

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6364009号
(P6364009)

(45) 発行日 平成30年7月25日 (2018. 7. 25)

(24) 登録日 平成30年7月6日 (2018. 7. 6)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)
 A 6 1 P 9/00 (2006. 01)
 A 6 1 P 27/16 (2006. 01)
 A 6 1 P 17/14 (2006. 01)
 A 6 1 P 13/12 (2006. 01)

C 1 2 N 15/113 1 1 O Z
 A 6 1 P 9/00 Z N A
 A 6 1 P 27/16
 A 6 1 P 17/14
 A 6 1 P 13/12

請求項の数 15 (全 118 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-531340 (P2015-531340)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月12日 (2013. 9. 12)
 (65) 公表番号 特表2015-535174 (P2015-535174A)
 (43) 公表日 平成27年12月10日 (2015. 12. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/059349
 (87) 国際公開番号 W02014/043292
 (87) 国際公開日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)
 審査請求日 平成28年9月9日 (2016. 9. 9)
 (31) 優先権主張番号 61/699, 884
 (32) 優先日 平成24年9月12日 (2012. 9. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509294070
 クォーク ファーマシューティカルズ インコーポレーティッド
 QUARK PHARMACEUTICALS, INC.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント ダンバートン サークル 6501
 6501 Dumbarton Circle, Fremont, California U. S. A.

(74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕

(74) 代理人 100179394
 弁理士 瀬田 あや子

最終頁に続く

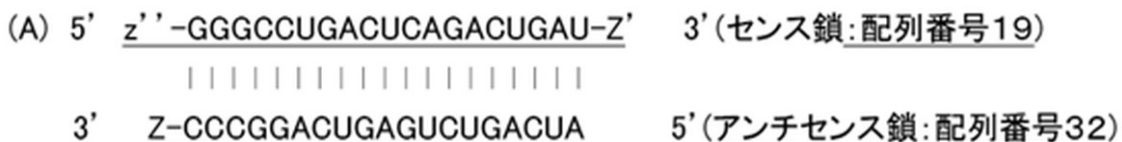
(54) 【発明の名称】 P 5 3 に対する二本鎖オリゴヌクレオチド分子、およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス鎖およびアンチセンス鎖を含有する二本鎖核酸分子であって、前記分子は以下の構造を含み：

【化 1】



ここで、A、C、G、Uのうちの任意の1つは、独立して、非修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、非修飾デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、または非従来の部分であり；

ここで、各「 」は、前記アンチセンス鎖と、前記センス鎖との間の対応する塩基対合を表し；

ここで、ZおよびZ'のそれぞれは独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の3'末端に共有結合された、1～5の連続的なヌクレオチド、1～5の連続的なヌクレオチドアナログ、もしくは1～5の連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、または結合部分であり；

ここで、z' z'は、存在しても、または存在しなくても良いが、もし存在する場合、前記センス鎖の5'末端に共有結合された、キャップ部分または結合部分であり；ならびに、

10

20

ここで、前記センス鎖の配列は、前記アンチセンス鎖の配列に対して相補的である（ただし、各ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドではない場合に限る）、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩であって、前記修飾リボヌクレオチドは、糖部分の 2' 位に修飾を含有し、特に、前記修飾リボヌクレオチドは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであるか；および / または、

前記非従来の部分は、鏡映ヌクレオチド、トレース核酸 (TNA)、ピラゾロトリアジン (PT) ヌクレオチドアナログ、および 2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたリボヌクレオチドからなる群から選択される、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩であって、

Z または Z' のうち 1 つ、または、両方が存在する、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩であって、Z および Z' のそれぞれが、1 ~ 2 の連続的な非ヌクレオチド部分である、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩であって、各非ヌクレオチド部分が、リン酸化されていても、またはリン酸化されていなくても良い、1, 3 - プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C3) であり、特に、Z が、リン酸化されていても、またはリン酸化されていなくても良い、1 つの C3 非ヌクレオチド部分 (C3) であり；および、ここで、Z' は、リン酸化されていても、またはリン酸化されていなくても良い、2 つの連続的な C3 非ヌクレオチド部分 (C3 - C3) である、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 6】

以下のセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する、請求項 1 に記載の分子であって：

【化 2】

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号19)
5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号32)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；
ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；
ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたリボヌクレオチド (5' > 3') であり；
ここで、前記アンチセンス鎖および前記センス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
ここで、前記センス鎖は、前記鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
ここで、前記センス鎖は、前記鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップ z' を含有し；
ここで、前記アンチセンス鎖は、前記鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、前記センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (p i) ; 分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の分子であって、前記センス鎖の 5' 末端に共有結合された前記 5' キャップは、1, 3 - プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C 3) であり; および、前記アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており (p h o s)、および、3' 末端の前記オーバーハングはリン酸化されている (- C 3 - C 3 - p i) ; 分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩であって、前記アンチセンス鎖において、前記鎖の 3' 末端に共有結合された前記 C 3 - C 3 非ヌクレオチドオーバーハングは、リン酸化されている (- C 3 - C 3 - p i)、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩であって、

前記 5' キャップ z' ' が存在し、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、逆位デオキシリボース部分、逆位デオキシ脱塩基部分 (i d A b)、アミノ - C 6 部分 (A M - c 6)、C 6 - アミノ - P i、非ヌクレオチド部分、特に、1, 3 - プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C 3)、鏡映ヌクレオチド、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 2 - ナフタレン酪酸ホスホジエステル (T H N B)、および、ビタミン部分または薬剤部分のような結合部分からなる群から選択される、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の分子、またはそのような分子の薬学的に受容可能な塩; および、薬学的に受容可能な担体を含む、組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩、もしくは、請求項 10 に記載の組成物であって、

p 5 3 の発現と関連した疾患または障害に罹患している対象を治療するための方法において使用され、

前記方法は、前記分子または組成物を、p 5 3 発現の下方制御に十分な量で前記対象へと投与することを含む、分子または組成物。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の使用のための分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩、もしくは組成物であって、

前記疾患または障害が、虚血再灌流傷害、難聴、聴覚障害、平衡障害、聴覚損失、化学療法誘発性脱毛症、放射線治療誘発性脱毛症、急性腎不全、急性腎障害、慢性腎疾患 (C K D)、抗癌剤療法に関連した副作用、腎移植患者における臓器移植後臓器機能障害 (D G F)、脊髄損傷、脳損傷、てんかん発作 (s e i z u r e)、脳卒中、神経変性疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、腫瘍、やけど、外傷、高熱、低酸素症、虚血、臓器移植、骨髄移植 (B M T)、心筋梗塞 / 心臓発作、心臓毒性、p 5 3 陽性癌および急性肝不全からなる群から選択される、分子、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩、もしくは組成物。

【請求項 13】

対象の p 5 3 陽性癌の治療における使用のための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の分子もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩、または、そのような分子を含む組成物もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩を含む組成物であって、

10

20

30

40

50

ここで、前記分子もしくはそのような分子の前記薬学的に受容可能な塩、または、そのような分子を含有する前記組成物もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩を含有する前記組成物は、p 5 3 遺伝子発現の下方制御に十分な量で投与され、および、それによって、前記対象において、p 5 3 陽性癌が化学療法に対して感受性となる、

分子もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩、または、そのような分子を含有する組成物もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物。

【請求項 1 4】

造血前駆細胞の増大、または造血刺激における使用のための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の分子もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩、または、そのような分子を含有する組成物もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物

10

【請求項 1 5】

p 5 3 ヌル造血幹細胞 (HSC) のホーミングにおける使用のための、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の分子もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩、または、そのような分子を含有する組成物もしくはそのような分子の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願

本出願は、「p 5 3 に対する二本鎖オリゴヌクレオチド分子およびその使用方法」という発明の名称の米国仮特許出願第 6 1 / 6 9 9 , 8 8 5 号 (2 0 1 2 年 9 月 1 2 日出願。全ての目的に対し、その全体が、参照により本明細書に援用される) の優先権を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、「2 4 7 - P C T 1 _ _ S T 2 5 . t x t」という名称のファイル (サイズは 2 9 キロバイトであり、MS - ウィンドウズと互換性のある操作システムを有する IBM - P C 機器のフォーマットで 2 0 1 3 年 9 月 3 日に作成され、本明細書と共に提出された) に存在する、ヌクレオチド配列および / またはアミノ酸配列を参照により援用する。

30

【0003】

技術分野

本出願は、p 5 3 遺伝子を下方制御するための核酸分子、同核酸分子を含有する医薬組成物、およびそれらの使用方法に関する。本明細書に開示される化合物および組成物は、p 5 3 遺伝子の発現に関連する疾患または障害に罹患している対象、または、p 5 3 遺伝子の発現に関連する疾患または障害の発現のリスクを有する対象の治療に有用である。そのような疾患 / 障害の例としては、限定されないが、虚血再灌流傷害、難聴、聴覚障害、平衡障害、聴覚損失、化学療法誘発性脱毛症 (脱毛) 、放射線治療誘発性脱毛症、急性腎不全、急性腎障害、慢性腎疾患 (CKD) 、抗癌剤療法に関連した副作用、腎移植患者における臓器移植後臓器機能障害 (DGF) 、脊髄損傷、脳損傷、てんかん発作 (s e i z u r e) 、脳卒中、神経変性疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、腫瘍、やけど、外傷、高熱、低酸素症、虚血、臓器移植、心筋梗塞 / 心臓発作、心臓毒性および急性肝不全が挙げられる。

40

【背景技術】

【0004】

s i RNA および RNA 干渉

RNA 干渉 (RNA i) は、二本鎖 (ds) RNA 依存性の遺伝子特異的な転写後サイレンシングに関連する現象である。米国特許出願第 1 3 / 5 0 8 , 4 9 3 号、米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 0 6 9 0 5 6 号、同第 2 0 1 0 0 0 2 9 7 4 6 号、同第 2 0 1 0 0 2

50

22409号、同第20110142917号、同第20120184597号、同第20120141378号および米国特許第7,825,099号、同第7,842,674号、同第7,910,566号、同第8,148,342号(すべて、本出願の譲受人に帰属する)は、p53遺伝子の下方制御に有用な二本鎖RNA化合物および組成物に関連し、ならびに、p53遺伝子の発現に関連する疾患または障害に罹患している患者、または、p53遺伝子の発現に関連する疾患または障害を発現するリスクのある患者を治療するための、そのような化合物および組成物の使用に関する。

【0005】

米国特許第6,982,277号、同第7,008,956号、同第7,012,087号(イリノイ大学評議会が譲受人となっている)は、細胞に影響を与えているストレス誘導性の事象から回復するために十分な時間の間、宿主正常細胞が可逆的にp53を阻害する方法、可逆的なp53阻害物質の治療有効量を、癌療法と併用してその必要のある哺乳類に対し投与することを含む、癌療法に関連した脱毛を減少させる方法;および、細胞に影響を与えるストレス誘導性事象に起因する、中枢神経系における哺乳類の細胞死を減少させる方法に関連し、当該方法には、p53活性を可逆的に阻害するために、p53一過性阻害物質の治療有効量を哺乳類に投与することが含まれている。

10

【0006】

米国特許出願公開第2010/0292301号および同第2011/0112168号、ならびに、PCT国際特許出願公開第2011/066475号、同第2011/084193号、同第2011/085056号および同第2012/078536号(本発明の譲受人に帰属し、参照により、その全体が本明細書に援用される)は、dsRNA分子の作製に有用な、核酸配列および修飾を開示する。

20

【0007】

米国特許出願公開第2011/0142917号、同第2011/0229557号及び同第2012/0141378号(本発明の譲受人に帰属し、参照により、その全体が本明細書に援用される)は、p53遺伝子を標的とする二本鎖RNA化合物の組成物および使用方法を開示する。

【0008】

p53遺伝子の発現に関連する状態、疾患もしくは障害の治療、または軽減に有用であり、非修飾dsRNAのカウンターパートと比較した場合に、生体利用効率の増加、生体内分布の改善、血清循環時間の増加、血清安定性の増加、血清クリアランスの減少、細胞取込の改善、標的外活性の減少、免疫原性の減少、エンドソーム放出の改善、標的組織または細胞への特異的送達の改善、および、ノックダウン活性の増加、を示す、分子、組成物、方法およびキットが必要とされている。

30

【発明の概要】

【0009】

p53遺伝子の発現を下方制御するための核酸分子、ならびに、同核酸分子を含有する組成物およびキット、ならびに、それらを使用する方法が、本明細書において開示される。当該組成物、方法、およびキットは、p53をコードするヌクレオチド配列(たとえば、mRNA配列)(たとえば、1以上のタンパク質またはタンパク質サブユニットをコードする、ヒトp53に対するmRNAコード配列(図1~7の配列番号1~7))またはその一部に結合する核酸分子(たとえば、低分子干渉核酸(sRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、または低分子ヘアピン型RNA(shRNA)等)の使用を含んでも良い。ある好ましい実施形態において、本明細書に開示される分子、組成物、方法およびキットは、p53遺伝子の発現を下方制御、またはp53の発現を阻害する。様々な実施形態において、核酸分子は、非修飾dsRNAまたは化学的に修飾されたdsRNA(たとえば、p53遺伝子の発現を下方制御するsiRNAまたはshRNA等)からなる群から選択される。

40

【0010】

一部の実施形態において、核酸分子は、p53の発現を下方制御する、合成された、非

50

修飾二本鎖RNA (dsRNA) 化合物である。

【0011】

一部の好ましい実施形態において、核酸分子は、p53の発現を下方制御する、合成された、化学修飾二本鎖RNA (dsRNA) 化合物である。ある好ましい実施形態において、「p53」とは、ヒトp53遺伝子を指す。ある好ましい実施形態において、「標的遺伝子」とは、ヒトp53遺伝子を指す。

【0012】

本明細書において提供される、化学的に修飾された核酸分子および組成物は、非修飾の対応核酸分子と比較して、血清安定性の増加、細胞取込の改善、標的外活性の減少、免疫原性の減少、エンドソーム放出の改善、標的組織または細胞への特異的送達の改善、およびノックダウン/下方制御活性の増加のうちの少なくとも1つを含む、有益な特性を示す。

10

【0013】

本明細書において、障害、疾患、損傷もしくは状態の発生または重篤度を治療または予防するための方法であって、その必要のある対象において治療または予防するための方法がさらに開示され、ここで、それらに関連する当該疾患または状態および/または症状または病態は、p53遺伝子の発現と関連している。一部の実施形態において、そのような障害、疾患、損傷、状態または病態は、内耳の障害、疾患、損傷、状態または病態；腎臓の障害、疾患、損傷、状態または病態；中枢神経系(CNS)の障害、疾患、損傷、状態または病態；心臓の障害、疾患、損傷、状態または病態；肝臓の障害、疾患、損傷、状態または病態；心臓の障害、疾患、損傷、状態または病態；臓器移植患者に影響を与える障害、疾患、損傷、状態または病態；抗癌療法を受けている患者が経験する障害、疾患、損傷、状態または病態、を含む群から選択される。一部の実施形態において、そのような障害、疾患、損傷、状態または病態は、虚血再灌流傷害、難聴、聴覚障害、平衡障害、聴覚損失、化学療法誘発性脱毛症(脱毛)、放射線治療誘発性脱毛症、急性腎不全、急性腎障害、慢性腎疾患(CKD)、抗癌剤療法に関連した副作用、腎移植患者における臓器移植後臓器機能障害(DGF)、脊髄損傷、脳損傷、てんかん発作(seizure)、脳卒中、パーキンソン病、アルツハイマー病、腫瘍、やけど、外傷、高熱、低酸素症、虚血、臓器移植、心筋梗塞/心臓発作、心臓毒性および急性肝不全を含む群から選択される。

20

【0014】

特定の実施形態において、p53を標的とする化学的に修飾されたdsRNA化合物、同化合物を含有する組成物およびキット、ならびに、アポトーシス(細胞のアポトーシス性の(プログラム化された)死である)に関与する状態または病態の治療における、それらの使用方法が提供される。治療される他の状態としては、p53発現が有害である任意の状態が挙げられ、および、本明細書に提供される化合物および組成物で治療される任意の状態が挙げられる。

30

【0015】

1つの態様において、本明細書において、p53遺伝子を標的とし、下方制御する核酸化合物の作製に有用なオリゴヌクレオチド配列(配列番号8~33)が提供される。

【0016】

別の態様において、p53遺伝子を標的とし、下方制御する核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。一部の好ましい実施形態において、本明細書に開示される核酸分子は、二本鎖構造を有する。一部の実施形態において、核酸化合物は、二本鎖構造を有し、および、各鎖のそれぞれは、以下の表1に記述される配列から選択されるオリゴヌクレオチド配列(配列番号8~33)を含有する。二本鎖構造を有する核酸化合物の一部の実施形態において、当該鎖の一方のオリゴヌクレオチド配列は、配列番号8~20のうちの1つから選択され、もう一方の鎖のオリゴヌクレオチド配列は、配列番号21~33のうちの1つから選択される。

40

【0017】

一部の実施形態において、(a)核酸分子は、センス鎖および相補的なアンチセンス鎖

50

を含有する二本鎖である；（b）核酸分子の各鎖は、19ヌクレオチドの長さである；（c）アンチセンス鎖の19ヌクレオチド配列は、哺乳類p53をコードするmRNAの連続配列（たとえば、配列番号1～7）またはその一部に対し相補的である；および、（d）センス鎖およびアンチセンス鎖は、以下の表1に記述されるオリゴヌクレオチド配列（配列番号8～33）から選択される、二本鎖構造を有する、核酸分子または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩が開示される。

表1．p53を標的とする核酸化合物のために選択されたセンス鎖オリゴヌクレオチド配列およびアンチセンス鎖オリゴヌクレオチド配列

【表1】

配列番号	センス鎖(5'>3')	配列番号	アンチセンス鎖(5'>3')
8	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
9	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAA 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
10	5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3'	23	5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
11	5' GGGUUGGUAGUUUCUACAA 3'	24	5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3'
12	5' GGGAUGUUUGGAGAUGUA 3'	25	5' UACAUCUCCCAAACAUC 3'
13	5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3'	26	5' UACAAGUCUUGGUGGAUC 3'
14	5' GAGGAUGUUUGGAGAU 3'	27	5' UAUCUCCCAAACAUC 3'
15	5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
16	5' GACUCAGACUGACAUUCU 3'	29	5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
17	5' GCAUUUGCACCUACCUCAA 3'	30	5' UUGAGGUAGGUGCAAUGC 3'
18	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAU 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	32	5' AUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	33	5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
34	5' CCGAGUGGAAGGAAAUUUG 3'	35	5' CAAAUUCCUCCACUCGG 3'
36	5' GAGAAUUAUUCACCCUUC 3'	37	5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3'

表1に記載される全ての位置は、センス鎖上およびアンチセンス鎖上で、5'>3'である。

【0018】

別の実施形態において、（a）核酸分子は、センス鎖および相補的なアンチセンス鎖を含有する二本鎖である；（b）核酸分子の各鎖は、19ヌクレオチドの長さである；（c）アンチセンス鎖の19ヌクレオチド配列は、哺乳類p53をコードするmRNAの連続配列（たとえば、配列番号1～7）またはその一部に対し相補的である；および、（d）センス鎖およびアンチセンス鎖は、以下の表2に記述される配列のペアを含有する、核酸化合物（たとえば、dsRNA分子）またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

表2．p53を標的とする二本鎖核酸化合物を作製するために選択されたセンス鎖およびアンチセンス鎖のペア

【表 2】

ペアの名称	配列番号	センス鎖(5'>3')	配列番号	アンチセンス鎖(5'>3')
p53_13	8	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
p53_34	9	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAA 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
	9	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAA 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_35	10	5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3'	23	5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
p53_36	11	5' GGGUUGGUAGUUUCUACAA 3'	24	5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3'
p53_37	12	5' GGAUGUUUGGAGAUGUA 3'	25	5' UACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_38	13	5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3'	26	5' UACAAGUCUUGGUGGAUC 3'
p53_39	14	5' GAGGAUGUUUGGAGAUA 3'	27	5' UAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_40	15	5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
p53_41	16	5' GACUCAGACUGACAUUCU 3'	29	5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3'
p53_42	17	5' GCAUUUGCACCUACCUCAA 3'	30	5' UUGAGGUAGGUGCAAUGC 3'
p53_43	18	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAU 3'	31	5' AUACAUCUCCCAAACAUC 3'
	18	5' GGAUGUUUGGAGAUGUAU 3'	22	5' UUACAUCUCCCAAACAUC 3'
p53_44	19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	32	5' AUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
	19	5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3'	28	5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3'
p53_45	20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	33	5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'
	20	5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3'	21	5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3'

表 2 に記載される全ての位置は、センス鎖上およびアンチセンス鎖上で、5'>3'である。

【0019】

本明細書に開示される二本鎖核酸分子の好ましい実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、センス鎖配列番号 16 およびアンチセンス鎖配列番号 29、センス鎖配列番号 19 およびアンチセンス鎖配列番号 32、ならびに、センス鎖配列番号 19 およびアンチセンス鎖配列番号 28、からなる群から選択される。

【0020】

本明細書に開示される核酸分子は、好ましくは、非修飾の対応 dsRNA 化合物と比較した場合に、活性を増加させる、安定性を増加させる、および/または、毒性を最小限化させる、修飾を保有する二本鎖核酸分子である。これらの分子は、標的器官への核酸の送達をもたらす薬学的ビヒクルと混合された場合に、p53 遺伝子に関連した様々な障

害の治療に有用で、効果的で、安全で、患者の服薬コンプライアンスが良い治療化合物となる。核酸化合物は、p 5 3 遺伝子発現を下方制御し、p 5 3 遺伝子の機能を減弱させるよう設計される。様々な実施形態において、p 5 3 遺伝子は、配列番号 1 ~ 7 に記述される m R N A ポリヌクレオチドのうちの任意の 1 つへと転写される、ヒト p 5 3 遺伝子である。

【 0 0 2 1 】

1 つの実施形態において、以下に記述される構造 (A) を有する修飾核酸分子が提供され：

(A) 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNN-Z 3' (アンチセンス鎖)

10

3' Z'-NNNNNNNNNNNNNNNNN-z" 5' (センス鎖)

ここで、各 N は、独立して、A、C、G、U のうちの任意の 1 つであり、および、独立して、非修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、または非従来の部分であり；ここで、各「」は、アンチセンス鎖の各 N と、センス鎖の対応する N の間の塩基対合を表し；

ここで、Z および Z' のそれぞれは独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の 3' 末端に共有結合された、1 ~ 5 の連続的なヌクレオチド、1 ~ 5 の連続的なヌクレオチドアナログ、もしくは 1 ~ 5 の連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、または結合部分であり；

ここで、z' は、存在しても、または存在しなくても良いが、もし存在する場合、センス鎖の 5' 末端に共有結合された、キャップ部分または結合部分であり；ならびに、ここで、センス鎖の配列は、アンチセンス鎖の配列に対して相補的である（ただし、各 N および N' が非従来の部分ではない場合に限る）。

20

【 0 0 2 2 】

1 つの実施形態において、以下に記述される構造 (A 1) を有する修飾核酸分子が提供され：

(A 1) 5' (N) x - Z 3' (アンチセンス鎖)
3' Z' - (N') y - z' 5' (センス鎖)

ここで、N および N' のそれぞれは、独立して、非修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、または非従来の部分でありうるリボヌクレオチドであり；

30

ここで、(N) x および (N') y のそれぞれは、各連続的な N または N' が、共有結合により隣接する N または N' に結合されているオリゴヌクレオチドであり；

ここで、Z および Z' のそれぞれは独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の 3' 末端に共有結合された、1 ~ 5 の連続的なヌクレオチド、1 ~ 5 の連続的なヌクレオチドアナログ、もしくは 1 ~ 5 の連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、または結合部分であり；

ここで、z' は、存在しても、または存在しなくても良いが、もし存在する場合、(N') y の 5' 末端に共有結合された、キャップ部分または結合部分であり；

ここで、x および y のそれぞれは、独立して、1 ~ 40 の間の整数であり；

ここで、(N') y の配列は、(N) x の配列に対して相補的であり；ならびに、

40

ここで、(N) x は、アンチセンス配列を含有し、(N') y は、センス配列を含有する（ただし、各 N および N' が非従来の部分ではない場合に限る）。

【 0 0 2 3 】

構造 (A 1) の様々な実施形態において、x = y である。構造 (A 1) の好ましい実施形態において、x = y = 19 である。

【 0 0 2 4 】

1 つの実施形態において、以下に記述される構造 (A 2) を有する修飾核酸分子が提供され：

(A 2) 5' N1 - (N) x - Z 3' (アンチセンス鎖)
3' Z' - N2 - (N') y - z' 5' (センス鎖)

50

ここで、 $N1$ 、 $N2$ 、 N および N' のそれぞれは、独立して、非修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、または非従来の部分であり；

ここで、 $(N)x$ および $(N')y$ のそれぞれは、各連続的な N または N' が、共有結合により隣接する N または N' に結合されているオリゴヌクレオチドであり；

ここで、 x および y のそれぞれは、独立して、 $17 \sim 39$ の間の整数であり；

ここで、 $N2$ は、 $(N')y$ に共有結合されており；

ここで、 $N1$ は、 $(N)x$ に共有結合されており、および、標的RNA（配列番号1～7）に対して不適合であり、または、標的RNAに対して相補的な相補的DNA部分であり；

ここで、 $N1$ は、天然型ウリジン、修飾された：ウリジン、デオキシリボウリジン、リボチミジン、デオキシリボチミジン、天然型アデノシン、修飾アデノシン、デオキシアデノシン、アデノシンピラゾロトリアジン核酸アナログ、デオキシアデノシンピラゾロトリアジン核酸アナログ、脱塩基リボース部分、および脱塩基デオキシリボース部分からなる群から選択される部分であり；

ここで、 z' は、存在しても、または存在しなくても良いが、もし存在する場合、 $N2 - (N')y$ の5'末端に共有結合された、キャップ部分、ビタミンまたは薬剤部分であり；

ここで、 Z および Z' のそれぞれは独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の3'末端に共有結合された、1～5の連続的なヌクレオチド、1～5の連続的なヌクレオチドアナログ、1～5の連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、結合部分であり；

ここで、 $(N')y$ の配列は、 $(N)x$ の配列に対して相補的であり；

ここで、 $(N)x$ の配列の少なくとも一部は、標的RNA中の連続的な配列に対して相補的であり；ならびに、

ここで、 $N1 - (N)x$ の配列は、アンチセンス配列を含有し、 $N2 - (N')y$ は、センス配列を含有する（ただし、各 N および N' が非従来の部分ではない場合に限る）。

【0025】

構造(A2)の様々な実施形態において、 $x = y$ である。構造(A2)の好ましい実施形態において、 $x = y = 18$ である。

【0026】

構造(A)、(A1)および(A2)の好ましい実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、センス鎖配列番号16およびアンチセンス鎖配列番号29、センス鎖配列番号19およびアンチセンス鎖配列番号32、ならびに、センス鎖配列番号19およびアンチセンス鎖配列番号28からなる群から選択される。

【0027】

構造(A)、(A1)および(A2)の様々な実施形態において、修飾リボヌクレオチドは、糖部分の2'の位置で修飾を含有する。一部の好ましい実施形態において、修飾リボヌクレオチドは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドである。

【0028】

構造(A)、(A1)および(A2)の様々な実施形態において、非従来の部分は、鏡映ヌクレオチド、非修飾デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、トレース核酸(TNA)、ヌクレオチドアナログおよび、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド(5'>3')からなる群から選択される。一部の好ましい実施形態において、ヌクレオチドアナログは、ピラゾロトリアジン(PT)ヌクレオチドアナログである。一部の好ましい実施形態において、非従来の部分は、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド(5'>3')である。

【0029】

構造(A)、(A1)および(A2)の様々な実施形態において、 Z または Z' の両方が存在しない。一部の実施形態において、 Z または Z' のうちの少なくとも1つは存在す

10

20

30

40

50

る。一部の実施形態において、ZおよびZ'の両方が存在する。一部の実施形態において、ZおよびZ'の両方が存在し、ZおよびZ'の両方は、1～5の連続的なヌクレオチドである。一部の実施形態において、ZおよびZ'の両方が存在し、ZおよびZ'の両方は、2つの連続的なヌクレオチドである。一部の実施形態において、ZおよびZ'の両方が存在し、ZおよびZ'の両方は、2つの連続的なヌクレオチドであり、各ヌクレオチドは、dTであり、ZおよびZ'のそれぞれは、2つの連続的なヌクレオチド(dTdT)を含有する。一部の実施形態において、ZおよびZ'の両方が存在し、ZおよびZ'のそれぞれは、1～5の連続的な非ヌクレオチド部分である。一部の実施形態において、ZおよびZ'の両方が存在し、ZおよびZ'のそれぞれは、1～2の連続的な非ヌクレオチド部分である。一部の好ましい実施形態において、各非ヌクレオチド部分は、1, 3 - プロパンジオール, モノ(リン酸二水素)(C3)[CASN: 13507-42-1]である。一部の好ましい実施形態において、ZおよびZ'の両方が存在し、Zは、1つのC3非ヌクレオチド部分(C3)であり、Z'は2つの連続的なC3非ヌクレオチド部分(C3-C3)である。

10

【0030】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、z'は存在しない。構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、z'は存在する。構造(A)、(A1)および(A2)の様々な実施形態において、z'は存在し、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、逆位の(inverted)脱塩基リボース部分、逆位のデオキシリボース部分、逆位のデオキシ脱塩基部分(idAb)、アミノ-C6部分(AM-c6)、C6-アミノ-Pi、非ヌクレオチド部分、鏡映ヌクレオチド、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 2 - ナフタレン酪酸ホスホジエステル(THNB)、ビタミンおよび薬剤部分からなる群から選択される。一部の実施形態において、z'は存在し、1, 3 - プロパンジオール, モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチド部分である。

20

【0031】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれの3'末端および5'末端のヌクレオチドは、リン酸化されている。一部の実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれの3'末端および5'末端のヌクレオチドは、リン酸化されていない。アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれにおける一部の実施形態において、3'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されていない。一部の実施形態において、センス鎖は、3'末端および5'末端の両方でリン酸化されている、または非リン酸化のいずれかである。一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、3'末端および5'末端の両方でリン酸化されている、または非リン酸化のいずれかである。

30

【0032】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物(1)であって：

5' cap-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号16)

5' AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号29)

40

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、u、cおよび、gのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたリボヌクレオチド(5'>3')であり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1, 3 - プロパンジオール, モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

50

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (p i) ；修飾核酸化合物 (1) 、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 0 3 3 】

化合物 (1) の 1 つの実施形態において、センス鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップは、1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C 3) であり、アンチセンス鎖の 5' 末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されており (p h o s) 、および、アンチセンス鎖の 3' 末端のオーバーハングは、リン酸化されている (- C 3 - C 3 - p i) 。

10

【 0 0 3 4 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (2) であって、：

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 1 6)

5' AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 2 9)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、G および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、g は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5' > 3') であり；

20

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C 3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (p i) ；修飾核酸化合物 (2) 、または、

30

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 0 3 5 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (3) であって、：

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 1 6)

5' AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 2 9)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、G および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、g は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5' > 3') であり；

40

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C 3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (p i) ；修飾核酸化合物 (3) 、または、

50

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0036】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物(4)であって：

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号16)

5' AAGAAUGUCAGUCAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号29)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、uは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド(5'>3')であり； 10

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物(4)、または、 20

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0037】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物(5)であって：

5' GACUCAGACUGACAUUCUA-dTdT 3' (センス鎖；配列番号16)

5' AAGAAUGUCAGUCAGUC-dTdT 3' (アンチセンス鎖；配列番号29)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖のそれぞれは、当該鎖の3'末端に共有結合された2つのヌクレオチドチミジン-チミジン(dTdT)オーバーハングを含有し、；および、 30

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖の3'末端はリン酸化されていない；修飾核酸化合物(5)、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0038】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物(6)であって：

5' C3-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号16)

5' phos-AAGAAUgUCAGUCAGUC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号29) 40

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、gは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド(5'>3')であり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており(C3-pi)； 50

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された C3' 5' キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合されたリン酸化 C3' - C3' 非ヌクレオチドオーバーハング (- C3' - C3' - p i) を含有し；および、
 ここで、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されている (p h o s) ；修飾核酸化合物 (6) 、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 0 3 9 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (7) であって：

5' C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 1 6)

10

5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号 2 9)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、u、c および、g のそれぞれは、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5' > 3') であり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C3') 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3' - p i) ；

20

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された C3' 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合されたリン酸化 C3' - C3' 非ヌクレオチドオーバーハング (- C3' - C3' - p i) を含有し；および、

ここで、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されている (p h o s) ；修飾核酸化合物 (7) 、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 0 4 0 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (8) であって：

5' C3-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 1 6)

30

5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号 2 9)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、g は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5' > 3') であり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C3') 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3' - p i) ；

40

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された C3' 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合されたリン酸化 C3' - C3' 非ヌクレオチドオーバーハング (- C3' - C3' - p i) を含有し；および、

ここで、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されている (p h o s) ；修飾核酸化合物 (8) 、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 0 4 1 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (9) であって：

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 1 9)

50

5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 32)
 ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;
 ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;
 ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド(5'>3')であり;
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール,モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;
 ;
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し;
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi);修飾核酸化合物(9)、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

10

【0042】

修飾核酸化合物(9)の1つの実施形態において、当該センス鎖の5'末端に共有結合された5'キャップは、1,3-プロパンジオール,モノ(リン酸二水素)(C3)であり;当該アンチセンス鎖の5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており(phos)、および、当該アンチセンス鎖の3'末端のオーバーハングはリン酸化されている(-C3-C3-pi)。

20

【0043】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物(10)であって:

5' cap-GGGCCUGACUCAGACugau-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 19)
 5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 32)
 ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;
 ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;
 ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド(5'>3')であり;
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール,モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;
 ;
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し;
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi);修飾核酸化合物(10)、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

30

40

【0044】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物(11)であって:

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 19)
 5' AUCAGUcUGAGUCAGGCCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 32)
 ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;
 ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;
 ここで、uは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに

50

結合されたりボヌクレオチド (5' > 3') であり ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し

;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し ;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し ; および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi) ; 修飾核酸化合物 (11)、
または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0045】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (12) であって :

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖 ; 配列番号 19)

5' AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖 ; 配列番号 32)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり ;

ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり ;

ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5' > 3') であり ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し

;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し ;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し ; および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi) ; 修飾核酸化合物 (12)、
または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0046】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (13) であって :

5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (センス鎖 ; 配列番号 19)

5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖 ; 配列番号 32)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり ;

ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり ;

ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5' > 3') であり ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3 - pi) ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された C3 5' キャップを含有し ;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合されたリン酸化 C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハング (- C3 - C3 - pi) を含有し ; および、

ここで、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている (

phos) ; 修飾核酸化合物 (13)、または、
そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0047 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (14) であって :

5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (センス鎖 ; 配列番号 19)

5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖 ; 配列番号 32)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり ;

ここで、Cは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり ;

ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5'>3') であり ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3-pi) ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合されたC3 5'キャップを含有し ;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたリン酸化C3-C3非ヌクレオチドオーバーハング (-C3-C3-pi) を含有し ; および、

ここで、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている (phos) ; 修飾核酸化合物 (14)、または、
そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0048 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (15) であって :

5' C3-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖 ; 配列番号 19)

5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖 ; 配列番号 32)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり ;

ここで、UおよびCは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり ;

ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチド (5'>3') であり ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3-pi) ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合されたC3 5'キャップを含有し ;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたリン酸化C3-C3非ヌクレオチドオーバーハング (-C3-C3-pi) を含有し ; および、

ここで、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている (phos) ; 修飾核酸化合物 (15)、または、
そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0049 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物 (16) であって :

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖 ; 配列番号 19)

5' UUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖 ; 配列番号 28)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり ;

ここで、UおよびCは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり ;

ここで、uは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに

結合されたりボヌクレオチド (5'>3') であり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール,モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物(16)、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0050】

修飾核酸化合物(1)、(2)、(3)、(4)、(9)、(10)、(11)、(12)および(16)の様々な実施形態において、アンチセンス鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングは、リン酸化されている(-C3-C3-pi)。

【0051】

修飾核酸化合物(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)および(17)の様々な実施形態において、5'キャップは、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、逆位デオキシリボース部分、逆位デオキシ脱塩基部分(idAb)、アミノ-C6部分(AM-c6)、C6-アミノ-pi、非ヌクレオチド部分、鏡映ヌクレオチド、5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレン酪酸ホスホジエステル(THNB)および結合部分からなる群から選択される。修飾核酸化合物(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)および(17)の様々な実施形態において、5'キャップは非ヌクレオチド部分である。修飾核酸化合物(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)および(17)の様々な実施形態において、5'キャップ非ヌクレオチド部分は、1,3-プロパンジオール,モノ(リン酸二水素)(C3)である。

【0052】

修飾核酸化合物(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)および(17)の様々な実施形態において、アンチセンス鎖の5'末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されている(phos)。

【0053】

修飾核酸化合物(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10)、(11)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)および(17)の様々な実施形態において、アンチセンス鎖の5'末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されていない(\$)。

【0054】

別の態様において、本明細書に記述される核酸分子(たとえば、siNA分子)、または、そのような分子の薬学的に受容可能な塩を、薬学的に受容可能な担体中に含有する医薬組成物が提供される。ある実施形態において、医薬製剤は、個々(たとえば、患者)への核酸分子(たとえば、siNA分子等)の送達に適した送達系(たとえば、以下に詳述される送達系)を含有、または包含する。ある実施形態において、本明細書に記述される核酸分子、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物は、対象におけるp53の発現に関連した疾患または障害を治療または予防における使用の

10

20

30

40

50

ためである。

【0055】

別の態様において、p53の発現が、障害、疾患、損傷、状態もしくは病態の病因または進行に関連している、障害、疾患、損傷、状態もしくは病態の発生または重篤度を治療（予防することを含む）するための方法が提供される。別の実施形態において、障害、疾患、損傷、状態または病態は、アポトーシス性の（プログラムされた）細胞死を伴っている。一部の実施形態において、限定されないが、虚血再灌流傷害、難聴、聴覚障害、平衡障害、聴覚損失、化学療法誘発性脱毛症（脱毛）、放射線治療誘発性脱毛症、急性腎不全、急性腎障害、慢性腎疾患（CKD）、抗癌剤療法に関連した副作用、腎移植患者における臓器移植後臓器機能障害（DGF）、脊髄損傷、脳損傷、てんかん発作（seizure）、脳卒中、神経変性疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、腫瘍、やけど、外傷、高熱、低酸素症、虚血、臓器移植、心筋梗塞/心臓発作、心臓毒性、p53陽性癌および急性肝不全から選択される疾患または障害に罹患している対象の治療方法が提供される。様々な実施形態において、当該方法には、p53の発現を下方制御するために十分な量で、本明細書に記述される核酸化合物またはその薬学的に受容可能な塩を対象に投与することが含まれる。様々な実施形態において、当該方法には、本明細書に開示される核酸分子、またはそのような分子の薬学的に受容可能な塩の有効量を対象に投与し、それにより、障害または疾患を治療することが含まれる。

10

【0056】

一部の実施形態において、対象は、対象において、p53陽性癌に罹患しており、および、核酸化合物またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、または、そのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物を、p53遺伝子の発現の下方制御に有効な量で投与し、それにより、p53陽性癌を化学療法に対し感受性化させる。

20

【0057】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物は、造血前駆細胞の増大における使用のためであり、または造血刺激における使用のためである。

【0058】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物は、p53ヌル造血幹細胞（HSC）のホーミングにおける使用のためである。

30

【0059】

本明細書においてこれから記述される好ましい方法、物質および例は、単に例示説明のためであり、限定の意図は無い；本明細書に記述されるものと類似または均等な物質および方法を、本発明の実行または検証に用いることができる。本発明の他の特性および利点が、以下の図面、詳細な記述および請求項から明らかになるであろう。

【発明を実施するための形態】

40

【0060】

本明細書において、ヒトp53遺伝子の発現を下方制御する分子および組成物が提供される。p53遺伝子の発現抑制は、様々な疾患および障害の治療および/または予防に有益であることが示されている。本出願は、特に、p53遺伝子の発現を下方制御する二本鎖核酸分子に関するものであり、および、様々な疾患および障害の治療および/または予防における、これらの分子の使用に関するものである。そのような疾患/障害の非限定的なリストを、本明細書に提供する。二本鎖核酸分子の作製に有用なセンス鎖および相補的なアンチセンス鎖を、上記の表1に記述する。ある特定の二本鎖核酸化合物を、以下の表A、BおよびEに記述する。

【0061】

50

p 5 3 阻害のための化合物、組成物および方法は、詳細に本明細書において考察され、および、任意の当該化合物またはそのような化合物、組成物の薬学的に受容可能な塩は、p 5 3 遺伝子の発現上昇に関連した疾患／障害に罹患する患者の治療に有益に用いられても良い。

【 0 0 6 2 】

ゆえに、1つの態様において、本開示は、概して、p 5 3 遺伝子の発現を下方制御する核酸化合物に関連するものであり、および、p 5 3 遺伝子の発現に関連した疾患、障害または損傷（たとえば、限定されないが、本明細書に記述される疾患および障害）に罹患する対象の治療における、これら新規化合物の使用に関するものである。

【 0 0 6 3 】

本明細書に開示される核酸は、たとえば、当該化合物の活性を増加させうる、安定性を増加させうる、および／または、毒性を最小化させうる構造および修飾を含んでいる。

【 0 0 6 4 】

1つの態様において、本開示は、修飾されていないヌクレオチド、および修飾されたヌクレオチド、ならびに／または、非従来の部分を含む、抑制性オリゴヌクレオチド化合物を提供する。

【 0 0 6 5 】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、糖修飾、塩基修飾、およびヌクレオチド間結合の修飾からなる群から選択される修飾ヌクレオチドを少なくとも1つ含有し、ならびに、さらに、DNA、および修飾ヌクレオチドまたは非従来の部分（LNA（ロックド核酸（locked nucleic acid））、ENA（エチレン架橋核酸）、PNA（ペプチド核酸）、アラビノシド、PACE、鏡映ヌクレオチド、2'-5'ヌクレオチド間結合により隣接するヌクレオチドに結合されたヌクレオチド、または6炭糖を有するヌクレオチドを含む）を含む）を含有してもよい。

【 0 0 6 6 】

本明細書に開示される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）の様々な実施形態において、アンチセンス鎖は、18～40ヌクレオチドの長さであってもよい。本明細書に開示される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）の一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、19ヌクレオチドの長さである。同様に、本明細書に開示される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）のセンス鎖は、18～40ヌクレオチドの長さであってもよい。本明細書に開示される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）の一部の好ましい実施形態において、センス鎖は、19ヌクレオチドの長さである。本明細書に開示される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）の一部の実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれは、19ヌクレオチドの長さである。本明細書に開示される核酸化合物（たとえば、dsRNA分子）の様々な実施形態において、化合物の二本鎖の領域は、19ヌクレオチドの長さである。

【 0 0 6 7 】

ある実施形態において、本明細書に提供される核酸化合物（たとえば、dsRNA核酸分子）のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、別々のオリゴヌクレオチド鎖である。一部の実施形態において、別々のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、二本鎖構造（たとえば、Watson-Crick塩基対等の水素結合を介した二本鎖としても知られる）を形成する。一部の実施形態において、1以上のヌクレオチド対が、非Watson-Crick塩基対を形成する。一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、互いに共有結合する、2つの別々の鎖である。他の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、センス領域およびアンチセンス領域の両方を有する、単一のオリゴヌクレオチドの一部である；一部の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ヘアピン構造を有する。

【 0 0 6 8 】

ある実施形態において、核酸分子は、オーバーハングに関しては、対称性である二本鎖核酸（dsRNA）分子であり、および、両末端に平滑末端を有する。他の実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、核酸分子は、オーバーハングに関しては対称性である $dsRNA$ であり、および、ヌクレオチド、または非ヌクレオチド、またはヌクレオチドと非ヌクレオチドの組み合わせのオーバーハングを、 $dsRNA$ 分子の両末端に有する。一部の実施形態において、対称性 $dsRNA$ 分子は、センス鎖に存在する二本鎖の 1 つの側に 3' - オーバーハングを有しており；および、アンチセンス鎖の 3' 末端に存在する分子の他側に 3' - オーバーハングを有している。ある好ましい実施形態において、核酸分子は、オーバーハングに関して非対称性である $dsRNA$ 分子であり、 $dsRNA$ 分子の一方の末端に平滑末端を有し、 $dsRNA$ 分子の他端にオーバーハングを有している。一部の実施形態において、非対称性 $dsRNA$ 分子は、センス鎖に存在する二本鎖の 1 つの側に 3' - オーバーハングを、アンチセンス鎖の 5' 末端に存在する平滑末端を、および、センス鎖の 5' 末端とアンチセンス鎖の 3' 末端の両方に存在する分子の他方の側には平滑末端を、有している。一部の実施形態において、オーバーハングは、ヌクレオチドのオーバーハングであり、他の実施形態においては、当該オーバーハングは、非ヌクレオチドのオーバーハングである。

10

【0069】

様々な実施形態において、核酸分子はさらに、センス鎖の 5' 末端に共有結合されたキャップ部分を含有する。一部の実施形態において、 $dsRNA$ 分子は、センス鎖に存在する二本鎖の 1 つの側に 3' - オーバーハングを有しており；アンチセンス鎖の 3' 末端に存在する分子の他側に 3' - オーバーハングを有しており、センス鎖の 5' 末端に共有結合されたキャップ部分を有している。一部の実施形態において、 $dsRNA$ 分子は、センス鎖に存在する 3' - オーバーハング、センス鎖の 5' 末端に共有結合されたキャップ部分、アンチセンス鎖の 5' 末端に存在する平滑末端、および、アンチセンス鎖の 3' 末端に存在する平滑末端を有している。一部の実施形態において、オーバーハングは、ヌクレオチドのオーバーハングであり、他の実施形態においては、オーバーハングは、非ヌクレオチドのオーバーハングである。様々な実施形態において、キャップ部分は、脱塩基リボース部分；脱塩基デオキシリボース部分；逆位脱塩基リボース部分；逆位脱塩基デオキシリボース部分；C6 - イミノ - P_i；鏡映ヌクレオチド（L - DNA および L - RNA を含む）；5' OMe ヌクレオチド；ヌクレオチドアナログ（たとえば、限定されないが、4' , 5' - メチレンヌクレオチド等）；1 - (- D - エリスロフラノシル) ヌクレオチド；4' - チオヌクレオチド、炭素環ヌクレオチド、 - ヌクレオチド；トレオ - ペントフラノシルヌクレオチド；非環式 3' , 4' - セコヌクレオチド；3 , 4 - ジヒドロキシブチルヌクレオチド，3 , 5 - ジヒドロキシペンチルヌクレオチド；5' - アミノ - リン酸アルキル；1 , 3 - ジアミノ - 2 - リン酸プロピル，3 - リン酸アミノプロピル；6 - リン酸アミノヘキシル；12 - リン酸アミノドデシル；リン酸ヒドロキシプロピル；1 , 5 - アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；5' - 5' - 逆位脱塩基部分；1 , 4 - リン酸ブタンジオール；5' - アミノ；架橋または非架橋メチルホスホン酸および、5' - メルカプト部分、から選択される。一部の好ましい実施形態において、センス鎖の 5' 末端に共有結合されたキャップ部分は、逆位脱塩基デオキシリボース部分、AM - c6、C3 非ヌクレオチド部分および THNB から選択される。

20

30

【0070】

一部の実施形態において、核酸分子は、ヘアピン構造を有し（1つのオリゴヌクレオチド上にセンス鎖とアンチセンス鎖を有する）、一方の末端はループ構造を、他方の末端は平滑末端を有する。一部の実施形態において、核酸分子は、一方の末端はループ構造、他方の末端はオーバーハング末端を有する、ヘアピン構造を有し；ある実施形態においては、オーバーハングは、センス鎖上にあり；ある実施形態においては、オーバーハングは、アンチセンス鎖上にある。

40

【0071】

様々な実施形態において、本明細書に開示される核酸分子（たとえば、 $dsRNA$ 分子）は、たとえば本明細書に記述される 1 以上の修飾、または修飾ヌクレオチドを含有してもよい。たとえば、本明細書に提供される核酸分子（たとえば、 $dsRNA$ 分子）は、修

50

飾された糖を有する修飾ヌクレオチド；修飾されたヌクレオ塩基を有する修飾ヌクレオチド；または、修飾されたリン酸基を有する修飾ヌクレオチド、を含有してもよい。同様に、本明細書に提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、修飾されたホスホジエステル主鎖を含有してもよく、および／または修飾された末端リン酸基を含有してもよい。

【0072】

本明細書に提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、たとえば本明細書に記述される、修飾された糖部分を含有する1以上のヌクレオチドを有しても良い。一部の実施形態において、修飾された糖部分は、2'-O-メチル、2'-メトキシエトキシ、2'-デオキシ、2'-フルオロ、2'-アリル、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、4'-チオ、4'-(CH₂)₂-O-2'-架橋、2'-ロックド核酸、および、2'-O-(N-メチルカルバメート)からなる群から選択される。一部の好ましい実施形態において、核酸は、少なくとも1つの2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドを含有する。

10

【0073】

本明細書に提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、たとえば、本明細書に記述される、1以上の修飾ヌクレオ塩基（複数含む）を有しても良い。

【0074】

本明細書に提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、たとえば、本明細書に記述される、ホスホジエステル主鎖に対する1以上の修飾を有しても良い。

20

【0075】

本明細書に提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、たとえば、本明細書に記述される、1以上の修飾リン酸基（複数含む）を有しても良い。

【0076】

本明細書に提供される核酸分子は、たとえば、本明細書に記述される、非修飾のヌクレオ塩基、修飾されていないホスホジエステル主鎖、および、非修飾のリン酸基を含有しても良い。

【0077】

様々な実施形態において、提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、非修飾のアンチセンス鎖および、1以上の修飾を有するセンス鎖を含有しても良い。一部の実施形態において、提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、非修飾のセンス鎖および、1以上の修飾を有するアンチセンス鎖を含有しても良い。好ましい実施形態において、提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方において、1以上の修飾ヌクレオチドを含有してもよい。

30

【0078】

本明細書に提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端にリン酸基を含有しても良い（すなわち、5'末端リン酸基）。一部の実施形態において、本明細書に開示されるdsRNA分子は、アンチセンス鎖の5'末端にリン酸基を含有しても良い。

【0079】

本明細書に提供される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端にリン酸基を含有しても良い（すなわち、3'末端リン酸基）。一部の実施形態において、本明細書に開示されるdsRNA分子は、アンチセンス鎖の3'末端にリン酸基を含有しても良い。

40

【0080】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸分子（たとえば、dsRNA分子）は、アンチセンス鎖の3'末端およびセンス鎖の3'末端にリン酸基を含有しても良い。

【0081】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸分子（たとえば、dsRNA分子

50

)は、アンチセンス鎖の3'末端およびセンス鎖の3'末端にリン酸基を含有し、そして、アンチセンス鎖の5'末端およびセンス鎖の5'末端は、リン酸化されていない。

【0082】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸分子(たとえば、dsRNA分子)は、アンチセンス鎖の3'末端およびセンス鎖の3'末端およびアンチセンス鎖の5'末端にリン酸基を含有し、そして、センス鎖の5'末端は、リン酸化されていない。

【0083】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸分子(たとえば、dsRNA分子)は、センス鎖の3'末端およびアンチセンス鎖の5'末端にリン酸基を含有し、そして、センス鎖の5'末端およびアンチセンス鎖の3'末端は、リン酸化されていない。

10

【0084】

本明細書に開示される核酸分子(たとえば、dsRNA分子)の一部の実施形態において、核酸分子のアンチセンス鎖およびセンス鎖は、3'末端および5'末端の両方ともリン酸化されていない。

【0085】

1つの実施形態において、以下に記述される構造(A)を有する修飾核酸分子が提供され:

(A) 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNN -Z 3' (アンチセンス鎖)

3' Z' -NNNNNNNNNNNNNNNNN-z" 5' (センス鎖)

20

ここで、各Nは、独立して、A、C、G、Uのうちの任意の1つであり、および、独立して、非修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、または非従来の部分であり;

ここで、各「」は、アンチセンス鎖の各Nと、センス鎖の対応するNの間の塩基対合を表し;

ここで、ZおよびZ'のそれぞれは独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の3'末端に共有結合された、1~5の連続的なヌクレオチド、1~5の連続的なヌクレオチドアナログ、もしくは1~5の連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、または結合部分であり;

ここで、z''は、存在しても、または存在しなくても良いが、もし存在する場合、センス鎖の5'末端に共有結合された、キャップ部分または結合部分であり; ならびに、

30

ここで、センス鎖の配列は、アンチセンス鎖の配列に対して相補的である(ただし、各NおよびN'が非従来の部分ではない場合に限る)。

【0086】

1つの実施形態において、以下に記述される構造(A1)を有する修飾核酸分子が提供され:

(A1) 5' (N)x - Z 3' (アンチセンス鎖)

3' Z' - (N')y - z''' 5' (センス鎖)

ここで、NおよびN'のそれぞれは、独立して、非修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、または非従来の部分でありうる、リボヌクレオチドであり;

ここで、(N)xおよび(N')yのそれぞれは、各連続的なNまたはN'が、共有結合により隣接するNまたはN'に結合されているオリゴヌクレオチドであり;

40

ここで、ZおよびZ'のそれぞれは独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の3'末端に共有結合された、1~5の連続的なヌクレオチド、1~5の連続的なヌクレオチドアナログ、もしくは1~5の連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、または結合部分であり;

ここで、z'''は、存在しても、または存在しなくても良いが、もし存在する場合、(N')yの5'末端に共有結合された、キャップ部分または結合部分であり;

ここで、xおよびyのそれぞれは、独立して、1~40の間の整数であり;

ここで、(N')yの配列は、(N)xの配列に対して相補的であり; ならびに、

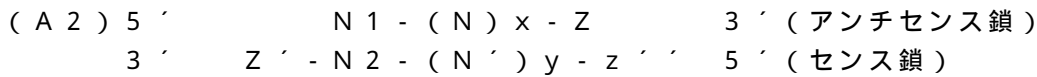
ここで、(N)xは、アンチセンス配列を含有し、(N')yは、センス配列を含有する

50

(ただし、各NおよびN'が非従来のな部分ではない場合に限る)。

【0087】

1つの実施形態において、以下に記述される構造(A2)を有する修飾核酸分子が提供され：



ここで、N1、N2、NおよびN'のそれぞれは、独立して、非修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、または非従来のな部分であり；

ここで、(N)xおよび(N')yのそれぞれは、各連続的なNまたはN'が、共有結合により隣接するNまたはN'に結合されているオリゴヌクレオチドであり；

ここで、xおよびyのそれぞれは、独立して、17～39の間の整数であり；

ここで、N2は、(N')yに共有結合されており；

ここで、N1は、(N)xに共有結合されており、および、標的RNA(配列番号1～7)に対して不適合であり、または、標的RNAに対して相補的な相補的DNA部分であり；

ここで、N1は、天然型ウリジン、修飾された：ウリジン、デオキシリボウリジン、リボチミジン、デオキシリボチミジン、天然型アデノシン、修飾アデノシン、デオキシアデノシン、アデノシンピラゾロトリアジン核酸アナログ、デオキシアデノシンピラゾロトリアジン核酸アナログ、脱塩基リボース部分、および脱塩基デオキシリボース部分からなる群から選択される部分であり；

ここで、z''は、存在しても、または存在しなくても良いが、もし存在する場合、N2-(N')yの5'末端に共有結合された、キャップ部分、ビタミンまたは薬剤部分であり；

ここで、ZおよびZ'のそれぞれは独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の3'末端に共有結合された、1～5の連続的なヌクレオチド、1～5の連続的なヌクレオチドアナログ、1～5の連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、結合部分であり；

ここで、(N')yの配列は、(N)xの配列に対して相補的であり；

ここで、(N)xの配列の少なくとも一部は、標的RNA中の連続的な配列に対して相補的であり；ならびに、

ここで、N1-(N)xの配列は、アンチセンス配列を含有し、N2-(N')yは、センス配列を含有する(ただし、各NおよびN'が非従来のな部分ではない場合に限る)。

【0088】

構造(A)、(A1)および(A2)の様々な実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、配列番号8～33から選択される。構造(A)、(A1)および(A2)の好ましい実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、センス鎖配列番号16およびアンチセンス鎖配列番号29、センス鎖配列番号19およびアンチセンス鎖配列番号32、ならびに、センス鎖配列番号19およびアンチセンス鎖配列番号28からなる群から選択される。

【0089】

構造(A2)の一部の実施形態において、N1およびN2は、Watson-Crick塩基対を形成する。他の実施形態において、N1およびN2は、非Watson-Crick塩基対を形成する。一部の実施形態において、塩基対は、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの間に形成される。構造(A2)の一部の実施形態において、x=y=18、x=y=19、または、x=y=20である。好ましい実施形態において、x=y=18である。N1-(N)xにおいて、x=18の場合、N1は、1位を指し、2～19位は、(N)18に含まれる。N2-(N')yにおいて、y=18の場合、N2は19位を指し、1～18位は(N')18に含まれる。

【0090】

構造(A2)の一部の実施形態において、N1は(N)xに共有結合され、配列番号1

10

20

30

40

50

～ 7 に記述される標的 mRNA には適合しない。様々な実施形態において、N 1 は、(N) x に共有結合され、配列番号 1 ～ 7 に記述される標的 mRNA に対して相補的な DNA 部分である。

【 0 0 9 1 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 2 - (N') y の配列は、N 1 - (N) x の配列に対して完全に相補的であり、(N) x の配列は、標的 RNA (配列番号 1 ～ 7) における連続配列に対して相補性を有している。

【 0 0 9 2 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 は、(N) x に共有結合され、標的 RNA (配列番号 1 ～ 7) に対して適合していないか、または、標的 RNA に対して相補的な DNA 部分である。

10

【 0 0 9 3 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 は、標的 RNA 配列中の対応するヌクレオチドがアデノシンである場合、アデノシンおよびデオキシアデノシンからなる群から選択される。構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 は、標的 RNA 配列中の対応するヌクレオチドがシチジンである場合、アデノシン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、およびデオキシウリジンからなる群から選択される。構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 は、標的 RNA 配列中の対応するヌクレオチドがグアノシンである場合、アデノシン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、ウリジンおよびデオキシウリジンからなる群から選択される。構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 は、標的 RNA 配列中の対応するヌクレオチドがウリジンである場合、ウリジンおよびデオキシウリジンからなる群から選択される。構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 および N 2 は、天然型または修飾された：ウリジンまたはデオキシウリジン、および、アデノシンまたはデオキシアデノシンの間に塩基対を形成する。他の実施形態において、N 1 および N 2 は、天然型または修飾された：デオキシウリジンおよびアデノシンの間に塩基対を形成する。

20

【 0 0 9 4 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、二本鎖核酸分子は、siRNA、siNA または miRNA である。本明細書に提供される二本鎖核酸分子はまた、「二重鎖」と呼称される。本明細書に開示される構造 (A 2) に従う核酸分子の一部の実施形態において、二本鎖核酸分子は、化学的に修飾された dsRNA である。

30

【 0 0 9 5 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 は、天然型ウリジンおよび修飾ウリジンから選択される。一部の実施形態において、N 1 は、天然型ウリジンである。

【 0 0 9 6 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、x = y = 18 であり、N 1 - (N) x は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含有し、N 2 - (N') y は、表 1、配列番号 8 ～ 33 に記述される配列の対に存在するセンスオリゴヌクレオチドを含有する。

【 0 0 9 7 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、x = y = 18 であり、ならびに、N 1 は、天然型または修飾ウリジン、天然型または修飾アデニン、および、天然型または修飾チミジンから選択される。

40

【 0 0 9 8 】

構造 (A 2) の一部の実施形態において、N 1 は、2'OMe 糖修飾ウリジン、または 2'OMe 糖修飾アデノシンである。構造 (A 2) のある実施形態において、N 2 は、2'OMe 糖修飾リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。

【 0 0 9 9 】

構造 (A)、(A 1) および (A 2) の一部の実施形態において、各 N は、非修飾リボヌクレオチドからなる。構造 (A 1) および (A 2) の一部の実施形態において、各 N' は、非修飾のリボヌクレオチドからなる。一部の好ましい実施形態において、N および N'

50

またはN'の内の少なくとも1つは、化学的に修飾されたりボヌクレオチド、非修飾デオキシリボヌクレオチド、化学的に修飾されたデオキシリボヌクレオチド、または非従来の部分を含む(ただし、NおよびN'のそれぞれがデオキシリボヌクレオチドではない場合に限る)。一部の実施形態において、非従来の部分は、鏡映ヌクレオチド、脱塩基リボース部分、および脱塩基デオキシリボース部分から選択される。一部の実施形態において、非従来の部分は、鏡映ヌクレオチド、好ましくはL-DNA部分である。一部の実施形態において、NまたはN'のうちの少なくとも1つは、2'-OMe糖修飾リボヌクレオチドを含む。

【0100】

構造(A1)および(A2)の一部の実施形態において、(N')_yの配列は、(N)_xの配列に対して完全に相補的である。構造(A1)および(A2)の他の実施形態において、(N')_yの配列は、(N)_xの配列に対して実質的に相補的である。

10

【0101】

構造(A1)および(A2)の一部の実施形態において、(N)_xは、配列番号1~7のうちの任意の1つに記述される標的mRNA中の約17~約39の連続したヌクレオチドに対して完全に相補的であるアンチセンス配列を含む。構造(A1)および(A2)の他の実施形態において、(N)_xは、配列番号1~7のうちの任意の1つに記述される標的mRNA中の約17~約39の連続したヌクレオチドに対して実質的に相補的であるアンチセンスを含む。構造(A1)および(A2)の一部の実施形態において、二本鎖核酸化合物は平滑末端であり、たとえば、ここで、z'、ZおよびZ'のそれぞれは存在しない。別の実施形態において、z'、ZまたはZ'の内の少なくとも1つは存在する。

20

【0102】

構造(A)、(A1)および(A2)の様々な実施形態において、ZおよびZ'のそれぞれは、独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、独立して、それが存在する鎖の3'末端に共有結合された、1~5の連続したヌクレオチド、1~5の連続したヌクレオチドアナログ、もしくは1~5の連続した非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、または結合部分を含む。構造(A)、(A1)および(A2)の様々な実施形態において、ZおよびZ'は、独立して、1以上の共有結合された修飾ヌクレオチドまたは非修飾ヌクレオチド(デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む)、または、1以上(好ましくは1~5、最も好ましくは1~2)の非従来の部分(たとえば、逆位脱塩基デオキシリボース部分または脱塩基リボース部分、または鏡映ヌクレオチド);本明細書に定義される、1以上(好ましくは1~5、最も好ましくは1~2)の非ヌクレオチドC3部分もしくはそれらの誘導体、非ヌクレオチドC4部分もしくはその誘導体、または、非ヌクレオチドC5部分もしくはその誘導体、非ヌクレオチドアミノ-C6部分もしくはそれらの誘導体等、を含む。

30

【0103】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、Z'は存在せず、ならびに、Zは存在し、および、1以上(好ましくは1~5、最も好ましくは1~2)の非ヌクレオチドC3部分を含む。一部の実施形態において、Zは存在せず、ならびに、Z'は存在し、および、1以上(好ましくは1~5、最も好ましくは1~2)の非ヌクレオチドC3部分を含む。一部の実施形態において、ZおよびZ'のそれぞれは、独立して、1以上(好ましくは1~5、最も好ましくは1~2)の非ヌクレオチドC3部分または、1以上の非ヌクレオチドアミノ-C6部分を含む。

40

【0104】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、ZおよびZ'のそれぞれは、脱塩基部分(たとえば、デオキシリボ脱塩基部分(本明細書において、「dAb」と呼称される)またはリボ脱塩基部分(本明細書において、「rAb」と呼称される)等)を含む。一部の実施形態において、Zおよび/またはZ'のそれぞれは、2つの共有結合された脱塩基部分を含むし、および、たとえば、dAb-dAbまたはrAb-

50

rAb または $dAb - rAb$ または $rAb - dAb$ であり、ここで、各部分は、好ましくはホスホ系の結合を介して、隣接する部分へと共有結合されている。一部の実施形態において、ホスホ系の結合には、ホスホロチオエート、ホスホノ酢酸、またはホスホジエステル結合が含まれる。好ましい実施形態において、ホスホ系の結合は、ホスホジエステル結合である。

【0105】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、Zおよび/またはZ'のそれぞれは、独立して、アルキル部分を含み、任意選択的にプロパン[(CH₂)₃]部分(C3)、またはそれらの誘導体(プロパノール(C3OH)および、プロパンジオールのホスホ誘導体("C3Pi")を含む)を含む。一部の実施形態において、Zおよび/またはZ'のそれぞれは、2つのアルキル部分を含有し、一部の例においては、C3Pi - C3OHである。C3Pi - C3OHの例の場合には、アンチセンス鎖の3'末端および/またはセンス鎖の3'末端は、ホスホ系の結合を介してC3部分に共有結合されており、および、C3部分は、ホスホ系の結合を介してC3OH部分に共有結合されている。一部の実施形態において、ホスホ系の結合には、ホスホロチオエート、ホスホノ酢酸、またはホスホジエステル結合が含まれる。好ましい実施形態において、ホスホ系の結合は、ホスホジエステル結合である。

10

【0106】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、Zは、C3Pi - C3OHを含有する。構造(A)、(A1)および(A2)の特定の実施形態において、Z'は、C3PiまたはC3OHを含有する。構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、二本鎖核酸分子は、アンチセンス鎖の3'末端に共有結合されたC3Pi - C3OH部分を含有し、および、センス鎖の3'末端に共有結合されたC3PiまたはC3OH部分を含有する。

20

【0107】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、z''が存在し、ならびに、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、逆位脱塩基リボース部分、逆位デオキシリボース部分、逆位デオキシ脱塩基部分(idAb)、アミノ - C6部分(AM - c6)、C6 - アミノ - Pi、非ヌクレオチド部分、鏡映ヌクレオチド、5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ - 2 - ナフタレン酪酸ホスホジエステル(THNB)、および結合部分からなる群から選択される。一部の実施形態において、結合部分は、ビタミンまたは薬剤部分である。構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、z''が存在し、ならびに、鏡映ヌクレオチド、脱塩基部分および逆位脱塩基部分から選択される。

30

【0108】

構造(A)、(A1)および(A2)の一部の実施形態において、各Nは、非修飾リボヌクレオチドからなる。構造(A1)(A2)の一部の実施形態において、各N'は、非修飾リボヌクレオチドからなる。好ましい実施形態において、Nおよび/またはN'のうちの少なくとも1つは、化学的に修飾されたリボヌクレオチド、非修飾デオキシリボヌクレオチド、化学的に修飾されたデオキシリボヌクレオチド、または非従来の部分である(ただし、各NおよびN'がデオキシリボヌクレオチドではない場合に限る)。

40

【0109】

一部の実施形態において、構造(A)、(A1)および(A2)の核酸化合物は、その糖残基が修飾された少なくとも1つのリボヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、化合物は、糖残基の2'の位置に修飾を含有する。一部の実施形態において、2'の位置の修飾は、アミノ、フルオロ、アルコキシ、またはアルキル部分が存在する。ある実施形態において、2'の修飾は、アルコキシ部分を含有する。好ましい実施形態において、アルコキシ部分は、メトキシ部分(2' - O - メチル; 2' OMe; 2' OMe; 2' - OCH₃とも呼称される)である。一部の実施形態において、核酸化合物は、アンチセンス鎖およびセンス鎖のうちの1つ、または両方において、2' Oメチル糖修飾交互の

50

リボヌクレオチドを含有する。他の実施形態において、化合物は、アンチセンス鎖、 (N) x または $N1 - (N) x$ にのみ、 $2'OMe$ 糖修飾リボヌクレオチドを含有する。一部の実施形態において、 $2'OMe$ 糖修飾リボヌクレオチドは、非修飾のヌクレオチドと交互に存在する。ある実施形態において、アンチセンス鎖の中間のリボヌクレオチド（たとえば、 $19mer$ の鎖における、 10 位のリボヌクレオチド）は修飾されていない。様々な実施形態において、核酸化合物は、少なくとも 5 つの交互の $2'OMe$ 糖修飾リボヌクレオチドおよび非修飾リボヌクレオチドを含有する。さらなる実施形態において、構造 $(A1)$ および / または $(A2)$ の化合物は、交互する位置で修飾リボヌクレオチドを含有し、ここで、 $(N) x$ または $N1 - (N) x$ の $5'$ 末端および $3'$ 末端の各リボヌクレオチドは、その糖残基が修飾されており、 $(N') y$ または $N2 - (N) y$ の $5'$ 末端および $3'$ 末端の各リボヌクレオチドは、その糖残基が修飾されていない。様々な実施形態において、交互する位置のリボヌクレオチドは、糖残基の $2'$ の位置で修飾されている。

【0110】

構造 (A) 、 $(A1)$ および $(A2)$ の一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれも、 $3'$ 末端および $5'$ 末端でリン酸化されていない。他の実施形態において、センス鎖および / またはアンチセンス鎖のうちの 1 つまたは両方が、 $3'$ 末端でリン酸化されている。他の実施形態において、センス鎖および / またはアンチセンス鎖のうちの 1 つまたは両方が、 $5'$ 末端でリン酸化されている。

【0111】

構造 $(A1)$ および / または $(A2)$ の一部の実施形態において、 $(N) x$ および / または $(N') y$ は、鏡映ヌクレオチドおよび、 $2' - 5'$ ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するヌクレオチドに結合されたヌクレオチドから選択される、非従来の部分を少なくとも 1 つ含有する。一部の好ましい実施形態において、非従来の部分は、 $2' - 5'$ ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するヌクレオチドに結合されたヌクレオチド ($5' > 3'$) である。一部の実施形態において、非従来の部分は鏡映ヌクレオチドである。様々な実施形態において、鏡映ヌクレオチドは、 L - リボヌクレオチド ($L - RNA$) および L - デオキシリボヌクレオチド ($L - DNA$) から選択される。一部の実施形態において、鏡映ヌクレオチドは、 $L - DNA$ である。

【0112】

構造 $(A1)$ および / または $(A2)$ のさらなる実施形態において、 $(N') y$ は、 $1 \sim 8$ の修飾リボヌクレオチドを含有し、ここで、修飾リボヌクレオチドは、デオキシリボース (DNA) ヌクレオチドである。ある実施形態において、 $(N') y$ は、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 または 8 までの DNA 部分を含有する。

【0113】

現時点での好ましい実施形態において、本明細書に提供される阻害物質は、 $p53$ 発現を下方制御する、合成された、化学修飾二本鎖核酸化合物であり、表 1 の配列番号 $8 \sim 33$ から選択されるオリゴヌクレオチドの対を含有する。

【0114】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表 1 において、ペア名称 $p53_13$ により特定される、アンチセンス鎖 $5'AGUAGUUCCAUAGGUCUG3'$ (配列番号 21) およびセンス鎖 $5'CAGACCUAUGGAACUACU3'$ (配列番号 8) を含有する。

【0115】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表 1 において、ペア名称 $p53_34$ により特定される、アンチセンス鎖 $5'UUACAUCUCCCAACAUC3'$ (配列番号 22) およびセンス鎖 $5'GGAUGUUUGGAGAUGUAA3'$ (配列番号 9) を含有する。

【0116】

一部の実施形態において、核酸化合物は、アンチセンス鎖 $5'UUACAUCUCCCAACAUC3'$ (配列番号 22) およびセンス鎖 $5'GGAUGUUUGGAGA$

10

20

30

40

50

AUGUAU3' (配列番号18)を含有する。

【0117】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__35により特定される、アンチセンス鎖5'UAGAAUGUCAGUCUGAGUC3' (配列番号23)およびセンス鎖5'GACUCAGACUGACAUUCUA3' (配列番号10)を含有する。

【0118】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__36により特定される、アンチセンス鎖5'UUGUAGAAACUACCAACCC3' (配列番号24)およびセンス鎖5'GGGUUGGUAGUUUCUACAA3' (配列番号11)を含有する。

10

【0119】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__37により特定される、アンチセンス鎖5'UACAUCUCCCAACAUCCC3' (配列番号25)およびセンス鎖5'GGGAUGUUUGGGAGAUGUA3' (配列番号12)を含有する。

【0120】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__38により特定される、アンチセンス鎖5'UACAAGUCUUGGUGGAUCC3' (配列番号26)およびセンス鎖5'GGAUCCACCAAGACUUGUA3' (配列番号13)を含有する。

20

【0121】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__39により特定される、アンチセンス鎖5'UAUCUCCCAACAUCCCUC3' (配列番号27)およびセンス鎖5'GAGGGAUGUUUGGGAGAUA3' (配列番号14)を含有する。

【0122】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__40により特定される、アンチセンス鎖5'UUCAGUCUGAGUCAGGCC3' (配列番号28)およびセンス鎖5'GGGCCUGACUCAGACUGAA3' (配列番号15)を含有する。

30

【0123】

一部の実施形態において、核酸化合物は、アンチセンス鎖5'UUCAGUCUGAGUCAGGCC3' (配列番号28)およびセンス鎖5'GGGCCUGACUCAGACUGAA3' (配列番号19)を含有する。

【0124】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__41により特定される、アンチセンス鎖5'AAGAAUGUCAGUCUGAGUC3' (配列番号29)およびセンス鎖5'GACUCAGACUGACAUUCUU3' (配列番号16)を含有する。

40

【0125】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__42により特定される、アンチセンス鎖5'UUGAGGUAGGUGCAAAUGC3' (配列番号30)およびセンス鎖5'GCAUUUGCACCUACCUCAA3' (配列番号17)を含有する。

【0126】

一部の実施形態において、核酸化合物は、表1において、ペア名称p53__43により特定される、アンチセンス鎖5'AUACAUCUCCCAACAUC3' (配列番号31)およびセンス鎖5'GGAUGUUUGGGAGAUGUAU3' (配列番号18)を含有する。

50

【 0 1 2 8 】

【 0 1 2 9 】

【 0 1 3 0 】

【 0 1 3 1 】

5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3' (アンチセンス鎖)

【 0 1 3 2 】

表 A

30

【表 3】

二本鎖名 称	センス鎖(5' > 3')	アンチセンス鎖(5' > 3')
p53_34	GGAUGUUUGGAGAUGUAA	UUACAUCUCCAAACAUCC
p53_35	GACUCAGACUGACAUUCUA	UAGAAUGUCAGUCUGAGUC
p53_36	GGGUUGGUAGUUUCUACAA	UUGUAGAAACUACCAACCC
p53_37	GGGAUGUUUGGAGAUGUA	UACAUCUCCAAACAUCCC
p53_38	GGAUCCACCAAGACUUGUA	UACAAGUCUUGGUGGAUCC
p53_39	GAGGGAUGUUUGGAGAUA	UAUCUCCCAACAUCUCCUC
p53_40	GGGCCUGACUCAGACUGAA	UUCAGUCUGAGUCAGGCCC
p53_41	GACUCAGACUGACAUUCUU	AAGAAUGUCAGUCUGAGUC
p53_42	GCAUUGCACCUCUACCAAA	UUGAGGUAGGUGCAAUUGC
p53_43	GGAUGUUUGGAGAUGUAU	AUACAUCUCCAAACAUCC
p53_44	GGGCCUGACUCAGACUGAU	AUCAGUCUGAGUCAGGCCC
p53_45	CAGACCUAUGGAAACUACA	UGUAGUUUCCAUAAGGUCUG

10

20

【0133】

上述および下述の全ての表において、二本鎖名称は、接頭語「p53」および「TP53」（相互交換可能に用いられる）により特定される。

【0134】

表AのすべてのdsRNA化合物に対して：

A、U、G、Cは、非修飾のリボヌクレオチドを示し；

A、U、G、Cは、2-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドを示す。

【0135】

表Aの核酸化合物の様々な実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれの3'末端および5'末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されていても、または、リン酸化されていなくても良い。表Aの各核酸化合物の一部の実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖は、3'末端および5'末端の両方で、リン酸化されていない。

【0136】

p53遺伝子の下方制御のための二本鎖核酸化合物の作製のための、ある好ましい二本鎖は、以下の表Bに記述される。さらに好ましい二本鎖は、以下の実施例の項において提供される。

表B . ある好ましい二本鎖

30

40

【表 4】

二本鎖 の名称	センス (N') y	アンチセンス (N) x
	5 → 3	5 → 3
p53_13	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> ACU-C3-pi	AGUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> AGGUC <u>U</u> G-C3-C3
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>u</u> acu-C3-pi	AGUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> AGGUC <u>U</u> G-C3-C3
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> ACU-pi	<u>A</u> GUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> AGGUC <u>U</u> G-pi
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>u</u> aca-C3-pi	<u>U</u> GUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> AGGUC <u>U</u> G-C3-C3
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> ACA-C3-pi	<u>U</u> GUAGU <u>u</u> UCC <u>A</u> AGGUC <u>U</u> G-pi
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> ACA-pi	UGUAGUUUCCAUAGGUCUG
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>U</u> ACA	UGUAGUUUCCAUAGGUCUG
p53_34	cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>U</u> GUAA-C3-pi	<u>U</u> UACAU <u>c</u> UCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>u</u> guaa-C3-pi	<u>U</u> UACAU <u>c</u> UCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>u</u> guaa-C3-pi	AU <u>A</u> CAU <u>c</u> UCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>U</u> GAU-C3-pi	<u>U</u> UACAU <u>c</u> UCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>u</u> gau-C3-pi	AU <u>A</u> CAU <u>c</u> UCC <u>C</u> AAAC <u>A</u> UCC-C3-C3
	GGAUGUUUGGGAGAUGUAUzdTzdT\$	AUACAUCUCCCAAACAUCczdTzdT\$
p53_35	cap-GACUCAGACUGACA <u>u</u> ucua-C3-pi	<u>U</u> AGAAU <u>g</u> UCAGUCU <u>G</u> AGU-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGACA <u>U</u> UCUA-C3-pi	<u>U</u> AGAAU <u>g</u> UCAGUCU <u>G</u> AGU-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGACA <u>U</u> UCUA-C3-pi	<u>U</u> AGAA <u>u</u> GU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AGU-C3-C3
	cap-GACUCAGACUGACA <u>U</u> UCUA-C3-pi	<u>U</u> AGAAU <u>g</u> UCAGUCU <u>G</u> AGU-C3-C3
	GACUCAGACUGACAUCUAzdTzdT\$	UAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdT\$
p53_40	cap-GGGCCUGACUCAGAC <u>U</u> GAA-C3-pi	<u>U</u> UCAGU <u>c</u> UGAGU <u>C</u> AGGCCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGAC <u>u</u> gaa-C3-pi	<u>U</u> UCAG <u>u</u> CUGAGU <u>C</u> AGGCCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGAC <u>U</u> GAU-C3-pi	<u>U</u> UCAG <u>u</u> CUGAGU <u>C</u> AGGCCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGAC <u>u</u> gau-C3-pi	AU <u>C</u> AG <u>u</u> CUGAGU <u>C</u> AGGCCC-C3-C3

10

20

30

40

二本鎖 の名称	センス (N') y	アンチセンス (N) x
	5 → 3	5 → 3
	cap-GGGCCUGACU <u>C</u> AGAC <u>CU</u> GAA-C3-pi	<u>UU</u> CAGU <u>c</u> UGAGU <u>C</u> AGG <u>CCC</u> -C3-C3
	cap-GGGCCUGACU <u>C</u> AGAC <u>CU</u> GAU-C3-pi	AU <u>C</u> AGU <u>c</u> UGAGU <u>C</u> AGG <u>CCC</u> -C3-C3
	cap-GGGCCUGACU <u>C</u> AGAC <u>CU</u> GAA-C3-pi	<u>UU</u> CAG <u>u</u> <u>CU</u> AGAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3-C3
	GGGCCUGACUCAGACUGAAzdTzdT\$	UUCAGUCUGAGUCAGGCCCCzdTzdT\$
p53_41	cap-GACUCAGACUGACA <u>uucuu</u> -C3-pi	AAGAA <u>U</u> g <u>UC</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>UC</u> -C3-C3
	cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUCUU</u> -C3-pi	AAGAAU <u>g</u> U <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>UC</u> -C3-C3
	cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUUU</u> -C3-pi	AAGAAU <u>g</u> U <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>UC</u> -C3-C3
	cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUUU</u> -C3-pi	AAGAA <u>u</u> GU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>UC</u> -C3-C3
	GACUCAGACUGACA <u>UUCUU</u> zdTzdT\$	AAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdT\$
p53_43	cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>uguau</u> -C3-pi	AU <u>AC</u> AU <u>c</u> UCC <u>C</u> AAAC <u>CAUCC</u> -C3-C3
	cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>UGUAU</u> -C3-pi	AU <u>AC</u> AU <u>c</u> UCC <u>C</u> AAAC <u>CAUCC</u> -C3-C3
p53_44	cap-GGGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi	AU <u>C</u> AGU <u>c</u> UGAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACUCAGAC <u>cugau</u> -C3-pi	AU <u>C</u> AG <u>u</u> <u>CU</u> AGAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACU <u>C</u> AGAC <u>CU</u> GAU-C3-pi	AU <u>C</u> AG <u>u</u> <u>CU</u> AGAGU <u>C</u> AGGCCCC-C3-C3
	cap-GGGCCUGACU <u>C</u> AGAC <u>CU</u> GAU-C3-pi	AU <u>C</u> AGU <u>c</u> UGAGU <u>C</u> AGG <u>CCC</u> -C3-C3
p53_45	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>uaca</u> -C3-pi	<u>UGU</u> AGU <u>u</u> UCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3-C3
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>UACA</u> -C3-pi	<u>UGU</u> AGU <u>U</u> UCC <u>CAU</u> AGGUC <u>UG</u> -pi
	cap- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>UACA</u> -pi	UGUAGUUUCCAUAAGGUCUG

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

表 B のすべての二本鎖核酸化合物に対して：

A、U、G、C は、非修飾のリボヌクレオチドを示し；

A、U、G、C は、2 - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドを示し；

a、u、c、g は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するヌクレオチドに結合されたヌクレオチドを示し (5' > 3')；

cap は、キャップ部分を示す。一部の好ましい実施形態において、キャップ部分は、脱

50

塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、逆位デオキシリボース部分、逆位デオキシ脱塩基部分 (i d A b)、アミノ - C 6 部分 (A M - c 6)、C 6 - アミノ - p i、非ヌクレオチド部分、鏡映ヌクレオチド、5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 2 - ナフタレン酪酸ホスホジエステル (T H N B) および結合部分からなる群である。

【 0 1 3 8 】

p i は、3 ´ リン酸を示す。

【 0 1 3 9 】

z は、キャップ部分を示す。

【 0 1 4 0 】

\$ は、末端リン酸が無いことを示す。

10

【 0 1 4 1 】

d T \$ は、チミジン (リン酸が無い) ことを示す。

【 0 1 4 2 】

C 3 - は、1 , 3 - プロパンジオール , モノ (リン酸二水素) (C 3) [C A S R N : 1 3 5 0 7 - 4 2 - 1] を示す。

【 0 1 4 3 】

C 3 - C 3 は、2 つの連続的な C 3 分子を示す。

【 0 1 4 4 】

上記の表 B に示される核酸化合物の様々な実施形態において、アンチセンス鎖の 3 ´ 末端に共有結合された C 3 - C 3 非ヌクレオチドオーバーハングはリン酸化されている (- C 3 - C 3 - p i) 。

20

【 0 1 4 5 】

上記の表 B に示される核酸化合物の一部の実施形態において、各核酸化合物の、アンチセンス鎖の 5 ´ 末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている。上記の表 B に示される核酸化合物の一部の実施形態において、各核酸化合物の、アンチセンス鎖の 5 ´ 末端のリボヌクレオチドはリン酸化されていない。

【 0 1 4 6 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5 ´ cap-CAGACCUAUGGAAACUACU-C3-pi 3 ´ (センス鎖 ; 配列番号 8)

30

5 ´ AGUAGUuUCCAUAAGGUCUG-C3-C3 3 ´ (アンチセンス鎖 ; 配列番号 2 1)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、U および C のそれぞれは、2 ´ - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、u は、2 ´ - 5 ´ ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5 ´ > 3 ´) ；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3 ´ 末端に共有結合された 1 , 3 - プロパンジオール , モノ (リン酸二水素) (C 3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

40

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5 ´ 末端に共有結合された 5 ´ キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3 ´ 末端に共有結合された C 3 - C 3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3 ´ 末端はリン酸化されている (p i) ；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。そのような化合物の 1 つの実施形態において、センス鎖の 5 ´ 末端に共有結合された 5 ´ キャップは、1 , 3 - プロパンジオール , モノ (リン酸二水素) (C 3) であり；および、アンチセンス鎖において、5 ´ 末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており、3 ´ 末端のオーバーハングはリン酸化されている (- C 3 - C 3 - p i) 。

【 0 1 4 7 】

50

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAAcuacu-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 8)

5' AGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 21)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、a、uおよびcのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。そのような化合物の1つの実施形態において、センス鎖の5'末端に共有結合された5'キャップは、1,3-プロパンジオール，モノ(リン酸二水素)(C3)であり；および、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており、3'末端のオーバーハングはリン酸化されている(-C3-C3-pi)。

【0148】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAACUACU-pi 3' (センス鎖；配列番号 8)

5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号 21)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；および、

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖において、3'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0149】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAAcuaca-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 20)

5' UGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 33)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、a、uおよびcのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モ

10

20

30

40

50

ノ（リン酸二水素）（C3）非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3 - C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている（pi）；修飾核酸化合物、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0150】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAACUACA-C3-pi 3' （センス鎖；配列番号20）

10

5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG-pi 3' （アンチセンス鎖；配列番号33）

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モノ（リン酸二水素）（C3）非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、センス鎖において、3'末端のオーバーハングはリン酸化されており（C3 - pi）；および、

20

ここで、アンチセンス鎖において、3'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている（pi）；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0151】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAACUACA-pi 3' （センス鎖；配列番号20）

5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' （アンチセンス鎖；配列番号33）

30

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、センス鎖において、3'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている、修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0152】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

40

5' cap-CAGACCUAUGGAAACUACA 3' （センス鎖；配列番号20）

5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' （アンチセンス鎖；配列番号33）

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有する；修飾核酸化合物、または、

50

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 5 3 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' C3-CAGACCUAUGGAACUACU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 8)

5' phos-AGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号 2 1)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、uは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')； 10

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5' C3キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方の3'末端はリン酸化されており(pi)；および、 20

ここで、アンチセンス鎖の5'末端はリン酸化されている(phos)；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 5 4 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' C3-CAGACCUAUGGAAauac-a-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 2 0)

5' phos-AGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号 2 1)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり； 30

ここで、a、uおよびcのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5' C3キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、 40

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方の3'末端はリン酸化されており(pi)；および、

ここで、アンチセンス鎖の5'末端はリン酸化されている(phos)；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 5 5 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGAUGUUUGGAGAUGUAA-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 9)

5' UUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 2 2)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；
 ここで、A、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；
 ;
 ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0156】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGAUGUUUGGAGAuguaa-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号9)

5' UUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号22)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；
 ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；
 ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0157】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGAUGUUUGGAGAuguaa-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号9)

5' AUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号31)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；
 ここで、A、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；
 ;
 ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 5 8 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGAUGUUUGGGAGAUGUAU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号18)

5' UUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号22)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 5 9 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGAUGUUUGGGAGAUgUAU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号18)

5' AUACAUcUCCCAAACAUCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号31)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 6 0 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' GGAUGUUUGGGAGAUdTdT 3' (センス鎖；配列番号18)

5' AUACAUcUCCCAAACAUCC-dTdT 3' (アンチセンス鎖；配列番号31)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖のそれぞれは、当該鎖の3'末端に共有結合された2つのヌクレオチド チミジン-チミジン(dTdT)オーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端およびアンチセンス鎖の3'末端は、リン酸化されていない；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0161】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GACUCAGACUGACAuucua-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号10)

5' UAGAAgUCAGUCgAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号23)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')； 10

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。 20

【0162】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUA-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号10)

5' UAGAAgUCAGUCgAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号23)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、gは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')； 30

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。 40

【0163】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUA-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号10)

5' UAGAAgUCAGUCgAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号23)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、uは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホス 50

ホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0164】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUA-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 10)

5' UAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 23)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、G および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、g は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0165】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' GACUCAGACUGACAUUCUA-dTdT 3' (センス鎖；配列番号 10)

5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT 3' (アンチセンス鎖；配列番号 23)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖のそれぞれは、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 2つのヌクレオチド チミジン - チミジン (dTdT) オーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端およびアンチセンス鎖の 3' 末端は、リン酸化されていない；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0166】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 15)

5' UUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 28)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0167】

10

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGGCCUGACUCAGAcugaa-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号15)

5' UUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号28)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

20

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0168】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

30

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号19)

5' UUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号28)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、uは、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

40

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0169】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号19)

5' AUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号32)

50

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；
 ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；
 ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により
 隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり（5'>3'）；
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホス
 ホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モ
 ノ（リン酸二水素）（C3）非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチ
 ドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている（pi）；修飾核酸化合物、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0170】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修
 飾核酸化合物であって：

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi 3' （センス鎖；配列番号15）

5' UUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' （アンチセンス鎖；配列番号28）

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；
 ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；
 ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに
 結合されたりボヌクレオチドであり（5'>3'）；
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホス
 ホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モ
 ノ（リン酸二水素）（C3）非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチ
 ドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている（pi）；修飾核酸化合物、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0171】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修
 飾核酸化合物であって：

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' （センス鎖；配列番号19）

5' AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' （アンチセンス鎖；配列番号32）

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；
 ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；
 ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに
 結合されたりボヌクレオチドであり（5'>3'）；
 ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホス
 ホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール，モ
 ノ（リン酸二水素）（C3）非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチ
 ドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている（pi）；修飾核酸化合物、または、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0172】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAA-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号15)

5' UUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号28)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、uのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0173】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' GGGCCUGACUCAGACUGAA-dTdT 3' (センス鎖；配列番号15)

5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC-dTdT 3' (アンチセンス鎖；配列番号28)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖のそれぞれは、当該鎖の3'末端に共有結合された2つのヌクレオチド チミジン-チミジン(dTdT)オーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端およびアンチセンス鎖の3'末端は、リン酸化されていない；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0174】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号16)

5' AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号29)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。そのような化合物の1つの実施

10

20

30

40

50

形態において、センス鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップは、1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) であり; および、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドはリン酸化され (phos)、および、3' 末端のオーバーハングはリン酸化されている (-C3-C3-pi)。

【0175】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって:

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 16)

5' AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 29)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、U、G および C のそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

ここで、g は、2'-5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5'>3');;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3-C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し; および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi); 修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0176】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって:

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 16)

5' AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 29)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、U、G および C のそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

ここで、g は、2'-5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5'>3');;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3-C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し; および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi); 修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0177】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって:

5' cap-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 16)

5' AAGAAuGUCAGUCUGAGUC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 29)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、U、G および C のそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

;

ここで、u は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3') ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し ;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し ; および、

ここで、センス鎖の 3' 末端はリン酸化されている (pi) ; 修飾核酸化合物、または、
そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

10

【0178】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって :

5' GACUCAGACUGACAUCUA-dTdT 3' (センス鎖 ; 配列番号 16)

5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT 3' (アンチセンス鎖 ; 配列番号 29)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖およびアンチセンス鎖のそれぞれは、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 2 つのヌクレオチド チミジン - チミジン (dTdT) オーバーハングを含有し ; および、

20

ここで、センス鎖の 3' 末端およびアンチセンス鎖の 3' 末端は、リン酸化されていない ; 修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0179】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって :

5' C3-GACUCAGACUGACAUCUU-C3-pi 3' (センス鎖 ; 配列番号 16)

5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖 ; 配列番号 29)

30

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり ;

ここで、U、g および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり ;

ここで、g は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3') ;

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており ;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3 - pi) ;

40

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された C3 5' キャップを含有し ;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し ; ならびに、

ここで、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドはリン酸化され (phos)、および、3' 末端のオーバーハングはリン酸化されている (-C3 - C3 - pi) ;

修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0180】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって :

50

5' C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 16)

5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 29)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、Cのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

ここで、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3');

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール,モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており(C3-pi);

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合されたC3 5'キャップを含有し;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;ならびに、

ここで、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化され(phos)、および、3'末端のオーバーハングはリン酸化されている(-C3-C3-pi);

修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

10

【0181】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって:

20

5' C3-GACUCAGACUGACAUUCUU-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 16)

5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 29)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

ここで、gは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3');

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール,モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており(C3-pi);

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合されたC3 5'キャップを含有し;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;ならびに、

ここで、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化され(phos)、および、3'末端のオーバーハングはリン酸化されている(-C3-C3-pi);

修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

30

【0182】

40

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって:

5' cap-GGAUGUUUGGAGAuguau-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 18)

5' AUACAUcUCCAAACAUCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 31)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、A、UおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3');

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホス

50

ホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モ
 ノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；
 ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；
 ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチ
 ドオーバーハングを含有し；および、
 ここで、センス鎖の 3' 末端は、リン酸化されている (p i)；修飾核酸化合物、または
 、
 そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0183】

10

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修
 飾核酸化合物であって：

5' cap-GGAUGUUUGGAGAUGUAU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 18)

5' AUACAUcUCCCAAACUCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 31)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに
 結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホス
 ホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

20

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モ
 ノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチ
 ドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端は、リン酸化されている (p i)；修飾核酸化合物、または
 、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0184】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修
 飾核酸化合物であって：

30

5' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 19)

5' AUCAGUcUGAGUcAGGCC-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 32)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに
 結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホス
 ホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

40

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モ
 ノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチ
 ドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の 3' 末端は、リン酸化されている (p i)；修飾核酸化合物、または
 、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。そのような化合物の 1つの実施
 形態において、センス鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップは、1, 3 - プロパン
 ジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) であり；および、アンチセンス鎖において、5'
 ' 末端のリボヌクレオチドはリン酸化され (p h o s)、および、3' 末端のオーバーハ

50

ングはリン酸化されている (- C 3 - C 3 - p i) 。

【 0 1 8 5 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5 ' cap-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3 ' (センス鎖；配列番号 1 9)

5 ' AUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3 ' (アンチセンス鎖；配列番号 3 2)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、a、u、cおよびgのそれぞれは、2' - 5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3') ；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C 3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC 3 - C 3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端は、リン酸化されている (p i) ；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 8 6 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5 ' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3 ' (センス鎖；配列番号 1 9)

5 ' AUCAGuCUGAGUCAGGCC-C3-C3 3 ' (アンチセンス鎖；配列番号 3 2)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、uは、2' - 5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3') ；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C 3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC 3 - C 3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端は、リン酸化されている (p i) ；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 8 7 】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5 ' cap-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3 ' (センス鎖；配列番号 1 9)

5 ' AUCAGucUGAGUCAGGCC-C3-C3 3 ' (アンチセンス鎖；配列番号 3 2)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCのそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、cは、2' - 5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3') ；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された 5' キャップを含有し;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し; および、

ここで、センス鎖の 3' 末端は、リン酸化されている (pi); 修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0188】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって:

5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 19)

5' phos-AUCAGUCUGAGUCAGGCCC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 32)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、U および C のそれぞれは、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3');

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3 - pi);

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された C3 5' キャップを含有し;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し; ならびに、

ここで、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており (phos)、および、3' 末端のオーバーハングはリン酸化されている (- C3 - C3 - pi); 修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0189】

1 つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって:

5' C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi 3' (センス鎖; 配列番号 19)

5' phos-AUCAGUCUGAGUCAGGCCC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖; 配列番号 32)

ここで、A、U、G および C のそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり;

ここで、C は、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチドであり;

ここで、c は、2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり (5' > 3');

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したりボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており;

ここで、センス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された 1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (C3) 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており (C3 - pi);

ここで、センス鎖は、当該鎖の 5' 末端に共有結合された C3 5' キャップを含有し;

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の 3' 末端に共有結合された C3 - C3 非ヌクレオチドオーバーハングを含有し; ならびに、

ここで、アンチセンス鎖において、5' 末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており (phos)、および、3' 末端のオーバーハングはリン酸化されている (- C3 - C3 - pi); 修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 9 0 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' C3-GGGCCUGACUCAGACUGAU-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 1 9)

5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3-C3-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号 3 2)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、UおよびCは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、cは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該オーバーハングはリン酸化されており(C3-pi)；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合されたC3 5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；ならびに、

ここで、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されており(phos)、および、3'末端のオーバーハングはリン酸化されている(-C3-C3-pi)；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 9 1 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAACuaca-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 2 0)

5' UGUAGUuUCCAUAGGUCUG-C3-C3 3' (アンチセンス鎖；配列番号 1 9)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、UおよびCは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、a、uおよびcのそれぞれは、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドであり(5'>3')；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ(リン酸二水素)(C3)非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；

ここで、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有し；および、

ここで、センス鎖の3'末端はリン酸化されている(pi)；修飾核酸化合物、または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【 0 1 9 2 】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAACUACA-C3-pi 3' (センス鎖；配列番号 2 0)

5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG-pi 3' (アンチセンス鎖；配列番号 3 3)

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合された1,3-プロパンジオール、モノ

ノ（リン酸二水素）（C3）非ヌクレオチドオーバーハングを含有し、および、ここで、当該センス鎖の3'末端はリン酸化されており（pi）；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；ならびに、

ここで、アンチセンス鎖において、3'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている（pi）；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0193】

1つの実施形態において、以下に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する修飾核酸化合物であって：

5' cap-CAGACCUAUGGAAACUACA-pi 3' （センス鎖；配列番号20）

5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' （アンチセンス鎖；配列番号33）

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、非修飾のリボヌクレオチドであり；

ここで、A、U、GおよびCのそれぞれは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドであり；

ここで、アンチセンス鎖およびセンス鎖において、各連続したリボヌクレオチドは、ホスホジエステル結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されており；

ここで、センス鎖は、当該鎖の5'末端に共有結合された5'キャップを含有し；ならびに、

ここで、センス鎖において、3'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されている（pi）；修飾核酸化合物、または、

そのような化合物の薬学的に受容可能な塩が提供される。

【0194】

本明細書に記述される上述の核酸化合物の様々な実施形態において、アンチセンス鎖は、当該鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングを含有する。本明細書に記述される上述の核酸化合物の一部の好ましい実施形態において、アンチセンス鎖の3'末端に共有結合されたC3-C3非ヌクレオチドオーバーハングは、リン酸化されている（-C3-C3-pi）。

【0195】

本明細書に記述される核酸化合物の様々な実施形態において、5'キャップは、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、逆位デオキシリボース部分、逆位デオキシ脱塩基部分（idAb）、アミノ-C6部分（AM-c6）、C6-アミノ-pi、非ヌクレオチド部分、鏡映ヌクレオチド、5,6,7,8-テトラヒドロ-2-ナフタレン酪酸ホスホジエステル（THNB）、ビタミンおよび薬剤部分からなる群から選択される。

【0196】

本明細書に記述される核酸化合物の様々な実施形態において、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されている（phos）。本明細書に記述される核酸化合物の様々な実施形態において、アンチセンス鎖において、5'末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されていない（\$）。

【0197】

別の態様において、本明細書に開示されるそのような核酸化合物を1つ以上；および、薬学的に受容可能な担体または賦形剤を含有する組成物が提供される。一部の実施形態において、dsRNA分子は、裸のdsRNAとして投与される。他の実施形態において、dsRNA分子は、薬学的に受容可能な担体と混合される。さらに他の実施形態において、dsRNAは、薬剤担体に内包化される。

【0198】

別の態様において、限定されないが、抗癌療法に関連した脱毛、腎損傷/腎不全（急性腎障害、特に虚血性急性腎不全、および慢性腎障害を含む）；内耳または中耳の疾患または障害（たとえば、聴覚障害、平衡障害等）；目の疾患または障害、臓器移植患者における臓器移植後臓器機能障害、特に、腎臓移植患者における臓器移植後臓器機能障害；脳卒

10

20

30

40

50

中、脳損傷、脊髄損傷、パーキンソン病、アルツハイマー病、心毒性、心筋梗塞/心不全、から選択される疾患または障害に罹患している対象の治療における、本明細書に開示される分子の使用が提供される。本明細書において、そのような疾患または障害の発生または重篤度を治療または予防するための方法であって、その必要のある対象において治療または予防するための方法が提供され、ここで、当該疾患または障害は、p 5 3 遺伝子の発現に関連している。そのような方法には、p 5 3 遺伝子の発現もしくは活性を阻害または減少させる、本明細書に提供される1以上の化合物の治療有効量または予防有効量を、そのような治療の必要がある哺乳類に対し投与することが含まれる。

【0199】

一部の実施形態において、少なくとも2つのdsRNA剤が共に投与される（たとえば、同時に、または順番に）。他の実施形態において、少なくとも2つのdsRNA剤が、それらの組み合わせを含有する医薬組成物中において、投与される。

【0200】

本明細書において、本明細書に開示される様々な修飾を含有する機能性核酸、そのような修飾機能性核酸を含有する薬品、医薬組成物の製造のためのそれらの使用、および、本明細書に開示される疾患または障害に罹患している患者、または、本明細書に開示される疾患または障害に罹患しやすい患者の治療のための方法が提供される。

【0201】

定義

便宜的のため、本明細書、実施例、および請求項中に使用された用語を、本明細書において記述する。

【0202】

本明細書において使用される、単数形の「ひとつの(a, an)」および「その(the)」とは、内容が別段明確に指定しない限り、複数形を含むことに注意されたい。

【0203】

態様または実施形態がマーカッシュ形式の群または代替の他の形式の群で記述される場合、当業者であれば、本開示が、当該群の構成要素の任意の亜群、または任意の個々の構成要素としても記述されるものであると、認識するであろう。

【0204】

「阻害物質」は、遺伝子の発現、または、そのような遺伝子の産物の活性を（部分的にまたは完全に）、所望の生物学的または生理学的効果を得るのに十分な程度にまで減少させることが出来る化合物である。本明細書において使用される、「阻害物質」という用語は、限定されないが、siRNA、shRNA、合成shRNA; miRNA、アンチセンスRNAおよびDNAならびにリボザイムを含む、オリゴヌクレオチド阻害物質のうちの1つ以上を指す。

【0205】

「二本鎖核酸化合物」または、「dsRNA分子」または、「dsRNA阻害物質」は、遺伝子の発現、またはそのような遺伝子の産物の活性を、所望の生理学的または生物学的効果を得るのに十分な程度にまで減少、または下方制御することができる化合物であり、dsRNA、siRNA、shRNA、合成shRNA; miRNAのうちの1以上を含む。阻害はまた、下方制御（または、RNAiに対してはサイレンシング）とも呼称される。

【0206】

本明細書において使用される、「阻害する」という用語は、遺伝子の発現または、そのような遺伝子の産物の活性を、所望の生物学的または生理学的効果を得るのに十分な程度にまで減少、または下方制御することを指す。阻害は、完全、または部分的なもののいずれかである。

【0207】

本明細書において使用される、標的遺伝子の「下方制御」または「阻害」という用語は、遺伝子の発現（転写または翻訳）の阻害、または、標的遺伝子のポリペプチド活性の阻

10

20

30

40

50

害を意味し、ここで、当該標的遺伝子は、配列番号 1 ~ 7 のうちの任意の 1 つに記述される mRNA へと転写された p 5 3、またはその SNP (一塩基多型) または他の変異体である。ヒト p 5 3 遺伝子の転写変異体のそれぞれの mRNA に対する g i ナンバーは、配列番号 1 ~ 7 に記述されている。標的 mRNA 配列、または転写変異体のポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 ~ 7 に記述される mRNA 配列、またはそれらの任意の相同的な配列 (好ましくは、配列番号 1 ~ 7 に記述される mRNA のうちの任意の 1 つに対して、少なくとも 70 % の同一性、より好ましくは 80 % の同一性、さらにより好ましくは 90 % または 95 % の同一性を有する) を指す。それゆえ、本明細書に記述される、変異、修正または修飾を受けた配列番号 1 ~ 7 の内の任意の 1 つから誘導されたポリヌクレオチド配列は、本開示に包含される。「mRNA ポリヌクレオチド配列」、「mRNA 配列」、および「mRNA」という用語は相互交換可能に用いられる。

10

【0208】

本明細書において使用される、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」という用語は、相互交換可能に用いられても良く、および、デオキシリボ核酸 (DNA)、およびリボ核酸 (RNA) を含有するヌクレオチド配列を指す。当該用語は、ヌクレオチドアナログから作製された RNA または DNA のいずれかのアナログを、均等物として含むことを理解されたい。

【0209】

「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」は、約 2 ~ 約 50 ヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチド、またはリボヌクレオチドの配列を指す。DNA または RNA ヌクレオチドのそれぞれは、独立して、天然、または合成であってもよく、および / または、修飾されていても、修飾されていなくても良い。修飾には、オリゴヌクレオチド中の糖部分、塩基部分、および / または、ヌクレオチド間の結合に対する変更を含む。本明細書に開示される核酸化合物には、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾デオキシヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、非従来の部分、およびそれらの組み合わせを含有する分子が包含される (ただし、各ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドではない場合に限る)。

20

【0210】

本明細書において使用される、「非従来の部分」という用語には、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、非修飾デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、鏡映ヌクレオチド (L-DNA および L-RNA)、塩基対ではないヌクレオチドアナログ、および 2' - 5' ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するヌクレオチドに結合されたヌクレオチド; C3、C4、C5 および C6 部分; トレオース核酸 (TNA)、ピラゾロトリアジン (PT) 塩基修飾核酸アナログ; モルホリノ; 架橋核酸 (LNA を含む) およびエチレン架橋核酸 (ENA) が含まれる。

30

【0211】

「実質的に相補的」とは、別の配列に対し、約 84 % 超の相補性を指す。たとえば、19 塩基対からなる二本鎖領域においては、1 つのミスマッチは、94.7 % の相補性となり、2 つのミスマッチは 89.5 % の相補性となり、3 つのミスマッチは 84.2 % の相補性となり、当該二本鎖領域は実質的に相補的となる。ゆえに、「実質的に同一」とは、別の配列に対し、約 84 % 超の同一性を指す。

40

【0212】

「ヌクレオチド」は、天然もしくは合成であってもよい、および / または、修飾されていてもよい、もしくは修飾されていなくてもよい、デオキシリボヌクレオチドならびにリボヌクレオチドを包含することを意味する。修飾には、オリゴヌクレオチド中の糖部分、塩基部分および / または、ヌクレオチド間の結合に対する変更が含まれる。

【0213】

ヌクレオチドは、天然型塩基、または合成修飾塩基から選択されても良い。天然型塩基としては、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルが含まれる。ヌクレオチドの修飾塩基としては、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン

50

、6 - メチル、2 - プロピルおよび他のアルキルアデニン、5 - ハロウラシル、5 - ハロシトシン、6 - アザシトシン、および6 - アザチミン、シュードウラシル、4 - チオウラシル、8 - ハロアデニン、8 - アミノアデニン、8 - チオールアデニン、8 - チオールアルキルアデニン、8 - ヒドロキシルアデニン、および他の8 - 置換アデニン、8 - ハログアニン、8 - アミノグアニン、8 - チオールグアニン、8 - チオールアルキルグアニン、8 - ヒドロキシルグアニンおよび他の置換グアニン、他のアザおよびデアザアデニン、他のアザおよびデアザグアニン、5 - トリフルオロメチルウラシルならびに、5 - トリフルオロシトシンが含まれる。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド中の1以上のヌクレオチドはイノシンと置換されている。

【0214】

10

一部の実施形態において、本開示により、修飾されていないヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチド、および/または、非従来の部分を含む、阻害性オリゴヌクレオチド化合物が提供される。当該化合物は、糖修飾、塩基修飾、および、ヌクレオチド間結合修飾からなる群から選択される修飾ヌクレオチドを少なくとも1つ含有し、および、たとえば、限定されないが、DNA、LNA（ロックド核酸）、ENA（エチレン架橋核酸）、PNA（ペプチド核酸）、アラビノシド、ホスホノカルボキシレート、またはホスフィノカルボキシレートヌクレオチド（PACEヌクレオチド）、鏡映ヌクレオチド、または6炭糖を有するヌクレオチド等の非従来の部分を含むとしても良い。

【0215】

ヌクレオチド/オリゴヌクレオチドのすべてのアナログ、または、ヌクレオチド/オリゴヌクレオチドに対するすべての修飾が、本明細書に開示される核酸化合物に使用される（ただし、当該アナログまたは修飾により、当該核酸化合物の機能が実質的な悪影響を受けない場合に限る）。

20

【0216】

糖修飾には、糖残基の2'部分に対する修飾が含まれ、および、欧州特許第EP 0 586 520 B1号または同第EP 0 618 925 B1号に記述される、特に、アミノ、フルオロ、アルコキシ（たとえば、メトキシ）、アルキル、アミノ、フルオロ、クロロ、ブロモ、CN、CF、イミダゾール、カルボキシレート、チオエート、C₁ ~ C₁₀ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリルまたはアラルキル、OCF₃、OCN、O-、S-、またはN-アルキル；O-、S、またはN-アルケニル；SOCH₃；SO₂CH₃；ON₂；NO₂、N₃；ヘテロジクロアルキル（heterozycl oalkyl）；ヘテロシクロアルカリル（heterozycl oalkaryl）；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノまたは置換シリルが含まれる。

30

【0217】

1つの実施形態において、本明細書に開示される核酸分子は、糖部分に2'修飾を含有する（「2'糖修飾」）リボヌクレオチドを少なくとも1つ含有する。ある実施形態において、化合物は、2'-O-アルキル、または2'-フルオロ、または2'-O-アリル、または、任意選択的に交互の位置に対する、任意の他の2'修飾を含有する。他の、安定化修飾もまた、可能である（たとえば、末端修飾）。一部の実施形態において、好ましい2'-O-アルキルは、2'-O-メチル（メトキシ）糖修飾である。

40

【0218】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの主鎖は修飾され、リン酸-D-リボース体を含むが、チオホスフェート-D-リボース体、トリエステル、チオエート、2'-5'架橋主鎖（5'-2'としてもまた呼称されうる）、PACE等もまた、含むとしてもよい。

【0219】

本明細書において使用される、「対ではないヌクレオチドアナログ」という用語は、塩基対ではない部分（限定されないが、6脱アミノアデノシン（6 des amino adenosine）（ネブラリン（Nebularine））、4-Me-インドール、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、Ds、Pa、N3-MeリボU、N3-

50

MeリボT、N3-Me-dC、N3-Me-dT、N1-Me-dG、N1-Me-dA、N3-エチル-dC、N3-Me-dCを含む)を含有する、ヌクレオチドアナログを意味する。一部の実施形態において、塩基対ではないヌクレオチドアナログは、リボヌクレオチドである。他の実施形態において、他の実施形態において、塩基対ではないヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドである。ヌクレオチドアナログの例は、ペプチド核酸(PNA)であり、ここで、DNA(またはRNA)のデオキシリボース(またはリボース)リン酸主鎖は、ペプチド中に存在するものと類似したポリアミド主鎖と置換されている。PNAアナログは、酵素分解に対して抵抗性であり、*in vivo*および*in vitro*における安定性を増強させることが示されている。オリゴヌクレオチドに対して行うことができる他の修飾としては、ポリマー主鎖、環状主鎖、非環状主鎖、チオホスフェート-D-リボース主鎖、トリエステル主鎖、チオエート主鎖、2'-5'架橋主鎖、人工核酸、モルホリノ核酸、グリコール核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、アラビノシド、および鏡映ヌクレオシド(たとえば、-D-デオキシリボヌクレオシドの代わりに、-L-デオキシリボヌクレオシド)が挙げられる。LNAヌクレオチドを含有するdsRNA分子の例は、Elmenet al., (NAR 2005, 33(1):439-447)に開示されている。

【0220】

本開示の化合物は、1以上の逆位ヌクレオチド(たとえば、逆位チミジンまたは逆位アデニン)(たとえば、Takei, et al., 2002, JBC 277(26):23800-06を参照のこと)を用いて合成されてもよい。

【0221】

「鏡映」ヌクレオチドは、天然型ヌクレオチドまたは普遍的に用いられているヌクレオチドに対して、反転したキラリティーを有するヌクレオチドである(すなわち、天然型(D-ヌクレオチド)の鏡像(L-ヌクレオチド)であり、鏡映リボヌクレオチドの場合においては、L-RNA、および「スピーゲルマー(spiegelmer)」とも呼称される)。ヌクレオチドはリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドであっても良く、さらに、少なくとも1つの糖、塩基および/または主鎖修飾を含有しても良い。鏡映ヌクレオチドの例は、米国特許第6,586,238号に開示されている。米国特許第6,602,858号は、少なくとも1つのL-ヌクレオチド置換を含有する核酸触媒を開示している。

【0222】

他の修飾としては、オリゴヌクレオチドの5'部分および/または3'部分への末端修飾が挙げられ、キャップ部分としてもまた知られている。そのような末端修飾は、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、脂質、ペプチド、糖および逆位脱塩基部分から選択される。

【0223】

本明細書に開示される核酸化合物の様々な実施形態において、好ましい修飾としては、センス鎖および/またはアンチセンス鎖中のTNA部分の組み込みが挙げられる。TNA部分を含有するdsRNAの例は、国際出願PCT/US11/063365号(本発明の譲受人と同一)に開示されている。一部の実施形態において、センス鎖の1~19リボヌクレオチドが、TNAと置換されていてもよい。

【0224】

本明細書に開示される核酸化合物の様々な実施形態において、好ましい修飾としては、センス鎖および/またはアンチセンス鎖中のピラゾロトリアジン系修飾ヌクレオチド部分の組み込みが挙げられる。ピラゾロトリアジン部分を含有するdsRNAおよびピラゾロトリアジン部分の例は、国際出願PCT/IL2013/050465号(本発明の譲受人に共譲渡)に開示されている。ピラゾロトリアジンDNAまたはRNAアナログは、好ましくは、19merのアンチセンス鎖へ1,5,6または7(5'>3')の位置において組み込まれる。一部の実施形態において、ピラゾロトリアジンRNAアナログが好ましい。ピラゾロトリアジンDNAアナログまたはピラゾロトリアジンRNAアナログはまた、3'末端オーバーハングとして、センス鎖またはアンチセンス鎖の3'末端に共有結

合されていてもよい。

【0225】

本明細書において使用される、「結合部分」という用語は、核酸分子、好ましくは、5'末端または3'末端のうちの1つ以上に共有結合されることができる、ペプチド、脂質、薬剤、ビタミン、ミネラル、フルオロフォアを含む部分を指す。理論に拘束されることは望まないが、結合部分により、核酸分子の活性に悪影響を与えることなく、生体分布、エンドソーム脱出、細胞取込、原形質保持、分子の標的化が、変化する。たとえば、好ましいビタミンは、ビタミンD、ビタミンA、またはビタミンE部分であり；好ましい脂質は、スフィンゴ脂質またはコレステロールまたはコレステロール誘導体である。「アルキル部分またはその誘導体」とは、直鎖炭素部分または分枝炭素部分および部分それ自体を指し、または、アルコール、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホノ酢酸を含む、官能基をさらに含有する部分を指し、また、アミン、カルボン酸、エステル、アミドアルデヒドを含有する。「炭化水素部分」および「アルキル部分」は、相互交換可能に用いられる。

10

【0226】

「末端官能基」には、ハロゲン基、アルコール基、アミン基、カルボン酸基、エステル基、アミド基、アルデヒド基、ケトン基、エーテル基が含まれる。

【0227】

本明細書において、p53遺伝子から転写されるmRNAを標的とする、核酸化合物の製造に有用なオリゴヌクレオチド配列（配列番号8～33）が提供される。

20

【0228】

本明細書において、*in vitro*および*in vivo*でp53遺伝子の発現を阻害する方法および組成物が提供される。概すると、当該*in vivo*の方法には、オリゴヌクレオチド化合物、特に、p53遺伝子から転写されたmRNAを標的とする本明細書に開示される二本鎖核酸化合物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する医薬組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する医薬組成物を、*in vivo*でp53遺伝子の発現を下方制御するために有効な量で投与することが含まれる。特に、本明細書において、p53遺伝子の発現に関連した疾患または障害の治療に有用な*in vivo*の方法が開示される。

【0229】

30

特に、本方法を用いて、たとえば、限定されないが、本明細書に開示される疾患または障害または状態等の、疾患または障害または状態の治療のために、p53遺伝子の発現を阻害することができる。

【0230】

本明細書において、配列番号1～7のうちの任意の1つに記述されるポリヌクレオチド配列を有するmRNAへと転写されるp53遺伝子の発現を下方制御する、化学修飾dsRNA化合物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、および、そのような化合物を1以上含有する医薬組成物またはそのような化合物の1以上の薬学的に受容可能な塩を含有する医薬組成物が開示される。

【0231】

40

本明細書に開示される核酸化合物の一部の実施形態において、核酸化合物は、p53遺伝子のmRNAポリヌクレオチド配列の18～40の連続的なヌクレオチドセグメントに対して、センス鎖が実質的に相補的であり、および、アンチセンス鎖が、当該センス鎖に対して実質的に相補的である、二本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0232】

概して、標的mRNA配列から多少逸脱しても、siRNA活性を損なうことなく、許容することができる（たとえば、Czaderna et al., Nuc. Acids Res. 2003, 31(11):2705-2716に記述されている）。一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、mRNAを破壊し、または、mRNAを破壊することなく、転写後レベルで、p53遺伝子の発現を下方制御す

50

る。理論に拘束されることは望まないが、本明細書に開示される核酸化合物は、特定の開裂および分解のためにmRNAを標的としてもよく、および/または、標的メッセージからの翻訳を阻害してもよい。

【0233】

一部の実施形態において、二本鎖核酸化合物は、一端、または両端が平滑末端である。より具体的には、二本鎖核酸化合物は、第一の鎖の5'末端により規定される末端および、第二の鎖の3'末端により規定される末端が平滑末端であってもよく、または、第一の鎖の3'末端により規定される末端および、第二の鎖の5'末端により規定される末端が平滑末端であってもよい。

【0234】

他の実施形態において、2つの鎖の内の少なくとも1つは、それが存在する鎖の3'末端に共有結合されたオーバーハングを有していても良い。各オーバーハングは、独立して、1~5の連続したヌクレオチド、1~5のピラゾロトリアジン(P.T)ヌクレオチドアナログ、1~5の連続した非ヌクレオチド部分もしくはそれらの組み合わせ、または結合部分からなってもよい。

【0235】

二本鎖核酸化合物の二本鎖の長さは、約18~約40ヌクレオチド、好ましくは19~23ヌクレオチドである。さらに、各鎖(オリゴマー)は、独立して、約18~約40塩基、好ましくは18~23塩基、およびさらに好ましくは19、20、または21ヌクレオチドからなる群から選択される長さを有していても良い。

【0236】

さらに、ある好ましい実施形態において、核酸化合物は、二本鎖構造を有しており；ここで、鎖の一方のオリゴヌクレオチド配列は、配列番号8~20のうちの1つから選択され、および、ここで、もう一方の鎖のオリゴヌクレオチド配列は、配列番号21~33のうちの1つから選択され；または、そのような化合物の薬学的に受容可能な塩である。一部の実施形態において、核酸化合物の鎖のうちの1つと、標的RNA(配列番号1~7)の間の相補性は、完全である。一部の実施形態において、核酸化合物の鎖のうちの1つは、標的RNA(配列番号1~7)に対して、実質的に相補的である(すなわち、当該鎖と標的RNAの間に、1、2、または3までの不適合を有する)。一部の実施形態において、二本鎖核酸化合物の鎖の間の相補性は、完全である。一部の実施形態において、二本鎖核酸化合物の鎖は、実質的に相補的である(すなわち、鎖の間に、1、2または3までの不適合を有する)。

【0237】

さらに、二本鎖核酸化合物の第一の鎖の5'末端は、第二の鎖の3'末端に連結されていてもよく、または、第一の鎖の3'末端は、第二の鎖の5'末端に連結されていてもよく、通常、3~100ヌクレオチドの長さ(好ましくは、約3~約10のヌクレオチド)を有する核酸リンカーを介して、当該結合はなされている。

【0238】

本明細書に開示される二本鎖核酸化合物は、活性増加、安定性増加、毒性の減少、標的外効果の減少、および/または、免疫応答の減少のうちの1以上をもたらす構造および修飾を保有している。好ましい実施形態において、本明細書に開示される二本鎖核酸化合物は、活性増加をもたらす構造および修飾を保有している。本明細書に開示される二本鎖核酸の構造は、標的遺伝子、特にp53遺伝子の発現の妨害または減弱に有用な二本鎖RNA化合物に、有益に適用される。

【0239】

様々な実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、糖修飾、塩基修飾、およびヌクレオチド間結合修飾からなる群から選択される修飾ヌクレオチドを少なくとも1つ含有する。したがって、本明細書に開示される化学修飾オリゴヌクレオチド化合物は、たとえば、DNA、LNA(ロックド核酸)、ENA(エチレン架橋核酸)、PNA(ペプチド核酸)、アラビノシド、PACE、鏡映ヌクレオシド、または6炭糖を有するヌク

10

20

30

40

50

レオチド等の修飾ヌクレオチドを含有しても良い。P A C Eヌクレオチドおよびアナログの例は、米国特許第6,693,187号および同第7,067,641号に開示されている(両特許ともに、参照により本明細書に援用される)。オリゴヌクレオチドはさらに、任意選択的に交互する位置で、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ、または2'-O-アシルまたは、任意の他の2'修飾を含有してもよい。活性を著しく減少させない、他の安定化修飾もまた可能である(たとえば、末端修飾)。オリゴヌクレオチドの活性部分の主鎖は、リン酸-D-リボース体を含有してもよく、チオリン酸-D-リボース体、トリエステル、チオエート、2'-5'架橋主鎖(5'-2'ともまた呼称されうる)、P A C E、または任意の他のタイプの修飾も含有してもよい。オリゴヌクレオチドの5'部分および/または3'部分の末端修飾は、存在しても、存在しなくてもよい。そのような末端修飾は、脂質、ペプチド、糖、逆位脱塩基部分または他の分子であっても良い。

10

【0240】

本開示は、p53遺伝子の発現を下方制御する核酸化合物(本明細書に記述される新規の修飾二本鎖核酸化合物等)の作製に有用なオリゴヌクレオチド配列(配列番号8~33)に関するものである。本発明のオリゴヌクレオチド配列は、p53遺伝子の発現の妨害または減弱に有用な二本鎖核酸化合物に有益に適用される。21merまたは23merのオリゴヌクレオチド配列は、本明細書に開示される19merの配列の5'延長および/または3'延長により作製されてもよい。そのような延長は、好ましくは、対応するp53mRNA配列に対して相補的である。

【0241】

20

また、本明細書において、様々な疾患または医学的状態の治療における、核酸化合物の使用が開示される。

【0242】

p53遺伝子の発現を下方制御する方法、分子および組成物は、詳細に本明細書において開示および考察され、ならびに、任意の当該分子および/または組成物は、当該状態の1以上に罹患する対象の治療に有益に用いられる。治療される特定の疾患および医学的状態は、本明細書に開示されている。

【0243】

dsRNAおよびRNA干渉

RNA干渉(RNAi)は、二本鎖(ds)RNA依存性遺伝子特異的転写後サイレンシングが関与する現象である。長いdsRNA分子に反応して活性化される、非特異的抗ウイルス防御メカニズムの活性により、実験的に哺乳類細胞を操作し、この現象を研究する最初の試みは妨害されていた(Gil et al., Apoptosis, 2000, 5:107-114)。後に、21ヌクレオチドRNAの合成二本鎖が、抗ウイルス包括的防御メカニズムを活性化させることなく、哺乳類細胞における遺伝子特異的RNAiを調節しうることが発見された(Elbashir et al., Nature 2001, 411:494-498 and Caplen et al., PNAS 2001, 98:9742-9747)。結果として、短い二本鎖RNAである、低分子干渉RNA(siRNA)が、遺伝子発現の阻害および遺伝子機能の解明のために広く用いられるようになった。

30

40

【0244】

RNA干渉(RNAi)は、小分子干渉RNA(siRNA)(Fire et al., Nature 1998, 391:806)またはマイクロRNA(miRNA)(Ambros V., Nature 2004, 431:350-355);および、Bartel DP., Cell, 2004, 116(2):281-97)が介在している。植物において観察された場合、この対応するプロセスは一般的に、特異的翻訳後遺伝子サイレンシングと呼称され、真菌において観察された場合には、クエリング(quelling)と呼称されている。

【0245】

siRNA化合物は、内因性または外因性遺伝子/mRNAの発現を下方制御またはサ

50

イレンス(すなわち、完全阻害または部分的阻害)する二本鎖RNAである。RNA干渉は、ある種のdsRNAが、特殊なタンパク質複合体へと入り込み、次いで、そこで、相補的な細胞性RNAを標的とし、それらを特異的に分解する能力に基づいている。ゆえに、RNA干渉応答は、siRNAを含有するエンドヌクレアーゼ複合体(一般的に、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と呼称され、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖に対して相補的な配列を有する一本鎖RNAの開裂を調節する)を特徴とする。標的RNAの開裂は、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中間において発生しうる(Elbashir, et al., Genes Dev., 2001, 15:188)。より詳細には、より長いdsRNAが、III型RNAase(DICER、DROSHA等)によって、短い(17~29bp)dsRNA断片(短阻害性RNAまたは「siRNA」とも呼称される)へと消化される(Bernstein et al., Nature, 2001, 409:363-6、および、Lee et al., Nature, 2003, 425:415-9を参照のこと)。RISCタンパク質複合体は、これらの断片および相補的mRNAを認識する。プロセス全体は、標的mRNAのエンドヌクレアーゼ開裂によって終了する(McManus and Sharp, Nature Rev Genet, 2002, 3:737-47; Paddison and Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003, 5(3): 217-24)(これらの用語および提言されているメカニズムに関するさらなる情報については、たとえば、Bernstein, et al., RNA. 2001, 7(11):1509-21; Nishikura, Cell. 2001, 107(4):415-8および国際公開第01/36646号を参照のこと)。

【0246】

既知の遺伝子に対応するdsRNA化合物の選択および合成は、広く報告されている；たとえば、Ui-Tei et al., J Biomed Biotechnol. 2006; 65052; Chalk et al., BBRC. 2004, 319(1):264-74; Sioud and Leirdal, Met. Mol Biol.; 2004, 252:457-69; Levenkova et al., Bioinform. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei et al., NAR 2004, 32(3):936-48を参照のこと。修飾siRNAの製造および使用の例については、Braasch et al., Biochem., 2003, 42(26):7967-75; Chiu et al., RNA, 2003, 9(9):1034-48; PCT出願公開第2004/015107号(atugen);同第02/44321号(Tuschlら)、および米国特許第5,898,031号および同第6,107,094号を参照のこと。

【0247】

いくつかの研究グループにより、細胞内でsiRNAを作製することができるDNA系ベクターの開発が報告されている。その方法は多くの場合、細胞内で効果的にプロセシングされ、siRNAを形成する、短ヘアピンRNAの転写が関与している(Paddison et al. PNAS USA 2002, 99:1443-1448; Paddison et al. Genes & Dev 2002, 16:948-958; Sui et al. PNAS USA 2002, 8:5515-5520;および、Brummelkamp et al. Science 2002, 296:550-553)。これらの報告には、内因的および外因的に発現された多くの遺伝子の特異的に標的化することができるsiRNAの作製方法が記述されている。

【0248】

実験によって、siRNAは、哺乳類およびヒトの両方において、in vivoで有効であることが判明している。具体的には、Bitkoらが、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)のヌクレオカプシドN遺伝子に指向する特異的siRNAが、鼻内投与を行った場合のマウスの治療において有効であることを明らかにしている(Nat. Med. 2

10

20

30

40

50

005, 11(1):50-55)。siRNAの治療応用に関する概説については、たとえば、Barik (Mol. Med 2005, 83: 764-773)、および、Chakraborty (Current Drug Targets 2007 8(3):469-82)を参照のこと。さらに、加齢性黄斑変性症(AMD)を治療するための、VEGFR1受容体を標的とする短siRNAを用いた臨床研究が、ヒト患者において行われている(Kaiser, Am J Ophthalmol. 2006 142(4):660-8)。治療剤としてのsiRNAの使用に関するさらなる情報については、Durcan, 2008. Mol. Pharma. 5(4):559-566; Kim and Rossi, 2008. BioTechniques 44:613-616; Grimm and Kay, 2007, JCI, 117(12):3633-41に見いだされ得る。

10

【0249】

化学合成

本発明の化合物は、リボ核酸オリゴヌクレオチド(またはデオキシリボ核酸ヌクレオチド)の合成に関する、当業者公知の任意の方法により合成されてもよい。そのような合成は、特に、Beaucage and Iyer, Tetrahedron 1992; 48:2223-2311; Beaucage and Iyer, Tetrahedron 1993; 49: 6123-6194、および、Caruthers, et. al., Methods Enzymol. 1987; 154: 287-313に記述されており;チオエートの合成は、特に、Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 367-402に記述されており、RNA分子の合成は、Sproat, in Humana Press 2005 edited by Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31に記述されており、および、各下流プロセスは、特に、Pingoud et. al., in IRL Press 1989 edited by Oliver R.W.A.; Kap. 7: 183-208に記述されている。

20

【0250】

他の合成方法も当分野に公知であり、たとえば、Usman et al., 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe et al., 1990, NAR., 18, 5433; Wincott et al., 1995, NAR. 23, 2677-2684; および Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59に記述される方法があり、これらの方法において、標準的な核酸保護基およびカップリング基(たとえば、5'末端のジメトキシトリチル、および3'末端のホスホラミダイト等)を使用しても良い。修飾された(たとえば、2'-O-メチル化)ヌクレオチドおよび、修飾されていないヌクレオチドが、所望により組み込まれる。

30

【0251】

本発明のオリゴヌクレオチドは別々に合成されてもよく、および、たとえば、ライゲーション(Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., 国際特許出願公開第93/23569号; Shabarov et al., 1991, NAR 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204)、または、合成および/または脱保護の後のハイブリダイゼーションにより、合成後に共に連結されてもよい。

40

【0252】

市販の機器(とりわけ、Applied Biosystemsから入手可能なもの)を用いても良いことに注意されたい;オリゴヌクレオチドは、本明細書に開示される配列に従い、調製される。化学合成された断片の重複している対は、当分野公知の方法を用いてライゲーションされてもよい(たとえば、米国特許第6,121,426号を参照のこ

50

と)。鎖は別々に合成され、次いで、管内で互いにアニーリングされる。次いで、二本鎖 *siRNA* は、アニーリングされなかった一本鎖オリゴヌクレオチド（たとえば、それらのうちの1つが過剰であったため）から HPLC により単離される。本発明の *siRNA* または *siRNA* 断片に関し、そのような配列の2以上が合成され、本発明における使用のために共に連結されてもよい。

【0253】

また、本発明の化合物は、タンデム合成技術（たとえば、米国特許出願公開第2004/0019001号（McSwiggan）に記述されている）を用いて合成されてもよく、ここで、*siRNA* 鎖の両方は、単一な連続するオリゴヌクレオチド断片として合成され、または、開裂可能なリンカーにより分離される鎖として合成され、次いで、開裂され、別々の *siRNA* 断片または鎖（ハイブリダイズし、*siRNA* 二本鎖の精製が可能となる）が産生される。リンカーは、ポリヌクレオチドリinkerまたは非ヌクレオチドリinkerであっても良い。

【0254】

本発明によりさらに、本明細書に記述される任意の疾患および状態を治療するための2以上の核酸分子を含有する医薬組成物が提供され、当該2つの分子は、同等の活性またはさもなければ有益な活性をもたらす量で、医薬組成物中において共に物理的に混合されてもよく、または、共有結合、非共有結合、または核酸リンカー（2～100、好ましくは2～50または2～30ヌクレオチドの範囲の長さ）により共に連結されてもよい。1つの実施形態において、核酸分子は、本明細書に記述される二本鎖核酸構造から構成されており、ここで、2つの核酸分子は、本明細書に記述されるオリゴヌクレオチドから選択される。従って、核酸分子は、タンデム *siRNA* 化合物を形成するために、共有結合、または非共有結合、またはリンカーにより連結されていてもよい。2つの *siRNA* 配列を含有する、そのようなタンデム *dsRNA* 分子は、通常、38～150ヌクレオチドの長さ、より好ましくは38または40～60ヌクレオチドの長さであり、および、もし3以上の *siRNA* 配列がタンデム分子に含まれている場合には、それ以上の長さである。内在性細胞プロセッシングを介して産生される *siRNA* をコードする、2以上の長い配列から構成されるより長いタンデム化合物（たとえば、長い *dsRNA*）もまた想定され、2以上の *shRNA* をコードするタンデム分子も想定される。そのようなタンデム分子もまた、本開示の一部であるとみなされる。本明細書に開示される、2つ（タンデム）の、またはそれ以上（*RNAi star*）の *dsRNA* 配列を含有する化合物が想定される。そのような「タンデム」または「*star*」分子の例は、PCT国際特許出願公開第2007/091269号（本出願の譲受人と同一であり、その全体が、参照により本明細書に援用される）に開示されている。

【0255】

p53を標的とする核酸分子が医薬組成物中の主な活性成分であっても良く、または、2以上の核酸（または、2以上の核酸をコードする、または内的に産生する分子（それが、2以上の核酸化合物をコードする、分子の混合物であれ、1以上のタンデム分子の混合物であれ））を含有する医薬組成物の1つの活性成分であっても良い（当該医薬組成物はさらに、1以上の追加の遺伝子を標的とする1以上の追加の核酸分子から構成されている）。当該追加の遺伝子（複数含む）の同時阻害は、本明細書に開示される疾患の治療に対し、付加的な、または相乗的な効果をもたらす可能性がある。

【0256】

さらに、本明細書に開示される核酸、または、そのような核酸をコードする、もしくは含有する任意の核酸分子は、本明細書に開示される疾患の治療のための標的化増強を得るため、標的細胞上に発現された、内在化可能な細胞表面分子に対する抗体（アプタマー分子を含む）に連結または結合（共有結合または非共有結合）されていても良い。たとえば、抗Fas抗体（好ましくは、中和抗体）と任意の *dsRNA* が（共有結合的、または非共有結合的に）組み合わされていてもよい。別の例において、リガンド/抗体のように作用することができるアプタマーを、任意の核酸化合物と（共有結合的、または非共有結合

的に) 組み合わせても良い。

【0257】

本明細書に開示される核酸分子は、直接的に、またはウイルス性ベクターと共に、または非ウイルス性ベクターとともに、のいずれかで送達されても良い。直接送達される場合、配列は通常、ヌクレアーゼ抵抗性の状態にある。あるいは、配列は、当該配列が本明細書の以下に記述される細胞中で発現されるように、発現カセットまたは発現構築物中へと組み込まれていても良い。一般的に、構築物は、配列が標的細胞中で発現されるように、適切な制御配列またはプロモーターを含有している。本発明の化合物の送達のために任意選択的に用いられるベクターは市販されており、および、当業者公知の方法により、本発明の化合物の送達目的のために改変を行っても良い。

10

【0258】

化学的修飾

ヌクレオチド/オリゴヌクレオチドのすべてのアナログ、またはヌクレオチド/オリゴヌクレオチドに対する修飾を、本発明に用いても良い(当該アナログまたは修飾が、ヌクレオチド/オリゴヌクレオチドの機能に対して、実質的に影響を与えない場合に限る)。ヌクレオチドは、天然型塩基または合成修飾塩基から選択されても良い。天然型塩基としては、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルが挙げられる。ヌクレオチドの修飾塩基は、本明細書に記述されている。

【0259】

さらに、ポリヌクレオチドのアナログが調製されてもよく、ここで、1以上のヌクレオチドの構造は、根本的に改変され、および、治療試薬または実験試薬として、より良く適合されている。ヌクレオチドアナログの例は、ペプチド核酸(PNA)であり、ここで、DNA(またはRNA)中のデオキシリボース(またはリボース)リン酸主鎖は、ペプチド中に存在するものと類似したポリアミド主鎖と置換されている。PNAアナログは、酵素分解に対して抵抗性であることが示されており、ならびに、*in vivo*および*in vitro*において安定性が増強されていることが示されている。オリゴヌクレオチドに対して行うことができる他の修飾としては、ポリマー主鎖、環状主鎖、非環状主鎖、チオホスフェート-D-リボース主鎖、トリエステル主鎖、チオエート主鎖、2'-5'架橋主鎖、人工核酸、モルホリノ核酸、ロックド核酸(LNA)、グリコール核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、アラビノシド、および鏡映ヌクレオシド(たとえば、*-D*-デオキシヌクレオシドの代わりに、*-L*-デオキシヌクレオシド)が挙げられる。LNAヌクレオチドを含有するdsRNA分子の例は、Elmen et al., (NAR 2005, 33(1): 439-447)に開示されている。

20

30

【0260】

本発明の核酸化合物は、1以上の逆位ヌクレオチド(たとえば、逆位チミジンまたは逆位アデニン(たとえば、Takei, et al., 2002, JBC 277(26): 23800-06を参照のこと))を用いて合成されても良い。

【0261】

本明細書において使用される、「非従来の部分」という用語は、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、鏡映ヌクレオチド、トレオース核酸(TNA)、ピラゾロトリアジン(PT)ヌクレオチドアナログ、塩基対ではないヌクレオチドアナログ、および2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するヌクレオチドに結合されたヌクレオチド; C3、C4、C5およびC6部分; 架橋核酸(LNAを含む)およびエチレン架橋核酸(ENA)を指す。

40

【0262】

本明細書において使用される、「キャップ」または「キャップ部分」という用語には、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、脱塩基リボース部分および脱塩基デオキシリボース部分の修飾(2'-Oアルキル修飾を含む); 逆位脱塩基リボース、逆位脱塩基デオキシリボース部分(idAb)、およびそれらの修飾; アミノ-C6部分(AM

50

- c 6)、C 6 - イミノ - p i、非ヌクレオチド部分、鏡映ヌクレオチド (L - DNA および L - RNA を含む) ; 5 ' OMe ヌクレオチド ; 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 2 - ナフタレン 醯酸 ホスホジエステル (THNB)、ビタミン、薬剤部分およびヌクレオチドアナログ (限定されないが、4 ' , 5 ' メチレンヌクレオチドを含む) ; 1 - (- D - エリスロフラノシル) ヌクレオチド ; 4 ' - チオヌクレオチド、炭素環ヌクレオチド ; 5 ' - アミノ - リン酸アルキル ; 1 , 3 - ジアミノ - 2 - リン酸プロピル、3 - リン酸アミノプロピル ; 6 - リン酸アミノヘキシル ; 12 - リン酸アミノドデシル ; リン酸ヒドロキシプロピル ; 1 , 5 - アンヒドロヘキシトールヌクレオチド ; - ヌクレオチド ; トレオ - ペントフラノシルヌクレオチド ; 非環式 3 ' , 4 ' - セコヌクレオチド ; 3 , 4 - ジヒドロキシブチルヌクレオチド ; 3 , 5 - ジヒドロキシペンチルヌクレオチド , 5 ' - 5 ' - 逆位脱塩基部分 ; 1 , 4 - リン酸ブタンジオール ; 5 ' - アミノ ; ならびに、架橋または非架橋メチルホスホン酸および 5 ' - メルカプト部分が挙げられる。

10

【 0 2 6 3 】

脱塩基デオキシリボース部分としては、たとえば、脱塩基デオキシリボース - 3 ' - リン酸 ; 1 , 2 - ジデオキシ - D - リボフラノース - 3 - リン酸 ; 1 , 4 - アンヒドロ - 2 - デオキシ - D - リビトール - 3 - リン酸が挙げられる。逆位脱塩基デオキシリボース部分としては、逆位デオキシリボ脱塩基 ; 3 ' , 5 ' 逆位デオキシリボ脱塩基 5 ' - リン酸が挙げられる。

【 0 2 6 4 】

「鏡映」ヌクレオチドは、天然型ヌクレオチドまたは普遍的に用いられているヌクレオチドに対して、反転したキラリティーを有するヌクレオチドである (すなわち、天然型 (D - ヌクレオチド) の鏡像 (L - ヌクレオチド)) 。ヌクレオチドは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドであっても良く、さらに、少なくとも 1 つの糖、塩基および / または主鎖の修飾を含有しても良い。米国特許第 6 , 6 0 2 , 8 5 8 号に、少なくとも 1 つの L - ヌクレオチド置換を含有する核酸触媒が開示されている。鏡映ヌクレオチドとしては、たとえば、L - DNA (L - デオキシリボアデノシン - 3 ' - リン酸 (鏡映 d A) ; L - デオキシリボシチジン - 3 ' - リン酸 (鏡映 d C) ; L - デオキシリボグアノシン - 3 ' - リン酸 (鏡映 d G) ; L - デオキシリボチミジン - 3 ' - リン酸 (鏡映 d T)) および L - RNA (L - リボアデノシン - 3 ' - リン酸 (鏡映 r A) ; L - リボシチジン - 3 ' - リン酸 (鏡映 r C) ; L - リボグアノシン - 3 ' - リン酸 (鏡映 r G) ; L - リボウラシル - 3 ' - リン酸 (鏡映 d U)) が挙げられる。

20

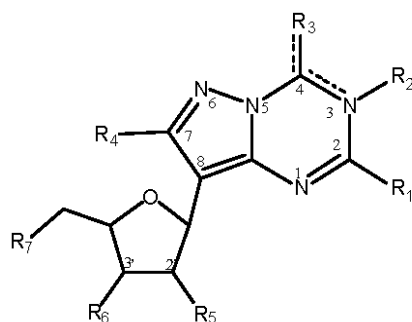
30

【 0 2 6 5 】

有用なピラゾロトリアジン (P T) ヌクレオチドアナログは、以下の一般式 I により表される :

(I)

【 化 1 】



40

ここで、

R₁ および R₄ のそれぞれは、独立して、H、ハロゲン、- CN、- SCN、- NO₂、- O - ヒドロカルビル、- S - ヒドロカルビル、- CO - H、- CO - ヒドロカルビル、- NR₈R₉、ヘテロアリアル、または、任意選択的に、1 以上の基 (其々、独立して、ハロゲン、- CN、- SCN、または - NO₂ である) により置換されたヒドロカルビル

50

から選択され、ここで、 R_8 および R_9 は、それぞれ、独立して、H、ヒドロカルビル、または、アミン保護基であり；または、 R_8 および R_9 は、それらが結合される窒素原子と共に、飽和複素環または不飽和複素環（任意選択的に、酸素、窒素または硫黄から選択される 1 ~ 2 のさらなるヘテロ原子を含有する）を形成し；

R_2 は、Hまたは、存在せず；

R_3 は、Oまたは $-NR_{10}R_{10'}$ であり、ここで、 R_{10} および $R_{10'}$ は、それぞれ、独立して、H、ヒドロカルビル、 $-CO-$ ヒドロカルビル、またはアミン保護基であり；および、

R_5 は、H、ハロゲン、 $-O^-$ 、または、 $-OR_{11}$ であり；

R_6 は、 $-O^-$ 、または $-OR_{11}$ であり；

R_7 は、 $-OR_{11}$ 、またはリン酸部分であり；

R_{11} はそれぞれ独立して、H、 $(C_1 - C_8)$ アルキル、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン- OR_{12} 、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン- SR_{12} 、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン- NR_{12} 、 R_{13} 、ヒドロキシル保護基、または、式 $-P(OR_{14})NR_{15}R_{16}$ のホスホラミダイト部分であり、ここで、 R_{14} は、Hまたはシアノ- $(C_1 - C_8)$ アルキル、好ましくはシアノエチルであり、ならびに、 R_{15} および R_{16} はそれぞれ、独立して、Hまたは $(C_1 - C_8)$ アルキル、好ましくはイソプロピルであり；

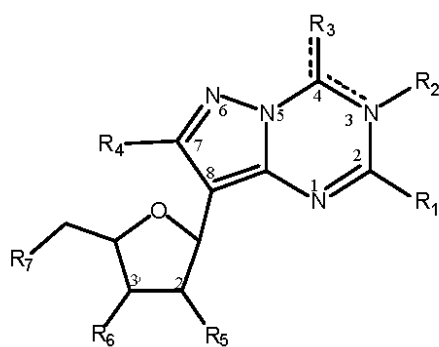
R_{12} および R_{13} はそれぞれ、独立して、Hまたは $(C_1 - C_8)$ アルキルであり；ならびに、

点線は、4 位の炭素原子と、3 位の窒素原子または R_3 残基のいずれかの間の、潜在的な二重結合を表し（ただし、 R_2 が H である場合、4 位の炭素原子と R_3 の間に二重結合があり、および、 R_2 が存在しない場合、4 位の炭素原子と 3 位の窒素原子の間に二重結合がある）、しかし、 R_5 および R_6 がそれぞれ独立して $-OH$ または $-O^-$ である場合のアナログ、および、 R_5 が H であり、 R_1 がヒドロカルビルである場合のアナログは除外する。

【0266】

本発明の様々な実施形態において、以下の一般式 I I の P T ヌクレオチドアナログを含有する二本鎖核酸分子が提供される：

【化 2】



ここで、

R_1 および R_4 のそれぞれは、独立して、H、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO_2$ 、 $-O-$ ヒドロカルビル、 $-S-$ ヒドロカルビル、 $-CO-H$ 、 $-CO-$ ヒドロカルビル、 $-NR_8R_9$ 、ヘテロアリール、または、任意選択的に、1 以上の基（其々、独立して、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-SCN$ 、または $-NO_2$ である）により置換されたヒドロカルビルから選択され、ここで、 R_8 および R_9 は、それぞれ、独立して、Hまたはヒドロカルビルであり、または、 R_8 および R_9 は、それらが結合される窒素原子と共に、飽和複素環または不飽和複素環（任意選択的に、酸素、窒素または硫黄から選択される 1 ~ 2 のさらなるヘテロ原子を含有する）を形成し；

R_2 は、Hまたは、存在せず；

R_3 は、Oまたは $-NR_{10}R_{10'}$ であり、ここで、 R_{10} および $R_{10'}$ は、それぞ

れ、独立して、H、ヒドロカルビル、または - CO - ヒドロカルビルであり；

R_5 は、H、ハロゲン、 $-O^-$ 、または、 $-OR_{11}$ であり；

R_6 は、 $-O^-$ 、または $-OR_{11}$ であり；

R_7 は、 OR_{11} 、モノリン酸部分またはリン酸結合部分であり；ならびに、

R_{11} はそれぞれ独立して、H、 $(C_1 - C_8)$ アルキル、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン - OR_{12} 、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン - SR_{12} 、または、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン - $NR_{12}R_{13}$ であり、ここで、 R_{12} および R_{13} はそれぞれ、独立して、Hまたは $(C_1 - C_8)$ アルキルであり；ならびに、

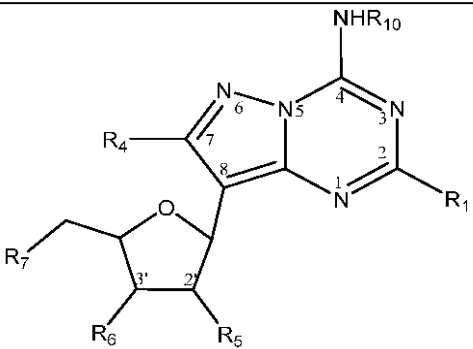
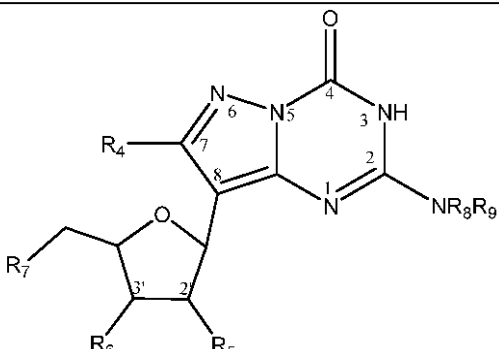
点線は、4位の炭素原子と、3位の窒素原子またはラジカル R_3 のいずれかの間の潜在的な二重結合を表す（ただし、 R_2 がHである場合、4位の炭素原子と R_3 の間に二重結合があり、および、 R_2 が存在しない場合、4位の炭素原子と3位の窒素原子の間に二重結合がある）。

10

【0267】

一部の実施形態において、PTヌクレオチドアナログは、式IIaのアデニンPTヌクレオチドアナログ、または式IIbのグアニンPTヌクレオチドアナログ（表Iに記載）を含有する。

表I：式IIaおよび式IIbの、アデニンおよびグアニンのPTヌクレオチドアナログ【表5】

IIa	IIb
	

20

30

【0268】

一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログは、式IIaのアデニンPTヌクレオチドアナログであり（すなわち、 R_2 は存在せず、 R_3 は NHR_{10} である）、ここで、 R_1 は、Hであり、 R_{10} は、Hであり； R_4 は、Hであり； R_5 は、H、ハロゲン、または $-OR_{11}$ であり、ここで、 R_{11} は、H、 $(C_1 - C_8)$ アルキル、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン - OR_{12} 、 $(C_1 - C_8)$ アルキレン - SR_{12} 、または $(C_1 - C_8)$ アルキレン - $NR_{12}R_{13}$ であり、ここで、 R_{12} および R_{13} のそれぞれは、独立して、Hまたは $(C_1 - C_8)$ アルキルであり； R_6 は、 $-O^-$ または、 $-OH$ であり；および、 R_7 は、OHまたはリン酸結合部分である。

一部の実施形態において、 R_{11} は、H、 CH_3 または、 $(CH_2)_2 - OCH_3$ である。一部の実施形態において、 R_{11} は、Hである（すなわち、 R_5 は、ヒドロキシ；2' OHである）。一部の実施形態において、 R_{11} は、 CH_3 である（すなわち、 R_5 は、メトキシ、2' OMeである）。一部の実施形態において、 R_{11} は、 $(CH_2)_2 - OCH_3$ である（すなわち、 R_5 は、メトキシエトキシ；2' MOEである）。

40

【0269】

一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログは、式IIaのデオシアデノシンPTヌクレオチドアナログであり、ここで、 R_1 は、Hであり、 R_{10} は、Hであり； R_4 は、Hであり； R_5 は、Hまたはハロゲンであり； R_6 は、 $-O^-$ または $-OH$ であり；および、 R_7 は、OHまたはリン酸部分である。一部の実施形態において、 R_5 は、Hである。一部の実施形態において、 R_5 は、ハロゲン

50

、好ましくは、フルオロ(F)である。

【0270】

一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン(PT)ヌクレオチドアナログは、式IIbのグアノシンPTヌクレオチドアナログであり、ここで、 R_4 、 R_8 および R_9 のそれぞれは、Hであり、 R_5 は、 $-OR_{11}$ であり、ここで、 R_{11} は、H、($C_1 - C_8$)アルキル、($C_1 - C_8$)アルキレン- OR_{12} 、($C_1 - C_8$)アルキレン- SR_{12} 、または($C_1 - C_8$)アルキレン- $NR_{12}R_{13}$ であり、ここで、 R_{12} および R_{13} のそれぞれは、独立して、Hまたは($C_1 - C_8$)アルキルであり； R_6 は、 $-O^-$ または $-OH$ であり；および、 R_7 は、OHまたはリン酸部分である。一部の実施形態において、 R_{11} は、H、 CH_3 または(CH_2)₂- OCH_3 である。一部の実施形態において、 R_{11} は、Hである(すなわち、 R_5 は、ヒドロキシ；2'-OHである)。一部の実施形態において、 R_{11} は、 CH_3 である(すなわち、 R_5 は、メトキシ、2'-Oメチルである)。一部の実施形態において、 R_{11} は、(CH_2)₂- OCH_3 である(すなわち、 R_5 は、メトキシメトキシ；2'-MOEである)。

10

【0271】

一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン(PT)ヌクレオチドアナログは、式IIbのデオキシグアノシンPTヌクレオチドアナログであり(すなわち、 R_2 は、Hであり、および、 R_3 は、Oである)、ここで、 R_4 、 R_8 および R_9 のそれぞれは、Hであり、 R_5 は、H、ハロゲン、または $-OR_{11}$ であり； R_6 は、 $-O^-$ または $-OH$ であり；および、 R_7 は、OHまたはリン酸結合部分である。一部の実施形態において、 R_5 は、Hである。一部の実施形態において、 R_5 は、ハロゲン、好ましくはフルオロ(F)である。

20

【0272】

本明細書に開示される核酸化合物の一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの主鎖は修飾され、および、リン酸-D-リボース体を含むし、また、チオリン酸-D-リボース体、トリエステル、チオエート、2'-5'架橋主鎖(2'5'結合ヌクレオチドまたは5'-2'とも呼称されうる)、PAC等もまた含有してもよい。さらなる修飾としては、可逆的、または、不安定なホスホトリエステル結合(たとえば、それぞれ、米国特許出願公開第20090093425号および米国特許出願公開第20110294869号に開示されている)が挙げられる。

30

【0273】

本明細書において開示される核酸化合物(構造A1およびA2)の様々な実施形態において、各連続的なNまたはN'の、隣接するNまたはN'への共有結合は、ホスホジエステル結合である。

【0274】

本明細書において開示される核酸化合物(構造A、A1およびA2)の一部の実施形態において、センス鎖は、3'末端および5'末端の両方で、リン酸化、または非リン酸化のいずれかである。本明細書において開示される核酸化合物(構造A、A1およびA2)の一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、3'末端および5'末端の両方で、リン酸化、または非リン酸化のいずれかである。本明細書において開示される核酸化合物(構造A、A1およびA2)の一部の実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれの3'末端および5'末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されている。本明細書において開示される核酸化合物(構造A、A1およびA2)の一部の実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれの3'末端および5'末端のリボヌクレオチドは、リン酸化されていない。本明細書において開示される核酸化合物(構造A、A1およびA2)の一部の実施形態において、アンチセンス鎖およびセンス鎖のそれぞれの3'末端および5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化され、5'末端のリボヌクレオチドはリン酸化されてない。

40

【0275】

本明細書において開示される核酸化合物(構造A、A1およびA2)の一部の実施形態

50

において、修飾リボヌクレオチドは、糖部分の2'の位置で修飾を含有する。本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、修飾リボヌクレオチドは、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドである。

【0276】

本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、非従来のな部分は、鏡映ヌクレオチド、トレース核酸（TNA）、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログ、および、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するリボヌクレオチドに結合されたりボヌクレオチドから選択される。

【0277】

本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、非従来のな部分は、ヌクレオチドアナログである。本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、非従来のな部分は、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログである。本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドが存在する。本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のみに存在する。本明細書に開示される核酸化合物の一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログは、4~7位（5'>3'）のうちの1つにおいて1つ、アンチセンス鎖に存在する。本明細書に開示される核酸化合物の一部の好ましい実施形態において、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログは、2つ（4、5、6または7位（5'>3'）の内の1つ、および、1位（5'>3'））、アンチセンス鎖において存在する。本明細書に開示される核酸化合物の様々な実施形態において、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログは、オーバーハングが存在する鎖の3'末端に共有結合されているオーバーハング（Zおよび/またはZ'）のうちの1つ、または両方において、および、アンチセンス鎖において、存在する。

【0278】

本明細書に開示される核酸化合物の様々な実施形態において、オーバーハング（ZまたはZ'）は、独立して、存在し、または存在しないが、もし存在する場合、それが存在する鎖の3'末端に共有結合されている。様々な実施形態において、オーバーハング（ZまたはZ'）は、独立して、1~5の連続的なヌクレオチド、ピラゾロトリアジン（PT）ヌクレオチドアナログもしくは連続的な非ヌクレオチド部分、またはそれらの組み合わせ、またはビタミン、または薬剤部分（それは、それが存在する鎖の3'末端に共有結合されている）を含有する。本明細書に開示される核酸化合物の一部の実施形態において、オーバーハング（ZおよびZ'）の両方が、存在しない。他の実施形態において、ZまたはZ'は、存在する。

【0279】

本明細書に開示される核酸化合物の一部の実施形態において、Zおよび/またはZ'は、1~5の連続的なヌクレオチドである。一部の実施形態において、各ヌクレオチドは、dTであり、ZおよびZ'のそれぞれは、2つの連続的なヌクレオチド（dTdT）である。

【0280】

本明細書に開示される核酸化合物の一部の実施形態において、Zおよび/またはZ'は、1~5の連続的な非ヌクレオチド部分である。一部の実施形態において、Zおよび/またはZ'のそれぞれは、独立して、非ヌクレオチド部分（たとえば、C2、C3、C4、C5またはC6アルキル部分）、任意選択的に、C3-1,3-プロパンジオール、モノ（リン酸二水素）（C3）[CAS RN: 13507-42-1]、または、その誘導体（プロパノール（C3-OH/C3OH）、プロパンジオールおよび、プロパンジオールのホスホジエステル誘導体（「C3Pi」）を含む）を含有する。一部の実施形態において、Zおよび/またはZ'は、2つの炭化水素部分を含有し、および、一部の例におい

て、 $C3Pi - C3OH$ または $C3Pi - C3Pi$ である。 $C3$ のそれぞれは、共有結合（好ましくは、ホスホ系の結合）を介して、隣接する $C3$ に共有結合されている。一部の実施形態において、ホスホ系の結合は、ホスホロチオエート、ホスホノ酢酸、またはホスホジエステル結合である。

【0281】

本明細書に開示される核酸化合物の一部の実施形態において、 Z および Z' のそれぞれは、1～2の連続的な非ヌクレオチド部分である。一部の好ましい実施形態において、各非ヌクレオチド部分は、1, 3-プロパンジオール、モノ（リン酸二水素）（ $C3$ ）である。本明細書に開示される核酸化合物の一部の好ましい実施形態において、 Z は、1つの $C3$ 非ヌクレオチド部分（ $C3$ ）であり、 Z' は、2つの連続的な $C3$ 非ヌクレオチド部分（ $C3 - C3$ ）である。

10

【0282】

本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、キャップ（ z'' ）は、存在しない。

【0283】

本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、キャップ（ここでは、 z'' ）は存在する。本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、キャップ z'' は、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、逆位脱塩基リボース部分、逆位デオキシリボース部分、逆位デオキシ脱塩基部分（ $idAb$ ）、アミノ- $C6$ 部分（ $AM - c6$ ）、 $C6$ -アミノ- Pi 、非ヌクレオチド部分、鏡映ヌクレオチド、5, 6, 7, 8-テトラヒドロ-2-ナフタレン酪酸ホスホジエステル（ $THNB$ ）、ビタミンおよび薬剤部分からなる群から選択される。本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、キャップ z'' は、1, 3-プロパンジオール、モノ（リン酸二水素）（ $C3$ ）である。本明細書において開示される核酸化合物（構造A、A1およびA2）の一部の実施形態において、 N 、 N' 、 $N1$ および $N2$ のそれぞれは、非修飾リボヌクレオチドであり、 z'' は存在しておらず、 Z および Z' は存在し、および dTT オーバーハングからなる。構造A1の一部の実施形態において、 $x = y = 19$ であり、および、 Z は、少なくとも1つの $C3$ アルキルオーバーハングを含有する。構造A2の特定の実施形態において、 $x = y = 18$ であり、および、 Z は、少なくとも1つの $C3$ アルキルオーバーハングを含有する。一部の実施形態において、 $C3 - C3$ オーバーハングは、共有結合（好ましくは、ホスホジエステル結合）を介して、（ N ） x または（ N' ） y の3'末端に共有結合されている。一部の実施形態において、第一の $C3$ と第二の $C3$ の間の結合は、ホスホジエステル結合である。一部の実施形態において、3'非ヌクレオチドオーバーハングは、 $C3Pi - C3Pi$ である。一部の実施形態において、3'非ヌクレオチドオーバーハングは、 $C3Pi - C3Ps$ である。一部の実施形態において、3'非ヌクレオチドオーバーハングは、 $C3Pi - C3OH$ （ OH はヒドロキシである）である。一部の実施形態において、3'非ヌクレオチドオーバーハングは、 $C3Pi - C3OH$ である。

20

30

【0284】

様々な実施形態において、アルキル部分は、アルキル誘導体（末端ヒドロキシル基、末端アミノ基、または末端リン酸基を含有する、 $C3$ アルキル、 $C4$ アルキル、 $C5$ アルキル、または $C6$ アルキル部分を含む）を含有する。一部の実施形態において、アルキル部分は、 $C3$ アルキルまたは $C3$ アルキル誘導体部分である。一部の実施形態において、 $C3$ アルキル部分は、プロパノール、プロピルホスフェート、プロピルホスホロチオエート、またはそれらの組み合わせを含有する。 $C3$ アルキル部分は、（ N' ） y の3'末端および/または（ N ） x の3'末端に、ホスホジエステル結合を介して共有結合されている。一部の実施形態において、アルキル部分は、プロパノール、リン酸プロピル、またはプロピルホスホロチオエートを含有する。一部の実施形態において、 Z および Z' のそれぞれは、独立して、プロパノール、リン酸プロピル、プロピルホスホロチオエート、それら

40

50

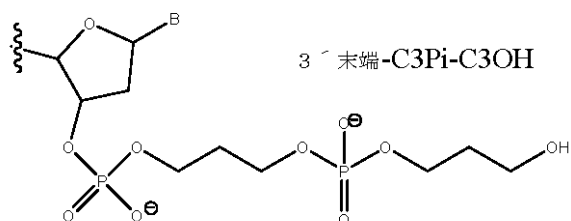
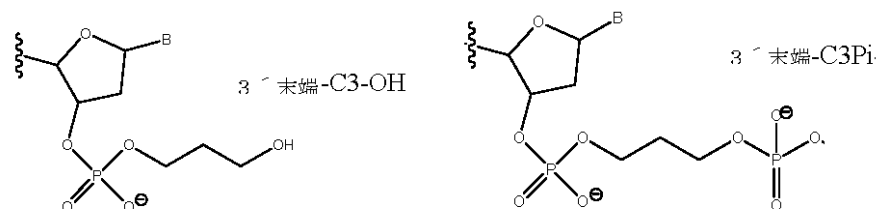
の組み合わせ、またはそれらの複数（特に、2または3の共有結合されたプロパノール、リン酸プロピル、プロピルホスホロチオエート、またはそれらの組み合わせ）から選択される。一部の実施形態において、ZおよびZ'のそれぞれは、独立して、リン酸プロピル、プロピルホスホロチオエート、プロピルホスホ - プロパノール；プロピル - ホスホ - プロピルホスホロチオエート；プロピルホスホ - リン酸プロピル；（リン酸プロピル）3、（リン酸プロピル）2 - プロパノール、（リン酸プロピル）2 - プロピルホスホロチオエートから選択される。任意のプロパンまたはプロパノール結合部分が、ZまたはZ'に含有されてもよい。

【0285】

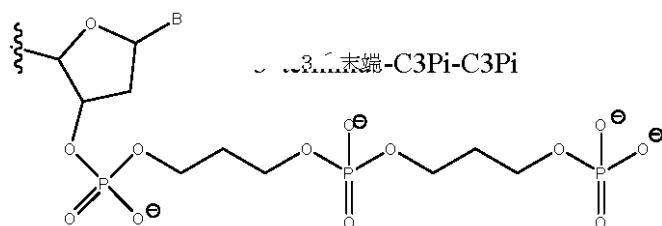
例示的な3'末端非ヌクレオチド部分の構造は、以下である：

10

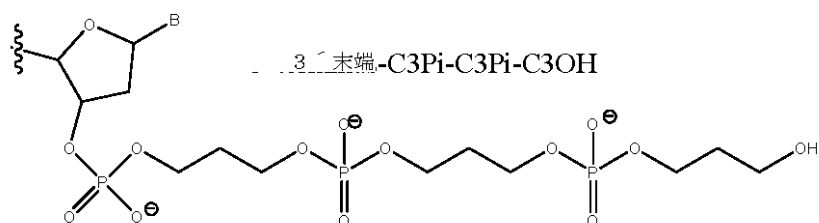
【化3】



20



30



40

【0286】

フェニルヒドロカルビル結合体

一部の実施形態において、フェニルヒドロカルビル部分（PHM）に共有結合された核酸分子が提供される。一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖を含有する核酸分子が提供され、ここで、少なくとも1つの鎖は、フェニルヒドロカルビル部分（PHM）に共有結合されている。

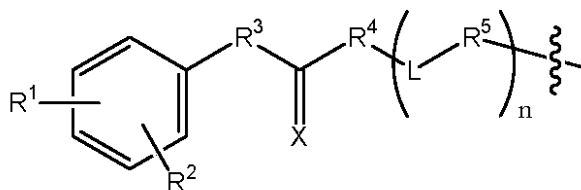
【0287】

一部の実施形態において、本明細書に開示される二本鎖核酸は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含有し、ここで、センス鎖、アンチセンス鎖、またはその両方は、直接、またはリンカーを介して、フェニルヒドロカルボニル基を含有する部分に共有結合されており

50

、当該部分は、一般式 I I I により表される：

【化 4】



III

10

ここで、 R^1 および R^2 はそれぞれ、独立して、H、ハロゲン、C1 - C10 ヒドロカルビル基、 OR^6 、 $OCOR^6$ 、 $COOR^6$ 、 CH_2OR^6 、CHO、 COR^6 、 NR^6R^7 および SR^6 からなる群から選択され；または、 R^1 および R^2 は、飽和または不飽和環状 C1 - C7 ヒドロカルビル環（任意選択的に、酸素、窒素、または硫黄から選択される 2 つまでのヘテロ原子により割りこまれており、および、任意選択的に、ハロゲン、C1 - C3 ヒドロカルビル基、 OR^6 、 $OCOR^6$ 、 $COOR^6$ 、 CH_2OR^6 、CHO、 COR^6 、 NR^6R^7 、 SR^6 、=O、=S および、=NH からなる群から独立して選択される 3 つまでの基により置換されている）を形成し；

R^3 は、C1 - C8 ヒドロカルビル基（任意選択的に、酸素、窒素、または硫黄から選択される 2 つまでのヘテロ原子により割りこまれている）であり；

20

R^4 は、NH、O、S または CR^6R^7 であり；

R^6 および、 R^7 は、それぞれ、独立して、H および C1 - C4 ヒドロカルビル基からなる群から選択され；

X は、O または S であり；

L は、12 までのアミノ酸残基のペプチジル鎖、 $-[CH_2-CH_2-O]_m-$ 、C1 - C12 ヒドロカルビル基（任意選択的に、O、N または S から選択される 2 つまでのヘテロ原子により割りこまれている）および R^8O- からなる群から選択され；

R^8 は、C1 - C12 ヒドロカルビル基（任意選択的に、O、N または S から選択される 2 つまでのヘテロ原子により割りこまれている）であり；

30

n は、0 ~ 10 の整数であり；

m は、1 ~ 10 の整数であり；

R^5 は、 $-P(O)(R^9)-O-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-O-$ ； $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ ； $-C(O)O-$ ； $-NHCS-$ ； $-NHCO-$ および、単結合からなる群から選択され；

R^9 は、 O^- 、 S^- 、 BH_3^- 、 NR^6R^7 または CH_3 からなる群から選択され；

または、その薬学的に受容可能な塩であり；

ここで、センス鎖は、p53 遺伝子（配列番号 1 ~ 7）に対応する mRNA のセグメントに対して配列同一性を有する。

【0288】

40

適応症

p53 遺伝子の発現阻害は、様々な疾患および障害の治療および / または予防に有益であることが示されている。本出願は、特に、p53 遺伝子の発現を下方制御する二本鎖核酸分子に関しており、ならびに、様々な疾患および障害の治療および / または予防における、これらの分子の使用に関している。そのような疾患 / 障害の例としては、限定されないが、虚血再灌流傷害、難聴、聴覚障害、平衡障害、聴覚損失、化学療法誘発性脱毛症、放射線治療誘発性脱毛症、急性腎不全、急性腎障害、慢性腎疾患（CKD）、抗癌剤療法に関連した副作用、腎移植患者における臓器移植後臓器機能障害（DGF）、脊髄損傷、脳損傷、てんかん発作（seizure）、脳卒中、パーキンソン病、アルツハイマー病、腫瘍、やけど、外傷、高熱、低酸素症、虚血、臓器移植、骨髄移植（BMT）、心筋梗

50

塞 / 心臓発作、心臓毒性および急性肝不全が挙げられる。

【0289】

1つの実施形態において、障害は、抗癌治療に関連した副作用であり、および、本明細書に開示される核酸化合物もしくはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物が、当該副作用を治療または改善するために、有効量で投与される。そのような抗癌治療は、放射線治療、化学療法、分子標的抗癌治療、および生物学的抗癌治療が含有されても良い。様々な実施形態において、そのような抗癌治療に関連した副作用は、脱毛（脱毛症）、精巣細胞の損傷、腸管上皮細胞の損傷、リンパ系の損傷、または造血系の損傷のうちの1つ以上から選択される。

10

【0290】

1つの実施形態において、疾患は、p53陽性癌であり、本明細書に開示される核酸化合物もしくはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物が、p53遺伝子の発現を下方制御するために有効量で投与され、それによって、対象において、p53陽性癌を化学療法に対し感受性化させる。

【0291】

1つの実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物もしくはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物は、造血前駆細胞の増大、または造血刺激における使用のためのものである。

20

【0292】

1つの実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物もしくはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物は、p53ヌルの造血幹細胞（HSC）のホーミングにおける使用のためのものである。

【0293】

医薬組成物

たとえば、低分子干渉核酸（siNA）、干渉RNA（RNAi）、低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、および低分子ヘアピンRNA（shRNA）分子等の、p53遺伝子発現の下方制御を調節することができる、または、p53遺伝子発現に対するRNA干渉を調節する核酸分子を用いることにより、p53の発現を下方制御するための組成物および方法が提供される。

30

【0294】

本明細書に開示される分子を、未加工の化学物質として、またはその薬学的に受容可能な塩として、投与することも可能ではあるが、それらは医薬組成物として提示されることが好ましい。ゆえに、本明細書に開示される1以上の核酸分子；またはその薬学的に受容可能な塩、および、薬学的に受容可能な担体を含有する医薬組成物が提供される。そのような医薬組成物は、2以上の異なる核酸化合物の混合物を含有しても良い。

【0295】

本明細書に提供される組成物、方法、およびキットには、p53タンパク質の発現および/またはp53タンパク質をコードする遺伝子の発現を、独立して、または共同で、調節する（たとえば、下方制御する）1以上の核酸分子および方法が含有されても良い。様々な態様および実施形態が、p53遺伝子に関連して記述される。しかしながら、それら様々な態様および実施形態は、他の関連遺伝子（たとえば、あるp53遺伝子に関連したホモログ遺伝子および転写変異体ならびに多型（たとえば、一塩基多型（SNP））等）も目的とするものである。それゆえ、様々な態様および実施形態はまた、たとえば、本明細書に記述される疾患、特性もしくは状態の維持または発現に関与する、シグナル伝達または遺伝子発現のp53介在経路に関与する、他の遺伝子も目的とするものである。これらの追加の遺伝子は、p53遺伝子に対して本明細書に記述される方法を用いて、標的部

40

50

位に関し分析することができる。ゆえに、他の遺伝子の下方制御および、他の遺伝子に関するそのような調節の効果を、本明細書に記述されるように実施、決定および測定することができる。

【0296】

さらに、p53発現を効果的に下方制御する量で、本明細書に開示される核酸化合物の1以上に共有結合された、または非共有結合された、本明細書に開示される核酸化合物の少なくとも1つ；および、薬学的に受容可能な担体を含有する医薬組成物が提供される。化合物は、内在性細胞複合体により、細胞内でプロセシングされ、本明細書に開示される1以上のオリゴヌクレオチドを産生しても良い。

【0297】

さらに、ヒトp53の細胞中の発現を効果的に下方制御する量の、本明細書に記述される1以上の化合物（当該化合物は、配列番号8～33に記述される配列を含有する）、および薬学的に受容可能な担体を含有する医薬組成物が提供される。

【0298】

1つの実施形態において、本明細書に記述されるオリゴヌクレオチド化合物、組成物および方法は、p53遺伝子を阻害/下方制御する（当該阻害/下方制御は、遺伝子機能の阻害/下方制御、ポリペプチド制御の阻害/下方制御、および、mRNA発現の阻害/下方制御から選択される）。

【0299】

1つの実施形態において、本明細書に開示される核酸を用いて、p53遺伝子ファミリー（当該遺伝子または遺伝子ファミリー配列は、配列相同性を共有している）の発現を阻害してもよい。そのような相同性配列は、たとえば、配列アライメントを用いて、当分野で周知のように特定されても良い。核酸分子は、たとえば、完全相同配列を用いて、または、追加の標的配列をもたらすことができる、非正規型塩基対（たとえば、不適合塩基対および/またはゆらぎ塩基対）を組み込むことにより、そのような相同性配列を標的とするように設計されても良い。不適合が特定されている例において、非正規型塩基対（たとえば、不適合塩基および/またはゆらぎ塩基）を用いて、2以上の遺伝子配列を標的とする核酸分子を作製しても良い。非限定的な例において、非正規型塩基対（たとえば、UUおよびCC塩基対）を用いて、配列相同性を共有する、異なるp53標的の配列を標的とすることができる核酸分子を作製する。ゆえに、本明細書に開示される核酸化合物を用いることの1つの利点は、相同遺伝子の間で保存されているヌクレオチド配列に対して相補的な核酸配列を含有するように、1つの核酸を設計することができることである。この方法で、異なる遺伝子を標的とする2以上の核酸分子を用いる代わりに、1つの核酸で2以上の遺伝子の発現を抑制することができる。

【0300】

核酸分子を用いて、たとえばp53ファミリー遺伝子等の遺伝子ファミリー（複数含む）に対応する保存配列を標的としてもよい。ゆえに、複数のp53標的を標的とする核酸分子により、治療効果の増加を得ることができる。さらに、核酸を用いて、様々な用途における遺伝子機能の経路の特徴を解明することができる。たとえば、核酸分子を用いて、経路における標的遺伝子（複数含む）の活性を阻害し、機能が不明な遺伝子（複数含む）の機能を、遺伝子機能解析、mRNA機能解析、または、翻訳解析において決定することができる。核酸分子を用いて、医薬開発に向け、様々な疾患および状態に関する潜在的な標的遺伝子経路を決定することができる。核酸分子を用いて、様々な疾患および状態に関する遺伝子発現の経路を理解することができる。

【0301】

1つの実施形態において、本明細書に提供される核酸化合物、組成物および方法は、p53ポリペプチドを阻害する（当該阻害は、機能阻害（特に、公知の天然型遺伝子/ポリペプチドの相互作用物質との、酵素アッセイまたは結合アッセイにより分析されてもよい）、タンパク質の下方制御またはタンパク質の阻害（特に、ウェスタンブロッティング、ELISA、または免疫沈降により分析されてもよい）およびmRNA発現の阻害（特に

10

20

30

40

50

、ノーザンブロットング、定量RT-PCR、*in situ*ハイブリダイゼーション、またはマイクロアレイハイブリダイゼーションにより分析されても良い)から選択される)。

【0302】

1つの実施形態において、本明細書に提供される組成物および方法には、p53 RNA に対するRNAiの活性を有する核酸分子が含まれ、当該核酸分子は、p53コード配列(たとえば、配列番号1~7に記述される配列等)を有する任意のRNAに対し相補的な配列を含有する。別の実施形態において、核酸分子は、p53 RNA に対するRNAiの活性を有していても良く、当該核酸分子には、変異体p53コード配列(たとえば、配列番号1~7に示されていないが、たとえば、本明細書に記述される疾患/障害/状態の発生および/または維持および/または発現に関連していることが当分野に公知である、他の変異型p53遺伝子)を有するRNAに対して相補的な配列が含有される。本明細書に記述される化学修飾を、本明細書に開示される任意の核酸構築物に対して適用しても良い。別の実施形態において、本明細書に開示される核酸分子は、p53遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用し、それにより、p53遺伝子発現の下方制御またはサイレンシングを調節することができるヌクレオチド配列を含有し、たとえば、ここで、当該核酸分子は、クロマチン構造または遺伝子のメチル化パターンを調節し、当該遺伝子の転写を妨害する、細胞内プロセスにより、p53遺伝子の発現制御を調節するものである。

10

【0303】

より具体的には、本明細書において、表1に記述されるセンス鎖配列およびアンチセンス鎖配列(配列番号8~33)、またはそれらのホモログを有する二本鎖核酸分子が提供され、ここで、各末端領域のリボヌクレオチドのうちの1~2つは、改変されている。

20

【0304】

送達および組成

本発明の核酸分子は、担体または希釈剤とともに調製された裸の分子の直接的な適用により、標的組織へと送達されても良い。

【0305】

「裸の核酸」または「裸のdsRNA」または「裸のsiRNA」という用語は、細胞への侵入を補助する、促進する、または容易にさせるよう作用する任意の送達ビヒクル(ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム製剤、リポフェクチンまたは沈殿剤等を含む)を含まない(freeである)核酸分子を指す。たとえば、PBSに溶解したdsRNAは、「裸のdsRNA」である。

30

【0306】

本明細書に開示される核酸分子、またはその薬学的に受容可能な塩は、細胞への侵入を補助する、促進する、または容易にさせるよう作用する担体または希釈剤(ウイルスベクター、ウイルス粒子、リポソーム製剤、リポフェクチン、または沈殿剤等を含む)と共に、直接、送達または投与されても良い。

【0307】

核酸分子は、対象への投与のために、送達ビヒクル(リポソームを含む)、担体および希釈剤およびそれらの塩を含有しても良く、および/または、薬学的に受容可能な製剤中に存在しても良い。一部の実施形態において、本発明のdsRNA分子は、リポソーム製剤中、およびリポフェクチン製剤中等で送達され、ならびに、当業者公知の方法により調製されてもよい。そのような方法は、たとえば、米国特許第5,593,972号、同第5,589,466号、および同第5,580,859号に記述されている(それらは参照により本明細書に援用される)。

40

【0308】

哺乳類細胞へのsiRNAの送達増強および改善を特に目的とした送達系が開発されている(たとえば、Shen et al., FEBS Lett. 2003, 539:111-114; Xia et al., Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010; Reich et al., Mol. Vision

50

2003, 9: 210-216; Sorensen et al., J. Mol. Biol. 2003, 327: 761-766; Lewis et al., Nat. Gen. 2002, 32: 107-108、および、Simeoni et al., NAR 2003, 31, 11: 2717-2724を参照のこと)。近年、siRNAを用いた、霊長類における遺伝子発現の阻害が成功している(Tolentino et al., Retina 24(4): 660を参照のこと)。

【0309】

特に、耳（任意選択的に、内耳）への、裸のRNA分子または製剤化RNA分子の送達
が、点耳薬として処方された所望化合物の投与により、または、中耳腔内注入により、成
功している。dsRNAを含有する耳の組成物が、米国特許出願公開第20110142
917号（本出願の譲受人と同一。参照によりその全体が本明細書に援用される）に開示
されている。

10

【0310】

所望の対象への、核酸の導入を促進するポリペプチドが、当分野に公知である（たと
えば、米国特許出願公開第20070155658号に記述される、たとえば2, 4, 6-
トリグアニジノトライジンおよび2, 4, 6-トラミドサルコシル（Tramidosa
rccocy l）メラミン等のメラミン誘導体、ポリアルギニンポリペプチド、ならびに、
交互のグルタミンおよびアスパラギン残基を含有するポリペプチド）。

【0311】

20

薬学的に受容可能な担体、溶媒、希釈剤、賦形剤、アジュバントおよびビヒクルならび
にインプラント担体は一般的に、本発明の活性成分と反応しない、不活性で、非毒性の固
体または液体の充填剤、希釈剤もしくは内包化物質を指し、ならびに、それらには、リポ
ソームおよびミクロスフィアが含まれる。本発明に有用な送達系の例としては、米国特許
第5, 225, 182号；同第5, 169, 383号；同第5, 167, 616号；同第
4, 959, 217号；同第4, 925, 678号；同第4, 487, 603号；同第4
, 486, 194号；同第4, 447, 233号；同第4, 447, 224号；同第4
, 439, 196号；および同第4, 475, 196号が挙げられる。多くの他のそのよう
なインプラント、送達系およびモジュールが、当業者に公知である。

【0312】

30

特定の実施形態において、投与には、全身投与が含まれる。別の実施形態において、投
与には、局所（topical or local）投与が含まれる。化合物のインプラ
ントもまた有用である。液体の剤型も調製される。液体組成物としては、水溶液（有機共
溶媒を含有する、および含有しない）、水性懸濁液もしくは油性懸濁液、食用油を伴う乳
濁液、ならびに、類似の医薬ビヒクルが挙げられる。組成物はまた、中耳腔内に、または
硝子体内に注入されても良い。組成物はまた、点眼薬または点耳薬として適用されても良
い。

【0313】

核酸分子の送達方法は、Akhtar et al., Trends Cell B
io., 2: 139 (1992); Delivery Strategies f
or Antisense Oligonucleotide Therapeutic
s, ed. Akhtar, (1995), Maurer et al., Mol
. Membr. Biol., 16: 129-140 (1999); Hofla
nd and Huang, Handb. Exp. Pharmacol., 13
7: 165-192 (1999); および、Lee et al., ACS Sy
mp. Ser., 752: 184-192 (2000); 米国特許第6, 395
, 713号；同第6, 235, 310号；同第5, 225, 182号；同第5, 169,
383号；同第5, 167, 616号；同第4, 959, 217号；同第4, 925, 67
8号；同第4, 487, 603号；および同第4, 486, 194号、および、Sull
ivan et al., PCT国際公開第94/02595号；PCT国際公開第00

40

50

／ 0 3 6 8 3 号および P C T 国際公開第 0 2 / 0 8 7 5 4 号；および、米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 7 7 8 2 9 号に記述されている。これらのプロトコールは、実質的にすべての核酸分子の送達に用いることができる。核酸分子は、当業者公知の様々な方法（限定されないが、イオントフォレーシスによる、または他のビヒクル（たとえば、生体分解性ポリマー、ハイドロゲル、シクロデキストリン（たとえば、G o n z a l e z e t a l . , B i o c o n j u g a t e C h e m . , 1 0 : 1 0 6 8 - 1 0 7 4 (1 9 9 9) ; W a n g e t a l . , P C T 国際特許出願公開第 0 3 / 4 7 5 1 8 号および同第 0 3 / 4 6 1 8 5 号を参照のこと）、乳酸-グリコール酸共重合体（P L G A）および P L C A ミクロスフィア（たとえば、米国特許第 6 , 4 4 7 , 7 9 6 号および米国特許出願公開第 2 0 0 2 1 3 0 4 3 0 号を参照のこと）、生体分解性ナノカプセル、および、
10 生体付着性ミクロスフィア等）への組み込みにより、または、タンパク質性ベクター（O ' H a r e a n d N o r m a n d , 国際 P C T 出願公開第 W O 0 0 / 5 3 7 2 2 号）による、リボソーム内への内包化を含む）により、細胞に投与することができる。あるいは、注入ポンプの使用により、または直接注入により、核酸／ビヒクルの組み合わせが局所的に送達される。本発明の核酸分子の直接注入（硝子体内、皮下、中耳腔内、筋肉内または皮内のいずれか）は、標準的な針とシリンジの手法、または針の無い技術（たとえば、C o n r y e t a l . , C l i n . C a n c e r R e s . , 5 : 2 3 3 0 - 2 3 3 7 (1 9 9 9) および、B a r r y らの、国際 P C T 出願公開第 W O 9 9 / 3 1 2 6 2 号に記述されているもの）を用いて行うことができる。本発明の分子は、薬剤として用いることができる。薬剤によって、対象における疾患状態の発生が阻害、調節され、または、対象における疾患状態の症状がある程度まで（好適にはすべての症状が）治療もしくは軽減される。本発明の 1 つの特定の実施形態において、局所性および経皮性製剤が選択されても良い。

【 0 3 1 4 】

本明細書に開示される、核酸化合物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩、またはそのような化合物を含有する組成物、またはそのような化合物の薬学的に受容可能な塩を含有する組成物が、個々の対象の臨床状態、治療される疾患、投与部位および投与方法、投与スケジュール、患者の年齢、性別、体重および医療従事者に公知の他の因子が考慮された、適正な医療行為に従って投与および服薬される。

【 0 3 1 5 】

核酸分子は、カチオン性脂質とともに、リボソーム内にパッケージされて複合体化されても良く、または、別の方法で標的細胞または組織に送達されても良い。核酸または核酸複合体は、バイオポリマーへの組み込みの有無にかかわらず、直接的な皮膚への塗布、経皮適用、または注入を介して、e x v i v o または i n v i v o で関連組織へ局所投与されても良い。

【 0 3 1 6 】

送達系としては、ポリ（エチレングリコール）脂質を含有する表面修飾リボソーム（P E G 修飾もしくは長期循環リボソームまたはステルスリボソーム）が挙げられる。これらの処方により、標的組織における薬剤の蓄積量を増加させる方法がもたらされる。この種類の薬剤担体は、オプソニン化および単核性食細胞系（M P S または R E S）による排除に対して抵抗性であり、これによって、長期間、血中に循環することができ、内包化された薬剤がより多く組織へと到達する（L a s i c e t a l . C h e m . R e v . 1 9 9 5 , 9 5 , 2 6 0 1 - 2 6 2 7 ; I s h i w a t a e t a l . , C h e m . P h a r m . B u l l . 1 9 9 5 , 4 3 , 1 0 0 5 - 1 0 1 1）。

【 0 3 1 7 】

核酸分子は、ポリエチレンイミン（たとえば、直鎖 P E I または分枝 P E I）および／またはポリエチレンイミン誘導体（たとえば、ポリエチレンイミン - ポリエチレングリコール - N - アセチルガラクトサミン（P E I - P E G - G A L）または、ポリエチレンイミン - ポリエチレングリコール - トリ - N - アセチルガラクトサミン（P E I - P E G - t r i G A L）誘導体、グラフト結合 P E I（たとえば、ガラクトース P E I、コレステ

10

20

30

40

50

ロールPEI、抗体誘導体化PEI、および、それらのポリエチレングリコールPEI (PEG-PEI) 誘導体等) (たとえば、Ogris et al., 2001, A
APA PharmSci, 3, 1-11; Furgeson et al.,
2003, Bioconjugate Chem., 14, 840-847; Ku
nath et al., 2002, Pharmaceutical Resear
ch, 19, 810-817; Choi et al., 2001, Bull.
Korean Chem. Soc., 22, 46-52; Bettinger
et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 55
8-561; Peterson et al., 2002, Bioconjugat
e Chem., 13, 845-854; Erbacher et al., 19
99, Journal of Gene Medicine Preprint, 1
1, 1-18; Godbey et al., 1999, PNAS USA, 9
6, 5177-5181; Godbey et al., 1999, Journa
l of Controlled Release, 60, 149-160; Die
bold et al., 1999, Journal of Biological
Chemistry, 274, 19087-19094; Thomas and
Klibanov, 2002, PNAS USA, 99, 14640-1464
5; Sagarraの、米国特許第6,586,524号および米国特許出願公開第200
30077829号を参照のこと)を含む)と複合体化、または製剤化されてもよい。

【0318】

核酸分子は、たとえば、米国特許出願公開第20010007666号に記述されてい
る、膜破壊剤と複合体化されても良い。膜破壊剤(複数含む)および核酸分子はまた、カ
チオン性脂質またはヘルパー脂質分子(たとえば、米国特許第6,235,310号に記
述される脂質)と複合体化されてもよい。

【0319】

本明細書に開示される核酸分子は、中枢神経系(CNS)または末梢神経系(PNS)
へ投与されても良い。研究により、神経細胞による核酸の効率的なin vivo取込が
示されている。たとえば、Sommer et al., 1998, Antisen
se Nuc. Acid Drug Dev., 8, 75; Epa et al.,
2000, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 1
0, 469; Broaddus et al., 1998, J. Neurosu
rg., 88(4), 734; Karle et al., 1997, Eur.
J. Pharmacol., 340(2/3), 153; Bannai et
al., 1998, Brain Research, 784(1,2), 304
; Rajakumar et al., 1997, Synapse, 26(3),
199; Wu-pong et al., 1999, BioPharm, 12
(1), 32; Bannai et al., 1998, Brain Res.
Protoc., 3(1), 83; および、Simantov et al., 1
996, Neuroscience, 74(1), 39を参照のこと。ゆえに、核
酸分子は、CNSおよび/またはPNSの細胞(たとえば、神経細胞、マクロファージ、
白質軸索および内皮細胞等)へと容易に送達および取り込まれることができる。

【0320】

送達系としては、たとえば、水性ゲルおよび非水性ゲル、クリーム、多重エマルジョン
、マイクロエマルジョン、リポソーム、軟膏、水性溶液、非水性溶液、ローション、エア
ロゾル、炭化水素基材および粉末等を含んでも良く、および、たとえば可溶化剤、透過増
強物質(たとえば、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪アルコールおよびアミノ酸等)、およ
び親水性ポリマー(たとえば、ポリカーボフィルおよびポリビニルピロリドン等)等の賦
形剤を含有しても良い。1つの実施形態において、薬学的に受容可能な担体は、リポソーム
または経皮増強物質である。本発明の化合物と使用することができるリポソームの非限
定的な例としては、以下が挙げられる：(1)カチオン性脂質N, NI, NII, NIII

I - テトラメチル - N、N I, N I I, N I I I - テトラパルミット (t e t r a p a l m i t) - y - スペルミン、および、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E) (G I B C O B R L) の 1 : 1 . 5 (M / M) リボソーム製剤である、C e l l F e c t i n ; (2) カチオン性脂質と D O P E (G l e n R e s e a r c h) の 2 : 1 (M / M) リボソーム製剤である、C y t o f e c t i n G S V ; (3) D O T A P (N - [1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシ) - N , N , N - トリ - メチル - 硫酸メチルアンモニウム) (B o e h r i n g e r M a n h e i m) ; および、(4) ポリカチオン性脂質 D O S P A、中性脂質 D O P E (G I B C O B R L) およびジアルキル化アミノ酸 (D i - A l k y l a t e d A m i n o A c i d) (D i L A 2) の 3 : 1 (M / M) リボソーム製剤である、L i p o f e c t a m i n e .

10

【0321】

送達系には、パッチ、錠剤、座薬、ペッサリー、ゲル、水性溶液および非水性溶液、ローションならびにクリームを含んでも良く、ならびに、たとえば可溶化剤および増強物質 (たとえば、プロピレングリコール、胆汁塩およびアミノ酸等) ならびに他のビヒクル (たとえば、ポリエチレングリコール、グリセロール、脂肪酸エステルおよび誘導体、ならびに、たとえばヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびヒアルロン酸等の親水性ポリマー等) 等の賦形剤を含有しても良い。

【0322】

核酸分子は、バイオ複合体 (たとえば、V a r g e e s e らの、米国特許出願第 10 / 4 2 7 , 1 6 0 号 ; 米国特許第 6 , 5 2 8 , 6 3 1 号 ; 米国特許第 6 , 3 3 5 , 4 3 4 号 ; 米国特許第 6 , 2 3 5 , 8 8 6 号 ; 米国特許第 6 , 1 5 3 , 7 3 7 号 ; 米国特許第 5 , 2 1 4 , 1 3 6 号 ; 米国特許第 5 , 1 3 8 , 0 4 5 号に記述される、核酸複合体) を含有しても良い。

20

【0323】

本明細書に開示される組成物、方法およびキットは、本発明の核酸分子を少なくとも 1 つコードする核酸配列を、当該核酸分子の発現が可能となる様式で含有する発現ベクターを含有しても良い。核酸分子、または二本鎖オリゴヌクレオチド化合物の鎖を発現することができる 1 以上のベクターを細胞環境中へと導入する方法は、細胞のタイプおよびその環境の組成に依存する。核酸分子またはベクター構築物は、細胞の内へ直接導入されても良く (すなわち、細胞内に) ; もしくは、空洞空間、間質腔、生体循環中へ、細胞外に導入されてもよく、経口的に導入されてもよく、または、核酸化合物を含有する溶液に細胞または生体を浸すことにより導入されてもよい。細胞は、好ましくは、哺乳類細胞 ; より好ましくはヒトの細胞である。発現ベクターの核酸分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含有してもよい。アンチセンス領域は、p 5 3 遺伝子をコードする RNA 配列または DNA 配列に対して相補的な配列を含有してもよく、および、センス領域は、アンチセンス領域に相補的な配列を含有してもよい。核酸分子は、相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有する、2 つの異なる鎖を含有してもよい。核酸分子は、相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有する一本鎖を含有してもよい。

30

【0324】

標的 RNA 分子と相互作用し、標的 RNA 分子 (たとえば、mRNA、配列番号 1 ~ 7) をコードする p 5 3 遺伝子を下方制御する核酸分子は、DNA ベクターまたは RNA ベクターへと挿入された転写ユニットから発現されてもよい。組換えベクターは、DNA プラスミドまたはウイルスベクターであってもよい。核酸分子発現ウイルスベクターは、限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアルファウイルスに基づき、構築されてもよい。核酸分子を発現することが出来る組換えベクターは、本明細書に記述されるように送達され、そして、標的細胞中で存続してもよい。あるいは、核酸分子の一過性発現をもたらすウイルスベクターが用いられてもよい。そのようなベクターは、必要に応じて、繰り返し投与することができる。発現した時点で、核酸分子は、たとえば RNA 干渉 (RNAi) を介して、結合し、そして遺伝子機能または発現が下方制御される。核酸分子発現ベクターの送達は、たとえば、静脈内投与または筋肉内

40

50

投与による全身投与、局所投与、対象から外殖された標的細胞への投与後の、対象への再導入、または、所望の標的細胞へと導入することができる任意の他の手段であっても良い。

【0325】

発現ベクターは、本明細書に開示される核酸分子を少なくとも1つ、当該核酸分子を発現することができるような様式で、コードする、核酸配列を含有しても良い。たとえば、ベクターは、二本鎖を含有する核酸分子の両鎖をコードする配列（複数含む）を含有しても良い。ベクターはまた、自己相補的であり、それによって、核酸分子を形成する、一本鎖核酸分子をコードする配列（複数含む）を含有してもよい。そのような発現ベクターの非限定的な例は、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; および、Novina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725に記述されている。発現ベクターはまた、哺乳類（たとえば、ヒト）の細胞に含有されていてもよい。

10

【0326】

発現ベクターは、二本鎖核酸の1つの鎖または両鎖をコードしてもよく、または、二本鎖核酸へと自己でハイブリダイズする、自己相補的な一本鎖をコードしてもよい。核酸分子をコードする核酸配列は、当該核酸分子が発現することができる様式で、操作可能に連結されていてもよい（たとえば、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500; および、Novina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725を参照のこと）。

20

【0327】

発現ベクターは、以下のうちの1つ以上を含有してもよい：a) 転写開始領域（たとえば、真核細胞のpol I、IIまたはIII開始領域）；b) 転写終結領域（たとえば、真核細胞のpol I、IIまたはIII終結領域）；c) イントロンおよび、d) 核酸分子のうちの少なくとも1つをコードする核酸配列、ここで、当該配列は、当該核酸分子が発現および/または送達されることができる様式で、開始領域および終結領域に操作可能に連結されている。ベクターは、核酸分子をコードする配列の5'側または3'側に操作可能に連結されたタンパク質に対するオープンリーディングフレーム（ORF）；および/または、イントロン（介在配列）を任意選択的に含有してもよい。

30

【0328】

核酸分子配列の転写は、真核細胞のRNAポリメラーゼI（pol I）、RNAポリメラーゼII（pol II）、またはRNAポリメラーゼIII（pol III）に対するプロモーターから誘導されてもよい。pol IIまたはpol IIIプロモーターからの転写は、全ての細胞中において高レベルで発現され、所与の細胞型の所与のpol IIプロモーターのレベルは、その近くに存在する遺伝制御配列（エンハンサー、サイレンサー等）の性質に依存する。また、適切な細胞中で原核生物のRNAポリメラーゼ酵素が発現される場合であれば、原核生物のRNAポリメラーゼプロモーターが用いられる（Elroy-Stein and Moss, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; Gao and Huang 1993, Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieber et al., 1993, Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhou et al., 1990, Mol. Cell

40

50

. Biol., 10, 4529-37)。研究者らによって、そのようなプロモーターから発現された核酸分子は、哺乳類細胞中で機能できることが証明されている（たとえば、Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992, EMBO J., 11, 4411-8; Lisziewicz et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 8000-4; Thompson et al., 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Sullenger & Cech, 1993, Science, 262, 1566)。より具体的には、たとえばU6核内低分子(s nRNA)、トランスファーRNA(tRNA)およびアデノウイルスVA RNAをコードする遺伝子から誘導されたもの等の転写ユニットは、細胞における、所望のRNA分子(たとえばsiNA等)の高濃度産生に有用である(Thompson et al., 上述; Couture and Stinchcomb, 1996, 上述; Noonberg et al., 1994, Nucleic Acid Res., 22, 2830; Noonbergら、米国特許第5, 624, 803号; Good et al., 1997, Gene Ther., 4, 45; Beigelmanら、国際PCT出願公開第WO96/18736号)。上述の核酸転写ユニットは、哺乳類細胞への導入のための様々なベクター(限定されないが、プラスミドDNAベクター、ウイルスDNAベクター(たとえば、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター等)またはウイルスRNAベクター(たとえば、レトロウイルスベクターまたはアルファウイルスベクター)を含む)へと組み込まれても良い(上述のCouture and Stinchcomb, 1996を参照のこと)。

【0329】

核酸分子は、真核細胞プロモーターから細胞内で発現されても良い(たとえば、Izant and Weintraub, 1985, Science, 229, 345; McGarry and Lindquist, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 399; Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992, J. Virol., 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991, J. Virol., 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990, Science, 247, 1222-1225; Thompson et al., 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Good et al., 1997, Gene Therapy, 4, 45)。当業者であれば、真核細胞中で、適切なDNA/RNAベクターから、任意の核酸を発現することができることを認識している。そのような核酸の活性は、酵素的核酸による初期転写物からの放出により、増大させることができる(Draperら、PCT国際公開第93/23569号、および、Sullivanら、PCT国際公開第94/02595号; Ohkawa et al., 1992, Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ven

10

20

30

40

50

tura et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chowrira et al., 1994, J. Biol. Chem., 269, 25856)。

【0330】

ウイルス粒子へとパッケージされたウイルス構築物により、細胞内への発現構築物の効率的な導入および発現構築物によりコードされたdsRNA構築物の転写の両方が達成される。

【0331】

経口導入のための方法としては、生体の食物とRNAの直接混合、ならびに、食物として用いられる種がRNAを発現するよう遺伝子操作を行う遺伝子組み換え法が挙げられ、それら食物は次いで、作用させる生体に与えられる。物理的方法を用いて、細胞内に核酸分子溶液を導入しても良い。核酸を導入する物理的方法としては、核酸分子を含有する溶液の注入、核酸分子により覆われた粒子の照射、RNA溶液中での細胞または生体の浸漬、または、核酸分子の存在下での、細胞膜のエレクトロポレーションが挙げられる。本明細書の1つの実施形態において、本明細書に開示される核酸分子を含有する細胞が提供される。

【0332】

たとえば、リン酸カルシウム等の、化学物質介在輸送等の、細胞へ核酸を導入するための当分野公知の他の方法を用いても良い。ゆえに、核酸分子は、以下の1以上の活性を果たす成分と共に、導入されてもよい：細胞によるRNA取り込みの増強、二本鎖のアニールリングの推進、アニールされた鎖の安定化、または、別の方法での標的遺伝子の阻害/下方制御の増大。

【0333】

ポリマーナノカプセルまたはマイクロカプセルは、内包化された、または結合されたdsRNAの細胞への輸送と放出を促進する。それらにはポリマー物質およびモノマー物質（特に、ポリシアノアクリル酸ブチルを含む）が含有される。物質および製造方法の概要は公開されている（Kreuter, 1991を参照のこと）。重合生成工程/ナノ粒子生成工程において、モノマー前駆体および/またはオリゴマー前駆体から形成されたポリマー物質は、それ自身、従来技術から知られており、ナノ粒子製造分野の当業者により、当該分野の通常の技術で適切に選択される、重合物質の分子量および分子量分布も同様である。

【0334】

核酸分子は、マイクロエマルションとして処方されてもよい。マイクロエマルションは、単一な光学的等方性であり、および熱力学的に安定な液体溶液である、水、油および両親媒性物質の系である。典型的には、マイクロエマルションは、水性界面活性剤溶液中に油を最初に分散させ、次いで、十分な量の第四の成分（一般的には、透明な系を形成するための中間鎖長のアルコール）を添加することにより調製される。

【0335】

マイクロエマルションの調製に用いられうる界面活性剤としては、限定されないが、単独または、補助界面活性剤と組み合わせた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート（ML310）、テトラグリセロールモノオレエート（MO310）、ヘキサグリセロールモノオレエート（PO310）、ヘキサグリセロールペンタオレエート（PO500）、デカグリセロールモノカプレート（MCA750）、デカグリセロールモノオレエート（MO750）、デカグリセロールセスキオレエート（SO750）、デカグリセロールデカオレエート（DA0750）が挙げられる。補助界面活性剤（通常は、エタノール、1-プロパノールおよび1-ブタノール等の単鎖アルコール）は、界面活性剤の膜へと侵入し、その結果として界面活性剤分子の間に生成された隙間により不規則な状態になった膜を生成することにより、界面の流動性を上昇させるものである。

【0336】

送達製剤は、水可溶性で、分解可能な架橋ポリマー（1以上の分解可能な架橋脂質部分、1以上のPEI部分、および/または、1以上のmPEG（PEGのメチルエーテル誘導体（メトキシポリ（エチレングリコール）））を含む）を含有しても良い。

【0337】

用量

投与される有用な用量および、投与の特定の方法は、細胞型等の因子、または、*in vivo*用途に関しては、年齢、体重および処置される具体的な動物およびその領域、用いられる具体的な核酸および送達方法、企図される治療用途または診断用途、剤型（たとえば、懸濁液、エマルション、ミセルまたはリボソーム）に依存して変化することが、当業者には明らかである。典型的には、用量は、低レベルで投与され、所望の効果が得られるまで、増加するものである。本明細書の目的に対する「治療有効量」とは、ゆえに、そのような点を考慮することにより決定されることが当分野に公知である。投与量は、限定されないが、生存率の改善、またはより早い回復、または症状の改善もしくは消失、および、当業者により適切な測定基準として選択される他の指標を含む改善が効果的に得られるものでなくてはならない。

【0338】

適切な量の核酸分子を導入してもよく、および、これらの量は、標準的な方法を用いて経験的に決定することができる。細胞環境中の個々の核酸分子種の有効濃度は、約1フェムトモル、約50フェムトモル、100フェムトモル、1ピコモル、1.5ピコモル、2.5ピコモル、5ピコモル、10ピコモル、25ピコモル、50ピコモル、100ピコモル、500ピコモル、1ナノモル、2.5ナノモル、5ナノモル、10ナノモル、25ナノモル、50ナノモル、100ナノモル、500ナノモル、1マイクロモル、2.5マイクロモル、5マイクロモル、10マイクロモル、100マイクロモルか、それ以上であってもよい。

【0339】

一般的に、ヒトに対する核酸化合物の活性用量は、単回投与、1～4週間またはそれ以上の期間に対し、1日当たり1回の投与、1日あたり2回または3回以上の投与のレジメンにおいては、1日当たり、1ng/kgから約20～100ミリグラム/レシピエントの体重キログラム（mg/kg）、好ましくは、1日当たり、約0.01mgから約2～10mg/レシピエントの体重kgである。核酸分子の適切な投与単位は、1日当たり、0.001～0.25ミリグラム/レシピエント体重キログラムの範囲であってもよく、または、1日当たり、0.01～20マイクログラム/体重キログラムの範囲であってもよく、または、1日当たり、0.01～10マイクログラム/体重キログラムの範囲であってもよく、または、1日あたり、0.10～5マイクログラム/体重キログラムの範囲であってもよく、または、1日あたり、0.1～2.5マイクログラム/体重キログラムの範囲であってもよい。投与量は、0.01ug～1g/体重kgであってもよい（たとえば、0.1ug、0.25ug、0.5ug、0.75ug、1ug、2.5ug、5ug、10ug、25ug、50ug、100ug、250ug、500ug、1mg、2.5mg、5mg、10mg、25mg、50mg、100mg、250mg、または500mg/体重kg）。

【0340】

1日当たり、約0.1mg～約140mg/体重キログラム程度のレベルの投与量が、上述の状態の治療に有用である（1日当たり、約0.5mg～約7g/対象）。単回投与製剤を調製するための、担体と組み合わせられてもよい活性成分の量は、治療される宿主と、投与の特定の方法により変化する。単位剤形は通常、約1mg～約500mgの活性成分を含有する。

【0341】

任意の特定の対象に対する、特定の投与レベルは、様々な因子（使用される具体的な化合物の活性、年齢、体重、一般健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、および排出

10

20

30

40

50

率、薬剤の組み合わせ、ならびに、治療されている具体的な疾患の重篤度を含む)に依存することが理解される。

【0342】

本明細書に開示される核酸分子を含有する医薬組成物は、1日に1度(QD)、1日に2度(bid)、1日に3度(tid)、1日に4度(qid)、または、任意の期間で、医学的に適切な任意の期間、投与されてもよい。しかしながら、治療剤はまた終日にわたり、適切な間隔で投与される、2、3、4、5、6またはそれ以上の下位投与量(sub-doses)を含有する投与単位で投与されてもよい。この場合、各下位投与量中に含有される核酸分子は、総一日投与量単位となるために、それに対応して少ない量であってもよい。また、投与単位は、たとえば数日間にわたりdsRNAが持続して一定量放出される、標準的な徐放製剤を用いて、数日にわたる単回投与に対して構成されてもよい。徐放製剤は当分野に公知である。投与単位はまた、1日用量の複数回分に相当する量を含有してもよい。組成物は、複数単位の核酸の合計で、十分な用量を含有するように、構成されてもよい。

10

【0343】

医薬組成物、キットおよび容器

また、患者に対し、核酸分子を投与または配分するための、本明細書に提供される、p53遺伝子の発現を下方制御するための核酸分子(たとえば、siNA分子)を含有する組成物、キット、容器および製剤が開示される。キットは、少なくとも1つの容器および少なくとも1つのラベルを含有する。適切な容器としては、たとえば、瓶、バイアル、シリンジおよび試験管が挙げられる。容器は、様々な物質(たとえばガラス、金属またはプラスチック)から形成されてもよい。容器は、核酸配列(複数含む)、および/または、関連する実験、予後予測、診断、予防および治療の目的に必要なとされる任意の他の構成要素を保持してもよい。そのような使用の指示書および/または説明書は、その容器の上、または容器と共に含まれても良く、これらの目的のために使用される試薬および他の組成物またはツールも同様である。

20

【0344】

あるいは、容器は、状態を治療、診断、予後予測または予防に効果的な組成物を保持してもよく、および、滅菌アクセスポートを有しても良い(たとえば、容器は、皮下注射針で穴を開けることができるストッパーを有する、点滴溶液バッグまたはバイアルであってもよい)。組成物中の活性剤は、好ましくは、p53mRNAに特異的に結合することができる核酸分子、および/または、p53遺伝子の機能を下方制御することができる核酸分子を含有する。

30

【0345】

キットはさらに、薬学的に受容可能な緩衝液(たとえば、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液および/またはデキストロース溶液等)を含有する第二の容器を含有してもよい。さらに、市販およびユーザーの観点から望ましい他の物質(他の緩衝液、希釈剤、充填剤、攪拌機、針、シリンジ、および/または使用指示および/または使用説明の添付文書)を含有してもよい。

【0346】

連邦法により、ヒトの治療における医薬組成物の使用には、連邦政府の当局による承認が必要とされる。合衆国において、法の施行は、食品医薬品局(Food and Drug Administration)が行い、そのような承認を受けるための適切な法規を公表している(詳細は、21 U.S.C. § 301-392にある)。生物学的物質(動物の組織から作製された産物を含む)に対する法規は、42 U.S.C. § 262に規定されている。同様の承認は、ほとんどの外国においても必要とされる。国ごとに法規は異なるが、個々の手順は当業者に公知であり、本明細書に提供される組成物および方法は、好ましくは、それらに従うものである。

40

【0347】

本明細書に開示される核酸分子を単独で、または他の療法と組み合わせて用いて、p5

50

3に関連した疾患、状態または障害（たとえば、耳、前庭感覚システムにおける疾患、損傷、状態または病態、および、細胞または組織における p 5 3 のレベルに関連または対応する他の任意の疾患または状態）を治療することができる。ゆえに、本明細書に開示される組成物、キットおよび方法は、ラベルまたは添付文書を含む、本明細書に開示される核酸分子をパッケージングすることが含んでも良い。ラベルは、たとえば、限定されないが、本明細書に開示される任意の疾患または状態を含む、疾患、障害、損傷および状態の治療または予防のための使用等の、核酸分子の使用のための指示を含んでも良い。ラベルは、そのような疾患、損傷または状態を治療または予防または緩和のための使用等の、核酸分子の使用のための指示を含んでも良い。ラベルは、細胞または組織内の p 5 3 のレベルに関連する、または応答する任意の他の疾患または状態の治療または予防のための使用等の、単独、または他の療法と組み合わせた、核酸分子の使用に関する指示を含んでも良い。ラベルは、p 5 3 の発現の減少および/または下方制御における使用のための指示を含んでも良い。「添付文書」とは、適応症、用法、用量、投与方法、禁忌、当該治療薬と組み合わせられる他の治療薬、および/または、そのような治療薬の使用に関する警告等に関する情報を含む、治療薬の市販パッケージに慣習的に含まれる説明書を指すために用いられる。

10

【0348】

当業者であれば、本明細書の核酸分子（たとえば、dsRNA分子）と容易に組み合わせることができ、ゆえに、本明細書において企図される、当分野に公知の他の治療、薬剤および療法を、認識するであろう。

20

【0349】

治療方法

別の態様において、本発明は、p 5 3 遺伝子の異常な発現に関連した疾患または障害に対する治療の必要のある対象の治療方法に関連し、p 5 3 遺伝子の発現を減少または阻害する阻害物質の有効量を当該対象に投与することが含まれる。

【0350】

1つの実施形態において、核酸分子を用いて、p 5 3 遺伝子の発現、および/もしくは、p 5 3 タンパク質の発現、および/もしくは、疾患または状態（たとえば、虚血等）に関連したハプロタイプ多型の発現を下方制御、または阻害しても良い。p 5 3 遺伝子および/またはタンパク質もしくはRNAレベルの分析を用いて、そのような多型を有する対象を特定してもよく、または、本明細書に記述される形質、状態、または疾患を発現するリスクを有する対象を特定してもよい。これらの対象は、たとえば、本明細書に開示される核酸分子および、p 5 3 遺伝子発現に関連する疾患の治療に有用な他の任意の組成物での治療等の治療に適しているものである。それゆえ、p 5 3 遺伝子および/またはタンパク質もしくはRNAレベルの分析を用いて、治療型を決定および治療対象における治療経過を測定してもよい。タンパク質レベルまたはRNAレベルのモニタリングを用いて、治療結果を予測し、および、形質、状態または疾患に関連したある遺伝子および/もしくはタンパク質のレベルならびに/または活性を調節する化合物および組成物の有効性を決定してもよい。

30

【0351】

一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、配列番号1~7のうちの任意の1つに記述されるmRNAへと転写されるp 5 3 遺伝子の発現を、対照と比較して、少なくとも40%、好ましくは50%、60%、または70%、より好ましくは75%、80%、または90%下方制御する方法における使用のためのものであり、当該方法は、p 5 3 遺伝子のmRNA転写物と、当該化合物のうちの1つ以上とを接触させることを含む。

40

【0352】

様々な実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、遺伝子機能の阻害、ポリペプチドの阻害、およびmRNA発現の阻害を含む群から選択される阻害により、p 5 3 遺伝子を阻害する。

50

【0353】

1つの実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、機能阻害（たとえば、とりわけ、酵素アッセイまたは、公知の天然型遺伝子/ポリペプチドの相互作用物質との結合アッセイ等により検証されるものである）、タンパク質の阻害（たとえば、とりわけ、ウェスタンブロットティング、ELISA、または免疫沈降等により検証されるものである）およびmRNA発現の阻害（たとえば、とりわけ、ノーザンブロットティング、定量RT-PCR、in situハイブリダイゼーションまたはマイクロアレイハイブリダイゼーション等により検証されるものである）を含有する群から選択される阻害により、p53ポリペプチドを阻害する。

【0354】

1つの実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、機能の下方制御（たとえば、とりわけ、酵素アッセイまたは、天然型遺伝子/ポリペプチドの公知の相互作用物質との結合アッセイ等により検証されるものである）、タンパク質の下方制御（たとえば、とりわけ、ウェスタンブロットティング、ELISA、または免疫沈降等により検証されるものである）、および、mRNA発現の下方制御（たとえば、とりわけ、ノーザンブロットティング、定量RT-PCR、in situハイブリダイゼーションまたはマイクロアレイハイブリダイゼーション等により検証されるものである）を含有する群から選択される下方制御により、哺乳類p53ポリペプチドを下方制御する。

【0355】

本明細書において、p53遺伝子またはポリペプチドを阻害する方法、分子および組成物を、詳細に考察し、ならびに、当該分子および/または組成物の内の任意のものは、当該状態の内の任意のものに罹患している患者の治療に有益に用いられる。公知の化合物は、本開示から除外されることを、明白に理解されたい。公知の化合物および組成物を用いた、新規の治療方法は、本開示の範囲内にある。当該方法には、p53遺伝子の発現を下方制御する、本明細書に開示される1以上の核酸化合物の治療有効量を投与することを含む。当該方法の一部の実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、毒物への露出に関連する疾患、障害または状態を治療するためのものである。「毒物への露出」とは、哺乳類が、毒物を利用できるようになったこと、または、毒物が哺乳類と接触することを意味する。毒物は、神経系に対して毒性であり得る。毒物への露出は、直接投与により（たとえば、食物、薬剤もしくは治療剤（たとえば、化学療法剤等）の摂取または投与）、偶然の汚染により、または、環境露出により（たとえば、空気曝露または水中曝露）、発生しうる。

【0356】

さらに、以下を含有する医薬組成物の調製プロセスが提供される：
本明細書に開示される核酸分子、またはその薬学的に受容可能な塩の1つ以上を提供すること；および、
薬学的に受容可能な担体とともに、当該分子または当該塩を混合すること。

【0357】

好ましい実施形態において、医薬組成物の調製に用いられる分子は、薬学的に有効な量で、担体と混合される。特定の実施形態において、本明細書に開示される核酸化合物は、ステロイド、または脂質、または別の適切な分子（たとえば、コレステロール）と結合される。

【0358】

本明細書に提供される核酸分子（たとえば限定されないが、p53遺伝子の発現を下方制御することができる、または、p53遺伝子の発現に対するRNA干渉を調節することができる、低分子干渉核酸（siNA）、干渉RNA（RNAi）、低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、および低分子ヘアピンRNA（shRNA）分子等）を用いることにより、p53の発現を下方制御するための組成物および方法が提供される。本明細書に開示される組成物および方法はまた、様々な状態または疾患（たとえば、本明細書に記述される障害、疾患および損傷等

) の治療において有用である。

【0359】

本明細書に開示される核酸分子は個々に、または、他の薬剤と組み合わせて、または、他の薬剤と併用して、p53と関連する疾患、形質、状態および/または障害(たとえば、限定されないが、本明細書に記述される疾患、障害および損傷等)を予防または治療するために用いられても良い。

【0360】

本明細書に開示される核酸分子は、配列特異的な方式で、p53遺伝子の発現を下方制御することができる。核酸分子は、センス鎖および、p53 mRNA(たとえば、配列番号1~7)の一部に対して少なくとも部分的に相補的である(アンチセンス)連続的なヌクレオチドを含有する、アンチセンス鎖を含有しても良い。

10

【0361】

一部の実施形態において、p53に特異的な核酸化合物を、他の治療剤および/または、他の分子標的(たとえば、限定されないが、様々なアポトーシス促進遺伝子等)に特異的な核酸化合物と併せて用いられても良い。

【0362】

対象または生体における、p53発現に関連した疾患もしくは状態を治療または予防するための方法は、対象または生体における、p53遺伝子発現の下方制御に適した条件下で、本明細書に提供される核酸分子と、当該対象または生体を接触させることを含んでも良い。

20

【0363】

好ましい実施形態において、治療される対象は、温血動物、特に、ヒトを含む哺乳類である。

【0364】

本明細書に開示される方法には、p53遺伝子の発現を下方制御する阻害性化合物を1つ以上、対象に投与することを含み、特に、本明細書に記述される核酸化合物を治療有効量で投与し、それにより対象を治療する。

【0365】

本明細書に開示される分子、特に、新規の二本鎖核酸化合物は、p53の発現を下方制御し、および、p53発現の下方制御が有益な疾患または状態の治療に有用である。p53を下方制御する方法、分子および組成物は、本明細書において、詳細に考察されており、および、当該分子および/または組成物のうちの任意のものは、当該状態のうちの任意のものに罹患している対象の治療に有益に用いられても良い。核酸化合物の作製に有用なセンス鎖およびアンチセンス鎖のオリゴヌクレオチド配列は、表1(配列番号8~33)に記述されている。具体的なオリゴヌクレオチド化合物は、表A、BおよびEに記述されている。好ましい実施形態において、治療される対象は温血動物であり、特に、ヒトを含む哺乳類である。

30

【0366】

「治療」という用語は、治療的な処置および、予防的もしくは防御的な手段の両方を指し、ここで、目的は、障害を予防すること、または、たとえば聴覚障害もしくは難聴(または平衡障害)等の障害の症状を軽減すること、または、本明細書に列挙される聴覚損失関連疾患に関連する細胞死を予防もしくは減少させることである。治療の必要があるのは、当該疾患または状態をすでに経験しているもの、当該疾患または状態を有する傾向にあるもの、および、当該疾患または状態が予防されるべきもの、が挙げられる。本明細書に開示される核酸化合物は、疾患または状態が発生する前、発生している間、または発生した後投与される。

40

【0367】

一部の実施形態において、本明細書に提供される分子および組成物は、オトトキシン(ototoxin)と共に投与される。たとえば、アミノグリコシド系抗生物質の投与による、哺乳類の感染治療に対する改善方法が開示され、当該改善方法には、抗生物質に関

50

連したオトトキシン誘導性難聴を軽減または予防する治療の必要のある対象に対し、p 53の発現を下方制御する化合物（特に、新規 siRNA）の1つ以上の治療有効量を投与することが含まれる。p 53の発現を下方制御する化合物、特に新規 dsRNAは、好ましくは、内耳の内に、局所的に投与される。

【0368】

さらに別の実施形態において、化学療法化合物の投与による、哺乳類の癌治療に対する改善方法が提供され、ここで、当該改善方法には、当該化学療法剤に関連した、オトトキシン誘導性難聴を軽減または予防する治療の必要のある対象に対し、本発明の組成物の治療有効量を投与することが含まれる。オトトキシン誘導性難聴を軽減または予防する化合物（たとえば、特に、本明細書に開示される dsRNA 分子）は、蝸牛に対し、たとえば P B S または他の生理学的な溶液等のビヒクルに溶解した裸の dsRNA として直接投与されるのが好ましいが、上述の送達ビヒクルと共に投与されてもよい。

【0369】

一部の実施形態においては、併用療法が好ましい。2つ以上の剤（すなわち、2以上の dsRNA、または、少なくとも1つの dsRNA と少なくとも1つの別の治療剤。それぞれ、別々に処方および投与される）を投与することにより、または、2以上の剤を1つの剤型中で投与することにより、併用療法が行われる。他の組み合わせもまた、併用療法に包含される。たとえば、2つの剤が共に処方され、そして、第三の剤を含有する別の製剤と併せて投与されても良い。併用療法中の2以上の剤は同時に投与されてもよいが、そうではなくてもよい。たとえば、第一の剤（または剤の組み合わせ）の投与が、第二の剤（または剤の組み合わせ）の投与に、分単位、時間単位、日単位、または週単位で先行しても良い。ゆえに、2以上の剤が、数分以内で、または1時間または数時間以内で、または1日または数日以内で、または数週以内で、互いに投与されてもよい。一部の場合においては、さらに長い間隔も可能である。併用療法で用いられる2以上の剤は、患者の体内に同時に存在しても、存在しなくても良い。併用療法には、当該組み合わせに用いられた剤の1つ以上の2回以上の投与が含まれる。たとえば、組み合わせに dsRNA 1 および dsRNA 2 が用いられた場合、任意の組み合わせで、1回以上、連続してそれらを投与することができる（たとえば、dsRNA 1 - dsRNA 2、dsRNA 2 - dsRNA 1、dsRNA 1 - dsRNA 2 - dsRNA 1、dsRNA 2 - dsRNA 1 - dsRNA 2、dsRNA 1 - dsRNA 1 - dsRNA 2、dsRNA 1 - dsRNA 2 - dsRNA 2 等の順番で）。

【0370】

本明細書に開示される化合物が治療剤として有用な、ある適応症の詳細は、本明細書に記述されている。

【0371】

実施形態は、例示説明的に記述され、用いられている専門用語は、限定ではなくむしろ、記述のための文言として機能することが意図されていることを理解されたい。

【0372】

本明細書全体を通じて、様々な公表文献（米国特許を含む）が、著者および年号により、および特許は番号により参照されている。これらの公表文献および特許および特許出願の、その全体の開示内容は、本出願が関連する技術の現状を、より完全に記述するために、参照により本出願に援用される。

【0373】

本明細書に提供される組成物および方法は、ここで以下の非限定的な実施例を参照することにより、より詳細に記述される。

【実施例】

【0374】

さらなる考察を行うことなく、当業者であれば、上述の記述により、本発明のすべてを活用することができると考えられる。以下の好ましい具体的な実施形態は、それゆえ、単なる例示説明とみなされるべきものであり、本発明を決して限定するものではない。

【0375】

本明細書に具体的には記述されていない当分野公知の標準的な分子生物学的プロトコールの多くは、原則的に、以下の文献に従う。Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New-York (1989, 1992)、および、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988)、および、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)、および、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988)、および、Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York and in Birren et al (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) ならびに、米国特許第4,666,828号；同第4,683,202号；同第4,801,531号；同第5,192,659号および同第5,272,057号に記述される技法（参照により本明細書に援用される）。ポリメラーゼ鎖反応（PCR）は、標準的なPCRプロトコールで実施された：A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990)。フローサイトメトリー（FACS）と組み合わせたin situ PCRは、特定のDNAおよびmRNAの配列を含有する細胞の検出のために用いることができる（Testoni et al., Blood 1996, 87:3822）。RT-PCRを実施する方法は当分野に公知である。

【0376】

実施例1．活性dsRNA化合物の新規配列の作製

独自のアルゴリズムと、p53遺伝子のmRNAの公知配列（配列番号1～7）を用いて、多くの可能性のあるdsRNAの配列を作製した。

【0377】

オリゴヌクレオチド配列は、ヒト遺伝子発現を標的とするための最適な予測配列として、独自アルゴリズムにおけるそれらのスコアに基づき、優先順位付けがなされた。

【0378】

実施例2．活性核酸化合物に対する好ましい新規配列の特定および、新規二本鎖核酸化合物の作製

最適スコアのオリゴヌクレオチド配列を、そのin vitro活性に基づき、さらに優先順位付けを行った。この目的のために、dsRNA化合物は、以下の修飾パターンを有して合成された：

アンチセンス鎖およびセンス鎖において、修飾されていないリボヌクレオチド、および、アンチセンス鎖およびセンス鎖の両方において、-dTdT\$ 3'-末端オーバーハングを有する、末端「__S709」により特定されるdsRNA（dTは、チミジンを表し、および、dT\$は、末端リン酸を有していないチミジンを表す）。

【0379】

末端__S500により特定される、dsRNA化合物は、以下の修飾パターンを有する：

交互に存在する2'-O-メチル（Me）糖修飾リボヌクレオチドは、アンチセンス鎖の第一、第三、第五、第七、第九、第十一、第十三、第十五、第十七および第十九の位置に存在し、全く同じ修飾（すなわち、2'-O-メチル糖修飾リボヌクレオチド）は、セン

ス鎖の第二、第四、第六、第八、第十、第十二、第十四、第十六、および第十八の位置に存在する。

【0380】

"p53_3"、"p53_QMON1"および、"p53_1"の接頭辞により特定されるdsRNA化合物は対照として用いられ、これらの対照化合物のアンチセンス鎖およびセンス鎖を、表Cに示す。

表C

【表6】

dsRNAの 名称	センス鎖(5'>3')	アンチセンス鎖(5'>3')
p53_3	5' CCGAGUGGAAGGAAUUUG 3'	5' CAAAUUCCUCCACUCGG 3'
p53_13	5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3'	5' AGUAGUUCCAUAAGGUCUG 3'
p53_1	5' GAGAAUUAUUCACCCUUC 3'	5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3'

10

【0381】

上記および下記のすべての表において、二本鎖の名称は、接頭辞「p53」および「T P53」（それらは、相互交換可能に用いられる）により、特定される。

20

【0382】

以下のアッセイを、*in vitro*活性の実験に用いた。

【0383】

活性アッセイ

内因的にp53遺伝子を発現しているヒト試験細胞またはラット試験細胞（ヒトHCT116細胞またはラットREF52細胞）（約 $1.5 \sim 2 \times 10^5$ ）を、30～50%のコンフルエンスになるまで、1.5mlの増殖培地中、約24時間、6ウェルプレートにおいて増殖させた。

【0384】

次いで、細胞を、リポフェクタミン2000試薬を用いて、dsRNA試験化合物（必要とされる最終濃度0.001～100nM/ウェル）と共にトランスフェクトした。

30

【0385】

実験のトランスフェクション効率を測定するために、5つのウェルを、個々に、リポフェクタミン2000試薬で処置して、「陰性対照試料」と規定し、および、5つのウェルを個々に、活性dsRNA（最終濃度は5nM）でトランスフェクトし、「対照活性試料」（陽性対照）として定義した。Cy3標識siRNAトランスフェクト細胞を、トランスフェクション効率の陽性対照として用いた。

【0386】

次いで、細胞を、 37 ± 1 、5%CO₂インキュベーター中で、48～72時間、インキュベートした。dsRNAトランスフェクト細胞を回収し、RNAを、EZ-RNAキット[Biological Industries（#20-410-100）]を用いて単離した。逆転写を以下のように行った：cDNAを合成し、ヒトおよび/またはラットp53mRNAレベルを、リアルタイムqPCRおよび、各試料に対するサイクロフィリンA（CYNA、PPIA）mRNAのレベルに対して標準化して、決定した。dsRNA活性は、トランスフェクトされていない対照試料に対する、siRNA処置試料におけるmRNA量の比率に基づき、決定された。

40

【0387】

活性実験の結果、p53遺伝子の下方制御のための新規dsRNA化合物として好ましい配列が特定された。これらの配列を上述の表1に記述する（配列番号8～33）。これ

50

らの配列を有する化合物および、末端"__S 7 0 9"により特定される修飾パターンを有する化合物で得られた活性の結果を表 D に表す。末端"__S 7 0 9"により特定される d s R N A 化合物は、アンチセンス鎖およびセンス鎖に修飾されていないリボヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖およびセンス鎖の両方に - d T d T \$ 3 ' - 末端オーバーハングを有する (d T はチミジンを表し、 d T \$ は末端リン酸の無いチミジンを表す) 。

表 D

【表 7】

試料の種類 (用いたdsRNA化合物)	dsRNA化合物 の濃度	対照のp53残余 mRNA%
p53_34_S709	80nM	36
p53_34_S709	40nM	44
p53_34_S709	20nM	40
p53_34_S709	4nM	70
p53_35_S709	80nM	49
p53_35_S709	40nM	40
p53_35_S709	20nM	94
p53_35_S709	4nM	119
p53_36_S709	80nM	105
p53_36_S709	40nM	126
p53_36_S709	20nM	144
p53_36_S709	4nM	150
p53_37_S709	80nM	73
p53_37_S709	40nM	58

10

20

30

40

試料の種類 (用いたdsRNA化合物)	dsRNA化合物 の濃度	対照のp53残余 mRNA%
p53_37_S709	20nM	119
p53_37_S709	4nM	84
p53_38_S709	80nM	65
p53_38_S709	40nM	55
p53_38_S709	20nM	53
p53_38_S709	4nM	122
p53_39_S709	80nM	73
p53_39_S709	40nM	48
p53_39_S709	20nM	67
p53_39_S709	4nM	106
p53_40_S709	80nM	43
p53_40_S709	40nM	58
p53_40_S709	20nM	62
p53_40_S709	4nM	67
p53_41_S709	80nM	35

10

20

30

40

試料の種類 (用いたdsRNA化合物)	dsRNA化合物 の濃度	対照のp53残余 mRNA%
p53_41_S709	40nM	26
p53_41_S709	20nM	49
p53_41_S709	4nM	67
p53_42_S709	80nM	
p53_42_S709	40nM	84
p53_42_S709	20nM	96
p53_42_S709	4nM	82

10

20

【0388】

表Dに示すように、二本鎖核酸化合物 p 5 3 _ 3 4 _ S 7 0 9、p 5 3 _ 3 5 _ S 7 0 9、p 5 3 _ 3 7 _ S 7 0 9、p 5 3 _ 3 8 _ S 7 0 9、p 5 3 _ 3 9 _ S 7 0 9、p 5 3 _ 4 0 _ S 7 0 9、p 5 3 _ 4 1 _ S 7 0 9 および p 5 3 _ 4 2 _ S 7 0 9 は、標的ヒト p 5 3 m R N A に対して活性であることが判明した (p 5 3 _ 4 1 _ S 7 0 9 化合物の活性が最も高かった)。

30

【0389】

実施例3．新規修飾二本鎖核酸化合物の作製および試験

好ましい配列 (配列番号 8 ~ 3 3) を用いて、新規修飾二本鎖核酸化合物を作製した。好ましいアンチセンス鎖およびセンス鎖の配列を用いて作製された新規修飾二本鎖核酸化合物は、上述の表Aおよび表Bに記述されている。以下の表Eは、好ましいアンチセンス鎖およびセンス鎖の配列 (配列番号 8 ~ 3 3) を用いて作製された一部の好ましい新規修飾二本鎖核酸化合物を示す。

表E

【表 8】

d s R N A 化合物	センス (N') y	アンチセンス (N) x
	5 → 3	5 → 3
TP53_13_S227 5	C3- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>UAC</u> U-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGUuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi
TP53_13_S227 6	C3- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAC <u>UAC</u> U-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGUuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi
TP53_13_S227 7	C3- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAcuacu-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGUuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi
TP53_13_S227 8	C3- <u>C</u> AGACCUAUGGAAAcuacu-C3-pi	5' phos-AG <u>U</u> AGUuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi
TP53_41_S709	GACUCAGACUGACAUUCUU-dTdT\$	AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT\$
TP53_41_S227 9	C3-GACUCAGACUGA <u>CAU</u> <u>UCU</u> U-C3-pi	5' phos-AAGAA <u>U</u> gU <u>C</u> AGUCU <u>GAG</u> <u>UC</u> -C3;C3-pi
TP53_41_S229 8	C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi	5' phos-AAGAA <u>U</u> gU <u>C</u> AGUCU <u>GAG</u> <u>UC</u> -C3;C3-pi
TP53_41_S229 9	C3-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi	5' phos-AAGAAUgU <u>C</u> AGUCUGAGUC-C3; C3-pi
TP53_41_S230 0	C3-GACUCAGACUGA <u>CAU</u> <u>UCU</u> U-C3-pi	5' phos-AAGAAUgU <u>C</u> AGUCUGAGUC-C3;C3-pi
TP53_44_S230 1	C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUc <u>UG</u> AGU <u>C</u> AGGCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S230 2	C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUcUGAGUCAGGCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S230 3	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>UG</u> AU-C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUc <u>UG</u> AGU <u>C</u> AGGCCC-C3;C3-pi
TP53_44_S230 4	C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>UG</u> AU-C3-pi	5' phos-AU <u>C</u> AGUcUGAGUCAGGCCC-C3;C3-pi

【 0 3 9 0 】

上記および下記のすべての表において、二本鎖の名称は、接頭辞「p 5 3」および「TP 5 3」（それらは、相互交換可能に用いられる）により、特定される。ゆえに、たとえば、接頭辞「p 5 3 _ 1 3」および「TP 5 3 _ 1 3」により特定される化合物は、センス鎖の配列が 5' C A G A C C U A U G G A A A C U A C U 3'（配列番号 8）および、アンチセンス鎖の配列が 5' A G U A G U U U C C A U A G G U C U G 3'（配列番号 21）を有する二本鎖核酸化合物を表す。

【 0 3 9 1 】

表 E のすべての d s R N A 化合物に対して：

A、U、G、C は、修飾されていないリボヌクレオチドを表し；

A、U、G、C は、2-O-メチル糖修飾リボヌクレオチドを表し；

a、u、c、g は、2'-5'ヌクレオチド間リン酸結合により隣接するヌクレオチドに結合されたヌクレオチド（5'>3'）を表し；

10

20

30

40

50

C 3 は、1, 3 - プロパンジオール, モノ (リン酸二水素) (3 - ヒドロキシプロパン - 1 - リン酸キャップ部分 [C A S R N : 1 3 5 0 7 - 4 2 - 1] としてもまた特定される) を表し;

C 3 C 3 は、2 つの連続的な C 3 分子からなるキャップ部分を表し、

p i は、3' リン酸を表し、

5' - p h o s は、5' リン酸を表す。

【0392】

新規修飾二本鎖核酸化合物の活性を、ヒト H C T 1 1 6 細胞およびラット R E F 5 2 細胞において実験した。

【0393】

表 F 1 に、ヒト H C T 1 1 6 細胞株における、一部の新規修飾二本鎖核酸化合物に対して得られた *i n v i t r o* 活性結果を要約する。すべての新規 d s R N A 化合物は、上述の表 E に記述されている。p 5 3 _ 1 3 _ S 5 0 0 は、比較目的に用いられた公知の化合物である。p 5 3 _ 1 3 _ S 5 0 0 化合物は、上述の表 C に記述されるセンス鎖およびアンチセンス鎖配列を有している。

【0394】

p 5 3 _ 1 3 _ S 5 0 0 化合物は、以下の修飾パターンを有している：
交互に存在する 2' - O - メチル (M e) 糖修飾リボヌクレオチドは、アンチセンス鎖の第一、第三、第五、第七、第九、第十一、第十三、第十五、第十七および第十九の位置に存在し、全く同じ修飾 (すなわち、2' - O - メチル糖修飾リボヌクレオチド) は、センス鎖の第二、第四、第六、第八、第十、第十二、第十四、第十六、および第十八の位置に存在する。

【0395】

表 F 1 における *i n v i t r o* 活性は、対照と比較した、残余標的 m R N A の % として示されている。

表 F 1

10

20

【表 9】

試料の種類(用いた dsRNA化合物)	dsRNA化合物 の濃度	対照のp53残余 mRNA%
無し(対照)		100
p53_13_S500	50nM	25
p53_13_S500	25nM	14
p53_13_S500	5nM	33
p53_13_S500	1nM	55
p53_1_S500	50nM	22
p53_1_S500	25nM	16
p53_1_S500	5nM	52
p53_1_S500	1nM	107
p53_13_S2275	50nM	19
p53_13_S2275	25nM	14
p53_13_S2275	5nM	25
p53_13_S2275	1nM	60
p53_13_S2276	50nM	19
p53_13_S2276	25nM	19
p53_13_S2276	5nM	44
p53_13_S2276	1nM	112
p53_13_S2277	50nM	22
p53_13_S2277	25nM	14
p53_13_S2277	5nM	38
p53_13_S2277	1nM	112
p53_13_S2278	50nM	41
p53_13_S2278	25nM	25
p53_13_S2278	5nM	49

10

20

30

40

試料の種類(用いた dsRNA化合物)	dsRNA化合物 の濃度	対照のp53残余 mRNA%
p53_13_S2278	1nM	99
p53_41_S709	50nM	5
p53_41_S709	25nM	8
p53_41_S709	5nM	14
p53_41_S709	1nM	30
p53_41_S2279	50nM	3
p53_41_S2279	25nM	8
p53_41_S2279	5nM	3
p53_41_S2279	1nM	5
p53_41_S2298	50nM	5
p53_41_S2298	25nM	8
p53_41_S2298	5nM	5
p53_41_S2299	1nM	
p53_41_S2299	50nM	3
p53_41_S2299	25nM	3
p53_41_S2299	5nM	5
p53_41_S2299	1nM	5
p53_41_S2300	50nM	3
p53_41_S2300	25nM	3
p53_41_S2300	5nM	2
p53_41_S2300	1nM	3
p53_44_S2301	50nM	5
p53_44_S2301	25nM	5
p53_44_S2301	5nM	3
p53_44_S2301	1nM	14

10

20

30

40

試料の種類(用いた dsRNA化合物)	dsRNA化合物 の濃度	対照のp53残余 mRNA%
p53_44_S2302	50nM	3
p53_44_S2302	25nM	3
p53_44_S2302	5nM	5
p53_44_S2302	1nM	8
p53_44_S2303	50nM	3
p53_44_S2303	25nM	5
p53_44_S2303	5nM	3
p53_44_S2303	1nM	3
p53_44_S2304	50nM	5
p53_44_S2304	25nM	5
p53_44_S2304	5nM	11
p53_44_S2304	1nM	19

10

20

【0396】

ヒトHCT116細胞において行われた*in vitro*活性実験の結果から、p53_41_S709、p53_41_S2279、p53_41_S2298、p53_41_S2299、p53_44_S2301、p53_44_S2302、p53_44_S2303および、p53_44_S2304として特定される化合物(上述の表Eにすべて記述されている)が、ヒトp53 mRNAの下方制御において、最も活性を有する

30

【0397】

表F2において、ラットREF52細胞株における、一部の新規修飾二本鎖核酸分子から得られた*in vitro*活性結果を要約する。

【0398】

表F2の*in vitro*活性は、対照と比較した、残余標的mRNAの%として示されている。

表F2

【表 10】

試料の種類 (用いた d s R N A 化合物)	d s R N A 化合物の濃度	対照の p 5 3 残余 m R N A %
REF52 対照	無し	100
p53_13_S500	50nM	26
	25nM	30
	5nM	63
	1nM	68
p53_41_S709	50nM	40
	25nM	87
	5nM	96
	1nM	211
p53_41_S2279	50nM	38
	25nM	20
	5nM	21
	1nM	60
p53_41_S2298	50nM	137
	25nM	81
	5nM	71
	1nM	113
p53_41_S2299	50nM	116
	25nM	122
	5nM	107
	1nM	153
p53_41_S2300	50nM	102
	25nM	81

10

20

30

40

	5nM	112
	1nM	149
p53_44_S2301	50nM	12
	25nM	14
	5nM	25
	1nM	55
p53_44_S2302	50nM	14
	25nM	9
	5nM	18
	1nM	59
p53_44_S2303	50nM	20
	25nM	12
	5nM	12
	1nM	38
p53_44_S2304	50nM	22
	25nM	33
	5nM	
	1nM	

10

20

30

【0399】

ラットREF52細胞において行われた*in vitro*活性実験の結果から、p53_44_S2301、p53_44_S2302、p53_44_S2303および、p53_44_S2304として特定される化合物（上述の表Eにすべて記述されている）が、本実験で試験した化合物のうち、ラットp53 mRNAの下方制御において、最も活性を有することが判明した。

【0400】

実施例4．psiCHECK（商標）-2システムを用いた、新規二本鎖RNA分子の潜在的な活性の評価

40

3つのpsiCHECK（商標）（Promega）をベースにした構築物を、潜在的な活性の評価のために調製した。psiCHECK構築物は、合致相補ガイド（*matched complementary guide*）の単一配列を含有した（AS-CM）。 $1.3 \sim 1.5 \times 10^6$ ヒトHeLa細胞を、10cmのディッシュに播種した。次いで、細胞を 37 ± 1 、5%CO₂インキュベーター内にて24時間インキュベートした。増殖培地は、8mlの新しい増殖培地を用いて播種の一日後に交換され、各プレートは、メーカーのプロトコルに従い、lipofectmine（商標）2000試薬を用いて、上述のプラスミドのうちの1つでトランスフェクトされ、 37 ± 1 、5%CO₂で5時間、インキュベートされた。インキュベーションの後、細胞を、80μlの増殖培地中、 5×10^3 細胞/ウェルの最終濃度で、96ウェルプレートに再播種した。16

50

時間後、細胞を、Lipofectamine 2000 試薬を用いて、トランスフェクション RNA 化合物でトランスフェクトした（最終濃度は、100 μ l の最終体積中、0.01 nM ~ 100 nM の範囲）。次いで、ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ活性（以下に記述）評価の後、細胞を 48 時間、 37 ± 1 でインキュベートした。

【0401】

二本鎖 RNA 化合物でのトランスフェクションの 48 時間後、Dual-Luciferase（登録商標）アッセイキット（Promega, カタログ番号 E1960）を用いて、メーカーの指示に従い、ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼの活性を、各 siRNA トランスフェクト試料において測定した。各試料に対し、ウミシイタケルシフェラーゼ活性値を、ホタルルシフェラーゼ活性値で割った（標準化）。ウミシイタケルシフェラーゼ活性は、対応する psiCHECK（商標）-2 プラスミドのみでトランスフェクトされた細胞（二本鎖 RNA は無し）において得られた標準値と比較した、試験試料中の標準化活性値のパーセンテージとして最終的に表されている。

10

【0402】

表 G、H および I において、AS - CM 配列に対する、psiCHECK システムを用いた新規二本鎖核酸分子の一部から得られた結果を示す（残余 mRNA %）。すべての新規二本鎖核酸化合物は、上述の表 E に記述されている。

【0403】

表 G、H および I において、AS - CM 配列に対する、psiCHECK システムを用いた新規二本鎖核酸分子の一部から得られた結果を示す（残余 mRNA %）。すべての新規 dsRNA 化合物は、上述の表 E に記述されている。

20

表 G

【表 1 1】

試料の名称(用いたdsRNA化合物)	dsRNA化合物の濃度	AS_CM 対照のp53 残余mRNA %
無し(対照)		100
TP53_41_S709	100nM	6
TP53_41_S709	33.3nM	5
TP53_41_S709	11.1nM	7
TP53_41_S709	5nM	9
TP53_41_S709	3.7nM	9
TP53_41_S709	1.23nM	11
TP53_41_S709	0.41nM	13
TP53_41_S709	0.137nM	22
TP53_41_S709	0.045nM	26
TP53_41_S709	0.015nM	33
TP53_41_S709	0.005nM	28
TP53_41_S2279	100nM	3
TP53_41_S2279	33.3nM	3
TP53_41_S2279	11.1nM	3
TP53_41_S2279	3.7nM	4
TP53_41_S2279	1.23nM	5
TP53_41_S2279	0.41nM	5
TP53_41_S2279	0.137nM	9
TP53_41_S2279	0.045nM	12
TP53_41_S2279	0.015nM	29
TP53_41_S2279	0.005nM	34

10

20

30

40

試料の名称(用いたdsRNA化合物)	dsRNA化合物の濃度	AS_CM 対照のp53 残余mRNA %
TP53_41_S2298	100nM	4
TP53_41_S2298	33.3nM	4
TP53_41_S2298	11.1nM	5
TP53_41_S2298	3.7nM	5
TP53_41_S2298	1.23nM	7
TP53_41_S2298	0.41nM	11
TP53_41_S2298	0.137nM	18
TP53_41_S2298	0.045nM	36
TP53_41_S2298	0.015nM	50
TP53_41_S2298	0.005nM	57
TP53_41_S2299	100nM	3
TP53_41_S2299	33.3nM	3
TP53_41_S2299	11.1nM	4
TP53_41_S2299	3.7nM	5
TP53_41_S2299	1.23nM	6
TP53_41_S2299	0.41nM	8
TP53_41_S2299	0.137nM	15
TP53_41_S2299	0.045nM	27
TP53_41_S2299	0.015nM	36
TP53_41_S2299	0.005nM	47
TP53_41_S2300	100nM	9
TP53_41_S2300	33.3nM	9
TP53_41_S2300	11.1nM	10

10

20

30

40

試料の名称(用いたdsRNA化合物)	dsRNA化合物の濃度	AS_CM 対照のp53 残余mRNA %
TP53_41_S2300	3.7nM	12
TP53_41_S2300	1.23nM	11
TP53_41_S2300	0.41nM	18
TP53_41_S2300	0.137nM	24
TP53_41_S2300	0.045nM	39
TP53_41_S2300	0.015nM	53
TP53_41_S2300	0.005nM	65

表 H

10

20

【表 1 2】

試料の名称 (用いた d s R N A化合物)	d s R N A化合物 の濃度	A S _ C M 対照の p 5 3 残余m R N A %
無し (対照)		100
p53_13_S500	100nM	6
p53_13_S500	33. 3nM	5
p53_13_S500	11. 1nM	6
p53_13_S500	3. 7nM	8
p53_13_S500	5 nM	5
QHMon1	1. 23nM	9
p53_13_S500	0. 41nM	11
p53_13_S500	0. 137nM	22
p53_13_S500	0. 045nM	34
p53_13_S500	0. 015nM	38
p53_13_S500	0. 005nM	48
TP53_13_S2275	100nM	3
TP53_13_S2275	33. 3nM	3
TP53_13_S2275	11. 1nM	4
TP53_13_S2275	3. 7nM	4
TP53_13_S2275	1. 23nM	6
TP53_13_S2275	0. 41nM	6
TP53_13_S2275	0. 137nM	8
TP53_13_S2275	0. 045nM	14
TP53_13_S2275	0. 015nM	18
TP53_13_S2275	0. 005nM	30

10

20

30

40

TP53_13_S2276	100nM	2
TP53_13_S2276	33.3nM	2
TP53_13_S2276	11.1nM	2
TP53_13_S2276	3.7nM	3
TP53_13_S2276	1.23nM	3
TP53_13_S2276	0.41nM	4
TP53_13_S2276	0.137nM	6
TP53_13_S2276	0.045nM	14
TP53_13_S2276	0.015nM	22
TP53_13_S2276	0.005nM	25
TP53_13_S2277	100nM	3
TP53_13_S2277	33.3nM	3
TP53_13_S2277	11.1nM	3
TP53_13_S2277	3.7nM	3
TP53_13_S2277	1.23nM	4
TP53_13_S2277	0.41nM	5
TP53_13_S2277	0.137nM	7
TP53_13_S2277	0.045nM	14
TP53_13_S2277	0.015nM	24
TP53_13_S2277	0.005nM	32
TP53_13_S2278	100nM	2
TP53_13_S2278	33.3nM	2
TP53_13_S2278	11.1nM	3
TP53_13_S2278	3.7nM	2
TP53_13_S2278	1.23nM	3
TP53_13_S2278	0.41nM	3

10

20

30

40

TP53_13_S2278	0.137nM	7
TP53_13_S2278	0.045nM	14
TP53_13_S2278	0.015nM	18
TP53_13_S2278	0.005nM	27

表 I

【表 1 3】

TP53_44_S2301	100nM	5
TP53_44_S2301	33.3nM	5
TP53_44_S2301	11.1nM	6
TP53_44_S2301	3.7nM	7
TP53_44_S2301	1.23nM	9
TP53_44_S2301	0.41nM	15
TP53_44_S2301	0.137nM	27
TP53_44_S2301	0.045nM	40
TP53_44_S2301	0.015nM	47
TP53_44_S2301	0.005nM	49
TP53_44_S2302	100nM	3
TP53_44_S2302	33.3nM	4
TP53_44_S2302	11.1nM	4
TP53_44_S2302	3.7nM	6
TP53_44_S2302	1.23nM	6
TP53_44_S2302	0.41nM	9
TP53_44_S2302	0.137nM	19
TP53_44_S2302	0.045nM	28
TP53_44_S2302	0.015nM	34
TP53_44_S2302	0.005nM	39
TP53_44_S2303	100nM	6

10

20

30

40

試料の名称（用いた dsRNA化合物）	dsRNA 化合物 の濃度	AS__CM 対照の p 5 3 残余m R NA %
TP53_44_S2303	33.3nM	6
TP53_44_S2303	11.1nM	6
TP53_44_S2303	3.7nM	7
TP53_44_S2303	1.23nM	7
TP53_44_S2303	0.41nM	13
TP53_44_S2303	0.137nM	24
TP53_44_S2303	0.045nM	46
TP53_44_S2303	0.015nM	47
TP53_44_S2303	0.005nM	73
TP53_44_S2304	100nM	4
TP53_44_S2304	33.3nM	4
TP53_44_S2304	11.1nM	4
TP53_44_S2304	3.7nM	5
TP53_44_S2304	1.23nM	6
TP53_44_S2304	0.41nM	11
TP53_44_S2304	0.137nM	24
TP53_44_S2304	0.045nM	
TP53_44_S2304	0.015nM	37
TP53_44_S2304	0.005nM	31

ps i C H E C K（商標）- 2 システムにおける活性実験の結果から、TP53__41配列、TP53__13配列、およびTP53__44配列に基づいた全ての二本鎖核酸化合物は、高い活性を有することが示された。

【0404】

実施例5．動物モデル

本発明の活性 siRNA の試験を、動物予測モデルにおいて行っても良い。

【0405】

急性腎不全（ARF）のモデルシステム

本明細書に開示される活性核酸化合物の、急性腎不全（ARF）治療に関する試験は、敗血症誘導性ARFまたは虚血再灌流誘導性ARFを用いて行っても良い。

【0406】

1. 敗血症誘導性ARF

敗血症誘導性ARFの2つの動物予測モデルが、Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, *Kidney Int.* Nov; 64(5): 1620-31に記述されている。これらの2つのモデルは、マウス、好ましくは老齢マウスに、リポ多糖の投与および盲腸結紮穿孔を行うものである。

【0407】

10

2. 虚血再灌流誘導性ARF

この動物予測モデルは、Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003 January, . P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor, *J Am Soc Nephrol.*; 14(1): 128-38に記述されている。

【0408】

虚血再灌流傷害は、ラットにおいて両側腎動脈クランプを45分間行い、その後、クランプを開放して、24時間再灌流を行うことにより誘導される。250 μ gの試験核酸化合物を、クランプの2時間前、クランプの30分後に、頸静脈に注射する。追加の試験核酸化合物250 μ gを、尾静脈を介して、クランプの4時間後および8時間後に投与する。GFPに対する核酸化合物を、陰性対照として用いる。ARFの進行は、術前と術後24時間の血清クレアチニンレベルの測定によりモニターされる。実験の最後に、ラットを、温めたPBS、次いで4%パラホルムアルデヒドで、大腿留置ラインを介して灌流する。左腎を取り出し、引き続く組織学的分析のために、4%パラホルムアルデヒド中に保存する。急性腎不全は、基準ラインからの血清クレアチニンレベルの急性の上昇としてしばしば定義づけられる。血清クレアチニンの少なくとも0.5 mg/dLの上昇、または44.2 μ mol/Lの上昇が、急性腎不全の指標とみなされている。血清クレアチニンは、術前のゼロ時点およびARF術の24時間後に測定される。

20

【0409】

ラットの腎臓における核酸化合物分布を実験するために、Cy3標識核酸化合物分子(2 mg/kg)を、ivで、3~5分間、投与し、その後、二光子共焦点顕微鏡を用いて、in vivoイメージングを行う。

30

【0410】

腎臓の虚血再灌流損傷に対する核酸化合物の効果はさらに、腎組織における管ネクロシスの程度を分析することにより測定される。肝ネクロシスは、以下のようにスコアリングされてもよい：損傷なし(損傷スコアリング0)、単細胞性の、斑状の分離ネクロシス(損傷スコアリング1)、組織の25%未満の管ネクロシス(損傷スコアリング2)、組織の25~50%の管ネクロシス(損傷スコアリング3)および、組織の50%を超える管ネクロシス(損傷スコアリング4)。

40

【0411】

表A、BおよびEの核酸化合物を、急性腎不全(ARF)のこれらのモデルにおいて試験し、それらがARF治療に有効であることが見出される。

【0412】

化学療法誘導性内耳有毛細胞死のモデルシステム

1. カルボプラチン誘導性内耳有毛細胞消失のモデルシステム

8匹のチンチラを、生理食塩水に溶解した試験核酸化合物(1、10および30 μ g)の各動物の左耳への直接投与により前処理する。プラセボとして、生理食塩水を、各動物の右耳に投与する。核酸化合物投与の2日後、動物を、カルボプラチン(75 mg/kg

50

i p) で処理する。チンチラを殺処分した後(カルボプラチン処置の2週間後)、内耳有毛細胞(IHC)および外有毛細胞(OHC)の死細胞の%を、左耳(核酸化合物処理)および右耳(生理食塩水処理)において算出する。

【0413】

2. シスプラチン誘導性内耳有毛細胞消失のモデル

オスのWistarラットを、シスプラチン処理の前に、クリック音のシグナル(8、16および32kHz)に対する基礎聴性脳幹反応(ABR)閾値について試験する。基礎聴性脳幹反応試験の後、シスプラチンを、30分にわたり、13mg/kgの腹腔内注入として投与する。処置された耳に、PBSに溶解した試験核酸化合物(15μg/4マイクロリットル)を投与する。対照の耳は、非関連のGFP核酸化合物またはPBSのいずれかで処理する。蝸牛に対する保護効果が可能となるように、核酸化合物分子を、シスプラチン投与の3~5日前の間に投与する。

10

【0414】

聴性脳幹反応(ABR)試験は、シスプラチン投与の3日後に繰り返される。聴性脳幹反応の閾値を、処置前および処置後の間で比較し、閾値の変化を記録する。シスプラチン処置後に閾値が大きく変化すれば、蝸牛中の有毛細胞消失がより重篤であることを示す。聴性脳幹反応試験を繰り返した後、動物を殺処分し、蝸牛を取り出して、走査型電子顕微鏡(SEM)のために処理し、屈曲領域(高頻度領域)における外有毛細胞(OHC)の消失を定量する。外有毛細胞消失の%は、画像野中の外有毛細胞の総数で、重篤なダメージを受けた細胞、または消失した細胞の数を割ることにより算出される。

20

【0415】

表A、BおよびEの核酸化合物を、蝸牛における化学療法誘導性内毛消失細胞のモデルにおいて試験し、それらが蝸牛における有毛細胞消失の重篤な減少、および化学療法誘導性聴覚損失の治療に有効であることが見出される。

【0416】

蝸牛における音響誘導性有毛細胞死のモデルシステム

音響外傷モデルにおける、試験核酸化合物の活性を、チンチラにおいて実験する。7匹の動物群に、音響外傷を施す。4kHzに集中させたノイズのオクターブ帯に動物を2.5時間、105dBで曝す。ノイズに曝されるチンチラの左耳を、約10μLの生理食塩水に溶解した30μgの核酸化合物で前処置する(音響外傷の48時間前); 右耳はピヒクル(生理食塩水)で前処理する。複合活動電位(CAP)は、蝸牛から伝達される神経活動を測定するための簡便で信頼性のある電気生理学的な方法である。CAPは、音刺激(たとえば、クリック音または破裂音等)が突如として発生した際に生じる局所電場電位を検出するために、蝸牛底の近くに電極を置くことにより記録される。各耳の機能状態は、音響外傷の2.5週後に評価する。具体的には、正円窓から記録された化合物の活動電位の平均閾値を、音響外傷の2.5週後に測定し、核酸処置された耳における閾値が、未処置(生理食塩水)の耳よりも低い(良い)かどうかを決定する。さらに、内毛細胞および外毛細胞の消失の量を、核酸処置耳および対照耳において測定する。結果から、蝸牛の正円窓に投与されたp53 siRNAが、音響外傷により生じた損傷を軽減させることができることが示される。

30

40

【0417】

表A、BおよびEの核酸化合物を、この音響誘導性聴覚損失モデルにおいて試験し、それらが音響外傷により生じた損傷の減少、および音響外傷誘導性の聴覚損失の治療に有効であることが見出される。

【0418】

さらなる聴覚損失モデル

A) モルモットにおける、聴覚再生(可塑性)モデル

聴力損失は、アルビノのモルモットを、カナマイシン(400~500mg/kg)の単回ic注射で全身的に処置し、次いで、エタクリン酸(EA)の単回iv(経静脈)注射をすることにより誘導される。この薬理的な聴覚損失により、およそ1~2日後、両側

50

のすべての有毛細胞が消失し、分化した支持細胞が残される。治療核酸を、中耳腔注射（TT）により中耳に投与し、または、点耳（ErD）により外耳道もしくは鼓膜へと投与する。

【0419】

試験核酸化合物の有効性は、以下のように評価する：

1) 蝸牛（複数含む）を、ミオシンVIIa（有毛細胞マーカー）およびファロイジンで全載染色したものと形態学的に分析する。

2) BrdU組込みを、有毛細胞の増殖率の指標として測定する。

【0420】

B) モルモットにおける、騒音誘導性急性聴覚損失モデル

騒音は、一時的または永続的な感音難聴（SNHL）および耳鳴りを伴う聴覚損傷を引き起こす。SNHLおよび耳鳴りは、単体で、または組み合わせで発生しうる。ヒトにおいては、騒音誘導性聴覚損失（NIHL）は、純音オーディオグラム、補充現象、上閾値聴覚試験の病的な結果、および耳の音響放出の振幅減少、における閾値変化により示される。聴覚障害は、継続的な騒音、または衝撃的な騒音への露出により誘導される。さらに、衝撃的な騒音の外傷または、爆発の外傷の可能性を、考慮に入れるべきである。継続的な騒音への露出よりも、衝撃的な騒音への露出により、さらに重篤な内耳の病変がもたらされうる。騒音障害発現の重要な基準は、音圧レベル（SPL）、レベル増加速度、露出時間、ならびに、個々の感受性（「脆弱性の内耳」）である。通常、騒音に曝されることにより、閾値の上昇（後に部分的に解消される）がもたらされ、その一時的な構成要素は、「一時的な閾値変化」（TTS）と呼ばれる。TTS後の回復相において、完全な回復が無かった場合には、永続的な内耳の損傷が生じた可能性がある（永続的な閾値変化＝PTS）。非常に強い音響強度により、直接的な細胞死、そして内耳およびPTSにおける構造の機械的な破壊がもたらされる可能性がある。

【0421】

このモデルにおいて、両側の病変部位は、騒音に曝されることで誘導される；モルモットは、117 dB SPLの広帯域雑音に6時間曝される。

【0422】

表A、BおよびEの核酸化合物がこのモデルにおいて試験され、それらが聴覚損失の予防または治療に有効であることが見出される。

【0423】

褥瘡または床ずれのモデルシステム

褥瘡または床ずれ（糖尿病性潰瘍を含む）は、継続的な圧力（通常、ベッドまたは車椅子からもたらされる）により身体、特に臀部、腰およびかかとの肌の脆弱な部分への循環が断たれた際に発生する、肌および組織の損傷域である。適切な血流が断たれることにより、虚血性ネクロシスが生じ、影響を受けた組織の潰瘍が発生する。褥瘡は、感覚が衰えた、または消失した患者、または、衰弱、飢餓、麻痺もしくは長く寝たきりの患者において最も多く発生する。仙骨、坐骨、大転子、外踝、および踵上の組織は特に影響を受けやすい；他の部位は、患者の状況によって、発生しうる。

【0424】

褥瘡および類似の外傷治療のための活性核酸化合物の試験は、Reid et al., (J Surgical Research, 116: 172 - 180, 2004) に記述されるマウスモデルにおいて行われる。

【0425】

さらにウサギモデル（Mustoe et al., (JCI, 1991, 87(2): 694 - 703; Ahn and Mustoe, Ann Pl Surg, 1991, 24(1): 17 - 23に記述される)を、核酸化合物の試験のために用いる。動物モデルにおける試験により、これらのsiRNA化合物が褥瘡および床ずれを治療および予防することが、示される。

【0426】

表 A、B および E の核酸化合物がこのモデルにおいて試験され、それらが褥瘡、床ずれ、および類似の外傷の治療に有効であることが見出される。

【 0 4 2 7 】

腎移植患者における臓器移植後臓器機能障害 (D G F) のモデルシステム

温虚血 - 左腎摘出術が行われ、次いで、自家移植が行われる (4 5 分間の温腎移植片保存期間が生じる)。自家移植の後、右腎摘出術を同じ動物で行う。試験核酸化合物を、腎移植片を摘出する前 (ドナー治療を模倣) (「 プレ 」)、または、腎自家移植の後 (レシピエント治療を模倣)、または、摘出前および移植後の両方 (ドナー治療とレシピエント治療の組み合わせ) (「 プレ - ポスト 」) のいずれかに、大腿静脈を介して投与する。

【 0 4 2 8 】

冷虚血 - 左腎摘出術をドナー動物に行い、次いで、5 時間、摘出腎を冷保存 (氷上) する。保存期間の最後に、レシピエントラットに両側腎摘出術を行い、次いで、冷保存された腎移植片の移植を行う。温虚血時間 (外科手術中を含む) の合計は 3 0 分である。試験核酸化合物を、腎摘出前のドナー動物に対して (「 プレ 」)、または、移植後 1 5 分のレシピエント動物に対して (「 1 5 分後 」)、または、移植後 4 時間の動物に対して (「 4 時間後 」)、のいずれかに、大腿静脈を介して投与する。

【 0 4 2 9 】

移植後の腎機能改善における核酸化合物の有効性を分析するために、血清クレアチニンレベルを、温虚血モデルおよび冷虚血モデルの両方において、移植後 1、2 および 7 日目に計測する。

【 0 4 3 0 】

表 A、B および E の核酸化合物が D G F (臓器移植後臓器機能障害) のこのモデルにおいて試験され、それらが冷虚血および温虚血、ならびに、引き続く再灌流に関連した D G F (臓器移植後臓器機能障害) からの腎臓の保護において有効であることが見出される。

【 0 4 3 1 】

慢性腎疾患 (C K D) のモデルシステム

本明細書に開示される活性核酸化合物の、慢性腎疾患 (C K D) 治療に関する試験は、以下のモデルを用いて行っても良い：

この動物モデルは、反復 A K I / A R F 発作から生じる C K D の予防または C K D 進行の減衰に関する、試験化合物の分析に有用である。

【 0 4 3 2 】

反復 A K I / A R F 発作は多くの場合、慢性腎疾患 (C K D) の増悪、C K D の進行、または C K D の発生をもたらす。A R F は、数日以内に発生する腎機能の急速な低下により特徴付けられる臨床的症候群である。理論に拘らないが、急性腎障害は、たとえば、大きな心臓手術等の大手術を行った患者における腎虚血 - 再灌流損傷等の、腎虚血 - 再灌流損傷の結果で発生しうる。A R F の主な特性は、血中の窒素性廃棄物 (尿素、クレアチニン) の滞留をもたらす、糸球体濾過率 (G F R) の急速な低下である。近年の研究では、腎組織におけるアポトーシスが、ヒトの A R F の大部分のケースにおいて認められている。アポトーシス性の細胞死の主要部位は、遠位ネフロンである。虚血損傷の最初の段階の間にアクチン細胞骨格の統合性が失われ、それによって、刷子縁の消失、限局性の細胞接着の消失、および引き続く、基底層からの細胞の離脱を伴う、上皮の平板化をもたらされる。

【 0 4 3 3 】

C K D に対するラットモデルには、以下の繰り返し (5 回) 虚血 - 再灌流誘導 A R F が含まれる：4 5 分、両側腎動脈クランプを行い、および、その後にクランプを開放して 2 4 時間再灌流を行った後に、虚血 - 再灌流損傷をラットに誘導する。P B S または試験核酸化合物 (1 2 m g / k g) を、クランプの 4 時間後、個々の実験動物に i . v . 注射する。A R F の進行を、術前 (基準線)、および術後 2 4 時間、2 日および 7 日で、血清クレアチニン (S C r) レベルを測定することによりモニターする。処置 (I / R 損傷、試験核酸化合物、S C r 測定) を、3 0 日の間隔を置き、4 回以上繰り返す (トータルで 5

10

20

30

40

50

回)。5回目のサイクルの7日後、24時間クレアチニンクリアランス(CrCl)代謝ケージおよび尿素タンパク質を計測する。右腎を、代謝ケージの2日後(5サイクルの10日後)に外科的に摘出し、腎臓をCKDに関して組織学的に分析する。右腎摘出の3週間後、左腎を体外に露出させ、生体二光子顕微鏡を用いて、(Cy3-siRNA取込および滞留に関して)in vivoで実験を行う。

【0434】

表A、BおよびEの核酸化合物がCKDのこのモデルにおいて試験され、それらがCKD治療において有効であることが見出される。

【0435】

脊髄損傷(SCI)のモデルシステム

動物および脊髄損傷：125匹のSprague-Dawleyのメスラット(10~11週齢)(Taconic, Germantown, NY)を用いて実験を行った。SCI術に関しては、ラットを2%のイソフルラン(IsoFlo, Abbott Lab, North Chicago, IL)を用いて麻酔し、脊髄をT9~T10での椎弓切除により露出させ、次いで、露出させたT11脊髄の上に、12.5mmまたは25mmの高さから、10.0gの棒を落とすことにより挫傷を負わせる(Constantini and Young, 1994; Hasegawa et al., 2005に記述される)。挫傷および注射(行われた場合には)の後に、筋肉および皮膚を別々に閉じる。セファゾリン(25mg/kg)を全てのラットに投与する。

【0436】

試験核酸化合物の注射：損傷部位への注射は、損傷の前の30分以内に行われる；1μl中、1μgの核酸化合物を、損傷の中心点、および中心点の2mm吻側部分および尾側部分の3点(合計で3μl)それぞれに注射する(Hasegawa et al., 2005)。各注射は、約10分の間、約1mmの深さで滅菌5μlHamiltonシリンジを用いてゆっくりと行われる。腰椎穿刺に関しては、麻酔されたラットを手術台表面(背面が屈曲され、腰椎領域が挙げられている)に置く。約1cmの長さの切開を、L3~5の脊髄突起上に行い、皮膚をけん引する。30ゲージの針を、L3~4またはL4~5で脊柱管へと進め、100μlのHamiltonシリンジを用いて髄腔内へと40μlを投与する。針が腰椎髄腔内に適切に置かれたかどうかは、入った瞬間の「へこむ(give)」感触と、尾が振られることにより示される(Lepore et al., 2005)。この方法により脳脊髄液(CSF)が損傷部位領域まで逆流したかどうかを測定するために、40μlのEvans Blue色素を腰膨大に注入し、注入後、数秒以内に色素が椎弓切除ラットの露出T9~10に現れることにより、液流が損傷部位を通過したことが確認される。

【0437】

細胞性トータルRNA調製およびQ-RT-PCR：RNAを単離するために、動物に、100mg/kgのペントバルビタールを注射し、冷PBSで灌流する。脊柱をすばやく摘出し、ドライアイス粉末上で凍結させる。損傷(I)中心点を真ん中とした5mmの脊髄切片を、隣接する5mmの近位切片および遠位切片、ならびに、胸椎レベル1(T1)の切片と共に解剖する(Chang et al., 2009)。一部の実験において、I切片は、正中線で二分され、それによって脊髄の同一領域を有する2つの組織片を取得し、RNAおよびタンパク質の分離抽出を行い、ペアとなる組織からの結果同士を比較することができる。RNAに関しては、組織をボリトロンホモゲナイザー(Kinematica Inc.)でホモジナイズし、RNAは、Qiagen RNeasy Plus Miniプロトコール(Qiagen, Valencia, CA)に従って調製する。RNAは、Nanodrop分光光度計(Thermo Scientific Inc.)を用いて定量し、1μgの総RNAを、ランダムヘキサマーによりプライムされる、SuperScript II逆転写酵素(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いた第一鎖cDNAに用いた。PCR反応は、Applied Biosystems 7500 Fast装置を用いて、1mMのプライマーおよび

10

20

30

40

50

S Y B R G r e e n マスターミックス (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) を用いて、20 μ l の反応液中、40 ng の c D N A で行う。各遺伝子の発現値は、G A P D H c D N A の量に対して標準化し、各試料中に存在する R N A の相対量を算出する。

【0438】

組織処理および染色：麻酔された動物に、生理食塩水、次いで、4 % パラホルムアルデヒドを用いて心臓内に灌流液を送る。脊髄を、印をつけた傷害中心点で摘出し、凍結切片作製のために同じ固定剤、凍結防止剤で固定後4～5時間包埋し、クライオスタット (H a c k e r - B r i g h t) で20 μ m にカットする。C y 3 . 5 で標識した核酸化合物を、Z e i s s S t e m i S V 1 1 顕微鏡を用いて単離したばかりの脊髄の中から検出し、全体的な分布を測定する。次いで、脊髄を4 % パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作製する。L F B 染色および他の手順を、H a s e g a w a e t a l . , 2005 に記述されるように行う。免疫染色に関しては、切片を、P B S に溶解した10 % 正常ヤギ血清 / 0 . 3 % T r i t o n X - 100 で2時間ブロッキングし、一次抗体で一晩、4 でインキュベートする。プロテナーゼK (D a k o) での抗原回収の後で、ウサギタンパク質キナーゼC - (P K C) (1 : 200) およびマウスE D 1 (1 : 300) (S e r o t e c , R a l e i g h , N C) を用いた染色を、25 、4 分間、同じ切片で行う。切片をP B S で洗浄し、抗ウサギA l e x a 488 二次抗体または抗マウスA l e x a 568 に次抗体 (1 : 400) と共に、室温で1時間、インキュベートする。洗浄後、切片をA q u a - M o u n t (L e r n e r L a b) に乗せる。同時に染色された切片群に対して、Z e i s s 510 共焦点レーザー走査顕微鏡 (L S M) またはZ e i s s A u t o m a t e d C e l l s c a n S y s t e m f o r A x i o v e r t 200 M を用いて、画像を撮影する。S e r o t o n i n ウサギ5 - H T (1 : 1000) (I m m u n o S t a r) を用いた染色を、同じ手順で行う (ただし、抗原回収は無く、二次抗体として抗ウサギA l e x a 568 (1 : 200) を用いている) 。

【0439】

組織学的な定量：L F B 染色の定量を用いて、組織スペアリング (s p a r i n g) を分析する。分析のためのすべての冠状断面を、同時にL F B に対して染色し、均一に発色させ、次いで、F i l m S c a n n e r L S - 8000 E D (N i k o n , J a p a n) を用いてスキャンする (4000 d p i の解像度) 。カラー画像を、グレースケールへと転換して、個々の切片の輪郭をP h o t o s h o p で描写し、N I H I m a g e J を用いて、各切片に対する総面積ピクセルを得る。一定の閾値を用いて、L F B 染色の閾値を超えるピクセルを得て、得られた面積を測定する。スペア化された組織を、各切片で輪郭描写された総面積により割られた、閾値を超えた面積として定義する。各脊髄から得られた画像を、1 mm 間隔で、10 mm より多く、脊髄 (損傷中心点に中心を置く) を測定する。ほとんどすべてのケースにおいて、最小スペア化組織を伴う位置は、指定損傷中心点に相当し、そうではない場合には、0 位置として再定義する。次いで、スペア組織の平均を算出し、位置関数としてプロットする。E D 1 染色については、1 mm 間隔の11の冠状断面を定量のために各動物から選択する。各位置で全冠状断面を包含するタイル状の画像を、A x i o v e r t 200 M 蛍光顕微鏡 (Z e i s s) 上で20 x の対物レンズ (N . A . = 0 . 75) で撮影し、Z e i s s L S M ヒストグラムソフトウェアを用いて分析する。一定閾値を全ての切片に適用し、それぞれに対し閾値を超える面積を、輪郭描写された総面積で割り、E D 1 + のパーセントを得る。C S T は、中心管の上の正中線に位置し、この領域におけるP K C 染色の輪郭を描写し、定量のために抽出する。マクロファージによる自家蛍光の面積を除外した後に各C S T 抽出領域の閾値を超える面積を取得し、次いで、標準化する。全ての定量分析は、処置群を盲目化された調査者により行われる。

【0440】

表A、BおよびEの核酸化合物がS C I のこのモデルにおいて試験され、それらがS C

10

20

30

40

50

I 治療において有効であることが見出される。

【0441】

ラットにおける、肺移植後の虚血再灌流損傷のモデルシステム

肺虚血/再灌流損傷は、Mizobuchi et al., The Journal of Heart and Lung Transplantation, Vol 23 No. 7 (2004) および、Kazuhiro Yasufuku et al., Am. J. Respir. Cell Mol Biol, Vol 25, pp 26-34 (2001) に記述されるようにラットの動物モデルで得られる。

【0442】

具体的には、イソフルランで麻酔を行った後、14ゲージのテフロンカテーテルを用いて気管をカニューレ挿管し、100%酸素を用いたげっ歯類人工呼吸器でラットに機械的に酸素供給を行う(70呼吸/分の比率、および呼吸終末陽圧は2cm H₂O)。左肺動脈、静脈、および主気管支を、Castanedaクランプで塞ぐ。操作の間、肺は生理食塩水で湿潤に保ち、切開口は、蒸発によるロスを最小限にするために覆っておく。虚血期間は60分の長さである。虚血期間の最後に、クランプを外し、肺に酸素を供給し、肺虚血導入後さらに4時間、24時間、および5日間、再灌流する。実験に最後に、肺を静かに摘出し、RNA抽出のために凍結、または、引き続く組織学的分析のためにグルタルアルデヒド混合物中で固定する。

【0443】

表A、BおよびEの核酸化合物がこのモデルにおいて試験され、それらが肺移植後の虚血再灌流傷害において有効であることが見出される。

【0444】

骨髄移植(BMT)のモデルシステム

Kelly RM et al. Blood. 2010 February 4; 115(5): 1088-1097に記述されるBMTの以下のモデルシステムを用いてもよい:

動物: C57BL/6(H-2^b; B6と呼ばれる)、[C57BL/6 × BALB/c]F₁(H-2^{d/b}; CB6F1と呼ばれる)メスマウス、BALB/c(H-2^d)またはC57BL/6.Ly5.1マウス、およびBim^{+/+}マウス(B6バックグラウンドに対し、10世代超の戻し交配を行った)を用いる。試験核酸化合物を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解し、放射線照射の30~45分前に腹腔内投与を行う。試験核酸化合物投与の選択用量/タイミングにより、最小限の毒性で、p53機能の最適な阻害が得られる。

【0445】

BMT: B6.Ly5.1(コンジェニック)またはBALB/c(アロジェニック)ドナー由来のBM細胞の単細胞懸濁液を、98%超の純度にまでT細胞を減少させる。CD4/8欠損BM細胞(10⁷ [アロジェニック]または、5 × 10⁶ [コンジェニック])を、24時間前にX線源から9 Gy(C57BL/6)または10 Gy(CB6F1)TBIを受けたレシピエントに静脈内投与する。

【0446】

蛍光活性化細胞ソーティングによるリンパ球分析: 丁寧な解離、洗浄、ろ過、懸濁(2%ウシ胎児血清/PBS)により胸腺細胞、脾臓細胞、およびLNの単細胞懸濁液を調製し、蛍光色素結合モノクローナル抗体と共に、30分間、4℃でインキュベートする。用いられた抗体は、CD4、CD8、CD3、T-細胞受容体、CD11c、B220、CD45.1、CD62L、およびCD44(eBioscience)に対するものである。BD FACSCantoでライブイベント(Live event)(105)が得られ、FlowJoソフトウェア(TreeStar)で分析する。

【0447】

蛍光活性化細胞ソーティングによる胸腺上皮細胞(TEC)分析: TECを単離する。

個々の胸腺を、コラゲナーゼ - D / DNase - I 中で2度、および、コラゲナーゼ / ディスパーゼ / DNase - I (Roche) 中で2度、37 でインキュベートする。プールされた消化物を、抗CD45 - PerCp - Cy5.5、抗 - EpCAM - PE、抗 - Ly51 / CDR1 - ビオチン + ストレプトアビジン結合PE / Cy7、抗 - MHC - II - Pacific Blue (eBioscience)、および、FITC - 結合 Ulex - europaeus - アグルチニン - 1 (UEA - 1; Vector Laboratories) で染色する。マウスAIRE特異的ラットmAb (5H12) を、マウス抗ラットIgG2c - Cy5を用いて検出する。1試料あたり、トータルで3 × 10⁶個のライブイベントを、得る。

【0448】

10

胸腺移出T細胞の検出：麻酔したマウスの1つの胸腺小葉に、10 μLのPBSに溶解した50 μgのスルホ - NHS - ビオチン (Pierce) を注入する。24時間後、胸腺および脾臓を、ストレプトアビジン結合PE / Cy7、CD4、CD8、CD3、CD45.1、CD44、およびCD62Lで染色し、フローサイトメトリーで分析する。

【0449】

免疫蛍光顕微鏡：組織をOCTに包埋し、液体窒素中ですぐに凍結する。アセトン固定された8 μmの胸腺切片を、10%正常ウマ血清 / PBSでブロッキングし、Ly51 / CDR1 - FITCおよびウサギ抗マウスCK5ポリクローナル抗体 (Covance Research Products) + Cy5結合ヤギ抗ウサギイムノグロブリンG (IgG; Invitrogen) で染色する。LN / 脾臓分析については、6 μmの凍結切片をアセトン固定し、B220 - FITC (クローンRA3 - 6B2; BD) と共に、glycoprotein - 38 (gp38; 精製クローン8.1.1; ATCC) または、CCL21 (R&D Systems) に対して、3時間、室温で染色する。CCL21およびgp38シグナルは、メーカー (Invitrogen) の説明書に従いTyramide Signal Amplificationキットで増幅する。スライドを、VECTASHIELD (Vector Laboratories) で固定し、画像を、10 × / 0.40 Olympus UPlanApo、または、40 × / 0.80 Olympus UPlanApo油浸レンズ、およびOlympus FV500カメラを介して撮影し、Fluoviewソフトウェア (v. 4.3) を用いて編集し、次いで、Adobe Photoshop CS2で分析およびトリミングを行う。

20

Lm感染および器官中のCFUの検出：全長ニワトリオブアルブミン (OVA) を発現する組換えLm株Lm - OVAおよび actA - Lm - OVA (弱毒株) を用いる。マウスに、脳心臓浸出物 (BHI) ブロス中、37 で増殖させた早期対数増殖期の細菌を接種する。コンジェニックBM移植片レシピエントに、10⁶コロニー形成単位 (CFU) の actA - Lm - OVAを感染させ、10⁵ CFUのLm - OVAで再チャレンジした。アロジェニックBMT実験については、マウスに、5 × 10⁴ CFUで静脈内に免疫し、2 × 10⁶ CFUのLm 2Cで再チャレンジする。第二感染の3日後、肝臓 / 脾臓を、0.05% Triton X - 100 / PBS中でホモジナイズし、BHIプレート上に播き、および、Lmコロニーを、24時間後、37 で数える。

30

【0450】

40

Lm - OVA特異的CD8 T細胞の定量：MHC - I - Dimer X : マウス - Ig - PE (BD Pharmingen) および精製OVA257 - 64 (SIINFEL) ペプチド (Anaspec) をメーカーの説明書に従い混合して、MHC - I - Dimer X : マウスIg : OVA257 - 64 - PE結合物を形成し、赤血球溶解末梢血と1時間、4 でインキュベートし、洗浄し、そして、表面マーカーに対する抗体と共にインキュベートする。1試料当たり、104を超えるドナーCD8 T細胞が回収される。

【0451】

表A、BおよびEの核酸化合物がこのモデルにおいて試験され、それらがBMT後の胸腺機能の再生において有効であることが見出される。

【0452】

50

造血刺激のモデルシステム

K I e t a l . C e l l C y c l e 9 : 7 , 1 4 3 4 - 1 4 4 3 ; A p r i l 1 , 2 0 1 0 に記述される以下のモデルを用いてもよい：

野生型マウス C 5 7 B l / 6 および B a l b / c の 2 つの系統を用いる。マウスに致死量の全身ガンマ線照射（C 5 7 B l / 6 に対しては T B I、9 G y、および、B a l b / c に対しては 8 G y）を行う直前に、試験核酸化合物またはビヒクルを、単回腹腔内（i . p .）注射する。マウスの生存率を記録する。本実験で用いられた T B I の用量は、消化管系のダメージおよび脳血管系のダメージ、ならびに造血（H P）系のダメージを引き起こす、さらに高用量のものと比較して、主に H P システムに対するダメージに死亡することが知られている。それゆえ、本実験で照射マウスの生存率に対して効果を示す試験核酸化合物は、H P システムの放射線保護物質として作用することを示す。

10

【 0 4 5 3 】

表 A、B および E の核酸化合物がこのモデルにおいて試験され、それらが H P システムを完全に再配置することができる造血幹細胞（H S C）および早期前駆細胞（H P C）の長期間機能に対する保護において有効であることが見出される。

【 0 4 5 4 】

上述の実施例は、本発明の実施形態の実行の特定の方法を例示説明するものであり、当分野の当業者であれば、本明細書に明示されていない、本発明の実施形態実行の別の方法を認識するであろう。本開示は、本発明の主旨の例示と見なされるべきものであり、例示説明される実施形態に本発明を限定する意図は無いことを理解されたい。

20

【 0 4 5 5 】

当業者であれば、日常的な実験により、本明細書に記述される本発明の具体的な実施形態の均等物を認識または、確認することができるであろう。そのような均等物は、以下の請求項により包含されることが意図される。

【 配列表 】

0006364009000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 31/713	
		A 6 1 K 31/7088	

(74)代理人 100185384

弁理士 伊波 興一朗

(74)代理人 100137811

弁理士 原 秀貢人

(72)発明者 フェインスタイン エレナ

イスラエル国 7 6 3 0 5 1 3 レホヴォト ハカーメル ストリート 1 3 / 5 5

(72)発明者 アヴキン - ナチュム シャロン

イスラエル国 7 4 0 5 4 ネス ジオナ ハクラミン ストリート 4

(72)発明者 カリンスキ ハガー

イスラエル国 7 5 7 0 1 リション - レ - ジオン ハイム ランダウ ストリート 1

(72)発明者 メット イゴール

イスラエル国 7 6 2 4 8 レホヴォト パルディ ストリート 9 / 1

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表2 0 0 2 - 5 2 8 4 6 4 (J P , A)

特表2 0 1 3 - 5 1 6 1 9 0 (J P , A)

J Biol Chem, 2003, vol.278, no.9, p.7108-7118, DOI:10.1074/jbc.M210326200

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)