

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5860029号  
(P5860029)

(45) 発行日 平成28年2月16日 (2016. 2. 16)

(24) 登録日 平成27年12月25日 (2015. 12. 25)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>31/713</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>31/713</b>	<b>Z N A</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>27/02</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>27/02</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>1 0 5</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/48</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>47/48</b>	

請求項の数 25 (全 158 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-502765 (P2013-502765)  
 (86) (22) 出願日 平成23年3月29日 (2011. 3. 29)  
 (65) 公表番号 特表2013-530127 (P2013-530127A)  
 (43) 公表日 平成25年7月25日 (2013. 7. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/030392  
 (87) 国際公開番号 W02011/123468  
 (87) 国際公開日 平成23年10月6日 (2011. 10. 6)  
 審査請求日 平成26年3月17日 (2014. 3. 17)  
 (31) 優先権主張番号 61/318, 702  
 (32) 優先日 平成22年3月29日 (2010. 3. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/318, 704  
 (32) 優先日 平成22年3月29日 (2010. 3. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505369158  
 アルナイラム ファーマシューティカルズ  
 , インコーポレイテッド  
 ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02  
 142, ケンブリッジ, サード スト  
 リート 300  
 (73) 特許権者 504159235  
 国立大学法人 熊本大学  
 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスチレチン (TTR) 関連眼アミロイドーシスのための s i R N A 療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

d s R N A を含む、対象の網膜色素上皮における T T R の発現を低下させるための医薬組成物であって、前記 d s R N A が A D - 1 8 3 2 4 または A D - 1 8 5 3 4 または A D - 2 3 0 4 3 である、前記対象の網膜に投与するための医薬組成物。

【請求項 2】

前記 d s R N A は、コレステロール分子にコンジュゲートされる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記対象は、ヒトである、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記対象は、T T R 関連眼アミロイドーシスの治療を必要とするヒトである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記対象は、V 3 0 M T T R 遺伝子を含むヒトである、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記 d s R N A は、A D - 1 8 3 2 4 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。

【請求項 7】

10

20

T T Rの発現が、網膜色素上皮 ( R P E ) において低下される、請求項 1 ~ 6 のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 8】

T T R m R N Aの発現が、対照と比較して、少なくとも40%または少なくとも60%低下される、請求項 1 ~ 7 のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 9】

投与が、I L - 6またはT N F - レベルによって測定された場合、炎症反応をもたらさない、請求項 1 ~ 8 のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記対象は、ダークアグーチ ( D a r k A g o u t i ) ( D A ) ラットである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 11】

前記 d s R N Aは、A D - 1 8 5 3 4である、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

T T Rの発現が、網膜色素上皮 ( R P E ) において低下される、請求項 10 または 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

T T R m R N Aの発現が、対照と比較して、少なくとも60%低下される、請求項 10 ~ 12 のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 14】

20

投与が、I L - 6またはT N F - レベルによって測定された場合、炎症反応をもたらさない、請求項 10 ~ 13 のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記対象は、ヒトA T T RのV 3 0 M遺伝子を有するトランスジェニックラットである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記 d s R N Aは、A D - 1 8 3 2 4である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

T T Rの発現が、網膜色素上皮 ( R P E ) において低下される、請求項 15 または 16 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 18】

T T R m R N Aの発現が、対照と比較して、少なくとも60%低下される、請求項 15 ~ 17 のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

投与が、I L - 6またはT N F - レベルによって測定された場合、炎症反応をもたらさない、請求項 15 ~ 18 のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項 20】

T T R関連眼アミロイドーシスの治療、予防、または管理が必要な患者の網膜に投与するための、A D - 1 8 3 2 4を含む、T T R関連眼アミロイドーシスを治療、予防、または管理するための医薬組成物。

40

【請求項 21】

d s R N Aを含む、網膜上皮細胞におけるT T Rの発現を阻害するための硝子体内投与のための医薬組成物であって、前記 d s R N AがA D - 1 8 3 2 4またはA D - 1 8 5 3 4であり、ここに、

( a ) 前記医薬組成物が前記網膜上皮細胞に導入され、および  
( b ) ステップ ( a ) で産生された細胞が、T T R 遺伝子のm R N A 転写物の分解を得るために十分な時間維持され、それによって、前記細胞内の前記T T R 遺伝子の発現が阻害されるところの、医薬組成物。

【請求項 22】

前記 d s R N Aは、A D - 1 8 3 2 4である、請求項 21 に記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 2 3】

前記網膜上皮細胞は、ヒト網膜色素上皮トランスジェニック細胞である、請求項 2 1 または 2 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 2 4】

T T R の発現が、少なくとも 1 0 %、4 0 %、または少なくとも 6 0 % 阻害される、請求項 2 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。

## 【請求項 2 5】

前記 d s R N A の導入が、I L - 6 または T N F - レベルによって測定された場合、炎症反応をもたらさない、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、s i R N A による T T R 関連眼アミロイドーシスを治療するための方法に関する。

## 【0 0 0 2】

## 関連出願への相互参照

本願は、2 0 1 0 年 3 月 2 9 日出願の米国仮出願第 6 1 / 3 1 8 , 7 0 4 号、および 2 0 1 0 年 3 月 2 9 日出願の米国仮出願第 6 1 / 3 1 8 , 7 0 2 号の利益を主張し、これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0 0 0 3】

20

## 配列表への言及

本願は、2 0 1 1 年 \_\_\_\_\_ に作成された、\_\_\_\_\_ バイトの大きさで、\_\_\_\_\_ . t x t と名づけられたテキストファイルとして、電子的に提出された配列表を含む。該配列表は、参照により組み込まれる。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 4】

トランスチレチン ( T T R ) は、分泌された甲状腺ホルモン結合タンパク質である。T T R は、血漿および脳脊髄液中のレチノール結合タンパク質 ( R B P ) / ビタミン A、および血清チロキシン ( T 4 ) に結合し、輸送する。

## 【0 0 0 5】

30

通常配列の T T R および変異配列 T T R は共に、アミロイドーシスを引き起こす。通常配列の T T R は、高齢者における心アミロイドーシスを引き起こし、これは老年性全身アミロイドーシス ( S S A ) ( 老年性心アミロイドーシス ( S C A ) と呼ばれる ) と称される。S S A は、しばしば、多くの他の器官において、微細な沈着物を伴う。T T R の変異は、T T R のアミロイド形成の過程を加速し、臨床的意義のある T T R アミロイドーシス ( A T T R ( アミロイドーシス - トランスチレチン型 ) と呼ばれる ) の発症に対する最も重要な危険因子である。8 5 個以上のアミロイド生成性 T T R 変異体が、全身家族性アミロイドーシスを引き起こすことが知られる。肝臓は、T T R の発現の主要部位である。発現の他の重要な部位には、脈絡叢、網膜、および脾臓が含まれる。

## 【0 0 0 6】

40

T T R アミロイドーシスは、種々の形態で現れる。末梢神経系が、さらに著しく影響を受ける場合、該疾患は、家族性アミロイド多発性神経障害 ( F A P ) と称される。心臓が主に関与するが、神経系は関与しない場合、該疾患は、家族性アミロイド心筋症 ( F A C ) と称される。T T R アミロイドーシスの第 3 の主要型は、髄膜 / C N S ( 中枢神経系 ) アミロイドーシスと称される。

## 【0 0 0 7】

二本鎖 RNA 分子 ( d s R N A ) が、RNA 干渉 ( R N A i ) として知られる、高度に保存された調節機序で遺伝子発現を遮断することが示されている。国際公開 WO 第 9 9 / 3 2 6 1 9 号 ( F i r e r a ) は、線虫における遺伝子の発現を阻害するための、少なくとも 2 5 ヌクレオチド長の d s R N A の使用を開示している。また、d s R N A は、植物 (

50

例えば、国際公開WO第99/53050号、Waterhouseら、および国際公開WO第99/61631号、Heifetzらを参照)、ショウジョウバエ(例えば、Yang, D., et al., Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200)、ならびに哺乳動物(国際公開WO第00/44895号、Limmer、および独国特許DE第101 00 586.5号、Kreutzerらを参照)を含む、他の生物において標的RNAを分解することが示されている。

【0008】

米国特許第20070207974号は、機能性および過機能性siRNAを開示する。米国特許第20090082300号は、TTRを対象とするアンチセンス分子を開示する。米国特許第7,250,496号は、TTRを対象とするマイクロRNAを開示する。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、十分な量の二本鎖リボ核酸(dsRNA)を対象の網膜に投与することによって、対象の網膜色素上皮(RPE)におけるトランスチレチン(TTR)の発現を低下させるための方法を提供する。幾つかの実施形態において、dsRNAは、AD-18324またはAD-18534である。dsRNAは、例えば、コレステロールにコンジュゲート(conjugate)させることができる。

【0010】

20

一実施形態において、対象は、ヒトである。別の実施形態において、対象は、TTR関連眼アミロイドーシスの治療を必要とするヒトである。また別の実施形態において、dsRNAは、AD-18324である。関連実施形態において、本方法は、RPEにおけるTTRの発現の低下をもたらす。別の関連実施形態において、本方法は、対照と比較して少なくとも40%または少なくとも60%の、TTRのmRNA発現の低下をもたらす。他の実施形態において、dsRNAの投与は、ヒトにおいて、IL-6またはTNF-レベルによって測定される場合、炎症反応をもたらさない。

【0011】

別の実施形態において、対象は、TTR関連眼アミロイドーシスの治療を必要とするATTTR(アミロイド生成性トランスチレチン)のV30M遺伝子を有するヒトである。一実施形態において、ATTTRのV30M対象に投与されるdsRNAは、AD-18324である。関連実施形態において、本方法は、網膜色素上皮におけるV30MのTTRの発現の低下をもたらす。別の実施形態において、本方法は、対照と比較して、少なくとも60%のV30MのTTRのmRNAの発現の低下をもたらす。他の実施形態において、dsRNAの投与は、ATTTRのV30M遺伝子を有するヒトにおいて、IL-6またはTNF-レベルによって測定される炎症反応をもたらさない。

30

【0012】

別の実施形態において、対象は、ダークアグーチ(Dark Agouti)(DA)ラットである。一実施形態において、DAラットに投与されるdsRNAは、AD-18534である。別の実施形態において、本方法は、網膜色素上皮におけるTTRの発現の低下をもたらす。また別の実施形態において、本方法は、対照と比較して、少なくとも60%のTTRのmRNAの発現の低下をもたらす。別の実施形態において、dsRNAの投与は、DAラットにおいて、IL-6またはTNF-レベルによって測定される炎症反応をもたらさない。

40

【0013】

幾つかの実施形態において、対象は、ヒトATTTR(アミロイド生成性トランスチレチン)のV30M遺伝子を有するトランスジェニックラットである。一実施形態において、ATTTRのV30Mトランスジェニックラットに投与されるdsRNAは、AD-18324である。関連実施形態において、本方法は、網膜色素上皮におけるTTRの発現の低下をもたらす。別の実施形態において、本方法は、対照と比較して、少なくとも60%の

50

TT RのmRNAの発現の低下をもたらす。他の実施形態において、dsRNAの投与は、ATT R V30M Tgラットにおいて、IL-6またはTNF- $\alpha$ レベルによって測定される場合、炎症反応をもたらさない。

#### 【0014】

一実施形態において、本発明は、TT R関連眼アミロイドーシスを治療、予防、または管理を必要とする患者に、治療上または予防上有効量のAD-18324を、該患者の網膜に投与することによって、TT R関連眼アミロイドーシスを治療、予防、または管理するための方法を提供する。

#### 【0015】

別の実施形態において、本発明は、ヒトを治療する方法を提供し、本方法は、TT R関連眼アミロイドーシスに罹患している、またはTT R関連眼アミロイドーシスを発症する危険性があると診断されるヒトを同定することと、該ヒトに、治療上もしくは予防上有効量のAD-18324を該ヒトの網膜に投与することと、を含む。

#### 【0016】

関連実施形態において、本発明は、網膜上皮細胞内のTT Rの発現を阻害するための方法を含み、本方法は、(a)AD-18324またはAD-18534であるdsRNAを該網膜上皮細胞に導入することと、(b)ステップ(a)において産生された該細胞を、TT R遺伝子のmRNA転写物の分解を得るために十分な時間維持し、それによって、該細胞内の該TT R遺伝子の発現を阻害することと、を含む。一実施形態において、本方法において投与されるdsRNAは、AD-18324である。幾つかの実施形態において、網膜上皮細胞は、ヒト網膜色素上皮トランスジェニック細胞である。別の実施形態において、本方法は、少なくとも10%、40%、または少なくとも60%のTT Rの発現の阻害をもたらす。関連実施形態において、該網膜上皮細胞への該dsRNAの導入は、IL-6またはTNF- $\alpha$ レベルによって測定される場合、炎症反応をもたらさない。

#### 【0017】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、以下の説明に説明される。本発明の他の特長、目的、利点は、説明および図面から、および特許請求の範囲から明らかとなる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0018】

【図1】TT RのsiRNAでのトランスフェクション後、培養したヒトPBMCにおける、TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ レベルのグラフである。

【図2A】HepG2細胞内のAD-18324およびAD-18328のそれぞれにおける用量反応曲線である。

【図2B】HepG2細胞内のAD-18324およびAD-18328のそれぞれにおける用量反応曲線である。

【図3】HepG2細胞内のAD-18246における用量反応曲線である。

【図4A】LNP01に製剤化されたTT R-dsRNA(AD-18324、AD-18328、およびAD-18246)の静脈内ボラス投与による、トランスジェニックH129-mTT R-KO/iNOS-KO/hTT Rマウスにおける、肝臓mRNAおよび血漿タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。

【図4B】LNP01に製剤化されたTT R-dsRNA(AD-18324、AD-18328、およびAD-18246)の静脈内ボラス投与による、トランスジェニックH129-mTT R-KO/iNOS-KO/hTT Rマウスにおける、肝臓mRNAおよび血漿タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。

【図5】SNALPに製剤化されたTT R-dsRNA(AD-18324およびAD-18328)の15分間の静脈内注入後の非ヒト霊長類の肝臓中のTT RのmRNAレベルの測定の概要を示すグラフである。

【図6】図6Aおよび図6Bは、SNALP-18328の静脈内ボラス投与によるトランスジェニックマウスにおける、ヒトV30M TTR肝臓mRNAおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。群平均が決定され、PBS対照群に対して正規化され

10

20

30

40

50

、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。P B Sと比較した、群平均の低下の割合(%)が、S N A L P - 1 9 5 5およびS N A L P - 1 8 3 2 8群に対して示される。( \* \* \*  $p < 0.001$ 、一元配置ANOVAおよびDunnの事後検定)

【図7】図7Aおよび図7Bは、S N A L P - 1 8 3 2 8の単回静脈内ボラス投与から22日にわたる、トランスジェニックマウスにおける、ヒトV30M TTR肝臓mRNAおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの低下の持続性を示す。群平均を決定した。TTR / G A P D HのmRNAレベルは、0日目のレベルに正規化され、プロットされた。各時点におけるS N A L P - 1 9 5 5と比較して、正規化されたTTRのmRNAレベルの割合の低下が、算出され、S N A L P - 1 8 3 2 8群に対して示される。( \* \* \*  $p < 0.001$ 、一元配置ANOVAおよびDunnの事後検定)

10

【図8】S N A L P - 1 8 3 2 8の15分間の単回静脈内注入から14日にわたる、非ヒト霊長類における、TTRの血清タンパク質レベルの時間経過を示す。

【図9】S N A L P - 1 8 3 2 8の静脈内ボラス投与後の、ヒトV30M TTR / H S F - 1ノックアウトマウスの種々の組織中のTTR - 免疫反応性の低下を示す。E : 食道、S : 胃、I 1 : 腸 / 十二指腸、I 4 : 腸 / 結腸、N : 神経、D : 後根神経節。

【図10】X T C - S N A L P - 1 8 3 2 8の15分間の静脈内注入後の、非ヒト霊長類の肝臓中のTTRのmRNAレベルの測定値を示す。

【図11】図11Aおよび図11Bは、L N P 0 9 - 1 8 3 2 8またはL N P 1 1 - 1 8 3 2 8の15分間の静脈内注入後の、非ヒト霊長類の肝臓中のTTRのmRNAおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの測定値を示す。図11Cは、P B S対照群と比較した時の、0.3mg / kgのL N P 0 9 - 1 8 3 2 8の15分間の静脈内注入から28日間にわたる、TTRの血清タンパク質レベルの時間経過を示す。

20

【図12】ヒトTTRのmRNA(参照配列NM\_000371.3、配列番号1331)の配列を示す。

【図13】図13Aおよび図13Bは、ヒトおよびラットTTRのmRNAのそれぞれの配列である。図13Aは、ヒトTTRのmRNAの配列(参照配列NM\_000371.2、配列番号1329)である。図13Bは、ラットTTRのmRNAの配列(参照配列NM\_012681.1、配列番号1330)である。

【図14】NM\_000371.3、NM\_000371.2、およびA D - 1 8 3 2 8のヌクレオチドアライメントを示す。

30

【図15】家族性アミロイド神経障害、家族性アミロイド心筋症、およびC N Sアミロイドーシスと関連するTTRにおける、症状および変異を図示する。

【図16】異なるTTRの注入継続時間での、S N A L P - 1 8 5 3 4を用いた肝臓中のmRNAレベルの低下を示す。動物群( $n = 4$ /群)は、15分間、または1、2、または3時間の注入を介して1mg / kgのS N A L P - 1 8 5 3 4を投与した。48時間後、ラットは、安楽死させ、肝臓が採集された。TTRおよびG A P D HのmRNAレベルが、Q u a n t i g e n e bDNAアッセイを使用して、肝臓溶解物から測定された。TTRのmRNAレベルとG A P D HのmRNAレベルとの比が、各動物について算出された。群平均が決定され、P B S対照群に正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。( \* \* \*  $p < 0.001$ 、P B Sと比較した、一元配置ANOVAおよびBonferroniの事後検定)

40

【図17】L N P 0 7 - 1 8 5 3 4またはL N P 0 8 - 1 8 5 3 4の15分間の静脈内注入後の、ラットの肝臓中のTTRのmRNAレベルの測定値を示す。

【図18】L N P 0 9 - 1 8 5 3 4またはL N P 1 1 - 1 8 5 3 4の15分間の静脈内注入後の、S p r a g u e - D a w l e yラットの肝臓中の内因性TTRのmRNAレベルのインビボ阻害を示す。動物群( $n = 4$ /群)は、15分間の注入を介して、0.01、0.03、0.1、または0.3mg / kgのL N P 0 9 - 1 8 5 3 4、L N P - 1 1 - 1 8 5 3 4、またはP B Sを静脈内に投与した。48時間後、動物は、安楽死させ、肝臓を採集した。TTRおよびG A P D HのmRNAレベルを、Q u a n t i g e n e bDNAアッセイを使用して、肝臓生検の溶解物から測定した。TTRのmRNAレベルとG

50

A P D Hのm R N Aレベルとの比が、各動物について算出された。群平均が決定され、P B S対照群に対して正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。

【図19】非ヒト霊長類における、T T Rを標的とするL N P 1 2に製剤化したs i R N Aの有効性を示す。データ点は、群平均±標準偏差を示す。

【図20】A L N - T T R 0 1によるm R N Aの抑制の持続性を示すN H PにおけるG L P研究からの結果を有するグラフである。

【図21】S N A L P - 1 8 3 2 8 ( A L N - T T R 0 1 ) の静脈内ボラス投与後の、成熟動物 ( h V 3 0 M T T R / H S F - 1 ノックアウトマウス ) の種々の組織中のT T Rの沈着物の後退を示すグラフである。

10

【図22】A R P E 1 9細胞におけるT T Rのm R N Aの発現へのヒトT T Rのs i R N AのA D - 1 8 3 2 4の効果を示すグラフである。A D - 1 8 3 2 4は、ラットT T Rのs i R N AのA D - 1 8 5 3 4と比較された。ヒトT T Rのm R N Aの発現は、ヒトG A P D Hの発現と比較して算出された。

【図23】ダークアグーチ ( D A ) ラットの網膜色素上皮細胞におけるT T Rのm R N Aの発現へのA D - 1 8 5 3 4の効果を示すグラフである。A D - 1 8 5 3 4は、対照s i R N A群、生理食塩水群、および非処置群と比較された。内因性ラットT T Rのm R N Aの発現は、ラットG A P D Hの発現と比較して算出された。

【図24】A T T R V 3 0 Mトランスジェニックラットの網膜色素上皮細胞におけるA T T Rのm R N Aの発現へのA D - 1 8 3 2 4の効果を示すグラフである。A D - 1 8 3 2 4は、対照s i R N A群、生理食塩水群、および非処置群と比較された。ヒトT T Rのm R N Aの発現は、ラットG A P D Hの発現と比較して算出された。

20

【図25】対照s i R N Aと比較した、A T T RのV 3 0 Mトランスジェニックラットの網膜色素上皮細胞におけるヒトT T Rタンパク質発現へのヒトT T Rのs i R N Aの効果を示すウエスタンブロット法である。

【図26】投与から14日および21日後の、ダークアグーチ ( D A ) ラットの網膜色素上皮細胞におけるラットT T Rのm R N Aの発現へのA D - 2 3 0 4 3 ( c h o - T T R s i R N A ) の効果を示すグラフである。内因性ラットT T Rのm R N Aの発現は、ラットG A P D Hの発現と比較して算出された。

【図27】投与から21日後の、ダークアグーチ ( D A ) ラットの網膜色素上皮細胞におけるラットT T Rのm R N Aの発現へのA D - 2 3 0 4 3 ( c h o - T T R s i R N A ) の効果を示すグラフである。内因性ラットT T Rのm R N Aの発現は、ラットG A P D Hの発現と比較して算出された。

30

【発明を実施するための形態】

【0019】

発明の詳細な説明

本発明は、d s R N A、およびd s R N AがT T R遺伝子を標的とする、細胞または哺乳動物における、T T R遺伝子の発現を阻害するためのd s R N Aを使用する方法を提供する。本発明はまた、T T R遺伝子の発現によって引き起こされる、哺乳動物における、T T Rアミロイドーシス等の病態および疾患を治療するための、組成物および方法も提供する。d s R N Aは、R N A干渉 ( R N A i ) として知られる過程を通じてm R N Aの配列に特異的な分解を導く。

40

【0020】

本明細書で取り上げられる組成物のd s R N Aは、30ヌクレオチド長未満、一般に、19~24ヌクレオチド長である、領域を有するR N A鎖 ( アンチセンス鎖 ) を含み、T T R遺伝子のm R N A転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である。これらのd s R N Aの使用は、哺乳動物における、T T Rの発現に関連する病理学に関係している遺伝子のm R N Aの標的化分解を可能にする。特に、T T Rのd s R N Aの非常に低い投薬量は、特異的かつ効率的にR N A iを媒介することができ、T T R遺伝子の発現の著しい阻害をもたらす。細胞に基づくアッセイを用いて、本発明者は、T T Rを標的とするd s R N

50

Aが、RNAiを特異的かつ効率的に媒介することができ、TTR遺伝子の発現の著しい阻害をもたらす事を実証した。したがって、これらのdsRNAを含む方法および組成物は、肝臓疾患またはTTRアミロイドーシス、例えば、FAPの治療において等、TTRを下方調節することによって媒介され得る病理過程を治療するのに有用である。

#### 【0021】

TTRのdsRNAを含有する方法および組成物は、TTRアミロイドーシス等のTTRの発現によって媒介される病理過程を治療するのに有用である。1つの実施形態において、TTRの発現によって媒介される障害を治療する方法には、TTRを標的とした、治療上有効な量のdsRNAを、かかる処置を必要とするヒトに投与することが含まれる。1つの実施形態において、dsRNAは、約0.01、0.1、0.5、1.0、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25mg/kgで、ヒトに投与される。

10

#### 【0022】

以下の詳細な説明は、TTR遺伝子の発現を阻害するための、dsRNAを含有する組成物の作製方法および使用方法、ならびにこの遺伝子の発現によって引き起こされる疾患および障害を治療するための、組成物および方法を開示する。本発明で取り上げられる医薬組成物は、薬剤として許容される担体と共に、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24ヌクレオチド長であり、TTR遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を含むアンチセンス鎖を有するdsRNAを含む。また、本発明で取り上げられる医薬組成物は、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24ヌクレオチド長であり、TTR遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を有するアンチセンス鎖を有するdsRNAも含む。

20

#### 【0023】

dsRNAのセンス鎖は、本明細書に開示されるセンス鎖のいずれかの15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含むことができる。dsRNAのアンチセンス鎖は、本明細書に開示されるアンチセンス鎖のいずれかの15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含むことができる。

#### 【0024】

1つの実施形態において、dsRNAは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の修飾ヌクレオチドを含むことができる。1つの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、および/またはコレステリル誘導体基またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される末端ヌクレオチドを含むことができる。1つの実施形態において、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、ロックされたヌクレオチド、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、ホスホルアミデート、および/またはヌクレオチドを有する非天然塩基を含むことができる。

30

40

#### 【0025】

1つの実施形態において、dsRNAの該相補性の領域は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上のヌクレオチド長である。1つの実施形態において、該相補性の領域は、配列番号169の10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含む。

#### 【0026】

1つの実施形態において、dsRNAのそれぞれの鎖は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、またはそれ以上のヌクレオチド長である。1つの実施形態において、該dsRNAは、表3A、3

50

B、4、6 A、6 B、7、および16から選択される、センス鎖、または10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは21個のそのヌクレオチドフラグメント、ならびに表3 A、3 B、4、6 A、6 B、7、および16から選択される、アンチセンス鎖、または10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは21個のそのヌクレオチドフラグメントを含む。

#### 【0027】

1つの実施形態において、細胞へのdsRNAの投与は、リアルタイムPCRアッセイによって測定した場合、TTRのmRNAの発現の約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞へのdsRNAの投与は、リアルタイムPCRアッセイによって測定した場合、TTRのmRNAの発現の約40%~45%、45%~50%、50%~55%、55%~60%、60%~65%、65%~70%、70%~75%、75%~80%、80%~85%、85%~90%、90%~95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞へのdsRNAの投与は、分岐DNAアッセイによって測定した場合、TTRのmRNAの発現の約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞へのdsRNAの投与は、分岐DNAアッセイによって測定した場合、TTRのmRNAの発現の約40%~45%、45%~50%、50%~55%、55%~60%、60%~65%、65%~70%、70%~75%、75%~80%、80%~85%、85%~90%、90%~95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。

#### 【0028】

1つの実施形態において、dsRNAは、0.01 pM、0.1 pM、1 pM、5 pM、10 pM、100 pM、または1000 pM未満のIC50を有する。1つの実施形態において、dsRNAは、約0.01、0.1、1、5、または10 mg/kgのED50を有する。

#### 【0029】

1つの実施形態において、dsRNAの投与は、カニクイザルにおける、TTRのmRNAを約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、またはそれ以上低下させることができる。1つの実施形態において、dsRNAの投与は、肝臓TTRのmRNAレベルを、約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上、または血清TTRのタンパク質レベルを、約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNAの投与は、肝臓TTRのmRNAレベル、および/または血清TTRのタンパク質レベルを最長1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25日、もしくはそれ以上の日数、低下させる。

#### 【0030】

1つの実施形態において、dsRNAは、LNP製剤に製剤化され、PBC対照群と比較して、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、もしくは1 mg/kgの用量で、TTRのmRNAレベルを、約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNAは、LNP製剤に製剤化され、ウエスタンブロットによって測定した場合、PBC対照群と比較して、TTRのタンパク質レベルを、約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNAは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25 mg/kgで、それを必要とする対象に投与する時、処置してから最長1、2、3、4、5、6、7、8、9、

10

20

30

40

50

10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは25日目まで、血清TTRのタンパク質レベルを抑制する。

【0031】

したがって、幾つかの態様において、TTRのdsRNAおよび薬剤として許容される担体を含む医薬組成物、TTR遺伝子の発現を阻害するために組成物を使用する方法、およびTTR遺伝子の発現によって引き起こされる疾患を治療するために医薬組成物を使用する方法が、本発明で取り上げられる。

【0032】

I. 定義

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される、特定の用語および語句の意味を以下に提供する。本明細書の他の部分の用語の用法と、本項で提供されるその定義との間に明らかな相違がある場合、本項の定義が優先される。

【0033】

「G」、「C」、「A」、および「U」のそれぞれは、一般に、塩基としてそれぞれグアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルを含むヌクレオチドを表す。「T」および「dT」は、本明細書で交換可能に使用され、核酸塩基がチミン、例えば、デオキシリボチミン(deoxyribothymine)である、デオキシリボヌクレオチドを指す。しかしながら、「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」または「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、以下でさらに詳述する修飾ヌクレオチド、または代替の置換部分も指すことができることが理解されよう。当業者は、グアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルが、かかる置換部分を担持するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対形成性を実質的に変化させることなく、他の部分によって置換可能であることを十分認識している。例えば、限定されないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン、またはウラシルを含むヌクレオチドと塩基対を形成することができる。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、本発明のヌクレオチド配列において、例えば、イノシンを含むヌクレオチドと置換され得る。かかる置換部分を含む配列は、本発明の実施形態である。

【0034】

本明細書で使用される、「トランスチレチン」(「TTR」)とは、細胞内の遺伝子を指す。TTRはまた、ATTR、HsT2651、PALB、プレアルブミン、TBPA、およびトランスチレチン(プレアルブミン、アミロイドーシスI型)としても知られている。ヒトTTRのmRNA転写物の配列は、NM\_000371で見出され得る。マウスTTRのmRNAの配列は、NM\_013697.2で見出され得、ラットTTRのmRNA配列は、NM\_012681.1で見出され得る。

【0035】

本明細書で使用される、「標的配列」は、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含む、TTR遺伝子の転写の間に形成される、mRNA分子のヌクレオチド配列の連続する部分を指す。

【0036】

本明細書で使用される、「配列を含む鎖」という用語は、標準的な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説明される、ヌクレオチド鎖を含む、オリゴヌクレオチドを指す。

【0037】

本明細書で使用される場合、別途記載のない限り、第2のヌクレオチド配列に関連して第1のヌクレオチド配列を説明するために使用される時の「相補的」という用語は、当業者には理解されるように、特定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖構造を形成する、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの能力を指す。かかる条件は、例えば、ストリンジェントな条件であり得、ストリンジェントな条件は、400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、12~16

10

20

30

40

50

時間 50 もしくは 70 、その後の洗浄を含み得る。生物内で遭遇され得る、生理的に適切な条件等の他の条件を適用することができる。当業者は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的な用途に応じて、2つの配列の相補性の試験に最も適切な、一連の条件を決定することができよう。

#### 【0038】

これには、第1および第2のヌクレオチド配列の全長にわたる、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドに対する、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの塩基対形成が含まれる。かかる配列は、本明細書において、互いに対して「完全に相補的」と呼ぶことができる。しかし、本明細書において、第1の配列が第2の配列に対して「実質的に相補的」とであると言われ  
10  
る場合、2つの配列は完全に相補的であり得るか、あるいはそれらの最終的な用途に最も適した条件下でハイブリダイズする能力を保持しながら、ハイブリダイズ時に、1個以上であるが、一般に4、3、または2個を超えないミスマッチ塩基対を形成してもよい。しかし、2つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイズ時に1つ以上の単鎖のオーバーハングを形成するように設計される場合、かかるオーバーハングは、相補性の決定に関してミスマッチとは見なされないものとする。例えば、21ヌクレオチド長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むdsRNAであって、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に完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むdsRNAは、本明細書に記載の目的上、やはり「完全に相補的」  
20  
であるとして言及され得る。

#### 【0039】

また、本明細書で使用される、「相補的」な配列は、それらのハイブリダイズ能に関する上記の要件が満たされる限り、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を含み得るか、または完全にそれらから形成され得る。かかる非ワトソンクリック塩基対には、G-Uゆらぎ(Wobble)またはフーグスティーン(Hoogsteen)型塩基対が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0040】

本明細書における「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、これらが使用される文脈から理解されるように、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間、またはdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基一致に対して使用され得る。  
30

#### 【0041】

本明細書で使用される、メッセンジャーRNA(mRNA)「の少なくとも一部に実質的に相補的」であるポリヌクレオチドは、5'UTR、オープンリーディングフレーム(ORF)、または3'UTRを含む、目的のmRNA(例えば、TTTをコードするmRNA)の連続する部分に実質的に相補的である、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、TTTをコードするmRNAの中断されていない部分に実質的に相補的である場合、TTTのmRNAの少なくとも一部に相補的である。

#### 【0042】

本明細書で使用される、「二本鎖RNA」または「dsRNA」という用語は、2つの逆平行な、上記で定義されるように実質的に相補的な核酸鎖を含む二重鎖構造を有する、リボ核酸分子の複合体を指す。一般に、各鎖のヌクレオチドの大半はリボヌクレオチドであるが、本明細書で詳細に説明されるように、それぞれもしくは両方の鎖は、少なくとも1個の非リボヌクレオチド、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も含み得る。加えて、本明細書で使用される「dsRNA」は、複数のヌクレオチドでの大幅な修飾を含み、本明細書で開示されるか、または当該技術分野において既知であるあらゆる種類の修飾を含む、リボヌクレオチドへの化学修飾を含み得る。siRNA型分子内で使用される、このようないずれの修飾も、本明細書および特許請求の範囲の目的上、「dsRNA」によって包含される。  
40

#### 【0043】

二重鎖構造を形成する2本の鎖は、より長い1つのRNA分子の異なる部分であってもよく、あるいはそれらは別個のRNA分子であってもよい。2本の鎖がより長い1つの分子の一部であり、したがって二重鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の中断されていないヌクレオチド鎖によって接続される場合、接続するRNA鎖は、「ヘアピンループ」と称される。2本の鎖が、二重鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の、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的に接続される場合、該接続構造は、「リンカー」と称される。該RNA鎖は、同一または異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、二重鎖内に存在するいずれかのオーバーハングを差し引いた、dsRNAの最も短い鎖内のヌクレオチド数である。二重鎖構造に加えて、dsRNAは、1つ以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。また、「siRNA」という用語は、上に記載の通り、dsRNAを指すように本明細書に使用される。

10

#### 【0044】

本明細書で使用される、「ヌクレオチドオーバーハング」とは、不對ヌクレオチド、またはdsRNAの1本の鎖の3'末端がもう一方の鎖の5'末端を越えて延びるか、またはその逆である時に、dsRNAの二重鎖構造から突出するヌクレオチドを指す。「平滑」または「平滑末端」は、dsRNAのその末端に不對ヌクレオチドがない、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。「平滑末端の」dsRNAは、その長さ全体にわたって二本鎖であるdsRNAであり、すなわち、該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。

20

#### 【0045】

「アンチセンス鎖」という用語は、標的配列に実質的に相補的である領域を含む、dsRNAの鎖を指す。本明細書で使用される、「相補性の領域」という用語は、配列、例えば本明細書において定義される標的配列に実質的に相補的である、アンチセンス鎖の領域を指す。相補性の領域が標的配列に完全に相補的ではない場合、該ミスマッチは、該末端領域内に最も許容され、存在する場合、一般に、末端領域内、例えば、5'および/または3'末端の6、5、4、3、もしくは2ヌクレオチド内にある。

#### 【0046】

本明細書で使用される、「センス鎖」という用語は、アンチセンス鎖の領域に実質的に相補的である領域を含む、dsRNAの鎖を指す。

30

#### 【0047】

本明細書で使用される、「SNALP」という用語は、安定な核酸脂質粒子を指す。SNALPは、dsRNA、またはdsRNAが転写されるプラスミド等の核酸を含む、少量の水性内部をコーティングする、脂質の小胞を表す。SNALPは、例えば、米国特許出願公開第20060240093号、第20070135372号、および2008年4月15日に出願の第US 61/045,228号に説明されている。これらの出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0048】

dsRNAについて言及する際、「細胞への導入」とは、当業者には理解されるように、細胞への取り込みまたは吸収を促進することを意味する。dsRNAの吸収または取り込みは、自発的な拡散過程もしくはは活性な細胞過程を通じて、または補助的な薬剤もしくはは装置によって発生し得る。この用語の意味は、インビトロでの細胞に限定されず、dsRNAは、生命体の一部である「細胞に導入」することもできる。そのような場合、細胞への導入は、該生物への送達を含む。例えば、インビボ送達については、dsRNAを組織部位に注射するか、または全身投与することができる。細胞へのインビトロでの導入には、電気穿孔法およびリポフェクション法等の当該技術分野において既知の方法が含まれる。さらなるアプローチは、本明細書に説明されているか、または当該技術分野において既知である。

40

#### 【0049】

「発現停止させる(silence)」、「~の発現を阻害する」、「~の発現を下方制御す

50

る」、および「～の発現を抑制する」等の用語は、それらが T T R 遺伝子について言及する限り、本明細書において、第 1 の細胞もしくは細胞群と実質的に同一であるが、T T R 遺伝子の発現が阻害されるように処置されていない第 2 の細胞もしくは細胞群（対照細胞）と比較して、T T R 遺伝子が転写され、T T R 遺伝子の発現が阻害されるように処置された第 1 の細胞もしくは細胞群から単離され得る m R N A の量の低下によって表した場合、T T R 遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を指す。阻害の程度は、通常、以下で表される。

$$\left[ \left\{ \left( \text{対象細胞中の m R N A} \right) - \left( \text{処理細胞中の m R N A} \right) \right\} / \left( \text{対象細胞中の m R N A} \right) \right] \cdot 100\%$$

【0050】

10

代替として、阻害の程度は、T T R 遺伝子の発現に機能的に結び付けられるパラメータ、例えば細胞によって分泌される T T R 遺伝子によってコードされるタンパク質の量、または特定の表現型、例えばアポトーシスを提示する細胞の数の低下に関して与えられてもよい。原則的に、T T R 遺伝子の発現停止は、構成的に、またはゲノム工学によってのいずれか、ならびに任意の適切なアッセイによって、該標的を発現する任意の細胞において決定することができる。しかし、ある d s R N A が特定の程度、T T R 遺伝子の発現を阻害し、したがって本発明に包含されるかどうかを決定するために参照が必要とされる場合、以下の実施例で提供されるアッセイが、かかる参照の役割を果たす。

【0051】

例えば、特定の場合において、T T R 遺伝子の発現は、本発明で取り上げられる二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、または 50 % 抑制される。幾つかの実施形態において、T T R 遺伝子は、本発明で取り上げられる二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約 60 %、70 %、または 80 % 抑制される。幾つかの実施形態において、T T R 遺伝子は、本発明で取り上げられる二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約 85 %、90 %、または 95 % 抑制される。

20

【0052】

T T R の発現の文脈において本明細書で使用される、「治療する」、「治療」等の用語は、T T R の発現によって媒介される病理過程の軽減または緩和を指す。本発明の文脈において、本明細書で以下に列举される他の病態のうちのいずれかに関連する限り（T T R の発現によって媒介される病理過程以外）、「治療する」、「治療」等の用語は、かかる病態に関連する少なくとも 1 つの症状の軽減もしくは緩和、または F A P 等の T T R アミロイドーシスの進行の遅延等の、かかる病態の進行の遅延もしくは逆行を意味する。T T R アミロイドーシスの症状には、神経障害（例えば、知覚障害、遠位部の感覚鈍麻）、自律性神経障害（例えば、胃潰瘍または起立性低血圧症等の胃腸障害）、運動神経障害、発作、認知症、ミエロパシー、多発性神経障害、手根管症候群、自律神経不全症、心筋症、硝子体混濁、腎不全、腎症、実質的に減少した m B M I（修正ボディー・マス・インデックス）、脳神経障害、および角膜格子状変性が含まれる。

30

【0053】

本明細書で使用される、「治療上有効な量」および「予防上有効な量」という句は、T T R の発現によって媒介される病理過程の処置、阻止、もしくは管理、または T T R の発現によって媒介される病理過程の明らかな症状において、治療的有用性を提供する量を指す。治療上有効である具体的な量は、普通の開業医が容易に決定することができ、例えば、T T R の発現によって媒介される病理過程の種類、患者の病歴および年齢、T T R の発現によって媒介される病理過程のステージ、ならびに他の T T R の発現によって媒介される病理過程に抗する薬剤の投与等の、当該技術分野において既知の因子に依存して異なり得る。

40

【0054】

本明細書で使用される、「医薬組成物」は、薬理学上有効な量の d s R N A と、薬剤として許容される担体とを含む。本明細書で使用される、「薬理学上有効な量」、「治療上

50

有効な量」、または単に「有効量」は、目的とする薬理学的、治療的、または阻止的結果を産生するのに効果的なRNAの量を指す。例えば、ある臨床的治療が、疾患または障害に関連する測定可能なパラメータにおいて、少なくとも25%の低下がある時に有効であると見なされる場合、該疾患または障害を治療するための薬物の治療上有効な量は、該パラメータにおける少なくとも25%の低下をもたらすために必要な量である。例えば、TTRを標的とするdsRNAの治療上有効な量は、TTRの血清レベルを少なくとも25%低下させることができる。別の例において、TTRを標的とするdsRNAの治療上有効な量は、肝機能または腎機能を少なくとも25%向上させることができる。

#### 【0055】

「薬剤として許容される担体」という用語は、治療薬を投与するための担体を指す。かかる担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。該用語は、明確に、細胞培養基を除く。経口投与される薬物について、薬剤として許容される担体には、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、甘味剤、香味剤、着色剤、および防腐剤等の薬剤として許容される賦形剤が含まれるが、これらに限定されない。好適な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムおよびカルシウム、リン酸ナトリウムおよびカルシウム、ならびにラクトースが含まれ、コーンスターチおよびアルギン酸が好適な崩壊剤である。結合剤にはデンプンおよびゼラチンを含むことができ、一方滑沢剤が存在する場合は、概してステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクであろう。所望の場合、錠剤をモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の材料でコーティングして、消化管内での吸収を遅らせることができる。

#### 【0056】

本明細書で使用される、「形質転換細胞」は、ベクターが導入されて、そこからdsRNA分子を発現することができる細胞である。

#### 【0057】

### II. 二本鎖リボ核酸(dsRNA)

本明細書でより詳細に記載されるように、本発明は、細胞または哺乳動物内、例えば、アミロイドーシスに罹患しているヒトのTTR遺伝子の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)分子を提供し、該dsRNAは、TTR遺伝子の発現において形成されるmRNAの少なくとも一部に相補的である相補性の領域を有する、アンチセンス鎖を含み、該相補性の領域は、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24ヌクレオチド長であり、該dsRNAは、該TTR遺伝子が発現する細胞と接触すると、例えば、PCRまたは分枝DNA(bDNA)ベースの方法によって、またはウエスタンブロット等によるタンパク質ベースの方法によってアッセイした場合、該TTR遺伝子の発現を少なくとも30%阻害する。TTR遺伝子の発現は、以下の実施例で説明されるようにアッセイによって測定したとき、少なくとも30%軽減され得る。例えば、Hep3B細胞等の細胞培養内のTTR遺伝子の発現は、bDNAまたはTa q M a nアッセイ等によってTTRのmRNAレベルを測定することによって、またはELISAアッセイ等によってタンパク質レベルを測定することによってアッセイされ得る。本発明のdsRNAは、1以上の単鎖ヌクレオチドオーバーハングをさらに含み得る。

#### 【0058】

該dsRNAは、以下でさらに説明されるように、当該技術分野において既知の標準的な方法、例えば、Biosearch, Applied Biosystems, Inc. から市販されるもの等の自動DNA合成装置の使用によって、合成することができる。該dsRNAは、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成するのに十分相補的である、2本のRNA鎖を含む。該dsRNAの1本の鎖(アンチセンス鎖)は、TTR遺伝子の発現の間に形成されたmRNAの配列から派生した標的配列に実質的に相補的であり、一般に完全に相補的である、相補性の領域を含み、もう一方の鎖(センス鎖)は、アンチセンス鎖に相補的である領域を含み、その結果、2本の鎖は、好適な条件下で組み合わせられると、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。一般に、二重鎖構造は、15~30、また

は25～30、または18～25、または19～24、または19～21、または19、20もしくは21塩基対長である。一実施形態において、二重鎖は19塩基対長である。別の実施形態において、二重鎖は21塩基対長である。2本の異なるsiRNAを組み合わせて使用する場合、二重鎖の長さは同一であってもよく、または異なってもよい。

#### 【0059】

本発明のdsRNAのそれぞれの鎖は、一般に15～30、または18～25、または18、19、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド長である。他の実施形態において、それぞれの鎖は25～30ヌクレオチド長である。二重鎖のそれぞれの鎖は、同一長さであってもよく、または異なる長さであってもよい。2本の異なるsiRNAを組み合わせて使用する場合、各siRNAのそれぞれの鎖の長さは、同一であつてもよく、または異なつてもよい。

10

#### 【0060】

本発明のdsRNAは、1個以上のヌクレオチドの1つ以上の単鎖のオーバーハングを含むことができる。一実施形態において、該dsRNAの少なくとも一端は、1～4、一般には1または2個のヌクレオチドの、単鎖のヌクレオチドオーバーハングを有する。別の実施形態において、該dsRNAのアンチセンス鎖は、センス鎖の3'末端および5'末端のそれぞれに、1～10個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。さらなる実施形態において、該dsRNAのセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端および5'末端のそれぞれに、1～10個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。

20

#### 【0061】

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、平滑末端の対応物より予想外に優れた阻害特性を有し得る。幾つかの実施形態において、1つのみのヌクレオチドオーバーハングの存在により、その全体的な安定性に影響を及ぼすことなく、dsRNAの干渉活性が強化される。1つのみのオーバーハングを有するdsRNAは、インビボ、ならびに種々の細胞、細胞培養基、血液、および血清内で特に安定および効果的であることが判明している。一般に、単鎖のオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端、または代替として、センス鎖の3'末端に位置する。該dsRNAは、一般にアンチセンス鎖の5'末端に位置する、平滑末端も有し得る。かかるdsRNAは改善された安定性および阻害活性を有し得、したがって、低投薬量、すなわち、1日当たり受容者の体重1kgにつき5mg未満の投与を可能にする。一般に、該dsRNAのアンチセンス鎖は、3'末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5'末端は平滑である。別の実施形態において、オーバーハング内のヌクレオチドのうちの1つ以上が、ヌクレオシドチオン酸と置換される。

30

#### 【0062】

一実施形態において、TTT遺伝子はヒトTTT遺伝子である。特定の実施形態において、該dsRNAのセンス鎖は、表3A、3B、4、6A、6B、または7からのセンス配列のうちの1つであり、該アンチセンス鎖は、表3A、3B、4、6A、6B、または7からのセンス配列のうちの1つである。表3A、3B、4、6A、6B、または7に提供される標的配列のいずれかの箇所を標的とする代替のアンチセンス剤を、標的配列および隣接するTTT配列を使用して、容易に決定することができる。

40

#### 【0063】

当業者は、20～23個だが、特に21個の塩基対の二重鎖構造を有するdsRNAが、RNA干渉の誘発に特に効果的であると認められていることをよく認識している(Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888)。しかし、他方、より短いもしくはより長いdsRNAが、同様に効果的であり得ることを見出している。上記の実施形態において、表3A、3B、4、6A、6B、または7に提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質のために、本発明で取り上げられるdsRNAは、本明細書に記載の長さの少なくとも1本の鎖を含むことができる。一端または両端のわずかな数のヌクレオチドを差し引いた、表3A、3B、4、6A、6B、または7の配列のうちの1つを有するより短いdsRNAが、上記のdsRNAと比較して、同様に効果的で

50

あり得ることは、妥当に予想され得る。したがって、表 3、4、6、または 7 の配列のうちの 1 つからの、少なくとも 15、16、17、18、19、20 個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドの部分的配列を有する dsRNA は、本明細書で以下に記載されるアッセイにおいて、TTR 遺伝子の発現を阻害するそれらの能力が、完全な配列を含む dsRNA と阻害の 5、10、15、20、25、もしくは 30 % 以下の異なる dsRNA が、本発明によって意図される。さらに、所望の TTR 標的配列内で切断する dsRNA を、対応する TTR アンチセンス配列および相補的なセンス配列を用いて容易に作製することができる。

#### 【0064】

加えて、表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 に提供される dsRNA は、RNAi に基づく切断の影響を受けやすい、TTR 内の部位を同定する。したがって、本発明は、本発明の薬剤のうちの 1 つによって標的とされる配列内を標的とする、dsRNA をさらに特徴とする。本明細書で使用される、第 2 の dsRNA は、第 2 の dsRNA が、第 1 の dsRNA のアンチセンス鎖に相補的である mRNA 内のいずれかの箇所でメッセージを切断する場合、第 1 の dsRNA の配列内を標的とすると言われる。かかる第 2 の dsRNA は、一般に、TTR 遺伝子内の選択した配列に隣接する領域から取られたさらなるヌクレオチド配列に連結される、表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 に提供される配列のうちの 1 つからの少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドからなる。

#### 【0065】

RNA 標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要であれば、当該技術分野において既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技法によって、日常的に検出することができる。dsRNA の標的 mRNA における切断部位は、一般に、当業者に既知の方法、例えば、Soutschek et al., Nature; 2004, Vol. 432, pp. 173-178 に記載の 5' - RACE 法（全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる）を用いて決定することができる。1 つの実施形態において、Soutschek らによって記載の 5' - RACE 法を用いて、ALN-18328 が、配列番号 1331 (NM\_000371.3) の 636 位のグアニンヌクレオチドと配列番号 1331 の 637 位のアデニンヌクレオチドとの間で、TTR の mRNA を切断することが確認された。1 つの実施形態において、ALN-18328 が、配列番号 1331 の 637 位のアデニンヌクレオチドと配列番号 1331 の 638 位のグアニンヌクレオチドとの間で、TTR の mRNA を切断しないことが確認された。

#### 【0066】

本発明で取り上げられる dsRNA は、標的配列との 1 つ以上のミスマッチを含有してもよい。一実施形態において、本発明で取り上げられる dsRNA は、3 つ以下のミスマッチを含有する。dsRNA 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、ミスマッチの範囲が、相補性の領域の中心に位置しないことが好ましい。該 dsRNA 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、いずれかの末端から 5 ヌクレオチド、例えば、相補性の領域の 5' もしくは 3' 末端のいずれかから 5、4、3、2、もしくは 1 ヌクレオチドに制限されることが好ましい。例えば、TTR 遺伝子の領域に相補的である 23 ヌクレオチドの dsRNA 鎖について、該 dsRNA は、一般には、中央の 13 個のヌクレオチド内にはいかなるミスマッチも含有しない。本発明内で記載される方法を使用して、標的配列とのミスマッチを含有する dsRNA が、TTR 遺伝子の発現の阻害に効果的であるかどうかを判定することができる。TTR 遺伝子の発現の阻害における、ミスマッチを有する dsRNA の有効性を考慮することは、特に TTR 遺伝子内の特定の相補性の領域が、集団内に多型の配列多様性を有することが既知である場合、重要である。

#### 【0067】

##### 修飾

また別の実施形態において、該 dsRNA は、安定性を増加させるために化学修飾される。本発明で取り上げられる核酸は、"Current protocols in n

10

20

30

40

50

ucleic acid chemistry」、Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N Y, U S A に記載されるもの等の、当該技術分野において十分確立された方法によって、合成および/または修飾することができ、該文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明において有用である dsRNA 化合物の具体例には、修飾された骨格を含むか、または天然のヌクレオシド間結合を含まない dsRNA が含まれる。本明細書で定義されるように、修飾された骨格を有する dsRNA には、該骨格にリン原子を保持するもの、および該骨格にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書の目的上、また当該技術分野において時折言及されるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾された dsRNA も、オリゴヌクレオシドであると見なすことができる。

10

#### 【0068】

修飾された dsRNA 骨格には、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の、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含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3 - アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、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、ならびに正常な 3 - 5 結合を有するボラノホスフェート、2 - 5 結合したこれらの類似体、そしてヌクレオシド単位の隣接する対が 3 - 5 から 5 - 3 へ、または 2 - 5 から 5 - 2 へ結合する、逆向きの極性を有するものが含まれる。また、種々の塩、混合塩、および遊離酸形態も含まれる。

20

#### 【0069】

上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第 3, 687, 808 号、第 4, 469, 863 号、第 4, 476, 301 号、第 5, 023, 243 号、第 5, 177, 195 号、第 5, 188, 897 号、第 5, 264, 423 号、第 5, 276, 019 号、第 5, 278, 302 号、第 5, 286, 717 号、第 5, 321, 131 号、第 5, 399, 676 号、第 5, 405, 939 号、第 5, 453, 496 号、第 5, 455, 233 号、第 5, 466, 677 号、第 5, 476, 925 号、第 5, 519, 126 号、第 5, 536, 821 号、第 5, 541, 316 号、第 5, 550, 111 号、第 5, 563, 253 号、第 5, 571, 799 号、第 5, 587, 361 号、および第 5, 625, 050 号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0070】

その中にリン原子を含まない、修飾された dsRNA 骨格は、単鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または 1 個以上の単鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成された）、シロキサノ骨格、硫化物、スルホキシド、およびスルホン骨格、ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファミン酸骨格、メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格、スルホネートおよびスルホンアミド骨格、アミド骨格、ならびに N、O、S、および CH<sub>2</sub> を混合した構成成分を有する他のもの、を有するものが含まれる。

40

#### 【0071】

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には、米国特許第 5, 034, 506 号、第 5, 166, 315 号、第 5, 185, 444 号、第 5, 214, 134 号、第 5, 216, 141 号、第 5, 235, 033 号、第 5, 64, 562 号、第 5, 264, 564 号、第 5, 405, 938 号、第 5, 434, 257 号、第 5, 466, 677 号、第 5, 470, 967 号、第 5, 489, 677 号、第 5, 541, 307 号、第 5, 561, 225 号、第 5, 596, 086 号、第 5, 602, 240 号、第 5

50

、608,046号、第5,610,289号、第5,618,704号、第5,623,070号、第5,663,312号、第5,633,360号、第5,677,437号、および第5,677,439号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0072】

他の好適なdsRNA模倣体において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち、骨格が、新規の基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とハイブリダイズするために維持される。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そのようなオリゴマー化合物の1つであるdsRNA模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物では、dsRNAの糖骨格が、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置換される。核酸塩基は保持され、該骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,539,082号、第5,714,331号、および第5,719,262号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

#### 【0073】

本発明の他の実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するdsRNA、およびヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシドであり、特に上述の米国特許第5,489,677号の $-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ 、 $-[メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として知られる]$ 、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、および $-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$  [式中、天然のホスホジエステル骨格は、 $-O-P-O-CH_2-$ として表される]、および上述の米国特許第5,602,240号のアミド骨格である。また、上述の米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有するdsRNAも好ましい。

#### 【0074】

また、修飾されたdsRNAは、1つ以上の置換糖部分も含有することができる。好ましいdsRNAは、2位に、OH; F; O-、S-、もしくはN-アルキル; O-、S-、もしくはN-アルケニル; O-、S-、もしくはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含み、ここで、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{10}$ 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。 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ が特に好ましく、式中、nおよびmは1~約10である。他の好ましいdsRNAは、2位に、 $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、もしくはO-アラルキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、介入物、dsRNAの薬物動態特性を改善するための基、またはdsRNAの薬力学的特性を改善するための基、ならびに類似した特性を有する他の置換基のうちの1つを含む。好ましい修飾には、2-メトキシエトキシ(2-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>であって、2-O-(2-メトキシエチル)または2-MOEとしても知られる)(Martinet al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)すなわち、アルコキシ-アルコキシ基が含まれる。好ましいさらなる修飾には、本明細書において以下の実施例に記載される、2-DMAOEとしても知られる、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、ならびに、同様に、本明細書において以下の実施例に記載される、2-ジメチルアミノエトキシエト

10

20

30

40

50

キシ（当該技術分野で 2 - O - ジメチルアミノエトキシエチルもしくは 2 - DMAE O E としても知られる）、すなわち、2 - O - - CH<sub>2</sub> - - O - - CH<sub>2</sub> - - N (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> が含まれる。

#### 【0075】

他の好ましい修飾には、2 - メトキシ（2 - OCH<sub>3</sub>）、2 - アミノプロポキシ（2 - OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>）、および 2 - フルオロ（2 - F）が含まれる。同様の修飾を、dsRNA の他の位置、特に 3' 末端ヌクレオチドもしくは 2' - 5' 結合 dsRNA 内の糖の 3' 位、および 5' 末端ヌクレオチドの 5' 位で作製することもできる。また、dsRNA は、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分等の糖模倣体を有してもよい。かかる修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第 4,981,957 号、第 5,118,800 号、第 5,319,080 号、第 5,359,044 号、第 5,393,878 号、第 5,446,137 号、第 5,466,786 号、第 5,514,785 号、第 5,519,134 号、第 5,567,811 号、第 5,576,427 号、第 5,591,722 号、第 5,597,909 号、第 5,610,300 号、第 5,627,053 号、第 5,639,873 号、第 5,646,265 号、第 5,658,873 号、第 5,670,633 号、および第 5,700,920 号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のうちのあるものは本出願によって共同所有され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0076】

dsRNA は、核酸塩基（当該技術分野ではしばしば単に「塩基」と称される）修飾または置換をも含み得る。本明細書で使用される、「非修飾」もしくは「天然」の核酸塩基には、プリン塩基、アデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基、チミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U）が含まれる。修飾された核酸塩基には、5 - メチルシトシン（5 - me - C）、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、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 - アゾのウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル（シュードウラシル）、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他の 8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ、特に 5 - ブロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の 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、ならびに 3 - デアザグアニンおよび 3 - デアザアデニン等の、他の合成および天然の核酸塩基が含まれる。さらなる核酸塩基には、米国特許第 3,687,808 号で開示されるもの、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 で開示されるもの、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 で開示されるものが含まれる。これらの核酸塩基のうち特定のものは、本発明で取り上げられるオリゴマー化合物の結合親和性を高めるために、特に有用である。これらには、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含む、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびに N - 2、N - 6、および O - 6 置換プリンが含まれる。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を 0.6 ~ 1.2 増加させることが示されていて（Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., DsRNA Research and Applic

10

20

30

40

50

ations, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276 - 278)、例示的な塩基置換であり、2 - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられると、さらに特に好ましい。

#### 【0077】

上記の修飾された核酸塩基の特定のもの、ならびに他の修飾された核酸塩基の調製を教示する代表的な米国特許には、上記の米国特許第3,687,808号、ならびに米国特許第4,845,205号、第5,130,30号、第5,134,066号、第5,175,273号、第5,367,066号、第5,432,272号、第5,457,187号、第5,459,255号、第5,484,908号、第5,502,177号、第5,525,711号、第5,552,540号、第5,587,469号、第5,594,121号、第5,596,091号、第5,614,617号、および第5,681,941号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれ、米国特許第5,750,692号も、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0078】

##### コンジュゲート (conjugate)

本発明のdsRNAの別の修飾は、該dsRNAの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させる、1つ以上の部分またはコンジュゲートの該dsRNAへの化学的結合を含む。かかる部分には、コレステロール部分 (Lettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553-6556)、コール酸 (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060)、チオエーテル、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., Biorg. 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)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H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)、ポリアミンもしく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もしくはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937)等の脂質部分が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0079】

かかるdsRNAコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第4,828,979号、第4,948,882号、第5,218,105号、第5,525,465号、第5,541,313号、第5,545,730号、第5,552,538号、第5,578,717号、第5,580,731号、第5,591,584号、第5,109,124号、第5,118,802号、第5,138,045号、第5,41

4, 077号、第5, 486, 603号、第5, 512, 439号、第5, 578, 718号、第5, 608, 046号、第4, 587, 044号、第4, 605, 735号、第4, 667, 025号、第4, 762, 779号、第4, 789, 737号、第4, 824, 941号、第4, 835, 263号、第4, 876, 335号、第4, 904, 582号、第4, 958, 013号、第5, 082, 830号、第5, 112, 963号、第5, 214, 136号、第5, 082, 830号、第5, 112, 963号、第5, 214, 136号、第5, 245, 022号、第5, 254, 469号、第5, 258, 506号、第5, 262, 536号、第5, 272, 250号、第5, 292, 873号、第5, 317, 098号、第5, 371, 241号、第5, 391, 723号、第5, 416, 203号、第5, 451, 463号、第5, 510, 475号、第5, 512, 667号、第5, 514, 785号、第5, 565, 552号、第5, 567, 810号、第5, 574, 142号、第5, 585, 481号、第5, 587, 371号、第5, 595, 726号、第5, 597, 696号、第5, 599, 923号、第5, 599, 928号、および第5, 688, 941号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0080】

ある化合物の全ての位置が均一に修飾されている必要はなく、実際、前述の修飾のうちの1つ以上を単一化合物に、あるいはさらにはdsRNA内の単一ヌクレオシドに組み込むことができる。また、本発明は、キメラ化合物であるdsRNA化合物も含む。本発明の文脈において、「キメラ(chimeric)」dsRNA化合物または「キメラ(chimera)」は、dsRNA化合物であり、特に2つ以上の化学的にはっきりと異なる領域を含有し、それぞれ、少なくとも1つのモノマー単位、すなわち、dsRNA化合物の場合のヌクレオチドからなる、dsRNAである。これらのdsRNAは、典型的には、該dsRNAは、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取り込みの増加、および/または標的核酸に対する結合親和性の増加を該dsRNAに付与するように、修飾される、少なくとも1つの領域を含有する。dsRNAのさらなる領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断することができる酵素に対する基質としての役割を果たすことができる。一例として、RNAアーゼHは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。RNAアーゼHの活性化は、したがって、RNA標的の切断をもたらし、それにより遺伝子発現のdsRNA阻害の効率を大きく亢進させる。それ故、キメラdsRNAが使用される場合、同一標的領域に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、しばしばより短いdsRNAによって匹敵する結果を得ることができる。

#### 【0081】

特定の場合において、該dsRNAは、非リガンド基によって修飾されてもよい。多くの非リガンド分子が、dsRNAの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させるためにdsRNAにコンジュゲートされており、かかるコンジュゲーション(conjugation)を行うための手順は、科学文献で入手可能である。かかる非リガンド部分には、コレステロール(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)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール(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)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールも

10

20

30

40

50

しくはトリエチルアンモニウム 1, 2 - ジ - O - ヘキサデシル - rac - グリセロ - 3 - H - ホスホネート (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777)、ポリアミンもしく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もしくはヘキシルアミノ - カルボニル - オキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923) 等の脂質部分が含まれている。かかる dsRNA コンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許は、上に列記されている。典型的なコンジュゲーションプロトコルは、配列の 1 つ以上の位置にアミノリンカーを有する dsRNA の合成を含む。次いで、アミノ基を、適切なカップリングもしくは活性化試薬を使用して、コンジュゲートされる分子と反応させる。コンジュゲーション反応は、依然として固体支持体に結合された dsRNA を用いて、または溶液相中での dsRNA の切断後のいずれかに実行することができる。典型的には、HPLC によって dsRNA コンジュゲートを精製して、純粋なコンジュゲートが得られる。

#### 【0082】

ベクターによりコードされる dsRNA

別の態様では、TTR の dsRNA 分子が、DNA もしくは RNA ベクターに挿入された転写単位から発現される (例えば Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10、Skillern, A らの国際 PCT 公開 WO 第 00/22113 号、Conrad の国際 PCT 公開 WO 第 00/22114 号、および Conrad の米国特許第 6,054,299 号を参照されたい)。これらの導入遺伝子は、線状構築物、環状プラスミド、またはウイルスベクターとして導入することができ、宿主ゲノムに統合される導入遺伝子として導入されて、受け継がれる。また、導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして受け継がれるのを可能にするように、構築することもできる (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292)。

#### 【0083】

dsRNA の個々の鎖を、2 つの個別の発現ベクター上のプロモーターを用いて転写し、標的細胞に同時トランスフェクションすることができる。あるいは、dsRNA のそれぞれ個々の鎖を、いずれも同一発現プラスミド上に位置するプロモーターを用いて転写してもよい。一実施形態において、dsRNA は、dsRNA がステムアンド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接合される逆方向反復として発現される。

#### 【0084】

組換え dsRNA 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。dsRNA を発現するウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (概説として、Muzyczka, et al., Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129 を参照)、アデノウイルス (例えば、Berknér, et al., BioTechniques (1998) 6:616)、Rose nfeld et al. (1991, Science 252:431-434)、および Rose nfeld et al. (1992)、Cell 68:143-155 を参照))、またはアルファウイルス、ならびに当該技術分野において既知の他のものに基づいて構築することができるが、これらに限定されない。種々の遺伝子を、上皮細胞を含む多くの異なる細胞型にインピトロおよび/またはインピボで導入するために、レトロウイルスが使用されている (例えば、Eglitis, et al., Science (1985) 230:1395-1398、Danos and Mulligan, Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464、Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018、Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145、Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043、Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381、Chowdhury et al., 1991, Science 254:1802-1805、van Beusechem et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-19、Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3: 641-647、Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895、Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150:4104-4115、米国特許第4,868,116号、米国特許第4,980,286号、PCT出願WO第89/07136号、PCT出願WO第89/02468号、PCT出願WO第89/05345号、およびPCT出願WO第92/07573号を参照)。細胞のゲノムに挿入された遺伝子を形質導入して発現することができる組換えレトロウイルスベクターは、組換えレトロウイルスゲノムを、PA317およびPsi-CRIP等の好適なパッケージング細胞系にトランスフェクションすることによって、産生することができる(Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10、Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349)。感受性宿主(例えば、ラット、ハムスター、イヌ、およびチンパンジー)内の多岐にわたる細胞および組織を感染させるために、組換えアデノウイルスベクターを使用することができ(Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769)、これは、感染に有糸分裂的に活性な細胞を必要としない利点も有する。

#### 【0085】

発現されるdsRNA分子のコード配列を受け入れることができる任意のウイルスベクターを使用することができ、例としては、アデノウイルス(AV)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス(LV)、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス)、ヘルペスウイルス等に由来するベクターである。ウイルスベクターの指向性は、エンベローブタンパク質もしくは他のウイルスからの他の表面抗原を用いて該ベクターをシュードタイピングすることにより、または異なるウイルスのキャプシドタンパク質を適宜置換することによって、修正することができる。

#### 【0086】

例えば、本発明で取り上げられるレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、狂犬病、エボラ、モコラ等からの表面タンパク質でシュードタイピングすることができる。本発明で取り上げられるAAVベクターは、ベクターが異なるキャプシドタンパク質の血清型を発現するように操作することにより、異なる細胞を標的とすることができる。例えば、血清型2のゲノム上に血清型2のキャプシドを発現するAAVベクターは、AAV2/2と称される。AAV2/2ベクター内のこの血清型2のキャプシド遺伝子を、血清型5のキャプシド遺伝子と置換して、AAV2/5ベクターを産生することができる。異なるキャプシドタンパク質血清型を発現するAAVベクターを構築するための技法は、当該技術分野の技能内であり、例えば、Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801を参照されたく、その開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0087】

本発明における使用に好適な組換えウイルスベクターの選択、dsRNAの発現のために核酸配列を該ベクターに挿入するための方法、および該ウイルスベクターを対象となる細胞に送達する方法は、当該技術分野の技能内である。例えば、Dornburg R (1995), Gene Therap. 2:301-310、Eglitis M A (

10

20

30

40

50

1988), *Biotechniques* 6:608-614、Miller A D (1990), *Hum Gene Therap.* 1:5-14、Anderson W F (1998), *Nature* 392:25-30、および Robinson D A et al., *Nat. Genet.* 33:401-406を参照されたく、それらの開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0088】

ウイルスベクターは、AVおよびAAVに由来し得る。一実施形態において、本発明で取り上げられるdsRNAは、例えば、U6もしくはH1 RNAプロモーター、またはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターのいずれかを有する組換えAAVベクターから、2つの別個の相補的な単鎖RNA分子として発現される。

10

【0089】

本発明のdsRNAを発現するために好適なAVベクター、組換えAVベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20:1006-1010に記載されている。

【0090】

本発明で取り上げられるdsRNAを発現するために好適なAAVベクター、組換えAAVベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、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、米国特許第5,139,941号、国際特許出願WO第94/13788号、および国際特許出願WO第93/24641号に記載され、それらの開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0091】

本発明で取り上げられるDNAプラスミドもしくはウイルスベクターのいずれか内でdsRNAの発現を駆動するプロモーターは、真核生物RNAポリメラーゼI(例えばリボソームRNAプロモーター)、RNAポリメラーゼII(例えばCMV初期プロモーター、もしくはアクチンプロモーター、もしくはU1 snRNAプロモーター)、または一般にRNAポリメラーゼIIIプロモーター(例えばU6 snRNAもしくは7SK RNAプロモーター)、あるいは原核生物プロモーター、例えば、発現プラスミドもT7プロモーターからの転写に必要なT7 RNAポリメラーゼをコードするという条件で、T7プロモーターであり得る。該プロモーターは、膵臓への導入遺伝子の発現を導くこともできる(例えば、the insulin regulatory sequence for pancreas (Bucchini et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2511-2515)を参照)。

30

【0092】

さらに、導入遺伝子の発現は、例えば、特定の生理的調節因子、例えば、循環ブドウ糖レベル、またはホルモンに感受性である調節配列等の、誘発可能な調節配列および発現系を使用することによって、正確に調節することができる(Docherty et al., 1994, *FASEB J.* 8:20-24)。細胞または哺乳動物内の導入遺伝子の発現を制御するために好適である、かかる誘発可能な発現系には、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、二量化の化学誘発物質、およびイソプロピル-ベータ-D1-チオガラクトピラノシド(EP TG)による調節が含まれる。当業者は、dsRNA導入遺伝子の目的とする用途に基づいて、適切な調節/プロモーター配列を選択することができよう。

40

【0093】

一般に、dsRNA分子を発現することができる組換えベクターは、以下に記載するように送達され、標的細胞内に生き残る。代替として、dsRNA分子の一過性発現を提供するウイルスベクターを使用することができる。かかるベクターは、必要に応じて繰り返

50

し投与することができる。発現すると、dsRNAは標的RNAに結合し、その機能または発現を調節する。dsRNAを発現するベクターの送達は、静脈内もしくは筋肉内投与等によって全身的、患者から外植された標的細胞に投与後、該患者へ再導入することによって、または所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段等によって、であり得る。

#### 【0094】

dsRNA発現DNAプラスミドは、典型的には、カチオン性脂質担体（例えばオリゴフェクタミン（Oligofectamine））、または非カチオン性脂質に基づく担体（例えばTransit-TKO（商標））との複合体として、標的細胞にトランスフェクションされる。1週間以上の期間にわたって、単一のTTR遺伝子の異なる領域または複数のTTR遺伝子を標的とする、dsRNAによって媒介されるノックダウンのための複数の脂質のトランスフェクションもまた、本発明によって企図される。ベクターの宿主細胞への導入の成功は、種々の既知の方法を使用して監視することができる。例えば、一過性トランスフェクションは、緑色蛍光タンパク質（GFP）等の蛍光マーカー等のレポーターを用いて示すことができる。エクスピボ細胞の安定なトランスフェクションは、トランスフェクション細胞に、ハイグロマイシンB耐性等の、特定の環境因子（例えば、抗生物質および薬物）に対する耐性を提供するマーカーを使用して、保証することができる。

#### 【0095】

また、TTRに特異的なdsRNA分子は、ベクターに挿入して、ヒト患者に対する遺伝子療法ベクターとして使用することもできる。遺伝子療法ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照）、または定位固定注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057を参照）によって、対象に送達することができる。遺伝子療法ベクターの医薬調製物は、許容される希釈剤中の遺伝子療法ベクターを含んでもよく、または遺伝子送達媒体が中に埋め込まれる徐放性マトリックスを含んでもよい。代替として、組換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターから、完全な遺伝子送達ベクターを無傷で産生することができる場合、医薬調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含んでもよい。

#### 【0096】

#### III. dsRNAを含有する医薬組成物

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるdsRNAと、薬剤として許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。該dsRNAを含有する医薬組成物は、TTRの発現によって媒介される病理過程等の、TTR遺伝子の発現もしくは活性に関連する疾患もしくは障害の治療に有用である。かかる医薬組成物は、送達様式に基づいて製剤化される。一例は、眼への直接送達用に製剤化される組成物である。別の例は、非経口投与を介して、例えば、静脈（IV）送達による全身投与用に製剤化される組成物である。別の例は、例えば、持続ポンプ注入等による脳への注入によって、脳実質への直接送達用に製剤化される組成物である。

#### 【0097】

本明細書で取り上げられる医薬組成物は、TTR遺伝子の発現を阻害するために十分な投薬量で投与される。

#### 【0098】

一般に、dsRNAの好適な用量は、1日当たり受容者の体重1キログラムにつき0.00001～200.0ミリグラムの範囲、一般には、1日当たり体重1キログラムにつき1～50mgの範囲であろう。

#### 【0099】

幾つかの実施形態において、該投薬量は、siRNAが、眼に投与されるとき、体重に対応しない。

#### 【0100】

該投薬量は、例えば、75 kgの人に対して25 µg、例えば、0.3 µg/kgであり得る。他の投薬量は、0.01、0.03、0.05、0.07、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、3.0、5.0、7.0、10.0、30.0、50.0、70.0、または100.0 µg/kgを含む。

【0101】

例えば、該dsRNAは、単回用量当たり0.0059 mg/kg、0.01 mg/kg、0.0295 mg/kg、0.05 mg/kg、0.0590 mg/kg、0.163 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.543 mg/kg、0.5900 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg、1.628 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、5.0 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg、または50 mg/kgで投与することができる。

10

【0102】

一実施形態において、該投薬量は、0.01~0.2 mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.01 mg/kg、0.02 mg/kg、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.06 mg/kg、0.07 mg/kg、0.08 mg/kg、0.09 mg/kg、0.10 mg/kg、0.11 mg/kg、0.12 mg/kg、0.13 mg/kg、0.14 mg/kg、0.15 mg/kg、0.16 mg/kg、0.17 mg/kg、0.18 mg/kg、0.19 mg/kg、または0.20 mg/kgの用量で投与することができる。

20

【0103】

一実施形態において、該投薬量は、0.005 mg/kg~1.628 mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.0059 mg/kg、0.0295 mg/kg、0.0590 mg/kg、0.163 mg/kg、0.543 mg/kg、0.5900 mg/kg、または1.628 mg/kgの用量で投与することができる。

【0104】

一実施形態において、該投薬量は、0.2 mg/kg~1.5 mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、または1.5 mg/kgの用量で投与することができる。

30

【0105】

dsRNAは、0.03 mg/kg、または0.03、0.1、0.2、もしくは0.4 mg/kgの用量で投与することができる。

【0106】

該医薬組成物は、1日1回投与することができ、あるいは、該dsRNAは、1日にわたって適切な間隔で、2、3、またはそれ以上の分割用量(sub-dose)として、さらに、持続注入または放出制御製剤による送達を用いて投与されてもよい。その場合、各分割用量に含有されるdsRNAは、1日当たりの総投薬量を達成するように、対応してより小さくしなければならない。投薬量単位は、例えば、数日間にわたって該dsRNAの持続放出を提供する、従来の持続放出製剤を使用して、数日間にわたる送達用に配合することができる。持続放出製剤は当該技術分野において周知であり、本発明の薬剤を用いて使用され得る部位等の特定の部位での薬剤の送達に特に有用である。本実施形態では、投薬量単位は、対応する複数の1日量を含む。

40

【0107】

TTRレベルに対する単回用量の効果は長く続き、その結果、その後の用量は、3、4、もしくは5日の間隔より多くなく、または1、2、3、もしくは4週間の間隔より多くなく、または5、6、7、8、9、もしくは10週間の間隔より多くない量で投与される

50

。

## 【0108】

当業者には、限定されないが、疾患もしくは障害の重症度、以前の処置、総合的な健康、および／または対象の年齢、ならびに存在する他の疾患を含む特定の因子が、対象を効果的に処置するために必要とされる投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得ることが理解されよう。さらに、治療上有効な量の組成物を用いた対象の治療には、単回処置または一連の治療が含まれ得る。本発明により包含される個々のdsRNAに対する効果的な投薬量およびインビボ半減期の推定は、従来の方法を使用して、または本明細書のいずれかの箇所で記載される適切な動物モデルを使用したインビボ試験に基づいて、行うことができる。

10

## 【0109】

マウス遺伝学における進歩によって、TTTの発現によって媒介される病理過程等の種々のヒト疾患の研究用に、多くのマウスモデルが生成されている。かかるモデルは、dsRNAのインビボ試験、ならびに治療上有効な用量を決定するために使用される。好適なマウスモデルは、例えば、ヒトTTTを発現するプラスミドを含有するマウスである。別の好適なマウスモデルは、ヒトTTTを発現する導入遺伝子を保有するトランスジェニックマウスである。

## 【0110】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータを、ヒトにおける使用のための一連の投薬量の処方決定に使用することができる。本発明で取り上げられる組成物の投薬量は、一般に、ほとんどまたは全く毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なり得る。本発明で取り上げられる方法において使用されるいずれの化合物についても、治療上有効な用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、IC50（すなわち、症状の半値阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む、化合物、または適切な場合は、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲（例えば、該ポリペプチドの濃度の低下を達成する）を達成するように、処方決定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

20

30

## 【0111】

本発明で取り上げられるdsRNAは、標的遺伝子の発現によって媒介される病理過程の処置に効果的な他の既知の薬剤と組み合わせて投与することができる。いずれの場合においても、投与する医師は、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載される、標準的な有効性の測定値を使用して得られた結果に基づいて、dsRNA投与の量およびタイミングを調整することができる。

## 【0112】

投与

本発明はまた、本発明で取り上げられるdsRNA化合物を含む医薬組成物および製剤も含む。本発明の医薬組成物は、局所的または全身的な処置が所望されるか、および処置される範囲に依存して、多くの方法で投与することができる。投与は、局所的、噴霧器によってを含む、例えば、粉末もしくは噴霧剤の吸入もしくは吹送による経肺、気管内、鼻腔内、表皮および経皮、経口もしくは非経口であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腔内、もしくは筋肉内注射もしくは注入、または頭蓋内、例えば、実質内、くも膜下腔内、もしくは脳室内投与が含まれる。

40

## 【0113】

該dsRNAは、肝臓（例えば、肝臓の肝細胞）等の特定の組織を標的とする状態で送達することができる。

## 【0114】

dsRNAは、眼等の特定の組織を標的とする状態で送達することができる。眼への送

50

達の様式は、眼球後方、皮下瞼、結膜下、眼球鞘下、前房、または硝子体注射（または内部注射もしくは注入）を含む。

#### 【0115】

本発明は、脳に直接注射することによって送達することができる医薬組成物が含まれる。該注射は、脳の特定領域（例えば、黒質、皮質、海馬、線条体、もしくは淡蒼球）への定位固定注射によるものであり得、該 dsRNA は、中枢神経系への複数領域（例えば、脳、および/または脊髄への複数領域）に送達され得る。該 dsRNA は、脳の拡散領域に送達（例えば、脳の皮質への拡散送達）され得る。

#### 【0116】

一実施形態において、TTR を標的とする dsRNA は、カニニューレ、または例えば、脳等の組織（例えば、脳の黒質、皮質、海馬、線条体、もしくは淡蒼球）内に埋め込まれた一端を有する他の送達デバイスを経由して送達され得る。該カニニューレは、該 dsRNA 組成物の貯蔵容器に接続することができる。流入または送達は、ポンプ、例えば、Alzet ポンプ等の浸透圧ポンプもしくはミニポンプによって媒介され得る（Durect, Cupertino, CA）。一実施形態において、ポンプおよび貯蔵容器は、組織から離れたエリア、例えば腹部内に埋め込まれ、送達は、ポンプまたは貯蔵所から放出部位に誘導する導管によって達成される。該 dsRNA 組成物の脳への注入は、数時間にわたって、または数日間、例えば、1、2、3、5、もしくは7日間、もしくはそれ以上であり得る。脳への送達用のデバイスは、例えば、米国特許第 6,093,180 号、および第 5,814,014 号に記載されている。

#### 【0117】

局所投与用の医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ剤、坐薬、スプレー、液体、および粉末が含まれ得る。従来の医薬用担体、水性、粉末、もしくは油性基剤、増粘剤等が必要であるか、または望ましくあり得る。被覆したコンドーム、手袋等も有用であり得る。好適な局所製剤には、本発明で取り上げられる dsRNA が、脂質、リボソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤、および界面活性剤等の局所送達剤と混合されるものが含まれる。好適な脂質およびリボソームには、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、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG））、ならびにカチオン性（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））が含まれる。本発明で取り上げられる dsRNA は、リボソーム内にカプセル化されてもよく、あるいはそれ、特にカチオン性リボソームと複合体を形成してもよい。代替として、dsRNA は、脂質、特にカチオン性脂質と複合されてもよい。好適な脂肪酸およびエステルには、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、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1-モノカプリン酸、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  $C_{1-10}$  アルキルエステル（例えば、ミリスチン酸イソプロピル（IPM））、モノグリセリド、ジグリセリド、あるいはその薬剤として許容される塩が含まれるが、これらに限定されない。局所製剤は、米国特許第 6,747,014 号に詳細に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0118】

#### コレステロールコンジュゲート

siRNA は、本明細書に記載されるコレステロールおよびビタミン E 等のリガンドにコンジュゲートされ得る。他のコンジュゲートは、当業者に公知の類似の方法によってオリゴヌクレオチドに結合することができることが理解され、そのような方法は、米国公開第 2005/0107325 号、第 2005/0164235 号、第 2005/0256069 号、および第 2008/0108801 号に見いだされ得、これらは、参照により

10

20

30

40

50

それらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0119】

#### リボソーム製剤

薬物の製剤化用に研究されて、使用されているマイクロエマルジョンの他に、組織立った多くの界面活性剤の構造がある。これらには、単層、ミセル、二重層、および小胞が含まれる。リボソーム等の小胞は、薬物送達の観点からの、それらが提示する特異性および作用の持続時間から、大きな関心を集めている。本発明において使用される、「リボソーム」という用語は、球状の1つまたは複数の二重層に配置された両親媒性脂質の小胞を意味する。

【0120】

リボソームは、親油性材料および水性の内部から形成される膜を有する、単層状または多層状の小胞である。水性部分が、送達される組成物を含有する。カチオン性リボソームは、細胞壁に融合することができる利点を有する。非カチオン性のリボソームは、細胞壁とさほど効率的に融合することはできないが、マクロファージによってインビボで取り込まれる。

【0121】

哺乳動物の無傷の皮膚を横断するために、脂質小胞は、好適な経皮勾配の影響下、それぞれ50nm未満の直径を有する、一連の微細孔を通過しなければならない。したがって、高度に変形可能で、そのような微細孔を通過することができるリボソームを使用することが望ましい。

【0122】

リボソームのさらなる利点には、天然のリン脂質から得られたリボソームは、生体適合性および生分解性であること、リボソームは、広範な水溶性および脂溶性の薬物を組み込むことができること、リボソームは、それらの内部区画でカプセル化された薬物を、代謝および分解から保護できること、が含まれる(Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。リボソーム製剤の調製において考慮すべき重要な事項は、脂質の表面電荷、小胞の大きさ、およびリボソームの水性容積である。

【0123】

リボソームは、作用部位への活性成分の移送および送達に有用である。リボソーム膜は、構造的に生体膜と同様であるため、リボソームが組織に適用されると、リボソームは細胞膜との融合を開始し、リボソームと細胞との融合が進行するに従って、リボソームの内容物が細胞内へ出て、そこで活性薬剤が作用し得る。

【0124】

リボソーム製剤は、多くの薬物のための送達様式として、広範な調査の焦点となっている。局所投与について、リボソームが他の製剤に勝る幾つかの利点を提示するという証拠が増えつつある。かかる利点には、投与された薬物の高度な体内吸収に関連する副作用の減少、投与された薬物の所望の標的での蓄積の増加、ならびに親水性および疎水性の両方の多岐にわたる薬物を皮膚へ投与する能力が含まれる。

【0125】

幾つかの報告は、高分子量のDNAを含む薬剤を皮膚へ送達するリボソームの能力について詳述している。鎮痛剤、抗体、ホルモン、および高分子量のDNAを含む化合物が、皮膚に投与されている。大半の適用が、表皮上層の標的化をもたらした。

【0126】

リボソームは、広義の2つのクラスに分類される。カチオン性リボソームは、負に荷電したDNA分子と相互に作用し、安定な複合体を形成する、正に荷電したリボソームである。正に荷電したDNA/リボソーム複合体は、負に荷電した細胞表面に結合し、エンドソーム内に取り入れられる。エンドソーム内の酸性pHにより、リボソームが破裂し、そ

10

20

30

40

50

の内容物を細胞の細胞質内に放出する (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985)。

【0127】

pH感受性であるか、または負に荷電したリポソームは、DNAと複合するのではなく、それを捕捉する。DNAおよび脂質は共に同様に荷電されているため、複合体形成ではなく反発が生じる。それでもなお、DNAの一部は、これらのリポソームの水性内部内に捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養下の細胞単層へ送達するために、pH感受性リポソームが使用されている。外因性遺伝子の発現が、標的細胞中で検出された (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。

10

【0128】

リポソーム組成物の1つの主要な種類には、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質が含まれる。例えば、中性のリポソーム組成物は、ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC)、またはジパルミチルホスファチジルコリン (DPPC) から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、一般にジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成され、一方、アニオン性の膜融合性リポソームは、主にジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) から形成される。リポソーム組成物の別の種類は、例えば、大豆ホスファチジルコリン、および卵ホスファチジルコリン等のホスファチジルコリン (PC) から形成される。別の種類は、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。

20

【0129】

幾つかの研究が、リポソーム製剤の皮膚への局所送達を評価している。インターフェロンを含有するリポソームのモルモット皮膚への適用は、皮膚ヘルペス炎の軽減をもたらし、一方、他の手段 (例えば、溶液またはエマルジョンとして) を介したインターフェロンの送達は効果がなかった (Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410)。さらに、さらなる研究は、リポソーム製剤の一部として投与されたインターフェロンの、水性系を使用するインターフェロンの投与に対する有効性を試験し、リポソーム製剤は水溶性投与より優れていると結論付けた (du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265)。

30

【0130】

また、非イオン性リポソーム系は、特に非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む系における、薬物の皮膚への送達の実用性を決定するために調べられている。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) を含む非イオン性リポソーム製剤が、シクロスポリンAをマウス皮膚の真皮に送達するために使用された。結果は、かかる非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層へのシクロスポリンAの沈着の促進に効果的であることを示した (Hu et al., S.T.P. Pharmac. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

40

【0131】

また、リポソームには、「立体的に安定化された」リポソームが含まれ、該用語は、本明細書で使用される場合、1つ以上の特定化された脂質を含むリポソームを指し、リポソームに組み込まれると、かかる特定化された脂質を欠くリポソームと比較して、循環寿命の向上をもたらす。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞を形成する脂質部分の一部が、(A) モノシアロガングリオシド  $G_{M1}$  等の1つ以上の糖脂質を含むか、または (B) ポリエチレングリコール (PEG) 部分等の1つ以上の親水性ポリマーで誘導体化されるものである。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、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に安定化されたリポソームについて、これらの立体的に安定化されたリポソームの循

50

環半減期の増加は、細網内皮系 (RES) の細胞内への取り込みの減少に由来すると、当該技術分野では考えられている (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42、Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

#### 【0132】

1つ以上の糖脂質を含む種々のリポソームが当該技術分野において既知である。Papahadjopoulosら (Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) は、モノシアロガングリオシド  $G_{M1}$ 、ガラクトセレブロシド硫酸、およびホスファチジルイノシトールの、リポソームの血中半減期を改善する能力について報告した。これらの所見は、Gabizonら (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988, 85, 6949) によって詳しく説明されている。共にAllenらによる、米国特許第4,837,028号および国際公開WO第88/04924号は、(1) スフィンゴミエリン、および(2) ガングリオシド  $G_{M1}$  もしくはガラクトセレブロシド硫酸エステルを含むリポソームを開示している。米国特許第5,543,152号 (Webbら) は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。1,2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含むリポソームは、国際公開WO第97/13499号 (Limら) に開示されている。

#### 【0133】

1つ以上の親水性ポリマーによって誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム、およびその調製方法は、当該技術分野において既知である。Sunamotoら (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) は、PEG部分を含有する非イオン性界面活性剤、 $2C_{12}15G$  を含むリポソームについて記載している。Illumら (FEBS Lett., 1984, 167, 79) は、ポリスチレン粒子のポリマーグリコールによる親水性コーティングが、血中半減期の著しい増加をもたらすことを指摘している。ポリアルキレングリコール (例えば、PEG) のカルボン酸基の結合によって修飾された合成リン脂質が、Sears (米国特許第4,426,330号、および第4,534,899号) によって記載されている。Klibanovら (FEBS Lett., 1990, 268, 235) は、PEGまたはステアリン酸PEGによって誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン (PE) を含むリポソームが、血中循環半減期の著しい増加を有することを示す実験について記載している。Blumeら (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) は、このような観察を、他のPEG誘導体化リン脂質、例えば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) とPEGとの組み合わせから形成されるDSPE-PEGに広げた。外部表面に共有結合されたPEG部分を有するリポソームが、欧州特許EP第0445131B1号および国際公開WO第90/04384号 (Fishery) に記載されている。PEGによって誘導体化された1~20モルパーセントのPEを含有するリポソーム組成物、およびその使用方法が、Woodleら (米国特許第5,013,556号、および第5,356,633号)、ならびにMartinら (米国特許第5,213,804号および欧州特許EP第0496813B1号) によって記載されている。他の多くの脂質-ポリマーコンジュゲートを含むリポソームが、国際公開WO第91/05545号および米国特許第5,225,212号 (共にMartinらによる)、ならびに国際公開WO第94/20073号 (Zalipskyら) に開示されている。PEG修飾セラミド脂質を含むリポソームが、国際公開WO第96/10391号 (Choiら) に記載されている。米国特許第5,540,935号 (Miyazakiら) および米国特許第5,556,948号 (Tagawaら) は、表面に官能基部分をさらに誘導体化することができるPEG含有リポソームについて記載している。

#### 【0134】

核酸を含む多くのリポソームが当該技術分野において既知である。Thierryらによる国際公開WO第96/40062号は、高分子量の核酸をリポソーム中にカプセル化するための方法を開示している。Tagawaらによる米国特許第5,264,221号

10

20

30

40

50

は、タンパク質結合リボソームを開示し、かかるリボソームの内容物には *dsRNA* が含まれ得ると主張している。Rahmanらによる米国特許第 5,665,710 号は、オリゴデオキシヌクレオチドをリボソーム中にカプセル化する特定の方法について記載している。Loveらによる国際公開WO第 97/04787 号は、*raf* 遺伝子を標的とする *dsRNA* を含むリボソームを開示している。

#### 【0135】

トランスファーソームはさらに別の種類のリボソームであり、薬物送達媒体の興味を引く候補者である、高度に変形可能な脂質凝集物である。トランスファーソームは脂質小滴として記載されてもよく、これは、高度に変形可能であるため、この小滴より小さな孔に容易に浸透することができる。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適合可能であり、例えば、自己最適性（皮膚の孔の形状に適合する）、自己修復性であり、しばしば断片化されることなく標的に到達し、しばしば自己負荷性（*self-loading*）である。トランスファーソームを作製するために、標準的なリボソーム組成物に対して、表面エッジアクチベータ（*surface edge-activator*）、通常界面活性剤を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へ送達するために使用されている。血清アルブミンのトランスファーソームによって媒介される送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注射と同様に効果的であることが示されている。

#### 【0136】

界面活性剤は、エマルジョン（マイクロエマルジョンを含む）およびリボソーム等の製剤中に幅広い用途を見出す。天然および合成の両方の、多くの異なる種類の界面活性剤の性質を分類および順位付ける最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（*HLB*）の使用によるものである。親水性基（「頭部基」としても知られる）の性質が、製剤に使用される異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手段を提供する（*Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285*）。

#### 【0137】

界面活性剤分子がイオン化されていない場合、これは、非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、医薬品および化粧品に幅広い用途を見出し、広範な *pH* 値にわたって使用可能である。一般に、それらの *HLB* 値は、その構造に依存して、2～約 18 の範囲である。非イオン性界面活性剤には、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等の非イオン性エステルが含まれる。脂肪アルコールエトキシ化物（*ethoxylate*）、プロポキシ化（*propoxylated*）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等の非イオン性アルカノールアミドおよびエーテルも、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤が、非イオン性界面活性剤のクラスのうちに最も一般的な構成物質である。

#### 【0138】

界面活性剤分子が水中に溶解または分散された時に負の電荷を保有する場合、その界面活性剤は、アニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤には、石鹼等のカルボン酸塩、アシルラクチレート（*lactylate*）、アミノ酸のアシルアミド、アルキル硫酸塩およびエトキシ化アルキル硫酸塩等の硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホネート、アシルイセチオネート（*isethionate*）、アシルタウレート（*taurate*）、およびスルホコハク酸塩等のスルホネート、ならびにリン酸塩が含まれる。アニオン性界面活性剤のクラスのうちに最も重要な構成物質は、アルキル硫酸塩および石鹼である。

#### 【0139】

界面活性剤分子が正の荷電を保有する場合、それが水中に溶解または分散されると、その界面活性剤はカチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤には、第四アンモニ

10

20

30

40

50

ウム塩およびエトキシ化アミンが含まれる。第四アンモニウム塩がこのクラスで最も使用される構成物質である。

#### 【0140】

界面活性剤分子が正または負の電荷のいずれをも保有する能力を有する場合、その界面活性剤は、両性として分類される。両性界面活性剤には、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルピタイン、およびフォスファチドが含まれる。

#### 【0141】

薬品、製剤、およびエマルジョン中の界面活性剤の使用が概説されている (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

10

#### 【0142】

##### 核酸脂質粒子

一実施形態において、本発明で取り上げられる T T R の d s R N A は、脂質製剤中に完全にカプセル化されて、S P L P、p S P L P、S N A L P、または他の核酸脂質粒子を形成する。本明細書で使用される、「S N A L P」という用語は、S P L P を含む安定な核酸脂質粒子を指す。本明細書で使用される、「S P L P」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 D N A を含む核酸脂質粒子を指す。S N A L P および S P L P は、典型的には、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を阻止する脂質 (例えば、P E G 脂質コンジュゲート) を含有する。S N A L P および S P L P は、静脈内 (i. v.) 注射後に長時間の循環寿命を呈し、遠位の部位 (例えば、投与部位から物理的に離れた部位) に蓄積するため、全身適用に非常に有用である。S P L P には、「p S P L P」が含まれ、これには、P C T 公開 W O 第 00 / 03683 号に記載されるカプセル化された縮合剤と核酸との複合体が含まれる。本発明の粒子は、典型的には約 50 nm ~ 約 150 nm、より典型的には約 60 nm ~ 約 130 nm、より典型的には約 70 nm ~ 約 110 nm、最も典型的には約 70 ~ 約 90 nm の平均直径を有し、実質的に無毒である。さらに、該核酸は、本発明の核酸脂質粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に抵抗性である。核酸脂質粒子およびその調製方法は、例えば、米国特許第 5,976,567 号、第 5,981,501 号、第 6,534,484 号、第 6,586,410 号、第 6,815,432 号、および P C T 公開 W O 第 96 / 40964 号に開示されている。

20

30

#### 【0143】

一実施形態において、脂質の薬物に対する比率 (質量 / 質量比率) (例えば、脂質の d s R N A に対する比率) 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 の範囲内であろう。幾つかの実施形態において、脂質の d s R N A に対する比率は、約 1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、または 11 : 1 であり得る。

#### 【0144】

一般に、核酸脂質粒子は、緩衝液、例えば、投与用の P B S 中に懸濁される。一実施形態において、脂質を製剤化した s i R N A の pH は、6.8 ~ 7.8、例えば、7.3 または 7.4 である。オスモル濃度は、例えば、250 ~ 350 m O s m / k g、例えば、約 300、例えば、298、299、300、301、302、303、304、または 305 であり得る。

40

#### 【0145】

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クロライド (D O D A C)、N, N - ジステアシル - N, N - ジメチルアンモニウムプロミド (D D A B)、N - (I - (2, 3 - ジオレオイルオキシ) プロピル) - N, N, N - トリメチルクロライド (D O T A P)、N - (I - (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クロライド (D O T M A)、N, N - ジメチル - 2, 3 - ジオレイルオキシ) プロピルアミン (D O D M A)、1, 2 - ジリノレイルオ

50

キシ (D i l i n o l e y l o x y) - N, N - ジメチルアミノプロパン (D L i n D M A)、1, 2 - ジリノレニルオキシ (D i l i n o l e n y l o x y) - N, N - ジメチルアミノプロパン (D L e n D M A)、1, 2 - ジリノレイルカルバモイルオキシ (D i l i n o l e y l c a r b a m o y l o x y) - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n - C - D A P)、1, 2 - ジリノレイオキシ (D i 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 (D L i n - D A C)、1, 2 - ジリノレイオキシ - 3 - モルホリノプロパン (D L i n - M A)、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n D A P)、1, 2 - ジリノレイルチオ (D i l i n o l e y l t h i o) - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n - S - D M A)、1 - リノレオイル - 2 - リノレイルオキシ (l i n o l e y l o x y) - 3 - ジメチルアミノプロパン (D L i n - 2 - D M A P)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロライド塩 (D L i n - T M A . C l)、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロライド塩 (D L i n - T A P . C l)、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 (D L i n - M P Z)、または3 - (N, N - ジリノレイルアミノ (D i o l e y l a m i n o) - 1, 2 - プロパンジオール (D L i n A P)、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) (D O A P)、1, 2 - ジリノレイルオキシ (D i l i n o l e y l o x o) - 3 - (2 - N, N - ジメチルアミノ)エトキシプロパン (D L i n - E G - D M A)、1, 2 - ジリノレニルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (D L i n D M A)、2, 2 - ジリノレイル (D i l i n o l e y l) - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (D L i n - K - D M A)、またはそれらの類似体、(3 a R, 5 s, 6 a S) - N, N - ジメチル - 2, 2 - ジ ( ( 9 Z, 1 2 Z) - オクタデカ - 9, 1 2 - ジエニル)テトラヒドロ - 3 a H - シクロペンタ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - アミン (A L N 1 0 0)、(6 Z, 9 Z, 2 8 Z, 3 1 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 2 8, 3 1 - テトラエン - 1 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ)ブタノエート (M C 3)、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)エチルアザネジール)ジドデカン - 2 - オール (T e c h G 1)、あるいはそれら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 2 0 モル% ~ 約 5 0 モル%、または約 4 0 モル% からなり得る。

#### 【0146】

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 (D S P C)、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (D P P G)、ジオレオイル - ホスファチジリエタノールアミン (D O P E)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (P O P C)、パルミトイルオレオイルホスファチジリエタノールアミン (P O P E)、ジオレオイル - ホスファチジリエタノールアミン 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (D O P E - m a l)、ジパルミトイルホスファチジリエタノールアミン (D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (D M P E)、ジステアロイル - ホスファチジル - エタノールアミン (D S P E)、1 6 - O - モノメチル P E、1 6 - O - ジメチル P E、1 8 - 1 - トランス P E、1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジリエタノールアミン (S O P E)、コレステロール、またはそれらの混合物を含むが、これらに限定されない、アニオン性脂質または中性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、コレステロールが含まれる場合、粒子中に存在する総脂質の約 5 モル% ~ 約 9 0 モル%、約 1 0 モル%、または約 5 8 モル% であり得る。

#### 【0147】

粒子の凝集を阻害するコンジュゲートされた脂質は、例えば、制限されないが、P E G - ジアシルグリセロール (D A G)、P E G - ジアルキルオキシプロピル (D A A)、P E G - リン脂質、P E G - セラミド (C e r)、またはそれらの混合物を含む、ポリエチ

10

20

30

40

50

レングリコール ( P E G ) - 脂質であり得る。 P E G - D A A コンジュゲートは、例えば、 P E G - ジラウリルオキシプロピル ( C i<sub>2</sub> )、 P E G - ジミリスチルオキシプロピル ( C i<sub>4</sub> )、 P E G - ジパルミチルオキシプロピル ( C i<sub>6</sub> )、または P E G - ジステアリルオキシプロピル ( C i<sub>8</sub> ) であり得る。 P E G コンジュゲートの他の例には、 P E G - c D M A ( N - [ ( メトキシポリ ( エチレングリコール ) 2 0 0 0 ) カルバミル ] - 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル ( d i m y r i s t y l o x 1 p r o p y l ) - 3 - アミン )、 m P E G 2 0 0 0 - D M G ( m P E G - ジミリスチルグリコール ( 2 , 0 0 0 の平均分子量を有する )、および P E G - C - D O M G ( R - 3 - [ ( - メトキシ - ポリ ( エチレングリコール ) 2 0 0 0 ) カルバモイル ] - 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - アミン ) が含まれる。粒子の凝集を阻止する共役された脂質は、粒子中に存在する総脂質の 0 モル % ~ 約 2 0 モル %、または約 1 . 0、1 . 1、1 . 2、0 . 1 3、1 . 4、1 . 5、1 . 6、1 . 7、1 . 8、1 . 9、または 2 モル % であり得る。

#### 【 0 1 4 8 】

幾つかの実施形態において、該核酸脂質粒子には、例えば、粒子中に存在する総脂質の約 1 0 モル % ~ 約 6 0 モル %、または約 4 8 モル % のコレステロールがさらに含まれる。

#### 【 0 1 4 9 】

一実施形態において、脂質 s i R N A ナノ粒子を調製するために、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することができる。 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については、 2 0 0 8 年 1 0 月 2 3 日出願の米国仮特許出願第 6 1 / 1 0 7 , 9 9 8 号に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 1 5 0 】

例えば、脂質 s i R N A 粒子には、 4 0 % 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、 1 0 % の D S P C、 4 0 % のコレステロール、 1 0 % の P E G - C - D O M G ( モルパーセント ) が含まれ、粒径 6 3 . 0 ± 2 0 n m および 0 . 0 2 7 の s i R N A / 脂質比である。

#### 【 0 1 5 1 】

さらに別の実施形態において、脂質 s i R N A 粒子を調製するために、化合物、 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 ) エチルアザネジール ) ジドデカン - 2 - オール ( T e c h G 1 ) を使用することができる。例えば、 d s R N A は、 5 0 : 1 0 : 3 8 . 5 : 1 . 5 のモル比で、 T e c h - G 1、ジステアロイルホスファチジルコリン ( D S P C )、コレステロール、および m P E G 2 0 0 0 - D M G を含む脂質製剤に、 7 : 1 ( w t : w t ) の総脂質の s i R N A に対する比率で、製剤化され得る。

#### 【 0 1 5 2 】

##### L N P 0 1

一実施形態において、脂質様 ( l i p i d o i d ) N D 9 8 - 4 H C l ( M W 1 4 8 7 ) ( 式 1 )、コレステロール ( S i g m a - A l d r i c h )、および P E G - C e r a m i d e C 1 6 ( A v a n t i P o l a r L i p i d s ) を使用して、脂質 s i R N A ナノ粒子 ( すなわち、 L N P 0 1 粒子 ) を調製することができる。それぞれエタノール中の原液を、 N D 9 8、 1 3 3 m g / m L ; コレステロール、 2 5 m g / m L、 P E G - C e r a m i d e C 1 6、 1 0 0 m g / m L のように調製することができる。次いで、 N D 9 8、コレステロール、および P E G - C e r a m i d e C 1 6 の原液を、例えば、 4 2 : 4 8 : 1 0 のモル比に混合することができる。混合された脂質溶液は、最終エタノール濃度が約 3 5 ~ 4 5 %、および最終酢酸ナトリウム濃度が約 1 0 0 ~ 3 0 0 m M になるように、(例えば、酢酸ナトリウム ( p H 5 ) 中の) s i R N A 水溶液と混合することができる。脂質 s i R N A ナノ粒子は、典型的には、混合時に自然発生的に形成される。所望の粒径分布に依存して、得られたナノ粒子混合物は、例えば、 L i p e x E x t r u d e r ( N o r t h e r n L i p i d s , I n c ) 等のサーモバレル押出機 ( t

10

20

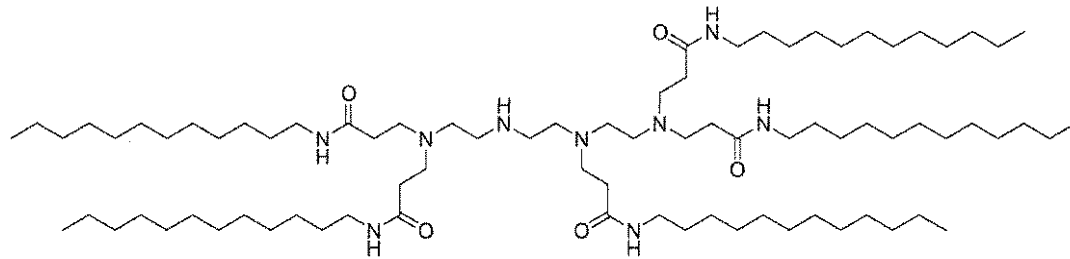
30

40

50

hermobarrel extruder) を使用して、ポリカーボネート膜 (例えば、100nmカットオフ) を通して押し出すことができる。場合によっては、押出ステップは割愛されてもよい。エタノール除去および同時の緩衝液交換は、例えば、透析または接線流濾過によって達成することができる。緩衝液は、例えば、約 pH 7、例えば、約 pH 6.9、約 pH 7.0、約 pH 7.1、約 pH 7.2、約 pH 7.3、または約 pH 7.4 のリン酸緩衝食塩水 (PBS) と交換することができる。

【化 1】



式 1

ND98 異性体 I

【0153】

LNP01 製剤については、例えば、国際出願公開WO第2008/042973号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0154】

さらなる例示的な脂質 siRNA 製剤は、以下の通りである。

10

20

	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脂質コンジュゲート 脂質:siRNA比	過程
SNALP	1,2-ジリノレイルオキシ-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	
SNALP-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	押出
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	押出
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	インライン混合
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	インライン混合

10

20

30

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	インライン混合
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	インライン混合
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)ブタノエート(MC3)	MC-3/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1	インライン混合
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)エチルアザネジイル)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	インライン混合

10

20

## 【 0 1 5 5 】

LNP09 製剤およびXTCを含む製剤は、例えば、2009年9月3日出願の米国仮出願第61/239,686号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【 0 1 5 6 】

LNP11 製剤およびMC3を含む製剤は、例えば、2009年9月22日出願の米国仮出願第61/244,834号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 1 5 7 】

LNP12 製剤およびTech G1を含む製剤は、例えば、2009年5月5日出願の米国仮出願第61/175,770号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【 0 1 5 8 】

標準的な方法、または押出を伴わない方法のうちのいずれかによって調製された製剤を同様の様態で特徴付けることができる。例えば製剤は、典型的には、目視検査によって特徴付けられる。それらは、凝集物または沈降物のない、白っぽい半透明の溶液であるべきである。脂質ナノ粒子の粒径および粒径分布は、例えば、Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern (USA)) を使用して、光散乱によって測定することができる。粒子は、40~100nm等の約20~300nmの粒径であるべきである。粒径分布は、単峰型であるべきである。製剤中、ならびに捕捉された画分中の総siRNA濃度は、色素排除アッセイを使用して推定される。製剤化されたsiRNAの試料を、製剤を分裂させる界面活性剤、例えば、0.5%のTriton-X100の存在または不在下、Ribogreen (Molecular Probes) 等のRNAに結合する色素を用いてインキュベートすることができる。製剤中の総siRNAは、標準

40

50

曲線に対する、該界面活性剤を含有する試料からのシグナルによって決定することができる。捕捉された画分を、総 s i R N A 含有量から s i R N A を「含まない」含有量（界面活性剤の不在下のシグナルによって測定される）を差し引くことによって決定する。捕捉された s i R N A のパーセントは、典型的には 85% 超である。S N A L P 製剤については、粒径は、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。好適な範囲は、典型的には少なくとも約 50 nm ~ 少なくとも約 110 nm、少なくとも約 60 nm ~ 少なくとも約 100 nm、または少なくとも約 80 nm ~ 少なくとも約 90 nm である。

10

#### 【0159】

経口投与用の組成物および製剤には、粉末もしくは顆粒、微粒子、ナノ粒子、水もしくは疎水性媒体中の懸濁液もしくは溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシエット、錠剤、またはミニタブレットが含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましくあり得る。幾つかの実施形態において、経口製剤とは、本発明で取り上げられる d s R N A が、1つ以上の浸透促進剤、界面活性剤、およびキレート化剤と併用して投与されるものである。好適な界面活性剤には、脂肪酸および/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および/またはその塩が含まれる。好適な胆汁酸/塩には、ケノデオキシコール酸 (C D C A) およびウルソデオキシケノデオキシコール酸 (U D C A)、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 (g l u c h o l i c a c i d)、グリコール酸 (g l y c h o l i c a c i d)、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 - 24, 25 - ジヒドロ - フシジン酸ナトリウム、ならびにグリコジヒドロフシジン酸ナトリウムが含まれる。好適な脂肪酸には、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、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカプリン酸、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、もしくはその薬剤として許容される塩（例えば、ナトリウム）が含まれる。幾つかの実施形態において、浸透促進剤の組み合わせが使用され、例えば、胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩が挙げられる。例示的な1つの組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、および U D C A のナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤には、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 - セチルエーテルが含まれる。本発明で取り上げられる d s R N A は、噴霧乾燥粒子を含む顆粒形態で経口的に送達されるか、または微小もしくはナノ粒子を形成するように複合されてもよい。d s R N A 複合剤には、ポリ - アミノ酸類；ポリイミン類；ポリアクリレート類；ポリアルキルアクリレート類、ポリオキセタン類、ポリアルキルシアノアクリレート類；カチオン化ゼラチン類、アルブミン類、デンプン類、アクリレート類、ポリエチレングリコール類 (P E G)、およびデンプン類；ポリアルキルシアノアクリレート類；D E A E 誘導体化ポリイミン類、ポルラン (p o l l u l a n) 類、セルロース類、およびデンプン類が含まれる。好適な複合剤には、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、ポリスペルミン、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 (T D A E)、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レート）、ポリ（エチルシアノアクリレート）、ポリ（ブチルシアノアクリレート）、ポリ（イソブチルシアノアクリレート）、ポリ（イソヘキシルシアノアクリレート）、D E A E - メタクリレート、D E A E - ヘキシルアクリレート、D E A E - アクリルアミド、D E A E - アルブミンおよび D E A E - デキストラン、ポリメチルアクリレート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ（D, L - 乳酸）、ポリ（D L - 乳酸 - c o - グリコール酸 (P L G A)、アルギン酸塩、ならびにポリエチレングリコール (P E G) が含まれる。d s R N A 用の経口製剤およびそれらの調製は、米国特許第 6, 887, 906 号、米国特許公開第 20030027780 号、および米国特

20

30

40

50

許第6,747,014号に詳細に記載され、これらはそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0160】

非経口、実質内（脳内への）、くも膜下腔内、脳室内、または肝内投与用の組成物および製剤には、滅菌水溶液が含まれてもよく、これも、限定されないが、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬剤として許容される担体もしくは賦形剤等の緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤を含有し得る。

【0161】

本発明の医薬組成物には、溶液、エマルジョン、およびリポソームを含有する製剤が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物は、予め形成された液体、自己乳化型固体および、自己乳化型半固体を含む種々の構成成分から生成することができるが、これらに限定されない。肝臓癌等の肝障害を処置する際に肝臓を標的とする製剤が特に好ましい。

10

【0162】

本発明の医薬製剤は、簡便に単位剤形で提示することができ、医薬産業において周知である従来の技法によって、調製することができる。かかる技法には、活性成分を1つもしくは複数の医薬用担体または1つもしくは複数の賦形剤と合わせるステップが含まれる。一般に、該製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体、あるいはその両方と均一かつ密接に関連させ、次いで必要であれば該産物を成形することによって調製される。

20

【0163】

本発明の組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐薬、および浣腸等の考えられる多くの剤形のうちのいずれかに製剤化することができる。また、本発明の組成物は、水性、疎水性、または混合媒体中の懸濁液として製剤化することもできる。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質をさらに含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

【0164】

エマルジョン

本発明の組成物は、エマルジョンとして調製および製剤化することができる。エマルジョンは、典型的には、1つの液体が、通常直径0.1  $\mu\text{m}$ を超える液滴の形態の別の液体中に分散された多相系である (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199, Rosoff, in 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., volume 2, p. 335, Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301)。エマルジョンは、しばしば、互いに密接に混合および分散される、2つの非混合性の液相を含む二相系である。一般に、エマルジョンは、油中水 (w/o) 型または水中油 (o/w) 型のいずれかの種類であり得る。水相が、大部分を占める油相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、油中水 (w/o) 型エマルジョンと称される。あるいは、油相が、大部分を占める水相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、水中油 (o/w) 型エマルジョンと称される。エマルジョンは、分散相に加えてさらなる構成成分と、水相または油相のいずれ

30

40

50

か中の溶液として、またはそれ自体別個の相として存在し得る、活性薬物とを含有することができる。また、乳化剤、安定剤、染料、および抗酸化剤等の医薬用賦形剤が、必要に応じてエマルジョン中に存在してもよい。また、医薬用エマルジョンは、例えば、油中水中油（ $o/w/o$ ）型および水中油中水（ $w/o/w$ ）型エマルジョンの場合等の、2つを超える相を含む、多重エマルジョンであってもよい。このような複合製剤は、しばしば、単純な二元エマルジョンは提供しない、特定の利点を提供する。 $o/w$ 型エマルジョンの個々の油滴が小さな水滴を囲む多重エマルジョンは、 $w/o/w$ 型エマルジョンを構成する。同様に、油の連続相中で安定化された水の小球内に囲まれた油滴の系は、 $o/w/o$ 型エマルジョンを提供する。

#### 【0165】

10

エマルジョンは、熱力学的安定性によってほとんどまたは全く特徴付けられない。しばしば、エマルジョンの分散相または不連続相が、外相または連続相中に良好に分散され、乳化剤の手段または製剤の粘度によってこの形態が維持される。エマルジョンの相のいずれも、エマルジョン型軟膏基剤およびクリームの場合のように、半固体または固体であり得る。エマルジョンを安定化する他の手段は、エマルジョンのいずれかの相に組み込むことができる乳化剤の使用を必要とする。乳化剤は、大きく、合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収基剤、および微細に分散された固体の4つのカテゴリーに分類することができる（Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199）。

20

#### 【0166】

合成界面活性剤は、表面活性剤としても知られ、エマルジョン製剤における広範な適用性が見出されており、文献で概説されている（Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199）。界面活性剤は、典型的には両親媒性であり、親水性および疎水性の部分を含む。界面活性剤の、親水性の疎水性に対する比率は、親水性/親油性バランス（HLB）と称されており、製剤の調製時の界面活性剤の分類および選択における、貴重なツールである。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて、非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性の異なるクラスに分類することができる（Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285）。

30

#### 【0167】

エマルジョン製剤に使用される天然乳化剤には、ラノリン、蜜蝋、フォスファチド類、レシチン、およびアカシアが含まれる。吸収基剤は、水を吸収して $w/o$ 型エマルジョンを形成するが、依然として無水ラノリンおよび親水性ペトロラタム等のそれらの半固体の稠度を保持することができる、親水性を有する。微細に分割された固体も、特に界面活性剤と組み合わせ、また粘性の調製物中で、良好な乳化剤として使用されている。これらには、極性の無機固体、例えば、重金属水酸化物、非膨張性粘土、例えば、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド性ケイ酸アルミニウムおよびコロイド性ケイ酸アルミニウムマグネシウム、顔料、ならびに非極性固体、例えば、炭素もしくはトリステアリン酸グリセリルが含まれる。

40

#### 【0168】

また、多岐にわたる非乳化材料もエマルジョン製剤に含まれ、エマルジョンの性質に寄

50

与する。これらには、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、防腐剤、および抗酸化剤が含まれる (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0169】

親水性コロイドまたは親水コロイドには、多糖類（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲニン、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）等の、天然に存在するガムおよび合成ポリマーが含まれる。これらは、水中で分散または膨張して、分散相の液滴の周りに強い界面薄膜を形成し、外相の粘度を増加させることによってエマルジョンを安定化させる、コロイド溶液を形成する。

【0170】

エマルジョンは、しばしば、微生物の成長を容易に支持することができる炭水化物、タンパク質、ステロール、およびフォスファチド等の多くの成分を含有するため、これらの製剤には、しばしば防腐剤が組み込まれる。エマルジョン製剤に含まれる一般的に使用される防腐剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四アンモニウム塩、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、およびホウ酸が含まれる。また、製剤の劣化を阻止するために、抗酸化剤も一般的にエマルジョン製剤に添加される。使用される抗酸化剤は、フリーラジカルスカベンジャー、例えば、トコフェロール、アルキルガレート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、または還元剤、例えば、アスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウム、ならびに抗酸化剤シナージスト、例えば、クエン酸、酒石酸、およびレシチンであり得る。

【0171】

皮膚、経口、および非経口経路を介するエマルジョン製剤の適用、ならびにそれらを製造するための方法は、文献で概説されている (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。経口送達用のエマルジョン製剤は、製剤化の容易さ、ならびに吸収および生物学的利用能の見地からの有効性から、非常に広範に使用されている (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245、Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。鉱油基材の緩下剤、油溶性ビタミン、および高脂肪栄養調製物が、o/w型エマルジョンとして一般的に経口投与されている材料に含まれる。

【0172】

本発明の一実施形態において、dsRNAおよび核酸の組成物が、マイクロエマルジョンとして製剤化される。マイクロエマルジョンは、水、油、および単一の、光学的に等方性かつ熱力学的に安定な液体溶液である両親媒性物質の系として定義することができる (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p

10

20

30

40

50

、245)。典型的には、マイクロエマルジョンは、まず油を界面活性剤水溶液中に分散し、次に十分な量の第4の構成成分、一般には中間鎖長のアルコールを添加して透明な系を形成することによって調製される、系である。したがって、マイクロエマルジョンは、表面活性分子の界面薄膜によって安定化される、2つの非混和液の熱力学的に安定で等方的な、透明の分散物質としても記載されている(Leung and Shah, in: 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、一般的に、油、水、界面活性剤、共界面活性剤、および電解質を含む、3~5つの構成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(w/o)型、または水中油(o/w)型であるかは、使用される油および界面活性剤の性質、ならびに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な積み込みに依存する(Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

#### 【0173】

相図を利用する現象論的手法が広範に研究されており、マイクロエマルジョンを製剤化する方法についての包括的な知識を当業者にもたらしめている(Rosoff, in 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., volume 1, p. 335)。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、自然発生的に形成される熱力学的に安定な液滴の製剤において、不水溶性薬物を可溶化する利点を提示する。

#### 【0174】

マイクロエマルジョンの調製に使用される界面活性剤には、単独、または共界面活性剤と組み合わせた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート(ML310)、テトラグリセロールモノオレエート(MO310)、ヘキサグリセロールモノオレエート(PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート(PO500)、デカグリセロールモノカプレート(MCA750)、デカグリセロールモノオレエート(MO750)、デカグリセロールセクイオレエート(sequiolate)(SO750)、デカグリセロールデカオレエート(DAO750)が含まれるが、これらに限定されない。共界面活性剤は、通常、エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノール等の短鎖アルコールであるが、界面活性剤の薄膜中に浸透し、その結果、界面活性剤分子の間に生成される空隙のために不規則な薄膜を形成することによって、界面流動性を増加させる役目を果たす。しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用を伴わずに調製することができ、アルコールを含まない自己乳化型のマイクロエマルジョン系が、当該技術分野において既知である。水相は、典型的には、水、該薬物の水溶液、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の誘導体であり得るが、これらに限定されない。油相には、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖(C8~C12)のモノ、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、ポリ糖化(polyglycolized)グリセリド、飽和ポリ糖化C8~C10グリセリド、植物油、ならびにシリコンオイル等の材料が含まれ得るが、これらに限定されない。

#### 【0175】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化および薬物吸収の亢進の見地から、特に興味深

10

20

30

40

50

い。ペプチドを含む薬物の経口での生物学的利用能を亢進させるために、脂質基剤のマイクロエマルジョン（o/w型およびw/o型の両方）が提案されている（Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390、Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205）。マイクロエマルジョンは、改善された薬物の可溶化、酵素的加水分解からの薬物の保護、界面活性剤が誘発する膜流動性および透過性における変化による薬物吸収の潜在的な亢進、調製の容易さ、固形剤形を超える経口投与の容易さ、改善された臨床的効力、および低減した毒性の利点を提供する（Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385、Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143）。しばしば、マイクロエマルジョンは、その構成成分が周囲温度で引き合わされると、自然発生的に形成され得る。これは、熱不安定性の薬物、ペプチド、またはdsRNAを製剤化する際に特に有利であり得る。また、マイクロエマルジョンは、化粧用途および医薬用途の双方における活性構成成分の経皮送達に効果的である。本発明のマイクロエマルジョン組成物および製剤は、消化管からのdsRNAおよび核酸の向上された体内吸収を促進し、dsRNAおよび核酸の局所的な細胞取り込みを改善することが期待される。

#### 【0176】

また、本発明のマイクロエマルジョンは、製剤の特性を改善し、本発明のdsRNAおよび核酸の吸収を亢進させるための、モノステアリン酸ソルビタン（Grill 3）、Labrasol、および浸透促進剤等のさらなる構成成分および添加剤を含有することができる。本発明のマイクロエマルジョンに使用される浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するものとして分類することができる（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92）。これらのクラスのそれぞれが、上述されている。

#### 【0177】

##### 浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、核酸、特にdsRNAの、動物の皮膚への効率的な送達を達成させるために、種々の浸透促進剤を用いる。ほとんどの薬物は、イオン化および非イオン化の両方の形態で溶液中に存在する。しかしながら、通常脂溶性または親油性の薬物のみが、容易に細胞膜を横断する。横断される膜が浸透促進剤で処理されている場合、非親油性薬物でさえも、細胞膜を横断し得ることが発見されている。非親油性薬物の細胞膜を横断する拡散の補助に加えて、浸透促進剤は、親油性薬物の透過性も亢進する。

#### 【0178】

浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するものとして分類することができる（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92）。浸透促進剤の前述のクラスのそれぞれについて、以下により詳細に記載する。

#### 【0179】

界面活性剤：本発明に関連して、界面活性剤（または「表面活性剤」）とは、水溶液中に溶解されると、溶液の表面張力または該水溶液と別の液体との間の界面張力を減少させ、粘膜を通るdsRNAの吸収が亢進されるという結果をもたらす、化学物質である。胆汁塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤には、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92）、ならびにFC-43等のペルフルオロ化合物エマルジョンが含まれる（Takahashi

shi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252)。

【0180】

脂肪酸：浸透促進剤として作用する種々の脂肪酸およびそれらの誘導体には、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、ジカプリン酸、トリカプリン酸、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-モノカプリン酸、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、それらの $C_{1-10}$ 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）、ならびにそれらのモノおよびジ-グリセリド（すなわち、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、カプリン酸塩、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、リノール酸塩等）が含まれる（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 Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654）。

10

【0181】

胆汁塩：胆汁の生理学的役割には、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が含まれる（Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935）。種々の天然胆汁塩、およびそれらの合成誘導体は、浸透促進剤として作用する。したがって、「胆汁塩」という用語には、胆汁の天然に存在する構成成分のうちのいずれも、ならびにそれらの合成誘導体のうちのいずれもが含まれる。好適な胆汁塩には、例えば、コール酸（もしくはその薬剤として許容されるナトリウム塩、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（sodium glucolate））、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）、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）が含まれる（Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: 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）。

20

30

40

【0182】

キレート剤：本発明に関連して使用されるキレート剤は、金属イオンとの複合体を形成することによって溶液から金属イオンを除去し、粘膜を通るdsRNAの吸収の亢進という結果をもたらす化合物として、定義することができる。本発明における浸透促進剤としての使用に関して、ほとんどの特徴付けられたDNAヌクレアーゼは触媒作用に二価金属

50

イオンを必要とすることから、キレート剤によって阻害されるため、キレート剤は、DNアーゼ阻害剤としても機能するさらなる利点を有する (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。好適なキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、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塩、およびホモバニレート (homovanillate))、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9、およびベータ-ジケトンのN-アミノアシル誘導体 (エナミン) が含まれるが、これらに限定されない (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)。

10

#### 【0183】

非キレート非界面活性剤：本明細書で使用される、非キレート非界面活性剤の浸透促進化合物は、キレート剤または界面活性剤としてわずかな活性しか示さないが、それにもかかわらず消化器粘膜を通じてのdsRNAの吸収を亢進する化合物として、定義することができる (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33)。このクラスの浸透促進剤には、例えば、不飽和環状尿素、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)、ならびに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等の非ステロイド性抗炎症薬 (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626) が含まれる。

20

#### 【0184】

##### 担体

また、本発明の特定の組成物には、製剤中に担体化合物が組み込まれる。本明細書で使用される、「担体化合物」または「担体」は、不活性 (すなわち、それ自体生物活性を有さない) であるが、例えば、生物活性のある核酸の分解、または循環からのその除去の促進によって、生物活性を有する核酸の生物学的利用能を減少させるインビボ過程によって、核酸として認識される、核酸、またはその類似体を指すことができる。核酸と担体化合物との同時投与は、典型的には後者の物質を過剰に伴い、おそらく共通の受容体に対する担体化合物と核酸との間の競合により、肝臓、腎臓、または他の循環外の貯蔵所で回収される核酸の量の著しい減少をもたらす得る。例えば、肝組織中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、ポリシチジン酸 (polycytidic acid)、または4-アセトアミド-4イソチオシアノ-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸と同時投与される場合、減少され得る (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121, Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

30

40

#### 【0185】

##### 賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬用担体」または「賦形剤」は、1つ以上の核酸を動物に送達するための、薬剤として許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性な媒体である。賦形剤は液体または固体であり得、核酸および所定の医薬組成物の他の構成成分と組み合わせられた時に、所望の用量、軟度等を提供するように、計画された投与の様態を念頭において選択される。典型的な医薬用担体には、結合剤 (例えば、アルファ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等)、充填剤 (例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶性セルロース、ベクチ

50

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等)、滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、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、酢酸ナトリウム等)、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等)、ならびに湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0186】

また、核酸と有害に反応しない、経口(non-parenteral)投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を、本発明の組成物を製剤化するために使用することができる。好適な薬剤として許容される担体には、水、塩類溶液、アルコール、  
10 ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、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等が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0187】

核酸の局所投与用の製剤には、滅菌および非滅菌水溶液、アルコール等の一般的な溶媒中の非水溶液、または液体もしくは固形の油基剤中の核酸の溶液が含まれ得る。該溶液は、緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤も含有し得る。核酸と有害に反応しない、経口(non-parenteral)投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を使用することができる。

#### 【0188】

好適な薬剤として許容される賦形剤には、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、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等が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0189】

#### 他の構成成分

本発明の組成物は、医薬組成物中に従来認められる他の補助的な構成成分を、それらの当該技術分野において確立された使用量レベルで、さらに含有することができる。したがって、例えば、本組成物は、さらに、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬、または抗炎症薬等の、適合性の、薬剤として活性な材料を含有してもよく、あるいは、染料、香味剤、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤等の、本発明の組成物の種々の剤形に物理的に製剤化するために有用な、さらなる材料を含有してもよい。しかし、かかる材料は、添加された時に、本発明の組成物の構成成分の生物活性を過度に妨げてはならない。該製剤を滅菌し、所望される場合、補助的な薬剤、例えば、該製剤の1つまたは複数の核酸と有害に相互作用しない滑沢剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝液、着色物質、香味物質、および/または芳香物質等と混合してもよい。

#### 【0190】

水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

#### 【0191】

幾つかの実施形態において、本発明で取り上げられる医薬組成物には、(a)1つ以上のdsRNA化合物および(b)非RNAi機序によって機能する1つ以上の抗サイトカイン生物剤が含まれる。かかる生物学の例には、IL1(例えばアンキンラ)、IL6(トシリズマブ)、またはTNF(エタネルセプト、インフリキシマブ、アドリムマブ、もしくはセルトリズマブ)を標的とする生物学が含まれる。

#### 【0192】

かかる化合物の毒性および治療効果は、例えば、LD50(集団の50%に致死的な用量)、およびED50(集団の50%に治療上有効な用量)を決定するための、細胞培養  
50

物または実験動物における標準的な医薬的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、LD50/ED50比として表すことができる。高い治療指数を呈する化合物が好ましい。

#### 【0193】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータを、ヒトにおける使用のための一連の投薬量の処方決定に使用することができる。本発明で取り上げられる組成物の投薬量は、一般に、ほとんどまたは全く毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なり得る。本発明で取り上げられる方法において使用されるいずれの化合物についても、治療上有効な用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、IC50（すなわち、症状の半値阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む、化合物、または適切な場合は、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲（例えば、該ポリペプチドの濃度の低下を達成する）を達成するように、処方決定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

#### 【0194】

それらの投与に加えて、上述のように、本発明で取り上げられるdsRNAは、TTRの発現によって媒介される病理過程の処置に効果的な他の既知の薬剤と組み合わせて投与することができる。いずれの場合においても、投与する医師は、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載される、標準的な有効性の測定値を使用して得られた結果に基づいて、dsRNA投与の量およびタイミングを調整することができる。

#### 【0195】

##### TTR遺伝子の発現によって引き起こされる眼疾患を治療するための方法

本発明は、特に、TTR関連眼アミロイドーシスの治療のための、TTRを標的とするdsRNAの使用に関する。本発明は、これは、TTR関連眼アミロイドーシスの治療、予防、または管理を必要とする患者に、治療上または予防上有効量のAD-18324を、該患者の網膜に投与することによって、TTR関連眼アミロイドーシスの治療、予防、または管理する方法を特徴とする。一実施形態において、本方法は、TTR関連眼アミロイドーシスに罹患している、またはTTR関連眼アミロイドーシスを発症する危険性があると診断されるヒトを特定し、該ヒトに、治療上もしくは予防上有効量のAD-18324を該ヒトの網膜に投与することによって、ヒトを治療することを含む。本発明はまた、AD-18324またはAD-18534であるdsRNAを網膜上皮細胞に導入し、TTR遺伝子のmRNA転写物の分解を得るために十分な時間、前述のステップにおいて産生された細胞を維持し、それによって、細胞内のTTR遺伝子の発現を阻害することによって、TTR関連眼アミロイドーシスに罹患しているヒトを治療する方法も含む。幾つかの実施形態において、本発明のTTRのsiRNAは、トランスチレチン（TTR）関連の家族性アミロイド多発性神経障害（FAP）患者、ならびに硝子体混濁および緑内障等の眼症状発現の治療の方法において使用される。網膜色素上皮（RPE）によって合成されたアミロイド生成性トランスチレチン（ATTR）が、眼アミロイドーシスの進行において重要な役割を果たすことを当業者により理解されよう。RPE細胞を軽減させ、ガラス体中のアミロイドの沈着の進行を妨げ、これにより、RPE中のATTRの発現の効果的な抑制を示す、汎網膜レーザー光凝固術が、眼アミロイドーシスの新規の療法になり得ることを、前述の研究は、示している（例えば、Kawajiri, T., et al., Ophthalmology (2010) 117: 552-555）。本明細書に開示されるTTRのsiRNAのいずれかの投与は、例えば、眼アミロイドーシス等のTTR関連FAPの眼症状発現の治療に使用することができる。dsRNAは、眼等の特定の組織を標的とする様式で送達することができる。眼への送達の様式は、眼球後方、皮下瞼、結膜下、眼球鞘下、前房、または硝子体注射（または内部注射もしくは注入）を含む。眼送達用の特定の製剤には、点眼剤または軟膏が含まれる。

## 【 0 1 9 6 】

d s R N A およびさらなる治療薬は、同様の併用で、例えば、非経口で投与することができるか、またはさらなる治療薬は、別個の組成物の一部として、または本明細書に記載の別の方法によって投与することができる。

## 【 0 1 9 7 】

本発明は、T T R アミロイドーシス、例えば、F A P 等のT T R の発現によって媒介される疾患または障害を有する患者に、T T R を標的とするd s R N A を投与する方法を取り上げる。該d s R N A の投与は、例えば、F A P に罹患している患者において、末梢神経系の機能を安定させ、向上させることができる。患者は、治療量のd s R N A、例えば、0 . 1 m g / k g、0 . 2 m g / k g、0 . 5 m g / k g、1 . 0 m g / k g、1 . 5 m g / k g、2 . 0 m g / k g、または2 . 5 m g / k g のd s R N A を投与することができる。該d s R N A は、一定期間、例えば、5 分間、1 0 分間、1 5 分間、2 0 分間、2 5 分間、6 0 分間、1 2 0 分間、または1 8 0 分間にわたって投与することができる。例えば、定期的に、例えば、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、またはそれ以上の期間、隔週で（すなわち、2 週間ごとに）、反復投与される。初期治療レジメン後、該治療は、より低い頻度で、投与することができる。例えば、隔週で3 ヶ月間、投与した後、6 ヶ月間、またはそれ以上の期間、1 ヶ月に1 回、反復投与することができる。該d s R N A の投与は、患者における血液中または尿のT T R レベルを、少なくとも2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、または9 0 % もしくはそれ以上軽減することができる。

## 【 0 1 9 8 】

総量の該d s R N A を投与する前に、患者は、総量の5 % 用量等の少量の用量を投与し、アレルギー反応または肝機能の変化等の副作用を監視することができる。例えば、肝機能の変化に対して監視される患者において、L F T（肝機能検査）の変化の低い発生率（例えば、L F T の1 0 ~ 2 0 % 発生率）は、許容される（例えば、可逆的な、A L T（アラニンアミノトランスフェラーゼ）および/またはA S T（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）レベルの3 倍の増加）。

## 【 0 1 9 9 】

多くのT T R 関連の疾病および障害は、遺伝性である。したがって、T T R のd s R N A を必要とする患者は、家族歴を得ることによって特定することができる。医者、看護師、または家族等のヘルスケア提供者は、T T R のd s R N A を処方する、または投与する前に家族歴を得ることができる。D N A テストもはまた、T T R のd s R N A を患者に投与する前に、T T R 遺伝子の変異を同定するために、該患者に実施され得る。

## 【 0 2 0 0 】

該患者は、T T R のd s R N A を受ける前に実施される生検を有し得る。該生検は、例えば、胃粘膜、末梢神経、皮膚、腹部脂肪、肝臓、もしくは腎臓等の組織上にあり得、該生検は、T T R によって媒介される障害を示す、アミロイド斑を示し得る。アミロイド斑を確認すると、患者は、T T R のd s R N A が投与される。

## 【 0 2 0 1 】

T T R 遺伝子の発現を阻害するための方法

さらに別の態様において、本発明は、哺乳動物における、T T R 遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。該方法は、標的T T R 遺伝子の発現が停止されるように、本発明で取り上げられる組成物を該哺乳動物に投与することを含む。

## 【 0 2 0 2 】

処置される生物がヒト等の哺乳動物である場合、本組成物は、頭蓋内（例えば脳室内、脳実質内、およびくも膜下腔）、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（噴霧剤）、経鼻、直腸、ならびに局所（口腔および舌下を含む）投与を含む、経口または非経口の経路を含むが、これらに限定されない、当該技術分野において既知の任意の手段によって投与することができる。ある実施形態において、本組成物は、静脈内注入もしくは注射によって投与される。

## 【0203】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および化学用語は、本発明が属する分野における当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本発明で取り上げられるdsRNAおよび方法の実践または試験に際して、本明細書に記載されるものと同様または等価の方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合は、定義を含み、本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および例は例示に過ぎず、限定するものではない。

## 【実施例】

## 【0204】

実施例1：dsRNA合成試薬の供給源

試薬の供給源が本明細書に具体的に与えられていない場合、かかる試薬は、分子生物学の用途に標準的な質/純度で、分子生物学用の試薬の任意の供給業者から得ることができる。

## 【0205】

siRNA合成

Expedite 8909合成機(Applied Biosystems、App  
lera Deutschland GmbH、Darmstadt, Germany)  
、および固体支持体として制御細孔ガラス(CPG、500、Proligo Bio  
chemie GmbH(Hamburg, Germany))を使用して、1μモルの  
規模で固相合成によって単鎖RNAを生成した。RNAおよび2'-O-メチルヌクレオ  
チドを含有するRNAを、対応するホスホラミダイトおよび2'-O-メチルホスホラミ  
ダイト(Proligo Biochemie GmbH(Hamburg, Germa  
ny))をそれぞれ用いて、固相合成によって生成した。これらの構成要素を、Curr  
ent protocols in nucleic acid chemistry,  
Beaucage, S.L. et al.(Edrs.), John Wiley &  
Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されるような、標準的なヌ  
クレオシドホスホラミダイト化学反応を用いて、オリゴボヌクレオチド鎖の配列内の選  
択された部位に組み込んだ。ヨウ素酸化剤溶液を、アセトニトリル(1%)中のBeau  
cage試薬(Chruachem Ltd(Glasgow, UK))の溶液と置き換  
えて、ホスホロチオエート結合を導入した。さらなる補助試薬をMallinckrodt  
Baker(Griesheim, Germany)から入手した。

## 【0206】

確立された手順に従い、陰イオン交換HPLCによって、粗オリゴボヌクレオチドの  
脱保護および精製を行った。収量および濃度を、分光光度計(DU 640B、Beck  
man Coulter GmbH、(Unterschleissheim, Germ  
any))を使用した、260nmの波長でのそれぞれのRNAの溶液のUV吸収によっ  
て判定した。アニーリング緩衝液(20mM リン酸ナトリウム(pH6.8)、100  
mM 塩化ナトリウム)中で相補鎖の等モル溶液を混合し、3分間85~90℃の湯浴中  
で加熱し、3~4時間かけて室温まで冷却することによって、二本鎖RNAを生成した。  
アニールされたRNA溶液は、使用するまで-20℃で保管した。

## 【0207】

3'-コレステロールにコンジュゲートしたsiRNA(本明細書で-Chol-3  
と称される)の合成には、RNA合成のために適切に改質された固体支持体を使用された。  
改質された固体支持体は、以下のように調製した。

ジエチル-2-アザブタン-1,4-ジカルボキシレートAA

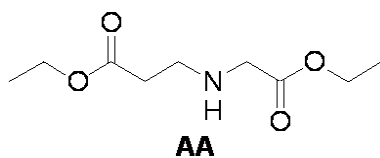
10

20

30

40

## 【化 2】



## 【0208】

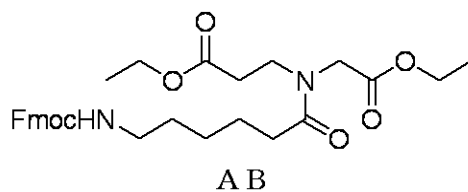
水酸化ナトリウムの 4.7 M の水溶液 (50 mL) を、水 (50 mL) 中のグリシンエチル塩酸塩 (32.19 g、0.23 モル) の、攪拌して氷冷した溶液に添加した。次いで、エチルアクリレート (23.1 g、0.23 モル) を添加し、混合物を、反応の完了が TLC によって確認されるまで、室温で攪拌した。19 時間後、該溶液をジクロロメタン (3 × 100 mL) で分配した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を蒸留して、AA (28.8 g、61%) を得た。

10

## 【0209】

3 - {エトキシカルボニルメチル - [6 - (9H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニル - アミノ) - ヘキサノイル] - アミノ} - プロピオン酸エチルエステル AB

## 【化 3】



20

## 【0210】

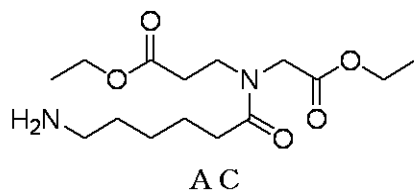
Fmoc - 6 - アミノ - ヘキサン酸 (9.12 g、25.83 ミリモル) をジクロロメタン (50 mL) に溶解し、氷冷した。ジイソプロピルカルボジイミド (3.25 g、3.99 mL、25.83 ミリモル) を該溶液に 0 で添加した。その後、ジエチル - アザブタン - 1, 4 - ジカルボキシレート (5 g、24.6 ミリモル)、およびジメチルアミノピリジン (0.305 g、2.5 ミリモル) を添加した。該溶液が室温になるようにし、さらに 6 時間攪拌した。反応の完了を TLC で確認した。反応混合物を真空下で濃縮し、酢酸エチルを添加して、ジイソプロピル尿素を沈殿させた。この懸濁液を濾過した。濾液を 5% 塩酸水溶液、5% 飽和重炭酸ナトリウム、および水で洗浄した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させて濃縮し、粗生成物を得て、カラムクロマトグラフィー (50% EtOAc / ヘキサン) で精製し、11.87 g (88%) の AB を得た。

30

## 【0211】

3 - [(6 - アミノ - ヘキサノイル) - エトキシカルボニルメチル - アミノ] - プロピオン酸エチルエステル AC

## 【化 4】



40

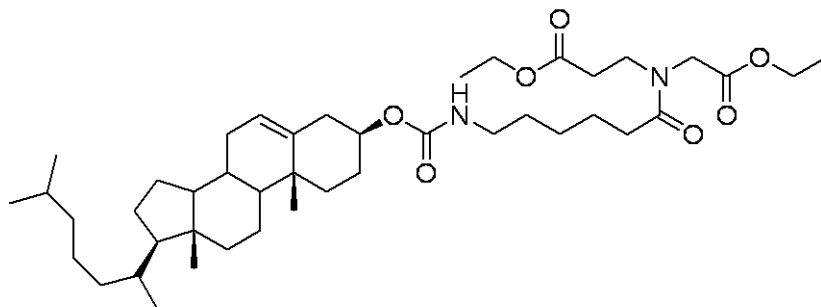
3 - {エトキシカルボニルメチル - [6 - (9H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニルアミノ) - ヘキサノイル] - アミノ} - プロピオン酸エチルエステル AB (11.5 g、21.3 ミリモル) を、0 のジメチルホルムアミド中の 20% ピペリジンに溶解した。この溶液を 1 時間攪拌し続けた。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣に水を添加し、酢酸エチルで生成物を抽出した。この粗生成物をその塩酸塩に変換することによって精製した。

50

## 【 0 2 1 2 】

3 - ( { 6 - [ 1 7 - ( 1 , 5 - ジメチル - ヘキシル ) - 1 0 , 1 3 - ジメチル - 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 , 1 7 - テトラデカヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ } - ヘキサノイル } エトキシカルボニルメチル - アミノ ) - プロピオン酸エチルエステル A D

【 化 5 】



10

AD

## 【 0 2 1 3 】

3 - [ ( 6 - アミノ - ヘキサノイル ) - エトキシカルボニルメチル - アミノ ] - プロピオン酸エチルエステル A C ( 4 . 7 g 、 1 4 . 8 ミリモル ) の塩酸塩をジクロロメタンに溶解した。この懸濁液を氷上で 0 に冷却した。この懸濁液にジイソプロピルエチルアミン ( 3 . 8 7 g 、 5 . 2 m L 、 3 0 ミリモル ) を添加した。得られた溶液に、コレステリルクロロホルメート ( 6 . 6 7 5 g 、 1 4 . 8 ミリモル ) を添加した。反応混合物を終夜撹拌した。反応混合物をジクロロメタンで希釈し、1 0 % 塩酸で洗浄した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した ( 1 0 . 3 g 、 9 2 % ) 。

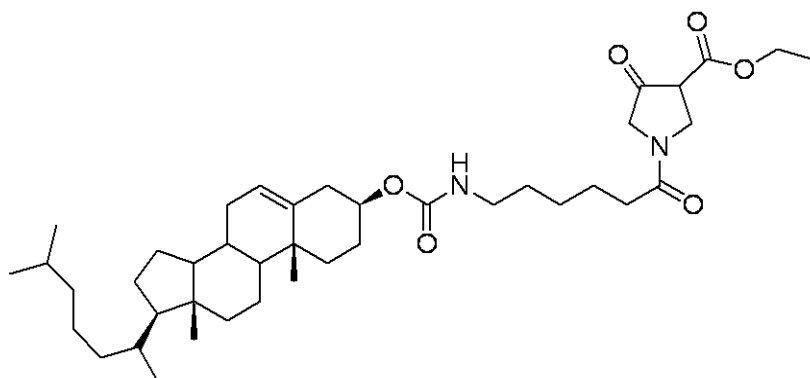
20

## 【 0 2 1 4 】

1 - { 6 - [ 1 7 - ( 1 , 5 - ジメチル - ヘキシル ) - 1 0 , 1 3 - ジメチル - 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 , 1 7 - テトラデカヒドロ - 1 H - シクロペンタ [ a ] フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ } - ヘキサノイル } - 4 - オキソ - ピロリジン - 3 - カルボン酸エチルエステル A E

30

【 化 6 】



40

AE

## 【 0 2 1 5 】

カリウム t - ブトキシド ( 1 . 1 g 、 9 . 8 ミリモル ) を 3 0 m L の乾燥トルエンでスラリーにした。この混合物を氷上で 0 に冷却し、5 g ( 6 . 6 ミリモル ) のジエステル A D を 2 0 分以内のうちに、撹拌しながらゆっくりと添加した。添加の間、温度は 5 未満に維持した。撹拌を 0 で 3 0 分間継続し、1 m L の氷酢酸、その直後に 4 0 m L の水中の 4 g の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  を添加した。得られた混合物を 2 回、それぞれ 1 0 0

50

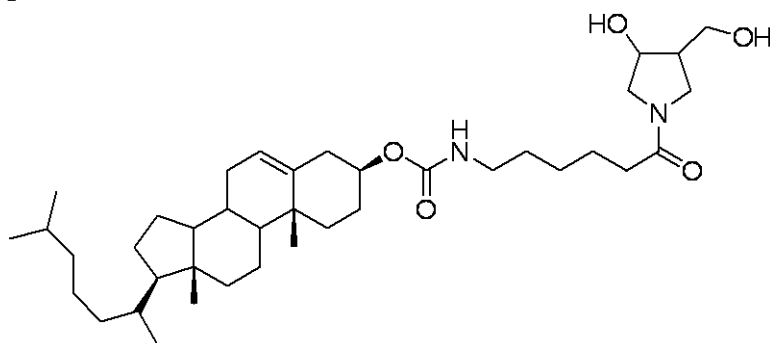
m L のジクロロメタンで抽出し、合わせた有機抽出物を 2 回、それぞれ 10 m L のリン酸緩衝液で洗浄し、乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を 60 m L のトルエンに溶解し、0 に冷却し、それぞれ 50 m L の、pH 9.5 の冷炭酸塩緩衝液で 3 回抽出した。水性抽出液をリン酸で pH 3 に調整し、それぞれ 40 m L のクロロホルムで 5 回抽出し、合わせて乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を 25% 酢酸エチル/ヘキサンを使用して、カラムクロマトグラフィーで精製し、1.9 g の b-ケトエステルを得た (39%)。

【0216】

[6-(3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-ピロリジン-1-イル)-6-オキソ-ヘキシル]-カルバミン酸 17-(1,5-ジメチル-ヘキシル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イルエステル AF

10

【化7】



20

AF

【0217】

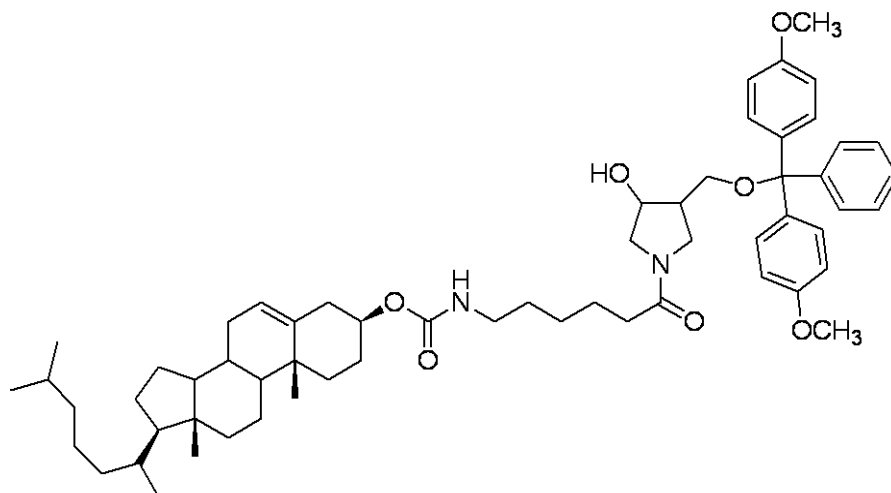
メタノール (2 mL) を、b-ケトエステル AE (1.5 g、2.2 ミリモル) と、テトラヒドロフラン (10 mL) 中の水素化ホウ素ナトリウム (0.226 g、6 ミリモル) との還流混合物に、1 時間かけて滴下した。攪拌を還流温度で 1 時間継続した。室温に冷却後、1 N の HCl (12.5 mL) を添加し、混合物を酢酸エチルで抽出した (3 × 40 mL)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮して生成物を得て、カラムクロマトグラフィー (10% MeOH / CHCl<sub>3</sub>) で精製した (89%)。

30

【0218】

(6-{3-[ビス-(4-メトキシ-フェニル)-フェニル-メトキシメチル]-4-ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル}-6-オキソ-ヘキシル)-カルバミン酸 17-(1,5-ジメチル-ヘキシル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イルエステル AG

## 【化 8】



10

AG

## 【0219】

ジオールAF (1.25 g、1.994ミリモル)を、真空内でピリジン (2×5 mL)を用いて蒸発乾固した。無水ピリジン (10 mL) および4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (0.724 g、2.13ミリモル)を撹拌しながら添加した。反応は、終夜室温で行われた。メタノールを添加して反応を停止させた。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣にジクロロメタン (50 mL)を添加した。この有機層を1 Mの飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。トルエンを蒸発させて残渣のピリジンを除去した。この粗生成物をカラムクロマトグラフィー (2% MeOH / クロロホルム、5% MeOH / CHCl<sub>3</sub> 中 R<sub>f</sub> = 0.5) で精製した (1.75 g、95%)。

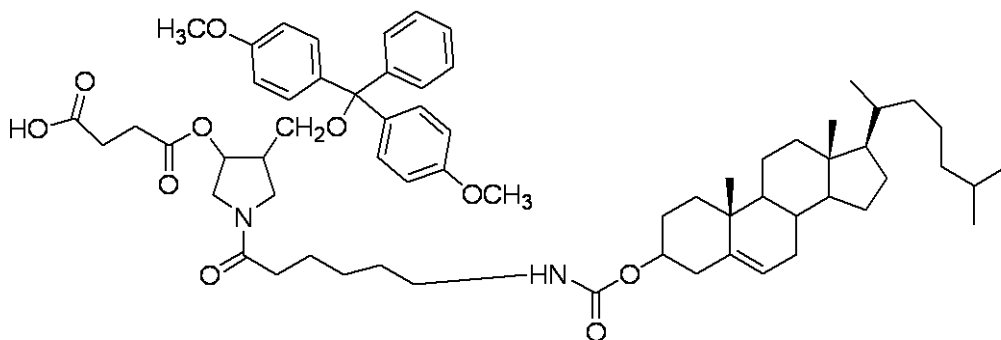
20

## 【0220】

コハク酸モノ-(4-[ビス-(4-メトキシ-フェニル)-フェニル-メトキシメチル]-1-{6-[17-(1,5-ジメチル-ヘキシル)-10,13-ジメチル2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1Hシクロペンタ[a]フェナントレン-3-イルオキシカルボニルアミノ]-ヘキサノイル}-ピロリジン-3-イル)エステルAH

30

## 【化 9】



40

AH

## 【0221】

化合物AG (1.0 g、1.05ミリモル)を無水コハク酸 (0.150 g、1.5ミリモル) およびDMA P (0.073 g、0.6ミリモル)と混合し、終夜40℃の真空内で乾燥させた。該混合物を無水ジクロロエタン (3 mL) に溶解し、トリエチルアミン (0.318 g、0.440 mL、3.15ミリモル)を添加し、この溶液をアルゴン雰囲気下で16時間、室温で撹拌した。次いで、これをジクロロメタン (40 mL) で希釈

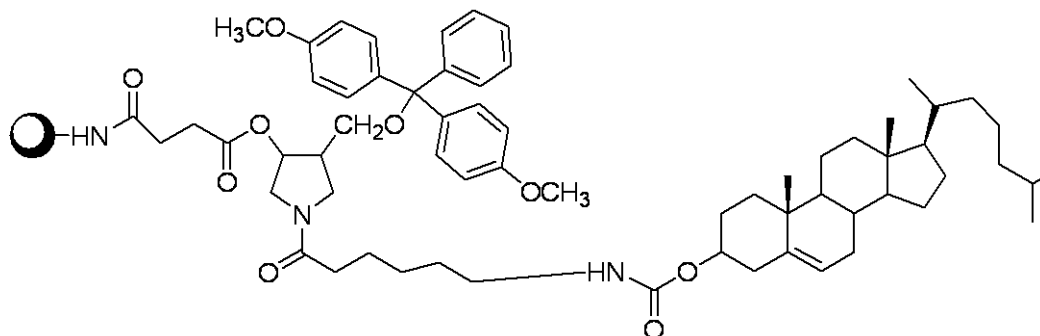
50

し、氷冷クエン酸水溶液（５重量％、３０ｍＬ）および水（２×２０ｍＬ）で洗浄した。該有機相を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮乾固した。残渣をそのまま次のステップに使用した。

【０２２２】

コレステロール誘導体化ＣＰＧ ＡＩ

【化１０】



10

AI

【０２２３】

コハク酸ＡＨ（０．２５４ｇ、０．２４２ミリモル）を、ジクロロメタン／アセトニトリル（３：２、３ｍＬ）の混合物に溶解した。その溶液に、アセトニトリル（１．２５ｍＬ）中のＤＭＡＰ（０．０２９６ｇ、０．２４２ミリモル）、アセトニトリル／ジクロロエタン（３：１、１．２５ｍＬ）中の２，２－ジチオ－ビス（５－ニトロピリジン）（０．０７５ｇ、０．２４２ミリモル）を順次添加した。得られた溶液に、アセトニトリル（０．６ｍＬ）中のトリフェニルホスフィン（０．０６４ｇ、０．２４２ミリモル）を添加した。反応混合物の色が鮮やかな橙色に変わった。この溶液を、手首動作式振盪機（wrist-action shaker）を使用して短く攪拌した（５分）。長鎖アルキルアミン－ＣＰＧ（ＬＣＡＡ－ＣＰＧ）（１．５ｇ、６１ｍＭ）を添加した。懸濁液を２時間攪拌した。焼結漏斗を通してＣＰＧを濾過し、アセトニトリル、ジクロロメタン、およびエーテルで順次洗浄した。無水酢酸／ピリジンを使用して未反応のアミノ基を遮蔽した。達成されたＣＰＧの装填を、ＵＶ測定値を取ることによって測定した（３７ｍＭ／ｇ）。

20

30

【０２２４】

５－１２－ドデカン酸ビスデシルアミド（bisdecylamide）基（本明細書で「５－Ｃ３２－」と称される）または５－コレステリル誘導体基（本明細書で「５－Chol－」と称される）を担持するsiRNAの合成は、コレステリル誘導体について、酸化ステップが、核酸オリゴマーの５末端にホスホロチオエート結合を導入するために、Beaucage試薬を使用して行われたことを除いて、国際公開ＷＯ第２００４／０６５６０１号に記載されるように行った。

【０２２５】

核酸配列を、標準的なヌクレオチド命名法、具体的には、表１の略語を使用して、以下に示す。

40

【０２２６】

表１：略

核酸配列に使用されるヌクレオチドモノマーの略語の説明。これらのモノマーは、オリゴヌクレオチドが存在する場合、５－３－ホスホジエステル結合によって相互に結合することが理解されよう。

【表 1】

略語	ヌクレオチド
A	アデノシン-3' -リン酸
C	シチジン-3' -リン酸
G	グアノシン-3' -リン酸
U	ウリジン-3' -リン酸
N	任意のヌクレオチド(G、A、C、U、dT、T)
a	2' -O-メチルアデノシン-3' -リン酸
c	2' -O-メチルシチジン-3' -リン酸
g	2' -O-メチルグアノシン-3' -リン酸
u	2' -O-メチルウリジン-3' -リン酸
T、dT	2' -デオキシチミジン-3' -リン酸
sT、sdT	2' -デオキシチミジン-5' リン酸-ホスホロチオエート

10

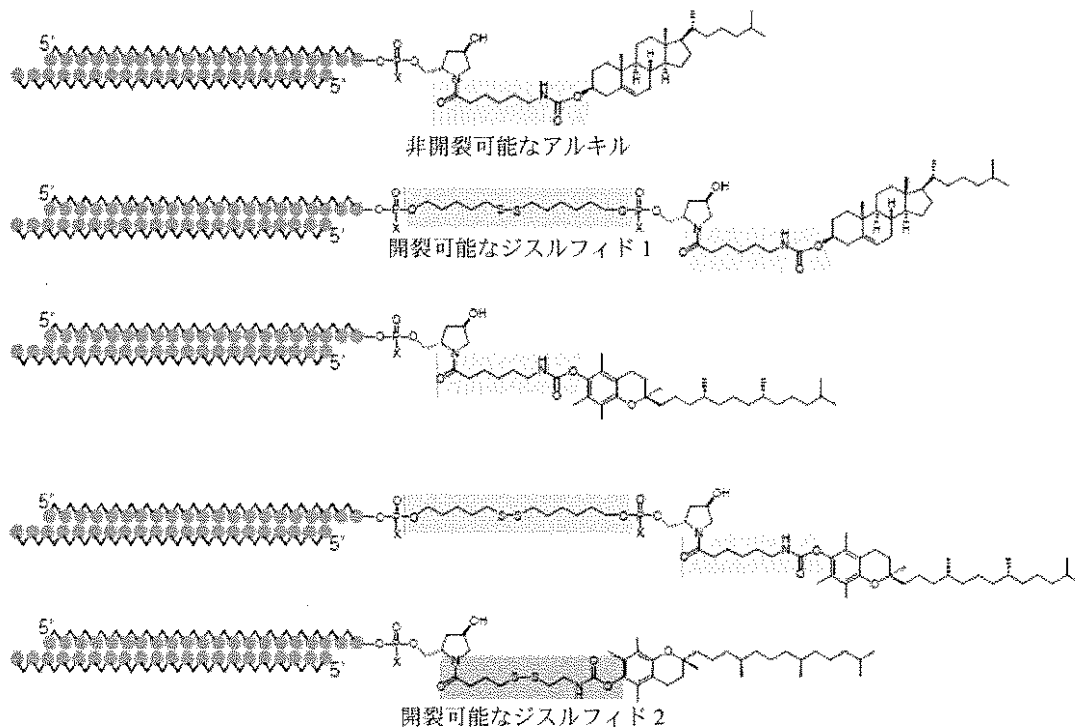
## 【 0 2 2 7 】

## 共役した s i R N A

コレステロールおよびビタミン E 等のリガンドに共役された s i R N A の調製を、スキーム 1 および 2 に示す。

20

## 【化 1 1】

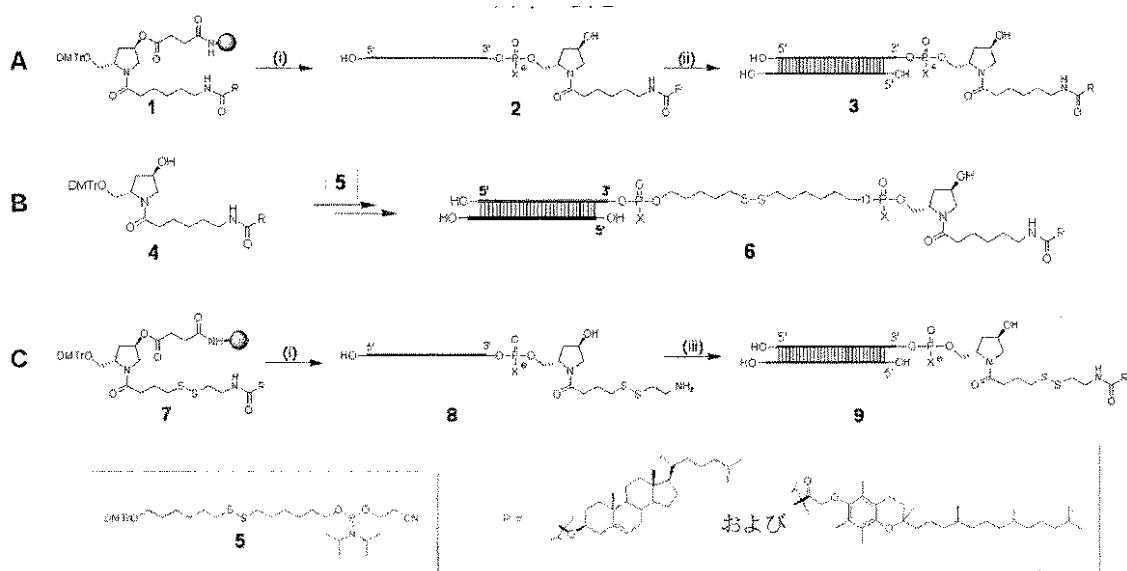


30

X=OまたはS

スキーム 1

40



10

スキーム 2. siRNA 親油性コンジュゲートの合成。A、B: 列上および C: 合成後のコンジュゲーション。(i) a. 固相の合成、b. 脱保護、および c. HPLC 精製、(ii) 相補鎖を用いたアニーリング、(iii) a. リガンドへの合成後の共役および b. 相補鎖を用いたアニーリング。X=O または S。

20

## 【 0 2 2 8 】

### 実施例 2 A. T T R の s i R N A 設計

#### 転写物

s i R N A 設計は、ヒト (記号 T T R) およびラット (記号 T t r) からの遺伝子トランスクリプトを標的とする s i R N A を同定するように行われた。該設計は、N C B I R e f s e q 収集からの T T R の転写物 N M \_ 0 0 0 3 7 1 . 2 (配列番号 1 3 2 9) (ヒト) および N M \_ 0 1 2 6 8 1 . 1 (配列番号 1 3 3 0) (ラット) を使用した。それらのそれぞれの T T R 遺伝子に 1 0 0 % 同一性がある、s i R N A 二重鎖を設計した。

## 【 0 2 2 9 】

### s i R N A 設計および特異性の予測

全ての可能な 1 9 塩基 (mer) の予測された特異性を、それぞれの配列に対して決定した。T T R の s i R N A を、F A S T A アルゴリズムを用いて、ヒトおよびラットのトランスクリプトーム (N C B I R e f s e q セット内の N M \_ および X M \_ の記録のセットとして定義される) に対する包括的検索において使用した。次いで、P y t h o n スクリプト「オフターゲット F a s t a . p y」を使用して、整列を解析し、s i R N A と任意の潜在的「オフターゲット」転写物との間のミスマッチの位置および数に基づいてスコアを得た。該オフターゲットスコアは、分子の 5' 末端から 2 ~ 9 位での、s i R N A の「播種」領域の差異を強調するように重み付けする。該オフターゲットスコアは、以下のとおり算出される。オリゴと転写物との間のミスマッチに、ペナルティーを課す。オリゴの 2 ~ 9 位での、播種領域のミスマッチには、2 . 8 のペナルティーを課し、推定切断部位 1 0 および 1 1 のミスマッチには、1 . 2 のペナルティーを課し、1 2 ~ 1 9 位でのミスマッチには、1 のペナルティーを課す。1 位でのミスマッチは、考慮されない。次いで、それぞれのオリゴ転写物対のオフターゲットスコアが、ミスマッチのペナルティーを合計することによって計算される。次いで、全てのオリゴ転写物対からの最小オフターゲットスコアを決定し、オリゴのその後の分類に使用する。両方の s i R N A 鎖を、算出したスコアに従って、特異性のカテゴリーに割り当てた。3 を超えるスコアは、高度の特異性があり、3 に等しいスコアは、特異性があり、2 . 2 ~ 2 . 8 のスコアは、中程度の特異性があると見なす。どのオリゴが合成されるべきか選択するときに、アンチセンス鎖のオフターゲットスコアを、降順に並べ、ヒトからの最良の 1 4 4 個 (最小オフターゲットスコア) オリゴ対、およびラットからの最良の 2 6 個の対を選択した。

30

40

50

## 【 0 2 3 0 】

s i R N A の配列選択

ヒト T T R に由来する合計 1 4 0 個のセンスおよび 1 4 0 個のアンチセンスの s i R N A オリゴを合成し、二重鎖に形成した。ラット T T R に由来する合計 2 6 個のセンスおよび 2 6 個のアンチセンスの s i R N A オリゴを合成し、二重鎖に形成した。二重鎖を、表 2 ~ 4 ( ヒト T T R ) および表 5 ~ 7 ( ラット T T R ) に示す。

## 【表 2 - 1】

ヒト T T R の d s R N A 用の認識番号

オリゴの配列および修飾については、表 4 を参照されたい

。

二重鎖#	センス オリゴ#	アンチセンス オリゴ#
AD-18243	A-32153	A-32154
AD-18244	A-32155	A-32156
AD-18245	A-32157	A-32158
AD-18246	A-32159	A-32160
AD-18247	A-32163	A-32164
AD-18248	A-32165	A-32166
AD-18249	A-32167	A-32168
AD-18250	A-32169	A-32170
AD-18251	A-32171	A-32172
AD-18252	A-32175	A-32176
AD-18253	A-32177	A-32178
AD-18254	A-32179	A-32180
AD-18255	A-32181	A-32182
AD-18256	A-32183	A-32184
AD-18257	A-32187	A-32188
AD-18258	A-32189	A-32190
AD-18259	A-32191	A-32192
AD-18260	A-32193	A-32194
AD-18261	A-32195	A-32196
AD-18262	A-32199	A-32200
AD-18263	A-32201	A-32202
AD-18264	A-32203	A-32204
AD-18265	A-32205	A-32206
AD-18266	A-32207	A-32208
AD-18267	A-32211	A-32212
AD-18268	A-32213	A-32214
AD-18269	A-32215	A-32216
AD-18270	A-32217	A-32218
AD-18271	A-32219	A-32220
AD-18272	A-32221	A-32222

10

20

30

40

【表 2 - 2】

AD-18273	A-32223	A-32224
AD-18274	A-32225	A-32226
AD-18275	A-32227	A-32228
AD-18276	A-32229	A-32230
AD-18277	A-32231	A-32232
AD-18278	A-32233	A-32234
AD-18279	A-32235	A-32236
AD-18280	A-32237	A-32238
AD-18281	A-32239	A-32240
AD-18282	A-32241	A-32242
AD-18283	A-32243	A-32244
AD-18284	A-32247	A-32248
AD-18285	A-32249	A-32250
AD-18286	A-32251	A-32252
AD-18287	A-32253	A-32254
AD-18288	A-32255	A-32256
AD-18289	A-32259	A-32260
AD-18290	A-32261	A-32262
AD-18291	A-32263	A-32264
AD-18292	A-32265	A-32266
AD-18293	A-32267	A-32268
AD-18294	A-32269	A-32270
AD-18295	A-32271	A-32272
AD-18296	A-32273	A-32274
AD-18297	A-32275	A-32276
AD-18298	A-32277	A-32278
AD-18299	A-32279	A-32280
AD-18300	A-32281	A-32282
AD-18301	A-32283	A-32284
AD-18302	A-32285	A-32286
AD-18303	A-32287	A-32288
AD-18304	A-32289	A-32290
AD-18305	A-32291	A-32292
AD-18306	A-32295	A-32296

10

20

30

【表 2 - 3】

AD-18307	A-32297	A-32298
AD-18308	A-32299	A-32300
AD-18309	A-32301	A-32302
AD-18310	A-32303	A-32304
AD-18311	A-32307	A-32308
AD-18312	A-32309	A-32310
AD-18313	A-32311	A-32312
AD-18314	A-32313	A-32314
AD-18315	A-32315	A-32316
AD-18316	A-32319	A-32320
AD-18317	A-32321	A-32322
AD-18318	A-32323	A-32324
AD-18319	A-32325	A-32326
AD-18320	A-32327	A-32328
AD-18321	A-32331	A-32332
AD-18322	A-32333	A-32334
AD-18323	A-32335	A-32336
AD-18324	A-32337	A-32338
AD-18325	A-32339	A-32340
AD-18326	A-32341	A-32342
AD-18327	A-32343	A-32344
AD-18328	A-32345	A-32346
AD-18329	A-32347	A-32348
AD-18330	A-32349	A-32350
AD-18331	A-32351	A-32352
AD-18332	A-32353	A-32354
AD-18333	A-32355	A-32356
AD-18334	A-32357	A-32358
AD-18335	A-32359	A-32360
AD-18336	A-32363	A-32364
AD-18337	A-32367	A-32368
AD-18338	A-32369	A-32370
AD-18339	A-32371	A-32372

10

20

30

【表 2 - 4】

AD-18340	A-32373	A-32374
AD-18341	A-32375	A-32376
AD-18342	A-32379	A-32380
AD-18343	A-32381	A-32382
AD-18344	A-32383	A-32384
AD-18345	A-32385	A-32386
AD-18346	A-32387	A-32388
AD-18347	A-32391	A-32392
AD-18348	A-32393	A-32394
AD-18349	A-32395	A-32396
AD-18350	A-32397	A-32398
AD-18351	A-32399	A-32400
AD-18352	A-32401	A-32402
AD-18353	A-32403	A-32404
AD-18354	A-32405	A-32406
AD-18355	A-32407	A-32408
AD-18356	A-32409	A-32410
AD-18357	A-32411	A-32412
AD-18358	A-32415	A-32416
AD-18359	A-32417	A-32418
AD-18360	A-32419	A-32420
AD-18361	A-32421	A-32422
AD-18362	A-32423	A-32424
AD-18363	A-32427	A-32428
AD-18364	A-32429	A-32430
AD-18446	A-32161	A-32162
AD-18447	A-32173	A-32174
AD-18448	A-32185	A-32186
AD-18449	A-32197	A-32198
AD-18450	A-32209	A-32210
AD-18451	A-32245	A-32246
AD-18452	A-32257	A-32258
AD-18453	A-32293	A-32294
AD-18454	A-32305	A-32306
AD-18455	A-32317	A-32318
AD-18456	A-32329	A-32330
AD-18457	A-32361	A-32362

10

20

30

40

【表 2 - 5】

AD-18458	A-32365	A-32366
AD-18459	A-32377	A-32378
AD-18460	A-32389	A-32390
AD-18461	A-32401	A-32402
AD-18462	A-32413	A-32414
AD-18463	A-32425	A-32426

【 0 2 3 1】

10

【表 3 A - 1】

ヒト T T R の d s R N A のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖：s = センス、a s = アンチセンス 位置 j : 転写物 ( N M \_ 0 0 0 3 7 1 . 2 、 配列番号 1 3 2 9 ) における 5' 位の塩基

鎖	位置	配列 (5' から 3' の方向)	配 列 番 号	3' のジヌクレオチドオ ーバーハングを有する 配列 (5' から 3' の方向)	配列番 号
S	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCC	1	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCNN	281
as	118	GGACACUUGGAUUCACCGG	2	GGACACUUGGAUUCACCGGNN	282
S	11	ACUCAUUCUUGGCAGGAUG	3	ACUCAUUCUUGGCAGGAUGNN	283
as	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGU	4	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUNN	284
S	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCA	5	AAGUGUCCUCUGAUGGUCANN	285
as	129	UGACCAUCAGAGGACACUU	6	UGACCAUCAGAGGACACUUNN	286
S	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGC	7	UCAUUCUUGGCAGGAUGGCNN	287
as	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGA	8	GCCAUCCUGCCAAGAAUGANN	288
s	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCG	9	AAGUUCUAGAUGCUGUCCGNN	289
as	148	CGGACAGCAUCUAGAACUU	10	CGGACAGCAUCUAGAACUUNN	290
s	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAG	11	GUUCUAGAUGCUGUCCGAGNN	291
as	150	CUCGGACAGCAUCUAGAAC	12	CUCGGACAGCAUCUAGACNN	292
s	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCA	13	CUAGAUGCUGUCCGAGGCANN	293
as	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAG	14	UGCCUCGGACAGCAUCUAGNN	294
s	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUC	15	GAUGCUGUCCGAGGCAGUCNN	295

20

30

as	156	GACUGCCUCGGACAGCAUC	16	GACUGCCUCGGACAGCAUCNN	296
s	14	CAUUCUUGGCAGGAUGGCU	17	CAUUCUUGGCAGGAUGGCUNN	297
as	32	AGCCAUCCUGCCAAGAAUG	18	AGCCAUCCUGCCAAGAAUGNN	298
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGUCCU	19	UGCUGUCCGAGGCAGUCCUNN	299
as	158	AGGACUGCCUCGGACAGCA	20	AGGACUGCCUCGGACAGCANN	300
s	146	CCGAGGCAGUCCUGCCAUC	21	CCGAGGCAGUCCUGCCAUCNN	301
as	164	GAUGGCAGGACUGCCUCGG	22	GAUGGCAGGACUGCCUCGGNN	302
s	152	CAGUCCUGCCAUCAUGUG	23	CAGUCCUGCCAUCAUGUGNN	303
as	170	CACAUUGAUGGCAGGACUG	24	CACAUUGAUGGCAGGACUGNN	304
s	164	CAAUGUGGCCGUGCAUGUG	25	CAAUGUGGCCGUGCAUGUGNN	305
as	182	CACAUGCACGGCCACAUUG	26	CACAUGCACGGCCACAUUGNN	306
s	178	AUGUGUUCAGAAAGGCUGC	27	AUGUGUUCAGAAAGGCUGCNN	307
as	196	GCAGCCUUUCUGAACACAU	28	GCAGCCUUUCUGAACACAUNN	308
s	2	CAGAAGUCCACUCAUUCUU	29	CAGAAGUCCACUCAUUCUUNN	309
as	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUG	30	AAGAAUGAGUGGACUUCUGNN	310
s	21	GGCAGGAUGGCUUCUCAUC	31	GGCAGGAUGGCUUCUCAUCNN	311
as	39	GAUGAGAAGCCAUCCUGCC	32	GAUGAGAAGCCAUCCUGCCNN	312

【表 3 A - 2】

s	210	GAGCCAUUUGCCUCUGGGA	33	GAGCCAUUUGCCUCUGGGANN	313
as	228	UCCCAGAGGCAAAUGGCUC	34	UCCCAGAGGCAAAUGGCUCNN	314
s	23	CAGGAUGGCUUCUCAUCGU	35	CAGGAUGGCUUCUCAUCGUNN	315
as	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUG	36	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGNN	316
s	24	AGGAUGGCUUCUCAUCGUC	37	AGGAUGGCUUCUCAUCGUCNN	317
as	42	GACGAUGAGAAGCCAUCCU	38	GACGAUGAGAAGCCAUCCUNN	318
s	245	AGAGCUGCAUGGGCUCACA	39	AGAGCUGCAUGGGCUCACANN	319
as	263	UGUGAGCCCAUGCAGCUCU	40	UGUGAGCCCAUGCAGCUCUNN	320
s	248	GCUGCAUGGGCUCACAACU	41	GCUGCAUGGGCUCACAACUNN	321
as	266	AGUUGUGAGCCCAUGCAGC	42	AGUUGUGAGCCCAUGCAGCNN	322
s	25	GGAUGGCUUCUCAUCGUCU	43	GGAUGGCUUCUCAUCGUCUNN	323
as	43	AGACGAUGAGAAGCCAUCC	44	AGACGAUGAGAAGCCAUCCNN	324
s	251	GCAUGGGCUCACAACUGAG	45	GCAUGGGCUCACAACUGAGNN	325
as	269	CUCAGUUGUGAGCCCAUGC	46	CUCAGUUGUGAGCCCAUGCNN	326
s	253	AUGGGCUCACAACUGAGGA	47	AUGGGCUCACAACUGAGGANN	327

10

20

30

as	271	UCCUCAGUUGUGAGCCCAU	48	UCCUCAGUUGUGAGCCCAUNN	328
s	254	UGGGCUCACAACUGAGGAG	49	UGGGCUCACAACUGAGGAGNN	329
as	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCCA	50	CUCCUCAGUUGUGAGCCCANN	330
s	270	GAGGAAUUUGUAGAAGGGA	51	GAGGAAUUUGUAGAAGGGANN	331
as	288	UCCCUUCUACAAAUCCUC	52	UCCCUUCUACAAAUCCUCNN	332
s	276	UUUGUAGAAGGGAUUAACA	53	UUUGUAGAAGGGAUUAACANN	333
as	294	UGUAUAUCCCUUCUACAAA	54	UGUAUAUCCCUUCUACAAANN	334
s	277	UUGUAGAAGGGAUUAACAA	55	UUGUAGAAGGGAUUAACAANN	335

as	295	UUGUAUAUCCCUUCUACAA	56	UUGUAUAUCCCUUCUACAANN	336
s	278	UGUAGAAGGGGAUAUACAAA	57	UGUAGAAGGGGAUAUACAAANN	337
as	296	UUUGUAUAUCCCUUCUACA	58	UUUGUAUAUCCCUUCUACANN	338
s	281	AGAAGGGGAUAUACAAAGUG	59	AGAAGGGGAUAUACAAAGUGNN	339
as	299	CACUUUGUAUAUCCCUUCU	60	CACUUUGUAUAUCCCUUCUNN	340
s	295	AAGUGGAAAUAAGACACCAA	61	AAGUGGAAAUAAGACACCAANN	341
as	313	UUGGUGUCUAUUUCCACUU	62	UUGGUGUCUAUUUCCACUUNN	342
s	299	GGAAAUAAGACACCAAAUCU	63	GGAAAUAAGACACCAAAUCUNN	343
as	317	AGAUUUGGUGUCUAUUUCC	64	AGAUUUGGUGUCUAUUUCCNN	344
s	300	GAAAUAAGACACCAAAUCUU	65	GAAAUAAGACACCAAAUCUUNN	345
as	318	AAGAUUUGGUGUCUAUUUC	66	AAGAUUUGGUGUCUAUUUCNN	346
s	303	AUAGACACCAAAUCUUACU	67	AUAGACACCAAAUCUUACUNN	347
as	321	AGUAAGAUUUGGUGUCUAU	68	AGUAAGAUUUGGUGUCUAUNN	348
s	304	UAGACACCAAAUCUUACUG	69	UAGACACCAAAUCUUACUGNN	349
as	322	CAGUAAGAUUUGGUGUCUA	70	CAGUAAGAUUUGGUGUCUANN	350
s	305	AGACACCAAAUCUUACUGG	71	AGACACCAAAUCUUACUGGNN	351

10

20

30

【表 3 A - 3】

as	323	CCAGUAAGAUUUGGUGUCU	72	CCAGUAAGAUUUGGUGUCUNN	352
s	317	UUACUGGAAGGCACUUGGC	73	UUACUGGAAGGCACUUGGCNN	353
as	335	GCCAAGUGCCUCCAGUAA	74	GCCAAGUGCCUCCAGUAANN	354
s	32	UUCUCAUCGUCUGCUCUC	75	UUCUCAUCGUCUGCUCUCNN	355
as	50	GAGGAGCAGACGAUGAGAA	76	GAGGAGCAGACGAUGAGAANN	356
s	322	GGAAGGCACUUGGCAUCUC	77	GGAAGGCACUUGGCAUCUCNN	357
as	340	GAGAUGCCAAGUGCCUCC	78	GAGAUGCCAAGUGCCUCCNN	358
s	326	GGCACUUGGCAUCUCCCA	79	GGCACUUGGCAUCUCCCAN	359
as	344	UGGGGAGAUGCCAAGUGCC	80	UGGGGAGAUGCCAAGUGCCNN	360
s	333	GGCAUCUCCCAUCCAUG	81	GGCAUCUCCCAUCCAUGNN	361
as	351	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTT	82	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTTNN	362
s	334	GCAUCUCCCAUCCAUGA	83	GCAUCUCCCAUCCAUGANN	363
as	352	UCAUGGAAUGGGGAGAUGC	84	UCAUGGAAUGGGGAGAUGCNN	364
s	335	CAUCUCCCAUCCAUGAG	85	CAUCUCCCAUCCAUGAGNN	365
as	353	CUCAUGGAAUGGGGAGAUG	86	CUCAUGGAAUGGGGAGAUGNN	366
s	336	AUCUCCCAUCCAUGAGC	87	AUCUCCCAUCCAUGAGCNN	367
as	354	GCUCAUGGAAUGGGGAGAU	88	GCUCAUGGAAUGGGGAGAUNN	368
s	338	CUCCCAUCCAUGAGCAU	89	CUCCCAUCCAUGAGCAUNN	369
as	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAG	90	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGNN	370
s	341	CCCAUCCAUGAGCAUGCA	91	CCCAUCCAUGAGCAUGCANN	371

10

20

30

40

as	359	UGCAUGCUC AUGGAAUGGG	92	UGCAUGCUC AUGGAAUGGGNN	372
s	347	CCAUGAGCAUGCAGAGGUG	93	CCAUGAGCAUGCAGAGGUGNN	373
as	365	CACCUCUGCAUGCUC AUGG	94	CACCUCUGCAUGCUC AUGGNN	374
s	352	AGCAUGCAGAGGUGGUAUU	95	AGCAUGCAGAGGUGGUAUUNN	375
as	370	AAUACCACCUCUGCAUGCU	96	AAUACCACCUCUGCAUGCUNN	376
s	354	CAUGCAGAGGUGGUAUUCA	97	CAUGCAGAGGUGGUAUUCANN	377
as	372	UGAAUACCACCUCUGCAUG	98	UGAAUACCACCUCUGCAUGNN	378
s	355	AUGCAGAGGUGGUAUUCAC	99	AUGCAGAGGUGGUAUUCACNN	379
as	373	GUGAAUACCACCUCUGCAU	100	GUGAAUACCACCUCUGCAUNN	380
s	362	GGUGGUAUUCACAGCCAAC	101	GGUGGUAUUCACAGCCAACNN	381
as	380	GUUGGCUGUGAAUACCACC	102	GUUGGCUGUGAAUACCACNN	382
s	363	GUGGUAUUCACAGCCAACG	103	GUGGUAUUCACAGCCAACGNN	383
as	381	CGUUGGCUGUGAAUACCAC	104	CGUUGGCUGUGAAUACCACNN	384
s	364	UGGUAUUCACAGCCAACGA	105	UGGUAUUCACAGCCAACGANN	385
as	382	UCGUUGGCUGUGAAUACCA	106	UCGUUGGCUGUGAAUACCANN	386
s	365	GGUAUUCACAGCCAACGAC	107	GGUAUUCACAGCCAACGACNN	387
as	383	GUCGUUGGCUGUGAAUACC	108	GUCGUUGGCUGUGAAUACCNN	388
s	366	GUAUUCACAGCCAACGACU	109	GUAUUCACAGCCAACGACUNN	389

10

20

30

【表 3 A - 4】

as	384	AGUCGUUGGCUGUGAAUAC	110	AGUCGUUGGCUGUGAAUACNN	390
s	367	UAUUCACAGCCAACGACUC	111	UAUUCACAGCCAACGACUCNN	391
as	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAUA	112	GAGUCGUUGGCUGUGAAUANN	392
s	370	UCACAGCCAACGACUCCGG	113	UCACAGCCAACGACUCCGGNN	393
as	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGA	114	CCGGAGUCGUUGGCUGUGANN	394
s	390	CCCCGCCGCUACACCAUUG	115	CCCCGCCGCUACACCAUUGNN	395
as	408	CAAUGGUGUAGCGGCGGGG	116	CAAUGGUGUAGCGGCGGGGNN	396
s	4	GAAGUCCACUCAUUCUUGG	117	GAAGUCCACUCAUUCUUGGNN	397
as	22	CCAAGAAUGAGUGGACUUC	118	CCAAGAAUGAGUGGACUUCNN	398
s	412	CCCUGCUGAGCCCCUACUC	119	CCCUGCUGAGCCCCUACUCNN	399
as	430	GAGUAGGGGCUCAGCAGGG	120	GAGUAGGGGCUCAGCAGGGNN	400
s	417	CUGAGCCCCUACUCCUAUU	121	CUGAGCCCCUACUCCUAUUNN	401
as	435	AAUAGGAGUAGGGGCUCAG	122	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGNN	402
s	418	UGAGCCCCUACUCCUAUUC	123	UGAGCCCCUACUCCUAUUCNN	403
as	436	GAAUAGGAGUAGGGGCUCA	124	GAAUAGGAGUAGGGGCUCANN	404
s	422	CCCCUACUCCUAUUCCACC	125	CCCCUACUCCUAUUCCACCNN	405
as	440	GGUGGAAUAGGAGUAGGGG	126	GGUGGAAUAGGAGUAGGGGNN	406
s	425	CUACUCCUAUUCCACCACG	127	CUACUCCUAUUCCACCACGNN	407
as	443	CGUGGUGGAAUAGGAGUAG	128	CGUGGUGGAAUAGGAGUAGNN	408
s	426	UACUCCUAUUCCACCACGG	129	UACUCCUAUUCCACCACGGNN	409

10

20

30

40

as	444	CCGUGGUGGAAUAGGAGUA	130	CCGUGGUGGAAUAGGAGUANN	410
s	427	ACUCCUAUUCACCACGGC	131	ACUCCUAUUCACCACGGCNN	411
as	445	GCCGUGGUGGAAUAGGAGU	132	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUNN	412
s	429	UCCUAUUCACCACGGCUG	133	UCCUAUUCACCACGGCUGNN	413
as	447	CAGCCGUGGUGGAAUAGGA	134	CAGCCGUGGUGGAAUAGGANN	414
s	432	UAUUCACCACGGCUGUCG	135	UAUUCACCACGGCUGUCGNN	415
as	450	CGACAGCCGUGGUGGAAUA	136	CGACAGCCGUGGUGGAAUANN	416
s	433	AUUCACCACGGCUGUCGU	137	AUUCACCACGGCUGUCGUNN	417
as	451	ACGACAGCCGUGGUGGAAU	138	ACGACAGCCGUGGUGGAAUNN	418
s	437	CACCACGGCUGUCGUCACC	139	CACCACGGCUGUCGUCACCNN	419
as	455	GGUGACGACAGCCGUGGUG	140	GGUGACGACAGCCGUGGUGNN	420
s	438	ACCACGGCUGUCGUCACCA	141	ACCACGGCUGUCGUCACCANN	421
as	456	UGGUGACGACAGCCGUGGU	142	UGGUGACGACAGCCGUGGUNN	422
s	439	CCACGGCUGUCGUCACCAA	143	CCACGGCUGUCGUCACCAANN	423
as	457	UUGGUGACGACAGCCGUGG	144	UUGGUGACGACAGCCGUGGNN	424
s	441	ACGGCUGUCGUCACCAAUC	145	ACGGCUGUCGUCACCAAUCNN	425
as	459	GAUUGGUGACGACAGCCGU	146	GAUUGGUGACGACAGCCGUNN	426
s	442	CGGCUGUCGUCACCAAUCC	147	CGGCUGUCGUCACCAAUCCNN	427

10

20

30

【表 3 A - 5】

as	460	GGAUUGGUGACGACAGCCG	148	GGAUUGGUGACGACAGCCGNN	428
s	449	CGUCACCAAUCCCAAGGAA	149	CGUCACCAAUCCCAAGGAANN	429
as	467	UUCUUGGGAUUGGUGACG	150	UUCUUGGGAUUGGUGACGNN	430
s	455	CAAUCCCAAGGAAUGAGGG	151	CAAUCCCAAGGAAUGAGGGNN	431
as	473	CCCUCAUUCUUGGGAUUG	152	CCCUCAUUCUUGGGAUUGNN	432
s	491	CCUGAAGGACGAGGGAUGG	153	CCUGAAGGACGAGGGAUGGNN	433
as	509	CCAUCCCUCGUCCUUCAGG	154	CCAUCCCUCGUCCUUCAGGNN	434
s	497	GGACGAGGGAUGGGAUUUC	155	GGACGAGGGAUGGGAUUUCNN	435
as	515	GAAAUCCCAUCCCUCGUCC	156	GAAAUCCCAUCCCUCGUCCNN	436
s	5	AAGUCCACUCAUUCUUGGC	157	AAGUCCACUCAUUCUUGGCNN	437
as	23	GCCAAGAAUGAGUGGACUU	158	GCCAAGAAUGAGUGGACUUNN	438
s	508	GGGAUUUCAUGUAACCAAG	159	GGGAUUUCAUGUAACCAAGNN	439
as	526	CUUGGUUACAUGAAAUCCC	160	CUUGGUUACAUGAAAUCCCN	440
s	509	GGAUUUCAUGUAACCAAGA	161	GGAUUUCAUGUAACCAAGANN	441
as	527	UCUUGGUUACAUGAAAUCC	162	UCUUGGUUACAUGAAAUCCNN	442
s	514	UCAUGUAACCAAGAGUAUU	163	UCAUGUAACCAAGAGUAUUNN	443
as	532	AAUACUCUUGGUUACAUGA	164	AAUACUCUUGGUUACAUGANN	444
s	516	AUGUAACCAAGAGUAUUC	165	AUGUAACCAAGAGUAUUCNN	445
as	534	GGAAUACUCUUGGUUACAU	166	GGAAUACUCUUGGUUACAUNN	446
s	517	UGUAACCAAGAGUAUCCA	167	UGUAACCAAGAGUAUCCANN	447
as	535	UGGAAUACUCUUGGUUACA	168	UGGAAUACUCUUGGUUACANN	448
s	518	GUAACCAAGAGUAUCCA	169	GUAACCAAGAGUAUCCAUNN	449

10

20

as	536	AUGGAAUACUCUUGGUUAC	170	AUGGAAUACUCUUGGUUACNN	450
s	54	UGCCUUGCUGGACUGGUAU	171	UGCCUUGCUGGACUGGUUUNN	451
as	72	AUACCAGUCCAGCAAGGCA	172	AUACCAGUCCAGCAAGGCANN	452
s	543	UAAAGCAGUGUUUUCACCU	173	UAAAGCAGUGUUUUCACCUNN	453
as	561	AGGUGAAAACACUGCUUUA	174	AGGUGAAAACACUGCUUUANN	454
s	55	GCCUUGCUGGACUGGUAAU	175	GCCUUGCUGGACUGGUUUUNN	455
as	73	AAUACCAGUCCAGCAAGGC	176	AAUACCAGUCCAGCAAGGCNN	456
s	551	UGUUUUCACCUCAUAUGCU	177	UGUUUUCACCUCAUAUGCUNN	457
as	569	AGCAUAUGAGGUGAAAACA	178	AGCAUAUGAGGUGAAAACANN	458
s	552	GUUUUCACCUCAUAUGCUA	179	GUUUUCACCUCAUAUGCUNN	459
as	570	UAGCAUAUGAGGUGAAAAC	180	UAGCAUAUGAGGUGAAAACNN	460
s	553	UUUUCACCUCAUAUGCUAU	181	UUUUCACCUCAUAUGCUNN	461
as	571	AUAGCAUAUGAGGUGAAAA	182	AUAGCAUAUGAGGUGAAAAANN	462
s	555	UUCACCUCAUAUGCUAUGU	183	UUCACCUCAUAUGCUAUGUNN	463
as	573	ACAUAAGCAUAUGAGGUGAA	184	ACAUAAGCAUAUGAGGUGAANN	464
s	557	CACCUCAUAUGCUAUGUUA	185	CACCUCAUAUGCUAUGUUANN	465
as	575	UAACAUAAGCAUAUGAGGUG	186	UAACAUAAGCAUAUGAGGUGNN	466

30

40

【表 3 A - 6】

s	56	CCUUGCUGGACUGGUUUUU	187	CCUUGCUGGACUGGUUUUNN	467
as	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGG	188	AAAUACCAGUCCAGCAAGGNN	468
s	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUC	189	AUAUGCUAUGUUAGAAGUCNN	469
as	581	GACUUCUAACAUAGCAUAU	190	GACUUCUAACAUAGCAUAUNN	470
s	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCC	191	UAUGCUAUGUUAGAAGUCCNN	471
as	582	GGACUUCUAACAUAGCAUA	192	GGACUUCUAACAUAGCAUANN	472
s	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAG	193	UGCUAUGUUAGAAGUCCAGNN	473
as	584	CUGGACUUCUAACAUAGCA	194	CUGGACUUCUAACAUAGCANN	474
s	57	CUUGCUGGACUGGUUUUUG	195	CUUGCUGGACUGGUUUUGNN	475
as	75	CAAAUACCAGUCCAGCAAG	196	CAAAUACCAGUCCAGCAAGNN	476
s	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUA	197	AGUCCAGGCAGAGACAAUANN	477
as	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTT	198	AUUGUCUCUGCCUGGACUTTNN	478
s	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAA	199	UCCAGGCAGAGACAAUAAANN	479
as	598	UUUAUUGUCUCUGCCUGGA	200	UUUAUUGUCUCUGCCUGGANN	480
s	607	GUGAAAGGCACUUUUCAUU	201	GUGAAAGGCACUUUUCAUUNN	481
as	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCAC	202	AAUGAAAAGUGCCUUUCACNN	482
s	62	UGGACUGGUUUUGUGUCU	203	UGGACUGGUUUUGUGUCUNN	483
as	80	AGACACAAAUACCAGUCCA	204	AGACACAAAUACCAGUCCANN	484
s	77	GUCUGAGGCUGGCCUACG	205	GUCUGAGGCUGGCCUACGNN	485

10

20

as	95	CGUAGGGCCAGCCUCAGAC	206	CGUAGGGCCAGCCUCAGACNN	486
s	79	CUGAGGCUGGCCCUACGGG	207	CUGAGGCUGGCCCUACGGGNN	487
as	97	CCCGUAGGGCCAGCCUCAG	208	CCCGUAGGGCCAGCCUCAGNN	488
s	81	GAGGCUGGCCCUACGGGCA	209	GAGGCUGGCCCUACGGGCANN	489
as	99	UGCCCGUAGGGCCAGCCUC	210	UGCCCGUAGGGCCAGCCUCNN	490
s	82	AGGCUGGCCCUACGGGCAC	211	AGGCUGGCCCUACGGGCACNN	491
as	100	GUGCCCGUAGGGCCAGCCU	212	GUGCCCGUAGGGCCAGCCUNN	492
s	84	GCUGGCCCUACGGGCACCG	213	GCUGGCCCUACGGGCACCGNN	493
as	102	CGGUGCCCGUAGGGCCAGC	214	CGGUGCCCGUAGGGCCAGCNN	494
s	85	CUGGCCCUACGGGCACCGG	215	CUGGCCCUACGGGCACCGGNN	495
as	103	CCGGUGCCCGUAGGGCCAG	216	CCGGUGCCCGUAGGGCCAGNN	496
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUG	217	GGCCCUACGGGCACCGGUGNN	497
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCC	218	CACCGGUGCCCGUAGGGCCNN	498
s	9	CCACUCAUUCUUGGCAGGA	219	CCACUCAUUCUUGGCAGGANN	499
as	27	UCCUGCCAAGAAUGAGUGG	220	UCCUGCCAAGAAUGAGUGGNN	500
s	90	CCUACGGGCACCGGUGAAU	221	CCUACGGGCACCGGUGAAUNN	501
as	108	AUUCACCGGUGCCCGUAGG	222	AUUCACCGGUGCCCGUAGGNN	502
s	91	CUACGGGCACCGGUGAAUC	223	CUACGGGCACCGGUGAAUCNN	503
as	109	GAUUCACCGGUGCCCGUAG	224	GAUUCACCGGUGCCCGUAGNN	504

30

40

【表 3 A - 7】

s	92	UACGGGCACCGGUGAAUCC	225	UACGGGCACCGGUGAAUCCNN	505
as	110	GGAUUCACCGGUGCCCGUA	226	GGAUUCACCGGUGCCCGUANN	506
s	93	ACGGGCACCGGUGAAUCCA	227	ACGGGCACCGGUGAAUCCANN	507
as	111	UGGAUUCACCGGUGCCCGU	228	UGGAUUCACCGGUGCCCGUNN	508
s	97	GCACCGGUGAAUCCAAGUG	229	GCACCGGUGAAUCCAAGUGNN	509
as	115	CACUUGGAUUCACCGGUGC	230	CACUUGGAUUCACCGGUGCNN	510
s	98	CACCGGUGAAUCCAAGUGU	231	CACCGGUGAAUCCAAGUGUNN	511
as	116	ACACUUGGAUUCACCGGUG	232	ACACUUGGAUUCACCGGUGNN	512
s	167	UGUGGCCAUGCAUGUGUUC	233	UGUGGCCAUGCAUGUGUUCNN	513
as	185	GAACACAUGCAUGGCCACA	234	GAACACAUGCAUGGCCACANN	514
s	168	GUGGCCAUGCAUGUGUUA	235	GUGGCCAUGCAUGUGUUCANN	515
as	186	UGAACACAUGCAUGGCCAC	236	UGAACACAUGCAUGGCCACNN	516
s	171	GCCAUGCAUGUGUUCAGAA	237	GCCAUGCAUGUGUUCAGAANN	517
as	189	UUCUGAACACAUGCAUGGC	238	UUCUGAACACAUGCAUGGCNN	518
s	432	UAUUCCACCACGGCUGUCA	239	UAUUCCACCACGGCUGUCANN	519
as	449	UGACAGCCGUGGUGGAAUA	240	UGACAGCCGUGGUGGAAUANN	520
s	447	GUCAUCACCAAUCCCAAGG	241	GUCAUCACCAAUCCCAAGGNN	521

10

20

as	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGAC	242	CCUUGGGAUUGGUGAUGACNN	522
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGU	243	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN	523
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGAC	244	ACUUUGACCAUCAGAGGACNN	524
s	122	GAUGGUCAAAGUUCUAGAU	245	GAUGGUCAAAGUUCUAGAUNN	525
as	140	AUCUAGAACUUUGACCAUC	246	AUCUAGAACUUUGACCAUCNN	526
s	139	AUGCUGUCCGAGGCAGUCC	247	AUGCUGUCCGAGGCAGUCCNN	527
as	157	GGACUGCCUCGGACAGCAU	248	GGACUGCCUCGGACAGCAUNN	528
s	172	CCGUGCAUGUGUUCAGAAA	249	CCGUGCAUGUGUUCAGAAAANN	529
as	190	UUUCUGAACACAUGCACGG	250	UUUCUGAACACAUGCACGGNN	530
s	238	AGUCUGGAGAGCUGCAUGG	251	AGUCUGGAGAGCUGCAUGGNN	531
as	256	CCAUGCAGCUCUCCAGACU	252	CCAUGCAGCUCUCCAGACUNN	532

30

s	252	CAUGGGCUCACAACUGAGG	253	CAUGGGCUCACAACUGAGGNN	533
as	270	CCUCAGUUGUGAGCCCAUG	254	CCUCAGUUGUGAGCCCAUGNN	534
s	33	UCUCAUCGUCUGCUCCUCC	255	UCUCAUCGUCUGCUCCUCCNN	535
as	51	GGAGGAGCAGACGAUGAGA	256	GGAGGAGCAGACGAUGAGANN	536
s	340	CCCCAUUCCAUGAGCAUGC	257	CCCCAUUCCAUGAGCAUGCNN	537
as	358	GCAUGCUCUAUGGAAUGGGG	258	GCAUGCUCUAUGGAAUGGGGNN	538
s	421	GCCCCUACUCCUAUUCAC	259	GCCCCUACUCCUAUUCACNN	539
as	439	GUGGAAUAGGAGUAGGGGC	260	GUGGAAUAGGAGUAGGGGCNN	540
s	431	CUAUUCCACCACGGCUGUC	261	CUAUUCCACCACGGCUGUCNN	541
as	449	GACAGCCGUGGUGGAAUAG	262	GACAGCCGUGGUGGAAUAGNN	542

40

【表 3 A - 8】

s	440	CACGGCUGUCGUCACCAAU	263	CACGGCUGUCGUCACCAAUNN	543
as	458	AUUGGUGACGACAGCCGUG	264	AUUGGUGACGACAGCCGUGNN	544
s	496	AGGACGAGGGAUGGGAUUU	265	AGGACGAGGGAUGGGAUUUNN	545
as	514	AAAUCCCAUCCCUCGUCCU	266	AAAUCCCAUCCCUCGUCCUNN	546
s	556	UCACCUCAUAUGCUAUGUU	267	UCACCUCAUAUGCUAUGUUNN	547
as	574	AACAUAGCAUAUGAGGUGA	268	AACAUAGCAUAUGAGGUGANN	548
s	559	CCUCAUAUGCUAUGUUAGA	269	CCUCAUAUGCUAUGUUAGANN	549
as	577	UCUAACAUAAGCAUAUGAGG	270	UCUAACAUAAGCAUAUGAGGNN	550
s	570	AUGUUAGAAGUCCAGGCAG	271	AUGUUAGAAGUCCAGGCAGNN	551
as	588	CUGCCUGGACUUCUAACAU	272	CUGCCUGGACUUCUAACAUNN	552
s	78	UCUGAGGCUGGCCCUCGCG	273	UCUGAGGCUGGCCCUCGCGNN	553
as	96	CCGUAGGGCCAGCCUCAGA	274	CCGUAGGGCCAGCCUCAGANN	554
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUG	275	GGCCCUACGGGCACCGGUGNN	555
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCC	276	CACCGGUGCCCGUAGGGCCNN	556
s	95	GGGCACCGGUGAAUCCAAG	277	GGGCACCGGUGAAUCCAAGNN	557
as	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCC	278	CUUGGAUUCACCGGUGCCCN	558
s	167	CCAUGCAUGUGUUCAGAAA	279	CCAUGCAUGUGUUCAGAAANN	559
as	185	UUUCUGAACACAUGCAUGG	280	UUUCUGAACACAUGCAUGGNN	560

10

20

【 0 2 3 2 】

【表 3 B - 1】

ヒト T T R の d s R N A のセンスおよびアンチセンス鎖配列			
鎖：s = センス、a s = アンチセンス 位置 j：転写物 (NM_000371.2、配列番号 1329) における 5' 位の塩基			
鎖	位置	3' のデオキシチミジンオーバーハングを有する配列 (5' から 3' の方向)	配列番号
s	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCdTdT	561
as	118	GGACACUUGGAUUCACCGGdTdT	562
s	11	ACUCAUUCUUGGCAGGAUGdTdT	563
as	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUdTdT	564
s	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCAdTdT	565
as	129	UGACCAUCAGAGGACACUdTdT	566
s	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGCdTdT	567
as	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGAdTdT	568
s	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCGdTdT	569
as	148	CGGACAGCAUCUAGAACUdTdT	570
s	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAGdTdT	571
as	150	CUCGGACAGCAUCUAGAACdTdT	572
s	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCAdTdT	573
as	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAGdTdT	574
s	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUCdTdT	575
as	156	GACUGCCUCGGACAGCAUCdTdT	576
s	14	CAUUCUUGGCAGGAUGGCUdTdT	577
as	32	AGCCAUCCUGCCAAGAAUGdTdT	578
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGUCCUdTdT	579
as	158	AGGACUGCCUCGGACAGCAdTdT	580
s	146	CCGAGGCAGUCCUGCCAUCdTdT	581
as	164	GAUGGCAGGACUGCCUCGGdTdT	582
s	152	CAGUCCUGCCAUCA AUGUGdTdT	583
as	170	CACAUUGAUGGCAGGACUGdTdT	584
s	164	CAAUGUGGCCGUGCAUGUGdTdT	585
as	182	CACAUGCACGCCACA UUGdTdT	586
s	178	AUGUGUUCAGAAAGGCUGCdTdT	587
as	196	GCAGCCUUUCUGAACACA UdTdT	588
s	2	CAGAAGUCCACUCAUUCUdTdT	589
as	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	590
s	21	GGCAGGAUGGCUUCUCAUCdTdT	591
as	39	GAUGAGAAGCCAUCCUGCCdTdT	592

10

20

30

40

【表 3 B - 2】

s	210	GAGCCAUUUGCCUCUGGGAdTdT	593
as	228	UCCCAGAGGCCAAAUGGCUCdTdT	594
s	23	CAGGAUGGCUUCUCAUCGUdTdT	595
as	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGdTdT	596
s	24	AGGAUGGCUUCUCAUCGUCdTdT	597
as	42	GACGAUGAGAAGCCAUCCUdTdT	598
s	245	AGAGCUGCAUGGGCUCACAdTdT	599
as	263	UGUGAGCCCAUGCAGCUCUdTdT	600
s	248	GCUGCAUGGGCUCACAACUdTdT	601
as	266	AGUUGUGAGCCCAUGCAGCdTdT	602
s	25	GGAUGGCUUCUCAUCGUCUdTdT	603
as	43	AGACGAUGAGAAGCCAUCCdTdT	604
s	251	GCAUGGGCUCACAACUGAGdTdT	605
as	269	CUCAGUUGUGAGCCCAUGCdTdT	606
s	253	AUGGGCUCACAACUGAGGAdTdT	607
as	271	UCCUCAGUUGUGAGCCCAUdTdT	608
s	254	UGGGCUCACAACUGAGGAGdTdT	609
as	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCCAdTdT	610
s	270	GAGGAAUUUGUAGAAGGGAdTdT	611
as	288	UCCCUUCUACAAAUUCCUCdTdT	612
s	276	UUUGUAGAAGGGAUUAUACAdTdT	613
as	294	UGUAUAUCCCUUCUACAAAdTdT	614
s	277	UUGUAGAAGGGAUUAUACAAdTdT	615
as	295	UUGUAUAUCCCUUCUACAAdTdT	616
s	278	UGUAGAAGGGAUUAUACAAAdTdT	617
as	296	UUUGUAUAUCCCUUCUACAdTdT	618

10

20

30

s	281	AGAAGGGAUUAUACAAAGUGdTdT	619
as	299	CACUUUGUAUAUCCCUUCUdTdT	620
s	295	AAGUGGAAAUAGACACCAAdTdT	621
as	313	UUGGUGUCUAUUUCCACUdTdT	622
s	299	GGAAAUAGACACCAAUCUdTdT	623
as	317	AGAUUUGGUGUCUAUUUCCdTdT	624
s	300	GAAAUAGACACCAAUCUdTdT	625
as	318	AAGAUUUGGUGUCUAUUUCdTdT	626
s	303	AUAGACACCAAUCUUACUdTdT	627
as	321	AGUAAGAUUUGGUGUCUAUdTdT	628
s	304	UAGACACCAAUCUUACUGdTdT	629
as	322	CAGUAAGAUUUGGUGUCUAdTdT	630
s	305	AGACACCAAUCUUACUGGdTdT	631
as	323	CCAGUAAGAUUUGGUGUCUdTdT	632
s	317	UUACUGGAAGGCACUUGGCdTdT	633
as	335	GCCAAGUGCCUCCAGUAAdTdT	634
s	32	UUCUCAUCGUCUGCUCCUCdTdT	635
as	50	GAGGAGCAGACGAUGAGAAAdTdT	636
s	322	GGAAGGCACUUGGCAUCUCdTdT	637

10

20

【表 3 B - 3】

as	340	GAGAUGCCAAGUGCCUUCcTdT	638
s	326	GGCACUUGGCAUCUCCCCAdTdT	639
as	344	UGGGGAGAUGCCAAGUGCCdTdT	640
s	333	GGCAUCUCCCCAUUCCAUGdTdT	641
as	351	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTTdTdT	642
s	334	GCAUCUCCCCAUUCCAUGAdTdT	643
as	352	UCAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	644
s	335	CAUCUCCCCAUUCCAUGAGdTdT	645
as	353	CUCAUGGAAUGGGGAGAUGdTdT	646
s	336	AUCUCCCCAUUCCAUGAGCdTdT	647
as	354	GCUCAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	648
s	338	CUCCCCAUUCCAUGAGCAUdTdT	649
as	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGdTdT	650
s	341	CCCAUUCCAUGAGCAUGCAdTdT	651
as	359	UGCAUGCUC AUGGAAUGGGdTdT	652
s	347	CCAUGAGCAUGCAGAGGUGdTdT	653
as	365	CACCUCUGCAUGCUC AUGGdTdT	654
s	352	AGCAUGCAGAGGUGGU AUUdTdT	655
as	370	AAUACCACCUCUGCAUGC UdTdT	656
s	354	CAUGCAGAGGUGGU AUUCAdTdT	657
as	372	UGAAUACCACCUCUGCAUGdTdT	658
s	355	AUGCAGAGGUGGU AUUCACdTdT	659
as	373	GUGAAUACCACCUCUGCAUdTdT	660
s	362	GGUGGU AUUCACAGCCAACdTdT	661
as	380	GUUGGCUGUGAAUACCACCdTdT	662
s	363	GUGGU AUUCACAGCCAACGdTdT	663
as	381	CGUUGGCUGUGAAUACCACdTdT	664
s	364	UGGU AUUCACAGCCAACGAdTdT	665

10

20

30

as	382	UCGUUGGCUGUGAAUACCAAdTdT	666
s	365	GGUAUUCACAGCCAACGACdTdT	667
as	383	GUCGUUGGCUGUGAAUACCAAdTdT	668
s	366	GUAUUCACAGCCAACGACUdTdT	669
as	384	AGUCGUUGGCUGUGAAUACdTdT	670
s	367	UAUUCACAGCCAACGACUCdTdT	671
as	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAUAdTdT	672
s	370	UCACAGCCAACGACUCCGGdTdT	673
as	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT	674
s	390	CCCCGCCGCUACACCAUUGdTdT	675
as	408	CAAUGGUGUAGCGGCGGGGdTdT	676
s	4	GAAGUCCACUCAUUCUUGGdTdT	677
as	22	CCAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT	678
s	412	CCCUGCUGAGCCCCUACUCdTdT	679
as	430	GAGUAGGGGCUCAGCAGGGdTdT	680
s	417	CUGAGCCCCUACUCCUAUUdTdT	681

【表 3 B - 4】

as	435	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGdTdT	682
s	418	UGAGCCCCUACUCCUAUUCdTdT	683
as	436	GAAUAGGAGUAGGGGCUCAdTdT	684
s	422	CCCCUACUCCUAUUCCACCdTdT	685
as	440	GGUGGAAUAGGAGUAGGGGdTdT	686
s	425	CUACUCCUAUUCCACCACGdTdT	687
as	443	CGUGGUGGAAUAGGAGUAGdTdT	688
s	426	UACUCCUAUUCCACCACGGdTdT	689
as	444	CCGUGGUGGAAUAGGAGUAdTdT	690
s	427	ACUCCUAUUCCACCACGGCdTdT	691
as	445	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUdTdT	692
s	429	UCCUAUUCCACCACGGCUGdTdT	693
as	447	CAGCCGUGGUGGAAUAGGAdTdT	694
s	432	UAUUCCACCACGGCUGUCGdTdT	695
as	450	CGACAGCCGUGGUGGAAUAdTdT	696
s	433	AUUCCACCACGGCUGUCGUdTdT	697
as	451	ACGACAGCCGUGGUGGAAUdTdT	698
s	437	CACCACGGCUGUCGUCACCdTdT	699
as	455	GGUGACGACAGCCGUGGUGdTdT	700
s	438	ACCACGGCUGUCGUCACCAdTdT	701
as	456	UGGUGACGACAGCCGUGGUdTdT	702
s	439	CCACGGCUGUCGUCACCAAdTdT	703
as	457	UUGGUGACGACAGCCGUGGdTdT	704
s	441	ACGGCUGUCGUCACCAAUCdTdT	705
as	459	GAUUGGUGACGACAGCCGUdTdT	706
s	442	CGGCUGUCGUCACCAAUCCdTdT	707
as	460	GGAUUGGUGACGACAGCCGdTdT	708
s	449	CGUCACCAAUCCCAAGGAAdTdT	709
as	467	UUCCUUGGGAUUGGUGACGdTdT	710

10

20

30

s	455	CAAUCCCAAGGAAUGAGGGdTdT	711
as	473	CCCUCAUUCUUGGGAUUGdTdT	712
s	491	CCUGAAGGACGAGGGAUGGdTdT	713
as	509	CCAUCCCUCGUCCUUCAGGdTdT	714
s	497	GGACGAGGGAUGGGAUUUCdTdT	715
as	515	GAAAUCCCAUCCCUCGUCCdTdT	716
s	5	AAGUCCACUCAUUCUUGGCdTdT	717
as	23	GCCAAGAAUGAGUGGACUUDdTdT	718
s	508	GGGAUUUCAUGUAACCAAGdTdT	719
as	526	CUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	720
s	509	GGAUUUCAUGUAACCAAGAdTdT	721
as	527	UCUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	722
s	514	UCAUGUAACCAAGAGUAUUdTdT	723
as	532	AAUACUCUUGGUUACAUGAdTdT	724

【表 3 B - 5】

s	516	AUGUAACCAAGAGUAUUCCdTdT	725
as	534	GGAAUACUCUUGGUUACAuTdT	726
s	517	UGUAACCAAGAGUAUUCCAdTdT	727
as	535	UGGAAUACUCUUGGUUACAdTdT	728
s	518	GUAACCAAGAGUAUUCCAuTdT	729
as	536	AUGGAAUACUCUUGGUUACdTdT	730
s	54	UGCCUUGCUGGACUGGUAUdTdT	731
as	72	AUACCAGUCCAGCAAGGCAdTdT	732
s	543	UAAAGCAGUGUUUUCACCUdTdT	733
as	561	AGGUGAAAACACUGCUUUAdTdT	734
s	55	GCCUUGCUGGACUGGUAUUdTdT	735
as	73	AAUACCAGUCCAGCAAGGCdTdT	736
s	551	UGUUUUCACCUCAUAUGCUdTdT	737
as	569	AGCAUAUGAGGUGAAAACAdTdT	738
s	552	GUUUUUCACCUCAUAUGCUAdTdT	739
as	570	UAGCAUAUGAGGUGAAAACdTdT	740
s	553	UUUUCACCUCAUAUGCUAUdTdT	741
as	571	AUAGCAUAUGAGGUGAAAAdTdT	742
s	555	UUCACCUCAUAUGCUAUGUdTdT	743
as	573	ACAUAGCAUAUGAGGUGAAAdTdT	744
s	557	CACCUCAUAUGCUAUGUUAAdTdT	745
as	575	UAACAUAGCAUAUGAGGUGdTdT	746
s	56	CCUUGCUGGACUGGUAUUUdTdT	747
as	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGGdTdT	748
s	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUCdTdT	749
as	581	GACUUCUAACAUAGCAUAUdTdT	750
s	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCCdTdT	751
as	582	GGACUUCUAACAUAGCAUAdTdT	752
s	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAGdTdT	753
as	584	CUGGACUUCUAACAUAGCAdTdT	754
s	57	CUUGCUGGACUGGUAUUUGdTdT	755

10

20

30

as	75	CAAAUACCAGUCCAGCAAGdTdT	756
s	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUAdTdT	757
as	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTTdTdT	758
s	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAAdTdT	759
as	598	UUUAUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	760
s	607	GUGAAAGGCACUUUUCAUUDTdT	761
as	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCACdTdT	762
s	62	UGGACUGGUUUUUGUGUCUdTdT	763
as	80	AGACACAAAUACCAGUCCAdTdT	764
s	77	GUCUGAGGCUGGCCCUCGdTdT	765
as	95	CGUAGGGCCAGCCUCAGACdTdT	766
s	79	CUGAGGCUGGCCCUCGCGdTdT	767
as	97	CCCGUAGGGCCAGCCUCAGdTdT	768
s	81	GAGGCUGGCCCUCGCGCAdTdT	769

【表 3 B - 6】

as	99	UGCCCGUAGGGCCAGCCUCdTdT	770
s	82	AGGCUGGCCCUCACGGGCACdTdT	771
as	100	GUGCCCGUAGGGCCAGCCUdTdT	772
s	84	GCUGGCCCUCACGGGCACCGdTdT	773
as	102	CGGUGCCCGUAGGGCCAGCdTdT	774
s	85	CUGGCCCUCACGGGCACCGGdTdT	775
as	103	CCGGUGCCCGUAGGGCCAGdTdT	776
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUGdTdT	777
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	778
s	9	CCACUCAUUCUUGGCAGGAdTdT	779
as	27	UCCUGCCAAGAAUGAGUGGdTdT	780
s	90	CCUACGGGCACCGGUGAAUdTdT	781
as	108	AUUCACCGGUGCCCGUAGGdTdT	782
s	91	CUACGGGCACCGGUGAAUCdTdT	783
as	109	GAUUCACCGGUGCCCGUAGdTdT	784
s	92	UACGGGCACCGGUGAAUCCdTdT	785
as	110	GGAUUCACCGGUGCCCGUAdTdT	786
s	93	ACGGGCACCGGUGAAUCCAdTdT	787
as	111	UGGAUUCACCGGUGCCCGUdTdT	788
s	97	GCACCGGUGAAUCCAAGUGdTdT	789
as	115	CACUUGGAUUCACCGGUGCdTdT	790
s	98	CACCGGUGAAUCCAAGUGUdTdT	791
as	116	ACACUUGGAUUCACCGGUGdTdT	792
s	167	UGUGGCCAUGCAUGUGUUCdTdT	793
as	185	GAACACAUGCAUGGCCACAdTdT	794
s	168	GUGGCCAUGCAUGUGUUCAdTdT	795
as	186	UGAACACAUGCAUGGCCACdTdT	796
s	171	GCCAUGCAUGUGUUCAGAAdTdT	797
as	189	UUCUGAACACAUGCAUGGCdTdT	798
s	432	UAUUCACCACGGCUGUCAdTdT	799
as	449	UGACAGCCGUGGUGGAAUAdTdT	800

10

20

30

s	447	GUCAUCACCAAUCCCAAGGdTdT	801
as	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	802
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT	803
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	804
s	122	GAUGGUCAAAGUUCUAGAAdTdT	805
as	140	AUCUAGAACUUUGACCAUCdTdT	806
s	139	AUGCUGUCCGAGGCAGUCCdTdT	807
as	157	GGACUGCCUCGGACAGCAUdTdT	808
s	172	CCGUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	809
as	190	UUUCUGAACACAUGCACGGdTdT	810
s	238	AGUCUGGAGAGCUGCAUGGdTdT	811
as	256	CCAUGCAGCUCUCCAGACUdTdT	812
s	252	CAUGGGCUCACAACUGAGGdTdT	813

10

【表 3 B - 7】

as	270	CCUCAGUUGUGAGCCCAUGdTdT	814
s	33	UCUCAUCGUCUGCUCCUCCdTdT	815
as	51	GGAGGAGCAGACGAUGAGAdTdT	816
s	340	CCCCAUUCCAUGAGCAUGCdTdT	817
as	358	GCAUGCUCUAUGGAAUGGGGdTdT	818
s	421	GCCCCUACUCCUAUUCCACdTdT	819
as	439	GUGGAAUAGGAGUAGGGGCdTdT	820
s	431	CUAUUCCACCACGGCUGUCdTdT	821
as	449	GACAGCCGUGGUGGAAUAGdTdT	822
s	440	CACGGCUGUCGUCACCAAUdTdT	823
as	458	AUUGGUGACGACAGCCGUGdTdT	824
s	496	AGGACGAGGGAUGGGAUUUdTdT	825
as	514	AAAUCCCAUCCCUUGUCCUdTdT	826
s	556	UCACCUCAUAUGCUAUGUUdTdT	827
as	574	AACAUAGCAUAUGAGGUGAdTdT	828
s	559	CCUCAUAUGCUAUGUUAGAdTdT	829
as	577	UCUAACAUAAGCAUAUGAGGdTdT	830
s	570	AUGUUAGAAGUCCAGGCAGdTdT	831
as	588	CUGCCUGGACUUCUAACAAdTdT	832
s	78	UCUGAGGCUGGCCCUACGGdTdT	833
as	96	CCGUAGGGCCAGCCUCAGAdTdT	834
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUGdTdT	835
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	836
s	95	GGGCACCGGUGAAUCCAAGdTdT	837
as	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCCdTdT	838
s	167	CCAUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	839
as	185	UUUCUGAACACAUGCAUGGdTdT	840

20

30

40

【表 4 - 1】

ヒト TTR の dsRNA の化学修飾したセンスおよびアンチセンス鎖配列  
 二重鎖番号については、表 2 を参照されたい。鎖：s = センス、as = アンチセンス  
 位置：転写物 (NM\_000371.2、配列番号 1329) における 5' 位の塩基

鎖	オリゴ#	位置	配列(5' から3' の方向)	配列番号
s	A-32153	100	ccGGuGAAuccAAGuGuccdTdT	841
as	A-32154	118	GGAcACUUGGAUUCACCGGdTdT	842
s	A-32155	11	AcucAuucuuGGcAGGAuGdTdT	843
as	A-32156	29	cAUCCUGCcAAGAAUGAGUdTdT	844
s	A-32157	111	AAGuGuccucuGAuGGucAdTdT	845
as	A-32158	129	UGACcAUcAGAGGAcACUUDdTdT	846
s	A-32163	13	ucAuucuuGGcAGGAuGGdTdT	847
as	A-32164	31	GCcAUCCUGCcAAGAAUGAdTdT	848
s	A-32165	130	AAGuucuAGAuGcuGuccGdTdT	849
as	A-32166	148	CGGAcAGcAUCuAGAACUdTdT	850
s	A-32167	132	GuucuAGAuGcuGuccGAGdTdT	851
as	A-32168	150	CUCGGAcAGcAUCuAGAACdTdT	852
s	A-32169	135	cuAGAuGcuGuccGAGGcAdTdT	853
as	A-32170	153	UGCCUCGGAcAGcAUCuAGdTdT	854
s	A-32171	138	GAuGcuGuccGAGGcAGucdTdT	855
as	A-32172	156	GACUGCCUCGGAcAGcAUCdTdT	856
s	A-32175	14	cAuucuuGGcAGGAuGGcudTdT	857
as	A-32176	32	AGCcAUCCUGCcAAGAAUGdTdT	858
s	A-32177	140	uGcuGuccGAGGcAGuccudTdT	859
as	A-32178	158	AGGACUGCCUCGGAcAGcAdTdT	860
s	A-32179	146	ccGAGGcAGuccuGccAucdTdT	861

10

20

30

as	A-32180	164	GAUGGcAGGACUGCCUCGGdTdT	862
s	A-32181	152	cAGuccuGccAucAAuGuGdTdT	863
as	A-32182	170	cAcAUUGAUGGcAGGACUGdTdT	864
s	A-32183	164	cAAuGuGGccGuGcAuGuGdTdT	865
as	A-32184	182	cAcAUGcACGGCcAcAUUGdTdT	866
s	A-32187	178	AuGuGuucAGAAAGGcuGcdTdT	867
as	A-32188	196	GcAGCCUUUCUGAAcAcAUdTdT	868
s	A-32189	2	cAGAAGuccAcucAuueuudTdT	869
as	A-32190	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	870
s	A-32191	21	GGeAGGAuGGcuucucAuedTdT	871
as	A-32192	39	GAUGAGAAGCcAUCCUGCCdTdT	872
s	A-32193	210	GAGccAuuuGccucuGGAdTdT	873
as	A-32194	228	UCCcAGAGGcAAAUGGCUCdTdT	874
s	A-32195	23	cAGGAuGGcuucucAucGudTdT	875
as	A-32196	41	ACGAUGAGAAGCcAUCCUGdTdT	876
s	A-32199	24	AGGAuGGcuucucAucGuedTdT	877
as	A-32200	42	GACGAUGAGAAGCcAUCCUdTdT	878
s	A-32201	245	AGAGcuGcAuGGGcuAcAdTdT	879
as	A-32202	263	UGUGAGCCcAUGcAGCUCUdTdT	880
s	A-32203	248	GcuGcAuGGGcuAcAAcudTdT	881

10

20

30

【表 4 - 2】

as	A-32204	266	AGUUGUGAGCCcAUGcAGCdTdT	882
s	A-32205	25	GGAuGGcuucucAucGucudTdT	883
as	A-32206	43	AGACGAUGAGAAGCcAUCCdTdT	884
s	A-32207	251	GcAuGGGcucAcAAcuGAGdTdT	885
as	A-32208	269	CUcAGUUGUGAGCCcAUGCdTdT	886
s	A-32211	253	AuGGGcucAcAAcuGAGGAdTdT	887
as	A-32212	271	UCCUcAGUUGUGAGCCcAUdTdT	888
s	A-32213	254	uGGGcucAcAAcuGAGGAGdTdT	889
as	A-32214	272	CUCCUcAGUUGUGAGCCcAdTdT	890
s	A-32215	270	GAGGAAuuuGuAGAAGGGAdTdT	891
as	A-32216	288	UCCCUUCuAcAAAUUCCUCdTdT	892
s	A-32217	276	uuuGuAGAAGGGAuAuAcAdTdT	893
as	A-32218	294	UGuAuAUCCCUUCuAcAAAdTdT	894
s	A-32219	277	uuGuAGAAGGGAuAuAcAAdTdT	895
as	A-32220	295	UUGuAuAUCCCUUCuAcAAdTdT	896
s	A-32221	278	uGuAGAAGGGAuAuAcAAAdTdT	897
as	A-32222	296	UUUGuAuAUCCCUUCuAcAdTdT	898
s	A-32223	281	AGAAGGGAuAuAcAAAGuGdTdT	899

10

20

30

as	A-32224	299	cACUUUGuAuAUCCCUUCUdTdT	900
s	A-32225	295	AAGuGGAAuAGAcAccAAdTdT	901
as	A-32226	313	UUGGUGUCuAUUUCcACUUDtTdT	902
s	A-32227	299	GGAAuAGAcAccAAAUcudTdT	903
as	A-32228	317	AGAUUUGGUGUCuAUUUCcTdT	904
s	A-32229	300	GAAuAGAcAccAAAUcudTdT	905
as	A-32230	318	AAGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT	906
s	A-32231	303	AuAGAcAccAAAUcuuAcudTdT	907
as	A-32232	321	AGuAAGAUUUGGUGUCuAUdTdT	908
s	A-32233	304	uAGAcAccAAAUcuuAcuGdTdT	909
as	A-32234	322	cAGuAAGAUUUGGUGUCuAdTdT	910
s	A-32235	305	AGAcAccAAAUcuuAcuGGdTdT	911
as	A-32236	323	CcAGuAAGAUUUGGUGUCUdTdT	912
s	A-32237	317	uuAcuGGAAGGcAcuuGGdTdT	913
as	A-32238	335	GCcAAGUGCCUUCcAGuAAdTdT	914
s	A-32239	32	uucucAucGucuGeuccuedTdT	915
as	A-32240	50	GAGGAGcAGACGAUGAGAAdTdT	916
s	A-32241	322	GGAAGGcAcuuGGcAucuedTdT	917
as	A-32242	340	GAGAUGCcAAGUGCCUUCcTdT	918
s	A-32243	326	GGcAcuuGGcAucucuccAdTdT	919
as	A-32244	344	UGGGGAGAUGCcAAGUGCCdTdT	920
s	A-32247	333	GgcAucucucccAuuccAuGdTdT	921
as	A-32248	351	cAUGGAAUGGGGAGAUGCCdTdT	922
s	A-32249	334	GcAucucucccAuuccAuGAdTdT	923
as	A-32250	352	UcAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	924
s	A-32251	335	cAucucucccAuuccAuGAGdTdT	925

10

20

30

40

【表 4 - 3】

as	A-32252	353	CUcAUGGAAUGGGGAGAUGdTdT	926
s	A-32253	336	AucuecccAuuecAuGAGcdTdT	927
as	A-32254	354	GCUcAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	928
s	A-32255	338	cuecccAuuecAuGAGcAudTdT	929
as	A-32256	356	AUGCUcAUGGAAUGGGGAGdTdT	930
s	A-32259	341	cccAuuecAuGAGcAuGcAdTdT	931
as	A-32260	359	UGcAUGCUcAUGGAAUGGGdTdT	932
s	A-32261	347	ccAuGAGcAuGcAGAGGuGdTdT	933
as	A-32262	365	cACCUCUGcAUGCUcAUGGdTdT	934
s	A-32263	352	AGcAuGcAGAGGuGGuAuudTdT	935
as	A-32264	370	AAuACcACCUCUGcAUGCUdTdT	936
s	A-32265	354	cAuGcAGAGGuGGuAuucAdTdT	937
as	A-32266	372	UGAAuACcACCUCUGcAUGdTdT	938
s	A-32267	355	AuGcAGAGGuGGuAuucAcdTdT	939
as	A-32268	373	GUGAAuACcACCUCUGcAUdTdT	940
s	A-32269	362	GguGGuAuucAcAGccAAcdTdT	941
as	A-32270	380	GUUGGCUGUGAAuACcACCdTdT	942
s	A-32271	363	GuGGuAuucAcAGccAAcGdTdT	943
as	A-32272	381	CGUUGGCUGUGAAuACcACdTdT	944
s	A-32273	364	uGGuAuucAcAGccAAcGAdTdT	945
as	A-32274	382	UCGUUGGCUGUGAAuACcAdTdT	946
s	A-32275	365	GguAuucAcAGccAAcGAcdTdT	947
as	A-32276	383	GUCGUUGGCUGUGAAuACCdTdT	948

10

20

30

40

s	A-32277	366	GuAuucAcAGccAAcGAcdTdT	949
as	A-32278	384	AGUCGUUGGCUGUGAAuACdTdT	950
s	A-32279	367	uAuucAcAGccAAcGAcdTdT	951
as	A-32280	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAuAdTdT	952
s	A-32281	370	ucAcAGccAAcGAcuccGGdTdT	953
as	A-32282	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT	954
s	A-32283	390	ccccGccGcuAcAccAuuGdTdT	955
as	A-32284	408	cAAUGGUGuAGCGGCGGGGdTdT	956
s	A-32285	4	GAAGuccAcucAuucuuGGdTdT	957
as	A-32286	22	CcAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT	958
s	A-32287	412	cccuGcuGAGcccccAcuedTdT	959
as	A-32288	430	GAGuAGGGGCUcAGcAGGGdTdT	960

10

20

s	A-32289	417	cuGAGcccccAcuccuAuudTdT	961
as	A-32290	435	AAuAGGAGuAGGGGCUcAGdTdT	962
s	A-32291	418	uGAGcccccAcuccuAuuedTdT	963
as	A-32292	436	GAAuAGGAGuAGGGGCUcAdTdT	964
s	A-32295	422	cccccAcuccuAuuccAcedTdT	965
as	A-32296	440	GGUGGAAuAGGAGuAGGGGdTdT	966
s	A-32297	425	cuAcuccuAuuccAccAcGdTdT	967
as	A-32298	443	CGUGGUGGAAuAGGAGuAGdTdT	968

30

【表 4 - 4】

s	A-32299	426	uAcuccuAuuccAccAcGGdTdT	969
as	A-32300	444	CCGUGGUGGAAuAGGAGuAdTdT	970
s	A-32301	427	AcuccuAuuccAccAcGGcdTdT	971
as	A-32302	445	GCCGUGGUGGAAuAGGAGUdTdT	972
s	A-32303	429	uccuAuuccAccAcGGcuGdTdT	973
as	A-32304	447	cAGCCGUGGUGGAAuAGGAdTdT	974
s	A-32307	432	uAuuccAccAcGGcuGueGdTdT	975
as	A-32308	450	CGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT	976
s	A-32309	433	AuuccAccAcGGcuGueGudTdT	977
as	A-32310	451	ACGAcAGCCGUGGUGGAAUdTdT	978
s	A-32311	437	cAccAcGGcuGueGueAccdTdT	979
as	A-32312	455	GGUGACGAcAGCCGUGGUGdTdT	980
s	A-32313	438	AccAcGGcuGueGueAccAdTdT	981
as	A-32314	456	UGGUGACGAcAGCCGUGGUdTdT	982
s	A-32315	439	ccAcGGcuGueGueAccAAdTdT	983
as	A-32316	457	UUGGUGACGAcAGCCGUGGdTdT	984
s	A-32319	441	AcGGcuGueGueAccAAuedTdT	985
as	A-32320	459	GAUUGGUGACGAcAGCCGUdTdT	986
s	A-32321	442	cGGcuGueGueAccAAuedTdT	987
as	A-32322	460	GGAUUGGUGACGAcAGCCGdTdT	988

10

20

30

s	A-32323	449	cGucAccAAucccAAGGAAdTdT	989
as	A-32324	467	UUCCUUGGGAUUGGUGACGdTdT	990
s	A-32325	455	cAAucccAAGGAuGAGGGdTdT	991
as	A-32326	473	CCCUcAUUCCUUGGGAUUGdTdT	992
s	A-32327	491	ccuGAAGGAcGAGGGAuGGdTdT	993
as	A-32328	509	CcAUCCCUCGUCCUUCAGGdTdT	994
s	A-32331	497	GGAcGAGGGAuGGGAuuuedTdT	995
as	A-32332	515	GAAAUCCcAUCCCUCGUCCdTdT	996
s	A-32333	5	AAGuccAcucAuucuuGGdTdT	997
as	A-32334	23	GCcAAGAAUGAGUGGACUUDTdT	998
s	A-32335	508	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	999
as	A-32336	526	CUUGGUuAcAUGAAAUCCCdTdT	1000
s	A-32337	509	GGAuucAuGuAAccAAGAdTdT	1001
as	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1002
s	A-32339	514	ucAuGuAAccAAGAGuAuudTdT	1003
as	A-32340	532	AAuACUCUUGGUuAcAUGAdTdT	1004
s	A-32341	516	AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT	1005
as	A-32342	534	GGAAuACUCUUGGUuAcAUdTdT	1006
s	A-32343	517	uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT	1007
as	A-32344	535	UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT	1008
s	A-32345	518	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1009
as	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1010
s	A-32347	54	uGccuuGeuGGAcuGGuAudTdT	1011
as	A-32348	72	AuACcAGUCcAGcAAGGcAdTdT	1012

10

20

30

40

【表 4 - 5】

s	A-32349	543	uAAAGcAGuGuuuucAccudTdT	1013
as	A-32350	561	AGGUGAAAAcACUGCUUuAdTdT	1014
s	A-32351	55	GccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT	1015
as	A-32352	73	AAuACcAGUCcAGcAAGGCdTdT	1016
s	A-32353	551	uGuuuucAccucAuAuGeudTdT	1017
as	A-32354	569	AGcAuAUGAGGUGAAAAcAdTdT	1018
s	A-32355	552	GuuuucAccucAuAuGcuAdTdT	1019
as	A-32356	570	uAGcAuAUGAGGUGAAAACdTdT	1020
s	A-32357	553	uuuucAccucAuAuGcuAudTdT	1021
as	A-32358	571	AuAGcAuAUGAGGUGAAAAdTdT	1022
s	A-32359	555	uucAccucAuAuGcuAuGudTdT	1023
as	A-32360	573	AcAuAGcAuAUGAGGUGAAdTdT	1024
s	A-32363	557	cAccucAuAuGcuAuGuuAdTdT	1025
as	A-32364	575	uAAcAuAGcAuAUGAGGUGdTdT	1026
s	A-32367	56	ccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT	1027
as	A-32368	74	AAuACcAGUCcAGcAAGGdTdT	1028
s	A-32369	563	AuAuGcuAuGuuAGAAGucdTdT	1029
as	A-32370	581	GACUUCuAAcAuAGcAuAUdTdT	1030
s	A-32371	564	uAuGcuAuGuuAGAAGuccdTdT	1031
as	A-32372	582	GGACUUCuAAcAuAGcAuAdTdT	1032
s	A-32373	566	uGcuAuGuuAGAAGuccAGdTdT	1033
as	A-32374	584	CUGGACUUCuAAcAuAGcAdTdT	1034

10

20

30

s	A-32375	57	cuuGcuGGAcuGGuAuuuGdTdT	1035
as	A-32376	75	cAAAUACcAGUCcAGcAAGdTdT	1036
s	A-32379	578	AGuccAGGcAGAGAcAAuAdTdT	1037
as	A-32380	596	uAUUGUCUCUGCCUGGACUdTdT	1038
s	A-32381	580	uccAGGcAGAGAcAAuAAAdTdT	1039
as	A-32382	598	UUuAUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	1040
s	A-32383	607	GuGAAAGGcAcuuuucAuudTdT	1041
as	A-32384	625	AAUGAAAAGUGCCUUUcACdTdT	1042
s	A-32385	62	uGGAcuGGuAuuuGuGucudTdT	1043
as	A-32386	80	AGAcAcAAAUACcAGUCcAdTdT	1044
s	A-32387	77	GucuGAGGcuGGccuAcGdTdT	1045

10

as	A-32388	95	CGuAGGGCcAGCCUcAGACdTdT	1046
s	A-32391	79	cuGAGGcuGGccuAcGGGdTdT	1047
as	A-32392	97	CCCGuAGGGCcAGCCUcAGdTdT	1048
s	A-32393	81	GAGGcuGGccuAcGGGcAdTdT	1049
as	A-32394	99	UGCCCGuAGGGCcAGCCUCdTdT	1050
s	A-32395	82	AGGcuGGccuAcGGGcAcdTdT	1051
as	A-32396	100	GUGCCCGuAGGGCcAGCCUdTdT	1052
s	A-32397	84	GcuGGccuAcGGGcAccGdTdT	1053
as	A-32398	102	CGGUGCCCGuAGGGCcAGCdTdT	1054
s	A-32399	85	cuGGccuAcGGGcAccGGdTdT	1055
as	A-32400	103	CCGGUGCCCGuAGGGCcAGdTdT	1056

20

30

40

【表 4 - 6】

s	A-32401	87	GGcccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1057
as	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGCCdTdT	1058
s	A-32403	9	ccAcucAuucuuGGcAGGAdTdT	1059
as	A-32404	27	UCCUGCcAAGAAUGAGUGGdTdT	1060
s	A-32405	90	ccuAcGGGcAccGGuGAAudTdT	1061
as	A-32406	108	AUUcACCGGUGCCCGuAGGdTdT	1062
s	A-32407	91	cuAcGGGcAccGGuGAAucdTdT	1063
as	A-32408	109	GAUUcACCGGUGCCCGuAGdTdT	1064
s	A-32409	92	uAcGGGcAccGGuGAAuccdTdT	1065
as	A-32410	110	GGAUUcACCGGUGCCCGuAdTdT	1066
s	A-32411	93	AcGGGcAccGGuGAAuccAdTdT	1067
as	A-32412	111	UGGAUUcACCGGUGCCCGUdTdT	1068
s	A-32415	97	GcAccGGuGAAuccAAGuGdTdT	1069
as	A-32416	115	cACUUGGAUUcACCGGUGCdTdT	1070
s	A-32417	98	cAccGGuGAAuccAAGuGudTdT	1071

10

20

as	A-32418	116	AcACUUGGAUUcACCGGUGdTdT	1072
s	A-32419	167	uGuGGccAuGcAuGuGuucdTdT	1073
as	A-32420	185	GAAcAcAUGcAUGGCcAcAdTdT	1074
s	A-32421	168	GuGGccAuGcAuGuGuucAdTdT	1075
as	A-32422	186	UGAAcAcAUGcAUGGCcACdTdT	1076
s	A-32423	171	GccAuGcAuGuGuucAGAAdTdT	1077
as	A-32424	189	UUCUGAAcAcAUGcAUGGCdTdT	1078
s	A-32427	432	uAuuccAccAcGGcuGucAdTdT	1079
as	A-32428	449	UGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT	1080

30

40

s	A-32429	447	GucAucAccAAueccAAGGdTdT	1081
as	A-32430	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	1082
s	A-32159	115	GuccueuGAuGGucAAAGudTdT	1083
as	A-32160	133	ACUUUGACcAUcAGAGGACdTdT	1084
s	A-32161	122	GAuGGucAAAGuueuAGAudTdT	1085
as	A-32162	140	AUCuAGAACUUUGACcAUCdTdT	1086
s	A-32173	139	AuGeuGuccGAGGcAGuccdTdT	1087
as	A-32174	157	GGACUGCCUCGGAcAGcAUdTdT	1088
s	A-32185	172	ccGuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1089
as	A-32186	190	UUUCUGAAcAcAUGcACGGdTdT	1090
s	A-32197	238	AGucUGGAGAGcAuGGdTdT	1091
as	A-32198	256	CcAUGcAGCUCUCcAGACUdTdT	1092
s	A-32209	252	cAuGGGcucAcAAcuGAGGdTdT	1093
as	A-32210	270	CCUcAGUUGUGAGCCcAUGdTdT	1094
s	A-32245	33	ucucAucGucGeueccuecdTdT	1095
as	A-32246	51	GGAGGAGcAGACGAUGAGAdTdT	1096
s	A-32257	340	ccccAuuecAuGAGcAuGcdTdT	1097
as	A-32258	358	GcAUGCUcAUGGAAUGGGGdTdT	1098
s	A-32293	421	GccccuAcuecuAuuecAcdTdT	1099
as	A-32294	439	GUGGAuAGGAGuAGGGGCdTdT	1100

10

20

30

【表 4 - 7】

s	A-32305	431	cuAuuccAccAcGGcuGuedTdT	1101
as	A-32306	449	GAcAGCCGUGGUGGAAuAGdTdT	1102
s	A-32317	440	cAcGGcuGueGueAccAAudTdT	1103
as	A-32318	458	AUUGGUGACGAcAGCCGUGdTdT	1104
s	A-32329	496	AGGAcGAGGGAuGGGAuuudTdT	1105
as	A-32330	514	AAAUCCcAUCCCUCGUCCUdTdT	1106
s	A-32361	556	ucAccucAuAuGcuAuGuudTdT	1107
as	A-32362	574	AAcAuAGcAuAUGAGGUGAdTdT	1108
s	A-32365	559	ccucAuAuGcuAuGuuAGAdTdT	1109
as	A-32366	577	UCuAAcAuAGcAuAUGAGGdTdT	1110
s	A-32377	570	AuGuuAGAAGuccAGGcAGdTdT	1111
as	A-32378	588	CUGCCUGGACUUCuAAcAUdTdT	1112
s	A-32389	78	ucuGAGGcuGGccuAcGGdTdT	1113
as	A-32390	96	CCGuAGGGCcAGCCUcAGAdTdT	1114
s	A-32401	87	GGccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1115
as	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGCCdTdT	1116
s	A-32413	95	GGGcAccGGuGAAuccAAGdTdT	1117
as	A-32414	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCcdTdT	1118
s	A-32425	167	ccAuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1119
as	A-32426	185	UUUCUGAAcAcAUGcAUGGdTdT	1120

10

20

30

【 0 2 3 4 】

【表 5】

ラット T T R の d s R N A の認識番号  
配列については、表 7 を参照されたい。

二重鎖#	センス オリゴ#	アンチセンス オリ ゴ#
AD-18529	A-32745	A-32746
AD-18530	A-32747	A-32748
AD-18531	A-32749	A-32750
AD-18532	A-32751	A-32752
AD-18533	A-32753	A-32754
AD-18534	A-32755	A-32756
AD-18535	A-32757	A-32758
AD-18536	A-32759	A-32760
AD-18537	A-32761	A-32762
AD-18538	A-32763	A-32764
AD-18539	A-32159	A-32160
AD-18540	A-32765	A-32766
AD-18541	A-32767	A-32768
AD-18542	A-32769	A-32770
AD-18543	A-32771	A-32772
AD-18544	A-32773	A-32774
AD-18545	A-32775	A-32776
AD-18546	A-32777	A-32778
AD-18547	A-32779	A-32780
AD-18548	A-32781	A-32782
AD-18549	A-32783	A-32784
AD-18550	A-32785	A-32786
AD-18551	A-32787	A-32788
AD-18552	A-32791	A-32792
AD-18553	A-32793	A-32794
AD-18554	A-32795	A-32796

10

20

30

【 0 2 3 5 】

【表 6 A - 1】

ラット TTR の d s R N A のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖：s = センス、a s = アンチセンス 位置：転写物（NM\_012681.1、配列番号 1330）における 5' 位の塩基

鎖	位置	配列(5' から3' の方向)	配列番号	3' のジヌクレオチド オーバーハングを有する 配列(5' から3' の方向)	配列番号
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGU	1121	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN	1173
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGAC	1122	ACUUUGACCAUCAGAGGACNN	1174
s	537	UUCUUGCUCUAUAAACCGU	1123	UUCUUGCUCUAUAAACCGUNN	1175
as	555	ACGGUUUAUAGAGCAAGAA	1124	ACGGUUUAUAGAGCAAGAANN	1176
s	543	CUCUAUAAACCGUGUUAGC	1125	CUCUAUAAACCGUGUUAGCNN	1177
as	561	GCUAACACGGUUUAUAGAG	1126	GCUAACACGGUUUAUAGAGN	1178
s	392	UCGCCACUACACCAUCGCA	1127	UCGCCACUACACCAUCGCANN	1179
as	410	UGCGAUGGUGUAGUGGCGA	1128	UGCGAUGGUGUAGUGGCGANN	1180
s	538	UCUUGCUCUAUAAACCGUG	1129	UCUUGCUCUAUAAACCGUGNN	1181
as	556	CACGGUUUAUAGAGCAAGA	1130	CACGGUUUAUAGAGCAAGANN	1182
s	541	UGCUCUAUAAACCGUGUUA	1131	UGCUCUAUAAACCGUGUUNN	1183
as	559	UACACGGUUUAUAGAGCA	1132	UACACGGUUUAUAGAGCANN	1184
s	532	CAGUGUUCUUGCUCUAUAA	1133	CAGUGUUCUUGCUCUAUAANN	1185
as	550	UUUAUAGAGCAAGAACACUG	1134	UUUAUAGAGCAAGAACACUGNN	1186
s	542	GCUCUAUAAACCGUGUUAG	1135	GCUCUAUAAACCGUGUUAGNN	1187
as	560	CUAACACGGUUUAUAGAGC	1136	CUAACACGGUUUAUAGAGCNN	1188
s	134	CCUGGAUGCUGUCCGAGGC	1137	CCUGGAUGCUGUCCGAGGCNN	1189
as	152	GCCUCGGACAGCAUCCAGG	1138	GCCUCGGACAGCAUCCAGGNN	1190
s	119	UCUGAUGGUCAAAGUCCUG	1139	UCUGAUGGUCAAAGUCCUGNN	1191
as	137	CAGGACUUUGACCAUCAGA	1140	CAGGACUUUGACCAUCAGANN	1192
s	241	CUGGAGAGCUGCACGGGCU	1141	CUGGAGAGCUGCACGGGCUNN	1193
as	259	AGCCCGUGCAGCUCUCCAG	1142	AGCCCGUGCAGCUCUCCAGNN	1194
s	544	UCUAUAAACCGUGUUAGCA	1143	UCUAUAAACCGUGUUAGCANN	1195
as	562	UGCUAACACGGUUUAUAGA	1144	UGCUAACACGGUUUAUAGANN	1196
s	530	AACAGUGUUCUUGCUCUAU	1145	AACAGUGUUCUUGCUCUAUNN	1197
as	548	AUAGAGCAAGAACACUGUU	1146	AUAGAGCAAGAACACUGUUNN	1198
s	118	CUCUGAUGGUCAAAGUCCU	1147	CUCUGAUGGUCAAAGUCCUNN	1199
as	136	AGGACUUUGACCAUCAGAG	1148	AGGACUUUGACCAUCAGAGNN	1200

10

20

30

【表 6 A - 2】

s	140	UGCUGUCCGAGGCAGCCCU	1149	UGCUGUCCGAGGCAGCCUNN	1201
as	158	AGGGCUGCCUCGGACAGCA	1150	AGGGCUGCCUCGGACAGCANN	1202
s	239	GUCUGGAGAGCUGCACGGG	1151	GUCUGGAGAGCUGCACGGGNN	1203
as	257	CCCGUGCAGCUCUCCAGAC	1152	CCCGUGCAGCUCUCCAGACNN	1204
s	531	ACAGUGUUCUUGCUCUAUA	1153	ACAGUGUUCUUGCUCUAUANN	1205
as	549	UAUAGAGCAAGAACACUGU	1154	UAUAGAGCAAGAACACUGUNN	1206
s	117	CCUCUGAUGGUCAAAGUCC	1155	CCUCUGAUGGUCAAAGUCCNN	1207
as	135	GGACUUUGACCAUCAGAGG	1156	GGACUUUGACCAUCAGAGGNN	1208
s	131	AGUCCUGGAUGCUGUCCGA	1157	AGUCCUGGAUGCUGUCCGANN	1209
as	149	UCGGACAGCAUCCAGGACU	1158	UCGGACAGCAUCCAGGACUNN	1210
s	217	UUGCCUCUGGGAAGACCGC	1159	UUGCCUCUGGGAAGACCGCNN	1211
as	235	GCGGUCUUCCCAGAGGCAA	1160	GCGGUCUUCCCAGAGGCAANN	1212
s	242	UGGAGAGCUGCACGGGCUC	1161	UGGAGAGCUGCACGGGCUCNN	1213
as	260	GAGCCCGUGCAGCUCUCCA	1162	GAGCCCGUGCAGCUCUCCANN	1214
s	244	GAGAGCUGCACGGGCUCAC	1163	GAGAGCUGCACGGGCUCACNN	1215
as	262	GUGAGCCCGUGCAGCUCUC	1164	GUGAGCCCGUGCAGCUCUCNN	1216
s	246	GAGCUGCACGGGCUCACCA	1165	GAGCUGCACGGGCUCACCANN	1217
as	264	UGGUGAGCCCGUGCAGCUC	1166	UGGUGAGCCCGUGCAGCUCNN	1218
s	399	UACACCAUCGCAGCCCUGC	1167	UACACCAUCGCAGCCCUGCNN	1219
as	417	GCAGGGCUGCGAUGGUGUA	1168	GCAGGGCUGCGAUGGUGUANN	1220
s	132	GUCCUGGAUGCUGUCCGAG	1169	GUCCUGGAUGCUGUCCGAGNN	1221
as	150	CUCGGACAGCAUCCAGGAC	1170	CUCGGACAGCAUCCAGGACNN	1222
s	245	AGAGCUGCACGGGCUCACC	1171	AGAGCUGCACGGGCUCACCNN	1223
as	263	GGUGAGCCCGUGCAGCUCU	1172	GGUGAGCCCGUGCAGCUCUNN	1224

10

20

【 0 2 3 6 】

30

【表 6 B - 1】

ラット T T R の d s R N A のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖：s = センス、a s = アンチセンス 位置：転写物（NM\_012681.1、配列番号 1330）における 5' 位の塩基

鎖	位置	3' のデオキシチミジンオーバーハングを有する配列(5' から3' の方向)	配列番号
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT	1225
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	1226
s	537	UUCUUGCUCUAUAAACCGUdTdT	1227
as	555	ACGGUUUAUAGAGCAAGAdTdT	1228
s	543	CUCUAUAAACCGUGUUAGCdTdT	1229
as	561	GCUAACACGGUUUAUAGAGdTdT	1230
s	392	UCGCCACUACACCAUCGCAdTdT	1231
as	410	UGCGAUGGUGUAGUGGCGAdTdT	1232
s	538	UCUUGCUCUAUAAACCGUGdTdT	1233
as	556	CACGGUUUAUAGAGCAAGAdTdT	1234
s	541	UGCUCUAUAAACCGUGUUAdTdT	1235
as	559	UAAACACGGUUUAUAGAGCAdTdT	1236
s	532	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAdTdT	1237
as	550	UUAUAGAGCAAGAACACUGdTdT	1238
s	542	GCUCUAUAAACCGUGUUAGdTdT	1239
as	560	CUAACACGGUUUAUAGAGCdTdT	1240
s	134	CCUGGAUGCUGUCCGAGGCdTdT	1241
as	152	GCCUCGGACAGCAUCCAGGdTdT	1242

10

20

30

s	119	UCUGAUGGUCAAAGUCCUGdTdT	1243
as	137	CAGGACUUUGACCAUCAGAdTdT	1244
s	241	CUGGAGAGCUGCACGGGCUdTdT	1245
as	259	AGCCCGUGCAGCUCUCCAGdTdT	1246
s	544	UCUAUAAACCGUGUUAGCAdTdT	1247
as	562	UGCUAACACGGUUUAUAGAdTdT	1248
s	530	AACAGUGUUCUUGCUCUAUdTdT	1249
as	548	AUAGAGCAAGAACACUGUdTdT	1250
s	118	CUCUGAUGGUCAAAGUCCUdTdT	1251
as	136	AGGACUUUGACCAUCAGAGdTdT	1252
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGCCCUdTdT	1253
as	158	AGGGCUGCCUCGGACAGCAdTdT	1254
s	239	GUCUGGAGAGCUGCACGGGdTdT	1255
as	257	CCCGUGCAGCUCUCCAGACdTdT	1256
s	531	ACAGUGUUCUUGCUCUAUAdTdT	1257
as	549	UAUAGAGCAAGAACACUGUdTdT	1258
s	117	CCUCUGAUGGUCAAAGUCCdTdT	1259
as	135	GGACUUUGACCAUCAGAGGdTdT	1260

10

20

【表 6 B - 2】

s	131	AGUCCUGGAUGCUGUCCGAdTdT	1261
as	149	UCGGACAGCAUCCAGGACUdTdT	1262
s	217	UUGCCUCUGGGAAGACCGCdTdT	1263
as	235	GCGGUCUUCCCAGAGGCAAdTdT	1264
s	242	UGGAGAGCUGCACGGGCUCdTdT	1265
as	260	GAGCCCGUGCAGCUCUCCAdTdT	1266
s	244	GAGAGCUGCACGGGCUCACdTdT	1267
as	262	GUGAGCCCGUGCAGCUCUCdTdT	1268
s	246	GAGCUGCACGGGCUCACCAdTdT	1269
as	264	UGGUGAGCCCGUGCAGCUCdTdT	1270
s	399	UACACCAUUCGAGCCCUdGdTdT	1271
as	417	GCAGGGCUGCGAUGGUGUAdTdT	1272
s	132	GUCCUGGAUGCUGUCCGAGdTdT	1273
as	150	CUCGGACAGCAUCCAGGACdTdT	1274
s	245	AGAGCUGCACGGGCUCACCdTdT	1275
as	263	GGUGAGCCCGUGCAGCUCUdTdT	1276

30

40

【 0 2 3 7 】

【表 7 - 1】

ラット T T R の d s R N A の化学修飾したセンスおよびアンチセンス鎖配列

二重鎖 # ( d s R N A 名) については、表 5 を参照されたい。鎖 : s = センス、a s = アンチセンス 位置 : 転写物 ( N M \_ 0 1 2 6 8 1 . 1 、配列番号 1 3 3 0 ) における 5 ' 位の塩基

鎖	オリゴ#	位置	配列(5' から3' の方向)	配列番号
s	A-32159	115	GuccucuGAuGGucAAAGudTdT	1277
as	A-32160	133	ACUUUGACcAUcAGAGGACdTdT	1278
s	A-32745	537	uucuuGeucuAuAAAccGudTdT	1279
as	A-32746	555	ACGGUUuAuAGAGcAAGAAAdTdT	1280
s	A-32747	543	cucuAuAAAccGuGuuAGcdTdT	1281
as	A-32748	561	GCuAAcACGGUUuAuAGAGdTdT	1282
s	A-32749	392	ucGccAcuAcAccAucGcAdTdT	1283
as	A-32750	410	UGCGAUGGUGuAGUGGCGAdTdT	1284
s	A-32751	538	ucuuGeucuAuAAAccGuGdTdT	1285
as	A-32752	556	cACGGUUuAuAGAGcAAGAdTdT	1286
s	A-32753	541	uGeucuAuAAAccGuGuuAdTdT	1287

10

20

30

as	A-32754	559	uAAcACGGUUuAuAGAGcAdTdT	1288
s	A-32755	532	cAGuGuucuuGeucuAuAAdTdT	1289
as	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	1290
s	A-32757	542	GeucuAuAAAccGuGuuAGdTdT	1291
as	A-32758	560	CuAAcACGGUUuAuAGAGCdTdT	1292
s	A-32759	134	ccuGGAuGeuGuccGAGGdTdT	1293
as	A-32760	152	GCCUCGGAcAGcAUCcAGGdTdT	1294
s	A-32761	119	ucuGAuGGucAAAGuccuGdTdT	1295

40

as	A-32762	137	cAGGACUUUGACcAUcAGAdTdT	1296
s	A-32763	241	cuGGAGAGcuGcAcGGGcudTdT	1297
as	A-32764	259	AGCCCGUGcAGCUCUCcAGdTdT	1298
s	A-32765	544	ucuAuAAAccGuGuuAGcAdTdT	1299
as	A-32766	562	UGCuAAcACGGUuAuAGAdTdT	1300
s	A-32767	530	AAcAGuGuucuuGcucuAudTdT	1301
as	A-32768	548	AuAGAGcAAGAAcACUGUuTdTdT	1302
s	A-32769	118	cucuGAuGGucAAAGuccudTdT	1303
as	A-32770	136	AGGACUUUGACcAUcAGAGdTdT	1304
s	A-32771	140	uGcuGuccGAGGcAGcccudTdT	1305
as	A-32772	158	AGGGCUGCCUCGGAcAGcAdTdT	1306
s	A-32773	239	GucuGGAGAGcuGcAcGGGdTdT	1307
as	A-32774	257	CCCGUGcAGCUCUCcAGACdTdT	1308
s	A-32775	531	AcAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	1309
as	A-32776	549	uAuAGAGcAAGAAcACUGUdTdT	1310
s	A-32777	117	ccucuGAuGGucAAAGuccdTdT	1311

10

20

30

【表 7 - 2】

as	A-32778	135	GGACUUUGACcAUcAGAGGdTdT	1312
s	A-32779	131	AGuccuGGAuGcuGuccGAdTdT	1313
as	A-32780	149	UCGGAcAGcAUCcAGGACUdTdT	1314
s	A-32781	217	uuGccuucuGGGAAGAccGcdTdT	1315
as	A-32782	235	GCGGUCUUCCcAGAGGcAAdTdT	1316
s	A-32783	242	uGGAGAGcuGcAcGGGcuedTdT	1317
as	A-32784	260	GAGCCCGUGcAGCUCUCcAdTdT	1318
s	A-32785	244	GAGAGcuGcAcGGGcucAcdTdT	1319
as	A-32786	262	GUGAGCCCGUGcAGCUCUCdTdT	1320
s	A-32787	246	GAGcuGcAcGGGcucAccAdTdT	1321
as	A-32788	264	UGGUGAGCCCGUGcAGCUCdTdT	1322
s	A-32791	399	uAcAccAucGcAGcccuGcdTdT	1323
as	A-32792	417	GcAGGGCUGCGAUGGUGuAdTdT	1324
s	A-32793	132	GuccuGGAuGcuGuccGAGdTdT	1325
as	A-32794	150	CUCGGAcAGcAUCcAGGACdTdT	1326
s	A-32795	245	AGAGcuGcAcGGGcucAccdTdT	1327
as	A-32796	263	GGUGAGCCCGUGcAGCUCUdTdT	1328

10

20

30

## 【 0 2 3 8 】

## T T R 配列の合成

40

1  $\mu$ モルの規模で、Mer Made 192 合成機において、T T R 配列を合成した。配列表の全ての配列については、「エンドライト」化学反応を以下の詳細のように適用した。

- ・センス鎖内の全てのピリミジン（シトシンおよびウリジン）は、対応する 2'-O-メチル塩基（2'-O-メチルCおよび2'-O-メチルU）と置換された。
- ・アンチセンス鎖では、リボAヌクレオシドに隣接する（5'位に向かって）ピリミジンは、それらの対応する2'-O-メチルヌクレオシドと置換された。
- ・センスおよびアンチセンス配列の両方の3'末端で、2つの塩基dTdTの拡張を導入した。
- ・配列ファイルをテキストファイルに変換し、Mer Made 192 合成ソフトウェアに

50

おける負荷に対して互換性を保つようにした。

#### 【0239】

T T R 配列の合成は、ホスホラミダイト化学反応を用いて、固定支持されたオリゴヌクレオチド合成を使用した。96 ウェルプレート中の1  $\mu$ mの規模で、上記の配列の合成を行った。アミダイト溶液を、0.1 M 濃度で調製し、エチルチオテトラゾール（アセトニトリル中0.6 M）を活性剤として使用した。

#### 【0240】

合成した配列を切断し、第1のステップにおいてメチルアミン、および第2のステップにおいて、トリエチルアミン3 H Fを用いて、96 ウェルプレート中に脱保護した。このようにして得られた粗配列を、アセトンとエタノールの混合液を用いて、沈殿させ、ペレットを、0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁させた。それぞれの配列からの試料を、LC - MSによって分析し、得られる大量データにより配列の同一性を確認した。試料の選択されたセットはまた、I E Xクロマトグラフィーによっても分析した。

#### 【0241】

過程における次のステップは、精製であった。全ての配列は、Source 15 Qカラムを用いて、AKTA explorer 精製システムにおいて精製した。完全長配列に対応する単一ピークを、溶離液中に収集し、続いて、イオン交換クロマトグラフィーによって純度について分析した。

#### 【0242】

AKTA 精製機を用いて、Sephadex G25カラム上に精製された配列を、脱塩した。脱塩したT T R 配列を、濃度および純度について分析した。次いで、T T R - dsRNAを形成するために、単鎖をアニールした。

#### 【0243】

#### 実施例2 B.mRNA抑制に対するT T RのsiRNAのインビトロスクリーニング

dsRNAを標的とするヒトT T R（表2）について、T T RのmRNAを定量化するために、qPCR（リアルタイムPCR）およびbDNA（分岐DNA）アッセイを用いて、Hep G2およびHep 3 B細胞内の内因性T T Rの発現の障害のアッセイを行った。dsRNAを標的とする齧歯類T T R（表5）を合成し、bDNAアッセイを用いて、H. 4. II. E細胞内の内因性T T Rの発現の障害のアッセイを行った。単回用量アッセイからの結果は、IC50を計算するための用量反応実験用のT T RのdsRNA二重鎖のサブセットを選択するために使用した。IC50の結果は、さらなる試験用のT T RのdsRNAを選択するために使用した。

#### 【0244】

#### 細胞培養およびトランスフェクション：

肝細胞株のHep G2、Hep 3 B、およびH. 4. II. E細胞（ATCC、Manassas, VA）を、トリプシン処理によりプレートから放出される前に、10% FBS、ストレプトマイシン、およびグルタミン（ATCC）で補完されるダルベッコ改変イーグル培地（ATCC）中の5% CO<sub>2</sub>の雰囲気下で、37 °Cでほぼコンフルエントまで増殖した。また、H. 4. II. E細胞も、イーグル最小必須培地中で増殖した。逆転写は、10  $\mu$ LのOpti-MEMに加えて、ウェル当たり0.2  $\mu$ LのLipofectamine RNAiMax（Invitrogen, Carlsbad, CA, cat # 13778-150）と一緒に、96 ウェルプレート中に5  $\mu$ LのOpti-MEMをウェル当たり5  $\mu$ LのsiRNA二重鎖に添加することによって行われ、室温で15分間インキュベートした。次いで、4  $\times$  10<sup>4</sup>（Hep G2）、2  $\times$  10<sup>4</sup>（Hep 3 B）、または2  $\times$  10<sup>4</sup>（H. 4. II. E）細胞を含有する、抗生物質を含有しない、80  $\mu$ Lの完全成長培地を添加した。RNA精製前に、細胞を、24時間インキュベートした。10 nMの最終2倍濃度で単回用量実験を行い、10、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、0.00001 nMで用量反応実験を行った。

#### 【0245】

MagMAX - 96 総RNA単離キット (Applied Biosystems, Foster City, CA, 部品番号#: AM1830) を用いた総RNA単離:

細胞は、採集され、140  $\mu$ Lの溶解/結合溶液中で溶解され、次いで、Eppendorf Thermomixerを用いて850 rpmで1分間混合した(混合速度は、過程を通して同一であった)。20マイクロリットルの磁気ビーズを、細胞溶解物に添加し、5分間混合した。磁気ビーズは、磁気スタンドを用いて捕捉し、ビーズを妨害することなく、浮遊物を除去した。浮遊物を除去した後、磁気ビーズを洗浄液1(イソプロパノールを添加)で洗浄し、1分間混合した。ビーズを再度捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、ビーズを150  $\mu$ Lの洗浄液2(エタノールを添加)で洗浄し、捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、50  $\mu$ LのDNアーゼ混合物(MagMax turbo DNase BufferおよびTurbo DNase)をビーズに添加し、それらを10~15分間混合した。混合後、100  $\mu$ LのRNA再生溶液を添加し、3分間混合した。浮遊物を除去し、磁気ビーズを150  $\mu$ Lの洗浄液2で再度洗浄し、1分間混合し、浮遊物を完全に除去した。磁気ビーズを2分間混合し、RNAを50  $\mu$ Lの水で溶離する前に乾燥させた。

10

【0246】

ABI 高性能cDNA逆転写キット (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat# 4368813) を用いたcDNA合成:

2  $\mu$ Lの10 $\times$ 緩衝液、0.8  $\mu$ Lの25 $\times$ dNTP、2  $\mu$ Lのランダムプライマー、1  $\mu$ Lの逆転写酵素、1  $\mu$ LのRNase阻害剤、および反応当たり3.2  $\mu$ LのH<sub>2</sub>Oのマスターミックスを、10  $\mu$ Lの総RNAに添加した。ステップ: 25 $^{\circ}$ で10分間、37 $^{\circ}$ で120分間、85 $^{\circ}$ で5秒間、4 $^{\circ}$ で保持を通して、Bio-Rad C-1000またはS-1000のサーマルサイクラー(Hercules, CA)を用いて、cDNAを生成した。

20

【0247】

リアルタイムPCR法:

2  $\mu$ LのcDNAを、MicroAmp Optical 96ウェルプレート(Applied Biosystems cat# 4326659)中のウェル当たり1  $\mu$ Lの18S TaqManプローブ(Applied Biosystems Cat# 4319413E)、1  $\mu$ LのTTR TaqManプローブ(Applied Biosystems cat# HS00174914 M1)、および10  $\mu$ LのTaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems Cat# 4324018)のマスターミックスを添加した。Ct(RQ)アッセイを用いて、ABI 7000 PrismまたはABI 7900 HTリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)において、リアルタイムPCRを行った。全ての反応を、3重に行った。

30

【0248】

Ct法を用いて、リアルタイムデータを分析し、倍率変化を計算するために、10 nM BlockIT 蛍光オリゴ(Invitrogen Cat# 2013)または10 nM AD-1955(非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照二重鎖)でトランスフェクションした細胞から行われたアッセイにたいして正規化した。

40

【0249】

分岐DNAアッセイ - QuantiGene 1.0 (Panomics, Fremont, CA, cat#: QG0004) - 齧歯類特異的な二重鎖をスクリーニングするために使用

H.4.II.E細胞(ATCC)を、10 nM siRNAでトランスフェクションした。培地を除去した後、H.4.II.Eを、100  $\mu$ Lの希釈した溶解混合物(1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20 mg/mLの最終濃度に対して1 mL当たり10  $\mu$ LのプロテイナーゼKの混合物)で溶解し、次いで、65 $^{\circ}$ で35分間インキュベートした。次いで、80  $\mu$ Lの作業プローブセット(TTRまた

50

はGAPDHプローブの混合物)および20μLの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを、53 ± 1 で終夜(約16~20時間)インキュベートした。捕捉プレートは、1×洗浄緩衝液(ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2の混合物)で3回洗浄し、次いで、1000rpmで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100μLの増幅作業用試薬を捕捉プレートに添加し、次いで、これを密閉し、46 ± 1 で1時間インキュベートした。洗浄および乾燥ステップを、1時間インキュベートした後に繰り返し、100μLの標識溶液試薬を添加した。次いで該プレートを洗浄し、乾燥させ、100μLの基質(ラウリル硫酸リチウムと基質溶液の混合物)を添加した。捕捉プレートを46 ± 1 で30分間インキュベーター中に入れた。次いで、捕捉プレートをインキュベーターから取り出し、室温で30分間インキュベートした。最終的に、Victor Luminometer(Perkin Elmer, Waltham, MA)を用いて、捕捉プレートを読み取った。

10

#### 【0250】

分岐DNAアッセイ - QuantiGene 2.0 (Panomics cat#: QS0011) : 全ての他の二重鎖をスクリーニングするために使用

提示された用量で、24時間インキュベートした後、培地を取り出し、細胞を、100μLの溶解混合物(1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20mg/mLの最終濃度に対して10μLのプロテイナーゼK/mLの混合物)中で溶解し、次いで、65 で35分間インキュベートした。次いで、20μLの作業プローブセット(遺伝子標的用のTTRプローブおよび内因性対照用のGAPDH)および80μLの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを55 ± 1 で(約16~20時間)インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1×洗浄緩衝液(ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2)で3回洗浄し、次いで、240gで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100μLの事前増幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、55 ± 1 で1時間インキュベートした。1時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、100μLの増幅作業試薬を添加した。1時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、100μLの標識プローブを添加した。捕捉プレートを、50 ± 1 で1時間インキュベートした。次いで、該プレートを1×洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、次いで、100μLの基質を捕捉プレートに添加した。5~15分間インキュベートした後、SpectraMax Luminometer(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて、捕捉プレートを読み取った。

20

30

#### 【0251】

##### b DNAデータ分析

b DNAデータは、(i)それぞれの3重の試料から平均バックグラウンドを減算し、(ii)得られる3重のGAPDH(対照プローブ)およびTTR(実験プローブ)値を平均し、次いで、(iii)比:(実験プローブ-バックグラウンド)/(対照プローブ-バックグラウンド)を得ることによって分析された。

#### 【0252】

##### 結果

40

TTR-dsRNA(TTRのsiRNA)における単回用量およびIC50の結果の概要を、下表8に示す。単回用量の結果は、HepG2細胞においてアッセイした、対照に対するTTRのmRNAの割合(%)として表す。IC50は、表示されるように、HepG2および/またはHep3B細胞において決定した。

#### 【0253】

【表 8 - 1】

T T R の s i R N A の インビトロ スクリーニングの単回用量および I C 5 0 の結果						
N D : データなし ; * は、2 つの実験の平均を表す結果を示す。						
	対照に対する、 10nMでの単回用量 の割合 (%)		I C 5 0 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
二重鎖#	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18243	50.35	141.53	ND	ND	ND	ND
AD-18244	64.26	158.55	ND	ND	ND	ND
AD-18245	56.89	107.22	ND	ND	ND	ND
AD-18246	10.53	32.51*	0.265	0.086	ND	ND
AD-18247	125.56	69.57	ND	ND	ND	ND
AD-18248	127.78	66.97	ND	ND	ND	ND
AD-18249	48.77	48.76	ND	ND	ND	ND
AD-18250	96.94	86.42	ND	ND	ND	ND
AD-18251	170.41	129.15	ND	ND	ND	ND
AD-18252	73.52	81.90	ND	ND	ND	ND
AD-18253	25.25	61.25	ND	ND	ND	ND
AD-18254	95.13	103.96	ND	ND	ND	ND
AD-18255	119.46	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18256	42.64	95.67	ND	ND	ND	ND
AD-18257	146.25	141.75	ND	ND	ND	ND
AD-18258	10.20	13.41*	0.007	0.005	0.004	0.005
AD-18259	9.30	20.91*	0.102	0.005	ND	ND
AD-18260	125.37	81.36	ND	ND	ND	ND
AD-18261	14.27	19.40*	0.210	ND	ND	ND
AD-18262	84.95	104.05	ND	ND	ND	ND
AD-18263	16.32	23.25*	0.110	ND	ND	ND
AD-18264	104.18	83.69	ND	ND	ND	ND
AD-18265	41.62	64.87	ND	ND	ND	ND
AD-18266	39.98	110.53	ND	ND	ND	ND
AD-18267	149.64	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18268	152.93	174.04	ND	ND	ND	ND
AD-18269	37.27	92.28	ND	ND	ND	ND
AD-18270	99.44	164.75	ND	ND	ND	ND
AD-18271	18.89	28.33*	0.503	0.004	ND	ND

10

20

30

40

【表 8 - 2】

AD-18272	128.32	132.58	ND	ND	ND	ND
AD-18273	115.78	201.95	ND	ND	ND	ND
AD-18274	8.97	20.04*	0.009	0.176	0.036	0.012
AD-18275	4.09	22.25*	0.026	0.118	ND	ND
AD-18276	19.73	45.22*	0.198	0.677	ND	ND
AD-18277	10.55	26.31*	0.121	0.426	ND	ND
AD-18278	108.86	116.26	ND	ND	ND	ND
AD-18279	66.59	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18280	103.26	170.52	ND	ND	ND	ND
AD-18281	87.98	123.88	ND	ND	ND	ND
AD-18282	82.47	140.32	ND	ND	ND	ND
AD-18283	106.54	182.78	ND	ND	ND	ND
AD-18284	106.93	151.78	ND	ND	ND	ND
AD-18285	26.58	60.05*	ND	0.089	ND	ND
AD-18286	109.95	173.66	ND	ND	ND	ND
AD-18287	54.23	155.45	ND	ND	ND	ND
AD-18288	73.52	174.09	ND	ND	ND	ND
AD-18289	103.36	174.76	ND	ND	ND	ND
AD-18290	17.06	52.04*	1.253	0.181	ND	ND
AD-18291	7.71	169.29*	1.304	0.019	ND	ND
AD-18292	7.51	210.03*	0.604	0.005	ND	ND
AD-18293	3.61	62.53*	0.078	0.003	ND	ND
AD-18294	111.53	107.56	ND	ND	ND	ND
AD-18295	115.88	105.37	ND	ND	ND	ND
AD-18296	57.03	38.03	ND	ND	ND	ND
AD-18297	87.69	73.87	ND	ND	ND	ND
AD-18298	10.39	7.25*	0.455	0.008	ND	ND
AD-18299	18.79	18.06*	0.895	0.014	ND	ND
AD-18300	108.70	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18301	114.22	70.50	ND	ND	ND	ND
AD-18302	116.19	122.40	ND	ND	ND	ND
AD-18303	124.89	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18304	132.99	89.54	ND	ND	ND	ND
AD-18305	153.10	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18306	159.22	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18307	116.83	84.57	ND	ND	ND	ND

10

20

30

40

【表 8 - 3】

AD-18308	156.72	87.80	ND	ND	ND	ND
AD-18309	113.22	101.97	ND	ND	ND	ND
AD-18310	132.33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18311	161.68	92.92	ND	ND	ND	ND
AD-18312	103.01	71.17	ND	ND	ND	ND
AD-18313	120.65	53.26	ND	ND	ND	ND
AD-18314	116.33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18315	115.13	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18316	118.73	122.34	ND	ND	ND	ND
AD-18317	114.03	121.10	ND	ND	ND	ND
AD-18318	80.85	122.57	ND	ND	ND	ND
AD-18319	119.14	148.87	ND	ND	ND	ND
AD-18320	22.86	55.43*	ND	0.023	0.403	ND
AD-18321	6.44	31.56*	0.001	0.033	ND	ND
AD-18322	54.21	100.46	ND	ND	ND	ND
AD-18323	6.37	28.71*	0.005	0.023	ND	ND
AD-18324	2.53	15.98*	0.002	0.006	0.005	0.014
AD-18325	2.52	11.96*	0.001	0.016	ND	ND
AD-18326	18.34	43.16*	0.025	0.186	ND	ND
AD-18327	18.28	13.90*	0.044	0.215	ND	ND
AD-18328	4.53	26.04*	0.003	0.004	0.006	0.006
AD-18329	96.93	131.54	ND	ND	ND	ND
AD-18330	11.80	45.18*	0.0004	0.010	0.020	ND
AD-18331	117.77	163.07	ND	ND	ND	ND
AD-18332	11.53	35.09*	0.001	0.076	0.065	ND
AD-18333	12.24	46.94*	0.001	0.115	0.075	ND
AD-18334	16.27	55.28*	0.0004	0.181	1.071	ND
AD-18335	53.52	112.80	ND	ND	ND	ND
AD-18336	6.39	33.00*	0.001	0.112	0.081	ND
AD-18337	51.77	105.33	ND	ND	ND	ND
AD-18338	48.21	102.86	ND	ND	ND	ND
AD-18339	6.48	26.56*	0.004	0.002	0.018	0.029
AD-18340	4.53	30.76*	0.002	0.002	ND	ND
AD-18341	31.27	100.41	ND	ND	ND	ND
AD-18342	7.60	42.89*	ND	0.016	0.076	ND
AD-18343	3.42	17.45*	ND	0.001	ND	ND
AD-18344	75.08	134.31	ND	ND	ND	ND

10

20

30

40

【表 8 - 4】

AD-18345	13.62	42.75*	0.002	0.013	ND	ND
AD-18346	59.25	121.10	ND	ND	ND	ND
AD-18347	91.23	139.54	ND	ND	ND	ND
AD-18348	89.95	159.29	ND	ND	ND	ND
AD-18349	108.01	144.96	ND	ND	ND	ND
AD-18350	123.65	125.87	ND	ND	ND	ND
AD-18351	108.36	104.02	ND	ND	ND	ND
AD-18352	87.82	128.72	ND	ND	ND	ND
AD-18353	14.40	65.77	0.012	0.027	ND	ND
AD-18354	99.27	123.53	ND	ND	ND	ND
AD-18355	135.04	150.88	ND	ND	ND	ND
AD-18356	100.76	178.96	ND	ND	ND	ND
AD-18357	125.30	162.85	ND	ND	ND	ND
AD-18358	103.15	136.01	ND	ND	ND	ND
AD-18359	34.74	140.48	ND	ND	ND	ND
AD-18360	103.86	146.86	ND	ND	ND	ND
AD-18361	105.74	152.74	ND	ND	ND	ND
AD-18362	106.96	188.22	ND	ND	ND	ND
AD-18363	124.22	58.46	ND	ND	ND	ND
AD-18364	113.75	66.87	ND	ND	ND	ND
AD-18446	29.73	13.30	ND	ND	ND	ND
AD-18447	109.74	53.63	ND	ND	ND	ND
AD-18448	22.96	8.81	ND	ND	ND	ND
AD-18449	112.59	50.11	ND	ND	ND	ND
AD-18450	89.41	34.89	ND	ND	ND	ND
AD-18451	74.35	23.88	ND	ND	ND	ND
AD-18452	125.25	54.86	ND	ND	ND	ND
AD-18453	126.98	56.31	ND	ND	ND	ND
AD-18454	113.88	52.48	ND	ND	ND	ND
AD-18455	163.00	48.89	ND	ND	ND	ND
AD-18456	15.70	10.52	ND	ND	ND	ND
AD-18457	12.86	8.22	ND	ND	ND	ND
AD-18458	13.00	7.00	ND	ND	ND	ND
AD-18459	14.41	10.72	ND	ND	ND	ND
AD-18460	121.16	74.87	ND	ND	ND	ND
AD-18461	100.53	71.87	ND	ND	ND	ND
AD-18462	47.75	29.35	ND	ND	ND	ND
AD-18463	58.98	44.79	ND	ND	ND	ND

10

20

30

40

## 【 0 2 5 4 】

5つのTTR-dsRNA(AD-18258、AD-18274、AD-18324、AD-18328、およびAD-18339)に対するIC50を特定するために使用された用量反応データを、下表9に詳細に示す。全て5つのsiRNAが、pM単位のIC50を有することが確認された。表8中のdsRNAに対するIC50データは、下表9に表したデータの要約である。

50

【 0 2 5 5 】

【表 9 - 1】

5 つの T T R の d s R N A に対する用量反応データ

		対照AD-1955と比較した、阻害率 (%)												
二重鎖 AD-182 58		二重鎖の用量 (nM)												
細胞型	検出方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	14.4	14.1	16.2	23.9	27.2	40.1	68.4	78.1	74.4	104.3	98.2	113.6	0.007
HepG2	qPCR	14.3	14.5	11.1	12.8	18.8	19.7	51.2	56.0	63.6	58.3	43.6	51.0	0.005
HepG2	qPCR	11.9	8.62	12.4	16.4	28.3	30.4	58.3	54.5	81.2	89.4	81.8	101.8	0.004
HepG2	qPCR	7.65	7.5	11.3	12.6	28.8	27.8	64.5	73.4	72.0	91.4	86.7	89.3	0.005

10

20

30

【表 9 - 2】

		対照AD-1955と比較した、阻害率 (%)												
二重鎖 AD-182		二重鎖の用量 (nM)												
細胞 型	検出 方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG 2	qPCR	6.68	8.45	11.7	24.2	42.08	49.89	56.95	62.99	64.47	54.92	67.39	72.67	0.009
HepG 2	bDNA	27.5	69	25.2	34.2	73.03	103.4	121.57	97.31	154.93	156.7	Nd	152.25	0.176
Hep3 B	qPCR	7.58	17	15.6	43.9	42.22	60.55	78.8	77.81	79.97	85.84	86.13	83.99	0.036
Hep3 B	bDNA	3.77	4.92	7.51	15	35.21	51.66	72.45	70.12	78.31	77.52	90.72	83.01	0.012

10

		対照AD-1955と比較した、阻害率 (%)												
二重鎖 AD-18324		二重鎖の用量 (nM)												
細胞 型	検出 方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	2.07	2.27	2.74	6.36	8.18	15.23	28.82	52.79	90.86	94.72	116.07	98.97	0.002
HepG2	bDNA	14.5	7.88	11.8	15.9	17.2	46.44	40.4	81.86	0	95.57	0	52.15	0.006
Hep3B	qPCR	2.07	3.48	5.76	16.2	18.73	44.54	49.77	68.88	63.48	76.81	74.7	77.83	0.005
Hep3B	bDNA	3.48	3.8	5.15	15.2	30.84	55.36	74.75	99.39	88.89	110.83	96.55	110.26	0.014

20

		対照AD-1955と比較した、阻害率 (%)												
二重鎖 AD-18328		二重鎖の用量 (nM)												
細胞 型	検出 方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	5.85	3.97	3.32	5.62	8	16.75	55.01	39.76	122.41	102.37	114.02	124.09	0.003
HepG2	bDNA	12.3	10.7	10.7	11.9	20.06	25	69.52	57.29	112.28	98.14	142.26	148.92	0.004
Hep3B	qPCR	3.17	5.52	11.7	13.8	27.68	39.58	61.21	61.87	80.51	87.56	106.03	108.72	0.006
Hep3B	bDNA	3.08	3.66	4.19	7.25	21.05	22.1	73.74	63.19	105.55	96.27	105.97	96.46	0.006

30

40

		対照AD-1955と比較した、阻害率 (%)												
二重鎖														
AD-18339		二重鎖の用量 (nM)												
細胞型	検出方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	6.27	7.28	Nd	11	15.25	38.69	38.78	71.7	84.09	62.2	75.61	85.46	0.004
HepG2	bDNA	15.1	8.14	5.13	6.89	12.17	32.14	42.98	64.01	60.76	79.95	81.97	95.43	0.002
Hep3B	qPCR	8.3	9.47	13.2	34.5	44.54	77.38	81.04	81.41	93.95	81.04	75.61	78.28	0.018
Hep3B	bDNA	10.5	9.43	11.7	27.1	44.88	72.32	79.88	79.6	87.46	96.53	95.13	89.88	0.029

10

## 【0256】

齧歯類特異的なTTR-dsRNA(TTRのsiRNA)に対する単回用量の結果の概要を、下表10に表す。単回用量の結果は、対照に対するTTRのmRNAの割合(%)として表し、10nMで齧歯類特異的なTTRのsiRNAをトランスフェクションした後、ラットH.4.II.E細胞においてアッセイした。これらの結果は、幾つかの齧歯類特異的なTTRのsiRNAが、インビトロで内因性ラットTTRのmRNAを抑制するのに効果的であることを示す。

## 【0257】

## 【表10】

20

齧歯類に特異的なTTR-dsRNA(TTRのsiRNA)のインビトロスクリーニングの単回用量の結果

二重鎖#	10nMにおける対照に対する割合 (%)	二重鎖#	10nMにおける対照に対する割合 (%)
AD-18529	19.83	AD-18542	6.3
AD-18530	44.49	AD-18543	16.46
AD-18531	6.01	AD-18544	17.55
AD-18532	24.06	AD-18545	3.53
AD-18533	37.78	AD-18546	2.75
AD-18534	8.19	AD-18547	7.01
AD-18535	10.18	AD-18548	5.02
AD-18536	16.13	AD-18549	1.61
AD-18537	15.88	AD-18550	9.58
AD-18538	19.93	AD-18551	7.74
AD-18539	49.24	AD-18552	3.74
AD-18540	2.99	AD-18553	50.39
AD-18541	1.32	AD-18554	111.06

30

## 【0258】

実施例3.TNF- およびIFN- の分泌の誘発に対するTTRのsiRNAのインビトロアッセイ

免疫刺激に対する潜在性を評価するために、TNF- およびIFN- の分泌の誘発に対するTTRのsiRNAを、インビトロでアッセイした。

## 【0259】

ヒトPBMCは、標準フィコールハイパック(Ficoll-Hypaque)密度遠心分離によって、健常なドナーから得た新たに回収したパフィーコート(Research Blood Components, Inc., Boston, MA)から単離された。新たに単離された細胞( $1 \times 10^5$  / ウェル /  $100 \mu\text{L}$ )を、96ウェルプレート

40

50

に播種し、10% 加熱不活性化したウシ胎仔血清および1% 抗生物質/抗真菌 (Invitrogen) で補完されるRPMI 1640 GlutaMax培地 (Invitrogen) で培養した。

【0260】

DOTAPトランスフェクション試薬 (Roche Applied Science) を用いて、siRNAをPBMCにトランスフェクションした。DOTAPは、まず、siRNAを含有する等容量のOpti-MEMと混合する前に、5分間Opti-MEM (Invitrogen) 中で希釈した。製造業者の取扱説明書によって規定されるように、siRNA/DOTAP複合体をインキュベートし、続いて、PBMC (50  $\mu$ L / ウェル) に添加し、次いで、これを24時間培養した。陽性および陰性対照siRNAを、全てのアッセイに含んだ。AD-5048を、陽性対照siRNAとして使用した。AD-5048は、ヒトアポリポタンパク質B (Sou tschek et al., 2004) を標的とする配列に対応し、このアッセイにおいて、IFN- およびTNF- の両方の分泌を引き起こす。このアッセイにおいて、IFN- およびTNF- の分泌を引き起こさない、AD-1955を、陰性対照siRNAとして使用した。全てのsiRNAを、133 nMの最終濃度で使用した。RNAのトランスフェクション試薬に対する比は、DOTAPの1  $\mu$ g 当たり16.5 pモルであった。

10

【0261】

両方ともBender MedSystems (Vienna, Austria) からのIFN- (BMS216INST) およびTNF- (BMS223INST) 用の市販のELISAキットを用いて、培養浮遊物中のサイトカインを、検出し、定量化した。TTRのsiRNAのサイトカイン誘発は、陽性対照siRNA AD-5048に対する、産生したIFN- またはTNF- の割合として表される。

20

【0262】

多くのTTRのsiRNAに対するIFN- およびTNF- の刺激結果を、図1 (4重のウェル  $\pm$  標準偏差の平均) および下表11 (AD-5048と比較した割合) に表す。TTRのsiRNAは、培養したヒトPBMCによる誘発した有意なTNF- またはIFN- の分泌は、評価されなかった。

【0263】

【表 1 1 - 1】

T T R の s i R N A に対する I F N -  $\alpha$  および T N F -  $\alpha$  の刺激結果

二重鎖#	IFN- $\alpha$ (AD-5048 に対する割合 (%) )	TNF- $\alpha$ (AD-5048 に対する割合 (%) )
AD-18246	0	4
AD-18258	0	0
AD-18259	0	0
AD-18261	0	0
AD-18263	0	0
AD-18271	0	0
AD-18274	2	1
AD-18275	0	0
AD-18276	0	0
AD-18277	0	0
AD-18285	0	0
AD-18290	0	0
AD-18291	0	0
AD-18292	0	0
AD-18293	0	0
AD-18298	0	0
AD-18299	0	0
AD-18320	0	0
AD-18321	0	0
AD-18323	0	0
AD-18324	0	0
AD-18325	0	0
AD-18326	0	0
AD-18327	0	0
AD-18328	0	0
AD-18330	0	0

10

20

30

【表 1 1 - 2】

AD-18332	1	0
AD-18333	0	1
AD-18334	0	1
AD-18336	1	0
AD-18339	0	0
AD-18340	0	0
AD-18342	0	0
AD-18343	0	0
AD-18345	0	0
AD-18353	0	0
AD-18448	0	0
AD-18456	0	0
AD-18457	0	0
AD-18458	0	0
AD-18459	0	0

40

【 0 2 6 4】

5 つの T T R 標的化リード d s R N A ( T T R の s i R N A ) を、ヒト肝細胞株 H e p

50

G2およびHep3Bにおいて、および免疫刺激活性の不在下で、pM範囲のIC50に基づいて選択した。いずれのミスマッチもない二重鎖は、オリゴとmRNAとの間でミスマッチがある二重鎖よりも標的転写物の有意なノックダウンを達成する可能性が高い。交差種毒物学的データのより良好な翻訳を可能にし、ヒト患者に対して広範な適用性を有するために、ラット、カニクイザル、およびヒトからのオーソログ遺伝子において100%同一性を有し、既知の多型を有する領域を標的としない、二重鎖が、一般に好ましい。5つのリード化合物は、pM範囲の肝細胞株におけるIC50に基づいて、免疫刺激活性の不在下で、ヒトTTR転写物への特異性、および二重鎖によって標的とされるmRNAの領域内で、既知の多型(変異)の不在下で選択された。TTRの場合は、ヒト、ラット、およびカニクイザルにおいて、完全な同一性がある、19塩基オリゴは見出されなかった。これらのデータの概要を、表12に表し、これにはまた、二重鎖および交差種反応性によって標的とされる領域内の既知のTTR変異の情報も含まれる。

【0265】

【表12】

5つの最も有力なTTRのdsRNAに対するデータの概要

二重鎖#	IC50 (qPCR): nM HepG2	IC50 (bDNA): nM HepG2	IFNa/TNFa	網羅されて いない 変異	交差種反応性
AD-18258	0.007	0.005	陰性	なし (非コーディング 領域)	サル:A~Gの14位で1つのミスマッチ ラット:いずれの位置でも相同性なし
AD-18274	0.009	0.176	陰性	Lys70Asn; Val71Ala; Ile73Val; Asp74His	サル:ミスマッチなし ラット:いずれの位置でも相同性なし
AD-18324	0.002	0.006	陰性	なし (非コーディング 領域)	サル:ミスマッチなし ラット:いずれの位置でも相同性なし
AD-18328	0.003	0.004	陰性	なし (非コーディング 領域)	サル:ミスマッチなし ラット:7つのミスマッチ
AD-18339	0.004	0.002	陰性	なし (非コーディング 領域)	なし

【0266】

実施例4. トランスジェニックマウスにおける、LNP01-18324、LNP01-18328、およびLNP01-18246による肝臓TTRのmRNAおよび血漿TTR

### Rタンパク質のインビボの低下

2つのTTRの*siRNA*であるAD-18324およびAD-18328を、インビボ評価のために選択した。これらの二重鎖は、肝細胞株（例えば、HepG2）における、インビボで有力な用量依存的な発現停止を示した。図2Aおよび図2Bは、AD-18324（図2A）またはAD-18328（図2B）でトランスフェクションした後の、HepG2細胞内の用量反応を示し、ここで、該用量は、x軸上にnMで表し、反応は、y軸上に、対照と比較した、画分TTRのmRNAの残存として表す。HepG2細胞では、AD-18324およびAD-18328のIC50は、それぞれ、2pMおよび3pMであると確認された。両方のリードdsRNA候補に対するTTR標的部位は、TTRのmRNAの3'非翻訳領域、文献で報告された変異がない領域内にある。

10

#### 【0267】

表からの2つのリード候補のそれぞれの鎖の配列を、以下に再現する。鎖：s = センス、as = アンチセンス 位置：NM\_000371.2の転写物における5'位の塩基

二重鎖#	鎖	オリゴ#	位置*	5' から3' への方向の配列	配列番号
AD-18324	s	A-32337	509	GGAuuucAuGuAAccAAGAdTdT	1001
AD-18324	as	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1002
AD-18328	s	A-32345	518	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1009
AD-18328	as	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1010

20

#### 【0268】

加えて、齧歯類交差反応性TTRのdsRNA、AD-18246をインビボでさらなる評価のために選択した。AD-18246は、オープンリーディングフレームの88位で開始する配列を標的とし、ここに、文献中に報告された3つの変異がある。HepG2細胞内のAD-18246に対する用量反応曲線を図3に示す。AD-18246は、実質的には、AD-18324およびAD-18328よりも有力ではなく、AD-18246のIC50は、265pMであると決定した。

#### 【0269】

30

AD-18324、AD-18328、およびAD-18246を、LNP01に製剤化した後、トランスジェニックマウスに投与した。3~5月齢のH129-mTTR-KO/iNOS-KO/hTTRのトランスジェニックマウス（マウストランスチレチンのノックアウト/誘導一酸化窒素シンターゼノックアウト/ヒトのトランスチレチントランスジェニック）に、*siRNA*のAD-18324およびAD-18328に対して、1.0mg/kg、3.0mg/kg、または6.0mg/kgで、*siRNA*のAD-18246に対して、3.0mg/kgで、および*siRNA*のAD-1955に対して、6.0mg/kgの濃度で、尾静脈を介して、200μLのLNP01に製剤化したトランスチレチンに特異的な*siRNA*（AD-18324、AD-18328、またはAD-18246）、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とするLNP01に製剤化した対照*siRNA*（AD-1955）、またはPBSを静脈内（IV）投与した。LNP01は、ND98、コレステロール、およびPEG-Ceramide C16からなる脂質様製剤である。

40

#### 【0270】

約40時間後、マウスに、200μLのケタミンで麻酔をかけ、次いで、右側の尾動脈を切断することによって採血した。全血は単離され、血漿は単離され、アッセイするまで-80で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

#### 【0271】

処置の有効性は、(i)投薬から48時間後、肝臓におけるTTRのmRNAの測定、

50

ならびに ( i i ) 前採血および投薬から 48 時間後、血漿中の T T R タンパク質の測定によって評価された。T T R 肝臓の m R N A レベルは、分岐 D N A アッセイ - Q u a n t i G e n e 2 . 0 ( P a n o m i c s c a t # : Q S 0 0 1 1 ) を利用してアッセイされた。簡潔に言えば、マウス肝臓の試料を粉砕し、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物 ( 1 容量の溶解混合物、2 容量のヌクレアーゼを含有しない水、および 2 0 m g / m L の最終濃度に対して 1 0 u L のプロテイナーゼ K / m L の混合物 ) を、6 5 ° C で 3 5 分間インキュベートした。次いで、2 0 u L の作業プローブセット ( 遺伝子標的用の T T R プローブおよび内因性対照用の G A P D H ) および 8 0 u L の細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを 5 5 ± 1 ° C ( 約 1 6 ~ 2 0 時間 ) インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1 × 洗浄緩衝液 ( ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分 1、および洗浄緩衝液の構成成分 2 ) で 3 回洗浄し、次いで、2 4 0 g で 1 分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。1 0 0 u L の事前増幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、5 5 ± 1 ° C で 1 時間インキュベートした。1 時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、1 0 0 u L の増幅作業試薬を添加した。1 時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、1 0 0 u L の標識プローブを添加した。捕捉プレートを、5 0 ± 1 ° C で 1 時間インキュベートした。次いで、該プレートを 1 × 洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、1 0 0 u L の基質を捕捉プレートに添加した。5 ~ 1 5 分間インキュベートした後、S p e c t r a M a x L u m i n o m e t e r を用いて、捕捉プレートを読み取った。b D N A データは、それぞれの 3 重の試料から平均バックグラウンドを減算し、得られる 3 重の G A P D H ( 対照プローブ ) および T T R ( 実験プローブ ) 値を平均し、次いで、比 : ( 実験プローブ - バックグラウンド ) / ( 対照プローブ - バックグラウンド ) をコンピュータで計算することによって分析された。

#### 【 0 2 7 2 】

T T R 血漿中レベルは、製造業者のガイドラインに従って、市販のキットの「A s s a y M a x ヒトプレアルブミン E L I S A キット」( A s s a y P r o , S t . C h a r l e s , M O , C a t a l o g # E P 3 0 1 0 - 1 ) を利用して、アッセイした。簡潔に言えば、マウス血漿は、1 × 混合希釈液中で 1 : 1 0 , 0 0 0 に希釈し、標準キットと共に前被覆されたプレートに添加し、室温で 2 時間インキュベートし、続いて、キットの洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。5 0 マイクロリットルのビオチン化プレアルブミン抗体を、それぞれのウェルに添加し、室温で 1 時間インキュベートし、続いて、洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。5 0 マイクロリットルのストレプトアビジン - ペルオキシダーゼコンジュゲートを、それぞれのウェルに添加し、室温で 3 0 分間インキュベートし、続いて、前述のように洗浄した。5 0 u L / ウェルの停止溶液を添加することによって反応の停止を伴い、5 0 u L / ウェルの発色基質を添加し、室温で 1 0 分間インキュベートすることによって、反応を生じさせた。4 5 0 n m での吸光度を、マイクロプレートリーダー ( M o l e c u l a r D e v i c e s , S u n n y v a l e , C A ) 上で読み取り、データを、S o f t m a x 4 . 6 ソフトウェアパッケージ ( M o l e c u l a r D e v i c e s ) を利用して分析した。

#### 【 0 2 7 3 】

L N P 0 1 - 1 8 3 2 4 および L N P 0 1 - 1 8 3 2 8 は、I V ボーラス投与を伴う用量依存的な様式で、肝臓 T T R の m R N A ( 図 4 A ) および血漿 T T R タンパク質 ( 図 4 B ) レベルを低下することが見出された。L N P 0 1 - 1 8 3 2 8 の m R N A E D 5 0 は、約 1 m g / k g であると決定され、一方、L N P 0 1 - 1 8 3 2 4 の E D 5 0 は、約 2 m g / k g であることが確認された。6 m g / k g での対照の L N P 0 1 - 1 9 5 5 が、P B S 群と比較して、肝臓 T T R の m R N A レベルに有意に影響を及ぼさなかったため、L N P 0 1 - 1 8 3 2 4 および L N P 0 1 - 1 8 3 2 8 の効果は特異的であった。L N P 0 1 - 1 8 3 2 4 および L N P 0 1 - 1 8 3 2 8 は、P B S 群と比較して、T T R の m R N A レベルにおけるものと同様の効力を有する、血漿 T T R タンパク質レベルを低下させた。3 m g / k g で、L N P 0 1 - 1 8 2 4 6 は、3 m g / k g の L N P 0 1 - 1 8 3 2 4 または L N P 0 1 - 1 8 3 2 8 よりも少ない程度で肝臓 T T R の m R N A レベルを低

10

20

30

40

50

下させた。

#### 【0274】

これらの結果は、IVボラスにより投与された、LNP01-18324およびLNP01-18328が、実質的には、トランスジェニックマウス肝臓によって発現されたヒトTTRのmRNAを低下させ、血中循環中のヒトTTRタンパク質の低下をもたらすことを実証する。

#### 【0275】

#### 実施例5. SNALP-18324およびSNALP-18328による非ヒト霊長類の肝臓中の野生型TTRのmRNAのインビボの低下

非ヒト霊長類における、肝臓TTRのmRNAレベルのTTR siRNAのAD-18324およびAD-18328の有効性を評価するために、該siRNAは、SNALPに製剤化され、15分間のIV注入によって投与された。カニクイザル(Macaca fascicularis)(2~5kg、1群当たり3匹の動物)に、SNALP-18324(0.3、1.0、もしくは3.0mg/kg)、SNALP-18328(0.3、1.0、もしくは3mg/kg)、またはSNALP-1955(3mg/kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照siRNA AD-1955を有する)を15分間のIV注入で投与した。投薬から48時間後、サルに、ペントバルビタールナトリウムで麻酔をかけ、失血させた。TTRのmRNA決定に対する肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80℃で保存された。

#### 【0276】

特注の分岐DNAアッセイを利用して、およびQuantigene 1.0技術を利用して、肝臓中のTTRのmRNAレベルを、アッセイした。簡潔に言えば、サル肝臓の試料を粉碎し、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物(1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20mg/mLの最終濃度に対して10μLのプロテインナーゼK/mLの混合物)を、65℃で35分間インキュベートした。次いで、20μLの作業プローブセット(遺伝子標的用のTTRプローブおよび内因性対照用のGAPDH)および80μLの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを55±1℃で(約16~20時間)インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1×洗浄緩衝液(ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2)で3回洗浄し、次いで、240gで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100μLの事前増幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、55±1℃で1時間インキュベートした。1時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、100μLの増幅作業試薬を添加した。1時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、100μLの標識プローブを添加した。捕捉プレートを、50±1℃で1時間インキュベートした。次いで、該プレートを1×洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、次いで、100μLの基質を捕捉プレートに添加した。5~15分間インキュベートした後、SpectraMax Luminometerを用いて、捕捉プレートを読み取った。bDNAデータは、(i)それぞれの3重の試料から平均バックグラウンドを減算し、(ii)得られるGAPDH(対照プローブ)およびTTR(実験プローブ)値を平均し、次いで、(iii)比:(実験プローブ-バックグラウンド)/(対照プローブ-バックグラウンド)を得ることによって分析された。

#### 【0277】

結果を図5に示す。SNALP-18324およびSNALP-18328は、陰性対照SNALP-1955と比較して、用量依存的な様式で、肝臓中のTTRのmRNAレベルを低下させた。SNALP-18328およびSNALP-18324のmRNA ED50は、それぞれ、約0.3および約1mg/kgであると決定した。

#### 【0278】

これらの結果は、SNALP-18324およびSNALP-18328が、IV注入による投与時に、非ヒト霊長類肝臓中の野生型TTRのmRNAを抑制するのに効果的であることを実証する。

## 【0279】

実施例6. トランスジェニックマウスにおける、SNALP-18328による変異(V30M) TTRのmRNAおよびタンパク質のインビボの低下

肝臓中の変異(V30M) TTRのmRNAおよび血清中の変異(V30M) TTRタンパク質における、TTRのsiRNA AD-18328の有効性を評価するために、AD-18328を、SNALPに製剤化し、V30M hTTRトランスジェニックマウスに、IVボラスにより投与した。8~12週齢のV30M hTTRトランスジェニックマウス(5匹の動物/群)に、200 $\mu$ LのSNALP-18328(0.03、0.3、もしくは3mg/kg)、SNALP-1955(3mg/kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照siRNA AD-1955を有する)、またはPBSを静脈内(IV)投与した。使用したマウスは、Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, PortugalからのMus musculus株H129-hTTR KOであった。簡潔に言えば、hTTR H129トランスジェニックマウスを、H129内因性TTR KOマウス(ヌルマウスTTRのバックグラウンドにおいて、H129-hTTRトランスジェニックマウスを生成するためのヌルマウス(Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17-20.))と交配した。

10

20

## 【0280】

注射してから48時間後、全て5つの処置群の動物に、致死量のケタミン/キシラジンを与えた。血清試料は、収集し、分析するまで-80で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

## 【0281】

TTRのmRNA定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、PBS処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、TTRのmRNAの発現の相対レベルを得た。

30

## 【0282】

TTRタンパク質の定量化については、製造業者のプロトコルに従って、AssayPro(St. Charles, MO)のAssaymax PreAlbumin ELISAキットを用いて、血清をアッセイした。

## 【0283】

肝臓mRNAおよび血清タンパク質における結果を、それぞれ、図6Aおよび図6Bに示す。SNALP-18328で処置したV30M hTTRトランスジェニックマウスは、PBS対照群と比較して、肝臓TTRのmRNAレベルにおいて、用量依存的、かつ有意な低下があり、SNALP-18328の3mg/kgで、97%( $p < 0.001$ )の最大低下率、およびSNALP-18328の約0.15mg/kgで、50%低下(ED50)に達した。血清TTRタンパク質はまた、SNALP-18328の3mg/kgで、(投薬前のレベルと比較して)血清TTRタンパク質の99%( $p < 0.01$ )の最大低下率を有する、用量依存的な様式で抑制され、これは、TTRのmRNAレベルの低下と一致した。3mg/kgでのSNALP-1955は、PBSと比較して、TTRのmRNAあるいはタンパク質レベルのいずれかにおいて統計的に有意な効果がなかった。

40

50

## 【0284】

これらの結果は、IV投与した時、SNALP-18328が、トランスジェニックマウス肝臓中の変異V30M TTRのmRNAを抑制するのに活性があり、血中循環中の変異V30M TTRタンパク質の低下をもたらすことを実証する。

## 【0285】

実施例7.トランスジェニックマウスにおける、SNALP-18328によるTTRのmRNAおよびタンパク質抑制の持続性

SNALP-18328によるTTRのmRNAおよびタンパク質抑制の持続性を評価するために、AD-18328をSNALPに製剤化し、V30M hTTRトランスジェニックマウスにIVボラス投与した。投薬後の種々の時点で、肝臓TTRのmRNAレベルおよび血清TTRのタンパク質レベルを定量化した。8~12週齢のV30M hTTRトランスジェニックマウス(4匹の動物/群)に、200μLのSNALP-18328(1mg/kg)、またはSNALP-1955(1mg/kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照siRNA AD-1955を有する)を静脈内(IV)投与した。使用したマウスは、Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, PortugalからのMus musculus株H129-hTTR KOであった。簡潔に言えば、hTTR H129トランスジェニックマウスを、H129内因性TTR KOマウス(ヌルマウスTTRのバックグラウンドにおいて、H129-hTTRトランスジェニックマウスを生成するためのヌルマウス(Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17-20)と交配した。投薬から3日目、8日目、15日目、または22日目に、両方の処置群の動物は、致死量のケタミン/キシラジンを与えられた。血清試料は、収集し、分析するまで-80で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

## 【0286】

TTRのmRNA定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、PBS処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、TTRのmRNAの発現の相対レベルを得た。

## 【0287】

TTRタンパク質の定量化については、製造業者のプロトコルに従って、AssayPro(St. Charles, MO)のAssaymax PreAlbumin ELISAキットを用いて、血清をアッセイした。

## 【0288】

肝臓mRNAおよび血清タンパク質における結果を、それぞれ、図7Aおよび図7Bに示す。hTTR V30Mトランスジェニックマウスにおいて、SNALP-18328の単回IVボラス投与は、肝臓中のTTRのmRNAレベルおよび血清中のTTRタンパク質レベルの持続的な阻害をもたらした。対照群(1mg/mL SNALP-1955)と比較して、1mg/kgでのSNALP-18328の単回IV投与は、投薬から3日目、8日目、15日目、および22日目の相対的TTRのmRNAレベルを、それぞれ、96%( $p < 0.001$ )、90%( $p < 0.001$ )、82%( $p < 0.001$ )、および73%( $p < 0.001$ )で有意に低下させ、研究の終了時(投薬から22日目)に、基線レベルに戻らなかった。タンパク質レベルはまた、投薬から3日目で、(SN

ALP - 1955と比較して) 97% ( $p < 0.001$ ) の血清 TTR の最大の低下を伴い減少した。投薬から 8 日目、15 日目、および 22 日目で、TTR タンパク質レベルは、SNALP - 1955と比較して、それぞれ、72% ( $p < 0.05$ )、32% ( $p < 0.05$ )、および 40% ( $p < 0.001$ ) で抑制された。

#### 【0289】

これらの結果は、SNALP - 18328 の単回 IV 投与は、V30M hTTR トランスジェニックマウスにおいて、標的肝臓 mRNA および血清タンパク質レベルの持続的な抑制を生じ、投薬から 22 日目で、肝臓 TTR の mRNA および血清 TTR タンパク質の有意な低下を得ることを実証する。

#### 【0290】

実施例 8. 非ヒト霊長類における、SNALP - 18328 による血清 TTR タンパク質および肝臓 mRNA 抑制の持続性

SNALP - 18328 による血清 TTR タンパク質抑制の持続性を評価するために、AD - 18328 を SNALP に製剤化し、非ヒト霊長類に IV 注入により投与した。投薬後の種々の時点で、血清 TTR のタンパク質レベルを定量化した。

#### 【0291】

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) (SNALP - 18328 群用の  $n = 5$  匹の動物 / 群および SNALP - 1955 群および PBS 群用の  $n = 3$  匹の動物 / 群) に、SNALP - 18328 (0.3、1、もしくは 3 mg / kg)、SNALP - 1955 (3 mg / kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照 siRNA AD - 1955 を有する)、または PBS を 15 分間の IV 注入で投与した。投与期の 0 日目、1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目、7 日目、10 日目、および 14 日目で、血清試料は、収集され、分析まで - 80 °C で保存された。

#### 【0292】

ウェスタンブロット分析を使用して、血清試料中の TTR タンパク質レベルを評価した。それぞれの群からの血清試料は、プールされ、Laemmli 試料緩衝液を用いて 1 : 1 に希釈した (-メルカプトエタノールを 1 : 20 の希釈で添加した)。該試料を 95 °C で 10 分間加熱した。12.5  $\mu$ L のそれぞれの試料を、10 ~ 20% Criterion (Biorad, Hercules, CA) 調製用ゲルのそれぞれのレーンに装填し、120V で 1.5 時間、SDS - PAGE により分離し、次いで、15V で 1 時間、セミドライシステムを用いて、ニトロセルロース膜に移した。1 x PBS を用いて 1 : 1 に希釈した LiCOR (Lincoln, NE) ブロッキング緩衝液中で、該膜を、終夜 4 °C でブロックした。まず、ロッカー (rock er) 上で室温で 1 時間、LiCOR ブロッキング緩衝液 / PBS 中で 1 : 1000 に希釈した希釈液で、該ブロットを、一次抗体 (Santa Cruz (Santa Cruz, CA) からのヤギ抗 TTR) でプローブした。ブロットは、PBS + 0.2% Tween 20 を用いて 4 回洗浄した (洗浄当たり 10 分間)。蛍光標識二次抗体 (Invitrogen (Carlsbad, CA) からの抗ヤギ 680 nm) を、LiCOR ブロッキング緩衝液 / PBS 中で 1 : 10,000 の希釈液で添加し、該ブロットを室温で 1 時間インキュベートした。インキュベートした後、ブロットを、PBS + 0.2% Tween 20 で 4 回洗浄し、続いて、1 x PBS で 1 回洗浄した。LiCOR 社の Odyssey Infrared Imaging System を使用して、タンパク質バンドを検出した。TTR モノマーは、15 kDa で移動する。

#### 【0293】

結果を図 8 に示す。血清 TTR のタンパク質レベルは、投薬前 (0 日目) のレベルと比較した場合、1 または 3 mg / kg の SNALP - 18328 で用量依存的な低下を示した。SNALP - 18328 の単回 IV 投与後の、抑制の持続性は、1 または 3 mg / kg の SNALP - 18328 での処置から少なくとも 14 日間である。

#### 【0294】

これらの結果は、SNALP - 18328 の単回 IV 投与は、非ヒト霊長類 (カニクイ

10

20

30

40

50

ザル (*Macaca fascicularis*) において、血中循環中の TTR タンパク質の持続的な抑制を生じ、投薬から 14 日目で、TTR タンパク質の有意な低下を得ることを実証する。

#### 【0295】

SNALP - 18328 による肝臓 TTR の mRNA 抑制の持続性を評価するために、AD - 18328 を SNALP (ALN - TTR01) に製剤化し、非ヒト霊長類に単回 IV 注入により投与した。肝臓 mRNA レベルは、投与後 3 日目または 30 日目に、本明細書に記載されるとおりに測定した。

#### 【0296】

これらの結果を、図 20 に示し、野生型 TTR の mRNA の ALN - TTR01 の抑制が、非ヒト霊長類において、投薬量 1.0 および 3.0 mg/kg に対して 3 日後、ならびに 10 mg/kg の用量で 30 日間、持続性があることを実証する。

#### 【0297】

実施例 9. トランスジェニックマウスにおける、SNALP - 18328 による末梢組織中の変異 (V30M) TTR のインビボの低下  
予防有効性

末梢組織中の TTR の低下における SNALP - 18328 (ALN - TTR01) の有効性を評価するために、hTTR V30M/HSF - 1 ノックアウトマウスを、TTR に対する免疫組織化学染色で評価した。2 月齢の hTTR V30M/HSF - 1 ノックアウトマウス (Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17 - 20) に、0 日目、14 日目、28 日目、および 42 日目での合計 4 回の投薬のために、2 週間に 1 回の 3 mg/kg の SNALP - 18328 (12 匹の動物)、3 mg/kg の SNALP - 1955 (非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照 siRNA AD - 1955 を有する、4 匹の動物)、または PBS (4 匹の動物) を IV ボーラス投与した。複数の末梢組織中の TTR 肝臓 mRNA レベルおよび TTR 免疫活性は、56 日目の、第 1 の投薬から 8 週間で評価された。

#### 【0298】

マウスに、1 mg/kg のメデトミジンで麻酔をかけ、致死量のケタミンを与えた。対象となる組織および臓器を収集した。免疫組織化学のために、食道 (E)、胃 (S)、腸 (十二指腸 (I1) および結腸 (I4))、神経 (N)、ならびに後根神経節 (D) を、中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィンで包埋した。TTR 検出のために、ウサギ抗ヒト TTR 一次抗体 (1:1000, DAKO, Denmark)、および抗ウサギビオチン共役二次抗体 (1:20 Sigma, USA) を、TTR タンパク質に染色するために、extravidin 標識体 (1:20, Sigma, USA) が続いた。反応は、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール、AEC (Sigma, USA) を用いて生じさせた。基質の反応色によって占められる領域を測定し、総画像領域に対してのこの値を正規化する、Scion image quant プログラムを用いて、免疫組織化学スライドの半定量分析を行った。占領領域の割合 (%) の平均値は、対応する標準偏差と共に表示する。それぞれの動物組織を、4 つの異なる領域において評価した。胃および腸の副交感神経節中のヒト TTR の存在は、一次抗体としてウサギ抗ヒト TTR (1:1000, DAKO, Denmark) およびマウス抗 PGP9.5 (1:40, Serotec, USA) で染色する二重免疫蛍光によって検査され、二次抗体は、それぞれ、抗ウサギ Alexa Fluor 488 (Molecular probes, UK) およびヤギ抗マウス Alexa Fluor 568 (Molecular probes, UK) であった。スライドは、vectashield (Vector) と共に実装され、FITC およびローダミン用のフィルターを装備する Zeiss Cell Observer System 顕微鏡 (Carl Zeiss, Germany) 中で可視化された

10

20

30

40

50

。

#### 【0299】

結果を図9に図示する。PBSおよびSNALP-1955で処置した動物と比較して、SNALP-18328で処置した動物は、検査した全ての組織（食道（E）、胃（S）、腸（十二指腸（I1）および結腸（I4））、神経（N）、ならびに後根神経節（D））において、TTRの免疫活性の有意な低下を得た。

#### 【0300】

これらの結果は、hTTR V30M/HSF-1ノックアウトマウスへのSNALP-18328投与は、食道、胃、腸（十二指腸および結腸）、神経、および後根神経節を含む、末梢組織および臓器において、TTRタンパク質の沈着の有意な低下を生じること

10

#### 【0301】

##### 治療有効性

ALN-TTR01を、成熟hTTR V30M/HSF-1ノックアウトマウスに投与して、変異ヒトTTRの沈着の回帰におけるTTRのsiRNA治療の効果を判定した。

#### 【0302】

21月齢の動物群（hTTR V30M/HSF-1ノックアウトマウス）に、0日目、14日目、28日目、14日目、56日目、および70日目に、3mg/kgの用量で、ALN-TTR01または対照siRNAをIVボラス投与した。77日目に、マウスに麻酔をかけ、組織を採取し、TTRの沈着物を、本明細書に記載のScion image quantプログラムを用いて、免疫組織化学染色スライドの半定量分析によってアッセイした。食道、結腸、胃、坐骨神経、および後根神経節を検査し、これらの結果を、この動物モデルにおいて、歴史的データと比較し、これにより、この歳で組織中に存在するTTRの沈着とTTRの線維の両方を実証した。

20

#### 【0303】

結果を図21のグラフに示す。結果は、TTRのsiRNAによる治療が、V30M hTTR組織沈着が存在する90%を超える回帰をもたらすことを実証する。

#### 【0304】

##### 実施例10.XTC-SNALP-18328による非ヒト霊長類の肝臓中の野生型TTRのmRNAのインビボの低下

30

非ヒト霊長類において、siRNAの送達についての新規の脂質ナノ粒子製剤XTC-SNALPの有効性を評価するために、TTRのsiRNA AD-18328を、XTC-SNALP（XTC-SNALP-18328）に製剤化し、15分間のIV注入により投与し、肝臓TTRのmRNAを定量化した。カニクイザル（Macaca fascicularis）に、XTC-SNALP-18328（0.03、0.1、0.3、または1mg/kg）またはXTC-SNALP-1955（1mg/kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照siRNA AD-1955を有する）を15分間のIV注入で投与した。投薬から48時間後、サルに、ペントバルビタールナトリウムで麻酔をかけ、失血させた。TTRのmRNA決定に対する肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。肝組織中のTTRのmRNAの定量化のために使用される方法は、上記の実施例5に記載されるものと同様であった。

40

#### 【0305】

結果を図10に示す。XTC-SNALP-18328は、陰性対照XTC-SNALP-1955と比較して、用量依存的様式で、肝臓中のTTRのmRNAレベルを低下させた。mRNA ED50は、約0.1mg/kg XTC-SNALP-18328であると決定した。

#### 【0306】

これらの結果は、XTC-SNALP-18328が、IV注入による投与時に、非ヒト霊長類肝臓中の野生型TTRのmRNAを抑制するのに効果的であることを実証する。

50

## 【0307】

実施例11. LNP09 - 18328およびLNP11 - 18328による非ヒト霊長類  
肝臓中の野生型TTRのmRNAのインビボの低下

非ヒト霊長類において、siRNAの送達のために、2つの新規の脂質ナノ粒子製剤のLNP09およびLNP11の有効性を評価するために、TTRのsiRNA AD - 18328を、LNP09 (LNP09 - 18328) またはLNP11 (LNP11 - 18328) に製剤化し、15分間のIV注入により投与し、肝臓TTRのmRNAおよび血清TTRのタンパク質レベルをアッセイした。カニクイザル (Macaca fascicularis) に、LNP09 - 18328 (0.03、0.1、もしくは0.3 mg/kg)、LNP11 - 18328 (0.03、0.1、もしくは0.3 mg/kg)、またはPBSを、15分間のIV注入により投与した。肝臓生検試料は、投薬から48時間後に収集され、急速冷凍され、処理するまで - 80 で保存された。血清は、投薬する前 (採血前)、および投薬から1日目、2日目、4日目、7日目、14日目、21日目、および28日目に、収集され、処理するまで - 80 で保存された。肝臓および血清TTRタンパク質の評価におけるTTRのmRNAの定量化に使用された方法は、上記の実施例5および8に記載のものと同様であった。

10

## 【0308】

結果は、mRNAについては、図11A、およびタンパク質については、図11Bおよび図11Cに示す。LNP09 - 18328およびLNP11 - 18328で処置した動物は、肝臓中のTTRのmRNAレベルの用量依存的な低下を示し、PBS対照と比較して、0.3 mg/kgで、約85% (LNP09 - 18328) および約90% (LNP11 - 18328) のmRNAの最大低下率に達した。mRNA ED50は、LNP09 - 18328およびLNP11 - 18328の両方において、約0.02 mg/kgであると決定した。投薬から7日目で、血清試料もまた、PBS対照レベルと比較して、0.1および0.3 mg/kgのLNP09 - 18328およびLNP11 - 18328に対して、TTRタンパク質の用量依存的な低下を示した。図11Cは、LNP09 - 18328の0.3 mg/kgの用量を有するTTRタンパク質レベルの減少が、PBS対照群と比較して、および採血前の試料と比較して、投薬から少なくとも28日間にわたって存続することを示す。

20

## 【0309】

これらの結果は、LNP09 - 18328およびLNP11 - 18328が、IV注入による投与時に、非ヒト霊長類肝臓中の野生型TTRのmRNAおよび血中循環中の野生型TTRタンパク質を抑制するのに効果的であることを実証する。さらになお、LNP09 - 18328による抑制は、持続し、IV注入から少なくとも28日間存続する。

30

## 【0310】

実施例12. LNP12 - 18328による非ヒト霊長類の野生型TTRのmRNAのインビボの低下

LNP12を製剤化したAD - 18328を、非ヒト霊長類に投与して、この製剤の有効性を評価した。

## 【0311】

LNP12 - 18328製剤は、Jeffsら (Jeffs LB, et al. (2004) A Scalable, Extrusion-Free Method for Efficient Liposomal Encapsulation of Plasmid DNA. Pharm Res 22:362-372) から編集されている方法を用いて調製した。簡潔に言えば、Tech-G1 (上述の)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、コレステロール、およびmPEG2000-DMGを、50:10:38.5:1.5のモル比で90%のエタノール中で可溶化した。siRNAを、0.4 mg/mLの濃度で、10 mM クエン酸塩、pH 3 緩衝液中で可溶化した。エタノール脂質溶液およびsiRNA水溶液は、等価低積流量で複式ポンプヘッドを備えた蠕動ポンプによって汲み上げられ、「T」分岐において混合された。脂質は、7:1

40

50

(wt:wt)の総脂質のsiRNAに対する比率で、siRNAと組み合わせられた。自然発生的に形成されたLNP12-18328製剤を、PBS(155mM NaCl、3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.5)に対して透析して、エタノールを除去し、緩衝液交換した。この製剤は、約90パーセントのsiRNA封入効率を有する平均粒子直径80nmを得た。

#### 【0312】

カニクイザル(n=3/群)は、橈側皮静脈による15分間の静脈内注入(5mL/kg)として、PBS、あるいは0.03、0.1、もしくは0.3mg/kgのLNP12-18328のいずれかを与えた。肝生検は、投与してから48時間後、動物から採取した。GAPDHのmRNAレベルに対するTTTRのmRNAレベルを、本明細書に記載される肝臓試料中で判定した。

10

#### 【0313】

図19に示すように、野生型トランスチレチン(TTTR)遺伝子の高いレベルの特異的なノックダウンが、わずか0.03mg/kgの用量で観察された。これにより、LNP12製剤が、いかなる前述の肝臓への送達システムによって必要とされるものよりも数桁低い用量で、遺伝子の発現停止を促進することが実証された。

#### 【0314】

##### 実施例13.TTTRが並べられた配列の合成

AD-18328の標的領域付近でTTTR遺伝子を標的とされる、TTTR二重鎖(「並べられた(tiled)二重鎖」)のセットを設計し、これは、NM\_000371.3のヌクレオチド628で開始するヒトTTTR遺伝子を標的とする。

20

#### 【0315】

下の実施例では、転写物上のsiRNAの5'位の塩基を示す番号付けは、NM\_000371.3(図12、配列番号1331)に基づく。上記の実施例では、ヒトsiRNAを標的とするsiRNAの番号付けは、NM\_000371.2(図13A)に基づく。NM\_000371.3は、図14に示すように、NM\_000371.2と比較して、110塩基まで5'UTRの配列を延在する。したがって、一例として、AD-18328の開始位置は、NM\_000371.3上の628およびNM\_000371.2上の518である(図14)。

#### 【0316】

30

1μモルの規模で、MerMade 192合成機において、TTTRが並べられた配列を合成した。配列表の全ての配列については、「エンドライト」化学反応を以下の詳細のように適用した。

- ・センス鎖内の全てのピリミジン(シトシンおよびウリジン)は、2'-O-メチル塩基(2'-O-メチルCおよび2'-O-メチルU)を含有した。
- ・アンチセンス鎖では、リボAヌクレオシドに隣接する(5'位に向かって)ピリミジンは、それらの対応する2'-O-メチルヌクレオシドと置換された。
- ・センスおよびアンチセンス配列の両方の3'末端で、2つの塩基dTdTの拡張を導入した。
- ・配列ファイルをテキストファイルに変換し、MerMade 192合成ソフトウェアにおける負荷に対して互換性を保つようにした。

40

#### 【0317】

##### 合成、切断、および脱保護:

TTTR配列の合成は、ホスホラミダイト化学反応を用いて、固定支持されたオリゴヌクレオチド合成を使用した。96ウェルプレート中の1μmの規模で、配列の合成を行った。アミダイト溶液を、0.1M濃度で調製し、エチルチオテトラゾール(アセトニトリル中0.6M)を活性剤として使用した。合成した配列を切断し、第1のステップにおいてメチルアミン、および第2のステップにおいて、フッ化物試薬を用いて、96ウェルプレート中に脱保護した。粗配列は、アセトン:エタノール(80:20)の混合液を用いて、沈殿させ、ペレットを、0.2M酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁させた。それぞ

50

れの配列からの試料を、定量化のための紫外線の同一性を確認するために、LC-MSによって、および純度を決定するために、IEクロマトグラフィーによって選択された試料のセットを分析した。

#### 【0318】

##### 精製および脱塩：

TTTが並べられた配列は、Source 15 Qカラムを用いて、AKTA explorer精製システムにおいて精製した。65 のカラム温度を精製中維持した。試料の注射および収集を、96 ウェル（1.8 mLの深いウェル）プレート中で行った。完全長配列に対応する単一ピークを、溶離液中に収集した。AKTA精製器を用いて、Sephadex G25カラム上に精製された配列を、脱塩した。濃度（A260での紫外線測定によって）および純度（イオン交換HPLCによって）のために、脱塩したTTT配列を、分析した。次いで、アニーリングのために単鎖を提出した。

#### 【0319】

##### TTTの単鎖および二重鎖：

TTTが並べられた二重鎖および対応する単鎖（センスおよびアンチセンス）の詳細な表を、下表（表13）に示す。

#### 【0320】

##### 【表13-1】

##### TTTが並べられた二重鎖および対応する単鎖

鎖：s = センス、as = アンチセンス 位置：転写物（NM\_000371.3、配列番号1331）における5' 位の塩基

二重鎖#	位置	オリゴ#	鎖	配列 (5' から3' への方向)	配列番号
AD-18323	618	A-32335	S	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	1332
		A-32336	AS	CUUGGUuAcAUGAAAUCCCdTdT	1333
AD-18324	619	A-32337	S	GGAUuuucAuGuAAccAAGAdTdT	1334
		A-32338	AS	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1335
AD-23000	620	A-42927	S	GAuuucAuGuAAccAAGAGdTdT	1336
		A-42928	AS	CUCUUGGUuAcAUGAAAUCdTdT	1337
AD-23001	621	A-42929	S	AuuucAuGuAAccAAGAGudTdT	1338
		A-42930	AS	ACUCUUGGUuAcAUGAAAUdTdT	1339
AD-23002	622	A-42931	S	uuucAuGuAAccAAGAGuAdTdT	1340
		A-42932	AS	uACUCUUGGUuAcAUGAAAdTdT	1341
AD-23003	623	A-42933	S	uucAuGuAAccAAGAGuAdTdT	1342
		A-42934	AS	AuACUCUUGGUuAcAUGAAAdTdT	1343

10

20

30

40

AD-18325	624	A-32339	S	ucAuGuAAccAAGAGuAuudTdT	1344
		A-32340	AS	AAuACUCUUGGUuAcAUGAdTdT	1345
AD-23004	625	A-42935	S	cAuGuAAccAAGAGuAuucdTdT	1346
		A-42936	AS	GAAuACUCUUGGUuAcAUGdTdT	1347
AD-18326	626	A-32341	S	AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT	1348
		A-32342	AS	GGAAuACUCUUGGUuAcAUdTdT	1349
AD-18327	627	A-32343	S	uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT	1350
		A-32344	AS	UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT	1351
AD-23005	628	A-42937	S	uAAccAAGAGuAuuccAuudTdT	1352
		A-42938	AS	AAUGGAAuACUCUUGGUuAdTdT	1353
AD-23006	629	A-42939	S	AAccAAGAGuAuuccAuuudTdT	1354
		A-42940	AS	AAAUGGAAuACUCUUGGUUdTdT	1355
AD-23007	631	A-42941	S	AccAAGAGuAuuccAuuuudTdT	1356
		A-42942	AS	AAAAUGGAAuACUCUUGGUdTdT	1357
AD-23008	632	A-42943	S	ccAAGAGuAuuccAuuuuudTdT	1358
		A-42944	AS	AAAAAUGGAAuACUCUUGGdTdT	1359
AD-23009	633	A-42945	S	cAAGAGuAuuccAuuuuuAdTdT	1360
		A-42946	AS	uAAAAAUGGAAuACUCUUGdTdT	1361
AD-23010	634	A-42947	S	AAGAGuAuuccAuuuuuAcdTdT	1362
		A-42948	AS	GuAAAAAUGGAAuACUCUuTdT	1363
AD-23011	635	A-42949	S	AGAGuAuuccAuuuuuAcudTdT	1364
		A-42950	AS	AGuAAAAAUGGAAuACUCUdTdT	1365

10

20

30

40

【表 1 3 - 2】

AD-23012	636	A-42951	S	GAGuAuuccAuuuuuAcuAdTdT	1366
		A-42952	AS	uAGuAAAAAUGGAAuACUCdTdT	1367
AD-23013	637	A-42953	S	AGuAuuccAuuuuuAcuAAdTdT	1368
		A-42954	AS	UuAGuAAAAAUGGAAuACUdTdT	1369
AD-23014	638	A-42955	S	GuAuuccAuuuuuAcuAAAdTdT	1370
		A-42956	AS	UUuAGuAAAAAUGGAAuACdTdT	1371
AD-23015	639	A-42957	S	uAuuccAuuuuuAcuAAAGdTdT	1372
		A-42958	AS	CUUuAGuAAAAAUGGAAuAdTdT	1373
AD-23016	640	A-42959	S	AuuccAuuuuuAcuAAAGcdTdT	1374
		A-42960	AS	GCUUuAGuAAAAAUGGAAUdTdT	1375
AD-23017	641	A-42961	S	uuccAuuuuuAcuAAAGcAdTdT	1376
		A-42962	AS	UGCUUuAGuAAAAAUGGAAdTdT	1377
AD-23018	642	A-42963	S	uccAuuuuuAcuAAAGcAGdTdT	1378
		A-42964	AS	CUGCUUuAGuAAAAAUGGAdTdT	1379
AD-23019	643	A-42965	S	ccAuuuuuAcuAAAGcAGudTdT	1380
		A-42966	AS	ACUGCUUuAGuAAAAAUGGdTdT	1381

10

20

30

AD-23020	644	A-42967	S	cAuuuuuAcuAAAGcAGuGdTdT	1382
		A-42968	AS	cACUGCUUuAGuAAAAAUGdTdT	1383
AD-23021	645	A-42969	S	AuuuuuAcuAAAGcAGuGudTdT	1384
		A-42970	AS	AcACUGCUUuAGuAAAAAUdTdT	1385
AD-23022	646	A-42971	S	uuuuuAcuAAAGcAGuGuudTdT	1386
		A-42972	AS	AAcACUGCUUuAGuAAAAAdTdT	1387
AD-23023	647	A-42973	S	uuuuAcuAAAGcAGuGuuudTdT	1388
		A-42974	AS	AAAcACUGCUUuAGuAAAAdTdT	1389
AD-23024	648	A-42975	S	uuuAcuAAAGcAGuGuuuudTdT	1390

10

20

		A-42976	AS	AAAAcACUGCUUuAGuAAAdTdT	1391
AD-23025	649	A-42977	S	uuAcuAAAAGcAGuGuuuucdTdT	1392
		A-42978	AS	GAAAAcACUGCUUuAGuAAAdTdT	1393
AD-23026	650	A-42979	S	uAcuAAAAGcAGuGuuuucAdTdT	1394
		A-42980	AS	UGAAAAcACUGCUUuAGuAdTdT	1395
AD-23027	651	A-42981	S	AcuAAAAGcAGuGuuuucAcdTdT	1396
		A-42982	AS	GUGAAAAcACUGCUUuAGUdTdT	1397
AD-23028	652	A-42983	S	cuAAAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1398
		A-42984	AS	GGUGAAAAcACUGCUUuAGdTdT	1399
AD-18330	653	A-32349	S	uAAAAGcAGuGuuuucAccudTdT	1400
		A-32350	AS	AGGUGAAAAcACUGCUUuAdTdT	1401
AD-23029	654	A-42985	S	AAAGcAGuGuuuucAccucdTdT	1402
		A-42986	AS	GAGGUGAAAAcACUGCUUuTdTdT	1403

10

20

【表 1 3 - 3】

30

AD-23030	655	A-42987	S	AAGcAGuGuuuucAccucAdTdT	1404
		A-42988	AS	UGAGGUGAAAAcACUGCUUdTdT	1405
AD-23031	656	A-42989	S	AGcAGuGuuuucAccucAudTdT	1406
		A-42990	AS	AUGAGGUGAAAAcACUGCUdTdT	1407
AD-18328	628	A-32345	S	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1408
		A-32346	AS	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1409

40

## 【 0 3 2 1 】

## 実施例 1 4 . T T R が並べられた s i R N A のインビトロスクリーニング

T T R が並べられた二重鎖を、リアルタイム P C R アッセイを用いて、内因性 T T R の発現の阻害のために、H e p 3 B 細胞内でアッセイした。

## 【 0 3 2 2 】

細胞培養およびトランスフェクション：H e p 3 B 細胞 ( A T C C 、 M a n a s s a s

50

、V A)を、トリプシン処理によりプレートから放出される前に、10% FBS、ストレプトマイシン、およびグルタミン(ATCC)で補完されるイーグル最小必須培地(EMEM、ATCC)中の5% CO<sub>2</sub>の雰囲気下で、37℃でほぼコンフルエントまで増殖した。96ウェルプレートの個々のウェル中に、5μLのOpti-MEMを5μLのそれぞれのsiRNAに添加することによって、逆転写を実行した。これに、10μLのOpti-MEMに加えて、0.2μLのLipofectamine RNAiMax(Invitrogen, Carlsbad CA、カタログ番号#13778-150)を、ウェルごとに添加し、混合物を室温で15分間インキュベートした。次いで、上記のものであるが、 $2.0 \times 10^4$  Hep3B細胞を含有する抗生物質を含有しない、80μLの完全成長培地を添加した。RNA精製前に、細胞を、24時間インキュベートした。0.1または10nMの最終2重濃度で実験を行った。

10

## 【0323】

MagMAX-96総RNA単離キット(Applied Biosystems, Foster City CA、部品番号#:AM1830)を用いた総RNA単離:細胞は、採集され、140μLの溶解/結合溶液中で溶解され、次いで、Eppendorf Thermomixerを用いて850rpmで1分間混合した(混合速度は、過程を通して同一であった)。20マイクロリットルの電磁ビーズおよび溶解/結合エンハンサーの混合物を、細胞溶解物に添加し、5分間混合した。磁気ビーズは、磁気スタンドを用いて捕捉し、ビーズを妨害することなく、浮遊物を除去した。浮遊物を除去した後、磁気ビーズを洗浄液1(イソプロパノールを添加)で洗浄し、1分間混合した。ビーズを再度捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、ビーズを150μLの洗浄液2(エタノールを添加)で洗浄し、捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、50μLのDNアーゼ混合物(MagMax turbo DNase BufferおよびTurbo DNase)をビーズに添加し、それらを10~15分間混合した。混合後、100μLのRNA再生溶液を添加し、3分間混合した。浮遊物を除去し、磁気ビーズを150μLの洗浄液2で再度洗浄し、1分間混合し、浮遊物を完全に除去した。磁気ビーズを2分間混合し、RNAを50μLの水で溶離する前に乾燥させた。

20

## 【0324】

ABI高性能cDNA逆転写キット(Applied Biosystems, Foster City, CA、Cat#4368813)を用いたcDNA合成:2μLの10×緩衝液、0.8μLの25×dNTP、2μLのランダムプライマー、1μLの逆転写酵素、1μLのRNase阻害剤、および反応当たり3.2μLのH<sub>2</sub>Oのマスターミックスを、10μLの総RNAに添加した。以下のステップを通して、Bio-Rad C-1000またはS-1000のサーマルサイクラー(Hercules, CA)を用いて、cDNAを生成した。25℃で10分間、37℃で120分間、85℃で5秒間、4℃で保持。

30

## 【0325】

リアルタイムPCR:2μLのcDNAを、LightCycler 480 384ウェルプレート(Roche cat#0472974001)中のウェル当たり、0.5μLのGAPDH TaqManプローブ(Applied Biosystems Cat#4326317E)、0.5μLのTTR TaqManプローブ(Applied Biosystems cat#HS00174914 M1)、および10μLのRoche Probes Master Mix(Roche Cat#04887301001)を含有するマスターミックスに添加した。LightCycler 480リアルタイムPCR機械(Roche)において、リアルタイムPCRを行った。それぞれの二重鎖を、2つの独立したトランスフェクションにおいて試験し、それぞれのトランスフェクションを二重でアッセイした。

40

## 【0326】

Ct法を用いて、リアルタイムデータを分析した。それぞれの試料を、GAPDHの発現に対して正規化し、非標的二重鎖AD-1955でトランスフェクションした細胞

50

と比較してノックダウンを評価した。表 1 4 は、s i R N A を用いた、T T R のノックダウンを示す。データは、A D - 1 9 5 5 で標的とされた細胞に対して、メッセージの残存する割合 ( % ) として表される。

【 0 3 2 7 】

A D - 1 8 3 2 8 の標的近くの T T R を標的とする、多数ではあるが、全てではない並べられた T T R - d s R N A は、0 . 1 n M で、H e p 3 B 細胞にトランスフェクションされる場合、T T R の m R N A 少なくとも 7 0 % 低下した。

【 0 3 2 8 】

【表 1 4 - 1 】

A D - 1 8 3 2 8 の標的近くの T T R を標的とする並べられた  
d s R N A による T T R の阻害

二重鎖#	0.1nMにてメッセージを 残存する割合 (%)	0.1nMにて標準偏差の割合 (%)	10nMにてメッセージを 残存する割合 (%)	10nMにて標準偏差の割合 (%)
AD-18323	6.7	1.90	1.7	0.02
AD-18324	1.8	0.58	0.9	0.10
AD-23000	5.5	0.93	2.1	0.87
AD-23001	15.2	4.89	4.9	1.74
AD-23002	3.1	1.12	1.4	0.55
AD-23003	17.3	3.13	1.7	0.06
AD-18325	1.5	0.27	1.4	0.66
AD-23004	9.0	0.15	10.5	0.96
AD-18326	22.0	1.85	7.6	0.78
AD-18327	11.6	2.64	9.6	1.67
AD-18328	1.1	0.70	0.6	0.16
AD-23005	0.8	0.31	0.6	0.21
AD-23006	1.5	0.46	1.2	0.43
AD-23007	2.4	0.91	1.9	0.46
AD-23008	0.6	0.10	0.8	0.26
AD-23009	1.0	0.13	0.9	0.22
AD-23010	60.1	15.66	66.2	22.71
AD-23011	56.5	16.99	53.6	4.70
AD-23012	7.7	2.36	7.7	3.25
AD-23013	7.0	0.64	8.0	1.06
AD-23014	0.7	0.01	0.6	0.10
AD-23015	15.4	0.25	16.5	7.07
AD-23016	27.1	0.37	6.7	1.80
AD-23017	4.5	1.26	1.4	0.40
AD-23018	44.6	9.45	7.5	1.09
AD-23019	2.2	0.68	0.8	0.10
AD-23020	52.7	6.45	29.7	1.17
AD-23021	95.4	16.16	45.0	3.00
AD-23022	70.1	3.01	60.8	12.11
AD-23023	2.7	1.12	1.8	0.07

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

AD-23024	1.7	0.30	1.8	0.33
AD-23025	64.2	13.21	10.5	1.34
AD-23026	1.9	0.15	1.9	0.78
AD-23027	2.5	0.21	1.6	0.49
AD-23028	6.7	4.41	1.2	0.50
AD-18330	6.0	0.56	5.7	1.15
AD-23029	4.5	0.47	1.6	0.10
AD-23030	3.9	0.25	3.3	0.84
AD-23031	3.4	0.78	1.7	0.02

10

## 【 0 3 2 9 】

実施例 1 5 . S p r a g u e - D a w l e y ラットにおいて、S N A L P - 1 8 5 3 4 の単回静脈内投与の有効性における注入期間の評価

## 目的

S p r a g u e - D a w l e y ラットにおいて、肝臓 T T R の m R N A レベルにおける S N A L P - 1 8 5 3 4 の単回 I V 注入の有効性における注入期間の効果を決定すること。

## 【 0 3 3 0 】

20

## 【表 1 5】

## 使用した略語および定義

SNALP-18534	SNALPに製剤化された齧歯類トランスチレチンに特異的なsiRNA
SNALP-1955	SNALPに製剤化された非哺乳動物のルシフェラーゼに特異的なsiRNA

## 【 0 3 3 1 】

上表からの A D - 1 8 5 3 4 のセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を、以下に再現する。

30

鎖	オリゴ#	位置	5' から 3' への方向の配列	配列番号
s	A-3275 5	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1289
as	A-3275 6	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	1290

## 【 0 3 3 2 】

40

## 研究材料

## 試験物質

S N A L P - 1 8 5 3 4 は、標的組織に送達するために、安定な核酸脂質粒子 ( S N A L P ) に製剤化される、齧歯類 T T R の m R N A ( A D - 1 8 5 3 4 ) を標的とする s i R N A からなる。S N A L P 製剤 ( 脂質粒子 ) は、新規のアミノ脂質 ( D L i n D M A ) 、 P E G 化脂質 ( m P E G 2 0 0 0 - C - D M A ) 、中性脂質 ( D P P C ) 、およびコレステロールからなる。S N A L P 製剤中の脂質 : 核酸の比は、約 5 . 8 : 1 ( w : w ) である。S N A L P - 1 9 5 5 は、S N A L P - 1 8 5 3 4 として同一の脂質粒子で製剤化される、非哺乳動物のルシフェラーゼ m R N A を標的とする s i R N A を含有し、非薬理的に活性な対照としての役割を果たす。用量レベルは、s i R N A 含有量の重量に基づ

50

いて、mg/kgとして表す。

### 【0333】

#### 研究設計&手順

##### 動物および試験物質の投与：

研究は、Sprague-Dawleyラットの9つの群（4匹の雄/群）からなつた。動物は、研究前の少なくとも2日間の順応期間が与えられ、全ての動物は、投薬開始時、7週齢であった。投与された用量は、1日目の投薬前に収集された体重データに基づいて計算された。試験および対照物質は、Baxter AS40A注射器ポンプに27Gテルモ翼状針を介して接続されたBaxter注射部位の隔膜で密閉された24G 3/4"のカニューレを用いて、尾静脈を介して、単回15分間、1時間、2時間、または3時間のIV注入として投与された。投与容量は、3mL/kgであり、注入速度は、12mL/kg/時であり、動物は、投薬中、ケージ中で自由に行動していた。ラットは、9つの処置群に分割され、表16に示されるように、SNALP-18534、SNALP-1955、またはPBSの単回IV注入で投与した。

### 【0334】

#### 【表16】

##### 試験動物の用量群

群	N	試験物質	注入の持続時間	用量
A	4	PBS	15分間	---
B	4	PBS	3時間	---
C	4	SNALP-1955	1時間	1 mg/kg
D	4	SNALP-1955	2時間	1 mg/kg
E	4	SNALP-1955	3時間	1 mg/kg
F	4	SNALP-18534	15分間	1 mg/kg
G	4	SNALP-18534	1時間	1 mg/kg
H	4	SNALP-18534	2時間	1 mg/kg
I	4	SNALP-18534	3時間	1 mg/kg

### 【0335】

##### 組織収集およびRNA単離：

0日目に、イソフルレン吸入で動物に麻酔をかけ、投薬前の血液試料を、retro-orbital bleedにより血清分離管に収集した。4で遠心分離を行う前に、室温で約30分間、血液試料を凝固させた。次いで、血清試料は、分析が行われるまで、-80で保存された。3日目に、全ての9つの処置群の動物に、致死量のケタミン/キシラジンを与えた。後大静脈を介して血清分離管に血液を収集し、次いで、4で遠心分離を行う前に、室温で約30分間、凝固させた。血清試料は、分析が行われるまで、-80で保存された。肝組織は、収穫され、ドライアイス上で瞬間凍結された。凍結された肝組織は、粉碎され、組織溶解物は、肝臓mRNAの定量化のために調製された。

### 【0336】

##### TTRのmRNAの定量化：

分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。

### 【0337】

T T Rのm R N Aの発現の相対レベルを得るために、15分間、1時間、および2時間の注入時間でのS N A L P - 1955およびS N A L P - 18534処置群に対する群平均値は、次いで、15分間の注入時間でのP B S処置群に対する平均値に対して正規化され、一方、3時間の注入時間でのS N A L P - 1955およびS N A L P - 18534処置群に対する群平均値は、次いで、3時間の注入時間でのP B S処置群に対する平均値に対して正規化された。

#### 【0338】

##### 結果

図16に示されるように、15分間～3時間の異なる注入時間での1mg/kg S N A L P - 18534の単回I V注入は、投薬から2日後に測定された肝臓T T Rのm R N Aレベルに匹敵する阻害をもたらす。1mg/kg S N A L P - 18534の単回I V注入はまた、S N A L P - 1955対照と比較した場合、15分間の単回I V注入から29日間にわたって持続的なT T Rの下方調節を示した(データは示さず)。P B S処置群と比較して、1mg/kgにて、S N A L P - 18534の単回15分間、1時間、2時間、または3時間のI V注入は、相対T T Rのm R N Aの発現レベルを、それぞれ、94% ( $p < 0.001$ )、94% ( $p < 0.001$ )、92% ( $p < 0.001$ )、および93% ( $p < 0.001$ )有意に低下させた。S N A L P - 18534活性の特異性は、同一の用量レベルで、1時間、2時間、または3時間のI V注入でのS N A L P - 1955投与による有意な標的阻害の欠如により実証される。

#### 【0339】

##### 結論

本研究は、15分間から最長3時間の異なる注入時間が、肝臓中のT T Rのm R N Aレベルの低下により評価されるように、ラットにおいて、1mg/kg S N A L P - 18534の単回I V投与の有効性に影響を及ぼさないことを実証する。

#### 【0340】

##### 実施例16. L N P 07 - 18534およびL N P 08 - 18534によるラット肝臓中の野生型T T Rのm R N Aのインビボの低下

ラットにおいて、s i R N Aの送達のための2つの新規の脂質ナノ粒子製剤のL N P 07およびL N P 08の有効性を評価するために、齧歯類特異的なT T Rのs i R N A、A D - 18534が、L N P 07 (L N P 07 - 18534)またはL N P 08 (L N P 08 - 18534)に製剤化され、15分間のI V注入により投与され、肝臓T T Rのm R N Aが定量化された。S p r a g u e - D a w l e yラット(群当たり4匹の動物)に、L N P 07 - 18534(0.03、0.1、0.3、もしくは1mg/kg)、L N P 08 - 18534(0.01、0.03、もしくは0.1mg/kg)、または非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする陰性対照s i R N A A D - 1955を含有するL N P 07 - 1955(1mg/kg)もしくはL N P 08 - 1955(0.1mg/kg)の15分間のI V注入により投与された。48時間後、動物に麻酔をかけ、肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80℃で保存された。

#### 【0341】

T T Rのm R N A定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quant i Gene Reagent System, P a n o m i c s, F r e m o n t, C A)を用いることによって、G A P D Hのm R N Aレベルと比較したT T Rのm R N Aレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のm R N Aレベルを定量化するために、Q u a n t i Geneアッセイ(G e n o s p e c t r a)を使用した。T T Rのm R N Aの平均レベルを、それぞれの試料に対するG A P D Hのm R N Aの平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、P B S処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、T T Rのm R N Aの発現の相対レベルを得た。

#### 【0342】

結果を図17に示す。L N P 07 - 18534は、用量依存的な様式で、肝臓中のT T

R の mRNA レベルを低下させ、 $1 \text{ mg / kg}$  で T T R の mRNA の 94 % 抑制を得た。 $1 \text{ mg / kg}$  で陰性対照 L N P 07 - 1955 が、P B S 対照と比較して、T T R の mRNA レベルに大きな影響を及ぼさなかったため、効果は、特異的であった。mRNA E D 50 は、約  $0.05 \text{ mg / kg}$  の L N P 07 - 18534 であることが確認された。L N P 08 - 18534 は、用量依存的な様式で、肝臓中の T T R の mRNA レベルを低下させ、 $0.1 \text{ mg / kg}$  で T T R の mRNA の 86 % 抑制を得た。 $0.1 \text{ mg / kg}$  で陰性対照 L N P 08 - 1955 が、P B S 対照と比較して、T T R の mRNA レベルに大きな影響を及ぼさなかったため、効果は、特異的であった。mRNA E D 50 は、約  $0.02 \text{ mg / kg}$  の L N P 08 - 18534 であることが確認された。

#### 【0343】

これらの結果は、L N P 07 - 18534 および L N P 08 - 18534 が、I V 注入により投与された場合、ラット肝臓中の野生型 T T R の mRNA を抑制するのに効果的であり、L N P 07 および L N P 08 が、肝臓に s i RNA を送達するために効果的な製剤であることを実証する。

#### 【0344】

実施例 17. Sprague - Dawley ラットにおいて、L N P 09 - 18534 または L N P 11 - 18534 の単回静脈内投与による T T R 肝臓の mRNA の低下  
目的：

内因性（野生型）肝臓 T T R の mRNA レベルを低下させることに対する、Sprague - Dawley ラットにおける、齧歯類 T T R 特異的な s i RNA の A D - 18534 の送達のための 2 つの新規の脂質ナノ粒子（L N P）製剤の有効性を評価すること。ラットに、 $0.01$ 、 $0.03$ 、 $0.1$ 、もしくは  $0.3 \text{ mg / kg}$  の L N P 09 - 18534、L N P 11 - 18534、またはリン酸緩衝食塩水（P B S）のいずれかで 15 分間の注入を介して静脈内に投与し、T T R 肝臓の mRNA レベルを、処置から 48 時間後にアッセイした。

#### 【0345】

材料および方法：

L N P 09 製剤：( X T C / D S P C / C h o l / P E G <sub>2000</sub> - C 14 ) = 50 / 10 / 38.5 / 1.5 モル%、脂質：s i RNA 約 11 : 1。L N P 11 製剤：( M C 3 / D S P C / C h o l / P E G <sub>2000</sub> - C 14 ) = 50 / 10 / 38.5 / 1.5 モル%、脂質：s i RNA 約 11 : 1。

#### 【0346】

組織収集および RNA 単離：3 日目に、全ての処置群の動物に、致死量のケタミン / キシラジンを与えた。後大静脈を介して血清分離管に血液を収集し、次いで、4 で遠心分離を行う前に、室温で約 30 分間、凝固させた。血清試料は、分析が行われるまで、 $-80$  で保存された。肝組織は、収穫され、ドライアイス上で瞬間凍結された。凍結された肝組織は、粉碎され、組織溶解物は、肝臓 mRNA の定量化のために調製された。

#### 【0347】

T T R の mRNA の定量化：分岐 DNA アッセイ ( Q u a n t i G e n e R e a g e n t S y s t e m , P a n o m i c s , F r e m o n t , C A ) を用いることによって、G A P D H の mRNA レベルと比較した T T R の mRNA レベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中の mRNA レベルを定量化するために、Q u a n t i G e n e アッセイ ( G e n o s p e c t r a ) を使用した。T T R の mRNA の平均レベルを、それぞれの試料に対する G A P D H の mRNA の平均レベルに対して正規化した。次いで、群平均値は、P B S 処置群に対する平均値に対して正規化され、T T R の mRNA の発現の相対レベルを得た。

#### 【0348】

結果：

図 18 に示されるように、P B S 処置動物と比較して、L N P 09 - 18534 および L N P 11 - 18534 で処置した動物は、肝臓中の T T R の mRNA レベルの有意な用

10

20

30

40

50

量依存的な低下を有し、PBC対照群と比較して、0.3mg/kgで、LNP09およびLNP11製剤化群の両方に対して、約90%のmRNAの最大低下率に達し、用量は、LNP11-18534の0.03mg/kg未満で、LNP09-18534の0.1mg/kg未満で、50%低下(ED<sub>50</sub>)に達した。

【0349】

#### 結論

本研究は、Sprague-Dawleyラットにおいて、LNP09-18534またはLNP11-18534の単回15分間のIV注入が、肝臓TTRのmRNAの用量依存的な低下をもたらすことを実証する。これらのデータは、内因性に発現した(野生型)TTR mRNAを、LNP11-18534およびLNP09-18534についてそれぞれ0.03mg/kg未満および0.1mg/kg未満のED<sub>50</sub>レベルで低下させる、LNP09-18534およびLNP11-18534の有効性を実証する。

10

【0350】

#### 実施例18.動物における毒性に対するアッセイ

ALN-TTR01は、非GLPおよびGLP条件下で、安全性および毒物学のアッセイを行った。ALN-TTR01は、SNALP製剤(DLiNDMA/DPPC/コレステロール/PEG2000-cDMA(57.1/7.1/34.4/1.4)脂質:sRNA約7)中のsRNA AD-18328である。アッセイは、カニクイザル(1、3、および10mg/kg)およびSprague-Dawleyラット(0.3、1、3、および6mg/kg)において行われた。ラットにおいて1mg/kg以下で、NHPにおいて3mg/kg以下でALN-TTR01の毒性は見出されなかった。(データは示さず)。

20

【0351】

#### 実施例19.薬物製品ALN-TTR01

薬物製品ALN-TTR01 Injectionは、等張リン酸緩衝生理食塩水中の脂質賦形剤(安定核酸脂質粒子[SNALP]と称される)を含むsRNA ALN-18328の白色からオフホワイト色の均質な滅菌脂質懸濁液である。ALN-TTR01の組成物は、下表に示される。

【0352】

【表 17】

薬物製品 ALN-TTRO1 の組成物

成分、等級	濃度 (mg/mL)	バイアル 当たり (mg)	効用
ALN-18328, cGMP	2.0	11.0	活性成分
DLinDMA (1,2-ジリノレイオキシ -N,N-ジメチル-3-アミ ノプロパン)、cGMP	7.3	40.2	新規の賦形剤、 活性成分との相互 作用に対する滴定 可能なアミノ酸脂 質
PEG <sub>2000</sub> -C-DMA (3-N-[( $\omega$ -メトキシポリ (エチレングリコール )2000)カルバモイル ]-1,2-ジミリスチルオ キシ-プロピルアミン) 、 cGMP	0.8	4.4	新規の賦形剤、 薬物製品の安定性 および所望の生体 内分布
DPPC (R-1,2-ジパルミト イル-sn-グリセロ-3-ホ スホコリン)、cGMP	1.1	6.1	SNALP粒子の構造 的完全性
コレステロール、合成、 cGMP	2.8	15.4	SNALP粒子の構造 的完全性
リン酸緩衝生理食塩水、 cGMP	適量	5.5mLまで	緩衝液

10

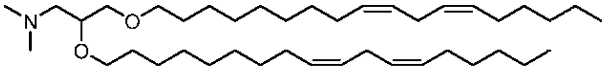
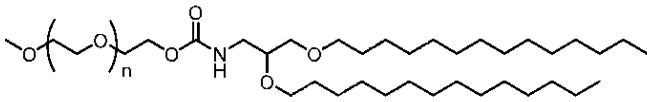
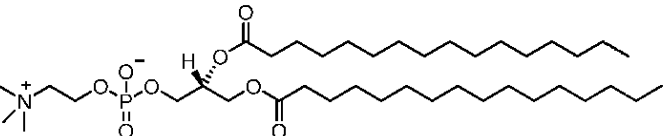
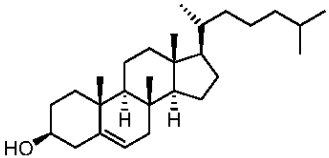
20

30

## 【0353】

脂質賦形剤は、下表に示される分子量および構造を有する。

【表 18】  
脂質賦形剤

脂質	分子量	化学名および構造
DLinDMA	616	1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン 
PEG <sub>2000</sub> -CDMA <sup>a</sup>	2824 多分散性 指数1.01	3-N-[(ω-メトキシポリ(エチレングリコール)2000)カルバモイル]-1,2-ジミリスチルオキシ-プロピルアミン 
DPPC	734	1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン 
コレステロール	387	コレスト-5-エン-3β-オール 

・ a 別名：m P E G<sub>2000</sub> - C - D M A

【0354】

A L N T T R 0 1 薬物製品は、5 . 5 m L の充填量を有する 1 0 m L のガラス製バイアル中に包装される（バイアル当たり 1 1 m g の A L N - 1 8 3 2 8）。容器の閉鎖システムは、U S P / E P の I 型ホウケイ酸塩ガラス製バイアル、テフロン表面加工ブチルゴム栓、およびアルミニウム製フリップオフキャップからなる。薬物製品は、5 ± 3 で保管される。

【0355】

薬物製品の安定性は、最長 2 4 ヶ月間アッセイされ、以下の基準を用いて判定される。

外観：白色からオフホワイト色、均質な乳白色の液体、異物なし

p H : 6 . 8 ~ 7 . 8

オスモル濃度：2 5 0 ~ 3 5 0 m O s m / k g

脂質：s i R N A 比：5 . 6 ~ 8 . 4 m g / m g

粒径（Z - 平均）：6 0 ~ 1 2 0 n m ≤ 0 . 1 5 .

【0356】

実施例 2 0 . A R P E 1 9 細胞における A D - 1 8 3 2 4 によるインビトロでのヒト T T R の m R N A の発現の低下

インビトロでの T T R の m R N A の発現における T T R の s i R N A の効果を判定するために、s i R N A A D - 1 8 3 2 4 および A D - 1 8 5 3 4 が、ヒト網膜色素上皮（A R P E - 1 9）細胞において試験された。

【0357】

A D - 1 8 3 2 4 は、ヒト T T R の s i R N A の二重鎖であり、A D - 1 8 5 3 4 は、ラット T T R の s i R N A の二重鎖である。A D - 1 8 5 3 4 および A D - 1 8 3 2 4 の

10

20

30

40

50

センスおよびアンチセンス鎖の配列を、以下に再現する。

二重鎖#	鎖	オリゴ#	位置	5' から3' の方向	配列番号
AD-1853 4	s	A-32755	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1411
	as	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	1412
AD-1832 4	s	A-32337	509	GGAuuuAuGuAAccAAGAdTdT	1413
	as	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1414

10

#### 【0358】

対照 *siRNA* は、*LUC* 遺伝子を標的とする AD - 1955 であった。

#### 【0359】

ARPE - 19 細胞は、Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用いて、*siRNA* でトランスフェクションした。この方法の幾つかの実施形態において、コレステロールまたはアテロコラーゲンを含む、他のトランスフェクション剤を用いることができる。24 時間インキュベーション後、50 ~ 60 % コンフルエントの ARPE - 19 細胞は、製造業者の取扱説明書に従って、AD - 18534 または AD - 18324 により一過性にトランスフェクションした。総 RNA は、トランスフェクションの開始から 48 時間後、リアルタイム定量 PCR 法のために単離された。ARPE - 19 細胞は、1 nM、10 nM、もしくは 50 nM の AD - 18534 で、または 1 nM、10 nM、もしくは 50 nM の AD - 18324 で投与された。

20

#### 【0360】

TTR の mRNA の発現は、リアルタイム定量 PCR 法によって測定された。総 RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いることによってトランスフェクションした細胞から単離された。総 RNA (0.5 μg) は、製造業者のプロトコルに従って、ExScript RT 試薬 (Takara Bio Inc.) を用いることによって cDNA に逆転写させた。それぞれの PCR 法は、SYBR Premix Dimer Eraser (Takara Bio Inc.) を用いて、Light Cycler System において、2 μL の cDNA および 0.2 μmol/L のそれぞれのプライマーを用いて実施された。以下のプライマーが使用された：ヒト TTR (順方向：5' - CATTCTTGGCAGGATGGCTTC - 3' (配列番号 1415)、逆方向：5' - CTC CCA GGTGT CATCAGCAG - 3' (配列番号 1416))。ヒト TTR の mRNA の発現は、ARPE - 19 細胞におけるヒト GAPDH の発現レベルと比較して算出された。

30

#### 【0361】

ヒト TTR の mRNA の発現は、用量依存性様式で、AD - 18324 によって著しく低下した。結果を図 22 に示す。1 nM 用量の AD - 18324 は、対照 *siRNA* 群と比較して、ヒト TTR の mRNA の相対的発現の少なくとも 10 % 低下をもたらした。10 nM 用量の AD - 18324 は、対照 *siRNA* 群と比較して、ヒト TTR の mRNA の相対的発現の少なくとも 40 % 低下をもたらした。50 nM 用量の AD - 18324 は、対照 *siRNA* 群と比較して、ヒト TTR の mRNA の相対的発現の少なくとも 60 % 低下をもたらした。AD - 18534 は、それぞれの用量で、ヒト TTR の相対的発現において顕著な低下を生じなかった。対照と比較して、IL - 6 または TNF - α レベルにおける効果がなかった。

40

#### 【0362】

これらの結果は、AD - 18324 が、用量依存性様式で、ヒト網膜色素上皮 (ARPE - 19) 細胞において、ヒト TTR の mRNA の発現を阻害するのにも有効であり、炎症反応を生じないことを実証する。

#### 【0363】

50

## 実施例 2 1. ダークアグーチ ( D A ) ラットにおける A D - 1 8 5 3 4 による内因性ラット T T R の m R N A の発現のインビボの低下

内因性ラット T T R の m R N A の発現におけるラット T T R の s i R N A の効果を判定するために、二重鎖 A D - 1 8 5 3 4 が、ダークアグーチ ( D A ) ラットにおいて、インビボで試験された。

### 【 0 3 6 4 】

A D - 1 8 5 3 4 のセンスおよびアンチセンス鎖の配列は、上述される。

### 【 0 3 6 5 】

D A ラットは、A D - 1 8 5 3 4 をそれらの硝子体腔中に注射した。成熟ラットを、ジエチルエーテル吸入によって麻酔した。瞳孔を拡張するために、1 ~ 2 滴の 1 % のトロピカミドをラットの眼に適用した。H a m i l t o n シリンジおよび 3 3 ゲージの針を用いて、s i R N A の硝子体内注射を実施した。注射した体積は、硝子体体積が、できる限り正常に近い状態であるように、5  $\mu$  L であった。2 4 時間後、ラットは、ジエチルエーテル吸入によって殺処分され、眼は、その後の解離のために採取された。眼は、角膜および水晶体を別々にして、後囊カップに入れた。R P E - 脈絡膜 - 強膜の複合体を、分析用の後囊カップから網膜を除去することによって単離した。他の方法を用いて、s i R N A 送達を最適化することができ、これには、用量の量または用量の時期を変更することが含まれる。幾つかの実施形態において、注射方法は、結膜下腔または網膜下を含む、眼の別の部分で起こる場合がある。他の実施形態において、注射した生理食塩水または s i R N A の量は、増加させてもよい。

### 【 0 3 6 6 】

ラットの T T R の m R N A の発現は、リアルタイム定量 P C R 法 ( q P C R ) によって測定された。総 R N A は、R N e a s y M i n i K i t ( Q i a g e n ) を用いることによってそれぞれの R P E - 脈絡膜 - 強膜の複合体から単離された。総 R N A は、E x S c r i p t R T 試薬 ( T a k a r a B i o I n c . ) を用いることによって c D N A に逆転写させた。それぞれの P C R 法は、S Y B R P r e m i x D i m e r E r a s e r ( T a k a r a B i o I n c . ) を用いて、L i g h t C y c l e r S y s t e m において行われた。以下のプライマーが使用された：ラット T T R ( 順方向：5' - T G C C T C G C T G G A C T G A T A T T T G - 3' ( 配列番号 1 4 1 7 ) ; 逆方向：5' - T T G A A C A C T T T C A C G G C C A C A - 3' ( 配列番号 1 4 1 8 ) ) 。ラット T T R の m R N A の発現は、ラット G A P D H の発現レベルと比較して算出された。

### 【 0 3 6 7 】

図 2 3 は、対照 s i R N A 、生理食塩水、または非処置を投与された D A ラットと比較して、A D - 1 8 5 3 4 を注射した後の D A ラットにおける、内因性ラット T T R の m R N A の発現の阻害を示す (  $p < 0 . 0 1$  ) 。A D - 1 8 3 5 4 で処置した D A ラットは、対照 s i R N A 群および生理食塩水対照群と比較して、内因性ラット T T R の m R N A の発現において、少なくとも 6 0 % 低下を示した (  $p < 0 . 0 1$  ) 。

### 【 0 3 6 8 】

これらの結果は、A D - 1 8 3 5 4 が、D A ラットの網膜色素上皮細胞において、内因性ラット T T R の m R N A の発現を抑制するのに活性があることを実証する。

### 【 0 3 6 9 】

## 実施例 2 2. A T T R V 3 0 M トランスジェニック ( T g ) ラットにおける、A D - 1 8 3 2 4 による A T T R の m R N A の発現のインビボの低下

ヒト変異体 ( V 3 0 M ) A T T R の m R N A の発現における T T R の s i R N A の A D - 1 8 3 2 4 の効果を評価するために、A D - 1 8 3 2 4 は、A T T R の V 3 0 M トランスジェニック ( T g ) ラットの網膜色素上皮細胞において、インビボで試験された。

### 【 0 3 7 0 】

ヒト A T T R の V 3 0 M 遺伝子を保有するトランスジェニックラットは、それらの硝子体腔中に、A D - 1 8 3 2 4 を注射した。H a m i l t o n シリンジおよび 3 3 ゲージの

針を用いて、AD - 18324のsiRNAの硝子体内注射を実施した。24時間後、ATT RのV30M Tgラットは、ジエチルエーテル吸入によって殺処分され、眼は、その後の解離のために採取された。眼は、角膜および水晶体を別々にして、後嚢カップに入れた。ATT RのmRNAの発現におけるAD - 18324の効果を評価するために、網膜を後嚢カップから取り出すことによって、RPE - 脈絡膜 - 強膜の複合体を単離した。AD - 18324のsiRNAを、33ゲージの針を用いて、硝子体腔中に、注射した。24時間後、網膜色素上皮を単離して、ATT RのmRNAの発現におけるAD - 18324の効果を評価した。

#### 【0371】

ATT RのmRNAの発現は、リアルタイムPCR法によって測定された。総RNAは、ExScript RT試薬(Takara Bio Inc.)を用いることによってcDNAに逆転写させた。それぞれのPCR法は、Premix Ex Taq(Takara Bio Inc.)を用いて、LightCycler Systemにおいて行われた。以下のプライマーが使用された：ヒトTTR(順方向：5' - GCCGTG CATGTGTGTTTCAGA - 3' (配列番号1419)、逆方向：5' - GCTCTTCC AGACTCACTGGTTTT - 3' (配列番号1420))。プローブが、Universal Probe Library(プローブ番号#66、Roche Diagnostics)によって提供された。ATT RのmRNAの発現は、ATT RのV30M TgラットにおけるラットGAPDHの発現と比較して算出された。

#### 【0372】

図24は、対照siRNA群、生理食塩水群、および非処置群と比較した、ATT RのV30M TgラットのRPE細胞におけるATT RのmRNAの発現の有意な低下を示す。ATT RのmRNAの発現は、非処置群と比較して、少なくとも60%低下した。

#### 【0373】

ウエスタンブロット分析を用いて、ATT Rタンパク質の発現を評価した。ラットから等量の水性の体液タンパク質を、12%のSDS - PAGEによって分画し、ニトロセルロース膜(Bio - Rad Laboratories)に移した。膜を、2.5%の無脂肪乳でブロックし、ウサギポリクローナル抗TTRであった一次抗体(希釈1:1000、Dako)で、4℃で終夜インキュベートし、続いて、二次反応として、西洋ワサビペルオキシダーゼ共役したヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体(希釈1:1000、Dako)で、室温で1時間インキュベートした。免疫複合体は、ECL<sup>+</sup>ウエスタンブロット検出システム(GE Healthcare Bio - Science)を用いて可視化した。

#### 【0374】

結果を図25に示す。ATT Rタンパク質の発現は、対照siRNAの注射後、ATT Rタンパク質の発現と比較して、AD - 18324により有意に低下した。

#### 【0375】

これらの結果は、ATT RのV30M TgラットにおけるAD - 18324の硝子体内注射が、ヒトTTRのmRNAおよびRPEにおけるタンパク質の発現を有意に低下させることを実証する。

#### 【0376】

実施例23. コレステロールとコンジュゲートしたAD - 18534を用いたダークアグーチ(DA)ラットにおける内因性ラットTTRのmRNAの発現のインビボの低下

内因性ラットTTRのmRNAの発現におけるコレステロールとコンジュゲートしたラットTTRのsiRNAの効果を判定するために、二重鎖AD - 23043が、ダークアグーチ(DA)ラットにおいて、インビボで試験された。

AD - 23043は、以下の配列を有するコレステロールとコンジュゲートしたsiRNAである。

10

20

30

40

二重鎖＃	鎖	5' から 3' の方向	配列番号
AD-230 43	センス	c A G u G u u c u u G c u c u A u A A d T d T s L 1 0	1 4 2 1
	アンチセ ンス	U u A u A G A G c A A G A A c A C U G d T d T	1 4 2 2

## 【0377】

D A ラットは、AD-23043をそれらの硝子体腔中に注射された。成熟ラットを、ジエチルエーテル吸入によって麻酔した。瞳孔を拡張するために、1～2滴の1%のトロピカミドをラットの眼に適用した。Hamiltonシリンジおよび33ゲージの針を用いて、siRNA(5μg)の硝子体内注射を実施した。注射した体積は、硝子体体積が、できる限り正常に近い状態であるように、5μLであった。14日または21日後、ラットは、ジエチルエーテル吸入によって殺処分され、眼は、その後の解離のために採取された。眼は、角膜および水晶体を別々にして、後嚢カップに入れた。RPE-脈絡膜-強膜の複合体を、分析用の後嚢カップから網膜を除去することによって単離した。

10

## 【0378】

ラットのTTRのmRNAの発現は、リアルタイム定量PCR法(qPCR)によって測定された。総RNAは、RNeasy Mini Kit(Qiagen)を用いることによってそれぞれのRPE-脈絡膜-強膜の複合体から単離された。総RNAは、ExScript RT試薬(Takara Bio Inc.)を用いることによってcDNAに逆転写させた。それぞれのPCR法は、SYBR Premix DimerErase(Takara Bio Inc.)を用いて、LightCycler Systemにおいて行われた。以下のプライマーが使用された：ラットTTR(順方向：5'-TGCCCTCGCTGGACTGATATTTG-3'(配列番号1424)；逆方向：5'-TTGAACACTTTTCACGGCCACA-3'(配列番号1423))。ラットTTRのmRNAの発現は、ラットGAPDHの発現レベルと比較して算出された。

20

## 【0379】

結果を図26および図27に示す。ラットTTRを標的とするコレステロール共役したsiRNAは、対照siRNAと比較して、内因性ラットTTRの発現を約40%低下させた。

30

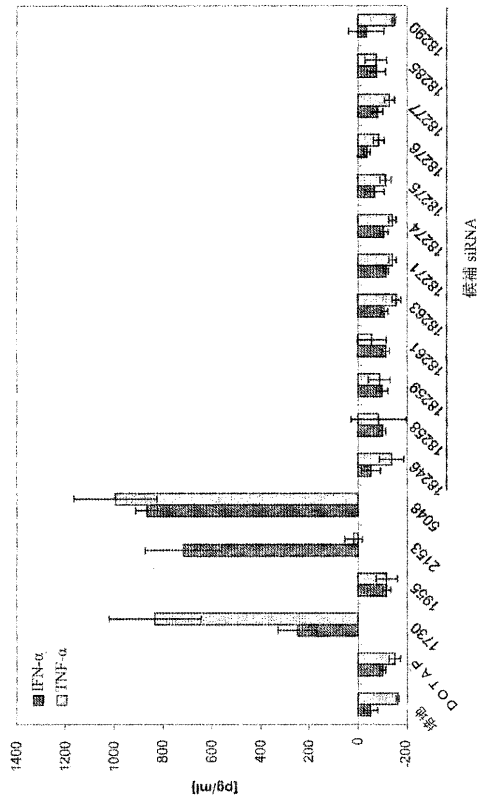
## 【0380】

実施例24. ヒトにおける眼アミロイドーシスの処置

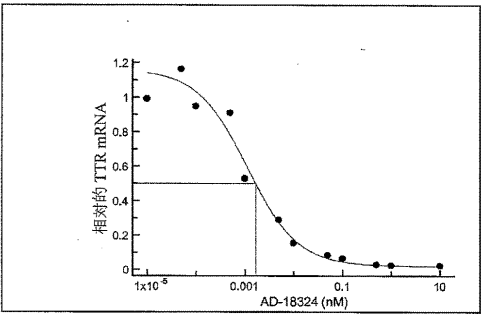
ヒトにおける眼アミロイドーシスの治療のために、本発明において使用された医薬組成物は、処置の侵襲性に依存して、および局所的または全身的治療が望ましいかどうかに基づいて、多くの方法において投与することができる。好ましい初期治療は、点眼、軟膏、経口投与、または注入によって実施することができる。非経口投与には、皮下眼瞼、結膜下注射、テノン嚢下注射、球後注射、前房注射、硝子体注射、または眼血管注射が含まれる。

40

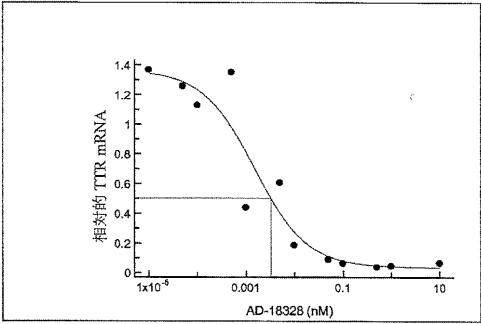
【図 1】



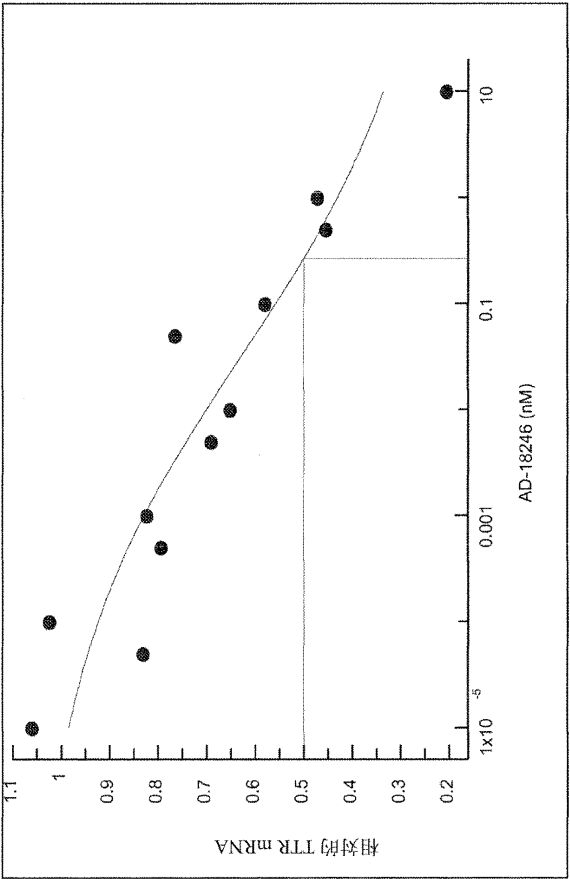
【図 2 A】



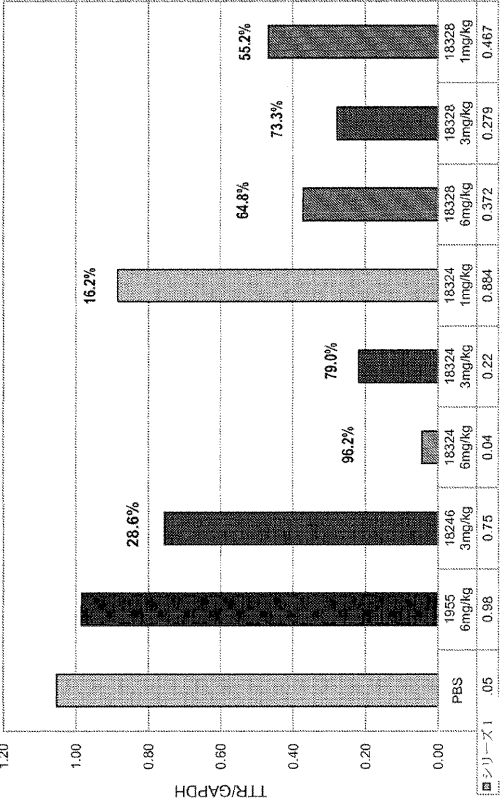
【図 2 B】



【図 3】



【図 4 A】



【 図 4 B 】

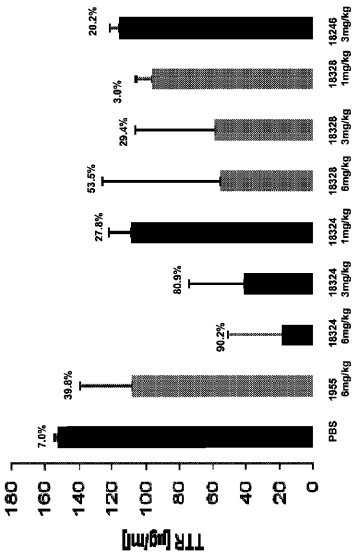
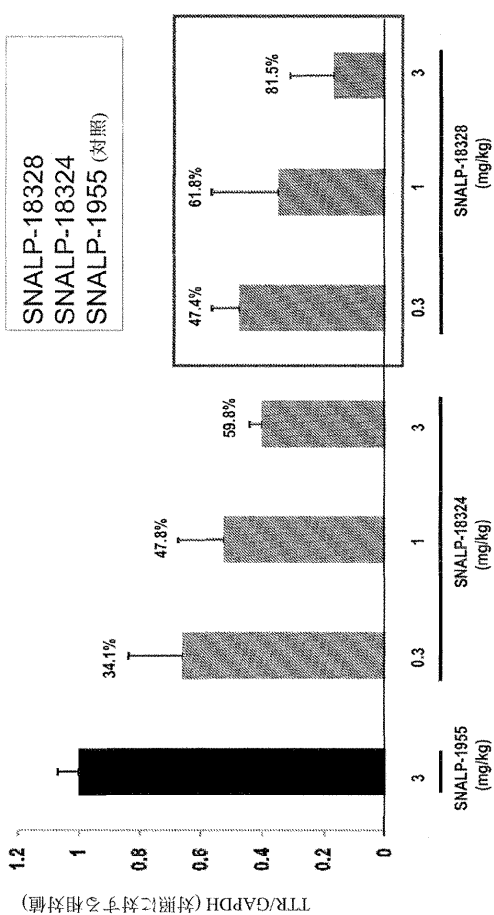
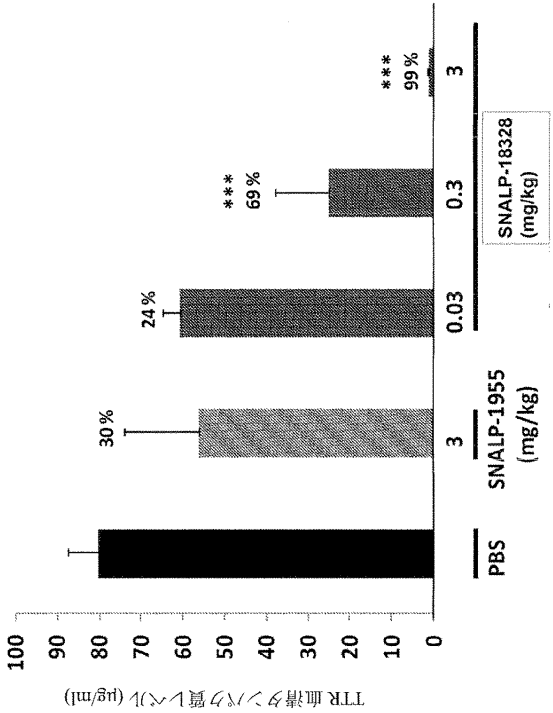


FIG. 4B

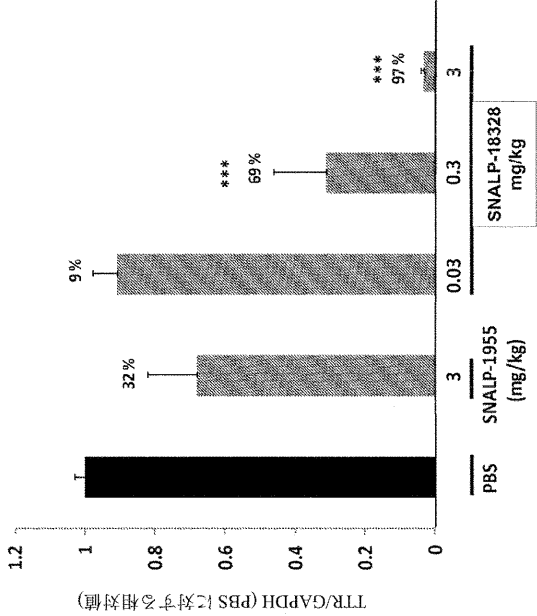
【 図 5 】



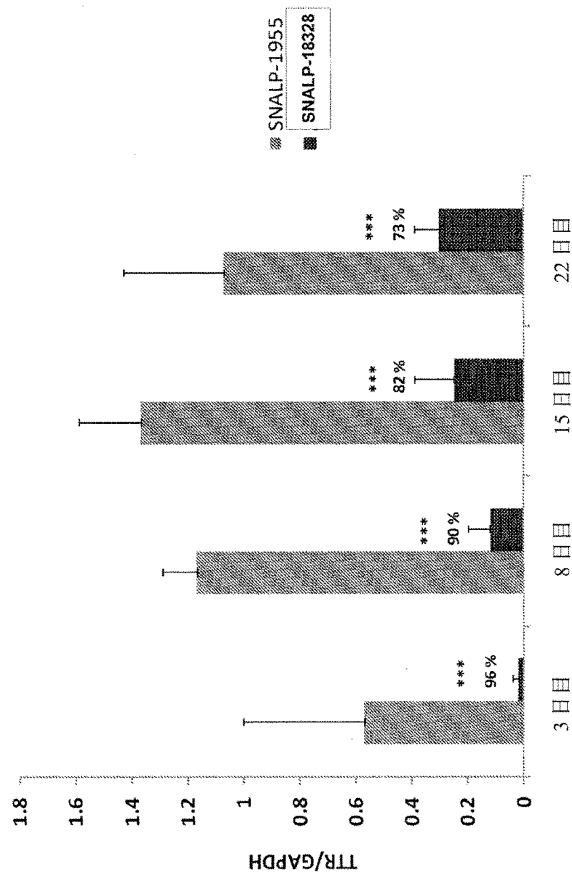
【 図 6 B 】



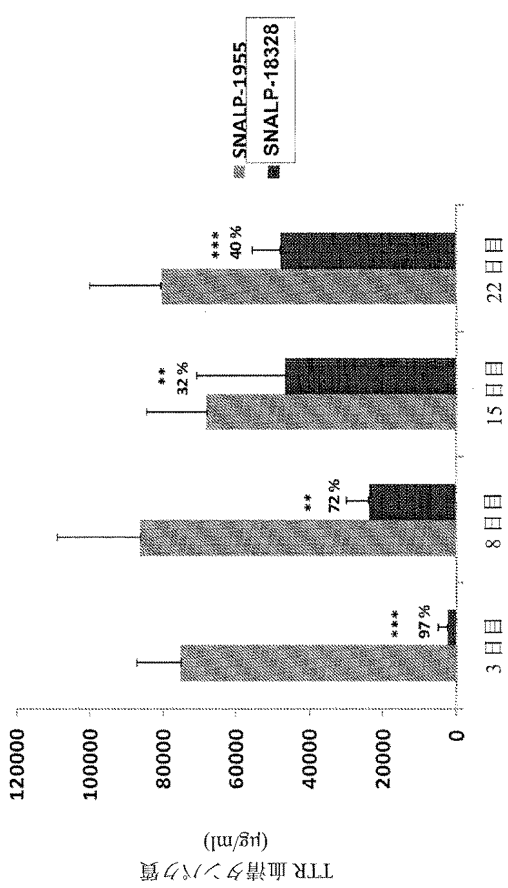
【 図 6 A 】



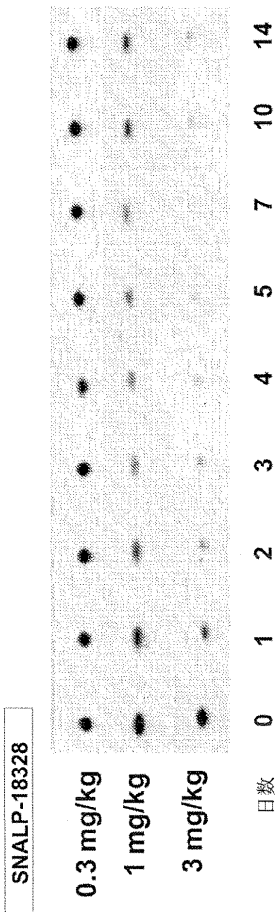
【図 7 A】



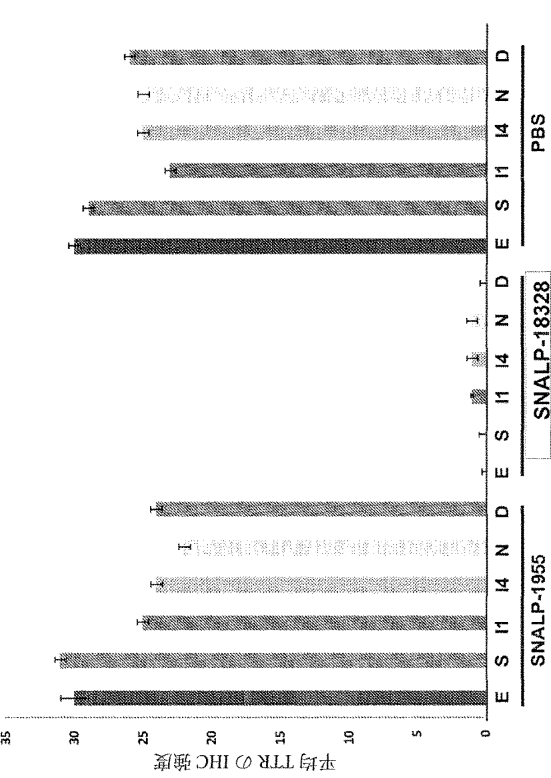
【図 7 B】



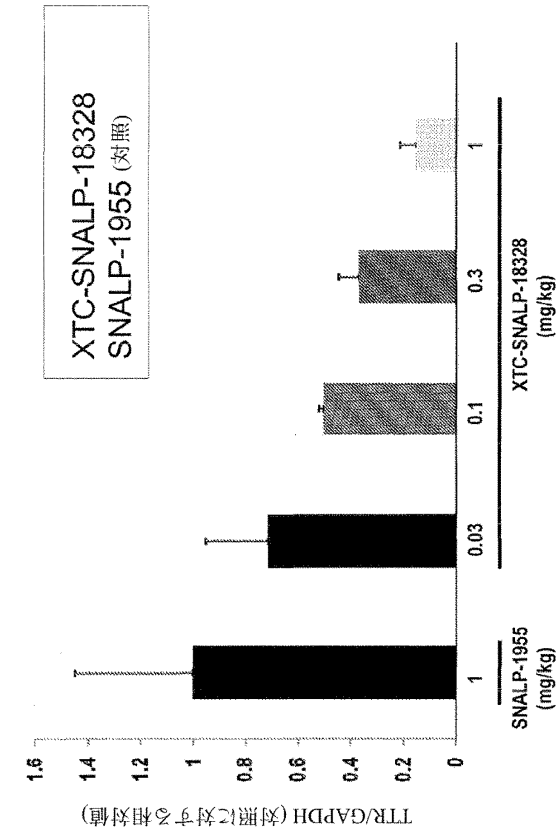
【図 8】



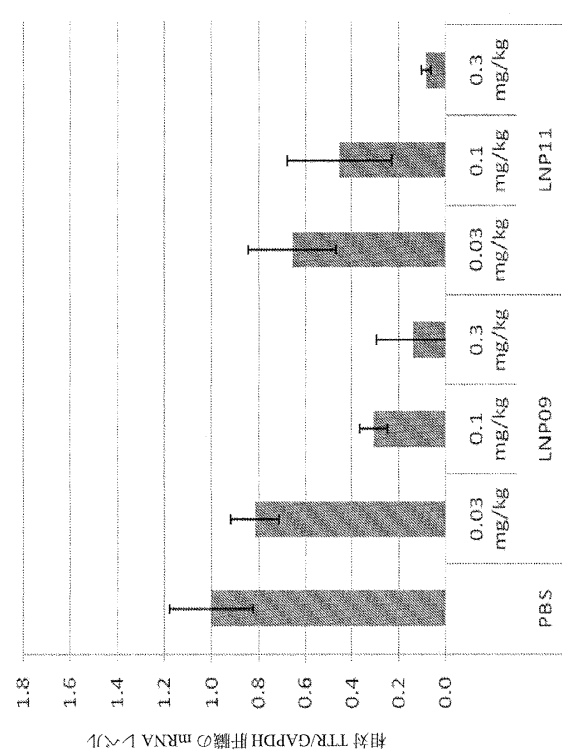
【図 9】



【図 1 0】



【図 1 1 A】



【図 1 1 B】

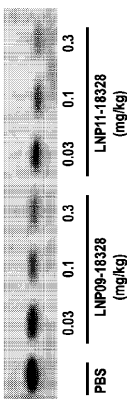
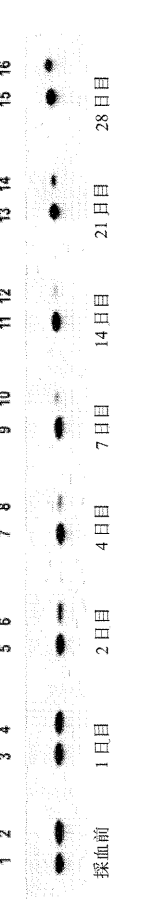


FIG. 11B

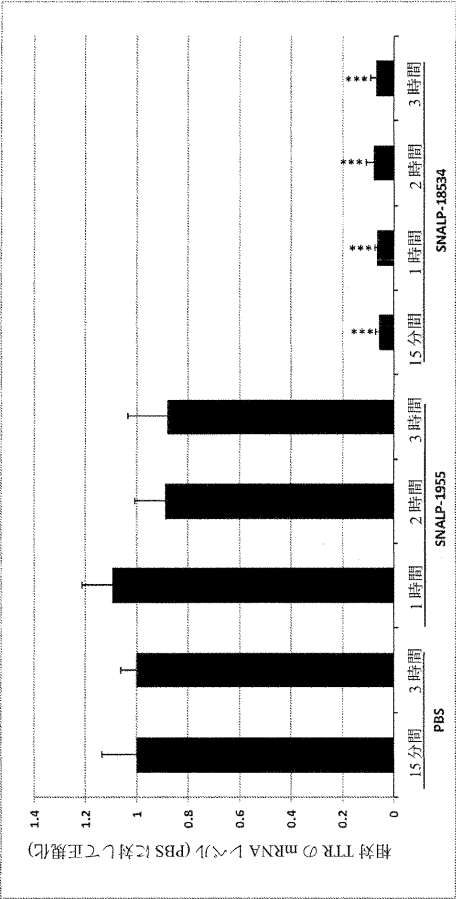
【図 1 1 C】



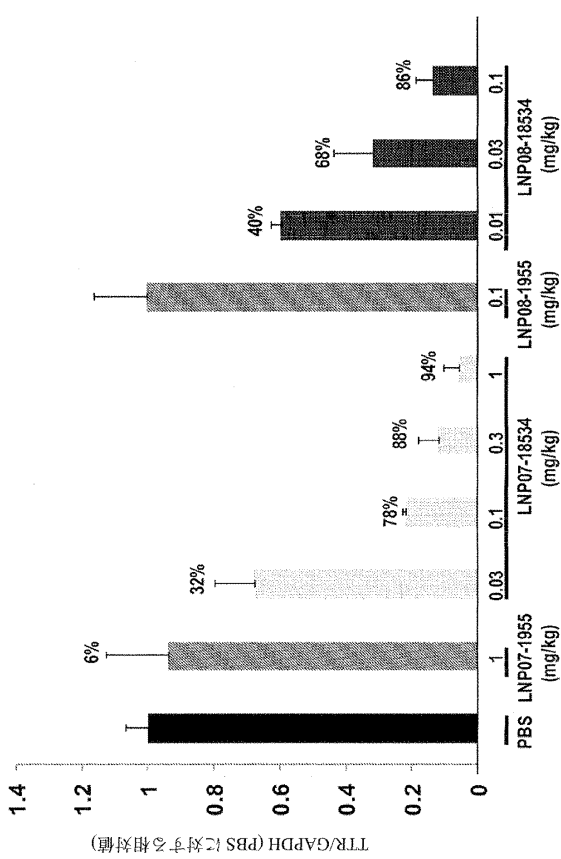
レーン 1、3、5、7、9、11、13、および 15: PBS 動物  
レーン 2、4、6、8、10、12、および 16: 0.3mg/kg LNP09-18328



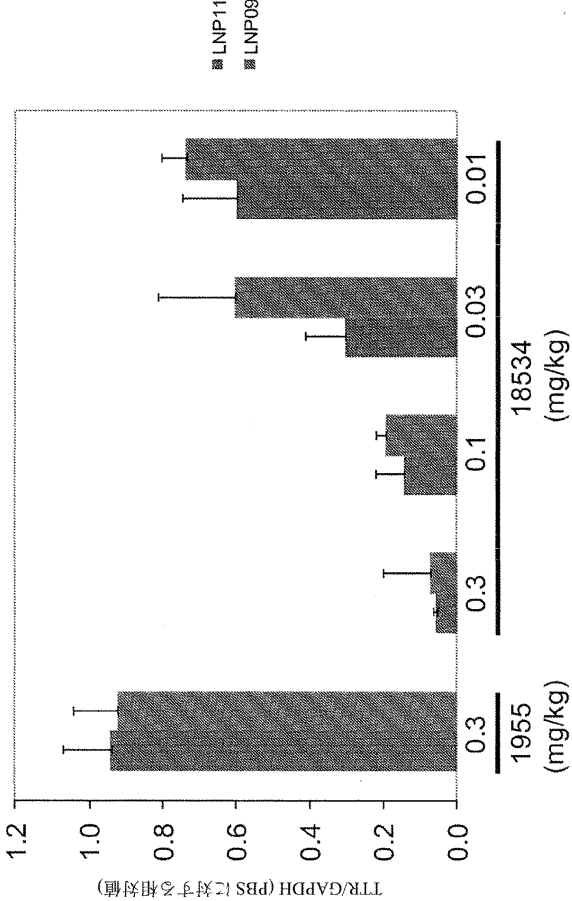
【図 16】



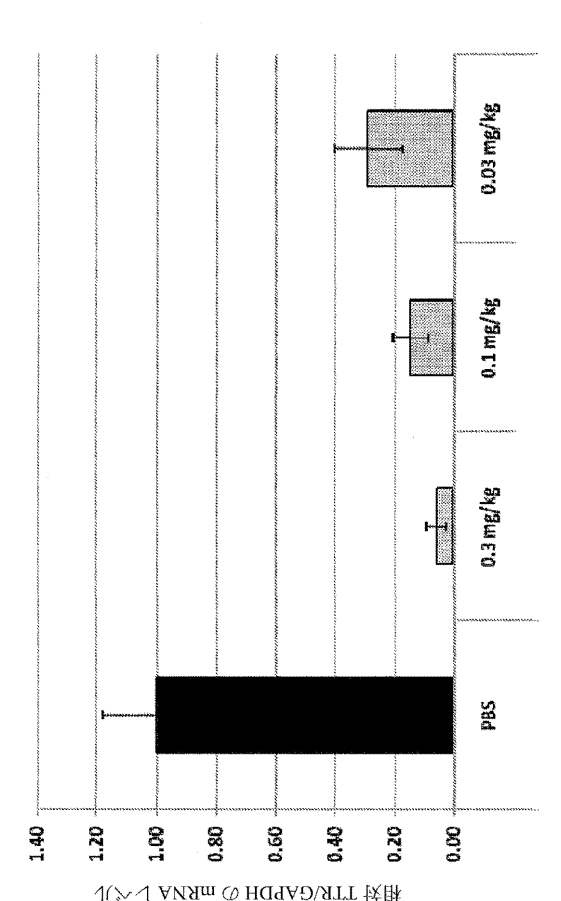
【図 17】



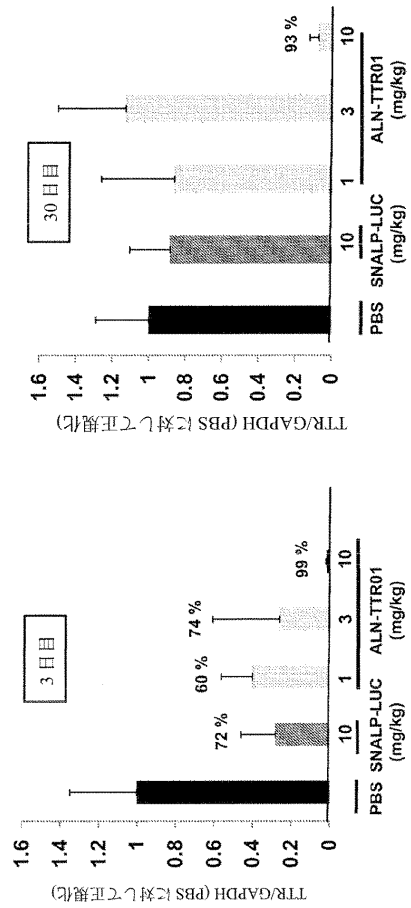
【図 18】



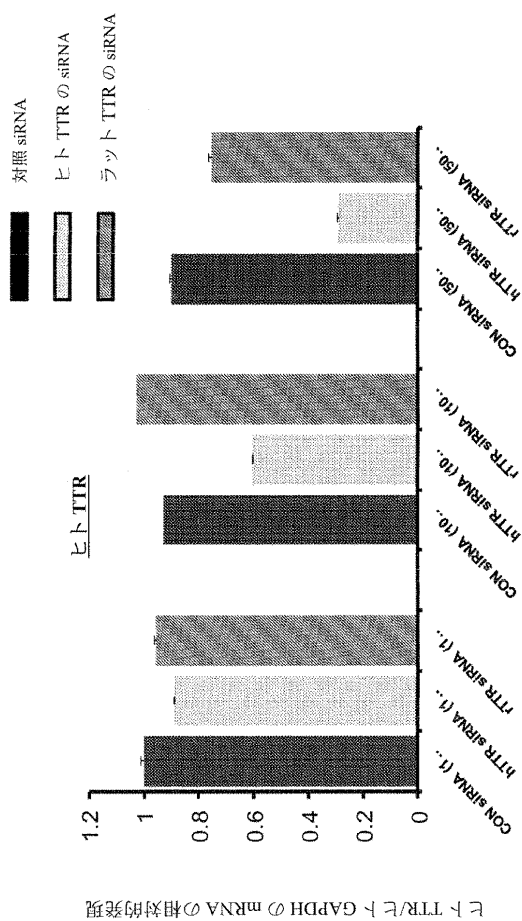
【図 19】



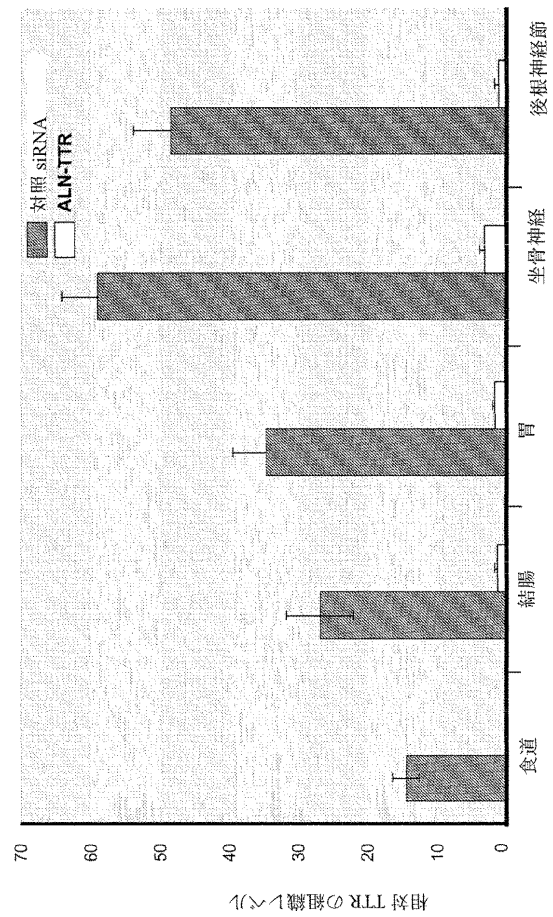
【図20】



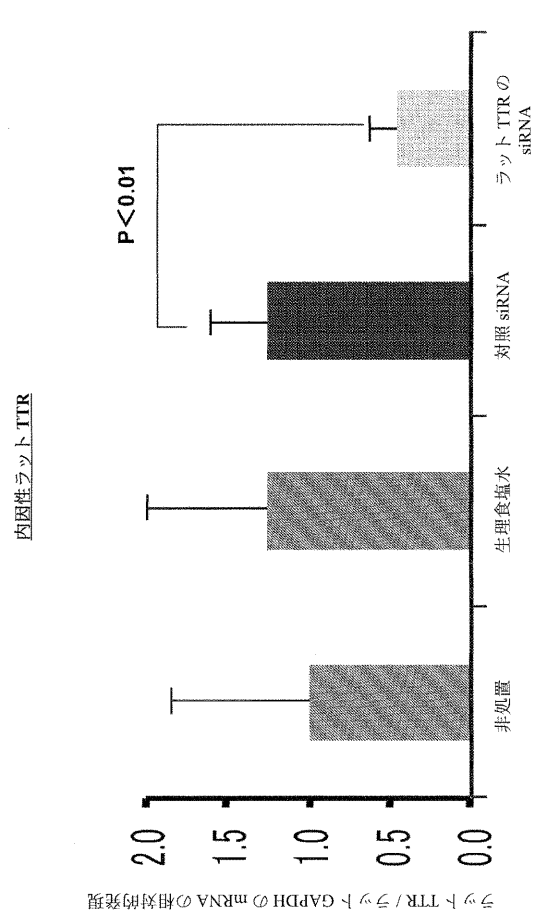
【図22】



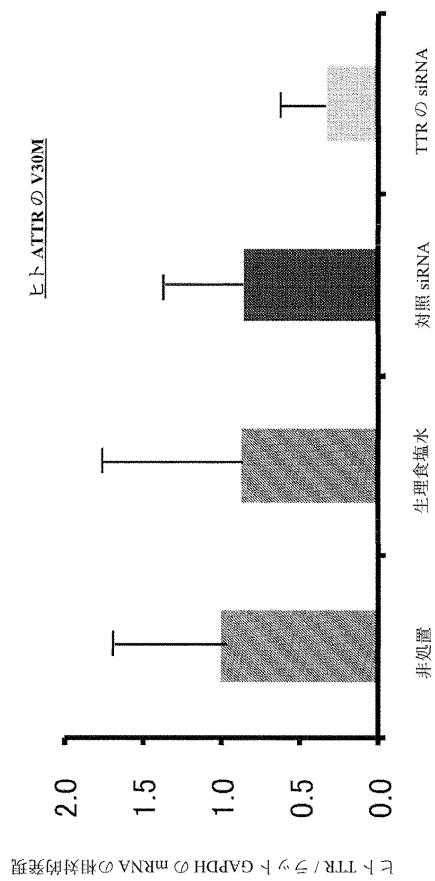
【図21】



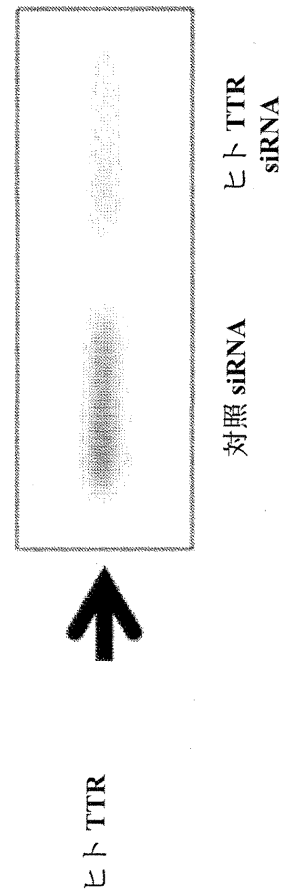
【図23】



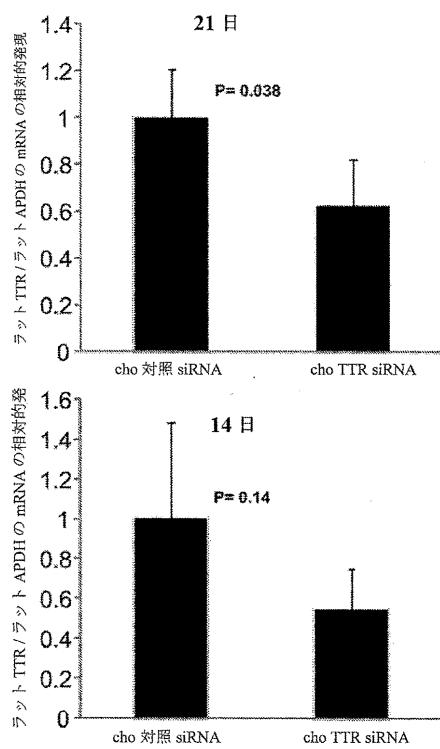
【図 24】



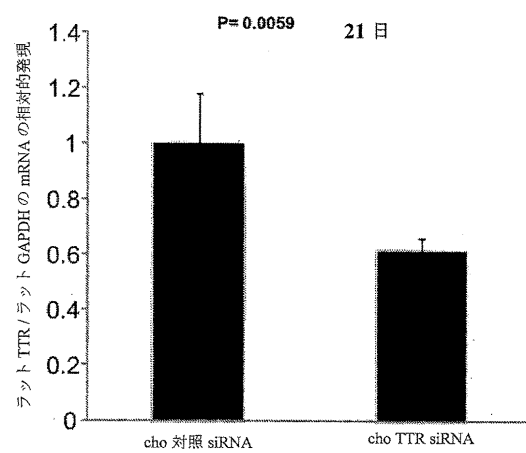
【図 25】



【図 26】



【図 27】



【配列表】

0005860029000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**A 6 1 K 47/28 (2006.01)** A 6 1 K 47/28  
 C 1 2 N 15/113 (2010.01) C 1 2 N 15/00 G

(73)特許権者 512252928

ユキオ・アンドウ

Y u k i o A N D O

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(73)特許権者 512252939

ヒロフミ・ジョノ

H i r o f u m i J O N O

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ユキオ・アンドウ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ヒロフミ・ジョノ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 レネ・アルバレス

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ダイナ・ウェン・イー・サー

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、サード・ストリート 3 0 0 番、アルナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 8 2 3 0 0 ( U S , A 1 )

Current Pharmaceutical Biotechnology, 2 0 0 5 年, Vol.6, p.7-15

あたらしい眼科, 2 0 1 0 年, Vol.27, No.10, p.1377-1384

薬剤学, 2 0 0 3 年, Vol.63, No.4, p.193-196

Current Pharmaceutical Design, 2 0 0 8 年, Vol.14, p.3219-3230

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2 0 0 5 年, Vol.337, p.1012-1018

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 7 1 3

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

