、５－置換ピリミジン、N^2－置換プリン、N^6－置換プリン、O^6－置換プリン、置換１，２，４－トリアゾール、ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ｐａｒａ－置換－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ｏｒｔｈｏ－置換－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ｂ

ｉｓ－ｏｒｔｈｏ－置換－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ｐａｒａ－（アミノアルキルヒドロキシ）－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ｏｒｔｈｏ－（アミノアルキルヒドロキシ）－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ｂｉｓ－ｏｒｔｈｏ－－（アミノアルキルヒドロキシ）－６－フェニル－ピロロ－ピリミジン－２－オン－３－イル、ピリドピリミジン－３－イル、２－オキソ－７－アミノ－ピリドピリミジン－３－イル、２－オキソ－ピリドピリミジン－３－イル、またはそれらの任意のＯ－アルキル化もしくはＮ－アルキル化誘導体などが挙げられる。あるいは、上記の塩基および「ユニバーサル塩基」のいずれかの置換アナログまたは修飾アナログを採用することもできる。

【０９６１】

本明細書で使用される場合、ユニバーサル核酸塩基は、ｉＲＮＡ二本鎖の融解挙動、細胞内酵素による認識、または活性に実質的に影響を与えることなく、四種の天然に存在する核酸塩基のすべてと塩基対形成することができる任意の核酸塩基である。一部の例示的なユニバーサル核酸塩基としては限定されないが、２，４－ジフルオロトルエン、ニトロピロリル、ニトロインドリル、８－アザ－７－デアザアデニン、４－フルオロ－６－メチルベンズイミダズル、４－メチルベンズイミダズル、３－メチルイソカルボスチリルイル、５－メチルイソカルボスチリルイル、３－メチル－７－プロピニルイソカルボスチリルイル、７－アザインドリル、６－メチル－７－アザインドリル、イミジゾピリジニル、９－メチル－イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリルイル、７－プロピニルイソカルボスチリルイル、プロピニル－７－アザインドリル、２，４，５－トリメチルフェニル、４－メチルイノリル、４，６－ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニル、およびその構造誘導体が挙げられる（例えば、Ｌｏａｋｅｓ，２００１，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２９，２４３７－２４４７を参照のこと）。

【０９６２】

さらなる核酸塩基としては、米国特許第３，６８７，８０８号に開示されるもの、２００９年３月２６日に出願された国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ０９／０３８４２５号に開示されるもの、Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ Ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，ｐａｇｅｓ ８５８－８５９，Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ，Ｊ．Ｉ．，ｅｄ．Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，１９９０に開示されるもの、Ｅｎｇｌｉｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９１，３０，６１３に開示されるもの、Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｈｅｒｄｅｗｉｊｉｎ，Ｐ．Ｅｄ．Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ，２００８に開示されるもの、およびＳａｎｇｈｖｉ，Ｙ．Ｓ．，Ｃｈａｐｔｅｒ １５，ｄｓＲＮＡ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐａｇｅｓ ２８９－３０２，Ｃｒｏｏｋｅ，Ｓ．Ｔ．ａｎｄ Ｌｅｂｌｅｕ，Ｂ．，Ｅｄｓ．，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，１９９３に開示されるものが挙げられる。上記文献すべての内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０９６３】

特定の実施形態では、修飾核酸塩基は、例えば、７－デアザプリン、５－メチルシトシン、またはＧ－クランプなどの親核酸塩基と構造がかなり類似している核酸塩基である。特定の実施形態では、核酸塩基模倣体は、例えば、三環式フェノキサジン核酸塩基模倣体など、より複雑な構造を含む。上記の修飾核酸塩基の作製方法は、当業者に公知である。

【０９６４】

核酸修飾（糖）

エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、修飾糖部分を有するヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む、一個以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５

個以上）の単量体を含み得る。例えば、ヌクレオシドのフラノシル糖環は、限定されないが、置換基の付加、二つの非ジェミナル環原子を架橋してロックド核酸または二環式核酸を形成することをはじめとする、多くの方法で修飾することができる。特定の実施形態では、オリゴマー化合物は、ＬＮＡである単量体を一個以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５個、またはそれ以上）含む。

【０９６５】

ロックド核酸の一部の実施形態では、フラノシルの２’位は、－［Ｃ（Ｒ１）（Ｒ２）］$_n$－、－［Ｃ（Ｒ１）（Ｒ２）］$_n$－Ｏ－、－［Ｃ（Ｒ１）（Ｒ２）］$_n$－Ｎ（Ｒ１）－、－［Ｃ（Ｒ１）（Ｒ２）］$_n$－Ｎ（Ｒ１）－Ｏ－、－［Ｃ（Ｒ１Ｒ２）］$_n$－Ｏ－Ｎ（Ｒ１）－、－Ｃ（Ｒ１）＝Ｃ（Ｒ２）－Ｏ－、－Ｃ（Ｒ１）＝Ｎ－、－Ｃ（Ｒ１）＝Ｎ－Ｏ－、－Ｃ（≡ＮＲ１）－、－Ｃ（≡ＮＲ１）－Ｏ－、－Ｃ（≡Ｏ）－、－Ｃ（≡Ｏ）Ｏ－、－Ｃ（≡Ｓ）－、－Ｃ（≡Ｓ）Ｏ－、－Ｃ（≡Ｓ）Ｓ－、－Ｏ－、－Ｓｉ（Ｒ１）２－、－Ｓ（＝Ｏ）$_x$－、および－Ｎ（Ｒ１）－から独立して選択されるリンカーによって、４’位に接続され、

式中、

ｘは、０、１、または２であり；

ｎは、１、２、３、または４であり；

各Ｒ１およびＲ２は独立して、Ｈ、保護基、ヒドロキシル、Ｃ１－Ｃ１２アルキル、置換Ｃ１－Ｃ１２アルキル、Ｃ２－Ｃ１２アルケニル、置換Ｃ２－Ｃ１２アルケニル、Ｃ２－Ｃ１２アルキニル、置換Ｃ２－Ｃ１２アルキニル、Ｃ５－Ｃ２０アリール、置換Ｃ５－Ｃ２０アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、Ｃ５－Ｃ７脂環式ラジカル、置換Ｃ５－Ｃ７脂環式ラジカル、ハロゲン、ＯＪ１、ＮＪ１Ｊ２、ＳＪ１、Ｎ３、ＣＯＯＪ１、アシル（Ｃ（≡Ｏ）－Ｈ）、置換アシル、ＣＮ、スルホニル（Ｓ（≡Ｏ）２－Ｊ１）、またはスルホキシル（Ｓ（≡Ｏ）－Ｊ１）であり；および

各Ｊ１およびＪ２は独立して、Ｈ、Ｃ１－Ｃ１２アルキル、置換Ｃ１－Ｃ１２アルキル、Ｃ２－Ｃ１２アルケニル、置換Ｃ２－Ｃ１２アルケニル、Ｃ２－Ｃ１２アルキニル、置換Ｃ２－Ｃ１２アルキニル、Ｃ５－Ｃ２０アリール、置換Ｃ５－Ｃ２０アリール、アシル（Ｃ（≡Ｏ）－Ｈ）、置換アシル、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、Ｃ１－Ｃ１２アミノアルキル、置換Ｃ１－Ｃ１２アミノアルキル、または保護基である。

【０９６６】

一部の実施形態では、ＬＮＡ化合物のリンカーはそれぞれ独立して、－［Ｃ（Ｒ１）（Ｒ２）］ｎ－、－［Ｃ（Ｒ１）（Ｒ２）］ｎ－Ｏ－、－Ｃ（Ｒ１Ｒ２）－Ｎ（Ｒ１）－Ｏ－、または－Ｃ（Ｒ１Ｒ２）－Ｏ－Ｎ（Ｒ１）－である。別の実施形態では、当該リンカーはそれぞれ独立して、４’－CH_2－２’、４’－$(CH_2)_2$－２’、４’－$(CH_2)_3$－２’、４’－CH_2－Ｏ－２’、４’－$(CH_2)_2$－Ｏ－２’、４’－CH_2－Ｏ－Ｎ（Ｒ１）－２’、および４’－CH_2－Ｎ（Ｒ１）－Ｏ－２’－であり、式中、各Ｒ１は独立して、Ｈ、保護基、またはＣ１－Ｃ１２アルキルである。

【０９６７】

特定のＬＮＡは、特許文献ならびに科学文献（Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１９９８，４，４５５－４５６；Ｋｏｓｈｋｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，１９９８，５４，３６０７－３６３０；Ｗａｈｌｅｓｔｅｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，２０００，９７，５６３３－５６３８；Ｋｕｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１９９８，８，２２１９－２２２２；ＷＯ９４／１４２２６；ＷＯ２００５／０２１５７０；Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，１９９８，６３，１００３５－１００３９；ＬＮＡを開示する取得済み米国特許および公開出願の例としては例えば、米国特許第７，０５３，２０７号、第６，２６８，４９０号、第６，７７０，７４８号、第６，７９４，４９９号、第７，０３４，１３３号、および第６，５２５，１９１号が挙げられ、権利化前の米国出願公開としては、２００４－０１７１５７０、２０

０４－０２１９５６５、２００４－００１４９５９、２００３－０２０７８４１、２００４－０１４３１１４、および２００３００８２８０７が挙げられる。

【０９６８】

また本明細書において、リボシル糖環の２’－ヒドロキシル基が糖環の４’炭素原子に結合され、それによってメチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）結合が形成され、二環式糖部分が形成されるＬＮＡも提供される（Ｅｌａｙａｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｉｎｖｅｎｓ．Ｄｒｕｇｓ，２００１，２，５５８－５６１；Ｂｒａａｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，２００１，８　１－７；およびＯｒｕｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２００１，３，２３９－２４３に概説され、また米国特許第６，２６８，４９０号および第６，６７０，４６１号も参照のこと）。結合は、２’酸素原子と４’炭素原子を架橋するメチレン（－CH_2－）基であってもよく、メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡという用語は、二環式部分に使用され、この位置にエチレン基がある場合には、エチレンオキシ（４’－CH_2CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡという用語が使用される（Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１９９８，４，４５５－４５６：Ｍｏｒｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２００３，１１，２２１１－２２２６）。メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡおよび他の二環式糖アナログは、相補的なＤＮＡおよびＲＮＡと非常に高い二本鎖の熱安定性（Ｔｍ＝＋３～＋１０℃）、３’－エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、および良好な溶解性を示す。ＢＮＡを含む強力で非毒性のアンチセンスオリゴヌクレオチドが報告されている（Ｗａｈｌｅｓｔｅｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，２０００，９７，５６３３－５６３８）。

【０９６９】

検討されているメチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡの異性体は、アルファ－Ｌ－メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡであり、これは３’－エキソヌクレアーゼに対して優れた安定性を有することが示されている。アルファ－Ｌ－メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡは、アンチセンスギャップマーおよびキメラに組み込まれ、強力なアンチセンス活性を示している（Ｆｒｉｅｄｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００３，２１，６３６５－６３７２）。

【０９７０】

メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡ単量体のアデニン、シトシン、グアニン、５－メチル－シトシン、チミン、およびウラシルの合成および作製は、オリゴマー化および核酸認識性能とともに報告されている（Ｋｏｓｈｋｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，１９９８，５４，３６０７－３６３０）。ＢＮＡおよびその作製は、国際公開第９８／３９３５２号および同第９９／１４２２６号にも記述されている。

【０９７１】

メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡ、ホスホロチオエート－メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡおよび２’－チオ－ＬＮＡのアナログも作製されている（Ｋｕｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．，１９９８，８，２２１９－２２２２）。核酸ポリメラーゼのための基質としてオリゴデオキシリボヌクレオチド二本鎖を含むロックドヌクレオシドアナログの作製も報告されている（Ｗｅｎｇｅｌらの国際公開第９９／１４２２６号）。その上、新規の立体構造的に制限された高アフィニティオリゴヌクレオチドアナログである２’－アミノ－ＬＮＡの合成も当分野で報告されている（Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，１９９８，６３，１００３５－１００３９）。それに加えて、２’－アミノ－ＬＮＡおよび２’－メチルアミノ－ＬＮＡも作製されており、相補的なＲＮＡ鎖およびＤＮＡ鎖との二本鎖の熱安定性も過去に報告されている。

【０９７２】

修飾糖部分は公知であり、その標的に対するアンチセンス化合物のアフィニティを変える、典型的にはアフィニティを高め、および／またはヌクレアーゼ耐性を高めるために使

用することができる。好ましい修飾糖の代表的なリストとしては限定されないが、メチレンオキシ（４’－CH_2－Ｏ－２’）ＬＮＡおよびエチレンオキシ（４’－（CH_2）$_2$－Ｏ－２’架橋）ＥＮＡを含む二環式修飾糖；置換糖、特に２’－Ｆ、２’－ＯＣＨ$_3$または２’－Ｏ（CH_2）$_2$－ＯＣＨ$_3$置換基を有する２’置換糖；および４’－チオ修飾糖が挙げられる。また糖は、とくに糖模倣基で置換されてもよい。修飾糖の作製方法は、当業者に公知である。かかる修飾糖の作製を教示するいくつかの代表的な特許および公開文献としては、限定されないが、米国特許第４，９８１，９５７号、第５，１１８，８００号、第５，３１９，０８０号、第５，３５９，０４４号、第５，３９３，８７８号、第５，４４６，１３７号、第５，４６６，７８６号、第５，５１４，７８５号、第５，５１９，１３４号、第５，５６７，８１１号、第５，５７６，４２７号、第５，５９１，７２２号、第５，５９７，９０９号、第５，６１０，３００号、第５，６２７，０５３号、第５，６３９，８７３号、第５，６４６，２６５号、第５，６５８，８７３号、第５，６７０，６３３号、第５，７９２，７４７号、第５，７００，９２０号、第６，５３１，５８４号、および第６，６００，０３２号、ならびにＷＯ　２００５／１２１３７１が挙げられる。

【０９７３】

「オキシ」－２’ヒドロキシル基修飾の例としては、アルコキシまたはアリールオキシ（ＯＲ、例えば、Ｒ＝Ｈ、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖）；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、Ｏ（CH_2CH_2O）$_n$$CH_2CH_2OR$、ｎ＝１～５０；ヌクレオシドのフラノース部分が、フラノース環上の二つの炭素原子を接続する架橋を含み、それによって二環式環系を形成する、「ロックド」核酸（ＬＮＡ）；Ｏ－アミンまたはＯ－（CH_2）$_n$アミン（ｎ＝１～１０、アミン＝NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノ）；およびＯ－CH_2CH_2（$NCH_2CH_2NMe_2$）$_2$が挙げられる。

【０９７４】

デオキシ修飾としては、水素（すなわち、一本鎖オーバーハングに特に関連するデオキシリボース糖）；ハロ（例えば、フルオロ）；アミノ（例えば、NH_2；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸）；ＮＨ（CH_2CH_2NH）$_n$$CH_2CH_2$－アミン（アミン＝$NH_2$；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ）；－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（Ｒ＝アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖）；シアノ；メルカプト；アルキル－チオ－アルキル；チオアルコキシ；チオアルキル；アルキル；シクロアルキル；アリール；アルケニルおよびアルキニルが挙げられ、これらは任意選択的に例えば網の官能基で置換され得る。

【０９７５】

他の好適な２’－修飾、例えば、修飾ＭＯＥは、米国特許出願公開第２０１３０１３０３７８号に記述されている。当該文献の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【０９７６】

２’位の修飾は、アラビノース立体配置で存在してもよい。「アラビノース立体配置」という用語は、アラビノース中の２’－ＯＨと同じ立体配置で、リボースのＣ２’上に置換基を配置することを指す。

【０９７７】

糖は、糖中の同じ炭素に二つの異なる修飾、例えば、ｇｅｍ修飾を含むことができる。糖基はまた、リボース中の対応する炭素の立体化学的配置とは反対向きの立体化学的配置を有する、一つ以上の炭素を含有してもよい。それ故に、オリゴマー化合物は、糖として、例えばアラビノースを含有する一つ以上の単量体を含んでもよい。単量体は、糖の１’位に、例えば、アルファ－ヌクレオシドの１’位にアルファ結合を有してもよい。また単量体は、４’位で反対向きの立体配置を有してもよく、例えば、Ｃ５’およびＨ４’、またはこれらを置き換える置換基は、相互に交換される。Ｃ５’およびＨ４’、またはこれらを

置き換える置換基が、相互に交換される場合、糖は、４’位で修飾されると言われる。

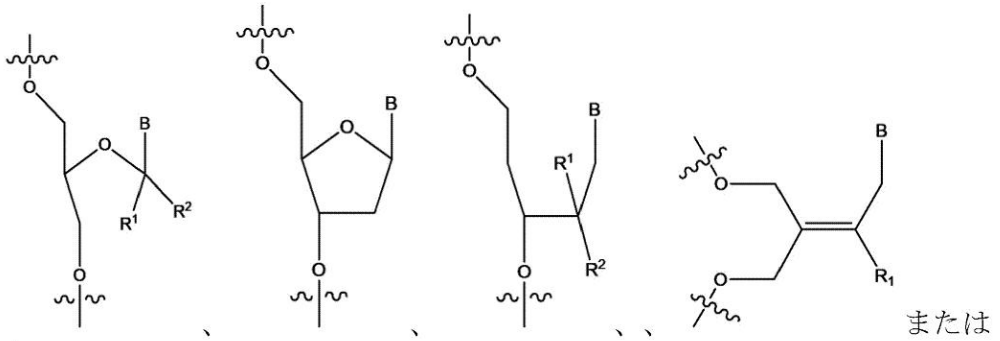
【０９７８】

本明細書に開示されるエフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、脱塩基性糖、すなわち、Ｃ－１’に核酸塩基が無い糖、またはＣ１’で核酸塩基の代わりに他の化学基を有する糖も含み得る。例えば、米国特許　第５，９９８，２０３号を参照のこと（当該文献の内容は、その全体が本明細書に組み込まれる）。これらの脱塩基糖は、構成する糖原子のうちの一つ以上で、修飾をさらに含有することもできる。エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、Ｌ異性体、例えば、Ｌ－ヌクレオシドである糖を一つ以上含有してもよい。糖基に対する修飾は、硫黄、任意選択的に置換された窒素またはCH_2基と４’－Ｏの置換を含んでもよい。一部の実施形態では、Ｃ１’と核酸塩基との間の結合は、α立体配置である。

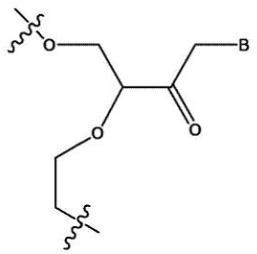
【０９７９】

糖修飾は、非環式ヌクレオチドを含んでもよく、この場合においてリボース炭素間のＣ－Ｃ結合（例えば、Ｃ１’－Ｃ２’、Ｃ２’－Ｃ３’、Ｃ３’－Ｃ４’、Ｃ４’－Ｏ４’、またはＣ１’－Ｏ４’）は存在しない、および／またはリボースの炭素もしくは酸素のうち少なくとも一つ（例えば、Ｃ１’、Ｃ２’、Ｃ３’、Ｃ４’、またはＯ４’）は独立して、または組み合わせて、ヌクレオチドに存在しない。一部の実施形態では、非環式ヌクレオチドは、

【化１３６】



または



であり、式中、Ｂは、修飾または未修飾の核酸塩基であり、R_1およびR_2は、独立して、Ｈ、ハロゲン、OR_3またはアルキルであり、R_3は、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖である）。

【０９８０】

一部の実施形態では、糖修飾は、２’－Ｈ、２’－Ｏ－Ｍｅ（２’－Ｏ－メチル）、２’－Ｏ－ＭＯＥ（２’－Ｏ－メトキシエチル）、２’－Ｆ、２’－Ｏ－［２－（メチルアミノ）－２－オキソエチル］（２’－Ｏ－ＮＭＡ）、２’－Ｓ－メチル、２’－Ｏ－C_6H（４’－Ｃ）（ＬＮＡ）、２’－Ｏ－CH_2CH_2－（４’－Ｃ）（ＥＮＡ）、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－Ｄ－ＤＭＡＰ），２’－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、およびアラビノース立体配置で２’－Ｏ－Ｍｅを有するｇｅｍ　２’－ＯＭｅ／２’Ｆからなる群から選択される。

【０９８１】

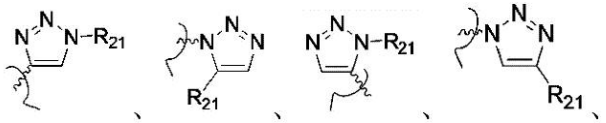
特定のヌクレオチドが、２’位を通して次のヌクレオチドに結合される場合、本明細書に記述される糖修飾は、当該特定のヌクレオチド、例えば、その２’－位を通して結合さ

れるヌクレオチドに対し、糖の３’－位に配置され得ることが理解されたい。３’位の修飾は、キシロース立体配置で存在してもよい。「キシロース立体配置」という用語は、キシロース糖中の３’－ＯＨと同じ立体配置で、リボースのＣ３’上に置換基を配置することを指す。

【０９８２】

Ｃ４’および／またはＣ１’に結合した水素は、直鎖または分岐鎖の任意選択的に置換されたアルキル、任意選択的に置換されたアルケニル、任意選択的に置換されたアルキニルによって置き換えることができ、この場合においてアルキル、アルケニル、およびアルキニルの骨格は、Ｏ、Ｓ、Ｓ（Ｏ）、SO_2、Ｎ（Ｒ’）、Ｃ（Ｏ）、Ｎ（Ｒ’）Ｃ（Ｏ）Ｏ、ＯＣ（Ｏ）Ｎ（Ｒ’）、ＣＨ（Ｚ’）、リン含有結合、任意選択的に置換されたアリール、任意選択的に置換されたヘテロアリール、任意選択的に置換された複素環式、または任意選択的に置換されたシクロアルキルのうちの一つ以上を含有することができ、式中、Ｒ’は水素、アシル、または任意選択的に置換された脂肪族であり、Ｚ’は、OR_{11}、ＣＯＲ１１、CO_2R_{11}、

【化１３７】



、

、

、

、

$NR_{21}R_{31}$、ＣＯＮ$R_{21}R_{31}$、ＣＯＮ（Ｈ）$NR_{21}R_{31}$、$ONR_{21}R_{31}$、ＣＯＮ（Ｈ）Ｎ＝$CR_{41}R_{51}$、Ｎ（R_{21}）Ｃ（＝NR_{31}）$NR_{21}R_{31}$、Ｎ（R_{21}）Ｃ（Ｏ）$NR_{21}R_{31}$、Ｎ（R_{21}）Ｃ（Ｓ）$NR_{21}R_{31}$、ＯＣ（Ｏ）$NR_{21}R_{31}$、ＳＣ（Ｏ）$NR_{21}R_{31}$、Ｎ（R_{21}）Ｃ（Ｓ）OR_{11}、Ｎ（R_{21}）Ｃ（Ｏ）OR_{11}、Ｎ（R_{21}）Ｃ（Ｏ）SR_{11}、Ｎ（R_{21}）Ｎ＝$CR_{41}R_{51}$、ＯＮ＝$CR_{41}R_{51}$、SO_2R_{11}、SOR_{11}、SR_{11}、および置換もしくは非置換複素環式からなる群から選択され、R_{21}およびR_{31}は各存在について独立して、水素、アシル、非置換もしくは置換された脂肪族、アリール、ヘテロアリール、複素環式、OR_{11}、ＣＯR_{11}、CO_2R_{11}、または$NR_{11}R_{11}$’であるか、またはR_{21}とR_{31}はそれらが結合している原子と一緒になって、複素環式環を形成し、R_{41}およびR_{51}は各存在について独立して、水素、アシル、非置換または置換された脂肪族、アリール、ヘテロアリール、複素環式、OR_{11}、ＣＯR_{11}、またはCO_2R_{11}、または$NR_{11}R_{11}$’であり、R_{11}およびR_{11}’は独立して水素、脂肪族、置換脂肪族、アリール、ヘテロアリール、または複素環式である。一部の実施形態では、５’末端ヌクレオチドのＣ４’に結合した水素は、置換される。

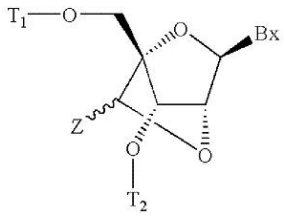
【０９８３】

一部の実施形態では、Ｃ４’およびＣ５’は一緒に、任意選択的に置換される複素環を形成し、当該複素環は、好ましくは、少なくとも一つの－ＰＸ（Ｙ）－を含み、式中、Ｘは、Ｈ、ＯＨ、ＯＭ、ＳＨ、任意選択的に置換されるアルキル、任意選択的に置換されるアルコキシ、任意選択的に置換されるアルキルチオ、任意選択的に置換されるアルキルアミノ、または任意選択的に置換されるジアルキルアミノであり、式中、Ｍは、各存在について独立して、＋１の全体的な電荷を有するアルキ金属または遷移金属であり、ＹはＯ、Ｓ、またはＮＲ’であり、式中、Ｒ’は水素、任意選択的に置換される脂肪族である。好ましくは、この修飾は、ｉＲＮＡの５末端にある。

【０９８４】

特定の実施形態では、ＬＮＡは、以下の式を有する二環式ヌクレオシドを含み：

【化１３８】

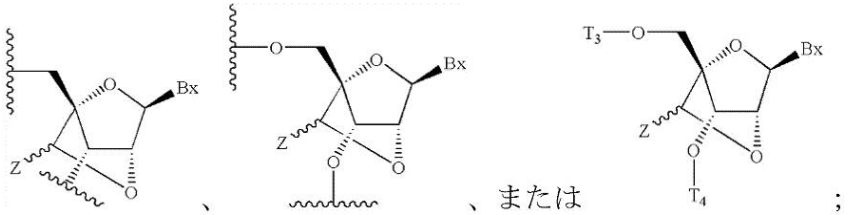


式中、
Ｂｘは、複素環式塩基部分であり；
Ｔ$_1$は、Ｈまたはヒドロキシル保護基であり；
Ｔ$_2$は、Ｈ、ヒドロキシル保護基、または反応性リン基であり；
Ｚは、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルケニル、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキニル、置換Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、置換Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルケニル、置換Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキニル、アシル、置換アシル、または置換アミドである。

【０９８５】

特定の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、以下の式の単量体を少なくとも一つ含み：

【化１３９】



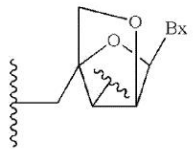
式中、
Ｂｘは、複素環式塩基部分であり；
Ｔ$_3$は、Ｈ、ヒドロキシル保護基、結合したコンジュゲート基であるか、またはヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、モノマーサブユニット、もしくはオリゴマー化合物に結合したヌクレオシド間結合基であり；
Ｔ$_4$は、Ｈ、ヒドロキシル保護基、結合したコンジュゲート基であるか、またはヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、モノマーサブユニット、もしくはオリゴマー化合物に結合したヌクレオシド間結合基であり；
式中、Ｔ$_3$およびＴ$_4$のうちの少なくとも一つは、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、モノマーサブユニット、またはオリゴマー化合物に結合したヌクレオシド間結合基であり；および
Ｚは、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルケニル、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキニル、置換Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、置換Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルケニル、置換Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキニル、アシル、置換アシル、または置換アミドである。

【０９８６】

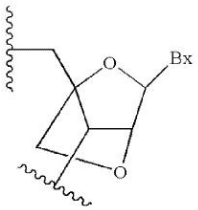
特定のかかる実施形態では、ＬＮＡとしては限定されないが、以下に示される（Ａ）α－Ｌ－メチレンオキシ（４’－ＣＨ$_2$－Ｏ－２’）ＬＮＡ、（Ｂ）β－Ｄ－メチレンオキシ（４’－ＣＨ$_2$－Ｏ－２’）ＬＮＡ、（Ｃ）エチレンオキシ（４’－（ＣＨ$_2$）$_2$－Ｏ－２’）ＬＮＡ、（Ｄ）アミノオキシ（４’－ＣＨ$_2$－Ｏ－Ｎ（Ｒ）－２’）ＬＮＡ、および（Ｅ）オキシアミノ（４’－ＣＨ$_2$－Ｎ（Ｒ）－Ｏ－２’）ＬＮＡが挙げられる：

【化１４０】

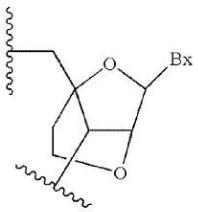
(A)



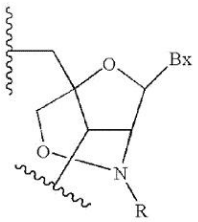
(B)



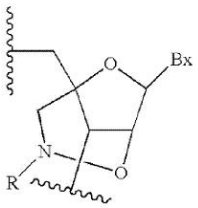
(C)



(D)



(E)



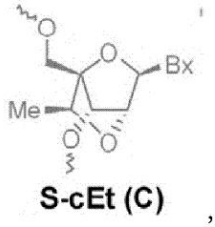
【０９８７】

特定の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、上記の式の少なくとも二つの連続する単量体の領域を少なくとも二つ含む。特定の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、ギャップ化モチーフを含む。特定の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、約８～約１４個の連続するβ－Ｄ－２’－デオキシリボフラノシルヌクレオシドの領域を少なくとも一つ含む。特定の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、約９～約１２個の連続するβ－Ｄ－２’－デオキシリボフラノシルヌクレオシドの領域を少なくとも一つ含む。

【０９８８】

特定の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、以下の式の（Ｓ）－ｃＥｔ単量体を少なくとも一つ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、またはそれ以上）含む：

【化１４１】



,

式中、Ｂｘは、複素環式塩基部分である。

【０９８９】

特定の実施形態では、単量体は、糖模倣体を含む。特定のかかる実施形態では、模倣体は、糖または糖－ヌクレオシド間結合の組み合わせの代わりに使用され、核酸塩基は、選択された標的へのハイブリダイゼーションのために維持される。糖模倣体の代表的な例としては限定されないが、シクロヘキセニルまたはモルホリノが挙げられる。糖－ヌクレオシド間結合の組み合わせに関する模倣体の代表的な例としては限定されないが、非荷電アキラル結合によって結合されたペプチド核酸（ＰＮＡ）およびモルホリノ基が挙げられる。一部の例では、模倣体は、核酸塩基の代わりに使用される。代表的な核酸塩基模倣体は、当分野で公知であり、限定されないが、三環式フェノキサジンアナログおよびユニバーサル塩基が挙げられる（Ｂｅｒｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２００，２８：２９１１－１４。参照により本明細書に組み込まれる）。糖、ヌクレオシド、および核酸塩基模倣体の合成方法は、当業者に公知である。

【０９９０】

核酸修飾（糖間結合）

本明細書において、単量体（限定されないが、修飾および非修飾のヌクレオシドならびにヌクレオチドが挙げられる）を一緒に結合し、それによってオリゴマー化合物、例えばオリゴヌクレオチドを形成する結合基が記載される。そのような結合基は、糖間結合とも呼称される。結合基の二つの主要な種は、リン原子の存在または非存在によって定義される。代表的なリン含有結合としては限定されないが、ホスホジエステル（Ｐ≡Ｏ）、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、およびホスホロチオエート（Ｐ≡Ｓ）が挙げられる。代表的な非リン含有結合基としては限定されないが、メチレンメチルイミノ（－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｏ－ＣＨ$_2$－）、チオジエステル（－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｓ－）、チオノカルバメート（－Ｏ－Ｃ（Ｏ）（ＮＨ）－Ｓ－）；シロキサン（－Ｏ－Ｓｉ（Ｈ）$_2$－Ｏ－）；およびＮ，Ｎ’－ジメチルヒドラジン（－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｎ（ＣＨ$_3$）－）が挙げられる。修飾された結合は、天然ホスホジエステル結合と比較して、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を変化させる、典型的には高めるために使用され得る。特定の実施形態では、キラル原子を有する結合は、ラセミ混合物として、別個のエナンチオマーとして作製することができる。代表的なキラル結合としては限定されないが、アルキルホスホネートおよびホスホロチオエートが挙げられる。リン含有結合および非リン含有結合の作製方法は、当業者に公知である。

【０９９１】

結合基中のリン酸基は、酸素のうちの一つを異なる置換基で置き換えることによって修飾することができる。この修飾によって得られる結果の一つは、核酸分解に対するオリゴヌクレオチドの耐性増加であってもよい。修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルホスホネートまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルが挙げられる。一部の実施形態では、結合中の非架橋リン酸酸素原子のうちの一つは、以下のうちのいずれかによって置き換えられてもよい：Ｓ、Ｓｅ、ＢＲ$_3$（Ｒは、水素、アルキル、アリール）、Ｃ（すなわち、アルキル基、アリール基など）、Ｈ、ＮＲ$_2$（Ｒは、水素、任意で置換されるアルキル、アリール）、またはＯＲ（Ｒは、任意で置換されるアルキルまたはアリールである）。非修飾リン酸基中のリン原子

は、アキラルである。しかし非架橋酸素のうちの一つを、上記の原子または原子群のうちの一つで置き換えることによって、リン原子がキラルの状態になる。言い換えれば、このようにして修飾されたリン酸基中のリン原子は、立体中心である。不斉中心リン原子は、「Ｒ」立体配置（本明細書において、Ｒｐ）または「Ｓ」立体配置（本明細書において、Ｓｐ）のいずれかを有し得る。

【０９９２】

ホスホロジチオエートは両方の非架橋酸素が硫黄で置換されている。ホスホロジチオエート中のリン中心はアキラルであり、オリゴヌクレオチドジアステレオマーの形成を妨げる。したがって、理論に拘束されることは望まないが、キラル中心を排除する両方の非架橋酸素への修飾、例えば、ホスホロジチオエートの形成は、それらがジアステレオマー混合物を生成できないという点で、望ましい場合がある。したがって、非架橋酸素は独立して、Ｏ、Ｓ、Ｓｅ、Ｂ、Ｃ、Ｈ、Ｎ、またはＯＲ（Ｒは、アルキルまたはアリール）のうちのいずれか一つであり得る。

【０９９３】

リン酸リンカーは、架橋酸素（すなわち、リン酸を単量体の糖に結合する酸素）を窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）で置換することによって修飾することもできる。置換は、結合酸素のうちのいずれか一つ、または両方の結合酸素で発生してもよい。架橋酸素がヌクレオシドの３’－酸素である場合、炭素での置換が好ましい。架橋酸素がヌクレオシドの５’－酸素である場合、窒素での置換が好ましい。

【０９９４】

リン酸と結合された酸素のうちの少なくとも一つが置換されている、またはリン酸基が非リン基で置換されている場合、修飾リン酸結合は、「非ホスホジエステル糖間結合」または「非ホスホジエステルリンカー」とも称される。

【０９９５】

特定の実施形態では、リン酸基は、非リン含有コネクター、例えば、脱ホスホリンカーによって置換されてもよい。脱ホスホリンカーは、本明細書において、非ホスホジエステルリンカーとも称される。理論に拘束されることは望まないが、荷電ホスホジエステル基は、核酸分解の反応の中心であるため、中性構造模倣体と置換することによって、ヌクレアーゼ安定性が向上すると考えられる。繰り返しになるが、理論に拘束されることは望まないが、一部の実施形態では、荷電リン酸基が中性部分で置換される改変を導入することが望ましい場合がある。

【０９９６】

リン酸基を置換することができる部分の例としては限定されないが、アミド（例えば、アミド－３（３’－CH_2－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｈ）－５’）、およびアミド－４（３’－CH_2－Ｎ（Ｈ）－Ｃ（＝Ｏ）－５’））、ヒドロキシルアミノ、シロキサン（ジアルキルシロキサン）、カルボキサミド、炭酸塩、カルボキシメチル、カルバミン酸塩、カルボン酸エステル、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルフィド、スルホン酸塩、スルホンアミド、スルホン酸エステル、チオホルムアセタール（３’－Ｓ－CH_2－Ｏ－５’）、ホルムアセタール（３’－Ｏ－CH_2－Ｏ－５’）、オキシム、メチレンイミノ、メチケンカルボニルアミノ、メチレンメチルイミノ（ＭＭＩ、３’－CH_2－Ｎ（CH_3）－Ｏ－５’）、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、メチレンオキシメチルイミノ、エーテル（Ｃ３’－Ｏ－Ｃ５’）、チオエーテル（Ｃ３’－Ｓ－Ｃ５’）、チオアセトアミド（Ｃ３’－Ｎ（Ｈ）－Ｃ（＝Ｏ）－CH_2－Ｓ－Ｃ５’、Ｃ３’－Ｏ－Ｐ（Ｏ）－Ｏ－ＳＳ－Ｃ５’、Ｃ３’－C_2H－ＮＨ－ＮＨ－Ｃ５’、３’－ＮＨＰ（Ｏ）（OC_3H）－Ｏ－５’、および３’－ＮＨＰ（Ｏ）（OC_3H）－Ｏ－５’、ならびにＮ、Ｏ、ＳおよびＣH_2構成部分が混合されて含有される非イオン性結合が挙げられる。例えば、Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｙ．Ｓ．Ｓａｎｇｈｖｉ ａｎｄ Ｐ．Ｄ．Ｃｏｏｋ Ｅｄｓ．ＡＣＳ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ ５８０；Ｃｈａｐｔｅｒｓ ３ ａｎｄ ４，（ｐｐ．４０－

６５）を参照されたい。好ましい実施形態としては、メチレンメチルイミノ（ＭＭＩ）、メチレンカルボニルアミノ、アミド、カルバミン酸塩、およびエチレンオキシドリンカーが挙げられる。

【０９９７】

当業者であれば、特定の例において、非架橋酸素を置換することによって、隣接する２’－ＯＨによる糖間結合の切断が強化され、よって多くの例において、非架橋酸素の修飾は、２’－ＯＨの修飾、例えば、隣接する糖間結合の切断に関与しない修飾、例えば、アラビノース糖、２’－Ｏ－アルキル、２’－Ｆ、ＬＮＡ、およびＥＮＡを必要とし得ることを認識している。

【０９９８】

好ましい非ホスホジエステル糖間結合としては、ホスホロチオエート、少なくとも１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれ以上のＳｐ異性体のエナンチオマー過剰率を有するホスホロチオエート、少なくとも１％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれ以上のＲｐ異性体のエナンチオマー過剰率を有するホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリオエステル、アルキルホスホネート（例えば、メチル－ホスホネート）、セレノホスフェート、ホスホロアミデート（例えば、Ｎ－アルキルホスホロアミデート）、およびボラノホスホネートが挙げられる。

【０９９９】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、修飾または非ホスホジエステル結合を少なくとも一つ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５個、またはそれ以上、および最大で全て）含む。一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、ホスホロチオエート結合を少なくとも一つ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５個、またはそれ以上、および最大で全て）含む。

【１０００】

エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤を構築することもでき、この場合においてリン酸結合および糖は、ヌクレアーゼ耐性のヌクレオシドまたはヌクレオチド　代替物によって置換される。理論に拘束されることは望まないが、反復的に荷電された骨格が存在しない場合、ポリアニオン（例えば、ヌクレアーゼ）を認識するタンパク質への結合が減少すると考えられている。一部の実施形態では、塩基が、中性の代替骨格によって繋がれる改変を導入することが望ましい場合があり得る。例としては、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、アミノエチルグリシルＰＮＡ（ａｅｇ　ＰＮＡ）、およびバックノン伸長ピロリジンＰＮＡ（ｂｅｐ　ＰＮＡ）ヌクレオシド代替物が挙げられる。好ましい代替物は、ＰＮＡ代替物である。

【１００１】

本明細書に記載されるエフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、一つ以上の不斉中心を含有してもよく、したがって、例えば糖アノマーなどの（Ｒ）もしくは（Ｓ）、または例えばアミノ酸などの（Ｄ）もしくは（Ｌ）などの絶対立体化学の観点から定義され得る、エナンチオマー、ジアステレオマー、および他の立体異性体の立体配置を生じさせることができる。本明細書に提供されるエフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤には、そのような可能性のある異性体のすべて、ならびにそれらのラセミ形態、および光学的に純粋な形態が含まれる。

【１００２】

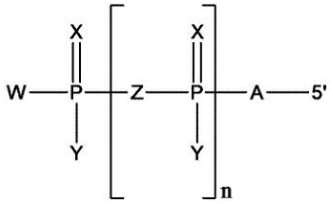
<u>核酸修飾（末端修飾）</u>

エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）もしくはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤のセンスヌクレオチド配列またはアンチセンスヌクレオチド配列の末端を修飾してもよい。そのような修飾は、ヌクレオチド配列の一方の末端または両端であってもよい。例えば、３’末端および／または５’末端を、例えば標識部分、例えばフルオロフォア（例えば、ピレン、ＴＡＭＲＡ、フルオレセイン、Ｃｙ３またはＣｙ５染料）または保護基（例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素またはエステルに基づく）などの他の機能性分子実体にコンジュゲートしてもよい。機能性分子実体は、リン酸基および／またはリンカーを介して、糖に結合されてもよい。リンカーの末端原子は、リン酸基、または糖のＣ－３’もしくはＣ－５’Ｏ、Ｎ、ＳまたはＣ基の結合原子に接続してもよく、またはそれらを置換してもよい。あるいはリンカーは、ヌクレオチド代替物（例えば、ＰＮＡ）の末端原子に接続してもよく、またはそれらを置換してもよい。

【１００３】

活性の調節に有用な末端修飾としては、リン酸塩またはリン酸アナログを用いた配列の５’末端の修飾が挙げられる。特定の実施形態では、配列の５’末端は、リン酸化され、またはホスホリルアナログを含む。５’－リン酸修飾の例としては、ＲＩＳＣ介在性遺伝子サイレンシングとの適合性がある修飾が挙げられる。５’末端の修飾は、対象の免疫系を刺激する、または阻害するのに有用であってもよい。一部の実施形態では、オリゴマー化合物の５’－末端は、修飾

【化１４２】



を含み、式中、Ｗ、Ｘ、およびＹはそれぞれ独立して、Ｏ、ＯＲ（Ｒは水素、アルキル、アリールである）、Ｓ、Ｓｅ、BR_3（Ｒは水素、アルキル、アリールである）、BH_3^-、Ｃ（すなわち、アルキル基、アリール基など）、Ｈ、NR_2（Ｒは水素、アルキル、アリールである）、またはＯＲ（Ｒは水素、アルキル、またはアリールである）からなる群から選択され、ＡおよびＺは各存在についてそれぞれ独立して、存在しない、Ｏ、Ｓ、CH_2、ＮＲ（Ｒは水素、アルキル、アリールである）、または任意選択的に置換されたアルキレンであり、この場合においてアルキレンの骨格は、Ｏ、Ｓ、ＳＳ、およびＮＲ（Ｒは水素、アルキル、アリールである）のうちの一つ以上を内部に、および／または末端に含んでもよく、ｎは、０～２である。一部の実施形態では、ｎは、１または２である。Ａは、糖の５’炭素に結合された酸素を置き換えると理解される。ｎが０である場合、ＷおよびＹは、それらが結合されるＰと一緒に、任意選択的に置換される５～８員の複素環を形成することができ、この場合においてＷおよびＹは各々独立して、Ｏ、Ｓ、ＮＲ’、またはアルキレンである。複素環は、アリールまたはヘテロアリールで置換されることが好ましい。一部の実施形態では、５’末端ヌクレオチドのＣ５’上の一方または両方の水素は、ハロゲン、例えば、Ｆで置換される。

【１００４】

５’－修飾の例としては限定されないが、５’－一リン酸（$(HO)_2$（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’）、５’－二リン酸（$(HO)_2$（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）、５’－三リン酸（$(HO)_2$（Ｏ）Ｐ－Ｏ－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）、５’－モノチオリン酸（ホスホロチオエート、（ＨＯ）２（Ｓ）Ｐ－Ｏ－５’）、５’－モノジチオリン酸（ホスホロジチオエート、（ＨＯ）（ＨＳ）（Ｓ）Ｐ－Ｏ－５’）、５’－ホスホロチオレート（（ＨＯ）２（Ｏ）Ｐ－Ｓ－５’）、５’－アルファ－チオトリホスフェート、５’－ベーター－チオトリホスフェート、５’－ガンマ－チオトリホスフェート、５’－ホスホロアミデート（$(HO)_2$（Ｏ）Ｐ－ＮＨ－５’、（ＨＯ）（NH_2）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’）が挙げられる。他の５’－修飾としては、５’－アルキルホスホネート

（Ｒ（ＯＨ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’、Ｒ＝アルキル、例えば、メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど）、５’－アルキルエーテルホスホネート（Ｒ（ＯＨ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’、Ｒ＝アルキルエーテル、例えば、メトキシメチル（CH_2OMe）、エトキシメチルなど）が挙げられる。他の５’－修飾の例としては、Ｚが少なくとも一回、任意に置換されるアルキルである場合、例えば、（（ＨＯ）$_2$（Ｘ）Ｐ－Ｏ［－（CH_2）$_a$－Ｏ－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、（（ＨＯ）$_2$（Ｘ）Ｐ－Ｏ［－（CH_2）$_a$－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、（（ＨＯ）２（Ｘ）Ｐ－［－（CH_2）$_a$－Ｏ－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’；ジアルキル末端リン酸塩およびリン酸塩模倣体；ＨＯ［－（CH_2）$_a$－Ｏ－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、H_2N［－（CH_2）$_a$－Ｏ－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－　５’、Ｈ［－（CH_2）$_a$－Ｏ－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、Me_2N［－（CH_2）$_a$－Ｏ－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、ＨＯ［－（CH_2）$_a$－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、H_2N［－（CH_2）$_a$－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、Ｈ［－（CH_2）$_a$－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’、Me_2N［－（CH_2）$_a$－Ｐ（Ｘ）（ＯＨ）－Ｏ］$_b$－５’が挙げられ、式中、ａおよびｂはそれぞれ独立して、１～１０である。他の実施形態としては、BH_3、BH_3^-、および／またはＳｅと、酸素および／または硫黄の置換が挙げられる。

【１００５】

末端修飾は、分布をモニタリングにも有用であり得、そのような場合、付加されるのに好ましい基としては、フルオロフォア、例えば、フルオレセインまたはＡｌｅｘａ染料、例えば、Ａｌｅｘａ　４８８が挙げられる。末端修飾は、取り込みの強化にも有用であり得、この場合に有用な修飾としては、標的化リガンドが挙げられる。末端修飾は、オリゴヌクレオチドを別の部分に架橋するのにも有用であり得、この場合に有用な修飾としては、マイトマイシンＣ、ソラレン、およびそれらの誘導体が挙げられる。

【１００６】

<u>熱的不安定化修飾</u>

例えば、エフェクター分子（例えば、ｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などの本発明の化合物は、アンチセンス鎖のシード領域（すなわち、アンチセンス鎖の５’末端の２～８位）に対向する部位でセンス鎖中に熱的不安定化修飾を導入して、ｉＲＮＡ二本鎖の解離または溶融の傾向を高める（二本鎖結合の自由エネルギーを減少させる）ことによって、ＲＮＡ干渉に対して最適化することができる。この修飾は、アンチセンス鎖のシード領域内において、二本鎖が解離または融解する傾向を高めることができる。

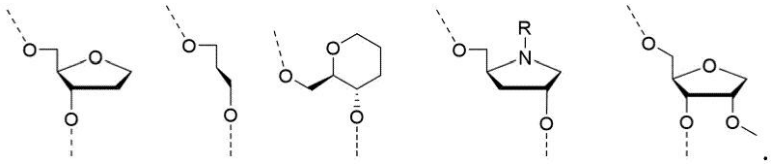
【１００７】

熱的不安定化修飾としては、脱塩基性修飾；対向する鎖の対向するヌクレオチドとのミスマッチ；および例えば、２’－デオキシ修飾または非環式ヌクレオチド、例えば、アンロックド核酸（ＵＮＡ）またはグリセロール核酸（ＧＮＡ）などの糖修飾を挙げることができる。

【１００８】

例示的な脱塩基性修飾は、以下である：

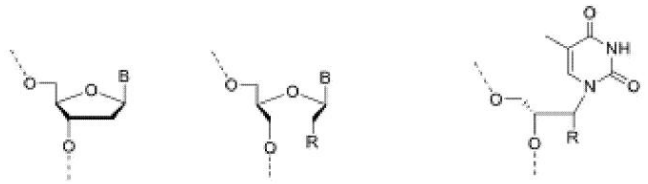
【化１４３】



【１００９】

例示的な糖修飾は、以下である：

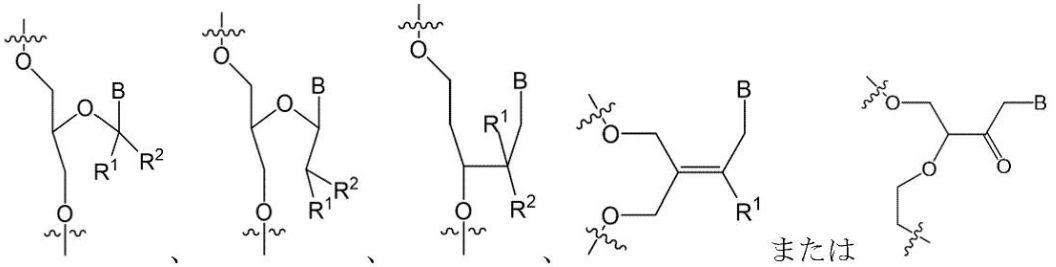
【化１４４】



【１０１０】

「非環式ヌクレオチド」という用語は、非環式のリボース糖を有する任意のヌクレオチドを指し、例えばリボース炭素環の結合（例えば、Ｃ１’－Ｃ２’、Ｃ２’－Ｃ３’、Ｃ３’－Ｃ４’、Ｃ４’－Ｏ４’、またはＣ１’－Ｏ４’）のいずれかが、存在しない、および／またはリボース炭素もしくは酸素のうち少なくとも一方（例えば、Ｃ１’、Ｃ２’、Ｃ３’、Ｃ４’、またはＯ４’）が独立に、または組み合わせて、ヌクレオチドに存在しないものである。一部の実施形態では、非環式ヌクレオチドは、

【化１４５】

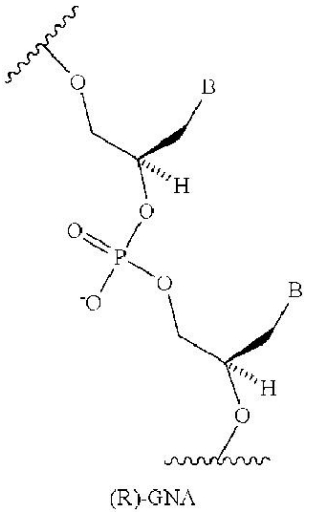


であり、式中、Ｂは、修飾または未修飾の核酸塩基であり、R^1およびR^2は独立して、Ｈ、ハロゲン、OR_3またはアルキルであり；R_3は、Ｈ、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖である）。「ＵＮＡ」という用語は、糖の結合のいずれかが除去されて、アンロック「糖」残基を形成するものである、非環式のアンロック核酸を指す。一実施例では、ＵＮＡはまた、Ｃ１’－Ｃ４’間の結合が除去されている単量体を包含する（すなわち、Ｃ１’炭素とＣ４’炭素との間の炭素－酸素－炭素の共有結合）。別の実施例では、糖のＣ２’－Ｃ３’結合（すなわち、Ｃ２’炭素とＣ３’炭素との間の炭素－炭素の共有結合）が除去される（Ｍｉｋｈａｉｌｏｖ　ｅｔ．ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，２６（１７）：２０５９（１９８５）、およびＦｌｕｉｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｓｙｓｔ．，１０：１０３９（２００９）を参照されたく、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。非環式誘導体は、ワトソン－クリック対合に影響を及ぼすことなく、より大きな骨格柔軟性を与える。非環式ヌクレオチドは、２’－５’または３’－５’連結を介して連結され得る。

【１０１１】

「ＧＮＡ」という用語は、グリコール核酸を指し、これはＤＮＡまたはＲＮＡと類似のポリマーであるが、ホスホジエステル結合によって連結された反復するグリセロール単位から構成される点でその「骨格」の組成が異なる。

【化１４６】



(R)-GNA

【１０１２】

熱的不安定化修飾は、熱的不安定化ヌクレオチドと、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）二本鎖内の対向する鎖中の対向するヌクレオチドとの間のミスマッチ（すなわち、非相補的な塩基対）であってもよい。例示的なミスマッチ塩基対としては、Ｇ：Ｇ、Ｇ：Ａ、Ｇ：Ｕ、Ｇ：Ｔ、Ａ：Ａ、Ａ：Ｃ、Ｃ：Ｃ、Ｃ：Ｕ、Ｃ：Ｔ、Ｕ：Ｕ、Ｔ：Ｔ、Ｕ：Ｔ、またはそれらの組み合わせが挙げられる。当技術分野で公知の他のミスマッチ塩基対合も本発明に従う。ミスマッチは、天然に存在するヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドのいずれかであるヌクレオチドの間に生じ得、すなわち、ミスマッチ塩基対合は、ヌクレオチドのリボース糖上の修飾とは独立してそれぞれのヌクレオチドに由来する核酸塩基間で生じ得る。特定の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、ミスマッチ対形成中に、２’－デオキシ核酸塩基である核酸塩基を少なくとも一つ含有し、例えば、２’－デオキシ核酸塩基は、センス鎖内にある。

【１０１３】

脱塩基ヌクレオチド、非環式ヌクレオチド修飾（ＵＮＡおよびＧＮＡを含む）およびミスマッチ修飾のより多くの例は、国際公開第２０１１／１３３８７６号に詳細に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

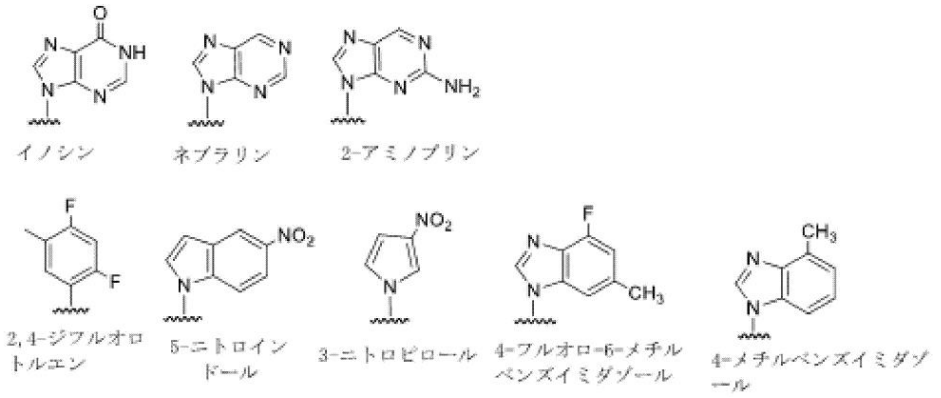
【１０１４】

熱的不安定化修飾はまた、対向し合う塩基と水素結合を形成する能力が低減または消失したユニバーサル塩基およびリン酸修飾を含み得る。

【１０１５】

対向する鎖の塩基と水素結合を形成する能力を損なう、または完全に失わせる核酸塩基修飾は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第２０１０／００１１８９５号に記述されるように、ｄｓＲＮＡ二本鎖の中心領域の不安定化について評価されている。例示的な核酸塩基の修飾としては、以下がある：

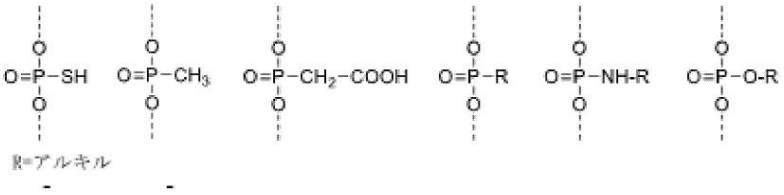
【化１４７】



【１０１６】

天然のホスホジエステル連結と比較して、ｄｓＲＮＡ二重鎖の熱的安定性を低下させることがわかっている例示的なリン酸修飾としては以下のものがある：

【化１４８】



【１０１７】

一部の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、２’－５’結合（２’－Ｈ、２’－ＯＨ、および２’－ＯＭｅ、ならびにＰ＝ＯまたはＰ＝Ｓを有する）を含んでもよい。例えば、２’－５’結合修飾を使用して、ヌクレアーゼ耐性を促進する、もしくはアンチセンス鎖へのセンスアの結合を阻害することが可能であり、またはセンス鎖の５’末端で使用して、ＲＩＳＣによるセンス鎖活性化を回避することが可能である。

【１０１８】

別の実施形態では、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤は、Ｌ糖（例えば、２’－Ｈ、２’－ＯＨおよび２’－ＯＭｅを有するＬ－リボース、Ｌ－アラビノース）を含んでもよい。例えば、これらＬ糖修飾を使用して、ヌクレアーゼ耐性を促進する、もしくはアンチセンス鎖へのセンスアの結合を阻害することが可能であり、またはセンス鎖の５’末端で使用して、ＲＩＳＣによるセンス鎖活性化を回避することが可能である。

【１０１９】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるエフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤の少なくとも一方の鎖は、５’リン酸化され、または５’プライム末端でホスホリルアナログを含む。５’－リン酸修飾は、ＲＩＳＣ介在性遺伝子サイレンシングと適合性がある修飾を含む。好適な修飾としては、以下が挙げられる：５’－モノホスフェート（$(HO)_2$（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’）；５’－ジホスフェート（$(HO)_2$（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）；５’－トリホスフェート（$(HO)_2$（Ｏ）Ｐ－Ｏ－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）；５’－グアノシンキャップ（７－メチル化または非メチル化）（７ｍ－Ｇ－Ｏ－５’－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）；５’－アデノシンキャップ（Ａｐｐｐ）、および任意の修飾または未修飾ヌクレオチドキャップ構造（Ｎ－Ｏ－５’－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－（ＨＯ）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－Ｐ（ＨＯ）（Ｏ）－Ｏ－５’）；５’－モノチオホスフェート（ホスホロチオエート；$(HO)_2$（Ｓ）Ｐ－Ｏ－５’）；５’－モノジチオホスフェート（ホスホロジチオエート；（ＨＯ）（ＨＳ）

（Ｓ）Ｐ－Ｏ－５’）、５’－ホスホロチオレート（（ＨＯ)2（Ｏ）Ｐ－Ｓ－５’）；酸素／硫黄置換モノホスフェート、ジホスフェート、およびトリホスフェートの任意の追加の組み合わせ（例えば、５’－アルファ－チオトリホスフェート、５’－ガンマ－チオトリホスフェートなど）、５’－ホスホルアミデート（（ＨＯ)2（Ｏ）Ｐ－ＮＨ－５’、（ＨＯ）（ＮＨ２）（Ｏ）Ｐ－Ｏ－５’）、５’－アルキルホスホネート（Ｒ＝アルキル＝メチル、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、ＲＰ（ＯＨ）（Ｏ）－Ｏ－５’－、５’－アルケニルホスホネート（すなわち、ビニル、置換ビニル）、（ＯＨ)2（Ｏ）Ｐ－５’－ＣＨ2－）、５’－アルキルエーテルホスホネート（Ｒ＝アルキルエーテル＝メトキシメチル（ＭｅＯＣＨ２－）、エトキシメチルなど、例えば、ＲＰ（ＯＨ）（Ｏ）－Ｏ－５’－）。

【１０２０】

標的遺伝子

限定されないが、エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の標的遺伝子としては、限定されないが、望ましくない細胞増殖を促進する遺伝子、成長因子遺伝子、成長因子受容体遺伝子、キナーゼを発現する遺伝子、アダプタータンパク質遺伝子、Ｇタンパク質スーパーファミリー分子をコードする遺伝子、転写因子をコードする遺伝子、血管新生を介在する遺伝子、ウイルス遺伝子、ウイルス複製に必要な遺伝子、ウイルスの機能を介在する細胞遺伝子、細菌病原体の遺伝子、アメーバ性病原体の遺伝子、寄生性病原体の遺伝子、真菌病原体の遺伝子、望ましくない免疫応答を介在する遺伝子、疼痛処理を介在する遺伝子、神経性疾患を介在する遺伝子、ヘテロ接合性の消失を特徴とする細胞に存在するアレン（ａｌｌｅｎｅ）遺伝子、または多型遺伝子の一方のアレジ（ａｌｌｅｇｅ）遺伝子が挙げられる。

【１０２１】

エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の具体的な標的遺伝子の例としては、限定されないが、ＰＣＳＫ－９、ＡｐｏＣ３、ＡＴ３、ＡＧＴ、ＡＬＡＳ１、ＴＭＰＲ、ＨＡＯ１、ＡＧＴ、Ｃ５、ＣＣＲ－５、ＰＤＧＦベータ遺伝子；Ｅｒｂ－Ｂ遺伝子、Ｓｒｃ遺伝子；ＣＲＫ遺伝子；ＧＲＢ２遺伝子；ＲＡＳ遺伝子；ＭＥＫＫ遺伝子；ＪＮＫ遺伝子；ＲＡＦ遺伝子；Ｅｒｋ１／２遺伝子；ＰＣＮＡ（ｐ２１）遺伝子；ＭＹＢ遺伝子；ｃ－ＭＹＣ遺伝子；ＪＵＮ遺伝子；ＦＯＳ遺伝子；ＢＣＬ－２遺伝子；Ｃｙｃｌｉｎ　Ｄ遺伝子；ＶＥＧＦ遺伝子；ＥＧＦＲ遺伝子；Ｃｙｃｌｉｎ　Ａ遺伝子；Ｃｙｃｌｉｎ　Ｅ遺伝子；ＷＮＴ－１遺伝子；ベーター－カテニン遺伝子；ｃ－ＭＥＴ遺伝子；ＰＫＣ遺伝子；ＮＦＫＢ遺伝子；ＳＴＡＴ３遺伝子；サバイビン遺伝子；Ｈｅｒ２／Ｎｅｕ遺伝子；トポイソメラーゼＩ遺伝子；トポイソメラーゼＩＩアルファ遺伝子；ｐ７３遺伝子；ｐ２１（ＷＡＦ１／ＣＩＰ１）遺伝子、ｐ２７（ＫＩＰ１）遺伝子；ＰＰＭ１Ｄ遺伝子；カベオリンＩ遺伝子；ＭＩＢ　Ｉ遺伝子；ＭＴＡＩ遺伝子；Ｍ６８遺伝子；腫瘍抑制遺伝子ｓ；ｐ５３遺伝子；ＤＮ－ｐ６３遺伝子；ｐＲｂ腫瘍抑制遺伝子；ＡＰＣ１腫瘍抑制遺伝子；ＢＲＣＡ１腫瘍抑制遺伝子；ＰＴＥＮ腫瘍抑制遺伝子；ＭＬＬ融合遺伝子、例えば、ＭＬＬ－ＡＦ９、ＢＣＲ／ＡＢＬ融合遺伝子；ＴＥＬ／ＡＭＬ１融合遺伝子；ＥＷＳ／ＦＬＩ１融合遺伝子；ＴＬＳ／ＦＵＳ１融合遺伝子；ＰＡＸ３／ＦＫＨＲ融合遺伝子；ＡＭＬ１／ＥＴＯ融合遺伝子；アルファｖ－インテグリン遺伝子；Ｆｌｔ－１受容体遺伝子；チューブリン遺伝子；ヒトパピローマウイルス遺伝子、ヒトパピローマウイルスの複製に必要な遺伝子、ヒト免疫不全ウイルス遺伝子、ヒト免疫不全ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ａ型肝炎ウイルス遺伝子、Ａ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ｂ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｂ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ｃ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｃ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ｄ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｄ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ｅ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｅ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ｆ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｆ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ｇ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｇ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、Ｈ型肝炎ウイルス遺伝子、Ｈ型肝炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、呼吸器合胞体ウイルス遺伝子、呼吸器合胞体ウイルスの複製に必要な遺伝子、単純ヘルペスウイルス遺伝子、単純ヘルペス

ウイルスの複製に必要な遺伝子、ヘルペスサイトメガロウイルス遺伝子、ヘルペスサイトメガロウイルスの複製に必要な遺伝子、ヘルペスエプスタイン・バールウイルス遺伝子、ヘルペスエプスタイン・バールウイルスの複製に必要な遺伝子、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス遺伝子、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの複製に必要な遺伝子、ＪＣウイルス遺伝子、ＪＣウイルスの複製に必要なヒト遺伝子、ミクソウイルス遺伝子、ミクソウイルス遺伝子の複製に必要な遺伝子、ライノウイルス遺伝子、ライノウイルス複製に必要な遺伝子、コロナウイルス遺伝子、コロナウイルス複製に必要な遺伝子、ウェストナイルウイルス遺伝子、ウェストナイルウイルスの複製に必要な遺伝子、セントルイス脳炎遺伝子、セントルイス脳炎の複製に必要な遺伝子、ダニ媒介性脳炎ウイルス遺伝子、ダニ媒介性脳炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、マレーバレー脳炎ウイルス遺伝子、マレーバレー脳炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、デングウイルス遺伝子、デングウイルス遺伝子の複製に必要な遺伝子、シミアンウイルス４０遺伝子、シミアンウイルス４０の複製に必要な遺伝子、ヒトＴ細胞リンパ球向性ウイルス遺伝子、ヒトＴ細胞リンパ球向性ウイルスの複製に必要な遺伝子、モロニー－マウス白血病ウイルス遺伝子、モロニー－マウス白血病ウイルスの複製に必要な遺伝子、脳心筋炎ウイルス遺伝子、脳心筋炎ウイルスの複製に必要な遺伝子、麻疹ウイルス遺伝子、麻疹ウイルスの複製に必要な遺伝子、水痘帯状疱疹ウイルス遺伝子、水痘帯状疱疹ウイルスの複製に必要な遺伝子、アデノウイルス遺伝子、アデノウイルスの複製に必要な遺伝子、黄熱ウイルス遺伝子、黄熱ウイルスの複製に必要な遺伝子、ポリオウイルス遺伝子、ポリオウイルスの複製に必要な遺伝子、ポックスウイルス遺伝子、ポックスウイルスの複製に必要な遺伝子、プラスモジウム遺伝子、プラスモジウム遺伝子の複製に必要な遺伝子、マイコバクテリウム・ウルセランス遺伝子、マイコバクテリウム・ウルセランスの複製に必要な遺伝子、結核菌遺伝子、結核菌の複製に必要な遺伝子、らい菌遺伝子、らい菌の複製に必要な遺伝子、黄色ブドウ球菌遺伝子、黄色ブドウ球菌の複製に必要な遺伝子、肺炎球菌遺伝子、肺炎球菌の複製に必要な遺伝子、化膿性連鎖球菌遺伝子、化膿性連鎖球菌の複製に必要な遺伝子、肺炎クラミジア遺伝子、肺炎クラミジアの複製に必要な遺伝子、肺炎マイコプラズマ遺伝子、肺炎マイコプラズマの複製に必要な遺伝子、インテグリン遺伝子、セレクチン遺伝子、補体系遺伝子、ケモカイン遺伝子、ケモカイン受容体遺伝子、ＧＣＳＦ遺伝子、Ｇｒｏ１遺伝子、Ｇｒｏ２遺伝子、Ｇｒｏ３遺伝子、ＰＦ４遺伝子、ＭＩＧ遺伝子、Ｐｒｏ－Ｐｌａｔｅｌｅｔ　Ｂａｓｉｃ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　遺伝子、ＭＩＰ－１Ｉ遺伝子、ＭＩＰ－１Ｊ遺伝子、ＲＡＮＴＥＳ遺伝子、ＭＣＰ－１遺伝子、ＭＣＰ－２遺伝子、ＭＣＰ－３遺伝子、ＣＭＢＫＲ１遺伝子、ＣＭＢＫＲ２遺伝子、ＣＭＢＫＲ３遺伝子、ＣＭＢＫＲ５ｖ、ＡＩＦ－１遺伝子、Ｉ－３０９遺伝子、イオンチャンネルの構成要素に対する遺伝子、神経伝達物質受容体に対する遺伝子、神経伝達物質リガンドに対する遺伝子、アミロイドファミリー遺伝子、プレセニリン遺伝子、ＨＤ遺伝子、ＤＲＰＬＡ遺伝子、ＳＣＡ１遺伝子、ＳＣＡ２遺伝子、ＭＪＤ１遺伝子、ＣＡＣＮＬ１Ａ４遺伝子、ＳＣＡ７遺伝子、ＳＣＡ８遺伝子、ヘテロ接合性消失（ＬＯＨ）細胞において存在するアレル遺伝子、多型遺伝子の一方のアレル遺伝子、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【１０２２】

ヘテロ接合性の消失（ＬＯＨ）は、ＬＯＨの領域において、例えば遺伝子などの配列の半接合を生じさせ得る。半接合によって、正常細胞と疾患状態の細胞、例えばがん細胞との間に著しい遺伝的な差異が生じ得、これが正常細胞と疾患状態の細胞、例えばがん細胞との間に有用な差異となる。二倍体細胞では遺伝子または他の配列はヘテロ接合性であるが、ＬＯＨがある細胞では半接合性となるため、この差異が生じ得る。ＬＯＨの領域は多くの場合、遺伝子を含んでいる。例えば腫瘍抑制性遺伝子や、一部の例では増殖などの正常な機能に必須である遺伝子などの他の遺伝子の配列であり、当該遺伝子の消失は望ましくない増殖を促進する。本発明の方法は、部分的には、本発明の組成物を用いて、必須遺伝子の一方のアレルを特異的に調節することに拠っている。

【１０２３】

特定の実施形態では、本発明は、ｍｉｃｒｏ－ＲＮＡを調節する複数標的分子（例えば

、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）を提供する。

【１０２４】

一部の実施形態では、本発明は、肝外送達のための、およびＣＮＳ遺伝子や眼の遺伝子を標的とするための複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）を提供する。

【１０２５】

一部の実施形態では、本明細書において、早期発症型家族性アルツハイマー病に対するＡＰＰ、脊髄小脳変性症２型およびＡＬＳに対するＡＴＸＮ２、ならびに筋萎縮性側索硬化症および前頭側頭型認知症に対するＣ９ｏｒｆ７２を標的とする、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）が提供される。

【１０２６】

一部の実施形態では、本明細書において、ＡＬＳに対するＴＡＲＤＢＰ、前頭側頭型認知症のＭＡＰＴ（Ｔａｕ）、およびハンチントン病のＨＴＴを標的とする複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）が提供される。

【１０２７】

一部の実施形態では、本明細書において、パーキンソン病に対するＳＮＣＡ、ＡＬＳに対するＦＵＳ、脊髄小脳変性症３型に対するＡＴＸＮ３、ＳＣＡ１に対するＡＴＸＮ１、ＳＣＡ７およびＳＣＡ８に対する遺伝子、ＤＲＰＬＡに対するＡＴＮ１、ＸＬＭＲに対するＭｅＣＰ２、プリオン病に対するＰＲＮＰ、潜性ＣＮＳ障害：ラフォラ病、ＤＭ１（ＣＮＳおよび骨格筋）に対するＤＭＰＫ、ならびにｈＡＴＴＲ（ＣＮＳ、眼および全身）に対するＴＴＲを標的とする、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）が提供される。

【１０２８】

脊髄小脳変性症は、遺伝性脳機能障害である。例えば、ＳＣＡ１－８など、脊髄小脳変性症の顕性遺伝型は、疾患修飾療法がない悲惨な障害である。例示的な標的としては、ＳＣＡ２、ＳＣＡ３、およびＳＣＡ１が挙げられる。

【１０２９】

ＣＮＳ遺伝子および眼遺伝子の追加的な例は、ＷＯ２０１９／２１７４５９に見出すことができ、当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【１０３０】

候補ｉＲＮＡの評価

当該剤または修飾分子、および対照分子を適切な条件に曝露して、選択した性能の存在について評価することにより、例えば修飾ＲＮＡなどの候補ｉＲＮＡ剤を、選択した性能に関して評価することができる。例えば、分解因子に対する耐性は、以下のように評価することができる：候補修飾ＲＮＡ（および対照分子、通常は非修飾型）を、分解条件に曝露してもよく、例えば、ヌクレアーゼなどの分解剤を含む環境に曝露してもよい。例えば、生体サンプルを使用してもよく、例えば、血液や、無細胞ホモジネートまたは破砕細胞などの細胞画分を、治療用途において遭遇する可能性のある環境に類似した生体サンプルを使用してもよい。次いで、候補物質および対照物質を、多くの方法のいずれかにより、分解耐性について評価してもよい。例えば、候補物質および対照物質は、放射性標識もしくは酵素標識、または例えばＣｙ３やＣｙ５などの蛍光標識を用いて、曝露前に標識されてもよい。対照ＲＮＡおよび修飾ＲＮＡは、分解剤、および任意選択的に対照剤、例えば熱不活化などで不活化された分解剤とともにインキュベートされてもよい。次いで、例えば修飾分子および対照分子のサイズなどの物理的パラメータが決定される。当該分子が元の長さを維持しているかを評価するために、または機能性を評価するために、当該分子をポリアクリルアミドゲル電気泳動やサイジングカラムなどの物理的な方法により判定してもよい。あるいは、ノーザンブロット分析を使用して、標識されていない修飾分子の長さ

を分析してもよい。

【１０３１】

機能性分析を使用して、候補剤を評価してもよい。機能性分析は、当該分子が遺伝子発現をサイレンシングする能力が、修飾によって変化したかを判定するために、最初に行われてもよく、または初期の非機能性分析（例えば、分解耐性に関する分析）の後で行われてもよい。例えば、マウスまたはヒトの細胞などの哺乳動物細胞などの細胞に、例えばＧＦＰなどの蛍光タンパク質を発現するプラスミドと、当該蛍光タンパク質をコードする転写因子に対して相同な候補ＲＮＡ剤を発現するプラスミドを同時トランスフェクトしてもよい（例えば、ＷＯ００／４４９１４を参照のこと）。例えば、ＧＦＰ　ｍＲＮＡに相同な修飾ｄｓｉＲＮＡは、トランスフェクションが候補ｄｓｉＲＮＡを含まない対照細胞、例えば、剤が付加されていない対照、および／または非修飾ＲＮＡが付加されている対照と比較した、細胞蛍光における減少をモニタリングすることによって、ＧＦＰ発現を阻害する能力について分析されてもよい。遺伝子発現に対する候補剤の有効性は、修飾ｄｓｉＲＮＡ化合物と非修飾ｄｓｉＲＮＡ化合物の存在下での細胞蛍光を比較することによって評価することができる。

【１０３２】

別の機能性分析では、内因性マウス遺伝子、例えば、ｃ－ｍｏｓなどの母系発現遺伝子に対して相同な候補ｄｓｉＲＮＡ化合物を、未成熟マウス卵母細胞に注入して、当該剤がインビボで遺伝子発現を阻害する能力を分析してもよい（例えば、ＷＯ０１／３６６４６を参照）。卵母細胞の表現型、例えば、中期ＩＩでの停止を維持する能力を、当該剤が発現を阻害している指標としてモニタリングしてもよい。例えば、ｄｓｉＲＮＡ化合物によりｃ－ｍｏｓ　ｍＲＮＡが切断されることによって、卵母細胞は中期停止を脱し、単為生殖性の発生を開始する（Ｃｏｌｌｅｄｇｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　３７０：６５－６８，１９９４；Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ，３７０：６８－７１，１９９４）。標的ＲＮＡレベルに対する修飾剤の効果は、陰性対照と比較して、標的ｍＲＮＡレベルの減少について分析するためのノーザンブロットによって、または標的タンパク質レベルの減少について分析するためのウェスタンブロットによって、検証することができる。対照は、剤が添加されていない細胞、および／または非修飾ＲＮＡが添加された細胞を含み得る。

【１０３３】

生理学的効果

本明細書に記載の複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）は、治療毒性の決定が、ヒト配列および非ヒト動物配列の両方とのｓｉＲＮＡの相補性によって容易となるように設計することができる。これらの方法により、ｓｉＲＮＡは、ヒト由来の核酸配列と、例えば、齧歯類、反芻動物または霊長類などの非ヒト動物の少なくとも一種に由来する核酸配列に対し完全に相補的である配列からなり得る。例えば、非ヒト哺乳動物は、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、サル、ボノボ、チンパンジー、アカゲザルまたはカニクイザルであってもよい。ｓｉＲＮＡ化合物の配列は、非ヒト哺乳動物およびヒトの例えばがん遺伝子や腫瘍抑制遺伝子などの相同遺伝子内の配列に対し、相補的であってもよい。非ヒト哺乳動物におけるｓｉＲＮＡ化合物の毒性を決定することによって、ヒトにおける当該ｓｉＲＮＡ化合物の毒性を推定することができる。より激しい毒性の試験については、ｓｉＲＮＡは、ヒトおよび二種以上、例えば、二種、または三種、またはそれ以上の非ヒト動物に対して相補的であってもよい。

【１０３４】

本明細書に記載される方法を使用して、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡもしくはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）のヒトに対する任意の生理学的効果、例えば、毒性作用などのなんらかの望ましくない効果、またはポジティブな効果、または望ましい効果を相関させることができる。

【１０３５】

ｓｉＲＮＡの細胞取り込みの増加

本明細書において、エフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の細胞取り込みを増加させる、および／または細胞内標的化を増加させる、共有結合コンジュゲートを含有する様々な複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）の組成物が記載される。

【１０３６】

さらに、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）、および当該複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）の細胞内への取り込みに効果を発揮する薬剤を投与することを含む、本発明の方法が提供される。薬剤は、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）が投与される前、後、または同時に投与されてもよい。薬剤は、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）に共有結合されてもよく、または非共有結合されてもよい。薬剤は、例えば、リポ多糖、ｐ３８　ＭＡＰキナーゼの活性化因子、またはＮＦ－κＢの活性化因子であってもよい。薬剤は、細胞に対し、一過性の効果であってもよい。薬剤は、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）の細胞内への取り込みを、例えば、細胞の細胞骨格を破壊することによって増加させることができ、例えば、細胞の微小管、マイクロフィラメント、および／または中間径フィラメントを破壊することによって、増加させることができる。薬剤は、例えば、タキソン（ｔａｘｏｎ）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャスプラキノリド、ラトルンクリンＡ、ファロイジン、スウィンホリドＡ（ｓｗｉｎｈｏｌｉｄｅ　Ａ）、インダノシン（ｉｎｄａｎｏｃｉｎｅ）、またはミオセルビン（ｍｙｏｓｅｒｖｉｎ）であってもよい。薬剤はまた、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）の所与の細胞または組織への取り込みを、例えば炎症反応を活性化することによって、増加させることができる。そのような効果を有するであろう薬剤の例としては、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦアルファ）、インターロイキン－１ベータ、ＣｐＧモチーフ、ガンマインターフェロン、またはより一般的には、ｔｏｌｌ様受容体を活性化する剤が挙げられる。

【１０３７】

エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）の作製

エフェクター分子（ｄｓＲＮＡ）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）は、例えば、様々な方法によって、バルクで作製されてもよい。例示的な方法には、有機合成およびＲＮＡ切断、例えば、インビトロでの切断が含まれる。

【１０３８】

有機合成。　ｓｉＲＮＡは、一本鎖ＲＮＡ分子、または二本鎖ＲＮＡ分子の各鎖を別々に合成することによって作製することができ、その後、構成要素の鎖をアニールすることができる。

【１０３９】

大型バイオリアクター、例えば、Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃ　ＡＢ（ウプサラ、スウェーデン）のＯｌｉｇｏＰｉｌｏｔ　ＩＩを使用して、所与のｓｉＲＮＡに対して特定のＲＮＡ鎖を大量に生産することができる。ＯｌｉｇｏＰｉｌｏｔＩＩリアクターは、わずか１．５モル過剰のホスホルアミダイトヌクレオチドを使用して、効率的にヌクレオチドを結合することができる。ＲＮＡ鎖を作るために、リボヌクレオチドアミダイトが使用される。単量体付加の標準サイクルを使用して、ｓｉＲＮＡの２１～２３ヌクレオチド鎖を合成することができる。典型的には、二つの相補鎖は別々に生成され、その後、例

えば、固体支持体からの解放および脱保護後にアニールされる。
【１０４０】
有機合成を使用して、個別のｓｉＲＮＡ種を生産することができる。特定の標的遺伝子に対する種の相補性を正確に規定することができる。例えば、種は、多型、例えば、一塩基多型を含む領域に対して相補的であり得る。さらに、多型の位置を正確に定義することができる。一部の実施形態では、多型は、内部領域、例えば、末端の一方または両方から少なくとも４、５、７、または９ヌクレオチド内に位置する。
【１０４１】
ｄｓｉＲＮＡ切断。 ｓｉＲＮＡは、より大きいｓｉＲＮＡを切断することによっても作製することができる。切断は、インビトロまたはインビボで介在されてもよい。例えば、インビトロで切断することによってｉＲＮＡを生成するために、以下の方法を使用することができる：
【１０４２】
インビトロ転写。ｄｓｉＲＮＡは、核酸（ＤＮＡ）セグメントを両方向に転写することによって作製される。例えば、ＨｉＳｃｒｉｂｅ（商標）ＲＮＡｉ転写キット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ社）は、Ｔ７プロモーターによって両側に隣接する位置でベクター内にクローニングされる核酸セグメントに対するｄｓｉＲＮＡを作製するためのベクターと方法を提供している。別個の鋳型が作製され、ｄｓｉＲＮＡの二つの相補鎖のＴ７転写が行われる。鋳型は、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼの添加によってインビトロで転写され、ｄｓｉＲＮＡが産生される。ＰＣＲおよび／または他のＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ３ポリメラーゼまたはＳＰ６ポリメラーゼ）を使用する類似の方法は、組み換え酵素の調製物を汚染する可能性があるドトキシンであってもよい。
【１０４３】
インビトロ切断。一つの実施形態では、この方法により作製されたＲＮＡは、注意深く精製されて取り出され、ｓｉＲＮＡは、例えばＤｉｃｅｒまたは同等のＲＮＡｓｅ ＩＩＩ系の活性を使用してインビトロでｓｉＲＮＡへと切断される。例えば、ｄｓｉＲＮＡは、ショウジョウバエからのインビトロ抽出において、または精製された成分、例えば、精製されたＲＮＡｓｅまたはＲＩＳＣ複合体（ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体）を使用して、インキュベートすることができる。例えば、Ｋｅｔｔｉｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ ２００１ Ｏｃｔ １５；１５（２０）：２６５４－９、およびＨａｍｍｏｎｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００１ Ａｕｇ １０；２９３（５５３２）：１１４６－５０．を参照のこと。
【１０４４】
ｄｓｉＲＮＡ切断は一般に、複数のｓｉＲＮＡ種を生成し、各々がソースｄｓｉＲＮＡ分子の特定の２１～２３ｎｔ断片である。例えば、ソースｄｓｉＲＮＡ分子の重複領域および隣接領域に対して相補的な配列を含むｓｉＲＮＡが存在する可能性がある。
【１０４５】
合成方法に関係なく、ｓｉＲＮＡ調製物は、剤形に適切な溶液（例えば、水溶液または有機溶液）中で調製することができる。例えば、ｓｉＲＮＡ調製物は、沈殿させ、純粋な再蒸留水中に再溶解させ、凍結乾燥させることができる。次いで、乾燥させたｓｉＲＮＡを、意図される製剤化プロセスに適切な溶液中に再懸濁させることができる。
【１０４６】
リガンドにコンジュゲートされた二本鎖ＲＮＡ剤の作製
一部の実施形態では、リガンドは、本明細書に記載される核酸塩基、糖部分、ヌクレオシド間結合、または担体を介して、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ剤などのエフェクター分子）にコンジュゲートされてもよい。
【１０４７】
リガンドをｓｉＲＮＡ剤にコンジュゲートするための方法（例えば、親油性部分または炭水化物系リガンドなど）の詳細は、ＷＯ２０１９／２１７４５９、ＷＯ２００９／０８２６０７、およびＷＯ２００９／０７３８０９に見出すことができる。それら文献はすべ

て、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【１０４８】
医薬組成物
一つの態様では、本発明は、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）、例えば、二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物、またはｓｓｉＲＮＡ化合物（例えば、処理されてｓｓｉＲＮＡ化合物へとなり得る大きなｓｉＲＮＡ化合物などの前駆体、または標的ＲＮＡに対して相補的な、例えば実質的に相補的な、および／または厳密に相補的なヌクレオチド配列を含む、ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物、例えば、二本鎖ｓｉＲＮＡ化合物、またはｓｓｉＲＮＡ化合物もしくはその前駆体をコードするＤＮＡ）を含む、医薬組成物を特徴とする。標的ＲＮＡは、内因性ヒト遺伝子の転写物であってもよい。一つの実施形態では、医薬組成物は、エマルション、マイクロエマルション、クリーム、ゼリー、またはリポソームであってもよい。
【１０４９】
一つの例では、医薬組成物は、局所送達剤と混合された複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む。局所送達剤は、複数の微小小胞であり得る。微小小胞は、リポソームであり得る。一部の実施形態では、リポソームは、カチオン性リポソームである。
【１０５０】
別の態様では、医薬組成物は、局所浸透促進剤と混合された複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む。一つの実施形態では、局所浸透促進剤は、脂肪酸である。脂肪酸は、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、１－モノカプリン酸グリセリル、１－ドデシルアザシクロヘプタン－２－オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはＣ$_{1-10}$アルキルエステル、モノグリセリド、ジグリセリド、またはその薬学的に許容可能な塩であり得る。
【１０５１】
別の実施形態では、局所浸透促進剤は、胆汁塩である。胆汁塩は、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸、グリコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、タウロ－２４，２５－ジヒドロ－フシジン酸ナトリウム、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、ポリオキシエチレン－９－ラウリルエーテル、またはその薬学的に許容される塩であり得る。
【１０５２】
別の実施形態では、局所浸透促進剤は、キレート剤である。キレート剤は、ＥＤＴＡ、クエン酸、サリチル酸塩、コラーゲンのＮ－アシル誘導体、ラウレス－９、ベーター－ジケトンのＮ－アミノアシル誘導体、またはそれらの混合物であり得る。
【１０５３】
別の実施形態では、浸透促進剤は界面活性剤、例えば、イオン性または非イオン性の界面活性剤である。界面活性剤は、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン－９－ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン－２０－セチルエーテル、ペルフルオロ化合物エマルション、またはそれらの混合物であり得る。
【１０５４】
別の実施形態では、浸透促進剤は、不飽和環状尿素、１－アルキル－アルコン、１－アルケニルアザシクロ－アラカノン、ステロイド性抗炎症剤、およびそれらの混合物からなる群から選択され得る。更に別の実施形態では、浸透促進剤は、グリコール、ピロール、アゾン、またはテルペンであってもよい。
【１０５５】

一つの態様では、本発明は、経口送達に適した形態の複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む医薬組成物を特徴とする。一つの実施形態では、経口送達を使用して、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）組成物を、例えば、小腸、結腸（例えば、結腸がんの治療のため）などの消化管の細胞または消化管の領域へと送達することができる。経口送達の剤形は、錠剤、カプセル、またはゲルカプセルであってもよい。一つの実施形態では、医薬組成物の複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）は、細胞接着タンパク質の発現を調節する、細胞増殖速度を調節する、または真核生物病原体もしくはレトロウイルスに対する生物活性を有する。別の実施形態では、医薬組成物は、哺乳動物の胃内において錠剤、カプセル、またはゲルカプセルが溶解するのを実質的に防止する腸溶性材料を含む。一部の実施形態では、腸溶性材料は、コーティングである。コーティングは、酢酸フタル酸塩、プロピレングリコール、モノオレイン酸ソルビタン、酢酸トリメリット酸セルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、または酢酸フタル酸セルロースであってもよい。

【１０５６】

別の実施形態では、医薬組成物の経口剤形は、浸透促進剤を含む。浸透促進剤は、胆汁塩または脂肪酸であってもよい。胆汁塩は、ウルソデオキシコール酸、ケノドキシコール酸、およびそれらの塩であってもよい。脂肪酸は、カプリン酸、ラウリン酸、およびそれらの塩であってもよい。

【１０５７】

別の実施形態では、医薬組成物の経口剤形は、賦形剤を含む。一つの例では、賦形剤は、ポリエチレングリコールである。別の例では、賦形剤は、プレシロール（ｐｒｅｃｉｒｏｌ）である。

【１０５８】

別の実施形態では、医薬組成物の経口剤形は、可塑剤を含む。可塑剤は、フタル酸ジエチル、セバシン酸トリアセチンジブチル、フタル酸ジブチル、またはクエン酸トリエチルであってもよい。

【１０５９】

一つの態様では、本発明は、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）、および送達ビヒクルを含む医薬組成物を特徴とする。

【１０６０】

一つの実施形態では、送達ビヒクルは、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を、局所投与経路によって細胞へと送達することができる。送達ビヒクルは、微小小胞であってもよい。一つの例では、微小小胞は、リポソームである。一部の実施形態では、リポソームは、カチオン性リポソームである。別の例では、微小小胞は、ミセルである。

【１０６１】

好適な局所製剤は、本開示で特徴とされる複数標的分子が、例えば脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤および界面活性剤などの局所送達剤との混合物となっているものを含む。適切な脂質およびリポソームとしては、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルＤＯＰＥエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリンＤＭＰＣ、ジステアロリホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロールＤＭＰＧ）およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルＤＯＴＡＰおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンＤＯＴＭＡ）が挙げられる。本開示において特徴とする複数標的分子は、リポソーム内に封入されてもよく、またはリポソーム、特にカチオン性リポソームと複合体を形成してもよい。あるいは、複数標的分子は、脂質、特にカチオン性脂質と複合体化されてもよい。

好適な脂肪酸およびエステルとしては、これに限定されるものではないが、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、１－モノカプリン酸グリセリル、１－ドデシルアザシクロヘプタン－２－オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはＣ１～２０アルキルエステル（例えば、イソプロピルミリステートＩＰＭ）、モノグリセリド、ジグリセリド、またはそれらの薬学的に許容可能な塩が挙げられる。局所製剤は、米国特許第６，７４７，０１４号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【１０６２】

マイクロエマルションに加えて、薬剤の製剤化のために研究および使用されている多くの組織化された界面活性剤構造がある。これらには、単層、ミセル、二層、および小胞が含まれる。リポソームなどの小胞は、その特異性および薬剤送達の観点から提供される作用持続時間のために、大きな関心を集めた。本開示で使用される場合、「リポソーム」という用語は、球状二重層または二重層に配置された両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。

【１０６３】

リポソームは、親油性材料から形成された膜と水性の内部とを有する単層または多層の小胞である。水性部分が、送達される組成物を含む。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合することができるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、細胞壁と効率的に融合することができないが、インビボでマクロファージによって取り込まれる。

【１０６４】

リポソームのさらなる利点としては、天然のリン脂質から得られるリポソームが生体適合性および生分解性であること、リポソームは広範囲の水および脂溶性薬物を組み込むことができること、リポソームはそれらの内部コンパートメント内のカプセル化された薬剤を代謝および分解から保護することができること、が挙げられる（Ｒｏｓｏｆｆ，ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｒｉｅｇｅｒ ａｎｄ Ｂａｎｋｅｒ（Ｅｄｓ．），１９８８，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，ｖｏｌｕｍｅ １，ｐ．２４５）。リポソーム製剤の調製における重要な検討事項は、脂質表面の電荷、小胞のサイズ、およびリポソームの水の量である。

【１０６５】

リポソームは、作用部位への活性成分の移送および送達に有用である。リポソーム膜は生体膜と構造的に類似しているため、リポソームが組織に適用されると、リポソームは細胞膜と融合し始め、リポソームと細胞の融合が進行すると、リポソーム内容物は、活性剤が作用し得る細胞内に排出される。

【１０６６】

リポソーム製剤は、多くの薬剤の送達様式として広範な調査の焦点となっている。局所投与については、リポソームが他の製剤よりもいくつかの利点を呈するという証拠が増加している。こうした利点としては、投与された薬物の高い体内吸収に関連する副作用の減少、所望の標的での投与された薬物の蓄積の増加、および多種多様な薬剤を皮膚に、親水的におよび疎水的に投与する能力が挙げられる。

【１０６７】

いくつかの報告は、高分子量ＤＮＡを含む薬剤を皮膚に送達するリポソームの能力を詳述している。鎮痛剤、抗体、ホルモン、および高分子量ＤＮＡを含む化合物が皮膚に投与されている。用途の大部分が上表皮の標的化をもたらした

【１０６８】

リポソームは、二つの広いクラスに分類される。カチオン性リポソームは、正に帯電したリポソームであって、負に帯電したＤＮＡ分子と相互作用して安定なした複合体を形成する。正に帯電したＤＮＡ／リポソーム複合体は、負に帯電した細胞表面に結合して、エンドソームに内在化される。エンドソーム内の酸性ｐＨによって、リポソームは破裂し、

その内容物を細胞質中へと放出する（（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，１９８７，１４７，９８０－９８５）。

【１０６９】

リポソームは、ｐＨ感受性、または負に帯電しており、ＤＮＡと複合体を形成するのではなく、ＤＮＡを捕捉する。ＤＮＡおよび脂質の両方が、同様に電荷しているため、複合体形成ではなく反発が生じる。それにもかかわらず、一部のＤＮＡは、これらリポソームの水性内側部分内に捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードするＤＮＡを、培養液中の細胞単一層に送達するために、ｐＨ感受性リポソームが使用されてきた。外因性遺伝子の発現が、標的細胞において検出された（Ｚｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ，１９９２，１９，２６９－２７４）。

【１０７０】

リポソーム組成物の主要なタイプの一つは、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性リポソーム組成物は、例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）またはジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）から形成され得る。アニオン性リポソーム組成物は、概して、ジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成され、その一方で、アニオン性融合性リポソームは、主に、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）から形成される。別のタイプのリポソーム組成物は、ホスファチジルコリン（ＰＣ）から形成され、例えば大豆製ＰＣおよび卵製ＰＣなどである。別のタイプは、リン脂質および／またはホスファチジルコリンおよび／またはコレステロールの混合物から形成される。

【１０７１】

いくつかの研究では、リポソーム薬物製剤の皮膚への局所送達を評価した。インターフェロンを含有するリポソームのモルモット皮膚への適用は、皮膚ヘルペス疼痛の低減をもたらした一方で、他の手段（例えば、溶液として、またはエマルションとして）を介したインターフェロンの送達は効果がなかった（Ｗｅｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，１９９２，２，４０５－４１０）。さらに、追加の研究では、水性系を使用したインターフェロンの投与に対する、リポソーム製剤の一部として投与されたインターフェロンの有効性を試験し、リポソーム製剤が水性投与よりも優れていると結論付けた（ｄｕ　Ｐｌｅｓｓｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９２，１８，２５９－２６５）。

【１０７２】

非イオン性リポソーム系、特に非イオン性界面活性剤とコレステロールを含む系は、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を判定するためにも試験されてきた。Ｎｏｖａｓｏｍｅ（商標）Ｉ（ジラウリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）およびＮｏｖａｓｏｍｅ（商標）ＩＩ（ジステアリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン－１０－ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム製剤が、マウスの皮膚の真皮中にシクロスポリンＡを送達するために使用された。結果として、こうした非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層中へのシクロスポリンＡの蓄積を促進する際に有効であることが示された（Ｈｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｓ．Ｔ．Ｐ．Ｐｈａｒｍａ．Ｓｃｉ．，１９９４，４，６，４６６）。

【１０７３】

リポソームはまた、「立体的に安定化した」リポソームも含み、本用語は、本明細書において使用する場合、一つ以上の特化された脂質を含むリポソームであって、リポソームに組み込まれた場合に、結果としてこの特化された脂質を欠くリポソームと比較して循環寿命の向上が生じるような一つ以上の特化された脂質を含むリポソームを指す。立体的に安定化したリポソームの例としては、リポソームのベシクル形成脂質部分が（Ａ）例えばモノシアロガングリオシドG_{M1}などである一つまたは複数の糖脂質を含むか、または（Ｂ）例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）部分などである一つまたは複数の親水性ポリマーで誘導体化されている、リポソームである。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、少なくとも、ガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはＰＥＧ誘導

体化脂質を含有する立体的に安定化されたリポソームの場合、これら立体的に安定化されたリポソームの循環半減期の向上は、細網内皮系（ＲＥＳ）の細胞内への取り込みの減少に由来すると、当技術分野では考えられている（Ａｌｌｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，１９８７，２２３，４２；Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９３，５３，３７６５）。

【１０７４】

一つまたは複数の糖脂質を含む様々なリポソームが、当技術分野で公知である。Ｐａｐａｈａｄｊｏｐｏｕｌｏｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，１９８７，５０７，６４）は、モノシアロガングリオシドＧ$_{M1}$、硫酸ガラクトセレブロシド、およびホスファチジルイノシトールのリポソームの血液半減期を向上させる能力について報告した。これら知見は、Ｇａｂｉｚｏｎら（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，１９８８，８５，：６９４９）によって解説された。いずれもＡｌｌｅｎらによる米国特許第４，８３７，０２８号および国際公開第８８／０４９２４号では、（１）スフィンゴミエリンと（２）ガングリオシドＧ$_{M1}$またはガラクトセレブロシド硫酸エステルとを含むリポソームが開示されている。米国特許第５，５４３，１５２号（Ｗｅｂｂら）では、スフィンゴミエリンを含むリポソームについて開示している。１，２－ｓｎ－ジミリストイルホスファチジルコリンを含むリポソームが、国際公開第９７／１３４９９号（Ｌｉｍ　ｅｔ　ａｌ）において開示されている。

【１０７５】

一つまたは複数の親水性ポリマーで誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム、およびその調製方法が当該技術分野で公知である。Ｓｕｎａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．（Ｂｕｌｌ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｊｐｎ．，１９８０，５３，２７７８）は、ＰＥＧ部分を含有する非イオン性洗剤である２Ｃ$_{12\,15\,G}$を含むリポソームを記載している。Ｉｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，１９８４，１６７，７９）は、ポリスチレン粒子を高分子グリコールで親水性コーティングすると、血中半減期が著しく延長されることに注目した。ポリアルキレングリコール（例えば、ＰＥＧ）のカルボン酸基の結合によって修飾された合成リン脂質は、Ｓｅａｒｒｓ（米国特許　第４，４２６，３３０号および第４，５３４，８９９号）によって記載される。Ｋｌｉｂａｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．（ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．，１９９０，２６８，２３５）は、ＰＥＧまたはＰＥＧステアレートで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）を含むリポソームが血液循環半減期の有意な増加を有することを実証する実験を記載した。Ｂｌｕｍｅ　ｅｔ　ａｌ．（Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ，１９９０，１０２９，９１）は、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）とＰＥＧの組み合わせから形成される他のＰＥＧ誘導体化リン脂質、例えば、ＤＳＰＥ－ＰＥＧに、このような観察を拡張した。その外部表面上に共有結合したＰＥＧ部分を有するリポソームは、Ｆｉｓｈｅｒの欧州特許第０　４４５　１３１（Ｂ１）号および国際公開第９０／０４３８４号に記載されている。ＰＥＧで誘導体化された１～２０モルパーセントのＰＥを含有するリポソーム組成物、およびその使用方法は、Ｗｏｏｄｌｅ　ｅｔ　ａｌ．（米国特許第５，０１３，５５６号および第５，３５６，６３３号）およびＭａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（米国特許第５，２１３，８０４号および欧州特許第０　４９６　８１３（Ｂ１）号）に記載されている。いくつかの他の脂質ポリマーコンジュゲートを含むリポソームは、国際公開第９１／０５５４５および米国特許　第５，２２５，２１２号（両方ともＭａｒｔｉｎ　ｅｔ　ａｌ）および国際公開第９４／２００７３（Ｚａｌｉｐｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．）に記載されている。ＰＥＧ修飾セラミド脂質を含むリポソームは、国際公開第９６／１０３９１号（Ｃｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ）に記載されている。米国特許第５，５４０，９３５号（Ｍａｋｉａｋｉ　ｅｔ　ａｌ．）および米国特許第５，５５６，９４８号（Ｔａｇａｗａ　ｅｔ　ａｌ．）は、その表面上の機能性部分でさらに誘導体化され得るＰＥＧ含有リポソームを記載している。

【１０７６】

核酸を含む多数のリポソームが当該技術分野で公知である。Ｔｈｉｅｒｒｙ　ｅｔ　ａ

ｌ．の国際公開第９６／４００６２は、高分子量核酸をリポソームに封入するための方法を開示している。Ｔａｇａｗａ　ｅｔ　ａｌ．による米国特許第５，２６４，２２１号は、タンパク質結合リポソームを開示しており、かかるリポソームの内容物がｄｓＲＮＡを含み得ると主張している。Ｒａｈｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．による米国特許５，６６５，７１０号は、リポソーム内にオリゴデオキシヌクレオチドを封入する特定の方法を記載している。Ｌｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．の国際公開第９７／０４７８７は、ｒａｆ遺伝子を標的とするｄｓＲＮＡを含むリポソームを開示している。

【１０７７】

トランスファーソームは、さらに別のタイプのリポソームであり、薬物送達ビヒクルとして魅力的な候補である高度に変形可能な脂質凝集体である。トランスファーソームは、高度に変形可能であるため、液滴より小さい孔を通って容易に通過することができる脂質滴として説明され得る。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適応可能であり、例えば、それらは、自己最適性（皮膚において孔の形状に順応性のある）であり、自己修復性であり、高頻度で断片化することなくそれらの標的に頻繁に到達し、また多くの場合自己負荷性である。トランスファーソームを作製するために、表面エッジ活性化剤、通常は界面活性剤、を標準リポソーム組成物に加えることができる。トランスファーソームは、皮膚に血清アルブミンを送達するために使用されてきた。血清アルブミンのトランスファーソーム媒介送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注入と同じくらい有効であることが分かっている。

【１０７８】

一つの態様では、本発明は、注射剤形での複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む医薬組成物を特徴とする。一実施形態では、医薬組成物の注射可能な剤形は、滅菌水溶液または分散液および滅菌粉末を含む。一部の実施形態では、滅菌溶液は、水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、またはプロピレングリコールなどの希釈剤を含み得る。

【１０７９】

一つの態様では、本発明は、経口剤形での複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む医薬組成物を特徴とする。一つの実施形態では、経口剤形は、錠剤、カプセル、およびゲルカプセルからなる群から選択される。別の実施形態では、医薬組成物は、哺乳動物の胃内において錠剤、カプセル、またはゲルカプセルが溶解するのを実質的に防止する腸溶性材料を含む。一部の実施形態では、腸溶性材料は、コーティングである。コーティングは、酢酸フタル酸塩、プロピレングリコール、モノオレイン酸ソルビタン、酢酸トリメリット酸セルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、または酢酸フタル酸セルロースであってもよい。一つの実施形態では、医薬組成物の経口剤形は、浸透促進剤、例えば本明細書に記載される浸透促進剤を含む。

【１０８０】

一つの態様では、本発明は、直腸剤形での複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む医薬組成物を特徴とする。一つの実施形態では、直腸剤形は、浣腸である。別の実施形態では、直腸剤形は、座剤である。

【１０８１】

一つの態様では、本発明は、膣剤形での複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む医薬組成物を特徴とする。一つの実施形態では、膣剤形は、坐剤である。別の実施形態では、膣剤形は、発泡体、クリーム、またはゲルである。

【１０８２】

一つの態様では、本発明は、肺または鼻の剤形での複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター

分子）を含む医薬組成物を特徴とする。一つの実施形態では、ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物は、例えばマイクロスフィアなどのマイクロ粒子といった粒子内に組み込まれる。粒子は、噴霧乾燥、凍結乾燥、蒸発、流動床乾燥、真空乾燥、またはこれらの組合せによって作製することができる。マイクロスフェアは、懸濁液、粉末、または移植可能な固体として製剤化することができる。

【１０８３】

治療方法および送達経路

本発明の別の態様は、細胞における標的遺伝子の発現を低下させる方法に関連し、当該方法は、当該細胞と、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）とを接触させることを含む。一つの実施形態では、細胞は、肝細胞である。一つの実施形態では、細胞は、肝外（ｅｘｔｒａｈｅｐｔｉｃ）細胞である。

【１０８４】

本発明の別の態様は、対象における標的遺伝子の発現を低下させる方法に関連し、当該方法は、当該対象に、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）を投与することを含む。

【１０８５】

複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、標的とされる遺伝子のタイプに応じて、および治療される障害のタイプに応じて、様々な経路によって対象に送達することができる。一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、肝臓に投与される。一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、例えば眼投与（例えば、硝子体内投与）または髄腔内投与など、肝外投与される。

【１０８６】

一つの実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、髄腔内投与される。複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）を髄腔内投与することによって、当該方法は、脳または脊椎組織、例えば皮質、小脳、頸椎、腰椎、および胸椎における標的遺伝子の発現を低下させることができる。

【１０８７】

開示の簡略化のために、本セクションにおける製剤、組成物、および方法は、主として修飾されたエフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ化合物に関して検討される。しかしこれら製剤、組成物、および方法は、他のエフェクター分子またはｓｉＲＮＡ化合物、例えば、非修飾のエフェクター分子またはｓｃｉＲＮＡ分子を用いて実施することができ、そのような実施は、本発明の範囲内にあると理解され得る。ｉＲＮＡｉを含む組成物は、様々な経路によって対象に送達することができる。例示的な経路としては、静脈内、局所、経直腸、経肛門、経膣、経鼻、肺内、および眼内が挙げられる。

【１０８８】

複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）分子などのエフェクター分子）は、投与に適した医薬組成物に組み込まれることができる。そのような組成物は、典型的には、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）のうちの一種以上、および薬学的に許容可能な担体を含む。本明細書において使用する場合、「薬学的に許容可能な担体」という文言は、医薬投与に適合性の、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびに同様のものを含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性成分と

不適合性である場合を除き、組成物におけるそれらの使用は意図される。補足的な有効成分もまた組成物に組み込まれ得る。

【１０８９】

本発明の医薬組成物は、局所処置または全身処置のどちらが所望されるか、ならびに処置される面積に応じて、いくつかの方法で投与され得る。投与は、局所（例えば、眼内、経膣、経直腸、鼻腔内、経皮を含む）、経口、または非経口の投与であってもよい。非経口投与は、点滴静注、皮下、腹腔内、もしくは筋肉注射、または髄腔内または脳室内の投与を含む。

【１０９０】

投与の経路および部位は、ターゲティングを増強するように選択され得る。例えば、筋肉細胞を標的とするためには、目的の筋肉内への筋肉注射が、論理的な選択となるであろう。肺細胞は、エアロゾル形態で、ｉＲＮＡを投与することによって標的とされ得る。血管内皮細胞は、バルーンカテーテルをｉＲＮＡでコーティングし、ＤＮＡを機械的に導入することによって標的とされ得る。

【１０９１】

局所投与用製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点眼薬、座剤、噴霧剤、液体、および粉末を含み得る。従来の医薬担体、水性、粉末、または油状の基剤、増粘剤なども必要であり得、または望ましくあり得る。コーティングしたコンドーム、手袋なども有用であり得る。

【１０９２】

経口投与用組成物としては、散剤または顆粒剤、水中の懸濁剤または溶液剤、シロップ剤、エリキシル剤または非水性媒体、タブレット剤、カプセル剤、ドロップ剤、またはトローチ剤を含む。錠剤の場合、使用できる担体としては、ラクトース、クエン酸ナトリウム、およびリン酸の塩が挙げられる。錠剤中には、例えばデンプンなどの種々の崩壊剤、および例えばステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクなどである潤滑剤が、通常使用される。カプセル形態での経口投与の場合、有用な希釈剤は、ラクトースおよび高分子量ポリエチレングリコールである。経口投与のために水性懸濁剤が必要な場合は、核酸組成物を、乳化剤および懸濁剤と組み合わせることができる。所望の場合、特定の甘味剤および／または香味剤を加えることができる。

【１０９３】

髄腔内投与または脳室内投与のための組成物は、緩衝剤、希釈剤、および他の好適な添加剤も含み得る滅菌水溶液を含んでもよい。

【１０９４】

非経口投与用の製剤は、緩衝剤、希釈剤、および他の好適な添加剤も含み得る滅菌水溶液を含んでもよい。脳室内注射は、例えばリザーバに取り付けられた、脳室内カテーテルによって促進され得る。静脈内での使用の場合、溶質の総濃度は、調製物を等張にするように制御されてもよい。

【１０９５】

眼投与については、軟膏又は点滴可能な液体は、アプリケーター又は点眼器などの当技術分野で既知の眼送達システムによって送達されてもよい。こうした組成物は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはポリ（ビニルアルコール）などの粘液模倣剤（ｍｕｃｏｍｉｍｅｔｉｃｓ）、ソルビン酸、ＥＤＴＡまたは塩化ベンジルクロニウムなどの防腐剤、および／または通常の量の希釈剤もしくは担体を含み得る。

【１０９６】

一つの実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）組成物の投与は、非経口であり、例えば、静脈内（例えば、ボーラスとして、または拡散性点滴として）、皮内、腹腔内、筋肉内、髄腔内、脳室内、頭蓋内、皮下、経粘膜、頬側、舌下、内視鏡下、経直腸、経口、経膣、局所、肺内、鼻腔内、経尿道、または眼内である。投与は、対象自身

によって、又は他の者、例えば、医療提供者などによって提供され得る。医薬品は、測定された用量で、または計量された用量を送達するディスペンサーで、提供することができる。選択される送達様式は、以下においてより詳細に説明する。

【１０９７】

髄腔内投与。　一つの実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、髄腔内注射（すなわち、脳および脊髄組織を浸す髄液への注射）によって送達される。髄液へのｉＲＮＡ剤の髄腔内注入は、ボーラス注入として、またはミニポンプによって行うことができ、ミニポンプは、皮下に植え込み可能であり、それによって髄液へのｓｉＲＮＡの定期的で一定の送達が提供される。髄液が産生される脈絡叢からの髄液の循環は、脊髄および後根神経節の周りを下り、その後上がって小脳を通過して、皮質を越えてクモ膜顆粒へと入り、そこで髄液はＣＮＳを出ることができるものであり、注入された化合物のサイズ、安定性、および溶解性に応じて、髄腔内より送達される分子は、ＣＮＳ全体を通して標的を攻撃することとなる。

【１０９８】

一部の実施形態では、髄腔内投与は、ポンプを介して行われる。ポンプは、外科手術によって植え込んだ浸透圧ポンプであり得る。一実施形態では、浸透圧ポンプは、髄腔内投与を容易にするために、脊柱管のクモ膜下腔内に植え込まれる。

【１０９９】

一部の実施形態では、髄腔内投与は、ある量の医薬品を収容するリザーバと、リザーバに収容された医薬品の一部を送達するように構成されたポンプを含む、製薬品の髄腔内送達システムを介して行われる。この髄腔内送達系についての更なる詳細は、２０１５年１月２８日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０１３２５３に見いだされ、当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【１１００】

髄腔内注入されるｉＲＮＡ剤の量は、標的遺伝子によって変化してもよく、適用されるべき適切な量は、標的遺伝子ごとに個別に決定しなければならない場合がある。典型的には、この量は、１０μｇ～２ｍｇ、好ましくは５０μｇ～１５００μｇ、より好ましくは１００μｇ～１０００μｇの範囲である。

【１１０１】

直腸投与。　本発明は、本明細書に記載される複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）の直腸投与または直腸送達のための方法、組成物、およびキットも提供する。

【１１０２】

したがって、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）は、直腸に投与されることができ、例えば直腸を通して下部結腸または上部結腸に導入されることができる。この方法は特に、炎症性障害、例えばポリープまたは結腸がんなどの望ましくない細胞増殖を特徴とする障害の治療に有用である。

【１１０３】

例えば、結腸検査またはポリープ除去に使用されるものと同様の柔軟性のあるカメラ誘導型のデバイスなど、薬剤の送達手段を含む投薬デバイスを導入することにより結腸部位に送達されることができる。

【１１０４】

複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）の直腸投与は、浣腸により行われる。浣腸の複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）は、生理食塩水または緩衝溶液中に溶解されてもよい。直腸投与は、他の成分、例えば賦形剤、例えば、ココアバターまたはヒドロプロピルメチルセルロースを含み得る座剤によって行われてもよい。

【１１０５】
眼送達。　本明細書に記載の複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、眼組織に投与することができる。例えば、薬剤は、眼の表面または近くの組織、例えばまぶたの内側に適用することができる。これらは、例えば、噴霧によって、点眼薬で、洗眼液又は軟膏として、局所的に適用され得る。投与は、対象自身によって、又は他の者、例えば、医療提供者などによって提供され得る。医薬品は、測定された用量で、または計量された用量を送達するディスペンサーで、提供することができる。医薬品はまた、眼の内部に投与され得、それを選択された領域又は構造に導入することができる針又は他の送達デバイスによって導入され得る。眼治療は特に、眼または近くの組織の炎症の治療に望ましい。

【１１０６】
特定の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、眼周囲、結膜、テノン嚢下、前房内、硝子体内、眼内、前若しくは後強膜近傍、網膜下、結膜下、球後、又は小管内注射などの眼組織注射によって、カテーテル、又は網膜ペレット、眼内インサート、坐剤、多孔性、非多孔性、若しくはゼラチン性の材料を含むインプラントなどの他の配置デバイスを使用した眼への直接適用によって、局所用点眼薬又は軟膏によって、あるいは結膜嚢内の、又は強膜に隣接して（経強膜）、若しくは強膜において（強膜内）、若しくは眼内に移植された徐放デバイスによって、眼に直接投与されてもよい。前房内注射は、薬剤が小柱網に達することを可能にするために、角膜を通って前眼房内に入り得る。小管内注射は、シュレム管を排出させる静脈集合チャネル内又はシュレム管内に入り得る。

【１１０７】
一つの実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、医療従事者による使用を目的とした、すぐに注射できる形態の予め充填されたシリンジなど、硝子体内注射によって、眼、例えば目の硝子体腔内に投与されてもよい。

【１１０８】
眼送達について、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、眼科的に許容可能な防腐剤、共溶媒、界面活性剤、粘性強化剤、浸透促進剤、緩衝剤、塩化ナトリウム、または水と組み合わされて、水性の滅菌された眼用の懸濁液または溶液を形成してもよい。溶液製剤は、コンジュゲートを生理学的に許容可能な等張水性緩衝液中に溶解することによって作製されてもよい。さらに、溶液は、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）の溶解を補助するための許容可能な界面活性剤を含んでもよい。粘性増加剤、例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどを医薬組成物に添加して、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）の保持を改善してもよい。

【１１０９】
滅菌された眼用の軟膏製剤を作製するために、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）を、例えば、鉱油、液性ラノリン、または白色ワセリンなどの適切なビヒクル中で、防腐剤と混合する。滅菌された眼用のゲル製剤は、当分野で公知の方法に従って、例えば、ＣＡＲＢＯＰＯＬ（登録商標）－９４０（ＢＦ　Ｇｏｏｄｒｉｃｈ、Ｃｈａｒｌｏｔｔｅ，Ｎ．Ｃ．）などの組み合わせから調製された親水性基剤中に、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）を懸濁することによって作製されてもよい。

【１１１０】
局所送達。　本明細書に記載される複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたは

ｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）のいずれかは、皮膚に直接投与することができる。例えば、薬剤は、皮膚に浸透するが、基底にある筋組織には浸透しないマイクロニードルまたはマイクロニードルのバッテリーを使用することによって、局所的に適用され、または皮膚の層に送達され得る。複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）の投与は、局所であってもよい。局所適用は、例えば、組成物を対象の真皮または表皮に送達することができる。局所投与は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点眼剤、座剤、噴霧剤、液体、または粉末の形態であってもよい。局所投与用の組成物は、リポソーム、ミセル、エマルション、または他の親油性分子アセンブリとして製剤化されてもよい。経皮投与は、例えば、イオントフォレーシス、フォノフォレーシス（ｐｈｏｎｏｐｈｏｒｅｓｉｓ）およびソノフォレーシスなど、少なくとも一つの浸透促進剤を用いて適用されてもよい。

【１１１１】

一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）は、局所投与を介して対象に送達される。「局所投与」とは、製剤を対象の表面に直接接触させることによる、対象への送達を指す。局所送達の最も一般的な形態は皮膚への送達であるが、本明細書に開示される組成物は、身体の他の表面、例えば、眼、粘膜、体腔の表面、または内部表面などに直接適用されてもよい。上述のように、最も一般的な局所送達は皮膚への送達である。当該用語は、限定されないが、局所および経皮を含む、いくつかの投与経路を包含する。これらの投与様式は、典型的には、皮膚の透過障壁の浸透、および標的組織または標的層への効率的な送達を含む。局所投与は、表皮および真皮に浸透し、最終的に組成物を全身送達する手段として使用することもできる。局所投与は、対象の表皮もしくは真皮、またはその特定の層、または基底にある組織へオリゴヌクレオチドを選択的に送達するための手段として使用されてもよい。

【１１１２】

本明細書で使用される場合、「皮膚」という用語は、動物の表皮および／または真皮を指す。哺乳動物の皮膚は、二つの主要な別個の層からなる。皮膚の外層は、表皮と呼ばれる。表皮は、角質層、顆粒層、有棘層、および基底層から構成され、角質層は皮膚の表面にあり、基底層は表皮の最も深い部分にある。表皮は、身体での位置に応じて、厚さは５０μｍ～０．２ｍｍである。

【１１１３】

表皮の下には真皮があり、真皮は、表皮よりもずっと厚い。真皮は主に線維束の形態でコラーゲンから構成される。コラーゲン束は、特に、血管、毛細リンパ管、腺、神経終末、および免疫学的に活性な細胞に対する支持を提供する。

【１１１４】

器官としての皮膚の主な機能の一つは、身体内への物質の進入を調節することである。皮膚の主な透過障壁は、角質層により提供され、角質層は、様々な分化状態の細胞の多層から形成される。角質層の細胞の間の空間は、格子様の構造で配置された様々な脂質で満たされており、皮膚の透過障壁をさらに強化するシールを提供する。

【１１１５】

皮膚によって提供される透過障壁は、約７５０Ｄａを超える分子量を有する分子に対しては、ほとんど不透過性である。大きな分子が皮膚の透過障壁を通過するためには、正常な浸透以外の機序を使用しなければならない。

【１１１６】

いくつかの因子によって、投与される剤に対する皮膚の透過性が決定される。これらの因子としては、治療される皮膚の特性、送達剤の特性、薬剤と送達剤、および薬剤と皮膚の両方の相互作用、適用される薬剤の用量、治療の形態、および治療後のレジメンが挙げられる。表皮および真皮を選択的に標的化するために、予め選択された層への薬剤の浸透を可能にする浸透促進剤を一つ以上含む製剤を製剤化することが可能な場合がある。

【１１１７】
経皮送達は、脂質可溶性の治療剤の投与に対する貴重な経路である。真皮は表皮よりも透過性が高く、そのため、擦過傷、火傷、または皮膚剥離を通じた吸収ははるかに迅速である。皮膚への血流を増加させる炎症、および他の生理学的な状態も、経皮的吸着を強化する。この経路を介した吸収は、油性ビヒクルの使用（塗油）によって強化される場合があり、または一つ以上の浸透促進剤の使用によって強化される場合がある。経皮経路を介して、本明細書に開示される組成物を送達するための他の効果的な方法としては、皮膚の水和、および徐放性局所パッチの使用が挙げられる。経皮経路は、全身治療および／または局所治療を目的とした本明細書に開示される組成物の送達に対し、有効な手段の可能性を提供する。

【１１１８】
さらに、イオントフォレーシス（電場の影響下での生体膜を通じたイオン性溶質の移行）（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，１９９１，ｐ．１６３）、フォノトフォレーシスまたはソノフォレーシス（超音波を使用して生体膜、特に皮膚および角膜を通過する様々な治療剤の吸収の強化）（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，１９９１，ｐ．１６６）、および投与位置、および投与部位での保持に対するビヒクル特性の最適化（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔｅｍｓ，１９９１，ｐ．１６８）は、局所適用された組成物を、皮膚および粘膜部位を横切り輸送することを強化するための有用な方法であり得る。

【１１１９】
提供される組成物および方法を使用して、培養された皮膚組織または保存された皮膚組織においてインビトロで、および動物において、様々なタンパク質および遺伝子の機能評価に使用してもよい。したがって、本発明は、任意の遺伝子の機能評価に適用され得る。本発明方法は、治療的または予防的にも使用され得る。例えば、乾癬、扁平苔癬、中毒性表皮壊死症、多形性紅斑、基底細胞がん、扁平上皮細胞がん、悪性黒色腫、パジェット病、カポジ肉腫、肺線維症、ライム病、ならびに皮膚のウイルス感染、真菌感染、および細菌感染などの疾患に罹患していることが判明している、または罹患が疑われる動物の治療を目的としている。

【１１２０】
肺送達。 本明細書に記載される複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）のいずれかは、肺系に投与することができる。肺投与は、吸入によって、または送達デバイスを肺系に導入することによって、例えば、薬剤を投薬することができる送達デバイスを導入することによって、行うことができる。特定の実施形態は、吸入による肺送達の方法を使用してもよい。薬剤は、ディスペンサー中で提供されてもよく、ディスペンサーは、吸入され得るように充分に小さい形態で、湿潤または乾燥した薬剤を送達する。デバイスは、定量の薬剤を送達することができる。対象または別の人物が、薬剤を投与することができる。肺送達は、肺組織が直接影響を受ける障害だけでなく、他の組織が影響を受ける障害にも有効である。複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）は、液体または非液体として製剤化されてもよく、例えば、肺送達用の粉末、結晶、またはエアロゾルとして製剤化されてもよい。

【１１２１】
複数標的分子（例えば、ｂｉｓ ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）を含む組成物は、肺送達によって対象に投与されてもよい。肺送達組成物は、患者による分散液の吸入によって送達されてもよく、それによって分散液内の組成物、例えばｉＲＮＡが肺に到達し、そこで容易に肺胞領域を通

じて血液循環内に直接吸収されることができる。肺送達は、全身送達、および肺疾患を治療するための局所送達の両方に有効であり得る。

【１１２２】

肺送達は、噴霧製剤、エアロゾル製剤、ミセル製剤、および乾燥粉末系製剤の使用を含む、様々な方法によって実施することができる。送達は、液体ネブライザー、エアロゾル系吸入器、および乾燥粉末分散デバイスを用いて行うことができる。定量デバイスが使用されてもよい。アトマイザーまたは吸入器を使用する利点の一つは、装置が自給式であるため、汚染の可能性が最小化されることである。乾燥粉末分散デバイスは、例えば、乾燥粉末として容易に製剤化され得る薬剤を送達する。ｉＲＮＡ組成物は、単独で、または好適な粉末担体と組み合わせて、凍結乾燥粉末または噴霧乾燥粉末として安定的に保存され得る。吸入用組成物の送達は、デバイスに組み込まれたときに、用量トラッキング、コンプライアンスの監視、および／またはエアロゾル薬剤の投与中に患者への投与量の発射を可能にする、タイマー、用量カウンター、時間測定デバイス、または時間インジケーターを含み得る、投与タイミングエレメントによって介在されてもよい。

【１１２３】

「粉末」という用語は、微細に分散された固形粒子からなり、それら粒子は容易に吸入デバイス中で分散され、続いて対象に吸入されることができ、それによって、当該粒子は肺に到達して、肺胞内への浸透が可能となる。したがって、粉末は、「吸入可能（ｒｅｓｐｉｒａｂｌｅ）」と言われる。例えば、平均粒子サイズは、直径約１０μｍ未満であり、比較的均一な回転楕円状の分布を有する。一部の実施形態では、直径は、約７．５μｍ未満であり、一部の実施形態では、約５．０μｍ未満である。通常、粒子サイズ分布は、直径約０．１μｍ～約５μｍ、場合によっては約０．３μｍ～約５μｍである。

【１１２４】

「乾燥」という用語は、組成物が約１０重量％（％ｗ）未満の含水率、通常は約５％ｗ未満、一部の例では、約３％ｗ未満の含水率を有することを意味する。乾燥組成物は、粒子が吸入デバイス中で容易に分散し、エアロゾルを形成するような乾燥組成物であってもよい。

【１１２５】

「治療有効量」という用語は、期待される生理学的応答を得るために、治療される対象において所望される薬剤レベルになるために必要とされる、組成物中に存在する量である。

【１１２６】

「生理学的有効量」という用語は、望ましい緩和効果または治癒効果を得るために、対象に送達される量である。

【１１２７】

「薬学的に許容可能な担体」という用語は、当該担体は肺に取り込まれることができ、肺に対して著しく有害な毒性作用が無いことを意味する。

【１１２８】

担体として有用な医薬賦形剤のタイプとしては、例えばヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）などの安定剤、例えば炭水化物、アミノ酸、およびポリペプチドなどの増量剤、ｐＨ調整剤または緩衝剤、例えば塩化ナトリウムなどの塩が挙げられる。これらの担体は、結晶性または非晶質の形態であってもよく、またはそれら二つの混合物であってもよい。

【１１２９】

特に価値のある増量剤としては、適合性のある炭水化物、ポリペプチド、アミノ酸、またはそれらの組み合わせが挙げられる。適切な炭水化物としては、例えば、ガラクトース、Ｄ－マンノース、ソルボースなどの単糖類、例えば、ラクトース、トレハロースなどの二糖類、例えば、２－ヒドロキシプロピル－ベータ－シクロデキストリンなどのシクロデキストリン、および例えば、ラフィノース、マルトデキストリン、デキストランなどの多糖類、例えば、マンニトール、キシリトールなどのアルジトールが挙げられる。炭水化物群としては、ラクトース、トレハロース、ラフィノースマルトデキストリン、およびマン

ニトールが挙げられる。好適なポリペプチドとしては、アスパルテームが挙げられる。アミノ酸としては、アラニンおよびグリシンが挙げられ、一部の実施形態では、グリシンが使用される。

【１１３０】

本発明の組成物の微量成分である添加剤は、噴霧乾燥中の立体構造の安定性、および粉末の分散性の改善を目的として含まれ得る。これらの添加剤としては、例えば、トリプトファン、チロシン、ロイシン、フェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸が挙げられる。

【１１３１】

好適なｐＨ調整剤または緩衝剤としては、有機酸と塩基、例えばクエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムなどから調製された有機塩が挙げられ、一部の実施形態では、クエン酸ナトリウムが使用され得る。

【１１３２】

ミセル状のｉＲＮＡ製剤の肺投与は、例えば、テトラフルオロエタン、ヘプタフルオロエタン、ジメチルフルオロプロパン、テトラフルオロプロパン、ブタン、イソブタン、ジメチルエーテル、ならびに他の非ＣＦＣ噴射剤およびＣＦＣ噴射剤などの噴射剤を有する、定量噴霧スプレーを介して行われてもよい。

【１１３３】

経口送達または経鼻送達。　本明細書に記載される複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）のいずれかは、例えば、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、薬用キャンディ、トローチ、または液体シロップの形態で経口投与することができる。さらに、組成物は、口腔の表面に局所的に適用することができる。

【１１３４】

本明細書に記載される複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）のいずれかは、経鼻投与することができる。経鼻投与は、鼻内への送達デバイスの導入によって、例えば、薬剤を投薬することができる送達デバイスを鼻内に導入することによって、実施することができる。経鼻送達の方法は、例えば、鼻腔表面への点滴剤または局所投与によるスプレー、エアロゾル、液体などを含む。薬剤は、ディスペンサー中で提供されてもよく、ディスペンサーは、吸入され得るように充分に小さい形態で湿潤または乾燥した薬剤を送達する。デバイスは、定量の薬剤を送達することができる。対象または別の人物が、薬剤を投与することができる。

【１１３５】

経鼻送達は、鼻組織が影響を直接受ける障害だけではなく、他の組織が影響を受ける障害にも有効であり、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物などのエフェクター分子）は、液体または非液体、例えば、粉末、結晶として製剤化されてもよく、または経鼻送達用に製剤化されてもよい。本明細書で使用される場合、「結晶」という用語は、結晶構造または結晶の特徴を有する固体を記述するものであり、すなわち、平面が限定された角度で交差し、規則的な内部構造が存在する三次元構造の粒子である。本発明の組成物は、異なる結晶の形態を有してもよい。結晶の形態は、例えば噴霧乾燥を含む様々な方法によって作製することができる。

【１１３６】

口腔粘膜と鼻粘膜の両方とも、他の投与経路を凌ぐ利点がある。例えば、これらの膜を通して投与された薬剤は、迅速に作用が発現し、治療血漿レベルを提供し、肝代謝の初回通過効果を回避し、そして激烈な消化管（ＧＩ）環境への曝露が回避される。追加的な利点としては、膜部位に簡単にアクセスすることができ、容易に薬剤を塗布、局在化、および除去することができるということが挙げられる。

【１１３７】

経口送達では、組成物は、口腔の表面、例えば、舌下粘膜を標的とすることができ、舌下粘膜には舌の腹側表面、および口底、または頬の内層を構成する頬粘膜が含まれる。舌

下粘膜は比較的透過性であり、したがって多くの薬剤の迅速な吸収、および許容可能な生体利用効率が得られる。さらに、舌下粘膜は、便利で、許容性があり、容易にアクセス可能である。

【１１３８】

分子が口腔粘膜を通して浸透する能力は、分子の大きさ、脂質溶解性、およびペプチドタンパク質イオン化に関連すると考えられる。１０００ダルトン未満の低分子は、迅速に粘膜を通過すると考えられる。分子が大きくなるにつれ、透過性は急速に低下する。脂質可溶性の化合物は、非脂質可溶性の分子よりも透過性が高い。最大吸収は、分子が電荷において非イオン化または中性である時に生じる。したがって、荷電分子が、口腔粘膜を通した吸収にとって最大の課題である。

【１１３９】

複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）などのエフェクター分子）の医薬組成物は、ヒトの口腔に、定量噴霧ディスペンサー、上述の混合ミセル状医薬製剤、および噴射剤から、吸入ではなく、口腔内に噴霧することによって投与されてもよい。一つの実施形態では、ディスペンサーは最初に振とうされ、その後に医薬製剤と噴射剤が口腔内に噴霧される。例えば、薬剤は、口腔内に噴霧されてもよく、または液体、固形もしくはゲルの形態で口腔表面に直接塗布されてもよい。この投与は特に、例えば歯肉や舌などの口腔の炎症の治療に望ましく、一つの実施形態では、口腔投与は、医薬組成物および噴射剤を投薬する例えば定量噴霧ディスペンサーなどのディスペンサーからの、吸入ではなく口腔内への噴霧によるものである。

キット

【１１４０】

特定の他の態様では、本発明は、エフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物の医薬製剤を含有する好適な容器を含むキットを提供する。特定の実施形態では、医薬製剤の個々の成分は、一容器で提供され得る。あるいは、医薬製剤の成分を別々に二つ以上の容器で、例えば、一つの容器はエフェクター分子（例えば、ｄｓＲＮＡ剤）またはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）化合物の調製物用であり、少なくとも別の容器は、担体化合物用で提供するのが好ましい場合がある。キットは、単一の箱内に一つまたは複数の容器などであるいくつかの様々な構成で包装され得る。この様々な構成要素は、例えば、キットと共に提供される使用説明書に従って、組み合わせることができる。当該構成要素は、例えば、医薬組成物を調製および投与するために、本明細書において説明した方法に従って組み合わせることができる。キットはまた、送達デバイスも含むことができる。

【１１４１】

本発明を、以下の実施例によってさらに説明するが、これらは限定として解釈されるべきではない。本出願全体を通して引用される全ての参考文献、係属中の特許出願および公開特許の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【１１４２】

調査ツール

特定の例では、遺伝子発現を調節することができるオリゴヌクレオチドが、調査ツールとして使用されてきた。例えば、特定の遺伝子産物の機能を調査する研究者は、細胞または動物に存在する遺伝子産物の量を減少させ、当該細胞または動物の表現型変化を観察するためのオリゴヌクレオチドを設計することができる。特定の実施形態では、本開示は、細胞または動物において、二つの異なる標的の量を減少させるための方法を提供する。一部の実施形態では、二つの異なる標的は、二つの異なる遺伝子または遺伝子産物であってもよい。一部の実施形態では、二つの異なる標的は、同じ遺伝子または遺伝子産物であってもよい。特定の実施形態では、研究者は、タンパク質または非翻訳核酸を特徴解析するために、かかる技術を使用することができる。特定の実施形態では、かかる実験を使用して、遺伝子産物および／もしくは特定の細胞機能の動態ならびに／または代謝回転が調査される。一部の実施形態では、かかる実験を使用して、異なる遺伝子または遺伝子産物の

間の関係性または相関が調査される。
【実施例】
【１１４３】
本明細書において本発明が全体的に記載されているが、本発明の特定の態様および実施形態の単なる例示を目的として含まれ、本発明を限定することは意図されない以下の実施例を参照することによって、本発明がさらに容易に理解されるであろう。
【１１４４】
実施例１：ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を作製する方法
複数の「ｂｉｓ」（二重標的化）ｓｉＲＮＡ複合体（本明細書に開示される複数標的分子の形態）は、ＰＣＴ出願番号　ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４２４９８において過去に記載された合成方法を使用して作製された。「ｂｉｓ」ｓｉＲＮＡ複合体を、ＣＴＮＮＢ１およびＳＯＤ１の核酸標的の同時（およびエフェクター分子濃度に関して化学量論的に同等な）阻害を目的に設計された（図２Ａ～２Ｃ）。各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体は、連続的なセンス鎖と、二つの別個の独立した一本鎖アンチセンス配列を含み、当該連続的なセンス鎖は、第一の標的核酸（ＣＴＮＮＢ１またはＳＯＤ１　ｍＲＮＡ）内のセンス鎖配列、および第二の標的核酸（ＣＴＮＮＢ１またはＳＯＤ１　ｍＲＮＡのうちの他方）内のセンス鎖配列をそれぞれ含み、個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）の各センス鎖は、三ヌクレオチドの長さ（現状での例示として）のヌクレオチドリンカーにより結合され、ならびに当該二つの別個の独立した一本鎖アンチセンス鎖は、第一の標的核酸と第二の標的核酸をそれぞれ標的とし、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（図２Ｄ）の連続的なセンス鎖の相補的なセンス鎖配列にアニーリングしている。例としてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（複数標的分子）を図３Ａに示す。
【１１４５】
各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（または混合二本鎖対照）の有効性および組織分布を、Ｃ５７／ＢＩ６マウスの中枢神経系で評価した。イソフルランを麻酔として使用して、２５ｍｌのハミルトンシリンジを備えた３．５ｍｍのカスタム針を使用して、マウスの脳の右側脳室に単回ＩＣＶ投与を行った。混合二本鎖対照においては、各二本鎖５０ｍｇを投与した。ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体は、１００ｍｇが投与された。すべての注射は、同じ管理者によって実施された。被験化合物当たり、少なくとも４匹の動物を使用した。動物は、投与後２１日目に安楽死させた。ＣＴＮＮＢ１およびＳＯＤ１の阻害を、脳の右半球および左半球、小脳、脳幹、肝臓、心臓、および肺において評価した。
【１１４６】
実施例２：ＣＮＳ送達を目的とした、効果的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体リンカーの特定
本開示のｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体は、図２Ａに表されるように、それぞれC_{16}修飾されたＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ分子およびＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ分子を使用して構築された。ｓｉＲＮＡ（結合されていない）の単純な混合物として、ＩＣＶ注射によってマウスに投与した場合、様々な脳組織において、指定されるC_{16}修飾ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ分子およびＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ分子は、それぞれＳＯＤ１を約４０～６０％まで阻害し、ＣＴＮＮＢ１を約２５～５０％まで阻害したことが特定された（図２Ｂ）。
【１１４７】
本明細書に開示されるｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体に対して有効なリンカーを特定するために、標的とされるｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１のｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体介在性の阻害をマウスにおいて評価し、標的ｍＲＮＡのノックダウンレベルも混合二本鎖送達と比較した（それぞれ、配列番号１３および１４のｓｉＲＮＡがＳＯＤ１標的化、配列番号１５および１６のｓｉＲＮＡがＣＴＴＮＢ１標的化）。マウスに、センス鎖結合３ヌクレオチドリンカー：２’－デオキシチミジン－３’－リン酸（ｄＴｄＴｄＴ）配列番号　３（図３Ａ～３Ｃ）、２’Ｏ－メチルウリジン（ｕｕ）配列番号：４（図４Ａ～４Ｃ）、ウリジン－３’－リン酸（ＵＵＵ）配列番号：５（図５Ａ～５Ｃ）、および２’－フルオロウリジン－３’－リン酸（ＵｆＵｆＵｆ）配列番号：６（図６Ａ～６Ｃ）のうちの一つを保有

するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を注射した。ノックダウン評価のために採取された組織は、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓であった。ｍＳＯＤ１値およびｍＣＴＮＮＢ１値の両方の約５０％の阻害は、２’－デオキシチミジン－３`－リン酸（ｄＴｄＴｄＴ）リンカー構築物ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡを用いて実現された（図３Ａ～３Ｃ）。ｍＳＯＤ１値の約３０％の阻害、およびｍＣＴＮＮＢ１値の約２５％の阻害は、２’Ｏ－メチルウリジン（ｕｕｕ）リンカー構築物ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡを用いて実現された（図４Ａ～４Ｃ）。ｍＳＯＤ１値およびｍＣＴＮＮＢ１値のわずか約２５％の阻害は、ウリジン－３’－リン酸（ＵＵＵ）リンカー構築物ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡを用いて実現された（図５Ａ～５Ｃ）。ｍＳＯＤ１の約４０％の阻害、およびｍＣＴＮＮＢ１の約３０％の阻害は、２’－フルオロウリジン－３’－リン酸（ＵｆＵｆＵｆ）リンカー構築物ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡを用いて実現された（図６Ａ～６Ｃ）。混合二本鎖および他のｂｉｓ　ｓｉＲＮＡリンカーの両方と比較して、ＣＮＳにおけるＳＯＤ１とＣＴＮＮＢ１の両方の阻害について観察された最も効果的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡリンカー構築物は、ｄＴｄＴｄＴ結合型ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡと特定された（図１０Ａ）。これは、検証された全ての脳組織で、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方で約５０％の阻害を示した。

【１１４８】

実施例３：複数標的分子におけるｂｉｓ　ｓｉＲＮＡエフェクター分子の配置の影響

複数標的分子の活性に対する、エフェクター分子の構成の潜在的な影響を、上述のＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡエフェクター分子およびＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡエフェクター分子をそれぞれ使用して評価した。なお、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（複数標的分子）内のそれぞれのｓｉＲＮＡエフェクターの位置が交換されている。ｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害を、ＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）融合センス鎖配列（配列番号２２および２３）を含むｂｉｓ　ｓｉＲＮＡをＩＣＶ注射されたマウスで評価した。上述のように、標的遺伝子阻害の評価のために採取された組織は、脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹、および肝臓であった。上述のＤＮＡリンカー（ｄＴｄＴｄＴ、図３Ａ～３Ｃ）を有するＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体で観察された、安定的なｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害活性とは対照的に、ＤＮＡリンカー（ｄＴｄＴｄＴ）を有するＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（すなわち、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ構築物内のｓｉＲＮＡエフェクター分子の順序においてのみ、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体とは異なっている）は、ｍＳＯＤ１標的ｍＲＮＡおよびｍＣＴＮＮＢ１標的ｍＲＮＡの両方について、わずか約２０％の阻害を示した（図７Ａ～７Ｃ）。２’Ｏ－メチルリンカー（ｕｕ）を有するＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体は、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ構築物内のｓｉＲＮＡエフェクター分子の順序においてのみ、２’Ｏ－メチルリンカーを有するＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（図４Ａ～４Ｃ）とは異なっており、これも同様に効果の減少が観察された。２’Ｏ－メチルリンカー（ｕｕｕ）を有するＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体は、わずか約１５％のｍＳＯＤ１標的ｍＲＮＡおよびｍＣＴＮＮＢ１標的ｍＲＮＡの阻害が観察された（図８Ａ～８Ｃ）。２’Ｏ－メチルリンカーを有するＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体について、約２５％～約３０％の阻害が上記で観察されたのとは対照的である（図４Ａ～４Ｃ）。混合二本鎖での処置、および試験された他のすべてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体と比較しても、最も有効なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ構成は、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）であり、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方について、約５０％のノックダウンが観察された（図１０Ｂ）。

【１１４９】

実施例４：各ｓｉＲＮＡエフェクター分子上ではなく、いずれかｓｉＲＮＡエフェクター

分子上に、複数標的分子当たり一つのC16修飾のみが配置された複数標的分子は、性能が不良であった

SOD1標的化siRNAエフェクター分子、またはCTNNB1標的化エフェクター分子のいずれかのセンス鎖6位（5’末端から番号付与）に、一つのみC16修飾を担持するbis siRNA複合体の阻害効率も評価された。注目すべきことは、（1）DNAリンカーにより結合されたCTNNB1-SOD1（C16）bis siRNA複合体（SOD1標的化siRNAセンス鎖の6位に一つのC16修飾を有するbis siRNA複合体。図9Aの上。配列番号21の融合センス鎖）または（2）DNAリンカーにより結合されたCTNNB1（C16）-SOD1 bis siRNA複合体（CTNNB1標的化siRNAセンス鎖の6位に一つのC16修飾を有するbis siRNA複合体。図9Aの下。配列番号24の融合センス鎖）のいずれかが、マウスにICV注射され、CTNNB1およびSOD1の阻害について試験された場合、検証されたいずれの脳組織（脳の右半球、脳の左半球、小脳、脳幹）および肝臓においても、bis siRNA複合体は阻害効果を示さなかった（図9B）。これらの結果は、両方のエフェクター分子のセンス鎖の6位でC16修飾を有するbis siRNA複合体に関して、インビボでCNS組織において観察された阻害効果とは著しく対照的であった（CTNNB1 siRNAおよびSOD1 siRNAの両方。図3A～3Cおよび図10Cを参照）。

【1150】

要約すると、多数のbis siRNA複合体が合成され、ICV注射によってかかる複数標的分子が投与された哺乳動物のCNSにおいて、CTNNB1標的遺伝子およびSOD1標的遺伝子の阻害効率が試験された。多くのCTNNB1（C16）-SOD1（C16）siRNA構築物、特にDNA（dTdTdT）リンカー（図10Dおよび10E）を有し、二つの別個の脂溶性部分（C16修飾）を有する構築物について、CTNNB1標的遺伝子とSOD1標的遺伝子の両方について安定して効果的で特異的な阻害が観察された。各siRNAエフェクター分子は、センス鎖の6位でC16修飾がコンジュゲートされた。コンジュゲート化脂溶性部分（例示されるC16修飾）を両方のsiRNAエフェクター分子に含有させることは、処置される対象のCNS組織における、かかる複数標的分子の標的遺伝子ノックダウンの有効性にとって重要であると特定された。両方ではなく一方のsiRNAエフェクター分子に一つのみC16修飾を含ませたbis siRNA構築物は、当該一つのC16修飾を有するエフェクター分子により標的とされた遺伝子であっても、標的遺伝子阻害の効果がないことが判明した（図10Dおよび10E）。bis siRNA構築物内のリンカーの組成、および互いに対する個々のsiRNAエフェクター分子の構成が、処置される対象のCNS組織における、bis siRNA構築物の標的遺伝子阻害の有効性に影響を与えることがさらに特定された（図10Dおよび10E）。

【1151】

したがって、安定的で効果的なCNS送達および標的遺伝子阻害が可能な複数標的分子が特定され、本明細書に提供される。

【1152】

実施例5：ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用したラット脳脊髄液（CSF）におけるbis-siRNAの定性的安定性

bis-siRNA複合体リンカーの安定性を、ラットCSF（BioIVT、カタログ番号RAT00CSFXZN）において、Criterion 10% TBEプレキャストゲル（BioRad社、カタログ番号3450053）を使用した非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって評価した。bis-siRNA、二本鎖混合物（AD-320650およびAD-413709）、および対照DNA二本鎖（AD-77748）を、CSF中、0.1μM、1：19の比率で、0、4、または24時間インキュベートし、その後、反応物をEDTA（50mM）を使用してクエンチし、分析まで-80℃で凍結させた。複合体の対照サンプルは、基質を添加しないPBS中でインキュベートされ、調製された。ローディング前に、サンプルを室温で解凍し、BlueJuice（商

標）Ｇｅｌ ｌｏａｄｉｎｇ Ｂｕｆｆｅｒ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、カタログ番号１０８１６－０１５）を、１：１０の比率で添加した。次いで、サンプルおよび１０ｂｐ ＤＮＡラダー（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、カタログ番号１０４８８－０１９）を、１ｘ ＴＢＥ（Ｔｒｉｓ／ホウ酸／ＥＤＴＡ；ＢｉｏＲａｄ社、カタログ番号１７１－００７０）ランニング緩衝液中、１０％ ＴＢＥゲル上にローディングし、定電圧（１００Ｖ）を４℃で２時間適用した。Ｓｙｂｅｒ Ｇｏｌｄ（１０％ ＴＢＥで１×、Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、カタログ番号Ｓ１１４９４）でゲルを１０分間染色し、Ｉｍａｇｅ Ｌａｂソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ社）を備えたＣｈｅｍｉＤｏｃ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍを使用して撮像した。

【１１５３】

ラット脳ホモジネートにおける、ｂｉｓ（ｓｉＲＮＡ）の半定量的安定性

ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体リンカーの安定性を、メスのＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの全脳組織（ＢｉｏＩＶＴ社、カタログ番号Ｓ０５９６６）から調製され、３ｍＬ緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ＨＣｌ、１％ ＮＰ－４０、１４０ｍＭ ＮａＣｌ。ｃＯｍｐｌｅｔｅ ＥＤＴＡ－ｆｒｅｅ Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ社、カタログ番号１１８３６１７０００１）、ｐＨ７．４を含む）当たり１ｇの組織として製剤化されたカスタムプレミアム製剤において評価した。代謝を高精度高分解能質量分析を介して分析した。ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（約８μＭ）を、１：５０の比率で脳とともに０時間または２４時間インキュベートした。混合物を、４５０μＬの溶解緩衝液（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社、カタログ番号ＡＬ０－８５７９）を用いて希釈し、固相抽出（ＳＰＥ）を、ＥｘｔｒａＨｅｒａ（Ｂｉｏｔａｇｅ社）装置により促進された陽圧下で、Ｃｌａｒｉｔｙ ＯＴＸ固相抽出プレート（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社、カタログ番号８Ｅ－Ｓ１０３－ＥＧＡ）を使用して実施した。カラムを、１ｍＬ メタノール、続いて１．９ｍＬ 平衡緩衝液（５０ｍＭ 酢酸アンモニウム、２ｍＭ アジ化ナトリウム、ｐＨ５．５）で馴化させた。試料をカラムにローディングし、１．５ｍＬの洗浄緩衝液（５０％アセトニトリル中、５０ｍＭ 酢酸アンモニウム、ｐＨ５．５）で三回洗浄した。サンプルを０．６ｍＬ 溶出緩衝液（１０ｍＭ ＥＤＴＡ、１００ｍＭ 重炭酸アンモニウム、４０％アセトニトリル中、１０ｍＭ ＤＴＴ、および１０％ＴＨＦ、ｐＨ８．８）で溶出し、窒素流（４０℃で６５ｐｓｉ N_2、ＴｕｒｂｏＶａｐ、Ｂｉｏｔａｇｅ社）を使用して乾燥させた。ＳＰＥの後、サンプルを１２０μＬの水で再構成し、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）により、Ｔｈｅｒｍｏ ＱＥｘａｃｔｉｖｅ上で、質量分析（ＭＳ）検出と組み合わせた液体クロマトグラフィーを使用して分析した。サンプルを注入し（３０μＬ）、ＸＢｒｉｄｇｅ ＢＥＨ Ｃ８ ＸＰカラム（１３０Å、２．５μｍ、２．１×３０ｍｍ；Ｗａｔｅｒｓ社、カタログ番号１７６００２５５４）を使用して、０～６５％移動相Ｂの勾配（移動相Ａ：１６ｍＭトリエチルアミン、２００ｍＭヘキサフルオロイソプロパノール；移動相Ｂ：メタノール）、８０℃、１ｍＬ／分の流量、６．２分間にわたって分離した。ＥＳＩ源は、フルスキャンのネガティブイオンモードにおいて、スプレー電圧＝２８００Ｖ、シースガス流＝６５単位、補助ガス流＝２０単位、スイープガス流＝４単位、キャピラリー温度＝３００℃、および補助ガスは３００℃に加熱、を使用して操作された。Ｐｒｏｍａｓｓソフトウェアを使用して、シグナルがデコンボリューションされた。観察された質量を代謝物にマッピングし、全鎖の割合として報告した。

【１１５４】

０、４、または２４時間インキュベーションした後、または対照としてＰＢＳで２４時間インキュベーションした後のラットＣＳＦにおける、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計ＡＭ－１８３～ＡＭ－１９０ の分解が観察された（図１１）。化合物を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析して、上述のようにリンカーの切断性を判定した。評価したすべてのヌクレオチドリンカーは、最大で２４時間までラットＣＳＦ中で安定的であったが、ＡＭ－１８５のＲＮＡリンカーは異なり、その大部分は、２４時間後に切断された（図１１）。

【１１５５】
上述のように、および図１２に示されるように、ラット脳ホモジネートにおける、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計ＡＭ－１８３～ＡＭ－１９０の２４時間のインキュベーション後に観察されたセンス鎖代謝物の性質をＭＳにより分析した。２’－ＯＭｅヌクレオチドリンカーを含有するＡＭ－１８４およびＡＭ－１８９は、これらの条件下で安定性を維持した。ＲＮＡリンカーまたはＤＮＡリンカーを有する残存ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡは、切断産物が３０～５０％、およびいくらかの鎖代謝物を示した（図１２）。
【１１５６】
実施例６：初期型ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計は、親ｓｉＲＮＡに類似して、ＣＳＦと血漿との間で長期的な分布を示し、血漿よりもＣＳＦ中において、約１０倍高い薬剤濃度を示した
初期型ＣＮＳ標的化ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計は、親ｓｉＲＮＡとして、ＳＯＤ１標的化ＡＤ－４０１８２４　ｓｉＲＮＡを採用した（図１３）。ＡＤ－４０１８２４　ｓｉＲＮＡのｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計は、各ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計において、二つの５’末端アンチセンスビニルリン酸基、二つのＣ$_{16}$親油性リガンド（各センス鎖の６位に存在する）、２０個の２’－フルオロ修飾ヌクレオチド（残りのｓｉＲＮＡヌクレオチドは２’－Ｏ－メチル修飾されている）、および１６個のホスホロチオエートを含んでいた。完全に対称な設計と比較して、ヌクレオチドリンカーを含む、範囲拡張されたリンカーが、本明細書に開示される例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計に利用可能であり、これは親ｓｉＲＮＡセンス鎖の３’末端から５’末端への結合を有する。本開示の初期型ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡに選択された特定のリンカー（図１４Ａ）には、以下が含まれた：トリヌクレオチドフルオロリンカー（ＧｆＡｆＵｆ）、サイトゾル切断設計として記載されており、「ＡＭ－１７８」ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計において使用される；トリヌクレオチドＤＮＡリンカー（ｄＧｄＡｄＴ）、脳脊髄液（ＣＳＦ）において部分的に切断されると予測される設計として記載され、「ＡＭ－１８１」ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計において使用される；および三重「Ｑ３１５」グルコースリンカー（図１４Ｂ）、エンドソーム内で切断されると予測され、「ＡＭ－１８２」ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計において使用される。様々な結合がされた「尾部（３’－末端）～頭部（５’－末端）」ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計が、ＣＮＳにおけるｓｉＲＮＡ成分の薬物動態（ＰＫ）および薬理（ＰＤ）に影響を与え得るかを決定するために、ラットコホートで髄腔（ＩＴ）投与（０．３ｍｇ）を、ｔ$_0$で実施し、ＰＫ分析のための血清採取（ステムループｑＰＣＲ）を、３０分、４時間、２４時間、７日、１４日、２１日、および２８日の時点で行った（合計で、１６５個の血清サンプルをＰＫ分析に使用した）。一方で、ＣＮＳ脳組織を、ＰＤ分析のために７日目および２８日目に採取した（合計で、３６０個の脳／末梢組織をＰＤ分析のために採取した）。
【１１５７】
フルオロ結合型「ＡＭ－１７８」ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計は、７日目および２８日目に全組織で同等のノックダウンを示した（図１５Ａおよび１５Ｂ）。ＤＮＡ結合型「ＡＭ－１８１」ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計も、７日目および２８日目に全組織で同等のノックダウンを示した（図１６Ａおよび１６Ｂ）。対照的に、三重「Ｑ３１５」結合型「ＡＭ－１８２」ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計は、７日目および２８日目に全組織で若干良好ではないノックダウンを示した（図１７Ａおよび１７Ｂ）。したがって、これらの初期型ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計については、７日目および２８日目に、親ｓｉＲＮＡと比較して同等または若干良好ではないレベルのノックダウンがＣＮＳ組織全体で観察された。ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計が、より持続可能なノックダウンを示し得るかを評価するために、より長期的な研究が必要であると考えられる。
【１１５８】
末端ＣＳＦにおける親ｓｉＲＮＡおよびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の送達レベルを、７日目および２８日目に評価した（図１８Ａおよび１８Ｂ。図１８Ｂは、図１８Ａと比較して以下の二匹の動物が除去されたチャートを示す：動物＃１１（７日目のＡＭ－１８１）および＃１９（２８日目のＡＤ－４０１８２４親ｓｉＲＮＡ）。また、動物＃３０、２８日

目のＡＭ－１８２投与動物からＣＳＦは得られず、投与された剤のＣＳＦ濃度に有意差は観察されなかったことに留意されたい。血漿中の親ｓｉＲＮＡおよびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計の値も、７日目（図１９Ａおよび１９Ｂ。７日目にＡＭ－１８２の低値が観察されたが、図１９Ｂは、図１９Ａの分析から一匹の動物（＃１１、ＡＭ－１８１、７日目）を取り除いていることに留意する）および２８日目（図２０Ａおよび図２０Ｂ。２８日までの長期的な薬物動態において有意差は観察されなかったが、図２０Ｂは、図２０Ａの分析から一匹の動物（＃１９、ＡＤ－４０１８２４、２８日目）を取り除いていることに留意する）に分析された。

【１１５９】

ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ構築物のセンス鎖の定量も行われた。ｂｉｓ構造のみを評価するために、ｂｉｓ特異的なプライマーを設計した。当該プライマーは、ｂｉｓ構築物のヌクレオチドリンカー領域にアニーリングし、ｂｉｓ－センス鎖のみを増幅する。ｂｉｓ特異的プライマーはもちろん、ヌクレオチド結合構造（すなわち、ＡＭ－１７８およびＡＭ－１８１）でのみ作動可能であり、ＡＭ－１８２との適合性はない（グルコースリンカーは、当該プライマー設計との適合性がないため）。予想通り、ＡＤ－４０１８２４で増幅は観察されなかった。特に、ｂｉｓ－センス鎖の正確な定量は低シグナルであるため難しく、したがってセンス鎖と比較して切断されたｂｉｓ構築物の割合を決定する際には注意を払わなければならない。ＩＴ注射後、インタクトなＡＭ－１７８およびＡＭ－１８１　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡは、投与から３０分で血漿中にて検出された（図２１Ａ）。したがって、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計は、血漿への漏出を妨げなかった。一方、ＣＳＦ値（７日目および２８日目）およびその後の血漿の時点では、低シグナルのため、定量下限（ＬＬＯＱ）を下回った。ＡＭ－１８１よりもインタクトなＡＭ－１７８が約三倍多い量で検出されたが、合計薬剤レベルは類似していた。かかる実験結果は、ＡＭ－１８１のＤＮＡリンカーの切断が早いことと一致していた（インビトロデータによる）。したがって、図２１Ａに提示されるデータは、投与から３０分後の血漿において：およそ１０～２０％のＡＭ－１７８（フルオロ）リンカーがインタクトなままであり、一方でＡＭ－１８１（ＤＮＡ）リンカーはおよそ３～６％がインタクトなままであったことを示す。

【１１６０】

ｂｉｓ－センス鎖の定量によって、インタクトなＡＭ－１７８が、７日目および２８日目のＣＳＦ中で検出されたが、ＡＭ－１８１は検出されなかったことも明らかになった（図２１Ｂ）。この結果は、ＡＭ－１８１のＤＮＡリンカーの切断が急速であることと一致しており、一方で、当該結果は、およそ２０％のＡＭ－１７８リンカー構築物が、７日目および２８日目にＣＳＦ中でインタクトなままであることも示している。

【１１６１】

親ｓｉＲＮＡ　ＡＤ－４０１８２４と、ｂｉｓ－ＳＯＤ１設計を比較した薬物動態（ＰＫ）分析を要約すると、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ設計は、ＣＳＦと血漿との間の長期的な分布に有意な影響を与えないことが特定された。投与から数時間以内では、親ｓｉＲＮＡ　ＡＤ－４０１８２４の血漿値が高いことが観察されたが、この初期に観察された差異は、投与から２４時間では無視できる程度であった。一方、７日目において、７日目の血漿中ではＡＭ－１８２の低値が観察されたが、これらの結果は２８日目では再現されなかった。特にこれらの結果は概して、いくつかの組織においてＡＭ－１８２の有効性が低下した結果と相関している。インタクトなＡＭ－１７８およびＡＭ－１８１　ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡは、投与後３０分で血漿中に検出されたが、これらの剤の濃度は、７日目および２８日目で血漿中よりもＣＳＦ中で約１０倍高かった。

【１１６２】

したがって、ＡＭ－１８１のＤＮＡリンカーは、ＡＭ－１７８のフルオロリンカーよりも急速に切断された可能性が高い。血漿（３０分）で、ＡＭ－１８１よりもおよそ3倍多い量のインタクトなＡＭ－１７８が観察された。一方、ＣＳＦではインタクトなＡＭ－１７８のみが検出された（ＡＭ－１８１の値はＬＬＯＱ未満であった）。血漿およびＣＳＦでも、インタクトなＡＭ－１７８と切断されたＡＭ－１７８が同じような比率で観察され

ており、この結果は、ｂｉｓ設計は、ＣＳＦにおいて、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡの保持に影響を与えないとの結論と一致した。

表１．核酸配列表現で使用されるヌクレオチド単量体の略語。

【表７】

略語	ヌクレオチド
A	アデノシン-3’-リン酸
Ab	ベータ-L-アデノシン-3’-リン酸
Abs	ベータ-L-アデノシン-3’-ホスホロチオエート
Af	2’-フルオロアデノシン-3’-ホスフェート
Afs	2’-フルオロアデノシン-3’-ホスホロチオエート
As	アデノシン-3’-ホスホロチオエート
C	シチジン-3’-リン酸
Cb	ベータ-L-シチジン-3’-リン酸
Cbs	ベータ-L-シチジン-3’-ホスホロチオエート
Cf	2’-フルオロシチジン-3’-ホスフェート
Cfs	2’-フルオロシチジン-3’-ホスホロチオエート
Cs	シチジン-3’-ホスホロチオエート
G	グアノシン-3’-リン酸
Gb	ベータ-L-グアノシン-3’-リン酸
Gbs	ベータ-L-グアノシン-3’-ホスホロチオエート
Gf	2’-フルオログアノシン-3’-ホスフェート
Gfs	2’-フルオログアノシン-3’-ホスホロチオエート
Gs	グアノシン-3’-ホスホロチオエート
T	5’-メチルウリジン-3’-ホスフェート
Tf	2’-フルオロ-5-メチルウリジン-3’-ホスフェート
Tfs	2’-フルオロ-5-メチルウリジン-3’-ホスホロチオエート
Ts	5-メチルウリジン-3’-ホスホロチオエート
U	ウリジン-3’-ホスフェート
Uf	2’-フルオロウリジン-3’-ホスフェート
Ufs	2’-フルオロウリジン-3’-ホスホロチオエート
Us	ウリジン-3’-ホスホロチオエート
N	修飾または未修飾の任意のヌクレオチド
a	2’-O-メチルアデノシン-3’-ホスフェート
as	2’-O-メチルアデノシン-3’-ホスホロチオエート
c	2’-O-メチルシチジン-3’-ホスフェート
cs	2’-O-メチルシチジン-3’-ホスホロチオエート
g	2’-O-メチルグアノシン-3’-ホスフェート
gs	2’-O-メチルグアノシン-3’-ホスホロチオエート
t	2’-O-メチル-5-メチルウリジン-3’-ホスフェート
ts	2’-O-メチル-5-メチルウリジン-3’-ホスホロチオエート
u	2’-O-メチルウリジン-3’-ホスフェート
us	2’-O-メチルウリジン-3’-ホスホロチオエート
s	ホスホロチオエート結合
(Agn)	アデノシン-グリコール核酸(GNA)
(Cgn)	シチジン-グリコール核酸(GNA)
(Ggn)	グアノシン-グリコール核酸(GNA)
(Tgn)	チミジン-グリコール核酸(GNA)S-異性体
P	ホスフェート
VP	5’-(E)-ビニルホスホネート
(Aam)	2’-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3’-ホスフェート
(Aams)	2’-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3’-ホスホロチオエート
(Gam)	2’-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3’-ホスフェート

【表８】

略語	ヌクレオチド
(Gams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3'-ホスホロチオエート
(Tam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-ホスフェート
(Tams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-ホスホロチオエート
dA	2'-デオキシアデノシン-3'-リン酸
dAs	2'-デオキシアデノシン-3'-ホスホロチオエート
dC	2'-デオキシシチジン-3'-リン酸
dCs	2'-デオキシシチジン-3'-ホスホロチオエート
dG	2'-デオキシグアノシン-3'-リン酸
dGs	2'-デオキシグアノシン-3'-ホスホロチオエート
dT	2'-デオキシチミジン-3'-リン酸
dTs	2'-デオキシチミジン-3'-ホスホロチオエート
dU	2'-デオキシウリジン
dUs	2`-デオキシウリジン-3`-ホスホロチオエート
(Aeo)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-ホスフェート
(Aeos)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
(Geo)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-ホスフェート
(Geos)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-ホスホロチオエート
(Teo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-ホスフェート
(Teos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
(m5Ceo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-ホスフェート
(m5Ceos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
(A3m)	3'-O-メチルアデノシン-2'-ホスフェート
(A3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルアデノシン-2'-ホスフェート
(G3m)	3'-O-メチルグアノシン-2'-ホスフェート
(G3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルグアノシン-2'-ホスフェート
(C3m)	3'-O-メチルシチジン-2'-ホスフェート
(C3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルシチジン-2'-ホスフェート
(U3m)	3'-O-メチルウリジン-2'-ホスフェート
(U3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルウリジン-2'-ホスフェート
(m5Cam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-ホスフェート
(m5Cams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
(Ahd)	2'-O-ヘキサデシル-アデノシン-3'-リン酸
(Ahds)	2'-O-ヘキサデシル-アデノシン-3'-ホスホロチオエート
(Ghd)	2'-O-ヘキサデシル-グアノシン-3'-リン酸
(Ghds)	2'-O-ヘキサデシル-グアノシン-3'-ホスホロチオエート
(Chd)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸
(Chds)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-ホスホロチオエート
(Uhd)	2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-リン酸
(Uhds)	2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-ホスホロチオエート
(pshe)	ヒドロキシエチルホスホロチオエート

【１１６３】

これら単量体は、オリゴヌクレオチド中に存在するとき、５’－３’－ホスホジエステル結合によって相互に結合されることが理解される。またヌクレオチドが２’－フルオロ修飾を含有する場合、当該フルオロは、親ヌクレオチド中のその位置にあるヒドロキシを置換する（すなわち、２’－デオキシ－２’－フルオロヌクレオチドである）ことも理解されるであろう。

表２：ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡおよびそれらの対照（ヌクレオチド修飾を含む）のために合成された一本鎖の配列

【表９】

標的	二本鎖ID	配列ID	鎖(S/AS)	配列5’～3’	配列番号
SOD1	AD-413709	A-555737	S	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	13
SOD1	AD-413709	A-637451	AS	VPuUfuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	14
CTNNB1	AD-320650	A-637448	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasa	15
CTNNB1	AD-320650	A-141362	AS	VPuUfucgAfaUfCfaaucCfaAfcaguasgsc	16
CTNNB1/SOD1	AM-183	A-2221110.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasadTdTdTcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	17
CTNNB1/SOD1	AM-184	A-2221111.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasauuucsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	18
CTNNB1/SOD1	AM-185	A-2221112.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasaUUUcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	19
CTNNB1/SOD1	AM-186	A-2221113.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasaUfUfUfcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	20
CTNNB1/SOD1	AM-187	A-2112117.1	S	usascuguUfgGfAfUfugauucgasasadTdTdTcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	21
SOD1/CTNNB1	AM-188	A-2112118.1	S	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasadTdTdTusascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasa	22
SOD1/CTNNB1	AM-189	A-2112119.1	S	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasauuuusascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasa	23
CTNNB1/SOD1	AM-190	A-2112130.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasadTdTdTcsasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	24
対照	AD-77748	A-110415	S	dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	25
対照	AD-77748	A-156352	AS	dAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdA	26

表３：ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡおよびそれらの対照（ヌクレオチド修飾を含まない）のために合成された一本鎖の配列

【表１０】

標的	二本鎖ID	配列ID	鎖(S/AS)	配列5’～3’	配列番号
SOD1	AD-413709	A-555737	S	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	1
SOD1	AD-413709	A-637451	AS	UUUAGAGUGAGGAUUAAAAUGAG	2
CTNNB1	AD-320650	A-637448	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAA	3
CTNNB1	AD-320650	A-141362	AS	UUUCGAAUCAAUCCAACAGUAGC	4
CTNNB1/SOD1	AM-183	A-2221110.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAATTTCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	5
CTNNB1/SOD1	AM-184	A-2221111.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAAUUUCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	6
CTNNB1/SOD1	AM-185	A-2221112.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAAUUUCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	7
CTNNB1/SOD1	AM-186	A-2221113.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAAUUUCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	8
CTNNB1/SOD1	AM-187	A-2112117.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAATTTCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	9
SOD1/CTNNB1	AM-188	A-2112118.1	S	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAATTTUACUGUUGGAUUGAUUCGAAA	10
SOD1/CTNNB1	AM-189	A-2112119.1	S	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAAUUUUACUGUUGGAUUGAUUCGAAA	11
CTNNB1/SOD1	AM-190	A-2112130.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAATTTCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	12
対照	AD-77748	A-110415	S	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	27
対照	AD-77748	A-156352	AS	AAAAAAAAAAAAAAAAAAA	28

表４：親ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ配列

【表１１】

二本鎖ID	オリゴID	鎖	標的	オリゴ配列(5’～3’)	配列番号	トランス配列(5’～3’)	配列番号
AD-401824	A-637448	センス	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	29	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	30
	A-444402	アンチセンス	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	31	UUUAGAGUGAGGAUUAAAAUGAG	32

表５：実施例６のｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ配列

【表１２】

複数標的分子の名称	鎖	標的	配列	配列番号
AM-178	センス	SOD1/SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasaGfAfUfcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	33
AM-181	センス	SOD1/SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasadGdAdTcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	34
AM-182	センス	SOD1/SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasaQ315Q315Q315csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	35

【１１６４】

実施例７：ヌクレオチドリンカーにより結合された個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）を有するｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体のマウスにおけるノックダウンの評価

複数の「ｂｉｓ」（二重標的化）ｓｉＲＮＡ複合体は、過去にＰＣＴ出願番号　ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４２４９８において過去に記載された合成方法を使用して作製された。「ｂｉｓ」ｓｉＲＮＡ複合体を、ＣＴＮＮＢ１およびＳＯＤ１の核酸標的の同時（およびエフェクター分子濃度に関して化学量論的に同等な）阻害を目的に設計した（図１Ａおよび２Ａ～２Ｃ）。各ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体は、連続的なセンス鎖と、二つの別個の独立した一本鎖アンチセンス配列を含み、当該連続的なセンス鎖は、第一の標的核酸（ＣＴＮＮＢ１またはＳＯＤ１　ｍＲＮＡ）内のセンス鎖配列、および第二の標的核酸（ＣＴＮＮＢ１またはＳＯＤ１　ｍＲＮＡのうちの他方）内のセンス鎖配列をそれぞれ含み、個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）の各センス鎖は、三ヌクレオチドの長さ（現状での例示として）のヌクレオチドリンカーにより結合され、ならびに当該二つの別個の独立した一本鎖アンチセンス鎖は、第一の標的核酸と第二の標的核酸をそれぞれ標的とし、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（図２Ｄ）の連続的なセンス鎖の相補的なセンス鎖配列にアニーリングしている。例としてのｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（複数標的分子）を図３Ａに示す。

【１１６５】

これらのｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の配列、化学パターン、およびリンカーも、表２～５に列挙される。

【１１６６】

各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（または混合二本鎖対照）の有効性および組織分布を、Ｃ５７／ＢＩ６マウスの中枢神経系および末梢において評価した。イソフルランを麻酔として使用して、２５μｌのハミルトンシリンジを備えた３．５ｍｍのカスタム針を使用して、マウスの脳の右側脳室に単回ＩＣＶ投与を行った。混合二本鎖対照においては、５μｌ当たり５０μｇの各二本鎖を投与した。５μｌ当たり１００μｇの各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体

が投与された。すべての注射は、同じ管理者によって実施された。被験化合物当たり、少なくとも４匹の動物を使用した。動物は、投与後２１日目に安楽死させた。ＣＴＮＮＢ１およびＳＯＤ１の阻害を、脳の右半球および左半球、小脳、脳幹、および肝臓において評価した。

【１１６７】

図２Ａおよび図２２Ａ～２２Ｂに一覧にされるように、様々なセンス鎖結合ヌクレオチドリンカーを有する、C_{16}修飾ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ分子およびC_{16}修飾ＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを使用して構築されたｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体による標的のｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１のノックダウンを、マウスで中枢神経系において評価した。標的ｍＲＮＡノックダウンレベルは、混合二本鎖送達（図２Ａおよび表２に示される、ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４１３７０９のｓｉＲＮＡ、およびＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－３２０６５０のｓｉＲＮＡの混合物）とも比較された。ノックダウン評価のために採取された組織は、脳の右半球、脳の左半球、小脳、および脳幹であった。

【１１６８】

結果を図２２Ｃ～２２Ｆに要約する。

【１１６９】

図２２Ｃは、投与された個々の各マウスについて、指定される各組織において、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを１００μｇＩＣＶ注射した後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を示す。図２２Ｃに示されるように、混合二本鎖および他のｂｉｓ－ｓｉＲＮＡリンカーの両方と比較して、ＣＮＳにおけるＳＯＤ１とＣＴＮＮＢ１の両方の阻害について観察された最も効果的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡリンカー構築物は、ｄＴｄＴｄＴ結合型ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１８３）と特定された。これは、検証された全ての脳組織で、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方で約５０％以上の阻害を示した。

【１１７０】

図２２Ｄは、一部のＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（ＡＭ－１８３、ＡＭ－１８４、ＡＭ－１８５、およびＡＭ－１８６）と、混合二本鎖送達（ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４１３７０９のｓｉＲＮＡ、ＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－３２０６５０のｓｉＲＮＡの混合物）を比較した、より詳細な図を示す。図２２Ｄは、ヌクレオチド－リンカー構築物（例えば、ｄＴｄＴｄＴ、ｕｕｕ、ＵＵＵ、ＵｆＵｆＵｆ）を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡが、混合二本鎖と比較して、検証されたすべての脳組織で、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方について、より優れた阻害、または少なくとも同等の阻害をもたらしたことを示す。図２２Ｄからも、混合二本鎖および他のｂｉｓ－ｓｉＲＮＡリンカーの両方と比較して、ＣＮＳにおけるＳＯＤ１とＣＴＮＮＢ１の両方の阻害について観察された最も効果的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡリンカー構築物は、ｄＴｄＴｄＴ結合型ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１８３）と特定されたことが確認される。これは、検証された全ての脳組織で、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方で約５０％以上の阻害を示した。

【１１７１】

図２２Ｅは、指定される各組織において、マウスでの１００μｇＩＣＶ注射後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合の結果をそれぞれ示したものであり、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ（ＳＯＤ１－Ｃ１６）またはＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ（ＣＴＮＮＢ１－Ｃ１６）で一つのC_{16}修飾を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体と、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡとＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡの両方で二つのC_{16}修飾を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（２Ｃ１６またはＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６））、および混合二本鎖送達（ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４１３７０９のｓｉＲＮＡ、およびＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－３２０６５０のｓｉＲＮＡの混合物）とを比較している。図２２Ｅに示されるように、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ（ＳＯＤ１－Ｃ１６

）またはＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ（ＣＴＮＮＢ１－Ｃ１６）のいずれかに一つのＣ１６修飾を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を使用した場合、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体はいずれも検証された脳組織のすべてにおいて阻害効果を示さなかった。これらの結果は、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡおよびＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ（２Ｃ１６またはＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６））の両方に二つのC_{16}修飾を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体が、インビボでＣＮＳ組織において観察された阻害効果とは著しく対照的であった。

【１１７２】

図２２Ｆは、指定される各組織において、マウスでの１００μｇＩＣＶ注射後、２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合の結果をそれぞれ示したものであり、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体内の各ｓｉＲＮＡエフェクターの位置を変えて、様々なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（図２Ａおよび表２に示される、ＡＭ－１８３、ＡＭ－１８４、ＡＭ－１８８、およびＡＭ－１８９）を比較している。ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（特に、ＤＮＡリンカーｄＴｄＴｄＴを有するもの）で観察された安定的なｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１の阻害活性とは対照的に、対応するＳＯＤ１（Ｃ１６）－ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体は、ｍＳＯＤ１標的ｍＲＮＡとｍＣＴＮＮＢ１標的ｍＲＮＡの両方に対して、阻害効果の低下を示した。

【１１７３】

上記に検討ものと同じｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体を使用し、マウスの肝臓におけるｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体による標的ｍＳＯＤ１および標的ｍＣＴＮＮＢ１のノックダウンも評価され、ＣＮＳにおけるノックダウンとの比較を行った。図２２Ｇに結果が要約されており、投与された個々の各マウスについて、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを１００μｇＩＣＶ注射した後、肝臓において２１日目に残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を４匹の動物のコホートについて示している。ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（図２２Ｃ～２２Ｆ）で、インビボでＣＮＳ組織において観察された阻害効果と比較し、同じｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体で検証された肝臓組織では、相対的に最小の阻害効果が観察された。

【１１７４】

実施例８Ａ：炭水化物系リンカーにより結合された個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）を有するｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体のマウスにおけるノックダウンを、ヌクレオチドリンカーと比較した評価

本実施例で使用される「ｂｉｓ」（二重標的化）ｓｉＲＮＡ複合体の作製および設計は、上述の実施例７に記載されるものとほぼ同じであるが、本実施例では、個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）の各センス鎖を結合するリンカーは、炭水化物系のリンカーであり、実施例７で使用されたヌクレオチドリンカーと比較した。本実施例は、炭水化物系リンカーによって結合された各ｓｉＲＮＡエフェクター分子のセンス鎖を有する例示的なＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子を、ヌクレオチド系リンカーによって結合された各ｓｉＲＮＡエフェクター分子のセンス鎖を有する分子と比較する。

【１１７５】

これらのｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の配列、化学パターン、およびリンカーは、図２３Ａ～２３Ｃに示される。

【１１７６】

各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（または混合二本鎖対照）の有効性および組織分布を、Ｃ５７／ＢＩ６マウスの中枢神経系および末梢において評価した。マウスの脳に単回ＩＣＶ投与を行った。混合二本鎖対照においては、５μｌ当たり５０μｇの各二本鎖が投与された。５μｌ当たり１００μｇの各ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体が投与された。被験化合物当たり、少なくとも４匹の動物を使用した。動物は、投与後２１日目に安楽死させた。ＣＴＮＮＢ１およびＳＯＤ１の阻害を、脳、心臓、および肝臓で評価した。

【１１７７】

図２３Ａ～２３Ｃに一覧にされるように、様々なセンス鎖結合ヌクレオチドリンカーを有する、Ｃ$_{16}$修飾ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ分子およびＣ$_{16}$修飾ＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを使用して構築されたｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体による標的のｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１のノックダウンを、マウスで中枢神経系において評価した。標的ｍＲＮＡノックダウンのレベルは、混合二本鎖送達とも比較された。ノックダウン評価のために採取された組織は、脳、心臓、および肝臓であった。

【１１７８】

結果を図２３Ｄ～２３Ｅに要約する。

【１１７９】

図２３Ｄは、三－炭水化物リンカー（ＡＭ－２０３、ＡＭ２０４、ＡＭ２０５）を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を使用した場合の脳におけるＳＯＤ１とＣＴＮＮＢ１の割合を、三－ヌクレオチドリンカー（ＡＭ１８３、ＡＭ２０２）を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体、および混合二本鎖送達に対して比較している。図２３Ｄは、ＣＮＳにおいて、三－炭水化物リンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体が、三－ヌクレオチドリンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体と比較して、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方を同等に阻害したことを示す。

【１１８０】

図２３Ｅは、三－炭水化物リンカー（ＡＭ－２０３、ＡＭ２０４、ＡＭ２０５）を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を使用した場合の肝臓および心臓におけるＳＯＤ１とＣＴＮＮＢ１の割合を、三－ヌクレオチドリンカー（ＡＭ１８３、ＡＭ２０２）を有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体、および混合二本鎖送達に対して比較している。図２３Ｅは、心臓において、三－炭水化物リンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体が、三－ヌクレオチドリンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体と比較して、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方を同等に阻害したことを示す。図２３Ｅはまた、肝臓においては、三－炭水化物リンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体と、三－ヌクレオチドリンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体の両方が、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１のいずれに対しても有意な阻害効果がなかったことも示す。

【１１８１】

実施例８Ｂ：環状の環化センス鎖を含むヌクレオチド系リンカーにより結合された個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）を有するｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体のマウスにおけるノックダウンを、直鎖状センス鎖を含むヌクレオチドリンカーと比較した評価

図２３Ｄは、Ｃ１６リガンドを一つのみ含有する環化環状センス鎖を有するＡＭ－２０６が、約５０％のＫＤを有していることを示している。一方で図２２Ｅ示されるように、直鎖状のセンス鎖と一つのＣ１６を含有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡを有するＡＭ－１８７およびＡＭ－１９０では、ＫＤは低かった。

【１１８２】

実施例９：様々なリンカーにより結合され、様々な化学修飾を有する個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）を用いたｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の髄腔内（ＩＴ）投与による、ラットにおけるノックダウンの評価

本実施例で使用される「ｂｉｓ」（二重標的化）ｓｉＲＮＡ複合体の作製および設計は、上記の実施例８に記載されるものとほぼ同じであるが、本実施例では、各ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡの化学修飾は、様々な化学修飾を含有している。本実施例は、様々なリンカーにより結合される各ｓｉＲＮＡエフェクター分子センス鎖と、各ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡに化学修飾を有する例示的なＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子のノックダウンを、髄腔内注射を介してラットにおいて評価する。

【１１８３】

これらのｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の配列、化学パターン、およびリンカーは、図２４Ａ～２４Ｃに示される。

【１１８４】

各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（または混合二本鎖対照）の有効性および組織分布を、中枢神経

系で評価した。ラットに単回ＩＴ投与を行った。混合二本鎖対照においては、０．１５ｍｇの各二本鎖が投与された。０．３ｍｇの各ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体が投与された。被験化合物当たり、少なくとも４匹の動物を使用した。図２４Ａ～２４Ｃに一覧にされるように、様々なセンス鎖結合リンカーおよび化学修飾を有する、C_{16}修飾ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ分子およびC_{16}修飾ＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを使用して構築されたｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体による標的のｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１のノックダウンを、ラットで中枢神経系において評価した。標的ｍＲＮＡノックダウンのレベルは、混合二本鎖送達とも比較された。ノックダウン評価のために採取された組織は、胸髄、前頭葉、海馬、および線条体であった。

【１１８５】

結果を、図２４Ｄに要約する。

【１１８６】

図２４Ｄは、投与された個々の各マウスについて、ＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ分子（図２４Ａ～２４Ｃに示されるように、様々なリンカーが個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）の各センス鎖を結合し、およびｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ分子中に様々な化学修飾を含有する）のそれぞれの髄腔内（ＩＴ）投与（０．３ｍｇ）をt_0で行った後、指定される各組織（胸髄、前頭葉、海馬および線条体）において、４匹の動物のコホートについて、それぞれ１５日目および２９日目で残存するＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を示すものであり、混合二本鎖送達（図２３Ｃに示されるように、ＳＯＤ１を標的とするＡＤ－４０１８２４のｓｉＲＮＡと、ＣＴＴＮＢ１を標的とするＡＤ－５０３８０１のｓｉＲＮＡの混合物）に対して比較している。

【１１８７】

図２４Ｄ　は、様々な化学修飾を有し、様々なリンカーを有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体を使用することによって、様々なＣＮＳ組織（胸髄、前頭葉、海馬および線条体）におけるＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を比較している。図２４Ｄは、すべての例示的なｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体が、それぞれのＣＮＳ組織において、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方に対して同等の阻害であったことを示す。また図２４Ｄは、例示的なｂｉｓｓｉＲＮＡ複合体のすべてが、胸髄においてＳＯＤ１またはＣＴＮＮＢ１のいずれに対しても最も高い阻害効果を有するようであったこと、前頭葉、海馬および線条体では、ＳＯＤ１またはＣＴＮＮＢ１のいずれに対しても明白な阻害は観察されなかったことを示す。

【１１８８】

実施例１０：様々なリンカーにより結合された個々のエフェクター分子（ｓｉＲＮＡ）を含む、ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の髄腔内（ＩＴ）投与による、ラットにおけるノックダウンの評価

本実施例で使用される「ｂｉｓ」（二重標的化）ｓｉＲＮＡ複合体の作製および設計は、上記の実施例８に記載されるものとほぼ同じであるが、各ｓｉＲＮＡエフェクター分子のセンス鎖に対して様々なリンカーが使用されている。本実施例は、様々なリンカーにより結合される各ｓｉＲＮＡエフェクター分子のセンス鎖を有する例示的なＣＴＮＮＢ１（Ｃ１６）－ＳＯＤ１（Ｃ１６）ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複数標的分子のノックダウンを、ＩＴ注射を介してラットにおいて評価する。

【１１８９】

これらのｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体の配列、化学パターン、およびリンカーは、図２５Ａ～２５Ｃに示される。

【１１９０】

各ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ（または混合二本鎖対照）の有効性および組織分布を、中枢神経系で評価した。ラットに単回ＩＴ投与を行った。混合二本鎖対照においては、０．３ｍｇの各二本鎖が投与された。０．６ｍｇの各ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体が投与された。被験化合物当たり、少なくとも４匹の動物を使用した。図２５Ａ～２５Ｃに一覧にされるように、様々なセンス鎖結合リンカーを有する、C_{16}修飾ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ分子およびC_{16}修飾ＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡ分子のそれぞれを使用して構築されたｂｉ

ｓ－ｓｉＲＮＡ複合体による標的のｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１のノックダウンを、ラットで中枢神経系において評価した。標的ｍＲＮＡノックダウンのレベルは、混合二本鎖送達とも比較された。ノックダウン評価のために採取された組織は、胸髄、小脳、前頭葉、海馬、および線条体であった。

【１１９１】

結果を、図２５Ｄに要約する。図２５Ｄ は、様々なリンカーを有するｂｉｓ ｓｉＲＮＡ複合体を使用することによって、様々なＣＮＳ組織（胸髄、小脳、前頭葉、海馬および線条体）におけるＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の割合を比較している。図２５Ｄは、すべての例示的なｂｉｓ ｓｉＲＮＡ複合体が、それぞれのＣＮＳ組織において、ＳＯＤ１およびＣＴＮＮＢ１の両方に対して同等の阻害であったことを示す。また図２５Ｄは、すべての例示的なｂｉｓ ｓｉＲＮＡ複合体が、胸髄において、ＳＯＤ１またはＣＴＮＮＢ１のいずれに対しても最も高い阻害効果を有するようであったこと、すべての例示的なｂｉｓ ｓｉＲＮＡ複合体が、小脳において、ＳＯＤ１またはＣＴＮＮＢ１のいずれに対しても有意な阻害効果を有するようであったこと、を示す。図２４Ｄと比較して、用量は０．３ｍｇ（図２４Ｄ）から０．６ｍｇ（図２５Ｄ）に増加している。この用量増加によって、前頭葉および海馬では、ＳＯＤ１またはＣＴＮＮＢ１のいずれに対しても阻害が改善されたようである。線条体では、０．６ｍｇでの用量増加があっても、ＳＯＤ１またはＣＴＮＮＢ１のいずれに対しても明白な阻害は観察されなかった。

【１１９２】

実施例１１：ラット脳ホモジネートにおけるｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体のオリゴヌクレオチド安定性／代謝の分析

ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡの安定性を、メスのＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットの全脳組織（ＢｉｏＩＶＴ社、カタログ番号Ｓ０５９６６）から調製され、３ｍＬ緩衝液（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ＨＣｌ、１％ ＮＰ－４０、１４０ｍＭ ＮａＣｌ。ｃＯｍｐｌｅｔｅ ＥＤＴＡ－ｆｒｅｅ Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ社、カタログ番号１１８３６１７０００１）、ｐＨ７．４を含む）当たり１ｇの組織として製剤化されたカスタムプレミアム製剤において評価した。代謝を高精度高分解能質量分析を介して分析した。ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（約８μＭ）を、１：５０の比率で脳とともに０時間または２４時間インキュベートした。混合物を、４５０μＬの溶解緩衝液（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社、カタログ番号ＡＬ０－８５７９）を用いて希釈し、固相抽出（ＳＰＥ）を、ＥｘｔｒａＨｅｒａ（Ｂｉｏｔａｇｅ社）装置により促進された陽圧下で、Ｃｌａｒｉｔｙ ＯＴＸ固相抽出プレート（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社、カタログ番号８Ｅ－Ｓ１０３－ＥＧＡ）を使用して実施した。カラムを、１ｍＬ メタノール、続いて１．９ｍＬ 平衡緩衝液（５０ｍＭ 酢酸アンモニウム、２ｍＭ アジ化ナトリウム、ｐＨ５．５）で馴化させた。試料をカラムにローディングし、１．５ｍＬの洗浄緩衝液（５０％アセトニトリル中、５０ｍＭ 酢酸アンモニウム、ｐＨ５．５）で三回洗浄した。サンプルを０．６ｍＬ 溶出緩衝液（１０ｍＭ ＥＤＴＡ、１００ｍＭ 重炭酸アンモニウム、４０％アセトニトリル中、１０ｍＭ ＤＴＴ、および１０％ＴＨＦ、ｐＨ８．８）で溶出し、窒素流（４０℃で６５ｐｓｉ N_2、ＴｕｒｂｏＶａｐ、Ｂｉｏｔａｇｅ社）を使用して乾燥させた。ＳＰＥの後、サンプルを１２０μＬの水で再構成し、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）により、Ｔｈｅｒｍｏ ＱＥｘａｃｔｉｖｅ上で、質量分析（ＭＳ）検出と組み合わせた液体クロマトグラフィーを使用して分析した。サンプルを注入し（３０μＬ）、ＸＢｒｉｄｇｅ ＢＥＨ Ｃ８ ＸＰカラム（１３０Å、２．５μｍ、２．１×３０ｍｍ；Ｗａｔｅｒｓ社、カタログ番号１７６００２５５４）を使用して、０～６５％移動相Ｂの勾配（移動相Ａ：１６ｍＭトリエチルアミン、２００ｍＭヘキサフルオロイソプロパノール；移動相Ｂ：メタノール）、８０℃、１ｍＬ／分の流量、６．２分間にわたって分離した。ＥＳＩ源は、フルスキャンのネガティブイオンモードにおいて、スプレー電圧＝２８００Ｖ、シースガス流＝６５単位、補助ガス流＝２０単位、スイープガス流＝４単位、キャピラリー温度＝３００℃、および補助ガスは３００℃に加熱、を使用して操作された。Ｐｒｏｍａｓｓソフトウェアを使用して、シグナルがデ

コンボリューションされた。観察された質量を代謝物にマッピングし、全鎖の割合として報告した。

【１１９３】

ラット脳ホモジネートにおける、例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１８３～ＡＭ－１８６）の様々なリンカー化学物質のインビトロ安定性を評価し、比較した。結果を図２６Ａに要約する。ラット脳ホモジネートにおける、例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１８３、ＡＭ－１８４、ＡＭ－１８８、およびＡＭ－１８９）での方向性に関するインビトロ安定性を評価し、比較した。結果を図２６Ｂに要約する。ラット脳ホモジネートにおける、ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡまたはＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡで一つのC_{16}修飾を保有する例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ（ＡＭ－１９０およびＡＭ－１８７）のインビトロ安定性、およびＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡとＣＴＮＮＢ１標的化ｓｉＲＮＡの両方で二つのC_{16}修飾を保有するｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ複合体（ＡＭ－１８３）のインビトロ安定性を、評価および比較し、さらに二本鎖混合物（ＡＤ－３２０６５０およびＡＤ－４１３７０９）に対しても比較した。結果を図２６Ｃに要約する。

【１１９４】

ラット脳ホモジネートにおける、ＣＮＳ標的化（ＡＭ－１８３、ＡＭ－２０２、ＡＭ－２０３、ＡＭ－２０４、ＡＭ－２０５およびＡＭ－２０６）および肝臓標的化（ＡＭ－１９１、ＡＭ－２０７、ＡＭ－２０８、ＡＭ－２０９、ＡＭ－２１０およびＡＭ－２１１）を目的にした例示的なｂｉｓ－ｓｉＲＮＡの代謝傾向を評価し、比較した。結果を図２６Ｄに要約する。

【１１９５】

実施例１２：ｂｉｓ低分子干渉ＲＮＡ（ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡ）、およびｂｉｓ低分子環状干渉ＲＮＡ（ｂｉｓ　ｓｃｉＲＮＡ）コンジュゲートの合成、ならびにインビトロおよびインビボでの遺伝子サイレンシング

<u>オリゴヌクレオチドの合成</u>

オリゴヌクレオチドを、以下の市販のＲＮＡアミダイトを使用して、Ｂｉｏａｕｔｏｍａｔｉｏｎ　Ｍｅｒｍａｄｅ　１２合成装置上で合成した：標準的な固相オリゴヌクレオチド合成プロトコルを使用した、ウリジンの５’－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２’－デオキシ－２’－フルオロ－、および５’－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２’－Ｏ－メチル－　３’－Ｏ－（２－シアノエチル－Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）ホスホロダミダイト単量体、４－Ｎ－アセチルシチジン、６－Ｎ－ベンゾイルアデノシン、ならびに２－Ｎ－イソブチリルグアノシン。２’－Ｃ１６リガンドを、ホスホジエステル結合によってｓｉＲＮＡに共有結合した。ホスホロチオエート結合を、ピリジンにおいて、０．１Ｍの３－（（Ｎ，Ｎ－ジメチル－アミノメチリデン）アミノ）－３Ｈ－１，２，４－ジチアゾール－５－チオン（ＤＤＴＴ）を利用した亜リン酸結合の硫化によって導入した。

【１１９６】

合成後、支持体をカラム上で０．５Ｍピペリジンのアセトニトリル（ＡＣＮ）溶液で１５分間処理した。カラムをＡＣＮで洗浄し、次いで再度０．５Ｍピペリジンのアセトニトリル溶液でさらに１５分間処理し、再度ＡＣＮで洗浄した。支持体を真空下で乾燥させ、密封可能な容器に入れ、水酸化アンモニウム（２８～３０％）のエタノール（２：１）溶液中で、３５℃で一晩、振とうしながら加熱した。５ｘ体積の水で支持体を除去するためにオリゴヌクレオチドを濾過し、ＬＣ－ＭＳおよびイオン交換ＨＰＬＣによって分析した。

【１１９７】

脱保護および大雑把な品質確認の後、イオン交換ＨＰＬＣ精製を行った。精製緩衝液Ａは、２０ｍＭのリン酸ナトリウム、１５％のＡＣＮ、ｐＨ８．５から構成された。緩衝液Ｂは同じ組成であるが、１Ｍの臭化ナトリウムが添加された。ＴＳＫｇｅｌ　ＳｕｐｅｒＱ－５ＰＷ（２０）アニオン交換樹脂（Ｔｏｓｏｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、００１８５４６）を精製に使用し、約２０カラム体積で、１５％～４５％の一般的な精製勾配を適用した。Ｄｉｏｎｅｘ　ＤＮＡＰａｃ　ＰＡ２００イオン交換分析カラム、４ｍｍ　ｘ

２５０ｍｍ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社、０６３０００）を使用したイオン交換分析によって、画分を室温で分析した。緩衝液Ａは、２０ｍＭのリン酸ナトリウム、１５％アセトニトリル、ｐＨ１２から構成された。緩衝液Ｂも同一であるが、１Ｍの臭化ナトリウムが添加された。１ｍＬ／分の流速で１２分間にわたり、３０％～５０％の勾配を使用して、画分を分析した。純度８５％を超える画分をプールし、濃縮して、１０ｍＬ／分の流量で、サイズ排除カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社、１７－５０８７－０１）で脱塩した。

【１１９８】

オリゴヌクレオチドは、ＭｅｒＭａｄｅ－１２　ＤＮＡ／ＲＮＡ合成装置上で合成した。Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社のＳｔｅｒｌｉｎｇ溶媒／試薬、５００－Å制御細孔ガラス（ＣＰＧ）固形支持体（Ｐｒｉｍｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ社）、２’－デオキシ３’－ホスホロアミダイト（Ｔｈｅｒｍｏ社）、および２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）、２’－デオキシ－２’－フルオロ（２’－Ｆ）リボヌクレオシド　３’－ホスホロアミダイト（Ｈｏｎｇｅｎｅ社）は全て受領した状態のままで使用した。２’－ＯＭｅ－ウリジン－５’－ｂｉｓ－ＰＯＭ－（Ｅ）ビニルホスホネート（ＶＰ）３’－ホスホロアミダイト（Ｐａｒｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｆａｃｉｌｅ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ｇｅｏｍｅｔｒｙ，ａｎｄ　２’－ｓｕｂｓｔｉｔｕｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｏｆ　５’－（Ｅ）－　ａｎｄ　５’－（Ｚ）－ｖｉｎｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｓｉＲＮＡ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，６１：７３４－４４（２０１８）に記載される手順に従い合成された。当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を、８５％アセトニトリル１５％ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中、０．１５Ｍに溶解し、合成装置上で標準条件を使用してカップリングさせた。ＧａｌＮＡｃ　ＣＰＧ支持体（Ｌ、スキームＩ）を、Ｎａｉｒ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ　Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｓｉＲＮＡ　ｌｏｃａｌｉｚｅｓ　ｉｎ　ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ　ａｎｄ　ｅｌｉｃｉｔｓ　ｒｏｂｕｓｔ　ＲＮＡｉ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｇｅｎｅ　ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３６：１６９５８－６１（２０１４）に記載される通りに作製し、使用し、当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。５－ブロモヘキシルホスホロアミダイト（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社、カタログ番号１０－１９４６）を、アセトニトリル中、０．１５Ｍに溶解し、合成装置上で標準条件を使用してカップリングした。３’－アルキンＣＰＧ支持体および３’－アルキンヒドロキシプロリノールホスホロアミダイト（Ｙ、スキームＩ）を、Ｊａｙａｐｒａｋａｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｎｏｎ－ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ　ｂｕｉｌｄｉｎｇ　ｂｌｏｃｋｓ　ｆｏｒ　ｃｏｐｐｅｒ－ａｓｓｉｓｔｅｄ　ａｎｄ　ｃｏｐｐｅｒ－ｆｒｅｅ　ｃｌｉｃｋ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｏｆ　ＲＮＡ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．，１２：５４１０－１３（２０１０）に記載される通りに作製し、使用した。当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。２’－プロパルギルアデノシンホスホロアミダイトは市販されており、ｕｎｉｖｅｒｓａｌ　Ｕｎｙｌｉｎｋｅｒ　ＣＰＧ支持体とともに受領した状態のままに使用した。低含水アセトニトリルを、ＥＭＤ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓから購入した。装置に備えられたものに基づく改変合成サイクルを使用して、ＤＮＡオリゴヌクレオチドおよびＲＮＡオリゴヌクレオチドを合成した。０．６Ｍの５－（Ｓ－エチルチオ）－１Ｈ－テトラゾールのアセトニトリル溶液を、活性化物質として使用した。ホスホロアミダイト溶液は、２’－ＯＭｅウリジンおよびシチジンに対する共溶媒として１５％ＤＭＦを含み、無水アセトニトリル中、０．１５Ｍとした。酸化試薬は、ＴＨＦ／ピリジン／水中、０．０２Ｍ　I_2とした。Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ’－（３－チオキソ－３Ｈ－１，２，４－ジチアゾール－５－イル）メタンイミドアミド（ＤＤＴＴ）、ピリジン中、０．０９Ｍを硫化試薬として使用した。脱トリチル化試薬は、ジクロロメタン（ＤＣＭ）中、３％ジクロロ酢酸（ＤＣＡ）とした。

【１１９９】

固相合成（ＳＰＳ）の完了後、ＣＰＧ固形支持体を、各流れの後に５分間保持しながら、無水アセトニトリル中、５％（ｖ／ｖ）ピペリジンで三回洗浄した。次いで、支持体を無水アセトニトリルで洗浄し、アルゴンで乾燥させた。次いで、オリゴヌクレオチドを、２８～３０％（ｗ／ｖ）NH_4OHと共に３５℃で２０時間インキュベートした。ＶＰ含有オリゴヌクレオチドについては、ＳＰＳの完了後、ＣＰＧ固形支持体を、２８～３０％（ｗ／ｖ）のNH_4OHと共にインキュベートし、５％（ｖ／ｖ）のジエチルアミンを３５℃で２０時間添加した（Ｏ’Ｓｈｅａ ｅｔ ａｌ．，“Ａｎ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｄｅｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ５’－［Ｏ，Ｏ－ｂｉｓ（ｐｉｖａｌｏｙｌｏｘｙｍｅｔｈｙｌ）］－（Ｅ）－ｖｉｎｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，”Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，７４：６１８２－８６（２０１８）を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）。溶媒を濾過により収集し、支持体を水ですすぎ、その後に分析した。約１OD_{260}単位／ｍＬのオリゴヌクレオチド溶液を粗生成物の分析に使用した。３０～５０μＬの溶液を注入した。ＬＣ／ＥＳＩ－ＭＳを、ＸＢｒｉｄｇｅ Ｃ８カラム（２．１×５０ｍｍ、２．５μｍ）を６０℃で使用したＡｇｉｌｅｎｔ ６１３０単一四重極ＬＣ／ＭＳシステムで行った。緩衝液Ａは、２００ｍＭの１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（ＨＦＩＰ）および１６．３ｍＭのトリエチルアミン（ＴＥＡ）の水溶液からなり、緩衝液Ｂは１００％メタノールとした。１０分にわたり、緩衝液Ｂの０％～４０％の勾配として、続いて洗浄し、０．７０ｍＬ／分の流量で再較正を行った。カラム温度は７５℃とした。

【１２００】

全てのオリゴヌクレオチドは、Ｎａｉｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ｓｉＲＮＡ ｌｏｃａｌｉｚｅｓ ｉｎ ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ ａｎｄ ｅｌｉｃｉｔｓ ｒｏｂｕｓｔ ＲＮＡｉ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３６：１６９５８－６１（２０１４）に記載される手順を基にして精製および脱塩され、さらにアニーリングしてＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを形成し、当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。

【１２０１】

センス鎖オリゴヌクレオチドの環化、およびｓｃｉＲＮＡコンジュゲートの形成－環化オリゴヌクレオチドのための５’－アジドおよび「クリック」化学合成。

センス鎖を官能化するために、市販の５－ブロモヘキシルホスホロアミダイトを固相合成中に５’末端にカップリングさせた。６－アジドヘキシルのクリック化学の「ハンドル」を提供するために、５’－（５－ブロモヘキシル）修飾オリゴヌクレオチドをローディングした１０μｍｏｌのＣＰＧ（Ｌｉｅｔａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ａｎ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｒｅａｇｅｎｔ ｆｏｒ ５’－ａｚｉｄｏ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，”Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，４８，８７９５－９８（２００７）を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）を、１３０ｍｇのアジ化ナトリウムおよび３００ｍｇのヨウ化ナトリウムを含有する１５ｍＬの無水ＤＭＦ溶液中に懸濁した。混合物を６５℃で７５分間、激しく振とうした。冷却後、溶液を濾過し、得られた５’－（５－アジドヘキシル）固形支持体に結合したオリゴヌクレオチドを含むＣＰＧビーズを、ＤＭＦ（２×１０ｍＬ）で洗浄し、アルゴン流下で乾燥させた。オリゴヌクレオチドを固形支持体から放出させ、上述のように精製および脱塩した。次いで、オリゴヌクレオチドを約１０ OD_{260}単位／ｍＬの濃度まで水に溶解させた。銅（Ｉ）触媒アルキンアジド付加環化（ＣｕＡＡＣ）「クリック」環化反応でＺを得て（スキームＩ）、２ｍＬのオリゴヌクレオチド溶液（約２００ OD_{260}単位）を、２ｍＬのメタノール、１．１ｍＬのＬ－アスコルビン酸ナトリウム（０．１ｍＭ）、および１．１ｍＬの硫酸銅（２０ｍＭ）と混合した。反応混合物を、撹拌バーを備えたマイクロ波（ＭＷ）管容器に入れ、ＭＷ反応器中に、６０℃で４０分間置いた（電力は約８Ｗ、撹拌、冷却、Ｐ＝０）。このプロトコルは、Ｌｉｅｔａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｎ

ｅｗ ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ ｃｙｃｌｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｂｉｃｙｃｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｂｙ ｃｌｉｃｋ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｓｓｉｓｔｅｄ ｂｙ ｍｉｃｒｏｗａｖｅｓ，”Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，７３，１９１－２００（２００８）に記載されるプロトコルの改変版である。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる。全ての環状オリゴヌクレオチドを精製および脱塩し、アンチセンス鎖とさらにアニーリングさせて、上述のように、ｓｃｉＲＮＡおよびｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡを形成した。

【１２０２】

酵素安定性アッセイ

３’エキソヌクレアーゼＳＶＰＤ安定性アッセイ。修飾オリゴヌクレオチドを、５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．２）および１０ｍＭの$MgCl_2$の溶液に、０．１ｍｇ／ｍＬで添加した。ヘビ毒ホスホジエステラーゼ（ＳＶＰＤ）（Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ社、カタログ番号ＬＳ００３９２６）を、７５０ｍＵ／ｍＬで混合物に添加した。酵素を添加した直後に、サンプルをＤｉｏｎｅｘ ＤＮＡＰａｃ ＰＡ２００カラム（４ｍｍ×２５０ｍｍ）に３０℃で注入し、７．５分にわたり、４０～５５％の緩衝液Ｂの勾配で、１ｍＬ／分の流量で実行した。緩衝液Ａは、２０ｍＭ リン酸ナトリウム、１５％ アセトニトリル、ｐＨ１１とした。緩衝液Ｂは、１Ｍ 臭化ナトリウム（ｐＨ１１）を含有する緩衝液Ａとした。アリコートは２４時間、一時間毎に分析した。完全長オリゴヌクレオチドに対応するピーク下面積を、０時間の時点（初回注入）の面積に対して正規化した。一次減衰動態を、半減期の計算から推定した。対照オリゴヌクレオチドであるdT_{19}・ｄＴ（ｄＴは、２’－デオキシチミジンであり、・は、一つの３’末端ホスホロチオエート結合である）を毎日分析し、半減期は、対照配列の半減期と比較して報告された。酵素は、１ｍＬ管に分注された１０００ｍＵ／ｍＬのストックとして調製され、－２０℃で保管された。毎週、新しいアリコートが使用された。実験は三重で行われた。

【１２０３】

５’エキソヌクレアーゼホスホジエステラーゼＩＩ安定性アッセイ。修飾オリゴヌクレオチドを、５０ｍＭ 酢酸ナトリウム（ｐＨ６．５）および１０ｍＭ $MgCl_2$の溶液に、０．１ｍｇ／ｍＬで添加した。ウシ脾臓由来のホスホジエステラーゼＩＩ（Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ社、カタログ番号ＬＳ００３ ６０２）を、５００ｍＵ／ｍＬで混合物に添加した。酵素を添加した直後に、サンプルをＤｉｏｎｅｘ ＤＮＡＰａｃ ＰＡ２００カラム（４ｍｍ×２５０ｍｍ）に３０℃で注入し、７．５分にわたり、３７～５２％の緩衝液Ｂの勾配で、１ｍＬ／分の流量で実行した。緩衝液Ａは、２０ｍＭ リン酸ナトリウム、１５％ アセトニトリル、ｐＨ１１とした。緩衝液Ｂは、１Ｍ 臭化ナトリウム（ｐＨ１１）を含有する緩衝液Ａとした。アリコートは２４時間、一時間毎に分析した。完全長オリゴヌクレオチドに対応するピーク下面積を、０時間の時点（初回注入）の面積に対して正規化した。一次減衰動態を、半減期の計算から推定した。対照オリゴヌクレオチドである$dT \cdot dT_{19}$（ｄＴは、２’－デオキシチミジンであり、・は、一つの５’末端ホスホロチオエート結合である）を毎日分析し、半減期は、対照配列の半減期と比較して報告された。酵素は、１ｍＬ管に分注された２０００ｍＵ／ｍＬのストックとして調製され、－２０℃で保管された。毎週、新しいアリコートが使用された。実験は三重で行われた。

【１２０４】

血漿および肝臓ホモジネートにおけるオリゴヌクレオチド安定性の分析

ラット血漿（ＢｉｏＩＶＴ社、カタログ番号ＲＡＴ００ＰＬ３８ＮＣＸＮＮ）および肝臓ホモジネート（ＢｉｏＩＶＴ社、カスタムオーダー）を、１０×補因子溶液で希釈し、１ｍＭ $MgCl_2$、１ｍＭ $MnCl_2$、および２ｍＭ $CaCl_2$の最終濃度とした。ｓｃｉＲＮＡを、５０μＬの血漿または肝臓ホモジネートに添加して、２０μｇ／ｍＬの最終濃度とした。反応混合物を、３７℃で穏やかに振とうしながらインキュベートした。所与の時点のそれぞれ（０、１、４、８、および２４時間）で、内部標準（１μｇ／ｍＬの最終濃度のオリゴヌクレオチドU_{21}）を含有する４５０μＬのＣｌａｒｉｔｙ Ｏ

ＴＸ溶解－ローディング緩衝液（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社、カタログ番号　ＡＬ０－８５７９）を添加することによって反応を停止させ、分析まで－８０℃で凍結した。実験は三重で行われた。

【１２０５】

ＬＣ－ＭＳ分析のためのオリゴヌクレオチド濃縮は、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｍｅｔａｂｏｌｉｔｅ　ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ　ｂｙ　ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ａｎｄ　ａｃｃｕｒａｔｅ　ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ，”Ｂｉｏａｎａｌｙｓｉｓ，１１：１９６７－８０（２０１９）に記載されるように、Ｃｌａｒｉｔｙ　ＯＴＸ　９６ウェル固相抽出プレートを使用して行われた。当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。最初にＳＰＥカラムを１ｍＬ　メタノールで馴化させ、続いて、２ｍＭアジ化ナトリウムを含む５０ｍＭ　酢酸アンモニウムのＨＰＬＣグレードの水での水溶液を２ｍＬ用いて、平衡化した。サンプルを、陽圧を加えることによってＳＰＥカラムにローディングした。次いで、５０ｍＭ　酢酸アンモニウムの５０／５０（ｖ／ｖ）の水およびアセトニトリル（ｐＨ５．５）での溶液を１ｍＬ用いたカラム洗浄を五回行った。最後に、オリゴヌクレオチドを、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、１００ｍＬ　重炭酸アンモニウムの４０／１０／５０（ｖ／ｖ／ｖ）アセトニトリル／テトラヒドロフラン／水（ｐＨ８．８）での溶液を含有する溶出緩衝液を使用して溶出する。溶出液を窒素下で乾燥させ、１２０μＬのＬＣ－ＭＳグレードの水に再懸濁させて、ＬＣ－ＭＳ分析を行った。

【１２０６】

修飾オリゴヌクレオチドの相対的定量化、および代謝産物の特定は、イオン対形成逆相液体クロマトグラフィー（Ｄｉｏｎｅｘ　Ｕｌｔｉｍａｔｅ　３０００）（ＬＣ－ＨＲＭＳ）と連結されたＴｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｑ　Ｅｘａｃｔｉｖｅでの高分解能質量分析を使用して実施された。Ｗａｔｅｒｓ　Ｘ－Ｂｒｉｄｇｅ　ＢＥＨ　Ｃ８　ＸＰカラム（カタログ番号１７６００２５５４，１３０Å、２．５μｍ、２．１ｍｍ×３０ｍｍ、８０℃）をクロマトグラフィー分離に使用した。注入量および流量は、それぞれ３０μＬおよび１ｍＬ／分とした。移動相Ａは、１６ｍＬ　トリエチルアミン（Ｓｉｇｍａ社、カタログ番号　４７１２８３）、２００ｍＭ　１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（Ｆｉｓｈｅｒ社、カタログ番号６７－５６－１）のＬＣ－ＭＳグレードの水（Ｆｉｓｈｅｒ社、カタログ番号７７３２－１８－５）での水溶液からなる。移動相Ｂは、１００％メタノール（Ｆｉｓｈｅｒ社、カタログ番号６７－５６－１）とした。勾配は、１％　移動相Ｂで始まり、４．３分かけて３５％　Ｂへと進行し、次いで、カラムを１％　移動相Ｂで１分間平衡化した。質量分析データの取得は、フルスキャンモードで、解像度設定３５，０００、５００－３０００　ｍ／ｚのスキャン範囲で実施された。噴霧電圧は２．８ｋＶとした。補助ガス温度、およびキャピラリー温度は、３００℃に設定した。

【１２０７】

Ｔｈｅｒｍｏ　Ｑｕａｎブラウザを使用して、被験オリゴヌクレオチドと内部標準の抽出イオンクロマトグラム（ＸＩＣ）の面積比を１０ｐｐｍの質量精度で計算した。被験オリゴヌクレオチドのＸＩＣに使用されるｍ／ｚイオンは、１０１８．７７５２、１０１８．８８６８、１０１９．１１０１、１０１９．２２２０、１０１９．３３２５、１０１９．４４３６、１０１９．５５５９、および１０１９．６６７１であり、内部標準のＸＩＣに使用されるｍ／ｚイオンは、１２５８．５０７３、１２５８．８４０８、１２５９．１７４０、１２５９．８４１１、１２８９．５０６１であった。ＬＣ－ＨＲＭＳ分析の後、ＰｒｏＭａｓｓ　ＨＲ　Ｄｅｃｏｎｖｏｌｕｔｉｏｎソフトウェア（Ｎｏｖａｔｉａ、ＬＬＣ）を使用してデータを処理して、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｍｅｔａｂｏｌｉｔｅ　ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ　ｂｙ　ｈｉｇｈ－ｒｅｓｏｌｕｔｉｏｎ　ａｎｄ　ａｃｃｕｒａｔｅ　ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ，”Ｂｉｏａｎａｌｙｓｉｓ，１１：１９６７－８０（２０１９）に記載されるように修飾オリゴヌクレオチドの直線化および主要代謝物を特定し

た。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる。

【１２０８】

半減期は、Ｃｈａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｅｅｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｃｈａｌｌｅｎｇｅ ｏｆ Ｐｒｅｄｉｃｔｉｎｇ Ｈｅｐａｔｉｃ Ｃｌｅａｒａｎｃｅ ｏｆ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ Ｓｌｏｗｌｙ Ｍｅｔａｂｏｌｉｚｅｄ ｂｙ Ｃｙｔｏｃｈｒｏｍｅ Ｐ４５０ Ｕｓｉｎｇ ａ Ｎｏｖｅｌ Ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅ Ｍｏｄｅｌ，ＨｅｐａｔｏＰａｃ，”Ｄｒｕｇ Ｍｅｔａｂ．Ｄｉｓｐｏｓ．４１：２０２４－３２（２０１３）に記載される方法に基づき、２４時間の全長被験オリゴヌクレオチドの消失をモニタリングすることによって計算された。当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。試験オリゴヌクレオチドおよび内部標準の量を、それぞれのオリゴヌクレオチドの各時点について、０時間に対して正規化した。残存する全長の割合の自然対数および傾きを、線形回帰を使用して計算した。半減期は、以下の式（１）を使用して計算された。

【数１】

$$t_{\frac{1}{2}} = -\frac{Ln\ (2)}{k} \qquad (1)$$

【１２０９】

熱融解試験

融解試験は、サーモプログラミング装置を備えたＢｅｃｋｍａｎ ＤＵ８００分光光度計で、１ｃｍの経路長の石英セルにおいて行われた。１６μＬの二本鎖ストック溶液（１．０×ＰＢＳ中、１ｍｇ／ｍＬ）を１ｍＬの０．１×ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）に添加することによって、二本鎖を希釈して、０．１×ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）中、約１μＭの最終濃度を得た。融解曲線は、１０～９０℃まで、１℃／分の加熱速度、２６０ｎｍでモニタリングされた。融解温度（T_m）は、（備え付けのソフトウェアにおいて）加熱曲線の一次導関数から計算され、報告された値は二回の独立した測定値の結果である。

【１２１０】

ＮＭＲ試験

凍結乾燥したＲＮＡを、２０ｍＭ ＮａＣｌおよび１０ｍＭ リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７）を含む、１０％ ^2H_2O／９０％ H_2Oの混合液中に溶解した。等モル比のセンス鎖およびアンチセンス鎖を混合して、直鎖または環状の二本鎖を構成した。６００μＬ中の二本鎖の最終濃度は、２０～６０μＭの範囲内であった。すべてのスペクトルは、冷却プローブを備えたＡｇｉｌｅｎｔ ＶＮＭＲＳ ８００ ＭＨｚ ＮＭＲ分光計で、２５℃で取得された。

【１２１１】

トランスフェクション 初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）にｓｉＲＮＡをトランスフェクトインビトロでのサイレンシング活性試験し、サイレンシング効率を試験した。指定された濃度のｓｉＲＮＡ（５μＬ）を、３８４ウェルプレートのウェル当たり４．９μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭおよび０．１μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、カタログ番号１３７７８－１５０）と混合し、室温でインキュベートした。１５分後、約５×１０^{3}個の細胞を含有する４０μＬのウイリアムＥ培地またはＥＭＥＭ培地をウェルに添加した。細胞を２４時間インキュベートし、その後、ＲＮＡの精製を行った。

【１２１２】

自由取り込み 自由取り込み実験は、ＰＭＨ中で実施された。ｓｉＲＮＡ（指定された濃度の５μＬ）を、３８４ウェルプレートのウェル当たり５μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭと混合した。１５分後、約５×１０^{3}個の細胞を含有する４５μＬのウイリアムＥ培地またはＥＭＥＭ培地をウェルに添加した。細胞を４８時間インキュベートし、その後、ＲＮＡの精製を行った。

【１２１３】

Ｄｙｎａｂｅａｓ ｍＲＮＡ単離キットを使用した全ＲＮＡの単離 Ｄｙｎａｂｅａ

ｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、カタログ番号６１０１２）を使用して、ＢｉｏＴｅｋ－ＥＬ４０６プラットフォームで自動化プロトコールを使用し、ＲＮＡを単離した。５０μＬの溶解／結合緩衝液（Ｔｒｉｓ ＨＣｌ ｐＨ ７．５、ＬｉＣｌ、ＥＤＴＡ ｐＨ ８．０、ＤＴＴ）、および３μＬの磁気ビーズを含有する２５μＬの溶解／結合緩衝液を、各ウェルに添加した。プレートを、電磁振とう機上で室温で１０分間インキュベートし、次いで磁性ビーズを捕捉して上清を除去した。ビーズ結合したＲＮＡを、１５０μＬ／ウェルの緩衝液Ａ（Ｔｒｉｓ ＨＣｌ ｐＨ ７．５、ＬｉＣｌ、ＥＤＴＡ ｐＨ ８．０、ＤＴＴ）を用いて二回洗浄し、次いで１５０μＬ／ウェルの緩衝液Ｂ（Ｔｒｉｓ ＨＣｌ ｐＨ ７．５、ＬｉＣｌ、ＥＤＴＡ ｐＨ ８．０）を用いて一回洗浄した。次いで、ビーズを１５０μＬの溶出緩衝液で洗浄し、再捕捉して、上清を収集した。

【１２１４】

ＡＢＩ Ｈｉｇｈ－ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ逆転写キットを使用したｃＤＮＡ合成。ＡＢＩキット（カタログ番号４３６８８１３）を使用してｃＤＮＡ合成を行った。Ｄｙｎａｂｅａｄｓを使用して単離されたＲＮＡを含有する３８４ウェルプレートのウェルに、１μＬの１０×緩衝液、０．４μＬのμ２５×ｄＮＴＰｓ、１μＬの１０×ランダムプライマー、０．５μＬの逆転写酵素、０．５μＬのＲＮａｓｅ阻害剤、および６．４Ｌのヌクレアーゼ非含有水を含むマスターミックスを１０μＬ添加した。プレートを密封し、混合して、電磁振とう機上で室温で１０分間インキュベートし、その後、３７℃で２時間インキュベートした。

【１２１５】

遺伝子発現解析（ＲＴ－ｑＰＣＲ）。 ＲＮＡ定量のためのすべてのプローブは、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社から取得し、遺伝子発現解析用の二重標識プローブを備えたＴａｑｍａｎ遺伝子発現システムを利用した。標的遺伝子発現を、二重標識システムを利用して、各ウェルのＧａｐｄｈユビキタス対照に対して正規化した。Ｃｔ値は、Ｌｉｇｈｔ Ｃｙｃｌｅｒ ４８０（Ｒｏｃｈｅ社）を使用して測定された。相対的な倍率変化を計算するために、ΔΔＣｔ法を使用してリアルタイムデータを分析し、非標的のｓｉＲＮＡ対照で処理された細胞を用いて実施されたアッセイに対して正規化した。Ｔａｑｍａｎプローブのカタログ番号：マウス Ｃ５（Ｍｍ００４３９２７５＿ｍ１）、マウス Ｇａｐｄｈ ４３５２３３９Ｅ、マウス Ｔｔｒ（Ｍｍ００４４３２６７＿ｍ１）。

【１２１６】

<u>マウスにおけるサイレンシング活性のインビボ試験</u>

マウスを使用するすべての手順は、地域、州、および連邦の規制に準拠するプロトコルを使用して、認定された実験室職員によって実施された。実験プロトコルは、動物実験委員会（ＩＡＣＵＣ）、国際実験動物管理公認協会（認証番号：００１３４５）、および実験動物福祉局（認証番号：Ａ４５１７－０１）によって承認された。動物試験のサンプル数は、ＩＡＣＵＣガイドラインに従い、必要に応じて、結果として得られたデータセットの信頼性を可能にする数のなかで最小数の動物を利用して決定された。すべての動物を、試験開始前の４８時間、実験室内に馴化させた。およそ８週齢のメスのＣ５７ＢＬ／６マウスを、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社から入手し、各群に無作為に割り当てた。すべての動物は、ＩＡＣＵＣプロトコルに従って処理された。

【１２１７】

動物に、ｓｃｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ二本鎖、またはＰＢＳ生理食塩水対照を１０μＬ／ｇで皮下投与した。本試験で使用された用量は、３ｍｇ／ｋｇであった。ｓｃｉＲＮＡおよびｓｉＲＮＡは、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ７．４）において希釈された。すべての投与溶液は、注射のときまで４℃で保管された。動物は、投与から５日または７日のいずれかの時点で安楽死させた。肝臓を採取し、瞬間凍結して分析した。

【１２１８】

血清採取。ＩＡＣＵＣが承認したプロトコルに従って、最終投与から２４時間後に後眼窩採血法を利用して血液を採取した。サンプルを、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ血清分離管（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社、カタログ番号ＢＤ３６５９６７）に

収集した。ＴＴＲ解析のために、血清サンプルを室温で１時間保持し、次いで室温で１０分間、２１，０００×ｇの微量遠心分離器で遠心分離した。血清を１．５ｍＬの微量遠心管に移し、アッセイのときまで－８０℃で保存した。循環Ｃ５の分析のために採取された血清を室温で１５分間維持し、次いで直ちに４℃に移した後、室温で１０分間、２１，０００×ｇの微量遠心機で遠心分離させた。血清を１．５ｍＬの微量遠心管に移し、アッセイのときまで－８０℃で保存した。

【１２１９】

循環血清トランスサイレチン（ＴＴＲ）値。血清サンプルを１：４，０００に希釈し、マウスプレアルブミンの検出に特異的なＡＬＰＲＯの市販キット（カタログ番号４１－ＰＡＬＭＳ－Ｅ０１）を使用して分析した。タンパク質濃度（μｇ／ｍＬ）を、製造業者の指示に従って、精製されたＴＴＲ標準と比較することによって決定した。

【１２２０】

循環血清補体５（Ｃ５）値。循環マウスＣ５値を特異的に検出するためのＥＬＩＳＡキットを開発した。一次抗体はヤギ抗ヒトＣ５（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、カタログ番号Ａ２２０）であり、二次抗体はウシ抗ヤギＩｇＧ－ＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ社、カタログ番号８０５－０３５－１８０）である。それらは他の種に対し、最小の交差反応性であった。抗体を０．８ｍｇ／ｍＬで使用した。ＴＭＢ基質キット（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社、カタログ番号ＤＹ９９９）を使用してアッセイを開発し、硫酸を使用して反応を停止させて測定した。血清サンプルを、分析のために１：５，０００に希釈した。

【１２２１】

インビボでの肝臓曝露およびＡｇｏ２搭載

マウスを、投与後７日目に安楽死させた。肝臓を液体窒素中で瞬間凍結し、さらなる分析のために粉末に粉砕した。肝臓の総ｓｉＲＮＡ値は、０．２５％　Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００を含有するＰＢＳ中、１０ｍｇ／ｍＬで肝臓粉末を再構成することによって測定された。組織懸濁液を、４℃の組織ホモジナイザー（Ｑｉａｇｅｎ　ＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ　ＬＴ）において、５０サイクル／秒で５分間、５ｍｍのスチールグライディングボールでさらに粉砕した。次いで、ホモジナイズしたサンプルを９５℃で５分間加熱し、短時間ボルテックスして、氷上で５分間放置した。次いでサンプルを２１，０００×ｇで１５分間、４℃で遠心分離した。ｓｉＲＮＡ含有上清を新しい管に移した。ｓｉＲＮＡのセンス鎖およびアンチセンス鎖の値を、ステムループ逆転写、続いてＴａｑｍａｎ　ＰＣＲ（ＳＬ－ＲＴ　ＱＰＣＲ）によって定量化し（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍｉｃｒｏＲＮＡｓ　ｂｙ　ｓｔｅｍ－ｌｏｏｐ　ＲＴ－ＰＣＲ，”Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，３３：ｅ１７９－ｅ１７９（２００５）；およびＰｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｓｉＲＮＡ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｉｎ　ｖｉｖｏ，”ＲＮＡ，１６：２５５３－２５６３（２０１０）に記載される方法を参照のこと。これら文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）、化学的に修飾されたｓｉＲＮＡに適合させた。

【１２２２】

マウス肝臓由来のＡｇｏ２結合ｓｉＲＮＡを、１：１００希釈で新たに添加されたプロテアーゼ阻害剤（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、カタログ番号Ｐ８３４０）、および１ｍＭ　ＰＭＳＦ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、カタログ番号Ｐ７６２６）を補充した溶解緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００）において、１００ｍｇ／ｍＬで肝臓粉末溶解物を調製することによって定量した。Ａｇｏ２免疫沈降（ＩＰ）および対照ＩＰごとに、総肝臓溶解物（１０ｍｇ）を使用した。Ａｇｏ２に結合しなかったｓｉＲＮＡを、１：１００希釈でプロテアーゼ阻害剤、および１ｍＭ　ＰＭＳＦを補充した溶解緩衝液（１６ｍｇ／ｍｌ）において、前飽和ＱＡＥ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社、カタログ番号１７－０２００－０１）を用いて一掃した。酢酸セルロースフィルター（Ｆｉｓｈ

ｅｒ社、カタログ番号Ｐ１６９７０２）を通してサンプルを濾過し、樹脂を取り除いた後、Ａｇｏ２　ＩＰを開始した。抗Ａｇｏ２抗体は、Ｗａｋｏ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社（クローン番号：２Ｄ４）から購入した。対照マウスＩｇＧは、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社（カタログ番号ｓｃ－２０２５）から購入した。プロテイン質Ｇ　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、カタログ番号１０００３Ｄ）を使用して、抗体を沈殿させた。Ａｇｏ２に会合したｓｉＲＮＡを、加熱（５０μＬ　ＰＢＳ、０．２５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００；９５℃で５分間）により溶出し、ＳＬ－ＲＴ　ＱＰＣＲにより定量した（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍｉｃｒｏＲＮＡｓ　ｂｙ　ｓｔｅｍ－ｌｏｏｐ　ＲＴ－ＰＣＲ，”Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，３３：ｅ１７９－ｅ１７９（２００５）；およびＰｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｓｉＲＮＡ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｉｎ　ｖｉｖｏ，”ＲＮＡ，１６：２５５３－２５６３（２０１０）に記載される方法を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）。

【１２２３】

分子モデリング

ヒトＡｇｏ２と、シード領域ペア形成を伴うアンチセンス（ガイド、ＡＳ）：パッセンジャー（センス、Ｓ）二本鎖との間の複合体の座標を、タンパク質データバンク（ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ；ＩＤコード　４Ｗ５Ｔ）から検索した（３６）。複合体では、Ｓ鎖は、残基Ｓ１～Ｓ９（５’～３’方向）から構成される。Ｚリンカーは、構造編集の「構造構築」ツールおよび「構造修飾」ツールを使用して、プログラムのＵＣＳＦキメラ（３７）を用いて、センス鎖（Ｓ９）の３’末端から開始して、構築された。３’－リン酸基を付加した後、リンカーは、理想的な結合長さおよび角度、ならびに可能な限りＳ鎖の５’末端の方向に伸長した立体構造を使用して構築されながら、ＡＳ鎖、およびＡｇｏ２のＰＩＷＩドメインとＭＩＤドメインのＡｇｏ２側鎖、およびＬ２リンカー領域とのわずかな接触は回避された。複合体の結晶構造で観察された５’末端のＳ１残基をループさせて、その５’－ヒドロキシル基を、伸長するＺリンカーの方向に向けた。リンカーの最後のメチレン炭素にリン酸を添加した後、Ｓ１の５’－ＯＨとリンとの間には、約５Ａの距離が残った。この距離は、センス鎖の環化が可能な１．６Åの最終距離まで、許容可能な結合およびねじれ角でＳ１およびリンカーのねじれ角を変えることにより、系統的に短縮された。

ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡコンジュゲートの化学合成。

【１２２４】

この実施例では、ｓｃｉＲＮＡ構築物は、センス鎖が環化され、３’末端で三価のＧａｌＮＡｃリガンドにコンジュゲートされるように設計されている。図２７Ａに示されるように、次いで環化センス鎖は、直鎖アンチセンス鎖にアニーリングされる。センス鎖およびアンチセンス鎖の両方が、図２７Ｂに示されるように、２’－ＯＭｅ、２’－Ｆ、およびＰＳ骨格修飾を有して構築された。

【１２２５】

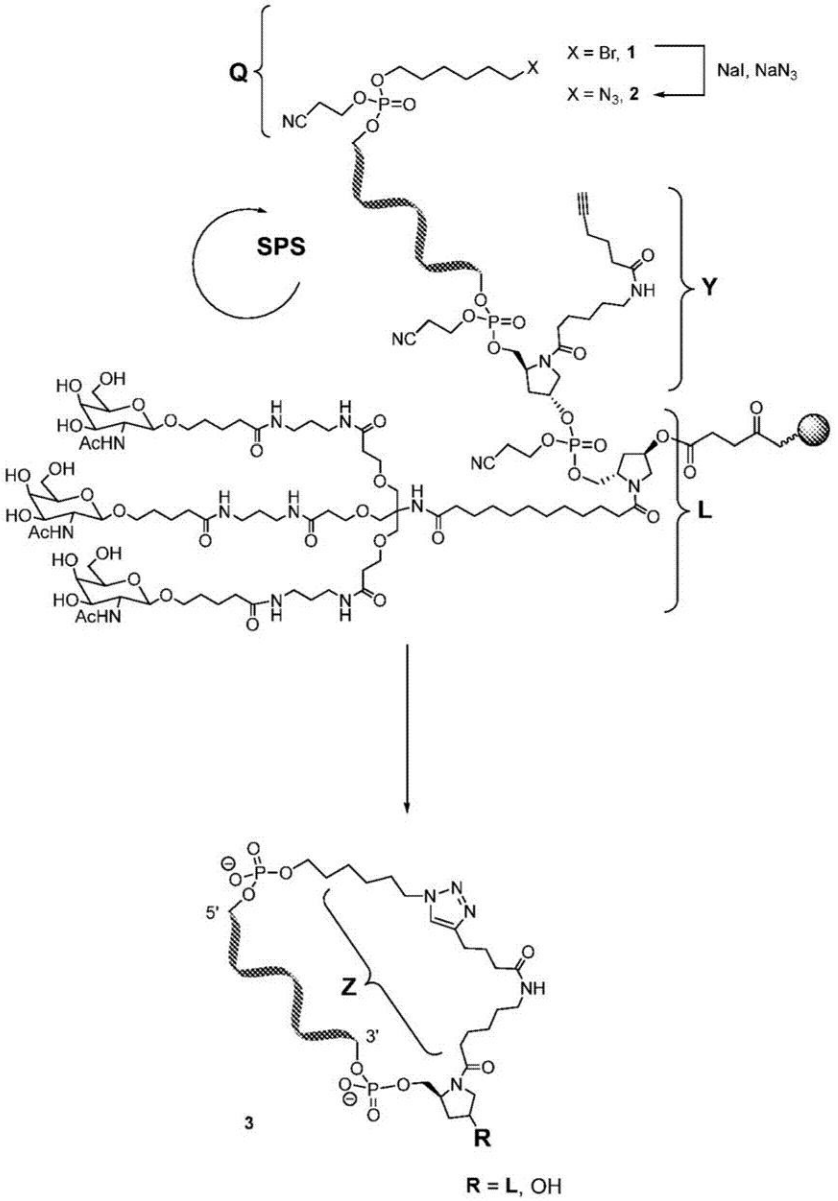
環化手順をスキームＩに例示する。スキームＩに示されるように、さらなる「クリック」化学「ハンドル」である、ヒドロキシプロリノールビルディングブロック（Ｙ）としてのＮ－アルキンリンカーがＧａｌＮＡｃリガンド（Ｌ）固形支持体に直接結合され（Ｎａｉｒ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ　Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｓｉＲＮＡ　ｌｏｃａｌｉｚｅｓ　ｉｎ　ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ　ａｎｄ　ｅｌｉｃｉｔｓ　ｒｏｂｕｓｔ　ＲＮＡｉ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｇｅｎｅ　ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３６：１６９５８－６１（２０１４）を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）、標準的な固相合成（ＳＰＳ）設定において、ホスホロアミダイトを介してセンス鎖の３’末端に導入された（Ｊａｙａｐｒａｋａｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｎｏｎ－ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ　ｂｕｉｌｄｉｎｇ　ｂｌｏｃｋｓ　ｆｏｒ　ｃｏｐｐｅｒ－ａｓｓｉｓｔ

ｅｄ ａｎｄ ｃｏｐｐｅｒ－ｆｒｅｅ ｃｌｉｃｋ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ＲＮＡ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．，１２：５４１０－１３（２０１０）を参照のこと。当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる）。ヒドロキシプロリノールリンカーと、三価のＧａｌＮＡｃリガンドの両方が、ＲＮＡｉ治療において臨床的に有効な部分である。

【１２２６】

センス鎖配列全体のＳＰＳが完了した後、市販の６－ブロモヘキシルホスホロアミダイトをセンス鎖の５’末端にカップリングした。その後、臭素（１、スキームＩ）をアジド基（２、スキームＩ）と置換して、６－アジドヘキシルハンドル（Ｑ）を得る（Ｌｉｅｔａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ａｎ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｒｅａｇｅｎｔ ｆｏｒ ５’－ａｚｉｄｏ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，”Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，４８：８７９５－９８（２００７）を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）。完全長５’－アジドオリゴヌクレオチドの固形支持体からの切り出し、脱保護と精製の後、銅（Ｉ）触媒アルキン－アジド付加環化（ＣｕＡＡＣ）「クリック」反応によって、環化が完了となり、ｓｃｉＲＮＡの環状センス鎖となる（Ｌｉｅｔａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｗ ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ ｃｙｃｌｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｂｉｃｙｃｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｂｙ ｃｌｉｃｋ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｓｓｉｓｔｅｄ ｂｙ ｍｉｃｒｏｗａｖｅｓ，”Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，７３：１９１－２００（２００８）；およびＨｕｉｓｇｅｎ，“Ｋｉｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ ｒｅａｃｔｉｏｎ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ：ｓｅｌｅｃｔｅｄ ｅｘａｍｐｌｅｓ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｅｘｐｅｒｉｅｎｃｅ ｏｆ ｆｏｒｔｙ ｙｅａｒｓ，”Ｐｕｒｅ ａｎｄ Ａｐｐｌ．Ｃｈｅｍ．，６１：６１３－２８（１９８９）を参照のこと。それら両文献ともその全体で参照により本明細書に組み込まれる）。対応する相補的なアンチセンス鎖とアニーリングすることにより、標的ｓｃｉＲＮＡ二本鎖を得た。

【化１４９】



スキームＩ。ｓｃｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃコンジュゲートの「クリック」環化ｓｃｉＲＮＡ　ＧａｌＮＡｃセンス鎖の合成。Ｑ、６－アジドヘキシルハンドル、ＳＰＳ、固相合成；Ｙ、アルキンヒドロキシプロリノールホスホロアミダイト；Ｌ、ＧａｌＮＡｃリガンド；およびＺ、リンカー。

【１２２７】

本実施例で使用されるオリゴヌクレオチドを表６に列挙し、特徴を付す。

表６．オリゴヌクレオチド配列および質量スペクトルに基づく特性

【表１３】

オリゴヌクレオチド	配列(5’-3’)[a]	二本鎖	センス/アンチセンス	計算値 MW	実測値 MW
ON-1	$(dT)_{19}$·dT			6037.96	6036.95
ON-2	dT·$(dT)_{19}$			6037.96	6037.11
ON-3	Q$(dT)_{23}$Y			7526.02	7524.37
ON-4	Z$(dT)_{23}$			7526.02	7524.47
ON-5	QaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaAY			8047.08	8045.22
ON-6	ZaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaA			8047.08	8044.98
ON-7	A·a·CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	si-1	センス	8590.17	8588.69
ON-8	u·U·aUaGaGcAagaAcAcUgUu·u·u	si-1 / si-3 / si-4	アンチセンス	7595.94	7594.79
ON-9	VPu·U·aUaGaGcAagaAcAcUgUu·u·u	si-2 / si-5	アンチセンス	7672.94	7670.55
ON-10	QA·a·CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	si-3	センス	9181.71	9179.98
ON-11	ZA·a·CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	si-4 / si-5	センス	9181.71	9179.71
ON-12	G·a·CaAaAuAACuCaCuAuAaUL	si-6	センス	8627.29	8626.45
ON-13	a·U·uAuAgUgAguuAuUuUgUc·a·a	si-6 / si-7	アンチセンス	7574.87	7573.88
ON-14	ZG·a·CaAaAuAACuCaCuAuAaUL	si-7	アンチセンス	9218.83	9217.13

[a]化学修飾は、以下のように指定される：・、PS結合；小文字ヌクレオチド、2’-OMe；斜体の大文字ヌクレオチド、2’-F；Q、6-アジドヘキシル-ホスフェート；VP、5’-(E)-ビニルホスホネート。L、Y、およびZの構造については、スキームIを参照されたい。Zは、環状オリゴヌクレオチドを示す。

【１２２８】

<u>環状オリゴヌクレオチドの酵素安定性。</u>

環状修飾Ｚによって付与され得たオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性の安定性を評価するために、３’－エキソヌクレアーゼまたは５’－エキソヌクレアーゼのいずれかを使用したインビトロアッセイを、適切なアッセイ対照と組み合わせて利用した。対照（ＯＮ－１およびＯＮ－２）と比較した、直鎖および環状の一本鎖オリゴヌクレオチドの酵素安定性の結果を表７に示す。

表７．直鎖および環状の一本鎖オリゴヌクレオチドの酵素安定性。

【表１４】

オリゴヌクレオチド	配列(5’-3’) [a]	3’-エキソヌクレアーゼ半減期[b]	24時間後にインタクトな割合 (%)	5’-エキソヌクレアーゼ半減期[c]	24時間後にインタクトな割合 (%)
ON-1 / ON-2	$(dT)_{19}$·dT / dT·$(dT)_{19}$	1	10.0	1	6.5
ON-3	Q$(dT)_{23}$Y	0.7	2.7	8.2	13.3
ON-4	Z$(dT)_{23}$	1.2	14.8	26.8	52.5
ON-5	QaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaAY	12.8	76.1	14.1	83.8
ON-6	ZaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaA	14.5	79.1	423.0	100.0

[a]化学修飾の凡例：・-ホスホロチオエート（PS）結合；dT－２’-デオキシチミジン；小文字ヌクレオチド－２’-O-メチル（OMe）；斜体の大文字ヌクレオチド－２’-デオキシ-２’-フルオロ（F）；Q=6-アジドヘキシル-ホスフェート；YおよびZの構造-スキームIを参照；およびZは、環状オリゴヌクレオチドを示す。
[b]半減期の値は、時間で決定され、$(dT)_{19}$・dT対照の半減期の値と比較して報告された。
[c]半減期の値は、時間で決定され、dT・$(dT)_{19}$対照の半減期の値を比較して報告された。一次減衰動態を、半減期の計算から推定した。データは、類似した結果の二つの独立した実験の代表値である。

【１２２９】

表７に示されるように、２３ｍｅｒの一本鎖ホスホジエステルオリゴヌクレオチドは、完全な２’－デオキシチミジン（ＯＮ－３およびＯＮ－４）または完全に化学的に２’－修飾されたヌクレオチド（ＯＮ－５およびＯＮ－６）のいずれかから構成された。各系には、「クリック化」Ｚ化学修飾を含む環状オリゴヌクレオチド鎖（ＯＮ－４およびＯＮ－６）ならびに「非クリック化」前駆体部分ＱおよびＹを含む環状オリゴヌクレオチド鎖（ＯＮ－３およびＯＮ－５）が含まれた。

【１２３０】

図２８Ａ～２８Ｄに示されるように、エキソヌクレアーゼアッセイの結果から、環状修飾Ｚによって、アッセイ対照ならびに直鎖状のカウンターパートよりも高いエキソヌクレアーゼ安定性が得られた。ＯＮ－４（デオキシチミジン）およびＯＮ－６（化学修飾）は、直鎖状のカウンターパート（それぞれＯＮ－３およびＯＮ－５）および対照オリゴヌクレオチド（ＯＮ－１およびＯＮ－２）よりも安定性が高かった。安定性は、当該修飾系において、完全に化学的に２’修飾されたヌクレオチドを導入することによってさらに強化された。環化され、完全に化学的に２’修飾されたオリゴヌクレオチドＯＮ－６）は、エキソヌクレアーゼ作用に対して事実上、安定であった。すなわち、実験の時間経過のなかで、いずれのヌクレアーゼにも有意な程度まで分解されなかった（図２８Ｄ）。非修飾の２’－デオキシ系（ＯＮ－３およびＯＮ－４）では、環状修飾Ｚによって、３’－エキソヌクレアーゼ（図２８Ａ）よりも、５’－エキソヌクレアーゼ（図２８Ｃ）に対して高い安定性が得られた。同様に、３’－エキソヌクレアーゼアッセイから、５’－エキソヌクレアーゼよりも、直鎖オリゴヌクレオチドと環状オリゴヌクレオチドの間の差異は小さいことが示された（図２８Ａおよび２８Ｃ）。

【１２３１】

環状ｓｉＲＮＡ設計の代謝産物を試験するために、安定性試験を、個々の一本鎖からアニーリングされたｓｃｉＲＮＡ二本鎖に拡張した。二つのｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－４およびｓｉ－５、以下の表９を参照）ならびに同じヌクレオチド配列および修飾を含有する直鎖ｓｉＲＮＡ（ｓｉ－３）のインビトロ安定性をラット血漿およびラット肝臓ホモジネート

において評価した。結果を図２９Ａ～２９Ｂに示す。ラット肝臓ホモジネートまたはラット血漿のＬＣ－ＭＳ分析に基づく、ｓｉ－３、ｓｉ－４、およびｓｉ－５の代謝産物の特定を、それぞれ表８Ａ、表８Ｂ、および表８Ｃに要約する。

【１２３２】

図２９Ａ～２９Ｂに示されるように、血漿中で、最大８時間まで、環状ｓｃｉＲＮＡ鎖または直鎖ｓｉＲＮＡ鎖のいずれの分解も検出されなかった（図２９Ａ）。しかし、ＬＣ－ＭＳによる代謝産物分析では、ラット血漿中で２４時間のインキュベーション後、環状鎖への水分子の付加が観察された（表８Ｂおよび８Ｃ）。これは、環状構造の開放から生じた可能性があり、直線化したオリゴヌクレオチドが生じた。ラット肝臓ホモジネートでは、環状ｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－４およびｓｉ－５）は、直鎖（ｓｉ－３）よりも安定性が高かった。２４時間でｓｉ－４またはｓｉ－５の分解はなかったが、ｓｉ－３については、２４時間で検出された完全長センス鎖は約５５％のみであった（図２９Ｂ）。４時間の半減期であった直鎖ｓｉＲＮＡと比較して、ｓｃｉＲＮＡの半減期は２９時間および３０時間であり、有意に長かった。この結果は、エキソヌクレアーゼの存在下でも環化によって安定性が高まるという一本鎖の安定性分析の結果と相関している。肝臓ホモジネートでは、ｓｉ－４またはｓｉ－５のいずれのセンス鎖の環状構造の開放も観察されなかった（表８Ｂおよび８Ｃ）。

表８Ａ．ラット肝臓ホモジネートまたはラット血漿からのｓｉ－３の代謝産物特定

【表１５】

質量実測値	可能性のある代謝産物の配列	鎖	説明[a]
7592.52	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	アンチセンス	親
6588.965	UaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	アンチセンス	5’ n-4
6371.919	Pu*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	アンチセンス	3’ n-4
6291.957	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	アンチセンス	3’ n-4
5700.846	VPu*U*aUaGaGcAagaAcAc	アンチセンス	3’ n-5
9177.039	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	センス	親
8973.962	ZA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL（-$GalNAc_1$）	センス	-$GalNAc_1$

[a]-GalNAc1は、三分岐リガンドから一つのGalNAc糖が欠落したことを指す。

表８Ｂ．ラット肝臓ホモジネートまたはラット血漿からのｓｉ－４の代謝産物特定

【表１６】

質量実測値	提唱される代謝産物配列	鎖	説明[a]
7592.52	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	アンチセンス	親
6588.965	UaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	アンチセンス	5’ n-4
6291.957	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	アンチセンス	3’ n-4
9177.039	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	センス	親
9195.049	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	センス	加水分解

[a]加水分解＝親鎖＋18.015Da。

表８Ｃ．ラット肝臓ホモジネートまたはラット血漿からのｓｉ－５の代謝産物特定

【表１７】

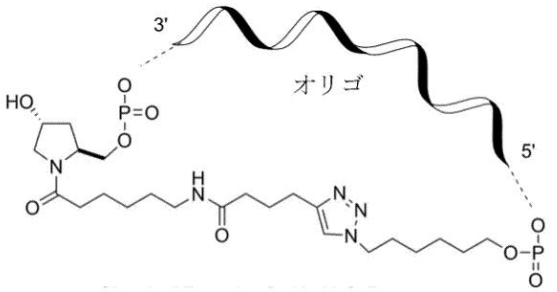
質量実測値	提唱される代謝産物配列	鎖	説明[a]
7668.030	VPU*U*aUaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	アンチセンス	親
6588.965	VPu*U*aUaGaGcAagaAcAcUgP	アンチセンス	5’ n-4
6447.9166	Pu*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	アンチセンス	3’ n-3
5700.846	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL/ ZA·a·CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	アンチセンス	3’ n-5
9177.039	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	センス	親
9195.049	Z49A*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	センス	加水分解
8973.962	Z49A*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL（-GalNAc$_1$）	センス	-GalNAc$_1$

[a]加水分解＝親鎖＋18.015Da。

－ＧａｌＮＡｃ１は、三分岐リガンドから一つのＧａｌＮＡｃ糖が欠落したことを指す。

Ｚ４９－３’－リン酸－Ｈｙｐ－Ｃ９－１，４－トリアゾール－Ｃ６－５’－リン酸のクリック反応による環化

【化１５０】



【１２３３】

ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡコンジュゲートの熱安定性およびＮＭＲ試験

表９は、環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡコンジュゲートおよび直鎖状ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡコンジュゲートの熱安定性を示す。２１ｎｔの環状センス鎖（Ｚ修飾を含有するｓｉＲＮＡセンス鎖）を、それぞれ相補的な２３ｎｔのアンチセンス鎖とハイブリダイズして、ｓｃｉＲＮＡ二本鎖を作製し、各複合体の融解温度（Ｔｍ）を決定した。比較のために、開放（すなわち、環状ではない）ｓｉＲＮＡ二本鎖のＴ$_m$も決定した。直鎖センス鎖（ｓｉ－１、ｓｉ－２、およびｓｉ－６）から形成された標準的なＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ構築物が試験に含まれたが、５’および３’のセンス鎖修飾ＱおよびＹが、ｓｉＲＮＡセンス鎖の５’末端と３’末端を接続する環状トリアゾールＺ部分を生じさせる「クリック」反応に関与していない、直鎖センス鎖（ｓｉ－３）から形成された一つの代表的なｓｉＲＮＡも含まれている。

【１２３４】

表９に示されるように、ｓｃｉＲＮＡ構築物（ｓｉ－４、ｓｉ－５、およびｓｉ－７）は、開放状態のカウンターパート（ｓｉ－３）または標準ｓｉＲＮＡ二本鎖と比較して、高い不安定性を示した（１５～２０℃）。この熱不安定化は、２１ｎｔの環状センス鎖の系統を示している。当該センス鎖は、ｓｉＲＮＡ二本鎖構造に柔軟性を与え、核酸塩基の一部はワトソン・クリック塩基対を形成することができる。

【１２３５】

図３０のｓｉＲＮＡ二本鎖の溶液状態での^{1}Ｈ ＮＭＲ分析から、直鎖ｓｉＲＮＡ二本

鎖のスペクトル（表９、ｓｉ－１、ｓｉ－２、ｓｉ－３、およびｓｉ－６）が、充分に分解された共鳴を呈したことが示される。イミノプロトンに対するいくつかのシグナルが、δ１２～１４ｐｐｍの領域で観察され、これはワトソン・クリック塩基対形成を示す。シグナルの数は、完全に相補的な二本鎖が形成されたことを示唆する。環状ｓｃｉＲＮＡ二本鎖のスペクトル（表９、ｓｉ－４、およびｓｉ－５）は、広範なシグナルを呈した。しかし、イミノ領域にいくつかのシグナルが観察されたことから、部分的に二本鎖の構造が示唆される。このことから、いくらかの熱不安定化と、核酸塩基の一部がワトソン・クリック塩基対を形成することが提唱される。

表９．直鎖ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡおよび環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡのコンジュゲートの初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）における熱安定性とインビボでの効力。

【表１８】

siRNA	標的	配列(5’-3’)[a]	T_m (℃)[b] (ΔT_m)[c]	トランスフェクションIC$_{50}$ (pM)[d]	自由取り込み IC$_{50}$ (pM)[e]
si-1	*Ttr*	*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L u·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgU*u·u·u	68.2	151.1±21.8	53.1±15.6
si-2	*Ttr*	*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L VPu·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgU*u·u·u	67.8 (-0.4)	41.9±13.8	21.6±3.3
si-3	*Ttr*	Q*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*YL u·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgU*u·u·u	67.3 (-0.9)	81.3±55.5	58.5±1.9
si-4	*Ttr*	Z*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L u·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgU*u·u·u	52.4 (-15.7)	836.8±140.4	197.9±31.2
si-5	*Ttr*	Z*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L VPu·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgU*u·u·u	52.5 (-15.7)	124.7±64.1	63.9±9.1
si-6	*C5*	*G*·a·*CaAaAuAACuCaCuAuAaU*L a·*U*·u*AuAgUgAguuAuUuUgUc*·a·a	62.3	60.5±30.1	109.2±53.8
si-7	*C5*	Z*G*·a·*CaAaAuAACuCaCuAuAaU*L a·*U*·u*AuAgUgAguuAuUuUgUc*·a·a	41.8 (-20.5)	830.2±195.0	824.4±72.7

[a]センス鎖配列は上段；アンチセンス鎖配列は下段。化学修飾の凡例：・-ホスホロチオエート（PS）結合；小文字ヌクレオチド－ 2’-O-メチル（OMe）；斜体の大文字ヌクレオチド－ 2’-デオキシ-2’-フルオロ（F）；センス鎖（上段）；アンチセンス鎖（下段）；Q－ 6-アジドヘキシル-ホスフェート；L、YおよびZの構造-スキームIを参照；VPとは、5’-（E）-ビニルホスホネートを指す；およびZは、環状オリゴヌクレオチドを示す。

[b] T_mは、1.0μMの濃度の各鎖を使用して、0.1×PBS緩衝液（pH7.4）において記録された融解曲線（A_{260}と温度の比較）の一次導関数の最大値から得られた融解温度を指す。

[c] ΔT_mは、非修飾二本鎖（si-2～si-5については、参照二本鎖は、si-1であり、エントリー(entry) si-7については、参照二本鎖は、si-6である）と比較した融解温度における変化を指す。二つの独立したアニーリングサンプル調製物、および測定値の平均(n=2)。

[d]化合物を、Lipofectamine RNAiMAXを用いたトランスフェクションによってPMHに加え、24時間のインキュベーション後、細胞を溶解し、RNA単離、cDNA合成、および定量的PCR分析のために処理した。mRNA値は、マウスGapdhに対して正規化した。平均IC$_{50}$値は、SDとともに報告された(n=4)。

[e]化合物を、自由取り込みによってPMHに加え、48時間のインキュベーション後、細胞を溶解し、RNA単離、cDNA合成、および定量的PCR分析のために処理した。mRNA値は、マウスGapdhに対して正規化した。平均IC$_{50}$値は、SDとともに報告された(n=4)。

【１２３６】

ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡコンジュゲートのインビトロおよびインビボでの活性。

いくつかのｓｃｉＲＮＡ設計を評価し、インビトロおよびインビボでの強力な遺伝子発現サイレンシングが観察されたが、一部の例では非環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの親よりも低かった。

【１２３７】

初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）において、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉ　Ｍａｘを使用したｓｉＲＮＡのトランスフェクション後、またはＧａｌＮＡｃリガンドおよびその取り込み受容体であるアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）（肝細胞表面上に遍在的に発現されている）を介したＰＭＨ内への単純な自由取り込みの後にｓｃｉＲＮＡのインビトロでの効力を決定した。ＰＭＨにおける直鎖ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡおよび環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡコンジュゲートのインビトロ効力の結果を、表９に示す。二つの別個の標的、すなわち齧歯類トランスサイレチン（Ｔｔｒ）または補体第５成分（Ｃ５）を標的とし、環状「クリック」構築物Ｚを生じさせる化学修飾ＱおよびＹを有するｓｃｉＲＮＡ構築物を、並行して標準ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡおよび対応する直鎖状「非クリック化」ｓｉＲＮＡ対照とともに作製した。表９は、二つの様式の細胞送達をそれぞれ使用することによって、すべての細胞において標的ｍＲＮＡ発現の強力な阻害が観察されたが、直鎖状のいずれかカウンターパートと比較して、環状ｓｃｉＲＮＡを用いたインビトロでのｍＲＮＡの阻害効力は低下した。

【１２３８】

表９に示されるように、Ｔｔｒ系では、直鎖対照のｓｉ－１およびｓｉ－３と比較して、環状ｓｃｉＲＮＡ化合物のｓｉ－４は、インビトロ効力が５倍（トランスフェクション）および４倍（自由取り込み）低下しており、これはT_m試験で観察された熱不安定化と相関していた。

【１２３９】

同じ状況下で、ｓｉＲＮＡの代謝安定性およびＡｇｏ２搭載を強化することができる修飾であるアンチセンス鎖の５’－（Ｅ）－ビニルホスホネートＶＰ修飾を使用した場合の効力を、対照ＶＰ　ｓｉＲＮＡ（ｓｉ－２）および環状ｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－５）を調製することによって評価した。ＶＰ修飾を導入することにより、ｓｃｉＲＮＡコンジュゲートのインビトロ効力がさらに強化され、直鎖と環状のＴｔｒ標的化ｓｉＲＮＡの間にある抗力のギャップはわずか３倍に低下した。二つの対照Ｔｔｒ標的化ｓｉＲＮＡ（ｓｉ－１およびｓｉ－２）の比較によって示されるように、ＶＰ修飾の導入によって、約３倍の効力の改善があった。ＶＰ修飾センス鎖を有する環状ｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－５）は、直鎖センス鎖（ｓｉ－２）を有するＶＰ修飾対照よりも３倍のみ低い効力であり、直鎖対照（ｓｉ－１）と同様の効力を示した。

【１２４０】

ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡ活性は、インビボでも評価された。この実験では、すべてのＧａｌＮＡｃコンジュゲート（ｓｉＲＮＡおよび直鎖のカウンターパートを含む）が単回投与として皮下投与され（０日目に３ｍｇ／ｋｇ）、循環ＴＴＲまたはＣ５タンパク質の血清値を各処置群について経時的に判定された。マウスにおける直鎖ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡ、および環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡコンジュゲートの単回皮下投与後の薬理プロファイルの結果を、図３１Ａ～３１Ｂに示す。図３１Ａ～３１Ｂにおいて、直鎖設計および環状設計は、インビボで強力な標的阻害を示した。Ｔｔｒ　ｓｉＲＮＡ系については、マウスのデータは、表９に示されるインビトロの結果に酷似しており、直鎖対照（ｓｉ－１およびｓｉ－２）を超えるｓｉＲＮＡの有効性の低下が、ｓｃｉＲＮＡ分子（ｓｉ－４およびｓｉ－５、図３１Ａ）で観察された。Ｃ５を標的とする系については、直鎖（ｓｉ－６）および環状（ｓｉ－７）のｓｉＲＮＡコンジュゲートで同一の３ｍｇ／ｋｇ用量としており、マウスにおいて循環Ｃ５タンパク質を同じように減少させる効力であったが（図３１Ｂ）、インビトロでは少なくとも約８倍の効力低下が観察された（表９）。

【１２４１】

ｓｃｉＲＮＡ化合物のインビボでの代謝安定性を、マウスにおいて３ｍｇ／ｋｇ用量の

ＳＣ投与後に、総肝臓レベルおよびＡｇｏ２負荷レベルを測定することによりさらに評価した。結果を、図３２Ａ～３２Ｂに示す。マウス肝臓を７日目に採取し、処理して、ＳＬ－ＲＴ　ＱＰＣＲにより各ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖を単離し、定量した。ｓｉＲＮＡｓｉ－１～ｓｉ－５について測定されたアンチセンス鎖の相対的な肝臓での量を図３２Ａに示す。代謝的に安定なＶＰ基を付加することによって、対応する直鎖状ｓｉＲＮＡ（ｓｉ－２）および環状ｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－５）の両方の肝臓値が、非ＶＰ　ｓｉＲＮＡよりも有意に増加したことが示される（それぞれ、直鎖センス鎖ｓｉ－１およびｓｉ－４を用いた各対照よりも約５倍高い）。ｓｉ－２とｓｉ－５の全肝値は同等であったが（図３２Ａ）、マウスにおけるそれらの薬理プロファイルは有意に異なっていた（図３１Ａを参照）。

【１２４２】

Ａｇｏ２搭載の効率を評価するために、マウス全肝溶解物からＡｇｏ２を免疫沈降させ、Ａｇｏ２からアンチセンス鎖を抽出および測定し、その結果を図３２Ｂに示す。非ＶＰ　ｓｉＲＮＡ（ｓｉ－１）と比較して、直鎖ｓｉＲＮＡ中にＶＰ修飾があることによって、（ｓｉ－２）アンチセンス鎖のＡｇｏ２搭載が強化された（図３２Ｂ）。ｓｃｉＲＮＡ　ＶＰのカウンターパート（ｓｉ－５）は、非ＶＰ　ｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－３）と比較して、同レベルのＡｇｏ２搭載の強化は示さなかった（図３２Ｂ）。Ａｇｏ２搭載における同様の低下傾向は、非ＶＰ直鎖状ｓｉＲＮＡ　ｓｉ－３とｓｃｉＲＮＡ　ｓｉ－４との間でも観察することができる（図３２Ｂ）。直鎖ｓｉＲＮＡ（ｓｉ－２）および環状ｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－５）は、同様のアンチセンス鎖肝臓レベルを示したが（図３２Ａ）、Ａｇｏ２搭載アンチセンス鎖は異なるレベルであった（図３２Ｂ）。このことから、環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡが直鎖ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡと同様の代謝安定性を示すこと、Ａｇｏ２へのアンチセンス鎖の搭載の効率は低いことが示される。

【１２４３】

これらの実施例は、三価ＧａｌＮＡｃリガンドおよびアルキン官能性リンカーを担持する「クリック」環化センス（Ｓ）鎖を有する、完全に化学修飾された新規の環状低分子干渉ＲＮＡ（ｓｃｉＲＮＡ）の固相合成を記載するものである。センス鎖合成の完了後、市販のブロモ試薬を５’末端でカップリングし、リンカーの臭化物基をアジド基と置換した（スキームＩ）。固形支持体から切り離し、脱保護、および精製した後、「クリック」反応条件によって、センス鎖の環化が可能となる。環状センス鎖と、対応する相補的アンチセンス鎖（ＡＳ）をアニーリングすることによって、ＧａｌＮＡｃ－コンジュゲート化ｓｃｉＲＮＡ二本鎖が得られた。

【１２４４】

これらの新規設計がＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡに与える物理化学的および薬理学的な特性を試験した。約２０ｎｔのオリゴヌクレオチドを環化することによって、ヌクレアーゼに対する安定性が得られたが、T_mが低下する可能性があり、それによって得られたＲＮＡ二本鎖の熱安定性も低下する可能性がある（表７および９を参照のこと）。２０ｎｔの環状オリゴヌクレオチドに、短いオリゴヌクレオチド標的（ｎ＝６ｎｔ～１０ｎｔ）をアニーリングすることによって、T_m値は増加を示した。このことから、短い直鎖標的は、環状ＤＮＡ鎖と構造的に良好に適応し得ることが示される。さらに、２０ｎｔの環状パートナーが二つの１０ｎｔの鎖に結合する三重鎖構造の場合、当該環状パートナーがフーグスティーン水素結合を形成し、構造のエントロピーを低下させることができるため、有益であり得る。２０ｎｔの環状オリゴヌクレオチドと、その２０ｎｔの標的をアニーリングすることによって、１０ｎｔの標的と同じT_m値が呈された。このことから、約１０ヌクレオチドの標的か、当該環状オリゴヌクレオチドとハイブリダイズできることが示唆される。ＤＮＡについては、ヌクレオチド環が長い方が、より安定した環状二本鎖の形成に役立ち得る。Ｋｕｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｔｅｍｐｌａｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｓｔｒａｎｄ　ｌｉｇａｔｉｏｎ，ｃｏｖａｌｅｎｔ　ｉｎｔｒａｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ＤＮＡ　ｃｉｒｃｕｌａｒｉｚａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｃａｔｅｎａｔｉｏｎ　ｕｓｉｎｇ　ｃｌｉｃｋ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅ

ｍ．Ｓｏｃ．，１２９：６８５９－６４（２００７）を参照のこと。

【１２４５】

２１塩基対を形成するように設計されたｓｃｉＲＮＡの熱融解およびＮＭＲの分析によって、センス鎖が剛直な環状構造を有する場合、核酸塩基の一部がワトソン・クリック塩基対を形成していることが示された。ｓｃｉＲＮＡのスペクトルにおいて、直鎖ｓｉＲＮＡよりも少なく、広がったＮＭＲシグナルが観察されたことから、ｓｃｉＲＮＡでは、部分的に塩基形成した二本鎖の不均一な混合物が溶液中に共存していることが示唆される。２１／２３ｎｔ　ｓｃｉＲＮＡは、環状センス鎖構造を示し、直鎖アンチセンス鎖とアニーリングしたときには、核酸塩基の一部がワトソン・クリック塩基対を形成する。これが当該二本鎖に熱不安定化をもたらす可能性がある。

【１２４６】

図３３は、シード領域のペア形成を伴い二本鎖ＲＮＡに結合したＡｇｏ２の結晶構造に基づく、ｓｃｉＲＮＡ：Ａｇｏ２複合体の分子モデルを示す。図３３に示されるように、ｓｃｉＲＮＡ：Ａｇｏ２複合体のモデルから、Ｚリンカーを用いたセンス鎖（Ｓ）の環化によって、シード領域（ＡＳ２：Ｓ２０～ＡＳ８：Ｓ１４）全体の塩基対形成が維持されたことが確認される。ＡＳおよびＳのＲＮＡ鎖に結合したＡｇｏ２の結晶構造を使用して、ｓｃｉＲＮＡシナリオを構築した。Ｓｃｈｉｒｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　ｂａｓｉｓ　ｆｏｒ　ｍｉｃｒｏＲＮＡ　ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，”Ｓｃｉｅｎｃｅ，３４６：６０８－１３（２０１４）を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる。したがって、Ｚリンカーは、３’末端のＳ鎖ヌクレオチド（結晶構造のＡ９、および表９に列挙されるＳ鎖の長さと一致する、図３３においてＳ２１の標識）と、結晶構造で見られる最初のＳ鎖の残基（Ａ１、モデルにおいてＳ１３の標識）を接続する。後者の残基を反転させてループを完成させ、環を閉じ、ＺリンカーはＳ：ＡＳ二本鎖の主溝を交差している。モデルに見られるシード領域全体の対形成は、２０ｎｔの環状鎖に標的とされた短いオリゴヌクレオチドに対して観察されたT_m値の増加と一致する。このモデルに基づき、Ｚにより環化された２１ｎｔのパッセンジャー鎖ヌクレオチド（図３３に示されるＳ１３－Ｓ２１モデルと比較して＋１２ｎｔ）のすべてを有する大きな環が形成されてもよい。このモデルに基づくと、Ｚリンカーは、８つ以下の対にわたって架橋する可能性があるが、四つまたは五つ以上の塩基対の後、センス鎖の開始部をＺリンカーに接続するループが必要となる。このモデルにおいてＳ２１残基の３’－リン酸に隣接するプロリノール部分は、ヒドロキシル基が外向きに突き出るような向きに置かれる。つまり、ＧａｌＮＡｃリガンドは複合体の表面上に配置され、Ａｇｏ２とぶつかる可能性が防止される（図３３）。

【１２４７】

この実験における環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡは、インビトロおよびインビボにおいて、強力な遺伝子発現サイレンシングを示した（表９、図３１Ａ～３１Ｂ）。ｓｃｉＲＮＡのセンス鎖の環化によって誘導される熱不安定化と二本鎖は、ＲＮＡｉ介在性サイレンシングに固有の効力に対し影響を及ぼすことを示しており、この影響は典型的にはインビトロで測定される場合、特に細胞内取り込みにトランスフェクション試薬を使用する場合に測定される。

【１２４８】

しかしながら、直鎖ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡと環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡとの間の効力の差は概して構築物がマウスで評価された場合、細胞培養と比較してあまり顕著ではなかった（図３１Ａ～３１Ｂ）。インビトロでの効力とインビボでの効力での相違は、効力に対する代謝安定性の影響が増大した結果である可能性があり（インビボでの有効性）、代謝安定性は、内因性のＲＮＡｉサイレンシング効力を上回っている。例えば、Ｔｔｒの系（図３１Ａ）では、ｓｃｉＲＮＡ中に安定化ＶＰ基を付加する（ｓｉ－５）ことによって、インビトロでの効力よりも、インビボでの効力に対し、数倍大きな影響が生じた。マウスでは、投与後１４日目で、ＶＰで修飾されたアンチセンス鎖を有するｓｃｉＲＮＡは、直鎖状の非ＶＰ修飾ｓｉＲＮＡ（ｓｉ－１）の効力と同等の効力であった。

【１２４９】
ラット血漿中では、ｓｃｉＲＮＡまたはｓｉＲＮＡのセンス鎖もアンチセンス鎖も、８時間では血漿中で分解されなかった。２４時間のインキュベーション後、ｓｃｉＲＮＡの環状センス鎖の大部分が直線化したことが観察された。このことから、環状構造は、プロドラッグのような作用をし得ること、加水分解（おそらくリン酸基の加水分解）によって、直鎖オリゴヌクレオチドが生じ得ることが示される。この加水分解は、ラット肝ホモジネート中で化合物をインキュベートしたときには発生しなかった。ＧａｌＮＡｃコンジュゲート化ｓｉＲＮＡは多くの場合、効率的なＡＳＧＰＲ介在性の取り込みによって肝臓内に急速に吸収される。したがって、肝細胞によるＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡの急速な取り込みによって、直鎖化がインビボ効力に影響を及ぼしている可能性がある。

【１２５０】
図３３の分子モデルは、二つのＲＮＡ鎖間で、シード領域のヌクレオチドの塩基対形成が保持されることによって、Ａｇｏ２にｓｃｉＲＮＡが搭載されるということを提唱している。このモデルはまた重要な構造変化にも焦点を当てており、当該変化は、ｓｃｉＲＮＡ二本鎖が曲がって、熱力学的に不安定化された二本鎖構造が生じることが必要となり得る。内因性のＲＮＡｉ効力の観点からすると、モデル中に示される部分的二本鎖構造は、これらのｓｃｉＲＮＡ構築物を、標準的なｓｉＲＮＡ二本鎖と一本鎖ｓｉＲＮＡ（ｓｓ－ｓｉＲＮＡ）との間のどこかに位置付けている。後者については、ｓｉＲＮＡ二本鎖のカウンターパートと比較して、１０～１００倍の効力低下が報告されている（Ｌｉｍａ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ｓｉＲＮＡｓ ａｃｔｉｖａｔｅ ＲＮＡｉ ｉｎ ａｎｉｍａｌｓ，”Ｃｅｌｌ，１５０：８８３－９４（２０１２）；Ｐｒａｋａｓｈ ｅｔ ａｌ．，“Ｌｉｐｉｄ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｉｍｐｒｏｖｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ｓｉＲＮＡ ａｎｄ ｇａｐｍｅｒ ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｉｎ ａｎｉｍａｌｓ，”ＡＣＳ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，８：１４０２－０６（２０１３）。これら文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる）。今日まで、ｓｓ－ｓｉＲＮＡプラットフォームを使用した治療開発上の臨床候補物質は報告されていない。さらに、ｓｃｉＲＮＡにＶＰ修飾を使用することによって、ｓｃｉＲＮＡに効力上の利益が生じた。

【１２５１】
本明細書の結果はまた、センス鎖が、Ａｇｏ２への二本鎖の搭載に関し、ＲＮＡｉ活性の役割を果たすことも示している。センス鎖も、ＧａｌＮＡｃリガンドの担体としての役割を果たしていた。肝細胞へのＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡ送達が成功したことから、環状センス鎖は、相対的に不安定であるにもかかわらず、アンチセンス鎖と複合体化されたことが示される。このことからさらに、ＧａｌＮＡｃリガンドが、内部ならびに末端に配置されたＲＮＡｉ治療薬を効率的に送達し得ることが確認される。

【１２５２】
本研究は、部分的二本鎖ｓｃｉＲＮＡ構築物の最初の実例である。当該構築物はインビボで薬理的および治療的に関連性のある用量で機能的に有効であり、代謝安定性の増大によって効力が増大し、さらにオフターゲット効果が低下した治療用ｓｉＲＮＡとして有用である。

【１２５３】
実施例１３：環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡの合成
環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡを本実施例で合成した。配列を以下の表に示す。

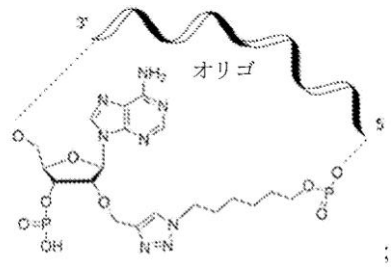
【表１９】

複数標的分子ID	オリゴID	配列(5’～3’)[a]	鎖	標的	オリゴID	配列5’～3’			鎖	標的
AM-206	A-2832990	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasauuucsasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasZ84	センス	CTNNB1/SOD1						
	A-141361	VPusUfsucgAfaUfCfaaucCfaAfcaguasgsc	アンチセンス	CTNNB1	A-444402	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg			アンチセンス	SOD1
AM-210	A-2832991	usascuguUfgGfAfUfugauucgasasauuucsasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasZ83L96	センス	CTNNB1/SOD1						
	A-141361	VPusUfsucgAfaUfCfaaucCfaAfcaguasgsc	アンチセンス	CTNNB1	A-444402	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg			アンチセンス	SOD1

[a]化学修飾は以下に示す：s、PS結合；小文字ヌクレオチド、2’-OMe；大文字ヌクレオチド、続いてf（Uf、Gf、Cf、Af）、2’-F；VP、5’-（E）-ビニルホスホネート；（Uhd）は、2’-O-ヘキサデシル-ウリジン-3’-ホスフェートである。Z83およびZ84の構造については、環化センス鎖を示すスキームIのZを参照のこと。

Ｚ８３は、ＡｐｙおよびＱ３０１の３’内部環状クリックによる環化センス鎖を示す。

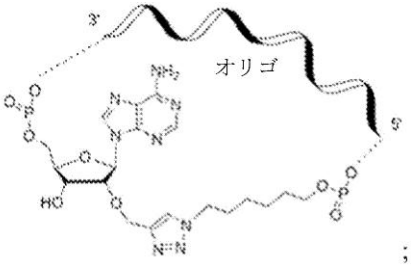
【化１５１】



；

Ｚ８４は、ＡｐｙおよびＱ３０１の３’末端環状クリックによる環化センス鎖を示す。

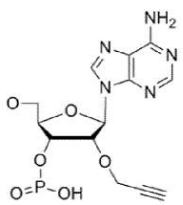
【化１５２】



；

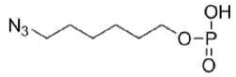
Ａｐｙとは、２’－Ｏ－プロピニル－アデノシン－３’－リン酸塩を指す。

【化１５３】



Ｑ３０１とは、６－アジドヘキシルホスフェートを指す。

【化１５４】



【１２５４】

オリゴヌクレオチドは、ＭｅｒＭａｄｅ－１２　ＤＮＡ／ＲＮＡ合成装置上で合成した。Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社のＳｔｅｒｌｉｎｇ溶媒／試薬、５００－Å制御細孔ガラス（ＣＰＧ）固形支持体（Ｐｒｉｍｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ社）、２’－デオキシ３’－ホスホロアミダイト（Ｔｈｅｒｍｏ社）、および２’－Ｏ－メチル（２’－ＯＭｅ）、２’－デオキシ－２’－フルオロ（２’－Ｆ）リボヌクレオシド　３’－ホスホロアミダイト（Ｈｏｎｇｅｎｅ社）は全て受領した状態のままで使用した。２’－ＯＭｅ－ウリジン－５’－ｂｉｓ－ＰＯＭ－（Ｅ）ビニルホスホネート（ＶＰ）３’－ホスホロアミダイト（Ｐａｒｍａｒ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｆａｃｉｌｅ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ｇｅｏｍｅｔｒｙ，ａｎｄ　２’－ｓｕｂｓｔｉｔｕｅｎｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｏｆ　５’－（Ｅ）－　ａｎｄ　５’－（Ｚ）－ｖｉｎｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｓｉＲＮＡ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，６１：７３４－４４（２０１８）に記載される手順に従い合成された。当該文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を、８５％アセトニトリル１５％ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）中、０．１５Ｍに溶解し、合成装置上で標準条件を使用してカップリングさせた。ＧａｌＮＡｃ　ＣＰＧ支持体（Ｌ、スキームＩ）を、Ｎａｉｒ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ　Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ　ｓｉＲＮＡ　ｌｏｃａｌｉｚｅｓ　ｉｎ　ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ　ａｎｄ　ｅｌｉｃｉｔｓ　ｒｏｂｕｓｔ　ＲＮＡｉ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｇｅｎｅ　ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３６：１６９５８－６１（２０１４）に記載される通りに作製し、使用し、当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。５－ブロモヘキシルホスホロアミダイト（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社、カタログ番号１０－１９４６）を、アセトニトリル中、０．１５Ｍに溶解し、合成装置上で標準条件を使用してカップリングした。３’－アルキンＣＰＧ支持体および３’－アルキンヒドロキシプロリノールホスホロアミダイト（Ｙ、スキームＩ）を、Ｊａｙａｐｒａｋａｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｎｏｎ－ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ　ｂｕｉｌｄｉｎｇ　ｂｌｏｃｋｓ　ｆｏｒ　ｃｏｐｐｅｒ－ａｓｓｉｓｔｅｄ　ａｎｄ　ｃｏｐｐｅｒ－ｆｒｅｅ　ｃｌｉｃｋ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｏｆ　ＲＮＡ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ，”Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．，１２：５４１０－１３（２０１０）に記載されるように作製および使用した。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる。低含水アセトニトリルを、ＥＭＤ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓから購入した。装置に備えられたものに基づく改変合成サイクルを使用して、ＤＮＡオリゴヌクレオチドおよびＲＮＡオリゴヌクレオチドを合成した。０．６Ｍの５－（Ｓ－エチルチオ）－１Ｈ－テトラゾールのアセトニトリル溶液を、活性化物質として使用した。ホスホロアミダイト溶液は、２’－ＯＭｅウリジンおよびシチジンに対する共溶媒として１５％ＤＭＦを含み、無水アセトニトリル中、０．１５Ｍとした。酸化試薬は、ＴＨＦ／ピリジン／水中、０．０２Ｍ　I_2とした。Ｎ，Ｎ－ジメチル－Ｎ’－（３－チオキソ－３Ｈ－１，２，４－ジチアゾール－５－イル）メタンイミドアミド（ＤＤＴＴ）、ピリジン中、０．０９Ｍを硫化試薬として使用した。脱トリチル化試薬は、ジクロロメタン（ＤＣＭ）中、３％ジクロロ酢酸（ＤＣＡ）とした。

【１２５５】

固相合成（ＳＰＳ）の完了後、ＣＰＧ固形支持体を、各流れの後に５分間保持しながら、無水アセトニトリル中、５％（ｖ／ｖ）ピペリジンで三回洗浄した。次いで、支持体を無水アセトニトリルで洗浄し、アルゴンで乾燥させた。次いで、オリゴヌクレオチドを、２８～３０％（ｗ／ｖ）NH_4OHと共に３５℃で２０時間インキュベートした。ＶＰ含有オリゴヌクレオチドについては、ＳＰＳの完了後、ＣＰＧ固形支持体を、２８～３０％

（ｗ／ｖ）のＮＨ４ＯＨと共にインキュベートし、５％（ｖ／ｖ）のジエチルアミンを３５℃で２０時間添加した（Ｏ’Ｓｈｅａ ｅｔ ａｌ．，“Ａｎ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｄｅｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ５’－［Ｏ，Ｏ－ｂｉｓ（ｐｉｖａｌｏｙｌｏｘｙｍｅｔｈｙｌ）］－（Ｅ）－ｖｉｎｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ，”Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，７４：６１８２－８６（２０１８）を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）。溶媒を濾過により収集し、支持体を水ですすぎ、その後に分析した。約１ＯＤ２６０単位／ｍＬのオリゴヌクレオチド溶液を粗生成物の分析に使用した。３０～５０μＬの溶液を注入した。ＬＣ／ＥＳＩ－ＭＳを、ＸＢｒｉｄｇｅ Ｃ８カラム（２．１×５０ｍｍ、２．５μｍ）を６０℃で使用したＡｇｉｌｅｎｔ ６１３０単一四重極ＬＣ／ＭＳシステムで行った。緩衝液Ａは、２００ｍＭの１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（ＨＦＩＰ）および１６．３ｍＭのトリエチルアミン（ＴＥＡ）の水溶液からなり、緩衝液Ｂは１００％メタノールとした。１０分にわたり、緩衝液Ｂの０％～４０％の勾配として、続いて洗浄し、０．７０ｍＬ／分の流量で再較正を行った。カラム温度は７５℃とした。

【１２５６】

全てのオリゴヌクレオチドは、Ｎａｉｒ ｅｔ ａｌ．，“Ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ｓｉＲＮＡ ｌｏｃａｌｉｚｅｓ ｉｎ ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ ａｎｄ ｅｌｉｃｉｔｓ ｒｏｂｕｓｔ ＲＮＡｉ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｇｅｎｅ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１３６：１６９５８－６１（２０１４）に記載される手順を基にして精製および脱塩され、さらにアニーリングしてＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡを形成し、当該文献は、その全体で参照により本明細書に組み込まれる。

【１２５７】

センス鎖オリゴヌクレオチドの環化、およびｓｃｉＲＮＡ－ＧａｌＮＡｃコンジュゲートの形成－環化オリゴヌクレオチドのための５’－アジドおよび「クリック」化学合成。

センス鎖を官能化するために、市販の５－ブロモヘキシルホスホロアミダイトを固相合成中に５’末端にカップリングさせた。６－アジドヘキシルのクリック化学の「ハンドル」を提供するために、５’－（５－ブロモヘキシル）修飾オリゴヌクレオチドをローディングした１０μｍｏｌのＣＰＧ（Ｌｉｅｔａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ａｎ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｒｅａｇｅｎｔ ｆｏｒ ５’－ａｚｉｄｏ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，”Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，４８，８７９５－９８（２００７）を参照のこと。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる）を、１３０ｍｇのアジ化ナトリウムおよび３００ｍｇのヨウ化ナトリウムを含有する１５ｍＬの無水ＤＭＦ溶液中に懸濁した。混合物を６５℃で７５分間、激しく振とうした。冷却後、溶液を濾過し、得られた５’－（５－アジドヘキシル）固形支持体に結合したオリゴヌクレオチドを含むＣＰＧビーズを、ＤＭＦ（２×１０ｍＬ）で洗浄し、アルゴン流下で乾燥させた。オリゴヌクレオチドを固形支持体から放出させ、上述のように精製および脱塩した。次いで、オリゴヌクレオチドを約１０ ＯＤ２６０単位／ｍＬの濃度まで水に溶解させた。銅（Ｉ）触媒アルキンアジド付加環化（ＣｕＡＡＣ）「クリック」環化反応でＺを得て（スキームＩ）、２ｍＬのオリゴヌクレオチド溶液（約２００ ＯＤ２６０単位）を、２ｍＬのメタノール、１．１ｍＬのＬ－アスコルビン酸ナトリウム（０．１ｍＭ）、および１．１ｍＬの硫酸銅（２０ｍＭ）と混合した。反応混合物を、撹拌バーを備えたマイクロ波（ＭＷ）管容器に入れ、ＭＷ反応器中に、６０℃で４０分間置いた（電力は約８Ｗ、撹拌、冷却、Ｐ＝０）。このプロトコルは、Ｌｉｅｔａｒｄ ｅｔ ａｌ．，“Ｎｅｗ ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ ｃｙｃｌｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｂｉｃｙｃｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ｂｙ ｃｌｉｃｋ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｓｓｉｓｔｅｄ ｂｙ ｍｉｃｒｏｗａｖｅｓ，”Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，７３，１９１－２００（２００８）に記載されるプロトコルの改変版である。当該文献はその全体で参照により本明細書に組み込まれる。全ての環状オリゴヌクレオチドを

精製および脱塩し、アンチセンス鎖とさらにアニーリングさせて、上述のように、ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡを形成した。

【１２５８】

マウスにおける、ＩＣＶ注射を介した例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡのノックダウンの評価。

例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）による、標的のｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１のノックダウンを、マウスにおいて、１００μｇのＩＣＶ注射後、マウス中枢神経系で評価した。

【１２５９】

実験設定および評価方法は、実施例８で検討したものと同じとした。ＡＭ－２０６の配列、化学パターン、およびリンカーも、図２３Ａ～２３Ｃに示される。

【１２６０】

マウス脳（図２３Ｄ）、肝臓および心臓（図２３Ｅ）における標的ｍＲＮＡノックダウンは、直鎖ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体および混合二本鎖送達とも比較された。結果を図２３Ｄ～２３Ｅに示す。

【１２６１】

ラットにおける、ＩＴ注射を介した例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡのノックダウンの評価。

例示的な環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ（ＡＭ－２０６）による、標的のｍＳＯＤ１およびｍＣＴＮＮＢ１のノックダウンを、ラットにおいて、０．３ｍｇのＩＴ注射後、ラット中枢神経系で評価した。

【１２６２】

実験設定および評価方法は、実施例９で検討したものと同じとした。ＡＭ－２０６の配列、化学パターン、およびリンカーも、図２４Ａ～２４Ｃに示される。

【１２６３】

ラットの胸髄、前頭葉、海馬、および線条体における標的ｍＲＮＡノックダウンも、直鎖ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体および混合二本鎖送達と比較した。結果を図２４Ｄに示す。

【１２６４】

ラット脳ホモジネートにおける環状ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡのオリゴヌクレオチド代謝の分析

例示的なＣＮＳ標的化環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡの代謝傾向を、ラット脳ホモジネートにおいて環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡを２４時間インキュベーションした後に評価し、直鎖ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ複合体と比較した。

【１２６５】

実験設定および評価方法は、実施例１１で検討したものと同じとしい、結果を図２６Ｄに要約する。

【図面】

【図１】

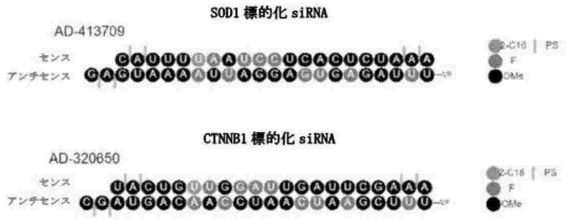


図 1A

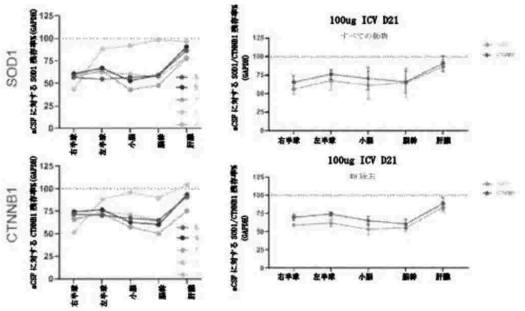


図 1B

【図２－１】

群番号	二重鎖 ID	センス鎖 ID	リンカー	パターン	動物番号	脳室 ICV 時点	用量 (ug)	測定値
1		aCSF	-	-			-	
2	AD-413709 AD-320650	A-555737/ A-637458	該当なし	混合物			各 50ug	
3	AM-183	A-2112110.1	dTdTdT	CTNNB1-SOD1 2xC16				
4	AM-184	A-2112111.1	uuu	CTNNB1-SOD1 2xC16				
5	AM-185	A-2112112.1	UUU	CTNNB1-SOD1 2xC16				
6	AM-186	A-2112113.1	UUUUU	CTNNB1-SOD1 2xC16	4			右半球、左半球、小脳、脳幹、肝臓、心臓、および肺における KD
7	AM-187	A-2112117.1	dTdTdT	CTNNB1-SOD1 1xC16 (SOD1)		21 日目	100ug	
8	AM-188	A-2112116.1	dTdTdT	SOD1-CTNNB1 2xC16				
9	AM-189	A-2112119.1	uuu	SOD1-CTNNB1 2xC16				
10	AM-190	A-2112130.1	dTdTdT	CTNNB1-SOD1 1xC16 (CTNNB1)				

図 2A

図 2B

【図２－２】

図 2C

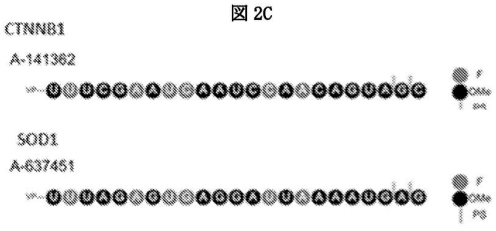


図 2D

【図３Ａ】

図 3A

【図３Ｂ】

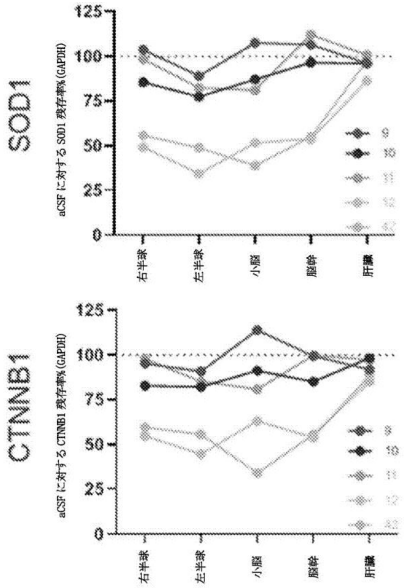


図 3B

【図３Ｃ】

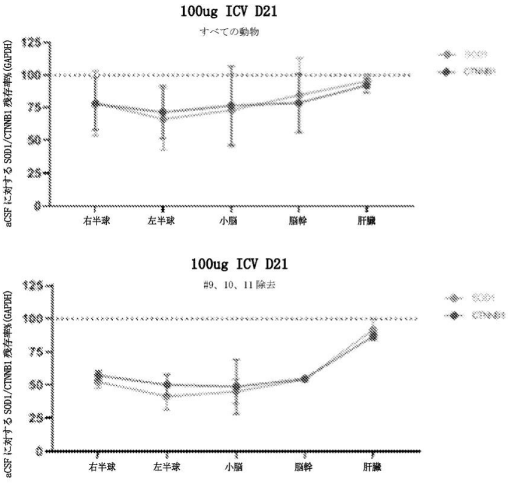


図 3C

【図４－１】

図 4A

【図４－２】

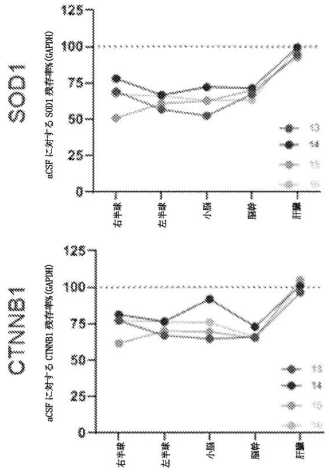


図 4B

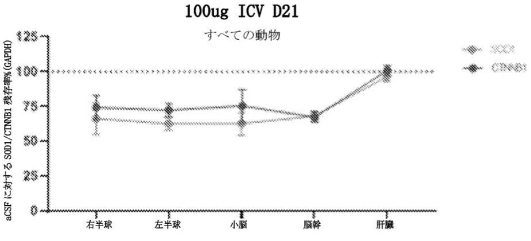


図 4C

【図５－１】

図 5A

【図５－２】

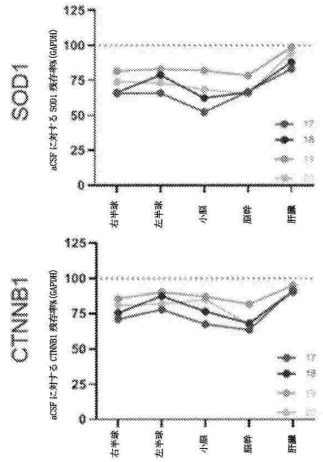


図 5B

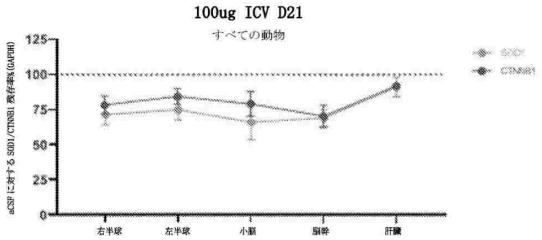


図 5C

【図６－１】

図 6A

【図６－２】

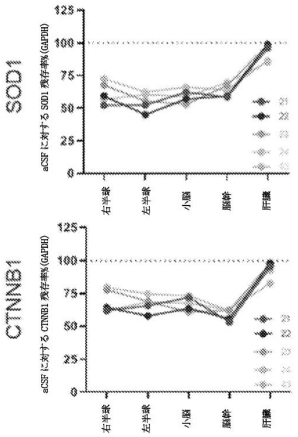


図 6B

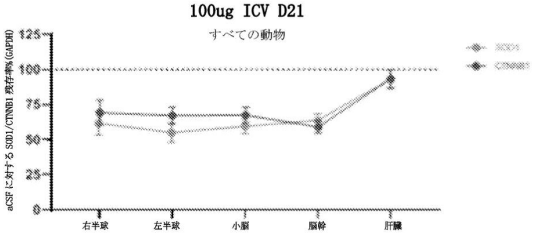


図 6C

【図７－１】

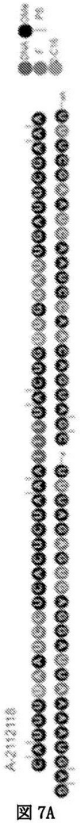


図 7A

【図７－２】

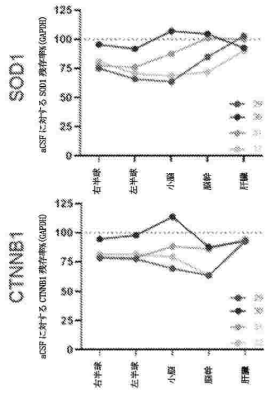
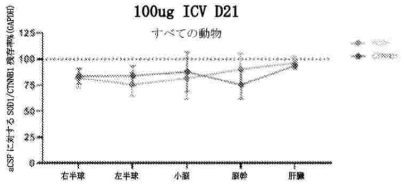


図 7B



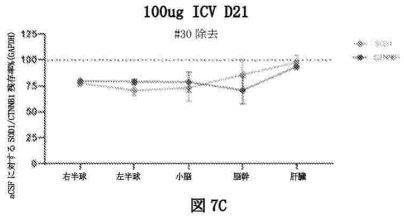


図 7C

【図８－１】

図 8A

【図８－２】

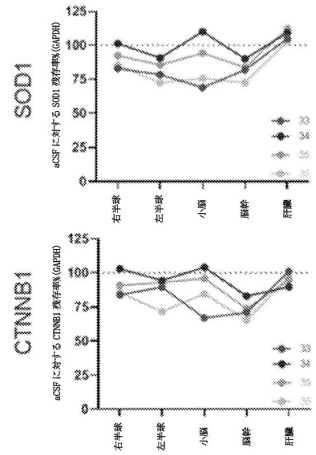


図 8B

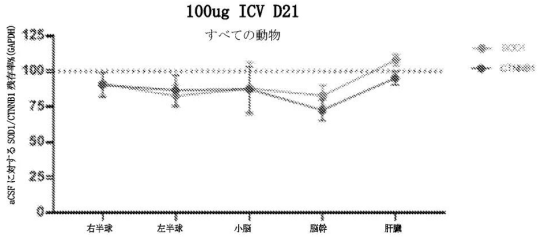


図 8C

【図９Ａ】

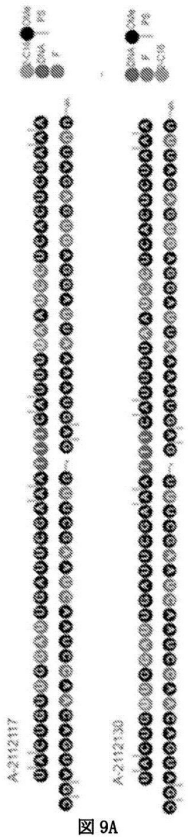


図 9A

【図９Ｂ】

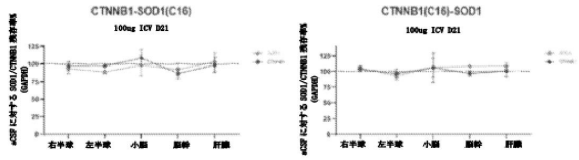


図 9B

【図１０－１】

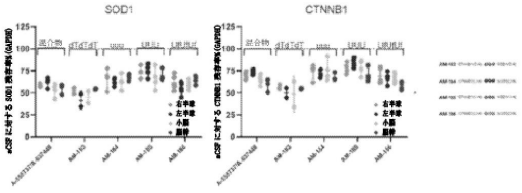


図 10A

【図１０－２】

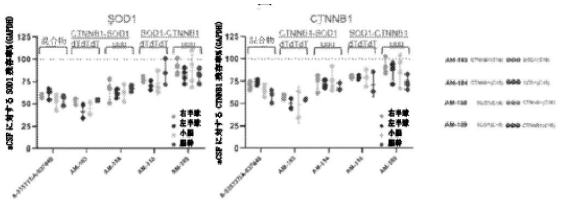


図 10B

【図１０－３】

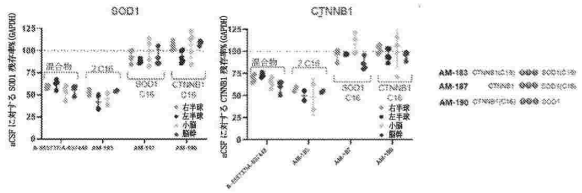


図 10C

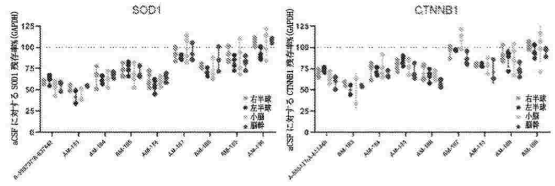


図 10D

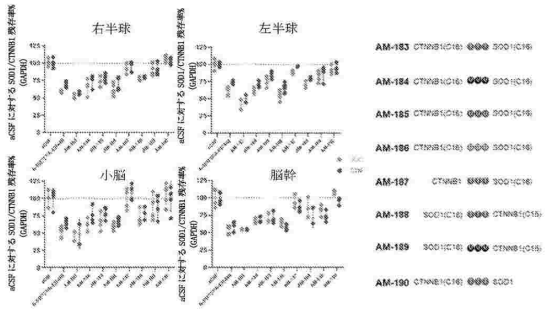


図 10E

【図１１】

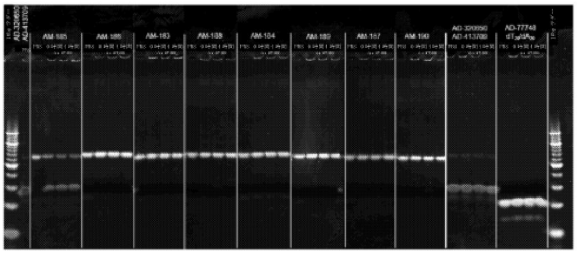


図 11

【図１２】

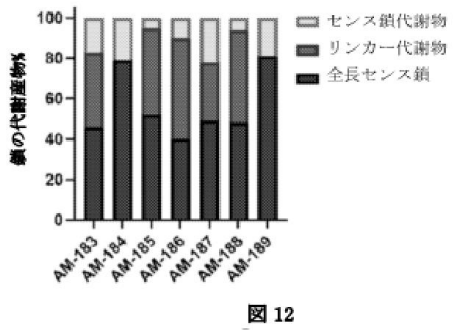


図 12

【図１３】

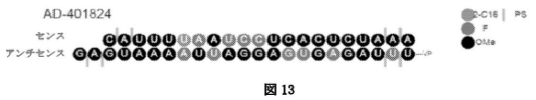


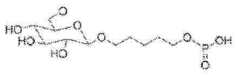
図 13

【図１４】

群番号	TA	リンカー	用量	N=3/群	PD 分析	PK 分析
1	人工 CSF	-	-	合計30匹のラット	9つの腰部或2~3つの末梢組織 7日目および28日目	血漿*:6時点 CSF:7日目および28日目
2	AD-401824 (親)	-	0.3mg			
3	AM-178 (フルオロリンカー)	GIAMUI				
4	AM-182 (DNA リンカー)	dGdAdT				
5	AM-182	3X Q315				

血漿*:
0.5時間、4時間、24時間、7日間、14日間、および28日間

図 14A



Q315: グルコースリンカー

図 14B

【図１５Ａ】

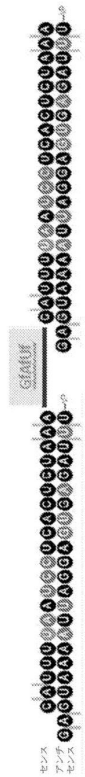


図 15A

【図１５Ｂ】

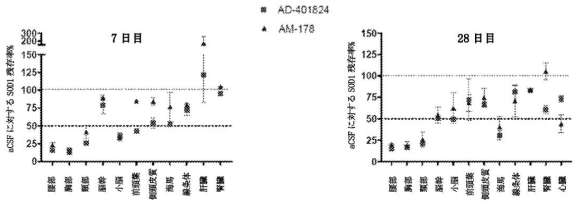


図 15B

【図１６Ａ】

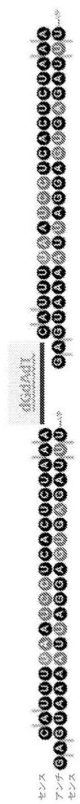


図 16A

【図１６Ｂ】

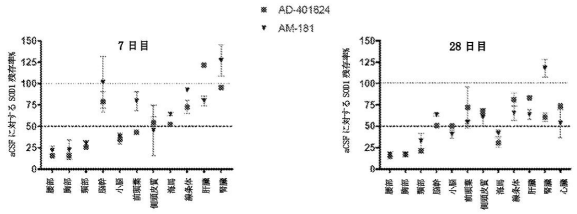


図 16B

【図１７Ａ】

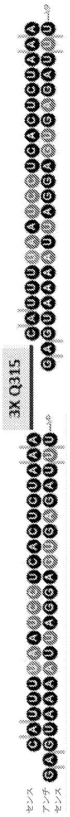


図 17A

【図１７Ｂ】

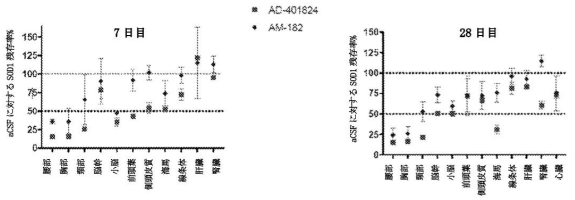


図 17B

【図１８】

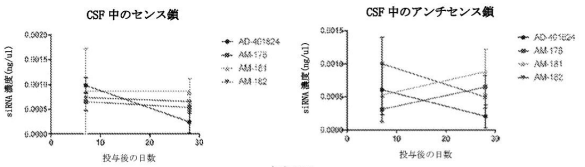


図 18A

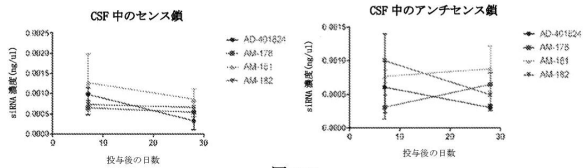


図 18B

【図１９】

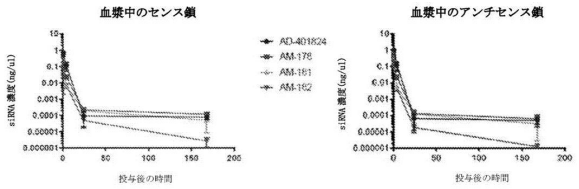


図 19A

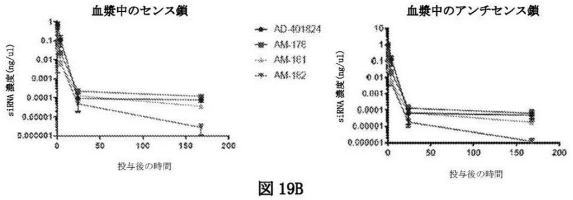


図 19B

【図２０】

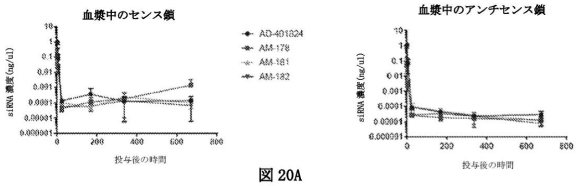


図 20A

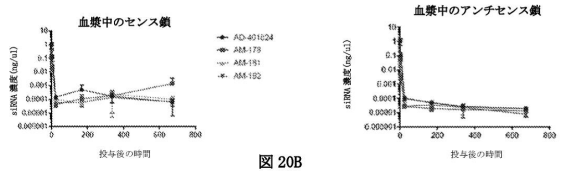


図 20B

【図２１】

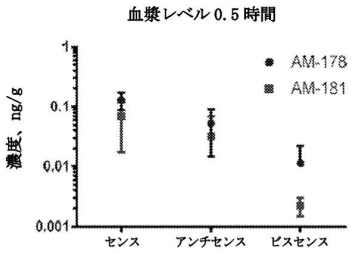


図 21A

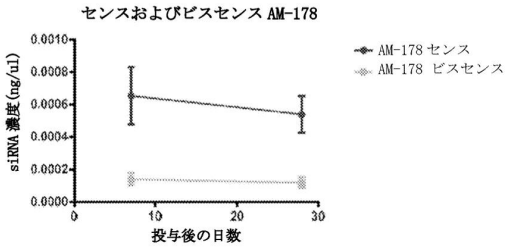


図 21B

【図２２－１】

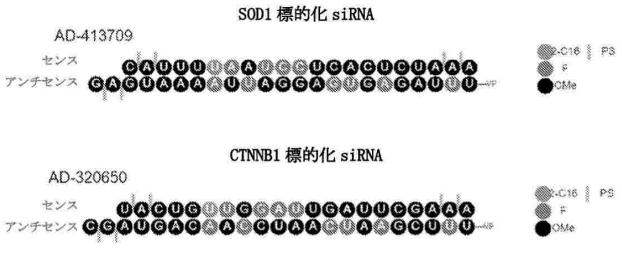


図 22A

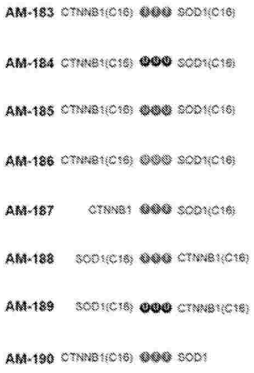


図 22B

【図２２－２】

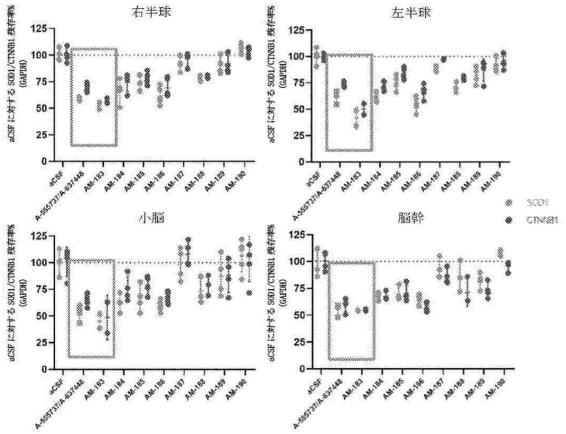


図 22C

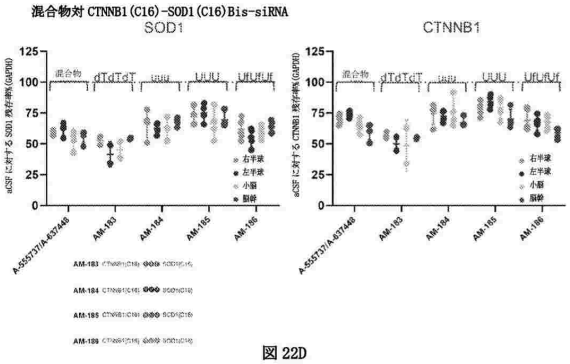


図 22D

【図２２－３】

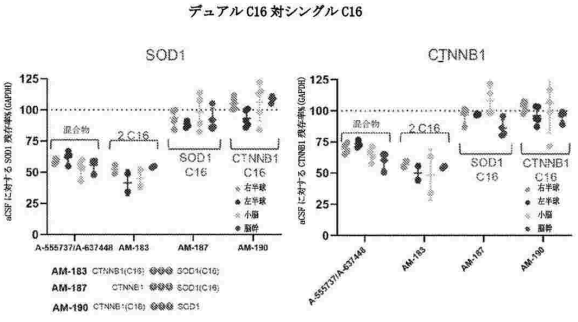


図 22E

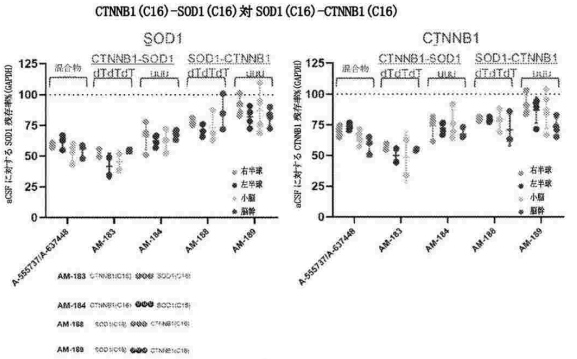


図 22F

【図２２－４】

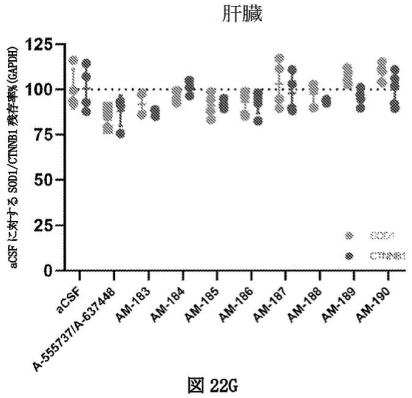


図 22G

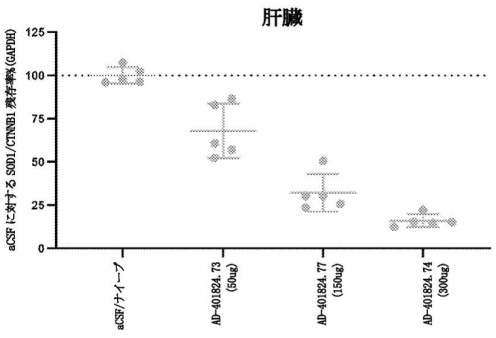


図 22H

【図２３－１】

群番号	二重鎖 ID	標的	センス鎖 ID	リンカー	動物番号	組織/CSF 時点	5μl中の用量（μg）	測定値
1	–	–	aCSF	–	4	21日目	–	脳、肝臓、心臓
2	AD-401824 AD-503801	CTNNB1/SOD1	A-637448 A-555737	該当なし			各50μg	
3	AM-183		A-2112110.1	dTdTdT			100μg	
4	AM-202		A-2112110.1	dTdTdT				
5	AM-203		A-2112114	3xQ304				
6	AM-204		A-2112115	3xQ317				
7	AM-205		A-2484857	3xY195				
8	AM-206		A-2832990	uuu				

図 23A

【図２３－２】

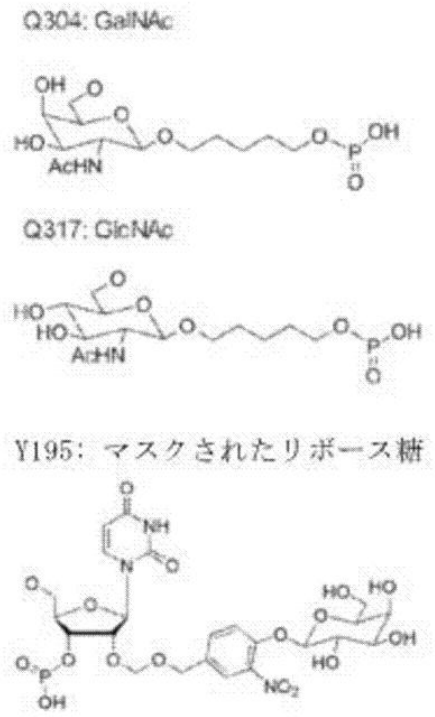


図 23B

【図２３－３】

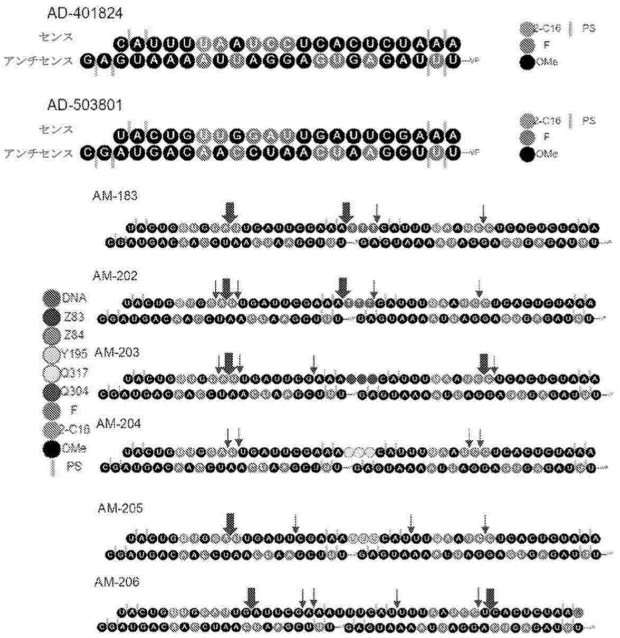


図 23C

【図２３－４】

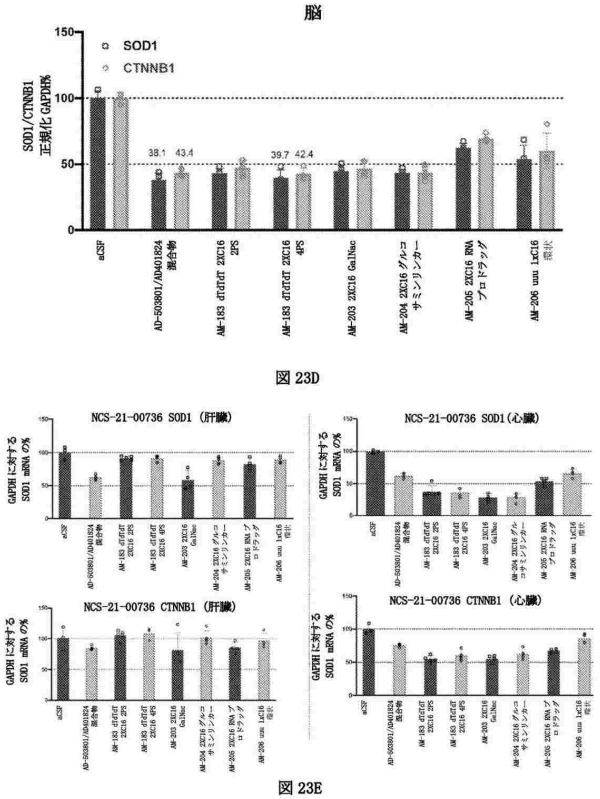


図 23D

図 23E

【図２４－１】

群	治療/二重ID	化学	用量 (mg)	投与経路/レジメン	期間	動物	組織採取*
1	aCSF	–	–	D1 シングルフリーハンド IT	D15	N=4 メスSDラット	CNS（qPCR用に凍結）： • 胸髄、前頭葉、小脳、海馬、線条体 CNS(組織学のために固定)： • 左半球 末梢（qPCR用に凍結）： • 心臓、肝臓
2	AD-401824/AD-503801	C16 SOD1/C16 CTNNB1 混合物	0.15/0.15				
3	AM-183	dTdTdT (10 PS)	0.3				
4	AM-202	dTdTdT (12 PS)	0.3				
5	AM-203	3xQ304 (12 PS)	0.3				
6	AM-204	3xQ317 (12 PS)	0.3				
7	AM-206	uuu (12 PS)	0.3				
8	aCSF	–	–		D29		
9	AD-401824/AD-503801	C16 SOD1/C16 CTNNB1 混合物	0.15/0.15				
10	AM-183	dTdTdT (10 PS)	0.3				
11	AM-202	dTdTdT (12 PS)	0.3				
12	AM-203	3xQ304 (12 PS) GalNac	0.3				
13	AM-204	3xQ317 (12 PS) GlcNac	0.3				
14	AM-206	uuu (12 PS) 環状化	0.3				

図 24A

【図２４－２】

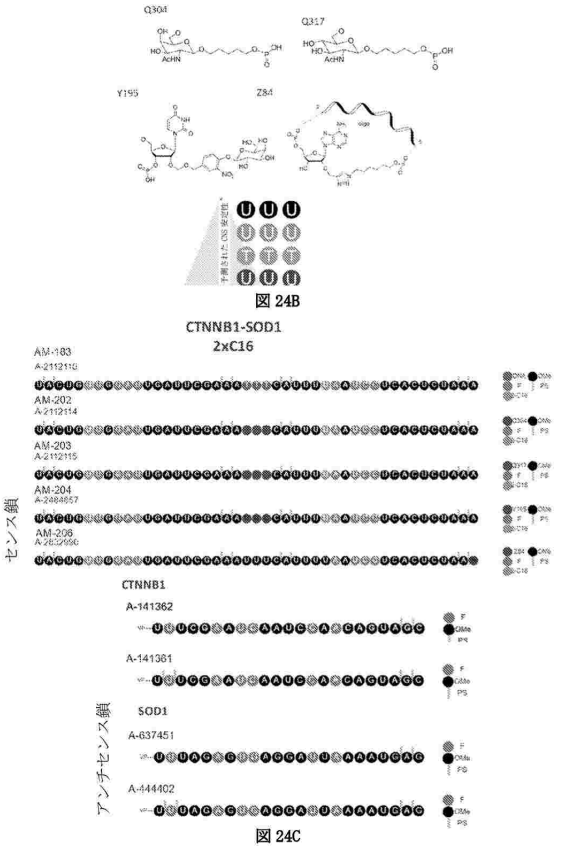


図 24B

図 24C

【図２４－３】

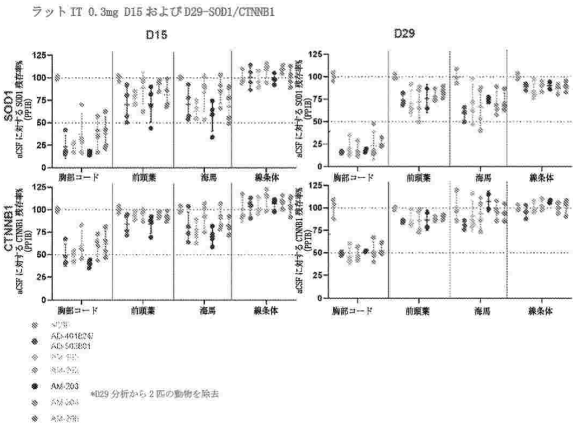


図 24D

【図２５Ａ】

群	治療/二重ID	リンカーケミストリー	30μl中の用量(mg)	投与経路/レジメン	期間	動物*(合計51)	組織採取*
1	aCSF	-	-	シングルD1 IT用量*	D15 (14日間)	4 メスSDラット	CNS（qPCR用に凍結）： • 胸髄、前頭葉、小脳、海馬、線条体 CNS(組織学のために固定)： • 左半球 末梢（qPCR用に凍結）： • 心臓、肝臓
2	AD-401824 + AD-503801	C16 SOD1 + C16 CTNNB1 混合物	0.3 + 0.3				
3	AM-202	dTdTdT（DNA）	0.6				
4	AM-203	3xQ304 (GalNAc)					
5	AM-204	3xQ317 (GlcNAc)					
6	AM-261	Cuは5'-3'をdTdTdTでクリック					
7	AM-263	Q8dTdTdT, 3' L8					
8	AM-264	Q8dTdTdT, 3' L8, 還元PS					
9	AM-265	Q8Q429（カテプシン切断可能）					
10	AM-266	3xY254（マスクされたリボU）					
11	AM-267	Q8dTdTdT、3' L8なし					
12	AM-268	BCNは5'-3'をdTdTdTでクリック					

図 25A

【図２５Ｂ】

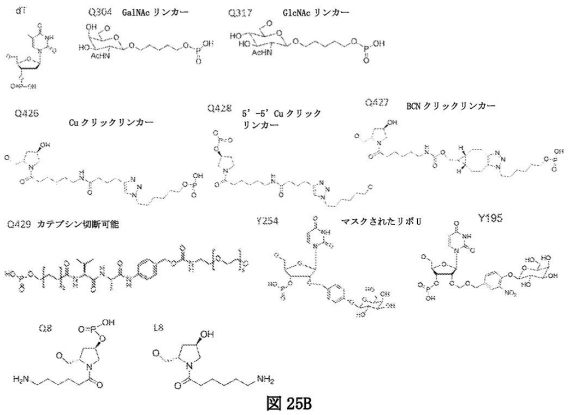


図 25B

【図２５Ｃ】

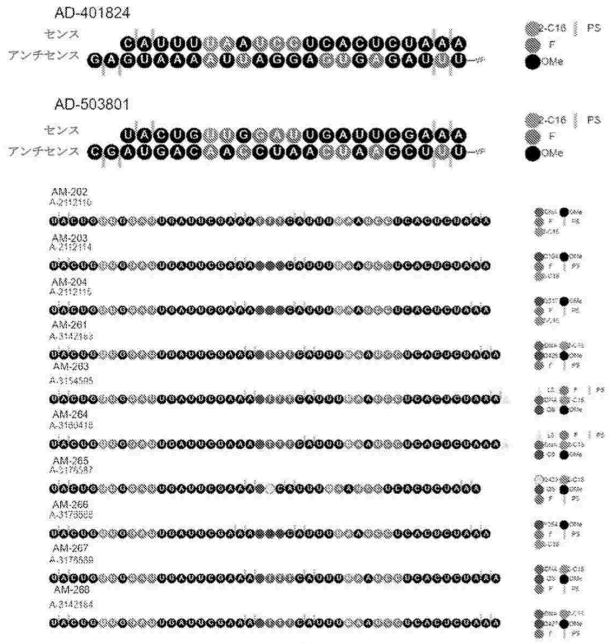


図 25C

【図２５Ｄ】

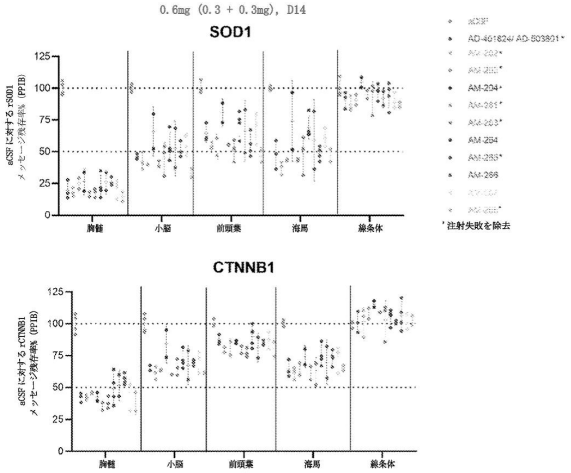


図 25D

【図２６Ａ】

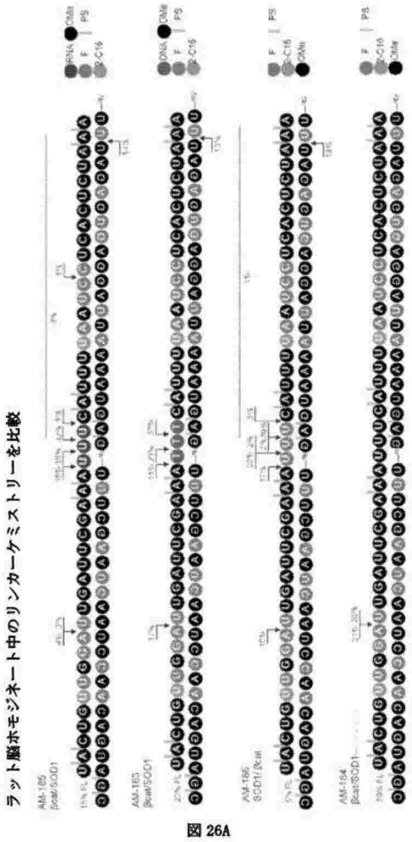


図 26A

【図２６Ｂ】

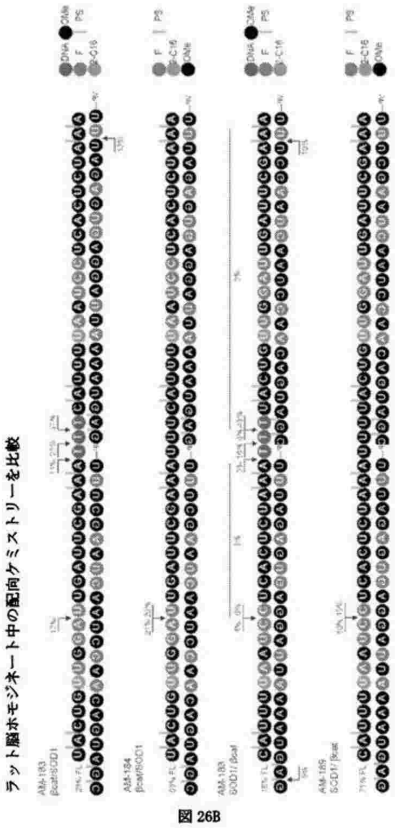


図 26B

【図２６Ｃ】

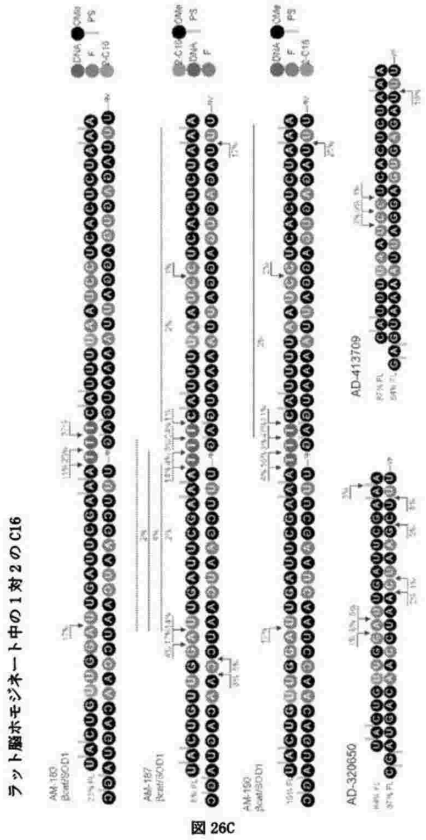


図 26C

【図２６Ｄ】

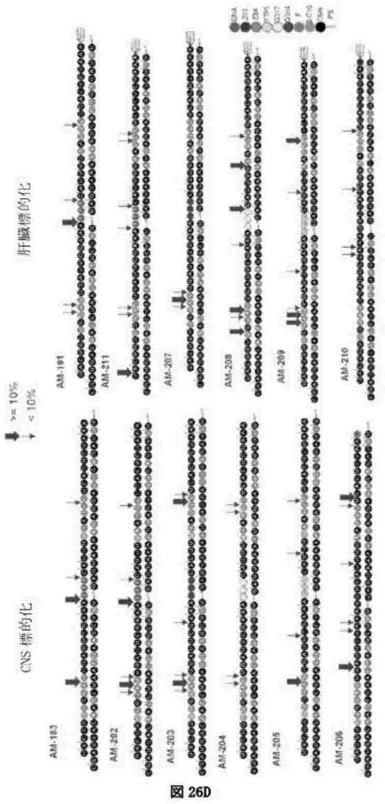


図 26D

【図２７】

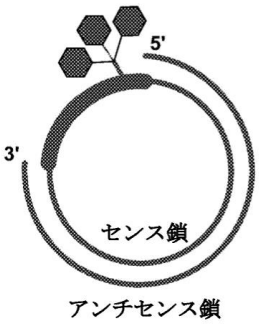


図 27A

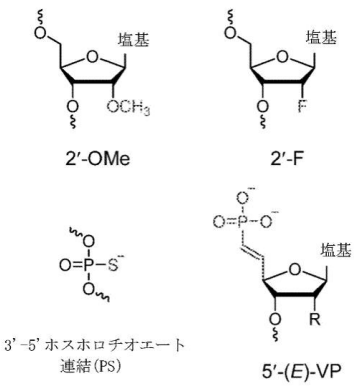


図 27B

【図２８－１】

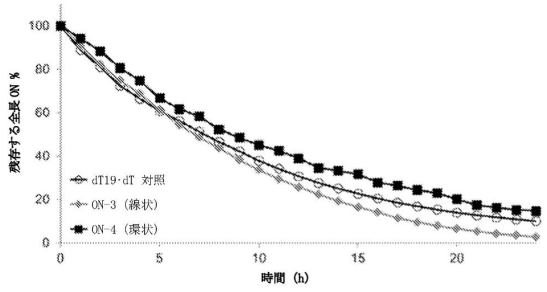


図 28A

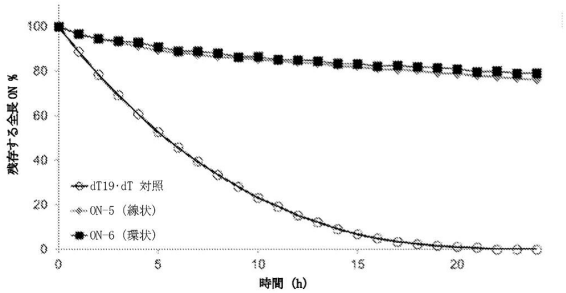


図 28B

【図２８－２】

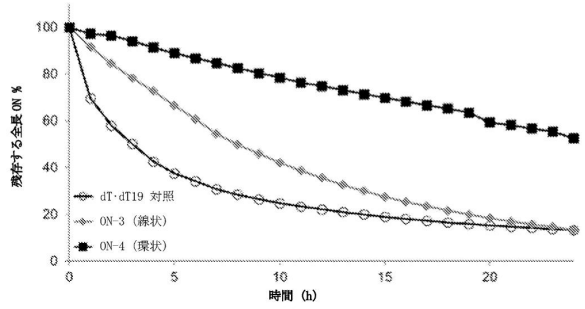


図 28C

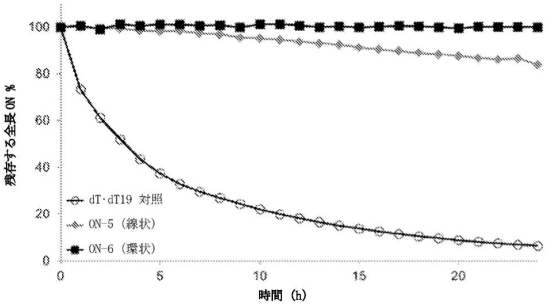


図 28D

【図２９】

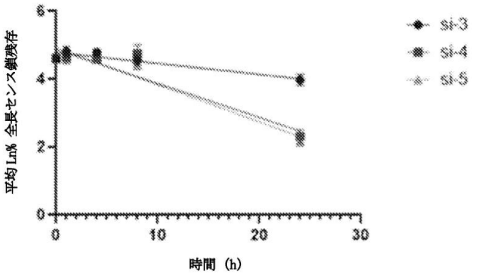


図 29A

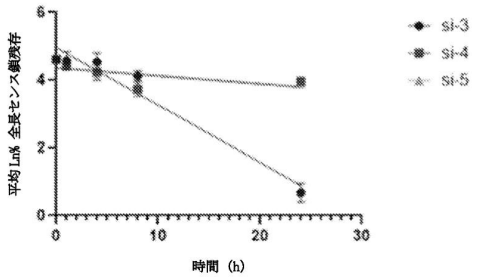


図 29B

【図３０】

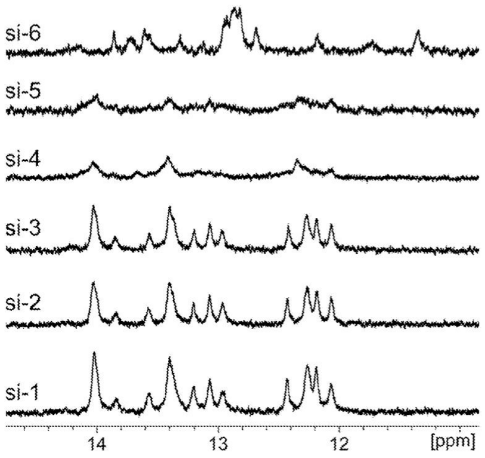


図 30

【図３１】

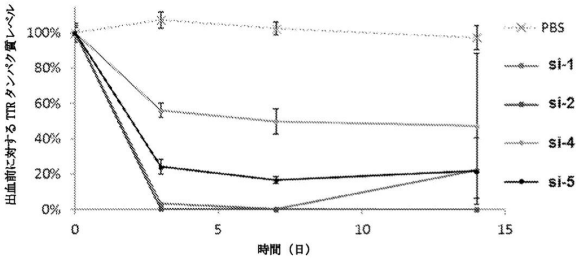


図 31A

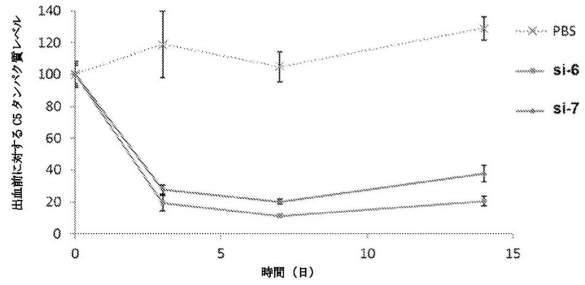


図 31B

【図３２】

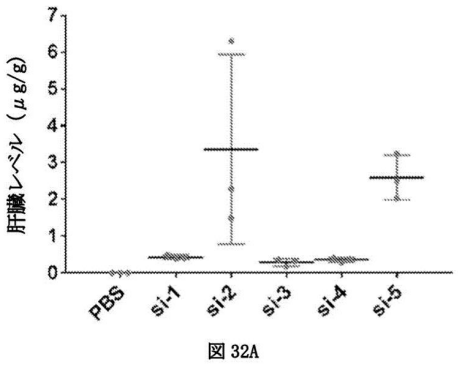


図 32A

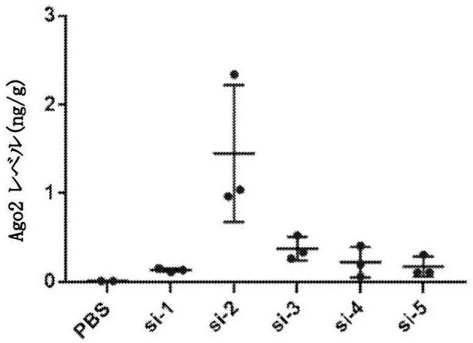


図 32B

【図３３】

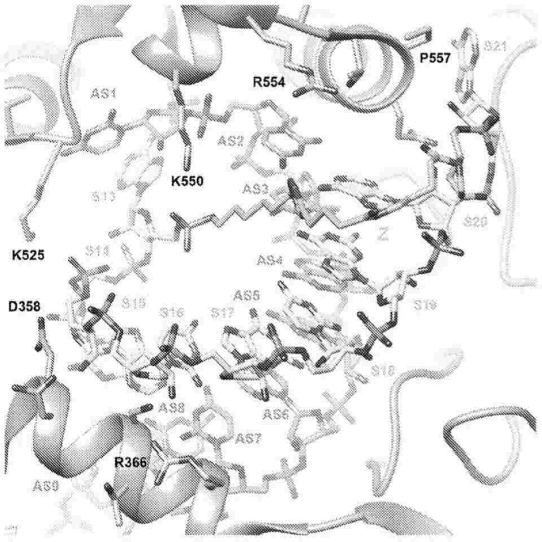


図 33

【手続補正書】
【提出日】令和6年5月1日(2024.5.1)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５１１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５１１】
一部の実施形態では、複数標的分子（例えば、ｂｉｓ　ｓｉＲＮＡまたはｓｃｉＲＮＡ（またはｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡ）剤などのエフェクター分子）は、特定の眼組織への送達を介在する受容体を標的とする標的化リガンドをさらに含む。これらの標的化リガンドは、特定の硝子体内送達および全身送達を可能とする親油性部分と組み合わせてコンジュゲートされ得る。眼組織への受容体介在性送達を標的とする標的化リガンドの例は、例えば、オールトランスレチノール（レチノイン酸受容体を標的とする）；ＲＧＤペプチド（網膜色素上皮細胞を標的とする）、例えばＨ－Ｇｌｙ－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｓｅｒ－Ｐｒｏ－Ｌｙｓ－Ｃｙｓ－ＯＨ（配列番号３７）またはＣｙｃｌｏ（－Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｄ－Ｐｈｅ－Ｃｙｓ（配列番号３８）；ＬＤＬ受容体リガンド；および炭水化物系リガンド（後眼の内皮細胞を標的とする）である。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０５１８】
例示的なエンドソーム溶解性／融合ペプチドとしては、限定されないが、ＡＡＬＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＥＡＡＡＡＧＧＣ（ＧＡＬＡ）（配列番号３９）；ＡＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＡＡＡＧＧＣ（ＥＡＬＡ）（配列番号４０）；ＡＬＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＥＡ（配列番号４１）；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＷＤＹＧ（ＩＮＦ－７）（配列番号４２）；ＧＬＦＧＡＩＡＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＷＹＧ（Ｉｎｆ　ＨＡ－２）（配列番号４３）；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＷＹＧＣＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤ　ＧＷＹＧＣ（ｄｉＩＮＦ－７）（配列番号４４）；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＧＣＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＭＩＤＧＧＣ（ｄｉＩＮＦ－３）（配列番号４５）；ＧＬＦＧＡＬＡＥＡＬＡＥＡＬＡＥＨＬＡＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＡＧＧＳＣ（ＧＬＦ）（配列番号４６）；ＧＬＦＥＡＩＥＧＦＩＥＮＧＷＥＧＬＡＥＡＬＡＥＡＬＥＡＬＡＡＧＧＳＣ（ＧＡＬＡ－ＩＮＦ３）（配列番号４７）；ＧＬＦ　ＥＡＩ　ＥＧＦＩ　ＥＮＧＷ　ＥＧｎＩ　ＤＧ　Ｋ　ＧＬＦ　ＥＡＩ　ＥＧＦＩ　ＥＮＧＷ　ＥＧｎＩ　ＤＧ（ＩＮＦ－５、ｎはノルロイシンである）（配列番号４８）；ＬＦＥＡＬＬＥＬＬＥＳＬＷＥＬＬＬＥＡ（ＪＴＳ－１）（配列番号４９）；ＧＬＦＫＡＬＬＫＬＬＫＳＬＷＫＬＬＬＫＡ（ｐｐＴＧ１）（配列番号５０）；ＧＬＦＲＡＬＬＲＬＬＲＳＬＷＲＬＬＬＲＡ（ｐｐＴＧ２０）（配列番号５１）；ＷＥＡＫＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡＫＨＬＡＫＡＬＡＫＡＬＫＡＣＥＡ（ＫＡＬＡ）（配列番号５２）；ＧＬＦＦＥＡＩＡＥＦＩＥＧＧＷＥＧＬＩＥＧＣ（ＨＡ）（配列番号５３）；ＧＩＧＡＶＬＫＶＬＴＴＧＬＰＡＬＩＳＷＩＫＲＫＲＱＱ（メリチン（Ｍｅｌｉｔｔｉｎ））（配列番号５４）；H_5WYG（配列番号５５）；およびCHK_6HC（配列番号５６）が挙げられる。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０５２１
【補正方法】変更
【補正の内容】

【０５２１】
例示的な細胞透過ペプチドとしては限定されないが、ＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎ）（配列番号５７）；ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＣ（Ｔａｔ断片の４８－６０）（配列番号５８）；ＧＡＬＦＬＧＷＬＧＡＡＧＳＴＭＧＡＷＳＱＰＫＫＫＲＫＶ（シグナル配列を基にしたペプチド）（配列番号５９）；ＬＬＩＩＬＲＲＲＩＲＫＱＡＨＡＨＳＫ（ＰＶＥＣ）（配列番号６０）；ＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（トランスポータン）（配列番号６１）；ＫＬＡＬＫＬＡＬＫＡＬＫＡＡＬＫＬＡ（両親媒性モデルペプチド）（配列番号６２）；ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（Ａｒｇ９）（配列番号６３）；ＫＦＦＫＦＦＫＦＦＫ（細菌細胞壁透過ペプチド）（配列番号６４）；ＬＬＧＤＦＦＲＫＳＫＥＫＩＧＫＥＦＫＲＩＶＱＲＩＫＤＦＬＲＮＬＶＰＲＴＥＳ（ＬＬ－３７）（配列番号６５）；ＳＷＬＳＫＴＡＫＫＬＥＮＳＡＫＫＲＩＳＥＧＩＡＩＡＩＱＧＧＰＲ（セクロピンＰ１）（配列番号６６）；ＡＣＹＣＲＩＰＡＣＩＡＧＥＲＲＹＧＴＣＩＹＱＧＲＬＷＡＦＣＣ（α－ディフェンシン）（配列番号６７）；ＤＨＹＮＣＶＳＳＧＧＱＣＬＹＳＡＣＰＩＦＴＫＩＱＧＴＣＹＲＧＫＡＫＣＣＫ（β－ディフェンシン）（配列番号６８）；ＲＲＲＰＲＰＰＹＬＰＲＰＲＰＰＰＦＦＰＰＲＬＰＰＲＩＰＰＧＦＰＰＲＦＰＰＲＦＰＧＫＲ－ＮＨ２（ＰＲ－３９）（配列番号６９）；ＩＬＰＷＫＷＰＷＷＰＷＲＲ－ＮＨ２（インドリシジン）（配列番号７０）；ＡＡＶＡＬＬＰＡＶＬＬＡＬＬＡＰ（ＲＦＧＦ）（配列番号７１）；ＡＡＬＬＰＶＬＬＡＡＰ（ＲＦＧＦアナログ）（配列番号７２）；およびＲＫＣＲＩＶＶＩＲＶＣＲ（バクテネシン）（配列番号７３）が挙げられる。

【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】１１６３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【１１６３】
これら単量体は、オリゴヌクレオチド中に存在するとき、５’－３’－ホスホジエステル結合によって相互に結合されることが理解される。またヌクレオチドが２’－フルオロ修飾を含有する場合、当該フルオロは、親ヌクレオチド中のその位置にあるヒドロキシを置換する（すなわち、２’－デオキシ－２’－フルオロヌクレオチドである）ことも理解されるであろう。
表２：ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡおよびそれらの対照（ヌクレオチド修飾を含む）のために合成された一本鎖の配列

【表９】

標的	二本鎖ID	配列ID	鎖(S/AS)	配列5’～3’	配列番号
SOD1	AD-413709	A-555737	S	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	13
SOD1	AD-413709	A-637451	AS	VPuUfuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	14
CTNNB1	AD-320650	A-637448	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasa	15
CTNNB1	AD-320650	A-141362	AS	VPuUfucgAfaUfCfaaucCfaAfcaguasgsc	16
CTNNB1/SOD1	AM-183	A-2221110.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasadTdTdTcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	17
CTNNB1/SOD1	AM-184	A-2221111.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasauuucsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	18
CTNNB1/SOD1	AM-185	A-2221112.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasaUUUcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	19
CTNNB1/SOD1	AM-186	A-2221113.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasaUfUfUfcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	20
CTNNB1/SOD1	AM-187	A-2112117.1	S	usascuguUfgGfAfUfugauucgasasadTdTdTcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	21
SOD1/CTNNB1	AM-188	A-2112118.1	S	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasadTdTdTusascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasa	22
SOD1/CTNNB1	AM-189	A-2112119.1	S	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasauuuusascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasa	23
CTNNB1/SOD1	AM-190	A-2112130.1	S	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasadTdTdTcsasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasa	24
対照	AD-77748	A-110415	S	dTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdTdT	25
対照	AD-77748	A-156352	AS	dAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdAdA	26

表３：ｂｉｓ－ｓｉＲＮＡおよびそれらの対照（ヌクレオチド修飾を含まない）のために合成された一本鎖の配列

【表１０】

標的	二本鎖ID	配列ID	鎖(S/AS)	配列5’～3’	配列番号
SOD1	AD-413709	A-555737	S	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	1
SOD1	AD-413709	A-637451	AS	UUUAGAGUGAGGAUUAAAAUGAG	2
CTNNB1	AD-320650	A-637448	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAA	3
CTNNB1	AD-320650	A-141362	AS	UUUCGAAUCAAUCCAACAGUAGC	4
CTNNB1/SOD1	AM-183	A-2221110.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAATTTCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	5
CTNNB1/SOD1	AM-184	A-2221111.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAAUUUCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	6
CTNNB1/SOD1	AM-185	A-2221112.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAAUUUCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	7
CTNNB1/SOD1	AM-186	A-2221113.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAAUUUCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	8
CTNNB1/SOD1	AM-187	A-2112117.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAATTTCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	9
SOD1/CTNNB1	AM-188	A-2112118.1	S	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAATTTUACUGUUGGAUUGAUUCGAAA	10
SOD1/CTNNB1	AM-189	A-2112119.1	S	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAAUUUUACUGUUGGAUUGAUUCGAAA	11
CTNNB1/SOD1	AM-190	A-2112130.1	S	UACUGUUGGAUUGAUUCGAAATTTCAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	12
対照	AD-77748	A-110415	S	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	27
対照	AD-77748	A-156352	AS	AAAAAAAAAAAAAAAAAAA	28

表４：親ＳＯＤ１標的化ｓｉＲＮＡ配列

【表１１】

二本鎖ID	オリゴID	鎖	標的	オリゴ配列(5’～3’)	配列番号	トランス配列(5’～3’)	配列番号
AD-401824	A-637448	センス	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	29	CAUUUUAAUCCUCACUCUAAA	30
	A-444402	アンチセンス	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	31	UUUAGAGUGAGGAUUAAAAUGAG	32

表５：実施例６のｂｉｓ－ｓｉＲＮＡ配列

【表１２】

複数標的分子の名称	鎖	標的	配列	配列番号
AM-178	センス	SOD1/SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasaGfAfUfcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	33
AM-181	センス	SOD1/SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasadGdAdTcsasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	34
AM-182	センス	SOD1/SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasaQ315Q315Q315csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfucacucuasasa	35, 36

【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】１２２７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【１２２７】
本実施例で使用されるオリゴヌクレオチドを表６に列挙し、特徴を付す。
表６．オリゴヌクレオチド配列および質量スペクトルに基づく特性

【表１３】

オリゴヌクレオチド	配列(5’-3’) [a]	配列番号	二本鎖	センス/アンチセンス	計算値 MW	実測値 MW
ON-1	$(dT)_{19}$-dT	74			6037.96	6036.95
ON-2	dT-$(dT)_{19}$	75			6037.96	6037.11
ON-3	Q$(dT)_{23}$Y	76			7526.02	7524.37
ON-4	Z$(dT)_{23}$	77			7526.02	7524.47
ON-5	QaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaAY	78			8047.08	8045.22
ON-6	ZaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaA	79			8047.08	8044.98
ON-7	A-a-CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	80	si-1	センス	8590.17	8588.69
ON-8	u-U-aUaGaGcAagaAcAcUgUu-u-u	81	si-1 / si-3 / si-4	アンチセンス	7595.94	7594.79
ON-9	VPu-U-aUaGaGcAagaAcAcUgUu-u-u	82	si-2 / si-5	アンチセンス	7672.94	7670.55
ON-10	QA-a-CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	83	si-3	センス	9181.71	9179.98
ON-11	ZA-a-CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	84	si-4 / si-5	センス	9181.71	9179.71
ON-12	G-a-CaAaAuAACuCaCuAuAaUL	85	si-6	センス	8627.29	8626.45
ON-13	a-U-uAuAgUgAguuAuUuUgUc-a-a	86	si-6 / si-7	アンチセンス	7574.87	7573.88
ON-14	ZG-a-CaAaAuAACuCaCuAuAaUL	87	si-7	アンチセンス	9218.83	9217.13

[a]化学修飾は、以下のように指定される：・、PS結合；小文字ヌクレオチド、2’-OMe；斜体の大文字ヌクレオチド、2’-F；Q、6-アジドヘキシル-ホスフェート；VP、5’-(E)-ビニルホスホネート。L、Y、およびZの構造については、スキームIを参照されたい。Zは、環状オリゴヌクレオチドを示す。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】１２２８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【１２２８】
環状オリゴヌクレオチドの酵素安定性。

環状修飾Ｚによって付与され得たオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性の安定性を評価するために、３’－エキソヌクレアーゼまたは５’－エキソヌクレアーゼのいずれかを使用したインビトロアッセイを、適切なアッセイ対照と組み合わせて利用した。対照（ＯＮ－１およびＯＮ－２）と比較した、直鎖および環状の一本鎖オリゴヌクレオチドの酵素安定性の結果を表７に示す。

表７．直鎖および環状の一本鎖オリゴヌクレオチドの酵素安定性。

【表１４】

オリゴヌクレオチド	配列(5’-3’)[a]	配列番号	3’-エキソヌクレアーゼ半減期[b]	24時間後にインタクトな割合（%）	5’-エキソヌクレアーゼ半減期[c]	24時間後にインタクトな割合（%）
ON-1 / ON-2	$(dT)_{19}$·dT / dT·$(dT)_{19}$	74, 75	1	10.0	1	6.5
ON-3	Q$(dT)_{23}$Y	76	0.7	2.7	8.2	13.3
ON-4	Z$(dT)_{23}$	77	1.2	14.8	26.8	52.5
ON-5	QaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaAY	78	12.8	76.1	14.1	83.8
ON-6	ZaaAaCaGuGuUCUuGcUcUaUaA	79	14.5	79.1	423.0	100.0

[a]化学修飾の凡例：・-ホスホロチオエート（PS）結合；dT－ 2’-デオキシチミジン；小文字ヌクレオチド－ 2’-O-メチル（OMe）；斜体の大文字ヌクレオチド－ 2’-デオキシ-2’-フルオロ（F）；Q=6-アジドヘキシル-ホスフェート；YおよびZの構造-スキームIを参照；およびZは、環状オリゴヌクレオチドを示す。
[b]半減期の値は、時間で決定され、$(dT)_{19}$・dT対照の半減期の値と比較して報告された。
[c]半減期の値は、時間で決定され、dT・$(dT)_{19}$対照の半減期の値を比較して報告された。一次減衰動態を、半減期の計算から推定した。データは、類似した結果の二つの独立した実験の代表値である。

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】１２３２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【１２３２】
図２９Ａ～２９Ｂに示されるように、血漿中で、最大８時間まで、環状ｓｃｉＲＮＡ鎖または直鎖ｓｉＲＮＡ鎖のいずれの分解も検出されなかった（図２９Ａ）。しかし、ＬＣ－ＭＳによる代謝産物分析では、ラット血漿中で２４時間のインキュベーション後、環状鎖への水分子の付加が観察された（表８Ｂおよび８Ｃ）。これは、環状構造の開放から生じた可能性があり、直線化したオリゴヌクレオチドが生じた。ラット肝臓ホモジネートでは、環状ｓｃｉＲＮＡ（ｓｉ－４およびｓｉ－５）は、直鎖（ｓｉ－３）よりも安定性が高かった。２４時間でｓｉ－４またはｓｉ－５の分解はなかったが、ｓｉ－３については、２４時間で検出された完全長センス鎖は約５５％のみであった（図２９Ｂ）。４時間の半減期であった直鎖ｓｉＲＮＡと比較して、ｓｃｉＲＮＡの半減期は２９時間および３０時間であり、有意に長かった。この結果は、エキソヌクレアーゼの存在下でも環化によって安定性が高まるという一本鎖の安定性分析の結果と相関している。肝臓ホモジネートでは、ｓｉ－４またはｓｉ－５のいずれのセンス鎖の環状構造の開放も観察されなかった（表８Ｂおよび８Ｃ）。
表８Ａ．ラット肝臓ホモジネートまたはラット血漿からのｓｉ－３の代謝産物特定

【表１５】

質量実測値	可能性のある代謝産物の配列	配列番号	鎖	説明[a]
7592.52	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	81	アンチセンス	親
6588.965	UaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	88	アンチセンス	5’ n-4
6371.919	Pu*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	89	アンチセンス	3’ n-4
6291.957	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	90	アンチセンス	3’ n-4
5700.846	VPu*U*aUaGaGcAagaAcAc	91	アンチセンス	3’ n-5
9177.039	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	83	センス	親
8973.962	ZA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL（-GalNAc$_1$）	92	センス	-GalNAc$_1$

[a]-GalNAc1は、三分岐リガンドから一つのGalNAc糖が欠落したことを指す。

表８Ｂ．ラット肝臓ホモジネートまたはラット血漿からのｓｉ－４の代謝産物特定

【表１６】

質量実測値	提唱される代謝産物配列	配列番号	鎖	説明[a]
7592.52	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	81	アンチセンス	親
6588.965	UaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	93	アンチセンス	5’ n-4
6291.957	U*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	94	アンチセンス	3’ n-4
9177.039	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	83	センス	親
9195.049	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	95	センス	加水分解

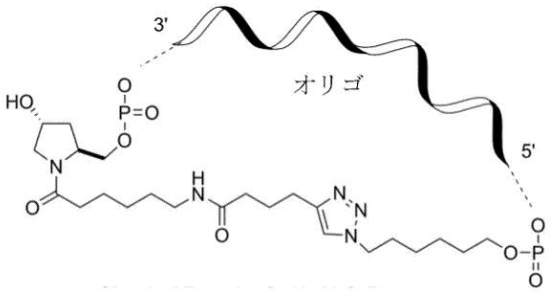
[a]加水分解＝親鎖＋１８.０１５Ｄａ。

表８Ｃ．ラット肝臓ホモジネートまたはラット血漿からのｓｉ－５の代謝産物特定

【表１７】

質量実測値	提唱される代謝産物配列	配列番号	鎖	説明[a]
7668.030	VPU*U*aUaGaGcAagaAcAcUgUu*u*u	82	アンチセンス	親
6588.965	VPu*U*aUaGaGcAagaAcAcUgP	96	アンチセンス	5’ n-4
6447.9166	Pu*U*aUaGaGcAagaAcAcUg	97	アンチセンス	3’ n-3
5700.846	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL/ ZA･a･CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	98, 99	アンチセンス	3’ n-5
9177.039	QA*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAYL	84	センス	親
9195.049	Z49A*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL	100	センス	加水分解
8973.962	Z49A*a*CaGuGuUCUuGcUcUaUaAL（-GalNAc$_1$）	101	センス	-GalNAc$_1$

[a]加水分解=親鎖+18.015Da。
－ＧａｌＮＡｃ１は、三分岐リガンドから一つのＧａｌＮＡｃ糖が欠落したことを指す。
Ｚ４９‐３’－リン酸－Ｈｙｐ－Ｃ９－１，４－トリアゾール－Ｃ６－５’－リン酸のクリック反応による環化
【化１５０】



【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】１２３５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【１２３５】
図３０のｓｉＲＮＡ二本鎖の溶液状態での^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析から、直鎖ｓｉＲＮＡ二本鎖のスペクトル（表９、ｓｉ－１、ｓｉ－２、ｓｉ－３、およびｓｉ－６）が、充分に分解された共鳴を呈したことが示される。イミノプロトンに対するいくつかのシグナルが、δ１２～１４ｐｐｍの領域で観察され、これはワトソン・クリック塩基対形成を示す。シグナルの数は、完全に相補的な二本鎖が形成されたことを示唆する。環状ｓｃｉＲＮＡ二本鎖のスペクトル（表９、ｓｉ－４、およびｓｉ－５）は、広範なシグナルを呈した。しかし、イミノ領域にいくつかのシグナルが観察されたことから、部分的に二本鎖の構造が示唆される。このことから、いくらかの熱不安定化と、核酸塩基の一部がワトソン・クリック塩基対を形成することが提唱される。
表９．直鎖ＧａｌＮＡｃ－ｓｉＲＮＡおよび環状ＧａｌＮＡｃ－ｓｃｉＲＮＡのコンジュゲートの初代マウス肝細胞（ＰＭＨ）における熱安定性とインビボでの効力。

【表１８】

siRNA	標的	配列(5’-3’)[a]	配列番号	T_m (℃)[b] (ΔT_m)[c]	トランスフェクションIC$_{50}$ (pM)[d]	自由取り込み IC$_{50}$ (pM)[e]
si-1	*Ttr*	*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L	80	68.2	151.1±21.8	53.1±15.6
		u·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgUu*·u·u	81			
si-2	*Ttr*	*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L	80	67.8 (-0.4)	41.9±13.8	21.6±3.3
		VPu·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgUu*·u·u	82			
si-3	*Ttr*	Q*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*YL	83	67.3 (-0.9)	81.3±55.5	58.5±1.9
		u·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgUu*·u·u	81			
si-4	*Ttr*	Z*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L	84	52.4 (-15.7)	836.8±140.4	197.9±31.2
		u·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgUu*·u·u	81			
si-5	*Ttr*	Z*A*·a·*CaGuGuUCUuGcUcUaUaA*L	84	52.5 (-15.7)	124.7±64.1	63.9±9.1
		VPu·*U*·a*UaGaGcAagaAcAcUgUu*·u·u	82			
si-6	*C5*	*G*·a·*CaAaAuAACuCaCuAuAaU*L	85	62.3	60.5±30.1	109.2±53.8
		a·*U*·u*AuAgUgAguuAuUuUgUc*·a·a	86			
si-7	*C5*	Z*G*·a·*CaAaAuAACuCaCuAuAaU*L	87	41.8 (-20.5)	830.2±195.0	824.4±72.7
		a·*U*·u*AuAgUgAguuAuUuUgUc*·a·a	86			

[a]センス鎖配列は上段；アンチセンス鎖配列は下段。化学修飾の凡例：・-ホスホロチオエート（PS）結合；小文字ヌクレオチド－ 2’-O-メチル（OMe）；斜体の大文字ヌクレオチド－ 2’-デオキシ-2’-フルオロ（F）；センス鎖（上段）；アンチセンス鎖（下段）；Q－ 6-アジドヘキシル-ホスフェート；L、YおよびZの構造-スキームIを参照；VPとは、5’-（E）-ビニルホスホネートを指す；およびZは、環状オリゴヌクレオチドを示す。

[b] T_mは、1.0μMの濃度の各鎖を使用して、0.1×PBS緩衝液（pH7.4）において記録された融解曲線（A_{260}と温度の比較）の一次導関数の最大値から得られた融解温度を指す。

[c] ΔT_mは、非修飾二本鎖（si-2～si-5については、参照二本鎖は、si-1であり、エントリー(entry) si-7については、参照二本鎖は、si-6である）と比較した融解温度における変化を指す。二つの独立したアニーリングサンプル調製物、および測定値の平均(n=2)。

[d]化合物を、Lipofectamine RNAiMAXを用いたトランスフェクションによってPMHに加え、24時間のインキュベーション後、細胞を溶解し、RNA単離、cDNA合成、および定量的PCR分析のために処理した。mRNA値は、マウスGapdhに対して正規化した。平均IC$_{50}$値は、SDとともに報告された(n=4)。

[e]化合物を、自由取り込みによってPMHに加え、48時間のインキュベーション後、細胞を溶解し、RNA単離、cDNA合成、および定量的PCR分析のために処理した。mRNA値は、マウスGapdhに対して正規化した。平均IC$_{50}$値は、SDとともに報告された(n=4)。

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】１２５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【１２５３】
実施例１３：環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡの合成
環状ｂｉｓ－ｓｃｉＲＮＡを本実施例で合成した。配列を以下の表に示す。

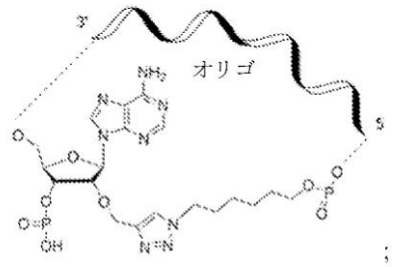
【表１９】

複数標的分子ID	オリゴID	配列(5’～3’)[a]	配列番号	鎖	標的	オリゴID	配列5’～3’	配列番号	鎖	標的
AM-206	A-2832990	usascug(Uhd)UfgGfAfUfugauucgasasauuucsasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasZ84	102	センス	CTNNB1/SOD1					
	A-141361	VPusUfsucgAfaUfCfaaucCfaAfcaguasgsc	103	アンチセンス	CTNNB1	A-444402	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	106	アンチセンス	SOD1
AM-210	A-2832991	usascuguUfgGfAfUfugauucgasasauuucsasuuuuAfaUfCfCfucacucuasasZ83L96	104	センス	CTNNB1/SOD1					
	A-141361	VPusUfsucgAfaUfCfaaucCfaAfcaguasgsc	105	アンチセンス	CTNNB1	A-444402	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	107	アンチセンス	SOD1

[a]化学修飾は以下に示す：s、PS結合；小文字ヌクレオチド、2’-OMe；大文字ヌクレオチド、続いてf（Uf、Gf、Cf、Af）、2’-F；VP、5’-（E）-ビニルホスホネート；（Uhd）は、2’-O-ヘキサデシル-ウリジン-3’-ホスフェートである。Z83およびZ84の構造については、環化センス鎖を示すスキームIのZを参照のこと。

Ｚ８３は、ＡｐｙおよびＱ３０１の３’内部環状クリックによる環化センス鎖を示す。

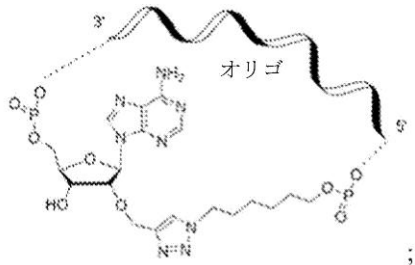
【化１５１】



;

Ｚ８４は、ＡｐｙおよびＱ３０１の３’末端環状クリックによる環化センス鎖を示す。

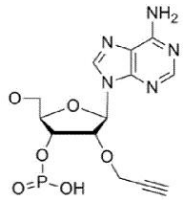
【化１５２】



;

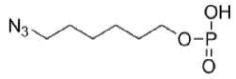
Ａｐｙとは、２’－Ｏ－プロピニル－アデノシン－３’－リン酸塩を指す。

【化１５３】



Ｑ３０１とは、６－アジドヘキシルホスフェートを指す。

【化１５４】



【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
20245275840000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/036455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALTERMAN JULIA F. ET AL.: "A divalent siRNA chemical scaffold for potent and sustained modulation of gene expression throughout the central nervous system", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 37, no. 8, 2 August 2019 (2019-08-02) , pages 884-894, XP036850007, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/S41587-019-0205-0 [retrieved on 2019-08-02] the whole document -/--	1-20, 22-37

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 January 2023	14/03/2023

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/036455

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	-& ALTERMAN JULIA F. ET AL.: "supplementary information", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 37, no. 8, 1 August 2019 (2019-08-01) , pages 884-894, XP093011247, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/s41587-019-0205-0 Retrieved from the Internet: URL:http://www.nature.com/articles/s41587-019-0205-0> the whole document	1-20, 22-37
Y	WO 2021/026490 A1 (MPEG LA, L.L.C. [US]) 11 February 2021 (2021-02-11) the whole document	1-20, 22-37
A	WO 2019/217459 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. [US]) 14 November 2019 (2019-11-14) paragraph [0010] paragraph [0032] - paragraph [0036] paragraph [0106] paragraph [0147] paragraph [0183] paragraph [0218]	4,6-9, 13,19, 20,31-35
A	REKA A. HARASZTI ET AL.: "Vinylphosphonate improves tissue accumulation and efficacy of conjugated siRNAs in vivo", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 45, no. 13, 7 June 2017 (2017-06-07), pages 7581-7592, XP055599779, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkx507 the whole document	1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/036455

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

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

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

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

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

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

3. Additional comments:

see separate sheet

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/036455

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

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

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

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

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-37

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/036455

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-37

A nucleic acid composition for modulating in the central nervous system (CNS) of a subject one or more target RNAs comprising one or more distinct target RNA sequences, the nucleic acid composition comprising a first double-stranded RNA (dsRNA) molecule and a single-stranded nucleic acid agent or a second dsRNA molecule, wherein: the first dsRNA molecule and the single-stranded nucleic acid agent or second dsRNA molecule are connected together by a linker and do not overlap with each other, the first dsRNA comprises at least one conjugated lipophilic moiety, the single-stranded nucleic acid agent or second dsRNA molecule comprises at least one conjugated lipophilic moiety, and each of the first dsRNA molecule and the single-stranded nucleic acid agent or second dsRNA molecule of said nucleic acid composition is capable of modulating the activity or expression of one or more target RNAs in a CNS tissue of the subject by at least 15% relative to an appropriate control. Subject-matter related thereto.

---

2. claims: 38-47

A small circular interfering RNA as concerned in claims 38-47.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/036455

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021026490 A1	11-02-2021	NONE	
WO 2019217459 A1	14-11-2019	AU 2019266207 A1	17-12-2020
		BR 112020022546 A2	02-02-2021
		CA 3098623 A1	14-11-2019
		CN 112400018 A	23-02-2021
		EP 3790970 A1	17-03-2021
		JP 2021522810 A	02-09-2021
		KR 20210018267 A	17-02-2021
		SG 11202010910Q A	30-12-2020
		TW 202016301 A	01-05-2020
		US 2022125823 A1	28-04-2022
		WO 2019217459 A1	14-11-2019

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*25/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｋ	*31/713(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713	
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088	
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者　ズラテブ，アイバン
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(72)発明者　サイル，クリストファー エス
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(72)発明者　マノハラン，ムティア
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(72)発明者　レンティーニ，スコット ピー
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(72)発明者　松田 成夫
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(72)発明者　ナイル，ジャヤプラカシュ ケイ
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(72)発明者　ペン，ハイヤン
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート６７５、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア

Ｆターム（参考）　4C076　AA95 BB11 CC01 CC41 DD52 DD55 DD63 DD67 EE01 EE30 EE41 EE56 EE59 FF31 FF68
4C084　AA13 MA05 MA56 MA66 NA13 NA14 ZA021 ZA022
4C086　AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 MA05 MA56 MA66 NA13 NA14 ZA02