

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7618229号  
(P7618229)

(45)発行日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(24)登録日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/113(2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 14 (全104頁)

(21)出願番号	特願2021-507003(P2021-507003)	(73)特許権者	505220170 ユニバーシティー オブ マサチューセッツ University of Mass a chusetts アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 0 8、ボストン ワン ピーコン ス トリート、サーティーファースト フロア
(86)(22)出願日	令和1年8月9日(2019.8.9)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(65)公表番号	特表2021-533762(P2021-533762 A)	(74)代理人	100156144 弁理士 落合 康
(43)公表日	令和3年12月9日(2021.12.9)	(72)発明者	アナスタシア・コボロバ アメリカ合衆国 0 1 5 8 1 マサチューセ ッツ州ウエストボロー、ロックローン・ ロード 1 0 番
(86)国際出願番号	PCT/US2019/046013		
(87)国際公開番号	WO2020/033899		
(87)国際公開日	令和2年2月13日(2020.2.13)		
審査請求日	令和4年8月9日(2022.8.9)		
(31)優先権主張番号	62/717,287		
(32)優先日	平成30年8月10日(2018.8.10)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/825,429		
(32)優先日	平成31年3月28日(2019.3.28)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 SNPを標的化する修飾オリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

2つのRNAを含む二分岐オリゴヌクレオチド化合物であって、前記RNAは、リンカー、スパーサー及び分岐点から選択される1つ以上の部分によって互いに連結され、各RNAは、5'末端、3'末端及前記RNAの5'末端から2~7ヌクレオチドに位置するシード領域を有し、各RNAは、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、各RNAは、

前記シード領域内の位置での一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド；及び

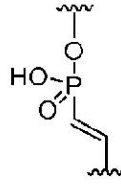
前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む、二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項2】

前記RNAは、前記RNAからのヌクレオチドを連結し、そして式：

10

## 【化 1】



を有する、サブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、

10

請求項1に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

## 【請求項3】

hsi-RNA構造を有する、請求項1に記載の二分岐オリゴヌクレオチド。

## 【請求項4】

前記SNP位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267及びrs363099からなる群から選択されるhth SNPのアレル多型と相補的である、請求項1に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

## 【請求項5】

20

2つ以上の二重鎖RNA(dsRNA)を含む二分岐オリゴヌクレオチド化合物であって、前記dsRNAは、リンカー(L)、スペーサー(S)及び分岐点(B)から選択される1つ以上の部分によって互いに連結され、

各dsRNAは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、それぞれ5'末端及び3'末端を有し、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、それぞれ1つ以上の化学修飾されたヌクレオチドを含み、

各アンチセンス鎖は、前記アンチセンス鎖の5'末端から2~7ヌクレオチドに位置するシード領域を有し、各アンチセンス鎖は、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、各アンチセンス鎖は、

前記シード領域内の位置での一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド；及び

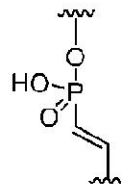
30

前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む、二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

## 【請求項6】

前記dsRNAは、前記dsRNAからのヌクレオチドを連結し、そして式：

## 【化 2】



40

を有する、サブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、

請求項5に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

## 【請求項7】

前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、それぞれ>80%の化学修飾されたヌクレオチドを含む、

50

請求項 5 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 8】

ビニルホスホネートモチーフが、前記 S N P 位置ヌクレオチドの隣又は前記 M M 位置ヌクレオチドの隣に挿入される、請求項 2 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 9】

ビニルホスホネートモチーフは、前記 S N P 位置ヌクレオチドの隣又は前記 M M 位置ヌクレオチドの隣に挿入される、請求項 6 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 10】

前記センス及びアンチセンス鎖の前記 5' 末端から 1 及び 2 位での前記ヌクレオチドは、ホスホオキシエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される、請求項 5 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

10

【請求項 11】

各アンチセンス鎖は、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含み、各センス鎖は、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを含み、且つ前記アンチセンス鎖に対して相補性を有する、請求項 5 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 12】

前記分岐オリゴヌクレオチド化合物の末端 5' 位に結合された疎水性部分をさらに含む、請求項 5 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

【請求項 13】

各二重鎖核酸配列は、前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖の前記 3' 末端又は前記 5' 末端でのリンカー、スペーサー又は分岐点に独立して連結される、請求項 5 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

20

【請求項 14】

前記 S N P 位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267 及び rs363099 からなる群から選択される h t t S N P のアレル多型と相補的である、請求項 5 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願

本出願は、2018年8月10日に出願された米国仮特許出願第62/717,287号明細書及び2019年3月28日に出願された同第62/825,429号明細書に対する優先権を主張する。これらの出願の全体的な内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府の支援を受けた研究の申告

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) によって与えられた助成金番号 NS104022 及び GM108803 の下で政府の援助によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

40

【背景技術】

【0003】

RNA 干渉は、遺伝子の機能を阻害するための単純且つ効果的なツールとなる。RNA サイレncing 剤は、高度な配列特異性を有する特定のタンパク質の発現をノックダウンするそれらの能力のため、研究ツール及び治療剤として特に関心を集めている。RNA サイレncing 剤の配列特異性は、特定の遺伝子の 1 つの変異体及び 1 つの野生型コピーを有するヘテロ接合体における顕性変異によって引き起こされる疾患の治療に特に有用である。しかしながら、野生型アレルの発現に影響を与えないか又は影響を最小限にとどめながら、変異体、疾患発病性アレル発現を優先的にサイレンシングできる RNA サイレncing

50

ング剤が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、ヘテロ接合体における対応する野生型遺伝子の発現に対して一塩基多型 (SNP) (例えば、ヘテロ接合型SNP) を含有する遺伝子の発現のサイレンシングを、例えば100倍を超えるまで高める新規のオリゴヌクレオチドの驚くべき発見に基づく。ある種の態様では、分解のためにSNP含有核酸を優先的に標的化するオリゴヌクレオチド (例えば、dsRNA) が提供され、オリゴヌクレオチド (例えば、二重鎖RNA (dsRNA)) は、分解のために対応する野生型 (非SNP含有) 核酸を標的化しないか、又はより低い程度で標的化する。ある種の態様では、本発明のオリゴヌクレオチド (例えば、dsRNA) は、1) 標的核酸におけるSNP位置と相補的であり; 且つ2) SNPに対して標的核酸の特定の位置でのミスマッチを含有する。ある種の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド (例えば、dsRNA) は、対応する野生型核酸配列に対して: 1) 野生型SNP位置; 及び2) 野生型SNP位置に対する標的核酸配列の特定の位置での2つのミスマッチも含有する。したがって、例示的なオリゴヌクレオチド (例えば、dsRNA) は、SNP含有標的に対する1つのミスマッチ及び対応する野生型配列に対する2つのミスマッチを含有し、したがって対応する野生型配列に対してSNP含有標的の優先的な切断をもたらす。

10

【0005】

一態様では、5'末端、3'末端及びシード領域を有するオリゴヌクレオチドであって、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、シード領域内の位置でのSNP位置ヌクレオチドであって、アレル多型と相補的であるSNP位置ヌクレオチド; 及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ (MM) 位置ヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドが提供される。いくつかの場合、オリゴヌクレオチドは、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、オリゴヌクレオチドは、5'末端から2~6位のいずれか1つでのSNP位置ヌクレオチド; 及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ位置ヌクレオチドを含む。

20

【0006】

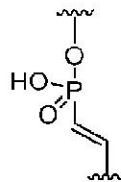
ある種の例示的な実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNAである。

30

【0007】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式:

【化1】



40

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート (VP) 修飾をさらに含む。

【0008】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

【0009】

ある種の例示的な実施形態では、オリゴヌクレオチドは、siRNA、miRNA、shRNA、CRISPRガイド、DNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、ギャップマー、ミックスマー、miRNA阻害剤、スプライススイッチングオリゴヌクレ

50

オチド (SSO)、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー (PMO) 及びペプチド核酸 (PNA) からなる群から選択される。

【0010】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) 又は dsRNA である。

【0011】

ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約15~35ヌクレオチドの第1の鎖及び第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15~35ヌクレオチドの第2の鎖を含み、第1の鎖は、アレル多型と相補的である、シード領域 (例えば、5'末端から2~6位で) におけるSNP位置ヌクレオチドを含み、第1の鎖は、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置するMM位置ヌクレオチドを含む。

【0012】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、RNAの5'末端から2、4又は6位に位置し、及びMM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置する。

【0013】

ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドの2、3、4又は6ヌクレオチド以内に位置する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドの5ヌクレオチド以内に位置する。

【0014】

ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、平滑末端である。ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、少なくとも1つの一本鎖ヌクレオチドオーバーハングを含む。ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、天然に存在するヌクレオチドを含む。ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。ある種の例示的な実施形態では、dsRNAの各ヌクレオチドは、修飾される。

【0015】

ある種の例示的な実施形態では、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、コレステリル誘導体に連結された末端ヌクレオチド及びドデカン酸ビスデシルアミド基に連結された末端ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0016】

ある種の例示的な実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート及び非天然塩基を含むヌクレオチドからなる群から選択される。

【0017】

ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、少なくとも1つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチド及び5'-ホスホロチオエート基を含む。

【0018】

ある種の例示的な実施形態では、第1の鎖は、少なくとも3つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。ある種の例示的な実施形態では、第1の鎖は、SNP位置ヌクレオチドのいずれかの側で2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0019】

ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、疎水性部分を含む。

【0020】

ある種の例示的な実施形態では、アレル多型を含む遺伝子の領域は、配列番号1~10からなる群から選択される核酸配列を含む。ある種の例示的な実施形態では、第1の鎖は、UUCUGUAGCAUCAGCUUCUCを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 1 】

ある種の例示的な実施形態では、本明細書に記載されるRNA（例えば、dsRNAの第1の鎖）は、2 - 7、4 - 7、4 - 8、4 - 15、6 - 5、6 - 8、6 - 11、6 - 14、6 - 16、3 - 5、3 - 7及び3 - 8からなる群から選択されるSNP位置ヌクレオチド（5'末端から参照される）- MM位置ヌクレオチド（5'末端から参照される）の組合せを含む。

## 【 0 0 2 2 】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267及びrs363099からなる群から選択されるh t t SNPのアレル多型と相補的である。

10

## 【 0 0 2 3 】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、ホスフェート、ビニルホスホネート、C5 - メチル（R、又はS、又はラセミ）、ビニル上のC5 - メチル及び還元ビニルからなる群から選択される5'安定化部分をさらに含む。

## 【 0 0 2 4 】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、アルキル鎖、ビタミン、ペプチド、スフィンゴ糖脂質、多価不飽和脂肪酸、セコステロイド、ステロイドホルモン及びステロイド脂質からなる群から選択されるコンジュゲート部分をさらに含む。

## 【 0 0 2 5 】

一態様では、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約15 ~ 35ヌクレオチドの第1の鎖及び第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15 ~ 35ヌクレオチドの第2の鎖を含むdsRNAであって、第1の鎖は、アレル多型と相補的である、シード領域（例えば、5'末端から2 ~ 6位の1つ）における位置のいずれか1つでのSNP位置ヌクレオチドを含み、第1の鎖は、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2 ~ 6ヌクレオチドに位置するMM位置ヌクレオチドを含む、dsRNAが提供される。

20

## 【 0 0 2 6 】

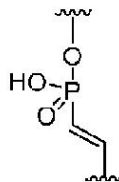
ある種の例示的な実施形態では、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約15 ~ 35ヌクレオチドの第1の鎖及び第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15 ~ 35ヌクレオチドの第2の鎖を含むdsRNAであって、第1の鎖は、アレル多型と相補的である、5'末端から2、4又は6位におけるSNP位置ヌクレオチドを含み、第1の鎖は、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2 ~ 6ヌクレオチドに位置するMM位置ヌクレオチドを含む、dsRNAが提供される。

30

## 【 0 0 2 7 】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：

## 【 化 2 】



40

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。

## 【 0 0 2 8 】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

## 【 0 0 2 9 】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、第1の鎖の5'末端から2

50

位、第1の鎖の5'末端から4位又は第1の鎖の5'末端から6位にある。他の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドの2ヌクレオチド以内に位置するか、SNP位置ヌクレオチドの3ヌクレオチド以内に位置するか、SNP位置ヌクレオチドの4ヌクレオチド以内に位置するか、SNP位置ヌクレオチドの5ヌクレオチド以内に位置するか、又はSNP位置ヌクレオチドの6ヌクレオチド以内に位置する。ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から4ヌクレオチドに位置し、及びMM位置ヌクレオチドは、5'末端から7ヌクレオチドに位置する。他の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から6ヌクレオチドに位置し、及びMM位置ヌクレオチドは、5'末端から11ヌクレオチドに位置する。

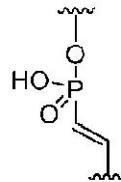
【0030】

別の態様では、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約15~35ヌクレオチドの第1の鎖及び第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15~35ヌクレオチドの第2の鎖を含むdsRNAであって、第1の鎖は、アレル多型と相補的である、5'末端から6位におけるSNP位置ヌクレオチドを含み、第1の鎖は、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、5'末端から11位に位置するMM位置ヌクレオチドを含む、dsRNAが提供される。

【0031】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：

【化3】



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

【0032】

ある種の例示的な実施形態では、第1の鎖は、SNP位置ヌクレオチドのいずれかの側で2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。ある種の例示的な実施形態では、第1の鎖は、少なくとも3つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0033】

ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、5'-ホスホロチオエート基を含む。

【0034】

ある種の例示的な実施形態では、アレル多型を含む遺伝子は、ハンチンチン(htt)遺伝子である。

【0035】

ある種の例示的な実施形態では、アレル多型を含む遺伝子の領域は、配列番号1~10からなる群から選択される核酸配列を含む。ある種の例示的な実施形態では、第1の鎖は、UUCUGUAGCAUCAGCUUCUCを含む。

【0036】

ある種の態様では、本明細書に記載されるRNA及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。

【0037】

ある種の態様では、細胞においてアレル多型を含む遺伝子の発現を阻害する方法であって、細胞を、本明細書に記載されるものと接触させることを含む方法が提供される。

【0038】

別の態様では、アレル多型を含む遺伝子によって特徴付けられるか又は引き起こされる

10

20

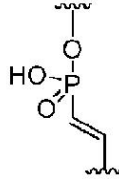
30

40

50

疾患又は障害の治療を、それを必要とする対象において行う方法であって、治療有効量の、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有するRNAを対象に投与することを含み、RNAは、アレル多型と相補的である、シード領域中の位置でのSNP位置ヌクレオチド及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するMM位置ヌクレオチドを含む、方法が提供される。ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：

【化4】



10

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。

【0039】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

【0040】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、ASO又はdsRNAである。

20

【0041】

ある種の例示的な実施形態では、dsRNAは、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約15~35ヌクレオチドの第1の鎖及び第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15~35ヌクレオチドの第2の鎖を含み、第1の鎖は、アレル多型と相補的である、シード領域(例えば、5'末端から2~6位のいずれか1つ、例えば5'末端から2、4又は6位で)内におけるSNP位置ヌクレオチドを含み、第1の鎖は、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置するMM位置ヌクレオチドを含む。

【0042】

ある種の例示的な実施形態では、前記dsRNAは、対象の脳に投与される。ある種の例示的な実施形態では、前記dsRNAは、線条体内注入によって投与される。ある種の例示的な実施形態では、線条体における遺伝子の発現の減少が達成される。ある種の例示的な実施形態では、皮質における遺伝子の発現の減少が達成される。

30

【0043】

ある種の例示的な実施形態では、アレル多型を含む遺伝子は、ハンチンチン(htt)遺伝子である。ある種の例示的な実施形態では、疾患は、ハンチントン病である。

【0044】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、RNAの5'末端から2、4又は6位に位置し、及びMM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置する。

40

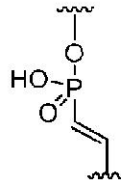
【0045】

別の態様では、2つのRNAを含む二分岐オリゴヌクレオチド化合物であって、RNAは、リンカー、スペーサー及び分岐点から選択される1つ以上の部分によって互いに連結され、各RNAは、5'末端、3'末端及びシード領域を有し、各RNAは、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、各RNAは、シード領域内の位置でのSNP位置ヌクレオチドであって、アレル多型と相補的なSNP位置ヌクレオチド及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するMM位置ヌクレオチドを含む、二分岐オリゴヌクレオチド化合物が提供される。

【0046】

50

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：  
【化5】



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。

10

【0047】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

【0048】

ある種の例示的な実施形態では、二分岐オリゴヌクレオチド化合物は、hsi-RNA構造を有する。

【0049】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267及びrs363099からなる群から選択されるh t t SNPのアレル多型と相補的である。

20

【0050】

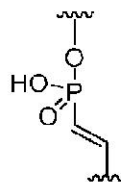
別の態様では、2つ以上の核酸配列を含む二分岐オリゴヌクレオチド化合物であって、核酸配列(N)は、リンカー(L)、スペーサー(S)及び任意選択的に分岐点(B)から選択される1つ以上の部分によって互いに連結され、各核酸配列は、二重鎖であり、且つセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ5'末端及び3'末端を有し、センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ1つ以上の化学修飾されたヌクレオチドを含み、各アンチセンス鎖は、シード領域を有し、各アンチセンス鎖は、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、各アンチセンス鎖は、シード領域内の位置でのSNP位置ヌクレオチドであって、アレル多型と相補的なSNP位置ヌクレオチド及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む、二分岐オリゴヌクレオチド化合物が提供される。

30

【0051】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：

【化6】



40

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。

【0052】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

【0053】

ある種の例示的な実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ>80%の

50

化学修飾されたヌクレオチドを含む。

【0054】

ある種の例示的な実施形態では、センス及びアンチセンス鎖の5'末端から1及び2位でのヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される。

【0055】

ある種の例示的な実施形態では、各アンチセンス鎖は、少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含み、各センス鎖は、少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含み、且つアンチセンス鎖に対して相補性を有する。

【0056】

ある種の例示的な実施形態では、化合物は、分岐オリゴヌクレオチド化合物の末端5'位に結合された疎水性部分をさらに含む。

10

【0057】

ある種の例示的な実施形態では、各二重鎖核酸配列は、センス鎖又はアンチセンス鎖の3'末端又は5'末端でのリンカー、スパーサー又は分岐点に独立して連結される。

【0058】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267及びrs363099からなる群から選択されるh t t SNPのアレル多型と相補的である。

【0059】

別の態様では、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有する核酸であって、シード領域内の位置でのSNP位置ヌクレオチドであって、アレル多型と相補的であるSNP位置ヌクレオチド、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチであるMM位置及びSNP位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)であって、各Xは、SNP位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)を含む、核酸が提供される。

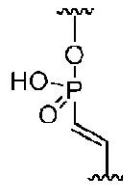
20

【0060】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：

【化7】

30



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。

【0061】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

40

【0062】

ある種の例示的な実施形態では、Xは、2'-O-メチル(2'-OMe)、2'-フルオロ(2'-F)、2'-リボ、2'-デオキシリボ、2'-F-4'-チオアラビノ(2'-F-ANA)、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-MOE)、4'-S-RNA、ロックド核酸(LNA)、4'-S-F-ANA、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、2'-シアノエチル-RNA(CNet-RNA)、トリシクロ-DNA、シクロヘキシル核酸(CeNA)、アラビノ核酸(ANA)及びヘキシトール核酸(HNA)からなる群から選択される糖修飾を含む。

50

## 【 0 0 6 3 】

ある種の例示的な実施形態では、Xは、SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近又はSNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。ある種の例示的な実施形態では、Xは、SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近及びSNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。

## 【 0 0 6 4 】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2位～6位に存在する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～11ヌクレオチドに位置する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～6ヌクレオチドに位置する。

10

## 【 0 0 6 5 】

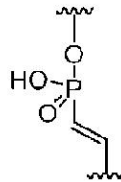
別の態様では、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有する核酸であって、シード領域内の位置でのSNP位置ヌクレオチドであって、アレル多型と相補的であるSNP位置ヌクレオチド、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチであるMM位置及びMM位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)であって、各Yは、MM位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)を含む、核酸が提供される。

## 【 0 0 6 6 】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：

20

## 【 化 8 】



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。

30

## 【 0 0 6 7 】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はMM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

## 【 0 0 6 8 】

ある種の例示的な実施形態では、Yは、MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近又はMM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。ある種の例示的な実施形態では、Yは、MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近及びMM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。

## 【 0 0 6 9 】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2位～6位に存在する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～11ヌクレオチドに位置する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～6ヌクレオチドに位置する。

40

## 【 0 0 7 0 】

別の態様では、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有する核酸であって、シード領域内の位置でのSNP位置ヌクレオチドであって、アレル多型と相補的であるSNP位置ヌクレオチド、遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチであるMM位置、及びSNP位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)であって、各Xは、SNP位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)、及びMM位

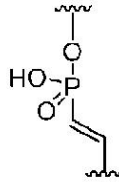
50

置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)であって、各Yは、MM位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)を含む、核酸が提供される。

【0071】

ある種の例示的な実施形態では、RNAは、式：

【化9】



10

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む。

【0072】

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、SNP位置ヌクレオチドの隣又はM位置ヌクレオチドの隣に挿入される。

【0073】

ある種の例示的な実施形態では、Xは、2'-OMe、2'-F、2'-リボ、2'-デオキシ 20 シリボ、2'-F-ANA、2'-MOE、4'-S-RNA、LNA、4'-S-F-ANA、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、CNet-RNA、トリシクロ-DNA、CeNA、ANA及びHNAからなる群から選択される糖修飾を含む。ある種の例示的な実施形態では、Yは、2'-OMe、2'-F、2'-リボ、2'-デオキシシリボ、2'-F-ANA、2'-MOE、4'-S-RNA、LNA、4'-S-F-ANA、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、CNet-RNA、トリシクロ-DNA、CeNA、ANA及びHNAからなる群から選択される糖修飾を含む。

【0074】

ある種の例示的な実施形態では、Xは、SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近又はSNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。ある種の例示的な実施形態では、Xは、SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近及びSNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。

30

【0075】

ある種の例示的な実施形態では、Yは、MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近又はMM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。ある種の例示的な実施形態では、Yは、MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近及びMM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する。

【0076】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2位~6位に存在する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置する。

40

【0077】

ある種の例示的な実施形態では、X及びYは、同じである。

【0078】

本発明の前述及び他の特徴並びに利点は、添付の図面と組み合わせて例示的な実施形態の以下の詳細な説明からより詳細に理解されることになる。本特許又は出願ファイルは、有色で作成された少なくとも1つの図面を含む。有色の図面を有する本特許又は特許出願公報のコピーは、入手を要請し、必要な手数料を支払えば、特許庁により提供される。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 7 9 】

【 図 1 】 図 1 は、h t t の野生型領域又は S N P、r s 3 6 2 2 7 3 を有する h t t の同じ領域のいずれかを含有する p s i C H E C K レポータープラスミドを示す。

【 図 2 】 図 2 は、様々な位置において S N P ヌクレオチドを有する h s i R N A でトランスフェクトされた H e L a 細胞における p s i C H E C K レポータープラスミドアッセイ後のルシフェラーゼ活性を示す棒グラフを示す。この一次選別により、複数の有効な疎水性修飾 s i R N A ( h s i R N A ) 配列が得られた。

【 図 3 】 図 3 は、p s i C H E C K レポータープラスミドに対する本発明の 3 つの例示的な h s i R N A のサイレンシング効果を示す用量反応曲線を示す。

【 図 4 】 図 4 は、サイレンシング h t t m R N A に対する 2 つの h s i R N A の効力を示す用量反応曲線を示す。

10

【 図 5 】 図 5 は、様々な位置で第 2 のミスマッチを有する h s i R N A でトランスフェクトされた H e L a 細胞における p s i C H E C K レポータープラスミドアッセイ後のルシフェラーゼ活性を示す棒グラフを示す。

【 図 6 】 図 6 は、( m m 2 - 7 ) を有するか又は ( m m 2 - 0 ) 追加のミスマッチを有しない S N P 2 h s i R N A のサイレンシング効果を比較する用量反応曲線を示す。

【 図 7 】 図 7 は、追加のミスマッチを有するか又は有しない S N P 4 h s i R N A のサイレンシング効果を比較する用量反応曲線を示す。

【 図 8 】 図 8 は、追加のミスマッチを有するか又は有しない S N P 6 h s i R N A のサイレンシング効果を比較する用量反応曲線を示す。

20

【 図 9 】 図 9 は、追加のミスマッチ ( S N P 4 - 0 及び S N P 4 - 1 1 ) を有しない同じ h s i R N A と比較して、追加のミスマッチ ( それぞれ S N P 4 - 7 及び S N P 6 - 1 1 ) を有する S N P 4 又は S N P 6 h s i R N A のサイレンシング効果を比較する用量反応曲線を示す。2 つのレポータープラスミドの 1 つでトランスフェクトされた H e L a 細胞は、受動的な取込みによって h s i R N A でリバーストランスフェクトされ、且つ 7 2 時間処理された。レポーター発現は、二重ルシフェラーゼアッセイにより測定された。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、追加のミスマッチを有する h s i R N A のサイレンシング効力を測定する h t t m R N A 発現の用量反応曲線を示す。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、本発明のある種の実施形態による h s i R N A 及び例示的な修飾を概略的に示す。

30

【 図 1 2 A 】 図 1 2 A ~ 1 2 C は、それぞれ S N P 2、S N P 4 及び S N P 6 h s i R N A ライブラリーを示す。アンチセンス鎖は、赤色の S N P 部位及び青色のミスマッチとともに 5 ' ~ 3 ' で示される。

【 図 1 2 B 】 図 1 2 A ~ 1 2 C は、それぞれ S N P 2、S N P 4 及び S N P 6 h s i R N A ライブラリーを示す。アンチセンス鎖は、赤色の S N P 部位及び青色のミスマッチとともに 5 ' ~ 3 ' で示される。

【 図 1 2 C 】 図 1 2 A ~ 1 2 C は、それぞれ S N P 2、S N P 4 及び S N P 6 h s i R N A ライブラリーを示す。アンチセンス鎖は、赤色の S N P 部位及び青色のミスマッチとともに 5 ' ~ 3 ' で示される。

【 図 1 3 】 図 1 3 は、アンチセンス及びセンス鎖配列並びにある種の実施形態による様々な h s i R N A コンストラクトに関する修飾パターンを示す。m m 4 - 7 及び m m 6 - 1 1 は、優れた S N P の識別を実証し、さらなる選別のために選択された。

40

【 図 1 4 】 図 1 4 は、ジ - s i R N A として設計された例示的な S N P 選択的化合物を示す。

【 図 1 5 】 図 1 5 は、ある種の例示的な実施形態による骨格結合を示す。オリゴヌクレオチド骨格は、ホスフェート、ホスホロチオエート ( ラセミ混合物又は立体特異的 )、ジホスホロチオエート、ホスホロアミダート、ペプチド核酸 ( P N A )、ボラノホスフェート、2 ' - 5 ' - ホスホジエステル、アミド、ホスホノアセテート、モルホリノなどの 1 つ又は任意の組合せを含み得る。

【 図 1 6 】 図 1 6 は、ある種の例示的な実施形態による糖修飾を示す。糖修飾は、2 ' - O

50

-メチル、2'-フルオロ、2'-リボ、2'-デオキシリボ、2'-F-ANA、MOE、4'-S-RNA、LNA、4'-S-F-ANA、2'-O-アシル、2'-O-エチルアミン、CNet-RNA、トリシクロ-DNA、CeNA、ANA、HNAなどの1つ又は任意の組合せを含む。

【図17】図17は、ある種の例示的な実施形態によるヌクレオチド間結合を示す。可能なヌクレオチド間結合は、任意の所与のオリゴヌクレオチド鎖の5'又は3'末端で第1の2つのヌクレオチド間において、示された部分のいずれかにより安定化され得る。

【図18】図18は、ある種の例示的な実施形態による5'安定化修飾を示す。好適な5'安定化修飾は、ホスフェート、非ホスフェート、ビニルホスホネート、C5-メチル(R又はS又はラセミ体)、ビニル上のC5-メチル、還元ビニル(例えば、3つの炭素アルキル)などであり得る。

10

【図19】図19は、ある種の例示的な実施形態によるコンジュゲート部分を示す。好適なコンジュゲート部分は、任意の長さのアルキル鎖、ビタミン、リガンド、ペプチド又は生理活性コンジュゲート、例えばスフィンゴ糖脂質、多価不飽和脂肪酸、セコステロイド、ステロイドホルモン、ステロイド脂質などであり得る。

【図20】図20は、5'末端から6位におけるSNP位置ヌクレオチド及び5'末端から11位に位置するミスマッチ位置ヌクレオチドを含むSNP識別骨格の活性が配列依存的であることを図で示す。

【図21】図21は、本明細書に記載されるビニルホスホネート(VP)修飾サブユニット間結合の代表的な合成を示す。

20

【図22】図22は、VP修飾サブユニット間結合を有するオリゴヌクレオチドを調製するための方法を示す。

【図23】図23は、ある種の例示的な実施形態によるVP修飾RNAの図による説明である。

【図24】図24は、ある種の例示的な実施形態に従って合成されたVP修飾オリゴヌクレオチドの配列を示す。

【図25】図25は、siRNA効力の包括的試験の概要である。

【図26】図26は、SNP部位rs362273の周囲のHTT配列に整列されたhsRNAアンチセンス骨格の概略図であり、緑色のボックスは、SNP部位の位置を示す。

30

【図27A】図27A~27Bは、変異体アレルのサイレンシングを損なうことなくアレル識別を向上させる、siRNA配列におけるミスマッチを付加する影響を示す。

【図27B】図27A~27Bは、変異体アレルのサイレンシングを損なうことなくアレル識別を向上させる、siRNA配列におけるミスマッチを付加する影響を示す。

【図28A】図28A~28Bは、合成装置によって調製されるVP修飾配列を示す。

【図28B】図28A~28Bは、合成装置によって調製されるVP修飾配列を示す。

【図29】図29は、本明細書で提供されるVP修飾オリゴヌクレオチドを調製するための別の方法を実証する。

【図30-1】図30は、SNP選択的siRNAの標的/非標的識別に対してVP修飾結合が有する効果を実証する。

40

【図30-2】図30は、SNP選択的siRNAの標的/非標的識別に対してVP修飾結合が有する効果を実証する。

【図31】図31は、二分岐siRNA化学骨格の例を示す。

【図32A】図32Aは、HTTタンパク質レベルを測定するために実施されたウエスタンブロットである。

【図32B】図32Bは、ピンクリンに標準化されたタンパク質レベルを示す。

【図33】図33は、Aの代わりにSNP部位でGを標的化するオリゴヌクレオチドのためのサイレンシング効果を比較する用量反応曲線を示す。

【図34】図34は、用量反応のために以前に選択された配列において単一のミスマッチを導入する配列の例を示す。

50

【図 3 5】図 3 5 は、いくつかの例示的なオリゴヌクレオチド骨格修飾を示す。

【図 3 6】図 3 6 は、ある種の例示的な実施形態によるオリゴヌクレオチド分岐モチーフを示す。二重らせんは、オリゴヌクレオチドを表す。異なるリンカー、スパーサー及び分岐点の組合せは、多様な分岐 *h s i R N A* 構造の生成を可能にする。

【図 3 7】図 3 7 は、コンジュゲートされた生理活性部分を有する本発明の分岐オリゴヌクレオチドを示す。

【図 3 8】図 3 8 は、例示的なアミダイトリンカー、スパーサー及び分岐部分を示す。

【図 3 9】図 3 9 は、代替的な *S N P* 部位 *r s 3 6 2 2 7 3* の周囲の *H T T* 配列に整列された *h s i R N A* アンチセンス骨格の概略図である。

【図 4 0】図 4 0 は、図 3 9 の *h s i R N A* でトランスフェクトされた *H e L a* 細胞における *p s i C H E C K* レポータープラスミドアッセイ後のルシフェラーゼ活性を示す棒グラフを示す。「*S N P*」に続く数は、*s i R N A* における *S N P* の位置を表す。

【図 4 1】図 4 1 は、*S N P* 3 部位で *C* 又は *T* を標的化する図 3 9 のオリゴヌクレオチドに対するサイレンシング効果を比較する用量反応曲線を示す。

【図 4 2】図 4 2 は、様々な位置で修飾されて第 2 のミスマッチを備えた、図 3 9 の *h s i R N A* でトランスフェクトされた *H e L a* 細胞における *p s i C H E C K* レポータープラスミドアッセイ後のルシフェラーゼ活性を示す棒グラフを示す。

【図 4 3】図 4 3 は、修飾サブユニット間リンカーの例を示す。

【図 4 4 A】図 4 4 A は、本明細書で提供される修飾ホスフィネート含有オリゴヌクレオチドに関する単量体を調製するための代表的な例を示す。

【図 4 4 B】図 4 4 B は、本明細書で提供される修飾ホスフィネート含有オリゴヌクレオチドに関する別の単量体を調製するための代表的な例を示す。

【図 4 4 C】図 4 4 C は、本明細書で提供される修飾ホスフィネート含有オリゴヌクレオチドを調製するための代表的な例を示す。

【図 4 5】図 4 5 は、*H T T* 遺伝子（配列番号 1 ~ 1 0（上端から下端に番号付けされる））内の例示的な *S N P* を示す。

【図 4 6 - 1】図 4 6 は、*S N P* 識別 *s i R N A* を生成し、且つ選択するための方法論を示すフローチャートである。

【図 4 6 - 2】図 4 6 は、*S N P* 識別 *s i R N A* を生成し、且つ選択するための方法論を示すフローチャートである。

【図 4 7】図 4 7 は、*s i R N A* 内の *S N P* の位置を意味する命名規則を示す。

【発明を実施するための形態】

【0080】

本開示は、変異体タンパク質をコードする遺伝子内に位置するアレル多型をサイレンシングするのに有用であるオリゴヌクレオチド、例えば *R N A*、サイレンシング剤、例えば二重鎖 *R N A*（「*d s R N A*」）などの *R N A*、アンチセンスオリゴヌクレオチド（「*A S O*」）などを含む組成物に関する。特定の態様では、オリゴヌクレオチド、例えば *R N A*、サイレンシング剤は、対応する変異体 *m R N A*（例えば、*S N P* 含有 *m R N A*）をヌクレオチド特異性及び選択性により破壊する本明細書で提供される *d s R N A* 剤である。オリゴヌクレオチド、例えば *R N A*、サイレンシング剤、例えば本明細書で開示される *d s R N A* 剤は、変異体遺伝子の多型領域に対応する *m R N A* を標的化し、変異体 *m R N A* の切断をもたらし、且つ対応する変異体タンパク質の合成、例えばハンチンチンタンパク質などの機能変異体タンパク質の獲得を妨げる。

【0081】

定義

本明細書で別段の定義がない限り、本明細書で使用される科学用語及び専門用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。任意の潜在的多義性の場合、本明細書で提供される定義は、任意の辞書又は外的な定義よりも優先される。文脈によって別段の要求がない限り、単数形用語は、複数を含むものとし、複数形用語は、単数形を含むものとする。「又は」の使用は、他で示されない限り「及び/又は」を意味する。

10

20

30

40

50

用語「含んでいる」並びに「含む」及び「含まれる」などの他の形の使用は、限定するものではない。

【0082】

オリゴヌクレオチド配列に関連して本明細書で使用されるとおり、「A」は、塩基アデニン（例えば、アデノシン又はその化学修飾された誘導体）を含むヌクレオチドを表し、「G」は、塩基グアニン（例えば、グアノシン又はその化学修飾された誘導体）を含むヌクレオチドを表し、「U」は、塩基ウラシル（例えば、ウリジン又はその化学修飾された誘導体）を含むヌクレオチドを表し、且つ「C」は、塩基アデニン（例えば、シチジン又はその化学修飾された誘導体）を含むヌクレオチドを表す。

【0083】

本明細書で使用される時、用語「キャッピング基」は、アルコール（ROH）、カルボン酸（RCO<sub>2</sub>H）又はアミン（RNH<sub>2</sub>）などの官能基中の水素原子を置き換える化学部分を指す。キャッピング基の非限定的な例としては、アルキル（例えば、メチル、三級ブチル）；アルケニル（例えば、ビニル、アルキル）；カルボキシル（例えば、アセチル、ベンゾイル）；カルバモイル；ホスフェート；及びホスホネート（例えば、ビニルホスホネート）が挙げられる。他の好適なキャッピング基は、当業者に知られている。

【0084】

用語「ヌクレオチド類似体」、又は「改変ヌクレオチド」、又は「修飾ヌクレオチド」は、天然に存在しないリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含む非標準的なヌクレオチドを指す。例示的なヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドの特定の化学的特性を変化させながらも、その意図された機能を果たすヌクレオチド類似体の能力を保持するように任意の位置で修飾される。誘導体化され得るヌクレオチドの位置の例としては、5位、例えば5 - (2 - アミノ) プロピルウリジン、5 - プロモウリジン、5 - プロピンウリジン、5 - プロペニルウリジンなど；6位、例えば6 - (2 - アミノ) プロピルウリジン；アデノシン及びノ又はグアノシンに関する8位、例えば8 - プロモグアノシン、8 - クロログアノシン、8 - フルオログアノシンなどが挙げられる。ヌクレオチド類似体としては、デアザヌクレオチド、例えば7 - デアザ - アデノシン；O及びN修飾（例えば、アルキル化、例えばN6 - メチルアデノシン又は当技術分野で知られる他のもの）ヌクレオチド；及びHerdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 2000 Aug. 10(4): 297 - 310に記載されるものなどの他の複素環式修飾ヌクレオチド類似体も挙げられる。

【0085】

用語「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチド及びノ又はヌクレオチド類似体の短いポリマーを指す。用語「RNA類似体」は、対応する未改変又は未修飾RNAと比較して少なくとも1つの改変又は修飾ヌクレオチドを有するが、対応する未改変又は未修飾RNAと同じ又は類似の性質又は機能を保持するポリヌクレオチド（例えば、化学的に合成されたポリヌクレオチド）を指す。上記のとおり、オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合を有するRNA分子と比較して、遅い速度のRNA類似体の加水分解をもたらす結合と連結され得る。例えば、類似体のヌクレオチドは、メチレンジオール、エチレンジオール、オキシメチルチオ、オキシエチルチオ、オキシカルボニルオキシ、ホスホロジアミダート、ホスホロアミダート及びノ又はホスホロチオエート結合を含み得る。特定の形態では、RNA類似体は、糖及びノ若しくは骨格修飾リボヌクレオチド並びにノ又はデオキシリボヌクレオチドを含む。そのような改変又は修飾は、RNAの末端又は内部的（RNAの1つ以上のヌクレオチドで）などの非ヌクレオチド材料の付加をさらに含み得る。RNA類似体は、RNA干渉を媒介する能力を有する天然RNAに十分に類似し得る。

【0086】

本明細書で使用する場合、例示的なオリゴヌクレオチドとしては、siRNA、miRNA、shRNA、CRISPRガイド、DNAオリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、AAVオリゴヌクレオチド、ギャップマー、ミックスマー、miRNA阻害剤、SSO、PMO、PNAなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 7 】

本明細書で使用する場合、用語「RNA干渉」(「RNAi」)は、RNAの選択的な細胞内分解を指す。RNAiは、外来RNA(例えば、ウイルスRNA)を除去するために細胞内で自然に起こる。天然RNAiは、他の同様のRNA配列に対する分解機構を誘導する遊離dsRNAから切断された断片を介して進行する。代わりに、RNAiは、例えば、標的遺伝子の発現をサイレンシングするために人為的に開始され得る。

## 【 0 0 8 8 】

本明細書で使用する場合、用語「hsiRNA」は、本明細書で提供される二重鎖RNAの実施形態を指し、RNA分子は、完全に化学的に修飾され、本明細書に記載されるとおりの1つ以上の疎水性修飾を含む。

10

## 【 0 0 8 9 】

「標的特異的RNA干渉(RNAi)を誘導する標的mRNA配列に十分に相補的な配列」である鎖を有するRNAi剤、例えばRNAサイレンシング剤は、鎖が、RNAi機構又はプロセスによって標的mRNAの破壊を引き起こすのに十分な配列を有することを意味する。

## 【 0 0 9 0 】

本明細書で使用する場合、用語「単離RNA」(例えば、「単離siRNA」又は「単離siRNA前駆体」)は、組換え技術によって生成される場合に他の細胞性材料若しくは培養物を実質的に含まないか、又は化学的に合成される場合に化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まないRNA分子を指す。

20

## 【 0 0 9 1 】

本明細書で使用する場合、用語「RNAサイレンシング」は、対応するタンパク質をコードする遺伝子の発現の阻害又は「サイレンシング」をもたらすRNA分子によって媒介される配列特異的な調節機構(例えば、RNA干渉(RNAi)、転写型遺伝子サイレンシング(TGS)、転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)、クエリング、共抑制、翻訳抑制など)の一群を指す。RNAサイレンシングは、植物、動物及び菌類を含む多くの種類の生物において観察されている。

## 【 0 0 9 2 】

用語「識別RNAサイレンシング」は、「第1の」又は「標的」ポリヌクレオチド配列の発現を実質的に阻害する一方、「第2の」又は「非標的」ポリヌクレオチド配列の発現を実質的に阻害しない(例えば、両方のポリヌクレオチド配列が同じ細胞中に存在するとき)RNA分子の能力を指す。ある種の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子に対応するが、非標的ポリヌクレオチド配列は、非標的遺伝子に対応する。他の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、標的アレルに対応するが、非標的ポリヌクレオチド配列は、非標的アレルに対応する。ある種の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子の調節領域(例えば、プロモーター又はエンハンサーエレメント)をコードするDNA配列である。他の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、標的遺伝子によってコードされる標的mRNAである。

30

## 【 0 0 9 3 】

疾患又は障害に「関与する」遺伝子は、疾患若しくは障害又は前記疾患若しくは障害の少なくとも1つの症状をもたらすか又は引き起こす正常な又は異常な発現又は機能の遺伝子を含む。

40

## 【 0 0 9 4 】

本明細書で使用する場合、用語「標的遺伝子」(例えば、ヘテロ接合型多型、例えばヘテロ接合型SNPの変異体アレル)は、発現が実質的に阻害又は「サイレンシングされる」ことになる遺伝子である。このサイレンシングは、RNAサイレンシングにより、例えば標的遺伝子のmRNAを切断すること又は標的遺伝子の翻訳抑制により達成され得る。用語「非標的遺伝子」(例えば、野生型アレル)は、発現が実質的にサイレンシングされない遺伝子である。一実施形態では、標的及び非標的遺伝子のポリヌクレオチド配列(例えば、標的及び非標的遺伝子によってコードされるmRNA)は、1つ以上のヌクレオチ

50

ドで異なり得る。別の実施形態では、標的及び非標的遺伝子は、1つ以上の多型（例えば、一塩基多型又はSNP）で異なり得る。別の実施形態では、標的及び非標的遺伝子は、100%未満の配列同一性を共有し得る。別の実施形態では、非標的遺伝子は、標的遺伝子のホモログ（例えば、オルソログ又はパラログ）であり得る。

【0095】

「標的アレル」は、発現が選択的に阻害又は「サイレンシングされる」ことになるアレル（例えば、SNPアレル）である。このサイレンシングは、RNAサイレンシングにより、例えば標的遺伝子又は標的アレルのmRNAをsiRNAによって切断することにより達成され得る。用語「非標的アレル」は、発現が実質的にサイレンシングされないアレル（例えば、対応する野生型アレル）である。ある種の実施形態では、標的及び非標的アレルは、同じ標的遺伝子に対応し得る。他の実施形態では、標的アレルは、標的遺伝子に対応するか又はそれと関連し、非標的アレルは、非標的遺伝子に対応するか又はそれと関連する。一実施形態では、標的及び非標的アレルのポリヌクレオチド配列は、1つ以上のヌクレオチドで異なり得る。別の実施形態では、標的及び非標的アレルは、1つ以上のアレル多型（例えば、1つ以上のSNP）で異なり得る。別の実施形態では、標的及び非標的アレルは、100%未満の配列同一性を共有し得る。

10

【0096】

用語「多型」は、本明細書で使用する場合、異なる供給源又は対象（しかし、同じ生物）に由来する同じ配列が比較されるときに同定又は検出される遺伝子配列における変種（例えば、1つ以上の欠失、挿入又は置換）を指す。例えば、多型は、異なる対象に由来する同じ遺伝子配列が比較されるときに同定され得る。そのような多型の同定は、当技術分野において通例のことであり、方法論は、例えば、乳癌点変異を検出するために使用されるものと同様である。同定は、例えば、対象のリンパ球から抽出されたDNAからなされ得、その後、多型領域を、前記多型領域に対する特異的なプライマーを使用して増幅させる。代わりに、多型は、同じ遺伝子の2つのアレルが比較されるときに同定され得る。

20

【0097】

特定の実施形態では、多型は、一塩基多型（SNP）である。生物体内の同じ遺伝子の2つのアレル間の配列における変種は、本明細書で「アレル多型」と呼ばれる。ある種の実施形態では、アレル多型は、SNPアレルに対応する。例えば、アレル多型は、本明細書でヘテロ接合型SNPとも呼ばれるSNPの2つのアレル間の単一のヌクレオチド変種を含み得る。多型は、コード領域内のヌクレオチドに存在し得るが、遺伝暗号の縮重のためにアミノ酸配列の変化をコードされない。代わりに、多型配列は、特定の位置で異なるアミノ酸をコードし得るが、アミノ酸における変化は、タンパク質機能に影響を及ぼさない。多型領域は、遺伝子の非コード領域でも見出され得る。特定の実施形態では、多型は、遺伝子のコード領域又は遺伝子の非翻訳領域（例えば、5'UTR又は3'UTR）において見出される。

30

【0098】

本明細書で使用する場合、用語「アレル頻度」は、個体の集団における単一の座位でのアレル（例えば、SNPアレル）の相対頻度の尺度（例えば、比率又はパーセンテージ）である。例えば、個体の集団がそれらの体細胞の各々において特定の染色体座位（及び座位を占有する遺伝子）のn座位を有する場合、アレルのアレル頻度は、アレルが集団内で占有する座位の割合又はパーセンテージである。特定の実施形態では、アレル（例えば、SNPアレル）のアレル頻度は、検体集団において少なくとも10%（例えば、少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%以上）である。

40

【0099】

用語「機能獲得変異」は、本明細書で使用する場合、前記遺伝子によってコードされるタンパク質（すなわち変異体タンパク質）が、疾患又は障害を引き起こすか又はそれに寄与するタンパク質（すなわち野生型タンパク質）と通常関連しない機能を獲得する遺伝子における任意の変異を指す。機能獲得変異は、コードされるタンパク質の機能において変化を起こす遺伝子における1つ又は複数のヌクレオチドの欠失、付加又は置換であり得る

50

。一実施形態では、機能獲得変異は、変異体タンパク質の機能を変化させるか又は他のタンパク質との相互作用をもたらす。別の実施形態では、機能獲得変異は、正常な野生型タンパク質の減少又は除去を、例えば改変された変異体タンパク質と前記正常の野生型タンパク質の相互作用によってもたらす。

#### 【0100】

本明細書で使用する場合、用語「機能獲得障害」は、機能獲得変異によって特徴付けられる障害を指す。一実施形態では、機能獲得障害は、機能獲得変異体によって引き起こされる神経変性疾患、例えばポリグルタミン障害及び/又はトリヌクレオチドリピート疾患、例えばハンチントン病である。別の実施形態では、機能獲得障害は、癌遺伝子における機能獲得によって引き起こされ、変異した遺伝子産物は、機能獲得変異体、例えば *ret* 癌遺伝子（例えば、*ret-1*）中の変異によって引き起こされる癌、例えば内分泌腫瘍、髄質性甲状腺腫瘍、副甲状腺ホルモン腫瘍、2型多発性内分泌新生物などである。追加の例示的な機能獲得障害としては、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ヒト免疫不全障害（HIV）及びスローチャネル型先天性筋無力症（SCCMS）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0101】

用語「トリヌクレオチドリピート疾患」は、本明細書で使用する場合、遺伝子内に位置する拡張されたトリヌクレオチドリピート領域によって特徴付けられる任意の疾患又は障害を指し、拡張されたトリヌクレオチドリピート領域は、疾患又は障害の原因となる。トリヌクレオチドリピート疾患の例としては、12型脊髄小脳失調症、8型脊髄小脳失調症、脆弱X症候群、脆弱XE精神遅滞、フリートライヒ運動失調症及び筋強直性ジストロフィーが挙げられるが、これらに限定されない。本発明による治療のために好ましいトリヌクレオチドリピート疾患は、疾患又は障害を引き起こすか又は原因となる変異体タンパク質をコードする遺伝子のコード領域の5'末端での拡張されたトリヌクレオチドリピート領域によって特徴付けられるか又は引き起こされるものである。変異がコード領域と関連しないある種のトリヌクレオチド疾患、例えば脆弱X症候群は、RNAiによって標的化されることになる好適なmRNAが存在しないため、本発明の方法論に従う治療に好適ではない可能性がある。対照的に、フリートライヒ運動失調症などの疾患は、原因となる変異がコード領域内にない（すなわちイントロン内にある）が、変異が例えばmRNA前駆体（例えば、スプライシングされる前のmRNA前駆体）内にあり得るため、本発明の方法論に従う治療のために好適であり得る。

20

30

#### 【0102】

用語「ポリグルタミン障害」は、本明細書で使用する場合、コード領域の5'末端での(CAG)<sub>n</sub>リピートの拡張（したがってコードされたタンパク質において拡張されたポリグルタミン領域をコードする）によって特徴付けられる任意の疾患又は障害を指す。一実施形態では、ポリグルタミン障害は、神経細胞の進行性の変性によって特徴付けられる。ポリグルタミン障害の例としては、ハンチントン病、1型脊髄小脳失調症、2型脊髄小脳失調症、3型脊髄小脳失調症（マシャド・ジョセフ病としても知られる）及び6型脊髄小脳失調症、7型脊髄小脳失調症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（dentato i u b r a l - p a l l i d o l u y s i a n a t r o p h y）などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0103】

用語「一塩基多型障害」又は「SNP障害」は、SNP、例えばヘテロ接合型SNPの存在によって特徴付けられる障害を指す。SNP障害としては、フェニルケトン尿症、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、白皮症、ハンチントン病、1型筋強直性ジストロフィー、高コレステロール血症（常染色体優性、B型）、神経線維腫症（1型）、多発性嚢胞腎（1及び2）、血友病A、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、X連鎖低リン血症性くる病、レット症候群、非閉塞性精子形成不全などが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なヘテロ接合型SNP障害は、ハンチントン病である。

#### 【0104】

50

ある種の態様では、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約15～35ヌクレオチドの第1の鎖及び第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15～35ヌクレオチドの第2の鎖を含む二重鎖RNA(dsRNA)が提供され、第1の鎖は、アレル多型と相補的である、5'末端から2～7位で一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド；及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2～11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む。いくつかの場合、MM位置は、SNP位置から2～10ヌクレオチドに位置する。いくつかの場合、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2～6位のいずれか1つである。例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2、4又は6位にあり、及びミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～6ヌクレオチドに位置する。いくつかの場合、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2～6位のいずれか1つであり、及びヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～6ヌクレオチドに位置する。

10

## 【0105】

本明細書で使用する場合、「一塩基多型位置ヌクレオチド」又は「SNP位置ヌクレオチド」は、標的核酸配列(すなわちSNPアレルに対応する変異体ヌクレオチド又は野生型アレルに対応する野生型ヌクレオチドのいずれか)の多型位置に対応する、本明細書に記載されるRNA(例えば、dsRNAの第1の鎖)の位置を指す。例えば、鎖は、SNPの位置が鎖の5'末端から2、3又は4ヌクレオチドにあると表示するために「SNP2」、「SNP3」又は「SNP3」と標識され得る。

## 【0106】

ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、シード領域内にある。ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2位～7位、5'末端から2位～6位又は5'末端から2位～5位に位置する。ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、本明細書に記載されるRNA(例えば、dsRNAの第1の鎖)の5'末端から2位、5'末端から3位、5'末端から4位、5'末端から5位、5'末端から6位又は5'末端から7位に位置する。ある種の例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、表5～7に記載される位置に位置する。

20

## 【0107】

本明細書で使用する場合、用語「シード領域」は、RNA鎖の5'末端から2～7位に対応する6ヌクレオチド区間を指す。標的mRNAのsiRNA識別は、そのアンチセンス鎖のシード領域によって与えられると考えられる。

30

## 【0108】

本明細書で使用する場合、「ミスマッチ位置ヌクレオチド」又は「MM位置ヌクレオチド」は、SNP位置ヌクレオチドに対応しない位置にある、本明細書に記載されるRNA(例えば、dsRNAの第1の鎖)の位置を指す。MM位置ヌクレオチドは、本明細書に記載されるRNAの5'末端若しくは3'末端(例えば、dsRNAの第1の鎖の5'若しくは3'末端)からのその位置によって定義され得るか、又は本明細書に記載されるRNA(例えば、dsRNAの第1の鎖)のSNP位置ヌクレオチドに対するその位置によって定義され得る。

## 【0109】

ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～11ヌクレオチド、2～10ヌクレオチド、2～9ヌクレオチド、2～8ヌクレオチド、2～7ヌクレオチド又は2～6ヌクレオチドに位置する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから11ヌクレオチド、10ヌクレオチド、9ヌクレオチド、8ヌクレオチド、7ヌクレオチド、6ヌクレオチド、5ヌクレオチド、4ヌクレオチド、3ヌクレオチド又は2ヌクレオチドに位置する。ある種の例示的な実施形態では、MM位置ヌクレオチドは、表5～7に記載される位置に位置する。

40

## 【0110】

一実施形態では、本明細書に記載されるRNA(例えば、dsRNAの第1の鎖)は、

50

アレル多型に対応するヌクレオチドに対する特定の位置での1つのミスマッチオリゴヌクレオチドを除いて、アレル多型に対して相同である。ある種の実施形態では、ミスマッチは、SNP位置ヌクレオチドの約6ヌクレオチド以内、SNP位置ヌクレオチドの約5ヌクレオチド以内、SNP位置ヌクレオチドの約4ヌクレオチド以内、SNP位置ヌクレオチドの約3ヌクレオチド以内、SNP位置ヌクレオチドの約2ヌクレオチド以内又はSNP位置ヌクレオチドの約1ヌクレオチド以内にある。特定の実施形態では、ミスマッチは、SNP位置ヌクレオチドに隣接しない。

【0111】

別の実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2、3、4、5又は6位にある。ある実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2位にある。ある実施形態では、5'末端から3位にある。ある実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から4位にある。ある実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から5位にある。ある実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から6位にある。

10

【0112】

ある種の例示的な実施形態では、本明細書に記載されるRNA（例えば、dsRNAの第1の鎖）は、5'末端から5、7、8、11、14、15又は16位にあるMM位置ヌクレオチドを含む。ある種の例示的な実施形態では、本明細書に記載されるRNA（例えば、dsRNAの第1の鎖）は、SNP位置ヌクレオチドから1、2、3、4、5、8、9、10又は11ヌクレオチドにあるMM位置ヌクレオチドを含む。

【0113】

ある種の例示的な実施形態では、本明細書に記載されるRNA（例えば、dsRNAの第1の鎖）は、2-7、4-7、4-8、4-15、6-5、6-8、6-11、6-14、6-16、3-5、3-7及び3-8からなる群から選択されるSNP位置ヌクレオチド（5'末端から参照される）-MM位置ヌクレオチド（5'末端から参照される）の組合せを含む。

20

【0114】

特定の例示的な実施形態では、本明細書に記載されるRNA（例えば、dsRNAの第1の鎖）は、5'末端から6位にあるSNP位置ヌクレオチド及び5'末端から11位にあるMM位置ヌクレオチドを含む。別の特定の例示的な実施形態では、本明細書に記載されるRNA（例えば、dsRNAの第1の鎖）は、5'末端から4位にあるSNP位置ヌクレオチド及び5'末端から7位にあるミスマッチを含む。

30

【0115】

一態様では、本明細書で提供される二重鎖RNAは、アレル多型を有する変異体アレルを選択的にサイレンシングする。ある実施形態では、本明細書で提供される二重鎖RNAは、アレル多型を有する変異体アレルをサイレンシングし、同じ遺伝子の野生型アレルに影響を及ぼさない。別の実施形態では、本明細書で提供される二重鎖RNAは、アレル多型を有する変異体アレルをサイレンシングし、変異体アレルより低い程度まで同じ遺伝子の野生型アレルをサイレンシングする。

【0116】

したがって、一態様では、本発明は、有効量の、変異体タンパク質（例えば、ハンチンチンタンパク質）をコードする遺伝子内のアレル多型を標的化するRNAi剤を対象に投与することにより、アレル多型と関連する変異体タンパク質によって特徴付けられるか又は引き起こされる疾患を有するか又はそのリスクを有する対象を治療する方法を提供し、その結果、遺伝子の配列特異的干渉は、疾患のために有効な治療をもたらす。

40

【0117】

一態様では、本明細書で開示されるRNAサイレンシング剤は、対応する野生型アレルより効率的に、多型を含む変異体アレルを優先的にサイレンシングする。ある種の例示的な実施形態では、本明細書で開示されるdsRNAは、対応する野生型アレルより約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%又は約90%多い多型を含むアレルをサイレンシングする。ある実施形態では、本明細書で開示されるRNA

50

サイレンシング剤は、対応する野生型アレルより少なくとも約50%多い多型を含むアレルをサイレンシングする。ある種の例示的な実施形態では、本明細書で開示されるdsRNAは、多型を含むアレルを、対応する野生型アレルのサイレンシングのレベルより少なくとも約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、約100倍、約110倍、約120倍、約130倍、約140倍、約150倍、約160倍、約170倍、約180倍、約190倍、約200倍、約250倍、約300倍、約350倍、約400倍、約450倍又は最大約500倍サイレンシングする。

【0118】

10

本明細書で使用する場合、RNAサイレンシング剤、例えばsiRNA又はRNAサイレンシング剤の用語「アンチセンス鎖」は、サイレンシングのために標的化される遺伝子のmRNAの約10~50ヌクレオチド、例えば約15~30、16~25、18~23又は19~22ヌクレオチドの一部と実質的に相補的な鎖を指す。アンチセンス鎖又は第1の鎖は、標的的特異的サイレンシングを誘導する所望の標的mRNA配列に十分に相補的である、例えばRNAi機構又はプロセス(RNAi干渉)による所望の標的mRNAの破壊を誘発するのに十分に相補的又は所望の標的mRNAの翻訳抑制を誘発するのに十分に相補的な配列を有する。

【0119】

20

RNAサイレンシング剤、例えばsiRNA又はRNAサイレンシング剤の用語「センス鎖」又は「第2の鎖」は、アンチセンス鎖又は第1の鎖と相補的な鎖を指す。アンチセンス及びセンス鎖は、標的配列と相補性を有する第1又は第2の鎖及び前記第1又は第2の鎖と相補性を有するそれぞれの第2又は第1の鎖である第1又は第2の鎖と呼ばれる場合もある。miRNA二本鎖中間体又はsiRNA様二本鎖は、サイレンシングのために標的化される遺伝子のmRNAの約10~50ヌクレオチドの一部と十分な相補性を有するmiRNA鎖及びmiRNA鎖と二本鎖を形成する十分な相補性を有するmiRNA\*鎖を含む。

【0120】

30

本明細書で使用する場合、用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「ASO」は、有効な様式、例えば標的mRNAの翻訳及び/又は標的pre-mRNAのスプライシングを阻害するのに有効な様式で標的RNAの領域を遮断するために、RNA(例えば、SNP含有mRNA又はSNP含有pre-mRNA)を標的化する十分な配列相補性を有する核酸(例えば、RNA)を指す。「標的RNAと十分に相補的な配列」を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンス剤が、別の方法でスプライシングを調節するであろうタンパク質のための結合部位をマスクするのに十分な配列を有すること、並びに/又はアンチセンス剤が、リボソームのための結合部位をマスクするのに十分な配列を有すること、並びに/又はアンチセンス剤が、スプライシング及び/又は翻訳を妨げる標的化されるRNAの三次元構造を改変するのに十分な配列を有することを意味する。

【0121】

40

本明細書で使用する場合、アンチセンス鎖の5'末端の場合のような「5'末端」は、例えば、アンチセンス鎖の5'末端での1~約5ヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドを指す。本明細書で使用する場合、センス鎖の3'末端の場合のような「3'末端」は、領域、例えば相補的なアンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドと相補的な1~約5ヌクレオチドの領域を指す。

【0122】

本明細書で使用する場合、用語「塩基対」は、オリゴヌクレオチド二本鎖(例えば、RNAサイレンシング剤の鎖と標的mRNA配列によって形成される二本鎖)の反対側の鎖上のヌクレオチド(又はヌクレオチド類似体)の対間、主に前記ヌクレオチド(又はヌクレオチド類似体)間のH結合、ファンデルワールス相互作用などに起因する相互作用を指す。本明細書で使用する場合、用語「結合強度」又は「塩基対強度」は、塩基対の強度を

50

指す。

【0123】

本明細書で使用する場合、用語「ミスマッチ塩基対」は、例えば、通常の相補的なG : C、A : T又はA : U塩基対ではない非相補的又は非ワトソン - クリック塩基対からなる塩基対を指す。本明細書で使用する場合、用語「曖昧な塩基対」(非識別塩基対としても知られる)は、ユニバーサルヌクレオチドによって形成される塩基対を指す。

【0124】

本発明のコンジュゲートされた化合物において有用なリンカーとしては、グリコール鎖(例えば、ポリエチレングリコール)、アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA及びその組合せが挙げられる。本明細書で使用する場合、略称「TEG」は、トリエチレングリ

10

【0125】

オリゴヌクレオチドの設計

ある種の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド、例えば*s i R N A*は、センス鎖及び相補的なアンチセンス鎖からなる二本鎖であり、アンチセンス鎖は、RNA*i*を媒介するアレル多型を含有する標的mRNAと十分な相補性を有する。例示的な実施形態では、*s i R N A*分子は、約10~50以上のヌクレオチド長を有し、すなわち、各鎖は、10~50ヌクレオチド(又はヌクレオチド類似体)を含む。特定の例示的な実施形態では、*s i R N A*分子は、各鎖において約15~35、例えば約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34又は約35ヌクレオチド長を有し、鎖の一方は、標的領域と十分に相補的である。例示的な実施形態では、鎖は、整列されていない鎖の末端に少なくとも1、2又は3つの塩基が存在するように整列され(すなわち反対側の鎖と相補的な塩基が存在しない)、その結果、1、2又は3つの残基のオーバーハングは、鎖がアニーリングされたときに二本鎖の一方又は両方の末端に生じる。例示的な実施形態では、*s i R N A*分子は、約10~50以上のヌクレオチド長を有し、すなわち、各鎖は、10~50ヌクレオチド(又はヌクレオチド類似体)を含む。特定の例示的な実施形態では、*s i R N A*分子は、各鎖において約15~35、例えば約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34又は約35ヌ

20

30

【0126】

一般に、*s i R N A*は、当技術分野で知られる任意の方法を使用することにより、例えば以下のプロトコルを使用することによって設計され得る。

【0127】

1. *s i R N A*は、アレル多型を含有する標的配列に特異的であり得る。例示的な実施形態では、第1の鎖は、アレル多型を含有する標的配列に対して1つのミスマッチを有するアレル多型を含有する標的配列と実質的に相補的であり、及び他方の鎖は、第1の鎖と実質的に相補的である。ある実施形態では、標的配列は、標的遺伝子のコード領域の外部にある。例示的な標的配列は、標的遺伝子の5'非翻訳領域(5'-UTR)又はイントロン領域から選択される。これらの部位でのmRNAの切断は、対応する変異体タンパク質の翻訳を排除するはずである。h t t遺伝子の他の領域に由来する標的配列も標的化するのに好適である。センス鎖は、標的配列に基づいて設計される。さらに、より低いG/C含量(35~55%)を有する*s i R N A*は、55%より高いG/C含量を有するものより活性であり得る。したがって、一実施形態では、本発明は、35~55%のG/C含量を有する核酸分子を含む。

40

【0128】

50

2. siRNAのセンス鎖は、選択された標的部位及びアレル多型の位置の配列に基づいて設計される。例示的な実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、PKR応答を誘発しない(すなわち十分に短い長さである)。しかしながら、より長いRNA剤は、例えば、PKR応答を生成できない細胞型において又はPKR応答が代替の手段によって下方制御されたか若しくは弱められた状況において有用であり得る。

#### 【0129】

本発明のsiRNA分子は、siRNAがRNAiを媒介できるように標的配列と十分な相補性を有する。一般に、標的遺伝子のRISC媒介性切断をもたらす標的遺伝子の標的配列部分と十分に同一なヌクレオチド配列を含有するsiRNAが使用される。したがって、例示的な実施形態では、siRNAのセンス鎖は、アレル多型を含有する標的の一部と十分に同一な配列を有するように設計される。本発明は、RNAiの効率及び特異性を高めるある種の配列変種を許容できる利点を有する。ある態様では、センス鎖は、野生型と変異体アレルとの間で少なくとも1つの塩基対が異なる標的領域、例えば機能獲得変異を含む標的領域などのアレル多型を含有する標的領域とともに1つのミスマッチヌクレオチドを有し、及び他方の鎖は、第1の鎖と同一であるか又は実質的に同一である。いくつかの実施形態では、ミスマッチは、アレル多型に対応するヌクレオチドの4ヌクレオチド上流、3ヌクレオチド上流、アレル多型に対応するヌクレオチドの2ヌクレオチド上流、アレル多型に対応するヌクレオチドの1ヌクレオチド上流、1ヌクレオチド下流、アレル多型に対応するヌクレオチドの2ヌクレオチド下流、アレル多型に対応するヌクレオチドの3ヌクレオチド下流、アレル多型に対応するヌクレオチドの4ヌクレオチド下流又はアレル多型に対応するヌクレオチドの5ヌクレオチド下流である。ある種の実施形態では、ミスマッチは、アレル多型に対応するヌクレオチドに隣接しない。さらに、1又は2つのヌクレオチドの小さい挿入又は欠失を伴うsiRNA配列もRNAiを媒介するために効果的であり得る。代わりに、ヌクレオチド類似体置換又は挿入を伴うsiRNA配列は、阻害のために効果的であり得る。

#### 【0130】

配列同一性は、配列比較及び当技術分野において知られるアラインメントアルゴリズムによって決定され得る。2つの核酸配列(又は2つのアミノ酸配列)の同一性パーセントを決定するため、配列は、最適な比較の目的のために整列される(例えば、ギャップは、最適なアラインメントのために第1の配列又は第2の配列に導入され得る)。次に、対応するヌクレオチド(又はアミノ酸)位置でのヌクレオチド(又はアミノ酸残基)が比較される。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置と同じ残基によって占められる場合、これらの分子は、その位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一の位置の数の関数であり(すなわちパーセント(%)) 相同性 = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100)、任意選択的に導入されるギャップの数及び/又は導入されるギャップの長さに関してスコアにペナルティーを課す。

#### 【0131】

配列の比較及び2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。一実施形態では、アラインメントは、低い程度の同一性を有する部分(すなわち局所的アラインメント)に対してではなく、十分な同一性を有して整列された配列の特定の部分に対して発生した。配列の比較のために利用される局所的アラインメントアルゴリズムの例示的な非限定的例は、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77の場合のように修飾された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のBLASTプログラム(バージョン2.0)に組み込まれる。

#### 【0132】

別の実施形態では、アラインメントは、適切なギャップを導入することによって最適化

10

20

30

40

50

され、同一性パーセントは、整列された配列の長さに対して決定される（すなわちギャップ付きアラインメント）。比較目的でギャップ付きアラインメントを得るため、ギャップ付きBLASTは、Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17) : 3389 - 3402において記載されるとおり利用され得る。別の実施形態では、アラインメントは、適切なギャップを導入することによって最適化され、同一性パーセントは、整列された配列の全長に対して決定される（すなわちグローバルアラインメント）。配列のグローバル比較のために利用される数学的アルゴリズムの例示的な非限定的例は、Myers and Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれる。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み残基表、12のギャップ長ペナルティー及び4のギャップペナルティーが使用され得る。

10

## 【0133】

3. siRNAのアンチセンス鎖又はガイド鎖は、通常、センス鎖と同じ長さであり、且つ相補的ヌクレオチドを含む。一実施形態では、ガイド及びセンス鎖は、完全に相補的であり、すなわち、鎖は、整列又はアニールされるときに平滑末端である。別の実施形態では、siRNAの鎖は、1~4、例えば2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有するように対形成され得る。オーバーハングは、標的遺伝子（又はその相補体）に対応するヌクレオチドを含み得る（又はそれからなり得る）。代わりに、オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド、例えばdT若しくはヌクレオチド類似体又は他の好適な非ヌクレオチド材料を含み得る（又はそれからなり得る）。したがって、別の実施形態では、核酸分子は、TTなどの2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有し得る。オーバーハングヌクレオチドは、RNA又はDNAのいずれかであり得る。上記のとおり、変異体：野生型ミスマッチは、プリン：プリンミスマッチである標的領域を選択することが望ましい。

20

## 【0134】

4. 当技術分野において知られる任意の方法を使用して、適切なゲノムデータベース（ヒト、マウス、ラットなど）に対して潜在的な標的を比較し、他のコード配列と有意な相同性を有する任意の標的配列を考慮から除外する。そのような配列相同性検索のための1つのそのような方法は、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）ウェブサイト

30

で利用可能なBLASTとして知られる。

## 【0135】

5. 評価のための判定基準を満たす1つ以上の配列を選択する。

## 【0136】

siRNAの設計及び使用についてのさらなる一般的な情報は、Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemieウェブサイト

で利用可能な「The siRNA User Guide」において見出され得る。

## 【0137】

代わりに、siRNAは、標的配列とハイブリダイズできるヌクレオチド配列（又はオリゴヌクレオチド配列）として機能的に定義され得る（例えば、400mM NaCl、40mM PIPES pH6.4、1mM EDTA、12~16時間の50 又は70 でのハイブリダイゼーション、続いて洗浄する）。追加の例示的なハイブリダイゼーション条件は、1xSSC中における70 若しくは1xSSC、50%ホルムアミド中における50 でのハイブリダイゼーション後の0.3xSSC中における70 での洗浄又は4xSSC中における70 若しくは4xSSC、50%ホルムアミド中における50 でのハイブリダイゼーションに続く1xSSC中における67 での洗浄を含む。50塩基対長より短いと予測されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度（ $T_m$ ）より5~10 低くあるべきであり、 $T_m$ は、以下の式に従って決定される。18塩基対長より短いハイブリッドに関して、 $T_m( ) = 2(A$

40

50

+ T塩基の数) + 4 (G + C塩基の数)。18 ~ 49塩基対長のハイブリッドに関して、 $T_m(\text{ }) = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - (600 / N)$ であり、Nは、ハイブリッド中の塩基の数であり、且つ $[Na^+]$ は、ハイブリダイゼーション緩衝液(1 x SSC = 0.165 Mに関する $[Na^+]$ )中のナトリウムイオンの濃度である。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのためのストリンジエンシー条件の追加の例は、全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み込まれる Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 9章及び11章並びに *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., 2.10節及び6.3 ~ 6.4節において提供される。

10

## 【0138】

陰性対照 siRNA は、選択された siRNA と同じヌクレオチド組成を有するが、適切なゲノムに対して有意な配列相補性を有するべきではない。そのような陰性対照は、選択された siRNA のヌクレオチド配列を無作為に混ぜることによって設計され得る。相同性検索は、陰性対照が適切なゲノムにおける任意の他の遺伝子に対する相同性を確実に欠くように実施され得る。加えて、陰性対照 siRNA は、1つ以上の塩基ミスマッチを配列に導入することによって設計され得る。

20

## 【0139】

6. siRNA が標的 mRNA (例えば、野生型又は変異体ハンチンチン mRNA) を破壊する有効性を検証するため、siRNA は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) を用いるインビトロ mRNA 発現系において標的 cDNA (例えば、ハンチンチン cDNA) とインキュベートされ得る。<sup>32</sup>P で放射標識された新たに合成された標的 mRNA (例えば、ハンチンチン mRNA) は、アガロースゲル上でオートラジオグラフにより検出される。切断された標的 mRNA の存在は、mRNA ヌクレアーゼ活性を示す。好適な対照は、siRNA の省略及び非標的 cDNA の使用を含む。代わりに、対照 siRNA は、選択された siRNA と同じヌクレオチド組成を有するが、適切な標的遺伝子に対して有意な配列相補性を有しないように選択される。そのような陰性対照は、選択された siRNA のヌクレオチド配列を無作為に混ぜることによって設計され得る。相同性検索は、陰性対照が適切なゲノムにおける任意の他の遺伝子に対する相同性を確実に欠くように実施され得る。加えて、陰性対照 siRNA は、1つ以上の塩基ミスマッチを配列に導入することによって設計され得る。

30

## 【0140】

siRNA は、上記の標的配列のいずれかを標的化するように設計され得る。前記 siRNA は、標的配列のサイレンシングを媒介する標的配列と十分に相補的なアンチセンス鎖を含む。ある種の実施形態では、RNA サイレncing 剤は、siRNA である。

## 【0141】

最適な mRNA 特異性及び最大の mRNA 切断をもたらす siRNA - mRNA 相補性部位が選択される。

40

## 【0142】

## siRNA 様分子

本発明の siRNA 様分子は、RNAi 又は翻訳抑制のいずれかによって遺伝子サイレンシングを誘導する mRNA (例えば、htt mRNA) の標的配列と「十分に相補的」である配列を有する(すなわち配列を有する鎖を有する)。siRNA 様分子は、siRNA 分子と同じ方法で設計されるが、センス鎖と標的 RNA との間の配列同一性の程度は、miRNA とその標的との間に観察されるものに近い。一般に、miRNA 配列と対応する標的遺伝子配列との間の配列同一性の程度は、減少するため、RNAi ではなく、翻訳抑制によって転写後遺伝子サイレンシングを媒介する傾向が増大する。したがって、

50

代替的な実施形態では、標的遺伝子の翻訳抑制による転写後遺伝子サイレンシングが望まれる場合、miRNA配列は、標的遺伝子配列と部分的な相補性を有する。ある種の実施形態では、miRNA配列は、標的mRNA内（例えば、標的mRNAの3'-UTR内）に分散した1つ以上の短い配列（相補性部位）と部分的な相補性を有する（Hutvagner and Zamore, Science, 2002; Zeng et al., Mol. Cell, 2002; Zeng et al., RNA, 2003; Doench et al., Genes & Dev., 2003）。翻訳抑制の機構は協同的であるため、複数の相補性部位（例えば、2、3、4、5又は6）がある種の実施形態において標的化され得る。

#### 【0143】

RNAi又は翻訳抑制を媒介するsiRNA様二本鎖の能力は、相補性部位における標的遺伝子配列と、サイレンシング剤のヌクレオチド配列との間の非同ーヌクレオチドの分布によって予測され得る。一実施形態では、翻訳抑制による遺伝子サイレンシングが望まれる場合、少なくとも1つの非同ーヌクレオチドは、相補性部位の中央部分に存在し、その結果、miRNAガイド鎖と標的mRNAによって形成される二本鎖は、中央「バルジ」を含有する（Doench J G et al., Genes & Dev., 2003）。別の実施形態では、2、3、4、5又は6個の連続的又は非連続的非同ーヌクレオチドが導入される。非同ーヌクレオチドは、ゆらぎ塩基対（例えば、G:U）又はミスマッチ塩基対（G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C、U:U）を形成するように選択され得る。さらなる例示的な実施形態では、「バルジ」は、miRNA分子の5'末端から12及び13位のヌクレオチドで中央に置かれる。

#### 【0144】

##### 修飾RNAサイレンシング剤

本発明のある種の態様では、上記のとおりの本発明のRNAサイレンシング剤（又はその任意の部分）は、薬剤の活性がさらに改善されるように修飾され得る。例えば、上記のRNAサイレンシング剤は、下記の修飾のいずれかで修飾され得る。修飾は、部分的には、標的の識別をさらに高めること、薬剤の安定性を高めること（例えば、分解を防止すること）、細胞内取込みを促進すること、標的効率を高めること、結合（例えば、標的に対する）の効力を改善すること、薬剤に対する患者の耐性を改善すること及び/又は毒性を低減することに役立ち得る。

#### 【0145】

##### 1) 標的の識別を高める修飾

ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、単一ヌクレオチドの標的識別を高める不安定化ヌクレオチドで置換され得る（両方が参照により本明細書に組み込まれる、2007年1月25日に出願された米国特許出願公開第11/698,689号明細書及び2006年1月25日に出願された米国仮特許出願第60/762,225号明細書を参照されたい）。このような修飾は、非標的mRNA（例えば、野生型mRNA）に対するRNAサイレンシング剤の特異性を消失させるのに十分であり得るが、標的mRNA（例えば、機能獲得変異体mRNA）に対するRNAサイレンシング剤の特異性に認識できるほどに影響を及ぼさない。

#### 【0146】

ある種の例示的な実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、そのアンチセンス鎖中の少なくとも1つのユニバーサルヌクレオチドの導入によって修飾される。ユニバーサルヌクレオチドは、4つの通常のヌクレオチド塩基（例えば、A、G、C、U）のいずれかと無差別に塩基対形成できる塩基部分を含む。ユニバーサルヌクレオチドは、通常、それがRNA二本鎖又はRNAサイレンシング剤及び標的mRNAのガイド鎖によって形成される二本鎖の安定性に対して相対的に低い効果を有するため利用される。例示的なユニバーサルヌクレオチドとしては、デオキシイノシン（例えば、2'-デオキシイノシン）、7-デアザ-2'-デオキシイノシン、2'-アザ-2'-デオキシイノシン、PNA-イノシン、モルホリノ-イノシン、LNA-イノシン、ホスホロアミダート-イノシン、

10

20

30

40

50

2'-O-メトキシエチル-イノシン及び2'-OMe-イノシンからなる群から選択されるイノシン塩基部分又はイノシン類似体塩基部分を有するものが挙げられる。特定の例示的な実施形態では、ユニバーサルヌクレオチドは、イノシン残基又は天然に存在するその類似体である。

【0147】

ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、特異性決定ヌクレオチドから11ヌクレオチド以内(例えば、疾患関連多型(例えば、SNP位置ヌクレオチド)を認識するヌクレオチドから11ヌクレオチド以内)での少なくとも1つの不安定化ヌクレオチドの導入によって修飾される。例えば、不安定化ヌクレオチドは、特異性決定ヌクレオチドから11、10、9、8、7、6、5、4、3、2又は1ヌクレオチド以内にある位置で導入され得る。例示的な実施形態では、不安定化ヌクレオチドは、特異性決定ヌクレオチドから3ヌクレオチドにある位置で導入される(すなわち不安定化ヌクレオチド及び特異性決定ヌクレオチド間に2つの安定化ヌクレオチドが存在するように)。2つの鎖又は鎖部分(例えば、siRNA及びshRNA)を有するRNAサイレンシング剤において、不安定化ヌクレオチドは、特異性決定ヌクレオチドを含有しない鎖又は鎖部分において導入され得る。特定の例示的な実施形態では、不安定化ヌクレオチドは、特異性決定ヌクレオチドを含有する同じ鎖又は鎖部分において導入される。

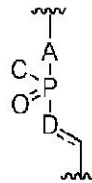
10

【0148】

ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、式1:

【化10】

20



(1)

(式中、

30

Dは、O、OCH<sub>2</sub>、OCH、CH<sub>2</sub>及びCHからなる群から選択され;

Cは、O<sup>-</sup>、OH、OR<sup>1</sup>、NH<sup>-</sup>、NH<sub>2</sub>、S<sup>-</sup>及びSHからなる群から選択され;

Aは、O及びCH<sub>2</sub>からなる群から選択され;

R<sup>1</sup>は、保護基であり;

【化11】



は、任意選択的な二重結合であり; 及び  
サブユニット間は、2つの任意選択的に修飾されたヌクレオチドを架橋している)  
の修飾されたサブユニット間結合の導入によって修飾される。

40

【0149】

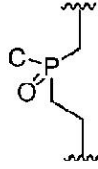
ある実施形態では、Cは、O<sup>-</sup>であり、A又はDのいずれかは、Oではない。

【0150】

ある実施形態では、Dは、CH<sub>2</sub>である。別の実施形態では、式VIIの修飾されたサブユニット間結合は、式2:

50

【化 1 2】



(2)

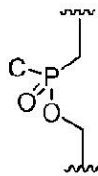
の修飾されたサブユニット間結合である。

10

【0 1 5 1】

ある実施形態では、Dは、Oである。別の実施形態では、式VIIの修飾されたサブユニット間結合は、式3：

【化 1 3】



(3)

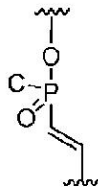
20

の修飾されたサブユニット間結合である。

【0 1 5 2】

ある実施形態では、Dは、CH<sub>2</sub>である。別の実施形態では、式VIIの修飾されたサブユニット間結合は、式4：

【化 1 4】



(4)

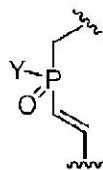
30

の修飾されたサブユニット間結合である。

【0 1 5 3】

別の実施形態では、修飾されたサブユニット間結合は、式5：

【化 1 5】



(5)

40

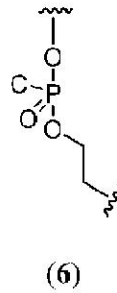
の修飾されたサブユニット間結合である。

【0 1 5 4】

50

ある実施形態では、Dは、 $\text{OCH}_2$ である。別の実施形態では、修飾されたサブユニット間結合は、式6：

【化16】



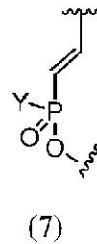
10

の修飾されたサブユニット間結合である。

【0155】

別の実施形態では、式VIIの修飾されたサブユニット間結合は、式7：

【化17】



20

の修飾されたサブユニット間結合である。

【0156】

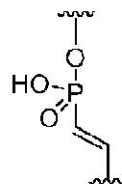
ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、図43のサブユニット間リンカーの1つ以上の導入によって修飾される。例示的な実施形態では、図43のサブユニット間リンカーは、SNP位置ヌクレオチドと、アンチセンス鎖のSNP位置ヌクレオチドに直接的に隣接し、且ついずれかの側の位置にあるヌクレオチドとの間に挿入される。

30

【0157】

ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、以下の式：

【化18】



40

を有するサブユニット間リンカーにおける1つ以上のビニルホスホネート(VP)モチーフの導入によって修飾される。

【0158】

ある種の実施形態では、VPモチーフは、オリゴヌクレオチド、例えばRNAの任意の位置で挿入される。例えば、20ヌクレオチドの長さを持つオリゴヌクレオチドに関して、VPモチーフは、位置1-2、2-3、3-4、4-5、5-6、6-7、7-8、8-9、9-10、10-11、11-12、12-13、13-14、14-15、15-16、16-17、17-18、18-19又は19-20及びこれらの任意の組合せで挿入され得る。

【0159】

50

ある種の例示的な実施形態では、VPモチーフは、アンチセンス鎖の位置1 - 2、5 - 6、6 - 7、10 - 11、18 - 19及び/又は19 - 20の1つ以上で挿入される。

【0160】

他の例示的な実施形態では、VPモチーフは、アンチセンス鎖の位置1 - 2、6 - 7、10 - 11及び/又は19 - 20の1つ以上で挿入される。

【0161】

例示的な実施形態では、VPモチーフは、アンチセンス鎖のSNP位置ヌクレオチドの隣(すなわちSNP位置ヌクレオチドと、それに直接的に隣接し、且ついずれかの側の位置にあるヌクレオチドとの間)に挿入される。別の例示的な実施形態では、VPモチーフは、アンチセンス鎖のMM位置ヌクレオチドの隣(すなわちMM位置ヌクレオチドと、それに直接的に隣接し、且ついずれかの側の位置にあるヌクレオチドとの間)に挿入される。

10

【0162】

## 2) 効力及び特異性を高める修飾

ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、非対称設計規則に従ってRNAiを媒介する効力及び特異性の増強を促進するように改変され得る(米国特許第8,309,704号明細書、同第7,750,144号明細書、同第8,304,530号明細書、同第8,329,892号明細書及び同第8,309,705号明細書を参照されたい)。そのような改変は、センス鎖に有利なようにsiRNA(例えば、本発明の方法を使用して設計されたsiRNA又はshRNAから生成されたsiRNA)のアンチセンス鎖のRISCへの侵入を促進し、その結果、アンチセンス鎖は、標的mRNAの切断又は翻訳抑制を優先的に誘導し、したがって標的切断及びサイレンシングの効率を増大させるか又は改善する。例示的な実施形態では、RNAサイレンシング剤の非対称は、RNAサイレンシング剤のアンチセンス鎖5'末端(AS5')とセンス鎖3'末端(S3')との間の塩基対強度を、前記サイレンシング剤のアンチセンス鎖3'末端(AS3')とセンス鎖5'末端(S'5)との間の結合強度又は塩基対強度に対して低下させることによって高められる。

20

【0163】

一実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称は、第1又はアンチセンス鎖の3'末端とセンス鎖部分の5'末端との間より、第1又はアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端との間でG:C塩基対が少なくなるように高められ得る。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称は、第1又はアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端との間に少なくとも1つのミスマッチ塩基対があるように高められ得る。例示的な実施形態では、ミスマッチ塩基対は、G:A、C:A、C:U、G:G、A:A、C:C及びU:Uからなる群から選択される。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称は、第1又はアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖部分の3'末端との間に少なくとも1つのゆらぎ塩基対、例えばG:Uがあるように高められ得る。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称は、希少ヌクレオチド、例えばイノシン(I)を含む少なくとも1つの塩基対があるように高められ得る。例示的な実施形態では、塩基対は、I:A、I:U及びI:Cからなる群から選択される。さらに別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤の非対称は、修飾ヌクレオチドを含む少なくとも1つの塩基対があるように高められ得る。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2-アミノ-G、2-アミノ-A、2,6-ジアミノ-G及び2,6-ジアミノ-Aからなる群から選択される。

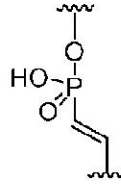
30

40

【0164】

ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、以下の式:

## 【化 1 9】



を有するビニルホスホネート（VP）モチーフの導入によってオリゴヌクレオチドにおける1つ以上のサブユニット間結合で改変される。

10

## 【0165】

## 3) 安定性の増強を有するRNAサイレンシング剤

本発明のRNAサイレンシング剤は、細胞培養のための血清又は増殖培地における安定性を改善するように修飾され得る。安定性を増強するため、3'残基は、分解に対して安定化され得、例えば、それらは、プリンヌクレオチド、特にアデノシン又はグアノシンヌクレオチドからなるように選択され得る。代わりに、修飾された類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば2'-デオキシチミジンによるウリジンの置換は、許容され、且つRNA干渉の効率に影響を及ぼさない。

## 【0166】

特定の態様では、本発明は、対応する未修飾のRNAサイレンシング剤と比較してインピボでの安定性が増強されるような、第2の鎖及び/又は第1の鎖が、内部ヌクレオチドの修飾ヌクレオチドによる置換によって修飾される第1及び第2の鎖を含むRNAサイレンシング剤を特徴とする。本明細書で定義されるとおり、「内部」ヌクレオチドは、核酸分子、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端以外の任意の位置に存在するものである。内部ヌクレオチドは、一本鎖分子内又は二本鎖又は二重鎖分子の鎖内に存在し得る。一実施形態では、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖は、少なくとも1つの内部ヌクレオチドの置換によって修飾される。別の実施形態では、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個以上の内部ヌクレオチドの置換によって修飾される。別の実施形態では、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖は、内部ヌクレオチドの少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上の置換によって修飾される。さらに別の実施形態では、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖は、内部ヌクレオチドの全ての置換によって修飾される。

20

30

## 【0167】

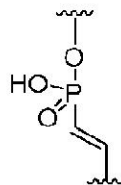
本発明の特定の実施形態では、RNAサイレンシング剤は、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド類似体を含有し得る。ヌクレオチド類似体は、標的特異的サイレンシング活性、例えばRNAi媒介性活性又は翻訳抑制活性が例えばsiRNA分子の5'末端及び/又は3'末端の領域において実質的に生じない位置に位置し得る。特に、末端は、修飾されたヌクレオチド類似体を組み込むことによって安定化され得る。

40

## 【0168】

ある種の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、以下の式：

## 【化 2 0】



50

を有するビニルホスホネート（VP）モチーフの導入によってオリゴヌクレオチドにおける1つ以上のサブユニット間結合で改変される。

【0169】

様々なオリゴヌクレオチド型（例えば、ギャップマー、ミックスマー、miRNA阻害剤、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド（「SSO」）、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴヌクレオチド（「PMO」）、ペプチド核酸（「PNA」）などは、任意選択的に、修飾（例えば、化学修飾）並びにノ又は本明細書及び例えば各々が全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第15/089,423号明細書；米国特許出願公開第15/236,051号明細書；米国特許出願公開第15/419,593号明細書；米国特許出願公開第15/697,120号明細書及び米国特許第9,809,817号明細書；及び米国特許出願公開第15/814,350号明細書及び米国特許第9,862,350号明細書において記載されるコンジュゲートの様々な組合せを利用して、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドにおいて使用され得る。

10

【0170】

例示的なヌクレオチド類似体としては、糖及びノ又は骨格修飾リボヌクレオチド（すなわちホスフェート-糖骨格に対する修飾を含む）が挙げられる。例えば、天然のRNAのホスホジエステル結合は、窒素又は硫黄ヘテロ原子の少なくとも1つを含むように修飾され得る。例示的な骨格修飾リボヌクレオチドにおいて、隣接リボヌクレオチドに連結するホスホエステル基は、修飾基、例えばホスホチオエート基によって置き換えられる。例示的な糖-修飾リボヌクレオチドにおいて、2'-OH基は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>又はONから選択される基によって置き換えられ、Rは、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、及びハロは、F、Cl、Br又はIである。

20

【0171】

特定の実施形態では、修飾は、2'-フルオロ、2'-アミノ及びノ又は2'-チオ修飾である。特に、例示的な修飾としては、2'-フルオロ-シチジン、2'-フルオロ-ウリジン、2'-フルオロ-アデノシン、2'-フルオロ-グアノシン、2'-アミノ-シチジン、2'-アミノ-ウリジン、2'-アミノ-アデノシン、2'-アミノ-グアノシン、2,6-ジアミノプリン、4-チオ-ウリジン及びノ又は5-アミノ-アリル-ウリジンが挙げられる。特定の実施形態では、2'-フルオロリボヌクレオチドは、あらゆるウリジン及びシチジンである。追加の例示的な修飾としては、5-プロモ-ウリジン、5-ヨード-ウリジン、5-メチル-シチジン、リボ-チミジン、2-アミノプリン、2'-アミノ-プチリル-ピレン-ウリジン、5-フルオロ-シチジン及び5-フルオロ-ウリジンが挙げられる。2'-デオキシ-ヌクレオチド及び2'-Omeヌクレオチドも本発明の修飾RNAサイレンシング剤部分内で使用され得る。追加の修飾残基としては、デオキシ-脱塩基、イノシン、N3-メチル-ウリジン、N6, N6-ジメチル-アデノシン、プソイドウリジン、プリンリボヌクレオチド及びリバピリンが挙げられる。特定の実施形態では、2'部分は、連結部分が2'-O-メチルオリゴヌクレオチドであるようにメチル基である。

30

40

【0172】

例示的な実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ロックド核酸（LNA）を含む。LNAは、ヌクレアーゼ活性に抵抗し（高度に安定である）、且つmRNAのための単一ヌクレオチド識別を有する糖修飾ヌクレオチドを含む（Elmen et al., *Nucleic Acids Res.*, (2005), 33(1): 439-447; Braasch et al. (2003) *Biochemistry* 42: 7967-7975, Petersen et al. (2003) *Trends Biotechnol* 21: 74-81)。これらの分子は、2'-デオキシ-2''-フルオロウリジンなどの可能な修飾とともに2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸を有する。さらに、LNAは、糖部分を3'-エンド立体構造に限定し、それにより塩基対形成のためにヌクレオチド

50

を事前に構築し、且つ1塩基当たり10 もオリゴヌクレオチドの融解温度を上昇させることにより、オリゴヌクレオチドの特異性を増大させる。

【0173】

別の例示的な実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ペプチド核酸(PNA)を含む。PNAは、ヌクレオチドの糖-ホスフェート部分がヌクレアーゼ消化に対して高度に抵抗性であり、且つ分子への結合特異性の改善を施すポリアミド骨格を形成できる中性2-アミノエチルグリシン部分と置き換えられる修飾ヌクレオチドを含む(Nielsen, et al., Science, (2001), 254:1497-1500)。

【0174】

ある種の例示的な実施形態では、核酸塩基修飾リボヌクレオチド、すなわち天然に存在する核酸塩基の代わりに少なくとも1つの天然に存在しない核酸塩基を含有するリボヌクレオチドが使用される。塩基は、アデノシンデアミナーゼの活性を遮断するように修飾され得る。例示的な修飾核酸塩基としては、5位で修飾されたウリジン及び/又はシチジン、例えば5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ブロモウリジン；8位で修飾されたアデノシン及び/又はグアノシン、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；O-及びN-アルキル化ヌクレオチド、例えばN6-メチルアデノシンが挙げられ、好適であるが、これらに限定されない。上記の修飾が組み合わせられ得ることが留意されるべきである。

【0175】

他の実施形態では、架橋は、RNAサイレンシング剤の薬物動態を改変する、例えば体内での半減期を増大させるために利用され得る。したがって、本発明は、核酸の2つの相補鎖を有するRNAサイレンシング剤を含み、2つの鎖は、架橋される。本発明は、別の部分(例えば、ペプチドなどの非核酸部分)、有機化合物(例えば、色素)などに(例えば、その3'末端で)コンジュゲートされるか又はコンジュゲートされないRNAサイレンシング剤も含む。このようにしてsiRNA誘導体を修飾することは、対応するsiRNAと比較して、得られるsiRNA誘導体の細胞内取込みを改善するか若しくは細胞における標的化活性を増強する場合があるか、細胞内でのsiRNA誘導体の追跡に有用であるか、又は対応するsiRNAと比較してsiRNA誘導体の安定性を改善する。

【0176】

他の例示的な修飾としては、(a)2'修飾、例えばセンス鎖又はアンチセンス鎖、特にセンス鎖上のU上での2'OMe部分の提供又は3'オーバーハングでの2'OMe部分の提供、例えば3'末端で(3'末端は、分子の3'原子又は最も3'の部分、例えば文脈によって示されるとおり最も3'のP又は2'位を意味する)；(b)骨格の修飾、例えばホスフェート骨格におけるOのSによる置換を有する、例えばU若しくはA若しくはその両方でのホスホロチオエート修飾の提供、特にアンチセンス鎖上；例えば、PのSによる置換を有する；(c)UのC5アミノリンカーによる置換；(d)AのGによる置換(ほとんどの場合、配列変化は、アンチセンス鎖ではなく、センス鎖上に位置する)；及び(d)2'、6'、7'又は8'位での修飾が挙げられる。例示的な実施形態は、これらの修飾の1つ以上が、アンチセンス鎖ではなく、センス鎖上に存在するものであるか、又はアンチセンス鎖がより少ないそのような修飾を有する実施形態である。さらに他の例示的な修飾としては、3'オーバーハング、例えば3'末端におけるメチル化Pの使用；2'修飾の組合せ、例えば2'OMe部分及び骨格の修飾の提供、例えばPのSによる置換を有する、例えばホスホロチオエート修飾の提供又は3'オーバーハング、例えば3'末端でのメチル化Pの使用；3'アルキルによる修飾；3'オーバーハング、例えば3'末端での脱塩基ピロリドンによる修飾；ナプロキセン、イブプロフェン又は3'末端で分解を阻害する他の部分による修飾が挙げられる。

【0177】

4)細胞取込みを高める修飾

他の実施形態では、RNAサイレンシング剤は、例えば、標的細胞(例えば、神経細胞

10

20

30

40

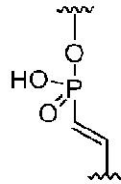
50

による細胞取込みを増強するために化学部分で修飾され得る。したがって、本発明は、別の部分（例えば、ペプチドなどの非核酸部分）、有機化合物（例えば、色素）などに（例えば、その3'末端で）コンジュゲートされるか又はコンジュゲートされないRNAサイレンシング剤を含む。コンジュゲーションは、例えば、Lambert et al., Drug Deliv. Rev.: 47(1), 99-112(2001)（ポリアルキルシアノアクリレート(PACA)ナノ粒子にロードされた核酸を記載する）；Fattal et al., J. Control Release 53(1-3): 137-43(1998)（ナノ粒子に結合された核酸を記載する）；Schwab et al., Ann. Oncol. 5 Suppl. 4: 55-8(1994)（挿入剤、疎水性基、ポリカチオン又はPACAナノ粒子に連結された核酸を記載する）；及びGodard et al., Eur. J. Biochem. 232(2): 404-10(1995)（ナノ粒子に連結された核酸を記載する）の方法を使用して、当技術分野において知られる方法によって行われ得る。

#### 【0178】

特定の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤に対する修飾は、オリゴヌクレオチドの1つ以上のサブユニット間リンカーにおいてビニルホスホネート(VP)モチーフを含み、VPモチーフは、以下の式：

#### 【化21】



を有する。

#### 【0179】

特定の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、親油性部分にコンジュゲートされる。一実施形態では、親油性部分は、カチオン性基を含むリガンドである。別の実施形態では、親油性部分は、siRNAの一方又は両方の鎖に結合される。例示的な実施形態では、親油性部分は、siRNAのセンス鎖の一方の末端に結合される。別の例示的な実施形態では、親油性部分は、センス鎖の3'末端に結合される。ある種の実施形態では、親油性部分は、コレステロール、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンA、葉酸又はカチオン性色素（例えば、Cy3）からなる群から選択される。例示的な実施形態では、親油性部分は、コレステロールである。他の親油性部分としては、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル又はフェノキサジンが挙げられる。

#### 【0180】

##### 5) テザーリガンド

他の要素が本発明のRNAサイレンシング剤に繋ぎ止められ得る。例えば、安定性、標的核酸とのハイブリダイゼーション熱力学、特定の組織若しくは細胞型への標的化又は細胞透過性を、例えばエンドサイトーシス依存的又は非依存的機構によって改善するためにRNAサイレンシング剤に繋ぎ止められたリガンドである。リガンド及び関連する修飾はまた、配列特異性を増大させることができ、結果的にオフサイト標的化を減少させることができる。テザーリガンドは、干渉物質として機能できる1つ以上の修飾塩基又は糖を含み得る。ある種の例示的な実施形態では、これらは、RNAサイレンシング剤/標的二本鎖のバルジなどの内部領域に位置する。干渉物質は、芳香族、例えば多環式芳香族又は複

10

20

30

40

50

素環式芳香族化合物であり得る。多環式干渉物質は、スタッキング能を有することができ、且つ2、3又は4つの縮合環を有する系を含むことができる。本明細書に記載されるユニバーサル塩基がリガンド上に含まれ得る。一実施形態では、リガンドは、標的核酸の切断によって標的遺伝子阻害に寄与する切断基を含み得る。切断基は、例えば、プレオマイシン（例えば、プレオマイシン - A 5、プレオマイシン - A 2 又はプレオマイシン - B 2）、ピレン、フェナントロリン（例えば、O - フェナントロリン）、ポリアミン、トリペプチド（例えば、lys - tyr - lysトリペプチド）又は金属イオンキレート化基であり得る。金属イオンキレート化基は、Lu (III) などの遊離金属イオンによるバルジの部位での標的RNAの選択的切断を促進できる、例えばLu (III) 又はEu (III) 大環状錯体、Zn (II) 2, 9 - ジメチルフェナントリン誘導体、Cu (II) テルピリジン又はアクリジンを含み得る。いくつかの実施形態では、ペプチドリガンドは、標的RNAの、例えばバルジ領域での切断を促進するRNAサイレンシング剤に繋ぎ止められ得る。例えば、1, 8 - ジメチル - 1, 3, 6, 8, 10, 13 - ヘキサアザシクロテトラデカン（サイクラム）は、標的RNA切断を促進するペプチドに（例えば、アミノ酸誘導体によって）コンジュゲートされ得る。テザーリガンドは、ハイブリダイゼーション特性の改善又は配列特異性の改善を有するRNAサイレンシング剤をもたらし得るアミノグリコシドリガンドであり得る。例示的なアミノグリコシドとしては、グリコシル化ポリリジン、ガラクトシル化ポリリジン、ネオマイシンB、トブラマイシン、カナマイシンA並びにネオ - N - アクリジン、ネオ - S - アクリジン、ネオ - C - アクリジン、トブラ - N - アクリジン及びカナA - N - アクリジンなどのアミノグリコシドのアクリジンコンジュゲートが挙げられる。アクリジン類似体の使用は、配列特異性を増大させることができる。例えば、ネオマイシンBは、DNAと比較してRNAについて高い親和性を有するが、配列特異性が低い。アクリジン類似体であるネオ - 5 - アクリジンは、HIV Rev 応答配列（RRE）についての親和性の増大を有する。いくつかの実施形態では、アミノグリコシドリガンドのグアニジン類似体（グアニジノグリコシド）は、RNAサイレンシング剤に繋ぎ止められる。グアニジノグリコシドにおいて、アミノ酸上のアミン基は、グアニジン基と交換される。グアニジン類似体の結合は、RNAサイレンシング剤の細胞透過性を増強することができる。テザーリガンドは、オリゴヌクレオチド剤の細胞取込みを増強できるポリ - アルギニンペプチド、ペプトイド又はペプチド模倣体であり得る。

#### 【0181】

例示的なリガンドは、介在性テザーを介して、典型的には共有結合的にリガンドコンジュゲート担体に直接的又は間接的に結合される。例示的な実施形態では、リガンドは、介在性テザーを介して担体に結合される。例示的な実施形態では、リガンドは、組み込まれるRNAサイレンシング剤の分布、標的化又は寿命を改変する。例示的な実施形態では、リガンドは、例えば、そのようなリガンドを欠く種と比較して、選択された標的、例えば分子、細胞又は細胞型、区画、例えば細胞又は器官の区画、組織、器官又は体の領域に対する親和性の増強をもたらす。

#### 【0182】

例示的なリガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション及び特異性特性を改善することができ、且つ結果として生じる天然若しくは修飾RNAサイレンシング剤又は本明細書に記載される単量体及び/若しくは天然若しくは修飾リボヌクレオチドの任意の組合せを含むポリマー分子のヌクレアーゼ抵抗性も改善し得る。リガンドは、一般に、例えば取込みを増強するための治療的修飾因子；例えば、分布をモニタリングするための診断用化合物又はレポーター基；架橋剤；ヌクレアーゼ抵抗性付与部分；及び天然又は異例の核酸塩基を含み得る。一般的な例としては、親油性物質、脂質、ステロイド（例えば、ウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン）、テルペン（例えば、トリテルペン、例えばサルササボゲニン、フリーデリン、エピフリエデラノール誘導体化リトコール酸）、ビタミン（例えば、葉酸、ビタミンA、ピオチン、ピリドキサル）、炭水化物、タンパク質、タンパク質結合剤、インテグリン標的化分子、ポリカチオン性物質、ペプチド、ポリアミン及びペプチド模倣体が挙げられる。リガンドは、天然に存在する物質（例えば、ヒト血清アルブミン

10

20

30

40

50

(HSA)、低密度リポタンパク質(LDL)又はグロブリン);炭水化物(例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン又はヒアルロン酸);アミノ酸又は脂質を含み得る。リガンドは、合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸などの組換え又は合成分子でもあり得る。ポリアミノ酸の例としては、ポリリジン(PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コグリコリド)コポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸無水物コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー又はポリホスファジンであるポリアミノ酸が挙げられる。ポリアミンの例としては、

10

#### 【0183】

リガンドは、標的化基、例えば細胞又は組織標的化剤、例えばレクチン、糖タンパク質、脂質又はタンパク質、例えば腎臓細胞などの特定の細胞型に結合する抗体も含み得る。標的化基は、チロトロピン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパレート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミンB12、ピオチン又はRGDペプチド若しくはRGDペプチド模倣体であり得る。リガンドの他の例としては、色素、挿入剤(例えば、アクリジン及び置換アクリジン)、架橋剤(例えば、プソラレン、マイトマイシンC)、ポルフィリン(TPPC4、テキサフィリン、サフィリン)、多環式芳香族炭化水素(例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン、フェナントロリン、ピレン)、lys-tyr-lystripeプチド、アミノグリコシド、グアニジウムアミノグリコシド、人工エンドヌクレアーゼ(例えば、EDTA)、親油性分子、例えばコレステロール(及びそのチオ類似体)、コール酸、コラン酸、リトコール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、グリセロール(例えば、エステル(例えば、モノ、ビス又はトリス脂肪酸エステル、例えばC10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19又はC20脂肪酸)及びそのエーテル、例えばC10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19又はC20アルキル;例えば、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、1,3-ビス-O(オクタデシル)グリセロール)、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ステアリン酸(例えば、グリセリルジステアリン酸)、オレイン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル又はフェノキサジン)及びペプチドコンジュゲート(例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド)、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG(例えば、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]<sub>2</sub>、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカ、酵素、ハプテン(例えば、ピオチン)、輸送/吸収促進剤(例えば、アスピリン、ナプロキセン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ(例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザ大環状分子のEu<sup>3+</sup>錯体)、ジニトロフェニル、HRP又はAPが挙げられる。

20

30

40

#### 【0184】

リガンドは、タンパク質、例えば糖タンパク質又はペプチド、例えばコリガンド又は抗体、例えば癌細胞、内皮細胞又は骨細胞などの特定の細胞型に結合する抗体に対して特異的な親和性を有する分子であり得る。リガンドは、ホルモン及びホルモン受容体も含み得

50

る。それらは、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、コファクター、多価ラクトース、多価ガラクトース、N - アセチル - ガラクトサミン、N - アセチル - グルコサミン多価マンノース又は多価フコースなどの非ペプチド性種も含み得る。リガンドは、例えば、リボ多糖、p 38 MAPキナーゼの活性化因子又はNF - Bの活性化因子であり得る。

【0185】

リガンドは、細胞へのRNAサイレンシング剤の取込みを、例えば細胞の細胞骨格を破壊することにより、例えば細胞の微小管、マイクロフィラメント及び/又は中間径フィラメントを破壊することにより増大させることができる物質、例えば薬物であり得る。薬物は、例えば、タキソル、ピンクリスチン、ピンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン又はミオセルピンであり得る。リガンドは、例えば、炎症反応を活性化することにより、RNAサイレンシング剤の細胞への取込みを増大させることができる。そのような効果を有することになる例示的なリガンドは、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン-1ベータ又はガンマインターフェロンを含む。

10

【0186】

一態様では、リガンドは、脂質又は脂質系分子である。そのような脂質又は脂質系分子は、通常、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン(HSA)に結合する。リガンドに結合するHSAは、標的組織、例えば体の非腎臓標的組織へのコンジュゲートの分布を可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であり得る。HSAに結合できる他の分子もリガンドとして使用され得る。例えば、ナプロキセン又はアスピリンが使用され得る。脂質又は脂質系リガンドは、(a)コンジュゲートの分解に対する抵抗性を増大させることができ、(b)標的細胞又は細胞膜への標的化又は輸送を増大させることができ、且つ/又は(c)血清タンパク質、例えばHSAへの結合を調整するために使用され得る。脂質系リガンドを使用して、標的組織へのコンジュゲートの結合を調節、例えば制御することができる。特定の実施形態では、脂質系リガンドは、HSAに結合する。しかしながら、HSAリガンド結合を元に戻すことができないほど親和性が強くないことが望まれる。別の例示的な実施形態では、脂質系リガンドは、HSAに弱く結合するか又は決して結合しない。

20

【0187】

別の態様では、リガンドは、標的細胞、例えば増殖性細胞によって取り入れられる部分、例えばビタミンである。これらは、例えば、悪性又は非悪性型、例えば癌細胞の望まれない細胞増殖によって特徴付けられる障害を治療するのに特に有用である。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E及びKが挙げられる。他の例示的なビタミンとしては、Bビタミン、例えば葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサル又は癌細胞によって取り入れられる他のビタミン若しくは栄養素が挙げられる。HSA及び低密度リポタンパク質(LDL)も含まれる。

30

【0188】

別の態様では、リガンドは、細胞透過剤、典型的にはらせん状細胞透過剤である。ある種の例示的な実施形態では、薬剤は、両親媒性である。例示的な薬剤は、tat又はアンテナペディアなどのペプチドである。薬剤がペプチドである場合、それは、修飾され得、ペプチド模倣体、逆転異性体、非ペプチド又はプソイドペプチド結合及びD - アミノ酸の使用を含む。らせん状薬剤は、通常、典型的には親油性面及び疎油性面を有するアルファヘリックス薬剤である。

40

【0189】

リガンドは、ペプチド又はペプチド模倣体であり得る。ペプチド模倣体(本明細書でオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる)は、天然のペプチドと同様に既定の三次元構造に折り畳むことができる分子である。ペプチド及びペプチド模倣体のオリゴヌクレオチド剤への結合は、細胞認識及び吸収を高めることによってなど、RNAサイレンシング剤の薬物動態分布に影響を及ぼし得る。ペプチド又はペプチド模倣体部分は、約5 ~ 50アミノ酸長、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50アミノ酸長で

50

あり得る。ペプチド又はペプチド模倣体は、例えば、細胞透過ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド又は疎水性ペプチド（例えば、主に Tyr、Trp 又は Phe からなる）であり得る。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、規制ペプチド又は架橋ペプチドであり得る。ペプチド部分は、L-ペプチド又はD-ペプチドであり得る。別の選択肢において、ペプチド部分は、疎水性膜移行配列（MTS）を含み得る。ペプチド又はペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリー又は one-bead-one-compound（OBOC）コンビナトリアルライブラリー（Lam et al., Nature 354: 82-84, 1991）から同定されるペプチドなど、DNA のランダム配列によってコードされ得る。例示的な実施形態では、組み込まれた単量体単位を介してRNAサイレンシング剤に繋ぎ止められたペプチド又はペプチド模倣体は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）-ペプチド又はRGD模倣物などの細胞標的化ペプチドである。ペプチド部分は、約5アミノ酸から約40アミノ酸の長さの範囲であり得る。ペプチド部分は、例えば、安定性を増大させるか又は立体構造特性を誘導する構造修飾を有し得る。下記の構造修飾のいずれかが利用され得る。

【0190】

#### 6) 疎水性部分

本明細書で提供される二重鎖RNAのある種の実施形態では、RNA分子は、1つ以上の疎水性部分にコンジュゲートされる（参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2018/031933号パンフレットを参照されたい）。ある実施形態では、疎水性部分は、低密度リボタンパク質及び/又は中間密度リボタンパク質に対する親和性を有する。関連する実施形態では、疎水性部分は、3個未満の二重結合を有する飽和又は不飽和部分である。

【0191】

別の実施形態では、疎水性部分は、高密度リボタンパク質に対する親和性を有する。関連する実施形態では、疎水性部分は、3個以上の二重結合を有する（例えば、3、4、5、6、7、8、9又は10個の二重結合を有する）多価不飽和部分である。特定の実施形態では、疎水性部分は、3個の二重結合を有する多価不飽和部分である。特定の実施形態では、疎水性部分は、4個の二重結合を有する多価不飽和部分である。特定の実施形態では、疎水性部分は、5個の二重結合を有する多価不飽和部分である。特定の実施形態では、疎水性部分は、6個の二重結合を有する多価不飽和部分である。

【0192】

別の実施形態では、疎水性部分は、脂肪酸、ステロイド、セコステロイド、脂質、ガングリオリド及びヌクレオリド類似体並びにエンドカンナビノイドからなる群から選択される。

【0193】

別の実施形態では、疎水性部分は、神経調節性脂質、例えばエンドカンナビノイドである。エンドカンナビノイドの非限定的な例としては、アナンダミド、アラキドノイルエタノールアミン、2-アラキドノイルグリセリルエーテル（ノラジンエーテル）、2-アラキドノイルグリセリルエーテル（ノラジンエーテル）、2-アラキドノイルグリセロール及びN-アラキドノイルドーパミンが挙げられる。

【0194】

別の実施形態では、疎水性部分は、オメガ-3脂肪酸である。オメガ-3脂肪酸の非限定的な例としては、ヘキサデカトリエン酸（HTA）、アルファ-リノレン酸（ALA）、ステアリドン酸（SDA）、エイコサトリエン酸（ETE）、エイコサテトラエン酸（ETA）、エイコサペンタエン酸（EPA、ティムノドン酸）、ヘネイコサペンタエン酸（HPA）、ドコサペンタエン酸（DPA、イワシ酸）、ドコサヘキサエン酸（DHA、セルボン酸）、テトラコサペンタエン酸及びテトラコサヘキサエン酸（ニシン酸）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0195】

別の実施形態では、疎水性部分は、オメガ-6脂肪酸である。オメガ-6脂肪酸の非限

10

20

30

40

50

定的な例としては、リノール酸、ガンマ - リノール酸 ( G L A )、エイコサジエン酸、ジホモ - ガンマ - リノール酸 ( D G L A )、アラキドン酸 ( A A )、ドコサジエン酸、アドレン酸、ドコサペンタエン酸 ( オズボンド酸 )、テトラコサテトラエン酸及びテトラコサペンタエン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 9 6 】

別の実施形態では、疎水性部分は、オメガ - 9 脂肪酸である。オメガ - 9 脂肪酸の非限定的な例としては、オレイン酸、エイコセン酸、ミード酸、エルカ酸及びネルヴオン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 9 7 】

別の実施形態では、疎水性部分は、コンジュゲートされたリノレン酸である。コンジュゲートされたリノレン酸の非限定的な例としては、 $\gamma$ -カレンジン酸、 $\delta$ -カレンジン酸、ジャカル酸、 $\gamma$ -エレオステアリン酸、 $\delta$ -エレオステアリン酸、カタルプ酸及びプニカ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 1 9 8 】

別の実施形態では、疎水性部分は、飽和脂肪酸である。飽和脂肪酸の非限定的な例としては、カプリル酸、カプリン酸、ドコサン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸及びセロチン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 9 9 】

別の実施形態では、疎水性部分は、ルメレン酸、 $\beta$ -パリナリン酸、 $\gamma$ -パリナリン酸、ボセオペンタエン酸、ピノレン酸及びポドカルプ酸からなる群から選択される酸である。

20

【 0 2 0 0 】

別の実施形態では、疎水性部分は、ドコサン酸 ( D C A )、ドコサヘキサエン酸 ( D H A ) 及びエイコサペンタエン酸 ( E P A ) からなる群から選択される。特定の実施形態では、疎水性部分は、ドコサン酸 ( D C A ) である。別の特定の実施形態では、疎水性部分は、D H A である。別の特定の実施形態では、疎水性部分は、E P A である。

【 0 2 0 1 】

別の実施形態では、疎水性部分は、セコステロイドである。特定の実施形態では、疎水性部分は、カルシフェロールである。別の実施形態では、疎水性部分は、コレステロール以外のステロイドである。

30

【 0 2 0 2 】

特定の実施形態では、疎水性部分は、コレステロールではない。

【 0 2 0 3 】

別の実施形態では、疎水性部分は、アルキル鎖、ビタミン、ペプチド又は生理活性コンジュゲートであり、スフィンゴ糖脂質、多価不飽和脂肪酸、セコステロイド、ステロイドホルモン又はステロール脂質を含むが、これらに限定されない。

【 0 2 0 4 】

ある実施形態では、本明細書で提供される二重鎖 R N A は、1 つ以上の化学修飾されたヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、二重鎖 R N A は、2 ' - メトキシ - ヌクレオチド及び 2 ' - フルオロ - ヌクレオチドを交互に含む。別の特定の実施形態では、二重鎖 R N A の 1 つ以上のヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される。本明細書で開示される d s R N A のある種の実施形態では、ミスマッチヌクレオチド及びミスマッチヌクレオチドに隣接するヌクレオチドは、2 ' - メトキシ - リボヌクレオチドである。

40

【 0 2 0 5 】

別の特定の実施形態では、本明細書で提供される二重鎖 R N A の 3 ' 末端から 1 及び 2 位にあるヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される。さらに別の特定の実施形態では、二重鎖 R N A の 3 ' 末端から 1 及び 2 位にあるヌクレオチド並びに二重鎖 R N A の 5 ' 末端から 1 及び 2 位にあるヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される。

50

## 【0206】

二重鎖RNAの一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは、少なくとも16個の連続したヌクレオチド、5'末端、3'末端を含み、標的と相補性を有し、

(1) 第1のオリゴヌクレオチドは、2'-メトキシ-ヌクレオチド及び2'-フルオロ-ヌクレオチドを交互に含み；

(2) 5'末端から2及び14位にあるヌクレオチドは、2'-メトキシ-ヌクレオチドではなく；

(3) ヌクレオチドは、ホスホジエステル又はホスホロチオエート結合を介して連結され；及び

(4) 3'末端から1～6位又は3'末端から1～7位にあるヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される。

10

## 【0207】

7) 高度な安定化パターン

本明細書で提供される二重鎖RNAの一実施形態では、

(1) 第1のオリゴヌクレオチドは、2'-メトキシ-リボヌクレオチド及び2'-フルオロ-リボヌクレオチドを交互に含み、各ヌクレオチドは、2'-メトキシ-リボヌクレオチド又は2'-フルオロ-リボヌクレオチドであり；且つ第1のオリゴヌクレオチドの5'末端から2及び14位にあるヌクレオチドは、2'-メトキシ-リボヌクレオチドではなく；

(2) 第2のオリゴヌクレオチドは、2'-メトキシ-リボヌクレオチド及び2'-フルオロ-リボヌクレオチドを交互に含み、各ヌクレオチドは、2'-メトキシ-リボヌクレオチド又は2'-フルオロ-リボヌクレオチドであり；且つ第2のオリゴヌクレオチドの5'末端から2及び14位にあるヌクレオチドは、2'-メトキシ-リボヌクレオチドであり；

20

(3) 第1のオリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、ホスホジエステル又はホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結され、3'末端から1～6位又は3'末端から1～7位にあるヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結され；及び

(4) 第2のオリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、ホスホジエステル又はホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結され、3'末端から1及び2位にあるヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される。

## 【0208】

二重鎖RNAの一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは、第2のオリゴヌクレオチドより3～7個多いリボヌクレオチドを有する。

30

## 【0209】

一実施形態では、二重鎖RNAは、11～16塩基対二本鎖を含み、各塩基対二本鎖のヌクレオチドは、異なる化学修飾を有する(例えば、1つのヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾を有し、及び他のヌクレオチドは、2'-メトキシを有する)。

## 【0210】

二重鎖RNAの一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは、第2のオリゴヌクレオチドより3～7個多いリボヌクレオチドを有する。別の実施形態において。

## 【0211】

一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは、アンチセンス鎖であり、第2のオリゴヌクレオチドは、センス鎖である。参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/161388号パンフレットを参照されたい。

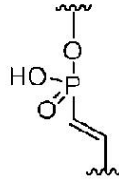
40

## 【0212】

一実施形態では、第1又は第2のオリゴヌクレオチドは、以下の式：

50

## 【化 2 2】



を有する 1 つ以上の V P サブユニット間修飾を含む。

## 【 0 2 1 3】

## 8) 分岐オリゴヌクレオチド

上で開示されるとおりの 2 つ以上の RNA サイレncing 剤、例えば siRNA などのオリゴヌクレオチドコンストラクトは、リンカー、スペーサー及び分岐点から独立して選択される 1 つ以上の部分によって互いに連結されて、2 つ以上の RNA サイレncing 剤を含有する分岐オリゴヌクレオチドを形成し得る。図 3 1 は、2 つの siRNA を送達するための例示的なジ-siRNA 二分岐骨格を示す。代表的な実施形態では、分岐オリゴヌクレオチドの核酸は、それぞれアンチセンス鎖（又はその部分）を含み、アンチセンス鎖は、ヘテロ接合型一塩基多型に対する十分な相補性を有して、RNA に媒介されるサイレンシング機構（例えば、RNAi）を媒介する。他の実施形態では、アンチセンス転写物をサイレンシングするためのセンス鎖（又はその部分）を含む核酸を特徴とする分岐オリゴヌクレオチドの第 2 の型が提供され、センス鎖は、アンチセンス転写物に対する十分な相補性を有して、RNA に媒介されるサイレンシング機構を媒介する。さらなる実施形態では、両方の型の核酸、すなわちアンチセンス鎖（又はその部分）及びセンス鎖（又はその部分）を含むオリゴヌクレオチドを含む核酸を含む分岐オリゴヌクレオチドの第 3 の型が提供される。

## 【 0 2 1 4】

例示的な実施形態では、分岐オリゴヌクレオチドは、リンカーを通して結合された 2 ~ 8 個の RNA サイレncing 剤を有し得る。リンカーは、疎水性であり得る。特定の実施形態では、本出願の分岐オリゴヌクレオチドは、2 ~ 3 個のオリゴヌクレオチドを有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、独立して、実質的な化学的安定化を有する（例えば、成分塩基の少なくとも 40 % が化学的に修飾される）。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、完全な化学的安定化を有する（すなわち成分塩基の全てが化学的に修飾される）。いくつかの実施形態では、分岐オリゴヌクレオチドは、それぞれ独立して 2 ~ 20 個のヌクレオチドを有する 1 つ以上の一本鎖ホスホロチオエートテールを含む。特定の実施形態では、各一本鎖テールは、8 ~ 10 個のヌクレオチドを有する。

## 【 0 2 1 5】

ある種の実施形態では、分岐オリゴヌクレオチドは、3 つの特性によって特徴付けられる：(1) 分岐構造、(2) 完全な代謝安定化、及び(3) ホスホロチオエートリンカーを含む一本鎖テールの存在。特定の実施形態では、分岐オリゴヌクレオチドは、2 又は 3 つの分岐を有する。分岐構造の全体的なサイズの増大は、取込みの増加を促進すると考えられる。また、活性の特定の理論に束縛されることなく、複数の隣接する分岐（例えば、2 又は 3）は、各分岐に協同的に作用させ、したがって内部移行、輸送及び放出の速度を劇的に高めることができると考えられる。

## 【 0 2 1 6】

分岐オリゴヌクレオチドは、様々な構造的に多様な実施形態において提供される。図 3 6 に示されるとおり、例えばいくつかの実施形態では、分岐点で結合された核酸は、一本鎖であり、且つ miRNA 阻害剤、ギャップマー、ミックスマー、SSO、PMO 又は PNA からなる。これらの一本鎖は、それらの 3' 又は 5' 末端で結合され得る。siRNA 及び一本鎖オリゴヌクレオチドの組合せも二重の機能のために使用され得る。別の実施形態では、ギャップマー、ミックスマー、miRNA 阻害剤、SSO、PMO 及び PNA と

10

20

30

40

50

相補的な短い核酸は、これらの活性一本鎖核酸を運び、且つ分布及び細胞内部移行を高めるために使用される。短い二本鎖領域は、分岐構造の細胞への内部移行時の迅速な解離のために低い融解温度 ( $T_m$  約 37 ) を有する。

【 0 2 1 7 】

図 3 7 に示されるとおり、ジ - s i R N A 分岐オリゴヌクレオチドは、化学的に多様なコンジュゲートを含み得る。コンジュゲートされた生理活性リガンドは、細胞特異性を高め、且つ膜会合、内部移行及び血清タンパク質結合を促進するために使用され得る。コンジュゲーションのために使用されることになる生理活性部分の例は、D H A g 2、D H A、G a l N A c 及びコレステロールを含む。これらの部分は、連結リンカー又はスペーサーのいずれかを通してジ - s i R N A に結合され得るか、又は別の遊離 s i R N A 末端に結合された追加のリンカー又はスペーサーを介して付加され得る。

10

【 0 2 1 8 】

分岐構造の存在は、同一の化学組成の非分岐化合物と比較して 1 0 0 倍を超えて脳における組織保持のレベルを改善するが、これは、細胞保持及び分布の新しい機構を示唆している。分岐オリゴヌクレオチドは、予想外にも、脊髄及び脳全体にわたる均一な分布を有する。さらに、分岐オリゴヌクレオチドは、予想外にも、様々な組織への効率的な全身送達及び非常に高いレベルの組織蓄積を呈する。

【 0 2 1 9 】

分岐オリゴヌクレオチドは、A S O、m i R N A、m i R N A 阻害剤、スプライススイッチング、P M O、P N A を含む様々な治療用核酸を含む。いくつかの実施形態では、分岐オリゴヌクレオチドは、コンジュゲートされた疎水性部分をさらに含み、且つインビトロ及びインビボでの前例のないサイレンシング及び効力を呈する。

20

【 0 2 2 0 】

リンカー

分岐オリゴヌクレオチドのある実施形態では、各リンカーは、独立して、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、R N A、D N A、ホスフェート、ホスホネート、ホスホロアミダート、エステル、アミド、トリアゾール及びこれらの組合せから選択され；リンカーのいずれかの炭素又は酸素原子は、任意選択的に、窒素原子と置き換えられるか、ヒドロキシル置換基を有するか、又はオキソ置換基を有する。一実施形態では、各リンカーは、エチレングリコール鎖である。別の実施形態では、各リンカーは、アルキル鎖である。別の実施形態では、各リンカーは、ペプチドである。別の実施形態では、各リンカーは、R N A である。別の実施形態では、各リンカーは、D N A である。別の実施形態では、各リンカーは、ホスフェートである。別の実施形態では、各リンカーは、ホスホネートである。別の実施形態では、各リンカーは、ホスホロアミダートである。別の実施形態では、各リンカーは、エステルである。別の実施形態では、各リンカーは、アミドである。別の実施形態では、各リンカーは、トリアゾールである。別の実施形態では、各リンカーは、図 3 7 の式から選択される構造である。

30

【 0 2 2 1 】

9) 式 ( I ) の化合物

別の態様において、本明細書では、式 ( I ) :

40

$L - ( N )_n \quad ( I )$

( 式中、L は、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、R N A、D N A、ホスフェート、ホスホネート、ホスホロアミダート、エステル、アミド、トリアゾール及びこれらの組合せから選択され、式 ( I ) は、任意選択的に、1 つ以上の分岐点 B 及び 1 つ以上のスペーサー S をさらに含み；B は、それぞれの存在に関して独立して、多価有機種又はその誘導体であり；S は、それぞれの存在に関して独立して、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、R N A、D N A、ホスフェート、ホスホネート、ホスホロアミダート、エステル、アミド、トリアゾール及びこれらの組合せから選択され；N は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む R N A 二本鎖であり、アンチセンス鎖は、アレル多型を含む遺伝子の領域と実質的に相補的な相補性の領域を含み、アンチセンス鎖は、アレル多型と相

50

補的である、5'末端から2~7位にある一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド;及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む)

の分岐オリゴヌクレオチド化合物が提供される。例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2、4又は6位にあり、及びミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置する。

【0222】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ独立して、1つ以上の化学修飾を含み;及びnは、2、3、4、5、6、7又は8である。

【0223】

ある実施形態では、式(I)の化合物は、表1の式(I-1)~(I-9)から選択される構造を有する。

【0224】

【表1】

表1

$\text{N} \text{---} \text{L} \text{---} \text{N}$ <p>(I-1)</p>	$\text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{L} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N}$ <p>(I-2)</p>	$\begin{array}{c} \text{N} \\   \\ \text{N} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{N} \end{array}$ <p>(I-3)</p>
$\begin{array}{c} \text{N} \\   \\ \text{N} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{N} \\   \\ \text{N} \end{array}$ <p>(I-4)</p>	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ <p>(I-5)</p>	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ <p>(I-6)</p>
$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ <p>(I-7)</p>	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\   \quad   \quad   \\ \text{N} \quad \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ <p>(I-8)</p>	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\   \quad   \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\   \quad   \quad   \\ \text{N} \quad \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ <p>(I-9)</p>

【0225】

一実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-1)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-2)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-3)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-4)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-5)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-6)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-7)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-8)である。別の実施形態では、式(I)の化合物は、式(I-9)である。

【0226】

式(I)の化合物のある実施形態では、各リンカーは、独立して、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA、ホスフェート、ホスホネート、ホスホロア

ミダート、エステル、アミド、トリアゾール及びこれらの組合せから選択され；リンカーのいずれかの炭素又は酸素原子は、任意選択的に、窒素原子と置き換えられるか、ヒドロキシル置換基を有するか、又はオキソ置換基を有する。式(I)の化合物の一実施形態では、各リンカーは、エチレングリコール鎖である。別の実施形態では、各リンカーは、アルキル鎖である。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、ペプチドである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、RNAである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、DNAである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、ホスフェートである。別の実施形態では、各リンカーは、ホスホネートである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、ホスホロアミダートである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、エステルである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、アミドである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、トリアゾールである。式(I)の化合物の別の実施形態では、各リンカーは、図36の式から選択される構造である。

10

## 【0227】

式(I)の化合物の一実施形態では、Bは、多価有機種である。式(I)の化合物の別の実施形態では、Bは、多価有機種の誘導体である。式(I)の化合物の一実施形態では、Bは、トリオール又はテトラオール誘導体である。別の実施形態では、Bは、トリ-又はテトラ-カルボン酸誘導体である。別の実施形態では、Bは、アミン誘導体である。別の実施形態では、Bは、トリ-又はテトラ-アミン誘導体である。別の実施形態では、Bは、アミノ酸誘導体である。式(I)の化合物の別の実施形態では、Bは、図38の式から選択される。

20

## 【0228】

多価有機種は、炭素及び3つ以上の結合価を含む部分(すなわち上で定義されるとおりのS、L又はNなどの部分との結合点)である。多価有機種の非限定的な例としては、トリオール(例えば、グリセロール、フロログルシノールなど)、テトラオール(例えば、リボース、ペンタエリスリトール、1,2,3,5-テトラヒドロキシベンゼンなど)、トリ-カルボン酸(例えば、クエン酸、1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸、トリメシン酸など)、テトラ-カルボン酸(例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸、ピロメリト酸など)、三級アミン(例えば、トリプロパルギルアミン、トリエタノールアミンなど)、トリアミン(例えば、ジエチレントリアミンなど)、テトラミン並びにヒドロキシル、チオール、アミノ及び/又はカルボキシル部分の組合せを含む種(例えば、リジン、セリン、システインなどのアミノ酸)が挙げられる。

30

## 【0229】

式(I)の化合物のある実施形態では、各核酸は、1つ以上の化学修飾されたヌクレオチドを含む。式(I)の化合物のある実施形態では、各核酸は、化学修飾されたヌクレオチドからなる。式(I)の化合物のある種の実施形態では、各核酸の>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%又は>50%は、化学修飾されたヌクレオチドを含む。

## 【0230】

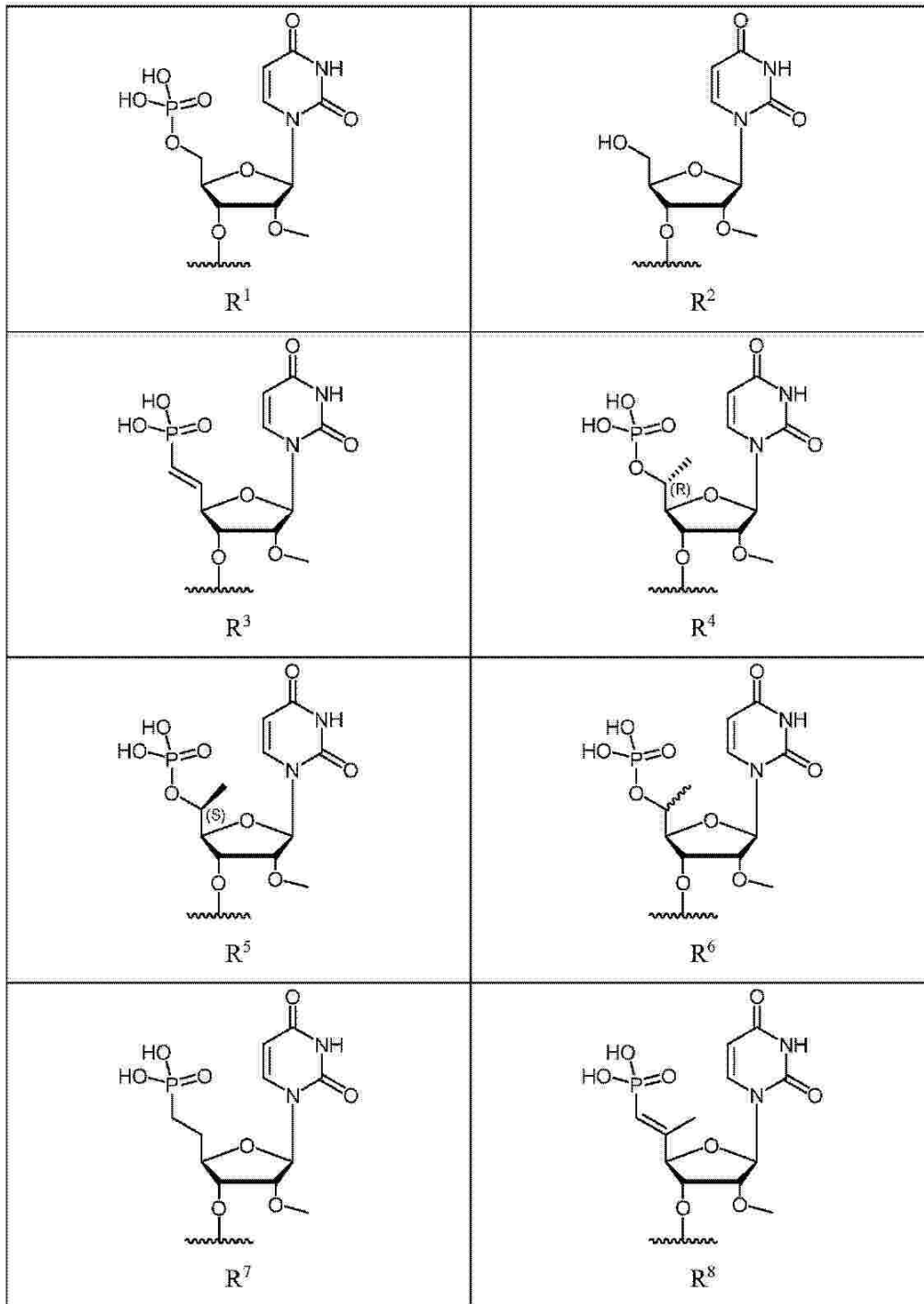
ある実施形態では、各アンチセンス鎖は、独立して、表2の群から選択される5'末端基Rを含む。

40

## 【0231】

## 【表 2】

表2



## 【0232】

一実施形態では、Rは、 $R_1$ である。別の実施形態では、Rは、 $R_2$ である。別の実施形態では、Rは、 $R_3$ である。別の実施形態では、Rは、 $R_4$ である。別の実施形態では、Rは、 $R_5$ である。別の実施形態では、Rは、 $R_6$ である。別の実施形態では、Rは、 $R_7$ である。別の実施形態では、Rは、 $R_8$ である。

## 【0233】

式(II)の構造

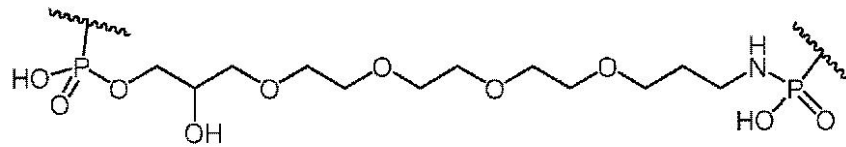
ある実施形態では、式(I)の化合物は、式(II)：







## 【化 3 1】



(L1)

の構造を有する。

## 【0246】

L1のある実施形態では、Rは、 $R^3$ であり、及びnは、2である。

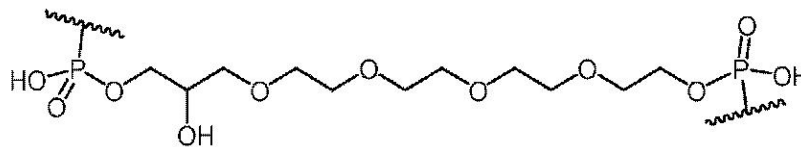
## 【0247】

式(II)の構造のある実施形態では、Lは、L1の構造を有する。式(III)の構造のある実施形態では、Lは、L1の構造を有する。式(IV)の構造のある実施形態では、Lは、L1の構造を有する。式(V)の構造のある実施形態では、Lは、L1の構造を有する。式(VI)の構造のある実施形態では、Lは、L1の構造を有する。

## 【0248】

式(I)の化合物のある実施形態では、Lは、L2：

## 【化 3 2】



(L2)

の構造を有する。

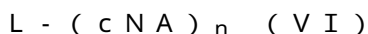
## 【0249】

L2のある実施形態では、Rは、 $R^3$ であり、及びnは、2である。式(II)の構造のある実施形態では、Lは、L2の構造を有する。式(III)の構造のある実施形態では、Lは、L2の構造を有する。式(IV)の構造のある実施形態では、Lは、L2の構造を有する。式(V)の構造のある実施形態では、Lは、L2の構造を有する。式(VI)の構造のある実施形態では、Lは、L2の構造を有する。

## 【0250】

## 10) 送達系

さらなる態様では、本明細書では、式(VI)：



(式中、Lは、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA、ホスフェート、ホスホネート、ホスホロアミダート、エステル、アミド、トリアゾール及びこれらの組合せから選択され、式(VI)は、任意選択的に、1つ以上の分岐点B及び1つ以上のスペーサーSをさらに含み；Bは、各存在に関して独立して、多価有機種又はその誘導体であり；Sは、各存在に関して独立して、エチレングリコール鎖、アルキル鎖、ペプチド、RNA、DNA、ホスフェート、ホスホネート、ホスホロアミダート、エステル、アミド、トリアゾール及びその組合せから選択され；各cNAは、独立して、1つ以上の化学修飾を含む担体核酸であり；及びnは、2、3、4、5、6、7又は8である)の構造を有する治療用核酸のための送達系が提供される。

## 【0251】

送達系の一実施形態では、Lは、エチレングリコール鎖である。送達系の別の実施形態

10

20

30

40

50

では、Lは、アルキル鎖である。送達系の別の実施形態では、Lは、ペプチドである。送達系の別の実施形態では、Lは、RNAである。送達系の別の実施形態では、Lは、DNAである。送達系の別の実施形態では、Lは、ホスフェートである。送達系の別の実施形態では、Lは、ホスホネートである。送達系の別の実施形態では、Lは、ホスホロアミダートである。送達系の別の実施形態では、Lは、エステルである。送達系の別の実施形態では、Lは、アミドである。送達系の別の実施形態では、Lは、トリアゾールである。

【0252】

送達系の一実施形態では、Sは、エチレングリコール鎖である。別の実施形態では、Sは、アルキル鎖である。送達系の別の実施形態では、Sは、ペプチドである。別の実施形態では、Sは、RNAである。送達系の別の実施形態では、Sは、DNAである。送達系の別の実施形態では、Sは、ホスフェートである。送達系の別の実施形態では、Sは、ホスホネートである。送達系の別の実施形態では、Sは、ホスホロアミダートである。送達系の別の実施形態では、Sは、エステルである。別の実施形態では、Sは、アミドである。別の実施形態では、Sは、トリアゾールである。

10

【0253】

送達系の一実施形態では、nは、2である。送達系の別の実施形態では、nは、3である。送達系の別の実施形態では、nは、4である。送達系の別の実施形態では、nは、5である。送達系の別の実施形態では、nは、6である。送達系の別の実施形態では、nは、7である。送達系の別の実施形態では、nは、8である。

【0254】

ある種の実施形態では、各cNAは、>95%、>90%、>85%、>80%、>75%、>70%、>65%、>60%、>55%又は>50%の化学修飾されたヌクレオチドを含む。

20

【0255】

ある実施形態では、式(VI)の化合物は、表3の式(VI-1)~(VI-9)から選択される構造を有する。

【0256】

30

40

50

【表 3】

表3

$\text{ANc}-\text{L}-\text{cNA}$ (VI-1)	$\text{ANc}-\text{S}-\text{L}-\text{S}-\text{cNA}$ (VI-2)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \\   \\ \text{ANc}-\text{L}-\text{B}-\text{L}-\text{cNA} \end{array}$ (VI-3)
$\begin{array}{c} \text{cNA} \\   \\ \text{ANc}-\text{L}-\text{B}-\text{L}-\text{cNA} \\   \\ \text{cNA} \end{array}$ (VI-4)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \quad \text{cNA} \\   \quad   \\ \text{S} \quad \text{S} \\   \quad   \\ \text{ANc}-\text{S}-\text{B}-\text{L}-\text{B}-\text{S}-\text{cNA} \end{array}$ (VI-5)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \\   \\ \text{ANc}-\text{S}-\text{B}-\text{L}-\text{B}-\text{S}-\text{cNA} \\   \\ \text{cNA} \end{array}$ (VI-6)
$\begin{array}{c} \text{cNA} \quad \text{cNA} \\   \quad   \\ \text{S} \quad \text{S} \\   \quad   \\ \text{ANc}-\text{S}-\text{B}-\text{L}-\text{B}-\text{S}-\text{cNA} \\   \quad   \\ \text{cNA} \quad \text{cNA} \end{array}$ (VI-7)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \quad \text{cNA} \\   \quad   \\ \text{S} \quad \text{S} \\   \quad   \\ \text{ANc}-\text{S}-\text{B}-\text{L}-\text{B}-\text{S}-\text{cNA} \\   \quad   \\ \text{cNA} \quad \text{cNA} \end{array}$ (VI-8)	$\begin{array}{c} \text{ANc} \quad \text{cNA} \\   \quad   \\ \text{S} \quad \text{S} \\   \quad   \\ \text{ANc}-\text{S}-\text{B}-\text{L}-\text{B}-\text{S}-\text{cNA} \\   \quad   \\ \text{cNA} \quad \text{cNA} \end{array}$ (VI-9)

10

20

## 【0257】

ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-1)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-2)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-3)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-4)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-5)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-6)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-7)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-8)の構造である。ある実施形態では、式(VI)の化合物は、式(VI-9)の構造である。

30

## 【0258】

ある実施形態では、式(VI)（例えば、式(VI-1)～(VI-9)を含む）の化合物、各cNAは、独立して、少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含む。ある実施形態では、各cNAは、独立して、化学修飾されたヌクレオチドからなる。

40

## 【0259】

ある実施形態では、送達系は、n個の治療用核酸(NA)をさらに含み、各NAは、アレル多型を含む遺伝子の領域と実質的に相補的な相補性の領域を含み、アンチセンス鎖は、アレル多型と相補的である、5'末端から2～7位にある一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド；及び遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、SNP位置ヌクレオチドから2～11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む。例示的な実施形態では、SNP位置ヌクレオチドは、5'末端から2、4又は6位にあり、及びミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチドから2～6ヌクレオチドに位置する。また、各NAは、少なくとも1つのcNAにハイブリダイズされる。一実施形態では、送達系は、2個のNAで構成される。別の実施形態では、送達系は、3個のN

50

Aで構成される。別の実施形態では、送達系は、4個のNAで構成される。別の実施形態では、送達系は、5個のNAで構成される。別の実施形態では、送達系は、6個のNAで構成される。別の実施形態では、送達系は、7個のNAで構成される。別の実施形態では、送達系は、8個のNAで構成される。

【0260】

ある実施形態では、各NAは、独立して、少なくとも16個の連続したヌクレオチドを含む。ある実施形態では、各NAは、独立して、16~20個の連続したヌクレオチドを含む。ある実施形態では、各NAは、独立して、16個の連続したヌクレオチドを含む。別の実施形態では、各NAは、独立して、17個の連続したヌクレオチドを含む。別の実施形態では、各NAは、独立して、18個の連続したヌクレオチドを含む。別の実施形態では、各NAは、独立して、19個の連続したヌクレオチドを含む。別の実施形態では、各NAは、独立して、20個の連続したヌクレオチドを含む。

10

【0261】

ある実施形態では、各NAは、少なくとも2個のヌクレオチドの不对オーバーハングを含む。別の実施形態では、各NAは、少なくとも3個のヌクレオチドの不对オーバーハングを含む。別の実施形態では、各NAは、少なくとも4個のヌクレオチドの不对オーバーハングを含む。別の実施形態では、各NAは、少なくとも5個のヌクレオチドの不对オーバーハングを含む。別の実施形態では、各NAは、少なくとも6個のヌクレオチドの不对オーバーハングを含む。ある実施形態では、オーバーハングのヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して連結される。

20

【0262】

ある実施形態では、各NAは、独立して、DNA、siRNA、アンタゴmiR、miRNA、ギャップマー、ミックスマー又はガイドRNAからなる群から選択される。一実施形態では、各NAは、独立して、DNAである。別の実施形態では、各NAは、独立して、アンタゴmiRである。別の実施形態では、各NAは、独立して、miRNAである。別の実施形態では、各NAは、独立して、ギャップマーである。別の実施形態では、各NAは、独立して、ミックスマーである。別の実施形態では、各NAは、独立して、ガイドRNAである。ある実施形態では、各NAは、同じである。ある実施形態では、各NAは、同じではない。

【0263】

ある実施形態では、n個の治療用核酸(NA)をさらに含む送達系は、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。一実施形態では、送達系は、2個の治療用核酸(NA)をさらに含む、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。別の実施形態では、送達系は、3個の治療用核酸(NA)をさらに含む、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。一実施形態では、送達系は、4個の治療用核酸(NA)をさらに含む、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。一実施形態では、送達系は、5個の治療用核酸(NA)をさらに含む、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。一実施形態では、送達系は、6個の治療用核酸(NA)をさらに含む、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。一実施形態では、送達系は、7個の治療用核酸(NA)をさらに含む、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。一実施形態では、送達系は、8個の治療用核酸(NA)をさらに含む、本明細書に記載される式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)及びその実施形態から選択される構造を有する。

30

40

【0264】

50

一実施形態では、送達系は、構造 L 1 又は L 2 のリンカーをさらに含む式 ( I )、( I I )、( I I I )、( I V )、( V )、( V I ) から選択される構造を有し、R は、R 3 であり、及び n は、2 である。別の実施形態では、送達系は、構造 L 1 のリンカーをさらに含む式 ( I )、( I I )、( I I I )、( I V )、( V )、( V I ) から選択される構造を有し、R は、R 3 であり、及び n は、2 である。別の実施形態では、送達系は、構造 L 2 のリンカーをさらに含む式 ( I )、( I I )、( I I I )、( I V )、( V )、( V I ) から選択される構造を有し、R は、R 3 であり、及び n は、2 である。

#### 【 0 2 6 5 】

#### 医薬組成物及び投与の方法

一態様において、本明細書では、治療有効量の、本明細書に記載されるとおりの 1 つ以上の化合物、オリゴヌクレオチド又は核酸及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。一実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるとおりの 1 つ以上の二重鎖の化学修飾された核酸及び薬学的に許容される担体を含む。特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるとおりの 1 つの二重鎖の化学修飾された核酸及び薬学的に許容される担体を含む。別の特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるとおりの 2 つの二重鎖の化学修飾された核酸及び薬学的に許容される担体を含む。

#### 【 0 2 6 6 】

特定の実施形態では、医薬組成物は、ヘテロ接合型 S N P 変異体タンパク質をコードする遺伝子の領域であって、アレル多型を含む前記領域と相補的な約 1 5 ~ 3 5 個のヌクレオチドを含む二重鎖 R N A 分子及び第 1 の鎖と相補的な約 1 5 ~ 3 5 個のヌクレオチドを含む第 2 の鎖を含み、d s R N A 分子は、アレル多型の位置にないミスマッチ；及び d s R N A 分子の中心にない多型に対応するミスマッチ及びヌクレオチドを含む。

#### 【 0 2 6 7 】

ある実施形態では、ミスマッチは、アレル多型に対応するヌクレオチドの 4 ヌクレオチド上流、3 ヌクレオチド上流、アレル多型に対応するヌクレオチドの 2 ヌクレオチド上流、アレル多型に対応するヌクレオチドの 1 ヌクレオチド上流、1 ヌクレオチド下流、アレル多型に対応するヌクレオチドの 2 ヌクレオチド下流、アレル多型に対応するヌクレオチドの 3 ヌクレオチド下流、アレル多型に対応するヌクレオチドの 4 ヌクレオチド下流又はアレル多型に対応するヌクレオチドの 5 ヌクレオチド下流である。ある種の実施形態では、ミスマッチは、アレル多型に対応するヌクレオチドに隣接しない。

#### 【 0 2 6 8 】

医薬組成物の別の実施形態では、二重鎖 R N A は、5 ' 末端から 2、3、4、5 又は 6 位にあるアレル多型に対応するヌクレオチドを含む。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 2 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 3 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 4 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 5 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 6 位にある。

#### 【 0 2 6 9 】

医薬組成物のある実施形態では、二重鎖 R N A は、アレル多型、例えばヘテロ接合型 S N P を有する変異体アレルを選択的にサイレンシングする。医薬組成物のある実施形態では、二重鎖 R N A は、アレル多型を有する変異体アレルをサイレンシングし、同じ遺伝子の野生型アレルに影響を及ぼさない。医薬組成物の別の実施形態では、本明細書で提供される二重鎖 R N A は、アレル多型を有する変異体アレルをサイレンシングし、変異体アレルより低い程度まで同じ遺伝子の野生型アレルをサイレンシングする。

#### 【 0 2 7 0 】

本発明の医薬組成物は、その目的の投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口、例えば静脈内 ( I V )、皮内、皮下 ( S C 又は S Q )、腹腔内、筋肉内、経口 (例えば、吸入)、経皮 (局所) 及び経粘膜投与が挙げられる。非経口、皮内又は皮下適用のために使用される溶液又は懸濁液は、以下の成分：注射用水、生理食塩

10

20

30

40

50

水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩などの緩衝液及び塩化ナトリウム又はブドウ糖などの浸透圧の調整用薬剤を含み得る。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整され得る。非経口製剤は、アンプル、ディスポーザブルシリンジ又はガラス若しくはプラスチック製の複数回投与バイアル内に封入され得る。

#### 【0271】

注射用途に好適な医薬組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散体及び注射用滅菌溶液又は分散体の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与のために好適な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany, N.J.）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合、組成物は、無菌でなければならず、また容易に注射できる程度の流体でなければならない。それは、製造及び貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液状ポリエチレングリコールなど）及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散体の場合に必要とされる粒径の維持及び界面活性剤の使用により維持され得る。微生物作用の予防は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張化剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムを含むことが望ましいであろう。注射可能な組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含むことによりもたらされ得る。

#### 【0272】

注射用滅菌溶液は、必要に応じて上に列挙された成分の1つ又は組合せによる適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を組み込み、その後、滅菌濾過を施すことによって調製され得る。一般に、分散体は、塩基性分散媒体及び上に列挙されたものに由来する必要な他の成分を含有する無菌溶媒に活性化化合物を組み込むことにより調製される。注射用滅菌溶液の調製のための滅菌粉末の場合、典型的な調製方法は、活性成分及び任意の追加の所望の成分の粉末を、予め滅菌濾過されたそれらの溶液から生成する真空乾燥及びフリーズドライである。

#### 【0273】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、ヒトで使用するための投与量の範囲を構築する際に使用され得る。そのような化合物の投与量は、通常、毒性がほとんど又は全くなく、ED50を含む循環濃度の範囲内にあるべきである。投与量は、用いられる剤形及び利用される投与経路に応じてこの範囲内で変化し得る。本発明の方法で使用される任意の化合物のために、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから概算することができる。用量は、細胞培養で決定されるとおりのEC50（すなわち最大半量の応答を達成する試験化合物の濃度）を含む循環する血漿中の濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて構築され得る。このような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定され得る。

#### 【0274】

##### 治療方法

本発明は、アレル多型（例えば、ヘテロ接合型SNP）によって全体的に又は部分的に引き起こされる疾患又は障害のリスクのある（又はそれになりやすい）対象を治療する予防的且つ治療的方法の両方を提供する。一実施形態では、疾患又は障害は、トリヌクレオチドリピート疾患又は障害である。別の実施形態では、疾患又は障害は、ポリグルタミン障害である。ある実施形態では、方法は、治療有効量の、本明細書で提供される二重鎖R

N A 分子を投与することを含む。ある実施形態では、疾患又は障害は、ハンチンチンの発現と関連する障害であり、且つハンチンチンの改変、特に C A G リピートのコピー数の増幅がハンチンチン遺伝子（構造又は機能）又はハンチンチンタンパク質（構造又は機能又は発現）の欠損をもたらし、その結果、臨床症状は、ハンチントン病患者に見られるものを含む。

【 0 2 7 5 】

方法の実施形態では、本明細書で開示される二重鎖 R N A は、アレル多型に対応するヌクレオチドに対する特定の位置での 1 つのミスマッチオリゴヌクレオチドを除いて、アレル多型に対して相同である。ある種の実施形態では、ミスマッチは、アレル多型に対応するヌクレオチドの約 6 ヌクレオチド以内、アレル多型に対応するヌクレオチドの約 5 ヌクレオチド以内、アレル多型に対応するヌクレオチドの約 4 ヌクレオチド以内、アレル多型に対応するヌクレオチドの約 3 ヌクレオチド以内、アレル多型に対応するヌクレオチドの約 2 ヌクレオチド以内又はアレル多型に対応するヌクレオチドの約 1 ヌクレオチド以内にある。特定の例示的な実施形態では、ミスマッチは、アレル多型に対応するヌクレオチドに隣接しない。

10

【 0 2 7 6 】

方法の別の実施形態では、二重鎖 R N A は、5 ' 末端から 2、3、4、5 又は 6 位にあるアレル多型に対応するヌクレオチドを含む。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 2 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 3 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 4 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 5 位にある。ある実施形態では、アレル多型に対応するヌクレオチドは、5 ' 末端から 6 位にある。

20

【 0 2 7 7 】

方法のある実施形態では、d s R N A は、5 ' 末端から 6 位にある多型に対応するヌクレオチド及び 5 ' 末端から 1 1 位にあるミスマッチを含む。方法のある実施形態では、d s R N A は、5 ' 末端から 4 位にある多型に対応するヌクレオチド及び 5 ' 末端から 7 位にあるミスマッチを含む。

【 0 2 7 8 】

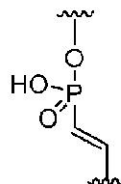
方法の別の実施形態では、二重鎖 R N A は、アレル多型を有する変異体アレルを選択的にサイレンシングする。ある実施形態では、二重鎖 R N A は、アレル多型を有する変異体アレルをサイレンシングし、同じ遺伝子の野生型アレルに影響を及ぼさない。別の実施形態では、二重鎖 R N A は、アレル多型を有する変異体アレルをサイレンシングし、変異体アレルより低い程度まで同じ遺伝子の野生型アレルをサイレンシングする。

30

【 0 2 7 9 】

方法のある実施形態では、d s R N A は、1 つ以上の V P サブユニット間結合修飾を含み、サブユニット間結合は、以下の式：

【 化 3 3 】



40

を有する。

【 0 2 8 0 】

追加の実施形態では、d s R N A は、図 4 3 に示されるサブユニット間結合修飾の 1 つ以上を含む。

【 0 2 8 1 】

50

本明細書で使用する場合、「治療」又は「治療すること」は、疾患若しくは障害、疾患若しくは障害の症状又は疾患に対する素因を治癒させるか、治すか、軽減するか、緩和するか、変化させるか、矯正するか、寛解させるか、改善するか又は影響を及ぼすための、患者への治療剤（例えば、RNA剤又はベクター又はそれをコードする導入遺伝子）の適用又は投与或いは疾患若しくは障害、疾患若しくは障害の症状又は疾患若しくは障害に対する素因を有する患者に由来する単離された組織又は細胞株への治療剤の適用又は投与として定義される。

【0282】

一態様では、本発明は、対象において、上記のとおり疾患又は障害を、対象に治療剤（例えば、RNA剤又はベクター又はそれをコードする導入遺伝子）を投与することによって予防するための方法を提供する。疾患のリスクのある対象は、例えば、本明細書に記載されるとおりの診断又は予後アッセイのいずれか又は組合せによって同定され得る。予防剤の投与は、疾患又は障害の症状の特徴の顕在化前に行うことができ、その結果、疾患又は障害が予防されるか、又は代わりにその進行が遅延される。

10

【0283】

本発明の別の態様は、対象を治療的に治療する方法に関し、すなわち疾患又は障害の症状の発症を変化させる。例示的な実施形態では、本発明の調節的な方法は、機能獲得変異体を発現する細胞を、遺伝子内の1つ以上の標的配列に特異的な治療剤（例えば、RNA剤又はベクター又はそれをコードする導入遺伝子）と接触させることを含み、その結果、遺伝子による配列特異的な干渉が果たされる。これらの方法は、インビトロで（例えば、細胞を薬剤とともに培養することによって）又は代わりにインビボで（例えば、対象に薬剤を投与することによって）実施され得る。

20

【0284】

神経細胞への取込みの増強のために修飾されたRNAサイレンシング剤は、体重1kg当たり約1.4mg未満又は体重1kg当たり10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005若しくは0.00001mg未満及び体重1kg当たり200nmole未満のRNA剤（例えば、約 $4.4 \times 10^{16}$ コピー）又は体重1kg当たり1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075若しくは0.00015nmole未満のRNAサイレンシング剤の単位用量で投与され得る。単位用量は、例えば、注射（例えば、静脈内又は筋肉内、髄腔内又は脳への直接的な）、吸入投与又は局所適用によって投与され得る。例示的な実施形態では、投与量は、2、1又は0.1mg/体重のkg未満である。

30

【0285】

RNAサイレンシング剤の器官への直接的な（例えば、脳への直接的な）送達は、1器官当たり約0.00001mg～約3mg又は1器官当たり約0.0001～0.001mg、1器官当たり約0.03～3.0mg、1器官当たり約0.1～3.0mg若しくは1器官当たり約0.3～3.0mgの程度の投与量であり得る。投与量は、神経疾患又は障害（例えば、ハンチントン病）を治療又は予防するのに有効な量であり得る。一実施形態では、単位用量は、1日1回よりも少ない頻度、例えば2日、4日、8日又は30日毎よりも少ない頻度で投与される。別の実施形態では、単位用量は、ある頻度で投与されない（例えば、規則的な頻度ではない）。例えば、単位用量は、1回投与され得る。一実施形態では、有効用量は、他の従来の治療モダリティーとともに投与される。

40

【0286】

一実施形態では、対象は、初回用量及び1回以上の維持用量のRNAサイレンシング剤を投与される。維持用量は、一般に、初回用量未満、例えば初回用量の2分の1未満である。維持レジメンは、1日当たり0.01 $\mu$ g～1.4mg/体重のkgの範囲の用量、例えば1日当たり体重の1kg当たり10、1、0.1、0.01、0.001又は0.00001mgで対象を治療することを含み得る。維持用量は、通常、5、10又は30

50

日毎に1回以下投与される。さらに、治療レジメンは、特定の疾患、その重症度及び患者の全体的な状態の性質に依存して変動することになる期間にわたって続き得る。特定の実施形態では、投与量は、1日当たり1回以下、例えば24、36又は48時間以上当たり1回以下、例えば5又は8日毎に1回以下送達され得る。治療後、患者は、患者の状態の変化及び病状の症状の軽減についてモニターされ得る。化合物の投与量は、患者が目下の投与量レベルに著しく応答しない場合に増加され得るか、又は病状の症状の軽減が観察される場合、病状が切除された場合若しくは望ましくない副作用が観察される場合に用量を減少させ得る。

【0287】

#### ハンチントン病

本発明のある種の態様では、RNAサイレンシング剤は、ハンチントン病の治療のために変異体ヒトハンチンチンタンパク質(htt)における多型(例えば、ヘテロ接合型一塩基多型)を標的化するために設計される。したがって、別の態様において、本明細書では、ハンチントン病を治療又は処置する方法であって、そのような治療又は処置を必要とする患者に、治療有効量の、本明細書に記載されるとおりの化合物、オリゴヌクレオチド若しくは核酸又は前記化合物、オリゴヌクレオチド若しくは核酸を含む医薬組成物を投与することを含む方法が提供される。

【0288】

常染色体優性疾患として遺伝されるハンチントン病は、認知障害及び運動疾患を引き起こす。飢餓又は感染症による若年死亡前に、患者は、重度の衰弱を伴って10年以上生存できる。疾患は、ほとんどの症例では30代又は40代で発症するが、一部の患者は10代で疾患を発症する。ハンチントン病の遺伝的変異は、ハンチンチン遺伝子における伸長したCAGリピートである。CAGリピートは、正常な個体において8~35コピーの数でばらつきがある(Kremer et al., 1994)。遺伝的変異(例えば、正常なハンチンチン遺伝子における36個未満から疾患における36個超へのCAGリピートの長さの増大)は、36個を超える連続したポリグルタミン残基を有する変異体ハンチンチンタンパク質の合成と関連する(Aronin et al., 1995)。一般に、36以上のCAGリピートを有する個体は、ハンチントン病に罹ることになる。根底にある変異として伸長したCAGを有する20もの他の疾患の原型となっているハンチントン病は、依然として有効な療法がない。様々な介入(アポトーシス経路の妨害、ミトコンドリア効率をブーストする試薬の添加及びNMDA受容体の遮断など)がハンチントン病の細胞培養及びマウスモデルにおいて有望であることが示されている。しかしながら、最良でも、これらの手法は、細胞又は動物の生存時間の短い延長を示す。

【0289】

ハンチントン病につながる疾患遺伝子は、ハンチンチン又は(htt)と呼ばれる。ハンチンチン座位は、180kbの広い範囲に及び、67個のエクソンからなる。ハンチンチン遺伝子は、広範に発現され、正常な発生に必要となる。それは、様々な胎児及び成体組織において異なる相対的存在量を示す2種類の選択的にポリアデニル化された形態として発現される。大きい方の転写物は、およそ13.7kbであり、主に成体及び胎児の脳において発現される一方、およそ10.3kbの小さい方の転写物は、より広範に発現される。2種類の転写物は、それらの3'非翻訳領域に関して異なる(Lin et al., 1993)。両方のメッセージは、3144アミノ酸を含有する348キロダルトンのタンパク質をコードすると予測される。ハンチントン病を引き起こす遺伝的異常は、mRNAに対して新たな特性を付与するか又はタンパク質の機能を改変すると考えられる。

【0290】

ハンチントン病は、遺伝学のセントラルドグマに従う：変異体遺伝子は、変異体mRNAの産生のための鋳型として機能し；次に、変異体mRNAは、変異体タンパク質の合成を誘導する(Aronin et al., 1995; DiFiglia et al., 1997)。変異体ハンチンチン(タンパク質)は、線条体及び皮質中の選択性ニューロンにおいて蓄積し、未決定の細胞活性を妨害し、且つ神経細胞の機能障害及び死を引き起

10

20

30

40

50

こす可能性がある (Aronin et al., 1999; Laforet et al., 2001)。変異体遺伝子の単一コピーが、ハンチントン病を引き起こすのに十分であるため、最も簡潔な治療は、変異体遺伝子を無効にするであろう。理論的な手法は、変異体ハンチンチンの遺伝子転写を止めること、変異体 mRNA を破壊すること及び翻訳を遮断することを含み得る。各々は、変異体ハンチンチンの消失という同じ帰結を有する。

【0291】

ハンチントン SNP

ある種の例示的な実施形態に従って標的化するのに好適なハンチンチン遺伝子配列における例示的な SNP は、下の表 4 に開示される。各 SNP 部位に関するゲノム配列は、例えば、NCBI によって維持される公的に利用可能な「SNP Entrez」データベースにおいて見出すことができる。HD 患者に関する各 SNP 部位についてのヘテロ接合性の頻度及び対照 DNA は、表 4 においてさらに示される。頻度の高いヘテロ接合型 SNP の組合せを標的化することにより、比較的少ない数のアレル特異的 RNA サイレンシング剤を使用して、HD 集団における高い割合の個体の治療が可能になる。

【0292】

【表 4】

表 4. htt SNP.

rs363125	ORF, エクソン39	11.00%	GTTAAGAGATGGGGACAGT A[A/C]TTCAACGCTAGAA GAACACA(配列番号1)
rs362273	ORF, エクソン57	35.20%	AGCCACGAGAAGCTGCTGC T[A/G]CAGATCAACCCCG AGCGGGA(配列番号2)
rs362307	3' UTR, エクソン67	48.60%	CCGGAGCCTTTGGAAGTCT G[C/T]GCCCTTGTGCCCT GCCTCCA(配列番号3)
rs362336	ORF, エクソン48	37.40%	CAGCCCGAGCTGCCTGCAG A[A/G]CCGGCGGCTACT GGAGCAA(配列番号4)
rs362331	ORF, エクソン50	39.40%	CCCACGCCTGCTCCCTCAT C[C/T]ACTGTGTGCACTT CATCCTG(配列番号5)
rs362272	ORF, エクソン61	36.10%	GGGTGGAGCCCTGCACGG C[A/G]TCCTCTATGTGCT GGAGTGC(配列番号6)
rs362306	3' UTR, エクソン67	35.80%	CTGCTGGTTGTTGCCAGGT T[A/G]CAGCTGCTCTTGC ATCTGGG(配列番号7)
rs362268	3' UTR, エクソン67	35.80%	TCCTCCCTCCTGCAGGCTG G[C/G]TGTTGGCCCTST GCTGTCC(配列番号8)
rs362267	3' UTR, エクソン67	35.50%	GATTTGGGAGCTCTGCTTG C[C/T]GACTGGCTGTGAG ACGAGGC(配列番号9)
rs363099	ORF, エクソン29	35.80%	GAAAAGTTTGGAGGGTTTC T[C/T]CGCTCAGCCTTGG ATGTTCT(配列番号10)

【0293】

一実施形態では、本発明の RNA サイレンシング剤は、表 4 に列挙される SNP 部位の 1 つ以上を標的化できる。一実施形態では、本発明の RNA サイレンシング剤は、ハンチンチン mRNA の rs363125 SNP 部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明の RNA サイレンシング剤は、ハンチンチン mRNA の rs362273 SNP 部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明の RNA サイレンシング剤は、ハンチンチン mRNA の rs362307 SNP 部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明の RNA サイレンシング剤は、ハンチンチン mRNA の rs362336 SNP 部位を

標的化できる。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ハンチンチンmRNAのrs362331 SNP部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ハンチンチンmRNAのrs362272 SNP部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ハンチンチンmRNAのrs362306 SNP部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ハンチンチンmRNAのrs362268 SNP部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ハンチンチンmRNAのrs362267 SNP部位を標的化できる。別の実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、ハンチンチンmRNAのrs363099 SNP部位を標的化できる。いくつかの実施形態では、RNAサイレンシング剤によって標的化されるSNP部位は、ハンチントン病と関連する。特定の例示的な実施形態では、RNAサイレンシング剤によって標的化されるSNP部位は、ハンチントン病と著しく関連する。

10

【0294】

追加の例示的な実施形態では、RNAサイレンシング剤は、表5～7の配列の1つ以上を含む。

【0295】

【表5】

HTT SNP	化合物名	SNP位置	追加のミスマッチ位置	配列	
				アンチセンス鎖	センス鎖
rs362273	SNP2-7	2	7	UUAGCAUCAGCUUCUCGUGG	AGAAGCUGCUGCUAA
rs362273	SNP4-7	4	7	UUGUAGUAGCAGCUUCUCGU	AAGCUGCUGCUACAA
rs362273	SNP4-8	4	8	UUGUAGCUGCAGCUUCUCGU	AAGCUGCUGCUACAA
rs362273	SNP4-15	4	15	UUGUAGCAGCAGCUACUCGU	AAGCUGCUGCUACAA
rs362273	SNP6-5A	6	5	UUCUAUAGCAGCAGCUUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273	SNP6-8	6	8	UUCUGUAUCAGCAGCUUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273	SNP6-11	6	11	UUCUGUAGCAUCAGCUUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273	SNP6-14	6	14	UUCUGUAGCAGCAUCUUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273	SNP6-16	6	16	UUCUGUAGCAGCAGCAUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362307	SNP3-5G	3	5	UCGCGGACUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAGUCCGCGA
rs362307	SNP3-7G	3	7	UCGCAGGCUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAGCCUGCGA
rs362307	SNP3-8	3	8	UCGCAGAUUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAAUCUGCGA

DNA分子において、UはTと置き換えられ得る

20

30

40

表5

【0296】

50

【表 6】

目的のSNP	化合物名	snp部位に隣接する siRNA配列の説明	追加の mismatches 位置	アンチセンス鎖	センス鎖
rs362273 (A)	SNP2-7	2	7	UUAGCAUCAGCUUCUCGUGG	AGAAGCUGCUGCUAA
rs362273 (A)	SNP4-7	4	7	UUGUAGUAGCAGCUUCUCGU	AAGCUGCUGCUACAA
rs362273 (A)	SNP4-8	4	8	UUGUAGCUGCAGCUUCUCGU	AAGCUGCUGCUACAA
rs362273 (A)	SNP4-15	4	15	UUGUAGCAGCAGCUACUCGU	AAGCUGCUGCUACAA
rs362273 (A)	SNP6-5A	6	5	UUCUUAUAGCAGCAGCUUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273 (A)	SNP6-8	6	8	UUCUGUAUCAGCAGCUUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273 (A)	SNP6-11	6	11	UUCUGUAGCAUCAGCUUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273 (A)	SNP6-14	6	14	UUCUGUAGCAGCAUCUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362273 (A)	SNP6-16	6	16	UUCUGUAGCAGCAGCAUCUC	GCUGCUGCUACAGAA
rs362307 (C')	SNP3-5G	3	5	UCGCGGACUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAGUCCGCGA
rs362307 (C')	SNP3-7G	3	7	UCGCAGGCUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAGCCUGCGA
rs362307 (C')	SNP3-8	3	8	UCGCAGAUUJCCAAAGGCUC	UUUGGAAAUCUGCGA

表6

【 0 2 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 7】

目的のSNP	snpに隣接する siRNA配列の説明		追加の ミスマッチ 位置	アンチセンス鎖	センス鎖
	化合物名	snp 位置			
rs362273 (G)	SNP2-7	2	7	UCAGCAUCAGCUUCUCGUGG	AGAAGCUGCUGCUGA
rs362273 (G)	SNP4-7	4	7	UUGCAGUAGCAGCUUCUCGU	AAGCUGCUGCUGCAA
rs362273 (G)	SNP4-8	4	8	UUGCAGCUGCAGCUUCUCGU	AAGCUGCUGCUGCAA
rs362273 (G)	SNP4-15	4	15	UUGCAGCAGCAGCUACUCGU	AAGCUGCUGCUGCAA
rs362273 (G)	SNP6-5A	6	5	UUCUACAGCAGCAGCUUCUC	GCUGCUGCUGCAGAA
rs362273 (G)	SNP6-8	6	8	UUCUGCAUCAGCAGCUUCUC	GCUGCUGCUGCAGAA
rs362273 (G)	SNP6-11	6	11	UUCUGCAGCAUCAGCUUCUC	GCUGCUGCUGCAGAA
rs362273 (G)	SNP6-14	6	14	UUCUGCAGCAGCAUCUUCUC	GCUGCUGCUGCAGAA
rs362307 (T)	SNP3-5G	3	5	UCACGGACUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAGUCCUGUA
rs362307 (T)	SNP3-7G	3	7	UCACAGGCUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAGCCUGUA
rs362307 (T)	SNP3-8	3	8	UCACAGAUUUCCAAAGGCUC	UUUGGAAAUCUGUA

10

20

表7

30

【0298】

核酸を送達する方法

本発明のRNAサイレンシング剤は、細胞（例えば、神経細胞）（すなわち細胞内に）に直接的に導入され得るか；又は生物体の腔、組織間隙、循環へと細胞外に導入され得るか、経口的に導入され得るか、又は核酸を含有する溶液中に細胞又は生物体を浸すことによって導入され得る。血管性又は血管外循環である血液又はリンパ系及び脳脊髄液は、核酸が導入され得る部位である。

【0299】

本発明のRNAサイレンシング剤は、核酸を含有する溶液の注射、核酸によって覆われた粒子による照射、核酸の溶液中での細胞又は生物体の浸漬又は核酸の存在下での細胞膜のエレクトロポレーションを含む、当技術分野で知られる核酸送達方法を使用して導入され得る。脂質に媒介される担体輸送、化学物質に媒介される輸送及びリン酸カルシウムなどのカチオン性リポソームトランスフェクションなどの核酸を細胞に導入するための、当技術分野において知られる他の方法が使用され得る。核酸は、次の活性：細胞による核酸取込みの増強又は別の方法による標的遺伝子の障害の増大の1つ以上を発揮する他の成分とともに導入され得る。

40

【0300】

核酸を導入する物理的な方法は、RNAを含有する溶液の注射、RNAによって覆われた粒子による照射、RNAの溶液中での細胞又は生物体の浸漬又はRNAの存在下での細

50

胞膜のエレクトロポレーションを含む。ウイルス粒子にパッケージ化されたウイルスコンストラクトは、発現コンストラクトの細胞への効率的な導入及び発現コンストラクトによってコードされるRNAの転写の両方を達成するであろう。脂質に媒介される担体輸送、リン酸カルシウムなどの化学物質ISに媒介される輸送などの核酸を細胞に導入するための、当技術分野において知られる他の方法が使用され得る。したがって、RNAは、次の活性：細胞によるRNA取込みの増強、一本鎖のアニーリングの阻害、一本鎖の安定又は別の方法による標的遺伝子の阻害の増大の1つ以上を発揮する成分とともに導入され得る。

#### 【0301】

RNAは、細胞（すなわち細胞内に）に直接的に導入され得るか、又は生物体の腔、組織間隙、循環へと細胞外に導入され得るか、経口的に導入され得るか、又はRNAを含有する溶液中に細胞又は生物体を浸すことによって導入され得る。血管性又は血管外循環である血液又はリンパ系及び脳脊髄液は、RNAが導入され得る部位である。

10

#### 【0302】

標的遺伝子を有する細胞は、生殖系列又は体細胞、分化全能性又は多能性、分裂又は非分裂、実質又は上皮、不死化又は形質転換したものなどに由来し得る。細胞は、幹細胞又は分化細胞であり得る。分化される細胞型としては、脂肪細胞、線維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮、ニューロン、グリア、血液細胞、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、白血球、顆粒球、角化細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞及び内分泌腺又は外分泌腺の細胞が挙げられる。

#### 【0303】

特定の標的遺伝子及び送達される二重鎖RNA材料の用量に依存して、このプロセスは、標的遺伝子の機能の部分的喪失又は完全喪失をもたらし得る。標的化される細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%又は99%以上における遺伝子発現の低減又は喪失が典型的である。遺伝子発現の阻害は、標的遺伝子に由来するタンパク質及び/又はmRNA産物のレベルの欠如（又は観察可能な減少）を指す。特異性は、細胞の他の遺伝子に対して明らかな影響を及ぼさずに標的遺伝子を阻害する能力を指す。阻害の結果は、細胞又は生物体の外面的な特性の試験（実施例において下に示されるとおり）によって又はRNA溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイによる遺伝子発現のモニタリング、抗体結合、酵素結合免疫吸着測定（ELISA）、ウエスタンブロッティング、放射性免疫測定法（RIA）、他のイムノアッセイ、蛍光活性化細胞分析（FACS）などの生化学的手法によって確認され得る。

20

30

#### 【0304】

細胞株又は生物体全体におけるRNA媒介性の阻害に関して、遺伝子発現は、タンパク質産物が容易にアッセイされるレポーター又は薬剤耐性遺伝子の使用によって便利にアッセイされる。そのようなレポーター遺伝子としては、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHS）、アルカリホスファターゼ（AP）、ベータガラクトシダーゼ（LacZ）、ベータグルコニダーゼ（GUS）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼ（Luc）、ノパリンシンターゼ（NOS）、オクトピンシンターゼ（OCS）及びその誘導体が挙げられる。アンピシリン、プレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキセート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシン及びテトラサイクリンに対する抵抗性を与える複数の選択マーカーが利用可能である。アッセイに依存して、遺伝子発現の量の定量化により、本発明に従って治療されない細胞と比較して10%、33%、50%、90%、95%又は99%より大きい阻害の程度を決定することが可能になる。注射される材料の用量が少ないほど及びRNAi剤の投与後の時間が長いほど、より少ない割合の細胞の阻害がもたらされ得る（例えば、標的化される細胞の少なくとも10%、20%、50%、75%、90%又は95%）。細胞における遺伝子発現の量子化は、標的mRNAの蓄積又は標的タンパク質の翻訳のレベルでより少ない量の阻害を示し得る。例として、阻害

40

50

の効率は、細胞中の遺伝子産物の量を評価することによって決定され得る。mRNAは、阻害性二重鎖RNAのために使用される領域の外部にあるヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブで検出され得るか、又は翻訳されたポリペプチドは、その領域のポリペプチド配列に対して産生された抗体で検出され得る。

【0305】

RNAは、1細胞当たり少なくとも1つのコピーの送達を可能にする量で導入され得る。材料の用量が高いほど（例えば、1細胞当たり少なくとも5、10、100、500又は1000コピー）、より効率的な阻害をもたらし得；より低い用量も特定の適用のために有用である場合がある。

【0306】

特定の態様では、本発明のRNAi剤（例えば、変異体遺伝子における多型を標的化するsiRNA）の効力は、細胞、特にニューロン（例えば、線条体又は皮質神経細胞クローン株及び/又は一次ニューロン）における変異体mRNA（例えば、変異体htt mRNA及び/又は変異体ハンチンチンタンパク質の産生）を特異的に分解するその能力について試験される。他の容易にトランスフェクト可能な細胞、例えばHeLa細胞又はCOS細胞も、細胞に基づく検証アッセイに好適である。細胞は、ヒト野生型又は変異体cDNA（例えば、ヒト野生型又は変異体ハンチンチンcDNA）でトランスフェクトされる。U-ループmRNAからsiRNAを生成できる標準的なsiRNA、修飾siRNA又はベクターがコトランスフェクトされる。変異体mRNA（例えば、変異体ハンチンチンmRNA）及び/又は変異体タンパク質（例えば、変異体ハンチンチン）の選択的な減少が測定される。変異体mRNA又はタンパク質の減少は、正常なmRNA又はタンパク質のレベルと比較され得る。外因的に導入された正常なmRNA又はタンパク質（又は内在性の正常なmRNA若しくはタンパク質）は、比較目的のためにアッセイされ得る。標準的なトランスフェクション技術に対してある程度抵抗性であることが知られる神経細胞を利用する場合、受動的な取込みによってRNAi剤（例えば、siRNA）を導入することが望ましい場合がある。

【0307】

ある種の例示的な実施形態では、本発明のRNAi剤、例えばdsRNA剤を含む組成物は、様々な経路によって対象の神経系に送達され得る。例示的な経路としては、髄腔内、実質部（例えば、脳内）、経鼻及び眼球への送達が挙げられる。組成物は、例えば、静脈内、皮下又は筋肉内注射によっても全身的に送達され得、これは、RNAi剤、例えばdsRNA剤の末梢ニューロンへの送達に特に有用である。送達の例示的な経路は、脳、例えば脳の脳室若しくは視床下部への又は脳の側方若しくは背側領域への直接的なものである。神経細胞送達のためのRNAi剤、例えばdsRNA剤は、投与に好適な医薬組成物に組み込まれ得る。

【0308】

例えば、組成物は、RNAi剤、例えばdsRNA剤の1つ以上の種及び薬学的に許容される担体を含み得る。本発明の医薬組成物は、局所性又は全身性の治療が所望されるかどうかに依存して且つ治療されることになる領域に依存して、いくつかの様式で投与され得る。投与は、局所的（眼部、鼻腔内、経皮を含む）、経口又は非経口であり得る。非経口投与は、点滴静脈内注射、皮下、腹腔内若しくは筋肉内注射、髄腔内又は脳室内（例えば、側脳室内）投与を含む。ある種の例示的な実施形態では、本発明のRNAサイレンシング剤は、本明細書に記載される様々な好適な組成物及び方法を使用して、血液脳関門（BBB）を通して送達される。

【0309】

送達の経路は、患者の障害に依存し得る。例えば、ハンチントン病と診断された対象は、本発明の抗httRNAi剤、例えばdsRNA剤を脳に（例えば、基底核の淡蒼球又は線条体及び線条体の中型有棘ニューロンの近傍に）直接的に投与され得る。本発明のRNAサイレンシング剤に加えて、患者は、第2の療法、例えば対症療法及び/又は疾患特異的療法を施され得る。第2の療法は、例えば、対症（例えば、症状を軽減するため）、

10

20

30

40

50

神経保護（例えば、疾患進行を遅らせるか又は止めるため）又は回復性（例えば、疾患プロセスを元に戻すため）であり得る。ハンチントン病の治療のために、例えば、対症療法は、薬物のハロペリドール、カルバマゼピン又はバルプロ酸塩を含み得る。他の療法は、精神療法、理学療法、言語療法、コミュニケーション及び記憶の援助、社会支援サービス及び食餌の助言を含み得る。

【0310】

RNA剤、例えばdsRNA剤は、脳の神経細胞に送達され得る。血液脳関門を越える組成物の通過を必要としない送達方法が利用され得る。例えば、RNA剤、例えばdsRNA剤を含有する医薬組成物は、疾患に冒された細胞を含有する領域への直接的な注射によって患者に送達され得る。例えば、医薬組成物は、脳への直接的な注射によって送達され得る。注射は、脳の特定の領域（例えば、黒質、皮質、海馬、線条体又は淡蒼球）への定位的な注射によるものであり得る。RNA剤、例えばdsRNA剤は、中枢神経系の複数の領域（例えば、脳の複数の領域及び/又は脊髄）に送達され得る。RNA剤、例えばdsRNA剤は、脳の拡散した領域に送達され得る（例えば、脳の皮質への拡散した送達）。

10

【0311】

一実施形態では、RNA剤、例えばdsRNA剤は、カニューレ又は組織、例えば脳、例えば脳の黒質、皮質、海馬、線条体若しくは淡蒼球に移植された1つの末端を有する他の送達デバイスの方法によって送達され得る。カニューレは、RNA剤、例えばdsRNA剤のリザーバーに連結され得る。流動又は送達は、ポンプ、例えばAlzetポンプ（Durect, Cupertino, CA）などの浸透圧ポンプ又はミニポンプによって媒介され得る。一実施形態では、ポンプ及びリザーバーは、組織から離れた領域、例えば腹部に移植され、送達は、ポンプ又はリザーバーから放出部位に導く導管によって行われる。脳への送達のためのデバイスは、例えば、米国特許第6,093,180号明細書及び同第5,814,014号明細書において記載される。

20

【0312】

本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤は、血液脳関門を横切ることができるようさらに修飾され得る。例えば、RNA剤、例えばdsRNA剤は、薬剤が関門を横切ることが可能な分子にコンジュゲートされ得る。そのような修飾RNA剤、例えばdsRNA剤は、任意の所望の方法、例えば脳室内若しくは筋肉内注射又は肺性送達などによって投与され得る。

30

【0313】

ある種の実施形態では、エキソソームを使用して、本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤を送達する。エキソソームは、BBBを通過することができ、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、化学療法剤及びタンパク質を全身注射後にニューロンに特異的に送達することができる（Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*. 2011 Apr; 29(4): 341-5. doi: 10.1038/nbt.1807; El-Andalousi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ. (2011). Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc*. 2012 Dec; 7(12): 2112-26. doi: 10.1038/nprot.2012.131; El-Andalousi S, Maeger I, Breakefield XO, Wood MJ. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 May; 12(5): 347-57. doi: 10.1038/nr

40

50

d3978; El Andaloussi S, Lakhali S, Maeger I, Wood MJ. (2013). Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013 Mar; 65(3): 391-7. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.008を参照されたい)。

【0314】

ある種の実施形態では、1つ以上の親油性分子を使用して、本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤のBBBを越えた送達が可能になる(Alvarez-Ervit(2011))。次に、RNAサイレンシング剤は、例えば、親油性偽装物の酵素分解によって活性化されて、薬物をその活性形態に放出するであろう。

10

【0315】

ある種の実施形態では、1つ以上の受容体媒介性の透過性化合物を使用して、BBBの透過性を増加させて、本発明のRNAサイレンシング剤の送達を可能にすることができる。これらの薬物は、内皮細胞間の緊密な接合点をゆるめる血液中の浸透圧を増大させることによってBBBの透過性を一時的に増大させる(El-Andaloussi(2012))。緊密な接合点をゆるめることにより、RNAサイレンシング剤の通常の静脈内注射が実施され得る。

【0316】

ある種の実施形態では、ナノ粒子に基づく送達系を使用して、本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤を、BBBを越えて送達する。本明細書で使用する場合、「ナノ粒子」は、典型的には、固体、生分解性、コロイド系であり、薬物又は遺伝子担体として広く研究されている高分子ナノ粒子を指す(S.P. Egusquiaguirre, M. Igartua, R.M. Hernandez, and J.L. Pedraz, "Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research," *Clinical and Translational Oncology*, vol. 14, no. 2, pp. 83-93, 2012)。高分子ナノ粒子は、天然ポリマー及び合成ポリマーの2つの主要な部類に分類される。siRNA送達のための天然ポリマーとしては、シクロデキストリン、キトサン及びアテロコラーゲンが挙げられるが、これらに限定されない(Y. Wang, Z. Li, Y. Han, L.H. Liang, and A. Ji, "Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA in vivo," *Current Drug Metabolism*, vol. 11, no. 2, pp. 182-196, 2010)。合成ポリマーとしては、集中的に研究されてきたポリエチレンイミン(PEI)、ポリ(DL-ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)及びデンドリマーが挙げられるが、これらに限定されない(X. Yuan, S. Naguib, and Z. Wu, "Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 8, no. 4, pp. 521-536, 2011)。ナノ粒子及び他の好適な送達系の概説については、Jong-Min Lee, Tae-Jong Yoon, and Young-Seok Cho, "Recent Developments in Nanoparticle-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 782041, 10 pages, 2013. doi: 10.1155/2013/782041(全体が参照により組み込まれる)を参照されたい。

20

30

40

【0317】

本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤を眼球に投与して、例えば網膜障害、例えば網膜症を治療することができる。例えば、医薬組成物は、眼の表面又は近くの組織、例えば眼瞼の内部に適用され得る。それらは、例えば、噴霧により、液滴において、洗眼薬又は

50

軟膏剤として局所的に適用され得る。軟膏剤又は滴下可能な液体は、塗布器又は点眼容器など、当技術分野において知られる眼性送達系によって送達され得る。そのような組成物は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はポリ(ビニルアルコール)などの粘液模倣物、ソルビン酸、EDTA又は塩化ベンジルクロムなどの保存剤並びに通常の量の希釈剤及び/又は担体を含み得る。医薬組成物はまた、眼の内部に投与され得、且つ選択された領域又は構造にそれを導入できる針又は他の送達デバイスによって導入され得る。RNAサイレンシング剤を含有する組成物は、眼パッチを介しても適用され得る。

#### 【0318】

一般に、本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤は、任意の好適な方法によって投与され得る。本明細書で使用する場合、局所送達は、眼、粘膜、体腔の表面を含む身体の任意の表面又は任意の内表面へのRNA剤、例えばdsRNA剤の直接的な適用を指し得る。局所投与のための製剤は、経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、液滴、噴霧剤及び液体を含み得る。従来の医薬担体、水性、粉末又は油性基剤、増粘剤などが必要であるか又は望ましい場合がある。局所投与は、対象の表皮若しくは真皮又はその特定の層或いは根底にある組織にRNA剤、例えばdsRNA剤を選択的に送達する手段としても使用され得る。

10

#### 【0319】

髄腔内又は脳室内(例えば、側脳室内)投与のための組成物は、緩衝液、希釈剤及び他の好適な添加剤を含有し得る滅菌水溶液を含み得る。髄腔内又は脳室内投与のための組成物は、通常、例えばRNA剤、例えばdsRNA剤に結合した親油性部分のみならず、トランスフェクション試薬又は追加の親油性部分を含まない。

20

#### 【0320】

非経口投与のための製剤は、緩衝液、希釈剤及び他の好適な添加剤を含有し得る滅菌水溶液を含み得る。脳室内注射は、例えば、リザーバーに取り付けられた、脳室内カテーテルによって促進され得る。静脈内での使用のために、溶質の総濃度は、調製物を等張にするように制御されるべきである。

#### 【0321】

本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤は、肺性送達によって対象に投与され得る。肺性送達組成物は、分散体内の組成物が、肺胞領域を通して血液循環に直接的に容易に吸収され得る肺に到達できるように分散体の吸入によって送達され得る。肺性送達は、肺の疾患を治療する全身送達及び局所送達の両方にとって効率的であり得る。一実施形態では、肺性送達によって投与されるRNA剤、例えばdsRNA剤は、血液脳関門を横切ることができるように修飾されている。

30

#### 【0322】

肺性送達は、噴霧、エアロゾル化、ミセル及び乾燥粉末系製剤の使用を含む様々な手法によって行われ得る。送達は、液体噴霧器、エアロゾル系吸入器及び乾燥粉末分散デバイスにより行われ得る。定量デバイスが典型的である。噴霧器又は吸入器を使用する利点の1つは、デバイスが独立型であるため汚染の可能性が最小化されることである。乾燥粉末分散体デバイスは、例えば、乾燥粉末として容易に製剤化され得る薬物を送達する。RNAサイレンシング剤組成物は、単独で又は好適な粉末担体と組み合わせて凍結乾燥又は噴霧乾燥された粉末として安定的に保管され得る。吸入のための組成物の送達は、デバイスに組み込まれるとき、エアロゾル薬物の投与中の患者に対する用量の追跡、服薬遵守の監視及び/又は用量の誘発を可能にするタイマー、用量カウンター、時間測定デバイス又は時間表示器を含み得る投与タイミング要素によって媒介され得る。

40

#### 【0323】

担体として有用な医薬賦形剤の種類としては、ヒト血清アルブミン(HSA)などの安定剤、炭水化物などの充填剤、アミノ酸及びポリペプチド; pH調整剤又は緩衝液; 塩化ナトリウムなどの塩などが挙げられる。これらの担体は、結晶形態若しくは非結晶形態であり得るか、又はその2つの混合物であり得る。

50

## 【0324】

特に有用な充填剤としては、適合性の炭水化物、ポリペプチド、アミノ酸又はこれらの組合せが挙げられる。好適な炭水化物としては、ガラクトース、D-マンノース、ソルボースなどの単糖類；ラクトース、トレハロースなどの二糖類；2-ヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリンなどのシクロデキストリン；及びラフィノース、マルトデキストリン、デキストランなどの多糖類；マンニトール、キシリトールなどのアルジトールが挙げられる。炭水化物の例示的な基としては、ラクトース、トレハロース、ラフィノース、マルトデキストリン及びマンニトールが挙げられる。好適なポリペプチドとしては、アスパルテームが挙げられる。アミノ酸としては、アラニン及びグリシンが挙げられ、グリシンが典型的である。

10

## 【0325】

好適なpH調整剤又は緩衝液としては、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムなどの有機酸及び塩基（クエン酸ナトリウムが典型的である）から調製される有機酸塩が挙げられる。

## 【0326】

本発明のRNA剤、例えばdsRNA剤は、経口及び経鼻送達によって投与され得る。例えば、これらの膜を通して投与される薬物は、迅速な作用発現を有し、治療的な血漿レベルをもたらす、肝代謝の初回通過効果を回避し、且つ不適な胃腸管（GI）環境への薬物の暴露を回避する。追加の利点は、膜部位への容易なアクセスを含み、その結果、薬物が容易に適用され、局在化され、且つ除去され得る。一実施形態では、経口又は経鼻送達によって投与されるRNAサイレンシング剤は、血液脳関門を横切ることができるように修飾されている。

20

## 【0327】

一実施形態では、RNA剤、例えばdsRNA剤を含む単位用量又は測定された用量の組成物は、移植デバイスによって分注される。デバイスは、対象内のパラメータを監視するセンサーを含み得る。例えば、デバイスは、浸透圧ポンプなどのポンプ及び任意選択的に関連する電子機器を含み得る。

## 【0328】

本明細書に記載される方法の他の好適な変更形態及び適応形態は、本明細書で開示される実施形態の範囲から逸脱することなく、好適な均等物を使用して行われ得ることが当業者に容易に明らかであろう。ある種の実施形態を詳細に記載してきたが、例示のためのみに含まれ、且つ限定することが意図されない以下の実施例を参照することにより、それらがより明確に理解されるであろう。

30

## 【実施例】

## 【0329】

実施例1：SNPの識別は mismatches の位置に応じて変動する

図46は、HTTの場合に構築されたSNP識別siRNAを生成し、且つ選択するための方法論を示すフローチャートであるが、他の遺伝子におけるSNPにも適用可能である。一次選別は、SNPが置かれるいずれの位置が最大の識別をもたらすかを決定するために実行される。次に、最良の結果をもたらす mismatch 位置が選択され、非標的アレルに対する親和性は、選択性及び/又は力価の改善を有するsiRNA分子への化学的及び構造的最適化が選択される二次選別においてさらに低減される。

40

## 【0330】

HD患者において高い比率のヘテロ接合性を有するHTT遺伝子内にいくつかのSNPが存在する（図45）。ハンチンチンのSNP特異的RNAi媒介性サイレンシングの最適化のために、HTT mRNAのエクソン57中のSNP rs362273がSNP選択的サイレンシングの最適化のためのモデル標的として使用された。このSNPヘテロ接合性は、HD患者集団の35%に存在する。

## 【0331】

本明細書に記載されるpsiCHECKレポータープラスミドは、Rluc 3'UTR

50

内にSNP rs362273及びhttのエクソン57からの部分的な隣接領域を含有する。野生型psiCHECKレポータープラスミドは、SNPを有しないhttの同じ領域を含有する(図1)。

#### 【0332】

変異体SNP(2273-1(A))を含有するハンチンチン(htt)mRNAと相補的であるように設計された疎水性修飾RNA(hsiRNA)は、psiCHECKレポータープラスミド系により効力について選別された。SNPに続く数は、hsiRNAにおけるSNPの位置を表す(図47)。図2は、2、4又は6位にSNPを置くことが、変異体アレルに対する効力を損なうことなく、最大のSNP識別をもたらしたことを示す。2つのレポータープラスミドの1つでトランスフェクトされたHeLa細胞は、受動的な取込みによって1.5µM hsiRNAでリバーストランスフェクトされ、且つ72時間処理された。ルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションの72時間後に測定された(図2)。

10

#### 【0333】

hsiRNAは、HeLa細胞による用量反応二重ルシフェラーゼアッセイにおけるアレル識別についてさらに試験された(図3)。複数のhsiRNAは、野生型レポータープラスミドと比較して、変異体SNPを含有するレポータープラスミドを優先的にサイレンシングした。2つのレポータープラスミドの1つでトランスフェクトされたHeLa細胞は、受動的な取込みによって1.5µM hsiRNAでリバーストランスフェクトされ、且つ72時間処理された。レポータープラスミド発現は、トランスフェクションの72時間後に測定された(図3)。

20

#### 【0334】

実施例2：内在性Htt mRNAにおけるSNP識別

hsiRNAは、ホモ接合型rs362273 SNPを含有する内在性ハンチンチンmRNAに対する効力について試験された。HeLa細胞は、各アレル上にAを有するrs362273でホモ接合型であるため、アレル識別は、このアッセイで評価されなかった。代わりに、図4は、2つのhsiRNA、SNP4-0及びSNP6-0が、妥当なSNPを含有するhtt mRNAをサイレンシングする際に非常に有効であったことを示す。mRNAレベルは、72時間の受動的な取込みによりhsiRNAでHeLa細胞を処理した後、Quantigene 2.0 bDNAアッセイを使用して測定された。ヒトhtt mRNAレベルは、ヒトHprtに標準化された。

30

#### 【0335】

実施例3：より高いアレル識別のための第2のミスマッチを有するhsiRNAの設計

用量反応のために以前に選択された3つのhsiRNA(SNP2-0、SNP4-0及びSNP6-0は、それぞれmm2、mm4及びmm6とも呼ばれる)の各々について、16個の新規のhsiRNAが設計され、軽微な配列修飾を伴って合成された(図34)。これらの配列は、第2のミスマッチが、標的SNPのサイレンシングにほとんど影響を与えないことなく、オフターゲットSNPのサイレンシングを以前よりも著しく損なうかどうかを試験するために、元の配列に沿う全ての可能な位置に単一のミスマッチを導入した。アンチセンス鎖配列は、赤色のSNP部位及び青色の新たなミスマッチとともに5'~3'で示される(図12)。

40

#### 【0336】

図12におけるhsiRNAの効力の一次選別は、SNPに対応するヌクレオチドの位置に対する第2のミスマッチの位置がHeLa細胞におけるSNP識別の様々なレベルをもたらすことを示した。2つのpsiCHECKレポータープラスミドの1つでトランスフェクトされたHeLa細胞は、受動的な取込みによって1.5µM hsiRNAでリバーストランスフェクトされ、且つ72時間処理された。ルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションの72時間後に測定された。図5は、複数のhsiRNAが、野生型レポータープラスミドと比較して、SNP変異を含有するレポータープラスミドを優先的にサイレンシングしたことを示す。

50

## 【0337】

第2のミスマッチを含有する最も有効な *h s i R N A* をさらに用量反応曲線において試験して、SNP 識別の改善を検証した。2つのレポータープラスミドの1つでトランスフェクトされた *H e L a* 細胞は、受動的な取込みによって *h s i R N A* でリバーストランスフェクトされ、且つ72時間処理された。レポーター発現は、二重ルシフェラーゼアッセイにより測定された。図6~8は、野生型レポータープラスミドに対してSNP変異を含有するレポータープラスミドをサイレンシングするための2つのミスマッチを有する *h s i R N A* の  $I C 5 0$  値を示す。SNP6-11 *h s i R N A* (5'末端から6位にある多型及び5'末端から11位にあるミスマッチに対応するヌクレオチドを有する *h s i R N A* 分子) 及びSNP4-7 *h s i R N A* (5'末端から4位にある多型及び5'末端から7位にあるミスマッチに対応するヌクレオチドを有する *h s i R N A*) は、最も有効であることが示された(図7~9を参照されたい)。驚くべきことに、SNPの周囲の修飾パターンの改変は、識別を損なうことなく、第2のミスマッチを導入することによって効力の喪失を救出する。SNP6-11 *h s i R N A* は、それが、ミスマッチヌクレオチドに隣接して2' O -メチル修飾(及びそれ自体2' O -メチル修飾を有するミスマッチヌクレオチド)を有するように改変された(図10を参照されたい)。

## 【0338】

## 実施例4:追加の修飾

様々なオリゴヌクレオチド型(例えば、ギャップマー、ミックスマー、*mi R N A* 阻害剤、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド(「SSO」)、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴヌクレオチド(「PMO」)、ペプチド核酸(「PNA」)などは、任意選択的に、修飾(例えば、化学修飾)並びに/又は本明細書及び例えば各々が全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第15/089,423号明細書;米国特許出願公開第15/236,051号明細書;米国特許出願公開第15/419,593号明細書;米国特許出願公開第15/697,120号明細書及び米国特許第9,809,817号明細書;及び米国特許出願公開第15/814,350号明細書及び米国特許第9,862,350号明細書において記載されるコンジュゲートの様々な組合せを利用して、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドにおいて使用され得る。

## 【0339】

例えば、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、ジ-*s i R N A* として設計され得る(例えば、図14を参照されたい)。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の異なる骨格結合を含み得る(例えば、図15を参照されたい)。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、様々な糖修飾を含み得る(例えば、図16を参照されたい)。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、様々なヌクレオチド間結合を含み得る(例えば、図17を参照されたい)。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上の5'安定化修飾を含み得る(例えば、図18を参照されたい)。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、1つ以上のコンジュゲート部分を含み得る(例えば、図19を参照されたい)。いくつかの例示的なオリゴヌクレオチド骨格修飾が図35において示される。

## 【0340】

本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドを効果的に使用して、単にSNP位置で塩基を変えることによってSNP部位でGを標的化することができる。図33に見られるとおり、化合物SNP6-11は、2回目に合成され、このとき、Aの代わりにSNP部位でGを標的化した。これは、いずれかのアレルを選択的にサイレンシングすることを可能にし、同じSNP部位で異なるヘテロ接合性を有する患者にとって非常に有用な戦略である。

## 【0341】

ある種の例示的な実施形態では、1つ以上の脱塩基ヌクレオチドは、SNP位置ヌクレオチド、MM位置ヌクレオチド、5'末端、3'末端又はこれらの任意の組合せで利用される。

## 【0342】

ある種の例示的な実施形態では、*hs iRNA*は、アレル特異性を改善するミスマッチの周囲の様々な糖修飾、例えば2' Fの代わりに2' FANA; SNP/ミスマッチ位置の周囲の三重の2' F又は三重の2' OMeを伴って合成される。

## 【0343】

## 実施例5: H T Tマウスモデル

BAC97-HDは、ヒト*h t t*エクソン1を連続したポリグルタミン(ポリQ)区間をコードする97個の混合されたCAA-CAGリピートを含有するloxP隣接ヒト変異体*h t t*エクソン1配列と置き換えることによって改変された、全体の病因となる170 kbヒトハンチンチン(*h t t*)ゲノム座位を含有するヒトバクテリア人工染色体(BAC)トランスジェニックインサートを含むトランスジェニックマウスを指す。

10

## 【0344】

リード化合物(SNP6-11)は、図31に示される構造を有する二分岐化学骨格に合成され、続いて8週齢のBAC97-HD雌マウスにおいて40 nmol両側性脳室内(ICV)注射(各側に対して20 nmol)を介してインビボで試験された。マウスは、SNP rs362273でGを有する正常マウス*h t t*遺伝子及びSNP rs362273AでAを有する病因となるヒト*h t t*遺伝子のトランスジェニックインサートの2コピーを有した。RNAトランスクリプトーム中の標的とマッチしないナンセンス配列も同じ二分岐骨格に合成され、陰性対照(NTC)としてマウスにおいて注射された。

20

## 【0345】

いくつかの脳領域が注射後1ヶ月のRNA及びタンパク質分析のためにマウスから回収され、H T Tタンパク質レベルは、Ab1抗体を使用するウエスタンブロットによって測定された。図32Aは、回収された線条体組織に対して実施されたウエスタンブロットであり、ピンクリンに標準化されたタンパク質レベルは、図32Bにおいて示される。

## 【0346】

## 実施例6: SNP標的化は、配列に非依存的である

リード化合物のSNP識別が配列依存的であったかが評価された。rs362273におけるGに対するUのミスマッチ又はAに対するCのミスマッチを含有するハンチンチン(*h t t*)mRNAと相補的であるように設計された疎水的に修飾されたRNA(*hs iRNA*)が使用された。Gに対するUのミスマッチと相補的な6-11 *hs iRNA*及びAに対するCのミスマッチと相補的な6-11 *hs iRNA*の両方が標的SNPを優先的に切断した(図20)。

30

## 【0347】

## 実施例7: ビニルホスホネート修飾されたサブユニット間結合の合成

本明細書で論じられるビニルホスホネート修飾されたサブユニット間結合の代表的な合成は、図21及び29において示される。図21の合成手順は、下に詳述される。

## 【0348】

## 化合物3aの合成

ピリジン(100 mL)中の化合物2a(16.6 g、20.8 mmol)の無水溶液に無水DIPEA(6.5 mL、37.4 mmol)及び塩化ベンゾイル(3.6 mL、31.2 mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌した後、過剰なピリジンを蒸発させ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈した。有機溶液をNaHCO<sub>3</sub>飽和水溶液によって洗浄した。有機層を回収し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル、4:1~1:1)により精製して、淡黄色フォームとして化合物3aを得た(14.5 g、78%); <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.88-7.87(m, 2H), 7.84(d, 1H, J = 8.3 Hz), 7.67-7.58(m, 5H), 7.48-7.45(m, 4H), 7.39-7.32(m, 4H), 7.25-7.23(m, 3H), 7.18-7.17(m, 2H), 7.12-7.07(m, 4H), 6.80-6.75(m, 4H), 6.08(dd, 1H, J<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, J<sub>HF</sub> = 15.2 Hz), 5.14, (

40

50

d, 1 H,  $J_{HH} = 8.3 \text{ Hz}$ ), 4.59 (ddd, 1 H,  $J_{HH} = 3.7, 1.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{HF} = 51.9 \text{ Hz}$ ), 4.43 (ddd, 1 H,  $J_{HH} = 7.4, 4.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{HF} = 19.1 \text{ Hz}$ ), 4.24 - 4.23 (m, 1 H), 3.79 (s, 6 H), 3.62 (dd, 1 H,  $J_{HH} = 11.2, 2.0 \text{ Hz}$ ), 3.35 (dd, 1 H,  $J_{HH} = 11.1, 2.0 \text{ Hz}$ ), 1.00 (s, 9 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) 168.4, 161.8, 158.72, 158.66, 148.9, 143.9, 139.4, 135.71, 135.70, 135.1, 134.8, 134.7, 132.3, 132.2, 131.3, 130.4, 130.2, 130.1, 129.1, 128.2, 128.0, 127.91, 127.89, 127.2, 113.19, 113.16, 102.2, 92.5 (d,  $J_{CF} = 194.4 \text{ Hz}$ ), 87.7 (d,  $J_{CF} = 34.5 \text{ Hz}$ ), 87.2, 82.4, 70.0 (d,  $J_{CF} = 15.4 \text{ Hz}$ ), 60.7, 60.4, 55.2, 26.6.

## 【0349】

## 化合物4aの合成

化合物3a (14.5 g、16.3 mmol) を、トリエチルシラン (8.0 mL、50.1 mmol) を含有する3%トリクロロ酢酸/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液 (200 mL) 中に溶解させ、室温で1時間撹拌した。溶液を $\text{NaHCO}_3$  飽和水溶液によって3回洗浄し、回収された有機層を $\text{MgSO}_4$  で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル、4:1~3:7) により精製して、白色フォームとして化合物4aを得た (8.67 g、91%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.89 - 7.88 (m, 2 H), 7.68 - 7.64 (6 H, m), 7.51 - 7.45 (m, 4 H), 7.42 - 7.38 (4 H, m), 5.93 (dd, 1 H,  $J_{HH} = 2.9 \text{ Hz}$ ,  $J_{HF} = 15.1 \text{ Hz}$ ), 5.73 (d, 1 H,  $J_{HH} = 8.2 \text{ Hz}$ ), 4.74 (ddd, 1 H,  $J_{HH} = 4.1, 3.2 \text{ Hz}$ ,  $J_{HF} = 52.2 \text{ Hz}$ ), 4.31 (ddd, 1 H,  $J_{HH} = 5.8, 4.7, J_{HF} = 15.4 \text{ Hz}$ ), 4.11 - 4.09 (m, 1 H), 3.82 - 3.79 (m, 1 H), 3.39 (ddd, 1 H,  $J_{HH} = 12.1, 5.6, 1.5 \text{ Hz}$ ), 1.64 (br, 1 H), 1.11 (s, 9 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) 168.3, 161.8, 149.0, 140.5, 135.7, 135.2, 132.8, 132.3, 131.3, 130.5, 130.4, 130.3, 129.2, 128.02, 127.96, 102.4, 91.8 (d,  $J_{CF} = 91.8 \text{ Hz}$ ), 89.5 (d,  $J_{CF} = 33.6 \text{ Hz}$ ), 69.5 (d,  $J_{CF} = 69.5 \text{ Hz}$ ), 60.3, 26.8.

## 【0350】

## 化合物6aの合成

化合物4a (6.5 g、11.0 mmol) の無水溶液にIBX (7.7 g、27.6 mmol) を加え、85 で2時間撹拌した。氷浴中で混合物を冷却した後、溶液中の沈殿物を、セライトに通して濾別した。回収された溶出液を蒸発させ、アルゴン雰囲気下で無水 $\text{CH}_3\text{CN}$  とともに3回共蒸発させ、白色フォームとして化合物5aを得て、さらに精製することなく使用した。別々のフラスコにおいて、 $\text{CBr}_4$  (7.3 g、22.1 mmol) を含有する無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL) 溶液に $\text{PPh}_3$  (11.6 g、44.2 mmol) を0 で加え、0 で0.5時間撹拌した。この溶液に化合物5aの無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液 (25 mL) を0 で滴下して加え (10分)、0 で2時間撹拌した。 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈した後、有機溶液を $\text{NH}_4\text{Cl}$  飽和水溶液によって洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。得られた材料を最小量のジエチルエーテル中に溶解させ、0 で激しく撹拌しながら過剰なジエチルエーテル溶液に滴下して加えた。溶液中の沈殿物を、セライトに通して濾別し、溶出液を蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル、9:1~1:1) により精製して、白色フォームとして化合物6aを得た (4.3 g、52%)。  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.68 - 7.84 (m, 2 H), 7.70 - 7.65 (m, 3 H), 7.60 - 7.58 (m, 2 H), 7.52 - 7.49 (m, 2 H), 7.42 - 7

. 36 (m, 4H), 7.31 - 7.28 (m, 2H), 7.09 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 6.25 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz), 5.75 (dd, 1H,  $J_{HF} = 8.24$  Hz), 5.49 (dd, 1H,  $J_{HF} = 21.4$  Hz), 4.77 (t, 1H,  $J_{HH} = 8.5$  Hz,  $J_{HF} = 8.5$  Hz), 4.38 (dd, 1H,  $J_{HH} = 4.1$  Hz,  $J_{HF} = 52.1$  Hz), 4.25 (ddd, 1H,  $J_{HH} = 8.1, 4.9$  Hz,  $J_{HF} = 19.4$  Hz), 1.10 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) 167.9, 161.6, 148.3, 141.4, 135.8, 134.7 (d,  $J_{C-Br} = 139.0$  Hz), 132.5, 132.2, 131.1, 130.5, 130.3, 130.2, 129.2, 127.9, 102.7, 97.3, 93.3 (d,  $J_{CF} = 39.1$  Hz), 91.5 (d,  $J_{CF} = 190.7$  Hz), 82.4, 73.9 (d,  $J_{CF} = 16.4$  Hz), 26.7.

10

## 【0351】

化合物7a-E及び7a-Zの合成

DMF (25 mL) 中の化合物6a (4.2 g、5.66 mmol) の無水溶液に亜リン酸ジメチル (2.09 mL、22.6 mmol) 及びトリエチルアミン (1.58 mL、11.3 mmol) を0 で加え、続いて室温で一晩攪拌した。溶液を酢酸エチルで希釈した後、有機溶液を $\text{NH}_4\text{Cl}$ 飽和水溶液及び塩水で洗浄した。次に、有機溶液を $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。得られた粗製の材料を、全ての純粋な異性体化合物が別々に回収されるまで、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル、9:1 ~ 1:1) により繰り返し精製して、化合物7a-E (1.95 g、52%) を得た;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.87 - 7.85 (m, 2H), 7.89 - 7.85 (m, 3H), 7.61 - 7.59 (m, 2H), 7.52 - 7.48 (m, 2H), 7.45 - 7.32 (m, 6H), 7.08 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.2$ ), 6.49 (d, 1H,  $J_{HH} = 13.7$ ), 5.99 (dd, 1H,  $J_{HH} = 13.7$  Hz, 8.1 Hz), 5.75 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.2$ ), 5.63 (d, 1H,  $J_{HF} = 19.8$  Hz), 4.43 (dd, 1H,  $J_{HF} = 52.6$  Hz,  $J_{HH} = 4.3$  Hz), 4.42 (t, 1H,  $J_{HH} = 8.0$  Hz), 4.07 (ddd,  $J_{HH} = 7.8, 4.7$  Hz,  $J_{HF} = 19.5$  Hz), 1.08 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) 148.4, 140.4, 135.8, 135.7, 135.3, 133.3, 132.3, 132.4, 132.1, 131.1, 130.5, 130.4, 130.3, 129.2, 127.95, 127.93, 112.4, 102.7, 91.7 (d,  $J_{CF} = 36.3$  Hz), 91.6 (d,  $J_{CF} = 191.6$  Hz), 82.8, 73.9 (d,  $J_{CF} = 16.4$  Hz), 26.7, 19.1; 及び7a-Z (0.58 g、15%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.87 - 7.85 (m, 2H), 7.68 - 7.65 (m, 3H), 7.61 - 7.59 (m, 2H), 7.52 - 7.48 (m, 2H), 7.42 - 7.39 (m, 2H), 7.34 - 7.29 (m, 4H), 7.12 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.2$  Hz), 6.51 (d, 1H,  $J_{HH} = 7.4$  Hz), 5.96 (dd, 1H,  $J_{HH} = 8.4$  Hz, 7.4 Hz), 5.75 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.2$  Hz), 5.57 (dd, 1H,  $J_{HH} = 1.2$  Hz,  $J_{HF} = 20.6$  Hz), 5.04 (dd, 1H,  $J_{HH} = 8.2$  Hz), 4.48 ( $J_{HH} = 3.5$  Hz,  $J_{HF} = 53.1$  Hz), 4.24 (ddd, 1H,  $J_{HH} = 7.8, 4.9$  Hz,  $J_{HF} = 18.6$  Hz), 1.09 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) 168.0, 161.7, 148.4, 141.4, 135.9, 135.8, 135.2, 132.6, 132.5, 131.2, 130.6, 130.5, 130.2, 130.1, 129.2, 127.8, 127.7, 114.5, 102.6, 93.0 (d,  $J_{CF} = 37.2$  Hz), 91.6 (d,  $J_{CF} = 191.6$  Hz), 80.3, 74.3 (d,  $J_{CF} = 16.4$  Hz), 26.7, 19.1.

20

30

40

## 【0352】

化合物9aの合成

無水化合物7a-E (1.95 g、2.94 mmol)、及び $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (12

50

5 mg、0.59 mmol)、及び[1, 1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)(652 mg、1.18 mmol)をアルゴンでパージし、続いて無水THF(50 mL)中に溶解させた。プロピレンオキシド(2.06 mL、29.4 mmol)を加えた後、化合物8a(2.07 g、3.24 mmol)を一度に加え、70 °Cで4時間撹拌した。減圧下で溶媒を除去した後、粗製の混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル、50:50~0:100)により精製し、化合物9aを含有する得られた画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH、0%~5%)によりさらに精製して、ジアステレオ異性体の混合物として化合物9aを得た(2.04 g、57%)；<sup>31</sup>P NMR(202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 18.3。

10

## 【0353】

## 化合物10aの合成

無水THF(22.5 mL)中の化合物9a(2.0 g、1.64 mmol)に1.0 M TBAF-THF(2.5 mL、2.5 mmol)を加え、周囲温度で30分間撹拌した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(120 mL)で希釈した後、有機層を塩水で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1% TEA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH、0%~6%)により精製して、化合物10aを得た(1.52 g、94%)；<sup>31</sup>P NMR(202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 19.0, 18.7。

## 【0354】

## 化合物11aの合成

化合物10a(589.7 mg、0.6 mmol)を無水CH<sub>3</sub>CNとの共蒸発の繰り返しによって無水にし、続いて無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(6.0 mL)中に溶解した。この溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.31 mL、1.8 mmol)及び2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホアミダイト(0.16 mL、0.72 mmol)を0 °Cで加えた。0 °Cで30分間撹拌した後、反応混合物を過剰なCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈した。有機層をNaHCO<sub>3</sub>飽和水溶液で繰り返し洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1% TEA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH、100%~4%)により精製して、白色フォームとして化合物11aを得た(570 mg、80%)；<sup>31</sup>P NMR(202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 150.3, 151.2, 151.1, 151.0, 18.72, 18.65, 18.55, 18.3。

20

30

## 【0355】

## 化合物4bの合成

ピリジン(10 mL)中の化合物3b(1.35 g、2.0 mmol)の無水溶液にDIPEA(0.63 mL、3.6 mmol)及び塩化ベンゾイル(0.35 mL、3.0 mmol)を加え、室温で3時間撹拌した。過剰なCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈した後、有機溶液をNaHCO<sub>3</sub>飽和水溶液及び塩水で洗浄した。MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた後、濾過し、蒸発させ、得られた粗製の材料をさらに精製することなく次の反応のために使用した。化合物3bを含有する得られた粗製の材料にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(25 mL)及びトリエチルシラン(1 mL、6.26 mmol)中の3%トリクロロ酢酸を加え、室温で1時間撹拌した。反応混合物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈した後、溶液をNaHCO<sub>3</sub>飽和水溶液で3回洗浄し、MgSO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、続いて蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル、4:1~1:4)により精製して、純粋な化合物4bを得た(596.7 mg、2工程で63%)；<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 8.13(d, 1H, J<sub>HH</sub>=8.2 Hz), 7.95(d, 2H, J<sub>HH</sub>=7.3 Hz), 7.81(t, 1H, J<sub>HH</sub>=7.5 Hz), 7.69-7.68(m, 2H), 7.64-7.59(m, 4H), 7.49-7.42(m, 6H), 5.93(d, 1H, J<sub>HH</sub>=4.6 Hz), 5.26(t, 1H, J<sub>HH</sub>=4.6 Hz), 4.36(dd, 1H, J<sub>HH</sub>=4.6, 4.6 Hz), 4.02-4.00(m, 1

40

50

H), 3.65 - 3.61 (m, 1H), 3.54 (dd, 1H,  $J_{HH} = 4.6, 4.6$  Hz), 3.09 (s, 3H), 1.03 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>) 169.8, 162.1, 149.5, 141.3, 136.1, 135.9, 135.8, 133.4, 133.2, 131.5, 130.7, 130.52, 130.48, 130.0, 128.4, 128.3, 102.1, 86.7, 85.6, 82.8, 79.7, 70.8, 60.2, 57.8, 27.2, 19.4; HRMS (ESI)  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}^- [\text{M}-\text{H}]^-$  に対する  $m/z$  計算値  $m/z$  599.2219、実測値  $m/z$  599.2258。

#### 【0356】

##### 化合物 6 b の合成

CH<sub>3</sub>CN (5 mL) 中の化合物 4 b (300.4 mg、0.5 mmol) の無水溶液に IBX (350 mg、1.3 mmol) を加え、85 °C で 2 時間 攪拌した。0 °C で溶液を冷却した後、沈殿物をセライト濾過によって濾別した。化合物 5 b を含有する得られた溶出液を蒸発させ、無水 CH<sub>3</sub>CN との共蒸発の繰り返しによって無水し、さらに精製することなく次の反応のために使用した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) 中の CBr<sub>4</sub> (331.6 mg、1.0 mmol) の分離用の調製された無水溶液にトリフェニルホスフィン (524.6 mg、2.0 mmol) を 0 °C で一度に加え、0 °C で 30 分間 攪拌した。この溶液に無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mL) 中の化合物 5 b を 0 °C で滴下して加え (10 分)、0 °C で 2 時間 攪拌した。次に、溶液を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で希釈し、NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液及び塩水で洗浄した。有機溶液を MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、蒸発させ、得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル、9:1~4:6) により精製して、化合物 6 b を得た (210.9 mg、56%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.88 (d, 2H,  $J_{HH} = 7.3$  Hz), 7.70 - 7.62 (5H, m), 7.51 - 7.38 (m, 9H), 7.08 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.2$  Hz), 6.26 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.6$  Hz), 5.75 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.2$  Hz), 5.68 (d, 1H,  $J_{HH} = 0.8$  Hz), 4.84 (dd, 1H,  $J_{HH} = 8.6$  Hz, 8.6 Hz), 3.86 (dd, 1H,  $J_{HH} = 7.5$  Hz, 5.0 Hz), 3.30 (s, 3H), 3.18 (br, 1H), 1.11 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz, CDCl<sub>3</sub>) 168.3, 161.7, 148.6, 138.9, 135.9, 135.8, 134.3, 132.6, 132.4, 131.2, 130.5, 130.4, 130.3, 129.2, 128.0, 127.9, 102.4, 97.5, 90.0, 82.44, 82.39, 74.4, 58.2, 26.7, 19.1; HRMS (ESI)  $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}^- [\text{M}-\text{H}]^-$  に対する  $m/z$  計算値  $m/z$  751.0480 [M-H]<sup>-</sup>, 実測値  $m/z$  753.6495。

#### 【0357】

##### 7 b - E 及び 7 b - Z の合成

DMF (35 mL) 中の化合物 6 b (6.11 g、8.1 mmol) の無水溶液に亜リン酸ジメチル (2.97 mL、34.0 mmol) 及びトリエチルアミン (2.26 mL、17.0 mmol) を 0 °C で加え、続いて室温で一晩 攪拌した。溶液を酢酸エチルで希釈した後、有機溶液を NH<sub>4</sub>Cl 飽和水溶液及び塩水で洗浄した。次に、有機溶液を MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、蒸発させ、粗製の材料を得て、全ての純粋な異性体化合物が別々に回収されるまで、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル、9:1~1:1) により繰り返し精製して、化合物 7 b - E を得た (3.0 g、55%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.89 - 7.87 (m, 2H), 7.70 - 7.62 (m, 5H), 7.51 - 7.39 (m, 8H), 7.10 (d, 1H,  $J_{HH} = 8.3$  Hz), 6.47 (dd, 1H,  $J_{HH} = 13.6, 0.8$  Hz), 6.01 (dd, 1H,  $J_{HH} = 13.6, 7.9$  Hz), 5.76 - 5.74 (m, 2H), 4.51 (dd, 1H,  $J_{HH} = 7.8, 7.8$  Hz), 7.36 (dd, 1H,  $J_{HH} = 7.8$  Hz, 4.9 Hz), 3.34 (s, 3H), 3.17 (dd, 1H,  $J_{HH} = 4.7, 1.2$  Hz), 1.09 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz, CDCl<sub>3</sub>)

168.3, 161.7, 148.7, 138.4, 135.9, 135.8, 135.3, 133.8, 132.6, 132.4, 131.2, 130.5, 130.4, 130.3, 129.2, 128.0, 127.9, 112.1, 102.3, 88.9, 82.8, 82.6, 77.2, 74.2, 58.1, 26.8, 19.1; 及び7b-Z (1.23 g, 2.2%);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.89-7.87 (m, 2H), 7.72-7.70 (m, 2H), 7.68-7.63 (m, 3H), 7.51-7.44 (m, 4H), 7.41-7.37 (m, 4H), 7.16 (d, 1H,  $J$ -8.2 Hz), 6.53 (dd, 1H,  $J_{\text{HH}}=7.4, 0.6$  Hz), 6.03 (dd, 1H,  $J_{\text{HH}}=8.5, 7.4$  Hz), 5.75-5.73 (m, 2H), 5.12 (t, 1H,  $J_{\text{HH}}=8.1$  Hz), 3.93 (dd, 1H,  $J_{\text{HH}}=6.9, 5.0$  Hz), 3.32 (br, 1H), 3.26 (s, 3H), 1.10 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) 168.3, 161.8, 148.7, 139.3, 135.91, 135.85, 135.22, 132.74, 132.71, 131.2, 130.8, 130.5, 130.23, 130.16, 129.2, 127.78, 127.75, 114.6, 102.2, 90.1, 82.4, 80.6, 77.2, 74.8, 58.1, 26.8, 19.2。

10

## 【0358】

## 化合物8bの合成

無水5'-O-DMTr-2'-デオキシ-2'-フルオロ-3'-[メチル-N,N-(ジイソプロピル)アミノ]ホスホロアミダイト(4.26 g, 6.0 mmol)を0.45 M 1H-テトラゾール/ $\text{CH}_3\text{CN}$ 溶液(27 mL, 12 mmol)中で溶解させ、室温で30分間攪拌した。この溶液に $\text{H}_2\text{O}$ (3.6 mL)を加え、室温で30分間攪拌した。酢酸エチルで希釈した後、有機溶液を塩水で6回洗浄し、 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、濾過し、続いて蒸発させた。少量の不純物とともに得られた化合物8bをさらに精製することなく次の反応のために使用した;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 202 MHz) 8.92, 8.28。

20

## 【0359】

## 化合物9bの合成

無水化合物7b-E(2.84 g, 4.20 mmol)及び $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (188.6 mg, 0.84 mmol)及び[1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)(931.4 mg, 1.68 mmol)をアルゴンでパージし、続いて無水THF(50 mL)中に溶解させた。プロピレンオキシド(2.94 mL, 42.0 mmol)を加えた後、化合物9b(3.16 g, 5.04 mmol)を一度に加え、70°Cで4時間攪拌した。減圧下で溶媒を除去した後、粗製の混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル, 50:50~0:100)により精製し、化合物9bを含有する得られた画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1% TEA- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH, 0%~5%)によりさらに精製して、ジアステレオ異性体の混合物として化合物9aを得た(3.3 g, 64%);  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 19.31, 18.72。

30

## 【0360】

## 化合物10bの合成

無水THF(36.5 mL)中の化合物9b(3.3 g, 2.70 mmol)に1.0 M TBAF-THF(4.05 mL, 4.05 mmol)を加え、周囲温度で30分間攪拌した。 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (150 mL)で希釈した後、有機層を塩水で洗浄し、 $\text{MgSO}_4$ で乾燥させ、濾過し、続いて蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1% TEA- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH, 0%~8%)により精製して、化合物10bを得た(1.25 g, 47%);  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 19.8, 19.1。

40

## 【0361】

## 化合物11bの合成

50

化合物 10b (393.2 mg, 0.4 mmol) を無水  $\text{CH}_3\text{CN}$  との共蒸発の繰り返しによって無水にし、続いて無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.0 mL) 中に溶解した。この溶液に  $N,N$ -ジイソプロピルエチルアミン (0.21 mL, 1.2 mmol) 及び 2-シアノエチル  $N,N$ -ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (0.11 mL, 0.48 mmol) を 0 で加えた。0 で 30 分間攪拌した後、反応混合物を過剰な  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈した。有機層を  $\text{NaHCO}_3$  飽和水溶液で繰り返し洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。得られた粗製の材料をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1% TEA -  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH, 100% ~ 4%) により精製して、白色フォームとして化合物 11b を得た (319.6 mg, 68%) ;  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 150.7, 150.4, 150.3, 19.9, 19.5, 19.4, 18.8。

10

## 【0362】

実施例 8 : ビニルホスホネート修飾されたオリゴヌクレオチドの固体支持体に媒介された合成

ビニルホスフィネート修飾されたサブユニット間結合を有するオリゴヌクレオチドの代表的な合成は、図 22 において示される。合成された VP 修飾された配列の例は、図 28A 及び 28B において見出され得る。

## 【0363】

ヌクレオチド間 (E) - ビニルホスホネート修飾された RNA オリゴヌクレオチドの合成。

1つのビニルホスホネート結合を有する合成 RNA オリゴヌクレオチドは、2'-修飾 (2'-フルオロ、2'-O-メチル) ホスホロアミダイト及びビニルホスホネート結合二量体ホスホロアミダイトの 0.1 M 無水  $\text{CH}_3\text{CN}$  溶液を使用して、MerMade 12 自動化 RNA 合成機 (BioAutomation) 上で実施された。固体支持体については、UnyLinker 支持体 (ChemGenes) が使用された。合成は、(i) 脱トリチル化、(ii) カップリング、(iii) キャッピング、及び (iv) ヨウ素酸化からなる標準的な 1.0  $\mu\text{mol}$  スケールの RNA ホスホロアミダイト合成サイクルによって実行された。無水  $\text{CH}_3\text{CN}$  中の 5-(ベンジルチオ)-1H-テトラゾールは、ホスホロアミダイト活性化試薬のために使用され、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の 3% ジクロロ酢酸は、脱トリチル化のために使用された。テトラヒドロフラン中の 16%  $N$ -メチルイミダゾール (Cap A) 及び 80:10:10 (v/v/v) テトラヒドロフラン -  $\text{Ac}_2\text{O}$  - 2,6-ルチジン (Cap B) がキャッピング反応のために使用された。THF-ピリジン -  $\text{H}_2\text{O}$  (7:2:1, v/v/v) 中の 0.02 M  $\text{I}_2$  が酸化のために使用され、ピリジン :  $\text{CH}_3\text{CN}$  (9:1, v/v) 中の 0.1 M 3-[ (ジメチルアミノ-メチリデン) アミノ ] - 3H-1,2,4-ジチアゾール 3-チオンが硫化のために使用された。5'末端リン酸化のためにビス(2-シアノエチル)- $N,N$ -ジイソプロピルホスホロアミダイトが使用された。3'-コレステロール修飾された RNA オリゴヌクレオチド合成のためにコレステロール 3'-lcaa CPG 500 (ChemGenes) が使用され、RNA 合成は、VP 修飾された RNA のために使用された条件と同じ条件において実行された。化学的な鎖伸長後、固体支持体からの脱保護及び切断は、 $\text{NH}_4\text{OH}$  - EtOH (3:1, v/v) によって 26 で 48 時間実行された。ビニルホスホネート修飾された RNA の場合、固体支持体上の RNA は、最初に、TMSBr-ピリジン -  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3:1:18, v/v/v) により RNA 合成カラムにおいて周囲温度で 1 時間処理された。次に、固体支持体は、合成カラムに通して流動溶液による水 (1 mL  $\times$  3)、 $\text{CH}_3\text{CN}$  (1 mL  $\times$  3) 及び  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL  $\times$  3) によって洗浄され、続いて真空下で乾燥させた。固体支持体をスクリーキャップ付きの試料チューブに移した後、 $\text{NH}_4\text{OH}$  - EtOH (3:1, v/v) による 26 で 48 時間の塩基処理が実行された。コレステロールコンジュゲートを伴わない粗製の RNA オリゴヌクレオチドは、標準的なアニオン交換 HPLC によって精製されたが、コレステロールコンジュゲートを伴う RNA は、逆相 HPLC によって精製された。得られた全ての精製 RNA は、Sephadex G-25 (GE Healthcare) によって脱塩され、エレクトロスブ

20

30

40

50

レイオン化質量分析 (ESI-MS) 分析によって特徴付けられた。

【0364】

実施例9：サイレンシング効力

図23及び24は、本明細書で試験されるVP修飾されたsiRNAの視覚的な表示を提供する。図25は、ガイド鎖上の様々な位置でのサブユニット間結合における1つ以上のビニルホスホネート修飾がサイレンシングに対して有する効果を例示する。図25におけるデータから見ることもできるとおり、RISCは、VP修飾に対して非常に感受性であり、且つ様々な位置でミスマッチ塩基対を有することにより、siRNA力価を破壊できる。

【0365】

図26、27A及び27Bは、変異体アレルをサイレンシングするVP修飾されたsiRNAの能力も示す。図27A及び27Bによって見ることもできるとおり、siRNA配列においてミスマッチを付加することは、変異体アレルのサイレンシングに影響を及ぼすことなくアレル識別を改善できた。図30は、SNP部位の隣のVP修飾された結合の導入がSNP選択的siRNAの標的/非標的識別を有意に増強したことを実証している。一次(6位)及び二次(11位)SNPを含有する化合物は、5位と6位との間にVP修飾を伴って又は伴わずに合成された。図30において見ることもできるとおり、VP修飾の存在は、「オンターゲット」活性に影響を与えないが、非標的mRNAのための任意の検出可能なサイレンシングを完全に除去した。図25、26、27A及び27Bにおいてデータを生成するための方法は、下に記載される。

【0366】

hsiRNAの受動的送達。

細胞は、96ウェル細胞培養プレートにおけるウェル毎に8,000細胞で6% FBSを含有するダルベッコ改変イーグル培地中に播種された。hsiRNAをOptiMEM (Carlsbad, CA; 31985-088) 中で最終濃度の2倍に希釈し、50 µLの希釈されたhsiRNAを50 µLの細胞に加え、最終の3% FBSをもたらした。細胞を37 °C及び5%のCO<sub>2</sub>で72時間インキュベートした。インビトロ用量反応アッセイにおける最大用量は、1.5 µMの化合物であった。

【0367】

標的mRNAの定量的分析のための方法。

mRNAは、QuantiGene 2.0アッセイキット(Affymetrix、QS0011)を使用して細胞から定量化された。細胞を、1つの部分の溶解混合物(Affymetrix、13228)、2つの部分のH<sub>2</sub>O及び0.167 µg/µLのプロテイナーゼK(Affymetrix、QS0103)で構成される250 µLの希釈された溶解混合物中において55 °Cで30分間溶解させた。細胞溶解物を十分に混合し、40 µLの各溶解物を、プロテイナーゼKを伴わない20 µL希釈された溶解混合物とともに捕捉プレートのウェル毎に添加した。ヒトHTT及びHPRT(Affymetrix; #SA-50339、SA-10030)のためのプローブセットを希釈し、製造業者の推奨するプロトコルに従って使用した。データセットは、HPRTに標準化された。

【0368】

棒グラフを作成するための方法。

データは、GraphPad Prism 7ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)を使用して分析された。濃度依存的IC<sub>50</sub>曲線は、反応に対するlog(阻害剤)-可変勾配(4パラメーター)を使用してフィッティングされた。各細胞処理プレートに関して、各用量でのノックダウンのレベルは、対照群(未処理群)の平均に標準化された。曲線の下限は5未満に設定され、曲線の上限は、95超に設定された。棒グラフを作成するため、相違のパーセントは、対応する各対照化合物のIC<sub>50</sub>値から各化合物のIC<sub>50</sub>値を引き、対照化合物のIC<sub>50</sub>値で除算し、100を乗じて計算された。相違のパーセントが-500%未満であった場合、相違のパーセントは、-500%に人為的に設定された。グラフの下限は、-300%で

10

20

30

40

50

切られた。

【0369】

本出願を通して引用され得る全ての参考文献（文献参照、特許、特許出願及びウェブサイトを含む）の内容は、そこに引用された参考文献と同様に、いかなる目的のためにも、それらの全体が参照により明示的に本明細書によって組み込まれる。本開示は、別段の指示がない限り、当技術分野でよく知られる免疫学、分子生物学及び細胞生物学の従来技術を採用することになる。

【0370】

本開示は、その趣旨又は本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態において具体化され得る。したがって、前述の実施形態は、本開示の限定ではなく、例示的な全ての観点において考えられることになる。したがって、本開示の範囲は、前述の記載ではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、そのため、特許請求の範囲の趣旨及び均等性の範囲内に収まる全ての変化形態が本明細書に包含されることになると意図される。

【0371】

実施例10：一次選別は、SNP rs362307ヘテロ接合性のための複数の有効な siRNA配列をもたらす

別の変異体SNP (rs362307) (図39)を含有するHTT mRNAと相補的であるように設計された siRNAの全ては、目的のSNPに関する標的領域を含有するレポータープラスミドにより選別された(図40)。2つのレポータープラスミドの1つでトランスフェクトされたHeLa細胞は、受動的な取込みによって1.5 μM hsiRNAでリバーストランスフェクトされ、且つ72時間処理された。SNPに続く数は、siRNAにおけるSNPの位置を表す。このSNPは、その周りの領域の高いG/C含量に基づいて標的化することがより難しくなるであろうと予想された。3位におけるSNPを置き換えることは、変異体アレルに対する効力を失うことなく、最大のSNP識別をもたらし、最適なSNP位置が配列特異的であることを示すと思われる(図41)。したがって、この一次選別プロセスは、任意のSNPのための最適なSNP位置を選択するために実行され得る。

【0372】

実施例11：SNP rs362307に適用されるとき、第2のミスマッチを続けてアレル識別を改善する

図42において報告されるとおり、全ての可能な位置に導入されるミスマッチを有する新規の配列の一次選別により、位置rs362307でもSNP識別の上昇を有する複数の有効な hsiRNAを得る。7位及び8位でのミスマッチの導入は、選択性を増大させるように見えたが、標的サイレンシング効力を保った。他の第2のミスマッチは、優れた識別をもたらしたが、全体的な活性が低下した。

【0373】

実施例12：SNPを含む配列におけるSNP識別の測定

表5～7に開示される配列の各々(すなわち特定のSNP位置ヌクレオチド及びミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドの組合せを有する各 hsiRNA)によってSNP識別を測定するために、httの野生型領域又は配列のSNPを有するhttの同じ領域のいずれかを含有するpsiCHECKレポータープラスミドが調製され、二重ルシフェラーゼを使用して試験された。2つのレポータープラスミドの1つでトランスフェクトされたHeLa細胞は、受動的な取込みによって hsiRNAでリバーストランスフェクトされ、且つ72時間処理される。ルシフェラーゼ活性は、追加のミスマッチを伴うか又は伴わないアッセイにおいて測定され、続いて用量反応曲線においてプロットし、比較して、サイレンシングの識別及び効力に関する最良の結果をもたらす配列を明らかにする。

【0374】

実施例13：ホスフィネート修飾されたサブユニット間結合の合成

本発明のホスフィネート修飾されたサブユニット間結合を調製するための方法は、図44A～44Cにおいて要約される。この方法は、遊離アルコールから対応するケトンへの

10

20

30

40

50

ジョーンズ酸化に続いて、Wittigオレフィン化を行い、中間体化合物3で示されるエキソメチレン部分を得ることを含む。BOMによるアミドの保護後のヒドロホウ素化-酸化により、遊離アルコール中間体5が得られる。メシル化後の改変されたフィンケルシュタイン反応は、ヨウ化中間体7を生成し、続いてさらなる官能化を経て、メチルホスフィネート単量体9を得る。

【0375】

単量体18を得るために、様々な保護及び脱保護工程を利用して、中間体13を得る。IBX酸化は、対応するケトンを生成した後、Wittigオレフィン化により、メチレンを得る。もう一度、ヒドロホウ素化-酸化に続いて、メシル化及びフィンケルシュタイン反応を行って、単量体18を得る。

10

【0376】

塩基性条件下で単量体9及び18を組み合わせることにより、ホスフィネート連結二量体19を得る。酸媒介性及びパールマン触媒による脱保護後のさらなるホスファンアミン官能化により、二量体22を得る。

本発明は、以下の態様を含む。

[項1] 5'末端、3'末端及びシード領域を有するオリゴヌクレオチドであって、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、

前記シード領域内の位置での一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド；及び

前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチド

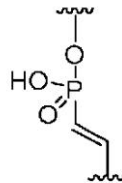
20

を含む、オリゴヌクレオチド。

[項2] 前記オリゴヌクレオチドは、RNAである、項1に記載のオリゴヌクレオチド。

[項3] 式：

[化1]



30

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート(VP)修飾をさらに含む、項2に記載のRNA。

[項4] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項3に記載のRNA。

[項5] siRNA、miRNA、shRNA、CRISPRガイド、DNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、ギャップマー、ミックスマー、miRNA阻害剤、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド(SSO)、ホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)及びペプチド核酸(PNA)からなる群から選択される、項1に記載のオリゴヌクレオチド。

40

[項6] ASO又は二重鎖RNA(dsRNA)である、項1に記載のオリゴヌクレオチド。

[項7] アレル多型を含む前記遺伝子の前記領域と相補的な約15~35ヌクレオチドの第1の鎖；及び

前記第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15~35ヌクレオチドの第2の鎖を含む、

前記第1の鎖は、前記アレル多型と相補的である、前記5'末端から2~6位における前記SNP位置ヌクレオチドを含む、

前記第1の鎖は、前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記SNP位置ヌク

50

レオチドから 2 ~ 6 ヌクレオチドに位置する前記 MM 位置ヌクレオチドを含む、項 6 に記載の dsRNA。

[項 8] 前記 SNP 位置ヌクレオチドは、前記 5' 末端から 2 位にある、項 7 に記載の dsRNA。

[項 9] 前記 SNP 位置ヌクレオチドは、前記 5' 末端から 4 位にある、項 7 に記載の dsRNA。

[項 10] 前記 SNP 位置ヌクレオチドは、前記第 1 の鎖の前記 5' 末端から 6 位にある、項 7 に記載の dsRNA。

[項 11] 前記 MM 位置ヌクレオチドは、前記 SNP 位置ヌクレオチドの 2 ヌクレオチド以内又は 3 ヌクレオチド以内に位置する、項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の dsRNA。

10

[項 12] 前記 MM 位置ヌクレオチドは、前記 SNP 位置ヌクレオチドの 4 ヌクレオチド以内に位置する、項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 13] 前記 MM 位置ヌクレオチドは、前記 SNP 位置ヌクレオチドの 6 ヌクレオチド以内に位置する、項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 14] 平滑末端である、項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 15] 少なくとも 1 つの一本鎖ヌクレオチドオーバーハングを含む、項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 16] 天然に存在するヌクレオチドを含む、項 7 ~ 15 のいずれか一項に記載の dsRNA。

20

[項 17] 少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、項 7 ~ 16 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 18] 各ヌクレオチドは、修飾される、項 7 ~ 15 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 19] 前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、5' - ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、コレステリル誘導体に連結された末端ヌクレオチド及びビドデカン酸ビスデシルアミド基に連結された末端ヌクレオチドからなる群から選択される、項 17 に記載の dsRNA。

[項 20] 前記修飾ヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、2' - デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2' - アミノ修飾ヌクレオチド、2' - アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート及び非天然塩基を含むヌクレオチドからなる群から選択される、項 17 に記載の dsRNA。

30

[項 21] 少なくとも 1 つの 2' - O - メチル修飾ヌクレオチド及び 5' - ホスホロチオエート基を含む、項 7 ~ 20 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 22] 前記第 1 の鎖は、少なくとも 3 つの 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、項 7 ~ 21 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 23] 前記第 1 の鎖は、前記 SNP 位置ヌクレオチドのいずれかの側で 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、項 22 に記載の dsRNA。

[項 24] 疎水性部分を含む、項 7 ~ 23 のいずれか一項に記載の dsRNA。

40

[項 25] 前記アレル多型を含む遺伝子の前記領域は、配列番号 1 ~ 10 からなる群から選択される核酸配列を含む、項 7 ~ 24 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 26] 前記第 1 の鎖は、UUCUGUAGCAUCAGCUUCUC を含む、項 7 ~ 25 のいずれか一項に記載の dsRNA。

[項 27] 二重鎖 RNA (dsRNA) であって、

アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約 15 ~ 35 ヌクレオチドの第 1 の鎖；及び前記第 1 の鎖の少なくとも一部と相補的な約 15 ~ 35 ヌクレオチドの第 2 の鎖を含み、

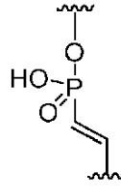
前記第 1 の鎖は、前記アレル多型と相補的である、5' 末端から 4 位における一塩基多型 (SNP) 位置ヌクレオチドを含み、

50

前記第1の鎖は、前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記5'末端から7位に位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む、二重鎖RNA(dsRNA)。

[項28] 式：

[化2]



10

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項27に記載のdsRNA。

[項29] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項28に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項30] 前記第1の鎖は、前記SNP位置ヌクレオチドのいずれかの側で2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、項27に記載のdsRNA。

[項31] 前記第1の鎖は、少なくとも3つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、項30に記載のdsRNA。

[項32] 5'-ホスホロチオエート基を含む、項31に記載のdsRNA。

20

[項33] アレル多型を含む前記遺伝子は、ハンチンチン(htt)遺伝子である、項27に記載のdsRNA。

[項34] 前記アレル多型を含む遺伝子の前記領域は、配列番号1~10からなる群から選択される核酸配列を含む、項27に記載のdsRNA。

[項35] 前記第1の鎖は、UUCUGUAGCAUCAGCUUCUCを含む、項27に記載のdsRNA。

[項36] 二重鎖RNA(dsRNA)であって、

アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的な約15~35ヌクレオチドの第1の鎖；及び前記第1の鎖の少なくとも一部と相補的な約15~35ヌクレオチドの第2の鎖を含み、

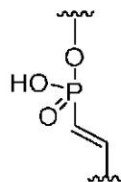
30

前記第1の鎖は、前記アレル多型と相補的である、5'末端から6位における一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドを含み、

前記第1の鎖は、前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記5'末端から11位に位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチドを含む、二重鎖RNA(dsRNA)。

[項37] 式：

[化3]



40

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項36に記載のdsRNA。

[項38] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項37に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項39] 前記第1の鎖は、前記SNP位置ヌクレオチドのいずれかの側で2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、項36に記載のdsRNA。

[項40] 前記第1の鎖は、少なくとも3つの2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む

50

、項 3 9 に記載の d s R N A。

[ 項 4 1 ] 5 ' - ホスホロチオエート基を含む、項 3 6 に記載の d s R N A。

[ 項 4 2 ] アレル多型を含む前記遺伝子は、ハンチンチン ( h t t ) 遺伝子である、項 3 6 に記載の d s R N A。

[ 項 4 3 ] 前記アレル多型を含む遺伝子の前記領域は、配列番号 1 ~ 1 0 からなる群から選択される核酸配列を含む、項 3 6 に記載の d s R N A。

[ 項 4 4 ] 前記第 1 の鎖は、U U C U G U A G C A U C A G C U U C U C を含む、項 3 6 に記載の d s R N A。

[ 項 4 5 ] 項 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の R N A 及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

10

[ 項 4 6 ] 細胞におけるアレル多型を含む遺伝子の発現を阻害する方法であって、前記細胞を、項 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の R N A と接触させることを含む方法。

[ 項 4 7 ] アレル多型を含む遺伝子によって特徴付けられるか又は引き起こされる疾患又は障害の治療を、それを必要とする対象において行う方法であって、治療有効量の、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5 ' 末端、3 ' 末端及びシード領域を有する R N A を対象に投与することを含み、前記 R N A は、

前記アレル多型と相補的である、前記シード領域内の位置での一塩基多型 ( S N P ) 位置ヌクレオチド；及び

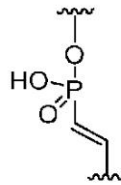
前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記 S N P 位置ヌクレオチドから 2 ~ 1 1 ヌクレオチドに位置するミスマッチ ( M M ) 位置ヌクレオチド

20

を含む、方法。

[ 項 4 8 ] 前記 R N A は、式：

[ 化 4 ]



30

を有するサブユニット間結合において少なくとも 1 つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項 4 7 に記載の方法。

[ 項 4 9 ] V P モチーフは、前記 S N P 位置ヌクレオチドの隣又は前記 M M 位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項 4 8 に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[ 項 5 0 ] 前記 R N A は、A S O 又は d s R N A である、項 4 7 に記載の方法。

[ 項 5 1 ] 前記 d s R N A は、

アレル多型を含む前記遺伝子の前記領域と相補的な約 1 5 ~ 3 5 ヌクレオチドの第 1 の鎖；及び

前記第 1 の鎖の少なくとも一部と相補的な約 1 5 ~ 3 5 ヌクレオチドの第 2 の鎖

を含み、

40

前記第 1 の鎖は、前記アレル多型と相補的である、前記 5 ' 末端から 2 ~ 6 位における前記 S N P 位置ヌクレオチドを含み、

前記第 1 の鎖は、前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記 S N P 位置ヌクレオチドから 2 ~ 6 ヌクレオチドに位置する前記 M M 位置ヌクレオチドを含む、項 4 7 に記載の方法。

[ 項 5 2 ] 前記 d s R N A は、前記対象の脳に投与される、項 5 1 に記載の方法。

[ 項 5 3 ] 前記 d s R N A は、線条体内注入によって投与される、項 5 1 に記載の方法。

[ 項 5 4 ] 線条体における前記遺伝子の発現の減少は、達成される、項 5 2 に記載の方法。

[ 項 5 5 ] 皮質における前記遺伝子の発現の減少は、達成される、項 5 2 に記載の方法。

50

[項56] アレル多型を含む前記遺伝子は、ハンチンチン (h t t) 遺伝子である、項47～55のいずれか一項に記載の方法。

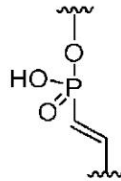
[項57] 前記疾患は、ハンチントン病である、項47～56のいずれか一項に記載の方法。

[項58] 前記SNP位置ヌクレオチドは、前記RNAの前記5'末端から2、4又は6位に位置し、及び前記MM位置ヌクレオチドは、前記SNP位置ヌクレオチドから2～6ヌクレオチドに位置する、項1に記載のRNA。

[項59] 2つのRNAを含む二分岐オリゴヌクレオチド化合物であって、前記RNAは、リンカー、スペーサー及び分岐点から選択される1つ以上の部分によって互いに連結され、各RNAは、5'末端、3'末端及びシード領域を有し、各RNAは、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、各RNAは、前記シード領域内の位置での一塩基多型 (SNP) 位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型 (SNP) 位置ヌクレオチド；及び前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記SNP位置ヌクレオチドから2～11ヌクレオチドに位置するミスマッチ (MM) 位置ヌクレオチドを含む、二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項60] 前記RNAは、式：

[化5]



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項59に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項61] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項60に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項62] h s i - RNA構造を有する、項59に記載の二分岐オリゴヌクレオチド。

[項63] 前記SNP位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267及びrs363099からなる群から選択されるh t t SNPのアレル多型と相補的である、項59に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項64] 前記SNP位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267及びrs363099からなる群から選択されるh t t SNPのアレル多型と相補的である、項1に記載のRNA。

[項65] ホスフェート、ビニルホスホネート、C5-メチル (R、又はS、又はラセミ)、ビニル上のC5-メチル及び還元ビニルからなる群から選択される5'安定化部分をさらに含む、項1に記載のRNA。

[項66] アルキル鎖、ビタミン、ペプチド、スフィンゴ糖脂質、多価不飽和脂肪酸、セコステロイド、ステロイドホルモン及びステロイド脂質からなる群から選択されるコンジュゲート部分をさらに含む、項1に記載のRNA。

[項67] アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有する核酸であって、

前記シード領域内の位置での一塩基多型 (SNP) 位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型 (SNP) 位置ヌクレオチド；

前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチであるミスマッチ (MM) 位置；及び

10

20

30

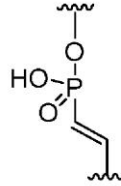
40

50

前記SNP位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)であって、各Xは、前記SNP位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)を含む、核酸。

[項68] 式:

[化6]



10

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項67に記載の核酸。

[項69] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項68に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

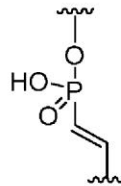
[項70] アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有する核酸であって、

前記シード領域内の位置での一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド;

前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチであるミスマッチ(MM)位置;及び前記SNP位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)であって、各Xは、前記SNP位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)を含む、核酸。

[項71] 式:

[化7]



30

を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項70に記載の核酸。

[項72] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項71に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項73] アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有する核酸であって、

前記シード領域内の位置での一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド;

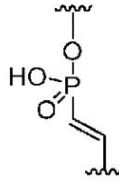
前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチであるミスマッチ(MM)位置;及び前記MM位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)であって、各Yは、前記MM位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)を含む、核酸。

[項74] 式:

[化8]

40

50



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項73に記載の核酸。

[項75] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項74に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

10

[項76] Xは、2'-O-メチル(2'-OMe)、2'-フルオロ(2'-F)、2'-リボ、2'-デオキシリボ、2'-F-4'-チオアラビノ(2'-F-ANA)、2'-O-(2'-メトキシエチル)(2'-MOE)、4'-S-RNA、ロックド核酸(LNA)、4'-S-F-ANA、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、2'-シアノエチル-RNA(CNet-RNA)、トリシクロ-DNA、シクロヘキシル核酸(CeNA)、アラビノ核酸(ANA)及びヘキシトール核酸(HNA)からなる群から選択される糖修飾を含む、項70に記載の核酸。

[項77] Yは、2'-OMe、2'-F、2'-リボ、2'-デオキシリボ、2'-F-ANA、2'-MOE、4'-S-RNA、LNA、4'-S-F-ANA、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、CNet-RNA、トリシクロ-DNA、CeNA、ANA及びHNAからなる群から選択される糖修飾を含む、項73に記載の核酸。

20

[項78] Xは、前記SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近又は前記SNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項70に記載の核酸。

[項79] Xは、前記SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近及び前記SNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項70に記載の核酸。

[項80] Yは、前記MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近又は前記MM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項73に記載の核酸。

[項81] Yは、前記MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近及び前記MM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項73に記載の核酸。

30

[項82] 前記SNP位置ヌクレオチドは、前記5'末端から2位~6位に存在する、項70又は73に記載の核酸。

[項83] 前記MM位置ヌクレオチドは、前記SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置する、項70又は73に記載の核酸。

[項84] 前記MM位置ヌクレオチドは、前記SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置する、項70又は73に記載の核酸。

[項85] アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的である、5'末端、3'末端及びシード領域を有する核酸であって、

前記シード領域内の位置での一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド；

40

前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチであるミスマッチ(MM)位置；及び

前記SNP位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)であって、各Xは、前記SNP位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(X)；及び

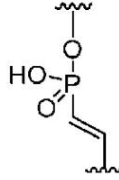
前記MM位置ヌクレオチドのいずれかの側での少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)であって、各Yは、前記MM位置ヌクレオチドから4、3又は2ヌクレオチド以内に位置する、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド(Y)

を含む、核酸。

[項86] 式：

[化9]

50



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項85に記載の核酸。

[項87] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項86に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。 10

[項88] Xは、2'-OMe、2'-F、2'-リボ、2'-デオキシリボ、2'-F-ANA、2'-MOE、4'-S-RNA、LNA、4'-S-F-ANA、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、CNet-RNA、トリシクロ-DNA、CeNA、ANA及びHNAからなる群から選択される糖修飾を含む、項85に記載の核酸。

[項89] Yは、2'-OMe、2'-F、2'-リボ、2'-デオキシリボ、2'-F-ANA、2'-MOE、4'-S-RNA、LNA、4'-S-F-ANA、2'-O-アリル、2'-O-エチルアミン、CNet-RNA、トリシクロ-DNA、CeNA、ANA及びHNAからなる群から選択される糖修飾を含む、項85に記載の核酸。

[項90] Xは、前記SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近又は前記SNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項85に記載の核酸。 20

[項91] Xは、前記SNP位置ヌクレオチドに対する5'の直近及び前記SNP位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項85に記載の核酸。

[項92] Yは、前記MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近又は前記MM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項85に記載の核酸。

[項93] Yは、前記MM位置ヌクレオチドに対する5'の直近及び前記MM位置ヌクレオチドに対する3'の直近に位置する、項85に記載の核酸。

[項94] 前記SNP位置ヌクレオチドは、前記5'末端から2位~6位に存在する、項85に記載の核酸。

[項95] 前記MM位置ヌクレオチドは、前記SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置する、項85に記載の核酸。 30

[項96] 前記MM位置ヌクレオチドは、前記SNP位置ヌクレオチドから2~6ヌクレオチドに位置する、項85に記載の核酸。

[項97] X及びYは、同じである、項70、73又は85のいずれか一項に記載の核酸。

[項98] X及びYは、異なる、項70、73又は85のいずれか一項に記載の核酸。

[項99] 2つ以上の核酸配列を含む二分岐オリゴヌクレオチド化合物であって、前記核酸配列(N)は、リンカー(L)、スペーサー(S)及び任意選択的に分岐点(B)から選択される1つ以上の部分によって互いに連結され、

各核酸配列は、二重鎖であり、且つセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、それぞれ5'末端及び3'末端を有し、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、それぞれ1つ以上の化学修飾されたヌクレオチドを含み、

各アンチセンス鎖は、シード領域を有し、各アンチセンス鎖は、アレル多型を含む遺伝子の領域と相補的であり、各アンチセンス鎖は、

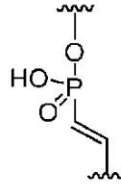
前記シード領域内の位置での一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチドであって、前記アレル多型と相補的である一塩基多型(SNP)位置ヌクレオチド；及び

前記遺伝子中のヌクレオチドとミスマッチである、前記SNP位置ヌクレオチドから2~11ヌクレオチドに位置するミスマッチ(MM)位置ヌクレオチド

を含む、二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[項100] 前記RNAは、式：

## [ 化 1 0 ]



を有するサブユニット間結合において少なくとも1つのビニルホスホネート修飾をさらに含む、項99に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

10

[ 項 1 0 1 ] VPモチーフは、前記SNP位置ヌクレオチドの隣又は前記MM位置ヌクレオチドの隣に挿入される、項100に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[ 項 1 0 2 ] 前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、それぞれ>80%の化学修飾されたヌクレオチドを含む、項99に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[ 項 1 0 3 ] 前記センス及びアンチセンス鎖の前記5'末端から1及び2位での前記ヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結される、項99に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[ 項 1 0 4 ] 各アンチセンス鎖は、少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含み、各センス鎖は、少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含み、且つ前記アンチセンス鎖に対して相補性を有する、項99に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

20

[ 項 1 0 5 ] 前記分岐オリゴヌクレオチド化合物の末端5'位に結合された疎水性部分をさらに含む、項99に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

[ 項 1 0 6 ] 各二重鎖核酸配列は、前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖の前記3'末端又は前記5'末端でのリンカー、スペーサー又は分岐点に独立して連結される、項99に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

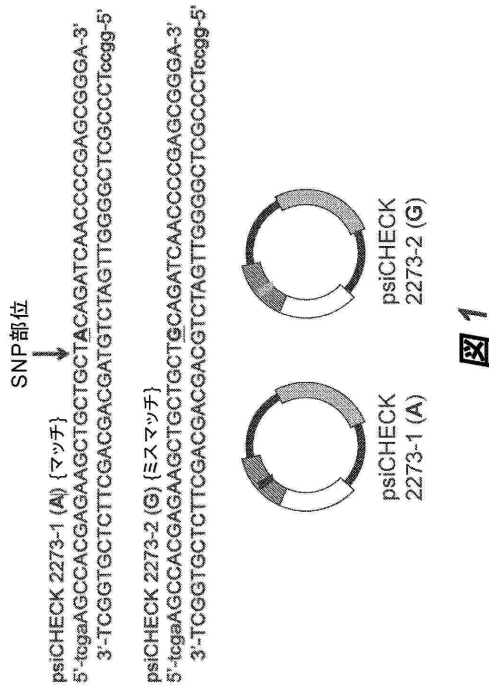
[ 項 1 0 7 ] 前記SNP位置ヌクレオチドは、rs363125、rs362273、rs362307、rs362336、rs362331、rs362272、rs362306、rs362268、rs362267及びrs363099からなる群から選択されるh t t SNPのアレル多型と相補的である、項99に記載の二分岐オリゴヌクレオチド化合物。

30

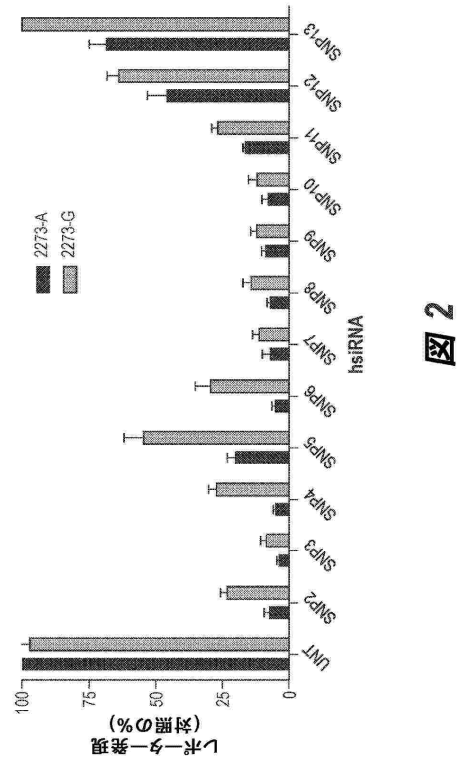
40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】



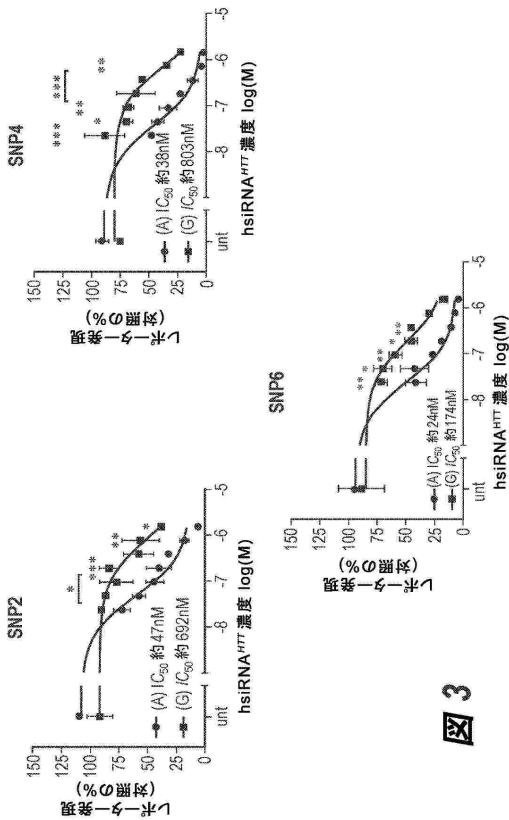
【 図 2 】



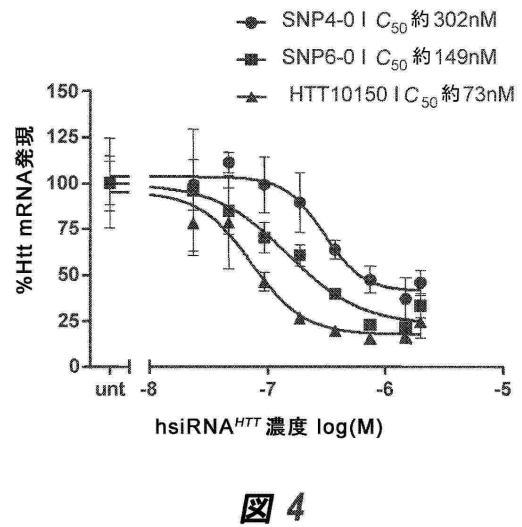
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】



30

40

50

【 図 5 】

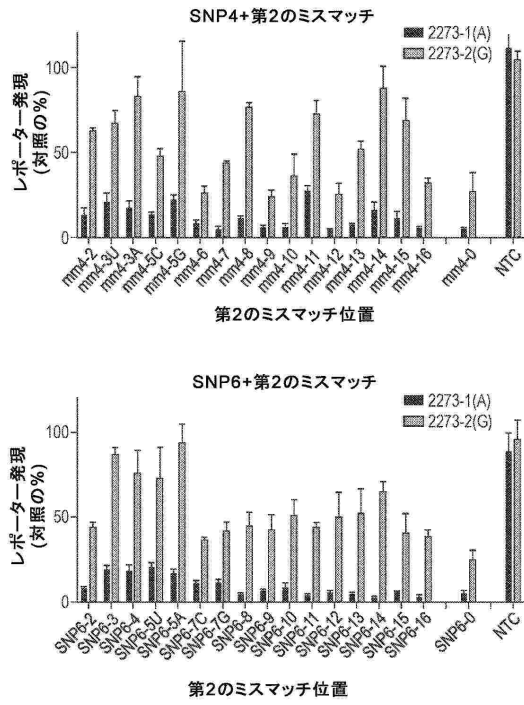


図 5

【 図 6 】

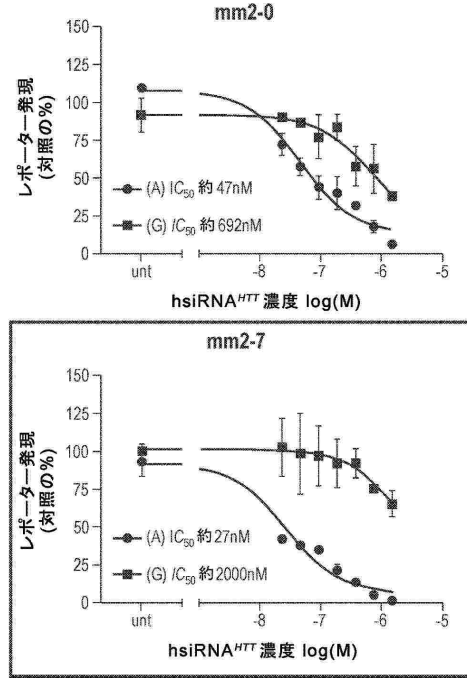


図 6

【 図 7 】

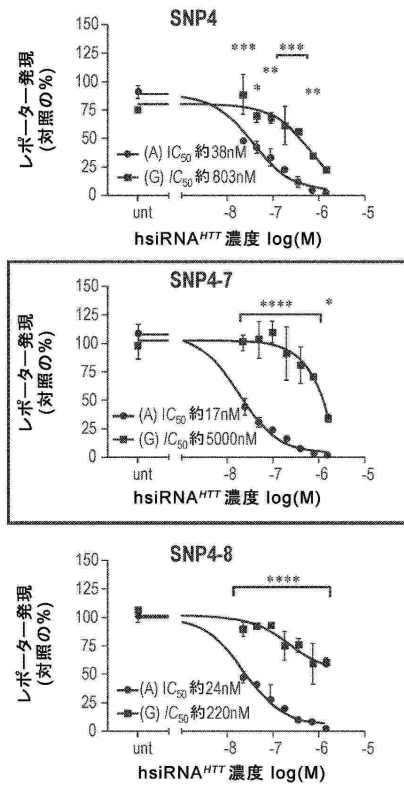


図 7

【 図 8 】

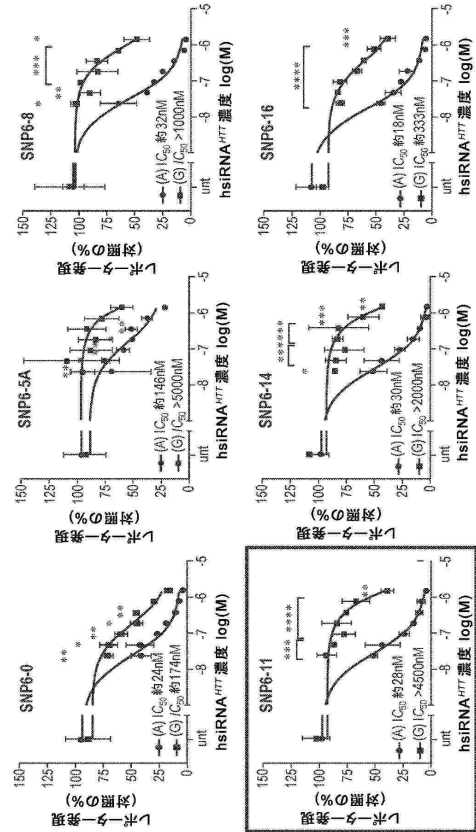


図 8

10

20

30

40

50

【 図 9 】

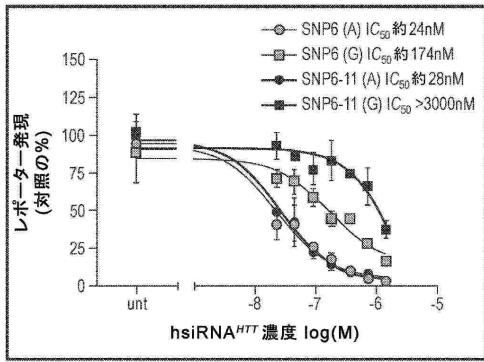
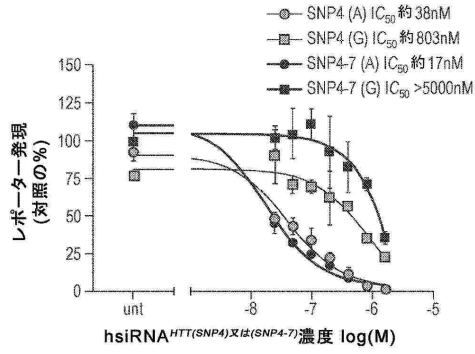


図 9

【 図 10 】

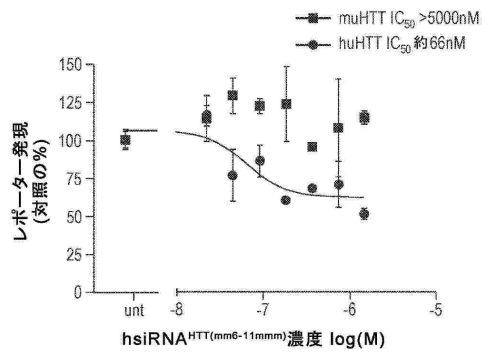
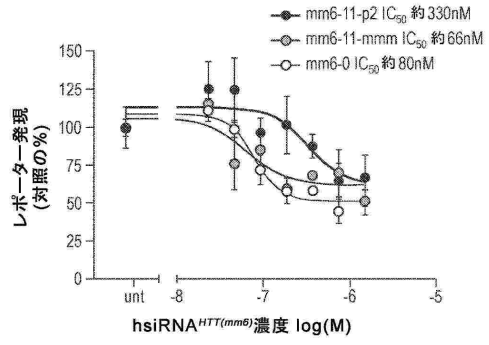


図 10

【 図 11 】

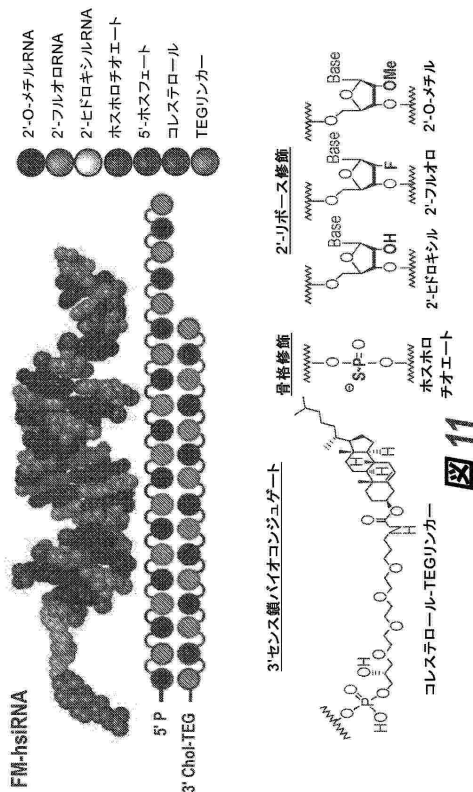


図 11

【 図 12 A 】

mim2-3G	P(mU)#(FU)#(mG)(mC)(FA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-3U	P(mU)#(FU)#(mU)(G)(mC)(FA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-3C	P(mU)#(FU)#(mC)(G)(mC)(FA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-4	P(mU)#(FU)#(mG)(FU)(mC)(FA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-5	P(mU)#(FU)#(mG)(FU)(mU)(G)(mC)(FA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-6	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(FU)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-7	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mU)(FA)(MU)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-8	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(FA)(MU)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-9	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(MU)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-10	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(FU)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-11	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-12	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(FA)(mU)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-13	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-14	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fU)(mU)#(fU)(mU)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-15	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mA)(fU)(mU)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)
mim2-16	P(mU)#(FU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fU)(mU)#(mG)#(U)#(mG)#(fG)

図 12A

10

20

30

40

50



【 図 15 】

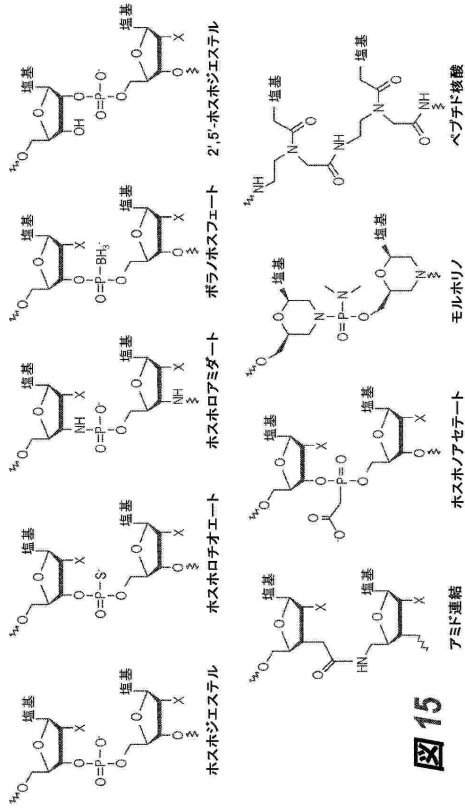


図 15

【 図 16 】

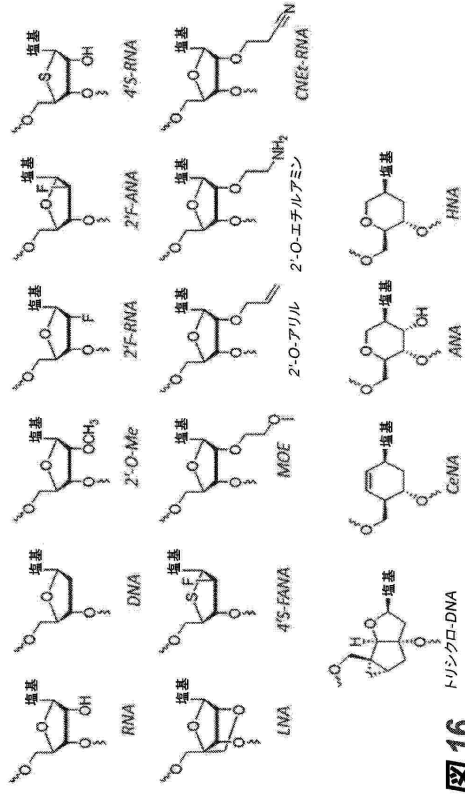


図 16

【 図 17 】

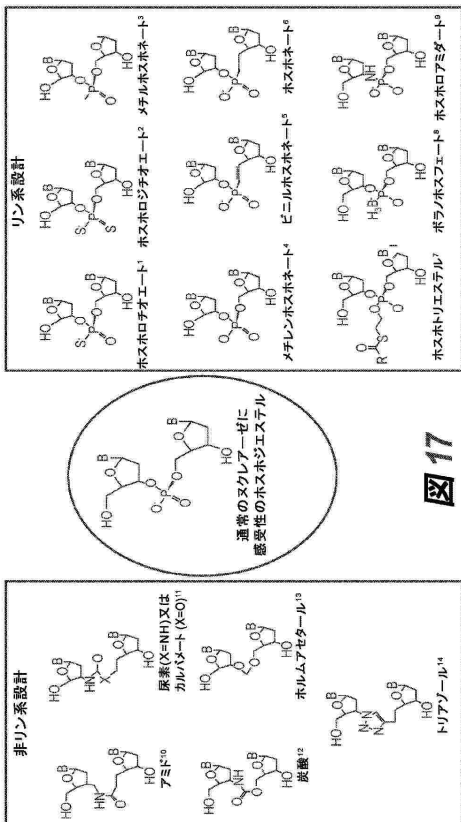


図 17

【 図 18 】

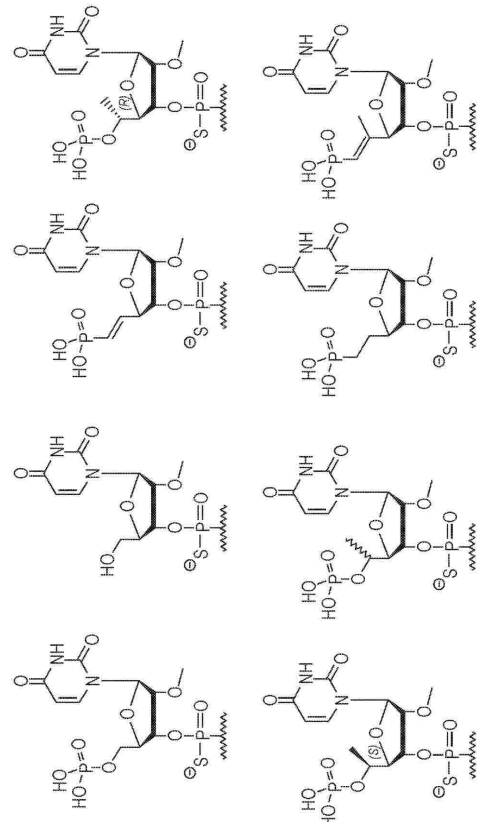


図 18

【 図 19 】

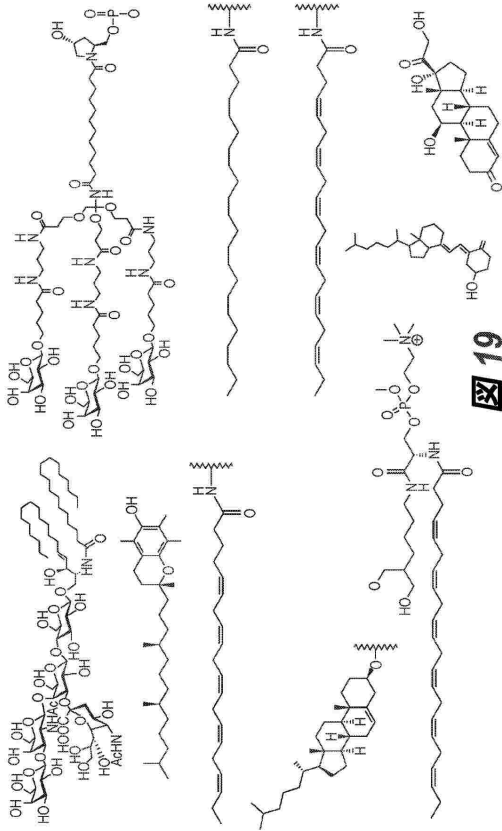


図 19

【 図 20 】

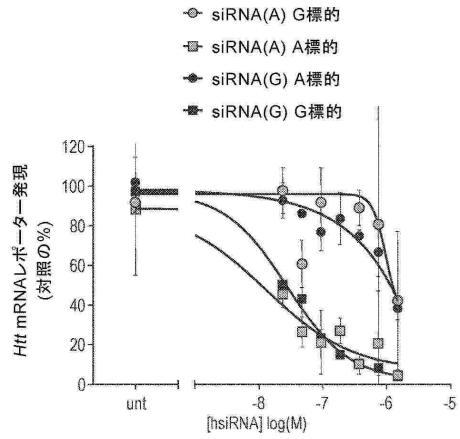


図 20

【 図 21 】

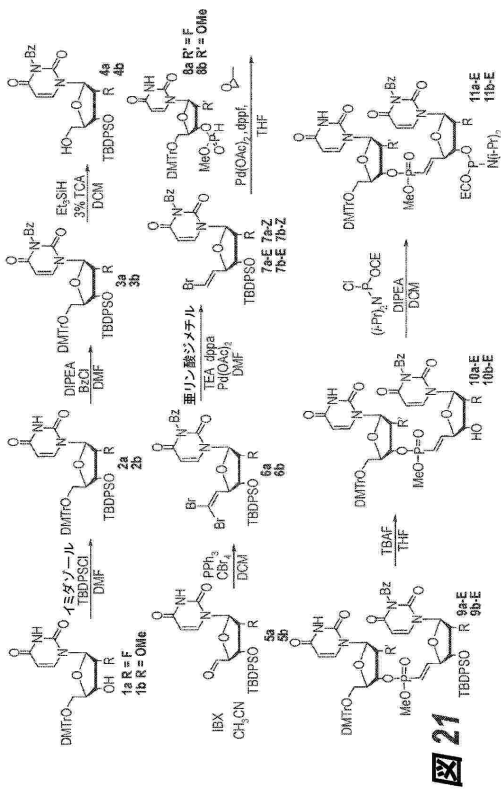


図 21

【 図 22 】

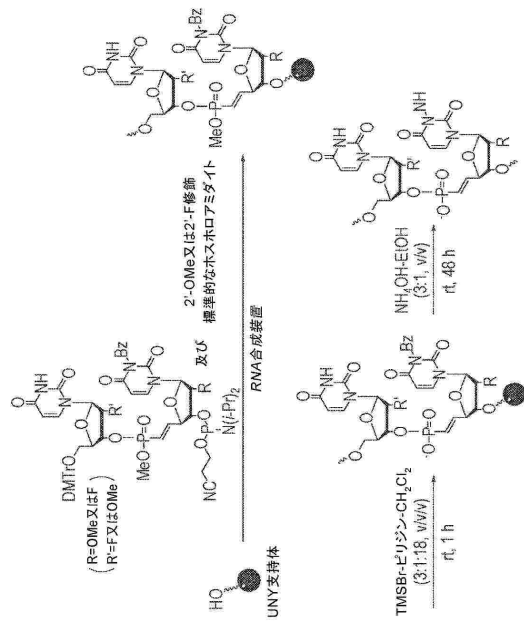


図 22

10

20

30

40

50





【 図 29 】

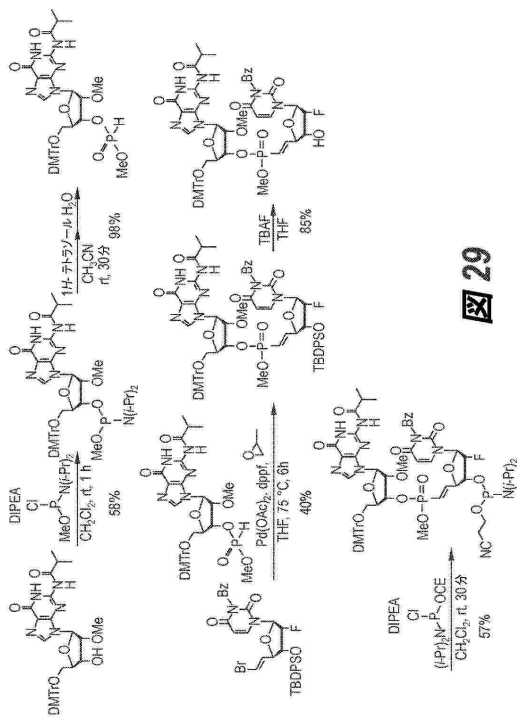


図 29

【 図 30 - 1 】

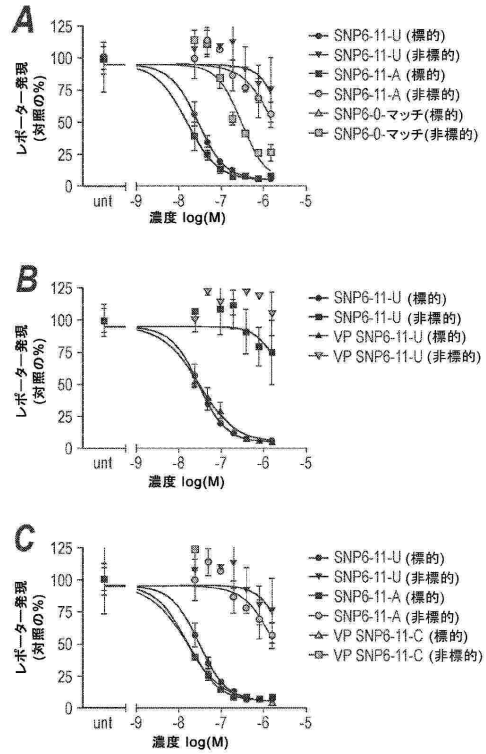


図 30

【 図 30 - 2 】

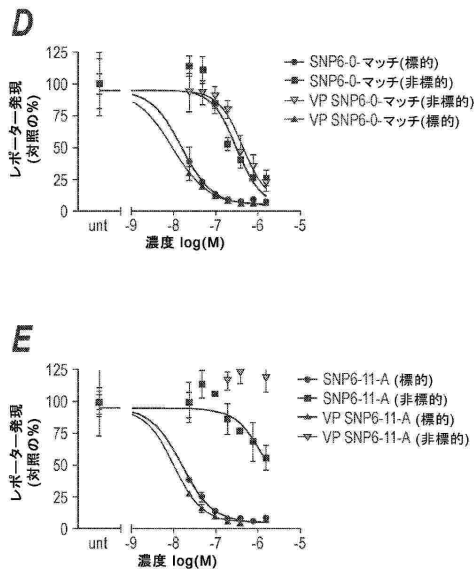


図 30

【 図 31 】

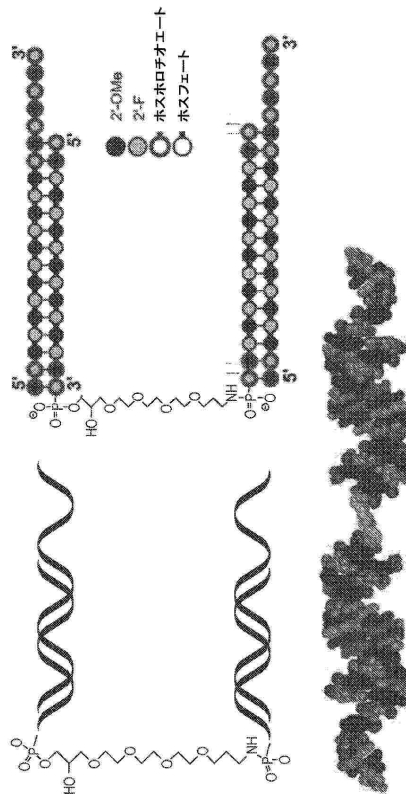


図 31

10

20

30

40

50

【 図 3 2 A 】

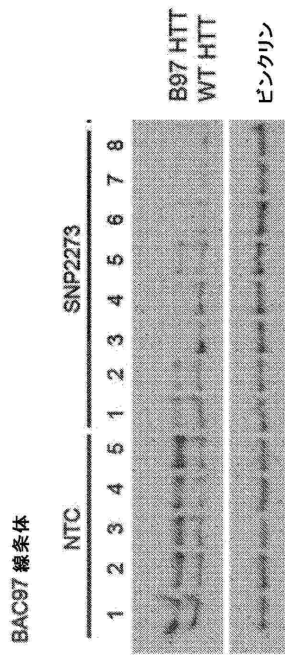


図 32A

【 図 3 2 B 】

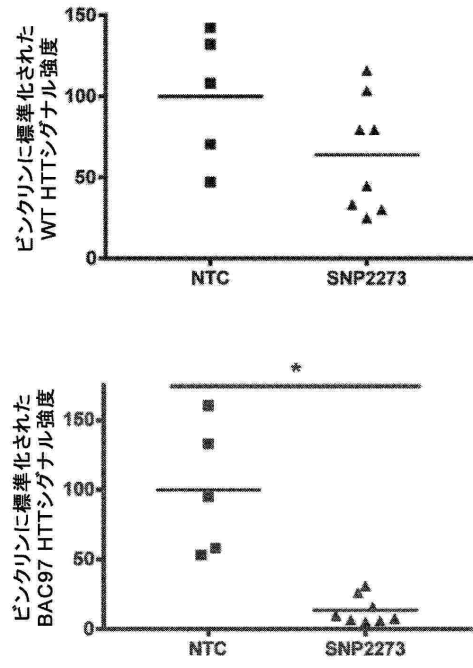


図 32B

【 図 3 3 】

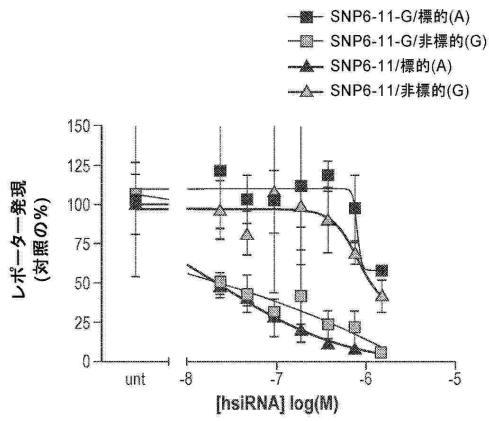


図 33

【 図 3 4 】

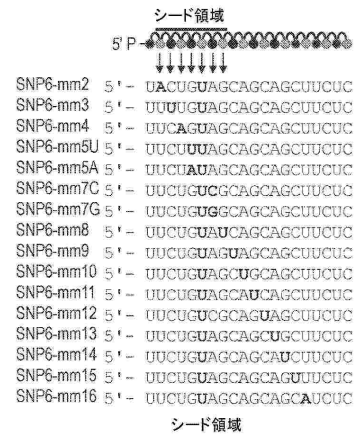


図 34

10

20

30

40

50



【 図 39 】

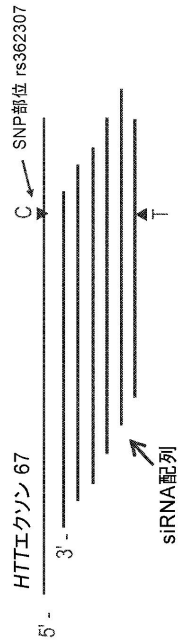


図 39

【 図 40 】

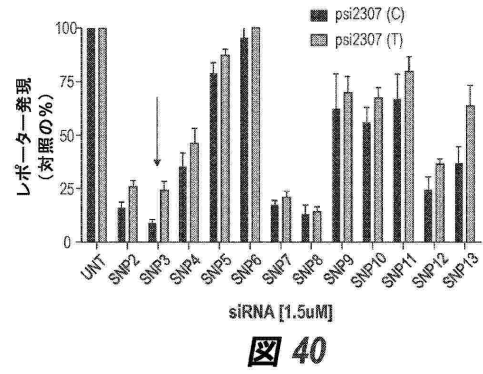


図 40

10

20

【 図 41 】

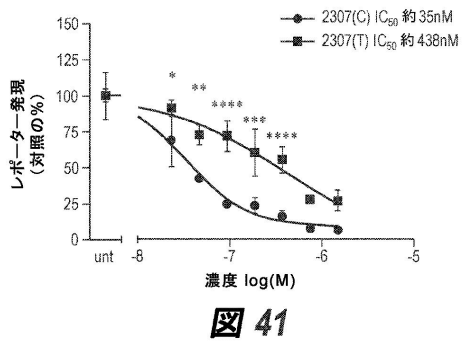


図 41

【 図 42 】

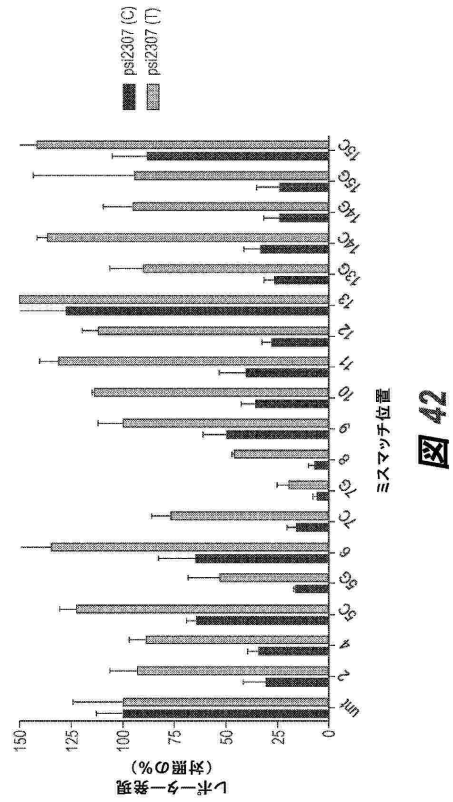


図 42

30

40

50

【 図 4 3 】

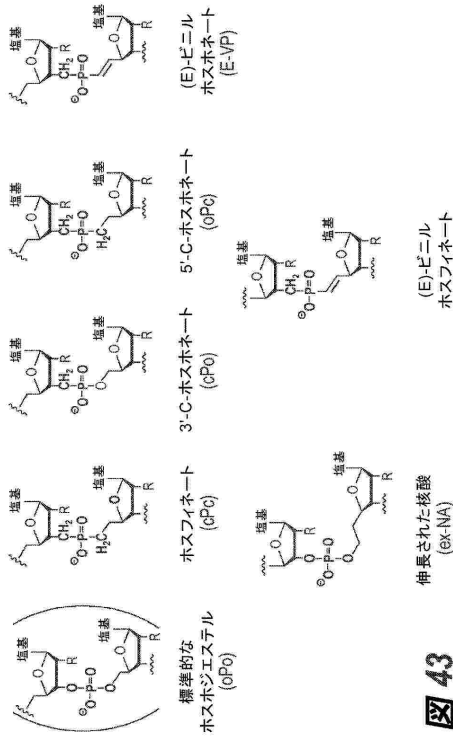
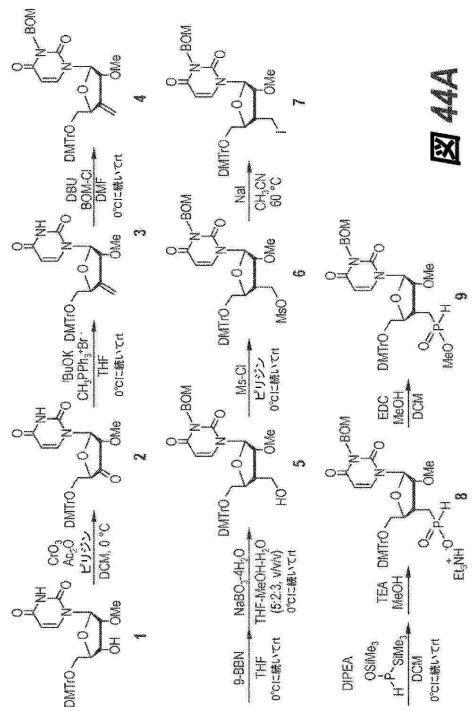


図 43

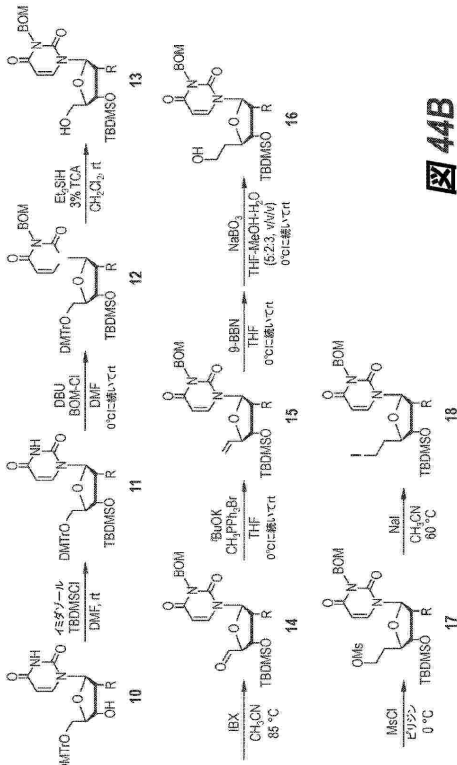
【 図 4 4 A 】



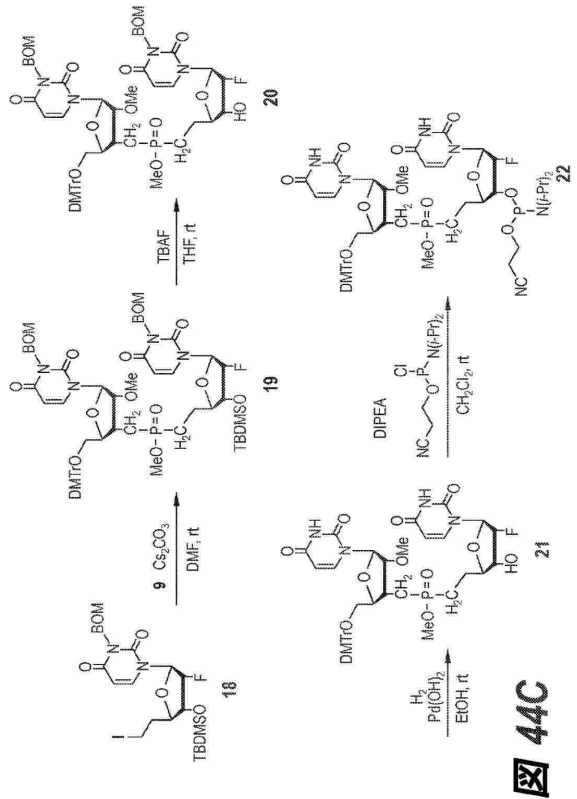
10

20

【 図 4 4 B 】



【 図 4 4 C 】



30

40

50



【配列表】

0007618229000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## 前置審査

(72)発明者 ジュリア・オルターマン

アメリカ合衆国 0 1 6 0 4 マサチューセッツ州ウースター、ハミルトン・ストリート 1 2 5 番、アパートメント 3

(72)発明者 フェイス・コンロイ

アメリカ合衆国 0 1 6 0 4 マサチューセッツ州ウースター、プランテーション・ストリート 1 1 3 番、アパートメント 2

(72)発明者 イーディス・フィスター

アメリカ合衆国 0 1 7 1 9 マサチューセッツ州ボックスボロー、マサチューセッツ・アベニュー 1 0 8 番

(72)発明者 ニール・アロニン

アメリカ合衆国 0 2 4 6 0 マサチューセッツ州ニュートンビル、ホイッター・ロード 1 9 番

(72)発明者 ケン・ヤマダ

アメリカ合衆国 0 2 1 0 8 マサチューセッツ州ボストン、ビーコン・ストリート 1 番、サーティファースト・フロア、ユニバーシティ・オブ・マサチューセッツ内

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 3 6 0 3 9 ( US , A 1 )

特表 2 0 1 8 - 5 1 6 0 9 1 ( JP , A )

米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 5 1 2 8 6 ( US , A 1 )

国際公開第 2 0 1 1 / 1 5 8 9 2 4 ( WO , A 1 )

Biochemistry, 2003, Vol.42, No.11, pp.3239-3246

PLoS One, 2008, Vol.3, No.5, #e2248, pp.1-9

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

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 )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d