

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和5年5月10日(2023.5.10)

【国際公開番号】WO2020/226960

【公表番号】特表2022-530678(P2022-530678A)

【公表日】令和4年6月30日(2022.6.30)

【年通号数】公開公報(特許)2022-118

【出願番号】特願2021-564975(P2021-564975)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/113(2010.01)

A 6 1 K 31/713(2006.01)

A 6 1 K 31/7115(2006.01)

A 6 1 K 31/7125(2006.01)

A 6 1 K 31/712(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 K 48/00(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/113 Z

A 6 1 K 31/713

A 6 1 K 31/7115

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 31/712

A 6 1 P 43/00 1 0 5

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 48/00

【誤訳訂正書】

【提出日】令和5年4月27日(2023.4.27)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 15～43ヌクレオチドを含み、かつ第1の領域(R1)及び第2の領域(R2)を有するセンス鎖と、

(2) 18～35ヌクレオチド及び5'及び3'末端を含むアンチセンス鎖であって、前記3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有するアンチセンス鎖、

前記センス鎖及びアンチセンス鎖は、別個の鎖であり、

第1の二重鎖(D1)が、前記センス鎖の前記第1の領域と、前記アンチセンス鎖とによって形成され、かつ8～29塩基対の長さを有し、

前記センス鎖の前記第2の領域が、第1の小領域(S1)、第2の小領域(S2)、及び前記第1及び第2の小領域を結合する一本鎖ループを含み、

前記第1及び第2の小領域が、第2の二重鎖(D2)を形成し、そして

前記第2の二重鎖が、6塩基対の長さを有し、かつT_mを上昇させるヌクレオチドを含まないか、又は1～5塩基対の長さを有し、かつ少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含む、

10

20

30

40

50

ことを特徴とする二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項 2】

a) 前記センス鎖が、15 ~ 30ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、20ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、10 ~ 14塩基対の長さを有するか、

b) 前記センス鎖が、16 ~ 31ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、21ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、11 ~ 15塩基対の長さを有するか、

c) 前記センス鎖が、17 ~ 32ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、22ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、12 ~ 16塩基対の長さを有するか、

10

d) 前記センス鎖が、18 ~ 33ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、23ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、13 ~ 17塩基対の長さを有するか、

e) 前記センス鎖が、19 ~ 34ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、24ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、14 ~ 18塩基対の長さを有するか、

f) 前記センス鎖が、20 ~ 35ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、25ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、15 ~ 19塩基対の長さを有するか、

20

g) 前記センス鎖が、21 ~ 36ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、26ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、16 ~ 20塩基対の長さを有するか、

h) 前記センス鎖が、22 ~ 37ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、27ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクとを有し、前記第 1 の二重鎖が、17 ~ 21塩基対の長さを有するか、

i) 前記センス鎖が、23 ~ 38ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、28ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、18 ~ 22塩基対の長さを有するか、

j) 前記センス鎖が、24 ~ 39ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、29ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、19 ~ 23塩基対の長さを有するか、

30

k) 前記センス鎖が、25 ~ 40ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、30ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクとを有し、前記第 1 の二重鎖が、20 ~ 24塩基対の長さを有するか、

l) 前記センス鎖が、26 ~ 41ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、31ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、21 ~ 25塩基対の長さを有するか、

m) 前記センス鎖が、27 ~ 42ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、32ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、22 ~ 26塩基対の長さを有するか、又は

40

n) 前記センス鎖が、28 ~ 43ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が、33ヌクレオチドと、前記 3' 末端に前記 6 ~ 10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンクを有し、前記第 1 の二重鎖が、23 ~ 27塩基対の長さを有する、

請求項 1 に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項 3】

前記アンチセンス鎖が、20 ~ 24、21 ~ 23、又は22ヌクレオチドを有し、前記第 1 の二重鎖が、12 ~ 16塩基対の長さを有し、前記一本鎖ループが、テトラループ又はトリループである、請求項 1 又は 2 に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項 4】

50

前記アンチセンス鎖中の少なくとも1つのヌクレオチドが、2' - Fで修飾され、前記アンチセンス鎖中の前記2' - Fで修飾された前記少なくとも1つのヌクレオチドが、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合に隣接している、請求項1～3のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項5】

前記アンチセンス鎖のヌクレオチド14が、2' - Fで修飾され、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合によって前記アンチセンス鎖のヌクレオチド13及び15に結合し、及び/又は前記アンチセンス鎖のヌクレオチド2が、2' - Fで修飾され、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合によって前記アンチセンス鎖のヌクレオチド1及び3に結合している、請求項1～4のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

10

【請求項6】

前記アンチセンス鎖が、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合に隣接する2' - Fで修飾された少なくとも2つのヌクレオチドを含む、前記リン含有ヌクレオチド間結合が、ホスホリボチオアート結合である、請求項1～5のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項7】

前記センス鎖のヌクレオチド1が、T_mを上昇させるヌクレオチドである、請求項1～6のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項8】

前記アンチセンス鎖のヌクレオチド6と塩基対を形成する前記センス鎖の第1の領域中のヌクレオチドが、T_mを上昇させるヌクレオチドであり、及び/又は前記アンチセンス鎖のヌクレオチド5と塩基対を形成する前記センス鎖の第1の領域中のヌクレオチドが、T_mを上昇させるヌクレオチドである、請求項1～7のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

20

【請求項9】

前記アンチセンス鎖のヌクレオチド1～4と塩基対を形成する前記センス鎖の第1の領域中のヌクレオチドのいずれもが、T_mを上昇させるヌクレオチドではない、請求項1～8のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項10】

前記第2の二重鎖が、1～3塩基対の長さを有しかつ少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

30

【請求項11】

前記センス鎖が、16～33ヌクレオチド長であり、前記アンチセンス鎖が、21～23ヌクレオチド長であり、前記第1の二重鎖が、12～17塩基対の長さを有し、前記第2の二重鎖が、1～3塩基対の長さを有しかつ少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項12】

前記センス鎖の前記第1の領域が、12～16ヌクレオチド長であり、前記センス鎖の前記第2の領域が、5～10ヌクレオチド長であり、

40

前記センス鎖の前記第1の領域と前記アンチセンスとによって形成される前記第1の二重鎖が、12～16塩基対の長さを有し、

前記センス鎖の前記第2の領域の前記第1及び第2の小領域によって形成される前記第2の二重鎖が、3塩基対、2塩基対、又は1塩基対の長さを有しかつ少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含み、そして

前記アンチセンス鎖が、22ヌクレオチド長でありかつその3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する、請求項1～11のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項13】

前記センス鎖の前記第2の領域が、5又は6ヌクレオチド長であり、前記第2の二重鎖

50

が、1塩基対の長さを有する、請求項12に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項14】

前記テトラループが、UNCG、GNRA、CUUG、A/UGNN、GGUG、RNA
YA、もしくはAGNNから選択されるRNAテトラループであるか、又はd(GNAB)
)、d(CNNG)、もしくはd(TNCG)から選択されるDNAテトラループである
、請求項3~13のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項15】

前記テトラループが、配列GAAAを有するか、又は、前記トリループが、配列GAA
を有する、請求項3~13のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項16】

前記 T_m を上昇させるヌクレオチドが、二環式ヌクレオチド、三環式ヌクレオチド、G
クランプ及びその類似体、ヘキシトールヌクレオチド、及び修飾ヌクレオチドからなる群
より選択され、前記修飾ヌクレオチドが、5-プロモ-ウラシル、5-ヨード-ウラシル
、5-プロピニル修飾ピリミジン、2-アミノアデニン、2-チオウリジン、5Me-チ
オウリジン、又はシュドウリジンである、請求項1~15のいずれか1項に記載の二本
鎖核酸阻害剤分子。

10

【請求項17】

前記 T_m を上昇させるヌクレオチドが、二環式ヌクレオチドであり、該二環式ヌクレオ
チドが、第1の環を含み、該第1の環が、フラノシルであり、前記フラノシルの2'炭素
と4'炭素を連結する架橋が、第2の環を形成し、そして

20

前記架橋が、以下、

a) 例えば、4'-CH₂-NH-O-2' (BN^{ANc}としても知られる)又は4'-CH₂
-N(CH₃)-O-2' (BN^{ANc}[NMe]としても知られる)を含む、4'-CH₂
-O-N(R)-2'及び4'-C₂H-N(R)-O-2' (式中、Rは、H、G~C₁₂
アルキル、又は保護基である)、

b) 4'-CH₂-2'、4'-(C₂H)₂-2'、4'-(C₂H)₃-2'、4'-(C₂H)
-O-2' (LNAとしても知られる)、4'-(C₂H)-S-2'、4'-(C₂H)₂-
O-2' (ENAとしても知られる)、4'-CH(C₃H)-O-2' (cetとしても知
られる)、及び4'-CH(C₂H₂OCH₃)-O-2' (cmoeとしても知られる)、な
らびにそれらの類似体、

30

c) 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'及びその類似体、

d) 4'-CH₂-N(OCH₃)-2'及びその類似体、

e) 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'及びその類似体、

f) 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'及びその類似体、及び

g) 4'-CH₂-C(=CH₂)-2'及びその類似体、

からなる群より選択される、

請求項1~16のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項18】

前記テトラループが、1つ、2つ、3つ、又は4つのリガンドコンジュゲートヌクレオチ
ドを含むか、又は前記トリループが、1つ、2つ、又は3つのコンジュゲートヌクレオチ
ドを含む、請求項3~17のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

40

【請求項19】

前記リガンドが、GalNAcであり、そして、前記GalNAcが、糖部分の2'位
において前記ヌクレオチドにコンジュゲートしている、請求項18に記載の二本鎖核酸阻
害剤分子。

【請求項20】

前記センス鎖及び/又は前記アンチセンス鎖の5'末端に5'ホスフェート模倣物をさ
らに含む、請求項1~19のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項21】

前記二本鎖核酸阻害剤分子が、脂質ナノ粒子を用いて製剤化され、

50

前記脂質ナノ粒子が、コア脂質及びエンベロープ脂質を含み、そして前記コア脂質が、第1のカチオン性脂質及び第1のペグ化脂質を含み、前記エンベロープ脂質が、第2のカチオン性脂質、中性脂質、ステロール、及び第2のペグ化脂質を含み、前記第1のカチオン性脂質が、DL-048であり、前記第1のペグ化脂質が、DSG-MPEGであり、前記第2のカチオン性脂質が、DL-103であり、前記中性脂質が、DSPCであり、前記ステロールが、コレステロールであり、前記第2のペグ化脂質が、DSPE-MPEGである、

請求項1～20のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

【請求項22】

治療有効量の請求項1～21のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子及び賦形剤を含む組成物であって、前記賦形剤が、薬学的に許容可能な賦形剤であることを特徴とする組成物。

【請求項23】

対象における標的遺伝子発現を低減するための請求項22に記載の組成物であって、前記標的遺伝子が、構造遺伝子、ハウスキーピング遺伝子、転写因子をコードする遺伝子、運動性因子をコードする遺伝子、細胞周期因子をコードする遺伝子、細胞周期阻害因子をコードする遺伝子、酵素をコードする遺伝子、成長因子をコードする遺伝子、サイトカインをコードする遺伝子、又は腫瘍抑制因子をコードする遺伝子である組成物。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0041

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0041】

特定の実施形態において、上記二本鎖核酸阻害剤は、センス鎖及び/またはアンチセンス鎖の5'末端に5'ホスフェート模倣物をさらに含む。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0076

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0076】

修飾ヌクレオシド：本明細書では、用語「修飾ヌクレオシド」とは、ホスフェート基または修飾ホスフェート基（本明細書で定義される）に結合しておらず、修飾核酸塩基（本明細書で定義される）、ユニバーサル核酸塩基（本明細書で定義される）、または修飾糖部分（本明細書で定義される）の1つ以上を含む糖（例えば、デオキシリボースもしくはリボースまたはそれらの類似体）とN-グリコシド結合しているヘテロ環式窒素塩基をいう。上記修飾核酸塩基またはユニバーサル核酸塩基（本明細書では塩基類似体とも呼ばれる）は、一般にヌクレオシド糖部分の1'位に位置し、1'位のアデニン、グアニン、シトシン、チミン、及びウラシル以外の核酸塩基をいう。特定の実施形態において、上記修飾核酸塩基またはユニバーサル核酸塩基は窒素塩基である。特定の実施形態において、上記修飾核酸塩基またはユニバーサル核酸塩基は窒素原子を含まない。例えば、米国特許出願公開第20080274462号を参照されたい。特定の実施形態において、上記修飾ヌクレオシドは、核酸塩基を含まない（無塩基）。本開示の文脈における好適な上記修飾核酸塩基もしくはユニバーサル核酸塩基または修飾糖は本明細書に記載されている。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0125

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【 0 1 2 5 】

本二本鎖核酸阻害剤分子の特定の実施形態において、センス鎖は21～25ヌクレオチドを有し；アンチセンス鎖は、3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含む22ヌクレオチドを有し、5'末端ヌクレオチドは、任意選択でホスフェート模倣物を含み；第1の二重鎖の長さは12～16塩基対であり；センス鎖の第2の領域はトリループを含み、第2の二重鎖は、長さが3塩基対であり、少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、第2の二重鎖中のいずれのヌクレオチドも、LNAなどのT_mを上昇させるヌクレオチドである。

【 誤訳訂正 5 】

【訂正対象書類名】明細書

10

【訂正対象項目名】0126

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【 0 1 2 6 】

本二本鎖核酸阻害剤分子の特定の実施形態において、センス鎖は22～26ヌクレオチドを有し；アンチセンス鎖は、3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含む22ヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドは、任意選択でホスフェート模倣物を含み；第1の二重鎖の長さは12～16塩基対であり；センス鎖の第2の領域はテトラループを含み、第2の二重鎖は、長さが3塩基対であり、少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、第2の二重鎖中のいずれのヌクレオチドも、LNAなどのT_mを上昇させるヌクレオチドである。

20

【 誤訳訂正 6 】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0127

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【 0 1 2 7 】

本二本鎖核酸阻害剤分子の特定の実施形態において、センス鎖は21～31ヌクレオチドを有し；アンチセンス鎖は、3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含む22ヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドは、任意選択でホスフェート模倣物を含み；第1の二重鎖の長さは12～16塩基対であり；センス鎖の第2の領域はトリループを含み、第2の二重鎖は、長さが3～5塩基対であり、且つ少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含むか、または長さが6塩基対であり、且つT_mを上昇させるヌクレオチドを含まない。特定の実施形態において、第2の二重鎖は、長さが3塩基対であり、第2の二重鎖のいずれのヌクレオチドも、LNAなどのT_mを上昇させるヌクレオチドである。

30

【 誤訳訂正 7 】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0128

【訂正方法】変更

40

【訂正の内容】

【 0 1 2 8 】

本二本鎖核酸阻害剤分子の特定の実施形態において、センス鎖は22～32ヌクレオチドを有し；アンチセンス鎖は、3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含む22ヌクレオチドを有し、上記アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドは、任意選択でホスフェート模倣物を含み；第1の二重鎖の長さは12～16塩基対であり；センス鎖の第2の領域はテトラループを含み、第2の二重鎖は、長さが3～5塩基対であり、且つ少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含むか、または長さが6塩基対であり、且つT_mを上昇させるヌクレオチドを含まない。特定の実施形態において、第2の二重鎖は、長さが3塩基対であり、第2の二重鎖のいずれのヌクレオチドも、LNAなどの

50

T_m を上昇させるヌクレオチドである。

【誤訳訂正 8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0210

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0210】

特定の実施形態において、本二本鎖核酸阻害剤分子は、上記テトラループ中の2～4個の糖リガンド部分、または上記トリループ中の2つまたは3つの糖リガンド部分にコンジュゲートしている。一実施形態において、テトラループ中のヌクレオチドの2つが糖リガンド部分にコンジュゲートしている。一実施形態において、テトラループ中のヌクレオチドの3つが糖リガンド部分にコンジュゲートしている。別の実施形態において、テトラループ中の4つヌクレオチドが糖リガンド部分にコンジュゲートしている。一実施形態において、上記トリループ中のヌクレオチドの2つが糖部分にコンジュゲートしている。一実施形態において、トリループ中のヌクレオチドの3つが糖部分にコンジュゲートしている。特定の実施形態において、上記糖リガンド部分はGalNAcである。使用することができる他のリガンドとしては、マンノース-6-ホスフェート、コレステロール、葉酸、トランスフェリン、及びガラクトースが挙げられるが、これらに限定はされない(他の具体的な例示的リガンドについては、例えば、WO2012/089352を参照されたい)。

10

20

【誤訳訂正 9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0237

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0237】

図10に示すように、短縮センス鎖を有する被検核酸阻害剤分子において、センス鎖のP1に二環式ヌクレオチドが、ならびに当初のヌクレオチド15(P15)(すなわち、構築物16～18について、それぞれP9、P8、及びP7)に単一の二環式ヌクレオチドが存在することにより、センス鎖の第1の領域(R1)中にいずれの二環式ヌクレオチドももたない相当する被検核酸阻害剤分子よりも(構築物4～6に対する構築物16～18で)、標的遺伝子mRNAノックダウン活性が向上した。さらに、当初のP15位に隣接する追加の二環式ヌクレオチドが存在し、センス鎖の第1の領域(R1)中の二環式ヌクレオチドが合計3つになることによっても、センス鎖の第1の領域中にいずれの二環式ヌクレオチドももたない相当する試験核酸阻害剤分子に対して(構築物4～6に対する構築物19～21で)、標的遺伝子mRNAノックダウンが向上した。図10を参照されたい。但し、当初のP18及びP19(構築物22についてはP12及びP13、構築物23についてはP11及びP12、構築物24についてはP10及びP11)に2つの二環式ヌクレオチドを追加することにより、センス鎖の第1の領域(R1)に2つの二環式ヌクレオチド(構築物16～18)またはセンス鎖の第1の領域(R1)に3つの二環式ヌクレオチド(構築物19～21)のいずれかを有する被検核酸阻害剤分子と比較して、標的遺伝子mRNAの発現が実質的に低下した。理論に拘束されることを望むものではないが、 T_m を上昇させるヌクレオチドがアンチセンス鎖の5'末端に近接することにより、標的遺伝子mRNAノックダウンに悪影響が及ぶ可能性があることが推定される。

30

40

本発明の好ましい態様は、以下の通りである。

【1】15～43ヌクレオチドを含み、且つ第1の領域(R1)及び第2の領域(R2)を有するセンス鎖と、

18～35ヌクレオチドならびに5'及び3'末端を含むアンチセンス鎖であって、前記3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記センス鎖と別個の鎖である前記アンチセンス鎖と、

50

前記センス鎖の前記第 1 の領域及び前記アンチセンス鎖によって形成される第 1 の二重鎖 (D 1) であって、長さが 8 ~ 29 塩基対である前記第 1 の二重鎖と
を含み、

前記センス鎖の前記第 2 の領域が、第 1 の小領域 (S 1)、第 2 の小領域 (S 2)、及び前記第 1 及び第 2 の小領域を結合する一本鎖ループを含み、前記第 1 及び第 2 の小領域が第 2 の二重鎖 (D 2) を形成し、

前記第 2 の二重鎖は、長さが 6 塩基対であり、且つ T_m を上昇させるヌクレオチドを含まないか、または、長さが 1 ~ 5 塩基対であり、且つ少なくとも 1 つの T_m を上昇させるヌクレオチドを含む、

二本鎖核酸阻害剤分子。

[2] a) 前記センス鎖が 15 ~ 30 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 20 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 10 ~ 14 塩基対であるか、

b) 前記センス鎖が 16 ~ 31 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 21 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 11 ~ 15 塩基対であるか、

c) 前記センス鎖が 17 ~ 32 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 22 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 12 ~ 16 塩基対であるか、

d) 前記センス鎖が 18 ~ 33 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 23 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 13 ~ 17 塩基対であるか、

e) 前記センス鎖が 19 ~ 34 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 24 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 14 ~ 18 塩基対であるか、

f) 前記センス鎖が 20 ~ 35 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 25 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 15 ~ 19 塩基対であるか、

g) 前記センス鎖が 21 ~ 36 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 26 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 16 ~ 20 塩基対であるか、

h) 前記センス鎖が 22 ~ 37 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 27 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 17 ~ 21 塩基対であるか、

i) 前記センス鎖が 23 ~ 38 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 28 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 18 ~ 22 塩基対であるか、

j) 前記センス鎖が 24 ~ 39 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 29 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 19 ~ 23 塩基対であるか、

k) 前記センス鎖が 25 ~ 40 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 30 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 20 ~ 24 塩基対であるか、

l) 前記センス鎖が 26 ~ 41 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 31 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 21 ~ 25 塩基対であるか、

m) 前記センス鎖が 27 ~ 42 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 32 ヌクレオチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 22 ~ 26 塩基対であるか、または

n) 前記センス鎖が 28 ~ 43 ヌクレオチドを有し、前記アンチセンス鎖が 33 ヌクレ

10

20

30

40

50

オチド、及び前記 3' 末端に前記 6 ~ 10 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有し、前記第 1 の二重鎖の長さが 23 ~ 27 塩基対である、
前記〔1〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔3〕前記アンチセンス鎖が 20 ~ 24、21 ~ 23、または 22 ヌクレオチドを有する、前記〔1〕または〔2〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔4〕前記アンチセンス鎖の前記 3' 末端が 7 ~ 9 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する、前記〔1〕 ~ 〔3〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔5〕前記第 1 の二重鎖の長さが 12 ~ 16 塩基対である、前記〔1〕 ~ 〔4〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔6〕前記ループがテトラループまたはトリループである、前記〔1〕 ~ 〔5〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。 10

〔7〕前記アンチセンス鎖中の少なくとも 1 つのヌクレオチドが 2' - F で修飾され、前記アンチセンス鎖中の前記 2' - F で修飾された前記少なくとも 1 つのヌクレオチドが、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合に隣接している、前記〔1〕 ~ 〔6〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔8〕前記アンチセンス鎖のヌクレオチド 14 が 2' - F で修飾され、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合によって前記アンチセンス鎖のヌクレオチド 13 及び 15 に結合し、及び / または前記アンチセンス鎖のヌクレオチド 2 が 2' - F で修飾され、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合によって前記アンチセンス鎖のヌクレオチド 1 及び 3 に結合している、前記〔1〕 ~ 〔7〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。 20

〔9〕前記アンチセンス鎖が、ホスホジエステル結合以外のリン含有ヌクレオチド間結合に隣接する 2' - F で修飾された少なくとも 2 つのヌクレオチドを含む、前記〔1〕 ~ 〔8〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔10〕前記リン含有ヌクレオチド間結合がホスホロチオアート結合である、前記〔7〕 ~ 〔9〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔11〕前記センス鎖の領域 1 が少なくとも 1 つの T_m を上昇させるヌクレオチドを含む、前記〔1〕 ~ 〔10〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔12〕前記センス鎖のヌクレオチド 1 が T_m を上昇させるヌクレオチドである、前記〔1〕 ~ 〔11〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。 30

〔13〕前記センス鎖の領域 1 が最大 3 つの T_m を上昇させるヌクレオチドを含む、前記〔1〕 ~ 〔12〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔14〕前記アンチセンス鎖のヌクレオチド 6 と塩基対を形成する前記センス鎖の領域 1 中のヌクレオチドが T_m を上昇させるヌクレオチドであり、且つ / または前記アンチセンス鎖のヌクレオチド 5 と塩基対を形成する前記センス鎖の領域 1 中のヌクレオチドが T_m を上昇させるヌクレオチドである、前記〔1〕 ~ 〔13〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔15〕前記アンチセンス鎖のヌクレオチド 1 ~ 4 と塩基対を形成する前記センス鎖の領域 1 中のヌクレオチドのいずれもが T_m を上昇させるヌクレオチドではない、前記〔1〕 ~ 〔14〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。 40

〔16〕前記第 2 の二重鎖の長さが 1 ~ 3 塩基対であり、前記第 2 の二重鎖が少なくとも 1 つの T_m を上昇させるヌクレオチドを含む、前記〔1〕 ~ 〔15〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔17〕前記第 2 の二重鎖が 2 ~ 10 個の T_m を上昇させるヌクレオチドを含み、且つ前記第 2 の二重鎖の長さが 1 ~ 5 塩基対であるか、または前記第 2 の二本鎖が 2 ~ 6 個の T_m を上昇させるヌクレオチドを含み、且つ前記第 2 の二本鎖の長さが 1 ~ 3 塩基対である、前記〔1〕 ~ 〔16〕のいずれか 1 項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔18〕前記センス鎖の長さが 16 ~ 33 ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の長さが 21 ~ 23 ヌクレオチドであり、前記第 1 の二重鎖の長さが 12 ~ 17 塩基対であり、前記第 2 の二重鎖の長さが 1 ~ 3 塩基対であり、前記第 2 の二重鎖が少なくとも 1 つの 50

T_mを上昇させるヌクレオチドを含む、前記〔1〕～〔17〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔19〕前記センス鎖の前記第1の領域の長さが12～16ヌクレオチドであり、前記センス鎖の前記第2の領域の長さが5～10ヌクレオチドであり、

前記センス鎖の前記第1の領域と前記アンチセンスによって形成される前記第1の二重鎖の長さが12～16塩基対であり、

前記センス鎖の前記第2の領域の前記第1及び第2の核酸によって形成される前記第2の二重鎖の長さが、3塩基対、2塩基対、または1塩基対であり、前記第2の二重鎖が少なくとも1つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含み、

前記アンチセンス鎖は、長さが22ヌクレオチドであり、その3'末端に6～10ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する、前記〔1〕～〔18〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔20〕前記センス鎖の前記第2の領域の長さが5または6ヌクレオチドであり、前記第2の二重鎖の長さが1塩基対である、前記〔19〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔21〕前記第2の二重鎖が少なくとも2つのT_mを上昇させるヌクレオチドを含む、前記〔1〕～〔20〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔22〕前記テトラループが、UNCG、GNRA、CUUG、A/UGNN、GGUG、RNYA、もしくはAGNNから選択されるRNAテトラループ、またはd(GNAB)、d(CNNG)、もしくはd(TNCG)から選択されるDNAテトラループである、前記〔1〕～〔21〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔23〕前記テトラループが配列GAAAを有する、前記〔1〕～〔22〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔24〕前記トリループが配列GAAを有する、前記〔1〕～〔23〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔25〕前記T_mを上昇させるヌクレオチドが、二環式ヌクレオチド、三環式ヌクレオチド、Gクランプ及びその類似体、ヘキシトールヌクレオチド、及び修飾ヌクレオチドからなる群より選択され、前記修飾ヌクレオチドは、糖部分の2'炭素において2'-Fまたは2'-OMeで修飾されていない、前記〔1〕～〔24〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔26〕前記修飾ヌクレオチドが、5-プロモ-ウラシル、5-ヨード-ウラシル、5-プロピニル修飾ピリミジン、2-アミノアデニン、2-チオウリジン、5Me-チオウリジン、またはシュドウリジンである、前記〔1〕～〔25〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔27〕前記T_mを上昇させるヌクレオチドが二環式ヌクレオチドである、前記〔1〕～〔26〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔28〕前記二環式ヌクレオチドが、フラノシルである第1の環と、前記フラノシルの2'炭素と4'炭素を連結して第2の環を形成する架橋とを含む、前記〔27〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔29〕前記フラノシルの2'炭素と4'炭素を連結する前記架橋が、

a) 例えば、4'-CH₂-NH-O-2' (BN^{NC}としても知られる) または 4'-CH₂-N(CH₃)-O-2' (BN^{NC}[NMe]としても知られる) を含む、4'-CH₂-O-N(R)-2' 及び 4'-C₂H-N(R)-O-2' (式中、RはH、G～C₁₂アルキル、または保護基である) と、

b) 4'-CH₂-2'、4'-(C₂H)₂-2'、4'-(C₂H)₃-2'、4'-(C₂H)₄-O-2' (LNAとしても知られる)、4'-(C₂H)-S-2'、4'-(C₂H)₂-O-2' (ENAとしても知られる)、4'-CH(C₃H)-O-2' (cetとしても知られる)、及び 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (cMOEとしても知られる)、ならびにそれらの類似体と、

c) 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' 及びその類似体と、

d) 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' 及びその類似体と、

10

20

30

40

50

e) 4' - C H₂ - O - N (C H₃) - 2' 及びその類似体と、

f) 4' - C H₂ - C (H) (C H₃) - 2' 及びその類似体と、

g) 4' - C H₂ - C (= C H₂) - 2' 及びその類似体と

からなる群より選択される、前記〔28〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔30〕前記テトラループまたはトリループが、少なくとも1つのリガンドコンジュゲートヌクレオチドを含む、前記〔1〕～〔29〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔31〕前記テトラループが2つ、3つ、または4つのリガンドコンジュゲートヌクレオチドを含むか、または前記トリループが2つまたは3つのコンジュゲートヌクレオチドを含む、前記〔30〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔32〕前記リガンドが G a l N A c である、前記〔30〕または〔31〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔33〕前記 G a l N A c が糖部分の2'位において前記ヌクレオチドにコンジュゲートしている、前記〔32〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔34〕前記センス鎖及び/または前記アンチセンス鎖の5'末端に5'-リン酸模倣物をさらに含む、前記〔1〕～〔33〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔35〕前記二本鎖核酸阻害剤分子が脂質ナノ粒子を用いて製剤化される、前記〔1〕～〔34〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔36〕前記脂質ナノ粒子がコア脂質及びエンベロープ脂質を含み、前記コア脂質が第1のカチオン性脂質及び第1のペグ化脂質を含み、前記エンベロープ脂質が、第2のカチオン性脂質、中性脂質、ステロール、及び第2のペグ化脂質を含む、前記〔35〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔37〕前記第1のカチオン性脂質が D L - 0 4 8 であり、前記第1のペグ化脂質が D S G - M P E G であり、前記第2のカチオン性脂質が D L - 1 0 3 であり、前記中性脂質が D S P C であり、前記ステロールがコレステロールであり、前記第2のペグ化脂質が D S P E - M P E G である、前記〔36〕に記載の二本鎖核酸阻害剤分子。

〔38〕治療有効量の前記〔1〕～〔37〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子及び賦形剤を含む組成物。

〔39〕前記組成物が医薬組成物であり、前記賦形剤が薬学的に許容される賦形剤である、前記〔38〕に記載の組成物。

〔40〕対象における標的遺伝子発現の低減方法であって、前記〔1〕～〔39〕のいずれか1項に記載の二本鎖核酸阻害剤分子または組成物を、標的遺伝子発現の低減を必要とする対象に、前記標的遺伝子発現を低減するのに十分な量で投与することを含む、前記方法。

〔41〕前記標的遺伝子が、構造遺伝子、ハウスキーピング遺伝子、転写因子をコードする遺伝子、運動性因子をコードする遺伝子、細胞周期因子をコードする遺伝子、細胞周期阻害因子をコードする遺伝子、酵素をコードする遺伝子、成長因子をコードする遺伝子、サイトカインをコードする遺伝子、または腫瘍抑制因子をコードする遺伝子である、前記〔40〕に記載の方法。

〔42〕前記投与することが、静脈内投与、筋肉内投与、または皮下投与を含む、前記〔40〕または〔41〕に記載の方法。

〔43〕前記対象がヒトである、前記〔40〕～〔42〕のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50