

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-514180
(P2025-514180A)

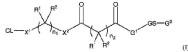
(43)公表日 令和7年5月2日(2025.5.2)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16		
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全49頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-563257(P2024-563257)	(71)出願人	501315876	ユニバーシティ オブ コネチカット アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 0 3 2, ファーミントン, ファーミントン アベニュー 4 0 0 110001210 弁理士法人 Y K I 国際特許事務所 バハル ラマン アメリカ合衆国 コネチカット グラスト ンベリー バーリントン ウェイ 4 1 クマール ヴィカス アメリカ合衆国 コネチカット ウィリマ ンティック フォスター ドライブ 1 1 6 ワハネ アニクト アメリカ合衆国 コネチカット ウィリマ 最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和5年4月26日(2023.4.26)	(74)代理人			
(85)翻訳文提出日	令和6年12月20日(2024.12.20)	(72)発明者			
(86)国際出願番号	PCT/US2023/019940	(72)発明者			
(87)国際公開番号	WO2023/212027	(72)発明者			
(87)国際公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)	(72)発明者			
(31)優先権主張番号	63/335,174	(72)発明者			
(32)優先日	令和4年4月26日(2022.4.26)	(72)発明者			
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者			
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(72)発明者			
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 強化された肝臓及び腎臓特異的標的化のための遺伝子配列－炭水化物コンジュゲート

(57)【要約】

以下の式を有する、遺伝子配列－炭水化物コンジュゲートであって、

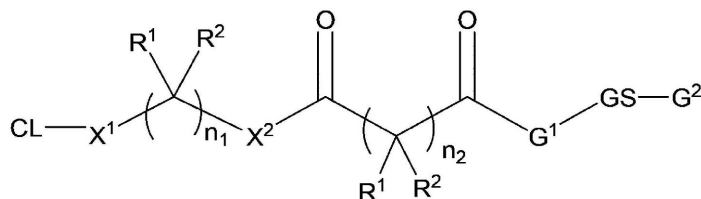


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式の遺伝子配列－炭水化物コンジュゲートであって、

【化 1】



10

式中、

GS が、遺伝子配列、好ましくは、mRNA 配列、siRNA 配列、又は DNA 配列などのペプチド核酸又はオリゴヌクレオチドであり、任意選択で、各遺伝子配列が、天然であるか、又は修飾されており、例えば、ガンマーセリン修飾ガンマペプチド核酸、アラニンガンマペプチド核酸、クランプ G 修飾ペプチド核酸、ロックド核酸 (LNA)、ホスホロチオエート (PS)、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO)、2'-O-メチル (2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-フルオロ (2'-F)、5'-メチルシトシン、又はそれらの組み合わせを含み、前記遺伝子配列が、3' 末端及び 5' 末端を有し、

20

R₁ 及び R₂ が、各々独立して、H、又は置換若しくは非置換の C₁～C₆ アルキルであり、

X¹ が、O、NR³、C=O、又は C(R³)₂ であり、R³ が、H、又は置換若しくは非置換の C₁～C₆ アルキルであり、

X² が、O、NR³、又は C(R³)₂ であり、R³ が、H、又は置換若しくは非置換の C₁～C₆ アルキルであり、

G¹ が、直接結合、又は PNA を前記コンジュゲートに連結する基であり、

G² が、H 又は官能性部分であり、

CL が、単糖、二糖、三糖、又は四糖に由来する 2～16 個の炭水化物残基を含む炭水化物リガンドであり、好ましくは、CL が、単糖又は二糖に由来する炭水化物残基を含み、

30

任意選択で、前記炭水化物リガンドが、そのヒドロキシ基又はアミノ基において、C₂～C₁₅ アシル基で完全に又は部分的にアシル化されており、好ましくは、前記炭水化物リガンドが、そのヒドロキシ基又はアミノ基において、完全に又は部分的にアセチル化されており、

n¹ が、1～20 であり、

n² が、0～20 である、遺伝子配列－炭水化物コンジュゲート。

【請求項 2】

前記遺伝子配列が、化学的に修飾されたヌクレオチド、例えば、ロックド核酸 (LNA)、ホスホロチオエート (PS)、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO)、2'-O-メチル (2'-O-Me)、G-クランプ、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、siRNA、2'-フルオロ (2'-F)、5'-メチルシトシン、又はそれらの組み合わせを含む、PNA、mRNA、又は siRNA を含む、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 3】

前記遺伝子配列が、肝細胞上のアジア糖タンパク質受容体 (ASGPR) を標的化するのに有効であるか、又は前記 PNA が、腎臓細胞を標的化するのに有効である、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

標的遺伝子、標的 mRNA、マイクロ RNA、又はノンコーディング RNA を調節する

50

ための、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記標的遺伝子又は RNA が、PKD1、PKD2、ベーターカテニン、グルタミシンテターゼ、c-Myc、TTR、第 VII 因子、Eg5、PCSK9、AAT、TPX2、apoB、SAA、RSV、PDGF、miR-122、miR-223、miR-21、miR-155、miR-132、miR-125b、miR-146a、miR-181、let-7、miR-34a、miR-805、miR-690、miR-134、miR-494、miR-202-5p、又は miR-192 である、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

G¹ が、1～20 個の炭素原子を有するか、又は G¹ が、前記 PNA を前記コンジュゲートに連結する官能性部分であり、例えば、G¹ が、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリエチレン-プロピレングリコールの残基、トリオキソミニポリエチレングリコール (PEG) 鎖のそのような残基である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

G² が、1～20 個の炭素原子を有するか、又は G² が、前記 PNA を前記コンジュゲートに連結する官能性部分であり、例えば、G² が、トリオキソミニPEG 鎖などのポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリエチレン-プロピレングリコールの残基である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記炭水化物リガンドが、X¹ への付着のためのリンカーを更に含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

前記炭水化物残基は、アシル基が 2～15 個の炭素原子を有する完全に又は部分的にアシル化された炭水化物残基、例えば、完全に又は部分的にアセチル化された炭水化物残基である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 10】

前記コンジュゲート上の官能性部分が、キエリン、トルバプタン、ニンテダニブ、パクリタキセル、プレオマイシン、シクロスポリン、シスプラチン、ロミデプシン、ドキシロビン、ドセタキセル、ダヌノルビン、ピンクリスチン、メトトレキサート、シクロホスファミド、ベネトクラクス、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、プレドニゾロン、シタラビン、又はビルフェニドンへの付着のためのリンカーを更に含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

標的遺伝子、mRNA、マイクロRNA、ノンコーディングRNA、DNA、ホルモン、細胞タンパク質、又は酵素を調節するための、請求項 1～10 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

標的遺伝子又は RNA が、PKD1、PKD2、GPX1、GPX4、CYP11B2、ERCC4、ERCC2、GSTO1、GSTO2、UMOD、MGP、GLO1、SLC7A9、SHROOM3、VEGFA、APOL1、MYH9、miR-21、miR-17、miR-10、miR-192、miR-216a 及び miR-217、miR-192、miR-377、miR-200c、miR-141、miR-205、並びに miR-192 である、請求項 1～11 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

前記炭水化物残基が、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、ガラクトース、ラクトビオン酸、又はそれらのアセチル化エステルに由来し、好ましくは、前記炭水化物残基が、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、ガラクトース、又はラクトビオン酸の完全に又は部分的にアセチル化された生成物である、請求項 1～12 のいずれか一

10

20

30

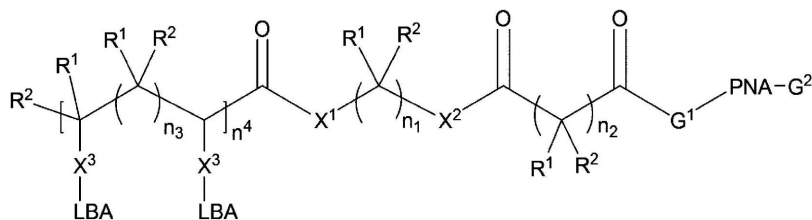
40

50

項に記載のコンジュゲート。

【請求項 14】

【化 2】



10

式中、

LBAが、ラクトビオン酸残基であり、

X^1 が、 NR^3 、O、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

各 X^3 が、独立して、O、 NR^3 、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

n_3 が、0～20であり、

n_4 が、1～8である、式の、請求項1～13のいずれか一項に記載のコンジュゲート

。

【請求項 15】

G^1 が、PNAを前記コンジュゲートに連結する基であり、

R^1 及び R^2 が、各々、Hであり、

X^1 、 X^2 、及び X^3 が、各々、NHであり、

$n_1 = 6$ 、 $n_2 = 2$ 、かつ $n_3 = 4$ である、請求項13に記載のコンジュゲート。

【請求項 16】

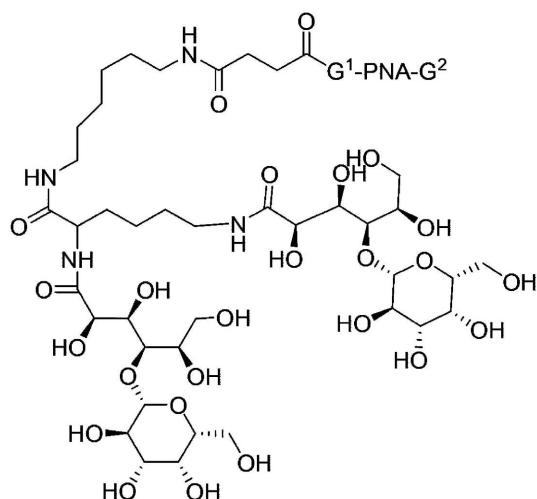
R^1 及び R^2 が、各々、Hであり、

$n_3 = 4$ であり、

前記PNAが、前記5'末端で前記コンジュゲートに連結されている、請求項13に記載のコンジュゲート。

【請求項 17】

【化 3】



40

好ましくは、式中、 G^1 が、PNAを前記コンジュゲートに連結する官能性部分であり、 G^2 が、官能性部分である、式の、請求項13に記載のコンジュゲート。

【請求項 18】

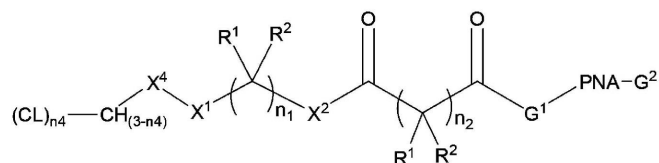
前記ラクトビオン酸残基が、2～15個の炭素原子を有するアシル基で完全に又は部分

50

的にアシル化されており、好ましくは、前記ラクトビオン酸残基が、完全に又は部分的にアセチル化されている、請求項 13～16 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 19】

【化 4】



10

式中、

X^1 が、 $C=O$ 又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、 H 、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

X^4 が、 O 、 NR^3 、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、 H 、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

CL が、置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、又はアミド、エステル、若しくはエーテル基を含む $C_6 \sim C_{12}$ アリールを含む 1～30 個の原子のリンカー鎖によって CH に連結された炭水化物残基であり、

n_4 が、2 又は 3 である、式の、請求項 1～12 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 20】

前記炭水化物残基は、前記アシル基が 2～15 個の炭素原子を有する完全に又は部分的にアシル化された炭水化物残基、例えば、完全に又は部分的にアセチル化された炭水化物残基である、請求項 18 に記載のコンジュゲート。

【請求項 21】

前記炭水化物残基が、 N -アセチルガラクトサミン (GalNAc) に由来するか、又は完全に若しくは部分的にアシル化されたアセチルガラクトサミンに由来する、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

【請求項 22】

臓器特異的送達のために、ポリマー、脂質、タンパク質、又は他の薬学的賦形剤とともに製剤化された、請求項 1～20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

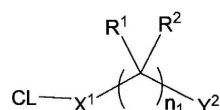
【請求項 23】

遺伝子配列を炭水化物リガンドにコンジュゲート化して、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の遺伝子配列-炭水化物コンジュゲート (式中、 X^2 が、 O 又は NR^3 である) を提供する方法であって、前記方法が、

前記遺伝子配列を官能基化して、遊離- $COOH$ 官能基を提供することと、

修飾された遺伝子配列の前記遊離- $COOH$ 官能基と、以下の式の化合物の Y^2 との間に結合を形成することと、を含み、

【化 5】



40

式中、 Y^2 が、 $-NHR^3$ 又は $-OH$ である、方法。

【請求項 24】

前記コンジュゲート化が、溶液相合成、固相合成、又はそれらの組み合わせによるものである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

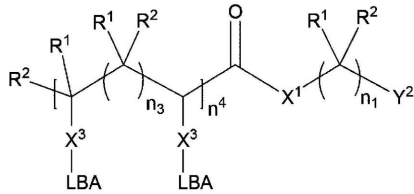
前記遺伝子配列を官能基化する前に、 G^1 、 G^2 、又はそれらの組み合わせの前駆体で前記遺伝子配列を修飾することを更に含む、請求項 22 又は 23 に記載の方法。

50

【請求項 26】

遺伝子配列をラクトビオン酸－骨格リガンドにコンジュゲート化して、請求項 13～17 のいずれか一項に記載の遺伝子配列－ラクトビオン酸コンジュゲート（式中、 X^1 及び X^2 が、各々独立して、 O 又は NHR^3 である）を提供する方法であって、前記方法が、前記遺伝子配列を官能基化して、遊離－ $COOH$ 官能基を提供することと、修飾された遺伝子配列の前記遊離－ $COOH$ 官能基と、以下の式の Y^2 との間に結合を形成することと、を含み、

【化 6】



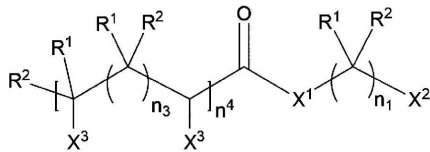
10

式中、 Y^2 が、 $-NHR^3$ 又は $-OH$ である、方法。

【請求項 27】

ラクトビオン酸を以下の式の骨格と反応させることを更に含み、

【化 7】



20

式中、

X^3 が、 $-OH$ 又は NHR^3 であり、

X^2 が、保護された O 又は保護された NHR^3 である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

対象における健康障害に関与する標的化 RNA の発現を低減するための方法であって、前記方法が、

請求項 1～20 のいずれか一項に記載の遺伝子配列－ラクトビオン酸コンジュゲートを、前記対象の細胞にインビボ又はエキスピボで提供することを含み、前記コンジュゲートの前記 PNA の前記標的化 RNA への結合が、前記標的化 RNA の発現を低減する、方法。

30

【請求項 29】

前記標的化 RNA が、マイクロ RNA である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

対象における健康障害において DNA を標的化し、遺伝子編集するための方法であって、前記方法が、

請求項 1～20 のいずれか一項に記載の遺伝子配列－炭水化物コンジュゲートを、前記対象の細胞にインビボ又はエキスピボで提供することを含み、前記細胞に標的化された前記コンジュゲートの前記 DNA が、遺伝子の発現を調節する、方法。

40

【請求項 31】

肝臓細胞又は腎臓細胞を標的化して、細胞核酸機能の発現を調節することを必要とする対象へそれを行い、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の遺伝子配列－炭水化物コンジュゲートを前記対象に投与することを含む、請求項 27 又は 28 に記載の方法。

【請求項 32】

前記細胞が、がん細胞である、請求項 27～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 PNA が、腎臓特異的マイクロ RNA、miR-21 を含む、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

腎線維化及び多発性嚢胞腎疾患の処置のための、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲートと、薬学的賦形剤と、を含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2022年4月26日に出願された米国仮出願第63／335,174号に対する優先権、及びその利益を主張し、この全容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0 0 0 2】

本出願は、遺伝子配列－炭水化物コンジュゲート、例えば、ペプチド核酸－炭水化物コンジュゲート、それらの製造方法、コンジュゲートを含む組成物、及びそれらの使用を対象とする。コンジュゲートは、肝臓細胞及び腎臓細胞の改善された標的化に特に有用である。

【背景技術】

【0 0 0 3】

肝臓及び腎臓は、代謝、解毒、排泄、タンパク質及び脂質の合成、サイトカイン及び成長因子の分泌、並びに免疫／炎症応答を含む重大な身体機能に關与する重要な臓器である。肝炎、アルコール性又は非アルコール性肝疾患、肝細胞がん腫、肝中心静脈閉塞症、並びに肝線維化及び肝硬変などの肝臓障害は、最も一般的な肝臓疾患である。米国成人の7人に1人超、又は約3,700万人が、慢性腎疾患CKDを有すると推定されている。腎線維化は、慢性腎疾患の最終的な徴候である。他の腎疾患としては、がん、IgA腎症、膜性腎症、及び急性腎損傷が挙げられる。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

多くの治療薬は、それらが効果を発揮することを目的としていない身体組織に送達され、これは、意図していない又は有害な副作用をもたらし得る。したがって、肝臓及び腎臓を含む体内の標的部位への治療分子（例えば、遺伝子配列、及び薬物、遺伝子、又はタンパク質などの活性剤）の安全かつ効率的な送達に対する必要性が存在する。これらの満たされていない必要性及び長い間解決されていない問題は、以下に記載される新しい組成物及び方法によって対処される。

30

【課題を解決するための手段】

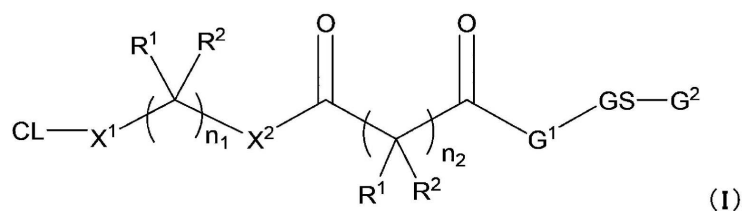
【0 0 0 5】

以下の式を有する、遺伝子配列－炭水化物コンジュゲートであって、

【0 0 0 6】

【化 1】

40



式中、GSが、遺伝子配列、好ましくは、mRNA配列、siRNA配列、又はDNA配列などのペプチド核酸又はオリゴヌクレオチドであり、任意選択で、各遺伝子配列が、天然であるか、又は修飾されており、例えば、ガンマーセリン修飾ガンマペプチド核酸、

50

アラニンガンマペプチド核酸、クランプG修飾ペプチド核酸、ロックド核酸 (locked nucleic acid、LNA)、ホスホロチオエート (phosphorothioate、PS)、ホスホロジアミデートモルホリノ (phosphorodiamidate morpholino、PMO)、2'-O-メチル (2'-O-methyl、2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル (2'-O-methoxyethyl、2'-O-MOE)、2'-フルオロ (2'-fluoro、2'-F)、5'-メチルシトシン、又はそれらの組み合わせを含み、この遺伝子配列が、3'末端及び5'末端を有し、 R_1 及び R_2 が、各々独立して、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 X^1 が、O、 NR^3 、 $C=O$ 、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 X^2 が、O、 NR^3 、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 G^1 が、直接結合、又はPNAをコンジュゲートに連結する基であり、 G^2 が、H又は官能性部分であり、CLが、単糖、二糖、三糖、又は四糖に由来する2~16個の炭水化物残基を含む炭水化物リガンドであり、好ましくは、CLが、単糖又は二糖に由来する炭水化物残基を含み、任意選択で、炭水化物リガンドが、そのヒドロキシ基又はアミノ基において、 $C_2 \sim C_{15}$ アシル基で完全に又は部分的にアシル化されており、好ましくは、炭水化物リガンドが、そのヒドロキシ基又はアミノ基において、完全に又は部分的にアセチル化されており、 n^1 が、1~20であり、 n^2 が、0~20である、遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートが開示される。

10

【0007】

遺伝子配列-炭水化物コンジュゲート、特に、PNA-炭水化物コンジュゲートの生成のための方法が記載される。

20

【0008】

薬学的組成物は、遺伝子配列-炭水化物コンジュゲート、特に、PNA-炭水化物コンジュゲート、及び薬学的賦形剤を含む。

【0009】

遺伝子配列-炭水化物コンジュゲート、特に、PNA-炭水化物コンジュゲートの使用のための方法が記載される。

【0010】

対象における健康障害に関与する標的化RNAの発現を低減するための方法は、本明細書に記載の遺伝子配列-ラクトビオン酸コンジュゲートを、対象の細胞にインビボ又はエキスピボで提供することを含み、コンジュゲートのPNAの標的化RNAへの結合が、標的化RNAの発現を低減し、特に、標的化RNAが、マイクロRNAである。

30

【0011】

対象における健康障害においてDNAを標的化し、遺伝子編集するための方法は、請求項1~20のいずれか一項に記載の遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートを、対象の細胞にインビボ又はエキスピボで提供することを含み、細胞に標的化されたコンジュゲートのDNAが、遺伝子の発現を調節する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

以下の図は、本開示を例解するために提供される例示的な実施形態である。これらの図面は、本開示に従って作製される組成物、方法、又は物品を、本明細書に記述される材料、条件、又はプロセスパラメータに限定することを意図するものではない。

40

【図1A-1】miR-122を標的化するラクトビオン酸 (lactobionic acid、LBA) 付加リンカーリガンド及びペプチド核酸の設計及び合成を例解している。具体的には、(A)は、リジンリンカーの合成スキーム (1~4) 及びリジンリンカーとのLBAコンジュゲート化 (5~8) の概略図である。

【図1A-2】miR-122を標的化するラクトビオン酸 (lactobionic acid、LBA) 付加リンカーリガンド及びペプチド核酸の設計及び合成を例解している。具体的には、(A)は、リジンリンカーの合成スキーム (1~4) 及びリジンリンカーとのLBAコンジュゲート化 (5~8) の概略図である。

50

【図 1 B】 (B) は、DNA 及び正常な PNA 単位の化学構造を示す。

【図 1 C】 (C) は、成熟した miR-122-5p (上) 及びシード領域 (下線) のヌクレオチド配列を示す。シード及び全長 miR-122 を標的化する PNA オリゴマー (下)。PNA 1 及び 2 はシード領域を標的化するように設計されたが、PNA 3 及び 4 は全長 miR-122 に結合し得る。PNA 2 及び 4 は、LBA-リジンコンジュゲートとのコンジュゲート化のために 5' 末端にコハク酸 (succinic acid、SA) を含有している。リジン (K) を PNA の 3' 末端に付加し、続いて、各 PNA の蛍光プローブ 5-カルボキシテトラメチルローダミン (carboxytetramethylrhodamine、TAM) に付加した。「OOO」は、トリオキソミニPEG リンカーを表す。

10

【図 2 A-1】 PNA 4 の LBA 及び tGalNAc とのコンジュゲート化、並びにそれらの品質管理評価を例解している。具体的には、(A) は、PNA 4 (14) の LBA (8~16) との溶液相コンジュゲート化を示す。

【図 2 A-2】 PNA 4 の LBA 及び tGalNAc とのコンジュゲート化、並びにそれらの品質管理評価を例解している。具体的には、(A) は、PNA 4 (14) の LBA (8~16) との溶液相コンジュゲート化を示す。

【図 2 B-1】 (B) は、PNA 4 (14) の tGalNAc (13~18) との溶液相コンジュゲート化を示す。

【図 2 B-2】 (B) は、PNA 4 (14) の tGalNAc (13~18) との溶液相コンジュゲート化を示す。

【図 2 C1】 (C) は、リガンドコンジュゲート化された PNA、PNA 4-LBA、及び PNA 4-tGalNAc の MALDI-MS である。コンジュゲートの計算質量及び実測質量が、それぞれの質量スペクトル上に描画されている。挿入図は、示されたコンジュゲートの逆相高速液体クロマトグラフィ (reverse phase-high performance liquid chromatography、RP-HPLC) トレースを示す。

20

【図 2 C2】 (C) は、リガンドコンジュゲート化された PNA、PNA 4-LBA、及び PNA 4-tGalNAc の MALDI-MS である。コンジュゲートの計算質量及び実測質量が、それぞれの質量スペクトル上に描画されている。挿入図は、示されたコンジュゲートの逆相高速液体クロマトグラフィ (reverse phase-high performance liquid chromatography、RP-HPLC) トレースを示す。

【図 3 A】 PNA コンジュゲート化されたリガンドの生物物理学的標的結合評価の結果を例解している。(A) は、低塩生理学的条件下での、短鎖 PNA 及び全長 PNA、並びに miR-122 の標的 DNA 配列とのコンジュゲートの正規化された熱融解曲線を示す。

30

【図 3 B】 (B) は、低塩生理学的条件下での、1:2 の DNA 対 PNA 比でのゲルシフト結合アッセイを示す。SYBR Gold 染色を使用して、DNA 及び PNA-DNA ヘテロ二本鎖 (遅延バンド) を可視化した。

【図 4 A】 全長 PNA コンジュゲート (PNA 3 及び PNA 4) のインビボ生体内分布研究の結果を例解している。(A) は、10mg/kg 皮下投与後の異なる時点での、全長 PNA 及びリガンドコンジュゲートで処置した C57BL/6J マウスから摘出した臓器の IVIS イメージングを示す。

【図 4 B】 (B) は、フローサイトメトリーによって分析した異なる時点での、皮下投与後の C57BL/6J マウスからの肝臓細胞における全長 PNA 及びリガンドコンジュゲートの取り込みを描画するヒストグラムを示す。

40

【図 4 C】 (C) は、皮下投与後 1 時間での、C57BL/6J マウスからの肝臓凍結切片の共焦点顕微鏡画像を示す。青色は核を示し、赤色は TAMRA を示す。

【図 4 D】 (D) は、皮下投与後の異なる時点での、全長 PNA 及びリガンドコンジュゲートで処置した C57BL/6J マウスの肝臓における TAMRA 蛍光についての平均放射効率を示す。結果は n=3 の平均値として表され、標準誤差平均値が誤差バーとして表されている。

【図 5 A】 抗シード PNA コンジュゲート (PNA 1 及び PNA 2) のインビボ生体内分布研究を例解している。(A) は、5mg/kg 皮下投与後の異なる時点での、抗シード

50

PNA及びリガンドコンジュゲートで処置したC57BL/6Jマウスから摘出した臓器のIVISイメージングを示す。

【図5B】(B)は、フローサイトメトリーによる、皮下投与後0.5時間目及び24時間目のC57BL/6Jマウスからの肝臓細胞における抗シードPNA及びリガンドコンジュゲートの取り込みを描画するヒストグラムを示す。

【図5C】(C)は、皮下投与後の異なる時点での、抗シードPNA及びリガンドコンジュゲートで処置したC57BL/6Jマウスの肝臓におけるTAMRA蛍光についての平均放射効率を示す。

【図5D】(D)は、1時間後の皮下投与後のC57BL/6Jマウスからの肝臓細胞における、抗シードPNA及びリガンドコンジュゲートの肝細胞取り込みを描画するフローサイトメトリードットプロットを示す。BV786チャンネルは、ASGPR受容体に対するASGPR抗体で染色された肝細胞を表す。FITCチャンネルは、肝細胞に対するHNF4α抗体で染色された肝細胞を表す。TAMRAチャンネルは、PNAを表す。

【図6A1】(A)全長PNA及びリガンドコンジュゲートの皮下投与後のC57BL/6Jマウスの肝臓細胞における、相対的なmiR-122、ALDOA及びBCKDK(miR-122の下流標的)発現レベルを例解している。結果はn=6の平均値として表され、標準誤差平均値が誤差バーとして表されている。t検定を使用して、統計分析を行った。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。

【図6A2】(A)全長PNA及びリガンドコンジュゲートの皮下投与後のC57BL/6Jマウスの肝臓細胞における、相対的なmiR-122、ALDOA及びBCKDK(miR-122の下流標的)発現レベルを例解している。結果はn=6の平均値として表され、標準誤差平均値が誤差バーとして表されている。t検定を使用して、統計分析を行った。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。

【図6A3】(A)全長PNA及びリガンドコンジュゲートの皮下投与後のC57BL/6Jマウスの肝臓細胞における、相対的なmiR-122、ALDOA及びBCKDK(miR-122の下流標的)発現レベルを例解している。結果はn=6の平均値として表され、標準誤差平均値が誤差バーとして表されている。t検定を使用して、統計分析を行った。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 。

【図6B1】(B)は、全長PNA及びリガンドコンジュゲートの皮下投与後のC57BL/6Jマウスの肝臓細胞における、ALDOA及びBCKDKタンパク質(miR-122下流標的)の代表的なウェスタンブロットを示す。結果は、n=2として表される。

【図6B2】(B)は、全長PNA及びリガンドコンジュゲートの皮下投与後のC57BL/6Jマウスの肝臓細胞における、ALDOA及びBCKDKタンパク質(miR-122下流標的)の代表的なウェスタンブロットを示す。結果は、n=2として表される。

【図6C1】(C)は、全長PNA及びリガンドコンジュゲートの皮下投与後のC57BL/6Jマウスの肝臓細胞における、相対的なALDOA及びBCKDK(miR-122の下流標的)タンパク質レベルを例解している。結果はn≥3の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。ノンパラメトリック一元配置ANOVAを使用して、統計的有意性をGraphPad Prismソフトウェアで分析した。多重比較のために、未補正のDunn検定を実行した。有意性レベル $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 対示された処置群。

【図6C2】(C)は、全長PNA及びリガンドコンジュゲートの皮下投与後のC57BL/6Jマウスの肝臓細胞における、相対的なALDOA及びBCKDK(miR-122の下流標的)タンパク質レベルを例解している。結果はn≥3の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。ノンパラメトリック一元配置ANOVAを使用して、統計的有意性をGraphPad Prismソフトウェアで分析した。多重比較のために、未補正のDunn検定を実行した。有意性レベル $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 対示された処置群。

【図7A】(A)有効性研究の終了時の、全長PNA及びリガンドコンジュゲートで皮下処置したC57BL/6Jマウスからの肝臓、腎臓、及び脾臓のH&E染色を例解してい

10

20

30

40

50

る。

【図 7 B】 (B) は、有効性研究の終了時の、全長 P N A 及びリガンドコンジュゲートで皮下処置した C 5 7 B L 6 / J マウスにおけるサイトカインパネル判定を示す。

【図 7 C】 (C) は、異なる処置群についての有効性研究中の C 5 7 B L 6 / J マウスの平均体重を表示している。結果は $n = 6$ の平均値として表され、標準誤差平均値が誤差バーとして表されている。

【図 7 D 1】 (D) は、R B C、W B C、血小板、及びヘモグロビン（データは示さず）を含む C B C 分析を示す。

【図 7 D 2】 (D) は、R B C、W B C、血小板、及びヘモグロビン（データは示さず）を含む C B C 分析を示す。

【図 7 D 3】 (D) は、R B C、W B C、血小板、及びヘモグロビン（データは示さず）を含む C B C 分析を示す。

【図 7 E 1】 (E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 2】 (E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 3】 (E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 4】 (E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 5】 (E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotrans

10

20

30

40

50

ferase、A S T）、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase、A L P）、アラニントランスアミナーゼ（alanine transaminase、A L T）、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素（blood urea nitrogen、B U N）、クレアチンホスホキナーゼ（creatine phosphokinase、C P K）、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 6】（E）は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase、A S T）、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase、A L P）、アラニントランスアミナーゼ（alanine transaminase、A L T）、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素（blood urea nitrogen、B U N）、クレアチンホスホキナーゼ（creatine phosphokinase、C P K）、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 7】（E）は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase、A S T）、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase、A L P）、アラニントランスアミナーゼ（alanine transaminase、A L T）、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素（blood urea nitrogen、B U N）、クレアチンホスホキナーゼ（creatine phosphokinase、C P K）、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 8】（E）は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase、A S T）、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase、A L P）、アラニントランスアミナーゼ（alanine transaminase、A L T）、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素（blood urea nitrogen、B U N）、クレアチンホスホキナーゼ（creatine phosphokinase、C P K）、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 9】（E）は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase、A S T）、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase、A L P）、アラニントランスアミナーゼ（alanine transaminase、A L T）、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素（blood urea nitrogen、B U N）、クレアチンホスホキナーゼ（creatine phosphokinase、C P K）、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 1 0】（E）は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase、A S T）、アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase、A L P）、アラニントランスアミナーゼ（alanine transaminase、A L T）、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素（blood urea nitrogen、B U N）、クレアチンホスホキナーゼ（creatine phosphokinase、C P K）、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなど

の電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 1 1】(E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

10

【図 7 E 1 2】(E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

20

【図 7 E 1 3】(E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 7 E 1 4】(E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

30

【図 7 E 1 5】(E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、A L T)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、B U N)、クレアチンホスホキナーゼ (creatinine phosphokinase、C P K)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

40

【図 7 E 1 6】(E) は、異なる処置群についての有効性研究の終了時の C 5 7 B L 6 / J マウスにおける、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase、A S T)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase、A L P)

50

、アラニントランスアミナーゼ (alanine transaminase、ALT)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素 (blood urea nitrogen、BUN)、クレアチンホスホキナーゼ (creatine phosphokinase、CPK)、並びにリン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、塩化物、及び血漿グルコースなどの電解質を含む血液化学分析を示す。結果は $n \geq 3$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 8 A】 $5 \text{ mg} / \text{kg}$ の皮下用量での C57BL6/J マウスにおける PNA2-LBAAc の生体内分布を例解している。(A) は、PNA1、PNA2-LBAAc、及び生理食塩水で処置した対照マウスの摘出した臓器の IVIS イメージングを示す。

【図 8 B】 (B) は、C57BL6/J マウスの腎臓における TAMRA 蛍光についての平均放射効率を示す。結果は $n \geq 2$ の平均値として表され、標準誤差平均が誤差バーとして表されている。

【図 8 C】 (C) は、フローサイトメトリーによる、皮下投与後 24 時間目及び 72 時間目の C57BL6/J マウスからの腎臓細胞における、PNA 及びアセチル化されたリガンドコンジュゲートの取り込みを描画するヒストグラムを示す。

【図 8 D】 (D) は、皮下投与後 24 時間後の C57BL6/J マウスからの腎臓凍結切片の共焦点顕微鏡画像を示す。青色は核を示す。赤色は TAMRA を示す。

【図 9 A】 LBAAc リガンドが 22mer の長さの PNA 配列を腎臓に効率的に送達したことを例解している。(A) は、miR-21 及び抗 miR-21 PNA、並びにそれらのリガンドコンジュゲートのヌクレオチド配列を示す。PNA6 は、LBA-リジンコンジュゲートとのコンジュゲート化のために 5' 末端にコハク酸 (SA) を含有している。リジン (K) を PNA の 3' 末端に付加し、続いて、各 PNA の蛍光プローブ 5-カルボキシテトラメチルローダミン (TAM) に付加した。OOO は、トリオキソミニPEG リンカーを表す。

【図 9 B】 (B) は、 $1.5 \text{ mg} / \text{kg}$ 皮下投与後 4 時間及び 24 時間の時点での、PNA 及びリガンドコンジュゲートで処置した C57BL6/J マウスから摘出した臓器の IVIS イメージングを示す。

【図 9 C】 (C) は、フローサイトメトリーによる、皮下投与後 4 時間目及び 24 時間目の C57BL6/J マウスからの腎臓細胞における PNA 及びアセチル化されたリガンドコンジュゲートの取り込みを描画するヒストグラムを示す。

【図 9 D】 (D) は、C57BL6/J マウスの腎臓における TAMRA 蛍光についての平均放射効率を示す。結果は $n = 2$ の平均値として表され、標準誤差平均値が誤差バーとして表されている。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書には、哺乳動物、具体的には、ヒトにおける特定の臓器、より具体的には、ヒトなどの哺乳動物の肝臓及び腎臓への、コンジュゲートの標的化された送達のための遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートが記載される。一態様では、遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートは、ペプチド核酸 (peptide nucleic acid、PNA)-炭水化物コンジュゲート (peptide nucleic acid-carbohydrate conjugate、PNA-C) である。具体的には、コンジュゲートは、両方に共有結合したリンカー骨格を介して遺伝子配列に共有結合的に連結した炭水化物リガンドを含む分子である。炭水化物リガンドは、肝臓又は腎臓を標的化するように選択することができる。好ましくは、コンジュゲートは、細胞上の特定の受容体を選択的に結合して、受容体を持つ細胞に遺伝子配列又は他の治療剤を送達する。

【0014】

本明細書で使用されるコンジュゲートは、3' 末端及び 5' 末端を有する遺伝子配列 (genetic sequence、GS) を含み、これは、mRNA 配列、siRNA 配列、又は DNA 配列などの PNA 又はオリゴヌクレオチドであり得る。各遺伝子配列は、天然であるか、又は任意選択で、例えば、ヌクレオチドの順序で、又は例えば、ガンマーセリン修飾さ

10

20

30

40

50

れたガンマペプチド核酸、アラニンガンマペプチド核酸、クランプG修飾されたペプチド核酸、ロックド核酸 (LNA)、ホスホロチオエート (PS)、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO)、2'-O-メチル (2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-フルオロ (2'-F)、5'-メチルシトシン、又はそれらの組み合わせとしての修飾を介して修飾され得る。一態様では、遺伝子配列は、PNAである。PNAは、以下に記載されるように修飾され得る。

【0015】

一態様では、コンジュゲートは、1~8個、又は1~5個、又は2~5個、又は2~4個の炭水化物残基 (リガンド) を持っている。炭水化物リガンドの数及びタイプは、肝臓又は腎臓を標的化するように、好ましくは、肝臓及び腎臓を選択的に標的化するように選択される。例えば、炭水化物リガンドは、細胞上で発現されたアシアロ糖タンパク質受容体 (Asialoglycoprotein receptor, ASGPR) を標的化するように選択され得る。ASGPRは、肝細胞の類洞側 (sinusoidal) 表面上で主に発現されたC型レクチンである。一態様では、コンジュゲートは、肝臓細胞及び腎臓細胞上のASGPRを標的化するために、1~8個、又は1~5個、又は2~5個、又は2~4個のガラクトースリガンドを持っている。一態様では、コンジュゲートは、肝臓細胞及び腎臓細胞上のASGPRを標的化するために、1~8個、又は1~5個、又は2~5個、又は2~4個のガラクトースアミン (GalNAc) リガンドを持っている。別の態様では、コンジュゲートは、肝臓細胞及び腎臓細胞上のASGPRを標的化するために、1~8個、又は1~5個、又は2~5個、又は2~4個、又は2~3個のラクトビオン酸リガンドを持っている。

【0016】

コンジュゲートの炭水化物リガンドは、そのヒドロキシ基又はアミノ基において、C2~C15アシル基で完全に又は部分的にアシル化することができる。例えば、炭水化物リガンドは、ヒドロキシ基又はアミノ基において、完全に又は部分的にアセチル化することができる。炭水化物リガンドのアセチル化は、無水酢酸、塩化アセチル、混合無水物、DCCなどのカップリング剤を有する酸、又は同様の試薬などのアセチル化試薬と、トリエチルアミン、ピリジン、DIEA、DMAAPなどの塩基、又は当技術分野で使用されるような有機塩基、無機塩基、若しくはポリマー塩基と、を使用して実行され得る。一態様では、炭水化物リガンドは、完全に又は部分的にアシル化され、好ましくは、アセチル化され、好ましくは、完全にアセチル化されるGalNAc残基である。代替的に、炭水化物リガンドは、完全に又は部分的にアシル化され、好ましくは、アセチル化され、好ましくは、完全にアセチル化されるラクトビオン酸残基である。

【0017】

炭水化物リガンドは、式Iに示されるような骨格リンカーによって遺伝子配列に共有結合的に付着することができる。多様な骨格を使用することができるが、一般に、少なくとも2つの官能基、例えば、少なくとも2つのアミノ基を含有し、1つ以上が炭水化物リガンドとの反応のためのものであり、1つ以上が遺伝子配列との反応のためのものである。アミノ基は、当技術分野で知られているように、かつ実施例に記載されるように、選択的に保護され得る。骨格は、溶解性などの特性を修飾するための部分を含み得る。例えば、リジン及びアルギニン残基が骨格中に存在し得る。

【0018】

式Iに示されるような態様では、基G¹又はG²は、任意選択で存在し得る。G¹は、骨格から遺伝子配列へのリンカー、例えば、1~20個の炭素原子と、任意選択で、ヒドロキシ、カルボキシ、チオ、又はアミノなどの1つ以上の反応性基と、を有するリンカーであり得る。別の態様では、G¹又はG²は、官能性部分であり得る。官能性部分G¹、G²は、結合リガンドからの立体的分離、親水性又は疎水性の強化、コンジュゲートの吸収の促進、体内でのコンジュゲートの分布の促進、又は医薬品化学及び薬物設計において有利な他の機能などの、所望の機能を付与することができる構造的特徴をコンジュゲートに提供することができる。官能性部分は、骨格と遺伝子配列との間に、若しくは遺伝子配列の終末端に、又はその両方に連結され得る。一態様では、官能性部分G¹、G²は、例

例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリエチレンープロピレングリコールの残基である。一態様では、 G^1 若しくは G^2 、又はその両方は、ポリエチレングリコール (polyethylene glycol、PEG) 基であり得る。PEG基は、遊離ヒドロキシ、アミノ、エーテル、又は同様の官能性部分で終端することができる1~25個のエチレングリコール残基 ($-OCH_2CH_2O-$) を含有することができる。任意選択で、これは、リガンド、コンジュゲートの骨格又は構造に結合する。

【0019】

別の態様では、官能性部分は、治療剤を含み得る。例えば、キエリン (kielin)、トルバプタン、ニンテダニブ、パクリタキセル、ブレオマイシン、シクロスポリン、シスプラチン、ロミデプシン、ドキシソルビシン、ドセタキセル、ダヌノルビシン (danunorubicin)、ピンクリスチン、メトトレキサート、シクロホスファミド、ベネトクラクス、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、プレドニゾロン、シタラビン、又はピルフェニドン。他の治療剤は、王立化学会 (Royal Society of Chemistry) によって公開された Merck Indexに見出すことができ、これは、印刷物及びオンライン <https://www.rsc.org/merck-index> で公開されている。例えば、 G^1 は、骨格と遺伝子配列との間のリンカーであり、それに共有結合した治療剤を含み得る。代替的に、又は加えて、基 G^2 は、直接的に又はリンカーによってのいずれかで遺伝子配列に共有結合した治療剤であり得る。式 I には示されていないが、炭水化物残基を連結するものと同様の連結を使用して、治療剤などの官能性部分を骨格に連結することも可能である。

10

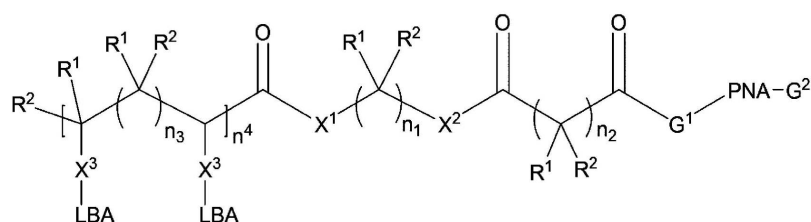
20

【0020】

一態様では、コンジュゲートは、遺伝子配列ーラクトビオン酸コンジュゲートである。ラクトビオン酸 (LBA) は、グルコン酸及びガラクトースから形成された二糖である。いくつかの実施形態では、ラクトビオン酸は、コンジュゲートの一部として誘導体化される。式 I a の PNAーラクトビオン酸コンジュゲートであって、

【0021】

【化2】



30

(Ia)

式中、LBAが、ラクトビオン酸残基Xであり、 X^1 が、 NR^3 、O、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、各 X^3 が、独立して、O、 NR^3 、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 n_3 が、0~20であり、 n_4 が、1~8である、PNAーラクトビオン酸コンジュゲート。好ましくは、 G^1 は、PNAをコンジュゲートに連結する基であり、 R^1 及び R^2 は、各々、Hであり、 X^1 、 X^2 、及び X^3 は、各々、NHであり、 $n_1 = 6$ 、 $n_2 = 2$ 、かつ $n_3 = 4$ である。一態様では、 R^1 及び R^2 は、各々、Hであり、 $n_3 = 4$ であり、PNAは、5'末端でコンジュゲートに連結されている。

40

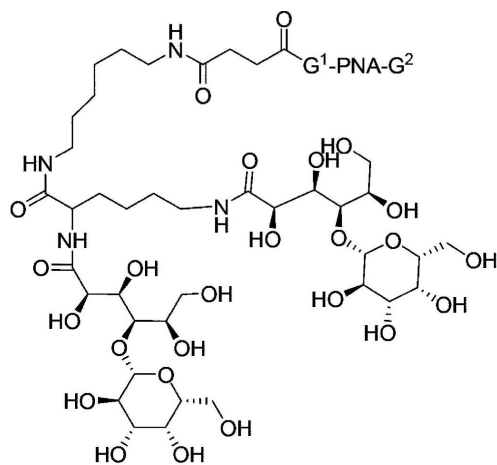
【0022】

例えば、PNAーラクトビオン酸コンジュゲートは、式 I a-1 のコンジュゲートであり得、

【0023】

50

【化 3】



10

式中、 G^1 及び G^2 が、上記で定義される通りであり、好ましくは、 G^1 が、PNA をコンジュゲートに連結する官能性部分であり、 G^2 が、官能性部分である。任意選択で、式 I a 及び I a-1 のうちのいずれかにおいて、ヒドロキシル基は、2～15 個の炭素原子又は 2～8 個の炭素原子を有するアシル基で完全に又は部分的にアシル化することができ、好ましくは、アセチル化することができ、より好ましくは、上述のように完全にアセチル化することができる。

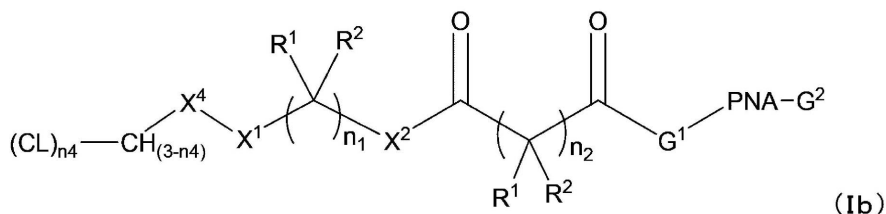
20

【0024】

別の態様では、コンジュゲートは、式 I b のコンジュゲートであり得、

【0025】

【化 4】



30

式中、 X^1 が、 $C=O$ 又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 X^4 が、O、 NR^3 、又は $C(R^3)_2$ であり、 R^3 が、H、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、CL が、置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、又はアミド、エステル、若しくはエーテル基を含む $C_6 \sim C_{12}$ アリールを含む 1～30 個の原子のリンカー鎖によって CH に連結された炭水化物残基であり、 n_4 が、2 又は 3 である。式 I b における炭水化物残基は、N-アセチルガラクトサミンから誘導することができ、アシル基が 2～15 個の炭素原子又は 2～8 個の炭素原子を有する完全に又は部分的にアシル化された炭水化物残基、例えば、完全にアセチル化されているなどの、完全に又は部分的にアセチル化された炭水化物残基であり得る。

40

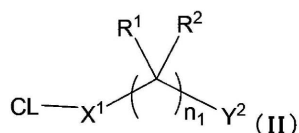
【0026】

遺伝子配列を炭水化物リガンドにコンジュゲート化して、遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートを提供する方法が記載される。方法は、遺伝子配列を官能基化して、遊離-COOH 官能基を提供することと、修飾された遺伝子配列の遊離-COOH 官能基と式 I I の化合物の Y^2 との間に結合を形成することと、を含み、

【0027】

50

【化 5】



式中、 Y^2 が、 $-\text{NHR}^3$ 又は $-\text{OH}$ である。この方法は、溶液相若しくは固相の合成、又はそれらの組み合わせによって実行することができる。遺伝子配列、例えば PNA は、当技術分野で知られているような溶液相若しくは固相の合成、又はそれらの組み合わせによって得ることができる。遺伝子配列は、以下に記載されるように修飾することができる。加えて、方法は、遺伝子配列を官能基化する前に、 G^1 、 G^2 、又はそれらの組み合わせの前駆体で遺伝子配列を修飾することを更に含み得る。

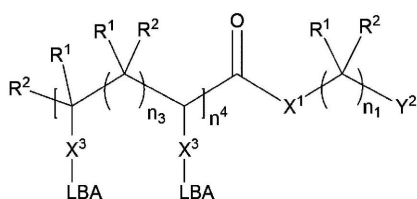
10

【0028】

一態様では、遺伝子配列をラクトビオン酸-骨格リガンドにコンジュゲート化して、遺伝子配列-ラクトビオン酸コンジュゲートを提供する方法は、遺伝子配列を官能基化して、遊離 $-\text{COOH}$ 官能基を提供することと、修飾された遺伝子配列の遊離 $-\text{COOH}$ 官能基と式 III の Y^2 との間に結合を形成することと、を含み、

【0029】

【化 6】



20

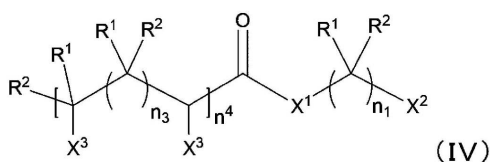
(III)

式中、 Y^2 が、 $-\text{NHR}^3$ 又は $-\text{OH}$ である。この場合も、遺伝子配列は、好ましくは、PNA である。一態様では、方法は、ラクトビオン酸を式 IV の骨格と反応させることを更に含み得、

30

【0030】

【化 7】



式中、 X^3 が、 $-\text{OH}$ 又は NHR^3 であり、 X^2 が、保護された O 又は保護された NH R^3 である。

40

【0031】

一態様では、実施例に記載され、かつ図 1 及び図 2 に示されるように、ラクトビオン酸残基は、そのアルファアミノ基及びイプシロンアミノ基によって、リジン残基を含む骨格にカップリングされ得る。リジンのカルボキシル基は、アルキルジアミン上のアミノ基にカップリングされ、他のアミノ基は、ペプチド核酸に連結されたスクシニル COOH 基にカップリングされる。他の態様では、アルキルジアミンをアルカンジオールによって置換して、エステル連結を有する骨格を形成することができる。代替的に、5' 末端のコハク酸は、置換又は非置換の $\text{C} \sim \text{C}_{20}$ ジカルボン酸によって置き換えることができる。PNA は、官能性部分、例えば、トリオキソミニPEG スペース及び 5' 末端のコハク酸で修飾されて、開裂後に遊離 $-\text{COOH}$ 官能基を提供する。そのように修飾されたいくつか

50

の PNA は、市販されている。次いで、遊離 COOH 基は、リガンド骨格上のアミノ基、ヒドロキシ基、ハロゲン化アルキル、又は他の好適な官能基、例えば、ラクトビオン酸又は GalNAc と反応することができる。

【0032】

特に、GalNAc が使用される場合、GalNAc は、アルキルエーテル、アミド、エステル残基を持つ基によって骨格に連結して、炭水化物リガンドを提供することができる。これらのリガンドのいくつかは、市販されているか、又は当業者には身近な化学合成法を使用して合成することができる。化学合成のための一般の方法は、他の出典の中でも、「Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations」, Richard C. Larock, Wiley-VCH: 1999 及び「March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure」, Jerry March & Michael Smith, John Wiley & Sons Inc.: 2001 に見出すことができる。当然、他の炭水化物残基は、基、例えば、リガンドを形成するためのアルキルエーテル残基、アミド残基、又はエステル残基を持つ鎖によって骨格に同様に連結され得る。

10

【0033】

コンジュゲートの使用のための方法が更に記載される。例えば、コンジュゲートは、肝臓及び腎臓におけるがんを処置するために使用することができる。一態様では、コンジュゲートは、腎線維化を処置するために使用することができる。別の態様では、コンジュゲートは、腎がんを処置するために使用することができる。別の態様では、コンジュゲートは、腎疾患を処置するために使用することができる。製剤は、インビボ遺伝子治療のために対象に直接投与され得る。

20

【0034】

コンジュゲート、特に、PNAC は、RNA 治療剤として使用することができる。具体的には、コンジュゲート、特に、PNAC は、マイクロ RNA (miRNA) 配列を標的化することができる。コンジュゲートは、転写後レベルで遺伝子発現を制御するために使用することができる。miRNA は、メッセンジャー RNA (messenger RNA、mRNA) の安定性及び翻訳を調節することを通して遺伝子発現を制御することにより、生理学的プロセスの維持において重要な役割を果たす。mRNA 又は miRNA などの細胞中の RNA を標的化するためのコンジュゲートの使用は、mRNA の場合には、翻訳段階で RNA の発現を阻害し、かつ／又は miRNA の発現及びその標的遺伝子に対するその下流の効果を下方調節又は上方調節することによって、遺伝子発現に影響を与え得る。コンジュゲートを使用して、いくつかの破壊性疾患を引き起こす miRNA の異常発現を制御することができる。コンジュゲートは、非定型 miRNA レベルが分化、増殖、及びアポトーシスを含む変化するプロセスにつながるがんを処置するために使用することができる。好ましい実施形態では、コンジュゲートは、肝臓及び腎臓におけるがんを処置するために使用される。一態様では、コンジュゲートは、腎線維化を処置するために使用することができる。一態様では、コンジュゲートは、腎がんを処置するために使用することができる。一態様では、コンジュゲートは、腎疾患を処置するために使用することができる。

30

40

【0035】

したがって、一態様では、対象における健康障害に関与する標的化 RNA の発現を低減するための方法は、本明細書に記載の遺伝子配列—ラクトビオン酸コンジュゲートを、対象の細胞にインビボ又はエキスピボで提供することを含み、コンジュゲートの PNA の標的化 RNA への結合が、標的化 RNA の発現を低減し、特に、標的化 RNA が、マイクロ RNA である。一態様では、RNA 治療薬は、肝臓細胞若しくは腎臓細胞、又はそれらの組み合わせを標的化して、それを必要とする対象の、特に、肝臓がん細胞若しくは腎臓がん細胞、又はそれらの組み合わせを含むがん細胞の細胞核酸機能の発現を調節する際に使用される。一態様では、PNA は、腎臓特異的マイクロ RNA、なおより具体的には、m

50

i R-21を含む。処置のための（処置を必要とする）状態は、腎線維化及び多発性嚢胞腎疾患であり得る。

【0036】

別の態様では、対象における健康障害においてDNAを標的化し、遺伝子編集するための方法は、請求項1～20のいずれか一項に記載の遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートを、対象の細胞にインビボ又はエキスピボで提供することを含み、細胞に標的化されたコンジュゲートのDNAが、遺伝子の発現を調節する。

【0037】

遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートは、それを必要とする対象のエキスピボ又はインビボでの処置のために使用することができる。方法は、典型的には、エキスピボ又はインビボで、任意選択で、増強剤と組み合わせて、細胞を有効量のコンジュゲートと接触させて、治療剤を送達すること、例えば、RNAの発現を修飾することを含む。一態様では、方法は、標的細胞の集団を有効量のコンジュゲートと接触させて、RNAの発現を修飾して、治療結果を達成することを含む。

【0038】

遺伝子配列-炭水化物コンジュゲートは、概して、有効量のコンジュゲート及びポリマー、脂質、タンパク質、又は臓器特異的送達のための他の薬学的賦形剤を含む、含んでいる製剤として提供される。製剤が投与様式に適するように選択される、薬学的に許容される担体（当技術分野では賦形剤とも称される）。薬学的に許容される担体は、投与される特定のコンジュゲートによって、かつコンジュゲートを投与するために使用される特定の
方法によって、部分的に決定される。例えば、製剤は、好適な薬学的担体中で局所的、局
在的、又は全身的に投与するためのものであり得る。したがって、コンジュゲートに好適
な製剤が多種多様にある。Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition by E. W. Martin (Mark
Publishing Company, 1975) は、典型的な担体及び調製方法を開
示している。例えば、製剤は、塩、担体、緩衝剤、乳化剤、希釈剤、賦形剤、キレート剤
、充填剤、乾燥剤、酸化防止剤、抗微生物剤、保存剤、結合剤、増量剤、シリカ、可溶化
剤、又は安定剤などの薬学的に許容される担体を含み得る。コンジュゲートはまた、細胞
への標的化のために、生分解性若しくは非生分解性のポリマー又はタンパク質又はリポソ
ームから形成された好適な生体適合性のマイクロカプセル、マイクロ粒子、ナノ粒子、又
はマイクロスフェア中にカプセル化され得る。粒子は、活性剤の制御放出を可能にす
ることができる。粒子は、マイクロ粒子及び／又はナノ粒子であり得る。粒子は、1つ以上の
ポリマーを含み得る。ポリマーのうちの1つ以上は、合成ポリマーであり得る。粒子は、
例えば、単一エマルジョン技法若しくは二重エマルジョン技法、又はナノ沈殿によって形
成され得る。そのような系は当業者によく知られており、適切な核酸とともに使用するた
めに最適化され得る。

【0039】

例えば、関節内（関節部内）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、及び皮下経路による非
経口投与に好適な製剤としては、酸化防止剤、緩衝薬、静菌薬、及び意図されるレシピエ
ントの血液と製剤を等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性の等張滅菌注射溶液、並
びに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、分散剤、安定剤、及び保存剤を含み得る水性及び非水
性の滅菌した懸濁液、溶液、又はエマルジョンが挙げられる。注射のための製剤は、単位
剤形、例えば、アンプル又は複数回用量容器で提示され、任意選択で、保存剤が添加され
得る。コンジュゲートは、滅菌した水性又は非水性の溶液、懸濁液、及びエマルジョンの
ような形態を取ることができ、これらは、ある特定の態様では、対象の血液と等張であり
得る。非水性溶媒の例は、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリ
ブ油、ゴマ油、ココナッツ油、落花生油、ピーナッツ油などの植物油、鉱油、オレイン酸
エチルなどの注射可能な有機エステル、又は合成モノグリセリド若しくはジグリセリドを
含む固定油である。水性担体としては、生理食塩水及び緩衝化媒体を含む、水、アルコー
ル／水溶液、エマルジョン、又は懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナ

トリウム溶液、1, 3-ブタンジオール、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、又は固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体及び栄養補給剤、並びに（リンゲルデキストロースに基づくものなどの）電解質補給剤が挙げられる。例えば、抗微生物薬、酸化防止剤、キレート剤、及び不活性ガスなどの、保存剤及び他の添加剤もまた存在し得る。加えて、滅菌固定油は、慣例的に、溶媒又は懸濁媒体として採用されている。この目的のために、合成モノグリセリド又はジグリセリドを含む任意の無菌性固定油を採用することができる。加えて、オレイン酸などの脂肪酸を注射剤の調製に使用することができる。当業者であれば、過度な実験を用いることなく、コンジュゲートを調製及び製剤化するための様々なパラメータを容易に決定することができる。

10

【0040】

コンジュゲートはまた、単独で、又は他の好適な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤にすることができる（すなわち、コンジュゲートが「噴霧」され得る）。エアロゾル製剤を、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素、及び空気などの加圧された許容される噴射剤中に入れることができる。吸入による投与のために、化合物は、好適な噴射剤を使用して、加圧パック又は噴霧器からのエアロゾルスプレー提示の形態で送達される。

【0041】

コンジュゲートの有効量又は治療有効量は、疾患若しくは障害の1つ以上の症状を処置、阻害、若しくは緩和するのに、又はそうでなければ、所望の薬理学的及び／若しくは生理学的効果、例えば、疾患若しくは障害の根底にある根本的な病態生理学的メカニズムのうちの1つ以上を低減、阻害、又は無効にするのに十分な投薬量であり得る。正確な投薬量は、製剤及び対象に依存する変数（例えば、年齢、免疫系の健康状態、臨床症状など）などの多様な要因に従って変動することになる。

20

【0042】

コンジュゲート、特に、コンジュゲートを含む製剤は、1日に1回、2回、又は3回、週に1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、月に1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、又は8回、標的細胞に投与するか、又は他の方法でそれと接触させることができる。例えば、いくつかの実施形態では、組成物は、2日若しくは3日毎に、又は平均して大体週に約2回～約4回投与される。

30

【実施例】

【0043】

本開示は、以下の実施例によって例解され、これらは、特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。

【0044】

別途指定されている場合を除いて、材料及び試薬は、Sigma-Aldrich又はThermo Fisher Scientificから入手し、受け取ったまま使用した。tGalNAcリガンドは、Sussex Research (Ottawa, Canada) から購入した。

【0045】

40

<実施例1. PNA-炭水化物コンジュゲートの合成>

図1A、並びに図2A及び図2Bに示されるように、PNA-LBAコンジュゲートを合成した。

【0046】

1, 6-ジアミノヘキサン-リジン骨格:

アミドカップリング反応によって、1, 6-ジアミノヘキサン-リジン骨格を合成する（図1A）。合成は、HBTU及びDIEAを有するDMF溶媒中で、FMOC保護リジンを6-アミノBoc保護1, 6-ジアミノヘキサンとカップリングすることによって開始した。次いで、DMF溶液中の20%ピペリジンを使用してリジン上の2つのFMOC基を脱保護して、リジン上のアルファアミノ基及びイプシロンアミノ基を遊離させて、2

50

つのラクトビオン酸分子へのカップリングのための骨格を提供した。

【0047】

炭水化物リガンド：LBA-骨格リガンド

図1Aに示される第2の工程では、LBAで骨格を官能基化した。まず、LBAを触媒量のTFAとともにメタノール中で還流させることによってラクトン形態に変換し、次いで、ラクトン形態を骨格に反応させるために、溶液をDIEAで塩基性化した。反応後、LBA上のヒドロキシル基を精製のためにアセチル化した。質量分析、並びに ^1H 及び ^{13}C NMR分光法は、反応生成物の同一性を裏付けた。

【0048】

官能基化ペプチド核酸：

miR-122を標的化するPNAオリゴマー（図1C）を、知られている標準的なBOC脱保護及び合成プロトコルを実装するMBHA樹脂固体支持体上で合成した。正常なPNAモノマーを使用して、miR-122のシード領域及び完全配列を標的化する短鎖（8mer）及び全長（22mer）PNAを合成した。

【0049】

標準的な方法を使用して、リジンをPNAの3'末端に付加した。次いで、溶液相コンジュゲート化のために、PNAオリゴマーを、3'末端のトリオキソミニPEG（商標）スパーサによって修飾し（11-（boc-アミノ）-3,6,9-トリオキサウンデカン酸を使用する）、5'末端のコハク酸によって修飾して、開裂後に遊離-COOH官能基を生成した。NMP中のPNAモノマー／リジン／トリオキソミニPEG／コハク酸／TAMRAの0.2Mの溶液、DMF中の0.52MのDIEA、及びDMF中の0.39MのHBTUを使用して、固相合成を実施した。細胞取り込み及び生体内分布研究のために、TAMRA蛍光染料を、トリオキソミニPEGスパーサを通してPNAの3'末端上にカップリングした。MBHA樹脂上でのPNA合成のためのこれらの材料及び方法についての詳細な手順は、以前に報告されている（Malik, Shipra, Frank J. Slack, and Raman Bahal. 「Formulation of PLGA nanoparticles containing short cationic peptide nucleic acids.」 Methods X 7 (2020). 101115）。

【0050】

炭水化物-PNAコンジュゲート：

図2Aに示されるように、官能基化PNA（PNA4）を、5'末端のコハク酸を介してLBA骨格リガンドのアミノ基にカップリングした。DMF／DMSO溶媒混合物中、カップリング試薬としてHATU、及び塩基としてDIEAを使用して反応を実施した。LBAのヒドロキシ基上にアセチル保護を持つ得られたアミドを、メタノール中のナトリウムメトキシドで処理して、PNA4-LBAコンジュゲートを得た。

【0051】

図2Bに示されるように、GalNAc-PNA4コンジュゲートを、DMF／DMSO溶媒中のDIEAによって触媒するカップリング試薬としてHATUを使用して、トリオキソミニPEGスパーサ及び遊離-COOHを有する5'末端のコハク酸を含有する官能基化PNAをGalNAcリンク骨格のアミノ基と反応させることによって同様に調製した。

【0052】

品質管理目的のために、炭水化物リガンドコンジュゲート化PNAのHPLC純度プロファイル及びMALDI質量スペクトルを工程毎に記録した（図2C）。PNA、PNA4-LBA、及びPNA4-tGalNAc生成物をMALDI-MSによって分析し、生成物形成を示した。図2Cの挿入図に示されるように、生成物はまた、逆相HPLCによって分析した。

【0053】

<実施例2．インビトロ結合研究>

10

20

30

40

50

PNA鎖上の修飾は、その標的結合を妨害してはならない。コンジュゲート化によるPNA鎖の修飾が標的結合を妨害するかどうかを検討するために、PNA及びそれらの炭水化物-PNAコンジュゲートを、ゲルシフトアッセイ及び熱融解曲線分析によるそれらの標的に対するそれらの親和性について判定した。

【0054】

ゲルシフトアッセイ：

PNAを標的DNAと2：1（PNA：DNA）の比で、37℃で一晩インキュベートし、次いで、試料を8%ポリアクリルアミドゲル上での分離について評価した。PNA1、PNA2-LBA、及びPNA2-tGalNAcは、miR-122のシード領域を標的化するように設計されたそれらのより短い配列に起因して、限定された標的結合を示した（図3B）。全長PNA及びコンジュゲートは、それらの遅延バンドからわかるように、標的DNAへの完全な結合を示した（図3B）。ゲル画像はまた、炭水化物リガンドコンジュゲート化後のPNAの分子量の増加に起因して、PNA4-LBA及びPNA4-tGalNAcについてのバンドにおいてより多くの遅延を示した。融解曲線分析は、これらの結果を裏付け、炭水化物リガンドコンジュゲート化PNA-DNA二量体については融解温度の上昇が観察された（図3A）。

【0055】

<実施例3．C57BL／6Jマウスにおける生体内分布研究>

PNA及びリガンド-PNAコンジュゲートの生体内分布

単回で125µM、10mL/kg皮下用量後の24時間生体内分布研究を、C57BL／6Jマウスにおいて研究した。全てのPNAを蛍光TAMRA（ローダミン染料）プローブでタグ付けした。0.5、1、2、4、8、及び24時間目の各々3匹のマウスを、IVISイメージング装置上でTAMRA蛍光についてイメージングし、主要な内臓を摘出するために犠死させた。肝臓、肺、心臓、腎臓、及び脾臓を含む異なる臓器の蛍光画像を記録して、相対的な生体内分布を調べた（図4A及び図5A）。皮下投与後、全長PNA（PNA3）は、肝臓内で最大1時間しか最小濃度を示さなかった。初期時点から、腎臓内のPNA3の実質的な部分は、腎排泄を通じたその急速な排出を示した。PNA4-LBA及びPNA4-tGalNAcの両方は、肝臓を非常に効率的に標的化し、肝臓内で最大24時間均一に分布した（図4A）。単離された肝臓からの時間依存的PNA-TAMRA蛍光曲線をプロットし、肝臓内のPNAの相対量を計算するために使用した（図4D）。時間肝臓蛍光の曲線下面積（area under the curve、AUC）を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して計算した。全体として、PNAコンジュゲートのAUC0-24倍率変化は、PNA3よりも著しく高かった。PNA4-LBA及びPNA4-tGalNAcについてのAUC0-24倍率変化は、それぞれ、 20.34 ± 2.53 （ p^{**} ）及び 25.88 ± 4.52 （ p^{**} ）であった。PNA4-tGalNAcは、肝臓内で初期高濃度を示したが、AUC0-24における変化は、PNA4-LBAと比較して著しくなかった。次に、本発明者らは、肝臓組織をセルストレーナに通し、続いて、RBC溶解した後に肝臓細胞のFACS分析を実行した。FACSデータは、同等のPNA4-LBA及びPNA4-tGalNAcの肝臓標的化及び保持を再度裏付けた（図4B）。また、早期の時点でのIVIS画像における目に見える蛍光差は、FACS分析において同じように顕著ではなかった。次に、組織からのTAMRA蛍光をイメージングするために、1時間目の肝臓試料からの凍結切片化を行った。蛍光画像は、肝臓切片におけるPNA4-LBA及びPNA4-tGalNAcに対する均一な分布を裏付けた（図4C）。

【0056】

抗シードリガンド-PNAコンジュゲートの生体内分布：

全長PNA（PNA3）と同じく、非コンジュゲート化短鎖PNA1もまた、投与の1時間後に腎臓によって排出されて、肝臓蓄積を低減することがわかった（図5A）。PNA2-LBA及びPNA2-tGalNAcの両方が、PNAを肝臓に送達した。両方のコンジュゲートは、肝臓内で最大24時間蓄積し、1時間で最大濃度を有しており、しか

しながら、濃度は、時間とともに著しく低下した（図 5 A）。PNA 2-tGalNAc は、研究全体を通して PNA 2-LBA よりも高い肝臓蓄積をもたらした。Graph Pad Prism ソフトウェアを使用して肝臓蛍光の AUC を計算し、それは、PNA 1 及び PNA 2-LBA よりも PNA-2-tGalNAc について著しく高かった（図 5 C）。PNA 2-LBA 及び PNA 2-tGalNAc の AUC は、非コンジュゲート化 PNA 1 よりも 9 (p*) 及び 28 (p****) 倍高かった。PNA 2-tGalNAc の高い肝臓蓄積は、2つの主要因によるものであり得、1つは、ラクトビオン酸中のガラクトースよりも高い tGalNAc の ASGPR 親和性であり、もう一方は、体内からの PNA の迅速な排出である。明らかに、より短い PNA については、tGalNAc のより高い ASGPR 親和性が肝臓の取り込み及び排出を決定すると思われる。0.5 時間での臓器分布はまた、PNA 2-LBA 濃度が PNA 2-tGalNAc よりも腎臓内で高いことを示した（図 5 A）。

10

【0057】

フローサイトメトリー分析によるこれらの観察の裏付けを実行した（図 5 B）。肝細胞中の PNA 濃度を表すヒストグラムプロットは、PNA 2-LBA 及び PNA 2-tGalNAc について 0.5 時間で良好な重複を示したが、それでも PNA 2-tGalNAc は、より高い蛍光強度を示した。コンジュゲート化 PNA は、肝臓試料中の miR-122 レベルにおいて著しい変化がなかったにもかかわらず、長時間の肝臓保持を示した。

【0058】

LBA-PNA 及び tGalNAc-PNA コンジュゲートによる肝細胞標的化：

20

HepG2 細胞を使用するインビトロ研究において、LBA 及び tGalNAc リガンドが、ASGPR 媒介細胞取り込みを示すことが見出された。マウスにおけるインビボ処置後にこれらの結果を確認した。PNA 及び炭水化物リガンド-PNA コンジュゲートの皮下投与の 1 時間後、マウス肝臓を灌流し、その場で消化させた。コラゲナーゼ媒介肝臓消化を使用して、肝臓細胞を分離し、肝細胞のために、得られた肝臓細胞懸濁液を、Percol 勾配を使用して濃縮した。得られた肝細胞画分を ASGPR 及び HNF-4α（肝細胞特異的マーカー）蛍光抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。象限 2 は PNA の TAMRA 蛍光を表し、二重陽性象限 3 は PNA を含有する肝細胞を表す。PNA 1 よりも PNA 2-LBA 及び PNA 2-tGalNAc の両方についての高い Q3/Q2 比が、肝細胞中の炭水化物リガンド-PNA コンジュゲートの優先的な蓄積を裏付けた（図 5 D）。

30

【0059】

<実施例 5. 有効性研究>

miR-122 発現は、肝臓に特異的であり、肝細胞 miRNA プールの 60~70% を構成する。健康な肝臓では、miR-122 発現は、コレステロール及び脂肪酸代謝において重大な役割を有する。生体内分布研究において、LBA 及び tGalNAc の両方が、PNA の優れた肝臓標的化送達を示すことが見出された。上述のゲルシフト及び融解曲線分析から、PNA の 5' 末端上の炭水化物リガンドの存在は、その標的結合能力に影響を与えないことが見出された。インビボ有効性及び安全性についてこれらの研究結果を判定することが、この研究の最大の目的であった。miR-122 のレベルを生体内分布研究からの肝臓試料において試験し、4、8、及び 24 時間目の PNA 4-LBA 及び PNA 4-tGalNAc による miR-122 レベルの優れたノックダウンが見出された。PNA 3 はまた、miR-122 ノックダウンをある程度示した。しかし、miR-122 の下流標的（ALDOA、BCKDK、GYS1、NDRG3、及び CUX-1）のレベルは、著しく変化しなかった（データは提供せず）。24 時間又は／及び単回用量の PNA はいずれも、肝臓において高度に発現する miR-122 の下流標的をノックダウンするのに不十分であった。短鎖 PNA 及びコンジュゲートは、標的部位における短鎖 PNA の乏しい結合に起因して、miR-122 の著しいノックダウンを示さなかった。

40

【0060】

生理食塩水処置群が対照として機能を果たす複数回用量研究における PNA 3、PNA

50

4-LBA、PNA 4-tGalNAcの有効性の比較を実行した。有効性判定のために、RT-PCR及びウェスタンブロット分析による肝臓試料中のmiR-122及びその下流標的のレベルを測定した。PNA 4-LBA及びPNA 4-tGalNAcの両方は、PNA 3よりもmiR-122の最大75%の著しいノックダウンを示した(p**) (図6A)。下流標的ALDOA、BCKDK、GYS1、NDRG3、及びCUX-1のmRNA発現分析は、PNA 4-LBA及びPNA 4-tGalNAc処置についてmRNAレベルの著しい増加を示した(≥p*) (図6A)。次に、ALDOA及びBckdkタンパク質についてのウェスタンブロット分析は、PNA 4-LBA(p*)及びPNA 4-tGalNAc処置後のタンパク質上方制御を裏付けた(図6B及び図6C)。PNA 3処置は、下流標的のレベルにおける著しい変化を示さなかった。miR-122は、コレステロール及び脂肪酸代謝の極めて重要な調節因子であるため、本発明者らは、コレステロール及びトリグリセリドの血漿レベルを比較した。PNA 4-LBA及びPNA 4-tGalNAc群の血漿コレステロール及びトリグリセリドレベルは、PNA 3及び生理食塩水処置群よりも低かった。コレステロール及びトリグリセリドレベルは、PNA 4-LBA処置後に著しく低かった(p*)。PNA 4-LBA及びPNA 4-tGalNAc処置群は、より低い血漿グルコースレベルを示したが、その差は統計的に著しくなかった(図7E)。更に、肝臓重量(体重の%)の変化もまた、PNA 4-LBA及びPNA 4-tGalNAcについて著しく少なく、これは、肝臓における脂肪貯蔵の減少と相関する。全体として、全ての生理学的パラメータの変化は大きくないが、健康なマウスにおける短い処置持続期間を考慮すると、これらの研究結果は有意義であり、肝臓への標的化送達後のPNAの有効性を裏付けている。

10

20

【0061】

<実施例6. 安全性研究>

C57BL/6JマウスにおいてPNA 3、PNA 4-LBA、及びPNA 4-tGalNAcについて安全性評価を実行した。3回の5mg/kg用量後の安全性評価のために、マウスの体重及び重要臓器の重量、H&E染色による組織病理(肝臓、腎臓、及び脾臓)、CBC分析、包括的な血液化学、並びに電解質レベル及びサイトカインパネルの血漿レベルを判定した。肝臓、腎臓、及び脾臓の組織切片に対して実行したH&E染色は、処置群間でいずれの著しい組織学的な差も示さなかった(図7A)。研究中、異なる処置群間でマウスの体重における有意差は観察されなかった(図7C)。同じように、臓器摘出(肝臓、腎臓、脾臓、心臓、及び肺)中、本発明者らは、いずれの毒性の明白なサインも見つけなかった。臓器重量(体重の%)は、PNA 4-LBA及びPNA 4-tGalNAc処置群において肝臓重量が低減したことを除いて、著しく変動しなかった。肝臓は脂肪貯蔵臓器であるため、miR-122ノックダウンによる観察された脂肪蓄積の低減は、本発明の文脈についての1つの考えられる説明であり得る。サイトカインレベルの上昇は、オリゴヌクレオチド処置から誘起された任意の免疫応答についての主要な指標である。Luminex系アッセイを使用してサイトカインTNFα、IL-12p70、MCP-1、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17A、IL-3、MIP-1α、MIP-1β、IL-25の血漿レベルを推定するために、最終用量の24時間目に血液を採取した。これらのサイトカインのうちのいずれも上方制御されることが見出されず、生理食塩水、PNA 3、PNA 4-LBA、及びPNA 4-tGalNAc処置におけるサイトカインレベルに有意差はなかった(図7B)。本発明者らの試料中のサイトカインの固有レベルは、キットの較正範囲よりも低かった。RBC、WBC、血小板、及びヘモグロビン(データは示さず)を含むCBC分析(図7D)、並びにアスパラギン酸トランスアミナーゼ(aspartate transaminase、AST)、アルカリホスファターゼ(ALP)、アラントランスアミナーゼ(ALT)、アルブミン、グロブリン、総ビリルビン、クレアチニン、血中尿素窒素(BUN)、クレアチンホスホキナーゼ(CPK)、及び電解質を含む包括的な血液化学は、様々な処置群間でいずれの有意差も示さなかった(図7E)。電解質は、リン、カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、及び塩化物を含んでいた。全体として、PNA 4-LBA及び

30

40

50

PNA 4-tGalNAcの試験した用量レジメンが高度に安全かつ有効であると判定により結論付けられた。

【0062】

＜実施例7．短鎖PNAの腎臓標的化送達＞

LBAリガンドの機能強化についての調査中、アセチル化LBAリガンド(LBAAc)は、腎臓を標的化するための優れた可能性を示した。PNA 2-LBAAc分布は、C57BL/6Jマウス(5mg/kg、皮下)における本発明者らの生体内分布研究に従って、主として腎臓に限定されることが見出された。最初に、1時間では、PNA 1及びPNA 2-LBAAcの両方が主に腎臓内に分布し、ある程度は肝臓に分布していた(図8A)。一般に、ネイキッドの／製剤化されていないPNAは、急速な腎臓排出を呈し、本発明者らは、その排出ピーク時間を示す、30分で腎臓内の短鎖PNA(PNA 1)についての最大蛍光強度を見出した。PNA-1と比較して、初期分布段階後のPNA 2-LBAAcは、腎臓内で最大蓄積を示した(図8A)。腎臓からのTAMRA標識PNAの平均放射効率を、定量分析のために異なる時点(1、4、24、48、及び72時間)で決定した(図8B)。興味深いことに、48時間目の腎臓内のPNA 2-LBAAc濃度は、PNA 1の排出段階(1時間)濃度と同等であった。これらの研究結果は、腎臓内のPNA 2-LBAAcの標的化及び蓄積を証明する。

【0063】

フローサイトメトリー分析による腎臓内のPNA 2-LBAAcコンジュゲート分布の裏付け：

24時間目及び72時間目からの腎臓試料を40µmのストレーナに通し、RBC溶解後、腎臓細胞懸濁液を4%PFAで固定し、フローサイトメーターで分析した。腎臓細胞におけるTAMRA蛍光シグナルを示すヒストグラムプロットは、PNA-1と比較して、腎臓において、PNA 2-LBAAcについて最大72時間のより高い保持を示すIVIS研究結果を裏付けた(図8C)。IVIS及びフローサイトメトリー分析の両方が、LBAAcリガンドによるPNAの腎臓標的化送達を裏付けた。次いで、腎臓におけるPNAの分布を調べるために、それらの腎臓切片をイメージングした。24時間目の腎臓試料からの10µm厚の切片を固定し、透過処理し、核可視化のためにDAPIで染色した。蛍光イメージングでは、腎臓内のPNA 2-LBAAcの均一な分布が観察された(図8D)。TAMRAシグナル強度は、PNA 2-LBAAcのより高い尿細管蓄積を表す。

【0064】

全長(22mer)PNAの腎臓標的化送達：

miR-21は、腎線維化において上方制御されることが見出された腎臓特異的マイクロRNA、及び線維化処置のための証明された標的である。全長(22mer)PNAオリゴマー、つまり、miR-21を標的化するPNA 5、PNA 6、及びLBAAcコンジュゲート(PNA 6-LBAAc)を設計及び合成した(図9A)。図2Aに記載されるように、PNA 6をLBAAcとコンジュゲート化した。

【0065】

C57BL/6JマウスにおけるPNA 5及びPNA 6-LBAAcの、1.5mg/kgの低い皮下用量(短鎖PNA 1及び2の1/10モル当量)での生体内分布判定：腎臓標的化についてのLBAAcの包括的な検証のために、より低い用量の生体内分布を選定した。IVISイメージングから、TAMRA蛍光シグナルは、PNA 5及びPNA 6-LBAAcの両方について腎臓のみに限定された(図9B)。4時間では、PNA及びコンジュゲートの両方が腎臓において同様の分布を示し、それらの平均蛍光強度は同等であった。24時間では、PNA 6-LBAAc濃度が腎臓内で増加していたのに対して、PNA 5は消失した。全体として、PNA 6-LBAAcについては、24時間目の非コンジュゲート化PNA 5と比較した場合、腎臓保持において4倍の増加が観察された(図9D)。結果は、腎臓細胞のフローサイトメトリー分析によって裏付けられた。RBC溶解後に得られた腎臓細胞を4%PFAで固定し、TAMRA蛍光について分析した。4時

間目及び24時間目の試料からのTAMRA蛍光を表すヒストグラムプロットは、腎臓細胞におけるPNA5の排出及びPNA6-LBAAcの蓄積を裏付けた(図9C)。全体として、PNA5は、PNAの通常の薬物動態に従い、いかなる組織分布も伴わずに急速に排出された。その一方で、PNA6-LBAAcは、コンジュゲートの疎水性が増加したために、より遅い生体内分布を示した。おそらく、PNA6-LBAAcの腎臓蓄積についてのTmaxは、>4時間である。決定的なことに、PNA5に対する4時間の時点と比較して24時間目の腎臓内のPNA6-LBAAcのより高い濃度は、LBAAcリガンドの腎臓標的化及び潜在性を裏付けた。

【0066】

論文Dhuri K, Bechtold C, Quijano E, Pham H, Gupta A, Vikram A, Bahal R. 「Antisense Oligonucleotides: An Emerging area in Drug Discovery and Development.」 Journal of Clinical Medicine, 2020は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0067】

以下の略語が本明細書で使用される。

【0068】

20

30

40

50

【表 1】

表1

略語	用語
FMOC	フルオレニルメチルオキシカルボニル
HBTU	ヘキサフルオロホスフェートベンゾトリアゾールテトラメチルウロニウム
DIEA	N, N-ジイソプロピルエチルアミン
tGalNAc	トリスN-アセチルガラクトサミン
LBA	ラクトビオン酸
PNA	ペプチド核酸
ALDOA	アルドラーゼA
BCKDK	分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼキナーゼ
GYS1	グリコーゲン[デンプン]シンターゼ
NDRG3	N-Myc下流調節遺伝子3タンパク質
CUX-1	ホメオドメインタンパク質についての遺伝子
トリオキソ-ミニPEGスパーサ	トリオキソ-ミニポリエチレングリコールスパーサ
GalNAc	N-アセチルガラクトサミン
ASGPR	アシアロ糖タンパク質受容体
DIPEA	N, N-ジイソプロピルエチルアミン
TFA	トリフルオロ酢酸
NMR分光法	核磁気共鳴分光法
miRNA	マイクロRNA
MBHA	4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂
BOC	tert-ブトキシカルボニル
TAMRA	5-カルボキシテトラメチルローダミン
HPLC	高速液体クロマトグラフィ
HATU	ヘキサフルオロホスフェートアザベンゾトリアゾールテトラメチルウロニウム
DMF	ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
NaOMe	ナトリウムメトキシド
MALDI	マトリックス支援レーザー脱離/イオン化
siRNA	短鎖干渉RNA又はサイレンシングRNA
SYBR Gold	核酸検出のための染料
DNA	デオキシリボ核酸
ADMET	吸収、分布、代謝、及び排泄-毒性
FACS	蛍光活性化細胞ソーティング
RBC溶解	赤血球(Red Blood Cell, RBC)溶解
IVIS	非侵襲的インビボイメージング
HNF4 α	肝細胞核因子4アルファ
ANOVA	分散分析
CBC	全血球計算
H&E染色	ヘマトキシリン及びエオシン染色
TNF α	腫瘍壊死因子
IL-12p70	インターロイキン-12p70
MCP-1	単球走化性タンパク質-1
IL-1 & IL-2, IL-4, IL-5, IL-10	インターロイキン
MIP-1 α MIP-1 β	マクロファージ炎症性タンパク質

10

20

30

40

【0069】

本出願における用語は、以下の定義を有する。

【0070】

本明細書で使用される場合、組成物、方法、及び物品は、代替的に、本明細書で開示される任意の適切な成分又は工程を含むか、それらからなるか、又は本質的にそれらからなり得る。組成物、方法、及び物品は、追加的又は代替的に、組成物、方法、及び物品の機能若しくは目的の達成に別段必要ではない任意の工程、成分、材料、配合成分、アジュバント、若しくは種を欠くか、又は実質的に含まないように製剤化することができる。単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈上別段の明確な指示がない限り、複数の指

50

示対象を含む。「又は」は、文脈によって別段明確に示されない限り、「及び／又は」を意味する。「任意選択の」又は「任意選択で」は、その後に記載される事象又は状況が起こり得るか、又は起こり得ないこと、並びにこの記載が、この事象が起こる場合及び起こらない場合を含むことを意味する。

【0071】

別段定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者が一般的に理解しているような意味と同じ意味を有する。

【0072】

本明細書で使用される場合、「ヒドロカルビル」及び「炭化水素」という用語は、炭素及び水素を含む置換基を指し、任意選択で、1～3個のヘテロ原子、例えば、酸素、窒素、ハロゲン、ケイ素、硫黄、又はそれらの組み合わせを有する。「アルキル」は、直鎖又は分岐鎖の飽和一価炭化水素基を指す。「アルキレン」は、直鎖又は分岐鎖の飽和二価炭化水素基を指す。「アルキリデン」は、直鎖又は分岐鎖の飽和二価炭化水素基を指し、単一の共通炭素原子上に両方の原子価を有する。「アルケニル」は、炭素-炭素二重結合によって接合された少なくとも2個の炭素を有する直鎖又は分岐鎖の一価炭化水素基を指す。「シクロアルキル」は、少なくとも3個の炭素原子を有する非芳香族一価単環式又は多環式炭化水素基を指し、「シクロアルケニル」は、少なくとも3個の炭素原子を有する非芳香族環式二価炭化水素基を指し、少なくとも1つの不飽和度を有する。「アリール」は、芳香族環中に炭素のみを含有する芳香族一価基を指す。「アリーレン」は、芳香族環中に炭素のみを含有する芳香族二価基を指す。「アルキルアリール」は、上で定義されたアルキル基で置換されているアリール基を指し、4-メチルフェニルが例示的なアルキルアリール基である。「アリールアルキル」は、上で定義されたアリール基で置換されているアルキル基を意味し、ベンジルが例示的なアリールアルキル基である。「アシル」は、カルボニル炭素橋($-C(=O)-$)を通して付着した、示された数の炭素原子を有する、上で定義されたアルキル基を指す。「アルコキシ」は、酸素橋($-O-$)を通して付着した、示された数の炭素原子を有する、上で定義されたアルキル基を指す。「アリールオキシ」は、酸素橋($-O-$)を通して付着した示された数の炭素原子を有する、上で定義されたアリール基を指す。

【0073】

別段示されない限り、前述の基の各々は、この置換が化合物の合成、安定性、又は使用に著しく悪影響を及ぼさないという条件で、置換されていないか、又は置換され得る。本明細書で使用される場合、「置換された」という用語は、指定された原子の通常の原子価を超えないという条件で、指定された原子又は基上の少なくとも1個の水素が別の基で置き換えられていることを意味する。置換基がオキソ(すなわち、 $=O$)である場合、原子上の2個の水素が置き換えられる。置換基又は変数の組み合わせは、置換が化合物の合成又は使用に著しく悪影響を及ぼさないという条件で許容される。「置換された」位置に存在し得る例示的な基としては、シアノ、ヒドロキシル、ニトロ、アジド、アルカノイル(アシルなどの $C_2\sim 6$ アルカノイル基などの)、カルボキサミド、 $C_1\sim 6$ 又は $C_1\sim 3$ アルキル、シクロアルキル、アルケニル、及びアルキニル(少なくとも1つの不飽和連結及び2～8個又は2～6個の炭素原子を有する基を含む)、 $C_1\sim 6$ 又は $C_1\sim 3$ アルコキシ、フェノキシなどの $C_6\sim 10$ アリールオキシ、 $C_1\sim 6$ アルキルチオ、 $C_1\sim 6$ 又は $C_1\sim 3$ アルキルスルフィニル、 $C_1\sim 6$ 又は $C_1\sim 3$ アルキルスルホニル、アミノジ($C_1\sim 6$ 又は $C_1\sim 3$)アルキル、少なくとも1つの芳香族環を有する $C_6\sim 12$ アリール(例えば、フェニル、ビフェニル、ナフチルなど、各環が置換又は非置換の芳香族のいずれかである)、1～3個の分離環又は縮合環及び6～18個の環炭素原子を有する $C_7\sim 19$ アリールアルキル、又は1～3個の分離環又は縮合環、及び6～18個の環炭素原子を有するアリールアルコキシ(ベンジルオキシが例示的なアリールアルコキシである)が挙げられるが、これらに限定されない。基の炭素原子の示された数は、いずれの置換基も含まない。

【0074】

本明細書で使用される場合、ペプチド核酸（PNA）は、ペプチド結合によって連結された反復N-（2-アミノエチル）-グリシン単位を含む骨格を有する人工的に合成されたポリマーである。図1に示されるように、様々なプリン塩基及びピリミジン塩基は、骨格上の窒素に対するメチレン橋（-CH₂-）及びカルボニル基（-（C=O）-）によって骨格に連結される。慣例により、PNAは、ペプチドと同様に、N末端が上方（又は左側）に、C末端が下方（又は右側）になるように表される。PNAは、正式には、ペプチド又は核酸ではなく、むしろそれら2つのハイブリッドである。

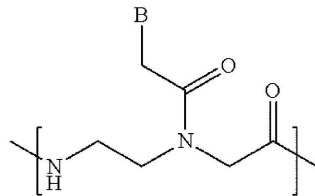
【0075】

いくつかの態様では、PNAオリゴマーを形成するPNAモノマーは、以下に例解されるように、ポリアミド骨格（ γ PNA）中のガンマ位で修飾されている（式中、「B」が、核酸塩基であり、「R」が、ガンマ位での置換である）。

10

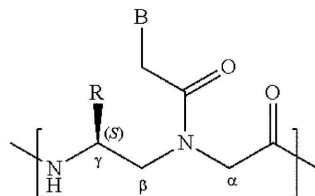
【0076】

【化8】



PNA

20



キラル γ PNA

【0077】

ガンマ位での置換は、キラリティを作り出し、PNAオリゴマーにらせん事前組織化を提供し、標的化RNAに対する実質的に増加した結合親和性をもたらす。他の有利な特性は、ガンマ位（上記のキラル γ PNA中の「R」基）における特定の置換の化学的性質に依存して与えられ得る。 γ PNAの合成は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第10,221,216号に、 γ PNA及び γ PNAの合成方法の開示について記載されている。

30

【0078】

他の側鎖による γ 置換の例としては、アラニン、セリン、スレオニン、システイン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、及びそれらの誘導体の γ 置換が挙げられる。本明細書中の「その誘導体」は、これらのアミノ酸側鎖に、例えば、セリン、システイン、スレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、リジン、及びアルギニンのアミノ酸側鎖に共有結合的に付着しているこれらの化学部分として定義される。

40

【0079】

一態様では、PNA/RNA/PNA三本鎖を形成するPNAオリゴマーは、テールクランプを有する γ PNA、又は γ tcPNAである。

【0080】

基本的なPNA構造の化学修飾が知られており、使用することができる。例えば、フッ素修飾、シクロペンチル修飾、ミニ-pep修飾、グアニジニウム修飾、ピロリジニル修飾、及び2-アミノピリジエン修飾PNAは、当技術分野で知られており、細胞透過性を

50

改善するか、又はRNA結合親和性を増加させるためのPNAオリゴマーの調製のために選定することができる。ミニPEG含有γ-PNA及びそれらの合成方法は、米国特許第10,793,605号に記載されている。

【0081】

PNAオリゴマーはまた、細胞透過性を増加させるためのPNAの溶解度を増加させるため、かつ／又は標的RNAに対するPNAの親和性を増加させるために、他の正に帯電した部分を含み得る。一般的に使用される正に帯電した部分としては、アミノ酸リジン及びアルギニンが挙げられるが、他の正に帯電した部分もまた有用であり得る。リジン及びアルギニン残基は、tcPNAリンカーに付加され得るか、又はPNAオリゴマー鎖のカルボキシ若しくはN末端に付加され得る。

10

【0082】

PNAに対する例示的な修飾としては、オリゴマーの末端又は内部部分におけるリジンなどの帯電したアミノ酸残基の組み込み、骨格、カルボキシメチレン橋、及び核酸塩基における極性基の包含、元のN-(2-アミノエチル)グリシン骨格上に置換基を持つキラルPNA、負に帯電した足場による元のアミノエチルグリシル骨格の置き換え、末端のうちの1つへの高分子量ポリエチレングリコール(PEG)のコンジュゲート化、キメラオリゴマーを生み出すための、PNAのRNAへの融合、骨格構造の再設計、DNA又はRNAへのPNAのコンジュゲート化が挙げられるが、これらに限定されない。これらの修飾は溶解度を改善するが、多くの場合、結合親和性及び／又は配列特異性の低減をもたらす。

20

【0083】

ガンマーPNA修飾としては、セリン修飾、リジン修飾、グルタミン酸修飾、又はアラニン修飾が挙げられる。特に、PNAがセリンガンマ修飾されている場合、γPNAは、それらの結合親和性に基づいて、従来の全長PNAと比較してより効率的にRNAを標的化する。

【0084】

DNA、RNA、及びOMe-RNAのホスホロチオエート類似体は、リンに結合した非架橋リガンドのうちの1つとして、酸素の代わりに硫黄を有する。

【0085】

モルホリノオリゴマー及びホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO)としても知られているモルホリノは、遺伝子発現を修飾するために分子生物学において使用されるオリゴマーの一種である。その分子構造は、ホスホロジアミデート基を通して連結されたメチレンモルホリン環の骨格に付着したDNA塩基を含有している。モルホリノは、リボ核酸(ribonucleic acid、RNA)の塩基対合表面の小さい(約25塩基)特異的配列への他の分子のアクセスを遮断する。モルホリノは、遺伝子機能をロックダウンすることによる逆遺伝学のための研究ツールとして使用される。

30

【0086】

ロックド核酸は、リボース環が2'-酸素と4'-炭素との間のメチレン連結によって拘束されているRNA誘導体である。この配座制限は、相補性配列に対する結合親和性を増加させ、遺伝子発現の制御及びマイクロアレイの最適化のための化学的手法を提供する。

40

【0087】

2'-O-メチル化は、RNAのヌクレオシド修飾であり、メチル基が、ヌクレオシドのリボース部分の2'-ヒドロキシルに付加されて、メトキシ基を生成する。2'-O-メチル化ヌクレオシドは、リボソームRNA及び核内低分子RNA中でほぼ見出され、リボソーム及びスプライセオソームの機能的に必須の領域中に生じる。

【0088】

RNAの2'-OMeヌクレオシド修飾と同じく、2'-O-メトキシエチル-RNA(2'-MOE)骨格は、強化された二本鎖安定性、著しいヌクレアーゼ耐性を提供する。

【0089】

2'-フルオロ(2'-F)は、高いRNA結合親和性及びヌクレアーゼ分解に対する耐

50

性を保有する強力なRNA類似体である。

【0090】

5'-メチルシトシンは、遺伝子転写を調節し、いくつかの他の生物学的役割を果たすDNA塩基シトシン(C)のメチル化形態である。[1]シトシンがメチル化されると、DNAは同じ配列を維持するが、メチル化された遺伝子の発現が変化し得る。

【0091】

追加の水素結合を形成することによってグアニン上にクランプされるシトシン類似体であるG-クランプ複素環修飾は、オリゴヌクレオチド/RNAハイブリッド親和性を強化するように合理的に設計された。内部連結グアニジニウム部分を含むPNA(PNA containing internally-linked guanidinium moieties、GPNA)は、哺乳動物細胞によって容易に取り込まれ、高い親和性及び配列特異性によりDNA及びRNAに結合する。

10

【0092】

保護基は、構造中の別の官能基のための反応を受けないように、有機分子中の反応性官能基を変換する官能基である。保護基は、有機合成において様々な形態で広く使用されている。保護及び脱保護に対する必要性、並びに適切な保護基の選択は、当業者であれば容易に決定することができる。保護基の化学的性質は、例えば、Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 4d. Ed., Wiley & Sons, 2007に見出すことができる。本明細書に記載される保護基、並びに形成方法及び開裂方法に対する調整は、様々な置換基を考慮して必要に応じて調整され得る。

20

【0093】

残基は、コンジュゲートなどのより大きい分子を作り上げるために統合される部分のうちのいずれかを表すために使用される。例えば、リジン残基は、本明細書の図面に示されるように、リジンカルボキシル基を介して(アミド官能基によって)アルキルジアミンに共有結合し、かつそのアルファアミノ基及びイプシロンアミノ基によってラクトビオン酸分子に(アミド結合によって)共有結合したコンジュゲートに不可欠なリジンアミノ酸構造を指す。残基は、部分とも称され得る。

【0094】

本明細書で使用されるRNAは、メッセンジャRNA、トランスファーRNA、リボソームRNA、及びマイクロRNAを含む、異なる機能を果たす異なるタイプのRNAを含む。マイクロRNA(miRNA)は、遺伝子発現に関与する。miRNAは、遺伝子発現の促進又は阻害のいずれかにおいて重要であると考えられているmRNAのノンコーディング領域である。これらは、約25個のヌクレオチドの小さい配列を伴い得る。

30

【0095】

塩基の配列は、DNA(GACTを使用する)又はRNA(GACU)分子内で対立遺伝子を形成するヌクレオチドの順序を表す一連の5つの異なる文字の組によって示される塩基の連続である。慣例により、配列は、通常、5'末端から3'末端に提示される。DNAについては、センス鎖が使用される。核酸は、通常では、線状(非分岐)ポリマーであるため、配列を特定することは、分子全体の共有結合構造を定義することに等しい。

40

【0096】

遺伝子発現は、情報をコードする遺伝子が、細胞内に存在して作動する構造に変換されるプロセスである。発現された遺伝子としては、mRNAに転写され、次いで、タンパク質に翻訳されるもの、及びRNAに転写されるが、タンパク質に翻訳されないもの(例えば、トランスファーRNA及びリボソームRNA)が挙げられる。miRNAは、遺伝子発現の促進又は阻害のいずれかにおいて重要であると考えられているmRNAのノンコーディング領域である。

【0097】

以下は、当技術分野で知られているいくつかの遺伝子名及びマイクロRNAについての簡単な記載である。他の情報は、参照により本明細書に組み込まれるウェブサイトhttp

50

ps: //www.genecards.org/に見出すことができる。

【0098】

PKD1遺伝子はポリシスチン1（相互作用する一過性受容体電位チャネル又は多発性嚢胞腎疾患1）である。PKD2遺伝子はポリシスチン2（一過性受容体電位カチオンチャネル又は多発性嚢胞腎疾患2）であり、 β -カテニンはカテニン β 1及びジャンクションプラコグロビンを意味し、グルタミンシンテターゼはレングシン（グルタミンシンテターゼドメインを有する水晶体タンパク質）を意味し、

MYC結合タンパク質を意味するc-Myc、プレアルブミンとも呼ばれるトランスサイレチンを意味するTTR（アミロイドーシスI型、手根管症候群1型、第VII因子血液凝固第VII因子、又は血液凝固第VII因子（血清プロトロンビン転化促進因子））、Eg5はニューロナチンを意味し、プロタンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9型を意味するPCSK9、AATはアポトーシス拮抗転写因子を意味し、TPX2はTPX2を意味し、アポリポタンパク質Bを意味するapoB、SAAは血清アミロイドA1クラスター（RSV）を意味し、PDGFは血小板由来増殖因子サブユニットAを意味し、miR-122はマイクロRNA122を意味し、miR-223はマイクロRNA223を意味し、miR-21は最初に同定されたマイクロRNAの一つであり、染色体17上の液胞膜タンパク質1（Vacuole Membrane Protein 1、VMP1）遺伝子座に位置している。それは、その遺伝子標的の多くを通して、腫瘍性病変及び非腫瘍性病変の両方に関係している。miR-21の主な標的のうちの3つは、ホスファターゼ及びテンシンホモログ（phosphatase and tensin homolog、PTEN）、トロポミオシン1（Tropomyosin 1、TPM1）、及びプログラム細胞死4（Programmed Cell Death 4、PDCD4）であり、miR-155は、ヒトにおけるマイクロRNAである。miR-155は、悪性腫瘍、ウイルス感染症、及び心血管疾患の進行を伴う様々な生理学的及び病理学的プロセスにおいて役割を果たす。

【0099】

miR-132は、神経発達、シナプス伝達、炎症、及び血管新生のメディエータを含む、記載されている標的を有するマイクロRNAである。

【0100】

miR-125bは、NF- κ B、p53、PI3K/Akt/mTOR、Erbb2、Wnt、及び別のシグナル伝達経路の調節に関与し、それによって、細胞増殖、分化、代謝、アポトーシス、薬物耐性、及び腫瘍免疫を制御するマイクロRNAである。

【0101】

miR-146aは、神経疾患、特に、神経炎症応答における病態生理学的プロセスの調節に関与すると考えられている標的遺伝子を有するマイクロRNAである。それは、神経疾患の進行中の神経炎症において重大な役割を果たすと考えられている。

【0102】

マイクロRNA前駆体であるmiR-181は、約70個のヌクレオチド前駆体として転写され、その後、RNase-III型酵素Dicerによってプロセシングされて、約22個のヌクレオチド成熟生成物を与える、小さいノンコーディングRNA分子である。それらは、翻訳を阻害すること及び／又は標的メッセンジャRNAの分解を誘導することによって、タンパク質発現を標的化し、それを調節する。この新しいクラスの遺伝子は、最近、悪性形質転換において中心的な役割を果たすことが示されている。miRNAは、多くの腫瘍において下方制御され、したがって、腫瘍抑制遺伝子として機能するようである。成熟生成物miR-181a、miR-181b、miR-181c、又はmiR-181dは、標的mRNAに対する相補性を通して、転写後レベルで調節的な役割を果たすと考えられている。

【0103】

let-7致死-7（let-7）遺伝子は、重要な発生制御因子として線虫において最初に発見され、知られている最初の2つのマイクロRNAのうちの一方になった（もう一方は、lin-4である）。let-7メンバーの発現は、それらのプロモータへのM

Y C 結合によって制御される。l e t - 7 は、ヒト細胞における R A S 発現の直接的な調節因子であることが実証されている。多くの報告は、l e t - 7 の発現レベルが高い頻度で低く、多くのがんにおいて l e t - 7 の染色体クラスターが欠失していることが多いことを示している。l e t - 7 は、より分化した腫瘍においてより高いレベルで発現され、これはまた、R A S 及び H M G A 2 などの活性化されたがん遺伝子のより低いレベルを有する。したがって、l e t - 7 の発現レベルは、分化段階に関連するいくつかのがんにおける予後マーカーであり得る。

【0104】

m i R - 3 4 a は、様々ながんにおいて調節不全であることが検出されているマイクロRNAであり、腫瘍抑制因子 p 5 3 によって直接的に調節されることが実証された最初の m i R N A でもある。m i R - 3 4 ファミリーは、腫瘍形成を阻害することが知られている。m i R - 3 4 ファミリーの発現は、内因性発現に依拠するか、又はトランスフェクションを模倣する。

【0105】

m i R - 8 0 5 は、L P S 処理されたマクロファージにおいて下方制御されることが報告されているマイクロRNAである。マイクロRNAである m i R - 6 9 0 は、M 2 極性化骨髄由来マクロファージエクソソームにおいて高度に発現され、インビボ及びインビトロの両方でインスリン抵抗性改善薬として機能することが報告されている。

【0106】

m i R - 1 3 4 は、脳特異的マイクロRNAであり、それは、海馬ニューロンに特異的に局在化することが報告されており、L I M K 1 m R N A とのアンチセンス対合を通してシナプス発生を間接的に調節し得る。ヒトの脳において、S I R T 1 は、m i R - 1 3 4 を通して C R E B タンパク質を媒介し、マイクロRNAに記憶形成などの高次脳機能における役割を与えられている。

【0107】

多発性嚢胞腎疾患 (Polycystic kidney disease、P K D) は、嚢胞のクラスターが主に腎臓内で発達し、腎臓を拡大させ、経時的に機能を失わせる遺伝性障害である。嚢胞は、流体を含有する非がん性の円形嚢である。嚢胞の大きさは変動し、非常に大きく成長し得る。多くの嚢胞又は大きな嚢胞を有すると、腎臓が損傷する場合がある。

【0108】

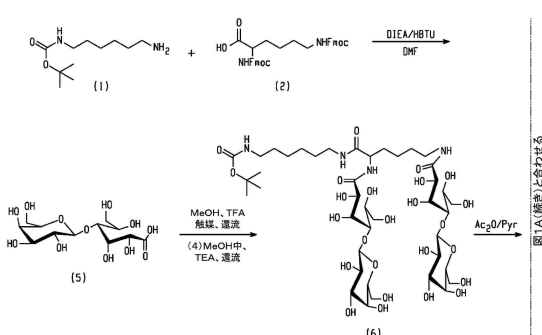
全ての引用された特許、特許出願、及び他の参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。しかしながら、本出願における用語が、組み込まれた参考文献における用語と矛盾又は相反する場合、本出願からの用語は、組み込まれた参考文献からの相反する用語よりも優先される。

【0109】

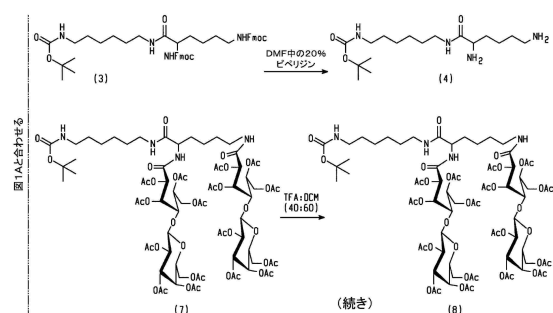
典型的な態様が例解目的で記述されてきたが、前述の記載は、本明細書の範囲に対する限定であるとみなされるべきではない。したがって、当業者であれば、本明細書の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な修正形態、適合形態、及び代替形態を想起することができる。

【図面】

【図 1 A - 1】



【図 1 A - 2】



(続き)

10

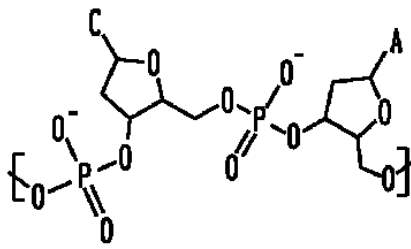
20

30

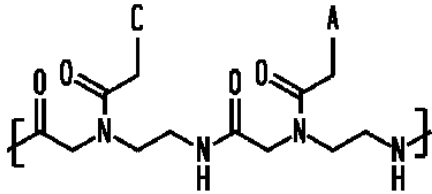
40

50

【図 1 B】



DNA



PNA

Fig. 1B

【図 1 C】

miR-122-5p: 5'-UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3'
シード領域

PNA 1 : 5'-----ACACTCCA-K-000-TAM-3'

PNA 2 : 5'-SA-000-----ACACTCCA-K-000-TAM-3'

PNA 3 : 5'-----CAAACACCATTGTCACACTCCA-K-000-TAM-3'

PNA 4 : 5'-SA-000-CAAACACCATTGTCACACTCCA-K-000-TAM-3'

10

20

【図 2 A - 1】

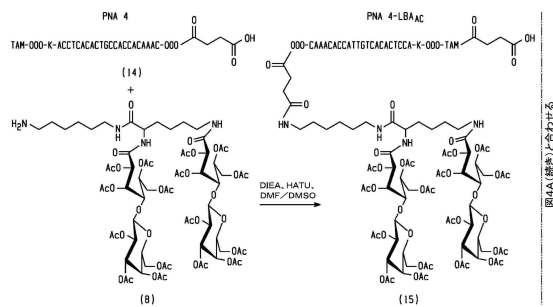
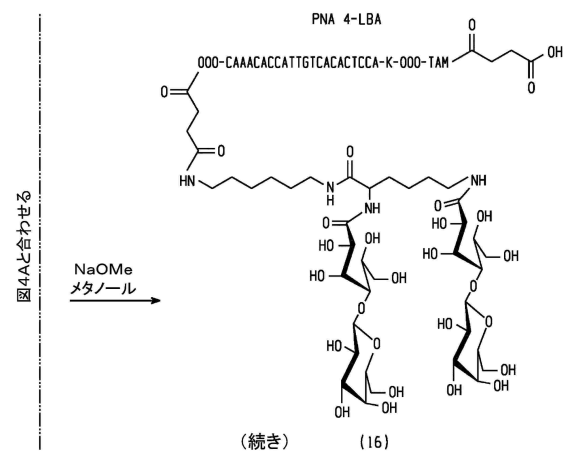


図4A(継続)と合わせる

【図 2 A - 2】



(続き)

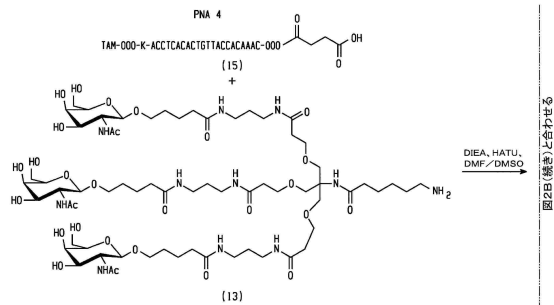
(16)

30

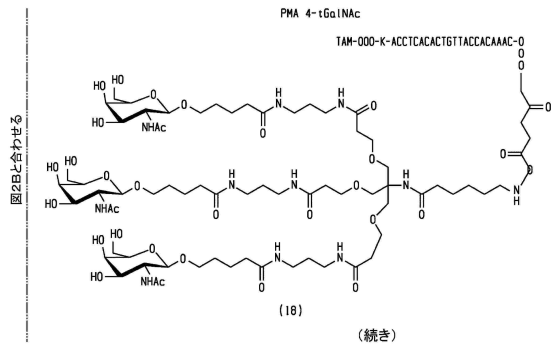
40

50

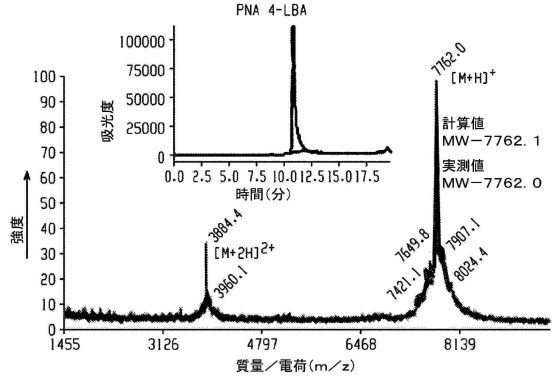
【図 2 B - 1】



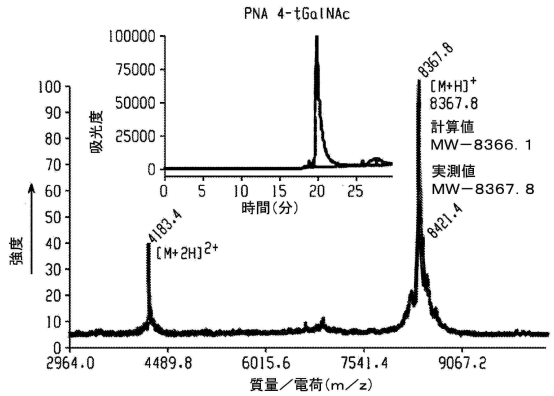
【図 2 B - 2】



【図 2 C 1】



【図 2 C 2】



10

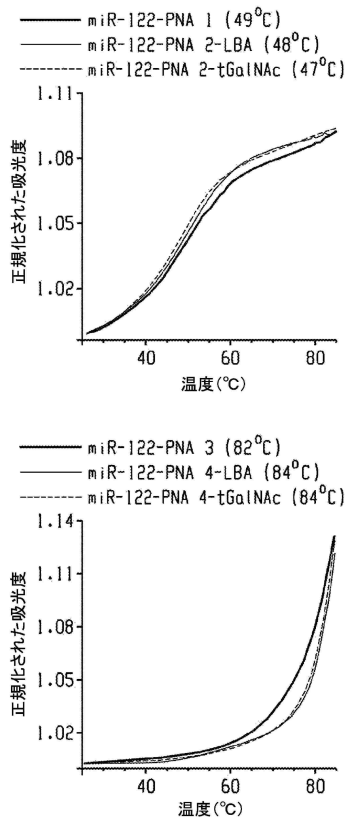
20

30

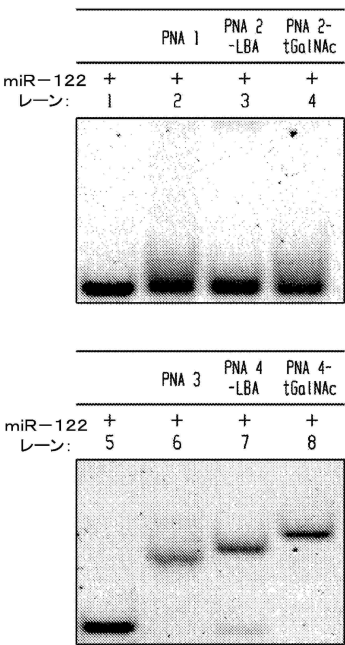
40

50

【図 3 A】



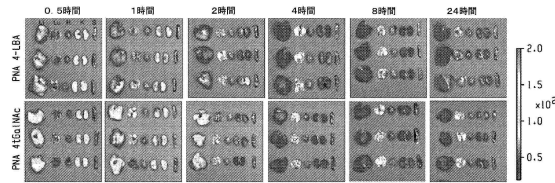
【図 3 B】



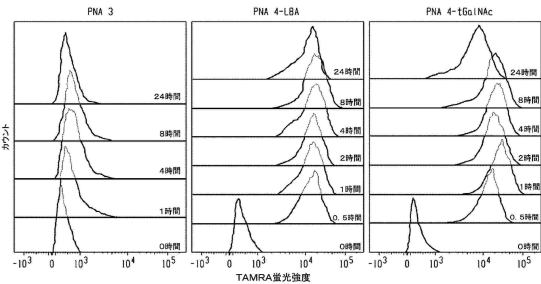
10

20

【図 4 A】



【図 4 B】

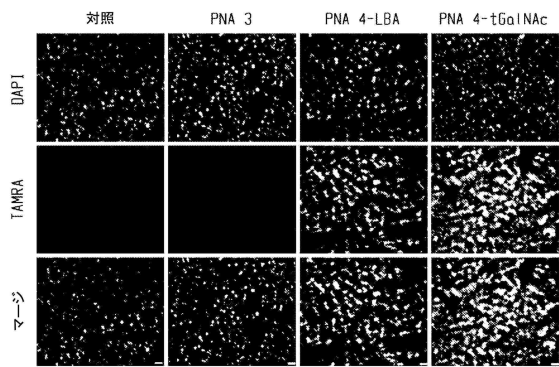


30

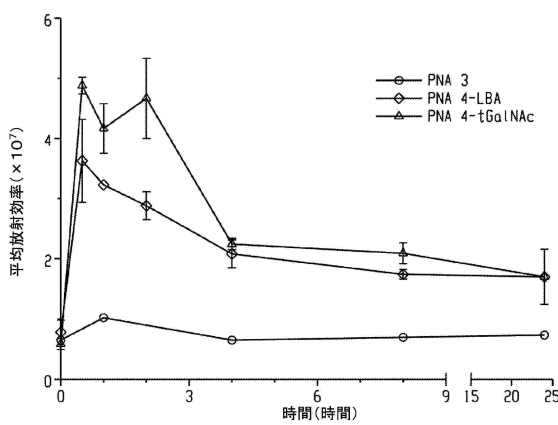
40

50

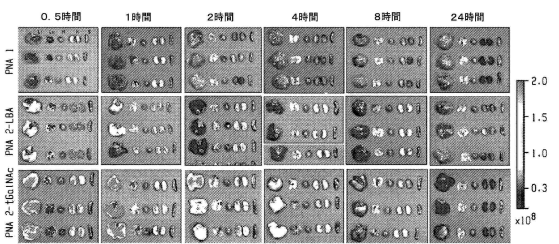
【図 4 C】



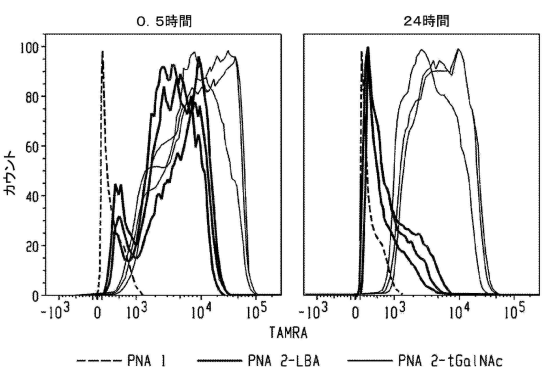
【図 4 D】



【図 5 A】



【図 5 B】



10

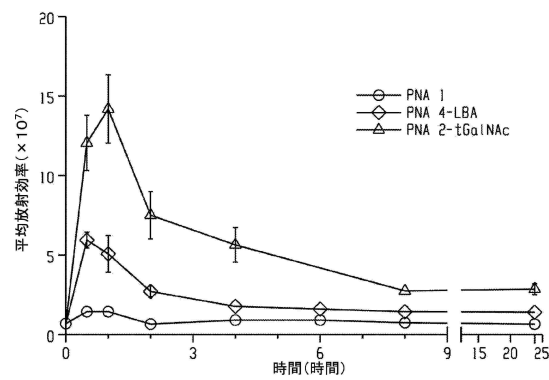
20

30

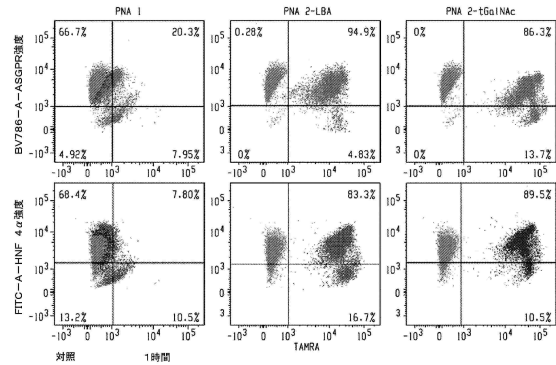
40

50

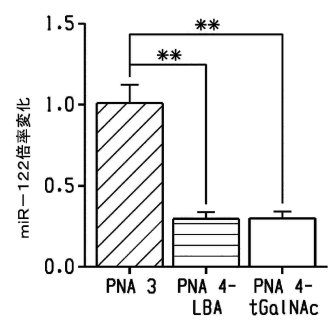
【図 5 C】



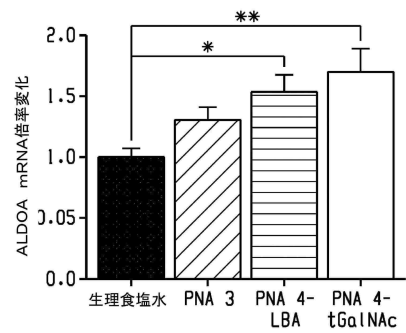
【図 5 D】



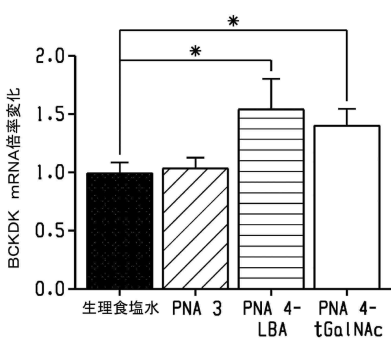
【図 6 A 1】



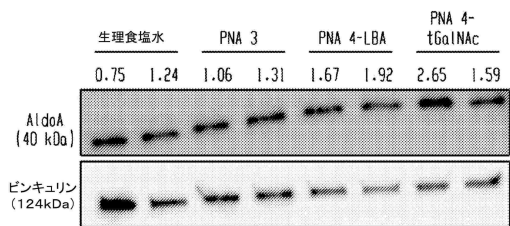
【図 6 A 2】



【図 6 A 3】



【図 6 B 1】



10

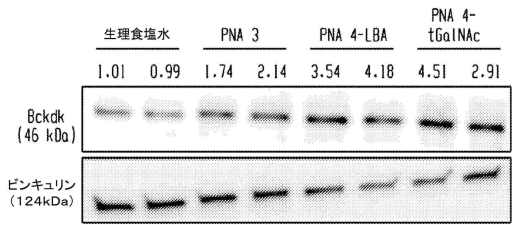
20

30

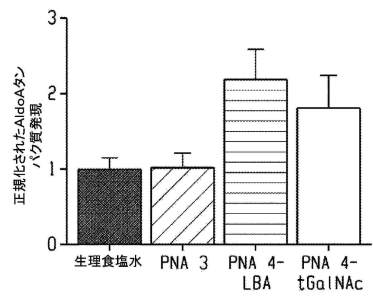
40

50

【図 6 B 2】

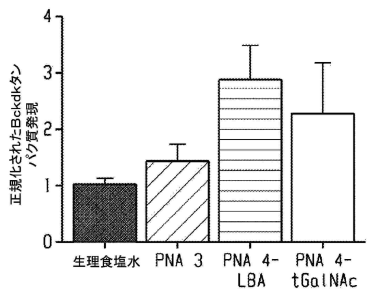


【図 6 C 1】

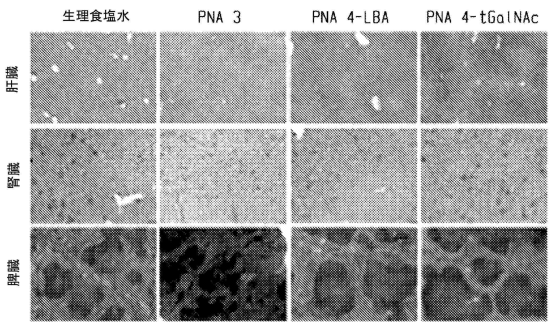


10

【図 6 C 2】

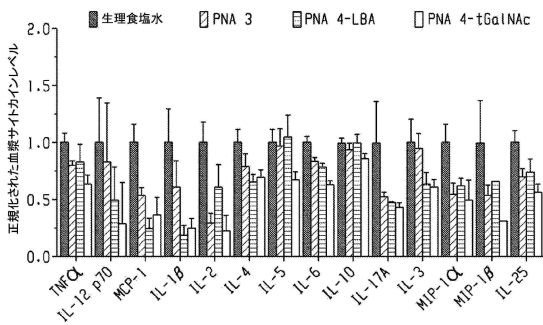


【図 7 A】

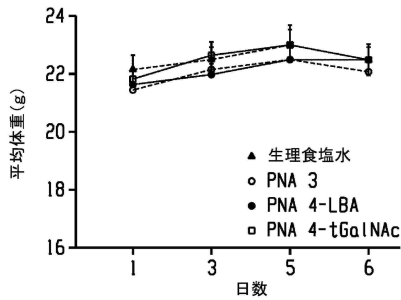


20

【図 7 B】



【図 7 C】

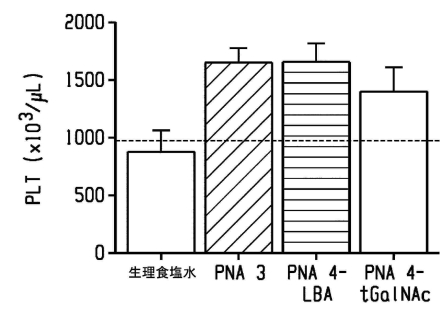


30

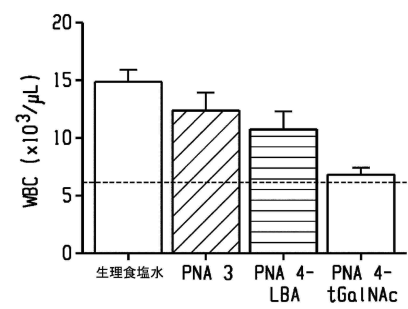
40

50

【図 7 D 1】

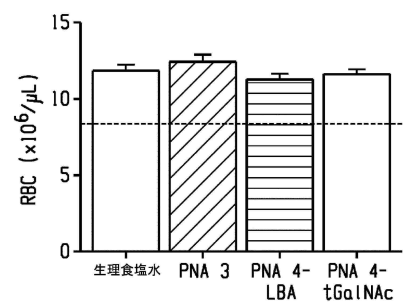


【図 7 D 2】

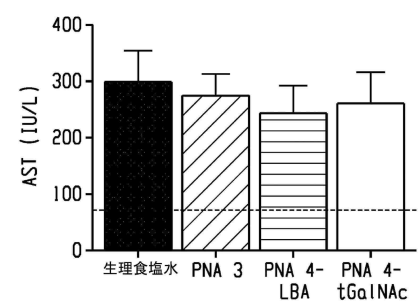


10

【図 7 D 3】

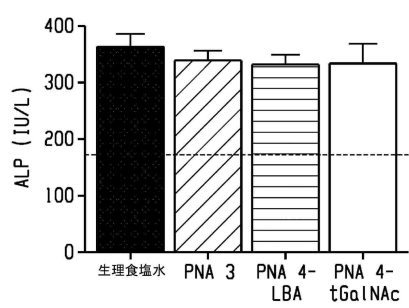


【図 7 E 1】

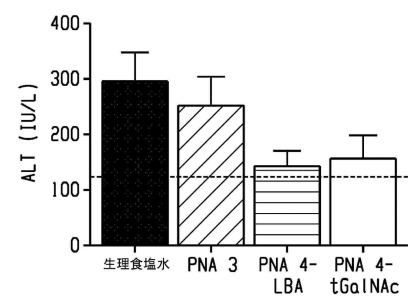


20

【図 7 E 2】



【図 7 E 3】

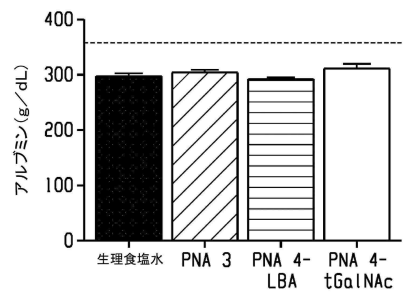


30

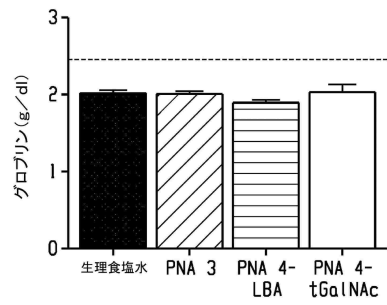
40

50

【図 7 E 4】

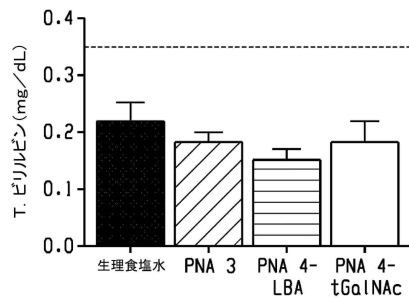


【図 7 E 5】

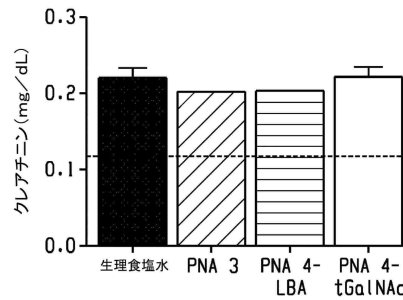


10

【図 7 E 6】

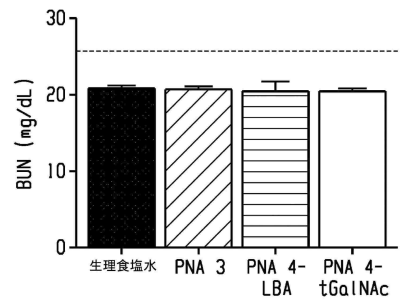


【図 7 E 7】

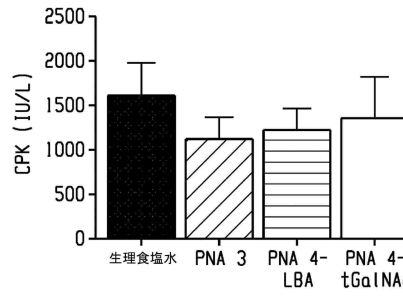


20

【図 7 E 8】



【図 7 E 9】

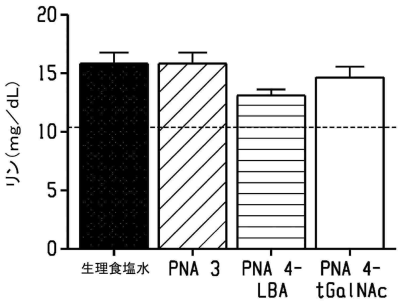


30

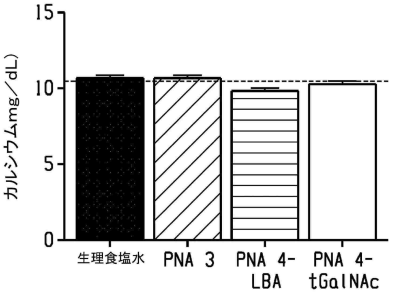
40

50

【図 7 E 1 0】

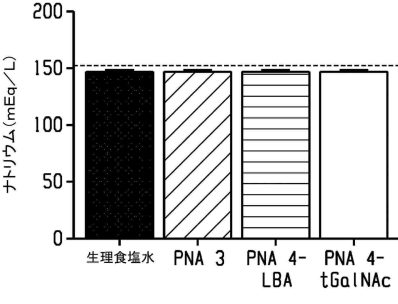


【図 7 E 1 1】

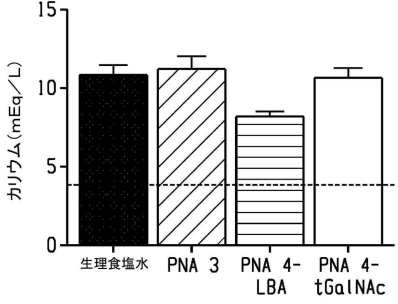


10

【図 7 E 1 2】

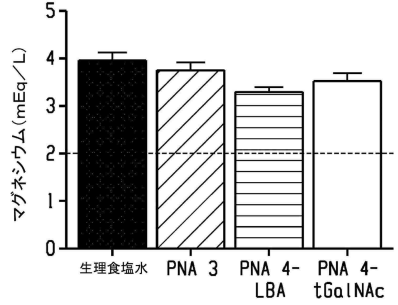


【図 7 E 1 3】

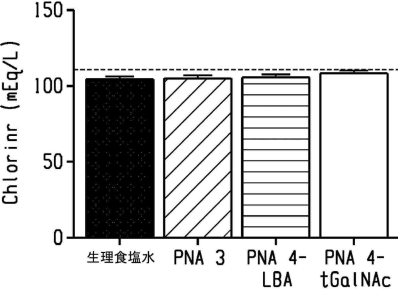


20

【図 7 E 1 4】



【図 7 E 1 5】

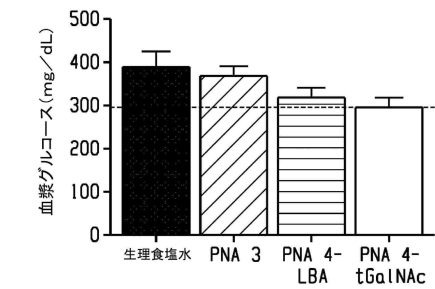


30

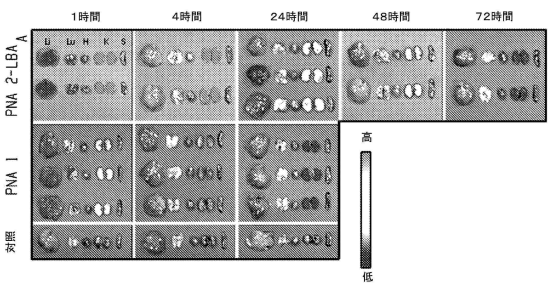
40

50

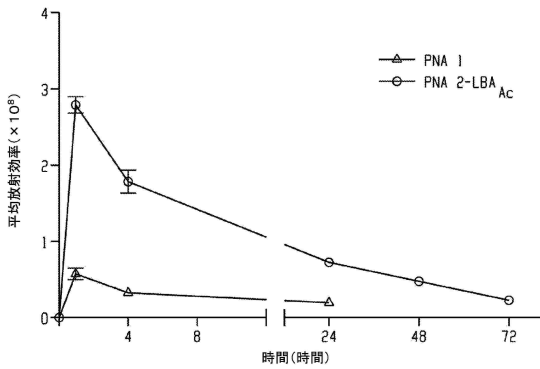
【図 7 E 1 6】



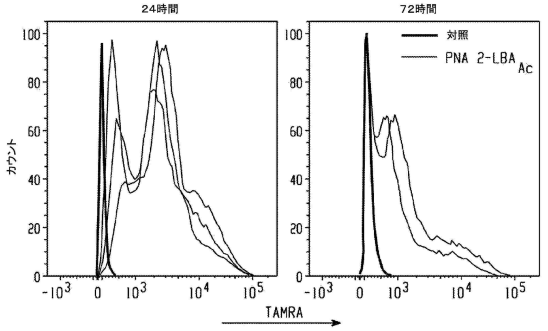
【図 8 A】



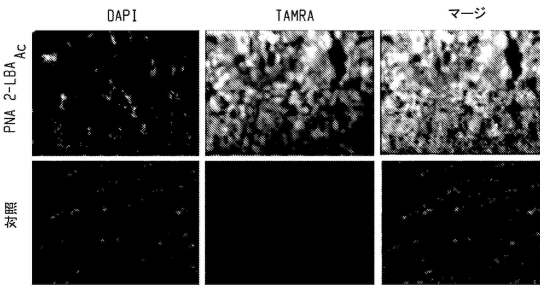
【図 8 B】



【図 8 C】



【図 8 D】



【図 9 A】

miR-21-5P : 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA- 3'
PNA 5 : 5'-----TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-K-000-Tam- 3'
PNA 6 : 5'-SA-000-TCAACACTCAGTCTGATAAGCTA-K-000-Tam- 3'

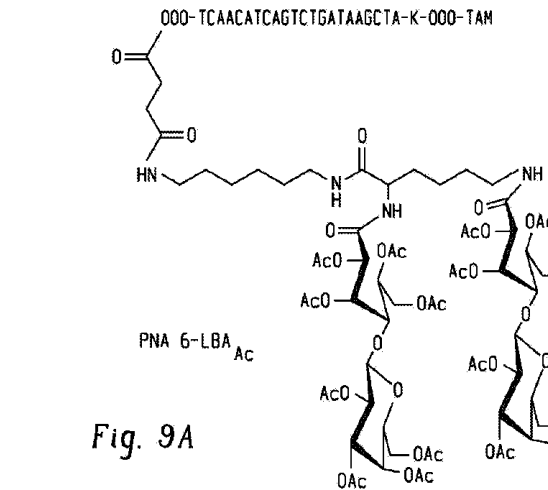
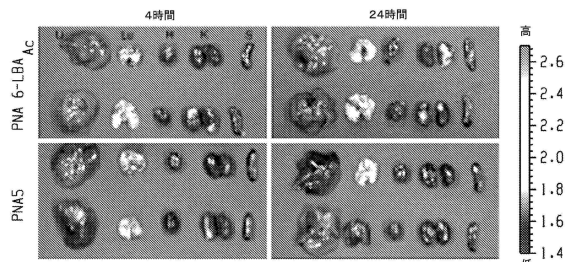
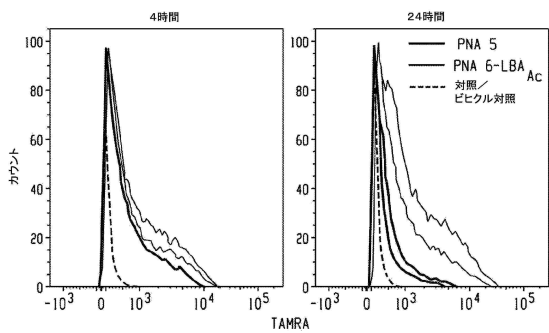


Fig. 9A

【図 9 B】

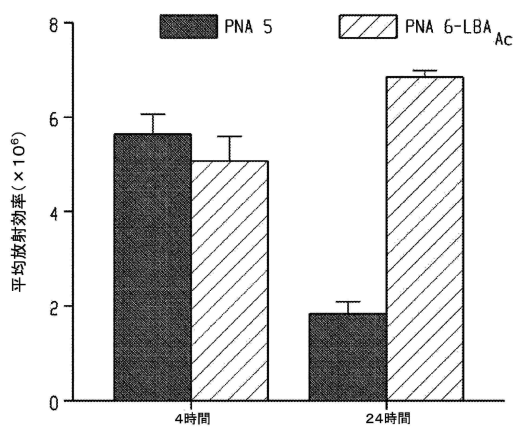


【図 9 C】



10

【図 9 D】



20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/019940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - INV. - C12N 15/113; A61P 13/12; A61K 47/56 (2023.01) ADD. CPC - INV. - C12N 15/113; A61P 13/12; A61K 47/56 (2023.08) ADD. - C12N 2310/3181; C12N 2310/351; C12N 2320/32 (2023.08) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0136042 A1 (MANOHARAN et al.) 31 May 2012 (31.05.2012) entire document	1-5
A	US 2008/0108545 A1 (ECCLES et al.) 08 May 2008 (08.05.2008) entire document	1-5
A	US 2021/0369632 A1 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 02 December 2021 (02.12.2021) entire document	1-5
A	US 6,746,868 B1 (FELGNER et al.) 08 June 2004 (08.06.2004) entire document	1-5
E, A	KUMAR et al., Multivalent Lactobionic Acid and N-Acetylgalactosamine-Conjugated Peptide Nucleic Acids for Efficient In Vivo Targeting of Hepatocytes, Advanced Healthcare Materials, Vol. 12, 20 January 2023, Pgs. 1-14	1-5
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2023		Date of mailing of the international search report SEP 28 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/019940

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.: 6-35
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 extra sheet(s).

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/019940

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

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

Group I+: claims 1-5 are drawn to genetic sequence-carbohydrate conjugates.

The first invention of Group I+ is restricted to a genetic sequence-carbohydrate conjugate of the shown formula: wherein the formula is represented by the structure of compound 16 as shown in Fig. 4a of the instant application PCT/US2023/19940, Sheet 5/27. It is believed that claims 1-5 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above embodiment.

Applicant is invited to elect additional formula(e) for each additional compound to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. Each additional elected formula(e) requires the selection of a single definition for each compound variable. An exemplary election would be a genetic sequence-carbohydrate conjugate of the shown formula: wherein the formula is represented by the structure of compound 18 as shown in Fig. 2b of the instant application PCT/US2023/19940. Additional formula(e) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulae do not share a significant structural element requiring the selection of alternatives for the compound variables GS, R1, R2, X1, X2, G1, G2, CL, n1 and n2 and accordingly these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a genetic sequence-carbohydrate conjugate having a core structure, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art as disclosed by US 2012/0136042 A1 to Manoharan et al.

US 2012/0136042 A1 to Manoharan et al. teaches a genetic sequence-carbohydrate conjugate having a core structure (Fig. 20, Glycolipid-siRNA conjugate, see shown structure).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 31/7125(2006.01)	A 6 1 K 31/7125	

,MC,ME,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,MG,MK,MN,MU,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

ンティック フォスター ドライブ 6 8

F ターム (参考)	4C076	AA95 CC16 CC17 CC27 CC41 EE59 FF70
	4C084	AA13 NA13 NA14 ZA75 ZA81 ZB26 ZC41
	4C086	AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZA75 ZA81 ZB26 ZC41