(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-525646
(P2024-525646A)
(43)公表日　令和6年7月12日(2024.7.12)

(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	*31/713(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/713		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/7105(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7105		
Ａ６１Ｋ	*47/69 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/69		
Ａ６１Ｋ	*9/127(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/127		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全63頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-500649(P2024-500649)
(86)(22)出願日　令和4年7月5日(2022.7.5)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月4日(2024.3.4)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/073426
(87)国際公開番号　WO2023/283546
(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　63/218,833
(32)優先日　令和3年7月6日(2021.7.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　524008890
スウィッチ・セラピューティクス・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９４０８０、サウス・サン・フランシスコ、イースト・ハリス・アベニュー　２４１
(74)代理人　110003708
弁理士法人鈴榮特許綜合事務所
(72)発明者　ハン、スー－ピン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９４１０９、サン・フランシスコ、パシフィック・アベニュー　１９４５、ナンバー３シー
(72)発明者　ダフ、ロバート
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　条件付きで活性化可能な核酸複合体

(57)【要約】
この明細書は、条件付きで活性化可能な低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）複合体、成分、組成物、並びに関連する方法及びシステムを提供する。ｓｉＲＮＡ複合体は、核酸複合体のセンサー核酸鎖の配列によるインプット核酸鎖（例．標的細胞に特異的なバイオマーカー遺伝子のｍＲＮＡ）への相補的結合時に活性化できる。活性化された核酸複合体は、コア核酸鎖及びパッセンジャー核酸鎖により形成される多くのＲＮＡｉ二重鎖を放出でき、それにより標的ＲＮＡを特異的に阻害できる。

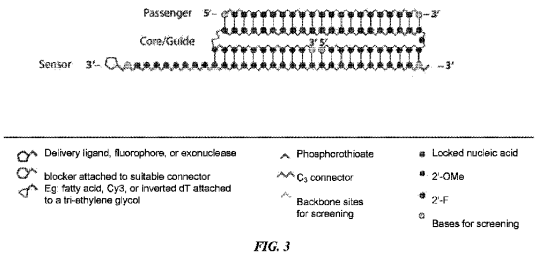


FIG. 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
連結した２０～７０のヌクレオシドを含む第１の核酸鎖；
前記第１の核酸鎖の中央領域に結合して第１の核酸二重鎖を形成する第２の核酸鎖；及び
前記第１の核酸鎖の５’領域及び３’領域に結合して第２の核酸二重鎖を形成する第３の核酸鎖、
を含む核酸複合体であって、
前記第３の核酸鎖はオーバーハングを有し、前記オーバーハングは、前記第１の核酸鎖に相補的ではなく、かつ、インプット核酸鎖と結合して前記第１の核酸鎖から前記第３の核酸鎖を解離でき、
前記第１の核酸鎖の前記中央領域は標的ＲＮＡに相補的な配列を含み、前記配列の長さは１０～３５ヌクレオシドである、
核酸複合体。
【請求項２】
前記標的ＲＮＡに相補的な配列の長さは１０～２１ヌクレオチドである、請求項１に記載の核酸複合体。
【請求項３】
前記第２の核酸鎖は、前記第１の核酸鎖の中央領域における連結した１９～２５のヌクレオチドに結合して、前記第１の核酸二重鎖を形成する、請求項１～２のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項４】
前記第１の核酸二重鎖はダイサー切断部位を含まない、請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項５】
前記核酸複合体はダイサー切断部位を含まない、請求項１～４のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項６】
前記第１の核酸鎖の中央領域は、５’コネクターを介して前記第１の核酸鎖の５’領域と連結している、請求項１～５のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項７】
前記第１の核酸鎖の中央領域は、３’コネクターを介して前記第１の核酸鎖の３’領域と連結している、請求項１～６のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項８】
前記５’コネクター、前記３’コネクター又は両者は、ℊ３炭素リンカー、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド又はエキソヌクレアーゼ切断抵抗性部分又はその組合せを含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項９】
前記修飾ヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオチド又は2'-F-ヌクレオチドである、請求項８に記載の核酸複合体。
【請求項１０】
前記５’コネクターは、C_3 ３炭素リンカー、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-F-ヌクレオチド、一本鎖である場合にエキソヌクレアーゼによって切断されるホスホジエステル５’－３’結合を有するヌクレオチド若しくはこれらの組合せを含むか、又は、ℊ３炭素リンカー、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-F-ヌクレオチド、一本鎖である場合にエキソヌクレアーゼによって切断されるホスホジエステル５’－３’結合を有するヌクレオチド若しくはこれらの組合せである、請求項１～７のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項１１】
前記３’コネクターはC_3 ３炭素リンカーである、請求項１０に記載の核酸複合体。
【請求項１２】

前記３’コネクターは、C_3 ３炭素リンカー、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、一本鎖である場合のエキソヌクレアーゼ切断抵抗性部分又はその組合せを含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項１３】

前記３’コネクターは、2'-O-メチルヌクレオチドを含む、又は、2'-O-メチルヌクレオチドであり、必要に応じて、前記2'-O-メチルヌクレオチドは、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルウリジン又は2'-O-メチルシチジンである、請求項１２に記載の核酸複合体。

【請求項１４】

前記第２の核酸鎖は、前記第１の核酸鎖の前記中央領域に完全に相補的であり、そのため、前記第１の核酸二重鎖の前記第２の核酸鎖の５’及び３’末端に平滑末端が形成される、請求項１～１３のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項１５】

前記第２の核酸鎖が、前記第１の核酸二重鎖の３’末端、又は５’末端又は両者にオーバーハングを有さない、請求項１～１３のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項１６】

前記第２の核酸鎖が、前記第１の核酸二重鎖に３’オーバーハング、５’オーバーハング又は両者を有する、請求項１～１３のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項１７】

前記第２の核酸鎖は３’オーバーハングを有し、前記３’オーバーハングの長さは１～５ヌクレオシドである、請求項１６に記載の核酸複合体。

【請求項１８】

前記第１の核酸鎖の前記中央領域の５’末端、前記第１の核酸鎖の前記中央領域の３’末端、又はその両者が、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項１９】

前記第１の核酸鎖の前記中央領域の５’末端、及び前記第１の核酸鎖の前記中央領域の３’末端が、独立して、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項２０】

前記第１の核酸鎖の前記中央領域が、前記中央領域の５’末端、３’末端又はその両者における２又は３ヌクレオシド間のヌクレオシド間結合を除き、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない、請求項１～１７のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項２１】

（１）前記第１の核酸鎖の前記中央領域、（２）前記第１の核酸鎖の前記５’領域、及び（３）前記第１の核酸鎖の前記３’領域のうちの１つ以上の領域のヌクレオシドの、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％又は少なくとも９５％が、化学修飾されている、請求項１～２０のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項２２】

前記第１の核酸鎖、前記第２の核酸鎖及び前記第３の核酸鎖のうちの１つ以上の核酸鎖のヌクレオシドの、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％又は少なくとも９５％が、化学修飾されている、請求項１～２０のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項２３】

前記核酸複合体のヌクレオシドの、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は全てが、化学修飾されている、請求項１～２２のいずれか一項に記載の核酸複合体。

【請求項２４】

前記化学修飾が、前記核酸複合体の、ヌクレアーゼ分解に抵抗するための修飾、融解温度（Ｔｍ）を上昇させるための修飾、又はその両者である、請求項２０～２３のいずれか

一項に記載の核酸複合体。
【請求項２５】
前記核酸複合体のヌクレオチドの、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は全てが、非ＤＮＡ及び非ＲＮＡヌクレオチドである、請求項１～２４のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項２６】
前記第２の核酸鎖のヌクレオシドの最大でも５％、最大でも１０％又は最大でも１５％が、ＬＮＡである、請求項１～２５のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項２７】
前記塩基の約１０％～５０％が、２’－４’架橋修飾を有する、請求項１～２６のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項２８】
前記塩基の約１０％～５０％が、ロックド核酸（ＬＮＡ）又はその類似体である、請求項１～２７のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項２９】
塩基の約１０％～５０％が、2'-O-メチル修飾、2'-Ｆ修飾又は両者を含む、請求項１～２８のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３０】
前記第１の核酸鎖のヌクレオシド間結合の５％未満、１０％未満、２５％未満、５０％未満が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項１～２９のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３１】
前記第１の核酸鎖が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない、請求項１～２９のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３２】
（１）前記５’コネクターの３’に隣接する１～３のヌクレオチド、及び／又は（２）前記３’コネクターの５’に隣接する１若しくは２のヌクレオチド、及び／又は（３）前記３’コネクターの３’に隣接する１～３のヌクレオチドの間のヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項１～２９のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３３】
前記インプット核酸鎖が、ＲＮＡである、請求項１～３２のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３４】
前記標的ＲＮＡが、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ノンコーディングＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ転写物、細胞ＲＮＡ転写物又はこの組合せである、請求項３３に記載の核酸複合体。
【請求項３５】
前記第２の核酸鎖の前記オーバーハングは前記インプット核酸鎖と結合してトーホールドを形成でき、それにより、前記第１の核酸鎖から前記第２の核酸鎖を解離する、請求項１～３４のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３６】
前記第２の核酸鎖の前記オーバーハングの長さは５～２０ヌクレオシドであり、必要に応じて９ヌクレオチドである、請求項１～３５のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３７】
前記第３の核酸鎖の前記オーバーハングの全てのヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項１～３６のいずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３８】
前記第３の核酸鎖の５’末端、３’末端又は両者が、末端部分を含み；必要に応じて、前記末端部分が、リガンド、フルオロフォア、エキソヌクレアーゼ、脂肪酸、Ｃｙ３、トリエチレングリコールと結合した逆方向ｄＴ又はこれらの組合せを含む、請求項１～３７の

いずれか一項に記載の核酸複合体。
【請求項３９】
標的ＲＮＡを調節する方法であって、
標的ＲＮＡを含む細胞を、請求項１～３８のいずれか一項に記載の核酸複合体と接触させる工程を含み、インプット鎖が前記第３の核酸鎖の前記オーバーハングに結合して、前記第１の核酸鎖から前記第３の核酸鎖を解離し、前記標的ＲＮＡに相補的な配列を前記細胞内に放出し、それにより、前記標的ＲＮＡを調節する、方法。
【請求項４０】
前記細胞を前記核酸複合体と接触させる工程を、in vitro、in vivo、ex vivo又はこれらの組合せで行う、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記細胞を前記核酸複合体と接触させる工程が対象の体内で起こる、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
前記細胞が疾患細胞で、必要に応じて、前記細胞が、がん細胞である、請求項３９～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
前記細胞がニューロンである、請求項３９～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
疾患又は状態を治療する方法であって、必要とする対象に請求項１～３８のいずれか一項に記載の核酸複合体を投与することを含み、前記インプット鎖が前記第３の核酸鎖のオーバーハングに結合して、前記第１の核酸鎖から前記第３の核酸鎖を解離し、前記標的ＲＮＡに相補的な配列を放出し、それにより、前記対象における前記標的ＲＮＡの活性又は前記標的ＲＮＡからのタンパク質発現を低下させて前記疾患又は状態を治療する、方法。
【請求項４５】
前記疾患又は状態が、中枢神経系（ＣＮＳ）疾患若しくは障害又はがんである、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記標的ＲＮＡがｍＲＮＡ又はｍｉＲＮＡである、請求項３９～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記核酸複合体を脂質媒介送達システムによって対象に投与し、必要に応じて、リポソーム、ナノ粒子又はミセルで投与する、請求項３９～４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
前記核酸複合体を、ナノ粒子、無機ナノ粒子、核酸脂質粒子、高分子ナノ粒子、リピドイドナノ粒子（ＬＮＰ）、キトサン及びイヌリンナノ粒子、シクロデキストリンナノ粒子、カーボンナノチューブ、リポソーム、ミセル構造物、カプシド、ポリマー、ポリマーマトリックス、ヒドロゲル、デンドリマー、核酸ナノ構造物、エキソソーム、ＧａｌＮＡｃ結合メリチン様ペプチド又はこの組合せによって、対象に投与する、請求項３９～４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記核酸複合体を、必要とする対象に、皮下注入又は静脈内注入によって投与する、請求項３９～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
前記核酸複合体を、必要とする対象に、濃度約０．１～１０ｎＭで投与し、必要に応じて約０．１～１．０ｎＭで投与する、請求項３９～４９のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照

本願は、2021年7月6日に出願した米国仮特許出願第63/218,833号の利益を合衆国法典第３５巻第１１９条（ｅ）項に基づいて主張するものであり、前記仮出願の内容は、その全体があらゆる目的で参照によりこの明細書に組み込まれる。

【０００２】

配列表への言及

本願は、電子形式の配列表とともに出願している。配列表は、サイズ２００キロバイトで、2022年7月3日に作成した75EN-329791-WOと題するファイルとして提供する。配列表の電子形式での情報は、その全体が参照によりこの明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００３】

分野

本開示は、一般に、核酸の分野、例えば、条件付きで活性化可能な低分子干渉ＲＮＡ複合体に関する。

【０００４】

関連技術の説明

動力学的核酸ナノテクノロジー及び生体分子コンピューティングの分野の新たな発展にもかかわらず、核酸論理スイッチを使用してＲＮＡ転写物（例．ｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ）を感知し、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）療法を特定の疾患関連細胞に限定できる標的化ＲＮＡｉ療法の開発には依然として課題がある。特に、薬効、感度及び安定性が改善され、設計が複雑ではなく、並びに必要な用量が少ない、標的化され、条件付きで活性化されるＲＮＡｉ療法を開発する必要がある。

【発明の概要】

【０００５】

この明細書は、連結した２０～７０のヌクレオシドを含む第１の核酸鎖と；第１の核酸鎖の中央領域に結合して第１の核酸二重鎖を形成する第２の核酸鎖と；第１の核酸鎖の５’領域及び３’領域に結合して第２の核酸二重鎖を形成する第３の核酸鎖とを含む核酸複合体であって、第３の核酸鎖が、オーバーハングを有し、オーバーハングが、第１の核酸鎖に相補的でなく、インプット核酸鎖と結合して第１の核酸鎖から第３の核酸鎖を解離できる、核酸複合体を開示する。一部の態様では、第１の核酸鎖の中央領域は、標的ＲＮＡに相補的な配列を含み、配列の長さは１０～３５ヌクレオシドである。

【０００６】

標的ＲＮＡに相補的な配列の長さは、例えば１０～２１ヌクレオチドの可能性がある。一部の態様では、第２の核酸鎖は、第１の核酸鎖の中央領域における連結した１９～２５のヌクレオチドに結合して第１の核酸二重鎖を形成する。一部の態様では、第１の核酸二重鎖、核酸複合体又は両者は、ダイサー切断部位を含まない。

【０００７】

第１の核酸鎖の中央領域は、例えば、第１の核酸鎖の５’領域に５’コネクターを介して連結できる。第１の核酸鎖の中央領域は、例えば、第１の核酸鎖の３’領域に３’コネクターを介して連結できる。一部の態様では、５’コネクター、３’コネクター又は両者は、Ｃ３　３炭素リンカー、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、若しくはエキソヌクレアーゼ切断抵抗性部分、又はこれらの組合せを含む。一部の態様では、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチド又は2'-F-ヌクレオチドである。一部の態様では、５’コネクターは、Ｃ３　３炭素リンカー、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-F-ヌクレオチド、一本鎖形態であるときにエキソヌクレアーゼにより切断可能なホスホジエステル５’及び３’接続を有するヌクレオチド、若しくはこれらの組合せを含むか、又は前述のものである。３’コネクターは、例えばＣ３　３炭素リンカーの可能性がある。一部の態様では、３’コネクターは、Ｃ３　３炭素リンカー、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、一本鎖形態であるときエキソヌクレアーゼ切断抵抗性部分又はこれらの組合せを含む。一部の態様では、３’コネクターは、2'-O-メチルヌクレオチドを含むか、又はそれであり、2'-O-メチルヌクレオチドは、必要に応じて2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチル

ウリジン又は2'-O-メチルシチジンである。

【０００８】

一部の態様では、第２の核酸鎖は、第１の核酸鎖の中央領域に完全に相補的であり、そのため、第１の核酸二重鎖の第２の核酸鎖の５’及び３’末端に平滑末端が形成される。一部の態様では、第２の核酸鎖は、第１の核酸二重鎖の３’末端、５’末端又は両者にオーバーハングを有さない。一部の態様では、第２の核酸鎖は、第１の核酸二重鎖に３’オーバーハング、５’オーバーハング又は両者を有する。一部の態様では、第２の核酸鎖は、３’オーバーハングを有し、３’オーバーハングの長さは１～５ヌクレオシドである。一部の態様では、第１の核酸鎖の中央領域の５’末端、第１の核酸鎖の中央領域の３’末端、又はその両者は、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。一部の態様では、第１の核酸鎖の中央領域の５’末端、及び第１の核酸鎖の中央領域の３’末端は、独立して、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。一部の態様では、第１の核酸鎖の中央領域は、中央領域の５’末端、３’末端又は両者における２又は３ヌクレオシド間のヌクレオシド間結合を除き、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。一部の態様では、（１）第１の核酸鎖の中央領域、（２）第１の核酸鎖の５’領域、及び（３）第１の核酸鎖の３’領域のうちの１つ以上の領域のヌクレオシドの、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％又は少なくとも９５％は、化学修飾されている。一部の態様では、第１の核酸鎖、第２の核酸鎖及び第３の核酸鎖のうちの１つ以上の核酸鎖のヌクレオシドの、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％又は少なくとも９５％は、化学修飾されている。一部の態様では、核酸複合体のヌクレオシドの、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は全ては、化学修飾されている。化学修飾は、例えば、核酸複合体の、ヌクレアーゼ分解に抵抗するための修飾、融解温度（Ｔｍ）を上昇させるための修飾、又はその両者の可能性がある。

【０００９】

一部の態様では、核酸複合体のヌクレオチドの、少なくとも９０％、少なくとも９５％又は全ては、非ＤＮＡ及び非ＲＮＡヌクレオチドである。一部の態様では、第２の核酸鎖のヌクレオシドの最大でも５％、最大でも１０％又は最大でも１５％は、ＬＮＡである。一部の態様では、塩基の約１０％～５０％は、２’－４’架橋修飾を有する。一部の態様では、塩基の約１０％～５０％は、ロックド核酸（ＬＮＡ）又はその類似体である。一部の態様では、塩基の約１０％～５０％は、2'-O-メチル修飾、2'-Ｆ修飾又は両者を含む。一部の態様では、第１の核酸鎖のヌクレオシド間結合の５％未満、１０％未満、２５％未満、５０％未満は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部の態様では、第１の核酸鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。一部の態様では、（１）５’コネクターの３’に隣接する１～３のヌクレオチド、及び／又は（２）３’コネクターの５’に隣接する１若しくは２のヌクレオチド、及び／又は（３）３’コネクターの３’に隣接する１～３のヌクレオチド、の間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【００１０】

インプット核酸鎖はＲＮＡの可能性がある。一部の態様では、標的ＲＮＡは、細胞ＲＮＡ転写物である。一部の態様では、標的ＲＮＡは、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ノンコーディングＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ転写物又はこれらの組合せである。

【００１１】

一部の態様では、第２の核酸鎖のオーバーハングは、インプット核酸鎖に結合してトーホールドを形成でき、それにより第１の核酸鎖から第２の核酸鎖を解離する。一部の態様では、第２の核酸鎖のオーバーハングの長さは５～２０ヌクレオシドであり、必要に応じて９ヌクレオチドである。一部の態様では、第３の核酸鎖のオーバーハングの全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部の態様では、第３の核酸鎖の５’末端、３’末端又は両者は、末端部分を含む。一部の態様では、末端部分は、リガンド、フルオロフォア、エキソヌクレアーゼ、脂肪酸、Ｃｙ３、トリエチレング

リコールと結合した逆方向ｄＴ又はこれらの組合せを含む。
【００１２】
この明細書は、標的ＲＮＡを調節する方法を提供し、前記方法は、標的ＲＮＡを含む細胞を、この明細書で開示するいずれか１つ以上の核酸複合体と接触させる工程を含み、インプット鎖が第３の核酸鎖のオーバーハングに結合して、第１の核酸鎖から第３の核酸鎖を解離し、標的ＲＮＡに相補的な配列を細胞内に放出し、それにより、標的ＲＮＡを調節する、方法を含む。
【００１３】
細胞を核酸複合体と接触させる工程は、in vitro、in vivo、ex vivo又はこの組合せで実行できる。一部の態様では、細胞を核酸複合体と接触させる工程は、対象の体内で起こる。一部の態様では、細胞は疾患細胞であり、必要に応じて、細胞はがん細胞である。一部の態様では、細胞はニューロンである。
【００１４】
この明細書は、疾患又は状態を治療する方法も提供し、前記方法は、必要とする対象に、この明細書で開示する核酸複合体のいずれか１つ以上を投与することを含み、インプット鎖が第３の核酸鎖のオーバーハングに結合して、第１の核酸鎖から第３の核酸鎖を解離し、標的ＲＮＡに相補的な配列を放出させ、それによって、対象における標的ＲＮＡの活性又は標的ＲＮＡからのタンパク質発現を低下させて疾患又は状態を治療する、方法も含む。一部の態様では、疾患又は状態は、中枢神経系（ＣＮＳ）疾患若しくは障害又はがんである。一部の態様では、標的ＲＮＡは、ｍＲＮＡ又はｍｉＲＮＡである。一部の態様では、核酸複合体を対象に脂質媒介送達システムによって投与し、必要に応じてリポソーム、ナノ粒子又はミセルによって投与する。一部の態様では、核酸複合体を対象にナノ粒子、無機ナノ粒子、核酸脂質粒子、高分子ナノ粒子、リピドイドナノ粒子（ＬＮＰ）、キトサン及びイヌリンナノ粒子、シクロデキストリンナノ粒子、カーボンナノチューブ、リポソーム、ミセル構造物、カプシド、ポリマー、ポリマーマトリックス、ヒドロゲル、デンドリマー、核酸ナノ構造物、エキソソーム、ＧａｌＮＡｃ結合メリチン様ペプチド又はこの組合せによって投与する。一部の態様では、核酸複合体を、必要とする対象に、皮下注入によって投与する。一部の態様では、請求項１～４０のいずれか一項に記載の核酸複合体を、必要とする対象に、静脈内注入によって投与する。一部の態様では、核酸複合体を、必要とする対象に、濃度約０．１～１０ｎＭで投与し、必要に応じて約０．１～１．０ｎＭで投与する。
【００１５】
本明細書に記載の主題の１つ以上の実施の詳細を、図面及び下記の説明で示す。他の特徴、側面及び利点は、説明、図面及び特許請求の範囲から明らかになる。この概要も、詳細な説明も、本発明の主題の範囲を規定又は限定することを目的としない。
【図面の簡単な説明】
【００１６】
【図１】図１は、限定するものではない代表的な２つの核酸複合体構築物（デザイン１及び２）の概要図である。
【図２】図２は、構成要素の鎖（センサー核酸鎖、コア核酸鎖及びパッセンジャー核酸鎖）と化学修飾のパターンを示した、限定するものではない代表的な核酸複合体の概要図である。
【図３】図３は、スクリーニングされる領域を黄色で強調した、限定するものではない代表的な核酸複合体構築物の概要図である。
【図４Ａ】図４Ａは、センサー鎖とＲＮＡマーカーの塩基対合後の標的細胞における核酸複合体の活性化を示す模式図である。
【図４Ｂ】図４Ｂは、コア核酸鎖からのセンサー核酸鎖の解離及びコア核酸鎖オーバーハングの分解の後の、活性ＲＮＡｉ二重鎖の形成を示す模式図である。
【図５Ａ】図５Ａは、パッセンジャー鎖が共通するがコア鎖が異なる、限定するものではない代表的な２つの核酸複合体構築物の配列の図である。パッセンジャー鎖ｖ３ｐ１：配

列番号２、コア鎖ｖ３ｃ１：Ｃ３スペーサーが接続した配列番号３～５。
【図５Ｂ】図５Ｂは、パッセンジャー鎖が共通するがコア鎖が異なる、限定するものではない代表的な２つの核酸複合体構築物の配列の図である。パッセンジャー鎖１：配列番号２、コア鎖ｖ３ｃ５：配列番号１１。
【図６】図６は、２つの陽性対照構築物の配列の図である。ＨＴＴガイド１：配列番号２１、ＨＴＴ Ｐａｓｓ１：配列番号２２、ＨＴＴガイド２：配列番号２３、ＨＴＴ Ｐａｓｓ２：配列番号２４。
【図７】図７は、図５に示す代表的なコア鎖（２つのＣ３リンカーを含むｖ３ｃ１）と組み立てられて、図８に示す標的タンパク質発現に使用する、パッセンジャー鎖が異なるさまざまなｓｉＲＮＡ複合体バリアント（Ｖ３Ｐ１、Ｖ３Ｐ２、Ｖ３Ｐ３、Ｖ３Ｐ４、Ｖ３Ｐ５、Ｖ３Ｐ６、Ｖ３Ｐ７、Ｖ３Ｐ８及びＶ３Ｐ９）を示す。
【図８】図８は、図７に示すｓｉＲＮＡ複合体バリアントを使用した標的タンパク質発現のデータを示す。
【図９】図９は、図５に示す代表的なコア鎖（Ｃ３リンカーを含まないｖ３ｃ５）と組み立てる、パッセンジャー鎖が異なるさまざまなｓｉＲＮＡ複合体バリアント（Ｖ３Ｐ１、Ｖ３Ｐ２、Ｖ３Ｐ３、Ｖ３Ｐ４、Ｖ３Ｐ５、Ｖ３Ｐ６、Ｖ３Ｐ７、Ｖ３Ｐ８及びＶ３Ｐ９）を示す。
【図１０】図１０は、図９に示すｓｉＲＮＡ複合体バリアントを使用した標的タンパク質発現のデータを示す。
【図１１Ａ】図１１Ａは、パッセンジャー鎖（パッセンジャー鎖１）及びセンサー鎖（Ｍｉｒ２３センサー１）が共通し、コア鎖（図１３～１４では、それぞれ、Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３と呼ぶ、コア鎖ｖ３ｃ１、コア鎖ｖ３ｃ２及びコア鎖ｖ３ｃ３）が異なる、代表的な核酸複合体構築物の配列の図である。図１１Ａに示す配列を表１に示す。
【図１１Ｂ】図１１Ｂは、パッセンジャー鎖（パッセンジャー鎖１）及びセンサー鎖（Ｍｉｒ２３センサー１）が共通し、コア鎖（図１３～１４では、それぞれ、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６と呼ぶ、コア鎖ｖ３ｃ４、コア鎖ｖ３ｃ５及びコア鎖ｖ３ｃ６）が異なる、代表的な核酸複合体構築物の配列の図である。図１１Ｂに示す配列を表１に示す。
【図１２】図１２は、さまざまな核酸複合体構築物の非変性ポリアクリルアミドゲル（ＰＡＧＥ）を示す。
【図１３】図１３は、パッセンジャー鎖ｖ３ｐ１が共通し、コア鎖（Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５及びＣ６）が異なる二本鎖構築物のさまざまな濃度でのＲＮＡｉ活性を示す。
【図１４】図１４は、パッセンジャー鎖ｖ３ｐ１及びセンサー鎖（Ｍｉｒ２３センサー１）が共通し、コア鎖（Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５及びＣ６）が異なる三本鎖構築物の３つの濃度でのＲＮＡｉ活性を示す。
【図１５】図１５は、この明細書で開示する限定するものではない代表的な核酸複合体構築物（上：Ｖ３Ｃ３ａ）、及び部分的に修飾した核酸複合体（下：Ｇ１Ｃ１Ｓ１）の配列の図である。図１５に示す配列は、表２に示している。
【図１６】図１６は、図１５に示す部分的に修飾した二本鎖構築物（Ｇ１Ｃ１ ｓｉＲＮＡ）及び部分的に修飾した三本鎖構築物（Ｇ１Ｃ１Ｓ１）と比較した代表的な二本鎖核酸複合体構築物（Ｖ３Ｃ３ａ ｓｉＲＮＡ）及び三本鎖核酸複合体構築物（Ｖ３Ｃ３ａ及びＶ３Ｃ３ｂ）の３つの異なる濃度でのＲＮＡｉ活性を示す。
【発明の詳細な説明】
【００１７】
図面を通して、参照番号は、参照要素間の対応を示すために再使用されることがある。図面は、明細書に記載した態様の例を説明するために提供されるものであり、本開示の範囲を限定することを意図したものではない。
【００１８】
以下の詳細な説明では、この出願の一部を形成する図面を参照する。図面では、別段の定めがない限り、同様の記号は、通常、同様の要素を示す。詳細な説明、図面及び特許請求の範囲に記載される説明的態様は、限定することを意図したものではない。明細書に提

示する主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく、他の態様を利用してもよく、他の変更を加えてもよい。明細書で一般的に説明され、図で示されるこの開示の側面を、多種多様な構成で配置すること、置換すること、組み合わせること、分離すること及び設計することができ、それらの全てが、明細書で明確に企図されており、明細書での開示の一部とされることは、容易に理解される。

【００１９】

明細書で言及する全ての特許、公開特許出願、他の刊行物及びGenBankからの配列、並びに他のデータベースは、関連技術に関してそれら全体が参照によりこの明細書に組み込まれる。

【００２０】

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、ほとんどの真核生物において保存される固有の細胞機構であって、細胞運命の決定、分化、生存及びウイルス感染からの防御に欠かせない遺伝子の発現を調節するのに役立つ細胞機構である。研究者は、配列特異的遺伝子サイレンシングのために合成二本鎖ＲＮＡを設計することによりこの天然の機構を活用している。動力学的核酸ナノテクノロジー及び生体分子コンピューティングの分野の新たな発展も、プログラム可能なＲＮＡｉ剤を設計するための概念的アプローチを提供する。しかし、ＲＮＡサイレンシングを特定の疾患関連細胞に限定し、正常組織に毒性副作用が及ばないようにするために、核酸論理スイッチを使用してＲＮＡ転写物（例．ｍＲＮＡ及びｍｉＲＮＡ）を感知できる標的化ＲＮＡｉ療法を開発する上での課題が残っている。重大な課題には、十分に抑制されないバックグラウンド薬物活性、活性化状態での弱い薬効、インプット及びアウトプット配列オーバーラップ、高い設計の複雑性、短い持続期間（２４時間未満）、並びに高い要求濃度（１０ｎＭ超）が含まれる。

【００２１】

この明細書は、条件付きで活性化可能な低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）複合体、成分、組成物、並びに関連する方法及びシステムを提供する。条件付き活性化可能なｓｉＲＮＡ複合体は、ｓｉＲＮＡ複合体へのインプット核酸鎖（例．疾患関連細胞に特異的な疾患バイオマーカー遺伝子）の相補的結合により誘発されたときに不活性化状態から活性化状態へスイッチでき、それによって、ｓｉＲＮＡ複合体のＲＮＡ干渉活性を活性化して、特定の標的ＲＮＡ（例．サイレンシングすべきＲＮＡ）を標的とすることができる。明細書に記載した核酸複合体は、低濃度での改善された効力、及びオフターゲット効果を低下できる改善された特異性によって、条件付きで活性化されるＲＮＡ干渉活性を介して特定の疾患関連細胞中の標的ＲＮＡをサイレンシングできる。

【００２２】

この明細書は核酸複合体を開示する。核酸複合体は、第１の核酸鎖（例．コア核酸鎖）と、第１の核酸鎖の中央領域に結合して第１の核酸二重鎖（例．ＲＮＡｉ二重鎖）を形成する第２の核酸鎖（例．パッセンジャー核酸鎖）と、コア核酸鎖の５’領域及び３’領域に結合して第２の核酸二重鎖（例．センサー二重鎖）を形成する第３の核酸鎖（例．センサー核酸鎖）とを含む。センサー核酸鎖はオーバーハングを有し、オーバーハングは、第１の核酸鎖に相補的でなく、インプット核酸鎖と結合してコア核酸鎖からセンサー核酸鎖を解離できる。コア核酸鎖の中央領域は、標的ＲＮＡに相補的な配列を含む。配列の長さは１０～３５ヌクレオシドの可能性がある。第１の核酸鎖（例．コア核酸鎖）は、連結した２０～７０のヌクレオシドを含むことができる。

【００２３】

この明細書は標的ＲＮＡを調節する方法も開示する。この方法は、標的ＲＮＡを含む細胞を、明細書に記載した核酸複合体と接触させる工程を含む。インプット核酸鎖を検知すると、インプット核酸鎖は、センサー核酸鎖のオーバーハングに結合でき、コア核酸鎖からセンサー核酸鎖を解離し、標的ＲＮＡに相補的な配列を細胞内に放出し、それにより、標的ＲＮＡを調節する。

【００２４】

この明細書は、疾患又は状態を治療する方法も開示する。この方法は、明細書に記載し

た核酸複合体を、必要とする対象に投与することを含む。インプット核酸鎖を検知すると、インプット鎖は、センサー核酸鎖のオーバーハングに結合して、コア核酸鎖からセンサー核酸鎖の解離し、標的ＲＮＡに相補的な配列を放出し、それにより、対象における標的ＲＮＡの活性又は標的ＲＮＡからのタンパク質発現を低下させて疾患又は状態を治療する。

【００２５】

定義

別段の定義がある場合を除き、この明細書で使用する技術及び学術用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。例えば、Singletonら, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)を参照されたい。この開示のために、以下の用語を定義する。

【００２６】

本明細書では、「ヌクレオシド」は、リボース又はデオキシリボースに共有結合したプリン又はピリミジン塩基を有する分子を指す。代表的なヌクレオシドには、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン及びチミジンが含まれる。

【００２７】

「ヌクレオチド」は、糖部分に１つ以上のリン酸基がエステル結合したヌクレオシドを指す。代表的なヌクレオチドには、ヌクレオシド一リン酸、二リン酸及び三リン酸が含まれる。

【００２８】

「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」は、この明細書では同じ意味で使用され、５’炭素原子と３’炭素原子がホスホジエステル結合しているヌクレオチドのポリマーを指す。

【００２９】

「ＲＮＡ」、「ＲＮＡ分子」又は「リボ核酸分子」は、リボヌクレオチドのポリマーを指す。「ＤＮＡ」、「ＤＮＡ分子」又は「デオキシリボ核酸分子」は、デオキシリボヌクレオチドのポリマーを指す。ＤＮＡ及びＲＮＡは、自然に（例．それぞれ、ＤＮＡ複製又はＤＮＡの転写により）合成できる。ＲＮＡを転写後に修飾できる。ＤＮＡ及びＲＮＡは、化学的にも合成できる。ＤＮＡ及びＲＮＡは、一本鎖又は多鎖状（例えば、二本鎖状又は三本鎖状）の可能性がある。「ｍＲＮＡ」又は「メッセンジャーＲＮＡ」は、遺伝子のＤＮＡ鎖の１つに相補的な、一本鎖ＲＮＡ分子である。「ｍｉＲＮＡ」又は「マイクロＲＮＡ」は、ＲＮＡサイレンシング及び遺伝子発現の転写後調節において機能する、低分子一本鎖ノンコーディングＲＮＡ分子である。

【００３０】

「ＲＮＡアナログ」は、対応する未改変又は未修飾ＲＮＡと比較して少なくとも１つの改変又は修飾ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを指す。ヌクレオチドは、対応する未改変又は未修飾ＲＮＡと同じ又は同様の性質又は機能、例えば、塩基対を形成する性質又は機能を保持できる。

【００３１】

一本鎖ポリヌクレオチドは、５’末端及び３’末端を有する。一本鎖ポリヌクレオチドの「５’末端」及び「３’末端」は、一本鎖ポリヌクレオチドの末端残基を示し、それぞれの端の遊離基の性質に基づいて区別される。一本鎖ポリヌクレオチドの５’末端は、その末端（５’末端）のデオキシリボース又はリボースの５位が炭素である一本鎖ポリヌクレオチドの末端残基を示す。一本鎖ポリヌクレオチドの３’末端は、その末端（３’末端）のヌクレオチド又はヌクレオシドの３位の炭素がヒドロキシル基で終わる残基を示す。さまざまな場合に、５’末端及び３’末端は、化学的に又は生物学的に、例えば、当業者には理解されるような官能基又は他の化合物の付加により、修飾できる。

【００３２】

本明細書では、「相補的結合」及び「相補的に結合する」は、２つの一本鎖が互いに塩

基対合して、核酸二重鎖又は二本鎖核酸を形成することを意味する。「塩基対合する」は、本明細書では、ワトソン・クリック塩基対合則に従う、反対の相補ポリヌクレオチド鎖又は配列上の塩基対間の水素結合の形成を示す。例えば、標準ワトソン・クリックＤＮＡ塩基対合では、アデニン（Ａ）はチミン（Ｔ）と塩基対を形成し、グアニン（Ｇ）はシトシン（Ｃ）と塩基対を形成する。ＲＮＡ塩基対合の場合、アデニン（Ａ）はウラシル（Ｕ）と塩基対を形成し、グアニン（Ｇ）はシトシン（Ｃ）と塩基対を形成する。２つの一本鎖間の、ある特定の割合のミスマッチは、安定した二本鎖の二重鎖を形成できるのであれば、許容される。一部の態様では、相補的に結合する２つの鎖のミスマッチの割合は、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％若しくは５０％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、最大でもこれらの割合、若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。

【００３３】

本明細書では、「ＲＮＡ干渉」又は「ＲＮＡｉ」は、ＲＮＡの選択的細胞内分解を指す。ＲＮＡｉが細胞内で自然に生じ、外来ＲＮＡ（例．ウイルスＲＮＡ）を除去できる。自然のＲＮＡｉは、分解機構を他の類似のＲＮＡ配列に方向付ける、遊離ｄｓＲＮＡから切断された断片によって進行する。あるいは、ＲＮＡｉは、例えば標的遺伝子の発現をサイレンシングするために、人工的に開始できる。

【００３４】

本明細書では、「低分子干渉ＲＮＡ」及び「ｓｉＲＮＡ」は、ｓｉＲＮＡが標的遺伝子と同じ細胞内で活性化されたとき、遺伝子又は標的遺伝子の発現を低下させること又は阻害することができる、ＲＮＡ又はＲＮＡアナログを指す。この明細書で使用するｓｉＲＮＡは、天然に存在する核酸塩基及び／又は化学修飾された核酸塩基（ＲＮＡアナログ）を含むことができる。

【００３５】

核酸複合体

この明細書は、核酸複合体のセンサー核酸鎖の配列とインプット核酸鎖（例．標的細胞（例．疾患関連細胞）に特異的な疾患バイオマーカー遺伝子のｍＲＮＡ）との相補的結合時に活性化できる核酸複合体を提供する。活性化された核酸複合体は、コア核酸鎖とパッセンジャー核酸鎖で形成される多くのＲＮＡｉ二重鎖を放出でき、標的ＲＮＡを特異的に阻害又はサイレンシングできる。標的ＲＮＡの配列は、インプット核酸鎖とは無関係の可能性がある。標的ＲＮＡは、インプット核酸鎖が由来する遺伝子とは異なる遺伝子に由来する可能性がある。標的ＲＮＡは、インプット核酸鎖が由来する遺伝子と同じ遺伝子に由来する可能性がある。

【００３６】

図１に、限定するものではない代表的な２つの核酸複合体構築物の概要図を示す。一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体は、図２の限定するものではない態様で示すように、コア核酸鎖（例．第１の核酸鎖）、パッセンジャー核酸鎖（例．第２の核酸鎖）及びセンサー核酸鎖（例．第３の核酸鎖）を含む。これら３つの鎖は、互いに塩基対合して、例えば、ＲＮＡｉ二重鎖（例．第１の核酸二重鎖）及びセンサー二重鎖（例．第２の核酸二重鎖）を形成できる。コア核酸鎖、パッセンジャー核酸鎖及びセンサー核酸鎖のうちの１つ以上が、修飾ヌクレオチドを含むＲＮＡアナログの可能性がある。

【００３７】

「核酸二重鎖」は、本明細書では、相補的結合によって互いに結合している２つの一本鎖ポリヌクレオチドを指す。核酸二重鎖は、２つの一本鎖ポリヌクレオチド間の塩基対の非共有結合により及び塩基スタッキング相互作用により、主として維持される、らせん構造、例えば、二本鎖ＲＮＡ分子を形成できる。

【００３８】
コア核酸鎖は、５’領域、３’領域、及び５’領域と３’領域の間の中央領域を含むことができる。コア核酸鎖の中央領域は、コア核酸鎖の５’領域及び／又は３’領域にコネクターを介して連結できる。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、コア核酸鎖の５’領域に５’コネクターを介して連結している。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、コア核酸鎖の３’領域に３’コネクターを介して連結している。コア核酸鎖の中央領域は、パッセンジャー核酸鎖と相補的に結合してＲＮＡｉ二重鎖（例．第１の核酸二重鎖）を形成する。コア核酸鎖の配列全体が、パッセンジャー核酸鎖と相補的に結合するとは限らない。例えば、コア核酸鎖の５’領域及び３’領域は、パッセンジャー核酸鎖を相補的に結合しない。

【００３９】
コア核酸鎖の中央領域は、標的核酸（例．サイレンシングすべきＲＮＡ）に相補的な配列を含むことができる。したがって、核酸複合体のコア核酸鎖は、ガイド鎖（アンチセンス鎖）としての役割を果たし、標的ＲＮＡと塩基対合するために使用される。したがって、パッセンジャー核酸鎖は、同じ標的核酸と相同の配列を更に含むことができる。

【００４０】
核酸複合体が活性化（例．インプット核酸鎖と結合）されると、放出されたＲＮＡｉ二重鎖は、標的核酸とコア核酸鎖の中央領域との結合により標的核酸と相補的に結合できる。一部の態様では、コア核酸鎖の標的ＲＮＡに相補的な配列の長さは約１０～３５ヌクレオシドの可能性がある。一部の態様では、コア核酸鎖は、連結した２０～７０のヌクレオシドを含む。

【００４１】
センサー核酸鎖は、コア核酸鎖の５’領域及び３’領域と相補的に結合してセンサー二重鎖（例．第２の核酸二重鎖）を形成する。センサー核酸鎖は、コア核酸鎖の中央領域にも、パッセンジャー核酸鎖にも結合しない。

【００４２】
センサー核酸鎖は、オーバーハングを含むことができる。「オーバーハング」は、本明細書では、二本鎖ポリヌクレオチド（例．二重鎖）の末端の１つにおける突出する不対ヌクレオチドの伸長を指す。オーバーハングは、ポリヌクレオチドのいずれかの鎖に存在する可能性があり、鎖の３’末端（３’オーバーハング）又は５’末端（５’オーバーハング）に含まれる可能性がある。オーバーハングは、センサー核酸鎖の３’末端に存在する可能性がある。センサー核酸鎖のオーバーハングは、コア核酸鎖のいずれの領域にも結合しない。

【００４３】
センサー核酸鎖は、インプット核酸鎖（例．疾患関連細胞をはじめとする標的細胞に特異的な疾患バイオマーカー遺伝子のｍＲＮＡ）に結合できる配列を含むことができる。活性化すると、センサー核酸鎖とインプット核酸鎖の結合がコア核酸鎖からセンサー核酸鎖を解離してその放出を引き起こすことができ、それにより、多くのＲＮＡｉ二重鎖が放出され、ＲＮＡｉ二重鎖のＲＮＡ干渉活性のスイッチが入る。インプット核酸鎖が存在しないか、インプット核酸が検出できなければ、明細書に記載した核酸複合体は、不活性化状態（スイッチオフ状態）のままで、コア核酸鎖からのセンサー核酸鎖の解離は生じない。したがって、インプット核酸鎖は、核酸複合体（例．ＲＮＡｉ二重鎖）のＲＮＡ干渉活性を活性化（スイッチオン）するトリガーとしての役割を果たすことができる。

【００４４】
明細書に記載した核酸複合体のＲＮＡｉ二重鎖の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、ＲＮＡｉ二重鎖の長さは、１０～３５ヌクレオチドの可能性がある。例えば、ＲＮＡｉ二重鎖の長さは、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５ヌクレオチド、これらの値のいずれか２つの範囲のヌクレオチドの可能性がある。一部の態様では、ＲＮＡｉ二重鎖の長さは、１９～２５ヌクレ

オチドの可能性がある。一部の態様では、ＲＮＡｉ二重鎖の長さは、１７～２２ヌクレオチドの可能性がある。一部の態様では、ＲＮＡｉ二重鎖の長さは、約２１ヌクレオチドの可能性がある。

【００４５】

明細書に記載した核酸複合体のセンサー二重鎖の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、センサー二重鎖の長さは、１０～３５ヌクレオチドの可能性がある。例えば、センサー二重鎖の長さは、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５ヌクレオチド、これらの値のいずれか２つの範囲のヌクレオチドの可能性がある。

【００４６】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体は、ダイサー切断部位を有さず、したがって、核酸複合体により媒介されるＲＮＡｉ干渉は、ダイサー媒介切断を回避できる。

【００４７】

当業者には明らかであるように、ダイサーは、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）分子を長さ約２０～２５ヌクレオチドのｄｓＲＮＡの短い断片へと切断することによりＲＮＡｉ経路を開始できる、ＲＮＡｓｅ ＩＩＩファミリーのエンドリボヌクレアーゼである。

【００４８】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体は、それがダイサーによるプロセシングを回避できる点で、国際公開第2020/033938号で開示されている条件付きで活性化される低分子干渉ＲＮＡ（Ｃｏｎｄ－ｓｉＲＮＡ）と区別される。Ｃｏｎｄ－ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡｉ活性のin vitro制御が以前に実証されている。しかし、Ｃｏｎｄ－ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡｉ活性化のために特定の部位でのダイサー切断を必要とする（例えば図１のデザイン１を参照）。さらに、オフ状態ＲＮＡｉ活性の抑制は、ダイサー結合及び活性の立体障害により達成された。

【００４９】

一部の態様では、この明細書で開示する核酸複合体には、ダイサー結合を抑止する構造的特徴がある。一部の態様では、ＲＮＡｉ二重鎖はダイサー基質を作り出さない。例えば、パッセンジャー核酸鎖とコア核酸鎖の中央領域で形成されるＲＮＡｉ二重鎖は、３’及び／又は５’オーバーハングを有さず、代わりに、パッセンジャー核酸鎖をダイサー結合に好ましくないものにする可能性がある平滑末端を形成する。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖の長さは約１７～２２ヌクレオチド（例．２１ヌクレオチド）であり、ダイサー切断を回避できるほど十分に短い。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、パッセンジャー核酸鎖の３’及び／又は５’末端側にＧ／Ｃリッチ塩基を有さない。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、ダイサー結合を回避するために末端部分に結合する。

【００５０】

この明細書で開示する核酸複合体の一部の態様では、広範な又は完全な化学修飾が、in vivo効力、薬物活性の継続期間、及びバックグラウンドＲＮＡｉ活性の抑制を改善するために、核酸複合体の１つ以上の鎖に導入される。化学修飾、例えば、2'-O-メチル塩基及びホスホロチオエート骨格がエンドヌクレアーゼ活性を阻害することは公知なので、ダイサー切断は、ｓｉＲＮＡドメインとセンサードメインの完全な化学修飾により妨げられる。ｓｉＲＮＡドメインの完全な化学修飾を可能にするために、元のＣｏｎｄ－ｓｉＲＮＡに対して修飾核酸複合体構築物上のコア及びパッセンジャー鎖の形状及び機能を変化させることが有利である。

【００５１】

一部の態様では、核酸複合体のｓｉＲＮＡドメインは、活性ＲＮＡｉ活性を有するためにダイサーによるエンドヌクレアーゼ切断を受ける必要がないように、この明細書で開示する修飾核酸複合体におけるｓｉＲＮＡドメイン二重鎖は短縮されている。一部の態様では、修飾核酸複合体のｓｉＲＮＡドメイン二重鎖は、Ｃｏｎｄ－ｓｉＲＮＡ構築物における２３塩基対のｓｉＲＮＡドメイン二重鎖と比較して、約２１塩基対である。

【００５２】
オフ状態でもセンサー鎖がＲＮＡｉ活性を遮断できるようにするために、ｓｉＲＮＡのガイド鎖（ＲＮＡｉノックダウンの標的となるｍＲＮＡに対するアンチセンス鎖）をコア鎖に組み込み、ｍＲＮＡ標的と相同の鎖がパッセンジャー鎖となる。したがって、修飾核酸複合体は、ｓｉＲＮＡドメイン上の５’オーバーハングがエキソヌクレアーゼ又はエンドヌクレアーゼ活性により除去されるまで、ｍＲＮＡ標的に対するＲＮＡｉ活性を示すことはできない。核酸複合体がオフ状態の場合、センサー二重鎖はオーバーハングを分解から保護し、ＲＮＡｉ活性がオフであることを確実にする。センサー鎖が、ＲＮＡマーカーとの塩基対合により除去されると、ｓｉＲＮＡドメインの５’及び３’オーバーハングが露出され、細胞のヌクレアーゼによる分解が可能になる。放出されたｓｉＲＮＡのエキソヌクレアーゼによる分解を防ぐために、一部の態様では、コア鎖に、５’及び３’エキソヌクレアーゼをブロックするドメインが組み込まれる（例えば図２を参照）。

【００５３】
明細書に記載した核酸複合体を、例えば、Oligonucleotide Synthesis by Herdewijin, Piet (2005) and Modified oligonucleotides: Synthesis and Strategy for Users, by Verma and Eckstein, Annul Rev. Biochem. (1998): 67:99-134をはじめとする、当技術分野で周知のオリゴヌクレオチド合成のための標準的な方法を使用して合成でき、この文献の内容は全体が参照によりこの明細書に組み込まれる。当業者には明らかであるように、合成された核酸複合体に望ましい生理条件下でその二次構造を形成させることができる。形成される二次構造を、当技術分野で公知の標準的な方法、例えば、化学的マッピング、ＮＭＲ又はコンピュータシミュレーションを使用して、試験できる。核酸複合体構築物は、試験結果に従い、所望の構築物が得られるまで、必要に応じて化学修飾又はミスマッチを導入又は除去することで、更に修飾できる。

【００５４】
好適なソフトウェアを使用して、核酸構造の設計及び解析を支援できる。例えば、Nupackを使用して、二重鎖の形成をチェックし、二重鎖の熱力学的安定性をランク付けできる。オリゴヌクレオチド設計ツールを使用して、ＬＮＡ修飾の配置を最適化できる。明細書に記載した核酸複合体における１つ以上の鎖のいずれかの領域を、明細書に記載したインプット核酸配列、標的核酸配列及び／又は化学修飾についてスクリーニングできる。例えば、図３に、限定するものではない代表的な核酸複合体構築物の概要図を示し、ＬＮＡ置換や明細書に記載した他のヌクレオチドアナログといった化学修飾についてスクリーニングされる末端塩基を黄色で強調している。

【００５５】
ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）

明細書では、核酸複合体のセンサー核酸鎖の配列に相補的な配列を有するインプット核酸（例．疾患関連細胞をはじめとする標的細胞に特異的な核酸配列）の検出に応答して、組み立てられた不活性化状態から活性化状態に変化し、特定の標的核酸に作用（例．分解又は阻害）できる、条件付きで活性化可能な核酸複合体を説明する。組み立てられた不活性化状態では、核酸複合体のセンサー核酸鎖がＲＮＡｉ二重鎖の酵素プロセシングを阻害し、ＲＮＡｉ活性をスイッチオフ状態に保つ。核酸複合体のセンサー核酸鎖と相補的なインプット核酸鎖が存在する場合、インプット核酸鎖は、トーホールド媒介鎖置換によってコア核酸鎖からのセンサー核酸鎖の解離を誘導することで、核酸複合体を活性化できる。解離は、センサー核酸鎖の３’又は５’末端に形成されたトーホールド（例．センサー核酸鎖の３’末端に形成されたトーホールド）から、インプット核酸鎖とセンサー核酸鎖のオーバーハングとの相補的結合によって開始できる。図４Ａは、センサー鎖とＲＮＡマーカーの塩基対合後の、標的細胞における核酸複合体の活性化を示す模式図である。センサー核酸鎖の除去後、コア核酸鎖の３’及び５’領域は、ヌクレアーゼ（例．エキソヌクレアーゼ）が分解できる３’及び５’オーバーハングとなる。この分解は、化学修飾ヌクレオチド及び／又はエキソヌクレアーゼ切断抵抗部分の存在に起因して、ＲＮＡｉ二重鎖の３’末端及び５’末端で停止し、その結果、活性ＲＮＡｉ二重鎖が、必要に応じて更なるエンド

ヌクレアーゼ処理と、ＲＮＡ誘導サイレシング複合体（ＲＩＳＣ）ロードに提供される。ＲＩＳＣは、ｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡの１つの鎖を組み込み、相補的な標的核酸を認識する鋳型としてｓｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡを使用する、多タンパク質複合体である。標的核酸が特定されると、ＲＩＳＣは、ＲＮａｓｅ（例．アルゴノート）を活性化し、標的核酸を切断により阻害する。一部の態様では、ダイサーは、ＲＮＡｉ二重鎖をＲＩＳＣにローディングするために必要とされない。図４Ｂは、コア核酸鎖からのセンサー核酸鎖の解離とコア核酸鎖オーバーハング分解後の、活性ＲＮＡｉ二重鎖の形成を示す模式図である。

【００５６】

パッセンジャー核酸鎖はその後廃棄され、コア核酸鎖（コア核酸鎖の中央領域）は、ＲＩＣＳに組み込まれる。本明細書で開示する核酸複合体のコア核酸鎖は、ガイド鎖（アンチセンス鎖）としての役割を果たし、標的ＲＮＡと塩基対合するために使用される。パッセンジャー核酸鎖は、コア核酸鎖がＲＩＣＳにロードされる前には保護鎖としての役割を果たす。ＲＩＣＳは、組み込まれたコア核酸鎖を、コア核酸鎖、特にコア核酸鎖の中央領域と相補な配列を有する標的ＲＮＡを認識する鋳型として使用する。標的ＲＮＡに結合すると、ＲＩＣＳの触媒成分であるアルゴノートが活性化され、結合した標的ＲＮＡを分解できる。標的ＲＮＡは分解される可能性があり、また、標的ＲＮＡの翻訳が阻害される可能性がある。

【００５７】

明細書に記載した核酸複合体は、活性化によって、標的細胞中の標的核酸を阻害でき、標的細胞中の標的核酸の発現を低下又は喪失させる。標的細胞は、疾患又は障害に関連付けられる又は関係する細胞である。「関連付けられる」「関係する」は、この明細書では、疾患又は状態の発生が標的細胞の発生に付随して生じるような、細胞と疾患又は状態との関係を指し、この関係には、原因－結果関係及び徴候／症状－疾患関係が含まれるが、これらに限定されるものではない。この明細書で使用する標的細胞は、通常、インプット核酸を検出可能に発現する。

【００５８】

一部の態様では、標的細胞における標的核酸の発現は、約、少なくとも、少なくとも約１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、阻害される。

【００５９】

本明細書では、遺伝子発現の阻害は、標的細胞における標的遺伝子からのタンパク質及び／又はｍＲＮＡ産物のレベルの非存在又は観察可能な減少を指す。阻害の程度は、実施例で示すように標的遺伝子の発現レベルの検査により評価できる。

【００６０】

遺伝子発現、及び／又は標的遺伝子発現の阻害は、タンパク質産物が容易にアッセイされるレポーター又は薬物耐性遺伝子の使用により決定できる。代表的なレポーター遺伝子には、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（ＡＨＡＳ）、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）、βガラクトシダーゼ（ＬａｃＺ）、βグルクロニダーゼ（ＧＵＳ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）、ノパリンシンターゼ（ＮＯＳ）、オクトピンシンターゼ（ＯＣＳ）及びこれらの誘導体が含まれるが、それら

には限定されない。アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシン及びテトラサイクリンに対する耐性を付与する複数の選択可能なマーカーが、利用可能である。遺伝子の発現量の定量によって、核酸複合体で処理されていない細胞又は陰性若しくは陽性対照で処理された細胞と比較して阻害の程度を決定することが可能になる。当業者には明らかであるように、さまざまな生化学技術、例えば、ＲＮＡ溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイによる遺伝子発現モニタリング、抗体結合、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、他のイムノアッセイ及び蛍光活性化細胞解析（ＦＡＣＳ）を利用できる。

【００６１】

一部の態様では、この明細書で開示する核酸複合体は、スイッチング性能の改善及びオフターゲット効果の減少を示す。この明細書で開示する核酸複合体は、核酸複合体が不活性化状態（スイッチオフ状態）の場合に不要なＲＮＡｉ活性を低下でき、インプット核酸鎖の検知によって核酸複合体が活性化された場合にＲＮＡｉ活性を増強できる。

【００６２】

一部の態様では、標的ではない細胞（例．インプット核酸鎖を有さない細胞）での標的核酸の発現は、およそ、最大でも若しくは最大でもおよそ、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、又は、これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲が、阻害される。標的ではない細胞は、標的細胞以外の対象の細胞を含むことができる。

【００６３】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体は、効力を増強し、低濃度でＲＮＡｉ活性を惹起できる。非特異的な、オフターゲット効果及び毒性（例．望ましくない炎症誘発応答）を、低濃度の核酸複合体を使用することにより、最小限に抑えることがでる。

【００６４】

この明細書で開示する核酸複合体の濃度は、態様によって変化することがある。一部の態様では、この明細書で開示する核酸複合体を、およそ、最大でも若しくは最大でもおよそ、０．００１ｎＭ、０．０１ｎＭ、０．０２ｎＭ、０．０３ｎＭ、０．０４ｎＭ、０．０５ｎＭ、０．０６ｎＭ、０．０７ｎＭ、０．０８ｎＭ、０．０９ｎＭ、０．１ｎＭ、０．２ｎＭ、０．３ｎＭ、０．４ｎＭ、０．５ｎＭ、０．６ｎＭ、０．７ｎＭ、０．８ｎＭ、０．９ｎＭ、１．０ｎＭ、１．５ｎＭ、２．０ｎＭ、２．５ｎＭ、３．０ｎＭ、３．５ｎＭ、４．０ｎＭ、４．５ｎＭ、５．０ｎＭ、５．５ｎＭ、６．０ｎＭ、６．５ｎＭ、７．０ｎＭ、７．５ｎＭ、８．０ｎＭ、８．５ｎＭ、９．０ｎＭ、９．５ｎＭ、１０ｎＭ、１１ｎＭ、１２ｎＭ、１３ｎＭ、１４ｎＭ、１５ｎＭ、１６ｎＭ、１７ｎＭ、１８ｎＭ、１９ｎＭ、２０ｎＭ、３０ｎＭ、４０ｎＭ、５０ｎＭ、又は、これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の濃度で提供できる。例えば、この明細書で開示する核酸複合体は、約０．１～１０ｎＭ、好ましくは約０．１～１ｎＭの濃度で提供できる。一部の態様では、この明細書で開示する核酸複合体のトランスフェクション濃度は、約０．１ｎＭ以下である。

【００６５】

明細書に記載した核酸複合体は、低濃度において、持続的で一貫した強力な阻害効果を可能にする。例えば、核酸複合体は、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも３６時間、少なくとも４８時間、少なくとも６０時間、少なくとも７２時間、少なくとも８４時間、又は少なくとも９６時間といった長期間、活性を維持できる。一部の態様では、核酸複合体は、活性を、３０日以下、６０日以下又は９０日以下、維持できる。

【００６６】

化学修飾

明細書に記載した核酸複合体に含まれている核酸鎖（コア核酸鎖、パッセンジャー核酸鎖及び／又はセンサー核酸鎖）は、非標準、修飾ヌクレオチド（ヌクレオチドアナログ）又は非標準、修飾ヌクレオシド（ヌクレオシドアナログ）を含む、非標準、修飾核酸鎖の可能性がある。「ヌクレオチドアナログ」又は「修飾ヌクレオチド」は、天然に存在しないリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含む、１つ以上の修飾（例．化学修飾）を含む非標準ヌクレオチドを指す。「ヌクレオシドアナログ」又は「修飾ヌクレオシド」は、シチジン、ウリジン、アデノシン、グアノシン及びチミジン以外の天然に存在しないヌクレオシドを含む、１つ以上の修飾（例．化学修飾）を含む非標準ヌクレオシドを指す。修飾ヌクレオシドは、リン酸基のない修飾ヌクレオチドである。化学修飾は、１個以上の原子又は部分の、異なる原子又は異なる部分若しくは官能基（例．メチル基、ヒドロキシル基）による置換を含むことができる。

【００６７】

ヌクレオチド／ヌクレオシドのある特定の化学的特性を改変するために、例えば、熱力学的安定性を高めるために、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性（例．エキソヌクレアーゼ抵抗性）を高めるために、並びに／又は、結合特異性を高めてオフターゲット効果を最小限に抑えるために、修飾が行われる。例えば、熱力学的安定性を融解温度T_mの測定に基づいて決定できる。高いT_mは、熱力学的に安定な化学物質に関連している可能性がある。

【００６８】

一部の態様では、修飾は、核酸複合体における核酸鎖のうちの１つ以上を、エキソヌクレアーゼ分解／切断に対して抵抗性にすることができる。「エキソヌクレアーゼ」は、本明細書では、ポリヌクレオチド鎖の末端（エキソ）から一度に１つずつヌクレオチドを切断することにより働くタイプの酵素を示す。３’又は５’末端でホスホジエステル結合を切断する加水分解反応が生じる。３’及び５’エキソヌクレアーゼは、高い効率及び速い動力学的速度で、細胞内のＲＮＡ及びＤＮＡ並びに細胞間の間質腔内及び血漿中のＲＮＡ及びＤＮＡを分解できる。近縁種は、ポリヌクレオチド鎖の中間（エンド）のホスホジエステル結合を切断するエンドヌクレアーゼである。３’及び５’エキソヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼ複合体は、細胞内のＲＮＡ及びＤＮＡ並びに細胞間の間質腔内及び血漿中のＲＮＡ及びＤＮＡを分解できる。「エキソリボヌクレアーゼ」は、本明細書では、ＲＮＡ分子の５’末端又は３’末端のいずれかから末端ヌクレオチドを除去することによりＲＮＡを分解する酵素である、エキソヌクレアーゼリボヌクレアーゼを指す。５’末端からヌクレオチドを除去する酵素は、５’－３’エキソリボヌクレアーゼと呼ばれ、３’末端からヌクレオチドを除去する酵素は、３’－５’エキソリボヌクレアーゼと呼ばれる。

【００６９】

修飾は、リン酸修飾、リボース修飾（糖部分における）及び／又は塩基修飾を含むことができる。この明細書で使用する好ましい修飾ヌクレオチドには、糖修飾及び／又は骨格修飾リボヌクレオチドが含まれる。

【００７０】

一部の態様では、修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖部分の修飾を含むことができる。例えば、ヌクレオチドの2’-ＯＨ基を、Ｈ、ＯＲ、Ｒ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、ＳＨ、ＳＲ、NH_2、ＮＨＲ、NR_2、ＣＯＯＲ又はＯＲから選択される基により置換でき、ここで、Ｒは、置換又は非置換C_1～C_6アルキル、アルケニル、アルキニル、アリールなどである。一部の態様では、ヌクレオチド又はヌクレオシドの2’-ＯＨ基は、2’-Ｏ-メチル基で置換されており、修飾ヌクレオチド又はヌクレオシドは、2'-Ｏ-メチルヌクレオチド又は2'-Ｏ-メチルヌクレオシド（2'-ＯＭｅ）である。2'-Ｏ-メチルヌクレオチド又は2'-Ｏ-メチルヌクレオシドは、2'-Ｏ-メチルアデノシン、2'-Ｏ-メチルグアノシン、2'-Ｏ-メチルウリジン又は2'-Ｏ-メチルシチジンの可能性がある。一部の態様では、ヌクレオチドの2'-ＯＨ基は、フッ素（Ｆ）により置換されており、修飾ヌクレオチド又はヌクレオ

シドは、2'-Ｆヌクレオチド又は2'-Ｆヌクレオシド（2'-デオキシ-2'-フルオロ又は2'-Ｆ）である。2'-Ｆヌクレオチド又は2'-Ｆヌクレオシドは、2'-F-アデノシン、2'-F-グアノシン、2'-F-ウリジン又は2'-F-シチジンの可能性がある。修飾は、他の修飾、例えば、ヌクレオシドアナログホスホロアミダイトも含むことができる。一部の態様では、グリコール核酸が使用できる。

【００７１】

一部の態様では、修飾ヌクレオチドは、例えば、リン酸基の酸素のうちの１個以上を硫黄又はメチル基で置換することによる、ヌクレオチドのリン酸基の修飾を含むことができる。一部の態様では、ヌクレオチドのリン酸基の非架橋酸素のうちの１個以上は、硫黄で置換されている。

【００７２】

一部の態様では、明細書に記載した核酸鎖は、ホスホジエステル結合ではない１つ以上の非標準ヌクレオシド間結合を含む。一部の態様では、明細書に記載した核酸鎖は、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。「ホスホロチオエート結合」（ＰＳ）は、本明細書では、非架橋酸素のうちの１個が硫黄で置換されている、ヌクレオチド間の結合を示す。一部の態様では、２つの非架橋酸素が硫黄で置換されていてもよい（ＰＳ２）。一部の態様では、非架橋酸素のうちの１個が、メチル基で置換されていてもよい。この明細書における「ホスホジエステル結合」は、リン酸が２つの糖を架橋している、ＤＮＡ及びＲＮＡにおける通常の糖リン酸骨格結合を示す。一部の態様では、コア核酸鎖、パッセンジャー核酸鎖及び／又はセンサー核酸鎖における１つ以上のホスホロチオエート結合の導入は、ヌクレアーゼ（例．エンドヌクレアーゼ及び／又はエキソヌクレアーゼ）に対する抵抗性の増大を修飾ヌクレオチドに賦与できる。

【００７３】

一部の態様では、修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドの塩基部分の修飾又は置換を含むことができる。例えば、ウリジン及びシチジン残基は、プソイドウリジン、2-チオウリジン、N6-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、又はウリジン及びシチジン残基の他の塩基アナログで置換されていることがある。アデノシンは、アデノシンの、フーグスティーン面の修飾（例．7-トリアゾロ-8-アザ-7-デアザアデノシン）及び／又はワトソン－クリック面の修飾（例．N2-アルキル-2-アミノプリン）を含むことができる。アデノシンアナログの例には、フーグスティーン又はワトソン－クリック面局在N-エチルピペリジントリアゾール修飾アデノシンアナログ、N-エチルピペリジン7-ＥＡＡトリアゾール（例．7-ＥＡＡ、7-エチニル-8-アザ-7-デアザアデノシン）、及び当業者が特定可能な他のアデノシンアナログも含まれる。シトシンは、当業者が特定可能ないずれの好適なシトシンアナログで置換されていてもよい。例えば、シトシンは、同等の塩基対合忠実度、熱安定性及び高度な蛍光を示す6’-フェニルピロロシトシン（ＰｈｐＣ）で、置換されていることがある。

【００７４】

この明細書で開示する核酸複合体における１以上のヌクレオチドは、ユニバーサル塩基で置換されていることがある。「ユニバーサル塩基」は、天然ヌクレオチドのそれぞれと、ほとんどそれらの間の区別なしに塩基対を形成するヌクレオチドアナログを指す。ユニバーサル塩基の例には、当技術分野で公知の、C-フェニル、C-ナフチル及び他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、並びにニトロアゾール誘導体、例えば、3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール及び6-ニトロインドールが含まれるが、これらには限定されない（例．Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447参照）。

【００７５】

一部の態様では、この明細書で開示する塩基修飾は自然免疫による認識を低下でき、核酸複合体のヌクレアーゼに対する抵抗性を高くできる。この明細書で開示する核酸複合体において使用できる塩基修飾の例は、例えばHuら、Signal Transduction and targeted Therapy 5: 101 (2020)にも記載されており、その内容は全体が参照によりこ

の明細書に組み込まれる。

【００７６】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体に含まれる核酸鎖（コア核酸鎖、パッセンジャー核酸鎖及び／又はセンサー核酸鎖）は、１つ以上のロックド核酸又はそのアナログを含むことができる。代表的なロックド核酸アナログには、例えば、それらの対応するロックドアナログホスホロアミダイト及び当業者には明らかな他の誘導体が含まれる。

【００７７】

本明細書では、「ロックド核酸」（ＬＮＡ）は、修飾ＲＮＡヌクレオチドを示す。ＬＮＡヌクレオチドのリボース部分は、２’炭素と４’炭素を接続する追加の架橋（２’－Ｏ，４’－Ｃメチレン架橋）で修飾されている。架橋は、リボースを３’エンド立体構造に「ロック」してリボフラノース環の柔軟性を制限し、構造を堅固な二環式構造に固定する。ＬＮＡヌクレオチドは、必要な場合いつでも、オリゴヌクレオチドのＤＮＡ又はＲＮＡ塩基と混合できる。この明細書で開示する核酸複合体へのＬＮＡへの組込みは、熱安定性（例．融解温度）、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特異性、並びにアレル判別の精度を高めることができる。ＬＮＡオリゴヌクレオチドは、相補一本鎖ＲＮＡへの及び相補一本鎖又は二本鎖ＤＮＡへのハイブリダイゼーション親和性を示す。ＬＮＡについての追加情報は、例えば、www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/locked-nucleic-acids-faq.htmlに記載されている。一部の態様では、グリコール核酸が使用できる。

【００７８】

明細書に記載した核酸複合体に含まれる核酸鎖（コア核酸鎖、パッセンジャー核酸鎖及び／又はセンサー核酸鎖）は、２’－４’架橋修飾を有する他の化学修飾ヌクレオチド又はヌクレオシドを含むことができる。２’－４’架橋修飾は、ヌクレオチドの２’及び４’炭素を接続する架橋の導入を指す。架橋は、（例えばＬＮＡにおける）２’－Ｏ，４’－Ｃメチレン架橋の可能性がある。架橋は、（例えはエチレン架橋型核酸（ＥＮＡ）中の）２’－Ｏ，４’－Ｃエチレン架橋又は当該技術分野において公知で特定可能な他の化学的結合の場合もある。

【００７９】

明細書に記載した核酸複合体への、ＬＮＡ、その類似体又は２’－４’架橋修飾を有する他の化学修飾ヌクレオチドの導入は、ハイブリダイゼーションの安定性を向上でき、ミスマッチ判別も向上できる。例えば、ＬＮＡ、その類似体、又は２’－４’架橋修飾を有する他の化学修飾ヌクレオチドを有するセンサー核酸鎖を含む核酸複合体の、インプット核酸鎖のマッチとミスマッチとを（例えば、インプット核酸鎖とセンサー核酸鎖との相補的結合で）区別する感度は、向上できる。

【００８０】

核酸複合体の核酸鎖のうちの１つ以上は、鎖の３’及び／又は５’末端と連結した化学的部分を含むことができる。末端部分は、１つ以上のいずれかの好適な末端リンカー又は修飾を含むことができる。例えば、末端部分は、オリゴヌクレオチドと別の分子又は特定の表面を連結させるリンカー（ビオチン、アミノ修飾剤、アルキン、チオール修飾剤、アジド、N-ヒドロキシスクシンイミド及びコレステロール）、色素（例．フルオロフォア又はダーククエンチャー）、フッ素修飾リボース、スペース（例．Ｃ３スペーサー、スペーサー９、スペーサー１８、ｄスペーサー、トリエチレングリコールスペーサー、ヘキサエチレングリコールスペーサー）、クリックケミストリーに関与する部分及び化学修飾（例．アルキン及びアジド）、並びに、抗体、金又は他の金属ナノ粒子、高分子ナノ粒子、デンドリマーナノ粒子、低分子、単鎖又は分枝脂肪酸、ペプチド、タンパク質、アプタマー、並びに他の核酸鎖及び核酸ナノ構造のような、３’及び５’末端を他の化学的部分に結合させるために使用できるリンカー又は末端修飾を含むことができる。末端部分は、検出できる標識、又は一本鎖核酸をヌクレアーゼによる分解から保護するためのブロッカーとして役立つ可能性がある。センサー核酸鎖の末端に結合できる別のリンカー及び末端修飾は、www.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna/oligo-modifications

及びwww.glenresearch.com/browse/labels-and-modifiersに記載されており、その内容は全体が参照によりこの明細書に組み込まれる。

【００８１】

ヌクレオチド及び／又はヌクレオシドの更なる修飾、例えば、Huら（Signal Transduction and targeted Therapy 5: 101 (2020)）に記載されている修飾を、明細書に記載した核酸複合体の１つ以上の鎖に導入することもでき、その内容は全体が参照によりこの明細書に組み込まれる。

【００８２】

リボース修飾

核酸複合体の修飾ヌクレオシドの割合は、態様によって変化することがある。一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８５％、９０％若しくは９５％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載した核酸複合体の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、核酸複合体のヌクレオチドの少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲が、修飾されている（例．非ＤＮＡ及び非ＲＮＡである）。一部の態様では、全ての核酸複合体のヌクレオチドが修飾されている（例．非ＤＮＡ及び非ＲＮＡ）。

【００８３】

核酸複合体の１つ以上の鎖の修飾ヌクレオシドの割合は、態様によって変化することがある。一部の態様では、明細書に記載したコア核酸鎖の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８５％、９０％若しくは９５％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載したコア核酸鎖の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、全てのコア核酸鎖のヌクレオシドが化学修飾されている。

【００８４】

明細書に記載したコア核酸鎖の中央領域内の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８５％、９０％若しくは９５％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載したコア核酸鎖の中央領域内の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。

【００８５】

明細書に記載したコア核酸鎖の５’領域内の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８５％、９０％若しくは９５％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載したコア核酸鎖の５’領域内の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又は

これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、コア核酸鎖の５’領域の全てのヌクレオシドが化学修飾されている。

【００８６】

明細書に記載したコア核酸鎖の３’領域内の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８５％、９０％若しくは９５％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載したコア核酸鎖の３’領域内の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、コア核酸鎖の３’領域の全てのヌクレオシドが化学修飾されている。

【００８７】

明細書に記載したパッセンジャー核酸鎖の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８５％、９０％若しくは９５％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載したパッセンジャー核酸鎖の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖の全てのヌクレオシドが化学修飾されている。

【００８８】

明細書に記載したセンサー核酸鎖の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８５％、９０％若しくは９５％、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、明細書に記載したセンサー核酸鎖の修飾ヌクレオシドの割合は、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、センサー核酸鎖の全てのヌクレオシドが化学修飾されている。

【００８９】

コア核酸鎖、パッセンジャー核酸鎖及びセンサー核酸鎖のうちの１つ以上における修飾ヌクレオシドは、2'-Ｏ-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドを含むことができる。

【００９０】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体内の2'-Ｏ-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％～５０％の可能性があるか、又は、およそこの範囲、少なくともこの範囲、少なくともおよそこの範囲、最大でもこの範囲若しくは最大でもおよそこの範囲の可能性がある。例えば、明細書に記載した核酸複合体内の2'-Ｏ-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、若しくは、これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、

少なくともこれらの割合、少なくともおよそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。

【００９１】

一部の態様では、明細書に記載したコア核酸鎖の2'-O-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％～５０％の可能性があるか、又は、およそこの範囲、少なくともこの範囲、少なくともおよそこの範囲、最大でもこの範囲若しくは最大でもおよそこの範囲の可能性がある。例えば、明細書に記載したコア核酸鎖の2'-O-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、若しくは、これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、少なくともおよそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。

【００９２】

一部の態様では、明細書に記載したパッセンジャー核酸鎖の2'-O-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％～５０％の可能性があるか、又は、およそこの範囲、少なくともこの範囲、少なくともおよそこの範囲、最大でもこの範囲若しくは最大でもおよそこの範囲の可能性がある。例えば、明細書に記載したパッセンジャー核酸鎖の2'-O-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、若しくは、これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、少なくともおよそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。

【００９３】

一部の態様では、明細書に記載したセンサー核酸鎖の2'-O-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％～５０％の可能性があるか、又は、およそこの範囲、少なくともこの範囲、少なくともおよそこの範囲、最大でもこの範囲若しくは最大でもおよそこの範囲の可能性がある。例えば、明細書に記載したセンサー核酸鎖の2'-O-メチルヌクレオシド及び／又は2'-Ｆヌクレオシドの割合は、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、若しくは、これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、少なくともおよそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。

【００９４】

リン酸修飾

明細書に記載した核酸複合体内のヌクレオチドのリン酸修飾の割合は、態様によって変化することがある。一部の態様では、リン酸修飾は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含むか、又はそれである。一部の態様では、コア核酸鎖のホスホロチオエートヌクレオシド間結合の割合は、５％未満、１０％未満、２５％未満、５０％未満、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲である。例えば、コア核酸鎖のホスホロチオエートヌクレオシド間結合の割合は、およそ、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２

１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又は、これらの割合未満若しくはおよそこれらの割合未満である。一部の態様では、コア核酸鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合修飾を含まない。

【００９５】

一部の態様では、コア核酸鎖のホスホジエステルヌクレオシド間結合の割合は、およそ、少なくとも又は少なくともおよそ、５０％、８０％若しくは９５％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲である。例えば、コア核酸鎖のホスホジエステルヌクレオシド間結合の割合は、およそ、少なくとも又は少なくともおよそ、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲である。一部の態様では、コア核酸鎖の全てのヌクレオシド間結合が、ホスホジエステルヌクレオシド間結合である。

【００９６】

一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域の５’末端は、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．１、２又は３のホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域の３’末端は、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．１、２又は３のホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域の５’末端、及びコア核酸鎖の中央領域の３’末端は、独立して、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．１、２又は３のホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、中央領域の５’末端、３’末端又は両者における２又は３ヌクレオシド間のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を除き、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。

【００９７】

一部の態様では、コア核酸鎖の５’コネクターの３’に隣接する１～３のヌクレオチド（例．１、２又は３のヌクレオチド）間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部の態様では、コア核酸鎖の３’コネクターの５’に隣接する１又は２のヌクレオチド間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部の態様では、コア核酸鎖の３’コネクターの３’に隣接する１～３のヌクレオチド（例．１、２又は３のヌクレオチド）間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部の態様では、コア核酸鎖の３’領域は、コア核酸鎖の３’コネクターの３’に隣接する１～３ヌクレオチド（例．１、２又は３のヌクレオチド）間のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を除き、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。一部の態様では、コア核酸鎖の５’領域は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。

【００９８】

一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。パッセンジャー核酸鎖のホスホロチオエートヌクレオシド間結合の割合は、５％未満、１０％未満、２５％未満、５０％未満、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲である。例えば、パッセンジャー核酸鎖のホスホロチオエートヌクレオシド間結合の割合は、およそ、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２

％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又は、これらの割合未満若しくはおよそこれらの割合未満である。

【００９９】

一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖の５’末端は、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．１、２又は３のホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖の３’末端は、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．１、２又は３のホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、パッセンジャー核酸鎖の５’末端、３’末端又は両者における最後の２、３又は４ヌクレオシド間のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を除き、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、パッセンジャー核酸鎖の５’末端における最後の２～３ヌクレオシド間及び３’末端における最後の２～３ヌクレオシド間のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を除き、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。

【０１００】

一部の態様では、センサー核酸鎖は、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。センサー核酸鎖のホスホロチオエートヌクレオシド間結合の割合は、５％未満、１０％未満、２５％未満、５０％未満、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性がある。例えば、センサー核酸鎖のホスホロチオエートヌクレオシド間結合の割合は、及び、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの割合未満若しくはおよそこれらの割合未満である。

【０１０１】

一部の態様では、センサー核酸鎖の５’末端は、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．１、２又は３のホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。一部の態様では、センサー核酸鎖の３’末端は、少なくとも１つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．１～２０のホスホロチオエートヌクレオシド間結合）を含む。一部の態様では、センサー核酸鎖の５’末端、及びセンサー核酸鎖の３’末端は、独立して、１つ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間結合（例．５’末端に１、２若しくは３又は３’末端に１～２０）を含む。一部の態様では、センサー核酸鎖は、パッセンジャー核酸鎖の５’末端、３’末端又は両者におけるホスホロチオエートヌクレオシド間結合を除き、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含まない。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖の３’末端におけるホスホロチオエートヌクレオシド間結合は、パッセンジャー核酸鎖の一本鎖オーバーハング内にある。

【０１０２】

ＬＮＡ、その類似体、及び２’－４’架橋修飾

核酸複合体のＬＮＡ又はその類似体の割合は、態様によって変化することがある。一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体のＬＮＡ又はその類似体の割合は、約１０％～５０％の可能性がある。例えば、明細書に記載した核酸複合体のＬＮＡ又はその類似体の割合は、およそ、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、の可能性があるか、又は最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性が

ある。
【０１０３】
核酸複合体の１つ以上の鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、態様によって変化することがある。一部の態様では、明細書に記載したコア核酸鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、５％、１０％若しくは１５％の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載したコア核酸鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。
【０１０４】
一部の態様では、明細書に記載したパッセンジャー核酸鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、５％、１０％若しくは１５％の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。例えば、明細書に記載したパッセンジャー核酸鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。一部の態様では、５％を超える、１０％を超える又は１５％を超える、明細書に記載したパッセンジャー核酸鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、核酸複合体のＲＮＡｉ活性を減少させることができる（実施例１を参照）。
【０１０５】
一部の態様では、明細書に記載したセンサー核酸鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、１０％～５０％の可能性があるか、又は、およそこの範囲、少なくともこの範囲、少なくともおよそこの範囲、最大でもこの範囲若しくは最大でもおよそこの範囲の可能性がある。例えば、明細書に記載したセンサー核酸鎖のＬＮＡ又はその類似体の割合は、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、若しくは、これらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合、少なくともおよそこれらの割合、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。
【０１０６】
核酸複合体の２’－４’架橋修飾の割合は、態様によって変化することがある。一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体の２’－４’架橋修飾の割合は、約１０％～５０％の可能性がある。例えば、明細書に記載した核酸複合体の２’－４’架橋修飾の割合は、およぼ、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、最大でもこれらの割合若しくは最大でもおよそこれらの割合の可能性がある。
【０１０７】
<u>コア鎖</u>
明細書に記載した核酸複合体のコア核酸鎖は、５’領域、３’領域、及び５’領域と３’領域の間の中央領域を含むことができる。５’領域、３’領域及び中央領域のそれぞれは互いに直接隣接でき、つまり、２つの隣接する領域の間にヌクレオチドがない。一部の態様では、５’領域の３’末端は、中央領域の５’末端から、１、２、３、４、５、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しく

は範囲のヌクレオチドで離れている可能性がある。一部の態様では、３’領域の５’末端は、中央領域の３’末端から、１、２、３、４、５、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲のヌクレオチドで離れている可能性がある。

【０１０８】

コア核酸鎖の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、コア核酸鎖は、連結した２０～７０のヌクレオシドを含む。例えば、コア核酸鎖は、連結した２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９又は７０のヌクレオシドを含むことができる。

【０１０９】

コア核酸鎖の中央領域の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、連結した１０～３５のヌクレオシドを含む。例えば、コア核酸鎖の中央領域は、連結した１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４又は３５のヌクレオシドを含むことができる。

【０１１０】

コア核酸鎖の３’領域及び５’領域は、同じ長さにすることも、異なる長さにすることもできる。コア核酸鎖の３’領域及び５’領域の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、コア核酸鎖の３’領域及び５’領域の長さは、連結した２～３３のヌクレオシドを含む。例えば、コア核酸鎖の３’領域及び５’領域は、連結した２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２又は３３のヌクレオシドを含むことができる。一部の態様では、３’領域及び５’領域それぞれは、センサー鎖と塩基対合してセンサー二重鎖を形成する連結した１１のヌクレオチドを含む。

【０１１１】

コア核酸鎖の中央領域は、標的ＲＮＡに相補的な配列を含む。標的ＲＮＡに相補的な配列の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、標的ＲＮＡに相補的な配列の長さは１０～２１ヌクレオチドである。例えば、標的ＲＮＡに相補的な配列の長さは、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０又は２１ヌクレオチドである。一部の態様では、コア核酸鎖は、パッセンジャー鎖と塩基対合してｓｉＲＮＡ二重鎖を形成する、長さ２１ヌクレオチドの中央領域を含む。

【０１１２】

コア核酸鎖の中央領域は、パッセンジャー核酸鎖に相補的な配列を含む。パッセンジャー核酸鎖に相補的な配列の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖に相補的な配列の長さは１９～２５ヌクレオチドである。例えば、パッセンジャー核酸鎖に相補的な配列の長さは、１９、２０、２１、２２、２３、２４又は２５ヌクレオチドである。

【０１１３】

一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、コア核酸鎖の５’領域及び３’領域にコネクターを介して連結している。例えば、コア核酸鎖の中央領域は、コア核酸鎖の５’領域に５’コネクターを介して連結している。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、コア核酸鎖の３’領域に３’コネクターを介して連結している。

【０１１４】

５’コネクター及び／又は３’コネクターは、３炭素リンカー（ｃリンカー）、ヌクレオチド、明細書に記載した修飾ヌクレオチド、又はコア核酸鎖が一本鎖である場合（例．センサー核酸鎖のコア核酸鎖からの解離後）にエキソヌクレアーゼ切断に抵抗できる部分

を含むことができる。例えば、５’コネクター及び／又は３’コネクターは、2'-F-アデノシン、2'-F-グアノシン、2'-F-ウリジン又は2'-F-シチジンといった2'-Ｆヌクレオチドを含むことができる。５’コネクター及び／又は３’コネクターは、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルウリジン又は2'-O-メチルシチジンといった2'-O-メチルヌクレオチドを含むことができる。５’コネクター及び／又は３’コネクターは、天然に存在するヌクレオチド、例えば、シチジン、ウリジン、アデノシン又はグアノシンを含むことができる。コア核酸鎖の５’コネクター及び／又は３’コネクターは、一本鎖形態であるときにエキソヌクレアーゼにより切断可能なホスホジエステル結合（ホスホジエステル５’及び３’接続）を含むことができる。コア核酸鎖の５’コネクター及び／又は３’コネクターは、一本鎖形態であるときにエキソヌクレアーゼ切断に抵抗できるいずれかの好適な部分を含むことができる。

【０１１５】

一部の態様では、５’コネクターは、Ｃ３ ３炭素リンカー、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド（2'-O-メチルヌクレオチド、2'-F-ヌクレオチド）、一本鎖形態であるときにエキソヌクレアーゼにより切断可能なホスホジエステル５’及び３’接続を有するヌクレオチド、又はこれらの組合せを含むことができるか、又は前述のものである。一部の態様では、５’コネクターは、2'-O-メチルヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルウリジン、又は2'-O-メチルシチジンを含むことができるか、又は前述のものである。

【０１１６】

一部の態様では、３’コネクターは、Ｃ３ ３炭素リンカー、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、一本鎖形態であるときエキソヌクレアーゼ切断抵抗性部分、若しくはこれらの組合せを含むことができるか、又は前述のものである。一部の態様では、３’コネクターは、2'-O-メチルヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルウリジン若しくは2'-O-メチルシチジンを含むことができるか、又は前述のものである。

【０１１７】

一部の態様では、３’コネクターは、2'-O-メチルヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルウリジン若しくは2'-O-メチルシチジンを含むか、又はそれであり、５’コネクターは、2'-O-メチルヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルウリジン若しくは2'-O-メチルシチジンを含むか、又はそれである。

【０１１８】

一部の態様では、コア核酸鎖の５’コネクターは、C_3 ３炭素リンカーを含まないか、Ｃ３ ３炭素リンカーではない。一部の態様では、コア核酸鎖の３’コネクターは、C_3 ３炭素リンカーを含むか、C_3 ３炭素リンカーである。一部の態様では、C_3 ３炭素リンカーを５’コネクターとして有さないことが有利である。一部の態様では、C_3 ３炭素リンカーを３’コネクターとして有することが有利である。一部の態様では、コア核酸鎖の５’コネクターは、C_3 ３炭素リンカーを含まないか、C_3 ３炭素リンカーでなく、一方、コア核酸鎖の３’コネクターは、C_3 ３炭素リンカーを含むか、C_3 ３炭素リンカーである。

【０１１９】

一部の態様では、Ｃ３ ３炭素リンカーを５’コネクターとして有さない核酸複合体は、高いＲＮＡ干渉活性を示す（実施例１～２を参照）。核酸複合体は、修飾ヌクレオチド又はヌクレオチドを５’コネクターとして有する可能性がある。核酸複合体は、５’コネクターを有さない可能性がある。核酸複合体は、Ｃ３ ３炭素リンカー、修飾ヌクレオチド又はヌクレオチドを３’コネクターとして有する可能性がある。核酸複合体は、３’コネクターを有さない可能性がある。一部の態様では、Ｃ３ ３炭素リンカーを５’コネクターとして有さないことによって、核酸複合体のＲＮＡ干渉活性が、Ｃ３ ３炭素リンカーを５’コネクターとして有する核酸複合体の、少なくとも約２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍

、８倍、９倍、１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲に、増加する。

【０１２０】

一部の態様では、Ｃ３ ３炭素リンカーを３’コネクターとして有する核酸複合体は、より高いＲＮＡ干渉活性を示す（実施例１～２を参照）。核酸複合体は、修飾ヌクレオチド又はヌクレオチドを５’コネクターとして有する可能性がある。核酸複合体は、５’コネクターを有さない可能性がある。核酸複合体は、Ｃ３ ３炭素リンカーを５’コネクターとして有さない。一部の態様では、Ｃ３ ３炭素リンカーを３’コネクターとして有することによって、核酸複合体のＲＮＡ干渉活性が、修飾ヌクレオチド（例．2'-Ｏ-メチルヌクレオチド）を３’コネクターとして有する核酸複合体の少なくとも約２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲に、増加する。一部の態様では、Ｃ３ ３炭素リンカーを３’コネクターとして有することによって、核酸複合体のＲＮＡ干渉活性が、３’コネクターを有さない核酸複合体の少なくとも約２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲に、増加する。

【０１２１】

一部の態様では、コア核酸鎖は、５’コネクター及び／又は３’コネクターを含まない。その代わりに、コア核酸鎖の中央領域は、標準的なホスホジエステル結合によって３’領域及び／又は５’領域と連結している。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、ホスホジエステル結合によってコア核酸鎖の５’領域と連結している。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、ホスホジエステル結合によってコア核酸鎖の３’領域と連結している。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、ホスホジエステル結合によってコア核酸鎖の３’領域と連結しており、さらに、コア核酸鎖の中央領域は、2'-Ｏ-メチルアデノシン、2'-Ｏ-メチルグアノシン、2'-Ｏ-メチルウリジン又は2'-Ｏ-メチルシチジンといった2'-Ｏ-メチルヌクレオチドによって、コア核酸鎖の５’領域と連結している。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、ホスホジエステル結合によってコア核酸鎖の５’領域と連結しており、さらに、コア核酸鎖の中央領域は、2'-Ｏ-メチルアデノシン、2'-Ｏ-メチルグアノシン、2'-Ｏ-メチルウリジン、又は2'-Ｏ-メチルシチジンといった2'-Ｏ-メチルヌクレオチドによって、コア核酸鎖の３’領域と連結している。一部の態様では、コア核酸鎖の中央領域は、ホスホジエステル結合によってコア核酸鎖の３’領域及び５’領域と連結している。

【０１２２】

代表的な態様では、化学修飾コア鎖は、センサー鎖と塩基対合してセンサー二重鎖を形成する、連結した１１のヌクレオチドの３’領域及び連結した１１のヌクレオチドの５’領域と、パッセンジャー鎖と塩基対合してｓｉＲＮＡ二重鎖を形成する、長さ２１ヌクレオチドの中央領域とを含む可能性がある（例えば図２を参照）。センサー二重鎖とｓｉＲＮＡ二重鎖を接続する５’リンカーは、ホスホジエステル骨格接続を有する2'-Ｏ-メチル修飾塩基からなることができ、３’リンカーはＣ３スペーサーの場合がある。コア鎖は、２つのホスホロチオエート骨格結合で接続された３つの化学修飾塩基からなる５’エキソヌクレアーゼブロックドメインと、３’リンカーとホスホロチオエート骨格結合で接続された３つの化学修飾塩基からなる３’エキソヌクレアーゼブロックドメインとを更に含むことができる。全てのコア鎖のヌクレオチドは、2-Ｏ-メチル化又は2'-Ｆ修飾で化学修飾されている。例えば、図２に示すように、中央領域の５’末端から２、６、１４及び１６番目の塩基は2'-Ｆ修飾されており、コア鎖の残部は2'-Ｏ-メチル化されている。

【０１２３】

一部の態様では、５’コネクター及び／又は３’コネクターを有さないことによって、核酸複合体のＲＮＡ干渉活性が、Ｃ３ ３炭素リンカーを５’コネクターとして有する核酸複合体の少なくとも約２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲に、増加する。

【０１２４】
パッセンジャー核酸鎖
明細書に記載した核酸複合体のパッセンジャー核酸鎖は、コア核酸鎖の中央領域と相補的に結合してＲＮＡｉ二重鎖（例．第１の核酸二重鎖）を形成する。コア核酸鎖の中央領域は、標的核酸鎖に相補的であるので、核酸複合体のパッセンジャー核酸鎖は、標的核酸鎖と相同の配列を含むことができる。
【０１２５】
本明細書では、「相同（の）」又は「相同性」は、少なくとも２つの配列間の配列同一性を指す。２つの核酸又はポリペプチド配列についての用語「配列同一性」又は「同一性」は、指定比較ウィンドウにわたって最大に一致するようにアラインしたときに同じである２つの配列中のヌクレオチド塩基又は残基を指す。
【０１２６】
一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖と標的核酸又はその一部分との配列同一性は、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの割合、少なくともこれらの割合若しくは少なくともおよそこれらの割合の可能性がある。核酸複合体のパッセンジャー核酸鎖は、標的核酸又はその一部分と実質的に同一、例えば、少なくとも８０％、９０％、又は１００％同一、の配列を有する可能性がある。
【０１２７】
パッセンジャー核酸鎖の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、連結した１０～３５のヌクレオシドを含む。例えば、コア核酸鎖は、連結した１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４又は３５のヌクレオシドを含むことができる。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、連結した１７～２１のヌクレオシドを含む。
【０１２８】
一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、ＲＮＡｉ二重鎖に３’オーバーハング、５’オーバーハング又は両者を有する。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は３’オーバーハングを有し、３’オーバーハングの長さは１～５ヌクレオシドである。
【０１２９】
一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖のオーバーハングは、インプット核酸鎖に結合してトーホールドを形成でき、それにより、トーホールド媒介鎖置換を開始し、コア核酸鎖からパッセンジャー核酸鎖を解離する。
【０１３０】
一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖のオーバーハングの長さは５～２０ヌクレオシドである。例えば、パッセンジャー核酸鎖のオーバーハングの長さは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０ヌクレオシドの可能性がある。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖のオーバーハングの長さは９ヌクレオシドである。
【０１３１】
一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖のオーバーハングの１つ以上のヌクレオシド間結合は、オーバーハングを分解から保護できるホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖のオーバーハングの全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合の可能性がある。
【０１３２】
一部の態様では、パッセンジャー核酸鎖は、ＲＮＡｉ二重鎖中に３’オーバーハング、５’オーバーハング又は両者を有さない。一部の態様では、オーバーハングのない平滑末

端を有することにより、パッセンジャー核酸鎖をダイサー結合に好ましくないものとし、それによってダイサー媒介切断を回避できる。

【０１３３】

代表的な態様では、パッセンジャー核酸鎖は完全に化学修飾されており、コア鎖の中央領域と塩基対合してｓｉＲＮＡ複合体を形成する２１のヌクレオチドを含む（例えば図２を参照）。ヌクレアーゼ活性に対する抵抗性を提供するために、パッセンジャー鎖の５’及び３’末端の最初及び最後の２つの骨格結合は、ホスホロチオエートである。パッセンジャー鎖のＲＩＳＣへの組込みに起因する意図しないＲＮＡｉ活性を低下させるために、パッセンジャー鎖の５’末端から９、１０及び１１番目の塩基は、2'-Ｆ修飾されている。（例えば、図４に示すパッセンジャー鎖の５’末端から２番目の塩基の）ＬＮＡ修飾によってｓｉＲＮＡ二重鎖の熱力学的安定性を向上させることができ、ＲＮＡｉスイッチングを向上させることができる。

【０１３４】

センサー核酸鎖

明細書に記載した核酸複合体のセンサー核酸鎖は、コア核酸鎖の５’領域及び３’領域と相補的に結合してセンサー二重鎖（例．第２の核酸二重鎖）を形成する領域を含む。コア核酸鎖の５’領域及び３’領域と相補的に結合する領域の長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、コア核酸鎖の５’領域及び３’領域と相補的に結合する領域は、連結した１０～３５のヌクレオシドを含む。例えば、コア核酸鎖の５’領域及び３’領域と相補的に結合するセンサー核酸鎖内の領域は、連結した１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４又は３５のヌクレオシドを含むことができる。

【０１３５】

センサー核酸鎖は、オーバーハングを含むことができる。オーバーハングは、センサー核酸鎖の３’末端、５’末端又は両者に存在する可能性がある。オーバーハングは、コア核酸鎖とは相補的ではなく、インプット核酸鎖に結合でき、それにより、トーホールド媒介鎖置換を開始し、コア核酸鎖からパッセンジャー核酸鎖を解離する。

【０１３６】

センサー核酸鎖のオーバーハングの長さは、態様によって変化することがある。一部の態様では、オーバーハングの長さは、連結した５～２０のヌクレオチドの可能性がある。例えば、センサー核酸鎖のオーバーハングは、長さ５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０のヌクレオチドを含むことができる。一部の態様では、センサー核酸鎖のオーバーハングの長さは１２ヌクレオチドである。

【０１３７】

センサー核酸鎖のオーバーハングは、塩基対合親和性を改善するために、一本鎖オーバーハングのヌクレアーゼ抵抗性を改善するために、及び鎖の誤ったエキソヌクレアーゼ誘導活性化を回避するための熱力学的安定性を改善するために導入される、ヌクレオチド修飾を含むことができる。代表的な修飾としては、2'-O-メチル修飾、2'-フルオロ修飾、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合、ＬＮＡの組み入れ、及び当業者が特定可能な同様のものが含まれるが、これらには限定されない。一部の態様では、センサー核酸鎖のオーバーハング内のヌクレオシド間結合の少なくとも５０％は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。例えば、センサー核酸鎖のオーバーハング内のヌクレオシド間結合の少なくとも５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はいずれか２つの間の数若しくは範囲は、ホスホロチオエートヌクレオシ

ド間結合である。一部の態様では、センサー核酸鎖のオーバーハング内の全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【０１３８】

一部の態様では、センサー核酸鎖の５’末端及び／又は３’末端には、末端部分を含むことができる。明細書に記載した好適な末端部分が使用できる。一部の態様では、末端部分は、トリ若しくはヘキサエチレングリコールスペーサー、Ｃ３スペーサー、逆方向ｄＴ、アミンリンカー、リガンド（例．標的化リガンド）、フルオロフォア、エキソヌクレアーゼ、脂肪酸、Ｃｙ３、トリエチレングリコールと結合した逆方向ｄＴ、又はこれらの組合せを含むことができる。

【０１３９】

代表的な態様では、センサー鎖は、完全に化学修飾され３１のヌクレオチドからなる（例えば図２参照）。センサー鎖の５’末端から最初の２２のヌクレオチドは、コア鎖の３’及び５’領域と完全に塩基対合してセンサー二重鎖を形成し、５’末端から最後の９のヌクレオチドは、一本鎖状であってセンサートーホールド（オーバーハング）を形成する。３’末端におけるセンサートーホールドは、ヌクレアーゼ活性を低下させるために、及び自己送達のためにタンパク質結合を増加させるために、隣接ヌクレオチド間にホスホロチオエート骨格結合を有する。ヌクレアーゼ活性を更に低下させるために、センサー鎖の５’末端から最初の２個の塩基も、ホスホロチオエート骨格結合で接続している。Ｃ１６パルミチン酸のようなリガンドは、自己送達を改善するためにセンサー鎖と結合できる。リガンドは、センサー鎖のヌクレオチドと結合できる。センサー鎖の５’末端は、ヌクレアーゼ活性に対する抵抗性を改善するためにトリエチレングリコールスペーサーでも修飾できる。

【０１４０】

センサー核酸鎖の配列を、インプット核酸鎖又はその一部分を感知するように設計できる。例えば、インプットバイオマーカーの配列から、インプット鎖に対してアンチセンスである全ての可能性のあるセンサーセグメントのリストを生成できる。ＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴを使用して、標的動物のトランスクリプトームにおけるセンサー配列の独自性をランク付けできる。ヒトがん細胞系については、ＢＬＡＳＴｎアルゴリズムを使用して配列をヒト転写物及びゲノムコレクションに照らしてチェックできる。一部の態様では、既知又は予測ＲＮＡ転写物に対する１７塩基超の配列相補性及び完全オーバーハング相補性を有するセンサーセグメントは、排除されてもよい。センサー核酸鎖の設計の例は、例えば国際公開第2020/033938号に開示されており、その内容は参照によりこの明細書に組み込まれる。

【０１４１】

<u>インプット核酸鎖</u>

明細書に記載したインプット核酸鎖は、核酸複合体におけるセンサー核酸の配列への結合時に核酸複合体（例．ＲＮＡｉ二重鎖）のＲＮＡ干渉活性を活性化（スイッチオン）するためのトリガーとしての役割を果たす。

【０１４２】

インプット核酸鎖は、核酸複合体のセンサー核酸の配列に相補的な配列を含む。インプット核酸鎖とセンサー核酸鎖（例．オーバーハング）との相補的結合は、コア核酸鎖からセンサー核酸鎖を解離し、それにより、パッセンジャー核酸鎖とコア核酸鎖の中央領域で形成されるＲＮＡｉ二重鎖のＲＮＡ干渉活性が活性化される。

【０１４３】

インプット核酸鎖は、一連の標的細胞（例．がん細胞）には比較的高い発現レベルで存在し、一連の標的ではない細胞（例．正常な細胞）には比較的低い発現レベルで存在する細胞ＲＮＡ転写物の可能性がある。一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体は、標的細胞において活性化（スイッチオン）される。標的ではない細胞中にある間、核酸複合体は、不活性状態（スイッチオフ状態）のままである。

【０１４４】

標的細胞において、インプット核酸鎖は、標的ではない細胞におけるレベルの２倍、５倍、１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍若しくは１００倍のレベル、又は、およそこれらのレベル、少なくともこれらのレベル若しくは少なくともおよそレベルで、発現できる。

【０１４５】

標的細胞において、インプット核酸鎖は、５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００転写物のレベルで、又は、およそこれらのレベルで、少なくともこれらのレベルで若しくは少なくともおよそこれらのレベルで、発現できる。一部の態様では、標的ではない細胞において、インプット核酸鎖は、転写物５０個未満、４０個未満、３０個未満、２０個未満、又は１０個未満のレベルで発現される。好ましくは、標的ではない細胞は、インプット核酸鎖の発現を検出できない。

【０１４６】

インプット核酸鎖は、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、長鎖ノンコーディングＲＮＡのようなノンコーディングＲＮＡ、ＲＮＡ断片、又はウイルスのＲＮＡ転写物を含むことができる。一部の態様では、インプット核酸鎖は、疾患の進行を引き起こし、ＲＮＡｉ療法の標的となる細胞において発現されるＲＮＡ転写物である。通常、標的ではない細胞は、標的ＲＮＡのサイレンシングが治療に有益でない副作用を引き起こす可能性がある一連の細胞である。インプットＲＮＡが標的細胞で過剰発現している疾患又は状態を治療するために、核酸複合体は、センサー核酸鎖がインプットＲＮＡ配列に相補的な配列を含むように、設計できる。核酸複合体を投与すると、インプットＲＮＡへのセンサー核酸鎖の結合により、標的細胞でセンサー二重鎖からＲＮＡｉ二重鎖が解離し、疾患又は状態を標的とするＲＮＡｉが活性化する。

【０１４７】

一部の態様では、インプット核酸鎖はバイオマーカーを含む。「バイオマーカー」は、疾患若しくは障害の、疾患若しくは障害に対する感受性の、及び／又は治療薬若しくは他の介入に対する応答の指標である、核酸配列（ＤＮＡ又はＲＮＡ）を指す。バイオマーカーは、遺伝子の発現、機能又は調節を反映できる。インプット核酸鎖は、当技術分野で公知のいずれかの疾患バイオマーカーを含むことができる。

【０１４８】

インプット核酸鎖は、細胞型ｍＲＮＡ又は細胞状態特異的ｍＲＮＡを含む、ｍＲＮＡの可能性がある。細胞型又は細胞状態特異的ｍＲＮＡの例には、Ｃ３、ＧＦＡＰ、ＮＰＰＡ、ＣＳＦ１Ｒ、ＳＬＣ１Ａ２、ＰＬＰ１及びＭＢＰ ｍＲＮＡが含まれるが、これらには限定されない。一部の態様では、インプット核酸鎖は、ｈｓａ－ｍｉｒ－２３ａ－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉｒ－１２４－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉｒ－２９ｂ－３ｐを含むがこれらに限定されない、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）である。一部の態様では、インプット核酸鎖は、ノンコーディングＲＮＡ、例えば、ＭＡＬＡＴ１（転移関連肺腺癌転写物１：metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1）であり、これは、ＮＥＡＴ２（ノンコーディング核濃縮豊富転写物２：noncoding nuclear-enriched abundant transcript 2）としても公知である。

【０１４９】

標的ＲＮＡ

コア核酸鎖の中央領域は、標的特異的ＲＮＡ干渉を方向付けるために標的ＲＮＡに相補的な配列を含む。一部の態様では、標的ＲＮＡは、細胞ＲＮＡ転写物である。標的ＲＮＡは、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ノンコーディングＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ転写物又はこれらの組合せの可能性がある。

【０１５０】

本明細書では、「標的ＲＮＡ」は、その発現をＲＮＡ干渉によって選択的に阻害又はサイレンシングすべきＲＮＡを指す。標的ＲＮＡは、その発現又は活性が疾患、障害又は状態に関連付けられるいずれかの細胞遺伝子又は遺伝子断片を含む標的遺伝子であることがある。標的ＲＮＡは、その発現又は活性が、疾患、障害又はある特定の状態に関連付けら

れる外来の若しくは外因性ＲＮＡ又はＲＮＡ断片（例．ウイルスＲＮＡ転写物又はプロウイルス遺伝子）の可能性がある。

【０１５１】

一部の態様では、標的ＲＮＡは、がん遺伝子、サイトカイニン遺伝子、イディオタイプタンパク質遺伝子（Ｉｄタンパク質遺伝子）、プリオン遺伝子、血管新生を誘導するタンパク質を発現する遺伝子、接着分子、細胞表面受容体、転移及び／若しくは浸潤過程に関与するタンパク質の遺伝子、プロテイナーゼの遺伝子、アポトーシス及び細胞周期を調節するタンパク質の遺伝子、ＥＧＦ受容体を発現する遺伝子、多剤耐性１遺伝子（ＭＤＲ１）、ヒトパピローマウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス若しくはヒト免疫不全ウイルスの遺伝子、心肥大に関与する遺伝子、又はその断片を含むことができる。

【０１５２】

標的ＲＮＡは、アポトーシスに関与するタンパク質をコードする遺伝子を含むことができる。代表的な標的ＲＮＡ遺伝子には、ｂｃｌ－２、ｐ５３、カスパーゼ、細胞傷害性サイトカイン、例えば、ＴＮＦ－α又はＦａｓリガンド、及びアポトーシスを媒介できる当技術分野で公知の多数の他の遺伝子が含まれるが、これらには限定されない。標的ＲＮＡは、細胞増殖に関与する遺伝子を含むことができる。代表的な標的ＲＮＡ遺伝子には、がん遺伝子（例．ＡＢＬＩ、ＢＣＬＩ、ＢＣＬ２、ＢＣＬ６、ＣＢＦＡ２、ＣＢＬ、ＣＳＦＩＲ、ＥＲＢＡ、ＥＲＢＢ、ＥＢＲＢ２、ＥＴＳＩ、ＥＴＳＩ、ＥＴＶ６、ＦＧＲ、ＦＯＳ、ＦＹＮ、ＨＣＲ、ＨＲＡＳ、ＪＵＮ、ＫＲＡＳ、ＬＣＫ、ＬＹＮ、ＭＤＭ２、ＭＬＬ、ＭＹＢ、ＭＹＣ、ＭＹＣＬＩ、ＭＹＣＮ、ＮＲＡＳ、ＰＩＭ Ｉ、ＰＭＬ、ＲＥＴ、ＳＲＣ、ＴＡＬＩ、ＴＣＬ３及びＹＥＳをコードする遺伝子）、並びに腫瘍抑制タンパク質をコードする遺伝子（例．ＡＰＣ、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＭＡＤＨ４、ＭＣＣ、ＮＦＩ、ＮＦ２、ＲＢ Ｉ、ＴＰ５３及びＷＴＩ）が含まれるが、これらには限定されない。標的ＲＮＡは、ヒト主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）遺伝子又はその断片を含むことができる。代表的なＭＨＣ遺伝子には、ＭＨＣクラスＩ遺伝子、例えば、クラスＩ ｃｃ鎖遺伝子についてのＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ若しくはＨＬＡ－Ｃ小領域における遺伝子、又はβ$_2$－ミクログロブリン並びにＭＨＣクラスＩＩ遺伝子、例えば、クラスＩＩ α鎖及びβ鎖遺伝子のＤＰ、ＤＱ及びＤＲ小領域の遺伝子のいずれか（即ち、ＤＰα、ＤＰβ、ＤＱα、ＤＱβ、ＤＲα及びＤＲβ）が含まれる。

【０１５３】

一部の態様では、標的ＲＮＡは、病原体関連タンパク質をコードする遺伝子を含むことができる。病原体関連タンパク質には、宿主の免疫抑制、病原体の複製、病原体の伝播又は感染の維持に関与するウイルスタンパク質、あるいは宿主への病原体の侵入、病原体若しくは宿主による薬物代謝、病原体のゲノムの複製若しくは組込み、宿主における感染の確立若しくは拡大又は次世代の病原体の集合を助長する宿主タンパク質が含まれるが、これらには限定されない。一部の態様では、病原体は、ウイルス（例えば、ヘルペスウイルス（例．単純ヘルペス、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ））、Ｃ型肝炎、ＨＩＶ、ＪＣウイルス）、細菌又は酵母の可能性がある。

【０１５４】

標的ＲＮＡは、中枢神経系（ＣＮＳ）の疾患又は状態に関連付けられる遺伝子を含む。ＣＮＳ疾患又は状態に関連付けられる代表的な遺伝子には、ＡＰＰ、ＭＡＰＴ、ＳＯＤ１、ＢＡＣＥ１、ＣＡＳＰ３、ＴＧＭ２、ＮＦＥ２Ｌ３、ＴＡＲＤＢＰ、ＡＤＲＢ１、ＣＡＭＫ２Ａ、ＣＢＬＮ１、ＣＤＫ５Ｒ１、ＧＡＢＲＡ１、ＭＡＰＫ１０、ＮＯＳ１、ＮＰＴＸ２、ＮＲＧＮ、ＮＴＳ、ＰＤＣＤ２、ＰＤＥ４Ｄ、ＰＥＮＫ、ＳＹＴ１、ＴＴＲ、ＦＵＳ、ＬＲＤＤ、ＣＹＢＡ、ＡＴＦ３、ＡＴＦ６、ＣＡＳＰ２、ＣＡＳＰ１、ＣＡＳＰ７、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ９、ＨＲＫ、Ｃ１ＱＢＰ、ＢＮＩＰ３、ＭＡＰＫ８、ＭＡＰＫ１４、Ｒａｃ１、ＧＳＫ３Ｂ、Ｐ２ＲＸ７、ＴＲＰＭ２、ＰＡＲＧ、ＣＤ３８、ＳＴＥＡＰ４、ＢＭＰ２、ＧＪＡ１、ＴＹＲＯＢＰ、ＣＴＧＦ、ＡＮＸＡ２、ＲＨＯＡ、ＤＵＯＸ１、ＲＴＰ８０１、ＲＴＰ８０１Ｌ、ＮＯＸ４、ＮＯＸ１、ＮＯＸ２（ｇｐ９１ｐｈｏ、ＣＹ

ＢＢ）、ＮＯＸ５、ＤＵＯＸ２、ＮＯＸＯ１、ＮＯＸＯ２（ｐ４７ｐｈｏｘ、ＮＣＦ１）、ＮＯＸＡ１、ＮＯＸＡ２（ｐ６７ｐｈｏｘ、ＮＣＦ２）、ｐ５３（ＴＰ５３）、ＨＴＲＡ２、ＫＥＡＰ１、ＳＨＣ１、ＺＮＨＩＴ１、ＬＧＡＬＳ３、ＨＩ９５、ＳＯＸ９、ＡＳＰＰ１、ＡＳＰＰ２、ＣＴＳＤ、ＣＡＰＮＳ１、ＦＡＳ及びＦＡＳＬＧ、ＮＯＧＯ及びＮＯＧＯ－Ｒ；ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、ＩＬ１ｂＲ、ＭＹＤ８８、ＴＩＣＡＭ、ＴＩＲＡＰ、並びにＨＳＰ４７が含まれるが、これらには限定されない。

【０１５５】

医薬組成物及び投与の方法

組成物

この明細書は、明細書に記載した核酸複合体を１つ以上の相溶性の薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物も提供する。

【０１５６】

明細書に記載した核酸複合体は、構築物の十分な部分が細胞に侵入して遺伝子サイレンシングを誘導することを可能にする手段によって、適切に製剤化し、細胞に導入できる。

【０１５７】

核酸複合体を、送達中の取り込み、分配及び／又は吸収を補助するための、他の分子、分子構造、化合物若しくは薬剤の混合物、又は他の製剤と混合すること、それによって封入すること、それと結合させること、又はそれに付随させることができる。

【０１５８】

「薬学的に許容される」は、正当な医学的判断の範囲内で、過度な毒性、刺激、アレルギー反応又は他の問題や合併症がなく、妥当なベネフィット－リスク比に見合った、人間及び動物の組織と接触して使用することに適している、薬剤、材料、組成物及び／又は剤形を指すためにこの明細書で用いられる。

【０１５９】

「薬学的に許容される担体」は、本明細書では、体の１つの器官又は部分から体の別の器官又は部分に対象化学物質を運ぶこと又は輸送することに関与する、薬学的に許容される材料、組成物又はビヒクル、例えば、液体若しくは固体フィラー、希釈剤、賦形剤、溶媒又は封入材料を意味する。それぞれの担体は、製剤の他の構成成分と相溶性である及び対象にとって有害でないという意味で、「許容される」ものでなければならない。薬学的に許容される担体として役立つ可能性がある材料の一部の例には、（１）糖、例えば、ラクトース、グルコース及びスクロース；（２）デンプン、例えば、トウモロコシデンプン及びバレイショデンプン；（３）セルロース及びその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロース；（４）トラガカント粉末；（５）麦芽；（６）ゼラチン；（７）タルク；（８）賦形剤、例えば、カカオ脂及び坐薬用ワックス；（９）油、例えば、落花生油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及び大豆油；（１０）グリコール、例えば、プロピレングリコール；（１１）ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール；（１２）エステル、例えば、オレイン酸エチル及びラウリン酸エチル；（１３）寒天；（１４）緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム；（１５）アルギン酸；（１６）パイロジェンフリー水；（１７）等張食塩水；（１８）リンゲル液；（１９）エチルアルコール；（２０）リン酸緩衝溶液；並びに（２１）医薬製剤に利用される他の非毒性相溶性物質が含まれる。

【０１６０】

一部の態様では、薬学的に許容される担体は、薬学的に許容される塩を含む。本明細書では、「薬学的に許容される塩」は、明細書に記載した組成物の成分のうちの１つの酸形態のものの塩を含む。これらは、アミンの有機又は無機酸塩を含む。好ましい酸塩は、塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩及びリン酸塩である。他の好適な薬学的に許容される塩は、当業者に周知であり、さまざまな無機及び有機酸の塩基性塩を含む。

【０１６１】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体とともに使用される薬学的に許容される塩としては、（１）カチオン、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、ポリアミン、例えばスペルミン及びスペルミジン、とで形成される塩；（２）無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸等、とで形成される酸付加塩；（３）有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクツロン酸等、とで形成される塩；並びに（４）元素アニオン、例えば、塩素、臭素及びヨウ素、から形成される塩を含むが、これらに限定されない。

【０１６２】

送達ベシクル

さまざまな送達システム、例えば、数ある中でも特に、抗体複合体、ミセル、天然多糖、ペプチド、合成カチオン性ポリマー、微粒子、脂質ベースのナノベクターを、明細書に記載した核酸複合体を送達するために利用できる。

【０１６３】

明細書に記載した核酸複合体の送達に使用される送達システム及び関連賦形剤は、態様によって変化することがある。送達システムは、利用される投与方法、製剤のタイプ、標的部位、及び治療すべき疾患又は障害のタイプに基づいて、組織透過性、細胞取り込みを助長するように、並びに血管外遊出及びエンドソーム脱出を防止するように選択できる。

【０１６４】

一部の態様では、核酸複合体を１つ以上のポリマーとともに製剤化して、核酸複合体と多次元ポリマーネットワークとを含有する超分子複合体を形成できる。ポリマーは、直鎖状であることもあり、又は分枝していることもある。超分子複合体は、いずれかの好適な形態をとることができ、好ましくは粒子の形態である。

【０１６５】

核酸複合体を脂質媒介送達システムによって送達できる。一部の態様では、核酸複合体をリポソームによって封入すること又はリポソームに付随させることができる。例えば、核酸複合体をポリカチオン縮合剤で縮合させ、低イオン強度水性媒体に懸濁させ、カチオン性リポソームをカチオン性小胞形成性脂質から形成できる。

【０１６６】

本明細書では、「リポソーム」は、１つ以上の脂質二重層で通常は形成されている外側の脂質シェルを有し、それによって水性内部が封入されている、脂質小胞を指す。一部の態様では、リポソームは、約２０～８０モルパーセントがカチオン性小胞形成性脂質で構成されており、残部が中性小胞形成性脂質及び／又は他の成分である、カチオン性リポソームである。本明細書では、「小胞形成性脂質」は、疎水性及び極性頭部基部分を有し、それによって水中で自発的に二層小胞になることができる、いずれかの両親媒性脂質（例．リン脂質）を指す。好ましい小胞形成性脂質は、通常は長さが約１４～２２の炭素原子で不飽和度がさまざまなアシル鎖を有する、リン脂質のようなジアシル鎖脂質である。

【０１６７】

カチオン性小胞形成性脂質は、極性頭部基が、使用可能なｐＨ（例．ｐＨ４～９）で正味正電荷を有する小胞形成性脂質である。その例には、リン脂質（例．ホスファチジルエタノールアミン）、糖脂質（例．カチオン性極性頭部基を有する、セレブロシド及びガングリオシド）、コレステロールアミン及び関連カチオン性ステロール（例．1,2-ジオレイルオキシ-3-(トリメチルアミノ)プロパン（ＤＯＴＡＰ）、N-[1-(2,3-ジテトラデシルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩＥ）、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＯＲＩＥ）、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）、３β[N-(Ｎ’,Ｎ’-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール（ＤＣ－Ｃｈｏｉ）及びジメチルジオクタデシルアンモニ

ウム（ＤＤＡＢ））が含まれる。

【０１６８】

中性小胞形成性脂質は、正味電荷を有さない、又は極性頭部基に負電荷を有する脂質のわずかな割合を含む、小胞形成性脂質である。小胞形成性脂質の例には、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）及びスフィンゴミエリン（ＳＭ）、並びにコレステロール、コレステロール誘導体及び他の非荷電ステロールが含まれる。

【０１６９】

一部の態様では、この明細書で使用する送達システムは、ナノ粒子（ＮＰ）、無機ナノ粒子（例．シリカＮＰ、金ＮＰ、Ｑドット、超常磁性酸化鉄ＮＰ、常磁性ランタニドイオン）及び他のナノ材料、核酸脂質粒子、高分子ナノ粒子、リピドイドナノ粒子（ＬＮＰ）、キトサン及びイヌリンナノ粒子、シクロデキストリンナノ粒子、カーボンナノチューブ、リポソーム、ミセル構造物、カプシド、ポリマー（例．ポリエチレンイミン、アニオン性ポリマー）、ポリマーマトリックス、ヒドロゲル、デンドリマー（例．ポリプロピレンイミン（ＰＰＩ）及びポリアミドアミン（ＰＡＭＡＭ））、核酸ナノ構造物、エキソソーム及びＧａｌＮＡｃ結合メリチン様ペプチド（ＮＡＧ－ＭＬＰ）を含むが、これらに限定されない。一部の態様では、緩衝溶液、例えばリン酸緩衝食塩溶液中で、核酸複合体を製剤化できる。

【０１７０】

一部の実験では、明細書に記載した核酸複合体は、リピドイドナノ粒子（ＬＮＰ）によって送達される。ＬＮＰは、イオン化可能なＬＮＰ、カチオン性ＬＮＰ及び／又は中性ＬＮＰを含むことができる。イオン化可能なＬＮＰは、循環している間はほぼ非荷電であるが、低ｐＨ環境で、例えばエンドソーム及びリソソーム内で、プロトン化される。カチオン性ＬＮＰは、血流中及びエンドソーム又はリソソーム内で恒常的な正電荷を示す。中性ＬＮＰは、循環している間、及びエンドソーム又はリソソーム内で、中性、非荷電である。

【０１７１】

明細書に記載した核酸複合体は、裸で提供でき、又はリガンドと複合化できる。裸のｓｉＲＮＡは、共有結合又は非共有結合のいずれかによりｓｉＲＮＡに付随している送達システムを含有しない、システムを指す。裸の形態で送達する場合、裸のｓｉＲＮＡを、標的部位に、例えば比較的閉じておりヌクレアーゼをほとんど含有しない特定の器官（例．眼）に、局所注入できる。

【０１７２】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体をリガンドと結合（例．融合又は複合化）させてリガンド－ｓｉＲＮＡコンジュゲートを形成でき、このコンジュゲートは、細胞又は組織の表面受容体とリガンドとの特異的認識と相互作用によって、ｓｉＲＮＡを所望の組織及び細胞に輸送できる。一般的な標的化リガンドには、炭水化物、アプタマー、抗体又は抗体断片、ペプチド（例．細胞膜透過性ペプチド、エンドソーム溶解性ペプチド）及び低分子（例．N-アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ））、並びに当業者には明らかであるような他のものが含まれる。

【０１７３】

核酸複合体はアプタマーと結合できる。「アプタマー」は、この明細書では、特定の標的に高い親和性及び特異性で結合する、オリゴヌクレオチド又はペプチド分子を指す。特に、核酸アプタマーは、例えば、in vitro選択の反復ラウンド、即ちＳＥＬＥＸ法によってさまざまな分子標的、例えば、低分子、タンパク質、核酸並びに更には細胞、組織及び生物に結合するように操作された、核酸種を含むことができる。ペプチドアプタマーは、細胞内のタンパク質に特異的に結合し、タンパク質間相互作用に干渉するように設計される、ペプチドである。特に、ペプチドアプタマーは、例えば、酵母ツーハイブリッド（Ｙ２Ｈ）システムから導出される選択戦略に従って得ることができる。アプタマーは、抗体のものに匹敵する分子認識特性を提供するので、バイオテクノロジー及び治療への応用

に有用である。

【０１７４】

一部の態様では、核酸複合体は低分子と結合する。「低分子」は、本明細書では、合成又は生体起源のものである有機化合物であって、モノマー及び／又は一次代謝産物を含むことがあるがポリマーではない有機化合物を示す。一部の態様では、低分子は、タンパク質でも核酸でもない分子であって、内因性である生物学的役割（例．標的の阻害若しくは活性化）若しくは外因性である生物学的役割（例．細胞シグナル伝達）を果たす分子、分子生物学においてツールとして使用される分子、又は医学において薬物として好適である分子を含むことができる。低分子は、天然生体分子とは無関係の場合もある。通常は、低分子は、１ｋｇ／ｍｏｌ未満のモル質量を有する。代表的な低分子には、二次代謝産物（例．アクチノマイシン－Ｄ）、ある特定の抗ウイルス薬（例えば、アマンタジン及びリマンタジン）、催奇形物質及び発がん性物質（例えば、13-酢酸12-ミリスチン酸ホルボール）、天然物（例えば、ペニシリン、モルフィン及びパクリタキセル）、及び当業者により特定可能な更なる分子が含まれる。一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体はＧａｌＮＡｃと結合する。

【０１７５】

特定の細胞型への核酸複合体の標的化における使用に好適なリガンドの例には、上皮がん及び骨髄幹細胞の葉酸受容体に結合できるフォレート、さまざまな細胞のビタミン受容体に結合できる水溶性ビタミン類、ＣＤ４$^{+}$リンパ球のＣＤ４に結合できるリン酸ピリドキサール、肝臓肝細胞及び血管内皮細胞のＬＤＬに結合できるアポリポタンパク質、インスリン受容体に結合できるインスリン、内皮細胞のトランスフェリン受容体に結合できるトランスフェリン、肝臓肝細胞のアシアロ糖タンパク質受容体に結合できるガラクトース、活性化内皮細胞のＥ、Ｐセレクチンに結合できるシアリル－ルイス^{X}、好中球及び白血球のＬセレクチンに結合できるＭａｃ－１、腫瘍上皮細胞のＦｌｋ－１、２に結合できるＶＥＧＦ、腫瘍上皮細胞のＦＧＦ受容体に結合できる塩基性ＦＧＦ、上皮細胞のＥＦＧ受容体に結合できるＥＦＧ、血管内皮細胞の$\alpha_4\beta_1$インテグリンに結合できるＶＣＡＭ－１、血管内皮細胞の$\alpha_L\beta_2$インテグリンに結合できるＩＣＡＭ－１、血管内皮細胞及び活性化血小板の$\alpha_v\beta_3$インテグリンに結合できるＰＥＣＡＭ－１／ＣＤ３１、アテローム性動脈硬化プラークにおける内皮細胞及び平滑筋細胞の$\alpha_v\beta_1$インテグリン及び$\alpha_v\beta_5$インテグリンに結合できるオステオポンチン、腫瘍内皮細胞及び血管平滑筋細胞の$\alpha_v\beta_3$インテグリンに結合できるＲＧＤ配列、又はＣＤ４$^{+}$リンパ球のＣＤ４に結合できるＨＩＶ ＧＰ １２０／４１若しくはＧＰ１２０、並びに当業者に特定可能な他のものが含まれるが、これらには限定されない。

【０１７６】

一部の態様では、明細書に記載した核酸複合体の送達は、標的細胞の少なくとも３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％又はそれより多くが核酸複合体を取り込むような送達である。一部の態様では、約０．１～１０ｎＭ核酸複合体が、標的細胞に送達される。

【０１７７】

製剤

いずれかの好適な医薬製剤を利用できる。一部の態様では、本開示の医薬組成物を、下記に適しているものを含めて、固体又は液体形態での投与のために特別に製剤化してもよい：（１）経口投与、例えば、液剤（水溶液若しくは非水溶液又は水性若しくは非水性懸濁液）錠剤、ボーラス、粉末、顆粒、ペースト；（２）非経口投与、例えば、皮下、皮内若しくは静脈内注入により、例えば、無菌溶液若しくは懸濁液として：（３）局所的適用、例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏若しくはスプレー剤として；（４）膣内に若しくは直腸内に、例えば、ペッサリー、クリーム若しくはフォームとして；又は（５）エアロゾル、例えば、ヒドロゲル組成物を含有する水性エアロゾル、リポソーム調製物若しくは固体粒子として。医薬組成物は、１つ以上の薬学的に許容される担体を含むことができる。

【０１７８】
本開示の方法において有用な製剤は、経口、鼻腔、局所的（頬側及び舌下を含む）、直腸内、膣内、エアロゾル及び／又は非経口投与に好適なものを含む。製剤を単位剤形で提供してもよく、薬学技術分野において周知のいずれの方法で調製してもよい。担体材料と組み合わせて単一剤形を生成できる有効成分の量は、治療する宿主、特定の投与方法に依存して変化する。担体材料と組み合わせて単一剤形を生成できる有効成分の量は、一般に、治療効果を生じさせるＲＮＡｉ構築物の量である。一般に、この量は、有効成分の約１％～約９９％、好ましくは約５％～約７０％、最も好ましくは約１０％～約３０％である。
【０１７９】
経口投与に好適な製剤は、各々が所定量の呼吸脱共役剤を有効成分として含有する、カプセル、カシェー、丸剤、錠剤、トローチ（着香基材、通常はスクロース及びアラビアゴム若しくはトラガントを使用する）、粉末、顆粒の形態、又は水性若しくは非水性液体中の溶液若しくは懸濁液としての形態、又は水中油型若しくは油中水型液体エマルジョンとしての形態、又はエリキシル若しくはシロップとしての形態、又はトローチ剤（不活性基剤、例えば、ゼラチン及びグリセリン、若しくはスクロース及びアラビアゴムを使用する）としての形態、並びに／又はマウスウォッシュ等としての形態であってもよい。核酸複合体組成物をまた、ボーラス、舐剤又はペーストとして投与してもよい。
【０１８０】
経口投与のための固体剤形（カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、粉末、顆粒等）の場合、有効成分は、１つ以上の薬学的に許容される担体、例えば、クエン酸ナトリウム若しくはリン酸水素カルシウム、並びに／又は次のもののうちのいずれかと混合される：（１）フィラー若しくは増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール及び／若しくはケイ酸；（２）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び／若しくはアラビアゴムなど、（３）保湿剤、例えば、グリセリン；（４）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、バレイショ若しくはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム；（５）溶解遅延剤、例えば、パラフィン；（６）吸収促進剤、例えば、第四級アンモニウム化合物；（７）湿潤剤、例えば、アセチルアルコール及びモノステアリン酸グリセリンなど；（８）吸収剤、例えば、カオリン及びベントナイト粘土；（９）滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム及びこれらの混合物；並びに（１０）着色剤。カプセル、錠剤及び丸剤の場合、医薬組成物は、緩衝剤も、含んでいてもよい。同様のタイプの固体組成物をまた、賦形剤、例えばラクトース又は乳糖、並びに高分子量ポリエチレングリコール等を使用する、ゼラチン製軟及び硬カプセル中のフィラーとして利用してもよい。
【０１８１】
錠剤は、必要に応じて１以上の補助構成成分とともに、圧縮又は成形によって製造してもよい。圧縮錠剤を、結合剤（例えば、ゼラチン若しくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存薬、崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウム若しくは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤又は分散剤を使用して調製してもよい。成形錠剤を、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状ペプチド又はペプチドミメティックの混合物を好適な機械で成形することにより作製してもよい。
【０１８２】
特定の対象、組成物及び投与方法で所望の治療応答を達成するのに有効であり、対象に対して毒性がない有効成分の量を得るために、本開示の医薬組成物中の有効成分の実際の投与量を本発明の方法で決定してもよい。
【０１８３】
錠剤、並びに、糖衣錠、カプセル、丸剤及び顆粒のような他の固体剤形には、必要応じて、割線を入れてもよく、腸溶コーティング及び医薬品製剤の技術分野で周知の他のコー

ティングのようなコーティング及びシェルを施してもよい。また、製剤中の有効成分を徐放又は制御放出するために、例えば、所望の放出プロファイルをもたらすためのさまざまな割合のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、リポソーム及び／又はマイクロスフェアを使用して、製剤化してもよい。それらを、例えば、細菌保留フィルターによる濾過により、又は使用直前に滅菌水若しくは他の無菌の注入可能な媒体に溶解できる無菌固体組成物に滅菌剤を配合することで、滅菌してもよい。これらの組成物には、必要に応じて、乳白剤も含めてもよく、また、有効成分を消化管の特定の部分でのみで、又はその部分で優先的に、場合によっては徐々に、放出する組成物であってもよい。使用できる包埋組成物の例には、高分子物質及びワックスが含まれる。有効成分は、必要に応じて上記賦形剤の１つ以上と共に、マイクロカプセル化することができる。

【０１８４】

経口投与のための液体剤形は、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルを含む。有効成分に加えて、液体剤形は、当技術分野において一般に使用されている不活性希釈剤、例えば、水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に、綿実、ラッカセイ、トウモロコシ、胚芽、オリーブ、ヒマシ及びゴマ油）、グリセリン、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにこれらの混合物などを含有してもよい。

【０１８５】

不活性希釈剤の他に、経口組成物は、アジュバント、例えば、湿潤剤、乳化及び懸濁化剤、甘味、着香、着色、芳香及び／又は保存剤も含む可能性がある。

【０１８６】

懸濁液は、有効成分に加えて、懸濁化剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天及びトラガカント、並びにこれらの混合物などを含有してもよい。

【０１８７】

直腸内又は膣内投与のための製剤を坐薬として提供してもよく、この坐薬は、１つ以上の呼吸脱共役剤と、例えば、カカオ脂、ポリエチレングリコール、坐薬用ワックス又はサリチル酸塩を含む１つ以上の適切な非刺激性の賦形剤又は担体とを混合することにより調製してもよく、室温で固体であるが体温では液体であり、それ故、直腸又は膣腔内で融解し、有効成分を放出する。

【０１８８】

膣内投与に好適である製剤は、担体、例えば、当技術分野において適切であることが公知である担体を含有する、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレー製剤も含む。

【０１８９】

ヒドロゲル組成物の局所的又は経皮投与のための剤形は、粉末、スプレー剤、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤を含む。有効成分を、無菌条件下で薬学的に許容される担体と、及び必要とされることがあるいずれかの保存薬、緩衝剤又は噴射剤と、混合してもよい。

【０１９０】

軟膏、ペースト、クリーム及びゲルは、呼吸脱共役剤に加えて、賦形剤、例えば、動物性及び植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク並びに酸化亜鉛、又はこれらの混合物を含有してもよい。

【０１９１】

眼科用製剤、眼軟膏、粉末、溶液（例．点眼剤）等も、この開示の範囲内と考えられる。

【０１９２】
本発明の医薬組成物に利用してもよい適切な水性及び非水性担体の例には、水、エタノール、ポリオール（グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）及びこれらの適切な混合物、植物油、例えばオリーブ油、並びに注入可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルが含まれる。適正な流動性は、例えば、コーティング剤、例えばレシチンの使用により、分散液の場合は必要粒径の維持により、及び界面活性剤の使用により、維持できる。
【０１９３】
これらの組成物はまた、アジュバント、例えば、保存薬、湿潤剤、乳化剤及び分散剤を含有してもよい。微生物の作用の防止を、さまざまな抗菌及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等によって確実にしてもよい。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウム等を組成物に含めることが望ましいこともある。加えて、注入可能な医薬品形態の持続的吸収を、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによってもたらしてもよい。
【０１９４】
明細書に記載した医薬組成物は、核酸複合体の治療有効量を含む。
【０１９５】
「治療有効量」は、本明細書では、所望の治療効果、例えばがん治療、を妥当なベネフィット－リスク比で生じさせるのに有効である、この明細書で開示する核酸複合体の量を意味する。治療有効量は、当業者には理解されるように、構築物の構造、利用される投与経路、標的部位、及び治療すべき特定の疾患又は障害によっても異なる。例えば、投与された臨床治療が、疾患又は障害に関連する測定可能なパラメーターの少なくとも２０％低下があったときに有効と見なされる場合、その疾患又は障害の治療のための構築物の治療有効量は、その測定可能なパラメーターの少なくとも２０％低下を達成するために必要な量である。
【０１９６】
一部の態様では、明細書に記載した医薬組成物は、治療を受けることになる対象（例．動物又はヒト）における標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な好適な投与量で核酸複合体を含む。一部の態様では、核酸複合体の好適な投与量は、１日に対象の体重１ｋｇ当たり０．００１～０．２５ｍｇ、０．０１～２０μｇ、０．０１～１０μｇ、０．１０～５μｇ又は０．１～２．５μｇである。核酸複合体を含む医薬組成物を、１日１回、１日２回、１日３回、又は必要に応じて若しくは医師による処方に応じて、投与できる。明細書に記載した医薬組成物を、一日を通して適切な間隔で投与される２、３、４、５、６以上の分割用量を含む投薬単位で、提供することもできる。投薬単位を、制御された様式で数日にわたって持続的に放出できる単一用量（例．持続又は制御放出製剤を使用する）用に配合することもできる。
【０１９７】
当業者には明らかであるように、明細書に記載した医薬組成物の好適な投薬単位は、細胞培養アッセイから得られるデータから推定でき、さらに、動物実験で得られるデータから決定できる。例えば、明細書に記載した医薬組成物の毒性及び治療効果を、例えば、ＬＤ５０（集団の５０％にとって致死的な用量）及びＥＤ５０（集団の５０％において治療に有効な用量）を決定するための、細胞培養物又は実験動物における標準的な薬学的手順により、決定できる。毒性効果と治療効果との用量比が治療指数であり、それを比ＬＤ５０／ＥＤ５０として表すことができる。治療指数が大きい組成物が好ましい。毒性を最小限に抑えるために、例えば、標的としない細胞の潜在的な損傷を最小限に抑えるために、及び副作用を低下させるために、特定の送達システムと組み合わせた組成物の好適な投与量を選択できる。
【０１９８】
投与
当業者には明らかであるように、明細書に記載した核酸複合体及びその組成物を、いず

れかの好適な投与経路を使用して対象に投与できる。核酸複合体及びその組成物を標的部位に局所投与すること又は全身投与することができる。

【０１９９】

「局所投与」又は「局所的投与」は、本明細書では、組成物を個体と接触させた結果、体内での組成物の位置が局所（イメージングが望まれる特定の組織、器官又は他の体の部分に限られる）となる投与経路を示す。代表的な局所投与経路には、針による特定の組織への注入、消化管への強制投与及びヒドロゲル組成物を含有する溶液の皮膚表面への塗布が含まれる。

【０２００】

「全身投与」は、本明細書では、核酸複合体組成物を個体と接触させた結果、体内での組成物の位置が全身的（即ち、イメージングが望まれる特定の組織、器官又は他の体の部分に限定されない）となる投与経路を示す。全身投与は、経腸及び非経口投与を含む。経腸投与は、物質が消化管経由で投与される全身投与経路であり、経口投与、胃栄養チューブによる投与、十二指腸栄養チューブによる投与、胃瘻造設術、経腸栄養法及び直腸内投与を含むが、これらには限定されない。非経口投与は、物質が消化管以外の経路により投与される全身投与経路であり、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与及び膀胱内注入を含むが、これらには限定されない。

【０２０１】

一部の態様では、投与方法は、エアロゾル送達、経鼻送達、経膣送達、直腸送達、頬側送達、眼内送達、局所送達、局所的送達、大槽内送達、腹腔内送達、経口送達、筋肉内注入、静脈内（ＩＶ）注入、皮下（ＳＣ）注入、結節内注入、腫瘍内注入、腹腔内注入及び／若しくは皮内注入又はこれらの組合せを含むことができる。投与は、部位特異的注入（例．眼内又は脳脊髄液中）の場合もある。

【０２０２】

一部の態様では、投与は、ex vivo形質導入、細胞注入、皮下注入、静脈内注入、髄腔内送達、脳室内注入、皮内注入、硝子体内送達、腫瘍内送達又は局所的適用（例．局所的点眼）の可能性がある。

【０２０３】

投与方法は、標的部位、標的となる細胞／組織の型、及び構築物が製剤化される方法に依存する。一部の態様では、脂質製剤を動物に、例えば、静脈内、筋肉内若しくは腹腔内注入により、経口的に、吸入により、又は当技術分野で公知の他の方法で投与できる。

【０２０４】

一部の態様では、投与は、表皮及び真皮の下の脂肪組織へのＳＣ注入の可能性がある。一部の態様では、ＳＣ投与は、明細書に記載したリガンド結合核酸複合体と関連している可能性がある。一部の態様では、ＳＣ投与は、薬物の血流への放出速度を遅くして、リンパ系に侵入させる可能性があり、取り込みを媒介する細胞受容体のリサイクルに多くの時間を与える。一部の態様では、ＳＣ投与は、迅速かつ容易に投与できる可能性があり、治療の負担が軽減される。

【０２０５】

ＩＶ投与は、例えば、ナノ粒子及び脂質ナノ粒子を用いて製剤化した明細書に記載の核酸複合体に関連している可能性がある。一部の態様では、ＩＶ投与は、肝臓での初回通過代謝を回避でき、血流を介して標的組織への迅速な進入をもたらす。

【０２０６】

<u>標的部位</u>

明細書に記載した組成物は、好適な標的部位に投与できる。標的部位は、in vitro、in vivo、又はex vivoの可能性がある。代表的な標的部位には、初代哺乳動物、細胞、不死化細胞系、腫瘍細胞、幹細胞等を含む、in vitro培養で増殖させた細胞を含むことができる。別の代表的な標的部位には、ex vivo培養での細胞、組織及び器官、個体の体内のin vivoでの細胞、組織、器官又は器官系、例えば、肺、脳、腎臓、肝臓、心臓、中枢神経系、末梢神経系、消化器系、循環系、免疫系、骨格系、感覚系、並びに、当業者が

特定可能な追加の環境が含まれる。

【０２０７】

標的部位は、疾患若しくは障害の部位を含むことでき、又は疾患若しくは障害の部位に近接している可能性がある。疾患又は障害の１つ以上の部位の位置を予め決定できる。疾患又は障害の１つ以上の部位の位置を、この方法中に（例えば．超音波又はＭＲＩといったイメージングに基づく方法により）決定できる。標的部位は、組織、例えば、副腎組織、虫垂組織、膀胱組織、骨、腸管組織、脳組織、乳房組織、気管支、冠状組織、耳組織、食道組織、眼組織、胆嚢組織、生殖器組織、心臓組織、視床下部組織、腎臓組織、大腸組織、腸組織、咽頭組織、肝臓組織、肺組織、リンパ節、口腔組織、鼻組織、膵臓組織、副甲状腺組織、下垂体組織、前立腺組織、直腸組織、唾液腺組織、骨格筋組織、皮膚組織、小腸組織、脊髄、脾臓組織、胃組織、胸腺組織、気管組織、甲状腺組織、尿管組織、尿道組織、軟部及び結合組織、腹膜組織、血管組織並びに／又は脂肪組織などを含むことができる。組織は炎症組織の可能性がある。組織は、（ｉ）グレードＩ、グレードＩＩ、グレードＩＩＩ若しくはグレードＩＶのがん組織；（ｉｉ）転移性がん組織；（ＩＩＩ）混合グレードがん組織；（ｉｖ）サブグレードがん組織；（ｖ）健康な若しくは正常な組織；及び／又は（ｖｉ）がん又は異常組織を含むことができる。一部の態様では、核酸複合体及びその組成物は、投与時にがん組織の血管系に蓄積する。一部の態様では、標的部位は固形腫瘍を含むことができる。

【０２０８】

核酸複合体又はその組成物を投与できる標的部位は、利用する投与方法及び治療すべき疾患又は障害のタイプに応じた態様によって変化することがある。一部の態様では、標的部位は、眼組織、呼吸器系、筋肉、肝臓、中枢神経系、固形腫瘍、造血系、皮膚、眼、胎盤、骨、又は当業者には明らかであるような個体における他の標的部位に関係できる。

【０２０９】

イメージングについての用語「個体」、「対象」又は「患者」は、本明細書では、動物、特に高等動物、特に脊椎動物、例えば、哺乳動物、更に特に人間を含む。

【０２１０】

一部の態様では、対象の標的部位における核酸複合体の濃度の、標的部位外（例．対象の血流、血清又は血漿中）の核酸複合体濃度に対する比は、変化することがある。一部の態様では、対象の標的部位における核酸複合体の濃度の、標的部位外（例．対象の血流、血清又は血漿中）の核酸複合体濃度に対する比は、１：１、１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．５：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２１：１、２２：１、２３：１、２４：１、２５：１、２６：１、２７：１、２８：１、２９：１、３０：１、３１：１、３２：１、３３：１、３４：１、３５：１、３６：１、３７：１、３８：１、３９：１、４０：１、４１：１、４２：１、４３：１、４４：１、４５：１、４６：１、４７：１、４８：１、４９：１、５０：１、５１：１、５２：１、５３：１、５４：１、５５：１、５６：１、５７：１、５８：１、５９：１、６０：１、６１：１、６２：１、６３：１、６４：１、６５：１、６６：１、６７：１、６８：１、６９：１、７０：１、７１：１、７２：１、７３：１、７４：１、７５：１、７６：１、７７：１、７８：１、７９：１、８０：１、８１：１、８２：１、８３：１、８４：１、８５：１、８６：１、８７：１、８８：１、８９：１、９０：１、９１：１、９２：１、９３：１、９４：１、９５：１、９６：１、９７：１、９８：１、９９：１、１００：１、２００：１、３００：１、４００：１、５００：１、６００：１、７００：１、８００：１、９００：１、１０００：１、２０００：１、３０００：１、４０００：１、５０００：１、６０００：１、７０００：１、８０００：１、９０００：１、１００００：１、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの比、少なくともこれらの比、少なくともおよそこれらの比、最大でもこれらの比若しくは最大でもおよそこれらの比の可能性がある。

【０２１１】
標的部位は、標的細胞を含むことができる。標的細胞は、腫瘍細胞（例．固形腫瘍細胞）の可能性がある。一部の態様では、対象の標的部位への明細書に記載した核酸複合体及び／又は組成物の投与によって、標的細胞の少なくとも約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲が、死滅する結果となる。核酸複合体及び／又は組成物の投与後の標的細胞死対非標的細胞死の比は、少なくとも約２：１の可能性がある。一部の態様では、核酸複合体及び／又は組成物の投与後の標的細胞死対非標的細胞死の比は、１：１、１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．５：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２１：１、２２：１、２３：１、２４：１、２５：１、２６：１、２７：１、２８：１、２９：１、３０：１、３１：１、３２：１、３３：１、３４：１、３５：１、３６：１、３７：１、３８：１、３９：１、４０：１、４１：１、４２：１、４３：１、４４：１、４５：１、４６：１、４７：１、４８：１、４９：１、５０：１、５１：１、５２：１、５３：１、５４：１、５５：１、５６：１、５７：１、５８：１、５９：１、６０：１、６１：１、６２：１、６３：１、６４：１、６５：１、６６：１、６７：１、６８：１、６９：１、７０：１、７１：１、７２：１、７３：１、７４：１、７５：１、７６：１、７７：１、７８：１、７９：１、８０：１、８１：１、８２：１、８３：１、８４：１、８５：１、８６：１、８７：１、８８：１、８９：１、９０：１、９１：１、９２：１、９３：１、９４：１、９５：１、９６：１、９７：１、９８：１、９９：１、１００：１、２００：１、３００：１、４００：１、５００：１、６００：１、７００：１、８００：１、９００：１、１０００：１、２０００：１、３０００：１、４０００：１、５０００：１、６０００：１、７０００：１、８０００：１、９０００：１、１００００：１、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲の可能性があるか、又は、およそこれらの比、少なくともこれらの比、少なくともおよそこれらの比、最大でもこれらの比若しくは最大でもおよそこれらの比の可能性がある。

【０２１２】
<u>標的ＲＮＡをモジュレートする方法</u>
この明細書は、明細書に記載した核酸複合体又はその組成物を使用して標的ＲＮＡを調節する方法も提供する。この方法は、標的ＲＮＡを含む細胞を、明細書に記載した核酸複合体と接触させる工程を含むことができる。インプット核酸鎖を検知すると、インプット鎖は、センサー核酸鎖のオーバーハングに結合でき、コア核酸鎖からセンサー核酸鎖を解離し、標的ＲＮＡに相補的な配列を細胞内に放出し、それにより、標的ＲＮＡを調節する。

【０２１３】
細胞を核酸複合体と接触させる工程は、in vitro、in vivo又はex vivoの細胞で実行できる。例えば、細胞は、初代哺乳動物細胞、不死化細胞系、腫瘍細胞、幹細胞等を含む、in vitro培養で増殖させた細胞の可能性がある。細胞は、ex vivo培養での細胞、組織及び器官、個体の体内のin vivoでの細胞、組織、器官又は器官系、例えば、肺、脳、腎臓、肝臓、心臓、中枢神経系、末梢神経系、消化器系、循環系、免疫系、骨格系、感覚系、並びに、当業者が特定可能な追加の環境、を含むことができる。細胞は、疾患細胞又は障害を受けた細胞の可能性がある。細胞は、がん細胞の可能性がある。細胞を核酸複合体と接触させる工程は、in vitro、ex vivo又はin vivo、例えば対象の体内で起こすこともできる。

【０２１４】
<u>疾患又は障害を治療する方法</u>
明細書に記載した核酸複合体又はその組成物を使用して疾患又は状態を治療する方法も

、この明細書で提供する。この方法は、明細書に記載した核酸複合体を、必要とする対象に投与することを含むことができる。インプット核酸鎖を検知すると、インプット核酸鎖は、センサー核酸鎖のオーバーハングに結合でき、コア核酸鎖からセンサー核酸鎖を解離して、標的ＲＮＡに相補的な配列を放出し、それにより、対象における標的ＲＮＡの活性又は標的ＲＮＡからのタンパク質発現を低下させて疾患又は状態を治療する。

【０２１５】

「状態」は、本明細書では、個体の完全な肉体的、精神的及び社会的に健康な様相を伴う標準的な身体状況に適合しない、個体の（全体として又はその部分の１つ以上として）体の身体状況を示す。明細書に記載した状態は、障害及び疾患を含むが、これらに限定されず、「障害」は、体又はその一部分についての機能的異常を伴う生存個体の状態を示し、「疾患」は、体又はその一部分についての正常機能を害する、並びに特徴的な徴候及び症状が通常は現れる、生存個体の状態を示す。

【０２１６】

本明細書では、「治療」、「治療する」は、患者に現れる疾患、障害又は生理的状態に応じて行われる介入を指す。治療の目的は、症状の緩和又は予防、疾患、障害又は状態の進行又は悪化の緩徐化又は停止、及び、疾患、障害又は状態の寛解のうちの１つ以上を含んでいてもよいが、これらに限定されるものではない。「治療する」及び「治療」は、例えば、治療学的治療、予防学的治療、及び対象が障害を発症するリスク又は他のリスク因子を軽減する適用を含む。治療は、障害の完全治癒を必要とせず、症状又は潜在的リスク因子を軽減させる態様を包含する。一部の態様では、「治療」は、治療学的治療と予防学的対策又は予防対策の両者を指す。治療を必要とする者は、疾患又は障害又は望ましくない生理的状態に既に罹患している者はもちろん、疾患又は障害又は望ましくない生理的状態を予防すべき者も含む。本明細書では、「予防」は、後に症状が発現する個体の負担を軽減する活動を指す。これは、一次、二次及び／又は三次予防レベルで行われることがあり、ａ）一次予防は、症状／障害／状態の発症を回避し；ｂ）二次予防は、状態／障害／症状の初期段階の治療を目的とし、したがって、状態／障害／症状の進行及び症状の出現を予防するための介入の機会を増加させるものであり；ｃ）三次予防は、例えば、機能を回復させること及び／又はいずれかの状態／障害／症状若しくは関連する合併症を軽減することにより、既存の状態／障害／症状の悪影響を低減させる。「予防する」は、発症の可能性の１００％消失を必要としない。むしろ、この用語は、発症する可能性が化合物の存在又は方法により低下したことを示す。

【０２１７】

さまざまな疾患及び障害が、この明細書で提供する核酸複合体組成物で治療できる。この明細書で開示する疾患及び障害は、、リンパ腫を伴うＨＩＶ感染症、血友病Ａ、血友病Ｂ、高コレステロール血症、アテローム動脈硬化性心血管疾患、腎機能障害、慢性Ｂ型肝炎、急性間質性ポルフィリン症、非典型溶血性尿毒症症候群、原発性高シュウ酸尿症、遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（ｈＡＴＴＲ）、α１－アンチトリプシン欠損症、肝臓疾患、Ｂ型肝炎、鎌状赤血球症、原発性高シュウ酸尿症、ユーイング肉腫、進行婦人科がん、ステージＩＩＩ／ＩＶ卵巣がん、膵臓がん、進行固形腫瘍、肝細胞がん／肝臓がん、リンパ腫及び白血病、心疾患、心不全、ケロイド、肥厚性瘢痕（hypertrophic cicatrix）、再発性又は治療抵抗性Ｂ細胞リンパ腫、肥厚性瘢痕（hypertrophic scar）、加齢性黄斑変性、網膜瘢痕化、噴門部手術、心肥大、非動脈炎性前部虚血性視神経症、アルポート症候群、ＨＩＶ感染症／ＡＩＤＳ、膵管腺がん／膵臓がん、ドライアイ疾患、並びにさまざまな固形腫瘍を含むが、これらに限定されない。

【０２１８】

一部の態様では、疾患又は状態は、がんの可能性がある。がんは、固形腫瘍、液性腫瘍又はこれらの組合せの可能性がある。明細書に記載した核酸複合体又はその組成物を、腫瘍を含む細胞、組織及び／又は器官に、好適な投与経路で投与できる。例えば、核酸複合体又はその組成物を、腫瘍を含む細胞、組織及び／又は器官に、皮下注入又は腫瘍内送達によって投与できる。

【０２１９】
がんは、結腸がん、直腸がん、腎細胞がん、肝臓がん、非小細胞肺がん、小腸がん、食道がん、黒色腫、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚又は眼内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門部がん、胃がん、精巣がん、子宮がん、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰部がん、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、内分泌系がん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟部組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、小児固形腫瘍、膀胱がん、腎臓又は尿管がん、腎盂がん、中枢神経系（ＣＮＳ）新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、Ｔ細胞リンパ腫、環境誘発性がん、前記がんの組合せ、並びに前記がんの転移性病変からなる群から選択できる。

【０２２０】
がんは、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性白血病、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｂ細胞急性リンパ性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）、Ｔ細胞急性リンパ性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、小細胞型又は大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性状態、ＭＡＬＴリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成及び骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、形質芽球性リンパ腫、形質細胞様樹状細胞新生物、ワルデンストレームマクログロブリン血症、又は前白血病のうちの１つ以上から選択される血液がんの可能性がある。

【０２２１】
この明細書で開示する核酸複合体及び組成物を使用して予防及び／又は治療できるがんの限定するものではない例には、以下のものが含まれる：腎がん；腎臓がん；多形性神経膠芽種；転移性乳がん；乳がん；乳房肉腫；神経線維腫；神経線維腫症；小児腫瘍；神経芽細胞腫；悪性黒色腫；表皮がん；白血病、例えば、これらに限定されないが、急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、例えば、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病、白血病及び骨髄異形成症候群、慢性白血病、例えば、これらに限定されないが、慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ球性白血病、ヘアリー細胞白血病；真性赤血球増加症；リンパ腫、例えば、これらに限定されないが、ホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、例えば、これらに限定されないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌型骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫及び髄外性形質細胞腫；ワルデンストレームマクログロブリン血症；意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症；良性単クローン性免疫グロブリン血症；重鎖病；骨がん及び結合組織肉腫、例えば、これらに限定されないが、骨肉腫、骨髄腫骨疾患、多発性骨髄腫、真珠腫誘発性骨肉腫、骨パジェット病、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟部組織肉腫、血管肉腫（angiosarcoma）（血管肉腫（hemangiosarcoma））、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫及び滑膜肉腫；脳腫瘍、例えば、これらに限定されないが、神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起神経膠腫、非グリア腫瘍、聴神経腫瘍、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽腫及び原発性脳リンパ腫；これらに限定されないが、腺がん、小葉（小細胞）がん、乳管がん、髄様乳がん、粘液性乳がん、乳腺管状がん、乳頭状乳がん、パジェット病（若年性パジェット病を含む）及び症性乳がんを含む、乳がん；副腎がん、例えば、これらに限定されないが、褐色細胞腫及び副腎皮質がん；甲状腺がん、例えば、これらに限定されないが、乳頭状又は濾胞性甲状腺がん、甲状腺髄様がん及び組織非形成性甲状腺がん；膵臓がん、例えば、これらに限定されないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ＶＩＰ産生腫瘍、ソマトスタチン分泌腫瘍及びカルチノイド又は島細胞腫；下垂体がん、例えば、これらに限定されないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症及び尿崩症；眼がん、例えば、これらに限定されないが、眼黒色腫、例えば、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫及び毛様体黒色腫、並びに網膜芽細胞腫；膣がん、例えば、扁平上皮がん、腺がん及び黒色腫

；外陰がん、例えば、扁平上皮がん、黒色腫、腺がん、基底細胞がん、肉腫及びパジェット病；子宮頸がん、例えば、これらに限定されないが、扁平上皮がん及び腺がん；子宮がん、例えば、これらに限定されないが、子宮頸がん及び子宮肉腫；卵巣がん、例えば、これらに限定されないが、卵巣上皮がん、境界腫瘍、胚細胞腫瘍及び間質腫瘍；子宮頸がん；食道がん、例えば、これらに限定されないが、扁平上皮がん、腺がん、腺様嚢胞がん、粘液性類表皮がん、腺扁平上皮がん、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、いぼ状がん及び燕麦細胞（小細胞）がん；胃がん、例えば、これらに限定されないが、腺がん、菌状発育性（ポリープ状）、潰瘍性、表在拡大型、散在拡大型、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫及びがん肉腫；結腸がん；大腸がん、ＫＲＡＳ変異型大腸がん；結腸がん；直腸がん；肝臓がん、例えば、これらに限定されないが、肝細胞がん及び肝芽腫、胆嚢がん、例えば、腺がん；胆管細胞がん、例えば、これらに限定されないが、乳頭状、結節状及びびまん性のもの；肺がん、例えば、ＫＲＡＳ変異型非小細胞肺がん、非小細胞肺がん、扁平上皮がん（類表皮がん）、腺がん、大細胞がん及び小細胞肺がん；肺がん；精巣がん、例えば、これらに限定されないが、胚腫瘍、セミノーマ、未分化、古典的（典型的）、精母細胞性、非セミノーマ、胎児性がん、テラトーマがん、絨毛がん（卵黄嚢腫瘍）、前立腺がん、例えば、これらに限定されないが、アンドロゲン非依存性前立腺がん、アンドロゲン依存性前立腺がん、腺がん、平滑筋肉腫及び横紋筋肉腫；陰茎がん（penal cancers）；口腔がん、例えば、これに限定されないが、扁平上皮がん；基底がん；唾液腺がん、例えば、これらに限定されないが、腺がん、粘液性類表皮がん及び腺様嚢胞がん；咽頭がん、例えば、これらに限定されないが、扁平上皮がん及びいぼ状のもの；皮膚がん、例えば、これらに限定されないが、基底細胞がん、扁平上皮がん及び黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、悪性黒子由来黒色腫、末端性黒子性黒色腫；腎臓がん、例えば、これらに限定されないが、腎細胞がん、腺がん、副腎腫、線維肉腫、（腎盂及び／又は尿管）移行上皮がん；腎がん；ウィルムス腫瘍；並びに膀胱がん、例えば、これらに限定されないが、移行上皮がん、扁平上皮がん、腺がん、がん肉腫。一部の態様では、がんは、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮がん、嚢胞腺がん、気管支原性がん、汗腺がん、皮脂腺がん、乳頭がん又は乳頭状腺がんである。

【０２２２】

一部の態様では、疾患又は障害は、中枢神経系（ＣＮＳ）疾患又は状態の可能性がある。明細書に記載した核酸複合体又はその組成物を、ＣＮＳの細胞、組織及び／又は器官に、いずれかの好適な投与経路を使用して投与できる。例えば、核酸複合体又はその組成物を対象のＣＮＳの細胞、組織及び／又は器官に、髄腔内注入、脳室内注入又は脳内注入によって投与して脳血液関門を通過させることができる。一部の態様では、ＣＮＳの細胞、組織及び／又は器官は、損傷又は炎症細胞、組織又は器官を含む。一部の態様では、ＣＮＳの細胞、組織及び／又は器官は、脳、白質、灰白質、脳幹、小脳、間脳、大脳、脊髄、脳神経、前述のもののいずれかについての細胞、前述のもののいずれかについての組織、又はこれらの組合せを含む。

【０２２３】

一部の態様では、ＣＮＳ疾患は、運動障害、記憶障害、嗜癖、注意欠陥／多動性障害（ＡＤＨＤ）、自閉症、双極性障害、うつ状態、脳炎、癲癇／発作、片頭痛、多発性硬化症、神経変性障害、精神疾患、神経炎症性疾患、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、トゥレット症候群、ジストニア又はこれらの組合せである。一部の態様では、疾患は、神経炎症性疾患である。例えば、神経炎症性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症又はこれらの組合せである。

【０２２４】

キット

この明細書は、１つ以上の明細書に記載した組成物を好適な包装材料の中に、例えば、容器、パック又はディスペンサーの中に含むキットであって、使用説明書、臨床研究の考察、副作用の一覧表等の文書を更に含んでいてもよい、キットも提供する。そのようなキットは、組成物の活性及び／若しくは利点を示す若しくは確証する、並びに／又は投薬、

投与、副作用、薬物の相互作用、若しくは医療提供者にとって有用な他の情報を説明する、情報、例えば、参考文献、添付文書、臨床試験結果、並びに／又はこれらの概要等も含むことができる。そのような情報は、さまざまな研究、例えば、in vivoモデルを含む実験動物を使用する研究及びヒト臨床試験に基づく研究、の結果に基づく可能性がある。キットは、１つ以上明細書に記載した単位用量を含むことができる。組成物は、キット・オブ・パーツの形態の可能性がある。キット・オブ・パーツの場合、この明細書で開示する組成物の１つ以上の成分は、互いに独立して提供され（例．構築物、賦形剤及び／又は希釈剤は、別々の組成物として提供され）、その後、組成物を生成するために（例えば使用者により）用いられる。

【実施例】

【０２２５】

これまでに検討した態様のいくつかの側面を以下の実施例で更に詳しく開示するが、これらの例は、如何なる点においてもこの開示の範囲を限定することを意図するものではない。

【０２２６】

実施例１　<u>Ｃ３リンカーが存在する又は存在しない場合のＲＮＡｉ活性</u>

この実施例は、Ｃ３リンカーを５’及び３’コネクターとして有する又は有さないさまざまなｓｉＲＮＡドメインバリアントのＲＮＡｉ活性を示す。

【０２２７】

新たな構築物のパッセンジャー鎖とコア鎖を組み立てて、新たな構築物のｓｉＲＮＡドメインを形成する。これらのｓｉＲＮＡドメインのさまざまなバリアントのＲＮＡｉ活性を試験する。

【０２２８】

構築物を試験するために、パッセンジャー鎖とコア鎖を１×リン酸緩衝食塩水中で熱アニーリングすることで、ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメントを組み立てた。デュアルルシフェラーゼアッセイにより、ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメントのＲＮＡｉ活性を測定した。リポフェクタミン２０００を使用して、ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメントを、ハンチンチン遺伝子ｓｉＲＮＡ標的配列を有するデュアルルシフェラーゼベクターとともに、ＨＣＴ１１６細胞にコトランスフェクトした。４８時間後、細胞を溶解し、対照として使用したホタルルシフェラーゼと標的配列を有するウミシイタケルシフェラーゼの発光値とを比較することで、標的遺伝子のノックダウンをアッセイした。ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡの組立て、細胞トランスフェクション及びデュアルルシフェラーゼアッセイの方法と手順は、例えば国際公開第2020/033938号に記載されており、その内容は参照により全体がこの明細書に組み込まれる。

【０２２９】

図５Ａ及び図５Ｂに、ＲＮＡｉ活性をこの実施例で決定する２つの代表的核酸複合体構築物の配列を示す。上の核酸複合体構築物は、パッセンジャー鎖ｖ３ｐ１と塩基対合しているコア鎖ｖ３ｃ１を含み、Ｃ３リンカーを５’及び３’コネクターとして使用する。下の核酸複合体構築物は、同じパッセンジャー鎖と塩基対合しているコア鎖ｖ３ｃ５を含み、この場合はＣ３リンカーを５’及び３’コネクターとして使用しない。代わりに、ｖ３ｃ５コア鎖は３’ｍＵコネクターを有し、５’末端にはコネクターがない。

【０２３０】

図６に、この実施例で説明するアッセイで用いる２つの陽性対照核酸複合体構築物（パッセンジャー鎖は、ハンチンチン遺伝子（ＨＴＴ）を標的とするｓｉＲＮＡを含む）の配列を示す。

【０２３１】

図７は、図５に示すｖ３ｃ１コア鎖と組み立て、この実施例で試験する、パッセンジャー鎖が異なるさまざまなｓｉＲＮＡバリアント（Ｖ３Ｐ１、Ｖ３Ｐ２、Ｖ３Ｐ３、Ｖ３Ｐ４、Ｖ３Ｐ５、Ｖ３Ｐ６、Ｖ３Ｐ７、Ｖ３Ｐ８及びＶ３Ｐ９）を示す。ｖ３ｃ１コア鎖は、Ｃ３リンカーを５’及び３’コネクターとして有する。標的タンパク質発現を、３つの濃

度：１０ｎＭ、１ｎＭ及び０．１ｎＭのｓｉＲＮＡバリアントを用いて試験した。図８に、図７に示すｓｉＲＮＡバリアントについての標的タンパク質の発現データを示す。標的タンパク質の少ない発現により、高いＲＮＡｉ活性が示唆される。

【０２３２】

図９は、図５に示すｖ３ｃ５コア鎖と組み立て、この実施例で試験する、パッセンジャー鎖が異なるさまざまなｓｉＲＮＡバリアント（Ｖ３Ｐ１、Ｖ３Ｐ２、Ｖ３Ｐ３、Ｖ３Ｐ４、Ｖ３Ｐ５、Ｖ３Ｐ６、Ｖ３Ｐ７、Ｖ３Ｐ８及びＶ３Ｐ９）を示す。ｖ３ｃ５コア鎖は、Ｃ３リンカーを５’及び３’コネクターとして有さない。代わりに、ｖ３ｃ５コア鎖は、３’ｍＵコネクターを有し、５’末端にコネクターを有さない。標的タンパク質発現を、３つの濃度：１０ｎＭ、１．０ｎＭ及び０．１ｎＭのｓｉＲＮＡバリアントを用いて試験した。図１０に、図９に示すｓｉＲＮＡバリアントについての標的タンパク質発現データを示す。図７～８と同様に、標的タンパク質の少ない発現により、高いＲＮＡｉ活性が示唆される。

【０２３３】

これらのデータは、５’コネクターとしてのＣ３リンカーが、ｓｉＲＮＡドメインのＲＮＡｉ活性を阻害することを示す。さまざまなパッセンジャーバリアント（Ｖ３Ｐ１、Ｖ３Ｐ２、Ｖ３Ｐ３、Ｖ３Ｐ４、Ｖ３Ｐ５、Ｖ３Ｐ６、Ｖ３Ｐ７、Ｖ３Ｐ８及びＶ３Ｐ９）間の標的タンパク質発現データの比較は、ＬＮＡ（例．ＨＴＴ Ｖ３Ｐ８）によるパッセンジャー鎖の広範な修飾がＲＮＡｉ活性を減少できることを示す。

【０２３４】

実施例２　さまざまな５’及び３’コネクターによるＲＮＡｉ活性

この実施例では、コア鎖の異なるバージョンを、同じセンサー（Ｍｉｒ２３センサー１）及びパッセンジャー鎖（パッセンジャー鎖１）を用いて試験して、ＲＮＡｉ活性に対する異なる５’及び３’コネクターの効果を調査した。ＲＮＡｉ活性を二本鎖構築物と三本鎖構築物間でも評価した。

【０２３５】

二本鎖構築物は、活性ｓｉＲＮＡドメインを形成する、コア鎖と塩基対合したパッセンジャー鎖からなる。三本鎖構築物は、３つ全ての鎖：パッセンジャー鎖、コア鎖及びセンサー鎖からなる。

【０２３６】

パッセンジャー鎖とコア鎖を、又はパッセンジャー鎖とコア鎖とセンサー鎖を、１×リン酸緩衝食塩水中で熱アニーリングすることにより、ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメント（二本鎖構築物）及び三本鎖構築物を組み立てた。

【０２３７】

リポフェクタミン２０００を使用して、ハンチンチン遺伝子ｓｉＲＮＡ標的配列を有するデュアルルシフェラーゼベクターによって、異なる濃度（例．０．１ｎＭ、１．０ｎＭ及び１０ｎＭ）でＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメント又は三本鎖構築物をＨＣＴ１１６細胞にコトランスフェクトした。４８時間後、細胞を溶解し、対照として使用したホタルルシフェラーゼと標的配列を有するウミシイタケルシフェラーゼの発光値と比較することにより、標的遺伝子のノックダウンについてアッセイした。ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡの組立て、細胞トランスフェクション及びデュアルルシフェラーゼアッセイについての方法及び手順の例は、例えば、国際出願ＷＯ 2020/033938に記載されている。

【０２３８】

図１１Ａ及び１１Ｂに、この明細書で開示するさまざまな核酸複合体であって、それぞれが、同じパッセンジャー鎖（パッセンジャー鎖１）及びセンサー鎖（Ｍｉｒ２３センサー１）、異なるコア鎖（コア鎖ｖ３ｃ１、コア鎖ｖ３ｃ２、コア鎖ｖ３ｃ３、コア鎖ｖ３ｃ４、コア鎖ｖ３ｃ５及びコア鎖ｖ３ｃ６）を有し、特に、コア鎖に異なる５’及び３’コネクターを有する、核酸複合体の配列を示す。例えば、ＣＡＳｉ １は、５’Ｃ３コネクターと３’Ｃ３コネクターの両者を有する。ＣＡＳｉ ２は、５’Ｃ３コネクターと、３’リンカーとしての2-O-メチル化Ｕとを有する。ＣＡＳｉ ３は、５’リンカーとしての2-O-メ

チル化Ａと、３’Ｃ３コネクターとを有する。ＣＡＳｉ ４は、５’リンカーとしての2-O-メチル化Ａと、３’リンカーとしての2-O-メチル化Ｕとを有する。ＣＡＳｉ ５は、５’リンカーとしてのホスホジエステル骨格結合と、３’リンカーとしての2-O-メチル化Ｕとを有する。ＣＡＳｉ ６は、５’リンカーとしてのホスホジエステル骨格結合と、３’リンカーとしてのホスホロチオエート結合とを有する。

【０２３９】

図１１Ａ及び１１Ｂで示す配列を表１にも示す。

【０２４０】

【表１】

表1 CASi鎖の代表的配列	
mir23センサー	
mir23センサー1	/5Sp9/*mC*+G*mA.+A.mG.mA.+A.mC.mG.+G.mA.+A.mA.mU.+C.mC.mC.+T.mG.mG.+C.mA*mA*+T*mG*mU*+G*+A*+T*/3CholTEG/ （配列番号1）
パッセンジャー鎖	
HTT V3P1	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA （配列番号2）
コア鎖	
CASi 1: V3C1	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG./iSpC3/.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA./iSpC3/.mU*mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU （iSpC3で隔てられた配列番号3、配列番号4及び配列番号5）
CASi 2: V3C2	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG./iSpC3/.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU （iSpC3で隔てられた配列番号6及び配列番号7）
CASi 3: V3C3	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mA.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA./iSpC3/.mU*mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU （iSpC3で隔てられた配列番号8及び配列番号9）
CASi 4: V3C4	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mA.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU （配列番号10）
CASi 5: V3C5	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU （配列番号11）
CASi 6: V3C6	mU.mC.mC.mG.mU.mU.mC.mU.mU.mC.mG.mU*fU*mA.mA.mU.fC.mU.mC.mU.mU.mU.fA.mC.fU.mG.mA.mU.mA.mU.mA.mA*mU*mG.mC.mC.mA.mG.mG.mG.mA.mU.mU （配列番号12）
/Sp9/ = ﾄﾘｴﾁﾚﾝｸﾞﾘｺｰﾙｽﾍﾟｰｻｰ CholTEG = ｺﾚｽﾃﾛｰﾙ-TEG /iSpC3/ = 内部C3ｽﾍﾟｰｻｰ * = ﾎｽﾎﾛﾁｵｴｰﾄ骨格 . = ﾎｽﾎｼﾞｴｽﾃﾙ骨格 mA, mG, mC, mU = 2'-O-ﾒﾁﾙ塩基 +A, +T, +C, +G = ﾛｯｸﾄﾞ核酸(LNA)塩基 fA, fU, fC, fG = 2'-ﾌﾙｵﾛ塩基 NH2 = 第一級アミンリンカー rA, rU, rC, rG = RNA	

【０２４１】

図１２は、全ての複合体が所望どおりに組み立てられていることを示す、さまざまな核酸複合体構築物の非変性ポリアクリルアミドゲル（ＰＡＧＥ）である。レーンは、以下のとおり（左から右へ）：Ｐ１Ｃ１；Ｐ１Ｃ１Ｓ２；Ｐ１Ｃ２；Ｐ１Ｃ２Ｓ２；Ｐ１Ｃ３；Ｐ１Ｃ３Ｓ２；Ｐ１Ｃ４；Ｐ１Ｃ４Ｓ２；Ｐ１Ｃ５；Ｐ１Ｃ５Ｓ２；Ｐ１Ｃ６；Ｐ１Ｃ６Ｓ２；Ｇ１ＲＣ１；Ｇ１ＲＣ１Ｓ２。Ｐ１はパッセンジャー鎖１を示す。

【０２４２】

図１３は、同じパッセンジャー鎖ｖ３ｐ１と異なるコア鎖（Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５及びＣ６）とをそれぞれが有する二本鎖構築物のさまざまな濃度でのＲＮＡｉ活性を示す。パッセンジャー鎖及びコア鎖の配列は、図１１Ａ及び１１Ｂに示した。

【０２４３】

図１４は、図１３の二本鎖構築物（ｓｉＲＮＡ １：Ｃ１；ｓｉＲＮＡ ２：Ｃ２；ｓｉＲＮＡ ３：Ｃ３；ｓｉＲＮＡ ４：Ｃ４；ｓｉＲＮＡ ５：Ｃ５；ｓｉＲＮＡ ６：Ｃ６）と比較した、同じパッセンジャー鎖ｖ３ｐ１と同じセンサー鎖（Ｍｉｒ２３センサー１）と異なるコア鎖（Ｃ１、Ｃ２、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５及びＣ６）とをそれぞれが有する三本鎖構築物（ＣＡＳｉ １、ＣＡＳｉ ２、ＣＡＳｉ ３、ＣＡＳｉ ４、ＣＡＳｉ ５及びＣＡＳｉ ６）の、３つの異なる濃度でのＲＮＡｉ活性を示す。パッセンジャー鎖、センサー鎖及びコア鎖の配列は、図１１Ａ及び１１Ｂ並びに表１に示した。

【０２４４】

これらのデータは、５’ｍＡコネクター及び３’Ｃ３（３炭素リンカー）コネクターを有する、二本鎖及び三本鎖構築物を含む構築物（例．ＣＡＳｉ ３構築物及びｓｉＲＮＡ ３二重鎖）が、最高のＲＮＡｉ活性を有することを示す。ｓｉＲＮＡ ３二重鎖とＣＡＳｉ３構築物間の異なるＲＮＡｉ活性は、ＣＡＳｉの良好なＲＮＡｉ活性スイッチングも示唆している。５’Ｃ３コネクターを有さない、二本鎖及び三本鎖構築物を含む構築物（例えば、Ｃ３、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６）は、５’Ｃ３コネクターを有する構築物（Ｃ１及びＣ２）より高いＲＮＡｉ活性を有する。５’コネクターを有さない構築物（Ｃ５及びＣ６）は、５’コネクター（例えば、ｍＡ）を有するがＣ３リンカーを有さない構築物（Ｃ３及びＣ４）より低いＲＮＡｉ活性を有する。同じコア鎖の場合、三本鎖構築物は、二本鎖構築物より低いＲＮＡｉ活性を有すると一般に予想される。

【０２４５】

実施例３　さまざまなＲＮＡ複合体設計のＲＮＡｉ活性

この実施例では、実験により、図１に示すデザイン１のＲＮＡｉスイッチング及びＲＮＡｉ活性を、この明細書で開示するＲＮＡ複合体設計（例．図１に示すデザイン２）と比較した。Ｖ３Ｃ３ａ及びＶ３Ｃ３ｂは、デザイン２の形態の構築物である。Ｇ１Ｃ１Ｓ１は、デザイン１の形態の構築物である。

【０２４６】

パッセンジャー鎖とコア鎖を、又はパッセンジャー鎖とコア鎖とセンサー鎖を、１×リン酸緩衝食塩水中で熱アニーリングすることにより、ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメント（二本鎖構築物）及び三本鎖構築物を組み立てた。リポフェクタミン２０００を使用して、ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメント（二本鎖構築物）及び三本鎖構築物をＨＣＴ１１６細胞にコトランスフェクトした。ＨＣＴ１１６細胞は、ＣＡＳｉセンサーを活性化する可能性があるＲＮＡバイオマーカー（例．心房性ナトリウム利尿ペプチド（ＡＮＰ）をコードするＮＰＰＡ遺伝子配列）（図１６ではＡｃｔ）又はＣＡＳｉセンサーを活性化しない対照核酸鎖（図１６ではＮｅｇ）を、Ｐｏｌ ＩＩＩプロモーターで駆動される短鎖ＲＮＡ転写物を使用して発現できる。ＨＣＴ１１６細胞は、ＰＰＰ３ＣＡ（カルシニューリン）遺伝子ｓｉＲＮＡ標的配列を有するデュアルルシフェラーゼベクターも有する。カルシニューリンは、カルシウム及びカルモジュリン依存性セリン／トレオニンプロテインホスファターゼであり、心肥大の重要な駆動因子として特定されている。ＡＮＰは心肥大の診断マーカーとして使用されている。したがって、三本鎖ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡ構築物のセンサー鎖を、ＡＮＰ ｍＲＮＡを検出するように設計し、さらに、ｓｉＲＮＡドメイン（例．パッセンジャー鎖）を、カルシニューリンを阻害するように設計する。

【０２４７】
７２時間後、細胞を溶解し、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ（標的配列を有する）の発光値を比較することで標的遺伝子（カルシニューリン）のノックダウンについてアッセイした。
【０２４８】
図１５に、図１に示すデザイン２の形態のコア鎖Ｖ３Ｃ３ａを含む核酸複合体（Ｔ２ ＣＡＳｉ構築物）及び図１に示すデザイン１の形態の核酸複合体（Ｃｏｎｄ－ｓｉＲＮＡ構築物）（下：Ｇ１Ｃ１Ｓ１）の配列を示す。Ｔ２ ＣＡＳｉ及びＣｏｎｄ－ｓｉＲＮＡ鎖の配列を表２に示す。
【０２４９】
【表２】

.表2 設計2のT2 CASi及び設計1のCond-siRNAの配列	
T2 ANP-カルシニューリン CASiのパッセンジャー	
Calc V3P3 パッセンジャー	/5Cy3/*mU*+A*mC.mA.mG.mG.fA.mA.fA.fA.fG.mC.mC.mA.mA.mA.mC.mA.mA*mC*mA （配列番号13）
T2 CASi及びCond-siRNAのセンサー鎖	
ANPセンサー1	/5Sp9/.mC.+T.mU.mC.+A.mC.mC.+A.mC.+C.mU.mC.mU.+C.mA.mG.+T.mG.+G.mC.mA.+A.mU*mG*mC*+G*mA*+C*mC*+A*mA*/3TEGChol/ （配列番号14）
T2 ANP-カルシニューリン CASiのコア鎖	
Rat ANP V3C3a	mA.mG.mG.mU.mG.mG.mU.mG.mA.mA.mG.mA.mU*fG*mU.mU.mG.fU.mU.mU.mG.mG.mC.fU.mU.fU.mU.mC.mC.mU.mG.mU.mA*/iSpC3/*mU*mU.mG.mC.mC.mA.mC.mU.mG.mA.mG （iSpC3で隔てられた配列番号15及び配列番号16）
Cond-siRNAのPPP3CAガイド鎖	
Calc G4	/5Cy3/.+C*+G.rA.rG.rU.rG.rU.rU.rG.rU.mU.rU.mG.mG.mC.rU.mU.rU.rU.rC.mC.mU.mG*mU*mU （配列番号17）
Cond-siRNAのコア鎖	
ANP-Calc コア鎖	mA.mG.mG.mU.mG.mG.mU.mG.mA.mA.mG./iSpC3/.mC*+A*mG.rG.rA.rA.rA.rA.rG.rC.rC.rA.rA.rA.rC.rA.rA.rC.rA.rC.rU.rC*mG./iSpC3/.mA.mU.mU.mG.mC.mC.mA.mU.mU.mG.mA.mG （iSpC3で隔てられた配列番号18、配列番号19及び配列番号20）

【０２５０】
図１６は、元の二本鎖（Ｇ１Ｃ１ ｓｉＲＮＡ）及び三本鎖構築物（Ｇ１Ｃ１Ｓ１）と比較した修飾二本鎖構築物（Ｖ３Ｃ３ａ ｓｉＲＮＡ）及び三本鎖構築物（Ｖ３Ｃ３ａ及びＶ３Ｃ３ｂ）の３つの異なる濃度でのＲＮＡｉ活性を示す。
【０２５１】
これらのデータは、修飾ＣＡＳｉ構築物が、ＲＮＡバイオマーカーの非存在下（Ｎｅｇ）ではより低いＲＮＡｉ活性、及びＲＮＡｉバイオマーカーの存在下（Ａｃｔ）ではより高いＲＮＡｉ活性を示すことを示し、したがって、修飾ＣＡＳｉ構築物のＲＮＡｉ活性が、ＲＮＡバイオマーカーが存在しない場合にはスイッチオフされることを示す。修飾構築物（Ｔ２ ＣＡＳｉ：Ｖ３Ｃ３ａ及びＶ３Ｃ３ｂ）のＲＮＡｉ活性も、元の設計（Ｃｏｎｄ－ｓｉＲＮＡ構築物Ｇ１Ｃ１Ｓ１）と比較して有意に改善された。修飾ＣＡＳｉ ｓｉＲＮＡセグメント（二本鎖構築物、例．Ｖ３Ｃ３ａ ｓｉＲＮＡ）も、元の二本鎖設計（Ｇ１Ｃ１ ｓｉＲＮＡ）と比較して有意に改善されたＲＮＡｉ活性を示す。

【０２５２】
用語法
上述の態様の少なくとも一部では、ある態様で使用する１つ以上の要素を別の態様で相互交換可能に使用することが、そのような置換が技術的に実行できない場合を除き、できる。さまざまな他の省略、追加及び修飾を、請求項記載の主題の範囲から逸脱せずに上記の方法及び構造に加えてもよいことは、当業者には理解される。全てのそのような修飾及び変更は、特許請求の範囲によって規定される主題の範囲に含まれるように意図されている。
【０２５３】
ここでの実質的に如何なる複数形及び／又は単数形の用語の使用に関しても、当業者は、文脈及び／又は用途に適切であるように、複数形を単数形に及び／又は単数形を複数形に言い換えることができる。明確にするために、さまざまな単数形／複数形の置き換えを明示的に示すことがある。本明細書及び特許請求の範囲では、単数形「１つの（ａ、ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」は、明らかに別段の定めがある場合を除き、複数の言及対象を含む。ここでの「又は」へのいずれの言及も、別段の説明がある場合を除き、「及び／又は」を包含するように意図されている。
【０２５４】
一般に、明細書において、特に、特許請求の範囲で使用する用語は、「限定するものではない」という用語として一般に意図されていることは、当業者には理解される（例．「含むこと」は、「含むが、それらに限定されないこと」と解釈すべきであり、「有すること」は、「少なくとも有すること」と解釈すべきであり、「～を含む」は、「～を含むが、それらに限定されない」と解釈すべきである、など）。導入される請求項の記載の特定の数が意図されている場合、そのような意図は、請求項に明示的に記載されることになり、そのような記載がない場合にはそのような意図は存在しないことは、当業者には更に理解される。例えば、理解の補助として、特許請求の範囲は、請求項の記載を導入するための導入語句「少なくとも１つ」及び「１つ以上」の利用を含むことがある。しかし、そのような語句の使用を、不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」による請求項の記載の導入によって、そのような導入される請求項の記載を含むいずれかの特定の請求項が、１つだけのそのような請求項の記載を含む態様に、たとえ同請求項が、導入語句「１つ以上」又は「少なくとも１つ」及び不定冠詞、例えば、「ａ」又は「ａｎ」を含む（例．「ａ」及び／又は「ａｎ」は、「少なくとも１つ」又は「１つ以上」を意味すると解釈すべきである）ときであっても、限定されることを含意すると、解釈すべきでなく；同じことが、請求項の記載を導入するために使用される定冠詞の使用にも言える。加えて、導入される請求項の記載の特定の数が明示的に記載されている場合であっても、そのような記載を、少なくとも記載されている数を意味すると解釈すべきであることは（例．他の修飾語のない「２つの記載」という裸の記載は、少なくとも２つの記載、又は２つ以上の記載を意味する）当業者には理解される。さらに、「Ａ、Ｂ及びＣなどのうちの少なくとも１つ」に類似した慣例が使用される場合、一般に、このような構成は、当業者には慣例（例．「Ａ、Ｂ及びＣのうちの少なくとも１つを有するシステム」は、これらに限定されないが、単独でＡ、単独でＢ、単独でＣ、一緒にＡとＢ、一緒にＡとＣ、一緒にＢとＣ、及び／又は一緒にＡとＢとＣ、などを有するシステムを含む）が理解されるという意味で意図されたものである。「Ａ、Ｂ又はＣなどのうちの少なくとも１つ」に類似した慣例が使用される場合、一般に、このような構成は、当業者には慣例（例．「Ａ、Ｂ又はＣのうちの少なくとも１つを有するシステム」は、これらに限定されないが、単独でＡ、単独でＢ、単独でＣ、一緒にＡとＢ、一緒にＡとＣ、一緒にＢとＣ、及び／又は一緒にＡとＢとＣ、などを有するシステムを含むことになる）が理解されるという意味で意図されたものである。２つ以上の代替用語を示す事実上如何なる離接語及び／又は語句も、本明細書中、特許請求の範囲中又は図面中を問わず、用語のうちの１つ、用語のいずれか又は両者の用語を含む可能性を企図すると解するべきであることは、当業者には更に理解される。例えば、語句「Ａ又はＢ」は、「Ａ」又は「Ｂ」又は「Ａ及びＢ」の可能性を含むと解されることになる。

【０２５５】
加えて、本開示の特徴又は側面が、マーカッシュ群によって記載されている場合、それにより、本開示が、マーカッシュ群のいずれかの個々の要素、又は要素のサブグループに関しても記載されていることは、当業者には理解される。
【０２５６】
当業者には理解されるように、いずれかの及びあらゆる目的で、例えば、明細書を提供する観点で、この明細書で開示されるあらゆる範囲は、それらのいずれかの及びあらゆる可能な部分的範囲及び部分的範囲の組合せも包含する。いずれの収載される範囲も、同範囲が少なくとも二等分、三等分、四等分、五等分、十等分などに分けられることを十分に記載しており、可能にすると、容易に認識できる。限定するものではない例として、ここで論じられるそれぞれの範囲を下３分の１、中３分の１及び上３分の１などに容易に分けることができる。同じく当業者には理解されるように、あらゆる言葉、例えば、「以下」、「少なくとも」、「より多くの」、「未満の」等の言葉は、記載されている数を含み、上で論じたように部分的範囲に後に分けることができる範囲を指す。最後に、当業者には理解されるように、範囲は、それぞれの個々の要素を含む。したがって、例えば、１～３個の物品を有する群は、１、２又は３個の物品を有する群を指す。同様に、１～５個の物品を有する群は、１、２、３、４又は５個の物品を有する群を指す、等々。
【０２５７】
さまざまな側面及び態様をここで開示したが、他の側面及び態様は、当業者には明らかである。ここで開示するさまざまな側面及び態様は、説明を目的としたものであり、限定することを意図したものではなく、真の範囲及び趣旨は、特許請求の範囲によって示される。
【図面】
【図１】

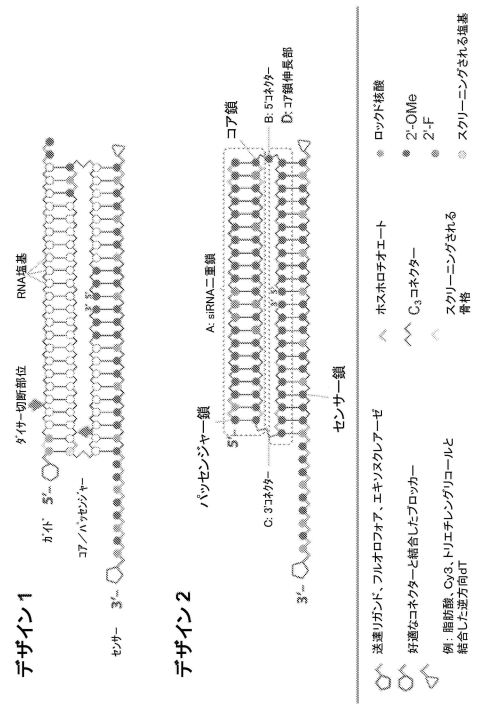


FIG. 1

【図２】

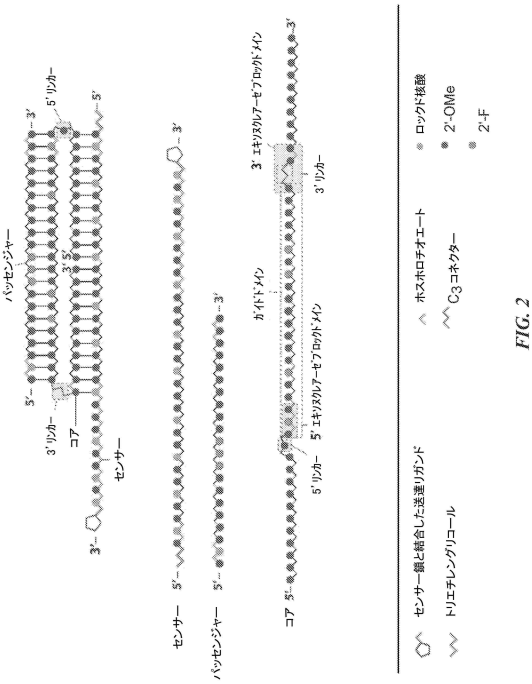


FIG. 2

【図３】

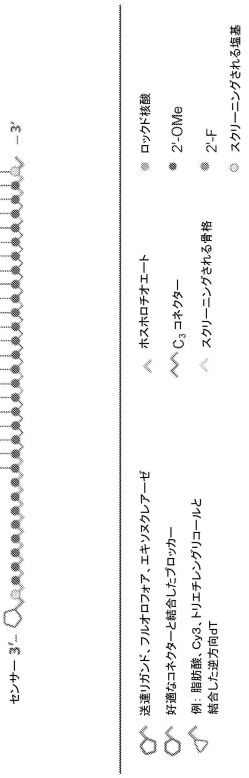


FIG. 3

【図４Ａ】

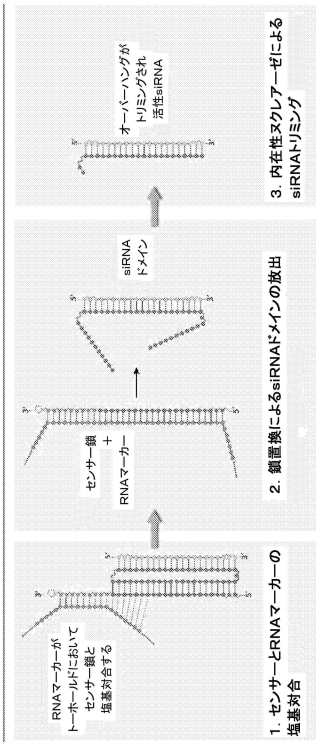


FIG. 4A

【図４Ｂ】

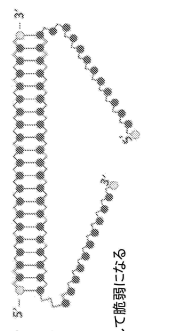


FIG. 4B

【図５Ａ】

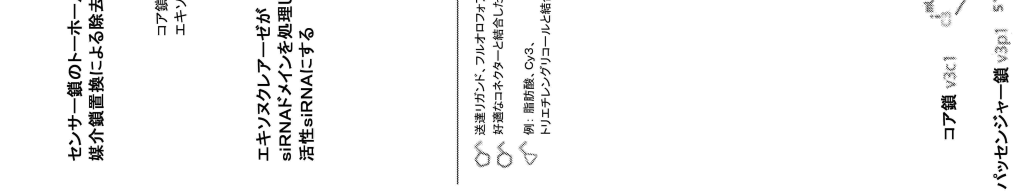


FIG. 5A

【図５Ｂ】



FIG. 5B

【図６】

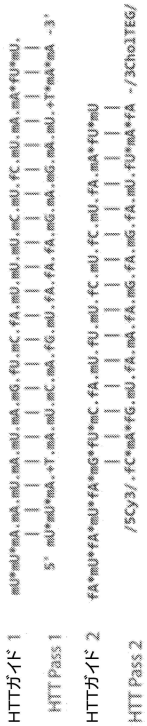


FIG. 6

【図７】

	パリアント3鎖	10 nM	1.0 nM	0.1 nM
siRNA 2	fA*mU*fA*mU*fA*mG*fU*mC.fA.mU.fU.mU.fC.mU.fC.mU.fA.mA*fU*mU /5Cy3/.fC*mA*fG.mU.fA.fA.mA.fA.mG.fA.mU.fU*mA*fA -/3ChoITEG/ （上：配列番号23、下：配列番号24）	0.48%	1.53%	31.87%
パッセンジャー鎖1 siRNA 1	mU*mU*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA （配列番号 22）	1.03%	0.80%	3.50%
HTT V3P1	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA （配列番号 2）	32.47%	53.56%	86.64%
HTT V3P2	/5Cy3/*+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA （配列番号 25）	16.43%	27.19%	78.99%
HTT V3P3	/5Sp9/*+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA （配列番号 26）	33.13%	50.16%	84.28%
HTT V3P4	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA/3InvdT/ （配列番号 27）	25.36%	65.29%	95.21%
HTT V3P5	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA/3Cy3Sp/ （配列番号 28）	13.26%	40.09%	86.44%
HTT V3P6	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA/3Sp9/ （配列番号 29）	27.57%	56.74%	85.55%
HTT V3P7	/5Cy3/*+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA/3InvdT/ （配列番号 30）	22.17%	52.90%	93.93%
HTT V3P8	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.+G.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA （配列番号 31）	92.19%	96.09%	99.78%
HTT V3P9	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.+T.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA （配列番号 32）	22.01%	33.09%	70.07%

FIG. 7

【図８】

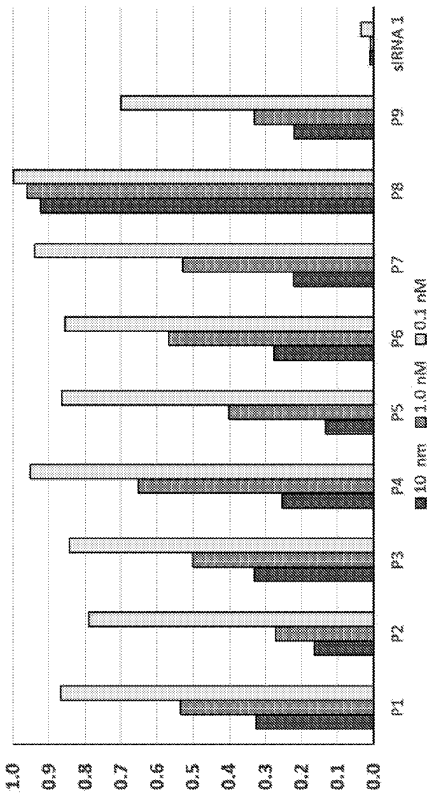


FIG. 8

【図９】

	パリアント-3鎖	10 nM	1.0 nM	0.1 nM
siRNA 2	fA*mU*fA*mU*fA*mG*fU*mC*.fA.mU.fU.mU.fC.mU.fC.mU.fA.mA*fU*mU /5Cy3/.fC*mA*fG.mU.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (上 配列番号23、下 配列番号24)	0.48%	1.53%	31.87%
パッセンジャー鎖1 siRNA 1	mU*mU*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (配列番号 22)	1.03%	0.80%	3.50%
HTT V3P1	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (配列番号 2)	10.87%	1.10%	7.95%
HTT V3P2	/5Cy3/*+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (配列番号 25)	3.04%	1.26%	8.51%
HTT V3P3	/5Sp9/*+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (配列番号 26)	6.42%	0.96%	13.47%
HTT V3P4	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA*/3InvdT/ (配列番号 27)	3.26%	0.75%	7.85%
HTT V3P5	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA*/3Cy3Sp/ (配列番号 28)	4.38%	1.12%	7.92%
HTT V3P6	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA*/3Sp9/ (配列番号 29)	3.77%	0.83%	5.31%
HTT V3P7	/5Cy3/*+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA*/3InvdT/ (配列番号 30)	2.85%	1.01%	11.53%
HTT V3P8	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.mU.fA.fA.fA.+G.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (配列番号 31)	32.01%	3.21%	13.51%
HTT V3P9	+T*+T*mA.+T.mA.mU.mC.mA.fG.+T.fA.fA.fA.mG.mA.mG.mA.mU.+T*mA*mA (配列番号 32)	4.20%	0.97%	4.13%

FIG. 9

【図１０】

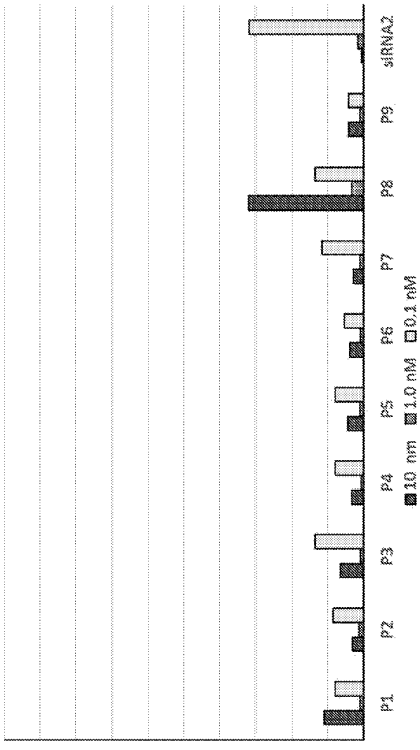


FIG. 10

【図１１Ａ】

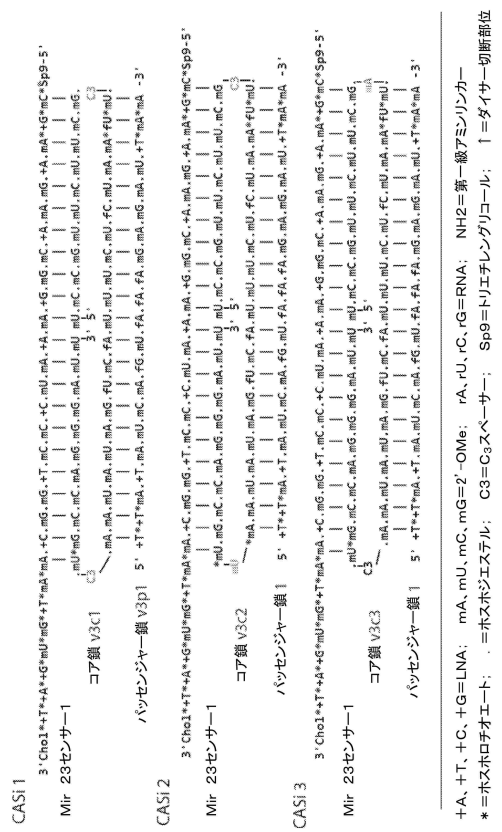


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

FIG. 11B

【図１２】

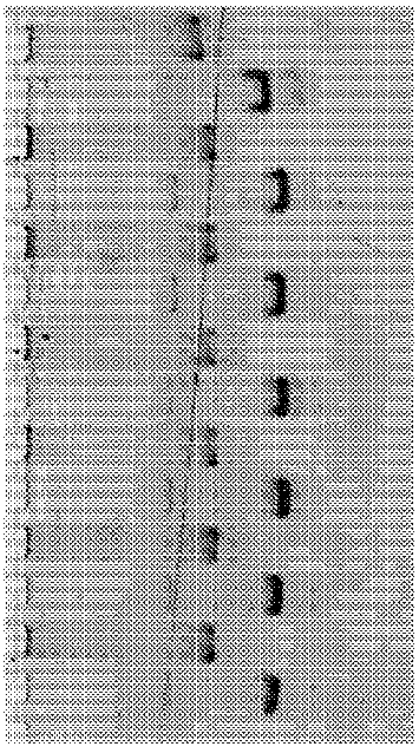


FIG. 12

【図１３】

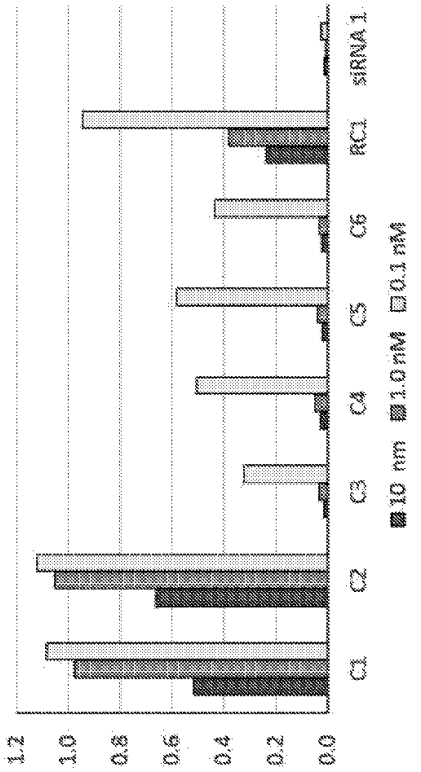


FIG. 13

【図１４】

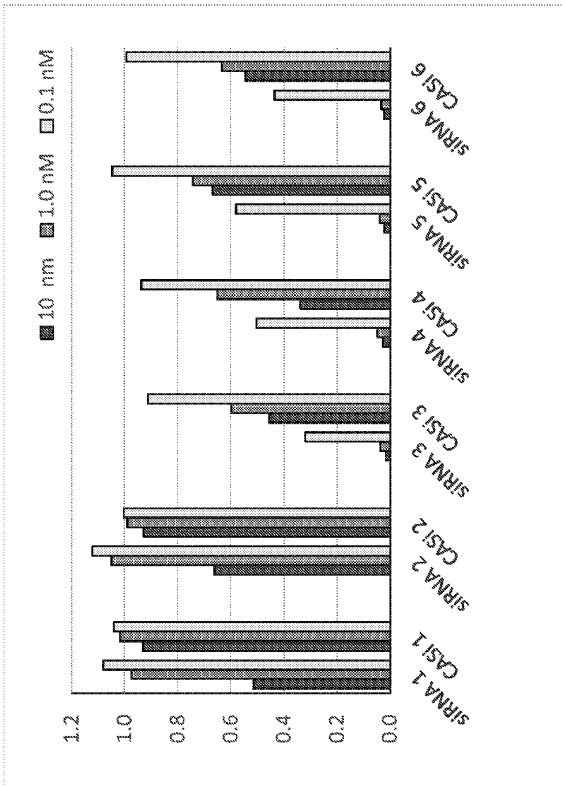


FIG. 14

【図１５】

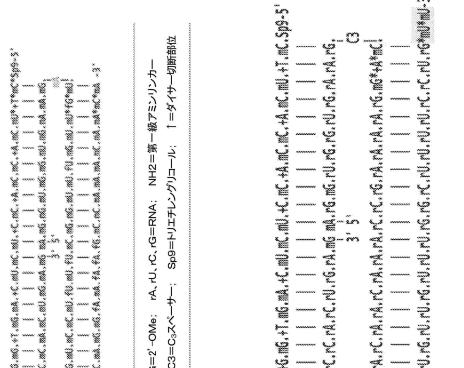


FIG. 15

【図１６】

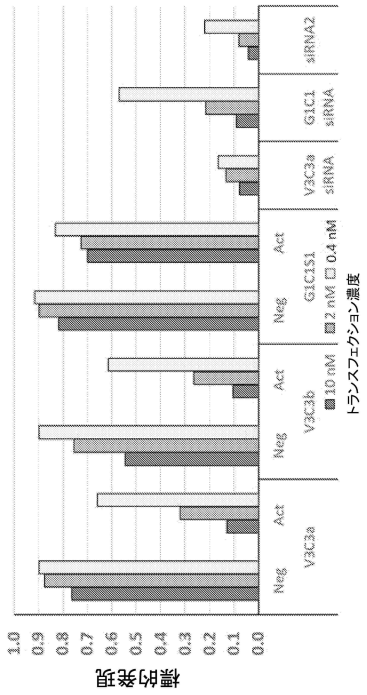


FIG. 16

【配列表】

2024525646000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/73426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 15/113 (2022.01)
ADD. C12N 15/111, C07H 21/00 (2022.01)
CPC - INV. C12N 15/113; C12N 2310/14, C12N 2320/50, C12N 2310/3519
ADD. C12N 15/111
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 data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021/0123060 A1 (CITY OF HOPE) 29 April 2021 (29.04.2021). Especially para [0024], [0025], [0026], [0028], [0031], sheet 21 fig 21, sheet 23 fig 23.	1-3
A	WO 2020/033938 A1 (CITY OF HOPE) 13 February 2020 (13.02.2020). Especially sheet 2 Fig. 1B, sheet 4 Fig. 3A, claims 1, 2, 8	1-3
A	US 2015/0315581 A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 5 November 2015 (05.11.2015). Especially claim 1.	1-3
A	US 2021/0095286 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 1 April 2021 (01.04.2021). Especially claims 1, 2, 3, 7	1-3

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 September 2022	OCT 04 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/73426

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 13ter.1(a)),

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/73426

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.: 4-50
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

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

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

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

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

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）
Ａ６１Ｋ	*9/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/16	
Ａ６１Ｋ	*9/51*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/51	
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	

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,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

４１０９、サン・フランシスコ、パシフィック・アベニュー １９４５、ナンバー３シー

(72)発明者 シェラー、リサ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４１０９、サン・フランシスコ、パシフィック・アベニュー １９４５、ナンバー３シー

Ｆターム（参考） 4C076 AA19 AA29 AA65 AA95 BB13 BB16 CC01 CC27 CC47 DD63 EE30 EE37 EE39 FF16 FF35 FF43 FF68

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA22 MA24 MA28 MA38 MA41 MA66 NA14 ZA02 ZB26