

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-532955

(P2020-532955A)

(43) 公表日 令和2年11月19日 (2020. 11. 19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z	4 C 0 5 7
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 7 6
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 132 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-506983 (P2020-506983)
 (86) (22) 出願日 平成30年8月7日 (2018. 8. 7)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年4月7日 (2020. 4. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/045671
 (87) 国際公開番号 W02019/032619
 (87) 国際公開日 平成31年2月14日 (2019. 2. 14)
 (31) 優先権主張番号 62/558, 183
 (32) 優先日 平成29年9月13日 (2017. 9. 13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/542, 043
 (32) 優先日 平成29年8月7日 (2017. 8. 7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 311001370
 フィオ ファーマシューティカルズ コー
 ポレーション
 Phio Pharmaceutical
 s Corp.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 1 7 5 2、マールボロ、シマラーノ ドラ
 イブ 2 5 7、スイート 1 0 1
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 エリセーエフ、アレクセイ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 1 3 5、ボストン、カミングス ロード
 2 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学修飾されたオリゴヌクレオチド

(57) 【要約】

本開示は、いくつかの側面において、免疫原性組成物の生産のための方法および組成物に関する。いくつかの態様において、本開示は、宿主細胞の分化をコントロールし、および/または減少させることが可能な1以上のオリゴヌクレオチド剤でex vivo処置されている宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、本開示により記載される組成物および方法は、がんを処置するための免疫原性モジュレーターとして有用である。

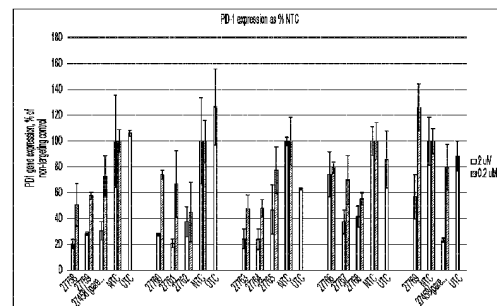


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T I G I T、P D C D 1、A K T、p 5 3、C b l - b、T e t 2、B l i m p - 1、T - B o x 2 1、D N M T 3 A、P T P N 6、または H K 2 をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子であって、ここで任意に、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 3 ~ 1 3 内の配列から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている、前記化学修飾された二本鎖核酸分子。

【請求項 2】

s d - r x R N A である、請求項 1 に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。

10

【請求項 3】

少なくとも 1 つの 2' - O - メチル修飾および / または少なくとも 1 つの 2' - フルオロ修飾、および少なくとも 1 つのホスホロチオアート修飾を含む、請求項 1 または 2 に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子。

【請求項 4】

T I G I T、P D C D 1、A K T、P 5 3、C b l - b、T e t 2、B l i m p - 1、T - B o x 2 1、D N M T 3 A、P T P N 6、または H K 2 をコードする遺伝子に対して向けられている s d - r x R N A であって、ここで s d - r x R N A は、表 3 ~ 1 3 内の配列から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む、前記 s d - r x R N A。

20

【請求項 5】

疎水的に修飾されている、請求項 4 に記載の s d - r x R N A。

【請求項 6】

1 以上の疎水性抱合体に連結しており、ここで任意に、疎水性抱合体が、コレステロールである、請求項 4 または 5 に記載の s d - r x R N A。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子および薬学的に許容し得る賦形剤を含む、組成物。

【請求項 8】

化学修飾された二本鎖核酸分子が、表 3、4、5、6、または 8 から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含むか、またはそれからなり、ここで任意に、化学修飾された二本鎖核酸分子は、T I G I T 1 (配列番号 6 0)、T I G I T 6 (配列番号 6 5)、T I G I T 2 1 (配列番号 1 0 0 および 1 0 1)、P D 2 6 (配列番号 1 1 2 および 1 1 3)、C B 2 3 (配列番号 2 3 6 および 2 3 7)、または C B 2 9 (配列番号 2 4 8 および 2 4 9) に記載の配列を含む、請求項 7 に記載の組成物。

30

【請求項 9】

請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の s d - r x R N A および薬学的に許容し得る賦形剤を含む、組成物。

【請求項 10】

s d - r x R N A が、C B 2 3 (配列番号 2 3 6 または 2 3 7) または C B 2 9 (配列番号 2 4 8 または 2 4 9) に記載の配列を含むか、またはそれからなる、請求項 9 に記載の組成物。

40

【請求項 11】

化学修飾された二本鎖核酸分子が、P D 2 6 センス鎖 (配列番号 1 1 2) に記載の配列を有するセンス鎖および / または P D 2 6 アンチセンス鎖 (配列番号 1 1 3) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

化学修飾された二本鎖核酸分子または s d - r x R N A が、P D 2 6 センス鎖 (配列番号 1 1 2) に記載の配列を有するセンス鎖および P D 2 6 アンチセンス鎖 (配列番号 1 1 3) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含むか、またはそれらからなる、請求項

50

1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

化学修飾された二本鎖核酸分子または $s d - r x R N A$ が、 $C B \quad 2 3$ センス鎖（配列番号 2 3 6）に記載の配列を有するセンス鎖および / または $C B \quad 2 3$ アンチセンス鎖（配列番号 2 3 7）に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

化学修飾された二本鎖核酸分子または $s d - r x R N A$ が、 $C B \quad 2 3$ センス鎖（配列番号 2 3 6）に記載の配列を有するセンス鎖および $C B \quad 2 3$ アンチセンス鎖（配列番号 2 3 7）に記載の配列を有するアンチセンス鎖からなる、請求項 1 3 に記載の組成物。

10

【請求項 1 5】

化学修飾された二本鎖核酸分子または $s d - r x R N A$ が、 $C B \quad 2 9$ センス鎖（配列番号 2 4 8）に記載の配列を有するセンス鎖および / または $C B \quad 2 9$ アンチセンス鎖（配列番号 2 4 9）に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

化学修飾された二本鎖核酸分子または $s d - r x R N A$ が、 $C B \quad 2 9$ センス鎖（配列番号 2 4 8）に記載の配列を有するセンス鎖および $C B \quad 2 9$ アンチセンス鎖（配列番号 2 4 9）に記載の配列を有するアンチセンス鎖からなる、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

化学修飾された二本鎖核酸分子が、 $T I G I T \quad 2 1$ センス鎖（配列番号 1 0 0）に記載の配列を有するセンス鎖および / または $T I G I T \quad 2 1$ アンチセンス鎖（配列番号 1 0 1）に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 1 8】

化学修飾された二本鎖核酸分子が、 $T I G I T \quad 2 1$ センス鎖（配列番号 1 0 0）に記載の配列を有するセンス鎖および $T I G I T \quad 2 1$ アンチセンス鎖（配列番号 1 0 1）に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

宿主細胞を含む免疫原性組成物であって、前記宿主細胞の分化のレベルをコントロールし、および / または減少させて、ヒトにおける投与のための特定の免疫細胞集団の産生を可能にするように、前記宿主細胞が化学修飾された二本鎖核酸分子で *ex vivo* 処置された、前記免疫原性組成物。

30

【請求項 2 0】

宿主細胞が、 $P D C D 1$ 、 $A K T$ 、 $p 5 3$ 、 $C b l - b$ 、 $T e t 2$ 、 $B l i m p - 1$ 、 $T - B o x 2 1$ 、 $D N M T 3 A$ 、 $P T P N 6$ 、または $H K 2$ をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を含み、ここで任意に、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 3 ~ 1 3 内の配列から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられており、さらにここで任意に、化学修飾された二本鎖核酸分子は、 $P D C D 1$ に対して向けられていおり、かつ表 3 または 6 から選択される配列の少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む、請求項 1 9 に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 2 1】

化学修飾された二本鎖核酸分子が、少なくとも 1 つの $2' - O -$ メチル修飾および / または少なくとも 1 つの $2' -$ フルオロ修飾、および少なくとも 1 つのホスホロチオアート修飾を含む、請求項 1 9 または 2 0 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 2】

化学修飾された二本鎖核酸分子が、疎水的に修飾されている、請求項 2 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 3】

50

化学修飾された二本鎖核酸分子が、1以上の疎水性抱合体に連結しており、ここで任意に、疎水性抱合体が、コレステロールである、請求項22に記載の免疫原性組成物。

【請求項24】

宿主細胞が、T細胞、NK細胞、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞（DC）、幹細胞（SC）、誘導多能性幹細胞（iPSC）、幹細胞メモリーT細胞、およびサイトカイン誘導性キラー細胞（CIK）の群から選択される、請求項19～23のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項25】

宿主細胞が、T細胞である、請求項24に記載の免疫原性組成物。

【請求項26】

T細胞が、CD8+T細胞であり、ここで任意に、T細胞が、化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAの導入後、T_{SCM}またはT_{CM}に分化し、さらにここで任意に、免疫原性組成物が、T_{SCM}またはT_{CM}細胞を少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%または100%含む、請求項24または25に記載の免疫原性組成物。

【請求項27】

T細胞が、高親和性T細胞受容体（TCR）および/またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する1以上の導入遺伝子を含む、請求項24～26のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項28】

宿主細胞が、健康なドナーに由来する、請求項19～27のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項29】

免疫原性組成物を生産するための方法であって、1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を細胞に導入することを含み、ここで1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子は、PDCD1、AKT、p53、Cbl-b、Tet2、Blimp-1、T-Box21、DNMT3A、PTPN6、および/またはHK2を標的とし、それにより宿主細胞を生産する、前記方法。

【請求項30】

免疫原性組成物を生産するための方法であって、請求項1～6のいずれか一項に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAを細胞に導入することを含み、前記方法。

【請求項31】

細胞が、T細胞、NK細胞、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞（DC）、幹細胞（SC）、誘導多能性幹細胞（iPSC）、幹細胞メモリーT細胞、およびサイトカイン誘導性キラー細胞（CIK）である、請求項29または30に記載の方法。

【請求項32】

T細胞が、CD8+T細胞であり、ここで任意に、T細胞が、化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAの導入後、T_{SCM}またはT_{CM}に分化し、さらにここで任意に、免疫原性組成物が、T_{SCM}またはT_{CM}細胞を少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%または100%含む、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

T細胞が、高親和性T細胞受容体（TCR）および/またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する1以上の導入遺伝子を含む、請求項31または32に記載の方法。

【請求項34】

細胞が、健康なドナーに由来する、請求項29～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

増殖性疾患または感染性疾患を患う対象を処置するための方法であって、請求項19～28のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を対象へ投与することを含む、前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

増殖性疾患が、がんである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

感染性疾患が、病原体感染である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

病原体感染が、細菌感染、ウイルス感染、または寄生生物感染である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

表 5 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む T I G I T 配列に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞を含む、免疫原性組成物。

10

【請求項 41】

表 3 または 6 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む P D C D 1 配列に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞を含む、免疫原性組成物。

【請求項 42】

化学修飾された二本鎖核酸分子が、s d - r x R N A である、請求項 40 または 41 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 43】

宿主細胞が、P D C D 1 を標的とする第 1 の化学修飾された二本鎖核酸分子または s d - r x R N A および T I G I T を標的とする第 2 の化学修飾された二本鎖核酸分子または s d - r x R N A を含む、請求項 40 ~ 42 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 44】

化学修飾された二本鎖核酸分子または s d - r x R N A が、宿主細胞において P D C D 1 または T I G I T の少なくとも 50 % の阻害を誘導する、請求項 40 ~ 43 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 45】

増殖性疾患または感染性疾患を患う対象を処置するための方法であって、請求項 40 ~ 44 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を対象へ投与することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2017年8月7日に提出された「IMMUNOTHERAPY OF CANCER UTILIZING CHEMICALLY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES」と題する米国仮出願第62/542,043号、および2017年9月13日に提出された「CONTROL OF DIFFERENTIATION UTILIZING CHEMICALLY MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES IN IMMUNOTHERAPY」と題する米国仮出願第62/558,183号の出願日の利益を、35 U.S.C. § 119(e)の下に主張し、そのそれぞれの全開示は参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

【0002】

40

分野

いくつかの側面において、本開示は、免疫原性組成物、および、治療的免疫細胞の集団またはサブセットを改善するための、細胞分化および代謝に關与する遺伝子標的を調節するためのオリゴヌクレオチドの使用を含む免疫原性組成物を作製する方法に關する。本開示は、さらには、例えば、がんおよび自己免疫障害を含む細胞増殖性障害または感染性疾患の処置のための免疫原性組成物を用いる方法に關する。

【背景技術】

【0003】

背景

免疫系の生理学的な機能は、新生物細胞を認識および排除することである。したがって

50

、腫瘍進行の側面は、免疫抵抗性メカニズムの発達である。これらの耐性メカニズムは、一度発達すると、自然免疫系が腫瘍成長に影響することを防ぐのみならず、がんに対する免疫治療的アプローチの有効性を制限する。免疫抵抗性メカニズムには、しばしば免疫チェックポイントと称される免疫阻害経路が含まれる。免疫阻害経路は、腫瘍細胞とCD8+細胞傷害性Tリンパ球との間の相互作用において特に重要な役割を果たし、養子細胞移植(AC T)治療剤を含む。

【0004】

養子細胞移植(AC T)の様々な方法は、血液または腫瘍材料などの患者の試料から回収された細胞のex vivo処置を含む。細胞ベースの処置の調製に含まれる共通のステップは、主な供給源(例として、末梢血)からの細胞の単離、遺伝子編集(例として、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞の操作または操作されたT細胞受容体(TCR)細胞)、活性化、および拡大である。

10

【0005】

ex vivoプロセッシングの間、細胞は、中でも、腫瘍への輸送、in vivoでの増殖能力と寿命、および免疫抑制環境におけるそれらの有効性などの、それらの治療特性に影響を与える可能性がある特定の表現型の変化を経る。例えば、T細胞分化および成熟の状態は、典型的には、サブタイプの以下のシーケンスを通じて進行する：ナイーブ(T_N) - 幹細胞メモリー(T_{SCM}) - セントラルメモリー(T_{CM}) - エフェクターメモリー(T_{EM}) - 最終分化エフェクターT細胞(T_{EFF})。CD8+T細胞の中でも初期メモリーT細胞(T_{SCM}/T_{CM})の表現的および機能的属性は、より分化したエフェクター細胞(例として、 T_{EM} 、 T_{EFF} 等々)よりも優れたin vivoでの拡大、存続、および抗腫瘍有効性を実証することが観察されている。

20

【0006】

がんの免疫治療は、臨床診療においてますます重要になってきている。免疫応答を誘発または増幅するように設計された免疫治療は、活性化免疫治療として分類することができる。一方で免疫応答を減少または抑制する免疫治療は抑制免疫療として分類することができる。がん免疫抵抗性メカニズムと戦うための1つの活性化免疫治療戦略は、宿主の免疫応答を刺激または維持するために、(例として、チェックポイント標的化モノクローナル抗体を使用することにより)免疫チェックポイントを阻害することである。

30

【0007】

しかしながら、がん免疫治療剤をチェックポイントインヒビターと組み合わせて使用することには数多の欠点が存在する。例えば、免疫チェックポイントの遮断は、免疫自己寛容性の破壊を導き、それによって「免疫関連有害事象」と呼ばれる自己免疫/自己炎症性副作用の新たな症候群が誘導され得る。加えて、チェックポイントインヒビターの毒性プロファイルは、伝えられるところによれば、他のクラスの腫瘍剤について報告された毒性プロファイルとは異なっており、皮膚、胃腸、内分泌、肺、肝臓、眼、および神経系を含む複数の器官系で炎症性イベントを誘導する可能性がある。

【発明の概要】

【0008】

概要

40

いくつかの側面において、本開示は、治療的T細胞(例として、 T_{SCM} および T_{CM})の所望されるサブタイプのレベルを増強するための、免疫原性組成物の産生の間、T細胞の分化プロセスをコントロールするための、組成物および方法に関する。本開示は、部分的には、シグナル伝達/転写因子、エピジェネティックな、代謝性および共阻害性/ネガティブ制御性標的に関連する遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチド分子を含む宿主細胞を含む免疫調節(例として、免疫原性)組成物、ならびに、かかる組成物を生産する方法に基づく。いくつかの側面において、本開示は、免疫原性組成物を生産する方法に用いられる化学修飾されたオリゴヌクレオチド分子を提供する。いくつかの態様において、本開示により記載される方法および組成物は、免疫原性組成物の製造のために、および増殖性または感染性疾患を有する対象を処置するために有用である。

50

【0009】

結果的に、いくつかの側面において、本開示は、タンパク質キナーゼB（PKB、AKTとも称される）、プログラム細胞死タンパク質1（PD1、PDCD1とも称される）、IgとITIMドメインとを有するT細胞免疫受容体（TIGIT）、腫瘍タンパク質p53（TP53、p53、細胞腫瘍抗原、リンタンパク質p53、腫瘍抑制剤p53、抗原NY-CO-13、または形質転換（transform）関連タンパク質53（TRP53）としても知られている）、E3ユビキチン-タンパク質リガーゼCbl-b（Cbl-b）、Tetメチルシトシンジメチルメタセラーゼ2（TET2、KIAA1546、Tet発がん遺伝子ファミリーメンバー2、予測される（Probable）メチルシトシンジメチルメタセラーゼTET2、メチルシトシンジメチルメタセラーゼTET2としても知られている）、PR/SETドメイン1（Blimp-1、PRドメイン含有1、ZNFドメインを含む、PRドメイン1、PRDM1、PRDI-BF1、ベータ-インターフェロン遺伝子ポジティブ制御ドメインI結合因子、ポジティブ制御ドメインI結合因子1、Bリンパ球誘導性成熟タンパク質1、PRドメインジメチルメタセラーゼタンパク質1、PRドメイン含有タンパク質1、PRDI結合因子1としても知られている）、T-Box21（TBX21、T細胞特異的T-Box転写因子T-Box、転写因子TBLYM、T-Boxタンパク質21、TBLYM、TBET、T-Box転写因子TBX21、T細胞において発現されるT-Box、T-PET、T-Boxとしても知られている）、DNA（シトシン-5）-メチルトランスフェラーゼ3A（DNMT3A）、タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体6型（PTPN6、SHP-1としても知られている）、またはヘキソキナーゼ2（HK2、筋肉形成ヘキソキナーゼとしても知られている）を標的とする（例として、これらをコードする遺伝子に対して向けられている）化学修飾された二本鎖核酸分子を提供する。

10

20

【0010】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表3～13内の配列から選択される配列の少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、自己送達RNA（例として、sd-rxRNA）である。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子（例として、sd-rxRNA）は、表3～13に記載の配列またはそれらのフラグメントを含むか、またはそれらからなるか、またはそれらを標的とするか、またはそれらに対して向けられている。

30

【0011】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、少なくとも1つの2'-O-メチル修飾および/または少なくとも1つの2'-フルオロ修飾、および少なくとも1つのホスホロチオアート修飾を含む。いくつかの態様において、ガイド鎖の5'端に対する第1のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を有する。いくつかの態様において、2'-O-メチル修飾は、5P-2'-O-メチルU修飾、または5'ビニルホスホナート2'-O-メチルU修飾である。

いくつかの態様において、sd-rxRNAは、疎水的に修飾されている。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、1以上の疎水性抱合体に連結している。いくつかの態様において、疎水性抱合体は、コレステロールである。

40

【0012】

いくつかの側面において、本開示は、TIGIT、DNMT3A、PTPN6、PDCD1、AKT、P53、Cbl-b、Tet2、Blimp-1、T-Box21、またはHK2をコードする遺伝子に対して向けられているsd-rxRNAを提供する。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、表3～13内の配列から選択される配列の少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む。

いくつかの側面において、本開示は、IgとITIMドメインとを有するT細胞免疫受容体（TIGIT）またはプログラム細胞死タンパク質1（PD1）を標的とする化学修飾された二本鎖核酸分子を提供する。

50

【 0 0 1 3 】

いくつかの側面において、本開示は、T I G I Tをコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 5 内の配列から選択される少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、s d - r x R N Aは、配列番号 1 0 0 (T I G I T 2 1 センス鎖) に記載の配列を有するセンス鎖センス鎖および / または配列番号 1 0 1 (T I G I T 2 1 アンチセンス鎖) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様において、s d - r x R N Aは、配列番号 1 0 0 (T I G I T 2 1 センス鎖) に記載の配列を有するセンス鎖および配列番号 1 0 1 (T I G I T 2 1 アンチセンス鎖) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。

10

【 0 0 1 4 】

いくつかの態様において、本開示は、P D 1 に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 3 または表 6 内の配列から選択される少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 6 に記載の配列を含む。いくつかの態様において、s d - r x R N Aは、配列番号 1 1 2 (P D 2 6 センス鎖) に記載の配列を有するセンス鎖および / または配列番号 1 1 3 (P D 2 6 アンチセンス鎖) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様において、s d - r x R N Aは、配列番号 1 1 2 (P D 2 6 センス鎖) に記載の配列を有するセンス鎖および配列番号 1 1 3 (P D 2 6 アンチセンス鎖) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。

20

【 0 0 1 5 】

いくつかの態様において、本開示は、C b 1 - b に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 4 および表 8 内の配列から選択される少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 8 に記載の配列を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子または s d - r x R N Aは、C B 2 3 センスまたはアンチセンス鎖 (配列番号 2 3 6 または 2 3 7) または C B 2 9 センスまたはアンチセンス鎖 (配列番号 2 4 8 または 2 4 9) に記載の配列を含むか、またはそれらからなる。

30

【 0 0 1 6 】

いくつかの態様において、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子または s d - r x R N Aは、C B 2 3 センス鎖 (配列番号 2 3 6) に記載の配列を有するセンス鎖および / または C B 2 3 アンチセンス鎖 (配列番号 2 3 7) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含むか、またはそれらからなる。いくつかの態様において、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子または s d - r x R N Aは、C B 2 9 センス鎖 (配列番号 2 4 8) に記載の配列を有するセンス鎖および / または C B 2 9 アンチセンス鎖 (配列番号 2 4 9) に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含むか、またはそれらからなる。

40

【 0 0 1 7 】

いくつかの態様において、本開示は、H K 2 に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 7 内の配列から選択される少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 7 に記載の配列を含む。

【 0 0 1 8 】

いくつかの態様において、本開示は、D N M T 3 A に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 9 内の配列から選択される少なくとも 1 2 個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表 9

50

に記載の配列を含む。

【0019】

いくつかの態様において、本開示は、PRDM1に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表10内の配列から選択される少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表10に記載の配列を含む。

【0020】

いくつかの態様において、本開示は、PTPN6に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表11内の配列から選択される少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表11に記載の配列を含む。

10

【0021】

いくつかの態様において、本開示は、TET2に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表11内の配列から選択される少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表11に記載の配列を含む。

【0022】

いくつかの態様において、本開示は、Tbox21に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表13内の配列から選択される少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表13に記載の配列を含む。

20

【0023】

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAおよび薬学的に許容し得る賦形剤を含む組成物を提供する。

いくつかの側面において、本開示は、(例として、表3~13のいずれか1つの記載の配列を標的とする)本開示により記載される化学修飾された二本鎖核酸分子、または(例として、表3~13に記載の)本開示により記載されるsd-rxRNA、および薬学的に許容し得る賦形剤を含む組成物(例として、免疫原性組成物)を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された核酸分子は、PD21~PD37(配列番号102~135)、TIGIT1(配列番号60)、TIGIT6(配列番号65)およびTIGIT21(配列番号100~101)から選択される配列を含む。

30

【0024】

いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞(例として、1以上の宿主細胞、または宿主細胞の集団)を含む免疫原性組成物に関する。宿主細胞の例は、これらに限定されないが、T細胞、NK細胞、抗原提示細胞(APC)、樹状細胞(DC)、幹細胞(SC)、誘導多能性幹細胞(iPSC)、および幹セントラルメモリーT細胞を含む。

40

いくつかの側面において、本開示は、表5内の配列から選択される配列の少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含むTIGIT配列に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供する。

【0025】

いくつかの側面において、本開示は、PD1をコードする遺伝子に対して向けられているsd-rxRNAを含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで、sd-rxRNAは、表3内の配列から選択される配列の少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、表6に記載の配列を含む。

【0026】

50

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子または $s d - r x R N A$ は、宿主細胞において、 $P D C D 1$ または $T I G I T$ の少なくとも 50 % の阻害を誘導する。

いくつかの側面において、本開示は、 $C b 1 - b$ をコードする遺伝子に対して向けられている $s d - r x R N A$ を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで、 $s d - r x R N A$ は、表 4 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、 $s d - r x R N A$ は、表 8 に記載の配列を含む。

【0027】

いくつかの側面において、本開示は、 $H K 2$ をコードする遺伝子に対して向けられている $s d - r x R N A$ を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで $s d - r x R N A$ は、表 7 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む配列を標的とする。いくつかの態様において $s d - r x R N A$ は、表 7 に記載の配列を含む。

10

【0028】

いくつかの側面において、本開示は、 $D N M T 3 A$ をコードする遺伝子に対して向けられている $s d - r x R N A$ を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで $s d - r x R N A$ は、表 9 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む配列を標的とする。いくつかの態様において $s d - r x R N A$ は、表 9 に記載の配列を含む。

【0029】

いくつかの側面において、本開示は、 $P R D M 1$ をコードする遺伝子に対して向けられている $s d - r x R N A$ を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで $s d - r x R N A$ は、表 10 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む配列を標的とする。いくつかの態様において $s d - r x R N A$ は、表 10 に記載の配列を含む。

20

【0030】

いくつかの側面において、本開示は、 $P T P N 6$ をコードする遺伝子に対して向けられている $s d - r x R N A$ を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで $s d - r x R N A$ は、表 11 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む配列を標的とする。いくつかの態様において $s d - r x R N A$ は、表 11 に記載の配列を含む。

30

【0031】

いくつかの側面において、本開示は、 $T E T 2$ をコードする遺伝子に対して向けられている $s d - r x R N A$ を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで $s d - r x R N A$ は、表 12 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む配列を標的とする。いくつかの態様において $s d - r x R N A$ は、表 12 に記載の配列を含む。

【0032】

いくつかの側面において、本開示は、 $T b o x 2 1$ をコードする遺伝子に対して向けられている $s d - r x R N A$ を含む宿主細胞を含む免疫原性組成物を提供し、ここで $s d - r x R N A$ は、表 13 内の配列から選択される配列の少なくとも 12 個の連続したヌクレオチドを含む配列を標的とする。いくつかの態様において $s d - r x R N A$ は、表 13 に記載の配列を含む。

40

【0033】

いくつかの側面において、本開示は、宿主細胞（例として、T細胞などの免疫細胞）を含む免疫原性組成物を提供し、前記宿主細胞（例として、T細胞）の分化のレベルをコントロールし、および/または減少させて、ヒトにおける投与のための特定の免疫細胞集団（例として、特定のT細胞サブタイプについて富化されている集団）の産生を可能にするように、前記宿主細胞は化学修飾された二本鎖核酸分子で *ex vivo* で処置されている。いくつかの態様において、免疫原性組成物は、特定の細胞型（例としてT細胞サブタイプ）について富化されている複数の宿主細胞を含む。例えば、いくつかの態様において、免疫

50

原性組成物は、 T_{SCM} または T_{CM} 細胞などの特定のT細胞サブタイプのT細胞を少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%または100%（例として、包括的に、50%～100%の間の任意のパーセンテージ）含む。

【0034】

いくつかの態様において、免疫原性組成物は、明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子（例として、DNMT3A、PTPN6、PDCD1、AKT、p53、Cbl-b、Tet2、Blimp-1、T-Box21、またはHK2をコードする遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNA）、またはDNMT3A、PTPN6、PDCD1、AKT、p53、Cbl-b、Tet2、Blimp-1、T-Box21、またはHK2をコードする1以上の遺伝子に対して向けられている化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAの組み合わせを含む宿主細胞を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAは、表3～13内の配列から選択される配列の少なくとも12個の連続したヌクレオチドを含む配列に対して向けられている。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子（例として、sd-rxRNA）は、表3～13に記載の配列またはそれらのフラグメントを含むか、またはそれらからなるか、またはそれらを標的とするか、またはそれらに対して向けられている。

10

【0035】

いくつかの態様において、宿主細胞は、T細胞、NK細胞、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞（DC）、幹細胞（SC）、誘導多能性幹細胞（iPSC）、幹細胞メモリーT細胞、およびサイトカイン誘導性キラー細胞（CIK）の群から選択される。いくつかの態様において、宿主細胞は、T細胞である。いくつかの態様において、T細胞は、CD8+T細胞である。いくつかの態様において、T細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAの導入後、 T_{SCM} または T_{CM} T細胞などの特定のT細胞サブタイプに分化する。

20

【0036】

いくつかの態様において、T細胞は、高親和性T細胞受容体（TCR）および/またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する1以上の導入遺伝子を含む。

いくつかの態様において、宿主細胞は、健康なドナー（例として、がんなどの増殖性疾患、または感染性疾患を有していない、または有している疑いのないドナー）に由来する。

30

いくつかの側面において、本開示は、免疫原性組成物を生産するための方法であって、本明細書に記載の1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAを細胞に導入することを含む、前記方法を提供する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAは、ex vivoで細胞に導入される。

【0037】

本明細書に記載の方法のいくつかの態様において、細胞は、T細胞、NK細胞、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞（DC）、幹細胞（SC）、誘導多能性幹細胞（iPSC）、幹細胞メモリーT細胞、およびサイトカイン誘導性キラー細胞（CIK）である。

40

いくつかの態様において、T細胞は、CD8+T細胞である。いくつかの態様において、T細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子またはsd-rxRNAの導入後、 T_{SCM} または T_{CM} T細胞などの特定のT細胞サブタイプに分化する。いくつかの態様において、T細胞は、高親和性T細胞受容体（TCR）および/またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現する1以上の導入遺伝子を含む。いくつかの態様において、細胞は、健康なドナーに由来する。

【0038】

いくつかの側面において、本開示は、増殖性疾患または感染性疾患を患う対象を処置するための方法であって、本明細書に記載の免疫原性組成物を対象へ投与することを含む、前記方法を提供する。いくつかの態様において、増殖性疾患は、がんである。いくつかの

50

態様において、感染性疾患は、ウイルス感染、細菌感染、または寄生生物感染などの病原体感染である。

【0039】

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

【図面の簡単な説明】

【0040】

図面の簡潔な説明

添付の図面は一定の縮尺で描かれることを意図していない。図面において、多様な図に例示されている同一またはほぼ同一の構成要素は、同様な番号で表されている。明確性の目的のために、すべての図面にすべての構成要素は標識され得ない。

【0041】

【図1】図1は、ヒト一次T細胞における、化学的に最適化されたPD-1標的化sd-rxRNAを利用したPDCD1 mRNAレベルの減少を示す。

【図2】図2は、ヒト一次T細胞における、PDCD1を標的とする化学的に最適化されたsd-rxRNAの用量応答曲線を示す。それぞれの化学的に最適化されたsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ M、0.125 μ Mおよび0.06 μ Mであった。

【図3】図3は、ヒト一次T細胞における、TIGIT標的化sd-rxRNAの用量応答曲線を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ M、0.1 μ Mおよび0.04 μ Mであった。

【0042】

【図4】図4は、T細胞の分化状態の進行の概略図を示す。

【図5】図5は、ex vivo培養におけるPD-1およびTIGIT標的化sd-rxRNAで処置された、活性化ヒト一次T細胞からの増強されたTセントラルメモリー(T_{CM})分化を示す。ヒトナイーブT細胞を、CD3/CD28 Dynabeads + IL-2で活性化し、2 μ M NTC（非標的化対照）sd-rxRNA、2 μ M PD1標的化sd-rxRNAおよび2 μ M TIGIT標的化sd-rxRNAで処置した。4日後、細胞を収集し、T細胞サブセットをマルチカラーフローサイトメトリーにより分析した。T_{CM}サブタイプへ分化したT細胞の集団は、夫々対照と比較して、PD-1およびTIGIT阻害に対して、3.9倍、および1.7倍増強された。

【図6】図6は、HepG2細胞における、HK2を標的とするsd-rxRNAの2点の用量応答曲線を示す。それぞれの化学的に最適化されたsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、1 μ Mおよび0.02 μ Mであった。

【0043】

【図7】図7は、Pan-T細胞における、HK2を標的とするsd-rxRNAの6点の用量応答曲線を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ M、0.125 μ Mおよび0.06 μ Mであった。

【図8】図8は、T細胞における、Cbl-bサイレンシングについての代表的なデータを示す。右側の見出しに示される用量応答実験において、それぞれのsd-rxRNAについて、試験される濃度は、左から右に、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ M、0.1 μ Mおよび0.04 μ Mであった。

【図9】図9は、ヒト一次NK細胞における、CBLBを標的とするsd-rxRNAの5点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ Mおよび0.125 μ Mであった。

【0044】

10

20

30

40

50

【図10】図10は、HepG2細胞における、DMNT3Aを標的とするsd-rxRNAの3点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に1 μ M、0.5 μ Mおよび0.25 μ Mであった。

【図11】図11は、Pan-T細胞における、DMNT3Aを標的とするsd-rxRNAの5点の用量応答曲線を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ M、0.125 μ Mおよび0.06 μ Mであった。

【図12】図12は、A549細胞における、PRDM1を標的とするsd-rxRNAの2点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、1 μ M（左）および0.2 μ M（右）であった。

10

【0045】

【図13】図13は、A549細胞における、PRDM1を標的とするsd-rxRNAの6点の用量応答を示す。用量応答実験について、それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、1 μ M、0.5 μ M、0.1 μ M、0.05 μ M、0.025 μ Mおよび0.01 μ Mであった。

【図14】図14は、A549細胞における、PTPN6を標的とするsd-rxRNAの2点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、1 μ M（左）および0.2 μ M（右）であった。

【図15】図15は、A549細胞における、PTPN6を標的とするsd-rxRNAの6点の用量応答を示す。用量応答実験について、それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に1 μ M、0.5 μ M、0.1 μ M、0.05 μ M、0.025 μ Mおよび0.01 μ Mであった。

20

【0046】

【図16】図16は、U2OS細胞における、TET2を標的とするsd-rxRNAの2点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、1 μ M（左）および0.2 μ M（右）であった。

【図17】図17は、U2OS細胞における、TET2を標的とするsd-rxRNAの6点の用量応答を示す。用量応答実験について、それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、1 μ M、0.5 μ M、0.1 μ M、0.05 μ M、0.025 μ Mおよび0.01 μ Mであった。

30

【図18】図18は、Pan-T細胞における、TBX21を標的とするsd-rxRNAの2点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、1 μ M（左）および0.2 μ M（右）であった。

【0047】

【図19】図19は、ヒト一次NK細胞における、TIGITを標的とするsd-rxRNAの3点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、2 μ M（左）、1 μ M（中央）および0.5 μ M（右）であった。

【図20】図20は、ヒト一次T細胞における、AKT1を標的とするsd-rxRNAの6点の用量応答を示す。それぞれのsd-rxRNAについて、試験された濃度は、左から右に、2 μ M、1 μ M、0.5 μ M、0.25 μ M、0.125 μ Mおよび0.06 μ Mであった。

40

【発明を実施するための形態】

【0048】

詳細な記載

いくつかの側面において、本開示は、免疫治療のための組成物および方法に関する。本開示は、部分的には、AKT、PD1、TIGIT、p53、Cbl-b、Tet2、Blimp-1、T-Box 21、またはHK2、DNMT3A、PTPN6などの、T細胞の分化プロセスのコントロール、および/またはT細胞発現または活性を調節に関連する遺伝子を標的とする化学修飾された二本鎖核酸分子（例として、sd-rxRNA）に基づく。sd-rxRNA技術は、具体的には、T細胞を含む細胞の分化プロセスの

50

ントロール、および所望されるサブタイプ (T_{SCM} / T_{CM}) に富んだ治療細胞の産生に好適である。sd-rxRNAのいくつかの利点は以下を含む：(i) sd-rxRNAは、短期間で開発され、「非ドラuggable (non-druggable)」標的、例として小分子による阻害が難しいもの、例として転写因子などを含む、実質的にはあらゆる標的をサイレンシングすることができる；(ii) 代替のex vivo siRNAトランスフェクション技法（例として、脂質を媒介したトランスフェクションまたはエレクトロポレーション）と比較して、sd-rxRNAは、高い細胞生存率を保持しながら、高トランスフェクション効率で、T細胞を含む様々な細胞型をトランスフェクションすることができる；(iii) 初期拡大段階において細胞培養培地に添加される場合、sd-rxRNA化合物は、患者へのそれらの再注入の時間による細胞の最終集団において消失するサイレンシング効果を可能にする、8～10分裂サイクルの間に、目的の標的の一過的なサイレンシングを提供する；(iv) sd-rxRNAを組み合わせ使用して、複数の標的を同時にサイレンシングできるため、したがって、様々な種類の細胞処置プロトコルでの使用にかなりの柔軟性を提供する。

10

【0049】

T細胞の分化に関与する特定の標的に向けられたsd-rxRNA、およびex vivo拡大後のT細胞の表現型に対するかかるsd-rxRNAの有益な効果は、本明細書に記載される。sd-rxRNAまたは特定の細胞産生プロトコルに好適なsd-rxRNAの組み合わせを同定するために用いられ得るスクリーニング方法もまた、示される。

20

【0050】

本明細書に使用されるとき、「核酸分子」は、これらに限定されないが、sd-rxRNA、rxRNA ori、オリゴヌクレオチド、ASO、siRNA、shRNA、miRNA、ncRNA、cp-lasiRNA、aiRNA、一本鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、RNAおよびDNAを含む。いくつかの態様において、核酸分子は、化学修飾されたオリゴヌクレオチドなどの化学修飾された核酸分子である。いくつかの態様において、核酸分子は、二本鎖である。いくつかの態様において、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子は、sd-rxRNA分子である。

【0051】

sd-rxRNA分子

本発明の側面は、DNMT3A、PTPN6、PDCD1、TIGIT、AKT、p53、Cbl-b、Tet2、T-Box 21、Blimp-1およびHK2などの、T細胞の分化プロセスをコントロールすること、および/または、T細胞発現または活性を調節することに関連する遺伝子を標的とする、sd-rxRNA分子に関する。いくつかの態様において、本開示は、PDCD1、AKT、p53、Cbl-b、Tet2、T-Box 21、Blimp-1、DNMT3A、PTPN6、およびHK2から選択される遺伝子を標的とするsd-rxRNAを提供する。いくつかの態様において、本明細書に記載のsd-rxRNAは、表3～13に記載の配列またはそれらのフラグメントを含むか、またはそれらからなる、またはそれらを標的とするか、またはそれらに対して向けられている。

30

【0052】

本発明の側面は、sd-rxRNA分子に関する。本明細書において用いられる場合、「sd-rxRNA」または「sd-rxRNA分子」とは、2014年8月5日に付与された、米国特許第8,796,443号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2015年11月3日に付与された、米国特許第9,175,289号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、および2009年9月22日に出願されたPCT公開番号WO2010/033247（出願番号PCT/US2009/005247）、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」において記載され、これらから本明細書に参照により組み込まれるもののような、自己送達型RNA分子を指す。簡単に述べると、sd-rxRNA（sd-rxRNAナノとも呼ばれる）は、最小長が16ヌクレオチドのガイド鎖および8～18ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む、単離された非対称二本鎖核酸分子であって、ここで二本鎖核酸分子

40

50

は二本鎖領域および一本鎖領域を有し、一本鎖領域は4～12ヌクレオチド長を有し、かつ、少なくとも3つのヌクレオチド骨格修飾を有する。好ましい態様において、二本鎖核酸分子は、平滑である1末端を有するか、または、1つもしくは2つのヌクレオチド突出を含む。sd-rxRNA分子は、化学修飾を通じて、いくつかの例において疎水性抱合体の付着を通じて、最適化され得る。上記の参照された特許および刊行物は、それらの全体において参照により本明細書に組み込まれる。

【0053】

いくつかの態様において、sd-rxRNAは、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を含み、ここで二本鎖である分子の領域は8～15ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は4～12ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖の一本鎖領域は3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも40%は修飾されている。

本発明の核酸分子は、本明細書において、本発明の単離された二本鎖またはデュプレックス核酸、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、ナノ分子、ナノRNA、sd-rxRNA^{ナノ}、sd-rxRNAまたはRNA分子と呼ばれる。

【0054】

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

一本鎖ポリヌクレオチドとは対照的に、デュプレックスポリヌクレオチドは伝統的に細胞への送達が困難であったが、それは、これらが強固な構造および多数の負の電荷を有するために、その膜輸送が困難になっているからである。しかしながら、sd-rxRNAは、部分的に二本鎖であるにも拘わらず、in vivoで一本鎖として認識され、したがって、細胞膜を超えて効率的に送達されることが可能である。その結果、本発明のポリヌクレオチドは、多くの例において自己送達が可能である。よって、本発明のポリヌクレオチドは、従来のRNAi剤と同様の様式において製剤化されても、あるいは、細胞または対象へ単独で（または非送達型キャリアとともに）送達されてもよく、自己送達を可能にする。本発明の一態様において、分子の一部が従来のRNAデュプレックスに類似し、分子の第2の部分が一本鎖である、自己送達型非対称二本鎖RNA分子が提供される。

【0055】

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

【0056】

好ましい態様において、本発明のRNAi化合物は、デュプレックス領域（8～15塩基長の効率的なRISC侵入に必要とされる）および4～12ヌクレオチド長の一本鎖領域を含む非対称化合物を含む。いくつかの態様において、デュプレックス領域は、13または14ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、6または7ヌクレオチドの一本鎖領域が好ましい。新しいRNAi化合物の一本鎖領域はまた、2～12個のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部（ホスホロチオアート修飾と呼ばれる）を含む。いくつかの態様において、6～8個のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部が好ましい。さらに、本発明のRNAi化合物はまた、安定性を提供し、RISC侵入と適合するユニークな化学修飾パターンを含む。いくつかの態様において、これらの要素の組み合わせは、in vitroおよびin vivoでのRNAi試薬の送達に非常に有用であるという予期せぬ特性

10

20

30

40

50

をもたらす。

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

【0057】

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

【0058】

いくつかの態様において、sd-rxRNA中のヌクレオチドのうち少なくとも30%が修飾されている。例えば、sd-rxRNA中のヌクレオチドのうち少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%が修飾されている。いくつかの態様において、sd-rxRNA中のヌクレオチドの100%が修飾されている。

【0059】

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

【0060】

sd-rxRNAは、いくつかの例において、新規の型の化学的性質(chemistries)を使用して化合物の疎水性を改善することにより、さらに改善され得る。例えば、1つの化学的性質は、疎水性塩基修飾の使用に関する。あらゆる位置におけるあらゆる塩基が、修飾が塩基の分配係数の増大をもたらす限りにおいて、修飾されてもよい。修飾の化学的性質のための好ましい位置は、ピリミジンの4位および5位である。これらの位置の主要な利点は、(a)合成の容易性、および、(b)RISC複合体のローディングおよび標的認識のために必須である、塩基対形成およびA型らせん(A form helix)形成への干渉がないこと、である。いくつかの態様において、複数のデオキシウリジンが全体的な化合物の効力に干渉せずに存在するsd-rxRNA化合物が使用される。加えて、組織分布および細胞取り込みにおける主要な改善は、疎水性抱合体の構造を最適化することにより

得られ得る。好ましい態様のいくつかにおいて、ステロールの構造は、C 17 に付着された鎖 (C17 attached chain) を変える (増大する / 減少する) ように修飾される。この型の修飾は、in vivoでの細胞取り込みの大きな増大を、および、組織取り込み成功率 (prosperities) の改善をもたらす。

【0061】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、センスおよびアンチセンス鎖のそれぞれの3' - 突出の有無にかかわらず約13 ~ 22塩基対の二本鎖領域、および約2 ~ 9ヌクレオチドのアンチセンス鎖上の3' - 一本鎖尾部を含む、疎水的に修飾されたsiRNAアンチセンスハイブリッド分子である。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、少なくとも1つの2' - O - メチル修飾、少なくとも1つの2' - フルオロ修飾、および少なくとも1つのホスホロチオアート修飾、ならびに、ステロール、コレステロール、ビタミンD、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、フェニル等から選択される少なくとも1つの疎水的修飾、疎水性修飾剤を含有する。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、複数のかかる修飾を含む。

10

【0062】

いくつかの側面において、本開示は、シグナル伝達 / 転写因子標的、エピジェネティックな標的、代謝性および共阻害性 / ネガティブ制御性標的などの、細胞の分化 (例として、T細胞の分化) に関連する標的をコードする遺伝子を標的とする化学修飾された二本鎖核酸分子に関する。シグナル伝達 / 転写因子の例は、これらに限定されないが、AKT、Blimp-1、およびT-Box21を含む。エピジェネティックなタンパク質の例は、これらに限定されないが、Tet2を含む。代謝の標的の例は、これらに限定されないが、HK2を含む。共阻害性 / ネガティブ制御性標的の例は、これらに限定されないが、Cbl-b、p53、TIGITおよびPD1を含む。

20

【0063】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸標的は、DNMT3A、PTPN6、PDCD1、TIGIT、AKT、p53、Tet2、Blimp-1、TBox21またはHK2をコードする遺伝子を標的とする。

いくつかの側面において、本開示は、免疫チェックポイントタンパク質をコードする遺伝子を標的とする化学修飾された二本鎖核酸分子に関する。一般に、免疫チェックポイントタンパク質は、(例として、T細胞機能を刺激または抑制することにより) 宿主免疫応答を調節するタンパク質である。刺激性免疫チェックポイントタンパク質の例は、これらに限定されないが、CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、グルコシルチコイド誘導性TNFRファミリー関連遺伝子 (GITR)、および誘導性T細胞共刺激因子 (ICOS) を含む。阻害性免疫チェックポイントタンパク質の例は、これらに限定されないが、アデノシンA2A受容体 (A2AR)、B7-H3、B7-H4、BおよびTリンパ球アテニュエーター (BTLA)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 (CTLA-4)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、プログラム細胞死タンパク質1 (PD1)、T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン3 (TIM3)、IgとTIMドメインとを有するT細胞免疫受容体 (TIGIT)、およびT細胞活性化のVドメインIgサブレッサー (VISTA) を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸は、PDCD1またはTIGITをコードする遺伝子を標的とする。

30

40

【0064】

本明細書に使用されるとき、「PDCD1」または「PD1」は、T細胞媒介炎症活性を抑制することにより、免疫系を下方制御し、免疫自己寛容を促進するように機能する細胞表面受容体である、プログラム細胞死タンパク質1を指す。いくつかの態様において、PDCD1は、NCBI参照配列番号NM_005018.2により表される核酸配列によりコードされる。

50

【 0 0 6 5 】

本明細書に使用されるとき、「TIGIT」は、例えばインターロイキン10（IL-10）産生を増加させることにより、CD226/TIGIT-PVR経路を介してT細胞媒介免疫を下方制御する免疫受容体である、IgとITIMドメインとを有するT細胞免疫受容体を指す。いくつかの態様において、TIGITは、NCBI参照配列番号NM__173799.3により表される核酸配列によりコードされる。

【 0 0 6 6 】

本明細書に使用されるとき、「AKT」は、グルコース代謝、細胞増殖、アポトーシスおよび転写において重要な役割を担うセリン/トレオニン特異的キナーゼであるタンパク質キナーゼBを指す。いくつかの態様において、AKTは、NCBI参照配列番号NM__005163により表される核酸配列によりコードされる。

10

【 0 0 6 7 】

本明細書に使用されるとき、「p53」は、分化および発達経路の制御に関係している腫瘍抑制剤として機能する、腫瘍タンパク質p53（細胞腫瘍抗原p53、リンタンパク質p53、腫瘍抑制剤p53、抗原NY-CO-13および形質転換関連タンパク質53としても知られている）を指す。いくつかの態様において、p53は、NCBI参照配列番号NM__001276761、NM__000546、NM__001126112、NM__001126113、NM__001126114、NM__001127233またはNM__011640により表される核酸配列によりコードされる。

20

【 0 0 6 8 】

本明細書に使用されるとき、「Cbl-b」は、T細胞活性化のネガティブレギュレーターとして役割を果たすE3リガーゼである、E3ユビキチン-タンパク質リガーゼCbl-bを指す。いくつかの態様において、Cbl-bは、NCBI参照配列番号NM__170662により表される核酸配列によりコードされる。

本明細書に使用されるとき、「Tet2」は、5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）の細胞内レベルを増加させる一連のメチルシトシンジオキシゲナーゼ遺伝子であるTetファミリーのメンバーである、Tetメチルシトシンジオキシゲナーゼ2を指す。いくつかの態様において、Tet2は、NCBI参照配列番号NM__001127208により表される核酸配列によりコードされる。

30

【 0 0 6 9 】

本明細書に使用されるとき、「Blimp-1」は、ベータ-インターフェロン遺伝子発現の抑制剤として作用するタンパク質をコードする、PR/SETドメイン1（PRDM1）を指す。いくつかの態様において、Blimp-1は、NCBI参照配列番号NM__001198により表される核酸配列によりコードされる。

【 0 0 7 0 】

本明細書に使用されるとき、「T-box 21」は、T-boxと呼ばれる共通のDNA結合ドメインを共有する遺伝子の保存的ファミリーのメンバーである、T-box転写因子TBX21を指す。いくつかの態様において、T-box 21は、NCBI参照配列番号NM__013351により表される核酸配列によりコードされる。

本明細書に使用されるとき、「HK2」は、グルコースのリン酸化に関与して、グルコース-6-リン酸を産生する酵素である、ヘキソキナーゼ2を指す。いくつかの態様において、HK2は、NCBI参照配列番号NM__000189により表される核酸配列によりコードされる。

40

【 0 0 7 1 】

本明細書に使用されるとき、「DNMT3A」は、DNA中の特定のCpG構造へのメチル基の転移を触媒する酵素（例として、DNAメチルトランスフェラーゼ）である、DNA（シトシン-5）-メチルトランスフェラーゼ3Aを指す。いくつかの態様において、DNMT3Aは、NCBI参照配列番号NM__175629.2により表される核酸配列によりコードされる。

【 0 0 7 2 】

50

本明細書に使用されるとき、「PTPN6」は、Src相同領域2ドメイン含有ホスファターゼ1 (SHP-1) としても知られているチロシン-タンパク質ホスファターゼ非受容体6型を指す。いくつかの態様において、PTPN6は、NCBI参照配列番号NM_002831.5により表される核酸配列によりコードされる。

本開示の化学修飾された二本鎖核酸分子により標的とされてもよいPDCD1およびCbl-b配列の非限定例は、表3~4に列挙される。

【0073】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表3~13内の配列の少なくとも12個のヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、表3~4内の少なくとも1つの配列を含む(例として、表3~4のいずれか1つに記載の配列を含む、センス鎖またはアンチセンス鎖を含む)。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子(例として、sd-rxRNA)は、表3~13に記載の配列またはそれらのフラグメントを含むか、またはそれらからなるか、またはそれらを標的とするか、またはにそれらに対して向けられている。

【0074】

いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子(例として、sd-rxRNA)は、PD26センス鎖(配列番号112)に記載の配列を有するセンス鎖および/またはPD26アンチセンス鎖(配列番号113)に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子(例として、sd-rxRNA)は、CB29センス鎖(配列番号248)に記載の配列を有するセンス鎖および/またはCB29アンチセンス鎖(配列番号249)に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子(例として、sd-rxRNA)は、CB23センス鎖(配列番号236)に記載の配列を有するセンス鎖および/またはCB23アンチセンス鎖(配列番号237)に記載の配列を有するアンチセンス鎖を含む。

【0075】

いくつかの態様において、本発明により処方されるdsRNAは、rxRNAoriである。rxRNAoriとは、2009年2月11日に出願されたPCT公開番号WO2009/102427(出願番号PCT/US2009/000852)、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、および2010年11月1日に出願された米国特許公開番号2011/0039914、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」において記載され、これらから参照により組み込まれる、RNA分子のクラスを指す。

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

【0076】

rxRNAoriは、本明細書において記載される修飾のいずれのものを含んでもよい。いくつかの態様において、rxRNAori中のヌクレオチドの少なくとも30%が修飾される。例えば、rxRNAori中のヌクレオチドのうちの少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%が修飾され

10

20

30

40

50

る。いくつかの態様において、 $s d - r x R N A$ 中のヌクレオチドの100%が修飾される。いくつかの態様において、 $r x R N A o r i$ のパスセンジャー鎖のみが修飾を含む。

【0077】

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

10

【0078】

したがって、本発明の側面は、ガイド (アンチセンス) 鎖およびパスセンジャー (センス) 鎖を含む、単離された二本鎖核酸分子に関する。本明細書に使用される用語「二本鎖」は、ヌクレオモノマーの少なくとも一部が相補的であり、二本鎖領域を形成するように水素結合されている、1以上の核酸分子を指す。いくつかの態様において、ガイド鎖の長さは、16~29ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、ガイド鎖は、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29ヌクレオチド長である。ガイド鎖は標的遺伝子に対して相補性を有する。ガイド鎖と標的遺伝子との間の相補性は、ガイド鎖のいずれの部分にわたっても存在することができる。本明細書に使用される相補性は、ガイド鎖が標的に対してRNAiを媒介できるように十分に相補的である限りにおいて、完全な相補性であっても、より不完全な相補性であってもよい。いくつかの態様において、相補性とは、ガイド鎖と標的との間の、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満のミスマッチを指す。完全な相補性とは、100%の相補性を指す。いくつかの態様において、標的配列と比較して挿入、欠失および単一の点変異を有するsiRNAもまた、阻害について有効であることが見出されている。さらに、siRNAの全ての部位が標的の認識について同等に寄与するわけではない。siRNAの中心におけるミスマッチは最も重要であり、本質的に (essentially) 標的RNAの切断を無効化する。アンチセンス鎖に関して、中心の上流または切断部位の上流におけるミスマッチは、耐性を示すが、標的RNAの切断を著しく低減する。アンチセンス鎖に関して、中心または切断部位の下流におけるミスマッチ、好ましくは3'末端の付近、例えばアンチセンス鎖の3'末端から1、2、3、4、5または6ヌクレオチドに位置するものは、耐性を示し、標的RNAの切断をごく僅かしか低減しない。

20

30

【0079】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書に記載の二本鎖核酸分子のいくつかの態様において、ガイド鎖は、少なくとも16ヌクレオチドの長さであり、RISC中でアルゴノートタンパク質をアンカーする。いくつかの態様において、ガイド鎖がRISC中へロードするとき、これは明確なシード領域を有し、標的mRNAの切断は、ガイド鎖の10~11位にわたって行われる。いくつかの態様において、ガイド鎖の5'末端は、リン酸化されているかまたはリン酸化されることができる。本明細書に記載される核酸分子は、最短トリガーRNA (minimum trigger RNA) として言及される場合もある。

40

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

50

【0080】

本発明の側面は、最小二本鎖領域を有する二本鎖核酸分子に関する。いくつかの態様において、分子の二本鎖である領域は、8～15ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、分子の二本鎖である領域は、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖領域は、13または14ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖である分子の領域は、13～22ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖である分子の領域は、16、17、18、19、20、21または22ヌクレオチド長である。

ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に100%の相補性が存在してもよく、または、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に1以上のミスマッチが存在してもよい。いくつかの態様において、二本鎖分子の一方の末端において、分子は、平滑末端であるかまたは1ヌクレオチドの突出を有する。分子の一本鎖領域は、いくつかの態様において、4～12ヌクレオチド長である。例えば、一本鎖領域は、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヌクレオチド長であってよい。しかしながら、ある態様において、一本鎖領域はまた、4ヌクレオチド長未満であっても、または、12ヌクレオチド長より長くてもよい。ある態様において、一本鎖領域は少なくとも6または少なくとも7ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、一本鎖領域は2または3ヌクレオチド長を含む、2～9ヌクレオチド長である。

【0081】

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

【0082】

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

【0083】

いくつかの態様において、熱力学的安定性は、LNA塩基の使用を通して増大する。いくつかの態様において、追加の化学修飾が導入される。化学修飾の数個の非限定的例は、5'ホスファート、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロ、リボチミジン、C-5プロピニル-dC(pdC)およびC-5プロピニル-dU(pdU); C-5プロピニル-C(pC)およびC-5プロピニル-U(pU); 5-メチルC、5-メチルU、5-メチルdC、5-メチルdUメトキシ、(2,6-ジアミノプリン)、5'-ジメトキシトリチル-N4-エチル-2'-デオキシシチジンおよびMGB(副溝結合剤)を含む。同一分子内で1つより多くの化学修飾が組み合わせられ得ることが、理解さ

10

20

30

40

50

れるべきである。

【0084】

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

10

20

30

40

50

【0085】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、およそ18~19ヌクレオチドの長さであり、およそ2~14のホスファート修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、ホスファート修飾された2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または14より多くのヌクレオチドを含有し得る。ガイド鎖は、RISC侵入に干渉せずに安定性を増大させる1以上の修飾を含有してもよい。ホスホロチオアート修飾ヌクレオチドなどのホスファート修飾ヌクレオチドは、3'末端にあっても、5'末端にあっても、または、ガイド鎖全体に広がっていてもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖の3'末端の10ヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のホスホロチオアート修飾ヌクレオチドを含有する。ガイド鎖はまた、2'-Fおよび／または2'-OMe修飾も含有することができ、これは、分子全体に位置することができる。いくつかの態様において、ガイド鎖の1位のヌクレオチド(ガイド鎖の最も5'の位置におけるヌクレオチド)は、2'-OMe修飾されているか、および／または、リン酸化されている。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドは、2'-F修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の2~10位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'-F修飾され得る。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドもまた、2'-OMe修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の11~18位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'-OMe修飾され得る。いくつかの態様において、ガイド鎖の最も3'末端におけるヌクレオチドは、未修飾である。ある態様において、ガイド鎖中のCおよびUの大部分は、2'-F修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11~18位におけるCまたはUは、2'-OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11~18位におけるCまたはUは、2'-OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されており、2~10位におけるCまたはUは2'-F修飾されている。

【0086】

いくつかの側面において、最適なパッセンジャー鎖は、およそ11~14ヌクレオチドの長さである。パッセンジャー鎖は、安定性を増大させる修飾を含有してもよい。パッセンジャー鎖における1以上のヌクレオチドは、2'-OMe修飾され得る。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖における1以上のCおよび／またはUヌクレオチドが2'-OMe修飾されているか、または、パッセンジャー鎖におけるCおよびUヌクレオチドの全てが2'-OMe修飾されている。ある態様において、パッセンジャー鎖における全てのヌクレオチドが2'-OMe修飾されている。パッセンジャー鎖上の1以上のヌクレオチドはまた、ホスホロチオアート修飾などのホスファート修飾もなされ得る。パッセンジャー鎖はまた、2'-リボ、2'-Fおよび2'-デオキシ修飾、または、上のいずれの組み合わせをも含有し得る。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との両方における化学修飾パターンは、良好に

耐容され得、化学修飾の組み合わせは、RNA分子の効力および自己送達の増大をもたらし得る。

【0087】

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

10

【0088】

本発明に関連する分子はまた、細胞取り込みのためにも最適化される。本明細書に記載されるRNA分子において、ガイド鎖および/またはパッセンジャー鎖は、抱合体に付着され得る。ある態様において、抱合体は疎水性である。疎水性の抱合体は、10より高い分配係数を有する低分子であり得る。抱合体は、コレステロールなどのステロール型分子であっても、または、C17に付着した長さが増大したポリ炭素鎖を有する分子であってもよく、抱合体の存在は、脂質トランスフェクション試薬の有無に関らずRNA分子が細胞に取り込まれる能力に影響を及ぼし得る。抱合体は、疎水性リンカーを通して、パッセンジャー鎖またはガイド鎖に付着され得る。いくつかの態様において、疎水性リンカーは5～12Cの長さであり、および/または、ヒドロキシピロリジンをベースとする。いくつかの態様において、疎水性抱合体はパッセンジャー鎖に付着し、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のいずれかのCUI残基は、修飾されている。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖のCUI残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%は、修飾されている。いくつかの側面において、本発明に関連する分子は、自己送達性(sd)である。本明細書において用いられる場合、「自己送達(self-delivery)」とは、分子が、トランスフェクション試薬などの追加の送達ビヒクルを必要とせずに細胞へ送達される能力を指す。

20

30

【0089】

本発明の側面は、RNAiにおける使用のために分子を選択することに関する。いくつかの態様において、8～15ヌクレオチドの二本鎖領域を有する分子は、RNAiにおける使用のために選択され得る。いくつかの態様において、分子は、その熱力学的安定性(G)に基づいて選択される。いくつかの態様において、-13 kkal/mol未満の(G)を有する分子が選択されるであろう。例えば、(G)値は、-13、-14、-15、-16、-17、-18、-19、-21、-22または-22 kkal/mol未満であってもよい。他の態様において、(G)値は、-13 kkal/molより高くてもよい。例えば、(G)値は、-12、-11、-10、-9、-8、-7または-7 kkal/molより高くてもよい。Gは、当該技術分野において知られているいずれの方法をも使用して計算され得ることが理解されるべきである。いくつかの態様において、Gは、Mfoldインターネットサイト(mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi)を通して利用可能なMfoldを使用して計算される。Gを計算するための方法は、以下の参考文献において記載され、それらから参照により組み込まれる：Zuker, M. (2003) Nucleic Acid Res., 31(13):3406-15; Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D. H. (1999) J. Mol. Biol. 288:911-940; Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. 101:7287-7292; Duan, S., Mathews, D. H., and Turner, D. H. (2006) Biochemistry 45:9819-9832; Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L., and Schuster

40

50

, P. (1999) Biopolymers 49:145-165。

【0090】

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

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

【0091】

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

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

【0092】

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

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

【0093】

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

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

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

【0094】

他の側面において、本発明の化学修飾された二本鎖核酸分子構造は、マイクロRNA機構によって、配列依存的な遺伝子サイレンシングを媒介する。本明細書に使用される用語「マイクロRNA」(「miRNA」)はまた、当該技術分野において、「小分子RNA(small temporal RNA)」(「stRNA」)としても言及され、遺伝子的に(例えば、ウイルス、哺乳動物または植物ゲノムにより)コードされる小さい(10~50ヌクレオチドの)RNAであって、RNAサイレンシングを指向または媒介することができるものを指す。「miRNA障害」は、miRNAの異常な発現または活性により特徴づけられる疾患または障害を指すべきである。

10

20

30

40

50

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

【0095】

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

10

【0096】

いくつかの態様において、細胞取り込みおよびmiRNA活性の阻害において有効な化学修飾された二本鎖核酸分子化合物のバージョンが記載される。化合物は本質的に、RISC侵入性のバージョンに類似するが、大きな鎖の化学修飾パターンが、切断を遮断してRISC作用の効果的な阻害剤として作用するように、最適化されている。例えば、化合物は、先に記載のホスホロチオアート含有物で完全にまたはほとんどにおいてO-メチル修飾されていてもよい。これらの型の化合物について、いくつかの態様においては、5'リン酸化は必要でない。二本鎖領域の存在は、細胞取り込みおよび効率的なRISCローディングを促進するので、好ましい。

20

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

30

【0097】

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

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

40

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

【0098】

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

50

基部分は、3'，3'連結または5'，5'連結されたデオキシ脱塩基部分などの、反転デオキシ脱塩基部分を含んでもよい。

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

【0099】

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

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

【0100】

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

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

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

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

【0101】

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

【0102】

一態様において、ポリヌクレオチドデュプレックス中の化学修飾ヌクレオチドは、上で詳細に議論されたものなどの、当該技術分野において知られているいずれの化学修飾ヌクレオチドであってもよい。特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、2'F修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾されたものおよび2'デオキシヌクレオチドからなる群より選択される。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド塩基の「疎水性修飾」から生じる。別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドはホスホロチオアートである。さらなる別の特定の態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオアート、2'-O-メチル、2'デオキシ、疎水性修飾およびホスホロチオアートの組み合わせである。これらの群の修飾が、リボース環、骨格およびヌクレオチドの修飾を指すなら、いくつかの修飾ヌクレオチドが、3つの修飾の型全ての組み合わせを持つことも実行可能である。

別の態様において、化学修飾は、デュプレックスの多様な領域にわたって同一ではない

。特定の態様において、第1のポリヌクレオチド（パッセンジャー鎖）は、多数の多様な化学修飾を、多様な部位において有する。このポリヌクレオチドについて、ヌクレオチドの90%までが化学修飾されていてもよく、および/または、導入されたミスマッチを有していてもよい。

【0103】

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

10

【0104】

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

20

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

【0105】

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

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

30

より詳細な本発明の側面は、以下のセクションにおいて記載される。

【0106】

デュプレックスの特徴

本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、2つの別々の相補的な核酸鎖により形成されてもよい。デュプレックス形成は、標的遺伝子を含有する細胞の内側または外側のいずれかで生じ得る。

40

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

【0107】

50

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

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

【0108】

修飾

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

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

【0109】

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

他の例において、プリンのN⁷位および/またはN²および/またはN³位は、アルキル基またはその置換誘導体により修飾されてもよい。さらなる例において、第3環はプリン二環系に縮合されてもよく、および/または、プリン環系内の窒素原子は炭素原子で置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

【0110】

5位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5591843号、米国特許第7,205,297号、米国特許第6,432,963号および米国特許第6,020,483号に開示されており; N⁴位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5,580,731号に開示されており; 8位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第6,355,787号および米国特許第5,580,9

72号に開示されており；N⁶位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,853,386号、米国特許第5,789,416号および米国特許第7,041,824号に開示されており；2位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,201,860号および米国特許第5,587,469号に開示されており；これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる。

【0111】

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

【0112】

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

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

【0113】

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

【0114】

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

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

10

20

30

40

50

めに使用され得る。いくつかのケースにおいて、アンチセンス鎖は、一般に、標的遺伝子に対して（アンチセンス方向において）実質的に同一であろう。

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

10

【0115】

全体として、修飾糖は、D - リボース、2' - O - アルキル（2' - O - メチルおよび2' - O - エチルを含む）、すなわち、2' - アルコキシ、2' - アミノ、2' - S - アルキル、2' - ハロ（2' - フルオロを含む）、2' - メトキシエトキシ、2' - アリルオキシ（ $-OCH_2CH=CH_2$ ）、2' - プロパルギル、2' - プロピル、エチニル、エテニル、プロペニルならびにシアノなどを含む。一態様において、糖部分は、記載されるように（Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)）、ヘキソースであってもよく、オリゴヌクレオチド中に組み込まれてもよい。例示的なヌクレオモノマーは、例えば米国特許第5,849,902号において見出され得、これは本明細書に参照により組み込まれる。

20

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

【0116】

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

30

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

【0117】

40

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

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3'および5'末端(termini)を含む（環状オリゴヌクレオチドを除く）。一態様において、オリゴヌクレオチドの3'お

50

10

20

30

40

50

本明細書に詳述されるとおり、酸素、硫黄、窒素および炭素の保護基が利用されてもよい。ヒドロキシル保護基は以下を含む：メチル、メトキシメチル（MOM）、メチルチオメチル（MTM）、*t*-ブチルチオメチル、（フェニルジメチルシリル）メトキシメチル（SMOM）、ベンジルオキシメチル（BOM）、*p*-メトキシベンジルオキシメチル（PMBM）、（4-メトキシフェノキシ）メチル（*p*-AOM）、グアイアコルメチル（GUM）、*t*-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル（POM）、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル（MEM）、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、ビス（2-クロロエトキシ）メチル、2-（トリメチルシリル）エトキシメチル（SEMORE）、テトラヒドロピラニル（THP）、3-プロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル（MTHP）、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピ

ラニル S , S - ジオキシド、 1 - [(2 - クロロ - 4 - メチル) フェニル] - 4 - メトキシ
 シピペリジン - 4 - イル (C T M P)、 1 , 4 - ジオキサソ - 2 - イル、テトラヒドロフ
 ラニル、テトラヒドロチオフラニル、 2 , 3 , 3 a , 4 , 5 , 6 , 7 , 7 a - オクタヒド
 ロ - 7 , 8 , 8 - トリメチル - 4 , 7 - メタノベンゾフラン - 2 - イル、

【 0 1 2 1 】

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

【 0 1 2 2 】

トリメチルシリル (T M S)、トリエチルシリル (T E S)、トリイソプロピルシリル (30
 T I P S)、ジメチルイソプロピルシリル (I P D M S)、ジエチルイソプロピルシリル
 (D E I P S)、ジメチルテキシルシリル (dimethylthexylsilyl)、t - ブチルジメチ
 ルシリル (T B D M S)、t - ブチルジフェニルシリル (T B D P S)、トリベンジルシ
 リル、トリ - p - キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル (D P
 M S)、t - ブチルメトキシフェニルシリル (T B M P S)、ホルマート、ベンゾイルホル
 マート、アセタート、クロロアセタート、ジクロロアセタート、トリクロロアセタート
 、トリフルオロアセタート、メトキシアセタート、トリフェニルメトキシアセタート、フ
 ェノキシアセタート、p - クロロフェノキシアセタート、 3 - フェニルプロピオナート、
 4 - オキソペンタノアート (レプリナート)、 4 , 4 - (エチレンジチオ) ペンタノアート
 (レプリノイルジチオアセタール)、ピバロアート、アダマントアート、クロトナート
 、 4 - メトキシクロトナート、ベンゾアート、p - フェニルベンゾアート、 2 , 4 , 6 -
 トリメチルベンゾアート (メシトアート)、

【 0 1 2 3 】

アルキルメチルカルボナート、 9 - フルオレニルメチルカルボナート (F m o c)、アル
 キルエチルカルボナート、アルキル 2 , 2 , 2 - トリクロロエチルカルボナート (T r o 40
 c)、 2 - (トリメチルシリル) エチルカルボナート (T M S E C)、 2 - (フェニルス
 ルホニル) エチルカルボナート (P s e c)、 2 - (トリフェニルホスホニオ) エチルカ
 ルボナート (P e o c)、アルキルイソブチルカルボナート、アルキルビニルカルボナ
 ートアルキルアリルカルボナート、アルキル p - ニトロフェニルカルボナート、アルキルベ
 ンジルカルボナート、アルキル p - メトキシベンジルカルボナート、アルキル 3 , 4 - ジ
 メトキシベンジルカルボナート、アルキル o - ニトロベンジルカルボナート、アルキル p
 - ニトロベンジルカルボナート、アルキル S - ベンジルチオカルボナート、 4 - エトキシ
 - 1 - ナフチルカルボナート、メチルジチオカルボナート、

【 0 1 2 4 】

2 - ヨードベンゾアート、 4 - アジドブチラート、 4 - ニトロ - 4 - メチルペンタノアー 50

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

【0125】

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

【0126】

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

【0127】

p - ニトロベンジルカルバマート、p - プロモベンジルカルバマート、p - クロロベンジルカルバマート、2, 4 - ジクロロベンジルカルバマート、4 - メチルスルフィニルベンジルカルバマート (M s z)、9 - アントリルメチルカルバマート、ジフェニルメチルカルバマート、2 - メチルチオエチルカルバマート、2 - メチルスルホニルエチルカルバマート、2 - (p - トルエンスルホニル)エチルカルバマート、[2 - (1, 3 - ジチアニル)]メチルカルバマート (D m o c)、4 - メチルチオフエニルカルバマート (M t p c)、2, 4 - ジメチルチオフエニルカルバマート (B m p c)、2 - ホスホニオエチルカルバマート (P e o c)、2 - トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバマート (P p o c)、1, 1 - ジメチル - 2 - シアノエチルカルバマート、m - クロロ - p - アシルオキシベンジルカルバマート、p - (ジヒドロキシボリル)ベンジルカルバマート、5 - ベンズイソキサゾリルメチルカルバマート、2 - (トリフルオロメチル) - 6 - クロモニルメチルカルバマート (T c r o c)、m - ニトロフェニルカルバマート、3, 5 - ジメトキシベンジルカルバマート、o - ニトロベンジルカルバマート、3, 4 - ジメトキシ - 6 - ニトロベンジルカルバマート、フェニル (o - ニトロフェニル)メチルカルバマート、フェノチアジニル - (10) - カルボニル誘導体、N' - p - トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、N' - フェニルアミノチオカルボニル誘導体、

10

20

30

40

50

【0128】

t - アミルカルバマート、S - ベンジルチオカルバマート、p - シアノベンジルカルバマート、シクロブチルカルバマート、シクロヘキシルカルバマート、シクロペンチルカルバマート、シクロプロピルメチルカルバマート、p - デシルオキシベンジルカルバマート、2, 2 - ジメトキシカルボニルビニルカルバマート、o - (N, N - ジメチルカルボキサミド)ベンジルカルバマート、1, 1 - ジメチル - 3 - (N, N - ジメチルカルボキサミド)プロピルカルバマート、1, 1 - ジメチルプロピニルカルバマート、ジ(2 - ピリジル)メチルカルバマート、2 - フラニルメチルカルバマート、2 - ヨードエチルカルバマート、イソボルニルカルバマート、イソブチルカルバマート、イソニコチニルカルバマート、p - (p' - メトキシフェニルアゾ)ベンジルカルバマート、1 - メチルシクロブチルカルバマート、1 - メチルシクロヘキシルカルバマート、1 - メチル - 1 - シクロプロピルメチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (3, 5 - ジメトキシフェニル)エチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (p - フェニルアゾフェニル)エチルカルバマート、1 - メチル - 1 - フェニルエチルカルバマート、1 - メチル - 1 - (4 - ピリジル)エチルカルバマート、フェニルカルバマート、p - (フェニルアゾ)ベンジルカルバマート、2, 4, 6 - トリ - t - ブチルフェニルカルバマート、4 - (トリメチルアンモニウム)ベンジルカルバマート、2, 4, 6 - トリメチルベンジルカルバマート、

【0129】

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

【 0 1 3 0 】

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

10

【 0 1 3 1 】

ジフェニルホスフィンアミド (D p p)、ジメチルチオホスフィンアミド (M p t)、ジフェニルチオホスフィンアミド (P p t)、ジアルキルホスホルアミダート、ジベンジルホスホルアミダート、ジフェニルホスホルアミダート、ベンゼンスルフェンアミド、o - ニトロベンゼンスルフェンアミド (N p s)、2 , 4 - ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、2 - ニトロ - 4 - メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、3 - ニトロピリジンスルフェンアミド (N p y s)、p - トルエンスルホンアミド (T s)、ベンゼンスルホンアミド、2 , 3 , 6 - トリメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M t r)、2 , 4 , 6 - トリメトキシベンゼンスルホンアミド (M t b)、2 , 6 - ジメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (P m e)、2 , 3 , 5 , 6 - テトラメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M t e)、4 - メトキシベンゼンスルホンアミド (M b s)、2 , 4 , 6 - トリメチルベンゼンスルホンアミド (M t s)、2 , 6 - ジメトキシ - 4 - メチルベンゼンスルホンアミド (i M d s)、2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホンアミド (P m c)、メタンスルホンアミド (M s)、- トリメチルシリルエタンスルホンアミド (S E S)、9 - アントラセンスルホンアミド、4 - (4 ' , 8 ' - ジメトキシナフチルメチル) ベンゼンスルホンアミド (D N M B S)、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミドおよびフェナシルスルホンアミド。

20

30

【 0 1 3 2 】

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

40

【 0 1 3 3 】

本明細書に記載のとおり、化合物は、あらゆる数の置換基または官能部分により置換されてよいことが理解される。一般に、用語「任意に」が先行するかどうかに関わらず、用語「置換された」およびこの発明の式に含まれる置換基は、所与の構造中の水素ラジカルの、特定置換基のラジカルによる置き換えを指す。任意の所与の構造中の1つより多くの位置が、特定群から選択された1つより多くの置換基により置換されてもよい場合、置換基は各位置において同一であっても異なってもよい。本明細書に使用される用語「置

50

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

10

【0134】

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

20

【0135】

ある態様において、本発明に採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～20個の脂肪族炭素原子を含有する。ある態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～10個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～8個の脂肪族炭素原子を含有する。さらなる他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～6個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～4個の脂肪族炭素原子を含有する。よって例示の脂肪族基は、これらに限定されないが、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、 $-CH_2-$ シクロプロピル、ビニル、アリル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、シクロブチル、 $-CH_2-$ シクロブチル、*n*-ペンチル、*sec*-ペンチル、イソペンチル、*tert*-ペンチル、シクロペンチル、 $-CH_2-$ シクロペンチル、*n*-ヘキシル、*sec*-ヘキシル、シクロヘキシル、 $-CH_2-$ シクロヘキシル部分等を含み、これは重ねて、1以上の置換基を有してもよい。アルケニル基は、これらに限定されないが、例えばエテニル、プロペニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-イルなどを含む。代表的なアルキニル基は、これらに限定されないが、エチニル、2-プロピニル（プロパルギル）、1-プロピニルなどを含む。

30

40

【0136】

本発明の化合物の、上記の脂肪族（およびその他の）部分の置換基のいくつかの例は、これらに限定されないが以下を含む：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ； $-F$ ； $-Cl$ ； $-Br$ ； $-I$ ； $-OH$ ； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-CF_3$ ； $-CH_2CF_3$ ； $-CHCl_2$ ； $-CH_2OH$ ； $-CH_2CH_2OH$ ； $-CH_2NH_2$ ； $-CH_2SO_2CH_3$ ； $-C(O)R_x$ ； $-CO_2(R_x)$ ； $-CON(R_x)_2$ ； $-OC(O)R_x$ ； $-OCO_2R_x$ ； $-OCON(R_x)_2$ ； $-N(R_x)_2$ ； $-S(O$

50

$)_2 R_x$; $-NR_x(CO)R_x$; ここで R_x の出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

【0137】

本明細書に使用される用語「ヘテロ脂肪族」は、例えば炭素原子の代わりに、1以上の酸素、硫黄、窒素、リンまたはケイ素原子を含む脂肪族部分を指す。ヘテロ脂肪族部分は分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、モルホリノ、ピロリジニルなどの飽和および不飽和のヘテロ環を含んでもよい。ある態様において、ヘテロ脂肪族部分は、それ上にある1以上の水素原子の、下記を含むがこれらに限定はされない1以上の部分による独立した置き換えによって置換される：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ； $-F$ ； $-Cl$ ； $-Br$ ； $-I$ ； $-OH$ ； $-NO_2$ ； $-CN$ ； $-CF_3$ ； $-CH_2CF_3$ ； $-CHCl_2$ ； $-CH_2OH$ ； $-CH_2CH_2OH$ ； $-CH_2NH_2$ ； $-CH_2SO_2CH_3$ ； $-C(O)R_x$ ； $-CO_2(R_x)$ ； $-CON(R_x)_2$ ； $-OC(O)R_x$ ； $-OCO_2R_x$ ； $-OCON(R_x)_2$ ； $-N(R_x)_2$ ； $-S(O)_2R_x$ ； $-NR_x(CO)R_x$ ；ここで R_x の出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

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

【0138】

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

【0139】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキルは、「非置換のアルキル」および「置換アルキル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の1以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルキル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、

アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、およびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。シクロアルキルは、例えば上記の置換基により、さらに置換されてもよい。「アルキルアリール」または「アリールアルキル」部分は、アリールで置換されたアルキル（例えばフェニルメチル（ベンジル））である。用語「アルキル」はまた、天然または非天然のアミノ酸の側鎖をも含む。用語「 n -アルキル」は、直鎖（すなわち、非分枝）の非置換のアルキル基を意味する。

10

【0140】

用語「アルケニル」は、上記のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも1つの二重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルケニル」は、直鎖アルケニル基（例えばエチレニル、プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニルなど）、分枝鎖アルケニル基、シクロアルケニル（脂環式）基（シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロオクテニル）、アルキルまたはアルケニル置換シクロアルケニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルケニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルケニル基は、6個以下の炭素原子をその骨格中に有する（例えば直鎖については $C_2 \sim C_6$ 、分枝鎖については $C_3 \sim C_6$ ）。同様に、シクロアルケニル基は、その環構造中に3～8個の炭素原子、より好ましくは環構造中に5または6個の炭素を有してもよい。用語 $C_2 \sim C_6$ は、2～6個の炭素原子を含むアルケニル基を含有する。

20

【0141】

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

30

40

【0142】

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

50

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

【0143】

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

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

【0144】

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

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

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

用語「置換される」は、当該部分に配置され得、当該分子がその意図する機能を行うことを可能にする、独立して選択される置換基を含む。置換基の例は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、 $(CR'R'')_0-3NR'R''$ 、 $(CR'R'')_0-3CN$ 、 NO_2 、ハロゲン、 $(CR'R'')_0-3C(Halo)$ 、 $(CR'R'')$

10

20

30

40

50

R') $_0 \sim 3$ CH (ハロゲン) $_2$ 、($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ CH $_2$ (ハロゲン)、($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ CONR' R'、($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ S (O) $_1 \sim 2$ NR' R'、
 ($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ CHO、($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ O ($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ H、($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ S (O) $_0 \sim 2$ R'、($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ O ($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ H、
 ($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ COR'、($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ CO $_2$ R'、または ($\text{CR}'\text{R}'$) $_0 \sim 3$ OR' 基；ここで各 R' および R' ' は、各々独立して、
 水素、C $_1 \sim$ C $_5$ アルキル、C $_2 \sim$ C $_5$ アルケニル、C $_2 \sim$ C $_5$ アルキニルもしくはア
 ール基であるか、または、R' および R' ' は、一緒になって、ベンジリデン基もしくは
 - (CH $_2$) $_2$ O (CH $_2$) $_2$ - 基である、を含む。

【 0 1 4 5 】

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

。

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

【 0 1 4 6 】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸
 配列」および「オリゴヌクレオチド」は、2 以上のヌクレオチドのポリマーを指す。ポリ
 ヌクレオチドは、DNA、RNA またはこれらの誘導体もしくは修飾バージョンであり得
 る。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、塩
 基部分、糖部分またはリン酸骨格において修飾され得、例えば分子の安定性、そのハイブ
 リダイゼーションパラメータなどが改善される。ポリヌクレオチドは、限定することなく
 以下を含む群から選択される修飾塩基部分を含んでもよい：5 - フルオロウラシル、5 -
 プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチ
 ン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル) ウラシル、5 - カル
 ボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラ
 シル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルクエオシン (galactosylqueosine)
 、イノシン、N 6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン
 、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシ
 トシン、5 - メチルシトシン、N 6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノ
 メチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシ
 ルクエオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 -
 メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ワイブトキシソシン (wybutoxosine)、シュ
 ードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チ
 オウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチル
 エステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミ
 ノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル) ウラシルおよび 2 , 6 - ジアミノプリン。ポリヌ
 クレオチドは、修飾糖部分 (例えば 2' - フルオロリボース、リボース、2' - デオキシ
 リボース、2' - O - メチルシチジン、アラビノースおよびヘキソース) および / または
 修飾リン酸部分 (例えばホスホロチオアートおよび 5' - N - ホスホロアミダイト結合)
 を含んでもよい。ヌクレオチド配列は典型的には、タンパク質および酵素を作るために細
 胞機構によって使用される情報を含む、遺伝情報を持つ。これらの用語は、二本鎖または
 一本鎖のゲノムおよび cDNA、RNA、あらゆる合成のおよび遺伝子操作のポリヌクレ
 オチド、および、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これは、一
 本鎖および二本鎖分子、すなわち DNA - DNA、DNA - RNA、および RNA - RN
 A ハイブリッド、ならびに、アミノ酸骨格に塩基を抱合させることにより形成された「タ

10

20

30

40

50

ンパク質核酸」(PNA)を含む。

【0147】

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

10

【0148】

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

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

20

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

【0149】

核酸分子は、分子の細胞への標的化および/または送達のために、疎水性部分と結びついてよい。ある態様において、疎水性部分はリンカーを介して核酸分子と結びつく。ある態様において、結びつきは非共有結合性相互作用を介する。他の態様において、結びつきは共有結合を介する。当該技術分野において知られているいずれのリンカーも、核酸を疎水性部分に結びつけるために使用されてもよい。当該技術分野において知られているリンカーは、公開された国際PCT出願:WO92/03464、WO95/23162、WO2008/021157、WO2009/021157、WO2009/134487、WO2009/126933、米国特許出願公開第2005/0107325号、米国特許第5,414,077号、米国特許第5,419,966号、米国特許第5,512,667号、米国特許第5,646,126号および米国特許第5,652,359号に記載されており、これらは本明細書に参照により組み込まれる。リンカーは、多原子リンカーに対する共有結合程度に単純であってもよい。リンカーは環式または非環式であってもよい。リンカーは、任意に置換されていてもよい。ある態様において、リンカーは核酸から切断されることができる。ある態様において、リンカーは、生理学的条件下で加水分解されることができる。ある態様において、リンカーは、酵素(例えばエステラーゼまたはホスホジエステラーゼ)により切断されることができる。ある態様において、リンカーは、核酸を疎水性部分から分離するスペーサー要素を含む。スペーサー要素は1~30個の炭素またはヘテロ原子を含んでもよい。ある態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素はプロトン化可能な官能基を含む。かかるプロトン化可能な官能基は、核酸分子のエンドソーム脱出を促進してもよい。プロトン化可能な官能基はまた、核酸の細胞への送達を支援することもでき、例えば分子の全体の電荷を中性化する。他の態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素は、生物学的に不活性である(すなわち、もたらされる核酸分子に対して生物学的活性または機能を付与しない)。

30

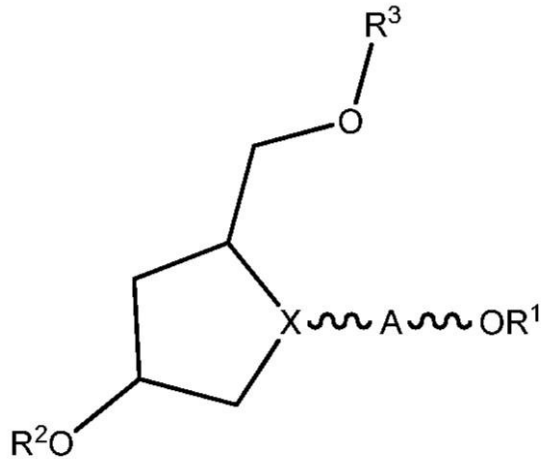
40

【0150】

50

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

【化 1】



10

式中、

20

X は、N または CH であり；

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

R¹ は、疎水性部分であり；

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

R³ は、核酸である、

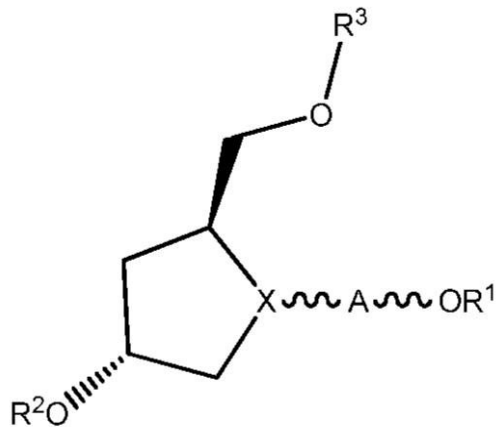
で表される。

30

【0151】

ある態様において、分子は、式：

【化 2】



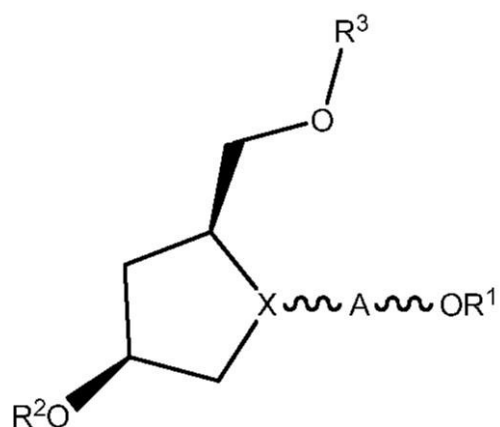
40

で表される。

【0152】

ある態様において、分子は、式：

【化 3】



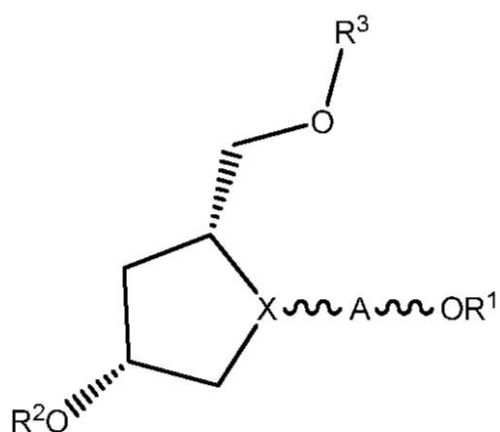
10

で表される。

【 0 1 5 3 】

ある態様において、分子は、式：

【化 4】



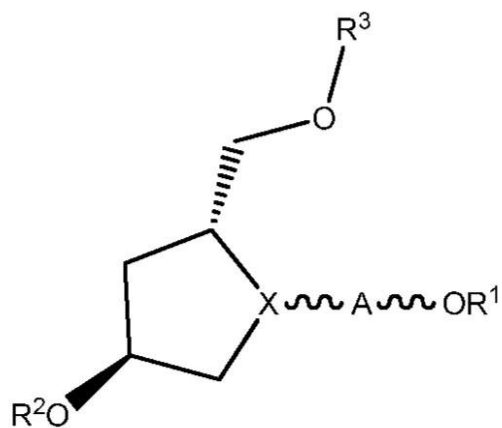
20

で表される。

【 0 1 5 4 】

ある態様において、分子は、式：

【化 5】



40

で表される。

【 0 1 5 5 】

ある態様において、 X は N である。ある態様において、 X は CH である。

50

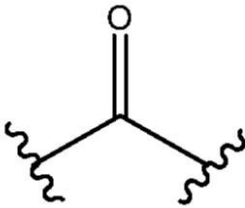
ある態様において、Aは結合である。ある態様において、Aは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のアルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₂₀アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₁₂アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC₁ ~ C₁₀アルキルである。ある態様において、Aは、非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

10

【0156】

ある態様において、Aは、式：

【化6】



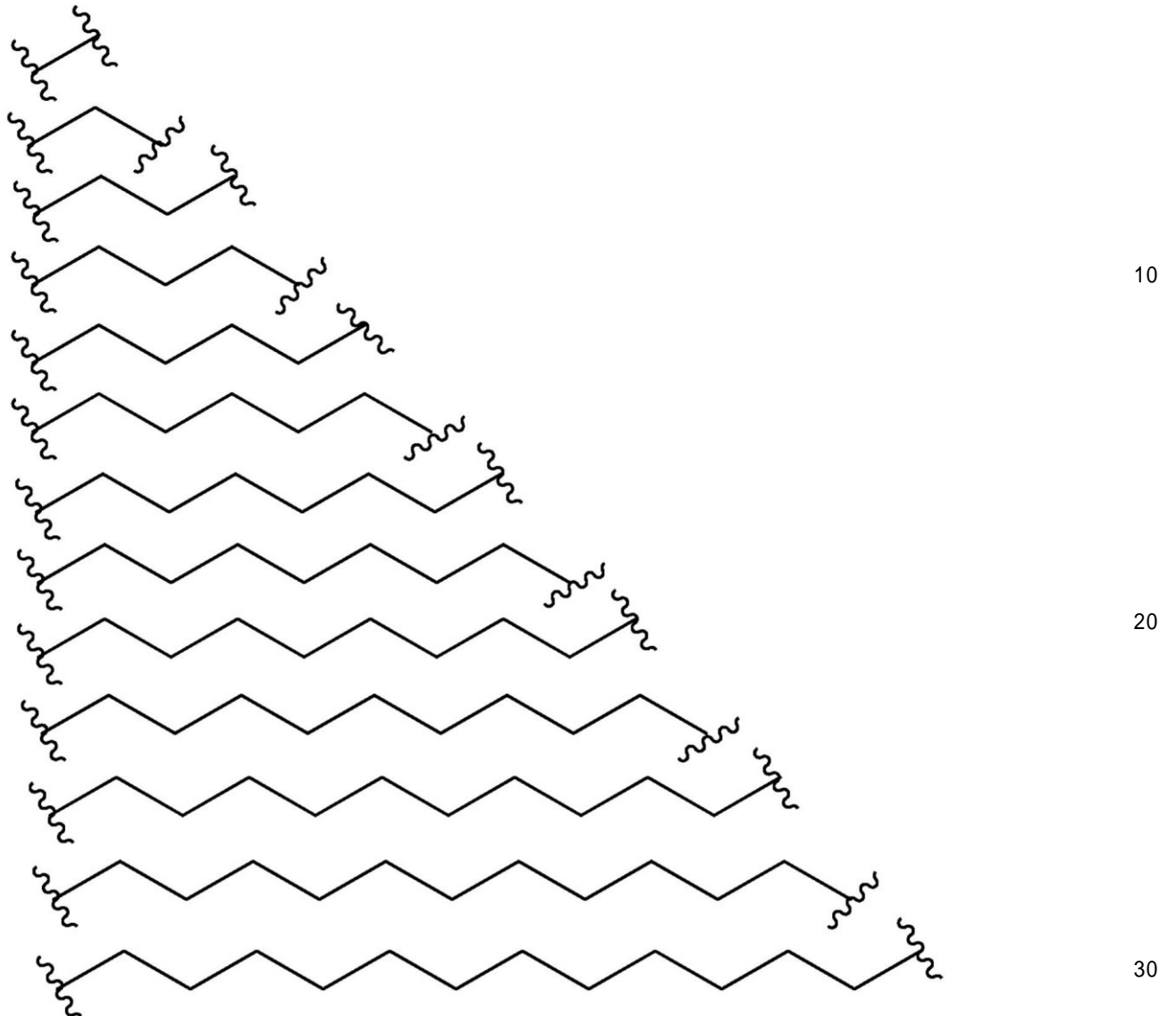
20

で表される。

【0157】

ある態様において、Aは、式：

【化 7】

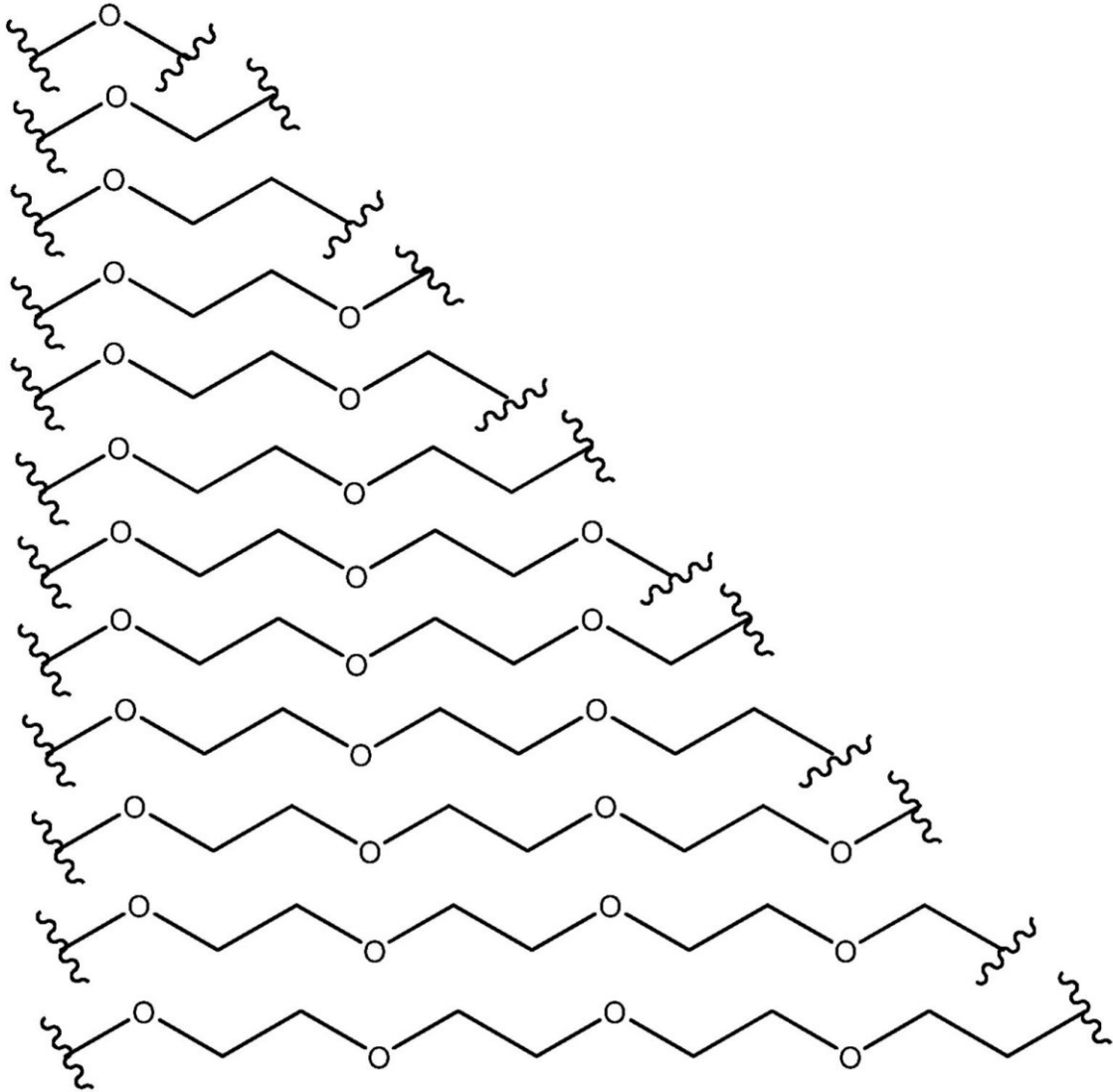


の 1 つで表される。

【 0 1 5 8 】

ある態様において、A は、式：

【化 8】



10

20

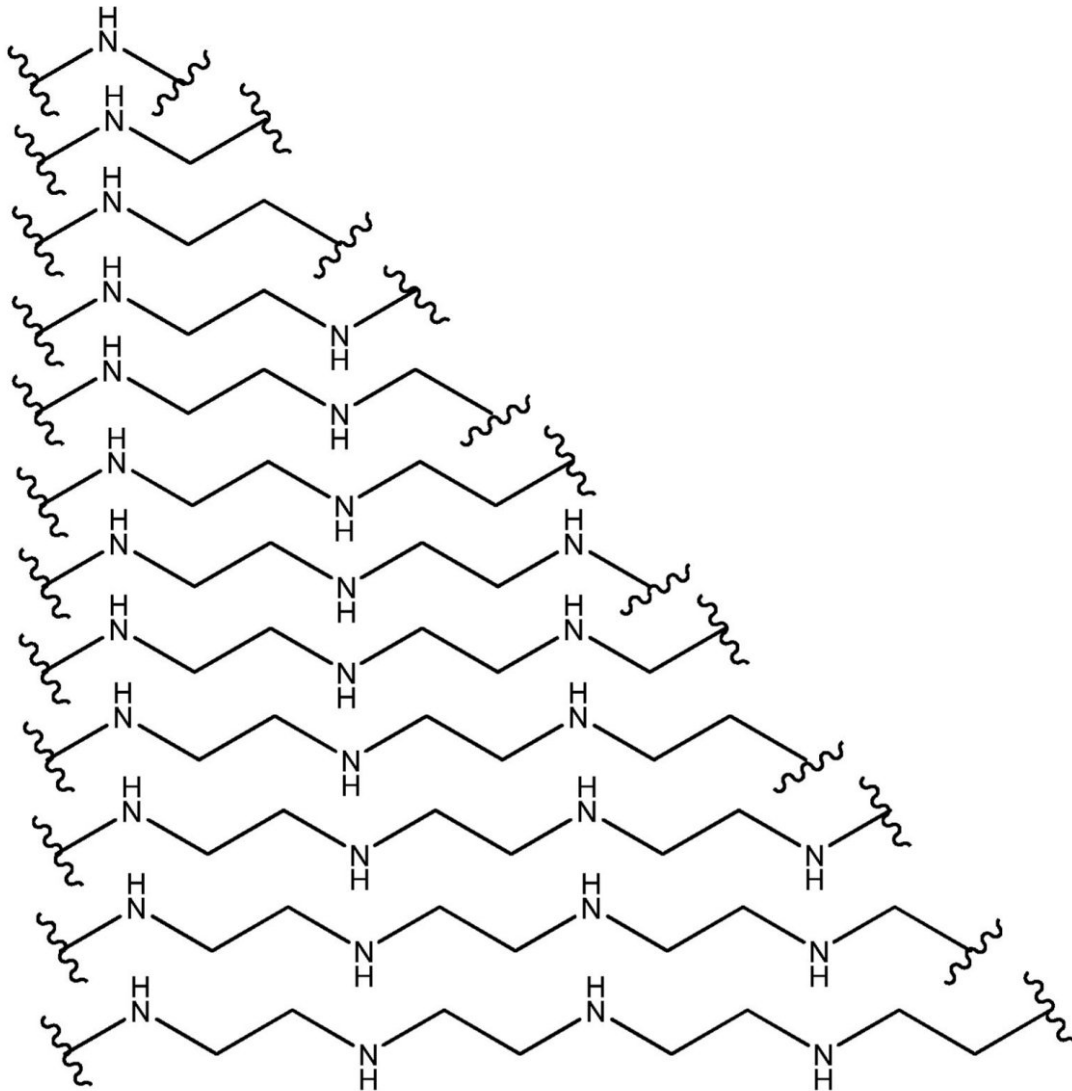
30

の 1 つで表される。

【 0 1 5 9 】

ある態様において、A は、式：

【化 9】

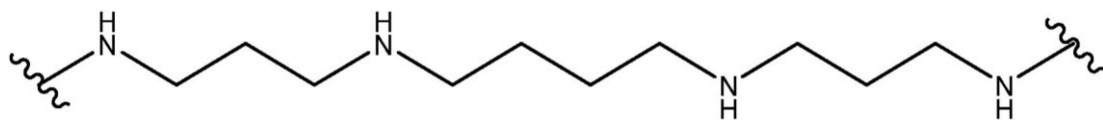


の 1 つで表される。

【 0 1 6 0 】

ある態様において、A は、式：

【化 1 0】

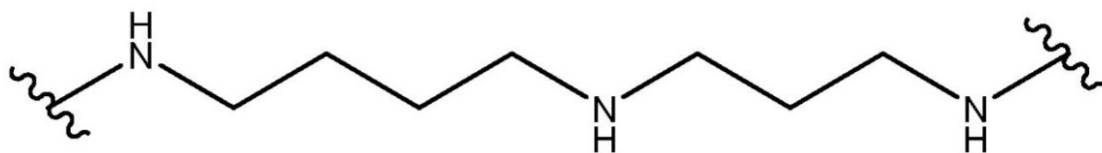


で表される。

【 0 1 6 1 】

ある態様において、A は、式：

【化 1 1】



で表される。

【 0 1 6 2 】

10

20

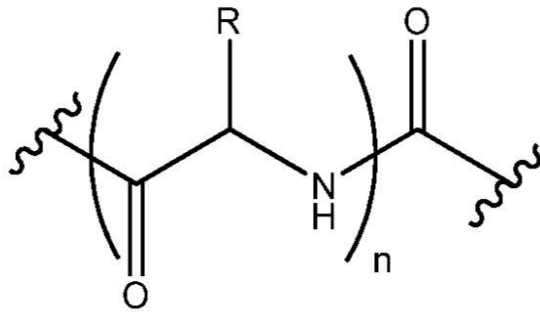
30

40

50

ある態様において、Aは、式：

【化12】



10

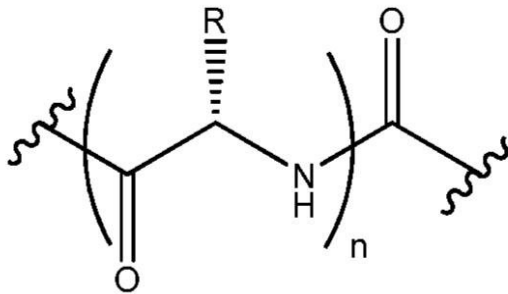
式中、

Rの出現の各々は、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；およびnは、1から20までの整数である（境界を含む）、で表される。

【0163】

ある態様において、Aは、式：

【化13】



20

で表される。

【0164】

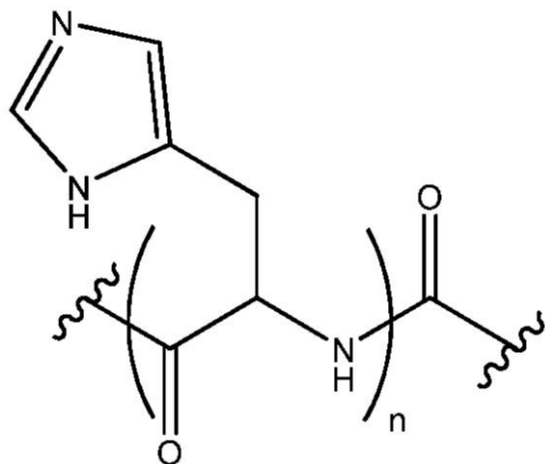
ある態様において、Rの出現の各々は、独立して、天然のアミノ酸の側鎖である。ある態様において、nは、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、nは、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、nは、1から5までの整数である（境界を含む）。

【0165】

ある態様において、Aは、式：

30

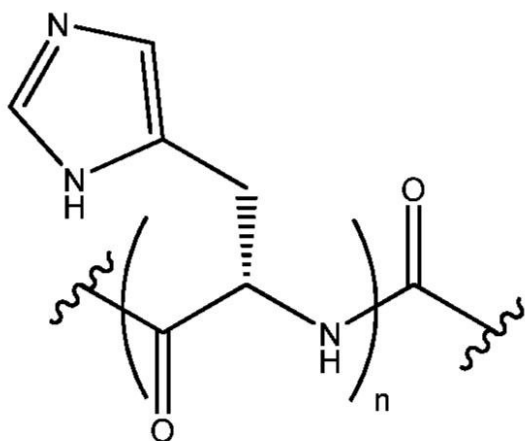
【化 1 4】



10

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

【化 1 5】



20

30

で表される。

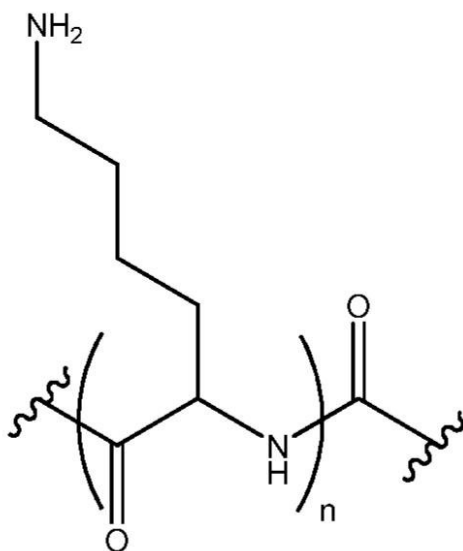
【0 1 6 6】

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

【0 1 6 7】

ある態様において、 A は、式：

【化 1 6】



10

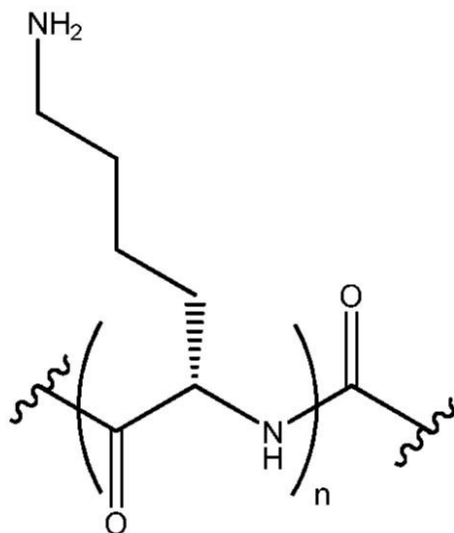
式中、 n は、1から20までの整数である（境界を含む）、
で表される。

20

【0 1 6 8】

ある態様において、 A は、式：

【化 1 7】



30

で表される。

40

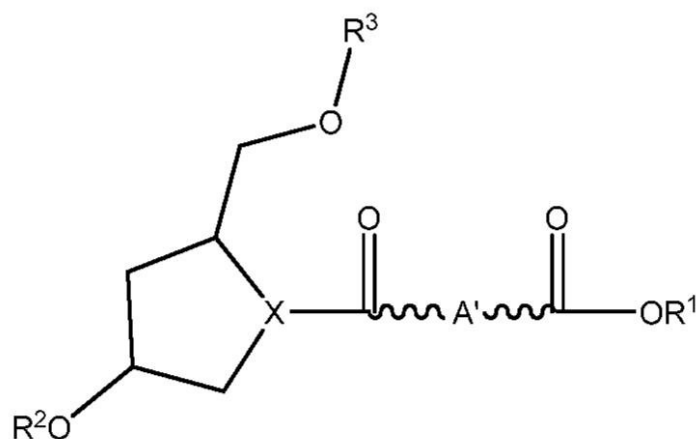
【0 1 6 9】

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

【0 1 7 0】

ある態様において、分子は、式：

【化 18】



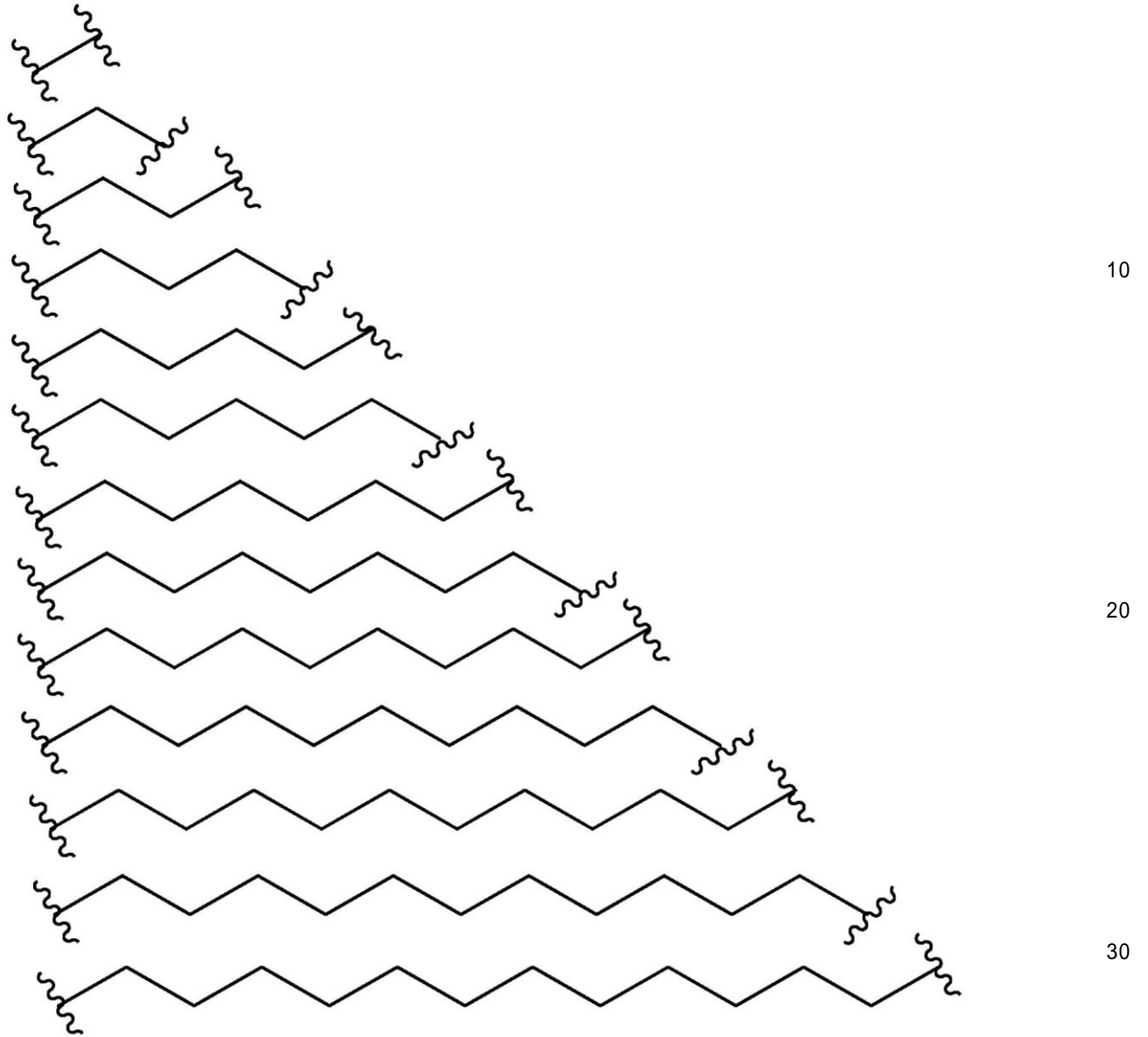
10

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

【0171】

ある態様において、 A' は、式：

【化 1 9】

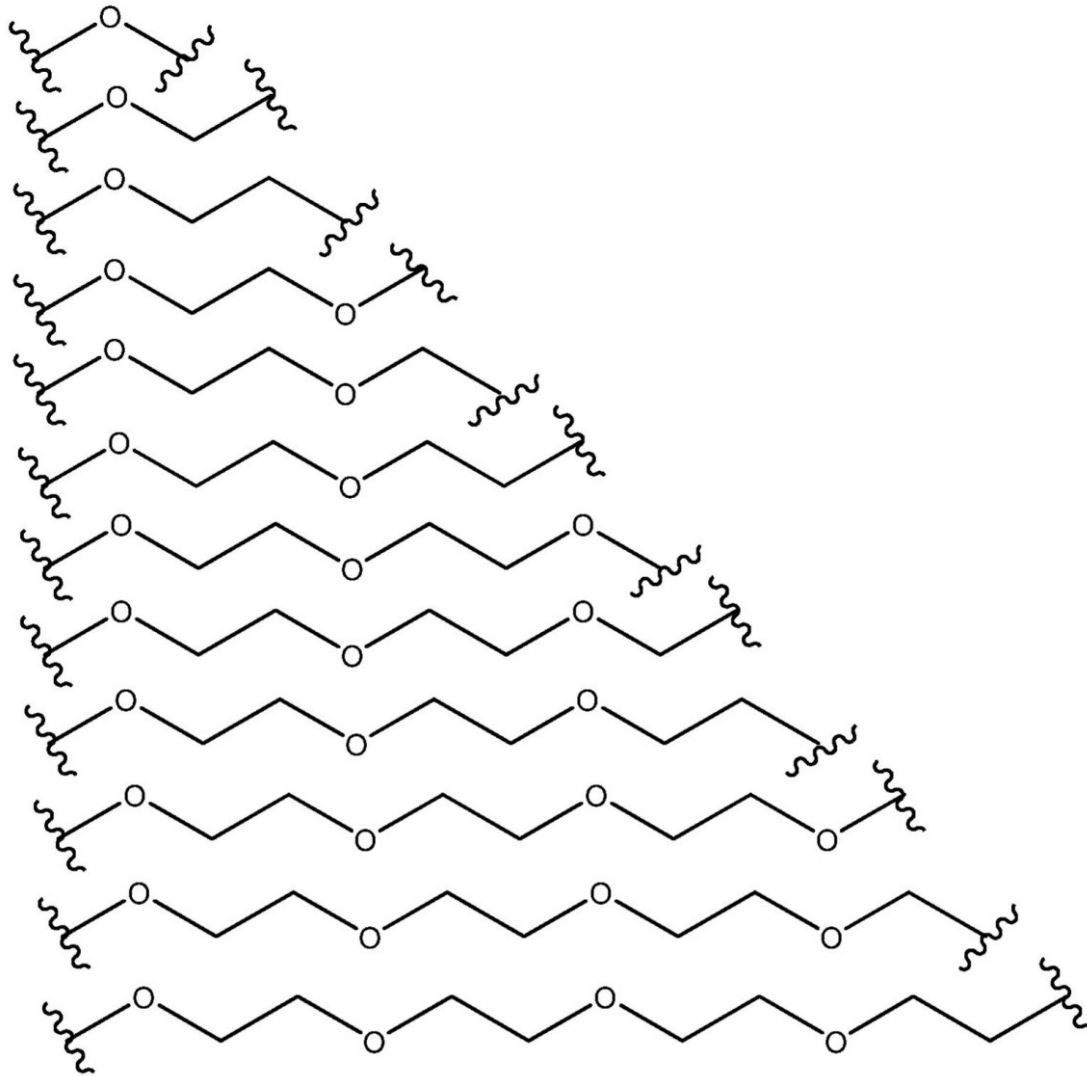


の 1 つで表される。

【 0 1 7 2】

ある態様において、A は、式：

【化 2 0】



10

20

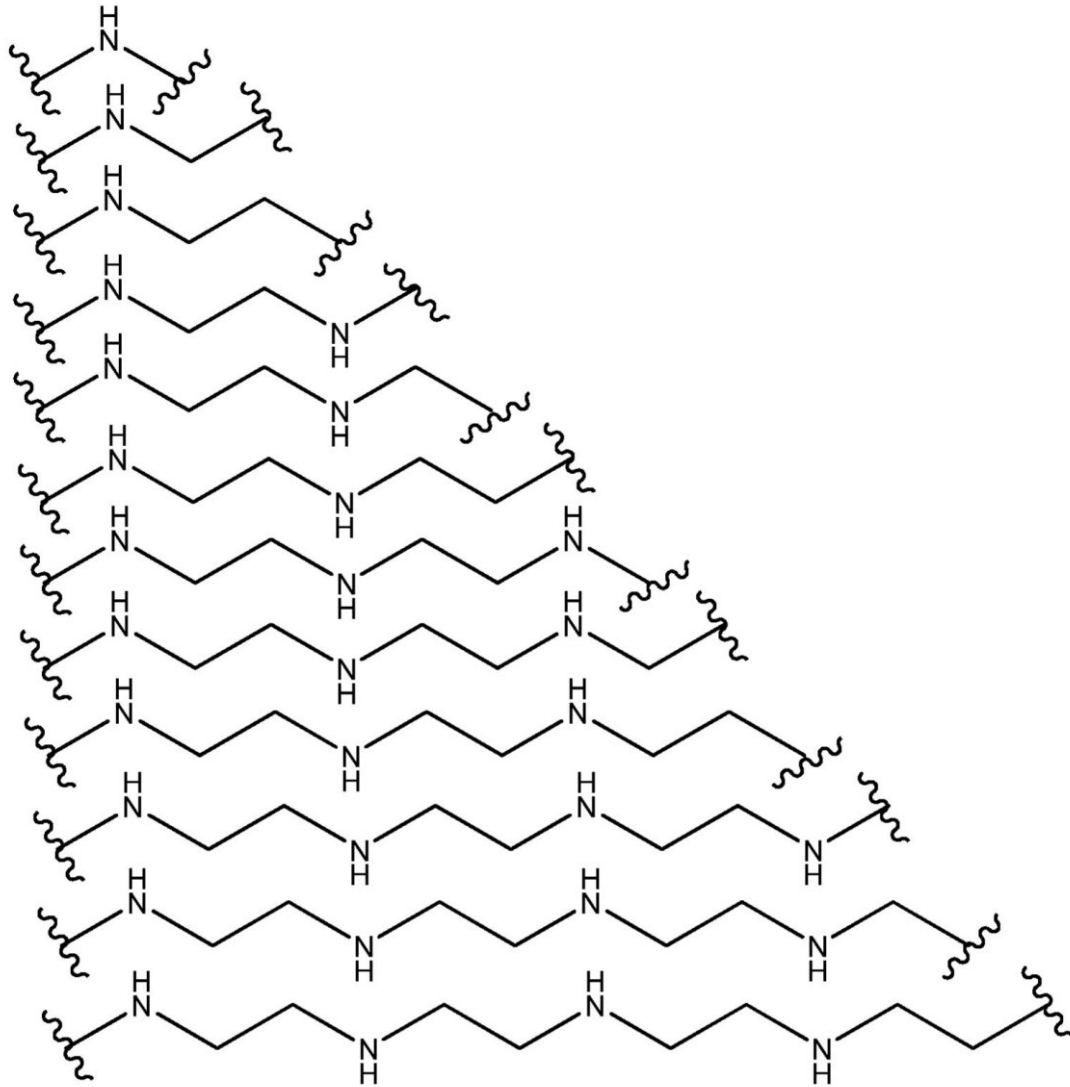
30

の 1 つで表される。

【 0 1 7 3】

ある態様において、A は、式：

【化 2 1】



10

20

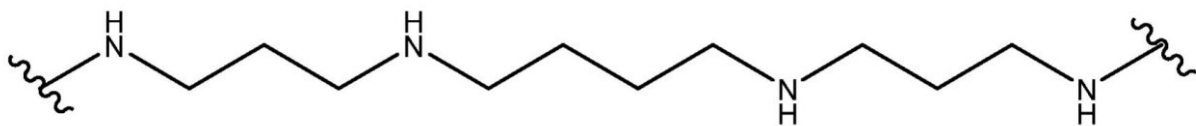
30

の 1 つで表される。

【 0 1 7 4】

ある態様において、A は、式：

【化 2 2】



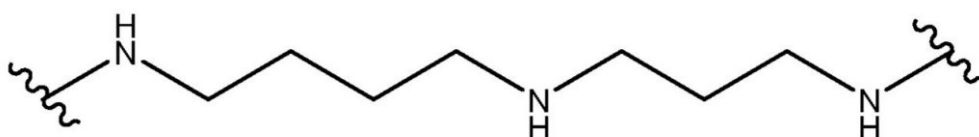
で表される。

40

【 0 1 7 5】

ある態様において、A は、式：

【化 2 3】



で表される。

50

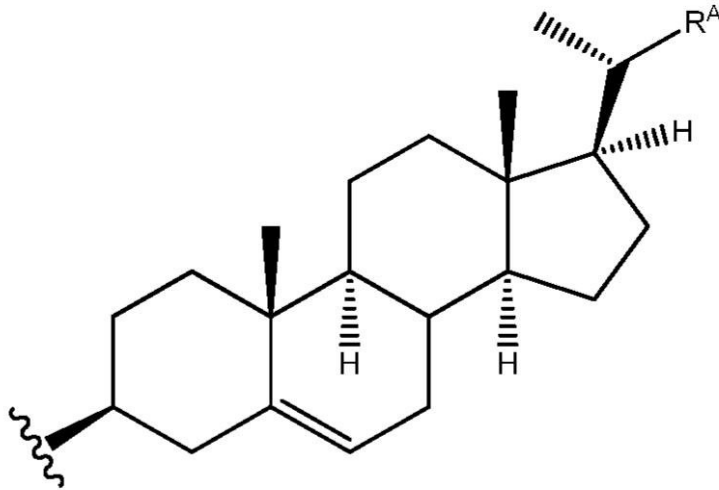
【 0 1 7 6】

ある態様において、 R^1 はステロイドである。ある態様において、 R^1 はコレステロールである。ある態様において、 R^1 は親油性ビタミンである。ある態様において、 R^1 はビタミンAである。ある態様において、 R^1 はビタミンEである。

【0177】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化24】



10

20

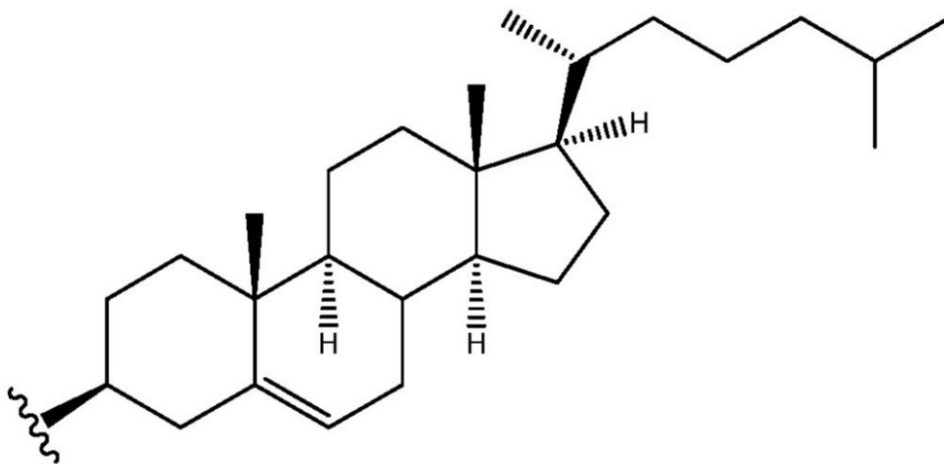
式中、 R^A は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、

で表される。

【0178】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化25】



30

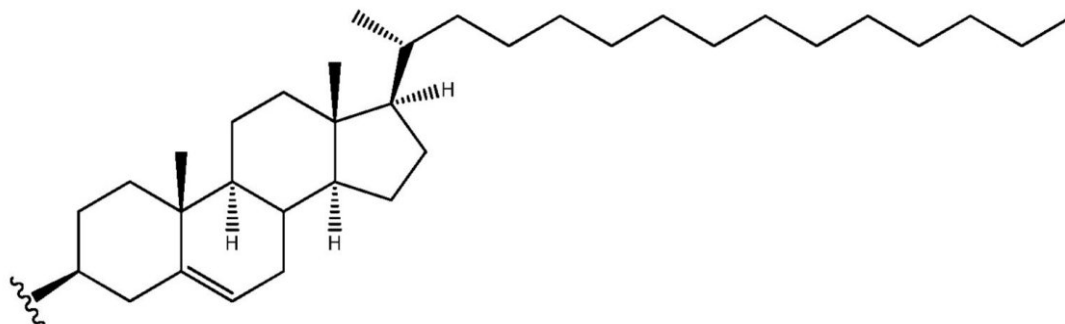
40

で表される。

【0179】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 6】



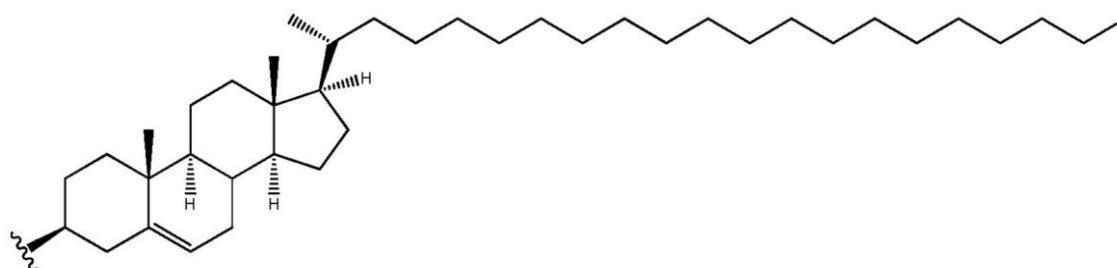
10

で表される。

【 0 1 8 0】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 7】



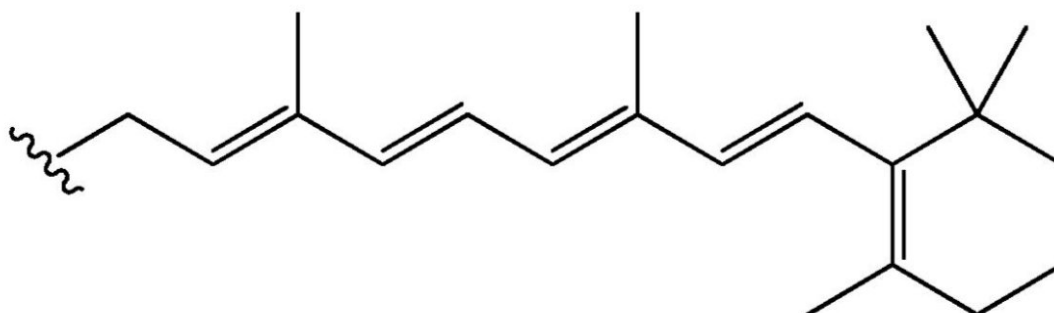
20

で表される。

【 0 1 8 1】

ある態様において、 R^1 は、式：

【化 2 8】



30

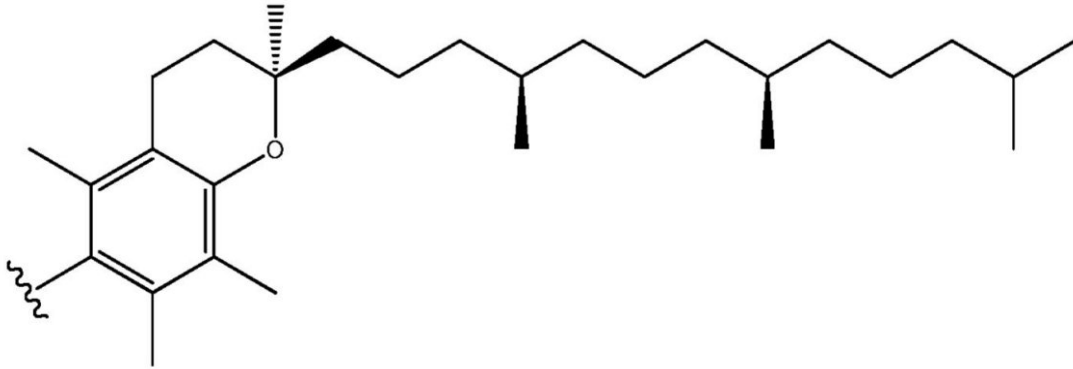
で表される。

【 0 1 8 2】

ある態様において、 R^1 は、式：

40

【化 2 9】



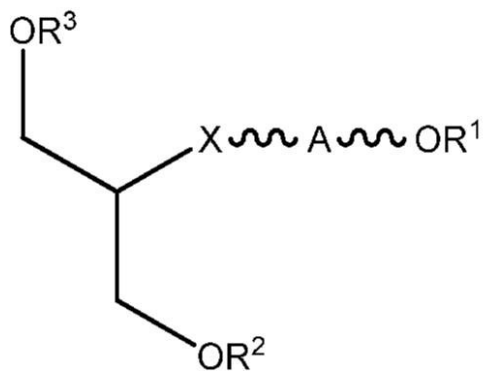
10

で表される。

【 0 1 8 3】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 0】



20

式中

X は、N または CH であり；

30

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

R¹ は、疎水性部分であり；

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

R³ は、核酸である、

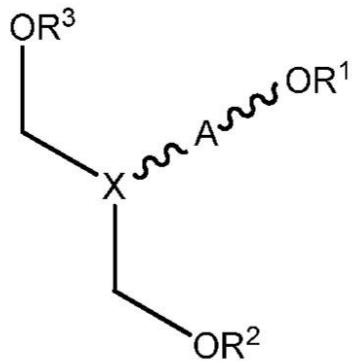
40

で表される。

【 0 1 8 4】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 1】



10

式中、

X は、N または CH であり；

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

R¹ は、疎水性部分であり；R² は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

20

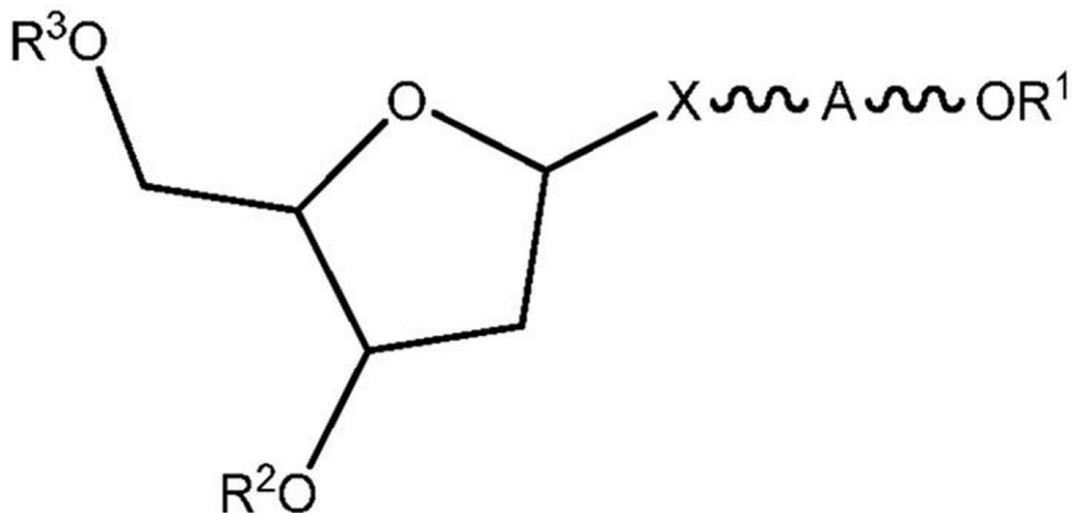
R³ は、核酸である、

で表される。

【0 1 8 5】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 2】



30

40

式中、

X は、N または CH であり；

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

R¹ は、疎水性部分であり；R² は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換

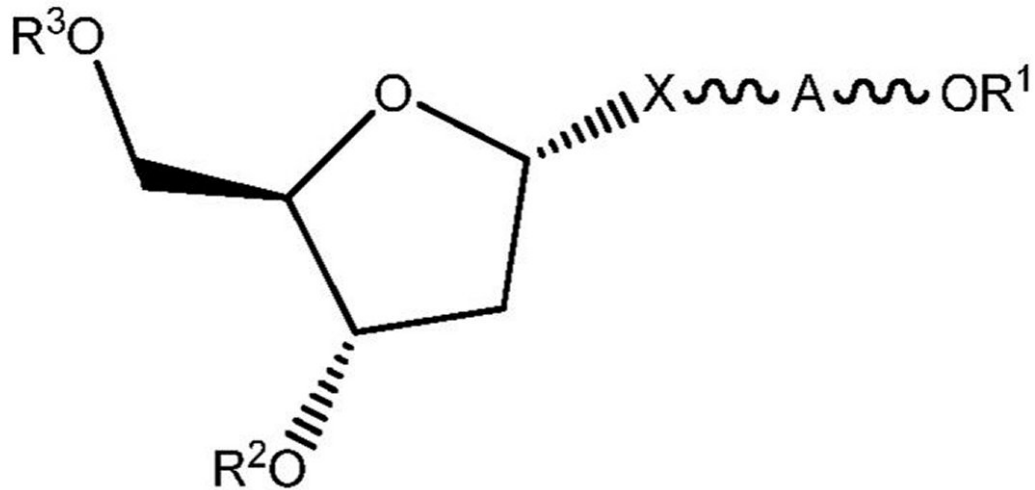
50

または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および
 R^3 は、核酸である、
 で表される。

【0186】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化33】



10

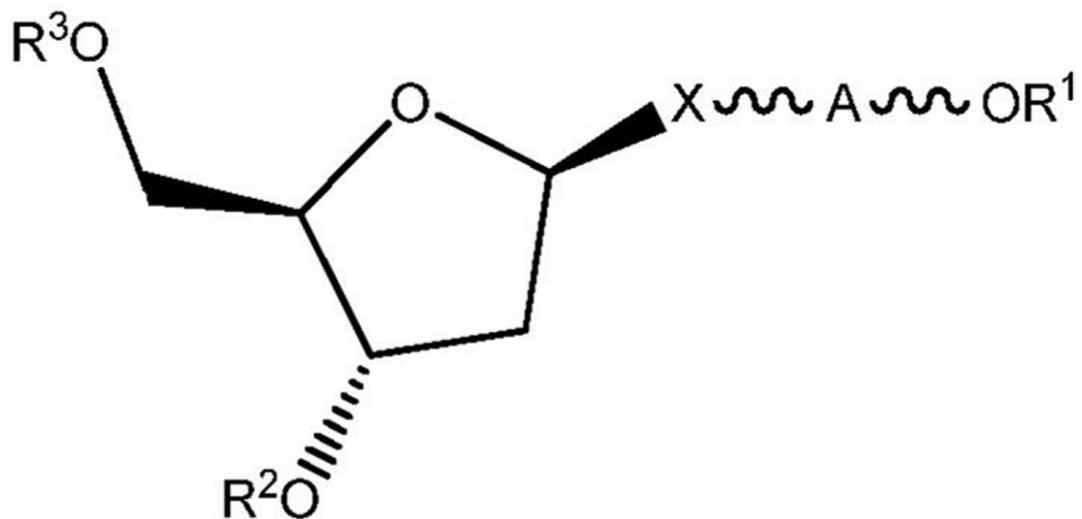
20

で表される。

【0187】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化34】



30

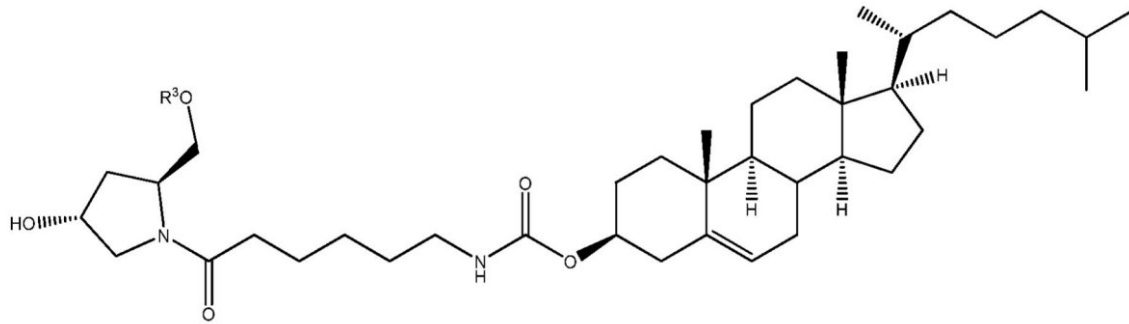
40

で表される。

【0188】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 5】



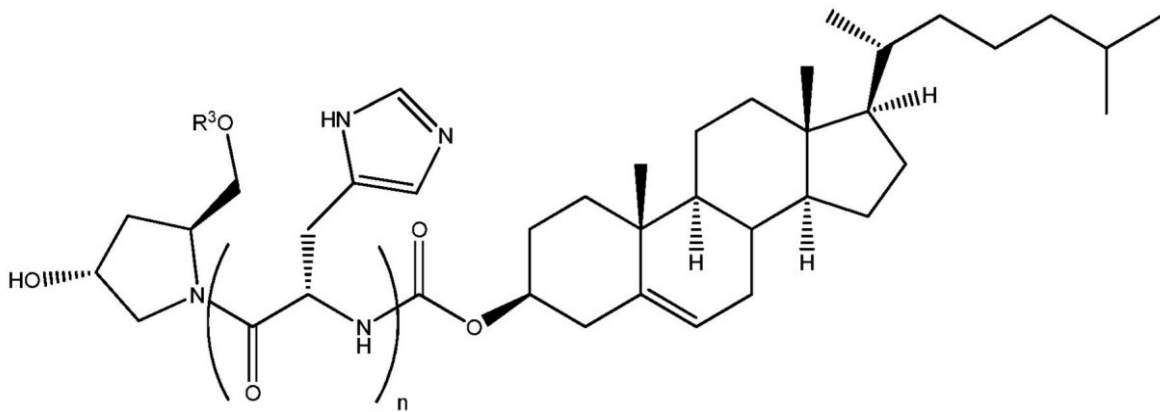
10

式中、R³ は、核酸である、
で表される。

【0189】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 6】



20

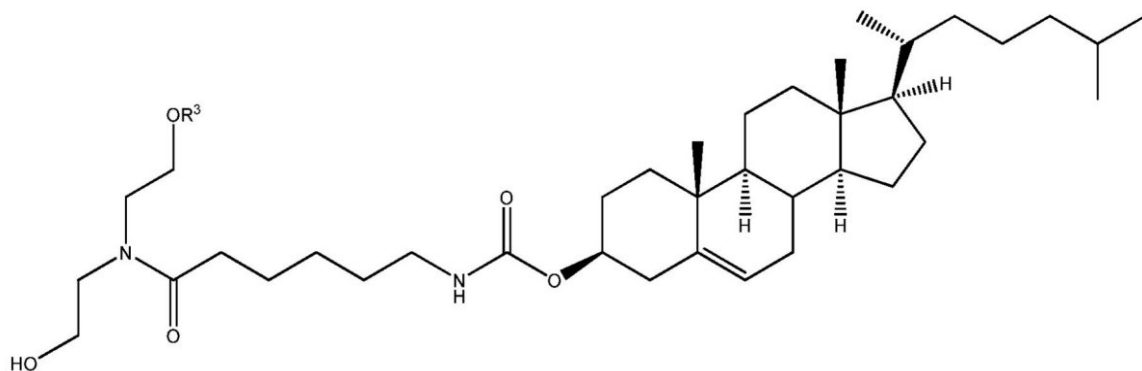
式中、R³ は、核酸であり；および
n は、1 から 20 までの整数（境界を含む）である。
で表される。

30

【0190】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 7】



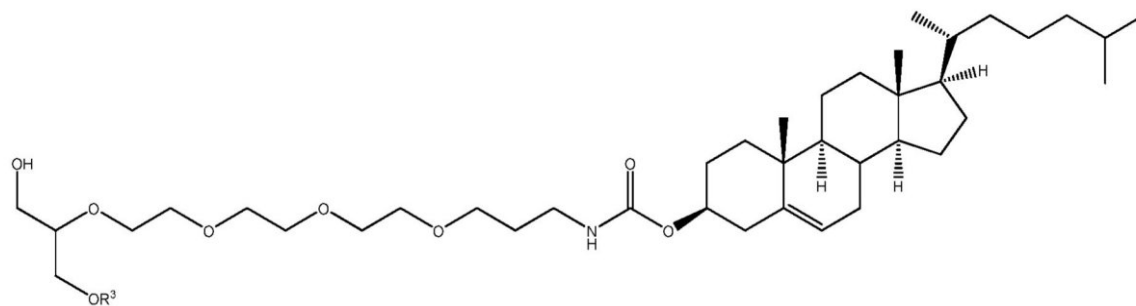
40

で表される。

【0191】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 8】



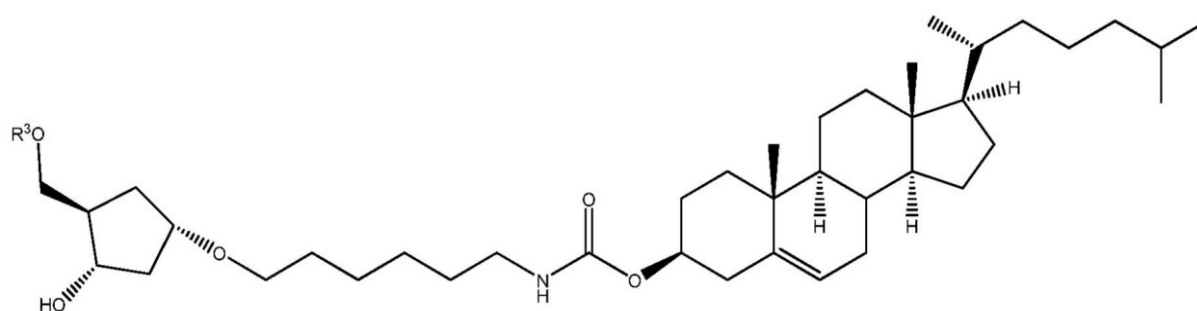
10

で表される。

【0 1 9 2】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 9】



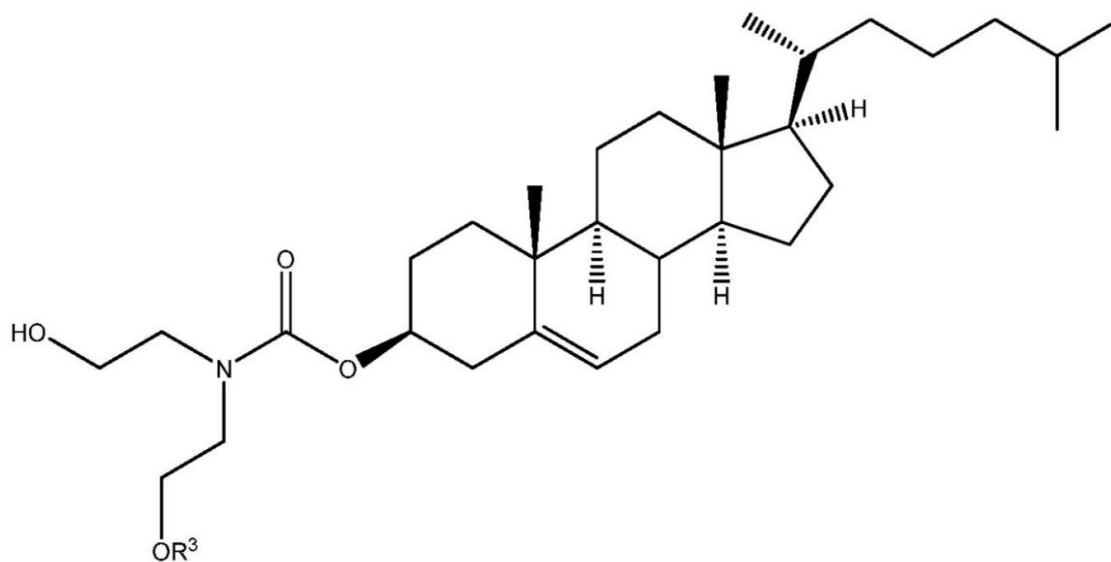
20

で表される。

【0 1 9 3】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 4 0】



30

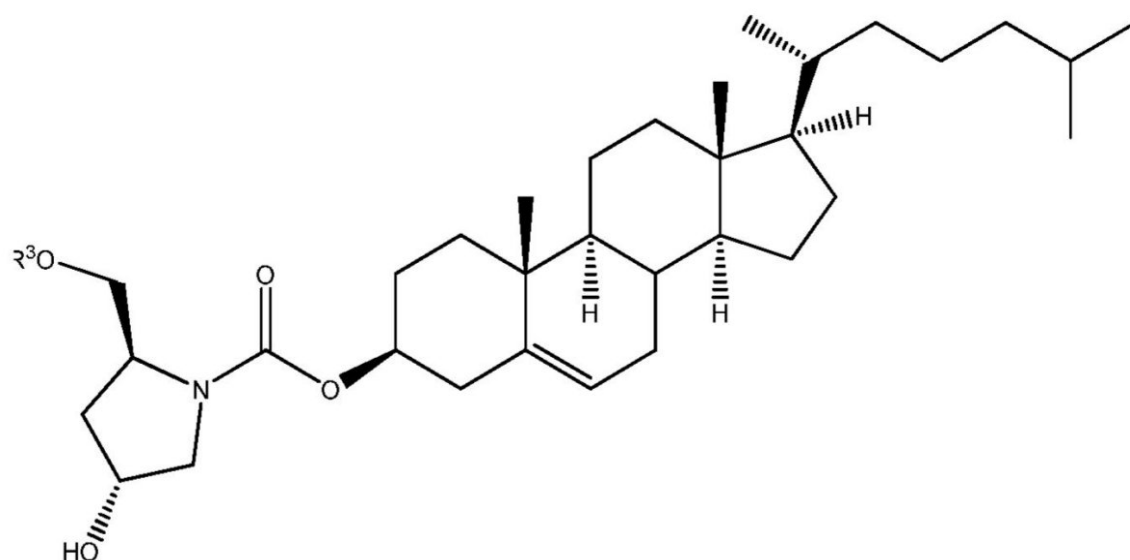
40

で表される。

【0 1 9 4】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 4 1】



10

で表される。

20

【0195】

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

30

【0196】

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、疎水的に修飾されたヌクレオチドまたは「疎水性修飾」を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾」は、(1) 塩基の全体的な疎水性が著しく増大し、および/または、(2) 塩基がなお通常のワトソン - クリック相互作用に類似するものを形成することができるよう修飾された塩基を指す。いくつかの非限定的な塩基修飾の例は、5 位のウリジンおよびシチジン修飾、例えばフェニル、4 - ピリジル、2 - ピリジル、インドリル、および、イソブチル、フェニル (C_6H_5)、トリプトファン (C_8H_6N) $CH_2CH(NH_2)CO$ 、イソブチル、ブチル、アミノベンジル、フェニル、およびナフチルを含む。

40

末端 (3' または 5' 末端)、ループ領域または化学修飾された二本鎖核酸分子の他のいずれ部分にも付着し得る他の型の抱合体は、ステロール、ステロール型分子、ペプチド、低分子、タンパク質などを含む。いくつかの態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子は、1 つより多い抱合体 (同じまたは異なる化学的性質のもの) を含んでもよい。いくつかの態様において、抱合体は、コレステロールである。

【0197】

いくつかの態様において、ガイド鎖の 5' 端に対する第 1 のヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾を有し、ここで任意に、2' - O - メチル修飾は、5' P - 2' O - メチル U

50

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

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

【0198】

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

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

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

【0199】

本発明のアンチセンス (ガイド) 配列は、「モルホリノオリゴヌクレオチド」を含んでもよい。モルホリノオリゴヌクレオチドは非イオン性であり、RNAse H 非依存的機構により機能する。モルホリノオリゴヌクレオチドの 4 つの遺伝子塩基 (アデニン、シトシン、グアニンおよびチミン/ウラシル) は、6 員のモルホリン環に連結されている。モルホリノオリゴヌクレオチドは、例えば非イオン性ホスホロジアミデート (phosphorodiamidate) サブユニット間連結部によって、4 つの異なるサブユニット型を結合することにより作られる。モルホリノオリゴヌクレオチドは、以下を含む多数の利点を有する: ヌクレアーゼに対する完全な耐性 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1996. 6:267); 予測可能な標的化 (Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141); 細胞における確実な活性 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:63); 優れた配列特異性 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:151); 最小限の非アンチセンス活性 (Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141); および簡便な浸透圧または搔爬による送達 (Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:291)。モルホリノオリゴヌクレオチドはまた、高用量におけるその非毒性のために好ましい。モルホリノオリゴヌクレオチドの調製の議論は、Antisense & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:187において見出され得る。

【0200】

本明細書に記載の化学修飾は、一本鎖ポリヌクレオチドの RISC 中へのローディングを促進すると考えられる。一本鎖ポリヌクレオチドは、RISC 中へのローディングおよび遺伝子サイレンシングの誘導において活性であることが示されている。しかしながら、

一本鎖ポリヌクレオチドについての活性のレベルは、デュプレックスポリヌクレオチドと比較したとき、2～4桁の規模でより低いと考えられる。

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

【0201】

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

本発明により提供される修飾は、全てのポリヌクレオチドに対して適用可能である。これは、一本鎖RISC侵入性ポリヌクレオチド、一本鎖RISC阻害性ポリヌクレオチド、多様な長さ(15～40bp)の従来のデュプレックス化ポリヌクレオチド、非対称性デュプレックス化ポリヌクレオチドなどを含む。ポリヌクレオチドは、5'末端修飾、リボース修飾、骨格修飾および疎水性ヌクレオシド修飾を含む、多様な化学修飾パターンにより修飾されていてもよい。

【0202】

合成

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

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

【0203】

オリゴヌクレオチドの合成プロトコルは当該技術分野において周知であり、例えば米国特許第5,830,653号;WO98/13526;Stec et al. 1984. J. Am. Chem. Soc. 106:6077;Stec et al. 1985. J. Org. Chem. 50:3908;Stec et al. J. Chromatog. 1985. 326:263;LaPlanche et al. 1986. Nucl. Acid. Res. 1986. 14:9081;Fasman G. D., 1989. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 1989. CRC Press, Boca Raton, Fla.;Lamone. 1993. Biochem. Soc. Trans. 21:1;米国特許第5,013,830号;米国特許第5,214,135号;米国特許第5,525,719号;Kawasaki et al. 1993. J. Med. Chem. 36:831;WO92/03568;米国特許第5,276,019号;および米国特許第5,264,423号において見出され得る。

【0204】

選択される合成方法は、所望のオリゴヌクレオチドの長さに依存し得、かかる選択は、当業者の技術の範囲内である。例えば、ホスホロアミダイトおよび亜リン酸トリエステル

10

20

30

40

50

法により、175またはそれより多いヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを生成し得、一方、H-ホスホナート法は、100ヌクレオチド未満のオリゴヌクレオチドのために良好に機能する。修飾塩基がオリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、および特に、修飾ホスホジエステル連結部が使用される場合、合成手順は、必要に応じて、公知の手順に従って変えられる。このことに関して、Uhlmannら(1990, Chemical Reviews 90:543-584)は、修飾塩基および修飾ホスホジエステル連結部を有するオリゴヌクレオチドを作製するための参考文献および概略手順を提供する。オリゴヌクレオチドを作製するための他の例示的な方法は、Sonveaux、1994年、「Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis」;Agrawal、Methods in Molecular Biology 26:1において教示される。例示的な合成方法はまた、「Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach」(Gait, M. J. IR L Press at Oxford University Press. 1984)においても教示される。その上、修飾ヌクレオチドを持ついくつかの配列を含む規定の配列の直鎖オリゴヌクレオチドは、数個の商業的供給源から容易に入手可能である。

10

【0205】

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

20

【0206】

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

30

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

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

40

【0207】

送達/キャリア

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、発明者は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子(例えば、sd-rxRNA)のパッセンジャー鎖およびガイド鎖上の修飾の特定のパターンが、ガイド鎖の核への侵入を容易にし、ガイド鎖が遺伝子サイレンシング(例えば、AKT、p53、PDCD1、TIGIT、Cbl-b、Tet2、Blimp-1、T-Box21、DNMT3A、PTPN6、およびHK2などの標的遺伝子のサイレンシング)を媒介すると考える。

50

【0208】

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの潜在的な作用機構がこの活性を説明することができるであろう。例えば、いくつかの態様において、核酸分子（例えば、*sd-rxRNA*）のガイド鎖（例えば、アンチセンス鎖）は、パッセンジャー鎖から解離して、一本鎖として核に入ることができる。いったん核内に入ると、一本鎖のガイド鎖は、*RNAse H*または別のリボヌクレアーゼと結合し、標的（例えば、*AKT*、*p53*、*PDCD1*、*TIGIT*、*Cbl-b*、*Tet2*、*Blimp-1*、*T-Box21*、*DNMT3A*、*PTPN6*、または*HK2*）を切断する（「アンチセンス作用機構」）。いくつかの態様において、核酸分子（例えば、*sd-rxRNA*）のガイド鎖（例えば、アンチセンス鎖）は、細胞質中または核外でアルゴノート（*Argo*）タンパク質と結合し、ロードされた*Argo*複合体を形成し得る。このロードされた*Argo*複合体は、核に移動し、次いで標的（例えば、*AKT*、*p53*、*PDCD1*、*TIGIT*、*Cbl-b*、*Tet2*、*Blimp-1*、*T-Box21*、*DNMT3A*、*PTPN6*、および*HK2*）を切断し得る。いくつかの態様において、核酸分子（例えば、*sd-rxRNA*）の両方の鎖（例えば、デュプレックス）は核に入り得、ガイド鎖は、*RNAse H*、*Argo*タンパク質または別のリボヌクレアーゼと結合し得、標的（例えば、*AKT*、*p53*、*PDCD1*、*TIGIT*、*Cbl-b*、*Tet2*、*Blimp-1*、*T-Box21*、*DNMT3A*、*PTPN6*、および*HK2*）を切断する。

10

【0209】

当業者は、本明細書に記載の二本鎖分子のセンス鎖（例えば、*sd-rxRNA*のセンス鎖）は、本明細書に記載の二本鎖核酸分子のガイド鎖の送達に限定されないことを理解する。むしろ、いくつかの態様において、本明細書に記載のパッセンジャー鎖は、他の分子（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*ASO*）を細胞の核に対して標的化する目的で、同分子に結合（例えば、共有結合、非共有結合、抱合、相補性の領域を介したハイブリダイズなど）される。いくつかの態様において、本明細書に記載のセンス鎖に結合した分子は、合成アンチセンスオリゴヌクレオチド（*ASO*）である。いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合したセンス鎖は、8～15ヌクレオチド長であり、化学修飾され、疎水性抱合体を含む。

20

【0210】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、*ASO*は、水素結合によって相補的なパッセンジャー鎖に結合され得る。したがって、いくつかの側面において、本開示は、単離された核酸分子を細胞に投与することを含む、核酸分子を細胞に送達する方法を提供し、ここで、単離された核酸はアンチセンスオリゴヌクレオチド（*ASO*）に対して相補的であるセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は8～15ヌクレオチド長であり、少なくとも2個のホスホロチオアート修飾を含み、センス鎖中のピリミジンの少なくとも50%が修飾され、ここで、同分子は疎水性抱合体を含む。

30

【0211】

細胞によるオリゴヌクレオチドの取り込み

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物は、1以上の細胞または細胞ライセートと接触させられて（すなわち、接触させられるか、または、本明細書においては投与または送達されるとして言及される）、これに取り込まれる。用語「細胞」は、原核および真核細胞、好ましくは脊椎動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞を含む。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は細菌細胞と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は真核細胞（例えば、植物細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞などの節足動物細胞）と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は幹細胞と接触させられる。いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、T細胞（例として、*CD8+T*細胞）などの免疫細胞と接触させられる。いくつかの態様において、T細胞は、*T_{SCM}*または*T_C_M*細胞である。好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、ヒト細胞と接触させられる。

40

50

【0212】

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

10

【0213】

別の態様において、細胞中へのオリゴヌクレオチドの送達は、リン酸カルシウム、DMSO、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な、当該技術分野において認識される方法により、または、トランスフェクションにより、例えばカチオン性、アニオン性または中性脂質組成物もしくはリポソームを使用して、当該技術分野において知られている方法を使用して（例えばWO90/14074；WO91/16024；WO91/17424；米国特許第4,897,355号；Bergan et al. 1993. Nucleic Acid Research. 21:3567を参照）、増強され得る。増強されたオリゴヌクレオチドの送達はまた、ベクター（例えばShi, Y. 2003. Trends Genet 2003 Jan. 19:9；Reichhart J M et al. Genesis. 2002. 34(1-2):1604；Yu et al. 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:6047；Sui et al. 2002. Proc. Natl. Acad Sci. USA 99:5515を参照）、ウイルス、ポリアミンまたはポリリジン、プロタミンもしくはN1、N12-ビス（エチル）スペルミンなどの化合物を使用するポリカチオン抱合体（例えばBartzatt, R. et al. 1989. Biotechnol. Appl. Biochem. 11:133；Wagner E. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4255を参照）の使用によっても媒介され得る。

20

【0214】

ある態様において、本発明の化学修飾された二本鎖核酸分子は、多様なベータ-グルカン含有粒子を使用して送達されてもよく、該粒子はGeRP（グルカンカプセル化RNAロード粒子）として言及され、これは2010年3月4日出願の米国仮出願第61/310,611号、表題「食細胞への標的化送達のための製剤および方法」に記載されており、参照により組み込まれる。かかる粒子はまた、米国特許公開US2005/0281781 A1およびUS2010/0040656、ならびにPCT公開WO2006/007372およびWO2007/050643においても記載されており、参照により組み込まれる。化学修飾された二本鎖核酸分子分子は、疎水的に修飾されていてもよく、および任意に、脂質および/または両親媒性ペプチドと結びついていてもよい。ある態様において、ベータ-グルカン粒子は酵母に由来する。ある態様において、ペイロードトラップ（payload trapping）分子は、少なくとも約1000Da、10,000Da、50,000Da、100kDa、500kDa等の分子量のポリマーである。好ましいポリマーは、（限定せずに）カチオン性ポリマー、キトサンまたはPEI（ポリエチレンジアミン）などを含む。

30

40

【0215】

グルカン粒子は、酵母細胞壁などの真菌細胞壁の不溶性構成要素に由来し得る。いくつかの態様において、酵母はパン酵母である。酵母由来グルカン分子は、1以上の（1, 3）-グルカン、（1, 6）-グルカン、マンナンおよびキチンを含み得る。いくつかの態様において、グルカン粒子は中空の酵母細胞壁を含み、これにより、粒子は細胞に似た3次元構造を維持し、この中でRNA分子などの分子と複合体化するかまたはこれをカプセル化し得る。酵母細胞壁粒子の使用に関連するいくつかの利点は、構成要素の利用可能性、それらの生分解性の性質、および、それらの食作用細胞を標的化する能力である。

【0216】

50

いくつかの態様において、グルカン粒子は細胞壁からの不溶性構成要素を抽出することにより調製され得、例えばパン酵母（フライシュマンのもの）を1 MのNaOH / pH 4.0、H₂Oで抽出し、続いて洗浄および乾燥することによる。酵母細胞壁粒子を調製するための方法は以下の文献に議論され、これらから参照により組み込まれる：米国特許第4,810,646号、同第4,992,540号、同第5,082,936号、同第5,028,703号、同第5,032,401号、同第5,322,841号、同第5,401,727号、同第5,504,079号、同第5,607,677号、同第5,968,811号、同第6,242,594号、同第6,444,448号、同第6,476,003号、米国特許公開第2003/0216346号、同第2004/0014715号および同第2010/0040656号ならびにPCT公開第W002/12348号。

【0217】

10

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

【0218】

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

20

【0219】

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

30

酵母細胞壁粒子などのグルカン粒子は、天然の脂質含量を有し得る。例えば、粒子は1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%または20%w/wを超える脂質を含有し得る。いくつかの態様において、天然脂質の存在はRNA分子の複合体化または捕捉を支援し得る。

【0220】

40

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

送達するRNA分子(単数または複数)は、グルカン粒子に複合体化されるか、そのシェル内に「捕捉」される。粒子のシェルまたはRNA構成要素は、Soto and Ostroff (2008) Bioconjug Chem 19:840に記載され、参照により組み込まれているように、視覚化のために標識され得る。GERPをロードする方法は以下にさらに議論される。

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

50

）および細胞を培養する培地の種類を含む。

【0221】

免疫原性組成物およびそれを生産する方法

いくつかの態様において、本明細書に記載の化学修飾された二本鎖核酸分子（例として、 $sd-rxRNA$ ）は、免疫原性組成物のための特定の細胞サブタイプまたはT細胞サブタイプの生産に有用である。本明細書に使用されるとき、「免疫原性組成物」は、本明細書に記載の化学修飾された核酸分子および任意に1以上の薬学的に許容し得る賦形剤または担体を含む宿主細胞を含む組成物である。いずれの具体的な理論によっても拘束されることは望まないが、本開示に記載される免疫原性組成物は、特定の細胞サブタイプ（例として、 T_{SCM} または T_{CM} T細胞などのT細胞サブタイプ）の富化された集団、および/または1以上の免疫チェックポイントタンパク質（例として、 $PDCD1$ 、 $TIGIT$ 等々）の減少した（例として、阻害された）発現または活性を有するように操作されている、免疫細胞（例として、T細胞、NK細胞、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞（DC）、幹細胞（SC）、誘導多能性幹細胞（iPSC）等々）の集団により特徴づけられ、したがって、いくつかの態様において、対象の免疫応答を調節する（例として、刺激するまたは阻害する）ために有用である。

10

【0222】

本明細書に使用されるとき、「宿主細胞」は、1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子が導入されている細胞である。典型的には、宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、ブタ細胞等々である。しかしながら、いくつかの態様において、宿主細胞は、非哺乳動物細胞、例えば原核生物細胞（例として、細菌細胞）、酵母細胞、昆虫細胞等々である。一般に、宿主細胞は、健康なドナーなどのドナー由来である（例として、化学修飾された二本鎖核酸が導入される細胞は、健康なドナーなどのドナーから採取される）。例えば、細胞は、健康なドナーなどのドナーから得られる、骨髄または血液などの生体試料から単離されてもよい。本明細書に使用されるとき「健康なドナー」は、増殖性障害または感染性疾患（例として、細菌感染症、ウイルス感染症、または寄生生物感染症）を有していない、または有している疑いのない対象を指す。しかしながら、いくつかの態様において、宿主細胞は、例えば自家細胞治療の文脈において、増殖性疾患または感染性疾患を有する（または有している疑いのある）対象に由来する。

20

【0223】

いくつかの態様において、細胞（例として、宿主細胞）は、免疫細胞、例えばT細胞、B細胞、樹状細胞（DC）、顆粒球、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ等々である。いくつかの態様において、細胞（例として、宿主細胞）は、幹細胞（SC）または誘導多能性幹細胞（iPSC）などの免疫細胞に分化することができる細胞である。いくつかの態様において、細胞（例として、宿主細胞）は、幹細胞メモリーT細胞であり、例えば Gattinoni et al. (2017) Nature Medicine 23;18-27に記載されており、それから参照により組み込まれる。

30

いくつかの態様において、細胞（例として、宿主細胞）は、キラーT細胞、ヘルパーT細胞、または制御性T細胞などのT細胞である。いくつかの態様においてT細胞は、キラーT細胞（例として、 $CD8+T$ 細胞）である。いくつかの態様において、T細胞は、ヘルパーT細胞（例として、 $CD4+T$ 細胞）である。いくつかの態様において、T細胞は、活性化T細胞（例として、抗原提示細胞上のMHCクラスII分子によりペプチド抗原が提示されているT細胞）である。

40

いくつかの態様において、T細胞は、高親和性T細胞受容体（TCR）および/またはキメラの抗体受容体（CAR）を発現する1以上の導入遺伝子を含む。

【0224】

いくつかの側面において、本開示は、宿主細胞を生産するために、本開示の1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子を細胞（例として、ドナーから得られる免疫細胞）に導入することが、宿主細胞において免疫チェックポイントタンパク質（例として、 $TIGIT$ 、 $PDCD1$ 等々）発現または活性の有意な減少をもたらすという発見に関する。いくつか

50

の態様において、宿主細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない細胞（例として、同じ細胞型の免疫細胞）と比べて、約５％～約５０％減少した免疫チェックポイントタンパク質の発現により特徴づけられる。いくつかの態様において、宿主細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない細胞（例として、同じ細胞型の免疫細胞）（例として、増殖性疾患または感染性疾患を有している、または有している疑いのある対象の免疫細胞）と比べて５０％超（例として、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、１００％、または５１％～１００％の間の任意のパーセンテージ）減少した免疫チェックポイントタンパク質の発現により特徴づけられる。

【０２２５】

いくつかの側面において、本開示は、宿主細胞を生産するために、本開示の１以上の化学修飾された二本鎖核酸分子（例として、１以上のｓｄ-ｒｘＲＮＡ）を細胞（例として、ドナーから得られる免疫細胞）に導入することが、宿主細胞において

１以上のシグナル伝達／転写因子、エピジェネティックな、代謝性および／または共阻害性／ネガティブ制御性タンパク質（例として、ＡＫＴ、ｐ５３、ＰＤＣＤ１、ＴＩＧＩＴ、Ｃｂｌ-ｂ、Ｔｅｔ２、Ｂｌｉｍｐ-１、Ｔ-Ｂｏｘ２１、ＨＫ２、ＤＮＭＴ３Ａ、ＰＴＰＮ６等々）発現または活性の有意な減少により特徴づけられるという発見に関する。

いくつかの態様において、宿主細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない細胞（例として、同じ細胞型の免疫細胞）と比べて、約５％～約５０％減少した免疫チェックポイントタンパク質の発現により特徴づけられる。いくつかの態様において、宿主細胞は、化学修飾された二本鎖核酸分子を含まない細胞（例として、同じ細胞型の免疫細胞）（例として、増殖性疾患または感染性疾患を有している、または有している疑いのある対象の免疫細胞）と比べて５０％超（例として、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、１００％、または５１％～１００％の間の任意のパーセンテージ、その間におけるすべての値を含む）減少した分子関連標的（例として、シグナル伝達分子、キナーゼ／ホスファターゼ、転写因子、エピジェネティックなモジュレーター、代謝性および制御性標的）の発現により特徴づけられる。

【０２２６】

いくつかの態様において、宿主細胞は、他の分化に関連する標的、例えば、ＡＫＴ、ｐ５３、ＰＤ１、ＴＩＧＩＴ、Ｃｂｌ-ｂ、Ｔｅｔ２、Ｂｌｉｍｐ-１、Ｔ-Ｂｏｘ２１、ＨＫ２、ＤＮＭＴ３Ａ、ＰＴＰＮ６、これらの任意の組み合わせ等々を標的とする、１以上の追加の化学修飾された二本鎖核酸分子をさらに含む。例えば、いくつかの態様において、免疫原性組成物は、分化に関連するタンパク質の以下の組み合わせの発現が減少しているように操作されている宿主細胞を含む：

ｐ５３およびＰＤ１

ｐ５３およびＡＫＴ

ＰＤ１およびＡＫＴ

ＰＤ１およびＡＫＴおよびｐ５３

Ｃｂｌ-ｂおよびＰＤ１

Ｃｂｌ-ｂおよびＡＫＴ

Ｃｂｌ-ｂおよびＰＤ１およびＡＫＴ

またはこれらの任意の組み合わせ。

【０２２７】

いくつかの態様において、宿主細胞は、他の免疫チェックポイントタンパク質、例えば、ＣＴＬＡ-４、ＢＴＬＡ、ＫＩＲ、Ｂ７-Ｈ３、Ｂ７-Ｈ４、ＴＧＦβ受容体等々を標的とする、１以上の追加の化学修飾された二本鎖核酸分子をさらに含む。例えば、いくつかの態様において、免疫原性組成物は、免疫チェックポイントタンパク質の以下の組み合わせの発現が減少しているように操作されている宿主細胞を含む：

ＣＴＬＡ４およびＰＤ１

S T A T 3 および p 3 8

P D 1 および B a x P D 1、C T L A 4、L a g - 1、I L M - 3、および T P 5 3

P D 1 および C a s p 8

P D 1 および I L 1 0 R

P D 1 および T I G I T。

【 0 2 2 8 】

いくつかの態様において、本開示により記載される免疫原性組成物は、複数の宿主細胞を含む。いくつかの態様において、複数の宿主細胞は、キログラム当たり約 $10,000$ 宿主細胞、キログラム当たり約 $50,000$ 宿主細胞、キログラム当たり約 $100,000$ 宿主細胞、キログラム当たり約 $250,000$ 宿主細胞、キログラム当たり約 $500,000$ 宿主細胞、キログラム当たり約 1×10^6 宿主細胞、キログラム当たり約 5×10^6 宿主細胞、キログラム当たり約 1×10^7 宿主細胞、キログラム当たり約 1×10^8 宿主細胞、キログラム当たり約 1×10^9 宿主細胞、またはキログラム当たり 1×10^9 宿主細胞超である。いくつかの態様において、複数の宿主細胞は、キログラム当たり約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{14}$ 宿主細胞である。

10

【 0 2 2 9 】

いくつかの側面において、本開示は、本開示に記載される免疫原性組成物を生産する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子（例として、*s d - r x R N A*）を細胞に導入することを含み、ここで、1以上の化学修飾された二本鎖核酸分子は、A K T、p 5 3、P D C D 1、T I G I T、C b l - b、T e t 2、B l i m p - 1、T - B o x 2 1、D N M T 3 A、P T P N 6、または H K 2、またはこれらの任意の組み合わせを標的とし、それにより特定の細胞サブタイプまたは T 細胞サブタイプ（例として、*T_{SCM}* または *T_{CM}*）を含む宿主細胞を産生する。

20

【 0 2 3 0 】

免疫原性組成物を生産する（例として、宿主細胞または宿主細胞の集団を生産する）方法は、*in vitro*、*ex vivo*、または *in vivo* で、例えば、培養物中のヒト細胞などの、培養物中の哺乳動物細胞において、実施されてもよい。いくつかの態様において、標的細胞（例として、ドナーから得られた細胞）は、本開示の他の箇所ですらに詳細に説明されているように、化学修飾された二本鎖核酸分子の細胞への侵入を促進するための脂質（例として、カチオン性脂質）またはリポソームなどの送達試薬の存在下で接触させてもよい。

30

【 0 2 3 1 】

担体および複合体化剤

本開示は、さらには、本明細書に記載の *R N A i* コンストラクトおよび薬学的に許容し得る担体または希釈剤を含む組成物に関する。いくつかの側面において、本開示は、本明細書に記載の *R N A i* コンストラクトおよび薬学的に許容し得る担体を含む免疫原性組成物に関する。

【 0 2 3 2 】

本明細書に使用されるとき、「薬学的に許容し得る担体」は、適切な溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。医薬活性物質のためのかかる媒体および剤の使用は、当該技術分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が活性成分と不相溶性である場合を除いて、それを治療組成物に使用することができる。補助的な活性成分もまた、組成物に組み込むことができる。

40

【 0 2 3 3 】

例えば、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、非経口投与のために、リポソーム、またはポリエチレングリコールで修飾された、もしくはカチオン性脂質と混合されたリポソームに組み込まれてもよい。リポソームへの追加の物質、例えば、特定の標的細胞に見出される膜タンパク質に対して反応性の抗体の組み込みは、オリゴヌクレオチドを特定の細胞型（例えば、T 細胞などの免疫細胞）に標的化するのに役立ち得る。

【 0 2 3 4 】

カプセル化剤は、ベシクル内にオリゴヌクレオチドを捕捉する。本発明の別の態様にお

50

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

【0235】

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

【0236】

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

【0237】

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

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

【0238】

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

【0239】

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

【0240】

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

10

【0241】

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

20

【0242】

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

30

いくつかの態様において、中性ナノトランスポーター組成物は、疎水性修飾ポリヌクレオチド、中性脂質混合物および任意にカーゴ分子を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの修飾の前よりも疎水性にする少なくとも1つの修飾を有する、本発明のポリヌクレオチド（例として、sd-rxRNA）である。修飾は、疎水性分子をポリヌクレオチドに付着（共有結合的または非共有結合的に）することにより達成されてもよい。いくつかの例において、疎水性分子は、親油性基であるかまたは親油性基を含む。

40

【0243】

用語「親油性基」は、水に対するアフィニティーよりも高い、脂質に対するアフィニティーを有する基を意味する。親油性基の例は、これらに限定されないが、コレステロール、コレステリルまたは修飾コレステリル残基、アダマンチン、ジヒドロテストロン（dihydrotestosterone）、長鎖アルキル、長鎖アルケニル、長鎖アルキニル、オレイル-リトコール酸、コレン酸、オレオイル-コレン酸、パルミチル酸、ヘプタデシル酸、ミリスチル酸、胆汁酸、コール酸またはタウロコール酸、デオキシコール酸、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド類、ビタミンEなどのビタミン類、飽和または不飽和のいずれかの脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル類、ピレン類、ボルフィリン類、テキサフィリン、アダマン

50

タン、アクリジン類、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、Texas-Red、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t - ブチルジメチルシリル、t - ブチルジフェニルシリル、シアニン色素（例えばCy 3またはCy 5）、Hoechst 33258色素、ソラレンまたはイブプロフェンを含む。コレステロール部分は還元されても（例えばコレスタン中のように）、または、置換されても（例えばハロゲンにより）よい。1分子における異なる親油性基の組み合わせもまた可能である。

【0244】

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

10

【0245】

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

20

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

【0246】

30

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

本発明の目的のために、用語「ステロール」またはステロイドアルコール類は、A環の3位においてヒドロキシル基を持つステロイドのサブグループを指す。これらは、アセチル・コエンザイムAからHMG-CoAレダクターゼ経路を介して合成される両親媒性脂質である。全体的な分子は、極めて扁平である。A環上のヒドロキシル基は、極性である。脂肪族鎖の残りは、非極性である。通常、ステロールは、17位において8炭素鎖を有すると考えられる。

40

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

【0247】

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

本発明の目的のために、用語「ステロールの側鎖」は、ステロール型分子の17位にて付着する側鎖の化学組成を指す。標準的な定義において、ステロールは、8炭素鎖を17位に保有する4環構造に限定される。本発明において、従来のもものよりも長いおよび短い

50

側鎖を持つステロール型分子が記載される。側鎖は、分枝であってもよいし、二重の骨格を含有していてもよい。

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

【0248】

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

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

【0249】

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

【0250】

疎水性修飾ポリヌクレオチドは、中性脂肪酸混合物と混合されて、ミセルを形成する。中性脂肪酸混合物は、疎水性修飾ポリヌクレオチドとともにミセルを形成し得る生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の中性または僅かに正味の負の電荷を有する、脂質の混合物である。本発明の目的のために、用語「ミセル」は、非荷電性脂肪酸とリン脂質との混合物により形成される、小さいナノ粒子を指す。中性脂肪酸混合物は、毒性を引き起こさない量で存在する限りにおいて、カチオン性脂質を含んでもよい。好ましい態様において、中性脂肪酸混合物は、カチオン性脂質を含まない。カチオン性脂質を含まない混合物は、全脂質のうちの1%未満、好ましくは0%が、カチオン性脂質であるものである。用語「カチオン性脂質」は、生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の正の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。用語「アニオン性脂質」は、生理学的pHにおいてまたはその付近において、正味の負の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。

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

【0251】

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

中性脂肪酸混合物は、好ましくは、コリンをベースとする脂肪酸およびステロールの混合物である。コリンをベースとする脂肪酸は、例として、DDPC、DLPC、DMPC、DPPC、DSPC、DOPC、POPCおよびDEPCなどの合成のホスホコリン誘

10

20

30

40

50

導体を含む。D O P C (化合物登録番号4235-95-4)は、ジオレオイルホスファチジルコリンである(ジエライドイルホスファチジルコリン、ジオレオイル - P C、ジオレオイルホスホコリン、ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、ジオレイルホスファチジルコリンとしても知られる)。D S P C (化合物登録番号816-94-4は、ジステアロイルホスファチジルコリンである(1, 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリンとしても知られる)。

【0252】

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

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

【0253】

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約12時間~約24時間の間接触させられる。別の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例えば上記の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約1~約5日間接触させられる。一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約3日間~約30日間接触させられる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約5~約20日間、接触状態に置かれる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7~約15日間、接触状態に置かれる。

【0254】

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

【0255】

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

イントラリピッド(Intralipid)は、以下の組成から構成され得る: 1000 mL が以下を含有する: 精製大豆油90 g、精製卵リン脂質12 g、無水グリセロール22 g、注射用水(1000 mL への十分量)。pHは、水酸化ナトリウムで、約pH 8に調整される。エネルギー含量/L: 4.6 MJ (190 kcal)。浸透圧(およそ): 300 mOsm / 水1 kg。別の態様において、脂質エマルジョンは、5%のベニバナ油、5%の

大豆油、乳化剤として添加される最大 1 . 2 % までの卵リン脂質および注射用水中の 2 . 5 % のグリセリンを含有する、リポシン (Liposyn) である。これはまた、pH 調整のために水酸化ナトリウムを含有してもよい。pH 8 . 0 (6 . 0 ~ 9 . 0) 。リポシンは、276 mosmol / リットル (実測値) の浸透圧を有する。

【 0 2 5 6 】

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

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

【 0 2 5 7 】

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

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

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

【 0 2 5 8 】

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

【 0 2 5 9 】

用語「カチオン性脂質」は、極性および非極性ドメインの両方を有する脂質および合成脂質であって、生理学的 pH またはその付近において正に荷電することができ、核酸などのポリアニオンに結合して核酸の細胞中への送達を促進するものを含む。一般に、カチオン性脂質は、飽和および不飽和アルキル、ならびに、脂環式のエーテル類およびアミンのエステル類、アミド類、または、これらの誘導体を含む。カチオン性脂質の直鎖および分枝アルキルおよびアルケニル基は、例えば、1 から約 25 個の炭素原子を含有し得る。好

10

20

30

40

50

ましい直鎖または分枝アルキルまたはアルケン基は、6個以上の炭素原子を有する。脂環式基は、コレステロールおよび他のステロイド基を含む。カチオン性脂質は、例えば Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 F^- 、アセタート、トリフルオロ酢酸、スルファート、亜硝酸化合物 (nitrite) およびニトラートを含有する多様な対イオン (アニオン) とともに調製され得る。

【0260】

カチオン性脂質の例は、ポリエチレンジアミン、ポリアミドアミン (PAMAM) スターバーストデンドリマー、リポフェクチン (DOTMA と DOPE との組合せ)、リポフェクターゼ (Lipofectase)、LIPOFECTAMINE (商標) (例えば、LIPOFECTAMINE (商標) 2000)、DOPE、サイトフェクチン (Cytofectin) (Gilead Sciences, Foster City, Calif.)、およびユーフェクチン (Eufectins) (JBL, San Luis Obispo, Calif.) を含む。例示的なカチオン性リボソームは、 $\text{N} - [1 - (2, 3 - \text{ジオレオロキシ}) - \text{プロピル}] - \text{N}, \text{N}, \text{N} - \text{トリメチルアンモニウムクロリド} (\text{DOTMA})$ 、 $\text{N} - [1 - (2, 3 - \text{ジオレオロキシ}) - \text{プロピル}] - \text{N}, \text{N}, \text{N} - \text{トリメチルアンモニウムメチルスルファート} (\text{DOTAP})$ 、 $3 - [\text{N} - (\text{N}', \text{N}' - \text{ジメチルアミノエタン}) \text{カルバモイル}]$ コレステロール ($\text{DC} - \text{Chol}$)、 $2, 3 - \text{ジオレイルオキシ} - \text{N} - [2 (\text{スペルミンカルボキサミド}) \text{エチル}] - \text{N}, \text{N} - \text{ジメチル} - 1 - \text{プロパンアミニウムトリフルオロアセタート} (\text{DOSPA})$ 、 $1, 2 - \text{ジミリスチルオキシプロピル} - 3 - \text{ジメチル} - \text{ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド}$ ；およびジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) から製造され得る。例えばカチオン性脂質 $\text{N} - (1 - (2, 3 - \text{ジオレイルオキシ}) \text{プロピル}) - \text{N}, \text{N}, \text{N} - \text{トリメチルアンモニウムクロリド} (\text{DOTMA})$ は、ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドのアンチセンス効果を 1000 倍増大することが見出された (Vlassov et al., 1994, Biochimica et Biophysica Acta 1197:95-108)。オリゴヌクレオチドはまた、例えばポリ (L-リジン) またはアビジンと複合体化されてもよく、脂質は、この混合物中、例えばステリル-ポリ (L-リジン) に含まれても含まれなくてもよい。

【0261】

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

【0262】

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

【0263】

別の態様において、オリゴヌクレオチドの取り込みを最適化するために、N-置換グリシンオリゴヌクレオチド (ペプトイド) が使用され得る。ペプトイドは、トランスフェクションのためのカチオン性脂質様化合物を作製するために使用されてきた (Murphy, et al., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:1517)。ペプトイドは、標準的な方法 (例えば Zuckermann, R. N., et al. 1992. J. Am. Chem. Soc. 114:10646；Zuckermann, R. N., et

10

20

30

40

50

al. 1992. Int. J. Peptide Protein Res. 40:497) を使用して合成され得る。カチオン性脂質とペプチドとの組合せであるリプトイド(liptoid)もまた、目的のオリゴヌクレオチドの取り込みを最適化するために使用され得る(Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345)。リプトイドは、ペプチドオリゴヌクレオチドを産生して、アミノ末端のサブモノマーをそのアミノ基を介して脂質にカップリングすることにより合成され得る(Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345)。

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

10

【0264】

別の態様において、本発明のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、約1～約4個の塩基性残基を有するペプチドを含む。これらの塩基性残基は、例えばペプチドのアミノ末端、C末端または内部領域に位置され得る。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されてきた。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖(例えばグリシン(これはまた非極性であるとも考えられる)、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ-分枝側鎖(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を持つアミノ酸を含む。塩基性アミノ酸の他にも、ペプチドの他の残基の大多数または全てが、非塩基性アミノ酸から、例えばリジン、アルギニンまたはヒスチジン以外のアミノ酸から選択され得る。好ましくは、長い中性の側鎖を有する中性アミノ酸が優位に使用される。

20

【0265】

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

30

【0266】

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

40

【0267】

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

50

、約3日間～約30日間までもの長さにわたり接触させられる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約5～約20日間接触させたままに置かれる。別の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7～約15日間接触させたままに置かれる。

【0268】

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

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

【0269】

一態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書において「輸送ペプチド」として言及される、オリゴヌクレオチドを細胞中へ輸送するペプチド配列を付着させることにより修飾される。一態様において、組成物は、タンパク質をコードする標的核酸分子に対して相補的であるオリゴヌクレオチドおよび共有結合で付着している輸送ペプチドを含む。

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

【0270】

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

【0271】

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

一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、受容体により媒介されるエンドサイトーシス機構を遺伝子の細胞中への送達のために利用する、分子抱合体として合成される

(例えばBunnell et al. 1992. Somatic Cell and Molecular Genetics. 18:559およびこれにおいて引用される参考文献を参照)。

【0272】

in vitroおよび/またはin vivoでのRNAi試薬の送達のための他の担体は、当該技術分野において知られており、目的のRNAiコンストラクトを(例として、T細胞などの宿主細胞へ)送達するために使用され得る。例えば、数例を挙げると、米国特許出願公開第20080152661号、同第20080112916号、同第20080107694号、同第20080038296号、同第20070231392号、同第20060240093号、同第20060178327号、同第20060008910号、同第20050265957号、同第20050064595号、同第20050042227号、同第20050037496号、同第20050026286号、同第20040162235号、同第20040072785号、同第20040063654号、同第20030157030号、WO2008/036825、WO04/065601およびAU2004206255B2を参照(全て参照により組み込まれる)。

10

【0273】

治療方法

いくつかの側面において、本開示は、本開示に記載される免疫原性組成物(例として、特定の細胞サブタイプまたはT細胞サブタイプの1以上の宿主細胞を含む免疫原性組成物)を対象(例として、増殖性疾患または感染性疾患を有している、または有している疑いのある対象)に投与することにより増殖性疾患または感染性疾患を処置する方法を提供する。いくつかの態様において、本明細書に記載の免疫原性組成物は、T細胞の分化プロセスのコントロールに関する1以上の遺伝子(例として、AKT、p53、PD1、TIGIT、Cbl-b、Tet2、Blimp-1、T-Box21、HK2、DNMT3A、PTPN6等々)の減少した(例として、阻害された)発現または活性を有する免疫細胞(例として、T細胞、NK細胞、抗原提示細胞(APC)、樹状細胞(DC)、幹細胞(SC)、誘導多能性幹細胞(iPSC)等々)の集団として特徴づけられる。いずれの具体的な理論によっても拘束されることは望まないが、本明細書に記載の免疫原性組成物は、いくつかの態様において、免疫チェックポイントタンパク質の減少した発現により特徴づけられ、よって免疫チェックポイントタンパク質の増加した発現により特徴付けられる、ある増殖性疾患または感染性疾患を有する対象の免疫系を刺激するのに有用である。

20

【0274】

本明細書に使用されるとき、「増殖性疾患」は、がん、アテローム性動脈硬化、リウマチ性関節炎、乾癬、特発性肺線維症、強皮症、肝臓の硬変等々を含む、過度の、細胞の増殖および細胞マトリックスのターンオーバーにより特徴づけられる疾患および障害を指す。がんの例は、これらに限定されないが、小細胞肺癌、結腸がん、乳がん、肺がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がん、黒色腫、骨がん(例として、骨肉腫等々)、慢性骨髄性白血病(CML)等々の血液学的悪性腫瘍を含む。

30

【0275】

本明細書に使用されるとき、用語「感染性疾患」は、病原体により対象の感染をもたらす疾患および障害を指す。ヒト病原体の例は、これらに限定されないが、ある細菌(例として、E. coli、Salmonella等々のある株)、ウイルス(HIV、HCV、インフルエンザ等々)、寄生生物(原生動物、蠕虫、アメーバ等々)、酵母(例として、あるCandida種等々)、および真菌(例として、あるAspergillus種)を含む。

40

【0276】

対象の例は、哺乳動物、例として、ヒトおよび他の霊長目の動物;ウシ、ブタ、ウマ、および農業(farming)(農業(agricultural))動物;イヌ、ネコ、および他の飼育慣らされた愛玩動物(domesticated pets);マウス、ラット、およびトランスジェニック非ヒト動物を含む。

いくつかの態様において、本開示に記載される免疫原性組成物は、養子細胞移植(AC T)治療方法により対象に投与される。AC Tモダリティの例は、これらに限定されないが、自家細胞治療(例として、対象自身の細胞が取り出され、遺伝子的に操作され、対象に戻される)および他家細胞治療(例として、細胞はドナーから取り出され、遺伝子的

50

に操作され、レシピエントに置かれる)を含む。いくつかの態様において、A C T治療方法に利用される細胞は、選択的された抗体部分に基づく標的抗原に対して特異性をディスプレイする操作されたT細胞受容体である、キメラ抗原受容体(C A R)を発現するように遺伝子的に操作されていてもよい。結果的に、いくつかの態様において、C A R T細胞(例としてC A R T)は、A C T治療の目的のために、本明細書に記載の方法を用いて、化学修飾された二本鎖核酸でトランスフェクトされてもよい。

【0277】

in vivoでの適用に関して、本発明の製剤を、選択した投与の経路(例えば、非経口、経口または腹腔内)に適応した種々の形態で患者に投与することができる。好ましい非経口投与は、以下の経路による投与を含む: 静脈内; 筋肉内; 間質内(interstitially); 動脈内; 皮下; 眼内; 滑膜内(intrasynovial); 経皮を含む経上皮; 吸入を介した肺; 眼(ophthalmic); 舌下および口腔内; 眼(ophthalmic)を含む局所; 経皮; 眼(ocular); 直腸; ならびに送気を介した経鼻吸入。

10

【0278】

非経口投与用の医薬製剤は、水溶性または水分散性の形態での活性化合物の水溶液を含む。加えて、好適な油性注射用懸濁液としての活性化合物の懸濁液も、投与されてもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルは、脂肪油、例えばゴマ油、または、合成脂肪酸エステル類、例えばオレイン酸エチルまたはトリグリセリドを含む。水性注射用懸濁液は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの、懸濁液の粘性を増大させる物質を含有してもよく、任意に、懸濁液はまた、安定化剤を含んでもよい。本発明のオリゴヌクレオチドは、液体の溶液、好ましくはハンクス溶液またはリンガー溶液などの生理学的に適合性の緩衝液中で処方されてもよい。さらに、オリゴヌクレオチドは、固体の形態において処方されて、使用の直前に再溶解されるか懸濁されてもよい。凍結乾燥形態もまた、本発明において含まれる。

20

【0279】

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

30

【0280】

本発明のオリゴヌクレオチドの活性量の投与は、所望の結果を達成するために必要な投与量および時間において、有効量として定義される。例えば、オリゴヌクレオチドの活性量は、細胞の型、使用されるオリゴヌクレオチド、ならびに、in vivoでの使用については疾患の状態、個体の年齢、性別および体重、ならびに、個体において所望の応答を惹起するオリゴヌクレオチドの能力などの因子に従って変動してもよい。細胞中でのオリゴヌクレオチドの治療的レベルの確立は、取り込みの速度と流出または分解の速度に依存する。分解の度合いを低下させることは、オリゴヌクレオチドの細胞内半減期を延長する。よって、化学修飾されたオリゴヌクレオチド、例えばリン酸骨格の修飾を持つものは、異なる用量を必要とする場合がある。

40

【0281】

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

投薬レジメンは、最適な治療応答を提供するために調整されてもよい。例えば、免疫原

50

性組成物は、繰り返して投与されてもよく、例えば数回の用量が毎日投与してもよく、または、その用量が、治療状況の要件に従って比例的に低減させてもよい。化学修飾された二本鎖核酸分子または免疫原性組成物が細胞へ投与されるかまたは対象へ投与されるかに関わらず、当業者は、対象とするそれらの適切な用量および投与のスケジュールを容易に決定することができるであろう。

皮内注射または皮下送達などを通じた免疫原性組成物の投与は、投薬レジメンの試験を通じて最適化され得る。いくつかの態様において、単一の投与は十分である。投与された免疫原性組成物の効果をさらに延長するために、当業者によく知られているように、組成物は、徐放性製剤またはデバイスで投与され得る。

【0282】

他の態様において、化学修飾された二本鎖核酸分子または免疫原性組成物は複数回投与される。いくつかの例において、これは、毎日、週2回、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、2カ月毎、3カ月毎、4カ月毎、5カ月毎、6カ月毎または6カ月に1回未満、投与される。いくつかの例において、これは、1日、1週間、1カ月および/または1年あたり、複数回投与される。例えば、これは、およそ1時間毎、2時間毎、3時間毎、4時間毎、5時間毎、6時間毎、7時間毎、8時間毎、9時間毎、10時間毎、12時間毎、または12時間よりも長い時間毎に、投与することができる。これは、1日あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または10回よりも多い回数、投与することができる。

本発明の側面は、免疫原性組成物を対象へ投与することに関する。いくつかの例において、対象は患者であり、免疫原性組成物の投与には、sd-rxRNA分子を医院で投与することが関与する。

いくつかの態様において、1種より多くの免疫原性組成物が同時に投与される。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種または10種より多くの異なる組成物を含む組成物が投与されてもよい。ある態様において、組成物は2または3種の異なる免疫原性組成物を含む。

【0283】

いくつかの態様において、1以上の抗がん剤は、本開示に記載される1以上の免疫原性組成物との組み合わせにおいて対象に投与される。「抗がん剤」は、小分子、核酸、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド（例として、抗体、抗体フラグメント等々）、または上記の任意の組み合わせであり得る。いくつかの態様において、抗がん剤は、免疫原性組成物の投与の前に、対象に投与される。いくつかの態様において、抗がん剤は、免疫原性組成物の投与の後に、対象に投与される。いくつかの態様において、抗がん剤は、免疫原性組成物と同時に（例として、同じ時間に）投与される。

【0284】

抗がん剤の例は、これらに限定されないが、アビトレキセート（メトトレキセート）、アブラキサン（パクリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤）、アドトラスツズマブエムタンシン、アドリアマイシンPFS（ドキソルビシン塩酸塩）、アドリアマイシンRDF（ドキソルビシン塩酸塩）、アドルシル（フルオロウラシル）、アフィニートール（エベロリムス）、アナストロゾール、アレディア（パミドロン酸二ナトリウム）、アリミデックス（アナストロゾール）、アロマシン（エキセメスタン）、カペシタビンクラフェン（シクロホスファミド）、シクロホスファミド、シトキサン（シクロホスファミド）、ドセタキセル、ドキソルビシン塩酸塩、エフデックス（フルオロウラシル）、エレンス（エピルビシン塩酸塩）、エピルビシン塩酸塩、エベロリムス、エキセメスタン、フェアストン（トレミフェン）、フェソロデックス（フルベストラント）、フェマーラ（レトロゾール）、フルオロプレックス（フルオロウラシル）、フルオロウラシル、フォレックス（メトトレキセート）、フォレックスPFS（メトトレキセート）、フルベストラント、ゲムシタビン塩酸塩、ジェムザール（ゲムシタビン塩酸塩）、酢酸ゴセレリン、ハーセプチン（トラスツズマブ）、イクサベピロン、イグゼンブラ（イクサベピロン）、カドサイラ（アドトラスツズマブエムタンシン）、ラパチニブジトシラート、レトロゾール、メガー

10

20

30

40

50

ス（酢酸メゲストロール）、酢酸メゲストロール、メトトレキサート、メトトレキサート L P F（メトトレキサート）、メキサート（メトトレキサート）、メキサート A Q（メトトレキサート）、ネオサル（シクロホスファミド）、ノルパデックス（クエン酸タモキシフェン）、ノルパデックス（クエン酸タモキシフェン）、パクリタキセル、パクリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤、パミドロン酸二ナトリウム、ペルヒタ（ペルツズマブ）、ペルツズマブ、クエン酸タモキシフェン、タキソール（パクリタキセル）、タキソテル（ドセタキセル）、トラスツズマブ、トレミフェン、タイケルブ（ラパチニブジトシラート）、ゼローダ（カペシタビン）、ゾラデックス（酢酸ゴセレリン）を含む。

【0285】

自己送達RNAi免疫治療剤

その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開番号US 2016/0304873に記載されているように、免疫治療剤は、免疫抑制メカニズムに関与する特定の遺伝子を標的化およびノックダウンするように設計された特定のsd-rxRNA剤で細胞を処置することにより生産された。とりわけ、表1に示す以下の細胞および細胞株は、sd-rxRNAで首尾よく処理され、特定のヒト細胞における標的とされた遺伝子発現の少なくとも70%をノックダウンすることが示された。

これらの研究は、通常トランスフェクションに極めて耐性のある細胞における標的遺伝子の発現を抑制するこれらの免疫原性剤の有用性を実証し、この剤があらゆる細胞型の標的細胞の発現を減少させることができることを示唆した。

【0286】

BAX、BAK1、CASP8、ADORA2A、CTLA4、LAG3、TGFBRI1、HAVCR2、CCL17、CCL22、DLL2、FASLG、CD274、IDO1、IL10RA、JAG1、JAG2、MAPK14、PDCD1、SOCS1、STAT3、TNFAIP3、TNFSF4、TYRO2、DNMT3A、PTPN6等々を含む、数多のヒト遺伝子が、免疫抑制メカニズムおよび/またはT細胞分化のコントロールへの関与のために候補標的遺伝子として選択された。

【0287】

表1

【表1】

細胞型	標的遺伝子	sd-rxRNA 標的配列	配列番号	% ノックダウン
一次ヒトT細胞	TP53 (P53)	GAGTAGGACATACCAGCTTA	1	>70% 2uM
一次ヒトT細胞	MAP4K4	AGAGTTCTGTGGAAGTCTA	2	>70% 2uM
Jurkat Tリンパ腫細胞	MAP4K4	AGAGTTCTGTGGAAGTCTA	3	100% 1uM 72時間
NK-92細胞	MAP4K4	AGAGTTCTGTGGAAGTCTA	4	80% 2uM 72時間
NK-92細胞	PPIB	ACAGCAAATTCATCGTGT	5	>75% 2uM 72時間
NK-92細胞	GADPH	CTGGTAAAGTGGATATTGTT	6	>90% 2uM 72時間
HeLa細胞	MAP4K4	AGAGTTCTGTGGAAGTCTA	7	>80% 2uM 72時間

【0288】

表2に列挙される遺伝子（GenBankアクセッション番号は括弧内に示される）を含む数多のヒト遺伝子が、免疫抑制メカニズムへの関与のために、候補標的遺伝子として選択された。

【0289】

表2：

【表 2】

BAX (NM_004324)	BAK1 (NM_001188)	CASP8 (NM_001228)
ADORA2A (NM_000675)	CTLA4 (NM_005214)	LAG3 (NM002286)
PDCD1 (NM_NM005018)	TGFBR1 (NM-004612)	HAVCR2 (NM_032782)
CCL17 (NM_002987)	CCL22 (NM_002990)	DLL2 (NM_005618)
FASLG (NM_000639)	CD274 (NM_001267706)	IDO1 (NM_002164)
IL10RA (NM_001558)	JAG1 (NM_000214)	JAG2 (NM_002226)
MAPK14 (NM_001315)	SOCS1 (NM_003745)	STAT3 (NM_003150)
TNFAIP3 (NM_006290)	TNFSF4 (NM_003326)	TYRO2 (NM_006293)
TP53 (NM_000546)		

10

20

【0290】

上記の表 2 に列挙される遺伝子のそれぞれを、抗原提示細胞および T 細胞の免疫抑制の予防のための、各遺伝子についての好ましい s d - r x R N A 標的化配列および標的領域を同定するために、独自に開発された (proprietary) アルゴリズムを用いて分析した。P D C D 1 標的配列の非限定例を、表 3 に示す。C b 1 - b 標的配列の非限定例を、表 4 に示す。

【0291】

表 3

【表 3】

オリゴ _ID	PCDC1 ヒト	配列	配列 番号	遺伝子_領域	配列 番号
PD1_1	PDCD1_NM_005018_ヒト _2070	UAUUUAUUUAUUUAUUAAU	8	CCTTCCCTGTGGTTCTATTATATTATA ATTATAATTAAATATGAG	28
PD1_2	PDCD1_NM_005018_ヒト _2068	UCUAUUUAUUUAUUUAUA	9	CCCCTCCCTGTGGTTCTATTATATTAT AATTATAATTAAATATG	29
PD1_3	PDCD1_NM_005018_ヒト _1854	CAUUCUGAAAAUUUUUAAA	10	GCTCTCCTTGAACCCATTCTGAAAT TATTAAAGGGGTGGCC	30
PD1_4	PDCD1_NM_005018_ヒト _2069	CUAUUAUUUAUUUAUUAA	11	CCCTTCCCTGTGGTTCTATTATATTAT AATTATAATTAAATATGA	31
PD1_5	PDCD1_NM_005018_ヒト _1491	AGUUUCAGGGAAGGUCAGAA	12	CTGCAGGCCTAGAGAAGTTTCAGGGA AGGTCAGAAGAGCTCCTGG	32
PD1_6	PDCD1_NM_005018_ヒト _2062	UGUGGUUCUAUUUAUUUAUA	13	GGGATCCCCCTTCCCTGTGGTTCTATT ATATTATAATTATAATTA	33
PD1_7	PDCD1_NM_005018_ヒト _719	UGUGUUCUCUGUGGACUAUG	14	CCCCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGT GGACTATGGGGAGCTGGA	34
PD1_8	PDCD1_NM_005018_ヒト _1852	CCCAUUCUGAAAAUUUUUA	15	GAGCTCTCCTTGAACCCATTCTGAA ATTATTTAAAGGGGTGG	35
PD1_9	PDCD1_NM_005018_ヒト _812	UGCCACCAUUGUCUUUCCUA	16	TGAGCAGACGGAGTATGCCACCATG TCTTTCCTAGCGGAATGGG	36
PD1_10	PDCD1_NM_005018_ヒト _1490	AAGUUUCAGGGAAGGUCAGA	17	CCTGCAGGCCTAGAGAAGTTTCAGGG AAGGTCAGAAGAGCTCCTG	37
PD1_11	PDCD1_NM_005018_ヒト _2061	CUGUGGUUCUAUUUAUUUAU	18	AGGGATCCCCCTTCCCTGTGGTTCTAT TATATTATAATTATAATT	38
PD1_12	PDCD1_NM_005018_ヒト _2067	UUCUAUUUAUUUAUUUAU	19	CCCCCTTCCCTGTGGTTCTATTATATT ATAATTATAATTAAATAT	39
PD1_13	PDCD1_NM_005018_ヒト _1493	UUUCAGGGAAGGUCAGAAGA	20	GCAGGCCTAGAGAAGTTTCAGGGAAG GTCAGAAGAGCTCCTGGCT	40
PD1_14	PDCD1_NM_005018_ヒト _1845	CUUGGAACCCAUUCCUGAAA	21	ACCCTGGGAGCTCTCCTTGAACCCAT TCCTGAAATTATTTAAAG	41
PD1_15	PDCD1_NM_005018_ヒト _2058	UCCCUGUGGUUCUAUUUAUAU	22	ACAAGGGATCCCCCTTCCCTGTGGTTC TATTATATTATAATTATA	42
PD1_16	PDCD1_NM_005018_ヒト _2060	CCUGUGGUUCUAUUUAUUA	23	AAGGGATCCCCCTTCCCTGTGGTTCTA TTATATTATAATTATAAT	43
PD1_17	PDCD1_NM_005018_ヒト _1847	UGGAACCCAUUCCUGAAAUU	24	CCTGGGAGCTCTCCTTGAACCCATTC CTGAAATTATTTAAAGGG	44
PD1_18	PDCD1_NM_005018_ヒト _2055	CCUCCCCUGUGGUUCUAUUA	25	GGGACAAGGGATCCCCCTTCCCTGTG GTTCTATTATATTATAATT	45
PD1_19	PDCD1_NM_005018_ヒト _2057	UUCCCUGUGGUUCUAUUUAUA	26	GACAAGGGATCCCCCTTCCCTGTGGTT CTATTATATTATAATTAT	46
PD1_20	PDCD1_NM_005018_ヒト _1105	CACAGGACUCAUGUCUCAAU	27	CAGGCACAGCCCCACCACAGGACTCA TGTCCTCAATGCCACAGTG	47

10

20

30

40

【 0 2 9 2 】

表 4

【表 4】

	Cbl-b ヒト		
オリゴ_ID		配列	配列番号
CB-01	CBLB ヒト NM_170662_978	caauugauuuacuugcaau	48
CB-02	CBLB ヒト NM_170662_985	uuuaacuugcaaugauuaca	49
CB-03	CBLB ヒト NM_170662_1124	gaaguuaagcacgacuaca	50
CB-04	CBLB ヒト NM_170662_1382	aaaguacacaggaacaaua	51
CB-05	CBLB ヒト NM_170662_1550	uucugucguugaaaaaaa	52
CB-06	CBLB ヒト NM_170662_1920	cuccuugcauggugaaaaa	53
CB-07	CBLB ヒト NM_170662_2517	cuguucggucuugauaaau	54
CB-08	CBLB ヒト NM_170662_2596	ugacuuagcauuuuuaa	55
CB-09	CBLB ヒト NM_170662_2813	agucucaugaacauucaa	56
CB-10	CBLB ヒト NM_170662_3618	gguguuuugauaccuguacu	57
CB-11	CBLB ヒト NM_170662_3818	caacugaucaaacuaugca	58
CB-12	CBLB ヒト NM_170662_3925	agcauuuuuugucaaaaa	59

10

20

【0293】

本発明の目的のために、範囲は、本明細書において、「約」1つの特定の値から、および/または「約」別の特定の値までとして表現されてもよい。かかる範囲が表現される場合、別の態様は、1つの特定の値から、および/または他の特定の値までを含む。同様に、先行詞「約」の使用により値が近似値として表現される場合、特定の値が別の態様を形成することが理解されるだろう。各範囲の終点は、他の終点に関連して、および他の終点とは独立して、共に重要であることがさらに理解されるだろう。

【0294】

さらに、本発明の目的のために、用語「a」または「an」の存在は、1以上のその存在を指し；例えば、「タンパク質 (a protein)」または「核酸分子 (a nucleic acid molecule)」は、1以上のこれらの化合物または少なくとも1つの化合物を指す。したがって、用語「a」(または「an」)、「1つ以上の (one or more)」および「少なくとも1つの (at least one)」は、本明細書で互換的に使用することができる。また、用語「含む (comprising)」、「含む (including)」、「有する (having)」は互換的に使用することができることに留意されたい。さらに、「からなる群から選択される」化合物は、2つ以上の化合物の混合物(すなわち、組み合わせ)を含む、その後にくリスト中の1つ以上の化合物を指す。

30

【0295】

本発明に従って、単離された、または生物学的に純粋なタンパク質または核酸分子は、その自然環境から取り出された化合物である。したがって、「単離された」および「生物学的に純粋」は、化合物が精製されている程度を必ずしも反映しない。本発明の単離された化合物は、その自然の供給源から得ることができ、分子生物学的技法を使用して生産することができ、または化学合成により生産することができる。

40

本明細書に記載の組成物および方法は、以下の例によってさらに例証されるが、これらは決して、さらに限定するものとして解釈されるべきではない。本出願を通して引用された全ての参考資料(参考文献、交付済み特許、公開された特許出願および同時係属の特許出願を含む)のすべての全体の内容は、参照によりここに明示的に組み込まれる。

【実施例】

50

【 0 2 9 6 】

例

例 1 : s d - r x R N A の操作および試験

表 1 に列挙される遺伝子を、好ましい s d - r x R N A 標的配列および標的領域を同定するために、独自に開発されたアルゴリズムを用いて分析した。P D C D 1 および C b l - b 標的化配列および / または s d - r x R N A 配列の非限定例を、表 3、表 4、表 6 および表 8 に示す。A K T、T e t 2、B l i m p - 1、T - B o x 2 1、P T P N 6、および H K 2 をコードする遺伝子の分析のための代表的な配列を、表 7 および 9 ~ 1 3 に示す。

【 0 2 9 7 】

例 2 : T I G I T を標的とする自己送達 R N A i 免疫治療剤

T I G I T (N C B I G e n B a n k アクセッション番号 N M _ 1 7 3 7 9 9) をコードする遺伝子を、抗原提示細胞および T 細胞の免疫抑制を予防するための、好ましい s d - r x R N A 標的配列および標的領域を同定するために、独自に開発されたアルゴリズムを用いて分析した。T I G I T についての結果を、表 5 に示す。

【 0 2 9 8 】

表 5

【表 5】

	TIGIT				
オリゴ _ID		配列	配列 番号	遺伝子_領域	配列 番号
Tigit 1	TIGIT_NM_173799_ヒト _840	CUUUUGUCUUUGCUAUUAUA	60	CTTCTGGAAGATACACTTTTGTCTTTGCT ATTATAGATGAATATA	80
Tigit 2	TIGIT_NM_173799_ヒト _2827	UAAUUGGUUAUAAGCAUAAAA	61	CAAGATGTGCTGTTATAATTGGTATAAGC ATAAAATCACACTAGA	81
Tigit 3	TIGIT_NM_173799_ヒト _2436	CAAAUUGGAAGUGAACUAAA	62	ATAGAACACAATTCACAAATTGGAAGTG AACTAAATGTAATGAC	82
Tigit 4	TIGIT_NM_173799_ヒト _2364	GUUUGCUGUGGCAGUUUACA	63	CGTAAAAATGTTGTTGTTGCTGTGGCAG TTTACAGCATTTTCT	83
Tigit 5	TIGIT_NM_173799_ヒト _1039	GAUCAUAAAUGCAAAAUUAA	64	AGTAACGTGGATCTTGATCATAAATGCA AAATTAATAAATATCTT	84
Tigit 6	TIGIT_NM_173799_ヒト _559	CGCGUUGACUAGAAAGAAGA	65	AGTCATCGTGGTGGTCGCGTTGACTAGA AAGAAGAAAGCCCTCAG	85
Tigit 7	TIGIT_NM_173799_ヒト _2666	UUUAAAUAAGAACUCACUGAA	66	TTTGAAAAAATTTTTTAAATAGAACTC ACTGAACTAGATTCTC	86
Tigit 8	TIGIT_NM_173799_ヒト _2406	GCAAAUCUGUUGGAAAUAGA	67	TCTTGCAAAATTAGTGCAAAATCTGTTGGA AATAGAACACAATTCA	87
Tigit 9	TIGIT_NM_173799_ヒト _2391	UCUUGCAAAAUAGUGCAAA	68	AGTTTACAGCATTTTCTTGCAAAATTAG TGCAAACTCTGTTGGAA	88
Tigit 10	TIGIT_NM_173799_ヒト _2284	ACAUAGGAAGAAUGAACUGA	69	TCTACCAAAATGGGTACATAGGAAGAAT GAACTGAAATCTGTCCA	89
Tigit 11	TIGIT_NM_173799_ヒト _2262	UCACUUUUCUACCAAUUGGG	70	ATTATTATTATTTTCTACTTTTCTACCAA ATGGGTACATAGGA	90
Tigit 12	TIGIT_NM_173799_ヒト _2531	GUGUUUUUAACAUAAUUUAU	71	TGGACTGAGAGTTGGGTGTTATTTAACAT AATTATGGTAATTGGG	91
Tigit 13	TIGIT_NM_173799_ヒト _924	UGUGUGUUCAGUUGAGUGAA	72	GTGTGTGTATGTGTGTGTGTTCAGTTG AGTGAATAAATGTCAT	92
Tigit 14	TIGIT_NM_173799_ヒト _847	CUUUGCUAUUAUAGAUGAAU	73	AAGATACACTTTTGTCTTTGCTATTATAG ATGAATATATAAGCAG	93
Tigit 15	TIGIT_NM_173799_ヒト _2637	GAAAUGGGAUUCAAUUUGAA	74	ATGGGTCAGGTTACTGAAATGGGATTCA ATTTGAAAAAATTTTT	94
Tigit 16	TIGIT_NM_173799_ヒト _2453	AAAAUGUAAUGACGAAAAGG	75	AATTGGAAGTGAATAAATGTAATGAC GAAAAGGGAGTAGTGT	95
Tigit 17	TIGIT_NM_173799_ヒト _2280	GGUACAUAGGAAGAAUGAA	76	CTTTTCTACCAATGGGTTACATAGGAAG AATGAAGTGAATCTG	96
Tigit 18	TIGIT_NM_173799_ヒト _2206	UUUAGCAACAAGACAAUUCA	77	GGGGTTGACAATTGTTTAGCAACAAGA CAATTCAACTATTCTC	97
Tigit 19	TIGIT_NM_173799_ヒト _850	UGCUAUUUAUGAUGAAUUA	78	ATACACTTTTGTCTTTGCTATTATAGATG AATATATAAGCAGCTG	98
Tigit 20	TIGIT_NM_173799_ヒト _2862	GAGAUUUAAUAGAAUAAUA	79	TCACACTAGATTCTGGAGATTAAATATGA ATAATAAGAATACTAT	99
TIGIT 最適化 された sd- rxRNA	鎖 ID				
TIGIT 21	27384	fU.mG.fA.mC.fU.mA.fG.mA.fA.mA .fG.mA.fA*mG*fA.TEG-Chl	100		
	27380	P.mU.fC.mU.fU.mC.fU.mU.fU.mC.f U.mA.fG.mU.fC*mA*fA*mC*fG*m C*fG	101		

【 0 2 9 9 】

例 3 : ヒト一次 T 細胞における、PDCD1 を標的とする強力に最適化された s

d - r x R N A の同定

一次ヒト T 細胞を AllCells (CA) から得て、10% ウシ胎仔血清 (Gibco) および 1000 IU/ml IL2 を含有する RPMI 完全培地中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも 4 日間、製造業者の指示に従って、抗 CD3 / CD28 Dynabeads (Gibco, 11131) で活性化させた。PD CD 1 を標的とする化学的に最適化された sd - r x R N A を試料 (ウェル) あたり血清フリー RPMI 中 0.2 ~ 2 μ M まで、sd - r x R N A を個別に希釈することにより調製し、96 ウェルプレートの 100 μ l / ウェルに分割した。細胞を 4% FBS および IL2 2000 IU/ml を含有する RPMI 培地中で、1,000,000 細胞 / ml に調製し、事前に希釈した sd - r x R N A を含む 96 ウェルプレートに 100 μ l / ウェルで播種した。PD CD 1 を標的とする sd - r x R N A の例を、表 6 に提供する。

10

【0300】

表 6

【表 6 - 1】

PD1 最適化された sd-rxRNA			配列番号
二重鎖 ID	鎖 ID	配列	
PD 21	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	102
	27383	P.mU.fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	103
PD 22	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	104
	27678	P.mU*fA*mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	105
PD 23	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	106
	27679	P.mU*fA*mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	107
PD 24	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	108
	27680	P.mU*fA*mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC.mA.fG*mG*fG*mA*fA	109
PD 25	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	110
	27681	S.mU*fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	111
PD 26	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	112
	27683	P.mU.fA.fU.mA.mA.fU.mA.mG.mA.fA.fC.fC.mA.fC*mA*mG*mG*mG*mA*ma	113
PD 27	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	114
	27684	P.mU.fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.fC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	115
PD 28	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	116
	27685	P.mU.fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.fC.mC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	117
PD 29	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	118
	27687	P.mU.fA.mU. A. A.fU. A. G. A.fA.mC.fC. A.fC* A* G*mG* G*mA*fA	119
PD 30	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	120
	27686	P.mY.fA.mY.fA.mA.fY.mA.fG.mA.fA.mX.fX.mA.fX*mA*fG*mG*fG*mA*fA	121
PD 31	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	122
	27681	VP.mU*fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	123
PD 32	27688	mU.mG.mU.mG.mG.mU.mU.mC.mU.mA.mU.mU.mA*mU*ma-TEG-Chl	124
	27383	P.mU.fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	125
PD 33	27689	fU*mG*fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	126
	27383	P.mU.fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	127
PD 34	27690	fU.mG.fU. G. G.mU.fU.mC.fU. A.fU.mU. A*mU*fA-TEG-Chl	128
	27383	P.mU.fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.mC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	129
PD 35	27379	fU.mG.fU.mG.fG.mU.fU.mC.fU.mA.fU.mU.fA*mU*fA-TEG-Chl	130
	27686	P.mY.fA.mY.fA.mA.fY.mA.fG.mA.fA.mX.fX.mA.fX*mA*fG*mG*fG*mA*fA	131
PD 36	27683	P.mU.fA.fU.mA.mA.fU.mA.mG.mA.fA.fC.fC.mA.fC*mA*mG*mG*mG*mA*ma	132
	27690	fU.mG.fU. G. G.mU.fU.mC.fU. A.fU.mU. A*mU*fA-TEG-Chl	133
PD 37	27684	P.mU.fA.mU.fA.mA.fU.mA.fG.mA.fA.fC.fC.mA.fC*mA*fG*mG*fG*mA*fA	134
	27690	fU.mG.fU. G. G.mU.fU.mC.fU. A.fU.mU. A*mU*fA-TEG-Chl	135

10

20

30

40

【表 6 - 2】

記号

A=アデノシン

G=グアノシン

U=ウリジン

C=シトシン

m = 2' -O-メチルヌクレオチド

f = 2' フルオロヌクレオチド

Y = 5 メチルウリジン

X = 5 メチルシトシン

* = ホスホロチオアート連結

. = ホスホジエステル連結

TEG-Chl = コレステロール-TEG-グリセリル

P = 5' 無機ホスファート

VP-5' ビニルホスホナート

S-5' チオホスファート

10

20

【0301】

72時間後、トランスフェクトされた細胞を、300 x gで10分間、スピンドウンした。培地を取り除き、細胞を40 µLのリン酸緩衝生理食塩水(Gibco)中で再懸濁した。次いで、細胞をInvitrogen mRNAキャッチャープレートに移し、製造業者の指示に従ってRNAを単離した。Taqman 遺伝子発現アッセイを以下の組み合わせにおいて用いた：ヒトPDCD1 - FAM (Taqman, Hs01550088_m1) / ヒトPP1B - FAM (Taqman HS00168719_m1)。反応容量を3重に調製したが、各試料は2重に行った。各反応ミックスの45 µL / ウェルの容量を、これまでに単離されたRNAからウェル当たり15 µL RNAと組み合わせた。試料を、製造者の指示に従って、Taqman RNA to CT 1-step kitを用いて増幅した。

30

図1に示す結果は、T細胞へ送達されたPDCD1標的化sd-rxRNA剤の有意なサイレンシングを実証し、2 µM sd-rxRNAによる遺伝子発現の60~70%超の阻害を得た。

【0302】

40

例4：ヒト一次T細胞における、PDCD1を標的とする化学的に最適化されたsd-rxRNAの6点の用量応答曲線

一次ヒトT細胞をAllCells(CA)から得て、10%ウシ胎仔血清(Gibco)および100 IU/mL IL2を含有するRPMI完全培地中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも4日間、製造業者の指示に従って、抗CD3 / CD28 Dynabeads(Gibco, 11131)で活性化させた。PDCD1を標的とする化学的に最適化されたsd-rxRNAを試料(ウェル)あたり血清フリーRPMI中0.06~2 µMまで、sd-rxRNAを個別に希釈することにより調製し、96ウェルプレートの100 µL / ウェルに分割した。細胞を4%FBSおよびIL2 2000 IU/mLを含有するRPMI培地中で、1,000,000細胞/mLに調製し、事前に希釈したsd-rx

50

R N Aを含む96ウェルプレートに100 μ l / ウェルで播種した。

【0303】

72時間後、トランスフェクトされた細胞を、300 x gで10分間、スピンドウンした。培地を取り除き、細胞を40 μ l のリン酸緩衝生理食塩水 (Gibco) 中で再懸濁した。次いで、細胞をInvitrogen mRNA キャッチャープレートに移し、製造業者の指示に従ってR N Aを単離した。Taqman 遺伝子発現アッセイを以下の組み合わせにおいて用いた：ヒトP D C D 1 - F A M (Taqman, Hs01550088_m1) / ヒトP P I B - F A M (Taqman HS00168719_m1)。各反応ミックスの45 μ l / ウェルの容量を、これまでに単離されたR N Aからウェル当たり15 μ l R N Aと組み合わせた。試料を、例3に記載されるように増幅した。

10

【0304】

図2に示す結果は、T細胞へ送達されるP D C D 1標的化s d - r x R N A剤 P D 26およびP D 27の有意なサイレンシングを実証し、2 μ M s d - r x R N Aによる遺伝子発現の60 ~ 70 %超の阻害を得た。

【0305】

例5：ヒト一次T細胞におけるT I G I Tを標的とするs d - r x R N Aのサイレンシング活性

一次ヒトT細胞をAllCells (CA) から得て、1000 I U / m l I L 2を含有するR P M I完全培地中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも4日間、製造業者の指示に従って、抗C D 3 / C D 2 8 Dynabeads (Gibco, 11131) で活性化させた。細胞からビーズを取り除くために短時間ボルテックスし、かつ指定されたマグネットを用いてそれらを分離することにより、細胞を回収した。T I G I Tを標的とする化学的に最適化されたs d - r x R N Aを、試料 (ウェル) あたり血清フリーR P M I中0.04 ~ 2 μ Mまで、s d - r x R N Aを個別に希釈することにより調製し、96ウェルプレートの100 μ l / ウェルに分割した。細胞を4 % F B SおよびI L 2 2000 U / m lを含有するR P M I培地中で、1,000,000細胞 / m lに調製し、事前に希釈したs d - r x R N Aを含む96ウェルプレートに100 μ l / ウェルで播種した。T I G I Tを標的とするs d - r x R N Aの例を、表4に提供する。

20

【0306】

72時間後、トランスフェクトされた細胞を、100 μ l / ウェルP B Sで一度洗浄し、製造業者の指示に従ってFastLane Cell Multiplex Kit試薬で処理した。Taqman 遺伝子発現アッセイを以下の組み合わせにおいて用いた：ヒトT I G I T - F A M (Taqman, Hs00545087_m1_m1) / G A P D H - V I C。各反応ミックスの18 μ l / ウェルの容量を、これまでに調製された溶解物からウェル当たり2 μ lの溶解物と組み合わせた。試料を、例2に記載されるように増幅した。

30

図3に示す結果は、T細胞へ送達されたT I G I T標的化s d - r x R N A剤T I G I T 6およびT I G I T 1の有意なサイレンシングを実証し、2 μ M s d - r x R N Aによる遺伝子発現の60 ~ 70 %超の阻害を得た。

【0307】

例6：ex vivo培養におけるP D - 1およびT I G I T標的化s d - r x R N Aで処置された活性化ヒト一次T細胞からの増強されたTセントラルメモリー (T_{CM}) 分化

40

この例は、T細胞の抗腫瘍有効性と自己リニューアル特性との間のバランスを達成するための、s d - r x R N AによるT細胞の調節を記載する。図4は、T細胞の分化状態の進行に対するs d - r x R N A処置の効果の概略図を示す。簡単に言えば、s d - r x R N AによるT細胞の処置は、細胞ベースの治療薬の製造 (例として、A C Tの産生) の間の細胞分化に影響を与える。加えて、異なる遺伝子を標的とする複数のs d - r x R N Aによる処置は、シグナル伝達経路、転写因子、代謝標的およびエピジェネティックな制御などの複数の分化メカニズムの刺激調節を可能にする。s d - r x R N AによるT細胞の処置は、「非ドラッグブルな」メカニズムの標的化を可能にする。

【0308】

50

健康なドナーの末梢血をStemExpress (Arlington, MA) から得た。ナイーブT細胞を、製造業者の指示に従って、Stem Cell Technologies (Cambridge, MA) からのEasySep™ヒトナイーブPan T細胞単離キットにより精製した。次いで、精製されたナイーブT細胞をAIM-V培地 + 5% FBS + 10 ng/mL hIL2 (GeneScript, Piscataway, NJ) 中で、1:1のビーズ対細胞比において、CD3/CD28 Dynabeads (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) で活性化させた。PD-1 (PD-1)、TIM-1を標的とする化学的に最適化されたsd-rxRNAおよび対照を非標的とするsd-rxRNAを、2 μMで培養物に添加した。4日後、細胞を収集し、Live/Dead fixable Aqua Dead Cell stain kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)、APC-H7 抱合抗ヒトCD3、Pacific Blue抱合抗ヒトCD8、FITC抱合抗ヒトCCR7およびAPC抱合抗ヒトCD45 RO (BD Bioscience, San Jose, CAおよびBioLegend, San Diego, CA) で染色した。図5に示すように、CD8⁺T_{CM} (CCR7⁺CD45RO⁻) サブタイプへのT細胞分化は、夫々対照と比較して、PD-1およびTIM-1阻害に対して、3.9倍、および1.7倍増強された。

10

【0309】

例7: HepG2細胞におけるHK2を標的とするsd-rxRNAの2点の用量応答曲線

HepG2細胞をATCC (VA) から得て、10%ウシ胎仔血清 (Gibco) を含有するEMEM完全培地中で培養した。トランスフェクションの24時間前に、96ウェルプレートに、ウェル当たり10,000細胞で細胞を播種した。HK2を標的とするsd-rxRNA化合物 (例として、表5に記載される) を試料 (ウェル) あたりAccell培地 (Dharmacon, CO) 中0.25~1 μMまで、sd-rxRNAを個別に希釈することにより調製し、事前に播種した96ウェルプレートの100 μL / ウェルに分割した。投与の48時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ (Affymetrix) を用いて、製造業者のプロトコルに従って、Quantigene 分岐鎖DNAアッセイによりmRNAレベルを決定した。図6は、HK2標的化sd-rxRNAが、HepG2細胞において、標的遺伝子mRNAレベルをin vitroで減少させることを実証する。データを、ハウスキーピング遺伝子 (PPIB) に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重 (biological triplicates) の平均からの標準偏差を表す。

20

30

【0310】

例8: Pan T細胞における、HK2を標的とするsd-rxRNAの6点の用量応答曲線

一次ヒトT細胞をAllCells (CA) から得て、10%ウシ胎仔血清 (Gibco) および100 IU/mL IL2を含有するRPMI完全培地中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも4日間、製造業者の指示に従って、抗CD3/CD28 Dynabeads (Gibco, 11131) で活性化させた。HK2を標的とするsd-rxRNA化合物および非標的化対照sd-rxRNA (#28599) を、試料 (ウェル) あたり血清フリーRPMI中0.04~2 μMまで、sd-rxRNAを個別に希釈することにより調製し、96ウェルプレートの100 μL / ウェルに分割した。細胞を4% FBSおよびIL2 2000 IU/mLを含有するRPMI培地中で、1,000,000細胞/mLに調製し、事前に希釈したsd-rxRNAを含む96ウェルプレートに100 μL / ウェルで播種した。HK2配列を標的とするsd-rxRNAの例を、表7に提供する。投与の72時間後、細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ (Affymetrix) を用いて、製造業者のプロトコルに従って、Quantigene 分岐鎖DNAアッセイによりmRNAレベルを決定した。図7は、HK2標的化sd-rxRNAが、ヒトPan T細胞において標的遺伝子mRNAレベルをin vitroで減少させることを実証する。データを、ハウスキーピング遺伝子 (PPIB) に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

40

【0311】

50

例 9 : T 細胞における C b l - b サイレンシング

T 細胞を 10 % ウシ胎仔血清 (Gibco) および 1000 IU/ml IL2 を含有する RPMI 完全培地中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも 4 日間、製造業者の指示に従って、抗 CD3 / CD28 Dynabeads (Gibco, 11131) で活性化させた。C b l - b を標的とする s d - r x RNA 化合物および非標的化対照 (NTC) s d - r x RNA を、試料 (ウェル) あたり血清フリー RPMI 中 2 μM または 0.04 ~ 2 μM まで、s d - r x RNA を個別に希釈することにより調製し、96 ウェルプレートの 100 μl / ウェルに分割した。細胞を 4 % FBS および IL2 2000 IU/ml を含有する RPMI 培地中で、1,000,000 細胞/ml に調製し、事前に希釈した s d - r x RNA を含む 96 ウェルプレートに 100 μl / ウェルで播種した。C b l - b 配列を標的とする s d - r x RNA の例を、表 8 に提供する。トランスフェクションインキュベーション期間の終了後、プレーティングされたトランスフェクトされた細胞を、100 μl / ウェル PBS で一度洗浄し、製造業者の指示に従って FastLane Cell Multiplex Kit 試薬で処理した。Taqman 遺伝子発現アッセイを以下の組み合わせにおいて用いた: ヒト C b l - b - FAM / GAPDH - VIC。各反応ミックスの 18 μl / ウェルの容量を、これまでに調製された溶解物からウェル当たり 2 μl の溶解物と組み合わせた。試料を、製造業者の指示に従って増幅した。

図 8 における結果は、T 細胞にトランスフェクトされた s d - r x RNA 化合物により両者の C b l - b の有意なサイレンシングを実証し、1 ~ 2 μM s d - r x RNA により遺伝子発現の 70 ~ 80 % の阻害に達した。

【0312】

例 10 : ヒト一次 NK 細胞における、C B L B を標的とする s d - r x RNA の 6 点の用量応答

末梢血 leukopak を StemCell Technologies から得た。一次 NK 細胞を、ネガティブセレクションキット (Miltenyi) を用いて単離し、細胞を、X-Vivo 10 (Lonza) + 1 ng/ml IL-15 中で培養した。細胞を、トランスフェクションのために回収し、細胞濃度を、IL-15 を含有する X-vivo 培地中約 1×10^6 細胞/ml に調整した。細胞を、0.125 μM ~ 2 μM の最終濃度の範囲で s d - r x RNA を含有する 24 ウェルプレートに直接播種した。72 時間のインキュベーション後、トランスフェクトされた細胞を回収し、製造業者のプロトコルに従って、RNEasy RNA 単離キット (Qiagen) を用いて RNA を単離した。Taqman 遺伝子発現アッセイを、以下の組み合わせで用いた: ヒト C b l b - FAM (Taqman, Hs00180288_m1) / ヒト T B P - FAM (Taqman, Hs00427620_m1)。各反応ミックスの 15 μl / ウェルの容量を、これまでに単離した RNA からウェル当たり 5 μl RNA と組み合わせた。試料を、RNA to Ct 1-step プロトコル (ThermoFisher) に従って増幅した。

図 9 に示す結果は、ヒト一次 NK 細胞へ送達される C b l b 標的化 s d - r x RNA 剤 27457 のサイレンシングを実証し、2 μM s d - r x RNA により遺伝子発現の 80 % 超の阻害を得た。

【0313】

例 11 : H e p G 2 細胞における、D M N T 3 A を標的とする s d - r x RNA の 3 点の用量応答曲線

H e p G 2 細胞を ATCC (VA) から得て、10 % ウシ胎仔血清 (Gibco) を含有する E M E M 完全培地中で培養した。トランスフェクションの 24 時間前に、96 ウェルプレートに、ウェル当たり 10,000 細胞で細胞を播種した。D M N T 3 A を標的とする s d - r x RNA 化合物を試料 (ウェル) あたり Accell 培地 (Dharmacon, CO) 中 0.25 ~ 1 μM まで、s d - r x RNA を個別に希釈することにより調製し、事前に播種された 96 ウェルプレートの 100 μl / ウェルに分割した。投与の 48 時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ (Affymetrix) を用いて、製造業者のプロトコルに従って Quantigene 分枝鎖 DNA アッセイにより mRNA レベルを決定した。図 10 は、D M N T 3 A 標的化 s d - r x RNA が、H e p G 2 細胞において標的遺伝子 m R

N A レベルを *in vitro* で減少させることを実証する。データを、ハウスキーピング遺伝子 (P P I B) に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【 0 3 1 4 】

例 1 2 : P a n - T 細胞における、D M N T 3 A を標的とする s d - r x R N A の 5 点の用量応答曲線

一次ヒト T 細胞を AllCells (CA) から得て、1 0 0 0 I U / m l I L 2 を含有する Immunocult-XF T 細胞拡大完全培地 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) 中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも 4 日間、製造業者の指示に従って、抗 C D 3 / C D 2 8 Dynabeads (Gibco, 11131) で活性化させた。D M N T 3 A を標的とする s d - r x R N A 化合物および非標的化対照 s d - r x R N A (#28599) を試料 (ウェル) あたり完全 Immunocult 中 0 . 0 4 ~ 2 μ M まで、s d - r x R N A を個別に希釈することにより調製し、9 6 ウェルプレートの 1 0 0 μ l / ウェルに分割した。細胞を Immunocult 完全培地中で調製し、事前に希釈した s d - r x R N A を含む 9 6 ウェルプレートに 1 0 0 μ l / ウェルで播種した。D M N T 3 A を標的とする s d - r x R N A 配列の例を表 9 に提供する。投与の 7 2 時間後、細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ (Affymetrix) を用いて、製造業者のプロトコルに従って Quantigene 分枝鎖 D N A アッセイにより m R N A レベルを決定した。図 1 1 は、D M N T 3 A 標的化 s d - r x R N A が、ヒト P a n T 細胞において標的遺伝子 m R N A レベルを *in vitro* で減少させることを実証する。データを、ハウスキーピング遺伝子 (P P I B) に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

10

20

【 0 3 1 5 】

例 1 3 : A 5 4 9 細胞における P R D M 1 を標的とする、s d - r x R N A の 2 点の用量応答

A 5 4 9 細胞を ATCC (VA) から得て、1 0 % ウシ胎仔血清 (Gibco) を含有する ATCC 処方 F - 1 2 K 完全培地中で培養した。トランスフェクションの 2 4 時間前に、9 6 ウェルプレートに、ウェル当たり 1 0 , 0 0 0 細胞で細胞を播種した。P R D M 1 を標的とする s d - r x R N A 化合物を試料 (ウェル) あたり Accell 培地 (Dharmacon) 中 0 . 2 ~ 2 μ M まで、s d - r x R N A を個別に希釈することにより調製し、事前に播種された 9 6 ウェルプレートの 1 0 0 μ l / ウェルに分割した。インキュベーションの 7 2 時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ (Affymetrix) を用いて、製造業者のプロトコルに従って Quantigene 分枝鎖 D N A アッセイにより m R N A レベルを決定した。

30

図 1 2 に示す結果は、A 5 4 9 細胞へ送達される P R D M 1 標的化 s d - r x R N A 剤のサイレンシングを実証し、2 μ M s d - r x R N A により遺伝子発現の 4 0 % 超の阻害を得た。データを、ハウスキーピング遺伝子 (H P R T) に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【 0 3 1 6 】

例 1 4 : A 5 4 9 細胞における P R D M 1 を標的とする、s d - r x R N A の 6 点の用量応答

A 5 4 9 細胞を ATCC (VA) から得て、1 0 % ウシ胎仔血清 (Gibco) を含有する ATCC 処方 F - 1 2 K 完全培地中で培養した。トランスフェクションの 2 4 時間前に、9 6 ウェルプレートに、ウェル当たり 1 0 , 0 0 0 細胞で細胞を播種した。P R D M 1 を標的とする s d - r x R N A 化合物を試料 (ウェル) あたり Accell 培地 (Dharmacon) 中 0 . 2 ~ 2 μ M まで、s d - r x R N A を個別に希釈することにより調製し、事前に播種した 9 6 ウェルプレートの 1 0 0 μ l / ウェルに分割した。P R D M 1 を標的とする s d - r x R N A 配列の例を、表 1 0 に提供する。インキュベーションの 7 2 時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ (Affymetrix) を用いて、製造業者のプロトコルに従って Quantigene 分枝鎖 D N A アッセイにより m R N A レベルを決定した。

40

図 1 3 に示す結果は、A 5 4 9 細胞へ送達される P R D M 1 標的化 s d - r x R N A 剤

50

のサイレンシングを実証し、 $2\ \mu\text{M}$ sd-rxRNA により遺伝子発現の80%超の阻害を得た。データを、ハウスキーピング遺伝子(HPR T)に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【0317】

例15：A549細胞における、PTPN6を標的とする sd-rxRNA の6点の用量応答

A549細胞をATCC(VA)から得て、10%ウシ胎仔血清(Gibco)を含有するATCC処方F-12K完全培地中で培養した。トランスフェクションの24時間前に、96ウェルプレートに、ウェル当たり10,000細胞で細胞を播種した。PTPN6を標的とする sd-rxRNA 化合物を試料(ウェル)あたりAccell培地(Dharmacon)中0.2~2 μM まで、 sd-rxRNA を個別に希釈することにより調製し、事前に播種した96ウェルプレートの100 μL /ウェルに分割した。インキュベーションの72時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ(Affymetrix)を用いて、製造業者のプロトコルに従ってQuantigene 分岐鎖DNAアッセイによりmRNAレベルを決定した。

図14に示す結果は、A549細胞へ送達されるPTPN6標的化 sd-rxRNA 剤のサイレンシングを実証し、 $2\ \mu\text{M}$ sd-rxRNA により遺伝子発現の40%超の阻害を得た。データを、ハウスキーピング遺伝子(TFRC)に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【0318】

例16：A549細胞における、PTPN6を標的とする sd-rxRNA の6点の用量応答

A549細胞をATCC(VA)から得て、10%ウシ胎仔血清(Gibco)を含有するATCC処方F-12K完全培地中で培養した。トランスフェクションの24時間前に、96ウェルプレートに、ウェル当たり10,000細胞で細胞を播種した。PTPN6を標的とする sd-rxRNA 化合物を試料(ウェル)あたりAccell培地(Dharmacon)中0.2~2 μM まで、 sd-rxRNA を個別に希釈することにより調製し、事前に播種した96ウェルプレートの100 μL /ウェルに分割した。PTPN6を標的とする sd-rxRNA 配列の例を、表11に提供する。インキュベーションの72時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ(Affymetrix)を用いて、製造業者のプロトコルに従ってQuantigene 分岐鎖DNAアッセイによりmRNAレベルを決定した。

図15に示す結果は、A549細胞へ送達されるPTPN6標的化 sd-rxRNA 剤である28613、28614、28617、28623、28627、28628、および28629のサイレンシングを実証し、 $2\ \mu\text{M}$ sd-rxRNA により遺伝子発現の80%超の阻害を得た。データを、ハウスキーピング遺伝子(TFRC)に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【0319】

例17：U2OS細胞における、TET2を標的とする sd-rxRNA の6点の用量応答

U2OSをATCC(VA)から得て、10%ウシ胎仔血清(Gibco)を含有するATCC処方マッコイ5a完全培地中で培養した。トランスフェクションの24時間前に、96ウェルプレートに、ウェル当たり10,000細胞で細胞を播種した。TET2を標的とする sd-rxRNA 化合物を試料(ウェル)あたりAccell培地(Dharmacon)中0.2~2 μM まで、 sd-rxRNA を個別に希釈することにより調製し、事前に播種した96ウェルプレートの100 μL /ウェルに分割した。インキュベーションの72時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ(Affymetrix)を用いて、製造業者のプロトコルに従ってQuantigene 分岐鎖DNAアッセイによりmRNAレベルを決定した。

図16に示す結果は、A549細胞へ送達されるTET2-標的化 sd-rxRNA 剤

のサイレンシングを実証し、 $2\ \mu\text{M}$ sd-rxRNA により遺伝子発現の80%超の阻害を得た。データを、ハウスキーピング遺伝子(PPIB)に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【0320】

例18: U2OS細胞における、TET2を標的とする sd-rxRNA の6点の用量応答

U2OSをATCC(VA)から得て、10%ウシ胎仔血清(Gibco)を含有するATCC処方F-12K完全培地中で培養した。トランスフェクションの24時間前に、96ウェルプレートに、ウェル当たり $10,000$ 細胞で細胞を播種した。TET2を標的とする sd-rxRNA 化合物を試料(ウェル)あたりAccell培地(Dharmacon)中 $0.2 \sim 2\ \mu\text{M}$ まで、 sd-rxRNA を個別に希釈することにより調製し、事前に播種した96ウェルプレートの $100\ \mu\text{L}$ /ウェルに分割した。TET2を標的とする sd-rxRNA 配列の例を、表12に提供する。インキュベーションの72時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ(Affymetrix)を用いて、製造業者のプロトコルに従ってQuantigene 分岐鎖DNAアッセイによりmRNAレベルを決定した。

図17に示す結果は、U2OS細胞へ送達されるTET2-標的化 sd-rxRNA 剤のサイレンシングを実証し、 $2\ \mu\text{M}$ sd-rxRNA により遺伝子発現の60%超の阻害を得た。データを、ハウスキーピング遺伝子(PPIB)に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【0321】

例19: PanT細胞における、TBX21を標的とする sd-rxRNA の2点の用量応答曲線

一次ヒトT細胞をAllCells(CA)から得て、10%ウシ胎仔血清(Gibco)および $100\ \text{IU/mL}$ IL-2を含有するRPMI完全培地中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも4日間、製造業者の指示に従って、抗CD3/CD28 Dynabeads(Gibco, 11131)で活性化した。TBX21を標的とする sd-rxRNA を試料(ウェル)あたり血清フリーRPMI中 0.2 および $1\ \mu\text{M}$ に、 sd-rxRNA を個別に希釈することにより調製し、96ウェルプレートの $100\ \mu\text{L}$ /ウェルに分割した。細胞を4%FBSおよびIL-2 $2000\ \text{IU/mL}$ を含有するRPMI培地中で、 $1,000,000$ 細胞/mLに調製し、事前に希釈した sd-rxRNA を含む96ウェルプレートに $100\ \mu\text{L}$ /ウェルで播種した。TET2を標的とする sd-rxRNA の例を、表13に提供する。投与の72時間後、トランスフェクトされた細胞を溶解し、遺伝子特異的プローブ(Affymetrix)を用いて、製造業者のプロトコルに従ってQuantigene 分岐鎖DNAアッセイによりmRNAレベルを決定した。

図18に示す結果は、TBX21標的化 sd-rxRNA が、PanT細胞において標的遺伝子mRNAレベルをin vitroで減少させることを実証する。データを、ハウスキーピング遺伝子(PPIB)に対して正規化し、非標的化対照に関してグラフ化した。エラーバーは、生物学的三重の平均からの標準偏差を表す。

【0322】

例20: ヒト一次NK細胞における、TIGITを標的とする sd-rxRNA の3点の用量応答

末梢血leukopakをStemCell Technologiesから得た。一次NK細胞を、ネガティブセレクションキット(Miltenyi)を用いて単離し、細胞を、10%FBS(Gibco)および $100\ \text{IU/mL}$ IL-2を含有するRPMI中で培養した。

細胞を、トランスフェクションのために回収し、細胞濃度を、5%FBS(Gibco)および $100\ \text{IU/mL}$ IL-2を含有するRPMI中約 1×10^6 細胞/mLに調整した。細胞を、 $0.5\ \mu\text{M} \sim 2\ \mu\text{M}$ の最終濃度の範囲で sd-rxRNA を含有する24ウェルプレートに直接播種した。TIGITを標的とする sd-rxRNA 配列の例を、表5に提供する。72時間のインキュベーション後、トランスフェクトされた細胞を回収し、製造業者のプロトコルに従って、RNEasy RNA単離キット(Qiagen)を用いてRNA

を単離した。Taqman遺伝子発現アッセイを、以下の組み合わせで用いた：ヒトTIGIT - FAM (Taqman, Hs00545087_m1) / ヒトTBPFAM (Taqman, Hs00427620_m1)。各反応ミックスの15 µl / ウェルの容量を、これまでに単離されたRNAからウェル当たり5 µl RNAと組み合わせた。試料を、RNA to Ct 1-stepプロトコル (ThermoFisher) に従って増幅した。

図19に示す結果は、ヒト一次NK細胞へ送達されるTIGIT標的化sd-rxRNA剤27459のサイレンシングを実証し、2 µM sd-rxRNAにより遺伝子発現の80%超の阻害を得た。

【0323】

例21：ヒト一次T細胞における、AKT1を標的とするsd-rxRNAの6点の用量応答曲線

一次ヒトT細胞をAllCells (CA) から得て、10%ウシ胎仔血清 (Gibco) および100 IU/ml IL2を含有するRPMI完全培地中で培養した。細胞を、トランスフェクションの前に、少なくとも4日間、製造業者の指示に従って、抗CD3 / CD28 Dynabeads (Gibco, 11131) で活性化させた。AKT1を標的とするsd-rxRNAを試料 (ウェル) あたり血清フリーRPMI中0.06 ~ 2 µMまで、sd-rxRNAを個別に希釈することにより調製し、96ウェルプレートの100 µl / ウェルに分割した。細胞を4%FBSおよびIL2 2000 IU/mlを含有するRPMI培地中で、1,000,000細胞/mlに調製し、事前に希釈したsd-rxRNAを含む96ウェルプレートに100 µl / ウェルで播種した。AKT1を標的とするsd-rxRNAの例を、表11に提供する。72時間後、トランスフェクトされた細胞を、300 x gで10分間、スピンドウンした。培地を取り除き、細胞を40 µlのリン酸緩衝生理食塩水 (Gibco) で再懸濁した。次いで、細胞をInvitrogen mRNAキャッチャープレートに移し、製造業者の指示に従ってRNAを単離した。Taqman遺伝子発現アッセイを以下の組み合わせにおいて用いた：ヒトAKT1 - FAM (Taqman, Hs0178289_m1) / ヒトPPIB - FAM (Taqman, Hs00168719_m1)。各反応ミックスの45 µl / ウェルの容量を、これまでに単離されたRNAからウェル当たり15 µl RNAと組み合わせた。試料を、製造業者の指示に従って増幅した。

図20に示す結果は、T細胞へ送達されるAKT1標的化sd-rxRNA剤28115のサイレンシングを実証し、2 µM sd-rxRNAにより遺伝子発現の40%超の阻害を得た。

【0324】

表の列挙

表1は、sd-rxRNAを用いて首尾よくサイレンシングされる遺伝子の例を示す。

表2は、sd-rxRNAを用いたサイレンシングのための候補遺伝子の例を示す。

表3は、PD1標的配列の例を示す。

表4は、Cb1-b標的配列の例を示す。

表5は、TIGIT標的配列およびsd-rxRNAの例を示す。

表6は、PD1 sd-rxRNAの例を示す。

表7は、HK2標的配列およびsd-rxRNAの例を示す。

表8は、Cb1-b sd-rxRNAの例を示す。

表9は、DNMT3A標的配列およびsd-rxRNAの例を示す。

表10は、PRDM1標的配列およびsd-rxRNAの例を示す。

表11は、PTPN6標的配列およびsd-rxRNAの例を示す。

表12は、TET2標的配列およびsd-rxRNAの例を示す。

表13は、Tbx21標的配列およびsd-rxRNAの例を示す。

【0325】

表7

10

20

30

40

【表 7 - 1】

オリゴ ID	遺伝子	アクセッション番号	開始部位	配列	遺伝子領域	パッセンジャー配列	ガイド配列
28545	HK2	NM_000189.4	2298	CCAGCUGUU UGACCACAU UG (配列番号 136)	gcaguggcacCCAGC UGUUUGACCACA UUGccgaauccug (配列番号 160)	UGUUUGAC CACAUUA (配列番号 184)	UAAUGUGGU CAAACAGCU GG (配列番号 208)
28546	HK2	NM_000189.4	2302	CUGUUUGAC CACAUUGCC GA (配列番号 137)	uggcaccagCUGUU UGACCACAUUGC CGAuggcuggcua (配列番号 161)	UGACCACA UUGCCGA (配列番号 185)	UCGGCAAUG UGGUCAAAC AG (配列番号 209)
28547	HK2	NM_000189.4	2305	UUUGACCAC AUUGCCGAA UG (配列番号 138)	caccagcugUUUGA CCACAUUGCCGA AUGcuggcuaacu (配列番号 162)	CCACAUUGC CGAAUA (配 列番号 186)	UAUUCGGCA AUGUGGUCA AA (配列番号 210)
28548	HK2	NM_000189.4	3858	AGAGGAGUU UGACCUGGA UG (配列番号 139)	uccaccggcgAGAGG AGUUUGACCUGG AUGugguugcugug (配列番号 163)	AGUUUGAC CUGGAUA (配列番号 187)	UAUCCAGGU CAAACUCCU CU (配列番号 211)
28549	HK2	NM_000189.4	3939	CUGUGAAGU UGGCCUCAU UG (配列番号 140)	aagaccucaCUGUG AAGUUGGCCUCA UUGuuggcacgggc (配列番号 164)	AAGUUGGC CUCAUUA (配列番号 188)	UAAUGAGGC CAACUUCAC AG (配列番号 212)
28550	HK2	NM_000189.4	3973	AAUGCCUGC UACAUGGAG GA (配列番号 141)	cacgggcagAAUGC CUGCUACAUGGA GGAgaugcgcaacg (配列番号 165)	CUGCUACA UGGAGGA (配列番号 189)	UCCUCCAUG UAGCAGGCA UU (配列番号 213)
28551	HK2	NM_000189.4	4363	UGUGACGAC AGCAUCAU GU (配列番号 142)	ugagagcaccUGUGA CGACAGCAUCAU UGUaaaggaggugu (配列番号 166)	CGACAGCA UCAUUGA (配列番号 190)	UCAAUGAUG CUGUCGUCA CA (配列番号 214)
28552	HK2	NM_000189.4	2597	GUGAGAUUG GUCUCAUUG UG (配列番号 143)	gaccacaacuGUGAG AUUGGUCUCAU GUGggcacgggcag (配列番号 167)	AUUGGUCU CAUUGUA (配列番号 191)	UACAAUGAG ACCAAUCUC AC (配列番号 215)
28553	HK2	NM_000189.4	4287	GUCUCAGAU UGAGAGUGA CU (配列番号 144)	ccaaguucuuGUCUC AGAUUGAGAGUG ACUgccuggcccug (配列番号 168)	AGAUUGAG AGUGACA (配列番号 192)	UGUCACUCU CAAUCUGAG AC (配列番号 216)
28554	HK2	NM_000189.4	4289	CUCAGAUUG AGAGUGACU GC (配列番号 145)	aaguucuuGUCAG AUUGAGAGUGAC UGCuggcccugcu (配列番号 169)	AUUGAGAG UGACUGA (配列番号 193)	UCAGUCACU CUCAAUCUG AG (配列番号 217)

10

20

30

40

【表 7 - 2】

28555	HK2	NM_000189.4	4544	AAGUCAUGC AUGAGACAG UG (配列番号 146)	cacuuugccaAAGUC AUGCAUGAGACA GUGaaggaccuggc (配列番号 170)	AUGCAUGA GACAGUA (配列番号 194)	UACUGUCUC AUGCAUGAC UU (配列番号 218)
28556	HK2	NM_000189.4	6985	UGAGCACUC AGUCUAGUG AA (配列番号 147)	cucaaaucuuUGAGC ACUCAGUCUAGU GAAGauguugucuu (配列番号 171)	ACUCAGUC UAGUGAA (配列番号 195)	UUCACUAGA CUGAGUGCU CA (配列番号 219)
28557	HK2	NM_000189.4	2187	GACCAACUU CCGUGUGCU UU (配列番号 148)	aucuuaggaggGACCA ACUUCGUGUGC UUUgggugaagaa (配列番号 172)	ACUUCGUG GUGCUUA (配列番号 196)	UAAGCACAC GGAAGUUGG UC (配列番号 220)
28558	HK2	NM_000189.4	4154	AAAUGAUCU GUGGAAUGU AC (配列番号 149)	agguucgagaAAAUG AUCAGUGGAAUG UACcugggugagau (配列番号 173)	AUCAGUGG AAUGUAA (配列番号 197)	UUACAUUCC ACUGAUCU UU (配列番号 221)
28559	HK2	NM_000189.4	6982	CCUUGAGCA CUCAGUCUA GU (配列番号 150)	caucuaaaauCCUUG AGCACUCAGUCU AGUGaagauguugu (配列番号 174)	AGCACUCA GUCUAGA (配列番号 198)	UCUAGACUG AGUGCUCAA GG (配列番号 222)
28560	HK2	NM_000189.4	4525	CUACAUCU CACUUUGCC AA (配列番号 151)	ccucuacaagCUACA UCCUCACUUUGC CAAagucaugcaug (配列番号 175)	UCCUCACU UGCCAA (配 列番号 199)	UUGGCAAAG UGAGGAUGU AG (配列番号 223)
28561	HK2	NM_000189.4	3516	CUUGGACCU UGGAGGAAC AA (配列番号 152)	acuucuuuggcCUUGG ACCUUGGAGGAA CAAauuuccggguc (配列番号 176)	ACCUUGGA GGAACAA (配列番号 200)	UUGUCCUC CAAGGUCCA AG (配列番号 224)
28562	HK2	NM_000189.4	3586	GAGAUGCAC AACAGAUC UA (配列番号 153)	ggguggagugGAGAU GCACAACAAGAU CUAcgccaucgcc (配 列番号 177)	GCACAACA AGAUCUA (配列番号 201)	UAGAUCUUG UUGUGCAUC UC (配列番号 225)
28563	HK2	NM_000189.4	3905	GAACUAUGA UGACCUGUG GC (配列番号 154)	gacacagucgGAACU AUGAUGACCUGU GGCuuugaagaccc (配列番号 178)	AUGAUGAC CUGUGGA (配列番号 202)	UCCACAGGU CAUCAUAGU UC (配列番号 226)
28564	HK2	NM_000189.4	1985	AGAAGGUUG ACCAGUAUC UC (配列番号 155)	gaccaagugcAGAAG GUUGACCAGUAU CUCuaccacaugcg (配 列番号 179)	GUUGACCA GUAUCUA (配列番号 203)	UAGAUACUG GUCAACCU CU (配列番号 227)
28565	HK2	NM_000189.4	1987	AAGGUUGAC CAGUAUCUC UA (配列番号 156)	ccaagugcagAAGGU UGACCAGUAUCU CUAccacaugcgcc (配 列番号 180)	UGACCAGU AUCUCUA (配列番号 204)	UAGAGAUAC UGGUCAACC UU (配列番号 228)

10

20

30

40

【表 7 - 3】

28566	HK2	NM_000189.4	2927	UUGAGACCA AAGACAUCU CA (配列番号 157)	accggugcuUUGAG ACCAAAGACAUC UCAgacauugaagg (配列番号 181)	ACCAAAGA CAUCUCA (配列番号 205)	UGAGAUGUC UUUGGUCUC AA (配列番号 229)
28567	HK2	NM_000189.4	3164	ACGGUUCG UCUACAAGA AA (配列番号 158)	auuggggucgACGGU UCCGUCUACAAG AAAcaccccauuu (配列番号 182)	UCCGUCUAC AAGAAA (配 列番号 206)	UUUCUUGUA GACGGAACC GU (配列番号 230)
28568	HK2	NM_000189.4	1991	UUGACCAGU AUCUCUACC AC (配列番号 159)	gugcagaaggUUGAC CAGUAUCUCUAC CACaugccucuc (配列番号 183)	CAGUAUCU CUACCAA (配列番号 207)	UUGGUAGAG AUACUGGUC AA (配列番号 231)

10

【 0 3 2 6 】

表 8 - C b 1 - b s d - r x R N A

【表 8 - 1】

Cbl-b sd- rxRNA			
二重鎖 ID	開始部位	配列	配列番号
CB 21	978	fG.mA.fU.mU.fU.mA.fA.mC.fU.mU.fG.mC.fA*mA*fA-TEG-Chl	232
		PmU.fU.mU.fG.mC.fA.mA.fG.mU.fU.mA.fA.mA.fU*mC*fA*mA*fU*mU*fG	233
CB 22	985	fC.mU.fU.mG.fC.mA.fA.mU.fG.mA.fU.mU.fA*mC*fA-TEG-Chl	234
		PmU.fG.mU.fA.mA.fU.mC.fA.mU.fU.mG.fC.mA.fA*mG*fU*mU*fA*mA*fA	235
CB 23	1124	fU.mA.fA.mA.fG.mC.fA.mC.fG.mA.fC.mU.fA*mC*fA-TEG-Chl	236
		PmU.fG.mU.fA.mG.fU.mC.fG.mU.fG.mC.fU.mU.fU*mA*fA*mC*fU*mU*fC	237
CB 24	1382	fU.mA.fC.mA.fC.mA.fG.mG.fA.mA.fC.mA.fA*mU*fA-TEG-Chl	238
		PmU.fA.mU.fU.mG.fU.mU.fC.mC.fU.mG.fU.mG.fU*mA*fA*mC*fU*mU*fU	239
CB 25	1550	fU.mC.fG.mU.fU.mG.fU.mG.fA.mA.fA.mU.fA*mA*fA-TEG-Chl	240
		PmU.fU.mU.fA.mU.fU.mU.fC.mA.fC.mA.fA.mC.fG*mA*fC*mA*fG*mA*fA	241
CB 26	1920	fU.mG.fC.mA.fU.mG.fG.mU.fG.mA.fG.mA.fA*mA*fA-TEG-Chl	242
		PmU.fU.mU.fU.mC.fU.mC.fA.mC.fC.mA.fU.mG.fC*mA*fA*mG*fG*mA*fG	243
CB 27	2517	fC.mG.fG.mU.fC.mU.fU.mG.fU.mG.fA.mU.fA*mA*fA-TEG-Chl	244
		PmU.fU.mU.fA.mU.fC.mA.fC.mA.fA.mG.fA.mC.fC*mG*fA*mA*fC*mA*fG	245
CB 28	2596	fU.mA.fA.mG.fC.mA.fU.mA.fU.mA.fU.mU.fU*mA*fA-TEG-Chl	246
		PmU.fU.mA.fA.mA.fU.mA.fU.mA.fU.mG.fC.mU.fU*mA*fA*mG*fU*mC*fA	247
CB 29	2813	fC.mA.fU.mU.fG.mA.fA.mC.fA.mU.fU.mC.fA*mA*fA-TEG-Chl	248
		PmU.fU.mU.fG.mA.fA.mU.fG.mU.fU.mC.fA.mA.fU*mG*fA*mG*fA*mC*fU	249
CB 30	3618	fU.mU.fU.mG.fA.mU.fA.mC.fC.mU.fG.mU.fA*mC*fA-TEG-Chl	250
		PmU.fG.mU.fA.mC.fA.mG.fG.mU.fA.mU.fC.mA.fA*mA*fA*mC*fA*mC*fC	251
CB 31	3818	fG.mA.fU.mC.fA.mA.fA.mC.fU.mA.fA.mU.fG*mC*fA-TEG-Chl	252
		PmU.fG.mC.fA.mU.fU.mA.fG.mU.fU.mU.fG.mA.fU*mC*fA*mG*fU*mU*fG	253
CB 32	3925	fU.mU.fA.mU.fU.mU.fG.mU.fC.mA.fA.mU.fA*mA*fA-TEG-Chl	254
		PmU.fU.mU.fA.mU.fU.mG.fA.mC.fA.mA.fA.mU.fA*mA*fA*mU*fG*mC*fU	255

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

記号

A=アデノシン

G=グアノシン

U=ウリジン

C=シトシン

m= 2' -O-メチルヌクレオチド

f= 2' フルオロヌクレオチド

Y= 5 メチルウリジン

X= 5 メチルシトシン

*=ホスホロチオアート連結

.=ホスホジエステル連結

TEG-Chl=コレステロール-TEG-グリセリル

P= 5' 無機ホスファート

10

20

【 0 3 2 7 】

表 9

【表 9 - 1】

オリゴ ID	遺伝子	アクセッション番号	開始部位	配列	遺伝子領域	パッセンジャー配列	ガイド配列
28359	DNMT3A	NM_175629.2	1747	UUAUUGAUG AGCGCACAA GA (配列番号 256)	gucaaggagaUUA UUGAUGAGCG CACAAGAgagc ggcuggu (配列番 号 280)	GAUGAGCG CACAAGA (配列番号 304)	UCUUGUGCG CUCAUCAAU AA (配列番号 328)
28360	DNMT3A	NM_175629.2	1266	AUUGUGUCU UGGUGGAUG AC (配列番号 257)	gccaggccgcAUU GUGUCUUGGU GGAUGACgggc cggagcc (配列番 号 281)	GUCUUGGU GGAUGAA (配列番号 305)	UUCAUCCAC CAAGACACA AU (配列番号 329)
28361	DNMT3A	NM_175629.2	1428	AUGUACCGC AAAGCCAUC UA (配列番号 258)	caagcagcccAUG UACCGCAAAG CCAUCUAcgagg uccugc (配列番 号 282)	CCGCAAAG CCAUCUA (配列番号 306)	UAGAUGGCU UUGCGGUAC AU (配列番号 330)
28362	DNMT3A	NM_175629.2	1988	AAACAACAA CUGCUGCAG GU (配列番号 259)	ucaugugcggAAA CAACAACUGC UGCAGGUgcuu uugcgug (配列番 号 283)	ACAACUGC UGCAGGA (配列番号 307)	UCCUGCAGC AGUUGUUGU UU (配列番号 331)
28363	DNMT3A	NM_175629.2	2411	ACAGAAGCA UAUCCAGGA GU (配列番号 260)	gcagcgucacACA GAAGCAUAUC CAGGAGUgggg cccauuc (配列番 号 284)	AGCAUAUC CAGGAGA (配列番号 308)	UCUCCUGGA UAUGCUUCU GU (配列番号 332)
28364	DNMT3A	NM_175629.2	2530	UCUUUGAGU UCUACCGCC UC (配列番号 261)	ggccggcucuUCU UUGAGUUCUA CCGCCUCcugca ugaugc (配列番 号 285)	GAGUUCUA CCGCCUA (配列番号 309)	UAGGCGGUA GAACUCAAA GA (配列番号 333)
28365	DNMT3A	NM_175629.2	3899	UAAAAGGUA CUGUUAACU AC (配列番号 262)	gauauauauaUAA AAGGUACUGU UAACUACugua caaccgc (配列番 号 286)	GGUACUGU UAACUAA (配列番号 310)	UUAGUUAAC AGUACCUUU UA (配列番号 334)
28366	DNMT3A	NM_175629.2	3622	CUGAUCAGA UAGGAGCAC AA (配列番号 263)	ugucucuagcCUG AUCAGAUAGG AGCACAAgcag gggacgg (配列番 号 287)	CAGAUAGG AGCACAA (配列番号 311)	UUGUGCUC UAUCUGAUC AG (配列番号 335)

10

20

30

40

【表 9 - 2】

28367	DNMT3A	NM_175629.2	2913	UUAUGGUGC ACUGAAAUG GA (配列番号 264)	agaggacauUUA UGGUGCACUG AAAUGGAaagg guuuuug (配列番 号 288)	GUGCACUG AAAUGGA (配列番号 312)	UCCAUUUC GUGCACCAU AA (配列番号 336)
28368	DNMT3A	NM_175629.2	2821	GCAAAGUGA GGACCAUUA CU (配列番号 265)	gccaaugucaGCA AAGUGAGGAC CAUUACUacgag gucaaa (配列番 号 289)	GUGAGGAC CAUUACA (配列番号 313)	UGUAAUGGU CCUCACUUU GC (配列番号 337)
28369	DNMT3A	NM_175629.2	3843	CGCUGUUA CUCUUGUUU AC (配列番号 266)	uucuagaageCGC UGUUACCUCU UGUUUACaguu uauauau (配列番 号 290)	UUACCUCU UGUUUAA (配列番号 314)	UUAAACAAG AGGUAACAG CG (配列番号 338)
28370	DNMT3A	NM_175629.2	3804	CCACACAGG AAACCUUGA AG (配列番号 267)	caggugccuaCCA CACAGGAAAC CUUGAAGaaaau caguuu (配列番 号 291)	CAGGAAAC CUUGAAA (配列番号 315)	UUUCAAGGU UUCCUGUGU GG (配列番号 339)
28371	DNMT3A	NM_175629.2	3418	CUUGCUGUG ACUGAAACA AG (配列番号 268)	gguuuuguuuCUU GCUGUGACUG AAACAAGaagg uuauuge (配列番 号 292)	UGUGACUG AAACAAA (配列番号 316)	UUUGUUUCA GUCACAGCA AG (配列番号 340)
28372	DNMT3A	NM_175629.2	2670	GUGAUGAUU GAUGCCAAA GA (配列番号 269)	guccaacccuGUG AUGAUUGAUG CCAAAGAagug ucagcug (配列番 号 293)	GAUUGAUG CCAAAGA (配列番号 317)	UCUUUGGCA UCAUCAUC AC (配列番号 341)
28373	DNMT3A	NM_175629.2	2169	AAUAACCAC GACCAGGAA UU (配列番号 270)	guucuucguAAU AACCACGACC AGGAAUUugac ccuccaa (配列番 号 294)	CCACGACC AGGAAUA (配列番号 318)	UAUUCUGG UCGUGGUUA UU (配列番号 342)
28374	DNMT3A	NM_175629.2	1386	UUUUGCAGU GCGUCCAC CA (SEQ ID NO271)	gcugagcugUUU UGCAGUGCGU UCCACCAgacca cguaca (配列番 号 295)	CAGUGCGU UCCACCA (配列番号 319)	UGGUGGAAC GCACUGCAA AA (配列番号 343)

10

20

30

40

【表 9 - 3】

28375	DNMT3A	NM_175629.2	1935	UACCAGUCC UACUGCACC AU (配列番号 272)	cgacgacgcUAC CAGUCCUACU GCACCAUcugcu gugggg (配列番 号 296)	GUCCUACU GCACCAA (配列番号 320)	UUGGUGCAG UAGGACUGG UA (配列番号 344)
28376	DNMT3A	NM_175629.2	2302	UUCAGGUGG ACCGCUACA UU (配列番号 273)	gacuugggcaUUC AGGUGGACCG CUACAUUgccuc ggaggu (配列番 号 297)	GUGGACCG CUACAU (配列番号 321)	UAUGUAGCG GUCCACCUG AA (配列番号 345)
28377	DNMT3A	NM_175629.2	2642	CAUCUCGCG AUUUCUCGA GU (配列番号 274)	acaagagggaCAU CUCGCGAUUU CUCGAGUccaac ccugug (配列番 号 298)	CGCGAUUU CUCGAGA (配列番号 322)	UCUCGAGAA AUCGCGAGA UG (配列番号 346)
28378	DNMT3A	NM_175629.2	3046	CUCCGCUGA AGGAGUAUU UU (配列番号 275)	caccucuucgCUC CGCUGAAGGA GUAUUUUcgcu gugugua (配列番 号 299)	CUGAAGGA GUAUUUA (配列番号 323)	UAAAUACUC CUUCAGCGG AG (配列番号 347)
28379	DNMT3A	NM_175629.2	2154	CAGAUGUUC UUCGCUAAU AA (配列番号 276)	cucccgccucCAG AUGUUCUUCG CUAAUAAccacg accagg (配列番 号 300)	GUUCUUCG CUAAUAA (配列番号 324)	UUAUUAGCG AAGAACAUC UG (配列番号 348)
28380	DNMT3A	NM_175629.2	1874	AAUGUGCCA AAACUGCAA GA (配列番号 277)	ucguuggaggAAU GUGCCAAAAC UGCAAGAcug cuuucug (配列番 号 301)	GCCAAAAC UGCAAGA (配列番号 325)	UCUUGCAGU UUUGGCACA UU (配列番号 349)
28381	DNMT3A	NM_175629.2	1329	UUCGAGAC GGCAAUUC UC (配列番号 278)	ggucaugugUUC GGAGACGGCA AAUUCUCagug gugugug (配列番 号 302)	AGACGGCA AAUUCUA (配列番号 326)	UAGAAUUUG CCGUCUCCG AA (配列番号 350)
28382	DNMT3A	NM_175629.2	1326	UGGUUCGGA GACGGCAAA UU (配列番号 279)	cugggucaugUGG UUCGGAGACG GCAAAUuca guggugu (配列番 号 303)	CGGAGACG GCAAAUA (配列番号 327)	UAUUUGCCG UCUCCGAAC CA (配列番号 351)

10

20

30

40

【 0 3 2 8 】

表 1 0

【表 10 - 1】

オリゴ ID	遺伝子	アクセッション番号	開始部位	配列	遺伝子領域	パッセンジャー配列	ガイド配列
28569	PRDM1	NM_001198.3	970	AGAGAGUAC AGCGUGAAA GA (配列番号 352)	ugucccaagAGA GAGUACAGCG UGAAAGAaauc cuaaaau (配列番 号 376)	GUACAGCG UGAAAGA (配列番号 400)	UCUUUCAC GCUGUACU CUCU (配列 番号 424)
28570	PRDM1	NM_001198.3	972	AGAGUACAG CGUGAAAGA AA (配列番号 353)	ucccaagAGA GUACAGCGUG AAAGAAAuccu aaaauug (配列番 号 377)	ACAGCGUG AAAGAAA (配列番号 401)	UUUCUUUC ACGCUGUA CUCU (配列 番号 425)
28571	PRDM1	NM_001198.3	815	AGGAACUUC UUGUGUGGU AU (配列番号 354)	ccugccaaccAGG AACUUCUUGU GUGGUAAuguc gggacuu (配列番 号 378)	CUUCUUGU GUGGUAA (配列番号 402)	UUACCACAC AAGAAGUU CCU (配列番 号 426)
28572	PRDM1	NM_001198.3	2135	AGGUCUGCC ACAAGAGAU UU (配列番号 355)	caugaagccAGG UCUGCCACAA GAGAUUUagca gcaccag (配列番 号 379)	UGCCACAA GAGAUUA (配列番号 403)	UAAUCUCU UGUGGCAG ACCU (配列 番号 427)
28573	PRDM1	NM_001198.3	2137	GUCUGCCAC AAGAGAUUU AG (配列番号 356)	ugaaugccagGUC UGCCACAAGA GAUUUAGcagc accagca (配列番 号 380)	CCACAAGA GAUUUAA (配列番号 404)	UUAAAUCU CUUGUGGC AGAC (配列 番号 428)
28574	PRDM1	NM_001198.3	4266	ACCACUUA AUUGUGAGC CA (配列番号 357)	uauuuuauaACC ACUUAUUUUG UGAGCCAagcca uguaaa (配列番 号 381)	UUAAAUUG UGAGCCA (配列番号 405)	UGGCUCAC AAUUUAAG UGGU (配列 番号 429)
28575	PRDM1	NM_001198.3	4276	UUGUGAGCC AAGCCAUGU AA (配列番号 358)	accacuuaaUUG UGAGCCAAGC CAUGUAAaaga ucuacuu (配列番 号 382)	AGCCAAGC CAUGUAA (配列番号 406)	UUACAUGG CUUGGCUC ACAA (配列 番号 430)

10

20

30

40

【表 10 - 2】

28576	PRDM1	NM_001198.3	2669	CUGUAAAGG UCAAACAAG AA (配列番号 359)	ccucugguacCUG UAAAGGUCAA ACAAGAAacag uugaacc (配列番 号 383)	AAGGUCAA ACAAGAA (配列番号 407)	UUCUUGUU UGACCUUU ACAG (配列 番号 431)
28577	PRDM1	NM_001198.3	5052	UUUACUUUG CUAGAACAA CA (配列番号 360)	uuacuggcuuUUU ACUUUGCUAG AACAACAaacua ucuuau (配列番 号 384)	UUUGCUAG AACAACA (配列番号 408)	UGUUGUUC UAGCAAAG UAAA (配列 番号 432)
28578	PRDM1	NM_001198.3	5055	ACUUUGCUA GAACAACAA AC (配列番号 361)	cuggcuuuuuACU UUGCUAGAAC AACAAACuauc uuauuu (配列番 号 385)	GCUAGAAC AACAAAA (配列番号 409)	UUUUGUUG UUCUAGCA AAGU (配列 番号 433)
28579	PRDM1	NM_001198.3	968	AGAGAGAGU ACAGCGUGA AA (配列番号 362)	aauguccaaAGA GAGAGUACAG CGUGAAAgaaa uccuaaa (配列番 号 386)	GAGUACAG CGUGAAA (配列番号 410)	UUUCACGC UGUACUCU CUCU (配列 番号 434)
28580	PRDM1	NM_001198.3	771	GAUGAACAU CUACUUCUA CA (配列番号 363)	gucagaacggGAU GAACAUCUAC UUCUACAccauu aagccc (配列番 号 387)	ACAUCUAC UUCUACA (配列番号 411)	UGUAGAAG UAGAUGUU CAUC (配列 番号 435)
28581	PRDM1	NM_001198.3	819	ACUUCUUGU GUGGUAUUG UC (配列番号 364)	ccaaccaggaACU UCUUGUGUGG UAUUGUCggga cuuugca (配列番 号 388)	UUGUGUGG UAUUGUA (配列番号 412)	UACAAUAC CACACAAG AAGU (配列 番号 436)
28582	PRDM1	NM_001198.3	1867	GAAGCCAUG AAUCUCAUU AA (配列番号 365)	cagcagcgacGAA GCCAUGAAUC UCAUUAaaaaca aaagaa (配列番 号 389)	CAUGAAUC UCAUUA (配列番号 413)	UAAAUGAG AUUCAUGG CUUC (配列 番号 437)
28583	PRDM1	NM_001198.3	3117	AAAGUUUAC AAUGACUGG AA (配列番号 366)	aaauuuuuuuAAA GUUUACAAUG ACUGGAAagau uccuugu (配列番 号 390)	UUACAAUG ACUGGAA (配列番号 414)	UCCAGUC AUUGUAAA CUUU (配列 番号 438)

10

20

30

40

【表 10 - 3】

28584	PRDM1	NM_001198.3	1999	AAUCUGAAG GUCCACCUG AG (配列番号 367)	ccagcucuccAAU CUGAAGGUCC ACCUGAGagug cacagug (配列番 号 391)	GAAGGUCC ACCUGAA (配列番号 415)	UUCAGGUG GACCUUCA GAUU (配列 番号 439)
28585	PRDM1	NM_001198.3	2027	GUGGAGAAC GGCCUUUCA AA (配列番号 368)	agagugcacaGUG GAGAACGGCC UUUCAAAuguc agacuug (配列番 号 392)	GAACGGCC UUUCAAA (配列番号 416)	UUUGAAAG GCCGUUCUC CAC (配列番 号 440)
28586	PRDM1	NM_001198.3	3494	AAGGCUUUA CCAACCUGU CU (配列番号 369)	gggugacaggAAG GCUUUACCAA CCUGUCUcucc uccaaa (配列番 号 393)	UUUACCAA CCUGUCA (配列番号 417)	UGACAGGU UGGUAAG CCUU (配列 番号 441)
28587	PRDM1	NM_001198.3	699	AAGCAACUG GAUGCGCUA UG (配列番号 370)	augaagagaaAAG CAACUGGAUG CGCUAUGugaa uccagca (配列番 号 394)	ACUGGAUG CGCUAUA (配列番号 418)	UAUAGCGC AUCCAGUU GCUU (配列 番号 442)
28588	PRDM1	NM_001198.3	2335	AGCCUCAAG GUUCACCUG AA (配列番号 371)	ccaucucuguAGC CUCAAGGUUC ACCUGAAaggg aacugcg (配列番 号 395)	CAAGGUUC ACCUGAA (配列番号 419)	UUCAGGUG AACCUUGA GGCU (配列 番号 443)
28589	PRDM1	NM_001198.3	2314	AAGAACUAC AUCCAUCUC UG (配列番号 372)	ccagugccacAAG AACUACAUC AUCUCUGuagcc ucaagg (配列番 号 396)	CUACAUC AUCUCUA (配列番号 420)	UAGAGAUG GAUGUAGU UCUU (配列 番号 444)
28590	PRDM1	NM_001198.3	2246	UUGUGCACC UGAAACUGC AC (配列番号 373)	uucaccaguUUG UGCACCUGAA ACUGCACAagcg ucugca (配列番 号 397)	CACCUGAA ACUGCAA (配列番号 421)	UUGCAGUU UCAGGUGC ACAA (配列 番号 445)
28591	PRDM1	NM_001198.3	2000	AUCUGAAGG UCCACCUGA GA (配列番号 374)	cagcucuccaAUC UGAAGGUCCA CCUGAGAgugc acagugg (配列番 号 398)	AAGGUCCA CCUGAGA (配列番号 422)	UCUCAGGU GGACCUUC AGAU (配列 番号 446)

10

20

30

40

【表 1 0 - 4】

28592	PRDM1	NM_001198.3	1939	CAGAACGGC AAGAUAAG UA (配列番号 375)	gcugaagaagCAG AACGGCAAGA UCAAGUA ugcaacg (配列番 号 399)	CGGCAAGA UCAAGUA (配列番号 423)	UACUUGAU CUUGCCGU UCUG (配列 番号 447)
-------	-------	-------------	------	---	--	--------------------------------------	---

【0 3 2 9】

表 1 1

【表 1 1 - 1】

オリゴ ID	遺伝子	アクセシ ョン番号	開始 部位	配列	遺伝子領域	パッセ ンジャー配列	ガイド配列
28606	PTPN6	NM_080549.3	1057	GCAAGAACC GCUACAAGA AC (配列番号 448)	gagaacaaggGCA AGAACCGCUA CAAGAACauuc uccccuu (配列番 号 472)	AACCGCUA CAAGAAA (配列番号 496)	UUUCUUGU AGCGGUUC UUGC (配列 番号 520)
28607	PTPN6	NM_080549.3	1059	AAGAACCGC UACAAGAAC AU (配列番号 449)	gaacaagggcAAG AACCGCUACA AGAACAUucuc cccuuug (配列番 号 473)	CCGCUACA AGAACAA (配列番号 497)	UUGUUCUU GUAGCGGU UCUU (配列 番号 521)
28608	PTPN6	NM_080549.3	1305	GAGAAAGGC CGGAACAAA UG (配列番号 450)	ccgagaggugGAG AAAGGCCGGA ACAAAUguc ccauacu (配列番 号 474)	AGGCCGGA ACAAUA (配列番号 498)	UAUUUGUU CCGGCCUUU CUC (配列番 号 522)
28609	PTPN6	NM_080549.3	1303	UGGAGAAAG GCCGGAACA AA (配列番号 451)	acccgagaggUGG AGAAAGGCCG GAACAAAugcg ucccaua (配列番 号 475)	AAAGGCCG GAACAAA (配列番号 499)	UUUGUCC GGCCUUUC UCCA (配列 番号 523)
28610	PTPN6	NM_080549.3	393	CAUAUUCGG AUCCAGAAC UC (配列番号 452)	ucaggugaccCAU AUUCGGAUCC AGAACUCaggg gauuucu (配列番 号 476)	UCGGAUCC AGAACUA (配列番号 500)	UAGUUCUG GAUCCGAA UAUG (配列 番号 524)

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

28611	PTPN6	NM_080549.3	395	UAUUCGGAU CCAGAACUC AG (配列番号 453)	aggugaccaUAU UCGGAUCCAG AACUCAGggga uuucua (配列番 号 477)	GGAUCCAG AACUCAA (配列番号 501)	UUGAGUUC UGGAUCCG AAUA (配列 番号 525)
28612	PTPN6	NM_080549.3	1239	AAUGACUUC UGGCAGAU GC (配列番号 454)	ggccacggucAAU GACUUCUGGC AGAUGGCgugg caggaga (配列番 号 478)	CUUCUGGC AGAUGGA (配列番号 502)	UCCAUCUGC CAGAAGUC AUU (配列番 号 526)
28613	PTPN6	NM_080549.3	1140	GACUACAUC AAUGCCAAC UA (配列番号 455)	ccccggguccGAC UACAUCAAUG CCAACUAcauca agaacc (配列番 号 479)	CAUCAAUG CCAACUA (配列番号 503)	UAGUUGGC AUUGAUGU AGUC (配列 番号 527)
28614	PTPN6	NM_080549.3	1060	AGAACCGCU ACAAGAACA UU (配列番号 456)	aacaagggaAGA ACCGCUACAA GAACAUUcucc cuuuga (配列番 号 480)	CGCUACAA GAACUA (配列番号 504)	UAUGUUCU UGUAGCGG UUCU (配列 番号 528)
28615	PTPN6	NM_080549.3	1473	CAUUACCAG UACCUGAGC UG (配列番号 457)	gggagucuggCAU UACCAGUACC UGAGCUGgcc gaccaug (配列番 号 481)	CCAGUACC UGAGCUA (配列番号 505)	UAGCUCAG GUACUGGU AAUG (配列 番号 529)
28616	PTPN6	NM_080549.3	1086	UUUGACCAC AGCCGAGUG AU (配列番号 458)	cauucuccUUU GACCACAGCC GAGUGAUccug caggac (配列番 号 482)	CCACAGCC GAGUGAA (配列番号 506)	UUCACUCG GCUGUGGU CAAA (配列 番号 530)
28617	PTPN6	NM_080549.3	1690	ACAUCCAGA AGACCAUCC AG (配列番号 459)	ugugacauugACA UCCAGAAGAC CAUCCAGaugg ugcgggc (配列番 号 483)	CAGAAGAC CAUCCAA (配列番号 507)	UUGGAUGG UCUUCUGG AUGU (配列 番号 531)
28618	PTPN6	NM_080549.3	1470	UGGCAUUAC CAGUACCUG AG (配列番号 460)	ucgggagauUGG CAUUACCAGU ACCUGAGcugg cccgacc (配列番 号 484)	UUACCAGU ACCUGAA (配列番号 508)	UUCAGGUA CUGGUAU GCCA (配列 番号 532)

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

28619	PTPN6	NM_080549.3	1188	GAGAACGCU AAGACCUAC AU (配列番号 461)	aggcccugauGAG AACGCUAAGA CCUACAUcgcca gccagg (配列番 号 485)	CGCUAAGA CCUACAA (配列番号 509)	UUGUAGGU CUUAGCGU UCUC (配列 番号 533)
28620	PTPN6	NM_080549.3	1191	AACGCUAAG ACCUACAUC GC (配列番号 462)	cccugaugagAAC GCUAAGACCU ACAUCGCcagcc aggguu (配列番 号 486)	UAAGACCU ACAUCGA (配列番号 510)	UCGAUGUA GGUCUUAG CGUU (配列 番号 534)
28621	PTPN6	NM_080549.3	1755	UACAAGUUC AUCUACGUG GC (配列番号 463)	ggaggcgagUAC AAGUUAUCU ACGUGGCcaucg cccagu (配列番 号 487)	GUUCAUCU ACGUGGA (配列番号 511)	UCCACGUA GAUGAACU UGUA (配列 番号 535)
28622	PTPN6	NM_080549.3	1393	AGCAUGACA CAACCGAAU AC (配列番号 464)	aacugcgaggAGC AUGACACAAC CGAAUACaaacu ccguac (配列番 号 488)	GACACAAC CGAAUAA (配列番号 512)	UUAUUCGG UUGUGUCA UGCU (配列 番号 536)
28623	PTPN6	NM_080549.3	2060	CACAAGGAG GAUGUGUAU GA (配列番号 465)	cggcugcagaCAC AAGGAGGAUG UGUAUGAgaac cugcaca (配列番 号 489)	GGAGGAUG UGUAUGA (配列番号 513)	UCAUACAC AUCCUCCUU GUG (配列番 号 537)
28624	PTPN6	NM_080549.3	894	GUGAAUGCG GCUGACAUU GA (配列番号 466)	ugccacgaggGUG AAUGCGGCUG ACAUUGAgaacc gagugu (配列番 号 490)	UGCGGCUG ACAUUGA (配列番号 514)	UCAAUGUC AGCCGCAU UCAC (配列 番号 538)
28625	PTPN6	NM_080549.3	739	ACAUCAAGG UCAUGUGCG AG (配列番号 467)	aggguaccccACA UCAAGGUCAU GUGCGAGggug gacgcu (配列番 号 491)	AAGGUCAU GUGCGAA (配列番号 515)	UUCGCACA UGACCUUG AUGU (配列 番号 539)
28626	PTPN6	NM_080549.3	1746	GAGGCGCAG UACAAGUUC AU (配列番号 468)	ggugcagacgGAG GCGCAGUACA AGUUCAUcuac guggcca (配列番 号 492)	GCAGUACA AGUUCAA (配列番号 516)	UUGAACUU GUACUGCG CCUC (配列 番号 540)

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

28627	PTPN6	NM_080549.3	910	UUGAGAACC GAGUGUUGG AA (配列番号 469)	gcggcugacaUUG AGAACCGAGU GUUGGAacuga acaagaa (配列番 号 493)	AACCGAGU GUUGGAA (配列番号 517)	UUCCAACAC UCGGUUCU CAA (配列番 号 541)
28628	PTPN6	NM_080549.3	2222	CAUUUCGCG AUGGACAGA CU (配列番号 470)	ccuguggaagCAU UUCGCGAUGG ACAGACUcaca ccugaa (配列番 号 494)	CGCGAUGG ACAGACA (配列番号 518)	UGUCUGUC CAUCGCGA AAUG (配列 番号 542)
28629	PTPN6	NM_080549.3	633	UGGACGUUU CUUGUGCGU GA (配列番号 471)	gggcgagcccUGG ACGUUUCUUG UGCGUGAgagc cucagcc (配列番 号 495)	GUUUCUUG UGCGUGA (配列番号 519)	UCACGCACA AGAAACGU CCA (配列番 号 543)

10

【0 3 3 0】

表 1 2

20

【表 1 2 - 1】

オリゴ ID	遺伝 子	アクセッション 番号	開始 部位	配列	遺伝子領域	パッセンジ ャー配列	ガイド配列
28317	TET2	NM_001127208.2	1104	UAAUGCCU AAUGGUGC UACA (配列 番号 544)	aagcgagugcUAA UGCCUAAUGG UGCUACAguuu cugccuc (配列番 号 568)	CCUAAUGG UGCUACA (配列番号 592)	UGUAGCAC CAUUAGGC AUUA (配列 番号 616)
28318	TET2	NM_001127208.2	3551	AAGAGCAU CAUUGAGA CCA (配列 番号 545)	ugugcagcaaAAG AGCAUCAUUG AGACCAUggag cagcauc (配列番 号 569)	CAUCAUUG AGACCAA (配列番号 593)	UUGGUCUC AAUGAUGC UCUU (配列 番号 617)
28319	TET2	NM_001127208.2	1107	UGCCUAAU GGUGCUAC AGUU (配列 番号 546)	gcagugcuuaUGC CUAAUGGUGC UACAGUUucug ccucuuc (配列番 号 570)	AAUGGUGC UACAGUA (配列番号 594)	UACUGUAG CACCAUUA GGCA (配列 番号 618)

30

40

【表 1 2 - 2】

28320	TET2	NM_001127208.2	3554	AGCAUCAU UGAGACCA UGGA (配列 番号 547)	gcagcaaaagAGC AUCAUUGAGA CCAUGGAgcagc aucuga (配列番 号 571)	CAUUGAGA CCAUGGA (配列番号 595)	UCCAUGGU CUCAAUGA UGCU (配列 番号 619)
28321	TET2	NM_001127208.2	477	AAGCAAGC CUGAUGGA ACAG (配列 番号 548)	gauggcccgAAG CAAGCCUGAU GGAACAGgaua gaaccaa (配列番 号 572)	AGCCUGAU GGAACAA (配列番号 596)	UUGUUGCA UCAGGCUU GCUU (配列 番号 620)
28322	TET2	NM_001127208.2	1386	AUGCUGAU AAUGCCAG UAAA (配列 番号 549)	gaugcugaugAUG CUGAUAAUGC CAGUAAAcuag cugcaau (配列番 号 573)	GAUAAUGC CAGUAAA (配列番号 597)	UUUACUGG CAUUAUCA GCAU (配列 番号 621)
28323	TET2	NM_001127208.2	631	AAAUGGAG ACACCAAG UGGC (配列 番号 550)	auccagaaguAAA UGGAGACACC AAGUGGCacuc uuucaa (配列番 号 574)	GAGACACC AAGUGGA (配列番号 598)	UCCACUUG GUGUCUCC AUUU (配列 番号 622)
28324	TET2	NM_001127208.2	1384	UGAUGCUG AUAAUGCC AGUA (配列 番号 551)	gugaugcugaUGA UGCUGAUAAU GCCAGUAaacua gcugca (配列番 号 575)	CUGAUAAU GCCAGUA (配列番号 599)	UACUGGCA UUAUCAGC AUCA (配列 番号 623)
28325	TET2	NM_001127208.2	2376	AGUCACAA AUGUACCA AGUU (配列 番号 552)	cuggagcacaAGU CACAAAUGUA CCAAGUUGaaau gaauca (配列番 号 576)	CAA AUGUA CCAAGUA (配列番号 600)	UACUUGGU ACAUUUGU GACU (配列 番号 624)
28326	TET2	NM_001127208.2	1613	AUGAAUGG UGCUUACU UCAA (配列 番号 553)	acaaaugaaAUG AAUGGUGCUU ACUUCAAgcaaa gcucag (配列番 号 577)	UGGUGCUU ACUUCAA (配列番号 601)	UUGAAGUA AGCACCAU UCAU (配列 番号 625)
28327	TET2	NM_001127208.2	768	UAAAACGC ACAGUUAG UGAA (配列 番号 554)	aauggaggaaUAA AACGCACAGU UAGUGAAccuu cucucuc (配列番 号 578)	CGCACAGU UAGUGAA (配列番号 602)	UUCACUAA CUGUGCGU UUUA (配列 番号 626)

10

20

30

40

【表 1 2 - 3】

28328	TET2	NM_001127208.2	1618	UGGUGCUU ACUUCAAG CAA (配列 番号 555)	augaaugaaUGG UGC UUACUUC AAGCAA (配列番号 603) aguguuc (配列 番号 579)	CUUACUUC AAGCAA (配列番号 603)	UUUGCUUG AAGUAAGC ACCA (配列 番号 627)
28329	TET2	NM_001127208.2	1620	GUGCUUAC UUCAAGCA AAGC (配列 番号 556)	gaaugaugGUG CUUACUUC GCAAAGCucag uguuac (配列 番号 580)	UACUUC GCAAAG (配列番号 604)	UCUUUGCU UGAAGUAA GCAC (配列 番号 628)
28330	TET2	NM_001127208.2	3314	CAGAAGGA CACUCAA AGCA (配列 番号 557)	gacccccCAG AAGGACACUC AAAAGCAugcu gcucuaa (配列 番号 581)	GGACACUC AAAAGCA (配列番号 605)	UGC UUUUG AGUGUCCU UCUG (配列 番号 629)
28331	TET2	NM_001127208.2	1184	UAUUAUCC AGAUUGUG UUUC (配列 番号 558)	acugucuaUAU UAUCCAGAUU GUGUUUCcauu gcggugc (配列 番号 582)	UCCAGAUU GUGUUUA (配列番号 606)	UAAACACA AUCUGGAU AAUA (配列 番号 630)
28332	TET2	NM_001127208.2	3318	AGGACACU CAAAGCA UGCU (配列 番号 559)	ccucccagaAGG ACACUCAA GCAUGCUgcuc uaaggug (配列 番号 583)	ACUAAAA GCAUGCA (配列番号 607)	UGCAUGCU UUUGAGUG UCCU (配列 番号 631)
28333	TET2	NM_001127208.2	1240	CAUUAACA GUCAGGCU ACUA (配列 番号 560)	acauaaugCAU UAACAGUCAG GCUACUAauga guugucc (配列 番号 584)	ACAGUCAG GCUACUA (配列番号 608)	UAGUAGCC UGACUGUU AAUG (配列 番号 632)
28334	TET2	NM_001127208.2	2580	UGUUGAAA CAGCACUU GAAU (配列 番号 561)	augucccagUGU UGAAACAGCA CUUGAAUcaaca ggcuuc (配列 番号 585)	AAACAGCA CUUGAAA (配列番号 609)	UUUCAAGU GCUGUUUC AACA (配列 番号 633)
28335	TET2	NM_001127208.2	2814	UUGGCCAG ACUAAAGU GGAA (配列 番号 562)	ggaucauucUUG GCCAGACUAA AGUGGAagaau guuuuca (配列 番号 586)	CAGACUAA AGUGGAA (配列番号 610)	UUCCACUU UAGUCUGG CCAA (配列 番号 634)

10

20

30

40

【表 1 2 - 4】

28336	TET2	NM_001127208.2	1579	UGGCAGCU CUGAACGG UAUU (配列 番号 563)	aagcuccuggUGG CAGCUCUGAA CGGUAUUuaaaa caaaa (配列番 号 587)	GCUCUGAA CGGUAUA (配列番号 611)	UAUACCGU UCAGAGCU GCCA (配列 番号 635)
28337	TET2	NM_001127208.2	3237	AAAGGUAC UUGAUACA UAAC (配列 番号 564)	cuugcucagcAAA GGUACUUGAU ACAUAACcaugc aaaugu (配列番 号 588)	UACUUGAU ACAUAAA (配列番号 612)	UUUAUGUA UCAAGUAC CUUU (配列 番号 636)
28338	TET2	NM_001127208.2	2993	AACAAUAC ACACCUAG UUUC (配列 番号 565)	uucuuguucaAAC AAUACACACC UAGUUUCagag aauaaag (配列番 号 589)	UACACACC UAGUUUA (配列番号 613)	UAAACUAG GUGUGUAU UGUU (配列 番号 637)
28339	TET2	NM_001127208.2	2631	ACUCACACC UUUUGCAA CAU (配列番 号 566)	ccauuuucaaACU CACACCUUUU GCAACAUaagcc ucauaa (配列番 号 590)	CACCUUUU GCAACAA (配列番号 614)	UUGUUGCA AAAGGUGU GAGU (配列 番号 638)
28340	TET2	NM_001127208.2	1874	CCUAAUCCA UCUACACA UGU (配列番 号 567)	uucccagaguCCU AAUCCAUCUA CACAUGUaugca gccccu (配列番 号 591)	UCCAUCUA CACAUGA (配列番号 615)	UCAUGUGU AGAUGGAU UAGG (配列 番号 639)

10

20

【0 3 3 1】

表 1 3

30

【表 1 3 - 1】

オリゴ ID	遺伝子	アクセッション番号	開始部位	配列	遺伝子領域	パッセンジャー配列	ガイド配列
28293	Tbox21	NM_013351.1	641	CACCUGUUG UGGUCCAAG UU (配列番号 640)	gcucaacaacCACC UGUUGUGGUC CAAGUUuaauca gcacc (配列番号 665)	GUUGUGGU CCAAGUA (配列番号 690)	UACUUGGA CCACAACAG GUG (配列番号 715)
28294	Tbox21	NM_013351.1	755	CACUACAGG AUGUUUGUG GA (配列番号 641)	gccaccagcCAC UACAGGAUGU UUGUGGAgug gucuugg (配列番号 666)	CAGGAUGU UUGUGGA (配列番号 691)	UCCACAAAC AUCCUGUA GUG (配列番号 716)
28295	Tbox21	NM_013351.1	2506	CUGAGAGUG GUGUCUGGA UA (配列番号 642)	auuuauuguaCUG AGAGUGGUGU CUGGAUAuuu ccuuug (配列番号 667)	AGUGGUGU CUGGAUA (配列番号 692)	UAUCCAGA CACCACUCU CAG (配列番号 717)
28296	Tbox21	NM_013351.1	1723	CUAUCCUUC CAGUGGUGA CA (配列番号 643)	gcgugucccCUA UCCUCCAGU GGUGACAgcuc cucccu (配列番号 668)	CUUCCAGU GGUGACA (配列番号 693)	UGUCCACC UGGAAGGA UAG (配列番号 718)
28297	Tbox21	NM_013351.1	1133	GCCGAGAUU ACUCAGCUG AA (配列番号 644)	cuaccagaauGCC GAGAUUACUC AGCUGAAuuu gauaaua (配列番号 669)	GAUUACUC AGCUGAA (配列番号 694)	UUCAGCUG AGUAAUCU CGGC (配列番号 719)
28298	Tbox21	NM_013351.1	1070	UCCAACACG CAUAUCUUU AC (配列番号 645)	cugcaacgcUCC AACACGCAUA UCUUUACuuuc caagaaa (配列番号 670)	CACGCAUA UCUUUAA (配列番号 695)	UUAAGAU AUGCGUGU UGGA (配列番号 720)
28299	Tbox21	NM_013351.1	1415	GUCAGCAUG AAGCCUGCA UU (配列番号 646)	guuucgagcaGUC AGCAUGAAGC CUGCAUUCuug cccucug (配列番号 671)	CAUGAAGC CUGCAUA (配列番号 696)	uAUGCAGGC UUAUGCU GAC (配列番号 721)
28300	Tbox21	NM_013351.1	1692	AAGGAGACU CUAAGAGGA GG (配列番号 647)	ggacugggcgAAG GAGACUCUAA GAGGAGGcgcg uguccc (配列番号 672)	GACUCUAA GAGGAGA (配列番号 697)	UCUCCUCU AGAGUCUC CUU (配列番号 722)

10

20

30

40

【表 1 3 - 2】

28301	Tbox21	NM_013351.1	2058	UUUACCUGG UGCUGCGUC UU (配列番号 648)	acuacagucgUUU ACCUGGUGCU GCGUCUUgcuu uugguuu (配列番 号 673)	CUGGUGCU GCGUCUA (配列番号 698)	UAGACGCA GCACCAGG UAAA (配列 番号 723)
28302	Tbox21	NM_013351.1	1019	CUGCAUAUC GUUGAGGUG AA (配列番号 649)	ccagccccggCUG CAUAUCGUUG AGGUGAAcgc ggagagc (配列番 号 674)	UAUCGUUG AGGUGAA (配列番号 699)	UUCACCUCA ACGAUAUG CAG (配列番 号 724)
28303	Tbox21	NM_013351.1	2196	CUUCCUUUG UACAGUAAC UU (配列番号 650)	acuccacuuuCUU CCUUUGUACA GUAACUucaac cuuuuc (配列番 号 675)	UUUGUACA GUAACUA (配列番号 700)	UAGUUACU GUACAAAG GAAG (配列 番号 725)
28304	Tbox21	NM_013351.1	1929	CUCUGUUUA GUAGUUGGU UG (配列番号 651)	ucugcccuuCUC UGUUUAGUAG UUGGUUGggga agugggg (配列番 号 676)	UUUAGUAG UUGGUUA (配列番号 701)	UAACCAAC UACUAAAC AGAG (配列 番号 726)
28305	Tbox21	NM_013351.1	1884	GAAACGGAU GAAGGACUG AG (配列番号 652)	acuaauuuggGAA ACGGAUGAAG GACUGAGaagg cccccgc (配列番 号 677)	GGAUGAAG GACUGAA (配列番号 702)	UUCAGUCC UUCAUCCG UUUC (配列 番号 727)
28306	Tbox21	NM_013351.1	1861	UUGGAGGAC ACCGACUAA UU (配列番号 653)	uguauuaggUUG GAGGACACCG ACUAAUuuggg aacgga (配列番 号 678)	GGACACCG ACUAAUA (配列番号 703)	UAUUAGUC GGUGUCCU CCAA (配列 番号 728)
28307	Tbox21	NM_013351.1	2202	UUGUACAGU AACUUUCAA CC (配列番号 654)	cuuucuuucuUUG UACAGUAACU UUCAACcuuu cguuggc (配列番 号 679)	CAGUAACU UUCAACA (配列番号 704)	UGUUGAAA GUUACUGU ACAA (配列 番号 729)
28308	Tbox21	NM_013351.1	976	CCAGAUGAU UGUGCUCCA GU (配列番号 655)	acaaugugacCCA GAUGAUUGUG CUCCAGUcccuc cauaag (配列番 号 680)	UGAUUGUG CUCCAGA (配列番号 705)	UCUGGAGC ACAAUCAU CUGG (配列 番号 730)

10

20

30

40

【表 1 3 - 3】

28309	Tbox21	NM_013351.1	1633	CUUGGUGUG GACUGAGAU UG (配列番号 656)	agggucccccCUU GGUGUGGACU GAGAUUGcccc auccgg (配列番 号 681)	UGUGGACU GAGAUUA (配列番号 706)	UAAUCUCA GUCCACACC AAG (配列番 号 731)
28310	Tbox21	NM_013351.1	2047	AACUACAGU CGUUUACCU GG (配列番号 657)	ccucugcccuAAC UACAGUCGUU UACCUGGugcu gcgucuu (配列番 号 682)	CAGUCGUU UACCUGA (配列番号 707)	UCAGGUAA ACGACUGU AGUU (配列 番号 732)
28311	Tbox21	NM_013351.1	2304	GAAAGGACU CACCUGACU UU (配列番号 658)	caggugcaggGAA AGGACUCACC UGACUUUggac agcuggc (配列番 号 683)	GACUCACC UGACUUA (配列番号 708)	UAAGUCAG GUGAGUCC UUUC (配列 番号 733)
28312	Tbox21	NM_013351.1	644	CUGUUGUGG UCCAAGUUU AA (配列番号 659)	caacaaccacCUGU UGUGGUCCAA GUUUUAucagca ccaga (配列番号 684)	GUGGUCCA AGUUUAA (配列番号 709)	UUAAACUU GGACCACA ACAG (配列 番号 734)
28313	Tbox21	NM_013351.1	653	UCCAAGUUU AAUCAGCAC CA (配列番号 660)	ccuguuguggUCC AAGUUUAAUC AGCACCAgacag agauga (配列番 号 685)	GUUUAAUC AGCACCA (配列番号 710)	UGGUGCUG AUUAAACU UGGA (配列 番号 735)
28314	Tbox21	NM_013351.1	767	UUUGUGGAC GUGGUCUUG GU (配列番号 661)	cuacaggaugUUU GUGGACGUGG UCUUGGUggac cagcacc (配列番 号 686)	GGACGUGG UCUUGGA (配列番号 711)	UCCAAGACC ACGUCCACA AA (配列番号 736)
28315	Tbox21	NM_013351.1	1205	UACACAUCU GUUGACACC AG (配列番号 662)	ugaguccaugUAC ACAUCUGUUG ACACCAGcaucc ccuccc (配列番 号 687)	AUCUGUUG ACACCAA (配列番号 712)	UUGGUGUC AACAGAUG UGUA (配列 番号 737)
28316	Tbox21	NM_013351.1	2259	GAACAAUA CACGUAUGU UA (配列番号 663)	gauccaaaaGAA CAAUACACG UAUGUUAuaac caucage (配列番 号 688)	AAUACACG UAUGUUA (配列番号 713)	UAACAUAC GUGUAUUU GUUC (配列 番号 738)
28115	AKT1	NM_005163.2	2625	UAUUGUGUA UUAUGUUGU UC (配列番号 664)	uaauuuguuUAU UGUGUAUUUAU GUUGUUCaaau gcuuu (配列番 号 689)	GUAUUAUG UUGUUCA (配列番号 714)	UGAACAAC AUAUAACA CAAU (配列 番号 739)

10

20

30

40

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

【 図 1 】

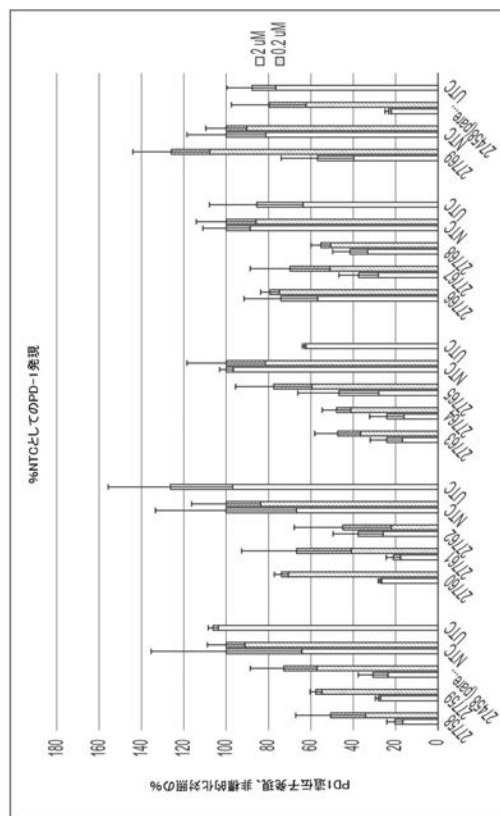


図 1

【 図 2 】

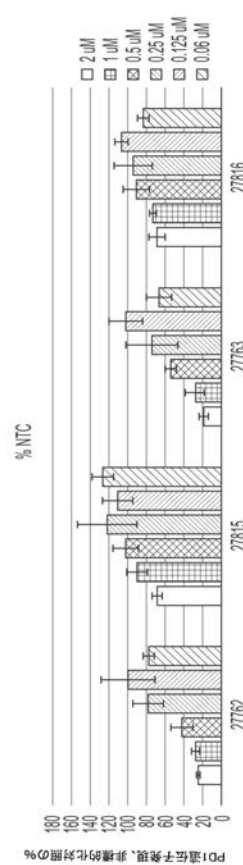


図 2

【図3】

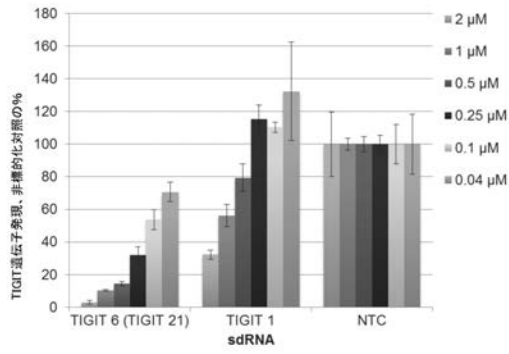


図 3

【図4】

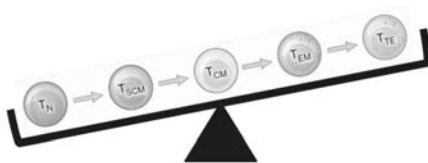


図 4

【図6】

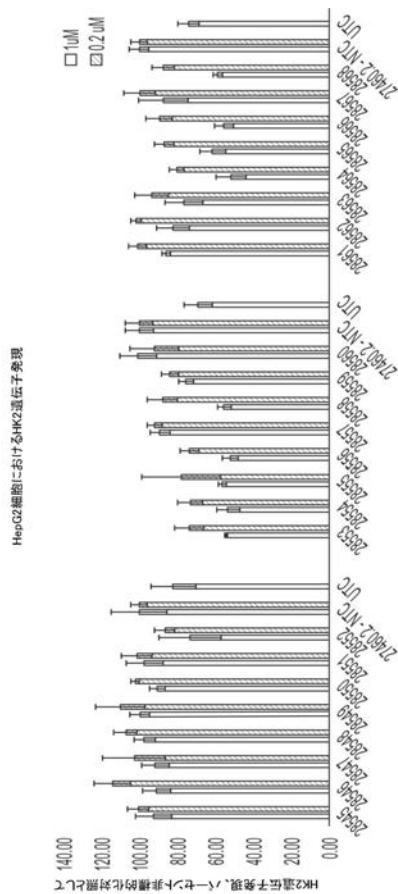


図 6

【図5】

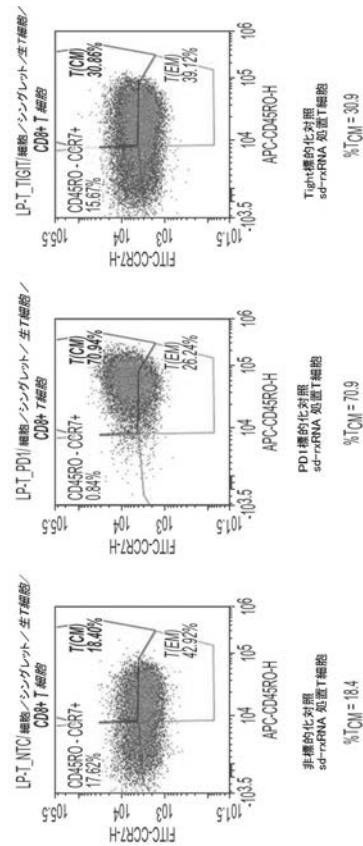


図 5

【図7】

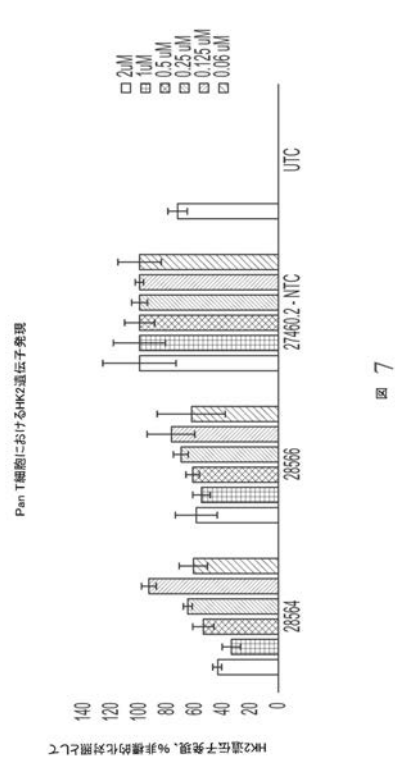


図 7

【図 8】

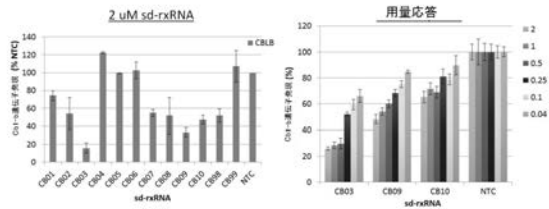


図 8

【図 9】

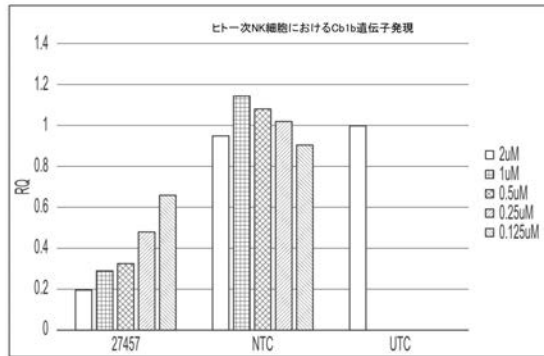


図 9

【図 11】

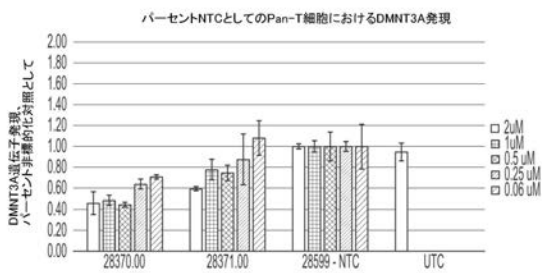


図 11

【図 10】

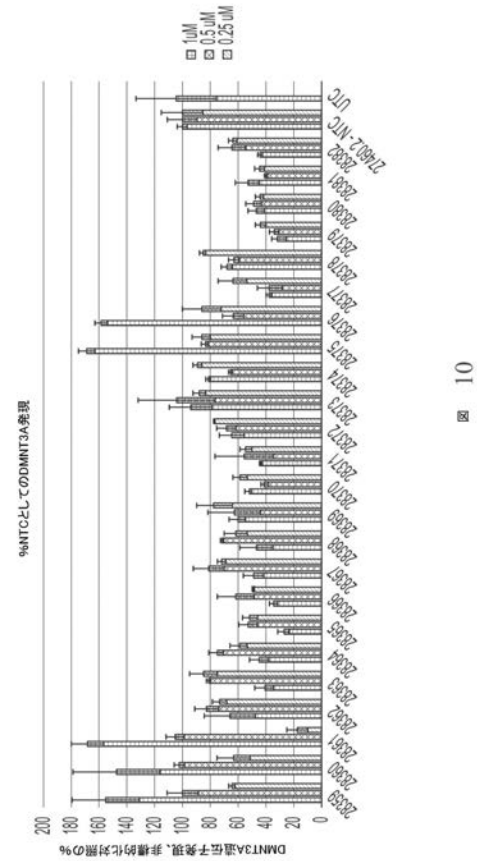


図 10

【図 12】

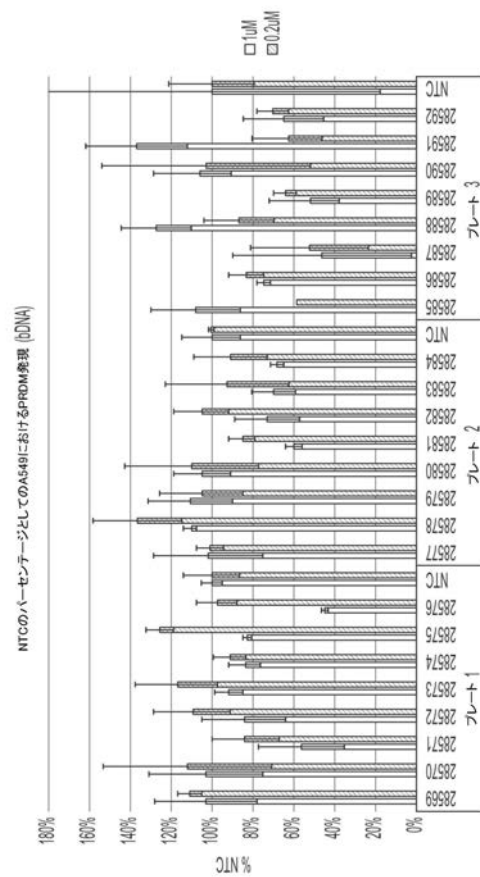


図 12

【図 1 3】

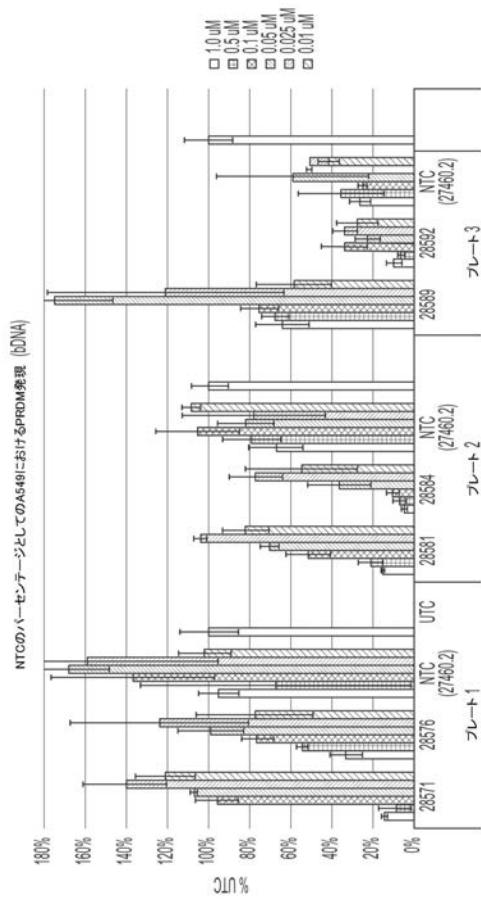


図 13

【図 1 4】

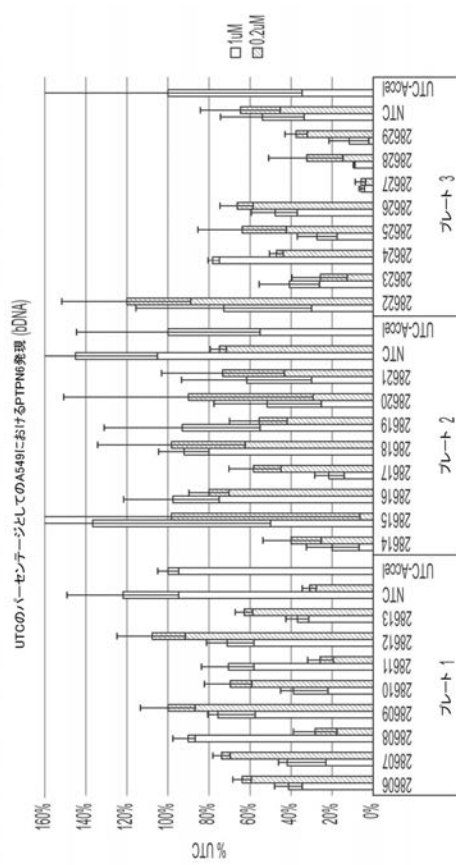


図 14

【図 1 5】

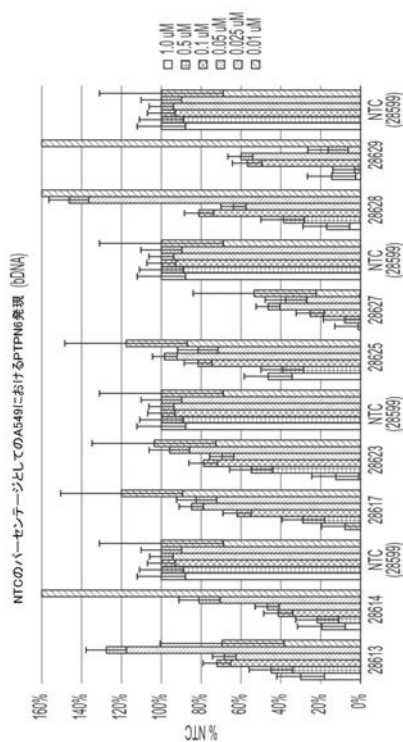


図 15

【図 1 6】

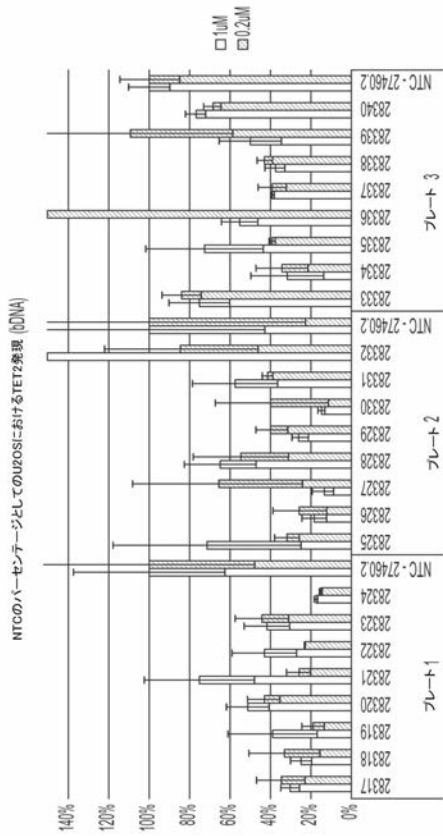


図 16

【図 17】

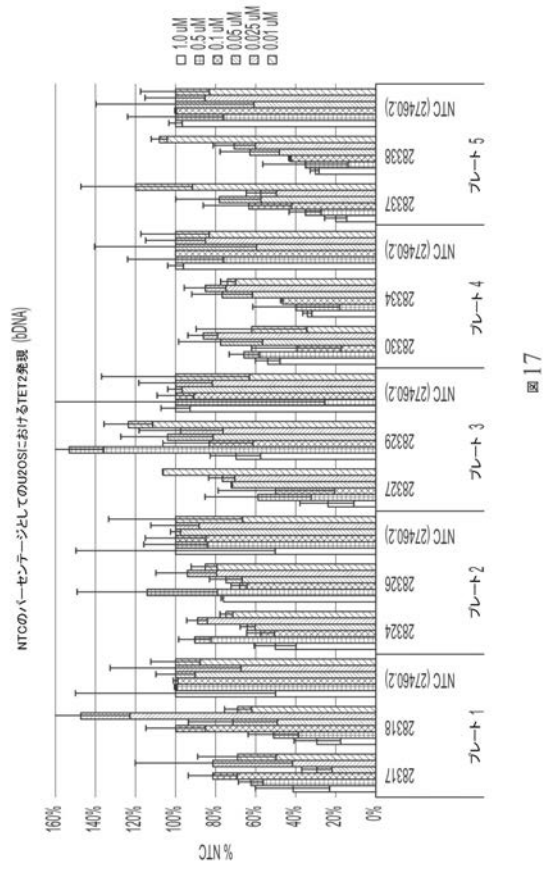


図 17

【図 18】

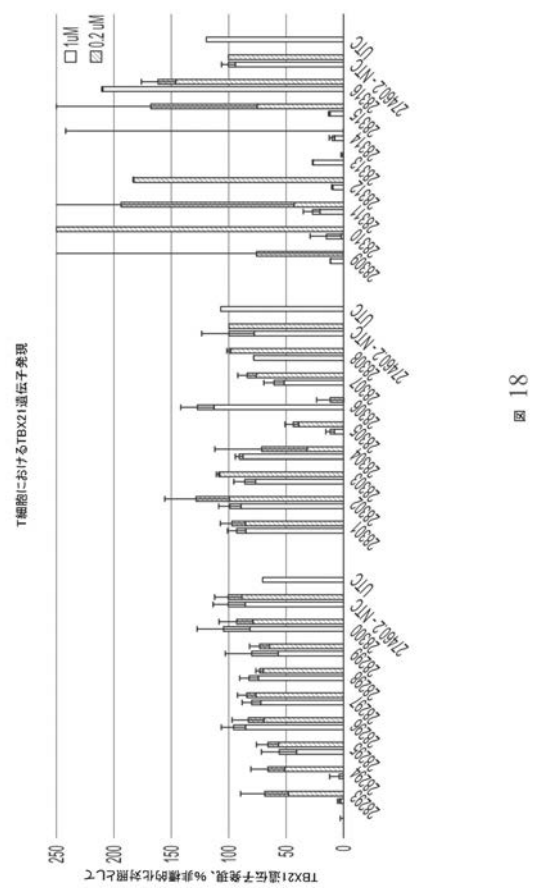


図 18

【図 19】

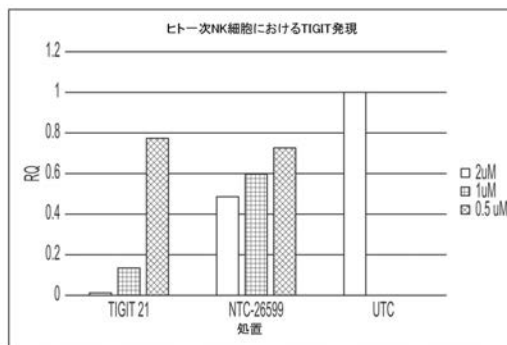


図 19

【図 20】

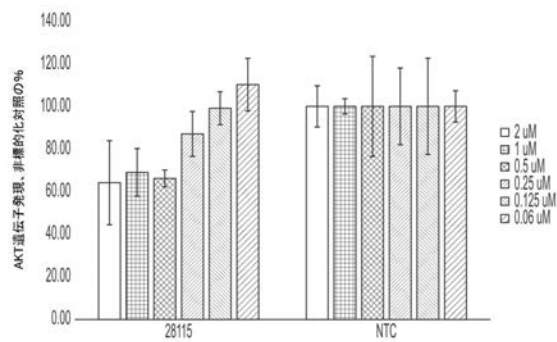


図 20

【配列表】

2020532955000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/045671

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/712; A61K 31/7125; A61K 31/713; C07H 21/02; C12N 15/11; C12N 15/113 (2018.01) CPC - A61K 31/713; C12N 15/111; C12N 15/113; C12N 2310/14; C12N 2310/321; C12N 2310/3521 (2018.08)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/375; 514/44A; 514/44R; 536/23.1; 536/24.5; 536/24.1 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0304873 A1 (MIRIMUNE INC.) 20 October 2016 (20.10.2016) entire document	19, 21
A	WO 2017/048824 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 23 March 2017 (23.03.2017) entire document	1-4, 19, 21, 40, 42
A	US 2005/0255487 A1 (KHVOROVA et al) 17 November 2005 (17.11.2005) entire document	1-4, 19, 21, 40, 42
A	US 2008/0293593 A1 (KHVOROVA et al) 27 November 2008 (27.11.2008) entire document	1-4, 19, 21, 40, 42
A	US 2012/0295819 A1 (LEAMON et al) 22 November 2012 (22.11.2012) entire document	1-4, 19, 21, 40, 42
A	US 2011/0294869 A1 (PETERSEN) 01 December 2011 (01.12.2011) entire document	1-4, 19, 21, 40, 42
A	US 2014/0364482 A1 (RXI PHARMACEUTICALS CORPORATION) 11 December 2014 (11.12.2014) entire document	1-4, 19, 21, 40, 42
A	US 2012/0065243 A1 (WOOLF et al) 15 March 2012 (15.03.2012) entire document	1-4, 19, 21, 40, 42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 December 2018		Date of mailing of the international search report 27 DEC 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenhaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/045671

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 8-17, 28-37, 100, 101, 112, 113, 236, 237, 248, and 249 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/045671

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-18, 24-28, 30-38, 43-45
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-4, 19, 21, 40 and 42 to the extent that they read on a double stranded nucleic acid molecule that is directed against a gene encoding TIGIT or Cbl-b, wherein the double stranded nucleic acid molecule consists of SEQ ID NO: 100 and SEQ ID NO: 101; or the double stranded nucleic acid molecule consists of SEQ ID NO: 236 and SEQ ID NO: 237.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/045671

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

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

Group I+: claims 1-6, 19-23, 29, and 40-42 are drawn to chemically-modified double stranded nucleic acid molecules, methods and compositions comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule, methods and compositions comprising the same, wherein the chemically-modified double stranded nucleic acid molecule comprises a sense strand of SEQ ID NO:100 and an antisense strand of SEQ ID NO:101; wherein the chemically-modified double stranded nucleic acid molecule is directed against a corresponding gene region of SEQ ID NO:85 of TIGIT. It is believed that claims 1-4, 19, 21, 40 and 42 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule of SEQ ID NO:100 and SEQ ID NO:101; and a target gene region of SEQ ID NO:85 of TIGIT.

Applicant is invited to elect additional chemically-modified double stranded nucleic acid molecules, each with specified SEQ ID NO for each sense and antisense strand, to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. An exemplary election would be a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule, methods and compositions comprising the same, wherein the chemically-modified double stranded nucleic acid molecule comprises a sense strand of SEQ ID NO:102 and an antisense strand of SEQ ID NO:103; wherein the chemically-modified double stranded nucleic acid molecule is directed against a corresponding gene region of SEQ ID NO:33 of PDCD1. Additional chemically-modified double stranded nucleic acid molecules will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

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

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for treating a subject suffering from a proliferative disease or infectious disease, requiring the selection of alternatives for the chemically-modified double stranded nucleic acid molecules and their corresponding target gene regions, where "[the] sd-rxRNA that is directed against a gene encoding TIGIT, PDCD1, AKT, P53, Cb1-b, Tat2, Blimp-1, T-Box21, DNMT3A, PTPN6, or HK2, wherein the sd-rxRNA comprises at least 12 contiguous nucleotides of a sequence selected from the sequences within Tables 3-13" and "the chemically-modified double stranded nucleic acid molecule is directed against a sequence comprising at least 12 contiguous nucleotides of a sequence selected from the sequences within Tables 3-13".

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features a chemically-modified double stranded nucleic acid sd-rxRNA that is directed against a gene, optionally wherein the chemically-modified double stranded nucleic acid molecule is directed against a sequence comprising at least 12 contiguous nucleotides of a sequence; an sd-rxRNA that is directed against a gene, wherein the sd-rxRNA comprises at least 12 contiguous nucleotides of a sequence; an immunogenic composition comprising a host cell which was treated ex vivo with a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule to control and/or reduce the level of differentiation of the host cell to enable the production of a specific immune cellular population for administration in a human; a method for producing an immunogenic composition, the method comprising introducing into a cell one or more chemically-modified double stranded nucleic acid molecules, thereby producing a host cell; an immunogenic composition comprising a host cell comprising a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule that is directed against a sequence comprising at least 12 contiguous nucleotides of a sequence; an immunogenic composition comprising a host cell comprising a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule that is directed against a sequence comprising at least 12 contiguous nucleotides of a sequence; these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2016/0304873 A1 to Mirimmune Inc. discloses a chemically-modified double stranded nucleic acid sd-rxRNA (Most preferably the oligonucleotide agent is a self-deliverable RNAi agent, which is a hydrophobically modified siRNA-antisense hybrid molecule, comprising a double-stranded region of about 13-22 base pairs... The oligonucleotide contains at least one 2'-O-Methyl modification, Para. [0046]) that is directed against a gene (by treating cells ex vivo with oligonucleotides to modulate expression of target genes involved in immune suppression mechanisms, Para. [0021]); an sd-rxRNA that is directed against a gene (Most preferably the oligonucleotide agent is a self-deliverable RNAi agent, which is a hydrophobically modified siRNA-antisense hybrid molecule, comprising a double-stranded region of about 13-22 base pairs... The oligonucleotide contains at least one 2'-O-Methyl modification, Para. [0046]; by treating cells ex vivo with oligonucleotides to modulate expression of target genes involved in immune suppression mechanisms, Para. [0021]), wherein the sd-rxRNA comprises at least 12 contiguous nucleotides of a sequence (Typically, the miRNA is at least about 15-50 nucleotides in length, Para. [0066]); an immunogenic composition comprising a host cell which was treated ex vivo with a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule (The immunogenic compositions described herein are useful for the treatment of proliferative disorders, including cancers, and/or infectious disease and are produced by the ex-vivo treatment of cells with oligonucleotides, Para. [0026]; Most preferably the oligonucleotide agent is a self-deliverable RNAi agent, which is a hydrophobically modified siRNA-antisense hybrid molecule, comprising a double-stranded region of about 13-22 base pairs... The oligonucleotide contains at least one 2'-O-Methyl modification, Para. [0046]; Immune cells may be engineered by transfection with plasmid, viral delivery vehicles, or mRNAs, Para. [0022]) to control and/or reduce the level of differentiation of the host cell to enable the production of a specific immune cellular population (sdRNA efficiently reduced surface expression of CTLA-4 and PD1 in activated Human Primary T cells, Para. [0133]; compositions comprising therapeutic cells obtained by treating cells ex vivo with oligonucleotides to modulate expression of target genes involved in immune suppression mechanisms, Para. [0021]; The obtained cells are treated directly as obtained or may be expanded in cell culture prior to treatment with oligonucleotides. The cells may also be genetically modified to

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/045671

express receptors that recognize specific antigens expressed on the tumor cell surface, Para. [0071]) for administration in a human (The invention includes a method of treating a cell proliferative disorder or infectious disease by administering to a subject in need thereof, Para. [0027]; with demonstrated silencing efficiency in humans, Para. [0079]); a method for producing an immunogenic composition (as well as methods of producing such therapeutic cells and methods of treating disease with the produced therapeutic cells, Para. [0019]; Various embodiments of the inventions disclosed herein include compositions comprising therapeutic cells, Para. [0021]), the method comprising introducing into a cell one or more chemically-modified double stranded nucleic acid molecules, thereby producing a host cell (cells treated with one or more oligonucleotide agent, wherein the cells comprise T-cells. The T-cells may be genetically engineered, for example, to express high affinity T-cell receptors, Para. [0055]; the self-deliverable RNAi technology provides a method of directly transfecting cells with the RNAi agent, without the need for additional formulations or techniques, Para. [0078]; an immunogenic composition comprising a host cell (The immunogenic compositions described herein are useful for the treatment of proliferative disorders, including cancers, and/or infectious disease and are produced by the ex-vivo treatment of cells with oligonucleotides, Para. [0026]; Most preferably the oligonucleotide agent is a self-deliverable RNAi agent, which is a hydrophobically modified siRNA-antisense hybrid molecule, comprising a double-stranded region of about 13-22 base pairs... The oligonucleotide contains at least one 2'-O-Methyl modification, Para. [0046]; Immune cells may be engineered by transfection with plasmid, viral delivery vehicles, or mRNAs, Para. [0022]) comprising a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule that is directed against a sequence comprising at least 12 contiguous nucleotides of a sequence (Most preferably the oligonucleotide agent is a self-deliverable RNAi agent, which is a hydrophobically modified siRNA-antisense hybrid molecule, comprising a double-stranded region of about 13-22 base pairs... The oligonucleotide contains at least one 2'-O-Methyl modification, Para. [0046]; by treating cells ex vivo with oligonucleotides to modulate expression of target genes involved in immune suppression mechanisms, Para. [0021]); an immunogenic composition comprising a host cell (The immunogenic compositions described herein are useful for the treatment of proliferative disorders, including cancers, and/or infectious disease and are produced by the ex-vivo treatment of cells with oligonucleotides, Para. [0026]; Most preferably the oligonucleotide agent is a self-deliverable RNAi agent, which is a hydrophobically modified siRNA-antisense hybrid molecule, comprising a double-stranded region of about 13-22 base pairs... The oligonucleotide contains at least one 2'-O-Methyl modification, Para. [0046]; Immune cells may be engineered by transfection with plasmid, viral delivery vehicles, or mRNAs, Para. [0022]) comprising a chemically-modified double stranded nucleic acid molecule that is directed against a sequence comprising at least 12 contiguous nucleotides of a sequence (Most preferably the oligonucleotide agent is a self-deliverable RNAi agent, which is a hydrophobically modified siRNA-antisense hybrid molecule, comprising a double-stranded region of about 13-22 base pairs... The oligonucleotide contains at least one 2'-O-Methyl modification, Para. [0046]; by treating cells ex vivo with oligonucleotides to modulate expression of target genes involved in immune suppression mechanisms, Para. [0021]).

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 0 7 H	21/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/113	1 1 0 Z	4 C 0 8 6	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	C 0 7 H	21/02		4 C 0 8 7	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/00			
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/04			
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/12			
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 P	33/00			
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/17	Z		
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/04			
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	48/00			
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	31/713			
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/54			
			C 1 2 N	15/12			

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA44
 4C057 BB02 DD03 MM02 MM05
 4C076 AA95 CC07 CC27 CC31 CC41 DD70 EE59
 4C084 AA13 NA14 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262 ZB311 ZB312 ZB331 ZB332
 ZB351 ZB352 ZB371 ZB372
 4C085 AA03 BA01 BB01 EE01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZB09
 ZB26 ZB31 ZB33 ZB35 ZB37
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 BB65 CA04 NA05 ZB09 ZB26 ZB31
 ZB33 ZB35 ZB37