

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6983752号
(P6983752)

(45) 発行日 令和3年12月17日(2021.12.17)

(24) 登録日 令和3年11月26日(2021.11.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)
A 6 1 P 21/02 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 47/28 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 1 3 O Z
A 6 1 K 31/713
A 6 1 P 21/02
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/28

請求項の数 12 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-500697 (P2018-500697)
(86) (22) 出願日 平成28年7月6日(2016.7.6)
(65) 公表番号 特表2018-519835 (P2018-519835A)
(43) 公表日 平成30年7月26日(2018.7.26)
(86) 国際出願番号 PCT/US2016/041095
(87) 国際公開番号 WO2017/007813
(87) 国際公開日 平成29年1月12日(2017.1.12)
審査請求日 令和1年7月8日(2019.7.8)
(31) 優先権主張番号 62/189,050
(32) 優先日 平成27年7月6日(2015.7.6)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73) 特許権者 311001370
フィオ ファーマシューティカルズ コー
ポレーション
Phio Pharmaceutical
s Corp.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
1 7 5 2、マールボロ、シマラーノ ドラ
イブ 2 5 7、スイート 1 0 1
(74) 代理人 100102842
弁理士 葛和 清司
(72) 発明者 カルディア, ジェームス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
2 0 3 8、フランクリン、ペーコン スト
リート 1 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1) を標的とする核酸分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む、スーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1) に対して向けられた単離された二本鎖核酸分子であって、ここで、単離された二本鎖核酸分子が、二本鎖領域および一本鎖領域を含み、ここで、分子の二本鎖である領域が、8 ~ 15ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖が、2 ~ 14ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22個のホスホロチオアート修飾を含有し、ここでパッセンジャー鎖が、8 ~ 15ヌクレオチド長であり、ここでパッセンジャー鎖が、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個のホスホロチオアート修飾を含有し、ここで、単離された二本鎖核酸分子のヌクレオチドの少なくとも40%が修飾されており、

(i) パッセンジャー鎖が、配列番号2、配列番号32または配列番号122を含み、ガイド鎖が、配列番号61、配列番号91または配列番号123を含む；

(ii) パッセンジャー鎖が、配列番号4、配列番号34または配列番号126を含み、ガイド鎖が、配列番号63または配列番号93を含む；

(iii) パッセンジャー鎖が、配列番号9、配列番号38または配列番号135を含み、ガイド鎖が、配列番号68、配列番号97または配列番号136を含む；

(iv) パッセンジャー鎖が、配列番号10または配列番号39を含み、ガイド鎖が、配列番号69または配列番号98を含む；または

10

20

(v) パッセンジャー鎖が、配列番号 5、配列番号 1 2 7 または配列番号 1 3 7 を含み、ガイド鎖が、配列番号 6 4、配列番号 1 2 8 または配列番号 1 3 8 を含む、前記単離された二本鎖核酸分子。

【請求項 2】

ヌクレオチドの少なくとも 60% が修飾されている、請求項 1 に記載の単離された二本鎖核酸分子。

【請求項 3】

修飾されている単離された二本鎖核酸分子のヌクレオチドの少なくとも 1 個が、2' O-メチルまたは 2'-フルオロ修飾を含む、請求項 1 または 2 に記載の単離された二本鎖核酸分子。

10

【請求項 4】

単離された二本鎖核酸分子の少なくとも 1 本の鎖が、完全にホスホロチオアート化されているか、または 1 つの残基を除いて完全にホスホロチオアート化されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単離された二本鎖核酸分子。

【請求項 5】

ヌクレオチド中の複数のウリジンおよび / またはシチジンが、メチル、イソブチル、オクチル、イミダゾールまたはチオフェンからなる群から選択される疎水性修飾を含み、ここで修飾が、ウリジンおよび / またはシチジンの 4 位または 5 位に位置している、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離された二本鎖核酸分子。

【請求項 6】

20

単離された二本鎖核酸分子に付着した疎水性抱合体をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離された二本鎖核酸分子。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の単離された二本鎖核酸分子を含む、組成物。

【請求項 8】

薬学的に許容し得るキャリアをさらに含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

第 2 の治療剤をさらに含む、請求項 7 または 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

ALS を処置するための請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 11】

単離された二本鎖核酸分子が、中枢神経系への送達のために処方される、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

単離された二本鎖核酸分子が、髄腔内注入および / または注射を介して投与される、請求項 10 または 11 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

40

本願は、2015年7月6日に提出された米国仮出願シリアル番号US 62/189,050、表題「NUCLEIC ACID MOLECULES TARGETING SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (SOD1)」の35 U.S.C. § 119(e) 下における利益を主張し、その全内容は、本明細書に参考として組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、少なくともその一部において、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経学的障害の処置のための SOD1 を標的とする in vivo での送達特性が改善された核酸分子の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

50

背景

相補的なオリゴヌクレオチド配列は有望な治療剤であり、遺伝子の機能を解明する上での有用な研究用ツール (research tool) である。しかしながら、先行技術のオリゴヌクレオチド分子は、それらの臨床的開発を妨げる可能性があるいくつかの問題に悩まされており、これは、かかる組成物を *in vivo* で使用する遺伝子発現 (タンパク質合成を含む) の意図した効率的な阻害の達成をしばしば困難にする。

主要な問題は、これらの化合物の、細胞および組織への送達であった。従来の二本鎖 RNAi 化合物は、19 ~ 29 塩基長であって、およそ $1.5 \times (10 \sim 15) \text{ nm}$ のサイズの高度に負に荷電した強固ならせんを形成する。このロッド型の分子は細胞膜を透過することができず、その結果として、*in vitro* および *in vivo* での両方において極めて限定的な効力しか有さない。その結果として、従来の全ての RNAi 化合物は、それらの組織分配および細胞取り込みを促進するために、何らかの種類の送達ビヒクルを必要とする。これは、RNAi 技術の主要な限定要因であると考えられる。

【0004】

先には、それらの細胞取り込み特性を改善するために、オリゴヌクレオチドに化学修飾を適用する試みが存在している。1つのかかる修飾は、オリゴヌクレオチドへのコレステロール分子の付着であった。このアプローチについての最初の報告は、1989年の Letsinger によるものであった。後に、ISIS Pharmaceuticals, Inc. (Carlsbad, CA) が、オリゴヌクレオチドへ、コレステロール分子を付着させる上でのより高度な技術を報告した (Manoharan, 1992)。

90年代後期における siRNA の発見に関して、それらの送達プロフィールを増強するために、同様の型の修飾がこれらの分子へ試みられた。僅かに修飾された (Soutschek, 2004) および重度に修飾された (Wolfrum, 2007) siRNA へ抱合させたコレステロール分子が、文献に登場した。Yamada ら (2008) はまた、コレステロールを媒介した siRNA の取り込みをさらに改善する高度なリンカーの化学 (linker chemistry) の使用について報告した。この努力にも拘わらず、これらの型の化合物の取り込みは、生体液の存在下において損なわれて阻害され、これが *in vivo* での遺伝子サイレンシングにおける効力を極めて限定させることになり、臨床の場でこれらの化合物の適用性を限定していると考えられる。

【発明の概要】

【0005】

要旨

いくつかの側面において、本開示は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む、スーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) に対して向けられた単離された二本鎖核酸分子、ここで、単離された二本鎖核酸分子は、二本鎖領域および一本鎖領域を含み、ここで、分子の二本鎖である領域は、8 ~ 15 ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は、2 ~ 14 ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 または 22 個のホスホロチオアート修飾を含有し、ここでパッセンジャー鎖は、8 ~ 15 ヌクレオチド長であり、ここでパッセンジャー鎖は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、単離された二本鎖核酸分子のヌクレオチドの少なくとも 40 % が修飾されている、に関する。

【0006】

いくつかの態様において、ヌクレオチドの少なくとも 60 % が修飾されている。いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子の少なくとも 1 本の鎖は、完全にホスホロチオアート化された骨格を含む。いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子の少なくとも 1 本の鎖は、完全にホスホロチオアート化されているか、または 1 つの残基を除いて完全にホスホロチオアート化されている。いくつかの態様において、修飾されている単離された二本鎖核酸分子のヌクレオチドの少なくとも 1 個は、2' - O - メチルまたは 2' - フルオロ修飾を含む。

【 0 0 0 7 】

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、スーパーオキシドディスムターゼ 1 (S O D 1) に対して向けられている。いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、PCT公開番号WO2010/033247において記載された配列番号 4 0 で表される修飾パターンを含まない。

いくつかの態様において、複数の U ' および / または C ' は、メチル、イソブチル、オクチル、イミダゾールまたはチオフェンからなる群から選択される疎水性修飾を含み、ここで、修飾は、U ' および / または C ' の 4 位または 5 位に位置する。

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、表 1 ~ 8 中の配列 (表 1 ~ 8 に規定された修飾パターンを含む) から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む。

10

【 0 0 0 8 】

いくつかの態様において、本開示は、表 1 ~ 8 中の配列から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む単離された二本鎖核酸分子、ここで、単離された二本鎖核酸分子が、表 2 における配列番号 7 0 、 7 1 、 7 2 、 7 3 、 7 9 、 8 0 、 8 1 、および 8 4 からなる群から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含むとき、ガイド鎖は 6 個より多いホスホロチオアート修飾を含有する、に関する。いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子はさらに、該単離された二本鎖核酸分子に付着した疎水性抱合体を含む。

【 0 0 0 9 】

20

いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 2 、配列番号 3 2 または配列番号 1 2 2 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 1 、配列番号 9 1 または配列番号 1 2 3 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 2 、配列番号 3 2 または配列番号 1 2 2 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 1 、配列番号 9 1 または配列番号 1 2 3 を含む。

【 0 0 1 0 】

いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 4 、配列番号 3 4 または配列番号 1 2 6 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 3 または配列番号 9 3 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 4 、配列番号 3 4 または配列番号 1 2 6 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 3 または配列番号 9 3 を含む。

30

【 0 0 1 1 】

いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 9 、配列番号 3 8 または配列番号 1 3 5 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 8 、配列番号 9 7 または配列番号 1 3 6 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 9 、配列番号 3 8 または配列番号 1 3 5 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 8 、配列番号 9 7 または配列番号 1 3 6 を含む。

【 0 0 1 2 】

40

いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 1 0 または配列番号 3 9 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 9 または配列番号 9 8 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 1 0 または配列番号 3 9 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 9 または配列番号 9 8 を含む。

【 0 0 1 3 】

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子のセンス鎖は、配列番号 5 、配列番号 1 2 7 または配列番号 1 3 7 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 4 、配列番号 1 2 8 または配列番号 1 3 8 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は

50

、配列番号 5、配列番号 1 2 7 または配列番号 1 3 7 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 4、配列番号 1 2 8 または配列番号 1 3 8 を含む。

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、ヘアピンを形成しない。

【0014】

いくつかの側面において、本開示は、本開示により記載される単離された二本鎖核酸分子を含む組成物に関する。いくつかの態様において、組成物は、賦形剤（例えば、薬学的に許容し得るキャリア）を含む。いくつかの態様において、組成物は、核酸（例えば、s d - r x R N A など）、小分子、ペプチドまたはポリペプチド（例えば、抗体）などの第 2 の治療剤を含む。

いくつかの側面において、本開示は、それを必要とする対象に、スーパーオキシドディスムターゼ 1（S O D 1）をコードする遺伝子に対して向けられた核酸分子の治療有効量を投与することを含む、A L S を処置するための方法に関する。

【0015】

いくつかの側面において、本開示は、それを必要とする対象に、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む、スーパーオキシドディスムターゼ 1（S O D 1）をコードする遺伝子に対して向けられた単離された二本鎖核酸分子の治療有効量を投与することを含む、A L S を処置するための方法に関し、ここで、単離された二本鎖核酸分子は、二本鎖領域および一本鎖領域を含み、ここで、分子の二本鎖である領域は、8 ~ 15 ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は、2 ~ 14 ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 または 22 個のホスホロチオアート修飾を含有し、ここでパッセンジャー鎖は、8 ~ 15 ヌクレオチド長であり、ここでパッセンジャー鎖は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 個のホスホロチオアート修飾を含有し、ここで、単離された二本鎖核酸分子のヌクレオチドの少なくとも 40 % が修飾されており、およびここで、単離された二本鎖核酸分子は、表 1 ~ 8 中の配列から選択される配列（表 1 ~ 8 に規定された修飾パターンを含む）の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む。

【0016】

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、完全にホスホロチオアート化されているか、または 1 つの残基を除いて完全にホスホロチオアート化されている。いくつかの態様において、修飾されている単離された二本鎖核酸分子のヌクレオチドの少なくとも 1 個は、2' O - メチルまたは 2' - フルオロ修飾を含む。

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子はさらに、該単離された二本鎖核酸分子に付着した疎水性抱合体を含む。

【0017】

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、中枢神経系への送達のために処方される。

いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、髄腔内注入および / または注射を介して投与される。

【0018】

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 2、配列番号 3 2 または配列番号 1 2 2 の少なくとも 12 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 1、配列番号 9 1 または配列番号 1 2 3 の少なくとも 12 個の連続的なヌクレオチドを含む。

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 2、配列番号 3 2 または配列番号 1 2 2 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 1、配列番号 9 1 または配列番号 1 2 3 を含む。

【0019】

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 4、配列番号 3 4 または配列番号 1 2 6 の少なくとも 12 個の連続的

10

20

30

40

50

なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 3 または配列番号 9 3 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 4、配列番号 3 4 または配列番号 1 2 6 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 3 または配列番号 9 3 を含む。

【 0 0 2 0 】

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 9、配列番号 3 8 または配列番号 1 3 5 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 8、配列番号 9 7 または配列番号 1 3 6 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。

10

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 9、配列番号 3 8 または配列番号 1 3 5 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 8、配列番号 9 7 または配列番号 1 3 6 を含む。

【 0 0 2 1 】

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 1 0 または配列番号 3 9 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 9 または配列番号 9 8 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 1 0 または配列番号 3 9 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 9 または配列番号 9 8 を含む。

20

【 0 0 2 2 】

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子のセンス鎖は、配列番号 5、配列番号 1 2 7 または配列番号 1 3 7 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含み、ガイド鎖は、配列番号 6 4、配列番号 1 2 8 または配列番号 1 3 8 の少なくとも 1 2 個の連続的なヌクレオチドを含む。

本明細書において記載される方法のいくつかの態様において、単離された核酸分子のセンス鎖は、配列番号 5、配列番号 1 2 7 または配列番号 1 3 7 を含み、ガイド鎖は、配列番号 6 4、配列番号 1 2 8 または配列番号 1 3 8 を含む。

【 0 0 2 3 】

30

本発明の限定の各々は、本発明の多様な態様を包含し得る。したがって、いずれか 1 の要素または要素の組み合わせを伴う本発明の限定の各々は、本発明の各側面に含まれ得ると考えられる。本発明はその適用において、以下の説明に記載されるまたは図面に例示される、解釈の詳細および構成要素の配置に限定されない。本発明は他の態様も可能であり、多様なやり方において実践または実行されることが可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 4 】

【図 1】ホスホロチオアート含有量を減少させると *in vitro* での細胞毒性が減少した活性 p s - r x RNA バリエーションをもたらす。上部のパネルは、S O D 1 サイレンシングを示し、下部のパネルは、細胞生存率を示す。これらのデータは、p s - r x RNA バリエーション 25635 および 25637 が強力であり、25600 と比べてより好都合な細胞毒性プロファイル (*in vitro*) を有することを実証する。

40

【図 2】ホスホロチオアート含有量を減少させると *in vitro* での細胞毒性が減少した活性 p s - r x RNA バリエーションをもたらす。上部のパネルは、S O D 1 サイレンシングを示し、下部のパネルは、細胞生存率を示す。これらのデータは、p s - r x RNA バリエーション 25645 が強力であり、25600 と比べてわずかにより好都合な細胞毒性プロファイル (*in vitro*) を有することを示す。

【 0 0 2 5 】

【図 3】脳 - 小脳 (ラットにおける皮内注射)。透過は化学含量 (chemistry content) の変化とともに増加する ; 取り込みは 25635 < 25637 < 25645 < 25652。* は小脳ではなく前

50

頭皮質。

【図4】頸髄 - 横切断。25637および変種25645は類似するが両方とも25652よりも分布が少ない。

【図5】頸髄 - 縦切断。25637は25652よりも組織中への分布が少ない。原型の $f1 - ps - rxRNA$ 化合物の投与は、完全な脳および脊髄への浸透をもたらす。この特定のアクセスにおける $ps - rxRNA$ バリエーション1 (25635) は脳または脊髄への浸透を達成するには不十分であった。 $ps - rxRNA$ バリエーション2および3 (それぞれ25637および25645) は、両方とも脳および脊髄の細胞による取り込みをもたらすが、原型の $f1 - ps - rxRNA$ (25652) よりも少ない。

【0026】

【図6】C57BL/6正常 (非トランスジェニック) マウスにおける、インプラントされた浸透圧ポンプを使用しての $SOD1$ を標的とする $sd - rxRNA$ の14日間の髄腔内注入に続く $SOD1$ mRNAの減少。正常マウスにおけるオリゴ番号25652での14日間のサイレンシング。14日間、浸透圧ポンプを $100 \mu l$ の $10 mg / ml$ の各化合物で満たした。 $qPCR$ による遺伝子発現解析を、 $PP1B$ ハウスキーピング遺伝子に対し正規化し、 PBS 群における $SOD1$ 発現に対して相対的にプロットした。サイレンシングは、脊髄の腰部のみ (カテーテル留置の領域) において観察された。ポンプの流速は $0.25 \mu l / 時間$ であった；したがって、14日間、各日に $60 \mu g$ の $SOD1$ を標的とする $ps - rxRNA$ または非ターゲティング対照 (NTC) $ps - rxRNA$ が送達された (合計 $840 \mu g$)。オリゴ番号25652のための8匹、NTC $ps - rxRNA$ のための8匹および PBS のための8匹を含む24匹のC57BL/6Jマウスを、この研究のために使用した。

【0027】

【図7】正常マウスにおける、 $SOD1$ を標的とする $sd - rxRNA$ バリエーション3 (オリゴ番号25645) の14日間の髄腔内注入に続く $SOD1$ mRNAの減少。C57BL/6正常 (非トランスジェニック) マウスにおいて、インプラントされた浸透圧ポンプを使用して14日間の髄腔内注入を行った。14日間、浸透圧ポンプを $100 \mu l$ の $10 mg / ml$ の各化合物で満たした。各日あたり $60 \mu g$ の $SOD1$ を標的とする $sd - rxRNA$ バリエーションまたは非ターゲティング対照 (NTC) $sd - rxRNA$ バリエーションが投与された。遺伝子発現を $PP1B$ ハウスキーピング遺伝子に対し正規化するために $qPCR$ による遺伝子発現解析を行い、 PBS 群における $SOD1$ 発現に対して相対的にプロットした。サイレンシングは、脊髄の腰部のみ (カテーテル留置の領域) において観察された。ポンプの流速は $0.25 \mu l / 時間$ であった；したがって、14日間、各日に $60 \mu g$ が送達された (合計 $840 \mu g$)。オリゴ番号25645のための10匹、NTC $ps - rxRNA$ のための10匹および PBS のための10匹を含む30匹のC57BL/6Jマウスを、この研究のために使用した。

【0028】

【図8】図8は、 $SOD1$ $sd - rxRNA$ バリエーションのオクチル修飾を使用して生成したデータを描写する。

【図9】図9は、 $SOD1$ $sd - rxRNA$ バリエーションのオクチル修飾を使用して生成したデータを描写する。

【図10】図10は、 $SOD1$ $sd - rxRNA$ バリエーションのチオフエン修飾を使用して生成したデータを描写する。

【図11】図11は、 $SOD1$ $sd - rxRNA$ バリエーションのイソブチル修飾を使用して生成したデータを描写する。

【発明を実施するための形態】

【0029】

詳細な説明

$SOD1$ (銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ)

本明細書に使用される「 $SOD1$ 」は、有害なスーパーオキシドラジカルを水へと変換

10

20

30

40

50

することに関与する3つのスーパーオキシドディスムターゼの1つであるスーパーオキシドディスムターゼ1酵素を指す。全てのALSの症例のおよそ10%は、顕性遺伝性であり、これらのうちの約20%が、サイトゾルスーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1) における欠損に起因している。加えて、SOD1は、ALSの非家族性の(例えば、散发性の)型に関係があるとされている(Jones, C. T., Brock, D. J. H., Chancellor, A. M., Warlow, C. P., Swingle, R. J. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutations and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 342: 1050-1051, 1993)。いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、複数の調査の系統は、SOD1における突然変異がこの酵素のディスムターゼ活性の喪失を通じてALSを引き起こすのではないことを示唆している。むしろ、突然変異SOD1は、多重の代替機構、そのうちの多くが、突然変異タンパク質の構造的不安定性および異常な結合および凝集を伴う、を通じて神経毒性を持つ。

10

【0030】

突然変異SOD1の毒性についての正確な詳細は、完全には定義されていないものの、突然変異SOD1タンパク質の負担の減少が動物モデルにおいて有意に死亡を遅らせることが、十分に明らかである。これは、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)(Smith et al)およびsiRNA(Maxwell, Pasinelli et al. 2004)(Xia, Zhou et al. 2006)(Wang, Ghosh et al. 2008)の両方を使用して達成されている。これらの研究は、siRNAベースの薬物が、潜在的に有意な、ALSおよびその他多くのCNS障害の処置のための治療の進歩を示す、という原理を例示する。両方の場合において、効力は、多量の材料の長期間にわたる送達によって達成された；これらの研究は、現在の形態のASOおよびsiRNAによる治療法の主な限界は、最適効率かつ非毒性のin vivo送達システムの欠如であるという点を例示する(Smith, Miller et al. 2006; Wang, Ghosh et al. 2008)。

20

【0031】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)

ALSは、中枢神経系における運動ニューロンに影響を及ぼす進行性の神経変性疾患である。運動ニューロンの変性は、麻痺および最終的に、通常は呼吸不全に起因する、死亡をもたらす。症例の一部において、ALSは、サイトゾルスーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)をコードする遺伝子における顕性で伝播する突然変異によって引き起こされる。突然変異SOD1のトランスジェニック発現は、マウスにおいてALSを引き起こす。

30

【0032】

核酸分子

本明細書に使用される「核酸分子」は、これらに限定されないが：sd-rxRNA、sd-rxRNAバリエーション、rxRNAオリゴ、オリゴヌクレオチド、ASO、siRNA、shRNA、miRNA、ncRNA、cp-lasiRNA、aiRNA、一本鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、RNAおよびDNAを含む。いくつかの態様において、核酸分子は、化学修飾されたオリゴヌクレオチドなどの、化学修飾されたオリゴヌクレオチドである。

40

【0033】

sd-rxRNA分子

本発明の側面は、sd-rxRNA分子に関する。本明細書において用いられる場合、「sd-rxRNA」または「sd-rxRNA分子」とは、2014年8月5日に付与された、米国特許第8,796,443号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2015年11月3日に付与された、米国特許第9,175,289号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、および2009年9月22日に出願されたPCT公開番号W02010/033247(出願番号PCT/US2009/005247)、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」において記載され、これらから本明細書に参考として組み込まれるもののような、自己送達型RNA分子を指す。

50

【0034】

簡単に述べると、*sd-rxRNA* (*sd-rxRNA* ナノとも呼ばれる) は、最小長が16ヌクレオチドのガイド鎖および8~18ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む、単離された非対称二本鎖核酸分子であって、ここで二本鎖核酸分子は二本鎖領域および一本鎖領域を有し、一本鎖領域は4~12ヌクレオチド長を有し、かつ、少なくとも3つのヌクレオチド骨格修飾を有する。好ましい態様において、二本鎖核酸分子は、平滑である1末端を有するか、または、1つもしくは2つのヌクレオチド突出を含む。*sd-rxRNA* 分子は、化学修飾を通じて、いくつかの例において疎水性抱合体の付着を通じて、最適化され得る。いくつかの態様において、単離された二本鎖核酸分子は、PCT公開番号W02010/033247において記載された配列番号40で表される修飾パターンを含まない。

10

【0035】

いくつかの態様において、*sd-rxRNA* は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を含み、ここで二本鎖である分子の領域は8~15ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は4~12ヌクレオチド長的一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖的一本鎖領域は3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも40%は修飾されている。

【0036】

いくつかの態様において、*sd-rxRNA* バリエーションは、18~23ヌクレオチド長のガイド鎖(アンチセンス鎖)および10~15ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖(センス鎖)を含有する *sd-rxRNA* を含む。ガイド鎖およびパッセンジャー鎖は、非対称のデュプレックス(duplex)を形成することができる。いくつかの態様において、ガイド鎖は、ホスホロチオアート修飾を含む6~22の骨格修飾を含有する。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖は、ホスホロチオアート修飾を含む2~14の骨格修飾を含有する。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖は、疎水性抱合体に付着している。用語「*sd-rxRNA* バリエーション」は、本明細書において、「*ps-rxRNA* 」と交換可能に使用される。

20

【0037】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22のホスホロチオアート修飾を含有する。いくつかの態様において、ガイド鎖は、完全にホスホロチオアート化されている。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14のホスホロチオアート修飾を含有する。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖は、完全にホスホロチオアート化されている。本明細書において、驚くべきことに、高レベルのホスホロチオアート修飾が、単離された二本鎖核酸分子の送達の増加をもたらし得ることが見出された。

30

【0038】

本発明に関連する核酸分子は、本明細書において、本発明のポリヌクレオチド、単離された二本鎖またはデュプレックス核酸、オリゴヌクレオチド、ナノ分子、ナノRNA、*sd-rxRNA* ナノ、*sd-rxRNA* またはRNA分子とも呼ばれる。

40

sd-rxRNA は、従来の*siRNA* と比較して、はるかに効果的に細胞によって取り込まれる。これらの分子は、標的遺伝子のサイレンシングにおいて高度に効率的であって、血清の存在下における高活性、効率的な自己送達、多様なリンカーとの適合性、および、毒性に関連する化学修飾の存在の減少または完全な欠如を含む、先に記載されたRNAi分子を凌駕する大きな利点を与える。

【0039】

一本鎖ポリヌクレオチドとは対照的に、デュプレックスポリヌクレオチドは伝統的に細胞への送達が困難であったが、それは、これらが強固な構造および多数の負の電荷を有するために、その膜輸送が困難になっているからである。しかしながら、*sd-rxRNA* は、部分的に二本鎖であるにも拘わらず、*in vivo* で一本鎖として認識され、したがって

50

、細胞膜を超えて効率的に送達されることが可能である。その結果、本発明のポリヌクレオチドは、多くの例において自己送達が可能である。よって、本発明のポリヌクレオチドは、従来のRNAi剤と同様の様式において製剤化されても、あるいは、細胞または対象へ単独で（または非送達型キャリアとともに）送達されてもよく、自己送達を可能にする。本発明の一態様において、分子の一部が従来のRNAデュプレックスに類似し、分子の第2の部分が一本鎖である、自己送達型非対称二本鎖RNA分子が提供される。

【0040】

本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの側面において、二本鎖領域と5ヌクレオチドまたはそれより長い一本鎖領域とを含む非対称構造と、具体的な化学修飾パターンとの組み合わせを有し、親油性または疎水性の分子に抱合される。このクラスのRNAi様化合物は、*in vitro*および*in vivo*で優れた効力を有する。強固なデュプレックス領域のサイズの低減が、一本鎖領域へ適用されるホスホロチオアート修飾と組み合わせられると、観察される優れた効力に寄与すると考えられる。

【0041】

いくつかの態様において、本発明に関連するRNAi化合物は、デュプレックス領域（8～15塩基長が効率的なRISC侵入に必要とされる）および4～12ヌクレオチド長の一本鎖領域を含む非対称化合物を含み；13または14ヌクレオチドのデュプレックスを持つ。いくつかの態様において、デュプレックス領域は13または14ヌクレオチド長である。6または7ヌクレオチドの一本鎖領域が、いくつかの態様において好ましい。いくつかの態様において、RNAi化合物は、2～12のホスホロチオアートのヌクレオチド間連結部（ホスホロチオアート修飾と呼ばれる）を含む。6～8のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部が、いくつかの態様において好ましい。いくつかの態様において、RNAi化合物は、ユニークな化学修飾パターンをも含み、これは安定性を提供し、RISC侵入に適合する。これらの要因の組み合わせが、*in vitro*および*in vivo*でのRNAi試薬の送達に高度に有用である、予想外の特性をもたらした。

【0042】

安定性を提供し、かつ、RISC侵入に適合する、化学修飾されたパターンは、センス鎖またはパッセンジャー鎖ならびにアンチセンス鎖またはガイド鎖への修飾を含む。例として、パッセンジャー鎖は、安定性を確実にし、かつ、活性に干渉しない、いずれの化学的実体によっても、修飾され得る。かかる修飾は、2'リボ修飾（O-メチル、2'F、2デオキシ等）およびホスホロチオアート修飾のような骨格修飾を含む。パッセンジャー鎖における好ましい化学修飾パターンは、パッセンジャー鎖内のCおよびUヌクレオチドのOメチル修飾を含む。代わりに、パッセンジャー鎖は完全にOメチル修飾されてもよい。

【0043】

ガイド鎖はまた、例えば、RISC侵入に干渉せずに、安定性を確実にするいずれの化学修飾によっても修飾されてもよい。ガイド鎖における好ましい化学修飾パターンは、CおよびUヌクレオチドの大多数が2'F修飾され、かつ、5'末端がリン酸化されているものを含む。ガイド鎖における別の好ましい化学修飾パターンは、1位と11～18位のC/Uとの2' Oメチル修飾および5'末端の化学的リン酸化を含む。ガイド鎖におけるさらに別の好ましい化学修飾パターンは、1位と11～18位のC/Uとの2' Oメチル修飾および5'末端の化学的リン酸化ならびに2～10位におけるC/Uの2'F修飾を含む。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖は、少なくとも1つの5'-メチルCまたはU修飾を含有する。

【0044】

いくつかの態様において、sd-rxRNA中のヌクレオチドのうち少なくとも30%が修飾されている。例えば、sd-rxRNA中のヌクレオチドのうち少なくとも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%

10

20

30

40

50

、 6 1 %、 6 2 %、 6 3 %、 6 4 %、 6 5 %、 6 6 %、 6 7 %、 6 8 %、 6 9 %、 7 0 %
、 7 1 %、 7 2 %、 7 3 %、 7 4 %、 7 5 %、 7 6 %、 7 7 %、 7 8 %、 7 9 %、 8 0 %
、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %
、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %または 9 9 %が修飾されている。いくつかの態様において、s d - r x R N A中のヌクレオチドの 1 0 0 %が修飾されている。

【 0 0 4 5 】

本発明のオリゴヌクレオチドの上記の化学修飾パターンは、良好な耐性を示し、非対称 R N A i 化合物の効力を実際に改善した。いくつかの態様において、記載された構成要素（ガイド鎖の安定化、ホスホロチオアートの伸長、センス鎖の安定化および疎水性抱合体）のいずれかの排除、またはいくつかの例において、サイズの増加は、最適以下の効力をもち、いくつかの例において、効力の完全な喪失をもちたす。要素の組み合わせは、H e L a細胞などの細胞への受動的送達の後であっても十分に活性がある化合物の開発をもちたす。

【 0 0 4 6 】

s d - r x R N Aは、いくつかの例において、新規の型の化学的性質（chemistries）を使用して化合物の疎水性を改善することにより、さらに改善され得る。例えば、1つの化学的性質は、疎水性塩基修飾の使用に関する。あらゆる位置におけるあらゆる塩基が、修飾が塩基の分配係数の増大をもちたす限りにおいて、修飾されてもよい。修飾の化学的性質のための好ましい位置は、ピリミジンの4位および5位である。これらの位置の主要な利点は、（a）合成の容易性、および、（b）R I S C複合体のローディングおよび標的認識のために必須である、塩基対形成およびA型らせん（A form helix）形成への干渉がないこと、である。

【 0 0 4 7 】

複数のデオキシウリジンが全体的な化合物の効力に干渉せずに存在するs d - r x R N A化合物のバージョンが使用された。加えて、組織分布および細胞取り込みにおける主要な改善は、疎水性抱合体の構造を最適化することにより得られ得る。好ましい態様のいくつかにおいて、ステロールの構造は、C 1 7に付着された鎖（C17 attached chain）を変える（増大する／減少する）ように修飾される。この型の修飾は、in vivoでの細胞取り込みの大きな増大を、および、組織取り込み成功率（prosperities）の改善をもちたす。

【 0 0 4 8 】

本発明により処方されるd s R N Aはまた、r x R N A o r iを含む。r x R N A o r iとは、2009年2月11日に出願されたPCT公開番号W02009/102427（出願番号PCT/US2009/000852）、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、および米国特許公開番号2011-0039914、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」において記載され、これらから参考として組み込まれる、R N A分子のクラスを指す。

【 0 0 4 9 】

いくつかの態様において、r x R N A o r i分子は、標的遺伝子の発現を阻害するための長さ12～35ヌクレオチドの二本鎖R N A（d s R N A）コンストラクトを含み、これは、5'末端および3'末端を有するセンス鎖、ここで、センス鎖は、2'修飾リボース糖で高度に修飾され、およびここで、センス鎖の中央部における3～6ヌクレオチドは、2'修飾リボース糖で修飾されない、ならびに、5'末端および3'末端を有するアンチセンス鎖、これはセンス鎖および標的遺伝子のm R N Aとハイブリダイズする、を含み、ここで、d s R N Aは、配列依存的な様式において、標的遺伝子の発現を阻害する。

【 0 0 5 0 】

r x R N A o r iは、本明細書において記載される修飾のいずれのものを含んでもよい。いくつかの態様において、r x R N A o r i中のヌクレオチドの少なくとも30%が修飾される。例えば、r x R N A o r i中のヌクレオチドのうちの少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51

10

20

30

40

50

%、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%または99%が修飾される。いくつかの態様において、sd-rxRNA中のヌクレオチドの100%が修飾される。いくつかの態様において、rxRNAoriのパッセンジャー鎖のみが修飾を含む。

【0051】

本発明は、その適用に関して、以下の説明において記載されるかまたは図面において例示される構成および構成要素の配置の詳細に限定されない。本発明は、他の態様および多様な方法において実施されるかまたは行われることが可能である。また、本明細書に使用される用語および専門用語は、説明を目的とするものであり、限定するものとしてみなされるべきではない。本明細書における「含む (including)」、「含む (comprising)」または「有する (having)」、「含有する (containing)」、「伴う (involving)」およびそれらの変形の使用は、その後列挙される項目およびその均等物ならびに追加の項目を包含することを意味する。

【0052】

本発明の側面は、ガイド (アンチセンス) 鎖およびパッセンジャー (センス) 鎖を含む、単離された二本鎖核酸分子に関する。本明細書に使用される用語「二本鎖」は、ヌクレオモノマーの少なくとも一部が相補的であり、二本鎖領域を形成するように水素結合されている、1または2以上の核酸分子を指す。いくつかの態様において、ガイド鎖の長さは、16~29ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、ガイド鎖は、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29ヌクレオチド長である。ガイド鎖は標的遺伝子に対して相補性を有する。ガイド鎖と標的遺伝子との間の相補性は、ガイド鎖のいずれの部分にわたっても存在することができる。本明細書に使用される相補性は、ガイド鎖が標的に対してRNAiを媒介できるように十分に相補的である限りにおいて、完全な相補性であっても、より不完全な相補性であってもよい。いくつかの態様において、相補性とは、ガイド鎖と標的との間の、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満のミスマッチを指す。完全な相補性とは、100%の相補性を指す。

【0053】

いくつかの態様において、標的配列と比較して挿入、欠失および単一の点変異を有するsiRNAもまた、阻害について有効であることが見出されている。さらに、siRNAの全ての部位が標的の認識について同等に寄与するわけではない。siRNAの中心におけるミスマッチは最も重要であり、本質的に (essentially) 標的RNAの切断を無効化する。アンチセンス鎖に関して、中心の上流または切断部位の上流におけるミスマッチは、耐性を示すが、標的RNAの切断を著しく低減する。アンチセンス鎖に関して、中心または切断部位の下流におけるミスマッチ、好ましくは3'末端の付近、例えばアンチセンス鎖の3'末端から1、2、3、4、5または6ヌクレオチドに位置するものは、耐性を示し、標的RNAの切断をごく僅かしか低減しない。

【0054】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの態様において、ガイド鎖は、少なくとも16ヌクレオチドの長さであり、RISC中でアルゴノートタンパク質をアンカーする。いくつかの態様において、ガイド鎖がRISC中へロードするとき、これは明確なシード領域を有し、標的mRNAの切断は、ガイド鎖の10~11位にわたって行われる。いくつかの態様において、ガイド鎖の5'末端は、リン酸化されているかまたはリン酸化されることができる。本明細書に記載される核酸分子は、最短トリガーRNA (minimum trigger RNA) として言及される場合もある。

【0055】

いくつかの態様において、パッセンジャー鎖の長さは、8~15ヌクレオチド長の範囲

10

20

30

40

50

である。ある態様において、パッセンジャー鎖は、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。パッセンジャー鎖は、ガイド鎖に対して相補性を有する。パッセンジャー鎖とガイド鎖との間の相補性は、パッセンジャーまたはガイド鎖のいずれの部位にわたっても存在してもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間には、分子の二本鎖領域内に100%の相補性が存在する。

【0056】

本発明の側面は、最小二本鎖領域を有する二本鎖核酸分子に関する。いくつかの態様において、分子の二本鎖である領域は、8～15ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、分子の二本鎖である領域は、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖領域は、13または14ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に100%の相補性が存在してもよく、または、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に1または2以上のミスマッチが存在してもよい。いくつかの態様において、二本鎖分子の一方の末端において、分子は、平滑末端であるかまたは1ヌクレオチドの突出を有する。分子の一本鎖領域は、いくつかの態様において、4～12ヌクレオチド長である。例えば、一本鎖領域は、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヌクレオチド長であってよい。しかしながら、ある態様において、一本鎖領域はまた、4ヌクレオチド長未満であっても、または、12ヌクレオチド長より長くてもよい。ある態様において、一本鎖領域は少なくとも6または少なくとも7ヌクレオチド長である。

【0057】

本発明に関連するRNAiコンストラクトは、-13kcal/mol未満の熱力学的安定性(G)を有することができる。いくつかの態様において、熱力学的安定性(G)は、-20kcal/mol未満である。いくつかの態様において、(G)が-21kcal/mol未満となったとき、効力の喪失が存在する。いくつかの態様において、-13kcal/molより高い(G)値は、本発明の側面に適合性である。いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの態様において、相対的に高い(G)値を有する分子は、相対的に高い濃度において活性になる場合があり、一方、相対的に低い(G)値を有する分子は、相対的に低い濃度において活性になる場合がある。いくつかの態様において、(G)値は、-9kcal/molよりも高くてもよい。最小二本鎖領域を有する本発明に関連するRNAiコンストラクトにより媒介される遺伝子サイレンシング効果は予測できないが、それは、ほぼ同一の設計であるが熱力学的安定性がより低い分子は、不活性であることが示されているからである(Rana et al. 2004)。

【0058】

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、dsRNAまたはdsDNAの8～10bpの伸長が、RISCのタンパク質構成要素またはRISCのコファクターにより構造的に認識され得る。さらに、タンパク質構成要素により感受され得るか、および/または、かかる構成要素と相互作用するために十分に安定であり得、その結果アルゴノートタンパク質中へロードされ得る、トリガー化合物(triggering compound)のためのフリーエネルギー要求が存在する。最適な熱力学が存在して、好ましくは少なくとも8ヌクレオチドである二本鎖部分が存在する場合、デュプレックスは認識され、RNAi機構中にロードされるであろう。

【0059】

いくつかの態様において、熱力学的安定性は、LNA塩基の使用を通して増大する。いくつかの態様において、追加の化学修飾が導入される。化学修飾の数個の非限定例は、5'ホスファート、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロ、リボチミジン、C-5プロピニル-dC(pdC)およびC-5プロピニル-dU(pdU); C-5プロピニル-C(pC)およびC-5プロピニル-U(pU); 5-メチルC、5-メチルU、5-メチルdC、5-メチルdUメトキシ、(2,6-ジアミノプリン)、5'-ジメトキシトリチル-N4-エチル-2'-デオキシシチジンおよびMGB(副溝結合剤

を含む。同一分子内で1つより多くの化学修飾が組み合わせられ得ることが、理解されるべきである。

【0060】

本発明に関連する分子は、効力の増大および/または毒性の低減のために、最適化される。例えば、ガイドおよび/またはパッセンジャー鎖のヌクレオチドの長さ、および/または、ガイドおよび/またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオアート修飾の数は、いくつかの側面においてRNA分子の効力に影響を及ぼし、一方、2'-フルオロ(2'F)修飾を2'-O-メチル(2'OMe)修飾により置き換えることは、いくつかの側面において分子の毒性に影響を及ぼす。具体的には、分子の2'F含有物の低減は、分子の毒性を低下させると予測される。さらに、RNA分子中のホスホロチオアート修飾の数は、細胞内への分子の取り込み、例えば細胞内への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。本明細書に記載される分子の好ましい態様は、2'F修飾を有さず、なお細胞取り込みおよび組織への浸透における同等の効力により特徴づけられる。かかる分子は、2'Fの大量使用により重度に修飾されたAccellおよびWolfrumにより記載される分子などの先行技術に対して、顕著な改善を表す。

10

【0061】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、およそ18~19ヌクレオチドの長さであり、およそ2~14のホスファート修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、ホスファート修飾された2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または14より多くのヌクレオチドを含有し得る。ガイド鎖は、RISC侵入に干渉せずに安定性を増大させる1以上の修飾を含有してもよい。ホスホロチオアート修飾ヌクレオチドなどのホスファート修飾ヌクレオチドは、3'末端にあっても、5'末端にあっても、または、ガイド鎖全体に広がっていてもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖の3'末端の10ヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のホスホロチオアート修飾ヌクレオチドを含有する。

20

【0062】

ガイド鎖はまた、2'Fおよび/または2'OMe修飾も含有することができ、これは、分子全体に位置することができる。いくつかの態様において、ガイド鎖の1位のヌクレオチド(ガイド鎖の最も5'の位置におけるヌクレオチド)は、2'OMe修飾されているか、および/または、リン酸化されている。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドは、2'F修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の2~10位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'F修飾され得る。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドもまた、2'OMe修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の11~18位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'OMe修飾され得る。

30

【0063】

いくつかの態様において、ガイド鎖の最も3'末端におけるヌクレオチドは、未修飾である。ある態様において、ガイド鎖中のCおよびUの大部分は、2'F修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11~18位におけるCまたはUは、2'OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11~18位におけるCまたはUは、2'OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されており、2~10位におけるCまたはUは2'F修飾されている。

40

【0064】

いくつかの側面において、最適なパッセンジャー鎖は、およそ11~14ヌクレオチドの長さである。パッセンジャー鎖は、安定性を増大させる修飾を含有してもよい。パッセンジャー鎖における1以上のヌクレオチドは、2'OMe修飾され得る。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖における1以上のCおよび/またはUヌクレオチドが2'OMe修飾されているか、または、パッセンジャー鎖におけるCおよびUヌクレオチドの全てが2'OMe修飾されている。ある態様において、パッセンジャー鎖における全てのヌ

50

クレオチドが2'OMe修飾されている。パッセンジャー鎖上の1以上のヌクレオチドはまた、ホスホロチオアート修飾などのホスファート修飾もなされ得る。パッセンジャー鎖はまた、2'リボ、2'Fおよび2デオキシ修飾、または、上のいずれの組み合わせをも含有し得る。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との両方における化学修飾パターンは、良好に耐容され得、化学修飾の組み合わせは、RNA分子の効力および自己送達の増大をもたらし得る。

【0065】

本発明の側面は、RNAiについて先に使用されてきた分子と比較した場合、二本鎖領域に対して相対的に長い一本鎖領域を有するRNAiコンストラクトに関する。分子の一本鎖領域は、細胞取り込みまたは遺伝子サイレンシングを促進するために修飾されていてもよい。いくつかの態様において、一本鎖領域のホスホロチオアート修飾は、細胞取り込みおよび/または遺伝子サイレンシングに影響を及ぼす。ガイド鎖のホスホロチオアート修飾されている領域は、分子の一本鎖および二本鎖の両領域内にヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、一本鎖領域は、2~12のホスホロチオアート修飾を含む。例えば、一本鎖領域は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12のホスホロチオアート修飾を含み得る。いくつかの例において、一本鎖領域は、6~8のホスホロチオアート修飾を含む。

【0066】

本発明に関連する分子はまた、細胞取り込みのためにも最適化される。本明細書に記載されるRNA分子において、ガイド鎖および/またはパッセンジャー鎖は、抱合体に付着され得る。ある態様において、抱合体は疎水性である。疎水性の抱合体は、10より高い分配係数を有する低分子であり得る。抱合体は、コレステロールなどのステロール型分子であっても、または、C17に付着した長さが増大したポリ炭素鎖を有する分子であってもよく、抱合体の存在は、脂質トランスフェクション試薬の有無に関らずRNA分子が細胞に取り込まれる能力に影響を及ぼし得る。抱合体は、疎水性リンカーを通して、パッセンジャー鎖またはガイド鎖に付着され得る。

【0067】

いくつかの態様において、疎水性リンカーは5~12Cの長さであり、および/または、ヒドロキシピロリジンをベースとする。いくつかの態様において、疎水性抱合体はパッセンジャー鎖に付着し、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のいずれかのCU残基は、修飾されている。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のCU残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%は、修飾されている。いくつかの側面において、本発明に関連する分子は、自己送達性(sd)である。本明細書において用いられる場合、「自己送達(self-delivery)」とは、分子が、トランスフェクション試薬などの追加の送達ビヒクルを必要とせずに細胞へ送達される能力を指す。

【0068】

本発明の側面は、RNAiにおける使用のために分子を選択することに関する。いくつかの態様において、8~15ヌクレオチドの二本鎖領域を有する分子は、RNAiにおける使用のために選択され得る。いくつかの態様において、分子は、その熱力学的安定性(G)に基づいて選択される。いくつかの態様において、-13kcal/mol未満の(G)を有する分子が選択されるであろう。例えば、(G)値は、-13、-14、-15、-16、-17、-18、-19、-21、-22または-22kcal/mol未満であってもよい。他の態様において、(G)値は、-13kcal/molより高くてもよい。例えば、(G)値は、-12、-11、-10、-9、-8、-7または-7kcal/molより高くてもよい。Gは、当該技術分野において知られているいずれの方法をも使用して計算され得ることが理解されるべきである。いくつかの態様において、Gは、Mfoldインターネットサイト(mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi)を通して利用可能なMfoldを使用して計算される。

【0069】

Gを計算するための方法は、以下の参考文献において記載され、それらから参考として組み込まれる：Zuker, M. (2003) *Nucleic Acid Res.*, 31(13):3406-15 ; Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D. H. (1999) *J. Mol. Biol.* 288:911-940 ; Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:7287-7292 ; Duan, S., Mathews, D. H., and Turner, D. H. (2006) *Biochemistry* 45:9819-9832 ; Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L., and Schuster, P. (1999) *Biopolymers* 49:145-165。

【 0 0 7 0 】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、5' および / または 3' 末端の突出を含有する。ポリヌクレオチドの一端におけるヌクレオチド突出の数および / または配列は、ポリヌクレオチドの他端と同じであっても異なってもよい。ある態様において、突出ヌクレオチドの1以上は、ホスホロチオアートまたは 2' - OMe 修飾などの化学修飾を含有してもよい。

10

ある態様において、ポリヌクレオチドは、未修飾である。他の態様において、少なくとも1つのヌクレオチドが修飾されている。さらなる態様において、修飾は、ガイド配列の5' 末端から2つ目のヌクレオチドにおいて、2' - Hまたは2' - 修飾されたりボース糖を含む。「2つ目のヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドの5' 末端から2つ目のヌクレオチドとして定義される。

【 0 0 7 1 】

本明細書に使用される「2' 修飾されたりボース糖」は、2' - OH基を有さないリボース糖を含む。「2' 修飾されたりボース糖」は、(未修飾の基準のDNAヌクレオチドにおいて見出される) 2' - デオキシリボースを含まない。例えば、2' 修飾されているリボース糖は、2' - O - アルキルヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド、2' - デオキシヌクレオチドまたはこれらの組み合わせであってもよい。

20

ある態様において、2' 修飾されているヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチド(例えばC/U)である。2' - O - アルキルヌクレオチドの例は、2' - O - メチルヌクレオチドまたは2' - O - アリルヌクレオチドを含む。

【 0 0 7 2 】

ある態様において、上述の5' 末端修飾を持つ本発明のsd-rxRNAポリヌクレオチドは、特定された5' 末端修飾がない類似のコンストラクトと比較したとき、有意に(例えば、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%またはそれを超えて)より低い「オフ・ターゲット(off-target)」遺伝子サイレンシングを呈し、よって、RNAi試薬または治療の全体的な特異性を大きく改善する。

30

本明細書に使用される「オフ・ターゲット」遺伝子サイレンシングは、例えばアンチセンス(ガイド)配列と、意図しない標的mRNA配列との間の偽の配列相同性に起因する、意図しない遺伝子サイレンシングを指す。

【 0 0 7 3 】

本発明のこの側面に従うと、あるガイド鎖修飾は、RNAi活性を有意に低下させることなく(またはRNAi活性を全く低下させずに)、ヌクレアーゼ安定性をさらに増大させ、および / または、インターフェロン誘導を低下させる。

40

ある修飾の組み合わせは、標的遺伝子の発現を阻害する能力の増強、血清安定性の増強、および / または、標的特異性の増大などにより部分的に表わされる、さらなる予想外の利点をもたらしてもよい。

ある態様において、ガイド鎖は、ガイド鎖の5' 末端における2番目のヌクレオチドにて、2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、かつ、他の修飾ヌクレオチドを含まない。

【 0 0 7 4 】

他の側面において、本発明のsd-rxRNA構造は、マイクロRNA機構によって、配列依存的な遺伝子サイレンシングを媒介する。本明細書に使用される用語「マイクロR

50

RNA」(「miRNA」)はまた、当該技術分野において、「小分子RNA (small temporal RNA)」(「stRNA」)としても言及され、遺伝的に(例えば、ウイルス、哺乳動物または植物ゲノムにより)コードされる小さい(10~50ヌクレオチドの)RNAであって、RNAサイレンシングを指向または媒介することができるものを指す。「miRNA障害」は、miRNAの異常な発現または活性により特徴づけられる疾患または障害を指すべきである。

【0075】

マイクロRNAは、マウス、線虫および哺乳動物において、発生またはがんなどの重要な経路において標的遺伝子を下方調節することに関与する。マイクロRNA機構を通した遺伝子サイレンシングは、miRNAとその標的メッセンジャーRNA(mRNA)との特異的であるがなお不完全な塩基対形成により、達成される。標的mRNA発現のマイクロRNA媒介性の下方調節において、多様な機構が使用されてもよい。

10

【0076】

miRNAは、およそ22ヌクレオチドの非コードRNAであって、植物および動物の発生の間中、転写後または翻訳後のレベルにて、遺伝子発現を調節し得る。miRNAの1つの共通の特徴は、それらがプレmiRNA(pre-miRNA)と称されるおよそ70ヌクレオチドの前駆体RNAステムループから、恐らくはRNase III型酵素であるダイサーまたはそのホモログによって、切り取られることである。天然に存在するmiRNAは、in vivoで内因性遺伝子により発現され、ヘアピンまたはステムループ前駆体(プレmiRNAまたはプリmiRNA(pri-miRNA))から、ダイサーまたは他のRNaseによりプロセッシングされる。miRNAは、in vivoで二本鎖デュプレックス(double-stranded duplex)として一過性に存在し得るが、一方の鎖のみが遺伝子サイレンシングを指揮するためにRISC複合体に取り込まれる。

20

【0077】

いくつかの態様において、細胞取り込みおよびmiRNA活性の阻害において有効なsd-rxRNA化合物のバージョンが記載される。化合物は本質的に、RISC侵入性のバージョンに類似するが、大きな鎖の化学修飾パターンが、切断を遮断してRISC作用の効果的な阻害剤として作用するように、最適化されている。例えば、化合物は、先に記載のホスホロチオアート含有物で完全にまたはほとんどにおいてO-メチル修飾されていてもよい。これらの型の化合物について、いくつかの態様においては、5'リン酸化は必要でない。二本鎖領域の存在は、細胞取り込みおよび効率的なRISCローディングを促進するので、好ましい。

30

【0078】

低分子RNAを配列特異的調節剤として使用する別の経路は、RNA干渉(RNAi)経路であり、これは、細胞における二本鎖RNA(dsRNA)の存在に対する、進化的に保存された応答である。dsRNAは、ダイサーにより、~20塩基対(bp)デュプレックスの低分子干渉RNA(siRNA)へと切断される。これらの低分子RNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と称される多タンパク質エフェクター複合体へと集合させられる。siRNAは次いで、完璧な相補性を持つ標的mRNAの切断をガイドする。

40

【0079】

バイोजェネシス、タンパク質複合体および機能のいくつかの側面は、siRNA経路とmiRNA経路との間で共有される。一本鎖ポリヌクレオチドは、siRNA機構においてdsRNAを模倣しても、または、miRNA機構においてマイクロRNAを模倣してもよい。

ある態様において、修飾RNAiコンストラクトは、同じ配列を有する未修飾RNAiコンストラクトと比較して、改善された血清および/または脳脊髄液中の安定性を有してもよい。

【0080】

ある態様において、RNAiコンストラクトの構造は、ヒト、マウスおよび他のげっ歯

50

類ならびに他の非ヒト哺乳動物からの初代細胞を含む哺乳動物の初代細胞などの初代細胞において、インターフェロン応答を誘導しない。ある態様において、RNAiコンストラクトはまた、無脊椎生物において標的遺伝子の発現を阻害するためにも使用されてもよい。

対象となるコンストラクトのin vivoでの安定性をさらに増大させるために、構造の3'末端は、保護基（単数または複数）により遮断されてもよい。例えば反転（inverted）ヌクレオチド、反転脱塩基部分またはアミノ末端修飾ヌクレオチドなどの保護基が使用されてもよい。反転ヌクレオチドは、反転デオキシヌクレオチドを含んでもよい。反転脱塩基部分は、3'，3'連結または5'，5'連結されたデオキシ脱塩基部分などの、反転デオキシ脱塩基部分を含んでもよい。

10

【0081】

本発明のRNAiコンストラクトは、標的遺伝子（単数または複数）によりコードされるあらゆる標的タンパク質の合成を阻害することができる。本発明は、細胞において、in vitroまたはin vivoのいずれかで、標的遺伝子の発現を阻害する方法を含む。したがって、本発明のRNAiコンストラクトは、標的遺伝子の過剰発現により特徴づけられる疾患を持つ患者を処置するのに有用である。

標的遺伝子は、細胞にとって内因性であっても外因性（例えば、ウイルスにより、または、組み換えDNA技術を使用して、細胞に導入されたもの）であってもよい。かかる方法は、標的遺伝子の発現を阻害するために十分な量でのRNAの細胞内への導入を含んでもよい。例えば、かかるRNA分子は、組成物が標的遺伝子の発現を阻害するように、標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的なガイド鎖を有してもよい。

20

【0082】

本発明はまた、本発明の核酸を発現するベクター、および、かかるベクターまたは核酸を含む細胞にも関する。細胞は、in vivoのまたは培養中の、ヒト細胞などの哺乳動物細胞であり得る。

本発明はさらに、対象となるRNAiコンストラクトと薬学的に許容し得るキャリアまたは希釈剤とを含む、組成物に関する。

方法は、in vitroで、ex vivoで、または、in vivoで、例えば、培養中のヒト細胞などの培養中の哺乳動物細胞において行ってもよい。

【0083】

30

標的細胞（例えば哺乳動物細胞）は、脂質（例えばカチオン性脂質）またはリポソームなどの送達試薬の存在下において、接触させられてもよい。

本発明の別の側面は、哺乳動物細胞を、対象となるRNAiコンストラクトを発現するベクターと接触させることを含む、哺乳動物細胞において標的遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。

【0084】

本発明の一側面において、約16～約30ヌクレオチドの範囲のサイズである第1のポリヌクレオチドと、約26～約46ヌクレオチドの範囲のサイズである第2のポリヌクレオチドとを含む、より長いデュプレックスポリヌクレオチドが提供され、ここで、第1のポリヌクレオチド（アンチセンス鎖）は、第2のポリヌクレオチド（センス鎖）および標的遺伝子の両方に対して相補的であり、両方のポリヌクレオチドは、デュプレックスを形成し、ここで、第1のポリヌクレオチドは、長さが6塩基より長い一本鎖領域を含有し、別の化学修飾パターンにより修飾されており、および/または、細胞送達を容易にする抱合体部分を含む。この態様において、パッセンジャー鎖のヌクレオチドの約40～約90%、ガイド鎖のヌクレオチドの約40～約90%、第1のポリヌクレオチドの一本鎖領域のヌクレオチドの約40～約90%が、化学修飾ヌクレオチドである。

40

【0085】

一態様において、ポリヌクレオチドデュプレックス中の化学修飾ヌクレオチドは、上で詳細に議論されたものなどの、当該技術分野において知られているいずれの化学修飾ヌクレオチドであってもよい。特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、2'F修飾ヌ

50

クレオチド、2' - O - メチル修飾されたものおよび2' デオキシヌクレオチドからなる群より選択される。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド塩基の「疎水性修飾」から生じる。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドはホスホロチオアートである。さらなる別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオアート、2' - O - メチル、2' デオキシ、疎水性修飾およびホスホロチオアートの組み合わせである。これらの群の修飾が、リボース環、骨格およびヌクレオチドの修飾を指すなら、いくつかの修飾ヌクレオチドが、3つの修飾の型全ての組み合わせを持つことも実行可能である。

【0086】

別の態様において、化学修飾は、デュプレックスの多様な領域にわたって同一ではない。特定の態様において、第1のポリヌクレオチド（パッセージャー鎖）は、多数の多様な化学修飾を、多様な部位において有する。このポリヌクレオチドについて、ヌクレオチドの90%までが化学修飾されていてもよく、および/または、導入されたミスマッチを有していてもよい。

【0087】

別の態様において、第1のまたは第2のポリヌクレオチドの化学修飾は、これらに限定されないが、5'位のウリジンおよびシトシンの修飾（4 - ピリジル、2 - ピリジル、インドリル、フェニル（ C_6H_5OH ）；トリプトファン（ C_8H_6N ） $CH_2CH(NH_2)CO$ ）、イソブチル、ブチル、アミノベンジル；フェニル；ナフチルなど）を含み、ここで、化学修飾は、ヌクレオチドの塩基対形成能力を変化させる場合がある。ガイド鎖について、本発明のこの側面の重要な特徴は、アンチセンスの5'末端に対する化学修飾の位置および配列である。例えば、ガイド鎖の5'末端の化学的リン酸化は通常、効力のために有益である。センス鎖のシード領域（5'末端に対して2～7位）におけるO - メチル修飾は、一般に良好な耐性を示さないが、一方、2' Fおよびデオキシは、良好な耐性を示す。ガイド鎖の中間部分およびガイド鎖の3'末端は、適用される化学修飾の型において、より許容的である。デオキシ修飾は、ガイド鎖の3'末端においては、耐性を示さない。

【0088】

本発明のこの側面のユニークな特徴は、塩基に対する疎水性の修飾の使用を伴う。一態様において、疎水性修飾は好ましくは、ガイド鎖の5'末端付近に位置し、他の態様においては、それらはガイド鎖の中間に局在し、他の態様においては、それらはガイド鎖の3'末端に局在し、さらに別の態様において、それらは、ポリヌクレオチドの全長を通して分布する。同じ型のパターンが、デュプレックスのパッセージャー鎖に適用可能である。

【0089】

分子の他方の部分は、一本鎖領域である。ある態様において、一本鎖領域は、7から40までのヌクレオチドの範囲であると予測される。

一態様において、第1のポリヌクレオチドの一本鎖領域は、40%～90%の疎水性塩基修飾、40%～90%のホスホロチオアート、40%～90%のリボース部分の修飾、および、前述のもののあらゆる組み合わせからなる群より選択される修飾を含有する。

【0090】

ガイド鎖（第1のポリヌクレオチド）のRISC複合体中へのローディングの効率は、重度に修飾されたポリヌクレオチドについて変わる場合があるので、一態様においては、効率的なガイド鎖のローディングを促進するために、デュプレックスポリヌクレオチドは、ガイド鎖（第1のポリヌクレオチド）上のヌクレオチド9、11、12、13または14と、センス鎖（第2のポリヌクレオチド）上の反対のヌクレオチドとの間のミスマッチを含む。

より詳細な本発明の側面は、以下のセクションにおいて記載される。

【0091】

デュプレックスの特徴

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、2つの別々の相補的な核酸鎖により形成されて

10

20

30

40

50

もよい。デュプレックス形成は、標的遺伝子を含む細胞の内側または外側のいずれかで生じ得る。

【0092】

本明細書に使用される用語「デュプレックス (duplex)」は、相補的な配列に水素結合している二本鎖 (double-stranded) 核酸分子 (単数または複数) の領域を含む。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子に対してセンスであるヌクレオチド配列、および、標的遺伝子に対してアンチセンスである相補配列を含んでもよい。センスおよびアンチセンスヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列に対応し、例えば、標的遺伝子配列と同一であるかまたは標的遺伝子の阻害をもたらすために十分に同一 (例えば、ほぼ少なくとも約 98% 同一、96% 同一、94%、90% 同一、85% 同一または 80% 同一) である。

10

【0093】

ある態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子のいずれの末端においても突出する一本鎖配列を有さない、すなわち、平滑末端である。他の態様において、個々の核酸分子は、異なる長さであってもよい。言い換えると、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖でない。例として、2つの別々の核酸分子が使用されるとき、分子の一方、例えばアンチセンス配列を含む第1の分子は、それにハイブリダイズする第2の分子より長くてもよい (分子の一部を一本鎖とする)。同様に、単一の核酸分子が使用されるとき、分子のいずれかの末端の部分が一本鎖のままであり得る。

20

【0094】

一態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチおよび/またはループまたはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約 70% にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約 80% にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約 90% ~ 95% にわたって二本鎖である。別の態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約 96% ~ 98% にわたって二本鎖である。ある態様において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 または 15 個までのミスマッチを含む。

30

【0095】

修飾

本発明のヌクレオチドは、糖部分、ホスホジエステル連結部および/または塩基を含む、多様な位置において修飾されてもよい。

【0096】

いくつかの態様において、ヌクレオチドの塩基部分は修飾されてもよい。例えば、ピリミジン塩基はピリミジン環の 2、3、4、5、および/または 6 位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、シトシンの環外アミンが修飾されてもよい。プリン塩基もまた修飾されてもよい。例えば、プリン塩基は、1、2、3、6、7 または 8 位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、アデニンの環外アミンが修飾されてもよい。いくつかのケースにおいて、塩基部分の環の窒素原子は、例えば炭素などの別の原子で置換されてもよい。塩基部分への修飾は、いずれの好適な修飾であってもよい。修飾の例は当業者に知られている。いくつかの態様において、塩基の修飾は、アルキル化プリンまたはピリミジン、アシル化プリンまたはピリミジン、または、その他のヘテロ環を含む。

40

【0097】

いくつかの態様において、ピリミジンは 5 位において修飾されてもよい。例えばピリミジンの 5 位は、アルキル基、アルキニル基、アルケニル基、アシル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。他の例において、ピリミジンの 5 位は、ヒドロキシル基

50

またはアルコキシル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。また、ピリミジンのN⁴位をアルキル化してもよい。さらに他の例において、ピリミジン5-6結合は飽和されていてもよく、ピリミジン環内の窒素原子は炭素原子により置換されてもよく、および/または、O²またはO⁴原子は、硫黄原子により置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

【0098】

他の例において、プリン⁷位および/またはN²および/またはN³位は、アルキル基またはその置換誘導体により修飾されてもよい。さらなる例において、第3環はプリン二環系に縮合されてもよく、および/または、プリン環系内の窒素原子は炭素原子で置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

10

【0099】

5位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5591843号、米国特許第7,205,297号、米国特許第6,432,963号および米国特許第6,020,483号に開示されており；N⁴位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5,580,731号に開示されており；8位で修飾されたプリン⁷の非限定的例は、米国特許第6,355,787号および米国特許第5,580,972号に開示されており；N⁶位で修飾されたプリン⁷の非限定的例は、米国特許第4,853,386号、米国特許第5,789,416号および米国特許第7,041,824号に開示されており；2位で修飾されたプリン⁷の非限定的例は、米国特許第4,201,860号および米国特許第5,587,469号に開示されており；これらの全ては、参考として本明細書に組み込まれる。

【0100】

20

修飾塩基の非限定的例は、N⁴、N⁴-エタノシトシン、7-デアザキサントシン、7-デアザグアノシン、8-オキソ-N⁶-メチルアデニン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N⁶-イソペンテニル-アデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁶-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン、プソイドウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、2-チオシトシンおよび2,6-ジアミノプリンを含む。いくつかの態様において、塩基部分はプリンまたはピリミジン以外のヘテロ環式塩基であってもよい。ヘテロ環式塩基は任意に修飾および/または置換されてもよい。

30

【0101】

糖部分は、天然の未修飾糖、例えば単糖（ペントース、例えばリボース、デオキシリボース）、修飾糖および糖アナログを含む。一般に、可能なヌクレオモノマーの修飾、特に糖部分のものは、例えば、1以上のヒドロキシル基のハロゲン、ヘテロ原子、脂肪族基での置き換え、または、ヒドロキシル基の、エーテル、アミン、チオールなどとしての官能化を含む。

40

【0102】

修飾ヌクレオモノマーの特に有用な一群は、2'-O-メチルヌクレオチドである。かかる2'-O-メチルヌクレオチドは、「メチル化されている」として言及されてもよく、対応するヌクレオチドは、非メチル化ヌクレオチドからアルキル化により、または直接的にメチル化ヌクレオチド試薬から、作られる。修飾ヌクレオモノマーは、未修飾ヌクレオモノマーと組み合わせて使用されてもよい。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、メチル化および非メチル化ヌクレオモノマーの両方を含有してもよい。

【0103】

いくつかの例示的な修飾ヌクレオモノマーは、糖または骨格（backbone）が修飾されたリボヌクレオチドを含む。修飾リボヌクレオチドは、5'位で修飾されたウリジンまたは

50

シチジン、例えば5'-(2-アミノ)プロピルウリジンおよび5'-プロモウリジン；8位で修飾されたアデノシンおよびグアノシン、例えば8-プロモグアノシン；デアザヌクレオチド、例えば7-デアザ-アデノシン；ならびにN-アルキル化ヌクレオチド、例えばN6-メチルアデノシンなどの、天然に存在しない塩基を（天然に存在する塩基の代わりに）含有してもよい。また、糖修飾リボヌクレオチドは、H、アルコキシ（もしくはOR）、Rもしくはアルキル、ハロゲン、SH、SR、アミノ（NH₂、NHR、NR₂など）またはCN基で置き換えられた2'-OH基をも有していてもよく、ここで、Rは、低級アルキル、アルケニルまたはアルキニルである。

【0104】

修飾リボヌクレオチドはまた、修飾基、例えばホスホロチオアート基により置き換えられた、隣接するリボヌクレオチドに繋がれたホスホジエステル基をも有してもよい。より一般的には、多様なヌクレオチド修飾が組み合わされてもよい。

アンチセンス（ガイド）鎖は、標的遺伝子（単数または複数）の少なくとも一部に対して実質的に同一であってもよいが、少なくとも塩基対形成特性に関連して、配列は、有用であるため、例えば標的遺伝子の表現型の発現を阻害するために、完全に同一である必要はない。一般により高い相同性は、より短いアンチセンス遺伝子の使用を埋め合わせるために使用され得る。いくつかのケースにおいて、アンチセンス鎖は、一般に、標的遺伝子に対して（アンチセンス方向において）実質的に同一であろう。

【0105】

2'-O-メチル修飾RNAの使用はまた、細胞ストレス応答を最少化することが望ましい状況においても有益であり得る。2'-O-メチルヌクレオモノマーを有するRNAは、未修飾RNAを認識すると考えられる細胞機構によって認識され得ない。2'-O-メチル化されたかまたは部分的に2'-O-メチル化されたRNAは、標的RNA阻害を維持しつつ、二本鎖核酸に対するインターフェロン応答を回避し得る。これは、例えば、インターフェロンまたは他の細胞ストレス応答を回避するために、インターフェロン応答を誘導する短いRNAi（例えばsiRNA）配列、および、インターフェロン応答を誘導し得るより長いRNAi配列の両方において、有用であり得る。

【0106】

全体として、修飾糖は、D-リボース、2'-O-アルキル（2'-O-メチルおよび2'-O-エチルを含む）、すなわち、2'-アルコキシ、2'-アミノ、2'-S-アルキル、2'-ハロ（2'-フルオロを含む）、2'-メトキシエトキシ、2'-アリルオキシ（-OCH₂CH=CH₂）、2'-プロパルギル、2'-プロピル、エチニル、エテニル、プロペニルならびにシアノなどを含む。一態様において、糖部分は、記載されるように（Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)）、ヘキサースであってもよく、オリゴヌクレオチド中に組み込まれてもよい。例示的なヌクレオモノマーは、例えば米国特許第5,849,902号において見出され得、これは本明細書に参考として組み込まれる。

【0107】

具体的な官能基の定義および化学用語は、以下にさらに詳細に記載される。本発明の目的のために、化学元素はCAS versionのHandbook of Chemistry and Physics, 75th Ed.の内表紙の元素周期表に従って同定され、具体的な官能基はこれに記載のようにして一般的に定義される。さらに、有機化学の一般原理ならびに具体的な官能部分および反応性は、Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999に記載され、この内容の全体は参考として本明細書に組み込まれる。

【0108】

本発明のある化合物は、特定の幾何学的形態または立体異性形態で存在してもよい。本発明は全てのかかる化合物を考慮し、これにはcis-およびtrans-異性体、R-およびS-鏡像異性体、ジアステレオマー、(D)-異性体、(L)-異性体、これらのラセミ混合物、および、これらのその他の混合物を、本発明の範囲内であるとして含む。追加の不斉炭素原子が、アルキル基などの置換基中に存在してよい。全てのかかる異性体

10

20

30

40

50

およびこれらの混合物は、本発明に含むことが意図される。

【0109】

種々の異性体比のいずれかを含有する異性体混合物は、本発明に従って利用されてもよい。例えば、2種の異性体のみが組み合わせられるとき、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2、99:1または100:0の異性体比を含有する混合物は全て、本発明に企図される。当業者は容易に、さらに複雑な異性体混合物について類似の比率が企図されることを理解するであろう。

【0110】

例として、本発明の化合物の特定のエナンチオマーが所望される場合、これは不斉合成により、または、キラル補助基による誘導体化により調製されてもよく、ここで得られたジアステレオマー混合物は分離され、補助基が切断されて、純粋な所望のエナンチオマーが提供される。代わりに、分子がアミノなどの塩基性官能基を含有する場合またはカルボキシルなどの酸性官能基を含有する場合、ジアステレオマー塩が、適切な光学活性酸または塩基により形成され、次いでこうして形成されたジアステレオマーが、当該技術分野において周知の分別結晶化またはクロマトグラフィー手段により分割され、続いて純粋なエナンチオマーが回収される。

【0111】

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'および5'末端(termini)を含む(環状オリゴヌクレオチドを除く)。一態様において、オリゴヌクレオチドの3'および5'末端は、例えば3'または5'結合を修飾することにより、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る(例えば米国特許第5,849,902号およびWO 98/13526)。例えば、オリゴヌクレオチドは「ブロック基(blocking group)」を含めることにより抵抗性になされ得る。本明細書に使用される用語「ブロック基」は、合成のための保護基または結合基のどちらかとしてオリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに付着され得る、置換基(例えばOH基以外のもの)を指す(例えば、FITC、プロピル($\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$)、グリコール($-\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} -$)ホスファート(PO_3^{2-})、ホスホン酸水素またはホスホロアミダイト)。「ブロック基」はまた、「末端ブロック基」または「エキソヌクレアーゼブロック基」をも含み、これらは、修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ抵抗性構造を含む、オリゴヌクレオチドの、3'および5'末端を保護する。

【0112】

例示の末端ブロック基は、キャップ構造(例えば7-メチルグアノシンキャップ)、反転(inverted)ヌクレオモノマー、例えば3'-3'または5'-5'末端反転を有するもの(例えばOrtiagao et al. 1992. Antisense Res. Dev. 2:129を参照)、メチルホスホナート、ホスホロアミダイト、非ヌクレオチド基(例えば、非ヌクレオチドリinker、アミノリinker、抱合体)などを含む。3'末端ヌクレオモノマーは、修飾糖部分を含み得る。3'末端ヌクレオモノマーは、オリゴヌクレオチドの3'-エキソヌクレアーゼ分解を防ぐブロック基により任意に置換され得る3'-Oを含む。例えば、3'-ヒドロキシルは、3' 3'ヌクレオチド間連結物を介してヌクレオチドにエステル化され得る。例えば、アルキルオキシラジカルは、メトキシ、エトキシまたはイソプロポキシであり得、好ましくはエトキシである。

【0113】

任意に、3'末端における3' 3'結合ヌクレオチドは、代替連結により連結され得る。ヌクレアーゼ分解を低減するために、最も5'の3' 5'連結部は、修飾連結部、例えばホスホロチオアートまたはP-アルキルオキシホスホトリエステル連結部であることができる。好ましくは、2つの最も5'の3' 5'連結物は、修飾連結部である。任意に、5'末端ヒドロキシ部分は、リン含有部分、例えば、ホスファート、ホスホロチオアートまたはP-エトキシホスファートで、エステル化され得る。

【0114】

合成方法が、本明細書に記載のとおり、種々の保護基を利用することを、当業者は理解するであろう。本明細書で使用される用語「保護基」は、特定の官能部分、例えばO、SまたはNを一時的に遮断して、多官能性化合物における別の反応部位にて反応が選択的に行われ得ることを意味する。ある態様において、保護基は良好な収率で選択的に反応して、計画された反応に対して安定である、保護された基質を与える；保護基は、容易に利用可能で好ましくは非毒性の、他の官能基を攻撃しない試薬により、良好な収率で選択的に除去可能であるべきである；保護基は、容易に分離可能な誘導体を（より好ましくは、新しい立体中心の生成なしに）形成する；および、保護基は、さらなる反応部位を有することを回避するために最小限の追加の官能性を有する。

【0115】

本明細書に詳述されるとおり、酸素、硫黄、窒素および炭素の保護基が利用されてもよい。ヒドロキシル保護基は以下を含む：メチル、メトキシメチル（MOM）、メチルチオメチル（MTM）、*t*-ブチルチオメチル、（フェニルジメチルシリル）メトキシメチル（SMOM）、ベンジルオキシメチル（BOM）、*p*-メトキシベンジルオキシメチル（PMBM）、（4-メトキシフェノキシ）メチル（*p*-AOM）、グアイアコルメチル（GUM）、*t*-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル（POM）、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル（MEM）、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル、ビス（2-クロロエトキシ）メチル、2-（トリメチルシリル）エトキシメチル（SEMOR）、テトラヒドロピラニル（THP）、3-ブロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル（MTHP）、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS, S-ジオキシド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル]-4-メトキシピペリジン-4-イル（CTMP）、1, 4-ジオキササン-2-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2, 3, 3a, 4, 5, 6, 7, 7a-オクタヒドロ-7, 8, 8-トリメチル-4, 7-メタノベンゾフラン-2-イル、

【0116】

1-エトキシエチル、1-（2-クロロエトキシ）エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチル、2, 2, 2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、2-（フェニルセレニル）エチル、*t*-ブチル、アリル、*p*-クロロフェニル、*p*-メトキシフェニル、2, 4-ジニトロフェニル、ベンジル、*p*-メトキシベンジル、3, 4-ジメトキシベンジル、*o*-ニトロベンジル、*p*-ニトロベンジル、*p*-ハロベンジル、2, 6-ジクロロベンジル、*p*-シアノベンジル、*p*-フェニルベンジル、2-ピコリル、4-ピコリル、3-メチル-2-ピコリルN-オキシド、ジフェニルメチル、*p*, *p*'-ジニトロベンズヒドリル、5-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、*n*-ナフチルジフェニルメチル、*p*-メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ（*p*-メトキシフェニル）フェニルメチル、トリ（*p*-メトキシフェニル）メチル、4-（4'-プロモフェナシルオキシフェニル）ジフェニルメチル、4, 4', 4''-トリス（4, 5-ジクロロフタルイミドフェニル）メチル、4, 4', 4''-トリス（レプリノイルオキシフェニル）メチル、4, 4', 4''-トリス（ベンゾイルオキシフェニル）メチル、3-（イミダゾール-1-イル）ビス（4', 4''-ジメトキシフェニル）メチル、1, 1'-ビス（4-メトキシフェニル）-1'-ピレニルメチル、9-アントリル、9-（9-フェニル）キサンテニル、9-（9-フェニル-10-オキソ）アントリル、1, 3-ベンゾジチオラン-2-イル、ベンズイソチアゾリルS, S-ジオキシド、

【0117】

トリメチルシリル（TMS）、トリエチルシリル（TES）、トリイソプロピルシリル（TIPS）、ジメチルイソプロピルシリル（IPDMS）、ジエチルイソプロピルシリル（DEIPS）、ジメチルテキシルシリル（dimethylthexylsilyl）、*t*-ブチルジメチルシリル（TBDMS）、*t*-ブチルジフェニルシリル（TBDPS）、トリベンジルシリル、トリ-*p*-キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル（DP

10

20

30

40

50

MS)、t-ブチルメトキシフェニルシリル(TBMPS)、ホルマート、ベンゾイルホルマート、アセタート、クロロアセタート、ジクロロアセタート、トリクロロアセタート、トリフルオロアセタート、メトキシアセタート、トリフェニルメトキシアセタート、フェノキシアセタート、p-クロロフェノキシアセタート、3-フェニルプロピオナート、4-オキソペンタノアート(レプリナート)、4,4-(エチレンジチオ)ペンタノアート(レプリノイルジチオアセタール)、ピバロアート、アダマントアート、クロトナート、4-メトキシクロトナート、ベンゾアート、p-フェニルベンゾアート、2,4,6-トリメチルベンゾアート(メシトアート)、

【0118】

アルキルメチルカルボナート、9-フルオレニルメチルカルボナート(Fmoc)、アルキルエチルカルボナート、アルキル2,2,2-トリクロロエチルカルボナート(Tr oc)、2-(トリメチルシリル)エチルカルボナート(TMSEC)、2-(フェニルスルホニル)エチルカルボナート(Psec)、2-(トリフェニルホスホニオ)エチルカルボナート(Peoc)、アルキルイソブチルカルボナート、アルキルビニルカルボナートアルキルアリルカルボナート、アルキルp-ニトロフェニルカルボナート、アルキルベンジルカルボナート、アルキルp-メトキシベンジルカルボナート、アルキル3,4-ジメトキシベンジルカルボナート、アルキルo-ニトロベンジルカルボナート、アルキルp-ニトロベンジルカルボナート、アルキルS-ベンジルチオカルボナート、4-エトキシ-1-ナフチルカルボナート、メチルジチオカルボナート、

【0119】

2-ヨードベンゾアート、4-アジドブチラート、4-ニトロ-4-メチルペンタノアート、o-(ジブプロモメチル)ベンゾアート、2-フォルミルベンゼンスルホナート、2-(メチルチオメトキシ)エチル、4-(メチルチオメトキシ)ブチラート、2-(メチルチオメトキシメチル)ベンゾアート、2,6-ジクロロ-4-メチルフェノキシアセタート、2,6-ジクロロ-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノキシアセタート、2,4-ビス(1,1-ジメチルプロピル)フェノキシアセタート、クロロジフェニルアセタート、イソブチラート、モノスクシノアート、(E)-2-メチル-2-ブテノアート、o-(メトキシカルボニル)ベンゾアート、-ナフトアート、ニトラート、アルキルN,N,N',N'-テトラメチルホスホロジアミダート、アルキルN-フェニルカルバマート、ボラート、ジメチルホスフィノチオイル、アルキル2,4-ジニトロフェニルスルフェナート(dinitrophenylsulfenate)、スルファート、メタンスルホナート(メシラート)、ベンジルスルホナートおよびトシラート(Ts)。

【0120】

1,2-または1,3-ジオールを保護するためには、保護基は以下を含む：メチレンアセタール、エチリデンアセタール、1-t-ブチルエチリデンケタール、1-フェニルエチリデンケタール、(4-メトキシフェニル)エチリデンアセタール、2,2,2-トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘブチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、p-メトキシベンジリデンアセタール、2,4-ジメトキシベンジリデンケタール、3,4-ジメトキシベンジリデンアセタール、2-ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルトエステル、1-メトキシエチリデンオルトエステル、1-エトキシエチリデンオルトエステル、1,2-ジメトキシエチリデンオルトエステル、-メトキシベンジリデンオルトエステル、1-(N,N-ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、-(N,N'-ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、2-オキサシクロペンチリデンオルトエステル、ジ-t-ブチルシリレン基(DTBS)、1,3-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサニリデン)誘導体(TIPDS)、テトラ-t-ブトキシジシロキサン-1,3-ジイリデン誘導体(TBDS)、環状カルボナート、環状ボロナート、エチルボロナートおよびフェニルボロナート。

【0121】

アミノ保護基は、以下を含む：メチルカルバマート、エチルカルバマート、9 - フルオレニルメチルカルバマート (Fmoc)、9 - (2 - スルホ)フルオレニルメチル (fluoroenylmethyl) カルバマート、9 - (2, 7 - ジブromo)フルオレニルメチルカルバマート、2, 7 - ジ - t - ブチル - [9 - (10, 10 - ジオキソ - 10, 10, 10, 10 - テトラヒドロチオキサントール)]メチルカルバマート (DBD-Tmoc)、4 - メトキシフェナシルカルバマート (Phenoc)、2, 2, 2 - トリクロロエチルカルバマート (Troc)、2 - トリメチルシリルエチルカルバマート (Teoc)、2 - フェニルエチルカルバマート (hZ)、1 - (1 - アダマンチル) - 1 - メチルエチルカルバマート (Adpoc)、1, 1 - ジメチル - 2 - ハロエチルカルバマート、1, 1 - ジメチル - 2, 2 - ジブromoエチルカルバマート (DB - t - BOC)、1, 1 - ジメチル - 2, 2, 2 - トリクロロエチルカルバマート (TCBOC)、1 - メチル - 1 - (4 - ビフェニル)エチルカルバマート (Bpoc)、1 - (3, 5 - ジ - t - ブチルフェニル) - 1 - メチルエチルカルバマート (t - Bumeoc)、2 - (2' - および4' - ピリジル)エチルカルバマート (Pyoc)、2 - (N, N - ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチルカルバマート、t - ブチルカルバマート (BOC)、1 - アダマンチルカルバマート (Adoc)、ビニルカルバマート (Voc)、アリルカルバマート (Allo c)、1 - イソプロピルアリルカルバマート (Ipaoc)、シンナミルカルバマート (Coc)、4 - ニトロシンナミルカルバマート (Noc)、8 - キノリルカルバマート、N - ヒドロキシピペリジニルカルバマート、アルキルジチオカルバマート、ベンジルカルバマート (Cbz)、p - メトキシベンジルカルバマート (Moz)、

10

20

【0122】

p - ニトロベンジルカルバマート、p - ブロモベンジルカルバマート、p - クロロベンジルカルバマート、2, 4 - ジクロロベンジルカルバマート、4 - メチルスルフィニルベンジルカルバマート (MsZ)、9 - アントリルメチルカルバマート、ジフェニルメチルカルバマート、2 - メチルチオエチルカルバマート、2 - メチルスルホニルエチルカルバマート、2 - (p - トルエンスルホニル)エチルカルバマート、[2 - (1, 3 - ジチアニル)]メチルカルバマート (Dmoc)、4 - メチルチオフエニルカルバマート (Mtpc)、2, 4 - ジメチルチオフエニルカルバマート (Bmpc)、2 - ホスホニオエチルカルバマート (Peoc)、2 - トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバマート (Ppoc)、1, 1 - ジメチル - 2 - シアノエチルカルバマート、m - クロロ - p - アシロキシベンジルカルバマート、p - (ジヒドロキシボリル)ベンジルカルバマート、5 - ベンズイソキサゾリルメチルカルバマート、2 - (トリフルオロメチル) - 6 - クロモニルメチルカルバマート (Tcro c)、m - ニトロフェニルカルバマート、3, 5 - ジメトキシベンジルカルバマート、o - ニトロベンジルカルバマート、3, 4 - ジメトキシ - 6 - ニトロベンジルカルバマート、フェニル (o - ニトロフェニル)メチルカルバマート、フェノチアジニル - (10) - カルボニル誘導体、N' - p - トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、N' - フェニルアミノチオカルボニル誘導体、

30

【0123】

t - アミルカルバマート、S - ベンジルチオカルバマート、p - シアノベンジルカルバマート、シクロブチルカルバマート、シクロヘキシルカルバマート、シクロペンチルカルバマート、シクロプロピルメチルカルバマート、p - デシロキシベンジルカルバマート、2, 2 - ジメトキシカルボニルビニルカルバマート、o - (N, N - ジメチルカルボキサミド)ベンジルカルバマート、1, 1 - ジメチル - 3 - (N, N - ジメチルカルボキサミド)プロピルカルバマート、1, 1 - ジメチルプロピニルカルバマート、ジ (2 - ピリジル)メチルカルバマート、2 - フラニルメチルカルバマート、2 - ヨードエチルカルバマート、イソボルニルカルバマート、イソブチルカルバマート、イソニコチニルカルバマート、p - (p' - メトキシフェニルアゾ)ベンジルカルバマート、1 - メチルシクロブチルカルバマート、1 - メチルシクロヘキシルカルバマート、1 - メチル - 1 - シクロプロピルメチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (3, 5 - ジメトキシフェニル)エチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (p - フェニルアゾフェニル)エチルカルバマート、1 - メ

40

50

チル - 1 - フェニルエチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (4 - ピリジル) エチルカルバマート、フェニルカルバマート、p - (フェニルアゾ) ベンジルカルバマート、2 , 4 , 6 - トリ - t - ブチルフェニルカルバマート、4 - (トリメチルアンモニウム) ベンジルカルバマート、2 , 4 , 6 - トリメチルベンジルカルバマート、

【 0 1 2 4 】

ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、3 - フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、3 - ピリジルカルボキサミド、N - ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、p - フェニルベンズアミド、o - ニトロフェニルアセトアミド、o - ニトロフェノキシアセトアミド、アセトアセトアミド、(N' - ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ) アセトアミド、3 - (p - ヒドロキシフェニル) プロパンアミド、3 - (o - ニトロフェニル) プロパンアミド、2 - メチル - 2 - (o - ニトロフェノキシ) プロパンアミド、2 - メチル - 2 - (o - フェニルアゾフェノキシ) プロパンアミド、4 - クロロブタンアミド、3 - メチル - 3 - ニトロブタンアミド、o - ニトロシンナミド、N - アセチルメチオニン誘導体、o - ニトロベンズアミド、o - (ベンゾイルオキシメチル) ベンズアミド、4 , 5 - ジフェニル - 3 - オキサゾリン - 2 - オン、N - フタルイミド、N - ジチアスクシンイミド (D t s)、N - 2 , 3 - ジフェニルマレイミド、N - 2 , 5 - ジメチルピロール、N - 1 , 1 , 4 , 4 - テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物 (S T A B A S E)、5 - 置換 1 , 3 - ジメチル - 1 , 3 , 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、5 - 置換 1 , 3 - ジベンジル - 1 , 3 , 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、1 - 置換 3 , 5 - ジニトロ - 4 - ピリドン、

【 0 1 2 5 】

N - メチルアミン、N - アリルアミン、N - [2 - (トリメチルシリル) エトキシ] メチルアミン (S E M)、N - 3 - アセトキシプロピルアミン、N - (1 - イソプロピル - 4 - ニトロ - 2 - オキソ - 3 - ピロリン - 3 - イル) アミン、第四級アンモニウム塩、N - ベンジルアミン、N - ジ (4 - メトキシフェニル) メチルアミン、N - 5 - ジベンゾスベリルアミン、N - トリフェニルメチルアミン (T r)、N - [(4 - メトキシフェニル) ジフェニルメチル] アミン (M M T r)、N - 9 - フェニルフルオレニルアミン (P h F)、N - 2 , 7 - ジクロロ - 9 - フルオレニルメチレンアミン、N - フェロセニルメチルアミノ (F c m)、N - 2 - ピコリルアミノ N' - オキシド、N - 1 , 1 - ジメチルチオメチレンアミン、N - ベンジリデンアミン、N - p - メトキシベンジリデンアミン、N - ジフェニルメチレンアミン、N - [(2 - ピリジル) メシチル] メチレンアミン、N - (N' , N' - ジメチルアミノメチレン) アミン、N , N' - イソプロピリデンジアミン、N - p - ニトロベンジリデンアミン、N - サリシリデンアミン、N - 5 - クロロサリシリデンアミン、N - (5 - クロロ - 2 - ヒドロキシフェニル) フェニルメチレンアミン、N - シクロヘキシリデンアミン、N - (5 , 5 - ジメチル - 3 - オキソ - 1 - シクロヘキセニル) アミン、N - ボラン誘導体、N - ジフェニルボリン酸誘導体、N - [フェニル (ペンタカルボニルクロム - またはタングステン) カルボニル] アミン、N - 銅キレート、N - 亜鉛キレート、N - ニトロアミン、N - ニトロソアミン、アミン N - オキシド、

【 0 1 2 6 】

ジフェニルホスフィンアミド (D p p)、ジメチルチオホスフィンアミド (M p t)、ジフェニルチオホスフィンアミド (P p t)、ジアルキルホスホルアミダート、ジベンジルホスホルアミダート、ジフェニルホスホルアミダート、ベンゼンスルフェンアミド、o - ニトロベンゼンスルフェンアミド (N p s)、2 , 4 - ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、2 - ニトロ - 4 - メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、3 - ニトロピリジンスルフェンアミド (N p y s)、p - トルエンスルホンアミド (T s)、ベンゼンスルホンアミド、2 , 3 , 6 - トリメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M t r)、2 , 4 , 6 - トリメトキシベンゼンスルホンアミド (M t b)、2 , 6 - ジメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (P m e)、2 , 3 , 5 , 6 - テトラメチル - 4 - メトキシベンゼ

10

20

30

40

50

ンスルホンアミド (M t e)、4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M b s)、2, 4, 6 - トリメチルベンゼンスルホンアミド (M t s)、2, 6 - ジメトキシ - 4 - メチルベンゼンスルホンアミド (i M d s)、2, 2, 5, 7, 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホンアミド (P m c)、メタンスルホンアミド (M s)、 - トリメチルシリルエタンスルホンアミド (S E S)、9 - アントラセンスルホンアミド、4 - (4', 8' - ジメトキシナフチルメチル) ベンゼンスルホンアミド (D N M B S)、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミドおよびフェナシルスルホンアミド。

【0127】

例示の保護基は本明細書に詳述される。しかしながら本発明は、これらの保護基に限定されることを意図せず、むしろ、種々の追加の等価な保護基が上の基準を使用して容易に同定され、本発明の方法において利用され得る。加えて、種々の保護基についてはProtective Groups in Organic Synthesis, Third Ed. Greene, T.W. and Wuts, P.G., Eds., John Wiley & Sons, New York: 1999に記載されており、この内容の全体は本明細書に参考として組み込まれる。

【0128】

本明細書に記載のとおり、化合物は、あらゆる数の置換基または官能部分により置換されてよいことが理解される。一般に、用語「任意に」が先行するかどうかに関わらず、用語「置換された」およびこの発明の式に含まれる置換基は、所与の構造中の水素ラジカルの、特定置換基のラジカルによる置き換えを指す。任意の所与の構造中の1つより多くの位置が、特定群から選択された1つより多くの置換基により置換されてもよい場合、置換基は各位置において同一であっても異なってもよい。本明細書に使用される用語「置換された」は、有機化合物の全ての許容し得る置換基を含むことが企図される。広い見地からは、許容し得る置換基は、有機化合物の、非環式および環式、分枝および非分枝、炭素環式およびヘテロ環式、芳香族および非芳香族置換基を含む。

【0129】

窒素などのヘテロ原子は、水素置換基および/またはヘテロ原子の原子価を満たす、本明細書に記載の有機化合物のいずれの許容し得る置換基を有してよい。その上、本発明は、いかなる様式においても、有機化合物の許容し得る置換基によって限定されることを意図しない。本発明により想定される置換基および変数の組み合わせは、好ましくは、例えば感染症または増殖性疾患などの処置に有用な安定な化合物の形成をもたらすものである。用語「安定な」とは、好ましくは、本明細書において、製造を可能とするのに十分な安定性を有し、検出されるのに十分な時間の間化合物の完全性を維持し、好ましくは本明細書に詳述される目的のために十分な時間有用であるような、化合物を指す。

【0130】

本明細書に使用される用語「脂肪族」は、飽和および不飽和両方の、直鎖(すなわち非分枝)、分枝、非環式、環式または多環式の脂肪族炭化水素であって、任意に1以上の官能基により置換されているものを含む。当業者に理解されるとおり、本明細書において「脂肪族」は、これらに限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニルおよびシクロアルキニル部分を含むことを意図する。よって、本明細書に使用される用語「アルキル」は、直鎖、分枝および環式アルキル基を含む。類似の慣例がその他の一般的用語、例えば「アルケニル」、「アルキニル」などにも適用される。その上、本明細書に使用される用語「アルキル」、「アルケニル」、「アルキニル」などは、置換および非置換基の両方を包含する。ある態様において、本明細書で使用される場合「低級アルキル」は、1~6個の炭素原子を有するアルキル基(環式、非環式、置換、非置換、分枝または非分枝)を示すために使用される。

【0131】

ある態様において、本発明に採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1~20個の脂肪族炭素原子を含有する。ある態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1~10個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1

～ 8 個の脂肪族炭素原子を含有する。さらなる他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～6 個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～4 個の脂肪族炭素原子を含有する。

【0132】

よって例示の脂肪族基は、これらに限定されないが、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、 $-CH_2-$ シクロプロピル、ビニル、アリル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、シクロブチル、 $-CH_2-$ シクロブチル、*n*-ペンチル、*sec*-ペンチル、イソペンチル、*tert*-ペンチル、シクロペンチル、 $-CH_2-$ シクロペンチル、*n*-ヘキシル、*sec*-ヘキシル、シクロヘキシル、 $-CH_2-$ シクロヘキシル部分等を含み、これは重ねて、1 以上の置換基を有してもよい。アルケニル基は、これらに限定されないが、例えばエテニル、プロベニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-イルなどを含む。代表的なアルキニル基は、これらに限定されないが、エチニル、2-プロピニル(プロパルギル)、1-プロピニルなどを含む。

【0133】

本発明の化合物の、上記の脂肪族(およびその他の)部分の置換基のいくつかの例は、これらに限定されないが以下を含む：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ； $-F$ ； $-Cl$ ； $-Br$ ； $-I$ ； $-OH$ ； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-CF_3$ ； $-CH_2CF_3$ ； $-CHCl_2$ ； $-CH_2OH$ ； $-CH_2CH_2OH$ ； $-CH_2NH_2$ ； $-CH_2SO_2CH_3$ ； $-C(O)R_x$ ； $-CO_2(R_x)$ ； $-CON(R_x)_2$ ； $-OC(O)R_x$ ； $-OCO_2R_x$ ； $-OCON(R_x)_2$ ； $-N(R_x)_2$ ； $-S(O)_2R_x$ ； $-NR_x(CO)R_x$ ；ここで R_x の出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

【0134】

本明細書に使用される用語「ヘテロ脂肪族」は、例えば炭素原子の代わりに、1 以上の酸素、硫黄、窒素、リンまたはケイ素原子を含む脂肪族部分を指す。ヘテロ脂肪族部分は分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、モルホリノ、ピロリジニルなどの飽和および不飽和のヘテロ環を含んでもよい。

【0135】

ある態様において、ヘテロ脂肪族部分は、それ上にある 1 以上の水素原子の、下記を含むがこれらに限定はされない 1 以上の部分による独立した置き換えによって置換される：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ； $-F$ ； $-Cl$ ； $-Br$ ； $-I$ ； $-OH$ ； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-CF_3$ ； $-CH_2CF_3$ ； $-CHCl_2$ ； $-CH_2OH$ ； $-CH_2CH_2OH$ ； $-CH_2NH_2$ ； $-CH_2SO_2CH_3$ ； $-C(O)R_x$ ； $-CO_2(R_x)$ ； $-CON(R_x)_2$ ； $-OC(O)R_x$ ； $-OCO_2R_x$ ； $-OCON(R_x)_2$ ； $-N(R_x)_2$ ； $-S(O)_2R_x$ ； $-NR_x(CO)R_x$ ；ここで R_x の出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロア

10

20

30

40

50

リーアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

【0136】

本明細書に使用される用語「ハロ」および「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選択される原子を指す。

用語「アルキル」は、飽和脂肪族基を含み、これは、直鎖アルキル基（例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなど）、分枝鎖アルキル基（イソプロピル、tert-ブチル、イソブチルなど）、シクロアルキル（脂環式）基（シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル）、アルキル置換シクロアルキル基およびシクロアルキル置換アルキル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキルは、6個以下（例えば直鎖については $C_1 \sim C_6$ 、分枝鎖については $C_3 \sim C_6$ ）、より好ましくは4個以下の炭素原子をその骨格中に有する。同様に、好ましいシクロアルキルは、3～8個の炭素原子をその環構造中に有し、より好ましくは5または6個の炭素を環構造中に有する。用語 $C_1 \sim C_6$ は、1～6個の炭素原子を含むアルキル基を含有する。

【0137】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキルは、「非置換のアルキル」および「置換アルキル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の1以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルキル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、およびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

【0138】

シクロアルキルは、例えば上記の置換基により、さらに置換されてもよい。「アルキルアリール」または「アリールアルキル」部分は、アリールで置換されたアルキル（例えばフェニルメチル（ベンジル））である。用語「アルキル」はまた、天然または非天然のアミノ酸の側鎖をも含む。用語「n-アルキル」は、直鎖（すなわち、非分枝）の非置換のアルキル基を意味する。

【0139】

用語「アルケニル」は、上記のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも1つの二重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルケニル」は、直鎖アルケニル基（例えばエチレニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニルなど）、分枝鎖アルケニル基、シクロアルケニル（脂環式）基（シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル）、アルキルまたはアルケニル置換シクロアルケニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルケニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルケニル基は、6個以下の炭素原子をその骨格中に有する（例えば直鎖については $C_2 \sim C_6$ 、分枝鎖については $C_3 \sim C_6$ ）。同様に、シクロアルケニル基は、その環構造中に3～8個の炭素原子、より好ましくは環構造中に5または

6 個の炭素を有してもよい。用語 $C_2 \sim C_6$ は、2 ～ 6 個の炭素原子を含むアルケニル基を含有する。

【0140】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルケニルは、「非置換のアルケニル」および「置換アルケニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の 1 以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルケニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

【0141】

用語「アルキニル」は、上記のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも 1 つの三重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルキニル」は、直鎖アルキニル基（例えばエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニルなど）、分枝鎖アルキニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルキニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキニル基は、6 個以下の炭素原子をその骨格中に有する（例えば直鎖については $C_2 \sim C_6$ 、分枝鎖については $C_3 \sim C_6$ ）。用語 $C_2 \sim C_6$ は、2 ～ 6 個の炭素原子を含むアルキニル基を含有する。

【0142】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキニルは、「非置換のアルキニル」および「置換アルキニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の 1 以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有するアルキニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

炭素の数が他に特定されない限りにおいて、「低級アルキル」は、本明細書に使用されるとおり、上で定義されるが、1 ～ 5 個の炭素原子をその骨格構造中に有するアルキル基を意味する。「低級アルケニル」および「低級アルキニル」は、例えば 2 ～ 5 個の炭素原子の鎖長を有する。

【0143】

用語「アルコキシ」は、酸素原子に共有結合している置換および非置換のアルキル、アルケニルおよびアルキニル基を含む。アルコキシ基の例は、メトキシ、エトキシ、イソブ

10

20

30

40

50

ロピルオキシ、プロポキシ、ブトキシおよびペントキシ基を含む。置換アルコキシ基の例は、ハロゲン化アルコキシ基を含む。アルコキシ基は、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリアルカルボニルオキシ、アルコシカルボニルオキシ、アリアルオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリアルカルボニル、アルコシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリアルアミノ、ジアリアルアミノおよびアルキルアリアルアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリアルカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフフィドリル（sulfydryl）、アルキルチオ、アリアルチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルファミル（alkylsulfmyl）、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリアルまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分などの、独立して選択される基により置換されていてもよい。ハロゲン置換アルコキシ基の例は、これらに限定されないが、フルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、クロロメトキシ、ジクロロメトキシ、トリクロロメトキシなどを含む。

【0144】

用語「ヘテロ原子」は、炭素または水素以外のあらゆる元素の原子を含む。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、硫黄およびリンである。

用語「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」は、（適切なカウンターイオンとともに）-OHまたは-O-を持つ基を含む。

用語「ハロゲン」は、フッ素、臭素、塩素、ヨウ素などを含む。用語「過ハロゲン化」は一般に、全ての水素がハロゲン原子により置き換えられている部分を指す。

【0145】

用語「置換される」は、当該部分に配置され得、当該分子がその意図する機能を行うことを可能にする、独立して選択される置換基を含む。置換基の例は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリアル、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ NR'R''、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ CN、NO₂、ハロゲン、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ C（ハロゲン）₃、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ CH（ハロゲン）₂、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ CH₂（ハロゲン）、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ CONR'R''、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ S(O)_{1 \sim 2}NR'R''、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ CHO、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ O(CR'R'')_{0 \sim 3}H、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ S(O)_{0 \sim 2}R'、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ O(CR'R'')_{0 \sim 3}H、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ COR'、 $(CR'R'')_0 \sim 3$ CO₂R'、または $(CR'R'')_0 \sim 3$ OR'基；ここで各R'およびR''は、各々独立して、水素、C_{1 \sim 5}アルキル、C_{2 \sim 5}アルケニル、C_{2 \sim 5}アルキニルもしくはアリアル基であるか、または、R'およびR''は、一緒になって、ベンジリデン基もしくは $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ 基である、を含む。

【0146】

用語「アミン」または「アミノ」は、窒素原子が少なくとも1個の炭素またはヘテロ原子に共有結合している化合物または部分を含む。用語「アルキルアミノ」は、窒素が少なくとも1つのさらなるアルキル基に結合している基および化合物を含む。用語「ジアルキルアミノ」は、窒素原子が、少なくとも2つの追加のアルキル基に結合している基を含む。

【0147】

用語「エーテル」は、2個の異なる炭素原子またはヘテロ原子に結合した酸素を含有する化合物または部分を含む。例えば、この用語は、「アルコシアルキル」を含み、これは、別のアルキル基に共有結合した酸素原子に共有結合しているアルキル、アルケニルまたはアルキニル基を指す。

【0148】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」および「オリゴヌクレオチド」は、2以上のヌクレオチドのポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、DNA、RNAまたはこれらの誘導体もしくは修飾バージョンであり得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において修飾され得、例えば分子の安定性、そのハイブリダイゼーションパラメータなどが改善される。

【0149】

ポリヌクレオチドは、限定することなく以下を含む群から選択される修飾塩基部分を含んでもよい：5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルクエオシン (galactosylqueosine)、イノシン、N⁶ - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N⁶ - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルクエオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N⁶ - イソペンテニルアデニン、ワイブトキシソシン (wybutoxosine)、シュードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシルおよび2, 6 - ジアミノプリン。

【0150】

ポリヌクレオチドは、修飾糖部分（例えば2' - フルオロリボース、リボース、2' - デオキシリボース、2' - O - メチルシチジン、アラビノースおよびヘキソース）および/または修飾リン酸部分（例えばホスホロチオアートおよび5' - N - ホスホロアミダイト結合）を含んでもよい。ヌクレオチド配列は典型的には、タンパク質および酵素を作るために細胞機構によって使用される情報を含む、遺伝情報を持つ。これらの用語は、二本鎖または一本鎖のゲノムおよびcDNA、RNA、あらゆる合成のおよび遺伝子操作のポリヌクレオチド、および、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これは、一本鎖および二本鎖分子、すなわちDNA - DNA、DNA - RNA、およびRNA - RNAハイブリッド、ならびに、アミノ酸骨格に塩基を抱合させることにより形成された「タンパク質核酸」(PNA)を含む。

【0151】

用語「塩基」は、知られているプリンおよびピリミジンヘテロ環式塩基、デアザプリンならびにそのアナログ（ヘテロ環置換アナログ、例えばアミノエトキシフェノキサジンを含む）、誘導体（例えば1 - アルキル - 、1 - アルケニル - 、ヘテロ芳香族 - および1 - アルキニル誘導体）および互変異性体を含む。プリンの例は、アデニン、グアニン、イノシン、ジアミノプリンおよびキサンチンならびにそのアナログ（例えば8 - オキソ - N⁶ - メチルアデニンまたは7 - ジアザキサンチン）および誘導体を含む。ピリミジンは、例えばチミン、ウラシルおよびシトシンならびにそれらのアナログ（例えば5 - メチルシトシン、5 - メチルウラシル、5 - (1 - プロピニル)ウラシル、5 - (1 - プロピニル)シトシンおよび4, 4 - エタノシトシン）を含む。好適な塩基の他の例は、2 - アミノピリジンおよびトリアジン類などの非プリニルおよび非ピリミジニル塩基を含む。

【0152】

好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、RNAヌクレオチドである。別の好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、修飾RNAヌクレオチドである。よって、オリゴヌクレオチドは、修飾RNAヌクレオチドを含有する。

10

20

30

40

50

【0153】

用語「ヌクレオシド」は、糖部分、好ましくはリボースまたはデオキシリボースに共有結合した塩基を含む。好ましいヌクレオシドの例は、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを含む。ヌクレオシドはまた、遊離カルボキシル基、遊離アミノ基または保護基を含んでもよいアミノ酸またはアミノ酸アナログに連結した塩基をも含む。好適な保護基は当該技術分野において周知である（P. G. M. WutsおよびT. W. Greene、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第2版、Wiley-Interscience、New York、1999年を参照）。

用語「ヌクレオチド」は、ホスファート基またはホスファートアナログをさらに含むヌクレオシドを含む。

10

【0154】

核酸分子は、分子の細胞への標的化および/または送達のために、疎水性部分と結びついてよい。ある態様において、疎水性部分はリンカーを介して核酸分子と結びつく。ある態様において、結びつきは非共有結合性相互作用を介する。他の態様において、結びつきは共有結合を介する。当該技術分野において知られているいずれのリンカーも、核酸を疎水性部分に結びつけるために使用されてもよい。当該技術分野において知られているリンカーは、公開された国際PCT出願：WO 92/03464、WO 95/23162、WO 2008/021157、WO 2009/021157、WO 2009/134487、WO 2009/126933、米国特許出願公開第2005/0107325号、米国特許第5,414,077号、米国特許第5,419,966号、米国特許第5,512,667号、米国特許第5,646,126号および米国特許第5,652,359号に記載されており、これらは本明細書に参考として組み込まれる。

20

【0155】

リンカーは、多原子リンカーに対する共有結合程度に単純であってもよい。リンカーは環式または非環式であってもよい。リンカーは、任意に置換されていてもよい。ある態様において、リンカーは核酸から切断されることができる。ある態様において、リンカーは、生理学的条件下で加水分解されることができる。ある態様において、リンカーは、酵素（例えばエステラーゼまたはホスホジエステラーゼ）により切断されることができる。

【0156】

ある態様において、リンカーは、核酸を疎水性部分から分離するスペーサー要素を含む。スペーサー要素は1～30個の炭素またはヘテロ原子を含んでもよい。ある態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素はプロトン化可能な官能基を含む。かかるプロトン化可能な官能基は、核酸分子のエンドソーム脱出を促進してもよい。プロトン化可能な官能基はまた、核酸の細胞への送達を支援することもでき、例えば分子の全体の電荷を中性化する。他の態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素は、生物学的に不活性である（すなわち、もたらされる核酸分子に対して生物学的活性または機能を付与しない）。

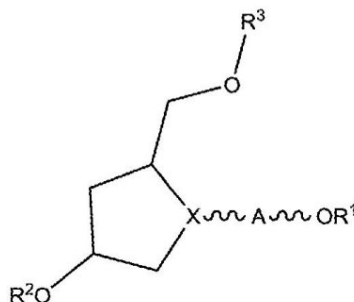
30

【0157】

ある態様において、リンカーおよび疎水性部分を持つ核酸分子は、本明細書に記載された式のものである。ある態様において、核酸分子は、式：

【化1】

40



式中、

50

X は、N または C H であり；

A は、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R¹ は、疎水性部分であり；

R² は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

R³ は、核酸である、

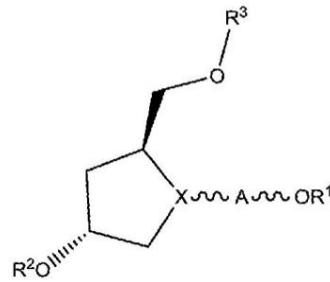
で表される。

10

【 0 1 5 8 】

ある態様において、分子は、式：

【 化 2 】

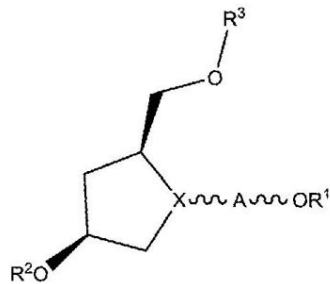


20

で表される。

ある態様において、分子は、式：

【 化 3 】



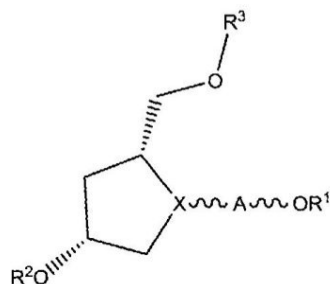
30

で表される。

【 0 1 5 9 】

ある態様において、分子は、式：

【 化 4 】

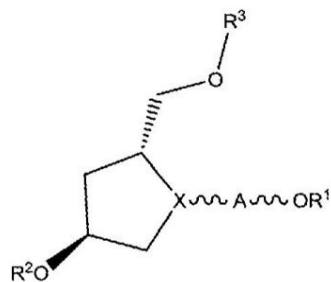


40

で表される。

ある態様において、分子は、式：

【化 5】



10

で表される。

【0160】

ある態様において、XはNである。ある態様において、XはCHである。

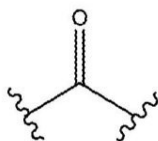
ある態様において、Aは結合である。ある態様において、Aは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₂₀ アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₁₂ アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₁₀ アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₈ アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₆ アルキルである。ある態様において、Aは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のヘテロ脂肪族である。

20

【0161】

ある態様において、Aは、式：

【化 6】



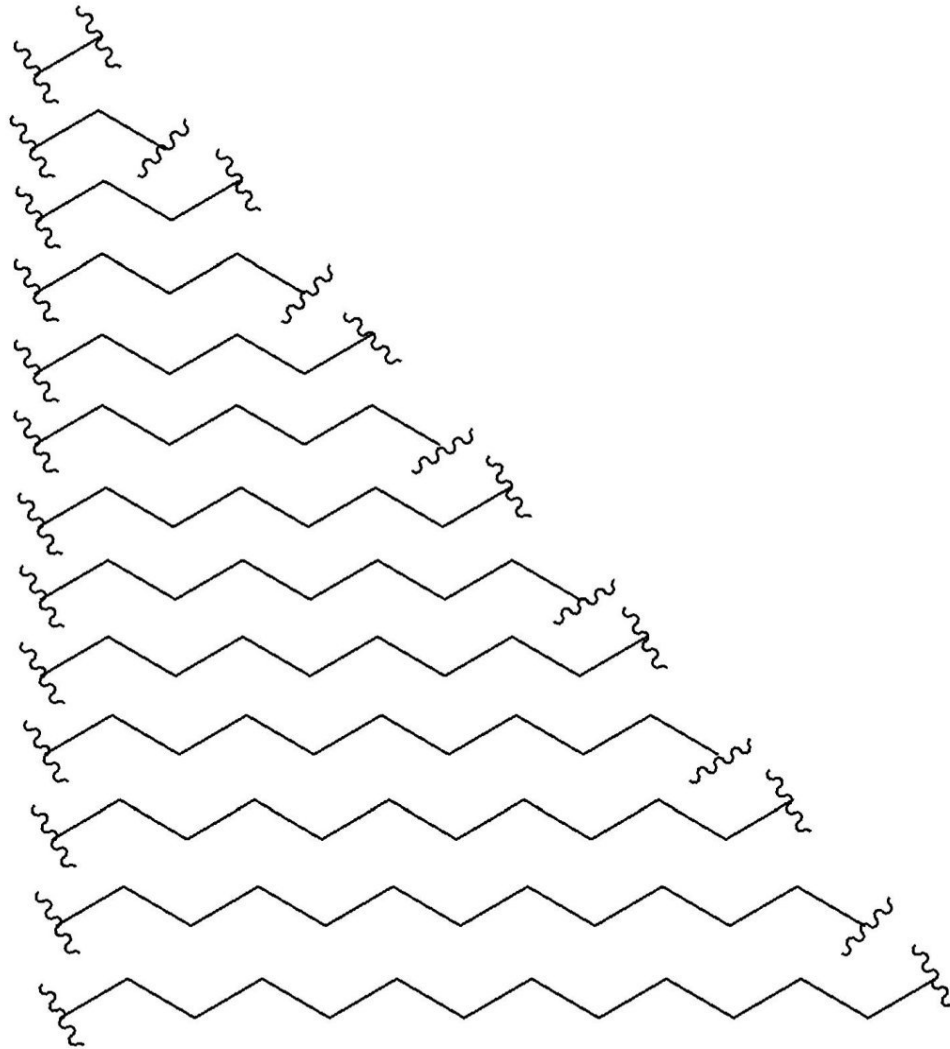
30

で表される。

【0162】

ある態様において、Aは、式：

【化 7】



10

20

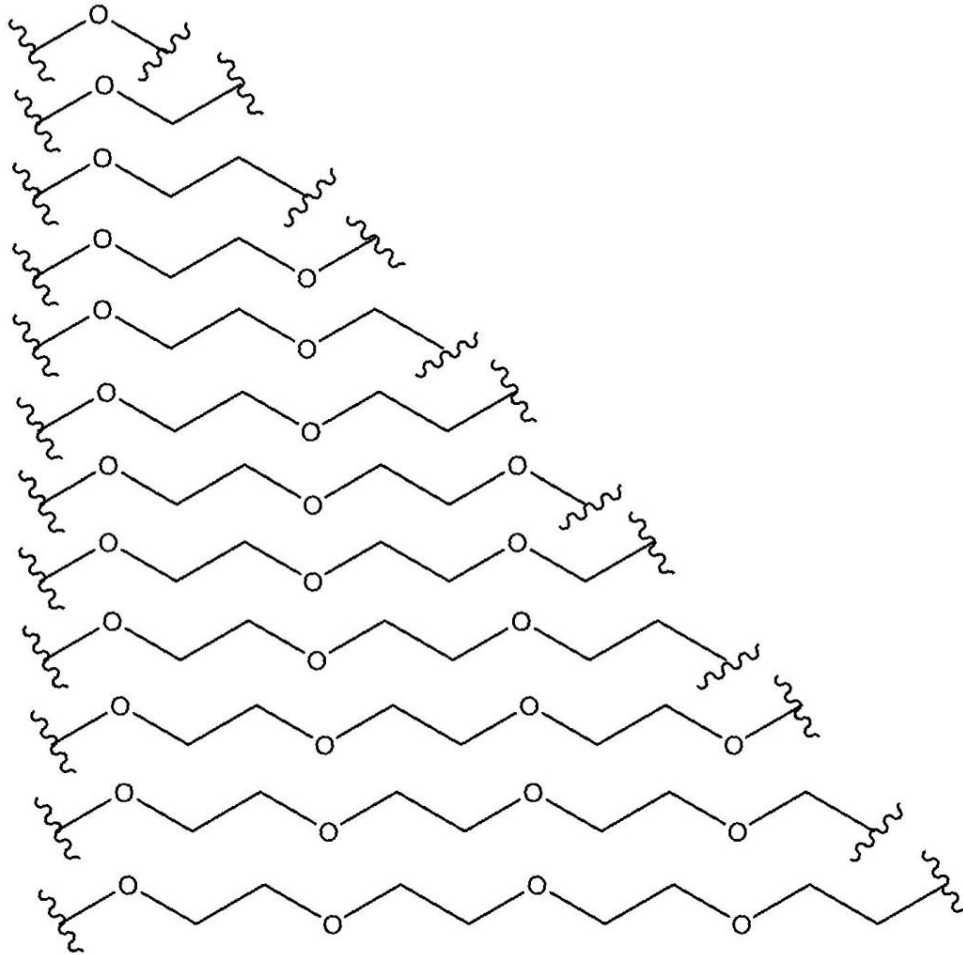
30

の 1 つで表される。

【 0 1 6 3 】

ある態様において、A は、式：

【化 8】



の 1 つで表される。

【 0 1 6 4 】

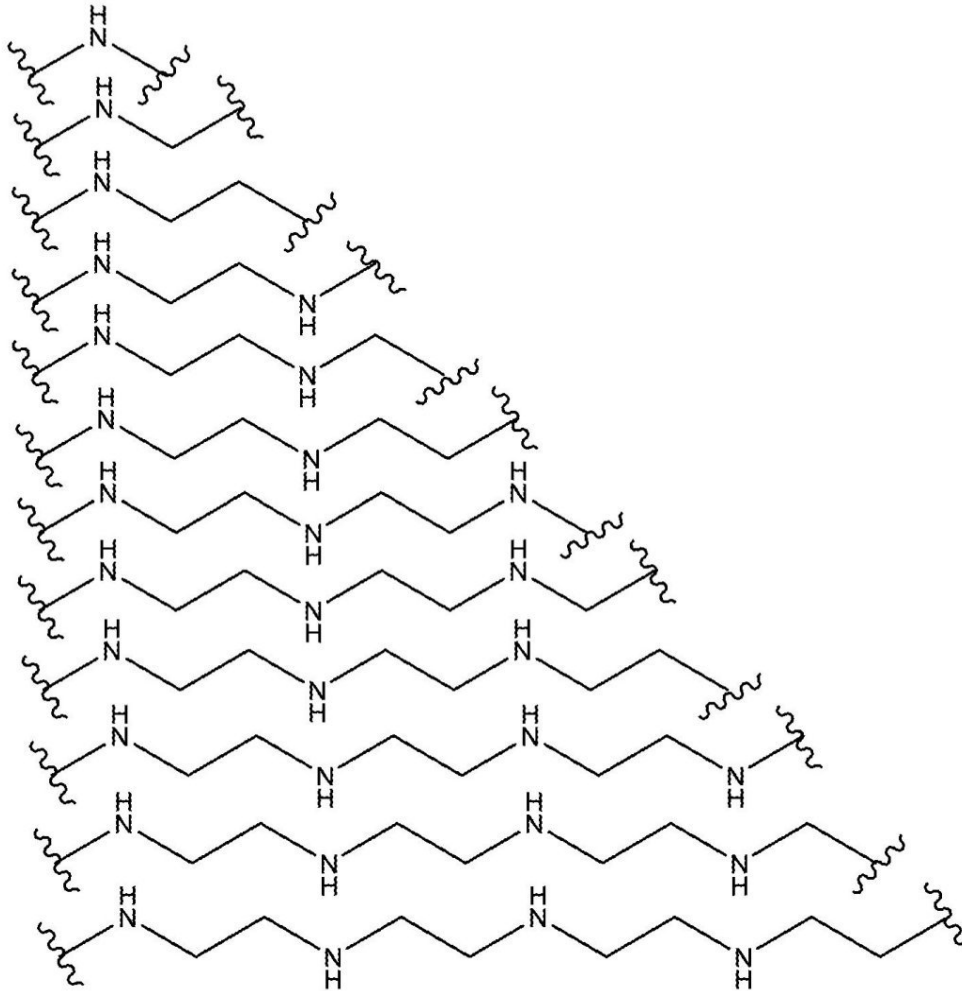
ある態様において、A は、式：

10

20

30

【化 9】



10

20

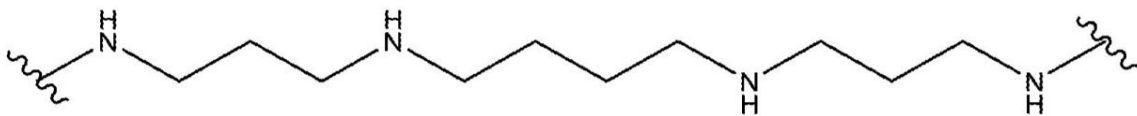
の 1 つで表される。

【 0 1 6 5 】

30

ある態様において、A は、式：

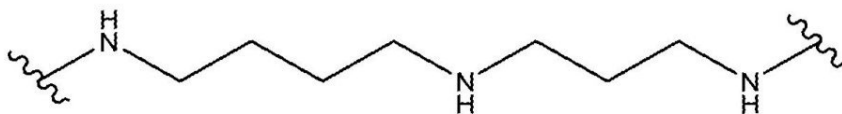
【化 1 0】



で表される。

ある態様において、A は、式：

【化 1 1】



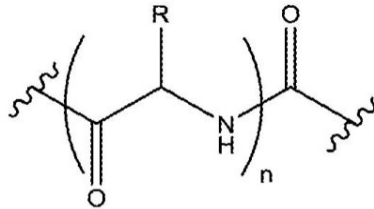
40

で表される。

【 0 1 6 6 】

ある態様において、A は、式：

【化 1 2】



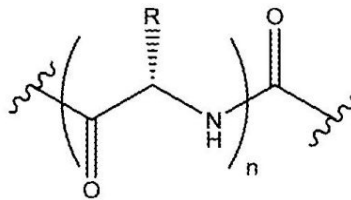
式中、

R の出現の各々は、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；および

n は、1 から 20 までの整数である、

で表される。ある態様において、A は、式：

【化 1 3】



で表される。

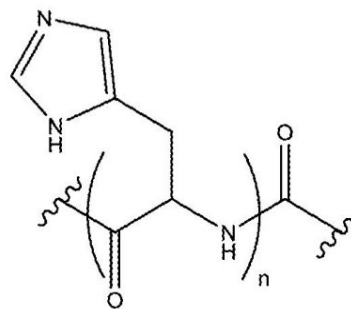
【0 1 6 7】

ある態様において、R の出現の各々は、独立して、天然のアミノ酸の側鎖である。ある態様において、n は、1 から 15 までの整数である（境界を含む）。ある態様において、n は、1 から 10 までの整数である（境界を含む）。ある態様において、n は、1 から 5 までの整数である（境界を含む）。

【0 1 6 8】

ある態様において、A は、式：

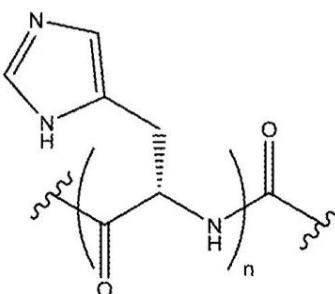
【化 1 4】



式中、n は、1 から 20 までの整数である（境界を含む）、

で表される。ある態様において、A は、式：

【化 1 5】



10

20

30

40

50

で表される。

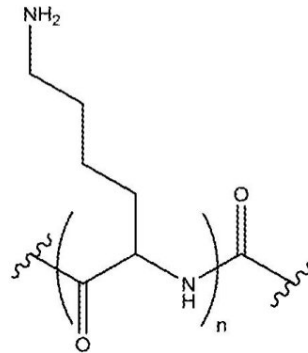
【0169】

ある態様において、 n は、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から5までの整数である（境界を含む）。

【0170】

ある態様において、 A は、式：

【化16】

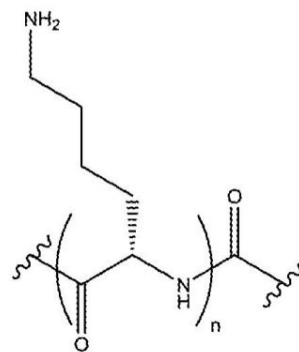


10

式中、 n は、1から20までの整数である（境界を含む）、
で表される。ある態様において、 A は、式：

20

【化17】



30

で表される。

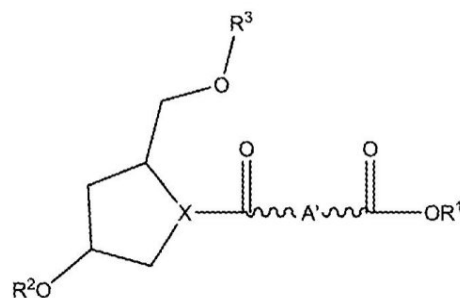
【0171】

ある態様において、 n は、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 n は、1から5までの整数である（境界を含む）。

【0172】

ある態様において、分子は、式：

【化18】



40

式中、 X 、 R^1 、 R^2 および R^3 は、本明細書に定義された通りであり；および
 A' は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか；ま

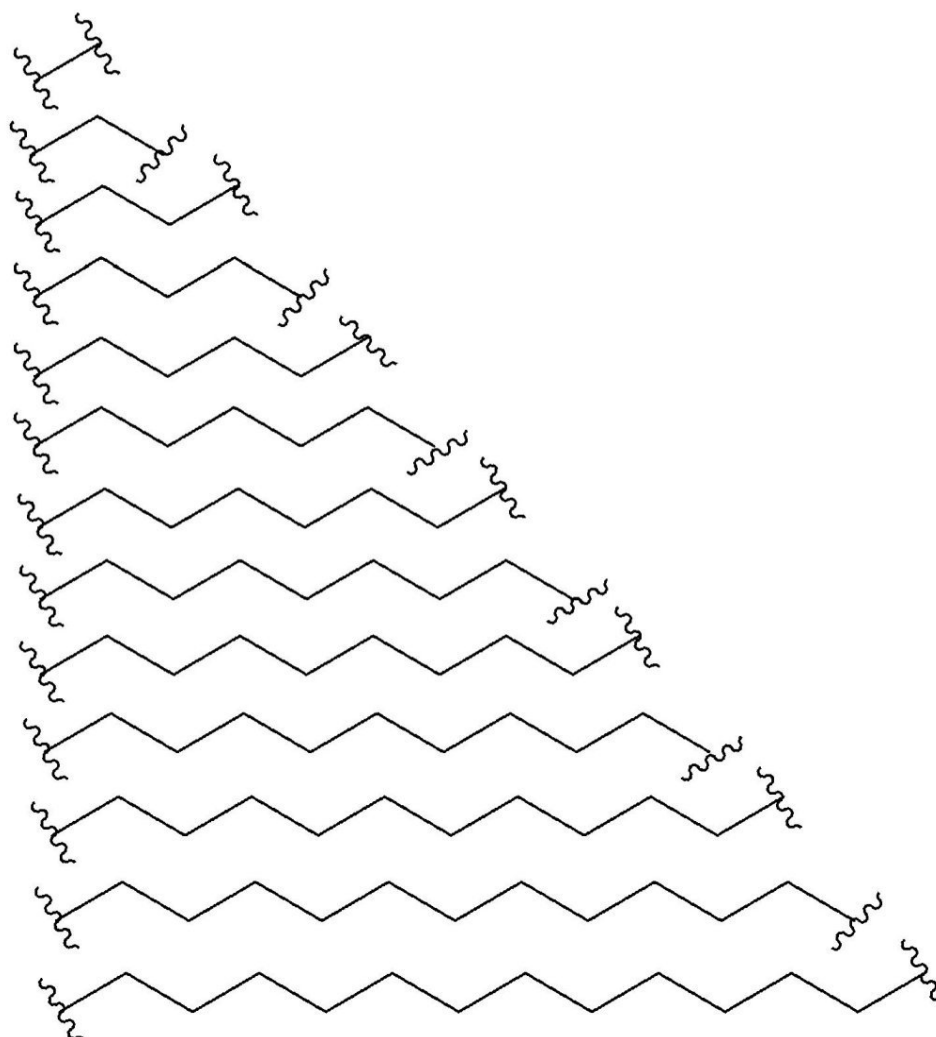
50

たは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、
で表される。

【 0 1 7 3 】

ある態様において、A' は、式：

【 化 1 9 】



10

20

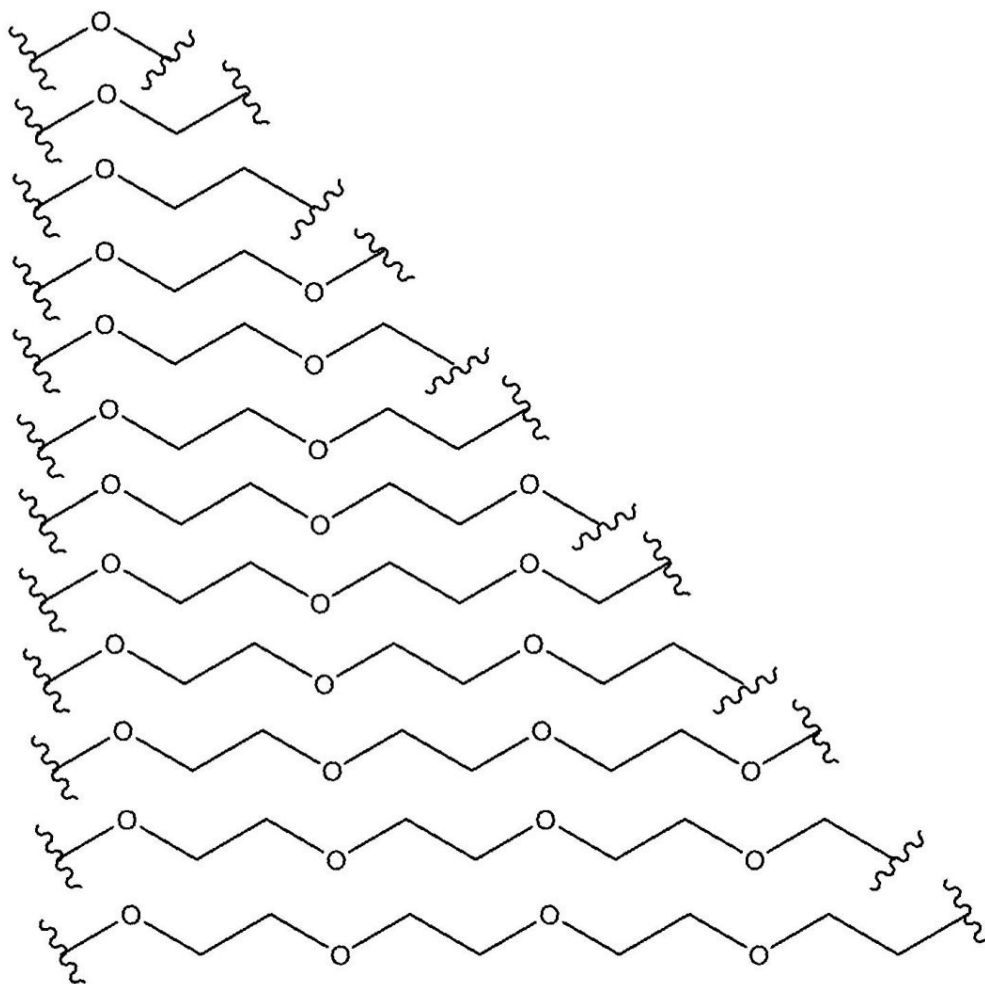
30

の 1 つで表される。

【 0 1 7 4 】

ある態様において、A は、式：

【化 20】



10

20

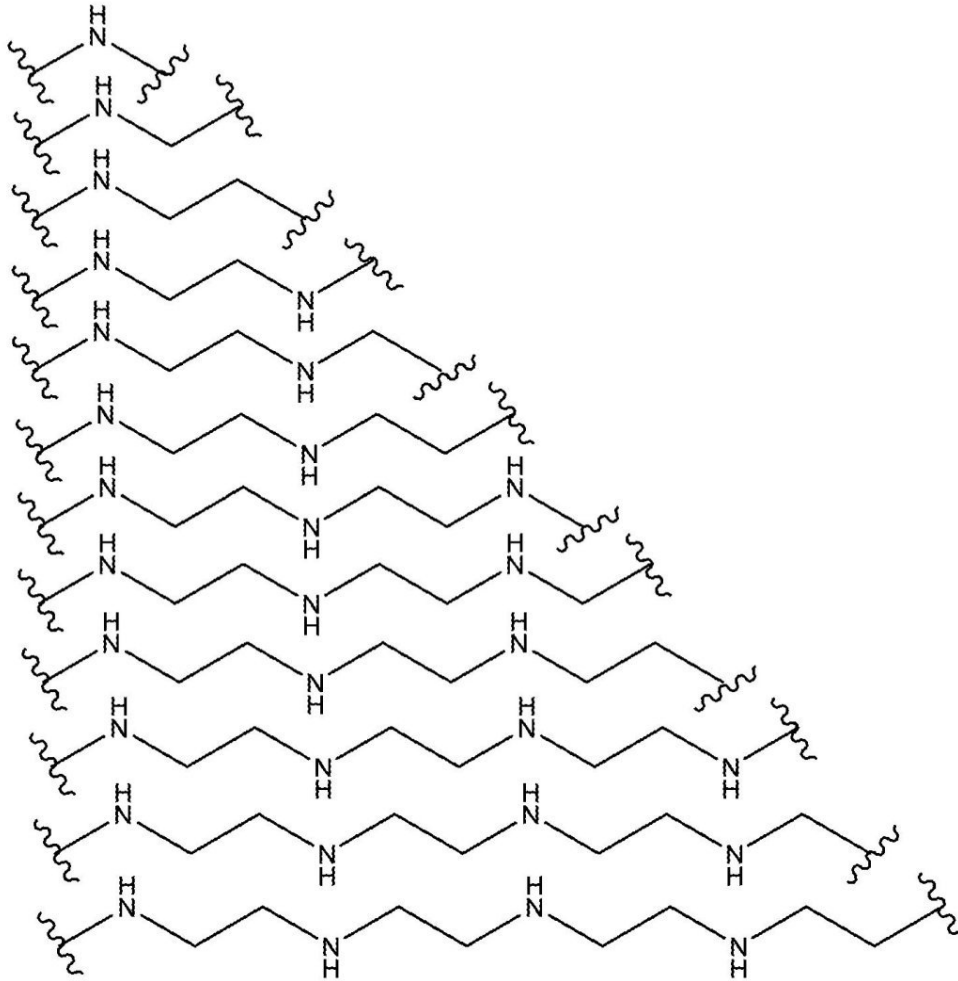
の 1 つで表される。

【 0 1 7 5 】

30

ある態様において、A は、式：

【化 2 1】



10

20

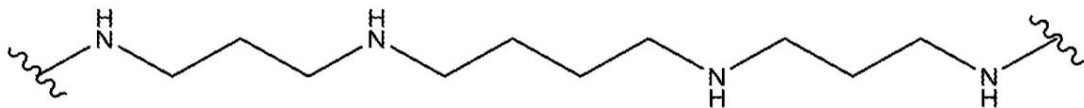
の 1 つで表される。

【 0 1 7 6 】

ある態様において、A は、式：

30

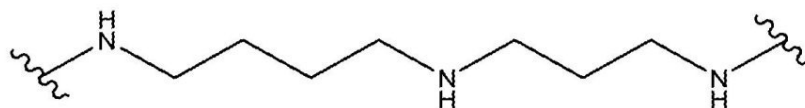
【化 2 2】



で表される。

ある態様において、A は、式：

【化 2 3】



40

で表される。

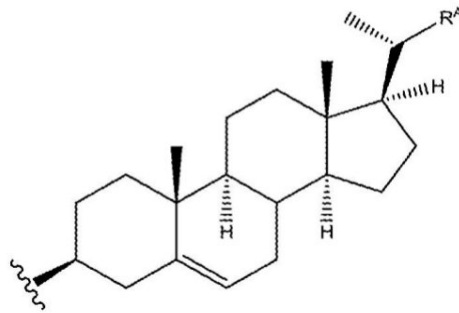
【 0 1 7 7 】

ある態様において、R¹ はステロイドである。ある態様において、R¹ はコレステロールである。ある態様において、R¹ は親油性ビタミンである。ある態様において、R¹ はビタミン A である。ある態様において、R¹ はビタミン E である。

【 0 1 7 8 】

ある態様において、R¹ は、式：

【化 2 4】



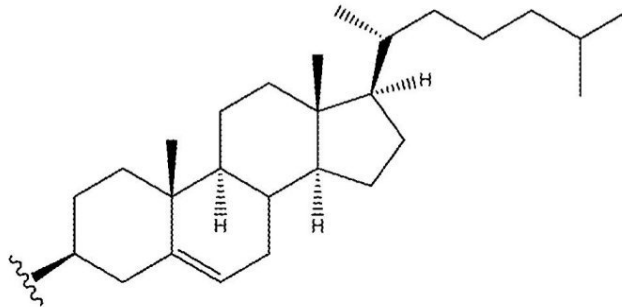
10

式中、 R^A は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、
で表される。

【0179】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 5】

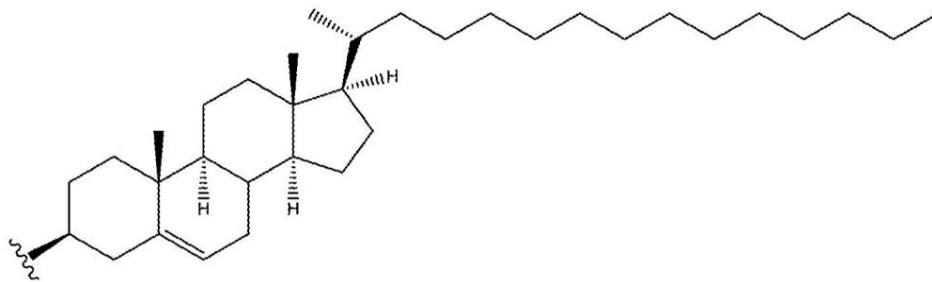


20

で表される。

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 6】



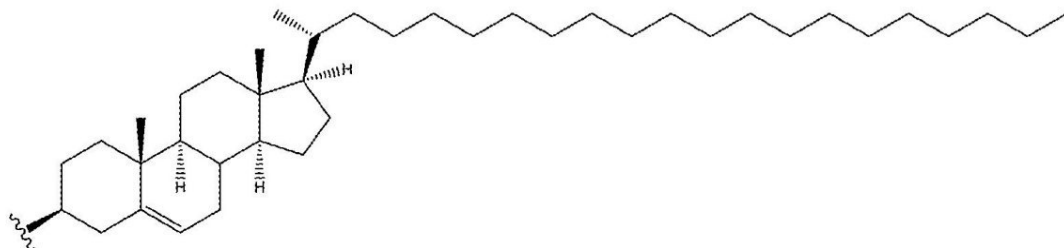
30

で表される。

【0180】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 7】



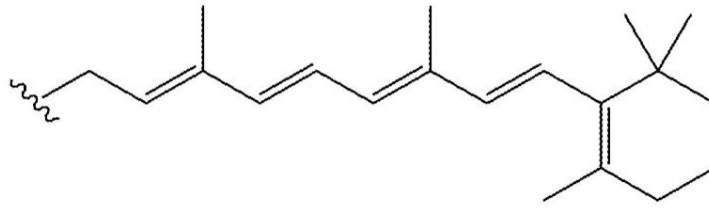
40

50

で表される。

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 28】



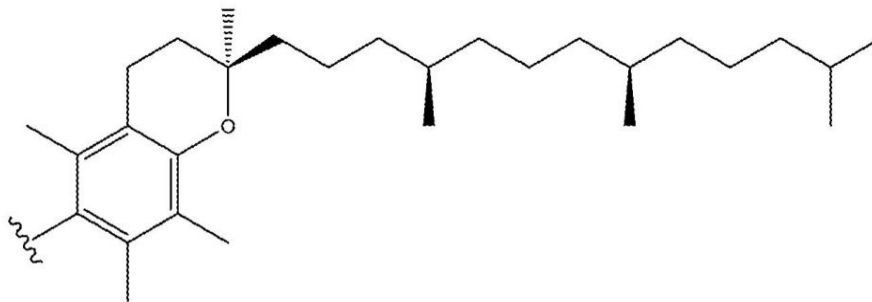
10

で表される。

【0181】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 29】



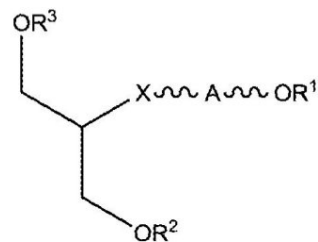
20

で表される。

【0182】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 30】



30

式中

X は、 N または CH であり；

A は、結合；置換または非置換の、環式または非環式の、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換の、環式または非環式の、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R^1 は、疎水性部分であり；

R^2 は、水素；酸素保護基；環式または非環式の、置換または非置換の、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式の、置換または非置換の、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換の、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換の、分枝もしくは非分枝のアリール；置換または非置換の、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

R^3 は、核酸である、

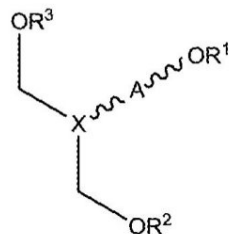
で表される。

【0183】

ある態様において、核酸分子は、式：

40

【化 3 1】



式中、

X は、N または C H であり；

A は、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R¹ は、疎水性部分であり；

R² は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

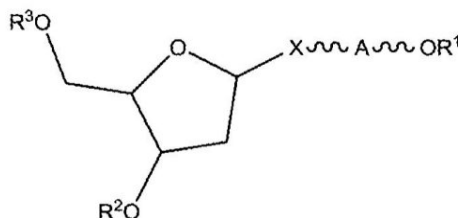
R³ は、核酸である、

で表される。

【 0 1 8 4 】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 2】



式中、

X は、N または C H であり；

A は、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

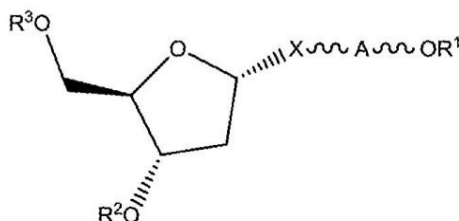
R¹ は、疎水性部分であり；

R² は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

R³ は、核酸である、

で表される。ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 3】



で表される。

【 0 1 8 5 】

10

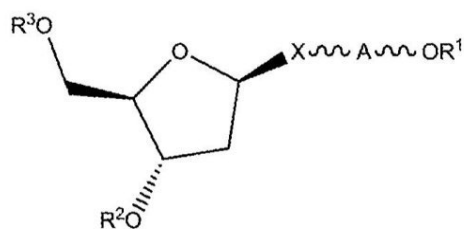
20

30

40

50

ある態様において、核酸分子は、式：
【化 3 4】

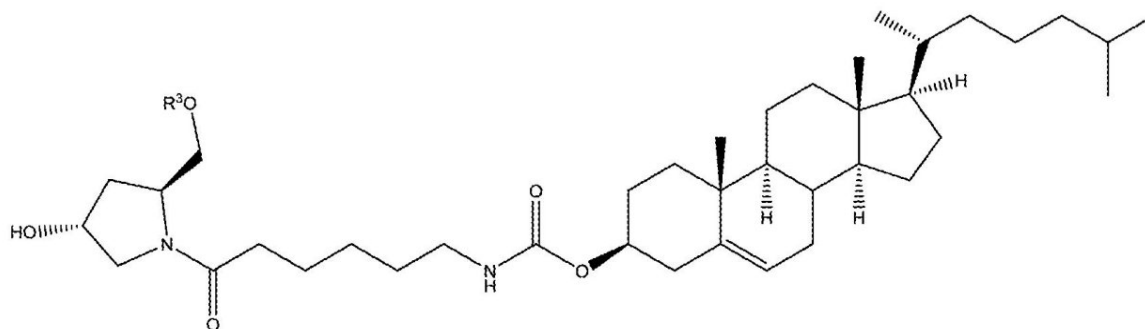


で表される。

10

【 0 1 8 6 】

ある態様において、核酸分子は、式：
【化 3 5】

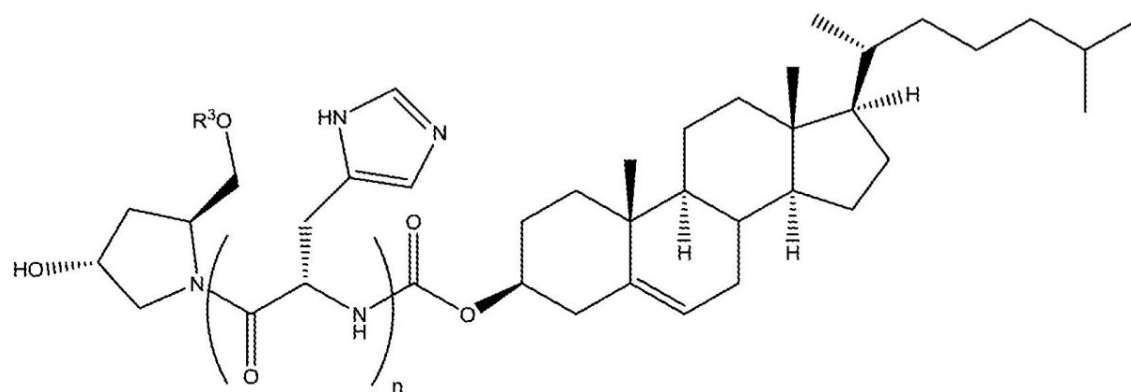


20

式中、 R^3 は、核酸である、
で表される。

【 0 1 8 7 】

ある態様において、核酸分子は、式：
【化 3 6】



30

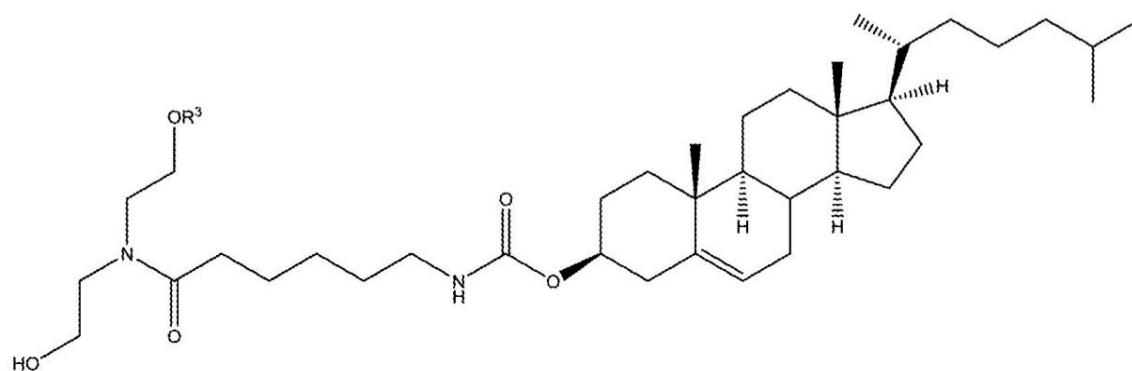
式中、 R^3 は、核酸であり；および
 n は、1 から 20 までの整数（境界を含む）である。
で表される。

40

【 0 1 8 8 】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 7】

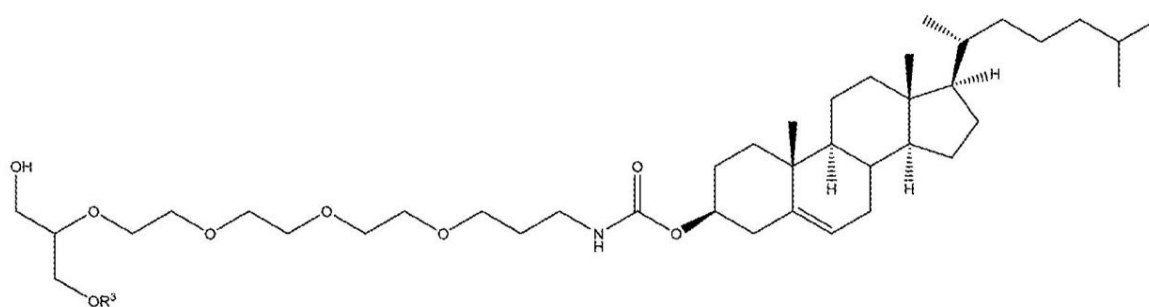


10

で表される。

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 8】



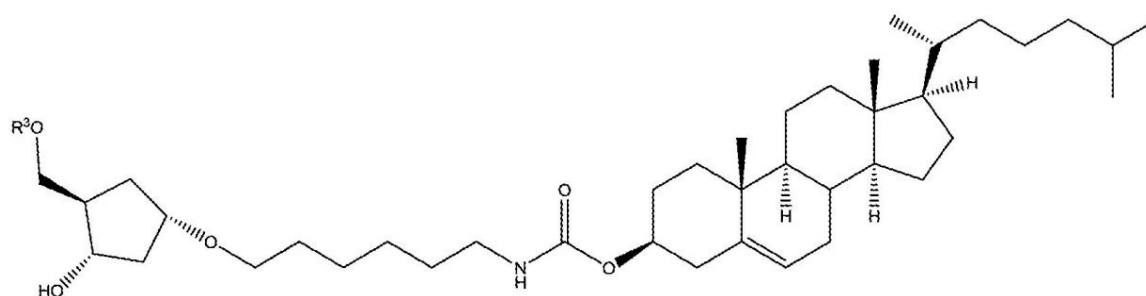
20

で表される。

【 0 1 8 9】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 9】

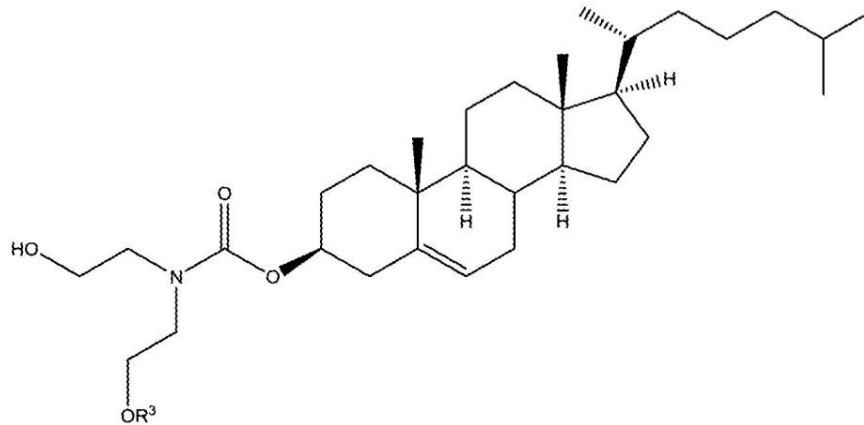


30

で表される。

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 4 0】



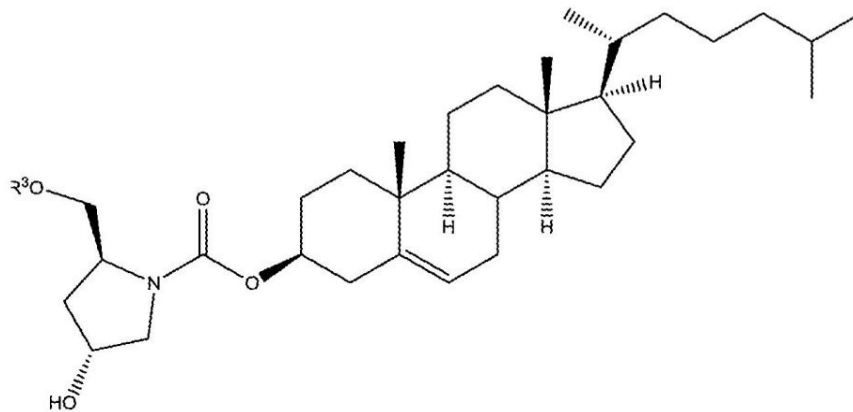
10

で表される。

【 0 1 9 0】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 4 1】



20

で表される。

【 0 1 9 1】

本明細書に使用される用語「連結部 (linkage)」は、天然に存在する、隣接するヌクレオモノマーに共有結合する未修飾ホスホジエステル部分 ($-\text{O}- (\text{PO}^2-) -\text{O}-$) を含む。本明細書に使用される用語「置換連結部 (substitute linkage)」は、ネイティブなホスホジエステル基の、隣接するヌクレオモノマーに共有結合するあらゆるアナログまたは誘導体を含む。置換連結部は、ホスホジエステルアナログ、例えばホスホロチオアート、ホスホロジチオアートおよび P - エチオキシホスホジエステル (P-ethoxyphosphodiester)、P - エトキシホスホジエステル、P - アルキルオキシホスホジエステル、メチルホスホナートおよびリンを含有しない結合、例えばアセタールおよびアミドを含む。かかる置換連結部は、当該技術分野において知られている (例えば Bjergarde et al. 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al. 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47)。ある態様において、ホスホロチオアート連結部などの非加水分解性連結部が好ましい。

30

40

【 0 1 9 2】

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、疎水的に修飾されたヌクレオチドまたは「疎水性修飾」を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾」は、(1) 塩基の全体的な疎水性が著しく増大し、および/または、(2) 塩基がなお通常のワトソン - クリック相互作用に類似するものを形成することができるように修飾された塩基を指す。いくつかの非限定的な塩基修飾の例は、5 位のウリジンおよびシチジン修飾、例えばフェニル、4 - ピリジル、2 - ピリジル、インドリル、および、イソブチル、フェニル (C_6H_5)

50

OH) ;トリプトファニル (C₈H₆N)CH₂CH(NH₂)CO)、イソブチル、ブチル、アミノベンジル ; フェニル ; およびナフチルを含む。

【0193】

末端 (3' または 5' 末端)、ループ領域または s d - r x RNA の他のいずれ部分にも付着し得る別の型の抱合体は、ステロール、ステロール型分子、ペプチド、低分子、タンパク質などを含む。いくつかの態様において、s d - r x RNA は、1 つより多い抱合体 (同じまたは異なる化学的性質のもの) を含んでもよい。いくつかの態様において、抱合体は、コレステロールである。

【0194】

標的遺伝子特異性を増大させるかまたはオフ・ターゲットサイレンシング作用を低減するための別の方法は、ガイド配列の 5' 末端の 2 番目のヌクレオチドに対応する位置にて、2' 修飾 (2' - O - メチル修飾など) を導入することである。本発明のアンチセンス (ガイド) 配列は、RNA 様および DNA 様の領域を含む「キメラオリゴヌクレオチド」であり得る。

【0195】

語「RNase H 活性化領域」は、オリゴヌクレオチド、例えばキメラオリゴヌクレオチドの、当該オリゴヌクレオチドが結合する標的 RNA 鎖を切断する RNase H を動員することができる領域を含む。典型的には、RNase H 活性化領域は、DNA または DNA 様ヌクレオモノマーの (少なくとも約 3 ~ 5、典型的には約 3 ~ 12、より典型的には約 5 ~ 12、より好ましくは約 5 ~ 10 の、連続したヌクレオモノマーの) 最小コアを含む (例えば米国特許第 5,849,902 号を参照)。好ましくは、RNase H 活性化領域は、約 9 個の連続したデオキシリボース含有ヌクレオモノマーを含む。

【0196】

語「非活性化領域」は、アンチセンス配列、例えばキメラオリゴヌクレオチドの領域であって、RNase H を動員または活性化しないものを含む。好ましくは、非活性化領域は、ホスホロチオアート DNA を含まない。本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの非活性化領域を含む。一態様において、非活性化領域は、ヌクレアーゼに対して安定であることができるか、または、標的に対して相補的であることおよびオリゴヌクレオチドにより結合される標的核酸分子と水素結合を形成することにより、標的に対する特異性を提供し得る。

【0197】

一態様において、連続したポリヌクレオチドの少なくとも一部は、置換連結部、例えばホスホロチオアート連結部により連結されている。

ある態様において、ガイド配列を超えるヌクレオチドの殆どまたは全ては (2' 修飾されていようがいまいが) ホスホロチオアート連結部により連結されている。かかるコンストラクトは、その血清タンパク質に対するより高いアフィニティーに起因して、薬物動態が改善されている傾向がある。ポリヌクレオチドの非ガイド配列部分におけるホスホロチオアート連結部は一般に、一旦ガイド鎖が RISC にロードされた後は、ガイド鎖の活性に干渉しない。本明細書において、驚くべきことに、高レベルのホスホロチオアート修飾が送達 of 改善をもたらすことが実証されている。いくつかの態様において、ガイドおよびノパッセンジャー鎖は、完全にホスホロチオアート化されている。

【0198】

本発明のアンチセンス (ガイド) 配列は、「モルホリノオリゴヌクレオチド」を含んでもよい。モルホリノオリゴヌクレオチドは非イオン性であり、RNase H 非依存的機構により機能する。モルホリノオリゴヌクレオチドの 4 つの遺伝子塩基 (アデニン、シトシン、グアニンおよびチミン/ウラシル) は、6 員のモルホリン環に連結されている。モルホリノオリゴヌクレオチドは、例えば非イオン性ホスホロジアミダート (phosphorodiamidate) サブユニット間連結部によって、4 つの異なるサブユニット型を結合することにより作られる。

【0199】

10

20

30

40

50

モルホリノオリゴヌクレオチドは、以下を含む多数の利点を有する：ヌクレアーゼに対する完全な耐性（Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1996. 6:267）；予測可能な標的化（Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141）；細胞における確実な活性（Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:63）；優れた配列特異性（Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:151）；最小限の非アンチセンス活性（Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141）；および簡便な浸透圧または搔爬による送達（Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:291）。モルホリノオリゴヌクレオチドはまた、高用量におけるその非毒性のために好ましい。モルホリノオリゴヌクレオチドの調製の議論は、Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:187において見出され得る。

【 0 2 0 0 】

10

本明細書に記載の化学修飾は、本明細書に記載のデータに基づき、一本鎖ポリヌクレオチドの R I S C 中へのローディングを促進すると考えられる。一本鎖ポリヌクレオチドは、R I S C 中へのローディングおよび遺伝子サイレンシングの誘導において活性であることが示されている。しかしながら、一本鎖ポリヌクレオチドについての活性のレベルは、デュプレックスポリヌクレオチドと比較したとき、2 ~ 4 桁の規模でより低いと考えられる。

【 0 2 0 1 】

本発明は、(a) 一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(b) ポリヌクレオチドの R I S C 複合体への効率的なローディングを促進し、および (c) 一本鎖ヌクレオチドの細胞による取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組み合わせを含んでもよい。加えて、態様のいくつかにおいて、単一のポリヌクレオチドの 5 ' 末端は、化学的にリン酸化されていてもよい。

20

【 0 2 0 2 】

さらに別の態様において、本発明は、R I S C 阻害性ポリヌクレオチドの機能を改善する化学修飾パターンの説明を提供する。一本鎖ポリヌクレオチドは、基質競合機構を通して、予めロードされた R I S C 複合体の活性を阻害することが示されている。通常アンタゴマー (antagomer) と称されるこれらの型の分子について、活性には、通常、高濃度が必要であり、in vivoでの送達はあまり効果的ではない。本発明は、(a) 一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(b) R I S C によるポリヌクレオチドの基質としての効率的な認識を促進し、および / または、(c) 細胞による一本鎖ヌクレオチドの取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組合せを含んでもよい。

30

【 0 2 0 3 】

本発明により提供される修飾は、全てのポリヌクレオチドに対して適用可能である。これは、一本鎖 R I S C 侵入性ポリヌクレオチド、一本鎖 R I S C 阻害性ポリヌクレオチド、多様な長さ (1 5 ~ 4 0 b p) の従来のデュプレックス化ポリヌクレオチド、非対称性デュプレックス化ポリヌクレオチドなどを含む。ポリヌクレオチドは、5 ' 末端修飾、リボース修飾、骨格修飾および疎水性ヌクレオシド修飾を含む、多様な化学修飾パターンにより修飾されていてもよい。

40

【 0 2 0 4 】

本発明の側面は、ホスホロチオアートの骨格修飾で高度に修飾された核酸分子に関する。完全にホスホロチオアート化された高活性の化合物 (21552) が、PCT公開番号WO2011/119852において開示されており、本明細書に参考として組み込まれる。興味深いことに、完全にホスホロチオアート修飾された 21mer のガイド鎖を含有した化合物は活性であったが、しかし、ガイド鎖の長さを2ヌクレオチド減少させたこと、例えば、19mer のガイド鎖 (21550) は、減少した活性をもたらした。

【 0 2 0 5 】

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、ガイド鎖を19ヌクレオチドから21ヌクレオチド (完全にホスホロチオアート化されたガイド鎖) に増加させることは

50

、ガイド鎖とmRNAとの融解温度を上昇させ得、増強されたサイレンシング活性をもたらし得る。13merのパッセンジャー鎖上のホスホロチオアート含量に変化をつけて、完全にホスホロチオアート修飾されたものとするように、または6つのホスホロチオアート修飾を含有するようにしたことは、活性の変化をもたらさなかった(PCT公開番号WO2011/119852に開示されているとおり、21551対21556)。

【0206】

複数の過去のグループが、完全にホスホロチオアート化されたRNAi化合物を開発することを試みている。一本鎖領域のない完全にホスホロチオアート化されたデュプレックスが、前に設計され試験されているが、しかしながら、これらの化合物では、許容し得る薬物動態プロファイルが実証されなかった。完全にホスホロチオアート化された一本鎖RNAi化合物もまた、先に設計されているが、しかしながら、これらの化合物は、効率的にRISCに侵入しなかった。その全体が本明細書に参考として組み込まれるPCT公開番号WO2011/119852は、効率的にRISCに侵入し、および完全にホスホロチオアート化された骨格を含有する、ハイブリッドRNAi化合物を開示した。

10

【0207】

いくつかの側面において、本開示は、高度にホスホロチオアート化された骨格を有する(例えば、完全にホスホロチオアート化された骨格、または、ほぼ完全にホスホロチオアート化された骨格(例えば、1つのホスホロチオアート化されていない残基を有する))を持った少なくとも1本の鎖を有する)、単離された二本鎖核酸分子の発見に関する。本明細書において、驚くべきことに、高レベルのホスホロチオアート修飾が、より少ないホスホロチオアート修飾を有する単離された二本鎖核酸分子(例えば、完全にホスホロチオアート化された、または、ほぼ完全にホスホロチオアート化された少なくとも1本の鎖を有しない)に対して、中枢神経系(CNS)における単離された二本鎖核酸分子の細胞による取り込みのレベルの上昇を媒介することが見出された。

20

【0208】

合成

本発明のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られているいずれの方法によっても、例えば酵素による合成および/または化学合成を使用して、合成され得る。オリゴヌクレオチドは、in vitroで(例えば酵素による合成および化学合成を使用して)、またはin vivoで(当該技術分野において周知の組み換えDNA技術を使用して)合成され得る。

30

【0209】

好ましい態様において、化学合成は、修飾ポリヌクレオチドのために使用される。直鎖オリゴヌクレオチドの化学合成は、当該技術分野において周知であり、溶液または固相の技術により達成され得る。好ましくは、合成は、固相方法によるものである。オリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト、亜リン酸トリエステル、H-ホスホナートおよびホストリエステル方法を含む、いくつかの異なる合成手順のいずれかにより、典型的には自動合成方法により、作られてもよい。

【0210】

オリゴヌクレオチドの合成プロトコルは当該技術分野において周知であり、例えば米国特許第5,830,653号; WO 98/13526; Stec et al. 1984. J. Am. Chem. Soc. 106:6077; Stec et al. 1985. J. Org. Chem. 50:3908; Stec et al. J. Chromatog. 1985. 326:263; LaPlanche et al. 1986. Nucl. Acid. Res. 1986. 14:9081; Fasman G. D., 1989. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 1989. CRC Press, Boca Raton, Fla.; Lamone. 1993. Biochem. Soc. Trans. 21:1; 米国特許第5,013,830号; 米国特許第5,214,135号; 米国特許第5,525,719号; Kawasaki et al. 1993. J. Med. Chem. 36:831; WO 92/03568; 米国特許第5,276,019号; および米国特許第5,264,423号において見出され得る。

40

【0211】

選択される合成方法は、所望のオリゴヌクレオチドの長さに依存し得、かかる選択は、

50

当業者の技術の範囲内である。例えば、ホスホロアミダイトおよび垂リン酸トリエステル法により、175またはそれより多いヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを生成し得、一方、H-ホスホナート法は、100ヌクレオチド未満のオリゴヌクレオチドのために良好に機能する。修飾塩基がオリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、および特に、修飾ホスホジエステル連結部が使用される場合、合成手順は、必要に応じて、公知の手順に従って変えられる。

【0212】

このことに関して、Uhlmannら(1990, Chemical Reviews 90:543-584)は、修飾塩基および修飾ホスホジエステル連結部を有するオリゴヌクレオチドを作製するための参考文献および概略手順を提供する。オリゴヌクレオチドを作製するための他の例示的な方法は、Sonveaux、1994年、「Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis」;Agrawal、Methods in Molecular Biology 26:1において教示される。例示的な合成方法はまた、「Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach」(Gait, M. J. IRL Press at Oxford University Press. 1984)においても教示される。その上、修飾ヌクレオチドを持ついくつかの配列を含む規定の配列の直鎖オリゴヌクレオチドは、数個の商業的供給源から容易に入手可能である。

【0213】

オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、または、ゲルクロマトグラフィーおよび高圧液体クロマトグラフィーを含む多数のクロマトグラフィー的方法のいずれにより、精製されてもよい。ヌクレオチド配列、特に未修飾ヌクレオチド配列を確認するために、オリゴヌクレオチドは、マクサム・ギルバートシークエンシング、サンガーシークエンシング、キャピラリー電気泳動シークエンシング、ワンダーリングスポット(wandering spot)シークエンシングの手順を含む、知られている手順のいずれかにより、またはHybond紙に結合させたオリゴヌクレオチドの選択的化学分解を使用することにより、DNAシークエンシングに供されてもよい。短いオリゴヌクレオチドの配列はまた、レーザー脱離質量分析または高速原子衝撃によっても分析され得る(McNeal, et al., 1982, J. Am. Chem. Soc. 104:976; Viari, et al., 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83; Grotjahn et al., 1982, Nuc. Acid Res. 10:4671)。シークエンシング方法はまた、RNAオリゴヌクレオチドについても利用可能である。

【0214】

合成されたオリゴヌクレオチドの品質は、オリゴヌクレオチドを、例えばBergot and Egan. 1992. J. Chrom. 599:35の方法を使用して、キャピラリー電気泳動および分解性強アニオンHPLC(denaturing strong anion HPLC:SAX-HPLC)により試験することにより、確認され得る。

他の例示的な合成技術は、当該技術分野において周知である(例えばSambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Volumes I and II (DN Glover Ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M J Gait Ed, 1984); Nucleic Acid Hybridisation (B D Hames and S J Higgins eds. 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); またはシリーズであるMethods in Enzymology (Academic Press, Inc.)を参照)。

【0215】

ある態様において、対象とするRNA iコンストラクトまたは少なくともその一部は、対象とするコンストラクトをコードする発現ベクターから転写される。この目的のために、当該技術分野において認識されるいずれのベクターも使用されてもよい。転写されたRNA iコンストラクトは、所望の修飾(未修飾センス鎖を修飾されたものにより置き換えることなど)が行われる前に、単離、精製されてもよい。

【0216】

細胞によるオリゴヌクレオチドの取り込み

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物は、1以上の細胞または細胞ライセートと接触させられて(すなわち、接触させられるか、または、本明細書においては投

10

20

30

40

50

与または送達されるとして言及される)、これに取り込まれる。用語「細胞」は、原核および真核細胞、好ましくは脊椎動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞を含む。好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、ヒト細胞と接触させられる。

【0217】

本発明のオリゴヌクレオチド組成物を、*in vitro*で、例えば試験管または培養ディッシュ中で(対象中へ導入されても、されなくてもよく)、または*in vivo*で、例えば哺乳動物対象などの対象において、細胞と接触させてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、局所的に、またはエレクトロポレーションを通して投与される。オリゴヌクレオチドは、エンドサイトーシスによって遅い速度で細胞に取り込まれるが、エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドは、一般に隔絶され、例えば標的核酸分子へのハイブリダイゼーションのために利用可能ではない。一態様において、細胞による取り込みを、エレクトロポレーションまたはリン酸カルシウム沈殿により容易になされ得る。しかしながら、これらの手順は*in vitro*または*ex vivo*の態様でのみ有用であり、便利ではなく、いくつかのケースにおいては細胞毒性と関連する。

【0218】

別の態様において、細胞中へのオリゴヌクレオチドの送達は、リン酸カルシウム、DMSO、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な、当該技術分野において認識される方法により、または、トランスフェクションにより、例えばカチオン性、アニオン性または中性脂質組成物もしくはリポソームを使用して、当該技術分野において知られている方法を使用して(例えばWO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; 米国特許第4,897,355号; Bergan et al. 1993. Nucleic Acid Research. 21:3567を参照)、増強され得る。増強されたオリゴヌクレオチドの送達はまた、ベクター(例えばShi, Y. 2003. Trends Genet 2003 Jan. 19:9; Reichhart J M et al. Genesis. 2002. 34(1-2):1604; Yu et al. 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:6047; Sui et al. 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:5515を参照)、ウイルス、ポリアミンまたはポリリジン、プロタミンもしくはNi、N12-ビス(エチル)スベルミンなどの化合物を使用するポリカチオン抱合体(例えばBartzatt, R. et al. 1989. Biotechnol. Appl. Biochem. 11:133; Wagner E. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4255を参照)の使用によっても媒介され得る。

【0219】

ある態様において、本発明のsd-rxRNAは、多様なベータ-グルカン含有粒子を使用して送達されてもよく、該粒子はGeRP(グルカンカプセル化RNAロード粒子)として言及され、これは2010年3月4日出願の米国仮出願第61/310,611号、表題「食細胞への標的化送達のための製剤および方法」に記載されており、参考として組み込まれる。かかる粒子はまた、米国特許公開US 2005/0281781 A1およびUS 2010/0040656、米国特許第8,815,818号、ならびにPCT公開WO 2006/007372およびWO 2007/050643においても記載されており、参考として組み込まれる。

【0220】

sd-rxRNA分子は、疎水的に修飾されていてもよく、および任意に、脂質および/または両親媒性ペプチドと結びついていてもよい。ある態様において、ベータ-グルカン粒子は酵母に由来する。ある態様において、ペイロードトラップ(payload trapping)分子は、少なくとも約1000Da、10,000Da、50,000Da、100kDa、500kDa等の分子量のポリマーである。好ましいポリマーは、(限定せずに)カチオン性ポリマー、キトサンまたはPEI(ポリエチレンジアミン)などを含む。

【0221】

グルカン粒子は、酵母細胞壁などの真菌細胞壁の不溶性構成要素に由来し得る。いくつかの態様において、酵母はパン酵母である。酵母由来グルカン分子は、1以上の(1,3)-グルカン、(1,6)-グルカン、マンナンおよびキチンを含み得る。いくつかの態様において、グルカン粒子は中空の酵母細胞壁を含み、これにより、粒子は細胞に似た3次元構造を維持し、この中でRNA分子などの分子と複合体化するかまたはこれ

をカプセル化し得る。酵母細胞壁粒子の使用に関連するいくつかの利点は、構成要素の利用可能性、それらの生分解性の性質、および、それらの食作用細胞を標的化する能力である。

【0222】

いくつかの態様において、グルカン粒子は細胞壁からの不溶性構成要素を抽出することにより調製され得、例えばパン酵母（フライシュマンのもの）を1MのNaOH/pH4.0、H₂Oで抽出し、続いて洗浄および乾燥することによる。酵母細胞壁粒子を調製するための方法は以下の文献に議論され、これらから参考として組み込まれる：米国特許第4,810,646号、同第4,992,540号、同第5,082,936号、同第5,028,703号、同第5,032,401号、同第5,322,841号、同第5,401,727号、同第5,504,079号、同第5,607,677号、同第5,968,811号、同第6,242,594号、同第6,444,448号、同第6,476,003号、米国特許公開第2003/0216346号、同第2004/0014715号および同第2010/0040656号ならびにPCT公開第WO02/12348号。

10

【0223】

グルカン粒子を調製するためのプロトコルもまた、以下の文献に記載されており、これらから参考として組み込まれる：Soto and Ostroff (2008), "Characterization of multilayered nanoparticles encapsulated in yeast cell wall particles for DNA delivery"; Bioconjug Chem 19(4):840-8; Soto and Ostroff (2007), "Oral Macrophage Mediated Gene Delivery System," Nanotech, Volume 2, Chapter 5 ("Drug Delivery"), pages 378-381; およびLi et al. (2007), "Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88-and Syk kinase-dependent pathways." Clinical Immunology 124(2):170-181.

20

【0224】

酵母細胞壁粒子などのグルカン含有粒子はまた、商業的にも得られ得る。いくつかの非限定的例は以下を含む：Biorigin (Sao Paulo, Brazil) からのNutricell MOS 55、SAF-Mannan (SAF Agri, Minneapolis, Minn.)、Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, Wis.)、アルカリ抽出粒子、例えばNutricepts (Nutricepts Inc., Burnsville, Minn.) およびASA Biotech製造のもの、Biopolymer Engineeringからの酸抽出WGP粒子および有機溶媒抽出粒子、例えばAlpha-beta Technology, Inc. (Worcester, Mass.) からのAdjuvax (商標) およびNovogen (Stamford, Conn.) からの微粒子グルカン。

30

【0225】

酵母細胞壁粒子などのグルカン粒子は、製造および/または抽出方法に依存して種々のレベルの純度を有し得る。いくつかの例において、粒子はアルカリ抽出、酸抽出または有機溶媒抽出して、細胞内構成要素および/または細胞壁の外部マンノタンパク質層を除去する。かかるプロトコルは、50~90%の範囲のグルカン含量(w/w)を有する粒子を製造し得る。いくつかの例において、低純度の粒子、すなわち低グルカンw/w含量の粒子が好ましい場合もあり、一方他の態様においては、高純度すなわち高グルカンw/w含量の粒子が好ましい場合もある。

【0226】

酵母細胞壁粒子などのグルカン粒子は、天然の脂質含量を有し得る。例えば、粒子は1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%または20%w/wを超える脂質を含有し得る。例のセクションにおいて、グルカン粒子2つのバッチ：YGP SAFおよびYGP SAF+L (天然脂質含有)の有効性を試験する。いくつかの態様において、天然脂質の存在はRNA分子の複合体化または捕捉を支援し得る。

40

グルカン含有粒子は典型的には、および2~4ミクロンの直径を有するが、2ミクロン未満または4ミクロンを超える直径の粒子もまた、本発明の側面に適合する。

【0227】

送達するRNA分子(単数または複数)は、グルカン粒子に複合体化されるか、そのシェル内に「捕捉」される。粒子のシェルまたはRNA構成要素は、Soto and Ostroff (20

50

08) Bioconjug Chem 19:840に記載され、参考として組み込まれているように、視覚化のために標識され得る。GeRPをロードする方法は以下にさらに議論される。

オリゴヌクレオチドの取り込みのための最適なプロトコルは、多数の因子に依存するであろうが、最も重要なのは、使用される細胞の型である。取り込みにおいて重要な他の因子は、これらに限定されないが、オリゴヌクレオチドの性質および濃度、細胞のコンフルエンス、細胞を入れる培養の種類（例えば懸濁培養であるかまたはプレート培養であるか）および細胞を培養する培地の種類を含む。

【0228】

カプセル化剤

カプセル化剤は、ビヒクル内にオリゴヌクレオチドを捕捉する。本発明の別の態様において、オリゴヌクレオチドは、キャリアまたはビヒクル、例えばリポソームまたはミセルと結びついてよいが、他のキャリアを使用され得ることは、当業者により理解される通りである。リポソームは、生体膜と類似する構造を有する脂質二重層からなるビヒクルである。かかるキャリアは、細胞による取り込みを促進するため、または、オリゴヌクレオチドを標的化するため、または、オリゴヌクレオチドの薬物動態または毒性学的特性を改善するために、使用される。

【0229】

例えば、本発明のオリゴヌクレオチドはまた、その中に活性成分が分散してまたは脂質層に接着した水性濃縮層からなる小体中に多様に存在して含有される医薬組成物であるリポソーム中にカプセル化されても、投与されてもよい。オリゴヌクレオチドは、溶解性に依存して、水性層および脂質層の両方に存在しても、一般にリポソーム懸濁液（liposomic suspension）と称されるものの存在してもよい。疎水性層は一般に、必ずではないが、レシチンおよびスフィンゴミエリンなどのリン脂質、コレステロールなどのステロイド、リン酸ジアセチルなどの多かれ少なかれイオン性の界面活性剤、ステアリルアミンまたはホスファチジル酸または疎水性の性質の他の材料を含む。リポソームの直径は一般に、およそ15 nmから約5ミクロンまでの範囲である。

【0230】

薬物送達ビヒクルとしてのリポソームの使用は、幾つかの利点を与える。リポソームは、細胞内安定性を増大し、取り込み効率を増大し、生物学的活性を改善する。リポソームは、細胞膜を構成する脂質と類似の様式において配置された脂質からなる、中空の球体ビヒクルである。これらは、水溶性化合物を封入する内部の水性の空間を有し、直径0.05から数ミクロンまでの範囲のサイズである。数個の研究から、リポソームが核酸を細胞へ送達し得ること、および、核酸が生物学的に活性であり続けることが示される。例えば、リポフェクチンまたはLIPOFECTAMINE（商標）2000などの本来は研究用ツールとして設計された脂質送達ビヒクルは、無傷の（intact）核酸分子を細胞へ送達し得る。

【0231】

リポソームを使用することの具体的な利点は以下を含む：それらは組成物において非毒性であり生分解性であること；それらは長期の循環半減期を呈すること；および、認識分子が、組織へ標的化するために、それらの表面へ容易に付着され得ること。最後に、液体懸濁液または凍結乾燥製品のいずれにおいても、リポソームベースの医薬のコスト効率の良い製造は、受容可能な薬物送達システムとしてのこの技術のバイアビリティを実証している。

【0232】

いくつかの側面において、本発明に関連する製剤は、天然に存在するかまたは化学的に合成されたかまたは修飾された、飽和および不飽和の脂肪酸残基のクラスについて選択されてもよい。脂肪酸は、トリグリセリド類、ジグリセリド類または個々の脂肪酸の形態で存在してもよい。別の態様において、非経口栄養のために薬理学において現在使用されている脂肪酸および/または脂質の乳液の、よく検証された混合物の使用が利用されてもよい。

【0233】

10

20

30

40

50

リポソームベースの製剤は、オリゴヌクレオチドの送達のために広範に使用される。しかしながら、市販の脂質またはリポソーム製剤の殆どは、少なくとも1つの正に荷電した脂質（カチオン性脂質）を含有する。この正に荷電した脂質の存在は、高レベルのオリゴヌクレオチドのローディングを得るために、および、リポソームの膜融合特性を増強するために、必須であると考えられている。最適な正に荷電した脂質の化合物を同定するための、数個の方法が実施され、公開されている。しかしながら、カチオン性脂質を含有する市販のリポソーム製剤は、高レベルの毒性によって特徴づけられる。in vivoでの限定された治療インデックスにより、正に荷電した脂質を含有するリポソーム製剤が、RNAサイレンシングを達成するために必要とされる濃度よりもごく僅かに高い濃度において、毒性（すなわち肝臓の酵素の増大）と関連することが明らかとなっている。

10

【0234】

本発明に関連する核酸は、疎水的に修飾され得、中性ナノトランスポーターに包含され得る。中性ナノトランスポーターのさらなる説明は、2009年9月22日に出願されたPCT出願PCT/US2009/005251、表題「中性ナノトランスポーター」および2011年9月29日に公開された米国特許公開第US2011/0237522号、表題「中性ナノトランスポーター」から参考として組み込まれる。かかる粒子は、非荷電の脂質混合物中へのオリゴヌクレオチドの定量的な組み込みを可能にする。かかる中性ナノトランスポーター組成物においてカチオン性脂質が毒性レベルを欠いていることは、重要な特性である。

【0235】

PCT/US2009/005251に実証されているとおり、オリゴヌクレオチドは、カチオン性脂質を有さない脂質混合物中に効率的に組み込まれ得、かかる組成物は、治療用オリゴヌクレオチドを機能的な様式で細胞に効果的に送達し得る。例えば、脂質混合物が、ホスファチジルコリンベースの脂肪酸およびコレステロールなどのステロールから構成されたとき、高レベルの活性が観察された。例として、中性脂質混合物の1つの好ましい製剤は、少なくとも20%のDOPCまたはDSPCおよび少なくとも20%のコレステロールなどのステロールから構成される。1:5の脂質対オリゴヌクレオチド比率という低さでも、オリゴヌクレオチドの非荷電製剤中での完全なカプセル化を得るのに充分であることが示された。

20

【0236】

中性ナノトランスポーター組成物は、オリゴヌクレオチドの中性脂質製剤中への効率的なローディングを可能にする。組成物は、分子の疎水性が増大するような様式において修飾されている（例えば、疎水性分子が、疎水性分子に、オリゴヌクレオチド末端または末端でないヌクレオチド、塩基、糖もしくは骨格上で、（共有結合的にまたは非共有結合的に）付着されている）オリゴヌクレオチドを含み、修飾オリゴヌクレオチドは、中性脂質製剤と混合されている（例えば、少なくとも25%のコレステロールおよび25%のDOPCまたはそのアナログを含有する）。別の脂質などのカーゴ分子もまた、組成物中に含まれ得る。この組成物は、製剤の一部がオリゴヌクレオチド自体中に構築される場合、中性脂質粒子中におけるオリゴヌクレオチドの効率的なカプセル化を可能にする。

30

【0237】

いくつかの側面において、50から140nmまでの範囲のサイズの安定な粒子は、疎水性オリゴヌクレオチドを好ましい製剤と複合体化することにより形成され得る。製剤は、それ自体では典型的には小さい粒子を形成せず、むしろ集塊物を形成し、これは疎水性修飾オリゴヌクレオチドを付加することにより、安定な50~120nmの粒子へと転換されることに言及することは興味深い。

40

【0238】

本発明の中性ナノトランスポーター組成物は、疎水性修飾ポリヌクレオチド、中性脂質混合物および任意にカーゴ分子を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの修飾の前よりも疎水性にする少なくとも1つの修飾を有する、本発明のポリヌクレオチド（すなわちsd-rxRNA）である。修飾は、疎水性分子をポリヌクレオチドに付着（共有結合的または非共有結合的に）

50

することにより達成されてもよい。いくつかの例において、疎水性分子は、親油性基であるかまたは親油性基を含む。

【0239】

用語「親油性基」は、水に対するアフィニティーよりも高い、脂質に対するアフィニティーを有する基を意味する。親油性基の例は、これらに限定されないが、コレステロール、コレステリルまたは修飾コレステリル残基、アダマンチン、ジヒドロテストロン (dihydrotestosterone)、長鎖アルキル、長鎖アルケニル、長鎖アルキニル、オレイル - リトコール酸、コレン酸、オレオイル - コレン酸、パルミチル酸、ヘプタデシル酸、ミリスチル酸、胆汁酸、コール酸またはタウロコール酸、デオキシコール酸、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド類、ビタミン E などのビタミン類、飽和または不飽和のいずれかの脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル類、ピレン類、ボルフィリン類、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン類、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、Texas-Red、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t - プチルジメチルシリル、t - プチルジフェニルシリル、シアニン色素 (例えば Cy 3 または Cy 5)、Hoechst 33258 色素、ソラレンまたはイブプロフェンを含む。コレステロール部分は還元されても (例えばコレスタン中のように)、または、置換されても (例えばハロゲンにより) よい。1 分子における異なる親油性基の組み合わせもまた可能である。

10

【0240】

疎水性分子は、ポリヌクレオチドの多様な位置において付着されてもよい。上記のとおり、疎水性分子は、ポリヌクレオチドの 3' または 5' 末端などのポリヌクレオチドの末端の残基に連結されていてもよい。代わりに、これは、ポリヌクレオチドの内部のヌクレオチドまたは枝上のヌクレオチドに連結されていてもよい。疎水性分子は、例として、ヌクレオチドの 2' 位に付着されていてもよい。疎水性分子はまた、ポリヌクレオチドのヌクレオチドの複素環式塩基、糖または骨格にも連結されていてもよい。

20

【0241】

疎水性分子は、リンカー部分によりポリヌクレオチドに繋がられていてもよい。任意に、リンカー部分は、非ヌクレオチド性のリンカー部分である。非ヌクレオチド性のリンカーは、例えば、脱塩基残基 (d スペース)、トリエチレングリコール (スペース 9) もしくはヘキサエチレングリコール (スペース 18) などのオリゴエチレングリコール、またはブタンジオールなどのアルカンジオールである。スペースユニットは、好ましくは、ホスホジエステルまたはホスホロチオアート結合により連結されている。リンカーユニットは、分子中に 1 回のみ現れても、または、例えばホスホジエステル、ホスホロチオアート、メチルホスホナートまたはアミン連結部などを介して、数回組み込まれてもよい。

30

【0242】

典型的な抱合プロトコルは、配列の 1 以上の位置においてアミノリンカーを保有するポリヌクレオチドの合成を含むが、しかしながらリンカーは必要ではない。アミノ基は、次いで、適切なカップリングまたは活性化試薬を使用して、抱合される分子と反応させられる。抱合反応は、まだ固体支持体に結合しているポリヌクレオチドを用いて、または、溶液相中でのポリヌクレオチドの切断に続いて、実施されてもよい。HPLC による修飾ポリヌクレオチドの精製は、典型的には、結果として純粋な材料を生じる。

40

【0243】

いくつかの態様において、疎水性分子は、ミセル中へ組み込まれるために十分な疎水性を提供する、ステロール型抱合体、フィトステロール抱合体、コレステロール抱合体、側鎖の長さを変えられたステロール型抱合体、脂肪酸抱合体、任意の他の疎水性基抱合体、および/または内部ヌクレオシドの疎水性修飾である。

【0244】

本発明の目的のために、用語「ステロール」またはステロイドアルコール類は、A 環の 3 位においてヒドロキシル基を持つステロイドのサブグループを指す。これらは、アセチ

50

ル - コエンザイム A から H M G - C o A レダクターゼ経路を介して合成される両親媒性脂質である。全体的な分子は、極めて扁平である。A 環上のヒドロキシル基は、極性である。脂肪族鎖の残りは、非極性である。通常、ステロールは、17 位において 8 炭素鎖を有すると考えられる。

【0245】

本発明の目的のために、用語「ステロール型分子」は、ステロイドアルコール類を指し、これは、ステロールと構造が類似する。主要な差異は、環の構造および 21 位に結合する側鎖の炭素の数である。

本発明の目的のために、用語「フィトステロール」(また植物ステロールとも称される)は、植物において天然に存在する植物化学物質である、一群のステロイドアルコール類である。200 種を超えるフィトステロールが知られている。

10

【0246】

本発明の目的のために、用語「ステロールの側鎖」は、ステロール型分子の 17 位にて付着する側鎖の化学組成を指す。標準的な定義において、ステロールは、8 炭素鎖を 17 位に保有する 4 環構造に限定される。本発明において、従来のもよりも長いおよび短い側鎖を持つステロール型分子が記載される。側鎖は、分枝であってもよいし、二重の骨格を含有していてもよい。

【0247】

よって、本発明に有用なステロールは、例えば、コレステロール、ならびに、17 位に 2 ~ 7 個または 9 個の炭素より長い側鎖が結合しているユニークなステロールを含む。特定の態様において、ポリ炭素テイルの長さは、5 ~ 9 個の炭素の間で変動する。かかる抱合体は、特に肝臓への送達において、有意により良好な *in vivo* 効力を有してもよい。これらの型の分子は、従来のコレステロールに抱合されたオリゴヌクレオチドよりも 5 ~ 9 倍低い濃度にて働くことが期待される。

20

【0248】

代わりに、ポリヌクレオチドは、タンパク質、ペプチド、または、疎水性分子として機能する正に荷電した化学物質に結合していてもよい。タンパク質は、プロタミン、dsRNA 結合ドメインおよびアルギニンリッチペプチドからなる群から選択されてもよい。例示的な正に荷電した化学物質は、スペルミン、スペルミジン、カダベリンおよびプトレシンを含む。

30

【0249】

別の態様において、疎水性分子抱合体は、疎水性修飾、ホスホロチオアート修飾および 2' リボ修飾を含むがこれらに限定されないポリヌクレオチドの最適な化学修飾パターンと組み合わせられたとき(本明細書に詳細に記載されるとおり)、さらに高い効力を実証し得る。

【0250】

別の態様において、ステロール型分子は、天然に存在するフィトステロールであってもよい。ポリ炭素鎖は、9 個より長くても、直鎖であっても、分枝鎖であっても、および/または、二重結合を含有していてもよい。ポリヌクレオチド抱合体を含有するいくつかのフィトステロールは、多様な組織へのポリヌクレオチドの送達において、有意により強力かつ活性であり得る。いくつかのフィトステロールは組織選択性を実証し得ることから、RNAi を特異的に特定の組織へ送達するための手段として使用され得る。

40

【0251】

疎水性修飾ポリヌクレオチドは、中性脂肪酸混合物と混合されて、ミセルを形成する。中性脂肪酸混合物は、疎水性修飾ポリヌクレオチドとともにミセルを形成し得る生理学的 pH においてまたはその付近において、正味の中性または僅かに正味の負の電荷を有する、脂質の混合物である。本発明の目的のために、用語「ミセル」は、非荷電性脂肪酸とリン脂質との混合物により形成される、小さいナノ粒子を指す。

【0252】

中性脂肪酸混合物は、毒性を引き起こさない量で存在する限りにおいて、カチオン性脂

50

質を含んでもよい。好ましい態様において、中性脂肪酸混合物は、カチオン性脂質を含まない。カチオン性脂質を含まない混合物は、全脂質のうちの1%未満、好ましくは0%が、カチオン性脂質であるものである。用語「カチオン性脂質」は、生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の正の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。用語「アニオン性脂質」は、生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の負の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。

【0253】

中性脂質は、強力であるが共有結合ではない引力（例えば静電気、ファンデルワールス、パイ・スタッキング(pi-stacking)などの相互作用）により、本発明のオリゴヌクレオチドに結合する。

10

中性脂質混合物は、天然に存在するかまたは化学合成された、または、修飾された、飽和および不飽和脂肪酸残基のクラスから選択される製剤を含んでもよい。脂肪酸は、トリグリセリド、ジグリセリドまたは個別の脂肪酸の形態で存在し得る。別の態様において、薬理学において非経口栄養のために現在使用されている脂肪酸のよく確認された混合物および/または脂質乳液が利用されてもよい。

【0254】

中性脂肪酸混合物は、好ましくは、コリンをベースとする脂肪酸およびステロールの混合物である。コリンをベースとする脂肪酸は、例として、DDPC、DLPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、POPCおよびDEPCなどの合成のホスホコリン誘導体を含む。DOPC（化合物登録番号4235-95-4）は、ジオレオイルホスファチジルコリンである（ジエライドイルホスファチジルコリン、ジオレオイル-PC、ジオレオイルホスホコリン、ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、ジオレイルホスファチジルコリンとしても知られる）。DSPC（化合物登録番号816-94-4）は、ジステアロイルホスファチジルコリンである（1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンとしても知られる）。

20

【0255】

中性脂肪酸混合物中のステロールは、例として、コレステロールであってもよい。中性脂肪酸混合物は、完全にコリンベースの脂肪酸およびステロールからなっても、または、これは任意にカーゴ分子を含んでもよい。例として、中性脂肪酸混合物は、少なくとも20%または25%の脂肪酸および20%または25%のステロールを有してもよい。

30

【0256】

本発明の目的のために、用語「脂肪酸」は、脂肪酸の従来の説明に関する。これらは、個別の実体またはジグリセリドおよびトリグリセリドの形態において存在し得る。本発明の目的のために、用語「脂質乳液」は、食事から十分な脂質を得ることができない対象へ静脈内に与えられる安全な脂質製剤を指す。これは、大豆油（または他の天然に存在するオイル）と卵のリン脂質との乳液である。脂質乳液は、いくつかの不溶性麻酔剤の製剤のために使用されている。本開示において、脂質乳液は、イントラリピッド（Intralipid）、リポシン（Liposyn）、ニュートリピッド（Nutrilipid）などの市販の製剤の一部、特定の脂肪酸が濃縮されている改変された市販の製剤、または、全く新たに処方された脂肪酸とリン脂質との組合せであってもよい。

40

【0257】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約12時間～約24時間の間接触させられる。別の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約1～約5日間接触させられる。

【0258】

一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約3日間～約30日間接触させられる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくと

50

も約5～約20日間、接触状態に置かれる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7～約15日間、接触状態に置かれる。

【0259】

製剤の50%～60%は、任意に、他のいずれの脂質または分子であってもよい。かかる脂質または分子は、本明細書において、カーゴ脂質またはカーゴ分子として言及される。カーゴ分子は、これらに限定されずに、イントラリピッド (intralipid)、低分子、膜融合ペプチドもしくは脂質を含むか、または、他の低分子が、細胞取り込み、エンドソームによる放出または組織分布特性を変えるために添加されてもよい。かかる特性が望ましい場合、カーゴ分子に耐性を示す能力は、これらの粒子の特性の改変のために重要である。例として、いくつかの組織特異的代謝物の存在は、組織分布プロフィールを大幅に変える場合がある。例えば、多様な飽和レベルを有するより短いまたはより長い脂質鎖が濃縮されているイントラリピッド (intralipid) 型製剤の使用は、これらの型の製剤の組織分布プロフィール (およびそれらのローディング) に影響を及ぼす。

10

【0260】

本発明に従い有用なカーゴ脂質の例は、膜融合脂質である。例として、双性イオン脂質 D O P E (化合物登録番号4004-5-1、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン) は、好ましいカーゴ脂質である。

【0261】

イントラリピッド (Intralipid) は、以下の組成から構成され得る：1000 mL が以下を含有する：精製大豆油 90 g、精製卵リン脂質 12 g、無水グリセロール 22 g、注射用水 (1000 mL への十分量)。pH は、水酸化ナトリウムで、約 pH 8 に調整される。エネルギー含量 / L : 4.6 MJ (190 kcal)。浸透圧 (およそ) : 300 m O s m / 水 1 k g。別の態様において、脂質乳液は、5% のベニバナ油、5% の大豆油、乳化剤として添加される最大 1.2% までの卵リン脂質および注射用水中の 2.5% のグリセリンを含有する、リボシン (Liposyn) である。これはまた、pH 調整のために水酸化ナトリウムを含有してもよい。pH 8.0 (6.0 ~ 9.0)。リボシンは、276 m O s m o l / リットル (実測値) の浸透圧を有する。

20

【0262】

カーゴ脂質のアイデンティティ、量および比率のバリエーションは、これらの化合物の細胞による取り込みおよび組織分布の特徴に影響を及ぼす。例えば、脂質テイルの長さおよび飽和性のレベルは、肝臓、肺、脂肪および心筋細胞への異なる取り込みに影響を及ぼす。ビタミン類または異なる形態のステロールなどの特別な疎水性分子の添加は、特定の化合物の代謝に関与する特別な組織への分布に有利に働き得る。いくつかの態様において、ビタミン A または E が用いられる。複合体は、異なるオリゴヌクレオチド濃度にて形成され、より高い濃度は、より効率的な複合体形成に有利に働く。

30

【0263】

別の態様において、脂質乳液は、脂質の混合物に基づく。かかる脂質は、天然の化合物、化学合成された化合物、精製脂肪酸または他のいずれの脂質をも含んでもよい。さらに別の態様において、脂質乳液の組成は、完全に人工的なものである。特定の態様において、脂質乳液は、70% を超えて、リノール酸である。さらに別の特定の態様において、脂質乳液は、少なくとも 1% のカルジオリピンである。リノール酸 (L A) は、不飽和オメガ - 6 脂肪酸である。これは、18 - 炭素鎖および 2 個のシス二重結合を有するカルボン酸からなる無色の液体である。

40

【0264】

本発明のさらに別の態様において、疎水性修飾ポリヌクレオチドの組織分布を変えるための手段として、脂質乳液の組成の変更が使用される。この方法論は、特定の組織へのポリヌクレオチドの特異的送達をもたらす。

別の態様において、カーゴ分子の脂質乳液は、70% を超えるリノール酸 ($C_{18}H_{32}O_2$) および / またはカルジオリピンを含む。

【0265】

50

イントラリピッド (intralipid) などの脂質乳液は、いくつかの非水溶性薬物 (プロポフォル (Propofol) (Diprivanとして再処方されている) など) のための送達用製剤として、前から使用されてきた。本発明のユニークな特徴は、(a) 修飾ポリヌクレオチドを1以上の疎水性化合物と組み合わせ、それによりこれが脂質ミセル中に組み込まれ得るというコンセプト、および(b)可逆性キャリアを提供するためにこれを脂質乳液と混合すること、を含む。血流中への注射の後で、ミセルは通常、アルブミン、HDL、LDLおよびその他の血清タンパク質と結合する。この結合は可逆性であり、最終的に脂質は細胞により吸収される。ミセルの一部として組み込まれるポリヌクレオチドは、次いで、細胞の表面近くに送達されるであろう。その後、ステロール型送達を含むがこれらに限定されない多様な機構を通して、細胞による取り込みが起こり得る。

10

【0266】

複合体化剤

複合体化剤は、強力であるが共有結合ではない引力 (例えば静電気、ファンデルワールス、パイ・スタッキングなどの相互作用) により、本発明のオリゴヌクレオチドに結合する。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの細胞による取り込みを増大するために、複合体化剤と複合体化され得る。複合体化剤の例は、カチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞へ送達するために使用され得る。しかしながら、上記のとおり、カチオン性脂質を含まない製剤が、いくつかの態様において好ましい。

【0267】

20

用語「カチオン性脂質」は、極性および非極性ドメインの両方を有する脂質および合成脂質であって、生理学的pHまたはその付近において正に荷電することができ、核酸などのポリアニオンに結合して核酸の細胞中への送達を促進するものを含む。一般に、カチオン性脂質は、飽和および不飽和アルキル、ならびに、脂環式のエーテル類およびアミンのエステル類、アミド類、または、これらの誘導体を含む。カチオン性脂質の直鎖および分枝アルキルおよびアルケニル基は、例えば、1から約25個の炭素原子を含有し得る。好ましい直鎖または分枝アルキルまたはアルケニル基は、6個以上の炭素原子を有する。脂環式基は、コレステロールおよび他のステロイド基を含む。カチオン性脂質は、例えばC⁺、Br⁺、I⁺、F⁺、アセタート、トリフルオロ酢酸、スルファート、亜硝酸化合物 (nitrite) およびニトラートを含む多様な対イオン (アニオン) とともに調製され得る。

30

【0268】

カチオン性脂質の例は、ポリエチレンイミン、ポリアミドアミン (PAMAM) スターバーストデンドリマー、リポフェクチン (DOTMAとDOPEとの組合せ)、リポフェクターゼ (Lipofectase)、LIPOFECTAMINE (商標) (例えば、LIPOFECTAMINE (商標) 2000)、DOPE、サイトフェクチン (Cytofectin) (Gilead Sciences、Foster City、Calif.)、およびユーフェクチン (Eufectins) (JBL、San Luis Obispo、Calif.) を含む。例示的なカチオン性リポソームは、N-[1-(2,3-ジオレオロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N-[1-(2,3-ジオレオロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルファート (DOTAP)、3-[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-Chol)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセタート (DOSPA)、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド; およびジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) から製造され得る。

40

【0269】

例えばカチオン性脂質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) は、ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドのアンチセンス効果を1000倍増大することが見出された (Vlassov et al.,

50

1994, *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:95-108)。オリゴヌクレオチドはまた、例えばポリ(L-リジン)またはアピジンと複合体化されてもよく、脂質は、この混合物中、例えばステリル-ポリ(L-リジン)に含まれても含まれなくてもよい。

【0270】

カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞に送達するために当該技術分野において使用されてきた(例えば米国特許第5,855,910号;同第5,851,548号;同第5,830,430号;同第5,780,053号;同第5,767,099号;Lewis et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3176; Hope et al. 1998. *Molecular Membrane Biology* 15:1を参照)。今回のオリゴヌクレオチドの取り込みを容易にするために使用され得る他の脂質組成物は、クレームされる方法と組み合わせて使用され得る。上で列記されるものに加えて、例えば米国特許第4,235,871号;米国特許第4,501,728号;同第4,837,028号;同第4,737,323号において教示されるものを含む他の脂質組成物もまた、当該技術分野において知られている。

【0271】

一態様において、脂質組成物は、剤、例えばウイルスタンパク質を、オリゴヌクレオチドの脂質媒介性トランスフェクションを増強するためにさらに含み得る(Kamata, et al., 1994. *Nucl. Acids. Res.* 22:536)。別の態様において、オリゴヌクレオチドは、例えば米国特許第5,736,392号に教示されるとおりのオリゴヌクレオチド、ペプチドおよび脂質を含む組成物の一部として、細胞と接触させられる。血清耐性である改善された脂質もまた記載されている(Lewis, et al., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:3176)。カチオン性脂質および他の複合体化剤は、エンドサイトーシスを通して細胞中へ運搬されるオリゴヌクレオチドの数を増大するために作用する。

【0272】

別の態様において、オリゴヌクレオチドの取り込みを最適化するために、N-置換グリシンオリゴヌクレオチド(ペプチド)が使用され得る。ペプチドは、トランスフェクションのためのカチオン性脂質様化合物を作製するために使用されてきた(Murphy, et al., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1517)。ペプチドは、標準的な方法(例えばZuckermann, R. N., et al. 1992. *J. Am. Chem. Soc.* 114:10646; Zuckermann, R. N., et al. 1992. *Int. J. Peptide Protein Res.* 40:497)を使用して合成され得る。カチオン性脂質とペプチドとの組合せであるリプトイド(liptoid)もまた、目的のオリゴヌクレオチドの取り込みを最適化するために使用され得る(Hunag, et al., 1998. *Chemistry and Biology*. 5:345)。リプトイドは、ペプチドオリゴヌクレオチドを産生して、アミノ末端のサブモノマーをそのアミノ基を介して脂質にカップリングすることにより合成され得る(Hunag, et al., 1998. *Chemistry and Biology*. 5:345)。

【0273】

正に荷電したアミノ酸を、高活性カチオン性脂質を作製するために使用され得ることは、当該技術分野において知られている(Lewis et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.* 93:3176)。一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、親油性部分に結合した多数のアルギニン、リジン、ヒスチジンまたはオルニチン残基を含む(例えば米国特許第5,777,153号を参照)。

【0274】

別の態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、約1~約4個の塩基性残基を有するペプチドを含む。これらの塩基性残基は、例えばペプチドのアミノ末端、C末端または内部領域に位置され得る。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されてきた。

【0275】

これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖(例えばグリシン(これはまた非極性であるとも考えられる)、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ-分枝側

10

20

30

40

50

鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を持つアミノ酸を含む。塩基性アミノ酸の他にも、ペプチドの他の残基の大多数または全てが、非塩基性アミノ酸から、例えばリジン、アルギニンまたはヒスチジン以外のアミノ酸から選択され得る。好ましくは、長い中性の側鎖を有する中性アミノ酸が優位に使用される。

【0276】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、1以上のガンマカルボキシグルタミン酸残基または -Gla 残基を有する天然または合成のポリペプチドを含む。これらのガンマカルボキシグルタミン酸残基により、ポリペプチドが、互いにおよび膜表面に、結合することが可能になる。言い換えると、一連の -Gla を有するポリペプチドは、RNAi コンストラクトが、それが接触した膜が何であれそれに固着することを助けるための汎用送達モダリティとして使用され得る。これは、少なくとも、RNAi コンストラクトが血流からクリアランスされることを遅延し、それらが標的にホーミングするチャンスを増強し得る。

10

【0277】

ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、天然のタンパク質中に存在してもよい（例えばプロトロンピンは10個の -Gla 残基を有する）。代わりに、これらは、精製された、組み換え的に作製された、または、化学合成されたポリペプチド中に、カルボキシ化により、例えばビタミンK依存性カルボキシラーゼを使用して、導入され得る。ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、連続的であっても非連続的であってもよく、ポリペプチド中のかかるガンマカルボキシグルタミン酸残基の総数および位置は、ポリヌクレオチドの異なるレベルの「固着性（stickiness）」を達成するために調節/微調整され得る。

20

【0278】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物と接触させられる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つなどの脂質を含む混合物と、約12時間～約24時間接触させられる。別の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つなどの脂質を含む混合物と、約1日～約5日間接触させられる。

【0279】

一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約3日間～約30日間までの長さにより接触させられる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約5～約20日間接触させたままに置かれる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7～約15日間接触させたままに置かれる。

30

【0280】

例えば、一態様において、オリゴヌクレオチド組成物は、サイトフェクチンCSまたはGSV（Glen Research; Sterling, Va. から入手可能）、GS3815、GS2888などの脂質の存在下において、本明細書に記載されるとおり、長期のインキュベーション期間にわたって細胞と接触させられてもよい。

40

【0281】

一態様において、細胞の、脂質およびオリゴヌクレオチド組成物を含む混合物とのインキュベーションは、細胞のバイアビリティを低下させない。好ましくは、トランスフェクション期間の後で、細胞は実質的に生存している。一態様において、トランスフェクションの後で、細胞は、少なくとも約70%～少なくとも約100%生存している。別の態様において、細胞は、少なくとも約80%～少なくとも約95%生存している。さらに別の態様において、細胞は、少なくとも約85%～少なくとも約90%生存している。

【0282】

一態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書において「輸送ペプチド」として言及される、オリゴヌクレオチドを細胞中へ輸送するペプチド配列を付着させることにより

50

修飾される。一態様において、組成物は、タンパク質をコードする標的核酸分子に対して相補的であるオリゴヌクレオチドおよび共有結合で付着している輸送ペプチドを含む。

【0283】

語「輸送ペプチド」は、オリゴヌクレオチドの細胞中への輸送を容易にさせるアミノ酸配列を含む。それが連結されている部分の細胞中への輸送を容易にさせる例示的なペプチドは、当該技術分野において知られており、例えばHIV-TAT転写因子、ラクトフェリン、ヘルペスVP22タンパク質および線維芽細胞増殖因子2を含む(Pooga et al. 1998. Nature Biotechnology. 16:857; およびDerossi et al. 1998. Trends in Cell Biology. 8:84; Elliott and O'Hare. 1997. Cell 88:223)。

【0284】

オリゴヌクレオチドは、知られている技術(例えばProchiantz, A. 1996. Curr. Opin. Neurobiol. 6:629; Derossi et al. 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Troy et al. 1996. J. Neurosci. 16:253; Vives et al. 1997. J. Biol. Chem. 272:16010)を使用して輸送ペプチドに付着させ得る。例えば、一態様において、活性化チオール基を保有するオリゴヌクレオチドは、そのチオール基を介して、輸送ペプチド中に存在するシステインに(例えばDerossi et al. 1998. Trends Cell Biol. 8:84; Prochiantz. 1996. Current Opinion in Neurobiol. 6:629; Allinquant et al. 1995. J Cell Biol. 128:919において教示されるとおり、例えばアンテナペディアホメオドメインの第2と第3とのヘリックスの間のターン中に存在するシステインに)連結させる。別の態様において、Boc-Cys-(Npy)s-OH基は、最後の(N末端)アミノ酸およびSH基を保有するオリゴヌクレオチドがペプチドにカップリングされ得るように、輸送ペプチドにカップリングされ得る(Troy et al. 1996. J. Neurosci. 16:253)。

【0285】

一態様において、連結基(linking group)はヌクレオモノマーに付着され得、輸送ペプチドはリンカーへ共有結合で付着させられ得る。一態様において、リンカーは、輸送ペプチドについての結合部位として、および、ヌクレアーゼに対する安定性を提供し得るものの両方として、機能し得る。好適なリンカーの例は、置換または非置換のC₁~C₂₀アルキル鎖、C₂~C₂₀アルケニル鎖、C₂~C₂₀アルキニル鎖、ペプチドおよびヘテロ原子(例えばS、O、NHなど)を含む。他の例示的なリンカーは、スルホスクシンイミジル-4-(マレイミドフェニル)-酪酸(SMPB)(例えばSmith et al. Biochem J 1991.276: 417-2を参照)などの二官能性架橋剤を含む。

【0286】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、受容体により媒介されるエンドサイトーシス機構を遺伝子の細胞中への送達のために利用する、分子抱合体として合成される(例えばBunnell et al. 1992. Somatic Cell and Molecular Genetics. 18:559およびこれにおいて引用される参考文献を参照)。

【0287】

標的化剤

オリゴヌクレオチドの送達はまた、オリゴヌクレオチドを細胞受容体へ標的化することによっても改善され得る。標的化部分は、オリゴヌクレオチドに抱合させても、オリゴヌクレオチドに結合したキャリア基(すなわち、ポリ(L-リジン)またはリポソーム)に付着させてもよい。この方法は、特異的受容体により媒介されるエンドサイトーシスを呈す細胞にとって良好に適する。

【0288】

例として、6-ホスホマンノシル化タンパク質に対するオリゴヌクレオチドの抱合体は、マンノース-6-リン酸特異的受容体を発現する細胞により、遊離オリゴヌクレオチドよりも20倍効率的に内部移行される。オリゴヌクレオチドはまた、細胞受容体に対するリガンドに、生分解性リンカーを使用してカップリングされてもよい。別の例において、送達コンストラクトは、ビオチン化オリゴヌクレオチドと強固な複合体を形成するマンノシル化ストレプトアビジンである。マンノシル化ストレプトアビジンは、ビオチン化オリ

ゴヌクレオチドの内部移行を20倍増大することが見出された (Vlassov et al. 1994. Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。

【0289】

加えて、特異的リガンドは、ポリリジンベースの送達システムのポリリジン成分に抱合させられ得る。例えば、トランスフェリン - ポリリジン、アデノウイルス - ポリリジンおよびインフルエンザウイルス赤血球凝集素HA - 2のN末端膜融合ペプチド - ポリリジン抱合体は、真核細胞における受容体媒介性DNA送達を大いに増強する。肺胞マクロファージ中のポリ(L - リジン)に抱合したマンノシル化糖タンパク質は、オリゴヌクレオチドの細胞による取り込みを増強するために採用されている (Liang et al. 1999. Pharmazie 54:559-566)。

10

【0290】

悪性細胞は、葉酸およびトランスフェリンなどの必須栄養素に対して高い必要性を有するので、これらの栄養素は、オリゴヌクレオチドをがん性細胞に標的化するために用いることができる。例えば、葉酸をポリ(L - リジン)に連結させると、前骨髄球性白血病(HL - 60)細胞およびヒトメラノーマ(M - 14)細胞において増強されたオリゴヌクレオチド取り込みが観察される (Ginobbi et al. 1997. Anticancer Res. 17:29)。別の例において、マレイル化されたウシ血清アルブミン、葉酸またはプロトポルフィリン三価鉄IXによりコートされたリポソームは、マウスマクロファージ、KB細胞および2.2.15ヒト肝細胞腫細胞において、オリゴヌクレオチドの増強された細胞による取り込みを示す (Liang et al. 1999. Pharmazie 54:559-566)。

20

【0291】

リポソームは、肝臓、脾臓、網膜内皮系において自然に蓄積する(いわゆる受動的標的化)。リポソームを、抗体およびプロテインAなどの多様なリガンドにカップリングすることにより、これらは、特定の細胞集団に対して能動的に標的化され得る。例えば、プロテインA保有リポソームを、マウス主要組織適合複合体によりコードされるL細胞上に発現するH - 2Kタンパク質に標的化されたH - 2K特異的抗体により、予め処置されてもよい (Vlassov et al. 1994. Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。

【0292】

他のin vitroおよび/またはin vivoでのRNAi試薬の送達は、当該技術分野において知られており、目的のRNAiコンストラクトを送達するために使用され得る。例えば、数例を挙げると、米国特許出願公開第20080152661号、同第20080112916号、同第20080107694号、同第20080038296号、同第20070231392号、同第20060240093号、同第20060178327号、同第20060008910号、同第20050265957号、同第20050064595号、同第20050042227号、同第20050037496号、同第20050026286号、同第20040162235号、同第20040072785号、同第20040063654号、同第20030157030号、WO 2008/036825、WO04/065601およびAU2004206255B2を参照(全て参考として組み込まれる)。

30

【0293】

投与

オリゴヌクレオチドの投与または送達の最適な経路は、所望の結果および/または処置される対象に依存して変動し得る。本明細書に使用される「投与」は、細胞をオリゴヌクレオチドに接触させることを指し、in vitroで、またはin vivoで実施され得る。標的核酸分子から翻訳されるタンパク質の発現を最適に減少させるために、オリゴヌクレオチドの投薬量は、例えばRNA安定性の読み出しによりまたは治療応答により測定されるものとして、過度の実験なしに調整されてもよい。

40

【0294】

例えば、核酸標的によりコードされるタンパク質の発現が測定され得、投薬レジメンがそれに従って調整される必要があるか否かを決定し得る。加えて、細胞におけるまたは細胞により産生されるRNAまたはタンパク質のレベルの増大または減少は、当該技術分野において認識されるいずれの技術をも使用して測定され得る。転写が減少したか否かを決定することにより、標的RNAの切断を誘導する上でのオリゴヌクレオチドの有効性が決

50

定され得る。

【0295】

上記オリゴヌクレオチド組成物のいずれも、単独でまたは薬学的に許容し得るキャリアと組み合わせて、使用され得る。本明細書に使用される「薬学的に許容し得るキャリア」は、好適な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含む。医薬活性物質のためのかかる媒体および剤は、当該技術分野において周知である。従来のおずれの媒体または剤が活性成分と適合しない場合を除いて、これは治療用組成物において使用され得る。補足の活性成分もまた、組成物中に組み込まれ得る。

【0296】

いくつかの態様において、本開示は、オリゴヌクレオチド（例えば、単離された二本鎖核酸分子）を含有する組成物（例えば、医薬組成物）に関する。いくつかの態様において、組成物は、さらなる治療剤を含む。さらなる治療剤の非限定的例は、これらに限定されないが、核酸（例えば、 $sd-rxRNA$ など）、小分子（例えば、がん、神経変性疾患、感染性疾患、自己免疫疾患などを処置するのに有用な小分子）、ペプチド（例えば、がん、神経変性疾患、感染性疾患、自己免疫疾患などを処置するのに有用なペプチド）およびポリペプチド（例えば、がん、神経変性疾患、感染性疾患、自己免疫疾患などを処置するのに有用な抗体）を含む。本開示の組成物は、いくつかの態様において、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多いさらなる治療薬を有してもよい。いくつかの態様において、組成物は、10よりも多いさらなる治療薬を含む。

【0297】

オリゴヌクレオチドは、非経口投与のために、リボソームもしくはポリエチレングリコールで修飾されたリボソーム中へ組み込んでも、または、カチオン性脂質と混和されてもよい。追加の物質、例えば特定の標的細胞上に見出される膜タンパク質に対して反応性の抗体の、リボソーム中への組み込みは、特異的な細胞型に対するオリゴヌクレオチドの標的化に役立ち得る。

【0298】

*in vivo*での適用に関して、本発明の製剤を、選択した投与の経路、例えば、非経口、経口または腹腔内、注入、髄腔内送達、実質内送達、静脈内送達または脳または脊髄への直接注射、に適応した種々の形態で患者に投与することができる。

【0299】

本発明の側面は、 $sd-rxRNA$ または $sd-rxRNA$ バリエーションなどの核酸分子の神経系への送達に関する。例えば、 $sd-rxRNA$ または $sd-rxRNA$ バリエーションは、脳または脊髄へと送達されることができる。 $sd-rxRNA$ バリエーションを脳または脊髄へと送達するためのあらゆる適切な送達機構を適用することができる。いくつかの態様において、脳または脊髄への送達は、注入、髄腔内送達、実質内送達、静脈内送達または脳または脊髄への直接注射によって起こる。

【0300】

いくつかの態様において、 $sd-rxRNA$ または $sd-rxRNA$ バリエーションは、脳の特定の領域へと送達される。 $sd-rxRNA$ または $sd-rxRNA$ バリエーションは、血液脳関門を通過するように適切に修飾されるかまたは製剤化されることができる。他の態様において、 $sd-rxRNA$ または $sd-rxRNA$ バリエーションは、血液脳関門を横切る必要がないようなやり方で投与される。

【0301】

いくつかの態様において、 $sd-rxRNA$ または $sd-rxRNA$ バリエーションは、脳または脊髄中へのポンプまたはカテーテルシステムによって送達される。かかる送達の例は、米国特許第6,093,180号（Elsberry）から参考として組み込まれる。脳中へと薬物を注入するための技術もまた、米国特許第5,814,014号（Elsberry et al.）から参考として組み込まれる。

【0302】

いくつかの態様において、核酸は、以下の経路による投与を含む非経口投与により投与

10

20

30

40

50

される：静脈内；筋肉内；間質内（interstitially）；動脈内；皮下；眼内；滑膜内（intrasynovial）；経皮を含む経上皮；吸入を介した肺；眼（ophthalmic）；舌下および口腔内；眼（ophthalmic）を含む局所；経皮；眼（ocular）；直腸；ならびに送気を介した経鼻吸入。いくつかの態様において、sd-rxRNA分子は、皮内注射によりまたは皮下的に投与される。

【0303】

医薬製剤は、水溶性または水分散性の形態での活性化合物の水性溶液を含むことができる。加えて、好適な油性注射用懸濁液としての活性化合物の懸濁液も、投与されてもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルは、脂肪油、例えばゴマ油、または、合成脂肪酸エステル類、例えばオレイン酸エチルまたはトリグリセリドを含む。水性注射用懸濁液は、例

10

【0304】

本発明のオリゴヌクレオチドは、液体の溶液、好ましくはハンクス溶液またはリンガー溶液などの生理学的に適合性の緩衝液中で処方されてもよい。さらに、オリゴヌクレオチドは、固体の形態において処方されて、使用の直前に再溶解されるか懸濁されてもよい。凍結乾燥形態もまた、本発明において含まれる。

【0305】

医薬製剤はまた、経皮貼付剤、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴下剤、スプレー、坐剤、液体または粉末を含むこともできる。加えて、従来の医薬用キャリア、水性、粉末または油性の基剤、または、増粘剤も、局所投与用の医薬製剤に使用されてもよい。

20

【0306】

経口投与用の医薬製剤はまた、散剤または顆粒、水または非水性媒体中の懸濁液または、溶液、カプセル、サケット（sachet）または錠剤を含むこともできる。加えて、増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散化補助剤または結合剤も、経口投与用の医薬製剤に使用されてもよい。

【0307】

経粘膜または経皮投与用に、浸透すべき障壁に適切な浸透剤（penetrant）が、製剤中に使用される。かかる浸透剤は当該技術分野において知られており、例えば、経粘膜投与用に、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体ならびに界面活性剤を含む。経粘膜投与は、鼻用スプレーを通して、または、坐剤を使用するものであってもよい。経口投与用に、オリゴヌクレオチドが、カプセル、錠剤およびトニックなどの従来の経口投与形態中へ製剤化される。局所投与用に、本発明のオリゴヌクレオチドが、当該技術分野において知られている軟膏（ointment）、軟膏（salve）、ゲルまたはクリーム中へに製剤化される。

30

【0308】

薬物送達ビヒクルは、例えばin vitroでの投与のため、全身投与のためまたは局所投与のために、選ばれ得る。これらのビヒクルは、遅延放りザーバとして機能するように、または、この含有物を標的細胞に直接的に送達するように、設計され得る。いくつかの直接送達用薬物ビヒクルを使用する利点は、1回の取り込みごとに複数の分子が送達されることである。かかるビヒクルは、さもなくば血流から急速にクリアランスされるであろう薬物の循環半減期を延長することが示されている。このカテゴリーに分類されるかかる特殊化された薬物送達ビヒクルのいくつかの例は、リボソーム、ハイドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルおよび生体粘着性マイクロスフィアである。

40

【0309】

記載のオリゴヌクレオチドは、対象へ全身投与されてもよい。全身吸収は、これに続いて全身にわたって分布する、薬物の血流中への侵入を指す。全身吸収をもたらす投与経路は以下を含む：静脈内、皮下、腹腔内および鼻内。これらの投与経路の各々は、オリゴヌクレオチドを、アクセス可能な罹患細胞に送達する。

【0310】

50

皮下投与に続いて、治療剤は局所リンパ節中へ流れ、リンパのネットワークを通して循環中へと進む。循環中への侵入の速度は、分子量またはサイズの関数であることが示されている。リポソームまたは他の薬物キャリアの使用は、オリゴヌクレオチドをリンパ節に局在させる。オリゴヌクレオチドを細胞中へ拡散するように修飾しても、未修飾または修飾オリゴヌクレオチドの細胞中への送達にリポソームが直接的に参加してもよい。

【0311】

選ばれた送達方法は、細胞中への侵入をもたらすであろう。いくつかの態様において、好ましい送達方法は、リポソーム（10～400nm）、ハイドロゲル、制御放出ポリマーおよび他の薬学的に適用可能なビヒクルならびにマイクロインジェクションまたはエレクトロポレーション（ex vivoでの処置のため）を含む。

10

【0312】

本発明の医薬製剤は、乳液として調製され製剤化されてもよい。乳液は通常、1つの液体が別の液体中に通常は直径0.1μmを超える液滴の形態で分散した、均質な系である。本発明の乳液は、乳化剤、安定化剤、色素、脂質、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存剤などの賦形剤を含んでもよく、抗酸化剤もまた、必要に応じて乳液中に存在してもよい。賦形剤は、水相、油相またはそれ自体が別の相として、溶液として存在してもよい。

【0313】

本発明の乳液製剤に使用されてもよい天然に存在する乳化剤の例は、ラノリン、ミツロウ、リン脂質、レシチンおよびアカシアを含む。微細に分割された固体もまた、特に界面活性剤と組み合わせて、粘性の製剤において、良好な乳化剤として使用されてきた。乳化剤として使用されてもよい微細に分割された固体は、重金属水酸化物などの極性無機固体、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウムおよびコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウムなどの非脂溶性粘土、顔料ならびに炭素またはステアリン酸グリセリルなどの非極性固体を含む。

20

【0314】

乳液製剤に含まれてもよい保存剤の例は、メチルパラベン、プロピルパラベン、4級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルおよびホウ酸を含む。乳液製剤に含まれてもよい抗酸化剤の例は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンなどのフリーラジカルスカベンジャーまたはアスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤ならびにクエン酸、酒石酸およびレシチンなどの抗酸化剤補助剤（antioxidant synergist）を含む。

30

【0315】

一態様において、オリゴヌクレオチドの組成物は、マイクロエマルジョン（microemulsion）として製剤化される。マイクロエマルジョンは、水、油および両親媒性物質の系であって、単一の光学的等方性および熱力学的安定性の溶液である。典型的には、マイクロエマルジョンは、第1に油を水性界面活性剤溶液中に分散させ、次いで、透明な系を形成するために、充分な量の第4の成分、一般的には中程度の鎖長のアルコールを加えることにより調製される。

40

【0316】

マイクロエマルジョンの調製において使用されてもよい界面活性剤は、これらに限定されないが、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル類、テトラグリセロールモノラウレート（ML310）、テトラグリセロールモノオレアート（MO310）、ヘキサグリセロールモノオレアート（PO310）、ヘキサグリセロールペンタオレアート（PO500）、デカグリセロールモノカプラート（MCA750）、デカグリセロールモノオレアート（MO750）、デカグリセロールセキオレアート（SO750）、デカグリセロールデカオレアート（DA0750）が、単独でまたは共界面活性剤（cosurfactant）と組合せて、含む。共界面活性剤、通常はエタノール、1-プロパノールおよび1-ブタノールなどの短鎖アルコールは、界面活性剤のフ

50

フィルム中に浸透して、その後、界面活性剤分子の間で生み出される空隙のために不規則なフィルムを作り出すことにより、界面の流動性を増大させるのに役立つ。

【0317】

しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用なしで調製されてもよく、アルコールを含まない自己乳化マイクロエマルジョン系が、当該技術分野において知られている。水相は、典型的には、これらに限定されないが、水、薬物の水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコールおよびエチレングリコールの誘導体であってもよい。油相は、これらに限定されないが、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル類、中鎖 ($C_8 \sim C_{12}$) モノ、ジおよびトリ-グリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル類、脂肪アルコール類、ポリグリコール化 (polyglycolized) グリセリド、飽和ポリグリコール化 $C_8 \sim C_{10}$ グリセリド、植物油およびシリコン油などの材料を含んでもよい。

10

【0318】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化および増強された薬物の吸収の観点から特に関心がある。脂質ベースのマイクロエマルジョン (油/水および水/油の両方) が、薬物の経口でのバイオアベイラビリティを増強するために提案されている。

【0319】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化の改善、酵素による加水分解からの薬物の保護、界面活性剤により誘導される膜の流動性および透過性の変化に起因する薬物吸収の増強の可能性、調製の容易性、固体投与形態と比べた経口投与の容易性、臨床的効力の改善ならびに毒性の低減を与える (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11:1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85:138-143)。

20

【0320】

マイクロエマルジョンはまた、化粧品および医薬適用の両方における、活性成分の経皮送達においても有効であった。本発明のマイクロエマルジョンの組成物および製剤は、胃腸管からのオリゴヌクレオチドの全身吸収の増大を促進し、ならびに、胃腸管、膈、口腔および他の投与の領域内における、オリゴヌクレオチドの局所的な細胞による取り込みを改善することが予測される。

【0321】

一態様において、本発明は、核酸、特にオリゴヌクレオチドの、動物の皮膚への効率的な送達に影響を及ぼす多様な浸透増強剤を採用する。越えるべき膜を浸透増強剤で処置した場合、非親油性薬物すら、細胞膜を越えることができる。細胞膜を越える非親油性薬物の拡散を増大することに加えて、浸透増強剤はまた、親油性薬物の浸透性を増強するようにも作用する。

30

【0322】

本発明において使用されてもよい5種のカテゴリーの浸透増強剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤および非キレート性非界面活性剤を含む。投与されるオリゴヌクレオチドの浸透を増強するために利用されてもよい他の剤は、エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのグリコール類、2-15ピロールなどのピロール類、アゾン類、リモネンなどのテルペン類ならびにメントンを含む。

40

【0323】

オリゴヌクレオチド、特に脂質製剤中のものはまた、医療用デバイス、例えば血管形成バルーンカテーテルなどのカテーテルを、カチオン性脂質製剤によりコーティングすることによっても投与され得る。コーティングは、例えば脂質製剤または脂質製剤と、好適な溶媒、例えば水をベースとする緩衝液、水性溶媒、エタノール、塩化メチレン、クロロフォルムなど、との混合物中に、医療用デバイスを浸漬することにより、達成されてもよい。

【0324】

一定量の製剤がデバイスの表面に自然に接着し、デバイスがその後適宜患者へ投与される。代わりに、脂質製剤の凍結乾燥混合物は、デバイスの表面に特異的に結合されてもよ

50

い。かかる結合技術は、例えばK. Ishihara et al., Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 27, pp. 1309-1314 (1993)に記載され、その開示は、本明細書においてその全体を参考として組み込まれる。

【0325】

投与されるべき有用な投薬量および特定の投与の形態は、細胞型、in vivoでの使用については年齢、体重および特定の動物および処置されるべきその領域、使用される特定のオリゴヌクレオチドおよび送達方法、企図される治療および診断用途ならびに製剤の形態、例えば懸濁液、乳液、ミセルまたはリポソームなどの要因に依存して変動し、このことは当業者に容易に明らかであろう。典型的には、投薬量は、より低い量で投与され、所望の結果が達成されるまで増加させられる。

10

【0326】

オリゴヌクレオチドを送達するために脂質が使用されるとき、投与される脂質化合物の量は変化し得、一般に、投与されているオリゴヌクレオチド剤の量に依存する。例えば、脂質化合物のオリゴヌクレオチド剤に対する重量比は、好ましくは約1:1から約15:1までであり、約5:1~約10:1の重量比がより好ましい。

【0327】

一般に、投与されるカチオン性脂質化合物の量は、約0.1ミリグラム(mg)~約1グラム(g)まで変化する。一般的なガイダンスのために、典型的には、患者の体重の各1kg毎に約0.1mg~約10mgの特定のオリゴヌクレオチド剤および約1mg~約100mgの脂質組成物が投与されるが、より高いおよびより低い量も使用され得る。

20

【0328】

本発明の剤は、医薬の投与に好適な生物学的に適合性の形態で、対象へ投与されるか、または、細胞と接触させられる。「投与に好適な生物学的に適合性の形態」は、オリゴヌクレオチドの治療効果があらゆる毒性効果を凌ぐ形態で、オリゴヌクレオチドが投与されることを意味する。一態様において、オリゴヌクレオチドは、対象へ投与される。対象の例は、哺乳動物、例えばヒトおよび他の霊長類；ウシ、ブタ、ウマおよび農耕(farming)(農業(agricultural))用動物；イヌ、ネコおよび他の家庭のペット；マウス、ラットおよびトランスジェニック非ヒト動物を含む。

【0329】

本発明のオリゴヌクレオチドの活性量の投与は、所望の結果を達成するために必要な投与量および時間において、有効量として定義される。例えば、オリゴヌクレオチドの活性量は、細胞の型、使用されるオリゴヌクレオチド、ならびに、in vivoでの使用については疾患の状態、個体の年齢、性別および体重、ならびに、個体において所望の応答を惹起するオリゴヌクレオチドの能力などの因子に従って変動してもよい。

30

【0330】

細胞中でのオリゴヌクレオチドの治療的レベルの確立は、取り込みの速度と流出または分解の速度に依存する。分解の度合いを低下させることは、オリゴヌクレオチドの細胞内半減期を延長する。よって、化学修飾されたオリゴヌクレオチド、例えばリン酸骨格の修飾を持つものは、異なる用量を必要とする場合がある。

【0331】

正確なオリゴヌクレオチドの投薬量および投与される用量の回数は、実験的および臨床試験において生み出されるデータに依存するであろう。所望の効果、送達ビヒクル、疾患の兆候および投与の経路などの数個の因子が、投薬量に影響を及ぼすであろう。投薬量は当業者により容易に決定され得、対象とする医薬組成物中へ製剤化される。好ましくは、処置の期間は、少なくとも疾患の症状の経過全体に及ぶであろう。

40

【0332】

投薬レジメンは、最適な治療応答を提供するために調整されてもよい。例えば、オリゴヌクレオチドは、繰り返して投与されてもよく、例えば数回の用量が毎日投与してもよく、または、その用量が、治療状況の要件に従って比例的に低減させてもよい。オリゴヌクレオチドが細胞へ投与されるかまたは対象へ投与されるかに関わらず、当業者は、対象と

50

するオリゴヌクレオチドの適切な用量および投与のスケジュールを容易に決定することができるであろう。

【0333】

s d - r x R N A の投与は、投薬レジメンの試験を通して最適化され得る。いくつかの態様において、単回投与で充分である。投与された s d - r x R N A の効果をさらに延長するために、s d - r x R N A は、当業者が精通しているとおり、遅延放出製剤またはデバイスにおいて投与され得る。s d - r x R N A 化合物の疎水性の性質により、広範で多様なポリマーの使用が可能となり、これらのいくつかは、従来のオリゴヌクレオチド送達に適合しない。

【0334】

10

他の態様において、s d - r x R N A は複数回投与される。いくつかの例において、これは、毎日、週2回、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、2カ月毎、3カ月毎、4カ月毎、5カ月毎、6カ月毎または6カ月に1回未満、投与される。いくつかの例において、これは、1日、1週間、1カ月および/または1年あたり、複数回投与される。例えば、これは、およそ1時間毎、2時間毎、3時間毎、4時間毎、5時間毎、6時間毎、7時間毎、8時間毎、9時間毎、10時間毎、12時間毎、または12時間よりも長い時間毎に、投与することができる。これは、1日あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または10回よりも多い回数、投与することができる。

【0335】

本発明の側面は、s d - r x R N A 分子を対象へ投与することに関する。いくつかの例において、対象は患者であり、s d - r x R N A 分子の投与には、s d - r x R N A 分子を医院で投与することが関与する。

20

いくつかの態様において、1種より多くの s d - r x R N A 分子が同時に投与される。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種または10種より多くの異なる s d - r x R N A 分子を含む組成物が投与されてもよい。ある態様において、組成物は2または3種の異なる s d - r x R N A 分子を含む。組成物が1種より多くの s d - r x R N A 分子を含むとき、組成物中の s d - r x R N A 分子は、同一の遺伝子または異なる遺伝子に指向し得る。

【0336】

いくつかの例において、送達される s d - r x R N A の有効量は、少なくともおよそ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、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、100 mg / kg、または100 mg / kg より多く、全ての中間の値を含む。

30

【0337】

いくつかの例において、送達される s d - r x R N A の有効量は、少なくとも約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 μ g または950 μ g より多く、全ての中間の値を含む。

40

本明細書に記載の方法により投与される s d - r x R N A 分子は、神経系における全ての細胞型に対して効率的に標的化されることができる。

【0338】

対象（例えば、対象の細胞）中へ核酸を導入する種々の様式が、本開示により企図される。例えば、核酸（例えば、核酸を含む溶液）を対象へ注射（例えば、細胞へ注射）する

50

ことができ、または、核酸で被覆された粒子を対象（例えば、細胞）に衝突させることができる。いくつかの態様において、細胞または生体が、核酸の溶液中に浸漬される。いくつかの態様において、核酸は、核酸の存在下における細胞膜のエレクトロポレーションによって細胞中または生体中へ導入される。

【0339】

いくつかの態様において、核酸を含むウイルスコンストラクトがウイルス粒子中にパッケージングされて、細胞中への核酸の導入および核酸の転写を達成する。対象（例えば、対象の細胞）中へ核酸を導入するための様式のさらなる例は、これらに限定されないが、脂質媒介性キャリア輸送、化学媒介性輸送（例えば、リン酸カルシウム）などを含む。

【0340】

核酸は、追加の構成要素とともに導入することができる。例えば、いくつかの態様において、核酸は、細胞による核酸の取り込みを増強する構成要素とともに導入される。いくつかの態様において、核酸は、一本鎖のアニールングを阻害する構成要素とともに導入される。いくつかの態様において、核酸は、核酸分子を安定化させるか、あるいはそうでなければ標的遺伝子の阻害を増大させる、構成要素とともに導入される。

【0341】

核酸は、細胞中へ直接導入されても（すなわち細胞内で）；または細胞外から、腔、間質の空間中へ、生体の循環中へ導入しても、経口で導入しても、または、細胞もしくは生体を、核酸を含む溶液中に浸漬することにより導入されてもよい。血管のまたは血管外の循環、血液またはリンパ系および脳脊髄液は、核酸が導入されてもよい部位である。

【0342】

いくつかの態様において、標的遺伝子を持つ細胞は、いずれの生物から由来してもよい。いくつかの態様において、標的遺伝子を持つ細胞は、いずれの生物に含有され（例えば、格納され、または内に存在し）てもよい。例えば、生物は、植物、動物、原虫、細菌、ウイルスまたは真菌であってよい。植物は、単子葉、双子葉または裸子植物であってよく；動物は脊椎動物であっても無脊椎動物であってもよい。好ましい微生物は、農業においてまたは工業により使用されるものであり、植物または動物に対して病原性であるものである。

代わりに、ベクター、例えば本発明の *siRNA* をコードする導入遺伝子は、当該技術分野において認識される技術を使用して、宿主細胞またはトランスジェニック動物中へ操作され得る。

【0343】

本発明の剤（またはそれをコードするベクターまたは導入遺伝子）についてのさらに好ましい使用は、真核細胞または真核の非ヒト生物、好ましくは哺乳動物の細胞または成体、最も好ましくはヒト細胞、例えば *HeLa* または 293 などの細胞株、または、げっ歯類、例えばラットおよびマウスにおいて行われる機能分析である。標的特異的 *RNA* 干渉に指向させるために標的 *mRNA* 配列に対して十分に相補的である好適なプライミング剤 / *RNAi* 剤を投与することにより、標的細胞において、例えば細胞培養においてまたは標的生物において、特異的なノックアウトまたはノックダウン表現型が得られ得る。

【0344】

よって、本発明のさらなる主題は、標的遺伝子特異的ノックアウトまたはノックダウン表現型を示す真核細胞または真核の非ヒト生物であって、完全に、または少なくとも部分的に、少なくとも1つの内因性標的遺伝子の発現を欠損するものであって、ここで、該細胞または生物は、標的遺伝子の発現を阻害することができる *RNAi* 剤をコードする *DNA* を含む、少なくとも1つのベクターによりトランスフェクトされている。本発明が、*RNAi* 剤の特異性に起因して、数個の異なる内因性遺伝子の標的特異的ノックアウトまたはノックダウンを可能にすることは、注目されるべきである。

【0345】

細胞または非ヒト生物、特にヒト細胞または非ヒト哺乳動物の遺伝子特異的ノックアウトまたはノックダウン表現型は、処理の分析（analytic to procedures）において、例え

10

20

30

40

50

ば遺伝子発現プロファイルおよび/またはプロテオームの分析などの複雑な生理学的プロセスの機能的および/または表現型的分析において、使用されてもよい。好ましくは、分析は、オリゴヌクレオチドベースのチップを使用するハイスループット法により行われる。

【0346】

治療的使用

遺伝子の発現を阻害することにより、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、神経変性疾患などの、タンパク質の発現が関与するあらゆる疾患を処置するために使用することができる。

【0347】

本発明の側面は、神経系に影響を及ぼす障害の処置における、sd-rxRNAまたはsd-rxRNAバリエーションsd-rxRNAなどの核酸分子の使用に関する。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、神経変性障害を処置するのに使用される。本明細書に使用される用語「神経変性障害」は、神経系の細胞および組織の構成要素の劣化によって引き起こされる障害、疾患または状態を指す。

【0348】

神経変性障害のいくつかの非限定的例は、脳卒中、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、脳室周囲白質軟化症(PVL)、筋萎縮性側索硬化症(ALS、「ルー・ゲーリック病」)、グアムにおけるALS・パーキンソン病・認知症複合、フリードライヒ運動失調症、ウィルソン病、多発性硬化症、脳性麻痺、進行性核上性麻痺(Steel-Richardson症候群)、球麻痺および仮性球麻痺、糖尿病性網膜症、多発梗塞性認知症、黄斑変性、ピック病、びまん性レビー小体病、プリオン病、例えばクロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病、クールー病および致死性家族性不眠症、

【0349】

原発性側索硬化症、変性運動失調症、マシャド・ジョセフ病/脊髄小脳性運動失調症3型およびオリブ橋小脳変性症、脊髄および球脊髄筋萎縮症(ケネディ病)、家族性痙攣性対麻痺、ウォルフアルト・クーゲルベルグ・ウェランダー病、テイ・サックス病、多系統変性症(シャイ・ドレーガー症候群)、ジル・ド・ラ・トゥレット病、家族性自律神経障害(ライリー・デイ症候群)、クーゲルベルグ・ウェランダー病、亜急性硬化性全脳炎、ウェルドニヒ・ホフマン病、シヌクレイノパチー(多系統萎縮症を含む)、サンドホフ病、大脳皮質基底核変性症、痙攣性対麻痺、原発性進行性失語、進行性多巣性白質脳症、線条体黒質変性症、家族性痙攣性疾患、神経変性に関連する慢性てんかん状態、ピンスヴァンガー病、および認知症(認知症の全ての基礎をなす病因を含む)を含む。

【0350】

いくつかの態様において、障害は、パーキンソン病、ハンチントン病、またはALSである。ある態様において、障害は、ALSであり、sd-rxRNAまたはsd-rxRNAバリエーションは、スーパーオキシドディスムターゼであるSOD1を標的とする。

【0351】

神経変性障害はまた、脳卒中、頭部もしくは脊髄への損傷、または急性の虚血性損傷によって引き起こされたものを含む、脳損傷または外傷の結果でもあり得る。虚血性損傷は、脳の受ける血流が不十分である時に生じる状態を指す。いくつかの態様において、脳または神経系の損傷は、外傷性負傷によってもたらされ得るか、または感染、放射線、化学または毒性損傷の結果であり得る。拡散性または局在性であり得る、脳内および神経系内の損傷には、頭蓋内または椎骨内の病変もしくは出血、塞栓性閉塞および血栓性閉塞を含む脳虚血もしくは脳梗塞、周産期低酸素虚血損傷、むち打ち症、乳幼児揺さぶられ症候群、急性虚血に続く再灌流、または心停止が含まれる。

【0352】

一態様において、オリゴヌクレオチドによるin vitroでの細胞の処置を、対象から取り除かれた細胞のex vivoでの治療のため(例えば白血病またはウイルス感染の処置のため

10

20

30

40

50

）、または、対象に由来しないが対象へ投与される予定の細胞の処置のため（例えば対象へ移植される予定の細胞における移植抗原の発現の除去）に使用することができる。加えて、*in vitro*での細胞の処置を、非治療的セッティングにおいて、例えば遺伝子の機能を評価するため、遺伝子の調節およびタンパク質合成を研究するため、または、遺伝子発現またはタンパク質合成を調節するように設計されたオリゴヌクレオチドに対して行われた改善を評価するために、使用することができる。

【0353】

*in vivo*での細胞の処置は、タンパク質の発現を阻害することが望ましい特定の臨床的セッティングにおいて有用であり得る。アンチセンス治療が好適であることが報告されている多数の医療条件（例えば米国特許第5,830,653号を参照）ならびに呼吸器多核体ウイルス感染症（WO 95/22,553）、インフルエンザウイルス（WO 94/23,028）および悪性腫瘍（WO 94/08,003）が存在する。アンチセンス配列の臨床的使用の他の例は、例えばGlaser, 1996. Genetic Engineering News 16:1において概説される。オリゴヌクレオチドによる切断のための例示的な標的として、例えばタンパクキナーゼC α 、ICAM-1、c-r a fキナーゼ、p53、c-m y bおよび慢性骨髄性白血病において見出されるb c r / a b l融合遺伝子が挙げられる。

【0354】

対象とする核酸は、ヒト、非ヒト霊長類、非ヒト哺乳動物、非ヒト脊椎動物、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、ウサギなど）、家畜動物、ペット（ネコ、イヌなど）、ツメガエル、魚類、昆虫（ショウジョウバエなど）および線虫（*C. elegans*）などのRNAi経路を有する任意の動物において、RNAiに基づく治療に使用することができる。

【0355】

本発明は、対象へ治療剤（例えばRNAi剤またはこれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）を投与することにより、対象において、異常なまたは望ましくない標的遺伝子の発現または活性に関連する疾患または状態を予防するための方法を提供する。適切である場合、対象を始めに、続くRNAi治療に対してより応答性となるように、プライミング剤により処置する。

【0356】

異常な、または望ましくない標的遺伝子の発現または活性により引き起こされるかこれが寄与する疾患についてのリスクを有する対象は、例えば本明細書に記載の診断または予防剤の投与は、疾患または障害が予防されるように、標的遺伝子の異常の特徴である症状の顕在化に先だって行われても、あるいは、その進行において遅れて行われてもよい。標的遺伝子の異常の型に依存して、例えば標的遺伝子、標的遺伝子アゴニストまたは標的遺伝子アンタゴニスト剤を、対象を処置するために使用することができる。

【0357】

別の側面において、本発明は、治療を目的として、標的遺伝子発現、タンパク質の発現または活性を調節するための方法に関する。したがって、例示的な態様において、本発明の調節方法は、標的遺伝子を発現することができる細胞を、標的遺伝子またはタンパク質に対して特異的な（例えば前記遺伝子によりコードされるmRNAに対して特異的な、または前記タンパク質のアミノ酸配列を特定する）本発明の治療剤と、標的タンパク質の発現または1以上の活性が調節されるように、接触させることを含む。

【0358】

これらの調節方法は、*in vitro*で（例えば細胞を剤とともに培養することにより）、*in vivo*で（例えば剤を対象へ投与することにより）、または、*ex vivo*で行うことができる。典型的には、対象を始めに、続くRNAi治療に対してより応答性になるように、プライミング剤で処置する。したがって、本発明は、標的遺伝子のポリペプチドまたは核酸分子の異常なまたは望ましくない発現または活性により特徴づけられる疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。標的遺伝子の活性の阻害は、標的遺伝子が異常に制御されていないか、および/または、低下した標的遺伝子の活性が有益な効果を有する

可能性がある状況において望ましい。

【0359】

本発明の治療剤は、異常なまたは望ましくない標的遺伝子の活性に関連する障害を処置（予防的または治療的に）するために、個体に投与することができる。かかる処置と組み合わせ、薬理ゲノミクス（すなわち、個体のジェノタイプと外来化合物または薬物に対する個体の応答との間の関係の研究）を考慮する。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度の間の関係を変化させることにより、重篤な毒性または治療の失敗をもたらす可能性がある。

【0360】

よって、医師または臨床医は、治療剤を投与するか否かを決定する上で、ならびに、投薬量および/または治療剤による処置の治療レジメンを調整する上で、関連する薬理ゲノミクス研究において得られる知識を適用することを考慮してもよい。薬理ゲノミクスは、罹患個体における薬物の体内処理(disposition)および異常作用の変化に起因する、薬物に対する応答における臨床的に重要な遺伝的バリエーションに対処する。例えば、Eichelbaum, M. et al. (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11): 983-985およびLinder, M. W. et al. (1997) Clin. Chem. 43(2):254-266を参照。

【0361】

本発明は、以下の例によってさらに例示されるが、これらは決して、さらに限定するものとして解釈されるべきではない。本出願を通して引用された全ての参考資料（参考文献、交付済み特許、公開された特許出願および同時係属の特許出願を含む）の全体の内容は、参考としてここに明示的に組み込まれる。

【0362】

例

例1：SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションの同定

SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションを設計し、合成し、in vitroでスクリーニングすることで、sd-rxRNAバリエーションの標的遺伝子mRNAレベルを低下させる能力を決定した。sd-rxRNAバリエーションを、HeLa細胞（ヒト子宮頸癌細胞株、10,000細胞/ウェル、96ウェルプレート）中における活性について試験した。HeLa細胞を、血清含有媒体中の多様な濃度のSOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションまたは非ターゲティング対照のパネルで処置した。試験した濃度は、5、1および0.1 μMであった。非ターゲティング対照sd-rxRNA(NTC)は、SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションと類似の構造のものであり、両方の鎖全体にわたり類似の安定化修飾を含有する。

【0363】

投与の48時間後に、細胞を溶解し、Quantigene branched DNAアッセイにより、製造者のプロトコルに従って、遺伝子特異的プローブ(Affymetrix, Santa Clara, CA)を使用して、mRNAレベルを決定した。例示的なセンスおよびアンチセンス配列が、以下の表1および2に提示されている。図1および2は、SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションが、in vitroでのHeLa細胞における標的遺伝子のmRNAレベルを有意に低下させることを実証する。データを、ハウスキーピング遺伝子(PPIB)に対して正規化し、非ターゲティング対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的な重複(biological duplicates)の平均からの標準偏差を表す。図1および2に対応する配列は、表3および4にそれぞれ見出すことができる。

【0364】

【表 1 - 1】

表 1. 例示的なセンスオリゴヌクレオチド

オリゴ番号	遺伝子 記号	センス配列	配列番 号	センス化学	センス骨格	注記
25634	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	1	DY547mm0m00m0m0 mmm	ooooooooos so	
25635	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	2	DY547mm0m00m0m0 mmm	ooooooooos so	
25636	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	3	DY547mm0m00m0m0 mmm	ooooooooos so	
25637	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	4	DY547mm0m00m0m0 mmm	ssssssssssso	
25600	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	5	mm0000m0m0mmm	ssssssssssso	
25638	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	6	DY547mm0m00m0m0 mmm	ssssssssssso	
25643	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	7	DY547mm0m00m0m0 mmm	ooooooooos so	
25644	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	8	DY547mm0m00m0m0 mmm	ssssssssssso	
25645	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	9	DY547mm0m00m0m0 mmm	ooooooooos so	
25652	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	10	DY547mm0000m0m0 mmm	ssssssssssso	
25568	SOD1	AGGZGGAAGZGAA	11	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25569	SOD1	AGGYGGAAGZGAA	12	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25570	SOD1	AGGZGGAAGYGAA	13	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25571	SOD1	AGGYGGAAGYGAA	14	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U

10

20

30

40

【表 1 - 2】

25572	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	15	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オ ク チ ル , x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25573	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	16	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オ ク チ ル , x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25574	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	17	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オ ク チ ル , x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25575	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	18	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z= オ ク チ ル , x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25576	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	19	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25578	SOD1	AGGYGGAAAZGAA	20	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z=チオフェン, x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25579	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	21	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z=チオフェン, x =5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25580	SOD1	AGGYGGAAAYGAA	22	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z=チオフェン, x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25584	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	23	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z=チオフェン, x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25585	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	24	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z=チオフェン, x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25586	SOD1	AGGZGGAAAZGAA	25	DY547mm0d00000d0 mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U
25587	SOD1	AGGYGGAAAZGAA	26	DY547mm0m00000d0 mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メ チ ル C, Y=5 メ チ ル U

10

20

30

40

【表 1 - 3】

25588	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	27	DY547mm0d00000m0 mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25589	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	28	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25590	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	29	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
24560	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	30	DY547mm0m00000m 0mm	ssssssssssso	
25634 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	31	mm0m00m0m0mmm	oooooooooooo so	
25635 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	32	mm0m00m0m0mmm	oooooooooooo so	
25636 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	33	mm0m00m0m0mmm	oooooooooooo so	
25637 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	34	mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25638 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	35	mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25643 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	36	mm0m00m0m0mmm	oooooooooooo so	
25644 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	37	mm0m00m0m0mmm	ssssssssssso	
25645 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	38	mm0m00m0m0mmm	oooooooooooo so	
25652 蛍光ラ ベルなし	SOD1	GAGAGGCAUGUUA	39	mm0000m0m0mmm	ssssssssssso	
25568 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGZGGAAAZGAA	40	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25569 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGYGGAAAZGAA	41	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U

10

20

30

40

【表 1 - 4】

25570 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	42	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25571 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGYGGAAAYGAA	43	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25572 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	44	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25573 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	45	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25574 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	46	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25575 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	47	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z= オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25576 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	48	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25578 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGYGGAAAZGAA	49	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=チオフエン, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25579 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	50	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=チオフエン, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25580 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGYGGAAAYGAA	51	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=チオフエン, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25584 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	52	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=チオフエン, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25585 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	53	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=チオフエン, x=5 メチル C, Y=5 メチル U

10

20

30

40

【表 1 - 5】

25586 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGZGGAAAZGAA	54	mm0d00000d0mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25587 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGYGGAAAZGAA	55	mm0m00000d0mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25588 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGZGGAAAYGAA	56	mm0d00000m0mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25589 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	57	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25590 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	58	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	Z=イソブチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
24560 蛍光ラ ベルなし	SOD1	AGGUGGAAAUGAA	59	mm0m00000m0mm	ssssssssssso	

【 0 3 6 5 】

【表 2 - 1】

表 2. 例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチド

オリゴ番号	アンチセンス配列	配列番号	アンチセンス化学	アンチセンス骨格	注記
25634	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	60	Pm00f0f0fffff0fff0fff0	ssssssssssssssso	
25635	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	61	Pm00f0f0ffffffffff0fff0	oooooooooooooooossssssso	
25636	UAACAUGCCUCUCUU CAUC	62	Pm00f0f0ffffffffff0f0	oooooooooooooooossssssso	
25637	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	63	Pm00f0f0ffffffffff0fff0	oooooooooooooooossssssso	
25600	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	64	Pm00f0f0fffff0fff0fff0	ssssssssssssssso	
25638	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	65	Pm00f0f0ffffffffff00	oooooooooooooooossssssso	

【表 2 - 2】

25643	UAACAUGCCUCUCUU CAUC	66	Pm00f0f0ffffff0f0	ssssssssssssssso	
25644	UAACAUGCCUCUCUU CAUC	67	Pm00f0f0ffffff0f0	ssssssssssssssso	
25645	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	68	Pm00f0f0ffffff0ff0	ssssssssssssssso	
25652	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	69	Pm00f0f0fffff0ff0ff0	ssssssssssssssso	
25568	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	70	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25569	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	71	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25570	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	72	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25571	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	73	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25572	YZXAYYZXXAXZYYGX XXAA	74	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25573	YYXAYYZXXAXZYYGX XXAA	75	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25574	YZXAYYYXXAXZYYGX XXAA	76	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x =5 メチル C, Y=5 メチル U
25575	YZXAYYZXXAXYYYGX XXAA	77	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25576	YYXAYYYXXAXYYYGX XXAA	78	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssso	x=5 メチル C, Y=5 メチル U

10

20

30

40

【表 2 - 3】

25578	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	79	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25579	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	80	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x =5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25580	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	81	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25584	YZXAYYZXXAXYYYGX XXAA	82	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25585	YYXAYYXXAXYYYGX XXAA	83	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25586	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	84	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25587	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	85	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25588	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	86	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25589	YZXAYYZXXAXZYYGX XXAA	87	Pmdf0ffdf0fmdmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U

10

20

30

40

【表 2 - 4】

25590	YYXAYYZXXAXXZYYGX XXAA	88	Pmff0ffdf0fmdmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
24560	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	89	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	
25634 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	90	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	ssssssssssssssssssso	
25635 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	91	Pm00f0f0ffffffffff0ff0	oooooooooooooooossssssso	
25636 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUC	92	Pm00f0f0ffffffffff0f0	oooooooooooooooossssssso	
25637 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	93	Pm00f0f0ffffffffff0ff0	oooooooooooooooossssssso	
25638 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	94	Pm00f0f0ffffffffff00	oooooooooooooooossssssso	
25643 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUC	95	Pm00f0f0ffffffffff0f0	ssssssssssssssssssso	
25644 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUC	96	Pm00f0f0ffffffffff0f0	ssssssssssssssssssso	
25645 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	97	Pm00f0f0ffffffffff0ff0	ssssssssssssssssssso	
25652 蛍 光ラベル なし	UAACAUGCCUCUCUU CAUCCU	98	Pm00f0f0ffff0ff0ff0	ssssssssssssssssssso	

10

20

30

40

【表 2 - 5】

25568 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	99	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25569 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	100	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25570 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	101	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25571 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	102	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25572 蛍 光ラベル なし	YZXAYYZXXAXXZYYGX XXAA	103	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25573 蛍 光ラベル なし	YYXAYYZXXAXXZYYGX XXAA	104	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25574 蛍 光ラベル なし	YZXAYYXXAXXZYYGX XXAA	105	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x=5 メチル C, Y=5 メチル U
25575 蛍 光ラベル なし	YZXAYYZXXAXXZYYGX XXAA	106	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=オクチル, x =5 メチル C, Y=5 メチル U
25576 蛍 光ラベル なし	YYXAYYXXAXXZYYGX XXAA	107	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	x =5 メチル C,Y=5 メチル U
25578 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	108	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25579 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	109	Pmff0fffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U

10

20

30

40

【表 2 - 6】

25580 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	110	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25584 蛍 光ラベル なし	YZXAYYZXXAXYYYGX XXAA	111	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25585 蛍 光ラベル なし	YYXAYYXXAXYYYGX XXAA	112	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=チオフェ ン, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25586 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	113	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25587 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	114	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25588 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	115	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25589 蛍 光ラベル なし	YZXAYYZXXAXZYYGX XXAA	116	Pmdf0ffdf0fmdmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
25590 蛍 光ラベル なし	YYXAYYZXXAXZYYGX XXAA	117	Pmff0ffdf0fmdmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	Z=イソブチ ル, x=5 メチ ル C, Y=5 メ チル U
24560 蛍 光ラベル なし	UUCAUUUCCACCUU UGCCCAA	118	Pmff0ffff0fmmmm0mmf 00	ssssssssssssssssssso	

【 0 3 6 6 】

【表 2 - 7】

表 1 および 2 についての凡例：	
f	=2' フルオロ
m	=2' Ome
P	=5' リン酸化
s	=ホスホロチオアート結合
o	=ホスホジエステル結合
DY547	=DY547 色素
d	=デオキシリボース

10

【 0 3 6 7 】

ヒト S O D 1 配列は、以下に列記される Genbank 受託番号 NM_000454.4 (配列番号 1 1 9) により表される。S O D 1 配列の多重突然変異が同定されており (Rosen et al (1993) Nature; Deng et al (1993) Science; De Bellerocche et al. (1995) J Med Genet.; Orrel et al (1997) J Neurol.; Cudkowicz (1997) Ann. Neurol.; および Anderson et al (1995) Nature Genet.)、これらもまた本願に概説された配列を利用して標的とすることができる：

20

GTTTGGGGCCAGAGTGGGCGAGGCGGAGGTCTGGCCTATAAAGTAGTCGCGGAGACGGGGTGCTGGTTTGCCTCGTAG
TCTCCTGCAGCGTCTGGGGTTTCCGTTGCAGTCCTCGGAACCAGGACCTCGGCGTGGCCTAGCGAGTTATGGCGACGAAG
GCCGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCAGTGCAGGGCATCATCAATTTGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCACTGAA
GGTGTGGGGAAGCATTAAGGACTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATGAGTTTGGAGATAATACAGCAGGCT
GTACCAGTGCAGGTCCTCACTTTAATCCTCTATCCAGAAAACACGGTGGGCCAAAGGATGAAGAGAGGCATGTTGGAGAC
TTGGGCAATGTGACTGCTGACAAAGATGGTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGGAGACCA
TTGCATCATTGGCCGCACACTGGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTGGGCAAAGGTGGAAATGAAGAAAGTACAAAGA
CAGGAAACGCTGGAAGTCGTTTGGCTTGTGGTGAATTGGGATCGCCCAATAAACATTCCCTTGGATGTAGTCTGAGGCC
CCTTAACCTCATCTGTTATCCTGCTAGCTGTAGAAATGTATCCTGATAAACATTAAACACTGTAATCTTAAAGTGAATT
GTGTGACTTTTTTCAAGAGTTGCTTTAAAGTACCTGTAGTGAGAACTGATTTATGATCACTTGAAGATTTGTATAGTTTT
ATAAACTCAGTTAAATGTCTGTTTCAATGACCTGTATTTTGCCAGACTTAAATCACAGATGGGTATTAACTTGTGAC
AATTTCTTTGTCAATTCAAGCCTGTGAATAAAAACCCTGTATGGCACTTATTATGAGGCTATTAAAGAATCCAAATTCAA
ACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号 1 1 9)

30

【 0 3 6 8 】

【表 3】

表 3. ホスホロチオアート含有量を減少させると in vitro での細胞毒性が減少した活性 p s - r x R N A バリエーションをもたらす (図 1 に対応する配列)

オリゴ番号			配列番号	総 # PS
25634	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	120	22
	GS	P.mU* A* A*fc* A*fu* G*fc*fc*fu*fc*fu* C*fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	121	
25635	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	122	10
	GS	P.mU. A. A.fc. A.fu. G.fc.fc.fu.fc.fu.fu.fu*fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	123	
25636	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	124	8
	GS	P.mU. A. A.fc. A.fu. G.fc.fc.fu.fc.fu. C*fu*fu*fu*fc* A*fu* C	125	
25637	PS	DY547.mG*mA* G*mA* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	126	20
	GS			
25600 (親 ps-rxRNA)	PS	mG*mA* G* A* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	127	32
	GS	P.mU* A* A*fc* A*fu* G*fc*fc*fu*fc*fu* C*fu*fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	128	

10

【 0 3 6 9 】

【表 4 - 1】

20

表 4. ホスホロチオアート含有量を減少させると in vitro での細胞毒性が減少した活性 p s - r x R N A バリエーションをもたらす (図 2 に対応する配列)

オリゴ番号			配列番号	総 # PS
25638	PS	DY547.mG*mA* G*mA* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	129	18
	GS	P.mU. A. A.fc. A.fu. G.fc.fc.fu.fc.fu.fu.fu*fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	130	
25643	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	131	20
	GS	P.mU* A* A*fc* A*fu* G*fc*fc*fu*fc*fu*fc*fu*fu*fc* A*fu* C	132	
25644	PS	DY547.mG*mA* G*mA* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	133	30
	GS	P.mU* A* A*fc* A*fu* G*fc*fc*fu*fc*fu*fc*fu*fu*fc* A*fu* C	134	
25645	PS	DY547.mG.mA. G.mA. G. G.mC. A.mU. G.mU*mU*mA	135	22
	GS	P.mU* A* A*fc* A*fu* G*fc*fc*fu*fc*fu*fc*fu*fu*fc* A*fu*fc*fc* U	136	
25600 (親 ps-rxRNA)	PS	mG*mA* G* A* G* G*mC* A*mU* G*mU*mU*mA	137	32

30

【 0 3 7 0 】

【表 4 - 2】

表 3 および 4 についての凡例：	
f	=2' フルオロ
m	=2' O m e
P	=5' リン酸化
*	=ホスホロチオアート結合
.	=ホスホジエステル結合
DY547	=DY547 色素
d	=デオキシリボース

10

【 0 3 7 1】

表 1 ~ 8 に提示された配列のいくつかは色素DY547に付着しているものとして描写されている一方で、表 1 ~ 8 に提示された配列の全ては、色素DY547の非存在下でもまた、本明細書において開示されていることが理解されるべきである。

【 0 3 7 2】

例 2：CNSにおける s d - r x RNA バリエーションの取り込み

図 3 ~ 5 は、多様なホスホロチオアートのレベルの s d - r x RNA 化学的バリエーションが CNS 中の細胞へと取り込まれ送達されることを実証する。s d - r x RNA 化学的バリエーションの組織分布を決定するために、SOD1 を標的とする蛍光標識された化合物を、15 μ L の 15 mg / mL 溶液で嚢内注射（IC 注射）により Sprague Dawley ラットに投与した。注射 2 4 時間後に、組織を収集し、共焦点顕微鏡法のために加工した。s d - r x RNA バリエーションの細胞による取り込みを検出するために、共焦点像を使用した。ホスホロチオアート含量のレベルは、CNS における細胞による取り込みの観察されたレベルと相関していた（例えば、ホスホロチオアート含量の上昇したレベルが、より大きな取り込みをもたらした）。

20

【 0 3 7 3】

例 3：CNSにおける SOD1 の s d - r x RNA バリエーションでのサイレンシング

図 6 は、SOD1 を標的とする s d - r x RNA バリエーション（オリゴ番号 25652）の 14 日間の髄腔内投与に続く in vivo（マウス、腰髄（LSC））での SOD1 サイレncing を実証する。非ターゲティング対照と比較して、SOD1 を標的とする s d - r x RNA バリエーションで処置されたマウスにおいては SOD1 mRNA レベルの 37% 低下が観察された（図 6）。

30

【 0 3 7 4】

方法：SOD1 を標的とする s d - r x RNA バリエーションまたは非ターゲティング対照（NTC）を、14 日間、浸透圧ポンプ（100 μ L の 10 mg / mL の化合物の溶液で満たした）を使用して、髄腔内注入によって投与した。脊髄の末端生検サンプルを第 14 日に収集した。RNA を単離して、qPCR による遺伝子発現解析に供した。データを、シクロフィリン B（PPIB）ハウスキーピング遺伝子のレベルに対し正規化し、1.0 に設定された非ターゲティング対照に対して相対的にグラフ化した。エラーバーは、個々の生検サンプル間の標準偏差を表す。SOD1 を標的とする s d - r x RNA バリエーション処置群対 PBS 群についての P 値は、* p < 0.001 であった。

40

【 0 3 7 5】

例 4：CNSにおける SOD1 の s d - r x RNA バリエーションでのサイレンシング

図 7 は、SOD1 を標的とする s d - r x RNA バリエーション（オリゴ番号 25645）の 14 日間の髄腔内投与に続く in vivo（マウス、腰髄（LSC））での SOD1 サイレncing を実証する。非ターゲティング対照と比較して、SOD1 を標的とする s d - r x RNA バリエーションで処置されたマウスにおいては SOD1 mRNA レベルの統計的に有意

50

な24%低下が観察された(図9)。

【0376】

方法：SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションまたは非ターゲティング対照(NTC)を、14日間、浸透圧ポンプ(100µLの10mg/mLの化合物の溶液で満たした)を使用して、髄腔内注入によって投与した。脊髄の末端生検サンプルを第14日に収集した。RNAを単離して、qPCRによる遺伝子発現解析に供した。データを、シクロフィリンB(CYP1B)ハウスキーピング遺伝子のレベルに対し正規化し、1.0に設定された非ターゲティング対照に対して相対的にグラフ化した。エラーバーは、個々の生検サンプル間の標準偏差を表す。SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーション処置群対非ターゲティング対照群についてのP値は、* $p < 0.01$ であった。

10

【0377】

例5：SOD-1を標的とするsd-rxRNAバリエーションの同定

SOD1を標的とする、塩基の4位または5位に疎水性修飾を含有するsd-rxRNAバリエーションを設計し、合成し、in vitroでスクリーニングすることで、sd-rxRNAバリエーションの標的遺伝子mRNAレベルを低下させる能力を決定した。sd-rxRNAバリエーションを、HeLa細胞(ヒト子宮頸癌細胞株、10,000細胞/ウェル、96ウェルプレート)中における活性について試験した。HeLa細胞を、血清含有媒体中の多様な濃度のSOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションまたは非ターゲティング対照のパネルで処置した。試験した濃度は、5、1および0.1µMであった。非ターゲティング対照sd-rxRNAは、SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションと類似の構造のものであり、両方の鎖全体にわたり類似の安定化修飾を含有する。

20

【0378】

投与の48時間後に、細胞を溶解し、Quantigene branched DNAアッセイにより、製造者のプロトコルに従って、遺伝子特異的プローブ(Affymetrix, Santa Clara, CA)を使用して、mRNAレベルを決定した。図8~11は、SOD1を標的とするsd-rxRNAバリエーションの、塩基の4位または5位に疎水性修飾を含有するものが、in vitroでのHeLa細胞における標的遺伝子のmRNAレベルを有意に低下させることを実証する。図8~11に対応する配列は、表5~8にそれぞれ見出すことができる。データを、ハウスキーピング遺伝子(CYP1B)に対して正規化し、非ターゲティング対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的な重複(biological duplicates)の平均からの標準偏差を表す。

30

【0379】

【表 5】

表 5. SOD1 s d - r x RNAバリエーションのオクチル修飾

ID	Z=	パッセンジャー鎖	配列番号	ガイド鎖	配列番号
25568	オクチル U	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	139	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	145
25569	オクチル U	DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	140	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	146
25570	オクチル U	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	141	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	147
25571		DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	142	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	148
25572	オクチル U	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	143	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	149
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	144	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	150

10

【 0 3 8 0 】

20

【表 6】

表 6. SOD1 s d - r x RNAバリエーションのオクチル修飾

ID	Z=	パッセンジャー鎖	配列番号	ガイド鎖	配列番号
25573	オクチル	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	151	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	157
25574	オクチル	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	152	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fY*fX*fX* A*fX*mX*mZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	158
25575	オクチル	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	153	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	159
25576		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	154	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*fY*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	160
25577	チオフェン	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	155	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	161
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	156	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	162

30

【 0 3 8 1 】

40

【表 7】

表 7. SOD1 s d - r x RNAバリエントのチオフェン修飾

ID	Z=	パッセンジャー鎖	配列番号	ガイド鎖	配列番号
25578	チオフェン	DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mZ* G*mA*mA	163	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	169
25579	チオフェン	DY547.mA*mG* G*mZ* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	164	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	170
25580		DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	165	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	171
25584	チオフェン	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	166	P.mY*fZ*fX* A*fY*fY*fZ*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	172
25585	チオフェン	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	167	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*fY*fX*fX* A*fX*mX*mY*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	173
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	168	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	174

10

【 0 3 8 2 】

20

【表 8 - 1】

表 8. SOD1 s d - r x RNAバリエントのイソブチル修飾

ID	Z=	パッセンジャー鎖	配列番号	ガイド鎖	配列番号
25586	イソブチル	DY547.mA*mG* G*dZ* G* G* A* A* A*dZ* G*mA*mA	175	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	181
25587	イソブチル	DY547.mA*mG* G*mY* G* G* A* A* A*dZ* G*mA*mA	176	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	182
25588	イソブチル	DY547.mA*mG* G*dZ* G* G* A* A* A*mY* G*mA*mA	177	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	183
25589	イソブチル	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	178	P.mY*dZ*fX* A*fY*fY*dZ*fX*fX* A*fX*mX*dZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	184
25590	イソブチル	DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	179	P.mY*fY*fX* A*fY*fY*dZ*fX*fX* A*fX*mX*dZ*mY*mY* G*mX*mX*fX* A* A	185
24560		DY547.mA*mG* G*mU* G* G* A* A* A*mU* G*mA*mA	180	P.mU*fU*fC* A*fU*fU*fU*fC*fC* A*fC*mC*mU*mU*mU* G*mC*mC*fC* A* A	186

30

【 0 3 8 3 】

40

【表 8 - 2】

表 5～8 についての凡例：	
X	=5 メチルC
Y	=5 メチルU
f	=2' フルオロ
m	=2' Ome
P	=5' リン酸化
*	=ホスホロチオアート結合
.	=ホスホジエステル結合
DY547	=DY547 色素
d	=デオキシリボース

10

【0384】

均等物

当業者は、慣用的な実験のみを使用して、本明細書に記載される本発明の具体的な態様についての多数の均等物を理解するかまたはそれに気付くことができるであろう。かかる均等物は、以下のクレームによって包含されることが意図される。

20

【0385】

特許文書を含め、本明細書に開示される全ての参考文献は、それらの全体が参照されることによって組み込まれる。本出願は、2009年9月22日に出願されたPCT公開番号WO2010/033247（出願番号PCT/US2009/005247）、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2014年8月5日に発行され、2012年2月16日にUS 2012/0040459として公開された、米国特許第8,796,443号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2015年11月3日に発行された、米国特許第9,175,289号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2009年2月11日に出願されたPCT公開番号WO2009/102427（出願番号PCT/US2009/000852）、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、および2011年2月17日に公開された米国特許公開番号2011/0039914、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、2011年3月24日に出願されたPCT公開番号WO2011/119852、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、および2015年7月14日に発行された米国特許第9,080,171号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」の、全ての図面および明細書の全ての部分を含む全内容（配列表またはアミノ酸/ポリヌクレオチド配列を含む）を、参照によって組み込む。

30

【図 1】

ホスホロチオアート含有量を減少させると in vitro
での細胞毒性が減少した活性ps-rxRNAバリエーションを
もたらす

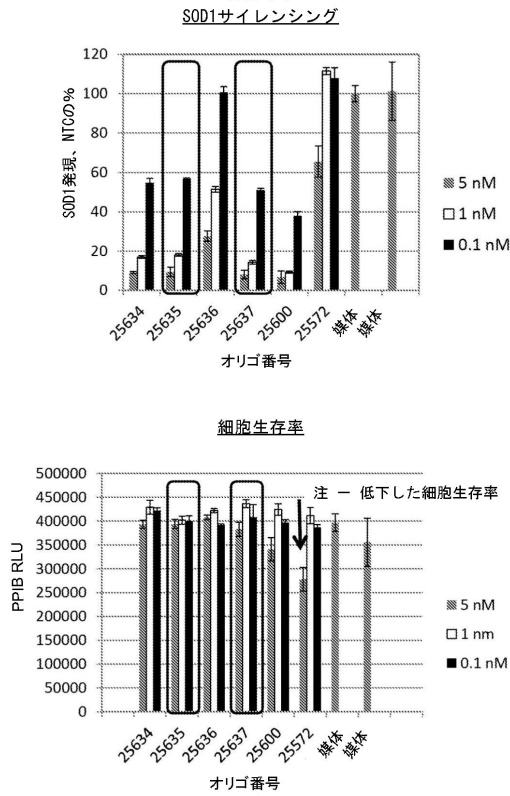


図 1

【図 2】

ホスホロチオアート含有量を減少させると in vitro
での細胞毒性が減少した活性ps-rxRNAバリエーションを
もたらす

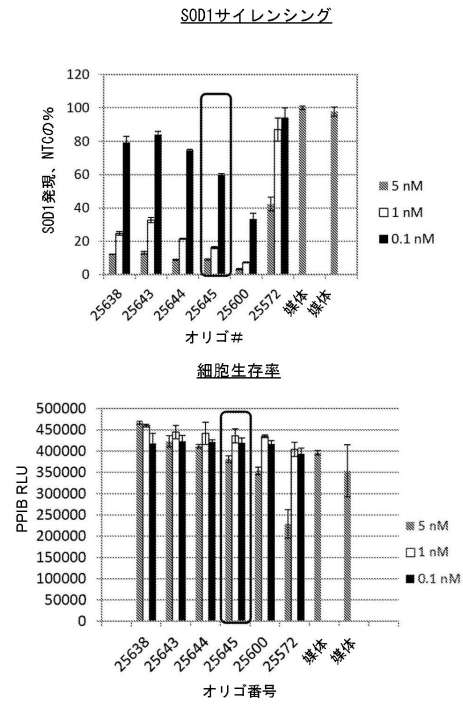
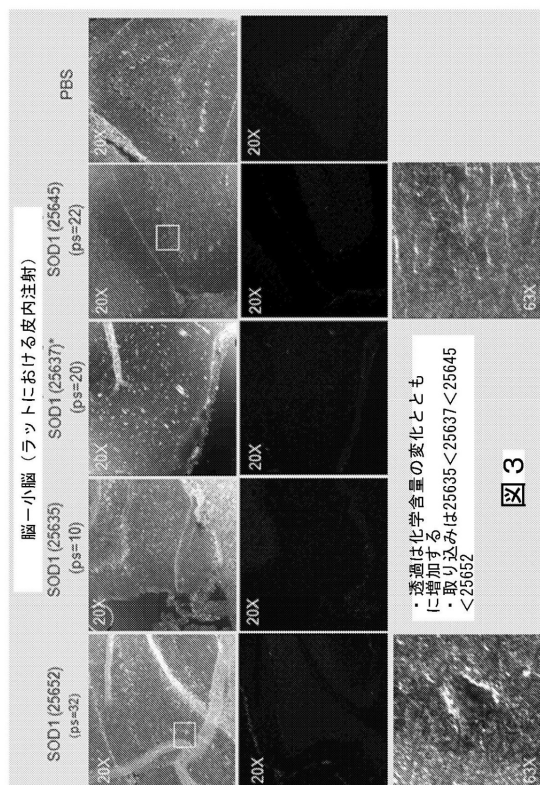
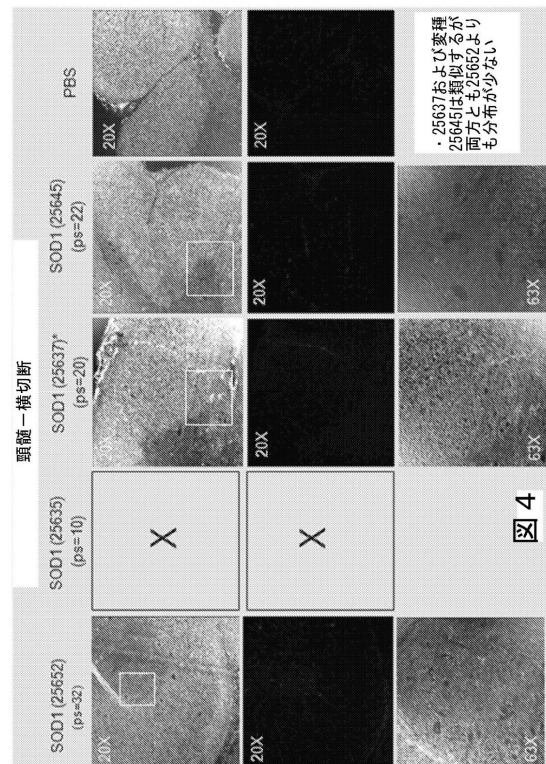


図 2

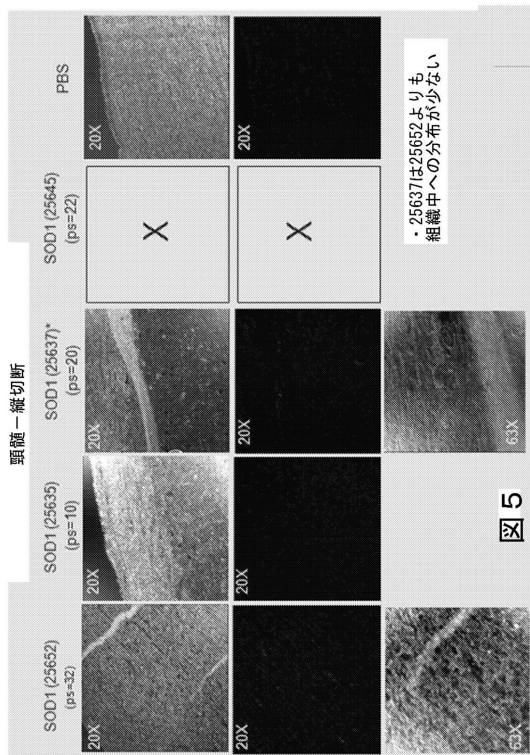
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

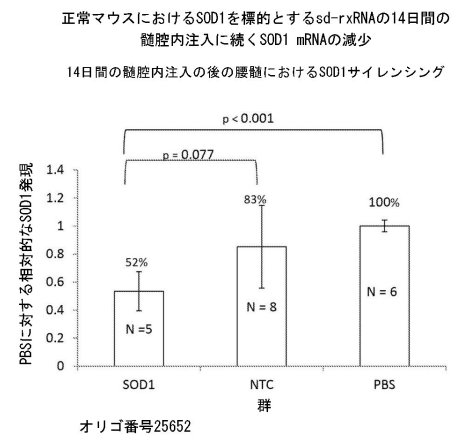


図 6

【図 7】

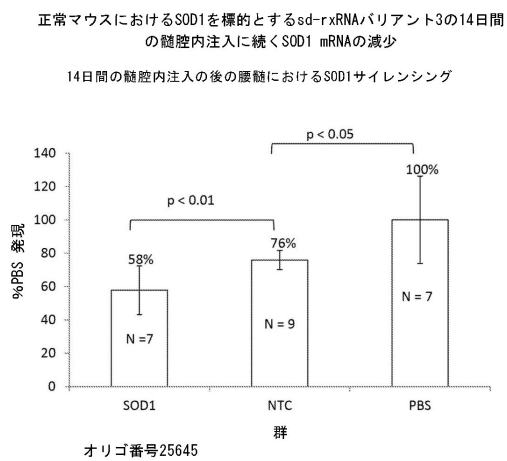


図 7

【図 8】

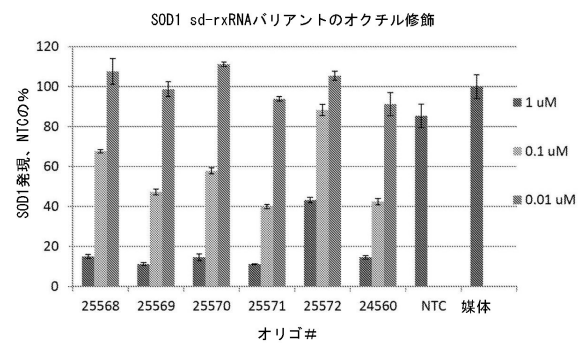


図 8

【図 9】

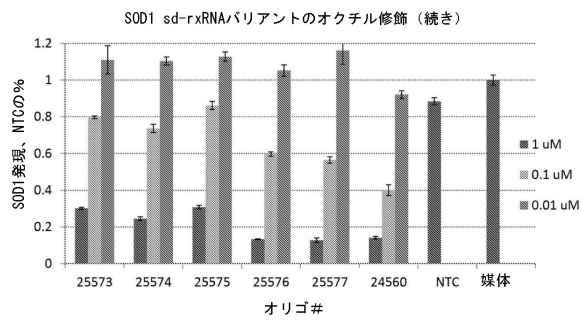


図 9

【図 10】

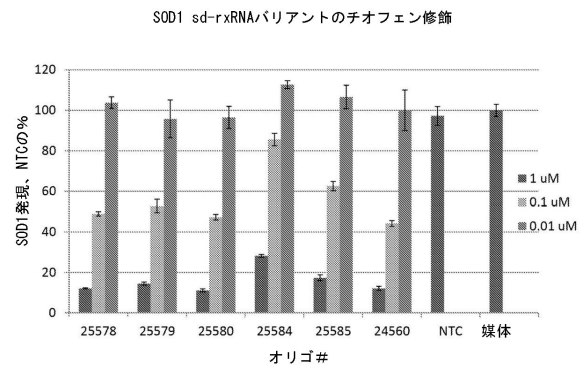


図 10

【図 11】

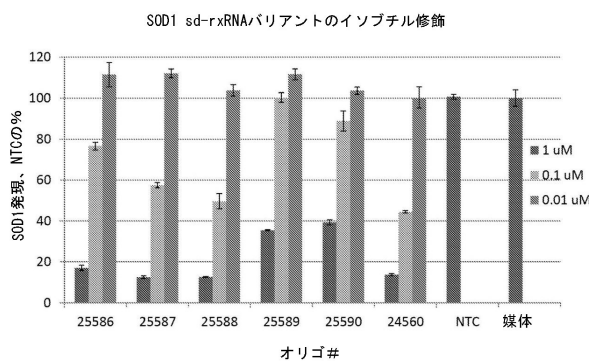


図 11

【配列表】

0006983752000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/99 (2006.01) C 1 2 N 9/99 Z N A

- (72)発明者 バーン, マイケル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 6 0、ネイティック、ローカー ストリート 8
- (72)発明者 ブルック, カレン, ジー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 5 6、メンダン、パーク ストリート 4 4
- (72)発明者 パヴコ, パメラ, エー.
アメリカ合衆国 コロラド州 8 0 5 0 4、ロングモント、プラトー ロード 8 2 2
- (72)発明者 リバティーン, リン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 0 1、フレーミングハム、ニクソン ロード 6 1

審査官 斉藤 貴子

- (56)参考文献 特表2012-502657(JP, A)
特表2011-511636(JP, A)
米国特許出願公開第2013/0131141(US, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N A 6 1 K A 6 1 P
C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)