

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6466832号
(P6466832)

(45) 発行日 平成31年2月6日 (2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月18日 (2019.1.18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 1 3 O Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 67 (全 179 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-509141 (P2015-509141)	(73) 特許権者	500034653
(86) (22) 出願日	平成25年4月25日 (2013.4.25)		ジェンザイム・コーポレーション
(65) 公表番号	特表2015-519047 (P2015-519047A)		アメリカ合衆国O2142マサチューセツ州 ケンブリッジ、ビニー・ストリート50番
(43) 公表日	平成27年7月9日 (2015.7.9)	(74) 代理人	100145403
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/038218		弁理士 山尾 憲人
(87) 国際公開番号	W02013/163430	(74) 代理人	100122301
(87) 国際公開日	平成25年10月31日 (2013.10.31)		弁理士 富田 憲史
審査請求日	平成28年4月22日 (2016.4.22)	(72) 発明者	アキン・アキンク
(31) 優先権主張番号	61/669,249		アメリカ合衆国O2142マサチューセツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア
(32) 優先日	平成24年7月9日 (2012.7.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/734,573		
(32) 優先日	平成24年12月7日 (2012.12.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Serpinc1 RNA組成物およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

d s RNA 剤が二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、前記アンチセンス鎖が、Serpinc1をコードするmRNAに対する相補性領域を含んでなり、相補性領域が、5'-UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCAAG-3'

(配列番号562)のヌクレオチド配列と1ヌクレオチド以下異なる、少なくとも21連続ヌクレオチドを含んでなり、

ここで、前記アンチセンス鎖が、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合および少なくとも1ヌクレオチドの3'オーバーハングを含んでなり、

ここで、前記センス鎖の前記ヌクレオチドの全てと前記アンチセンス鎖の前記ヌクレオチドの全てが修飾ヌクレオチドであり、

ここで、前記ヌクレオチド修飾が、2'-O-メチル(2'-OMe)および2'-フルオロヌクレオチド修飾からなる群から選択され、かつ

ここで、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)誘導体を含んでなるリガンドが、d s RNA 剤のセンス鎖の3'末端と共役する、

Serpinc1 発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(d s RNA)剤。

【請求項2】

各鎖が30ヌクレオチド長以下である、請求項1に記載のd s RNA 剤。

【請求項3】

二本鎖領域が、17-25ヌクレオチド対長さである、請求項1に記載のd s RNA 剤

10

20

°

【請求項 4】

二本鎖領域が、2 1－2 3ヌクレオチド対長さである、請求項 1 に記載の d s R N A 剤

°

【請求項 5】

二本鎖領域が、1 7－2 3ヌクレオチド対長さである、請求項 1 に記載の d s R N A 剤

°

【請求項 6】

二本鎖領域が、2 3－2 7ヌクレオチド対長さである、請求項 1 に記載の d s R N A 剤

°

【請求項 7】

二本鎖領域が、1 9－2 1ヌクレオチド対長さである、請求項 1 に記載の d s R N A 剤

°

【請求項 8】

各鎖が約 1 9－2 5ヌクレオチド長である、請求項 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 9】

各鎖が 2 1－2 3ヌクレオチド長である、請求項 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 10】

センス鎖が 2 1ヌクレオチド長であり、かつアンチセンス鎖が 2 3ヌクレオチド長である、請求項 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 11】

前記相補性領域が、5'－UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCCAG－3'（配列番号 562）のヌクレオチド配列からなる、請求項 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 12】

前記センス鎖が、5'－GGUUAACACCAUUUACUUCAA－3'（配列番号 294）のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ前記アンチセンス鎖が、5'－UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCCAG－3'（配列番号 562）のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 13】

5'－GGUUAACACCAUUUACUUCAA－3'（配列番号 294）のヌクレオチド配列からなるセンス鎖と、5'－UUGAAGUAAAUGGUGUUAACCCAG－3'（配列番号 562）のヌクレオチド配列からなるアンチセンス鎖とを含んでなる、請求項 1 2 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 14】

前記センス鎖が、5'－GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf－3'（配列番号 956）を含んでなり、かつ前記アンチセンス鎖が、5'－uUfgAfaGfuAfaAfu g gUfgUfuAfaCfcsAfs g－3'（配列番号 975）を含んでなり、

ここで、a、c、g および u が、2'－O－メチル（2'－OMe）A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2'－フルオロ A、C、G および U であり；および s が、ホスホロチオエート結合である、請求項 1 2 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 15】

前記センス鎖が、5'－GfsgsUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAf－3'（配列番号 941）を含んでなり、かつ前記アンチセンス鎖が、5'－usUfsgAfaGfuAfaAfu g gUfgUfuAfaCfcsas g－3'（配列番号 960）を含んでなり、

ここで、a、c、g および u が、2'－O－メチル（2'－OMe）A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2'－フルオロ A、C、G および U であり；および s が、ホスホロチオエート結合である、

10

20

30

40

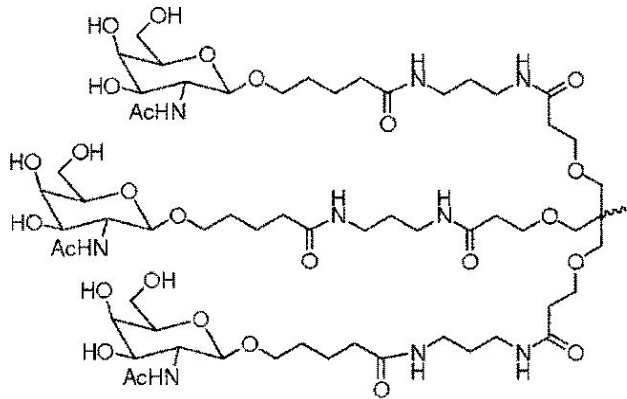
50

請求項 1 2 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 1 6】

前記リガンドが、

【化 1】



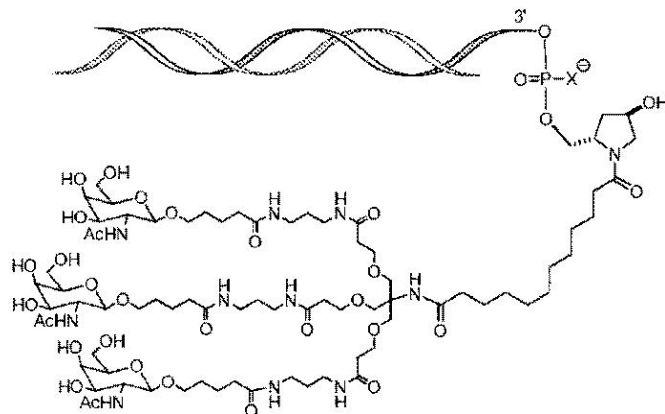
10

である、請求項 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 1 7】

以下の概略図、

【化 2】



20

(式中、

XはOまたはSである)に示されるように前記リガンドと共役する、請求項 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 1 8】

前記 X が O である、請求項 1 7 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 1 9】

センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、前記センス鎖が、5'-G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f-3' (配列番号 941) のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ前記アンチセンス鎖が、5'-u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g-3' (配列番号 960) のヌクレオチド配列を含んでなり、

40

ここで、a、c、g および u が、2'-O-メチル (2'-OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2'-フルオロ A、C、G および U であり；および s が、ホスホロチオエート結合である、

S e r p i n c 1 発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤。

【請求項 2 0】

リガンドをさらに含んでなる、請求項 1 9 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 2 1】

50

前記リガンドが、 $dsRNA$ のセンス鎖の3'末端と共役する、請求項20に記載の $dsRNA$ 剤。

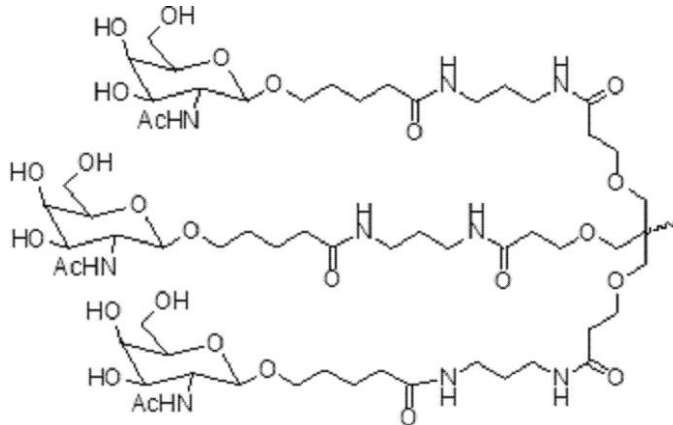
【請求項22】

前記リガンドが、 N -アセチルガラクトサミン ($GalNAc$) 誘導体である、請求項20に記載の $dsRNA$ 剤。

【請求項23】

前記リガンドが、

【化3】



10

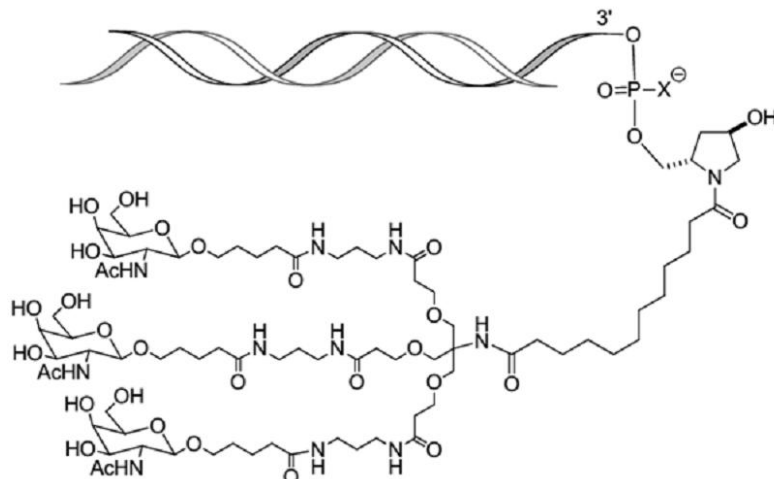
である、請求項22に記載の $dsRNA$ 剤。

20

【請求項24】

以下の概略図、

【化4】



30

(式中、 X は O または S である)に示されるように前記リガンドと共役する、請求項22に記載の $dsRNA$ 剤。

【請求項25】

X が、 O である、請求項24に記載の $dsRNA$ 剤。

40

【請求項26】

請求項1-25のいずれか一項に記載の $dsRNA$ 剤を含有する細胞。

【請求項27】

請求項1-25のいずれか一項に記載の $dsRNA$ 剤を含んでなる、 $Serpinc1$ 遺伝子発現を阻害する医薬組成物。

【請求項28】

(a) 細胞を請求項1-25のいずれか一項に記載の $dsRNA$ 剤に接触させるステップと；

(b) ステップ(a)で生成された細胞を $Serpinc1$ 遺伝子の $mRNA$ 転写物の分解を得るのに十分な時間維持し、それによって前記細胞内の $Serpinc1$ 遺伝子発現

50

を阻害するステップと

を含んでなる、細胞内で *Serpinc1* 発現を阻害するインビトロの方法。

【請求項 29】

Serpinc1 発現低下から利益を受ける障害を有する対象を治療する方法における使用のための、請求項 1 - 25 のいずれか一項に記載の *dsRNA* 剤または請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

Serpinc1 発現低下から利益を受ける障害を有する対象において少なくとも 1 つの症状を予防する方法における使用のための、請求項 1 - 25 のいずれか一項に記載の *dsRNA* 剤または請求項 27 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 31】

前記障害が出血障害である、請求項 29 または 30 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 32】

前記出血障害が血友病である、請求項 31 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 33】

対象への *dsRNA* 剤の投与が、血液凝固の増大および／または *Serpinc1* タンパク質蓄積の低下を引き起こす、請求項 29 または 30 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 34】

前記 *dsRNA* 剤が、 $0.01\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ または $0.5\text{ mg/kg} \sim 50\text{ mg/kg}$ の用量で投与される、請求項 29 または 30 に記載の *dsRNA* 剤。

20

【請求項 35】

前記 *dsRNA* 剤が、 $10\text{ mg/kg} \sim 30\text{ mg/kg}$ の用量で投与される、請求項 34 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 36】

前記 *dsRNA* 剤が、 0.3 mg/kg 、 0.5 mg/kg 、 1 mg/kg 、 1.5 mg/kg 、 3 mg/kg 、 10 mg/kg 、および 30 mg/kg からなる群から選択される用量で投与される、請求項 34 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 37】

前記 *dsRNA* 剤が、前記対象に週 1 回投与される、請求項 35 または 36 に記載の *dsRNA* 剤。

30

【請求項 38】

前記 *dsRNA* 剤が、前記対象に月 2 回投与される、請求項 35 または 36 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 39】

前記 *dsRNA* 剤が、 $0.5\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ の累積週間用量で前記対象に皮下投与され、前記 *dsRNA* 剤が配列番号 941 を含んでなるセンス鎖および配列番号 960 を含んでなるアンチセンス鎖を有する AD-57213 である、請求項 29 または 30 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 40】

前記出血障害が、血友病 A である、請求項 32 に記載の *dsRNA* 剤。

40

【請求項 41】

前記出血障害が、血友病 B である、請求項 32 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 42】

前記出血障害が、血友病 C である、請求項 32 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 43】

出血障害が、血友病 A であり、かつ対象が、インヒビター対象である、請求項 32 に記載の *dsRNA* 剤。

【請求項 44】

出血障害が、血友病 B であり、かつ対象が、インヒビター対象である、請求項 32 に記載の *dsRNA* 剤。

50

50

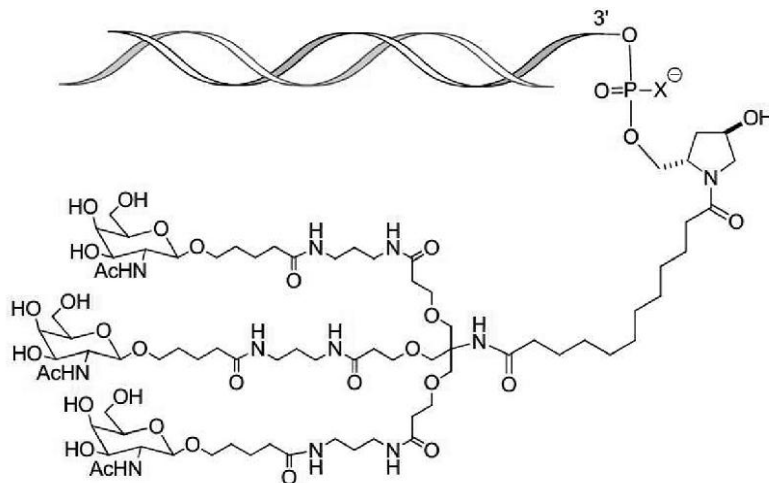
【請求項 6 1】

dsRNA 剤がセンス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、センス鎖が、5' - G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f - 3' (配列番号 9 4 1) のヌクレオチド配列からなり、かつアンチセンス鎖が、5' - u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g - 3' (配列番号 9 6 0) のヌクレオチド配列からなり、

a、c、g および u が、2' - O - メチル (2' - OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2' - フルオロ A、C、G、U であり；および s が、ホスホロチオエート結合であり、かつ

リガンドが、センス鎖の 3' 末端と共役し、かつリガンドが以下の構造：

【化 5】



を有する、

Serpinc1 発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤。

【請求項 6 2】

センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなる二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を含んでなり、

センス鎖が、5' - G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f L 9 6 - 3' (配列番号 9 4 1) のヌクレオチド配列からなり、かつアンチセンス鎖が、5' - u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g - 3' (配列番号 9 6 0) のヌクレオチド配列からなり、

a、c、g および u が、2' - O - メチル (2' - OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2' - フルオロ A、C、G、U であり；s が、ホスホロチオエート結合であり；および L 9 6 が N - [トリス (G a l N A c - アルキル) - アミドデカノイル] - 4 - ヒドロキシプロピノールである、

Serpinc1 遺伝子発現を阻害する医薬組成物。

【請求項 6 3】

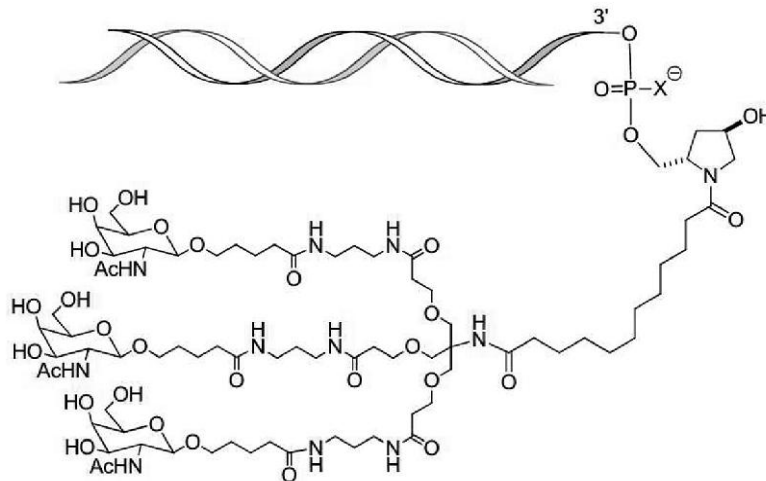
センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなる二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を含んでなり、

センス鎖が、5' - G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f - 3' (配列番号 9 4 1) のヌクレオチド配列からなり、かつアンチセンス鎖が、5' - u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g - 3' (配列番号 9 6 0) のヌクレオチド配列からなり、

a、c、g および u が、2' - O - メチル (2' - OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2' - フルオロ A、C、G、U であり；および s が、ホスホロチオエート結合であり、かつ

リガンドが、センス鎖の 3' 末端と共役し、かつリガンドが以下の構造：

【化 6】



10

を有する、

Serpincl 遺伝子発現を阻害する医薬組成物。

【請求項 64】

20

dsRNA が、センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり

センス鎖が、5' - G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f L 9 6 - 3' (配列番号 941) のヌクレオチド配列からなり、かつアンチセンス鎖が、5' - u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g - 3' (配列番号 960) のヌクレオチド配列からなり、

a、c、g および u が、2' - O - メチル (2' - OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2' - フルオロ A、C、G、U であり；s が、ホスホロチオエート結合であり；および L 96 が N - [トリス (G a l N A c - アルキル) - アミドデカノイル] - 4 - ヒドロキシプロリノールである、

血友病 A または血友病 B を有する対象を治療する方法における使用のための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を含んでなる医薬組成物。

30

【請求項 65】

dsRNA が、センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、

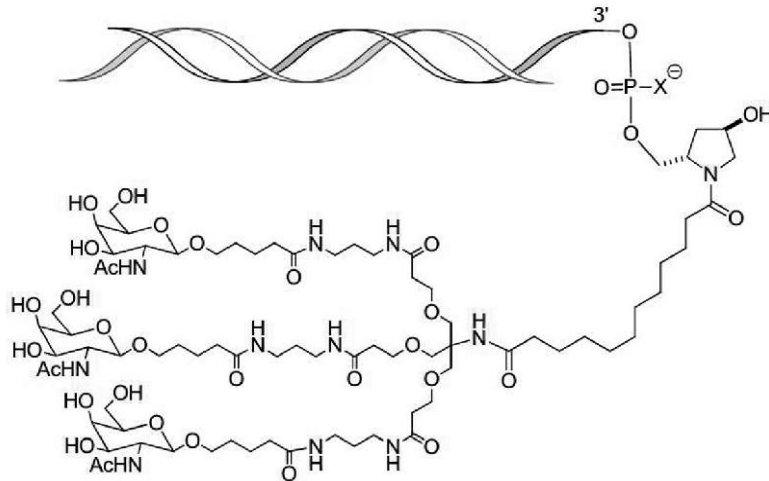
センス鎖が、5' - G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f - 3' (配列番号 941) のヌクレオチド配列からなり、かつアンチセンス鎖が、5' - u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g - 3' (配列番号 960) のヌクレオチド配列からなり、

a、c、g および u が、2' - O - メチル (2' - OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2' - フルオロ A、C、G、U であり；および s が、ホスホロチオエート結合であり、かつ

40

リガンドが、センス鎖の 3' 末端と共役し、かつリガンドが以下の構造：

【化 7】



10

を有する、

血友病 A または血友病 B を有する対象を治療する方法における使用のための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項 66】

20

dsRNA が、センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、

センス鎖が、5'-G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f L 9 6-3' (配列番号 941) のヌクレオチド配列からなり、かつアンチセンス鎖が、5'-u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g-3' (配列番号 960) のヌクレオチド配列からなり、

a、c、g および u が、2'-O-メチル (2'-OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2'-フルオロ A、C、G、U であり；s が、ホスホロチオエート結合であり；および L 9 6 が N-[トリス (G a l N A c-アルキル)-アミドデカノイル]-4-ヒドロキシプロリノールである、

血友病 A または血友病 B を有する対象において少なくとも 1 つの症状を予防する方法における使用のための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を含んでなる医薬組成物。

30

【請求項 67】

dsRNA が、センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、

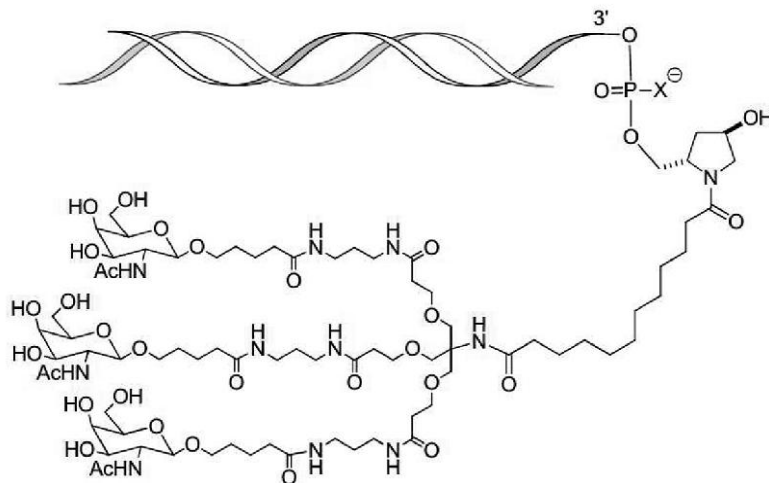
センス鎖が、5'-G f s g s U f u A f a C f a C f C f A f u U f u A f c U f u C f a A f-3' (配列番号 941) のヌクレオチド配列からなり、かつアンチセンス鎖が、5'-u s U f s g A f a G f u A f a A f u g g U f g U f u A f a C f c s a s g-3' (配列番号 960) のヌクレオチド配列からなり、

a、c、g および u が、2'-O-メチル (2'-OMe) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f が、2'-フルオロ A、C、G、U であり；および s が、ホスホロチオエート結合であり、かつ

40

リガンドが、センス鎖の 3' 末端と共役し、かつリガンドが以下の構造：

【化 8】



10

を有する、

血友病 A または血友病 B を有する対象において少なくとも 1 つの症状を予防する方法における使用のための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を含んでなる医薬組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012 年 4 月 26 日に提出された、米国仮特許出願第 61/638,952 号明細書、2012 年 7 月 9 日に提出された米国仮特許出願第 61/669,249 号明細書、2012 年 12 月 7 日に提出された米国仮特許出願第 61/734,573 号明細書、および 2013 年 3 月 15 日に提出された米国特許出願公開第 13/837,129 号明細書の優先権を主張する。前述の各出願は、その内容全体を参照によって本明細書に援用する。

30

【背景技術】

【0002】

Serpinc1 は、セリンプロテイナーゼインヒビター (セルピン) スーパーファミリーのメンバーである。Serpinc1 は、トロンビン、ならびに X、IX、XI、XII、および VII 因子などの凝固系のその他の活性化セリンプロテアーゼを阻害し、したがって血液凝固カスケードを調節する、血漿プロテアーゼインヒビターである (例えば図 1 を参照されたい)。Serpinc1 の抗凝固活性は、トロンビン: 抗トロンビン (TAT) 複合体の形成を触媒する、ヘパリンおよびその他の関連グリコサミノグリカンの存在によって高められる。

【0003】

40

遺伝性または後天性のいずれの出血障害も、血液凝固が不十分な病状である。例えば血友病は、血液凝固 (clotting) または凝固 (coagulation) を制御する身体能力を損なう、一群の遺伝性出血障害である。血友病 A は、機能性第 VIII 凝固因子の欠如を伴う劣性 X 連鎖遺伝障害であり、血友病症例の 80% に相当する。血友病 B は、機能性第 IX 凝固因子の欠如を伴う劣性 X 連鎖遺伝障害である。それは、血友病症例のおよそ 20% を構成する。血友病 C は、機能性 XI 凝固因子の欠如を伴う常染色体性遺伝障害である。ヘテロ接合の個人もまた、出血増大を示すことから、血友病 C は完全に劣性でない。

【0004】

現在のところ血友病の治療法はないが、それは例えば血友病 A における第 VIII 凝固因子

50

などの欠損している凝固因子の定期的輸液によって、制御し得る。しかし一部の血友病患者は、投与された代替因子に対する抗体（インヒビター）を生じ、したがって代替凝固因子では難治性になる。したがってこのような対象における出血は、適切に制御され得ない。

【0005】

例えば第V I I I因子およびその他の凝固因子に対する高力価のインヒビターの発生は、血友病療法の最も深刻な合併症であり、出血の治療を非常に困難にする。目下、このような対象において出血を止める唯一の戦略は、第V I I I因子インヒビターバイパス活性（F E I B A）などの「バイパス剤」、および活性化組換えV I I因子（r F V I I a）、血漿交換療法、継続的因子置換、および免疫寛容療法の使用であり、そのい

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって当該技術分野で、血友病などの出血障害を有する対象のための代案の治療薬に対する必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、S e r p i n c 1遺伝子のRNA転写物のRNA誘導サイレンシング複合体（R I S C）媒介切断をもたらす、i RNA組成物を提供する。S e r p i n c 1遺伝子は、例えばヒトなどの対象内の細胞などの細胞内にあってもよい。本発明はまた、S e r p i n c 1遺伝子発現を阻害するための、および／またはS e r p i n c 1遺伝子発現の阻害または低下から利益を受ける、例えば血友病のような出血障害などの障害を有する対象を治療するための、本発明のi RNA組成物を使用する方法および用途も提供する。

20

【0008】

したがって一態様では、本発明は、S e r p i n c 1発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（d s RNA）を提供する。d s RNAはセンス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、センス鎖は配列番号1のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下異なる、少なくとも15連続ヌクレオチドを含んでなり、アンチセンス鎖は配列番号5のヌクレオチド配列と3ヌクレオチド以下異なる、少なくとも15連続ヌクレオチドを含んでなる。

30

【0009】

別の態様では、本発明は、S e r p i n c 1発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（d s RNA）を提供する。d s RNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでなり、アンチセンス鎖は、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つに列挙されるアンチセンス配列のいずれか1つと3ヌクレオチド以下異なる、少なくとも15連続ヌクレオチドを含んでなる相補性領域を含んでなる。

【0010】

一実施形態では、センスおよびアンチセンス鎖は、A D - 5 0 4 8 7 . 1、A D - 5 0 4 7 7 . 1、A D - 5 0 4 8 3 . 1、A D - 5 0 4 7 5 . 1、A D - 5 0 4 9 5 . 1、A D - 5 0 4 7 6 . 1、A D - 5 0 4 9 9 . 1、A D - 5 0 4 7 8 . 1、A D - 5 0 4 8 9 . 1、A D - 5 0 5 0 1 . 1、A D - 5 0 5 0 7 . 1、A D - 5 0 4 8 4 . 1、A D - 5 0 5 1 5 . 1、A D - 5 0 5 4 0 . 1、A D - 5 0 5 2 8 . 1、A D - 5 0 5 4 9 . 1、A D - 5 0 5 3 9 . 1、A D - 5 0 5 3 4 . 1、A D - 5 0 5 2 7 . 1、A D - 5 0 5 1 4 . 1、A D - 5 0 5 0 9 . 1、A D - 5 0 5 2 9 . 1、A D - 5 4 9 4 4、A D - 5 6 8 1 3、A D - 5 7 2 0 5、A D - 5 7 2 1 4、およびA D - 5 7 2 1 3からなる群から選択される配列、および表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つに列挙される配列のいずれか、またはこれらの配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列を含んでなる。本発明の特定の実施形態では、d s RNAは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含んでなる。一実施形態では、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-

40

50

ホスホロチオエート基を含んでなるヌクレオチド、およびコレステリル誘導体またはドデカン酸ビスデシルアミド基に連結した末端ヌクレオチドからなる群から選択される。別の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミダート、および非天然塩基包含ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0011】

dsRNAの相補性領域は、少なくとも17ヌクレオチド長、19～21ヌクレオチド長、または19ヌクレオチド長であってもよい。

【0012】

一実施形態では、dsRNAの各鎖は、30ヌクレオチド長以下である。

【0013】

少なくとも1本のdsRNA鎖は、少なくとも1ヌクレオチドまたは少なくとも2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含んでなってもよい。

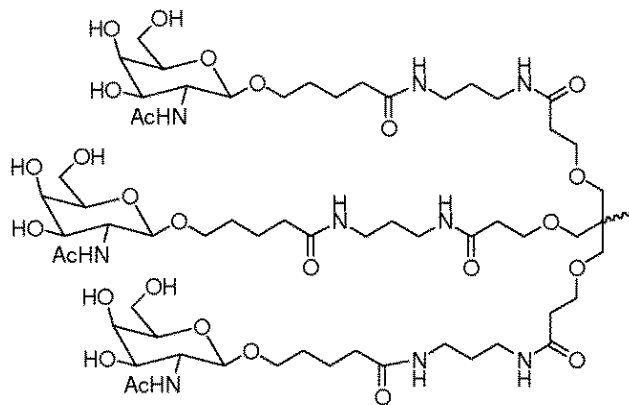
【0014】

特定の実施形態では、dsRNAは、リガンドをさらに含んでなる。一実施形態では、リガンドは、dsRNAのセンス鎖の3'末端に共役する。

【0015】

いくつかの実施形態では、二価または三価の分枝リンカーを通じて付着するリガンドは、1つまたは複数のN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 誘導体である。特定の実施形態では、リガンドは、

【化1】



である。

【0016】

いくつかの実施形態では、RNAi剤は、以下の概略図に示されるリガンドに共役する。

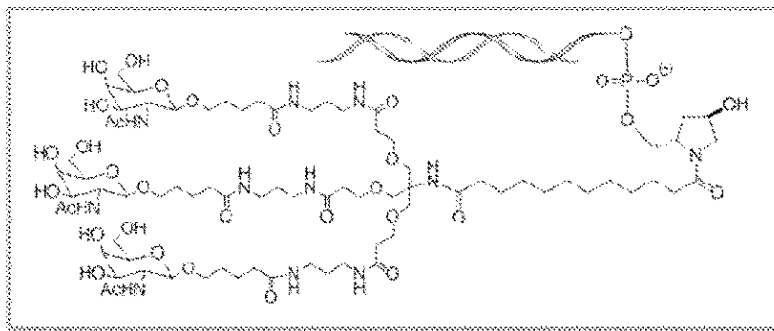
。

10

20

30

【化 2】

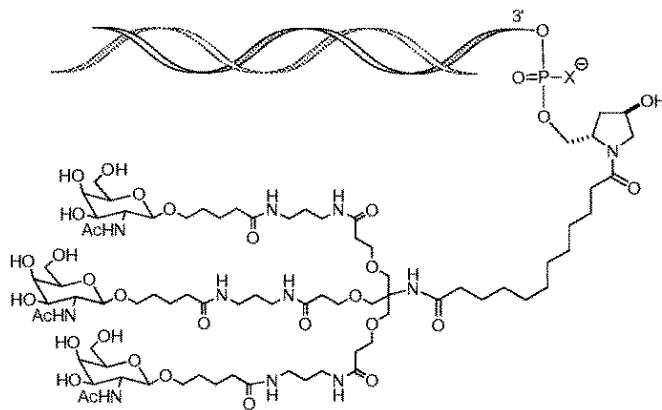


10

【0017】

別の実施形態では、RNA i 剤は、以下の概略図に示されるリガンドに共役し、式中、XはOまたはSである。

【化 3】



20

【0018】

一実施形態では、dsRNAの相補性領域は、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つのアンチセンス配列の1つからなる。

【0019】

別の実施形態では、dsRNAは、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つの配列から選択されるセンス鎖配列からなるセンス鎖と、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つの配列から選択されるアンチセンス配列からなるアンチセンス鎖とを含んでなる。

【0020】

別の態様では、本発明は、本発明のdsRNAを含有する細胞を提供する。

【0021】

さらに別の態様では、本発明は、少なくとも1本のdsRNA鎖をコードするベクターを提供し、dsRNAはSerpinc1をコードするmRNAの少なくとも一部との相補性領域を含んでなり、dsRNAは30塩基対以下の長さであり、dsRNAはmRNAを切断標的とする。

【0022】

相補性領域は、少なくとも15ヌクレオチド長または19～21ヌクレオチド長であってもよい。

【0023】

さらなる態様では、本発明は、少なくとも1本のdsRNA鎖をコードするベクターを含んでなる細胞を提供し、dsRNAはSerpinc1をコードするmRNAの少なく

30

40

50

とも一部との相補性領域を含んでなり、dsRNAは30塩基対以下の長さであり、dsRNAはmRNAを切断標的とする。

【0024】

一態様では、本発明は、本発明のdsRNAまたはベクターを含んでなる、Serpinc1遺伝子発現を阻害するための医薬組成物を提供する。

【0025】

一実施形態では、医薬組成物は、MC3、SNALP、またはXTC製剤などの脂質製剤をさらに含んでなる。

【0026】

別の態様では、本発明は、細胞内でSerpinc1発現を阻害する方法を提供する。方法は、細胞を本発明のdsRNAまたはベクターに接触させて、生成された細胞をSerpinc1遺伝子のmRNA転写物の分解を得るのに十分な時間保ち、それによって細胞内でSerpinc1遺伝子発現を阻害するステップを含む。

【0027】

細胞は、例えば血友病などの出血障害に罹患しているヒト対象のような、ヒト対象などの対象内にあってもよい。

【0028】

本発明の方法の一実施形態では、Serpinc1発現は、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%阻害される。

【0029】

別の態様では、本発明は、例えば血友病のような出血障害などの、Serpinc1発現の低下から利益を受ける、障害を有する対象を治療する方法を提供する。方法は、本発明のdsRNAまたはベクターの治療有効量を対象に投与し、それによって対象を治療するステップを含む。

【0030】

一態様では、本発明は、Serpinc1発現低下から利益を受ける、例えば血友病などの障害を有する対象中で、例えば出血などの少なくとも1つの症状を予防する方法を提供する。方法は、例えば本発明のdsRNAなどのiRNAまたはベクターの治療有効量を対象に投与し、それによってSerpinc1発現低下から利益を受ける障害を有する対象中で、少なくとも1つの症状を予防するステップを含む。

【0031】

障害は、血友病などの出血障害であってもよい。

【0032】

一実施形態では、対象へのdsRNAの投与は、血液凝固の増大および／またはSerpinc1タンパク質の発現および／または蓄積の低下を引き起こす。

【0033】

一実施形態では、dsRNAは、例えばdsRNAのセンス鎖の3'末端で、リガンドに共役する。一実施形態では、リガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)誘導体である。

【0034】

一実施形態では、dsRNAは、例えば約0.05mg/kg～約5mg/kg、約0.05mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約5mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、約0.2mg/kg～約5mg/kg、約0.2mg/kg～約10mg/kg、約0.3mg/kg～約5mg/kg、約0.3mg/kg～約10mg/kg、約0.4mg/kg～約5mg/kg、約0.4mg/kg～約10

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

g/kg、約0.5～約30mg/kg、約0.75～約30mg/kg、約1～約30mg/kg、約1.5～約30mg/kg、約2～約30mg/kg、約2.5～約30mg/kg、約3～約30mg/kg、約3.5～約30mg/kg、約4～約30mg/kg、約4.5～約30mg/kg、約5～約30mg/kg、約7.5～約30mg/kg、約10～約30mg/kg、約15～約30mg/kg、約20～約30mg/kg、約20～約30mg/kg、約25～約30mg/kg、約0.5～約20mg/kg、約0.75～約20mg/kg、約1～約20mg/kg、約1.5～約20mg/kg、約2～約20mg/kg、約2.5～約20mg/kg、約3～約20mg/kg、約3.5～約20mg/kg、約4～約20mg/kg、約4.5～約20mg/kg、約5～約20mg/kg、約7.5～約20mg/kg、約10～約20mg/kg、または約15～約20mg/kgの用量で投与される。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

【0037】

例えば、対象には、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または約50mg/kgなどの治療量のiRNAを投与し得る。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

20

30

【0038】

例えばリガンドに共役するdsRNAは、週1回または月2回、対象に投与してもよい。

【0039】

別の態様では、本発明は、対象中でSerpincl発現を阻害する方法を提供する。方法は、本発明のdsRNAまたはベクターの治療有効量を対象に投与し、それによって対象中でSerpincl発現を阻害するステップを含む。

【0040】

一実施形態では、dsRNAは、例えばdsRNAのセンス鎖の3'末端で、リガンドに共役する。一実施形態では、リガンドはN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)誘導体である。

40

【0041】

一実施形態では、dsRNAは、例えば約0.05mg/kg～約5mg/kg、約0.05mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約5mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、約0.2mg/kg～約5mg/kg、約0.2mg/kg～約10mg/kg、約0.3mg/kg～約5mg/kg、約0.3mg/kg～約10mg/kg、約0.4mg/kg～約5mg/kg、約0.4mg/kg～約10mg/kg、約0.5mg/kg～約5mg/kg、約0.5mg/kg～約10mg/kg、約1mg/kg～約5mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約1.5mg/kg～約5mg/kg、約1.5mg/kg～約10mg/kg、約2mg/kg

50

～約2.5mg/kg、約2mg/kg～約10mg/kg、約3mg/kg～約5mg/kg、約3mg/kg～約10mg/kg、約3.5mg/kg～約5mg/kg、約4mg/kg～約5mg/kg、約4.5mg/kg～約5mg/kg、約4mg/kg～約10mg/kg、約4.5mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約10mg/kg、約5.5mg/kg～約10mg/kg、約6mg/kg～約10mg/kg、約6.5mg/kg～約10mg/kg、約7mg/kg～約10mg/kg、約7.5mg/kg～約10mg/kg、約8mg/kg～約10mg/kg、約8.5mg/kg～約10mg/kg、約9mg/kg～約10mg/kg、または約9.5mg/kg～約10mg/kgなどの約0.01mg/kg～約10mg/kgの用量で投与される。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

【0042】

例えばdsRNAは、約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、または約10mg/kgの用量で投与されてもよい。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

20

【0043】

別の実施形態では、dsRNAは、約0.5～約50mg/kg、約0.75～約50mg/kg、約1～約50mg/kg、約1.5～約50mg/kg、約2～約50mg/kg、約2.5～約50mg/kg、約3～約50mg/kg、約3.5～約50mg/kg、約4～約50mg/kg、約4.5～約50mg/kg、約5～約50mg/kg、約7.5～約50mg/kg、約10～約50mg/kg、約15～約50mg/kg、約20～約50mg/kg、約20～約50mg/kg、約25～約50mg/kg、約25～約50mg/kg、約30～約50mg/kg、約35～約50mg/kg、約40～約50mg/kg、約45～約50mg/kg、約0.5～約45mg/kg、約0.75～約45mg/kg、約1～約45mg/kg、約1.5～約45mg/kg、約2～約45mg/kg、約2.5～約45mg/kg、約3～約45mg/kg、約3.5～約45mg/kg、約4～約45mg/kg、約4.5～約45mg/kg、約5～約45mg/kg、約7.5～約45mg/kg、約10～約45mg/kg、約15～約45mg/kg、約20～約45mg/kg、約20～約45mg/kg、約25～約45mg/kg、約25～約45mg/kg、約30～約45mg/kg、約35～約45mg/kg、約40～約45mg/kg、約40～約45mg/kg、約0.5～約40mg/kg、約0.75～約40mg/kg、約1～約40mg/kg、約1.5～約40mg/kg、約2～約40mg/kg、約2.5～約40mg/kg、約3～約40mg/kg、約3.5～約40mg/kg、約4～約40mg/kg、約4.5～約40mg/kg、約5～約40mg/kg、約7.5～約40mg/kg、約10～約40mg/kg、約15～約40mg/kg、約20～約40mg/kg、約20～約40mg/kg、約25～約40mg/kg、約25～約40mg/kg、約30～約40mg/kg、約35～約40mg/kg、約40～約40mg/kg、約0.5～約30mg/kg、約0.75～約30mg/kg、約1～約30mg/kg、約1.5～約30mg/kg、約2～約30mg/kg、約2.5～約30mg/kg、約3～約30mg/kg、約3.5～約30mg/kg、約4～約30mg/kg

30

40

50

／k g、約4.5～約30mg／k g、約5～約30mg／k g、約7.5～約30mg／k g、約10～約30mg／k g、約15～約30mg／k g、約20～約30mg／k g、約25～約30mg／k g、約0.5～約20mg／k g、約0.75～約20mg／k g、約1～約20mg／mg、約1.5～約20mg／k b、約2～約20mg／k g、約2.5～約20mg／k g、約3～約20mg／k g、約3.5～約20mg／k g、約4～約20mg／k g、約4.5～約20mg／k g、約5～約20mg／k g、約7.5～約20mg／k g、約10～約20mg／k g、または約15～約20mg／k gの用量で投与される。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0044】

例えば、対象には、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または約50mg／k gなどの治療量のiRNAを投与し得る。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0045】

例えばリガンドに共役するdsRNAは、週1回または月2回、対象に投与してもよい。

【0046】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の方法を実施するキットを提供する。一実施形態では、本発明は、細胞内でSerpincl遺伝子発現を阻害するのに有効な量の二本鎖RNAi剤に細胞を接触させることで、細胞内でSerpincl発現を阻害する方法を実施するキットを提供する。キットは、RNAi剤および使用説明書および、任意選択的に、RNAi剤を対象に投与する手段を含んでなる。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】血液凝固カスケードの概略図である。

【図2A-2B】示されるiRNAの単回投与に続く、Hep3B細胞中のSerpincl発現の阻害を示すグラフである。

【図3A-3B】示されるAD-50509またはAD-1955のLNP製剤の単回投与に続く、CD-1マウス中のSerpincl mRNA (A) およびタンパク質 (B) 発現の阻害を示すグラフである。

【図4A-4B】1mg／k gのAD-50509またはAD-1955のLNP製剤の単回投与に続く、CD-1マウス中のSerpincl mRNA (A) およびタンパク質 (B) 発現の阻害持続期間を示すグラフである。

【図4C】1mg／k gのAD-50509またはAD-1955のLNP製剤の単回投与に続く、CD1マウス中のSerpincl活性およびSerpinclタンパク質発現の阻害を示すグラフである。

【図5】示されるGalNAc共役iRNAの10mg/kgの単回投与に続く、Serpincl mRNAおよびタンパク質レベルのノックダウン百分率を示すグラフである。

【図6】GalNAc共役AD-54944の5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、および75mg/kgの単回投与、および5×5mg/kgの反復投与に続く、C57BL/6マウス中のSerpinclタンパク質発現の阻害を示すグラフである。

【図7A-7B】C57BL/6マウス中のSerpinclタンパク質発現の阻害持続期間に対する、GalNAc共役AD-54944の反復投与の効果を示すグラフである。

【図8-9】GalNAc共役AD-54944を投与されたC57BL/6マウス中のSerpinclタンパク質発現のサイレンシング持続期間に対する、示される分割投薬計画の効果を示すグラフである。

【図10A-10B】示されるGalNAc共役iRNAの10mg/kg (A) または3mg/kg (B) の単回投与に続く、Serpinclタンパク質レベルのノックダウン百分率を示すグラフである。

【図11】示されるGalNAc共役iRNAの10mg/kgまたは3mg/kgの単回投与に続く、Serpinclタンパク質レベルのノックダウン百分率を示すグラフである。

【図12】示されるGalNAc共役iRNAの10mg/kgまたは3mg/kgの単回投与に続く、Serpincl活性のノックダウン百分率を示すグラフである。

【図13】AD-57213の単回投与に対する、用量効果応答を示すグラフである。

【図14】血友病Aマウ中における、AD-57213の1mg/kg、3mg/kgまたは10mg/kgの単回投与に続く、Serpinclのサイレンシング持続期間を示すグラフである。

【図15】AD-57213の30mg/kg、10mg/kg、3mg/kg、1mg/kg、および0.3mg/kgの単回投与に続く、C57BL/6マウス中のSerpincl mRNA発現の阻害を示すグラフである。

【図16A-16C】示されるAD-57213 (A)、AD-57205 (B)、およびAD-57214 (C) の単回投与に続く、Serpinclのサイレンシング持続期間を示すグラフである。

【図17-19】GalNAc共役AD-57213を投与されたC57BL/6マウス中のSerpinclタンパク質発現のサイレンシング持続期間に対する、示される分割投薬計画の効果を示すグラフである。

【図20】非ヒト霊長類中のSerpinclタンパク質発現の持続期間に対する、示される化合物の単回投与スクリーニング効果を示すグラフである。

【図21】非ヒト霊長類中のSerpinclタンパク質発現の持続期間に対する、GalNAc共役AD-57213の単回投与スクリーニング効果を示すグラフである。

【図22】非ヒト霊長類中のSerpinclタンパク質発現の持続期間に対する、示される化合物の単回投与スクリーニング効果を示すグラフである。

【図23】非ヒト霊長類中の血清抗トロンビン (Serpincl) レベルに対する、化合物AD-57213の単回投与の効果を示すグラフである。

【図24A-24D】非ヒト霊長類中における、血清抗トロンビン (Serpincl) レベルと、ピーク血漿トロンビンレベルの変化倍数との相関に対する、化合物AD-57213のA) 1mg/kg、B) 3mg/kg、C) 10mg/kg、およびD) 30mg/kgの単回投与の効果を示すグラフである。ピークトロンビンの変化倍数は、二次y軸 (灰色) 上に描写され、相対的抗トロンビンレベルは、一次y軸 (黒) 上に描写される。

【図25】相対的抗トロンビン (Serpincl) サイレncingの関数としてのピークトロンビン増大の変化倍数として、AD-57213の効果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図26A-26B】非ヒト霊長類中の血清抗トロンビンレベルに対する、*Serpinc1* siRNAの多回投与(0.5mg/kg qw、1mg/kg q2w、1.5mg/kg qw、3mg/kg q2w)の効果を示すグラフである。データ点は群平均を表し、誤差棒は標準偏差を表す(N=3)。(qw=毎週;q2w=隔週)。

【図27A-27B】非ヒト霊長類中の*Serpinc1*サイレンシングの累積効果を示すグラフである。

【図28A】微小血管レーザー損傷に続く血小板蓄積に対する、*Serpinc1*サイレンシングの効果を示すグラフである。グラフは、全ての被害的損傷からの中央値を示す。

【図28B】微小血管レーザー損傷に続くフィブリン面積に対する、*Serpinc1*サイレンシングの効果を示すグラフである。グラフは、全ての被害的損傷からの中央値を示す。

10

【図29】脂質核酸粒子に調合された化合物AD-57213の投与に続く、*Serpinc1*サイレンシングの持続期間を示すグラフである。

【図30A】ヒト(*Homo sapiens*)セルピンペプチダーゼインヒビター、分岐群C(抗トロンビン)、メンバー1(SERPINC1)(配列番号1)のヌクレオチド配列を示す。

【図30B】アカゲザル(*Macaca mulatta*)セルピンペプチダーゼインヒビター、分岐群C(抗トロンビン)、メンバー1(SERPINC2)(配列番号1)のヌクレオチド配列を示す。

【図30C】ハツカネズミ(*Mus musculus*)セリン(またはシステイン)ペプチダーゼインヒビター、分岐群C(抗トロンビン)、メンバー1(*Serpinc1*)(配列番号3)のヌクレオチド配列を示す。

20

【図30D】ドブネズミ(*Rattus norvegicus*)セルピンペプチダーゼインヒビター、分岐群C(抗トロンビン)、メンバー1(*Serpinc1*)(配列番号4)のヌクレオチド配列を示す。

【図30E】配列番号1の逆相補体(配列番号5)を示す。

【図30F】配列番号2の逆相補体(配列番号6)を示す。

【図30G】配列番号3の逆相補体(配列番号7)を示す。

【図30H】配列番号4の逆相補体(配列番号8)を示す。

【図30I】例示的な疎水性MTS含有ペプチドRFGFのアミノ酸配列(sequence)(配列番号9);例示的なRFGF類似体のアミノ酸配列(配列番号10);HIV Tatタンパク質のアミノ酸(amino acid)配列(配列番号11);ショウジョウバエ(*Drosophila*)アンテナペディアタンパク質のアミノ酸配列(配列番号12);および例示的なペプチドベースの切断可能連結基のアミノ酸配列を示す。

30

【図31A-31B】抗トロンビン低下が、試験管内で、第IX因子枯渇ヒト血漿中のトロンビン生成を増大させることを描写するグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明は、*Serpinc1*遺伝子のRNA転写物のRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)媒介切断をもたらす、iRNA組成物を提供する。*Serpinc1*遺伝子は、例えばヒトなどの対象内の細胞などの細胞内にあってもよい。本発明はまた、*Serpinc1*遺伝子発現を阻害するための、および/または*Serpinc1*遺伝子発現の阻害または低下から利益を受ける、例えば血友病などの出血障害のような障害を有する対象を治療するために、本発明のiRNA組成物を使用する方法も提供する。本発明は、*Serpinc1*遺伝子発現の阻害または低下から利益を受ける、例えば血友病のような出血障害などの障害を有する対象中で、例えば出血などの少なくとも1つの症状を予防する方法をさらに提供する。

40

【0049】

本発明のiRNAとしては、例えば15~30、15~29、15~28、15~27、15~26、15~25、15~24、15~23、15~22、15~21、15~

50

20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22ヌクレオチド長などの約30ヌクレオチド以下の長さの領域を有するRNA鎖（アンチセンス鎖）が挙げられ、その領域は、Serpinc1遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部と実質的に相補的である。これらのiRNAの使用は、哺乳類中のSerpinc1遺伝子のmRNAの標的化分解を可能にする。特に、非常に低投与量のSerpinc1 iRNAは、特異的かつ効率的にRNA干渉（RNAi）を媒介し得て、Serpinc1遺伝子発現の著しい阻害がもたらされる。本発明者らは、Serpinc1を標的にするiRNAが、試験管内および生体内でRNAiを媒介して、Serpinc1遺伝子発現の顕著な阻害をもたらすことを実証した。したがってこれらのiRNAを含む方法および組成物は、例えば血友病のような出血障害を有する対象などの、Serpinc1タンパク質のレベルおよび／または活性の低下によって利益を受ける対象を治療するのに有用である。

10

【0050】

以下の詳細な説明は、Serpinc1遺伝子発現を阻害するiRNAを含有する組成物を作成して利用する方法、ならびこの遺伝子の発現の阻害および／または低下から利益を受ける疾患および障害を有する対象を治療するための組成物、使用、および方法を開示する。

20

【0051】

I. 定義

本発明がより容易に理解されるように、特定の用語を最初に定義する。これに加えて、パラメータの値または値範囲が列挙される場合は常に、列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図されることに留意すべきである。

【0052】

冠詞「a」および「an」は、冠詞の1つまたは2つ以上（すなわち少なくとも1つ）の文法的目的に言及するために、本明細書で使用される。一例として「因子（an element）」は、1つの因子、または例えば複数の因子などの2つ以上の因子を意味する。

30

【0053】

「含む」という用語は、本明細書では、「をはじめとするが、これに限定されるものではない」という用語を意味するために使用され、またそれと区別なく使用される。

【0054】

「または」という用語は、本明細書では、文脈上、明確に別の意味でない限り、「および／または」という用語を意味するために使用され、またそれと区別なく使用される。

【0055】

本明細書の用法では、「Serpinc1」は、細胞内で発現される特定のポリペプチドを指す。Serpinc1は、セルピンペプチダーゼインヒビター、分岐群C（抗トロンビン）、メンバー1；抗トロンビンIII；AT3；抗トロンビン；およびヘパリン補助因子1としてもまた知られている。ヒトSerpinc1 mRNA転写物の配列は、例えばGenBank受入番号GI：254588059（NM_000488；配列番号1）にある。アカゲザルSerpinc1 mRNAの配列は、例えばGenBank受入番号GI：157167169（NM_001104583；配列番号2）にある。マウスSerpinc1 mRNAの配列は、例えばGenBank受入番号GI：237874216（NM_080844；配列番号3）にある。ラットSerpinc1 mRNAの配列は、例えばGenBank受入番号GI：58865629（NM_001012027；配列番号4）にある。

40

50

【0056】

「Serpinc1」という用語は、本明細書の用法では、Serpinc1遺伝子の一塩基多型などの、Serpinc1遺伝子の自然発生的DNA配列多様性によって、細胞内で発現される特定のポリペプチドも指す。Serpinc1遺伝子内の多数のSNPが同定されており、例えばNCBI dbSNPにある（例えばwww.ncbi.nlm.nih.gov/snpを参照されたい）。Serpinc1遺伝子内のSNPの非限定的例は、NCBI dbSNP受入番号rs677；rs5877；rs5878；rs5879；rs941988；rs941989；rs1799876；rs19637711；rs2008946；およびrs2227586にある。

【0057】

本明細書の用法では、「標的配列」は、一次転写産物のRNAプロセッシング産物であるmRNAをはじめとする、Serpinc1遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続部分を指す。一実施形態（embodiment）では、配列の標的部分は、Serpinc1遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の部分またはその近辺における、iRNA指向切断のための基質としての役割を果たすのに、少なくとも十分長い。

【0058】

標的配列は、例えば約15～30ヌクレオチド長などの約9～36ヌクレオチド長であってもよい。例えば、標的配列は、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22ヌクレオチドなど、約15～30ヌクレオチド長であり得る。列挙された範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であることが意図される。

【0059】

本明細書の用法では、「配列を含んでなる鎖」という用語は、標準ヌクレオチド命名法を使用して、言及される配列によって記載されるヌクレオチド鎖を含んでなる、オリゴヌクレオチドを指す。

【0060】

「G」、「C」、「A」、「T」、および「U」は、通常、塩基としてそれぞれグアニン、シトシン、アデニン、チミジン、およびウラシルを含有するヌクレオチドをそれぞれ表す。しかし「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」という用語はまた、以下でさらに詳述されるような修飾ヌクレオチドにも、または代替置換部分にも言及し得るものと理解される（例えば表2を参照されたい）。当業者は、このような置換部分を有するヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドの塩基対形成特性を実質的に変更することなく、グアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルをその他の部分で置き換え得ることを十分承知している。制限を意図しない例として、塩基としてイノシンを含んでなるヌクレオチドは、アデニン、シトシン、またはウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対形成し得る。したがってウラシル、グアニン、またはアデニンを含有するヌクレオチドは、本発明で取り上げるdsRNAのヌクレオチド配列中で、例えばイノシンを含有するヌクレオチドで置き換え得る。別の実施例では、アデニンおよびシトシンは、オリゴヌクレオチドのどこでも、それぞれグアニンおよびウラシルで置換され得て、標的mRNAとG-Uゆらぎ塩基対を形成する。このような置換部分を含有する配列は、本発明で取り上げる組成物および方法に適する。

【0061】

「iRNA」、「RNAi剤」、「iRNA剤」、「RNA干渉剤」という用語は、本明細書で同義的に使用され、本明細書定義で定義されるRNAを含有して、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)経路を通じたRNA転写物の標的切断を媒介する薬剤を指す。iRNAは、RNA干渉(RNAi)として知られている過程を通じて、mRNAの配列特異的分解を誘発する。iRNAは、例えば哺乳類対象などの対象内の細胞などの細胞内で、Serpincl1発現を調節し、例えば阻害する。

【0062】

一実施形態では、本発明のRNAi剤としては、例えばSerpincl1標的mRNA配列などの標的RNA配列と相互作用して、標的RNAの切断を誘導する一本鎖RNAが挙げられる。理論による拘束は望まないが、細胞に導入された長い二本鎖RNAは、ダイサーとして知られているIII型エンドヌクレアーゼによって、siRNAに分解されと考えられる(Sharp et al., (2001) Genes Dev. 15:485)。リボヌクレアーゼIII様酵素であるダイサーは、dsRNAをプロセスして、特徴的な2塩基3'オーバーハングがある19~23塩基対の短い干渉RNAにする(Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。次にsiRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれ、1つまたは複数のヘリカーゼがsiRNA二本鎖を巻き戻し、相補的アンチセンス鎖が標的認識を誘導できるようにする(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。適切な標的mRNAとの結合に際して、RISC内の1つまたは複数のエンドヌクレアーゼが標的を切断し、サイレンシングを誘発する(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。したがって、一態様では、本発明は、細胞内で生成されて、RISC複合体形成を促進し、標的遺伝子、すなわちSerpincl1遺伝子のサイレンシングをもたらす一本鎖RNA(siRNA)に関する。したがって「siRNA」という用語はまた、上述したようなRNAiに言及するために、本明細書で使用される。

【0063】

別の実施形態では、RNAi剤は、標的mRNAを阻害するために、細胞または生物に導入された「一本鎖siRNA」であってもよい。一本鎖siRNAは、一般に15~30個のヌクレオチドであり、化学的に修飾されている。一本鎖siRNAのデザインおよび試験は、そのそれぞれの内容全体を参照によって本明細書に援用する、米国特許第8,101,348号明細書、およびLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載される。本明細書に記載されるあらゆるアンチセンスヌクレオチド配列は、本明細書に記載される一本鎖siRNAとして、またはLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載される方法で化学的に修飾して、使用してもよい。

【0064】

別の態様では、薬剤は、アンチセンス阻害機序によって標的を阻害する、一本鎖アンチセンスRNA分子である。一本鎖アンチセンスRNA分子は、標的mRNA内の配列と相補的である。一本鎖アンチセンスRNA分子は、mRNAと塩基対を形成して翻訳機構を物理的に妨害することにより、化学量論の様式で翻訳を阻害し得る。Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355を参照されたい。代案としては、一本鎖アンチセンスRNA分子は、標的とハイブリダイズ(hybridizing)して、RNaseH切断事象を通じて標的を切断することで、標的mRNAを阻害する。一本鎖アンチセンスRNA分子は、約15~約30ヌクレオチド長であってもよく、標的配列と相補的な配列を有する。例えば一本鎖アンチセンスRNA分子は、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つのアンチセンス配列のいずれか1つからの、少なくとも約15、16、17、18、19、20以上の連続ヌクレオチド配列を含んでなくてもよい。

【0065】

別の実施形態では、本発明の組成物、使用、および方法で使用される「iRNA」は、

二本鎖RNAであり、本明細書で「二本鎖RNA i 剤」、「二本鎖RNA (dsRNA) 分子」、「dsRNA 剤」または「dsRNA」と称される。「dsRNA」という用語は、標的RNA、すなわちSerpinc1遺伝子に関して「センス」および「アンチセンス」配向を有すると言及される、2本の逆平行で実質的に相補的な核酸鎖を含んでなる、二本鎖構造を有するリボ核酸分子複合体を指す。本発明のいくつかの実施形態では、二本鎖RNA (dsRNA) は、本明細書でRNA干渉またはRNAiと称される転写後遺伝子サイレンシング機序を通じて、例えばmRNAなどの標的RNA分解を引き起こす。

【0066】

二本鎖領域は、RISC経路を通じた所望の標的RNA特異的分解を可能にするあらゆる長さであってもよく、約9〜36塩基対長さなどの範囲であってもよく、例えば約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、および21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、または36塩基対長さなどの約15〜30塩基対長さ、例えば約15〜30、15〜29、15〜28、15〜27、15〜26、15〜25、15〜24、15〜23、15〜22、15〜21、15〜20、15〜19、15〜18、15〜17、18〜30、18〜29、18〜28、18〜27、18〜26、18〜25、18〜24、18〜23、18〜22、18〜21、18〜20、19〜30、19〜29、19〜28、19〜27、19〜26、19〜25、19〜24、19〜23、19〜22、19〜21、19〜20、20〜30、20〜29、20〜28、20〜27、20〜26、20〜25、20〜24、20〜23、20〜22、20〜21、21〜30、21〜29、21〜28、21〜27、21〜26、21〜25、21〜24、21〜23、または21〜22塩基対長さなどである。列挙された範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であることが意図される。

【0067】

二本鎖構造を形成する2本の鎖は、より大型のRNA分子の異なる部分であってもよく、またはそれらは別のRNA分子であってもよい。2本の鎖が1つのより大型の分子の部分であり、したがって二本鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端と、それぞれ他方の鎖の5'末端との間が中断されていないヌクレオチド鎖によって結合される場合、結合RNA鎖は「ヘアピンループ」と称される。ヘアピンループは、少なくとも1つの不對ヌクレオチドを含んでなり得て；いくつかの実施形態では、ヘアピンループは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも23以上の不對ヌクレオチドを含んでなり得る。

【0068】

dsRNAの2本の実質的に相補的な鎖が、別のRNA分子によって構成されている場合、これらの分子は共有結合的に連結され得るが、必ずしもそうである必要はない。2本の鎖が、二本鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端と、それぞれ他方の鎖の5'末端との間で、中断されていないヌクレオチド鎖以外の手段によって共有結合される場合、結合構造は「リンカー」と称される。RNA鎖は、同じまたは異なるヌクレオチド数を有してもよい。最大塩基対数は、dsRNAの最短鎖中のヌクレオチド数から、二本鎖中に存在するあらゆるオーバーハングを差し引いた数である。二本鎖構造に加えて、RNAiは、1つまたは複数のヌクレオチドオーバーハングを含んでなってもよい。

【0069】

本明細書の用法では、「ヌクレオチドオーバーハング」という用語は、例えばdsRNAなどのiRNAの二本鎖構造から突出する、少なくとも1つの不對ヌクレオチドを指す。例えばdsRNAの1本の鎖の3'末端が他方の鎖の5'末端を越えて伸びる、またはその逆の場合、ヌクレオチドオーバーハングがある。dsRNAは、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーハングを含んでなり得て；代案としては、オーバーハングは、少なくとも2つのヌクレオチド、少なくとも3つのヌクレオチド、少なくとも4つのヌクレオチド、少なくとも5つ以上のヌクレオチドを含んでなり得る。ヌクレオチドオーバーハ

グは、デオキシリボヌクレオチド／ヌクレオシドをはじめとする、ヌクレオチド／ヌクレオシド類似体を含んでなり得て、またはそれからなる。オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、またはそのあらゆる組み合わせの上にある。さらにオーバーハングのヌクレオチドは、dsRNAのアンチセンスまたはセンス鎖のいずれかの5'末端、3'末端、または双方の末端上に存在し得る。

【0070】

一実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖は、例えば3'末端および／または5'末端でオーバーハングする、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドなどの1～10ヌクレオチドを有する。一実施形態では、dsRNAのセンス鎖は、例えば3'末端および／または5'末端でオーバーハングする、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドなどの1～10ヌクレオチドを有する。別の実施形態では、オーバーハング中の1つまたは複数のヌクレオチドは、チオリン酸ヌクレオシドで置換されている。

10

【0071】

本明細書でdsRNAに関して用いられる「平滑化された」または「平滑末端化された」という用語は、dsRNAの所与の末端に不對ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体がない、すなわちヌクレオチドオーバーハングがないことを意味する。dsRNA末端の片方または双方が、平滑化され得る。dsRNAの双方の末端が平滑化されている場合、dsRNAは平滑末端化されたと言われる。明確化のために言うと、「平滑末端化された」dsRNAは、双方の末端が平滑化されたdsRNAであり、すなわち分子のいずれの末端にもヌクレオチドオーバーハングがない。ほとんどの場合、このような分子は、その全長にわたって二本鎖である。

20

【0072】

「アンチセンス鎖」または「ガイド鎖」という用語は、例えばSerpinc1 mRNAなどの標的配列と実質的に相補的な領域を含む、dsRNAなどのiRNA鎖を指す。本明細書の用法では、「領域相補性」という用語は、例えば本明細書で定義されるようなSerpinc1ヌクレオチド配列のような標的配列などの配列と実質的に相補的な、アンチセンス鎖上の領域を指す。相補性領域が標的配列と完全に相補的でない場合、分子の内部または末端領域にミスマッチがあり得る。一般に、最も耐容されるミスマッチは、例えばiRNAの5'および／または3'末端の5、4、3、または2ヌクレオチド内などの末端領域にある。

30

【0073】

「センス鎖」または「パッセンジャー鎖」という用語は、本明細書の用法では、本明細書で定義されるアンチセンス鎖の領域と実質的に相補的な領域を含む、iRNA鎖を指す。

【0074】

本明細書の用法では、特に断りのない限り、「相補的」という用語は、第2のヌクレオチド配列との関連で第1のヌクレオチド配列を記述するのに使用される場合、当業者に理解されるであろうように、第1のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、特定条件下で、第2のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとハイブリダイズして、二本鎖構造を生成する能力を指す。このような条件は、例えばストリンジェントな条件であり得て、ストリンジェントな条件としては、400mMのNaCl、pH6.4の40mMのPIPES、1mMのEDTA、50℃または70℃で12～16時間と、それに続く洗浄が挙げられる（例えば“Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい）。生物中で遭遇し得る生理学的に妥当な条件などのその他の条件が、適用され得る。当業者は、ハイブリダイズしたヌクレオチドの最終用途に従って、2つの配列の相補性試験に最適な条件の組を判定することができる。

40

50

【0075】

例えば本明細書に記載される d s R N A 内などの i R N A 内の相補配列は、片方または双方のヌクレオチド配列全長にわたる、第 1 のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと、第 2 のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとの塩基対合を含む。このような配列は、本明細書で互いに「完全に相補的」と称し得る。しかし本明細書で第 1 の配列が第 2 の配列に関して「実質的に相補的」と称される場合、2 つの配列は完全に相補的であり得て、またはそれらは最大で 30 塩基対の二本鎖のハイブリダイゼーションに際して、例えば R I S C 経路を通じた遺伝子発現の阻害などのそれらの最終用途に最も妥当な条件下でハイブリダイズする能力を保ちながら、1 つまたは複数であるが概して 5、4、3 または 2 以下のミスマッチ塩基対を形成し得る。しかしハイブリダイゼーションに際して、1 つまたは複数の一本鎖オーバーハングを形成するように、2 つのオリゴヌクレオチドがデザインされる場合、このようなオーバーハングは、相補性の判定に関してミスマッチと見なされないものとする。例えば 21 ヌクレオチド長の 1 つのオリゴヌクレオチドと、23 ヌクレオチド長の別のオリゴヌクレオチドとを含んでなり、より長いオリゴヌクレオチドがより短いオリゴヌクレオチドと完全に相補的な 21 ヌクレオチドの配列を含んでなる d s R N A は、本明細書に記載される目的では、なおも「完全に相補的」と称される。

10

【0076】

「相補的」配列は、本明細書の用法ではまた、それらのハイブリダイズ能力に関する上の要件が満たされる限りにおいて、非ワトソン・クリック塩基対および／または非天然および修飾ヌクレオチドから形成される塩基対も含み、またはそれから完全に形成され得る。このような非ワトソン・クリック塩基対としては、G：U ゆらぎ塩基対またはフーグスティーン型塩基対が挙げられるが、これに限定されるものではない。

20

【0077】

本明細書では、「相補的」、「完全に相補的」、および「実質的に相補的」という用語は、それらが使用される文脈から理解されるであろうように、d s R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖間の、または i R N A 剤のアンチセンス鎖と標的配列間の塩基整合に関して使用し得る。

【0078】

本明細書の用法では、メッセンジャー R N A (m R N A) の「少なくとも一部と実質的に相補的」なポリヌクレオチドは、対象 m R N A (例えば S e r p i n c 1 をコードする m R N A) の連続部分と、実質的に相補的なポリヌクレオチドを指す。例えばポリヌクレオチドは、配列が、S e r p i n c 1 をコードする m R N A の非中断部分と実質的に相補的であれば、S e r p i n c 1 m R N A の少なくとも一部と相補的である。

30

【0079】

一般に、各鎖のヌクレオチドの大部分はリボヌクレオチドであるが、本明細書で詳細に記載されるように、片方または双方の鎖はまた、例えばデオキシリボヌクレオチドおよび／または修飾ヌクレオチドなどの 1 つまたは複数の非リボヌクレオチドも含み得る。さらに「i R N A」としては、化学修飾のあるリボヌクレオチドが挙げられる。このような修飾としては、本明細書で開示され、または当該技術分野で公知の全てのタイプの修飾が挙げられる。本明細書および特許請求の目的で、あらゆるこのような修飾は、i R N A 分子における用法では「i R N A」に包含される。

40

【0080】

「阻害する」という用語は、本明細書の用法では、「低下させる」、「サイレンシング」、「下方制御」、「抑制」、およびその他の類似した用語と同義的に使用され、あらゆるレベルの阻害を含む。

【0081】

「S e r p i n c 1 発現を阻害する」という語句は、本明細書の用法では、あらゆる S e r p i n c 1 遺伝子 (例えばマウス S e r p i n c 1 遺伝子、ラット S e r p i n c 1 遺伝子、サル S e r p i n c 1 遺伝子、またはヒト S e r p i n c 1 遺伝子など)、なら

50

びに *Serpinc1* タンパク質をコードする *Serpinc1* 遺伝子の変種または変異体の発現の阻害を含む。

【0082】

「*Serpinc1* 遺伝子発現の阻害」としては、例えば少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の阻害などの *Serpinc1* 遺伝子発現の少なくとも部分的抑制などの *Serpinc1* 遺伝子のあらゆるレベルの阻害が挙げられる。

10

【0083】

Serpinc1 遺伝子発現は、例えば *Serpinc1* mRNA レベル、*Serpinc1* タンパク質レベル、または例えばトロンビン生成能力 (portential) 尺度としてのトロンビン：抗トロンビン複合体レベル、出血時間、プロトロンビン時間 (PT)、血小板数、および／または活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) などの、*Serpinc1* 遺伝子発現に伴うあらゆる変数のレベルに基づいて評価してもよい。阻害は、対照レベルと比較した、これらの変数の1つまたは複数の絶対または相対レベルの低下によって評価してもよい。対照レベルは、例えば投与前基線レベル、または未処置のまたは対照 (例えば緩衝液のみの対照または非活性薬剤対照など) で処置された同様の対象、細胞、またはサンプルから測定されたレベルなどの当該技術分野で利用される、あらゆるタイプの対照レベルであってもよい。

20

【0084】

一実施形態では、*Serpinc1* 遺伝子発現の少なくとも部分的抑制は、第1の細胞または細胞群と実質的に同一であるが、しかるべく処理されていない第2の細胞または細胞群 (対照細胞) と比較して、*Serpinc1* 遺伝子発現が阻害されるように処置されている、その中で *Serpinc1* 遺伝子が転写される第1の細胞または細胞群から単離され、またはその中に検出され得る、*Serpinc1* mRNA の量の低下によって評価される。阻害の程度は、

30

【数1】

$$\frac{(\text{対照細胞中のmRNA}) - (\text{処置細胞中のmRNA})}{(\text{対照細胞中のmRNA})} \cdot 100\%$$

を用いて表してもよい。

【0085】

本明細書の用法では、dsRNAなどの「RNAi 剤に細胞を接触させる」という語句は、あらゆる可能な手段によって細胞を接触させるステップを含む。RNAi 剤に細胞を接触させることは、試験管内でiRNAに細胞を接触させる、または生体内でiRNAに細胞を接触させるステップを含む。接触は、直接または間接的に実施してもよい。したがって、例えば方法を実施する者が、RNAi 剤を細胞と物理的に接触させてもよく、または代案としては、引き続いて細胞との接触が可能になり、または引き起こされる状況に、RNAi 剤を置いてもよい。

40

【0086】

試験管内における細胞の接触は、例えば細胞をRNAi 剤と共にインキュベートして実施してもよい。生体内における細胞の接触は、例えば細胞が位置する組織内にまたはその近辺にRNAi 剤を注入して実施してもよく、または接触させる細胞が位置する組織に引き続いて薬剤が到達するように、例えば血流または皮下空隙などの別の領域にRNAi 剤を注入して実施してもよい。例えばRNAi 剤は、例えば肝臓などの対象部位にRNAi

50

剤を誘導する、GalNAc3などのリガンドを含有し、および／またはそれと共役していてもよい。試験管内と生体内接触法の組み合わせもまた、可能である。例えば細胞を試験管内でRNAi剤と接触させて、引き続いて対象に移植してもよい。

【0087】

一実施形態では、細胞をiRNAに接触させるステップは、細胞内への取り込みまたは吸収を容易にし、またはそれをもたらすことで、「iRNAを導入する」または「細胞に送達する」ステップを含む。iRNAの吸収または取り込みは、助力を受けない拡散性または活性細胞過程を通じて、または助剤または装置によって生じ得る。iRNAの細胞内への導入は、試験管内および／または生体内であってもよい。例えば生体内導入のために、iRNAを組織部位に注射し、または全身投与し得る。生体内送達はまた、その内容全体を参照によって本明細書に援用する、米国特許第5,032,401号明細書および米国特許第5,607,677号明細書、および米国特許出願公開第2005/0281781号明細書に記載されるものなどのβ-グルカン送達系によって実施し得る。細胞への生体外導入としては、電気穿孔およびリポフェクションなどの当該技術分野で公知の方法が挙げられる。さらなるアプローチは、本明細書で以下に記載され、および／または当該技術分野で公知である。

10

【0088】

「脂質ナノ粒子」または「LNP」という用語は、例えばiRNAなどの核酸分子またはそれからiRNAが転写されるプラスミドなどの薬理的活性分子を封入する脂質層を含んでなる、小胞である。LNPは、例えばその内容全体を参照によって本明細書に援用する米国特許第6,858,225号明細書、米国特許第6,815,432号明細書、米国特許第8,158,601号明細書、および米国特許第8,058,069号明細書に記載される。

20

【0089】

「SNALP」という用語は、安定した核酸-脂質粒子を指す。SNALPは、iRNAなどの核酸またはそれからiRNAが転写されるプラスミドを含んでなる、還元性水性内部を覆う、脂質の小胞である。SNALPは、例えば、その内容全体を参照によって本明細書に援用する、米国特許出願公開第20060240093号明細書、米国特許出願公開第20070135372号明細書、および国際公開第2009082817号パンフレットに記載される。「SNALP」製剤の例は、下述される。

30

【0090】

本明細書の用法では、「対象」は、霊長類（ヒト、例えばサルおよびチンパンジーなどの非ヒト霊長類など）、非霊長類（ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス、ウマ、およびクジラなど）をはじめとする哺乳類、または鳥類（例えばアヒルまたはガチョウ）などの動物である。一実施形態では、対象は、Serpincl1発現低下から利益を受ける、疾患、障害または病状を治療されまたは評価されるヒト；Serpincl1発現低下から利益を受ける、疾患、障害または病状のリスクがあるヒト；Serpincl1発現低下から利益を受ける、疾患、障害または病状を有するヒト；および／または本明細書に記載されるようにSerpincl1発現低下から利益を受ける、疾患、障害または病状を治療されるヒトなどのヒトである。本明細書の用法では、「治療する」または「治療」という用語は、検出可能または検出不能を問わない、1つまたは複数の症状の緩和または改善、出血程度の低減、出血状態の安定化（すなわち悪化しない）、出血の改善または一時的緩和をはじめとするが、これに限定されるものではない、有益なまたは所望の結果を指す。「治療」はまた、治療不在下の予測生存期間と比較した生存期間の長期化も意味し得る。

40

【0091】

「低下させる」とは、疾病マーカーまたは症状の文脈で、このようなレベルの統計的に有意な低下を意味する。低下は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%以上であり得て、好ましくは、このような疾患がない個人の正常範囲内にあると一般に認められたレベルに低下する。

50

【0092】

本明細書の用法では、Sertpinc1遺伝子の発現低下から利益を受ける、疾患、障害またはその病状に関して使用される「予防」または「予防する」は、対象が例えば出血のような症状などの、このような疾患、障害、または病状に伴う症状を発症する可能性の低下を指す。出血を発症する可能性は、例えば1つまたは複数の出血危険因子を有する個人が出血を発症しない場合に、または同一危険因子を有して本明細書に記載される治療を受けない集団と比較して重症度のより低い出血を発症する場合に、低下される。疾患、障害または病状を発症しないこと、またはこのような疾患、障害または病状に伴う症状発症の減少（例えばその疾患または障害の臨床的に認められた尺度で少なくとも約10%の）、または遅延した症状呈示の遅延（例えば数日間、数週間、数ヶ月または数年間）が、効果的予防と見なされる。

10

【0093】

本明細書の用法では、「出血障害」という用語は、芳しくない血液凝固および／または過剰な出血をもたらす疾患または障害である。出血障害は、血友病またはフォン・ウィルブラント病などの遺伝性障害であってもよく、または例えば、播種性血管内凝固症候群、妊娠関連子癇、ビタミンK欠損、自己免疫障害、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、皮膚科学的障害（例えば乾癬、天疱瘡）、呼吸器疾患（例えば喘息、慢性閉塞性肺疾患）、例えばアスピリンやヘパリンやワルファリンなどの投薬の結果のアレルギー薬物反応、糖尿病、急性B型肝炎感染、急性C型肝炎感染、悪性病変または固形腫瘍（例えば前立腺、肺、結腸、膵臓、胃、胆管、頭頸部、子宮頸部、乳房、黒色腫、腎臓、および／または血液学的悪性病変）に関連する後天性疾患であってもよい。一実施形態では、遺伝性出血障害は、例えば血友病A、B、またはCなどの血友病である。一実施形態（embodiment）では、対象は、例えば血友病などの遺伝性出血障害を有し、代替凝固療法に対して、例えば同種抗体インヒビターなどのインヒビターを生じており、本明細書で「インヒビター対象」と称される。一実施形態では、インヒビター対象は、血友病Aを有する。別の実施形態では、インヒビター対象は、血友病Bを有する。さらに別の実施形態では、インヒビター対象は、血友病Cを有する。

20

【0094】

本明細書の用法では、「治療有効量」は、出血障害および出血を有する対象に投与されると、（例えば既存の疾患の、または1つまたは複数の疾患症状の低減、改善または維持によって）疾患の治療をもたらすのに十分なRNAi剤の量を含むことが意図される。「治療有効量」は、RNAi剤、薬剤投与方法、疾患とその重症度、および治療される対象の病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的体質、先行または併用治療薬のタイプ、もしあればその他の個人特性に応じて変動してもよい。

30

【0095】

本明細書の用法では、「予防有効量」は、例えば出血障害を有して外科手術が予定されている対象などの、出血障害を有するが出血していない対象に投与されると、疾患の、または1つまたは複数の疾患症状を予防または改善するのに十分なiRNAの量を含むことが意図される。疾患の改善としては、疾患経過の減速、または後に発症する疾患の重症度の低下が挙げられる。「予防有効量」は、iRNA、薬剤投与方法、疾患リスクの程度、および治療される患者の病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的体質、先行または併用治療薬のタイプ、もしあればその他の個人特性に応じて変動してもよい。

40

【0096】

「治療有効量」または「予防有効量」としてはまた、あらゆる治療薬に当てはまる妥当な利点／リスク比で、いくつかの所望の局所性または全身性効果を生じる、RNAi剤の量も挙げられる。本発明の方法で用いられるiRNAは、このような治療に当てはまる妥当な利点／リスク比を生じるのに十分な量で、投与されてもよい。

【0097】

「薬学的に許容可能」という語句は、本明細書で、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー性応答がなく、またはその他の問題または合併症が、妥当な利

50

点／リスク比で釣り合う、ヒト対象および動物対象の組織との接触で使用するのに適する、化合物、材料、組成物、および／または剤形を指すために用いられる。

【0098】

本明細書の用法では、「薬理的に許容可能な担体」という語句は、液体または固体増量剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば潤滑剤、滑石マグネシウム、カルシウムまたはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸（steric acid）など）、または対象化合物を1つの臓器または身体の部分から、別の臓器または身体の部分に運搬または輸送するのに関連する溶媒封入材料などの、薬理的に許容可能な材料、組成物またはビヒクルを意味する。各担体は、製剤のその他の成分と適合し、治療される対象に傷害性でないという意味で、「許容可能」でなくてはならない。薬理的に許容可能な担体の役割を果たし得る材料のいくつかの例としては、（1）乳糖、グルコースおよびスクロースなどの糖類；（2）コーンスターチおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；（3）カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなどのセルロースとその誘導体；（4）粉末トラガカント；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）マグネシウム状態（magnesium state）、ラウリル硫酸ナトリウム、および滑石などの平滑剤；（8）カカオ脂および坐薬ワックスなどの賦形剤；（9）落花生油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、コーンオイル、および大豆油などの油；（10）プロピレングリコールなどのグリコール；（11）グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；（12）オレイン酸エチルおよびエチラウレートなどのエステル；（13）寒天；（14）水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；（15）アルギン酸；（16）発熱性物質非含有水；（17）等張生理食塩水；（18）リンゲル液；（19）エチルアルコール；（20）pH緩衝溶液；（21）ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ酸無水物；（22）ポリペプチドおよびアミノ酸などの増量剤；（23）血清アルブミン、HDL、およびLDLなどの血清成分；および（22）医薬製剤で用いられるその他の無毒の適合性物質が挙げられる。

【0099】

本明細書の用法では、「サンプル」という用語は、対象から単離された同様の体液、細胞、または組織の採取物、ならびに対象内に存在する体液、細胞、または組織を含む。生体液の例としては、血液、血清および漿液（serosal fluids）、血漿、脳脊髄液、眼液、リンパ液、尿、唾液などが挙げられる。組織サンプルとしては、組織、臓器または局在性領域からのサンプルが挙げられる。例えばサンプルは、特定の臓器、臓器の部分、または体液またはこれらの臓器内の細胞に由来してもよい。特定の実施形態では、サンプルは、肝臓（例えば肝臓全体または肝臓の特定部分、または例えば肝実質細胞などの肝臓の特定タイプの細胞）に由来してもよい。いくつかの実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象から採取された血液または血漿を指す。

【0100】

II. 本発明の iRNA

本明細書に記載されるのは、Serpincl 遺伝子発現を阻害する iRNA である。一実施形態では、iRNA 剤は、例えば遺伝性出血障害などの出血障害を有するヒトのような、哺乳類などの対象内の細胞などの細胞内で、Serpincl 遺伝子発現を阻害する二本鎖リボ核酸（dsRNA）分子を含む。dsRNA は、Serpincl 遺伝子発現中に形成される mRNA の少なくとも一部と相補的である、相補性領域を有するアンチセンス鎖を含む。相補性領域は、約 30 ヌクレオチド以下の長さ（例えば約 30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、または 18 ヌクレオチド以下の長さ）である。Serpincl 遺伝子を発現する細胞との接触に際して、iRNA は、Serpincl 遺伝子（例えばヒト、霊長類、非霊長類、または鳥類 Serpincl 遺伝子）の発現を、例えば PCR または分枝 DNA（bDNA）ベースの方法による、または例えばウエスタンブロット法またはフローサイトメトリー技術を使用する免疫蛍光分析などのタンパク質ベースの方法によるアッセイで、少なくとも約 10% 阻害

する。

【0101】

dsRNAは相補的な2本のRNA鎖を含み、それらはその中でdsRNAが使用される条件下でハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。dsRNAの1本の鎖（アンチセンス鎖）は相補性領域を含み、それは標的配列と実質的に相補的であり、一般に完全に相補的である。標的配列は、Serpinc1遺伝子の発現中に形成されるmRNAの配列に由来し得る。他方の鎖（センス鎖）は、適切な条件下で組み合わせると、2本の鎖がハイブリダイズして二本鎖構造を形成するように、アンチセンス鎖と相補的な領域を含む。本明細書の他の箇所に記載されるように、そして当該技術分野で公知のように、dsRNAの相補配列はまた、別個のオリゴヌクレオチド上にあるものとは対照的に、単一核酸分子の自己相補領域として含有され得る。

10

【0102】

一般に、二本鎖構造は、例えば15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22塩基対長さなどの15～30塩基対長さである。列挙された範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であることが意図される。

20

【0103】

同様に、標的配列の相補性領域は、例えば15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22ヌクレオチド長など15～30ヌクレオチド長である。列挙された範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であることが意図される。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、dsRNAは、約15～約20ヌクレオチド長、または約25～約30ヌクレオチド長である。一般にdsRNAは、ダイサー酵素の基質の役割を果たすのに十分長い。例えば約21～23ヌクレオチド長より長いdsRNAが、ダイサーの基質の役割を果たしてもよいことは、当該技術分野で周知である。当業者は認識するであろうように、切断標的とされるRNAの標的領域は、ほとんどの場合、より大型のRNA分子の一部であり、それはmRNA分子であることが多い。該当する場合、mRNA標的の「部分」は、RNAi指向切断（すなわちRISC経路を通じた切断）の基質となるのに十分長い、mRNA標的の連続配列である。

40

【0105】

当業者は、例えば約10～36、11～36、12～36、13～36、14～36、15～36、9～35、10～35、11～35、12～35、13～35、14～35、15～35、9～34、10～34、11～34、12～34、13～34、14～34、15～34、9～33、10～33、11～33、12～33、13～33、14～33、15～33、9～32、10～32、11～32、12～32、13～32、14

50

～32、15～32、9～31、10～31、11～31、12～31、13～32、14～31、15～31、15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22塩基対などの約9～36塩基対の二本鎖領域などの二本鎖領域が、dsRNAの主要機能部分であることもまた認識するであろう。したがって一実施形態では、それが例えば、所望のRNAを切断に標的化する15～30塩基対の機能性二本鎖にプロセシングされる範囲内で、30塩基対を超える二本鎖領域を有するRNA分子またはRNA分子複合体は、dsRNAである。したがって当業者は、一実施形態では、miRNAがdsRNAであることを認識するであろう。別の実施形態では、dsRNAは、天然miRNAでない。別の実施形態では、Serpinc1発現を標的化するのに有用なiRNA剤は、より大型のdsRNAの切断によって標的細胞内で生成されない。

10

【0106】

本明細書に記載されるdsRNAは、例えば1、2、3、または4ヌクレオチドなどの1つまたは複数の一本鎖ヌクレオチドオーバーハングをさらに含み得る。少なくとも1つのヌクレオチドオーバーハングを有するdsRNAは、それらの平滑末端相当物と比較して、意外にも優れた阻害特性を有し得る。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド／ヌクレオシドをはじめとする、ヌクレオチド／ヌクレオシド類似体を含んでなり得て、またはそれからなる。オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、またはそのあらゆる組み合わせ上にあり得る。さらにオーバーハングのヌクレオチドは、dsRNAのアンチセンスまたはセンス鎖のいずれかの5'末端、3'末端、または双方の末端上に存在し得る。

20

【0107】

dsRNAは、以下でさらに考察されるように、例えばBiosearch, Applied Biosystems, Inc. から市販されるものなどの自動DNA合成機を使用して、当該技術分野で公知の標準法によって合成し得る。

30

【0108】

本発明のiRNA化合物は、二段階法を使用して調製されてもよい。最初に、二本鎖RNA分子の個々の鎖が、別々に調製される。次に、構成要素鎖がアニールされる。siRNA化合物の個々の鎖は、溶液相または固相有機または双方を使用して調製し得る。有機合成は、非天然または修飾ヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド鎖を容易に調製し得る利点を提供する。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、溶液相または固相有機合成または双方を使用して調製し得る。

【0109】

40

一態様では、本発明のdsRNAは、センス配列とアンチセンス配列の少なくとも2つのヌクレオチド配列を含む。センス鎖は、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つで提供される配列群から選択され、センス鎖に対応するアンチセンス鎖は、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つの配列群から選択される。この態様では、2配列の一方は2配列の他方に相補的であり、配列の1つは、Serpinc1遺伝子発現中に生じるmRNA配列と実質的に相補的である。したがってこの態様では、dsRNAは、2つのオリゴヌクレオチドを含み、1つのオリゴヌクレオチドは、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つのセンス鎖と説明され、第2のオリゴヌクレオチドは、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つのセンス鎖に対応するアンチセ

50

ンス鎖と説明される。一実施形態では、dsRNAの実質的に相補的な配列は、別々のオリゴヌクレオチド上に含有される。別の実施形態では、dsRNAの実質的に相補的な配列は、単一オリゴヌクレオチド上に含有される。

【0110】

表3、4、8、11、12、14、15、20、および21の配列の一部は、修飾および／または共役配列と説明されるが、例えば本発明のdsRNAなどの本発明のiRNAのRNAは、未修飾、非共役、および／または説明されるものとは異なって修飾されおよび／または共役している、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21に記載される配列のいずれか1つを含んでなくてもよいものと理解される。

【0111】

当業者は、例えば21塩基対などの約20～23塩基対の二本鎖構造を有するdsRNAが、RNA干渉を誘発するのに特に効果的であるとして支持されていることを十分承知している(Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888)。しかし他の当業者らは、より短いまたはより長いRNA二本鎖構造もまた、同様に効果的であり得ることを見出している。(Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226)。上述の実施形態では、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つで提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質のために、本明細書に記載されるdsRNAは、最低限21ヌクレオチド長の少なくとも1本の鎖を含み得る。片方または両方の末端の数個のヌクレオチドのみが抜けている、表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つの配列の1つを有するより短い二本鎖が、上で説明したdsRNAと比較して同様に効果的であり得ることは、合理的に予想され得る。したがって表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つの配列の1つに由来する、少なくとも15、16、17、18、19、20以上の連続ヌクレオチドの配列を有して、Serpinc1遺伝子発現を阻害する能力が、完全長配列を含んでなるdsRNAと、約5、10、15、20、25、または30%の以下異なるdsRNAは、本発明の範囲内であることが意図される。

【0112】

さらに表3、4、8、11、12、14、15、20、および21のいずれか1つで提供されるRNAは、RISC媒介切断に対する感受性が高いSerpinc1転写物中の部位を同定する。したがって本発明は、これらの配列の1つ内を標的とするiRNAをさらに特徴とする。本明細書の用法では、iRNAが、特定部位内のどこかで転写物の切断を促進する場合、iRNAはRNA転写物のその特定部位内を標的にすると言われる。このようなiRNAは、一般に、Serpinc1遺伝子中の選択配列に隣接する領域からの追加的なヌクレオチド配列と連結する、表3、4、8、11、12、14、15、20および21のいずれか1つで提供される配列の1つからの約15個の連続ヌクレオチドを含む。

【0113】

標的配列は、一般に約15～30ヌクレオチド長であるが、この範囲内の特定の配列が、あらゆる所与の標的RNAの切断を誘導する適合性には、幅広い多様性がある。本明細書で提示される様々なソフトウェアパッケージおよびガイドラインは、あらゆる所与の遺伝子標的の最適標的配列を同定するためのガイダンスを提供するが、標的RNA配列に、所与のサイズの「ウィンドウ」または「マスク」（非限定的例として21個のヌクレオチド）を実際にまたは比喩的に（例えばコンピュータシミュレーションによるものをはじめとする）配置させて、標的配列の役割を果たし得るサイズ範囲の配列を同定する、経験的アプローチもまた取り得る。配列「ウィンドウ」を最初の標的配列位置の1ヌクレオチド上流または下流に連続的に移動することで、選択されたあらゆる所与の標的サイズについて完全な可能な配列の組が同定されるまで、次の潜在的標的配列が同定され得る。このプロセスは、同定された配列の系統的合成、および（本明細書に記載されまたは当該技術分野で公知のアクセシを使用した）至適に機能する配列を同定する試験と相まって、iRNA

A剤で標的化した場合に、標的遺伝子発現の最良の阻害を媒介するRNA配列を同定し得る。したがって例えば表2、3、4、8、11、12、14、15、20および21のいずれか1つ中で同定される配列が、効果的な標的配列を表す一方で、所与の配列の1ヌクレオチド上流または下流に、連続的に「ウィンドウを歩行させる」ことにより、同等またはより良い阻害特性がある配列を同定することで、阻害効率のさらなる最適化を達成し得ることが検討される。

【0114】

さらにヌクレオチドを体系的に付加または除去して、より長いまたはより短い配列を作成し、その位置から、標的RNAよりも長いまたはより短いサイズのウィンドウを歩行させることで、これらの作成された配列を試験することにより、例えば表2、3、4、8、11、12、14、15、20および21のいずれか1つ中で同定される、あらゆる配列のさらなる最適化を達成し得ることが検討される。この場合もやはり、この新しい標的候補を作成するアプローチと、当該技術分野で公知のおよび／または本明細書に記載される阻害アッセイにおける、これらの標的配列に基づくiRNAの有効性の試験とを組み合わせることにより、阻害効率にさらなる改善をもたらし得る。なおもさらに、例えば本明細書に記載されまたは当該技術分野で公知の修飾ヌクレオチドの導入、オーバーハングの付加またはその変更、または当該技術分野で公知のおよび／または本明細書で考察されるその他の修飾によって、発現阻害物質として分子をさらに最適化する（例えば血清安定性または循環半減期増大、熱安定増大、膜貫通送達促進、特定位置または細胞型の標的化、サイレンシング経路酵素との相互作用増大、エンドソームからの放出増大など）ことで、このような最適化配列を調節し得る。

【0115】

本明細書に記載されるiRNAは、標的配列との1つまたは複数のミスマッチを含有し得る。一実施形態では、本明細書に記載されるiRNAは、3個以下のミスマッチを含有する。iRNAのアンチセンス鎖が、標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチの範囲は、相補性領域の中心に位置しないことが好ましい。iRNAのアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチは、相補性領域の5'または3'末端のいずれかから、最後の5ヌクレオチド内に限定されることが好ましい。例えばSERPINC1遺伝子領域に相補的な23ヌクレオチドiRNA剤鎖では、RNA鎖は、一般に、中心的な13ヌクレオチド内にいかなるミスマッチも含有しない。本明細書に記載される方法または当該技術分野で公知の方法を使用して、標的配列とのミスマッチを含有するiRNAが、SERPINC1遺伝子の発現の阻害に効果的かどうかを判定し得る。SERPINC1遺伝子の発現の阻害における、ミスマッチがあるiRNAの有効性の検討は、特にSerpinc1遺伝子の特定の相補性領域が、集団内で多型配列バリエーションを有することが知られている場合に、重要である。

【0116】

III. 発明の修飾iRNA

一実施形態では、例えばdsRNAなどの本発明のiRNAのRNAは、未変性であり、例えば当該技術分野で公知であり本明細書に記載される、化学修飾および／または結合を含まない。別の実施形態では、例えばdsRNAなどの発明のiRNAのRNAを化学的に修飾して、安定性またはその他の有益な特性を高める。本発明で取り上げる核酸は、参照によって本明細書に援用する、“Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されるものなどの当該技術分野で確立された方法によって、合成および／または修飾し得る。例えば修飾としては、例えば5'末端修飾（リン酸化、共役結合、逆転結合）または3'末端修飾（共役結合、DNAヌクレオチド、逆転結合など）などの末端修飾；例えば安定化塩基での、不安定化塩基での、または拡大パートナーのレパートリーと塩基対形成する塩基での置換、塩基除去（脱塩基ヌクレオチド）、または共役結合塩基などの塩基修飾；糖修飾（例えば2'位または4'位における）または糖置換；

リン酸ジエステル結合の修飾または置換をはじめとする主鎖修飾が挙げられる。本明細書に記載される実施形態で有用な iRNA 化合物の特定の例としては、修飾主鎖を含有する RNA、または天然ヌクレオシド間結合を含有しない RNA が挙げられるが、これに限定されるものではない。修飾主鎖を有する RNA としては、特に主鎖中にリン原子を有しないものが挙げられる。本明細書の目的では、そして当該技術分野で時に言及されるように、それらのヌクレオシド間主鎖中にリン原子を有しない修飾 RNA もまた、オリゴヌクレオシドであると思なされる。いくつかの実施形態では、修飾 iRNA は、そのヌクレオシド間主鎖中にリン原子を有する。

【0117】

修飾 RNA 主鎖としては、例えばホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートをはじめとするメチルおよびその他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホロアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートをはじめとするホスホロアミダート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、およびノルマル 3'-5' 結合、それらの 2'-5' 連結アナログを有するボラノホスフェート、および隣接するヌクレオシド単位対が 3'-5' から 5'-3'、または 2'-5' から 5'-2' に連結する、逆転極性を有するボラノホスフェートが挙げられる。様々な塩、混合塩、および遊離酸形態もまた挙げられる。

【0118】

上記リン含有結合の調製を教示する、代表的な米国特許としては、その全体がそれぞれ参照によって本明細書によりここに援用される、米国特許第 3, 687, 808 号明細書；米国特許第 4, 469, 863 号明細書；米国特許第 4, 476, 301 号明細書；米国特許第 5, 023, 243 号明細書；米国特許第 5, 177, 195 号明細書；米国特許第 5, 188, 897 号明細書；米国特許第 5, 264, 423 号明細書；米国特許第 5, 276, 019 号明細書；米国特許第 5, 278, 302 号明細書；米国特許第 5, 286, 717 号明細書；米国特許第 5, 321, 131 号明細書；米国特許第 5, 399, 676 号明細書；米国特許第 5, 405, 939 号明細書；米国特許第 5, 453, 496 号明細書；米国特許第 5, 455, 233 号明細書；米国特許第 5, 466, 677 号明細書；米国特許第 5, 476, 925 号明細書；米国特許第 5, 519, 126 号明細書；米国特許第 5, 536, 821 号明細書；米国特許第 5, 541, 316 号明細書；米国特許第 5, 550, 111 号明細書；米国特許第 5, 563, 253 号明細書；米国特許第 5, 571, 799 号明細書；米国特許第 5, 587, 361 号明細書；米国特許第 5, 625, 050 号明細書；米国特許第 6, 028, 188 号明細書；米国特許第 6, 124, 445 号明細書；米国特許第 6, 160, 109 号明細書；米国特許第 6, 169, 170 号明細書；米国特許第 6, 172, 209 号明細書；米国特許第 6, 239, 265 号明細書；米国特許第 6, 277, 603 号明細書；米国特許第 6, 326, 199 号明細書；米国特許第 6, 346, 614 号明細書；米国特許第 6, 444, 423 号明細書；米国特許第 6, 531, 590 号明細書；米国特許第 6, 534, 639 号明細書；米国特許第 6, 608, 035 号明細書；米国特許第 6, 683, 167 号明細書；米国特許第 6, 858, 715 号明細書；米国特許第 6, 867, 294 号明細書；米国特許第 6, 878, 805 号明細書；米国特許第 7, 015, 315 号明細書；米国特許第 7, 041, 816 号明細書；米国特許第 7, 273, 933 号明細書；米国特許第 7, 321, 029 号明細書；および米国特許第 RE 39464 号明細書が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0119】

その中にリン原子を含まない修飾 RNA 主鎖は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または 1 つまたは複数の短鎖ヘテロ原子または複素環式ヌクレオシド間結合によって形成された主鎖を有する。これらとしては、モルホリノ結合（一部はヌクレオシドの糖

10

20

30

40

50

部分から形成される) ; シロキサン主鎖 ; スルフィド、スルホキシドおよびスルホン主鎖 ; ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖 ; メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖 ; アルケン含有主鎖 ; スルファメート主鎖 ; メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ主鎖 ; スルホネートおよびスルホンアミド主鎖 ; アミド主鎖を有するもの ; および混合N、O、S、およびCH₂構成成分を有するその他のものが挙げられる。

【0120】

上記オリゴヌクレオシドの調製を教示する、代表的な米国特許としては、その全体がそれぞれ参照によって本明細書によりここに援用される、米国特許第5, 034, 506号明細書 ; 米国特許第5, 166, 315 ; 5, 185, 444号明細書 ; 米国特許第5, 214, 134号明細書 ; 米国特許第5, 216, 141号明細書 ; 米国特許第5, 235, 033号明細書 ; 米国特許第5, 64, 562号明細書 ; 米国特許第5, 264, 564号明細書 ; 米国特許第5, 405, 938号明細書 ; 米国特許第5, 434, 257号明細書 ; 米国特許第5, 466, 677号明細書 ; 米国特許第5, 470, 967号明細書 ; 米国特許第5, 489, 677号明細書 ; 米国特許第5, 541, 307号明細書 ; 米国特許第5, 561, 225号明細書 ; 米国特許第5, 596, 086号明細書 ; 米国特許第5, 602, 240号明細書 ; 米国特許第5, 608, 046号明細書 ; 米国特許第5, 610, 289号明細書 ; 米国特許第5, 618, 704号明細書 ; 米国特許第5, 623, 070号明細書 ; 米国特許第5, 663, 312号明細書 ; 米国特許第5, 633, 360号明細書 ; 米国特許第5, 677, 437号明細書 ; および米国特許第5, 677, 439号明細書が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0121】

別の実施形態では、適切なRNA模倣物がiRNA中での使用のために検討され、その中では、糖およびヌクレオシド間結合の双方、すなわち、ヌクレオチド単位の骨格が、新しいグループで置換されている。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。このような1つのオリゴマー化合物であり、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているRNA模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物中では、RNAの糖主鎖が、アミド含有主鎖、特にアミノエチルグリシン主鎖で置換されている。核酸塩基は保持されて、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子と直接または間接的に結合する。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許としては、そのそれぞれの内容全体を参照によって本明細書に援用する、米国特許第5, 539, 082号明細書 ; 米国特許第5, 714, 331号明細書 ; および米国特許第5, 719, 262号明細書が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに本発明のiRNA中で使用するのに適するPNA化合物は、例えばNielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に記載される。

【0122】

本発明で取り上げるいくつかの実施形態は、ホスホロチオエート主鎖があるRNA、および特に先述の米国特許第5, 489, 677号明細書の $\text{---CH}_2\text{---NH---CH}_2\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{---N(CH}_3\text{)---O---CH}_2\text{---}$ [メチレン(メチルイミノ)またはMMI主鎖として知られている]、 $\text{---CH}_2\text{---O---N(CH}_3\text{)---CH}_2\text{---}$ 、 $\text{---CH}_2\text{---N(CH}_3\text{)---N(CH}_3\text{)---CH}_2\text{---}$ 、および $\text{---N(CH}_3\text{)---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$ [天然リン酸ジエステル主鎖は $\text{---O---P---O---CH}_2\text{---}$ として表される]であるヘテロ原子主鎖がある、および先述の米国特許第5, 602, 240号明細書のアミド主鎖がある、オリゴヌクレオシドとを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で取り上げるRNAは、先述の米国特許第5, 034, 506号明細書のモルホリノ主鎖構造を有する。

【0123】

修飾RNAはまた、1つまたは複数の置換糖部分を含有し得る。例えば本明細書で取り上げるdsRNAなどのiRNAは、2'位に、OH ; F ; O-、S-、またはN-アルキル ; O-、S-、またはN-アルケニル ; O-、S-、またはN-アルキニル ; またはO-アルキル-O-アルキルの1つを含み得て、アルキル、アルケニル、およびアルキニ

ルは、置換または非置換 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、または $C_2 \sim C_{10}$ アルケニルおよびアルキニルであり得る。例示的な適切な修飾としては、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ (式中、 n および m は 1 ～ 約 10 である) が挙げられる。別の実施形態では、 $dsRNA$ は、2' 位に以下の 1 つを含む: $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカニール、アラニール、 O -アルカニールまたは O -アラニール、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 $SOCH_3$ 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカニール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、 RNA 切断基、レポーター基、介入物、 $iRNA$ の薬物動態特性を改善する基、または $iRNA$ の薬力学的特性を改善する基、および同様の特性を有するその他の置換基。いくつかの実施形態では、修飾は、2'-メトキシエトキシ (2'- $O-CH_2CH_2OCH_3$ 、2'- $O-(2$ -メトキシエチル) または 2'- MOE としてもまた知られている) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78: 486-504)、すなわちアルコキシ-アルコキシ基を含む。別の例示的な修飾は、以下に本明細書の実施例で記載されるように、2'- $DMAOE$ としてもまた知られている、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、および、2'-ジメチルアミノエトキシエチル (当該技術分野で 2'- O -ジメチルアミノエトキシエチルまたは 2'- $DMAEOE$ としても公知である)、すなわち 2'- $O-CH_2-O-CH_2-N(CH_3)_2$ である。

【0124】

その他の修飾としては、2'-メトキシ (2'- OCH_3)、2'-アミノプロポキシ (2'- $OCH_2CH_2CH_2NH_2$)、および 2'-フルオロ (2'- F) が挙げられる。同様の修飾はまた、具体的には 3' 末端ヌクレオチド上の糖の 3' 位、または 2'-5' 結合 $dsRNA$ 中、および 5' 末端ヌクレオチドの 5' 位など、 $iRNA$ の RNA 上のその他の位置でも行い得る。 $iRNA$ はまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有してもよい。上記修飾糖構造の調製を教示する、代表的な米国特許としては、特定のものは本出願と所有者が共通である、米国特許第 4,981,957 号明細書；米国特許第 5,118,800 号明細書；米国特許第 5,319,080 号明細書；米国特許第 5,359,044 号明細書；米国特許第 5,393,878 号明細書；米国特許第 5,446,137 号明細書；米国特許第 5,466,786 号明細書；米国特許第 5,514,785 号明細書；米国特許第 5,519,134 号明細書；米国特許第 5,567,811 号明細書；米国特許第 5,576,427 号明細書；米国特許第 5,591,722 号明細書；米国特許第 5,597,909 号明細書；米国特許第 5,610,300 号明細書；米国特許第 5,627,053 号明細書；米国特許第 5,639,873 号明細書；米国特許第 5,646,265 号明細書；米国特許第 5,658,873 号明細書；米国特許第 5,670,633 号明細書；および米国特許第 5,700,920 号明細書が挙げられるが、これに限定されるものではない。上記のそれぞれの内容全体を参照によって本明細書によりここに援用する。

【0125】

$iRNA$ はまた、核酸塩基 (当該技術分野では単に「塩基」と称されることが多い) 修飾または置換を含み得る。本明細書の用法では、「未修飾」または「天然」核酸塩基としては、プリン塩基アデニン (A) およびグアニン (G)、およびピリミジン塩基チミン (T)、シトシン (C) およびウラシル (U) が挙げられる。修飾核酸塩基としては、5-メチルシトシン (5-me-C)；5-ヒドロキシメチルシトシン；キサンチン；ヒポキサンチン；2-アミノアデニン；アデニンおよびグアニンの 6-メチルおよびその他のアルキル誘導体；アデニンおよびグアニンの 2-プロピルおよびその他のアルキル誘導体；2-チオウラシル、2-チオチミンおよび 2-チオシトシン；5-ハロウラシルおよびシトシン；5-プロピニルウラシルおよびシトシン；6-アゾウラシル、シトシン、およびチミン；5-ウラシル (プソイドウラシル)；4-チオウラシル；8-ハロ、8-アミノ

、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよびその他の8置換アデニンおよびグアニン；5-ハロ、具体的には5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、およびその他の5置換ウラシルおよびシトシン；7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン；8-アザグアニンおよび8-アザアデニン；7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン（daazaadenine）；および3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどのその他の合成および天然核酸塩基が挙げられる。さらに核酸塩基としては、米国特許第3,687,808号明細書で開示されるもの、Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008で開示されるもの；The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990で開示されるもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613によって開示されるもの、およびSanghvi, Y. S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993によって開示されるものが挙げられる。これらの核酸塩基のいくつかは、本発明で取り上げるオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらとしては、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンをはじめとする、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、およびN-2、N-6およびO-6置換プリンが挙げられる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6~1.2℃増大させることが示されており（Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、模範的な塩基置換であり、なおもより特に、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられた場合にそうである。

【0126】

上記の特定の修飾核酸塩基ならびにその他の修飾核酸塩基の調製を教示する、代表的な米国特許としては、その内容全体をそれぞれ参照によって本明細書によりここに援用する、上記の米国特許第3,687,808号明細書、米国特許第4,845,205号明細書；米国特許第5,130,30号明細書；米国特許第5,134,066号明細書；米国特許第5,175,273号明細書；米国特許第5,367,066号明細書；米国特許第5,432,272号明細書；米国特許第5,457,187号明細書；米国特許第5,459,255号明細書；米国特許第5,484,908号明細書；米国特許第5,502,177号明細書；米国特許第5,525,711号明細書；米国特許第5,552,540号明細書；米国特許第5,587,469号明細書；米国特許第5,594,121、5,596,091号明細書；米国特許第5,614,617号明細書；米国特許第5,681,941号明細書；米国特許第5,750,692号明細書；米国特許第6,015,886号明細書；米国特許第6,147,200号明細書；米国特許第6,166,197号明細書；米国特許第6,222,025号明細書；米国特許第6,235,887号明細書；米国特許第6,380,368号明細書；米国特許第6,528,640号明細書；米国特許第6,639,062号明細書；米国特許第6,617,438号明細書；米国特許第7,045,610号明細書；米国特許第7,427,672号明細書；および米国特許第7,495,088号明細書が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0127】

iRNAのRNAはまた、1つまたは複数のロックド核酸（LNA：locked nucleic acid）を含むように修飾され得る。ロックド核酸は、修飾リボース部分を有するヌクレオチドであり、その中でリボース部分は、2'および4'炭素を結合す

る追加の架橋を含んでなる。この構造は、リボースを3' - エンド立体構造内に効果的に「ロック」する。siRNAへのロックド核酸の追加は、血清中のsiRNA安定性を増大させ、非特異的効果を低下させることが示されている(Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33 (1): 439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6 (3): 833-843; Grunweller, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31 (12): 3185-3193)。

【0128】

ロックド核酸ヌクレオチドの調製を教示する代表的な米国特許としては、そのそれぞれの内容全体を参照によって本明細書に援用する、米国特許第6, 268, 490号明細書; 米国特許第6, 670, 461号明細書; 米国特許第6, 794, 499号明細書; 米国特許第6, 998, 484号明細書; 米国特許第7, 053, 207号明細書; 米国特許第7, 084, 125号明細書; および米国特許第7, 399, 845号明細書が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0129】

RNA分子末端に対する潜在的安定化修飾としては、N-(アセチルアミノカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-NHAc)、N-(カプロイル-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6)、N-(アセチル-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-NHAc)、チミジン-2'-O-デオキシチミジン(エーテル)、N-(アミノカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール(Hyp-C6-アミノ)、2-ドコサノイル-ウリジン-3"-リン酸、逆転塩基dT(idT)などが挙げられる。この修飾の開示は、国際公開第2011/005861号パンフレットにある。

【0130】

IV. リガンド共役iRNA

本発明のiRNAのRNAの別の修飾は、iRNAの活性、細胞分布、または細胞内取り込みを高める、1つまたは複数のリガンド、部分または複合体を、RNAに化学的に連結することを伴う。このような部分としては、コレステロール部分(Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556)などの脂質部分; コール酸(Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4: 1053-1060); 例えばベリル-S-トリチルチオール(Manoharan et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 660: 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533-538)などのチオエーテル; 例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10: 1111-1118; Kabanov et al., *FEB S Lett.*, 1990, 259: 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75: 49-54)などの脂肪族鎖; 例えばジヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチル-アンモニウム1, 2-ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-ホスホネート(Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777-3783)などのリン脂質; ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969-973); またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-3654); パルミチル部分(Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229-237); またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分(Crooke et al., *J. Ph*

10

20

30

40

50

armacol. Exp. Ther., 1996, 277: 923-937) が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0131】

一実施形態では、リガンドは、それが組み込まれた iRNA 剤の分布、標的化または寿命を変化させる。好ましい実施形態では、リガンドは、例えばこのようなリガンドが不在である化学種と比較して、例えば分子、細胞または細胞型、例えば細胞内または器官内区画などの区画、身体の組織または器官または領域などの選択された標的に対する、改善された親和性を提供する。好ましいリガンドは、二重鎖化核酸中の二本鎖対合形成に加わらない。

【0132】

リガンドは、タンパク質（例えばヒト血清アルブミン（HSA: human serum albumin）、低密度リポタンパク質（LDL: low-density lipoprotein）、またはグロブリン）；炭水化物（例えばデキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、N-アセチルガラクトサミン、またはヒアルロン酸）；または脂質などの天然物質を含み得る。リガンドはまた、例えば合成ポリアミノ酸などの合成ポリマーなど、組換えまたは合成分子であり得る。ポリアミノ酸の例はポリアミノ酸を含み、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物共重合体、ポリ（L-ラクチド-コグリコリド（glycolide））共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド共重合体（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンが挙げられる。ポリアミンの例としては、ポリエチレンイミン、ポリリジン（PLL）、スベルミン、スベルミジン、ポリアミン、擬ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、 dendrimer-ポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミン四級塩、またはαラセンペプチドである。

【0133】

リガンドはまた、例えばレクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質など、例えば腎細胞などの特定細胞型に結合する抗体である、細胞または組織標的化剤などの標的化基を含み得る。標的化基は、甲状腺刺激ホルモン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤プロテインA、ムチン炭水化物、多価乳糖、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン（glucose amine）多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビタミンA、ビオチン、またはRGDペプチドまたはRGDペプチド模倣体であり得る。

【0134】

リガンドのその他の例としては、染料、挿入剤（例えばアクリジン）、架橋剤（例えばソラレン（psoralene）、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えばフェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えばEDTA）、例えばコレステロールなどの親油性分子、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1, 3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1, 3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン）およびペプチド複合体（例えばアンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG（例えばPEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカ、酵素、ハプテン（例えばビオチン）、輸送/吸収促進薬（例えばアスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ

10

20

30

40

50

(例えばイミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザ大環状化合物のEu³⁺複合体)、ジニトロフェニル、HRP、またはAPが挙げられる。

【0135】

リガンドは、例えば糖タンパク質などのタンパク質；または例えば共リガンドに特異的親和性を有する分子などのペプチド；または例えば肝臓細胞などの指定された細胞型に結合する抗体などの抗体であり得る。リガンドはまた、ホルモンおよびホルモン受容体を含んでもよい。それらはまた、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補助因子、多価乳糖、多価ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン多価マンノース、または多価フコースなどの非ペプチド化学種を含み得る。リガンドは、例えばリポ多糖、p38 MAPキナーゼ活性化因子、またはNF-κB活性化因子であり得る。

10

【0136】

リガンドは、例えば細胞の微小管、微小繊維、および／または中間径フィラメントを破壊することで、例えば細胞の細胞骨格を破壊することにより、細胞へのiRNA剤の取り込みを増大させ得る薬剤などの物質であり得る。薬剤は、例えばタキソン(taxon)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド(japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、またはミオセルビンであり得る。

【0137】

20

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるiRNAに付着するリガンドは、薬物動態調節因子(PK調節因子)を指す。PK調節因子としては、親油性物質、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミンなどが挙げられる。例示的なPK調節因子としては、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかのホスホロチオエート結合を含んでなるオリゴヌクレオチドもまた、血清タンパク質に結合することが知られており、したがって例えば、主鎖中に複数のホスホロチオエート結合を含んでなる、約5塩基、10塩基、15塩基、または20塩基オリゴヌクレオチドなどの短鎖オリゴヌクレオチドもまた、リガンドとして(例えばPK調節リガンドとして)本発明に適している。これに加えて、血清成分(例えば血清タンパク質)に結合するアプタマーもまた、本明細書に記載される実施形態中で、PK調節リガンドとして使用するのに適する。

30

【0138】

本発明のリガンド共役オリゴヌクレオチドは、結合分子のオリゴヌクレオチド上への付加から誘導されるものなどの、ペンダント反応性官能基を有するオリゴヌクレオチドの使用によって、合成してもよい(下述)。この反応性オリゴヌクレオチドは、市販のリガンド、多様な保護基のいずれかを有する合成されたリガンド、または付着する結合部分を有するリガンドと、直接反応させてもよい。

【0139】

40

本発明の複合体で使用されるオリゴヌクレオチドは、好都合に、そして慣例的に、周知の固相合成技術を通じて生成されてもよい。このような合成のための装置は、Applied Biosystems(Foster City, Calif.)をはじめとする、いくつかの供給業者によって販売される。これに加えて、または代案として、当該技術分野で公知のこのような合成のためのその他のあらゆる手段を用いてもよい。同様の技術を使用して、ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体などのその他のオリゴヌクレオチドを調製することもまた知られている。

【0140】

本発明のリガンド共役オリゴヌクレオチド、およびリガンド分子を保有する配列特異的結合ヌクレオチド中では、オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、標準ヌクレ

50

オチドまたはヌクレオシド前駆体、または既に結合部分を保有するヌクレオチドまたはヌクレオシド複合体前駆体、既にリガンド分子を保有するリガンドーヌクレオチドまたはヌクレオシドー複合体前駆体、または非ヌクレオシドリガンドを保有する基本単位を使用して、適切なDNA合成機上で組み立ててもよい。

【0141】

既に結合部分を有するヌクレオチド複合体前駆体を使用する場合、配列特異的結合ヌクレオシドの合成が典型的に完了し、次にリガンド分子が結合部分と反応されて、リガンド共役オリゴヌクレオチドが生成する。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドまたは結合ヌクレオシドは、市販されて、慣例的にオリゴヌクレオチド合成で使用される、標準ホスホラミダイトおよび非標準ホスホラミダイトに加えて、リガンドーヌクレオシド複合体から誘導されるホスホラミダイトを使用して、自動合成装置によって合成される。

10

【0142】

A. 脂質複合体

1つの実施形態では、リガンドまたは複合体は、脂質または脂質ベースの分子である。このような脂質または脂質ベースの分子は、好ましくは、例えばヒト血清アルブミン(HSA)などの血清タンパク質と結合する。HSA結合リガンドは、例えば身体の高腎臓標的組織などの標的組織への複合体の分布を可能にする。例えば標的組織は、肝臓の実質細胞をはじめとする肝臓であり得る。HSAに結合し得るその他の分子もまた、リガンドとして使用し得る。例えばナプロキセンまたはアスピリンを使用し得る。脂質または脂質ベースのリガンドは、(a)複合体の分解耐性を増大させ得て、(b)標的細胞または細胞膜の標的化またはそれへの輸送を増大させ得て、および/または(c)例えばHSAなどの血清タンパク質の結合を調節するのに使用し得る。

20

【0143】

例えば複合体の標的組織への結合を制御するなど、阻害のために、脂質ベースのリガンドを使用し得る。例えばより強力にHSAに結合する脂質または脂質ベースのリガンドは、腎臓に標的化される可能性がより低く、したがって身体から除去される可能性がより低い。より弱くHSAに結合する脂質または脂質ベースのリガンドは、複合体を腎臓に標的化するのに使用し得る。

【0144】

好ましい実施形態では、脂質ベースのリガンドはHSAに結合する。好ましくは、それは、複合体が好ましくは高腎臓組織に分布するように、十分な親和性でHSAと結合する。しかし親和性は、HSAリガンド結合が逆転され得ない程度にまで、強力ではないことが好ましい。

30

【0145】

別の好ましい実施形態では、複合体が好ましくは腎臓に分布するように、脂質ベースのリガンドはHSAと弱く結合し、または全く結合しない。腎細胞を標的とするその他の部分もまた、脂質ベースのリガンドに代えて、またはそれに加えて使用し得る。

【0146】

別の態様では、リガンドは、例えば増殖細胞などの標的細胞に取り込まれる、ビタミンなどの部分である。これらは、例えばがん細胞などの悪性または非悪性型などの望まれない細胞増殖によって特徴付けられる障害を治療するのに、特に有用である。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E、およびKが挙げられる。その他の例示的なビタミンとしては、例えば葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサールなどのBビタミン、または肝臓細胞などの標的細胞に取り込まれるその他のビタミンまたは栄養素が挙げられる。またHSAおよび低密度リポタンパク質(LDL)も挙げられる。

40

【0147】

B. 細胞透過剤

別の態様では、リガンドは細胞透過剤であり、好ましくはらせん細胞透過剤である。好ましくは、細胞透過剤は両親媒性である。例示的な細胞透過剤は、tatまたはアンテノ

50

ペディア (antennopedia) などのペプチドである。細胞透過剤がペプチドである場合、それはペプチジル模倣薬、逆転異性体、非ペプチドまたは偽ペプチド結合、およびD-アミノ酸使用をはじめとする、修飾を受け得る。らせん剤は、好ましくは親油性および疎油性相を有する α -らせん剤である。

【0148】

リガンドは、ペプチドまたはペプチド模倣体であり得る。ペプチド模倣薬（本明細書においてオリゴペプチド模倣薬とも称される）は、天然ペプチドに類似する定義された三次元構造に折り畳み可能な分子である。ペプチドおよびペプチド模倣薬のiRNA剤への付加は、細胞認識と吸収の促進などにより、iRNAの薬物動態分布に影響を及ぼし得る。ペプチドまたはペプチド模倣薬部分は、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50アミノ酸長など、約5～50アミノ酸長であり得る。

10

【0149】

ペプチドまたはペプチド模倣薬は、例えば細胞透過性ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、または疎水性ペプチド（例えば主にTyr、TrpまたはPheからなる）であり得る。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、束縛ペプチドまたは架橋ペプチドであり得る。別の代案では、ペプチド部分は、疎水性膜移行配列(MTS)を含み得る。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列AAVALLPAVLLALLAAP（配列番号9）を有するRFGFである。疎水性MTSを含有するRFGF類似体（例えばアミノ酸配列AALLPVLLAAP（配列番号10））もまた、標的部分であり得る。ペプチド部分は、細胞膜を越えて、ペプチド、オリゴヌクレオチド、およびタンパク質をはじめとする、多数の極性分子を輸送し得る「送達」ペプチドであり得る。例えばHIV Tatタンパク質（GRKKRRQRRRPPQ（配列番号11））およびショウジョウバエ（Drosophila）アンテナペディアタンパク質（RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号12））からの配列は、送達ペプチドとして機能できることが分かっている。ペプチドまたはペプチド模倣薬は、ファージディスプレイライブラリー、または1ビーズ1化合物(OBOC)コンビナトリアルライブラリーから同定されるペプチドなどの、DNAのランダム配列によってコードされ得る(Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991)。細胞標的化目的のために、組み込まれたモノマー単位を通じて、dsRNA作用物質に係留されるペプチドまたはペプチド模倣体の例は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)-ペプチド、またはRGD模倣体である。ペプチド部分は、約5アミノ酸～約40アミノ酸長に及び得る。ペプチド部分は、安定性を増大させ、または立体構造特性を誘導するような、構造修飾を有し得る。下述の構造修飾のいずれかを使用し得る。

20

30

【0150】

本発明の組成物および方法で使用されるRGDペプチドは、直鎖または環状であってもよく、例えばグリコシル化またはメチル化により修飾して、特定組織への標的化を容易にしてもよい。RGD含有ペプチドおよびペプチド模倣剤(peptidomimetics)としては、D-アミノ酸、ならびに合成RGD模倣体が挙げられる。RGDに加えて、インテグリンリガンドを標的にするその他の部分を使用し得る。このリガンドの好ましい複合体は、PECAM-1またはVEGFを標的にする。

40

【0151】

「細胞透過性ペプチド」は、例えば細菌または真菌細胞などの微生物細胞、またはヒト細胞などの哺乳類細胞などの細胞に浸透できる。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば α -らせん直鎖ペプチド（例えばLL-37またはセクロピン(Ceropin)P1）、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば α -デフェンシン、 β -デフェンシンまたはバクテネシン）、または1つまたは2つの主要アミノ酸（例えばPR-39またはインドリジン）のみを含有するペプチドであり得る。細胞透過性ペプチドはまた、核局在化シグナル(NLS)を含み得る。例えば細胞透過性ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメインおよびSV40大型T抗原のNLSに由来する、MPGなどの二分両親媒性ペプチドであり得る(Simeoni et al., Nucl. Acids Res

50

． 3 1 : 2 7 1 7 - 2 7 2 4 , 2 0 0 3) 。

【 0 1 5 2 】

C. 炭水化物複合体

本発明の組成物および方法のいくつかの実施形態では、iRNAオリゴヌクレオチドは、炭水化物をさらに含んでなる。炭水化物共役iRNAは、本明細書に記載されるような、核酸ならびに生体内治療用途に適する組成物の生体内送達に、有利である。本明細書の用法では、「炭水化物」は、各炭素原子に結合する酸素、窒素またはイオウ原子がある、少なくとも6個の炭素原子（直鎖、分枝または環状であり得る）を有する、1つまたは複数の単糖単位で構成される炭水化物それ自体；各炭素原子に結合する酸素、窒素またはイオウ原子がある、少なくとも6個の炭素原子（直鎖、分枝または環状であり得る）をそれぞれ有する、1つまたは複数の単糖単位で構成される炭水化物部分をその一部として有する化合物のいずれかである化合物を指す。代表的な炭水化物としては、糖類（単糖類、二糖類、三糖類、および約4、5、6、7、8、または9個の単糖単位を含有するオリゴ糖類）、およびデンプン、グリコーゲン、セルロース、および多糖類ガムなどの多糖類が挙げられる。特定の単糖類としては、C5以上（例えばC5、C6、C7、またはC8）の糖類が挙げられ；二および三糖類としては、2または3個の単糖単位を有する糖類が挙げられる（例えばC5、C6、C7、またはC8）。

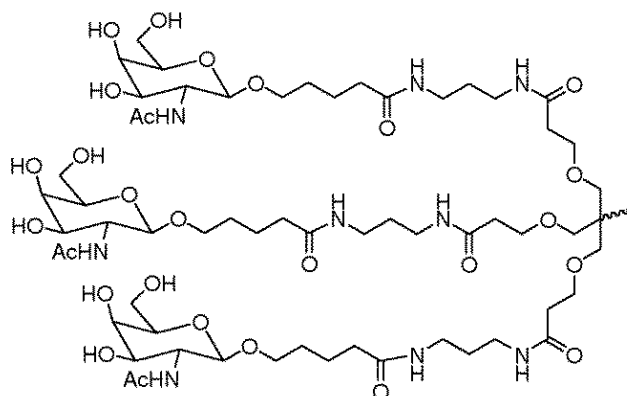
10

【 0 1 5 3 】

一実施形態では、本発明の組成物および方法で使用される炭水化物複合体は単糖である。一実施形態では、単糖は、

20

【 化 4 】



式II

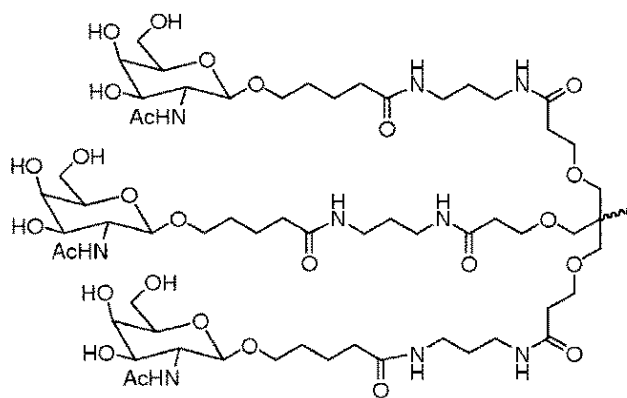
30

などのN-アセチルガラクトサミンである。

【 0 1 5 4 】

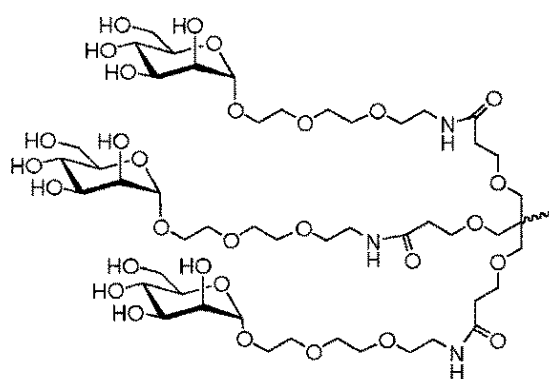
別の実施形態では、本発明の組成物および方法で使用される炭水化物複合体は、

【化 5】



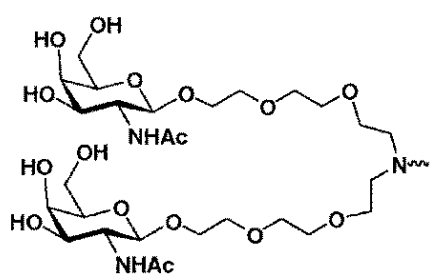
式 II,

10



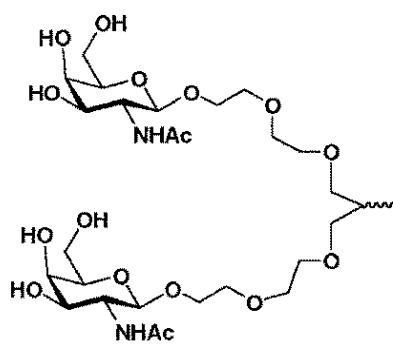
式 III,

20



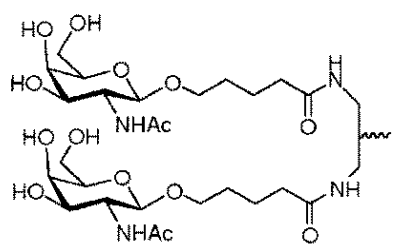
式 IV,

30



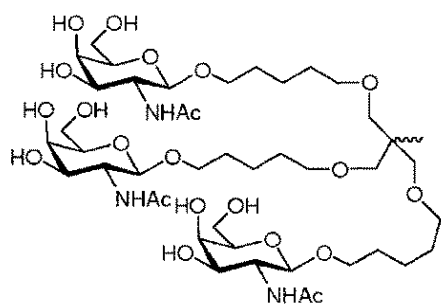
式 V,

40



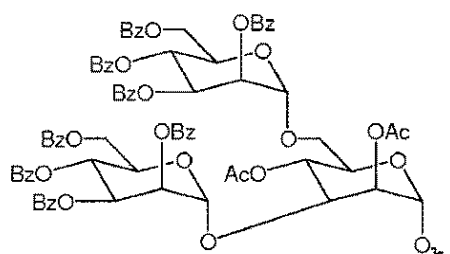
式 VI,

【化 6】

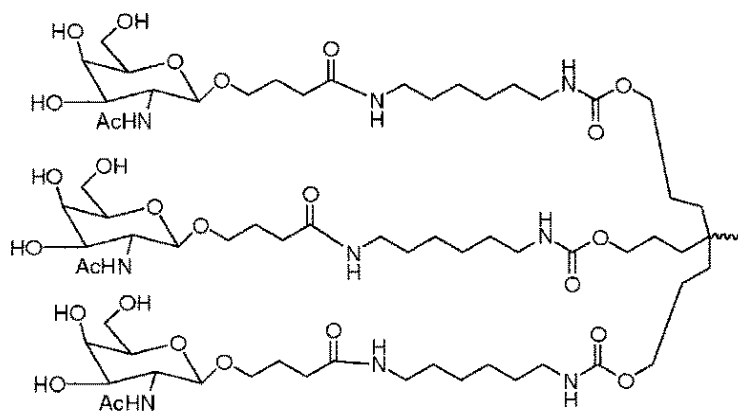


式VII,

10

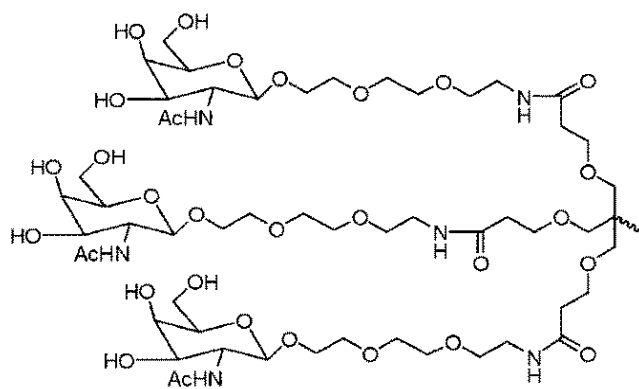


式VIII,



式IX,

20



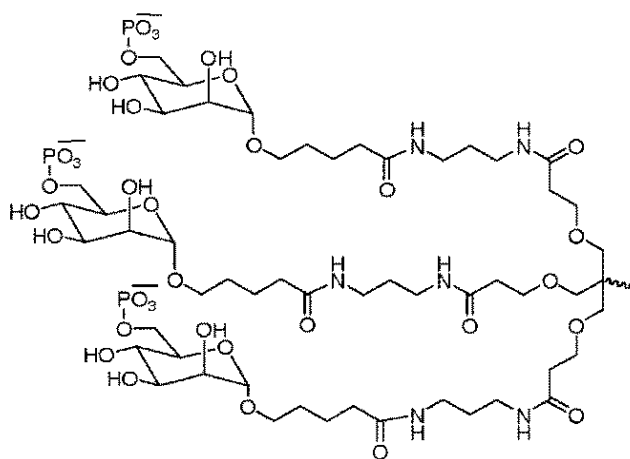
式X,

30

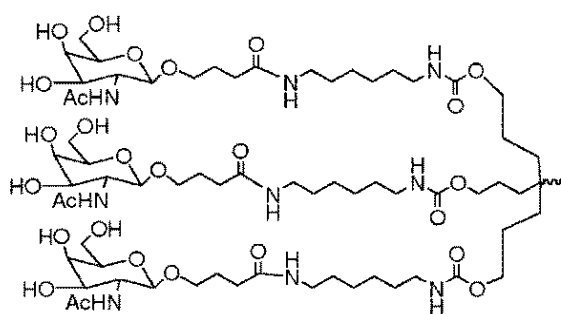
40

The diagram shows a branched polyether dendron structure. It consists of three terminal phosphate groups (PO₃⁻) attached to a central polyether backbone. The backbone is composed of repeating units of 1,3-bis(2-methoxyethoxy)propan-2-ol, which are linked by ether bonds. The terminal phosphate groups are attached to the 1,3-bis(2-methoxyethoxy)propan-2-ol units via ether bonds. The structure is shown in a perspective view, with the phosphate groups at the ends of the branches.

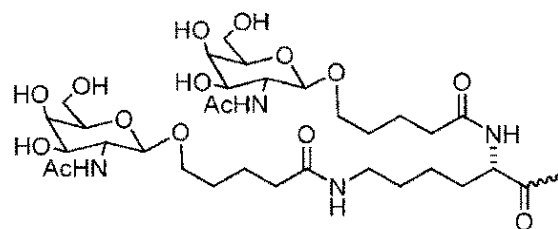
10



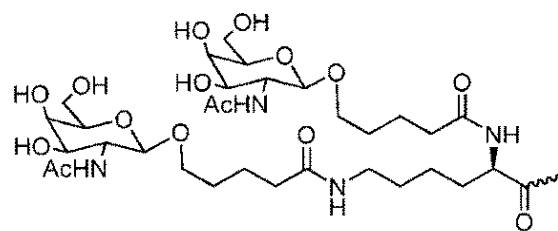
20



30

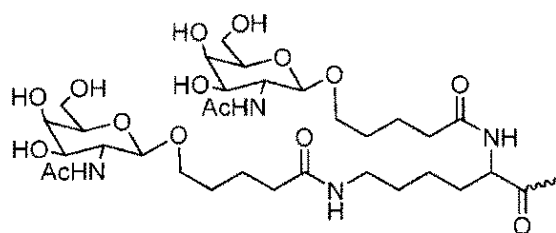


40

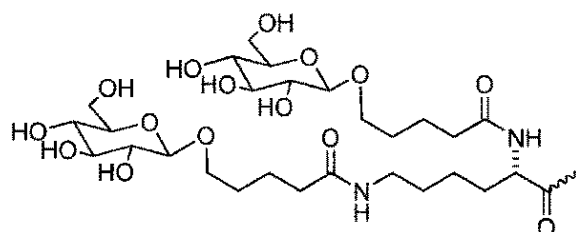


式XV,

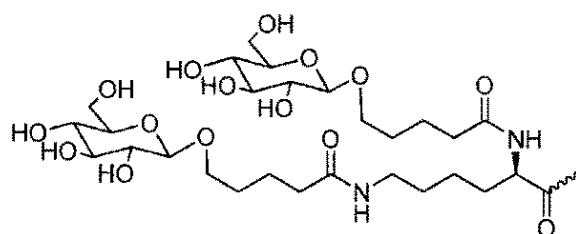
【化 8】



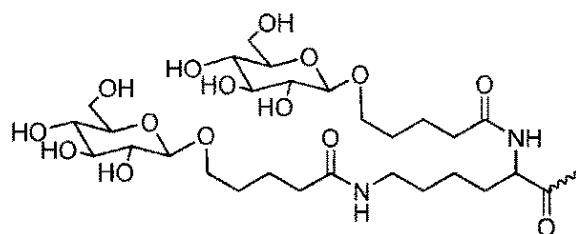
式 XVI,



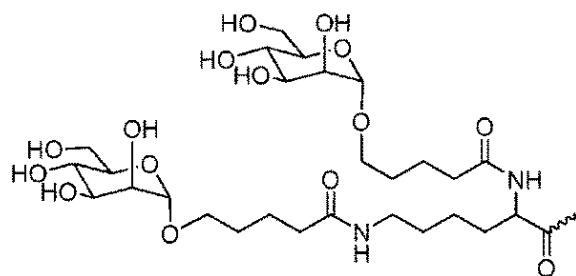
式 XVII,



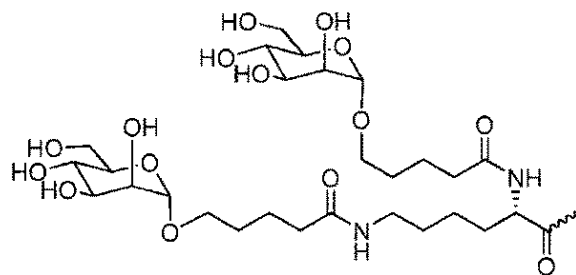
式 XVIII,



式 XIX,



式 XX,



式 XXI,

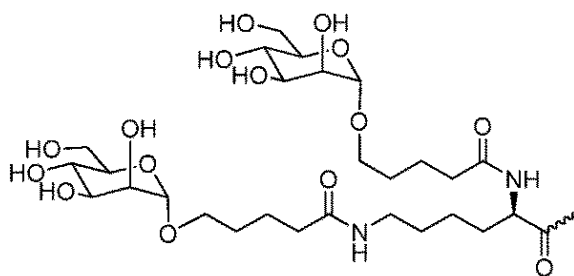
10

20

30

40

【化 9】



式 XXII

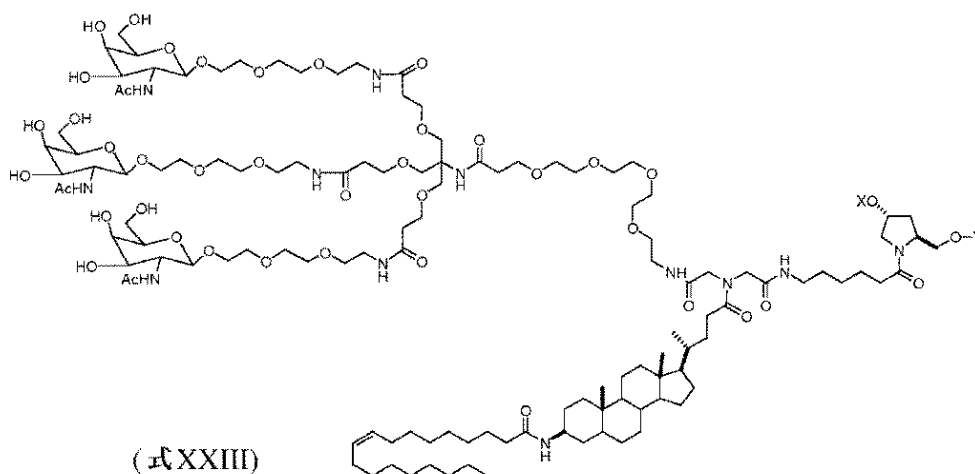
10

からなる群から選択される。

【0155】

本明細書に記載される実施形態で使用される別の代表的な炭水化物複合体としては、

【化 10】



(式 XXIII)

20

(式中、

XまたはYの一方はオリゴヌクレオチドであり、他方は水素である)が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0156】

いくつかの実施形態では、炭水化物複合体は、PK調節因子および／または細胞透過性ペプチドなどであるが、これに限定されるものではない、上述の1つまたは複数の追加的なリガンドをさらに含んでなる。

【0157】

D. リンカー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される複合体またはリガンドは、切断可能または切断不能であり得る、様々なリンカーによって、iRNAオリゴヌクレオチドに付着し得る。

40

【0158】

「リンカー」または「連結基」という用語は、例えば化合物の2つの部分に共有結合するなどの、化合物の2つの部分を結合する有機部分を意味する。リンカーは、典型的に、直接結合、または酸素またはイオウなどの原子、NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NHなどの単位、または置換または非置換アルキル、置換または非置換アルケニル、置換または非置換アルキニル、アリーラルキル、アリーラルケニル、アリーラルキニル、ヘテロアリーラルキル、ヘテロアリーラルケニル、ヘテロアリーラルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケ

50

ニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル (alkylhererocyclallylalkynyl)、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリール (alkynylhereroaryl) などであるが、これに限定されるものではない原子鎖を含んでなり、その1つまたは複数のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R⁸)、C(O)、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換複素環(式中、R⁸は水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である)によって中断されまたは終結され得る。一実施形態では、リンカーは、約1~24個の原子、2~24個の原子、3~24個の原子、4~24個の原子、5~24個の原子、6~24個の原子、6~18個の原子、7~18個の原子、7~17この原子、8~17個の原子、6~16個の原子、7~16個の原子、または、8~16個の原子である。

10

20

【0159】

切断可能連結基は、細胞外で十分に安定しているが、標的細胞への侵入時に切断されて、リンカーがつかぎ止めている2つの部分を放出するものである。好ましい実施形態では、切断可能連結基は、標的細胞中で、または第1の標準状態下(例えば細胞内条件を模倣し、またはそれに相当するように選択し得る)で、対象の血中において、または第2の標準状態下(例えば血中または血清に見られる条件を模倣し、またはそれに相当するように選択し得る)よりも、少なくとも約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍以上、または少なくとも約100倍より迅速に切断される。

30

【0160】

切断可能連結基は、例えばpH、酸化還元電位または分解性分子の存在などの切断作用物質の影響を受けやすい。一般に切断作用物質は、血清または血液中よりも細胞中でより一般的であり、またはより高いレベルまたは活性で見られる。このような分解性作用物質の例としては、例えば還元によって酸化還元切断可能連結基を分解し得る、細胞中に存在する、酸化または還元酵素またはメルカプタンなどの還元剤をはじめとする、特定の基質のために選択された、または基質特異性がない酸化還元剤；エステラーゼ；エンドソームまたは例えば5以下のpHをもたらすものなどの酸性環境をもたらし得る作用物質；一般酸、ペプチダーゼ(基質特異性であり得る)、およびホスファターゼとして作用することで、酸切断可能連結基を加水分解または分解し得る酵素が挙げられる。

40

【0161】

ジスルフィド結合などの切断可能連結基は、pHに対する感受性が高くあり得る。ヒト血清のpHが7.4であるのに対し、細胞内平均pHはわずかにより低く、約7.1~7.3の範囲にわたる。エンドソームは、5.5~6.0の範囲のより酸性のpHを有し、リソソームは、約5.0のさらにより酸性のpHを有する。いくつかのリンカーは、好ましいpHで切断される切断可能連結基を有し、それによって細胞中のリガンドから、または細胞の所望の区画へ、カチオン性脂質が放出される。

【0162】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能な切断可能連結基を含み得る。リンカーに組み込まれる切断可能連結基のタイプは、標的とされる細胞に左右され得る。例えば肝臓を

50

標的化するリガンドは、エステル基を含むリンカーを通じてカチオン性脂質に連結し得る。肝細胞はエステラーゼに富み、したがってリンカーは、エステラーゼが豊富でない細胞型よりも、肝細胞中でより効率的に切断される。エステラーゼに富むその他の細胞型としては、肺、腎皮質、および精巣の細胞が挙げられる。

【0163】

ペプチド結合を含有するリンカーは、肝細胞および滑膜細胞などのペプチダーゼに富んだ細胞型を標的化する際に使用し得る。

【0164】

一般に切断可能連結基の候補の適合性は、候補連結基を切断する分解性作用物質（条件）の能力を検査することで評価し得る。切断可能連結基の候補は、血中において、またはその他の非標的組織との接触時に、切断に抵抗する能力についてもまた検査することもまた望ましい。したがって第1の条件が標的細胞中での切断を示すように選択され、第2の条件がその他の組織または例えば血液または血清などの生体液中での切断を示すように選択される、第1および第2の条件間の切断の相対的感受性を判定し得る。評価は、無細胞系中、細胞中、細胞培養中、臓器または組織培養中、または全身の動物中で実施し得る。無細胞または培養条件で最初の評価を行い、全身の動物中でのさらなる評価によって確認することが有用なこともあり得る。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択された生体外条件下）と比較して、細胞中（または細胞内条件を模倣するように選択された生体外条件下）で、少なくとも約2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100倍より迅速に切断される。

【0165】

i. 酸化還元切断可能連結基

1つの実施形態では、切断可能連結基は、還元または酸化に際して切断される酸化還元切断可能連結基である。還元的切断可能連結基の一例は、ジスルフィド連結基（ $-S-S-$ ）である。切断可能連結基候補が、適切な「還元的切断可能連結基」か、または例えば特定のiRNA部分および特定の標的作用物質と共に使用するのに適するかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法に頼ることができる。例えば候補は、例えば標的細胞などの細胞中で観察される切断速度を模倣する、当該技術分野で公知の試薬を使用して、ジチオスレイトール（DTT）、またはその他の還元剤とのインキュベーションによって評価し得る。候補はまた、血液または血清条件を模倣するように選択される条件下で評価し得る。1つの候補化合物は、血中で最大で約10%切断される。他の実施形態では、有用な候補化合物は、血液（または細胞外条件を模倣するように選択された生体外条件下）と比較して、細胞中（または細胞内条件を模倣するように選択された生体外条件下）で、少なくとも約2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90または約100倍より迅速に分解される。候補化合物の切断速度は、細胞内媒体を模倣するように選択された条件下で標準酵素動態アッセイを使用して、細胞外媒体を模倣するように選択された条件と比較して判定し得る。

【0166】

i i. リン酸ベースの切断可能連結基

別の実施形態では、切断可能なリンカーは、リン酸ベースの切断可能連結基を含んでなる。リン酸ベースの切断可能連結基は、リン酸基を分解または加水分解する作用物質によって切断され得る。細胞中でリン酸基を切断する作用物質の一例は、細胞内のホスファターゼなどの酵素である。リン酸ベースの連結基の例は、 $-O-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(SR_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-S-$ である。好ましい実施形態は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(O$

H) $-O-$ 、 $-O-P(S)(SH)-O-$ 、 $-S-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(OH)-S-$ 、 $-S-P(O)(OH)-S-$ 、 $-O-P(S)(OH)-S-$ 、 $-S-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(H)-O-$ 、 $-O-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-O-$ 、 $-S-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-S-$ 、 $-O-P(S)(H)-S-$ である。好ましい実施形態は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ である。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。

【0167】

i i i. 酸切断可能連結基

別の実施形態では、切断可能なリンカーは、酸切断可能連結基を含んでなる。酸切断可能連結基は、酸性条件下で切断される連結基である。好ましい実施形態では、酸切断可能連結基は、pH約6.5以下（例えば約6.0、5.75、5.5、5.25、5.0以下）の酸性環境内において、または一般酸として作用し得る酵素などの作用物質によって切断される。細胞内では、エンドソームおよびリソソームなどの特定の低pH細胞小器官が、酸切断可能連結基の切断環境を提供し得る。酸切断可能連結基の例としては、ヒドラゾン、エステル、およびアミノ酸エステルが挙げられるが、これに限定されるものではない。酸切断可能基は、一般式 $-C=NN-$ 、 $C(O)O$ 、または $-OC(O)$ を有し得る。好ましい実施形態は、炭素がエステルの酸素に付着する場合（アルコキシ基）は、アリール基、置換アルキル基、またはジメチルベンチルまたはt-ブチルなどの三級アルキル基である。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。

【0168】

i v. エステルベースの連結基

別の実施形態では、切断可能なリンカーは、エステルベースの切断可能連結基を含んでなる。エステルベースの切断可能連結基は、細胞内でエステラーゼおよびアミダーゼなどの酵素によって切断される。エステルベースの切断可能連結基の例としては、アルキレン、アルケニレン、およびアルキニレン基のエステルが挙げられるが、これに限定されるものではない。エステル切断可能連結基は、一般式 $-C(O)O-$ または $-OC(O)-$ を有する。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。

【0169】

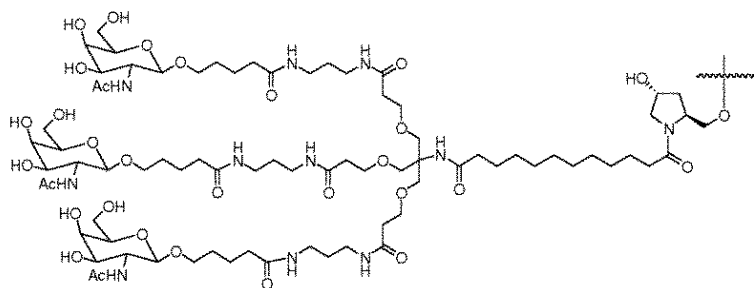
v. ペプチドベースの切断基

さらに別の実施形態では、切断可能なリンカーは、ペプチドベースの切断可能連結基を含んでなる。ペプチドベースの切断可能連結基は、細胞内で、ペプチダーゼおよびプロテアーゼなどの酵素によって切断される。ペプチドベースの切断可能連結基は、アミノ酸の間に形成されて、オリゴペプチド（例えばジペプチド、トリペプチドなど）およびポリペプチドを生じる、ペプチド結合である。ペプチドベースの切断可能基には、アミド基（ $-C(O)NH-$ ）は含まれない。アミド基は、あらゆるアルキレン、アルケニレンまたはアルキニレン（alkynylene）間に形成され得る。ペプチド結合は、アミノ酸の間に形成されて、ペプチドおよびタンパク質を生じる特殊なタイプのアミド結合である。ペプチドベースの切断基は、一般にアミノ酸の間に形成されて、ペプチドおよびタンパク質を生じるペプチド結合（すなわちアミド結合）に限定され、アミド官能基全体は含まない。ペプチドベースの切断可能連結基は、一般式 $-NHCHRA C(O)NHCHRB C(O)-$ を有し、式中、RAおよびRBは2つの隣接するアミノ酸のR基である。これらの候補は、上述したものと類似の方法を使用して評価し得る。

【0170】

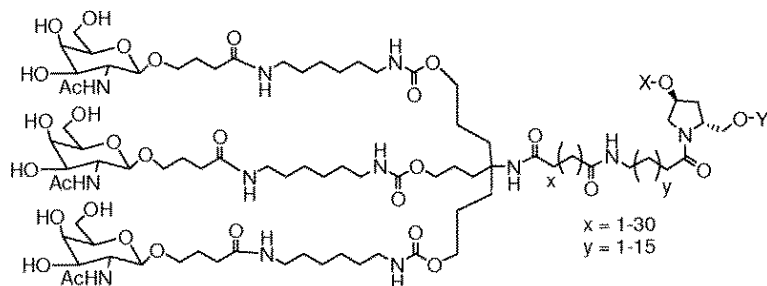
一実施形態では、本発明のiRNAは、リンカーを通じて炭水化物と共役する。本発明の組成物および方法のリンカーと共役するiRNA炭水化物の非限定的例としては、

【化 1 1】



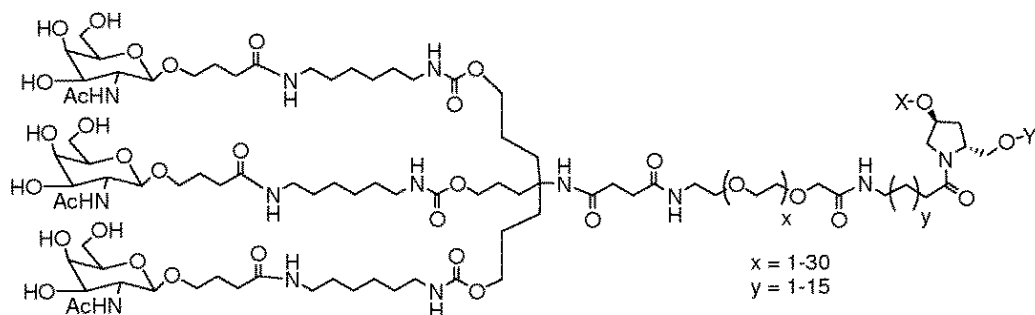
(式XXIV),

10

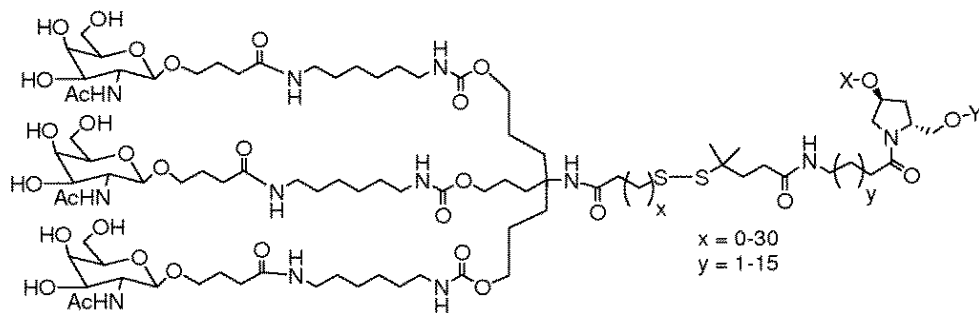


(式XXV),

20

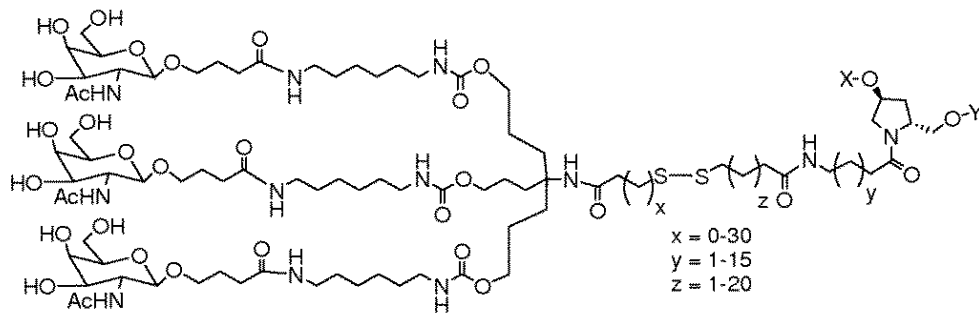


(式XXVI),



(式XXVII),

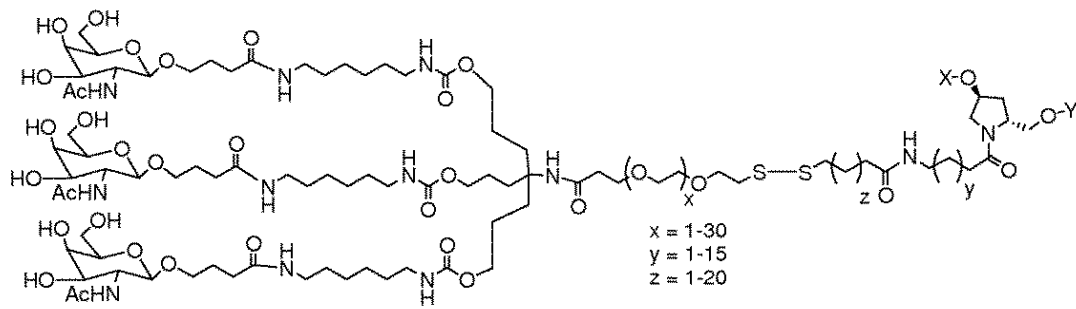
30



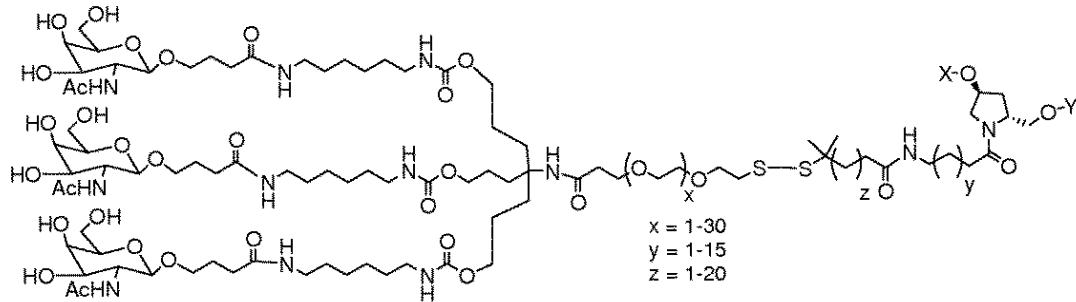
(式XXVIII),

40

【化 1 2】



(式XXIX),および



(式XXX)

(式中、

XまたはYの一方はオリゴヌクレオチドであり、他方は水素である)が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0171】

本発明の組成物および方法の特定の実施形態では、リガンドは、二価または三価の分枝リンカーを通じて付着する1つまたは複数の「GalNAc」(N-アセチルガラクトサミン)誘導体である。

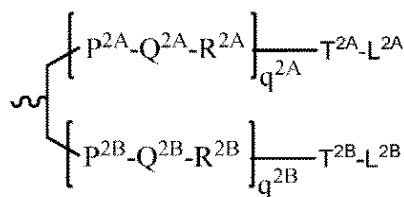
【0172】

一実施形態では、本発明のdsRNAは、
式(XXXI)～(XXXIV)、

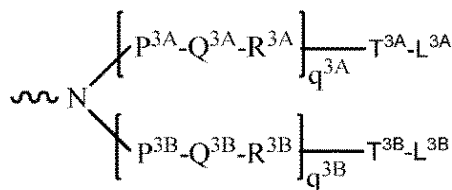
30

【化 1 3】

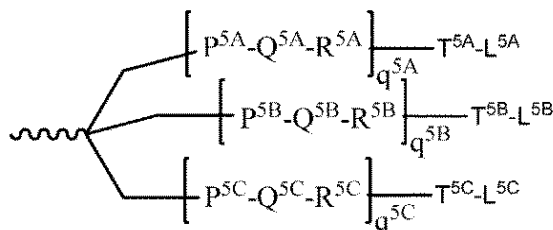
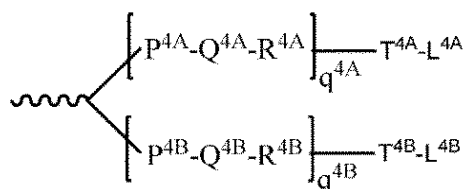
式 XXXI



式 XXXII



10



20

式 XXXIII

式 XXXIV

(式中、

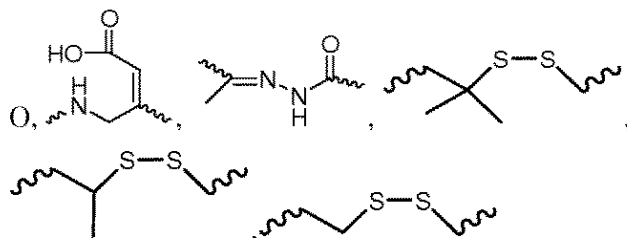
$\text{q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{q}^{5\text{B}}$ 、および $\text{q}^{5\text{C}}$ は、独立して、0～20の各出現を表し、反復単位は、同一であるかまたは異なり得て；

$\text{P}^{2\text{A}}$ 、 $\text{P}^{2\text{B}}$ 、 $\text{P}^{3\text{A}}$ 、 $\text{P}^{3\text{B}}$ 、 $\text{P}^{4\text{A}}$ 、 $\text{P}^{4\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{A}}$ 、 $\text{P}^{5\text{B}}$ 、 $\text{P}^{5\text{C}}$ 、 $\text{T}^{2\text{A}}$ 、 $\text{T}^{2\text{B}}$ 、 $\text{T}^{3\text{A}}$ 、 $\text{T}^{3\text{B}}$ 、 $\text{T}^{4\text{A}}$ 、 $\text{T}^{4\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{A}}$ 、 $\text{T}^{5\text{B}}$ 、 $\text{T}^{5\text{C}}$ は、各出現についてそれぞれ独立して、不在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、 CH_2 、 CH_2NH または CH_2O であり；

$\text{Q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{C}}$ は、各出現についてそれぞれ独立して、不在、アルキレン、置換アルキレンであり、1つまたは複数のメチレンは、O、S、S(O)、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{R}')=\text{C}(\text{R}'')$ 、 $\text{C}\equiv\text{C}$ または $\text{C}(\text{O})$ の1つまたは複数によって中断または終結され得て；

$\text{R}^{2\text{A}}$ 、 $\text{R}^{2\text{B}}$ 、 $\text{R}^{3\text{A}}$ 、 $\text{R}^{3\text{B}}$ 、 $\text{R}^{4\text{A}}$ 、 $\text{R}^{4\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{A}}$ 、 $\text{R}^{5\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{C}}$ は、各出現についてそれぞれ独立して、不在、NH、O、S、 CH_2 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHCH}(\text{R}^{\text{a}})\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{NH}-$ 、CO、 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$ 、

【化 1 4】



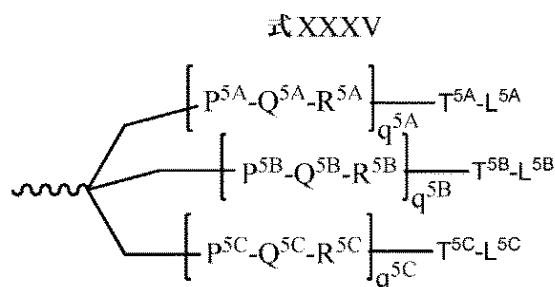
40

またはヘテロシクリルであり；

$\text{L}^{2\text{A}}$ 、 $\text{L}^{2\text{B}}$ 、 $\text{L}^{3\text{A}}$ 、 $\text{L}^{3\text{B}}$ 、 $\text{L}^{4\text{A}}$ 、 $\text{L}^{4\text{B}}$ 、 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ および $\text{L}^{5\text{C}}$ はリガンドを表し；すなわち各出現についてそれぞれ独立して、単糖 (GalNAc など)、二糖類、三糖、四糖、オリゴ糖、または多糖類であり； R^{a} は、Hまたはアミノ酸側鎖である) のいずれかで示される構造群から選択される、二価または三価の分枝リンカーと共役する。三価の共役 GalNAc 誘導体は、

50

式 (XXXV)、
【化15】



10

(式中、
L^{5A}、L^{5B}およびL^{5C}は、GalNAc誘導体などの単糖を表す)などの標的遺伝子の発現を阻害するために、RNAi剤と共に使用するのに特に有用である。

【0173】

GalNAc誘導体に共役する適切な二価および三価の分枝リンカー基の例としては、式II、VII、XI、X、およびXIIIとして、上で列挙された構造が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0174】

RNA複合体の調製を教示する、代表的な米国特許としては、そのそれぞれの内容全体を参照によって本明細書によりここに援用する、米国特許第4,828,979号明細書；米国特許第4,948,882号明細書；米国特許第5,218,105号明細書；米国特許第5,525,465号明細書；米国特許第5,541,313号明細書；米国特許第5,545,730号明細書；米国特許第5,552,538号明細書；米国特許第5,578,717号明細書、米国特許第5,580,731号明細書；米国特許第5,591,584号明細書；米国特許第5,109,124号明細書；米国特許第5,118,802号明細書；米国特許第5,138,045号明細書；米国特許第5,414,077号明細書；米国特許第5,486,603号明細書；米国特許第5,512,439号明細書；米国特許第5,578,718号明細書；米国特許第5,608,046号明細書；米国特許第4,587,044号明細書；米国特許第4,605,735号明細書；米国特許第4,667,025号明細書；米国特許第4,762,779号明細書；米国特許第4,789,737号明細書；米国特許第4,824,941号明細書；米国特許第4,835,263号明細書；米国特許第4,876,335号明細書；米国特許第4,904,582号明細書；米国特許第4,958,013号明細書；米国特許第5,082,830号明細書；米国特許第5,112,963号明細書；米国特許第5,214,136号明細書；米国特許第5,082,830号明細書；米国特許第5,112,963号明細書；米国特許第5,214,136号明細書；米国特許第5,245,022号明細書；米国特許第5,254,469号明細書；米国特許第5,258,506号明細書；米国特許第5,262,536号明細書；米国特許第5,272,250号明細書；米国特許第5,292,873号明細書；米国特許第5,317,098号明細書；米国特許第5,371,241号明細書、米国特許第5,391,723号明細書；米国特許第5,416,203号明細書、米国特許第5,451,463号明細書；米国特許第5,510,475号明細書；米国特許第5,512,667号明細書；米国特許第5,514,785号明細書；米国特許第5,565,552号明細書；米国特許第5,567,810号明細書；米国特許第5,574,142号明細書；米国特許第5,585,481号明細書；米国特許第5,587,371号明細書；米国特許第5,595,726号明細書；米国特許第5,597,696号明細書；米国特許第5,599,923号明細書；米国特許第5,599,928および5,688,941号明細書；米国特許第6,294,664号明細書；米国特許第6,320,017号明細書；米国特許第6,576,752号明細書；米国特許第6,783,931号明細書；米国特許第6,

20

30

40

50

900, 297号明細書; 米国特許第7, 037, 646号明細書、米国特許第8, 106, 022号明細書が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0175】

所与の化合物中の全ての位置が一様に修飾される必要はなく、事実上、前述の修飾の2つ以上が、単一化合物中に、またはiRNA内の単一ヌクレオシド中にさえ、組み込まれ得る。本発明は、キメラ化合物であるiRNA化合物もまた含む。

【0176】

「キメラ(chimeric)」iRNA化合物または「キメラ(chimeras)」は、本発明の文脈で、それぞれ少なくとも1つのモノマー単位から、すなわちdsRNA化合物の場合はヌクレオチドから構成される、2つ以上の化学的に異なる領域を含有するiRNA化合物、好ましくはdsRNAである。これらのiRNAは、典型的に、iRNAに、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大、細胞内取り込みの増大、および/または標的核酸に対する結合親和性の増大を与えるように、RNAが修飾される少なくとも1つの領域を含有する。iRNAの追加的な領域が、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断できる、酵素基質の役割を果たしてもよい。一例として、RNase Hは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。したがってRNase Hの活性化はRNA標的の切断をもたらし、それによって遺伝子発現のiRNA阻害効率を大幅に高める。その結果、同一標的領域とハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシdsRNAと比較して、キメラdsRNAが使用される場合、より短いiRNAによって、比較できる結果が得られることが多い。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、そして必要ならば当該技術分野で公知の関連核酸ハイブリダイゼーション技術によって、慣例的に検出し得る。

【0177】

場合によっては、iRNAのRNAは、非リガンド基によって修飾し得る。iRNAの活性、細胞分布または細胞内取り込みを高めるために、いくつかの非リガンド分子がiRNAに共役結合されており、このような共役結合を実施する手順は、学術文献で入手できる。このような非リガンド部分は、コレステロールなどの脂質部分(Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2007, 365(1): 54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553)、コール酸(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053)、例えばヘキシル-S-トリチルチオールなどのチオエーテル(Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660: 306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3: 2765)、チオコレステロール(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533)、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基などの脂肪族鎖(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10: 111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259: 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75: 49)、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1, 2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネートなどのリン脂質(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18: 3777)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14: 969)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651)、パルミチル部分(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264: 229)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Crooke et al., J. Ph

10

20

30

40

50

armacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)を含む。このようなRNA複合体の調製を教示する代表的な米国特許は、上に列挙した。典型的な共役結合プロトコルは、配列の1つまたは複数の位置にアミノリンカーを有するRNAの合成を伴う。次に適切なカップリングまたは活性化試薬を使用して、アミノ基を共役結合する分子と反応させる。共役結合反応は、溶液相中で、RNAが固体支持体になお結合する間に、またはRNA切断に続いて実施することができる。HPLCによるRNA複合体精製は、典型的に純粋な複合体を与える。

【0178】

IV. 発明のiRNAの送達

例えばヒト対象（例えば出血障害を有する対象などのそれを必要とする対象）などの対象内の細胞などの細胞への本発明のiRNAの送達は、いくつかの異なる方法で達成し得る。例えば送達は、試験管内または生体内のどちらかで、細胞を本発明のiRNAに接触させることで実施してもよい。生体内送達はまた、例えばdsRNAなどのiRNAを含んでなる組成物を対象に投与することで直接実施してもよい。代案としては、生体内送達は、iRNAをコードして発現を誘導する、1つまたは複数のベクターを投与することで、間接的に実施してもよい。これらの代替案は、下でさらに考察される。

【0179】

一般に、（試験管内または生体内で）核酸分子を送達するあらゆる方法が、本発明のiRNAで使用するために適応させ得る（例えば、その内容全体を参照によって本明細書に援用する、Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144および国際公開第94/02595号パンフレットを参照されたい）。生体内送達では、iRNA分子を送達するために検討すべき要素としては、例えば、送達分子の生物学的安定性、非特異的効果の防止、および標的組織中の送達分子の蓄積が挙げられる。iRNAの非特異的効果は、例えば組織内への直接注射または移植または製剤を局所投与するなどの局所投与によって最小化し得る。治療部位への局所投与は、作用物質の局所濃度を最大化し、そうしなければ作用物質によって害を被り得る、または作用物質を分解し得る、全身組織の作用物質への曝露を限定し、iRNA分子のより低い総用量での投与を可能にする。いくつかの研究は、iRNAが局所的に投与された場合に、成功裏の遺伝子産物ノックダウンを示している。例えばカニクイザルにおける硝子体内注射による(Tolentino, MJ., et al (2004) Retina 24:132-138)、およびマウスにおける網膜下注射による(Reich, S.J., et al (2003) Mol. Vis. 9:210-216)、VEGF dsRNAの眼内送達は、どちらも加齢黄斑変性の実験モデルで新血管形成を防止することを示した。これに加えて、マウスにおけるdsRNAの直接腫瘍内注射は、腫瘍体積を低下させ(Pille, J., et al (2005) Mol. Ther. 11:267-274)、腫瘍を有するマウスの生存期間を延長し得た(Kim, W.J., et al (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S., et al (2007) Mol. Ther. 15:515-523)。RNA干渉は、直接注射によるCNSへの(Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602)、および鼻腔内投与による肺への(Howard, KA., et al (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) Nat. Med. 11:50-55)局所性送達の成功が示されている。疾患を治療するために、iRNAを全身的に投与するために、R

10

20

30

40

50

NAは修飾され、または代案としては薬物送達系を使用して送達され得て；どちらの方法も、生体内エンドーおよびエキソヌクレアーゼによるdsRNAの迅速な分解を防止するように作用する。RNAまたは薬学的担体の修飾はまた、標的組織へのiRNA組成物の標的化も可能にし得て、望ましくない非特異的効果が回避される。コレステロールなどの親油性基の化学的結合によってiRNA分子を修飾し、細胞内取り込みを高め分解を防止し得る。例えば親油性コレステロール部分に共役結合されたApoBに対抗するiRNAがマウスに全身注射され、肝臓および空腸の双方でapoB mRNAノックダウンがもたらされた(Soutschek, J., et al (2004) Nature 432:173-178)。iRNAのアプタマーへの共役結合は、前立腺がんのマウスモデルにおいて腫瘍増殖を抑制し、腫瘍退縮を媒介することが示されている。(McNamara, J.O., et al (2006) Nat. Biotechnol. 24:1005-1015)。代案の実施形態では、iRNAは、ナノ粒子、 dendリマー、ポリマー、リポソーム、またはカチオン性送達系などの薬物送達システムを使用して送達され得る。正に帯電したカチオン性送達系は、iRNA分子(負に帯電)の結合を容易にして、負に帯電した細胞膜における相互作用もまた高めて、細胞によるiRNAの効率的な取り込みを可能にする。カチオン性脂質、 dendリマー、またはポリマーは、iRNAに結合され、またはiRNAを包む小胞またはミセルを形成するように誘導され得る(例えばKim SH., et al (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116を参照されたい)。小胞またはミセルの形成は、全身投与した際にiRNAの分解をさらに防止する。カチオン性iRNA複合体を作成して投与する方法は、十分に当業者の能力の範囲内である(例えばその内容全体を参照によって本明細書に援用する、Sorensen, DR., et al (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) J. Hypertens. 25:197-205を参照されたい)。iRNAの全身性送達に有用な薬物送達系のいくつかの非限定的例としては、DOTAP(Sorensen, DR., et al (2003), 前出; Verma, UN., et al (2003), 前出)、オリゴフェクトアミン(Oligofectamine)、“solid nucleic acid lipid particles”(Zimmermann, TS., et al (2006) Nature 441:111-114)、カルジオリピン(Chien, PY., et al (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A., et al (2005) Int. J. Oncol. 26:1087-1091)、ポリエチレンイミン(Bonnet ME., et al (2008) Pharm. Res. 8月16日オンライン先行発表; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)ペプチド(Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487)、およびポリアミドアミン(Tomalia, DA., et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804)が挙げられる。いくつかの実施形態では、全身投与のために、iRNAはシクロデキストリンと複合体を形成する。iRNAおよびシクロデキストリンの投与方法および医薬組成物は、その内容全体を参照によって本明細書に援用する米国特許第7,427,605号明細書にある。

【0180】

A. 本発明のiRNAをコードするベクター

Serpinc1遺伝子標的化iRNAは、DNAまたはRNAベクターに挿入された転写単位から発現され得る(例えばCouture, A., et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al. 国際公開第00/22113号パンフレット; Conrad, 国際公開第00/22114号パンフレット; およびConrad, 米国特許第6,054,299号明細書を参照されたい)。発現は、

使用される特定のコンストラクトおよび標的組織または細胞型次第で、一過性（数時間から数週間程度）または持続性（数週間から数ヶ月以上）であり得る。これらの導入遺伝子は、組み込み型または非組み込み型ベクターであり得る、直鎖コンストラクト、環状プラスミド、またはウイルスベクターとして導入し得る。導入遺伝子はまた、それが染色体外プラスミドとして遺伝するのを可能にするよう構築し得る（Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292）。

【0181】

個々の iRNA 鎖または鎖群は、発現ベクター上のプロモータから転写され得る。2つの別個の鎖を発現させて、例えば dsRNA を生成させる場合、（例えば形質移入または感染によって）2つの別個の発現ベクターを標的細胞に同時導入し得る。代案としては、そのどちらも同一発現プラスミド上に位置するプロモータによって、dsRNA の個々の鎖を転写し得る。一実施形態では、dsRNA は、dsRNA がステムループ構造を有するように、リンカーポリヌクレオチド配列によって連結する逆位反復ポリヌクレオチドとして発現される。

【0182】

iRNA 発現ベクターは、一般に DNA プラスミドまたはウイルスベクターである。真核生物細胞に適合し、好ましくは脊椎動物細胞に適合する発現ベクターを使用して、本明細書に記載される iRNA 発現のための組換えコンストラクトを生成し得る。真核細胞発現ベクターは当該技術分野で周知であり、いくつかの商業的供給元から入手できる。典型的にこのようなベクターは、所望の核酸断片を挿入するための都合良い制限酵素認識部位を含有させて、提供される。iRNA 発現ベクターの送達は、静脈内または筋肉内投与などによる全身投与、患者から外植された標的細胞への投与とそれに続く患者への再導入、または所望の標的細胞に導入できるようにするあらゆる別の手段などであり得る。

【0183】

iRNA 発現プラスミドは、カチオン性脂質担体（例えばオリゴフェクトアミン）または非カチオン性脂質ベースの担体（例えば Trans it-TKO（商標））との複合体として、標的細胞に形質移入し得る。1週間以上の期間にわたって標的 RNA の異なる領域を標的化する、iRNA 媒介ノックダウンのための複数脂質形質移入もまた、本発明により検討される。ベクターの宿主細胞への成功裏の導入は、様々な既知の方法を使用してモニターし得る。例えば一過性形質移入は、緑色蛍光タンパク質（GFP）などの蛍光性マーカーなど、レポーターによって示し得る。生体外における細胞への安定した形質移入は、形質移入細胞に、ハイグロマイシン B 耐性などの特定環境要素（例えば抗生物質および薬剤）耐性を提供するマーカーを使用して、確実にし得る。

【0184】

本明細書に記載される方法および組成物と共に利用し得るウイルスベクターシステムとしては、（a）アデノウイルスベクター；（b）レンチウイルスベクター、モロニー Maus 白血病ウイルスなどをはじめとするが、これに限定されるものではないレトロウイルスベクター；（c）アデノ随伴ウイルスベクター；（d）単純ヘルペスウイルスベクター；（e）SV40 ベクター；（f）ポリオーマウイルスベクター；（g）乳頭腫ウイルスベクター；（h）ピコルナウイルスベクター；（i）例えばワクシニアウイルスベクターなどのオルソボックス、または例えばカナリア痘または鶏痘などのアピボックスなどのボックスウイルスベクター；および（j）ヘルパー依存性またはガットレスアデノウイルスが挙げられるが、これに限定されるものではない。複製欠陥ウイルスもまた、有利であり得る。異なるベクターは、細胞のゲノムに組み込まれ、または組み込まれない。コンストラクトは、所望ならば、形質移入のためのウイルス配列を含み得る。代案としては、コンストラクトは、例えば EPV および EBV ベクターなどのエピソーム複製ができるベクターに組み込まれ得る。iRNA の組換え発現のためのコンストラクトは、一般に、標的細胞中の iRNA 発現を確実にするための、例えばプロモータ、エンハンサーなどの調節因子を必要とする。ベクターおよびコンストラクトについて検討されるその他の態様は、以下にさらに詳しく記載する。

【0185】

iRNAを送達するのに有用なベクターは、所望の標的細胞または組織中のiRNAの発現に十分な調節因子（プロモータ、エンハンサーなど）を含む。調節因子は、構成的または調節／誘導性発現のいずれかを提供するように選択し得る。

【0186】

iRNAの発現は、例えば循環グルコースレベル、またはホルモンなどの特定の生理学的制御因子に感受性の誘導性制御配列を使用して、正確に調節し得る（Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24）。細胞または哺乳類におけるdsRNA発現の制御に適するこのような誘導性発現系としては、例えばエクジソン、エストロゲン、プロゲステロン、テトラサイクリン、二量体化の化学誘導物質、およびイソプロピル-β-D1-チオガラクトピラノシド（IPTG）による調節が挙げられる。当業者は、iRNA導入遺伝子の意図される用途に基づいて、適切な調節／プロモータ配列を選択できる。

【0187】

iRNAをコードする核酸配列を含有するウイルスベクターを使用し得る。例えばレトロウイルスベクターを使用し得る（Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)を参照されたい）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しいパッケージングと宿主細胞DNAへの組み込みに必要な成分を含有する。iRNAをコードする核酸配列は、患者への核酸の送達を容易にする、1つまたは複数のベクターにクローン化される。レトロウイルスベクターに関してより詳しくは、例えば化学療法により高い耐性を示す幹細胞を生成するために、mdr1遺伝子を造血幹細胞に送達するレトロウイルスベクターの使用を記載する、Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)にある。遺伝子療法におけるレトロウイルスベクターの使用を例証するその他の参考文献は、Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); およびGrossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)である。使用が検討されるレンチウイルスベクターとしては、例えば参照によって本明細書に援用する、米国特許第6,143,520号明細書；米国特許第5,665,557号明細書；および米国特許第5,981,276号明細書に記載されるHIVベースのベクターが挙げられる。

【0188】

アデノウイルスもまた、本発明のiRNAの送達で使用するために検討される。アデノウイルスは、例えば気道上皮に遺伝子を送達するために、特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは気道上皮に天然で感染して、軽症の疾患を引き起こす。アデノウイルスベースの送達系その他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染できる利点を有する。Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993)は、アデノウイルスベースの遺伝子療法のレビューを提示する。Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)は、遺伝子をアカゲザルの気道上皮に移入するための、アデノウイルスベクターの使用を実証した。遺伝子療法におけるアデノウイルスの使用のその他の事例は、Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); 国際公開第94/12649号パンフレット；およびWang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995)にある。本発明で取り上げるiRNAを発現するための適切なAVベクター、組換えAV

ベクターを構築する方法、およびベクターを標的細胞に送達する方法は、Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010に記載される。

【0189】

アデノ随伴ウイルス(AAV: Adeno-associated virus)ベクターもまた、本発明のiRNAを送達するために使用され得る(Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300(1993); 米国特許第5,436,146号明細書)。一実施形態では、iRNAは、例えば、U6またはH1 RNAプロモータ、またはサイトメガロウイルス(CMV)プロモータのいずれかを有する、組換えAAVベクターからの2つの別個の相補的一本鎖RNA分子として発現され得る。本発明で取り上げるdsRNAを発現するのに適切なAAVベクター、組換えAVベクターを構築する方法、およびベクターを標的細胞に送達する方法は、その開示全体を参照によって本明細書に援用する、Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61:3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70:520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63:3822-3826; 米国特許第5,252,479号明細書; 米国特許第5,139,941号明細書; 国際公開第94/13788号パンフレット; および国際公開第93/24641号パンフレットに記載される。

【0190】

本発明のiRNAを送達するのに好適な別のウイルスベクターは、例えば、修飾ウイルスアンカラ(MVA)またはNYVACなどの弱毒化ワクシニアなどのワクシニアウイルス、鶏痘またはカナリア痘などのアビボックスなどのボックスウイルスである。

【0191】

ウイルスベクターの親和性は、必要に応じて、その他のウイルスからの外被タンパク質またはその他の表面抗原でベクターをシュードタイピングすることで、または異なるウイルスからのカプシドタンパク質で置換することで、修飾し得る。例えば水疱性口内炎ウイルス(VSV: vesicular stomatitis virus)、狂犬病、エボラ、モコラなどからの表面タンパク質によって、レンチウイルスベクターをシュードタイピングし得る。AAVベクターは、ベクターを遺伝子操作して、異なるカプシドタンパク質血清型を発現させることで、異なる細胞を標的化するようにできる; 例えばその開示全体を参照によって本明細書に援用する、Rabinowitz J E et al. (2002), J. Virol 76:791-801を参照されたい。

【0192】

ベクターの医薬品は、許容される希釈剤中のベクターを含み得て、またはその中に遺伝子送達ビヒクルが包埋される徐放マトリックスを含み得る。代案としては、例えばレトロウイルスベクターなどの完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞から無傷で生成され得る場合、医薬品は遺伝子送達系を生成する1つまたは複数の細胞を含み得る。

【0193】

V. 発明の医薬組成物

本発明は、本発明のiRNAを含む医薬組成物および製剤もまた含む。一実施形態では、本発明で提供されるのは、本明細書に記載されるiRNAと、薬学的に許容できる担体とを含有する医薬組成物である。iRNAを含有する医薬組成物は、例えば出血障害などのSerpinc1遺伝子の発現または活性に関連する、疾患または障害を治療するのに有用である。このような医薬組成物は、送達様式に基づいて調合される。一実施例は、例えば静脈内(IV)送達による、非経口送達を通じた、全身投与のために調合される組成物である。別の例は、例えば連続ポンプ輸液などの脳内点滴による、脳実質内への直接送達のために調合される組成物である。本発明の医薬組成物は、Serpinc1遺伝子発現を阻害するのに十分な投与量で投与してもよい。一般に、本発明のiRNAの適切な用量は、1日あたり受容者の体重1キログラムあたり約0.001~約200.0ミリグラ

【 0 1 9 4 】

10

20

30

40

50

kg、約1～約20mg/mg、約1.5～約20mg/kgb、約2～約20mg/kg、約2.5～約20mg/kg、約3～約20mg/kg、約3.5～約20mg/kg、約4～約20mg/kg、約4.5～約20mg/kg、約5～約20mg/kg、約7.5～約20mg/kg、約10～約20mg/kg、または約15～約20mg/kgの用量で投与される。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0196】

例えばdsRNAは、約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、または約10mg/kgの用量で投与されてもよい。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

20

【0197】

別の実施形態では、dsRNAは、約0.5～約50mg/kg、約0.75～約50mg/kg、約1～約50mg/mg、約1.5～約50mg/kgb、約2～約50mg/kg、約2.5～約50mg/kg、約3～約50mg/kg、約3.5～約50mg/kg、約4～約50mg/kg、約4.5～約50mg/kg、約5～約50mg/kg、約7.5～約50mg/kg、約10～約50mg/kg、約15～約50mg/kg、約20～約50mg/kg、約20～約50mg/kg、約25～約50mg/kg、約25～約50mg/kg、約30～約50mg/kg、約35～約50mg/kg、約40～約50mg/kg、約45～約50mg/kg、約0.5～約45mg/kg、約0.75～約45mg/kg、約1～約45mg/mg、約1.5～約45mg/kgb、約2～約45mg/kg、約2.5～約45mg/kg、約3～約45mg/kg、約3.5～約45mg/kg、約4～約45mg/kg、約4.5～約45mg/kg、約5～約45mg/kg、約7.5～約45mg/kg、約10～約45mg/kg、約15～約45mg/kg、約20～約45mg/kg、約20～約45mg/kg、約25～約45mg/kg、約25～約45mg/kg、約30～約45mg/kg、約35～約45mg/kg、約40～約45mg/kg、約0.5～約40mg/kg、約0.75～約40mg/kg、約1～約40mg/mg、約1.5～約40mg/kgb、約2～約40mg/kg、約2.5～約40mg/kg、約3～約40mg/kg、約3.5～約40mg/kg、約4～約40mg/kg、約4.5～約40mg/kg、約5～約40mg/kg、約7.5～約40mg/kg、約10～約40mg/kg、約15～約40mg/kg、約20～約40mg/kg、約20～約40mg/kg、約25～約40mg/kg、約25～約40mg/kg、約30～約40mg/kg、約35～約40mg/kg、約0.5～約30mg/kg、約0.75～約30mg/kg、約1～約30mg/mg、約1.5～約30mg/kgb、約2～約30mg/kg、約2.5～約30mg/kg、約3～約30mg/kg、約3.5～約30mg/kg、約4～約30mg/kg、約4.5～約30mg/kg、約5～約30mg/kg、約7.5～約30mg/kg、約10～約30mg/kg、約15～約30mg/kg、約20～約30mg/kg、約20～約30mg/kg、約25～約30mg/kg、約0.5～約20mg/kg、約0.75～約20mg/kg、約1～約20mg/mg、約1.5～約20mg/kgb、約2～約20mg/kg、約2.5～約20mg/kg、約3～約20mg/kg

30

40

50

g、約3.5～約20mg/kg、約4～約20mg/kg、約4.5～約20mg/kg、約5～約20mg/kg、約7.5～約20mg/kg、約10～約20mg/kg、または約15～約20mg/kgの用量で投与される。一実施形態では、dsRNAは、約10mg/kg～約30mg/kgの用量で投与される。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0198】

例えば、対象には、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または約50mg/kgなどの治療量のiRNAを投与し得る。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

20

【0199】

医薬組成物は、毎日1回投与し得て、またはiRNAは、一日を通して適切な間隔で、2、3回以上の部分用量として投与し得て、または持続注入または放出制御製剤を通じた送達さえも使用して、投与し得る。その場合、各部分用量に含有されるiRNAは、1日あたり総用量を達成するために、対応してより少量でなくてはならない。投薬単位はまた、例えば数日間にわたってiRNAの徐放を提供する、従来型の徐放性製剤を使用して、数日間にわたる送達のために配合し得る。徐放性製剤は当該技術分野で周知であり、特に、本発明の作用物質で使用し得る、特定部位への作用物質送達のために有用である。この実施形態では、投薬単位は、相当する複数の1日量を含有する。

30

【0200】

別の実施形態では、医薬組成物の単回投与は、引き続く用量が、3、4、または5日間以下の間隔で、または1、2、3、または4週間以下の間隔で投与されるように、長期にわたり得る。本発明のいくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物の単回投与は、週1回投与される。本発明の別の実施形態では、本発明の医薬組成物の単回投与は、月2回投与される。

【0201】

当業者は、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の総体的な健康および／または年齢、および存在するその他の疾患をはじめとするが、これに限定されるものではない、特定の要因が、対象を効果的に治療するのに要求される用量およびタイミングに影響し得ることを理解するであろう。さらに治療有効量の組成物による対象の治療は、単回治療または一連の治療を含み得る。本発明に包含される個々のiRNAの有効投与量および生体内半減期は、本明細書の他の箇所で記載されるように、従来の手順を使用して、または適切な動物モデルを使用した生体内試験に基づいて、推定し得る。

40

【0202】

マウス遺伝学における進歩は、Serpinc1発現低下から利益を受ける出血障害などの、様々なヒト疾患研究のためのいくつかのマウスモデルを作り出した。このようなモデルは、iRNAの生体内試験のために、ならびに治療有効用量を判定するために、使用

50

し得る。例えば、Bolliger, et al. (2010) Thromb Haemost 103:1233-1238、Bi L, et al. (1995) Nat Genet 10:119-21、Lin et al. (1997) Blood 90:3962-6、Kundu et al. (1998) Blood 92:168-74、Wang et al. (1997) Proc Natl Acad Sci U S A 94:11563-6、および Jin, et al. (2004) Blood 104:1733に記載されるものなどの凝固因子遺伝子ノックアウトを有するマウスのような、血友病Aマウスモデルおよび血友病(Hemophilia) Bマウスモデルなどの適切なマウスモデルが当該技術分野で公知である。

【0203】

本発明の医薬組成物は、局所性または全身性の治療が所望されるかどうかに応じて、そして治療領域次第で、いくつかの方法で投与し得る。投与は、局所（例えば経皮パッチによる）、例えばネブライザーをはじめとする、粉末または煙霧剤の吸入または吹送による経肺；気管内、鼻腔内、経表皮および経皮、経口または非経口であってもよい。非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または点滴；例えば埋め込みデバイスを通じた真皮下投与；または例えば脳実質内、クモ膜下腔内または脳室内などの頭蓋内投与が挙げられる。iRNAは、肝臓（例えば肝臓の実質細胞）などの特定組織を標的化する様式で、送達され得る。局所投与のための医薬組成物および製剤としては、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐薬、スプレー、液体、および粉末が挙げられる。従来の薬学的担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが、必要でありまたは望ましい可能性もある。被覆コンドーム、手袋などもまた、有用であり得る。適切な局所製剤としては、その中で、本発明で取り上げるiRNAが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化作用物質、および界面活性剤などの局所送達作用物質との混和材料中にあるものが挙げられる。適切な脂質およびリポソームとしては、中性（例えばジオレオイルホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリスティルホスファチジルコリンDMPC、ジステアロリホスファチジル(distearoylphosphatidyl)コリン)、陰性（例えばジミリスティルホスファチジルグリセロールDMPG）およびカチオン性（例えばジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAPおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA）が挙げられる。本発明で取り上げるiRNAは、リポソーム内にカプセル化されることができ、またはそれと、特にカチオン性リポソームと、複合体形成することができる。代案としては、iRNAは、脂質、特にカチオン性脂質と複合体形成することができる。適切な脂肪酸およびエステルとしては、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはC₁~C₂₀アルキルエステル（例えばイソプロピルミリスチン酸IPM）、モノグリセリド、ジグリセリド、または薬学的に許容可能なその塩）が挙げられるが、これに限定されるものではない。局所製剤は、参照によって本明細書に援用する、米国特許第6,747,014号明細書に詳述される。

【0204】

A. 膜様分子アセンブリーを含んでなるiRNA製剤

本発明の組成物および方法で使用されるiRNAは、例えばリポソームまたはミセルなどの膜様分子アセンブリー内の送達のために調合し得る。本明細書の用法では、「リポソーム」という用語は、例えば1つの二重層または複数の二重層などの、少なくとも1つの二重層に配列された両親媒性脂質から構成される小胞を指す。リポソームは、親油性材料と水性内部から形成される膜を有する、単層のまたは多重膜小胞を含む。水性部分は、iRNA組成物を含有する。親油性材料は、水性内部を水性外部から隔離し、水性外部は、典型的にiRNA組成物を含まないが、場合によっては含んでもよい。リポソームは、活性成分の作用部位への移行と送達のために有用である。リポソーム膜は生体膜と構造的に

10

20

30

40

50

類似するので、リポソームを組織に適用すると、リポソーム性二重層は細胞膜の二重層と融合する。リポソームと細胞の融合が進行するにつれて、iRNAを含む内部水性内容物が細胞内に送達され、そこではiRNAが標的RNAに特異的に結合し得て、RNAiを媒介し得る。場合によっては、リポソームもまた特異的に標的化され、例えばiRNAを特定の細胞型に誘導する。

【0205】

RNAi剤を含有するリポソームは、多様な方法によって調製し得る。一例では、リポソームの脂質成分は、脂質成分なしでミセルが形成されるように、洗剤に溶解される。例えば脂質成分は、両親媒性カチオン性脂質または脂質複合体であり得る。洗剤は、高い臨界ミセル濃度を有し得て、非イオン性であってもよい。例示的な洗剤としては、コール酸、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸、およびラウロイルサルコシンが挙げられる。次にRNAi剤調製物は、脂質成分を含むミセルに添加される。脂質上のカチオン基はRNAi剤と相互作用して、RNAi剤周囲で凝縮してリポソームを形成する。凝縮後、例えば透析によって洗剤を除去し、RNAi剤のリポソーム調製物を得る。

【0206】

必要ならば、例えば凝縮を助ける担体化合物を、制御された添加によって縮合反応中に添加し得る。例えば担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えばスペルミンまたはスペルミジン）であり得る。pHもまた調節して、凝縮を支援し得る。

【0207】

送達ビヒクルの構造的構成要素としてポリヌクレオチド／カチオン性脂質複合体を組み込む、安定したポリヌクレオチド送達ビヒクルを生成する方法は、例えばその内容全体を参照によって本明細書に援用する、国際公開第96/37194号パンフレットにさらに記載される。リポソーム形成は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; 米国特許第4,897,355号明細書; 米国特許第5,171,678号明細書; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; および Fukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984に記載される例示的な方法の1つまたは複数の態様も含み得る。送達ビヒクルとして使用される適切なサイズの脂質凝集体を調製する一般に使用される技術としては、超音波処理、および凍結解凍と押出の組み合わせが挙げられる（例えばMayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986を参照されたい）。一貫して小型（50~200nm）で比較的均一な凝集体が所望される場合は、顕微溶液化を使用し得る（Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984）。これらの方法は、リポソーム内のRNAi剤調製品の詰め込みに容易に適応される。

【0208】

リポソームは、2つの大まかなクラスに分類される。カチオン性リポソームは、負に帯電した核酸分子と相互作用して安定した複合体を形成する、正に帯電したリポソームである。正に帯電した核酸／リポソーム複合体は、負に帯電した細胞表面に結合してエンドソーム内部に取り入れられる。エンドソーム内の酸性pHのためにリポソームは破裂して、それらの内容物を細胞質内へ放出する（Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985）。

【0209】

pH感受性または負電荷のリポソームは、核酸と複合体を形成せず、むしろそれを封入する。核酸と脂質は、どちらも同様の荷電を持つため、複合体形成ではなく反発が起きる。それでもなおいくらかの核酸は、これらのリポソームの水性内部に封入される。pH感

10

20

30

40

50

受性リポソームは、培養中で、チミジンキナーゼ遺伝子をコードする核酸を細胞単層に送達するのに使用されている。外来性遺伝子の発現は、標的細胞内で検出された (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。

【0210】

1つの主要タイプのリポソーム組成物は、天然由来ホスファチジルコリン以外に、リン脂質を含む。例えば中性リポソーム組成物は、ジミリス Toil ホスファチジルコリン (DMPC) またはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) から形成され得る。アニオン性リポソーム組成物が、一般にジミリス Toil ホスファチジルグリセロールから形成されるのに対し、アニオン性融合性リポソームは、主にジオレオイルスファチジルエタノールアミン (DOPE) から形成される。別のタイプのリポソーム組成物は、例えばダイズ PC、および卵 PC などのホスファチジルコリン (PC) から形成される。別のタイプは、リン脂質および／またはホスファチジルコリンおよび／またはコレステロールの混合物から形成される。

【0211】

試験管内および生体内でリポソームを細胞内に導入するその他の方法の例としては、米国特許第5,283,185号明細書；米国特許第5,171,678号明細書；国際公開第94/00569号パンフレット；国際公開第93/24640号パンフレット；国際公開第91/16024号パンフレット；Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994；Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993；Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992；Gershon, Biochem. 32:7143, 1993；および Strauss EMBO J. 11:417, 1992が挙げられる。

【0212】

非イオン性リポソーム系、特に非イオン性界面活性剤とコレステロールを含んでなる系が研究され、皮膚への薬剤送達におけるそれらの効用が判定されている。Novasome (商標) I (ジラウリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) および Novasome (商標) II (ジステアリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) を含んでなる非イオン性リポソーム製剤を使用して、マウス皮膚真皮内ヘシクロスポリンAが送達された。結果は、このような非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層内へのシクロスポリンAの沈着を容易にする上で、効果的であることを示唆した (Hu et al. S. T. P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

【0213】

リポソームはまた、「立体的安定化」リポソームを含み、この用語は本明細書の用法では、1つまたは複数の特殊化された脂質を含んでなるリポソームを指し、それは、リポソーム中に組み込まれると、このような特殊化された脂質を欠くリポソームと比較して、改善された循環寿命をもたらす。立体的安定化リポソームの例は、その中で、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、(A) モノシアログングリオシド G_{M1} などの1つまたは複数の糖脂質を含んでなり、または (B) ポリエチレングリコール (PEG) 部分などの1つまたは複数の親水性ポリマーで誘導体化されているものである。いかなる特定の理論による拘束も望まないが、当該技術分野では、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、または PEG 誘導体化脂質を含有する立体的安定化リポソームでは、これらの立体的安定化リポソームの循環半減期の改善は、細網内皮系 (RES: reticuloendothelial system) 細胞への取り込み低下に由来するものと考えられる (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42；Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

【0214】

1つまたは複数の糖脂質を含んでなる様々なリポソームが、当該技術分野で公知である。Papahadjopoulosら (Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987

10

20

30

40

50

、507, 64) は、モノシアログングリオシド G_{M1} 、ガラクトセレブロシドサルフェートおよびホスファチジルイノシトールが、リポソームの血液半減期を改善する能力を報告した。これらの知見は、Gabinzonら (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988, 85, 6949) によって詳しく説明された。どちらもAllenらに付与された、米国特許第4, 837, 028号明細書および国際公開第88/04924号パンフレットは、(1) スフィンゴミエリンと、(2) ガングリオシド G_{M1} またはガラクトセレブロシド硫酸エステルとを含んでなる、リポソームを開示する。米国特許第5, 543, 152号明細書 (Webbら) は、スフィンゴミエリンを含んでなるリポソームを開示する。1, 2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含んでなるリポソームは、国際公開第97/13499号パンフレット (Limら) で開示される。

10

【0215】

一実施形態では、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合できる利点を有する。非カチオン性リポソームは、原形質膜と効率的に融合できないが、生体内でマクロファージに取り込まれ、RNAi 剤をマクロファージに送達するのに使用され得る。

【0216】

リポソームのさらなる利点としては、以下が挙げられる。天然リン脂質から得られるリポソームは、生体適合性かつ生分解性であり；リポソームには、幅広い水および脂質可溶性薬剤を組み込み得て；リポソームは、それらの内部区画にカプセル化されたRNAi 剤を代謝および分解から保護し得る (Rosoff, "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製における重要な考察は、リポソームの脂質表面電荷、小胞サイズ、および水性容量である。

20

【0217】

正に帯電した合成カチオン性脂質であるN-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウム塩化物 (DOTMA) を使用して、小型リポソームを形成し得て、それは核酸と自然発生的に相互作用して、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合できる脂質-核酸複合体を形成し、RNAi 剤送達をもたらす (DOTMAおよびそのDNAとの併用の説明については、例えばFelgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84:7413-7417, 1987および米国特許第4, 897, 355号明細書を参照されたい)。

30

【0218】

ADOTMA類似体である1, 2-ビス (オレオイルオキシ) -3-(トリメチルアンモニウム) プロパン (DOTAP) をリン脂質と組み合わせて使用し、DNA錯化小胞を形成し得る。リポフェクチン (商標) Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) は、生体組織培養細胞に、高アニオン性核酸を送達するための効果的薬剤であり、それは負に帯電したポリヌクレオチドと自然発生的に相互作用して複合体を形成する、正に帯電したDOTMAリポソームを含んでなる。十分に正に帯電したリポソームを使用すれば、得られる複合体上の正味電荷もまた正である。このようにして調製された正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自然発生的に付着して、原形質膜と融合し、例えば組織培養細胞内に機能性核酸を効率的に送達する。別の市販のカチオン性脂質、1, 2-ビス (オレオイルオキシ) -3, 3-(トリメチルアンモニウム) プロパン (「DOTAP」) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) は、オレオイル部分がエーテル結合でなくエステルによって結合することで、DOTMAと異なる。

40

【0219】

その他の報告されたカチオン性脂質化合物としては、2つの脂質タイプの1つと共役するカルボキシスベルミンをはじめとする、多様な部分と共役しているものが挙げられ、例えば、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタオレオイルアミド (「DOGS」) (

50

Transfectam (商標), Promega, Madison, Wisconsin) およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシステルミルアミド (「DPPE S」) などの化合物が挙げられる (例えば米国特許第5, 171, 678号明細書を参照されたい)。

【0220】

別のカチオン性脂質複合体は、DOPEと組み合わせられてリポソームに調合されているコレステロール (「DC-Chol」) による、脂質の誘導体化を含む (Gao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179: 280, 1991を参照されたい)。ポリリジンとDOPEに共役させて生成されるリポポリリジンが、血清存在下における形質移入に効果的であると報告されている (Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065: 8, 1991)。特定の細胞系では、共役するカチオン性脂質を含有するこれらのリポソームは、DOTMA含有組成物より低い毒性を示し、より効率的な形質移入を提供すると言われている。その他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIEおよびDMRIE-HP (Vical, La Jolla, California)、およびリポフェクタミン (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland) が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に適したその他のカチオン性脂質は、国際公開第98/39359号パンフレットおよび国際公開第96/37194号パンフレットに記載される。

【0221】

リポソーム製剤は局所投与に特に適しており、リポソームはその他の製剤に優るいくつかの利点を示す。このような利点としては、投与薬剤の高い全身性吸収に関連した副作用の低下、所望標的における投与薬剤の蓄積増大、およびRNAi剤を皮膚内に投与する能力が挙げられる。いくつかの実装では、リポソームは、RNAi剤を表皮細胞に送達するのに、また例えば皮膚内などの皮膚組織内へのRNAi剤の浸透を高めるのに使用される。例えばリポソームは、局所的に塗布し得る。リポソームとして調合された治療薬の皮膚への局所送達、実証されている (例えば、Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, vol. 2, 405-410およびdu Plessis et al., Antiviral Research, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogertite, S., Biotechniques 6: 682-690, 1988; Itani, T. et al. Gene 56: 267-276, 1987; Nicolaou, C. et al. Meth. Enz. 149: 157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. Meth. Enz. 101: 512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7851-7855, 1987を参照されたい)。

【0222】

非イオン性リポソームシステム、特に非イオン性界面活性剤とコレステロールを含んでなるシステムが研究され、皮膚への薬剤送達におけるそれらの効用が判定されている。Novasome I (ジラウリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) およびNovasome II (ジステアリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) を含んでなる非イオン性リポソーム製剤が、マウスの皮膚の真皮内に薬剤を送達するのに使用された。RNAi剤を含むこのような製剤は、皮膚疾患を治療するのに有用である。

【0223】

iRNAを含むリポソームは、高度に変形可能にし得る。このような変形能は、リポソームの平均半径よりも小さい孔を通り抜けて、リポソームが浸透できるようにし得る。例えばトランスファーソームは、変形可能なリポソームの一種である。トランスファーソーム (Transferosomes) は、通常は界面活性剤である表面エッジ活性化剤を

、標準リポソーム組成物に添加して、作成し得る。RNAi剤を含むトランスファーソームは、皮膚内のケラチノサイトにRNAi剤を送達するために、例えば感染によって皮下送達し得る。無傷の哺乳類皮膚を越えるために、脂質小胞は、適切な経皮勾配の影響下で、それぞれ直径が50nm未満の一連の細孔を通過しなくてはならない。さらに脂質特性のために、これらのトランスファーソーム(Transfersomes)は、自己最適化し(例えば皮膚孔の形状に適應する)、自己修復し得て、断片化することなく頻繁にそれらの標的に到達し得て、自己装填することが多い。

【0224】

本発明を適用できるその他の製剤は、2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61/018,616号明細書；2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61/018,611号明細書；2008年3月26日に出願された米国仮特許出願第61/039,748号明細書；2008年4月22日に出願された米国仮特許出願第61/047,087号明細書、および2008年5月8日に出願された米国仮特許出願第61/051,528号明細書に記載される。2007年10月3日に出願されたPCT出願PCT/US2007/080331号明細書もまた、本発明を適用できる製剤を記載する。

【0225】

トランスファーソームはなおも別のタイプのリポソームであり、薬物送達ビヒクルのための魅力的な候補である、高度に変形可能な脂質凝集体である。トランスファーソームは、非常に高度に変形可能であるために、小滴よりも小さい孔を通じて容易に浸透できる脂肪滴と説明され得る。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適應でき、例えばそれらは自己最適化し(皮膚孔形状に適應する)、自己修復し、しばしば断片化することなくそれらの標的に到達し、自己装填することが多い。トランスファーソームを作成するために、通常は界面活性剤である表面縁活性化剤を標準リポソーム組成物に添加することができる。トランスファーソームは、血清アルブミンを皮膚に送達するのに使用されている。血清アルブミンのトランスファーソーム媒介送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注射と同程度に、効果的であることが示されている。

【0226】

界面活性剤には、(マイクロエマルジョンをはじめとする)エマルジョンおよびリポソームなどの製剤における、幅広い応用がある。天然および合成双方の多数の異なる界面活性剤型の特性の分類および格付けの最も一般的な方法は、親水性/親油性バランス(HLB: hydrophilic/lipophile balance)の使用による。親水性基(「ヘッド」としてもまた知られている)の性質は、製剤中で使用される異なる界面活性剤を分類する、最も有用な手段を提供する(Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285)。

【0227】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、それは非イオン性界面活性剤に分類される。非イオン性界面活性剤には、医薬および美容製品における幅広い用途があり、広いpH値範囲にわたって使用できる。一般にそれらのHLB値は、それらの構造に応じて2~約18の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシ化エステルなどの非イオン性エステルが挙げられる。脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコールおよびエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーなどの非イオン性アルカノールアミドおよびエーテルもまた、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤クラスの最も良く見られる構成員である。

【0228】

界面活性剤分子が、水への溶解または分散時に負電荷を保有する場合、界面活性剤はアニオン性に分類される。アニオン性界面活性剤としては、石鹼などのカルボン酸塩、ラク

10

20

30

40

50

チル酸アシル、アミノ酸のアシルアミド、硫酸アルキルおよびエトキシ化硫酸アルキルなどの硫酸エステル、アルキルベンゼンスルホネートなどのスルホネート、イセチオン酸アシル、タウリン酸アシルおよびスルホコハク酸アシル、およびリン酸アシルが挙げられる。アニオン性界面活性剤クラスの最も重要な構成員は、硫酸アルキルおよび石鹸である。

【0229】

界面活性剤分子が、水への溶解または分散時に正電荷を保有する場合、界面活性剤はカチオン性に分類される。カチオン性界面活性剤としては、四級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが挙げられる。四級アンモニウム塩が、このクラスで最も良く使用される構成員である。

10

【0230】

界面活性剤分子が、陽性または陰性電荷のいずれかを有する能力を有する場合、界面活性剤は両性に分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタイン、およびリン脂質が挙げられる。

【0231】

医薬品、製剤中およびエマルション中の界面活性剤の使用については、概説されている (Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285)。

【0232】

本発明の方法で使用される iRNA はまた、ミセル製剤として提供し得る。「ミセル」は、その中で、分子の疎水性部分が全て内側を向き、親水性部分が周囲の水性相に接したままであるように、両親媒性分子が球状構造に配列される、特定タイプの分子アセンブリと、本明細書で定義される。環境が疎水性であれば、逆の配置が存在する。

20

【0233】

経皮膜を通じた送達に適した混合ミセル調合物は、siRNA 組成物、アルカリ金属 C₈~C₂₂ アルキル硫酸塩、およびミセル形成化合物の水溶液を混合して、調製してもよい。例示的なミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容可能な塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレアート、モノラウレート、ルリヂサ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシンとその薬学的に許容可能な塩、グリセリン、ポリグリセリン、リジン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテルおよびその類似体、ポリドカノールアルキルエーテルおよびその類似体、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、およびそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属アルキル硫酸塩の添加と同時に、またはその後に添加してもよい。混合ミセルは、成分を実質的にどのように混合しても形成するが、より小型のミセルを提供するためには、激しく混合される。

30

【0234】

一方法では、siRNA 組成物と、少なくともアルカリ金属アルキル硫酸塩とを含有する、第1のミセル組成物が調製される。次に第1のミセル組成物は、少なくとも3つのミセル形成化合物と混合されて、混合ミセル組成物が形成する。別の方法では、ミセル組成物は、siRNA 組成物、アルカリ金属アルキル硫酸塩、および少なくとも1つのミセル形成化合物を混合して調製され、激しい混合を伴う残りのミセル形成化合物の添加がそれに続く。

40

【0235】

フェノールおよび／またはm-クレゾールを混合ミセル組成物に添加して、調合物を安定化し、細菌増殖から保護してもよい。代案としては、ミセル形成成分と共に、フェノールおよび／またはm-クレゾールを添加してもよい。グリセリンなどの等張剤もまた、混合ミセル組成物形成後に添加してもよい。

【0236】

50

ミセル調合物を噴霧として送達するためには、調合物を煙霧剤計量分配装置に入れて、計量分配装置に噴霧剤を装填し得る。加圧下にある噴霧剤は、計量分配装置内で液体形態である。成分の比率は、水性相と噴霧剤相が1つになるように、すなわち1つの相になるように調節される。2つの相がある場合、例えば定量バルブを通じて内容物の一部を分散する前に、計量分配装置を振盪する必要がある。医薬品の分注用量は、定量バルブから精微噴霧で噴射される。

【0237】

噴霧剤としては、水素含有クロロフルオロカーボン、水素含有フルオロカーボン、ジメチルエーテル、およびジエチルエーテルが挙げられる。特定の実施形態では、HFA 134a (1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン) を使用してもよい。

10

【0238】

必須成分の特定濃度は、比較的簡単な実験法によって判定し得る。口腔を通じた吸収のためには、注射を通じた用量、または胃腸管を通じた投与の例えば少なくとも2倍または3倍に増大させることが、往々にして望ましい。

【0239】

B. 脂質粒子

例えば本発明のdsRNAなどのiRNAは、例えばLNPなどの脂質製剤中で完全にカプセル化して、例えばSPLP、pSPLP、SNALP、またはその他の核酸-脂質粒子を形成してもよい。

【0240】

20

本明細書の用法では、「SNALP」という用語は、SPLPをはじめとする、安定核酸-脂質粒子を指す。本明細書の用法では、「SPLP」という用語は、脂質小胞内にカプセル化されたプラスミドDNAを含んでなる核酸-脂質粒子を指す。SNALPおよびSPLPは、典型的に、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を妨げる脂質（例えばPEG脂質複合体）を含有する。SNALPおよびSPLPは、静脈内（i.v.）注射に続いて長期循環寿命を示し、遠位部位（例えば部位投与から物理的に離れた部位）に蓄積するので、全身的使用のために極めて有用である。SPLPとしては、国際公開第00/03683号パンフレットに記載のカプセル化縮合剤-核酸複合体を含む「pSPLP」が挙げられる。本発明の粒子は、典型的に約50nm～約150nm、より典型的に約60nm～約130nm、より典型的に約70nm～約110nm、最も典型的に約70nm～約90nmの平均径を有して、実質的に無毒である。これに加えて、本発明の核酸-脂質粒子中に存在する場合、核酸は、水溶液中でヌクレアーゼ分解耐性である。核酸-脂質粒子、およびそれらを調製する方法は、例えば米国特許第5,976,567号明細書；米国特許第5,981,501号明細書；米国特許第6,534,484号明細書；米国特許第6,586,410号明細書；米国特許第6,815,432号明細書；米国特許出願公開第2010/0324120号明細書；および国際公開第96/40964号パンフレットで開示される。

30

【0241】

一実施形態では脂質と薬剤の比率（質量/質量比）（例えば脂質対dsRNA比）は、約1:1～約50:1、約1:1～約25:1、約3:1～約15:1、約4:1～約10:1、約5:1～約9:1、または約6:1～約9:1の範囲である。上記に引用した範囲の中間にある範囲も、本発明の一部と考えられる。

40

【0242】

カチオン性脂質は、例えばN,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウム塩化物（DODAC）、N,N-ジステアイル-N,N-ジメチルアンモニウム臭化物（DDAB）、N-（1-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩化物（DOTAP）、N-（1-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウム塩化物（DOTMA）、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ）プロピルアミン（DODMA）、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLiDMA）、1,2-ジリノレニルオキシ-

50

N, N-ジメチルアミノプロパン (DL enDMA)、1, 2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DL in-C-DAP)、1, 2-ジリノレオキシ (Di l i n o l e y o x y)-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (DL in-DAC)、1, 2-ジリノレオキシ (Di l i n o l e y o x y)-3-モルホリノプロパン (DL in-MA)、1, 2-ジリノレオイル-3-ジメチルアミノプロパン (DL inDAP)、1, 2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DL in-S-DMA)、1-リノレオイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DL in-2-DMAP)、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DL in-TMA. Cl)、1, 2-ジリノレオイル-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DL in-TAP. Cl)、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン (DL in-MPZ)、または3-(N, N-ジリノレイルアミノ)-1, 2-プロパンジオール (DL inAP)、3-(N, N-ジオレイルアミノ)-1, 2-プロパンジオ (p r o p a n e d i o) (DOAP)、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N, N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DL in-EG-DMA)、1, 2-ジリノレニルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DL inDMA)、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1, 3]-ジオキソラン (DL in-K-DMA) またはそのアナログ、(3aR, 5s, 6aS)-N, N-ジメチル-2, 2-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1, 3]ジオキソール-5-アミン (ALN100)、(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンター6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタン酸 (MC3)、1, 1'-((2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチルアザンジイル)ジドデカン-2-オール (Tech G1)、またはその混合物であり得る。カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約20モル%~約50モル%または約40モル%を構成し得る。

【0243】

別の実施形態では、化合物2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソランを使用して、脂質-siRNAナノ粒子を作成し得る。2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソランの合成は、参照によって本明細書に援用する、2008年10月23日に出願された米国仮特許出願第61/107, 998号明細書に記載される。

【0244】

一実施形態では、脂質-siRNA粒子は、40%の2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン：10%のDSPC：40%のコレステロール：10%のPEG-C-DMG (モル百分率) を含み、粒度 63.0 ± 20 nmのおよびsiRNA/脂質比0.027である。

【0245】

イオン性/非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセリン (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセリン (DPPG)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボン酸 (DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノールアミン (DSPE)、16-O-モノメチルPE、16-O-ジメチルPE、18-1-transPE、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジエタノールアミン (SOPE)、コレステロール、またはその混合物をはじめとすることがで

きるが、これに限定されるものではない、アニオン性脂質または中性脂質とすることもできる。コレステロールが含まれる場合、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約5モル%～約90モル%、約10モル%、または約58モル%であり得る。

【0246】

粒子凝集を阻害する共役結合脂質は、例えば制限なしに、PEG-ジアシルグリセロール(DAG)、PEG-ジアルキルオキシプロピル(DAA)、PEG-リン脂質、PEG-セラミド(Cer)をはじめとする、ポリエチレングリコール(PEG)-脂質、またはその混合物であり得る。PEG-DAA複合体は、例えばPEG-ジラウリルオキシプロピル(Ci₂)、PEG-ジミリスチルオキシプロピル(Ci₄)、PEG-ジパルミチルオキシプロピル(Ci₆)、またはPEG-ジステアリルオキシプロピル(C₈)であり得る。粒子凝集を妨げる共役結合脂質は、粒子中に存在する総脂質の0モル%～約20モル%または約2モル%であり得る。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、核酸-脂質粒子は、例えば、粒子中に存在する総脂質の約10モル%～約60モル%または約48モル%のコレステロールをさらに含む。

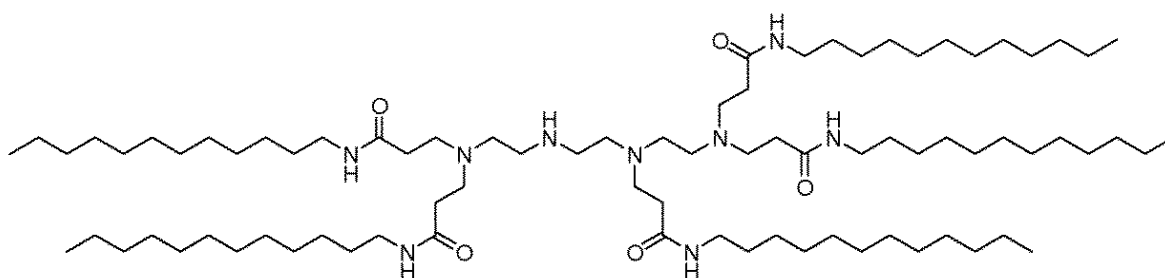
【0248】

一実施形態では、リポイドND98・4HCl(MW 1487)(その内容を参照によって本明細書に援用する、2008年3月26日に出願された米国特許出願第12/056,230号明細書を参照されたい)、コレステロール(Sigma-Aldrich)、およびPEG-セラミドC16(Avanti Polar Lipids)を使用して、脂質-dsRNAナノ粒子(すなわちLNP01粒子)を作成し得る。エタノール中の各原液は、次のように調製し得る:ND98、133mg/ml;コレステロール、25mg/ml;PEG-セラミドC16、100mg/ml。次にND98、コレステロール、およびPEG-セラミドC16の原液を例えば42:48:10のモル比で合わせ得る。合わせた脂質溶液は、最終エタノール濃度が約35～45%で最終酢酸ナトリウム濃度が約100～300mMになるように、(例えばpH5の酢酸ナトリウム中で)水性dsRNAと混合し得る。脂質-dsRNAナノ粒子は、典型的に、混合に際して自然発生的に形成する。所望の粒度分布次第で、結果として生じるナノ粒子混合物は、例えばLipex Extruder(Northern Lipids, Inc)などのサーモバレル押出機を使用して、ポリカーボネートメンブラン(例えば100nmカットオフ)を通じて押出し得る。場合によっては、押出ステップは省き得る。エタノール除去および同時緩衝液交換は、例えば透析または接線流濾過によって達成し得る。緩衝液は、例えば約pH6.9、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、または約pH7.4など、約pH7のリン酸緩衝食塩水(PBS:phosphate buffered saline)で交換し得る。

20

30

【化16】



40

ND98イソマー-I

式1

【0249】

LNP01製剤は、例えば参照によって本明細書に援用する、国際公開第2008/042973号パンフレットに記載される。

50

【0250】

追加的な例示的脂質dsRNA製剤は、表1に記載される。

【0251】

【表1-1】

表1

	イオン化可能/カチオン性脂質	カチオン性脂質/ 非カチオン性脂質/ コレステロール/PEG-脂質抱合体 脂質:siRNA 比
SNALP-1	1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジ メチルアミノプロパン (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/ コレステロール/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質:siRNA 約 7:1

10

【0252】

【表 1 - 2】

2-XTC	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DPPC/コレステロール /PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質:siRNA 約 7:1	
LNP05	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約 6:1	
LNP06	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約 11:1	10
LNP07	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約 6:1	
LNP08	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約 11:1	20
LNP09	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1	
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン (ALN100)	ALN100/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1	
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)ブタノアート (MC3)	MC-3/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1	30
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチルアザンジール)ジドデカン-2-オール (Tech G1)	Tech G1/DSPC/コレステロール /PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1	
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 33:1	40
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質:siRNA: 11:1	

【表 1－3】

LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/ GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質:siRNA: 11:1	10
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1	
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1	
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 12:1	
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂質:siRNA: 8:1	20
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1	
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DS G 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1	
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1	

DSPC:ジステアロイルホスファチジルコリン

DPPC:ジパルミトイルホスファチジルコリン

PEG-DMG:PEG-ジジミリストイル(didymyristoyl)グリセロール(C14-PEG、またはPEG-C14)(平均分子量2000のPEG)

PEG-DSG:PEG-ジスチリルグリセロール(C18-PEG、またはPEG-C18)(平均分子量2000のPEG)

PEG-cDMA:PEG-カルバモイル-1,2-ジミリスチルオキシプロピルアミン(平均分子量2000のPEG)

【0254】

SNALP(1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA))を含んでなる製剤は、参照によって本明細書に援用する、2009年4月15日に出願された、国際公開第2009/127060号パンフレットに記載される。

【0255】

XTCを含んでなる製剤は、例えば、参照によって本明細書に援用する、2009年1月29日に出願された米国仮出願第61/148,366号明細書；2009年3月2日に出願された米国仮出願第61/156,851号明細書；2009年6月10日に出願された米国仮出願第号明細書；2009年7月24日に出願された米国仮出願第61/228,373号明細書；2009年9月3日に出願された米国仮出願第61/239,686号明細書、および2010年1月29日に出願された国際出願第PCT/US2010/022614号明細書に記載される。

【0256】

MC3を含んでなる製剤は、例えばその内容全体を参照によって本明細書に援用する、

2010年6月10日に出願された、米国特許出願公開第2010/0324120号明細書に記載される。

【0257】

ALNY-100含有製剤は、例えば参照によって本明細書に援用する、2009年1月10日に出願された、国際出願PCT/US第09/63933号明細書に記載される。

【0258】

C12-200含有製剤は、参照によって本明細書に援用する、2009年5月5日に出願された米国仮特許出願第61/175,770号明細書、および2010年5月5日に出願された国際出願PCT/US10/33777号明細書に記載される。

10

【0259】

イオン性／カチオン性脂質の合成

例えば本発明の核酸－脂質粒子で使用されるカチオン性脂質などの化合物のいずれもが、実施例でより詳細に記載される方法をはじめとする、既知の有機合成技術によって調製され得る。特に断りのない限り、全ての置換基は、以下に定義するとおりである。

【0260】

「アルキル」は、1～24個の炭素原子を含有する、直鎖または分枝、非環式または環式、飽和脂肪族炭化水素を意味する。代表的飽和直鎖アルキルとしては、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシルなどが挙げられ；他方、飽和分枝アルキルとしては、イソプロピル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、イソペンチルなどが挙げられる。代表的飽和環式アルキルとしては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどが挙げられ；他方、不飽和環式アルキルとしては、シクロペンテニルおよびシクロヘキセニルなどが挙げられる。

20

【0261】

アルケニルは、隣接する炭素原子間に少なくとも1つの二重結合を含有する、上で定義されるようなアルキルを意味する。アルケニルには、cisおよびtransの双方の異性体が含まれる。代表的な直鎖および分枝アルケニルとしては、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニルなどが挙げられる。

30

【0262】

「アルキニル」は、隣接する炭素間に少なくとも1つの三重結合をさらに含有する、上で定義されるようなあらゆるアルキルまたはアルケニルを意味する。代表的な直鎖および分枝アルキニルとしては、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1-ブチニルなどが挙げられる。

【0263】

「アシル」は、以下に定義するとおり、炭素が結合点でオキシ基によって置換される、あらゆるアルキル、アルケニル、またはアルキニルを意味する。例えば-C(=O)アルキル、-C(=O)アルケニル、および-C(=O)アルキニルが、アシル基である。

【0264】

40

「複素環」は、下の複素環のいずれかがベンゼン環に融合する二環をはじめとする、窒素、酸素、およびイオウから独立して選択される1または2個のヘテロ原子を含有する、飽和、不飽和、または芳香族のいずれかの5～7員環単環、または7～10員環二環、複素環を意味し、窒素およびイオウヘテロ原子は任意選択で酸化されていることができ、窒素ヘテロ原子は任意選択で四級化され得る。複素環は、あらゆるヘテロ原子または炭素原子を介して付着し得る。複素環としては、以下に定義されるヘテロアリールが挙げられる。複素環としては、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル(piperidiny l)、ピペリジニル(piperizyny l)、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロプルーイミジニル、テトラヒドロチオフエ

50

ニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニルなどが挙げられる。

【0265】

「置換されていていなくてもよいアルキル」、「置換されていていなくてもよいアルケニル」、「置換されていていなくてもよいアルキニル」、「置換されていていなくてもよいアシル」、および「置換されていていなくてもよい複素環」という用語は、置換される場合、少なくとも1つの水素原子が置換基で置換されていることを意味する。オキソ置換基(=O)の場合、2つの水素原子が置き換えられる。この点において、置換基としては、オキソ、ハロゲン、複素環、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}^x$ 、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 、および $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ が挙げられ、 n は0、1または2であり、 R^x および R^y は同一であるかまたは異なり、独立して水素、アルキルまたは複素環であり、前記アルキルおよび複素環置換基のそれぞれは、1つまたは複数のオキソ、ハロゲン、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、アルキル、 $-\text{OR}^x$ 、複素環、 $-\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{C}(=\text{O})\text{R}^y$ 、 $-\text{NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$ 、 $-\text{SO}_n\text{R}^x$ 、および $-\text{SO}_n\text{NR}^x\text{R}^y$ によってさらに置換され得る。

10

【0266】

「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、およびヨードを意味する。

【0267】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、保護基の使用を要し得る。保護基の手順は、当業者に良く知られている(例えばProtective Groups in Organic Synthesis, Green, T. W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999を参照されたい)。簡単に述べると、本発明の文脈では、保護基は、官能基の望まれない反応性を低下させまたは排除する、あらゆる基である。保護基は官能基に付加されて、特定の反応中にその反応性をマスクし、次に除去されて元の官能基を曝露し得る。いくつかの実施形態では、「アルコール保護基」が使用される。「アルコール保護基」は、アルコール官能基の望まれない反応性を低下させまたは排除する、あらゆる基である。保護基は、当該技術分野で周知の技術を使用して、付加して除去し得る。

20

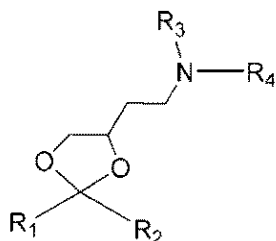
30

【0268】

式Aの合成

いくつかの実施形態では、本発明の核酸脂質粒子は、式A、

【化17】



40

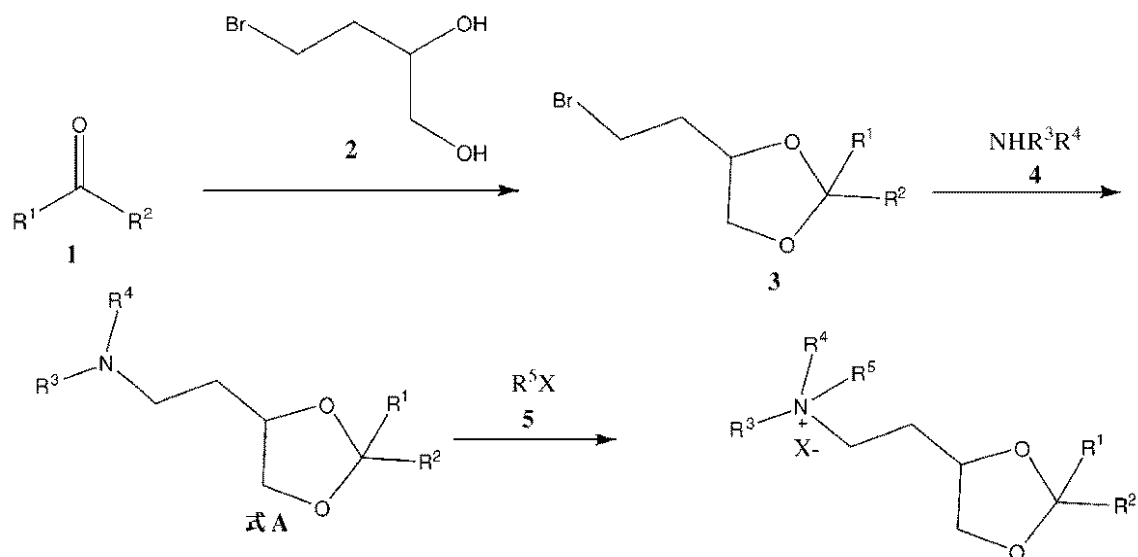
(式中、 $\text{R}1$ および $\text{R}2$ は、独立してそれぞれ置換されていていなくてもよい、アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、 $\text{R}3$ および $\text{R}4$ は、独立して低級アルキルであり、または $\text{R}3$ および $\text{R}4$ は、一緒になって置換されていていなくてもよい複素環を形成し得る)のカチオン性脂質を使用して調合される。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、XTC(2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン)である。一般に、上の式Aの脂質は、特に断りのない限り全ての置換基が上で定義されるとおりである、以下の反応スキーム1または2によって作成され得る。

【0269】

50

【化 1 8】

スキーム 1



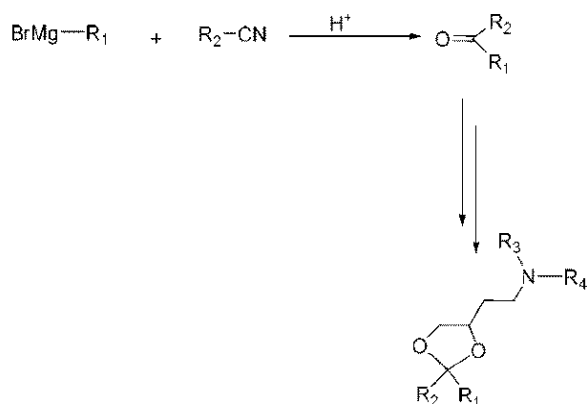
R_1 および R_2 が独立して、それぞれ置換されていていなくてもよい、アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、 R_3 および R_4 が独立して低級アルキルであり、または R_3 および R_4 が一緒になって、置換されていていなくてもよい複素環を形成し得る、脂質 A は、スキーム 1 に従って調製され得る。ケトン 1 および臭化物 2 は購入され、または当業者に知られている方法に従って調製され得る。1 と 2 の反応は、ケタール 3 をもたらす。ケタール 3 をアミン 4 で処理して、式 A の脂質を得る。式 A の脂質は、式 5 (式中、X は、ハロゲン、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩などから選択されるアニオン対イオンである) の有機塩によって、対応するアンモニウム塩に変換し得る。

20

【0 2 7 0】

【化 1 9】

スキーム 2



代案としては、ケトン 1 出発原料は、スキーム 2 に従って調製され得る。グリニャール試薬 6 およびシアン化物 7 は購入され、または当業者に知られている方法に従って調製され得る。6 と 7 の反応は、ケトン 1 をもたらす。ケトン 1 の対応する式 A の脂質への変換は、スキーム 1 に記載されるとおりである。

【0 2 7 1】

MC 3 の合成

D L i n - M - C 3 - D M A (すなわち (6 Z, 9 Z, 28 Z, 31 Z) - ヘプタトリ

50

アコンター 6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタン酸)の調製は、次のとおりであった。ジクロロメタン (5 mL) 中の (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンター 6, 9, 28, 31-テトラエン-19-オール (0.53 g)、4-N, N-ジメチルアミノ酪酸塩酸塩 (0.51 g)、4-N, N-ジメチルアミノピリジン (0.61 g)、および 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.53 g) 溶液を室温で一晩攪拌した。溶液を希塩酸で、続いて希水性炭酸水素ナトリウムで洗浄した。無水硫酸マグネシウム上で有機画分を乾燥させ、濾過して、回転蒸発器上で溶媒を除去した。1~5%のメタノール/ジクロロメタン溶出勾配を使用して、残留物をシリカゲルカラム (20 g) に通過させた。精製産物を含む画分を合わせて溶媒を除去し、無色の油 (0.54 g) を得た。

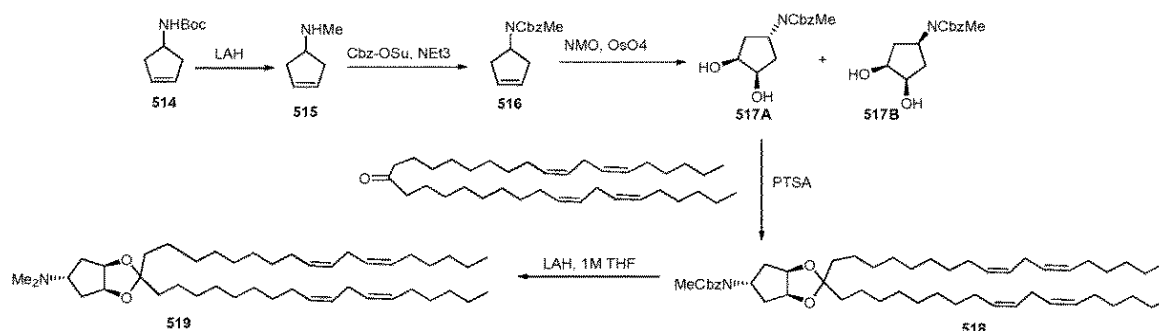
10

【0272】

ALNY-100の合成

以下のスキーム 3 を使用して、ケタール 519 [ALNY-100] の合成を実施した。

【化20】



20

【0273】

515の合成

ニ頸 RBF (1 L) 内の攪拌される 200 mL の無水 THF 中の LiAlH₄ (3.74 g、0.09852 モル) 懸濁液に、70 mL の THF 中の 514 (10 g、0.04926 モル) の溶液を 0 °C において窒素雰囲気下で緩慢に添加した。添加完了後、反応混合物を室温に加熱し、次に加熱して 4 時間還流した、反応の進捗は、TLC によってモニターした。反応完了 (TLC による) 後、混合物を 0 °C に冷却し、飽和 Na₂SO₄ 溶液の注意深い添加によってクエンチした。反応混合物を室温で 4 時間攪拌し、濾過した。残留物を THF で良く洗浄した。濾液および洗浄液を混合し、400 mL のジオキサンおよび 26 mL の濃 HCl で希釈して、室温で 20 分間攪拌した。揮発度 (volatilities) を真空下で揮散して、515 の塩酸塩を白色固体として得た。収量：7.12 g。¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) : δ = 9.34 (broad, 2H), 5.68 (s, 2H), 3.74 (m, 1H), 2.66–2.60 (m, 2H), 2.50–2.45 (m, 5H)。

30

【0274】

516の合成

250 mL ニ頸 RBF 内の 100 mL の乾燥 DCM 中の化合物 515 の攪拌される溶液に、NEt₃ (37.2 mL、0.2669 モル) を添加して、窒素雰囲気下で 0 °C に冷却した。50 mL の乾燥 DCM 中の N-(ベンジルオキシカルボニルオキシ)-スクシンイミド (20 g、0.08007 モル) の緩慢な添加後、反応混合物が室温に暖まるまで放置した。反応完了後 (TLC による 2~3 時間)、混合物を 1 N の HCl 溶液 (1 × 100 mL) および飽和 NaHCO₃ 溶液 (1 × 50 mL) で連続的に洗浄した。次に無水 Na₂SO₄ 上で有機層を乾燥し、溶媒を蒸発させて粗製物を得て、それをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、516 を粘着性塊として得た。収量：11 g (89%)。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) : δ = 7.36–7.27

40

50

(m, 5H), 5.69 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.96 (br., 1H)
2.74 (s, 3H), 2.60 (m, 2H), 2.30–2.25 (m, 2H). LC-MS
[M+H]⁺ = 232.3 (96.94%).

【0275】

517Aおよび517Bの合成

室温において、500mL一頸RBF内で、シクロペンテン516 (5g、0.02164mol)を220mLアセトンと水(10:1)の溶液中に溶解し、それにN-メチルモルホリン-N-オキシド(7.6g、0.06492mol)を添加し、tert-ブタノール中の4.2mLの7.6%OsO₄(0.275g、0.00108mol)溶液がそれに続いた。反応完了後(約3時間)、固体Na₂SO₃の添加によって混合物をクエンチし、得られた混合物を室温で1.5時間攪拌した。反応混合物をDCM(300mL)で希釈して、水(2×100mL)で洗浄し、飽和NaHCO₃(1×50mL)溶液、水(1×30mL)、最後に鹹水(1×50mL)が続いた。有機相を無水Na₂SO₄上で乾燥させて、真空中で溶媒を除去した。粗製物のシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製からジアステレオマー混合物を得て、それを予備HPLCによって分離した。収量: -6g粗製

【0276】

517A-ピーク-1(白色固体)、5.13g(96%)。1H-NMR(DMSO, 400MHz): δ = 7.39–7.31 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.78–4.73 (m, 1H), 4.48–4.47 (d, 2H), 3.94–3.93 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.72–1.67 (m, 4H)。LC-MS-[M+H]⁺ = 266.3, [M+NH₄]⁺ = 283.5存在, HPLC-97.86%。立体化学はX線によって確認された。

【0277】

518の合成

化合物505の合成について記載されるものと類似の手順を使用して、化合物518を無色の油として得た(1.2g、41%)。1H-NMR(CDCl₃, 400MHz): δ = 7.35–7.33 (m, 4H), 7.30–7.27 (m, 1H), 5.37–5.27 (m, 8H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.58–4.57 (m, 2H), 2.78–2.74 (m, 7H), 2.06–2.00 (m, 8H), 1.96–1.91 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.37–1.25 (br m, 36H), 0.87 (m, 6H)。HPLC-98.65%。

【0278】

化合物519の合成の基本手順

ヘキサン(15mL)中の化合物518(1eq)溶液をTHF中のLAH(1M, 2eq)氷冷溶液に、滴下して添加した。添加完了後、混合物を40℃で0.5時間加熱し、次に氷浴上で再度冷却した。混合物を飽和水性Na₂SO₄によって注意深く加水分解し、次にセライトを通して濾過して油に濃縮した。カラムクロマトグラフィーから、純粋な519を無色の油として得た(1.3g、68%)。13C-NMR = 130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 22.6, 14.1; エレクトロスプレー-MS(+ve): C₄₄H₈₀NO₂ (M+H)⁺の分子量、計算値654.6、測定値654.6。

【0279】

標準法または押出のない方法のいずれかによって調製された製剤は、同様の様式で特性解析し得る。例えば製剤は、典型的に外観検査によって特徴付けられる。それらは凝集体または沈降物を含まない、白みがあった半透明溶液であるべきである。脂質-ナノ粒子の粒度および粒度分布は、例えばMalvern Zetasizer Nano ZS (

10

20

30

40

50

Malvern, USA) を使用して、光散乱によって測定し得る。粒度は、40~100 nmなど、約20~300 nmであるべきである。粒度分布は、単峰型分布であるべきである。製剤ならびに封入画分中の総dsRNA濃度は、色素排除アッセイを使用して推定された。調合されたdsRNAのサンプルを例えば0.5% Triton-X100などの配合破壊性界面活性剤の存在または不在下で、Ribogreen (Molecular Probes) などのRNA結合色素と共にインキュベートし得る。製剤中の総dsRNAは、標準曲線と比較して、界面活性剤含有サンプルからのシグナルによって判定し得る。封入画分は、総dsRNA含量から、「遊離」dsRNA含量(界面活性剤不在下のシグナルにより測定される)を減じて求められる。封入dsRNA百分率は、典型的に>85%である。SNALP製剤では、粒度は、少なくとも30 nm、少なくとも40 nm、少なくとも50 nm、少なくとも60 nm、少なくとも70 nm、少なくとも80 nm、少なくとも90 nm、少なくとも100 nm、少なくとも110 nm、および少なくとも120 nmである。適切な範囲は、典型的に、少なくとも約50 nmから少なくとも約110 nm、少なくとも約60 nmから少なくとも約100 nm、または少なくとも約80 nmから少なくとも約90 nmである。

【0280】

経口投与のための組成物および製剤としては、粉末または顆粒、微小粒子、ナノ微粒子、水または非水性媒体中の懸濁液または溶液、カプセル、ゲルカプセル、サッシェ剤、錠剤またはミニ錠剤が挙げられる。増粘剤、着香剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤またはバインダーが望ましい可能性がある。いくつかの実施形態では、経口製剤は、その中で本発明で取り上げるDsRNAが、1つまたは複数の浸透促進界面活性剤およびキレート化剤と併せて投与されるものである。適切な界面活性剤としては、脂肪酸および／またはエステルまたはそれらの塩、胆汁酸および／またはそれらの塩が挙げられる。適切な胆汁酸／塩としては、ケノデオキシコール酸(CDCA: chenodeoxycholic acid) およびウルソデオキシケノデオキシコール酸(UDCA: ursodeoxycholic acid)、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸、グリコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロー24, 25-ジヒドロフシジン酸ナトリウム、およびグリコジヒドロフシジン酸ナトリウムが挙げられる。適切な脂肪酸としては、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはモノグリセリド、ジグリセリド、または薬学的に許容可能なその塩(例えばナトリウム)が挙げられる。いくつかの実施形態では、例えば胆汁酸／塩と組み合わされた脂肪酸／塩などの浸透促進剤の組み合わせが使用される。1つの例示的組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、およびUDCAのナトリウム塩である。浸透促進剤としては、さらにポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる。本発明で取り上げるDsRNAは、噴霧乾燥粒子をはじめとする顆粒形態で、経口的に送達されてもよく、または複合体化してマイクロまたはナノ粒子を形成してもよい。DsRNA複合化剤としては、ポリアミノ酸；ポリイミン；ポリアクリレート；アクリル酸ポリアルキル、ポリオキセタン、ポリアルキルシアノアクリル酸；カチオン化ゼラチン、アルブミン、デンプン、アクリレート、ポリエチレングリコール(PEG) およびデンプン；ポリアルキルシアノアクリル酸；DEAE誘導体化ポリイミン、プルラン(pollulans)、セルロースおよびデンプンが挙げられる。適切な複合化剤としては、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスベルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレンP(TDAE)、ポリアミノスチレン(例えばp-アミノ)、ポリ(メチルシアノアクリル酸)、ポリ(エチルシアノアクリル酸)、ポリ(ブチルシアノアクリル酸)、ポリ(イソブチルシアノアクリル酸)、ポリ(イソヘキシルシナオアクリル酸(isohexylcynaoc

10

20

30

40

50

rylate))、DEAE-メタクリレート、DEAE-ヘキシルアクリレート、DEAE-アクリルアミド、DEAE-アルブミンおよびDEAE-デキストラン、ポリアクリル酸メチル、ポリヘキシルアクリレート、ポリ(D, L-乳酸)、ポリ(DL-乳酸-コ-グリコール酸(PLGA)、アルギン酸塩、およびポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。dsRNAの経口製剤およびそれらの調製は、そのそれぞれを参照によって本明細書に援用する、米国特許第6,887,906号明細書、米国特許出願公開第20030027780号明細書、および米国特許第6,747,014号明細書に詳細に記載される。

【0281】

非経口、脳実質内(脳内)、クモ膜下腔内、脳室内または肝臓内投与のための組成物および製剤は無菌水溶液を含むことができ、それはまた、緩衝液と、希釈剤と、浸透促進剤、担体化合物、およびその他の薬学的に許容可能な担体または賦形剤などをはじめとするが、これに限定されるものではないその他の適切な添加剤とを含有し得る。

【0282】

本発明の医薬組成物としては、溶液、エマルション、およびリポソーム含有製剤が挙げられるが、これに限定されるものではない。これらの組成物は、既製液体、自己乳化固体および自己乳化半固体をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様な成分から生成され得る。肝臓がんなどの肝臓の障害を治療する場合、特に好ましいのは、肝臓を標的とする製剤である。

【0283】

好都合には単位剤形で提示され得る本発明の医薬製剤は、製薬産業で周知の従来の技術に従って調製され得る。このような技術は、活性成分を薬学的担体または賦形剤に組み合わせるステップを含む。一般に、製剤は、活性成分を液体担体または超微粒子固体担体またはその双方と一様に密接に組み合わせ、次に、必要ならば生成物を整形することで調製される。

【0284】

本発明の組成物は、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐薬、および浣腸などであるが、これに限定されるものではない、多数の可能な剤形のいずれかに調合され得る。本発明の組成物は、また、水性、非水性または混合媒体中の懸濁液として調合され得る。水性懸濁液は、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールおよび／またはデキストランをはじめとする、懸濁液の粘度を増大させる物質をさらに含有し得る。懸濁液は、安定剤もまた含有し得る。

【0285】

C. 追加的な製剤

i. エマルション

本発明の組成物は、エマルションとして調製し調合し得る。エマルションは、典型的に、通常、直径が0.1 μmを超える小滴形態で、別の液体中に分散する1つの液体の不均一系である(例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volu

10

20

30

40

50

me 2, p. 335; Higuchi et al., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301を参照されたい)。エマルションは、密接に混合して互いに分散する、2つの不混和性液体相を含んでなる、二相性システムであることが多い。一般にエマルションは、油中水型(w/o)または水中油型(o/w)のいずれかであり得る。水性相がバルク油性相中に微細分散して、微小滴として分散される場合、得られた組成物は、油中水型(w/o)エマルションと称される。代案としては、油性相がバルク水性相中に微細分散して、微小滴として分散される場合、得られた組成物は、水中油型(o/w)エマルションと称される。エマルションは、分散相と、水性相および油性相いずれかの中の溶液として、またはそれ自体が別個の相として存在し得る、10
活性薬剤とに加えて、追加的な成分を含有し得る。乳化剤、安定剤、染料、および抗酸化物質などの医薬品賦形剤はまた、必要に応じてエマルション中に存在し得る。医薬品エマルションはまた、例えば油中水中油(o/w/o)および水中油中水型(w/o/w)エマルションなどの場合、2つを超える相を含んでなる複数エマルションであり得る。このような複合体製剤は、単純な二成分エマルションが提供しない、特定の利点を提供することが多い。その中でo/wエマルションの個々の油滴が小さな水滴を囲い込む複数エマルションは、w/o/wエマルションを構成する。同様に、水の小球中に封入されて、油性連続相内で安定化される油滴システムは、o/w/oエマルションを提供する。

【0286】

エマルションは、熱力学的安定性がわずかまたは皆無であることによって、特徴付けられる。頻繁に、エマルションの分散または不連続相は、外部または連続相内に良く分散し、乳化剤または製剤粘度の手段を通じて、この形態に保たれる。エマルション様式の軟膏基剤およびクリームの場合のように、エマルション相のいずれかが、半固体または固体であり得る。エマルションを安定化する別の手段は、エマルション相のいずれかに組み込まれ得る、乳化剤の使用を伴う。乳化剤は、広義に4つのカテゴリー分類され得る：合成界面活性剤、天然乳化剤、吸収基剤、および微細分散固体(例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, Pharmaceutical 30
Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199を参照されたい)。

【0287】

表面活性剤としてもまた知られている合成界面活性剤は、エマルション製剤において幅広い用途があり、文献で概説されている(例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, Pharmaceutical D 40
osage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, volume 1, p. 199を参照されたい)。界面活性剤は典型的に両親媒性であり、親水性および疎水性部分を含んでなる。親水性と疎水性の比率は、界面活性剤の親水性/親油性バランス(HLB)と称され、製剤の調製において界面活性剤を分類し選択する上での有益な手段である。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて、異なるクラスに分類され得る：非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性(例えばAn 50

sel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285を参照されたい)。

【0288】

エマルション製剤で使用される天然乳化剤としては、ラノリン、蜜蝋、リン脂質、レシチン、およびアカシアが挙げられる。無水ラノリンおよび親水性ペトロラタムなどの、水を吸い上げてw/oエマルションを形成し得るような親水特性を有する吸収基剤は、なおもそれらの半固体粘稠度を維持する。微細分散固体はまた、優れた乳化剤として、特に界面活性剤と組み合わせられて、粘稠な調製品中で使用されている。これらとしては、重金属水酸化物などの極性無機固体、ベントナイトなどの非膨張性粘土、アタパルガイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、ケイ酸アルミニウムのコロイドおよびケイ酸アルミニウムマグネシウムのコロイド、顔料、および炭素またはトリステアリン酸グリセリルなどの非極性固形分が挙げられる。

【0289】

多岐にわたる非乳化材料もまたエマルション製剤に含まれて、エマルションの特性に寄与する。これらとしては、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存料、および抗酸化剤が挙げられる (Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199)。

【0290】

親水性コロイドまたは親水コロイドとしては、多糖類 (例えばアカシア、寒天、アルギン酸、カラゲナン、グアーガム、カラヤガム、およびトラガカント)、セルロース誘導体 (例えばカルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース)、および合成ポリマー (例えばカルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー) などの天然ガムおよび合成ポリマーが挙げられる。これらは水中に分散しまたは水中で膨張して、分散相小滴周囲に強力な界面膜を形成することで、および外部相の粘度を増大させることで、エマルションを安定化するコロイド溶液を形成する。

【0291】

エマルションは、微生物の増殖を容易に支持し得る、炭水化物、タンパク質、ステロール、およびリン脂質などのいくつかの成分を含有することが多いので、これらの製剤には保存料が組み込まれることが多い。エマルション製剤に含まれる一般に使用される保存料としては、メチルパラベン、プロピルパラベン、四級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸が挙げられる。抗酸化剤もまた、一般にエマルション製剤に添加されて、製剤の劣化を防止する。使用される抗酸化剤は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシルエンなどのフリーラジカルスカベンジャー; またはアスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤; およびクエン酸、酒石酸、およびレシチンなどの抗酸化剤共力剤であり得る。

【0292】

皮膚、経口、および非経口経路を通じたエマルション製剤の適用と、それらを製造する方法については、文献で概説されている。(例えばAnsel's Pharmaceu

10

20

30

40

50

tical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199を参照されたい)。経口送達のためのエマルジョン製剤は、調合の容易さ、ならびに吸収および生物学的利用能の観点からの効率のために、非常に広く使用されている（例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199を参照されたい)。鉱物油ベースの緩下剤、油性ビタミン、および高脂肪栄養剤は、一般にo/wエマルジョンとして経口投与されている材料の一つである。

10

20

【0293】

ii. マイクロエマルジョン

本発明の一実施形態では、iRNAと核酸の組成物は、マイクロエマルジョンとして調合される。マイクロエマルジョンは、単一の光学的に等方で熱力学的に安定している溶液である、水、油、および両親媒性物質のシステムと定義され得る（例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245を参照されたい）。典型的に、マイクロエマルジョンは、最初に油を水性界面活性剤溶液に分散して、次に一般に中間鎖長のアルコールである、十分な量の第4の成分を添加し、透明なシステムを形成することで、調製されるシステムである。したがって、マイクロエマルジョンは、界面活性分子の界面膜によって安定化された、2つの不混和性液体の熱力学的に安定した等方的に透明な分散体として記述されている（Leung and Shah, Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215）。マイクロエマルジョンは、通常、油、水、界面活性剤、共界面活性剤、および電解質をはじめとする、3~5成分の組み合わせを通じて調製される。マイクロエマルジョンが、油中水型(w/o)または水中油型(o/w)であるかどうかは、使用される油および界面活性剤の特性と、界面活性剤分子の極性頭部および炭化水素尾部の構造および幾何学的充填とに左右される（Schott, Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271）。

30

40

【0294】

状態図を利用した現象学的アプローチは、広範に研究されており、マイクロエマルショ

50

ンの調合法に関する包括的知識が、当業者にもたらされている（例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245; Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335を参照されたい）。従来のエマルジョンと比較して、マイクロエマルジョンは、水不溶性薬剤を自然発生的に形成される熱力学的に安定した小滴の配合物に可溶化する利点を提供する。

【0295】

マイクロエマルジョンの調製で使用する界面活性剤としては、単独のまたは共界面活性剤と組み合わされた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート (ML310)、テトラグリセロールモノオレアート (MO310)、ヘキサグリセロールモノオレアート (PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレアート (PO500)、デカグリセロールモノカプレート (MCA750)、デカグリセロールモノオレエート (MO750)、デカグリセロールセキオレアート (sequioleate) (SO750)、デカグリセロールデカオレアート (DAO750) が挙げられるが、これに限定されるものではない。通常、エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノールなどの短鎖アルコールである共界面活性剤は、界面活性剤塗膜に浸透することにより界面流動性を増大させるのに役立ち、その結果、界面活性剤分子間に生じる隙間に起因する不規則塗膜を作り出す。しかしマイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用なしに調製され得、アルコール非含有自己乳化マイクロエマルジョン系は、当該技術分野で公知である。水性相は、典型的に、水、薬剤水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコール誘導体であり得るが、これに限定されるものではない。油相としては、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8~C12) モノ、ジ、およびトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化 (polyglycolized) グリセリド、飽和ポリグリコール化 (polyglycolized) C8-C10 グリセリド、植物油、およびシリコン油などの材料が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0296】

マイクロエマルジョンは、薬剤可溶化と薬剤吸収改善の観点から、特に興味深い。脂質ベースのマイクロエマルジョン (o/wおよびw/oの双方) が、ペプチドをはじめとする薬剤の経口バイオアベイラビリティを高めるために、提案されている（例えば米国特許第6,191,105号明細書；米国特許第7,063,860号明細書；米国特許第7,070,802号明細書；米国特許第7,157,099号明細書；Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390；Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205を参照されたい）。マイクロエマルジョンは、薬剤可溶化改善、酵素加水分解からの薬剤保護、界面活性剤が誘発する膜の流動性と透過度の変化に起因する予想される薬剤吸収増強、調製の容易さ、固体剤形に比した経口投与の容易さ、臨床効力改善、および毒性低下の利点をもたらす（例えば米国特許第6,191,105号明細書；米国特許第7,063,860号明細書；米国特許第7,070,802号明細書；米国特許第7,157,099号明細書；Constantinides et al., Pharmaceutical Research

， 1994， 11， 1385；Ho et al.， J. Pharm. Sci.， 1996， 85， 138－143を参照されたい）。マイクロエマルションは多くの場合、それらの成分を周囲温度で一緒に合わせた場合に、自然発生的に形成することができる。これは、熱不安定性薬剤、ペプチドまたはiRNAを調合する場合に、特に有利となり得る。マイクロエマルションは、美容および医薬用途の双方で、活性成分の経皮送達に効果的であった。本発明のマイクロエマルション組成物および製剤は、iRNAおよび核酸の胃腸管からの全身性吸収の増大を容易にし、ならびにiRNAおよび核酸の局所性細胞内取り込みを改善することが期待される。

【0297】

本発明のマイクロエマルションは、ソルビタンモノステアレート（Grill 3）、Labrasol、および浸透促進剤などの追加的な成分および添加剤もまた含有して、製剤の特性を改善し、本発明のiRNAおよび核酸の吸収を高め得る。本発明のマイクロエマルション中で使用される浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、および非キレート化非界面活性剤の5つの広義のカテゴリーの1つに属すると分類され得る（Lee et al.， Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems， 1991， p. 92）。これらの各クラスについては、上で論じた。

【0298】

i i i. 微粒子

本発明のRNA i剤は、例えば微粒子などの粒子に組み込まれてもよい。微粒子は、噴霧乾燥によって製造し得るが、それはまた、凍結乾燥、蒸発、流動床乾燥、真空乾燥、またはこれらの技術の組み合わせをはじめとする、その他の方法によって製造してもよい。

【0299】

i v. 浸透促進剤

一実施形態では、本発明は、様々な浸透促進剤を用いて、核酸、特にiRNAの動物皮膚への効率的な送達をもたらす。ほとんどの薬剤は、イオン化および非イオン化形態の双方で、溶液中に存在する。しかし通常、脂質可溶性または親油性薬剤のみが、細胞膜を容易に通過する。通過する膜が浸透促進剤で処理されれば、非親油性薬剤でさえも細胞膜を通過し得ることが発見されている。細胞膜横切る非親油性薬剤の拡散を助けるのに加えて、浸透促進剤はまた、親油性薬剤の透過性を高める。

【0300】

浸透促進剤は、5つの広義のカテゴリー、すなわち界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化作用物質、および非キレート化非界面活性剤の1つに属すると、分類され得る（例えばMalmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee et al.， Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems， 1991， p. 92を参照されたい）。前述の浸透促進剤の各クラスについては、以下でより詳しく説明される。

【0301】

界面活性剤（または「表面活性剤」）は、水溶液に溶解すると、溶液の表面張力、または水溶液と別の液体との界面張力を低下させて、粘膜を通じたiRNA吸収の改善をもたらす、化学物質である。胆汁塩と脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤としては、例えばラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンー9ーラウリルエーテル、およびポリオキシエチレンー20ーセチルエーテル（例えばMalmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee et al.， Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems， 1991， p. 92を参照されたい）；およびFC-43などのペルフルオロ化合物エマルション。Takahashi et al.， J. P

harm. Pharmacol., 1988, 40, 252) が挙げられる。

【0302】

浸透促進剤として作用する様々な脂肪酸およびそれらの誘導体としては、例えばオレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸（*n*-デカン酸）、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン（1-モノオレオイル-*rac*-グリセロール）、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、そのC₁~20アルキルエステル（例えばメチル、イソプロピル、および*t*-ブチル）、およびそのモノ-およびジ-グリセリド（すなわちオレアート、ラウレート、カプレート、ミリステート、パルミテート、ステアレート、リノレアートなど）が挙げられる。（例えばTouitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Harriri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654を参照されたい）。

【0303】

胆汁の生理学的役割としては、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が挙げられる（例えばMalmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935を参照されたい）。様々な天然胆汁酸塩、およびそれらの合成誘導体が、浸透促進剤として作用する。したがって「胆汁酸塩」という用語は、胆汁の天然成分のいずれかならびにそれらの合成誘導体のいずれかを含む。適切な胆汁酸塩としては、例えばコール酸（またはその薬学的に許容可能なナトリウム塩、コール酸ナトリウム）、デヒドロコール酸（デヒドロコール酸ナトリウム）、デオキシコール酸（デオキシコール酸ナトリウム）、グルコール酸（グルコール酸ナトリウム）、グリコール酸（グリココール酸ナトリウム）、グリコデオキシコール酸（グリコデオキシコール酸ナトリウム）、タウロコール酸（タウロコール酸ナトリウム）、タウロデオキシコール酸（タウロデオキシコール酸ナトリウム）、ケノデオキシコール酸（ケノデオキシコール酸ナトリウム）、ウルソデオキシコール酸（UDCA）、タウロ-24, 25-ジヒドロフシジン酸ナトリウム（STDHF: sodium tauro-24, 25-dihydrofusidate）、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、およびポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（POE）が挙げられる。（例えばMalmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583を参照されたい）。

10

20

30

40

50

）。

【0304】

本発明との関連で使用されるキレート化剤は、金属イオンと複合体を形成することによって、それを溶液から除去して、粘膜を通したiRNA吸収の改善をもたらす化合物と定義され得る。本発明における浸透促進剤としてのそれらの使用に関して、ほとんどのDNAヌクレアーゼは、触媒作用のために二価の金属イオンを要し、キレート化剤によって阻害されるので、キレート化作用物質は、デオキシリボヌクレアーゼ阻害物質の役割も果たすという追加的利点を有する(Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。適切なキレート化作用物質としては、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA: ethylenediaminetetraacetate)、クエン酸、サリチル酸塩(例えばサリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチル酸、およびホモバニレート(homovanilate))、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレスー9、およびβ-ジケトン(エナミン)のN-アミノアシル誘導体が挙げられるが、これに限定されるものではない。(例えばKatdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51を参照されたい)。

【0305】

本明細書の用法では、非キレート化非界面活性剤浸透促進化合物は、キレート化作用物質としてまたは界面活性剤として有意でない活性を実証するが、それでもなお消化器粘膜を通じてiRNAの吸収を高める化合物と定義し得る(例えばMuranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33を参照されたい)。このクラスの浸透促進剤としては、例えば不飽和環式尿素、1-アルキル-および1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); およびジクロフェナクナトリウム、インドメタシンおよびフェニルブタゾンなどの非ステロイド性抗炎症剤(Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)が挙げられる。

【0306】

細胞レベルのiRNA取り込みを高める作用物質もまた、本発明医薬およびその他の組成物に添加し得る。例えばリポフェクチンなどのカチオン性脂質(Junichiらに付与された米国特許第5,705,188号明細書)、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリリジンなどのポリカチオン性分子(Lolloらに付与された国際公開第97/30731号パンフレット)もまた、dsRNAの細胞内取り込みを高めることが知られている。市販される形質移入試薬の例としては、例えば特に、Lipofectamine(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、293fectin(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Cellfectin(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、DMRIE-C(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、FreeStyle(商標)MAX(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine(商標)2000 CD(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、RNAiMAX(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Oligof

ectamine (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Optifect (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2 Transfection Reagent (Roche; Grenzachstrasse, Switzerland)、DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Grenzacherstrasse, Switzerland)、またはFugene (Grenzacherstrasse, Switzerland)、Transfectam (登録商標) Reagent (Promega; Madison, WI)、TransFast (商標) Transfection Reagent (Promega; Madison, WI)、Tfx (商標) -20 Reagent (Promega; Madison, WI)、Tfx (商標) -50 Reagent (Promega; Madison, WI)、DreamFect (商標) (OZ Biosciences; Marseille, France)、EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France)、TransPass^a D1 Transfection Reagent (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA)、Lyovect (商標) / Lipogen (商標) (Invitrogen; San Diego, CA, USA)、PerFectin Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、NeuroPORTER Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER 2 Transfection reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、Cytofectin Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、BaculoPORTER Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、TroganPORTER (商標) transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、RiboFect (Bioline; Taunton, MA, USA)、PlasFect (Bioline; Taunton, MA, USA)、UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、またはHiFect (商標) (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA) が挙げられる。

【0307】

エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのグリコール；2-ピロールなどのピロール；アゾン；およびリモネンおよびメントンなどのテルペンをはじめとするその他の作用物質が、投与された核酸の浸透を高めるのに利用され得る。

【0308】

v. 担体

本発明の特定の組成物は、また配合中に担体化合物が組み込まれる。本明細書の用法では、「担体化合物」または「担体」は、不活性（すなわちそれ自体は生物学的活性を有しない）であるが、例えば生物学的に活性の核酸を分解し、またはその循環からの除去を促進することで、生物学的活性を有する核酸の生物学的利用能を低下させる、生体内過程によって、核酸と認識される、核酸、またはその類似体を指し得る。核酸および担体化合物の、典型的に後者の物質の過剰量での同時投与は、恐らく通常の変容体に対する担体化合物と核酸間の競合のために、肝臓、腎臓またはその他の循環外貯蔵所で回収される核酸量の実質的低下をもたらす得る。例えば肝臓組織内の部分的ホスホロチオエートdsRNAの回収は、それが、ポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジック (poly cy

t i d i c) または 4-アセトアミド-4'-イソチオシアノースチルベン-2, 2'-ジスルホン酸と同時に投与された場合に、低下し得る (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

【0309】

v i . 賦形剤

担体化合物とは対照的に、「薬学的担体」または「賦形剤」は、1つまたは複数の核酸を動物に送達するための、薬学的に許容可能な溶媒、懸濁剤またはあらゆるその他の薬理学的に不活性なビヒクルである。賦形剤は液体または固体であり得、核酸および所与の医薬組成物のその他の成分と組み合わせた際に、所望の嵩、粘稠度などを提供するように、計画される投与様式を念頭に置いて選択される。典型的な薬学的担体としては、結合剤（例えばα化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；増量剤（例えば乳糖およびその他の糖類、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレートまたはリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、滑石、シリカ、二酸化ケイ素のコロイド、ステアリン酸、ステアリン酸金属塩、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えばデンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど）；および湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウムなど）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0310】

核酸と有害反応しない、経口投与に適する、薬学的に許容可能な有機または無機賦形剤を使用して、本発明の組成物を調合し得る。適切な薬学的に許容可能な担体としては、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、滑石、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0311】

核酸の局所投与のための製剤は、無菌および非無菌水性溶液、アルコールなどの共通溶剤中の非水性溶液、または液体または固体油基剤中の核酸溶液を含み得る。溶液はまた、緩衝液、希釈剤、およびその他の適切な添加剤も含有し得る。核酸有害反応しない、経口投与に適する、薬学的に許容可能な有機または無機賦形剤を使用し得る。

【0312】

適切な薬学的に許容可能な賦形剤としては、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、滑石、ケイ酸、粘稠なパラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0313】

v i i . その他の成分

本発明の組成物は、医薬組成物中に従来法で見られるその他の補助剤成分を、技術分野で確立されたそれらの使用レベルで、さらに含有し得る。したがって例えば組成物は、例えば、止痒剤、渋味剤、局所麻酔薬または抗炎症剤などの追加的な適合性薬理的活性材料を含有することができ、または染料、着色剤、保存料、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤などの本発明の組成物の様々な剤形を物理的に調合する上で有用な追加的材料を含有し得る。しかしこのような材料は、添加した場合に、本発明の組成物の成分の生物学的活性に過度に干渉すべきでない。製剤は滅菌され得て、所望ならば、製剤の核酸と有害に相互作用しない、例えば、潤滑剤、保存料、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧圧力に影響を及ぼす塩、緩衝液、着色料、着色料および／または芳香族物質などなどの助剤と混合される。

【0314】

水性懸濁液は、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールおよび／

またはデキストランをはじめとする、懸濁液の粘度を増大させる物質を含有し得る。懸濁液は、安定剤もまた含有し得る。

【0315】

いくつかの実施形態では、本発明で取り上げる医薬組成物は、(a) 1つまたは複数の iRNA 化合物、および (b) 非 RNA i 機序によって機能し、出血障害の治療に有用な 1つまたは複数の薬剤を含む。このような薬剤の例としては、抗炎症剤、抗脂肪症薬、抗ウイルス、および／または抗線維症薬が挙げられるが、これに限定される (limited) ものではない。それに加えて、シリマリンなどの肝臓を保護するのに一般に使用されるその他の物質もまた、本明細書に記載される iRNA と併用し得る。肝臓疾患の治療に有用なその他の薬剤としては、テルビブジンと、エンテカビルと、テラプレビルおよび例えば Tungらに付与された米国特許出願公開第 2005/0148548 号明細書、米国特許出願公開第 2004/0167116 号明細書、および米国特許出願公開第 2003/0144217 号明細書；および Haleらに付与された米国特許出願公開第 2004/0127488 号明細書で開示されたものなどのプロテアーゼインヒビターが挙げられる。

10

【0316】

このような化合物の毒性および治療効果は、例えば LD50 (集団の 50% に致死性の用量) および ED50 (集団の 50% に治療的に有効な用量) を判定するための細胞培養物または実験動物中などで、標準薬学的手順によって判定し得る。毒性および治療効果間の用量比が治療指数であり、それは LD50/ED50 比として表し得る。高い治療指数を示す化合物が、好ましい。

20

【0317】

細胞培養アッセイと動物実験から得られるデータは、ヒトで使用するための投与範囲を策定するのに使用し得る。本発明で取り上げる組成物の投与量は、一般に、毒性がわずかまたは皆無である ED50 をはじめとする、循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明で取り上げる方法で使用されるあらゆる化合物について、最初に、治療有効用量を細胞培養アッセイから推定し得る。用量は、細胞培養中で判定される、IC50 (すなわち症状の最大半量阻害を達成する試験化合物濃度) をはじめとする、化合物の、または適切な場合には標的配列のポリペプチド産物の、循環血漿濃度範囲を達成する (例えばポリペプチド濃度の低下を達成する) ように、動物モデル中で策定されてもよい。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に判定し得る。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定し得る。

30

【0318】

本明細書で取り上げる iRNA は、上で考察されるそれらの投与に加えて、Serpinc1 発現によって媒介される病理過程の治療に効果的なその他の既知の作用物質と組み合わせ、投与し得る。いずれにしても処置を行う医師は、当該技術分野で公知のまたは本明細書に記載される、有効性の標準的手段を使用して観察される結果に基づいて、iRNA 投与の量およびタイミングを調節し得る。

【0319】

VI. 発明の方法

本発明はまた、本発明の iRNA、および／または本発明の iRNA を含有する組成物を使用して、細胞内で Serpinc1 発現を低下させおよび／または阻害する方法も提供する。その他の態様では、本発明は、細胞内で Serpinc1 発現を低下させおよび／または阻害するのに使用される、本発明の iRNA、および／または本発明の iRNA を含んでなる組成物を提供する。なおも別の態様では、細胞内で Serpinc1 発現を低下させおよび／または阻害する薬剤を製造 (manufacture) するための、本発明の iRNA、および／または本発明の iRNA を含んでなる組成物の使用が提供される。

40

【0320】

50

方法および使用は、細胞を例えば本発明の dsRNA などの iRNA に接触させて、細胞を Serpinc1 遺伝子の mRNA 転写物の分解を得るのに十分な時間保ち、それによって細胞内で Serpinc1 遺伝子発現を阻害するステップを含む。

【0321】

遺伝子発現の低下は、当該技術分野で公知のあらゆる方法によって評価し得る。例えば Serpinc1 発現の低下は、例えばノーザンブロット法や qRT-PCR などの当業者には通例の方法を使用して Serpinc1 の mRNA 発現レベルを測定することで、ウエスタンブロット法や免疫学的技術などの当業者には通例の方法を使用して Serpinc1 タンパク質レベルを測定することで、および／または細胞の血液凝固機序（または生体内状況における血液凝固それ自体）と関係する 1 つまたは複数の分子に影響を及ぼす Serpinc1 の生物学的活性を測定することで、判定してもよい。

10

【0322】

本発明の方法および使用では、細胞は、試験管内または生体内で接触させてもよく、すなわち細胞は対象内にあってもよい。

【0323】

本発明の方法を使用した治療に適する細胞は、Serpinc1 遺伝子を発現するあらゆる細胞であってもよい。本発明の方法および使用で使用するのに適した細胞は、例えば、霊長類細胞（ヒト細胞または例えばサル細胞またはチンパンジー細胞などの非ヒト霊長類細胞など）、非霊長類細胞（ウシ細胞、ブタ細胞、ラクダ細胞、ラマ細胞、ウマ細胞、ヤギ細胞、ウサギ細胞、ヒツジ細胞、ハムスター、モルモット細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、ラット細胞、マウス細胞、ライオン細胞、トラ細胞、クマ細胞、またはバッファロー細胞など）などの哺乳類細胞、鳥類細胞（例えばアヒル細胞またはガチョウ細胞）、またはクジラ細胞であってもよい。一実施形態では、細胞は、例えばヒト肝細胞などのヒト細胞である。

20

【0324】

Serpinc1 発現は、細胞中で、少なくとも約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、および 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または約 100% 阻害されてもよい。

30

【0325】

本発明の生体内における方法および使用は、iRNA を含有する組成物を対象に投与するステップを含んでもよく、iRNA は、治療される哺乳類の Serpinc1 遺伝子の RNA 転写物の少なくとも一部と相補的なヌクレオチド配列を含む。ヒトなどの哺乳類などの生物が治療される場合、組成物は、経口；腹腔内；または頭蓋内（例えば心室内、実質内、およびクモ膜下腔内）、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（煙霧剤）、経鼻、直腸をはじめとする非経口経路、および局所（バックルおよび舌下をはじめとする）投与をはじめとするが、これに限定されるものではない、当該技術分野で公知の任意の手段によって投与し得る。特定の実施形態では、組成物は、静脈輸液または注射によって投与される。

40

【0326】

いくつかの実施形態では、投与は、蓄積注射による。蓄積注射は、長期にわたり、一貫性を持って iRNA を放出してもよい。したがって蓄積注射は、例えば所望の Serpinc1 阻害、または治療的または予防的効果などの所望の効果をj得るのに、必要な投薬頻度を低下させてもよい。蓄積注射はまた、より一貫した血清濃度を提供してもよい。蓄積注射としては、皮下注射または筋肉内注射が挙げられる。好ましい実施形態では、蓄積注

50

射は皮下注射である。

【0327】

いくつかの実施形態では、投与は、ポンプによる。ポンプは、外部ポンプ、または外科的に埋め込まれたポンプであってもよい。特定の実施形態では、ポンプは、皮下移植浸透圧ポンプである。別の実施形態では、ポンプは、点滴ポンプである。点滴ポンプは、静脈内、皮下、動脈、または硬膜外輸液のために使用してもよい。好ましい実施形態では、点滴ポンプは、皮下点滴ポンプである。別の実施形態では、ポンプは、iRNAを肝臓に送達する、外科的に埋め込まれたポンプである。

【0328】

投与様式は、局所性または全身性の治療が所望されるかどうかに基づいて、および治療領域に基づいて、選択されてもよい。投与経路および部位は、標的化を向上させるように選択してもよい。

【0329】

一態様では、本発明はまた、例えばヒトなどの哺乳類中で、Serpincl1遺伝子発現を阻害する方法も提供する。本発明はまた、哺乳類中でSerpincl1遺伝子発現を阻害するのに使用される、例えば哺乳類細胞内でSerpincl1遺伝子を標的とするdsRNAなどのiRNAを含んでなる組成物も提供する。別の態様では、本発明は、哺乳類中でSerpincl1遺伝子発現を阻害する薬剤を製造するための、例えば哺乳類細胞内でSerpincl1遺伝子を標的とするdsRNAなどのiRNAの使用を提供する。

【0330】

方法および使用は、例えば哺乳類細胞内でSerpincl1遺伝子を標的とするdsRNAなどのiRNAを含んでなる組成物を、例えばヒトなどの哺乳類に投与して、Serpincl1遺伝子のmRNA転写物の分解を得て、それによって哺乳類中でSerpincl1遺伝子発現を阻害するに十分な時間にわたり、哺乳類を保つステップを含む。

【0331】

遺伝子発現の低下は、技術分野で公知のあらゆる方法によって、そして例えばqRT-PCRなどの本明細書に記載される方法によって、評価し得る。タンパク質産生の低下は、技術分野で公知のあらゆる方法によって、そして例えばELISAなどの本明細書に記載される方法によって、評価し得る。一実施形態では、穿刺肝臓生検サンプルが、Serpincl1遺伝子および／またはタンパク質発現の低下をモニターするための組織材料の役割を果たす。別の実施形態では、血液サンプルが、Serpincl1遺伝子および／またはタンパク質発現の低下をモニターするための組織材料の役割を果たす。別の実施形態では、Serpincl1遺伝子発現の阻害は、例えばSerpincl1経路中で遺伝子の発現および／または活性を判定することで、間接的にモニターされる（例えば図1を参照されたい）。例えばXa因子の活性をモニターして、Serpincl1遺伝子発現の阻害を判定してもよい。例えば血液または肝臓サンプルなどのサンプル中の抗トロンビンレベル、血餅形成、および／または内因性トロンビン生成能もまた、評価してもよい。適切なアッセイは、下の実施例セクションにさらに記載される。

【0332】

本発明は、例えば血友病などのSerpincl1発現低下から利益を受ける障害を有する対象を治療する方法をさらに提供する。本発明の治療法（および使用）は、Serpincl1遺伝子を標的にするiRNA、またはSerpincl1遺伝子を標的にするiRNAを含んでなる医薬組成物の治療有効量を、例えばヒトである対象に投与して、それによってSerpincl1発現低下から利益を受ける障害を有する対象を治療するステップを含む。

【0333】

一態様では、本発明は、Serpincl1発現低下から利益を受ける障害を有する対象中で、少なくとも1つの症状を予防する方法を提供する。方法は、例えば本発明のdsRNAなどのiRNAまたはベクターの治療有効量を対象に投与し、それによってSerpincl1発現低下から利益を受ける障害を有する対象中で、少なくとも1つの症状を予防

10

20

30

40

50

するステップを含む。例えば本発明は、例えば血友病などの *Serpinc1* 発現低下から利益を受ける障害に罹患している対象において、出血を予防する方法を提供する。

【0334】

別の態様では、本発明は、例えば *Serpinc1* 発現の低下および／または阻害から利益を受ける対象などの対象を治療するための、本発明の *iRNA* の治療有効量の使用を提供する。*iRNA* としては、*Serpinc1* 遺伝子を標的にする *iRNA*、または *Serpinc1* 遺伝子を標的にする *iRNA* を含んでなる医薬組成物が挙げられる。

【0335】

さらに別の態様では、本発明は、例えば *Serpinc1* 発現の低下および／または阻害から利益を受ける対象などの対象を治療するための薬剤の製造における、*Serpinc1* 遺伝子を標的にする本発明の *iRNA*、または *Serpinc1* 遺伝子を標的にする *iRNA* を含んでなる医薬組成物の使用を提供する。

10

【0336】

別の態様では、本発明は、例えば血友病のような出血障害などの *Serpinc1* 発現の低下および／または阻害から利益を受ける障害に罹患している対象において、少なくとも1つの症状を予防するための、例えば本発明の *dsRNA* である *iRNA* の使用を提供する。

【0337】

さらなる態様では、本発明は、例えば血友病のような出血障害などの *Serpinc1* 発現の低下および／または阻害から利益を受ける障害に罹患している対象において、少なくとも1つの症状を予防するための薬剤の製造における本発明の *iRNA* の使用を提供する。本発明の *iRNA* は、「裸の」または「遊離 *iRNA*」形態で投与してもよい。裸の *iRNA* は、医薬組成物不在で投与される。裸の *iRNA* は、適切な緩衝溶液中にあってよい。緩衝溶液は、酢酸エステル、クエン酸塩、プロタミン、炭酸、またはリン酸、またはそれらのあらゆる組み合わせを含んでなってもよい。一実施形態では、緩衝溶液は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) である。*iRNA* を含有する緩衝溶液の pH およびモル浸透圧濃度は、対象への投与に適するように調節し得る。

20

【0338】

代案としては、本発明の *iRNA* は、*dsRNA* リポソーム製剤などの医薬組成物として投与してもよい。

30

【0339】

Serpinc1 遺伝子発現の低下および／または阻害から利益を受ける対象は、例えば本明細書に記載される遺伝性出血障害または後天性出血障害などの出血障害を有する対象である。一実施形態では、遺伝性出血障害を有する対象は、例えば血友病 A、B、または C などの血友病に罹患している。一実施形態 (embodiment) では、例えば血友病などの遺伝性出血障害を有する対象は、インヒビター対象である。一実施形態では、インヒビター対象は、血友病 A を有する。別の実施形態 (embodiment) では、インヒビター対象は、血友病 B を有する。さらに別の実施形態では、インヒビター対象は、血友病 C を有する。*Serpinc1* 遺伝子発現の低下および／または阻害から利益を受ける対象の治療としては、治療処置 (例えば対象が出血している (特発性出血または外傷の結果としての出血) および血餅形成できないなどのオンデマンド)、および予防処置 (例えば対象は出血していないおよび／または外科手術を受ける予定である) が挙げられる。

40

【0340】

本発明は、例えばこれらの障害を治療するために目下用いられているもののような、既知の医薬品および／または既知の治療法などのその他の医薬品および／またはその他の治療法と組み合わせて、例えば出血障害を有する対象などの *Serpinc1* 発現の低下および／または阻害から利益を受ける対象を治療するための、*iRNA* またはその医薬組成物の使用のための方法および使用をさらに提供する。例えば特定の実施形態では、*Serpinc1* を標的にする *iRNA* は、本明細書の他の箇所記載されるように、例えば出血障害を治療するのに有用な薬剤と組み合わせて投与される。例えば出血障害を有する対

50

象などの *Serpinc1* 発現の低下 (reduction) から利益を受ける対象を治療するのに適した追加的な治療薬および治療法としては、新鮮凍結血漿 (FFP) ; 組換え FVIIa ; 組換え FIX ; FXI 濃縮物 ; 不活性化ウイルス、vWF 含有 FVII濃縮物 ; ステロイドまたは静脈内免疫グロブリン (IVIg) およびシクロホスファミドと共に、高用量の FVII または FIX を含んでもよい脱感作療法 ; 抗線維素溶解療法ありまたはなしの免疫抑制および FVII または FIX の点滴と併用される血漿交換療法 ; 免疫抑制療法 (例えばシクロホスファミド、プレドニゾン、および / または抗 CD20) ありまたはなしの免疫寛容誘導 (ITI) ; 酢酸デスモプレッシン [DDAVP] ; アミノカプロン酸およびトラネキサム酸などの抗線維素溶解薬 ; 活性化プロトロンビン複合体濃縮物 (PCC) ; 抗血友病薬 ; コルチコステロイド ; 免疫抑制剤 ; およびエストロゲンが挙げられる。iRNA および追加的な治療薬および / または治療法は、例えば非経口的に同時におよび / または同じ組み合わせで投与してもよく、または追加的な治療薬は、別の組成物の一部として、または別の時点で、および / または当該技術分野で公知のまたは本明細書に記載される、別の方法によって投与し得る。

10

【0341】

一実施形態では、方法および使用は、標的 *Serpinc1* 遺伝子の発現が、約 1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、または約 80 時間などにわたって低下するように、本明細書で取り上げる組成物を投与するステップを含む。一実施形態では、標的 *Serpinc1* 遺伝子の発現は、例えば約 1 週間、2 週間、3 週間、または約 4 週間以上など、少なくとも約 2、3、4、5、6、7 日間以上などの長期間にわたって低下する。

20

【0342】

好ましくは、本明細書で取り上げる方法、使用、および組成物で有用な iRNA は、標的 *Serpinc1* 遺伝子の (一次またはプロセシングされた) RNA を特異的に標的とする。これらの遺伝子の発現を阻害するための、iRNA を使用した組成物、使用、および方法は、本明細書に記載されるように調製して実施し得る。

【0343】

本発明の方法および使用に従った dsRNA の投与は、出血障害がある患者中で、このような疾患または障害の重症度、徴候、症状、および / またはマーカの低下をもたらしてもよい。「低下」とは、この文脈で、このようなレベルの統計的に有意な低下を意味する。低下は、例えば、少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または約 100 % であり得る。

30

【0344】

疾患の治療または予防の効能は、例えば、疾患進行、疾患寛解、症状重症度、出血発生頻度、疼痛減少、生活の質、治療効果維持に必要な薬剤用量、疾病マーカーレベルまたは治療されるまたは予防目標である、所与の疾患に適した、あらゆるその他の測定可能パラメータレベルを測定することで評価し得る。このようなパラメータのいずれか 1 つ、またはパラメータの任意の組み合わせを測定することで、治療または予防有効性をモニターすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば出血障害治療の効能は、例えばトロンビン : 抗トロンビンレベルを周期的にモニターすることで、評価してもよい。最初の読み取りと後からの読み取りの比較は、治療が効果的かどうかの指標を医師に提供する。このようなパラメータのいずれか 1 つ、またはパラメータの任意の組み合わせを測定することで、治療または予防有効性をモニターすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。*Serpinc1* を標的にする iRNA またはその医薬組成物投与との関連で、出血障害「に対して効果的」とは、臨床的に適切な様式での投与が、少なくとも統計学的に有意な割合の患者に、症状改善、治癒、疾患低減、延命、生活の質改善、または出血障害および関連原因の治療に精通している医者によって、好ましいと一般に認められているその他の効果などの有益な効果をもたらすことを意味する。

40

50

【0345】

病態の1つまたは複数のパラメータに統計的に有意な改善がある場合、または処置がなければ予期される症状悪化または発症の欠如によって、治療または予防効果は明らかである。一例として、疾患の測定可能なパラメータの少なくとも10%の、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%以上の好ましい変化は、効果的な治療を示唆し得る。所与のiRNA薬剤またはその薬剤の配合物の有効性はまた、当該技術分野で公知の所与の疾患のための実験動物モデルを使用して、判定し得る。実験動物モデルを使用する場合、治療の有効性は、マーカーまたは症状の統計的に有意な低下が観察される場合に、証明される。

【0346】

10

代案としては、効能は、一例としてChild-Pughスコア（時にChild-Turcotte-Pughスコアとも）などの、臨床的に認められた疾患重症度評価尺度に基づく、診断当業者による判定で、疾患重症度の低下によって評価され得る。例えば適切な尺度を使用して評価された、疾患重症度の低下をもたらすあらゆる好ましい変化は、本明細書に記載されるiRNAまたはiRNA調合物を使用した適切な治療を示す。

【0347】

対象には、約0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.4mg/kg、0.45mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.6mg/kg、0.65mg/kg、0.7mg/kg、0.75mg/kg、0.8mg/kg、0.85mg/kg、0.9mg/kg、0.95mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kgのdsRNA、2.6mg/kgのdsRNA、2.7mg/kgのdsRNA、2.8mg/kgのdsRNA、2.9mg/kgのdsRNA、3.0mg/kgのdsRNA、3.1mg/kgのdsRNA、3.2mg/kgのdsRNA、3.3mg/kgのdsRNA、3.4mg/kgのdsRNA、3.5mg/kgのdsRNA、3.6mg/kgのdsRNA、3.7mg/kgのdsRNA、3.8mg/kgのdsRNA、3.9mg/kgのdsRNA、4.0mg/kgのdsRNA、4.1mg/kgのdsRNA、4.2mg/kgのdsRNA、4.3mg/kgのdsRNA、4.4mg/kgのdsRNA、4.5mg/kgのdsRNA、4.6mg/kgのdsRNA、4.7mg/kgのdsRNA、4.8mg/kgのdsRNA、4.9mg/kgのdsRNA、5.0mg/kgのdsRNA、5.1mg/kgのdsRNA、5.2mg/kgのdsRNA、5.3mg/kgのdsRNA、5.4mg/kgのdsRNA、5.5mg/kgのdsRNA、5.6mg/kgのdsRNA、5.7mg/kgのdsRNA、5.8mg/kgのdsRNA、5.9mg/kgのdsRNA、6.0mg/kgのdsRNA、6.1mg/kgのdsRNA、6.2mg/kgのdsRNA、6.3mg/kgのdsRNA、6.4mg/kgのdsRNA、6.5mg/kgのdsRNA、6.6mg/kgのdsRNA、6.7mg/kgのdsRNA、6.8mg/kgのdsRNA、6.9mg/kgのdsRNA、7.0mg/kgのdsRNA、7.1mg/kgのdsRNA、7.2mg/kgのdsRNA、7.3mg/kgのdsRNA、7.4mg/kgのdsRNA、7.5mg/kgのdsRNA、7.6mg/kgのdsRNA、7.7mg/kgのdsRNA、7.8mg/kgのdsRNA、7.9mg/kgのdsRNA、8.0mg/kgのdsRNA、8.1mg/kgのdsRNA、8.2mg/kgのdsRNA、8.3mg/kgのdsRNA、8.4mg/kgのdsRNA、8.5mg/kgのdsRNA、8.6mg/kgのdsRNA、8.7mg/kgのdsRNA、8.8mg/kgのdsRNA、8.9mg/kgのdsRNA、9.0mg/kgのdsRNA、9.1mg/kg

20

30

40

50

g の d s R N A、9. 2 m g / k g の d s R N A、9. 3 m g / k g の d s R N A、9. 4 m g / k g の d s R N A、9. 5 m g / k g の d s R N A、9. 6 m g / k g の d s R N A、9. 7 m g / k g の d s R N A、9. 8 m g / k g の d s R N A、9. 9 m g / k g の d s R N A、9. 0 m g / k g の d s R N A、10 m g / k g の d s R N A、15 m g / k g の d s R N A、20 m g / k g の d s R N A、25 m g / k g の d s R N A、30 m g / k g の d s R N A、35 m g / k g の d s R N A、40 m g / k g の d s R N A、45 m g / k g の d s R N A、または約 50 m g / k g の d s R N A などの治療量の i R N A を投与し得る。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0348】

例えば本発明の組成物が、本明細書に記載される d s R N A と、脂質とを含んでなる特定の実施形態では、対象に、約 0. 01 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0. 01 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 0. 05 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0. 05 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 0. 1 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0. 1 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 0. 2 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0. 2 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 0. 3 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0. 3 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 0. 4 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0. 4 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 0. 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 1 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 1 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 1. 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 1. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 2 m g / k g ~ 約 2. 5 m g / k g、約 2 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 3 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 3 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 3. 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4. 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 4. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 5. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 6 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 6. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 7 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 7. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 8 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 8. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 9 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、または約 9. 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g などの治療量の i R N A を投与し得る。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0349】

例えば d s R N A は、約 0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1、1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2、2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、2. 6、2. 7、2. 8、2. 9、3、3. 1、3. 2、3. 3、3. 4、3. 5、3. 6、3. 7、3. 8、3. 9、4、4. 1、4. 2、4. 3、4. 4、4. 5、4. 6、4. 7、4. 8、4. 9、5、5. 1、5. 2、5. 3、5. 4、5. 5、5. 6、5. 7、5. 8、5. 9、6、6. 1、6. 2、6. 3、6. 4、6. 5、6. 6、6. 7、6. 8、6. 9、7、7. 1、7. 2、7. 3、7. 4、7. 5、7. 6、7. 7、7. 8、7. 9、8、8. 1、8. 2、8. 3、8. 4、8. 5、8. 6、8. 7、8. 8、8. 9、9、9. 1、9. 2、9. 3、9. 4、9. 5、9. 6、9. 7、9. 8、9. 9、または約 10 m g / k g の用量で投与されてもよい。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0350】

例えば本発明の組成物が、本明細書に記載される d s R N A と、N-アセチルガラクトサミンとを含んでなる別の実施形態では、対象に、約 0. 1 ~ 約 50 m g / k g、約 0. 25 ~ 約 50 m g / k g、約 0. 5 ~ 約 50 m g / k g、約 0. 75 ~ 約 50 m g / k g、約 1 ~ 約 50 m g / k g、約 1. 5 ~ 約 50 m g / k g、約 2 ~ 約 50 m g / k g、約 2. 5 ~ 約 50 m g / k g、約 3 ~ 約 50 m g / k g、約 3. 5 ~ 約 50 m g / k g、約 4 ~ 約 50 m g / k g、約 4. 5 ~ 約 50 m g / k g、約 5 ~ 約 50 m g / k g、約 7. 5 ~ 約 50 m g / k g、約 8 ~ 約 50 m g / k g、約 9 ~ 約 50 m g / k g、約 10 ~ 約 50 m g / k g、約 15 ~ 約 50 m g / k g、約 20 ~ 約 50 m g / k g、約 25 ~ 約 50 m g / k g、約 30 ~ 約 50 m g / k g、約 35 ~ 約 50 m g / k g、約 40 ~ 約 50 m g / k g、約 45 ~ 約 50 m g / k g、約 50 ~ 約 50 m g / k g、約 55 ~ 約 50 m g / k g、約 60 ~ 約 50 m g / k g、約 65 ~ 約 50 m g / k g、約 70 ~ 約 50 m g / k g、約 75 ~ 約 50 m g / k g、約 80 ~ 約 50 m g / k g、約 85 ~ 約 50 m g / k g、約 90 ~ 約 50 m g / k g、約 95 ~ 約 50 m g / k g、約 100 ~ 約 50 m g / k g、または約 50 m g / k g 以上の用量で投与されてもよい。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

5～約50mg/kg、約10～約50mg/kg、約15～約50mg/kg、約20～約50mg/kg、約20～約50mg/kg、約25～約50mg/kg、約25～約50mg/kg、約30～約50mg/kg、約35～約50mg/kg、約40～約50mg/kg、約45～約50mg/kg、約0.1～約45mg/kg、約0.25～約45mg/kg、約0.5～約45mg/kg、約0.75～約45mg/kg、約1～約45mg/kg、約1.5～約45mg/kg、約2～約45mg/kg、約2.5～約45mg/kg、約3～約45mg/kg、約3.5～約45mg/kg、約4～約45mg/kg、約4.5～約45mg/kg、約5～約45mg/kg、約7.5～約45mg/kg、約10～約45mg/kg、約15～約45mg/kg、約20～約45mg/kg、約20～約45mg/kg、約25～約45mg/kg、約25～約45mg/kg、約30～約45mg/kg、約35～約45mg/kg、約40～約45mg/kg、約0.1～約40mg/kg、約0.25～約40mg/kg、約0.5～約40mg/kg、約0.75～約40mg/kg、約1～約40mg/kg、約1.5～約40mg/kg、約2～約40mg/kg、約2.5～約40mg/kg、約3～約40mg/kg、約3.5～約40mg/kg、約4～約40mg/kg、約4.5～約40mg/kg、約5～約40mg/kg、約7.5～約40mg/kg、約10～約40mg/kg、約15～約40mg/kg、約20～約40mg/kg、約20～約40mg/kg、約25～約40mg/kg、約25～約40mg/kg、約30～約40mg/kg、約35～約40mg/kg、約0.1～約30mg/kg、約0.25～約30mg/kg、約0.5～約30mg/kg、約0.75～約30mg/kg、約1～約30mg/kg、約1.5～約30mg/kg、約2～約30mg/kg、約2.5～約30mg/kg、約3～約30mg/kg、約3.5～約30mg/kg、約4～約30mg/kg、約4.5～約30mg/kg、約5～約30mg/kg、約7.5～約30mg/kg、約10～約30mg/kg、約15～約30mg/kg、約20～約30mg/kg、約20～約30mg/kg、約25～約30mg/kg、約25～約30mg/kg、約30～約30mg/kg、約0.1～約20mg/kg、約0.25～約20mg/kg、約0.5～約20mg/kg、約0.75～約20mg/kg、約1～約20mg/kg、約1.5～約20mg/kg、約2～約20mg/kg、約2.5～約20mg/kg、約3～約20mg/kg、約3.5～約20mg/kg、約4～約20mg/kg、約4.5～約20mg/kg、約5～約20mg/kg、約7.5～約20mg/kg、約10～約20mg/kg、または約15～約20mg/kgの用量などの治療量のiRNAを投与し得る。一実施形態では、本発明の組成物が本明細書に記載のdsRNAおよびN-アセチルガラクトサミンを含む場合、対象には、治療量の約10～約30mg/kgのdsRNAが投与され得る。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0351】

例えば、対象には、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、

47、48、49、または約50mg/kgなどの治療量のiRNAを投与し得る。列挙された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0352】

iRNAは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、および21、22、23、24、または約25分間などにわたる静脈輸液によって投与し得る。投与は、例えば1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月以上などにわたり、毎週、隔週（すなわち2週毎）で、定期的に繰り返してもよい。最初の治療計画の後に、治療は、より低い頻度で行い得る。例えば3ヶ月にわたる毎週または隔週の投与後、6ヶ月または1年以上にわたり月1回の投与を反復し得る。

【0353】

一実施形態では、本発明は、約0.5mg/kg～約5mg/kg、または約1mg/kg～約3mg/kgの累積週間用量で、化合物AD-57213を前記対象に皮下投与することで、例えば血友病などの出血障害に罹患している対象を治療する方法を提供する。

【0354】

一実施形態では、方法は、約0.5mg/kgの累積週間用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約0.5mg/kgとして、0.5mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の実施形態では、方法は、隔週1mg/kgとして、0.5mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

【0355】

別の実施形態では、方法は、約1.5mg/kgの累積週間用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約1.5mg/kgとして、1.5mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の実施形態では、方法は、隔週3mg/kgとして、1.5mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

【0356】

別の実施形態では、方法は、約2mg/kgの累積週間用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約2mg/kgとして、2mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の実施形態では、方法は、隔週4mg/kgとして、2mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

【0357】

なおも別の実施形態では、方法は、約3mg/kgの累積週間用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約3mg/kgとして、3mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の実施形態では、方法は、隔週6mg/kgとして、3mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

【0358】

別の実施形態では、本発明は、約0.5mg/kg～約5mg/kgまたは約1mg/kg～約3mg/kgの累積週間用量で化合物AD-57213を対象に皮下投与することで、対象において、例えば血友病などの出血障害の少なくとも1つの症状を予防する方法を提供する。

【0359】

一実施形態では、方法は、約0.5mg/kgの累積週間用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約0.5mg/kgとして、0.5mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の実施形態では、方法は、隔週1mg/kgとして、0.5mg/kgの累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

【0360】

別の実施形態では、方法は、約 1.5 mg/kg の累積週用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約 1.5 mg/kg として、 1.5 mg/kg の累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の一実施形態では、方法は、隔週 3 mg/kg として、 1.5 mg/kg の累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

【0361】

別の実施形態では、方法は、約 2 mg/kg の累積週用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約 2 mg/kg として、 2 mg/kg の累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の一実施形態では、方法は、隔週 4 mg/kg として、 2 mg/kg の累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

10

【0362】

なおも別の実施形態では、方法は、約 3 mg/kg の累積週用量を対象に皮下投与するステップを含んでもよい。例えば一実施形態では、方法は、毎週約 3 mg/kg として、 3 mg/kg の累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。別の一実施形態では、方法は、隔週 6 mg/kg として、 3 mg/kg の累積週間用量を対象に投与するステップを含んでもよい。

【0363】

iRNA 投与は、例えば患者の細胞、組織、血液、尿またはその他のコンパートメント中で、Serpincl レベルを少なくとも約 5%、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、および 21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、39、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または少なくとも約 99% 以上低下させ得る。

20

【0364】

一実施形態では、治療および／または予防的方法としては、対象に、例えば患者の細胞、組織、血液、尿またはその他のコンパートメント中の Serpincl レベルを、少なくとも約 40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、69、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または約 80% 阻害低下させる (inhibit reduce) のに十分な用量で、化合物 AD-57213 を皮下投与することが挙げられる。

30

【0365】

iRNA の総用量の投与前に、5% 輸液反応などのより少ない用量を患者に投与して、アレルギー反応などの悪影響についてモニターし得る。別の実施例では、サイトカイン (例えば TNF- α または INF- α) レベル増大などの望まれない免疫賦活性効果について、患者をモニターし得る。

40

【0366】

Serpincl 発現に対する阻害効果のために、本発明に従った組成物またはそれから調製される医薬組成物は、生活の質を高め得る。

【0367】

特に断りのない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似したまたは同等の方法および材料を、本発明で取り上げる iRNA および方法の実施または試験で使用し得るが、適切な方法および材料は下述のとおりである。本明細書で言及される、全ての刊行物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は

50

、その内容全体を参照によって援用する。矛盾する場合は、定義を含めて本明細書が優先される。これに加えて、材料、方法、および実施例は、例証のみを意図し、制限は意図されない。

【実施例】

【0368】

実施例1：iRNA合成

試薬供給元

試薬の供給元が本明細書で具体的に示さない場合、このような試薬は、分子生物学用途の品質／純度規格の分子生物学用試薬のあらゆる供給業者から得られてもよい。

【0369】

転写物

s iRNAデザインを実施して、NCBI遺伝子データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) でアノテートされたヒト、アカゲザル (アカゲザル (Macacamulatta)、イヌ、マウス、およびラットSERPINCL転写物を標的にするs iRNAを同定した。デザインは、NCBIRefSeqコレクションからの以下の転写物を使用した：Human-NM_000488.2、NM_000488.3；Rhesus-NM_001104583.1；Dog-XM_856414.1；Mouse-NM_080844.4；Rat-NM_001012027.1。高度な霊長類／イヌ類／齧歯類配列多様性のために、s iRNA二本鎖は、二本鎖整合ヒトおよびアカゲザル転写物のみ；ヒト、アカゲザル、およびイヌ転写物のみ；ヒト、アカゲザル、マウス、およびラット転写物のみ；およびマウスおよびラット転写物のみを含有するバッチをはじめとするが、これに限定されるものではない、いくつかの別個のバッチでデザインされた。全てのs iRNA二本鎖は、各デザインバッチ (上記) で考察された、列挙されたヒト転写物およびその他の種の転写物と100%の同一性を共有するようにデザインされた。

【0370】

s iRNAデザイン、特異性、および効能予測

全ての可能な19量体の予測された特異性は、各配列から予測された。次に7ヌクレオチドよりも長い反復を欠いている、候補19量体を選択した。これらの874の候補ヒト／アカゲザル、67ヒト／アカゲザル／イヌ、103ヒト／アカゲザル／マウス／ラット、および569マウス／ラットs iRNAを、pythonスクリプト「BruteForce.py」中で実装される網羅的な「総当たり攻撃」アルゴリズムを使用する、適切なトランスクリプトーム (ヒト、アカゲザル、イヌ、マウス、またはラットNCBIRefSeqセット内のNM_およびXM_recordsセットと定義される) に対する包括的検索でを使用した。次にスクリプトは、転写物オリゴアラインメントを構文解析し、s iRNAとあらゆる可能な「オフターゲット」転写物とのミスマッチの配置および数に基づいて、スコアを作成した。オフターゲットスコアを重み付けして、分子の5'末端から2～9位で、s iRNAの「シード」領域内の違いを強調した。

【0371】

総当たり攻撃検索からの各オリゴ転写物対には、個々のミスマッチスコアを加算することでミスマッチスコアが与えられ；2～9位のミスマッチは2.8と見なされ、10～11位の切断部位のミスマッチは1.2と見なされ、領域12～19のミスマッチは1.0と見なされた。さらに3つの異なる、各オリゴのシード由来六量体に由来する七量体および八量体の発生頻度を比較することで、オフターゲット予測を実施した。5'開始点に対する2～7位からの六量体を使用して、2つの七量体および1つの八量体を作成した。「七量体1」は、六量体に3'-Aを付加して作成し；七量体2は、六量体に5'-Aを付加して作成し；八量体は、六量体の5'および3'末端の双方にAを付加して作成した。ヒト、アカゲザル、マウス、またはラット3'UTRome (NCBIのRefSeqデータベースからのトランスクリプトームの部分配列と定義され、コード領域末端「CDS」は明確に画定されている) 中の八量体および七量体の発生頻度は、事前に計算された。

八量体発生頻度は、八量体頻度範囲からの中央値を使用して、七量体発生頻度について正規化した。次に $((3 \times \text{正規化八量体数}) + (2 \times \text{七量体2数}) + (1 \times \text{七量体1数}))$ の合計を計算することで、「*mirSeedScore*」を計算した。

【0372】

計算スコアに従って、双方の *siRNA* 鎖を特異性カテゴリーに割り当てた。3を超えるスコアは高度に特異的であり、3に等しいスコアは特異的であり、2.2～2.8のスコアは中程度に特異的であると認定された。アンチセンス鎖の特異性によって二本鎖をソートして、アンチセンスオリゴが1位のGCを欠き、13位と14位双方のGを欠き、シード領域に3つ以上のUまたはAを有する二本鎖を選択した。

【0373】

10

siRNA 配列選択

合計66のセンスおよび66のアンチセンス由来ヒト／アカゲザル、6のセンスおよび6のアンチセンス由来ヒト／アカゲザル／マウス、12のヒト／アカゲザル／マウス／ラット、および21のセンスおよび21のアンチセンス由来マウス／ラット *siRNA* オリゴが合成され、二本鎖に形成された。*Septin1* センスおよびアンチセンス鎖配列の詳細な一覧は、表3および4で示される。

【0374】

siRNA 合成

I. 一般的小規模および中規模RNA合成手順

RNAオリゴヌクレオチドは、標準固相オリゴヌクレオチド合成プロトコルに従って、市販されるウリジンの5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-tert-ブチルジメチルシリル-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホラミダイトモノマー、4-N-アセチルシチジン、6-N-ベンゾイルアデノシン、および2-N-イソブチルグアノシン、そして対応する2'-O-メチルおよび2'-フルオロホスホラミダイトを使用して、0.2～500 μmol の規模で合成した。アミダイト溶液は、0.1～0.15 Mの濃度で調製し、5-エチルチオ-1H-テトラゾール（アセトニトリル中の0.25～0.6 M）を活性化剤として使用した。酸化段階のために、合成中に、ルチジン：アセトニトリル（1：1）（v；v）中の0.2 Mフェニルアセチルジスルフィド（PADS）、またはピリジン中の0.1 M 3-（ジメチルアミノメチレン）アミノ-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン（DDTT）を使用して、ホスホロチオエート主鎖の修飾を導入した。合成完了後、配列を固体担体から切断し、メチルアミンとそれに続くトリエチルアミン・3HFを使用して脱保護し、存在するあらゆる2'-O-tert-ブチルジメチルシリル保護基を除去した。

20

30

【0375】

5～500 μmol 規模の完全2'修飾配列（2'-フルオロおよび／または2'-O-メチルまたはそれらの組み合わせ）の合成では、35℃で16時間または55℃で5.5時間のいずれかで、3：1（v／v）エタノールおよび濃縮（28～32%）水性アンモニアを使用して、オリゴヌクレオチドを脱保護した（where deprotected）。アンモニア脱保護に先だって、固体担体上で20分間、アセトニトリル中の0.5 Mピペリジンで、オリゴヌクレオチドを処理した（where treated）。LC-MSおよびアニオン交換HPLC（IEX-HPLC）によって、粗製オリゴヌクレオチドを分析した。20 mMのリン酸、10%～15% ACN、pH=8.5（緩衝液A）、および20 mMのリン酸、10%～15% ACN、1 MのNaBr、pH=8.5（緩衝液B）を使用して、IEX-HPLCによってオリゴヌクレオチド精製を実施した。分析HPLCによって、画分を純度について分析した。適切な純度の生成物含有画分を貯留し、脱塩に先だって回転蒸発器上で濃縮した。サイズ排除クロマトグラフィーによってサンプルを脱塩し、凍結乾燥した。1×PBS緩衝液中で、等モル量のセンスおよびアンチセンス鎖をアニールして、対応する *siRNA* 二本鎖を調製した。

40

【0376】

小規模（0.2～1 μmol ）では、96ウェル構成のMerMade 192合成機

50

上で合成を実施した。完全2'-修飾配列(2'-フルオロおよび/または2'-O-メチルまたはそれらの組み合わせ)の場合は、室温で30~60分間のメチルアミンと、それに続く60℃で30分間のインキュベーションを使用して、または室温で30~60分間の3:1(v/v)エタノールおよび濃縮(28~32%)水性アンモニアと、それに続く40℃で1.5時間のインキュベーションを使用して、オリゴヌクレオチドを脱保護した(when deprotected)。次に粗製オリゴヌクレオチドをアセトニトリル:アセトン(9:1)溶液中で沈殿させて、遠心分離によって単離し、上清を傾斜法で除去した。粗製オリゴヌクレオチドペレットを20mMのNaOAc緩衝液に再懸濁し、LC-MSおよびアニオン交換HPLCによって分析した。5mL HiTrapセファデックスG25カラム(GE Healthcare)上の96深型ウェルプレート内で、粗製オリゴヌクレオチド配列を脱塩した。各ウェル内に、個々の配列に対応する約1.5mLのサンプルを収集した。LC-MSおよびアニオン交換クロマトグラフィーによって、これらの精製脱塩オリゴヌクレオチドを分析した。Tecanロボット上で、等モル量のセンスおよびアンチセンス配列をアニーリングして、二本鎖を調製した。1×PBS緩衝液中で、二本鎖の濃度を10μMに調節した。

10

【0377】

II. 生体内分析のためのGalNAc共役オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチド合成のための4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)保護一級水酸基を保有するY型リンカーと、係留を通じて付着するGalNAcリガンドとが事前装填された固体担体を使用して、0.2~500μmolの規模で、GalNAcリガンドと3'末端で共役するオリゴヌクレオチドを合成した。

20

【0378】

5~500μmol規模でのGalNAc複合体合成では、以下の修正を加えて、上のRNA合成プロトコルに従った。ポリスチレンベースの合成担体では、合成中のDMT切断のために、トルエン中の5%ジクロロ酢酸を使用した。担体からの切断および脱保護は、上述のように実施した。ホスホロチオエートに富む配列(通常は5個を超えるホスホロチオエート(phosphorothioates))は、最後の5'-DMT基を除去することなく(「DMT-on」)合成し、上述したような切断および脱保護後に、水中の50mMの酢酸アンモニウム(緩衝液A)と、80%アセトニトリル(acetonitrile)中の50mMの酢酸アンモニウム(緩衝液B)とを使用して、逆相HPLCによって精製した。分析HPLCおよび/またはLC-MSによって、画分を純度について分析した。適切な純度の生成物含有画分を貯留し、回転蒸発器上で濃縮した。水中の20%~25%酢酸を使用して、完了するまで、DMT基を除去した。サイズ排除クロマトグラフィーによってサンプルを脱塩し、凍結乾燥した。1×PBS緩衝液中で、等モル量のセンスおよびアンチセンス鎖をアニールして、対応するsiRNA二本鎖を調製した。

30

【0379】

複数のホスホロチオエート結合がある配列を含むGalNAc複合体(0.2~1μmol)の小規模合成では、MerMadeプラットフォーム上のRNAまたは完全な2'-F/2'-OMe含有配列の合成のための上述のプロトコルを適用した。合成は、GalNAc官能化制御孔ガラス担体を含有する、事前充填カラム上で実施した。

40

【0380】

実施例2:試験管内スクリーニング

細胞培養および形質移入

37℃および5%CO₂雰囲気内で、10%FBS、ストレプトマイシン、およびグルタミン(ATCC)が添加されたイーグル最少必須培地(ATCC)中で、Hep3B細胞(ATCC, Manassas, VA)をコンフルエンス近くまで培養した後、トリプシン処理によってプレートから遊離させた。マウス交差反応性二本鎖では、形質移入前の1時間以内にマウス初代培養肝細胞(PMH)を新鮮に単離して、初代培養肝細胞培養液中で培養した。96ウェルプレートの個々のウェル内で、各5μlのsiRNA二本鎖に

50

、ウェルあたり14.8 μ lのOpti-MEMと0.2 μ lのLipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad CA; カタログ番号13778-150)を添加することで、Hep3BとPMH双方の形質移入を実施した。次に混合物を室温で15分間インキュベートした。次に約 2×10^4 個のHep3B細胞を含有する、抗生物質を含まない80 μ lの完全増殖培地をsiRNA混合物に添加した。細胞をRNA精製に先だって、24時間培養した。10 nMおよび0.1 nMの最終二本鎖濃度で単回投与実験を実施し、10 nM~128 pMの範囲にわたる8×5倍連続希釈を使用して、用量応答実験を実施した(図2Aおよび2Bを参照されたい)。

【0381】

自由取り込み形質移入

10

96ウェルプレートの各ウェル内で、95 μ lのIn Vitro Gro CP培地(In Vitro Technologies-Celsis, Baltimore, MD)に再懸濁した 4×10^4 の新鮮に解凍された冷凍保存カニクイザル肝実質細胞に、PBS中の5 μ lの各GalNac共役siRNAを合わせた。混合物を37℃および5%CO₂雰囲気内で、約24時間培養した。siRNAは、100 nM、10 nM、および0.1 nMの最終濃度で、有効自由取り込みアッセイのために試験した。

【0382】

DYNABEADS mRNA単離キット(Invitrogen; パーツ番号610-12)を使用した全RNA単離

20

細胞を収集して150 μ lの溶解/結合緩衝液に溶解し、次にEppendorf Thermomixerを使用して、850 rpmで5分間混合した(混合速度は、処理全体にわたり同一であった)。10 μ lの磁性ビーズと、80 μ lの溶解/結合緩衝液混合物を丸底プレートに入れて、1分間混合した。磁性スタンドを使用して磁性ビーズを捕捉し、ビーズをかき乱すことなく上清を除去した。上清を除去した後、溶解細胞を残留ビーズに入れて、5分間混合した。上清を除去した後、磁性ビーズを150 μ lの洗浄液緩衝液Aで2回洗浄し、1分間混合した。ビーズを再度捕捉して、上清を除去した。次にビーズを150 μ lの洗浄緩衝液Bで洗浄し、捕捉して上清を除去した。次にビーズを150 μ lの溶出緩衝液で洗浄し、捕捉して上清を除去した。最後に、ビーズを2分間乾燥させた。乾燥後、50 μ lの溶出緩衝液を添加して、5℃で70分間混合した。ビーズを磁石上に5分間捕捉した。40 μ lの上清を除去して、別の96ウェルプレートに入れた。

30

【0383】

ABI高容量cDNA逆転写キットを使用したcDNA合成(Applied Biosystems, Foster City, CA; カタログ番号4368813)

反応あたり、2 μ lの10×緩衝液、0.8 μ lの25×dNTPs、2 μ lのランダムプライマー、1 μ lの逆転写酵素、1 μ lのRNaseインヒビター、および3.2 μ lのH₂Oのマスター混合物を10 μ lの全RNAに付加した。cDNAは、以下のステップを通じて、Bio-Rad C-1000またはS-1000サーマルサイ클ラー(Hercules, CA)を使用して作成した: 25℃で10分間、37℃で120分間、85℃で5秒間、および4℃で保持。

【0384】

40

リアルタイムPCR

384ウェルプレートのウェルあたり、0.5 μ lのヒトGAPDH TaqManプロブ(Applied Biosystems; カタログ番号4326317E)、ヒト細胞では0.5 μ lのヒトSERPINC1 TaqManプロブ(Applied Biosystems; カタログ番号Hs00892758_m1)またはマウス細胞では0.5 μ lのマウスGAPDH TaqManプロブ(Applied Biosystems; カタログ番号4308313)、0.5 μ lのマウスSERPINC1 TaqManプロブ(Applied Biosystems; カタログ番号Mm00446573_m1); および5 μ lのLightcycler 480プロブマスター混合物(Roche; カタログ番号04887301001)を含有するマスター混合

50

物に、2 μ l の cDNA を添加した。 $\Delta\Delta Ct$ (RQ) アッセイを使用して、ABI 7900 HT リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) 内で、リアルタイム PCR を実施した。各二本鎖は、2 つの独立した形質移入で試験され、要約表で特に断りのない限り、各形質移入は複製でアッセイされた。

【0385】

Serpinc1 mRNA レベルの相対的倍数変化を計算するために、 $\Delta\Delta Ct$ 法を使用してリアルタイムデータを分析し、10 nM の AD-1955 で形質移入された細胞または模擬形質移入細胞で実施したアッセイに、正規化した。XLFit を使用した 4 パラメータ適合モデルを使用して、 IC_{50} を計算し、同一投与範囲にわたって AD-1955 で形質移入された細胞に、またはそれ自身の最低用量に正規化した。表 5 は、示される iRNA で形質移入された Hep3B 細胞および PMH 細胞における、単回投与スクリーニングの結果を示す。表 6 は、示される iRNA の Hep3B および PMH 細胞への形質移入の用量応答結果を示す。

10

【0386】

AD-1955 のセンスおよびアンチセンス配列は、次の通り：
 センス cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTs dT- (配列番号 13)
 アンチセンス UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT- (配列番号 14)。

【0387】

【表 2-1】

表 2. 核酸配列の表現で使用するヌクレオチドモノマー略号。これらのモノマーは、オリゴヌクレオチド中に存在する場合、5'-3'-リン酸ジエステル結合によって相互に連結するものと理解される。

20

略号	ヌクレオチド
A	アデノシン-3'-リン酸
<u>Ab</u>	β -L-アデノシン-3'-リン酸
<u>Abs</u>	β -L-アデノシン-3'-ホスホロチオエート
Af	2'-フルオロアデノシン-3'-リン酸
Afs	2'-フルオロアデノシン-3'-ホスホロチオエート
As	アデノシン-3'-ホスホロチオエート
C	シチジン-3'-リン酸
<u>Cb</u>	β -L-シチジン-3'-リン酸

30

【0388】

【表 2 - 2】

略号	ヌクレオチド
Cbs	β -L-シチジン-3'-ホスホロチオエート
Cf	2'-フルオロシチジン-3'-リン酸
Cfs	2'-フルオロシチジン-3'-ホスホロチオエート
(Chd)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸
(Chds)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-ホスホロチオエート
Cs	シチジン-3'-ホスホロチオエート
G	グアノシン-3'-リン酸
Gb	β -L-グアノシン-3'-リン酸
Gbs	β -L-グアノシン-3'-ホスホロチオエート
Gf	2'-フルオログアノシン-3'-リン酸
Gfs	2'-フルオログアノシン-3'-ホスホロチオエート
Gs	グアノシン-3'-ホスホロチオエート
T	5'-メチルウリジン-3'-リン酸
Tb	β -L-チミジン-3'-リン酸
Tbs	β -L-チミジン-3'-ホスホロチオエート
Tf	2'-フルオロ-5-メチルウリジン-3'-リン酸
Tfs	2'-フルオロ-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
Ts	5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
U	ウリジン-3'-リン酸
Ub	β -L-ウリジン-3'-リン酸
Ubs	β -L-ウリジン-3'-ホスホロチオエート
Uf	2'-フルオロウリジン-3'-リン酸
Ufs	2'-フルオロウリジン-3'-ホスホロチオエート
(Uhd)	2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-リン酸
(Uhds)	2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-ホスホロチオエート
Us	ウリジン-3'-ホスホロチオエート
N	あらゆるヌクレオチド (G、A、C、T または U)
a	2'-O-メチルアデノシン-3'-リン酸
As	2'-O-メチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
c	2'-O-メチルシチジン-3'-リン酸
cs	2'-O-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート

10

20

30

【 0 3 8 9 】

【表 2 - 3】

略号	ヌクレオチド
g	2'-O-メチルグアノシン-3'-リン酸
gs	2'-O-メチルグアノシン-3'-ホスホロチオエート
t	2'-O-メチル-5-メチルウリジン-3'-リン酸
ts	2'-O-メチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
u	2'-O-メチルウリジン-3'-リン酸
us	2'-O-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
<u>dA</u>	2'-デオキシアデノシン-3'-リン酸
<u>dAs</u>	2'-デオキシアデノシン-3'-ホスホロチオエート
<u>dC</u>	2'-デオキシシチジン-3'-リン酸
<u>dCs</u>	2'-デオキシシチジン-3'-ホスホロチオエート
<u>dG</u>	2'-デオキシグアノシン-3'-リン酸
<u>dGs</u>	2'-デオキシグアノシン-3'-ホスホロチオエート
dT	2'-デオキシチミジン
<u>dTs</u>	2'-デオキシチミジン-3'-ホスホロチオエート
<u>dU</u>	2'-デオキシウリジン
s	ホスホロチオエート結合
L96	N-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミドデカノイル)]-4-ヒドロキシ プロリノール Hyp-(GalNAc-アルキル)3
(Aeo)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-リン酸
(Aeos)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
(Geo)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-リン酸
(Geos)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-ホスホロチオエート
(Teo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-リン酸
(Teos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
(m5Ceo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-リン酸
(m5Ceos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート

10

20

30

【0390】

【表 3 - 1】

表3.Serpinc1 dsRNAの未修飾センスおよびアンチセンス鎖配列(「センス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号15~71として開示され、「アンチセンス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号72~128として開示される)

二本鎖名称	センス名称	センス配列	アンチセンス名称	アンチセンス配列
AD-50475.1-UM	A-104633.1	CCCUGUGGACAUUCGCACA	A-104634.1	UGUGCAGAUGUCCACAGGG
AD-50476.1-UM	A-104649.1	CUACCACUUCUUAUCAGCA	A-104650.1	UGCUGAUAGAAAGUGGUAG
AD-50477.1-UM	A-104665.1	CUAUCGAAAAGCCAACAAA	A-104666.1	UUUGUUGGCUUUUCGAUAG
AD-50478.1-UM	A-104681.1	GGACUUCAAGGAAAUAUGCA	A-104682.1	UGCAUUUUCCUUGAAGUCC
AD-50479.1-UM	A-104697.1	GUUACACCAUUUACUUCA	A-104698.1	UGAAGUAAAUGGUGUUAAC
AD-50480.1-UM	A-104713.1	CCUGGUUUUUUAAGAGAA	A-104714.1	UUCUCUUUAAAAACCAGG
AD-50481.1-UM	A-104635.1	GACAUUCCCAUGAAUCCCA	A-104636.1	UGGGAUUCAUGGGAAUGUC
AD-50482.1-UM	A-104651.1	CACCUGGCAGAUUCCAAGA	A-104652.1	UCUUGGAAUCUGCCAGGUG
AD-50483.1-UM	A-104667.1	CGAAAAGCCAACAAAUCCU	A-104668.1	AGGAUUUGUUGGCUUUUCG
AD-50484.1-UM	A-104683.1	GAAAUGCAGAGCAAUCCA	A-104684.1	UGGAUUGCUCUGCAUUUUC
AD-50485.1-UM	A-104699.1	GGCCUGUGGAAGUCAAGU	A-104700.1	ACUUUGACUCCACAGGCC
AD-50486.1-UM	A-104715.1	GAAGUCCUCUGAACACUA	A-104716.1	UAGUGUUCAGAGGAACUUC
AD-50487.1-UM	A-104637.1	CCAUGAAUCCCAUGUGCAU	A-104638.1	AUGCACAUGGGAUUAUGG
AD-50488.1-UM	A-104653.1	CAACUGAUGGAGGUUUUA	A-104654.1	UAAAUACCUCAUCAGUUG
AD-50489.1-UM	A-104669.1	CCAAGUUAGUAUCAGCCAA	A-104670.1	UUGGCGUAUACUACUUGG
AD-50490.1-UM	A-104685.1	CGGCCAUCAACAAUUGGGU	A-104686.1	ACCCAUUUGUUGAUGGCCG
AD-50491.1-UM	A-104701.1	GAGGACGGCUUCAGUUUGA	A-104702.1	UCAAACUGAAGCCGUCCUC
AD-50492.1-UM	A-104717.1	CCUCUGAACACUUAUUCU	A-104718.1	AGAUAAUAGUGUUCAGAGG
AD-50493.1-UM	A-104639.1	CAUGAAUCCCAUGUGCAUU	A-104640.1	AAUGCACAUGGGAUUAUG
AD-50494.1-UM	A-104655.1	GAUGGAGGUUUUAAGUUU	A-104656.1	AAACUUAAAUACCUCCAUC
AD-50495.1-UM	A-104671.1	GUAUCAGCCAUCGCCUUU	A-104672.1	AAAGGCGAUUGGUGAUAC
AD-50496.1-UM	A-104687.1	GGGUGUCCAUAAGACCGA	A-104688.1	UCGGUCUUUUUGGACACCC
AD-50497.1-UM	A-104703.1	CAGCCUGAAAAGUCCAAA	A-104704.1	UUUGGACUUUUCAGGGCUG
AD-50498.1-UM	A-104641.1	CCCAUGUGCAUUUACCGCU	A-104642.1	AGCGGUAAAUGCACAUGGG
AD-50499.1-UM	A-104657.1	GUUUUAAGUUUGACACCA	A-104658.1	UGGUGUCAACUUAAAUAC
AD-50500.1-UM	A-104673.1	GACAAAUCCCUUACCUUCA	A-104674.1	UGAAGGUAAAGGGAUUUGUC
AD-50501.1-UM	A-104689.1	CUGUUCUGGUGCUGGUUAA	A-104690.1	UUAACCAGCACCAGAACAG
AD-50502.1-UM	A-104705.1	CCAAACUCCAGGUUUUGU	A-104706.1	ACAAUACCUGGGAGUUUGG
AD-50503.1-UM	A-104643.1	CCCGCUUUGCUAACACUUU	A-104644.1	AAAGUGGUAGCAAAGCGGG
AD-50505.1-UM	A-104675.1	CUUACCUCAAUAGAGACCU	A-104676.1	AGGUCUCAUUGAAGGUAAG
AD-50506.1-UM	A-104691.1	CUGGUGCUGGUUAACACCA	A-104692.1	UGGUGUUAACCAGCACCAG
AD-50507.1-UM	A-104707.1	CAAACUCCAGGUUUUGUU	A-104708.1	AACAAUACCUGGGAGUUUG
AD-50508.1-UM	A-104645.1	GCUUUGCUACCACUUUCUA	A-104646.1	UAGAAAGUGGUAGCAAAGC
AD-50510.1-UM	A-104677.1	CCUACCAGGACAUAGUGA	A-104678.1	UCACUGAUGUCCUGGUAGG
AD-50511.1-UM	A-104693.1	GGUGCUGGUUAACACCAUU	A-104694.1	AAUGGUGUUAACCAGCACC

【表 3 - 2】

AD-50512.1 -UM	A-104709.1	GCCGUUCGCUAAACCCCAA	A-104710.1	UUGGGGUUUAGCGAACGGC
AD-50515.1 -UM	A-104679.1	GGACAUCAGUGAGUUGGUA	A-104680.1	UACCAACUCACUGAUGUCC
AD-50516.1 -UM	A-104695.1	GUGCUGGUUAAACCAUUU	A-104696.1	AAUUGGUGUUAACAGCAC
AD-50517.1 -UM	A-104711.1	GCCUUUCCUGGUUUUUUAUA	A-104712.1	UAUAAAAACCAGGAAAGGC
AD-50518.1 -UM	A-104719.1	CUUUUUGCUAUGACCAAGCU	A-104720.1	AGCUUGGUCAUAGCAAAAG
AD-50523.1 -UM	A-104721.1	UGUACCAGGAAGGCAAGUU	A-104722.1	AACUUGCCUCCUGGUACA
AD-50528.1 -UM	A-104723.1	ACUAUUUUCUUAUGGGCA	A-104724.1	UGCCCAUGAAGAUAAUAGU
AD-50540.1 -UM	A-104729.1	UCAUGGGCAGAGUAGCCAA	A-104730.1	UUGGCUACUCUGCCCAUGA
AD-50539.1 -UM	A-104785.1	CCAUUUACUUAAGGGCCU	A-104786.1	AGGCCCUUGAAGUAAAUGG
AD-50544.1 -UM	A-104787.1	UACUUAAGGGCCUGUGGA	A-104788.1	UCCACAGGCCCUUGAAGUA
AD-50549.1 -UM	A-104789.1	ACUUAAGGGCCUGUGGAA	A-104790.1	UUCCACAGGCCCUUGAAGU
AD-50514.1 -UM	A-104663.1	CGACUCUAUCGAAAAGCCA	A-104664.1	UGGCUUUUCGAUAGAGUCG
AD-50522.1 -UM	A-104779.1	AACUGCCGACUCUAUCGAA	A-104780.1	UUCGAUAGAGUCGGCAGUU
AD-50527.1 -UM	A-104781.1	ACUGCCGACUCUAUCGAAA	A-104782.1	UUUCGAUAGAGUCGGCAGU
AD-50531.1 -UM	A-104739.1	GACUCUAUCGAAAAGCCAA	A-104740.1	UUGGCUUUUCGAUAGAGUC
AD-50534.1 -UM	A-104769.1	UCUUCUUUGCCAAACUGAA	A-104770.1	UUCAGUUUGGCAAAGAAGA
AD-50538.1 -UM	A-104771.1	UGCCAAACUGAACUGCCGA	A-104772.1	UCGGCAGUUCAGUUUGGCA
AD-50543.1 -UM	A-104773.1	CCAAACUGAACUGCCGACU	A-104774.1	AGUCGGCAGUUCAGUUUGG
AD-50553.1 -UM	A-104777.1	ACUGAACUGCCGACUCUAU	A-104778.1	AUAGAGUCGGCAGUUCAGU
AD-50504.1 -UM	A-104659.1	GAACUGCCGACUCUAUCGA	A-104660.1	UCGAUAGAGUCGGCAGUUC
AD-50509.1 -UM	A-104661.1	CUGCCGACUCUAUCGAAAA	A-104662.1	UUUUCGAUAGAGUCGGCAG
AD-50529.1 -UM	A-104751.1	CUGGUUAAACCAUUUACU	A-104752.1	AGUAAAUGGUGUUAACCAAG

10

20

【 0 3 9 2 】

【表 4 - 1】

表4.Serpinc1 dsRNAの修飾センスおよびアンチセンス鎖配列(「センス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号129～185として開示され、「アンチセンス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号186～242として開示される)

30

二本鎖名称	センス名称	センス配列	アンチセンス名称	アンチセンス配列
AD-50475.1	A-104633.1	cccuGuGGAcAucGcAcAdTsdT	A-104634.1	UGUGcAGAUGUCcAcAGGGdTsdT
AD-50476.1	A-104649.1	cuAccAcuuucuAucAGcAdTsdT	A-104650.1	UGCUGAuAGAAAGUGGuAgdTsdT
AD-50477.1	A-104665.1	cuAucGAAAGccAAcAAAdTsdT	A-104666.1	UUUGUUGGCUUUUCGAuAgdTsdT
AD-50478.1	A-104681.1	GGAcuucAAGGAAAuGcAdTsdT	A-104682.1	UGcAUUUUCCUUGAAGUCCdTsdT
AD-50479.1	A-104697.1	GuuAAcAccAuuuAcuucAdTsdT	A-104698.1	UGAAGuAAAUGGUGUuAACdTsdT
AD-50480.1	A-104713.1	ccuGGuuuuuAuAAGAGAAAdTsdT	A-104714.1	UUCUCUuAuAAAAACcAGGdTsdT
AD-50481.1	A-104635.1	GAcAuucccAuGAAucccAdTsdT	A-104636.1	UGGGAUUcAUGGGAAUGUCdTsdT
AD-50482.1	A-104651.1	cAccuGGcAGAuuccAAGAdTsdT	A-104652.1	UCUUGGAUUCUGCcAGGUgdTsdT
AD-50483.1	A-104667.1	cGAAAAGccAAcAAuuccdTsdT	A-104668.1	AGGAUUUGUUGGCUUUUCGdTsdT
AD-50484.1	A-104683.1	GAAAuGcAGAGcAAuccAdTsdT	A-104684.1	UGGAUUGCUCUGcAUUUUCdTsdT

40

【 0 3 9 3 】

【表 4 - 2】

AD-50485.1	A-104699.1	GGccuGuGGAAGucAAAGudTsdT	A-104700.1	ACUUUGACUUCcAcAGGCCdTsdT
AD-50486.1	A-104715.1	GAAGuuccucuGAACAcuAdTsdT	A-104716.1	uAGUGUUCAGAGGAACUUCdTsdT
AD-50487.1	A-104637.1	ccAuGAAucccAuGuGcAudTsdT	A-104638.1	AUGcAcAUGGGAUUCAGGdTsdT
AD-50488.1	A-104653.1	cAAcuGAuGGAGGuAuuuAdTsdT	A-104654.1	uAAAuACCUCcAUcAGUUGdTsdT
AD-50489.1	A-104669.1	ccAAGuuAGuAucAGccAAdTsdT	A-104670.1	UUGGCUGAuAcuAACUUGGdTsdT
AD-50490.1	A-104685.1	cGGccAucAAcAAuGGGudTsdT	A-104686.1	ACCCAUUUGUUGAUGGCCdTsdT
AD-50491.1	A-104701.1	GAGGAcGGcuuAGuuuGAdTsdT	A-104702.1	UcAAACUGAAGCCGUCCUdTsdT
AD-50492.1	A-104717.1	ccucuGAACAcuAuuAucudTsdT	A-104718.1	AGAuAAuAGUGUUCAGAGdTsdT
AD-50493.1	A-104639.1	cAuGAAucccAuGuGcAuudTsdT	A-104640.1	AAUGcAcAUGGGAUUCAGdTsdT
AD-50494.1	A-104655.1	GAuGGAGGuAuuuAAGuuuTsdT	A-104656.1	AAACUuAAuACCUCcAUCdTsdT
AD-50495.1	A-104671.1	GuAucAGccAAucGccuuuTsdT	A-104672.1	AAAGGCGAUUGGCUGAuAcdTsdT
AD-50496.1	A-104687.1	GGGuGuccAAuAAGAccGAdTsdT	A-104688.1	UCGGUCUuAUUGGAcACCCdTsdT
AD-50497.1	A-104703.1	cAGcccuGAAAAGuccAAAdTsdT	A-104704.1	UUUGGACUUUUCAGGGCUGdTsdT
AD-50498.1	A-104641.1	cccAuGuGcAuuuAccGcuTsdT	A-104642.1	AGCGGuAAAUGcAcAUGGGdTsdT
AD-50499.1	A-104657.1	GuAuuuAAGuuuGAcAccAdTsdT	A-104658.1	UGGUGUcAAACUuAAuACdTsdT
AD-50500.1	A-104673.1	GAcAAAucccuuAccuucAdTsdT	A-104674.1	UGAAGGuAAGGGAUUUGUCdTsdT
AD-50501.1	A-104689.1	cuGuucuGGuGcuGGuuAAdTsdT	A-104690.1	UuAACcAGcACcAGAAcAGdTsdT
AD-50502.1	A-104705.1	ccAAAcucccAGGuAuuGudTsdT	A-104706.1	AcAAuACCUGGGAGUUUGdTsdT
AD-50503.1	A-104643.1	cccGcuuuGcuAccAuuuTsdT	A-104644.1	AAAGUGGuAGcAAAGCGGGdTsdT
AD-50505.1	A-104675.1	cuuAccuucAAuGAGAccuTsdT	A-104676.1	AGGUCUcAUUGAAGGuAAGdTsdT
AD-50506.1	A-104691.1	cuGGuGcuGGuuAacAccAdTsdT	A-104692.1	UGGUGUuAACcAGcACcAGdTsdT
AD-50507.1	A-104707.1	cAAAcucccAGGuAuuGuuTsdT	A-104708.1	AAcAAuACCUGGGAGUUUGdTsdT
AD-50508.1	A-104645.1	GcuuuGcuAccAuuuAdTsdT	A-104646.1	uAGAAAGUGGuAGcAAAGCdTsdT
AD-50510.1	A-104677.1	ccuAccAGGAcAucAGuGAdTsdT	A-104678.1	UcACUGAUGUCCUGGuAGdTsdT
AD-50511.1	A-104693.1	GGuGcuGGuuAacAccAuudTsdT	A-104694.1	AAUGGUGUuAACcAGcACCCdTsdT
AD-50512.1	A-104709.1	GccGuucGcuAAAcucccAdTsdT	A-104710.1	UUUGGGUUuAGCGAACGGCdTsdT
AD-50515.1	A-104679.1	GGAcAucAGuGAGuuGGuAdTsdT	A-104680.1	uACcAACUcACUGAUGUCCdTsdT
AD-50516.1	A-104695.1	GuGcuGGuuAacAccAuuuTsdT	A-104696.1	AAAUGGUGUuAACcAGcACdTsdT
AD-50517.1	A-104711.1	GccuuuccuGGuuuuuAuAdTsdT	A-104712.1	uAuAAAAACcAGGAAAGGGdTsdT
AD-50518.1	A-104719.1	cuuuuGcuAuGAccAAGcuTsdT	A-104720.1	AGCUUGGUcAuAGcAAAAGdTsdT
AD-50523.1	A-104721.1	uGuAccAGGAAGGcAAGuudTsdT	A-104722.1	AACUUGCCUCCUGGuAcAdTsdT
AD-50528.1	A-104723.1	AcuAuuAucuuAuGGGcAdTsdT	A-104724.1	UGCCcAUGAAGAuAAuAGuTsdT
AD-50540.1	A-104729.1	ucAuGGGcAGAGuAGccAAdTsdT	A-104730.1	UUGGCuACUCUGCCcAUGAdTsdT
AD-50539.1	A-104785.1	ccAuuuAuuuAAGGGccuTsdT	A-104786.1	AGGCCCUUGAAGuAAUUGdTsdT
AD-50544.1	A-104787.1	uAuuuAAGGGccuGuGGAdTsdT	A-104788.1	UCcAcAGGCCCUUGAAGuAdTsdT
AD-50549.1	A-104789.1	AcuucAAGGGccuGuGGAAdTsdT	A-104790.1	UUCcAcAGGCCCUUGAAGuAdTsdT
AD-50514.1	A-104663.1	cGAcucuAucGAAAAGccAdTsdT	A-104664.1	UGGCUUUUCGGuAGAGUCGdTsdT
AD-50522.1	A-104779.1	AAcuGccGAcucuAucGAAAdTsdT	A-104780.1	UUCGAuAGAGUCGGcAGUuTsdT
AD-50527.1	A-104781.1	AcuGccGAcucuAucGAAAdTsdT	A-104782.1	UUUCGAuAGAGUCGGcAGUuTsdT
AD-50531.1	A-104739.1	GAcucuAucGAAAAGccAAdTsdT	A-104740.1	UUGGCUUUUCGGuAGAGUCdTsdT
AD-50534.1	A-104769.1	ucuuuuuGccAAcAucGAAAdTsdT	A-104770.1	UUCAGUUUGGcAAAGAAGAdTsdT
AD-50538.1	A-104771.1	uGccAAAcuGAAcuGccGAdTsdT	A-104772.1	UCGGcAGUUCAGUUUGGcAdTsdT
AD-50543.1	A-104773.1	ccAAAcuGAAcuGccGAcuTsdT	A-104774.1	AGUCGGcAGUUCAGUUUGGdTsdT
AD-50553.1	A-104777.1	AcuGAACuGccGAcucuAdTsdT	A-104778.1	AuAGAGUCGGcAGUUCAGUdTsdT

10

20

30

40

【表 4－3】

AD-50504.1	A-104659.1	GAACuGccGAcucuAucGAdTsdT	A-104660.1	UCGAuAGAGUCGGcAGUUCdTsdT
AD-50509.1	A-104661.1	cuGccGAcucuAucGAAAdTsdT	A-104662.1	UUUUCGAuAGAGUCGGcAGdTsdT
AD-50529.1	A-104751.1	cuGGuuAAcAccAuuuAcudTsdT	A-104752.1	AGuAAAUGGUGUuAACcAGdTsdT

【 0 3 9 5 】

【表 5－1】

表5¹.Serpinc1単回投与スクリーニング

10

二本鎖名称	ヒト(Hep3B)		マウス(PMH)	
	10nM平均	0.1nM平均	10nM平均	0.1nM平均
AD-50475.1	0.11	0.21		
AD-50476.1	0.08	0.43		
AD-50477.1	0.10	0.10		
AD-50478.1	0.12	0.36		
AD-50479.1	0.24	0.84		
AD-50480.1	0.31	0.73		
AD-50481.1	0.74	1.12		
AD-50482.1	0.61	0.89		
AD-50483.1	0.07	0.14		
AD-50484.1	0.12	0.33		
AD-50485.1	0.58	1.18		
AD-50486.1	0.79	0.94		
AD-50487.1	0.05	0.09		
AD-50488.1	0.83	1.07		
AD-50489.1	0.09	0.28		
AD-50490.1	0.04	0.78		
AD-50491.1	0.19	0.77		
AD-50492.1	0.16	0.84		
AD-50493.1	0.17	0.55		
AD-50494.1	0.16	0.59		
AD-50495.1	0.08	0.13		
AD-50496.1	0.57	0.94		
AD-50497.1	0.85	1.15		
AD-50498.1	0.16	1.02		
AD-50499.1	0.10	0.21		
AD-50500.1	0.22	0.58		
AD-50501.1	0.10	0.32		

20

30

40

'修正された

50

【 0 3 9 6 】

【表 5 - 2 】

AD-50502.1	0.76	1.07		
AD-50503.1	0.08	0.47		
AD-50505.1	0.74	0.77		
AD-50506.1	0.85	0.89		
AD-50507.1	0.03	0.37		
AD-50508.1	0.16	0.97		
AD-50510.1	0.09	0.89		
AD-50511.1	0.15	0.71		
AD-50512.1	0.88	1.19		
AD-50515.1	0.13	0.49		
AD-50516.1	0.85	0.95		
AD-50517.1	0.14	0.59		
AD-50518.1	0.36	1.05		
AD-50523.1	0.03	0.66		
AD-50528.1	0.04	0.27		
AD-50540.1	0.14	0.37		
AD-50539.1	0.09	0.46	0.39	1.10
AD-50544.1	0.23	0.75	0.36	1.07
AD-50549.1	0.10	0.19	0.17	0.71
AD-50514.1	0.12	0.48	0.19	0.95
AD-50522.1	0.61	1.02	0.46	1.32
AD-50527.1	0.06	0.15	0.08	0.45
AD-50531.1	0.09	0.47	0.24	1.04
AD-50534.1	0.05	0.10	0.11	0.55
AD-50538.1	0.61	0.86	0.79	1.23
AD-50543.1	0.40	1.04	0.49	1.23
AD-50553.1	0.40	0.93	0.72	1.25
AD-50504.1	ND	ND	0.92	1.25
AD-50509.1	ND	ND	0.12	0.37
AD-50529.1	ND	ND	0.23	0.47

10

20

30

【 0 3 9 7 】

【表 6】

表6.Serpinc1 IC₅₀データ

二本鎖名称	Hep3B IC ₅₀ (nM)	PMH IC ₅₀ (nM)
AD-50487.1	0.003	-
AD-50477.1	0.006	-
AD-50483.1	0.011	-
AD-50475.1	0.011	-
AD-50495.1	0.017	-
AD-50476.1	0.026	-
AD-50499.1	0.027	-
AD-50478.1	0.028	-
AD-50489.1	0.029	-
AD-50501.1	0.045	-
AD-50507.1	0.052	-
AD-50484.1	0.081	-
AD-50515.1	0.185	-
AD-50540.1	0.023	-
AD-50528.1	0.056	-
AD-50549.1	0.053	ND
AD-50539.1	0.170	ND
AD-50534.1	0.007	ND
AD-50527.1	0.028	ND
AD-50514.1	0.085	ND
AD-50527.1	ND	0.019
AD-50534.1	ND	0.011
AD-50509.1	ND	0.006
AD-50529.1	ND	0.021

【0398】

s i R N Aの一部はまた、2'-OMe修飾によって合成され、リポフェクタミン調合物中のこれらのs i R N Aの二本鎖を使用して、H e p 3 B細胞を形質移入した。修飾二本鎖の単回投与スクリーニング結果は、表7で示される。

【0399】

【表 7 - 1】

表7.リード最適化(2'-OMe変種)

親	二本鎖ID	1nM平均	0.1nM平均	0.01nM平均
AD-50477	AD-50477.1	0.22	0.33	0.53
AD-50477	AD-55025.1	0.29	0.68	0.86
AD-50477	AD-55031.1	0.42	0.74	0.93
AD-50477	AD-55037.1	0.52	0.73	0.95
AD-50477	AD-55043.1	0.45	0.70	0.94
AD-50477	AD-55049.1	0.24	0.47	0.95
AD-50477	AD-55055.1	0.37	0.68	0.99
AD-50477	AD-55061.1	0.43	0.66	0.85
AD-50477	AD-55067.1	0.56	0.72	0.92
AD-50477	AD-55026.1	0.28	0.59	0.87
AD-50477	AD-55032.1	0.49	0.76	0.86
AD-50477	AD-55038.1	0.52	0.75	0.93
AD-50477	AD-55044.1	0.84	0.77	1.06
AD-50487	AD-50487.1	0.21	0.50	0.76
AD-50487	AD-55050.1	0.24	0.53	0.75
AD-50487	AD-55056.1	0.27	0.50	0.84
AD-50487	AD-55062.1	0.30	0.61	0.84
AD-50487	AD-55068.1	0.20	0.37	0.66
AD-50487	AD-55027.1	0.18	0.36	0.67
AD-50487	AD-55033.1	0.22	0.43	0.70
AD-50487	AD-55039.1	0.19	0.38	0.67
AD-50487	AD-55045.1	0.18	0.29	0.57

【 0 4 0 0 】

10

20

30

【表 7 - 2】

AD-50487	AD-55051.1	0.17	0.29	0.60
AD-50487	AD-55057.1	0.21	0.37	0.65
AD-50487	AD-55063.1	0.19	0.33	0.63
AD-50487	AD-55069.1	0.16	0.26	0.51
AD-50509	AD-50509.1	0.15	0.31	0.57
AD-50509	AD-55029.1	0.17	0.26	0.49
AD-50509	AD-55028.1	0.17	0.35	0.54
AD-50509	AD-55052.1	0.21	0.32	0.59
AD-50509	AD-55035.1	0.19	0.31	0.62
AD-50509	AD-55047.1	0.19	0.35	0.66
AD-50509	AD-55058.1	0.21	0.40	0.66
AD-50509	AD-55046.1	0.18	0.37	0.66
AD-50509	AD-55070.1	0.17	0.40	0.68
AD-50509	AD-55034.1	0.19	0.37	0.69
AD-50509	AD-55041.1	0.20	0.28	0.63
AD-50509	AD-55064.1	0.19	0.34	0.65
AD-50509	AD-55040.1	0.18	0.34	0.69
AD-50534	AD-50534.1	0.19	0.42	0.83
AD-50534	AD-55053.1	0.24	0.38	0.59
AD-50534	AD-55030.1	0.15	0.33	0.64
AD-50534	AD-55054.1	0.18	0.40	0.69
AD-50534	AD-55059.1	0.18	0.33	0.56
AD-50534	AD-55036.1	0.22	0.37	0.61
AD-50534	AD-55060.1	0.19	0.42	0.62
AD-50534	AD-55071.1	0.29	0.56	0.81
AD-50534	AD-55048.1	0.26	0.56	0.83
AD-50534	AD-55066.1	0.30	0.49	0.76
AD-50534	AD-55042.1	0.25	0.47	0.79
AD-50534	AD-55065.1	0.24	0.50	0.83

【0401】

実施例 3～4：リード最適化および生体内試験

表 8 は、リード最適化および生体内送達のために、脂質ナノ粒子（LNP）として（すなわち MC 3 と共に）調合された、または GalNAc に共役された、Serpinc1 を標的にする二本鎖 siRNA 配列の詳細な一覧である。

【0402】
【表8-1】

表8. リード最適化のためのSerpinc1 dsRNAのセンスおよびアンチセンス鎖配列(「センス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号243～510として開示され、「アンチセンス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号511～778として開示される)

二本鎖名称	センス名称	センス配列	アンチセンス名称	アンチセンス配列
AD-50477.1	A-104665.1	cuAucGAAAAA GccAAcAAAdTsdt	A-104666.1	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55025.1	A-113301.1	cuAucGAAAAA GccAAcAAAdTsdt	A-113302.1	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55031.1	A-113301.2	cuAucGAAAAA GccAAcAAAdTsdt	A-113303.1	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55037.1	A-113301.3	cuAucGAAAAA GccAAcAAAdTsdt	A-113304.1	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55043.1	A-113301.4	cuAucGAAAAA GccAAcAAAdTsdt	A-113305.1	UUUGuUGGcUUUcGAuAGdTsdt
AD-55049.1	A-113306.1	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113302.2	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55055.1	A-113306.2	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113303.2	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55061.1	A-113306.3	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113304.2	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55067.1	A-113306.4	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113305.2	UUUGuUGGcUUUcGAuAGdTsdt
AD-55076.1	A-113307.1	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113302.3	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55032.1	A-113307.2	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113303.3	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55038.1	A-113307.3	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113304.3	UUUGUUUGGCUUUUcGAuAGdTsdt
AD-55044.1	A-113307.4	cuAucGAAAAA GcCAAcAAAdTsdt	A-113305.3	UUUGuUGGcUUUcGAuAGdTsdt
AD-50487.1	A-104637.1	ccAuGAUucccAuGuGcAuTsdt	A-104638.1	AUGcAcAUGGGGAUUcAUGGdTsdt
AD-55050.1	A-113308.1	ccAuGAUucccAuGuGcAuTsdt	A-113309.1	AUGcAcAUGGGGAUUcAUGGdTsdt
AD-55056.1	A-113308.2	ccAuGAUucccAuGuGcAuTsdt	A-113310.1	AUGcAcAUGGGGAUUcAUGGdTsdt
AD-55062.1	A-113308.3	ccAuGAUucccAuGuGcAuTsdt	A-113311.1	AUGcAcAUGGGGAUUcAUGGdTsdt
AD-55068.1	A-113308.4	ccAuGAUucccAuGuGcAuTsdt	A-113312.1	AUGcAcAUGGGGAUUcAUGGdTsdt

10

20

30

40

50

【0403】
【表8-2】

AD-55027.1	A-113313.1	ccAuGAAucccAuGUGcAUdTdT	A-113309.2	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-55033.1	A-113313.2	ccAuGAAucccAuGUGcAUdTdT	A-113310.2	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-55039.1	A-113313.3	ccAuGAAucccAuGUGcAUdTdT	A-113311.2	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-55045.1	A-113313.4	ccAuGAAucccAuGUGcAUdTdT	A-113312.2	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-55051.1	A-113314.1	ccAuGAAuccCcAuGUGcAUdTdT	A-113309.3	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-55057.1	A-113314.2	ccAuGAAuccCcAuGUGcAUdTdT	A-113310.3	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-55063.1	A-113314.3	ccAuGAAuccCcAuGUGcAUdTdT	A-113311.3	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-55069.1	A-113314.4	ccAuGAAuccCcAuGUGcAUdTdT	A-113312.3	AUGcAcAUGGGGAUUCcAUGGdTdT
AD-550509.1	A-104661.1	cuGccGAuccuAucGAAAAAdTsdt	A-104662.1	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55029.1	A-113321.1	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113316.3	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55028.1	A-113315.1	cuGccGAuccuAucGAAAAAdTdT	A-113316.1	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55052.1	A-113320.1	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113316.2	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55035.1	A-113321.2	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113317.3	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55047.1	A-113321.4	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113319.3	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55058.1	A-113320.2	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113317.2	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55046.1	A-113315.4	cuGccGAuccuAucGAAAAAdTdT	A-113319.1	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55070.1	A-113320.4	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113319.2	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55034.1	A-113315.2	cuGccGAuccuAucGAAAAAdTdT	A-113317.1	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55041.1	A-113321.3	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113318.3	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55064.1	A-113320.3	cuGccGAuccuCuAUCGAaAdTdT	A-113318.2	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-55040.1	A-113315.3	cuGccGAuccuAucGAAAAAdTdT	A-113318.1	UUUUCGAUAGAGUCGcGcAGdTdT
AD-50534.1	A-104769.1	ucuuuuuuGccAAAcuGAAAdTsdt	A-104770.1	UUcAGUUUGGcAAAAAGAGAdTsdt
AD-55053.1	A-113322.1	ucuuuuuuGccAAAcuGAAAdTdT	A-113323.1	UUcAGUUUGGcAAAAAGAGAdTdT
AD-55030.1	A-113327.1	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113323.2	UUcAGUUUGGcAAAAAGAGAdTdT
AD-55054.1	A-113327.5	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113328.1	UUcAGUUUGGcAAAAAGAGAdTdT

10

20

30

40

50

【 0 4 0 4 】
【 表 8 - 3 】

AD-55059.1	A-113322.2	ucuuuuuuGccAAAcuGAAAdTdT	A-113324.1	UUcAGUUUGGcAAAGAAAGadTdT
AD-55036.1	A-113327.2	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113324.2	UUcAGUUUGGcAAAGAAAGadTdT
AD-55060.1	A-113327.6	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113329.1	UUcAGUUUGGcAAAGAAAGadTdT
AD-55071.1	A-113322.4	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113326.1	UUcAGUUUGGcCAAAAGAAAGadTdT
AD-55048.1	A-113327.4	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113326.2	UUcAGUUUGGcCAAAAGAAAGadTdT
AD-55066.1	A-113327.7	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113330.1	UUcAGUUUGGcCAAAAGAAAGadTdT
AD-55042.1	A-113327.3	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113325.2	UUcAGUUUGGcCAAAAGAAAGadTdT
AD-55065.1	A-113322.3	ucuuuuuuGcCAAAACuGAAAdTdT	A-113325.1	UUcAGUUUGGcCAAAAGAAAGadTdT
AD-54944.1	A-113073.1	GfgUfaAfaCfaCfcAfaUfuUfaCfaAfl96	A-113074.1	uUfgAfaGfaAfaAfaUfgUfgUfaCfaCfscAfsfsg
AD-54951.1	A-112997.1	UfaGfaAfaCfaGfcCfaAfaCfaCfaUfuUfl96	A-112998.1	aAfaGfgCfgAfaUfuUfggcUfgAfaUfaCfaUfasAfsfsc
AD-54942.1	A-113041.1	CfgCfuUfuGfcUfaAfaCfaAfaUfuUfaUfl96	A-113042.1	aUfaGfaAfaGfuGfguaGfcAfaAfaCfscGfscGfsg
AD-54948.1	A-113043.1	CfuUfuGfcUfaCfcAfaCfaUfuUfaUfaAfl96	A-113044.1	uGfaUfaGfaAfaGfuGfgUfaGfcAfaAfaCfscGfscGfsg
AD-54957.1	A-112999.1	AfuCfaAfaAfaGfcCfaAfaAfaAfaCfaUfuUfl96	A-113000.1	aGfgAfaUfuGfuUfggcUfuUfuCfaAfaUfasAfsfsg
AD-54933.1	A-112991.1	UfcCfaAfaGfaAfaUfaCfaUfuUfgCfaUfl96	A-112992.1	aUfgCfaCfaUfgGfgauUfaAfaUfgGfscGfscAfsu
AD-54962.1	A-113079.1	UfaAfgGfcAfaUfuUfuCfuUfgAfgGfuAfaAfl96	A-113080.1	uUfuAfaCfaCfaAfaAfaAfaUfgCfaUfuUfasUfsg
AD-54972.1	A-113051.1	GfcAfaCfuGfaUfgGfgGfgUfaUfaAfl96	A-113052.1	uUfaAfaUfaCfaUfccaUfaAfaUfuGfscUfsg
AD-54949.1	A-113059.1	UfuUfaAfaUfuUfgGfgAfaCfaUfaUfuUfl96	A-113060.1	aGfaUfaUfgGfuGfucaAfaCfaUfaUfaAfasUfsc
AD-54936.1	A-113039.1	CfaAfaGfaAfaUfuCfaUfuUfgCfaUfuUfl96	A-113040.1	aAfaUfgCfaCfaUfggcAfaUfuAfaUfgGfscGfsc
AD-54971.1	A-113035.1	UfgCfuGfgUfaAfaCfaCfaAfaUfuAfaUfl96	A-113036.1	aGfuAfaAfaUfgUfguuAfaCfaAfaCfaCfsc
AD-54955.1	A-113061.1	UfuUfaUfaAfaAfaAfaCfaAfaUfuUfl96	A-113062.1	aUfuUfgUfuGfgCfuuuUfaGfaUfaGfscGfsc
AD-54953.1	A-113029.1	UfuCfaCfaUfuUfuGfcUfaCfaCfaUfuUfl96	A-113030.1	aAfaGfuGfgUfaGfcaAfaCfaCfaAfaUfasUfsc
AD-54937.1	A-113055.1	GfaUfgGfaGfgUfaAfaUfuUfaAfaUfuUfgAfl96	A-113056.1	uCfaAfaCfaUfaAfaAfaCfaCfaUfaUfscAfsfsg
AD-54967.1	A-113065.1	AfgAfaAfaAfaCfaCfaUfaCfaUfuUfaAfl96	A-113066.1	uUfgAfaGfgUfaAfaGfgAfaUfuGfuCfscCfsc
AD-54935.1	A-113023.1	UfgCfuAfaCfaCfaUfuUfuCfaUfaCfaAfl96	A-113024.1	uGfcUfgAfaAfaAfaagUfgGfuAfaCfaAfa
AD-54976.1	A-113037.1	UfgUfaUfaCfaAfaUfuUfgAfaAfaGfaAfl96	A-113038.1	uUfcCfaAfaCfaCfaUfaUfaAfaUfaCfaUfsg

10

20

30

40

50

【 0 4 0 5 】
【 表 8 - 4 】

AD-54965.1	A-113033.1	AfaCfuGfcCfGfAfcUfuCfuUfaUfcGfaAfaAfl96	A-113034.1	uUfuUfcGfaUfaGfaguCfGfGfcAfgUfusCfSa
AD-54959.1	A-113031.1	GfcCfGfAfcUfcUfaUfcGfaAfaAfgCfaAfl96	A-113032.1	uGfgCfuUfuUfcGfaUfaGfaGfuCfuCfGfGfcsAfg
AD-54943.1	A-113057.1	UfaUfuUfaAfgUfuUfaUfgAfcAfcCfaUfaUfl96	A-113058.1	aUfaUfgGfuGfuCfGfaaCfuUfaAfaUfasCfsc
AD-54956.1	A-113077.1	UfgGfgCfcUfuUfuUfcGfAfcUfuCfuUfaUfl96	A-113078.1	uGfaAfcAfgAfuCfGacAfaGfgCfcCfcsUfsg
AD-54973.1	A-113067.1	CfaAfaUfcCfcUfuUfaUfcCfuUfaUfaUfl96	A-113068.1	uCfaUfuGfaAfgGfuuaGfgGfaUfuUfgsUfsc
AD-54975.1	A-113021.1	UfcCfaAfaCfuCfCfCfaGfgUfaUfuUfuUfl96	A-113022.1	aAfcAfaUfaCfcUfGfgGfAfgUfuUfgGfasCfsu
AD-54963.1	A-113001.1	GfaAfcUfgCfcGfAfcUfuUfaUfcUfaAfaAfl96	A-113002.1	uUfuCfGfAfuAfgAfgucGfgCfaGfuUfcsAfg
AD-54978.1	A-113069.1	UfcAfaCfaAfaUfgGfgUfuUfaUfaAfaAfl96	A-113070.1	uAfuUfgGfaCfaCfcaUfuUfgUfuGfasUfsg
AD-54952.1	A-113013.1	CfaCfuGfuUfcUfgGfuGfuUfuUfaAfaAfl96	A-113014.1	uUfaAfcCfaGfaAfcAfcGfaAfaUfgUfgsAfg
AD-54950.1	A-113075.1	GfgAfcGfgCfuUfcAfaUfuUfaAfaGfgAfl96	A-113076.1	uCfcUfuCfaAfaCfugaAfgCfcGfuCfcsUfsc
AD-54964.1	A-113017.1	CfuGfgAfcUfuCfaAfaAfgGfaAfaUfuGfaAfl96	A-113018.1	uGfcAfuUfuUfcCfuugAfaGfuCfaAfgsGfsg
AD-54974.1	A-113005.1	AfgGfuAfuUfuUfaAfgUfuUfuGfaCfaCfaAfl96	A-113006.1	uGfgUfgUfcAfaAfcuAfaAfaAfuAfcUfcsCfsc
AD-54969.1	A-113003.1	UfuAfcUfuCfaAfaGfgGfgCfuUfgGfaAfl96	A-113004.1	uUfcCfaCfaGfgCfcUfuUfgAfaGfuAfasAfsu
AD-54961.1	A-113063.1	UfuUfuUfgGfaGfAfcAfaUfcCfcUfuAfl96	A-113064.1	uAfaGfgGfaUfuUfgucUfcCfaAfaAfasGfsg
AD-54968.1	A-113081.1	GfaUfuGfcUfgGfcCfuUfuCfuCfuAfaAfl96	A-113082.1	uUfuAfgCfaAfaCfGgCfaGfcAfaUfcsAfg
AD-54947.1	A-113027.1	CfcGfaCfuCfuAfuUfcGfaAfaGfcCfaAfl96	A-113028.1	uUfgGfcUfuUfuCfGauAfgUfcGfgsCfSa
AD-54941.1	A-113025.1	CfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfgGfgCfcUfl96	A-113026.1	aGfgCfcCfuUfgAfgUfaAfaUfuGfgUfgsUfsu
AD-54966.1	A-113049.1	CfaAfgCfuGfgGfuGfcCfuUfuUfaUfgAfl96	A-113050.1	uCfaUfuAfcAfgGfcacCfcAfgCfuUfgsGfsu
AD-54940.1	A-113009.1	AfcAfcUfaUfuAfuUfcUfuUfuGfgGfaAfl96	A-113010.1	uGfcCfcAfuGfaAfgauAfaUfaGfuGfusUfsc
AD-54958.1	A-113015.1	AfgGfaAfaAfuGfcAfgAfgCfaAfuCfaAfl96	A-113016.1	uGfgAfuUfgCfuCfugaAfuUfuUfcCfusUfsg
AD-54938.1	A-113071.1	UfcUfgGfuGfcUfgGfuUfaAfcAfcCfaUfl96	A-113072.1	aUfgGfuGfuUfaAfcAfcGfaAfcCfaGfasAfg
AD-54934.1	A-113007.1	AfgCfcCfuGfuGfgAfaCfuUfuGfgAfcAfl96	A-113008.1	uGfuGfcAfgAfuGfuuccAfcAfgGfgCfusCfsc
AD-54939.1	A-112993.1	CfuUfuUfuCfuUfuUfgGfcCfaAfaCfuGfaAfl96	A-112994.1	uUfaAfgUfuUfgGfcaAfgAfaGfaAfgsUfsg
AD-54960.1	A-113047.1	UfcUfcCfaCfgGfcUfuUfuGfcUfaUfgAfl96	A-113048.1	uCfaUfaGfcAfaAfgCfcUfgGfaGfasUfSa
AD-54954.1	A-113045.1	GfcAfcCfuGfgCfAfgGfaUfuCfcAfaGfaAfl96	A-113046.1	uUfcUfuGfgAfaUfcugCfcAfgGfuGfcsUfsg

10

20

30

40

50

【 0 4 0 6 】
【表 8 — 5】

AD-54970.1	A-113019.1	CfuUfcAfuGfgGfcFAfgAfgUfaGfcCfaAflL96	A-113020.1	uUfgGfcUfaCfuCfugcCfcAfuGfaAfgsAfsu
AD-54946.1	A-113011.1	CfuCfcAfaGfuUfAfgUfaUfaCfaGfcCfaAflL96	A-113012.1	uUfgGfcUfgAfuAfcuaAfcUfuGfgAfgsGfsa
AD-56331.1	A-113073.4	GfgUfuAfaCfaCfcFAfuUfaUfcUfuCfaAflL96	A-115852.1	UUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56337.1	A-115853.1	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaAflL96	A-113074.4	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56343.1	A-115854.1	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaalL96	A-113074.5	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56349.1	A-115855.1	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuacUfuCfaalL96	A-113074.6	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56355.1	A-115856.1	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcuucaalL96	A-113074.7	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56361.1	A-115857.1	GfguuAfaCfcFAfuUfuacUfucaalL96	A-113074.8	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56367.1	A-115858.1	GfguuAfaCfcFAfuUfuacUfucaalL96	A-113074.9	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56326.1	A-115859.1	GfguuAfaCfcFAfuUfuacuucaalL96	A-113074.10	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56332.1	A-115860.1	GfguuacaCfcFAfuUfuacuucaalL96	A-113074.11	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG
AD-56338.1	A-113073.5	GfgUfuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaAflL96	A-115861.1	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56344.1	A-115853.2	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaAflL96	A-115861.2	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56350.1	A-115854.2	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaalL96	A-115861.3	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56356.1	A-115855.2	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuacUfuCfaalL96	A-115861.4	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56362.1	A-115856.2	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcuucaalL96	A-115861.5	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56368.1	A-115857.2	GfguuAfaCfcFAfuUfuacUfucaalL96	A-115861.6	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56327.1	A-115858.2	GfguuAfaCfcFAfuUfuacUfucaalL96	A-115861.7	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56333.1	A-115859.2	GfguuAfaCfcFAfuUfuacuucaalL96	A-115861.8	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56339.1	A-115860.2	GfguuacaCfcFAfuUfuacuucaalL96	A-115861.9	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasG
AD-56345.1	A-113073.6	GfgUfuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaAflL96	A-115862.1	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasG
AD-56351.1	A-115853.3	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaAflL96	A-115862.2	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasG
AD-56357.1	A-115854.3	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcUfuCfaalL96	A-115862.3	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasG
AD-56363.1	A-115855.3	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuacUfuCfaalL96	A-115862.4	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasG
AD-56369.1	A-115856.3	GfguuAfaCfaCfcFAfuUfuAfcuucaalL96	A-115862.5	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasG

【 0 4 0 7 】
【 表 8 - 6 】

AD-56328.1	A-115857.3	GfguuAfacaCfCfAfUfUfuacUfucaal96	A-115862.6	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg
AD-56334.1	A-115858.3	GfguuAfacaCfCfAfUfuuaacUfucaal96	A-115862.7	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg
AD-56340.1	A-115859.3	GfguuAfacaCfCfAfUfuuaacucaal96	A-115862.8	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg
AD-56346.1	A-115860.3	GfguuacaCfCfAfUfuuaacucaal96	A-115862.9	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg
AD-56352.1	A-115863.1	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-113074.12	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56358.1	A-115864.1	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-113074.13	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56364.1	A-115865.1	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-113074.14	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56370.1	A-115866.1	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-113074.15	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56329.1	A-115867.1	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-113074.16	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56335.1	A-115868.1	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-113074.17	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56341.1	A-115869.1	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-113074.18	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56347.1	A-115868.2	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115870.1	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56353.1	A-115868.3	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115871.1	uUfgAaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56359.1	A-115868.4	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115872.1	uUfgAaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56365.1	A-115868.5	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115873.1	uUfgAaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56371.1	A-115868.6	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115874.1	uUfgAaguAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56330.1	A-115868.7	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115875.1	uUfgAaGuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56336.1	A-115868.8	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115876.1	uUgAaguAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56342.1	A-115868.9	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115877.1	uUgAaGuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56348.1	A-115868.10	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115861.10	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56354.1	A-115868.11	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115878.1	uUfgAaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56360.1	A-115868.12	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115879.1	uUfgAaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56366.1	A-115868.13	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115880.1	uUfgAaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56372.1	A-115868.14	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115881.1	uUfgAaguAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg
AD-56378.1	A-115868.15	GfgUfUfAfaCfaCfCfAfUfUfuAfuCfaAfL96	A-115882.1	uUfgAaGuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg

10

20

30

40

50

【0408】
【表8-7】

AD-56384.1	A-115868.16	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115883.1	uUgAaGuAaAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56390.1	A-115868.17	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115884.1	uUgAaGuAaAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56396.1	A-113073.7	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.1	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56402.1	A-115863.2	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.2	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56408.1	A-115864.2	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.3	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56414.1	A-115865.2	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.4	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56373.1	A-115886.1	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.5	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56379.1	A-115866.2	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.6	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56385.1	A-115867.2	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.7	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56391.1	A-115868.18	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.8	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56397.1	A-115869.2	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115885.9	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56403.1	A-113073.8	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.1	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56409.1	A-115863.3	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.2	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56415.1	A-115864.3	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.3	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56374.1	A-115865.3	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.4	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56380.1	A-115886.2	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.5	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56386.1	A-115866.3	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.6	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56392.1	A-115867.3	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.7	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56398.1	A-115868.19	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.8	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56404.1	A-115869.3	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-115887.9	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56410.1	A-115888.1	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-113074.19	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56416.1	A-115889.1	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-113074.20	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56375.1	A-115890.1	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-113074.21	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56381.1	A-115891.1	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-113074.22	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs
AD-56387.1	A-115892.1	GfGfUfUfAfAfCfaCfCfaUfUfUfAfCfUfUfUfCfAfAfL96	A-113074.23	uUfGfAfAfGfUfAfAfAfuggUfgUfUfAfAfCfcsAfs

10

20

30

40

50

【0409】
【表8-8】

AD-56393.1	A-115893.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.24	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56399.1	A-115894.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.25	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56405.1	A-115895.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.26	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56411.1	A-115896.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.27	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56417.1	A-115897.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.28	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56376.1	A-115898.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.29	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56382.1	A-115899.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.30	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56388.1	A-115900.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.31	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56394.1	A-115901.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.32	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56400.1	A-115902.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.33	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56406.1	A-115903.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.34	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56412.1	A-115904.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.35	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56418.1	A-115905.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.36	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56377.1	A-115906.1	gguuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.37	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56383.1	A-113073.9	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115907.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56389.1	A-113073.10	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115908.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56395.1	A-113073.11	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115909.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56401.1	A-113073.12	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115910.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56407.1	A-113073.13	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115911.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56413.1	A-113073.14	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115912.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56419.2	A-113073.15	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115913.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56425.2	A-113073.16	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115914.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56431.2	A-113073.17	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115915.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56436.2	A-113073.18	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115916.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg
AD-56442.2	A-113073.19	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115917.1	uUfgAfaGfuAfaAfuuggUfgUfuAfaCfcsAfsfg

10

20

30

40

50

【0410】
【表8-9】

AD-56448.2	A-113073.20	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115918.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsGf
AD-56454.2	A-113073.21	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115919.1	uugaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56460.2	A-113073.22	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115920.1	uUfgaaguAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56420.2	A-113073.23	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115921.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56426.2	A-113073.24	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115922.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56432.2	A-113073.25	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115923.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56437.2	A-113073.26	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115924.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56443.2	A-113073.27	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115925.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56449.2	A-113073.28	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115926.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56455.2	A-113073.29	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115927.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56461.2	A-115888.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115919.2	uugaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56421.2	A-115889.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115920.2	uUfgaaguAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56427.2	A-115890.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115921.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56433.2	A-115891.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115922.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56438.2	A-115892.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115923.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56444.2	A-115893.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115924.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56450.2	A-115894.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115925.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56456.2	A-115895.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115926.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56462.2	A-115896.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115907.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56422.2	A-115897.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115908.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56428.2	A-115898.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115909.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56434.2	A-115899.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115910.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56439.2	A-115900.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115911.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56445.2	A-115901.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115912.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG
AD-56451.2	A-115902.2	GfgUfuAfaCfaCfcfAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115913.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsG

10

20

30

40

50

【0 4 1 1】
【表 8-1 0】

AD-56457.2	A-115903.2	GfgUfuAfaCaCfCfaFuuuAfcUfuCfaAfL96	A-115914.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56463.2	A-115904.2	GfgUfuAaCaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115915.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56423.2	A-115905.2	GfguuAaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115916.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56429.2	A-115906.2	gguuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115917.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56440.2	A-113073.31	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115928.1	uUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56446.2	A-115929.1	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115928.2	uUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56452.2	A-113073.32	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115930.1	UUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56458.2	A-115929.2	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115930.2	UUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56464.2	A-113073.33	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115931.1	uUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56424.2	A-115929.3	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115931.2	uUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56430.2	A-115932.1	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115931.3	uUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56435.2	A-113073.34	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115933.1	UUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56441.2	A-115929.4	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115933.2	UUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56447.2	A-115932.2	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115933.3	UUfgAfaGfuAfaAfugGfuUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56453.2	A-115934.1	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-113074.39	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56459.2	A-115935.1	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-113074.40	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56465.2	A-115936.1	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-113074.41	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56471.2	A-115937.1	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-113074.42	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg
AD-56477.2	A-113073.35	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115938.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfc
AD-56483.3	A-113073.36	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115939.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfsc
AD-56488.2	A-113073.37	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115940.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfasCfsc
AD-56483.4	A-113073.38	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115939.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfsc
AD-56497.2	A-115941.1	UfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115940.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfasCfsc
AD-56502.2	A-115941.2	UfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115942.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfa
AD-56466.2	A-115941.3	UfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-115943.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfsa

【0412】
【表8-11】

AD-56472.2	A-115941.4	UfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115944.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfusAfsa
AD-56478.2	A-115945.1	AfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115943.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfsa
AD-56484.2	A-115945.2	AfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115944.2	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfusAfsa
AD-56493.2	A-113073.39	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115948.1	uUfgAf(Aeo)GfuAfaAfuggUfgUfaCfcsAfsa
AD-56498.2	A-113073.40	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115949.1	uUfgAfa(Geo)uAfaAfuggUfgUfaCfcsAfsa
AD-56467.2	A-113073.42	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115951.1	uUfgAfaGfu(Aeo)AfaAfuggUfgUfaCfcsAfsa
AD-56473.2	A-113073.43	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115952.1	uUfgAfaGfuAf(Aeo)AfuggUfgUfaCfcsAfsa
AD-56479.2	A-113073.44	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115953.1	uUfgAfaGfuAfa(Aeo)uggUfgUfaCfcsAfsa
AD-56485.2	A-113073.45	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115954.1	uUfgAfaGfuAfaAfugg(Teo)UfaCfcsAfsa
AD-56490.2	A-113073.46	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115955.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUf(Geo)UfuAfaCfcsAfsa
AD-56494.2	A-113073.47	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115956.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfg(Teo)uAfaCfcsAfsa
AD-56499.2	A-113073.48	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115957.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUf(Teo)AfaCfcsAfsa
AD-56504.2	A-113073.49	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115958.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfu(Aeo)AfaCfcsAfsa
AD-56468.2	A-113073.50	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115959.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAf(Aeo)CfcsAfsa
AD-56474.2	A-113073.51	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115960.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfa(m5Ceos)csAfsa
AD-56480.2	A-113073.52	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115961.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCf(m5Ceos)Afsa
AD-56486.2	A-113073.53	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115962.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)
AD-56491.2	A-113073.54	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-115963.1	uUfgAfaGfuAfaAf(Teo)(Geo)UfgUfusAfsa
AD-56495.2	A-115964.1	GfgUfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.43	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsa
AD-56500.2	A-115965.1	Gf(Geo)UfuAfaCfaCfcAfaUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.44	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsa
AD-56505.2	A-115966.1	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfcAfaUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	A-113074.45	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsa
AD-56469.2	A-115967.1	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfcAfaUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	A-113074.46	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsa
AD-56475.2	A-115968.1	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfcAfaUfuAfcUf(Teo)Af(m5Ceos)Uf(Te	A-113074.47	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsa

10

20

30

40

50

【 0 4 1 3 】
【表 8－1 2】

			o)Cf(Aeo)AfL96			
AD-56481.2	A-115969.1	Gf(Geo)Uf(Teo)AfAfaCfaCfCfAf(Teo)Uf(Teo)Af(m5Ceo)Uf(Teo)Cf(Aeo)AfL96	A-113074.48	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg		
AD-56487.2	A-115970.1	Gf(Geo)Uf(Teo)Af(Aeo)Cf(Aeo)CfCfAf(Teo)Uf(Teo)Af(m5Ceo)Uf(Teo)Cf(Aeo)AfL96	A-113074.49	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg		

10

20

30

40

50

【0414】

実施例3：LNP媒介siRNA送達

上述の試験管内単回投与とIC₅₀結果に基づいて、脂質ナノ粒子（LNP）製剤のために、修飾AD-50509を選択した。AD-50509のLNP媒介送達の有効用量を判定するために、AD-50509 siRNAのLNP製剤（AF-011）の単回投与を0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、または1.0mg/kgで、CD1マウスに静脈内注射した。動物を48時間後に殺処分し（sacrificied）、本明細書に記載されるようにして、GAPDHと比較したSerpincl mRNAレベル、およびSerpinclタンパク質レベルを測定した。図3Aおよび3Bに示されるように、約0.1mg/kgのED₅₀で、AF-011-AD-50509による85%の最大Serpincl mRNAサイレンシングが達成され（図3A）、約0.05mg/kgのED₅₀で、90%の最大Serpinclタンパク質サイレンシングが達成された（図3B）。

10

【0415】

AD-50509 siRNA（AF-011-50509）LNP製剤のサイレンシング持続期間は、CD1マウス中で、siRNAの単回1mg/kg静脈内注射に続いて判定した。動物を投与の1、2、3、7、14、21、または28日後に殺処分して、Serpincl mRNAの相対レベルおよびSerpinclタンパク質のレベルを測定した。図4Aは、AF-011調合AD-50509が、投与の24時間以内に約90%のSerpincl mRNAサイレンシングを達成し、投与の約2週間後に、Serpincl mRNAの相対量におよそ50%の回復があったことを実証する。図4Bは、AF-011に処方されたAD-50509が、投与の約72時間以内に約90%のSerpinclタンパク質mRNAサイレンシングを達成し、投与の約2週間後に、Serpinclタンパク質の相対量におよそ50%の回復があったことを実証する。Serpincl活性はまた、CD1マウス中で、LNPに処方されたAD-50509 siRNAの単回1mg/kg静脈内注射に続いて、市販のキット（Aniara）を使用して、Xa因子活性を測定することでも判定された。動物を投与の1、2、3、7、14、21、または28日後に殺処分して、Serpinclタンパク質の相対活性レベルおよび相対Serpinclタンパク質レベルを測定した。図4Cは、Serpinclタンパク質レベルとSerpincl活性レベルの間に、良好な相関があることを示す。

20

30

【0416】

実施例4：GalNAc共役siRNA

44本の修飾Serpincl siRNA二本鎖を、センス鎖の3'末端で三価のGALNAcと共役させた。これらの二本鎖を、カニクイザル肝実質細胞中における、共役二本鎖の単回投与自由取り込み効率について、アッセイした。表9は、これらのアッセイ結果を示す。

【0417】

【表 9 - 1】

表9.GalNAc単回投与自由取り込み

二本鎖ID	100 nM平均	10 nM平均	0.1 nM平均
AD-54944.1	0.4	0.53	0.94
AD-54951.1	0.37	0.56	1
AD-54942.1	0.38	0.58	1.01
AD-54948.1	0.36	0.6	0.96
AD-54957.1	0.47	0.61	1
AD-54933.1	0.51	0.65	0.96
AD-54962.1	0.48	0.66	0.95
AD-54972.1	0.49	0.66	1.05
AD-54949.1	0.49	0.71	0.96
AD-54936.1	0.54	0.72	1.07
AD-54971.1	0.49	0.72	1
AD-54955.1	0.52	0.74	0.98
AD-54953.1	0.63	0.76	1.07
AD-54937.1	0.64	0.81	0.94
AD-54967.1	0.74	0.82	1.02
AD-54935.1	0.68	0.83	0.99
AD-54976.1	0.7	0.85	1.04
AD-54965.1	0.7	0.86	0.97
AD-54959.1	0.79	0.86	0.95
AD-54943.1	0.75	0.86	0.94
AD-54956.1	0.86	0.87	0.95
AD-54973.1	0.96	0.89	1
AD-54975.1	0.67	0.89	0.99
AD-54963.1	0.73	0.9	0.96
AD-54978.1	0.85	0.9	0.98
AD-54952.1	0.59	0.91	1.11
AD-54950.1	0.89	0.91	0.95

【 0 4 1 8】

【表 9 - 2】

AD-54964.1	0.87	0.93	1.01
AD-54974.1	0.83	0.93	0.96
AD-54969.1	0.87	0.94	0.94
AD-54961.1	0.74	0.94	1.07
AD-54968.1	0.89	0.95	0.91
AD-54947.1	0.92	0.96	0.94
AD-54941.1	0.91	0.96	1
AD-54966.1	0.93	0.97	1.06
AD-54940.1	0.86	0.99	1.03
AD-54958.1	0.97	0.99	1.06
AD-54938.1	0.93	0.99	1.05
AD-54934.1	0.92	1	0.96
AD-54939.1	0.84	1.02	1.02
AD-54960.1	0.98	1.03	1.02
AD-54954.1	1.04	1.03	1.01
AD-54970.1	1.03	1.06	1.01
AD-54946.1	0.83	1.17	1.1

10

20

【0 4 1 9】

これらの二本鎖はまた、自由取り込みおよび形質移入アッセイで、用量応答についてもアッセイされた。

30

【0 4 2 0】

表 1 0 は、自由取り込みおよび形質移入の双方について、これらのアッセイ結果および二本鎖の順位を示す。最高の IC_{50} がある 5 本の二本鎖は淡灰色で網掛けされ、最低の 5 本の二本鎖は濃灰色で網掛けされる。二本鎖の IC_{50} 順位は、GalNAc 複合体の自由取り込みおよび形質移入媒介取り込みの間で、良好に保たれた。

【0 4 2 1】

【表 10】

表10.GalNAc共役二本鎖の用量応答:自由取り込みおよび形質移入

	自由取り込み (nM)	自由取り込み 格付け	形質移入 (nM)	形質移入 格付け
AD-54948.1	8.2	1	0.018	3
AD-54951.1	10.1	2	0.009	1
AD-54942.1	10.8	3	0.024	6
AD-54957.1	17.8	4	0.012	2
AD-54944.1	19.3	5	0.019	4
AD-54933.1	33.2	6	0.031	7
AD-54936.1	43.2	7	0.032	9
AD-54971.1	44.7	8	0.041	11
AD-54962.1	80.2	9	0.032	8
AD-54972.1	101.4	10	0.035	10
AD-54955.1	148.1	11	0.022	5
AD-54949.1	No IC50	12	0.302	13
AD-54953.1	No IC50	13	0.058	12

10

20

【0422】

実施例5:AD-54944最適化

上の実施例4に記載されるように、AD-54944は、自由取り込みおよび形質移入アッセイの双方による判定で、最も活性が高いGalNAc共役siRNA二本鎖の1つであり、したがってさらなる最適化および生体内試験のために選択された。

【0423】

同一AD-54944親配列をベースとして29種の化合物を調製し、10mg/kgの単回投与を使用して、生体内効能についてスクリーニングした。動物(C57BL/6)は、0日目に皮下注射して、3日目に殺処分した。血清Serpincl1タンパク質レベルは、ELISAアッセイによって測定し、Serpincl1 mRNAレベルは、動物からの肝臓サンプルを使用して、QRT-PCRによって測定した。表11および12は、二本鎖の配列、そしてSerpincl1タンパク質レベル百分率のPBSからのノックダウンとしてのこれらの二本鎖の単回投与スクリーニング結果を示す。図5は、Serpincl1 mRNAおよびタンパク質レベルのPBSからのノックダウン百分率として、単回投与スクリーニング結果を示す。

30

【0424】

【表 1 1 - 1】

表11. AD-54944最適化配列およびタンパク質レベル。(「センサ配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号779～808として開示され、
「アンチセンサ配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号809～838として開示される)

二本鎖名称	センサ配列	アンチセンサ配列	%PBS	標準偏差
AD-54944	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	66.8	4.8
AD-56345	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	83.6	19.2
AD-56351	GfguuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	71.7	7.5
AD-56363	GfguuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	57.9	7.6
AD-56334	GfguuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	59.4	6.0
AD-56346	GfguuacaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	82.3	13.2
AD-56352	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	52.2	3.6
AD-56410	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	55.0	2.5
AD-56405	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	60.6	3.1
AD-56383	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	66.7	7.6
AD-56730	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	64.4	3.4
AD-56380	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	75.7	5.0
AD-56397	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	76.9	0.8
AD-56434	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	52.0	5.1
AD-56488	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	85.3	16.6
AD-56486	GfgUfuAfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	67.7	0.5
AD-56505	Gfg(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	59.7	0.2
AD-56736	Gfg(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfcAfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	49.7	1.2

【表 1 1-2】

		o)AfL96			
AD-56738		Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfafuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)AfL96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	65.0	3.6
AD-56739		Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfafuUf(Teo)Af(m5Ceo)Uf(Teo)Cf(Ae o)AfL96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	57.6	2.1
AD-56740		Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfafuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)AfL96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg	85.5	14.8
AD-56743		Gf(Geo)UfuAfaCfaCfAfafuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)AfL96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg	48.3	3.9
AD-56745		Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfafuUfuAfm5Ceo)Uf(Teo)Cf(Aeo)Af L96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg	54.4	9.9
AD-56454		GfgUfuAfaCfaCfAfafuUfuAfcUfuCfaAfL96	uugaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	72.0	11.0
AD-56449		GfgUfuAfaCfaCfAfafuUfuAfcUfuCfaAfL96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	54.4	15.9
AD-56746		Gf(Geo)UfuAfaCfaCfAfafuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)AfL96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	64.7	17.2
AD-56333		GfguuAfaCaCfAfafuuuacuucaal96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg	71.5	11.3
AD-56382		GfgUfuAfaCfaCfAfafuuuacUfuCfaAfL96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	65.7	2.7
AD-56748		GfgUfuAfaCfaCfAfafuuuacUfuCfaAfL96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	99.4	19.1
AD-54944 (オリジナル)		GfgUfuAfaCfaCfAfafuUfuAfcUfuCfaAfL96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	46.9	1.7
対照				96.0	8.5
PBS				100.0	4.7

【表 1 2 - 1】

表12.AD-54944最適化配列およびタンパク質レベル。(「センス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号839~868として開示され、「アンチセンス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号869~898として開示される)

二本鎖名称	センス配列	アンチセンス配列	%PBS	標準偏差
AD-54944 (オリジナル)	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	46.9	1.7
AD-56743	Gf(Geo)UfuAfaCfaCfCfaUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsaasG	48.3	3.9
AD-56736	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaUfuUf(Teo)Af(m5Ceo)Uf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUf(Geo)UfuAfaCfcsAfsG	49.7	1.2
AD-56434	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	52.0	5.1
AD-56352	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	52.2	3.6
AD-56745	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsaasG	54.4	9.9
AD-56449	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	54.4	15.9
AD-56410	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	55.0	2.5
AD-56739	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaUfuUf(Teo)Af(m5Ceo)Uf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsaasG	57.6	2.1
AD-56363	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsaasG	57.9	7.6
AD-56334	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsaasG	59.4	6.0
AD-56505	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	59.7	0.2
AD-56405	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	60.6	3.1
AD-56730	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsGf	64.4	3.4
AD-56746	Gf(Geo)UfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	64.7	17.2
AD-56738	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsaasG	65.0	3.6
AD-56382	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	65.7	2.7
AD-56383	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	66.7	7.6
AD-54944 (新規)	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsG	66.8	4.8
AD-56486	GgUfuAfaCfaCfCfaUfuUfuAfcUfuCfaAfl96	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	67.7	0.5

【表 1 2 - 2】

AD-56333	GfguuAfaCaCfCfAfuuuacuuaal96	uuUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg	71.5	11.3
AD-56351	GfguuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96	uuUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	71.7	7.5
AD-56454	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96	uuUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	72.0	11.0
AD-56380	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96	uuUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	75.7	5.0
AD-56397	GfgfuUfuAfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96	uuUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	76.9	0.8
AD-56346	GfguuacaCfCfAfuuuacuuaal96	uuUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	82.3	13.2
AD-56345	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96	uuUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	83.6	19.2
AD-56488	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfL96	uuUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfsc	85.3	16.6
AD-56740	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfAfuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)AfL96	uuUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg	85.5	14.8
対照			96.0	8.5
AD-56748	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuuuacuUfuCfaAfL96	uuUfgaaGfuAfaAfuggUfguuAfaCfcsasg	99.4	19.1
PBS			100.0	4.7

【 0 4 2 8 】

Ga1NAc 共役 AD-54944 の生体内用量応答は、C57BL/6J マウス (n 50

10

20

30

40

= 5) に単回皮下投与することで判定された。GalNAc 共役 AD-54944 はまた、5 mg/kg の反復 1 日量で、C57BL/6J マウス (n = 5) に 5 日間にわたり皮下投与した。投与の 72 時間後に動物を殺処分して、上述したように、肝臓および血清サンプル中で Serpinc1 タンパク質および活性レベルを測定した。

【0429】

図 6 に示されるように、GalNAc 共役 AD-54944 の単回皮下投与は、約 10 mg/kg のタンパク質 EC₅₀ をもたらし、毎日 5 × 5 mg/kg の反復投与は、約 75 % のタンパク質サイレンシングをもたらした。

【0430】

C57BL/6J マウスにおける GalNAc 共役 AD-54944 の追加的な反復投与もまた、8 週間にわたり実施して、サイレンシングの効能と持続期間を判定した。図 7A および 7B は、これらの試験結果を示す。

【0431】

実施例 6：AD-54944 の分割投薬の用量持続期間

化合物 AD-54944 による Serpinc1 発現および活性ノックダウンをさらに評価するために、分割投薬実験を実施した。C57BL/6 マウスに、GalNAc 共役 AD-54944 を皮下投与して、週 3 回の AD-54944 の 1/3 用量の効果を、週 1 回の AD-54944 の完全濃縮用量の効果と比較した。研究デザインの概要は、表 13 に示される。血清 Serpinc1 タンパク質レベルは、0、3、7、10、14、17、21、24、29、31、および 35 日目に測定した。

【0432】

【表 13】

表 13. 分割投薬実験の研究デザイン

群	試験化合物	用量 (mg/kg)	頻度
1	AD-54944	1.25	3×/週 (月、水、金)
2		2.5	
3		5	
4		10	
5		3.75	1×/週 (月)
6		7.5	
7		15	
8		30	
9	PBS	—	

【0433】

Serpinc1 タンパク質レベルの投与前レベルからのノックダウン百分率としての、週 1 回の分割投薬スクリーニングの結果は、図 8 で示され、Serpinc1 タンパク質レベルの投与前レベルからのノックダウン百分率としての、週 3 回投薬のスクリーニングの結果は、図 9 で示される。結果は、双方の群で GalNAc 共役 AD-54944 に用量応答効果があり、30 mg/kg で週 1 回投与、および 10 mg/kg で週 3 回投与の双方が、Serpinc1 の長期サイレンシングをもたらすことを実証する。

【0434】

実施例 7：AD-54944 のさらなる最適化

AD-54944の効能をさらに改善するために、AD-54944親配列をベースとして追加的な化合物を調製した。一般に修飾としては、ホスホロチオエート (phosphorothiate) 結合、C16 (ヘキサデシル) 修飾、5'末端キャップ、および2'メチルの付加が挙げられる。3mg/mgの単回投与および10mg/kgの単回投与の双方を使用して、新しい化合物を生体内効能についてスクリーニングした。動物 (C57BL/6) は、0日目に皮下注射して、3日目に殺処分した。血清Serpinc1タンパク質レベルは、ELISAアッセイによって測定した。ELISAアッセイは、Abcamから購入された抗トロンビンIIIマウスELISAキットを使用して実施した。簡単に述べると、血清を希釈 (例えば約1:10,000) して、製造会社の使用説明に従って使用した。プレートは、アッセイの終了時に450nmで読み取った。

10

【0435】

表14は、二本鎖の配列と、そしてSerpinc1タンパク質レベル百分率のPBSからのノックダウンとしてのこれらの二本鎖の単回投与スクリーニング結果を示す。図10Aおよび10Bは、Serpinc1タンパク質レベルのPBSからのノックダウン百分率としての単回投与スクリーニング結果を示す。表14および図10から分かるように、化合物AD-56813は、Serpinc1タンパク質レベルのノックダウンレベルに基づいて、新しいリードとして出現した。

【0436】

化合物の活性を保つ (maintained) 化合物の安定性に要する最少化学修飾を判定するために、その中で2'-メトキシエチルおよびホスホロチオエート結合数が低下している、AD-56813親配列をベースとして、さらなる化合物を調製した。3mg/mgの単回投与および10mg/kgの単回投与の双方を使用して、新しい化合物を生体内効能についてスクリーニングした。動物 (C57BL/6) は、0日目に皮下注射して、3日目に殺処分した。Serpinc1 (AT3) 活性および血清Serpinc1タンパク質レベルは、ELISAアッセイによって測定した。ELISAアッセイは、上述したように実施した。Serpinc1活性は、BIOPHEN (抗Xa因子) 活性試験キットを使用して測定した。簡単に述べると、血清サンプルを約1:20~約1:60に希釈し、製造会社の使用説明に従って処理した。プレートは、アッセイの終了時に450nmで読み取った。

20

【0437】

新たに調製された二本鎖の配列、そしてSerpinc1タンパク質レベルのPBSからのノックダウン百分率としてのこれらの二本鎖の単回投与スクリーニングの結果は、表15で示される。図11は、Serpinc1タンパク質レベルのPBSからのノックダウン百分率としての単回投与スクリーニング結果を示し、図12は、PBSからのSerpinc1活性のノックダウン百分率としての単回投与スクリーニング結果を示す。

30

【0438】

表15ならびに図11および12から分かるように、化合物に対する修飾数は劇的に低下されたが、化合物AD-57213は、Serpinc1発現および活性のノックダウンを維持し、したがって、新しいリードとして出現した。10mg/kgのAD-57213の単回投与は、ED₉₀をもたらし、3mg/kgの単回投与は、ED₅₀をもたらした。

40

【0439】

【表 1 4 - 1】

表14.AD-54944最適化配列およびタンパク質レベル。(「センス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号899~919として開示され、「アンチセンス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号920~940として開示される)

二本鎖ID	センス鎖	センス配列	アンチセンス	アンチセンス配列	3 mpk %	10 mpk %
AD-56813.2	A-116280.6	Gfs(Geo)UfsuAfaCfsaCfsCfsAfuUfsuAfcUfsuCfs(Aeo)Afl96	A-116278.6	usUfsgAfaGfuAfaAfuggUfsgUfsuAfaCfscs(Aeos)(Geo)	0.62	0.04 0.26 0.04
AD-56789.2	A-116276.12	GfgUfsuAfaCfsaCfsCfsAfuUfsuAfcUfsuCfsaAfl96	A-116275.7	uUfsgAfaGfuAfaAfuggUfsgUfsuAfaCfscsAfsg	0.74	0.11 0.44 0.11
AD-56741	A-115968.11	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaFuUf(Teo)Af(m5Ce)o)Uf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	A-115861.11	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg		0.52 0.09
AD-54944/parent	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUfuCfaAfl96	A-113074.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	0.93	0.10 0.63 0.10
AD-56743	A-115965.5	Gf(Geo)UfuAfaCfaCfCfaFuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	A-115861.11	uUfgaaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg		0.71 0.24
AD-56836.2	A-115966.25	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaFuUfuAfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	A-116284.3	uUfgAfaGf(Uhd)AfaAfuggUfgUfuAfaCfcsasg	1.01	0.11 0.73 0.11
AD-56797.2	A-115968.8	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaFuUf(Teo)Af(m5Ce)o)Uf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	A-116250.6	uUfgAfaGfuAfaAfuggUf(Geo)UfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	0.87	0.25 0.74 0.25
AD-56801.2	A-116277.6	Gf(Geo)UfsuAfaCfsaCfsCfsAfuUfsuAfcUfsuCfs(Aeo)Afl96	A-116279.9	uUfsgAfaGfuAfaAfuggUfsgUfsuAfaCfscs(Aeos)(Geo)	0.83	0.08 0.77 0.08
AD-56831.2	A-116290.3	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfCfaFuUf(Uhd)AfcUf(Teo)Cf(Aeo)Afl96	A-115962.21	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	1.11	0.09 0.78 0.09
AD-56830.2	A-116283.3	Gfs(Geo)UfsuAfaCfsaCfCfaFuUfsuAfcUfsuCfs(Aeo)Afl96	A-116279.12	uUfsgAfaGfuAfaAfuggUfgUfsuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	1.01	0.13 0.79 0.13

【表 1 4 - 2】

AD-56761.2	A-116247.13	eo)AFL96	Geo)	A-116244.6	uUfgaaGfuAfaAfuUfggUfguaaacsasg	0.82	0.26	0.83	0.26
AD-56735.2	A-115966.29	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfuUfuAfeUf(Teo)Cf(Aeo)AFL96	Geo)	A-115962.18	uUfgAfaGfuAfaAfuUfggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	1.20	0.15	0.90	0.15
AD-56872	A-115965.5	Gf(Geo)UfuAfaCfaCfAfuUfuAfeUf(Teo)Cf(Aeo)AFL96	Geo)	A-116392.1	uUfgaaGfuAfaAfuUfggUfguuAfaCfcs(Aeos)(Geo)			0.93	0.24
AD-56820.2	A-116317.4	gUf(Uhd)AfaCfaCfAfuUfuAfeUfuCfaAFL96	eo)	A-116297.10	uUfgAfaGfuAfaAfuUfggUfgUfuAfaCfcs(m5Ceos)(Aeo)	1.05	0.10	0.94	0.10
AD-56793.2	A-116382.1	gdGuudAdAcadCdCaundTdAeu(Uhd)dCadAFL96	udTdGadA	A-116373.11	gdTdGadA	0.98	0.08	0.99	0.08
PBS/ 対照						1.00	0.04	1.00	0.04
AD-56873	A-115968.11	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfuUf(Teo)Afl(m5Ce)o)Uf(Teo)Cf(Aeo)AFL96	uUfgaaGfuAfaAfuUfggUfguuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	A-116392.1	uUfgaaGfuAfaAfuUfggUfguuAfaCfcs(Aeos)(Geo)			1.01	0.18
AD-54965	A-113033.1	AfaCfuGfcCfGafCfUfcUfaUfcGfaAfaAFL96	uUfuUfcGfaUfaGfaguCfGfcAfgUfusCfisa	A-113034.1	uUfuUfcGfaUfaGfaguCfGfcAfgUfusCfisa	0.89	0.07	1.03	0.07
AD-56787.2	A-116381.1	gguaaaccadAudTdAcadT(Uhd)dCasal96	udTdGadA	A-116373.10	udTdGadA	1.03	0.18	1.04	0.18
AD-56840.2	A-116317.5	gUf(Uhd)AfaCfaCfAfuUfuAfeUfuCfaAFL96	uUfgAfaGfuAfaAfuUfggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	A-116344.5	uUfgAfaGfuAfaAfuUfggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	1.38	0.14	1.05	0.14
AD-56834.2	A-116333.3	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfuUfuAfeUfuCfaAFL96	uUfgaaGfuAfaAfuUfggUfguuAfaCfcsAfb	A-116334.3	uUfgaaGfuAfaAfuUfggUfguuAfaCfcsAfb	1.17	0.14	1.06	0.14
AD-56841.2	A-115966.26	Gf(Geo)Uf(Teo)AfaCfaCfAfuUfuAfeUf(Teo)Cf(Aeo)AFL96	uUfgAfaGf(Uhd)AfaAfuUfggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	A-116285.3	uUfgAfaGf(Uhd)AfaAfuUfggUfgUfuAfaCfcs(Aeos)(Geo)	1.15	0.21	1.09	0.21

【0 4 4 1】

10

20

30

40

【表 15-1】

表15.AD-56813最適化配列およびタンパク質およびタンパク質レベル。(「センサ配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号941～959として開示され、「アンチセンサ配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号960～978として開示される)

二本鎖名称	センサID	センサ (5'から3')	AS ID	アンチセンサ (5'から3')	ELISA						活性					
					10 mpk			3 mpk			10 mpk			3 mpk		
					平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
AD-57213.1	A-116858.1	GfsgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116861.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.098	0.021	0.264	0.032	0.099	0.021	0.255	0.030				
AD-57214.1	A-116859.1	GfsgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116861.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.140	0.027	0.200	0.132	0.121	0.028	0.123	0.114				
AD-57205.1	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116861.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.147	0.100	0.592	0.094	0.145	0.043	0.542	0.139				
AD-56813.2	A-116280.6	Gfg(Geo)UfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116278.6	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.161	0.047	0.500	0.033	0.179	0.055	0.583	0.065				
AD-57212.1	A-116276.12	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116860.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.164	0.026	0.355	0.007	0.198	0.011	0.395	0.023				
AD-57204.1	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116860.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.170	0.127	0.659	0.004	0.121	0.094	0.608	0.060				
AD-56741.2	A-115968	Gfg(Geo)UfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-115861	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.347	0.098	0.666	0.036	0.419	0.126	0.880	0.070				
AD-57203.1	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116278.6	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.359	0.053	0.829	0.056	0.358	0.064	0.796	0.030				
AD-56765.2	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116275.7	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.366	0.053	0.668	0.040	0.385	0.041	0.791	0.047				
AD-56789.2	A-116276.12	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-116275.7	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.401	0.057	0.700	0.059	0.406	0.078	0.785	0.059				
AD-57211.1	A-116858.1	GfsgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-113074.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.446	0.023	0.760	0.142	0.536	0.027	0.831	0.117				
AD-57210.1	A-116857.1	GfsgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-113074.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.476	0.028	0.734	0.053	0.547	0.041	0.826	0.065				
AD-57208.1	A-116276.12	GfgUfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-113074.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.542	0.016	0.915	0.085	0.486	0.006	0.831	0.034				
AD-56475.3	A-115968	Gfg(Geo)UfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-113074.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.574	0.058	0.932	0.127	0.415	0.019	0.735	0.123				
AD-57209.1	A-116280.6	Gfg(Geo)UfuAfaCfaCfCfAfuUfuAfcUfuCfaAfl.96	A-113074.1	usUfsgAfaGfuAfaAfuUfuAfuAfaCfcsasg	0.588	0.135	0.966	0.100	0.460	0.136	0.823	0.076				

【表 1 5 - 2】

AD-54944.13	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfcCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-113074.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	0.617	0.025	0.715	0.071	0.667	0.016	0.835	0.083
AD-57206.1	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfcCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-116870.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsg	0.681	0.097	0.811	0.110	0.707	0.068	0.940	0.149
AD-57208.2	A-116276.12	GfgUfuAfaCfaCfcCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-113074.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcsAfsg	0.736	0.109	0.714	0.101	0.729	0.122	0.817	0.090
AD-57207.1	A-113073.1	GfgUfuAfaCfaCfcCfaFuUfuAfcUfuCfaAfL96	A-116871.1	uUfgAfaGfuAfaAfuggUfgUfuAfaCfcAfsg	0.934	0.043	0.975	0.035	0.984	0.104	1.009	0.066
					1.000	0.029	1.000		1.000	0.077	1.000	

実施例 8：血友病マウスにおける *Serpinc1* ノックダウン

標的とされる第 *VIII* 因子の欠失を有して、血友病 A 表現型を再現するオスおよびメスマウス (C57BL/6/129 ハイブリッド)、および対照または野生型 (C57BL/6 メス) マウスに、GalNAc に共役した化合物 AD-57213 の単回投与を 30 mg/kg、10 mg/kg、3 mg/kg、または 1 mg/kg で 0 日目に皮下注射し、動物を 3 日目に殺処分して、*Serpinc1* 活性を上述したように測定した。図 13 は、AD-57213 の単回投与が、*Serpinc1* 活性を効果的にノックダウンするだけでなく、AD-57213 に対する用量応答があることを示す。

【0444】

血友病状況におけるトロンビン生成に対する抗トロンビン低下の影響を調べるために、第 *IX* 因子 (*FIX*) および抗トロンビン (*Antithrombin*) (*AT*) 枯渇ヒト血漿に対して、トロンビン生成試験を実施した。(*FIX* 枯渇は、血友病 B 表現型を再現する)。引き続いて血漿サンプルに、様々なレベル (1 IU/ml = 100%) で *AT* を戻し入れて、異なるレベルの抗トロンビン (0 ~ 100%) がある *FIX* 枯渇血漿サンプルを作り出した。対照血漿は、二重枯渇血漿に、1 IU/ml 抗トロンビンおよび 5 µg/ml *FIX* (100%) を戻し入れて作成された。図 31A は、*FIX* および *AT* 枯渇ヒト血漿中におけるトロンビン生成を描写する (組織因子 = 5 pM)。図 31B は、*FIX* および *AT* 枯渇ヒト血漿中におけるピークトロンビン i を描写する (組織因子 = 5 pM)。これらの数値で示されるように、抗トロンビン低下は、試験管内で、第 *IX* 因子枯渇ヒト血漿中におけるトロンビン生成を増大させる。

【0445】

実施例 9：AD-57213 の用量持続期間

血友病 A マウス (B6; 129S4-F8^{tm1/Kaz/J}; Jackson Labs) における、抗トロンビンサイレンシング持続期間を評価するために、GalNAc 共役 AD-57213 の単回投与に続いて、マウスに化合物 AD-57214、AD-57205、または AD-57213 または PBS を皮下注射した。全血を眼窩後方採取して、*Serpinc1* mRNA レベルおよび *Serpinc1* 活性についてアッセイした。3、7、10、14、17、21、28、および 36 日目における、*Serpinc1* 活性の PBS からのノックダウン百分率としての、10 mg/kg、3 mg/kg、または 1 mg/kg で投与された化合物 AD-57213 の単回投与スクリーニング結果は、図 14 に描写される。図 16 は、3、7、10、14、17、21、および 25 日目における、*Serpinc1* 活性の PBS からのノックダウン百分率としての、図に示される用量で投与された化合物 AD-57213、AD-57205、および AD-57214 の単回投与スクリーニング結果を示す。

【0446】

0 日目に、30 mg/kg、10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg の用量で AD-57213、または PBS を皮下注射した血友病 A マウス (B6; 129S4-F8^{tm1/Kaz/J}; Jackson Labs) 中で、肝臓 mRNA、血清中 *AT* 抗原、および *AT* 活性を評価した。動物は、上述したように注射の 3 日後に殺処分した。図 15 は、AD-57213 について、3 日目における、*Serpinc1* mRNA レベルの PBS からのノックダウン百分率としての、*Serpinc1* 抗原レベルの PBS からのノックダウンの百分率としての、および *Serpinc1* 活性の PBS からのノックダウン百分率としての、単回投与スクリーニング結果を示す。

【0447】

図 14 ~ 16 によって証明されるように、化合物 AD-57213 の投与は、HA マウスにおいて、7 日目に 1 mg/kg 未満の単回投与 ED₅₀ で、*Serpinc1* の強力な用量依存的抑制をもたらす。*Serpinc1* 抑制は持続して、達成された最大の抗トロンビン抑制レベルと相関する。1 mg/kg の単回投与が、約 15 日間にわたり維持される 50% の抑制をもたらした一方で、10 mg/kg の用量は、28 日間にわたり維持される 80% を超える抑制をもたらした。

【0448】

実施例10：AD-57213の分割投薬の用量持続期間

化合物AD-57213によるSerpinc1発現および活性ノックダウンをさらに評価するために、分割投薬実験を実施した。C57BL/6マウスに、GalNAc共役AD-57213を皮下投与して、週3回のAD-57213の1/3用量の効果を、週1回のAD-57213の完全濃縮用量の効果と比較した。研究デザインの概要は、表16に示される。血清Serpinc1タンパク質レベルが測定された。

【0449】

【表16】

表 16. 分割投薬実験の研究デザイン

群	試験化合物	用量 (mg/kg)	頻度
1	AD-57213	3	qlw (月)
2		1.5	
3		0.75	
4		1	t.i.w. (月、水、金)
5		0.5	
6		0.25	
7	PBS	-	qlw

(qlw:週に1回)

(tiw:週に3回)

【0450】

Serpinc1タンパク質レベルのPBSからのノックダウン百分率としての週1回 (qlw) 投薬の結果は、図17で示され、Serpinc1タンパク質レベルのPBSからのノックダウン百分率としての週3回 (t.i.w.) 投薬の結果は、図18で示される。

【0451】

図17および18に示されるように、反復投薬は、化合物AD-57213は、いくつかの相加効果がある、用量依存的な持続性応答をもたらした。3mg/kgを投与された動物は、2回の毎週投与後に、>95%ノックダウンのほぼ最下点レベルに達したのに対し、より低い2種の用量群は、3回の毎週投与後に、最下点に達し (1.5mg/kgでは約90%ノックダウン、0.75mg/kgでは約80%)。

【0452】

異なる群における異なる投薬計画をさらに試験するために、同一週間用量を分割して週3回投与し、例えば1.5mg/kg qlwを0.5mg/kg tiwと比較した。図19に示されるように、累積週間用量は、同一ノックダウンレベルを与えた。例えば、1.5mg/kg (qlw) で達成されたSerpinc1レベルは、週3回投与される0.5mg/kgで達成されたSerpinc1レベルと同等であった。

【0453】

実施例11：Serpinc1 siRNAの非ヒト霊長類投薬

化合物AD-57213を表17で概説されるように、非ヒト霊長類中の効能について、試験した。血清Serpinc1タンパク質レベルは、14、8、4日前に、1日目は投薬4時間後に、そして2、4、8、11、15、22、29、37、44、51、および58日後に測定した。

【0454】

【表 17】

表17.非ヒト霊長類投薬実験

被験物質	群番号	n	用量レベル (mg/kg)	投与経路	理論的根拠	
AD54944	1	3	10	SC	親化合物	
AD-57213	2	3	30	SC	リードに対する 用量応答	3×10 mpkと同様
	3	3	10	SC		10mpkでの 化合物の比較
	4	3	3	SC		用量曲線
	5	3	1	SC		
AD-57205	5	3	10	SC	マウス中で 10 mpkで 57213と同一効力	より少ない PSを有する
LNP- 55029	7	3	0.3	IV	試験標的	標的ノックダウン およびアッセイの 陽性対照

【0455】

図20は、投薬前 *Serpinc1* レベルと比較した相対血清 *Serpinc1* レベルの群平均としての、試験した全ての化合物について、単回投与スクリーニング結果を示し、試験した全ての *iRNA* が、*Serpinc1* タンパク質レベルを効果的にノックダウンすることを実証する。

【0456】

図21は、投薬前 *Serpinc1* レベルと比較した相対血清 *Serpinc1* レベルの群平均としての、化合物 AD-57213 の単回投与スクリーニング結果を示す。

【0457】

図22は、8日目における、投薬前 *Serpinc1* レベルと比較した相対血清 *Serpinc1* レベルの群平均としての、試験した全化合物の単回投与スクリーニング結果を示す。

【0458】

全体的には、結果は、非ヒト霊長類において、AD-57213 による、*Serpinc1* タンパク質レベルの用量依存的ノックダウンがあり、AD-57213 および AD-57205 の双方が、親化合物 AD-52444 よりも改善された効力を示すことを実証する。

【0459】

実施例12：治療的 *Serpinc1* siRNA の非ヒト霊長類投薬

化合物AD-57213を非ヒト霊長類中の効能について試験した。カニクイザルに、下の表18で概説されるように化合物AD-57213を投与した。AD-57213の投与後、様々な時点で血漿を採取して、ELISAによって抗トロンビンタンパク質 (*Serpinc1*) レベルについて分析した。

【0460】

【表18】

表18.研究デザイン:非ヒト霊長類におけるAD-57213薬理学

群番号	被験物質	N	用量レベル (mg/kg)	投与経路	試料採取
1	AD-57213	3	1	SC	AT タンパク質 およびトロンビン 生成検査用血漿
2		3	3	SC	
3		3	10	SC	
4		3	30	SC	

10

【0461】

図23は、3回の投与前測定値の平均と比較した相対血清 *Serpinc1* レベルの群平均としての、化合物AD-57213の単回投与スクリーニング結果を示す。結果は、それぞれ1、3、10および30mg/kgでの、約50、70、80および>90%のサイレンシングによって、用量依存的 *Serpinc1* サイレncingを実証する。データ点は群平均を表し、誤差棒は標準偏差を表す。

20

【0462】

図24A~Dは、化合物AD57213のA) 1mg/kg、B) 3mg/kg、C) 10mg/kg、およびD) 30mg/kgの単回投与における、相対血清 *Serpinc1* レベルと、ピーク血漿トロンビンレベルの変化倍数との間の相関を示す。 *Serpinc1* レベルは、3回の投与前測定値の平均と比較して表される。トロンビン生成曲線は、Calibrated Automated Thrombino scopeを使用して、様々な時点で採取され血漿サンプルから作成した(組織因子=1pM)。ピークトロンビンの変化倍数は、各動物について、2回の投与前測定値の平均ピークトロンビン値と比較して計算された。データ点は群平均を表し、誤差棒は標準偏差を表す。図25は、相対的 *Serpinc1* サイレncingの関数として、ピークトロンビン増大の倍数変化の統合された散布図を示す。

30

【0463】

動物にはまた、3回の毎週30mg/kgのAD-57213用量も投与して、動物から採取された血液サンプル中で、 *Serpinc1* タンパク質およびmRNAレベルを測定した。これらの試験結果を図26A(出血前レベルと比較した *Serpinc1* タンパク質レベル) および26B(GAPDHと比較した *Serpinc1* mRNAレベル) に提示する。

40

【0464】

全体的には、結果は、非ヒト霊長類において、化合物AD-57213による *Serpinc1* タンパク質レベルの持続する量依存的障害があり、それは、トロンビン生成に最大で4倍の増大をもたらすことを実証する。

【0465】

実施例13：非ヒト霊長類投薬における *Serpinc1* siRNA の反復投与

反復投与プロトコルによって、非ヒト霊長類において、化合物AD-57213を効能について試験し、化合物の累積効果を評価した。カニクイザルに、2ヶ月間にわたる0.5mg/kg q1w; 1mg/kg q2w(隔週)、および6週間にわたる1.5mg/kg q1w; 3mg/kg q2wで、化合物AD-57213を投与した。図27で

50

図示されるように、血清を様々な時点で採取し、E L I S Aによって抗トロンビンタンパク質レベル（S e r p i n C 1）について分析した。抗トロンビンレベルは、3回の投与前測定の平均と比較して表された。

【0466】

0. 5 m g / k g の累積週間用量の最初の2つの用量群では、5週間後にA Tレベルの80%低下が得られた。1. 5 m g / k g の累積週間用量の後者の2群では、> 95%の最大ノックダウンが得られた。図27Aは、後者の2群からのデータを示す。3 m g / k g の用量を投与した動物を54日目に安楽死させ、1. 5 m g / k g q 1 wの用量を投与した動物には、36日目に追加的な6回目の週間用量を投与して、ベースラインレベルの回復をモニターした。図27Bは、0. 5 m g / k g の累積週間用量後のA Tレベルを示す。

10

【0467】

データは、全ての投薬計画で、用量依存性抗トロンビンサイレンシングが観察され、25日目までに、抑制の定常状態レベルが達成されたことを実証する。

【0468】

実施例14：血友病マウスへの化合物A D - 5 7 2 1 3投与に続く止血の矯正

血友病動物は、トロンビン生成能が低く、安定した血餅を形成できない。これらの動物中の抗トロンビンタンパク質の低下は、止血の再バランスと内在性トロンビン生成能の増大を助けて、血餅形成ができるようにするはずである。生体内画像診断を伴う微小血管レーザー傷害モデルにおいて、血友病Aおよび血友病Bマウス中で、この仮説を試験した。マウスに化合物A D - 5 7 2 1 3を注射して、処置後10日目に傷害を誘発した。傷害部位の血小板およびフィブリン蓄積を視覚化し、記録して定量化した。図28Aは、レーザー外科手術後の経時的な血小板蓄積（a c c u l u l a t i o n）中央値を示し、図28Bは、レーザー外科手術後の経時的な全ての被害の損傷からのフィブリン値の中央値を示す。図28Aおよび28Bによって実証されるように、1 m g / k gまたは30 m g / k gで注射された化合物A D - 5 7 2 1 3は、損傷の100%で、血餅形成に至る血小板およびフィブリン沈着をもたらした。表19は、H AおよびH B動物を用いた別個の2回の実験からの結果を要約する。

20

【0469】

【表19】

30

表19

群	動物 (N)	損傷 (N)	安定した血栓 (N)	肝臓中の AT mRNA百分率
WT	2	10	10	100%
HA + PBS	2	13	0	100%
HA + 1 mg/kg ALN-AT3	4	20	20	50%
HA + 30mg/kg ALN-AT3	4	20	20	5%
HB + PBS	2	6	0	100%
HB + 30mg/kg ALNAT3	2	6	6	5%

40

【0470】

実施例15：A D - 5 7 2 1 3 L N P製剤の生体内効能

化合物A D - 5 5 0 2 9（非結合）およびA D - 5 7 2 1 3（G a l N A cに共役する）を脂質核酸粒子（A f - 1 1）に調合し、これらのL N P調合化合物を0. 03 m g / k g、0. 1 m g / k g、および0. 3 m g / k g用量で野生型動物に投与した。対照として、ルシフェラーゼ（A F 1 1 - 1 9 5 5）を使用した。

【0471】

どちらの化合物も、0. 3 m g / k gで> 95%のノックダウンをもたらしたが、A F

50

11-57213ではレベルが15日間維持されたのに対し、AF11-55029では8日間維持された(図29を参照されたい)。作用持続期間における2種の化合物間の同様の違いは、より低い用量でも観察された。

【0472】

実施例16：追加的なsiRNAのデザイン、合成、および試験管内スクリーニング
siRNAデザイン

GenBank受入番号NM_000488.3に記載されるヒトSERPINC1 mRNA配列を使用して、センスおよびアンチセンス鎖の双方が19ヌクレオチド長のsiRNA二本鎖をデザインした。1599ヌクレオチド転写物全体にわたって7ヌクレオチドより長い反復を含有しない、1581本の二本鎖を最初に同定した。次に、各二本鎖位置でヌクレオチド対を評価する線形モデル、およびスクリーニングで使用される用量および細胞系に従って、1581本の全ての二本鎖を予測効能について点数化した。二本鎖はまた、カスタム総当たりアルゴリズムを使用してヒトRefSeqコレクション中の全ての転写物に対して整合させ、SERPINC1以外の転写物に対するミスマッチ(鎖あたり)の最小数について点数化した。次に以下のスキームに従って、合成およびスクリーニングする二本鎖を1581本から選択した。転写物の5'末端から開始して、各10±2ヌクレオチド「ウィンドウ」内で、

- 1) 最大予測効能を有し、
- 2) SERPINC1以外の全ての転写物に対する、少なくとも1つのミスマッチを双方の鎖に有し、
- 3) その他の二本鎖セットの一部として、既に合成およびスクリーニングされていない二本鎖を選択した。

【0473】

所与のウィンドウ内で全ての基準を満たす二本鎖が同定され得れば、そのウィンドウをスキップした。これらの基準を満たす164本の二本鎖が、同定された。

【0474】

Sepinc1センスおよびアンチセンス鎖配列の詳細な一覧は、表20および21で示される。

【0475】

10

20

【表 20-1】

表20.AT3(SERPINC1)未修飾配列(「センス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号979~1141として開示され、「アンチセンス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号1142~1304として開示される)

二本鎖名称	センスオリゴ名称	センス配列	アンチセンスオリゴ名称	アンチセンス配列	000-488.3中の配置
AD-59267.1	A-120250.1	GGAGAAGAAGGCAACUGAG	A-120251.1	CUCAGUUGCCUUCUUCUCC	293-311
AD-59268.1	A-120266.1	UGACCAAGCUGGGUGCCUG	A-120267.1	CAGGCACCCAGCUUGGUCA	481-499
AD-59269.1	A-120282.1	GGUUAACACCAUUUACUUC	A-120283.1	GAAGUAAAUGGUGUUAACC	860-878
AD-59270.1	A-120298.1	GCUGGUUAACACCAUUUAC	A-120299.1	GUAAAUGGUGUUAACCAGC	857-875
AD-59271.1	A-120314.1	UAAUGACACCCUCCAGCAA	A-120315.1	UUGCUGGAGGGUGUCAUUA	500-518
AD-59272.1	A-120330.1	CGUGUUCAGCAUCUUAUGAU	A-120331.1	AUCAUAGAUGCUGAACACG	952-970
AD-59273.1	A-120252.1	UUGAGGACGGCUUCAGUUU	A-120253.1	AAACUGAAGCCGUCCUCAA	1189-1207
AD-59274.1	A-120268.1	CGGCGUGUCUGGGAACUGU	A-120269.1	ACAGUUCCCAGACACGCCG	351-369
AD-59275.1	A-120284.1	UUAACACCAUUUACUCAA	A-120285.1	UUGAAGUAAAUGGUGUUAA	862-880
AD-59276.1	A-120300.1	CCCUGAAAAGUCCAAACUC	A-120301.1	GAGUUUGGACUUUUCAGGG	1250-1268
AD-59277.1	A-120316.1	CGAGAUGACCUCUAUGUCU	A-120317.1	AGACAUAGAGGUCAUCUCG	1290-1308
AD-59278.1	A-120332.1	UCUACAAGGCUGAUGGAGA	A-120333.1	UCUCCAUCAGCCUUGUAGA	931-949
AD-59279.1	A-120254.1	AGCUCACUGUUCUGGUGCU	A-120255.1	AGCACCAGAACAGUGAGCU	841-859
AD-59280.1	A-120270.1	AGGAGCAGCUGCAAGACAU	A-120271.1	AUGUCUUGCAGCUGCUCCU	1210-1228
AD-59281.1	A-120286.1	GCCACCAACCGGCGUGUCU	A-120287.1	AGACACGCCGGUUGGUGGC	342-360

【0476】

10

20

【表 20 - 2】

AD-59282.1	A-120302.1	CAGAACAGAAGAUCCCGGA	A-120303.1	UCCGGGAUCUUCUGUUCUG	322-340
AD-59283.1	A-120318.1	CCUUGUCGAUCUGUUCAGC	A-120319.1	GCUGAACAGAUCGACAAGG	1232-1250
AD-59284.1	A-120334.1	AGGCAAGUCCGUUAUCGG	A-120335.1	CCGAUAACGGAACUUGCCU	980-998
AD-59285.1	A-120256.1	UUUUGUCCUUGCUGCUAU	A-120257.1	AUGAGCAGCAAGGACAAA	172-190
AD-59286.1	A-120272.1	AGACCUACCAGGACAUCAG	A-120273.1	CUGAUGUCCUGGUAGGUCU	682-700
AD-59287.1	A-120288.1	AACUGAACUGCCGACUCUA	A-120289.1	UAGAGUCGGCAGUUCAGUU	589-607
AD-59288.1	A-120304.1	CAUUUACUUAAGGGCCUG	A-120305.1	CAGGCCUUGAAGUAAAUG	869-887
AD-59289.1	A-120320.1	CCCUGGACUUAAGGAAAA	A-120321.1	UUUUCUUGAAGUCCAGGG	730-748
AD-59290.1	A-120336.1	AGCUGCAAGUACCGUGUU	A-120337.1	AACAGCGGUACUUGCAGCU	1361-1379
AD-59291.1	A-120258.1	ACACAAGGAAGGAACUGUU	A-120259.1	AACAGUCCUCCUUGUGU	913-931
AD-59292.1	A-120274.1	GCAACUGAGGAGAGGGCU	A-120275.1	AGCCCUCAUCCUCAGUUGC	303-321
AD-59293.1	A-120290.1	GUAGCCAACCUUGUGUUA	A-120291.1	UAACACAAGGGUUGGCUAC	1491-1509
AD-59294.1	A-120306.1	GUUUGUGAACAGAAGUAAA	A-120307.1	UUUACUUCUGUUCACAAAC	1550-1568
AD-59295.1	A-120322.1	GGGUGACUUUAAGGCCAA	A-120323.1	UUGGCCUUGAAAGUCACCC	1411-1429
AD-59296.1	A-120338.1	UUUUCGCGCGUGGCUGAA	A-120339.1	UUCAGCCACGCGCCGAUAA	992-1010
AD-59297.1	A-120260.1	CCACUUCUUCUUGCCAAA	A-120261.1	UUUGGCAAGAAGAAGUGG	572-590
AD-59298.1	A-120276.1	AACACCAUUUACUUAAGG	A-120277.1	CCUUGAAGUAAUUGGUGUU	864-882
AD-59299.1	A-120292.1	GAUGGAGAGUCGUGUUCAG	A-120293.1	CUGAACACGACUCUCAUC	942-960
AD-59300.1	A-120308.1	CACCAUUUACUUAAGGGC	A-120309.1	GCCCUUGAAGUAAUUGGUG	866-884
AD-59301.1	A-120324.1	UUUACUUAAGGGCCUGUG	A-120325.1	CACAGGCCUUGAAGUAAA	871-889
AD-59302.1	A-120340.1	UAAGAGAAGUCCUCUGAA	A-120341.1	UUCAGAGGAACUUCUCUUA	1450-1468
AD-59303.1	A-120262.1	GCGGGACAUCCCAUGAAU	A-120263.1	AUUC AUGGAAUGUCCCGC	251-269
AD-59304.1	A-120278.1	UGCCCCACCCUGUCCUCUG	A-120279.1	CAGAGGACAGGGUGGGGCA	21-Mar
AD-59305.1	A-120294.1	UGGUUAACACCAUUUACUU	A-120295.1	AAGUAAUUGGUGUUAACCA	859-877
AD-59306.1	A-120310.1	CGGAUUGCCUCAGAUACA	A-120311.1	UGUGAUCUGAGGCAAUCCG	62-80
AD-59307.1	A-120326.1	CCAGGACAUCAGUGAGUUG	A-120327.1	CAACUCACUGAUGUCCUGG	689-707
AD-59308.1	A-120342.1	CCAGUUUUCAGGCGAUUG	A-120343.1	CAAUCCGCCUGAAAACUGG	50-68
AD-59309.1	A-120264.1	CACCAUAUCUGAGAAAACA	A-120265.1	UGUUUUCUCAGAU AUGGUG	542-560
AD-59310.1	A-120280.1	AAGUAAAAUAAUACAAA	A-120281.1	UUUGUAUUUUAUUUACUU	1562-1580
AD-59311.1	A-120296.1	GCACCCAGGUGCUUGAGUU	A-120297.1	AACUCAAGCACCUGGGUGC	1012-1030
AD-59312.1	A-120312.1	UAACACCAUUUACUUAAG	A-120313.1	CUUGAAGUAAUUGGUGUUA	863-881
AD-59313.1	A-120328.1	CCUUCAAAGGUGAUGACAU	A-120329.1	AUGUCAUCACCUUUGAAGG	1033-1051
AD-59314.1	A-120344.1	CAAGGCCAAUCCCGCUUU	A-120345.1	AAAGCGGAAUUGGCCUUG	371-389
AD-59315.1	A-120360.1	UCAGUUUGAAGGAGCAGCU	A-120361.1	AGCUGCUCCUUAACACUGA	1201-1219
AD-59316.1	A-120376.1	GGGACUGCGUGACCUGUCA	A-120377.1	UGACAGGUCACGAGUCCC	199-217
AD-59317.1	A-120392.1	UCAGCCAAUCGCCUUUUUG	A-120393.1	CAAAAAGGCGAUUGGCUGA	639-657
AD-59318.1	A-120408.1	CCUCGGAAGCAUCAAUGA	A-120409.1	UCAUUGAUGGUUCCGAGG	823-841
AD-59319.1	A-120424.1	GACAAUGAUACAUUUUC	A-120425.1	GGAAAAUGUUAUCAUUGUC	429-447
AD-59320.1	A-120346.1	CUUUAUUCUUGCACCUCUU	A-120347.1	AAGAGGUGCAAAGAAUAG	1521-1539
AD-59321.1	A-120362.1	AUUGCUGGCCGUUCGUAA	A-120363.1	UUAGCGAAGCGCCAGCAU	1383-1401
AD-59322.1	A-120378.1	AAUGAAGAAGGAGUGAA	A-120379.1	UUCACUGCCUUCUUAUUU	1340-1358
AD-59323.1	A-120394.1	UGAGUUGGUUAUUGGAGCC	A-120395.1	GGCUCCAUAUACCAACUCA	701-719
AD-59324.1	A-120410.1	UCCAGCAACUGAUGGAGGU	A-120411.1	ACCUCAUCAGUUGCUGGA	511-529

10

20

30

40

【表 20-3】

AD-59325.1	A-120426.1	AACUGUAACCCUGGAAAA	A-120427.1	UUUCCAGAGGUUACAGUU	140-158
AD-59326.1	A-120348.1	UCAACAAUUGGUGUCCAA	A-120349.1	UUGGACACCAUUUGUUGA	772-790
AD-59327.1	A-120364.1	GAUUAGCGGCCAUGUAUUC	A-120365.1	GAAUACAUGGCCGCUAAUC	109-127
AD-59328.1	A-120380.1	GUGCUUGAGUUGCCCUUCA	A-120381.1	UGAAGGGCAACUCAAGCAC	1020-1038
AD-59329.1	A-120396.1	UGCAGAAGGCCGAGAUGAC	A-120397.1	GUCAUCUCGGCCUUCUGCA	1280-1298
AD-59330.1	A-120412.1	CUAUUUUUGGUUUGUGAAC	A-120413.1	GUUCACAAACCAAAAUAG	1541-1559
AD-59331.1	A-120428.1	CAGUGAAGCAGCUGCAAGU	A-120429.1	ACUUGCAGCUGCUUCACUG	1352-1370
AD-59332.1	A-120350.1	GUGUCCAAUAGACCGAAG	A-120351.1	CUUCGGUCUUAUUGGACAC	783-801
AD-59333.1	A-120366.1	AUGAAUUGGAGGAGAUGAU	A-120367.1	AUCAUCUCCCAAUUCAU	1141-1159
AD-59334.1	A-120382.1	AUCUAUGAUGUACCAGGAA	A-120383.1	UUCUGGUACAUCAUAGAU	962-980
AD-59335.1	A-120398.1	CCAUAAGGCAUUCUUGAG	A-120399.1	CUAAGAAUUGCCUUAUGG	1319-1337
AD-59336.1	A-120414.1	AUGCAUCCAUUAGGCAUU	A-120415.1	AAUGCCUUAUGGAAUGCAU	1312-1330
AD-59337.1	A-120430.1	UGGUGCUGGUUAAACCAU	A-120431.1	AUGGUGUUAACCAGACCA	853-871
AD-59338.1	A-120352.1	AUCUGUUCAGCCUGAAAA	A-120353.1	UUUUCAGGGCUGAACAGAU	1240-1258
AD-59339.1	A-120368.1	AGAUGAUGCUGUGGUCCA	A-120369.1	UGGACCACCAGCAUCAUCU	1153-1171
AD-59340.1	A-120384.1	AUAUGGAGCCAAGCUCCAG	A-120385.1	CUGGAGCUUGGCUCAUUAU	710-728
AD-59341.1	A-120400.1	CCGAAUCACCGAUGUCAUU	A-120401.1	AAUGACAUCGGUGAUUCGG	803-821
AD-59342.1	A-120416.1	GCAGAGCAAUCCAGAGCGG	A-120417.1	CCGCUCUGGAUUGCUCUGC	750-768
AD-59343.1	A-120432.1	ACACCAUUUACUUAAGGG	A-120433.1	CCCUGAAGUAAAUGGUGU	865-883
AD-59344.1	A-120354.1	GUACCAGGAAGGCAAGUUC	A-120355.1	GAACUUGCCUCCUGGUAC	971-989
AD-59345.1	A-120370.1	UGCCCAAGCCUGAGAAGAG	A-120371.1	CUCUUCUCAGGCUUGGGCA	1069-1087
AD-59346.1	A-120386.1	UUCUUUGCCAAACUGAACU	A-120387.1	AGUUCAGUUUGGCAAGAA	579-597
AD-59347.1	A-120402.1	UGGCCAAGGUAGAGAAGGA	A-120403.1	UCCUUCUCUACCUGGCCA	1090-1108
AD-59348.1	A-120418.1	UGCUGCAAGAGUGGCUUGGA	A-120419.1	UCCAGCCACUCUUGCAGCA	1123-1141
AD-59349.1	A-120434.1	CCAUGUGCAUUUACCGCUC	A-120435.1	GAGCGGUAUUAUGCACAUGG	271-289
AD-59350.1	A-120356.1	AGACAUGGGCCUUGUCGAU	A-120357.1	AUCGACAAGGCCCAUGUCU	1223-1241
AD-59351.1	A-120372.1	UUUUGGAGACAAAUCUUU	A-120373.1	AAGGGAUUUGUCUCCAAA	653-671
AD-59352.1	A-120388.1	GGAUGAGGGCUCAGAACAG	A-120389.1	CUGUUCUGAGCCCUAUCC	311-329
AD-59353.1	A-120404.1	CGGCUUUUGCUAUGACCA	A-120405.1	UUGGUCAUAGCAAAGCCG	469-487
AD-59354.1	A-120420.1	AGCUCCAGCCCUGGACUU	A-120421.1	AAGUCCAGGGCUGGAGCU	721-739
AD-59355.1	A-120436.1	CUGAUCAGAUCCACUUCUU	A-120437.1	AAGAAGUGGAUCUGAUCAG	562-580
AD-59356.1	A-120358.1	UGCUGGUGGUCCACAUGCC	A-120359.1	GGCAUGUGGACCACAGCA	1159-1177
AD-59357.1	A-120374.1	GCGAGAUUAGAGGAAAGA	A-120375.1	UCUUUCCUCUAAAUCUCGC	30-48
AD-59358.1	A-120390.1	CUGCUCAUUGGCUUCUGGG	A-120391.1	CCCAGAAGCCAAUGAGCAG	183-201
AD-59359.1	A-120406.1	CCUUCAAUGAGACCUACCA	A-120407.1	UGGUAGGUCUCAUUGAAGG	673-691
AD-59360.1	A-120422.1	ACCAUUUACUUAAGGGCC	A-120423.1	GGCCCUUGAAGUAAAUGGU	867-885
AD-59387.1	A-120438.1	GCACCUUUCUUAUUUUUG	A-120439.1	CAAAAAUAGGAAGAGGUGC	1531-1549
AD-59388.1	A-120454.1	GUGGCUGAAGGCACCCAGG	A-120455.1	CCUGGGUGCCUUCAGCCAC	1002-1020
AD-59389.1	A-120470.1	UCCGCAUUGAGGACGGCUU	A-120471.1	AAGCCGUCCUCAAUGCGGA	1183-1201
AD-59390.1	A-120486.1	UGGACAUUCGACAGCCAA	A-120487.1	UUGGCUGUGCAGAUGUCCA	229-247
AD-59391.1	A-120502.1	GUCCAAACUCCAGGUUUU	A-120503.1	AAUACCUGGGAGUUUGGAC	1259-1277
AD-59392.1	A-120518.1	AGAAGGAACUACCCAGAGA	A-120519.1	UCUGGGUGAGUUCUUCU	1102-1120
AD-59393.1	A-120440.1	UCUUGAGGUAAAUGAAGAA	A-120441.1	UUCUUCAUUUACCUCAGA	1331-1349

10

20

30

40

【表 20-4】

AD-59594.1	A-120456.1	AGCCUGUGGACAUCUGCA	A-120457.1	UGCAGAUGUCCACAGGGCU	222-240
AD-59595.1	A-120472.1	CAGAGCGGCCAUCAACAAA	A-120473.1	UUUGUUGAUGCCGCUCUG	761-779
AD-59596.1	A-120488.1	AUUUAAGUUUGACACCAUA	A-120489.1	UAUGGUGUCAACUUAAAU	530-548
AD-59597.1	A-120504.1	UGAGAAGAGCCUGGCCAAG	A-120505.1	CUUGGCCAGGCUCUUCUCA	1079-1097
AD-59598.1	A-120520.1	UCACCAUGGUCCUCAUCUU	A-120521.1	AAGAUGAGGACCAUGGUGA	1051-1069
AD-59599.1	A-120442.1	GGAAGGAACUGUUCUACAA	A-120443.1	UUGUAGAACAGUUCUUC	919-937
AD-59600.1	A-120458.1	CUGGUUUUUAUAGAGAAG	A-120459.1	CUUCUCUUAUAAAACCAG	1440-1458
AD-59601.1	A-120474.1	CUGGGUGCCUGUAAUGACA	A-120475.1	UGUCAUACAGGCACCCAG	489-507
AD-59602.1	A-120490.1	GUACCGCUGUUGUGAUUGC	A-120491.1	GCAUACACAACAGCGUAC	1369-1387
AD-59603.1	A-120506.1	UCUAUCAGCACCUGGCAGA	A-120507.1	UCUGCCAGGUGCUGAUAGA	400-418
AD-59604.1	A-120522.1	CUGGCAGAUUCAAGAAUG	A-120523.1	CAUUCUUGGAAUCUGCCAG	411-429
AD-59605.1	A-120444.1	CGAUGUCAUUCUCCGGA	A-120445.1	UUCGAGGGAUUGACAUCG	812-830
AD-59606.1	A-120460.1	GCUUCUGGGACUGCGUGAC	A-120461.1	GUCACGAGUCCAGAAC	193-211
AD-59607.1	A-120476.1	CCUGUCACGGAGCCUGU	A-120477.1	ACAGGGCUCCUGACAGG	211-229
AD-59608.1	A-120492.1	AUUUACUUAAGGGCCUGU	A-120493.1	ACAGGCCUUGAAGUAAAU	870-888
AD-59609.1	A-120508.1	UGCUACCACUUCUAUCAG	A-120509.1	CUGAUAGAAAGUGGUAGCA	389-407
AD-59610.1	A-120524.1	GGAACUGUCCAAGGCCAAU	A-120525.1	AUUGGCCUUGGACAGUUC	362-380
AD-59611.1	A-120446.1	ACAAAUCCUCCAAGUUAGU	A-120447.1	ACUAAUUGGAGGAUUUGU	619-637
AD-59612.1	A-120462.1	AUUUACCGCUCCCGGAGA	A-120463.1	UCUCCGGGAGCGGUAAAU	279-297
AD-59613.1	A-120478.1	ACCCUGAGUAUCUCCACG	A-120479.1	CGUGGAGAUACUCAGGGU	452-470
AD-59614.1	A-120494.1	CACUAUCUCCACUUGCCCA	A-120495.1	UGGGCAAGUGGAGAUAGUG	79-97
AD-59615.1	A-120510.1	AAAUACAACUACUCCAU	A-120511.1	AUGGAAGUAGUUUGAUUU	1572-1590
AD-59616.1	A-120526.1	CUGGUUAACACCAUUUACU	A-120527.1	AGUAAUGGUGUUAACCAG	858-876
AD-59617.1	A-120448.1	UCAUCUUGCCCAAGCCUGA	A-120449.1	UCAGGCUUGGGCAAGAUGA	1063-1081
AD-59618.1	A-120464.1	CCUCAGAUACACUAUCUC	A-120465.1	GAGAUAGUGAUCUGAGG	69-87
AD-59619.1	A-120480.1	CUGUCCUCUGGAACCUCUG	A-120481.1	CAGAGGUUCCAGAGGACAG	30-Dec
AD-59620.1	A-120496.1	CCCUGUGGAAGAUUAGCGG	A-120497.1	CCGCUAAUCUCCACAGGG	99-117
AD-59621.1	A-120512.1	AUCUCCACGGCUUUUGCUA	A-120513.1	UAGCAAAAGCCGUGGAGAU	462-480
AD-59622.1	A-120528.1	GUGGCUUGGAUAAUUGGAG	A-120529.1	CUCCAUUUACUCCAGCCAC	1133-1151
AD-59623.1	A-120450.1	CAAGUUAAGUAUCAGCAAU	A-120451.1	AUUGGCUGAUACUACUUG	629-647
AD-59624.1	A-120466.1	GUGAUGACAUACCAUGGU	A-120467.1	ACCAUGGUGAUGUCAUCAC	1042-1060
AD-59625.1	A-120482.1	UUCCAAGAAUGACAAUGAU	A-120483.1	AUCAUUGUCAUUCUUGGAA	419-437
AD-59626.1	A-120498.1	UGAUGGAGGUUUUAAGUU	A-120499.1	AACUUAUUUACCUCAUCA	520-538
AD-59627.1	A-120514.1	GUUUUCCAAUGUGAUAGGA	A-120515.1	UCCUAUCACAUUGGAAUAC	122-140
AD-59628.1	A-120530.1	CAGCCAAGCCGCGGACAU	A-120531.1	AUGUCCCGCGCUGGUGUG	241-259
AD-59629.1	A-120452.1	CAUGCCCCGCUUCCGCAUU	A-120453.1	AAUGCGGAAGCGGGGCAUG	1172-1190
AD-59630.1	A-120468.1	AUGUGAUAGGAACUGUAA	A-120469.1	GUUACAGUCCUUAUCACAU	130-148
AD-59631.1	A-120484.1	ACAAAUCCCUUACCUCAA	A-120485.1	UUGAAGGUAAGGGAUUUGU	661-679
AD-59632.1	A-120500.1	AGGUUUUUCUUUGUCCUU	A-120501.1	AAGGACAAAAGUAAACCU	163-181
AD-59633.1	A-120516.1	AGAUCCCGGAGGCCACAA	A-120517.1	UUGGUGGCCUCCGGGAUCU	331-349
AD-59634.1	A-120532.1	ACAUUUUCCUGUACCCCU	A-120533.1	AGGGGUGACAGGAAAUGU	439-457
AD-59635.1	A-120548.1	GGCCUUUCCUGGUUUUUUU	A-120549.1	AUAAAACCAGGAAAGGCC	1432-1450
AD-59636.1	A-120564.1	UUGUGUUAAGUAAAAUGUU	A-120565.1	AACAUUUUACUUAACACAA	1502-1520

10

20

30

40

【表 20 - 5】

AD-59637.1	A-120534.1	CAAGGAAAAUGCAGAGCAA	A-120535.1	UUGCUCUGCAUUUCCUUG	740-758
AD-59638.1	A-120550.1	CUGAGAAAACAUUCUGAUCA	A-120551.1	UGAUCAGAUUUUUCUCAG	550-568
AD-59639.1	A-120566.1	UUACUUC AAGGGCCUGUGG	A-120567.1	CCACAGGCCCUUGAAGUAA	872-890
AD-59640.1	A-120536.1	ACCCCAACAGGGUGACUUU	A-120537.1	AAAGUCACCCUGUUGGGGU	1402-1420
AD-59641.1	A-120552.1	CCAGGUUUUGUUCAGAAAG	A-120553.1	CUUCUGCAACAAUACCUGG	1269-1287
AD-59642.1	A-120568.1	GCCUGUGGAAGUCAAGUU	A-120569.1	AACUUUGACUUCACAGGC	883-901
AD-59643.1	A-120538.1	UGGAACCUCUGCGAGAUUU	A-120539.1	AAAUCUCGCAGAGGUUCCA	20-38
AD-59644.1	A-120554.1	AGCCUGAGAACACAAGGA	A-120555.1	UCCUUGUGUUCUCAGGGCU	903-921
AD-59645.1	A-120570.1	CUCUAGUCUCAGAUCAU	A-120571.1	AUGCAUCUGAGACAUAGAG	1299-1317
AD-59646.1	A-120540.1	AAGACCGAAGGCCGAUUA	A-120541.1	UGAUUCGGCCUUCGGUCUU	792-810
AD-59647.1	A-120556.1	UAAAAUGUUCUUAUUCUUU	A-120557.1	AAAGAAUAGAACAUUUUA	1512-1530
AD-59648.1	A-120572.1	UCUGGAAAAAGGAAGUUU	A-120573.1	AAACCUCCUUUUUCCAGA	150-168
AD-59649.1	A-120542.1	UUCAAGGCCAACAGGCCUU	A-120543.1	AAGGCCUGUUGGCCUUGAA	1419-1437
AD-59650.1	A-120558.1	GAAGUCAAGUUCAGCCCU	A-120559.1	AGGGCUGAACUUUGACUUC	890-908
AD-59651.1	A-120574.1	CCAUCAAUGAGCUCACUGU	A-120575.1	ACAGUGAGCUAUUGAUGG	832-850
AD-59652.1	A-120544.1	CUCUGAACACUUAUUCUU	A-120545.1	AAGAUAAUAGUGUUCAGAG	1462-1480
AD-59653.1	A-120560.1	UGCUGGUUAACACCAUUUA	A-120561.1	UAAUUGGUGUUAACCAGCA	856-874
AD-59654.1	A-120546.1	AGAGGAAAGAACCAUUUU	A-120547.1	AAAACUGGUUCUUUCCUCU	39-57
AD-59655.1	A-120562.1	UGCCAGCCUGUGGAAGA	A-120563.1	UCUCCACAGGGCUGGGCA	92-110

10

20

【0480】

【表 21 - 1】

表21.AT3(SERPINC1)修飾配列(「センス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号1305~1467として開示され、「アンチセンス配列」欄の配列は、それぞれ出現順に配列番号1468~1630として開示される)

二本鎖名称	センスオリゴ名称	オリゴ配列	アンチセンス オリゴ名称	オリゴ配列
AD-59267.1	A-120250.1	GGAGAAGAAGGCAACUGAdTdT	A-120251.1	CUCAGUUGCCUUCUUCUCCdTdT
AD-59268.1	A-120266.1	UGACCAAGCUGGGUGCCUGdTdT	A-120267.1	CAGGCACCCAGCUUGGUCAdTdT
AD-59269.1	A-120282.1	GGUUAACACCAUUUACUUCdTdT	A-120283.1	GAAGUAAAUGGUGUUAACdTdT
AD-59270.1	A-120298.1	GCUUGGUUAACACCAUUUACdTdT	A-120299.1	GUAAUUGGUGUUAACCAGCdTdT
AD-59271.1	A-120314.1	UAAUGACACCCUCCAGCAAdTdT	A-120315.1	UUGCUGAGGGUGUCAUUAdTdT
AD-59272.1	A-120330.1	CGUGUUCAGCAUCUAUGAUdTdT	A-120331.1	AUCAUAGAUGCUGAACACGdTdT
AD-59273.1	A-120252.1	UUGAGGACGGCUUCAGUUdTdT	A-120253.1	AAACUGAAGCCGUCCUCAAdTdT
AD-59274.1	A-120268.1	CGGCGUGUCUGGGAACUGUdTdT	A-120269.1	ACAGUUCACAGACGCGCdTdT
AD-59275.1	A-120284.1	UUAAACCAUUUACUUAAdTdT	A-120285.1	UUGAAGUAAAUGGUGUUAAdTdT
AD-59276.1	A-120300.1	CCCUGAAAAGUCCAAACUCdTdT	A-120301.1	GAGUUUGGACUUUUCAGGGdTdT
AD-59277.1	A-120316.1	CGAGAUGACCUCUAUGUCUdTdT	A-120317.1	AGACAUAGAGGUCAUCUCGdTdT
AD-59278.1	A-120332.1	UCUACAAGGCUGAUGGAGAdTdT	A-120333.1	UCUCCAUCAGCCUUGUAGAdTdT
AD-59279.1	A-120254.1	AGCUCACUGUUCUGGUGCUdTdT	A-120255.1	AGCACCAGAACAGUGAGCUdTdT
AD-59280.1	A-120270.1	AGGAGCAGCUGCAAGACAUdTdT	A-120271.1	AUGUCUUGCAGCUGCUCCUdTdT

30

40

【0481】

【表 2 1 - 2】

AD-59281.1	A-120286.1	GCCACCAACCGCGUGUCUdTdT	A-120287.1	AGACACGCCGGUUGGUGGcTdT
AD-59282.1	A-120302.1	CAGAACAGAAGAUCCCGAdTdT	A-120303.1	UCCGGGAUCUUCUGUUCUGdTdT
AD-59283.1	A-120318.1	CCUUGUCGAUCUGUUCAGCdTdT	A-120319.1	GCUGAACAGAUCCGACAAGGdTdT
AD-59284.1	A-120334.1	AGGCAAGUUCCGUUAUCGgdTdT	A-120335.1	CCGAUAACGGAACUUGCCUdTdT
AD-59285.1	A-120256.1	UUUUGUCCUUGCUGCUAUdTdT	A-120257.1	AUGAGCAGCAAGGACAAAdTdT
AD-59286.1	A-120272.1	AGACCUACCAGGACAUCAGdTdT	A-120273.1	CUGAUGUCCUGGUAGGUCUdTdT
AD-59287.1	A-120288.1	AACUGAACUGCCGACUCUAdTdT	A-120289.1	UAGAGUCGGCAGUUCAGUdTdT
AD-59288.1	A-120304.1	CAUUUACUUAAGGGCCUGdTdT	A-120305.1	CAGGCCCUUGAAGUAAAdTdT
AD-59289.1	A-120320.1	CCCUGGACUUAAGGAAAAdTdT	A-120321.1	UUUUCUUGAAGUCCAGGgdTdT
AD-59290.1	A-120336.1	AGCUGCAAGUACCGCUGUdTdT	A-120337.1	AACAGCGGUACUUGCAGCUdTdT
AD-59291.1	A-120258.1	ACACAAGGAAGAACUGUdTdT	A-120259.1	AACAGUCCUCCUUGUGUdTdT
AD-59292.1	A-120274.1	GCAACUGAGGAUGAGGGCUdTdT	A-120275.1	AGCCCUCAUCCUCAGUUGCdTdT
AD-59293.1	A-120290.1	GUAGCCAACCCUUGUGUAdTdT	A-120291.1	UAAACAAGGGUUGGUACdTdT
AD-59294.1	A-120306.1	GUUUGUGAACAGAAAGUAdTdT	A-120307.1	UUUACUUCUGUUCACAACdTdT
AD-59295.1	A-120322.1	GGGUGACUUAAGGCCAAAdTdT	A-120323.1	UUGGCCUUGAAAGUACCCdTdT
AD-59296.1	A-120338.1	UUUUCGGCGCGUGGCUAAdTdT	A-120339.1	UUCAGCCACGCGCCGAUAdTdT
AD-59297.1	A-120260.1	CCACUUCUUCUUGCCAAAdTdT	A-120261.1	UUUGGCAAGAAGAAGUGGdTdT
AD-59298.1	A-120276.1	AACACCAUUUACUUAAGGdTdT	A-120277.1	CCUUGAAGUAAUUGGUUdTdT
AD-59299.1	A-120292.1	GAUGGAGAGUCGUGUUCAGdTdT	A-120293.1	CUGAACACGACUCUCCAUCdTdT
AD-59300.1	A-120308.1	CACCAUUUACUUAAGGGCdTdT	A-120309.1	GCCCUUGAAGUAAUUGGUGdTdT
AD-59301.1	A-120324.1	UUUACUUAAGGGCCUGUGdTdT	A-120325.1	CACAGGCCCUUGAAGUAAAdTdT
AD-59302.1	A-120340.1	UAAGAGAAGUCCUCUGAAdTdT	A-120341.1	UUCAGAGGAACUUCUUAAdTdT
AD-59303.1	A-120262.1	GCGGGACAUUCCCAUGAAUdTdT	A-120263.1	AUUCAGGGAAUGUCCCGCdTdT
AD-59304.1	A-120278.1	UGCCCCACCCUGUCCUGdTdT	A-120279.1	CAGAGGACAGGGUGGGGCdTdT
AD-59305.1	A-120294.1	UGGUUAACACCAUUUACUdTdT	A-120295.1	AAGUAAUUGGUGUUAACAdTdT
AD-59306.1	A-120310.1	CGGAUUGCCUCAGAUCAAdTdT	A-120311.1	UGUGAUCUGAGGCAAUCCdTdT
AD-59307.1	A-120326.1	CCAGGACAUACAGAGUUGdTdT	A-120327.1	CAACUCACUGAUGUCCUGdTdT
AD-59308.1	A-120342.1	CCAGUUUUCAGGCGGAUUGdTdT	A-120343.1	CAAUCCGCCUGAAACUGGdTdT
AD-59309.1	A-120264.1	CACCAUAUCUGAGAAAAdTdT	A-120265.1	UGUUUUCUCAGAUUUGGUGdTdT
AD-59310.1	A-120280.1	AAGUAAAAUAAUACAAAdTdT	A-120281.1	UUUGUAUUUAAUUUACUdTdT
AD-59311.1	A-120296.1	GCACCCAGGUGCUUGAGUdTdT	A-120297.1	AACUCAAGCACCUGGGUGCdTdT
AD-59312.1	A-120312.1	UAACACCAUUUACUUAAGdTdT	A-120313.1	CUUGAAGUAAUUGGUGUAdTdT
AD-59313.1	A-120328.1	CCUCAAAGGUGAUGACAUdTdT	A-120329.1	AUGUCAUACCUUUGAAGGdTdT
AD-59314.1	A-120344.1	CAAGGCCAAUCCCGCUUdTdT	A-120345.1	AAAGCGGGAUUGGCCUUGdTdT
AD-59315.1	A-120360.1	UCAGUUUGAAGGAGCAGCUdTdT	A-120361.1	AGCUGCUCCUUAACUGAdTdT
AD-59316.1	A-120376.1	GGGACUGCGUGACCUGUAdTdT	A-120377.1	UGACAGGUCACGAGUCCdTdT
AD-59317.1	A-120392.1	UCAGCCAAUCGCCUUUUGdTdT	A-120393.1	CAAAAAGGCGAUUGGCUGAdTdT
AD-59318.1	A-120408.1	CCUCGGAAGCCAUAUGAdTdT	A-120409.1	UCAUUGAUGGCUUCCAGGdTdT
AD-59319.1	A-120424.1	GACAAUGAUACAUUUCCdTdT	A-120425.1	GGAAAAUGUUAUCAUUGCdTdT
AD-59320.1	A-120346.1	CUUAUUCUUGCACCUCUdTdT	A-120347.1	AAGAGGUGCAAAGAAUAGdTdT
AD-59321.1	A-120362.1	AUUGCUGGCCGUUCGUAdTdT	A-120363.1	UUAGCGAACGCCAGCAUdTdT
AD-59322.1	A-120378.1	AAAUGAAGAAGGCAGUGAdTdT	A-120379.1	UUCACUGCCUUCUUAUUdTdT
AD-59323.1	A-120394.1	UGAGUUGGUUAUUGGAGCCdTdT	A-120395.1	GGCUCAUAUACCAACUAdTdT
AD-59324.1	A-120410.1	UCCAGCAACUGAUGGAGGUdTdT	A-120411.1	ACCUCCAUCAGUUGCUGGAdTdT

10

20

30

40

【表 2 1 - 3】

AD-59325.1	A-120426.1	AACUGUAACCUCUGGAAAdTdT	A-120427.1	UUUUCAGAGGUUACAGUdTdT
AD-59326.1	A-120348.1	UCAACAAUUGGUGUCCAAdTdT	A-120349.1	UUGGACACCAUUGUUGAdTdT
AD-59327.1	A-120364.1	GAUUAGCGCCAUGUAUUCdTdT	A-120365.1	GAAUACAUGGCCGCUAAUCdTdT
AD-59328.1	A-120380.1	GUGCUUGAGUUGCCUUCAdTdT	A-120381.1	UGAAGGGCAACUCAAGCAdTdT
AD-59329.1	A-120396.1	UGCAGAAGGCCGAGAUACdTdT	A-120397.1	GUCAUCUCGGCCUUCUGCAdTdT
AD-59330.1	A-120412.1	CUAUUUUUGGUUUGUGAACdTdT	A-120413.1	GUUCACAAACCAAAAUAGdTdT
AD-59331.1	A-120428.1	CAGUGAAGCAGCUGCAAGUdTdT	A-120429.1	ACUUGCAGCUGCUUCACUGdTdT
AD-59332.1	A-120350.1	GUGUCCAUAAGACCGAAGdTdT	A-120351.1	CUUCGGUCUUAUUGGACAdTdT
AD-59333.1	A-120366.1	AUGAAUUGGAGGAGAUAdTdT	A-120367.1	AUCAUCUCCUCAAUUCAdTdT
AD-59334.1	A-120382.1	AUCUAUGAUGUACCAGGAAdTdT	A-120383.1	UUCUUGGUACAUAAGAAdTdT
AD-59335.1	A-120398.1	CCAUAAGCAUUCUUGAGdTdT	A-120399.1	CUCAAGAAUUGCCUUAUGGdTdT
AD-59336.1	A-120414.1	AUGCAUCCAUAAGGCAUdTdT	A-120415.1	AAUGCCUUAUGGAAUGCAUdTdT
AD-59337.1	A-120430.1	UGGUGCUGGUUAACCAUdTdT	A-120431.1	AUGGUGUUAACAGCACCAdTdT
AD-59338.1	A-120352.1	AUCUGUUCAGCCUGAAAAdTdT	A-120353.1	UUUUCAGGGCUGAACAGAUdTdT
AD-59339.1	A-120368.1	AGAUGAUGCUGGUGUCCAdTdT	A-120369.1	UGGACCACAGCAUCAUCdTdT
AD-59340.1	A-120384.1	AUAUGGAGCCAAGCUCCAGdTdT	A-120385.1	CUGGAGCUUGGCUCAUAdTdT
AD-59341.1	A-120400.1	CCGAAUACCGAUGUCAUdTdT	A-120401.1	AAUGACAUCGGUGAUUCGGdTdT
AD-59342.1	A-120416.1	GCAGAGCAAUCCAGAGCGdTdT	A-120417.1	CCGCUCUGGAUUGCUCUGdTdT
AD-59343.1	A-120432.1	ACACCAUUUACUUAAGGGdTdT	A-120433.1	CCCUUGAAGUAAAUGGUGdTdT
AD-59344.1	A-120354.1	GUACCAGGAAGGCAAGUUCdTdT	A-120355.1	GAACUUGCCUCCUGGUACdTdT
AD-59345.1	A-120370.1	UGCCCAAGCCUGAGAAGAdTdT	A-120371.1	CUCUUCUCAGGCUUGGGCAdTdT
AD-59346.1	A-120386.1	UUCUUUGCCAAACUGAACUdTdT	A-120387.1	AGUUCAGUUUGGCAAGAAAdTdT
AD-59347.1	A-120402.1	UGGCCAAGGUAGAGAAGAdTdT	A-120403.1	UCCUUCUCUACCUUGGCCAdTdT
AD-59348.1	A-120418.1	UGCUGCAAGAGUGGUGGAdTdT	A-120419.1	UCCAGCCACUCUUGCAGCAdTdT
AD-59349.1	A-120434.1	CCAUGUGCAUUAACCGUCdTdT	A-120435.1	GAGCGGUAAUUGCAUUGGdTdT
AD-59350.1	A-120356.1	AGACAUGGCCUUGUCGAUdTdT	A-120357.1	AUCGACAAGGCCAUGUCUdTdT
AD-59351.1	A-120372.1	UUUUGGAGACAAAUCCUdTdT	A-120373.1	AAGGGAUUUGUCUCCAAAdTdT
AD-59352.1	A-120388.1	GGAUGAGGGCUCAGAACAdTdT	A-120389.1	CUGUUCUGAGCCUCAUCCdTdT
AD-59353.1	A-120404.1	CGGCUUUUGCUAUGACCAAdTdT	A-120405.1	UUGGUCAUAGCAAAAGCCGdTdT
AD-59354.1	A-120420.1	AGCUCCAGCCCGUGGACUdTdT	A-120421.1	AAGUCCAGGGCUGGAGCUdTdT
AD-59355.1	A-120436.1	CUGAUCAGAUCCAUUCUdTdT	A-120437.1	AAGAAGUGGAUCUGAUCAdTdT
AD-59356.1	A-120358.1	UGCUGGUGGUCCACAUGCCdTdT	A-120359.1	GGCAUGUGGACCACAGCAdTdT
AD-59357.1	A-120374.1	GCGAGAUUAGAGGAAAGAdTdT	A-120375.1	UCUUUCCUUAUUAUCUGCAdTdT
AD-59358.1	A-120390.1	CUGCUCAUUGGCUUCUGGdTdT	A-120391.1	CCCAGAAGCCAUGAGCAGdTdT
AD-59359.1	A-120406.1	CCUUCAAUGAGACCUACCAAdTdT	A-120407.1	UGGUAGGUCUUAUUGAAGdTdT
AD-59360.1	A-120422.1	ACCAUUUACUUAAGGGCCdTdT	A-120423.1	GGCCCUUGAAGUAAAUGGUdTdT
AD-59587.1	A-120438.1	GCACCUCUCCAUUUUUGdTdT	A-120439.1	CAAAAAUAGGAAGAGGUGCAdTdT
AD-59588.1	A-120454.1	GUGGUGAAGGACCCAGGdTdT	A-120455.1	CCUGGGUGCCUUCAGCCAdTdT
AD-59589.1	A-120470.1	UCCGCAUUGAGGACGGCUdTdT	A-120471.1	AAGCCGUCCUCAAUGCGGAdTdT
AD-59590.1	A-120486.1	UGGACAUCUGCAGCCAAdTdT	A-120487.1	UUGGCUGUGCAGAUUGCAAdTdT
AD-59591.1	A-120502.1	GUCCAAACUCCAGGUUUdTdT	A-120503.1	AAUACCUGGGAGUUUGGAdTdT
AD-59592.1	A-120518.1	AGAAGGAACUACCCAGAdTdT	A-120519.1	UCUGGGUGAGUUCUUCUdTdT
AD-59593.1	A-120440.1	UCUUGAGGUAAAUGAAGAdTdT	A-120441.1	UUCUUAUUUACCUCAAGAdTdT
AD-59594.1	A-120456.1	AGCCUGUGGACAUCUGCAdTdT	A-120457.1	UGCAGAUGUCCACAGGGCAdTdT

10

20

30

40

【表 2 1 - 4】

AD-59595.1	A-120472.1	CAGAGCGGCAUCAACAAAdTdT	A-120473.1	UUUGUUGAUGGCCGUCUGdTdT
AD-59596.1	A-120488.1	AUUUAAGUUUGACACCAUAdTdT	A-120489.1	UAUGGUGUCAAACUUAUAdTdT
AD-59597.1	A-120504.1	UGAGAAGAGCCUGGCCAAGdTdT	A-120505.1	CUUGGCCAGGCUCUUCUCAdTdT
AD-59598.1	A-120520.1	UCACCAUGGUCCUCAUCUdTdT	A-120521.1	AAGAUGAGGACCAUGGUGAdTdT
AD-59599.1	A-120442.1	GGAAGGAACUGUUCUACAAdTdT	A-120443.1	UUGUAGAACAGUUCUUCdTdT
AD-59600.1	A-120458.1	CUGGUUUUAUAAGAGAAdTdT	A-120459.1	CUUCUCUUAUAAAAACAdTdT
AD-59601.1	A-120474.1	CUGGGUGCCUGUAAUGACAdTdT	A-120475.1	UGUCAUACAGGCACCCAGdTdT
AD-59602.1	A-120490.1	GUACCGCUGUUGUGAUUGCdTdT	A-120491.1	GCAAUCACAACAGCGGUACdTdT
AD-59603.1	A-120506.1	UCUAUCAGCACCUGGCAGAdTdT	A-120507.1	UCUGCCAGGUGCUGAUAGAdTdT
AD-59604.1	A-120522.1	CUGGCAGAUUCCAAGAAUGdTdT	A-120523.1	CAUUCUUGGAAUCUGCCAGdTdT
AD-59605.1	A-120444.1	CGAUGUCAUCCUCGGAAdTdT	A-120445.1	UUCCGAGGGAAUGACAUCdTdT
AD-59606.1	A-120460.1	GCUUCUGGGACUGCGUGAdTdT	A-120461.1	GUCACGCAGUCCAGAAAGCdTdT
AD-59607.1	A-120476.1	CCUGUCACGGGAGCCUGdTdT	A-120477.1	ACAGGGCUCCGUGACAGdTdT
AD-59608.1	A-120492.1	AUUUACUUAAGGGCCUGdTdT	A-120493.1	ACAGGCCUUGAAGUAAUdTdT
AD-59609.1	A-120508.1	UGCUACCACUUCUACUAGdTdT	A-120509.1	CUGAUAGAAAGUGGUAGCdTdT
AD-59610.1	A-120524.1	GGAACUGUCCAAGGCCAAUdTdT	A-120525.1	AUUGGCCUUGGACAGUUCdTdT
AD-59611.1	A-120446.1	ACAAAUCUCAAGUUAUGdTdT	A-120447.1	ACUAAUUGGAGGAUUUGdTdT
AD-59612.1	A-120462.1	AUUUACCGCUCCCGGAGAdTdT	A-120463.1	UCUCCGGGAGCGGUAAUdTdT
AD-59613.1	A-120478.1	ACCCUGAGUAUCUCCAGdTdT	A-120479.1	CGUGGAGAUACUCAGGGUdTdT
AD-59614.1	A-120494.1	CACUAUCUCCACUUGCCAdTdT	A-120495.1	UGGGCAAGUGGAGAUAGUdTdT
AD-59615.1	A-120510.1	AAAUACAAACUACUCCAAdTdT	A-120511.1	AUGGAAGUAGUUUGAUUUdTdT
AD-59616.1	A-120526.1	CUGGUUAAACCAUUUACUdTdT	A-120527.1	AGUAAAUGGUGUUAACAdTdT
AD-59617.1	A-120448.1	UCAUCUUGCCCAAGCCUGAdTdT	A-120449.1	UCAGGCUUGGCAAGAUGAdTdT
AD-59618.1	A-120464.1	CCUCAGAUACACUAUCUCdTdT	A-120465.1	GAGAUAGUGUAUCUGAGdTdT
AD-59619.1	A-120480.1	CUGUCCUCUGGAACCUCUdTdT	A-120481.1	CAGAGGUUCCAGAGACAdTdT
AD-59620.1	A-120496.1	CCCUGUGGAAGAUUAGCGdTdT	A-120497.1	CCGCUAAUCUCCACAGGGdTdT
AD-59621.1	A-120512.1	AUCUCCACGGCUUUUGCUAdTdT	A-120513.1	UAGCAAAAGCCGUGGAGAUdTdT
AD-59622.1	A-120528.1	GUGGCUGGAUGAAUUGAGdTdT	A-120529.1	CUCCAAUUCAUCCAGCCAdTdT
AD-59623.1	A-120450.1	CAAGUUAGUAUCAGCCAAUdTdT	A-120451.1	AUUGGCUGAUACUAAUUGdTdT
AD-59624.1	A-120466.1	GUGAUGACAUCACCAUGGdTdT	A-120467.1	ACCAUGGUGAUGUACACdTdT
AD-59625.1	A-120482.1	UUGCAAGAAUGACAAUGAdTdT	A-120483.1	AUCAUUGUCAUUCUUGGAAdTdT
AD-59626.1	A-120498.1	UGAUGGAGGUUUUAAGUdTdT	A-120499.1	AACUUAUUUACCUCAUAdTdT
AD-59627.1	A-120514.1	GUUUUCAAUGUGAUAGGAdTdT	A-120515.1	UCCUAUCACAUUGGAAUAdTdT
AD-59628.1	A-120530.1	CAGCCAAGCCGCGGGACAAdTdT	A-120531.1	AUGUCCCGCGGCUUGGUGdTdT
AD-59629.1	A-120452.1	CAUGCCCCGCUUCCGCAUdTdT	A-120453.1	AAUGCGGAAGCGGGCAUGdTdT
AD-59630.1	A-120468.1	AUGUGAUAGGAACUGUACdTdT	A-120469.1	GUUACAGUCCUUAUCAUdTdT
AD-59631.1	A-120484.1	ACAAAUCCCUUACCUCAAdTdT	A-120485.1	UUGAAGGUAAAGGAUUUGdTdT
AD-59632.1	A-120500.1	AGGUUUUUCUUUGUCCUdTdT	A-120501.1	AAGGACAAAAGAUAAACUdTdT
AD-59633.1	A-120516.1	AGAUCGGGAGGGCCACCAAdTdT	A-120517.1	UUGGUGGCCUCCGGGAUCdTdT
AD-59634.1	A-120532.1	ACAUUUUCCUGUACCCCUdTdT	A-120533.1	AGGGGUGACAGGAAAAUGdTdT
AD-59635.1	A-120548.1	GGCCUUUCCUGGUUUUAUdTdT	A-120549.1	AUAAAAACAGGAAAGGCCdTdT
AD-59636.1	A-120564.1	UUGUGUUAAGUAAAAUGUdTdT	A-120565.1	AACAUUUUACUUAACAAAdTdT
AD-59637.1	A-120534.1	CAAGGAAAUGCAGAGCAAdTdT	A-120535.1	UUGCUCUGCAUUUCCUUGdTdT
AD-59638.1	A-120550.1	CUGAGAAAACUUGAUCAdTdT	A-120551.1	UGAUCAGAUUUUUCUAGdTdT

10

20

30

40

【表 2 1 - 5】

AD-59639.1	A-120566.1	UUACUUAAGGGCCUGUGdTdT	A-120567.1	CCACAGGCCCUUGAAGUAAdTdT
AD-59640.1	A-120536.1	ACCCCAACAGGGUGACUUdTdT	A-120537.1	AAAGUCACCCUGUUGGGGdTdT
AD-59641.1	A-120552.1	CCAGGUUUUGUUGCAGAAGdTdT	A-120553.1	CUUCUGCAACAAUACCUUGdTdT
AD-59642.1	A-120568.1	GCCUGUGAAGUCAAGUUdTdT	A-120569.1	AACUUUGACUCCACAGGCdTdT
AD-59643.1	A-120538.1	UGGAACCUCUGCGAGAUUdTdT	A-120539.1	AAAUCUCGAGAGGUUCCAdTdT
AD-59644.1	A-120554.1	AGCCUGAGAACACAAGAdTdT	A-120555.1	UCCUUGUGUUCUCAGGGCAdTdT
AD-59645.1	A-120570.1	CUCUAUGUCUCAGAUCAUdTdT	A-120571.1	AUGCAUCUGAGACAUAGAdTdT
AD-59646.1	A-120540.1	AAGACCGAAGGCCGAUAdTdT	A-120541.1	UGAUUCGGCCUUCGGCUUdTdT
AD-59647.1	A-120556.1	UAAAAUGUUCUUAUUCUUdTdT	A-120557.1	AAAGAAUAAGAACAUUUAdTdT
AD-59648.1	A-120572.1	UCUGGAAAAAGGAAGGUUdTdT	A-120573.1	AAACCUUCCUUUUUCCAGAdTdT
AD-59649.1	A-120542.1	UUCAAGGCCAACAGGCCUUdTdT	A-120543.1	AAGGCCUGUUGGCCUUGAdTdT
AD-59650.1	A-120558.1	GAAGUCAAGUUCAGCCUdTdT	A-120559.1	AGGGCUGAACUUUGACUUCdTdT
AD-59651.1	A-120574.1	CCAUCAAUGAGCUCACUGUdTdT	A-120575.1	ACAGUGAGCUCAUUGAUGGdTdT
AD-59652.1	A-120544.1	CUCUGAACACUUAUUCUUdTdT	A-120545.1	AAGAUAAUAGUGUUCAGAdTdT
AD-59653.1	A-120560.1	UGCUGGUUACACCAUUUAdTdT	A-120561.1	UAAUUGGUGUUAACAGCAdTdT
AD-59654.1	A-120546.1	AGAGGAAAGAACAGUUUdTdT	A-120547.1	AAAACUGGUUCUUCUUCUdTdT
AD-59655.1	A-120562.1	UGCCAGCCUGUGGAAGAdTdT	A-120563.1	UCUCCACAGGGCUGGGCAdTdT

10

20

【0485】

細胞培養および形質移入

37℃および5%CO₂雰囲気内で、10%FBS、ストレプトマイシン、およびグルタミン(ATCC)が添加されたイーグル最少必須培地(ATCC)中で、HepG2細胞(ATCC, Manassas, VA)をコンフルエンス近くまで培養した後、トリプシン処理によってプレートから遊離させた。96ウェルプレートの個々のウェル内で、各4μlの164本のsiRNA二本鎖に、ウェルあたり14.8μlのOpti-MEMと0.2μlのLipofectamine RNAiMax(Invitrogen, Carlsbad CA; カタログ番号13778-150)を添加することで、形質移入を実施した。次に混合物を室温で15分間インキュベートした。次に約2.5×10⁴個のHepG2細胞を含有する、抗生物質を含まない80μlの完全増殖培地をsiRNA混合物に添加した。細胞をRNA精製に先だって、24時間培養した。実験は20nMで実施され、未感作細胞と、AD-1955で形質移入された細胞と、陰性対照としてのルシフェラーゼを標的にするsiRNAとが含まれた。

30

【0486】

DYNABEADS mRNA単離キット(Invitrogen; パーツ番号610-12)を使用した全RNA単離

細胞を収集して150μlの溶解/結合緩衝液に溶解し、次にプラットフォーム振盪機上で、700rpmで5分間混合した(混合速度は処理全体にわたり同一であった)。10マイクロリットルの磁性ビーズと80μlの溶解/結合緩衝液混合物を丸底プレートに入れて、1分間混合した。磁性スタンドを使用して磁性ビーズを捕捉し、ビーズをかき乱すことなく上清を除去した。上清を除去した後、溶解細胞を残留ビーズに入れて、5分間混合した。上清を除去した後、磁性ビーズを150μlの洗浄緩衝液Aで2回洗浄して、1分間混合した。ビーズを再度捕捉して、上清を除去した。次にビーズを150μlの洗浄緩衝液Bで洗浄し、捕捉して上清を除去した。次にビーズを150μlの溶出緩衝液で洗浄し、捕捉して上清を除去した。ビーズを2分間乾燥させた。乾燥後、50μlの溶出緩衝液を添加して、5℃で70分間混合した。ビーズを磁石上に5分間捕捉した。単離RNAを含有する(containing)40μlの上清を取り出して、別の96ウェルプレートに入れた。

40

【0487】

50

ABI 高容量 cDNA 逆転写キットを使用した cDNA 合成 (Applied Biosystems, Foster City, CA; カタログ番号 4368813)

反応あたり、2 μ l の 10 $\times$ 緩衝液、0.8 μ l の 25 $\times$ dNTP、2 μ l のランダムプライマー、1 μ l の逆転写酵素、1 μ l の RNase 阻害剤、および 3.2 μ l の H₂O のマスターミックスを 10 μ l の全 RNA に添加した。cDNA は、以下のステップを通じて、Bio-Rad C-1000 または S-1000 サーマルサイクラー (Hercules, CA) を使用して作成した: 25 $^{\circ}$ C で 10 分間、37 $^{\circ}$ C で 120 分間、85 $^{\circ}$ C で 5 秒間、4 $^{\circ}$ C で保持。

【0488】

リアルタイム PCR

10

384 ウェルプレート (Roche; カタログ番号 04887301001) 中のウェルあたり、0.5 μ l の ヒト GAPDH TaqMan プローブ (Applied Biosystems; カタログ番号 4326317E)、0.5 μ l ヒト SERPINC1 TaqMan プローブ (Applied Biosystems; カタログ番号 Hs00892758_m1)、および 5 μ l の Lightcycler 480 プローブマスター混合物 (Roche; カタログ番号 04887301001) を含有するマスター混合物に、2 μ l の cDNA を添加した。LC 480 リアルタイム PCR 装置 (Roche) 内で、リアルタイム PCR を実施した。

【0489】

相対的倍数変化を計算するために、 $\Delta\Delta C_t$ 法を使用してリアルタイムデータを分析し、20 nM の AD-1955 で形質移入された細胞で実施したアッセイに正規化した。

20

【0490】

表 22 は、HepG2 における、示される iRNA の単回投与スクリーニング結果を示す。

【0491】

【表 2 2 - 1】

表22².示されるiRNAの20nMの単回投与スクリーニング

二本鎖ID	20nM平均	標準偏差
AD1955	100.4	9.1
AD-59267.1	9.3	2.7
AD-59268.1	72.2	20.3
AD-59269.1	6.9	0.4
AD-59270.1	18.3	5.2
AD-59271.1	27.9	7.6
AD-59272.1	13.0	1.1
AD-59273.1	79.4	10.9
AD-59274.1	5.9	1.1
AD-59275.1	16.1	5.5
AD-59276.1	6.1	2.2
AD-59277.1	4.4	0.9
AD-59278.1	9.3	0.4
AD-59279.1	12.7	4.7
AD-59280.1	4.5	1.7
AD-59281.1	15.7	5.6
AD-59282.1	25.9	6.9
AD-59283.1	27.0	18.9
AD-59284.1	8.6	3.7
AD-59285.1	11.2	3.7
AD-59286.1	15.2	5.0
AD-59287.1	6.9	1.9
AD-59288.1	74.5	16.5
AD-59289.1	3.3	1.3
AD-59290.1	13.8	2.5
AD-59291.1	9.4	2.8
AD-59292.1	9.5	3.5
AD-59293.1	2.5	1.1
AD-59294.1	4.8	1.8
AD-59295.1	11.8	7.2
AD-59296.1	32.4	4.9
AD-59297.1	78.5	105.0
AD-59298.1	76.3	10.7
AD-59299.1	4.4	0.8
AD-59300.1	32.2	10.8
AD-59301.1	48.5	15.2
AD-59302.1	7.2	3.0

*修正された

【 0 4 9 2】

【表 2 2 - 2】

AD-59303.1	17.0	2.3
AD-59304.1	87.1	16.4
AD-59305.1	4.4	0.9
AD-59306.1	35.7	10.6
AD-59307.1	6.3	0.4
AD-59308.1	65.1	9.1
AD-59309.1	7.5	2.0
AD-59310.1	27.1	9.5
AD-59311.1	8.1	1.4
AD-59312.1	84.5	8.5
AD-59313.1	17.8	0.2
AD-59314.1	21.1	0.4
AD-59315.1	85.5	29.8
AD-59316.1	13.0	1.6
AD-59317.1	64.0	10.7
AD-59318.1	7.9	2.2
AD-59319.1	31.8	4.7
AD-59320.1	5.7	2.1
AD-59321.1	3.4	0.0
AD-59322.1	9.6	1.3
AD-59323.1	100.1	4.8
AD-59324.1	40.2	2.9
AD-59325.1	5.8	0.7
AD-59326.1	20.4	10.9
AD-59327.1	5.0	2.0
AD-59328.1	8.0	2.8
AD-59329.1	54.1	5.9
AD-59330.1	21.6	12.3
AD-59331.1	4.3	2.4
AD-59332.1	12.9	3.8
AD-59333.1	26.1	1.0
AD-59334.1	41.9	4.7
AD-59335.1	12.5	1.7
AD-59336.1	13.5	1.7
AD-59337.1	78.6	3.6
AD-59338.1	17.9	12.3
AD-59339.1	5.8	4.1
AD-59340.1	92.3	10.0
AD-59341.1	8.0	1.8
AD-59342.1	11.1	1.9
AD-59343.1	43.6	4.2
AD-59344.1	6.0	2.3
AD-59345.1	23.6	3.6
AD-59346.1	41.0	3.2

10

20

30

40

【表 2 2 - 3】

AD-59347.1	12.2	1.0
AD-59348.1	30.0	5.1
AD-59349.1	14.4	0.9
AD-59350.1	9.1	1.0
AD-59351.1	10.7	1.6
AD-59352.1	1.9	0.4
AD-59353.1	4.6	0.8
AD-59354.1	30.1	0.1
AD-59355.1	12.2	2.2
AD-59356.1	63.6	11.5
AD-59357.1	112.1	20.6
AD-59358.1	23.2	3.0
AD-59359.1	7.5	0.8
AD-59360.1	19.2	0.5
AD-59587.1	8.4	2.7
AD-59588.1	24.8	5.7
AD-59589.1	4.4	1.7
AD-59590.1	13.6	1.3
AD-59591.1	3.1	0.5
AD-59592.1	12.1	2.7
AD-59593.1	7.6	3.5
AD-59594.1	7.5	1.6
AD-59595.1	20.1	2.9
AD-59596.1	7.3	1.3
AD-59597.1	61.3	6.8
AD-59598.1	24.4	1.6
AD-59599.1	4.3	0.4
AD-59600.1	30.1	2.8
AD-59601.1	11.4	0.8
AD-59602.1	6.0	0.0
AD-59603.1	19.4	2.2
AD-59604.1	5.8	0.6
AD-59605.1	6.5	0.3
AD-59606.1	9.9	0.6
AD-59607.1	28.0	2.8
AD-59608.1	66.1	8.0
AD-59609.1	84.2	9.0
AD-59610.1	8.0	1.7
AD-59611.1	6.6	1.5
AD-59612.1	31.5	2.7
AD-59613.1	27.6	1.7
AD-59614.1	20.3	0.5
AD-59615.1	12.8	1.4
AD-59616.1	6.8	0.3

10

20

30

40

【表 2 2 - 4】

AD-59617.1	13.1	0.9
AD-59618.1	5.4	0.2
AD-59619.1	59.1	5.4
AD-59620.1	6.3	1.7
AD-59621.1	18.4	1.8
AD-59622.1	9.6	1.2
AD-59623.1	8.7	2.1
AD-59624.1	13.6	0.7
AD-59625.1	12.0	1.5
AD-59626.1	14.6	1.8
AD-59627.1	7.7	6.7
AD-59628.1	7.6	0.3
AD-59629.1	55.7	8.2
AD-59630.1	20.2	5.9
AD-59631.1	12.3	0.1
AD-59632.1	3.1	0.3
AD-59633.1	20.4	2.1
AD-59634.1	3.7	0.0
AD-59635.1	16.1	1.3
AD-59636.1	13.0	1.0
AD-59637.1	14.4	4.8
AD-59638.1	7.7	1.0
AD-59639.1	70.4	5.3
AD-59640.1	2.5	0.1
AD-59641.1	18.1	2.1
AD-59642.1	5.9	1.0
AD-59643.1	70.7	17.8
AD-59644.1	17.9	4.7
AD-59645.1	2.5	0.1
AD-59646.1	19.9	0.1
AD-59647.1	74.8	12.0
AD-59648.1	6.8	0.0
AD-59649.1	95.2	6.2
AD-59650.1	71.1	1.0
AD-59651.1	5.0	0.8
AD-59652.1	5.5	1.2
AD-59653.1	15.3	1.0
AD-59654.1	67.4	0.9
AD-59655.1	10.8	1.0
未処置	94.9	14.2

10

20

30

40

【図 1】

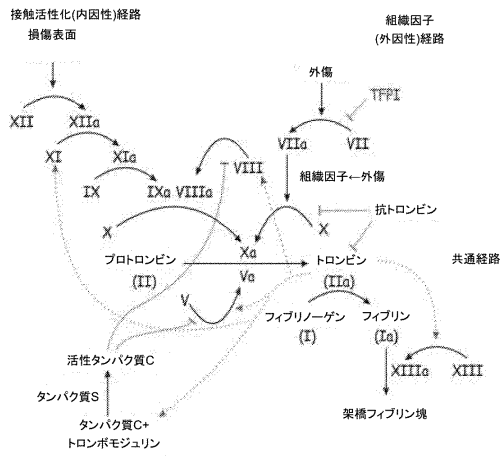


図1

【図 2 A】

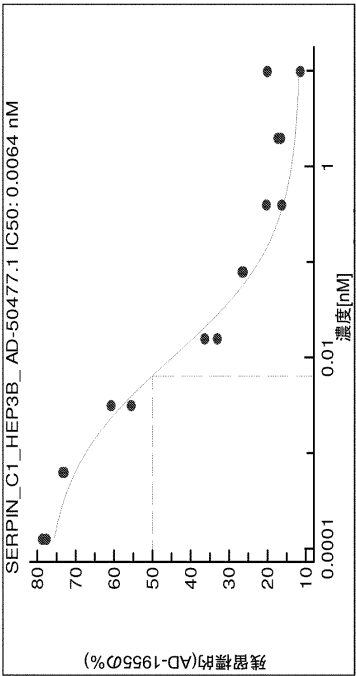


図2A

【図 2 B】

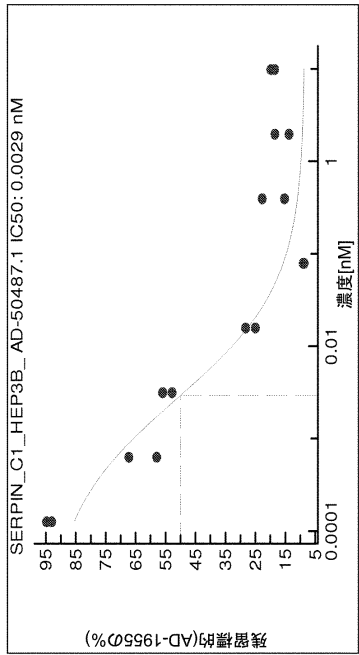
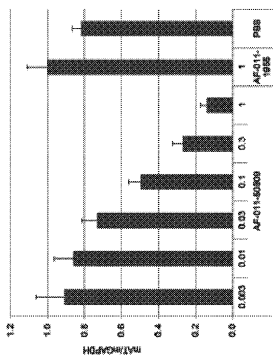


図2B

【図 3 A】



【図 3 B】

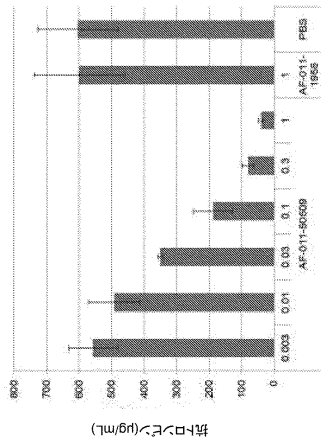


Figure 3A

図3B

【図 4 A】

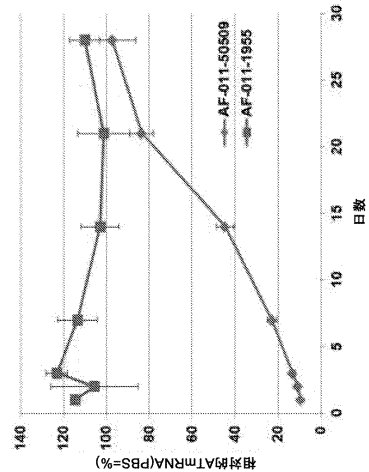


図4A

【図 4 B】

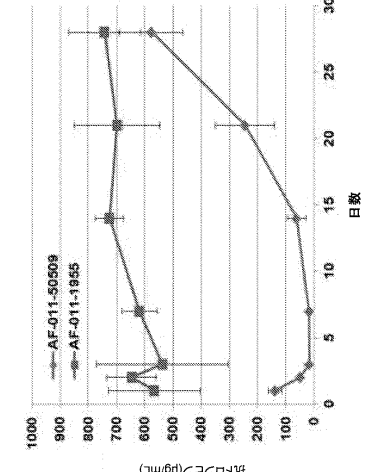


図4B

【図 4 C】

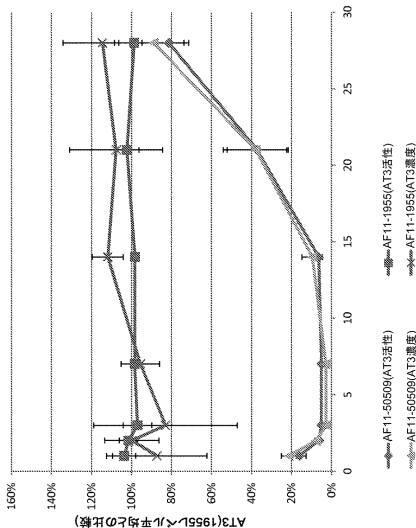


図4C

【図 5】

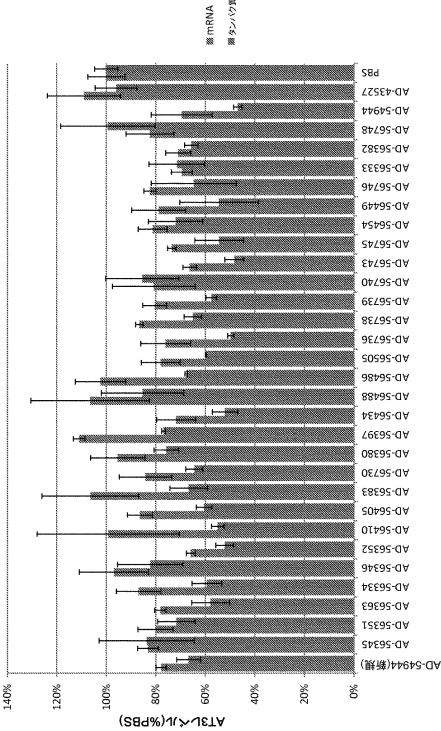


図5

【図 6】

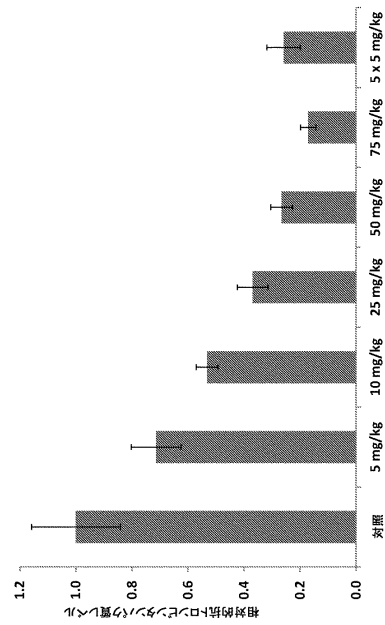


図6

【図 7 A】

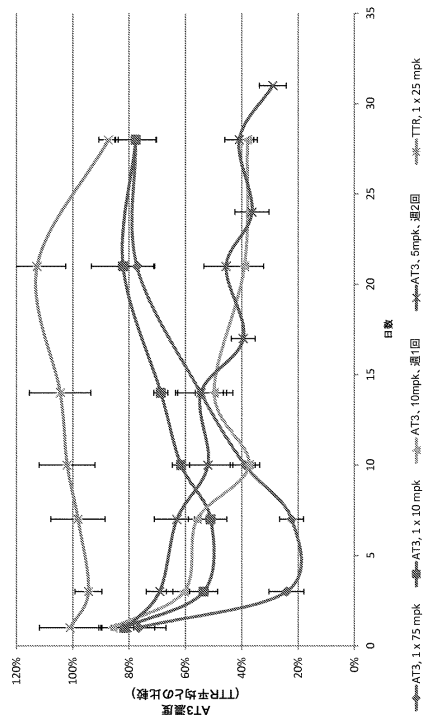


図7A

【図 7 B】

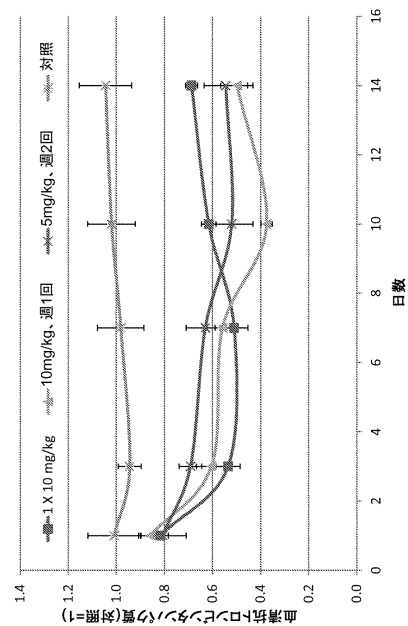


図7B

【図 8】

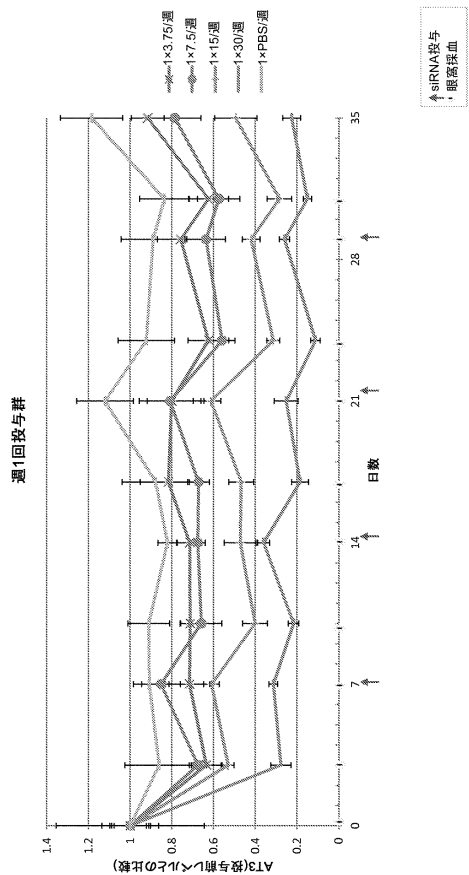


図8

【図 13】

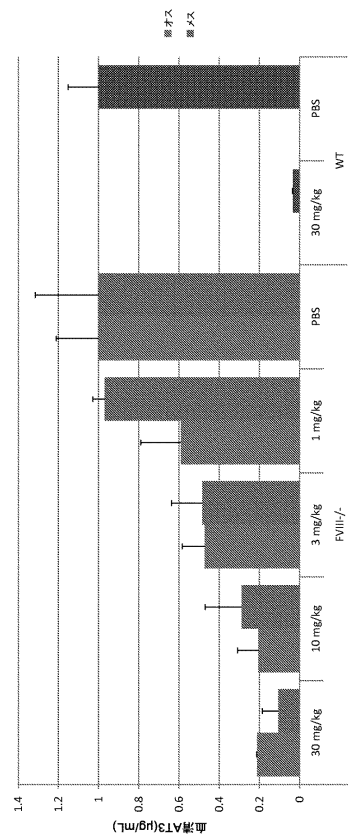


図 13

【図 14】

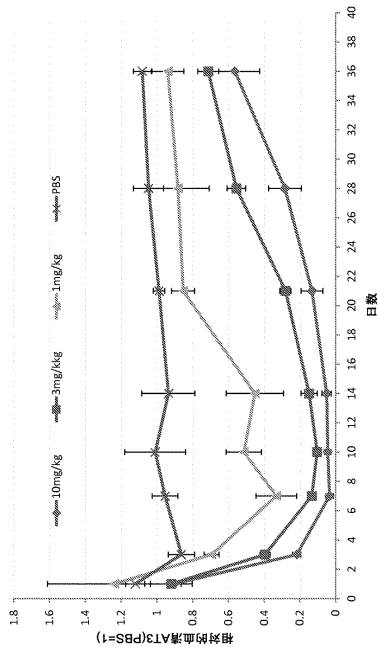


図 14

【図 15】

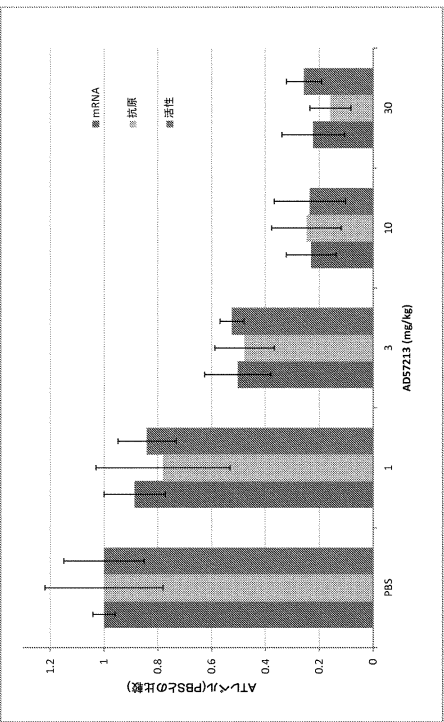


図 15

【図 16】

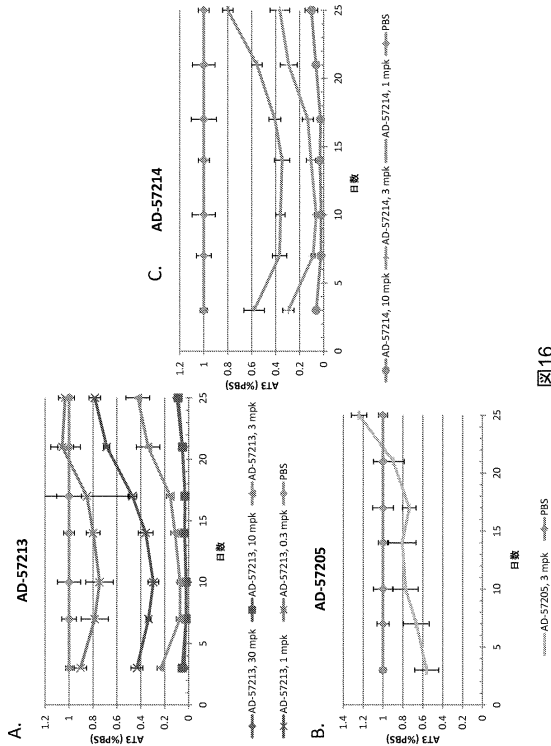


図 16

【図 17】

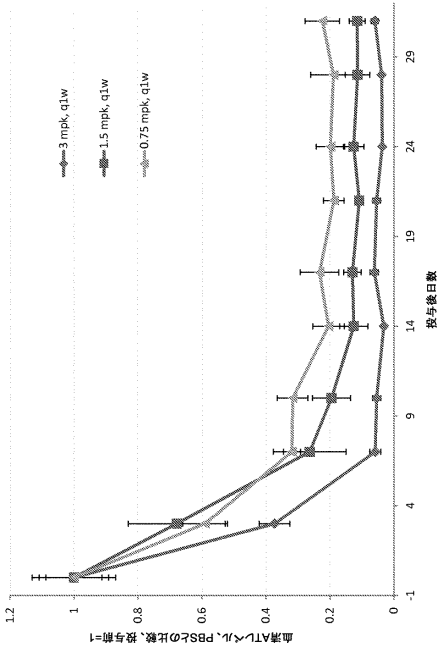


図 17

【図 18】

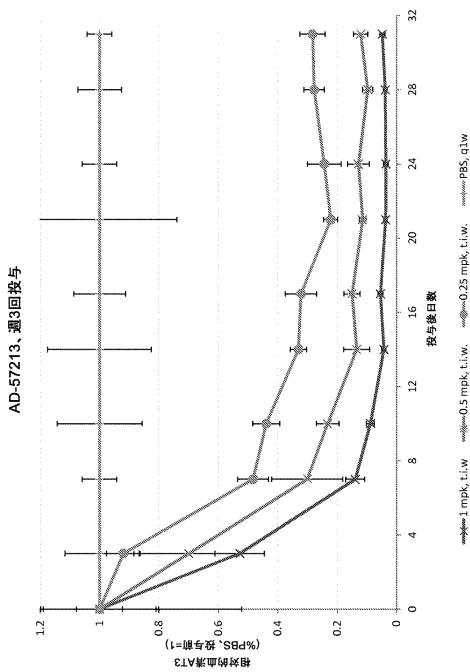


図 18

【図 19】

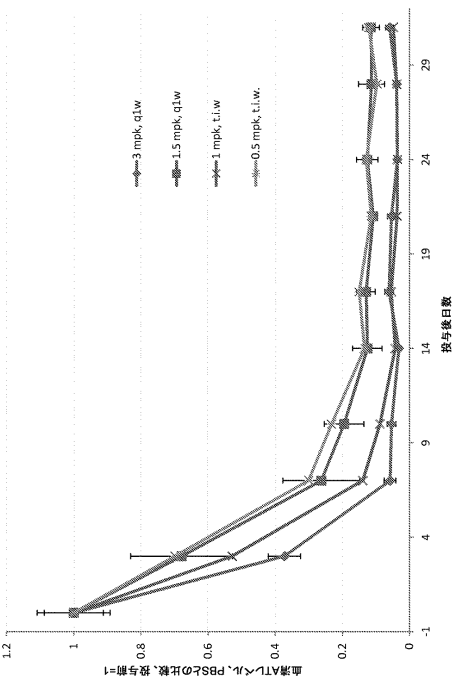


図 19

【図 20】

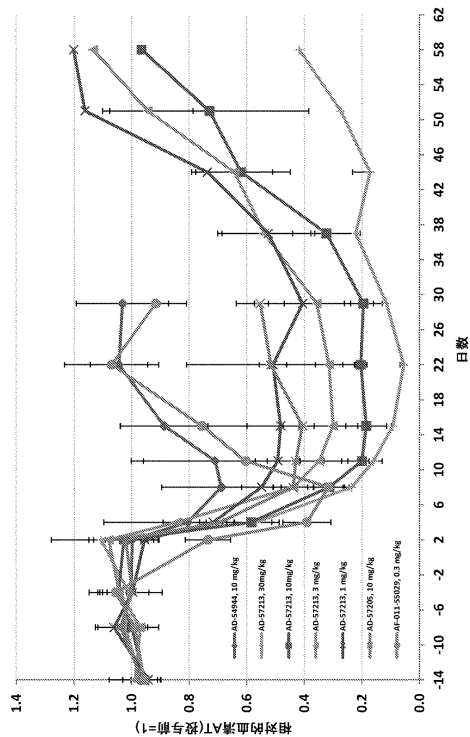
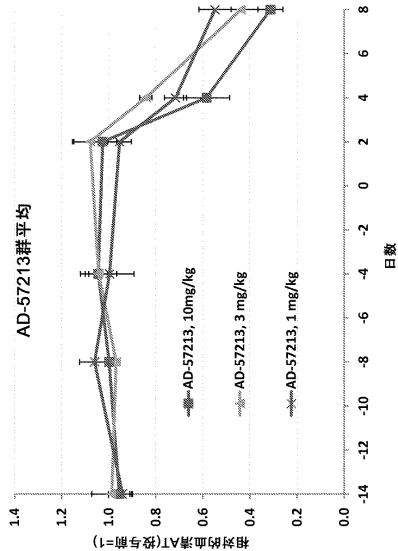


図 20

【図 2 1】



【図 2 2】

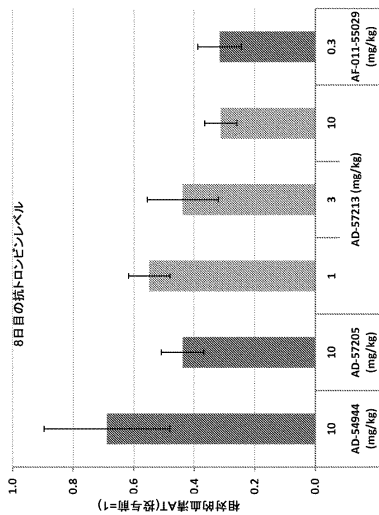
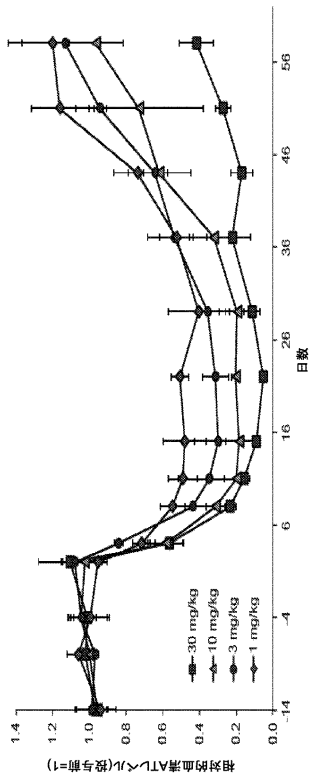


図21

図22

【図 2 3】



【図 2 4】

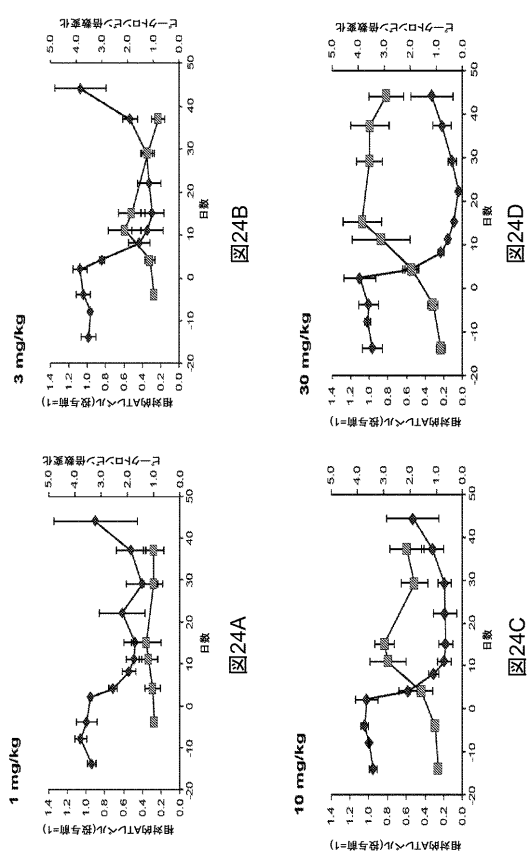


図23

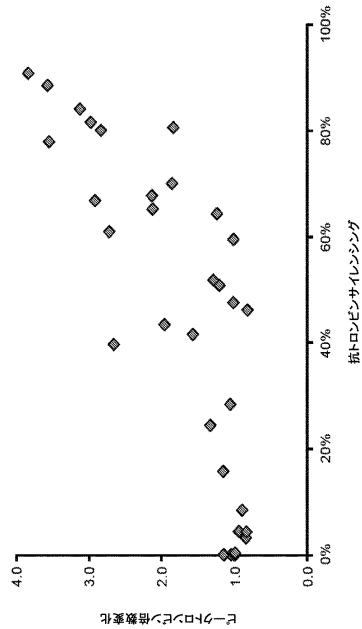
図24B

図24A

図24D

図24C

【図 2 5】



【図 2 6】

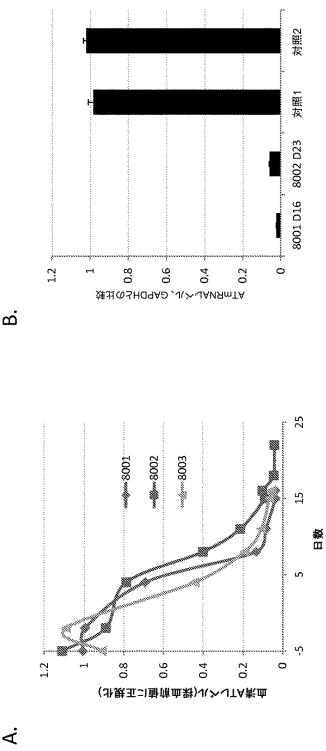
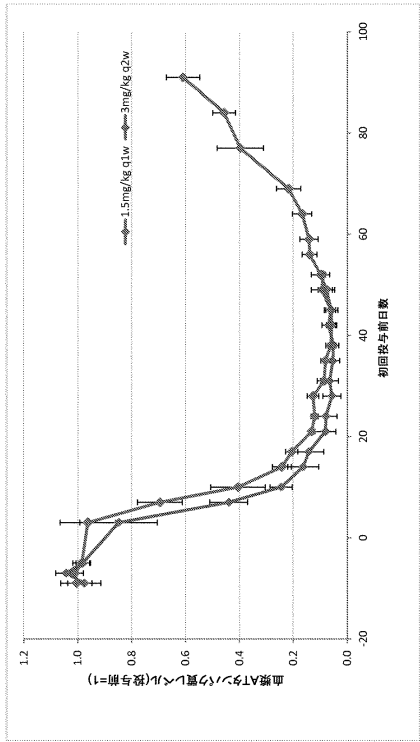


図25

図26

【図 2 7 A】



【図 2 7 B】

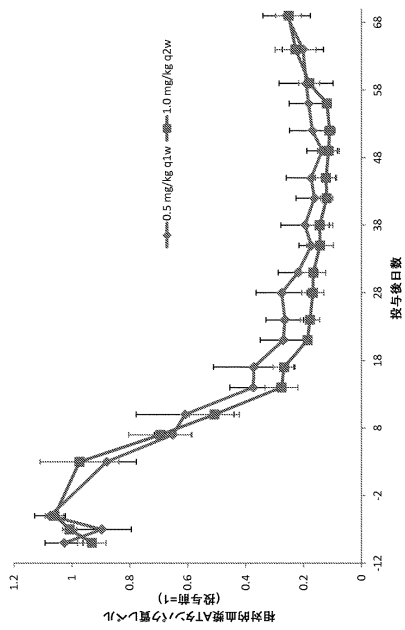


図27A

図27B

【図 3 1 A】

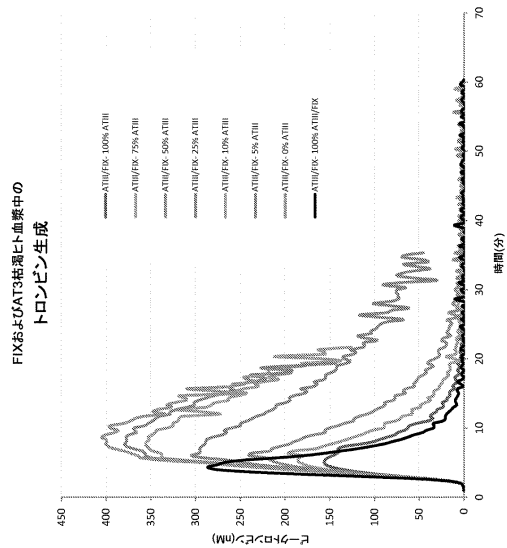


図31A

【図 3 1 B】

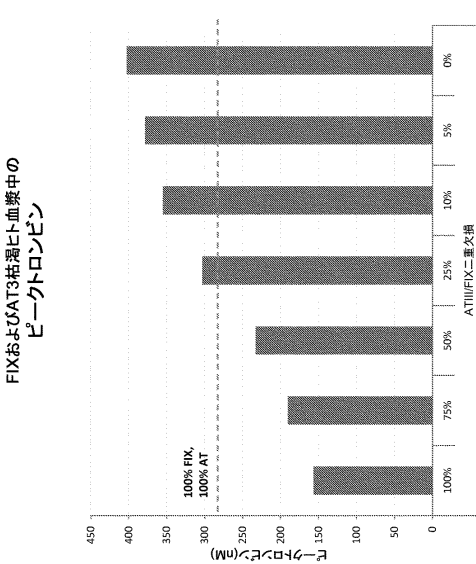


図31B

【配列表】

0006466832000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/37	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	C 1 2 Q 1/37
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 P 7/04
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 47/54
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
			A 6 1 P 43/00 1 1 1

(31)優先権主張番号 61/638,952

(32)優先日 平成24年4月26日(2012.4.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 13/837,129

(32)優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 アルフィカ・セーガル

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 イバンカ・トウジャースカ

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 ドナルド・フォスター

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番

(72)発明者 スチュアート・ミルスタイン

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 ブライアン・ベッテンコート

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 マルティン・マイアー

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 クラウス・カリセ

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 サティアナラヤーナ・クチマンチ

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 カラントッタティル・ジー・ラジーブ

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 ムティア・マノハラン

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

審査官 植原 克典

- (56)参考文献 国際公開第2011/104169 (WO, A1)
国際公開第2010/144740 (WO, A1)
特表2011-511004 (JP, A)
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1983年, vol.258 no.13, pp.8389-8394
血液凝固系及びその制御系, 三重県立看護大学紀要, 2008年, vol.12, pp.1-6
日本外科学会雑誌, 2003年, vol.104 no.12, pp.840-846
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
PubMed
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN)