

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-148060

(P2017-148060A)

(43) 公開日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A G 4 C O 8 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C O 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	

審査請求 有 請求項の数 10 O L 外国語出願 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-81112 (P2017-81112)	(71) 出願人	509294070
(22) 出願日	平成29年4月17日 (2017.4.17)		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
(62) 分割の表示	特願2013-556834 (P2013-556834) の分割		QUARK PHARMACEUTICALS, INC.
原出願日	平成24年3月1日 (2012.3.1)		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
(31) 優先権主張番号	61/448,707		6501 Dumbarton Circle, Fremont, California U. S. A.
(32) 優先日	平成23年3月3日 (2011.3.3)	(74) 代理人	100113376
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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】 T o l l 様受容体経路のオリゴヌクレオチド修飾因子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】急性又は慢性の炎症等の治療に有用な T o l l 様受容体遺伝子の発現を下方調節する d s R N A 化合物の提供。

【解決手段】以下の構造を有するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子。5' N 1 - (N) x - Z 3' (アンチセンス鎖)、3' Z' - N 2 - (N') y - z " 5' (センス鎖)。(各 N 2、N 及び N' は未修飾或いは修飾されたりボヌクレオチド又は非定型；(N) x は T L R 4 m R N A 配列に相補的；(N') y の配列は (N) x の配列に相補的；x 及び y は 1 7 ~ 2 4 の整数；N 1 は (N) x に共有結合し標的 R N A に対してミスマッチである未修飾或いは修飾されたりボヌクレオチド；z " は存在又は非存在であって、存在するならばキャッピング部分；Z 及び Z' は存在又は非存在で、存在するならば、存在する鎖の 3' 末端にて共有結合する 1 ~ 5 の連続するヌクレオチド、連続する非ヌクレオチド部分又はその組み合わせ)

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子であって、鎖が、T L R 2 __ 2 5 (配列番号：2 0 6 0 7 及び 2 0 6 1 4)、T L R 2 __ 2 8 (配列番号：2 0 6 0 8 及び 2 0 6 1 5)、T L R 2 __ 4 2 (配列番号：2 0 6 0 9 及び 2 0 6 1 6)、T L R 2 __ 4 3 (配列番号：2 0 6 1 0 及び 2 0 6 1 7)、T L R 2 __ 4 7 (配列番号：2 0 6 1 1 及び 2 0 6 1 8)、T L R 2 __ 3 1 (配列番号：2 0 6 1 2 及び 2 0 6 1 9)、T L R 2 __ 3 4 (配列番号：2 0 6 1 3 及び 2 0 6 2 0) として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される二本鎖核酸分子。

【請求項 2】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子であって、鎖が、T L R 4 __ 0 8 (配列番号：2 0 6 2 1 及び 2 0 6 3 0)、T L R 4 __ 1 0 (配列番号：2 0 6 2 2 及び 2 0 6 3 1)、T L R 4 __ 1 1 (配列番号：2 0 6 2 3 及び 2 0 6 3 2)、T L R 4 __ 1 4 (配列番号：2 0 6 2 4 及び 2 0 6 3 3)、T L R 4 __ 1 5 (配列番号：2 0 6 2 5 及び 2 0 6 3 4)、T L R 4 __ 2 8 (配列番号：2 0 6 2 6 及び 2 0 6 3 5)、T L R 4 __ 2 9 (配列番号：2 0 6 2 7 及び 2 0 6 3 6)、T L R 4 __ 3 1 (配列番号：2 0 6 2 8 及び 2 0 6 3 7)、T L R 4 __ 3 3 (配列番号：2 0 6 2 9 及び 2 0 6 3 8) として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される二本鎖核酸分子。

【請求項 3】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子であって、鎖が M Y D 8 8 __ 1 1 (配列番号：1 2 1 7 8 及び 1 2 6 6 0) として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される二本鎖核酸分子。

【請求項 4】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子であって、鎖が T I C A M 1 __ 2 0 (配列番号：2 0 6 4 4 及び 2 0 6 5 5)、T I C A M 1 __ 1 5 (配列番号：2 0 6 3 9 及び 2 0 6 5 0)、T I C A M 1 __ 1 6 (配列番号：2 0 6 4 0 及び 2 0 6 5 1)、T I C A M 1 __ 1 7 (配列番号：2 0 6 4 1 及び 2 0 6 5 2)、T I C A M 1 __ 1 8 (配列番号：2 0 6 4 2 及び 2 0 6 5 3)；T I C A M 1 __ 1 9 (配列番号：2 0 6 4 3 及び 2 0 6 5 4)；T I C A M 1 __ 2 1 (配列番号：2 0 6 4 5 及び 2 0 6 5 6)、T I C A M 1 __ 2 2 (配列番号：2 0 6 4 6 及び 2 0 6 5 7)、T I C A M 1 __ 2 3 (配列番号：2 0 6 4 7 及び 2 0 6 5 8)、T I C A M 1 __ 2 4 (配列番号：2 0 4 4 8 及び 2 0 6 5 9)、T I C A M 1 __ 2 5 (配列番号：2 0 6 4 9 及び 2 0 6 6 0) として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される二本鎖核酸分子。

【請求項 5】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子であって、センス鎖及びアンチセンス鎖が、T I R A P __ 1 6 (配列番号：2 0 6 6 1 及び 2 0 6 7 3)、T I R A P __ 1 7 (配列番号：2 0 6 6 2 及び 2 0 6 7 4)、T I R A P __ 1 8 (配列番号：2 0 6 6 3 及び 2 0 6 7 5)；T I R A P __ 1 9 (配列番号：2 0 6 6 4 及び 2 0 6 7 6)；T I R A P __ 2 0 (配列番号：2 0 6 6 5 及び 2 0 6 7 7)、T I R A P __ 2 1 (配列番号：2 0 6 6 6 及び 2 0 6 7 8)、T I R A P __ 2 2 (配列番号：2 0 6 6 7 及び 2 0 6 7 9)、T I R A P __ 2 3 (配列番号：2 0 6 6 8 及び 2 0 6 8 0)、T I R A P __ 2 4 (配列番号：2 0 6 6 9 及び 2 0 6 8 1)、T I R A P __ 2 5 (配列番号：2 0 6 7 0 及び 2 0 6 8 2)、T I R A P __ 2 6 (配列番号：2 0 6 7 1 及び 2 0 6 8 3) 及び T I R A P __ 2 7 (配列番号：2 0 6 7 2 及び 2 0 6 8 4) として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される二本鎖核酸分子。

【請求項 6】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子であって、鎖が配列番号：1 3～5 8 4 6 (T L R 2 を標的とする)、配列番号：5 8 4 7～1 2 1 4 4 (T L R 4 を標的とする)、配列番号：1 2 1 4 5～1 6 3 3 2 (M Y D 8 8 を標的とする)、配列番号：1 6 3 3 3～1 8 2 4 2 (T I C A M 1 を標的とする) 及び配列番号：1 8 2 4 3～2 0 6

10

20

30

40

50

06 (TIRAPを標的とする)に示されるオリゴヌクレオチド対から選択される二本鎖核酸分子。

【請求項7】

以下の構造を有する二本鎖核酸分子であって、

(A1) 5' (N) x - Z 3' (アンチセンス鎖)
3' Z' - (N') y - z' 5' (センス鎖)

式中、各N及びN'は未修飾であってもよく又は修飾されてもよいヌクレオチド、又は非定型の部分であり；

式中、(N) x及び(N') yのそれぞれは各連続するN又はN'が共有結合によって次のN又はN'と連結されるオリゴヌクレオチドであり；

Z及びZ'のそれぞれが独立して存在し、又は非存在であるが、存在するならば、それが存在する鎖の3'末端にて共有結合する1～5の連続するヌクレオチド又は非ヌクレオチド部分又はその組み合わせを独立して含み；

z"は、存在してもよく又は非存在であってもよいが、存在するならば、(N') yの5'末端で共有結合するキャッピング部分であり；

x及びyのそれぞれは独立して18～25の間の整数であり；

(N') yの配列が(N) xの配列に相補性であり、(N) xが配列番号：1 (TLR2のmRNA)；配列番号：2～4 (TLR4のmRNA)、配列番号：5～9 (MYD88のmRNA)、配列番号：10 (TICAM1のmRNA)又は配列番号：11～12 (TIRAPのmRNA)のいずれか1つで示される標的RNAに対するアンチセンス配列を含む、二本鎖核酸分子。

【請求項8】

(N) x及び(N') yが、配列番号：13～1448又は1449～3060 (TLR2を標的とする)；又は配列番号：5847～8320又は8321～8612 (TLR4を標的とする)；又は配列番号：12145～13108又は13109～13924 (MYD88を標的とする)；又は配列番号：16333～16866又は16867～16882 (TICAM1を標的とする)；又は配列番号：18243～19010又は19011～19046 (TIRAPを標的とする)で示されるセンス配列及び相補性のアンチセンス配列を含む請求項7に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項9】

(N) x及び(N') yが、TLR2__25 (配列番号：20607及び20614)、TLR2__28 (配列番号：20608及び20615)、TLR2__42 (配列番号：20609及び20616)、TLR2__43 (配列番号：20610及び20617)、TLR2__47 (配列番号：20611及び20618)として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される請求項8に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項10】

(N) x及び(N') yが、TLR4__08 (配列番号：20621及び20630)、TLR4__10 (配列番号：20622及び20631)、TLR4__11 (配列番号：20623及び20632)、TLR4__14 (配列番号：20624及び20633)、TLR4__15 (配列番号：20625及び20634)、TLR4__28 (配列番号：20626及び20635)、TLR4__29 (配列番号：20627及び20636)、TLR4__31 (配列番号：20628及び20637)、TLR4__33 (配列番号：20629及び20638)として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される請求項8に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項11】

(N) x及び(N') yが、MYD88__11 (配列番号：12178及び12660)；TICAM1__20 (配列番号：20644及び20655)；又はTIRAP__16 (配列番号：20661及び20673)として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される請求項8に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項12】

10

20

30

40

50

分子が、(N) x (アンチセンス鎖) の 5' 末端ヌクレオチドで標的 mRNA に対してミスマッチを 1 つ含む請求項 7 に記載の二本鎖分子。

【請求項 13】

以下の構造：

(A2)

5' N¹ - (N) x - Z 3' (アンチセンス鎖)

3' Z' - N² - (N') y - z" 5' (センス鎖) を有し、

式中、各 N²、N 及び N' は未修飾又は修飾されたりボヌクレオチド、又は非定型の部分であり；

式中、(N) x 及び (N') y のそれぞれは各連続する N 又は N' が共有結合によって隣接する N 又は N' と連結されるオリゴヌクレオチドであり；

式中、x 及び y のそれぞれは独立して 17～24 の間の整数であり；

式中、(N') y の配列は (N) x の配列に対して相補性であり、(N) x は、配列番号：1 (TLR2 の mRNA)；配列番号：2～4 (TLR4 の mRNA)、配列番号：5～9 (MYD88 の mRNA)、配列番号：10 (TICAM1 の mRNA) 又は配列番号：11～12 (TIRAP の mRNA) のいずれか 1 つに示される標的 RNA における連続する配列に対して相補性であり；

式中、N¹ は、(N) x に共有結合し、標的 RNA に対してミスマッチがあり、又は標的 RNA に対して相補性の DNA 部分であり；

式中、N¹ は、ウリジン (rU)、デオキシリボウリジン (dU)、リボチミジン (rT)、デオキシリボチミジン (dT)、アデノシン (rA) 及びデオキシアデノシン (dA) から選択される未修飾又は修飾されたヌクレオチドから成る群から選択される部分であり；

式中、z" は存在してもしなくてもよいが、存在する場合、N² - (N') y の 5' 末端にて共有結合されるキャッピング部分であり；

式中、Z 及び Z' のそれぞれは独立して存在するか又は非存在であるが、存在するならば独立して、それが存在する鎖の 3' 末端で共有結合する 1～5 の連続するヌクレオチド、連続する非ヌクレオチド部分又はそれらの組み合わせである、請求項 12 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 14】

(N) x 及び (N') y が、配列番号：3061～5260 又は 5261～5846 (TLR2 を標的とする)；配列番号：8613～12040 又は 12041～12144 (TLR4 を標的とする)；配列番号：13925～15910 又は 15911～16332 (MYD88 を標的とする)；配列番号：16883～18236 又は 18237～18242 (TICAM1 を標的とする) 又は配列番号：19047～20590 又は 20591～20606 (TIRAP を標的とする) で示されるセンス配列及び相補性のアンチセンス配列を含む請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 15】

N¹ - (N) x 及び N² - (N') y が、TLR2__31 (配列番号：20612 及び 20619)、TLR2__34 (配列番号：20613 及び 20620) として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 16】

N¹ - (N) x 及び N² - (N') y が、TICAM1__15 (配列番号：20639 及び 20650)、TICAM1__16 (配列番号：20640 及び 20651)、TICAM1__17 (配列番号：20641 及び 20652)、TICAM1__18 (配列番号：20642 及び 20653)；TICAM1__19 (配列番号：20643 及び 20654)；TICAM1__21 (配列番号：20645 及び 20656)、TICAM1__22 (配列番号：20646 及び 20657)、TICAM1__23 (配列番号：20647 及び 20658)、TICAM1__24 (配列番号：20448 及び 20659)、TICAM1__25 (配列番号：20649 及び 20660) として記載されるオリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドから選択される請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 17】

$N^1 - (N)_x$ 及び $N^2 - (N')_y$ が、TIRAP__17 (配列番号: 20662 及び 20674)、TIRAP__18 (配列番号: 20663 及び 20675); TIRAP__19 (配列番号: 20664 及び 20676); TIRAP__20 (配列番号: 20665 及び 20677)、TIRAP__21 (配列番号: 20666 及び 20678)、TIRAP__22 (配列番号: 20667 及び 20679)、TIRAP__23 (配列番号: 20668 及び 20680)、TIRAP__24 (配列番号: 20669 及び 20681)、TIRAP__25 (配列番号: 20670 及び 20682)、TIRAP__26 (配列番号: 20671 及び 20683) 及び TIRAP__27 (配列番号: 20672 及び 20684) として記載されるオリゴヌクレオチドから選択される請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

10

【請求項 18】

各連続する N 又は N' を連結する共有結合がホスホジエステル結合である請求項 7 ~ 17 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 19】

$x = y$ であり、 x 及び y のそれぞれが、19、20、21、22 又は 23 である請求項 7 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 20】

$x = y = 19$ である請求項 19 に記載の二本鎖核酸分子。

20

【請求項 21】

$x = y$ であり、 x 及び y のそれぞれが、18、19、20、21、又は 22 である請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 22】

$x = y = 18$ である請求項 21 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 23】

$(N')_y$ の配列が $(N)_x$ の配列に対して完全に相補性である請求項 7 ~ 12 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 24】

$N^2 - (N')_y$ の配列が $N^1 - (N)_x$ の配列に対して完全に相補性である請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

30

【請求項 25】

N^1 及び N^2 が少なくとも 1 つの水素結合を形成する請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 26】

N^1 及び N^2 がワトソン／クリックの塩基対を形成する請求項 25 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 27】

N^1 及び N^2 が非ワトソン／クリックの塩基対を形成する請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

40

【請求項 28】

N^1 及び N^2 がリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの間で塩基対を形成する請求項 26 又は 27 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 29】

N^1 が、 $(N)_x$ に共有結合し、標的 RNA に対して相補性である DNA 部分を含む請求項 28 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 30】

N^1 が、未修飾の又は修飾されたアデノシン、デオキシアデノシン、デオキシウリジン、リボチミジン、又はデオキシチミジンから選択され、標的 RNA における対合ヌクレオチドがアデノシンである請求項 13 に記載の二本鎖核酸分子。

50

【請求項 3 1】

N¹ が、未修飾の又は修飾されたアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン、デオキシウリジン、リボチミジン、又はデオキシチミジンから選択され、標的 RNA における対合ヌクレオチドがシチジンである請求項 1 3 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 3 2】

N¹ が、未修飾の又は修飾されたアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン、デオキシウリジン、リボチミジン、又はデオキシチミジンから選択され、標的 RNA における対合ヌクレオチドがグアノシンである請求項 1 3 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 3 3】

N¹ が、デオキシアデノシン、デオキシウリジン、リボチミジン、又はデオキシチミジンから選択され、標的 RNA における対合ヌクレオチドがウリジンである請求項 1 3 に記載の二本鎖核酸分子。

10

【請求項 3 4】

N¹ が、アデノシン及びデオキシアデノシンから選択され、N² がウリジンであり、N¹ 及び N² が塩基対を形成する請求項 1 3 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 3 5】

N¹ が、ウリジン又はデオキシウリジンから選択され、N² がデオキシアデノシン又はアデノシンから選択され、N¹ 及び N² が塩基対を形成する請求項 1 3 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 3 6】

N¹ が、アデノシンを含み、N² がウリジンを含み、N¹ 及び N² が塩基対を形成する請求項 2 8 に記載の二本鎖核酸分子。

20

【請求項 3 7】

N 又は N' の少なくとも一方が、修飾されたヌクレオチド又は非定型の部分を含む請求項 7 ～ 3 6 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 3 8】

(N)_x 又は N¹ - (N)_x におけるピリミジンリボヌクレオチドの少なくとも 1 つが 2' 糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチドを含む請求項 3 7 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 3 9】

2' 糖修飾されたりボヌクレオチドが 2' - OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む請求項 3 8 に記載の二本鎖核酸分子。

30

【請求項 4 0】

(N)_x 又は N¹ - (N)_x において 1、3、5、9、11、13、15、17 及び 19 (5' > 3') 位における N が 2' - OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含み、2、4、6、8、10、12、14、16 及び 18 (5' > 3') 位における N が未修飾のリボヌクレオチドを含む請求項 7 ～ 3 9 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 4 1】

(N)_x 又は N¹ - (N)_x において 2、4、6、8、11、13、15、17 及び 19 (5' > 3') 位における N が 2' - OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む請求項 7 ～ 3 9 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

40

【請求項 4 2】

Z が、(N)_x 又は N¹ - (N)_x の 3' 末端に共有結合し、C3OH、C3Pi、C3Pi - C3OH 及び C3Pi - C3Pi から成る群から選択される非ヌクレオチド部分を含む請求項 7 ～ 4 1 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 4 3】

Z が、(N)_x 又は N¹ - (N)_x の 3' 末端に共有結合し、ジヌクレオチド d T d T を含む請求項 7 ～ 4 1 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 4 4】

(N')_y 又は N² - (N')_y の 5' 末端から 7、8、9 又は 10 位の少なくとも 1

50

つにおける N' がトレース核酸部分、 $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド及びシュドウリジンから選択される請求項 7～43 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 45】

N' が、 $(N')_y$ 又は $N^2 - (N')_y$ における $3'$ 末端又は $3'$ 末端から 2 番目で開始する 4、5 又は 6 の連続する位置にてトレース核酸 (TNA) 部分又は $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチドを含む請求項 7～44 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 46】

z'' が、 $(N')_y$ 又は $N^2 - (N')_y$ の $5'$ 末端に共有結合し、逆位脱塩基デオキシリボース部分、逆位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、C3 部分、L-DNA 又は L-RNA から成る群から選択される請求項 7～45 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

10

【請求項 47】

Z' が、 $(N')_y$ 又は $N^2 - (N')_y$ の $3'$ 末端に共有結合し、 $C3OH$ 、 $C3Pi$ 、 $C3Pi - C3OH$ 及び $C3Pi - C3Pi$ から成る群から選択される請求項 7～46 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 48】

5 位における TNA 部分、6 位における TNA 部分、7 位における TNA 部分、8 位における TNA 部分、9 位における TNA 部分、5～6 位における TNA 部分、6～7 位における TNA 部分、7～8 位における TNA 部分、8～9 位における TNA 部分、5～7 位における TNA 部分、6～8 位における TNA 部分、7～9 位における TNA 部分、5～8 位における TNA 部分、6～9 位における TNA 部分又は 5～9 位における TNA を含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

20

【請求項 49】

$(N)_x$ 又は $N^1 - (N)_x$ が、5 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、6 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、7 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、8 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、9 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、5～6 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、6～7 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、7～8 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、8～9 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、5～7 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、6～8 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、7～9 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、5～8 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、6～9 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド又は 5～9 位における $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチドを含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

30

【請求項 50】

$(N)_x$ 又は $N^1 - (N)_x$ が、5 位におけるミラーヌクレオチド、6 位におけるミラーヌクレオチド、7 位におけるミラーヌクレオチド、8 位におけるミラーヌクレオチド、9 位におけるミラーヌクレオチド、5～6 位におけるミラーヌクレオチド、6～7 位におけるミラーヌクレオチド、7～8 位におけるミラーヌクレオチド、8～9 位におけるミラーヌクレオチド、5～7 位におけるミラーヌクレオチド、6～8 位におけるミラーヌクレオチド、7～9 位におけるミラーヌクレオチド、5～8 位におけるミラーヌクレオチド、6～9 位におけるミラーヌクレオチド又は 5～9 位におけるミラーヌクレオチドを含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

40

【請求項 51】

センス鎖の $5'$ 末端から 9 又は 10 位の少なくとも一方における N' が、トレース核酸 (TNA) 部分、 $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチド、シュドウリジン又はそれらの組み合わせから選択される請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 52】

$(N')_y$ 又は $N^2 - (N')_y$ が、9 位及び／又は 10 位にてトレース核酸 (TNA) 部分を含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 53】

$(N')_y$ 又は $N^2 - (N')_y$ が、9 位及び／又は 10 位にて $2'$ 、 $5'$ ヌクレオチ

50

ドを含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 54】

(N')_y 又は N² - (N')_y が、9 位及び／又は 10 位にてシュードウリジンを含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 55】

N' が、センス鎖の 3' 末端又は 3' 末端から 2 番目で開始する 4、5 又は 6 の連続する 2', 5' ヌクレオチドを含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 56】

センス鎖がさらに Z' を含む請求項 7～47 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 57】

Z' が、C3 部分又は 3' 末端のリン酸 (Pi) を含む請求項 56 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 58】

センス鎖が、3' 末端又は 3' 末端から 2 番目で開始する 4 又は 5 の連続する 2', 5' ヌクレオチドを含む請求項 7～57 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 59】

各鎖が長さ 19 のヌクレオチドであり、(N')_y が 15、16、17 及び 18 位又は 16、17、18 及び 19 位又は 15、16、17、18 及び 19 位で 2', 5' ヌクレオチドを含む請求項 58 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 60】

x = y = 19 であり、
アンチセンス鎖の 5' 末端から 5、6、7、8 又は 9 位の少なくとも 1 つにおける N が、
トレオース核酸部分、2', 5' ヌクレオチド又はミラーヌクレオチドから選択され；
センス鎖の 5' 末端から 9 又は 10 位の少なくとも 1 つにおける N' が、トレオース核酸部分、2', 5' ヌクレオチド及びシュードウリジンから選択され；
アンチセンス鎖における少なくとも 1 つのピリミジンリボヌクレオチドが置換される請求項 58 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 61】

x = y = 19 であり、アンチセンス鎖の 9 位にて 2', 5' ヌクレオチド及びセンス鎖の 5 又は 6 位にて 2', 5' ヌクレオチドを含む請求項 58 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 62】

さらに、少なくとも 1 つの 2' - OMe 修飾されたピリミジンリボヌクレオチドを含む請求項 61 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 63】

x = y = 19 であり；
アンチセンス鎖の 5' 末端から 5、6、7、8 又は 9 位の少なくとも 1 つにおける N が、
トレオース核酸部分、2', 5' ヌクレオチド又はミラーヌクレオチドから選択され；
センス鎖の 3' 末端又は 3' 末端から 2 番目で開始する 4、5 又は 6 の連続する位置における N' が 2', 5' ヌクレオチドを含む請求項 58 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 64】

N' の少なくとも 1 つがミラーヌクレオチドを含む請求項 37 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 65】

(N')_y 又は N² - (N')_y が、一方の又は双方の末端にて少なくとも 1 つのミラーヌクレオチドを含む請求項 64 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 66】

(N')_y 又は N² - (N')_y が、2 つの連続するミラーヌクレオチドを含み、1 つは 3' 末端から 2 番目の位置に、1 つは 3' 末端にある請求項 65 に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項 67】

10

20

30

40

50

少なくとも1つのミラーヌクレオチドがL-リボヌクレオチド及びL-デオキシリボヌクレオチドから選択される請求項64に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項68】

ミラーヌクレオチドがL-デオキシリボヌクレオチドである請求項67に記載の二本鎖核酸分子。

【請求項69】

(N)^x又は(N')^yが、3'末端及び5'末端でリン酸化されない、又は3'末端若しくは3'末端及び5'末端の双方でリン酸化される請求項7～12のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項70】

N¹-(N)^x又はN²-(N')^yが3'末端及び5'末端でリン酸化されない、又は3'末端若しくは3'末端及び5'末端の双方でリン酸化される請求項13～17のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項71】

各N及び各N'が未修飾のリボヌクレオチドを含む請求項7～36のいずれかに記載の二本鎖核酸分子。

【請求項72】

遺伝子の発現を阻害するのに有効な量での請求項1～71のいずれかに記載の二本鎖核酸分子と薬学上許容可能なキャリアを含む医薬組成物であって、遺伝子が配列番号1～12のいずれか1つで示されるポリヌクレオチド配列を有するRNAをコードする医薬組成物。

【請求項73】

遺伝子の発現を阻害するのに有効な量で請求項1～71のいずれかに記載の二本鎖核酸分子を含む細胞であって、遺伝子が配列番号1～12のいずれか1つで示されるポリヌクレオチド配列を有するRNAをコードする細胞。

【請求項74】

治療における使用のための請求項1～71のいずれかに記載の二本鎖核酸分子及び請求項72に記載の組成物。

【請求項75】

前記治療が、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は臓器移植における一次移植片機能不全(PGD)から成る群から選択される疾患又は傷害の治療である請求項74の使用。

【請求項76】

標的遺伝子の発現に関連する疾患又は障害又は症状又は状態を治療することが必要な対象を治療する方法であって、ある量の請求項1～71のいずれかに記載の二本鎖核酸分子、又は遺伝子発現を下方調節するのに有効な量での請求項72に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、前記遺伝子が配列番号1～12のいずれか1つで示されるポリヌクレオチド配列を有するRNAをコードする、方法。

【請求項77】

前記疾患又は傷害が、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は臓器移植における一次移植片機能不全(PGD)から成る群から選択される請求項76に記載の方法。

【請求項78】

前記疾患又は傷害が、臓器移植における一次移植片機能不全(PGD)を含む請求項77に記載の方法。

【請求項79】

前記臓器移植が肺移植を含む請求項78に記載の方法。

【請求項80】

10

20

30

40

50

それを必要とする対象にて一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全（P G D）から成る群から選択される移植後合併症の発生及び重症度を治療する又は予防する方法であって、前記合併症が、配列番号 1 ～ 1 2 のいずれか 1 つで示されるポリヌクレオチド配列を有する R N A をコードする遺伝子の発現に関連し、前記方法が、予防上又は治療上有効な量の請求項 1 ～ 7 1 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子、又は遺伝子発現を下方調節するのに有効な量での請求項 7 2 に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。

【請求項 8 1】

それを必要とする対象にて急性又は慢性の炎症を軽減する方法であって、前記炎症が、配列番号 1 ～ 1 2 のいずれか 1 つで示されるポリヌクレオチド配列を有する R N A をコードする遺伝子の発現に関連し、前記方法が、治療上有効な量の請求項 1 ～ 7 1 のいずれかに記載の二本鎖核酸分子、又は遺伝子発現を下方調節するのに有効な量での請求項 7 2 に記載の組成物を対象に投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、あらゆる目的でその全体が参照によって本明細書に組み入れられる「T L R 2、T L R 4、M Y D 8 8、T I C A M 1 及び T I R A P のヌクレオチド阻害剤及びその使用方法」と題する 2 0 1 1 年 3 月 3 日に提出された米国仮特許出願、出願番号 6 1 / 4 4 8, 7 0 7 の利益を主張する。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、2 3 3 ～ P C T 1 __ S T 2 5. t x t と題され、2 0 1 2 年 2 月 2 8 日に 3, 9 0 8 k b の大きさで創製され、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる配列表を含有する。

【0 0 0 3】

本明細書で提供されるのは、T o l l 様受容体（T L R）経路における哺乳類の標的遺伝子 T L R 2、T L R 4、M Y D 8 8、T I C A M 1 及び T I R A P を阻害するための核酸分子、それを含む医薬組成物及びその使用方法である。具体的な化合物には、未修飾の及び化学的に修飾された d s R N A 及び s i R N A オリゴヌクレオチド及びそれを含む組成物が含まれる。

【背景技術】

【0 0 0 4】

d s R N A を生成するのに有用なオリゴヌクレオチド配列及びヌクレオチドの修飾は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる、とりわけ、米国特許公開番号、U S 2 0 0 8 0 2 9 3 6 5 5、U S 2 0 0 9 0 1 6 2 3 6 5、U S 2 0 1 0 0 2 9 2 3 0 1 及び U S 2 0 1 1 0 1 1 2 1 6 8 並びに P C T 特許公開番号、W O 2 0 1 1 / 0 6 6 4 7 5、W O 2 0 1 1 / 0 8 4 1 9 3 及び W O 2 0 1 1 / 0 8 5 0 5 6 にて本開示の出願者によって記載されている。

【0 0 0 5】

T o l l 様受容体経路を調節することにて有用な高いノックダウン活性、高い安定性及び／又は低下したオフターゲット効果を示す活性のある且つ効果的な d s R N A 治療剤に対するニーズが存在したままである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

本明細書で提供されるのは、T o l l 様受容体経路における標的遺伝子の発現を調節するのに有用な組成物、方法及びキットである。種々の態様では、提供されるのは、配列番号：1（T L R 2 の m R N A）；配列番号：2 ～ 4（T L R 4 の m R N A）、配列番号：

10

20

30

40

50

5～9 (MYD88のmRNA)、配列番号：10 (TICAM1のmRNA)又は配列番号：11～12 (TIRAPのmRNA)を含む配列番号1～12で示されるmRNAポリヌクレオチド配列を有するTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPから成る群から選択される哺乳類遺伝子の核酸分子阻害剤である。

【0007】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPから成る群から選択される遺伝子の発現を阻害する、下方調節する又は低下させる新規の二本鎖核酸分子、特に二本鎖RNA (dsRNA)、及び1以上のそのようなオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドを発現することが可能であるベクターを含む医薬組成物である。さらに本明細書で提供されるのは、炎症及び炎症性疾患、及び肺移植のような臓器移植に関連する移植片拒絶を治療する方法であり、その際、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP遺伝子の1以上の発現が炎症及び臓器移植に関連する移植片拒絶の病因又は進行に関連する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

一部の態様及び実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは化学的に修飾されたdsRNA化合物である。一部の実施形態では、dsRNAのセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドは、配列番号：13～5846 (TLR2を標的とする)、配列番号：5847～12144 (TLR4を標的とする)、配列番号：12145～16332 (MYD88を標的とする)、配列番号：16333～18242 (TICAM1を標的とする)及び配列番号：18243～20606 (TIRAPを標的とする)で示されるセンスオリゴヌクレオチド及び対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択される。

【0009】

従って、態様の1つでは、提供されるのは、以下の二本鎖構造を有する核酸分子であり、

(A1) $5' \quad (N) x - Z \quad 3' \quad (\text{アンチセンス鎖})$
 $3' \quad Z' - (N') y \sim z'' \quad 5' \quad (\text{センス鎖})$

式中、各N及びN'は、未修飾であってもよく又は修飾されてもよいヌクレオチド、又は非定型の部分であり；

式中、(N)x及び(N')yのそれぞれは、各連続するN又はN'が共有結合によって次のN又はN'に連結されるオリゴヌクレオチドであり；

式中、Z及びZ'のそれぞれは、独立して存在し又は非存在であるが、存在するならば、独立してそれが存在する鎖の3'末端にて共有結合する1～5の連続するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分又はその組み合わせを含み；

式中、z''は、存在しても非存在であってもよいが、存在するならば、(N')yの5'末端にて共有結合するキャッピング部分であり；

式中、x及びyのそれぞれは独立して18～25の間の整数である。

【0010】

式中、(N')yの配列は(N)xの配列に対して相補性であり、(N)xは配列番号1～12のいずれか1つで示される標的RNAのアンチセンス配列を含む。

【0011】

一部の実施形態では、各連続したN又はN'を連結する共有結合はホスホジエステル結合である。

【0012】

一部の実施形態では、 $x = y$ であり、x及びyのそれぞれが独立して19、20、21、22又は23である。種々の実施形態では、 $x = y = 19$ である。

【0013】

一部の実施形態では、センス鎖オリゴヌクレオチド及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドは、TLR2を標的とするための配列番号：13～3060；TLR4を標的とするための配列番号：5847～8612；MYD88を標的とするための配列番号：121

4 5～1 3 9 2 4；T I C A M 1を標的とするための配列番号：1 6 3 3 3～1 6 8 8 2；又はT I R A Pを標的とするための配列番号：1 8 2 4 3～1 9 0 4 6で示されるオリゴヌクレオチド対から選択される。

【0014】

特定の好まれる実施形態では、本明細書で開示されるような二本鎖核酸分子（たとえば、s i N A分子）のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、配列番号：1 3～1 4 4 8若しくは1 4 4 9～3 0 6 0（T L R 2を標的とする）；又は配列番号：5 8 4 7～8 3 2 0若しくは8 3 2 1～8 6 1 2（T L R 4を標的とする）；又は配列番号：1 2 1 4 5～1 3 1 0 8若しくは1 3 1 0 9～1 3 9 2 4（M Y D 8 8を標的とする）；又は配列番号：1 6 3 3 3～1 6 8 6 6若しくは1 6 8 6 7～1 6 8 8 2（T I C A M 1を標的とする）；又は配列番号：1 8 2 4 3～1 9 0 1 0若しくは1 9 0 1 1～1 9 0 4 6（T I R A Pを標的とする）で示されるセンス配列及びアンチセンス配列のいずれか1つに相当する配列を含む。

10

【0015】

一部の実施形態では、二本鎖核酸分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、T L R 2__2 5、T L R 2__2 8、T L R 2__4 2、T L R 2__4 3及びT L R 2__4 7で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、T L R 2__2 5（配列番号：2 0 6 0 7及び2 0 6 1 4）、T L R 2__2 8（配列番号：2 0 6 0 8及び2 0 6 1 5）、T L R 2__4 2（配列番号：2 0 6 0 9及び2 0 6 1 6）、T L R 2__4 3（配列番号：2 0 6 1 0及び2 0 6 1 7）並びにT L R 2__4 7（配列番号：2 0 6 1 1及び2 0 6 1 8）で示される配列の対から選択される。

20

【0016】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A分子）にはT L R 2__2 5（配列番号：2 0 6 0 7及び2 0 6 1 4）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A分子）にはT L R 2__2 8（配列番号：2 0 6 0 8及び2 0 6 1 5）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A分子）にはT L R 2__4 2（配列番号：2 0 6 0 9及び2 0 6 1 6）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A分子）にはT L R 2__4 3（配列番号：2 0 6 1 0及び2 0 6 1 7）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A分子）にはT L R 2__4 7（配列番号：2 0 6 1 1及び2 0 6 1 8）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。

30

【0017】

一部の実施形態では、二本鎖核酸分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、T L R 4__0 8、T L R 4__1 0、T L R 4__1 1、T L R 4__1 4、T L R 4__1 5、T L R 4__2 8、T L R 4__2 9、T L R 4__3 1及びT L R 4__3 3で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、T L R 4__0 8（配列番号：2 0 6 2 1及び2 0 6 3 0）、T L R 4__1 0（配列番号：2 0 6 2 2及び2 0 6 3 1）、T L R 4__1 1（配列番号：2 0 6 2 3及び2 0 6 3 2）、T L R 4__1 4（配列番号：2 0 6 2 4及び2 0 6 3 3）、T L R 4__1 5（配列番号：2 0 6 2 5及び2 0 6 3 4）、T L R 4__2 8（配列番号：2 0 6 2 6及び2 0 6 3 5）、T L R 4__2 9（配列番号：2 0 6 2 7及び2 0 6 3 6）、T L R 4__3 1（配列番号：2 0 6 2 8及び2 0 6 3 7）並びにT L R 4__3 3（配列番号：2 0 6 2 9及び2 0 6 3 8）で示される配列の対から選択される。

40

【0018】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A分子）にはT L R 4__0 8（配列番号：2 0 6 2 1及び2 0 6 3 0）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N

50

A分子)にはTLR4__10(配列番号:20622及び20631)で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTLR4__11(配列番号:20623及び20632)で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTLR4__14(配列番号:20624及び20633)で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTLR4__15(配列番号:20625及び20634)で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTLR4__28(配列番号:20626及び20635)で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTLR4__29(配列番号:20627及び20636)で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTLR4__31(配列番号:20628及び20637)で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTLR4__33(配列番号:20629及び20638)で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。

【0019】

一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖はMYD88__11で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖及びセンス鎖はMYD88__11(配列番号:12178及び12660)で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはMYD88__11(配列番号:12178及び12660)で示される配列の対が含まれる。

【0020】

一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖はTICAM1__20で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖はTICAM1__20(配列番号:20644及び20655)で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTICAM1__20(配列番号:20644及び20655)で示される配列の対が含まれる。

【0021】

一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖はTIRAP__16で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖及びセンス鎖はTIRAP__16(配列番号:20661及び20673)で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子(たとえば、siNA分子)にはTIRAP__16(配列番号:20661及び20673)で示される配列の対が含まれる。

【0022】

種々の実施形態では、二本鎖分子はガイド鎖(アンチセンス鎖)の5'末端ヌクレオチドにて標的mRNAに対するミスマッチを含む。

【0023】

従って、提供されるのは、以下の構造を有する二本鎖核酸分子である。

【0024】

(A2) 5' N¹ - (N)_x - Z 3' (アンチセンス鎖)

3' Z' - N² - (N')_y - z" 5' (センス鎖)

式中、各N²、N及びN'は未修飾の又は修飾されたりボヌクレオチド又は非定型の部分であり;

式中、(N)_x及び(N')_yのそれぞれは、各連続するN又はN'が共有結合によって

隣接するN又はN'に連結するオリゴヌクレオチドであり；

式中、x及びyのそれぞれは17～24の間の整数であり；

式中、(N')yの配列は(N)xの配列に対して相補性であり、(N)xはTLR2、TLR4、MYD88、TICAM及びTIRAPから選択される標的RNAにおける連続配列に対して相補性であり；

式中、N¹は(N)xに共有結合し、標的RNAに対してミスマッチがあり、又は標的RNAに対して相補性のDNA部分であり；

式中、N¹は、ウリジン(rU)、デオキシリボウリジン(dU)、リボチミジン(rT)、デオキシリボチミジン(dT)、アデノシン(rA)及びデオキシアデノシン(dA)から選択される未修飾又は修飾されたヌクレオチドから成る群から選択される部分であり；

式中、z"は存在してもしなくてもよいが、存在する場合、N²-(N')yの5'末端にて共有結合されるキャッピング部分である。

【0025】

式中、Z及びZ'のそれぞれは独立して存在するか又は非存在であるが、存在するならば独立して、それが存在する鎖の3'末端で共有結合する1～5の連続するヌクレオチド、連続する非ヌクレオチド又はそれらの組み合わせである。

【0026】

一部の実施形態では、(N')yの配列は(N)xの配列に対して完全に相補性である。種々の実施形態では、N²-(N')yの配列はN¹-(N)xの配列に対して相補性である。一部の実施形態では、(N)xは標的RNAの約17～約24の連続するヌクレオチドに対して完全に相補性であるアンチセンスを含む。他の実施形態では、(N)xは標的RNAの約17～約39の連続するヌクレオチドに対して実質的に相補性であるアンチセンスを含む。

【0027】

一部の実施形態では、N¹及びN²は少なくとも1つの水素結合を形成する。一部の実施形態では、N¹及びN²はワトソン／クリックの塩基対を形成する。一部の実施形態では、N¹及びN²は非ワトソン／クリックの塩基対を形成する。一部の実施形態では、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で形成される。

【0028】

構造A2の一部の実施形態では、x=y=18、x=y=19又はx=y=20である。好まれる実施形態ではx=y=18である。

【0029】

一部の実施形態では、N¹は(N)xに共有結合し、標的RNAに対してミスマッチがある。種々の実施形態では、N¹は(N)xに共有結合し、標的RNAに対して相補性のDNA部分である。

【0030】

一部の実施形態では、N¹は(N)xに共有結合し、標的RNAに対して相補性のDNA部分である。

【0031】

一部の実施形態では、N¹は、アデノシン、デオキシアデノシン、デオキシウリジン、リボチミジン又はデオキシチミジンから選択され、標的RNAにて対合するヌクレオチドはアデノシンである。好まれる実施形態では、N¹はアデノシン、デオキシアデノシン又はデオキシウリジンから選択される。

【0032】

一部の実施形態では、N¹は、アデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン、デオキシウリジン、リボチミジン又はデオキシチミジンから選択され、標的RNAにて対合するヌクレオチドはシチジンである。好まれる実施形態では、N¹はアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン又はデオキシウリジンから選択される。

【0033】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、 N^1 は、未修飾の又は修飾されたアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン、デオキシウリジン、リボチミジン又はデオキシチミジンから選択され、標的RNAにて対合するヌクレオチドはグアノシンである。一部の実施形態では、 N^1 は、 $2'-OMe$ 糖修飾されたアデノシン、ウリジン又はリボチミジンを含む。一部の実施形態では、 N^1 は、 $2'$ フルオロ又は $2'$ アミノ糖修飾されたアデノシン、ウリジン又はリボチミジンを含む。

【0034】

好まれる実施形態では、 N^1 は、アデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン又はデオキシウリジンから選択される。一部の実施形態では、 N^1 はアデノシン及びデオキシアデノシンから選択され、 N^2 はウリジンであり、 N^1 と N^2 は塩基対を形成する。一部の実施形態では、 N^1 はウリジン及びデオキシウリジンから選択され、 N^2 はアデノシンであり、 N^1 と N^2 は塩基対を形成する。

10

【0035】

一部の実施形態では、 N^1 はデオキシアデノシン、デオキシウリジン、リボチミジン又はデオキシチミジンから選択され、標的RNAにて対合するヌクレオチドにおけるヌクレオチドはウリジンである。好まれる実施形態では、 N^1 はデオキシアデノシン又はデオキシウリジンから選択される。

【0036】

一部の実施形態では、 N^1 はウリジン又はデオキシウリジンから選択され、 N^2 はアデノシン又はデオキシアデノシンから選択され、 N^1 と N^2 は塩基対を形成する。

20

【0037】

一部の実施形態では、 N^1 はアデノシン又はデオキシアデノシンから選択され、 N^2 はウリジン又はデオキシウリジンから選択され、 N^1 と N^2 は塩基対を形成する。他の実施形態では、 N^1 はデオキシウリジンであり、 N^2 はアデノシンであり、 N^1 と N^2 は塩基対を形成する。一部の実施形態では、 N^1 はアデノシンであり、 N^2 はウリジンであり、 N^1 と N^2 は塩基対を形成する。

【0038】

一部の実施形態では、センス鎖オリゴヌクレオチド及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドは、TLR2を標的とするための配列番号：3061～5260若しくは5261～5846；TLR4を標的とするための配列番号：8613～12040若しくは12041～12144；MYD88を標的とするための配列番号：13925～15910若しくは15911～16332；TICAM1を標的とするための配列番号：16883～18236若しくは18237～18242又はTIRAPを標的とするための配列番号：19047～20590若しくは20591～20606で示されるオリゴヌクレオチド対から選択される。

30

【0039】

一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖はTLR2__31及びTLR2__34で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、TLR2__31（配列番号：20612及び20619）並びにTLR2__34（配列番号：20613及び20620）で示される配列の対から選択される。種々の実施形態では、アンチセンス鎖における N^1 はウリジン又は化学的に修飾されたウリジンを含み、センス鎖における N^2 はリボアデノシン又は化学的に修飾されたリボアデノシンを含む。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTLR2__31（配列番号：20612及び20619）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTLR2__34（配列番号：20613及び20620）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。

40

【0040】

一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、TICAM1__15、TICAM1__16、TICAM1__17、TICAM1__18、TICAM1__19、TICA

50

M1__21、TICAM1__22、TICAM1__23、TICAM1__24、及びTICAM1__25で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、TICAM1__15（配列番号：20639及び20650）、TICAM1__16（配列番号：20640及び20651）、TICAM1__17（配列番号：20641及び20652）、TICAM1__18（配列番号：20642及び20653）；TICAM1__19（配列番号：20643及び20654）；TICAM1__21（配列番号：20645及び20656）、TICAM1__22（配列番号：20646及び20657）、TICAM1__23（配列番号：20647及び20658）、TICAM1__24（配列番号：20448及び20659）並びにTICAM1__25（配列番号：20649及び20660）で示される配列の対から選択される。

10

【0041】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__15（配列番号：20639及び20650）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__16（配列番号：20640及び20651）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siRNA分子）にはTICAM1__17（配列番号：20641及び20652）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__18（配列番号：20642及び20653）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__19（配列番号：20643及び20654）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__21（配列番号：20645及び20656）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__22（配列番号：20646及び20657）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__23（配列番号：20647及び20658）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__24（配列番号：20448及び20659）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、siNA分子）にはTICAM1__25（配列番号：20649及び20660）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。

20

30

【0042】

一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、TIRAP__17、TIRAP__18、TIRAP__19、TIRAP__20、TIRAP__21、TIRAP__22、TIRAP__23、TIRAP__24、TIRAP__25、TIRAP__26及びTIRAP__27で示される配列の対から選択される。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、TIRAP__17（配列番号：20662及び20674）、TIRAP__18（配列番号：20663及び20675）；TIRAP__19（配列番号：20664及び20676）；TIRAP__20（配列番号：20665及び20677）、TIRAP__21（配列番号：20666及び20678）、TIRAP__22（配列番号：20667及び20679）、TIRAP__23（配列番号：20668及び20680）、TIRAP__24（配列番号：20669及び20681）、TIRAP__25（配列番号：20670及び20682）、TIRAP__26（配列番号：20671及び20683）並びにTIRAP__27（配列番号：20672及び20684）で示される配列の対から選択される。

40

【0043】

50

一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__1 7（配列番号：2 0 6 6 2 及び2 0 6 7 4）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__1 8（配列番号：2 0 6 6 3 及び2 0 6 7 5）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__1 9（配列番号：2 0 6 6 4 及び2 0 6 7 6）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 0（配列番号：2 0 6 6 5 及び2 0 6 7 7）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 1（配列番号：2 0 6 6 6 及び2 0 6 7 8）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 2（配列番号：2 0 6 6 7 及び2 0 6 7 9）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 3（配列番号：2 0 6 6 8 及び2 0 6 8 0）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 4（配列番号：2 0 6 6 9 及び2 0 6 8 1）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 5（配列番号：2 0 6 7 0 及び2 0 6 8 2）で示される配列の対が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 6（配列番号：2 0 6 7 1 及び2 0 6 8 3）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような核酸分子（たとえば、s i N A 分子）にはT I R A P__2 7（配列番号：2 0 6 7 2 及び2 0 6 8 4）で示される配列の対のセンス鎖及びアンチセンス鎖が含まれる。

【0 0 4 4】

種々の実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：1 3～5 8 4 6（T L R 2を標的とする）、配列番号：5 8 4 7～1 2 1 4 4（T L R 4を標的とする）、配列番号：1 2 1 4 5～1 6 3 3 2（M Y D 8 8を標的とする）、配列番号：1 6 3 3 3～1 8 2 4 2（T I C A M 1を標的とする）及び配列番号：1 8 2 4 3～2 0 6 0 6（T I R A Pを標的とする）又は好ましくは、以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチド対に基づいて生成され、構造（A 1）及び構造（A 2）に係る以下の修飾の1以上を含む：

（a）（N）_x = 1 9又はN¹ - （N）_x = 1 9であり、（N）_x又はN¹ - （N）_xの5'末端から5、6、7、8又は9位の少なくとも1つが、トレオース核酸（T N A）部分、2'，5'ヌクレオチド、ミラーヌクレオチド、U N A又は脱塩基部分から選択される；

（b）（N）_x = 1 9又はN¹ - （N）_x = 1 9であり、（N）_x又はN¹ - （N）_xにおけるピリミジンリボヌクレオチドの少なくとも1つが2'糖修飾されたりボヌクレオチドを含む；

（c）（N）_x又はN¹ - （N）_xにて、1 1、1 3、1 5、1 7及び1 9位におけるNは2' - O M e糖修飾されたりボヌクレオチドを含み、1 0、1 2、1 4、1 6及び1 8位におけるNは未修飾のリボヌクレオチドを含む；

（d）（N）_x又はN¹ - （N）_xにて、1、3、5、9、1 1、1 3、1 5、1 7及び1 9位におけるNは2' - O M e糖修飾されたりボヌクレオチドを含み、2、4、6、8、1 0、1 2、1 4、1 6及び1 8位におけるNは未修飾のリボヌクレオチドを含む；

（e）（N）_x又はN¹ - （N）_xにて、2、4、6、8、1 1、1 3、1 5、1 7及び1 9位におけるNは2' - O M e糖修飾されたりボヌクレオチドを含む；

（f）Zは（N）_x又はN¹ - （N）_xの3'末端に共有結合し、C 3 O H、C 3 P i、C 3 P i - C 3 O H及びC 3 P i - C 3 P iから成る群から選択される非ヌクレオチド部

分を含む；

(g) (N') y 又は $N^2 - (N')$ y の 5' 末端から 7、8、9 又は 10 位の少なくとも 1 つにおける N' はトレオース核酸部分、2', 5' ヌクレオチド及びシュードウリジンから選択される；

(h) N' は、 (N') y 又は $N^2 - (N')$ y における 3' 末端位置又は 3' 末端から 2 番目の位置にて 4、5、又は 6 の連続した位置でトレオース (TNA) 核酸部分又は 2', 5' ヌクレオチドを含む；

(i) (N') y 又は $N^2 - (N')$ y におけるピリミジンリボヌクレオチドの少なくとも 1 つは 2' 糖修飾したリボヌクレオチドである；

(j) z'' は (N') y 又は $N^2 - (N')$ y の 5' 末端に共有結合するキャップ部分であり、逆位脱塩基デオキシリボース部分、逆位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、以下で定義されるような C3 部分、L-DNA、L-RNA から選択され；

(k) Z' は (N') y 又は $N^2 - (N')$ y の 3' 末端に共有結合し、C3OH、C3Pi、C3Pi-C3OH 又は C3Pi-C3Pi の 1 つを含む。

【0045】

好まれる実施形態では、 $x = y = 19$ である。

【0046】

一部の実施形態では、それぞれ連続する N 又は N' を連結する共有結合はホスホジエステル結合である。種々の実施形態では、共有結合はすべてホスホジエステル結合である。

【0047】

構造 A1 及び構造 A2 の二本鎖核酸分子の一部の実施形態では、アンチセンス鎖 $[(N)x$ 又は $N^1 - (N)x]$ の 5' 末端から 5、6、7、8 又は 9 位の少なくとも 1 つにおける N は、トレオース核酸 (TNA) 部分、2', 5' ヌクレオチド、ミラーヌクレオチド、UNA 又はそれらの組み合わせから選択される。理論に束縛されることは望まないが、前述の位置の 1 以上にてトレオース核酸 (TNA) 部分、2', 5' ヌクレオチド、ミラーヌクレオチドを有する二本鎖核酸は、二本鎖分子に高いオンターゲット活性及び／又は低いオフターゲット活性及び／又はヌクレアーゼに対する高い安定性を付与する。

【0048】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖 [構造 A1 の $(N)x$ 又は構造 A2 の $N^1 - (N)x]$ は、5 位における TNA 部分、6 位における TNA 部分、7 位における TNA 部分、8 位における TNA 部分、9 位における TNA 部分、5～6 位における TNA 部分、6～7 位における TNA 部分、7～8 位における TNA 部分、8～9 位における TNA 部分、5～7 位における TNA 部分、6～8 位における TNA 部分、7～9 位における TNA 部分、5～8 位における TNA 部分、6～9 位における TNA 部分、又は 5～9 位における TNA 部分を含む。

【0049】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖 [構造 A1 の $(N)x$ 又は構造 A2 の $N^1 - (N)x]$ は、5 位における 2', 5' ヌクレオチド、6 位における 2', 5' ヌクレオチド、7 位における 2', 5' ヌクレオチド、8 位における 2', 5' ヌクレオチド、9 位における 2', 5' ヌクレオチド、5～6 位における 2', 5' ヌクレオチド、6～7 位における 2', 5' ヌクレオチド、7～8 位における 2', 5' ヌクレオチド、8～9 位における 2', 5' ヌクレオチド、5～7 位における 2', 5' ヌクレオチド、6～8 位における 2', 5' ヌクレオチド、7～9 位における 2', 5' ヌクレオチド、5～8 位における 2', 5' ヌクレオチド、6～9 位における 2', 5' ヌクレオチド、又は 5～9 位における 2', 5' ヌクレオチドを含む。

【0050】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖 [構造 A1 の $(N)x$ 又は構造 A2 の $N^1 - (N)x]$ は、5 位におけるミラーヌクレオチド、6 位におけるミラーヌクレオチド、7 位におけるミラーヌクレオチド、8 位におけるミラーヌクレオチド、9 位におけるミラーヌク

10

20

30

40

50

レオチド、5～6位におけるミラーヌクレオチド、6～7位におけるミラーヌクレオチド、7～8位におけるミラーヌクレオチド、8～9位におけるミラーヌクレオチド、5～7位におけるミラーヌクレオチド、6～8位におけるミラーヌクレオチド、7～9位におけるミラーヌクレオチド、5～8位におけるミラーヌクレオチド、6～9位におけるミラーヌクレオチド、又は5～9位におけるミラーヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ミラーヌクレオチドはL-DNA又はL-RNAである。

【0051】

二本鎖核酸分子の一部の実施形態では、センス鎖の5'末端から9又は10位の少なくとも1つにおけるN'〔構造A1の(N')y又は構造A2のN²-(N')y〕は、トレオース核酸(TNA)部分、2', 5'ヌクレオチド、シュドウリジン又はそれらの組み合わせから選択される。理論に束縛されることは望まないが、センス(パッセンジャー)鎖における9又は10位のいずれか1以上にてトレオース核酸(TNA)部分、2', 5'ヌクレオチド、シュドウリジンを有する二本鎖核酸分子は、二本鎖分子に高いオンターゲット活性及び/又は高いヌクレアーゼ安定性を付与する。

10

【0052】

一部の実施形態では、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN²-(N')yは9位及び/又は10位にてトレオース核酸(TNA)部分を含む。

【0053】

一部の実施形態では、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN²-(N')yは9位及び/又は10位にて2', 5'ヌクレオチドを含む。

20

【0054】

一部の実施形態では、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN²-(N')yは9位及び/又は10位にてシュドウリジンを含む。

【0055】

二本鎖核酸分子の一部の実施形態では、N'は、センス鎖〔構造A1の(N')y又は構造A2のN²-(N')y〕の3'末端位置又は末端から2番目の位置にて4、5又は6の連続する2', 5'ヌクレオチドを含む。理論によって束縛されることは望まないが、センス(パッセンジャー)鎖の3'末端位置又は末端から2番目の位置にて4、5又は6の連続する2', 5'ヌクレオチドを有する二本鎖核酸分子は、二本鎖に対する高いヌクレアーゼ安定性及び/又はセンス(パッセンジャー)鎖の低いオフターゲット効果を付与する。一部の実施形態では、センス鎖はさらにZ'を含む。一部の実施形態では、ZはC3部分(たとえば、C3Pi、C3-OH)又は3'末端のリン酸(Pi)を含む。

30

【0056】

構造A1及びA2の一部の実施形態では、センス鎖は3'末端位置又は末端から2番目の位置にて4つの連続する2', 5'ヌクレオチドを含む。構造A1の一部の実施形態では、x=y=19であり、(N')yは15、16、17及び18位又は16、17、18及び19位にて2', 5'ヌクレオチドを含む。構造A2の一部の実施形態では、x=y=18であり、N²-(N')yは15、16、17及び18位又は16、17、18及び19位にて2', 5'ヌクレオチドを含む。

【0057】

構造A1及びA2の一部の実施形態では、センス鎖は3'末端位置又は末端から2番目の位置にて5つの連続する2', 5'ヌクレオチドを含む。構造A1の一部の実施形態では、x=y=19であり、(N')yは14、15、16、17及び18位又は15、16、17、18及び19位にて2', 5'ヌクレオチドを含む。構造A2の一部の実施形態では、x=y=18であり、N²-(N')yは14、15、16、17及び18位又は15、16、17、18及び19位にて2', 5'ヌクレオチドを含む。

40

【0058】

構造A1及びA2の一部の実施形態では、センス鎖は3'末端位置又は末端から2番目の位置にて6つの連続する2', 5'ヌクレオチドを含む。構造A1の一部の実施形態では、x=y=19であり、(N')yは13、14、15、16、17及び18位又は1

50

4、15、16、17、18及び19位にて2'，5'ヌクレオチドを含む。構造A2の一部の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $N2 - (N')y$ は14、15、16、17及び18位又は14、15、16、17、18及びN2位にて2'，5'ヌクレオチドを含む。

【0059】

一部の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、二本鎖核酸分子は以下を含む

【0060】

アンチセンス鎖の5'末端から5、6、7、8又は9位の少なくとも1つにおけるNは、トレオース核酸部分、2'，5'ヌクレオチド、ミラーヌクレオチドから選択される。

【0061】

センス鎖の5'末端から9又は10位の少なくとも1つにおけるN'はトレオース核酸部分、2'，5'ヌクレオチド、及びシュードウリジンから選択される；並びに

【0062】

アンチセンス鎖における少なくとも1つのピリミジンリボヌクレオチドは2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドである。

【0063】

一部の実施形態では、二本鎖分子は、アンチセンス鎖の9位にて2'，5'ヌクレオチド及びセンス鎖の5又は6位にて2'，5'ヌクレオチドを含む。追加の実施形態では、アンチセンス鎖はさらに2'-OMe修飾されたピリミジンリボヌクレオチドを含む。

【0064】

別の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、二本鎖核酸分子は以下を含む

【0065】

アンチセンス鎖の5'末端から5、6、7、8又は9位の少なくとも1つにおけるNはトレオース核酸部分、2'，5'ヌクレオチド、又はミラーヌクレオチドから選択され；及び

【0066】

センス鎖の3'末端位置又は末端から2番目の位置にて開始する4、5又は6の連続する位置におけるN'は2'，5'ヌクレオチドを含む。

【0067】

一部の実施形態では、二本鎖核酸分子は、dsRNA、siRNA、siNA又はmiRNAを含む二本鎖オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、 $(N)x$ 及び $(N')y$ は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対を含み、好ましくは、TLR2__25（配列番号：20607及び20614）、TLR2__28（配列番号：20608及び20615）、TLR2__42（配列番号：20609及び20616）、TLR2__43（配列番号：20610及び20617）、TLR2__47（配列番号：20611及び20618）、TLR2__31（配列番号：20612及び20619）、TLR2__34（配列番号：20613及び20620）；又は

【0068】

TLR4__08（配列番号：20621及び20630）、TLR4__10（配列番号：20622及び20631）、TLR4__11（配列番号：20623及び20632）、TLR4__14（配列番号：20624及び20633）、TLR4__15（配列番号：20625及び20634）、TLR4__28（配列番号：20626及び20635）、TLR4__29（配列番号：20627及び20636）、TLR4__31（配列番号：20628及び20637）、TLR4__33（配列番号：20629及び20638）；又は

【0069】

10

20

30

40

50

MYD88__11 (配列番号: 12178 及び 12660) ; 又は
【0070】

TICAM1__20 (配列番号: 20644 及び 20655) 、TICAM1__15 (配列番号: 20639 及び 20650) 、TICAM1__16 (配列番号: 20640 及び 20651) 、TICAM1__17 (配列番号: 20641 及び 20652) 、TICAM1__18 (配列番号: 20642 及び 20653) ; TICAM1__19 (配列番号: 20643 及び 20654) ; TICAM1__21 (配列番号: 20645 及び 20656) 、TICAM1__22 (配列番号: 20646 及び 20657) 、TICAM1__23 (配列番号: 20647 及び 20658) 、TICAM1__24 (配列番号: 20448 及び 20659) 、TICAM1__25 (配列番号: 20649 及び 20660) ;
又は

10

【0071】

TIRAP__16 (配列番号: 20661 及び 20673) 、TIRAP__17 (配列番号: 20662 及び 20674) 、TIRAP__18 (配列番号: 20663 及び 20675) ; TIRAP__19 (配列番号: 20664 及び 20676) ; TIRAP__20 (配列番号: 20665 及び 20677) 、TIRAP__21 (配列番号: 20666 及び 20678) 、TIRAP__22 (配列番号: 20667 及び 20679) 、TIRAP__23 (配列番号: 20668 及び 20680) 、TIRAP__24 (配列番号: 20669 及び 20681) 、TIRAP__25 (配列番号: 20670 及び 20682) 、TIRAP__26 (配列番号: 20671 及び 20683) 並びに TIRAP__27 (配列番号: 20672 及び 20684) ; 又は

20

又は

又は

で示されるセンス鎖及びアンチセンス鎖の対の1つを含む。

【0072】

一部の実施形態では、二本鎖分子はホスホジエステル結合を含む。種々の実施形態では、二本鎖分子は、 $x = y$ であり、 x が 19、20、21、22 及び 23 から成る群から選択される整数であるリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $x = y = 19$ である。

【0073】

30

一部の実施形態では、構造 1 の (N) x 又は構造 A 2 の N1 - (N) x は未修飾のリボヌクレオチドを含む。

【0074】

一部の実施形態では、構造 1 の (N) x 又は構造 A 2 の N1 - (N) x は、修飾された及び未修飾のリボヌクレオチドを含み、各修飾されたりボヌクレオチドは 2' -OMe 糖修飾のリボヌクレオチドであり、(N) x の 3' 末端における N は修飾されたりボヌクレオチドであり、(N) x は、3' 末端で開始する少なくとも 5 つの交互修飾されたりボヌクレオチド及び全部で少なくとも 9 つの修飾されたりボヌクレオチドを含み、残りの N はそれぞれ未修飾のリボヌクレオチドである。追加の実施形態では、(N) x は、5' 及び 3' 末端での各 N が 2' -OMe 糖修飾のリボヌクレオチドである交互位置では修飾されたりボヌクレオチドを含み、真ん中のリボヌクレオチド、たとえば、19 量体鎖の 10 位でのリボヌクレオチドは修飾されない。

40

【0075】

一部の実施形態では、構造 1 の (N) x 又は構造 A 2 の N1 - (N) x は、単一交互の 2' -O-メチル (2' -OMe) 糖修飾されたりボヌクレオチド及び未修飾のリボヌクレオチドを含み、たとえば、その際、1、3、5、7、9、11、13、15、17 及び 19 位におけるリボヌクレオチドは 2' -OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドである。他の実施形態では、2、4、6、8、11、13、15、17 及び 19 位におけるリボヌクレオチドが 2' -OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドであり、残りのリボヌクレオチドは修飾されない。

50

【0076】

一部の実施形態では、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yは、ミラーヌクレオチド、又は2', 5'ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接するヌクレオチドに連結されたヌクレオチドから選択される少なくとも1つの非定型の部分を含む。

【0077】

上記構造の一部の実施形態では、化合物は、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yの一方又は双方の末端にて少なくとも1つのミラーヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、化合物は、2つの連続するミラーヌクレオチドを含み、1つは構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yの3'末端から2番目の位置であり、1つは3'末端位置である。好まれる一実施形態では、x=y=19であり、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yは18位にてL-デオキシリボヌクレオチドを含む。

【0078】

一部の実施形態では、ミラーヌクレオチドは、L-リボヌクレオチド及びL-デオキシリボヌクレオチドから選択される。種々の実施形態では、ミラーヌクレオチドはL-デオキシリボヌクレオチドである。一部の実施形態では、y=19であり、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yは、1~17位及び19位における未修飾のリボヌクレオチド及び3'末端から2番目(18位)におけるL-DNA1つから成る。他の実施形態では、y=19であり、(N')yは、1~16位及び19位における未修飾のリボヌクレオチド及び3'末端から2番目での連続する2つのL-DNA(17及び18位)から成る。一部の実施形態では、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yはさらに、Z'、たとえば、C3OH及び/又はz"、たとえば、及び逆位脱塩基部分又はアミノ部分を含む。

【0079】

上記構造の別の実施形態では、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yは、一方又は双方の末端での2', 5'ホスホジエステル結合によって次のヌクレオチドと一緒に連結される少なくとも2つの連続するヌクレオチドを含む。構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yの特定の好まれる実施形態では、3'末端から2番目のヌクレオチドは2', 5'ホスホジエステル架橋によって3'末端のヌクレオチドに連結される。

【0080】

二本鎖RNA分子は、平滑末端(すなわち、z"、Z及びZ'が存在しない)の二本鎖オリゴヌクレオチド構造、x=y=19であり、構造A1における(N')y又は構造A2におけるN2-(N')yは、2', 5'ホスホジエステル結合によって3'末端での3つの連続するヌクレオチドと一緒に連結される未修飾のリボヌクレオチド及び未修飾リボヌクレオチドと2'-OMe糖修飾のリボヌクレオチドが交互にあるアンチセンス鎖(AS)を含む。

【0081】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号: 13~5846(TLR2を標的とする)、配列番号: 5847~12144(TLR4を標的とする)、配列番号: 12145~16332(MYD88を標的とする)、配列番号: 16333~18242(TICAM1を標的とする)及び配列番号: 18243~20606(TIRAPを標的とする)で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1~5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド; 1、5、6又は7位(5'>3')の少なくとも1つにおけるTNA、2', 5'リボヌクレオチド、ミラーヌクレオチド、UNA又は脱塩基部分; 及び3'末端に共有結合する3'末端の非ヌクレオチド部分を含み; 並びにセンス鎖は、少なくとも1つの2', 5'リボヌクレオチド又は2'-OMe糖修飾されたリボヌクレオチド及び3'末端に共有結合する非

10

20

30

40

50

ヌクレオチド部分及び5'末端に共有結合するキャップ部分を含む。

【0082】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、7位におけるTNA又は2', 5'リボヌクレオチド、及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分を含み；センス鎖は、3'末端の16～19位又は15～19位（5'>3'）における4～5の連続した2', 5'リボヌクレオチド又はTNA、3'末端で共有結合する非ヌクレオチド部分及び5'末端で共有結合する逆位脱塩基部分のようなキャップ部分を含み、任意でアンチセンス鎖の1位にて2'-OMe糖修飾されたリボヌクレオチド又はアンチセンス鎖の1位にて2', 5'リボヌクレオチドを含む。

10

【0083】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、7位における2', 5'リボヌクレオチド、及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又はC3Pi-C3OH非ヌクレオチド部分を含み；及びセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、9位におけるTNA又は2', 5'リボヌクレオチド、及び3'末端で共有結合するC3OH又はC3Piの非ヌクレオチド部分、及び5'末端に共有結合する逆位脱塩基部分のようなキャップ部分を含む。

20

【0084】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド；3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分；及び5'末端で共有結合するキャップ部分を含み；並びにアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド；5、6又は7位の少なくとも1つにおけるTNA又は2', 5'リボヌクレオチド；及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分を含む。

30

40

【0085】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分；及び5'末端で共有結合するキャッ

50

ブ部分を含み；並びにアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド；7位におけるTNA又は2', 5'リボヌクレオチド；及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分を含む。

【0086】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド；3'末端で共有結合するC3OH部分；及び5'末端で共有結合する逆位脱塩基デオキシリボヌクレオチド部分のようなキャップ部分を含み；並びにアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド；7位（5'>3'）におけるTNA又は2', 5'リボヌクレオチド；及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又はC3Pi-C3OH非ヌクレオチド部分を含む。

【0087】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、3'末端における2', 5'リボヌクレオチド；3'末端に共有結合する非ヌクレオチド部分及び5'末端に共有結合するキャップ部分を含み；並びにアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド；5、6又は7位（5'>3'）の少なくとも1つにおけるTNA又は2', 5'リボヌクレオチド；及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分を含む。

【0088】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、（5'>3'）15～19位又は16～19位における4～5の連続するTNA又は2', 5'リボヌクレオチド、3'末端で共有結合するC3～OH3'部分及び5'末端で共有結合する逆位脱塩基デオキシリボヌクレオチド部分のようなキャップ部分を含み；並びにアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド；7位におけるTNA又は2', 5'リボヌクレオチド；及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又はC3Pi-C3OH部分を含む。

【0089】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、9又は10位の1つにおける任意の2', 5'リボヌクレオチド、3'末端で共有結合する非ヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド部分及び5'末端で共有結合するキャップ部分を含み；並びにアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチド、5、6又は7位の少なくとも1つにおけるTNA又は2'5'リボヌクレオチド、及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分を含む。

【0090】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、9位における2'，5'リボヌクレオチド、3'末端で共有結合するC3OH非ヌクレオチド部分及び5'末端で共有結合する逆位脱塩基デオキシリボヌクレオチド部分のようなキャップ部分を含み；且つアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、6位におけるTNA又は2'，5'リボヌクレオチド、及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又はC3Pi-C3OH部分を含む。

【0091】

一実施形態では、二本鎖核酸分子は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）で示されるオリゴヌクレオチドの対、又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対から選択されるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、センス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、3'末端で共有結合するC3OH又はC3Piの非ヌクレオチド部分、及び5'末端で共有結合する逆位脱塩基デオキシリボヌクレオチド部分のようなキャップ部分を含み；且つアンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチド、6位における2'，5'リボヌクレオチド、及び3'末端で共有結合するヌクレオチド部分又はC3Pi-C3OH部分を含む。

【0092】

一実施形態では、3'末端で共有結合するヌクレオチド部分はジヌクレオチドdT dTを含む。

【0093】

態様の1つによれば、本発明は、TLR2を標的とする配列番号：13～3060；TLR4を標的とする配列番号：5847～8612；MYD88を標的とする配列番号：12145～13924；TICAM1を標的とする配列番号：16333～16882；又はTIRAPを標的とする配列番号：18243～19046で示されるオリゴヌクレオチド配列を有するセンス鎖及びアンチセンス鎖から成る二本鎖RNA分子を生成する方法を提供し、該方法は、

(a) センス鎖を合成する工程と

(b) アンチセンス鎖を合成する工程と

(c) アンチセンス鎖にセンス鎖をアニーリングする工程を含み、

それによって二本鎖RNA分子を生成することを含む。一実施形態では、合成には、化学的に修飾されていないdsRNA鎖の合成が含まれる。一実施形態では、合成には、2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチド、又は2'，5'結合した核酸、脱塩基及び逆位脱塩基の部分等を含む非定型の部分を含む修飾されたヌクレオチドの取り込みが含まれる。

【0094】

一実施形態では、(N)xも(N')yも3'及び5'の末端でリン酸化されない

。他の実施形態では、(N) x 及び (N') y のいずれか又は双方が 3' 末端でリン酸化される。

【0095】

第2の態様では、本明細書で提供されるのは、標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な量での本明細書で開示されるような1以上の二本鎖分子及び薬学上許容可能なキャリアを含む医薬組成物であり、標的遺伝子は、配列番号1～12で示されるmRNAを有する遺伝子から選択される。

【0096】

別の態様では、提供されるのは、標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な量での本明細書で開示されるような1以上の二本鎖分子を含む細胞である。

10

【0097】

種々の実施形態では、化合物は、配列番号：13～5846 (TLR2を標的とする)、配列番号：5847～12144 (TLR4を標的とする)、配列番号：12145～16332 (MYD88を標的とする)、配列番号：16333～18242 (TICAM1を標的とする) 及び配列番号：18243～20606 (TIRAPを標的とする) で示されるオリゴヌクレオチドの対、アンチセンスオリゴヌクレオチド (N) x 及び対応するセンスオリゴヌクレオチド、又は以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対を含む。

【0098】

他の態様では、開示されるのは、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又はそれが必要な対象における肺移植のような臓器移植における一次移植片機能不全 (PGD) を予防する又は治療するのに有用なオリゴヌクレオチド化合物である。

20

【0099】

標的遺伝子の発現を低下させる又は阻害する量の本明細書で開示されるような二本鎖分子を対象に投与することを含む、標的遺伝子の発現に関連する疾患又は障害に関連する疾患又は障害又は症状の治療を必要とする対象を治療する方法である。好まれる実施形態では、二本鎖分子は本明細書で記載されるように化学的に修飾される。

【0100】

また提供されるのは、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は肺移植のような臓器移植における一次移植片機能不全 (PGD) から選択される疾患又は傷害の治療のための本明細書で記載されるような二本鎖分子である。

30

【0101】

さらに提供されるのは、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は肺移植のような臓器移植における一次移植片機能不全 (PGD) から選択される疾患又は傷害の治療のために薬物を調製するための本明細書で記載されるような二本鎖分子である。

40

【0102】

他の態様では、開示は、それが必要な対象における一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全 (PGD) から選択されるが、これらに限定されない移植後 (たとえば、肺移植の後) 合併症の発生又は重症度を治療する又は防ぐ方法に関するものであり、その際、合併症は表A1で示される遺伝子から選択される遺伝子の発現に関連する。そのような方法には、そのような治療を必要とする哺乳類に予防上又は治療上有効な量の本明細書で開示される1以上の二本鎖分子を投与して少なくとも1つのそのような遺伝子の発現又は活性を阻害する又は低下させることが関与する。他の態様では、開示は、それを必要とする対象において急性又は慢性の炎症を抑える方法に関するものであり、その際、炎症は表A1

50

で示される遺伝子から選択される遺伝子の発現に関連する。そのような方法には、そのような治療を必要とする哺乳類に予防上又は治療上有効な量の本明細書で開示される1以上の二本鎖分子を投与して少なくとも1つのそのような遺伝子の発現又は活性を阻害する又は低下させることが関与する。

【0103】

一部の実施形態では、臓器移植のレシピエント（たとえば、肺移植のレシピエント）にて移植後の合併症が存在し、標的遺伝子は、配列番号1～12で示されるmRNAのポリヌクレオチド配列を有するTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPから選択される。TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの発現を阻害するためにdsRNAを調製するのに有用なセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドの対は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）又は好ましくは以下の表1～5で示されるオリゴヌクレオチドの対で示される。

10

【0104】

ここに記載される方法、物質及び例は、説明に役立つのみであって、限定を意図するものではない；本明細書で記載されるものに類似する又は同等である物質及び方法を本発明の実践又は試験で 사용할 ことができる。本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及びクレームから明らかとなるであろう。

20

【0105】

本開示は、本明細書における種々の実施形態で開示される特徴の組み合わせの適用及び変異のいずれか及びすべてを網羅するように意図される。特定の実施形態が本明細書で説明され、記載されるが、本発明は同一目的を達成するこれら実施形態の特徴の任意の配置を包含することが十分に理解されるべきである。本明細書で具体的に述べられない実施形態を形成する上記特徴の組み合わせは本記載を見直す際、当業者に明らかであろう。

【発明を実施するための形態】

【0106】

本発明は一般に、移植後（たとえば、肺移植後）合併症に関連する特定の標的遺伝子の発現を下方調節する化合物及びそのような移植後合併症に関連する疾患又は障害に罹っている対象を治療することにおけるその使用に関する。TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPから選択される標的遺伝子の1以上の発現の阻害は今や、臓器移植、たとえば、肺移植の有害効果；さらに具体的には、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全（PGD）から選択されるが、これらに限定されない移植後（たとえば、肺移植後）合併症に苦しむ対象を治療するのに有益であることが示される。本発明は特に、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの発現を阻害する干渉RNA（siRNA）化合物のような小分子の二本鎖RNA分子及び特定の疾患及び障害の治療におけるこれらsiRNA化合物の使用に関する。dsRNA化合物の調製で有用な好まれるセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドは、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）にて示される。

30

40

【0107】

配列番号1～12のいずれか1つで示されるmRNAを有する標的遺伝子を阻害するための化合物、組成物及び方法が本明細書で詳細に議論され、前記化合物及び／又は組成物のいずれかが移植後に遭遇する移植後（たとえば、肺移植後）合併症に苦しむ患者の治療に有益に採用される。

【0108】

50

本明細書で提供されるのは、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP遺伝子から選択される標的遺伝子の生体内での発現を阻害するための組成物及び方法である。一般に、方法は、配列番号：1（TLR2のmRNA）；配列番号：2～4（TLR4のmRNA），配列番号：5～9（MYD88のmRNA），配列番号：10（TICAM1のmRNA）又は配列番号：11～12（TIRAPのmRNA）から選択されるmRNAを標的とする小分子干渉RNA（すなわち、siRNA）を含むdsRNA化合物のようなオリゴヌクレオチドを投与することを含む。

【0109】

化学的に修飾されたdsRNA化合物を対象に送達する方法が本明細書で詳細に議論され、前記分子及び／又は組成物が本明細書で開示される疾患及び障害で苦しんでいる対象の治療で有益に採用され得る。治療は完全であってもよいし、又は部分的であってもよく、当業者によって容易に決定され得る。

10

【0110】

本明細書で開示される化合物は未修飾のdsRNA化合物と比べると活性を高め、安定性を高め、毒性をできるだけ抑え、オフターゲット効果を低下させ、及び／又は免疫応答を低下させる構造及び修飾を持ち、本明細書で開示されるdsRNAの新規の修飾は、特に本明細書で議論される標的遺伝子における標的遺伝子の発現を妨げる又は減衰させるのに有用な二本鎖オリゴヌクレオチド配列に有益に適用される。

【0111】

本明細書で開示される標的遺伝子の詳細を以下の表A1にて提示する。

20

【0112】

【表 1】

表A1標的遺伝子

標的遺伝子	配列番号、完全な名称、g i 及び受入番号
TLR2	配列番号:1 >gi 68160956 ref NM_003264.3 ヒト T o l l 様受容体 2 (TLR2), mRNA
TLR4	配列番号:2 >gi 207028620 ref NM_138554.3 ヒト T o l l 様受容体 4 (TLR4), 転写変異体 1, mRNA 配列番号:3 >gi 207028451 ref NR_024168.1 ヒト T o l l 様受容体 4 (TLR4), 転写変異体 3, 非コーディング RNA 配列番号:4 >gi 207028550 ref NR_024169.1 ヒト T o l l 様受容体 4 (TLR4), 転写変異体 4, 非コーディング RNA
MYD88	配列番号:5 >gi 197276653 ref NM_002468.4 ヒト 骨髄分化一次応答遺伝子 (88) (MYD88), mRNA 配列番号:6 >gi 289546502 ref NM_001172567.1 ヒト 骨髄分化一次応答遺伝子 (88) (MYD88), 転写変異体 1, mRNA 配列番号:7 >gi 289546580 ref NM_001172568.1 ヒト 骨髄分化一次応答遺伝子 (88) (MYD88), 転写変異体 3, mRNA 配列番号:8 >gi 289546652 ref NM_001172569.1 ヒト 骨髄分化一次応答遺伝子 (88) (MYD88), 転写変異体 4, mRNA 配列番号:9 >gi 289546499 ref NM_001172566.1 ヒト 骨髄分化一次応答遺伝子 (88) (MYD88), 転写変異体 5, mRNA
TICAM1	配列番号:10 >gi 197209874 ref NM_182919.2 ヒト T o l l 様受容体アダプター分子 1 (TICAM1, TRIF), mRNA
TIRAP	配列番号:11 >gi 89111123 ref NM_148910.2 ヒト T o l l ーインタヘロイキン受容体 1 (TIR) ドメイン含有のアダプタータンパク質 (TIRAP), 転写変異体 2, mRNA 配列番号:12 >gi 89111121 ref NM_001039661.1 ヒト T o l l ーインタヘロイキン 1 受容体 (TIR) ドメイン含有のアダプタータンパク質 (TIRAP), 転写変異体 3, mRNA

10

20

30

40

【0113】

表 A 1 は、本明細書で開示されるようなオリゴヌクレオチド阻害剤が指向するヒト mRNA の例となるポリヌクレオチド配列についての g i (Gene Identifier) 及び受入番号を提供する。

【0114】

表 A 1 で示される mRNA ポリヌクレオチドのいずれか 1 つの阻害は、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、臓器移植（たとえば肺移植）における移植後合併症、たとえば、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全（PGD）を予防する、治療する及

50

び／又は減衰させるのに有用である。

【0115】

種々の実施形態では、開示されるのは、小分子干渉RNA (siRNA) を含む化学的に修飾されたdsRNA分子及び臓器移植、たとえば、肺移植患者における種々の移植後合併症の予防及び治療におけるdsRNAの使用である。治療される疾患及び状態は、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全(PGD)に向けられる。

【0116】

dsRNA化合物を合成するのに有用な好まれるセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドのリストは、配列番号：13～5846 (TLR2を標的とする)、配列番号：5847～12144 (TLR4を標的とする)、配列番号：12145～16332 (MYD88を標的とする)、配列番号：16333～18242 (TICAM1を標的とする) 及び配列番号：18243～20606 (TIRAPを標的とする) にて提供される。dsRNA化合物の合成に有用な18量体及び19量体のセンスオリゴヌクレオチド及び対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトの遺伝子発現を標的とするための最良の配列として所有権のあるアルゴリズムに従ってそのスコアに基づいて優先順位が付けられる。標的遺伝子を阻害する分子、組成物及び方法が本明細書で詳細に議論され、前記分子及び／又は組成物のいずれかが前記移植後合併症に苦しむ患者の治療に有益に採用される。

【0117】

構造的設計

態様の1つでは、本明細書で提供されるのは、センス鎖とアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子であり、その際、少なくとも一方の鎖は、3'末端で共有結合する1、2、3、4又は5の非ヌクレオチド部分を含み、非ヌクレオチド部分はアルキル(炭化水素)部分又はその誘導体及びリン酸系部分から選択される。特定の好まれる実施形態では、少なくとも一方の鎖はアンチセンス鎖である。好まれる実施形態では、アンチセンス鎖は、以下で定義されるようなC3-C3; C3-C3-Pi; C3-C3-Ps; idAb-idAbを含む、3'末端で共有結合する2つの非ヌクレオチド部分を含む。

【0118】

種々の実施形態では、本明細書で提供されるのは、二本鎖核酸分子であり、その際、
(a) 核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み;
(b) 核酸分子の各鎖は独立して長さ17～40ヌクレオチドであり;
(c) アンチセンス鎖の17～40のヌクレオチド配列は、TLR2をコードするmRNA (たとえば、配列番号：1)、TLR4をコードするmRNA (たとえば、配列番号：2～4); MYD88をコードするmRNA (たとえば、配列番号：5～9; TICAM1をコードするmRNA (たとえば、配列番号：10) 又はTIRAPをコードするmRNA (たとえば、配列番号：11～12) から選択されるmRNAの配列に対して相補性であり; 且つ

(d) センス鎖の17～40のヌクレオチド配列は、アンチセンス鎖に対して相補性であり、TLR2をコードするmRNA (たとえば、配列番号：1)、TLR4をコードするmRNA (たとえば、配列番号：2～4); MYD88をコードするmRNA (たとえば、配列番号：5～9; TICAM1をコードするmRNA (たとえば、配列番号：10) 又はTIRAPをコードするmRNA (たとえば、配列番号：11～12) から選択されるmRNAの17～40のヌクレオチド配列を含む。

【0119】

一部の実施形態では、提供されるのは、構造(A1)を有する二本鎖核酸分子であり：

(A1) 5' (N) x-Z 3' (アンチセンス鎖)

3' Z'~(N') y-z" 5' (センス鎖)

式中、各N及びN'は、未修飾であってもよく又は修飾されてもよいヌクレオチド又は非

定型の部分であり；

式中、(N) x 及び (N') y のそれぞれは、各連続する N 又は N' が共有結合によって次の N 又は N' に連結されるオリゴヌクレオチドであり；

式中、Z 及び Z' の少なくとも一方が存在し、それが存在する鎖の 3' 末端にて共有結合する非ヌクレオチド部分を含み；

式中、z'' は、存在しても非存在であってもよいが、存在するならば、(N') y の 5' 末端にて共有結合するキャッピング部分であり；

式中、x 及び y のそれぞれは独立して 18～40 の間の整数であり；

式中、(N') y の配列は (N) x の配列に対して相補性を有し、(N) x の配列は配列番号 1～12 のいずれか 1 つで示される標的 RNA における連続配列に対して相補性を有する。

10

【0120】

一部の実施形態では、各連続する N 又は N' を連結する共有結合はホスホジエステル結合である。

【0121】

一部の実施形態では、 $x = y = 18 \sim 25$ 又は $19 \sim 27$ 、たとえば、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 である。一部の実施形態では、 $x = y$ であり、x 及び y のそれぞれは 19、20、21、22、又は 23 である。一部の実施形態では、 $x = y = 19$ である。

【0122】

一部の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、Z 又は Z' の一方が存在し、2 つの非ヌクレオチド部分から成る。

20

【0123】

一部の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、Z' が存在し、2 つの非ヌクレオチド部分から成る。

【0124】

一部の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、Z が存在し、2 つの非ヌクレオチド部分から成る。

【0125】

一部の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、Z が存在し、2 つの非ヌクレオチド部分から成り、Z' が存在し、1 つの非ヌクレオチド部分から成る。

30

【0126】

追加の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、Z 及び Z' が存在し、それぞれ独立して 2 つの非ヌクレオチド部分を含む。

【0127】

一部の実施形態では、二本鎖核酸分子は、DNA 部分又はアンチセンス鎖の 1 位 (5' 末端) にて標的に対するミスマッチを含む。そのような構造が本明細書で記載される。一実施形態によれば、提供されるのは以下で示される構造 (A2) を有する二本鎖核酸分子である：

(A2) 5' N¹ — (N) x — Z 3' (アンチセンス鎖)
3' Z' — N² — (N') y — z'' 5' (センス鎖)

40

式中、各 N²、N 及び N' は未修飾の又は修飾されたりボヌクレオチド又は非定型の部分であり；

式中、(N) x 及び (N') y のそれぞれは、各連続する N 又は N' が共有結合によって隣接する N 又は N' に連結するオリゴヌクレオチドであり；

式中、x 及び y のそれぞれは独立して 17～39 の間の整数であり；

式中、(N') y の配列は (N) x の配列に対して相補性を有し、(N) x は配列番号 1～12 で示される標的 RNA における連続配列に対して相補性を有し；

式中、N¹ は (N) x に共有結合し、標的 RNA に対してミスマッチがあり、又は標的 RNA に対して相補性の DNA 部分であり；

50

式中、 N^1 は、天然の又は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、アデノシン及びデオキシアデノシンから成る群から選択される部分であり；

式中、 z'' は存在してもしなくてもよいが、存在するのであれば、 $N^2 - (N')_y$ の 5' 末端にて共有結合されるキャッピング部分であり；

式中、 Z 又は Z' の少なくとも一方が存在し、それが存在する鎖の 3' 末端にて共有結合される非ヌクレオチド部分を含む。

【0128】

一部の実施形態では、 $x = y = 17 \sim 24$ 又は $18 \sim 23$ である。好まれる実施形態では、 $x = y = 18$ である。

【0129】

一部の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 Z' が存在し、2つの非ヌクレオチド部分から成る。

【0130】

好まれる実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 Z が存在し、2つの非ヌクレオチド部分から成る。

【0131】

好まれる実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 Z が存在し、2つの非ヌクレオチド部分から成り；且つ Z' が存在し、1つの非ヌクレオチド部分から成る。

【0132】

追加の $x = y = 18$ であり、 Z 及び Z' が存在し、それぞれ独立して2つの非ヌクレオチド部分を含む。

【0133】

一部の実施形態では、 $(N')_y$ の配列は $(N)_x$ の配列に対して完全に相補性である。種々の実施形態では、 $N^2 - (N')_y$ の配列は $N^1 - (N)_x$ の配列に対して相補性である。一部の実施形態では、 $(N)_x$ は標的 RNA における約 17 ～ 約 39 の連続するヌクレオチドに対して完全に相補性であるアンチセンスを含む。他の実施形態では、 $(N)_x$ は標的 RNA における約 17 ～ 約 39 の連続するヌクレオチドに対して実質的に相補性であるアンチセンスを含む。

【0134】

一部の実施形態では、 N^1 及び N^2 はワトソン／クリックの塩基対を形成する。一部の実施形態では、 N^1 及び N^2 は非ワトソン／クリックの塩基対を形成する。一部の実施形態では、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で形成される。

【0135】

一部の実施形態では、 $x = y = 18$ 、 $x = y = 19$ 又は $x = y = 20$ である。好まれる実施形態では、 $x = y = 18$ である。 $N^1 - (N)_x$ にて x が 18 である場合、 N^1 は 1 位を指し、2 ～ 19 位は $(N)_{18}$ に含まれる。 $N^2 - (N')_y$ にて x が 18 である場合、 N^2 は 19 位を指し、1 ～ 18 位は $(N')_{18}$ に含まれる。

【0136】

一部の実施形態では、 N^1 は $(N)_x$ に共有結合し、標的 RNA に対してミスマッチがある。種々の実施形態では、 N^1 は $(N)_x$ に共有結合し、標的 RNA に対して相補性である DNA 部分である。

【0137】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖の 1 位におけるウリジンはアデノシン、デオキシアデノシン、デオキシウリジン (dU)、リボチミジン又はデオキシチミジンから選択される N^1 によって置換される。種々の実施形態では、 N^1 はアデノシン、デオキシアデノシン又はデオキシウリジンから選択される。

【0138】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖の 1 位におけるグアノシンはアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン、デオキシウリジン、リボチミジン又はデオキシチミジンから選

10

20

30

40

50

択される N^1 によって置換される。種々の実施形態では、 N^1 はアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン又はデオキシウリジンから選択される。

【0139】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖の1位におけるシチジンはアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン、デオキシウリジン、リボチミジン又はデオキシチミジンから選択される N^1 によって置換される。種々の実施形態では、 N^1 はアデノシン、デオキシアデノシン、ウリジン又はデオキシウリジンから選択される。

【0140】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖の1位におけるアデノシンは、デオキシアデノシン、デオキシウリジン、リボチミジン又はデオキシチミジンから選択される N^1 によって置換される。種々の実施形態では、 N^1 は、デオキシアデノシン又はデオキシウリジンから選択される。

10

【0141】

一部の実施形態では、 N^1 及び N^2 はウリジン又はデオキシウリジンとアデノシン又はデオキシアデノシンとの間で塩基対を形成する。他の実施形態では、 N^1 及び N^2 はデオキシウリジンとアデノシンとの間で塩基対を形成する。

【0142】

一部の実施形態では、二本鎖核酸分子は、たとえば、siRNA、siNA、又はmiRNAのような二本鎖RNAである。本明細書で提供されるような二本鎖核酸分子は「二本鎖」とも呼ばれる。

20

【0143】

特定の好まれる実施形態では、 $x = y = 18$ である。一部の実施形態では、 N^1 及び N^2 はワトソン／クリック型の塩基対を形成する。他の実施形態では、 N^1 及び N^2 は非ワトソン／クリック型の塩基対を形成する。特定の実施形態では、 N^1 はリボアデノシン、修飾されたりボアデノシン、デオキシリボアデノシン、修飾されたデオキシリボアデノシンから成る群から選択される。他の実施形態では、 N^1 はリボウリジン、デオキシリボウリジン、修飾されたりボウリジン、修飾されたデオキシリボウリジンから成る群から選択される。

【0144】

特定の実施形態では、アンチセンス鎖の1位（5'末端）はデオキシリボウリジン（dU）又はアデノシンを含む。一部の実施形態では、 N^1 はリボアデノシン、修飾されたりボアデノシン、デオキシリボアデノシン、修飾されたデオキシリボアデノシンから成る群から選択され、 N^2 はリボウリジン、デオキシリボウリジン、修飾されたりボウリジン、修飾されたデオキシリボウリジンから成る群から選択される。特定の実施形態では、 N^1 はリボアデノシン及び修飾されたりボアデノシンから成る群から選択され、 N^2 はリボウリジン及び修飾されたりボウリジンから成る群から選択される。

30

【0145】

特定の実施形態では、 N^1 はリボウリジン、デオキシリボウリジン、修飾されたりボウリジン、修飾されたデオキシリボウリジンから成る群から選択され、 N^2 はリボアデノシン、修飾されたりボアデノシン、デオキシリボアデノシン、修飾されたデオキシリボアデノシンから成る群から選択される。特定の実施形態では、 N^1 はリボウリジン及びデオキシリボウリジンから成る群から選択され、 N^2 はリボアデノシン及び修飾されたりボアデノシンから成る群から選択される。特定の実施形態では、 N^1 はリボウリジンであり、 N^2 はリボアデノシンである。特定の実施形態では、 N^1 はデオキシリボウリジンであり、 N^2 はリボアデノシンである。

40

【0146】

構造（A2）の一部の実施形態では、 N^1 は2'-OMe糖修飾されたりボウラシル又は2'-OMe糖修飾されたりボアデノシンを含む。 N^1 は2'-フルオロ及び2'-アミノ糖修飾されたりボウラシル又は2'-フルオロ及び2'-アミノ糖修飾されたりボアデノシンを含む。構造（A2）の特定の実施形態では、 N^2 は2'-OMe糖修飾されたりボヌク

50

レオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含む。

【0147】

構造（A2）の一部の実施形態では、 N^1 は2'-OMe糖修飾されたりボウラシル又は2'-OMe糖修飾されたりボシトシンを含む。構造（A2）の特定の実施形態では、 N^2 は2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。

【0148】

以下の表、表A2は N^1 及び相当する N^2 の非限定例を提供する。

【0149】

【表2】

表A2

標的ヌクレオチド	標的に完全に一致するASの5'末端ヌクレオチド	N^1 (ASの5'末端位置)	N^2 (SENの3'末端位置)
A	U	rA, dA	rU, dU, rT, dT
A	U	dU, rT, dT	rA, dA
C	G	rA, dA	rU, dU, rT, dT
C	G	rU, dU, rT, dT	rA, dA
G	C	rA, dA	rU, dU, rT, dT
G	C	rU, dU, rT, dT	rA, dA
U	A	dA	rU, dU, rT, dT
U	A	dU, rT, dT	rA, dA

【0150】

一部の実施形態では、 N 及び N' のそれぞれは未修飾のヌクレオチドである。一部の実施形態では、 N 及び N' の少なくとも一方は化学的に修飾されたヌクレオチド又は非定型の部分である。一部の実施形態では、非定型の部分はミラーヌクレオチド、脱塩基リボース部分及び脱塩基デオキシリボース部分から選択される。一部の実施形態では、非定型の部分はミラーヌクレオチド、好ましくはL-DNA部分である。一部の実施形態では、 N 及び N' の少なくとも一方は2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドである。

【0151】

一部の実施形態では、 (N') yの配列は (N) xの配列に完全に相補性である。他の実施形態では、 (N') yの配列は (N) xの配列に実質的に相補性である。

【0152】

一部の実施形態では、 (N) xは標的RNAの約17～約39の連続するヌクレオチドに対して完全に相補性であるアンチセンス配列を含む。他の実施形態では、 (N) xは標的RNAの約17～約39の連続するヌクレオチドに対して実質的に相補性であるアンチセンス配列を含む。

【0153】

一部の実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は、たとえば、siRNA、siRNA又はmiRNAのようなdsRNAである。

【0154】

構造A1及びA2の一部の実施形態では、 Z が存在し、 Z' は存在しない。他の実施形

10

20

30

40

50

態では、Z'が存在し、Zは存在しない。追加の実施形態では、Z及びZ'双方が存在する。一部の実施形態では、Z及びZ'が存在し、同一である。さらなる実施形態では、Z及びZ'が存在し、異なる。一部の実施形態では、Z及びZ'は独立して2、3、4又は5の非ヌクレオチド部分又は2、3、4又は5の非ヌクレオチド部分とヌクレオチドの組み合わせである。一部の実施形態では、Z及びZ'のそれぞれは、ホスホジエステル結合を介してdsRNAの3'末端に共有結合する2つの非ヌクレオチド部分から成る。

【0155】

非ヌクレオチド部分は、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、アルキル部分又はその誘導体、及び無機リン酸から成る群から選択される。一部の実施形態では、非ヌクレオチド部分はアルキル部分又はその誘導体である。一部の実施形態では、アルキル部分はアルコール、末端アミン、末端リン酸及び末端ホスホロチオエート部分から成る群から選択される末端官能基を含む。

【0156】

一部の実施形態では、Zは存在し、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、炭化水素部分又はその誘導体、及び無機リン酸から成る群から選択される1以上の非ヌクレオチド部分を含む。一部の実施形態では、Zは存在し、2つのアルキル部分又はその誘導体から成る。

【0157】

追加の実施形態では、Z'は存在し、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、炭化水素部分、及び無機リン酸から成る群から選択される1以上の非ヌクレオチド部分を含む。一部の実施形態では、Z'は存在し、1以上のアルキル部分又はその誘導体から成る。

【0158】

一部の実施形態では、Zは存在し、2つのアルキル部分又はその誘導体から成り、Z'は存在し、単一のアルキル部分又はその誘導体から成る。

【0159】

一部の実施形態では、Z及び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（本明細書ではdAbとも呼ぶ）又はリボ脱塩基部分（本明細書ではrAbとも呼ぶ）を含む。一部の実施形態では、Z及び／又はZ'のそれぞれは、2つの共有結合した脱塩基部分を含み、たとえば、5'>3' dAb-dAb又はrAb-rAb又はdAb-rAb又はrAb-dAbである。各部分は共有結合、好ましくはホスホ系の結合を介して隣接部分と共有結合する。一部の実施形態では、ホスホ系の結合はホスホロチオエート結合、ホスホロアセテート結合又はホスホジエステル結合である。

【0160】

一部の実施形態では、Z及び／又はZ'のそれぞれは独立してC2、C3、C4、C5又はC6のアルキル部分、任意でC3〔プロパン、-(CH₂)₃-〕部分又はその誘導体、たとえば、プロパノール（C3-OH）、プロパンジオール、又はプロパンジオールのホスホジエステル誘導体（「C3Pi」）を含む。好まれる実施形態では、Z及び／又はZ'のそれぞれは2つの炭化水素部分を含み、一例ではC3-C3である。各C3は共有結合、好ましくはホスホ系の結合を介して隣接C3と共有結合する。一部の実施形態では、ホスホ系の結合はホスホロチオエート結合、ホスホロアセテート結合又はホスホジエステル結合である。

【0161】

一部の実施形態では、Z及び／又は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、それらの組み合わせ又はそれらの複数から選択される。

【0162】

非限定の例となる非ヌクレオチド部分を以下の図に示す。

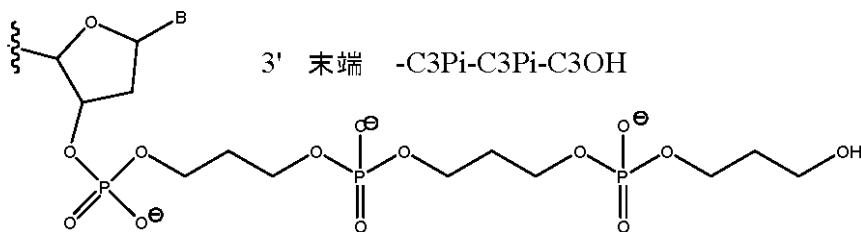
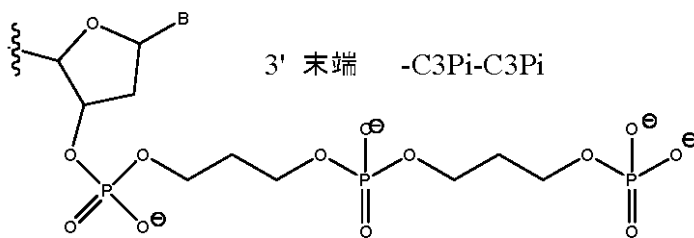
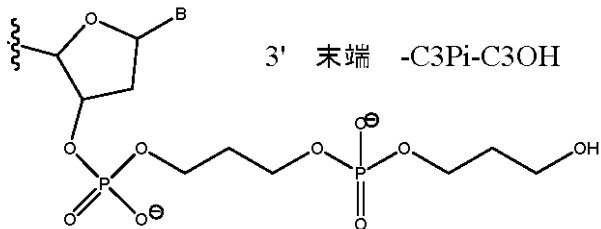
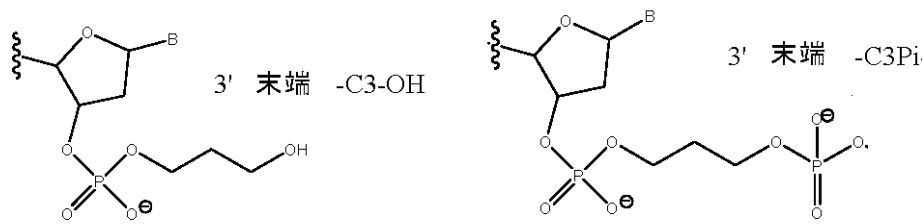
10

20

30

40

【化 1】



【0163】

構造 A 1 及び構造 A 2 の一部の実施形態では、Z 又は Z' の少なくとも一方が存在し、それが存在する鎖に共有結合する少なくとも 2 つの非ヌクレオチド部分を含む。一部の実施形態では、Z 又は Z' のそれぞれは独立して C 3 アルキル、C 3 アルコール又は C 3 エステルの部分を含む。一部の実施形態では、Z' は存在せず、Z が存在し、非ヌクレオチド C 3 部分を含む。一部の実施形態では、Z は存在せず、Z' が存在し、非ヌクレオチド C 3 部分を含む。

【0164】

構造 A 1 及び A 2 の一部の実施形態では、N 及び N' のそれぞれは未修飾のヌクレオチドである。一部の実施形態では、N 又は N' の少なくとも一方は化学的に修飾されたヌクレオチド又は非定型の部分である。一部の実施形態では、非定型の部分は、ミラーヌクレオチド、脱塩基リボース部分及び脱塩基デオキシリボース部分から選択される。一部の実施形態では、非定型の部分はミラーヌクレオチド、好ましくは L-DNA 部分である。一部の実施形態では、N 又は N' の少なくとも一方は 2'-OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。

【0165】

一部の実施形態では、(N')_y の配列は (N)_x の配列に完全に相補性である。他の

実施形態では、 (N') y の配列は (N) x の配列に実質的に相補性である。

【0166】

他の実施形態では、構造 A 1 又は構造 A 2 の化合物は糖残基にて修飾された少なくとも 1 つのリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、化合物は糖残基における 2' 位での修飾を含む。一部の実施形態では、2' 位での修飾にはアミノ、フルオロ、アルコキシ又はアルキルの部分の存在が含まれる。特定の実施形態では、2' 位での修飾にはアルコキシ部分が含まれる。好まれる実施形態では、アルコキシ部分はメトキシ部分 (2'-O-メチル; 2'-OMe; 2'-OCH₃としても知られる) である。一部の実施形態では、核酸化合物は、アンチセンス鎖及びセンス鎖の一方又は双方にて 2'-OMe 糖修飾された交互のリボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、化合物はアンチセンス鎖、 (N) x 又は $N^1 - (N)$ x のみにて 2'-OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、アンチセンス鎖の真ん中のリボヌクレオチド、たとえば、19 量体鎖における 10 位のリボヌクレオチドは修飾されない。種々の実施形態では、核酸化合物は少なくとも 5 つの交互の 2'-OMe 糖修飾された及び未修飾のリボヌクレオチドを含む。追加の実施形態では、構造 A 1 又は構造 A 2 の化合物は、交互の位置にて修飾されたりボヌクレオチドを含み、 (N) x 又は $N^1 - (N)$ x の 5' 及び 3' 末端での各リボヌクレオチドは糖残基で修飾され、 (N) y 又は $N^2 - (N)$ y の 5' 及び 3' 末端での各リボヌクレオチドは糖残基で未修飾である。

10

【0167】

一部の実施形態では、二本鎖分子は以下の修飾の 1 以上を含む。

20

(a) アンチセンス鎖の 5' 末端から 5、6、7、8 又は 9 位の少なくとも 1 つにおける N は 2' , 5' ヌクレオチド又はミラーヌクレオチドから選択される;

(b) センス鎖の 5' 末端から 9 又は 10 位の少なくとも 1 つにおける N' は 2' , 5' ヌクレオチド又はシュードウリジンから選択される;

(c) (N') y の 3' 末端位置での連続する 4、5 又は 6 位における N' は 2' , 5' ヌクレオチドを含む。

【0168】

一部の実施形態では、二本鎖分子は以下の修飾の組み合わせを含む。

(a) アンチセンス鎖は 5' 末端から 5、6、7、8 又は 9 位の少なくとも 1 つにて 2' , 5' ヌクレオチド又はミラーヌクレオチドを含み; 且つ

30

(b) センス鎖は 5' 末端から 9 又は 10 位にて 2' , 5' ヌクレオチド及びシュードウリジンの少なくとも 1 つを含む。

【0169】

一部の実施形態では、二本鎖分子は以下の修飾の組み合わせを含む。

(a) アンチセンス鎖は 2' , 5' ヌクレオチド又は 5' 末端から 5、6、7、8 又は 9 位の少なくとも 1 つにてミラーヌクレオチドを含み; 且つ

(c) センス鎖は 3' 末端から 2 番目又は 3' 末端の位置にて 4、5 又は 6 の連続する 2' , 5' ヌクレオチドを含む。

【0170】

一部の実施形態では、センス鎖 $[(N)$ x 又は $N^1 - (N)$ x] は 1、2、3、4、5、6、7、8、又は 9 の 2'-OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、2、4、6、8、11、13、15、17 及び 19 位にて 2'-OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、アンチセンス鎖は 1、3、5、7、9、11、13、15、17 及び 19 位にて 2'-OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、アンチセンス鎖は 3、5、7、9、11、13、15、17 及び 19 位にて 2'-OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は 1 以上の 2'-OMe 糖修飾されたピリミジンを含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖におけるピリミジンヌクレオチドはすべて 2'-OMe 糖修飾される。一部の実施形態では、センス鎖は 2'-OMe 糖修飾されたピリミジンを含む。

40

50

【0171】

構造A1及び構造A2の一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は独立して3'末端及び5'末端にてリン酸化される又はリン酸化されない。構造A1及び構造A2の一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は3'及び5'の末端にてリン酸化されない。他の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は3'末端にてリン酸化される。

【0172】

構造A1及び構造A2の一部の実施形態では、(N)yはミラーヌクレオチド、2', 5'ヌクレオチド及びTNAから選択される少なくとも1つの非定型の部分を含む。一部の実施形態では、非定型の部分はミラーヌクレオチドである。種々の実施形態では、ミラーヌクレオチドはL-リボヌクレオチド(L-RNA)及びL-デオキシリボヌクレオチド(L-DNA)から選択される。好まれる実施形態では、ミラーヌクレオチドはL-DNAである。特定の実施形態では、センス鎖は(5'末端から)9又は10位にて非定型の部分を含む。好まれる実施形態では、センス鎖は(5'末端から)9位にて非定型の部分を含む。一部の実施形態では、センス鎖は長さ19ヌクレオチドであり、(5'末端から)15位にて4、5又は6の連続する非定型の部分を含む。一部の実施形態では、センス鎖は15、16、17及び18位にて4の連続する2', 5'ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、センス鎖は15、16、17、18及び19位にて5の連続する2', 5'ヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、センス鎖はさらにZ'を含む。一部の実施形態では、Z'はC3OH部分又はC3Pi部分を含む。

【0173】

構造A1の一部の実施形態では、(N')yは少なくとも1つのL-DNAを含む。一部の実施形態では、 $x=y=19$ であり、(N')yは1~17及び19位における未修飾のリボヌクレオチド及び3'末端の2番目の位置(18位)における1つのL-DNAから成る。他の実施形態では、 $x=y=19$ であり、(N')yは1~16及び19位における未修飾のリボヌクレオチド及び3'末端の2番目の位置(17及び18位)における2つのL-DNAから成る。種々の実施形態では、非定型の部分は2', 5'ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドである。種々の実施形態によれば、(N')yは2', 5'ヌクレオチド間リン酸結合によって連結される3'末端での2、3、4、5又は6の連続するリボヌクレオチドを含む。一実施形態では、(N')yの3'末端における4つの連続するヌクレオチドは3つの2', 5'ホスホジエステル結合によって連結され、その際、2', 5'ホスホジエステル結合を形成する2', 5'ヌクレオチドの1以上が3'-O-メチル(3'-OMe)糖修飾をさらに含む。好ましくは、(N')yの3'末端のヌクレオチドは2'-OMe糖修飾を含む。特定の実施形態では、 $x=y=19$ であり、(N')yは、15、16、17、18及び19位にて2以上の連続するヌクレオチドを含み、2', 5'ヌクレオチド間結合(2', 5'ヌクレオチド)によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、2', 5'ヌクレオチド間結合を形成するヌクレオチドは3'デオキシリボースヌクレオチド又は3'メトキシヌクレオチド(3'OHの代わりに3'H又は3'OMe)を含む。一部の実施形態では、 $x=y=19$ であり、(N')yは、15~16、16~17及び17~18位の間で隣接するヌクレオチドが2', 5'ヌクレオチド間結合によって連結されるように15、16及び17位にて、又は15~16、16~17、17~18及び18~19位の間で隣接するヌクレオチドが2', 5'ヌクレオチド間結合によって連結されるように15、16、17、18及び19位にて2', 5'ヌクレオチドを含み、16~17、17~18及び18~19位の間で隣接するヌクレオチドが2', 5'ヌクレオチド間結合によって連結されるように3'OHが、3'末端ヌクレオチドにて又は16、17及び18位にて利用可能である。一部の実施形態では、 $x=y=19$ であり、(N')yは、それぞれ、16~17及び17~18位間で又は17~18及び18~19位間で又は15~16及び17~18位間で2', 5'ヌクレオチド間結合によって隣接するヌクレオチドが連結されるように、16及び17位又は17及び18位

又は15及び17位にて2', 5'ヌクレオチドを含む。他の実施形態では、(N')yにおけるピリミジンリボヌクレオチド(rU、rC)は2', 5'ヌクレオチド間結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドで置換される。一部の実施形態では、x=y=19であり、(N')yは、4つの2', 5'結合、特にヌクレオチド位置15~16、16~17、17~18及び18~19の間での結合によって連結される3'末端における5つの連続するヌクレオチドを含む。

【0174】

一部の実施形態では、x=y=19であり、(N')yは、4つの2'5'結合によって連結される3'末端における5つの連続するヌクレオチドを含み、任意でさらに、逆位脱塩基部分及びC3アルキル[C3; 1,3-プロパンジオールモノ(リン酸二水素)]
10
キャップから独立して選択されるZ'及びz'を含む。一部の実施形態では、C3アルキルキャップは3'又は5'末端のヌクレオチドに共有結合する。一部の実施形態では、3'のC3末端キャップはさらに3'リン酸を含む。一部の実施形態では、3'のC3末端キャップはさらに3'末端ヒドロキシル基を含む。

【0175】

一部の実施形態では、x=y=19であり、(N')yは、18位にてL-DNAを含み、(N')yは任意でさらに逆位脱塩基部分及びC3アルキル[C3; 1,3-プロパンジオールモノ(リン酸二水素)]
20
キャップから独立して選択されるZ'及びz'を含む。

【0176】

一部の実施形態では、(N')yは、3'末端のリン酸を含む(すなわち、3'末端でリン酸化される)。一部の実施形態では、(N')yは、3'末端のヒドロキシルを含む。

【0177】

一部の実施形態では、x=y=19であり、(N)xは1、3、5、7、9、11、13、15、17、19位又は2、4、6、8、11、13、15、17、19位にて2'-OMe糖修飾されたリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、x=y=19であり、(N)xは2'-OMe糖修飾されたピリミジンを含む。一部の実施形態では、(N)xにおけるピリミジンはすべて2'-OMe糖修飾を含む。

【0178】

構造A2の一部の実施形態では、x=y=18であり、N²はリボアデノシン部分である。一部の実施形態では、x=y=18であり、N²-(N')yは、4つの2', 5'結合、特にヌクレオチド位置15~16、16~17、17~18及び18~19の間での結合によって連結される3'末端における5つの連続するヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、結合はホスホジエステル結合を含む。一部の実施形態では、x=y=18であり、N²-(N')yは、4つの2', 5'結合によって連結される3'末端における5つの連続するヌクレオチドを含み、任意でさらに逆位脱塩基部分及びC3アルキル[C3; 1,3-プロパンジオールモノ(リン酸二水素)]
30
キャップから独立して選択されるZ'及びz'を含む。一部の実施形態では、x=y=18であり、N²-(N')yは、18位にてL-DNAを含み、任意でさらに逆位脱塩基部分及びC3アルキル[C3; 1,3-プロパンジオールモノ(リン酸二水素)]
40
キャップから独立して選択されるZ'及びz'を含む。一部の実施形態では、(N')yは、3'末端のリン酸を含む。一部の実施形態では、N²-(N')yは、3'末端のヒドロキシルを含む。一部の実施形態では、x=y=18であり、N¹-(N)xは、1、3、5、7、9、11、13、15、17、19位又は1、3、5、9、11、13、15、17、19位又は3、5、9、11、13、15、17位又は2、4、6、8、11、13、15、17、19位にて2'-OMe糖修飾されたリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、x=y=18であり、N¹-(N)xは、(5'末端から)11、13、15、17及び19位にて2'-OMe糖修飾されたリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、x=y=18であり、N¹-(N)xは、1、3、5、7、9、11、13、15、17、19位又は3、5
50

、7、9、11、13、15、17、19位にて2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $N^1 - (N)_x$ は、2、4、6、8、11、13、15、17、19位にて2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。

【0179】

一部の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $N^1 - (N)_x$ は、2'-OMe糖修飾されたピリミジンを含む。一部の実施形態では、 $(N)_x$ におけるピリミジンはすべて2'-OMe糖修飾を含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖はさらに、5、6又は7位(5' > 3')にてL-DNA又は2', 5'ヌクレオチドを含む。他の実施形態では、アンチセンス鎖はさらに、5~6位又は6~7位(5' > 3')におけるリボヌクレオチド間で2', 5'ヌクレオチド間結合を生成するリボヌクレオチドを含む。

10

【0180】

追加の実施形態では、 $N^1 - (N)_x$ はさらに、非ヌクレオチドのオーバーハングからなるZを含む。一部の実施形態では、非ヌクレオチドのオーバーハングはC3-C3[1, 3-プロパンジオールモノ(リン酸二水素)]₂である。

【0181】

構造A2の一部の実施形態では、 $(N)_y$ は少なくとも1つのL-DNAを含む。一部の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $(N')_y$ は、1~16及び18位における未修飾のリボヌクレオチドと3'末端の2番目の位置(17位)におけるL-DNAから成る。他の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $(N')_y$ は、1~15及び18位における未修飾のリボヌクレオチドと3'末端の2番目の位置(16及び17位)における2つの連続するL-DNAから成る。種々の実施形態では、非定型の部分は、2', 5'ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドである。種々の実施形態によれば、 $(N')_y$ は2', 5'ヌクレオチド間結合によって連結される3'末端における2、3、4、5又は6の連続するリボヌクレオチドを含む。一実施形態では、 $(N')_y$ の3'末端での4つの連続するヌクレオチドが2', 5'ホスホジエステル結合によって連結され、その際、2', 5'ホスホジエステル結合を形成する2', 5'ヌクレオチドの1以上がさらに3'-O~メチル(3'OMe)糖修飾を含む。好ましくは、 $(N')_y$ の3'末端のヌクレオチドは2'-OMe糖修飾を含む。特定の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $(N')_y$ において14、15、16、17及び18位における2以上の連続するヌクレオチドは2', 5'ヌクレオチド間結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、2', 5'ヌクレオチド間結合を形成するヌクレオチドは3'デオキシリボースヌクレオチド又は3'メトキシヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $(N')_y$ は、15~16、16~17及び17~18位の間に又は16~17及び17~18位の間に2', 5'ヌクレオチド間結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $x = y = 18$ であり、 $(N')_y$ は、14~15、15~16、16~17及び17~18位の間に、又は15~16、16~17及び17~18位の間に、又は16~17及び17~18位の間に、又は17~18位の間に、又は15~16及び17~18位の間に2', 5'ヌクレオチド間結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを含む。他の実施形態では、 $(N')_y$ におけるピリミジンリボヌクレオチド(rU、rC)は2', 5'ヌクレオチド間結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドで置換される。

20

30

40

【0182】

構造A1及び構造A2の一部の実施形態では、各Nは未修飾のリボヌクレオチドから成る。構造A1及び構造A2の一部の実施形態では、各N'は未修飾のリボヌクレオチドから成る。好まれる実施形態では、N及びN'の少なくとも1つは修飾されたりボヌクレオチド又は非定型の部分である。

【0183】

他の実施形態では、構造A1又は構造A2の分子は、糖残基で修飾された少なくとも1

50

つのリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、化合物は糖残基の2'位における修飾を含む。一部の実施形態では、2'位における修飾にはアミノ、フルオロ、アルコキシ又はアルキル部分の存在が含まれる。特定の実施形態では、2'の修飾にはアルコキシ部分が含まれる。好まれる実施形態では、アルコキシ部分はメトキシ部分(2'-O-メチル; 2'-OMe; 2'-OCH₃としても知られる)である。一部の実施形態では、核酸化合物はアンチセンス鎖及びセンス鎖の一方又は双方で2'-OMe糖修飾された交互のリボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、化合物は、アンチセンス鎖、(N)_x又はN¹-(N)_xにて2'-OMe糖修飾されたりリボヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、アンチセンス鎖の真ん中のリボヌクレオチド、たとえば、19量体鎖における10位のリボヌクレオチドは修飾されない。種々の実施形態では、核酸化合物は少なくとも5つの交互の2'-OMe糖修飾されたりリボヌクレオチドと未修飾のリボヌクレオチドを含む。

10

【0184】

追加の実施形態では、構造A1又は構造A2の化合物は、交互の位置で未修飾のリボヌクレオチドを含み、その際、(N)_x又はN¹-(N)_xの5'及び3'末端の各リボヌクレオチドはその糖残基で修飾され、(N')_y又はN²-(N')_yの5'及び3'末端の各リボヌクレオチドはその糖残基で修飾されない。

【0185】

一部の実施形態では、(N)_x又はN¹-(N)_xは2、4、6、8、11、13、15、17及び19位にて2'-OMeで修飾されたりリボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、(N)_x(N)_x又はN¹-(N)_xは1、3、5、7、9、11、13、15、17及び19位にて2'-OMeで修飾されたりリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、(N)_x又はN¹-(N)_xは2'-OMeで修飾されたピリミジンを含む。一部の実施形態では、(N)_x又はN¹-(N)_xにおけるピリミジンヌクレオチドはすべて2'-OMeで修飾される。一部の実施形態では、(N)_y又はN²-(N)_yは2'-OMeで修飾されたピリミジンを含む。追加の実施形態では、構造A1又は構造A2の化合物は交互の位置で修飾されたりリボヌクレオチドを含み、その際、(N)_x又はN¹-(N)_xの5'及び3'末端の各リボヌクレオチドはその糖残基で修飾され、(N')_y又はN²-(N')_yの5'及び3'末端の各リボヌクレオチドはその糖残基で修飾されない。

20

30

【0186】

本明細書で開示される核酸分子は、たとえば、Z及びz"が存在しない場合又はZ'が存在しない場合、一方の末端で平滑末端を有する。核酸分子は、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかに沿ってどの位置に位置してもよい修飾されたヌクレオチド又は非定型の部分によって修飾され得る。核酸分子は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15の修飾されたヌクレオチドを含み得る。核酸分子は、約1、2、3、4、5、6、7又は8の非定型の部分を含み得る。核酸分子は、約1、2、3、4、5、6、7又は8の、好ましくは1、2、3又は4の隣接する修飾されたヌクレオチド又は非定型の部分の群を含み得る。修飾された核酸は、センス鎖のみ、アンチセンス鎖のみ、又はセンス鎖とアンチセンス鎖の双方に存在し得る。一部の実施形態では、修飾されたヌクレオチドは、2'-O-メチルで修飾されたヌクレオチド、2'-デオキシフルオロで修飾されたヌクレオチド、2'-アミノで修飾されたヌクレオチドを含む2'-糖修飾されたヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、非定型の部分は、ミラーヌクレオチド(すなわち、L-DNA又はL-RNA)又は2', 5'結合を形成することができるヌクレオチド(2' 5'ヌクレオチド)を含む。

40

【0187】

本明細書で使用されるとき、用語「二本鎖領域」は、2つの相補性又は実質的に相補性のオリゴヌクレオチドが、通常ワトソン/クリック型塩基対によって又は二本鎖形成を可能にする任意の他の様式によって互いに塩基対を形成する二本鎖分子における領域を指す。たとえば、19ヌクレオチド単位を有するオリゴヌクレオチド鎖は19ヌクレオチド単

50

50

一部の実施形態では、Z 及び Z' のそれぞれは、脱塩基部分、任意でデオキシリボ脱塩基（本明細書では「d A b」と呼ぶ）部分又はリボ脱塩基（本明細書では「r A b」と呼ぶ）部分を含む。一部の実施形態では、Z 及び／又は Z' のそれぞれは d A b - d A b 又

は $rAb - rAb$ である。

【0197】

一部の実施形態では、Z 及び／又は Z' のそれぞれは独立してアルキル部分、任意でプロパンジオールのホスホジエステル誘導体 ($(CH_2)_3 - Pi$ 、「 C_3Pi 」とも呼ぶ) で修飾された部分を含む。一部の実施形態では、Z 及び／又は Z' は $C_3Pi - C_3Pi$ である。特定の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、Z は 2 つのプロパンジオール誘導体 $C_3 - C_3$ (すなわち、 $C_3 - Pi - C_3 - Pi$) を含む。種々の実施形態では、 C_3 部分はホスホジエステル結合を介してセンス鎖又はアンチセンス鎖の 3' 末端に共有結合する。

【0198】

追加の実施形態では、Z 及び／又は Z' は、1 以上の脱塩基部分と未修飾のヌクレオチドの組み合わせ、又は 1 以上の炭化水素部分と未修飾のヌクレオチドの組み合わせ、又は 1 以上の脱塩基部分と炭化水素部分の組み合わせを含む。そのような実施形態では、Z 及び／又は Z' は任意で $C_3 - rAb$ 又は $C_3 - dAb$ である。

【0199】

構造 A1 又は A2 に関するさらなる実施形態では、核酸分子はさらにアンチセンス鎖の 2、4、6、8、11、13、15、17 及び 19 位にて 2'-OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。追加の実施形態では、化合物はまたセンス鎖の 18 位にて L-DNA ヌクレオチドも含む。追加の実施形態では、化合物は 2', 5' ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを含む。追加の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、 $(N')_y$ における 15~19 又は 16~19 又は 17~19 位におけるヌクレオチドは 2', 5' ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接ヌクレオチドに連結される。一部の実施形態では、 $x = y = 19$ であり、 $(N')_y$ における 15~19 又は 16~19 又は 17~19 又は 15~18 又は 16~18 位におけるヌクレオチドは 2', 5' ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接ヌクレオチドに連結される。

【0200】

特定の実施形態によれば、本明細書で提供されるのは、1 以上の修飾されたヌクレオチドをさらに含む $siRNA$ のような $dsRNA$ 化合物であり、その際、修飾されたヌクレオチドは、糖部分、塩基部分又はヌクレオチド間結合部分にて修飾を持つ。

【0201】

一部の実施形態では、 $(N)_x$ は修飾されたりボヌクレオチド及び未修飾のリボヌクレオチドを含み、各修飾されたりボヌクレオチドは 2'-OMe 修飾されたりボヌクレオチドであり、 $(N)_x$ の 3' 末端における N は修飾されたりボヌクレオチドであり、 $(N)_x$ は 3' 末端で開始する少なくとも 5 つの交互の修飾されたりボヌクレオチド及び合計少なくとも 9 の修飾されたりボヌクレオチドを含み、残りの各 N は未修飾のリボヌクレオチドである。

【0202】

一部の実施形態では、 $(N)_x$ 及び $(N')_y$ の少なくとも一方が少なくとも 1 つのミラーヌクレオチドを含む。 $(N')_y$ における一部の実施形態では、少なくとも 1 つの非定型の部分が存在し、非定型の部分は、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、修飾された若しくは未修飾のデオキシリボヌクレオチド、ミラーヌクレオチド、2', 5' ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチド、又は本明細書で開示される任意の他の非定型の部分であり得る。

【0203】

一部の実施形態では、非定型の部分は L-DNA ミラーヌクレオチドであり；追加の実施形態では、少なくとも 1 つの非定型の部分が $(N')_y$ における 15、16、17 又は 18 位に存在する。一部の実施形態では、非定型の部分は、ミラーヌクレオチド、脱塩基リボース部分、及び脱塩基デオキシリボース部分から選択される。一部の実施形態では、非定型の部分は、ミラーヌクレオチド、好ましくは L-DNA 部分である。一部の実施形態では、L-DNA 部分は 17 位、18 位、又は 17 と 18 位に存在する。

【0204】

一部の実施形態では、(N) xは9の交互に存在する修飾されたりボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、(N) xは2位にて2'修飾されたヌクレオチドをさらに含む9交互に存在する修飾されたりボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、(N) xは、奇数の1、3、5、7、9、11、13、15、17、19位にて2'-OMe修飾されたりボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、(N) xは2位及び18位の一方又は双方で2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドをさらに含む。さらに他の実施形態では、(N) xは2、4、6、8、11、13、15、17、19位にて2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、(N) xにおける少なくとも1つのピリミジンリボヌクレオチドは2'-OMe糖修飾を含む。一部の実施形態では、(N) xにおけるピリミジンリボヌクレオチドはすべて2'-OMe糖修飾を含む。一部の実施形態では、(N) xにおける2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15のピリミジンリボヌクレオチドは2'-OMe糖修飾を含む。

【0205】

種々の実施形態では、z"が存在し、脱塩基リボース部分、デオキシリボース部分、逆位脱塩基リボース部分、デオキシリボース部分；C6-アミノ-Pi；ミラーヌクレオチドから選択される。

【0206】

核酸分子の一実施形態では、(N') yは、2'，5'ホスホジエステル結合によって連結される、(N') yの5'及び3'末端のいずれか又は双方にて少なくとも2つのヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、x=y=19であり；(N) xにおいてヌクレオチドは修飾されたりボヌクレオチドと未修飾のリボヌクレオチドの間で交互であり、各修飾されたりボヌクレオチドは2'-OMe修飾され、(N) xの真ん中に位置するリボヌクレオチドは未修飾であり；(N') yの3'末端にて3つのヌクレオチドが2つの2'，5'ホスホジエステル結合によって連結される。他の実施形態では、x=y=19であり；(N) xにおいてヌクレオチドは修飾されたりボヌクレオチドと未修飾のリボヌクレオチドの間で交互であり、各修飾されたりボヌクレオチドは2'-OMe修飾され、(N) xの真ん中に位置するリボヌクレオチドは未修飾であり；(N') yの5'末端にて4つの連続するヌクレオチドが3つの2'，5'ホスホジエステル結合によって連結される。さらなる実施形態では、(N) yの中央位置に位置する追加のヌクレオチドは2'-OMe修飾されたりボヌクレオチドであり得る。別の実施形態では、(N) xにおいてヌクレオチドは2'-OMe修飾されたりボヌクレオチドと未修飾のリボヌクレオチドの間で交互であり、(N') yにおいて5'末端の4つの連続するヌクレオチドは3つの2'，5'ホスホジエステル結合によって連結され、5'末端のヌクレオチド又は5'末端における2又は3の連続するヌクレオチドは3'-O-Me糖修飾を含む。

【0207】

構造(A1)の特定の実施形態では、x=y=19であり、(N') yにおいて少なくとも1つの位置でのヌクレオチドはミラーヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及び2'，5'ヌクレオチド間結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを含む。

【0208】

構造(A1)の特定の実施形態では、x=y=19であり、(N') yはミラーヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、ミラーヌクレオチドはL-DNAヌクレオチドである。特定の実施形態では、L-DNAはL-デオキシリボシチジンである。一部の実施形態では、(N') yは18位にてL-DNAを含む。他の実施形態では、(N') yは17位及び18にてL-DNAを含む。特定の実施形態では、(N') yは2位及び17位と18位の一方又は双方にてL-DNA置換を含む。x=y=21又はx=y=23である構造(A1)の他の実施形態が予想され、これらの実施形態では、15、16、17、18位の代わりに上記で議論された(N') yのための修飾は、21量体については17、18、19、20位であり、23量体については19、20、21、22であり、同様

に、17位と18位の一方又は双方における修飾は、21量体については19位又は20位の一方又は双方であり、23量体については21位及び22位の一方又は双方である。19量体における修飾はすべて同様に21量体及び23量体について調整される。

【0209】

構造A1又はA2の種々の実施形態によれば、 (N') y又は $N2-(N')$ yにおける3'末端での2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13又は14の連続するリボヌクレオチドは2'、5'ヌクレオチド間結合によって連結される。一実施形態では、 (N') yの3'末端での4つの連続するヌクレオチドは2'、5'ホスホジエステル結合によって連結され、2'、5'ホスホジエステル結合を形成する2'、5'ヌクレオチドはさらに3'-Oメチル糖修飾を含む。好ましくは、 (N') yの3'末端のヌクレオチドは2'-Oメチル糖修飾を含む。構造(A1)の特定の実施形態では、 $x=y=19$ であり、 (N') yにおいて15、16、17、18、及び19位の2以上の連続するヌクレオチドは2'、5'ヌクレオチド間結合によって隣接ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、2'、5'ヌクレオチド間結合を形成するヌクレオチドは3'デオキシリボースヌクレオチド又は3'メトキシヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 (N') yにおける17位及び18位のヌクレオチドは2'、5'ヌクレオチド間結合によって連結される。他の実施形態では、 (N') yにおける16、17、18、16~17、17~18、又は16~18位のヌクレオチドは2'、5'ヌクレオチド間結合によって連結される。

【0210】

特定の実施形態では、 (N') yは、2位にてL-DNA及び16、17、18、16~17、17~18、又は16~18位にて2'、5'ヌクレオチド間結合を含む。特定の実施形態では、 (N') yは、16、17、18、16~17、17~18、又は16~18位における2'、5'ヌクレオチド間結合、及び5'末端のキャップヌクレオチドを含む。

【0211】

核酸分子の一実施形態では、3'末端のヌクレオチド又は (N') yの3'末端での2又は3の連続するヌクレオチドはL-デオキシリボヌクレオチドである。

【0212】

核酸分子の他の実施形態では、 (N') yにおいていずれかの末端での2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13若しくは14の連続するリボヌクレオチド、又は5'及び3'末端のそれぞれでの2~8の修飾されたヌクレオチドは独立して2'糖修飾されたヌクレオチドである。一部の実施形態では2'糖修飾は、アミノ、フルオロ又はアルキルの部分の存在を含む。特定の実施形態では、2'糖修飾はメトキシ部分(2'-OMe)を含む。

【0213】

一実施形態では、 (N') yの5'末端における3、4又は5の連続するヌクレオチドは2'-OMe修飾を含む。別の実施形態では (N') yの3'末端における3つの連続するヌクレオチドは2'-OMe糖修飾を含む。

【0214】

(N') y又は $N2-(N')$ y又はさらなるものにおける構造A1又はA2の一部の実施形態では、いずれかの末端での連続するリボヌクレオチド又は5'及び3'末端のそれぞれにおける2~8の修飾されたヌクレオチドは独立して二環式ヌクレオチドである。種々の実施形態では、二環式ヌクレオチドはロックされた核酸(LNA)である。2'-O、4'-C-エチレン架橋した核酸(ENA)はLNAの一種である。

【0215】

種々の実施形態では、 (N') y又は $N2-(N')$ yは5'末端又は3'及び5'末端の双方で修飾されたヌクレオチドを含む。

【0216】

構造A1又はA2の一部の実施形態では、 (N') yの3'及び5'末端のいずれか又

は双方での少なくとも2つのヌクレオチドはP-エトキシ主鎖修飾によって連結される。

(N) xにおける特定の実施形態 $x = y = 19$ 又は $x = y = 23$ では、ヌクレオチドは、修飾されたりボヌクレオチドと非修飾のりボヌクレオチドの間で交互であり、各修飾されたりボヌクレオチドは2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドであり、(N) xの真ん中位置に位置するりボヌクレオチドは修飾されず、(N') yの3'末端又は5'末端における4つの連続するヌクレオチドはP-エトキシ主鎖修飾によって連結される。別の実施形態では、(N') yの3'末端又は5'末端における3つの連続するヌクレオチドはP-エトキシ主鎖修飾によって連結される。

【0217】

(N') y又はN2-(N') y以上における構造A1又はA2の一部の実施形態では、5'及び3'末端のそれぞれにおける2、3、4、5、6、7、又は8の連続するりボヌクレオチドは独立してミラーヌクレオチド、2', 5'ホスホジエステル結合によって連結されるヌクレオチド、2'-OMe糖修飾されたヌクレオチド、又は二環式ヌクレオチドである。一実施形態では、(N') yの5'及び3'末端は同一である。一実施形態では、(N') yの5'末端における4つの連続するヌクレオチドは3つの2', 5'ホスホジエステル結合によって連結され、(N') yの3'末端における3つの連続するヌクレオチドは2つの2', 5'ホスホジエステル結合によって連結される。別の実施形態では、(N') yの5'末端における修飾は(N') yの3'末端における修飾とは異なる。一実施形態では、(N') yの5'末端における修飾されたヌクレオチドは、ミラーヌクレオチドであり、(N') yの3'末端における修飾されたヌクレオチドは2', 5'ホスホジエステル結合によって連結される。別の特定の実施形態では、(N') yの5'末端における3つの連続するヌクレオチドはLNAヌクレオチドであり、(N') yの3'末端における3つの連続するヌクレオチドは2つの2', 5'ホスホジエステル結合によって連結される。(N) xでは、ヌクレオチドは、修飾されたりボヌクレオチドと非修飾のりボヌクレオチドの間で交互であり、各修飾されたりボヌクレオチドは2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドであり、(N) xの真ん中に位置するりボヌクレオチドは修飾されず、又は(N) xにおけるりボヌクレオチドは修飾されない。

【0218】

構造A1の別の実施形態では、本明細書で提供されるのは、 $x = y = 19$ であり；(N) xでは、ヌクレオチドは、修飾されたりボヌクレオチドと非修飾のりボヌクレオチドの間で交互であり、各修飾されたりボヌクレオチドは2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドであり、(N) xの真ん中位置に位置するりボヌクレオチドは修飾されず、(N') yの3'末端における3つのヌクレオチドは2つの2', 5'ホスホジエステル結合によって連結され、(N') yの5'末端における3つのヌクレオチドはENAのようなLNAであり；且つZ及び／又はZ'は独立して、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、炭化水素部分及び無機リン酸から成る群から選択される1以上の非ヌクレオチド部分、又は1以上の非ヌクレオチドと1以上のヌクレオチドの組み合わせを含む化合物である。一部の実施形態では、ZはC3Pi-C3Pi、C3Pi-C3OH；C3Pi-rAb；C3Pi-dAb；dAb-dAb及びrAb-rAbから選択される。

【0219】

別の実施形態では、(N') y又はN2-(N') yの5'末端における5つの連続するヌクレオチドは2'-O-メチル糖修飾を含み、(N') yの3'末端における2つの連続するヌクレオチドはL-DNAである。

【0220】

N') y又はN2-(N') yにおける他の実施形態によれば、5'又は3'末端のヌクレオチド、又はいずれかの末端における2、3、4、5又は6の連続するヌクレオチド又は5'及び3'末端のそれぞれにおける1~4の修飾されたヌクレオチドは独立して、ホスホノカルボキシレート又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)である。一部の実施形態では、PACEヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドである。N') y又はN2-(N') yにおける一部の実施形態では、5'及び3'

末端のそれぞれにおける1又は2の連続するヌクレオチドはP A C Eヌクレオチドである。P A C Eヌクレオチド及び類似体の例は、双方とも参照によって組み入れられる米国特許第6, 693, 187号及び同第7, 067, 641号に開示されている。

【0221】

構造(A1)の一実施形態では、 $x = y = 19$ であり、(N)xは、3'末端にて2', 5'ヌクレオチド間結合1つによって2つの連続するヌクレオチドが連結される非修飾のリボヌクレオチドを含み；(N')yは5'末端にて2', 5'ヌクレオチド間結合1つによって2つの連続するヌクレオチドが連結される非修飾のリボヌクレオチドを含み；且つZ及び／又はZ'は独立して、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、炭化水素部分及び無機リン酸から成る群から選択される1以上の非ヌクレオチド部分、又は1以上の非ヌクレオチドと1以上のヌクレオチドの組み合わせを含む。Zは、C3Pi-C3Ps；C3Pi-C3OH；C3Pi-C3Pi；C3Pi-rAb；C3Pi-dAb；dAb-dAb及びrAb-rAbから選択され、各C3、rAb、dAbはホスホノ系の結合を介して隣接するC3Pi、rAb、dAbに共有結合する。一部の実施形態では、ホスホノ系の結合はホスホジエステル結合又はホスホロチオホスフェート結合である。

10

【0222】

一部の実施形態では、 $x = y = 19$ であり；(N)xは、3'末端における3つの連続するヌクレオチドが2', 5'ホスホジエステル結合によって一緒に連結される非修飾のリボヌクレオチドを含み；(N')yは、5'末端における4つの連続するヌクレオチドが2', 5'ホスホジエステル結合によって一緒に連結される非修飾のリボヌクレオチドを含み；且つZ及び／又はZ'は独立して、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、炭化水素部分及び無機リン酸から成る群から選択される1以上の非ヌクレオチド部分、又は1以上の非ヌクレオチドと1以上のヌクレオチドの組み合わせを含む。一部の実施形態では、ZはC3Pi-C3Ps；C3Pi-C3OH；C3Pi-C3Pi；C3Pi-rAb；C3Pi-dAb；dAb-dAb及びrAb-rAbから選択され、各C3Pi、rAb、dAbはホスホノ系の結合を介して隣接するC3Pi、rAb、dAbに共有結合する。一部の実施形態では、ホスホノ系の結合はホスホジエステル結合又はホスホロチオホスフェート結合である。

20

【0223】

構造A1又はA2の一実施形態によれば、(N')y又は(N')y-N2の5'末端における4つの連続するヌクレオチドはそれぞれ3つの2', 5'ホスホジエステル結合によって連結され；(N')xの3'末端における3つの連続するヌクレオチドは2つの2', 5'ホスホジエステル結合によって連結され；且つZ及びZ'は、独立して、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、炭化水素部分及び無機リン酸から成る群から選択される1以上の非ヌクレオチド部分、又は1以上の非ヌクレオチドと1以上のヌクレオチドの組み合わせを含む。一部の実施形態では、ZはC3Pi-C3Ps；C3Pi-C3OH；C3Pi-C3Pi；C3Pi-rAb；C3Pi-dAb；C3-dAb；dAb-dAb及びrAb-rAbから選択される。(N')yの5'末端における3つのヌクレオチド及び(N')xの3'末端における2つのヌクレオチドは3'-O-Me糖修飾も含み得る。

30

40

【0224】

構造A1又はA2の一実施形態では、(N')y又は(N')y-N2の5'末端における5つの連続するヌクレオチドはそれぞれ2'-O-Me糖修飾を含み、(N')xの3'末端における5つの連続するヌクレオチドは2'-O-Me糖修飾を含む。別の実施形態では、(N')yの5'末端における10の連続するヌクレオチドは2'-O-Me糖修飾を含み、(N')xの3'末端における5つの連続するヌクレオチドは2'-O-Me糖修飾を含む。別の実施形態では、(N')y5'末端における13の連続するヌクレオチドは2'-O-Me糖修飾を含み、(N')xの3'末端における5つの連続するヌクレオチドは2'-O-Me糖修飾を含み；且つZ及びZ'は、独立して、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、炭化水素部分及び無機リン酸から成る群から選択される1以上の非ヌ

50

【 0 2 2 5 】

10

20

【 0 2 2 7 】

30

40

【 0 2 2 9 】

50

[illegible]

$N'N'N'N'-z''$

又は

$$5' \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N$$

$$N-C3P i-C3OH$$

$$3' \quad iPC3-N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'$$

$$N'N'N'N'-z''$$

式中、N及びN'は独立して未修飾でもよい若しくは修飾されてもよいリボヌクレオチド、又は非定型の部分であり；

式中、各Nは共有結合によって隣接するNに連結され；

式中、各N'は共有結合によって隣接するN'に連結され；

式中、Nの1～10は2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドであり；

式中、5、6、7、8又は9位（5'>3'）のNは2'，5'ヌクレオチド又はミラーヌクレオチドであり；

式中、15～19位（5'>3'）のN'は2'，5'リボヌクレオチドであり；

式中、z''は、センス鎖の5'末端に共有結合するキャッピング部分である。

【0230】

一部の好まれる実施形態では、本明細書で開示される核酸分子は以下の構造を有する。

$$5' \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N$$

$$N-C3P i-C3OH$$

$$3' \quad HOC3-N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'$$

$$N'N'N'N'-z''$$

又は

$$5' \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N \quad N$$

$$N-C3P i-C3OH$$

$$3' \quad iPC3-N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'N'$$

$$N'N'N'N'-z''$$

式中、N及びN'は独立して未修飾でもよい若しくは修飾されてもよいリボヌクレオチド、又は非定型の部分であり；

式中、各Nは共有結合によって隣接するNに連結され；

式中、各N'は共有結合によって隣接するN'に連結され；

式中、Nの1～10は2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドであり；

式中、5、6、7、8又は9位（5'>3'）のNは2'，5'ヌクレオチド又はミラーヌクレオチドであり；

式中、N'は1以上の2'-OMe糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチドを含み；

式中、9又は10位（5'>3'）のNは2'，5'リボヌクレオチドであり；

式中、z''は、センス鎖の5'末端に共有結合するキャッピング部分である。

【0231】

構造（A1～A2）の一部の実施形態では、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のいずれか、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖の双方が3'末端にて無機リン酸部分を含む。

【0232】

二本鎖核酸分子の一部の実施形態では、3'末端でのNは修飾されたりボヌクレオチドであり、(N)xは少なくとも8の修飾されたりボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾されたりボヌクレオチドは2'-OMe糖修飾されたりボヌクレオチドを含む。他の実施形態では、少なくとも8の修飾されたりボヌクレオチドのうち少なくとも5つが3'末端にて開始して交互である。

【0233】

二本鎖核酸分子の一部の実施形態では、z''が存在し、脱塩基リボース部分、デオキシリボース部分、逆位脱塩基リボース部分、デオキシリボース部分、C6-アミノ-Pi、ミラーヌクレオチドから選択される。

【0234】

10

20

30

40

50

(N') yにおける二本鎖核酸分子の一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の非定型の部分が存在し、その非定型の部分は、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、修飾された若しくは未修飾のデオキシリボヌクレオチド、ミラーヌクレオチド、非塩基対ヌクレオチド類似体、又は2', 5'ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接するヌクレオチドに連結されるヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、(N) xも(N') yも3'及び5'末端ではリン酸化されない。一部の実施形態では、(N) x及び(N') yの双方が3'末端でリン酸化される。さらに別の実施形態では、(N) x及び(N') yのいずれか又は双方が非切断性のリン酸基を用いて3'末端にてリン酸化される。さらに別の実施形態では、(N) x及び(N') yのいずれか又は双方が切断性又は非切断性のリン酸基を用いて末端2'末端位置にてリン酸化される。

10

【0235】

上述の構造すべてに関する特定の実施形態では、Zが存在する。他の実施形態では、Z'が存在する。追加の実施形態では、Z及びZ'の双方が存在する。一部の実施形態では、Z及びZ'双方が存在し、同一である。さらなる実施形態では、Z及びZ'双方が存在し、異なる。一部の実施形態では、Z及びZ'は独立して1、2、3、4又は5の非ヌクレオチド部分又は非ヌクレオチド部分とヌクレオチドの組み合わせである。

【0236】

一部の実施形態では、Zが存在し、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、(CH₂)₃のような炭化水素部分、及び無機リン酸部分から選択される1非以上のヌクレオチド部分を含む。

20

【0237】

追加の実施形態では、Z'が存在し、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、(CH₂)₃のような炭化水素部分、及び無機リン酸部分から選択される1非以上のヌクレオチド部分を含む。

【0238】

一部の実施形態では、Z及び/又はZ'のそれぞれは1又は2の非ヌクレオチド部分を含み、さらにヌクレオチドを含む。

【0239】

一部の実施形態では、Z及び/又はZ'は脱塩基部分、任意で、デオキシリボ-脱塩基部分(「dAb」と呼ぶ)又はリボ脱塩基(「rAb」と呼ぶ)部分を含む。一部の実施形態では、Z及び/又はZ'のそれぞれはdAb-dAb又はrAb-rAbである。

30

【0240】

一部の実施形態では、Z及び/又はZ'は1以上の炭化水素部分、任意で(CH₂)₃-P_i(「C3P_i」と呼ぶ)を含む。一部の実施形態では、Z及び/又はZ'はC3P_i-C3P_s; C3P_i-C3OH; 又はC3P_i-C3P_iである。

【0241】

追加の実施形態では、Z及び/又はZ'は、脱塩基部分と未修飾のヌクレオチドの組み合わせ、又は炭化水素修飾部分と未修飾のヌクレオチドの組み合わせ、又は脱塩基部分と炭化水素修飾部分の組み合わせを含む。そのような実施形態では、Z及び/又はZ'は任意でC3P_i-rAbである。特定の実施形態ではZのみが存在し、C3P_i-C3P_s; C3P_i-C3OH; C3P_i-C3P_iである。

40

【0242】

上述の構造の実施形態では、化合物は、少なくとも1つの非ヌクレオチド部分を含む少なくとも1つの3'オーバーハング(Z及び/又はZ')を含む。Z及びZ'は独立して1つの非ヌクレオチド部分及び1以上の共有結合した修飾された若しくは未修飾のヌクレオチド又は非定型の部分、たとえば、逆位dT若しくはdA; dT、LNA、ミラーヌクレオチド等を含む。Z及び/又はZ'が存在するsiRNAは、Z及び/又はZ'が存在しない又はZ及び/又はZ'がdTdTであるsiRNAと比べると、改善された活性及び/又は安定性及び/又はオフターゲット活性及び/又は低下した免疫応答を有する。

【0243】

50

上述の構造すべてに関する特定の実施形態では、化合物は、1以上のホスホノカルボキシレート及び／又はホスフィノカルボキシレートヌクレオチド（P A C Eヌクレオチド）を含む。一部の実施形態では、P A C Eヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであり、ホスフィノカルボキシレートヌクレオチドホスフィノアセテートヌクレオチドである。P A C Eヌクレオチド及び類似体の例は双方とも参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第6, 693, 187号及び同第7, 067, 641号に開示されている。

【0244】

上述の構造すべてに関する特定の実施形態では、化合物は、架橋された核酸又は二環式ヌクレオチドとしても定義される1以上のロックされた核酸（L N A）を含む。例となるロックされた核酸には、2'-O, 4'-C～エチレンヌクレオシド（E N A）又は2'-O, 4'-C-メチレンヌクレオシドが挙げられる。L N A及びE N Aの他の例は、すべて参照によって本明細書に組み入れられるW O 9 8 / 3 9 3 5 2、W O 0 0 / 4 7 5 9 9及びW O 9 9 / 1 4 2 2 6に開示されている。

【0245】

上述の構造すべてに関する特定の実施形態では、化合物は、1,5-アンヒドロ-2-デオキシ-D-アルトリト-ヘキシトールとしても定義される1以上のアルトリトールを含む（たとえば、すべて参照によって本明細書に組み入れられるAllart, et al., 1998. Nucleosides & Nucleotides 17:1523~1526; Herdewijn et al., 1999. Nucleosides & Nucleotides 18:1371~1376; Fisher et al., 2007, NAR 35(4):1064~1074を参照）。

【0246】

本発明は、N及び／又はN'のそれぞれがデオキシリボヌクレオチド（d A、d C、d G、d T）である二本鎖化合物を排除する。特定の実施形態では、(N) x及び(N') yは独立して1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のデオキシリボヌクレオチドを含み得る。特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、Nのそれぞれが未修飾のリボヌクレオチドであり、(N') yの3'末端ヌクレオチド又は3'末端における2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10のヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドである化合物である。さらなる実施形態では、(N) xの5'末端のヌクレオチド又は5'末端における2、3、4、5、6、7、8若しくは9の連続するヌクレオチド又は3'末端における1、2、3、4、5若しくは6の連続するヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドであり、N'のそれぞれは未修飾のリボヌクレオチドである。その上さらなる実施形態では、(N) xは、5'及び3'末端のそれぞれで独立して未修飾のリボヌクレオチド及び1又は2、3又は4の連続するデオキシリボヌクレオチド及び内部位置での1又は2、3、4、5又は6の連続するデオキシリボヌクレオチドを含み、N'のそれぞれは未修飾のリボヌクレオチドである。一部の実施形態では、Nの5'末端ヌクレオチド又はNの2若しくは3の連続するもの及びN'の1、2若しくは3はデオキシリボヌクレオチドである。活性のあるDNA/RNA siRNAキメラの特定の例は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許公開2005/0004064及びU i - T e i, 2008 (NAR 36 (7) : 2136~2151)に開示されている。

【0247】

共有結合は1つのヌクレオチド単量体を隣接するヌクレオチド単量体に連結するヌクレオチド間結合を指す。共有結合には、たとえば、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合、P-アルコキシ結合、P-カルボキシ結合等が挙げられる。RNA及びDNAの正常なヌクレオチド間結合は3'から5'へのホスホジエステル結合である。特定の実施形態では、共有結合はホスホジエステル結合である。共有結合には、とりわけW O 2 0 0 4 / 0 4 1 9 2 4にて開示されたもののようなリンを含有しないヌクレオチド間結合が包含される。特に指示されない限り、本明細書で議論される構造の実施形態では、各連続するN又はN'の間での共有結合はホスホジエステル結合である。

【0248】

一部の実施形態では、(N) xのオリゴヌクレオチド配列は(N') yのオリゴヌクレオチド配列に対して完全に相補性である。他の実施形態では、(N) x及び(N') yは

実質的に相補性である。特定の実施形態では、(N) x は標的 mRNA における連続する配列に対して完全に相補性である。他の実施形態では、(N) x は標的 mRNA における連続する配列に対して実質的に相補性である。

【0249】

定義

便宜上、本明細書、実施例及びクレームで採用される特定の用語を本明細書で説明する。

【0250】

本明細書で使用されるとき、単数形態「a」、「an」及び「the」は、内容が明瞭に指示さない限り、複数形態を含むことが留意されるべきである。

10

【0251】

「阻害剤」は、所望の生物学的な又は生理学的な効果を達成するのに十分な程度まで遺伝子の発現又はそのような遺伝子の産物の活性を（部分的に又は完全に）低減することが可能である化合物である。用語「阻害剤」は本明細書で使用されるとき、二本鎖の核酸阻害剤を指す。

【0252】

「dsRNA 阻害剤」又は dsNA 阻害剤は、所望の生物学的な又は生理学的な効果を達成するのに十分な程度まで遺伝子の発現又はそのような遺伝子の産物の活性を低減することが可能である二本鎖の核酸化合物又は分子を指す。用語「siRNA」は本明細書で使用されるとき、siRNA、shRNA、合成 shRNA、miRNA の 1 以上を指す。本明細書で使用されるとき、遺伝子の発現に関して、用語「阻害する」、「下方調節する」又は「低減する」は、1 以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニット（たとえば、mRNA）をコードする標的遺伝子の発現若しくは RNA 分子若しくは同等の RNA 分子のレベル、又は 1 以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットの活性を、阻害剤（たとえば、核酸分子、たとえば、本明細書で記載されるような構造的特徴を有する dsNA）の非存在下で見られるものを下回って低減すること、たとえば、発現が阻害剤非存在下で見られるものよりも 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5% 未満に低減され得ることを意味する。

20

【0253】

本明細書で使用されるとき、標的遺伝子の用語「阻害」は、遺伝子発現（転写又は翻訳）又は標的遺伝子のポリペプチド活性の阻害を意味し、その際、標的遺伝子は TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1 及び TIRAP 又はそれらの変異体から成る群から選択される哺乳類の遺伝子である。標的 mRNA のポリヌクレオチド配列又は mRNA 配列を有する標的遺伝子は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1 及び TIRAP の mRNA に対して好ましくは少なくとも 70% の同一性、さらに好ましくは 80% の同一性、一層さらに好ましくは 90% 又は 95% の同一性を有する mRNA 配列又はその相同配列を指す。従って、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1 及び TIRAP から成る群から選択される哺乳類の遺伝子に由来するポリヌクレオチド配列、及び本明細書で記載されるような変異、変更及び修飾を受けた mRNA は、本発明に包含される。用語「mRNA ポリヌクレオチド配列」、「mRNA 配列」及び「mRNA」は相互交換可能に使用される。

30

40

【0254】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は相互交換可能に使用されてもよく、デオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）を含むヌクレオチド配列を指す。用語はまたヌクレオチド類似体から作製される RNA 又は DNA の類似体を同等物として含むように理解されるべきである。本出願の全体を通して、mRNA 配列は相当する遺伝子の標的を表すように言及される。用語「mRNA ポリヌクレオチド配列」及び mRNA は相互交換可能に使用される。

【0255】

「オリゴヌクレオチド」又は「オリゴマー」は、約 2 ～ 約 50 ヌクレオチドのデオキシ

50

リボヌクレオチド配列又はリボヌクレオチド配列を指す。各DNA又はRNAのヌクレオチドは独立して天然であっても合成であってもよく、及び／又は修飾されてもよく又は未修飾であってもよい。修飾には、オリゴヌクレオチドにおける糖部分、塩基部分への変化及び／又はヌクレオチド間の結合が含まれる。本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドにはデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたデオキシリボヌクレオチド、修飾されたリボヌクレオチド及びそれらの組み合わせが含まれる。本明細書で使用されるとき、用語「非対合ヌクレオチド類似体」は、6-デスアミノアデノシン（ネブラリン）、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-MeリボT、N3-Me dC、N3-Me dT、N1-Me dG、N1-Me dA、N3-エチル-dC、N3-Me dCを含むが、これらに限定されない非塩基対合部分を含むヌクレオチド類似体を意味する。一部の実施形態では、非塩基対合ヌクレオチド類似体はリボヌクレオチドである。他の実施形態では、それはデオキシリボヌクレオチドである。

10

【0256】

本明細書で提供されるのは、生体内での標的遺伝子の発現を阻害する方法及び組成物である。一般に、方法は、RNA干渉のメカニズムによって標的遺伝子の発現を下方調節するのに十分な量で、二本鎖RNA、特に小分子干渉RNA（すなわち、siRNA）又は細胞にてsiRNAを生成する核酸物質のようなオリゴヌクレオチドを投与して哺乳類mRNAを標的とすることを含む。特に、方法は、その遺伝子の発現に関連する疾患で苦しんでいる対象の治療のために遺伝子の発現を阻害するのに有用である。本明細書で開示されるように、標的遺伝子のdsRNA又は阻害剤は種々の病理を治療するための薬剤として使用される。

20

【0257】

「siRNA化合物」及び「核酸分子」は本明細書では相互交換可能に使用されてもよい。

【0258】

「ヌクレオチド」は、ヌクレオシド（糖、通常、リボース又はデオキシリボース、及びプリン塩基又はピリミジン塩基）とホスホリンカー；たとえば、天然であっても合成であってもよく、及び修飾されてもよく又は未修飾であってもよいデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドから成る化合物を包含することとする。修飾には、糖分子、塩基分子及び／又はヌクレオチド間結合への変化及び置換が含まれる。

30

【0259】

「リン酸系」の部分には無機リン酸（Pi）及びホスホロチオエート（Ps）が含まれる。

【0260】

ヌクレオチド／オリゴヌクレオチドの類似体又はそれへの修飾すべては、前記類似体又は修飾がヌクレオチド／オリゴヌクレオチドの機能に実質的に有害に影響しないという条件で、本明細書にて開示される分子と共に採用され得る。許容可能な修飾には、糖部分の修飾、塩基部分の修飾、ヌクレオチド間結合における修飾及びそれらの組み合わせが挙げられる。

40

【0261】

「脱塩基部分」又は「脱塩基ヌクレオチド類似体」と呼ばれることもあるものは、さらに適正にはシュードヌクレオチド又は非定型の部分と呼ばれる。ヌクレオチドは、リボース糖又はデオキシリボース糖とリン酸と塩基（DNAにおけるアデノシン、グアノシン、チミン又はシトシン；RNAにおけるアデニン、グアニン、ウラシル又はシトシン）から成る核酸の単量体単位である。修飾されたヌクレオチドは、糖、リン酸及び／又は塩基の1以上の修飾を含む。脱塩基シュードヌクレオチドは塩基を欠くので、厳密にはヌクレオチドではない。脱塩基デオキシリボース部分には、たとえば、脱塩基のデオキシリボース-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

50

ボース部分には、逆位デオキシリボ脱塩基；3'，5'逆位デオキシ脱塩基5'-リン酸が挙げられる。一般に、逆位脱塩基部分は3'，3'結合を介して3'末端ヌクレオチドに共有結合し；逆位脱塩基部分は5'，5'結合を介して5'末端ヌクレオチドに共有結合し；逆位脱塩基部分は5'，3'結合を介して逆位脱塩基部分に一般に共有結合する。

【0262】

用語「キャッピング部分（z"）」は本明細書で使用されるとき、（N'）yの5'末端に共有結合することができる部分を含み、2'-Oアルキル修飾を含む脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース部分、2'-Oアルキル修飾を含む修飾された脱塩基リボース部分及び脱塩基デオキシリボース部分；逆位の脱塩基リボース部分及び脱塩基デオキシリボース部分及びそれらの修飾体；C6-イミノ-Pi；L-DNA及びL-RNAを含むミラーヌクレオチド；5'-OMeヌクレオチド；及び4'，5'-メチレンヌクレオチド；1-（β-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、カルボン酸ヌクレオチド；5'-アミノアルキルリン酸；1,3-ジアミノ-2-プロピルリン酸、3-アミノプロピルリン酸；6-アミノヘキシルリン酸；12-アミノドデシルリン酸；ヒドロキシプロピルリン酸；1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；α-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-ブタンジオールリン酸；5'-アミノ；及び架橋又は非架橋のメチルホスホネート及び5'-メルカプト部分を含むヌクレオチド類似体を含む。

【0263】

特定のキャッピング部分は、脱塩基リボース部分又は脱塩基デオキシリボース部分；逆位脱塩基リボース部分又は逆位脱塩基デオキシリボース部分；C6-アミノ-Pi；L-DNA及びL-RNAを含むミラーヌクレオチドである。本明細書で開示される化合物は、1以上の逆位ヌクレオチド、たとえば、逆位チミジン又は逆位アデニンを用いて合成され得る（たとえば、Takei, et al., 2002. JBC 277(26):23800~06を参照）。

【0264】

化学修飾にはロックされない核酸又はUNAも含まれ、それは非ヌクレオチド非環式類似体であり、その中にはC2'-C3'結合は存在しない（UNAは真にヌクレオチドではないが、それらは本明細書で熟考されるような「修飾された」ヌクレオチド又は修飾された核酸の範囲内に明らかに含まれる）。特定の実施形態では、オーバーハングを持つ核酸分子が修飾されてオーバーハングの位置にて（すなわち、2ヌクレオチドオーバーハンド）UNAを有する。他の実施形態では、UNAは3'-又は5'-末端にて含まれる。UNAは、核酸の鎖に沿ってどこでも、すなわち、5、6、7、8又は9位にて位置づけられ得る。核酸分子は1以上のUNAを含有し得る。例となるUNAはNucleic Acids Symposium Series, No. 52, p. 133~134 (2008)にて開示されている。

【0265】

用語「非ヌクレオチド部分」はヌクレオチドではない部分、すなわち、ヌクレオチドの成分：糖、塩基及びリンカーのすべてを含むわけではない部分を指す。

【0266】

用語「非定型の部分」は本明細書で使用されるとき、脱塩基部分、逆位脱塩基部分、アルキル部分又はアルコール部分及び無機リン酸を含む非ヌクレオチド部分を指し、さらに、デオキシリボヌクレオチド、修飾されたデオキシリボヌクレオチド、ミラーヌクレオチド（L-DNA又はL-RNA）、非塩基対合ヌクレオチド類似体及び2'，5'ヌクレオチド間リン酸結合（2'，5'ヌクレオチドとしても知られる）により隣接ヌクレオチドに連結されたヌクレオチド；LNA及びエチレン架橋された核酸を含む架橋された核酸、修飾された結合（たとえば、PACE）及び塩基修飾されたヌクレオチド並びに非定型の部分として本明細書で明らかに開示される追加の部分を含む。

【0267】

オーバーハングと関連して使用される際、「アルキル部分」又は「炭化水素部分」は、C 2、C 3、C 4、C 5又はC 6の直鎖又は分枝鎖の、たとえば、C 2（エチル）、C 3（プロピル）を含むアルキル部分を指す。オーバーハングと関連して使用される際、アルキル部分又は炭化水素部分の「誘導体」は、とりわけ、アルコール、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホノアセテート、アミン、カルボン酸、エステル、アミド及びアルデヒドから選択され得る官能基を含む、C 2、C 3、C 4、C 5又はC 6の直鎖又は分枝鎖のアルキル部分を指す。

【0268】

リボース部分又はデオキシリボース部分の修飾に関して使用される際、「アルキル」は直鎖、分枝鎖、又は環状の飽和炭化水素構造及びそれらの組み合わせを含むように意図される。「低級アルキル」は、リボース部分又はデオキシリボース部分の修飾に関して使用される場合、1～6の炭素原子のアルキル基を具体的に指す。低級アルキル基の例には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、s-ブチル、t-ブチル等が挙げられる。好まれるアルキル基はC₂₀以下のものである。シクロアルキルはアルキルのサブセットであり、3～8の炭素原子の環状の飽和炭化水素基を含む。シクロアルキル基の例にはc-プロピル、c-ブチル、c-ペンチル、ノルボルニル、アダマンチル等が挙げられる。

【0269】

末端官能基には、ハロゲン基、アルコール基、アミン基、カルボキシル基、エステル基、アミド基、アルデヒド基、ケトン基、エーテル基が挙げられる。

【0270】

本明細書で使用されるとき、「ミラー」ヌクレオチド（スピーゲルマーとも呼ぶ）は天然に存在する又は通常採用されるヌクレオチドに対して逆転したキラリティ、すなわち、天然に存在する又は通常採用されるヌクレオチドの鏡像を持つヌクレオチド類似体である。ミラーヌクレオチドはリボヌクレオチド（L-RNA）又はデオキシリボヌクレオチド（L-DNA）であり、さらに、少なくとも1つの糖又は塩基の修飾及び／又はたとえば、ホスホロチオエート部分又はホスホネート部分のような主鎖の修飾を含む。米国特許第6,602,858号は少なくともL-ヌクレオチド置換を含む核酸触媒を開示している。ミラーヌクレオチドには、たとえば、L-DNA（L-デオキシリボアデノシン-3'-リン酸（ミラー-dA）；L-デオキシリボシチジン-3'-リン酸（ミラー-dC）；L-デオキシグアノシン-3'-リン酸（ミラー-dG）；L-デオキシチミジン-3'-リン酸（ミラー-dT）、及びL-RNA（L-リボアデノシン-3'-リン酸（ミラー-rA）、リボシチジン-3'-リン酸（ミラー-rC）、リボグアノシン-3'-リン酸（ミラー-rG）、リボウラシル-3'-リン酸（ミラー-dU）が挙げられる。

【0271】

修飾されたデオキシリボヌクレオチドには、たとえば、5'末端位置（1位）でのヌクレオチドとして有用であり得る5'-OMeDNA（5-メチル-デオキシリボグアノシン-3'-リン酸）；PACE（デオキシリボアデノシン-3'-ホスホノアセテート、デオキシリボシチジン-3'-ホスホノアセテート、デオキシリボグアノシン-3'-ホスホノアセテート、デオキシリボチミジン-3'-ホスホノアセテート）が挙げられる。

【0272】

非定型の部分には、LNA（2'-O, 4'-C-メチレン架橋核酸アデノシン3'-リン酸、2'-O, 4'-C-メチレン架橋核酸5-メチル-シチジン3'-リン酸、2'-O, 4'-C-メチレン架橋核酸グアノシン3'-リン酸、5-メチル-ウリジン（又はチミジン）3'-リン酸）；及びENA（2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸アデノシン3'-リン酸、2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸5-メチル-シチジン3'-リン酸、2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸グアノシン3'-リン酸、5-メチル-ウリジン（又はチミジン）3'-リン酸）を含む架橋核酸が挙げられる。

【0273】

一部の実施形態では、非定型の部分は、脱塩基リボース部分、脱塩基デオキシリボース

10

20

30

40

50

部分、デオキシリボヌクレオチド、ミラーヌクレオチド、及び2', 5'ヌクレオチド間リン酸結合によって隣接するヌクレオチドに連結されるヌクレオチドである。

【0274】

ヌクレオチドは、天然に存在する塩基又は合成の修飾された塩基から選択される。天然に存在する塩基には、アデニン、グアニン、シトシン、チミン及びウラシルが挙げられる。ヌクレオチドの修飾された塩基には、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル、2-プロピル及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-アザシトシン及び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及び他の8-置換されたアデニン、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、及び他の置換されたグアニン、他のアザ及びデアザアデニン、他のアザ及びデアザグアニン、5-トリフルオロメチルウラシル及び5-トリフルオロシトシンが挙げられる。1以上の脱塩基シュードヌクレオチドを含むdsRNA化合物が本明細書に包含される。脱塩基シュードヌクレオチド単量体を含む修飾された塩基を含むヌクレオチド単量体は、オリゴヌクレオチドの1以上のリボヌクレオチドについて置換され得る。脱塩基シュードヌクレオチド単量体は、1以上の末端位置にて又は5'末端キャップとして含められ得る。5'末端キャップは、逆位脱塩基シュードヌクレオチド類似体、L-DNAヌクレオチド及びC6-イミンリン酸からも選択され得る。

10

【0275】

加えて、1以上のヌクレオチドの構造が基本的に変えられ、治療試薬又は実験試薬としてさらに適合するポリヌクレオチドの類似体が調製される。ヌクレオチド類似体の例は、DNA（又はRNA）におけるデオキシリボース（又はリボース）リン酸主鎖がペプチドで見られるものに類似するポリアミドを含むペプチド核酸（PNA）である。PNA類似体は、酵素分解に耐性であり、生体内及び試験管内で寿命が長いことが示されている。

20

【0276】

糖残基への考えられる修飾は多種多様であり、それには2'-Oアルキル、2'-ハロ（たとえば、2'-デオキシフルオロ）、ロックされた核酸（LNA）、グリコール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、アラビノシド；アルトリトール（ANA）及びモルフォリノを含む他の6員環糖、及びシクロヘキシニルが挙げられる。糖残基の2'部分における考えられる修飾には、とりわけ、欧州特許EP0586520B1又はEP0618925B1に記載されたような、アミノ、フルオロ、メトキシ、アルコキシ、アルキル、アミノ、フルオロ、クロロ、プロモ、CN、CF、イミダゾール、カルボキシレート、チオエート、C₁~C₁₀の低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカリル又はアラルキル、OCF₃、OCN、O-、S-又はN-アルキル；O-、S、又はN-アルケニル；SOCH₃；SO₂CH₃；ON₂；NO₂，N₃；ヘテロジクロアルキル；ヘテロジクロアルカリル；アミノアルキルアミノ；ポリアルキルアミノ又は置換シリルが挙げられる。1以上のデオキシリボヌクレオチドはまた本明細書で開示される化合物においても認容される。一部の実施形態では、（N'）は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のDNA部分を含む。

30

【0277】

LNA化合物は、国際特許公開番号、WO00/47599、WO99/14226及びWO98/39352に開示されている。LNAヌクレオチドを含むsiRNA化合物の例は、Elmenら、（NAR2005. 33（1）：439~447）及び国際特許公開番号、WO2004/083430に開示されている。6員環のヌクレオチド類似体は、Allartら（Nucleosides & Nucleotides, 1998, 17:1523-1526,; and Perez~Perez, et al., 1996, Bioorg. and Medicinal Chem Letters 6:1457-1460）にて開示されている。ヘキシトール及びアルトリトールヌクレオチド単量体を含む6員環の環ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、国際特許出願公開番号、WO2006/047842にて開示されている。

40

50

【0278】

たとえば、エチル（結果的にホスホーエチルトリエステルを生じる）；プロピル（結果的にホスホープロピルトリエステルを生じる）；及びブチル（結果的にホスホーブチルトリエステルを生じる）のようなヌクレオチド間結合の修飾として知られる主鎖の修飾も可能である。他の主鎖の修飾には、ポリマー主鎖、環状主鎖、非環式主鎖、チオホスホネート-D-リボース主鎖、アミデート、ホスホノアセテート誘導体が挙げられる。特定の構造には、1又は複数の2', 5'ヌクレオチド間結合（架橋又は主鎖）を有するdsRNA化合物が挙げられる。

【0279】

一部の実施形態では、(N)xも(N')yも3'及び5'末端でリン酸化されない。他の実施形態では、(N)x及び(N')yのいずれか又は双方が、3'末端にてリン酸化される。さらに別の実施形態では、(N)x及び(N')yのいずれか又は双方が、非切断性リン酸基によって3'末端でリン酸化される。さらに別の実施形態では、(N)x及び(N')yのいずれか又は双方は、切断性又は非切断性のリン酸基を用いて末端2'末端位置にてリン酸化される。さらに、本明細書で開示される阻害性の核酸分子は、1以上のギャップ及び／又は1以上のニック及び／又は1以上のミスマッチを含み得る。理論によって束縛されることを望まないで、ギャップ、ニック及びミスマッチは、核酸/siRNAを部分的に不安定化するという利点を有するので、DICER、DROSHA又はRISCのような内因性の細胞機構によってその阻害性成分にさらに容易に処理され得る。

【0280】

本明細書で使用されるとき、核酸におけるギャップは、一方の鎖における1以上の内部ヌクレオチドの非存在を指すが、核酸におけるニックは、一方の鎖における2つの隣接ヌクレオチド間でのヌクレオチド間結合の非存在を指す。本明細書で開示される分子のいずれかが1以上のギャップ及び／又は1以上のニックを含有し得る。

【0281】

核酸分子は、平滑末端、すなわち、オーバーハングヌクレオチドを含まない末端を持つものを含む。核酸分子は、1以上の平滑末端を含むことができる。平滑末端の核酸分子は、核酸分子の各鎖に存在するヌクレオチドの数に等しい数の塩基対を有する。核酸分子は、たとえば、アンチセンス鎖の5'末端及びセンス鎖の3'末端がオーバーハングヌクレオチドを含まない、一方の平滑末端を含むことができる。核酸分子は、たとえば、アンチセンス鎖の3'末端及びセンス鎖の5'末端がオーバーハングヌクレオチドを含まない、一方の平滑末端を含み得る。核酸分子は、たとえば、アンチセンス鎖の5'末端及びセンス鎖の3'末端と同様にアンチセンス鎖の3'末端及びセンス鎖の5'末端がオーバーハングヌクレオチドを含まない2つの平滑末端を含み得る。平滑末端の核酸分子に存在する他のヌクレオチドには、たとえば、ミスマッチ、突出、ループ、又は核酸分子の活性を調節して、たとえば、RNA干渉に介在するゆらぎ塩基対が含まれる。

【0282】

本明細書で提供される核酸分子（たとえば、dsNA分子）の特定の実施形態では、分子の少なくとも一方が少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーハングを有する（たとえば、1～8のヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの末端に共有結合する）。たとえば、本明細書で開示される二本鎖核酸分子の一方又は双方の鎖は、5'末端又は3'末端又はその双方でオーバーハングを有し得る。オーバーハングは核酸分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖のいずれか又は双方に存在し得る。オーバーハングの長さは、たった1つのヌクレオチド及び1～8以上のヌクレオチド（たとえば、1、2、3、4、5、6、7又は8のヌクレオチド；一部の好まれる実施形態では、オーバーハングは2、3、4、5、6、7又は8のヌクレオチドであり；たとえば、オーバーハングは2つのヌクレオチドであり得る）ほど長くてもよい。オーバーハングを形成するヌクレオチドには、本明細書で開示されるような、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、天然の及び非天然の核酸塩基、又は糖、塩基若しくはリン酸基で修飾されたヌクレオチドが含まれる。二本鎖核酸分

子は5'オーバーハング及び3'オーバーハングの双方を有し得る。5'末端及び3'末端におけるオーバーハングは長さが異なってもよい。オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチドであってもよい少なくとも1つの核酸の修飾を含み得る。1以上のデオキシリボヌクレオチドが5'末端にあってもよい。核酸分子の対応する相手鎖の3'末端は、オーバーハング、さらに好ましくはデオキシリボヌクレオチドオーバーハングを有さなくてもよい。1以上のデオキシリボヌクレオチドが3'末端にあってもよい。dsRNAの対応する相手鎖の5'末端は、オーバーハング、さらに好ましくはデオキシリボヌクレオチドオーバーハングを有さなくてもよい。鎖の5'末端又は3'末端のいずれかにおけるオーバーハングは、1~8（たとえば、約1、2、3、4、5、6、7又は8）の対になっていないヌクレオチドであってもよく、好ましくは、オーバーハングは2~3の対になっていないヌクレオチド、さらに好ましくは2つの対になっていないヌクレオチドである。核酸分子は、約1~約20（たとえば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20）；好ましくは1~8（たとえば、約1、2、3、4、5、6、7又は8）のヌクレオチドのオーバーハング末端を持つ二本鎖核酸分子、たとえば、約19塩基対と3'末端のモノヌクレオチド、ジヌクレオチド又はトリヌクレオチドのオーバーハングを持つ約21ヌクレオチドの二本鎖を含み得る。本明細書で提供される核酸分子は、平滑末端を持つ二本鎖核酸分子を含み得るが、その際、双方の末端が平滑であり、又は代わりに末端の一方が平滑である。本明細書で提供される核酸分子は、1以上の平滑末端を含み得る、すなわち、平滑末端はオーバーハングヌクレオチドを有さない。一実施形態では、平滑末端の核酸分子は、核酸分子の各鎖に存在するヌクレオチドの数に等しい数の塩基対を有する。核酸分子は、平滑末端を含み得るが、その際、アンチセンス鎖の5'末端及びセンス鎖の3'末端はオーバーハングヌクレオチドを有さない。核酸分子は、一方の平滑末端を含み得るが、その際、アンチセンス鎖の3'末端及びセンス鎖の5'末端はオーバーハングヌクレオチドを有さない。核酸分子は、2つの平滑末端を含み得るが、たとえば、その際、アンチセンス鎖の5'末端及びセンス鎖の3'末端と同様にアンチセンス鎖の3'末端及びセンス鎖の5'末端はオーバーハングヌクレオチドを有さない。特定の好まれる実施形態では、核酸化合物は平滑末端である。平滑末端のdsNA分子に存在する他のヌクレオチドには、たとえば、ミスマッチ、突出、ループ、又は核酸分子の活性を調節して、RNA干渉に介在するゆらぎ塩基対が含まれる。

【0283】

多数の実施形態では、本明細書で記載されるような核酸分子（たとえば、dsNA分子）のオーバーハングヌクレオチドの1以上、又はすべては、本明細書で記載されるように修飾され；たとえば、ヌクレオチドの1以上、又はすべては、2'-デオキシヌクレオチドであり得る。

【0284】

核酸化合物の修飾の量、位置及びパターン

本明細書で開示される核酸分子（たとえば、dsNA分子）は、核酸分子に存在するヌクレオチドの総数のある比率として修飾されたヌクレオチドを含み得る。そのようなものとして、核酸分子は、約5%~約100%の修飾されたヌクレオチド（5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%の修飾されたヌクレオチド）を含み得る。所与の核酸分子に存在する修飾されたヌクレオチドの実際の比率は核酸に存在するヌクレオチドの総数に左右される。核酸分子が一本鎖であれば、修飾比率は、一本鎖核酸分子に存在するヌクレオチドの総数に基づき得る。同様に、核酸分子が二本鎖であれば、修飾比率は、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖双方に存在するヌクレオチドの総数に基づき得る。

【0285】

本明細書で開示される核酸分子は、核酸分子における合計ヌクレオチドのある比率として修飾されたRNAを含み得る。そのようなものとして、核酸分子は、約5%~約100

%の修飾されたヌクレオチド（核酸分子に存在する合計ヌクレオチドの5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%）を含み得る。

【0286】

核酸分子（たとえば、dsNA分子）は、約1～約5、具体的には約1、2、3、4又は5のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、及び／又は1以上（たとえば、約1、2、3、4、5以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／又は1以上（たとえば、約1、2、3、4、5以上）の普遍的塩基で修飾されたヌクレオチド、及び任意でセンス鎖の3'末端、5'末端若しくは3'末端と5'末端の双方での末端キャップ分子を含むセンス鎖を含んでもよく；その際、アンチセンス鎖は、約1～約5、具体的には約1、2、3、4、5以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、及び／又は1以上（たとえば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／又は1以上（たとえば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上）の普遍的塩基で修飾されたヌクレオチド、及び任意でアンチセンス鎖の3'末端、5'末端若しくは3'末端と5'末端の双方での末端キャップ分子を含む。核酸分子は、センス鎖の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のピリミジンヌクレオチドを含んでもよく、及び／又はアンチセンス核酸鎖は、約1～約5、たとえば、約1、2、3、4、5以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合と共に、又はそれなしで、2'-デオキシ、2'-O-メチル、及び／又は2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾され、及び／又は3'末端、5'末端又は3'末端と5'末端の双方における末端キャップ分子は同一の鎖又は異なった鎖に存在する。

【0287】

核酸分子は、核酸分子の各鎖にて約1～約5以上（具体的には約1、2、3、4、5以上）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み得る。

【0288】

核酸分子は、たとえば、一方又は双方の核酸配列鎖の3'末端、5'末端又は3'末端と5'末端の双方にて2'，5'ヌクレオチド間結合を含み得る。加えて、2'，5'ヌクレオチド間結合は、一方又は双方の核酸配列鎖の中で種々の他の位置に存在することができ、たとえば、siNA分子の一方又は双方の鎖におけるピリミジンヌクレオチドの各ヌクレオチド間結合を含む約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上が2'，5'ヌクレオチド間結合を含むことができ、又はsiNA分子の一方又は双方の鎖におけるプリンヌクレオチドの各ヌクレオチド間結合を含む約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上が2'，5'ヌクレオチド間結合を含むことができる。

【0289】

化学的に修飾された小分子干渉核酸（dsNA）分子は、アンチセンス領域を含み得るが、その際、アンチセンス領域に存在する任意（たとえば、1以上、又はすべて）のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（たとえば、ピリミジンヌクレオチドのすべてが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、アンチセンス領域に存在する任意（たとえば、1以上、又はすべて）のプリンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロプリンヌクレオチドである（たとえば、プリンヌクレオチドのすべてが2'-デオキシ-2'-フルオロプリンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロプリンヌクレオチドである）。

【0290】

化学的に修飾された小分子干渉核酸（dsNA）分子は、アンチセンス領域を含み得るが、その際、アンチセンス領域に存在する任意（たとえば、1以上、又はすべて）のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（たとえば、ピリミジンヌクレオチドのすべてが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジ

ンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、アンチセンス領域に存在する任意(たとえば、1以上、又はすべて)のプリンヌクレオチドは 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである(たとえば、プリンヌクレオチドのすべてが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである)。

【0291】

細胞又は再構成された試験管内の系の中で TLR2 及び/又は TLR4 に対して RNA 干渉 (RNAi) に介在することが可能である化学的に修飾された小分子干渉核酸 (dsRNA) 分子は、センス領域を含み得るが、その際、センス領域に存在する 1 以上のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(たとえば、ピリミジンヌクレオチドのすべてが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、センス領域に存在する 1 以上のプリンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロプリンヌクレオチドであり(たとえば、プリンヌクレオチドのすべてが 2'-デオキシ-2'-フルオロプリンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロプリンヌクレオチドである)、且つアンチセンス鎖を含み得るが、その際、アンチセンス領域に存在する 1 以上のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり(たとえば、ピリミジンヌクレオチドのすべてが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のピリミジンヌクレオチドが 2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、アンチセンス領域に存在する 1 以上のプリンヌクレオチドは 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである(たとえば、プリンヌクレオチドのすべてが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである)。センス領域及び/又はアンチセンス領域は、任意でセンス配列及び/又はアンチセンス配列の 3' 末端、5' 末端又は 3' 末端と 5' 末端の双方にて存在する、たとえば、任意の修飾のような末端キャップ修飾を有することができる。センス領域及び/又はアンチセンス領域は任意でさらに約 1~約 4 (たとえば、約 1、2、3、又は 4) の 2'-デオキシリボヌクレオチドを有する 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含むことができる。オーバーハングヌクレオチドはさらに、1 以上(たとえば、約 1、2、3、4 以上)のホスホロチオエート、ホスホノアセテート、及び/又はチオホスホノアセテートのヌクレオチド間結合を含むことができる。センス領域に存在するプリンヌクレオチドは、代わりに 2'-O-メチルプリンヌクレオチドであってもよく(たとえば、プリンヌクレオチドのすべてが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである)、アンチセンス鎖に存在する 1 以上のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである(たとえば、プリンヌクレオチドのすべてが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである)。センス領域における 1 以上のプリンヌクレオチドは代わりにプリンリボヌクレオチドであってもよく(たとえば、プリンヌクレオチドのすべてがプリンリボヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドがプリンリボヌクレオチドである)、アンチセンス領域に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである(たとえば、プリンヌクレオチドのすべてが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが 2'-O-メチルプリンヌクレオチドである)。センス領域における 1 以上のプリンヌクレオチド及び/又はアンチセンス領域に存在する 1 以上のプリンヌクレオチドは代わりに、2'-デオキシヌクレオチド、ロックされた核酸 (LNA) ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド及び 2'-O-メチルヌクレオチドから成る群から選択され得る(たとえば、プリンヌクレオチドすべてが 2'-デオキシヌクレオチド、ロックされた核酸 (LNA) ヌクレオチド、

10

20

30

40

50

2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド及び2'-O-メチルヌクレオチドから成る群から選択され、又は代わりに複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシヌクレオチド、ロックされた核酸(LNA)ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド及び2'-O-メチルヌクレオチドから成る群から選択される)。

【0292】

二本鎖オリゴヌクレオチド

既知の遺伝子に対応するsiRNAのようなdsRNAの選択及び合成は、広く報告されており；たとえば、Ui-Teiら、J. Biomed. Biotechnol. 2006; 65052; Chalkら、BBRC. 2004, 319(1):264~74; Sioud及びLeirdal, Met. Mol. Biol. 2004, 252:457~69; Levenkovaら、Bioinform. 2004, 20(3):430~2; Ui~Teiら、NAR. 2004, 32(3):936~48を参照のこと。修飾されたdsRNAの使用及び製造の例については、Braaschら、Biochem. 2003, 42(26):7967~75; Chiuら、RNA. 2003, 9(9):1034~48; PCT公開番号WO2004/015107及びWO02/44321並びに米国特許第5,898,031号及び同第6,107,094号を参照のこと。

【0293】

本明細書で提供されるのは、所望の遺伝子の発現を下方調節する二本鎖オリゴヌクレオチド(たとえば、siRNAを含むdsRNA)である。本明細書で開示されるdsRNAは、センス鎖が所望の遺伝子のmRNA配列に由来し、アンチセンス鎖がセンス鎖に対して少なくとも実質的に相補性である二本鎖オリゴリボヌクレオチドである。一般に、標的mRNAからの若干の逸脱はsiRNA活性を損なうことなく認容される(たとえば、Czauderna et al., NAR. 2003, 31(11):2705~2716を参照)。本明細書で開示されるdsRNAはmRNAを破壊して又は破壊することなく転写後のレベルで遺伝子発現を阻害する。理論に束縛されないで、dsRNAは、特異的な切断及び分解についてmRNAを標的とし、標的とされたメッセージからの翻訳を阻害するsiRNAであり得る。

【0294】

他の実施形態では、2つの鎖の少なくとも一方が5'末端にて少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーハングを有し得るが、そのオーバーハングは少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチドから成り得る。RNA二本鎖の長さは約16~約40リボヌクレオチドであり、好ましくは19リボヌクレオチドである。さらに、各鎖の長さは、独立して約16~約40塩基、好ましくは18~23塩基、さらに好ましくは19リボヌクレオチドから成る群から選択される長さを有し得る。

【0295】

特定の実施形態では、前記第1の鎖と標的核酸との間の相補性は完全である。一部の実施形態では、鎖は実質的に相補性であり、すなわち、前記第1の鎖と標的mRNAの間、又は第1の鎖と第2の鎖の間で1、2、又は5までのミスマッチを有する。実質的に相補性は、別の配列に対する約70%を超え、100%未満の相補性を指す。たとえば、19塩基対から成る二本鎖領域では、ミスマッチ1つは94.7%の相補性を生じ、ミスマッチ2つは約89.5%の相補性を生じ、ミスマッチ3つは約84.2%の相補性を生じ、ミスマッチ4つは約79%の相補性を生じ、ミスマッチ5つは約74%の相補性を生じ、二本鎖を実質的に相補性にする。従って、実質的に同一性は別の配列に対する約70%を超える同一性を指す。

【0296】

第1の鎖と第2の鎖は、非核酸ポリマー、とりわけ、ポリエチレングリコールで構成され得るループ構造によって連結され得る。或いは、ループ構造は、修飾された及び未修飾のリボヌクレオチド並びに修飾された及び未修飾のデオキシリボヌクレオチドを含む核酸で構成され得る。

【0297】

さらに、dsRNAの第1の鎖の5'末端は第2の鎖の3'末端に連結されてもよく、又は第1の鎖の3'末端は第2の鎖の5'末端に連結されてもよく、前記連結は、通常2～100の核酸塩基、好ましくは約2～約30の核酸塩基の間の長さを有する核酸リンカーを介する。

【0298】

一部の実施形態では、化合物は化合物のアンチセンス鎖及びセンス鎖の少なくとも一方で修飾された交互のリボヌクレオチドを含み、19量体及び23量体のオリゴマーについては、アンチセンス鎖の5'及び3'末端でのリボヌクレオチドはその糖残基で修飾され、センス鎖の5'及び3'末端でのリボヌクレオチドはその糖残基で修飾されない。21量体のオリゴマーについては、センス鎖の5'及び3'末端でのリボヌクレオチドはその糖残基で修飾され、アンチセンス鎖の5'及び3'末端でのリボヌクレオチドはその糖残基で修飾されず、又は3'末端にて任意の追加の修飾を有し得る。上述のように、一部の実施形態では、アンチセンス鎖の真ん中のヌクレオチドは修飾されない。

【0299】

一実施形態によれば、オリゴヌクレオチド/siRNAのアンチセンス鎖及びセンス鎖は3'末端でのみリン酸化され、5'末端ではリン酸化されない。別の実施形態によれば、アンチセンス鎖及びセンス鎖はリン酸化されない。さらに別の実施形態によれば、センス鎖の最も5'のリボヌクレオチドが修飾されて生体内での5'リン酸化の可能性がなくなる。

【0300】

本明細書で開示される修飾/構造のいずれかを有する本明細書で開示されるdsRNA配列が調製される。配列に加えた配列の組み合わせは新規であり、本明細書で開示される状態の治療に有用である。

【0301】

「標的」又は「標的遺伝子」は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPのRNA及び配列番号1～12で示されるmRNAのポリヌクレオチド配列、又は好ましくは少なくとも70%の同一性、さらに好ましくは80%の同一性、一層さらに好ましくは90%又は95%の同一性を有するその相同配列を指す。これは、本明細書で記載されるような変異、変化、多型現象又は修飾を受けている配列番号1～12に由来する任意の配列を包含する。

【0302】

本明細書で提供されるのは、治療特性を持つ、新規の未修飾の及び化学的に修飾されたオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド化合物である。特に本明細書で提供されるのは、化学的に修飾されたdsRNAである。本明細書で開示されるdsRNAは、以下の利点：高い活性又は低い毒性又は低いオフターゲット効果又は低い免疫応答の1以上を有する新規の構造及び新規の修飾を持ち；dsRNAの新規の修飾は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP遺伝子の発現を下方調節すること、阻害すること又は減衰することに有用な二本鎖RNAに有益に適用され、種々の医療状態の治療における新規のsiRNAの使用に有益に適用される。治療される特定の状態には、臓器移植、たとえば、肺移植患者における移植後合併症、たとえば、一次移植片不全、虚血性再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植反応及び/又は一次移植片機能不全(PGD)を予防すること、治療すること及び減衰させることが挙げられるが、これらに限定されない。

【0303】

本明細書で開示される化合物は、高い活性、高い安定性、低い毒性、低いオフターゲット効果及び/又は低い免疫応答の1以上を付与する構造及び修飾を持つ。本明細書で開示される二本鎖構造は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP遺伝子の発現を妨げる又は減衰させるのに有用な二本鎖RNAに有益に適用される。

【0304】

本明細書で開示されるのはまた、臓器移植、たとえば、肺移植患者における移植後合併

症、たとえば、一次移植片不全、虚血性再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植反応及び／又は一次移植片機能不全（PGD）を予防すること、治療すること及び減衰させることにおける化学的に修飾されたdsRNAの使用である。本明細書で開示されるようなdsRNAの合成に有用なセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドは、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）にて提供されている。

【0305】

配列番号：13～3060は構造（A1）に係るdsDNA化合物を生成してTLR2を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供し；配列番号：3061～5846は、構造（A2）に係るdsDNA化合物を生成してTLR2を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供する。TLR2の発現を下方調節するために二本鎖核酸分子を生成するのに有用な特定の好まれるオリゴヌクレオチド対は以下の表1で示される。

【0306】

配列番号：5847～8612は、構造（A1）に係るdsRNA化合物を生成してTLR4を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供し、配列番号：8613～12144は、構造（A2）に係るdsRNA化合物を生成してTLR4を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供する。

【0307】

配列番号：12145～13924は、構造（A1）に係るdsRNA化合物を生成してMYD88を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供し、配列番号：13925～16332は、構造（A2）に係るdsRNA化合物を生成してMYD88を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供する。MYD88の発現を下方調節するために二本鎖核酸分子を生成するのに有用な特定の好まれるオリゴヌクレオチド対は以下の表3で示される。

【0308】

配列番号：16333～16882は、構造（A1）に係るdsRNA化合物を生成してTICAM1を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供し、配列番号：16333～18242は、構造（A2）に係るdsRNA化合物を生成してTICAM1を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供する。TICAM1の発現を下方調節するために二本鎖核酸分子を生成するのに有用な特定の好まれるオリゴヌクレオチド対は以下の表4で示される。

【0309】

配列番号：18243～19010は、構造（A1）に係るdsRNA化合物を生成してTIRAPを標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供し、配列番号：19011～20606は、構造（A2）に係るdsRNA化合物を生成してTIRAPを標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドを提供する。TIRAPの発現を下方調節するために二本鎖核酸分子を生成するのに有用な特定の好まれるオリゴヌクレオチド対は以下の表5で示される。

【0310】

追加の21量体又は23量体のdsRNA配列は、本明細書で開示される19量体オリゴヌクレオチド配列の5'及び／又は3'の伸長によって生成される。そのような伸長は好ましくは相当するmRNA配列に対して相補性である。

【0311】

TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子を阻害する本明細書で開示される方法、分子及び組成物が本明細書で詳細に議論され、前記分子及び／又は組成物のいずれかが前記状態の1以上で苦しむ対象の治療にて有益に採用される。

【0312】

10

20

30

40

50

本明細書全体を通して、ヌクレオチドの位置は1～19に番号付けられ、アンチセンス鎖又はセンス鎖の5'末端から数えられる。たとえば、(N)xにおける1位はオリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖における5'末端のヌクレオチドを指し、(N')yにおける1位はオリゴヌクレオチドのセンス鎖における5'末端のヌクレオチドを指す。構造A2に係る二本鎖核酸分子では、N1はアンチセンス鎖の1位(5'末端のヌクレオチド)を表し、N2はセンス鎖の3'末端のヌクレオチドを表す。

【0313】

本明細書で開示される追加の分子は、連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり、その際、そのようなヌクレオチドの第1の断片は第1の阻害性RNA分子をコードし、そのようなヌクレオチドの第2の断片は第2の阻害性RNA分子をコードし、そのようなヌクレオチドの第3の断片は第3の阻害性RNA分子をコードする。第1、第2及び第3の断片のそれぞれは、二本鎖RNAの一方の鎖を含んでもよく、第1、第2及び第3の断片はリンカーによって一緒に連結され得る。さらに、オリゴヌクレオチドは1以上のリンカーによって一緒に連結された3つの二本鎖断片を含み得る。

【0314】

従って、本明細書で開示される分子の1つは、3つの阻害性RNA分子をコードする連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり；前記オリゴヌクレオチドは、三重鎖構造を持つので、3つの二本鎖アームは、上記で提示されたリンカーのいずれかのような1以上のリンカーによって一緒に連結される。この分子が「星」様構造を形成し、本明細書ではRNA星とも呼ばれ得る。そのような構造は、本発明の譲受人に譲渡され、参照によってその全体が本明細書に組み入れられるPCT特許公開番号WO2007/091269に開示されている。

【0315】

前記三重鎖オリゴヌクレオチドは、以下の一般構造を有するオリゴリボヌクレオチドであってもよい。

5' オリゴ1 (センス) リンカーA オリゴ2 (センス) 3'
 3' オリゴ1 (アンチセンス) リンカーB オリゴ3 (アンチセンス) 5'
 3' オリゴ3 (アンチセンス) リンカーC オリゴ2 (アンチセンス) 5'

又は

5' オリゴ1 (センス) リンカーA オリゴ2 (アンチセンス) 3'
 3' オリゴ1 (アンチセンス) リンカーB オリゴ3 (センス) 5'
 3' オリゴ3 (アンチセンス) リンカーC オリゴ2 (センス) 5'

又は

5' オリゴ1 (センス) リンカーA オリゴ3 (アンチセンス) 3'
 3' オリゴ1 (アンチセンス) リンカーB オリゴ2 (センス) 5'
 5' オリゴ3 (センス) リンカーC オリゴ2 (アンチセンス) 3'

式中、リンカーA、リンカーB又はリンカーCの1以上が存在し；鎖の極性及び分子の一般構造がそのままである限り、2以上のオリゴヌクレオチドとリンカーA～Cの1以上の組み合わせが可能である。さらに、リンカーA～Cの2以上が存在するのであれば、それらは同一であっても異なってもよい。

【0316】

従って、三重のアーム構造が形成され、各アームはセンス鎖及び相補性のアンチセンス鎖を含む(すなわち、オリゴ1センス鎖に対するオリゴ1アンチセンス塩基対等)。三重のアーム構造は三重の鎖であってもよく、それによって各アームは塩基の対合を持つ。

【0317】

さらに、上記三重鎖構造は、鎖の1以上にてリンカーの代わりにギャップを有し得る。ギャップを1つ持つそのような分子は、技術的には三重鎖ではなく四重鎖であり；挿入する追加のギャップ又はニックは追加の鎖を有する分子をもたらす。本発明の発明者らにより得られた予備的な結果は、前記のギャップのある分子が類似のしかし、ギャップのない分子よりもTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP標的遺伝子を

阻害することにおいて活性があることを示している。

【0318】

一部の実施形態では、本明細書で開示される新規 dsRNA 化合物のアンチセンス鎖もセンス鎖も 3' 及び 5' 末端ではリン酸化されない。他の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖のいずれか又は双方が 3' 末端にてリン酸化される。さらに別の実施形態では、非切断性のリン酸基を用いてセンス鎖及びアンチセンス鎖のいずれか又は双方が 3' 末端にてリン酸化される。さらに別の実施形態では、切断性又は非切断性のリン酸基を用いてセンス鎖及びアンチセンス鎖のいずれか又は双方が末端 5' 末端位置にてリン酸化される。さらに別の実施形態では、切断性又は非切断性のリン酸基を用いてセンス鎖及びアンチセンス鎖のいずれか又は双方が末端 2' 末端位置にてリン酸化される。一部の実施形態では、dsRNA 化合物は平滑末端であり、末端ではリン酸化されないが、比較実験は、3' 末端の一方又は双方でリン酸化された dsRNA 化合物が非リン酸化化合物に比べて生体内で同様の活性を有することを示している。

10

【0319】

本明細書で開示される修飾／構造のいずれかを有する、本明細書で開示される dsRNA 配列を調製することができる。配列に加えた構造の組み合わせは新規であり、本明細書で開示される状態の治療に使用することができる。

【0320】

特に指示されない限り、本明細書で議論される構造の好まれる実施形態では、各連続する N と N' の間での共有結合はホスホジエステル結合である。

20

【0321】

上記の構造すべてについて一部の実施形態では、アンチセンス鎖のオリゴヌクレオチド配列はセンス鎖のオリゴヌクレオチド配列に対して完全に相補性である。他の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖は実質的に相補性である。特定の実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号：1～12 のいずれか 1 つにて示される標的 mRNA の約 18～約 40 の連続するリボヌクレオチドに対して完全に相補性である。

【0322】

他の実施形態では、アンチセンス鎖は配列番号：1～12 のいずれか 1 つにて示される標的 mRNA の約 18～約 40 の連続するリボヌクレオチドに対して実質的に相補性である。

30

【0323】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるのは、配列番号：13～20606 のいずれか 1 つで開示されるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む発現ベクターである。一部の実施形態では、発現ベクターはさらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドに対して相補性を有するセンスオリゴヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、さらに提供されるのは配列番号 13～20606 又は 20602～20684 のいずれか 1 つで開示されるセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドを含む発現ベクターを含む細胞である。本明細書でさらに開示されるのは、配列番号 13～20606 又は 20602～20684 のいずれか 1 つで開示されるセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドを含む発現ベクターを含む細胞にて発現される siRNA、それを含む医薬組成物及び本明細書で開示される障害のいずれか 1 つの治療のためのその使用である。

40

【0324】

他の実施形態では、本明細書で開示されるのは、配列番号 13～20606 のいずれか 1 つで開示されるアンチセンスのオリゴヌクレオチドを含む第 1 の発現ベクター及び第 1 の発現ベクターに含まれるアンチセンスのオリゴヌクレオチドに対して相補性を有するセンスのオリゴヌクレオチドを含む第 2 の発現ベクターである。種々の実施形態では、本明細書で開示されるのは、配列番号 13～20606 のいずれか 1 つで開示されるアンチセンスのオリゴヌクレオチドを含む第 1 の発現ベクター及び第 1 の発現ベクターに含まれるアンチセンスのオリゴヌクレオチドに対して相補性を有するセンスのオリゴヌクレオチドを含む第 2 の発現ベクターを含む細胞である。本明細書でさらに開示されるのは、そのよ

50

うな第1及び第2の発現ベクターを含む細胞にて発現されるdsRNA、それを含む医薬組成物及び本明細書で開示される疾患及び障害のいずれか1つの治療のためのその使用である。

【0325】

RNA干渉

RNA干渉(RNAi)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が関与する現象である。RNAiは、小分子干渉RNA(siRNA)が介在する哺乳類における配列特異的な転写後遺伝子のサイレンシングの過程を指す(Fire et al, Nature 1998. 391, 806) or microRNAs(miRNA; Ambros, Nature 2004 431:7006, 35 0~55; and Bartel, Cell. 2004. 116(2) : 281~97)。RNAiは、Gilら、Apoptosis, 2000. 5:107~114, Elbashirら、Nature、2001, 411:494~498及びCaplenら、PNAS., USA, 2001, 98:9742~9747を含む多数の出版物に記載されている。siRNAは、内因性若しくは細胞性の相方の遺伝子/mRNA、又はウイルス核酸のような外因性の遺伝子の発現を部分的に又は完全に阻害する二本鎖RNA分子である。RNA干渉のメカニズムは以下に詳説される。

10

【0326】

研究によってsiRNAはヒトを含む哺乳類にて生体内で有効であることが明らかにされている。siRNAの治療応用の概説については、たとえば、Barik(Mol. Med, 2005, 83:764-773), Chakraborty(Current Drug Targets, 2007, 8(3):469-82); Durcan(Mol. Pharma. 2008. 5(4):559-566); Kim及びRossi(BioTechniques, 2008. 44:613-616); Grimm及びKay, (JCI, 2007. 117(12):3633-41)を参照のこと。

20

【0327】

RNAi現象に関する多数のPCT出願が公開されている。それらには、PCT公開WO00/44895; PCT公開WO00/49035; PCT公開WO00/63364; PCT公開WO01/36641; PCT公開WO01/36646; PCT公開WO99/32619; PCT公開WO00/44914; PCT公開WO01/29058; 及びPCT公開WO01/75164が挙げられる。

30

【0328】

RNA干渉(RNAi)は細胞質のタンパク質複合体に侵入するdsRNA種の能力に基づき、次いでそれは相補性の細胞性RNAを標的とし、特異的にそれを分解する。RNA干渉反応は、一般にRNA誘導型サイレンシング複合体と呼ばれる、dsRNAを含有するエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、それは、dsRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補性の配列を有する一本鎖RNAの切断に介在する。標的RNAの切断は、dsRNA二本鎖のアンチセンス鎖に相補性の領域の中央で生じ得る(Elbashir et al., Genes Dev., 2001, 15(2):188-200)。さらに詳細には、III型RNA分解酵素((DICER, DROSHA, etc.; Bernstein et al., Nature, 2001, 409(6818):363~6; Lee et al., Nature, 2003, 425(6956):415-9)によってさらに長いdsRNAが短い(17~29bp)dsRNA断片(小分子阻害性RNA、「siRNA」とも呼ばれる)に消化される。RISCタンパク質複合体はこれらの断片及び相補性のmRNAを認識する。全過程は標的mRNAのエンドヌクレアーゼ切断によって完結する(McManus & Sharp, Nature Rev Genet, 2002, 3(10):737~47; Paddison & Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003, 5(3):217~24) (これらの用語及び提案された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 and PCT公開WO 01/36646を参照のこと)。

40

【0329】

既知の遺伝子に対応するdsRNAの選択及び合成は広く報告されており;たとえば、Ui-Teiら、J. Biomed. Biotechnol. 2006; 2006:65

50

052; Chalkら、BBRC. 2004, 319(1):264-74; Sioud
及びLeirdal, Met. Mol. Biol.; 2004, 252:457-69;
Levenkovaら、Bioinform. 2004, 20(3):430-2; U-
Teiら、Nuc. Acid Res. 2004, 32(3):936-48を参照の
こと。修飾されたdsRNAの使用及び製造の例については、Braaschら、Bio-
chem., 2003, 42(26):7967-75; Chiuら、RNA, 2003
, 9(9):1034-48; PCT公開WO2004/015107 (Atugen)
; WO02/44321 (Tuschlら)並びに米国特許第5,898,031号及び
同第6,107,094号を参照のこと。

【0330】

dsRNAの合成

所有権のあるアルゴリズム及び本明細書で開示される標的遺伝子の既知の配列を用いて、多数の可能性があるdsRNAの配列を生成する。上記明細書に係るdsRNA分子は本明細書で記載されるように本質的に調製される。

【0331】

本明細書で開示されるdsRNAは、リボ核酸（又はデオキシリボ核酸）オリゴヌクレオチドの合成について当該技術で周知である方法のいずれかによって合成される。そのような合成はとりわけ、Beaucage及びIyer, Tetrahedron, 1992; 48:2223-2311; Beaucage及びIyer, Tetrahedron, 1993; 49:6123-6194及びCaruthersら, Methods Enzymol. 1987; 154:287-313に記載されており; チオエートの合成はとりわけ、Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 1985; 54:367-402に記載されており; RNA分子の合成はSproat, Herdewijn, P. 編のHumana Press, 2005; Kap. 2:17-31に記載されており; 各下流の工程はとりわけ、Pingoudら、Oliver, R. W. A. 編のIRL Press, 1989; Kap. 7:183-208に記載されている。

【0332】

他の合成手順は当該技術で既知であり、たとえば、Usmanら、1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringerら、1990, NAR., 18, 5433; Wincottら、1995, NAR. 23, 2677-2684; 及びWincottら、1997, Methods Mol. Biol., 74, 59に記載された手順では、たとえば、5'末端におけるジメトキシトリチル及び3'末端におけるホスホロアミダイトのような一般的な核酸保護剤及びカップリング剤が使用される。修飾された（たとえば、2'-O-メチル化）ヌクレオチド及び未修飾のヌクレオチドは所望のように取り込まれる。

【0333】

本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、別々に合成し、合成及び／又は脱保護の後、たとえば、ライゲーション (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., 国際特許公開番号WO93/23569; Shabarova et al., 1991, NAR 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204) 又はハイブリッド形成によって合成後一緒に連結することができる。

【0334】

市販の機械（とりわけ、Applied Biosystemsから利用可能な）を使用することができ; 本明細書で開示される配列に従ってオリゴヌクレオチドが調製されることが留意される。化学的に合成した断片の重複する対は、当該技術で周知の方法を用いて連結することができる（たとえば、米国特許第6,121,426号を参照）。鎖を別々に合成し、次いで試験管にて互いにアニーリングする。次いでアニーリングされなかった（それらの一方の過剰のために）一本鎖オリゴヌクレオチドから二本鎖RNAをHPLCによって分離する。本明細書で開示されるdsRNA又はdsRNA断片に関して、2

10

20

30

40

50

以上のそのような配列を合成し、本明細書で使用するために一緒に連結することができる。

【0335】

たとえば、米国特許公開番号US2004/0019001に記載されたように直列合成法を介して本明細書で開示される化合物を合成することができ、その際、双方のdsRNA鎖は切断可能なリンカーによって切断される単一の連続したオリゴヌクレオチド断片又は鎖として合成され、その後、切断されてハイブリッド形成し、RNA二本鎖の精製を可能にするRNA断片又は鎖を分離する。リンカーはポリヌクレオチドリinker又は非ヌクレオチドリinkerから選択される。

【0336】

医薬組成物

本明細書で開示される化合物が未加工の化学物質として投与されることが可能である一方で、それを医薬組成物として提示することが好ましい。従って、本明細書で開示されるのは、本明細書で開示される1以上の化学的に修飾されたdsRNA化合物と薬学上許容可能な賦形剤又はキャリアを含む医薬組成物である。一部の実施形態では、医薬組成物は本明細書で開示される2以上の新規dsRNA化合物を含む。

【0337】

さらに本明細書で開示されるのは、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子を阻害するのに有効な量での本明細書で開示される1以上の化合物に共有結合する又は非共有結合する少なくとも1つの二本鎖RNA分子と、薬学上許容可能なキャリアを含む医薬組成物である。一部の実施形態では、RNA化合物は内因性の細胞性複合体／酵素によって細胞内で処理されて本明細書で開示されるような1以上の化合物を生成する。

【0338】

さらに本明細書で開示されるのは、薬学上許容可能なキャリアと、細胞内で標的遺伝子の発現を阻害するのに有効な量での本明細書で開示される化学的に修飾されたdsRNA化合物の1以上を含む医薬組成物であり、該化合物は配列番号1～12に示される標的mRNAの配列に対して実質的に相補性である配列を含む。治療用の二本鎖核酸分子を生成するのに有用な好まれるオリゴヌクレオチド配列は、配列番号：13～5846（TLR2を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAPを標的とする）、好ましくは配列番号：20607～20684に示される。

【0339】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるdsRNA化合物は医薬組成物における主要な有効成分である。他の実施形態では、本明細書で開示されるdsRNA化合物は、2以上のdsRNAを含有する医薬組成物における有効成分の1つであり、前記医薬組成物はさらに、本明細書で開示される遺伝子を標的とする1以上の追加のdsRNA分子で構成される。他の実施形態では、本明細書で開示されるdsRNA化合物は、2以上のdsRNAを含有する医薬組成物における有効成分の1つであり、前記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dsRNA分子で構成される。一部の実施形態では、本明細書で開示される2以上のdsRNA化合物による標的遺伝子の同時阻害は、本明細書で開示される疾患の治療に相加的又は相乗的な効果を提供する。一部の実施形態では、たとえば、TLR2遺伝子及びTLR4の同時阻害は、本明細書で開示される疾患の治療に相加的又は相乗的な効果を提供する。

【0340】

一部の実施形態では、本明細書で開示される状態の治療に対する高いターゲッティングを達成するために、本明細書で開示されるdsRNA化合物は、標的細胞上に発現される細胞表面の内部移行可能な分子に対する抗体又はアプタマーに（共有結合で又は非共有結合で）連結又は結合される。特定の一実施形態では、抗Fas抗体（好ましくは中和抗体

10

20

30

40

50

）を本明細書で開示される s i R N A のような二本鎖 R N A 分子と（共有結合で又は非共有結合で）結合させる。種々の実施形態では、リガンド／抗体のように作用するアプタマーを本明細書で開示される s i R N A のような二本鎖 R N A 分子と（共有結合で又は非共有結合で）結合させる。

【0341】

送達

化学的に修飾された二本鎖 R N A 分子は、化合物自体（たとえば、裸の s i R N A として）又は薬学上許容可能な塩として投与され、単独で、又は 1 以上の薬学上許容可能なキャリア、溶媒、希釈剤、賦形剤、補助剤及びビヒクルと組み合わせた有効成分として投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような d s R N A 分子はキャリア又は希釈剤と共に調製された裸の分子の直接適用によって標的組織に送達される。

10

【0342】

用語「裸の s i R N A」は、ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム製剤、リポフェクチン又は沈殿剤等を含む、細胞への侵入を補助する、促進する又は円滑にする送達ビヒクルを含まない s i R N A 分子を指す。たとえば、P B S 中の s i R N A は「裸の s i R N A」である。

【0343】

哺乳類細胞への d s R N A の送達の改善及び向上を具体的に目指した送達系は開発されている（たとえば、Shen et al FEBS Let. 539: 111-114 (2003), Xia et al., Nat. Biotech. 20: 1006~1010 (2002), Reich et al., Mol. Vision 9: 210-216 (2003), Sorensen et al., J. Mol. Biol. 327: 761~766 (2003), Lewis et al., Nat. Gen. 32: 107-108 (2002) and Simeoni et al., NAR 31, 11: 2717-2724 (2003)を参照）。s i R N A は最近霊長類における遺伝子発現の阻害に上手く利用されている（たとえば、Tolentino et al., Retina 2004. 24(1):132-138）。

20

【0344】

薬学上許容可能なキャリア、溶媒、希釈剤、賦形剤、補助剤及びビヒクルは一般に、本明細書で開示される活性のある s i R N A 化合物と反応しない不活性な非毒性の固体又は液体の充填剤、希釈剤又は被包する物質を指す。たとえば、本明細書で開示される s i R N A は、ポリエチレンイミン（P E I）と共に、P E I 誘導体、たとえば、分枝鎖 P E I のオレイン酸及びステアリン酸修飾の誘導体と共に、キトサンと共に、又はポリ（乳酸-
c o -グリコール酸）（P L G A）と共に製剤化される。たとえば、リボソーム、ミクロ
スフェア又はナノスフェア及びナノ粒子にて組成物を製剤化することは安定性及び有益な
吸収を高め得る。

30

【0345】

さらに、異なった呼吸器治療様式（たとえば、液体換気又は噴霧化 P F C）が肺損傷の動物モデル及び臨床試験にて肺コンプライアンスを改善することに加えて肺の炎症反応を低下させることが示されているので、組成物は、人工酸素キャリア、たとえば、パーフルオロカーボン（P F C）、たとえば、臭化パーフルオロオクチル（パーフルブロン）を含み得る（Lehmler HJ. 2008. Expert Review of Respiratory Medicine, vol. 2, No. 2: 273~289）。

40

【0346】

本明細書で開示されるような送達系の例には、米国特許第 5, 2 2 5, 1 8 2 号；同第 5, 1 6 9, 3 8 3 号；同第 5, 1 6 7, 6 1 6 号；同第 4, 9 5 9, 2 1 7 号；同第 4, 9 2 5, 6 7 8 号；同第 4, 4 8 7, 6 0 3 号；同第 4, 4 8 6, 1 9 4 号；同第 4, 4 4 7, 2 3 3 号；同第 4, 4 4 7, 2 2 4 号；同第 4, 4 3 9, 1 9 6 号；及び同第 4, 4 7 5, 1 9 6 号が挙げられる。多数のそのような送達系及びモジュールは当業者に周知である。特定の実施形態では、吸入用の製剤が選択される。

【0347】

従って、一部の実施形態では、本明細書で開示される s i R N A 分子は、リボソーム製剤及びリポフェクチン製剤で送達され、当業者に周知の方法によって調製される。そのよ

50

うな方法は、参照によって本明細書に組み入れられる、たとえば、米国特許第 5, 593, 972 号、同第 5, 589, 466 号、及び同第 5, 580, 859 号に記載されている。

【0348】

本明細書で開示されるような化合物の改善された送達のための追加の製剤には、標的とする分子への s i R N A 分子の抱合を挙げることができる。抱合は普通、サイレンシング活性を妨害しないように、s i R N A のセンス鎖への標的とする分子の共有結合を介して形成される。本明細書で有用な可能性のある標的とする分子には、タンパク質、ペプチド及びアプタマー、並びにたとえば、コレステロールのような天然の化合物が挙げられる。標的とする抗体については、プロタミン融合タンパク質への抱合が使用されている（たとえば、Song et al., Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, Nat Biotechnol. 2005. 23(6):709-17を参照）。

10

【0349】

裸の s i R N A、又は本明細書で開示されるような化学的に修飾された s i R N A を含む医薬組成物は、個々の患者の臨床状態、治療される疾患、投与の部位と方法、投与のスケジュール、患者の年齢、性別、体重、及び主治医に知られた他の因子を考慮して適正な医療行為に従って投与され、投薬される。

【0350】

従って、本明細書における目的で「治療上有効な量」は、当該技術で知られるようなそのような考慮によって決定される。用量は、改善された生存率又はさらに迅速な回復、又は症状及び当業者による適当な対策として選択されるような他の指標の改善若しくは排除を含むがこれらに限定されない改善を達成するのに有効でなければならない。本明細書で開示される s i R N A は、単回用量又は複数回用量で投与することができる。

20

【0351】

一般に、ヒトにとっての d s R N A 化合物の有効な用量は、単回投与又は短い（たとえば、1～5分）間隔で与える、灌流後数分～数時間以内に投与する一連の投与の計画にて、用量当たり体重 k g 当たり 1 n g / k g ～約 20～10 m g / k g、好ましくは用量当たり体重 k g 当たり約 0.01 m g ～約 2～100 m g / k g の範囲である。

【0352】

本明細書で開示されるような化学的に修飾された d s R N A 化合物は、従来の投与経路のいずれかによって投与される。化学的に修飾された d s R N A 化合物は、経口で、皮下で、又は静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、眼内、冠動脈内、経鼓膜及び鼻内の投与、並びにクモ膜下及び点滴法を含む非経口で投与される。化合物の埋め込みも有用である。

30

【0353】

非侵襲性の投与、たとえば、注射又は局所若しくは部分的な投与のために液体形態が調製される。用語、注射には、皮下、経皮、静脈内、筋肉内、クモ膜下、眼内、経鼓膜、及び他の非経口の投与経路が含まれる。液体組成物には、有機共溶媒を伴った又は伴わない水溶液、水性又は油性の懸濁液、食用油によるエマルジョン、並びに類似の医薬ビヒクルが含まれる。

【0354】

対象が肺移植を受けている実施形態では、本明細書で開示されるような治療用の化合物及び組成物は好ましくは、これらの組成物／化合物を含有するエアゾールの吸入によって、前記組成物の気管内点滴によって、又は換気装置による吸入によって（たとえば、意識のない患者への投与）、対象に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるような s i R N A 化合物は肺移植を受けている対象の肺への吸入によって投与される。医薬組成物の肺への送達に関するさらなる情報については、Weissら、Human Gene Therapy 1999. 10:2287-2293; Densmoreら、Molecular therapy 1999. 1:180-188; Gautamら、Molecular Therapy 2001. 3:551-556; 並びに Shahiwal a 及び Misra, AAPS PharmSciTech 2004. 24;

40

50

6 (3) : E 4 8 2 - 6 . を参照のこと。さらに、s i R N A についての呼吸器製剤は、米国特許出願公開番号 2 0 0 4 / 0 0 6 3 6 5 4 に記載されている。s i R N A についての呼吸器製剤は、米国特許出願公開番号 2 0 0 4 / 0 0 6 3 6 5 4 に記載されている。本発明の譲受人への国際特許公開番号 W O 2 0 0 8 / 1 3 2 7 2 3 は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられるが、呼吸器系への s i R N A の治療用送達を開示している。

【0355】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるような化学的に修飾された d s R N A は、たとえば、静脈内投与による全身性送達のために製剤化される。

【0356】

加えて、特定の実施形態では、本明細書で開示される新規の治療で使用するための組成物は、たとえば、鼻内投与用のエアゾールとして形成される。特定の実施形態では、本明細書で開示される新規の治療で使用するための組成物は、たとえば、鼻内点滴用の点鼻剤として形成される。

【0357】

治療方法

態様の 1 つでは、本明細書で開示されるのは、治療上有効な量の、本明細書で開示されるような s i R N A 化合物を対象に投与することを含む、T L R 2、T L R 4、M Y D 8 8、T I C A M 1 及び T I R A P の発現又は活性に関連する移植後合併症、傷害又は状態で苦しむ対象を治療する方法である。好まれる実施形態では、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。

【0358】

「対象を治療すること」は、状態、合併症又は傷害に関連する症状を改善する、重症度を減らす又は状態を治癒させる、又は状態が生じるのを防ぐのに有効な治療物質を対象に投与することを指す。「治療」は、治療用処置及び予防用又は防御用の対策の双方を指し、目的は、状態、合併症又は傷害を防ぐこと、又はその症状を軽減することである。治療が必要なものには、状態をすでに経験しているもの、状態を有しやすいもの、状態が防がれるべきものが挙げられる。本明細書で開示される化合物は、状態の発症の前、その間又はその後に投与される。種々の実施形態では、対象は、限定しないで、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全 (P G D) から選択される状態、合併症又は傷害について臓器移植 (たとえば、肺移植) 後、治療されている。

【0359】

「治療上有効な量」は、対象における又は改善された生存率又はさらに迅速な回復、又は症状及び当業者による適当な対策として選択されるような他の指標の改善若しくは排除を含むが、これらに限定されないその生理的な系における改善を達成するのに有効である医薬化合物又は組成物の量を指す。

【0360】

本明細書で開示される疾患を治療する方法は、追加の阻害剤、以下で詳述されるような有効成分 (たとえば、s i R N A) の医薬特性を改善する物質、又は上述の状態、合併症及び障害のいずれかで苦しむ又はそれに感受性である対象の治療にて有効であることが知られる追加の化合物 (たとえば、免疫抑制剤) と併せて又は併用で T L R 2、T L R 4、M Y D 8 8、T I C A M 1 及び T I R A P の d s R N A 阻害剤を投与することを含む。別の態様では、本明細書で提供されるのは、少なくとも 1 つの追加の治療上の活性剤との治療用二本鎖 R N A 分子の併用である。さらに、提供されるのは、本明細書で開示されるような 1 以上の化学的に修飾された R N A 分子に標的遺伝子の m R N A を接触させることを含む、対照と比べて少なくとも 4 0 % 標的遺伝子の発現を下方調節する方法である。

【0361】

一実施形態では、本明細書で開示されるような化学的に修飾された d s R N A 化合物は

、哺乳類のTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子を阻害し、又は下方調節し、それによって阻害又は下方調節は、遺伝子機能の阻害又は下方調節、ポリペプチドの阻害又は下方調節及びmRNA発現の阻害又は下方調節を含む群から選択される。

【0362】

本明細書で開示されるのは、本明細書で開示される1以上のdsRNAとTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP遺伝子のmRNA転写物を接触させることを含む対照と比べて、少なくとも約40%、好ましくは50%、60%、70%、さらに好ましくは75%、80%、又は90%TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP遺伝子の発現を阻害する方法である。

10

【0363】

一実施形態では、本明細書で開示される化学的に修飾されたdsRNA化合物による阻害の効果は、mRNA又は対応するタンパク質に対するsiRNAの効果調べることによって判定し、それによって阻害は、機能の阻害（たとえば、酵素アッセイ又は天然の遺伝子／ポリペプチドの既知の相互作用物質との結合アッセイによって調べられる）、タンパク質の阻害（たとえば、ウェスタンブロッティング、ELISA又は免疫沈降によって調べられる）及び標的遺伝子のmRNAの発現の阻害（たとえば、ノーザンブロッティング、定量的RT-PCR、その場でのハイブリッド形成又はマイクロアレイハイブリッド形成によって調べられる）から成る群から選択される。

【0364】

20

一実施形態では、化学的に修飾された二本鎖RNA分子は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子又はポリペプチドを下方調節するが、それによって下方調節は、機能の下方調節（たとえば、酵素アッセイ又は天然の遺伝子／ポリペプチドの既知の相互作用物質との結合アッセイによって調べられる）、タンパク質の下方調節（たとえば、ウェスタンブロッティング、ELISA又は免疫沈降によって調べられる）及び標的遺伝子のmRNAの発現の下方調節（たとえば、ノーザンブロッティング、定量的RT-PCR、その場でのハイブリッド形成又はマイクロアレイハイブリッド形成によって調べられる）から成る群から選択される。

【0365】

追加の実施形態では、臓器移植（たとえば、肺移植）後の対象を治療する方法が提供され、その際、対象は、哺乳類のTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子のレベルの上昇を伴う状態、合併症又は障害に苦しみ、又はそれに感受性であり、方法は、本明細書で開示される化学的に修飾されたsiRNA化合物又は組成物を治療上有効な量で対象に投与し、それによって対象を治療することを含む。

30

【0366】

本明細書で提供されるのは、哺乳類のTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子の発現の阻害が有益である慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全（PGD）の治療における、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子から選択される哺乳

40

遺伝子の発現を下方調節する化合物、特に新規の小分子干渉RNA（siRNA）の使用である。

【0367】

哺乳類のTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子又はポリペプチドの発現を阻害する方法、新規の化学的に修飾されたdsRNA及び前記dsRNAを含む医薬組成物を本明細書で詳細に議論し、前記dsRNA及び／又は医薬組成物のいずれかが前記状態のいずれかで苦しむ又はそれに感受性である対象の治療に有益に採用される。既知の化合物は本発明から除外されることが明白に理解されるべきである。既知の化合物及び組成物を用いた新規の治療方法は本発明の範囲内に入る。

【0368】

50

本明細書で開示される方法は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの遺伝子の発現を下方調節する、本明細書で開示される化学的に修飾されたdsRNA化合物の1以上の治療上有効な量を投与することを含む。

【0369】

本明細書で開示されるのはまた、医薬組成物を調製する工程であり、それは、

【0370】

1以上の化学的に修飾された二本鎖RNA分子を提供することと

【0371】

前記化合物を薬学上許容可能なキャリアと混合することを含む。

【0372】

好まれる実施形態では、医薬組成物の調製に使用されるdsRNA化合物は薬学上有効な量でキャリアと混合される。一実施形態では、本明細書で開示される化学的に修飾されたdsRNA化合物は、ステロイド、又は脂質、又は別の好適な標的とする分子、たとえば、タンパク質、ペプチド、アプタマー、天然の化合物（たとえば、コレステロール、キシロース）に抱合される。

【0373】

併用療法

本明細書で開示される疾患を治療する方法は、追加のTLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAP阻害剤、化学的に修飾されたdsRNA化合物の薬理学特性を改善する物質、又はたとえば、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全（PGD）、慢性又は急性の無菌性炎症、又は神経障害性の疼痛に限定されない臓器移植、たとえば、肺移植の後の合併症又は傷害に苦しむ又はそれに感受性である対象の治療に有効であることが分かっている追加の化合物と併せて又は併用して新規の化学的に修飾されたdsRNA分子を投与することを含む。

【0374】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、少なくとも1つの追加の治療上活性のある剤との治療用の二本鎖RNA分子の併用を含む医薬組成物である。「併せて」又は「併用で」によって、先立って、同時に又は続いてを意味する。従って、そのような併用の個々の成分は同一の又は別々の医薬製剤から順次又は同時に投与される。

【0375】

新規の化学的に修飾されたdsRNA化合物及び本明細書で記載される治療法と併せて、たとえば、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全（PGD）に限定されない臓器移植、たとえば、肺移植の後の合併症又は傷害に罹りやすい対象を治療するための既知の治療を含む併用療法は、本発明の考慮される部分である。そのような既知の治療には、限定しないで薬理学的な免疫抑制が挙げられる。

【0376】

加えて、本明細書で開示されるdsRNA化合物は、そのような状態を治療するための第2の治療上活性のある化合物（たとえば、免疫抑制剤）による補助療法として使用するための薬物の調製に使用される。化学的に修飾された二本鎖RNA分子との併用における既知の第2の治療剤の適当な用量は当業者によって容易に十分に理解される。

【0377】

一部の実施形態では、上記で言う併用は、単一の医薬製剤の形態での使用について提示される。

【0378】

本明細書で開示される薬学上活性のあるsiRNA化合物のいずれか1つを含む医薬組成物の投与は、静脈内に、動脈内にを含む多数の既知の投与経路のいずれかによって、熟練した内科医によって決定されるような、鼻内又は気管内の点滴によって実行される。特殊化した製剤を用いて、吸入又は鼻内点滴を介して組成物を冠動脈内に投与することが可

10

20

30

40

50

能である。

【0379】

「併せて」によって、追加の薬学上有効な化合物が、本発明の医薬組成物の投与に先立って、同時に又はその後、投与されることを意味する。従って、上記で言うそのような併用の個々の成分は、同一又は別々の医薬製剤から順次又は同時に投与される。本 s i R N A 化合物と同様に、上記で詳述したように、たとえば、経口、頬内、吸入、舌下、直腸、膣、経子宮、鼻、局所、経皮（すなわち、経皮）又は非経口（静脈内、筋肉内、皮下、及び冠状動脈内）の投与に限定されないいずれかによって第2の治療剤が投与される。

【0380】

一部の実施形態では、本明細書で開示される化学的に修飾された二本鎖 R N A 分子及び第2の治療剤は、単一の組成物で提供されて又は2以上の異なる組成物として提供されて同一の経路で投与される。しかしながら、他の実施形態では、本明細書で開示される新規の二本鎖 R N A 分子と第2の治療剤の異なる経路が可能である。当業者は、単独又は併用のいずれかで、各治療剤の投与の最良の経路に気付く。

【0381】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で言及される合併症及び状態のいずれかの治療のために2以上の d s R N A 分子を含む医薬組成物である。一部の実施形態では、2以上の d s R N A 分子又は前記分子を含む製剤は、同一のさもなければ有益な活性を生成する量で医薬組成物にて混合される。特定の実施形態では、2以上の d s R N A 分子は、共有結合し、又は非共有結合し、又は2～100、好ましくは2～50若しくは2～30のヌクレオチドに及ぶ長さの核酸リンカーによって一緒に連結される。一実施形態では、2以上の d s R N A 分子は、T L R 2、T L R 4、M Y D 8 8、T I C A M 1 及び T I R A P に対する m R N A を標的とする。一部の実施形態では、2以上の d s R N A 化合物の少なくとも1つが T L R 2、T L R 4、M Y D 8 8、T I C A M 1 及び T I R A P を標的とする。一部の実施形態では、R N A 化合物の少なくとも1つが配列番号13～20606のいずれか1つで設定されるアンチセンス配列と実質的に同一のアンチセンス配列を含む。一部の実施形態では、d s R N A のセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドは、配列番号13～20606のいずれか1つで示されるセンス及び対応する（相補性の）アンチセンスのオリゴヌクレオチドから選択される。好ましいセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチド対は、以下の表1～5に示される。

【0382】

一部の実施形態では、本明細書で開示される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 d s R N A 分子を含む。一部の実施形態では、前記追加の遺伝子の同時阻害は、本明細書で開示される合併症、傷害又は障害の治療に相加的な又は相乗的な効果を提供する。

【0383】

本明細書で開示される治療計画は、投与方式、投与のタイミング及び投与量という点で実施されるので、本明細書で開示される状態の有害な結末からの患者の機能的な回復が改善される。

【0384】

一部の実施形態では、本明細書で開示される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 d s R N A 分子を含む。一部の実施形態では、前記追加の遺伝子の同時阻害は、本明細書で開示される疾患の治療に相加的な又は相乗的な効果を提供する。

【0385】

本明細書で開示される治療計画は、本明細書で開示される状態の有害な結末からの患者の機能的な回復が改善されるように、又は障害の発症を先送りするように、投与方式、投与のタイミング及び投与量という点で実施される。細胞における個々の核酸分子の有効な濃度は、約1フェトモル、約50フェトモル、100フェトモル、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マイクロモル以上であり得る。

【0386】

哺乳類にとって適当な投与量は、体重のkg当たり0.01mg～1g（たとえば、kg当たり0.1mg、0.25mg、0.5mg、0.75mg、1mg、2.5mg、5mg、10mg、25mg、50mg、100mg、250mg、500mg、1mg、2.5mg、5mg、10mg、25mg、50mg、100mg、250mg、又は500mg）であり得る。

【0387】

一日当たり体重のkg当たり約0.01mg～約100mgの投与量レベルが上述の状態の治療に有用である。キャリアと組み合わせて単回投与形態を作製することができる有効成分の量は治療される宿主及び投与の特定に方式によって変化する。投与単位形態は一般に約0.1mg～約500mgの間の有効成分を含有する。投与単位は、局所送達、たとえば、硝子体内送達又は経鼓膜送達のために調整され得る。

【0388】

キット

別の態様では、任意で使用のための指示書と共に、TLR2を標的とする二本鎖核酸から成る治療剤を含むキットが提供される。一部の実施形態では、TLR2を標的とする二本鎖核酸は配列番号13～5846で示される配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0389】

別の態様では、任意で使用のための指示書と共に、TLR4を標的とする二本鎖核酸から成る治療剤を含むキットが提供される。一部の実施形態では、TLR4を標的とする二本鎖核酸は配列番号5847～12144で示される配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0390】

別の態様では、任意で使用のための指示書と共に、MYD88を標的とする二本鎖核酸から成る治療剤を含むキットが提供される。一部の実施形態では、MYD88を標的とする二本鎖核酸は配列番号12145～16332で示される配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0391】

別の態様では、任意で使用のための指示書と共に、TICAM1を標的とする二本鎖核酸から成る治療剤を含むキットが提供される。一部の実施形態では、TICAM1を標的とする二本鎖核酸は配列番号16333～18242で示される配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0392】

別の態様では、任意で使用のための指示書と共に、TIRAPを標的とする二本鎖核酸から成る治療剤を含むキットが提供される。一部の実施形態では、TIRAPを標的とする二本鎖核酸は配列番号18243～20606で示される配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。

【0393】

別の態様では、提供されるのは、少なくとも2つの治療剤を含むキットであり、2つの剤は、任意で使用のための指示書と共に、TLR2阻害剤、TLR4阻害剤、MYD88阻害剤、TICAM1阻害剤及びTIRAP阻害剤から成る群から選択される。

【0394】

キットの一部の実施形態では、各治療剤は独立して、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPから選択される標的遺伝子をコードするヌクレオチド配列（たとえば、mRNA配列）を結合する小分子干渉核酸（siNA）、小分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）又は小

10

20

30

40

50

分子ヘアピンRNA (shRNA) から成る群から選択される。一部の実施形態では、各核酸分子は二本鎖RNA (dsRNA) 又は小分子干渉RNA (siRNA) である。一部の実施形態では、各核酸分子は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPを標的とするdsRNAから成る群から選択される。一部の実施形態では、本明細書で提供されるキットは、任意で使用するための指示書と共に、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPから成る群から選択される少なくとも2つの遺伝子及び／又は遺伝子産物を阻害することが可能である単一剤を意味する併用阻害剤を含む。

【0395】

一部の実施形態では、キットの各治療剤は核酸分子を含み、その際、

- (a) 核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み；
- (b) 核酸分子の各鎖は独立して長さ17～40のヌクレオチドであり；
- (c) アンチセンス鎖の17～40のヌクレオチドの配列は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1又はTIRAPをコードするmRNAから選択されるmRNAの配列に対して相補性であり；
- (d) センス鎖の17～40のヌクレオチドの配列は、アンチセンス鎖に対して相補性であり、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1又はTIRAPをコードするmRNAから選択されるmRNAの17～40のヌクレオチドの配列を含む。

【0396】

適応

肺損傷、肺虚血性再灌流傷害

肺移植

肺移植は、患者の病んだ肺を部分的に又は全体的にドナー由来の肺で置き換える外科的処置である。肺移植は、進行した／末期の肺疾患の患者にとって選択される治療になっている。ここ数十年、ドナーの管理、臓器の保存、免疫抑制計画及び感染性合併症の制御が実質的に改善され、移植処置の手術法が開発されている。それにもかかわらず、一次移植片機能不全 (PGD) は肺移植の推定10～25%を占め、肺レシピエントの早期の移植後の罹病率及び死亡率の主な原因となっている (Lee JC and Christie JD. 2009. Proc Am Thorac Soc, vol. 6: 39-46)。PGDは一次移植片不全、虚血性再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全及び肺再移植応答と様々に呼ばれている。加えて、再灌流傷害、急性拒絶と慢性移植片機能不全のその後の発症との間の関係を示唆する若干の証拠がある。

【0397】

移植後の、特に肺移植後の慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全 (PGD) を防ぐ又は治療するのに有用な有効なオリゴヌクレオチドに基づく治療法は、大きな治療価値がある。

【0398】

種々の実施形態では、本明細書で開示される化学的に修飾されたdsRNA化合物は、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全 (PGD) のような、しかしこれらに限定されない肺移植後の合併症又は損傷を治療する又は予防するのに有用である。

【0399】

用語「肺移植」は、患者の病んだ肺を部分的に又は全体的にドナー由来の肺で置き換える外科的処置を包含することとする。特定の状況では異種移植が熟考され得るが、同種移植が普通好ましい。

【0400】

肺移植の適応には、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、肺性高血圧、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、及びアイゼンメンゲル症候群が挙げられる。通常、4つの異なる外科的技法

が使用される：単一肺移植、両側性連続移植、心肺同時移植及び肺葉移植であり、臓器の大半は死亡したドナーから得られる。

【0401】

本明細書で開示される dsRNA 化合物は、以下の慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び／又は一次移植片機能不全（PGD）のいずれかを改善すること、減衰させること、治療すること又は予防することを含むが、これらに限定されない、肺移植の医療合併症を経験している対象を治療するのに特に有用である。

【0402】

一部の実施形態では、標的遺伝子は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1 及び TIRAP から選択される。さらに他の実施形態では、siRNA 化合物を合成するのに有用なセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチド配列は、配列番号：13～5846（TLR2 を標的とする）、配列番号：5847～12144（TLR4 を標的とする）、配列番号：12145～16332（MYD88 を標的とする）、配列番号：16333～18242（TICAM1 を標的とする）及び配列番号：18243～20606（TIRAP を標的とする）に示される。

【0403】

急性の肺損傷（ALI）／急性の呼吸器窮迫症候群（ARDS）

【0404】

呼吸器窮迫症候群（RDS）としても知られる急性の呼吸器窮迫症候群（ARDS）は、肺に対する種々の形態の損傷に対する深刻な反応である。これは、透過亢進型肺水腫を生じる最も関連する障害である。

【0405】

ARDS は種々の直接的な及び間接的な損傷が原因で生じる重篤な肺疾患である。それは、炎症、低酸素症の原因になり、多臓器不全を生じることが多い、炎症性メディエータの付随する全身性の放出を伴うガス交換の損傷をもたらす肺実質の炎症を特徴とする。この状態は生命を脅かすものであり、致死的であることが多く、普通、人工呼吸器及び集中治療室への入院が求められる。あまり重篤ではない形態は急性肺損傷（ALI）と呼ばれる。

【0406】

一部の実施形態では、本明細書で開示される分子及び方法は、急性肺損傷、特に虚血性／再灌流の傷害又は酸化的ストレスから生じる状態の発生及び重症度を治療する又は予防するのに有用である。たとえば、肺移植及び他の急性の肺損傷に関連するコロナウイルス感染又はエンドトキシンによる急性の呼吸器窮迫症候群（ARDS）、重度の急性呼吸器症候群（SARS）、虚血性再灌流傷害。

【0407】

炎症状態

本化合物が使用される炎症性の状態は、喘息状態、クローン病、潰瘍性大腸炎、再灌流傷害、自己免疫疾患、炎症性大腸疾患（IBD）、アテローム性硬化症、再狭窄、環状動脈心疾患、糖尿病、リウマチ疾患、皮膚病、たとえば、乾癬及び脂漏症、移植拒絶、及び肺、心臓、腎臓、口腔、子宮の炎症である。

【0408】

神経障害性の疼痛

神経障害性の疼痛は、組織の損傷又は機能不全を伴うことが多い複雑な慢性の疼痛である。神経障害性の疼痛は、体知覚に影響を及ぼす病変又は疾患のために生じ得るが、痛覚過敏、自然発生的な疼痛、及び異痛症を特徴とする。異痛症は、侵害性の刺激に応答する疼痛又は正常では疼痛反応を誘発しない刺激による疼痛であり、正常では疼痛として感知されない熱刺激又は機械的刺激に対する過敏症として引き出され得る。

【0409】

神経障害性の疼痛は、脊髄損傷（SCI）、又は末梢神経の損傷（PNI）、後根神経

10

20

30

40

50

節又は脳が原因で生じ得る。ヒトでは、火傷のような、刺すような及び／又は電気のような感覚が損傷後数カ月以内に発生し得る。神経障害性の疼痛の別の原因は糖尿病である。糖尿病性の神経障害は、糖尿病の最も一般的な合併症の1つであり、異痛症はその症状の1つである。神経障害性の疼痛のさらなる原因には、帯状疱疹感染、H I V 関連の神経障害、四肢切断、栄養欠乏、毒素、遺伝及び免疫が介在する障害が挙げられる。神経障害性の疼痛は、末梢神経における腫瘍の圧迫によって又は治療（たとえば、タキサン類による化学療法）の副作用として癌患者に現れ得る。

【0410】

異痛症及び脊髄損傷（S C I）

慢性の疼痛は、S C I のさらに頻繁な且つ問題のある続発症の1つであり、患者の有効
なりハビリテーションを妨害することが多い。非 S C I 集団、たとえば、偏頭痛及びヘル
ペス後神経痛で見られる慢性疼痛症候群に加えて、S C I 患者は S C I 独特の疼痛症候群
にも苦しみ得る。慢性の S C I 疼痛の報告された有病率は 25%～94% の間で変化し、
これらの患者のほぼ 3 分の 1 が重篤な疼痛を経験する（Bonica JJ. Introduction: seman
tic, epidemiologic, and educational issues. In: Casey KL, ed. Pain and central n
ervous system disease: the central pain syndromes. New York: Raven Press, 1991:1
3-29; Siddall PJ, et al. Pain 1999;81:187-97; Gerhart KA, et al. Paraplegia 1992
;30:282-7）。幾つかの研究が種々の型の S C I 疼痛の有病率を報告している。筋骨格系
の疼痛が損傷後 6 ヶ月（40%）（Siddall PJ, Pain 1999; 81: 187-97）、及び S C I
後 5 年（59%）（Siddall PJ, et al. Pain 2003; 103: 249-57）で経験する最も一般
的な型であった。受傷レベルの及び受傷レベルより下位の神経障害性の疼痛の有病率の増
加は、同様に S C I 後 5 年を超えて認められる。S C I 疼痛の発症に影響を及ぼす変数は
不明のままである。受傷のレベル、受傷の完全性、受傷の原因及び心理社会的な因子のよ
うな因子が考慮されている（Siddall PJ, et al. In: Yeziarski RP, Burchiel KJ, eds.
Spinal cord injury pain: assessment, mechanisms, management. Progress in Pain R
esearch and Management. Vol. 23 Seattle: IASP Press, 2002:9-24）。筋骨格系の疼痛
は、胸部レベルの損傷を持つ患者でさらに一般的であり、S C I 後 2 週間で外科的介入の
あったものでさらに多いことが報告された（Sved P, et al. Spinal Cord 1997;35:526-3
0）。異痛症に関連する神経障害性の疼痛は、不完全な脊髄損傷の患者、胸髄よりも頸髄
の損傷で、及び脊髄中心症候群でさらに一般的であることが認められた（Siddall PJ, et
al. Pain 1999 ;81 :187-97）。 10 20 30

【0411】

S C I 後の疼痛の型

段階 2 のもとでの S C I 疼痛の 4 つの主な型に加えて、他の認識された疼痛状態があり
、そのほとんどは疼痛分類の研究に関する国際学会における段階 3 のもとにある（Siddal
l PJ, et al. International Association for the Study of Pain Newsletter 2000;3:3
-7）。これらは、適切な治療が指示され得るように臨床的に特定される必要がある。

【0412】

筋骨格系の疼痛

脊椎の機械的な不安定性：この種の疼痛は、靱帯／関節の破壊又は骨折によってもたら
され、脊椎の不安定性を生じる。それは損傷後早期に生じ、S C I の部位に近い脊椎の領
域に位置する。それは、活動によって悪化し、休息によって低下する位置に関係する。診
断は、レントゲン写真、コンピュータ断層撮影又は M R I に助けられて病態の性質と部位
を特定する。 40

【0413】

筋肉痙攣の疼痛：痙性は、腱反射の亢進を伴った緊張性伸張反射（筋緊張）における速
度依存性の増大を特徴とする運動障害として定義され、伸張反射の過剰興奮を生じる。α
運動ニューロンと筋肉に対する多数の興奮性及び抑制性の調節シナプスの影響のいずれか
における不均衡が伸張反射弓の過剰活動を生じる。この疼痛の型は普通、S C I 後後期に
起き、不完全 S C I の人々に見られることが多い。 50

【0414】

受傷レベルの神経障害性の疼痛

部分的な除神経後疼痛／G i r d l e又はB o r d e r又は一時的な帯域疼痛：これは、S C Iのレベルの上下での2～4つの部分のバンドの範囲内で生じる受傷レベルの神経障害性の疼痛の変異である。それは、正常な感覚と無感覚の皮膚の境界で起きることが多い。

【0415】

脊髄空洞症：空洞（すなわち、脊髄における異常な嚢胞）による疼痛は、発症遅延を伴って平均6年で起きることが多い。頸部受傷による脊髄の中央部の損傷は、疼痛及び腕の弱化及び相対的に強いが痙性の脚機能の特徴とする脊髄中心症候群を生じる。脊髄空洞症の疼痛は、異痛を伴った一定の灼熱痛として記載されることがある。

10

【0416】

受傷レベル下位の神経障害性の疼痛

中枢性感覚異常症候群／中枢性疼痛／除神経後疼痛：S C Iのレベルに対して後ろ側、すなわち、肩から足にかけて全身にわたり、びまん性に分布する疼痛、受傷レベル下位の神経障害性の疼痛の典型。疼痛は、痛覚過敏と関連し、経時的に徐々に悪化し得る。それは、自然発生的な及び／又は誘発された症状の発現と共に生じ、感染、突然の音、及び不快な運動によって悪化することが多い。

【0417】

S C I疼痛の病態生理及びメカニズム

S C Iに関連する疼痛は、機械的な外傷からの病態変化を特徴とする受傷と脊髄実質の血管の障害の双方の結果である。それは、病変の性質、損傷された神経構造、及び残った組織の二次的な病態生理学的変化に影響される。S C I疼痛の根底にある少なくとも3つの基本メカニズム：神経過剰興奮性の増大、抑制の低下、及び神経の認識又は可塑性の低下が提案されている。

20

【0418】

神経過剰興奮性の増大

外傷性S C I又は虚血性S C I後のS C Iの当初の結果は、短いが劇的な興奮性アミノ酸の増加であり、それが二次的な生理的变化の受傷カスケードを引き起こす。この脊椎の「中枢性受傷カスケード」の主な構成成分には、共同で相互作用して受傷レベルにてニューロンの反応性を高め、結果的に異痛及び痛覚過敏の臨床症状を生成する解剖学的な、神経化学的な、興奮毒性の及び炎症性の事象が含まれる（Yezierski RP. Pathophysiology and animal models of spinal cord injury pain. In: Yezierski RP, Burchiel KJ, eds. Spinal cord injury pain: assessment, mechanisms, management. Progress in pain research and management. Vol. 23. Seattle: IASP Press, 2002:117-36）。

30

【0419】

歯周炎

歯周炎は、歯肉の炎症若しくは感染が未治療のままである又は治療が遅れる場合に生じる。感染及び炎症は、歯肉から歯を支える靱帯及び骨に広がり、最終的には結果的に歯を失う。歯の基で蓄積するプラーク及び歯石が原因となる炎症は、歯と歯肉の間に形成されるポケットにおけるプラークを捕捉する。連続する炎症は最終的には歯を取り囲む組織及び骨の破壊を引き起こす。

40

【0420】

修飾された化合物の合成

本明細書で開示される化合物は、リボ核酸（又はデオキシリボ核酸）オリゴヌクレオチドの合成について当該技術で周知である方法のいずれかによって合成することができる。そのような合成は、とりわけ、Beaucage及びIyer, Tetrahedron、1992；48：2223～2311；Beaucage及びIyer, Tetrahedron、1993；49：6123～6194並びにCaruthersら、Methods Enzymol. 1987；154：287～313に記載されており；チオ

50

エートの合成は、とりわけ、Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 367~402に記載されており; RNA分子の合成は、Sproat, in Humana Press 2005 edited by Herdewijn P.; Kap. 2: 17~31に記載されており; 各下流の工程は、とりわけ、Pinguoudら、in IRL Press 1989 edited by Oliver R. W. A.; Kap. 7: 183~208に記載されている。

【0421】

他の合成手順は、たとえば、Usmanら、J. Am. Chem. Soc., 1987, 109: 7845; Scaringeら、NAR, 1990, 18: 5433; Wincottら、NAR, 1995, 23: 2677~2684; 及びWincottら、Methods Mol. Biol., 1997, 74: 59に記載された手順のように、当該技術で既知であり、これらの手順は、たとえば、5'末端でのジメトキシトリチル及び3'末端でのホスホロアミダイトのような一般的な核酸の保護基及びカップリング基を利用する。修飾された（たとえば、2'-O-メチル化された）ヌクレオチド及び未修飾のヌクレオチドを所望のように組み入れる。

【0422】

本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、別々に合成し、合成及び／又は脱保護の後、たとえば、ライゲーション (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., 国際特許公開番号WO 93/23569; Shabarova et al., 1991, NAR 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204) 又はハイブリッド形成によって合成後一緒に連結することができる。

【0423】

市販の機械（とりわけ、Applied Biosystemsから利用可能な）を使用することができ; 本明細書で開示される配列に従ってオリゴヌクレオチドが調製されることが留意される。化学的に合成した断片の重複する対は、当該技術で周知の方法を用いて連結することができる（たとえば、米国特許第6, 121, 426号を参照）。鎖を別々に合成し、次いで試験管にて互いにアニーリングする。次いでアニーリングされなかった（それらの一方の過剰のために）一本鎖オリゴヌクレオチドから二本鎖RNAをHPLCによって分離する。本明細書で開示されるdsRNA又はdsRNA断片に関して、2以上のそのような配列を合成し、本明細書で使用するために一緒に連結することができる。

【0424】

たとえば、米国特許公開番号US 2004/0019001に記載されたように直列合成法を介して本明細書で開示される化合物を合成することができ、その際、双方のdsRNA鎖は切断可能なリンカーによって切断される単一の連続したオリゴヌクレオチド断片又は鎖として合成され、その後、切断されてハイブリッド形成し、RNA二本鎖の精製を可能にするRNA断片又は鎖を分離する。リンカーはポリヌクレオチドリンカー又は非ヌクレオチドリンカーから選択される。

【0425】

用語「共有結合」は本明細書で使用されるとき、アーム間で電子の対を共有することを特徴とする化学結合を指す。

【0426】

用語「非共有結合」は本明細書で使用されるとき、普通、特定の配向又は構成にて分子又は分子の一部と一緒に保持する力を提供する分子又は分子の一部の間での実際、共有結合ではない種々の相互作用を指す。これらの非共有結合相互作用には、イオン結合、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力及び双極子-双極子結合が挙げられる。

【実施例】

【0427】

さらに労作することなく、当業者は前の説明を用いて本発明を最大限に利用することが

できると考えられる。従って、以下の好まれる特定の実施形態は、単に説明に役立つとして解釈されるべきであって、請求される発明を制限するものとして決して解釈されるべきではない。

【0428】

本明細書で具体的に説明されない当該技術で既知の標準的な分子生物学的プロトコールは一般に、Sambrookら、Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), 及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988) 10
に示すように、及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) に示すように及びPerbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988) に示すように、及びWatsonら、Recombinant DNA, Scientific American Books, New York 及びBirrenら、(eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1~4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) 及び米国特許第4, 666, 828号; 同第4, 683 20
, 202号; 同第4, 801, 531号; 同第5, 192, 659号及び同第5, 272, 057号に示すような方法論に示すように本質的に理解され、参照によって本明細書に組み入れられる。ポリメラーゼ鎖反応(PCR)は、標準のPCRプロトコール: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990) に示すように実施した。特定のDNA及びmRNA配列を含有する細胞の検出には、フローサイトメトリー(FACS)と組み合わせたその場でのPCRを使用することができる(Testoni et al., Blood 1996, 87:3822.)。qPCR及びRT-PCRを実施する方法は当該技術で周知である。

【0429】

実施例1: 標的遺伝子に対して活性のあるsiRNA化合物の配列の生成及びsiRNAの作製 30

所有権のあるアルゴリズムと本明細書で開示される遺伝子の既知の配列を用いて、siRNAのアンチセンス配列及び対応するセンス配列を生成した。アルゴリズムに加えて、19~量体の5'及び/又は3'の伸長によって20-、21-、22-、及び23-量体のオリゴマー配列を生成する。この方法を用いて生成した配列は、相当するmRNA配列の断片に対して完全に相補性である。

【0430】

配列番号13~20606は、本明細書で開示されるようなdsRNA化合物の調製で有用なオリゴヌクレオチド配列を提供する。各オリゴヌクレオチド配列は5'から3'の方向で提示される。 40

【0431】

各遺伝子について、19-量体のセンス及び対応するアンチセンスのオリゴヌクレオチド配列の別々のリストがあり、それは、ヒトの遺伝子発現を標的とする最良の配列として所有権のあるアルゴリズムにおけるそのスコアに基づいて優先順位が付けられる。

【0432】

本明細書で開示されるdsRNA化合物は、以下にて本明細書で記載される方法によって合成される。

【0433】

以下の表1~5は二本鎖核酸分子を生成するのに有用な配列の対を提供する。

【0434】

【表 3】

表1. TLR2を標的とする二本鎖核酸化合物を生成するのに有用な選択されたオリゴヌクレオチド

名称	配列 番号	センス 5'>3'	配列 番号	アンチセンス 5'>3'	構造
TLR2_25	20607	GGGUGGAGAACCUUAUGGU	20614	ACCAUAAGGUUCUCCACCC	A1
TLR2_28	20608	GGCAAGUGGAUCAUUGACA	20615	UGUCAAUGAUCCACUUGCC	A1
TLR2_42	20609	GGGUAAAUCUGAGAGCUGC	20616	GCAGCUCUCAGAUUUUACCC	A1
TLR2_43	20610	CCAUUGAAAAGAGCCACAA	20617	UUGUGGCUCUUUUCAAUGG	A1
TLR2_47	20611	AUAAUGAACACCAAGACCU	20618	AGGUCUUGGUGUUCAUUUAU	A1
TLR2_31	20612	GGUAAAUCUGAGAGCUGCA	20619	UGCAGCUCUCAGAUUUUACC	A2
TLR2_34	20613	CUGGACUUCUCCCAUUUCA	20620	UGAAAUGGGAGAAGUCCAG	A2

【 0 4 3 5 】

【表 4】

表2. TLR4を標的とする二本鎖核酸化合物を生成するのに有用な選択されたオリゴヌクレオチド

名称	配列 番号	センス 5'>3'	配列 番号	アンチセンス 5'>3'	構造
TLR4_08	20621	AACUUA AUGUGGCUCACAA	20630	UUGUGAGCCACAUUAAGUU	A1
TLR4_10	20622	GGCUGGCAAUUCUUUCCAA	20631	UUGGAAAGAAUUGCCAGCC	A1
TLR4_11	20623	GAUUUAUCCAGGUGUGAAA	20632	UUUCACACCUGGAUAAAUC	A1
TLR4_14	20624	CUCAAUCUCUCUUUAGACA	20633	UGUCUAAAGAGAGAUUGAG	A1
TLR4_15	20625	CGCUGGUGUAUCUUUGAAA	20634	UUUCAAGAUACACCAGCG	A1
TLR4_28	20626	AAA AUGGCUGGCAAUUCUA	20635	UAGAAUUGCCAGCCAUUUU	A1
TLR4_29	20627	AGCCGCUGGUGUAUCUUUG	20636	CAAAGAUACACCAGCGGCU	A1
TLR4_31	20628	AAAUGGCUGGCAAUUCUUA	20637	UAAGAAUUGCCAGCCAUUU	A1
TLR4_33	20629	AUGGCUGGCAAUUCUUUCA	20638	UGAAAGAAUUGCCAGCCAU	A1

【 0 4 3 6 】

【表 5】

表3. MYD88を標的とする二本鎖核酸化合物を生成するのに有用な選択されたオリゴヌクレオチド

名称	配列 番号	センス 5'>3'	配列 番号	アンチセンス 5'>3'	構造
MYD88_11	12178	GAAUGUGACUCCAG ACCA	12660	UGGUCUGGAAGUCAC AUUC	A1

10

20

30

40

50

【 0 4 3 7 】

【 表 6 】

表4. TICAM1を標的とする二本鎖核酸化合物を生成するのに有用な選択された
オリゴヌクレオチド

名称	配列 番号:	センス 5'>3'	配列 番号	アンチセンス 5'>3'	構造
TICAM1_15	20639	GGGUGAAGGGUCUUGGUGA	20650	UCACCAAGACCCUUCACC C	A2
TICAM1_16	20640	CUGGAAUCAUCAUCGGAAA	20651	UUUCCGAUGAUGAUUCCA G	A2
TICAM1_17	20641	GGACGAACACUCCCAGAUAA	20652	UAUCUGGGAGUGUUCGUC C	A2
TICAM1_18	20642	GGCACUGAACGCAGCCUAA	20653	UUAGGCUGCGUUCAGUGC C	A2
TICAM1_19	20643	CCAGCAACUUGGAAAUCAA	20654	UUGAUUCCAAGUUGCUG G	A2
TICAM1_20	20644	AGCCCUUCAUUUAGGACAA	20655	UUGUCCUAAAUGAAGGGC U	A1
TICAM1_21	20645	GGGUAUUGCUACGGUCUUA	20656	UAAGACCGUAGCAAUACC C	A2
TICAM1_22	20646	CCGGGAGCCCUUCAUUUAA	20657	UUAAAUGAAGGGCUCCCG G	A2
TICAM1_23	20647	GGCAGAAUGACCGCGUGUA	20658	UACACGCGGUCAUUCUGC C	A2
TICAM1_24	20648	GCGCCUUCGACAUUCUAGA	20659	UCUAGAAUGUCGAAGGCG C	A2
TICAM1_25	20649	CCUACUUCUCACCUCCAAA	20660	UUUGGAGGUGAGAAGUAG G	A2

【 0 4 3 8 】

【表 7】

表5. TIRAPを標的とする二本鎖核酸化合物を生成するのに有用な選択されたオリゴヌクレオチド

名称	配列 番号	センス 5'>3'	配列 番号	アンチセンス 5'>3'	構造
TIRAP_16	20661	CUAAGAAGCCUCUAGGCAA	20673	UUGCCUAGAGGCUUCUUAG	A1
TIRAP_17	20662	UAAGAAGCCUCUAGGCAAA	20674	UUUGCCUAGAGGCUUCUUA	A2
TIRAP_18	20663	GGAGCAAAGACUAUGACGA	20675	UCGUCAUAGUCUUUGCUCC	A2
TIRAP_19	20664	GCAAAGACUAUGACGUCUA	20676	UAGACGUCAUAGUCUUUGC	A2
TIRAP_20	20665	GGCGCUAUAGUGUCCGAGA	20677	UCUCGGACACUAUAGCGCC	A2
TIRAP_21	20666	GCCUCAGCUCAGUCACGUA	20678	UACGUGACUGAGCUGAGGC	A2
TIRAP_22	20667	CUAAGAAGCCUCUAGGCAU	20679	AUGCCUAGAGGCUUCUUAG	A2
TIRAP_23	20668	GCUUCACAGCCUACCUCAA	20680	UUGAGGUAGGCUGUGAAGC	A2
TIRAP_24	20669	UAAGAAGCCUCUAGGCAAU	20681	AUUGCCUAGAGGCUUCUUA	A2
TIRAP_25	20670	CAAAGAAGCUGUCAUGCGA	20682	UCGCAUGACAGCUUCUUUG	A2
TIRAP_26	20671	GGUGCAAGUACCAGAUGCA	20683	UGCAUCUGGUACUUGCACC	A2
TIRAP_27	20672	GCUCCGAUUCAUGUACUAA	20684	UUAGUACAUGAAUCGGAGC	A2

10

20

【0439】

以下の表6は、構造（A1）に従ってdsRNAオリゴヌクレオチドを調製するのに利用した修飾されたヌクレオチド／非定型の部分の配列コードを提供する。

【表 8】

表6-1

名称	バッチ 番号	センス 5→3	アンチセンス 5→3
MYD88_1_S129	138977	rU;rC;rG;rA;rU;rG;rC;rC ;rU;rU;rC;rA;rU;rC;rU;r G;rC;LdT;rA\$	mU;rA;mG;rC;mA;rG;mA;rU ;mG;rA;mA;rG;mG;rC;mA;r U;mC;rG;mA\$
MYD88_1_S505	138978	rU;rC;rG;rA;rU;rG;rC;rC ;rU;rU;rC;rA;rU;rC;rU;r G;rC;LdT;rA\$	rU;mA;rG;mC;rA;mG;rA;mU ;rG;rA;mA;rG;mG;rC;mA;r U;mC;rG;mA\$
MYD88_11_S129	138983	rG;rA;rA;rU;rG;rU;rG;rA ;rC;rU;rU;rC;rC;rA;rG;r A;rC;LdC;rA\$	mU;rG;mG;rU;mC;rU;mG;rG ;mA;rA;mG;rU;mC;rA;mC;r A;mU;rU;mC\$
MYD88_11_S505	138984	rG;rA;rA;rU;rG;rU;rG;rA ;rC;rU;rU;rC;rC;rA;rG;r A;rC;LdC;rA\$	rU;mG;rG;mU;rC;mU;rG;mG ;rA;rA;mG;rU;mC;rA;mC;r A;mU;rU;mC\$
MYD88_11_S870	60241388	c6Np;rG;mA;rA;mU;rG;mU; rG;mA;rC;mU;rU;mC;rC;mA ;rG;mA;rC;mC;rA\$	mU;rG;mG;rU;mC;rU;mG;rG ;mA;rA;mG;rU;mC;rA;mC;r A;mU;rU;mC;dT;dT\$
MYD88_11_S871	60241391	c6Np;rG;mA;rA;mU;rG;mU; rG;mA;rC;mU;mU;mC;dC;mA ;rG;mA;dC;dC;rA\$	mU;rG;rG;dT;mC;dT;mG;rG ;mA;rA;mG;dT;mC;rA;mC;r A;mU;dT;mC;dT;dT\$
MYD88_11_S872	60241394	c6Np;rG;mA;rA;mU;rG;mU; rG;mA;rC;mU;rU;mC;dC;mA ;rG;mA;dC;dC;dA\$	mU;rG;mG;rU;mC;rU;mG;rG ;mA;rA;mG;rU;mC;rA;mC;r A;mU;rU;mC;dT;dT\$
MYD88_11_S873	60241397	rG;mA;rA;mU;rG;mU;rG;mA ;rC;mU;rU;mC;rC;mA;rG;r A;mC;dB;rA\$	mU;rG;mG;rU;mC;rU;mG;rG ;mA;rA;mG;rU;mC;rA;mC;r A;mU;rU;mC;dT;dT\$
MYD88_11_S874	60241400	rG;mA;rA;mU;rG;mU;rG;mA ;rC;mU;rU;mC;rC;mA;rG;r A;mC;dB;rA\$	mU;rG;mG;dT;mC;dT;mG;rG ;mA;rA;mG;rU;mC;rA;mC;r A;mU;rU;mC;dT;dT\$

10

20

30

40

表6-2

名称	バッチ 番号	センス 5→3	アンチセンス 5→3
MYD88_11_S97 1		c6Np;rG;mA;rA;mU;rG;mU; rG;mA;dC;mU;mU;mC;dC;mA; ;rG;mA;dC;dC;rA\$	mU;rG;rG;dT;mC;dT;mG;rG ;mA;rA;mG;dT;mC;rA;mC;r A;mU;dT;mC;dT;dT\$
MYD88_11_S97 2		c6Np;rG;mA;rA;mU;rG;mU; rG;mA;dC;mU;dT;dC;dC;mA; ;rG;mA;dC;dC;dA\$	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG;rG ;mA;rA;rG;mU;mC;rA;mC;r A;mU;mU;mC;dT;dT\$
MYD88_11_S97 3		c6Np;rG;rA;rA;dT;rG;dT; rG;rA;dC;dT;dT;dC;dC;rA; ;rG;rA;dC;dC;rA\$	mU;rG;rG;dT;mC;dT;mG;rG ;mA;rA;mG;dT;mC;rA;mC;r A;mU;dT;mC;dT;dT\$
MYD88_11_S97 4		c6Np;rG;rA;rA;dT;rG;dT; rG;rA;dC;dT;dT;dC;dC;rA; ;rG;rA;dC;dC;rA\$	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG;rG ;mA;rA;rG;mU;mC;rA;mC;r A;mU;mU;mC;dT;dT\$
TIRAP_1_S73	60258224	rC;mC;rU;mG;rG;mU;rG;mC ;rA;mA;rG;mU;rA;mC;rC;m A;rG;mA;rU\$	mA;rU;mC;rU;mG;rG;mU;rA ;mC;rU;mU;rG;mC;rA;mC;r C;mA;rG;mG\$
TIRAP_2_S73	60258227	rA;mG;rC;mU;rC;mC;rG;mA ;rU;mU;rC;mA;rU;mG;rU;m A;rC;mU;rA\$	mU;rA;mG;rU;mA;rC;mA;rU ;mG;rA;mA;rU;mC;rG;mG;r A;mG;rC;mU\$
TLR2_1_S710	60205154	rG;rG;rU;rG;rC;rA;rA;rG ;rU;rA;rU;rG;rA;rA;rC;r U;rG;rG;rA\$	rU;rC;rC;rA;rG;rU;rU;rC ;rA;rU;rA;rC;rU;rU;rG;r C;rA;rC;rC\$
TLR2_1_S814_ M1	140417	i dB;rG;rG;rU;rG;rC;rA;r A;rG;dT;rA;dT;rG;rA;rA; dC;rU;rG;LdG;rU\$	rA;mC;rC;mA;rG;mU;rU;mC ;rA;rU;rA;mC;rU;mU;rG;m C;rA;mC;rC\$
TLR2_1_S815	140418	i dB;rG;rG;dT;rG;dC;rA;r A;rG;dT;mA;dT;rG;rA;rA; dC;mU;LdG;rG;rA\$	mU;mC;rC;rA;rG;mU;mU;mC ;rA;rU;rA;mC;mU;mU;rG;m C;rA;mC;rC\$

10

20

30

40

表6-3

名称	バッチ 番号	センス 5→3	アンチセンス 5→3
TLR2_15_S73	60238659	rG;mG;rG;mC;rA;mG;rU;mC ;rU;mU;rG;mA;rA;mC;rA;m U;rU;mU;rA\$	mU;rA;mA;rA;mU;rG;mU;rU ;mC;rA;mA;rG;mA;rC;mU;r G;mC;rC;mC\$
TLR2_16_S73	60274507 -6027450 8	rG;mA;rG;mU;rG;mG;rU;mG ;rC;mA;rA;mG;rU;mA;rU;m G;rA;mA;rC\$	mG;rU;mU;rC;mA;rU;mA;rC ;mU;rU;mG;rC;mA;rC;mC;r A;mC;rU;mC\$
TLR2_16_S938	60274509 -6027451 0	rG;mA;rG;mU;rG;mG;rU;mG ;rC;mA;rA;mG;rU;mA;rU;m G;rA;mA;rA\$	mU;rU;mU;rC;mA;rU;mA;rC ;mU;rU;mG;rC;mA;rC;mC;r A;mC;rU;mC\$
TLR2_16_S939	60274509 -6027450 8	rG;mA;rG;mU;rG;mG;rU;mG ;rC;mA;rA;mG;rU;mA;rU;m G;rA;mA;rA\$	mG;rU;mU;rC;mA;rU;mA;rC ;mU;rU;mG;rC;mA;rC;mC;r A;mC;rU;mC\$
TLR2_16_S941	60274507 -6027451 0	rG;mA;rG;mU;rG;mG;rU;mG ;rC;mA;rA;mG;rU;mA;rU;m G;rA;mA;rC\$	mU;rU;mU;rC;mA;rU;mA;rC ;mU;rU;mG;rC;mA;rC;mC;r A;mC;rU;mC\$

10

20

【0440】

以下の表7は、構造（A2）に従ってdsRNAオリゴヌクレオチドを調製するのに利用した修飾されたヌクレオチド／非定型の部分の配列コードを提供する。

30

【表 9】
表7

名称	バッチ 番号	センス 5→3	アンチセンス 5→3
MYD88_13_S73	60206348	rG;mG;rA;mG;rA;mU;rG;mA ;rU;mC;rC;mG;rG;mC;rA;m A;rC;mU;rA\$	mU;rA;mG;rU;mU;rG;mC;r C;mG;rG;mA;rU;mC;rA;mU ;rC;mU;rC;mC\$
MYD88_18_S73	60238315	rG;mC;rC;mU;rA;mU;rC;mG ;rC;mU;rG;mU;rU;mC;rU;m U;rG;mA;rA\$	mU;rU;mC;rA;mA;rG;mA;r A;mC;rA;mG;rC;mG;rA;mU ;rA;mG;rG;mC\$
TIRAP_7_S73	60227223	rC;mG;rG;mA;rA;mC;rU;mC ;rC;mG;rA;mU;rU;mC;rA;m U;rG;mU;rA\$	mU;rA;mC;rA;mU;rG;mA;r A;mU;rC;mG;rG;mA;rG;mU ;rU;mC;rC;mG\$
TIRAP_9_S73	60227229	rG;mA;rU;mU;rC;mA;rU;mG ;rU;mA;rC;mU;rA;mU;rG;m U;rG;mG;rA\$	mU;rC;mC;rA;mC;rA;mU;r A;mG;rU;mA;rC;mA;rU;mG ;rA;mA;rU;mC\$
TIRAP_15_S73	60238354	rC;mC;rA;mC;rA;mG;rU;mG ;rA;mG;rG;mA;rG;mG;rA;m U;rU;mU;rA\$	mU;rA;mA;rA;mU;rC;mC;r U;mC;rC;mU;rC;mA;rC;mU ;rG;mU;rG;mG\$
TLR2_3_S73	60205160	rC;mG;rG;mG;rC;mA;rA;mA ;rU;mG;rG;mA;rU;mC;rA;m U;rU;mG;rA\$	mU;rC;mA;rA;mU;rG;mA;r U;mC;rC;mA;rU;mU;rU;mG ;rC;mC;rC;mG\$
TLR2_3_S818_ M1	140422	idB;rC;rG;rG;rG;rC;rA;r A;rA;dT;rG;rG;rA;dT;rC; rA;rU;dT;rG;rU\$	rA;mC;rA;rA;mU;rG;rA;m U;rC;rC;rA;mU;rU;mU;rG ;mC;rC;mC;rG\$
TLR4_1_S500	126174	rG;mG;rC;mU;rG;mG;rC;mA ;rA;mU;rU;mC;rU;mU;rU;m C;rA;mA;rA	mU;rU;mU;rG;mA;rA;mA;r G;mA;rA;mU;rU;mG;rC;mC ;rA;mG;rC;mC
TLR4_3_S500	126176	rG;mA;rU;mC;rU;mU;rG;mG ;rG;mA;rG;mA;rA;mU;rU;m U;rA;mA;rA	mU;rU;mU;rA;mA;rA;mU;r U;mC;rU;mC;rC;mC;rA;mA ;rG;mA;rU;mC
TLR4_5_S500	126178	rG;mU;rU;mG;rG;mU;rG;mU ;rA;mU;rC;mU;rU;mU;rG;m A;rA;mU;rA	mU;rA;mU;rU;mC;rA;mA;r A;mG;rA;mU;rA;mC;rA;mC ;rC;mA;rA;mC

10

20

30

40

【表 10】

表8. 修飾されたヌクレオチド／非定型の部分のコード

コード	修飾
c6Np	(5' キャップ) アミノ-C6-リン酸又は アミノ修飾因子 C6 (Glen Research)
dA	デオキシリボアデノシン-3' -リン酸
dB	脱塩基デオキシリボース-3' -リン酸
dC	デオキシリボシチジン-3' -リン酸
dG	デオキシリボグアノシン-3' -リン酸
dT	チミジン-3' -リン酸
dT\$	チミジン (リン酸なし)
iB	逆位デオキシー脱塩基
LdA	L-デオキシリボアデノシン-3' -リン酸 (鏡像 dA)
LdA\$	L-デオキシリボアデノシン (リン酸なし) (鏡像 dA)
LdC	L-デオキシリボシチジン-3' -リン酸 (鏡像 dC)
LdC\$	L-デオキシリボシチジン (リン酸なし) (鏡像 dC)
LdG	L-デオキシリボグアノシン-3' -リン酸 (鏡像 dG)
LdT	L-デオキシリボチミジン-3' -リン酸 (鏡像 dT)
LdT\$	L-デオキシリボチミジン (リン酸なし) (鏡像 dT)
mA	2' -O-メチルアデノシン-3' -リン酸
mA\$	2' -O-メチルアデノシン (リン酸なし)
mC	2' -O-メチルシチジン-3' -リン酸
mC\$	2' -O-メチルシチジン (3' -リン酸なし)
mG	2' -O-メチルグアノシン-3' -リン酸
mG\$	2' -O-メチルグアノシン (リン酸なし)
mU	2' -O-メチルリジン-3' -リン酸
mU\$	2' -O-メチルリジン (リン酸なし)
rA	リボアデノシン-3' -リン酸
rA\$	リボアデノシン (リン酸なし)
rC	リボシチジン-3' -リン酸
rC\$	リボシチジン (リン酸なし)
rG	リボグアノシン-3' -リン酸
rU	リボウリジン-3' -リン酸
rU\$	リボウリジン (リン酸なし)

【0442】

実施例 2. 例となる二本鎖オリゴヌクレオチド化合物の RNA i 活性

10

20

30

40

50

活性

標準の合成手順を用いて一本鎖オリゴヌクレオチド（センス鎖及びアンチセンス鎖）を合成する。DMT-プロパノジオールホスホロアミダイト（ChemGene；CLP-9908）を0.05Mの濃度にてカップリングさせる。相補性の一本鎖オリゴヌクレオチドをアニーリングすることによって二本鎖を生成する。層流フードにてWFI（注射用水、Norbrook）で希釈することによって一本鎖オリゴヌクレオチドの約500 μ Mのストック溶液を調製する。実際のssRNA（一本鎖）の濃度は、WFIを用いて各500 μ MのssRNAを1:200に希釈し、ナノドロップを用いてODを測定することによって決定する。手順を3回繰り返し、平均濃度を算出する。次いでストック溶液を250 μ Mの最終濃度に希釈した。相補性の一本鎖は85℃で加熱することによってアニーリングし、少なくとも45分にわたって室温に冷却した。20%のポリアクリルアミドゲルで5 μ Lを調べ、染色することによって完全なアニーリングについて二本鎖を調べた。試料は-80℃で保存した。

10

【0443】

本明細書で開示される二本鎖核酸分子を以下の活性について調べた：約 $1.5 \sim 2 \times 10^5$ 個の試験細胞（ヒト遺伝子を標的とするsiRNAについてのHeLa細胞及び／又は293T細胞）及びマウス／ラットの遺伝子を標的とするsiRNAについてのNRK52（正常なラット肝臓の近位尿細管細胞）及び／又はNMuMG細胞（マウス乳腺上皮細胞株）を6穴プレートにおける各ウェルに播いた（70～80%の集密度）。

【0444】

20

約24時間後、最終濃度0.001 nM～約50 nMでのリポフェクタミン（商標）2000試薬（Invitrogen）を用いて修飾されたsiRNA化合物で細胞に形質移入した。細胞をCO₂インキュベータにて37℃で72時間インキュベートした。

【0445】

形質移入の陽性対照として、PTEN-Cy3を標識したsiRNA化合物を用いる。GFPsiRNA化合物をsiRNA活性の陰性対照として使用する。

【0446】

形質移入の72時間後、細胞を回収し、RNAを細胞から抽出する。蛍光顕微鏡によって形質移入の効率を調べる。

【0447】

30

特定の好まれるsiRNA構造を用いた遺伝子発現の阻害の比率は、内因性の遺伝子を発現している細胞におけるqPCR解析を用いて決定される。

【0448】

【表 1 1】

表9. 特定の好まれるTLR2化合物の活性

名称	センス配列	アンチセンス配列	ヒト TLR2 を安定して発現する Rat1 細胞における残留 mRNA20, 5, 0.5, 0.1nM (反復)
TLR2_31	GGUAAAUCUGAGAGCUGCA	UGCAGCUCUCAGAUUUUACC	14, 7, 16 (10, 42, 86)
TLR2_42	GGGUAAAUCUGAGAGCUGC	GCAGCUCUCAGAUUUUACCC	9, 14, 15, 37 (9, 25, 40)
TLR2_25	GGGUGGAGAACCUUAUGGU	ACCAUAAGGUUCUCCACCC	14, 17, 90, 54 (42, 84, 13, 29)
TLR2_28	GGCAAGUGGAUCAUUGACA	UGUCAAUGAUCCACUUGCC	24, 21, 30, 39 (12, 48, 64)
TLR2_34	CUGGACUUCUCCAUUUA	UGAAAUGGGAGAAGUCCAG	9, 28, 30, 28 (16, 37, 84)
TLR2_43	CCAUUGAAAAGAGCCACAA	UUGUGGCUCUUUCAAUGG	34, 24, 18, 19 (6, 29, 46)
TLR2_47	AUAAUGAACACCAAGACCU	AGGUCUUGGUGUUAUUAU	31, 35, 33, 37 (12, 43, 66)

10

20

【0 4 4 9】

調べたRNAiのIC50値は、種々の最終siRNAの濃度によって得られる活性の結果を用いた用量反応曲線を構築することによって決定される。用量反応曲線は、形質移入したsiRNAの濃度の対数値に対して残った標的mRNAの相対的な量をプロットすることによって構築される。測定されたデータに対して最良のS字曲線を適合させることによって曲線が算出される。S字曲線適合は、3点曲線適合としても知られる。

【数 1】

30

$$Y = Bot + \frac{100 - Bot}{1 + 10^{(LogIC50 - X) \times HillSlope}}$$

【0 4 5 0】

式中、Yは残った標的mRNAの反応であり、Xは形質移入したsiRNAの濃度の対数であり、Botは最低プラトーでのY値であり、LogIC50は、Yが最低と最高のプラトーの間で中間である場合のX値であり、斜面は曲線の傾きである。

40

【0 4 5 1】

血清安定性

ヒト血清又はヒト組織抽出物にて以下のように二本鎖の安定性について二本鎖核酸分子を調べた。

【0 4 5 2】

最終濃度7μMのdsRNAを100%ヒト血清(Sigma, Cat#H4522)にて37℃でインキュベートする(ヒト血清で1:14.29に希釈しrsiRNAストック100μM又は種々の組織型からのヒト組織抽出物)。様々な時点(たとえば、0、30分、1、3、6、8、10、16、及び24時間)で15μLの1.5×TBE緩衝液に5μLを加える。直ちに試料を液体窒素で凍結し、-20℃で保存する。

50

【0453】

当該技術で既知の方法に従って調製された非変性の20%アクリルアミドゲルに各試料を負荷する。UV光のもとで臭化エチジウムによってオリゴを視覚化する。

【0454】

一般に、試験管内の試験で選択される特定の配列を有するdsRNAは、ヒト及びラットやウサギの遺伝子のような第2の種に特異的である。

【0455】

エンドヌクレアーゼに対する安定性

【0456】

核酸分子に対する3'非ヌクレオチド部分の安定化効果を検討するために、センス鎖、アンチセンス鎖及びアニーリングしたsiRNA二本鎖を様々な細胞種から調製した細胞質抽出物にてインキュベートする。HCT116細胞における安定性を調べるプロトコールは以下で提供される。

【0457】

抽出物：HCT116細胞質抽出物(12mg/mL)

【0458】

抽出緩衝液：1mMのDTTを伴った25mMのHEPES、37℃でpH7.3；8mMのMgCl₂；150mMのNaClを使用前に新しく作って直ちに加えた。

【0459】

方法：3.5mLの試験siRNA(100mM)を120mgのHCT116細胞質抽出物を含む46.5mLと混合した。46.5mLは、12mLのHCT116抽出物とDTT及びプロテアーゼ阻害剤カクテル/100(Calbiochem、set I I I ~ 539134)で補完した34.5mLの抽出緩衝液から成る。インキュベーター管におけるsiRNAの最終濃度は7mMである。試料は37℃でインキュベートし、指示した時点で新しい管から5mLを取り出し、15mLの1×TBE/50%グリセロール負荷緩衝液と混合し、直ちに液体窒素で凍結する。負荷緩衝液N2におけるsiRNAの最終濃度は約1.75mMである(21ngのsiRNA/mL)。普通のPAGE及びEtBr染色による解析のために、レーン当たり50ngを負荷する。ノーザン解析には、1ngの試験siRNAをレーン当たり負荷する。他の細胞型には、HeLa細胞及び肝星細胞(HSC)が挙げられる。

【0460】

出願者らは、3'末端のアルキル又はアルキル誘導体のオーバーハングを含む核酸分子が、平滑末端の核酸分子及び3'ヌクレオチドのオーバーハングを含む核酸分子に比べて高い安定性を呈することを示した。

【0461】

実施例3：気管支肺胞洗浄液における二本鎖RNA分子の安定性

ヒト血清及び／又は気管支肺胞洗浄液(BALF)にて、本明細書で開示されるdsRNA化合物のヌクレアーゼ耐性を調べる。安定性試験については、dsRNA化合物をヒト血清及び／又は気管支肺胞洗浄液(BALF)にて必要な最終濃度(たとえば、7µM)に希釈する。5µLのアリコートをして1.5×TBE負荷緩衝液1.5µLに移し、液体窒素で直ちに凍結し、-20℃に移す。これが「時点0」を表す。残りのdsRNA溶液を5µLのアリコートに分割し、それを37℃にて30分間、1、6、8、10、16又は24時間インキュベートする。

【0462】

インキュベーションの後、dsRNA化合物試料を1.5×TBE負荷緩衝液15µLに移す。負荷緩衝液中の各dsRNA化合物5µLを非変性20%ポリアクリルアミドゲルに負荷し、電気泳動を行う。陽性対照、二本鎖の移動対照(関連性のない19量体の対で平滑末端、類似の化学修飾を持つ二本鎖RNA)、及び一本鎖の移動対照(化学修飾を持つ、関連性のないssRNA)も時点0の試料と同様に同一ゲル上に負荷し、並行して電気泳動する。

【0463】

d s R N A を可視化するために、臭化エチジウム溶液（ $1.0 \mu\text{g} / \mu\text{g}$ ）でゲルを染色する。

【0464】

ヒト血清及び／又は気管支肺胞洗浄液（B A L F）にてインキュベートした後、P A G E 上で s i R N A 試料の移動パターンを調べることによって、本明細書で開示される d s R N A 化合物の安定性を判定する。

【0465】

実施例 4：同所性の血管化通気肺移植のマウスモデルにて T L R 2（配列番号 1）；T L R 4（配列番号：2～4）；M Y D 8 8（配列番号：5～9）、T I C A M 1（配列番号：10）及び T I R A P（配列番号 S：11～12）に向けられた d s R N A の治療活性の有効性

長い冷虚血及び免疫拒絶の双方が原因となる一次移植片機能不全を防ぐことにおける本明細書で開示される d s R N A 化合物の治療有効性を同系及び同種のマウスにおける同所性の血管化通気肺移植にて調べる。マウスにおける同所性の血管化通気肺移植は、肺動脈、肺静脈及び気管支の吻合についてカフ法を利用する。この方法は幾つかの出版物で報告されている（Okazaki et al., Am J Transplant, 2007; 7:1672-9 and Krupnick et al. Nature Protocols, 2009; vol.4 No. 1:86-93）。

【0466】

d s R N A 化合物：試験化合物は好ましくは、ヒトとマウス又はヒトとラットの m R N A 標的配列に対して種間特異性を有する d s R N A である。T L R 2 を標的とする d s R N A 化合物のセンス及びアンチセンスの配列は配列番号 13～5846 に示し；T L R 4 を標的とする d s R N A 化合物のセンス及びアンチセンスの配列は配列番号 5847～12144 に示し；M Y D 8 8 を標的とする d s R N A 化合物のセンス及びアンチセンスの配列は配列番号 12145～16332 に示し；T I C A M 1 を標的とする d s R N A 化合物のセンス及びアンチセンスの配列は配列番号 16333～18242 に示し；T I R A P を標的とする d s R N A 化合物のセンス及びアンチセンスの配列は配列番号 18243～20606 に示す。二本鎖核酸分子を生成するのに有用な特定の好まれるオリゴヌクレオチド対は表 1～5 に示す。センス鎖及び／又はアンチセンス鎖は上記で開示したように好ましくは化学的に修飾される。

【0467】

投与量及び投与：d s R N A 化合物は、肺移植手術終了時（吻合開口の直後）、気管内点滴によってレシピエント動物に投与される。これらの動物モデルでは個々の d s R N A 化合物の以下の用量： $6 \mu\text{g} / \text{マウス}$ 、 $12.5 \mu\text{g} / \text{マウス}$ 、 $25 \mu\text{g} / \text{マウス}$ 、及び $50 \mu\text{g} / \text{マウス}$ を調べる。表 1～5 に示すオリゴヌクレオチド対の配列を用いて好まれる二本鎖核酸分子を生成する。

【0468】

同系マウスの肺移植（C 5 7 B L / 6 → C 5 7 B L / 6）

実験設計：ドナー及びレシピエントは双方とも C 5 7 B L / 6 マウスである。移植に先立って、ヒトの肺移植片を保存するのに使用される溶液と類似の成分の低デキストロース溶液における冷保存にて 18 時間、肺移植片を長く冷保存することによって虚血性再灌流傷害を誘導する（18 時間の冷虚血時間（C I T））。この方法は移植後 24 時間での一次移植片機能不全に一致する症状を誘導する。試験 d s R N A を気管に投与する。肺受傷の 24 時間後、肺のレシピエントを評価する。

【0469】

投与：肺への d s R N A 溶液の気管内点滴による；0 日目の吻合開口の直後、d s R N A 化合物の 1 用量又は d s R N A 化合物の組み合わせを投与する。

【0470】

評価：以下によって測定されるように肺機能の評価を介して、移植後 24 時間にて肺のレシピエントを評価する。

- ・肉眼での病理～肺浮腫の出現
- ・肺機能～ PaO_2 、動脈血の酸素供給
- ・細胞浸潤物の気道内蓄積
- ・気管支肺泡洗浄（BAL）細胞の総量と白血球百分率

【0471】

結果：この同系モデルでは、長い冷虚血（18時間のCIT）にさらしたマウス同種移植片は、移植後24時間で測定したとき、酸素供給の損傷、肺浮腫、高い炎症性サイトカインの産生、顆粒球の移植片内及び気道内の蓄積を発生させる。それに対して、1時間の冷保存移植片（1時間のCIT）のマウス肺レシピエントは移植後24時間で肺受傷の証拠をほとんど示さない。

【0472】

試験品（TLR2及びTLR4二本鎖核酸の組み合わせ、TLR2に特異的なsdRNA、TLR4に特異的なsdRNA又はビヒクルを含む組成物）を吻合の開口及び再灌流の開始の直後投与した。表1～5に示すオリゴヌクレオチド対の配列を用いて好まれる二本鎖核酸分子を生成する。

【0473】

実施例5：マウス同種肺移植（Balb/c→C57BL/6）におけるTLR2（配列番号1）：TLR4（配列番号：2～4）；MYD88（配列番号：5～9）、TICAM1（配列番号：10）及びTIRAP（配列番号S：11～12）に向けられたdsRNAの治療活性の有効性

実験設計：長い冷虚血は、免疫抑制が介在する肺同種移植片の受容を妨げる。このモデルでは、Balb/cの肺を18時間の冷虚血時間（CIT）に供し、免疫抑制剤：術後0日に抗CD40L及び2日目にCTLA4Igで処理するC57BL/6レシピエントに移植する。1時間保存された同種移植片を受け取ったレシピエントとは対照的に、18時間保存したものはIFN γ ⁺CD8⁺T細胞の移植片内の顕著な蓄積と共にその同種移植片を急性に拒絶した。

【0474】

評価：以下の評価を介して移植後7日にて肺レシピエントを評価した。

- ・移植片内のIFN γ ⁺CD8⁺T細胞の存在量
- ・急性移植片拒絶の組織病理学的な兆候、スコア

【0475】

投与：肺へのdsRNA溶液の気管内点滴による；0日目の吻合開口の直後、及びTx後1日目にdsRNA化合物の2用量又はdsRNA化合物の組み合わせを投与する。

【0476】

実施例6：神経障害性の疼痛の動物モデル：ラットの脊椎神経結紮モデル（Chung）におけるTLR2（配列番号1）：TLR4（配列番号：2～4）；MYD88（配列番号：5～9）、TICAM1（配列番号：10）及びTIRAP（配列番号S：11～12）に向けられたdsRNAの治療活性

Chungラットモデル（Kim and Chung, 1992. Pain. 1992 Sep; 50 (3) :355～63）は末梢神経の受傷による灼熱痛又は焼灼痛のヒト患者の症状を再現する。Chungの処置は、冒された足の傷害的熱及び機械的な異痛に対する長く続く痛覚過敏を生じる。脊椎神経結紮（SNL）のラットは、神経障害性の疼痛を緩和するのに使用するための活性のあるdsRNA化合物を特定するのに有用である。表1～5に示すオリゴヌクレオチド対の配列を用いて好まれる二本鎖核酸分子を生成する。

【0477】

Chungモデルラットにおける神経障害性の疼痛の緩和：体重190～210グラムのオスのスプラグ・ドーリーラットでChungモデルを実行し、異痛状態を誘導する。動物は少なくとも5日間順化させる。順化の間及び試験期間全体を通して、動物は限られたアクセスの齧歯類施設内で飼い、ケージ当たり最高5匹の群で飼育する。動物には市販の齧歯類用餌を自由に与え、飲水も自由に与える。自動制御された環境条件は毎日モニ

10

20

30

40

50

ターする。動物には独特の動物特定用の尾の印を与える。

【0478】

順化期間の間、動物を無作為に実験群に割り振る。各投与群は別々のケージで飼育し、糞便の消費を介して生じ得る交差汚染を回避する。ケージ当たり、2～3匹を収容する。

【0479】

手短には、ケタミン／キシラジンナトリウムでラットを麻酔し、その後、左のL-5及びL-6脊椎神経を脊柱に隣接して単離し、結紮する。筋肉を縫合し、皮膚をクランプで閉じる。7日間の術後回復期間で、試験に含めることについて動物を調べる。以下の基準の1以上を満たす場合、疼痛が検出される。

【0480】

口で穏やかに噛むこと又は爪を引っ張ることを伴って操作した足を舐めること；操作した足を空中に上げること；神経受傷の反対側で重さに耐えること；後肢の奇形及び異常歩行；左後肢の弱化。L4が無傷であることを保証するには動物が脚を動かすことができないなければならない。

【0481】

アルゼットポンプ：幾つかの群の動物は、手術の当日浸透圧ポンプを皮下に埋め込まれる。脊髓の髄内空間にてレベルL4で終わるポリエチレン管を埋め込み、ポンプにカニューレを接続した。

【0482】

腰部注入：一部の群の動物に以下のようにボラス腰部注入を行う：髄内の管を動物のIT空間にL4～L5のレベルで挿入し、試験剤をゆっくり投与した。

【0483】

本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書で開示される分子、組成物及び方法に対して置換及び修飾を行うことができることは当業者に容易に明らかであろう。従って、そのような追加の実施形態は開示及び以下のクレームの範囲内である。本開示は、TLR2、TLR4、MYD88、TICAM1及びTIRAPの発現を下方調節するために治療上有効な二本鎖核酸分子を生成することを目指して本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドと化学修飾の種々の組み合わせを当業者に教示する。治療上有効な二本鎖核酸分子は、生物流体、生体利用効率における1以上の安定性、高いオンターゲット活性、低いオフターゲット活性を呈する。従って、本明細書で記載される特定の実施形態は限定的ではなく、当業者は、改善された活性との治療上の組み合わせを特定することを目指して過度な実験を行うことなく、追加の特定の組み合わせを調べることができることを容易に十分に理解することができる。

【0484】

用語「含むこと」、「有すること」、「包含すること」、「含有すること」等は限定することなく（たとえば、「含むが、それらに限定されない」を意味する）発展的に読まれるべきである。本明細書で値の範囲の言及は、本明細書で特に指示されない限り、その範囲内に入る各別々の値に個々に言及する縮めた表現の方法として役立つことを単に意図するものであって、各別々の値は、本明細書で個々に言及されるかのように本明細書に組み入れられる。本明細書で記載される方法はすべて、本明細書で特に指示されない限り、又は文脈によって明瞭に相反しない限り、任意の好適な順序で実行することができる。本明細書で提供される任意の及びすべての例、又は例となる言語（たとえば、「たとえば」）の使用は、特に請求されない限り、本発明をさらに良好に明らかにすることを意図するものであって、本発明の範囲に限定をもたらすものではない。本明細書における言語は、本発明の実践に必須であるとして請求されない要素を示すと解釈されるべきではない。さらに、本明細書で採用される用語及び表現は説明の用語として使用されており、限定の用語ではなく、示される及び記載される特徴又はその一部の同等物を排除するそのような用語及び表現の使用の意図はないが、種々の改変が請求される本発明の範囲内で可能であることは認識される。

【0485】

本開示は、本明細書では広く且つ一般的に記載されている。一般的な開示の範囲内に入るさらに狭い種及び下位の一般的な群分けのそれぞれも本発明の一部を形成する。削除された物質が本明細書で具体的に言及されるかどうかにかかわらず、これは、条件付きで又は属から主題を除く否定的な限定を伴って本発明の一般的な説明を包含する。他の実施形態は以下のクレームの範囲内である。加えて、本発明の特徴又は態様がマーカッシュ群という点で記載される場合、当業者は本発明もまたそれによってマーカッシュ群のメンバーの個々のメンバー又は亜群という点で記載されることを認識するであろう。

【0486】

本出願の全体を通して種々の特許及び出版物が引用される。これら文書の開示はその全体が参照によって本明細書に組み入れられ、本発明に関する技術の最先端をさらに完全に記載する。

10

【0487】

上記の実施例は実施形態を実施する特定の方法を説明しているが、実際、当業者は本明細書で明白には示されない、実施形態を実施する代替りの方法を十分に理解するであろう。本開示は、本発明の原理の例示としてみなされるべきであって、説明された実施形態に本発明を限定することを意図するものではないことが理解されるべきである。

【0488】

当業者は、わずかな日常的な実験を用いて、本明細書で記載される本発明の特定の実施形態の同等物を認識するであろうし、確定することができよう。そのような同等物は以下のクレームによって包含されることが意図される。

20

【配列表】

2017148060000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年4月19日(2017.4.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

TLR4__14で表す配列対（それぞれ配列番号20624及び20633）で記載されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む二本鎖核酸分子。

【請求項2】

請求項1に記載の二本鎖核酸分子であって、以下の構造：

(A2) 5' N1 - (N) x - Z 3' (アンチセンス鎖)
 3' Z' - N2 - (N') y - z 5' (センス鎖)

式中、各N2、N及びN'は未修飾又は修飾されたりボヌクレオチド、又は非定型の部分であり；

(N) x 及び (N') y のそれぞれは、各連続するN又はN'が共有結合によって次のN又はN'と連結されるオリゴヌクレオチドであり；

x 及び y のそれぞれは独立して17～24の間の整数であり；

(N') y の配列が(N) x の配列に相補性であり、(N) x が配列番号2～4 (TLR4のmRNA) のいずれか1つで示される標的RNA中の連続する配列に相補性であり；

N1は、(N) x に共有結合し、かつ、標的RNAに対してミスマッチである、未修飾又は修飾されたりボヌクレオチドであり；

z" は、存在してもよく又は非存在であってもよいが、存在するならば、N2 - (N') y の5'末端で共有結合するキャッピング部分であり；

Z 及び Z' のそれぞれが独立して存在し、又は非存在であるが、存在するならば、独立

して、それが存在する鎖の 3' 末端にて共有結合する 1 ～ 5 の連続するヌクレオチド、連続する非ヌクレオチド部分又はその組み合わせであり；

N 1 - (N) x の配列は、配列番号 2 0 6 3 3 で表される、
を有する、
二本鎖核酸分子。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の二本鎖核酸分子であって、

N 1、N 2、N または N' の少なくとも 1 つが、修飾されたヌクレオチド、または又は非定型の部分を含む、
二本鎖核酸分子

【請求項 4】

請求項 3 に記載の二本鎖核酸分子であって、

N 1 - (N) x が少なくとも 1 つのピリミジンリボヌクレオチドを含み、N 1 - (N) x におけるピリミジンリボヌクレオチドの少なくとも 1 つが 2' 糖修飾されたピリミジンリボヌクレオチドを含む、
二本鎖核酸分子。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の二本鎖核酸分子であって、

2' 糖修飾されたりボヌクレオチドが 2' - OMe 糖修飾されたりボヌクレオチドを含む、
二本鎖核酸分子。

【請求項 6】

標的遺伝子の発現に関連する疾患又は障害又は症状又は状態を治療することが必要な対象を治療する方法であって、ある量の請求項 1 に記載の二本鎖核酸分子を、遺伝子発現を下方調節するのに有効な量で前記対象に投与することを含み、前記遺伝子が配列番号 2 ～ 4 (TLR 4 の mRNA) のいずれか 1 つで示されるポリヌクレオチド配列を有する RNA をコードする、
方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、

前記疾患又は傷害が、慢性又は急性の無菌性炎症、神経障害性の疼痛、一次移植片不全、虚血性の再灌流傷害、再灌流傷害、再灌流浮腫、同種移植片機能不全、肺再移植応答及び臓器移植における一次移植片機能不全 (PGD) から成る群から選択される、
方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、

前記疾患又は傷害が、臓器移植における一次移植片機能不全 (PGD) を含む、
方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、

前記臓器移植が肺移植を含む、
方法。

【請求項 10】

遺伝子の発現を阻害するのに有効な量での請求項 1 に記載の二本鎖核酸分子と薬学上許容可能なキャリアを含む医薬組成物であって、遺伝子が配列番号 2 ～ 4 (TLR 4 の mRNA) のいずれか 1 つで示されるポリヌクレオチド配列を有する RNA 分子をコードする、
医薬組成物。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 7/10	(2006.01)	A 6 1 P 7/10	
A 6 1 P 41/00	(2006.01)	A 6 1 P 41/00	

(74)代理人 100185384

弁理士 伊波 興一朗

(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 レホヴォト ハカーメル ストリート 1 3 / 5 5

(72)発明者 アダムスキー スヴェトラナ

イスラエル国 7 0 7 0 0 ジェドゥラ ハートジット ロード 4

(72)発明者 アヴキンナーナチュム 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 リションーレージオン 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

F ターム(参考) 4C084 AA13 NA14 ZA081 ZA361 ZA511 ZB081 ZB111

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA08 ZA36 ZA51 ZB08

ZB11

【外国語明細書】

20171480600000001.pdf

20171480600000002.pdf

20171480600000003.pdf