

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-503397
(P2025-503397A)

(43)公表日 令和7年2月4日(2025.2.4)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 6
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全231頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号 特願2024-534108(P2024-534108)		(71)出願人 505369158			
(86)(22)出願日 令和4年12月7日(2022.12.7)		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			
(85)翻訳文提出日 令和6年8月1日(2024.8.1)		ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.			
(86)国際出願番号 PCT/US2022/081113		アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート675、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア			
(87)国際公開番号 WO2023/108020		(74)代理人 100145403			
(87)国際公開日 令和5年6月15日(2023.6.15)		弁理士 山尾 憲人			
(31)優先権主張番号 63/286,891		(74)代理人 100122301			
(32)優先日 令和3年12月7日(2021.12.7)		弁理士 富田 憲史			
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		(74)代理人 100170520			
(31)優先権主張番号 63/341,885		弁理士 笹倉 真奈美			
(32)優先日 令和4年5月13日(2022.5.13)					
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)					
(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ					
最終頁に続く		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 MY L I Pをサイレンシングするための i R N A組成物および方法

(57)【要約】

本発明は、ミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MY L I P) 遺伝子を標的とする二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 組成物、ならびに当該 d s R N A組成物を使用して、MY L I Pの発現を阻害する方法、およびMY L I Pの発現の低減から恩恵を受けるであろう対象、例えば、MY L I P関連疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、dsRNA 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む、dsRNA 剤。

【請求項 2】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、前記 dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、表 3 または 4 に記載されるアンチセンス配列のうちのいずれか 1 つと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む、MYLIP をコードする mRNA に対して相補性の領域を含む、dsRNA 剤。

10

【請求項 3】

前記 dsRNA 剤は、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチドを含む、請求項 1 または 2 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 4】

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤。

20

【請求項 5】

アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 6】

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 7】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖 RNA（dsRNA）剤であって、dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

30

センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、修飾されたヌクレオチドであり、

センス鎖は、3' - 末端に付着されたリガンドにコンジュゲートされている、dsRNA 剤。

40

【請求項 8】

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む、請求項 7 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 9】

アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む、請求項 7 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 10】

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む、請求項 7 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 11】

50

前記修飾されたヌクレオチドの少なくとも1つは、デオキシヌクレオチド、3'末端デオキシチミジン(dT)ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾されたヌクレオチド、2'-フルオロ修飾されたヌクレオチド、2'-デオキシ修飾されたヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、非ロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束エチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-O-アリル修飾されたヌクレオチド、2'-C-アルキル修飾されたヌクレオチド、2'-ヒドロキシル修飾されたヌクレオチド、2'-メトキシエチル修飾されたヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾されたヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミデート、非天然塩基を含むヌクレオチド、テトラヒドロピラン修飾されたヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキソール修飾されたヌクレオチド、シクロヘキセニル修飾されたヌクレオチド、ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、5'ホスフェートを含むヌクレオチド、5'ホスフェートミミックを含むヌクレオチド、グリコール修飾されたヌクレオチド、および2'-O-(N-メチルアセトアミド)修飾されたヌクレオチド、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項3～10のいずれか1つに記載のdsRNA剤。

10

【請求項12】

ヌクレオチド修飾は、2'-O-メチルおよび／または2'-フルオロ修飾である、請求項11に記載のdsRNA剤。

【請求項13】

相補性の領域は、少なくとも17ヌクレオチド長である、請求項1～12のいずれか1項に記載のdsRNA剤。

20

【請求項14】

相補性の領域は、19～30ヌクレオチド長である、請求項1～13のいずれか1項に記載のdsRNA剤。

【請求項15】

相補性の領域は、19～25ヌクレオチド長である、請求項14に記載のdsRNA剤。

【請求項16】

相補性の領域は、21～23ヌクレオチド長である、請求項15に記載のdsRNA剤。

30

【請求項17】

各鎖が、30個以下のヌクレオチドの長さである、請求項1～16のいずれか1項に記載のdsRNA剤。

【請求項18】

各鎖は、独立に、19～30ヌクレオチド長である、請求項1～17のいずれか1項に記載のdsRNA剤。

【請求項19】

各鎖は、独立に、19～25ヌクレオチド長である、請求項18に記載のdsRNA剤。

【請求項20】

各鎖は、独立に、21～23ヌクレオチド長である、請求項18に記載のdsRNA剤。

40

【請求項21】

少なくとも1つの鎖が少なくとも1ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項1～20のいずれか1項に記載のdsRNA剤。

【請求項22】

少なくとも1つの鎖が少なくとも2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項21に記載のdsRNA剤。

【請求項23】

リガンドをさらに含む、請求項1～6および11～22のいずれか1項に記載のdsR

50

N A 剤。

【請求項 2 4】

リガンドは、d s R N A 剤のセンス鎖の 3' 末端にコンジュゲートされている、請求項 2 3 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 2 5】

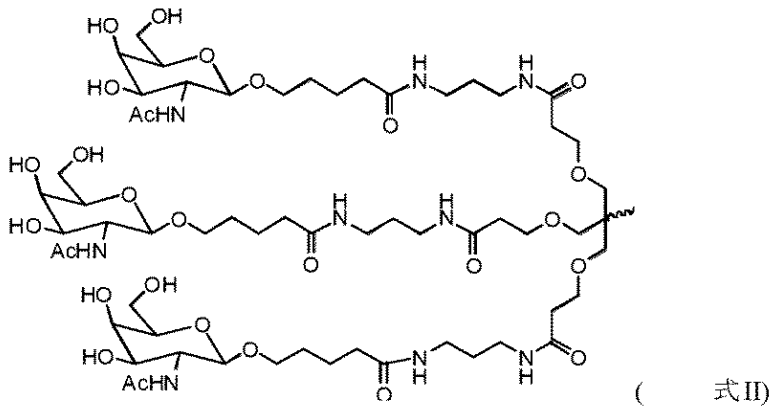
リガンドはN-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 誘導体である、請求項 7 または 2 4 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 2 6】

リガンドは、

【化 1】

10



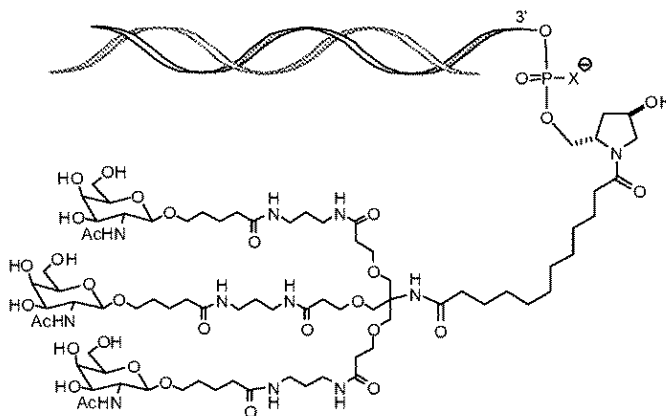
20

である、請求項 2 5 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 2 7】

d s R N A 剤は、以下の図式：

【化 2】



30

【式中、XはOまたはSである】

に示されるようにリガンドにコンジュゲートされている、請求項 2 6 に記載の d s R N A 剤。

40

【請求項 2 8】

XはOである、請求項 2 7 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 2 9】

相補性の領域は、表 3 または 4 におけるアンチセンス配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 2 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 3 0】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (M Y L I P) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤であって、前記 d s R N A 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、M Y L I P をコードする m R N

50

Aの一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、前記dsRNA剤は、式(I i)：

センス：5' $n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q$ 3'

アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - (X'X'X'_k)N_b' - Y'Y'Y'_b'N - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' (I i)$

〔式中、

i、j、kおよびlは、各々独立に0または1であり、

p、p'、qおよびq'は、各々独立に0～6であり、

各 N_a および N_a' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' は、独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、

N_b 上の修飾は、Y上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、Y'上の修飾と異なる〕によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされている、dsRNA剤。

【請求項31】

iは0である、jは0である、iは1である、jは1である、iおよびjはともに0である、またはiおよびjはともに1である、請求項30に記載のdsRNA剤。

【請求項32】

kは0である、lは0である、kは1である、lは1である、kおよびlはともに0である、またはkおよびlはともに1である、請求項30に記載のdsRNA剤。

【請求項33】

XXXは、X'X'X'に対して相補的であり、YYYは、Y'Y'Y'に対して相補的であり、ZZZは、Z'Z'Z'に対して相補的である、請求項30に記載dsRNA剤。

【請求項34】

YYYモチーフは、センス鎖の切断部位においてまたはその付近に存在する、請求項30に記載のdsRNA剤。

【請求項35】

Y'Y'Y'モチーフは、5'末端からアンチセンス鎖の11、12および13位において存在する、請求項30に記載のdsRNA剤。

【請求項36】

式(I i)は、式(I j)：

センス：5' $n_p - N_a - YYY - N_a - n_q$ 3'

アンチセンス：3' $n_p - N_a - Y'Y'Y' - n_q' 5' (I j)$

によって表される、請求項30に記載のdsRNA剤。

【請求項37】

式(I i)は、式(I k)：

センス：5' $n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q$ 3'

アンチセンス：3' $n_p - N_a - Y'Y'Y' - n_q' - Z'Z'Z' - n_q' 5' (I k)$

〔式中、各 N_b および N_b' は、独立に、1～5個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す〕

によって表される、請求項30に記載のdsRNA剤。

【請求項38】

式(I i)は、式(I l)：

10

20

30

40

50

センス：5' η_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'

アンチセンス：3' η_p - N_a - X'X'X' $\bar{b}N$ - Y'Y'Y' $\bar{a}N$ - n_q 5' (I l)

〔式中、各 N_b および N_b' は、独立に、1～5個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す〕

によって表される、請求項30に記載の dsRNA 剤。

【請求項39】

式 (I i) は、式 (I m)：

センス：5' η_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'

アンチセンス：3' η_p - N_a - X'X'X' $\bar{b}N$ - Y'Y'Y' $\bar{b}N$ - Z'Z'Z' $\bar{a}N$ - n_q 5' (I m)

〔式中、各 N_b および N_b' は、独立に、1～5個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各 N_a および N_a' は、独立に、2～10個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す〕

によって表される、請求項30に記載の dsRNA 剤。

【請求項40】

相補性の領域は、少なくとも17ヌクレオチド長である、請求項30～39のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項41】

相補性の領域は、19～30ヌクレオチド長である、請求項30～39のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項42】

相補性の領域は、19～25ヌクレオチド長である、請求項41に記載の dsRNA 剤。

【請求項43】

相補性の領域は、21～23ヌクレオチド長である、請求項42に記載の dsRNA 剤。

【請求項44】

各鎖は、30ヌクレオチド長以下である、請求項30～43のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項45】

各鎖は、独立に、19～30ヌクレオチド長である、請求項30～43のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項46】

ヌクレオチド上の修飾は、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-オールキル、2'-O-アシル、2'-C-フルオロ、2'-O-メチル、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項30～45のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項47】

ヌクレオチド上の修飾は、2'-O-メチルおよび／または2'-フルオロ修飾である、請求項46に記載の dsRNA 剤。

【請求項48】

Y' は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドである、請求項30～46のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項49】

少なくとも1つの鎖は、少なくとも1ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項30～48のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項50】

少なくとも1つの鎖は、少なくとも2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項30～49のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項51】

dsRNA 剤は、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌク

10

20

30

40

50

レオチド間連結をさらに含む、請求項 30～50 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 52】

ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、1 つの鎖の 3' 末端にある、請求項 51 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 53】

前記鎖はアンチセンス鎖である、請求項 52 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 54】

前記鎖はセンス鎖である、請求項 52 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 55】

ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、1 つの鎖の 5' 末端にある、請求項 51 に記載の dsRNA 剤。

10

【請求項 56】

前記鎖はアンチセンス鎖である、請求項 55 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 57】

前記鎖はセンス鎖である、請求項 55 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 58】

ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、1 つの鎖の 3' および 5' 末端の両方にある、請求項 51 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 59】

二重鎖のアンチセンス鎖の 5' 末端の 1 位における塩基対は、AU 塩基対である、請求項 30 に記載の dsRNA 剤。

20

【請求項 60】

$p' > 0$ である、請求項 30 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 61】

$p' = 2$ である、請求項 30 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 62】

$q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ であり、 p' 個のオーバーハングヌクレオチドは、標的 mRNA に対して相補的である、請求項 61 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 63】

$q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ であり、 p' 個のオーバーハングヌクレオチドは、標的 mRNA に対して非相補的である、請求項 61 に記載の dsRNA 剤。

30

【請求項 64】

センス鎖が、合計 21 ヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖が、合計 23 ヌクレオチドを有する、請求項 30 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 65】

少なくとも 1 つの $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート連結を介して、隣接するヌクレオチドに連結する、請求項 30 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 66】

すべての $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート連結を介して、隣接するヌクレオチドに連結する、請求項 65 に記載の dsRNA 剤。

40

【請求項 67】

センス鎖のヌクレオチドのうちのすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちのすべてが修飾を含む、請求項 30 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 68】

リガンドは、dsRNA 剤のセンス鎖の 3' 末端にコンジュゲートされている、請求項 30～67 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 69】

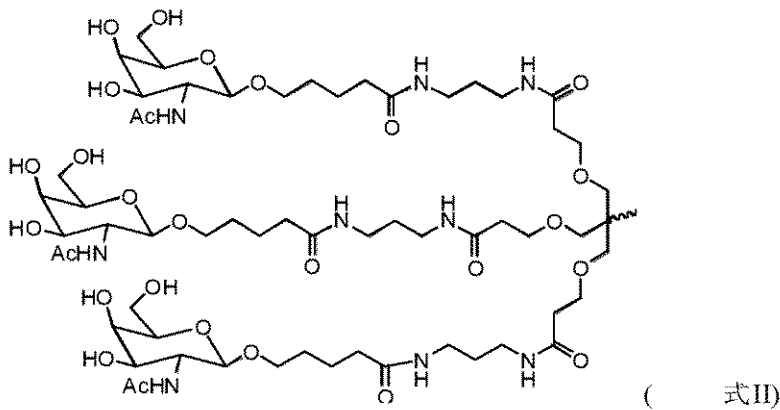
リガンドは、一価、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された 1 つまたは複数の N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 誘導体である、請求項 68 に記載の dsRNA 剤。

50

【請求項 7 0】

リガンドは、

【化 3】



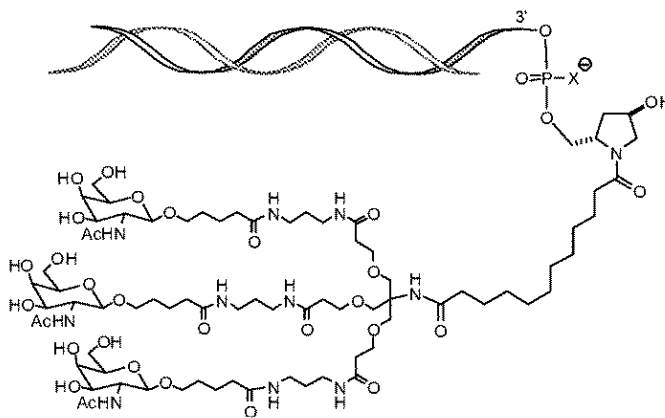
10

である、請求項 6 9 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 7 1】

d s R N A 剤は、以下の図式：

【化 4】



20

30

【式中、XはOまたはSである】

に示されるようにリガンドにコンジュゲートされている、請求項 7 0 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 7 2】

XはOである、請求項 7 1 に記載の d s R N A 剤。

【請求項 7 3】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤であって、d s R N A 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIPをコードするmRNAの一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、d s R N A 剤は、式 (I i)：

40

センス：5' η_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - η_q 3'

アンチセンス：3' $\eta_{p'}$ - N_{b'} - (X' X' X_{k'}) - N_{b'} - Y' Y' Y' - N_{b'} - (Z' Z' Z')_l - N_{a'} - $\eta_{q'}$ 5' (I i)

【式中、

i、j、kおよびlは、各々独立に0または1であり、

p、p'、qおよびq'は、各々独立に0～6であり、

各N_aおよびN_{a'}は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せ

50

である 0 ～ 25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである 0 ～ 10 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' は、独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3 つの連続するヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、修飾は、2' - オームチルまたは 2' - フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる] によって表され、センス鎖は、少なくとも 1 つのリガンドにコンジュゲートされている、 $dsRNA$ 剤。 10

【請求項 74】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 ($dsRNA$) 剤であって、 $dsRNA$ 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIP をコードする mRNA の一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、 $dsRNA$ 剤は、式 (I i) :

センス: $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q$ 3' 20

アンチセンス: $3' n_p' - N_b' - (X'X'X'_k)N_b' - Y'Y'Y'_b - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' (I i)$

[式中、

i 、 j 、 k および l は、各々独立に 0 または 1 であり、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_q および n_q' は、独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に 0 ～ 6 であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも 1 つの n_p' が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである 0 ～ 25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、 30

各 N_b および N_b' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである 0 ～ 10 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3 つの連続するヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、修飾は、2' - オームチルまたは 2' - フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる] によって表され、センス鎖は、少なくとも 1 つのリガンドにコンジュゲートされている、 $dsRNA$ 剤。 40

【請求項 75】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 ($dsRNA$) 剤であって、 $dsRNA$ 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIP をコードする mRNA の一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、 $dsRNA$ 剤は、式 (I i) :

センス: $5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q$ 3' 40

アンチセンス: $3' n_p' - N_b' - (X'X'X'_k)N_b' - Y'Y'Y'_b - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' (I i)$ 50

[式中、

i 、 j 、 k および l は、各々独立に0または1であり、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_q および n_q' は、独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に0～6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

10

各 N_b および N_b' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾は、2'-オームチルまたは2'-フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる]によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされており、リガンドは一価、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体である、dsRNA剤。

20

【請求項76】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質(MYLIP)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤であって、dsRNA剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIPをコードするmRNAの一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、dsRNA剤は、式(Ii)：

センス：5' n_p - N_a - (XXX) $_i$ - N_b - YYY - N_b - (ZZZ) $_j$ - N_a - n_q
3'

アンチセンス：3' n_p' - N_b' - ($X'X'X'_k$) $_{l'}$ - N_b' - $Y'Y'Y'_{b'}$ - ($Z'Z'Z'$) $_{l'}$ - N_a' - n_q' 5' (Ii)

[式中、

30

i 、 j 、 k および l は、各々独立に0または1であり、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_q および n_q' は、独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に0～6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

40

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾は、2'-オームチルまたは2'-フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる]によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされており、リガンドは一価、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体である、dsRNA剤。

【請求項77】

50

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、dsRNA剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIPをコードするmRNAの一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、dsRNA剤は、式（Ij）：

センス：5' η_p - N_a - YYY - N_a - η_q 3'

アンチセンス：3' η_p - N_a - Y'Y'Y' $\bar{a}$ N - η_q 5'（Ij）

〔式中、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 η_p 、 η_q および η_q' は、独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に 0～6 であり、

$\eta_p' > 0$ であり、少なくとも1つの η_p' が、ホスホロチオエート連結を介して、隣接するヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立に、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである 0～25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

YYY および Y'Y'Y' は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾である〕によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされ、リガンドは、一価、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された1つまたは複数の GalNAc 誘導体である、dsRNA 剤。

【請求項 78】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、

センス鎖は、5' 末端に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、

アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、

アンチセンス鎖は、5' 末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結および3' 末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、

センス鎖は、3' 末端において、一価、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された1つまたは複数の GalNAc 誘導体にコンジュゲートされている、dsRNA 剤。

【請求項 79】

センス鎖のヌクレオチドのうちのすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちのすべてが、修飾されたヌクレオチドである、請求項 78 に記載の dsRNA 剤。

【請求項 80】

相補的な領域は、表 3 または 4 に記載されるアンチセンス配列の位置のいずれか1つを含む、請求項 2、30 および 73～79 のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 81】

センス鎖およびアンチセンス鎖は、表 3 または 4 に記載される薬剤のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1～80 のいずれか1項に記載の dsRNA 剤。

【請求項 8 2】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤であって、dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

センス鎖は、表 3 または 4 のいずれか 1 つの薬剤のヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は、表 3 または 4 のいずれか 1 つの薬剤のヌクレオチド配列を含み、

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾されたヌクレオチドであり、

dsRNA剤はリガンドにコンジュゲートされている、dsRNA剤。

【請求項 8 3】

dsRNA剤は、MYLIPをコードするmRNAのホットスポット領域を標的とする請求項 1～8 2 のいずれか 1 項に記載のdsRNA。

【請求項 8 4】

ホットスポット領域は、配列番号 1 のヌクレオチド 3 4 1～4 1 7 を含む、請求項 8 3 に記載のdsRNA剤。

【請求項 8 5】

dsRNA剤は、AD-1 7 5 3 6 2 4、AD-1 7 5 3 5 5 7、AD-1 7 5 3 5 3 6 および AD-1 7 5 3 5 2 0 からなる群から選択される、請求項 8 4 に記載のdsRNA剤。

【請求項 8 6】

ミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）mRNAのホットスポット領域を標的とするdsRNA剤。

【請求項 8 7】

請求項 1～8 6 のいずれか 1 項に記載のdsRNA剤を含む細胞。

【請求項 8 8】

請求項 1～8 6 のいずれか 1 項に記載のdsRNA剤の少なくとも 1 つの鎖をコードするベクター。

【請求項 8 9】

請求項 1～8 6 のいずれか 1 項に記載のdsRNA剤を含む、ミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための医薬組成物。

【請求項 9 0】

薬剤は、緩衝化されていない溶液において製剤化される、請求項 8 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 1】

緩衝化されていない溶液は生理食塩水または水である、請求項 9 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 2】

薬剤は、緩衝溶液により製剤化される、請求項 8 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 3】

前記緩衝溶液は、酢酸塩、クエン酸塩、プロラミン、炭酸塩もしくはリン酸塩、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 9 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 4】

緩衝溶液が、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）である、請求項 9 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 5】

細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）発現を阻害する方法であって、細胞を請求項 1～8 6 のいずれか 1 項に記載のdsRNA剤、または請求項 8 9～9 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物と接触させることによって、細胞におけるMYLIPの発現を阻害することを含む方法。

【請求項 9 6】

10

20

30

40

50

前記細胞は対象内にある、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

前記対象はヒトである、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

MYLIP 発現は、少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 阻害される、または MYLIP 発現の検出のレベル未満まで阻害される、請求項 95～97 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

ヒト対象は、MYLIP-関連疾患、障害または状態に罹患している、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

MYLIP 関連疾患、障害または状態は脂質不均衡である、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

脂質不均衡は高コレステロール血症、高脂血症または高トリグリセリド血症を含む、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

脂質不均衡は高コレステロール血症を含む、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

高コレステロール血症は高 LDL コレステロール血症を含む、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

MYLIP 関連疾患、障害または状態は脂質不均衡に関連する病理学的状態である、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 105】

MYLIP 関連疾患、障害または状態は心血管疾患である、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

心血管疾患はアテローム性動脈硬化症である、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】

心血管疾患は冠動脈性心疾患である、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 108】

対象における MYLIP の発現を阻害する方法であって、請求項 1～86 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤、または請求項 84～89 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の治療有効量を対象に投与することによって、前記対象における MYLIP の発現を阻害することを含む方法。

【請求項 109】

MYLIP 関連疾患、障害または状態に罹患している対象を処置する方法であって、請求項 1～86 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤、または請求項 89～94 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の治療有効量を対象に投与することによって、MYLIP 関連疾患、障害または状態に罹患している対象を処置することを含む方法。

【請求項 110】

MYLIP 遺伝子の発現の低減から恩恵を受けるであろう疾患、障害または状態を有する対象における少なくとも 1 つの症状を予防する方法であって、請求項 1～86 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤、または請求項 89～94 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の予防有効量を対象に投与することによって、MYLIP 遺伝子の発現の低減から恩恵を受けるであろう疾患、障害または状態を有する対象における少なくとも 1 つの症状を予防することを含む方法。

【請求項 111】

対象における心血管疾患の発症または心血管疾患の悪化のリスクを低減する方法であって、請求項 1～86 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤、または請求項 89～94 のい

10

20

30

40

50

いずれか 1 項に記載の医薬組成物の治療有効量を対象に投与することによって、対象における心血管疾患の発症または心血管疾患の悪化のリスクを低減することを含む方法。

【請求項 1 1 2】

対象におけるアテローム性動脈硬化症の発症またはアテローム性動脈硬化症の悪化のリスクを低減する方法であって、請求項 1～86 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤、または請求項 89～94 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の治療有効量を対象に投与することによって、対象におけるアテローム性動脈硬化症の発症またはアテローム性動脈硬化症の悪化のリスクを低減することを含む方法。

【請求項 1 1 3】

上昇した血漿低密度リポタンパク質（LDL）コレステロールを有する対象においてコレステロールの血漿レベルを低下させる方法であって、請求項 1～86 のいずれか 1 項に記載の dsRNA 剤、または請求項 89～94 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物の治療有効量を対象に投与することによって、対象におけるコレステロールの血漿レベルを低下させることを含む方法。

【請求項 1 1 4】

MYLIP 関連疾患、障害または状態は脂質不均衡である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

脂質不均衡は高コレステロール血症、高脂血症、または高トリグリセリド血症を含む、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

脂質不均衡は高コレステロール血症を含む、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

高コレステロール血症は高 LDL コレステロール血症を含む、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

MYLIP 関連疾患、障害または状態は脂質不均衡に関連する病理学的状態である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

MYLIP 関連疾患、障害または状態は心血管疾患である、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

心血管疾患はアテローム性動脈硬化症である、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

心血管疾患は冠動脈性心疾患である、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

対象は肥満である、請求項 95～121 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

追加の治療剤を対象に投与することをさらに含む、請求項 95～122 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

追加の治療剤はスタチンを含む、請求項 125 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

dsRNA 剤は、約 0.01 mg/kg から約 10 mg/kg または約 0.5 mg/kg から約 50 mg/kg の用量において対象に投与される、請求項 95～124 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

薬剤は対象に静脈内、筋肉内または皮下投与される、請求項 95～125 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

対象におけるMYLIPのレベルを決定することをさらに含む、請求項95～126のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本願は、2021年12月7日出願された米国特許仮出願第63／286,891号および2022年5月13日出願された米国特許仮出願第63／341,885号に対する優先権の利益を主張する。前記出願の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列リスト

本願は、XMLフォーマットにおいて電子的に提出された配列リストを含んでおり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2022年12月6日に作成されたXMLコピーは、A108868__1560WO__SL.XMLと命名され、644,814バイトのサイズである。

【0003】

本開示は、MYLIPの発現の特異的阻害に関する。

【背景技術】

【0004】

ミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質(MYLIP)は、低密度リポタンパク質(LDL)受容体(LDLR)およびリポタンパク質を認識する他の細胞表面受容体のユビキチン化およびそれに続く分解を促進する細胞質タンパク質である。LDLRは主に肝臓に存在し、コレステロールを多く含むLDLのエンドサイトーシスを媒介することにより、LDLおよびコレステロールの血漿中レベルを維持するのに役立っている。LDLは通常、内在化した後、速やかに細胞表面にリサイクルされる。LDLR発現のモジュレーションは多くの経路によって制御されており、調節異常は血中LDL-コレステロールの蓄積増加によるアテローム性動脈硬化症および心血管疾患と関連している。肝臓の実質組織を形成する肝細胞は、全身の循環から脂質を受け取り、エネルギーのための脂質の動員および余剰の脂質を脂質滴(LD)の形態での保存を担っているため、肝臓は、脂質ホメオスタシスを担う主たる臓器となっている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

脂質不均衡、特に高LDLコレステロールを有する対象に対する現在の標準治療は、主にスタチンによる処置であり、食事療法または生活習慣の改善、および例えば高血圧、糖尿病、肥満などの共存症の管理も含み得る。しかし、スタチンは、糖尿病、肝機能障害／損傷、出血性脳卒中、筋肉損傷、神経障害、脾機能障害、および性機能障害のリスク上昇を含む、多くの副作用と関連している。さらに、多くの対象はスタチン単独では目標コレステロールレベルに達することができず、スタチンはPCSK9のレベルを上昇させ、これがLDLRの分解を促進することが示されている。したがって、当技術分野では、脂質不均衡および関連する状態を有する対象の代替的な処置法へのニーズが存在する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、ミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質(MYLIP)遺伝子のRNA転写物のRNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)媒介切断を実行するiRNA組成物を提供する。MYLIP遺伝子は、細胞内、例えば、対象、例えばヒトの中の細胞にあってもよい。本発明は、MYLIP遺伝子の発現の阻害、および／またはMYLIP遺伝子の発現の阻害もしくは低減から恩恵を受けるであろう対象、例えば、MYLIP関連疾患、例えば脂質不均衡(例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など

10

20

30

40

50

）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）に罹患している対象、もしくは罹患しやすい対象を処置するために本発明の iRNA 組成物を使用する方法をも提供する。

【0007】

したがって、一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤を提供する。dsRNA 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列と 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、dsRNA 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、配列番号 1 のヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む。

10

【0008】

別の態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤を提供する。dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、表 3 または 4 に記載されるアンチセンス配列のうちのいずれか 1 つと 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む、MYLIP をコードする mRNA に対する相補性の領域を含む。一部の実施形態において、dsRNA 剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、表 3 または 4 に記載されるアンチセンス配列のうちのいずれか 1 つの少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む、MYLIP をコードする mRNA に対する相補性の領域を含む。

20

【0009】

一実施形態において、相補性の領域は、配列番号 1 のヌクレオチド 113～133、161～181、190～210、235～255、265～285、286～306、312～332、329～349、343～363、359～379、380～400、397～417、424～444、454～474、468～488、487～507、506～526、520～540、537～557、553～573、580～600、613～633、640～660、667～687、681～701、697～717、711～731、746～766、760～780、774～794、789～809、811～831、826～846、857～877、874～894、888～908、904～924、934～954、954～974、972～992、991～1011、1028～1048、1052～1072、1066～1086、1085～1105、1105～1125、1129～1149、1156～1176、1190～1210、1223～1243、1247～1267、1268～1288、1282～1302、1296～1316、1357～1377、1371～1391、1389～1409、1416～1436、1432～1452、1446～1466、1475～1495、1490～1510、1507～1527、1522～1542、1536～1556、1550～1570、1570～1590、1584～1604、1598～1618、1614～1634、1632～1652、1647～1667、1661～1681、1675～1695、1714～1734、1749～1769、1765～1785、1802～1822、1832～1852、1855～1875、1872～1892、1905～1925、1921～1941、1940～1960、1965～1985、1996～2016、2021～2041、2040～2060、2059～2079、2073～2093、2088～2108、2110～2130、2125～2145、2157～2177、2172～2192、2192～2212、2216～2236、2256～2276、2277～2297、2293～2313、2335～2355、

30

40

50

2 3 4 9 ~ 2 3 6 9、2 3 6 9 ~ 2 3 8 9、2 3 9 5 ~ 2 4 1 5、2 4 1 7 ~ 2 4 3 7、
 2 4 4 2 ~ 2 4 6 2、2 4 6 2 ~ 2 4 8 2、2 4 8 2 ~ 2 5 0 2、2 4 9 6 ~ 2 5 1 6、
 2 5 1 3 ~ 2 5 3 3、2 5 2 9 ~ 2 5 4 9、2 5 4 5 ~ 2 5 6 5、2 5 8 7 ~ 2 6 0 7、
 2 6 0 1 ~ 2 6 2 1、2 6 6 6 ~ 2 6 8 6、2 6 8 2 ~ 2 7 0 2、2 6 9 6 ~ 2 7 1 6、
 2 7 2 0 ~ 2 7 4 0、2 7 3 6 ~ 2 7 5 6、2 7 5 0 ~ 2 7 7 0、2 7 7 7 ~ 2 7 9 7、
 2 7 9 3 ~ 2 8 1 3、2 8 0 8 ~ 2 8 2 8、2 8 2 3 ~ 2 8 4 3、2 8 3 7 ~ 2 8 5 7、
 2 8 5 4 ~ 2 8 7 4、2 8 6 8 ~ 2 8 8 8、2 8 9 1 ~ 2 9 1 1、2 9 1 8 ~ 2 9 3 8、
 2 9 3 8 ~ 2 9 5 8、2 9 5 8 ~ 2 9 7 8、2 9 9 9 ~ 3 0 1 9、3 0 1 3 ~ 3 0 3 3、
 3 0 3 0 ~ 3 0 5 0 または 3 0 4 5 ~ 3 0 6 5 内に位置する任意の 1 5 個の連続するヌクレオチドに対して完璧に相補的なヌクレオチドと 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含む。

10

【0 0 1 0】

一部の実施形態において、相補性の領域は、配列番号 1 のヌクレオチド 1 1 3 ~ 1 3 3、
 1 6 1 ~ 1 8 1、1 9 0 ~ 2 1 0、2 3 5 ~ 2 5 5、2 6 5 ~ 2 8 5、2 8 6 ~ 3 0 6、
 3 1 2 ~ 3 3 2、3 2 9 ~ 3 4 9、3 4 3 ~ 3 6 3、3 5 9 ~ 3 7 9、3 8 0 ~ 4 0 0、
 3 9 7 ~ 4 1 7、4 2 4 ~ 4 4 4、4 5 4 ~ 4 7 4、4 6 8 ~ 4 8 8、4 8 7 ~ 5 0 7、
 5 0 6 ~ 5 2 6、5 2 0 ~ 5 4 0、5 3 7 ~ 5 5 7、5 5 3 ~ 5 7 3、5 8 0 ~ 6 0 0、
 6 1 3 ~ 6 3 3、6 4 0 ~ 6 6 0、6 6 7 ~ 6 8 7、6 8 1 ~ 7 0 1、6 9 7 ~ 7 1 7、
 7 1 1 ~ 7 3 1、7 4 6 ~ 7 6 6、7 6 0 ~ 7 8 0、7 7 4 ~ 7 9 4、7 8 9 ~ 8 0 9、
 8 1 1 ~ 8 3 1、8 2 6 ~ 8 4 6、8 5 7 ~ 8 7 7、8 7 4 ~ 8 9 4、8 8 8 ~ 9 0 8、
 9 0 4 ~ 9 2 4、9 3 4 ~ 9 5 4、9 5 4 ~ 9 7 4、9 7 2 ~ 9 9 2、9 9 1 ~ 1 0 1
 1、1 0 2 8 ~ 1 0 4 8、1 0 5 2 ~ 1 0 7 2、1 0 6 6 ~ 1 0 8 6、1 0 8 5 ~ 1 1 0
 5、1 1 0 5 ~ 1 1 2 5、1 1 2 9 ~ 1 1 4 9、1 1 5 6 ~ 1 1 7 6、1 1 9 0 ~ 1 2 1
 0、1 2 2 3 ~ 1 2 4 3、1 2 4 7 ~ 1 2 6 7、1 2 6 8 ~ 1 2 8 8、1 2 8 2 ~ 1 3 0
 2、1 2 9 6 ~ 1 3 1 6、1 3 5 7 ~ 1 3 7 7、1 3 7 1 ~ 1 3 9 1、1 3 8 9 ~ 1 4 0
 9、1 4 1 6 ~ 1 4 3 6、1 4 3 2 ~ 1 4 5 2、1 4 4 6 ~ 1 4 6 6、1 4 7 5 ~ 1 4 9
 5、1 4 9 0 ~ 1 5 1 0、1 5 0 7 ~ 1 5 2 7、1 5 2 2 ~ 1 5 4 2、1 5 3 6 ~ 1 5 5
 6、1 5 5 0 ~ 1 5 7 0、1 5 7 0 ~ 1 5 9 0、1 5 8 4 ~ 1 6 0 4、1 5 9 8 ~ 1 6 1
 8、1 6 1 4 ~ 1 6 3 4、1 6 3 2 ~ 1 6 5 2、1 6 4 7 ~ 1 6 6 7、1 6 6 1 ~ 1 6 8
 1、1 6 7 5 ~ 1 6 9 5、1 7 1 4 ~ 1 7 3 4、1 7 4 9 ~ 1 7 6 9、1 7 6 5 ~ 1 7 8
 5、1 8 0 2 ~ 1 8 2 2、1 8 3 2 ~ 1 8 5 2、1 8 5 5 ~ 1 8 7 5、1 8 7 2 ~ 1 8 9
 2、1 9 0 5 ~ 1 9 2 5、1 9 2 1 ~ 1 9 4 1、1 9 4 0 ~ 1 9 6 0、1 9 6 5 ~ 1 9 8
 5、1 9 9 6 ~ 2 0 1 6、2 0 2 1 ~ 2 0 4 1、2 0 4 0 ~ 2 0 6 0、2 0 5 9 ~ 2 0 7
 9、2 0 7 3 ~ 2 0 9 3、2 0 8 8 ~ 2 1 0 8、2 1 1 0 ~ 2 1 3 0、2 1 2 5 ~ 2 1 4
 5、2 1 5 7 ~ 2 1 7 7、2 1 7 2 ~ 2 1 9 2、2 1 9 2 ~ 2 2 1 2、2 2 1 6 ~ 2 2 3
 6、2 2 5 6 ~ 2 2 7 6、2 2 7 7 ~ 2 2 9 7、2 2 9 3 ~ 2 3 1 3、2 3 3 5 ~ 2 3 5
 5、2 3 4 9 ~ 2 3 6 9、2 3 6 9 ~ 2 3 8 9、2 3 9 5 ~ 2 4 1 5、2 4 1 7 ~ 2 4 3
 7、2 4 4 2 ~ 2 4 6 2、2 4 6 2 ~ 2 4 8 2、2 4 8 2 ~ 2 5 0 2、2 4 9 6 ~ 2 5 1
 6、2 5 1 3 ~ 2 5 3 3、2 5 2 9 ~ 2 5 4 9、2 5 4 5 ~ 2 5 6 5、2 5 8 7 ~ 2 6 0
 7、2 6 0 1 ~ 2 6 2 1、2 6 6 6 ~ 2 6 8 6、2 6 8 2 ~ 2 7 0 2、2 6 9 6 ~ 2 7 1
 6、2 7 2 0 ~ 2 7 4 0、2 7 3 6 ~ 2 7 5 6、2 7 5 0 ~ 2 7 7 0、2 7 7 7 ~ 2 7 9
 7、2 7 9 3 ~ 2 8 1 3、2 8 0 8 ~ 2 8 2 8、2 8 2 3 ~ 2 8 4 3、2 8 3 7 ~ 2 8 5
 7、2 8 5 4 ~ 2 8 7 4、2 8 6 8 ~ 2 8 8 8、2 8 9 1 ~ 2 9 1 1、2 9 1 8 ~ 2 9 3
 8、2 9 3 8 ~ 2 9 5 8、2 9 5 8 ~ 2 9 7 8、2 9 9 9 ~ 3 0 1 9、3 0 1 3 ~ 3 0 3
 3、3 0 3 0 ~ 3 0 5 0 または 3 0 4 5 ~ 3 0 6 5 内に位置する任意の 1 5 個の連続するヌクレオチドに対して完璧に相補的な少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含む。

20

30

40

【0 0 1 1】

一実施形態において、相補性の領域は、配列番号 1 のヌクレオチド 1 1 1 ~ 1 3 3、1
 5 9 ~ 1 8 1、1 8 8 ~ 2 1 0、2 3 3 ~ 2 5 5、2 6 3 ~ 2 8 5、2 8 4 ~ 3 0 6、3
 1 0 ~ 3 3 2、3 2 7 ~ 3 4 9、3 4 1 ~ 3 6 3、3 5 7 ~ 3 7 9、3 7 8 ~ 4 0 0、3

50

9 5 ~ 4 1 7、4 2 2 ~ 4 4 4、4 5 2 ~ 4 7 4、4 6 6 ~ 4 8 8、4 8 5 ~ 5 0 7、5
 0 4 ~ 5 2 6、5 1 8 ~ 5 4 0、5 3 5 ~ 5 5 7、5 5 1 ~ 5 7 3、5 7 8 ~ 6 0 0、6
 1 1 ~ 6 3 3、6 3 8 ~ 6 6 0、6 6 5 ~ 6 8 7、6 7 9 ~ 7 0 1、6 9 5 ~ 7 1 7、7
 0 9 ~ 7 3 1、7 4 4 ~ 7 6 6、7 5 8 ~ 7 8 0、7 7 2 ~ 7 9 4、7 8 7 ~ 8 0 9、8
 0 9 ~ 8 3 1、8 2 4 ~ 8 4 6、8 5 5 ~ 8 7 7、8 7 2 ~ 8 9 4、8 8 6 ~ 9 0 8、9
 0 2 ~ 9 2 4、9 3 2 ~ 9 5 4、9 5 2 ~ 9 7 4、9 7 0 ~ 9 9 2、9 8 9 ~ 1 0 1 1、
 1 0 2 6 ~ 1 0 4 8、1 0 5 0 ~ 1 0 7 2、1 0 6 4 ~ 1 0 8 6、1 0 8 3 ~ 1 1 0 5、
 1 1 0 3 ~ 1 1 2 5、1 1 2 7 ~ 1 1 4 9、1 1 5 4 ~ 1 1 7 6、1 1 8 8 ~ 1 2 1 0、
 1 2 2 1 ~ 1 2 4 3、1 2 4 5 ~ 1 2 6 7、1 2 6 6 ~ 1 2 8 8、1 2 8 0 ~ 1 3 0 2、
 1 2 9 4 ~ 1 3 1 6、1 3 5 5 ~ 1 3 7 7、1 3 6 9 ~ 1 3 9 1、1 3 8 7 ~ 1 4 0 9、
 1 4 1 4 ~ 1 4 3 6、1 4 3 0 ~ 1 4 5 2、1 4 4 4 ~ 1 4 6 6、1 4 7 3 ~ 1 4 9 5、
 1 4 8 8 ~ 1 5 1 0、1 5 0 5 ~ 1 5 2 7、1 5 2 0 ~ 1 5 4 2、1 5 3 4 ~ 1 5 5 6、
 1 5 4 8 ~ 1 5 7 0、1 5 6 8 ~ 1 5 9 0、1 5 8 2 ~ 1 6 0 4、1 5 9 6 ~ 1 6 1 8、
 1 6 1 2 ~ 1 6 3 4、1 6 3 0 ~ 1 6 5 2、1 6 4 5 ~ 1 6 6 7、1 6 5 9 ~ 1 6 8 1、
 1 6 7 3 ~ 1 6 9 5、1 7 1 2 ~ 1 7 3 4、1 7 4 7 ~ 1 7 6 9、1 7 6 3 ~ 1 7 8 5、
 1 8 0 0 ~ 1 8 2 2、1 8 3 0 ~ 1 8 5 2、1 8 5 3 ~ 1 8 7 5、1 8 7 0 ~ 1 8 9 2、
 1 9 0 3 ~ 1 9 2 5、1 9 1 9 ~ 1 9 4 1、1 9 3 8 ~ 1 9 6 0、1 9 6 3 ~ 1 9 8 5、
 1 9 9 4 ~ 2 0 1 6、2 0 1 9 ~ 2 0 4 1、2 0 3 8 ~ 2 0 6 0、2 0 5 7 ~ 2 0 7 9、
 2 0 7 1 ~ 2 0 9 3、2 0 8 6 ~ 2 1 0 8、2 1 0 8 ~ 2 1 3 0、2 1 2 3 ~ 2 1 4 5、
 2 1 5 5 ~ 2 1 7 7、2 1 7 0 ~ 2 1 9 2、2 1 9 0 ~ 2 2 1 2、2 2 1 4 ~ 2 2 3 6、
 2 2 5 4 ~ 2 2 7 6、2 2 7 5 ~ 2 2 9 7、2 2 9 1 ~ 2 3 1 3、2 3 3 3 ~ 2 3 5 5、
 2 3 4 7 ~ 2 3 6 9、2 3 6 7 ~ 2 3 8 9、2 3 9 3 ~ 2 4 1 5、2 4 1 5 ~ 2 4 3 7、
 2 4 4 0 ~ 2 4 6 2、2 4 6 0 ~ 2 4 8 2、2 4 8 0 ~ 2 5 0 2、2 4 9 4 ~ 2 5 1 6、
 2 5 1 1 ~ 2 5 3 3、2 5 2 7 ~ 2 5 4 9、2 5 4 3 ~ 2 5 6 5、2 5 8 5 ~ 2 6 0 7、
 2 5 9 9 ~ 2 6 2 1、2 6 6 4 ~ 2 6 8 6、2 6 8 0 ~ 2 7 0 2、2 6 9 4 ~ 2 7 1 6、
 2 7 1 8 ~ 2 7 4 0、2 7 3 4 ~ 2 7 5 6、2 7 4 8 ~ 2 7 7 0、2 7 7 5 ~ 2 7 9 7、
 2 7 9 1 ~ 2 8 1 3、2 8 0 6 ~ 2 8 2 8、2 8 2 1 ~ 2 8 4 3、2 8 3 5 ~ 2 8 5 7、
 2 8 5 2 ~ 2 8 7 4、2 8 6 6 ~ 2 8 8 8、2 8 8 9 ~ 2 9 1 1、2 9 1 6 ~ 2 9 3 8、
 2 9 3 6 ~ 2 9 5 8、2 9 5 6 ~ 2 9 7 8、2 9 9 7 ~ 3 0 1 9、3 0 1 1 ~ 3 0 3 3、
 3 0 2 8 ~ 3 0 5 0 または 3 0 4 3 ~ 3 0 6 5 内に位置する任意の 1 5 個の連続するヌク
 レオチドに対して完璧に相補的なヌクレオチドと 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが
 異なる少なくとも 1 5 個の連続するヌクレオチドを含む。

【0 0 1 2】

一部の実施形態において、相補性の領域は、配列番号 1 のヌクレオチド 1 1 1 ~ 1 3 3
 、1 5 9 ~ 1 8 1、1 8 8 ~ 2 1 0、2 3 3 ~ 2 5 5、2 6 3 ~ 2 8 5、2 8 4 ~ 3 0 6
 、3 1 0 ~ 3 3 2、3 2 7 ~ 3 4 9、3 4 1 ~ 3 6 3、3 5 7 ~ 3 7 9、3 7 8 ~ 4 0 0
 、3 9 5 ~ 4 1 7、4 2 2 ~ 4 4 4、4 5 2 ~ 4 7 4、4 6 6 ~ 4 8 8、4 8 5 ~ 5 0 7
 、5 0 4 ~ 5 2 6、5 1 8 ~ 5 4 0、5 3 5 ~ 5 5 7、5 5 1 ~ 5 7 3、5 7 8 ~ 6 0 0
 、6 1 1 ~ 6 3 3、6 3 8 ~ 6 6 0、6 6 5 ~ 6 8 7、6 7 9 ~ 7 0 1、6 9 5 ~ 7 1 7
 、7 0 9 ~ 7 3 1、7 4 4 ~ 7 6 6、7 5 8 ~ 7 8 0、7 7 2 ~ 7 9 4、7 8 7 ~ 8 0 9
 、8 0 9 ~ 8 3 1、8 2 4 ~ 8 4 6、8 5 5 ~ 8 7 7、8 7 2 ~ 8 9 4、8 8 6 ~ 9 0 8
 、9 0 2 ~ 9 2 4、9 3 2 ~ 9 5 4、9 5 2 ~ 9 7 4、9 7 0 ~ 9 9 2、9 8 9 ~ 1 0 1
 1、1 0 2 6 ~ 1 0 4 8、1 0 5 0 ~ 1 0 7 2、1 0 6 4 ~ 1 0 8 6、1 0 8 3 ~ 1 1 0
 5、1 1 0 3 ~ 1 1 2 5、1 1 2 7 ~ 1 1 4 9、1 1 5 4 ~ 1 1 7 6、1 1 8 8 ~ 1 2 1
 0、1 2 2 1 ~ 1 2 4 3、1 2 4 5 ~ 1 2 6 7、1 2 6 6 ~ 1 2 8 8、1 2 8 0 ~ 1 3 0
 2、1 2 9 4 ~ 1 3 1 6、1 3 5 5 ~ 1 3 7 7、1 3 6 9 ~ 1 3 9 1、1 3 8 7 ~ 1 4 0
 9、1 4 1 4 ~ 1 4 3 6、1 4 3 0 ~ 1 4 5 2、1 4 4 4 ~ 1 4 6 6、1 4 7 3 ~ 1 4 9
 5、1 4 8 8 ~ 1 5 1 0、1 5 0 5 ~ 1 5 2 7、1 5 2 0 ~ 1 5 4 2、1 5 3 4 ~ 1 5 5
 6、1 5 4 8 ~ 1 5 7 0、1 5 6 8 ~ 1 5 9 0、1 5 8 2 ~ 1 6 0 4、1 5 9 6 ~ 1 6 1
 8、1 6 1 2 ~ 1 6 3 4、1 6 3 0 ~ 1 6 5 2、1 6 4 5 ~ 1 6 6 7、1 6 5 9 ~ 1 6 8

1、1673～1695、1712～1734、1747～1769、1763～1785、1800～1822、1830～1852、1853～1875、1870～1892、1903～1925、1919～1941、1938～1960、1963～1985、1994～2016、2019～2041、2038～2060、2057～2079、2071～2093、2086～2108、2108～2130、2123～2145、2155～2177、2170～2192、2190～2212、2214～2236、2254～2276、2275～2297、2291～2313、2333～2355、2347～2369、2367～2389、2393～2415、2415～2437、2440～2462、2460～2482、2480～2502、2494～2516、2511～2533、2527～2549、2543～2565、2585～2607、2599～2621、2664～2686、2680～2702、2694～2716、2718～2740、2734～2756、2748～2770、2775～2797、2791～2813、2806～2828、2821～2843、2835～2857、2852～2874、2866～2888、2889～2911、2916～2938、2936～2958、2956～2978、2997～3019、3011～3033、3028～3050または3043～3065内に位置する任意の15個の連続するヌクレオチドに対して完璧に相補的な少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。

10

【0013】

一実施形態において、センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド113～133、161～181、190～210、235～255、265～285、286～306、312～332、329～349、343～363、359～379、380～400、397～417、424～444、454～474、468～488、487～507、506～526、520～540、537～557、553～573、580～600、613～633、640～660、667～687、681～701、697～717、711～731、746～766、760～780、774～794、789～809、811～831、826～846、857～877、874～894、888～908、904～924、934～954、954～974、972～992、991～1011、1028～1048、1052～1072、1066～1086、1085～1105、1105～1125、1129～1149、1156～1176、1190～1210、1223～1243、1247～1267、1268～1288、1282～1302、1296～1316、1357～1377、1371～1391、1389～1409、1416～1436、1432～1452、1446～1466、1475～1495、1490～1510、1507～1527、1522～1542、1536～1556、1550～1570、1570～1590、1584～1604、1598～1618、1614～1634、1632～1652、1647～1667、1661～1681、1675～1695、1714～1734、1749～1769、1765～1785、1802～1822、1832～1852、1855～1875、1872～1892、1905～1925、1921～1941、1940～1960、1965～1985、1996～2016、2021～2041、2040～2060、2059～2079、2073～2093、2088～2108、2110～2130、2125～2145、2157～2177、2172～2192、2192～2212、2216～2236、2256～2276、2277～2297、2293～2313、2335～2355、2349～2369、2369～2389、2395～2415、2417～2437、2442～2462、2462～2482、2482～2502、2496～2516、2513～2533、2529～2549、2545～2565、2587～2607、2601～2621、2666～2686、2682～2702、2696～2716、2720～2740、2736～2756、2750～2770、2777～2797、2793～2813、2808～2828、2823～2843、2837～2857、2854～2874、2868～2888、2891～2911、2918～2938、2938～2958、2958～2978、2999～3019、3013～3033、30

20

30

40

50

30～3050および3045～3065のヌクレオチド配列のうちのいずれか1つと1、2または3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号2の相補的なヌクレオチド配列と1、2または3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む。

【0014】

一実施形態において、dsRNA剤は、少なくとも1個の修飾されたヌクレオチドを含む。

【0015】

一実施形態において、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む。別の実施形態において、アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む。さらに別の実施形態において、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む。

【0016】

一態様において、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質(MYLIP)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供する。dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列と1、2または3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列と1、2または3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾されたヌクレオチドであり、センス鎖は、3'末端に付着されたりガンドにコンジュゲートされる。一部の実施形態において、dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾されたヌクレオチドであり、センス鎖は、3'末端に付着されたりガンドにコンジュゲートされる。

【0017】

一実施形態において、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む。別の実施形態において、アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む。さらに別の実施形態において、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾を含む。

【0018】

一実施形態において、前記修飾されたヌクレオチドの少なくとも1つは、デオキシヌクレオチド、3'末端デオキシチミジン(dT)ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾されたヌクレオチド、2'-フルオロ修飾されたヌクレオチド、2'-デオキシ修飾されたヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、非ロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束エチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-O-アシル修飾されたヌクレオチド、2'-C-アルキル修飾されたヌクレオチド、2'-ヒドロキシル(hydroxyl)修飾されたヌクレオチド、2'-メトキシエチル修飾されたヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾されたヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミデート、非天然塩基を含むヌクレオチド、テトラヒドロピラン修飾されたヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキシトール修飾されたヌクレオチド、シクロヘキセニル修飾されたヌクレオチド、ホスホチオエート基を含むヌクレオチド、メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、5'ホスフェートを含むヌクレオチド、5'ホスフェートミミックを含むヌクレオチド、グリコール修飾されたヌクレオチド、および2'-O-(N-メチルアセトアミド)修飾されたヌクレオチド、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される。

【0019】

一実施形態において、ヌクレオチド修飾は、2'-O-メチルおよび／または2'-フルオロ修飾である。

【0020】

相補性の領域は、少なくとも17ヌクレオチド長、19～30ヌクレオチド長、19～25ヌクレオチド長、または21～23ヌクレオチド長であってもよい。

【0021】

各鎖は、30ヌクレオチド長以下であってもよく、例えば、各鎖は、独立して19～30ヌクレオチド長であり、各鎖は、独立して19～25ヌクレオチド長であり、各鎖は、独立して21～23ヌクレオチド長である。

【0022】

dsRNAは、少なくとも1ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む少なくとも1つの鎖、または少なくとも2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む少なくとも1つの鎖を含んでもよい。

【0023】

一実施形態において、dsRNA剤は、リガンドをさらに含む。

【0024】

一実施形態において、リガンドは、dsRNA剤のセンス鎖の3'末端にコンジュゲートされる。

【0025】

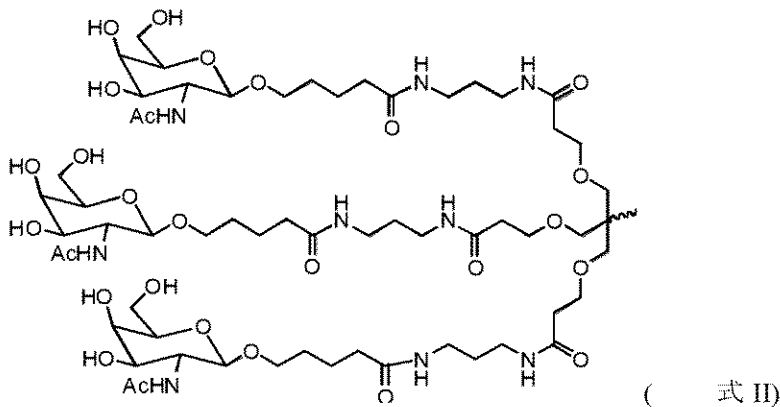
一実施形態において、リガンドは、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）誘導体である。

【0026】

一実施形態において、リガンドは、

【0027】

【化1】



である。

【0028】

一実施形態において、dsRNA剤は、以下の図式：

【0029】

10

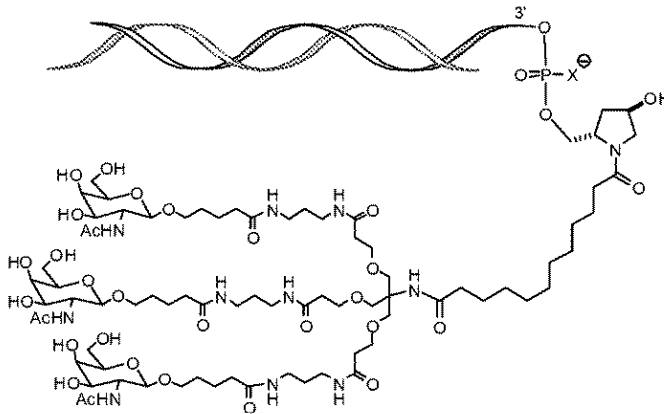
20

30

40

50

【化 2】



10

【式中、XはOまたはSである】

に示されるようにリガンドにコンジュゲートされる。

【0030】

一実施形態において、XはOである。

【0031】

一実施形態において、相補性の領域は、表3または4におけるアンチセンス配列のうちのいずれか1つを含む。

20

【0032】

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖を提供する。dsRNA剤は、アンチ鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIPをコードするmRNAの一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、前記dsRNA剤は、式（Ii）：

センス：5' $n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q$ 3'

アンチセンス：3' $n_p' - N_b' - (X'X'X'_k)N_b' - Y'Y'Y'_b'N - (Z'Z'Z'_l) - N_a' - n_q'$ 5' (Ii)

30

【式中、

i、j、kおよびlは、各々独立に0または1であり、

p、p'、qおよびq'は、各々独立に0～6であり、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

40

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、

N_b 上の修飾は、Y上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、Y'上の修飾と異なる]によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされる。

【0033】

一実施形態において、iは0である、jは0である、iは1である、jは1である、iおよびjはともに0である、またはiおよびjはともに1である。別の実施形態において、kは0である、lは0である、kは1である、lは1である、kおよびlはともに0である、またはkおよびlはともに1である。

【0034】

50

一実施形態において、 XXX は、 $X'X'X'$ に対して相補的であり、 YYY は、 $Y'Y'Y'$ に対して相補的であり、 ZZZ は、 $Z'Z'Z'$ に対して相補的である。

【0035】

一実施形態において、 YYY モチーフは、センス鎖の切断部位においてまたはその付近に存在し、例えば、 $Y'Y'Y'$ モチーフは、 $5'$ 末端からアンチセンス鎖の11、12および13位において存在する。

【0036】

一実施形態において、式(I i)は、式(I j)：

センス： $5' \text{ } \eta_p - N_a - YYY - N_a - n_q \text{ } 3'$

アンチセンス： $3' \text{ } \eta_p - N_a - Y'Y'Y' \text{ } \bar{a}N - n_q \text{ } 5' \text{ (I j)}$

10

によって表される。

【0037】

別の実施形態において、式(I i)は、式(I k)：

センス： $5' \text{ } \eta_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q \text{ } 3'$

アンチセンス： $3' \text{ } \eta_p - N_a - Y'Y'Y' \text{ } \bar{b}N - Z'Z'Z' \text{ } \bar{a}N - n_q \text{ } 5' \text{ (I k)}$

【式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1～5個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを表す】

によって表される。

【0038】

別の実施形態において、式(I i)は、式(I l)：

20

センス： $5' \text{ } \eta_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q \text{ } 3'$

アンチセンス： $3' \text{ } \eta_p - N_a - X'X'X' \text{ } \bar{b}N - Y'Y'Y' \text{ } \bar{a}N - n_q \text{ } 5' \text{ (I l)}$

【式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1～5個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを表す】

によって表される。

【0039】

別の実施形態において、式(I i)は、式(I m)：

センス： $5' \text{ } \eta_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q \text{ } 3'$

アンチセンス： $3' \text{ } \eta_p - N_a - X'X'X' \text{ } \bar{b}N - Y'Y'Y' \text{ } \bar{b}N - Z'Z'Z' \text{ } \bar{a}N - n_q \text{ } 5' \text{ (I m)}$

30

【式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1～5個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを表し、各 N_a および N_a' は、独立して、2～10個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを表す】

によって表される。

【0040】

相補性の領域は、少なくとも17ヌクレオチド長、19～30ヌクレオチド長、19～25ヌクレオチド長、または21～23ヌクレオチド長であってもよい。

【0041】

各鎖は、30ヌクレオチド長以下であってもよく、例えば、各鎖は、独立して、19～30ヌクレオチド長である。

40

【0042】

一実施形態において、ヌクレオチド上の修飾は、LNA、UNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-アルキル、2'-O-アリル、2'-C-フルオロ、2'-O-メチル、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、およびそれらの組合せからなる群から選択される。

【0043】

一実施形態において、ヌクレオチド上の修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾である。

【0044】

一実施形態において、 Y' は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾されたヌクレ

50

オチドである。

【0045】

一実施形態において、dsRNA剤の少なくとも1つの鎖が、少なくとも1つのヌクレオチドの3'オーバーハング、または少なくとも2つのヌクレオチドの3'オーバーハングを含んでもよい。

【0046】

一実施形態において、dsRNA剤は、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結をさらに含んでもよい。

【0047】

一実施形態において、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、1つの鎖の3'末端に存在する。一実施形態において、鎖はアンチセンス鎖である。別の実施形態において、鎖はセンス鎖である。

【0048】

一実施形態において、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、1つの鎖の5'末端に存在する。一実施形態において、鎖はアンチセンス鎖である。別の実施形態において、鎖はセンス鎖である。

【0049】

一実施形態において、鎖はアンチセンス鎖である。別の実施形態において、鎖はセンス鎖である。

【0050】

一実施形態において、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結は、1つの鎖の5'および3'の両末端に存在する。

【0051】

一実施形態において、二重鎖のアンチセンス鎖の5'端の1つの位置の塩基対は、AU塩基対である。

【0052】

一実施形態において、 $p' > 0$ である。別の実施形態において、 $p' = 2$ である。

【0053】

一実施形態において、 $q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ であり、 p' 個のオーバーハングヌクレオチドは、標的mRNAに対して相補的である。別の実施形態において、 $q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ であり、 p' 個のオーバーハングヌクレオチドは、標的mRNAに対して非相補的である。

【0054】

一実施形態において、センス鎖は、合計21のヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖は、合計23のヌクレオチドを有する。

【0055】

一実施形態において、少なくとも1つの $n_{p'}$ は、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結される。別の実施形態において、すべての $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結される。

【0056】

一実施形態において、センス鎖のヌクレオチドのうちのすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちのすべてが修飾を含む。

【0057】

一実施形態において、リガンドは、dsRNA剤のセンス鎖の3'末端にコンジュゲートされる。

【0058】

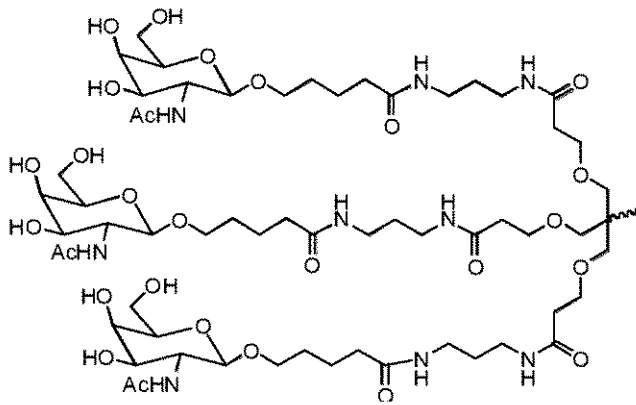
一実施形態において、リガンドは、一価、二価または三価の分枝状リンカーを介して付着された1つまたは複数のN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 誘導体である。

【0059】

一実施形態において、リガンドは、

【 0 0 6 0 】

【 化 3 】



10

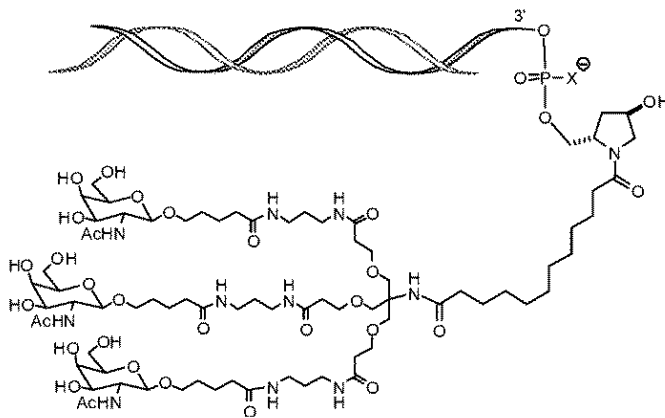
である。

【 0 0 6 1 】

一実施形態において、dsRNA剤は、以下の図式：

【 0 0 6 2 】

【 化 4 】



20

30

【式中、XはOまたはSである】

に示されるようにリガンドにコンジュゲートされる。

【 0 0 6 3 】

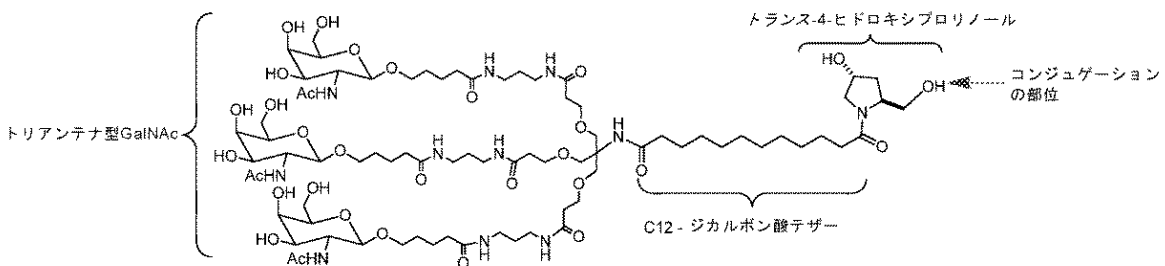
一実施形態において、XはOである。

【 0 0 6 4 】

一部の実施形態において、RNA i 剤は、表 2 に定義され以下に示されるように、L 9 6 にコンジュゲートされる。

【 0 0 6 5 】

【 化 5 】



40

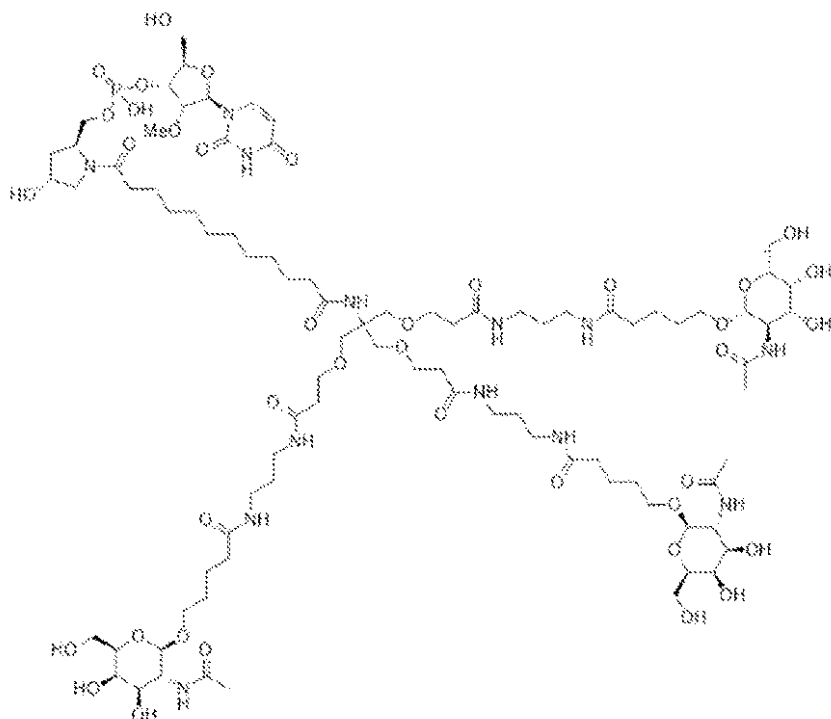
【 0 0 6 6 】

50

一部の実施形態において、RNA i 剤は、例えば、以下に示される u L 9 6 :

【0067】

【化6】



10

20

(2'-O-メチルウリジン-3'-ホスフェート((2S, 4R)-1-[29-[[2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ]-14, 14-ビス[[3-[[3-[[5-[[2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ]-1-オキソペンチル] アミノ] プロピル] アミノ]-3-オキソプロポキシ] メチル]-1, 12, 19, 25-テトラオキソ-16-オキサ-13, 20, 24-トリアザノナコス-1-イル]-4-ヒドロキシ-2-ピロリジニル) メチルエステル) などの3'末端L96修飾されたヌクレオチドを含んでもよい。

30

【0068】

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質(MYLIP)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供する。dsRNA剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIPをコードするmRNAの一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、dsRNA剤は、式(Ii)：

センス：5' η_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'

アンチセンス：3' $\eta_{p'}$ - N_b' - (X'X'X_{k'}) - N_b' - Y'Y'Y'_{b'} - N_a' - n_{q'} 5' (Ii)

40

[式中、

i、j、kおよびlは、各々独立に0または1であり、

p、p'、qおよびq'は、各々独立に0～6であり、

各N_aおよびN_a'は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各N_bおよびN_b'は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各n_p、n_{p'}、n_qおよびn_{q'}は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

50

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾は、2'-オームチルまたは2'-フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる] によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされる。

[0069]

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を提供する。dsRNA 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIP をコードする mRNA の一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、前記 dsRNA 剤は、式 (I i) :

センス: $5' \text{ } n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q$ 3'

アンチセンス: $3' \text{ } n_p' - N_b' - (X'X'X'_k)N_b' - Y'Y'Y'_b - N' - (Z'Z'Z'_l) - N_a' - n_q' 5' \text{ (I i)}$

[式中、

i 、 j 、 k および l は、各々独立に0または1であり、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_q および n_q' は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に0~6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0~25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0~10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾は、2'-オームチルまたは2'-フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる] によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされる。

[0070]

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を提供する。dsRNA 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIP をコードする mRNA の一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、前記 dsRNA 剤は、式 (I i) :

センス: $5' \text{ } n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q$ 3'

アンチセンス: $3' \text{ } n_p' - N_b' - (X'X'X'_k)N_b' - Y'Y'Y'_b - N' - (Z'Z'Z'_l) - N_a' - n_q' 5' \text{ (I i)}$

[式中、

i 、 j 、 k および l は、各々独立に0または1であり、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_q および n_q' は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に0~6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合

せである 0 ～ 25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである 0 ～ 10 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3 つの連続するヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、修飾は、2'-O-メチルまたは 2'-フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる] によって表され、センス鎖は、少なくとも 1 つのリガンドにコンジュゲートされており、リガンドは一価、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された 1 つまたは複数の $GaLnAc$ 誘導体である。 10

[0071]

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を提供する。dsRNA 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIP をコードする mRNA の一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、dsRNA 剤は、式 (I i) :

センス: $5' \eta_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q$ 3' 20

アンチセンス: $3' \eta_p' - N_b' - (X'X'X'_k)N_b' - Y'Y'Y'_b - N' - (Z'Z'Z'_l) - N_a' - n_q' 5' (I i)$

[式中、

i 、 j 、 k および l は、各々独立に 0 または 1 であり、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_q および n_q' は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に 0 ～ 6 であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも 1 つの η_p' が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである 0 ～ 25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、 30

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである 0 ～ 10 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、各々独立に、3 つの連続するヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、修飾は、2'-O-メチルまたは 2'-フルオロ修飾であり、

N_b 上の修飾は、 Y 上の修飾と異なり、 N_b' 上の修飾は、 Y' 上の修飾と異なる] によって表され、センス鎖は、少なくとも 1 つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、少なくとも 1 つのリガンドにコンジュゲートされ、リガンドは、一価、二価または三価の分枝状リンカーを介して付着された 1 つまたは複数の $GaLnAc$ 誘導体である。 40

[0072]

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤を提供する。dsRNA 剤は、アンチセンス鎖に対して相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、MYLIP をコードする mRNA の一部に対して相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、dsRNA 剤は、式 (I j) :

センス: $5' \eta_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'$

アンチセンス: $3' \eta_p' - N_b' - Y'Y'Y'_a - N' - n_q' 5' (I j)$

[式中、

それぞれ存在してもしていなくてもよい各 n_p 、 n_q および n_q' は、独立して、オー 50

バーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、各々独立に0～6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート連結を介して隣接ヌクレオチドに連結され、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されたもしくは未修飾の、またはそれらの組合せである0～25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

$Y Y Y$ および $Y' Y' Y'$ は、各々独立に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾は、2'-O-メチルおよび／または2'-フルオロ修飾である]によって表され、センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされ、リガンドは、一価、二価または三価の分枝状リンカーを介して付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体である。

10

【0073】

一態様において、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質(MYLIP)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を提供する。dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列と1、2または3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列と1、2または3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、

センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、センス鎖は、5'末端に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、アンチセンス鎖は、5'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結および3'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、

センス鎖は、3'末端において一価、二価または三価の分枝状リンカーを介して付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。一部の実施形態において、dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列の少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含み、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、センス鎖は、5'末端に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、アンチセンス鎖は、5'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結および3'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、

センス鎖は、3'末端において一価、二価または三価の分枝状リンカーを介して付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。

20

30

【0074】

一実施形態において、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドの実質的にすべてが、修飾されたヌクレオチドである。

40

【0075】

一実施形態において、相補性の領域は、表3または4に記載されるアンチセンス配列のうちのいずれか1つを含む。

【0076】

一実施形態において、薬剤は、AD-1753226、AD-1753250、AD-1753259、AD-1753324、AD-1753346、AD-1753413、AD-1753439、AD-1753456、AD-1753520、AD-1753536、AD-1753557、AD-1753624、AD-1753651、AD

50

-1753661、AD-1753725、AD-1753744、AD-1753813、AD-1753827、AD-1753844、AD-1753860、AD-1753917、AD-1753949、AD-1754026、AD-1754053、AD-1754117、AD-1754133、AD-1754147、AD-1754162、AD-1754226、AD-1754240、AD-1754255、AD-1754327、AD-1754342、AD-1754353、AD-1754420、AD-1754434、AD-1754450、AD-1754530、AD-1754550、AD-1754618、AD-1754637、AD-1754661、AD-1754735、AD-1754749、AD-1754818、AD-1754838、AD-1754862、AD-1754939、AD-1755013、AD-1755046、AD-1755120、AD-1755141、AD-1755155、AD-1755219、AD-1755326、AD-1755340、AD-1755358、AD-1755435、AD-1755451、AD-1755515、AD-1755539、AD-1755554、AD-1755621、AD-1755636、AD-1755650、AD-1755714、AD-1755734、AD-1755747、AD-1755761、AD-1755827、AD-1755830、AD-1755845、AD-1755859、AD-1755923、AD-1755943、AD-1756028、AD-1756044、AD-1756131、AD-1756146、AD-1756219、AD-1756236、AD-1756319、AD-1756335、AD-1756354、AD-1756429、AD-1756439、AD-1756514、AD-1756533、AD-1756552、AD-1756616、AD-1756631、AD-1756653、AD-1756718、AD-1756749、AD-1756814、AD-1756834、AD-1756858、AD-1756915、AD-1756932、AD-1756947、AD-1757019、AD-1757032、AD-1757052、AD-1757124、AD-1757146、AD-1757171、AD-1757191、AD-1757211、AD-1757225、AD-1757242、AD-1757258、AD-1757274、AD-1757278、AD-1757292、AD-1757308、AD-1757323、AD-1757337、AD-1757361、AD-1757377、AD-1757391、AD-1757418、AD-1757434、AD-1757449、AD-1757464、AD-1757478、AD-1757495、AD-1757509、AD-1757532、AD-1757544、AD-1757564、AD-1757583、AD-1757603、AD-1757617、AD-1757634およびAD-1757649からなる群から選択される。

10

20

30

【0077】

一実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、表3または4に記載される薬剤のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0078】

別の態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）剤を提供し、ここで、dsRNA剤は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。センス鎖は、表3または4の薬剤のいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は、表3または4の薬剤のいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。センス鎖の実質的にすべてのヌクレオチドおよびアンチセンス鎖の実質的にすべてのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドであり、dsRNA剤はリガンドにコンジュゲートしている。

40

【0079】

前記dsRNA剤の様々な実施形態において、dsRNA剤は、MYLIPをコードするmRNAのホットスポット領域を標的とする。一実施形態において、ホットスポット領域は、配列番号1のヌクレオチド341～417を含む。dsRNA剤は、AD-175

50

3624、AD-1753557、AD-1753536、およびAD-1753520からなる群から選択し得る。

【0080】

別の態様において、本発明は、ミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）mRNAのホットスポット領域を標的とするdsRNA剤を提供する。

【0081】

本発明は、本発明のdsRNA剤のいずれかを含む細胞、ベクターおよび医薬組成物をも提供する。dsRNA剤は、緩衝化されていない溶液、例えば生理食塩水もしくは水、または緩衝溶液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩もしくはリン酸塩、またはそれらの組合せを含む溶液において配合されてもよい。一実施形態において、緩衝溶液はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）である。

10

【0082】

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害する方法を提供する。方法は、細胞を、本発明のdsRNA剤または医薬組成物と接触させることにより、細胞におけるMYLIPの発現を阻害することを含む。

【0083】

細胞は、ヒト対象などの対象の中にあってもよい。

【0084】

一実施形態において、MYLIP発現は、対照レベルに対して少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、またはMYLIP発現の検出のレベル未満まで阻害される。

20

【0085】

一実施形態において、ヒト対象は、MYLIP関連疾患、障害または状態に罹患している。一実施形態において、MYLIP関連疾患、障害または状態は、脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）である。高コレステロール血症は高LDLコレステロール血症であり得る。

【0086】

一態様において、本発明は、対象におけるMYLIPの発現を阻害する方法を提供する。方法は、本発明のdsRNA剤または医薬組成物の治療有効量を対象に投与することにより、対象におけるMYLIPの発現を阻害することを含む。

30

【0087】

別の態様において、本発明は、MYLIP関連疾患、障害または状態に罹患している対象を処置する方法を提供する。方法は、本発明のdsRNA剤または医薬組成物の治療有効量を対象に投与することにより、MYLIP関連疾患、障害または状態に罹患している対象を処置することを含む。MYLIP関連疾患、障害または状態は前記の疾患、障害または状態のいずれか1つであり得る。

【0088】

別の態様において、本発明は、MYLIP遺伝子の発現の低減から恩恵を受けるであろう、疾患、障害または状態を有する対象における少なくとも1つの症状を予防する方法を提供する。方法は、本発明のdsRNA剤または医薬組成物の剤の予防有効量を対象に投与することにより、MYLIP遺伝子の発現の低減から恩恵を受けるであろう、疾患、障害または状態を有する対象における少なくとも1つの症状を予防することを含む。

40

【0089】

別の態様において、本発明は、対象における心血管疾患（例えばアテローム性動脈硬化症）の発症のリスクまたは心血管疾患の悪化のリスクを低減する方法を提供する。方法は、本発明のdsRNA剤または医薬組成物の治療有効量を対象に投与することにより、対象における心血管疾患の発症のリスクまたは心血管疾患の悪化のリスクを低減すること

50

含む。

【0090】

さらに他の態様において、本発明は、血漿の低密度リポタンパク質（LDL）コレステロールが上昇した対象において、コレステロールの血漿レベルを低下させる方法を提供する。方法は、本発明の dsRNA 剤または医薬組成物の治療有効量を対象に投与することにより、対象におけるコレステロールの血漿レベルを低下させることを含む。

【0091】

一実施形態において、本発明の方法および使用は、追加の治療剤を対象に投与することをさらに含む。追加の治療剤はスタチンであり得る。

【0092】

ある特定の実施形態において、対象は、約 0.01 mg/kg から約 200 mg/kg などの治療量の dsRNA が投与され得る。他の実施形態において、対象は、約 0.01 mg/kg から約 500 mg/kg などの治療量の dsRNA が投与され得る。さらに他の実施形態において、対象は、約 500 mg/kg 以上の治療量の dsRNA が投与され得る。

【0093】

一実施形態において、dsRNA 剤は、約 0.01 mg/kg から約 10 mg/kg または約 0.5 mg/kg から約 50 mg/kg の用量において対象に投与される。

【0094】

薬剤は、対象に静脈内投与、筋肉内投与または皮下投与される。一実施形態において、薬剤は、対象に皮下投与される。

【0095】

一実施形態において、本発明の方法および使用は、対象における MYLIP のレベルを決定することをさらに含む。

【0096】

一態様において、本発明は、細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）であって、dsRNA 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖が、表 3 または 4 における薬剤のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が、表 3 または 4 における薬剤のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、センス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべておよびアンチセンス鎖のヌクレオチドのうちの実質的にすべてが、修飾されたヌクレオチドであり、dsRNA 剤がリガンドにコンジュゲートされている、二本鎖リボ核酸（dsRNA）を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0097】

本発明は、MYLIP 遺伝子の RNA 転写物の RNA 誘導型サイレンシング複合体（RISC）媒介切断を実行する、iRNA 組成物を提供する。MYLIP 遺伝子は、細胞内、例えば、ヒトなどの対象内の細胞内にあり得る。本発明は、MYLIP 遺伝子の発現を阻害するために、かつ MYLIP 遺伝子の発現を阻害または低減することから恩恵を受けるであろう対象、例えば、MYLIP 関連疾患、障害または状態に罹患している対象または罹患しやすい対象、例えば、脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）に罹患している対象または罹患しやすい対象を処置するために本発明の iRNA 組成物を使用する方法をも提供する。

【0098】

MYLIP を標的とする本発明の iRNA は、約 30 ヌクレオチド長以下、例えば、15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29

10

20

30

40

50

、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22ヌクレオチド長の領域であって、MYLIP遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である領域を有するRNA鎖（アンチセンス鎖）を含んでもよい。

【0099】

一部の実施形態において、本発明の二本鎖RNAi剤の鎖の一方または両方が、MYLIP遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部に対して実質的に相補的である少なくとも19の連続するヌクレオチドの領域を含めて、66ヌクレオチド長以下、例えば、36～66、26～36、25～36、31～60、22～43、27～53ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、より長いアンチセンス鎖を有する当該iRNA剤は、20～60ヌクレオチド長の第2のRNA鎖（センス鎖）を、センス鎖とアンチセンス鎖が18～30の連続するヌクレオチドの二重鎖を形成するように含んでもよい。

【0100】

本明細書に記載されるiRNA剤の使用は、哺乳動物におけるMYLIP遺伝子のmRNAの標的化された分解を可能にする。

【0101】

特に、非常に低い投与量のiRNAは、RNA干渉（RNAi）を特異的かつ効率的に媒介して、MYLIP遺伝子の発現を有意に阻害できる。したがって、これらのiRNAを含む方法および組成物は、MYLIP遺伝子の発現を阻害または低減することから恩恵を受けるであろう対象、例えば、MYLIP関連疾患、障害または状態に罹患している対象または罹患しやすい対象、例えば、脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）に罹患している対象または罹患しやすい対象を処置するのに有用である。

【0102】

以下の詳細な説明では、MYLIP遺伝子の発現を阻害するためにiRNAを含有する組成物をどのように作製および使用するかということ、ならびにこの遺伝子の発現の阻害および／または低減から恩恵を受けるであろう、疾患および障害を有する対象を処置するための組成物および方法について開示する。

【0103】

I. 定義

本発明がさらに容易に理解され得るために、ある特定の用語が、最初に定義される。加えて、パラメータの値または値の範囲が列記される場合にはいつでも、列記された値の中間の値および範囲も、本発明の一部であることが意図されることが意図される。

【0104】

冠詞「a」および「an」は、本明細書において、冠詞の文法上の対象の1つまたは2つ以上（すなわち、少なくとも一つ）を意味するために使用される。例えば、「要素（an element）」は、1つの要素または2つ以上の要素、例えば、複数の要素を意味する。

【0105】

用語「を含む（including）」は、語句「を含むが、これらに限定されるわけではない（including but not limited to）」を意味するために本明細書において使用され、当該語句と相互互換的に使用される。

【0106】

用語「または」は、文脈において明確に示されない限り、用語「および／または」を意味するために本明細書において使用され、当該語句と相互互換的に使用される。

【0107】

10

20

30

40

50

用語「約」は、当技術分野において、典型的な交差の範囲内であることを意味するために、本明細書において使用される。例えば、「約」は、平均から約2標準偏差として理解することができる。ある特定の実施形態において、約は、±10%を意味する。ある特定の実施形態において、約は、±5%を意味する。約が、一連の数または範囲の前に存在する場合、「約」は、一連における数または範囲のそれぞれを修飾することができることは理解されよう。

【0108】

数または一連の数の前の「少なくとも」という用語は、文脈から明らかなように、用語「少なくとも」の隣の数、および論理的に含まれ得るすべての後続の数または整数を含むと理解される。例えば、核酸分子におけるヌクレオチドの数は、整数でなければならない。例えば、「21ヌクレオチド核酸分子の少なくとも18個のヌクレオチド」は、18、19、20または21個のヌクレオチドが示された特性を有することを意味する。「少なくとも」が一連の数または範囲の前に存在するときは、「少なくとも」は、当該一連の数または範囲における数の各々を修飾することができる」と理解される。

10

【0109】

本明細書において使用される場合、「以下 (no more than)」または「以下 (or less)」は、語句の隣の値、およびゼロまでの、文脈から論理的であるように論理的なより低い値または整数として理解される。例えば、「2個以下のヌクレオチド」のオーバーハングを有する二重鎖は、2、1または0ヌクレオチドオーバーハングを有する。「以下」が一連の数または範囲の前に存在する場合は、「以下」は、当該一連の数または範囲における数の各々を修飾できることが理解される。本明細書において使用される場合、範囲は、上限および下限の両方を含む。

20

【0110】

本明細書において使用される場合、用語「少なくとも約」は、パラメータおよび量などの測定可能な値を指す場合は、特定値からの+/-10%、+/-5%または+/-1%などの+/-20%のバリエーションを、当該バリエーションが、開示される発明において実施するのに適切である限りにおいて包含する。例えば、「少なくとも約25%」のMYLIP遺伝子の発現の阻害は、MYLIP遺伝子の発現の阻害が、特定の25%の+/-20%の任意の値、すなわち20%、30%または20%と30%の間の任意の中間値であると測定され得ることを意味する。

30

【0111】

本明細書において使用される場合、「対照レベル」は、本明細書に記載されるRNAi剤が発現される細胞、組織もしくは系と同一の非モジュレート細胞、組織もしくは系における遺伝子の発現レベル、またはRNA分子の発現レベルまたは1つまたは複数のタンパク質もしくはタンパク質サブユニットの発現レベルを指す。RNAi剤が発現される細胞、組織または系は、RNAi剤が存在しない場合に観察される発現より少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、4倍、または5倍以上の上記において説明された遺伝子、RNAおよび/またはタンパク質の発現を有する。%および/または倍の差は、対照レベルに対して、例えば、

40

【0112】

【数1】

[RNAi剤を使用した発現 - RNAi剤を使用しない発現]

$$\%差 = \frac{\text{RNAi剤を使用した発現} - \text{RNAi剤を使用しない発現}}{\text{RNAi剤を使用しない発現}}$$

により算出することができる。

【0113】

本明細書において使用される場合、検出の方法は、存在する検体の量が方法の検出のレ

50

ベル未満であることを判断することを含み得る。

【0114】

示される標的部位とセンスまたはアンチセンス鎖についてのヌクレオチド配列とが矛盾する場合は、示される配列が優先される。

【0115】

化学構造と化学名とが矛盾する場合は、化学構造が優先される。

【0116】

別段の指定がなければ、「IDOL (「Inducible Degradable of the LDL receptor」)」、および「MIR (「Modulator of Immune Recognition」)」としても知られる「MYLIP」という用語は、限定することなく、ヒト、ウシ、鶏、齧歯類、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、霊長類、サルおよびモルモットを含む任意の脊椎動物または哺乳動物の供給源からのミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質をコードする周知の遺伝子を指す。

10

【0117】

その用語は、天然MYLIPの少なくとも1つのインビボまたはインビトロ活性を維持する天然MYLIPの断片および変異体をも指す。その用語は、MYLIPの完全長の未処理前駆体形態、ならびにシグナルペプチドの翻訳後切断に起因する成熟形態およびタンパク質分解処理に起因する形態を包含する。

【0118】

ヒトMYLIP遺伝子は、8つのエクソンを有する。ヒトMYLIP転写物のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、例えば、GenBank参考配列NM_013262.4 (配列番号1、逆相補物の配列番号2)に見出すことができる。

20

【0119】

MYLIP遺伝子は、染色体領域6p22.3に位置する。MYLIP遺伝子を内包するヒト染色体のゲノム領域のヌクレオチド配列は、例えば、GenBankで入手可能なGenome Reference Consortium Human Build 38 (ヒトゲノムbuild38またはGRCh38とも称される)に見出すことができる。MYLIP遺伝子を内包するヒト第6染色体のゲノム領域のヌクレオチド配列はまた、例えば、ヒト第6染色体のヌクレオチド16,129,086~16,151,015に対応する、GenBank受託番号NC_000006.12に見出すこともできる。

30

【0120】

マウスMYLIP転写物のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、例えば、GenBank参考配列NM_153789.3 (配列番号3、逆相補物の配列番号4)に見出すことができる。

【0121】

ラットMYLIP転写物のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、例えば、GenBank参考配列NM_001107344.2 (配列番号5、逆相補物の配列番号6)に見出すことができる。

【0122】

アカゲザルMYLIP転写物のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、例えば、GenBank参考配列NM_001261795.2 (配列番号7、逆相補物の配列番号8)に見出すことができる。

40

【0123】

カニクイザルMYLIP遺伝子には2つの予測される転写物変異体が存在する。カニクイザルMYLIP転写物変異体X1のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、例えば、GenBank参考配列XM_005553979.2 (配列番号9、逆相補物の配列番号10)に見出すことができる。カニクイザルMYLIP転写物変異体X2のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、例えば、GenBank参考配列XM_005553980.2 (配列番号11、逆相補物の配列番号12)に見出すことができる。

【0124】

50

MYLIP mRNA配列のさらなる例は、公共的に利用可能なデータベース、例えば、GenBank、UniProtおよびOMIMを使用して容易に利用可能である。MYLIPに関するさらなる情報は、例えば、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29116>に見出すことができる。MYLIPという用語は、本明細書において使用される場合、臨床変異体データベース、例えば[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=MYLIP\[gene\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=MYLIP[gene])に提示されるMYLIP遺伝子のバリエーションをも指す。

【0125】

「MYLIP」という用語は、本明細書において使用される場合、MYLIP遺伝子の天然に存在するDNA配列バリエーションにより細胞において発現される特定のポリペプチド、例えば、MYLIP遺伝子における単一ヌクレオチド多型をも指す。MYLIP遺伝子内の多くのSNPが同定されており、例えば、NCBI dbSNPに見出すことができる（例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/snpを参照されたい）。

【0126】

ミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）は低密度リポタンパク質（LDL）受容体（LDLR）の細胞質尾部に直接結合し、UBE2D1/E1複合体によるそのユビキチン化を促進するE3ユビキチンリガーゼである（Hong, et al. (2014) Cell Metab. 20(5):910-918 (doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.001)）。ユビキチン化されると、LDLRは多胞体（MVB）タンパク質選別経路に入り、分解されるためにリソソームにシャトルされる。LDLRは主に肝臓で発現する、LDL粒子の外側リン脂質層に埋め込まれたアポタンパク質B100を認識し、コレステロールを多く含むLDLのエンドサイトーシスを媒介する細胞表面受容体である。この受容体はまた、カイロミクロン残渣およびVLDL残渣（IDL）に見られるアポEタンパク質を認識し、APOER2およびVLDLRの分解を促進することから、神経細胞の発達および機能におけるMYLIPの役割の可能性が示唆される。MYLIPは種々の組織で発現しており、例えば、甲状腺、胎盤、子宮、子宮頸部、骨髄、および動脈の一部で高発現であり、ならびに肝臓では低発現である。MYLIPの転写は、コレステロール、脂肪酸、およびグルコースホメオスタシスを調節する役割で知られる甲状腺ホルモン受容体様核内受容体である肝X受容体（LXR）によって誘導され、肝脂肪生成の誘導は、潜在的なLXRアゴニスト治療薬の望ましくない副作用として同定されている。ゲノムワイド関連研究では、MYLIP遺伝子座の多型がヒトの血漿LDLコレステロールレベルと関連しており、機能喪失（LOF）変異はLDLコレステロールレベルの低下と関連していることから、LDLR依存的なLDLクリアランスの亢進が示唆されている。（Hong et al.(2014)Cell Metab. 20(5):910-918(doi:10.1016/j.cmet.2014.10.001)）。MYLIPとともに、LDLRの分解を促進する前駆タンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシン9型（PCSK9）経路、およびLDLRの転写を誘導するステロール調節要素結合タンパク質（SREBP）経路も、LDLRの発現に影響を及ぼすことが知られている。（Zhang et al.(2012)Arterioscler Thromb Vasc Biol.32(11):2541-6(doi:10.1161/ATVBAHA.112.250571)）。

【0127】

MYLIPは45 kDaの細胞質タンパク質で、N末端のFERMドメインおよびC末端のRINGドメインという2つの別個のタンパク質ドメインを保有する（Martinelli et al.(2020)J Biol Chem. 295(39):13570-13583 (doi: 10.1074/jbc.RA120.014349)）。FERMドメインは、MYLIPと保存されたLDLRモチーフとの相互作用を調整する推定ヘリックスを介して、細胞膜でLDLRの細胞内尾部と相互作用する。RINGドメインはE2ユビキチンコンジュゲート酵素をMYLIPにリクルートし、UBC13とUBE2Dファミリーの両方のE2がLDLRの分解においてMYLIPと相互作用することが証明されている。ユビキチン化LDLRがたどるエンドサイトーシス経路は、PCSK9が利用する経路とは異なり、クラスリンおよびARH（アリアル炭化水素受容体）非依存性である。（Zhang et al. (2012) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 32(11):2541-6 (doi: 10.1161/ATVBAHA.112.250571)）。

【0128】

マウスにおけるMYLIPの急性肝過剰発現は、LDLRタンパク質レベルを低下させ、血漿コレステロールレベルを上昇させることが示されており、一方、マウスの培養細胞におけるMYLIPの標的化された欠失は、LDLRタンパク質レベルを上昇させ、LDL取り込みを増加させ、これはスタチン処置の効果と相加的であった。しかしながら、LXR活性化は霊長類では血漿LDLレベルを上昇させるが、マウスでは上昇させないことが示されており、これは霊長類ではマウスよりもMYLIPの上方制御のレベルが強いことを示している。(Zelcer et al.(2009)Science. 3;325(5936):100-4 (doi: 10.1126/science.1168974); Hong, et al. (2014) Cell Metab. 20(5):910-918 (doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.001))。

10

【0129】

本明細書において使用される場合、「標的配列」は、MYLIP遺伝子の転写の際に形成されるmRNA分子、例えば、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAなどのヌクレオチド配列における連続する一部分を意味する。一実施形態において、配列の標的部分は、MYLIP遺伝子の転写の際に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の一部分またはその付近におけるiRNA依存性切断のための基質として機能するのに、少なくとも十分に長いであろう。

【0130】

MYLIP遺伝子の標的配列は、約9～36ヌクレオチド長、例えば約15～30ヌクレオチド長であってもよい。例えば、標的配列は、約15～30ヌクレオチド長、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23または21～22ヌクレオチド長であり得る。上記に列記した範囲および長さの中間的な範囲および長さも、本発明の一部であることが想到される。

20

30

【0131】

本明細書において使用される場合、用語「配列を含む鎖」は、標準的ヌクレオチド用語体系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の鎖を含むオリゴヌクレオチドを意味する。

【0132】

「G」、「C」、「A」、「T」および「U」はそれぞれ、一般的に、それぞれ塩基としての、グアニン、シトシン、アデニン、チミジンおよびウラシルを含むヌクレオチドを表す。しかしながら、用語「リボヌクレオチド」または「ヌクレオチド」は、以下においてより詳述されるような修飾ヌクレオチド、または代理の置換部分（例えば、表2を参照されたい）も意味することができることは理解されよう。当業者は、グアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルが、そのような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対合特性を実質的に変更することなく、他の部分で置き換えることができることを十分に意識している。例えば、これらに限定されるものではないが、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むヌクレオチドは、本発明において特徴とされるdsRNA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で置換することができる。別の例において、オリゴヌクレオチドのいずれかにおけるアデニンおよびシトシンは、標的mRNAとG-UWobble塩基対合を形成するために、それぞれ、グアニンおよびウラシルで置換することができる。そのような置換部分を含む配列は、本発明において特徴とされる

40

50

組成物および方法にとって好適である。

【0133】

本明細書において相互互換的に使用される、用語「iRNA」、「RNAi剤」、「iRNA剤」、および「RNA干渉剤」は、本明細書において用語が定義されるRNAを含む、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)経路を介して、RNA転写における標的化された切断を媒介するような、薬剤を意味する。iRNAは、RNA干渉(RNAi)として知られるプロセスを通じてmRNAの配列特異的な分解を誘導する。iRNAは、細胞中で、例えば対象、例えば哺乳類対象内の細胞中で、MYLIP遺伝子の発現を阻害する。

【0134】

一実施形態において、本発明のRNAi剤は、標的RNAの切断を指示するために、標的RNA配列、例えば、MYLIP標的mRNA配列と相互作用する一本鎖RNAを含む。理論に束縛されることを望むわけではないが、細胞内に導入された長い二本鎖RNAは、Dicerとして知られるIII型エンドヌクレアーゼによって、siRNAへと分解されると考えられる[Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485]。リボヌクレアーゼIII様酵素であるDicerは、dsRNAを、特徴的な2つの塩基3'オーバーハングを有する19~23塩基対の低分子干渉RNAへとプロセッシングする[Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363]。次いで、siRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)へと導入され、この場合、1つまたは複数のヘリカーゼが、siRNA二重鎖を解き、相補的アンチセンス鎖が標的認識を誘導することを可能にする[Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309]。適切な標的mRNAへの結合の際に、RISC内の1つまたは複数のエンドヌクレアーゼは、サイレンシングを誘導するために、標的を切断する[Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188]。したがって、一態様において、本発明は、細胞内において生成され、RISC複合体の形成を促進し、それにより標的遺伝子、すなわちMYLIP遺伝子のサイレンシングを行う、一本鎖RNA(sssiRNA)に関する。したがって、用語「siRNA」は、上記において説明されたRNAiも意味するために本明細書において使用される。

【0135】

別の実施形態において、RNAi剤は、標的mRNAを阻害するために細胞または有機体に導入された一本鎖RNAi剤であり得る。一本鎖RNAi剤(ssRNAi)は、RISCエンドヌクレアーゼであるアルゴノート2に結合し、次いで、標的mRNAを切断する。一本鎖siRNAは、概して、15~30ヌクレオチドであり、化学的に修飾される。一本鎖RNAi剤の設計および試験は、米国特許第8,101,348号およびLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載されており、そのそれぞれの内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において説明されるアンチセンスヌクレオチド配列はいずれも、本明細書において説明される一本鎖siRNAとして、またはLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載される方法によって化学的に修飾される一本鎖siRNAとして使用され得る。

【0136】

別の実施形態において、本発明の組成物および方法における使用のための「iRNA」は、二本鎖RNAであり、本明細書において「二本鎖RNAi剤」、「二本鎖RNA(dsRNA)分子」、「dsRNA剤」、または「dsRNA」と呼ばれる。用語「dsRNA」は、標的RNA、すなわち、MYLIP遺伝子に関して「センス」または「アンチセンス」配向を有すると言われる、2本の逆平行の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意味する。本発明の一部の実施形態において、二本鎖RNA(dsRNA)は、本明細書においてRNA干渉またはRNAiと呼ばれる転写後遺伝子サイレンシングメカニズムによって、標的RNA、例えば、mRNAの分解を誘導する。

【0137】

概して、dsRNA分子の各鎖のヌクレオチドの多くがリボヌクレオチドであるが、本

明細書に詳述されるように、各々の鎖または両方の鎖が、1つまたは複数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を含むこともできる。加えて、本明細書において使用される場合、「RNA i 剤」は、化学修飾を有するリボヌクレオチドを含み得；RNA i 剤は、複数のヌクレオチドにおける実質的な修飾を含み得る。本明細書において使用される場合、用語「修飾ヌクレオチド」は、修飾糖部分、修飾ヌクレオチド間連結、および／または修飾核酸塩基を独立して有するヌクレオチドを意味する。したがって、修飾ヌクレオチドなる用語は、ヌクレオチド間連結、糖部分、または核酸塩基への、例えば、官能基または原子などの置換、付加、または除去を包含する。本発明の薬剤における使用にとって好適な修飾は、本明細書において開示される修飾または当技術分野で公知の修飾のすべてのタイプを包含する。siRNAタイプの分子において使用される、任意のそのような修飾は、本明細書および特許請求の範囲の目的のために「RNA i 剤」によって包含される。

10

【0138】

二重鎖領域は、RISC経路を通じて所望の標的RNAの特異的な分解を可能にする任意の長さであってもよく、約9～36の範囲の塩基対長、例えば約15～30塩基対長、例えば、約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35または36塩基対長、例えば、約15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22塩基対長であってもよい。上記に列記した範囲および長さの中間的な範囲および長さも、本発明の一部であることが想到される。

20

【0139】

二重鎖構造を形成する2つの鎖は、1つのより大きなRNA分子における異なる一部分であり得るか、またはそれらは、別々のRNA分子であり得る。2つの鎖がより大きな分子の一部で、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端とそれぞれ他方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの連続した鎖によって接続され得る場合は、接続するRNAを「ヘアピンループ」と呼ぶ。ヘアピンループは、少なくとも1つの無対のヌクレオチドを含むことができる。一部の実施形態において、ヘアピンループは、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも20個、または少なくとも23個以上の対合されないヌクレオチド、またはdsRNAの標的部位に誘導されないヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態において、ヘアピンループは、10個以下のヌクレオチドであり得る。一部の実施形態において、ヘアピンループは、8個以下の対合されないヌクレオチドであり得る。一部の実施形態において、ヘアピンループは、4～10個の対合されないヌクレオチドであり得る。一部の実施形態において、ヘアピンループは、4～8個のヌクレオチドであり得る。

30

40

【0140】

dsRNAの2つの実質的に相補的な鎖は、別々のRNA分子に含まれ、それらの分子は、必ずしも必要ではないが、共有結合することができる。2つの鎖が、1つの鎖の3'末端と、二重鎖構造を形成するそれぞれ他の鎖の5'末端との間において、割り込まれないヌクレオチドの鎖以外の手段によって共有結合される場合、接続構造は、「リンカー」と呼ばれる。RNA鎖は、同じ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、dsRNAの最も短い鎖におけるヌクレオチドの数から二重鎖に存在するすべてのオー

50

バーハングを引いた数である。二重鎖構造に加えて、RNA i は、1つまたは複数のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。RNA i 剤の一実施形態において、少なくとも1つの鎖は、少なくとも1つのヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。別の実施形態において、少なくとも1つの鎖は、少なくとも2つのヌクレオチド、例えば、2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14または15個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。他の実施形態において、RNA i 剤の少なくとも1つの鎖は、少なくとも1つのヌクレオチドの5'オーバーハングを含む。ある特定の実施形態において、少なくとも1つの鎖は、少なくとも2つのヌクレオチド、例えば、2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14または15個のヌクレオチドの5'オーバーハングを含む。さらに他の実施形態において、RNA i 剤の1つの鎖の3'および5'末端は、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーハングを含む。 10

【0141】

一実施形態において、本発明のRNA i 剤は、標的RNA配列、例えばMYLIP標的mRNA配列と相互作用して標的RNAの切断を誘導する、その各々の鎖が30個未満、例えば、17~27、19~27、17~25、19~25または19~23個のヌクレオチドを含むdsRNAである。別の実施形態において、本発明のRNA i 剤は、標的RNA配列、例えばMYLIP標的mRNA配列と相互作用して標的RNAの切断を誘導する、その各々の鎖が19~23個のヌクレオチドを含むdsRNAである。一実施形態において、センス鎖は、21ヌクレオチド長である。別の実施形態において、アンチセンス鎖は、23ヌクレオチド長である。 20

【0142】

本明細書において使用される場合、用語「ヌクレオチドオーバーハング」は、iRNA、例えばdsRNAの二重鎖構造から突出する少なくとも1つの無対のヌクレオチドを意味する。例えば、dsRNAの一方の鎖の3'端が、他方の鎖の5'端を越えて延びる場合、その逆の場合も同様に、ヌクレオチドオーバーハングが存在する。dsRNAは、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーハングを含むことができ；あるいは、オーバーハングは、少なくとも2つのヌクレオチド、少なくとも3つのヌクレオチド、少なくとも4つのヌクレオチド、少なくとも5つのヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドを含むことができる。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドなどのヌクレオチド／ヌクレオシドアナログを含み得、またはそれらからなり得る。オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、またはそれらの任意の組合せの上にあり得る。その上、オーバーハングのヌクレオチドは、dsRNAのアンチセンス鎖またはセンス鎖のどちらかの5'端、3'端、またはその両方に存在し得る。 30

【0143】

一実施形態において、dsRNAのアンチセンス鎖は、3'端および／または5'端に1~10ヌクレオチドオーバーハング、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドのオーバーハングを有する。一実施形態において、dsRNAのセンス鎖は、3'端および／または5'端に1~10ヌクレオチドオーバーハング、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドのオーバーハングを有する。別の実施形態において、オーバーハングにおけるヌクレオチドの1つまたは複数は、ヌクレオシドチオホスフェートで置き換えられる。 40

【0144】

ある特定の実施形態において、センス鎖もしくはアンチセンス鎖またはその両鎖上のオーバーハングは、10ヌクレオチドを超えるヌクレオチド長、例えば、10~30ヌクレオチド、10~25ヌクレオチド、10~20ヌクレオチドまたは10~15ヌクレオチド長の拡張された長さを含み得る。ある特定の実施形態において、伸長されたオーバーハングは、二重鎖のセンス鎖にある。ある特定の実施形態において、伸長されたオーバーハングは、二重鎖のセンス鎖の3'端に存在する。ある特定の実施形態において、伸長されたオーバーハングは、二重鎖のアンチセンス鎖にある。ある特定の実施形態 50

において、伸長されたオーバーハングは、二重鎖のアンチセンス鎖の3'端に存在する。ある特定の実施形態において、伸長されたオーバーハングは、二重鎖のアンチセンス鎖の5'端に存在する。ある特定の実施形態において、拡張されたオーバーハングにおけるヌクレオチドの1つまたは複数が、ヌクレオシドチオホスフェートと置き換えられる。

【0145】

用語「ブラント (blunt)」または「ブラントエンド (blunt ended)」は、dsRNAに関して本明細書において使用される場合、dsRNAの所定の末端において無対ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが存在しない、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングが存在しないことを意味する。dsRNAの片端または両端は、ブラントであり得る。dsRNAの両端がブラントである場合、dsRNAは、ブラントエンドであると言われる。明瞭化のため、「ブラントエンド」dsRNAは、両端がブラントであるdsRNA、すなわち、分子のどちらの末端にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないdsRNAである。ほとんどの場合、そのような分子は、その長さ全体にわたって二本鎖であろう。

10

【0146】

用語「アンチセンス鎖」または「ガイド鎖」は、標的配列、例えば、MYLIP mRNAに対して実質的に相補的な領域を含む、iRNA、例えば、dsRNAの鎖を意味する。

【0147】

本明細書において使用される場合、用語「相補性の領域」は、本明細書において定義されるように、配列、例えば、標的配列、例えば、MYLIPヌクレオチド配列に対して実質的に相補的であるアンチセンス鎖上の領域を意味する。相補性の領域が、標的配列に対して完全には相補的でない場合、そのミスマッチは、分子の内部領域または末端領域においてであり得る。概して、最も許容されるミスマッチは、末端領域内、例えば、iRNAの5'および／または3'末端内にある。一部の実施形態において、本発明の二本鎖RNA剤は、アンチセンス鎖にヌクレオチドミスマッチを含む。一部の実施形態において、本発明の二本鎖RNA剤のアンチセンス鎖は、標的mRNAとの4個以下のミスマッチを含み、例えば、アンチセンス鎖は、標的mRNAとの4、3、2、1または0個のミスマッチを含む。一部の実施形態において、本発明の二本鎖RNA剤のアンチセンス鎖は、センス鎖との4個以下のミスマッチを含み、例えば、アンチセンス鎖は、センス鎖との4、3、2、1または0個のミスマッチを含む。一部の実施形態において、本発明の二本鎖RNA剤は、センス鎖にヌクレオチドミスマッチを含む。一部の実施形態において、本発明の二本鎖RNA剤のセンス鎖は、アンチセンス鎖との4個以下のミスマッチを含み、例えば、センス鎖は、アンチセンス鎖との4、3、2、1または0個のミスマッチを含む。一部の実施形態において、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、iRNAの3'末端から5、4、3個のヌクレオチド内に存在する。別の実施形態において、ヌクレオチドミスマッチは、例えば、iRNA剤の3'末端ヌクレオチドに存在する。一部の実施形態において、ミスマッチは、シード領域に存在しない。

20

30

【0148】

用語「センス鎖」または「パッセンジャー鎖」は、本明細書において使用される場合、用語が本明細書において定義されるようなアンチセンス鎖の領域に対して実質的に相補的である領域を含むiRNAの鎖を意味する。

40

【0149】

本明細書において使用される場合、用語「切断領域」は、切断部位に直接隣接して位置される領域を意味する。切断部位は、切断が存在する標的上の部位である。一部の実施形態において、切断領域は、切断部位のどちらかの末端において直接隣接している3つの塩基を含む。一部の実施形態において、切断領域は、切断部位のどちらかの末端において直接隣接している2つの塩基を含む。一部の実施形態において、詳細には、切断部位は、アンチセンス鎖のヌクレオチド10および11によって結合される部位において存在し、切断領域は、ヌクレオチド11、12、および13を含む。

50

【0150】

本明細書において使用される場合、特に明記されない限り、用語「相補的」は、当業者によって理解されるように、第2のヌクレオチド配列との関連において第1のヌクレオチド配列を説明するために使用される場合、ある特定の条件下において、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖を形成する第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの能力を意味する。当該状態は、例えば、限定することなく、400mMのNaCl、40mMのPIPES、pH6.4、1mMのEDTA、50℃もしくは70℃で12～16時間の後洗浄を行うことを含む「厳しい条件」であり得る（例えば、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい）。本明細書において使用される場合、「厳しい条件」または「厳しいハイブリダイゼーション条件」は、アンチセンス化合物が、その標的配列にハイブリダイズするが、ハイブリダイズする他の配列の数を最小限とする条件を指す。厳しい条件は、配列依存的であり、異なる状況により異なり、アンチセンス化合物が標的配列にハイブリダイズする「厳しい条件」は、アンチセンス化合物の性質および組成、ならびにそれらを調査するアッセイによって決定される。他の条件、例えば生物の内部で遭遇し得るような生理的に適切な条件も適用することができる。当業者は、ハイブリダイズしたヌクレオチドの最終的な適用に従って2つの配列の相補性の試験に最も適切な条件のセットを決定することができるであろう。

【0151】

iRNA内、例えば、本明細書において説明されるdsRNA内の相補配列は、一方または両方のヌクレオチド配列の長さ全体にわたって、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまた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またはポリヌクレオチドの塩基対合を含む。そのような配列は、本明細書において、お互いに関して「完全に相補的」とであると呼ぶことができる。しかし、本明細書において第1の配列を第2の配列に対して「実質的に相補的」と呼ぶ場合は、2つの配列が完全に相補的であり得る、または30個までの二重鎖のためのハイブリダイゼーションの際に、一般には5個、4個、3個もしくは2個以下の1つまたは複数のミスマッチ塩基対を形成し得る。一部の実施形態において、本明細書に開示される「実質的に相補的な」配列は、標的MYLIP配列の同等領域に対してその長さ全体にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。しかしながら、2つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーションの際に1つまたは複数の一本鎖オーバーハングを形成するように設計される場合、そのようなオーバーハングは、相補性の判定に関して、ミスマッチとは見なされない。例えば、21ヌクレオチド長の1つのオリゴヌクレオチドと23ヌクレオチド長の別のオリゴヌクレオチドとを含む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対して完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むようなdsRNAは、依然として、本明細書において説明される目的に対して、「完全に相補的」と見なすことができる。

【0152】

「相補的」配列は、本明細書において使用される場合、ハイブリダイズするそれらの能力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／または非天然の修飾ヌクレオチドから形成された塩基対も含み得るか、またはそれらから完全に形成され得る。そのような非ワトソン・クリック塩基対としては、これらに限定されるわけではないが、G:U WobbleまたはHogsteen塩基対合が挙げられる。

【0153】

用語「相補的」、「完全に相補的」、および「実質的に相補的」は、本明細書において、それらの使用との関連から理解できるように、2つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの間、例えば、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間、またはiRNA

A 剤のアンチセンス鎖と標的配列との間における塩基マッチングに関連して使用することができる。

【0154】

本明細書において使用される場合、メッセンジャーRNA (mRNA) 「の少なくとも一部に対して実質的に相補的」であるポリヌクレオチドは、目的のmRNA (例えば、MYLIPをコードするmRNA) の連続部分に対して実質的に相補的であるポリヌクレオチドを意味する。例えば、ポリヌクレオチドは、配列が、MYLIPをコードするmRNAの割り込みされていない部分に対して実質的に相補的である場合、MYLIP mRNAの少なくとも一部に対して相補的である。

【0155】

したがって、一部の実施形態において、本明細書に開示されるアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、標的MYLIP配列 (例えばヒトMYLIP配列) に対して完全に相補的である。他の実施形態において、本明細書において開示されるアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、標的MYLIP配列 (例えば、ヒトMYLIP配列) に対して実質的に相補的であり、配列番号1のヌクレオチド配列または配列番号1の断片の同等の領域に対してその長さ全体にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

【0156】

一実施形態において、本発明のRNAi剤は、さらに標的MYLIP配列 (例えばヒトMYLIP配列) に対して相補的であるアンチセンスポリヌクレオチドに対して実質的に相補的であり、センス鎖ポリヌクレオチドは、配列番号2のヌクレオチド配列または配列番号2のいずれか1つの断片の同等の領域に対してその長さ全体にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

【0157】

一部の実施形態において、本明細書に開示されるアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、標的マウスMYLIP配列に対して完全に相補的である。他の実施形態において、本明細書に開示されるアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、マウスMYLIPに対して実質的に相補的であり、配列番号3のヌクレオチド配列または配列番号3のいずれか1つの断片の同等の領域に対してその長さ全体にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

【0158】

一実施形態において、本発明のRNAi剤は、さらにマウスMYLIP配列に対して相補的であるアンチセンスポリヌクレオチドに対して実質的に相補的であり、センス鎖ポリヌクレオチドは、センス鎖ポリヌクレオチドは、配列番号4のヌクレオチド配列または配列番号4のいずれか1つの断片の同等の領域に対してその長さ全体にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

【0159】

一部の実施形態において、本発明のiRNAは、標的MYLIP配列に対して実質的に相補的であるアンチセンス鎖を含み、表3もしくは4におけるセンス鎖のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列、または表3もしくは4におけるセンス鎖のうちのいずれか1つの断片の同等の領域に対してその長さ全体にわたって少なくとも約80%相補的、例えば、約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94

10

20

30

40

50

%、95%、96%、97%、98%もしくは99%相補的、または100%相補的である、連続するヌクレオチド配列を含む。

【0160】

「阻害すること」という用語は、本明細書で使用される場合、「低減すること」、「サイレンシングすること」、「下方制御すること」、「抑制すること」および他の同様の用語と同義的に使用され、阻害の任意のレベルを含む。

【0161】

「MYLIP遺伝子の発現を阻害する」という語句は、本明細書において使用される場合、任意のMYLIP遺伝子（例えば、マウスMYLIP遺伝子、ラットMYLIP遺伝子、モンキーMYLIP遺伝子またはヒトMYLIP遺伝子など）、ならびにMYLIPタンパク質をコードするMYLIP遺伝子の変異体もしくは突然変異体の発現の阻害を含む。

10

【0162】

「MYLIP遺伝子の発現を阻害する」は、MYLIP遺伝子の任意のレベルの阻害、例えば、MYLIP遺伝子の少なくとも部分的な抑制、例えば少なくとも約20%の阻害を含む。ある特定の実施形態において、阻害は、対照レベルに対して少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%である。

20

【0163】

MYLIP遺伝子の発現は、MYLIP遺伝子の発現に付随する任意の変数のレベル、例えば、MYLIP mRNAレベルまたはMYLIPタンパク質レベルに基づいて評価されてもよい。MYLIP遺伝子の発現は、例えば、組織サンプルにおけるMYLIPの酵素活性（例えば、GTPアーゼ活性化タンパク質（GAP）活性）、または肝臓サンプルなどの組織サンプルにおけるMYLIP媒介シグナル伝達のレベルに基づいて間接的に評価されてもよい。阻害は、対照レベルと比較した、これらの変数のうち1つまたは複数の絶対または相対レベルの低下によって評価できる。対照レベルは、当技術分野で利用される任意の種類の対照レベル、例えば、投与前ベースラインレベルまたは未処置であるか、もしくは対照（例えば、バッファーのみの対照または不活性の薬剤対照など）を用いて処置された同様の対象、細胞もしくは試料から決定されるレベルであり得る。

30

【0164】

一実施形態において、MYLIP遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制は、MYLIP mRNAの量の低減によって評価され、このmRNAは、MYLIP遺伝子が転写されており、MYLIP遺伝子の発現が阻害されるように処置された、または処置されている第1の細胞または細胞群から単離することができる、またはそのような細胞または細胞群において検出され、第1の細胞または細胞群に実質的に同一であるが、そのように処置されたまたは処置されていない第2の細胞または細胞群（対照細胞）と比較される。

40

【0165】

阻害の程度は、以下の式で表されてもよい。

【0166】

【数2】

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

【0167】

dsRNAなどの「細胞をRNAi剤と接触させること」なる語句は、本明細書におい

50

て使用される場合、任意の可能な手段によって細胞を接触させることを包含する。細胞をRNAi剤と接触させることは、細胞を*in vitro*においてiRNAと接触させることまたは細胞を*in vivo*においてiRNAと接触させることを含む。接触させることは、直接的または間接的に行われ得る。したがって、例えば、RNAi剤は、方法を個別に実施することによって、細胞と物理的に接触させ得るか、あるいはRNAi剤は、その後に細胞と接触することを可能にし得るまたは引き起こし得るような状況に置かれ得る。

【0168】

細胞をインビトロにおいて接触させることは、例えば、細胞をRNAi剤と共にインキュベートすることによって為され得る。細胞をインビボにおいて接触させることは、例えば、RNAi剤を細胞が位置されている組織中またはその付近に注入することによって、または別の領域、例えば、血流（すなわち静脈内）もしくは皮下腔に、その後に、接触される細胞が位置される組織に薬剤が到達するように注入することによって為され得る。例えば、RNAi剤は、RNAi剤を特定の部位、例えば肝臓に誘導するリガンド、例えば、GalNAc3を含む、かつ／またはそれにカップリングされ得る。接触させるためのインビトロでの方法およびインビボでの方法の組合せも可能である。例えば、細胞を*in vitro*においてRNAi剤と接触させ、その後に対象に移してもよい。

【0169】

一実施形態において、細胞をiRNAと接触させることは、細胞内への取り込みまたは吸収を促進または実施することによって「導入すること」または「iRNAを細胞内にデリバリーすること」を含む。iRNAの吸収または取り込みは、自発的拡散性のもしくはは活性な細胞プロセスによって、または助剤もしくはデバイスによって生じ得る。iRNAを細胞内に導入することは、*in vitro*および／または*in vivo*においてであり得る。例えば、*in vivo*導入の場合、iRNAは、組織部位に注入され得るかまたは全身的に投与され得る。インビボデリバリーは、ベータグルカン送達系、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,032,401号および5,607,677号ならびに米国公開第2005/0281781号に記載されるものによっても為され得る。細胞内への*in vitro*導入としては、当技術分野で公知の方法、例えば、エレクトロポレーションおよびリポフェクションなどが挙げられる。さらなるアプローチは、本明細書の下記において説明されるとともに／または当技術分野で公知である。

【0170】

用語「脂溶性物質」または「親油性部分」は、広くは、脂質に対する親和性を有する任意の化合物または化学的部分を指す。親油性部分の親油性を特徴づける1つの方法は、オクタノール／水分配係数 $\log K_{ow}$ によるものであり、 K_{ow} は、オクタノール相における化学物質の濃度の平衡にある2相系の水相におけるその濃度に対する比率である。オクタノール／水分配係数は、実験規模で測定された物質の特性である。しかし、それは、第1原理または経験的方法を使用して算出される、構造成分の化学物質に帰属される係数を使用することによって予測されてもよい（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるTetko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 41:1407-21 (2001)を参照されたい）。それは、水よりも非水性または油性環境を好む物質の傾向（すなわち親水性／親油性バランス）の熱力学的測度を提供する。原理的に、化学物質は、その $\log K_{ow}$ が0を超えると、性質上親油性である。典型的には、親油性部分は、1を超える、1.5を超える、2を超える、3を超える、4を超える、5を超える、または10を超える $\log K_{ow}$ を保有する。例えば、6-アミノヘキサノールの $\log K_{ow}$ は、例えば、およそ0.7と予測される。同様の方法を使用して、コレステリルN-（ヘキサン-6-オール）カルバメートの $\log K_{ow}$ は、10.7と予測される。

【0171】

分子の親油性は、それが担持する官能基に関連して変化し得る。例えば、ヒドロキシル基またはアミン基を親油性部分の末端に付加すると、親油性部分の分配係数（例えば $\log$

10

20

30

40

50

g K_{ow}) 値を増加または低下させることができる。

【0172】

あるいは、1つまたは複数の親油性部分にコンジュゲートされる二本鎖RNA i 剤の疎水性は、そのタンパク質結合特性によって測定することができる。例えば、ある特定の実施形態において、二本鎖RNA i 剤の血漿タンパク質結合アッセイにおける未結合画分は、二本鎖RNA i 剤の相対的疎水性にポジティブに相関し、次いでそれが二本鎖RNA i 剤のサイレンシング活性にポジティブに相関し得るように決定され得る。

【0173】

一実施形態において、判断される血漿タンパク質結合アッセイは、ヒト血清アルブミンタンパク質を使用する電気泳動移動度シフト解析 (EMSA) である。この結合アッセイの例示的なプロトコルは、例えば、PCT/US 2019/031170号に詳細に説明されている。手短には、二重鎖をヒト血清アルブミンとともにインキュベートし、未結合画分を決定した。例示的なアッセイプロトコルは、1×PBSに0、20または90%血清を含む、最終濃度が0.5 μM (全体積20 μL) になるように希釈された10 μMの原液濃度の二重鎖を含む。サンプルを混合し、30秒遠心分離し、続いて室温で10分間インキュベートすることができる。インキュベーション工程が完了すると、4 μLの6×EMSAゲル装填溶液を各サンプルに添加し、30秒遠心分離し、各サンプル12 μLを26ウェルのBioRadの10%PAGE上に装填することができる (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)。ゲルを100ボルトで1時間泳動させることができる。泳動が完了した後に、ゲルをケーシングから除去し、50 mLの10%TBE (トリス塩基、ホウ酸およびEDTA) にて洗浄する。洗浄が完了すると、5 μLのSYBR Goldをゲルに添加し、次いでそれを室温で10分間インキュベートし、ゲルを50 mLの10%TBEにて再度洗浄することができる。この例示的なアッセイにおいて、Gel Doc XR+ゲルドキュメンテーションシステムを使用して、以下のパラメータを用いてゲルを読み取ることができる: イメージングアプリケーションをSYBR Goldに設定し、サイズをBioRad基準ゲルに設定し、露光をインテンスバンド用オートマチックに設定し、画素飽和表示がワンになり、カラーをグレーに設定する。検出、分子量解析および出力をすべて無効とすることができる。ゲルのきれいな写真が得られると、Image Lab 5.2を使用して、画像を処理することができる。レーンおよびバンドを手動で設定してバンド強度を測定することができる。各サンプルのバンド強度をPBSに正規化して、未結合siRNAの画分を得ることができる。この測定により、相対的疎水性を決定することができる。結合アッセイにおける未結合siRNAの画分によって測定される二本鎖RNA i 剤の疎水性は、siRNAのインビボ送達を強化するために、0.15を超える、0.2を超える、0.25を超える、0.3を超える、0.35を超える、0.4を超える、0.45を超える、または0.5を超える。

【0174】

したがって、親油性部分を二本鎖RNA i 剤の内部位置にコンジュゲートすることは、siRNAのインビボ送達を強化するための疎水性の向上をもたらす。

【0175】

用語「脂質ナノ粒子」または「LNP」は、薬学的に活性な分子、例えば、核酸分子、例えば、iRNAまたはiRNAの転写元のプラスミドなどを封入する脂質層を含むベシクルである。LNPは、例えば、米国特許第6,858,225号、同第6,815,432、8,158,601号、および同第8,058,069号に記載されており、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0176】

本明細書において使用される場合、「対象」は、動物、例えば、霊長類 (例えば、ヒト、非ヒト霊長類、例えば、サルおよびチンパンジーなど)、非霊長類 (ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス、ウマおよびクジラなど) を含む哺乳動物、またはトリ (例えば、アヒルもしくはガチョウ) である。

【0177】

実施形態において、対象は、ヒトであり、例えばMYLIP発現の低減によって利益を得ると予想される疾患、障害、または状態のために処置または評価されたヒト；MYLIP発現の低減によって利益を得ると予想される疾患、障害、または状態のリスクがあるヒト；MYLIP発現の低減によって利益を得ると予想される疾患、障害、または状態を有するヒト；および／または本明細書に記載されるようにMYLIP発現の低減によって利益を得ると予想される疾患、障害、または状態のために処置されたヒトである。

【0178】

別の実施形態において、対象は、MYLIP遺伝子についてホモ接合性である。遺伝子の各アレルは、機能性MYLIPタンパク質をコードしてもよい。さらに別の実施形態において、対象は、MYLIP遺伝子についてヘテロ接合性である。対象は、機能性MYLIPタンパク質をコードするアレルおよびMYLIPの機能喪失変異体をコードするアレルを有してもよい。本明細書において使用される場合、「処置している」または「処置」という用語は、限定することなく、MYLIP遺伝子発現および／またはMYLIPタンパク質生成に関連する1つまたは複数の症状の緩和または改善を含む有益なまたは所望の結果を指す。一部の実施形態において、MYLIP遺伝子発現および／またはMYLIPタンパク質産生に関連する症状は、病態または原因がMYLIP発現および／またはMYLIPタンパク質産生とは独立しているが、それにもかかわらずMYLIP遺伝子発現および／またはMYLIPタンパク質産生を阻害することによって補償／処置／対策され得る疾患または障害、例えば、MYLIP関連疾患、例えば、脂質不均衡（例えば、高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えば、アテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）の症状であり得る。「処置」は、処置が行われない場合に予想される生存と比較して、生存を延長することも意味し得る。

【0179】

対象におけるMYLIP遺伝子発現もしくはMYLIPタンパク質生成のレベル、または疾患マーカーもしくは症状の文脈における「より低い」という用語は、当該レベルの統計的に有意な減少を指す。減少は、例えば、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または該当細胞もしくは組織、例えば肝細胞、もしくは他の対象サンプル、例えばそれに由来する血液もしくは血清、尿におけるその検出方法に対する検出のレベル未満であり得る。特定の実施形態において、減少は、少なくとも20%である。

【0180】

本明細書において使用される場合、MYLIP遺伝子の発現の低減から恩恵を受けるであろう、疾患、障害またはその状態に関して使用される場合の「予防」または「予防している」は、対象が、当該疾患、障害または状態に関連する症状、例えば、MYLIP遺伝子発現の症状、例えば、脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）を発症する確率の低減を指す。疾患、障害または状態を発症しないこと、またはそのような疾患、障害または状態に関連する症状の発症の減少（例えば、その疾患または障害に対して臨床的に受け入れられる規模の少なくとも約10%の減少）、または遅延された症状（例えば、肝臓における脂質の蓄積および／または肝臓における脂肪滴の広がり）の提示の遅延（例えば、数日、数週間、数か月、または数年の遅延）は、有効な予防と見なされる。

【0181】

本明細書において使用される場合、「MYLIP関連疾患」という用語は、MYLIP遺伝子発現またはMYLIPタンパク質生成によって引き起こされる、またはそれに関連

する疾患または障害である。「MYLIP 関連疾患」という用語は、MYLIP 遺伝子発現またはタンパク質活性の低下から恩恵を受けるであろう疾患、障害または状態を含む。例えば、「MYLIP 関連疾患」は、MYLIP 遺伝子の発現および／または MYLIP タンパク質の生成の結果として生じるものではないが、それでも MYLIP 遺伝子の発現および／または MYLIP タンパク質の生成の低減により、疾患または障害の症状を緩和する、またはその有害な生理学的影響を抑止または補正することができる疾患または障害を含む。MYLIP 関連疾患または障害を有する、またはそのリスクがある対象は、野生型 MYLIP 遺伝子を示す、かつ／またはその代わりに正常・健常レベルの MYLIP 遺伝子の発現および MYLIP タンパク質生成を示す対象を含む。MYLIP 関連疾患は、対象が、MYLIP 遺伝子にミスセンス突然変異および／または欠失を担持する疾患、またはさもないと MYLIP 発現のさらなる減少から恩恵を受けるであろう、MYLIP の発現が減少した対象における疾患をさらに含む。

10

【0182】

一実施形態において、「MYLIP 関連疾患」は、脂質不均衡（すなわち、脂質異常症）である。脂質異常症は、血液中の脂質（例えば、トリグリセリド、コレステロールおよび／または脂肪リン脂質）の異常な量を指し、例えば、高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症が含まれる。

【0183】

「MYLIP 関連疾患」としては、原発性脂質異常症、高トリグリセリド血症、高脂血症、高リポタンパク血症、またはアテローム性脂質異常症、糖尿病性脂質異常症、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、乳糜血症、混合型脂質異常症（肥満、代謝症候群、糖尿病など）、脂肪栄養症、皮下脂肪萎縮症、ならびに例えば LPL 活性の低下および／または LPL 欠損、LDL 受容体活性の低下および／または LDL 受容体欠損、ApoC2 の変化、ApoE 欠損、ApoB の増加、極低密度リポタンパク質（VLDL）の生成の増加および／または脱離の減少、特定の薬物処置（例えば、グルココルチコイド処置誘発脂質異常症）、任意の遺伝性素因、食事もしくは生活習慣に起因する他の状態を含む脂質異常症などにおける脂質代謝を伴うものが挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0184】

高脂血症、高リポタンパク血症および／または脂質異常症に関連または起因する他の MYLIP 関連疾患または障害としては、心臓血管疾患もしくは障害、例えば、アテローム性動脈硬化症、動脈瘤、高血圧症、狭心症、卒中、脳血管疾患、鬱血性心不全、冠動脈疾患、心筋梗塞または末梢血管疾患が挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0185】

「治療有効量」は、本明細書において使用される場合、MYLIP 関連疾患、障害または状態を有する対象に投与される場合に疾患の効果的な処置（例えば、既存の疾患、または疾患の1つまたは複数の症状を弱化、改善または維持することによる）に十分である RNAi 剤の量を含むことを意図する。「治療有効量」は、RNAi 剤、薬剤がどのように投与されるか、疾患およびその重症度、ならびに病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、先行または並行する処置のタイプ、存在するのであれば、処置される対象の他の個別の特性に応じて変わり得る。

40

【0186】

「予防有効量」は、本明細書において使用される場合、MYLIP 関連疾患、障害または状態を有する対象に投与される場合に疾患、または疾患の1つまたは複数の症状を予防または改善するのに十分である iRNA の量を含むことを意図する。疾患の改善は、疾患の経過を鈍化させること、または後で発症する疾患の重症度を減少させることを含む。「予防有効量」は、iRNA、薬剤がどのように投与されるか、疾患のリスクの程度、ならびに病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、先行または並行する処置のタイプ、存在するのであれば、処置される患者の他の個別の特性に応じて変わり得る。

【0187】

50

「治療有効量」または「予防有効量」は、任意の処置に適用可能な合理的な恩恵／リスク比においていくつかの所望の局所的または全身的效果を生じるRNAi剤の量も包含する。本発明の方法において用いられるiRNAは、そのような処置に適用可能な合理的な恩恵／リスク比を生じるのに十分な量において投与され得る。

【0188】

語句「薬学的に許容される」は、過度の毒性、刺激性、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、合理的な恩恵／リスク比に見合う、健全な医学的判断の範囲内でのヒト対象および動物対象の組織との接触における使用にとって好適な、化合物、材料、組成物、および／または剤形を意味するために本明細書において用いられる。

【0189】

語句「薬学的に許容される担体」は、本明細書において使用される場合、1つの臓器、または身体の一部から、他の臓器、例えば、身体の一部への対象化合物の搬送または輸送に関与する、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクル、例えば、液体または固体充填剤など、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、潤滑剤、タルクマグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸（steric acid））、または溶媒封入材料を意味する。各担体は、製剤の他の原材料に対して適合性であるという意味において「許容され」なければならない、ならびに処置される対象に対して有害であってはならない。薬学的に許容される担体として機能し得る材料のいくつかの例としては、（1）糖、例えば、ラクトース、グルコース、およびショ糖など；（2）デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなど；（3）セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなど；（4）トラガント末；（5）モルト；（6）ゼラチン；（7）潤滑剤、例えば、ステアリン酸（stearate）マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルクなど；（8）賦形剤、例えば、ココアバターおよび座剤ワックスなど；（9）オイル、例えば、落花生油、綿実油、サフラワー油、胡麻油、オリーブ油、トウモロコシ油、および大豆油など；（10）グリコール、例えば、プロピレングリコールなど；（11）ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなど；（12）エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなど；（13）寒天；（14）緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなど；（15）アルギン酸；（16）発熱物質不含水；（17）等張食塩水；（18）リンガー溶液；（19）エチルアルコール；（20）pH緩衝溶液；（21）ポリエステル、ポリカーボネート、および／またはポリ無水物；（22）充填剤（bulking agent）、例えば、ポリペプチドおよびアミノ酸など；（23）血清成分、例えば、血清アルブミン、HDL、およびLDLなど；ならびに（22）医薬製剤に用いられるその他の無毒の親和性物質が挙げられる。

【0190】

用語「試料」は、本明細書において使用される場合、対象から単離された同様の体液、細胞、または組織、ならびに対象内に存在する体液、細胞、または組織のコレクションを包含する。生体液の例としては、血液、血清、および漿膜液、血漿、髄液、眼液、リンパ液、尿、唾液、などが挙げられる。組織試料は、組織、臓器、または局所領域からの試料を含み得る。例えば、試料は、特定の臓器、臓器の一部、またはそれらの臓器内の体液または細胞から得られ得る。ある特定の実施形態において、サンプルは、肝臓（例えば、肝臓全体、または肝臓のある特定の部分、または肝臓におけるある特定の種類の細胞、例えば、肝細胞など）に由来してもよい。一部の実施形態において、「対象に由来するサンプル」は、対象から得られた血液または血漿を指す。

【0191】

用語「置換された」は、所定の構造における1つまたは複数の水素ラジカルを、限定することなく、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロシクリル、ハロ、チオール、アルキルチオ、アリールチオ、アルキルチオアルキル、アリールチオアルキル、アルキルスルホニル、アルキルスルホニルアルキル、アリールスルホニルアルキル、アル

10

20

30

40

50

コキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ハロアルキル、アミノ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアミノアルキル、アリールアミノアルキル、アミノアルキルアミノ、ヒドロキシ、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、アミノカルボニルアルキル、アシル、アラルコキシカルボニル、カルボン酸、スルホン酸、スルホニル、ホスホン酸、アリール、ヘテロアリール、複素環および脂肪族を含む特定の置換基のラジカルで置き換えることを指す。置換基をさらに置換できることが理解される。

【0192】

用語「アルキル」は、N、OまたはSが適宜挿入されていてもよい、示された数の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖であってもよい飽和および不飽和非芳香族炭化水素鎖（これらは、限定することなく、プロピル、アリルまたはプロパルギルを含む）を指す。例えば、「(C1-C6)アルキル」は、線状または分枝状配置の1から6個の炭素原子を有するラジカルを意味する。「(C1-C6)アルキル」は、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、ペンチルおよびヘキシルを含む。ある特定の実施形態において、本開示の親油性部分は、C6-C18アルキル炭化水素鎖を含み得る。

【0193】

用語「アルキレン」は、特定数の炭素原子を有する置換されていてもよい飽和脂肪族分枝または直鎖二価炭化水素ラジカルを指す。例えば、「(C1-C6)アルキレン」は、線状配置の1~6個の炭素原子を有する二価飽和脂肪族ラジカル、例えば、 $[(CH_2)_n]$ （nは1~6の整数である）を意味する。「(C1-C6)アルキレン」は、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレンおよびヘキシレンを含む。あるいは、「(C1-C6)アルキレン」は、分枝状配置の1~6個の炭素原子を有する二価飽和ラジカル、例えば、 $[(CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3))]$ 、 $[(CH_2CH_2CH_2CH_2C(CH_3)_2)]$ および $[(CH_2C(CH_3)_2CH(CH_3))]$ などを意味する。用語「アルキレンジオキシ」は、 $-O-R-O-$ 構造の二価の種（Rはアルキレンを表す）を指す。

【0194】

用語「メルカプト」は、 $-SH$ ラジカルを指す。用語「チオアルコキシ」は、 $-S-$ アルキルラジカルを指す。

【0195】

用語「ハロ」は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素の任意のラジカルを指す。「ハロゲン」および「ハロ」は、本明細書において相互互換的に使用される。

【0196】

本明細書において使用される場合、用語「シクロアルキル」は、別段の指定がなければ、3~14個の炭素原子を有する飽和または不飽和非芳香族炭化水素環基を意味する。例えば、「(C3-C10)シクロアルキル」は、(3~10)員の飽和脂肪族環式炭化水素環の炭化水素ラジカルを意味する。シクロアルキル基の例としては、シクロプロピル、メチルシクロプロピル、2,2-ジメチルシクロブチル、2-エチルシクロペンチルおよびシクロヘキシル等が挙げられるが、それらに限定されない。シクロアルキルは、多数のスピロまたは縮合環を含んでもよい。シクロアルキル基は、正規の価で許容されるように、任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換または五置換されてもよい。

【0197】

本明細書において使用される場合、用語「アルケニル」は、直鎖状または分枝状であり、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含み、別段の指定がなければ2~10個の炭素原子を有する非芳香族炭化水素ラジカルを指す。当該基には、5つ以下の炭素-炭素二重結合が存在してもよい。例えば、「C2~C6」アルケニルは、2~6個の炭素原子を有するアルケニルラジカルとして定義される。アルケニル基の例としては、エテニル、プロ

10

20

30

40

50

ペニル、ブテニルおよびシクロヘキセニルが挙げられるが、それらに限定されない。アルケニル基の直鎖、分枝または環式部分は、二重結合を含んでもよく、正規の価で許容されるように、任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換または五置換されてもよい。用語「シクロアルケニル」は、特定数の炭素原子、および少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する単環式炭化水素基を意味する。

【0198】

本明細書において使用される場合、用語「アルキニル」は、直鎖状または分枝状であり、別段の指定がなければ2~10個の炭素原子を有し、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む炭化水素ラジカルを指す。5つ以下の炭素-炭素三重結合が存在してもよい。したがって、「C2~C6アルキニル」は、2~6個の炭素原子を有するアルキニルラジカルを意味する。アルキニル基の例としては、エチニル、2-プロピニルおよび2-ブチニルが挙げられるが、それらに限定されない。アルキニル基の直鎖または分枝部分は、正規の価で許容されるように三重結合を含んでもよく、正規の価で許容されるように、任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換または五置換されてもよい。

10

【0199】

本明細書において使用される場合、「アルコキシル」または「アルコキシ」は、指定数の炭素原子が酸素架橋を通じて付着された、以上に定義されるアルキル基を指す。例えば、「(C1-C3)アルコキシ」は、メトキシ、エトキシおよびプロポキシを含む。例えば、「(C1-C6)アルコキシ」は、C1、C2、C3、C4、C5およびC6アルコキシ基を含むことを意図する。例えば、「(C1-C8)アルコキシ」は、C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7およびC8アルコキシ基を含むことを意図する。アルコキシの例としては、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、i-プロポキシ、n-ブトキシ、s-ブトキシ、t-ブトキシ、n-ペントキシ、s-ペントキシ、n-ヘプトキシおよびn-オクトキシが挙げられるが、それらに限定されない。「アルキルチオ」は、硫黄連結原子を通じて付着されたアルキルラジカルを意味する。用語「アルキルアミノ」または「アミノアルキル」は、NH連結を通じて付着されたアルキルラジカルを意味する。「ジアルキルアミノ」は、窒素連結原子を通じて付着された2つのアルキルラジカルを意味する。アミノ基は、非置換、一置換または二置換であってもよい。一部の実施形態において、2つのアルキルラジカルは同一である（例えばN,N-ジメチルアミノ）。一部の実施形態において、2つのアルキルラジカルは異なっている（例えばN-エチル-N-メチルアミノ）。

20

30

【0200】

本明細書において使用される場合、「アリール」または「芳香族」は、各環に7個以下の原子を有し、少なくとも1つの環が芳香族である任意の安定な単環式または多環式炭素環を意味する。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、アントラセニル、テトラヒドロナフチル、インダニルおよびビフェニルが挙げられるが、それらに限定されない。アリール置換基が二環式であり、1つの環が非芳香族である場合には、付着は芳香族環を介すると理解される。アリール基は、正規の価で許容されるように、任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換または五置換されてもよい。用語「アリールアルキル」または用語「アラルキル」は、アリールで置換されたアルキルを指す。用語「アリールアルコキシ」は、アリールで置換されたアルコキシを指す。

40

【0201】

「ヘテロ」は、環系における少なくとも1つの炭素原子を、N、SおよびOから選択される少なくとも1つのヘテロ原子で置き換えることを指す。「ヘテロ」は、非環系における少なくとも1つの炭素原子を置き換えることをも指す。ヘテロ環系またはヘテロ非環系は、例えば、1、2または3個の炭素原子がヘテロ原子で置き換えられていてもよい。

【0202】

本明細書において使用される場合、用語「ヘテロアリール」は、各環に7個以下の原子を有し、少なくとも1つの環が芳香族であり、O、NおよびSからなる群から選択される1~4のヘテロ原子を含む安定な単環式または多環式環を表す。ヘテロアリール基の例と

50

しては、アクリジニル、カルバゾイル、シノリニル、キノキサリニル、ピラゾリル、インドリル、ベンゾトリアゾリル、フラニル、チエニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、ベンズイミダゾロニル、ベンゾキサゾロニル、キノリニル、イソキノリニル、ジヒドロイソインドロニル、イミダゾピリジニル、イソインドロニル、インダゾリル、オキサゾリル、オキサジアゾリル、イソキサゾリル、インドリル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、テトラヒドロキノリンが挙げられるが、それらに限定されない。「ヘテロアリアル」は、任意の窒素含有ヘテロアリアル基のN酸化誘導体を含むことも理解される。ヘテロアリアル置換基が二環式であり、1つの環が非芳香族であるか、またはヘテロ原子を含まない場合には、付着は芳香族環を介するか、またはヘテロ原子含有環を介すると理解される。ヘテロアリアル基は、正規の価で許容されるように、任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換または五置換されてもよい。

10

【0203】

本明細書において使用される場合、用語「複素環」、「複素環式」または「ヘテロシクリル」は、多環式基を含む、O、NおよびSからなる群から選択される1～4個のヘテロ原子を含む3～14員の芳香族または非芳香族複素環を意味する。本明細書において使用される場合、用語「複素環式」は、用語「複素環」および「ヘテロシクリル」と同義であるとも考えられ、本明細書に規定される同じ定義を有するとも理解される。「ヘテロシクリル」は、上述のヘテロアリアル、ならびにそのジヒドロおよびテトラヒドロ類似体を含む。ヘテロシクリル基の例としては、アゼチジニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾフラザニル、ベンゾピラゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾチオフエニル、ベンゾオキサゾリル、カルバゾリル、カルボリニル、シンノリニル、フラニル、イミダゾリル、インドリニル、インドリル、インドラジニル、インダゾリル、イソベンゾフラニル、イソインドリル、イソキノリル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、ナフトピリジニル、オキサジアゾリル、オキソオキサゾリジニル、オキサゾリル、オキサゾリン、オキソピラジニル、オキソピロリジニル、オキソモルホリニル、イソオキサゾリン、オキセタニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドピリジニル、ピリダジニル、ピリジル、ピリジノニル、ピリミジル、ピリミジノニル、ピロリル、キナゾリニル、キノリル、キノキサリニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラゾリル、テトラゾロピリジル、チアジアゾリル、チアゾリル、チエニル、トリアゾリル、1,4-ジオキサニル、ヘキサヒドロアゼピニル、ピラジニル、ピペリジニル、ピリジン-2-オニル、ピロリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ジヒドロベンゾイミダゾリル、ジヒドロベンゾフラニル、ジヒドロベンゾチオフエニル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロフラニル、ジヒドロイミダゾリル、ジヒドロインドリル、ジヒドロイソオキサゾリル、ジヒドロイソチアゾリル、ジヒドロオキサジアゾリル、ジヒドロオキサゾリル、ジヒドロピラジニル、ジヒドロピラゾリル、ジヒドロピリジニル、ジヒドロピリミジニル、ジヒドロピロリル、ジヒドロキノリニル、ジヒドロテトラゾリル、ジヒドロチアジアゾリル、ジヒドロチアゾリル、ジヒドロチエニル、ジヒドロトリアゾリル、ジヒドロアゼチジニル、ジオキシドチオモルホリニル、メチレンジオキシベンゾイル、テトラヒドロフラニル、およびテトラヒドロチエニル、ならびにそれらのN酸化誘導体が挙げられるが、それらに限定されない。ヘテロシクリル置換基の付着は、炭素原子を介するか、またはヘテロ原子を介してなされ得る。ヘテロシクリル基は、正規の価で許容されるように、任意の位置で一置換、二置換、三置換、四置換または五置換されてもよい。

20

30

40

【0204】

「ヘテロシクロアルキル」は、炭素のうちの1～4個が酸素、窒素または硫黄などのヘテロ原子で置き換えられたシクロアルキル残基を指す。ラジカルがヘテロシクリル基である複素環の例としては、テトラヒドロピラン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、チアゾリジン、オキサゾール、オキサゾリン、イソキサゾール、ジオキサンおよびテトラヒドロフラン等が挙げられる。

【0205】

50

用語「ヘテロアリール」は、単環式であれば1～3個のヘテロ原子を、二環式であれば1～6個のヘテロ原子を、三環式であれば1～9個のヘテロ原子を有し、前記ヘテロ原子がO、NまたはSから選択され（例えば、炭素原子、および単環式、二環式または三環式の場合はそれぞれ1～3、1～6または1～9個のN、OまたはSのヘテロ原子）、各環の0、1、2、3または4個の原子が置換基で置換されていてもよい芳香族5～8員単環式、8～12員二環式または11～14員三環式環系を指す。ヘテロアリール基の例としては、ピリジル、フリルまたはフラニル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チオフェニルまたはチエニル、キノリニル、インドリルおよびチアゾリルが挙げられる。用語「ヘテロアリールアルキル」または用語「ヘテロアラルキル」は、ヘテロアリールで置換されたアルキルを指す。用語「ヘテロアリールアルコキシ」は、ヘテロアリールで置換されたアルコキシを指す。

10

【0206】

用語「シクロアルキル」は、本明細書において用いられる場合、3～12個の炭素、例えば3～8個の炭素、および例えば3～6個の炭素を有し、シクロアルキル基が適宜さらに置換されていてもよい飽和および部分不飽和環式炭化水素基を含む。シクロアルキル基は、限定することなく、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチルおよびシクロオクチルを含む。

【0207】

用語「アシル」は、いずれも置換基でさらに置換されていてもよいアルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロシクリルカルボニルまたはヘテロアリールカルボニル置換基を指す。

20

【0208】

本明細書において使用される場合、「ケト」は、カルボニル架橋を通じて付着された、本明細書に定義されるアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリールまたはアリール基を指す。

【0209】

ケト基の例としては、アルカノイル（例えば、アセチル、プロピオニル、ブタノイル、ペンタノイル、ヘキサノイル）、アルケノイル（例えばアクリロイル）、アルキノイル（例えば、エチノイル、プロピノイル、ブチノイル、ペンチノイル、ヘキシノイル）、アリロイル（例えばベンゾイル）、ヘテロアリロイル（例えば、ピロロイル、イミダゾロイル、キノリノイル、ピリジノイル）が挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0210】

本明細書において使用される場合、「アルコキシカルボニル」は、カルボニル架橋（すなわち-C(O)O-アルキル）を通じて付着された、以上に定義される任意のアルコキシ基を指す。アルコキシカルボニル基の例としては、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、n-プロポキシカルボニル、t-ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニルまたはn-ペントキシカルボニルが挙げられる。

【0211】

本明細書において使用される場合、「アリールオキシカルボニル」は、オキシカルボニル架橋（すなわち-C(O)O-アリール）を通じて付着された、本明細書に定義される任意のアリール基を指す。アリールオキシカルボニル基の例としては、フェノキシカルボニルおよびナフチルオキシカルボニルが挙げられるが、それらに限定されない。

40

【0212】

本明細書において使用される場合、「ヘテロアリールオキシカルボニル」は、オキシカルボニル架橋（すなわち-C(O)O-ヘテロアリール）を通じて付着された、本明細書に定義される任意のヘテロアリール基を指す。ヘテロアリールオキシカルボニル基の例としては、2-ピリジルオキシカルボニル、2-オキサゾリルオキシカルボニル、4-チアゾリルオキシカルボニルまたはピリミジニルオキシカルボニルが挙げられるが、それらに限定されない。

50

【0213】

用語「オキソ」は、炭素に付着したときはカルボニルを、窒素に付着したときはN酸化物を、硫黄に付着したときはスルホキッドまたはスルホンを形成する酸素原子を指す。

【0214】

本明細書に開示される化合物および組成物は特定の原子（例えば、N、OまたはS原子）を、その化合物または組成物が置かれる環境に応じてプロトン化または脱プロトン化状態で有していてもよいことを当業者は容易に理解する（understand and appreciate）であろう。したがって、本明細書において使用される場合、本明細書に開示される構造は、例えばOH、SHまたはNHなどの特定の官能基がプロトン化または脱プロトン化されてもよいことを想定している。本明細書における開示は、当業者が容易に理解するように、開示されている化合物および組成物を、環境のpHに基づくそれらのプロトン化の状態にかかわらず含めることを意図する。

10

【0215】

II. 発明のiRNA

標的遺伝子の発現を阻害するiRNAが本明細書に記載される。一実施形態において、iRNAは、MYLIP遺伝子の発現を阻害する。一実施形態において、iRNA剤は、細胞、例えば肝細胞、例えば、対象、例えば哺乳動物、例えば、肥満、代謝障害、またはMYLIP関連障害を有するヒトの体内の肝細胞におけるMYLIP遺伝子の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（dsRNA）分子を含む。

【0216】

dsRNAは、MYLIP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対して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む。相補性の領域は、約30ヌクレオチド以下（例えば、約30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19または18ヌクレオチド長以下）である。iRNAは、標的遺伝子を発現する細胞と接触すると、標的遺伝子（例えば、ヒト、霊長類、非霊長類または齧歯類標的遺伝子）の発現を、RNAi剤と接触していない類似細胞またはMYLIP遺伝子に対して相補的でないRNAi剤と比較して少なくとも約10%阻害する。遺伝子の発現は、例えば、PCRもしくは分枝状DNA（bdNA）ベースの方法によって、またはタンパク質ベースの方法によって、例えば、ウェスタンブロッティングまたは流動細胞技術を使用する免疫蛍光分析によってアッセイされてもよい。一実施形態において、ノックダウンのレベルは、ヒトA549細胞においてアッセイされる。一部の実施形態において、ノックダウンのレベルは、初代マウス肝細胞においてアッセイされる。

20

30

【0217】

dsRNAは、2つのRNA鎖を含み、それらは、相補的であり、dsRNAが使用される条件下においてハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。dsRNA（アンチセンス鎖）の1つの鎖は、標的配列に対して実質的に相補的、または完全に相補的である相補性の領域を含む。標的配列は、MYLIP遺伝子の発現時に形成されるmRNAの配列に由来し得る。他方の鎖（センス鎖）は、アンチセンス鎖に対して相補的な領域を含み、それにより、2つの鎖は、好適な条件下で組み合わせられた場合、ハイブリダイズして二重鎖構造を形成する。本明細書の他の箇所で説明され、当技術分野で公知であるように、dsRNAの相補配列は、別々のオリゴヌクレオチド上において相対するように、単一の核酸分子の自己相補領域として含ませることもできる。

40

【0218】

概して、二重鎖構造は、15～30塩基対長、例えば、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20

50

～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22塩基対長である。上記に列記した範囲および長さの中間的な範囲および長さも、本発明の一部であることが想到される。

【0219】

同様に、標的配列に対する相補性の領域は、15から30ヌクレオチド長、例えば、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22ヌクレオチド長である。上記に列記した範囲および長さの中間的な範囲および長さも、本発明の一部であることが想到される。

【0220】

一部の実施形態において、dsRNAのセンスおよびアンチセンス鎖は、各々独立に、約15から約30ヌクレオチド長、または約25から約30ヌクレオチド長であり、例えば、各鎖は、独立して、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、dsRNAは、約15から約23ヌクレオチド長、約25から約30ヌクレオチド長である。概して、dsRNAは、Dicer酵素のための基質として役立つのに十分に長い。例えば、約21～23ヌクレオチドより長いdsRNAは、Dicerのための基質として機能することができることは、当技術分野において周知である。当業者も認識するであろうように、切断のために標的化されるRNAの領域は、ほとんどの場合、より長いRNA分子、多くの場合、mRNA分子の一部である。関連する場合、mRNA標的の「一部」は、RNAi依存性切断（すなわち、RISC経路による切断）のための基質であることを可能にするのに十分な長さのmRNA標的の連続配列である。

【0221】

当業者は、二重鎖領域がdsRNA、主たる機能性部分、例えば、約9から36塩基対、例えば、約10～36、11～36、12～36、13～36、14～36、15～36、9～35、10～35、11～35、12～35、13～35、14～35、15～35、9～34、10～34、11～34、12～34、13～34、14～34、15～34、9～33、10～33、11～33、12～33、13～33、14～33、15～33、9～32、10～32、11～32、12～32、13～32、14～32、15～32、9～31、10～31、11～31、12～31、13～32、14～31、15～31、15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28

、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、または21～22塩基対の二重鎖領域であることをも認識するであろう。したがって、一実施形態において、切断のために所望のRNAを標的化する、例えば、15～30塩基対の、機能的二重鎖へとプロセッシングされる限り、30超の塩基対の二重鎖領域を有するRNA分子またはRNA分子の複合体は、dsRNAである。したがって、当業者は、一実施形態において、miRNAがdsRNAであることを認識するであろう。別の実施形態において、dsRNAは、天然に存在するmiRNAではない。別の実施形態において、MYLIP発現を標的化するために有用なiRNA剤は、より大きなdsRNAの切断によって標的細胞において生成されない。

10

【0222】

本明細書において説明されるdsRNAは、例えば、1、2、3、または4ヌクレオチドの、1つまたは複数の一本鎖ヌクレオチドオーバーハングをさらに含むことができる。少なくとも1つのヌクレオチドオーバーハングを有するdsRNAは、それらの平滑末端同等物と比較して予想外に優れた阻害特性を有することができる。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシヌクレオチド／ヌクレオシドなどのヌクレオチド／ヌクレオシドアナログを含み得るかまたはそれらからなり得る。オーバーハングは、センス鎖上、アンチセンス鎖上、またはそれらの任意の組合せであり得る。その上、オーバーハングのヌクレオチドは、dsRNAのアンチセンス鎖またはセンス鎖のどちらかの5'端上、3'端上、またはその両方に存在し得る。

20

【0223】

dsRNAは、例えば、Biosearch, Applied Biosystems, Inc. などから市販されるような自動化DNA合成装置を使用することによって、以下にさらに説明する当該技術分野において公知の標準的方法によって合成され得る。

【0224】

本発明のiRNA化合物は、二段階手法を使用して調製され得る。最初に、二本鎖RNA分子の個々の鎖が、別々に調製される。次いで、当該成分の鎖がアニールされる。dsRNA化合物の個々の鎖は、溶液相または固相有機合成またはその両方を使用して調製することができる。有機合成は、非天然のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド鎖を容易に調製することができるという利点を提供する。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、溶液相または固相有機合成またはその両方を使用して調製することができる。

30

【0225】

一態様において、本発明のdsRNAは、少なくとも2つのヌクレオチド配列、センス配列およびアンチセンス配列を含む。センス鎖は、表3または4に提示される配列の群から選択され、センス鎖のアンチセンス鎖の対応するヌクレオチド配列は、表3または4の配列の群から選択される。この態様において、2つの配列の一方は、2つの配列の他方に対して相補的であり、この場合、配列の一方は、MYLIP遺伝子の発現の際に生じたmRNAの配列に対して実質的に相補的である。そのため、この態様において、dsRNAは、一方のオリゴヌクレオチドが、表3または4におけるセンス鎖（パッセンジャー鎖）として説明され、第2のオリゴヌクレオチドが、表3または4におけるセンス鎖に対する対応するアンチセンス鎖（ガイド鎖）として説明される、2つのオリゴヌクレオチドを含むであろう。一実施形態において、dsRNAに対する実質的に相補的な配列は、別々のオリゴヌクレオチドに含まれる。別の実施形態において、dsRNAに対する実質的に相補的な配列は、単一のオリゴヌクレオチドに含まれる。

40

【0226】

表3または4における配列は、修飾された、修飾されていない、コンジュゲートされていない、かつ／またはコンジュゲートされた配列として説明されるが、本発明のiRNAのRNA、例えば、本発明のdsRNAは、修飾されていない、コンジュゲートされていない、かつ／または説明されているものとは異なって修飾および／またはコンジュゲート

50

されている表 3 または 4 に記載される配列のうちのいずれか 1 つを含んでもよい。

【0227】

当業者は、約 20～23 塩基対、例えば、21 塩基対の二重鎖構造を有する dsRNA が、RNA 干渉を誘発することにおいて特に有効であると認められていることを十分意識している (Elbashir et al., (2001) EMBO J., 20:6877-6888)。しかしながら、他のものは、より短いまたはより長い RNA 二重鎖構造も有効であり得ることを分かっている [Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226]。上記において説明した実施形態において、本明細書において提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質により、本明細書において説明される dsRNA は、最小 21 ヌクレオチド長さの少なくとも 1 つの鎖を含むことができる。片端または両端のいくつかのヌクレオチドを差し引いたより短い二重鎖は、上記において説明される dsRNA と比較して、同様に有効であり得ることは、合理的に予想することができる。したがって、本明細書において提示される配列のうちの 1 つに由来する少なくとも 15、16、17、18、19 または 20 個以上の連続するヌクレオチドの配列を有し、対照レベルと比較した、MYLP 遺伝子の発現を阻害するそれらの能力が、完全配列を含む dsRNA と少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95% の阻害が異なる dsRNA は、本発明の範囲内にあることが想到される。

【0228】

加えて、表 3 または 4 に記載される RNA 剤は、RISC 媒介切断に感受性である MYLP mRNA 転写物における部位を同定する。そのため、本発明は、この部位内を標的化する iRNA をさらに特徴とする。本明細書において使用される場合、iRNA は、特定の部位内のいずれかにおける mRNA 転写物の切断を促進する場合、mRNA 転写物の特定の部位「内を標的化する」と言われる。そのような iRNA は、概して、遺伝子における選択された配列に隣接する領域から取られた追加のヌクレオチド配列にカップリングした本明細書において提供される配列の 1 つから、少なくとも約 15 の連続するヌクレオチドを含むであろう。

【0229】

標的配列は、概して約 15～30 ヌクレオチド長であるが、任意の所定の標的 RNA の切断を誘導するための個の範囲における特定の配列の適合性には大きなバリエーションがある。本明細書において提示される様々なソフトウェアパッケージおよびガイドラインは、任意の所定の遺伝子標的についての最適な標的の同定のためのガイダンスを提供するが、所定のサイズ（非限定的な例として 21 ヌクレオチド）の「ウィンドウ」または「マスク」を RNA 配列上に文字通りまたは比喩的に（例えば、インシリコを含む）配置して、標的配列として役立つことができるサイズ範囲における配列を同定する経験的手法を取ることでもある。配列「ウィンドウ」を漸進的に初期の標的配列位置の上流または下流に 1 ヌクレオチド移動させることによって、選択された任意の所定の標的サイズについて可能な配列の完全なセットが同定されるまで、次の可能性のある標的配列を同定することができる。このプロセスは、最適に働く配列を同定するために、同定された配列の体系的合成および試験（本明細書に記載される、または当該技術分野において公知のアッセイを使用する）とカップリングされると、iRNA 剤により標的された場合に標的遺伝子発現の最良の阻害を媒介する RNA 配列を同定することができる。したがって、本明細書において同定される配列は有効な標的配列を表すが、ウィンドウを漸進的に所定の配列の上流または下流に 1 ヌクレオチド動かして、同等またはより良好な阻害特性を有する配列を同定することによって、阻害効率のさらなる最適化を達成できることが想到される。

【0230】

さらに、本明細書において同定される任意の配列について、ヌクレオチドを体系的に点かまたは除去してより長いまたはより短い配列を生成し、より長いまたはより短いサイズのウィンドウをその点から標的 RNA の上方または下方に動かすことによって生成された

配列を試験することによって、さらなる最適化が達成され得る。また、新たな候補標的を生成するこの手法を、当該技術分野において公知の、かつ／または本明細書において記載される阻害アッセイにおけるそれらの標的配列に基づくiRNAの有効性についての試験とカップリングすることにより、阻害の効率のさらなる向上をもたらすことができる。さらに、当該最適化された配列は、例えば、本明細書に記載される、もしくは当該技術分野において公知修飾されたヌクレオチドの導入、オーバーハングの追加もしくは変更、または発現阻害剤としての分子をさらに最適化する（例えば、血清安定化または循環半減期を向上させる、熱安定性を向上させる、膜貫通送達を強化する、特定の位置または細胞種に対して標的化する、サイレンシング経路酵素との相互作用を増強する、エンドソームからの放出を増大させる）ための当該技術分野において公知の、かつ／または本明細書に記載される他の修飾によって調整できる。

10

【0231】

本明細書に記載されるiRNA剤は、標的配列に対する1つまたは複数のミスマッチを含み得る。一実施形態において、本明細書に記載されるiRNAは、3つ以下のミスマッチ（すなわち、3、2、1または0個のミスマッチ）を含む。一実施形態において、本明細書に記載されるRNAi剤は、2つ以下のミスマッチを含む。一実施形態において、本明細書に記載されるRNAi剤は、1つ以下のミスマッチを含む。一実施形態において、本明細書に記載されるRNAi剤は、0個のミスマッチを含む。ある特定の実施形態において、RNAi剤のアンチセンス鎖が標的配列に対するミスマッチを含むときは、ミスマッチを、相補性の領域の5'または3'末端から最後の5つのヌクレオチド内に適宜限定することができ、20
ることができる。例えば、当該実施形態において、23ヌクレオチドRNAi剤では、MYLIP遺伝子の領域に対して相補的な鎖は、概して、中央の13個のヌクレオチド内にミスマッチを含まない。本明細書に記載される方法、または当該技術分野において公知の方法を使用して、標的配列に対するミスマッチを含むRNAi剤がMYLIP遺伝子の発現を阻害することにおいて有効であるかどうかを判断することができる。例えば、Jackson et al. (Nat. Biotechnol. 2003; 21: 635-637) は、センス鎖の12~18 ntでのみMAPK14 siRNAとの配列同一性を有する小さな遺伝子のセットの発現が類似の動態でMAPK14に下方制御されると記載した。同様に、qPCRおよびレポーターアッセイを使用したLin et al. (Nucleic Acids Res. 2005; 33(14): 4527-4535) は、siRNAと標的との7 nt相補が、標的のmRNA分解を引き起こすのに十分であることを示した。特に、MYLIP遺伝子における特定の相補性の領域が、集団内に多形配列バリエーションを有することが知られる場合は、MYLIP遺伝子の発現を阻害することにおけるミスマッチを有するiRNAの効果を考慮することが重要である。

20

30

【0232】

RNA標的は、そのRNA標的の他の領域より、領域へのRNAi剤の結合により誘発されるRNA干渉を介するRNA標的の媒介切断に対して比較的より感受性または適性のある標的RNAヌクレオチド配列の領域またはスパンを有していることがある。当該「ホットスポット領域」（または単に「ホットスポット」）内のRNA干渉に対する感受性の増大は、領域を標的とするiRNA剤は、標的RNAの他の領域を標的とするiRNA剤よりiRNA干渉を誘発する有効性が高い可能性が大きいことを意味する。例えば、理論に縛られることはないが、標的RNAの標的領域のアクセシビリティは、その領域を標的とするiRNA剤の有効性に影響を及ぼし、一部のホットスポット領域のアクセシビリティが高められる場合がある。例えば、RNA標的を（例えば、ホットスポット領域内または近傍に）形成する二次構造は、標的領域に結合し、RNA干渉を誘発するiRNA剤の能力に影響を与える場合がある。

40

【0233】

本発明のある特定の態様によれば、iRNA剤は、標的RNAの任意の同定された部分（例えば特定のエクソン）を含めて、本明細書に記載される標的RNAのうちのいずれかのホットスポット領域を標的とするように設計されてもよい。本明細書において使用される場合、ホットスポット領域は、RNAi剤を使用する標的化が、同じ標的RNAの他の領

50

域の標的化と比較して明らかに高い有効サイレンシングの確率をもたらす標的RNA配列のおよそ19~200、19~150、19~100、19~75、19~50、21~200、21~150、21~100、21~75、21~50、50~200、50~150、50~100、50~75、75~200、75~150、75~100、100~200または100~150ヌクレオチド領域を指すものであってもよい。本発明のある特定の態様によれば、ホットスポット領域は、標的RNAの限定された領域、一部のケースでは、例えば、標的RNAの長さの半分未満、例えば、標的RNAの長さの約5%、10%、15%、20%、25%または30%を含む、標的化の実質的に限定された領域を含んでもよい。逆に、ホットスポットが比較される他の領域は、標的RNAの長さの少なくとも半分以上を累積的に含んでもよい。例えば、他の領域は、標的RNAの長さの少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%を累積的に含んでもよい。

10

【0234】

標的RNAの比較される領域は、インビトロまたはインビボスクリーニングアッセイから得られる有効性データを使用してホットスポットを同定するために実験的に評価されてもよい。例えば、標的RNAをスパンする様々な領域を標的とするRNAi剤は、各領域に結合する有効iRNA剤の頻度（例えば、mRNA発現またはタンパク質発現などによって測定される、標的遺伝子発現が阻害される量）について比較されてもよい。概して、ホットスポットは、RNA標的の限定された領域に結合する多数の有効RNAi剤のクラスタリングを観察することによって認識することができる。ホットスポットは、ホットスポットとして同定される標的領域の少なくとも約60%、例えば、領域の両末端を含む、領域の長さの約70%、約80%、約90%または約95%以上（すなわち、領域の各末端のヌクレオチドを含む、領域内のヌクレオチドの少なくとも約60%、70%、80%、90%または95%以上がiRNA剤の標的とされた）を累積的にスパンするiRNA剤の有効性を観察することによってそのまま十分に特徴づけられてもよい。本発明の一部の態様によれば、領域に対する少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%の阻害（例えば、約50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下または5%以下のmRNAの残留）を示すiRNA剤は、有効性があると同定されてもよい。

20

30

【0235】

定義されたサイズ（例えば、25、30、40、50、60、70、80、90または100、110、120、130、140、150、160、170、180、190または200 nt）の異なる領域にわたる阻害測定の定量的比較を使用して、RNA領域の標的化に対する適性を評価してもよい。例えば、各領域に対して阻害の平均レベルを決定してもよく、各領域の平均を比較してもよい。ホットスポット領域内の阻害の平均レベルは、すべての評価された領域についての平均の平均より実質的に高くてもよい。一部の態様によれば、ホットスポット領域における阻害の平均レベルは、平均の平均より少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%高くてもよい。一部の態様によれば、ホットスポット領域における阻害の平均レベルは、平均の平均を超える少なくとも約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0標準偏差であってもよい。阻害の平均レベルは、統計的有意（例えば $p < 0.05$ ）量だけ高くてもよい。一部の態様によれば、ホットスポット領域内の各阻害測定値は、閾値量を超えてもよい（例えば、mRNA残留の閾値量か、またはそれ以下）。一部の態様によれば、領域内の各阻害測定値は、すべての測定領域にわたるすべての阻害測定値の平均より実質的に高くてもよい。例えば、ホットスポット領域における各阻害測定値は、すべての測定値の平均より少なくとも約10%、20%、30%、40%または50%高くてもよい。一部の態様によれば、各阻害測定値は、すべての阻害測定値の平均を超える少なくとも約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0標準偏差であってもよい。各阻害測定値は、すべての阻害測定値

40

50

より統計的有意（例えば $p < 0.05$ ）量だけ高くてもよい。ホットスポットを評価するための標準は、両立できる場合は上記標準の様々な組合せを含んでもよい（例えば、少なくとも第1の量とほぼ同じで、第1の量より小さい第2の量の閾値レベル未満の阻害測定値を有さない阻害の平均レベル）。

【0236】

したがって、標的RNAのホットスポット領域を標的とする、本明細書において記載される特定の例示的iRNA剤を含む任意のiRNA剤は、当該ホットスポット領域の標的化が、ホットスポット領域でない領域の標的化と比較して強い阻害応答を示しやすいため、標的mRNAのRNA干渉を誘発するために好ましく選択されてもよいことが明示的に想到される。実質的に（例えば、標的配列の長さの少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%）重複するか、または好ましくは、完全にホットスポット領域内に存在する標的配列を標的とするRNAi剤は、ホットスポット領域を標的とすると考えてもよい。本発明のRNA標的のホットスポット領域は、当該ホットスポット領域の範囲が明確に指定されているか否かにかかわらず、本明細書の他の箇所に記載される標準のいずれかを含めて、本明細書に開示されるデータが、有効なRNAi剤の標的とされる頻度がより高いことを示す任意の領域を含んでもよい。

10

【0237】

様々な実施形態において、本発明のdsRNA剤は、MYLIPをコードするmRNAのホットスポット領域を標的とする。一実施形態では、ホットスポット領域は、配列番号1のヌクレオチド341～417を含む。dsRNA剤は、AD-1753624、AD-1753557、AD-1753536、およびAD-1753520からなる群から選択し得る。

20

【0238】

III. 発明の修飾されたiRNA

一実施形態において、本発明のiRNAのRNA、例えば、dsRNAは、修飾されておらず、修飾されたヌクレオチド、例えば、当該技術分野において公知の、かつ本明細書に記載される化学的修飾および／またはコンジュゲーションを含まない。別の実施形態において、本発明のiRNAのRNA、例えば、dsRNAは、安定性または他の有益な特性を向上させるために化学的に修飾される。本発明のある特定の実施形態において、本発明のiRNAのヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾される。本発明の他の実施形態において、本発明のiRNAのヌクレオチドのうちのすべてが修飾される。「ヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾される」本発明のiRNAは、完全にではなく概ね修飾され、5、4、3、2または1以下の修飾されていないヌクレオチドを含み得る。

30

【0239】

本発明の一部の態様において、本発明のiRNAのヌクレオチドのうちの実質的にすべてが修飾されており、iRNA剤は、2'-フルオロ修飾（例えば、9以下の2'-フルオロ修飾、8以下の2'-フルオロ修飾、7以下の2'-フルオロ修飾、6以下の2'-フルオロ修飾、5以下の2'-フルオロ修飾、4以下の2'-フルオロ修飾、3以下の2'-フルオロ修飾、または2以下の2'-フルオロ修飾）を含む10以下のヌクレオチドを含む。例えば、一部の実施形態において、センス鎖は、2'-フルオロ修飾（例えば、3以下の2'-フルオロ修飾、または2以下の2'-フルオロ修飾）を含む4以下のヌクレオチドを含む。他の実施形態において、アンチセンス鎖は、2'-フルオロ修飾（例えば、5以下の2'-フルオロ修飾、4以下の2'-フルオロ修飾、4以下の2'-フルオロ修飾、または2以下の2'-フルオロ修飾）を含む6以下のヌクレオチドを含む。

40

【0240】

本発明の他の態様において、本発明のiRNAのヌクレオチドのうちのすべてが修飾されており、iRNA剤は、2'-フルオロ修飾（例えば、9以下の2'-フルオロ修飾、8以下の2'-フルオロ修飾、7以下の2'-フルオロ修飾、6以下の2'-フルオロ修飾、5以下の2'-フルオロ修飾、4以下の2'-フルオロ修飾、5以下の2'-フルオロ修飾

50

、4以下の2'-フルオロ修飾、3以下の2'-フルオロ修飾、または2以下の2'-フルオロ修飾)を含む10以下のヌクレオチドを含む。

【0241】

一実施形態において、本発明の二本鎖RNA i 剤は、アンチセンス鎖の5'ヌクレオチドにおいて5'-ホスフェートまたは5'-ホスフェートミミックをさらに含む。別の実施形態において、二本鎖RNA i 剤は、アンチセンス鎖の5'ヌクレオチドにおいて5'-ホスフェートミミックをさらに含む。具体的な実施形態において、5'-ホスフェートミミックは、5'-ビニルホスフェート(5'-VP)である。一実施形態において、ホスフェートミミックは、5'-シクロプロピルホスホネート(VP)である。一部の実施形態において、二本鎖iRNA剤のアンチセンス鎖の5'端は、5'-ビニルホスホネート(VP) 10

【0242】

一実施形態において、修飾されたヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、デオキシヌクレオチド、2'-O-メチル修飾されたヌクレオチド、2'-フルオロ修飾されたヌクレオチド、2'-デオキシ修飾されたヌクレオチド、グリコール修飾されたヌクレオチド(GNA)、例えば、Ggn、Cgn、TgnまたはAggn、2'ホスフェートを有するヌクレオチド、例えば、G2p、C2p、A2pまたはU2p、およびビニル-ホスホネートヌクレオチド；ならびにそれらの組合せからなる群から選択される。他の実施形態において、表3および4の二重鎖の各々を個別に修飾して、本開示の別の二本鎖iRNA剤を提供してもよい。一例において、3'末端L96リガンドを除去し、3つの3'末端ヌクレオチド間の2つのホスホジエステルヌクレオチド間連結をホスホロチオエートヌクレオチド間連結と交換することによって各センス二重鎖の3'末端を修飾してもよい。すなわち、式： 20

$$5' - N_1 - \dots - N_{n-2} N_{n-1} N_n L96 3'$$

のセンス配列の3つの3'末端ヌクレオチド(N)を

$$5' - N_1 - \dots - N_{n-2} S N_{n-1} S N_n 3'$$

と置き換えてもよい。

すなわち、例えば、アンチセンス配列を変更しないまま、AD-1753226、センス配列：

csgscagagGfcUfGfCfagccuucgauL96 (配列番号287)を 30

、

csgscagagGfcUfGfCfagccuucgsasu (配列番号692)

で置き換えて、本開示の別の二本鎖iRNA剤を提供してもよい。

【0243】

本発明において特徴とされる核酸は、当技術分野で十分に確立された方法、例えば、参照により本明細書に組み込まれる"Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されるものによって合成および／または修飾できる。修飾には、例えば、末端修飾、例えば、5'端修飾(リン酸化、コンジュゲーション、反転連結)または3'端修飾(コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、反転連結など)、塩基修飾、例えば、安定化塩基、不安定化塩基もしくは拡大されたレパートリーのパートナーと塩基対合する塩基との置き換え、塩基の除去(脱塩基ヌクレオチド)またはコンジュゲートされた塩基、糖修飾(例えば、2'位置または4'位置での)もしくは糖の置き換え、および／またはホスホジエステル結合の修飾もしくは置き換えを含む骨格修飾が含まれる。本明細書に記載される実施形態において有用なiRNA化合物の具体例としては、修飾された骨格を含み、天然のヌクレオシド間連結を含まないRNAが挙げられるが、それらに限定されない。修飾された骨格を有するRNAとして、中でも、骨格中にリン原子を有さないものが挙げられる。本明細書の目的上、時には、当技術分野で言及されるように、そのヌクレオシド間骨格中にリン原子を有さない修飾されたRNAもまた、オリゴヌクレオシドであると考え 50

間骨格中にリン原子を有する。

【0244】

修飾されたRNA骨格として、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネートならびに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ロアミデートを含むホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、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および通常の3'-5'連結を有するボラノホスフェート、2'-5'連結されたこれらの類似体およびヌクレオシド単位の隣接する対が、3'-5'から5'-3'または2'-5'から5'-2'に連結される反転した極性を有するものが挙げられる。種々の塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。本発明の一部の実施形態において、本発明のdsRNA剤は、遊離酸形態である。本発明の他の実施形態において、本発明のdsRNA剤は、塩形態である。一実施形態において、本発明のdsRNA剤は、ナトリウム塩形態である。ある特定の実施形態において、本発明のdsRNA剤がナトリウム塩形態である場合には、ナトリウムイオンが、薬剤中に存在するホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート基の実質的にすべてに対する対イオンとして薬剤中に存在する。ホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート連結の実質的にすべてがナトリウム対イオンを有する薬剤は、5、4、3、2または1つ以下の、ナトリウム対イオンを有さないホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態において、本発明のdsRNA剤がナトリウム塩形態である場合は、ナトリウムイオンは、薬剤中に存在するホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート基のすべての対イオンとして存在する。

20

【0245】

上記のリン含有連結の調製を教示する代表的な米国特許として、それだけには限らないが、米国特許第3,687,808号、同4,469,863号、同4,476,301号、同5,023,243号、同5,177,195号、同5,188,897号、同5,264,423号、同5,276,019号、同5,278,302号、同5,286,717号、同5,321,131号、同5,399,676号、同5,405,939号、同5,453,496号、同5,455,233号、同5,466,677号、同5,476,925号、同5,519,126号、同5,536,821号、同5,541,316号、同5,550,111号、同5,563,253号、同5,571,799号、同5,587,361号、同5,625,050号、同6,028,188号、同6,124,445号、同6,160,109号、同6,169,170号、同6,172,209号、同6,239,265号、同6,277,603号、同6,326,199号、同6,346,614号、同6,444,423号、同6,531,590号、同6,534,639号、同6,608,035号、同6,683,167号、同6,858,715号、同6,867,294号、同6,878,805号、同7,015,315号、同7,041,816号、同7,273,933号、同7,321,029号および米国再発行特許第RE39464号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0246】

中にリン原子を含まない修飾されたRNA骨格は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合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連結または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間連結によって形成される骨格を有する。これらとして、モルホリノ連結（幾分かはヌクレオシドの糖部分から形成される）、シロキサン骨格、スルフィド、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、スルファメート骨格、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、アミド骨格を有するものならびに混合N、O、SおよびCH₂構成成分部分を有する他のものが挙げられ

50

る。

【0247】

上記のオリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許として、それだけには限らないが、米国特許第5,034,506号、同5,166,315号、同5,185,444号、同5,214,134号、同5,216,141号、同5,235,033号、同5,64,562号、同5,264,564号、同5,405,938号、同5,434,257号、同5,466,677号、同5,470,967号、同5,489,677号、同5,541,307号、同5,561,225号、同5,596,086号、同5,602,240号、同5,608,046号、同5,610,289号、同5,618,704号、同5,623,070号、同5,663,312号、同5,633,360号、同5,677,437号および同5,677,439号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0248】

他の実施形態において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間連結、すなわち骨格の両方が代替の基と置き換えられた好適なRNAミメティックが、iRNAにおける使用のために想到される。核酸塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのこのようなオリゴマー化合物、優れたハイブリダイゼーション特性を有すると分かっているRNAミメティックは、ペプチド核酸(PNA)と呼ばれる。PNA化合物では、RNAの糖骨格は、アミド含有骨格、特に、アミノエチルグリシン骨格と置き換えられている。核酸塩基は、保持され、直接的または間接的に骨格のアミド部分のアザ窒素原子に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許として、それだけには限らないが、米国特許第5,539,082号、同5,714,331号および同5,719,262号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明のiRNAにおいて使用するために適したさらなるPNA化合物は、例えば、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に記載されている。

20

【0249】

本発明において特徴づけられる一部の実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するRNA、ならびにヘテロ原子骨格、特に、以上で参照した米国特許第5,489,677号の $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [メチレン(メチルイミノ)またはNMI骨格として知られる]、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ および $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、および以上で参照した米国特許第5,602,240号のアミド骨格を有するオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、本明細書において特徴とされるRNAは、上記で参照された米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有する。天然ホスホジエステル骨格が $-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{OCH}_2-$ として表され得る。

30

【0250】

修飾されたRNAはまた、1つまたは複数の置換された糖部分を含有し得る。本明細書において特徴とされるiRNA、例えば、dsRNAは、2'位置に以下： OH ； F ； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ もしくは $\text{N}-$ アルキル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ もしくは $\text{N}-$ アルケニル； $\text{O}-$ 、 $\text{S}-$ もしくは $\text{N}-$ アルキニルまたは $\text{O}-$ アルキル- $\text{O}-$ アルキルのうち1つを含む場合があり、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキルまたは $\text{C}_2\sim\text{C}_{10}$ アルケニルおよびアルキニルであり得る。例示的な適した修飾として、 $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ および $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]$ $_2$ が挙げられ、式中、 n および m は、1～約10である。他の実施形態において、dsRNAは、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキル、置換されたアルキル、アルカリル、アラルキル、 $\text{O}-$ アルカリルまたは $\text{O}-$ アラルキル、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 SOCH_3 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロア

40

50

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、置換されたシリル、RNA切断基、受容体基、インターカレータ、iRNAの薬物動態特性を向上させるための基、またはiRNAの薬力学的特性を向上させるための基、および類似の特性を有する置換基のうちの1つを2'位に含む。一部の実施形態において、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2'-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られる2'-O-CH₂CH₂OCH₃) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504)、すなわち、アルコキシ-アルコキシ基を含む。別の例示的修飾として、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、本明細書において以下に実施例において記載されるような2'-DMAOEとしても知られるO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても当技術分野で公知の)、すなわち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂がある。さらなる例示的修飾として、5'-Me-2'-Fヌクレオチド、5'-Me-2'-OMeヌクレオチド、5'-Me-2'-デオキシヌクレオチド(これら3つのファミリー中のRおよびS異性体の両方)、2'-アルコキシアルキルおよび2'-NMA(N-メチルアセトアミド)が挙げられる。

【0251】

他の修飾として、2'-メトキシ(2'-OC₃H₇)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が挙げられる。同様の修飾はまた、iRNAのRNA上の他の位置、特に、3'末端ヌクレオチド上または2'-5'連結dsRNA中の糖の3'位置および5'末端ヌクレオチドの5'位置でも行うことができる。iRNAはまた、糖ミメティック、例えば、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分を有し得る。このような修飾された糖構造の調製を教示する代表的な米国特許として、それだけには限らないが、米国特許第4,981,957号、同5,118,800号、同5,319,080号、同5,359,044号、同5,393,878号、同5,446,137号、同5,466,786号、同5,514,785号、同5,519,134号、同5,567,811号、同5,576,427号、同5,591,722号、同5,597,909号、同5,610,300号、同5,627,053号、同5,639,873号、同5,646,265号、同5,658,873号、同5,670,633号および同5,700,920号が挙げられ、それらのうちある特定のものは、本出願と共同所有されている。前記のものの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0252】

本発明のiRNAはまた、核酸塩基(当技術分野では簡単に「塩基」と呼ばれることも多い)修飾または置換を含み得る。本明細書で使用される場合、「未修飾の」または「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)、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、他の合成および天然核酸塩基、例えば、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(anal)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(daazaadenine)ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンが含まれる。さらなる修飾された核酸塩基には、米国特許第3,687,808号に開示されるもの、Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 200

8において開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990において開示されるもの、Englisch et al., (1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613によって開示されるものおよびSanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993によって開示されるものが含まれる。これらの修飾された核酸塩基のうちある特定のものは、本発明において特徴とされるオリゴマー化合物の結合親和性を増大するために特に有用である。これらには、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびに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、核酸二重鎖安定性を0.6~1.2℃だけ増大すると分かっており (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、さらにより詳しくは、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合に例示的塩基置換である。

10

【0253】

上記の修飾された核酸塩基ならびに他の修飾された核酸塩基のある特定のものの調製を教示する代表的な米国特許として、それだけには限らないが、上記の米国特許第3,687,808号、同4,845,205号、同5,130,302号、同5,134,066号、同5,175,273号、同5,367,066号、同5,432,272号、同5,457,187号、同5,459,255号、同5,484,908号、同5,502,177号、同5,525,711号、同5,552,540号、同5,587,469号、同5,594,121号、同5,596,091号、同5,614,617号、同5,681,941号、同5,750,692号、同6,015,886号、同6,147,200号、同6,166,197号、同6,222,025号、同6,235,887号、同6,380,368号、同6,528,640号、同6,639,062号、同6,617,438号、同7,045,610号、同7,427,672号および同7,495,088号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0254】

本発明のiRNAを修飾して、1つまたは複数のロックド核酸(LNA)を含めることもできる。ロックド核酸は、リボース部分が2'および4'炭素を接続する追加の架橋を含む、修飾されたリボース部分を有するヌクレオチドである。この構造は、リボースを3'-エンド構造立体配座に効率的に「ロックする」。siRNAへのロックド核酸の付加は、血清におけるsiRNA安定性を増大し、オフターゲット効果を低減すると分かっている [Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447, Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843, Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193]。

30

【0255】

本発明のiRNAを修飾して、1つまたは複数の二環式糖部分を含めることもできる。「二環式糖」は、2つの原子を架橋することによって修飾されたフラノシル環である。「二環式ヌクレオシド」(「BNA」)は、糖環の2つの炭素原子を接続し、それによって二環式環構造を形成する架橋を含む糖部分を有するヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、架橋は、糖環の4'-炭素と2'-炭素を接続する。したがって、一部の実施形態において、本発明の薬剤は、1つまたは複数のロックド核酸(LNA)を含み得る。ロックド核酸は、リボース部分が2'および4'炭素を接続する追加の架橋を含む、修飾されたリボース部分を有するヌクレオチドである。言い換えれば、LNAは、4'-CH₂-O-2'架橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオチドである。この構造は、リボースを3'-エンド構造立体配座に効率的に「ロックする」。siRNAへのロックド核酸の付加は、血清におけるsiRNA安定性を増大し、オフターゲット効果を低減すると分か

40

50

っている [Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447、Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843、Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193]。本発明のポリヌクレオチドにおいて使用するための二環式ヌクレオシドの例として、制限するものではないが、4'と2'リボシル環原子の間の架橋を含むヌクレオシドが挙げられる。ある特定の実施形態において、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド剤として、4'から2'への架橋を含む1つまたは複数の二環式ヌクレオシドが挙げられる。このような4'から2'へ架橋された二環式ヌクレオシドの例として、それだけには限らないが、4'-(CH₂)-O-2' (LNA)、4'-(CH₂)-S-2'、4'-(CH₂)₂-O-2' (EN A)、4'-(CH(CH₃))-O-2' (「拘束エチル」または「c E t」とも呼ばれる) および 4'-(CH(CH₂OCH₃))-O-2' (およびその類似体、例えば、米国特許第7, 399, 845号を参照されたい)、4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (およびその類似体、例えば、米国特許第8, 278, 283号を参照されたい)、4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (およびその類似体、例えば、米国特許第8, 278, 425号を参照されたい)、4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (例えば、米国特許公開第2004/0171570号を参照されたい)、4'-CH₂-N(R)-O-2' [式中、Rは、H、C₁~C₁₂アルキルまたは保護基である] (例えば、米国特許第7, 427, 672号を参照されたい)、4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (例えば、Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照されたい) および 4'-CH₂-C(-CH₂)-2' (およびその類似体、例えば、米国特許第8, 278, 426号を参照されたい) が挙げられる。前記の各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0256】

ロックド核酸ヌクレオチドの調製を教示するさらなる代表的な米国特許および米国特許公開として、それだけには限らないが、以下：米国特許第6, 268, 490号、同6, 525, 191号、同6, 670, 461号、同6, 770, 748号、同6, 794, 499号、同6, 998, 484号、同7, 053, 207号、同7, 034, 133号、同7, 084, 125号、同7, 399, 845号、同7, 427, 672号、同7, 569, 686号、同7, 741, 457号、同8, 022, 193号、同8, 030, 467号、同8, 278, 425号、同8, 278, 426号、同8, 278, 283号、US 2008/0039618 および US 2009/0012281 が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0257】

例えば、 α -L-リボフラノースおよび β -D-リボフラノースを含む1つまたは複数の立体化学的糖立体配置を有する前記の二環式ヌクレオシドのいずれも、調製できる (WO 99/14226を参照されたい)。

【0258】

本発明のiRNAをまた、1または複数の拘束エチルヌクレオチドを含むように修飾できる。本明細書で使用される場合、「拘束エチルヌクレオチド」または「c E t」は、4'-CH(CH₃)-O~2' 架橋を含む二環式糖部分を含むロックド核酸である。一実施形態において、拘束エチルヌクレオチドは、S立体配座にあり、本明細書において「S-c E t」と呼ばれる。

【0259】

本発明のiRNAはまた、1つまたは複数の「立体配座制限ヌクレオチド」(「CRN」)を含み得る。CRNは、リボースのC2'とC4'炭素を、またはリボースのC3とC5'炭素を接続するリンカーを有するヌクレオチド類似体である。CRNは、リボース環を安定な立体配座にロックし、mRNAに対するハイブリダイゼーション親和性を増大する。リンカーは、酸素を安定性および親和性のために最適な位置に配置するのに十分な長さのものであり、その結果、リボース環パッキングを少なくなる。

【0260】

上記のCRNのある特定のものの調製を教示する代表的な刊行物として、それだけには限らないが、米国特許公開第2013/0190383号およびPCT公開WO2013/036868が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0261】

一部の実施形態において、本発明のiRNAは、UNA（アンロックド核酸）ヌクレオチドである1つまたは複数のモノマーを含む。UNAは、アンロックド非環式核酸であり、糖の結合のいずれも除去されており、アンロックド「糖」残基を形成する。一例では、UNAはまた、C1'-C4'の間の結合（すなわち、C1'とC4'炭素の間の共有結合の炭素-酸素-炭素結合）が除去されているモノマーも包含する。別の例では、糖のC2'-C3'結合（すなわち、C2'とC3'炭素の間の共有結合の炭素-炭素結合）が除去されている〔参照により本明細書に組み込まれる、Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008)およびFluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039を参照されたい〕。

10

【0262】

UNAの調製を教示する代表的な米国の刊行物として、それだけには限らないが、米国特許第8,314,227号および米国特許公開第2013/0096289号、同2013/0011922号および同2011/0313020号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0263】

本開示のRNAi剤は、1つまたは複数の「シクロヘキセン核酸」または（「CeNA」）をも含んでもよい。CeNAは、DNAのフラノース部分のシクロヘキセン環での置き換えを有するヌクレオチド類似体である。シクロヘキセニルヌクレオシドをDNA鎖に含めると、DNA/RNAハイブリッドの安定性が高められる。CeNAは、血清における分解に対して安定であり、CeNA/RNAハイブリッドは、大腸菌リボヌクレアーゼHを活性化してRNA鎖の切断をもたらすことができる（参照により本明細書に組み込まれるWang et al., Am. Chem. Soc. 2000, 122, 36, 8595-8602を参照されたい）。

20

【0264】

RNA分子の末端への潜在的に安定化する修飾として、N-（アセチルアミノカプロイル）-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-C6-NHAc）、N-（カプロイル-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-C6）、N-（アセチル-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-NHAc）、チミジン-2'-O-デオキシチミジン（エーテル）、N-（アミノカプロイル）-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-C6-アミノ）、2-デオキサノイル-ウリジン-3'-ホスフェート、反転塩基dT（idT）および他のものを挙げるができる。この修飾の開示内容は、PCT公開第WO2011/005861号に見出すことができる。

30

【0265】

本発明のiRNAの他の修飾として、5'ホスフェートまたは5'ホスフェートミミック、例えば、RNAi剤のアンチセンス鎖上の5'末端ホスフェートまたはホスフェートミミックが挙げられる。適したホスフェートミミックは、例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2012/0157511号に開示されている。

40

【0266】

ある特定の実施形態において、本発明のRNAi剤は、表3または4に記載される薬剤の群から選択されるMYLIP遺伝子の発現を阻害する薬剤である。これらの薬剤のうちのいずれかは、リガンドをさらに含んでもよい。

【0267】

A. 本発明のモチーフを含む修飾されたiRNA

本発明のある特定の態様において、本発明の二本鎖RNAi剤は、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、2012年11月16日に出願された国際公開第

50

2013/075035号に開示される化学修飾を有する薬剤を含む。

【0268】

したがって、本発明は、インピボで標的遺伝子（すなわち、MYLIP遺伝子）の発現を阻害可能な二本鎖RNA i剤を提供する。RNA i剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。RNA i剤の各鎖は、12～30ヌクレオチド長の範囲であってもよい。例えば、各鎖は、14～30ヌクレオチド長、17～30ヌクレオチド長、25～30ヌクレオチド長、27～30ヌクレオチド長、17～23ヌクレオチド長、17～21ヌクレオチド長、17～19ヌクレオチド長、19～25ヌクレオチド長、19～23ヌクレオチド長、19～21ヌクレオチド長、21～25ヌクレオチド長、または21～23ヌクレオチド長であってもよい。一実施形態において、センス鎖は、21ヌクレオチド長である。一実施形態において、アンチセンス鎖は、23ヌクレオチド長である。

10

【0269】

センス鎖およびアンチセンス鎖は通常、「RNA i剤」とも本明細書において呼ばれる二重鎖の二本鎖RNA（「dsRNA」）を形成する。RNA i剤の二重鎖領域は、12～30ヌクレオチド対の長さであり得る。例えば、二重鎖領域は、14～30ヌクレオチド対の長さ、17～30ヌクレオチド対の長さ、27～30ヌクレオチド対の長さ、17～23ヌクレオチド対の長さ、17～21ヌクレオチド対の長さ、17～19ヌクレオチド対の長さ、19～25ヌクレオチド対の長さ、19～23ヌクレオチド対の長さ、19～21ヌクレオチド対の長さ、21～25ヌクレオチド対の長さまたは21～23ヌクレオチド対の長さであり得る。別の例では、二重鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26および27ヌクレオチド長から選択される。

20

【0270】

一実施形態において、RNA i剤は、一方または両方の鎖の3'端、5'端または両端に1つまたは複数のオーバーハング領域および／またはキャッピング基を含有し得る。オーバーハングは、1～6ヌクレオチド長、例えば、2～6ヌクレオチド長、1～5ヌクレオチド長、2～5ヌクレオチド長、1～4ヌクレオチド長、2～4ヌクレオチド長、1～3ヌクレオチド長、2～3ヌクレオチド長または1～2ヌクレオチド長であり得る。オーバーハングは、一方の鎖が他方よりも長い結果または同一の長さの2つの鎖がねじれ形である結果であり得る。オーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得る、または標的化される遺伝子配列と相補的であり得る、または別の配列であり得る。また、第1のおよび第2の鎖を、例えば、ヘアピンを形成する追加の塩基によって、または他の非塩基リンカーによってつなぐこともできる。

30

【0271】

一実施形態において、RNA i剤のオーバーハング領域におけるヌクレオチドは、各々独立に、2'-糖修飾された、例えば、2'-F、2'-O-メチル、チミジン（T）、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン（Teo）、2'-O-メトキシエチルアデノシン（AeO）、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン（m5CeO）、およびそれらの任意の組合せを含むが、それらに限定されない、修飾されたまたは未修飾のヌクレオチドであり得る。例えば、TTは、いずれかの鎖上のいずれかの末端のオーバーハング配列であり得る。オーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得る、または標的化される遺伝子配列と相補的であり得る、または別の配列であり得る。

40

【0272】

RNA i剤のセンス鎖、アンチセンス鎖または両鎖の5'-または3'-オーバーハングは、リン酸化され得る。一部の実施形態において、オーバーハング領域（複数可）は、2つのヌクレオチドの間にホスホロチオエートを有する2つのヌクレオチドを含有し、2つのヌクレオチドは、同一である場合も、異なる場合もある。一実施形態において、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖または両鎖の3'端に存在する。一実施形態において、この3'-オーバーハングは、アンチセンス鎖中に存在する。一実施形態において、この3'-オーバーハングは、センス鎖中に存在する。

50

【0273】

RNAi 剤は、その安定性全体に影響を及ぼすことなく RNAi の干渉活性を強化できる単一のオーバーハングのみを含有し得る。例えば、一本鎖オーバーハングは、センス鎖の 3' 末端に、あるいは、アンチセンス鎖の 3' 末端に位置し得る。RNAi はまた、アンチセンス鎖の 5' 端（すなわちセンス鎖の 3' 端）に位置する平滑末端を有し得、またはその逆である。一般に、RNAi のアンチセンス鎖は、3' 端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5' 端は平滑である。理論に捉われようとは思わないが、非対称のアンチセンス鎖の 5' 端の平滑末端およびアンチセンス鎖の 3' 端オーバーハングは、RISC プロセスへのガイド鎖積み込みに好都合である。

【0274】

一実施形態において、RNAi 剤は、19ヌクレオチド長のダブルブラントエンド型（double blunt-ended）であり、センス鎖は、5' 端から位置 7、8、および 9 の 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有する。アンチセンス鎖は、5' 端から 11、12、および 13 位の 3 連続ヌクレオチド上に 3 個の 2' -O -メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有する。

【0275】

別の実施形態において、RNAi 剤は、20ヌクレオチド長のダブルブラントエンド型であり、センス鎖は、5' 端から位置 8、9、および 10 の 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有する。アンチセンス鎖は、5' 端から位置 11、12、および 13 の 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの 2' -O -メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有する。

【0276】

さらに別の実施形態において、RNAi 剤は、21ヌクレオチド長のダブルブラントエンド型であり、センス鎖は、5' 端から位置 9、10、および 11 の 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有する。アンチセンス鎖は、5' 端から位置 11、12、および 13 の 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの 2' -O -メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有する。

【0277】

一実施形態において、RNAi 剤は、21ヌクレオチドのセンス鎖および 23ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、5' 端から位置 9、10、および 11 の 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの 2' -F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有し、アンチセンス鎖は、5' 端から位置 11、12、および 13 の 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの 2' -O -メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含有し、RNAi 剤の一方の末端は、平滑であり、もう一方の末端は、2ヌクレオチドのオーバーハングを含む。2ヌクレオチドオーバーハングは、アンチセンス鎖の 3' 端に存在し得る。

【0278】

2ヌクレオチドオーバーハングがアンチセンス鎖の 3' 末端にある場合、アンチセンス鎖の末端の 3 個の 3' ヌクレオチド間に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結があってもよく、3ヌクレオチドのうちの 2 個はオーバーハングヌクレオチドであり、第 3 のヌクレオチドはオーバーハングヌクレオチドの隣の対合されたヌクレオチドである。一実施形態において、RNAi 剤は、センス鎖の 5' 端およびアンチセンス鎖の 5' 端の両方で末端の 3 つのヌクレオチドの間に 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結をさらに有する。一実施形態において、モチーフの一部であるヌクレオチドを含む RNAi 剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖中のどのヌクレオチドも、修飾されたヌクレオチドである。一実施形態において、各残基は独立に、例えば、交互モチーフ中で 2' -O -メチルまたは 2' -フルオロで修飾されている。RNAi 剤は、リガンド（例えば、GalNAc₃）をさらに含んでもよい。

【0279】

一実施形態において、RNAi 剤は、センスおよびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、25～30ヌクレオチド残基の長さであり、5' 末端ヌクレオチド（位置 1）から開始

10

20

30

40

50

して、第1の鎖の位置1～23は、少なくとも8のリボヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、36～66ヌクレオチド残基の長さであり、3'末端ヌクレオチドから開始して、センス鎖の位置1～23と対合する位置に少なくとも8のリボヌクレオチドを含んで、二本鎖を形成し、アンチセンス鎖の少なくとも3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、最大6つの連続3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、それによって、1～6ヌクレオチドの3'一本鎖オーバーハングを形成し、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対合しない10～30の連続ヌクレオチドを含み、それによって、10～30ヌクレオチドの一本鎖5'オーバーハングを形成し、少なくともセンス鎖5'末端および3'末端ヌクレオチドは、センスおよびアンチセンス鎖が最大相補性のためにアラインされる場合に、アンチセンス鎖のヌクレオチドと対合される塩基であり、それによって、センスおよびアンチセンス鎖の間に実質的に二本鎖の領域を形成し、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の長さの少なくとも19リボヌクレオチドに沿って標的RNAと十分に相補的であり、二本鎖核酸が哺乳動物細胞中に導入される場合に標的遺伝子発現を低減させ、センス鎖は、3連続ヌクレオチド上の3つの2'-F修飾の少なくとも1つのモチーフを含有し、モチーフのうち少なくとも1つは、切断部位においてまたはその付近に存在する。アンチセンス鎖は、切断部位にまたはその付近に3連続ヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含有する。

10

【0280】

一実施形態において、RNAi剤は、センスおよびアンチセンス鎖を含み、RNAi剤は、少なくとも25かつ多くとも29ヌクレオチドである長さを有する第1の鎖と、多くとも30ヌクレオチドである長さを有し、5'端から位置11、12、および13の3連続ヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを有する第2の鎖とを含み、第1の鎖の3'端と、第2の鎖の5'端は平滑末端を形成し、第2の鎖は、第1の鎖よりもその3'端で1～4ヌクレオチド長く、二重鎖領域は、少なくとも25ヌクレオチド長である領域であり、第2の鎖は、少なくとも19ヌクレオチドの第2の鎖の長さに沿って標的mRNAと十分に相補的であり、RNAi剤が哺乳動物細胞中に導入される場合に標的遺伝子発現を低減させ、RNAi剤のダイサー切断は、第2の鎖の3'端を含むsiRNAを優先的にもたらし、それによって、哺乳動物において標的遺伝子の発現を低減する。適宜、RNAi剤は、リガンドをさらに含んでもよい。

20

【0281】

一実施形態において、RNAi剤のセンス鎖は、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含有し、モチーフのうち1つは、センス鎖中の切断部位において存在する。

30

【0282】

一実施形態において、RNAi剤のアンチセンス鎖もまた、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含有することができ、モチーフのうち1つは、アンチセンス鎖中の切断部位においてまたはその付近に存在する。

【0283】

17～23ヌクレオチド長の二重鎖領域を有するRNAi剤について、アンチセンス鎖の切断部位は通常、5'端からおよそ位置10、11および12である。したがって、3つの同一の修飾のモチーフは、アンチセンス鎖の位置9、10、および11、位置10、11、および12、位置11、12、および13、位置12、13、および14または位置13、14、および15において存在する場合があります。数はアンチセンス鎖の5'端から最初のヌクレオチドから開始し、または数はアンチセンス鎖の5'端から二重鎖領域内の最初の対合されたヌクレオチドから開始する。アンチセンス鎖中の切断部位はまた、5'端からのRNAiの二重鎖領域の長さに応じて変化し得る。

40

【0284】

RNAi剤のセンス鎖は、鎖の切断部位に3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含有し得る、アンチセンス鎖は、鎖の切断部位にまたはその付近に3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを有し得る

50

。センス鎖およびアンチセンス鎖が dsRNA 二本鎖を形成する場合には、センス鎖およびアンチセンス鎖を、センス鎖上の 3 つのヌクレオチドの 1 つのモチーフおよびアンチセンス鎖上の 3 つのヌクレオチドの 1 つのモチーフが、少なくとも 1 つのヌクレオチド重複を有するように、すなわち、センス鎖中のモチーフの 3 つのヌクレオチドの少なくとも 1 つが、アンチセンス鎖中のモチーフの 3 つのヌクレオチドの少なくとも 1 つと塩基対を形成するように配列できる。あるいは、少なくとも 2 つのヌクレオチドが重複する場合がある、または 3 つのヌクレオチドすべてが重複する場合がある。

【0285】

一実施形態において、RNAi 剤のセンス鎖は、3 連続ヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 2 つ以上のモチーフを含有し得る。第 1 のモチーフは、鎖の切断部位においてまたはその付近に存在する場合があり、他のモチーフは、ウイング修飾であり得る。本明細書において「ウイング修飾」という用語は、同一の鎖の切断部位のまたはその付近のモチーフから離れている鎖の別の部分において存在するモチーフを指す。ウイング修飾は、第 1 のモチーフに隣接しているか、または少なくとも 1 つもしくはより多くのヌクレオチドだけ離れている。モチーフが互いにすぐ隣接する場合には、モチーフの化学は、互いに別個であり、モチーフが 1 つまたは複数のヌクレオチドだけ離れている場合には、化学は、同一である場合も異なっている場合もある。2 以上のウイング修飾が存在する場合もある。例えば、2 つのウイング修飾が存在する場合には、各ウイング修飾は、切断部位にもしくはその付近にある第 1 のモチーフに対して 1 つの末端において、またはリードモチーフのいずれかの側に存在し得る。

【0286】

センス鎖と同様に、RNAi 剤のアンチセンス鎖は、3 連続ヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 2 つ以上のモチーフを含有する場合があり、モチーフの少なくとも 1 つは鎖の切断部位においてまたはその付近に存在する。このアンチセンス鎖はまた、センス鎖上に存在し得るウイング修飾と同様の配列で 1 つまたは複数のウイング修飾を含有し得る。

【0287】

一実施形態において、RNAi 剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖上のウイング修飾は通常、鎖の 3' 端、5' 端または両端に最初の 1 つまたは 2 つの末端ヌクレオチドを含まない。

【0288】

別の実施形態において、RNAi 剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖上のウイング修飾は通常、鎖の 3' 端、5' 端または両端に二重鎖領域内の最初の 1 つまたは 2 つの対合されるヌクレオチドを含まない。

【0289】

RNAi 剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖が各々、少なくとも 1 つのウイング修飾を含有する場合には、ウイング修飾は、二重鎖領域の同一末端に入る場合があり、1、2 または 3 つのヌクレオチドの重複を有する。

【0290】

RNAi 剤のセンス鎖またはアンチセンス鎖が各々、少なくとも 2 つのウイング修飾を含有する場合には、センス鎖およびアンチセンス鎖を、1 つの鎖に由来する 2 つの修飾が各々、二重鎖領域の 1 つの末端に入り、1、2 または 3 つのヌクレオチドの重複を有し、1 つの鎖に由来する 2 つの修飾が各々、二重鎖領域のもう一方の末端に入り、1、2 または 3 つのヌクレオチドの重複を有し、2 つの修飾 1 つの鎖がリードモチーフの各側に入り、二重鎖領域中に 1、2 または 3 つのヌクレオチドの重複を有するように配列できる。

【0291】

一実施形態において、モチーフの一部であるヌクレオチドを含む、RNAi 剤のセンス鎖およびアンチセンス鎖におけるすべてのヌクレオチドが修飾されてもよい。各ヌクレオチドは、非連結性リン酸酸素の 1 つまたは両方および／または連結性リン酸酸素の 1 つまたは複数の 1 つまたは複数の変更、リボース糖の構成要素、例えばリボース糖上の 2' ヒドロキシルの変更、リン酸部分の「デホスホ」リンカーとの大規模な置き換え、天然に存

在する塩基の修飾または置き換え、およびリボースーリン酸骨格の置き換えまたは修飾を含み得る同一または異なる修飾で修飾され得る。

【0292】

核酸はサブユニットのポリマーであるので、修飾の多くは、核酸内で反復される位置において存在する、例えば、塩基またはリン酸部分またはリン酸部分の非連結性Oの修飾。一部の 경우에는、修飾は、核酸中の対象位置のすべてにおいて存在するが、多くの場合、生じない。例として、修飾は、3'または5'末端位置においてのみ存在する場合があります、末端領域にのみ、例えば、鎖の末端ヌクレオチド上の位置において、または最後の2、3、4、5もしくは10ヌクレオチドに存在する場合があります。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域または両方に存在する場合があります。修飾は、RNAの二本鎖領域にのみ存在する場合があります、またはRNAの一本鎖領域にのみ存在する場合があります。例えば、非連結性O位置でのホスホロチオエート修飾は、一方または両方の末端においてのみ存在する場合があります、末端領域にのみ、例えば、鎖の末端ヌクレオチド上の位置において、または最後の2、3、4、5もしくは10ヌクレオチドに存在する場合があります、または二本鎖および一本鎖領域に、特に、末端において存在する場合があります。5'端または両端がリン酸化され得る。

【0293】

例えば、安定性を増強すること、オーバーハング中に特定の塩基を含めること、または一本鎖オーバーハング中、例えば、5'もしくは3'オーバーハング中、または両方中に修飾されたヌクレオチドもしくはヌクレオチド代替物を含めることが可能であり得る。例えば、オーバーハング中にプリンヌクレオチドを含めることが望ましいものであり得る。一部の実施形態において、3'または5'オーバーハング中の塩基のすべてまたは一部が、例えば、本明細書において記載される修飾で修飾され得る。修飾は、例えば、当技術分野で公知である修飾でのリボース糖の2'位置での修飾の使用、例えば、核酸塩基のリボ糖の代わりに修飾された、デオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F)または2'-O-メチルの使用、およびリン酸基における修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

【0294】

一実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、ロックド核酸(LNA)、非ロックド核酸(UNA)、立体配座的に制限されたヌクレオチド(CRN)、拘束エチルヌクレオチド(cET)、HNA、シクロヘキセン核酸(CeNA)、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシルまたは2'-フルオロで独立に修飾される。鎖は、2つ以上の修飾を含み得る。一実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロで独立に修飾される。

【0295】

少なくとも2つの異なる修飾は通常、センス鎖およびアンチセンス鎖上に存在する。それら2つの修飾は、2'-O-メチルもしくは2'-フルオロ修飾、または他の修飾であり得る。

【0296】

一実施形態において、N_aおよび／またはN_bは、交互パターンの修飾を含む。「交互モチーフ」という用語は、本明細書において使用される場合、各々の修飾が1つの鎖の交互ヌクレオチド上に存在する1つまたは複数の修飾を有するモチーフを指す。交互ヌクレオチドとは、1つおきのヌクレオチド毎に1つまたは3ヌクレオチド毎に1つまたは同様のパターンを指す場合がある。例えば、A、BおよびCが各々、ヌクレオチドへの修飾の1つのタイプを表す場合には、交互モチーフは、「A B A B A B A B A B A B...」、「A A B B A A B B A A B B...」、「A A B A A B A A B A A B...」、「A A A B A A A B A A A B...」、「A A B B B A A A B B B...」または「A B C A B C A B C A B C...」などであり得る。

【0297】

交互モチーフ中に含有される修飾のタイプは、同一である場合も、異なっている場合も

ある。例えば、A、B、C、Dが各々、ヌクレオチド上の修飾の1つのタイプを表す場合には、交互ターン、すなわち、1つおきのヌクレオチド上の修飾は、同一である場合があるが、センス鎖またはアンチセンス鎖の各々は、「A B A B A B…」、「A C A C A C…」、「B D B D B D…」または「C D C D C D…」などといった交互モチーフ内の修飾のいくつかの可能性から選択され得る。

【0298】

一実施形態において、本発明のRNAi剤は、アンチセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンに対してシフトされているセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンを含む。シフトは、センス鎖のヌクレオチドの修飾された基が、アンチセンス鎖のヌクレオチドの異なって修飾された基に対応するようなものであり得、逆もまた同様である。例えば、センス鎖は、dsRNA二重鎖中のアンチセンス鎖と対合される場合には、センス鎖中の交互モチーフは、鎖の5' - 3' から「A B A B A B」で開始する場合があります。アンチセンス鎖中の交互モチーフは、二重鎖領域内の鎖の5' - 3' から「B A B A B A」で開始する場合があります。別の例として、センス鎖中の交互モチーフは、鎖の5' - 3' から「A A B B A A B B」で開始する場合があります。アンチセンス鎖中の交互モチーフは、二重鎖領域内の鎖の5' - 3' に「B B A A B B A A」で開始する場合があります。その結果、センス鎖とアンチセンス鎖の間で修飾パターンの完全なまたは部分的なシフトがある。

10

【0299】

一実施形態において、RNAi剤は、2' - O - メチル修飾の交互モチーフのパターンを含み、センス鎖上の2' - F修飾は、初期には2' - O - メチル修飾交互モチーフのパターンおよび初期にはアンチセンス鎖上の2' - F修飾の交互モチーフのパターン、すなわちアンチセンス鎖上の2' - F修飾されたヌクレオチドを有するセンス鎖塩基対上の2' - O - メチル修飾されたヌクレオチドに対するシフトを有し、逆もまた同様である。センス鎖の1位は、2' - F修飾から開始する場合があります。アンチセンス鎖の1位は、2' - O - メチル修飾から開始する場合があります。

20

【0300】

3個の連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つまたは複数のモチーフのセンス鎖および／またはアンチセンス鎖への導入は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖中に存在する初期の修飾パターンを中断する。3個の連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つまたは複数のモチーフをセンスおよび／またはアンチセンス鎖に導入することによるセンスおよび／またはアンチセンス鎖の修飾パターンの導入は、意外にも、標的遺伝子に対する遺伝子サイレンシング活性を高める。

30

【0301】

一実施形態において、3個の連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾のモチーフを鎖のいずれかに導入する場合は、モチーフの隣のヌクレオチドの修飾は、モチーフの修飾と異なる修飾である。例えば、モチーフを含む配列の部分は「N_a Y Y Y N_b」[式中、「Y」は、3個の連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾のモチーフを表し、「N_a」および「N_b」は、Yの修飾と異なるモチーフ「Y Y Y」の隣のヌクレオチドに対する修飾を表し、N_aおよびN_bは、同一のまたは異なる修飾であり得る]である。あるいは、ウイング修飾が存在する場合には、N_aおよび／またはN_bは存在してもいなくてもよい。

40

【0302】

RNAi剤は、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結をさらにも含む。ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾は、鎖の任意の位置において、センス鎖もしくはアンチセンス鎖または両鎖の任意のヌクレオチド上に存在してもよい。例えば、ヌクレオチド間連結修飾は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖上のすべてのヌクレオチド上に存在してもよく、各ヌクレオチド連結修飾は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖上の交互パターンに存在してもよく、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターン中に両方のヌクレオチド間連結修飾を含んでもよい。センス鎖上のヌクレオチド間連結の交互パターン

50

は、アンチセンス鎖と同一であっても異なってもよく、センス鎖上のヌクレオチド間連結の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間連結の交互パターンに対するシフトを有し得る。一実施形態において、二本鎖RNAi剤は、6～8のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。一実施形態において、アンチセンス鎖は、5'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結および3'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、センス鎖は、5'末端または3'末端に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含む。

【0303】

一実施形態において、RNAiは、オーバーハング領域においてホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチドの間にホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結を有する2個のヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチド間連結修飾に、二重鎖領域において、オーバーハングヌクレオチドを末端の対合ヌクレオチドと連結させることもできる。例えば、少なくとも2、3、4またはすべてのオーバーハングヌクレオチドを、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結によって連結でき、オーバーハングヌクレオチドを、オーバーハングヌクレオチドと隣接する対合されるヌクレオチドと連結するさらなるホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結があってもよい。例えば、3ヌクレオチドのうち2つがオーバーハングヌクレオチドであり、3番目は、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対合されるヌクレオチドである、末端の3ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結があり得る。これらの末端の3個のヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端、センス鎖の3'末端、アンチセンス鎖の5'末端、および／またはアンチセンス鎖の5'にあってもよい。

【0304】

一実施形態において、2ヌクレオチドオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にあり、末端の3個のヌクレオチドの間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結が存在し、3個のヌクレオチドのうち2つはオーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドの隣の対合ヌクレオチドである。適宜、RNAi剤は、センス鎖の5'末端およびアンチセンス鎖の5'末端の両方において末端の3個のヌクレオチドの間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結をさらに有し得る。

【0305】

一実施形態において、RNAi剤は、標的との、二本鎖内のミスマッチ（複数可）またはそれらの組合せを含む。ミスマッチは、オーバーハング領域または二重鎖領域中に存在し得る。塩基対は、解離または融解を促進するその傾向に基づいてランク付けできる（例えば、特定の対合の会合または解離の自由エネルギーで、最も簡単なアプローチは、個々の対に基づいて対を調べることであるが、次の隣接分析または同様の分析も使用できる）。解離の促進の点では：A：UはG：Cを上回って好ましく、G：UはG：Cを上回って好ましく、I：CはG：Cを上回って好ましい（I＝イノシン）。ミスマッチ、例えば、非正準対合または正準対合以外のもの（本明細書において別の場所で記載されるような）は、正準（A：T、A：U、G：C）対合を上回って好ましく、ユニバーサル塩基を含む対合は正準対合を上回って好ましい。

【0306】

一実施形態において、RNAi剤は、二本鎖の5'端でのアンチセンス鎖の解離を促進するために、A：U、G：U、I：Cおよびミスマッチ対、例えば、非正準対合または正準対合以外のものまたはユニバーサル塩基を含む対合の群から独立に選択される、アンチセンス鎖の5'端から二重鎖領域内の最初の1、2、3、4または5つの塩基対のうち少なくとも1つを含む。

【0307】

一実施形態において、アンチセンス鎖中の5'端から二重鎖領域内の1位のヌクレオチ

ドは、A、dA、dU、UおよびdTからなる群から選択される。あるいは、アンチセンス鎖の5'端から二重鎖領域内の最初の1、2または3つの塩基対のうち少なくとも1つは、AU塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'端から二重鎖領域内の最初の塩基対は、AU塩基対である。

【0308】

別の実施形態において、センス鎖の3'端のヌクレオチドは、デオキシチミジン（deoxythymidine）（dT）である。別の実施形態において、アンチセンス鎖の3'端のヌクレオチドは、デオキシチミジン（dT）である。一実施形態において、デオキシチミジンヌクレオチドの短い配列、例えば、センスおよび／またはアンチセンス鎖の3'端の2つのdTヌクレオチドがある。

10

【0309】

一実施形態において、センス鎖配列は、式（I）：

5' $\eta_p - N_a - (X \ X \ X) \ i - N_b - Y \ Y \ Y - N_b - (Z \ Z \ Z) \ j - N_a - n_q$ 3' (I)

[式中、

iおよびjは各々独立に、0または1であり、

pおよびqは各々独立に、0～6であり、

各 N_a は独立に、0～25の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b は独立に、0～10の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

20

各 n_p および n_q は独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

N_b およびYは、同一修飾を有さず、ならびに

XXX、YYYおよびZZZは各々独立に、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す]

によって表すことができる。一実施形態において、YYYは、すべて2'-F修飾されたヌクレオチドである。

【0310】

一実施形態において、 N_a および／または N_b は、交互パターンの修飾を含む。

【0311】

一実施形態において、YYYモチーフは、センス鎖の切断部位においてまたはその付近に存在する。例えば、RNAi剤が17～23ヌクレオチド長の二重鎖領域を有する場合には、YYYモチーフは、センス鎖の切断部位においてまたはその近傍に存在し得る（例えば、位置6、7、8、7、8、9、8、9、10、9、10、11、10、11、12または11、12、13に生じ得る）、数は5'端から最初のヌクレオチドから開始する、または適宜、数は5'端から二重鎖領域内の最初の対合されたヌクレオチドで開始してもよい。

30

【0312】

一実施形態において、iは1であり、jは0である、またはiは0であり、jは1である、またはiおよびjは両方とも1である。したがって、センス鎖は、以下の式：

40

5' $\eta_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q$ 3' (Ib)、

5' $\eta_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q$ 3' (Ic)、または

5' $\eta_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q$ 3' (Id)

によって表すことができる。

【0313】

センス鎖が式（Ib）によって表される場合は、 N_b は、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2または0の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は、独立に、2～20、2～15または2～10個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し得る。

【0314】

50

センス鎖が式 (I c) として表される場合は、 N_b は、 $0 \sim 10$ 、 $0 \sim 7$ 、 $0 \sim 10$ 、 $0 \sim 7$ 、 $0 \sim 5$ 、 $0 \sim 4$ 、 $0 \sim 2$ または 0 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は、独立に、 $2 \sim 20$ 、 $2 \sim 15$ または $2 \sim 10$ の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す場合もある。

【0315】

センス鎖が、式 (I d) として表される場合には、各 N_b は独立に、 $0 \sim 10$ 、 $0 \sim 7$ 、 $0 \sim 5$ 、 $0 \sim 4$ 、 $0 \sim 2$ または 0 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。ある特定の実施形態において、 N_b は、 0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 または 6 である。各 N_a は独立に、 $2 \sim 20$ 、 $2 \sim 15$ または $2 \sim 10$ の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す場合もある。

10

【0316】

X 、 Y および Z の各々は、互いに同一である場合も、異なっている場合もある。

【0317】

他の実施形態において、 i は 0 であり、 j は 0 であり、センス鎖は、次式：

$5' \quad \eta_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q \quad 3' \quad (I a)$

によって表すことができる。

【0318】

センス鎖が、式 (I a) によって表される場合には、各 N_a は独立に、 $2 \sim 20$ 、 $2 \sim 15$ または $2 \sim 10$ の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を含み得る。

20

【0319】

一実施形態において、RNA i のアンチセンス鎖配列は、式 (I e)：

$5' \quad \eta_q - N_a' - (Z' Z' Z_k') - N_b' - Y' Y' Y' - N' - (X' X' X_l') - N_a' - n_p' \quad 3' \quad (I e)$

[式中、

k および l は各々独立に、 0 または 1 であり、

p' および q' は各々独立に、 $0 \sim 6$ であり、

各 N_a' は独立に、 $0 \sim 25$ の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各 N_b' 独立に、 $0 \sim 10$ の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

30

各 n_p' および η_q' は独立に、オーバーハングヌクレオチドを表し、

N_b' および Y' は、同一修飾を有さず、

$X' X' X'$ 、 $Y' Y' Y'$ および $Z' Z' Z'$ は各々独立に、 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つのモチーフを表す]

によって表すことができる。

【0320】

一実施形態において、 N_a' および N_b' は、交互パターンの修飾を含む。

【0321】

$Y' Y' Y'$ モチーフは、センス鎖の切断部位においてまたはその付近に存在する。例えば、RNA i 剤が、 $17 \sim 23$ ヌクレオチド長の二重鎖領域を有する場合には、 $Y' Y' Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の位置 9 、 10 、 11 、位置 10 、 11 、 12 、位置 11 、 12 、 13 、位置 12 、 13 、 14 または -13 、 14 、 15 において存在する場合があり、数は $5'$ 端から最初のヌクレオチドから開始する、または適宜、数は $5'$ 端から二重鎖領域内の最初の対合されたヌクレオチドで開始してもよい。ある特定の実施形態において、 $Y' Y' Y'$ モチーフは、位置 11 、 12 、 13 において存在する。

【0322】

一実施形態において、 $Y' Y' Y'$ モチーフは、すべて $2' - OMe$ 修飾されたヌクレオチドである。

【0323】

50

一実施形態において、 k は1であり、 l は0であるか、または k は0であり、 l は1であるか、または k および l は両方とも1である。

【0324】

したがって、アンチセンス鎖は、次式：

5' η_q $\vdash$ N_a ' $\vdash$ Z ' Z ' Z ' $\vdash$ N $\vdash$ Y ' Y ' Y ' $\vdash$ a $\vdash$ η_p ' 3' (I f)、

5' η_q $\vdash$ N_a ' $\vdash$ Y ' Y ' Y ' $\vdash$ N $\vdash$ X ' X ' X ' $\vdash$ $n3$ ' (I g)、または

5' η_q $\vdash$ N_a ' $\vdash$ Z ' Z ' Z ' $\vdash$ N $\vdash$ Y ' Y ' Y ' $\vdash$ b $\vdash$ N $\vdash$ X ' X ' X ' $\vdash$ a $\vdash$ η_p ' 3' (I h)

によって表すことができる。

【0325】

アンチセンス鎖が式 (I f) によって表される場合には、 N_b ' は、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2 または 0 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a ' は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15 または 2 ~ 10 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0326】

センス鎖が式 (I c) として表される場合は、 N_b は、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2 または 0 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は、独立に、2 ~ 20、2 ~ 15 または 2 ~ 10 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し得る。

【0327】

アンチセンス鎖が式 (I h) として表される場合には、各 N_b ' は独立に、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2 または 0 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a ' は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15 または 2 ~ 10 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。ある特定の実施形態において、 N_b は、0、1、2、3、4、5 または 6 である。

【0328】

他の実施形態において、 k は0であり、 l は0であり、アンチセンス鎖は、次式：

5' η_p $\vdash$ N_a ' $\vdash$ Y ' Y ' Y ' $\vdash$ a $\vdash$ n_q ' 3' (I a)

によって表すことができる。

【0329】

アンチセンス鎖が、式 (I e) として表される場合には、各 N_a ' は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15 または 2 ~ 10 の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0330】

X '、Y ' および Z ' の各々は、互いに同一である場合も、異なっている場合もある。

【0331】

センス鎖およびアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2' - メトキシエチル、2' - オ - メチル、2' - オ - アリル、2' - C - アリル、2' - ヒドロキシルまたは 2' - フルオロで独立に修飾され得る。例えば、センス鎖およびアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、2' - オ - メチルまたは 2' - フルオロ 40 で独立に修飾される。各 X、Y、Z、X '、Y ' および Z ' は、特に、2' - オ - メチル修飾または 2' - フルオロ修飾を表す場合がある。

【0332】

一実施形態において、RNAi 剤のセンス鎖は、二重鎖領域が 21 nt である場合に、鎖の位置 9、10 および 11 において存在する YYY モチーフを含有し得る、数は 5' 端から最初のヌクレオチドから開始する、または適宜、数は 5' 端から二重鎖領域内の最初の対合されたヌクレオチドで開始してもよく、Y は、2' - F 修飾を表す。センス鎖は、二重鎖領域の対向端にウイング修飾として XXX モチーフまたは ZZZ モチーフをさらに含有する場合があり、XXX および ZZZ は各々独立に、2' - OMe 修飾または 2' - F 修飾を表す。

10

20

30

40

50

【0333】

一実施形態において、アンチセンス鎖は、鎖の位置11、12、13において存在するY'Y'Y'モチーフを含有し得る、数は5'端から最初のヌクレオチドから開始する、または適宜、数は5'端から二重鎖領域内の最初の対合されたヌクレオチドで開始してもよく、Y'は、2'-O-メチル修飾を表す。アンチセンス鎖は、二重鎖領域の対向端にウイング修飾としてX'X'X'モチーフまたはZ'Z'Z'モチーフをさらに含有する場合があります、X'X'X'およびZ'Z'Z'は各々独立に、2'-OMe修飾または2'-F修飾を表す。

【0334】

上記の式(Ia)、(Ib)、(Ic)および(Id)のいずれか1つによって表されるセンス鎖は、それぞれ式(Ie)、(If)、(Ig)および(Ih)のいずれか1つによって表されるアンチセンス鎖と二重鎖を形成する。 10

【0335】

したがって、本発明の方法において使用するためのRNAi剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含むことができ、各鎖は、14~30ヌクレオチドを有し、RNAi二重鎖は、式(Ii)：

センス：5' η_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'
アンチセンス：3' η_p' - N_a' - (X' X' X')_k - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - (Z' Z' Z')_l - N_a' - n_q' 5' (Ii)

[式中、

20

i、j、kおよびlは各々独立に、0または1であり、

p、p'、qおよびq'は各々独立に、0~6であり、

各N_aおよびN_a'は独立に、0~25の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み、

各N_bおよびN_b'は独立に、0~10の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

各n_p'、 η_p 、n_q'および η_q は、それらの各々は存在する場合も存在しない場合もあるが、オーバーハングヌクレオチドを独立に表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は各々独立に、38連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す]によって表される。

【0336】

一実施形態において、iは0であり、jは0であるか、またはiは1であり、jは0であるか、またはiは0であり、jは1であるか、またはiおよびjは両方とも0であるか、またはiおよびjは両方とも1である。別の実施形態において、kは0であり、lは0であるか、またはkは1であり、lは0であり、kは0であり、lは1であるか、またはkおよびlは両方とも0であるか、またはkおよびlは両方とも1である。

【0337】

RNAi二重鎖を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖の例示的組合せは、以下の式 40

5' η_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'
3' η_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5' (Ij)
5' η_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'
3' η_p' - N_a' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' - n_q' 5' (Ik)
5' η_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'
3' η_p' - N_a' - X' X' X' - N_b' - Y' Y' Y' - N_a' - n_q' 5' (Il)
5' η_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'
3' η_p' - N_a' - X' X' X' - N_b' - Y' Y' Y' - N_b' - Z' Z' Z' - N_a' - n_q' 5' (Im)

50

を含む。

【0338】

RNA i 剤が式 (I j) によって表される場合には、各 N_a は独立に、2～20、2～15または2～10の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0339】

RNA i 剤が式 (I k) によって表される場合には、各 N_b は独立に、1～10、1～7、1～5または1～4の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は独立に、2～20、2～15、または2～10の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0340】

RNA i 剤が式 (I l) として表される場合には、各 N_b 、 N_b' は、独立に、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2または0個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は、独立に、2～20、2～15または2～10個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0341】

RNA i 剤が、式 (I m) として表される場合には、各 N_b 、 N_b' は、独立に、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2または0個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a 、 N_a' は、独立に、2～20、2～15または2～10個の修飾されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。 N_a 、 N_a' 、 N_b および N_b' の各々は、独立に、交互パターンの修飾を含む。

【0342】

式 (I i)、(I j)、(I k)、(I l) および (I m) における X、Y および Z の各々は、互いに同一であっても異なってもよい。

【0343】

RNA i 剤が式 (I i)、(I j)、(I k)、(I l) および (I m) によって表される場合には、Yヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、Y'ヌクレオチドのうちの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Yヌクレオチドのうちの少なくとも2つが、対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成する、またはYヌクレオチドのうちのすべての3つが、すべて対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0344】

RNA i 剤が式 (I k) または (I m) によって表される場合には、Zヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、Z'ヌクレオチドのうちの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Zヌクレオチドのうちの少なくとも2つが、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する、またはZヌクレオチドのうちのすべての3つが、すべて対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0345】

RNA i 剤が式 (I l) または (I m) によって表される場合には、Xヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、X'ヌクレオチドのうちの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Xヌクレオチドのうちの少なくとも2つが、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する、またはXヌクレオチドXのうちのすべての3つが、すべて対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0346】

一実施形態において、Yヌクレオチド上の修飾は、Y'ヌクレオチド上の修飾と異なり、Zヌクレオチド上の修飾は、Z'ヌクレオチド上の修飾と異なり、かつ／またはXヌクレオチド上の修飾は、X'ヌクレオチド上の修飾と異なる。

【0347】

一実施形態において、RNA i 剤が式 (I m) によって表される場合には、 N_a 修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾である。別の実施形態において、RNA i 剤が式 (I m) によって表される場合には、 N_a 修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート連結

10

20

30

40

50

を介して隣接するヌクレオチドに連結される。さらに別の実施形態において、RNAi 剤が式 (Im) によって表される場合には、Na 修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾であり、 $np' > 0$ であり、少なくとも1つの np' がホスホロチオエート連結を介して、隣接するヌクレオチドに連結され、センス鎖は、二価または三価の分枝状リンカー（下記）を通じて付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。別の実施形態において、RNAi 剤が式 (Im) によって表される場合には、Na 修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾であり、 $np' > 0$ であり、少なくとも1つの np' がホスホロチオエート連結を介して、隣接するヌクレオチドに連結され、センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。

10

【0348】

一実施形態において、RNAi 剤が式 (Ij) によって表される場合には、Na 修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾であり、 $np' > 0$ であり、少なくとも1つの np' がホスホロチオエート連結を介して、隣接するヌクレオチドに連結され、センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート連結を含み、センス鎖は、二価または三価の分枝状リンカーを通じて付着された1つまたは複数のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。

【0349】

一実施形態において、RNAi 剤は、式 (Ii)、(Ij)、(Ik)、(Il) および (Im) によって表される少なくとも2つの二重鎖を含有する多量体であり、二重鎖は、リンカーによって接続される。リンカーは、切断可能である場合も、切断可能でない場合もある。多量体は、リガンドをさらに含んでもよい。二重鎖の各々は、同一の遺伝子を標的化する場合も、2つの異なる遺伝子を標的化する場合もあり、または二重鎖の各々は、2つの異なる標的部位の同一遺伝子を標的化する場合もある。

20

【0350】

一実施形態において、RNAi 剤は、式 (Ii)、(Ij)、(Ik)、(Il) および (Im) によって表される、3、4、5、6またはそれより多い二重鎖を含有する多量体であり、二重鎖は、リンカーによって接続される。リンカーは、切断可能である場合も、切断可能でない場合もある。多量体は、リガンドをさらに含んでもよい。二重鎖の各々は、同一の遺伝子を標的化する場合も、2つの異なる遺伝子を標的化する場合もあり、または二重鎖の各々は、2つの異なる標的部位の同一遺伝子を標的化する場合もある。

30

【0351】

一実施形態において、式 (Ii)、(Ij)、(Ik)、(Il) および (Im) によって表される2つのRNAi 剤は、5'端で互いに連結され、3'端の一方または両方は、リガンドにコンジュゲートされてもよい。薬剤の各々は、同一の遺伝子を標的化する場合も、2つの異なる遺伝子を標的化する場合もあり、または薬剤の各々は、2つの異なる標的部位の同一遺伝子を標的化する場合もある。

【0352】

ある特定の実施形態において、本発明のRNAi 剤は、2'-フルオロ修飾を含む少数のヌクレオチド、例えば、2'-フルオロ修飾を有する10個以下のヌクレオチドを含み得る。例えば、RNAi 剤は、2'-フルオロ修飾を有する10、9、8、7、6、5、4、3、2、1または0個のヌクレオチドを含み得る。具体的な実施形態において、本発明のRNAi 剤は、本発明のRNAi 剤は、2'-フルオロ修飾を有する10個のヌクレオチド、例えば、センス鎖における2'-フルオロ修飾を有する4個のヌクレオチドおよびアンチセンス鎖における2'-フルオロ修飾を有する6個のヌクレオチドを含む。別の実施形態において、本発明のRNAi 剤は、2'-フルオロ修飾を有する6個のヌクレオチド、例えば、センス鎖における2'-フルオロ修飾を有する4個のヌクレオチドおよびアンチセンス鎖における2'-フルオロ修飾を有する2個のヌクレオチドを含む。

40

【0353】

50

他の実施形態において、本発明の *i* RNA 剤は、2'-フルオロ修飾を含む極めて少数のヌクレオチド、例えば、2'-フルオロ修飾を含む2個以下のヌクレオチドを含み得る。例えば、RNA *i* 剤は、2'-フルオロ修飾を有する2、1または0個のヌクレオチドを含み得る。具体的な実施形態において、RNA *i* 剤は、2'-フルオロ修飾を有する2個のヌクレオチド、例えば、センス鎖における2'-フルオロ修飾を有する0個のヌクレオチドおよびアンチセンス鎖における2'-フルオロ修飾を有する2個のヌクレオチドを含み得る。

【0354】

種々の刊行物には、本発明の方法において使用され得る多量体 RNA *i* 剤が記載されている。このような刊行物には、WO 2007/091269、米国特許第7858769号、WO 2010/141511、WO 2007/117686、WO 2009/014887 および WO 2011/031520 が含まれ、それらの各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0355】

以下においてより詳細に説明されるように、1つまたは複数の炭水化物部分の RNA *i* 剤へのコンジュゲーションを含む RNA *i* 剤は、RNA *i* 剤の1つまたは複数の特性を向上させることができる。多くの場合、炭水化物部分を、RNA *i* 剤の修飾されたサブユニットに付着させる。例えば、dsRNA 剤の1つまたは複数のリボヌクレオチドサブユニットのリボース糖が別の部分、例えば、炭水化物リガンドが付着する非炭水化物（例えば、環式）担体と置き換えられ得る。サブユニットのリボース糖がそのように置き換えられているリボヌクレオチドサブユニットは、本明細書において、リボース置き換え修飾サブユニット（RRMS）と呼ばれる。環式担体は、炭素環式の環系である、すなわちすべての環原子が炭素原子である、またはヘテロ環式の環系である、すなわち1つまたは複数の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、硫黄であり得る。複素環式担体は、単環式の環系であってもよく、または2つ以上の二重結合、例えば、縮合環を含んでもよい。環式担体は、完全に飽和した環系であってもよく、または1つまたは複数の二重結合を含んでもよい。

【0356】

リガンドは、担体を介してポリヌクレオチドに付着され得る。担体は、(i) 少なくとも1つの「骨格付着点」、例えば、2つの「骨格付着点」、および(ii) 少なくとも1つの「繫留付着点」を含む。「骨格付着点」とは、本明細書で使用される場合、官能基、例えば、ヒドロキシル基、または、一般的に、骨格、例えば、リボ核酸のリン酸または修飾されたリン酸、例えば、硫黄含有骨格への担体の組み込みのために利用可能な、およびそれに適している結合を指す。「繫留付着点」（TAP）とは、一部の実施形態において、選択された部分を接続する環式担体の構成物環原子、例えば、炭素原子またはヘテロ原子（骨格付着点を提供する原子とは別個）を指す。部分は、例えば、炭水化物、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖および多糖であり得る。選択された部分は、介在するテザーによって環式担体に接続されてもよい。したがって、環式担体は、官能基、例えば、アミノ基を含む、または一般的に、構成物環への、別の化学実体、例えば、リガンドの組み込みもしくは繫留に適している結合を提供することが多いであろう。

【0357】

RNA *i* 剤は、担体を介してリガンドにコンジュゲートされることがあり、担体は、環式基または非環式基であり得る。環式基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1,3] ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジニル、テトラヒドロフリル、およびデカリンから選択され得る。非環式基は、セリノール骨格またはジエタノールアミン骨格から選択され得る。

【0358】

本発明の別の実施形態において、*i* RNA 剤は、各々の鎖が14～40個のヌクレオチ

10

20

30

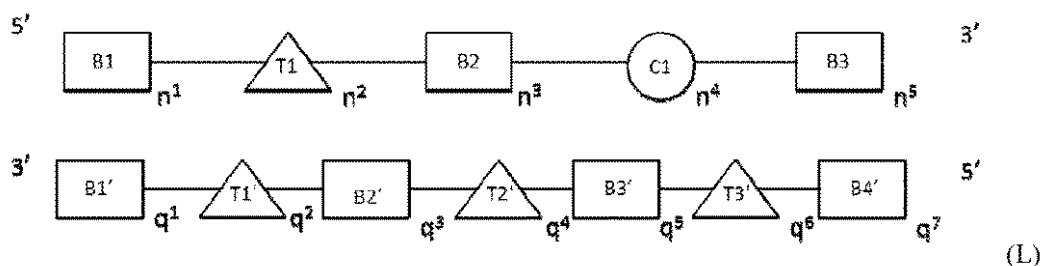
40

50

ドを有するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む。RNA i 剤は、式 (L) :

【0359】

【化7】



10

によって表される場合がある。

【0360】

式 (L) において、B1、B2、B3、B1'、B2'、B3' および B4' は、各々独立に、2'-O-アルキル、2'-置換アルコキシ、2'-置換アルキル、2'-ハロ、ENA および BNA / LNA からなる群から選択される修飾を含むヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、B1、B2、B3、B1'、B2'、B3' および B4' は、それぞれ 2'-OMe または 2'-F 修飾を含む。ある特定の実施形態において、B1、B2、B3、B1'、B2'、B3' および B4' のうちの少なくとも1つは、2'-O-N-メチル2'アセトアミド (2'-O-NMA) 修飾を含む。

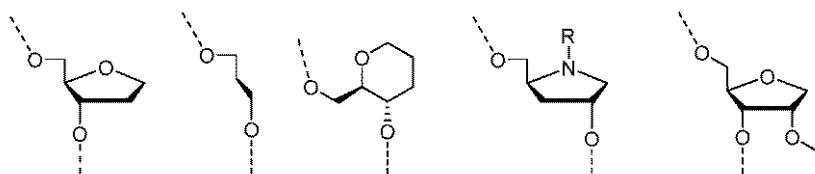
【0361】

C1 は、アンチセンス鎖のシード領域と反対側の部位 (すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端の位置 2 ~ 8) に配置された熱不安定化ヌクレオチドである。例えば、C1 は、アンチセンス鎖の 5' 末端の位置 2 ~ 8 においてヌクレオチドと対合するセンス鎖の位置にある。一例において、C1 は、センス鎖の 5' 末端から位置 15 にある。C1 ヌクレオチドは、脱塩基修飾を含み得る熱不安定化修飾、二重鎖における対向するヌクレオチドとのミスマッチ、および糖修飾、例えば、2'-デオキシ修飾または非環式ヌクレオチド、例えば、アンロックド核酸 (UNA) またはグリセロール核酸 (GNA) を有する。ある特定の実施形態において、C1 は、i) アンチセンス鎖における対向するヌクレオチドとのミスマッチ、ii)

30

【0362】

【化8】

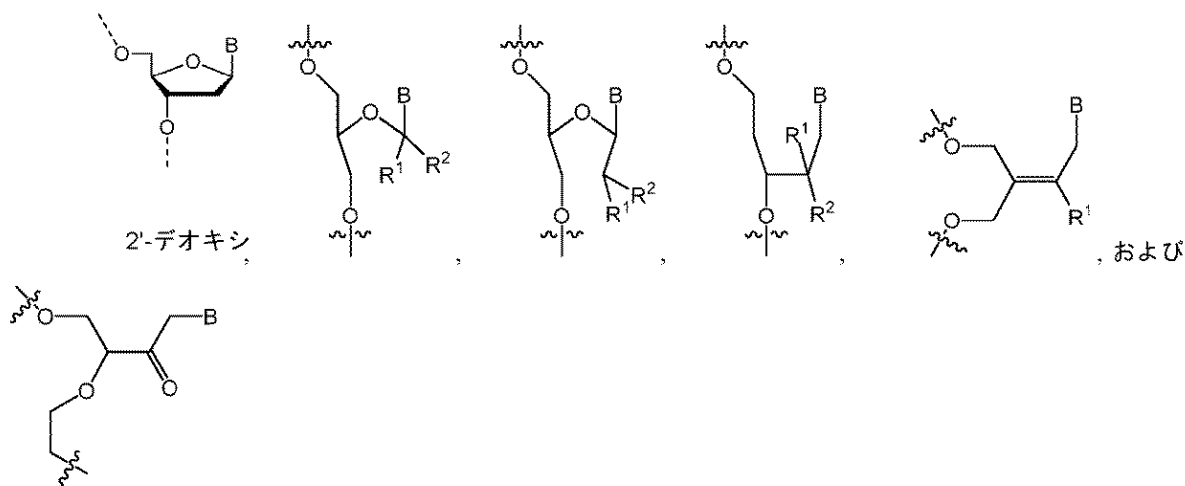


; からなる群から選択される脱塩基修飾、および iii)

40

【0363】

【化 9】



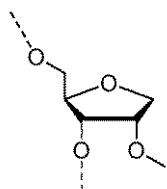
10

【式中、Bは、修飾されたまたは未修飾の核酸塩基であり、 R^1 および R^2 は、独立に、H、ハロゲン、 OR_3 またはアルキルであり、 R_3 は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラールキル、ヘテロアリールまたは糖である】からなる群から選択される糖修飾からなる群から選択される熱不安定化修飾を有する。ある特定の実施形態において、C1における熱不安定化修飾は、G：G、G：A、G：U、G：T、A：A、A：C、C：C、C：U、C：T、U：U、T：TおよびU：Tからなる群から選択されるミスマッチであり、適宜、ミスマッチ対における少なくとも1つの核酸塩基が2'-デオキシ核酸塩基である。一例において、C1における熱不安定化修飾は、GNA、または

20

【0364】

【化10】



30

である。

【0365】

T1、T1'、T2'およびT3'は、各々独立に、2'-OMe修飾の立体容積より小さいまたはそれに等しい立体容積をヌクレオチドに提供する修飾を含むヌクレオチドを表す。立体容積は、修飾の立体効果の合計を指す。ヌクレオチドの修飾の立体効果を決定するための方法は、当業者に既知である。修飾は、ヌクレオチドのリボース糖の2'位置、または非リボースヌクレオチドに対する修飾、非環式ヌクレオチド、もしくはリボース糖の2'位置と類似するまたは同等であるヌクレオチドの骨格にあり得るものであり、2'-OMe修飾の立体容積より小さいまたはそれに等しい立体容積をヌクレオチドに提供する。例えば、T1、T1'、T2'およびT3'は、各々独立に、DNA、RNA、LNA、2'-Fおよび2'-F-5'-メチルから選択される。ある特定の実施形態において、T1はDNAである。ある特定の実施形態において、T1'は、DNA、RNAまたはLNAである。ある特定の実施形態において、T1'は、DNA、RNAまたはLNAである。ある特定の実施形態において、T2'は、DNAまたはRNAである。ある特定の実施形態において、T3'は、DNAまたはRNAである。

40

【0366】

n^1 、 n^3 および q^1 は、独立に、4～15ヌクレオチド長である。

【0367】

50

n^5 、 q^3 および q^7 は、独立に、1～6ヌクレオチド長である。

【0368】

n^4 、 q^2 および q^6 は、独立に、1～3ヌクレオチド長であり、あるいは n^4 は0である。

【0369】

q^5 は、独立に、0～10ヌクレオチド長である。

【0370】

n^2 および q^4 は、独立に、0～3ヌクレオチド長である。

【0371】

あるいは、 n^4 は0～3ヌクレオチド長である。

10

【0372】

ある特定の実施形態において、 n^4 は0であり得る。一例において、 n^4 は0であり、 q^2 および q^6 は1である。別の例において、 n^4 は0であり、 q^2 および q^6 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

【0373】

ある特定の実施形態において、 n^4 、 q^2 および q^6 は、それぞれ1である。

20

【0374】

ある特定の実施形態において、 n^2 、 n^4 、 q^2 、 q^4 および q^6 は、それぞれ1である。

【0375】

ある特定の実施形態において、C1は、センス鎖が19～22ヌクレオチド長であり、 n^4 が1である場合には、C1は、センス鎖の5'末端の位置14～17にある。ある特定の実施形態において、C1は、センス鎖の5'末端の位置15にある。

【0376】

ある特定の実施形態において、T3'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置2から開始する。一例において、T3'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置2にあり、 q_1 は1に等しい。

30

【0377】

ある特定の実施形態において、T1'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置14から開始する。一例において、T1'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置14にあり、 q^2 は1に等しい。

【0378】

1つの例示的な実施形態において、T3'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置2から開始し、T1'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置14から開始する。一例において、T3'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置2から開始し、 q_1 は1に等しく、T1'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置14から開始し、 q_2 は1に等しい。

40

【0379】

ある特定の実施形態において、T1'およびT3'は、11ヌクレオチド長離れている（すなわちT1'およびT3'を数えない）。

【0380】

ある特定の実施形態において、T1'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置14にある。一例において、T1'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置14にあり、 q_1 は1に等しく、2'位置、または2'-OMeリボースより小さな立体容積を提供する非リボース、非環式もしくは骨格における位置にある修飾。

【0381】

ある特定の実施形態において、T3'は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置2にある

50

。一例において、 $T3'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置2にあり、 ${}^6q$ は1に等しく、2'位置、または2'-OMeリボースより小さな立体容積を提供する、非リボース、非環式もしくは骨格における位置にある修飾。

【0382】

ある特定の実施形態において、 $T1$ は、センス鎖の切断部位にある。一例において、センス鎖が19～22ヌクレオチド長であり、 n^2 が1である場合には、 $T1$ は、センス鎖の5'末端からの位置11にある。1つの例示的な実施形態において、センス鎖が19～22ヌクレオチド長であり、 n^2 が1である場合には、 $T1$ は、センス鎖の5'末端からの位置11におけるセンス鎖の切断部位にある。

【0383】

ある特定の実施形態において、 $T2'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置6から開始する。一例において、 $T2'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置6～10にあり、 q^4 は1である。

【0384】

1つの例示的な実施形態において、センス鎖が19～22ヌクレオチド長であり、 n^2 が1である場合には、 $T1$ は、センス鎖の切断部位、例えば、センス鎖の5'末端からの位置11にあり、 $T1'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置14にあり、 ${}^2q$ は1に等しく、 $T1'$ に対する修飾は、リボース糖における2'位置、または2'-OMeリボースより小さな立体容積を提供する非リボース、非環式もしくは骨格における位置にある。 $T2'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置6～10にあり、 ${}^4q$ は1であり、 $T3'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置2にあり、 q^6 は1に等しく、 $T3'$ に対する修飾は、リボース糖における2'位置、または2'-OMeリボースより小さな立体容積を提供する非リボース、非環式もしくは骨格における位置にある。

【0385】

ある特定の実施形態において、 $T2'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置8から開始する。一例において、 $T2'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置8から開始し、 q^4 は2である。

【0386】

ある特定の実施形態において、 $T2'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置9から開始する。一例において、 $T2'$ は、アンチセンス鎖の5'末端からの位置9にあり、 ${}^4q$ は1である。

【0387】

ある特定の実施形態において、 $B1'$ は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ${}^1q$ は9であり、 $T1'$ は2'-Fであり、 ${}^2q$ は1であり、 $B2'$ は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 $T2'$ は2'-Fであり、 ${}^4q$ は1であり、 $B3'$ は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は6であり、 $T3'$ は2'-Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'-OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

【0388】

ある特定の実施形態において、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ${}^1q$ は9であり、 $T1'$ は2'-Fであり、 q^2 は1であり、 $B2'$ は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ${}^3q$ は4であり、 $T2'$ は2'-Fであり、 q^4 は1であり、 $B3'$ は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ${}^5q$ は6であり、 $T3'$ は2'-Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'-OMeであり、 ${}^7q$ は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23

10

20

30

40

50

内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

【0389】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。

10

【0390】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

20

【0391】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は6であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は7であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。

30

【0392】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は6であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は7であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

40

【0393】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は1であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は6であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。

50

【0394】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1h は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T 2'は2'-Fであり、 ^4q は1であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は6であり、T 3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 ^7q は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

10

【0395】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1h は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は5であり、T 2'は2'-Fであり、 ^4q は1であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は5であり、T 3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 ^7q は1であり、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2つの追加のTTがあってもよい。

20

【0396】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1h は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は5であり、T 2'は2'-Fであり、 ^4q は1であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は5であり、T 3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 ^7q は1であり、アンチセンス鎖の3'末端に少なくとも2つの追加のTTがあってもよく、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

30

【0397】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1h は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T 3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 q^7 は1である。

40

【0398】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1h は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T 3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロ

50

チオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。

【0399】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-Fであり、 ^7q は1である。 10

【0400】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-Fであり、 ^7q は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。 20

【0401】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1である。 30

【0402】

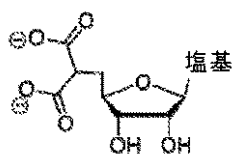
ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。 40

【0403】

RNA i 剤は、センス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端にリン含有基を含み得る。5'末端リン含有基は、5'末端ホスフェート（5'-P）、5'末端ホスホロチオエート（5'-PS）、5'末端ホスホロジチオエート（5'-P₂S）、5'末端ビニルホスホネート（5'-VP）、5'末端メチルホスホネート（MePhos）、または5'-デオキシ-5'-C-マロニル（

【0404】

【化11】

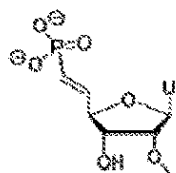


）であり得る。5'末端リン含有基が5'末端ビニルホスホネート（5'-VP）である場合、5'-VPは、5'-E-VP異性体（すなわち、trans-ビニルホスホネート

10

【0405】

【化12】

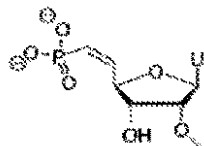


）、5'-Z-VP異性体（すなわち、cis-ビニルホスホネート

20

【0406】

【化13】



）、またはこれらの混合物のいずれかであり得る。

【0407】

ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、センス鎖の5'末端にリン含有基を含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖の5'末端にリン含有基を含む。

30

【0408】

ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、5'-Pを含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖に5'-Pを含む。

【0409】

ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、5'-PSを含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖に5'-PSを含む。

【0410】

ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、5'-VPを含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖に5'-VPを含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖に5'-E-VPを含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖に5'-Z-VPを含む。

40

【0411】

ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、5'-P₂を含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖に5'-P₂を含む。

【0412】

ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、5'-P₂を含む。ある特定の実施形態において、RNA i 剤は、アンチセンス鎖に5'-デオキシ-5'-C-マロニルを含む。

50

【0413】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。RNAi剤は、5'-PSを含む。

【0414】

10

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。RNAi剤は、5'-Pを含む。

【0415】

20

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。RNAi剤は、5'-VPを含む。5'-VPは、5'-E-VP、5'-Z-VP、またはそれらの組合せであり得る。

【0416】

30

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。RNAi剤は、5'-PS₂を含む。

【0417】

40

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-OMeであり、 ^7q は1である。RNAi剤は、5'-デオキシ-5'-C-マロニルを含む。

【0418】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまた 50

は 2' - F であり、 q^1 は 9 であり、 $T 1'$ は 2' - F であり、 ^2q は 1 であり、 $B 2'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^3 は 4 であり、 $T 2'$ は 2' - F であり、 ^4q は 2 であり、 $B 3'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 ^5q は 5 であり、 $T 3'$ は 2' - F であり、 q^6 は 1 であり、 $B 4'$ は 2' - OMe であり、 ^7q は 1 であり、センス鎖の位置 1 ~ 5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNAi 剤は、5' - P をも含む。

【0419】

10

ある特定の実施形態において、 $B 1$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 ^1n は 8 であり、 $T 1$ は 2' - F であり、 n^2 は 3 であり、 $B 2$ は 2' - OMe であり、 n^3 は 7 であり、 n^4 は 0 であり、 $B 3$ は 2' - OMe であり、 n^5 は 3 であり、 $B 1'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^1 は 9 であり、 $T 1'$ は 2' - F であり、 ^2q は 1 であり、 $B 2'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^3 は 4 であり、 $T 2'$ は 2' - F であり、 ^4q は 2 であり、 $B 3'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 ^5q は 5 であり、 $T 3'$ は 2' - F であり、 q^6 は 1 であり、 $B 4'$ は 2' - OMe であり、 ^7q は 1 であり、センス鎖の位置 1 ~ 5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNAi 剤は 5' - PS をも含む。

20

【0420】

ある特定の実施形態において、 $B 1$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 ^1n は 8 であり、 $T 1$ は 2' - F であり、 n^2 は 3 であり、 $B 2$ は 2' - OMe であり、 n^3 は 7 であり、 n^4 は 0 であり、 $B 3$ は 2' - OMe であり、 n^5 は 3 であり、 $B 1'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^1 は 9 であり、 $T 1'$ は 2' - F であり、 ^2q は 1 であり、 $B 2'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^3 は 4 であり、 $T 2'$ は 2' - F であり、 ^4q は 2 であり、 $B 3'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 ^5q は 5 であり、 $T 3'$ は 2' - F であり、 q^6 は 1 であり、 $B 4'$ は 2' - OMe であり、 ^7q は 1 であり、センス鎖の位置 1 ~ 5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNAi 剤は、5' - VP をも含む。5' - VP は、5' - E - VP、5' - Z - VP、またはそれらの組合せであり得る。

30

【0421】

ある特定の実施形態において、 $B 1$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 ^1n は 8 であり、 $T 1$ は 2' - F であり、 n^2 は 3 であり、 $B 2$ は 2' - OMe であり、 n^3 は 7 であり、 n^4 は 0 であり、 $B 3$ は 2' - OMe であり、 n^5 は 3 であり、 $B 1'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^1 は 9 であり、 $T 1'$ は 2' - F であり、 ^2q は 1 であり、 $B 2'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^3 は 4 であり、 $T 2'$ は 2' - F であり、 ^4q は 2 であり、 $B 3'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 ^5q は 5 であり、 $T 3'$ は 2' - F であり、 q^6 は 1 であり、 $B 4'$ は 2' - OMe であり、 ^7q は 1 であり、センス鎖の位置 1 ~ 5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNAi 剤は、5' - P S₂ をも含む。

40

【0422】

50

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T 2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^{5} は5であり、T 3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 ^7q は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-デオキシ-5'-C-マロニルをも含む。

10

【0423】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T 3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、5'-Pをも含む。

20

【0424】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T 3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、5'-PSをも含む。

【0425】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T 3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、5'-VPをも含む。5'-VPは、5'-E-VP、5'-Z-VP、またはそれらの組合せであり得る。

30

【0426】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T 3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B 4'は2'-OMeであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、5'-PS₂をも含む。

40

【0427】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T 1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B 2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B 3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T 1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B 2'は2' 50

－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 $6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、RNAi剤は、5'－デオキシ－5'－C－マロニルをも含む。

【0428】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 $1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 $2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 $6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－Pをも含む。

【0429】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 $1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 $2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 $6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－PSをも含む。

【0430】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 $1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 $2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 $6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－VPをも含む。5'－VPは、5'－E－VP、5'－Z－VP、またはそれらの組合せであり得る。

【0431】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 $1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 $2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 $6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチ

センス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾 (5' 末端から数えた場合) が含まれる。RNA i 剤は、5' - P S₂ をも含む。

【0432】

ある特定の実施形態において、B1 は 2' - OMe または 2' - F であり、¹n は 8 であり、T1 は 2' - F であり、ⁿ2 は 3 であり、B2 は 2' - OMe であり、ⁿ3 は 7 であり、ⁿ4 は 0 であり、B3 は 2' - OMe であり、ⁿ5 は 3 であり、B1' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q1 は 9 であり、T1' は 2' - F であり、²q は 1 であり、B2' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q3 は 4 であり、^q4 は 0 であり、B3' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q5 は 7 であり、T3' は 2' - F であり、⁶q は 1 であり、B4' は 2' - OMe であり、^q7 は 1 であり、センス鎖の位置 1 ~ 5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾 (5' 末端から数えた場合)、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾 (5' 末端から数えた場合) が含まれる。RNA i 剤は、5' - デオキシ - 5' - C - マロニル をも含む。

【0433】

ある特定の実施形態において、B1 は 2' - OMe または 2' - F であり、¹n は 8 であり、T1 は 2' - F であり、ⁿ2 は 3 であり、B2 は 2' - OMe であり、ⁿ3 は 7 であり、ⁿ4 は 0 であり、B3 は 2' - OMe であり、ⁿ5 は 3 であり、B1' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q1 は 9 であり、T1' は 2' - F であり、²q は 1 であり、B2' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q3 は 4 であり、T2' は 2' - F であり、⁴q は 2 であり、B3' は 2' - OMe または 2' - F であり、⁵ は 5 であり、T3' は 2' - F であり、^q6 は 1 であり、B4' は 2' - F であり、⁷q は 1 である。RNA i 剤は、5' - P をも含む。

【0434】

ある特定の実施形態において、B1 は 2' - OMe または 2' - F であり、¹n は 8 であり、T1 は 2' - F であり、ⁿ2 は 3 であり、B2 は 2' - OMe であり、ⁿ3 は 7 であり、ⁿ4 は 0 であり、B3 は 2' - OMe であり、ⁿ5 は 3 であり、B1' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q1 は 9 であり、T1' は 2' - F であり、²q は 1 であり、B2' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q3 は 4 であり、T2' は 2' - F であり、⁴q は 2 であり、B3' は 2' - OMe または 2' - F であり、⁵ は 5 であり、T3' は 2' - F であり、^q6 は 1 であり、B4' は 2' - F であり、⁷q は 1 である。RNA i 剤は、5' - P S をも含む。

【0435】

ある特定の実施形態において、B1 は 2' - OMe または 2' - F であり、¹n は 8 であり、T1 は 2' - F であり、ⁿ2 は 3 であり、B2 は 2' - OMe であり、ⁿ3 は 7 であり、ⁿ4 は 0 であり、B3 は 2' - OMe であり、ⁿ5 は 3 であり、B1' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q1 は 9 であり、T1' は 2' - F であり、²q は 1 であり、B2' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q3 は 4 であり、T2' は 2' - F であり、⁴q は 2 であり、B3' は 2' - OMe または 2' - F であり、⁵ は 5 であり、T3' は 2' - F であり、^q6 は 1 であり、B4' は 2' - F であり、⁷q は 1 である。RNA i 剤は、5' - VP をも含む。5' - VP は、5' - E - VP、5' - Z - VP、またはそれらの組合せであり得る。

【0436】

ある特定の実施形態において、B1 は 2' - OMe または 2' - F であり、¹n は 8 であり、T1 は 2' - F であり、ⁿ2 は 3 であり、B2 は 2' - OMe であり、ⁿ3 は 7 であり、ⁿ4 は 0 であり、B3 は 2' - OMe であり、ⁿ5 は 3 であり、B1' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q1 は 9 であり、T1' は 2' - F であり、²q は 1 であり、B2' は 2' - OMe または 2' - F であり、^q3 は 4 であり、T2' は 2' - F であり、⁴q は 2 であり、B3' は 2' - OMe または 2' - F であり、⁵ は 5 であり、T3' は 2' - F であり、^q6 は 1 であり、B4' は 2' - F であり、⁷q は 1 である。RNA i 剤は、5' - VP をも含む。5' - VP は、5' - E - VP、5' - Z - VP、またはそれらの組合せであり得る。

⁶は1であり、B 4'は2'-Fであり、⁷qは1である。dsRNA RNA i 剤は、5'-PS₂をも含む。

【0437】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T 1は2'-Fであり、ⁿ2は3であり、B 2は2'-OMeであり、ⁿ3は7であり、ⁿ4は0であり、B 3は2'-OMeであり、ⁿ5は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q1は9であり、T 1'は2'-Fであり、²qは1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q3は4であり、T 2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵は5であり、T 3'は2'-Fであり、^q6は1であり、B 4'は2'-Fであり、⁷qは1である。RNA i 剤は、5'-デオキシ- 10
5'-C-マロニルをも含む。

【0438】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T 1は2'-Fであり、ⁿ2は3であり、B 2は2'-OMeであり、ⁿ3は7であり、ⁿ4は0であり、B 3は2'-OMeであり、ⁿ5は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q1は9であり、T 1'は2'-Fであり、²qは1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q3は4であり、T 2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵は5であり、T 3'は2'-Fであり、^q6は1であり、B 4'は2'-Fであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'-Pをも含む。 20

【0439】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T 1は2'-Fであり、ⁿ2は3であり、B 2は2'-OMeであり、ⁿ3は7であり、ⁿ4は0であり、B 3は2'-OMeであり、ⁿ5は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q1は9であり、T 1'は2'-Fであり、²qは1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q3は4であり、T 2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵は5であり、T 3'は2'-Fであり、^q6は1であり、B 4'は2'-Fであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は5'-PSをも含む。 30

【0440】

ある特定の実施形態において、B 1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T 1は2'-Fであり、ⁿ2は3であり、B 2は2'-OMeであり、ⁿ3は7であり、ⁿ4は0であり、B 3は2'-OMeであり、ⁿ5は3であり、B 1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q1は9であり、T 1'は2'-Fであり、²qは1であり、B 2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、^q3は4であり、T 2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B 3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵は5であり、T 3'は2'-Fであり、^q6は1であり、B 4'は2'-Fであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'-VPをも含む。5'-VPは、5'-E-VP、5'-Z-VP、またはそれ 40

らの組合せであり得る。

【0441】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、T2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵は5であり、T3'は2'-Fであり、q⁶は1であり、B4'は2'-Fであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-P S₂をも含む。

【0442】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、T2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵は5であり、T3'は2'-Fであり、q⁶は1であり、B4'は2'-Fであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-デオキシ-5'-C-マロニルをも含む。

【0443】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、q⁴は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q⁵は7であり、T3'は2'-Fであり、⁶qは1であり、B4'は2'-Fであり、q⁷は1である。RNAi剤は、5'-Pをも含む。

【0444】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、q⁴は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q⁵は7であり、T3'は2'-Fであり、⁶qは1であり、B4'は2'-Fであり、q⁷は1である。RNAi剤は、5'-P Sをも含む。

【0445】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、q⁴は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q⁵は7であり、T3'は2'-Fであり、⁶qは1であり、B4'は

2'-Fであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、5'-VPをも含む。5'-VPは、5'-E-VP、5'-Z-VP、またはそれらの組合せであり得る。

【0446】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 $1n$ は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 $2q$ は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 $6q$ は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、5'-P_{S2}をも含む。

10

【0447】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 $1n$ は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 $2q$ は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 $6q$ は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1である。RNAi剤は、5'-デオキシ-5'-C-マロニルをも含む。

【0448】

20

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 $1n$ は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 $2q$ は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 $6q$ は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-Pをも含む。

30

【0449】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 $1n$ は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 $2q$ は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 $6q$ は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-PSをも含む。

40

【0450】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 $1n$ は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 $2q$ は1であり、B2'は2'-

50

－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－VPをも含む。5'－VPは、5'－E－VP、5'－Z－VP、またはそれらの組合せであり得る。

【0451】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 ${}^2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－P₂Sをも含む。

10

20

【0452】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 ${}^2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－デオキシ－5'－C－マロニルをも含む。

30

【0453】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 ${}^2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 $T2'$ は2'－Fであり、 ${}^4q$ は2であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 n^5 は5であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 q^6 は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 ${}^7q$ は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－Pおよび標的化リガンドをも含む。特定の実施形態において、5'－Pは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

40

【0454】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^1n$ は8であ

50

り、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、T2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵qは5であり、T3'は2'-Fであり、q⁶は1であり、B4'は2'-OMeであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-PSおよび標的化リガンドをも含む。特定の実施形態において、5'-PSは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

10

【0455】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、T2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵qは5であり、T3'は2'-Fであり、q⁶は1であり、B4'は2'-OMeであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-VP（例えば、5'-E-VP、5'-Z-VP、またはそれらの組合せ）および標的化リガンドをも含む。

20

【0456】

ある特定の実施形態において、5'-VPは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

30

【0457】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q³は4であり、T2'は2'-Fであり、⁴qは2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、⁵qは5であり、T3'は2'-Fであり、q⁶は1であり、B4'は2'-OMeであり、⁷qは1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'-PS₂および標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'-PS₂は、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

40

【0458】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、¹nは8であり、T1は2'-Fであり、n²は3であり、B2は2'-OMeであり、n³は7であり、n⁴は0であり、B3は2'-OMeであり、n⁵は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、q¹は9であり、T1'は2'-Fであり、²qは1であり、B2'は2' 50

－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 $T2'$ は2'－Fであり、 ${}^4q$ は2であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^5n$ は5であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 q^6 は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 ${}^7q$ は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－デオキシ－5'－C－マロニルおよび標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'－デオキシ－5'－C－マロニルは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

10

【0459】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 ${}^2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－Pおよび標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'－Pは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

20

【0460】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 ${}^2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－PSおよび標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'－PSは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

30

【0461】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 ${}^1n$ は8であり、 $T1$ は2'－Fであり、 n^2 は3であり、 $B2$ は2'－OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、 $B3$ は2'－OMeであり、 n^5 は3であり、 $B1'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^1 は9であり、 $T1'$ は2'－Fであり、 ${}^2q$ は1であり、 $B2'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、 $B3'$ は2'－OMeまたは2'－Fであり、 q^5 は7であり、 $T3'$ は2'－Fであり、 ${}^6q$ は1であり、 $B4'$ は2'－OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1～5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18～23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（5'末端から数えた場合）が含まれる。RNAi剤は、5'－VP（例えば、5'－E－VP、

40

50

5'-Z-VP、またはそれらの組合せ) および標的化リガンドをも含む。ある特定の実施形態において、5'-VPは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0462】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B4'は2'-OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾(5'末端から数えた場合)、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾(5'末端から数えた場合)が含まれる。RNAi剤は、5'-PS₂および標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'-PS₂は、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0463】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B4'は2'-OMeであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾(5'末端から数えた場合)、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾(5'末端から数えた場合)が含まれる。RNAi剤は、5'-デオキシ-5'-C-マロニルおよび標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'-デオキシ-5'-C-マロニルは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0464】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、T2'は2'-Fであり、 ^4q は2であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^5q は5であり、T3'は2'-Fであり、 q^6 は1であり、B4'は2'-Fであり、 ^7q は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾(センス鎖の5'末端から数えた場合)、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾(アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合)が含まれる。RNAi剤は、5'-Pおよび標的化リガンドをも含む。特定の実施形態において、5'-Pは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0465】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2' 50

—OMe または 2'—F であり、 q^3 は 4 であり、 $T2'$ は 2'—F であり、 $4q$ は 2 であり、 $B3'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 5 は 5 であり、 $T3'$ は 2'—F であり、 q^6 は 1 であり、 $B4'$ は 2'—F であり、 $7q$ は 1 であり、センス鎖の位置 1～5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'—PS および標的化リガンドをも含む。特定の実施形態において、5'—PS は、アンチセンス鎖の 5' 末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の 3' 末端にある。
【0466】

10

ある特定の実施形態において、 $B1$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 $1n$ は 8 であり、 $T1$ は 2'—F であり、 n^2 は 3 であり、 $B2$ は 2'—OMe であり、 n^3 は 7 であり、 n^4 は 0 であり、 $B3$ は 2'—OMe であり、 n^5 は 3 であり、 $B1'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 q^1 は 9 であり、 $T1'$ は 2'—F であり、 $2q$ は 1 であり、 $B2'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 q^3 は 4 であり、 $T2'$ は 2'—F であり、 $4q$ は 2 であり、 $B3'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 5 は 5 であり、 $T3'$ は 2'—F であり、 q^6 は 1 であり、 $B4'$ は 2'—F であり、 $7q$ は 1 であり、センス鎖の位置 1～5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'—VP（例えば、5'—E—VP、5'—Z—VP、またはそれらの組合せ）および標的化リガンドをも含む。ある特定の実施形態において、5'—VP は、アンチセンス鎖の 5' 末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の 3' 末端にある。
【0467】

20

ある特定の実施形態において、 $B1$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 $1n$ は 8 であり、 $T1$ は 2'—F であり、 n^2 は 3 であり、 $B2$ は 2'—OMe であり、 n^3 は 7 であり、 n^4 は 0 であり、 $B3$ は 2'—OMe であり、 n^5 は 3 であり、 $B1'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 q^1 は 9 であり、 $T1'$ は 2'—F であり、 $2q$ は 1 であり、 $B2'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 q^3 は 4 であり、 $T2'$ は 2'—F であり、 $4q$ は 2 であり、 $B3'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 5 は 5 であり、 $T3'$ は 2'—F であり、 q^6 は 1 であり、 $B4'$ は 2'—F であり、 $7q$ は 1 であり、センス鎖の位置 1～5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'—PS₂ および標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'—PS₂ は、アンチセンス鎖の 5' 末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の 3' 末端にある。
【0468】

30

ある特定の実施形態において、 $B1$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 $1n$ は 8 であり、 $T1$ は 2'—F であり、 n^2 は 3 であり、 $B2$ は 2'—OMe であり、 n^3 は 7 であり、 n^4 は 0 であり、 $B3$ は 2'—OMe であり、 n^5 は 3 であり、 $B1'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 q^1 は 9 であり、 $T1'$ は 2'—F であり、 $2q$ は 1 であり、 $B2'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 q^3 は 4 であり、 $T2'$ は 2'—F であり、 $4q$ は 2 であり、 $B3'$ は 2'—OMe または 2'—F であり、 5 は 5 であり、 $T3'$ は 2'—F であり、 q^6 は 1 であり、 $B4'$ は 2'—F であり、 $7q$ は 1 であり、センス鎖の位置 1～5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNA

40

50

i 剤は、5'-デオキシ-5'-C-マロニルおよび標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5'-デオキシ-5'-C-マロニルは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0469】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'-Pおよび標的化リガンドをも含む。特定の実施形態において、5'-Pは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0470】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'-PSおよび標的化リガンドをも含む。特定の実施形態において、5'-PSは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0471】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^1 は9であり、T1'は2'-Fであり、 ^2q は1であり、B2'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^3 は4であり、 q^4 は0であり、B3'は2'-OMeまたは2'-Fであり、 q^5 は7であり、T3'は2'-Fであり、 ^6q は1であり、B4'は2'-Fであり、 q^7 は1であり、センス鎖の位置1~5内における2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の5'末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置1および2における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置18~23内の2つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の5'末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5'-VP（例えば、5'-E-VP、5'-Z-VP、またはそれらの組合せ）および標的化リガンドをも含む。ある特定の実施形態において、5'-VPは、アンチセンス鎖の5'末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の3'末端にある。

【0472】

ある特定の実施形態において、B1は2'-OMeまたは2'-Fであり、 ^1n は8であり、T1は2'-Fであり、 n^2 は3であり、B2は2'-OMeであり、 n^3 は7であり、 n^4 は0であり、B3は2'-OMeであり、 n^5 は3であり、B1'は2'-OMeまた

は 2' - F であり、 q^1 は 9 であり、 $T1'$ は 2' - F であり、 $2q$ は 1 であり、 $B2'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^3 は 4 であり、 q^4 は 0 であり、 $B3'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^5 は 7 であり、 $T3'$ は 2' - F であり、 $6q$ は 1 であり、 $B4'$ は 2' - F であり、 q^7 は 1 であり、センス鎖の位置 1 ~ 5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5' - P₂ および標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5' - P₂ は、アンチセンス鎖の 5' 末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の 3' 末端にある。

10

【0473】

ある特定の実施形態において、 $B1$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 $1n$ は 8 であり、 $T1$ は 2' - F であり、 n^2 は 3 であり、 $B2$ は 2' - OMe であり、 n^3 は 7 であり、 n^4 は 0 であり、 $B3$ は 2' - OMe であり、 n^5 は 3 であり、 $B1'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^1 は 9 であり、 $T1'$ は 2' - F であり、 $2q$ は 1 であり、 $B2'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^3 は 4 であり、 q^4 は 0 であり、 $B3'$ は 2' - OMe または 2' - F であり、 q^5 は 7 であり、 $T3'$ は 2' - F であり、 $6q$ は 1 であり、 $B4'$ は 2' - F であり、 q^7 は 1 であり、センス鎖の位置 1 ~ 5 内における 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（センス鎖の 5' 末端から数えた場合）、ならびにアンチセンス鎖の位置 1 および 2 における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18 ~ 23 内の 2 つのホスホロチオエートオリゴヌクレオチド間連結修飾（アンチセンス鎖の 5' 末端から数えた場合）が含まれる。RNA i 剤は、5' - デオキシ - 5' - C - マロニル および標的化剤をも含む。ある特定の実施形態において、5' - デオキシ - 5' - C - マロニル は、アンチセンス鎖の 5' 末端にあり、標的化リガンドは、センス鎖の 3' 末端にある。

20

【0474】

特定の実施形態において、本発明の RNA i 剤は、

(a) (i) 21 個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3' - 末端に付着された ASGPR リガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された 3 つの GalNAc 誘導体を含む ASGPR リガンド、および

30

(iii) 位置 1、3、5、7、9 ~ 11、13、17、19 および 21 における 2' - F 修飾、ならびに位置 2、4、6、8、12、14 ~ 16、18 および 20 における 2' - OMe 修飾（5' 末端から数えた場合）を有するセンス鎖と、

(b) (i) 23 個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 位置 1、3、5、9、11 ~ 13、15、17、19、21 および 23 における 2' - OMe 修飾、ならびに位置 2、4、6 ~ 8、10、14、16、18、20 および 22 における 2' - F 修飾（5' 末端から数えた場合）、および

(iii) ヌクレオチド位置 21 と 22 の間およびヌクレオチド位置 22 と 23 の間（5' 末端から数えた場合）のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

40

dsRNA i 剤は、アンチセンス鎖の 3' 末端における 2 ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の 5' 末端における平滑末端を有する。

【0475】

別の特定の実施形態において、本発明の RNA i 剤は、

(a) (i) 21 個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3' - 末端に付着された ASGPR リガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された 3 つの GalNAc 誘導体を含む ASGPR リガンド、

(iii) 位置 1、3、5、7、9 ~ 11、13、15、17、19 および 21 における 2' - F 修飾、ならびに位置 2、4、6、8、12、14 ~ 16、18 および 20 における 2' - OMe 修飾を有するセンス鎖（5' 末端から数えた場合）、および

50

(i v) ヌクレオチド位置 1 と 2 の間およびヌクレオチド位置 2 と 3 の間 (5' 末端から数えた場合) のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 23 個のヌクレオチドの長さ、

(i i) 位置 1、3、5、7、9、11~13、15、17、19 および 21~23 における 2'-OMe 修飾、ならびに位置 2、4、6、8、10、14、16、18 および 20 における 2'-F 修飾 (5' 末端から数えた場合)、および

(i i i) ヌクレオチド位置 1 と 2 の間、ヌクレオチド位置 2 と 3 の間、ヌクレオチド位置 21 と 22 の間およびヌクレオチド 22 と 23 の間 (5' 末端から数えた場合) のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNA i 剤は、アンチセンス鎖の 3' 末端における 2 ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の 5' 末端における平滑末端を有する。

10

【0476】

別の特定の実施形態において、本発明の RNA i 剤は、

(a) (i) 21 個のヌクレオチドの長さ、

(i i) 3'-末端に付着された ASGPR リガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された 3 つの GalNAc 誘導体を含む ASGPR リガンド、

(i i i) 位置 1~6、8、10 および 12~21 における 2'-OMe 修飾、位置 7 および 9 における 2'-F 修飾、ならびに位置 11 におけるデオキシヌクレオチド (例えば dT) (5' 末端から数えた場合)、および

(i v) ヌクレオチド位置 1 と 2 の間およびヌクレオチド位置 2 と 3 の間 (5' 末端から数えた場合) のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

20

(b) (i) 23 個のヌクレオチドの長さ、

(i i) 位置 1、3、5、7、9、11、13、15、17 および 19~23 における 2'-OMe 修飾、ならびに位置 2、4~6、8、10、12、14、16 および 18 における 2'-F 修飾 (5' 末端から数えた場合)、および

(i i i) ヌクレオチド位置 1 と 2 の間、ヌクレオチド位置 2 と 3 の間、ヌクレオチド位置 21 と 22 の間およびヌクレオチド 22 と 23 の間 (5' 末端から数えた場合) のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNA i 剤は、アンチセンス鎖の 3' 末端における 2 ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の 5' 末端における平滑末端を有する。

30

【0477】

別の特定の実施形態において、本発明の RNA i 剤は、

(a) (i) 21 個のヌクレオチドの長さ、

(i i) 3'-末端に付着された ASGPR リガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された 3 つの GalNAc 誘導体を含む ASGPR リガンド、

(i i i) 位置 1~6、8、10、12、14 および 16~21 における 2'-OMe 修飾、ならびに位置 7、9、11、13 および 15 における 2'-F 修飾、および

(i v) ヌクレオチド位置 1 と 2 の間およびヌクレオチド位置 2 と 3 の間 (5' 末端から数えた場合) のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 23 個のヌクレオチドの長さ、

40

(i i) 位置 1、5、7、9、11、13、15、17、19 および 21~23 における 2'-OMe 修飾、ならびに位置 2~4、6、8、10、14、16、18 および 20 における 2'-F 修飾 (5' 末端から数えた場合)、および

(i i i) ヌクレオチド位置 1 と 2 の間、ヌクレオチド位置 2 と 3 の間、ヌクレオチド位置 21 と 22 の間およびヌクレオチド 22 と 23 の間 (5' 末端から数えた場合) のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNA i 剤は、アンチセンス鎖の 3' 末端における 2 ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の 5' 末端における平滑末端を有する。

【0478】

別の特定の実施形態において、本発明の RNA i 剤は、

50

(a) (i) 21個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3'-末端に付着されたASGPRリガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された3つのGalNAc誘導体を含むASGPRリガンド、

(iii) 位置1～9および12～21における2'-OMe修飾、ならびに位置10および11における2'-F修飾、および

(iv) ヌクレオチド位置1と2の間およびヌクレオチド位置2と3の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 23個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 位置1、3、5、7、9、11～13、15、17、19および21～23における2'-OMe修飾、ならびに位置2、4、6、8、10、14、16、18および20における2'-F修飾(5'末端から数えた場合)、および

(iii) ヌクレオチド位置1と2の間、ヌクレオチド位置2と3の間、ヌクレオチド位置21と22の間およびヌクレオチド22と23の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端における2ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の5'末端における平滑末端を有する。

【0479】

別の特定の実施形態において、本発明のRNAi剤は、

(a) (i) 21個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3'-末端に付着されたASGPRリガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された3つのGalNAc誘導体を含むASGPRリガンド、

(iii) 位置1、3、5、7、9～11および13における2'-F、ならびに位置2、4、6、8、12および14～21における2'-OMe、および

(iv) ヌクレオチド位置1と2の間およびヌクレオチド位置2と3の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 23個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 位置1、3、5～7、9、11～13、15、17～19および21～23における2'-OMe修飾、ならびに位置2、4、8、10、14、16および20における2'-F修飾(5'末端から数えた場合)、および

(iii) ヌクレオチド位置1と2の間、ヌクレオチド位置2と3の間、ヌクレオチド位置21と22の間およびヌクレオチド22と23の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端における2ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の5'末端における平滑末端を有する。

【0480】

別の特定の実施形態において、本発明のRNAi剤は、

(a) (i) 21個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3'-末端に付着されたASGPRリガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された3つのGalNAc誘導体を含むASGPRリガンド、

(iii) 位置1、2、4、6、8、12、14、15、17および19～21における2'-OMe修飾、ならびに位置3、5、7、9～11、13、16および18における2'-F修飾、および

(iv) ヌクレオチド位置1と2の間およびヌクレオチド位置2と3の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 25個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 位置1、4、6、7、9、11～13、15、17および19～23における2'-OMe修飾、ならびに位置2、3、5、8、10、14、16および18における2'-F修飾(5'末端から数えた場合)、および

(iii) ヌクレオチド位置1と2の間、ヌクレオチド位置2と3の間、ヌクレオチド位置21と22の間およびヌクレオチド22と23の間(5'末端から数えた場合)のホ

10

20

30

40

50

スホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端における4ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の5'末端における平滑末端を有する。

【0481】

別の特定の実施形態において、本発明のRNAi剤は、

(a) (i) 21個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3'-末端に付着されたASGPRリガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された3つのGalNAc誘導体を含むASGPRリガンド、

(iii) 位置1~6、8および12~21における2'-OMe修飾、ならびに位置7および9~11における2'-F修飾、および

(iv) ヌクレオチド位置1と2の間およびヌクレオチド位置2と3の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 23個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 位置1、3~5、7、8、10~13、15および17~23における2'-OMe修飾、ならびに位置2、6、9、14および16における2'-F修飾(5'末端から数えた場合)、および

(iii) ヌクレオチド位置1と2の間、ヌクレオチド位置2と3の間、ヌクレオチド位置21と22の間およびヌクレオチド22と23の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端における2ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の5'末端における平滑末端を有する。

【0482】

別の特定の実施形態において、本発明のRNAi剤は、

(a) (i) 21個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3'-末端に付着されたASGPRリガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された3つのGalNAc誘導体を含むASGPRリガンド、

(iii) 位置1~6、8および12~21における2'-OMe修飾、ならびに位置7および9~11における2'-F修飾、および

(iv) ヌクレオチド位置1と2の間およびヌクレオチド位置2と3の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 23個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 位置1、3~5、7、10~13、15および17~23における2'-OMe修飾、ならびに位置2、6、8、9、14および16における2'-F修飾(5'末端から数えた場合)、および

(iii) ヌクレオチド位置1と2の間、ヌクレオチド位置2と3の間、ヌクレオチド位置21と22の間およびヌクレオチド22と23の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNAi剤は、アンチセンス鎖の3'末端における2ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の5'末端における平滑末端を有する。

【0483】

別の特定の実施形態において、本発明のRNAi剤は、

(a) (i) 19個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 3'-末端に付着されたASGPRリガンドであって、三価の分枝状リンカーを通じて付着された3つのGalNAc誘導体を含むASGPRリガンド、

(iii) 位置1~4、6および10~19における2'-OMe修飾、ならびに位置5および7~9における2'-F修飾、および

(iv) ヌクレオチド位置1と2の間およびヌクレオチド位置2と3の間(5'末端から数えた場合)のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するセンス鎖と、

(b) (i) 21個のヌクレオチドの長さ、

(ii) 位置1、3~5、7、10~13、15および17~21における2'-OM

10

20

30

40

50

e 修飾、ならびに位置 2、6、8、9、14 および 16 における 2' - F 修飾（5' 末端から数えた場合）、および

(iii) ヌクレオチド位置 1 と 2 の間、ヌクレオチド位置 2 と 3 の間、ヌクレオチド位置 19 と 20 の間およびヌクレオチド 20 と 21 の間（5' 末端から数えた場合）のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を有するアンチセンス鎖とを含み、

RNAi 剤は、アンチセンス鎖の 3' 末端における 2 ヌクレオチドのオーバーハング、およびアンチセンス鎖の 5' 末端における平滑末端を有する。

【0484】

ある特定の実施形態において、本発明の方法において使用するための iRNA 剤は、表 3 または 4 に記載される薬剤から選択される薬剤である。これらの薬剤は、リガンドをさらに含んでもよい。

10

【0485】

一実施形態において、薬剤は、AD-1753226、AD-1753250、AD-1753259、AD-1753324、AD-1753346、AD-1753413、AD-1753439、AD-1753456、AD-1753520、AD-1753536、AD-1753557、AD-1753624、AD-1753651、AD-1753661、AD-1753725、AD-1753744、AD-1753813、AD-1753827、AD-1753844、AD-1753860、AD-1753917、AD-1753949、AD-1754026、AD-1754053、AD-1754117、AD-1754133、AD-1754147、AD-1754162、AD-1754226、AD-1754240、AD-1754255、AD-1754327、AD-1754342、AD-1754353、AD-1754420、AD-1754434、AD-1754450、AD-1754530、AD-1754550、AD-1754618、AD-1754637、AD-1754661、AD-1754735、AD-1754749、AD-1754818、AD-1754838、AD-1754862、AD-1754939、AD-1755013、AD-1755046、AD-1755120、AD-1755141、AD-1755155、AD-1755219、AD-1755326、AD-1755340、AD-1755358、AD-1755435、AD-1755451、AD-1755515、AD-1755539、AD-1755554、AD-1755621、AD-1755636、AD-1755650、AD-1755714、AD-1755734、AD-1755747、AD-1755761、AD-1755827、AD-1755830、AD-1755845、AD-1755859、AD-1755923、AD-1755943、AD-1756028、AD-1756044、AD-1756131、AD-1756146、AD-1756219、AD-1756236、AD-1756319、AD-1756335、AD-1756354、AD-1756429、AD-1756439、AD-1756514、AD-1756533、AD-1756552、AD-1756616、AD-1756631、AD-1756653、AD-1756718、AD-1756749、AD-1756814、AD-1756834、AD-1756858、AD-1756915、AD-1756932、AD-1756947、AD-1757019、AD-1757032、AD-1757052、AD-1757124、AD-1757146、AD-1757171、AD-1757191、AD-1757211、AD-1757225、AD-1757242、AD-1757258、AD-1757274、AD-1757278、AD-1757292、AD-1757308、AD-1757323、AD-1757337、AD-1757361、AD-1757377、AD-1757391、AD-1757418、AD-1757434、AD-1757449、AD-1757464、AD-1757478、AD-1757495、AD-1757509、AD-1757532、AD-1757544、AD-1757564、AD-1757583、AD-1757603、AD-1757617、AD-1757634 または AD-1757649 である。これらの薬剤は、リガンドをさら

20

30

40

50

に含んでもよい。

【0486】

B. 熱不安定化修飾

ある特定の実施形態において、dsRNA分子は、熱不安定化修飾をアンチセンス鎖のシード領域に組み込むことによってRNA干渉について最適化することができる。本明細書に使用される場合、「シード領域」は、参照された鎖の5'端の位置2～9を意味する。例えば、熱不安定化修飾をアンチセンス鎖のシード領域に組み込んで、オフターゲット遺伝子サイレンシングを低減または阻害することができる。

【0487】

用語「熱不安定化修飾」は、当該修飾を有さないdsRNAの融解温度(T_m)より総合的な T_m が低いdsRNAをもたらす修飾を含む。例えば、熱不安定化修飾は、dsRNAの T_m を1～4℃、例えば、セ氏1℃、2℃、3℃または4℃下げることができる。そして、用語「熱不安定化ヌクレオチド」は、1つまたは複数の熱不安定化修飾を含むヌクレオチドを指す。

【0488】

アンチセンス鎖の5'端から数えて最初の9のヌクレオチド位置内に二重鎖の少なくとも1個の熱不安定化修飾を含むアンチセンス鎖を有するdsRNAは、オフターゲット遺伝子サイレンシング活性が低下していることが発見された。したがって、一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'領域の最初の9のヌクレオチド位置内に二重鎖の少なくとも1個（例えば、1、2、3、4または5個以上）の熱不安定化修飾を含む。一部の実施形態において、二重鎖の1つまたは複数の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から位置2～9、例えば位置4～8に位置する。一部のさらなる実施形態において、二重鎖の熱不安定化修飾（複数可）は、アンチセンス鎖の5'末端から位置6、7または8に位置する。さらに一部のさらなる実施形態において、二重鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から位置7に位置する。一部の実施形態において、二重鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'末端から位置2、3、4、5または9に位置する。

【0489】

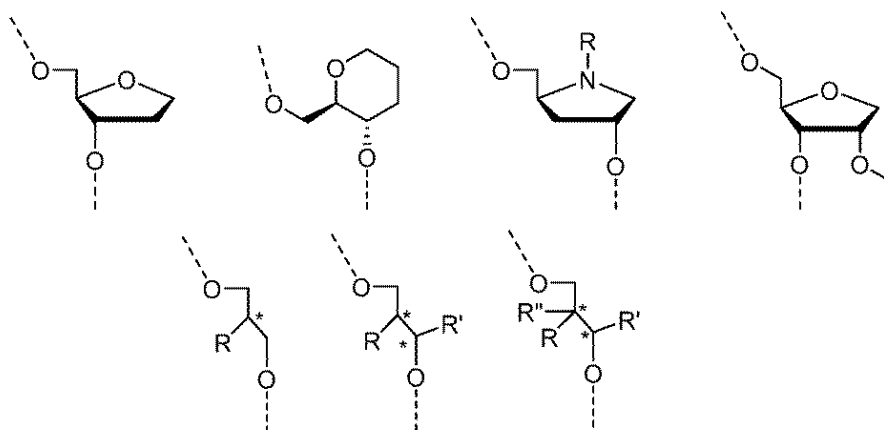
熱不安定化修飾は、限定することなく、脱塩基修飾；対向する鎖における対向するヌクレオチドとのミスマッチ；および2'-デオキシ修飾または非環式ヌクレオチド、例えば、非ロックド核酸(UNA)またはグリコール核酸(GNA)などの糖修飾を含み得る。

【0490】

例示的な脱塩基修飾としては、

【0491】

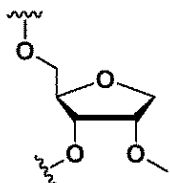
【化14】



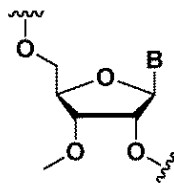
(式中、 $R = H, Me, Et$ または OMe ； $R' = H, Me, Et$ または OMe ； $R'' = H, Me, Et$ または OMe である)

【0492】

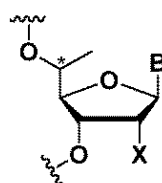
【化15】



Mod2
(2'-OMe脱塩基
スペーサー)

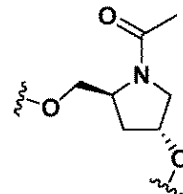


Mod3
(3'-OMe)



Mod4
(5'-Me)

X = OMe, F



Mod5
(Hyp-スペーサー)

10

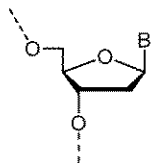
(式中、Bは、修飾されたまたは未修飾の核酸塩基である)
が挙げられるが、それらに限定されない。

【0493】

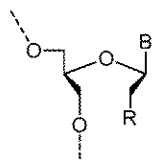
例示的な糖修飾としては、

【0494】

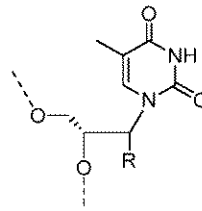
【化16】



2'-デオキシ

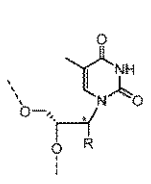


非ロックド核酸
R = H, OH, O-アルキル

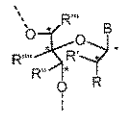


グリコール核酸
R = H, OH, O-アルキル

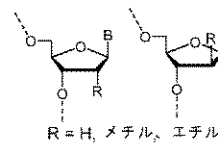
20



グリコール核酸
R = H, OH, O-アルキル



非ロックド核酸
R = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-alkyl, NH₂, NHMe, NMe₂
R' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-alkyl, NH₂, NHMe, NMe₂
R'' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-alkyl, NH₂, NHMe, NMe₂
R''' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-alkyl, NH₂, NHMe, NMe₂
R'''' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-alkyl, NH₂, NHMe, NMe₂



R = H, メチル, エチル

30

(式中、Bは、修飾されたまたは未修飾の核酸塩基である) が挙げられるが、それらに限定されない。

【0495】

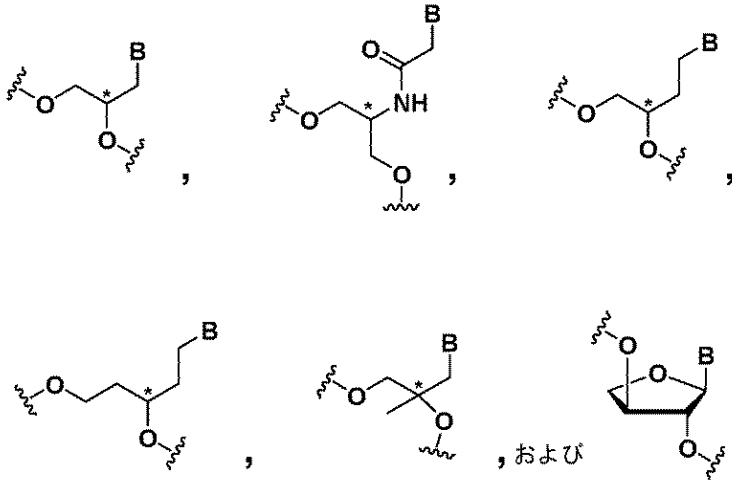
一部の実施形態において、二重鎖の熱不安定化修飾は、

【0496】

40

50

【化 1 7】



10

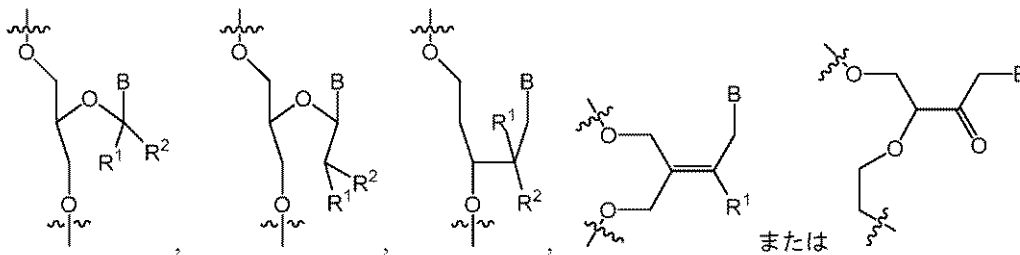
〔式中、Bは、修飾されたまたは未修飾の核酸塩基であり、各構造上の星印は、R、Sまたはラセミを表す〕からなる群から選択される。

【0497】

用語「非環式ヌクレオチド」は、例えば、リボース炭素間の結合（例えば、C1' - C2'、C2' - C3'、C3' - C4'、C4' - O4'またはC1' - O4'）のいずれかが不在であるか、またはリボース炭素または酸素（例えば、C1'、C2'、C3'、C4'またはO4'）のうちの少なくとも1つが、独立にまたは組み合わせて、ヌクレオチドから不在である、非環式リボース糖を有する任意のヌクレオチドを指す。一部の実施形態において、非環式ヌクレオチドは、

【0498】

【化 1 8】



30

〔式中、Bは、修飾されたまたは未修飾の核酸塩基であり、R¹およびR²は、独立に、H、ハロゲン、OR₃またはアルキルであり、R₃は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖である〕である。非環式誘導体は、ワトソン・クリック対合に影響を及ぼすことなくより高い骨格柔軟性を提供する。非環式ヌクレオチドは、2' - 5'または3' - 5'連結を介して連結され得る。

【0499】

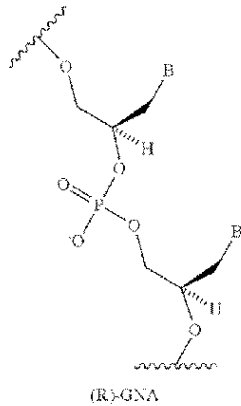
40

用語「GNA」は、DNAまたはRNAに類似するが、ホスホジエステル結合によって連結される繰り返しグリセロール単位で構成される点でその「骨格」の組成が異なるポリマーであるグリコール核酸を指す。

【0500】

50

【化 19】



【0501】

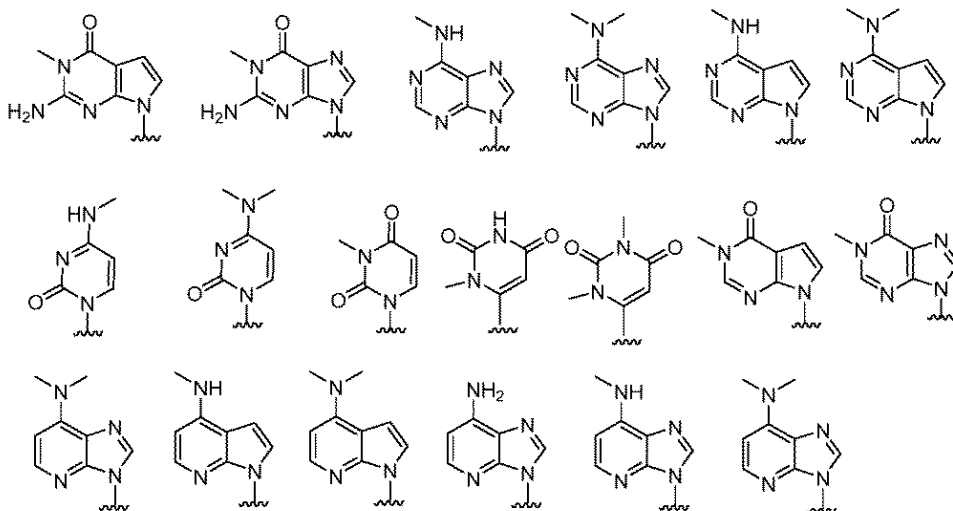
二重鎖の熱不安定化修飾は、熱不安定化ヌクレオチドと dsRNA 二重鎖内の反対側の鎖における対向するヌクレオチドとのミスマッチ（すなわち非相補的塩基対）であり得る。例示的なミスマッチ塩基対としては、G : G、G : A、G : U、G : T、A : A、A : C、C : C、C : U、C : T、U : U、T : T、U : T またはそれらの組合せが挙げられる。当該技術分野において公知の他のミスマッチ塩基対合も本発明に適している。ミスマッチは、天然に存在するヌクレオチドまたは修飾されたヌクレオチドの間に存在し得る。すなわち、ミスマッチ塩基対合は、ヌクレオチドのリボース糖上の修飾から独立したそれぞれのヌクレオチドから核酸塩基間に存在し得る。ある特定の実施形態において、dsRNA 分子は、2'-デオキシ核酸塩基であるミスマッチ対合における少なくとも 1 つの核酸塩基を含み、例えば、2'-デオキシ核酸塩基はセンス鎖にある。

【0502】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖のシード領域における二重鎖の熱不安定化修飾は、標的 mRNA 上の相補性塩基に対するワトソン・クリック水素結合が低下したヌクレオチド、例えば、

【0503】

【化 20】



を含む。

【0504】

脱塩基ヌクレオチド、非環式ヌクレオチド修飾（UNA および GNA を含む）およびミスマッチ修飾のさらなる例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる WO 2011 / 133876 号に詳述されている。熱不安定化修飾は、対向する塩基と水素結合を形

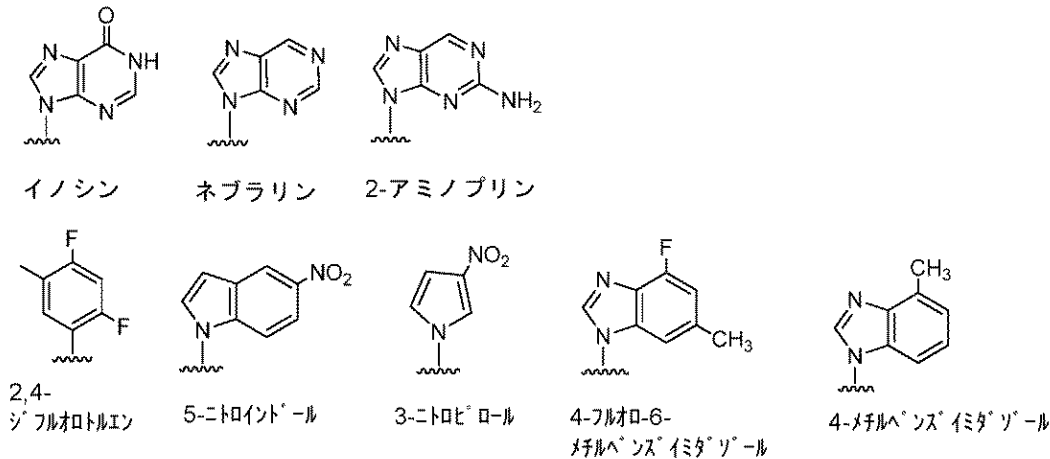
成する能力が弱化または無効化されたユニバーサル塩基、およびホスフェート修飾を含んでもよい。

【0505】

一部の実施形態において、二重鎖の熱不安定化修飾は、非標準塩基を有するヌクレオチド、例えば、限定することなく、反対側の鎖における塩基と水素結合を形成する能力が弱化または完全に無効化された核酸塩基修飾を含む。これらの核酸塩基修飾は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2010/0011895号に記載されるようにdsRNA二重鎖の中央領域の不安定化について評価された。例示的な核酸塩基修飾は、

【0506】

【化21】



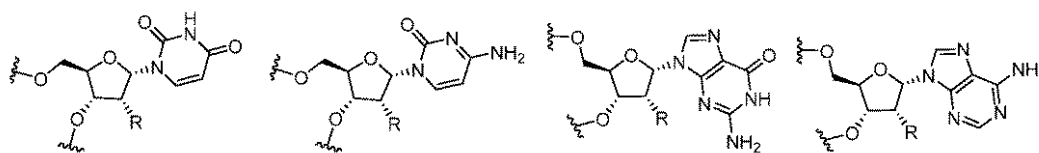
である。

【0507】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖のシード領域における二重鎖の熱不安定化修飾は、標的mRNA上の塩基に対して相補的な1つまたは複数の α -ヌクレオチド、例えば、

【0508】

【化22】



【式中、Rは、H、OH、OCH₃、F、NH₂、NHMe、NMe₂またはO-アルキルである】を含む。

【0509】

天然のホスホジエステル連結と比較してdsRNA二重鎖の熱安定性を低下させることが知られている例示的なホスフェート修飾は、

【0510】

10

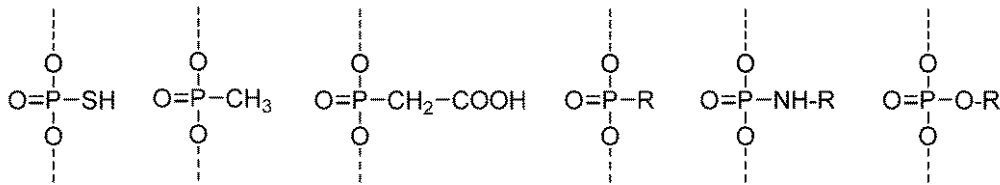
20

30

40

50

【化 2 3】



R = アルキル

である。

【0511】

R 基に対するアルキルは、C₁ - C₆ アルキルであり得る。R 基に対する具体的なアルキルとしては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルが挙げられるが、それらに限定されない。

【0512】

当業者が認識するように、核酸塩基の機能的役割が、本開示の RNA i 剤の特異性を定めることであることを考慮すると、例えば、オンターゲット効果をオフターゲット効果と比較して高めることを目的として、例えば、不安定化修飾を開示の RNA i 剤に導入するために、核酸塩基修飾を本明細書に記載される様々な方法で実施することはできるものの、非核酸塩基修飾、例えば、ポリリボヌクレオチドの糖基またはリン酸骨格への修飾の方が、本開示の RNA i 剤上で利用可能、かつ概して存在する修飾の範囲がはるかに広がる傾向がある。当該修飾は、本開示の他のセクションにより詳細に記載されており、天然の核酸塩基、または上記もしくは本明細書の他の箇所に記載される修飾された核酸塩基のいずれかを有する、本開示の RNA i 剤について明確に想到される。

【0513】

熱不安定化修飾を含むアンチセンス鎖に加えて、dsRNA は、1 つまたは複数の安定化修飾をも含み得る。例えば、dsRNA は、少なくとも 2 個（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個以上）の安定化修飾を含み得る。限定することなく、安定化修飾は、いずれも 1 つの鎖に存在し得る。一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、いずれも少なくとも 2 個の安定化修飾を含む。安定化修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖の任意のヌクレオチド上に存在し得る。例えば、安定化修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上のあらゆるヌクレオチド上に存在し得るか、各安定化修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上に交互パターンで存在し得るか、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターンの両安定化修飾を含む。センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一であるか、または異なってもよく、センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の安定化修飾の交互パターンに対してシフトを有し得る。

【0514】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、少なくとも 2 個（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個以上）の安定化修飾を含む。限定することなく、アンチセンス鎖における安定化修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、安定化修飾を 5' 端から位置 2、6、8、9、14 および 16 に含む。一部の他の実施形態において、アンチセンス鎖は、安定化修飾を 5' 端から位置 2、6、14 および 16 に含む。さらなる一部の他の実施形態において、アンチセンス鎖は、安定化修飾を 5' 端から位置 2、14 および 16 に含む。

【0515】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接する少なくとも 1 つの安定化修飾を含む。例えば、安定化修飾は、不安定化修飾の 5' 端または 3' 端、すなわち不安定化修飾の位置から位置 -1 または +1 のヌクレオチドであり得る。一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の 5' 端および 3' 端、すなわち不安定化修

10

20

30

40

50

飾の位置から位置 - 1 および + 1 の各々に安定化修飾を含む。

【0516】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の 3' 端、すなわち不安定化修飾の位置から位置 + 1 および + 2 に少なくとも 2 個の安定化修飾を含む。

【0517】

一部の実施形態において、センス鎖は、少なくとも 2 個（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個以上）の安定化修飾を含む。限定することなく、センス鎖における安定化修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態において、センス鎖は、安定化修飾を 5' 端から位置 7、10 および 11 に含む。一部の他の実施形態において、センス鎖は、安定化修飾を 5' 端から位置 7、9、10 および 11 に含む。一部の実施形態において、センス鎖は、アンチセンス鎖の 5' 端から数えて、アンチセンス鎖の位置 11、12 および 15 に対向するまたは相補的な位置に安定化修飾を含む。一部の他の実施形態において、センス鎖は、アンチセンス鎖の 5' 端から数えて、アンチセンス鎖の位置 11、12、13 および 15 に対向するまたは相補的な位置に安定化修飾を含む。一部の実施形態において、センス鎖は、2、3 または 4 個の安定化修飾のブロックを含む。

10

【0518】

一部の実施形態において、センス鎖は、アンチセンス鎖における二重鎖の熱不安定化修飾に対向するまたは相補的な位置において安定化修飾を含まない。

【0519】

例示的な熱安定化修飾としては、2' - フルオロ修飾が挙げられるが、それに限定されない。他の熱不安定化修飾としては、LNA が挙げられるが、それに限定されない。

20

【0520】

いくつかの実施形態において、本開示の dsRNA は、少なくとも 4 個（例えば、4、5、6、7、8、9、または 10 個以上）の 2' - フルオロヌクレオチドを含む。限定することなく、2' - フルオロヌクレオチドはすべて、1 つの鎖に存在し得る。一部の実施形態において、センスおよびアンチセンス鎖は、いずれも少なくとも 2 個の 2' - フルオロヌクレオチドを含む。2' - フルオロ修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖の任意のヌクレオチド上に存在し得る。例えば、2' - フルオロ修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上のあらゆるヌクレオチド上に存在し得るか、各 2' - フルオロ修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上に交互パターンで存在し得るか、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターンの両 2' - フルオロ修飾を含む。センス鎖上の 2' - フルオロ修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一であるか、または異なってもよく、センス鎖上の 2' - フルオロ修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の 2' - フルオロ修飾の交互パターンに対してシフトを有し得る。

30

【0521】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、少なくとも 2 個（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個以上）の 2' - フルオロヌクレオチドを含む。限定することなく、アンチセンス鎖における 2' - フルオロ修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態において、アンチセンスは、2' - フルオロヌクレオチドを 5' 端から位置 2、6、8、9、14 および 16 に含む。一部の他の実施形態において、アンチセンスは、2' - フルオロヌクレオチドを 5' 端から位置 2、6、14 および 16 に含む。さらなる一部の他の実施形態において、アンチセンスは、2' - フルオロヌクレオチドを 5' 端から位置 2、14 および 16 に含む。

40

【0522】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接する少なくとも 1 つの 2' - フルオロヌクレオチドを含む。例えば、2' - フルオロヌクレオチドは、不安定化修飾の 5' 端または 3' 端、すなわち不安定化修飾の位置から位置 - 1 または + 1 のヌクレオチドであり得る。一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の 5' 端および 3' 端、すなわち不安定化修飾の位置から位置 - 1 および + 1 の各々に 2' - フルオロヌクレオチドを含む。

50

【0523】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の3'端、すなわち不安定化修飾の位置から位置+1および+2に少なくとも2個の2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0524】

一部の実施形態において、センス鎖は、少なくとも2個（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以上）の2'-フルオロヌクレオチドを含む。限定することなく、センス鎖における2'-フルオロ修飾は、任意の位置に存在し得る。一部の実施形態において、アンチセンスは、2'-フルオロヌクレオチドを5'端から位置7、10および11に含む。一部の他の実施形態において、センス鎖は、2'-フルオロヌクレオチドを5'端から位置7、9、10および11に含む。一部の実施形態において、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置11、12および15に対向するまたは相補的な位置に2'-フルオロヌクレオチドを含む。一部の他の実施形態において、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置11、12、13および15に対向するまたは相補的な位置に2'-フルオロヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、センス鎖は、2、3または4個の2'-フルオロヌクレオチドのブロックを含む。

【0525】

一部の実施形態において、センス鎖は、アンチセンス鎖における二重鎖の熱不安定化修飾に対向するまたは相補的な位置において2'-フルオロヌクレオチドを含まない。

【0526】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、21ヌクレオチド（nt）センス鎖および23ヌクレオチド（nt）アンチセンスを含み、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域（すなわちアンチセンス鎖の5'端から位置2～9）に存在し、dsRNAの一方の端がブラントであり、他方の端が2ntオーバーハングを含み、dsRNAは、（i）アンチセンスが2、3、4、5または6個の2'-フルオロ修飾を含むこと；（ii）アンチセンスが1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；（iii）センス鎖がリガンドとコンジュゲートしていること；（iv）センス鎖が2、3、4または5個の2'-フルオロ修飾を含むこと；（v）センス鎖が1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；（vi）dsRNAが少なくとも4個の2'-フルオロ修飾を含むこと；および（vii）dsRNAがアンチセンス鎖の5'端にブラント端を含むことのうちの少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6または7すべて）の特徴をさらに有してもよい。好ましくは、2ntオーバーハングは、アンチセンスの3'端に存在する。

【0527】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、センスおよびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、25～30ヌクレオチド残基の長さであり、5'末端ヌクレオチド（位置1）から開始して、前記センス鎖の位置1～23に少なくとも8個のリボヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、36～66ヌクレオチド残基の長さであり、3'末端ヌクレオチドから開始して、センス鎖の位置1～23と対合する位置に少なくとも8個のリボヌクレオチドを含んで、二重鎖を形成し、アンチセンス鎖の少なくとも3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対合せず、6個以下の連続する3'末端ヌクレオチドはセンス鎖と対合せず、それによって、1～6個のヌクレオチドの3'一本鎖オーバーハングを形成し、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対合しない10～30個の連続するヌクレオチドを含み、それによって、10～30ヌクレオチド一本鎖5'オーバーハングを形成し、少なくともセンス鎖5'末端および3'末端ヌクレオチドは、センスおよびアンチセンス鎖が最大相補性のためにアラインされる場合に、アンチセンス鎖のヌクレオチドと対合される塩基であり、それによって、センスおよびアンチセンス鎖の間に実質的に二重鎖の領域を形成し、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の長さの少なくとも19リボヌクレオチド

に沿って標的RNAと十分に相補的であり、二本鎖核酸が哺乳動物細胞中に導入される場合に標的遺伝子発現を低減させ、アンチセンス鎖は、少なくとも1個の熱不安定化ヌクレオチドを含み、少なくとも1個の熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖のシード領域（すなわちアンチセンス鎖の5'端の位置2～9）に存在する。例えば、熱不安定化ヌクレオチドは、センス鎖の5'端の位置14～17に対向するまたは相補的な位置の間に存在し、dsRNAは、(i)アンチセンスが2、3、4、5または6個の2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii)アンチセンスが1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(iii)センス鎖がリガンドとコンジュゲートしていること；(iv)センス鎖が2、3、4または5個の2'-フルオロ修飾を含むこと；(v)センス鎖が1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(vi)dsRNAが少なくとも4個の2'-フルオロ修飾を含むこと；および(vii)dsRNAが12～30ヌクレオチド対の長さの二重鎖領域を含むことのうちの少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6または7すべて）の特徴をさらに有してもよい。

10

【0528】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、センスおよびアンチセンス鎖を含み、前記dsRNA分子は、少なくとも25かつ多くとも29ヌクレオチドである長さを有するセンス鎖と、多くとも30ヌクレオチドである長さを有するアンチセンス鎖とを含み、センス鎖は、5'端から位置11において酵素分解に対して感受性がある修飾されたヌクレオチドを含み、前記センス鎖の3'端および前記アンチセンス鎖の5'端は、ブラント端を形成し、前記アンチセンス鎖は、その3'端においてセンス鎖より1～4ヌクレオチド長く、二重鎖領域は、少なくとも25ヌクレオチドの長さであり、前記アンチセンス鎖は、前記アンチセンス鎖の長さの少なくとも19ntに沿って標的mRNAと十分に相補的であり、前記dsRNA分子が哺乳動物細胞中に導入される場合に標的遺伝子発現を低減させ、前記dsRNAのダイサー切断は、前記アンチセンス鎖の前記3'端を含むsiRNAを優先的にもたらし、それによって、哺乳動物における標的遺伝子の発現を低減させ、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドを含み、少なくとも1つの熱不安定化ヌクレオチドは、アンチセンス鎖におけるシード領域（すなわちアンチセンス鎖の5'端の位置2～9）に存在し、dsRNAは、(i)アンチセンスが2、3、4、5または6個の2'-フルオロ修飾を含むこと；(ii)アンチセンスが1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(iii)センス鎖がリガンドとコンジュゲートしていること；(iv)センス鎖が2、3、4または5個の2'-フルオロ修飾を含むこと；(v)センス鎖が1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(vi)dsRNAが少なくとも4個の2'-フルオロ修飾を含むこと；および(vii)dsRNAが12～29ヌクレオチド対の長さの二重鎖領域を含むことのうちの少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6または7すべて）の特徴をさらに有してもよい。

20

30

【0529】

一部の実施形態において、dsRNA分子のセンス鎖およびアンチセンス鎖におけるすべてのヌクレオチドが修飾されてもよい。各ヌクレオチドは、非連結性リン酸酸素の1つまたは両方または連結性リン酸酸素の1つまたは複数の1つまたは複数の変更、リボース糖の構成要素、例えばリボース糖上の2'ヒドロキシルの変更、リン酸部分の「デホスホ」リンカーとの大規模な置き換え、天然に存在する塩基の修飾または置き換え、およびリボース-リン酸骨格の置き換えまたは修飾を含み得る、同一または異なる修飾で修飾されてもよい。

40

【0530】

核酸はサブユニットのポリマーであるので、修飾の多くは、核酸内で反復される位置において存在する、例えば、塩基またはリン酸部分またはリン酸部分の非連結性Oの修飾。一部の場合には、修飾は、核酸中の対象位置のすべてにおいて存在するが、多くの場合は、そうではない。例として、修飾は、3'または5'末端位置でのみ存在する場合があります、

50

末端領域においてのみ、例えば、鎖の末端ヌクレオチド上の位置で、または最後の 2、3、4、5 もしくは 10 ヌクレオチドにおいて存在する場合がある。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域または両方において存在する場合がある。修飾は、RNA の二本鎖領域においてのみ存在する場合があり、または RNA の一本鎖領域においてのみ存在する場合がある。例えば、非連結性 O 位置でのホスホロチオエート修飾は、一方または両方の末端でのみ存在する場合があり、末端領域においてのみ、例えば、鎖の末端ヌクレオチド上の位置で、または最後の 2、3、4、5 もしくは 10 ヌクレオチドにおいて存在する場合があり、あるいは二本鎖および一本鎖領域において、特に、末端に存在する場合がある。5' 端または両端がリン酸化され得る。

【0531】

10

例えば、安定性を増強すること、オーバーハング中に特定の塩基を含めること、または一本鎖オーバーハング中、例えば、5' もしくは 3' オーバーハング中、または両方中に修飾されたヌクレオチドもしくはヌクレオチド代替物を含めることが可能であり得る。例えば、オーバーハング中にプリンヌクレオチドを含めることが望ましいものであり得る。一部の実施形態において、3' または 5' オーバーハング中の塩基のすべてまたは一部が、例えば、本明細書において記載される修飾で修飾され得る。修飾は、例えば、当技術分野で公知である修飾でのリボース糖の 2' 位置での修飾の使用、例えば、核酸塩基のリボ糖の代わりに修飾された、デオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F) または 2'-O-メチルの使用、およびリン酸基における修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

20

【0532】

一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、ロックド核酸(LNA)、非ロックド核酸(UNA)、シクロヘキセン核酸(CeNA)、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-デオキシまたは 2'-フルオロで独立に修飾される。鎖は、2つ以上の修飾を含み得る。一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、2'-O-メチルまたは 2'-フルオロで独立に修飾される。これらの修飾は、アンチセンス鎖に存在する二重鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾に対する追加であることを理解されたい。

【0533】

少なくとも 2 つの異なる修飾は通常、センス鎖およびアンチセンス鎖上に存在する。それら 2 つの修飾は、2'-デオキシ、2'-O-メチルもしくは 2'-フルオロ修飾、非環式ヌクレオチドまたは他の修飾であり得る。一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖は各々、2'-O-メチルまたは 2'-デオキシから選択される、2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-O-Nメチルアセトアミド(2'-O-NMA)ヌクレオチド、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル(2'-O-DMAEOE)ヌクレオチド、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)ヌクレオチドまたは 2'-ara-Fヌクレオチドで独立に修飾される。ここでも、これらの修飾は、アンチセンス鎖に存在する二重鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾に対する追加であることを理解されたい。

30

40

【0534】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、特に B1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4' 領域において交互パターンの修飾を含む。「交互モチーフ」または「代替パターン」という用語は、本明細書において使用される場合、各々の修飾が 1 つの鎖の交互ヌクレオチド上に存在する 1 つまたは複数の修飾を有するモチーフを指す。交互ヌクレオチドとは、1 つおきのヌクレオチド毎に 1 つまたは 3 つおきのヌクレオチド毎に 1 つまたは同様のパターンを指す場合がある。例えば、A、B および C が各々、ヌクレオチドへの修飾の 1 つのタイプを表す場合には、交互モチーフは、「A B A B A B A B A B A B...」、「A A B B A A B B A A B B...」、「A A B A A B A A B A A B...」、「A

50

A A B A A A B A A A B …」、「A A A B B B A A A B B B …」または「A B C A B C A B C A B C …」などであり得る。

【0535】

交互モチーフ中に含有される修飾のタイプは、同一である場合も、異なっている場合もある。例えば、A、B、C、Dが各々、ヌクレオチド上の修飾の1つのタイプを表す場合には、交互ターン、すなわち、1つおきのヌクレオチド上の修飾は、同一である場合があるが、センス鎖またはアンチセンス鎖の各々は、「A B A B A B …」、「A C A C A C …」、「B D B D B D …」または「C D C D C D …」などといった交互モチーフ内の修飾のいくつかの可能性から選択され得る。

【0536】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、アンチセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンに対してシフトされているセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンを含む。シフトは、センス鎖のヌクレオチドの修飾された基が、アンチセンス鎖のヌクレオチドの異なって修飾された基に対応するようなものであり得、逆もまた同様である。例えば、センス鎖は、dsRNA 二重鎖中のアンチセンス鎖と対合される場合には、センス鎖中の交互モチーフは、鎖の 5' - 3' から「A B A B A B」で開始する場合があります。アンチセンス鎖中の交互モチーフは、二重鎖領域内の鎖の 3' - 5' から「B A B A B A」で開始する場合があります。別の例として、センス鎖中の交互モチーフは、鎖の 5' - 3' から「A A B B A A B B」で開始する場合があります。アンチセンス鎖中の交互モチーフは、二重鎖領域内の鎖の 3' - 5' から「B B A A B B A A」で開始する場合があります。その結果、センス鎖とアンチセンス鎖の間で修飾パターンの完全なまたは部分的なシフトがある。

【0537】

本開示の dsRNA 分子は、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結をさらに含んでもよい。ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾は、鎖の任意の位置において、センス鎖もしくはアンチセンス鎖または両鎖の任意のヌクレオチド上に存在してもよい。例えば、ヌクレオチド間連結修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖上のすべてのヌクレオチド上に存在してもよく、各ヌクレオチド間連結修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖上の交互パターンで存在してもよく、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターン中に両方のヌクレオチド間連結修飾を含む。センス鎖上のヌクレオチド間連結修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一であっても異なってもよく、センス鎖上のヌクレオチド間連結修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間連結修飾の交互パターンに対するシフトを有し得る。

【0538】

一部の実施形態において、dsRNA 分子は、オーバーハング領域においてホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2個のヌクレオチドの間にホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結を有する2個のヌクレオチドを含む。ヌクレオチド間連結修飾に、二重鎖領域において、オーバーハングヌクレオチドを末端の対合されたヌクレオチドと連結させることもできる。例えば、少なくとも2、3、4またはすべてのオーバーハングヌクレオチドを、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結によって連結でき、オーバーハングヌクレオチドを、オーバーハングヌクレオチドの隣の対合されたヌクレオチドと連結するさらなるホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結があってもよい。例えば、3ヌクレオチドのうち2個がオーバーハングヌクレオチドであり、3番目は、オーバーハングヌクレオチドの隣の対合したヌクレオチドである、末端の3個のヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオチド間連結があり得る。好ましくは、これらの末端の3個のヌクレオチドはアンチセンス鎖の3'末端にあってもよい。

【0539】

一部の実施形態において、dsRNA 分子のセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7

、8、9、10、11、12、13、14、15または16個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた2～10個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の1～10個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記センス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むアンチセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

【0540】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた2個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

10

【0541】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた3個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

20

【0542】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた4個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

30

【0543】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた5個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

40

【0544】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた6個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは

50

、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

【0545】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7または8個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた7個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

10

【0546】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5または6個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた8個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

20

【0547】

一部の実施形態において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3または4個のホスフェートヌクレオチド間連結によって隔てられた9個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結の2個のブロックを含み、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結のうちの1つは、オリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に配置され、前記アンチセンス鎖は、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびホスフェートヌクレオチド間連結の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエートもしくはメチルホスホネートまたはホスフェート連結を含むアンチセンス鎖と対合される。

30

【0548】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、センスまたはアンチセンス鎖の末端位置の1～10内に1つまたは複数のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドは、センスまたはアンチセンス鎖の一方の端または両方の端においてホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結を通じて連結される場合がある。

【0549】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、センスまたはアンチセンス鎖の各々の二重鎖の内部領域の1～10個のヌクレオチド内に1つまたは複数のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドは、センス鎖の5'端から数えて二重鎖領域の位置8～16においてホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結を通じて連結される場合があり、dsRNA分子は、末端位置の1～10個のヌクレオチド内に1つまたは複数のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾を適宜さらに含み得る。

40

【0550】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'端から数えて)位置1～5内の1～5個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド

50

間連結修飾および位置 18～23 内の 1～5 個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 1～5 個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1～5 個をさらに含む。

【0551】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 または 2 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

10

【0552】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 または 2 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

【0553】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 または 2 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

20

【0554】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 または 2 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

30

【0555】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

【0556】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

40

【0557】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連

50

結修飾をさらに含む。

【0558】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 または 2 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

【0559】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

10

【0560】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

20

【0561】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1～5 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 または 2 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 18～23 内の 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

【0562】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 20 および 21 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 21 における 1 個をさらに含む。

30

【0563】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 21 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 20 および 21 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

40

【0564】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 および 2 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 21 および 22 における 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 21 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

【0565】

一部の実施形態において、本開示の dsRNA 分子は、センス鎖の（5' 端から数えて）位置 1 における 1 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置 21 に

50

ける1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の(5'端から数えて)位置1および2における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置21および22における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

【0566】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'端から数えて)位置1および2における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置22および23における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の(5'端から数えて)位置1における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置21における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

10

【0567】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、センス鎖の(5'端から数えて)位置1における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置21における1個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾、ならびにアンチセンス鎖の(5'端から数えて)位置1および2における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾および位置23および23における2個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結修飾をさらに含む。

【0568】

一部の実施形態において、本開示の化合物は、骨格キラル中心のパターンを含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも5個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも6個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも7個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも8個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも9個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも10個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも11個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも12個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも13個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも14個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも15個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも16個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも17個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも18個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Sp立体配置中に少なくとも19個のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Rp立体配置中に8個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Rp立体配置中に7個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Rp立体配置中に6個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Rp立体配置中に5個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Rp立体配置中に4個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、Rp立体配置中に3個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨

20

30

40

50

格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置中に 2 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、R p 立体配置中に 1 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 8 個以下のヌクレオチド間連結（非限定的な例としてホスホジエステル）を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 7 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 6 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 5 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 4 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 3 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 2 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、キラルでない 1 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置中の少なくとも 10 個のヌクレオチド間連結、およびキラルでない 8 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置中の少なくとも 11 個のヌクレオチド間連結、およびキラルでない 7 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置中の少なくとも 12 個のヌクレオチド間連結、およびキラルでない 6 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置中の少なくとも 13 個のヌクレオチド間連結、およびキラルでない 6 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置中の少なくとも 14 個のヌクレオチド間連結、およびキラルでない 5 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、骨格キラル中心の共通パターンは、S p 立体配置中の少なくとも 15 個のヌクレオチド間連結、およびキラルでない 4 個以下のヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態において、S p 立体配置中のヌクレオチド間連結は、連続的または非連続的であってもよい。一部の実施形態において、R p 立体配置中のヌクレオチド間連結は、連続的または非連続的であってもよい。一部の実施形態において、キラルでないヌクレオチド間連結は、連続的または非連続的であってもよい。

10

20

30

【0569】

一部の実施形態において、本開示の化合物は、立体化学ブロックであるブロックを含む。一部の実施形態において、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間連結が R p であるという点において R p ブロックである。一部の実施形態において、5' - ブロックは R p ブロックである。一部の実施形態において、3' - ブロックは R p ブロックである。一部の実施形態において、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間連結が S p であるという点において S p ブロックである。一部の実施形態において、5' - ブロックは S p ブロックである。一部の実施形態において、3' - ブロックは S p ブロックである。一部の実施形態において、提供されたオリゴヌクレオチドは、R p ブロックおよび S p ブロックの両方を含む。一部の実施形態において、提供されたオリゴヌクレオチドは、1 つまたは複数の R p ブロックを含むが、S p ブロックを含まない。一部の実施形態において、提供されたオリゴヌクレオチドは、1 つまたは複数の S p ブロックを含むが、R p ブロックを含まない。一部の実施形態において、提供されたオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオチド間連結が天然ホスフェート連結である 1 つまたは複数の P O ブロックを含む。

40

【0570】

一部の実施形態において、本開示の化合物は、各糖部分が 2' - F 修飾を含む S p ブロックである 5' - ブロックを含む。一部の実施形態において、5' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々が、修飾されたヌクレオチド間連結であり、各糖部分が 2' - F 修飾を含む S p ブロックである。一部の実施形態において、5' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々がホスホロチオエート連結であり、各糖部分が 2' - F 修飾を含む S p ブロッ

50

クである。一部の実施形態において、5' - ブロックは、4 個以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態において、5' - ブロックは、5 個以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態において、5' - ブロックは、6 個以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態において、5' - ブロックは、7 個以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態において、3' - ブロックは、各糖部分が 2' - F 修飾を含む S p ブロックである。一部の実施形態において、3' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々が、修飾されたヌクレオチド間連結であり、各糖部分が 2' - F 修飾を含む S p ブロックである。一部の実施形態において、3' - ブロックは、ヌクレオチド間連結の各々がホスホロチオエート連結であり、各糖部分が 2' - F 修飾を含む S p ブロックである。一部の実施形態において、3' - ブロックは、4 個以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態において、3' - ブロックは、5 個以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態において、3' - ブロックは、6 個以上のヌクレオシド単位を含む。一部の実施形態において、3' - ブロックは、7 個以上のヌクレオシド単位を含む。

10

20

30

40

50

【0571】

一部の実施形態において、本開示の化合物は、その後特定のタイプのヌクレオチド間連結、例えば、天然ホスフェート連結、修飾されたヌクレオチド間連結、R p キラルヌクレオチド間連結、S p キラルヌクレオチド間連結などが続く領域またはオリゴヌクレオチド中のあるタイプのヌクレオシドを含む。一部の実施形態において、A の後に S p が続く。一部の実施形態において、A の後に R p が続く。一部の実施形態において、A の後に天然ホスフェート連結 (P O) が続く。一部の実施形態において、U の後に S p が続く。一部の実施形態において、U の後に R p が続く。一部の実施形態において、U の後に天然ホスフェート連結 (P O) が続く。一部の実施形態において、C の後に S p が続く。一部の実施形態において、C の後に R p が続く。一部の実施形態において、C の後に天然ホスフェート連結 (P O) が続く。一部の実施形態において、G の後に S p が続く。一部の実施形態において、G の後に R p が続く。一部の実施形態において、G の後に天然ホスフェート連結 (P O) が続く。一部の実施形態において、C および U の後に S p が続く。一部の実施形態において、C および U の後に天然ホスフェート連結 (P O) が続く。一部の実施形態において、A および G の後に S p が続く。一部の実施形態において、A および G の後に R p が続く。

【0572】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、ヌクレオチド位置 21 および 22 の間ならびにヌクレオチド位置 22 および 23 の間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域 (すなわち、アンチセンス鎖の 5' 端の位置 2 ~ 9) に位置する二重鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾を含み、d s R N A は、(i) アンチセンスが 2、3、4、5 または 6 個の 2' - フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスが 3、4 または 5 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(i i i) センス鎖がリガンドとコンジュゲートしていること；(i v) センス鎖が 2、3、4 または 5 個の 2' - フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖が 1、2、3、4 または 5 個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(v i) d s R N A が少なくとも 4 個の 2' - フルオロ修飾を含むこと；(v i i) d s R N A が、12 ~ 40 ヌクレオチド対の長さの二重鎖領域を含むこと；および (v i i i) d s R N A がアンチセンス鎖の 5' 端にプラント端を有することのうちの少なくとも 1 (例えば、1、2、3、4、5、6、7 または 8 すべて) の特徴をさらに有してもよい。

【0573】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖は、ヌクレオチド位置 1 および 2 の間、ヌクレオチド位置 2 および 3 の間、ヌクレオチド位置 21 および 22 の間ならびにヌクレオチド位置 22 および 23 の間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域 (すなわち、アンチセンス鎖の 5' 端の位置 2 ~ 9) に位置する二重鎖の少なくとも 1 つの熱不安定化修飾を含み、d s R N A は、(i) アンチセンスが 2、3、4、5 または 6 個の 2' - フルオロ修飾を含むこと；(i i) セン

ス鎖がリガンドとコンジュゲートしていること；(i i i) センス鎖が2、3、4または5個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(i v) センス鎖が1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(v) d s R N A が少なくとも4個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(v i) d s R N A が、12~40ヌクレオチド対の長さの二重鎖領域を含むこと；(v i i) d s R N A が、12~40ヌクレオチド対の長さの二重鎖領域を含むこと；および(v i i i) d s R N A がアンチセンス鎖の5' 端にプラント端を有することのうちの少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6、7または8すべて）の特徴をさらに有してもよい。

【0574】

一部の実施形態において、センス鎖は、ヌクレオチド位置1および2の間ならびにヌクレオチド位置2および3の間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域（すなわち、アンチセンス鎖の5' 端の位置2~9）に位置する二重鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、d s R N A は、(i) アンチセンスが2、3、4、5または6個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(i i) アンチセンスが1、2、3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(i i i) センス鎖がリガンドとコンジュゲートしていること；(i v) センス鎖が2、3、4または5個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(v) センス鎖が3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(v i) d s R N A が少なくとも4個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(v i i) d s R N A が、12~40ヌクレオチド対の長さの二重鎖領域を含むこと；および(v i i i) d s R N A がアンチセンス鎖の5' 端にプラント端を有することのうちの少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6、7または8すべて）の特徴をさらに有してもよい。

【0575】

一部の実施形態において、センス鎖は、ヌクレオチド位置1および2の間ならびにヌクレオチド位置2および3の間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、ヌクレオチド位置1および2の間、ヌクレオチド位置2および3の間、ヌクレオチド位置21および22の間ならびにヌクレオチド位置22および23の間にホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域（すなわち、アンチセンス鎖の5' 端の位置2~9）に位置する二重鎖の少なくとも1つの熱不安定化修飾を含み、d s R N A は、(i) アンチセンスが2、3、4、5または6個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(i i) センス鎖がリガンドとコンジュゲートしていること；(i i i) センス鎖が2、3、4または5個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(i v) センス鎖が3、4または5個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結を含むこと；(v) d s R N A が少なくとも4個の2' -フルオロ修飾を含むこと；(v i) d s R N A が、12~40ヌクレオチド対の長さの二重鎖領域を含むこと；および(v i i) d s R N A がアンチセンス鎖の5' 端にプラント端を有することのうちの少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6または7すべて）の特徴をさらに有してもよい。

【0576】

一部の実施形態において、本開示のd s R N A 分子は、標的との、二本鎖内のミスマッチ（複数可）またはそれらの組合せを含む。ミスマッチは、オーバーハング領域または二重鎖領域中に存在し得る。塩基対は、解離または融解を促進するその傾向に基づいてランク付けできる（例えば、特定の対合の会合または解離の自由エネルギーで、最も簡単なアプローチは、個々の対に基づいて対を調べることであるが、次の隣接分析または同様の分析も使用できる）。解離の促進の点では：A：UはG：Cを上回って好ましく、G：UはG：Cを上回って好ましく、I：CはG：Cを上回って好ましい（I=イノシン）。ミスマッチ、例えば、非正準対合または正準対合以外のもの（本明細書において別の場所で記載されるような）は、正準（A：T、A：U、G：C）対合を上回って好ましく、ユニバーサル塩基を含む対合は正準対合を上回って好ましい。

【0577】

一部の実施形態において、本開示のd s R N A 分子は、二本鎖の5' 端でのアンチセン

ス鎖の解離を促進するために、A : U、G : U、I : C および mismatches、例えば、非正準対合または正準対合以外のものまたはユニバーサル塩基を含む対合の群から独立に選択され得る、アンチセンス鎖の 5' 端から二重鎖領域内の最初の 1、2、3、4 または 5 つの塩基対のうち少なくとも 1 つを含む。

【0578】

一部の実施形態において、アンチセンス鎖中の 5' 端から二重鎖領域内の 1 位のヌクレオチドは、A、dA、dU、U および dT からなる群から選択される。あるいは、アンチセンス鎖の 5' 端から二重鎖領域内の最初の 1、2 または 3 つの塩基対のうち少なくとも 1 つは、AU 塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の 5' 端から二重鎖領域内の最初の塩基対は、AU 塩基対である。

10

【0579】

一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドの任意の位置のジヌクレオチドのホスホジエステル (PO)、ホスホロチオエート (PS) またはホスホロジチオエート (PS2) 連結の 3' 末端への 4' 修飾されたまたは 5' 修飾されたヌクレオチドの導入は、ヌクレオチド間連結に立体効果を及ぼすため、それをヌクレアーゼに対して保護または安定化できることが判明した。一部の実施形態において、ジヌクレオチドの PO、PS または PS2 連結の 3' 末端への 4' 修飾されたまたは 5' 修飾されたヌクレオチドの導入は、ジヌクレオチド対における 2 番目のヌクレオチドを修飾する。他の実施形態において、ジヌクレオチドの PO、PS または PS2 連結への 4' 修飾されたまたは 5' 修飾されたヌクレオチドの導入は、ジヌクレオチド対の 3' 端においてヌクレオチドを修飾する。

20

【0580】

一部の実施形態において、5' 修飾ヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖 siRNA の任意の位置のジヌクレオチドの 3' 端において導入される。例えば、5' アルキル化ヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖 siRNA の任意の位置のジヌクレオチドの 3' 端において導入されてもよい。リボース糖の 5' 位のアルキル基は、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。例示的な 5' -アルキル化ヌクレオチドは、5' -メチルヌクレオチドである。5' -メチルは、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。

【0581】

一部の実施形態において、4' 修飾ヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖 siRNA の任意の位置のジヌクレオチドの 3' 端において導入される。例えば、4' アルキル化ヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖 siRNA の任意の位置のジヌクレオチドの 3' 端において導入されてもよい。リボース糖の 4' 位のアルキル基は、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。例示的な 4' -アルキル化ヌクレオチドは、4' -メチルヌクレオチドである。4' -メチルは、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。あるいは、4' -O-アルキル化ヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖 siRNA の任意の位置のジヌクレオチドの 3' 端において導入されてもよい。リボース糖の 4' -O-アルキルは、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。例示的な 4' -O-アルキル化ヌクレオチドは、4' -O-メチルヌクレオチドである。4' -O-メチルは、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。

30

40

【0582】

一部の実施形態において、5' アルキル化ヌクレオチドは、dsRNA のセンス鎖またはアンチセンス鎖上の任意の位置において導入され、そのような修飾は dsRNA の効力を維持し、高める。5' -アルキルは、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。例示的な 5' -アルキル化ヌクレオチドは、5' -メチルヌクレオチドである。5' -メチルは、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体であり得る。

【0583】

一部の実施形態において、4' アルキル化ヌクレオチドは、dsRNA のセンス鎖またはアンチセンス鎖上の任意の位置において導入され、そのような修飾は dsRNA の効力を維持し、高める。4' -アルキルは、ラセミ体またはキラル純粋な R もしくは S 異性体

50

であり得る。例示的な4'-アルキル化ヌクレオチドは、4'-メチルヌクレオチドである。4'-メチルは、ラセミ体またはキラル純粋なRもしくはS異性体であり得る。

【0584】

一部の実施形態において、4'-O-アルキル化ヌクレオチドは、dsRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖上の任意の位置において導入され、そのような修飾はdsRNAの効力を維持し、高める。5'-アルキルは、ラセミ体またはキラル純粋なRもしくはS異性体であり得る。例示的な4'-O-アルキル化ヌクレオチドは、4'-O-メチルヌクレオチドである。4'-O-メチルは、ラセミ体またはキラル純粋なRもしくはS異性体であり得る。

【0585】

一部の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、(2'-H、2'-OHおよび2'-OMeならびにP=OまたはP=Sを含む)2'-5'連結を含み得る。例えば、2'-5'連結修飾は、ヌクレアーゼ抵抗の促進、もしくはアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合の阻害のために使用できる、またはRISCによるセンス鎖活性化の回避のためにセンス鎖の5'端において使用できる。

【0586】

別の実施形態において、本開示のdsRNA分子は、L-糖(例えば、2'-H、2'-OHおよび2'-OMeを含むL-リボース、L-アラビノース)を含み得る。例えば、L糖修飾は、ヌクレアーゼ抵抗の促進、もしくはアンチセンス鎖へのセンス鎖の結合の阻害のために使用できる、またはRISCによるセンス鎖活性化の回避のためにセンス鎖の5'端において使用できる。

【0587】

ある特定の実施形態において、本開示の方法において使用するためのiRNA剤は、表3または4のいずれか一方に記載される薬剤の群から選択される。これらの薬剤は、リガンドをさらに含んでもよい。

【0588】

IV. リガンドにコンジュゲートされたiRNA

本発明のiRNAのRNAの別の修飾は、RNAを1つまたは複数のリガンド、iRNAの活性、細胞分布または細胞取り込みを増強する部分またはコンジュゲートと化学的に連結することを含む。このような部分として、それだけには限らないが、コレステロール部分などの脂質部分(Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6553-6556)、コール酸(Manoharan et al., (1994) Biorg. Med. Chem. Lett., 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., (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:306-309; Manoharan et al., (1993) Biorg. Med. Chem. Lett., 3:2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20:533-538)、脂肪鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al., (1991) EMBO J, 10:1111-1118、Kabanov et al., (1990) FEBS Lett., 259:327-330、Svinarchuk et al., (1993) Biochimie, 75:49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-オ-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-ホスホネート(Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654、Shea et al., (1990) Nucl. Acids Res., 18:3777-3783)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14:969-973)またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654)、パルミチル部分(Mishra et al., (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1264:229-237)またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分(Crooke et al., (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277:923-937)が挙げられる。

【0589】

一実施形態において、リガンドは、それが組み込まれるiRNA剤の分布、標的化また

10

20

30

40

50

は寿命を変更する。ある特定の実施形態において、リガンドは、例えば、当該リガンドが存在しない種と比較されるように、選択された標的、例えば、分子、細胞または細胞種、コンパートメント、例えば、細胞のまたは臓器のコンパートメント、組織、器官または身体の領域に対する親和性の増強を提供する。一般的なリガンドは、二本鎖核酸において二重鎖対合に関与しない。

【0590】

リガンドとしては、天然に存在する物質、例えば、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）またはグロブリン）、炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンまたはヒアルロン酸）または脂質を挙げることができる。リガンドはまた、組換えまたは合成分子、例えば、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸であり得る。ポリアミノ酸の例として、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸であるポリアミノ酸、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ポリ（L-ラクチド-co-グリコリド（glycolide））共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド共重合体（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸（ethylacrylic acid））、N-イソプロピルアクリルアミドポリマーまたはポリホスファジンが挙げられる。ポリアミンの例として、ポリエチレンジイミン、ポリリジン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド-ポリアミン、ペプチドミメティックポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩またはアルファヘリックスペプチドが挙げられる。

【0591】

リガンドにはまた、標的化基、例えば、細胞または組織標的化剤、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば、特定の細胞種、例えば、腎臓細胞に結合する抗体が含まれ得る。標的化基は、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤プロテインA、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロールステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビタミンA、ビオチンまたはRGDペプチドもしくはRGDペプチドミメティックであり得る。

【0592】

リガンドの他の例として、色素、インターカレート剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ブソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフフィリン（Sapphyrin））、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性分子、例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチルまたはフェノキサジン）およびペプチドコンジュゲート（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、リン酸、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、mPEG、[mPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカ、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送/吸収促進物質（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザ大環状分子のEu³⁺複合体）、ジニトロフェニル、HRPまたはAPが挙げられる。

【0593】

リガンドは、タンパク質、例えば、糖タンパク質またはペプチド、例えば、共リガンドに対して特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば、肝細胞などの特定の細胞種に結合する抗体であり得る。リガンドにはまた、ホルモンおよびホルモン受容体が含まれ得る。それらにはまた、非ペプチド種、例えば、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補助因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノースまたは多価フコースが含まれ得る。リガンドは、例えば、リボ多糖、p38 MAPキナーゼのアクチベーターまたはNF-κBのアクチベーターであり得る。

【0594】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格を破壊することによって、例えば、細胞の微小管、微小線維および／または中間径線維を破壊することによってiRNA剤の細胞への取り込みを増大し得る物質、例えば、薬物であり得る。薬物は、例えば、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャスプラキノリド(japlakinolide)、ラトルンクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシンまたはミオセルビンであり得る。

【0595】

一部の実施形態において、本明細書において記載されるようなiRNAに付着されるリガンドは、薬物動態モジュレーター(PKモジュレーター)として作用する。PKモジュレーターには、親油性物質、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤(PEG)、ビタミンなどが含まれる。例示的PKモジュレーターとして、それだけには限らないが、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられる。いくつかのホスホロチオエート連結を含むオリゴヌクレオチドはまた、血清タンパク質に結合すると知られており、したがって、短いオリゴヌクレオチド、例えば、骨格中に複数のホスホロチオエート連結を含む、約5塩基、10塩基、15塩基または20塩基のオリゴヌクレオチドはまた、リガンドとして(例えば、PKモジュレーティングリガンドとして)本発明に適している。さらに、血清構成成分(例えば、血清タンパク質)に結合するアプタマーも、本明細書において記載される実施形態においてPKモジュレーティングリガンドとして使用するのに適している。

【0596】

本発明のリガンドがコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、ペンダント反応性官能性を有する、例えば、オリゴヌクレオチド上への連結分子の付着に由来する(以下に記載される)オリゴヌクレオチドの使用によって合成できる。この反応性オリゴヌクレオチドを、市販のリガンド、種々の保護基のいずれかを有する合成されているリガンドまたはそれに付着された連結部分を有するリガンドと直接反応させることができる。

【0597】

本発明のコンジュゲートにおいて使用されるオリゴヌクレオチドは、固相合成の公知の技術によって好都合に、日常的に作製できる。このような合成のための機器は、例えば、Applied Biosystems(カリフォルニア州、フォスターシティ)を含むいくつかのベンダーによって販売されている。当技術分野で公知のこのような合成のための任意の他の手段をさらに、または代わりに使用してもよい。他のオリゴヌクレオチド、例えば、ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体を調製するために同様の技術を使用することも公知である。

【0598】

本発明のリガンドがコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドおよびリガンド-配列特異的な連結されたヌクレオシドを有する分子では、オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオシドを、標準ヌクレオチドもしくはヌクレオシド前駆体または連結部分をすでに有するヌクレオチドもしくはヌクレオシドコンジュゲート前駆体、リガンド分子をすでに有するリガンド-ヌクレオチドもしくはヌクレオシドコンジュゲート前駆体またはビルディン

10

20

30

40

50

グブロックを有する非ヌクレオシドリガンドを利用して適したDNAシンセサイザーで組み立てることができる。

【0599】

連結部分をすでに有するヌクレオチド-コンジュゲート前駆体を使用する場合には、配列特異的な連結されたヌクレオシドの合成が通常完了され、次いで、リガンド分子が連結部分と反応されて、リガンドがコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドが形成される。一部の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドまたは連結されたヌクレオシドは、市販されており、オリゴヌクレオチド合成において日常的に使用される標準ホスホラミダイトおよび非標準ホスホラミダイトに加えて、リガンド-ヌクレオチドコンジュゲートに由来するホスホラミダイトを使用して自動化シンセサイザーによって合成される。

10

【0600】

A. 脂質コンジュゲート

一実施形態において、リガンドまたはコンジュゲートは、脂質または脂質ベースの分子である。当該脂質または脂質ベースの分子は、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン(HSA)に結合する。HSA結合性リガンドは、身体の標的組織、例えば、非腎臓標的組織へのコンジュゲートの分布を可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であり得る。HSAに結合できる他の分子も、リガンドとして使用できる。例えば、ナプロキセン(neproxin)またはアスピリンを使用できる。脂質または脂質ベースのリガンドは、(a)コンジュゲートの分解に対する耐性を増大できる、(b)標的細胞もしくは細胞膜中への標的化もしくは輸送を増大できる、および/または(c)血清タンパク質、例えば、HSAへの結合を調整できる。

20

【0601】

脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートの標的組織への結合を阻害、例えば制御するために使用され得る。例えば、より強力にHSAに結合する脂質または脂質ベースのリガンドは、腎臓へ標的化される可能性が低く、したがって、身体から排除される可能性が低くなる。あまり強力にHSAに結合しない脂質または脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートを腎臓に標的化するために使用できる。

【0602】

ある特定の実施形態において、脂質ベースのリガンドは、HSAに結合する。それは、コンジュゲートが、非腎臓組織へ分布されるように十分な親和性でHSAに結合できる。しかし、親和性は、一般に、HSA-リガンド結合を元に戻すことができないほど強くない。

30

【0603】

他の実施形態において、脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートが、腎臓へ分布されるように、HSAに弱く結合するか、全く結合しない。脂質ベースのリガンドの代わりに、またはそれに加えて、腎臓細胞を標的化する他の部分も使用できる。

【0604】

別の態様において、リガンドは、標的細胞、例えば、増殖している細胞によって取り込まれる部分、例えば、ビタミンである。これらは、例えば、悪性または非悪性種、例えば、がん細胞の望まれない細胞増殖を特徴とする障害の処置にとって特に有用である。例示的ビタミンとして、ビタミンA、EおよびKが挙げられる。他の例示的ビタミンとしては、Bビタミン、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサル、または肝細胞などの標的細胞によって取り込まれる他のビタミンもしくは栄養素が挙げられる。また、HSAおよび低密度リポタンパク質(LDL)も含まれる。

40

【0605】

B. 細胞透過剤

別の態様において、リガンドは、細胞透過剤、例えば、ヘリックス細胞透過剤である。ある特定の実施形態において、その薬剤は、両親媒性である。例示的細胞透過剤は、ペプチド、例えば、tatまたはアンテナペディア(antennopedia)である。薬剤がペプチドである場合は、修飾され得、ペプチジルメティック、逆転異性体、非ペプ

50

チドまたはシュードペプチド連結およびD-アミノ酸の使用を含む。ヘリカル剤は、一般に、アルファヘリカル剤であり、親油性および疎油性相を有し得る。

【0606】

リガンドは、ペプチドまたはペプチドミメティックであり得る。ペプチドミメティック（本明細書においてオリゴペプチドミメティックとも呼ばれる）は、天然ペプチドと類似する規定の三次元構造にフォールディング可能な分子である。ペプチドおよびペプチドミメティックのiRNA剤への付着は、細胞認識および吸収を増強することなどによって、iRNAの薬物動態分布に影響を及ぼし得る。ペプチドまたはペプチドミメティック部分は、約5〜50アミノ酸長、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50アミノ酸長であり得る。

10

【0607】

ペプチドまたはペプチドミメティックは、例えば、細胞透過ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチドまたは疎水性ペプチド（例えば、主にTyr、TrpまたはPheからなる）であり得る。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、拘束ペプチドまたは架橋ペプチドであり得る。別の代替法では、ペプチド部分は、疎水性膜移行配列（MTS）を含み得る。例示的な疎水性MTS含有ペプチドとして、アミノ酸配列AAVALLP AVL L A L L A P（配列番号13）を有するRFGFがある。疎水性MTSを含有するRFGF類似体（例えば、アミノ酸配列AALLPVLLAAP（配列番号14））も、標的化部分であり得る。ペプチド部分は、細胞膜を横切ってペプチド、オリゴヌクレオチドおよびタンパク質を含む大きな極性分子を運ぶことができる、「送達」ペプチドであり得る。例えば、HIV Tatタンパク質に由来する配列（GRKKRRQRRRPPQ（配列番号15））およびショウジョウバエアンテナペディアンタンパク質に由来する配列（RQIKIWFQNRRMKWKK（配列番号16））は、送達ペプチドとして機能化能であると見出されている。ペプチドまたはペプチドミメティックは、ファージディスプレイライブラリーまたは1-ビーズ-1-化合物（OBOC）コンビナトリアルライブラリー（Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991）から同定されるペプチドなどの、DNAのランダム配列によってコードされ得る。細胞標的を目的として、組み込まれたモノマー単位を介してdsRNA剤に繫留されるペプチドまたはペプチドミメティックの例としては、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）-ペプチドまたはRGDミミックがある。ペプチド部分は、約5アミノ酸〜約40アミノ酸長の範囲であり得る。ペプチド部分は、例えば、安定性または直接的な立体配座特性を増大する構造修飾を有し得る。以下に記載される構造修飾のいずれも利用できる。

20

30

【0608】

本発明の組成物および方法において使用するためのRGDペプチドは、線状である場合も、環状である場合もあり、特定の組織（複数可）への標的化を促進するように修飾される、例えば、グリコシル化またはメチル化される場合もある。RGD含有ペプチドおよびペプチドミメティックは、D-アミノ酸ならびに合成RGDミミックを含み得る。RGDに加えて、インテグリンリガンドを標的化する他の部分を使用できる。このリガンドの特定のコンジュゲートは、PECAM-1またはVEGFを標的化する。

【0609】

「細胞透過ペプチド」は、細胞、例えば、微生物細胞、例えば、細菌もしくは真菌細胞または哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞に透過可能である。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば、 α -ヘリックス線状ペプチド（例えば、LL-37またはセロピンP1）、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば、 α -デフェンシン、 β -デフェンシンまたはバクテネシン）または1つもしくは2つの優性アミノ酸のみを含有するペプチド（例えば、PR-39またはインドリシジン）であり得る。細胞透過ペプチドはまた、核局在性シグナル（NLS）を含み得る。例えば、細胞透過ペプチドは、例えば、HIV-1 gp41とSV40ラージT抗原のNLSの融合ペプチドドメインに由来するMPGなどの二分両親媒性ペプチドであり得る（Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003）。

40

50

【0610】

C. 炭水化物コンジュゲート

本発明の組成物および方法の一部の実施形態において、iRNAオリゴヌクレオチドは、炭水化物をさらに含む。炭水化物がコンジュゲートされたiRNAは、本明細書において記載されるような、核酸ならびにインビボ治療的使用に適した組成物のインビボ送達にとって有利である。本明細書で使用される場合、「炭水化物」とは、各炭素原子に結合された酸素、窒素もしくは硫黄原子とともに少なくとも6個の炭素原子（線状、分岐または環状であり得る）を有する1つもしくは複数の単糖単位で構成されている炭水化物自体またはその一部として、各炭素原子に結合された酸素、窒素もしくは硫黄原子とともに各々少なくとも6個の炭素原子（線状、分岐または環状であり得る）を有する1または複数の単糖単位で構成されている炭水化物部分を有する化合物のいずれかである化合物を指す。代表的な炭水化物として、糖（単糖、二糖、三糖および約4、5、6、7、8または9つの単糖単位を含有するオリゴ糖）ならびに多糖、例えば、デンプン、グリコーゲン、セルロースおよび多糖ゴムが挙げられる。具体的な単糖としては、C5および以上の（例えば、C5、C6、C7またはC8）糖が挙げられ、二糖および三糖としては、2つまたは3つの単糖単位を有する糖（例えば、C5、C6、C7またはC8）が挙げられる。

10

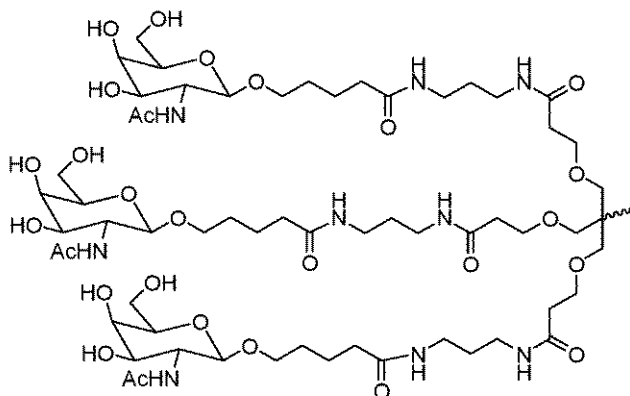
【0611】

一実施形態において、本発明の組成物および方法での使用のための炭水化物コンジュゲートは、

【0612】

20

【化24】

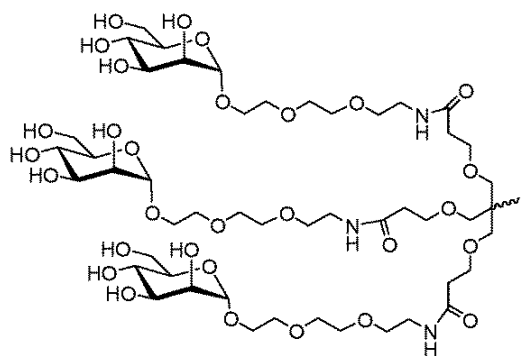


式II,

30

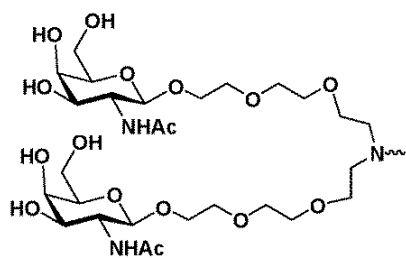
40

50



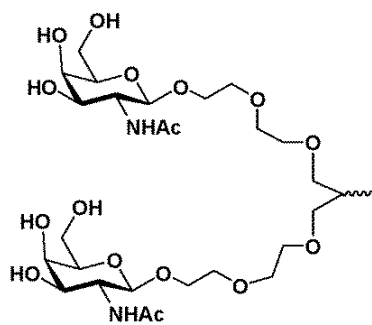
式 III,

10



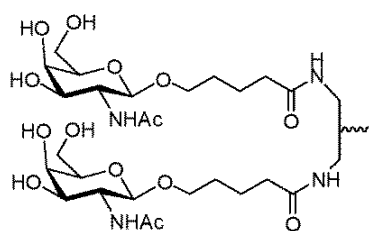
式 IV,

20



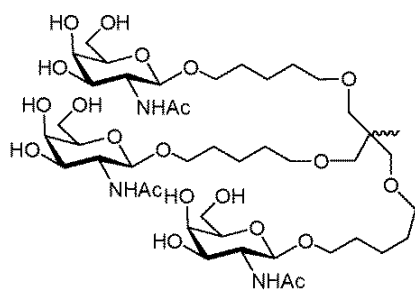
式 V,

30



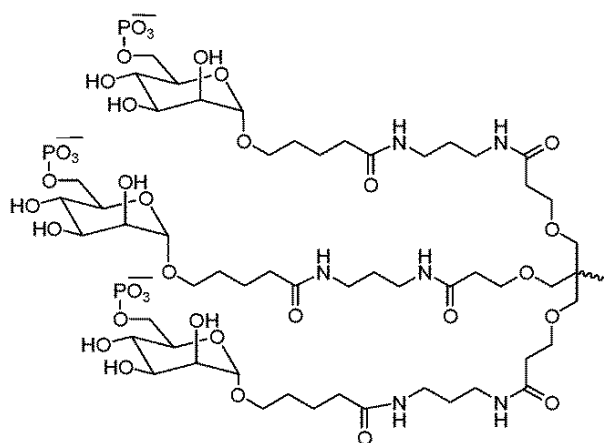
式 VI,

40



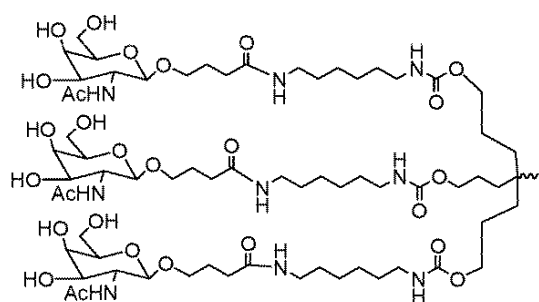
式 VII,

50



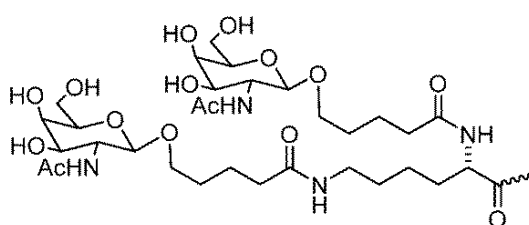
10

式 XII,

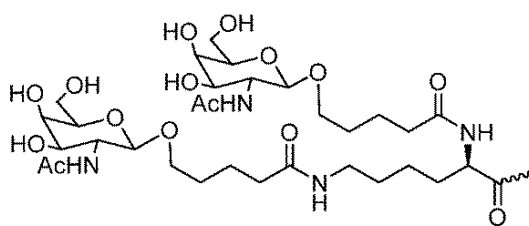


20

式 XIII,

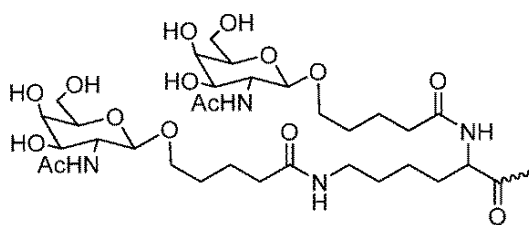


式 XIV,



式 XV,

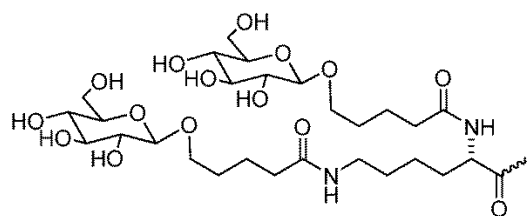
30



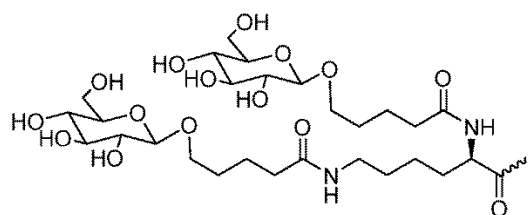
式 XVI,

40

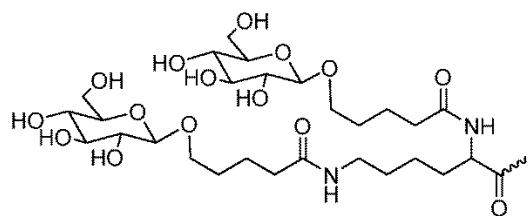
50



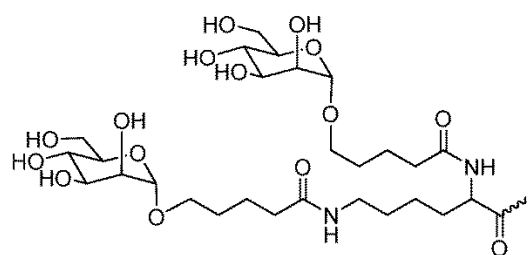
式 XVII,



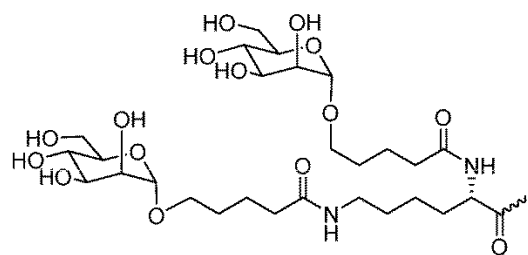
式 XVIII,



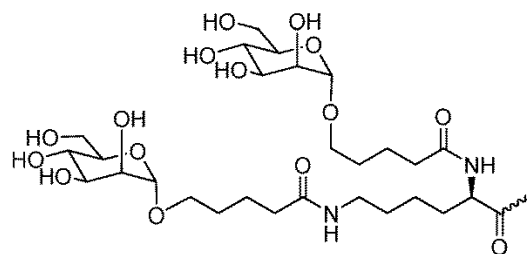
式 XIX,



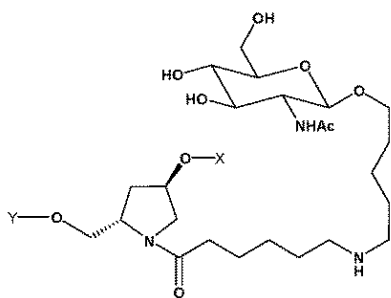
式 XX,



式XXI,

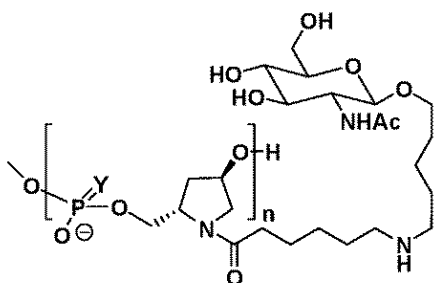


式 XXII,



式 XXIII;

10

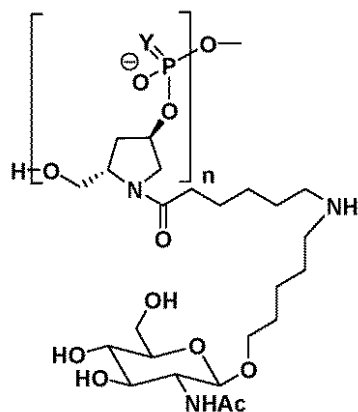


〔式中、Yは、OまたはSであり、nは3～6である。(式XXIV)〕；

【0613】

20

【化25】



30

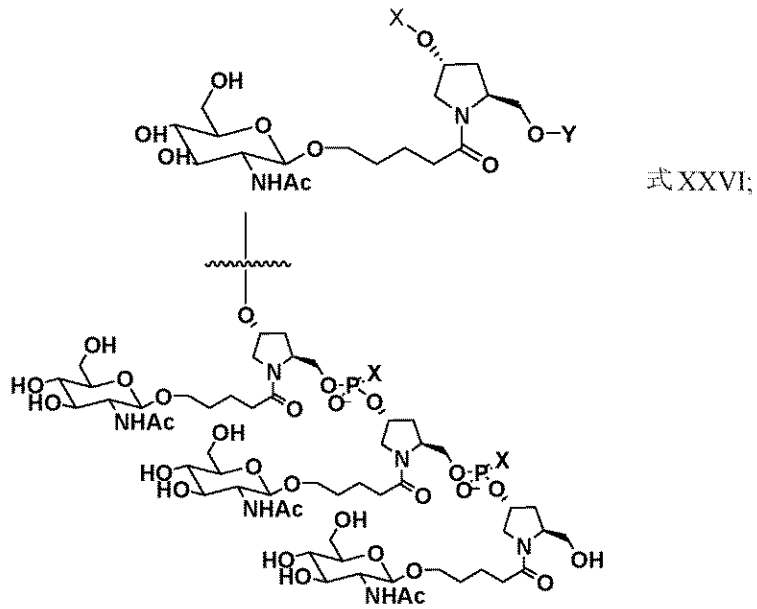
〔式中、Yは、OまたはSであり、nは3～6である。(式XXV)〕；

【0614】

40

50

【化 2 6】



10

〔式中、X は、O または S である。 (式 X X V I I) 〕 ；
 【 0 6 1 5 】

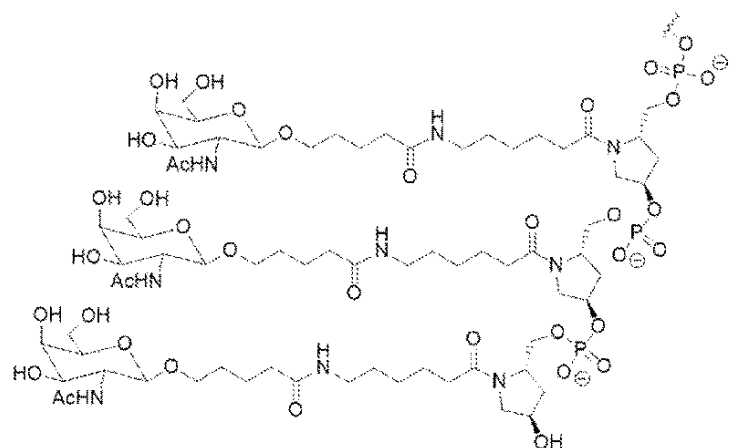
20

30

40

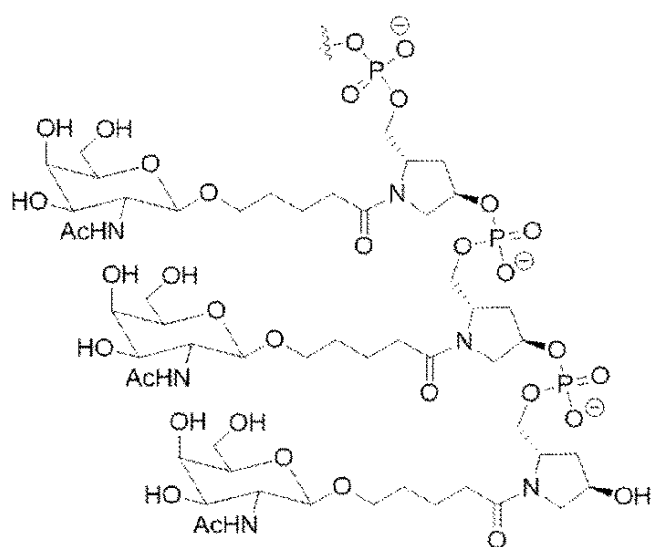
50

【化 2 7】



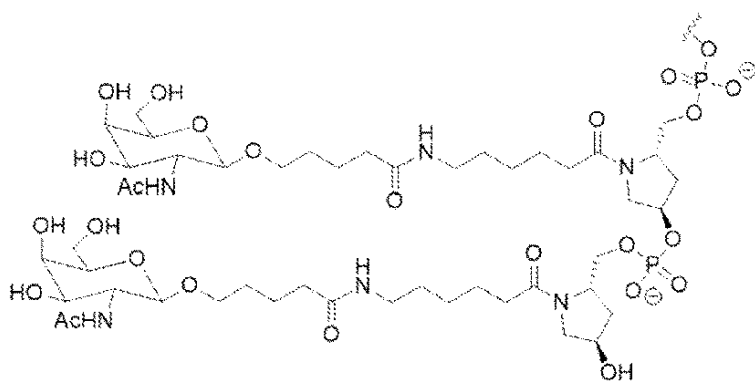
10

式 XXVIII;



20

式 XXIX;

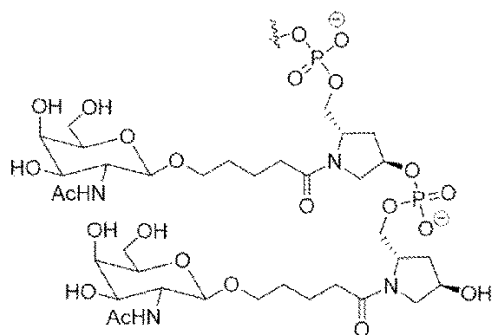


30

式 XXX;

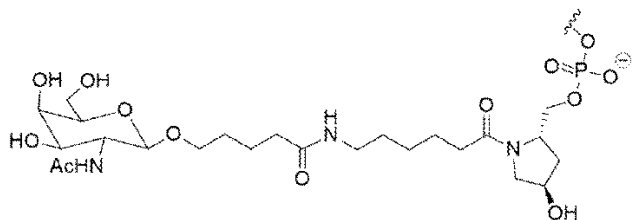
40

50



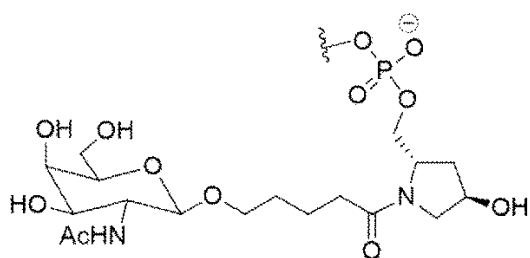
式 XXXI;

10

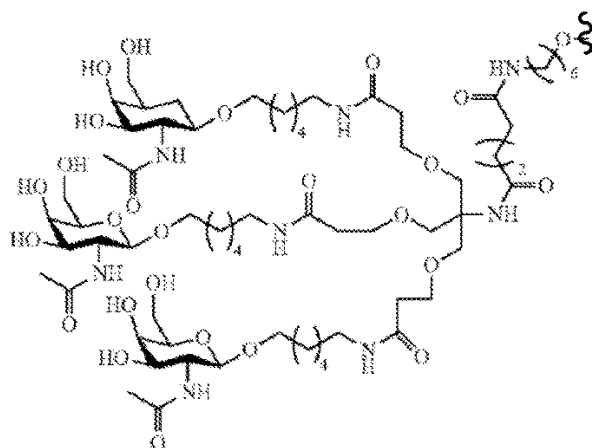


式 XXXII;

20



式 XXXIII; および



式 XXXIV

30

40

からなる群から選択される。

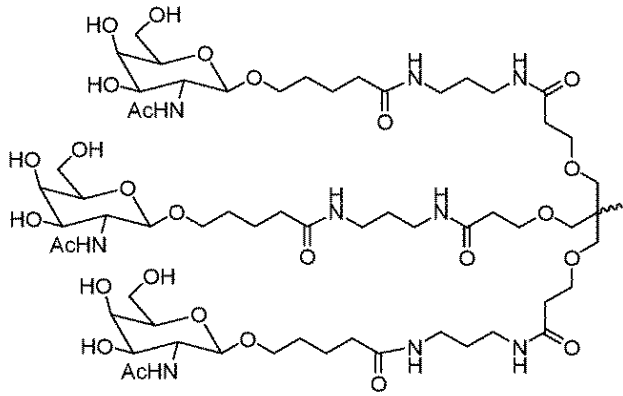
【0616】

別の実施形態において、本発明の組成物および方法での使用のために炭水化物コンジュゲートは、単糖である。一実施形態において、単糖は、N-アセチルガラクトサミン、例えば、

【0617】

50

【化 2 8】



式 II

10

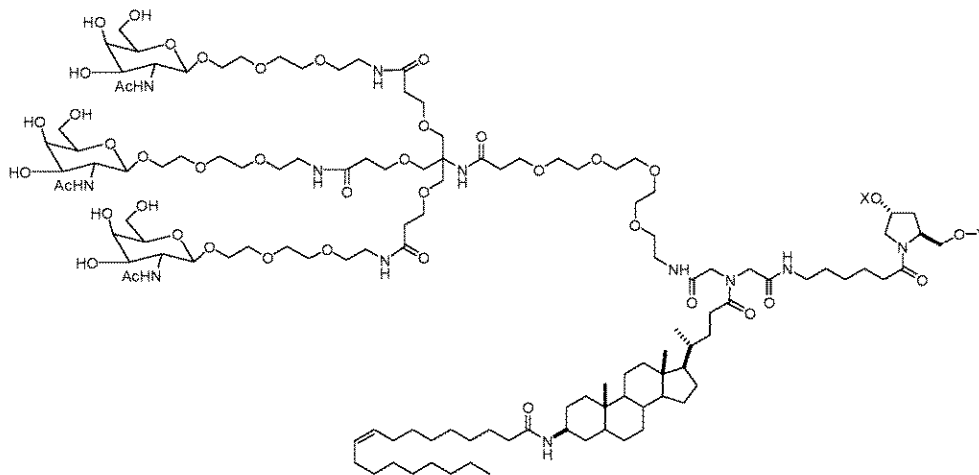
である。

【0 6 1 8】

本明細書に記載される実施形態での使用のための別の代表的な炭水化物としては、

【0 6 1 9】

【化 2 9】



式 XXXV

20

30

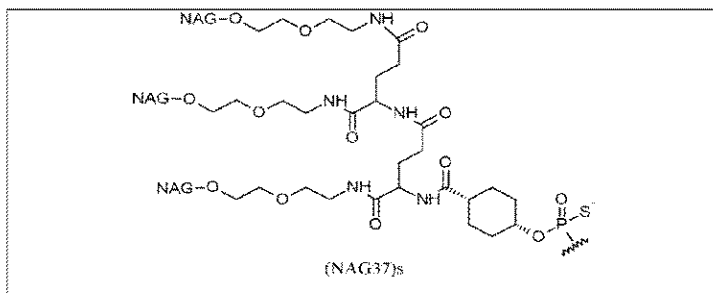
X または Y の一方がオリゴヌクレオチドである場合は、他方が水素である。

【0 6 2 0】

一部の実施形態において、好適なリガンドは、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる WO 2 0 1 9 / 0 5 5 6 3 3 号に開示されるリガンドである。一実施形態において、リガンドは以下の構造を含む。

【0 6 2 1】

【化 3 0】



式 XXXVI

40

【0 6 2 2】

50

ある特定の実施形態において、本開示のRNAi剤は、GalNAcリガンドを含んでもよい。本発明のある特定の実施形態において、GalNAcまたはGalNAc誘導体は、一価のリンカーを介して本発明のiRNAに付着される。一部の実施形態において、GalNAcまたはGalNAc誘導体は、二価のリンカーを介して本発明のiRNA剤に付着される。本発明のさらに他の実施形態において、GalNAcまたはGalNAc誘導体は、三価のリンカーを介して本発明のiRNA剤に付着される。

【0623】

一実施形態において、本発明の標準的なRNAi剤は、iRNA剤に付着された1つのGalNAcまたはGalNAc誘導体、例えば、本明細書に記載されるdsRNA剤のセンス鎖の3'または5'末端を含む。別の実施形態において、本発明の二本鎖RNAi剤は、各々が独立して、複数の一価のリンカーを通じて二本鎖RNAi剤の複数のヌクレオチドに付着された複数の（例えば2、3、4、5または6）のGalNAcまたはGalNAc誘導体を含む。

【0624】

一部の実施形態において、例えば、本発明のiRNA剤の2つの鎖が、複数の対合されないヌクレオチドを含むヘアピンループを形成する、一方の鎖の3'端と、それぞれのもう一方の鎖の5'端の間のヌクレオチドの中断されない鎖によって接続された1つの大きな分子の一部である場合には、ヘアピンループ内の対合されないヌクレオチドは各々、一価リンカーを介して付着されたGalNAcまたはGalNAc誘導体を独立に含み得る。

【0625】

一部の実施形態において、炭水化物コンジュゲートは、それだけには限らないが、PKモジュレーターおよび／または細胞透過ペプチドなどの、上記のような1または複数のさらなるリガンドをさらに含む。

【0626】

本発明において使用するのに適したさらなる炭水化物コンジュゲート（およびリンカー）として、各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2014/179620号および同WO2014/179627号に記載されるものが挙げられる。

【0627】

D. リンカー

一部の実施形態において、本明細書において記載されるコンジュゲートまたはリガンドを、切断可能である場合も、切断可能でない場合もある種々のリンカーを用いてiRNAオリゴヌクレオチドに付着させることができる。

【0628】

「リンカー」または「連結基」という用語は、化合物の2つの部分を接続する、例えば、化合物の2つの部分を共有結合によって付着させる有機部分を意味する。リンカーは、通常、直接結合または酸素もしくは硫黄などの原子、NR8、C(O)、C(O)NH、SO、SO2、SO2NHなどの単位またはそれだけには限らないが、1つもしくは複数のメチレンがO、S、S(O)、SO2、N(R8)、C(O)によって中断または終結され得る、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリール

アルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル (alkylheterocyclalkynyl)、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリール、アルキニルヘテロアリール (alkynylheteroaryl)、R₈が、水素、アシル、脂肪族もしくは置換脂肪族である、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換複素環式などの原子の鎖を含む。一実施形態において、リンカーは、約1~24個原子、2~24、3~24、4~24、5~24、6~24、6~18、7~18、8~18個の原子、7~17、8~17、6~16、7~17または8~16個の原子である。

【0629】

切断可能な連結基とは、細胞の外側で十分に安定であるが、標的細胞中に入ると、切断されて、リンカーと一緒に保持している2つの部分を放出するものである。一実施形態において、切断可能な連結基は、対象の血液において、または第2の参照条件下（血液または血清において見出される条件を模倣または表すように選択され得る）よりも、標的細胞において、または第1の参照条件下（例えば、細胞内条件を模倣または表すように選択され得る）で、少なくとも約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍またはそれより多く、または少なくとも約100倍速く切断される。

【0630】

切断可能な連結基は、切断剤、例えば、pH、酸化還元電位または分解性分子の存在の影響を受けやすい。一般に、切断剤は、血清または血液においてよりも細胞の内側で、より一般的であるか、またはより高いレベルもしくは活性で見出される。このような分解剤の例として、特定の基質のために選択される、または基質特異性を有さない酸化還元剤が挙げられ、例えば、酸化酵素もしくは還元酵素または還元によって酸化還元切断可能な連結基を分解できる、細胞中に存在する、メルカプタンなどの還元剤、エステラーゼ、エンドソームまたは酸性環境を作出できる薬剤、例えば、5以下のpHをもたらすもの、一般酸、ペプチダーゼ（基質特異的であり得る）およびホスファターゼとして作用することによって酸切断可能な連結基を加水分解もしくは分解できる酵素を含む。

【0631】

切断可能な連結基、例えば、ジスルフィド結合は、pHの影響を受けやすい場合がある。ヒト血清のpHは7.4であるが、平均細胞内pHはわずかに低く、約7.1~7.3の範囲である。エンドソームは、5.5~6.0の範囲のより酸性のpHを有し、リソソームは、およそ5.0のさらにより酸性のpHを有する。いくつかのリンカーは、選択されたpHで切断され、それによって、カチオン性脂質を細胞の内側のリガンドから、または細胞の所望のコンパートメント中に放出する切断可能な連結基を有するであろう。

【0632】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能である切断可能な連結基を含み得る。リンカー中に組み込まれる切断可能な連結基の種類は、標的化されるべき細胞に応じて変わり得る。例えば、肝臓標的化リガンドを、エステル基を含むリンカーを介してカチオン性脂質に連結できる。肝臓細胞は、エステラーゼが豊富であり、したがって、リンカーは、肝臓細胞において、エステラーゼが豊富ではない細胞種よりも効率的に切断される。エステラーゼが豊富な他の細胞種として、肺、腎皮質および精巣の細胞が挙げられる。

【0633】

肝臓細胞および滑膜細胞などのペプチダーゼが豊富な細胞種を標的化する場合には、ペプチド結合を含有するリンカーを使用できる。

【0634】

10

20

30

40

50

一般に、候補の切断可能な連結基の適合性は、分解剤（または条件）の、候補連結基を切断する能力を試験することによって評価できる。また、血液中で、または他の非標的組織と接触する場合に、切断に抵抗する能力について候補の切断可能な連結基を試験することも望ましいであろう。したがって、第1および第2の条件の間の切断に対する相対的感受性を決定でき、第1のものは、標的細胞において切断を示すように選択され、第2のものは、他の組織または生物学的流体、例えば、血液もしくは血清において切断を示すように選択される。評価は、無細胞系において、細胞において、細胞培養物において、臓器においてまたは組織培養物において、または動物全体において実施できる。細胞不含または培養条件において最初の評価を行うことおよび動物全体におけるさらなる評価によって確認することは、有用であり得る。ある特定の実施形態において、有用な候補化合物は、血液もしくは血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）と比較して、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）少なくとも約2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90または約100倍速く切断される。

10

【0635】

i. 酸化還元切断可能な連結基

一実施形態において、切断可能な連結基は、還元または酸化の際に切断される酸化還元切断可能な連結基である。還元的に切断可能な連結基の例として、ジスルフィド連結基（ $-S-S-$ ）がある。候補の切断可能な連結基が適した「還元的に切断可能な連結基」であるか、または、例えば、特定のiRNA部分および特定の標的化剤とともに使用するのに適しているか否かを決定するために、本明細書において記載される方法に目を向けることができる。例えば、細胞、例えば、標的細胞において観察されるであろう切断の速度を模倣する、当技術分野で公知の試薬を使用してジチオトレイトール（DTT）または他の還元剤とともにインキュベートすることによって、候補を評価できる。候補はまた、血液または血清条件を模倣するように選択された条件下で評価できる。あるものでは、候補化合物は、血液において最大で約10%切断される。他の実施形態において、有用な候補化合物は、血液（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、細胞において（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）少なくとも約2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90または約100倍速く分解される。候補化合物の切断の速度は、細胞外媒体を模倣するように選択された条件と比較して、細胞内媒体を模倣するように選択された条件下で標準酵素動態学アッセイを使用して決定できる。

20

30

【0636】

ii. リン酸ベースの切断可能な連結基

別の実施形態において、切断可能なリンカーは、リン酸ベースの切断可能な連結基を含む。リン酸ベースの切断可能な連結基は、リン酸基を分解または加水分解する薬剤によって切断される。細胞中のリン酸基を切断する薬剤の例として、細胞中のホスファターゼなどの酵素がある。リン酸ベースの連結基の例として、 $-O-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(SR_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-S-$ がある。さらなる実施形態としては、 $-O-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(SH)-O-$ 、 $-S-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(OH)-S-$ 、 $-S-P(O)(OH)-S-$ 、 $-O-P(S)(OH)-S-$ 、 $-S-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(H)-O-$ 、 $-O-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-O-$ 、 $-S-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-S-$ 、 $-O-P(S)(H)-S-$ が挙げられ、各存在におけるRkは、独立に、C1-C20アルキル、C1-C20ハロアルキル、C6-C10アリールまたはC

40

50

7-C12アラルキルであり得る。ある特定の実施形態において、ホスフェートベースの連結基は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ である。これらの候補は、上記の方法とそれに類似の方法を使用して評価できる。

【0637】

i i i . 酸切断可能な連結基

別の実施形態において、切断可能なリンカーは、酸切断可能な連結基を含む。酸切断可能な連結基は、酸性条件下で切断される連結基である。ある特定の実施形態において、酸切断可能な連結基は、約6.5以下の（例えば、約6.0、5.75、5.5、5.25、5.0またはそれより低い）pHを有する酸性環境において、または一般酸として作用できる酵素などの薬剤によって切断される。細胞では、特定の低pHオルガネラ、例えば、エンドソームおよびリソソームは、酸切断可能な連結基のための切断環境を提供できる。酸切断可能な連結基の例として、それだけには限らないが、ヒドラゾン、エステルおよびアミノ酸のエステルが挙げられる。酸切断可能な基は、一般式 $-C=NN-$ 、 $C(O)O$ または $-OC(O)-$ を有し得る。1つの例示的な実施形態は、炭素がエステル（アルコキシ基）の酸素に付着した場合（アルコキシ基）、アリール基、置換アルキル基、または第三級アルキル基、例えば、ジメチルペンチルもしくはヘプチルである。これらの候補は、上記のものと類似の方法を使用して評価できる。

10

【0638】

i v . エステルベースの連結基

別の実施形態において、切断可能なリンカーは、エステルベースの切断可能な連結基を含む。エステルベースの切断可能な連結基は、細胞中のエステラーゼおよびアミダーゼなどの酵素によって切断される。エステルベースの切断可能な連結基の例として、それだけには限らないが、アルキレン、アルケニレンおよびアルキニレン基のエステルが挙げられる。エステル切断可能な連結基は、一般式 $-C(O)O-$ または $-OC(O)-$ を有する。これらの候補は、上記のものと類似の方法を使用して評価できる。

20

【0639】

v . ペプチドベースの切断基

さらに別の実施形態において、切断可能なリンカーは、ペプチドベースの切断可能な連結基を含む。ペプチドベースの切断可能な連結基は、細胞中のペプチダーゼおよびプロテアーゼなどの酵素によって切断される。ペプチドベースの切断可能な連結基は、アミノ酸の間で形成され、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）およびポリペプチドをもたらすペプチド結合である。ペプチドベースの切断可能な基は、アミド基（ $-C(O)NH-$ ）を含まない。アミド基は、任意のアルキレン、アルケニレンまたはアルキネレンの間で形成され得る。ペプチド結合は、アミノ酸の間で形成され、ペプチドおよびタンパク質をもたらすアミド結合の特別なタイプである。ペプチドベースの切断基は、一般に、アミノ酸の間で形成され、ペプチドおよびタンパク質をもたらす、ペプチド結合（すなわち、アミド結合）に限定され、アミド官能基全体を含まない。ペプチドベースの切断可能な連結基は、一般式 $-NHCH(R)A-C(O)NHCH(R)B-C(O)-$ 、[式中、RAおよびRBは、2つの隣接するアミノ酸のR基である]を有する。これらの候補は、上記のものと類似の方法を使用して評価できる。

30

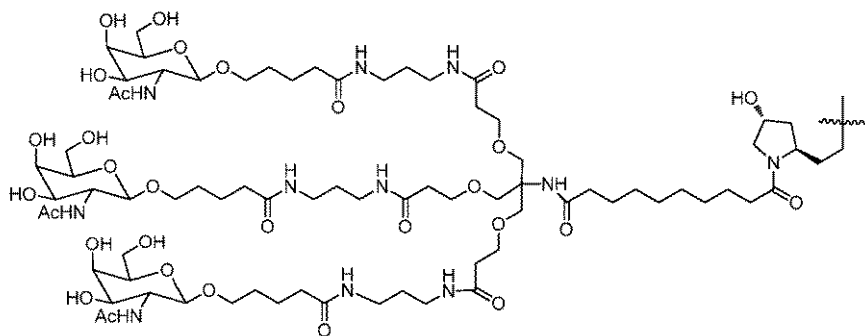
40

【0640】

一実施形態において、本発明のiRNAは、リンカーを介して炭水化物にコンジュゲートされる。本発明の組成物および方法のリンカーを有するiRNA炭水化物コンジュゲートの限定されない例として、それだけには限らないが、

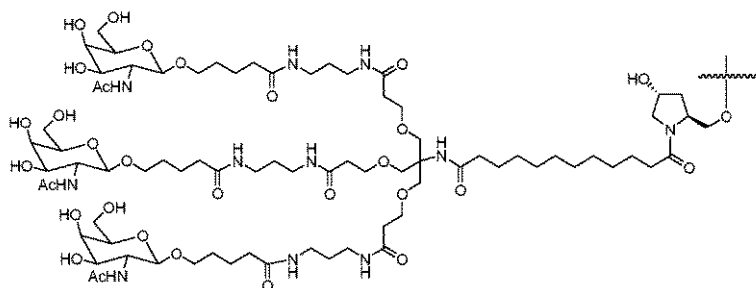
【0641】

【化 3 1】



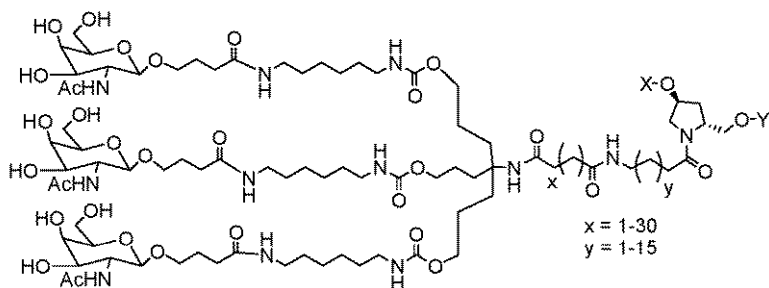
式 XXXVII;

10



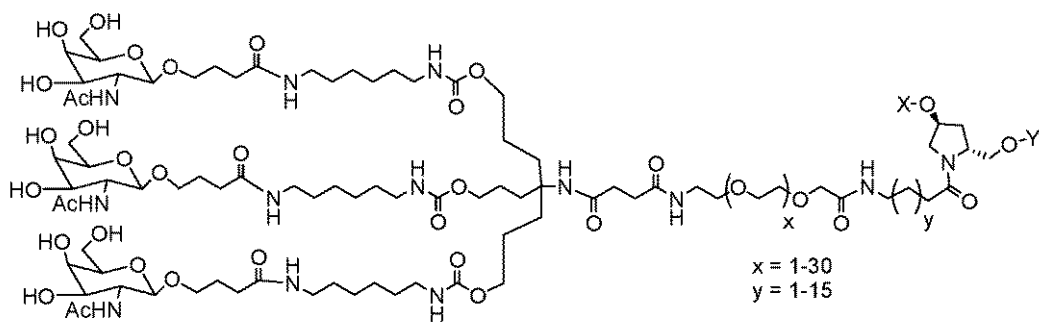
式 XXXVIII;

20



式 XXXIX;

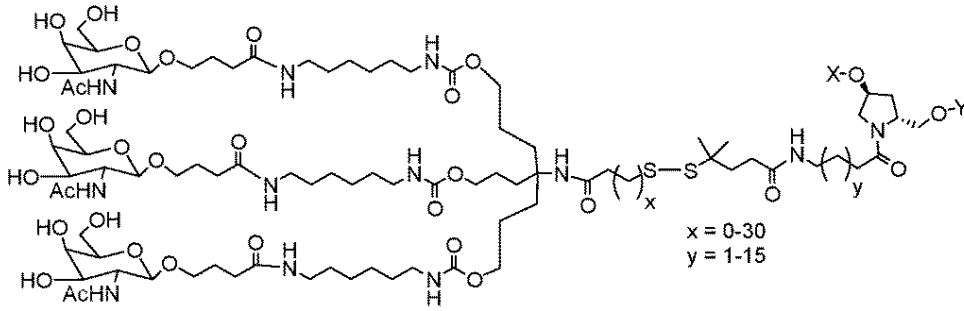
30



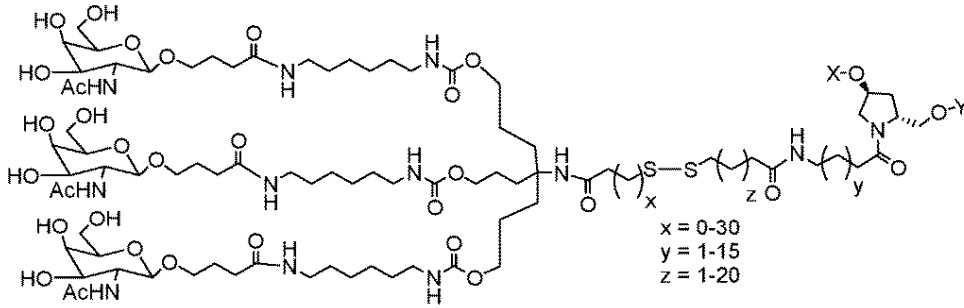
式 XL;

40

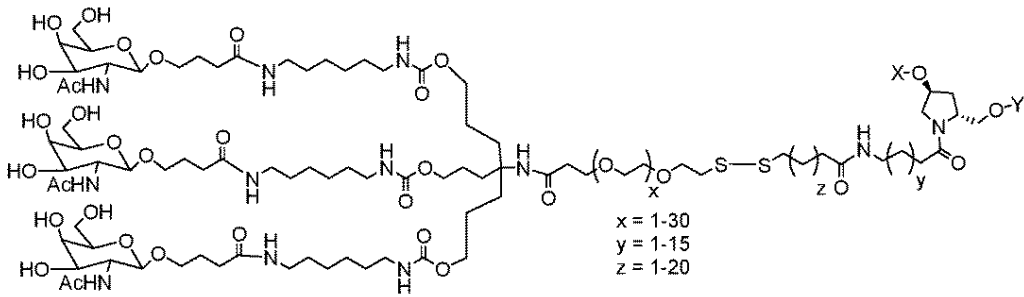
50



10

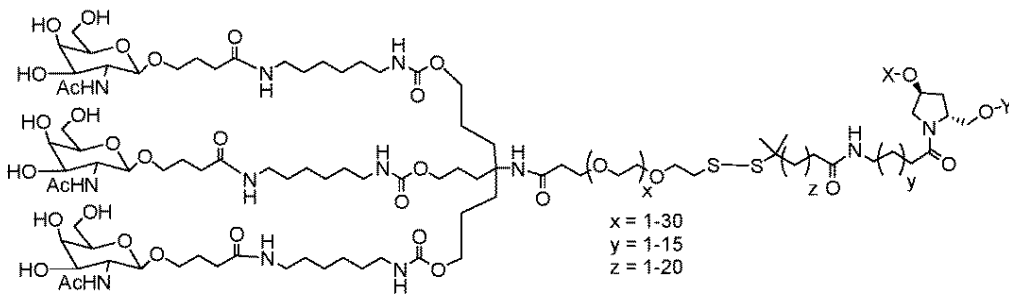


20



XLIV; および

30



XLV;

40

〔X または Y のうち一方が、オリゴヌクレオチドである場合は、もう一方は、水素である〕

が挙げられる。

【0642】

本発明の組成物および方法のある特定の実施形態において、リガンドは、二価または三価分岐リンカーを介して付着された1つまたは複数の GalNAc (N-アセチルガラクトサミン) 誘導体である。

【0643】

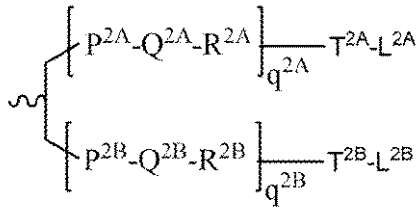
一実施形態において、本発明の dsRNA は、式 (XLV) ~ (XLVII) のい

50

れかで示される構造の群から選択される二価または三価分岐リンカーにコンジュゲートされる：

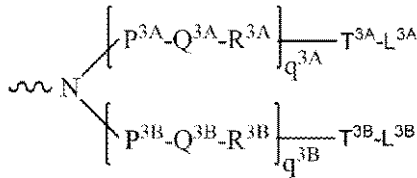
【0644】

【化32】

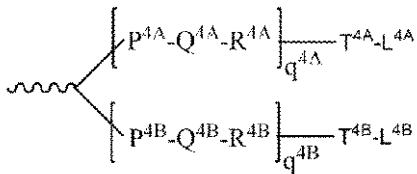


式 XLV,

10

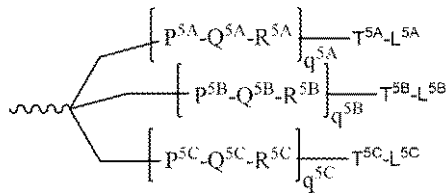


式 XLVI,



式 XLVII, または

20



式 XLVIII,

【式中、

q^{2A}、q^{2B}、q^{3A}、q^{3B}、q^{4A}、q^{4B}、q^{5A}、q^{5B}およびq^{5C}は、各出現について独立に、0～20を表し、反復単位は、同一である場合も、異なる場合もあり、

30

P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C}は、各出現について各々独立に、存在しない、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NHまたはCH₂Oであり、

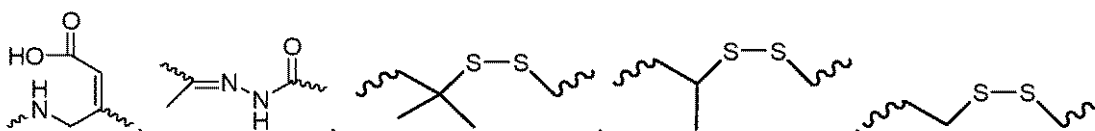
Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C}は、各出現について独立に、存在しない、アルキレン、置換アルキレンであり、1つまたは複数のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡CまたはC(O)のうち1つまたは複数によって中断または終結され得る、

40

R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}は、各出現について各々独立に、存在しない、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

【0645】

【化33】



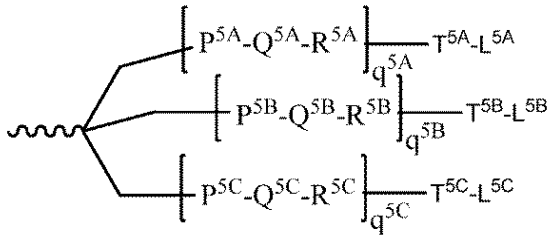
50

またはヘテロシクリルであり、

L^{2A}、L^{2B}、L^{3A}、L^{3B}、L^{4A}、L^{4B}、L^{5A}、L^{5B}およびL^{5C}は、リガンド、すなわち、各出現について各々独立に、単糖（G a l N A c など）、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖または多糖を表し、R^aは、Hまたはアミノ酸側鎖である。三価コンジュゲート性G a l N A c 誘導体は、標的遺伝子、例えば、式（X L I X）のもの：

【0646】

【化34】



10

式 XLIX

【式中、L^{5A}、L^{5B}およびL^{5C}は、単糖、例えば、G a l N A c 誘導体を表す】
の発現を阻害するために、R N A i 剤とともに使用するために特に有用である。

【0647】

G a l N A c 誘導体をコンジュゲートする適した二価および三価分岐リンカー基の例として、それだけには限らないが、式 I I、V I I、X、X I、およびX I I Iのような上記で列挙された構造が挙げられる。

20

【0648】

R N A コンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許として、それだけには限らないが、米国特許第4,828,979号、同4,948,882号、同5,218,105号、同5,525,465号、同5,541,313号、同5,545,730号、同5,552,538号、同5,578,717号、同5,580,731号、同5,591,584号、同5,109,124号、同5,118,802号、同5,138,045号、同5,414,077号、同5,486,603号、同5,512,439号、同5,578,718号、同5,608,046号、同4,587,044号、同4,605,735号、同4,667,025号、同4,762,779号、同4,789,737号、同4,824,941号、同4,835,263号、同4,876,335号、同4,904,582号、同4,958,013号、同5,082,830号、同5,112,963号、同5,214,136号、同5,082,830号、同5,112,963号、同5,214,136号、同5,245,022号、同5,254,469号、同5,258,506号、同5,262,536号、同5,272,250号、同5,292,873号、同5,317,098号、同5,371,241号、同5,391,723号、同5,416,203号、同5,451,463号、同5,510,475号、同5,512,667号、同5,514,785号、同5,565,552号、同5,567,810号、同5,574,142号、同5,585,481号、同5,587,371号、同5,595,726号、同5,597,696号、同5,599,923号、同5,599,928号および同5,688,941号、同6,294,664号、同6,320,017号、同6,576,752号、同6,783,931号、同6,900,297号、同7,037,646号、同8,106,022号が挙げられ、それらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0649】

所与の化合物においてすべての位置について均一に修飾される必要はなく、実際、前記修飾のうち2つ以上を単一化合物中に、またはさらにi R N A内の単一ヌクレオシドに組み込むことができる。本発明はまた、キメラ化合物であるi R N A化合物を含む。

【0650】

50

本発明との関連で「キメラ」iRNA化合物または「キメラ」とは、各々、少なくとも1つのモノマー単位、すなわち、dsRNA化合物の場合にはヌクレオチドで構成されている、2つ以上の化学的に別個の領域を含有する、iRNA化合物、例えば、dsRNA i剤である。これらのiRNAは通常、iRNAに、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大、細胞取り込みの増大および／または標的核酸に対する結合親和性の増大を付与するようにRNAが修飾される少なくとも1つの領域を含有する。iRNAのさらなる領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断可能な酵素の基質として働くことができる。例として、RNAアーゼHは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。したがって、RNAアーゼHの活性化は、RNA標的の切断をもたらし、それによって、遺伝子発現のiRNA阻害の効率を大きく増強する。結果的に、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、キメラdsRNAが使用される場合により短いiRNAで比較できる結果を得ることができることが多い。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、必要に応じて、当技術分野で公知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって日常的に検出できる。

10

20

30

40

50

【0651】

ある特定の例では、iRNAのRNAは、非リガンド基によって修飾できる。iRNAの活性、細胞分布または細胞取り込みを増強するために、いくつかの非リガンド分子がiRNAにコンジュゲートされており、このようなコンジュゲーションを実施するための手順は、科学文献において利用可能である。このような非リガンド部分には、コレステロールなどの脂質部分 [Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61, Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553]、コール酸 (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053)、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., *F EBS 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-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1, 2-ジ-オ-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) が含まれていた。このようなRNAコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許は、上記で列挙されている。通常のコジュゲーションプロトコールは、配列の1つまたは複数の位置にアミノリンカーを有するRNAの合成を含む。次いで、適切なカップリングまたは活性化試薬を使用して、アミノ基が、コンジュゲートされている分子と反応する。コンジュゲーション反応は、RNAがまだ固体支持体に結合している状態で、または溶液相でRNAが切断された後に実施できる。HPLCによるRNAコンジュゲートの精製によって、通常、純粋なコンジュゲートが得られる。

【0652】

V. 本発明のiRNAのデリバリー

細胞、例えば、対象内の細胞、例えば、ヒト対象（例えば、それを必要とする対象、例えば、脂質代謝の障害を有する対象など）内の細胞への本開示のiRNAのデリバリーは、いくつかの異なる方法において達成することができる。例えば、デリバリーは、細胞を*in vitro*または*in vivo*のどちらかにおいて本発明のiRNAと接触させ

ることによって実施され得る。*in vivo*デリバリーは、*iRNA*、例えば、*dsRNA*を含む組成物を対象に投与することによって直接的に実施してもよい。あるいは、*in vivo*デリバリーは、*iRNA*をコードしその発現を誘導する1つまたは複数のベクターを投与することによって間接的に実施してもよい。これらの代替策は、下記においてさらに説明される。

【0653】

A. 直接送達

概して、核酸分子をデリバリーする任意の方法 (*in vitro*または*in vivo*) は、本発明の*iRNA*の使用に適合させることができる [例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Akhtar S. and Julian RL., (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144およびWO 94/02595を参照されたい]。インビボデリバリーの場合、*iRNA*分子をデリバリーするために考慮する要因としては、例えば、デリバリーされた分子の生物学的安定性、非特異的効果の防止、および標的組織におけるデリバリーされた分子の蓄積が挙げられる。*iRNA*の非特異的効果は、局所投与、例えば、組織への直接注入もしくは移植または調製物の局所投与によって最小限に抑えることができる。処置部位への局所投与は、薬剤の局所濃度を最大化し、薬剤によって害され得るかまたは薬剤を分解することができる全身組織への薬剤の曝露を制限し、投与される*iRNA*分子のより少ない合計用量を可能にする。いくつかの研究は、*iRNA*が局所的に投与された場合での遺伝子産物のノックダウンの成功を示している。例えば、カニクイザルでの硝子体注入によるVEGF *dsRNA*の眼内デリバリー [Tolentino, MJ. et al., (2004) Retina 24:132-138] およびマウスでの網膜下注入 [Reich, SJ. et al. (2003) Mol. Vis. 9:210-216] は、両方とも、加齢黄斑変性症の実験モデルにおいて、新生血管形成を予防することが示された。加えて、マウスへの*dsRNA*の直接的腫瘍内注入は、腫瘍体積を減少させ [Pille, J. et al. (2005) Mol. Ther. 11:267-274]、ならびに腫瘍を有するマウスの生存を長引かせることができる [Kim, WJ. et al., (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S. et al., (2007) Mol. Ther. 15:515-523]。RNA干渉は、直接注入によるCNSへの [Dorn, G. et al., (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH. et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H. et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602]、および鼻腔内投与による肺への [Howard, KA. et al., (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X. et al., (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V. et al., (2005) Nat. Med. 11:50-55]、局所デリバリーによる成功も示している。疾患の処置のために*iRNA*を全身投与する場合、RNAを修飾することができ、またはその代わりに、薬物デリバリーシステムを使用してデリバリーすることができ；両方の方法は、*in vivo*でのエンドヌクレアーゼおよびエクソヌクレアーゼによる*dsRNA*の急速な分解を防ぐように機能する。RNAまたは医薬担体の修飾も、標的組織への*iRNA*組成物の標的化を可能にすることができ、望ましくないオフターゲット効果を避けることができる。*iRNA*分子は、細胞取り込みを増強し、分解を防ぐように、コレステロールなどの親油性基への化学的コンジュゲーションによって修飾することができる。例えば、親油性コレステロール部分にコンジュゲートさせたApoBへと誘導された*iRNA*を、マウスに全身的に注入したところ、結果として、肝臓および空腸の両方においてapoB mRNAのノックダウンを生じた [Soutschek, J. et al., (2004) Nature 432:173-178]。アプタマーへの*iRNA*のコンジュゲーションは、前立腺がんのマウスモデルにおいて腫瘍の成長を阻害し、腫瘍縮小を媒介することが分かっている [McNamara, JO. et al., (2006) Nat. Biotechnol. 24:1005-1015]。代替の実施形態において、*iRNA*は、薬物デリバリーシステム、例えば、ナノ粒子、 dendrimer、ポリマー、リポソーム、またはカチオン性デリバリーシステムなどを使用してデリバリーすることができる。正に帯電したカチオン性デリバリーシステムは、*iR*

10

20

30

40

50

NA分子（負に帯電した）の結合を促進し、負に帯電した細胞膜での相互作用も高め、それにより、細胞によるiRNAの効率的な取り込みを可能にする。カチオン性脂質、 dendriマー、またはポリマーは、iRNAに結合することができるか、またはiRNAを封入するベシクルまたはミセルを形成するように誘導することができる[例えば、Kim SH, et al., (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116を参照されたい]。ベシクルまたはミセルの形成はさらに、全身投与したときのiRNAの分解を防ぐ。カチオン性iRNA複合体を作製および投与する方法は、十分に当業者の能力の範囲内である[例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Sorensen, DR., et al. (2003) J. Mol. Biol 327:761-766; Verma, UN. et al., (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS et al. (2007) J. Hypertens. 25:197-205を参照されたい]。iRNAの全身デリバリーにとって有用な薬物デリバリーシステムのいくつかの非限定的な例としては、DOTAP [Sorensen, DR., et al (2003), supra; Verma, UN. et al., (2003), supra]、オリゴフェクタミン (Oligofectamine)、「固体核酸脂質粒子」[Zimmermann, TS. et al., (2006) Nature 441:111-114]、カルジオリピン [Chien, PY. et al., (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A. et al., (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091]、ポリエチレンミン [Bonnet ME. et al., (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 7:1659]、Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド [Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487]、およびポリアミドアミン [Tomalia, DA. et al., (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H. et al., (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804]が挙げられる。一部の実施形態において、iRNAは、全身投与のためにシクロデキストリンと複合体を形成する。投与の方法およびiRNAとシクロデキストリンとによる医薬組成物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第7,427,605号に見出すことができる。

10

20

30

40

50

【0654】

B. 発明のベクターコードiRNA

MYLIP遺伝子を標的とするiRNAは、DNAまたはRNAベクターに挿入された転写単位から発現され得る（例えば、Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., 国際PCT公開第00/22113号、Conrad、国際PCT公開第00/22114号、およびConrad、米国特許第6,054,299号を参照されたい）。発現は、使用される具体的なコントラクトおよび標的組織または細胞種に応じて、過渡的であり得る（数時間から数週間のオーダー）、または継続され得る（数週間から数か月以上）。これらの導入遺伝子は、直鎖状コンストラクト、環状プラスミド、またはウイルスベクターとして導入することができ、それらは、統合ベクターまたは非統合ベクターであり得る。導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして継代されることを可能にするように構築することもできる [Gassmann, et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1292]。

【0655】

iRNAの個々の鎖は、発現ベクター上のプロモーターから転写させることができる。2つの別々の鎖が、例えば、dsRNAを産生するように発現される場合、2つの別々の発現ベクターを、標的細胞中に共導入することができる（例えば、トランスフェクションまたは感染によって）。あるいは、dsRNAのそれぞれ個別の鎖を、両方が同じ発現プラスミド上に位置されたプロモーターによって転写させることができる。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連結された逆方向反復ポリヌクレオチドとして発現される。

【0656】

iRNA発現ベクターは、一般的に、DNAプラスミドまたはウイルスベクターである。真核細胞と相溶性の発現ベクター、例えば、脊椎動物細胞と相溶性の発現ベクターを使

用して、本明細書に記載される iRNA の発現のための組換えコンストラクトを生成することができる。真核細胞発現ベクターは、当該技術分野で周知であり、いくつかの商業的供給源から入手可能である。通常、所望の核酸セグメントの挿入のための便利な制限酵素部位を含む当該ベクターが提供される。iRNA 発現ベクターのデリバリーは、例えば、静脈内または筋肉内投与によって、患者から外植された標的細胞への投与とその後の患者への再導入によって、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によって、全身性であり得る。

【0657】

本明細書において説明される方法および組成物と共に用いることができるウイルスベクターシステムとしては、これらに限定されるわけではないが、(a) アデノウイルスベクター；(b) レトロウイルスベクター、例えば、これらに限定されるわけではないが、レンチウイルスベクター、モロニー Maus 白血病ウイルスなど；(c) アデノ随伴ウイルスベクター；(d) 単純ヘルペスウイルスベクター；(e) SV40 ベクター；(f) ポリオームウイルスベクター；(g) パピローマウイルスベクター；(h) ピコルナウイルスベクター；(i) 水泡ウイルスベクター、例えば、オルソポックス、例えば、種痘疹ウイルスベクターなど、または鳥ポックス (avipox)、例えば、カナリア痘または家禽ジフテリアなど；ならびに (j) ヘルパー依存性またはガットレス (gutless) アデノウイルスが挙げられる。複製欠損ウイルスも有利であり得る。異なるベクターは、細胞のゲノムの中に組み込まれるかまたは組み込まれないであろう。コンストラクトは、所望の場合、トランスフェクションのためのウイルス配列を含ませることができる。あるいは、コンストラクトは、エピソーム複製が可能なベクター、例えば、EPV および EBV ベクターなどに組み込むことができる。iRNA の組換え発現のためのコンストラクトは、概して、標的細胞における iRNA の発現を確実にするために、調節要素、例えば、プロモーター、エンハンサー、などを必要とするであろう。ベクターおよびコンストラクトを考慮する他の態様は、当該技術分野で公知である。

【0658】

VI. 本発明の医薬組成物

本発明は、本発明の iRNA を含む医薬組成物および製剤をも含む。したがって、一実施形態において、細胞、例えば、肝細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害する二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤であって、dsRNA 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列と 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む二本鎖リボ核酸剤と、医薬として許容し得る担体とを含む医薬組成物を本明細書において提供する。一部の実施形態において、dsRNA 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む。

【0659】

別の実施形態において、細胞、例えば、肝細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) の発現を阻害する二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 剤であって、dsRNA 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 3 のヌクレオチド配列と 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 4 のヌクレオチド配列と 1、2 または 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含む二本鎖リボ核酸剤と、医薬として許容し得る担体とを含む医薬組成物を本明細書において提供する。一部の実施形態において、dsRNA 剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、配列番号 3 のヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の連続するヌクレオチドを含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 4 のヌクレオチド配列の少なくとも 15 個の

連続するヌクレオチドを含む。

【0660】

別の実施形態において、細胞、例えば、肝細胞におけるミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質（MYLIP）の発現を阻害するdsRNA剤であって、dsRNA剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、表3または4に記載されるアンチセンス配列のうちのいずれか1つと1、2または3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む相補性の領域を含むdsRNA剤と、医薬として許容し得る担体とを含む医薬組成物を本明細書において提供する。一部の実施形態において、dsRNA剤は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、表3または4に記載されるアンチセンス配列のうちのいずれか1つの少なくとも15個の連続するヌクレオチドを含む相補性の領域を含む。

10

【0661】

本発明のiRNAを含む医薬組成物は、MYLIP遺伝子の発現または活性に関連する疾患または障害、例えば、脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）を処置するのに有用である。

【0662】

そのような医薬組成物は、デリバリーのモードに基づいて製剤化される。一例は、非経口デリバリー、例えば、静脈内（IV）、筋肉内（IM）または皮下デリバリーによる全身投与のために製剤化される組成物である。別の例としては、例えば、肝臓内への注入による、例えば、連続ポンプ注入などによる肝臓内へ直接的なデリバリーのために製剤化された組成物がある。本発明の医薬組成物は、MYLIP遺伝子の発現を阻害するのに十分な投薬量において投与され得る。概して、本発明のiRNAの好適な用量は、1日あたりレシピエントの体重1キログラムあたり約0.001ミリグラムから約200.0ミリグラムの範囲、概して、1日あたり体重1キログラムあたり約1mgから50mgの範囲であろう。通常、本発明のiRNAの好適な用量は、約0.1mg/kgから約5.0mg/kgの範囲、約0.3mg/kgおよび約3.0mg/kgであろう。

20

【0663】

反復投与療法は、定期的な、例えば、1日おきから1年に1回などの治療量のiRNAの投与を含み得る。ある特定の実施形態において、iRNAは、週に約1回、7～10日毎に1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回、5週間毎に1回、6週間毎に1回、7週間毎に1回、8週間毎に1回、9週間毎に1回、10週間毎に1回、11週間毎に1回、12週間毎に1回、月に1回、2か月毎に1回、3か月毎に1回（四半期に1回）、4か月毎に1回、5か月毎に1回、または6か月毎に1回投与される。

30

【0664】

初期処置計画の後、処置は、低頻度において投与することができる。

【0665】

当業者は、ある特定の要因、例えば、これらに限定されるわけではないが、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の健康全般および／または年齢、および他の存在する疾患など、は、対象を効果的に処置するために必要な投薬量および投薬のタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するだろう。その上、治療有効量の組成物による対象の処置は、単一の処置または一連の処置を含み得る。本発明により包含される個々のiRNAの有効投与量およびインビボ半減期の推定は、従来の手法を使用して、または本明細書の他の箇所に記載されるように適宜の動物モデルを使用した試験に基づいて為され得る。

40

【0666】

マウス遺伝学の進歩は、様々なヒト疾患、例えば、MYLIPの発現の低減から恩恵を受けるであろうMYLIP関連疾患、障害または状態の研究のための多くのマウスモデルを生み出した。当該モデルは、iRNAのインビボ試験のため、ならびに治療有効用量を決定するために使用できる。好適なマウスモデルは、当該技術分野で公知であり、例えば、高脂肪食（HFD、洋風食とも呼ばれる）、メチオニン-コリン欠乏（MCD）食、ま

50

たは高脂肪（１５％）、高コレステロール（１％）食（H F H C）を与えられたマウスおよびラット、肥満（o b）遺伝子において突然変異を含む肥満（o b / o b）マウス（W iegman et al., (2003) Diabetes, 52:1081-1089）、食物由来関節硬化症マウスモデル（Ishida et al., (1991) J. Lipid. Res., 32:559-568）、ヘテロ接合性リポタンパク質リパーゼノックアウトマウスモデル（Weistock et al., (1995) J. Clin. Invest. 96(6):2555-2568）、コリン欠乏Ｌ－アミノ酸確定高脂肪食（C D A H F D）を与えられたマウスおよびラット（Matsumoto et al. (2013) Int. J. Exp. Pat h. 94:93-103）、高トランス脂肪コレステロール食（H T F － C）を与えられたマウスおよびラット（Clapper et al. (2013) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 305:G483-G495）、高脂肪高コレステロール胆汁塩食（H F / H C / B S）を与えられたマウスおよびラット（Matsuzawa et al. (2007) Hepatology 46:1392-1403）、ならびに高脂肪食＋フルクトース（３０％）水を与えられたマウスおよびラット（Softic et al. (2018) J. Clin. Invest. 128(1)-85-96）を含む。

10

20

【０６６７】

本発明の医薬組成物は、局所処置または全身処置のどちらが所望されるか、および処置されるエリアに応じて、いくつかの方法において投与することができる。投与は、局所（例えば、経皮貼布による）、経肺、（例えば、ネブライザーなどによる散剤またはエアゾール剤の吸入または吹送による）；気管内、鼻腔内、表皮および経皮、経口または非経口であり得る。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、もしくは筋肉内注射もしくは注入；皮下（例えば、移植されたデバイスによる）、または脳内（例えば、実質内、髄腔内、または心室内投与による）を含む。

【０６６８】

i R N A は、特定の細胞または組織、例えば、肝臓（例えば、肝臓の肝細胞）などを標的とする方法においてデリバリーされ得る。

【０６６９】

一部の実施形態において、本発明の医薬組成物は、対象への筋肉内投与に好適である。他の実施形態において、本発明の医薬組成物は、対象への静脈内投与に好適である。本発明の一部の実施形態において、本発明の医薬組成物は、例えば、２９ g または ３０ g ニードルを使用する対象への皮下投与に好適である。

【０６７０】

本発明の医薬組成物は、緩衝化されていない溶液、例えば、生理食塩水もしくは水、または緩衝溶液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩もしくはリン酸塩、またはそれらの組合せを含む緩衝溶液などにおいて R N A i 剤を含んでもよい。

【０６７１】

一実施形態において、本発明の医薬組成物、例えば、皮下投与に好適な組成物などは、リン酸緩衝生理食塩水（P B S）において本発明の R N A i 剤を含む。P B S の好適な濃度は、例えば、１ m M、１．５ m M、２ m M、２．５ m M、３ m M、３．５ m M、４ m M、４．５ m M、５ m M、６．５ m M、７ m M、７．５ m M、９ m M、８．５ m M、９ m M、９．５ m M、または約 １０ m M P B S である。本発明の一実施形態において、本発明の医薬組成物は、約 ５ m M の P B S（例えば、０．６４ m M の NaH_2PO_4 、４．３６ m M の Na_2HPO_4 、８５ m M の NaCl ）の溶液に溶解された本発明の R N A i 剤を含む。上記範囲および値の中間の値も本発明の一部であることを意図する。加えて、上記値のいずれかの組合せを上限および／または下限として使用する値の範囲を含めることを意図する。

30

40

【０６７２】

本発明の医薬組成物の p H は、約 ５．０ から約 ８．０、約 ５．５ から約 ８．０、約 ６．０ から約 ８．０、約 ６．５ から約 ８．０、約 ７．０ から約 ８．０、約 ５．０ から約 ７．５、約 ５．５ から約 ７．５、約 ６．０ から約 ７．５、約 ６．５ から約 ７．５、約 ５．０ から約 ７．２、約 ５．２５ から約 ７．２、約 ５．５ から約 ７．２、約 ５．７５ から約 ７．２、約 ６．０ から約 ７．２、約 ６．５ から約 ７．２、または約 ６．８ から約 ７．２ であり得る

50

。上記範囲および値の中間の範囲および値も本発明の一部であることを意図する。

【0673】

本発明の医薬組成物のオスモル濃度、例えば、約400mOsm/kg以下、例えば、50~400mOsm/kg、75~400mOsm/kg、100~400mOsm/kg、125~400mOsm/kg、150~400mOsm/kg、175~400mOsm/kg、200~400mOsm/kg、250~400mOsm/kg、300~400mOsm/kg、50~375mOsm/kg、75~375mOsm/kg、100~375mOsm/kg、125~375mOsm/kg、150~375mOsm/kg、175~375mOsm/kg、200~375mOsm/kg、250~375mOsm/kg、300~375mOsm/kg、50~350mOsm/kg、75~350mOsm/kg、100~350mOsm/kg、125~350mOsm/kg、150~350mOsm/kg、175~350mOsm/kg、200~350mOsm/kg、250~350mOsm/kg、50~325mOsm/kg、75~325mOsm/kg、100~325mOsm/kg、125~325mOsm/kg、150~325mOsm/kg、175~325mOsm/kg、200~325mOsm/kg、250~325mOsm/kg、300~325mOsm/kg、300~350mOsm/kg、50~300mOsm/kg、75~300mOsm/kg、100~300mOsm/kg、125~300mOsm/kg、150~300mOsm/kg、175~300mOsm/kg、200~300mOsm/kg、250~300mOsm/kg、50~250mOsm/kg、75~250mOsm/kg、100~250mOsm/kg、125~250mOsm/kg、150~250mOsm/kg、175~350mOsm/kg、200~250mOsm/kg、例えば、約50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、295、300、305、310、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、または約400mOsm/kgは、皮下投与に好適であり得る。上記範囲および値の中間の範囲および値も本発明の一部であることを意図する。

【0674】

本発明のRNAi剤を含む本発明の医薬組成物は、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または約2.0mLの医薬組成物を含むバイアル中に存在してもよい。本発明の医薬組成物におけるRNAi剤の濃度は、約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、130、125、130、135、140、145、150、175、180、185、190、195、200、205、210、215、230、225、230、235、240、245、250、275、280、285、290、295、300、305、310、315、330、325、330、335、340、345、350、375、380、385、390、395、400、405、410、415、430、425、430、435、440、445、450、475、480、485、490、495、または約500mg/mLであり得る。一実施形態において、本発明の医薬組成物におけるRNAi剤の濃度は、約100mg/mLである。上記範囲および値の中間の値も本発明の一部であることを意図する。

【0675】

本発明の医薬組成物は、本発明のdsRNA剤を遊離酸の形態で含み得る。本発明の他の実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明のdsRNA剤を塩の形態、例えば、ナトリウム塩の形態で含み得る。ある特定の実施形態において、本発明のdsRNA剤

が塩の形態である場合には、薬剤中に存在するホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート基のうちの実質的にすべてに対する対イオンとして薬剤中に存在する。ホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート連結のうちの実質的にすべてがナトリウム対イオンを含む薬剤は、ナトリウム対イオンを有さない5、4、3、2または1以下のホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態において、本発明のdsRNA剤がナトリウム塩の形態である場合には、ナトリウムイオンは、薬剤中に存在するホスホジエステルおよび／またはホスホロチオエート基のうちのすべてに対する対イオンとして薬剤中に存在する。

【0676】

局所投与用の医薬組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤、および散剤を含み得る。従来の、医薬担体、水性、粉末状、または油性基剤、増粘剤などは、必要であり得るか、または望ましくあり得る。被覆されたコンドーム、手袋なども有用であり得る。好適な局所用製剤としては、本発明において特徴とされるiRNAが、局所デリバリー剤、例えば、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化剤、および界面活性物質との混合物であるような製剤が挙げられる。好適な脂質およびリポソームとしては、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOPE、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（distearolyphosphatidyl）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）、およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAPおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA）が挙げられる。本発明において特徴とされるiRNAは、リポソーム内においてカプセル化することができ、またはリポソーム、特にカチオン性リポソームに対して複合体を形成することができる。あるいは、iRNAは、脂質、特にカチオン性脂質に対して複合体化することができる。好適な脂肪酸およびエステルとしては、これらに限定されるわけではないが、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、ジカプロエート、トリカプロエート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプロエート、1-ドデシルアザシクロヘプタナー2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはC₁~20アルキルエステル（例えば、イソプロピルミリステートIPM）、モノグリセライド、ディグリセライド、またはそれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。局所用製剤は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,747,014号において詳細に説明されている。

【0677】

A. 膜分子アセンブリを含むiRNA製剤

本発明の組成物および方法における使用のためのiRNAは、膜分子アセンブリ、例えば、リポソームまたはミセルでのデリバリー用に製剤化することができる。薬物の製剤化のために研究および使用されてきたマイクロエマルジョンの他に、多くの組織化された界面活性剤が存在する。これらとしては、単層、ミセル、二層およびベシクルが挙げられる。ベシクル、例えば、リポソームは、薬物デリバリーの観点からのそれらの特異性およびそれらが示す作用の持続時間により大きな関心を集めてきた。本発明において使用される場合、「リポソーム」という用語は、球状の1つまたは複数の二層において配列された両親媒性脂質からなるベシクルを意味する。

【0678】

リポソームは、脂溶性材料および水性内部から形成されたメンブレンを有する単層または多層ベシクルを含む。水性部分は、デリバリーされる組成物（例えばiRNA）を含む。脂溶性材料は、水性内部を、iRNA組成物を一部の例において含み得るが通常は含まない水性外部から隔離する。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合できるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、細胞壁と効率的に融合できないが、インビボにおいてマクロファージにより取り込まれる。

【0679】

無傷の哺乳動物の皮膚を横断するために、脂質ベシクルは、好適な経皮勾配の影響下において、それぞれが50nm未満の直径を有する一連の微細な孔を通過しなければならない。したがって、高度に変形可能であり、当該微細な孔を通過できるリポソームを使用することが望ましい。

【0680】

リポソームは、作用の部位への有効成分の移動およびデリバリーに有用である。リポソームメンブレンは、生物メンブレンに構造が類似しているため、リポソームを組織に適用すると、リポソームは、細胞膜と合体し始め、リポソームと細胞の合体が進行するに従って、リポソームの内容物は、活性薬剤が作用し得る細胞内部に注ぎ込まれる。

10

【0681】

リポソーム製剤は、多くの薬物についてのデリバリーの方式として、広範な調査の中心になってきた。局所投与では、リポソームは、他の製剤と比較していくつかの利点を示す。当該利点としては、投与された薬物の高度な全身的吸収に関連する副作用の低下、投与された薬物の所望の標的における蓄積の増大、親水性および疎水性を含めて各種の薬物を皮膚内に投与できることが挙げられる。

【0682】

いくつかの報告書には、リポソームが、高分子量のDNAを含む薬剤を皮膚内にデリバリーできることが詳述されている。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た。用途の多くは、上面表皮の標的化をもたらした。

20

【0683】

iRNA剤を含有するリポソームは、様々な方法によって調製することができる。一例において、リポソームの脂質成分が界面活性剤に溶解され、それにより、脂質成分によってミセルが形成される。例えば、脂質成分は、両親媒性カチオン性脂質または脂質コンジュゲートであり得る。界面活性剤は、高い臨界ミセル濃度を有することができ、非イオン性であり得る。例示的界面活性剤としては、コレート、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコレート、およびラウロイルサルコシンが挙げられる。次いで、iRNA剤調製物が、脂質成分を含むミセルに加えられる。脂質上のカチオン性基は、iRNA剤と相互作用し、iRNA剤の周りに凝縮してリポソームを形成する。凝縮後、界面活性剤は、iRNA剤のリポソーム調製物を得るために、例えば、透析などによって除去される。

30

【0684】

必要であれば、凝集反応の際に、例えば、制御された添加によって、凝集を補助する担体化合物を加えることもできる。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマーであり得る（例えば、スペルミン、またはスペルミジン）。凝縮を支持するために、pHも調整することができる。

【0685】

デリバリービヒクルの構造要素としてポリヌクレオチド／カチオン性脂質複合体を組み込む、安定なポリヌクレオチドデリバリービヒクルを生成する方法は、例えば、WO96/37194においてより詳細に説明されており、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。リポソームの形成は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; 米国特許第4,897,355号; 米国特許第5,171,678号; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; and Fukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984において説明される例示的方法の1つまたは複数の態様も含むことができる。デリバリービヒクルとしての使用のために適切なサイズの脂質集合体を調製するために一般的に使用される方法としては、超音波処理ならびに凍結融解および押出加工が挙げられる[例えば、Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986を参照されたい]。一貫して小さくて(50nmから200nm)比較的

40

50

均一な集合体が所望される場合、顕微溶液化を使用することができる [Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984]。これらの方法は、iRNA 剤調製物をリポソーム内にパッキングすることに容易に適合される。

【0686】

リポソームは、2つの広いクラスに分類される。カチオン性リポソームは、正に帯電したリポソームであり、負に帯電したDNA分子と相互作用して、安定な複合体を形成する。正に帯電したDNA／リポソーム複合体は、負に帯電した細胞表面に結合し、エンドソームに内在化される。エンドソーム内の酸性pHにより、リポソームは破裂して、その内容を細胞質中へと放出する [Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985]。

10

【0687】

リポソームは、pH感応性 (pH-sensitive) であるかまたは負に帯電しており、それとの複合体ではなくDNAを捕捉する。DNAおよび脂質の両方が、同じように荷電されるため、複合体形成ではなく反発が生じる。それにもかかわらず、いくつかのDNAは、これらのリポソームの水性内部へと捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養中の細胞単層にデリバリーするために、pH感応性リポソームが使用されている。外因性遺伝子の発現が、標的遺伝子において検出された [Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274]。

【0688】

リポソーム組成物の主要なタイプの1つは、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性リポソーム組成物は、例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) またはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、概して、ジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成され、その一方で、アニオン性融合リポソームは、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。別のタイプのリポソーム組成物は、ホスファチジルコリン (PC)、例えば、大豆PCおよび卵PCなど、から形成される。別のタイプは、リン脂質および／またはホスファチジルコリンおよび／またはコレステロールの混合物から形成される。

20

【0689】

in vitro および in vivo においてリポソームを細胞に導入する他の方法の例としては、米国特許第5,283,185号および同5,171,678号; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; and Strauss EMBO J. 11:417, 1992が挙げられる。

30

【0690】

非イオン性リポソーム系、特に、非イオン性界面活性剤とコレステロールとを含む系も、皮膚への薬物のデリバリーにおけるそれらの有用性を判定するために調べられている。ノバソーム (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) およびノバソーム (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、マウスの皮膚の真皮中にシクロスポリン-Aをデリバリーするために使用された。結果は、そのような非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層中へのシクロスポリン-Aの蓄積を促進することにおいて有効であることを示した [Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466]。

40

【0691】

リポソームは、「立体的に安定化された」リポソームも含み、当該用語は、本明細書において使用される場合、リポソームに組み込まれた場合に、結果としてそのような特化された脂質を欠くリポソームと比較して増強された循環寿命を生じるような1つまたは複数の特化された脂質を含むリポソームを意味する。立体的に安定化されたリポソームの例は

50

、リポソームのベシクル形成脂質部分の一部が、(A) 1つまたは複数の糖脂質、例えば、モノシアロガングリオシドGM₁を含むもの、または(B)：1つまたは複数の親水性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)部分などによって誘導体化されるものである。いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、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誘導体化脂質を含む立体的に安定化されたリポソームの場合、これらの立体的に安定化されたリポソームの増強された循環半減期は、細網内皮系(RES)の細胞内への減少した取り込みに由来すると、当技術分野において考えられる[Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765]。

【0692】

1つまたは複数の糖脂質を含む様々なリポソームが、当技術分野で公知である。Papahadjopoulosら[Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64]は、リポソームの血液半減期を改善する、モノシアロガングリオシドGM₁、硫酸ガラクトセレブロシドサルフェート、およびホスファチジルイノシトールの能力について報告している。これらの知見は、Gabizonら[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949]によって解説されている。米国特許第4,837,028号およびWO88/04924(両方ともAllenらによる)では、(1)スフィンゴミエリン、および(2)ガングリオシドGM₁また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が開示されている。米国特許第5,543,152号(Webbら)では、スフィンゴミエリンを含むリポソームについて開示されている。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が、WO97/13499(Limら)において開示されている。

【0693】

一部の実施形態において、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合することができるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、原形質膜と効率的には融合することができないが、*in vivo*においてマクロファージによって取り込まれるため、iRNA剤をマクロファージにデリバリーするために使用することができる。

【0694】

リポソームのさらなる利点としては、天然のリン脂質から得られるリポソームが生体適合性および生分解性であること；リポソームは、様々な水および脂質溶解性薬物を組み込むことができること；リポソームは、それらの内部コンパートメント内のカプセル化されたiRNAを、代謝および劣化から保護することができることが挙げられる[Rosoff, in "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245]。リポソーム製剤の調製における重要な考慮すべき事柄は、脂質表面の電荷、ベシクルのサイズ、およびリポソームの水の量である。

【0695】

正に帯電した合成カチオン性脂質であるN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチル塩化アンモニウム(DOTMA)は、小さいリポソームを形成するために使用することができ、リポソームは、自然に核酸と相互作用して、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合することができる脂質-核酸複合体を形成し、それにより、結果としてiRNA剤のデリバリーをもたらす(例えば、DOTMAおよびDNAによるその使用の説明は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987、および米国特許第4,897,355号を参照されたい)。

【0696】

DOTMAアナログである1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニア)プロパン(DOTAP)は、リン脂質と組み合わせて使用することにより、DNA複合体化ベシクルを形成することができる。リポフェクチン(商標)(Bethesda Research Laboratories、ゲイザースバーグ、メリーランド州

10

20

30

40

50

）は、負に帯電したポリヌクレオチドと自然に相互作用して複合体を形成する正に帯電したDOTMAリポソームを含む、生きた組織培養細胞内への高いアニオン性の核酸のデリバリーのための有効な薬剤である。十分に正に帯電したリポソームが使用される場合、結果として得られる複合体上の正味電荷も正である。この方法において調製された正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自然に付着し、原形質膜と融合して、機能的核酸を、例えば、組織培養細胞内へと効率的にデリバリーする。別の市販のカチオン性脂質である1, 2-ビス（オレオイルオキシ）-3, 3-（トリメチルアンモニア）プロパン（「DOTAP」）（Boehringer Mannheim、インディアナポリス、インディアナ）は、オレオイル部分が、エーテル連結ではなくエステルによって連結されている点においてDOTMAとは異なっている。

10

【0697】

他の報告されたカチオン性脂質化合物としては、様々な部分にコンジュゲートしているもの、例えば、2つのタイプの脂質の一方にコンジュゲートしているカルボキシスぺルミンなど、ならびに5-カルボキシスぺルミルグリシンジオクタオレオイルアミド（「DOG S」）（トランスフェクタム（商標）、Promega、マディソン、ウィスコンシン州）およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスぺルミルアミド（「DPPE S」）などの化合物が挙げられる（例えば、米国特許第5, 171, 678号を参照されたい）。

【0698】

別のカチオン性脂質コンジュゲートは、DOPEと組み合わせてリポソーム中へと製剤化されているコレステロールによる脂質の誘導体化（「DC-Chol」）を含む[Gao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991を参照されたい]。ポリリジンとDOPEにコンジュゲートさせることによって作製されたリポポリリジンは、血清の存在下でのトランスフェクションにとって効果的であることが報告されている[Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991]。ある特定の細胞系にとって、コンジュゲートしたカチオン性脂質を含むこれらのリポソームは、低い毒性を示すと言われており、DOTMA含有組成物よりもより効率的なトランスフェクションを提供する。他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIEおよびDMRIE-HP（Vical、ラ・ホーヤ、カリフォルニア）およびリポフェクタミン（DOSPA）（Life Technology, Inc.、ゲイザースバーグ、メリーランド州）が挙げられる。オリゴヌクレオチドのデリバリーにとって好適な他のカチオン性脂質は、WO98/39359およびWO96/37194に記載されている。

20

【0699】

リポソーム製剤は、局所性投与に対して特に適している。リポソームは、他の製剤と比較していくつかの利点を示す。そのような利点としては、投与された薬物の高い体内吸収に関連する副作用の減少、所望の標的での投与された薬物の累積の増加、およびiRNA剤を皮膚に投与する能力が挙げられる。いくつかの実践形態において、リポソームは、iRNA剤を上皮細胞にデリバリーするため、および皮膚組織内、例えば、皮膚内へのiRNA剤の浸透を増強するためにも、使用される。例えば、リポソームは、局所的に適用することができる。リポソームとして製剤化された薬物の皮膚への局所デリバリーは、文献に報告されている[例えば、Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, vol. 2, 405-410 and du Plessis et al., Antiviral Research, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., Biotechniques 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. Gene 56:267-276, 1987; Nicolau, C. et al. Meth. Enz. 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. Meth. Enz. 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851-7855, 1987を参照されたい]。

30

40

【0700】

非イオン性リポソーム系、特に、非イオン性界面活性剤とコレステロールを含む系、も、皮膚への薬物のデリバリーにおけるそれらの有用性を判定するためにも調べられている

50

。マウスの皮膚の真皮内に薬物をデリバリーするために、ノバソーム（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ー１０ーステアリルエーテル）およびノバソーム（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ー１０ー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使用された。iRNA剤を伴うそのような製剤は、皮膚科障害を処置するために有用である。

【0701】

iRNAを含むリポソームは、非常に変形可能に作製することができる。そのような変形能は、リポソームがリポソームの平均半径より小さい孔を通して浸透することを可能にする。例えば、トランスファーソーム（transferosome）は、変形可能なタイプのリポソームである。トランスファーソームは、表面エッジ活性化剤（surface edge activator）、通常は界面活性剤を標準的リポソーム組成物に加えることによって作製することができる。iRNAを含むトランスファーソームは、iRNAを皮膚のケラチン生成細胞にデリバリーするために、感染によって、例えば皮下に、デリバリーすることができる。無傷の哺乳動物の皮膚を横断するために、脂質ベシクルは、好適な経皮勾配の影響下において、それぞれが50nm未満の直径を有する一連の微細な孔を通過しなければならない。加えて、脂質特性に起因して、これらのトランスファーソームは、自己最適性（例えば皮膚などにおける孔の形状に適応性のある）、自己修復性であり得、ならびに断片化することなく頻繁にそれらの標的に達することができ、多くの場合、自己装填することができる。

【0702】

本発明に適した他の製剤は、WO2008／042973に記載される。

【0703】

トランスファーソームは、さらに別の種類のリポソームであり、薬物デリバリー媒体の魅力的な候補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、脂肪滴より小さな孔を容易に通過できるほど高度に変形可能である脂肪滴と記載し得る。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適応し、例えば、それらは、自己最適性（皮膚における孔の形状に適応性のある）であり、自己修復性であり、断片化することなく頻繁にそれらの標的に達し、多くの場合、自動装填性である。トランスファーソームを作製するために、表面エッジ活性化剤、通常は界面活性剤を標準的リポソーム組成物に加えることができる。トランスファーソームは、皮膚に血清アルブミンをデリバリーするために使用されてきた。血清アルブミンのトランスファーソーム媒介デリバリーは、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注入と同じくらい有効であることが分かっている。

【0704】

界面活性剤は、エマルション（マイクロエマルションを含む）およびリポソームなどの製剤において、広い応用を見出す。天然および合成の、多くの異なるタイプの界面活性剤の特性を分類および格付けする最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（HLB）の使用による方法である。親水性基（「ヘッド」としても知られる）の性質は、製剤に使用される様々な界面活性剤をカテゴライズ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）。

【0705】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、それらは、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、医薬品および化粧製品において広い応用を見出し、広い範囲のpH値において使用可能である。概して、それらのHLB値は、それらの構造に応じて2から約18の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、非イオン性エステル、例えば、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシ化エステルなどが挙げられる。非イオン性アルカノールアミドおよびエーテル、例えば、脂肪族アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、およびエトキシ化／プロポキシ化ブロックポリマーなど、も、このクラスに含まれる。ポリオキシエ

チレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤のクラスの最も一般的なメンバーである。

【0706】

水に溶解または分散されたときに、界面活性剤分子が負電荷を保持する場合、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としては、カルボキシレート、例えば、石鹸など、アシルラクチレート、アミノ酸のアシルアミド、硫酸のエステル、例えば、アルキル硫酸エステルおよびエトキシ化アルキル硫酸エステルなど、スルホネート、例えば、アキルベンゼンスルホネート、など、アシルイセチオネート、アシルタウレート、ならびにスルホスクシネートおよびホスフェートが挙げられる。アニオン性界面活性剤のクラスの最も一般的なメンバーは、アルキル硫酸エステルおよび石鹸である。

【0707】

水に溶解または分散されたときに、界面活性剤分子が正電荷を保持する場合、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としては、第四級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが挙げられる。第四級アンモニウム塩は、このクラスの最も使用されるメンバーである。

【0708】

界面活性剤分子が、正電荷または負電荷のどちらかを保持する能力を有する場合、界面活性剤は、両性として分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルペタインおよびホスファチドが挙げられる。

【0709】

薬品、製剤、およびエマルションにおける界面活性剤の使用は、概説されている (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285)。

【0710】

本発明の方法での使用のための iRNA は、ミセル製剤としても提供することができる。「ミセル」は、本明細書において、分子のすべての疎水性基が内側を向くように両親媒性分子が球状構造において整列され、それにより、親水性部分を周囲の水相に接触させたままにする、特定のタイプの分子アセンブリとして定義される。環境が疎水性の場合、逆の配置も存在する。

【0711】

経皮的な膜によるデリバリーにとって好適な混合ミセル製剤は、iRNA の水溶液と、アルカリ金属の C₈ から C₂₂ アルキル硫酸塩と、ミセル形成化合物とを混合することによって調製され得る。例示的ミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容される塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレエート、モノラウレート、ルリチシャ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシンおよびその薬学的に許容される塩、グリセリン、ポリグリセリン、リシン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテルおよびそのアナログ、ポリドカノールアルキルエーテルおよびそのアナログ、ケノデオキシコレート (chenodeoxycholate)、デオキシコレート、ならびにそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属のアルキル硫酸塩と同時に加えてもよく、またはそれらを加えた後に加えてもよい。混合ミセルは、原材料の、実質的に任意の種類の混合によって形成されるであろうが、より小さいサイズのミセルを提供するために、激しい混合によって形成されるであろう。

【0712】

一方法において、第1のミセル組成物は、RNA i と少なくともアルカリ金属アルキル硫酸塩とを含むように調製される。第1のミセル組成物は、次いで、少なくとも3つのミセル形成化合物と混合され、混合ミセル組成物を形成する。別の方法において、ミセル組成物は、RNA i とアルカリ金属アルキル硫酸塩と、ミセル形成化合物のうちの少なくとも1つとを混合し、その後、激しく混合しながら、残りのミセル形成化合物を加えることによって調製される。

10

20

30

40

50

【0713】

製剤を安定化させるため、および細菌増殖から保護するために、フェノールまたはm-クレゾールを混合ミセル組成物に加えてもよい。あるいは、フェノールまたはm-クレゾールを、ミセル形成原材料と共に加えてもよい。グリセリンなどの等張剤を、混合ミセル組成物の形成後に加えてもよい。

【0714】

噴霧剤としてのミセル製剤のデリバリーのために、製剤を、エアゾールディスペンサーに入れることができ、ディスペンサーは、発射薬を装填される。加圧下の発射薬は、ディスペンサー内において液体状態である。原材料の比率は、水相および発射薬相が1つになるように、すなわち、1つの相が存在するように調整される。2つの相が存在する場合、例えば、計量式バルブなどによって、内容物の一部を分配する前に、ディスペンサーを振盪する必要がある。医薬品の分配用量が、微細な噴霧において計量式バルブから射出される。

10

【0715】

発射薬は、含水素クロロフルオロカーボン、含水素フルオロカーボン、ジメチルエーテル、およびジエチルエーテルを含み得る。ある特定の実施形態において、HFA134a (1, 1, 1, 2テトラフルオロエタン) が使用され得る。

【0716】

必須の原材料の特定の濃度は、比較的簡単な実験によって決定することができる。口腔による吸収のために、射出のためまたは胃腸管を通る投与のために、投薬量を、例えば、少なくとも二倍または三倍に増加させることは、多くの場合、望ましい。

20

【0717】

B. 脂質粒子

本発明のiRNA、例えば、dsRNA剤は、脂質製剤、例えば、LNPまたは他の核酸粒子中に完全に封入されてもよい。

【0718】

本明細書において使用される場合、用語「LNP」は、安定な核酸-脂質粒子を意味する。LNP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防ぐ脂質（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）を含む。LNPは、静脈内注射（i.v.）後に、延長された循環寿命を示し、遠位部位（例えば、投与部位から物理的に分離された部位）において蓄積するため、全身投与にとって非常に有用である。本明細書において使用される場合は、「SPLP」という用語は、脂質ベシクル内に封入されたプラスミドDNAを含む核酸-脂質粒子を指す。LNPは、「pSPLP」を含み、それは、PCT公開第WO00/03683号において詳しく説明されるようなカプセル化された縮合剤-核酸複合体を含む。本発明の粒子は、典型的には、約50nmから約150nm、より典型的には約60nmから約130nm、より典型的には約70nmから約110nm、最も典型的には約70nmから約90nmの平均直径を有し、実質的に非毒性である。加えて、核酸は、本発明の核酸-脂質粒子中に存在する場合、水溶液中において、ヌクレアーゼによる分解に対して抵抗性を有する。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；同第5,981,501号；同第6,534,484号；同第6,586,410号；同第6,815,432号；およびPCT公開第WO96/40964において開示されている。

30

40

【0719】

ある特定の実施形態において、脂質と薬物の比率（質量/質量比）（例えば、脂質とdsRNAの比率）は、約1:1から約50:1、約1:1から約25:1、約3:1から約15:1、約4:1から約10:1、約5:1から約9:1、または約6:1から約9:1の範囲であるだろう。上記に列記した範囲の中間的な範囲も、本発明の一部であることが想到される。

【0720】

カチオン性脂質は、例えば、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチル塩化アンモニウム

50

(DODAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチル臭化アンモニウム(DDAB)、N-(I-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチル塩化アンモニウム(DOTAP)、N-(I-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチル塩化アンモニウム(DOTMA)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ)プロピルアミン(DODMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLenDMA)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-モルホリノプロパン(DLin-MA)、1,2-ジリノレイル-3-ジメチルアミノプロパン(DLinDAP)、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-S-DMA) 1-リノレイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-2-DMAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチル塩化アミノプロパン塩(DLin-TMA.Cl)、1,2-ジリノレイル-3-トリメチル塩化アミノプロパン塩(DLin-TAP.Cl)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン(DLin-MPZ)もしくは3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DLinAP)、3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール(DOAP)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、2,2-ジリノエチル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)もしくはその類似体、(3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン(ALN100)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-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)、1,1'-(2-(4-(2-(2-(2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチルアザンジイル)ジドデカン-2-オール(Tech G1)、またはそれらの混合物であり得る。カチオン性脂質は、粒子中に存在する全脂質の約20モル%から約50モル%または約40モル%を構成し得る。

10

20

30

【0721】

ある特定の実施形態において、化合物2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソランを使用して、脂質-siRNAナノ粒子を調製することができる。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は、参照により本明細書に組み込まれる、2008年10月23日に出願された米国仮特許出願第61/107,998号に記載されている。

【0722】

ある特定の実施形態において、脂質-siRNA粒子は、40%の2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン、10%のDSPC、40%のコレステロール、10%のPEG-C-DMG(モルパーセント)を含み、 63.0 ± 2.0 nmの粒子サイズおよび0.027のsiRNA/脂質比を有する。

40

【0723】

非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジオレイル-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレイルホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレイルホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジオレイル-ホスファチジルエタノールアミン-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレ-

50

ト (D O P E - m a l)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E)、ジミリスチ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)、16-O-モノメチル P E、16-O-ジメチル P E、18-1-トランス P E、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (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、そ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には、粒子中に存在する全脂質の約5モル%から約90モル%、約10モル%または約58モル%であり得る。

【0724】

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、限定することなく、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 i₂)、P E G-ジミリスチルオキシプロピル (C i₄)、P E G-ジパルミチルオキシプロピル (C i₆) または P E G-ジステアリルオキシプロピル (C i₈) であり得る。粒子の凝集を防止するコンジュゲートされた脂質は、粒子中に存在する全脂質の0モル%から約20モル%、または約2モル%であり得る。

10

【0725】

一部の実施形態において、核酸-脂質粒子は、例えば、粒子中に存在する全脂質の約10モル%から約60モル%または約48モル%のコレステロールをさらに含む。

20

【0726】

L N P 0 1

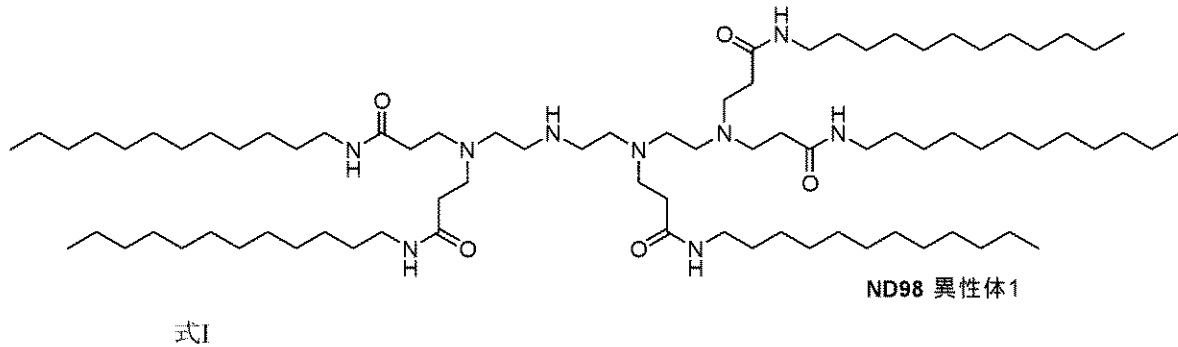
ある特定の実施形態において、リポイド N D 9 8 / 4 H C l (M W 1 4 8 7) (参照により本明細書に組み込まれる、2008年3月26日に出願された米国特許出願第12 / 0 5 6, 2 3 0号を参照されたい)、コレステロール (S i g m a - A l d r i c h) および P E G - C e r a m i d e C 1 6 (A v a n t i P o l a r L i p i d s) を使用して、脂質-d s R N A ナノ粒子 (例えば、L N P 0 1 粒子) を調製することができる。エタノール中の各々の原液、すなわち 1 3 3 m g / m l の N D 9 8、2 5 m g / m l のコレステロール、1 0 0 m g / m l の P E G - セラミド C 1 6 を以下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 - セラミド C 1 6 原液を、例えば、4 2 : 4 8 : 1 0 のモル比において組み合わせる。組み合わせた脂質溶液を水性 d s R N A と (例えば、p H 5 の酢酸ナトリウム中で)、最終エタノール濃度が約 3 5 ~ 4 5 % になり、最終酢酸ナトリウム濃度が約 1 0 0 ~ 3 0 0 m M になるように混合することができる。脂質-d s R N A ナノ粒子は、通常、混合と同時に形成する。所望の粒子サイズ分布に応じて、例えば、サーモバレル押出機、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.) を使用して、ポリカーボネートメンブレン (例えば 1 0 0 n m カットオフ) を通じて、得られたナノ粒子混合物を押し出すことができる。一部の場において、押出工程を省略することができる。エタノール除去および同時の緩衝剤交換を、例えば、透析または接線流濾過によって遂行することができる。緩衝剤を、例えば、緩衝生理食塩水 (P B S) と p H 約 7、例えば p H 約 6. 9、p H 約 7. 0、p H 約 7. 1、p H 約 7. 2、p H 約 7. 3 または p H 約 7. 4 において交換することができる。

30

40

【0727】

【化 3 5】



10

【0728】

LNP01 製剤は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際出願公開第2008/042973号に記載されている。

【0729】

追加の例示的な脂質－dsRNA 製剤は、以下の表に提示される。

【0730】

【表 1】

表1. 例示的な脂質配合物

20

	陽イオン性脂質	陽イオン性脂質/非陽イオン性脂質/コレステロール/ PEG-脂質コンジュゲート 脂質:siRNA比
SNALP	1,2-ジリノール酸-N, N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Cholesterol/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質:siRNA ~ 7:1
S-XTC	2,2-ジノレニル-4-ジメチルアミノエチル- [1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DPPC/Cholesterol/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-ジノレニル-4-ジメチルアミノエチル- [1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-ジノレニル-4-ジメチルアミノエチル- [1,3]-ジオキソラン(XTC)	X7TC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-ジノレニル-4-ジメチルアミノエチル- [1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-ジノレニル-4-ジメチルアミノエチル- [1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-ジノレニル-4-ジメチルアミノエチル- [1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1

30

40

50

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-シクロヘンタ[d][1,3]ジオキサール-5-アミン(ALN100)	ALN100/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘptaトリアコンタ-6,9,18,31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)プロパレート(MC3)	MC-3/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-ヒドロキシデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシデシル)アミノ)エチル)ビヘンゼン-1-イル)エチルアザンソイルジステカン-2-オール(C12-200)	C12-200/DSPC/Cholesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂質:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1

10

20

30

40

50

DSPC: ジステアロイルホスファチジルコリン

DPPC: ジパルミトイルホスファチジルコリン

PEG-DMG: PEG-ジジミリスチルグリセロール(C14-PEG または PEG-C14)(平均モル重量 2000 の PEG)

PEG-DSG: PEG-ジスチリルグリセロール(C18-PEG または PEG-C18)(平均モル重量 2000 の PEG)

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

【0731】

製剤を構成する SNA LP (1, 2-ジリノレニルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DLi nDMA) は、参照により本明細書に組み込まれる、2009年4月15日に出願された国際公開第2009/127060号に記載されている。

【0732】

製剤を構成する XTC は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、2009年1月29日に出願された米国仮特許出願第61/148,366号、2009年3月2日に出願された米国仮特許出願第61/156,851号、2009年6月10日に出願された米国仮特許出願第61/185,712号、2009年7月24日に出願された米国仮

【 0 7 3 3 】

【 0 7 3 4 】

【 0 7 3 5 】

【 0 7 3 6 】

経口投与用の組成物および製剤としては、粉末剤または粒剤、マイクロ粒子、ナノ粒子、水または非水性媒体における懸濁剤または溶液剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、サッシェ、錠剤またはミニ錠剤が挙げられる。増粘剤、矯臭剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤は、望ましくあり得る。一部の実施形態において、経口製剤は、本発明において特徴とされる dsRNA が、1 つまたは複数の浸透促進剤、界面活性剤、およびキレート化剤と併せて投与される、製剤である。好適な界面活性剤としては、脂肪酸および／またはエステルまたはそれらの塩、胆汁酸および／またはそれらの塩が挙げられる。好適な胆汁酸／塩としては、ケノデオキシコール酸（CDCA）およびウルソデオキシケノデオキシコール酸（UDCA）、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（glucolic acid）、グリコール酸（glycolic acid）、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およびグリコジヒドロフシジン酸ナトリウムが挙げられる。好適な脂肪酸としては、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸リノール酸、リノレン酸、ジカプロエート、トリカプロエート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1-モノカプロエート、1-ドデシルアザシクロヘプタナ-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはモノグリセリド、ジグリセリド、またはその薬学的に許容される塩（例えば、ナトリウム）が挙げられる。一部の実施形態において、浸透促進剤の組合せ、例えば、胆汁酸／塩と組み合わされた脂肪酸／塩などが使用される。例示的組合せの 1 つは、ラウリン酸、カプリン酸、および UDCA のナトリウム塩である。さらに、浸透促進剤としては、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-セチルエーテルが挙げられる。本発明において特徴とされる dsRNA は、噴霧された乾燥粒子などの粒状において、経口によりデリバリーすることができ、またはマイクロ粒子またはナノ粒子を形成するために複合体化することができる。dsRNA 複合剤としては、ポリ-アミノ酸；ポリイミン；ポリアクリレート；ポリアルキルアクリレート、ポリアルキルアクリレート、ポリアルキルシアノアクリレート；カチオン化されたゼラチン、アルブミン、デンプン、アクリレート、ポリエチレングリコール（PEG）、およびデンプン；ポリアルキルシアノアクリレート；DEAE 誘導体化ポリイミン、プルラン（pullulan）、セルロース、およびデンプンが挙げられる。好適な複合剤としては、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L リジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスペルミン、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（TDAE）、ポリアミノスチレン（例えば、p-アミノ）、ポリ（メチルシアノアクリレート）、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）が挙げられる。

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(isohexylcyanoacrylate))、DEAE-メタクリレート、DEAE-ヘキシルアクリレート、DEAE-アクリルアミド、DEAE-アルブミン、およびDEAEデキストラン、ポリ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-コグリコール酸(PLGA))、アルギネート、およびポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。dsRNAのための経口製剤およびその調製は、米国特許第6,887,906号、米国公開第20030027780号、および米国特許第6,747,014号において詳細に説明されており、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【0737】

非経口、実質内(脳内へ)、髄腔内、脳室内、または肝内投与のための組成物および製剤は、緩衝剤、希釈剤、および他の好適な添加剤、例えば、これらに限定されるわけではないが、浸透促進剤、担体化合物、他の薬学的に許容される担体または賦形剤などを含むことができる滅菌水溶液を含むことができる。

【0738】

本発明の医薬組成物は、溶液、エマルション、およびリポソームを含有する製剤を含む。これらの組成物は、これらに限定されるわけではないが、予め形成された液体、自己乳化性固体、および自己乳化性半固体を含む様々な成分から生成することができる。製剤には、肝臓を標的とするものが含まれる。

【0739】

本発明の医薬製剤は、単位剤形において簡便に提示することができ、製薬産業において周知の従来技術に従って調製することができる。そのような技術は、活性成分を医薬担体または賦形剤と混合する工程を含む。概して、製剤は、活性成分を液体担体または微粉化された固体担体またはその両方と均一にかつ密接に混合し、次いで、必要であれば、生成物を成形することによって調製される。

【0740】

本発明の組成物は、例えば、これらに限定されるわけではないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ、軟質ゲル、坐剤、および浣腸剤などの多くの可能な剤形のいずれかへと製剤化することができる。本発明の組成物は、水性媒質、非水性媒質、または混合媒質における懸濁液としても製剤化することができる。水懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる物質、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などをさらに含有することができる。懸濁液は、安定化剤も含有することができる。

【0741】

1つまたは複数の親水性ポリマーにより誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム、およびそれらの調製方法が、当該技術分野において公知である。Sunamotoら(Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778)は、PEG部分を含む非イオン性界面活性剤2C₁₂15Gを含むリポソームについて記載した。Illumら(FEBS Lett., 1984, 167, 79)は、ポリマーグリコールによるポリスチレン粒子の親水性コーティングが有意に増大された血液半減期をもたらすことに注目した。ポリアルキレングリコール(例えば、PEG)のカルボン酸基の付着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号および同第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により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液循環半減期の有意な増大を有することを証明する実験について記載した。Blumeら(Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91)は、当該観察を他の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の組合せから形成されるDSPE-PEGへと拡大した。それらの外部表面に二重結合されたPEG部分を有するリポソームが、Fisherへの欧州特許第0445131(B1)号および国際公開第90/04384号に記載されている。PEGに

10

20

30

40

50

より誘導体化された1～20モルパーセントのPEを含むリポソーム、およびその使用方法が、Woodleら（米国特許第5,013,556号および同第5,356,633号）ならびにMartinら（米国特許第5,213,804号および欧州特許第0496813（B1）号）によって記載されている。多くの他の脂質-ポリマーコンジュゲートを含むリポソームが、国際公開第91/05545号および米国特許第5,225,212号（いずれもMartira）ならびに国際公開第94/20073号（Zalipskyら）に開示されている。PEG修飾されたセラミド脂質を含むリポソームが国際公開第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）には、それらの表面上に機能性部分によりさらに誘導体化され得るPEG含有リポソームが記載されている。

10

【0742】

核酸を含む多くのリポソームが当該技術分野において公知である。Thierryらへの国際公開第96/40062号には、高分子量の核酸をリポソーム中に封入するための方法が開示されている。Tagawaらへの米国特許第5,264,221号には、タンパク質が結合されたりリポソームが開示され、当該リポソームの内容物がdsRNAを含み得ることが主張されている。Rahmanらへの米国特許第5,665,710には、オリゴデオキシヌクレオチドをリポソーム中に封入するある特定の方法が記載されている。Loveらへの国際公開第97/04787号には、raf遺伝子に対して標的化されたdsRNAを含むリポソームが開示されている。

20

【0743】

C. さらなる製剤

i. エマルション

本発明の組成物は、エマルションとして調製および製剤化することができる。エマルションは、典型的には、一方の液体が通常は直径0.1 μm を超える液滴の形態において別の液体に分散された不均質系である[例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, 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を参照されたい]。エマルションは、多くの場合、お互いに十分に混合され分散された2つの不混和性液相を含む二相系である。一般的に、エマルションは、油中水（w/o）種または水中油（o/w）種のどちらかであり得る。水相が、微細化されて微細な液滴として大量の油相中に分散されている場合、結果として得られる組成物は、油中水（w/o）エマルションと呼ばれる。あるいは、油相が、微細化されて微細な液滴として大量の水相中に分散されている場合、結果として得られる組成物は、水中油（o/w）エマルションと呼ばれる。エマルションは、分散相および、水相中また油相中のどちらかの溶液としてまたはそれ自体別々の相として存在し得る活性薬物に加えて、追加の成分を含有することができる。乳化剤、安定化剤、染料、および抗酸化剤などの医薬品賦形剤も、必要であれば、エマルション中に存在していてもよい。医薬エマルションは、例えば、油中水中油（o/w/o）および水中油中水（w/o/w）エマルションの場合など、3相以上で構成される多相エマルションでもあってもよい。そのような複合製剤は、多くの場合、単純な二相エマルションでは提供することができないある特定の利点を提供する。o/wエマルションの個々の油滴が小さい水滴を封入する多相エマルションは、w/o/wエマルションを構成する。同様に、連続油相中において安定化された水の小滴中に

30

40

50

封入された油滴の系は、 $o/w/o$ エマルションを提供する。

【0744】

エマルションは、熱力学的安定性がほとんどないかまたは全くないことによって特徴づけられる。多くの場合、エマルションの分散相または不連続相は、外部相または連続相中によく分散されており、乳化剤または製剤の粘度によってこの形態に維持される。エマルション様式の軟膏基剤およびクリーム剤の場合と同様に、エマルションの相のいずれかは、半固体または固体であってもよい。エマルションを安定化するその他の手段は、乳化剤の使用を伴い、それらは、エマルションのいずれかの相に組み込まれ得る。乳化剤は、以下の4つのカテゴリ：合成界面活性剤、天然乳化剤、吸収基剤、および微細分散固体に大きく分類することができる [例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照されたい]。

10

【0745】

表面活性剤としても知られる合成界面活性剤は、エマルションの製剤化において広い適用可能性を見出しており、文献において概説されている [例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, 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を参照されたい]。界面活性剤は、典型的には両親媒性であり、親水性部分および疎水性部分を含む。界面活性剤の疎水性性質に対する親水性性質の比は、親水性／親油性バランス (HLB) と命名されており、製剤の調製において界面活性剤を分類および選択する際の有益なツールである。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて以下の異なるクラス：非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性に分類することができる [例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285を参照されたい]。

20

30

【0746】

エマルション製剤において使用される天然の乳化剤としては、ラノリン、蜜蝋、ホスファチド、レシチン、およびアカシアが挙げられる。脱水ラノリンおよび親水性ワセリンなどの吸収基剤は、親水特性を有し、そのため、それらは、水を吸い上げて w/o エマルションを形成し、それでもなお、それらの半固体の稠度を維持することができる。微粒子固体も、とりわけ界面活性剤との組合せにおいて、および粘性調製物において、良好な乳化剤として使用されている。これらは、極性無機固体、例えば、重金属水酸化物など、膨潤クレイ、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、コロイド状ケイ酸アルミニウムおよびコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウムなど、顔料、および非極性固体、例えば、炭素またはトリステアリン酸グリセリンなどを含む。

40

【0747】

非常に多様な非乳化材料も、エマルション製剤に含まれ、エマルションの特性に貢献する。そのようなものとしては、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、保存料、および抗酸化剤が挙げられる [Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharm

50

aceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199]。

【0748】

親水性コロイドまたはハイドロコロイドとしては、天然ゴムおよび合成ポリマー、例えば、多糖（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲナン、グアーゴム、カラヤゴム、およびトラガカント）、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース）、および合成ポリマー（例えば、カルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー）などが挙げられる。これらは、水に分散または膨潤して、コロイド状溶液を形成し、それは、分散相液滴の周囲に強力な界面フィルムを形成すること、および外部相の粘度を増加することによって、エマルションを安定化する。

10

【0749】

エマルションは、多くの場合、微生物の増殖を容易に支援することができる多くの成分、例えば、炭水化物、タンパク質、ステロール、およびホスファチドなどを含有するため、これらの製剤は、多くの場合、保存料が組み込まれている。エマルション製剤に含まれる一般的に使用される保存料としては、メチルパラベン、プロピルパラベン、4級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸が挙げられる。製剤の劣化を防ぐために、抗酸化剤も、一般的に、エマルション製剤に加えられる。使用される抗酸化剤は、フリーラジカル捕捉剤、例えば、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンなど、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ど、ならびに酸化防止相乗剤、例えば、クエン酸、酒石酸、およびレシチンなどであり得る。

20

【0750】

皮膚、経口、および非経口経路によるエマルション製剤の適用ならびにそれらの製造方法は、文献において概説されている[例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照されたい]。経口デリバリー用のエマルション製剤は、製剤の容易さ、ならびに吸収およびバイオアベイラビリティの見地からの有効性により、非常に広く使用されている[例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, 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を参照されたい]。鉱油系緩下剤、脂溶性ビタミン、および高脂肪栄養製剤は、o/wエマルションとして一般的に経口投与されている材料の1つである。

30

【0751】

i i. マイクロエマルション

本発明の一実施形態において、iRNAおよび核酸の組成物は、マイクロエマルションとして製剤化される。マイクロエマルションは、単一の光学的に等方性で熱力学的に安定な液体溶液である、水、油、および両親媒性物質の系として定義することができる[例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245を参照されたい]。典型的には、マイクロエマルションは、油を界面活性剤水溶液に分散させ、次いで、十分な量の第4の成分、概して中鎖長の

40

50

アルコールを加え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、マイクロエマルションは、表面活性分子の界面フィルムによって安定化される、2つの不混和性液体の熱力学的に安定で等方的に澄明な分散液として説明されている (Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215)

。マイクロエマルションは、一般的に、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤、および電解質を含む3つから5つの成分を組み合わせることによって調製される。マイクロエマルションが油中水 (w/o) タイプまたは水中油 (o/w) タイプのどちらであるかは、使用される油および界面活性剤の特性、ならびに界面活性剤分子の極性ヘッドおよび炭化水素テールの構造および幾何学的パッキングに依存する (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

10

【0752】

状態図を利用する現象論的アプローチが、広く研究されており、それは、マイクロエマルションをどのようにして製剤化するかの包括的な知識を当業者にもたらした [例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, 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を参照されたい]。従来のエマルションと比較して、マイクロエマルションは、水不溶性薬物を、自然発生的に形成された熱力学的に安定な液滴の製剤に可溶化するという利点を提供する。

20

【0753】

マイクロエマルションの調製において使用される界面活性剤としては、これらに限定されるわけではないが、単独での、または補助界面活性剤と組み合わせた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Br i j 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ロエート (MCA750)、デカグリセロールモノオレエート (MO750)、デカグリセロールセスキオレエート (sequioleate) (SO750)、デカグリセロールデカオレエート (DAO750) が挙げられる。補助界面活性剤は、通常はエタノール、1-プロパノール、および1-ブタノールなどの短鎖アルコールであり、界面活性剤フィルムに浸透し、その結果、界面活性剤分子の間に生じるボイドスペースにより、乱れたフィルムを作り出すことによって、界面の流動性を増加させる役割を果たす。しかしながら、マイクロエマルションは、補助界面活性剤を用いずに調製することもでき、アルコール不含自己乳化性マイクロエマルション系は、当技術分野で公知である。水相は、典型的には、これらに限定されるわけではないが、水、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。油相は、これらに限定されるわけではないが、Cap tex 300、Cap tex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8~C12) モノ、ジ、およびトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化グリセリド、飽和ポリグリコール化C8~C10グリセリド、植物油、およびシリコン油などの材料を含むことができる。

30

40

【0754】

マイクロエマルションは、薬物可溶化および薬物の吸収増強の見地から、特に興味深い。脂質系マイクロエマルション (o/wおよびw/oの両方) は、ペプチドなどの薬物の経口バイオアベイラビリティを増強すると提唱されている (例えば、米国特許第6, 191, 105号; 同第7, 063, 860号; 同第7, 070, 802号; 同第7, 157

50

， 0 9 9 号；Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 13 85-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205を参照されたい）。マイクロエマルションは、薬物の可溶化の向上、酵素加水分解からの薬物の保護、界面活性剤によって誘導される膜流動性および浸透性の変化に起因する、薬物吸収における可能な増強、調製の容易さ、固体剤形よりも経口投与の容易さ、臨床効力の向上、および毒性の減少の利点を提供する（例えば、米国特許第 6，191，105号；同第 7，063，860号；同第 7，070，802号；同第 7，157，099号；Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143を参照されたい）。多くの場合、マイクロエマルションは、それらの成分が周囲温度において一緒にされたとき、自然発生的に形成され得る。これは、易熱分解性の薬物であるペプチドまたは iRNA を製剤化する場合に、特に有利であり得る。さらに、マイクロエマルションは、美容および医薬的適用の両方における、活性成分の経皮デリバリーにとっても効果的であった。本発明のマイクロエマルション組成物および製剤は、胃腸管からの iRNA および核酸の全身吸収の増加、ならびに iRNA および核酸の局所細胞取り込みの向上を促進するであろうことが予想される。

10

【0755】

本発明のマイクロエマルションは、製剤の性質を向上させるため、および本発明の iRNA および核酸の吸収を高めるために、追加の成分および添加剤、例えば、ソルビタンモノステアレート（Grill 3）、ラブラソール（Labrasol）、および浸透促進剤など、も含有することができる。本発明のマイクロエマルションにおいて使用される浸透促進剤は、5つのカテゴリ：界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、および非キレート化非界面活性剤のうちの1つに属する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は、上記において説明されている。

20

【0756】

i i i . マイクロ粒子

本発明の RNA i 剤は、粒子、例えば、マイクロ粒子などに組み込まれ得る。マイクロ粒子は、噴霧乾燥によって生成することができるが、凍結乾燥、蒸発、流動層乾燥、真空乾燥、またはこれらの技術の組合せなどの他の方法によっても生成され得る。

【0757】

30

i v . 浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、動物の皮膚への、核酸、特に iRNA の効率的なデリバリーを実施するために、様々な浸透促進剤を採用する。ほとんどの薬物は、イオン化状態および非イオン化状態の両方において存在する。しかしながら、通常、脂溶性または親油性薬物のみが、細胞膜を容易に横断する。横断される膜が、浸透促進剤で処置されている場合、非親油性薬物も、細胞膜を横断することができることが分かっている。非親油性薬物が細胞膜を横断して拡散するのを支援することに加えて、浸透促進剤も、親油性薬物の透過性を高める。

【0758】

浸透促進剤は、5つの広いカテゴリ、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、および非キレート化非界面活性剤のうちの1つに属するとして分類することができる（例えば、Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92を参照されたい）。浸透促進剤の上記において言及されたクラスのそれぞれについては、以下においてより詳細に説明される。

40

【0759】

界面活性剤（または「表面活性剤」）は、水溶液中に溶解されたとき、溶液の表面張力または水溶液と別の液体との間の界面張力を減少させ、結果として、粘膜を通過する iRNA の吸収を高める化学物質である。胆汁塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤

50

としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); and perfluorochemical emulsions, such as F C-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252を参照されたい）。

【0760】

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

【0761】

胆汁の生理的役割としては、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が挙げられる（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935を参照されたい）。様々な天然の胆汁塩、およびそれらの合成誘導体が、浸透促進剤としての役割を果たす。したがって、用語「胆汁塩」は、胆汁の天然に存在する成分のすべて、ならびにそれらの合成誘導体のすべてを包含する。好適な胆汁塩としては、例えば、コール酸（またはその薬学的に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）、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）が挙げられる（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583を参照されたい）。

【0762】

キレート化剤は、本発明に関連して使用される場合、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、結果として、粘膜を通るiRNAの吸収を高める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、ほとんどの特徴的なDNAヌクレアーゼは、触媒作用のために二価金属イオンを必要

とし、結果として、キレート化剤によって阻害されるため、キレート化剤は、DNAse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; Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。好適なキレート化剤としては、これらに限定されるわけではないが、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、クエン酸、サリチレート (例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチレート、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β-ジケトンのN-アミノアシル誘導体 (エナミン) が挙げられる (例えば、Katdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51を参照されたい)。

10

【0763】

本明細書において使用される場合、非キレート化非界面活性剤である浸透促進化合物は、キレート化剤または界面活性剤としては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してのiRNAの吸収を高める化合物として定義することができる (例えば、Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33を参照されたい)。このクラスの浸透促進剤としては、例えば、不飽和環状尿素、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); ならびに非ステロイド性抗炎症剤、例えば、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、およびフェニルブタゾンなどが挙げられる (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)。

20

【0764】

細胞レベルでのiRNAの取り込みを増強する薬剤も、本発明の医薬組成物および他の組成物に加えることができる。例えば、カチオン性脂質、例えば、リポフェクチンなど (Junichiら、米国特許第5,705,188号)、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリカチオン性分子、例えば、ポリリジンなど (国際公開第97/30731号) も、dsRNAの細胞取り込みを増強することが知られている。市販のトランスフェクション試薬の例としてはなかでも、例えば、Lipofectamine (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、Lipofectamine 2000 (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、293fectin (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、Cellfectin (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、DMRIE-C (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、FreeStyle (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad) Lipofectamine (商標) 2000 CD (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、Lipofectamine (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad) RNAiMAX (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、Oligofectamine (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)、Optifect (商標) (Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad) X-tremeGENE Q2トランスフェクション試薬 (Roche、スイスGrenzacherstrasse)、DOTAPリボソームトランスフェクション試薬 (スイスGrenzacherstrasse)、DOSPERリボソームトランスフェクション試薬 (スイスGrenzacherstrasse) もしくはFugene (スイスGrenzacherstrasse)、Transfectam (登録商標) 試薬 (Promega、ウィスコンシン州Madison)、TransFast (商標) トランスフェクション試薬 (Promega、ウィスコンシン州Madison) Tfx (商標) -20試薬 (Pr

30

40

50

omega、ウィスコンシン州Madison)、Tfx(商標)－50試薬(Promega、ウィスコンシン州Madison)、DreamFect(商標)(OZ Biosciences、フランスMarseille)、EcoTransfect(OZ Bioscience、フランスMarseille)、TransPass^a D1トランスフェクション試薬(New England Biolabs、米国マサチューセッツ州Ipswich)、Lyovect(商標)／LipoGen(商標)(Invitrogen、米国カリフォルニア州San Diego)、Perfectinトランスフェクション試薬(Genlantis、米国カリフォルニア州San Diego)、NeuroPORTERトランスフェクション試薬(Genlantis、米国カリフォルニア州San Diego)、GenePORTERトランスフェクション試薬(Genlantis、米国カリフォルニア州San Diego)、GenePORTER2トランスフェクション試薬(Genlantis、米国カリフォルニア州San Diego)、サイトフェクチントランスフェクション試薬(Genlantis、米国カリフォルニア州San Diego)、BaculoPORTERトランスフェクション試薬(Genlantis、米国カリフォルニア州San Diego)、TroganPORTER(商標)(Genlantis、米国カリフォルニア州San Diego)、RiboFect(Bioline、米国マサチューセッツ州Taunton)、PlasFect(Bioline、米国マサチューセッツ州Taunton)、UniFECTOR(B-Bridge International、米国カリフォルニア州Mountain View)、SureFECTOR(B-Bridge International、米国カリフォルニア州Mountain View)、またはHiFect(商標)(B-Bridge International、米国カリフォルニア州Mountain View)が挙げられる。

10

20

【0765】

投与された核酸の浸透を高めるために、他の薬剤、例えば、グリコール、例えば、エチレングリコールおよびプロピレングリコールなど、ピロール、例えば、2-ピロールなど、アゾン、ならびにテルペン、例えば、リモネンおよびメントンなどを用いることができる。

【0766】

v. 担体

本発明のある特定の組成物は、また、製剤において担体化合物を組み込む。本明細書において使用される場合、「担体化合物」または「担体」は、核酸、または不活性である(すなわち、それ自体が生物活性を有さない)が、例えば、生物学的に活性の核酸を分解すること、もしくは循環からのその除去を促進することによって、生物活性を有する核酸の生物学的利用率を低下させるインビボプロセスによって核酸として認識される核酸類似体を指し得る。核酸と担体化合物との、通常は後者の物質が過剰の同時投与は、おそらくは共通の受容体についての担体化合物と核酸との間の競合により、肝臓、腎臓または他の過剰循環貯蔵器において回復された核酸の量の減少をもたらし得る。例えば、肝組織における部分的にホスホリチオエートのdsRNAの回復は、それがポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジン酸または4-アセトアミド-4'-イソチオシアノsチルベン-2,2'-ニスルホン酸と同時投与される場合に、低減され得る(Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

30

40

【0767】

vi. 賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬担体」または「賦形剤」は、1つまたは複数の核酸を動物にデリバリーするための、薬学的に許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性なビヒクルである。賦形剤は、液体または固体であり得、ならびに、核酸および所定の医薬組成物その他の成分を組み合わせたときに、所望の体積、稠度などを提供するように計画された投与の様式を念頭において選択される。典型的な医薬担体としては、

50

これらに限定されるわけではないが、結着剤（例えば、予めゼラチン化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；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、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、またはリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、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、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど）；および湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が挙げられる。

【0768】

核酸と有害に反応しない、非経静脈投与にとって好適な薬学的に許容される有機または無機賦形剤も、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。好適な薬学的に許容される担体としては、これらに限定されるわけではないが、水、塩溶液、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などが挙げられる。

【0769】

核酸の局所投与用の製剤は、滅菌および非滅菌水溶液、アルコールなどの一般的な溶媒における非水溶液、または液体もしくは固体油基剤における核酸の溶液を含むことができる。溶液は、緩衝剤、希釈剤、および他の好適な添加剤も含有することができる。核酸と有害に反応しない、非経静脈投与にとって好適な薬学的に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。

【0770】

好適な薬学的に許容される賦形剤としては、これらに限定されるわけではないが、水、塩溶液、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などが挙げられる。

【0771】

v i i . 他の成分

本発明の組成物は、さらに、医薬組成物中に従来的に見出される他の補助成分を、確立されたそれらの使用レベルにおいて含有することができる。したがって、例えば、組成物は、追加の適合性の、薬学的に活性な材料、例えば、止痒剤、収斂剤、局部麻酔薬、もしくは抗炎症剤などを含有することができ、または、本発明の組成物の様々な剤形を物理的に製剤化する際に有用な追加の材料、例えば、染料、矯臭剤、防腐剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤、および安定化剤などを含有することができる。ただし、そのような材料は、添加したときに、本発明の組成物の成分の生物活性を過度に妨害すべきではない。製剤は、滅菌することができ、所望の場合は、製剤の核酸と有害に相互作用しない助剤、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝剤、着色剤、風味剤、および／または芳香族物質などと混合することができる。

【0772】

水性懸濁液は、懸濁液の粘度を増加する物質、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などを含有することができる。懸濁液は、安定化剤も含有することができる。

【0773】

一部の実施形態において、本発明において特徴づけられる医薬組成物は、（a）1つまたは複数の iRNA 化合物、および（b）非RNAメカニズムによって機能し、MYLIP 関連疾患、障害または状態を処置するのに有用である1つまたは複数の薬剤を含む。各薬剤の例としては、ACE 阻害剤（アンギオテンシン被覆酵素阻害剤）、例えば、ベナゼプリル（ロテンシン）、アンギオテンシン II 受容体アンタゴニスト（ARB）（例えば、ロサルタンカリウム、例えば、Merck & Co. 's Cozaar（登録商標）

10

20

30

40

50

）、例えば、カンデサルタン（アタカンド）、HMG-CoAリダクターゼ阻害剤（例えばスタチン例えば、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、またはシンバスタチン）、カルシウム結合剤、例えば、セルロースリン酸ナトリウム（カルシビンド）、利尿剤、例えば、チアジド利尿剤、例えば、ヒドロクロチアジド（Microzide）、インスリン増感剤、例えば、PPAR γ アゴニストピオグリタゾン、glp-1rアゴニスト、例えば、リラグリタチド、ビタミンE、SGLT2阻害剤、DPPIV阻害剤、コレステロール吸収阻害剤、例えばエゼチミブ、胆汁酸封鎖剤、例えばコレスチラミン、コレスチポール、またはコルセラム、ナイアシンまたはビタミンB3、またはPCSK9阻害剤、例えばエボロクマブ、アリロクマブ、抗PCSK9 iRNA剤（例えば米国特許第9,822,365号明細書、Tan et al., 2017年11月21日発行）、および腎臓／肝臓移植片、または前述のもののうちのいずれかの組合せが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0774】

そのような化合物の毒性および治療有効性は、例えば、LD₅₀（集団の50％に致死的である用量）およびED₅₀（集団の50％において治療的有效な用量）を判定するために、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手法によって判定することができる。毒性と治療有効性との間の用量比は、治療指数であり、LD₅₀／ED₅₀の比として示すことができる。高い治療指数を示す化合物が一般的である。

【0775】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータは、ヒトにおける使用のために様々な投薬量を製剤化する際に使用することができる。本発明における本明細書において特徴とされる組成物の投薬量は、概して、わずかな毒性かまたは毒性が全くないED₅₀、例えばED₈₀またはED₉₀含む循環濃度の範囲内である。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変更することができる。本発明において特徴とされる方法で使用される任意の化合物に対して、最初に、細胞培養アッセイから治療有効用量を見積もることができる。細胞培養において決定されたIC₅₀（すなわち、症状の1／2最大阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む、化合物、または、適切な場合には、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲を達成する（例えば、ポリペプチドの濃度減少を達成する）ように、用量を動物モデルにおいて製剤化することができる。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に判定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって、測定することができる。

20

30

【0776】

本発明において特徴とされるiRNAは、上記において説明されるようなそれらの投与以外に、MYLPの発現によって媒介される病理学的プロセスの処置において有効な他の既知の薬物と併用して投与することもできる。いずれにしても、投与する医師は、当技術分野で公知であるかまたは本明細書において説明された、有効性の標準的尺度を使用して観察された結果に基づいて、iRNA投与の量およびタイミングを調整することができる。

40

【0777】

カチオン性脂質の合成：

本発明において特徴づけられる化合物、例えば、カチオン性脂質糖のいずれも公知の合成技術によって調製されてもよい。すべての置換基は、別段の指示がない限り、以下に定義される通りである。

【0778】

「アルキル」とは、1～24個の炭素原子を含む直鎖状または分枝状の非環式または環式の飽和脂肪族炭化水素を意味する。代表的な飽和直鎖状アルキルとしては、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチルおよびn-ヘキシル等が挙げられ、飽和分枝状アルキルとしては、イソプロピル、イソブチル、tert-ブチルおよびイソペン

50

チル等が挙げられる。代表的な飽和環式アルキルとしては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチルおよびシクロヘキシル等が挙げられ、不飽和環式アルキルとしては、シクロペンテニルおよびシクロヘキシル等が挙げられる。

【0779】

「アルケニル」とは、隣接する炭素原子間の少なくとも1つの二重結合を含む、以上に定義されるアルキルを意味する。アルケニルは、シスおよびトランス異性体の両方を含む。代表的な直鎖状および分枝状アルケニルとしては、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニルおよび2,3-ジメチル-2-ブテニル等が挙げられる。

10

【0780】

「アルキニル」とは、隣接する炭素原子間の少なくとも1つの三重結合を含む、以上に定義されるアルキルまたはアルケニルを意味する。代表的な直鎖状および分枝状アルキニルとしては、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニルおよび3-メチル-1-ブチニル等が挙げられる。

【0781】

「アシル」とは、以下に定義されるように、付着点における炭素がオキソ基で置換された任意のアルキル、アルケニルまたはアルキニルを意味する。例えば、 $-C(=O)$ アルキル、 $-C(=O)$ アルケニルおよび $-C(=O)$ アルキニルは、アシル基である。

【0782】

「複素環」とは、上記複素環のいずれかがベンゼン環に融合された二環式環を含めて、飽和、不飽和、または芳香族であり、窒素、酸素および硫黄から独立に選択される1個または2個のヘテロ原子を含む5~7員の単環式、または7~10員の二環式の複素環式環であって、窒素および硫黄ヘテロ原子は、適宜酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、適宜四級化されていてもよい複素環式環を意味する。複素環は、ヘテロ原子または炭素原子を介して付着されてもよい。複素環としては、以下に定義されるヘテロアリールが挙げられる。複素環としては、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル (piperidinyl)、ピペリジニル (piperizynyl)、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロプリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニルおよびテトラヒドロチオピラニル等が挙げられる。

20

30

【0783】

「置換されていてもよいアルキル」、「置換されていてもよいアルケニル」、「置換されていてもよいアルキニル」、「置換されていてもよいアシル」および「置換されていてもよい複素環」という用語は、置換されている場合、少なくとも1つの水素原子が置換基と置き換えられていることを意味する。オキソ置換基 ($=O$) の場合は、2つの水素原子が置き換えられている。この関連において、置換基としては、オキソ、ハロゲン、複素環、 $-CN$ 、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ および $-SO_nNR^xR^y$ [式中、 n は、0、1または2、 R^x および R^y は、同一または異なり、独立に、水素、アルキルまたは複素環であり、前記アルキルおよび複素環置換基の各々は、オキソ、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-CN$ 、アルキル、 $-OR^x$ 、複素環、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ および $-SO_nNR^xR^y$ のうちの1つまたは複数によりさらに置換されていてもよい] が挙げられる。

40

【0784】

「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードを意味する。

【0785】

一部の実施形態において、本発明において特徴づけられる方法は、保護基の使用を必要

50

とし得る。保護基手法は、当業者に周知である（例えば、PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999を参照されたい）。手短には、本発明の文脈内の保護基は、機能性基の不必要な反応性を低減または排除する任意の基である。保護基を機能性基に付加して、ある特定の反応時におけるその反応性をマスクし、次いで除去して、本来の機能性基を露呈させる。一部の実施形態において、「アルコール保護基」が使用される。「アルコール保護基」は、アルコール保護基の不必要な反応性を低下または排除する任意の基である。保護基は、当該技術分野において周知の技術を使用して付加および除去することができる。

【0786】

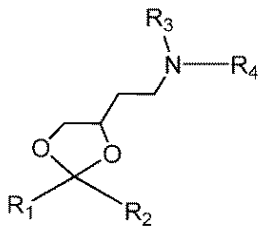
式Aの合成

10

ある特定の実施形態において、本発明において特徴づけられる核酸-脂質粒子は、式A：

【0787】

【化36】



20

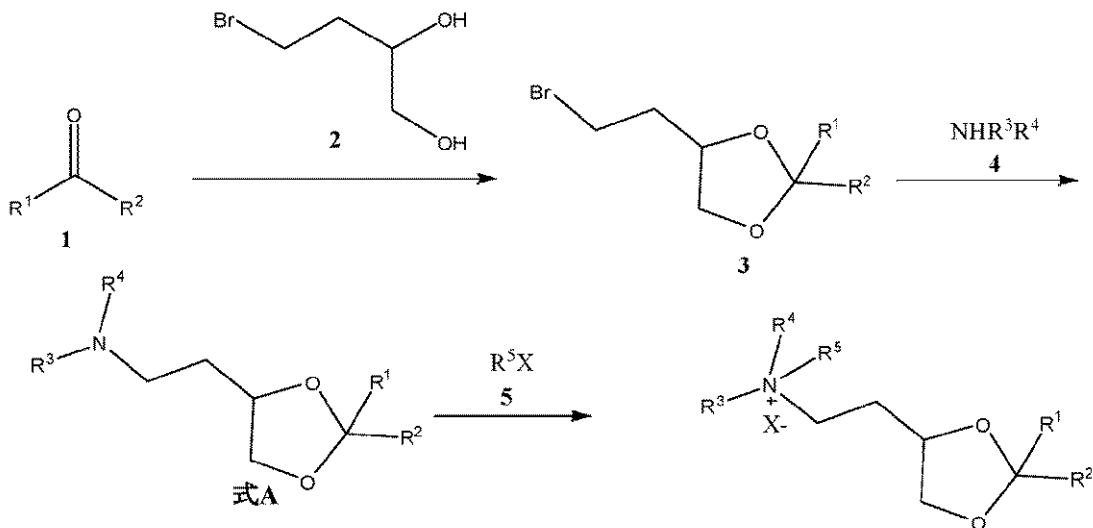
〔式中、R1およびR2は、独立に、アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、各々は適宜置換され得るものであり、R3およびR4は、独立に低級アルキルである、またはR3およびR4は、一緒になって、置換されていてもよい複素環式環を形成し得る〕のカチオン性脂質を使用して製剤化される。一部の実施形態において、カチオン性脂質は、XTC（2，2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1，3]-ジオキサン）である。概して、上記式Aの脂質は、別段の指示がない限り、すべての置換基が以上に定義されている通りである場合の以下の反応スキーム1または2によって作製されてもよい。

30

【0788】

【化37】

スキーム1



40

【0789】

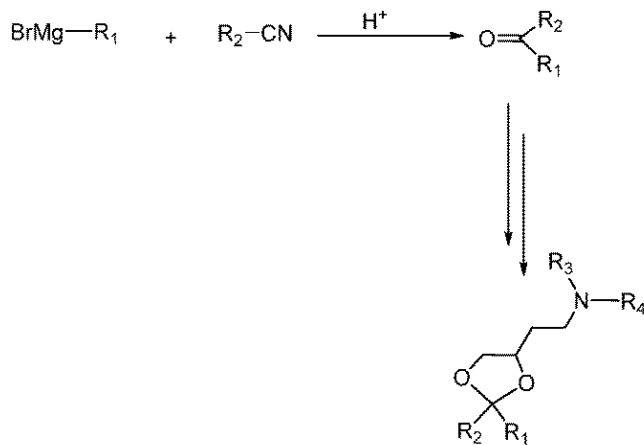
50

R₁ および R₂ は、独立に、アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、各々は R₃ および R₄ は、独立に低級アルキルである、または R₃ および R₄ は、一緒になって、置換されていてもよい複素環式環を形成し得る場合の脂質 A をスキーム 1 に従って調製することができる。ケトン 1 および臭化物 2 は、購入する、または当業者に公知の方法に従って調製することができる。1 および 2 の反応は、ケタール 3 を生じさせる。アミン 4 によるケタール 3 の処理は、式 A の脂質を生じさせる。式 A の脂質を有機塩 5 により対応するアンモニウム塩に変換することができ、X は、ハロゲン、水酸化物、ホスフェートまたはサルフェートから選択されるアニオン対イオンである。

【0790】

【化38】

スキーム2



【0791】

あるいは、ケトン 1 出発材料をスキーム 2 に従って調製することができる。グリニャール試薬 6 およびシアニド 7 は、購入する、または当業者に公知の方法に従って調製することができる。6 および 7 の反応は、ケトン 1 を生じさせる。式 A の対応する脂質へのケトン 1 の変換は、スキーム 1 に記載される通りである。

【0792】

MC3 の合成：

DLin-M-C3-DMA (すなわち (6Z, 9Z, 28Z, 31Z) -ヘプタトリアコンター 6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタノエート) は、以下の通りであった。ジクロロメタン (5 mL) 中 (6Z, 9Z, 28Z, 31Z) -ヘプタトリアコンター 6, 9, 28, 31-テトラエン-19-オール (0.53 g)、4-N, N-ジメチルアミノ酪酸塩酸塩 (0.51 g)、4-N, N-ジメチルアミノピリジン (0.61 g) および 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (0.53 g) の溶液を室温において終夜攪拌した。溶液を希塩酸により洗浄した後、重炭酸ナトリウム希釈水溶液により洗浄した。有機画分を無水硫酸マグネシウムにより乾燥させ、濾過し、ロータリーエバポレータにて溶媒を除去した。1~5%メタノール／ジクロロメタン溶離勾配を使用して、残渣をシリカゲルカラム (20 g) 下に押し込んだ。精製された生成物を含む画分を一緒にし、溶媒を除去して、無色油 (0.54 g) を得た。

【0793】

ALNY-100 の合成

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

【0794】

10

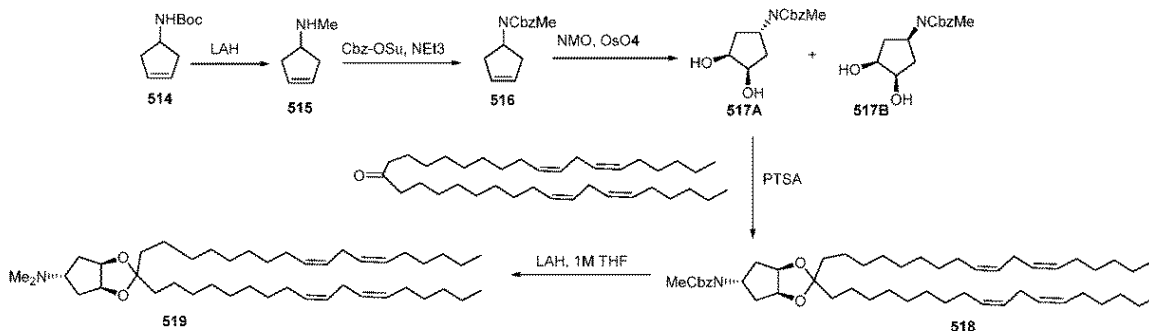
20

30

40

50

【化 3 9】



10

【0795】

515の合成：

二口RBF (1 L) における200 mLの無水THF中LiAlH₄ (3.74 g、0.09852 mol) の攪拌された懸濁液に対して、70 mLのTHF中514 (10 g、0.0492 mol) の溶液を窒素雰囲気下で0℃において徐々に添加した。完全添加後、反応混合物を室温まで加温し、次いで4時間加熱して還流させた。反応の進行をTLCによってモニタリングした。(TLCにより) 反応を完了した後、混合物を0℃まで冷却し、飽和Na₂SO₄溶液を注意深く添加することによりクエンチした。反応混合物を室温において4時間攪拌し、濾別した。残渣をTHFで十分に洗浄した。濾液と洗浄液を混合し、400 mLのジオキサンおよび26 mLの濃HClにより希釈し、室温において20分攪拌した。揮発物を真空下で揮散させて、白色固体としての515の塩酸塩を得た。収量：7.12 g。1H-NMR (DMSO, 400 MHz): δ = 9.34 (広幅, 2H), 5.68 (s, 2H), 3.74 (m, 1H), 2.66-2.60 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 5H).

20

【0796】

516の合成

250 mL二口RBFにおける100 mLの乾燥DCM中化合物515の攪拌された溶液に対して、NEt₃ (37.2 mL、0.2669 mol) を添加し、窒素雰囲気下で0℃まで冷却した。50 mLの乾燥DCM中N-(ベンジルオキシカルボニルオキシ)-スクシンイミド (20 g、0.08007 mol) を徐々に添加した後、反応混合物を室温まで加温させた。反応 (TLCにより2~3 h) の完了後、混合物を1 NのHCl溶液 (1×100 mL) および飽和NaHCO₃溶液 (1×50 mL) により連続的に洗浄した。次いで、有機層を無水Na₂SO₄により乾燥させ、溶媒を蒸発させて、粗製材料を得て、それをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、粘着性塊状物としての516を得た。収量：11 g (89%)。1H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.36-7.27 (m, 5H), 5.69 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.96 (br., 1H), 2.74 (s, 3H), 2.60 (m, 2H), 2.30-2.25 (m, 2H). LC-MS [M+H]⁺ -232.3 (96.94%).

30

【0797】

517Aおよび517Bの合成：

単口500 mL RBFにおける220 mLアセトンおよび水 (10:1) の溶液にシクロペンタン516 (5 g、0.02164 mol) を溶解させ、それに対して、室温においてN-メチルモルホリン-N-オキシド (7.6 g、0.06492 mol) を添加した後、4.2 mLのtert-ブタノール中OsO₄ (0.275 g、0.00108 mol) の7.6%溶液を添加した。反応 (約3 h) の完了後、固体のNa₂SO₃の添加により混合物をクエンチし、得られた混合物を室温において1.5 h攪拌した。反応混合物をDCM (300 mL) により希釈し、水 (2×100 mL) により洗浄した後、飽和NaHCO₃ (1×50 mL)、水 (1×30 mL) および最後に食塩水 (1×50 mL) により洗浄した。有機相をNa₂SO₄により乾燥させ、溶媒を真空において除去した。粗製材料のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製により、ジアステレオマーの混合物を得て、それらを分取HPLCにより分離した。収量：-6 g粗製物517A-ピーク

40

50

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

【0798】

518の合成:

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

【0799】

化合物519の合成のための一般的手順:

ヘキサン（15 mL）中化合物518（1当量）の溶液をTHF中LAH（1M、2当量）の氷冷溶液に滴加した。完全に添加した後、混合物を40℃において0.5 hにわたって加熱し、次いで氷浴上で再度冷却した。混合物を飽和Na₂SO₄水溶液により注意深く加水分解し、次いでCelite（登録商標）を通じて濾過し、油に還元した。カラムクロマトグラフィーにより、無色油として得られる純粋の519（1.3 g、68%）を得た。¹³C NMR = 130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 22.6, 14.1; エレクトロスプレーMS (+ve): C₄₄H₈₀NO₂ (M+H)⁺の分子量、計算値654.6, 実測値654.6

【0800】

標準的、または押出を含まない方法によって調製された製剤を同様にして特徴づけることができる。例えば、製剤は、通常、目視検査によって特徴づけられる。それらは、凝集物または堆積物のない白みがかった半透明溶液とする。脂質ナノ粒子の粒子サイズおよび粒子サイズ分布は、例えば、Malvern Zetasizer Nano ZS（Malvern、米国）を使用する光散乱によって測定され得る。粒子は、サイズが約20~300 nm、例えば、40~100 nmなどとする。粒子サイズ分布は単峰型とする。製剤ならびに捕捉された画分における総dsRNA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dsRNAのサンプルをRNA結合色素、例えば、製剤破壊界面活性剤、例えば、0.5% Triton-X100の存在下または不在下でのRibogreen（登録商標）（Molecular Probes）などとともにインキュベートすることができる。製剤における全dsRNAを、標準曲線と比較した、界面活性剤を含むサンプルからのシグナルによって決定することができる。捕捉された画分は、全dsRNA含有量から「遊離」dsRNA含有量（界面活性剤の不在下で信号により測定される）を減算することによって決定される。捕捉されたdsRNAの割合は、通常85%を超える。SNA LP製剤については、粒子サイズが、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、通常、少なくとも約50 nmから少なくとも約110 nm、少なくとも約60 nmから少なくとも約100 nm、または少なくとも約80 nmから少なくとも約90 nmである。

【0801】

VII. 発明の方法

本発明は、本発明のiRNAおよび／または本発明の組成物を使用して、細胞、例えば、対象における細胞、例えば、肝細胞におけるMYLIP発現を低減および／または阻害する方法をも提供する。方法は、細胞をRNAi剤、または本発明のRNAi剤を含む医薬組成物と接触させることを含む。一部の実施形態において、細胞は、MYLIP遺伝子

の mRNA 転写物の分解を得るのに十分な時間にわたって維持される。

【0802】

遺伝子発現の低減は、当該技術分野において公知の任意の方法によって評価され得る。例えば、MYLIP の発現の低減は、当業者に日常的な方法、例えば、ノーザンブロットイング、qRT-PCR を使用して MYLIP の mRNA 発現レベルを決定することによって；当業者に日常的な方法、例えば、ウエスタンブロット、免疫学的技術を使用して MYLIP のタンパク質レベルを決定することによって決定されてよい。MYLIP の発現の低減は、MYLIP の生物活性の低下、例えば、MYLIP の酵素活性の低下、および／または血漿および／もしくは組織サンプルにおける脂質、トリグリセリド、コレステロール（LDL-C、HDL-C および総コレステロール）もしくは脂肪酸のうちの 1 つまたは複数の変化（例えば、血清トリグリセリドの増加またはコレステロールの減少）を測定することによって間接的に評価され得る。

10

【0803】

本発明の方法では、細胞をインビトロまたはインビボで接触させることができる、すなわち、細胞は、対象内であり得る。

【0804】

本発明の方法を使用する処置に好適な細胞は、MYLIP 遺伝子を発現する任意の細胞であり得る。本発明の方法での使用に好適な細胞は、哺乳動物の細胞、例えば、霊長類の細胞（例えば、ヒト細胞または非ヒト霊長類の細胞、例えば、サル細胞またはチンパンジー細胞）、非霊長類の細胞（例えば、ウシ細胞、ブタ細胞、ラクダ細胞、ラマ細胞、ウマ細胞、ヤギ細胞、ウサギ細胞、ヒツジ細胞、ハムスター、モルモット細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、ラット細胞、マウス細胞、ライオン細胞、トラ細胞、クマ細胞もしくは水牛細胞）、トリ細胞（アヒル細胞もしくはガチョウ細胞）またはクジラ細胞であり得る。一実施形態において、細胞はヒト細胞、例えば、ヒト肝細胞である。

20

【0805】

MYLIP 発現は、細胞において、対照レベルに対して少なくとも約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または約 100 % 阻害される。ある特定の実施形態において、MYLIP 発現は、対照レベルに対して少なくとも約 20 % 阻害される。

30

【0806】

一実施形態において、本発明のインビボ方法は、iRNA を含む組成物を対象に投与することであって、iRNA が、処置される哺乳動物の MYLIP 遺伝子の RNA 転写物の少なくとも一部に対して相補的であるヌクレオチド配列を含むことを含み得る。

40

【0807】

処置されるべき生物が哺乳動物、例えば、ヒトである場合には、組成物は、それだけには限らないが、経口、腹腔内または頭蓋内（例えば、脳室内、実質内およびくも膜下腔内）、静脈内の、筋肉内の、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、鼻腔、直腸および局所（頬側および舌下を含む）投与を含む非経口経路を含む、当技術分野で公知の任意の手段によって投与され得る。ある特定の実施形態において、組成物は、静脈内注入または注射によって投与される。ある特定の実施形態において、組成物は、皮下注射によって投与される。

。

【0808】

50

一部の実施形態において、投与は、デポー注射によってである。デポー注射は、長時間にわたって一貫した方法で iRNA を放出し得る。したがって、デポー注射は、所望の効果、例えば、所望の MYLP 阻害または治療的もしくは予防的效果を得るために必要とされる投薬の頻度を低減し得る。デポー注射はまた、より一貫した血清濃度を提供し得る。デポー注射は、皮下注射または筋肉内注射を含み得る。ある特定の実施形態において、デポー注射は、皮下注射である。

【0809】

一部の実施形態において、投与は、ポンプによってである。ポンプは、外部ポンプまたは外科的に埋め込まれたポンプであり得る。ある特定の実施形態において、ポンプは、皮下に埋め込まれた浸透圧ポンプである。他の実施形態において、ポンプは、注入ポンプである。注入ポンプは、静脈内、皮下、動脈性または硬膜外注入のために使用され得る。ある特定の実施形態において、注入ポンプは、皮下注入ポンプである。他の実施形態において、ポンプは、iRNA を肝臓にデリバリーする外科的に埋め込まれたポンプである。

10

【0810】

本発明の iRNA は、例えば、好適なバッファー溶液中の医薬組成物中に存在し得る。バッファー溶液は、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩またはリン酸塩またはそれらの任意の組合せを含み得る。一実施形態において、バッファー溶液はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) である。iRNA を含むバッファー溶液の pH およびオスモル濃度は、それが対象への投与に好適になるように調整され得る。

【0811】

あるいは、本発明の iRNA は、医薬組成物、例えば、dsRNA リポソーム製剤などとして投与されてもよい。

20

【0812】

投与様式は、局所処置が望まれるか、または全身処置が望まれるかに基づいて、また処置されるべき領域に基づいて選択できる。投与の経路および部位は、標的化を増強するように選択できる。

【0813】

一態様において、本発明はまた、哺乳動物において MYLP 遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。方法は、哺乳動物に、哺乳動物の細胞において MYLP 遺伝子を標的化する dsRNA を含む組成物を投与し、それによって、細胞において MYLP 遺伝子の発現を阻害することを含む。

30

【0814】

一部の実施形態において、方法は、哺乳動物の細胞における MYLP 遺伝子を標的とする dsRNA を含む組成物を哺乳動物に投与することによって、細胞における MYLP 遺伝子の発現を阻害することを含む。別の実施形態において、方法は、哺乳動物の細胞における MYLP 遺伝子を標的とする dsRNA 剤を含む医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。

【0815】

別の態様において、本発明は、哺乳動物における MYLP 遺伝子の発現を阻害するための本発明の iRNA 剤または医薬組成物の使用を提供する。

40

【0816】

さらに別の実施形態において、本発明は、哺乳動物における MYLP 遺伝子の発現を阻害するための医薬品の製造における、MYLP 遺伝子を標的とする本発明の iRNA 剤または当該薬剤を含む医薬組成物の使用を提供する。

【0817】

遺伝子発現の低減は、当技術分野で公知の任意の方法によって、また本明細書において記載される方法、例えば、qRT-PCR によって評価できる。タンパク質生成の低減は、当該技術分野において公知のあらゆる方法、および本明細書に記載される方法、例えば、ELISA、酵素活性によって評価され得る。

【0818】

50

本発明は、iRNA剤、iRNA剤を含む医薬組成物、または本発明のiRNAを含むベクターを、脂肪肝関連疾患、障害もしくは状態を有する、またはそれを発症しやすい対象に投与することを含む治療および予防方法をも提供する。

【0819】

一態様において、本発明は、MYLIP発現の低減から恩恵を受けるであろう障害、例えば、MYLIP関連疾患を有する対象を処置する方法を提供する。

【0820】

本発明の処置方法（および使用）は、MYLIPの発現を阻害するdsRNA剤、またはMYLIPの発現を阻害するdsRNAを含む医薬組成物の治療有効量を対象、例えば、ヒトに投与することによって、対象を処置することを含む。

10

【0821】

一態様において、本発明は、MYLIP発現の低減から恩恵を得るであろう障害、例えば、脂質不均衡（例えば、高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）、またはそれに関連する病理学的状態（例えば、アテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）を有する対象における少なくとも1つの症状を予防する方法を提供する。方法は、予防有効量のdsRNA剤またはdsRNAを含む医薬組成物を対象に投与することによって、対象における少なくとも1つの症状を予防することを含む。

【0822】

一実施形態において、MYLIP関連疾患、障害または状態は脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）である。

20

【0823】

本発明は、脂質不均衡（例えば、高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えば、アテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）に罹患している対象、または発症しやすい対象に、本発明のiRNA剤、iRNA剤を含む医薬組成物、またはiRNAを含むベクター、およびMYLIPを標的とするiRNA剤、そのようなiRNA剤を含む医薬組成物、またはそのようなiRNAを含むベクターを投与することを含む、治療的および予防的方法をも提供する。

30

【0824】

本発明は、対象、例えば、MYLIP発現、例えば、MYLIP関連疾患、例えば脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）の低減および／または阻害から恩恵を受けるであろう対象を処置するための本発明のiRNA剤、またはMYLIPの発現を阻害するdsRNAを含む医薬組成物の治療有効量の使用をも提供する。

【0825】

別の態様において、本発明は、対象、例えば、MYLIP発現、例えば、MYLIP関連疾患の低減および／または阻害から恩恵を受けるであろう対象を処置するための医薬品の製造における、遺伝子のMYLIPを標的とする本発明のiRNA剤、例えばdsRNA、または遺伝子のMYLIPを標的とするiRNA剤を含む医薬組成物の使用を提供する。

40

【0826】

本発明は、MYLIP発現の低減から恩恵を受けるであろう障害、例えば脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）を有する対象における少なくとも1つの症状を予防するための本発明のiRNA剤、またはMYLIPの発現を阻害するdsRNAを含む医薬組成物の予防有効量の使用をも提供する。

50

【0827】

別の態様において、本発明は、MYLIP発現の低減から恩恵を受けるであろう障害、例えば脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）を有する対象における数なくとも1つの症状を予防するための医薬品の製造における、MYLIP遺伝子を標的とする本発明のiRNA剤、例えばdsRNA、またはMYLIP遺伝子を標的とするiRNA剤を含む医薬組成物の使用を提供する。

【0828】

一態様において、本発明は、MYLIP発現の低減から恩恵を受けるであろう障害、例えば、MYLIP関連疾患、障害を有する対象を処置する方法を提供し、または状態は、脂質不均衡（例えば高コレステロール血症、高脂血症、高トリグリセリド血症など）またはそれに関連する病理学的状態（例えばアテローム性動脈硬化症、冠動脈性心疾患、他の心血管障害など）である。

【0829】

一実施形態において、対象は、MYLIP遺伝子についてホモ接合性である。遺伝子の各アレルは、機能性MYLIPタンパク質をコードしてもよい。別の実施形態において、対象は、MYLIP遺伝子についてヘテロ接合性である。対象は、機能性MYLIPタンパク質をコードするアレルおよびMYLIPの機能喪失変異体をコードするアレル、または機能性MYLIPタンパク質をコードするアレルおよびMYLIPの機能獲得変異体をコードするアレルを有してもよい。対象は、アミノ酸残基342のアスパラギン（N342）をコードするアレルについてホモ接合性であってもヘテロ接合性であってもよい。対象はN342S変異体（rs9370867）をいずれかのアレルまたは両方のアレルに有していない可能性がある。（Weissglas-Vokov et al.(2011)J Clin Invest.121(8):3062-71(doi:10.1172/JCI45504)を参照）。対象は、アミノ酸残基266（R266）のアルギニンをコードするアレルについてホモ接合性であってもヘテロ接合性であってもよい。対象は、R266X変異体をいずれかのアレルまたは両方のアレルに有していない可能性がある。対象は、以下のMYLIP変異体：Arg193Gln、Val250Met、およびArg372Gln（rs150756832）の1つまたは複数についてホモ接合性であってもヘテロ接合性であってもよく、これらはLDLコレステロールレベルが高い対象と関連している。（Sorrentino et al.(2013)Eur Heart J.34(17):1292-7(doi:10.1093/eurheartj/ehs472)参照）。

【0830】

本発明のある特定の実施形態において、方法は、MYLIP発現の低減から恩恵を受けるであろう対象を同定することを含み得る。方法は、対象からのサンプルが、Arg193Gln、Val250MetまたはArg372Gln（rs150756832）変異体または高LDLコレステロールレベルまたはMYLIP機能獲得と関連する他の変異体をコードする核酸を含むか否かを決定することを含み得る。方法は、対象からのサンプルが、前記の変異体の1つを含むMYLIPタンパク質をコードする第1の核酸を含むか否かを決定することによって、MYLIPの発現を阻害することによりMYLIP関連障害を処置または阻害するための候補として対象を分類すること、ならびに変異体核酸の少なくとも1つが検出される場合、および／または変異体タンパク質の少なくとも1つが検出される場合にMYLIPを阻害することによりMYLIP関連障害を処置または阻害するための候補として対象を分類することを含む。変異体は、任意の好適な手段、例えば、ELISAアッセイ、RT-PCR、シーケンシングなどによって検出され得る。一部の実施形態において、方法は、対象が、上記の変異体の1つについてホモ接合性であるかヘテロ接合性であるかを決定することをさらに含む。

【0831】

本明細書に使用される場合、「血清脂質」という用語は、血液中に存在する任意の主たる脂質を指す。血清脂質は、遊離形態において、またはタンパク質複合体、例えばリポタ

10

20

30

40

50

ンパク質複合体の一部として血液中に存在し得る。血清脂質の非限定的な例としては、トリグリセリド（TG）、コレステロール、例えば、総コレステロール（TC）、低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）、高密度リポタンパク質コレステロール（HDL-C）、極低密度リポタンパク質コレステロール（VLDL-C）および中密度リポタンパク質コレステロール（IDL-C）を挙げることができる。

【0832】

一実施形態において、MYLIPの発現の低減から恩恵を得るであろう対象は、例えば、2型糖尿病または糖尿病予備軍を有する対象、肥満対象、コレステロールなどの血中脂質レベルが高い対象、高血圧を有する対象、代謝症候群を含む特定の代謝障害を有する対象、または既存の心血管疾患を有する対象（例えば、心筋梗塞、脳卒中、慢性狭心症、動脈瘤などを経験した対象）である。一実施形態において、MYLIPの発現の低減から恩恵を得るであろう対象は、例えば、スタチンまたは他のコレステロール調整薬を服用している対象である。

10

【0833】

一実施形態において、本発明の方法での使用のための「iRNA」は、「二重標的化RNA i剤」である。「二重標的化RNA i剤」という用語は、第2標的RNA、例えば、PCSK9遺伝子に対して「センス」および「アンチセンス」配向を有すると言われる、2つの逆平行および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含む第2のdsRNA剤を含む分子に対して共有結合により付着された、第1の標的RNA、すなわちMYLIP遺伝子に対して「センス」および「アンチセンス」配向を有すると言われる、2つの逆平行および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含む第1のdsRNA剤を含む分子を指す。本発明の一部の実施形態において、二重標的化RNA i剤は、本明細書においてRNA干渉またはRNA iと呼ばれる転写後遺伝子サイレンシングメカニズムを通じて、第1および第2の標的RNA、例えば、mRNAの分解を引き起こす。

20

【0834】

dsRNA剤は、約0.1mg/kgから約50mg/kgの用量において対象に投与され得る。通常、好適な用量は、約0.1mg/kgから約5.0mg/kgの範囲、例えば、約0.3mg/kgおよび約3.0mg/kgである。

【0835】

iRNAは静脈内注入により、ある期間にわたって定期的に投与され得る。ある特定の実施形態において、最初の処置レジメン後に、より少ない頻度で処置を投与できる。

30

【0836】

iRNAの投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、尿または他のコンパートメントにおけるMYLIPレベルを対照レベルに対して少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも約99%以上低下させることができる。一実施形態において、iRNAの投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、尿または他のコンパートメントにおけるMYLIPレベルを対象レベルに対して少なくとも20%低下させることができる。

40

【0837】

iRNAの本格用量の投与の前に、患者は、5%注入反応などのより少ない用量を投与され、RNA i剤の全用量の投与の前に、患者により少ない用量、例えば、5%の注入反

50

応を投与し、有害作用、例えば、アレルギー反応についてモニタリングできる。別の例では、患者を、望まれない免疫賦活性効果、例えば、サイトカイン（例えば、TNF- α または INF- α ）レベルの増大についてモニタリングできる。

【0838】

あるいは、iRNAは、例えば、皮下注射によって皮下投与され得る。1つまたは複数の注射を使用して、所望の日用量のiRNAを対象にデリバリーすることができる。一定期間にわたって、注射を反復できる。投与を定期的に反復できる。ある特定の実施形態において、最初の処置レジメン後に、より少ない頻度で処置を投与できる。反復投与療法は、定期的な、例えば、1日おきから1年に1回などの治療量のiRNAの投与を含み得る。ある特定の実施形態において、iRNAは、週に約1回、7～10日毎に1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回、5週間毎に1回、6週間毎に1回、7週間毎に1回、8週間毎に1回、9週間毎に1回、10週間毎に1回、11週間毎に1回、12週間毎に1回、月に1回、2か月毎に1回、3か月毎に1回（四半期に1回）、4か月毎に1回、5か月毎に1回、または6か月毎に1回投与される。

10

【0839】

一実施形態において、方法は、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24時間、28、32または約36時間かけて、標的MYLP遺伝子の発現が低減されるように、本明細書において特徴づけられる組成物を投与することを含む。一実施形態において、標的MYLP遺伝子の発現は、延長された期間、例えば、少なくとも約2、3、4日以上、例えば、約1週間、2週間、3週間または4週間以上かけて低減される。

20

【0840】

ある特定の実施形態において、本明細書において特徴づけられる方法および組成物に有用なiRNAは、標的MYLP遺伝子のRNA（初代または処理された）を特異的に標的とする。iRNAを使用してこれらの遺伝子の発現を阻害する組成物および方法は、本明細書において記載されるように調製および実施できる。

【0841】

本発明の方法によるdsRNAの投与は、MYLP関連障害（例えば脂質不均衡）を有する患者における当該疾患または障害の重症度、兆候、症状および／またはマーカーの低減をもたらし得る。これに関連して「低減」とは、このようなレベルの統計的に有意な低下を意味する。低下は、例えば、対照レベルに対して少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%であり得る。

30

【0842】

疾患の処置または予防の有効性は、例えば、疾患進行、疾患緩解、症状の重症度、疼痛の低減、生活の質、処置効果を持続するために必要とされる投薬の用量、疾患マーカーまたは処置されているまたは予防のために標的とされる所与の疾患にとって適切な任意の他の測定可能なパラメータのレベルを測定することによって評価できる。このようなパラメータのうち任意の1つまたはパラメータの任意の組合せを測定することによって、処置または予防の有効性をモニタリングすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、MYLP関連障害（例えば、脂質不均衡）の処置の有効性は、例えば、1つまたは複数の血清脂質レベル、例えば、トリグリセリドレベルの周期的なモニタリングによって評価することができる。後の読み取り値を、最初の読み取り値と比較することによって、処置が有効であるか否かの指標が医師に提供される。このようなパラメータのうち任意の1つまたはパラメータの任意の組合せを測定することによって、処置または予防の有効性をモニタリングすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。iRNAまたはその医薬組成物の投与に関して、MYLP関連障害「に対して有効」とは、臨床的に適切な方

40

50

法での投与が、患者の少なくとも統計的に有意な画分に対して有益な効果、例えば、症状の改善、治癒、疾患の低減、寿命の延長、生活の質の向上、またはMYLIP関連障害および関連する原因を処置することに精通している医師によってポジティブと一般的に認識される他の効果をもたらす。

【0843】

処置または予防的効果は、疾患状態の1つまたは複数のパラメータにおいて統計的に有意な改善がある場合に、または悪化しなかったこともしくはそうでなければ予測される症状を発症しなかったことによって明らかである。例として、疾患の測定可能なパラメータにおける（対象に対する）少なくとも約10%の好都合な変化、例えば、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%またはそれより多くが、有効な処置を示し得る。所与のiRNA薬物またはその薬物の製剤の有効性はまた、当技術分野で公知のように、所与の疾患の実験動物モデルを使用して判断できる。

10

【0844】

本発明は、例えば、MYLIP発現またはMYLIPの低減および／または阻害から恩恵を受けるであろう対象、例えば、MYLIP関連疾患、障害または状態を有する対象を処置するための本発明のiRNA剤または医薬組成物を、他の医薬および／または他の治療方法、例えば、公知の医薬および／または公知の治療方法、例えば、これらの障害を処置するために現在採用されているものなどと組み合わせて使用するための方法をさらに提供する。例えば、ある特定の実施形態において、本発明のiRNA剤または医薬組成物は、例えば、ピリドキシン、ACE阻害剤（アンギオテンシン変換酵素阻害剤）、例えば、血圧を低下させるためのベナゼプリル剤、例えば、利尿剤、ベータ遮断薬、ACE阻害剤、アンギオテンシンII受容体遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、アルファ遮断薬、アルファ-2受容体アンタゴニスト、組み合わせられたアルファおよびベータ遮断薬、中枢性アゴニスト、末梢アドレナリン作動性阻害剤および血管拡張剤、またはコレステロールを減少させるための薬剤、例えば、スタチン、選択的コレステロール吸収阻害剤、レジン、脂質低下療法、インスリン増感剤、例えば、PPAR γ アゴニストピオグリタゾン、glp-1rアゴニスト、例えば、例えば、リラグルタリド、ビタミンE、SGLT2阻害剤、またはDPP-IV阻害剤、または前述のもののうちのいずれかの組合せと組み合わせて投与される。

20

【0845】

いくつかの具体的な実施形態において、本発明のiRNA剤または医薬組成物は、HMG-CoAリダクターゼ阻害剤と組み合わせて投与される。HMG-CoAリダクターゼ阻害剤は、スタチン、例えば、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、またはシンバスタチンであってもよい。スタチンは、肝臓のメバロン酸経路の酵素を競合的に阻害することにより、コレステロール合成を阻害する。また、スタチンは肝臓のコレステロールレベルを低下させることにより、LDLの合成を増加させ得る。スタチンはSREBP経路に間接的に作用し、LDLの発現を調節する。アテローム性動脈硬化症の予防において、血清脂質レベルを低下させる以外の多面的作用も研究されている。スタチンは、LDL発現を増加させると同時にPCSK9レベルを増加させ、コレステロール低下能に逆効果をもたらすことが示されている。本明細書における処置はいずれも、スタチンと組み合わせて投与することができる。

30

40

【0846】

いくつかの具体的な実施形態において、本発明のiRNA剤または医薬組成物は、コレステロール吸収阻害剤、例えばエゼチミブ、胆汁酸封鎖剤、例えばコレスチラミン、コレステロール、またはコレスベラム、ナイアシンまたはビタミンB3、またはPCSK9阻害剤、例えばエボロクマブ、アリロクマブ、または抗PCSK9 iRNA剤と組み合わせて投与される（例えば米国特許第9,822,365号、Tan et al., 2017年11月21日に発行、を参照）。これらの処置のいずれか1つまたは複数を、本発明のiRNA剤または医薬組成物と組み合わせて、スタチンなどのHMG-CoAリダ

50

クターゼ阻害剤と適宜さらに組み合わせ、併用投与することができる。

【0847】

iRNA剤および追加の治療剤および／または処置は、同時に、かつ／または同一の組合せにおいて皮下投与され得る、または追加の治療剤は、個別の組成物の一部として、または個別の時点において、かつ／または当該技術分野において公知の、もしくは本明細書に記載される別の方法によって投与され得る。

【0848】

VIII. キット

本発明は、本発明の方法のいずれかを実施するためのキットをも提供する。当該キットは、1つまたは複数のRNAi剤、および使用のための使用説明書、例えば、細胞を本発明のRNAi剤または医薬組成物と、MYLIPの発現を阻害するのに有効な量において接触させることによって、細胞におけるMYLIPの発現を阻害するための使用説明書を含む。キットは、細胞をRNAi剤（例えば、注射デバイス）と接触させるための手段、またはMYLIPの阻害を測定するための手段（例えば、MYLIP mRNAおよび／またはMYLIPタンパク質の阻害を測定するための手段）を適宜さらに含んでもよい。MYLIPの阻害を測定するための当該手段は、対象からサンプル、例えば、血漿サンプルなどを得るための手段を含んでもよい。本発明のキットは、RNAi剤を対象に投与するための手段、または治療有効量もしくは予防有効量を決定するための手段を適宜さらに含んでもよい。

【0849】

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと類似または同等の方法および材料を、本発明において特徴とされるiRNAおよび方法の実施または試験に使用できるが、適した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すべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が支配する。さらに、材料、方法および例は、単に例示的なものであり、制限であるように意図されない。

【実施例】

【0850】

【実施例1】

MYLIP iRNA設計、合成および選択

本実施例では、MYLIP iRNA剤の設計、合成および選択のための方法を説明する。本明細書で提供される核酸配列は、標準的な命名法を用いて表される。表2の略語を参照のこと。表2：核酸配列表示で使用されるヌクレオチドモノマーの略語。

【0851】

【表 2】

表 2. 核酸配列表示に使用されるヌクレオチドモノマーの略語。これらのモノマーは、オリゴヌクレオチド中に存在する場合は、5'-3'-ホスホジエステル結合によって互いに連結されていると理解され、ヌクレオチドが 2'-フルオロ修飾を含む場合は、フルオロが親ヌクレオチドの位置のヒドロキシに置き換わる(すなわち、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドになる)ことが理解される。略語は、3'末端位置に見いだされる場合に 3'-ホスフェートを省略したヌクレオチド(すなわち、3'-OH になる)に対応することも理解される。

略語	ヌクレオチド
A	アデノシン-3'-ホスフェート
Ab	ベータ-L-アデノシン-3'-ホスフェート
Abs	ベータ-L-アデノシン-3'-ホスホロチオエート
Af	2'-フルオロアデノシン-3'-ホスフェート
Afs	2'-フルオロアデノシン-3'-ホスホロチオエート
As	アデノシン-3'-ホスホロチオエート
C	シチジン-3'-ホスフェート
Cb	ベータ-L-シチジン-3'-ホスフェート
Cbs	ベータ-L-シチジン-3'-ホスホロチオエート
Cf	2'-フルオロシチジン-3'-ホスフェート
Cfs	2'-フルオロシチジン-3'-ホスホロチオエート
Cs	シチジン-3'-ホスホロチオエート
G	グアノシン-3'-ホスフェート
Gb	ベータ-L-グアノシン-3'-ホスフェート
Gbs	ベータ-L-グアノシン-3'-ホスホロチオエート
Gf	2'-フルオログアノシン-3'-ホスフェート
Gfs	2'-フルオログアノシン-3'-ホスホロチオエート
Gs	グアノシン-3'-ホスホロチオエート
T	5'-メチルウリジン-3'-ホスフェート
Tf	2'-フルオロ-5'-メチルウリジン-3'-ホスフェート
Tfs	2'-フルオロ-5'-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
Ts	5'-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
U	ウリジン-3'-ホスフェート
Uf	2'-フルオロウリジン-3'-ホスフェート
Ufs	2'-フルオロウリジン-3'-ホスホロチオエート
Us	ウリジン-3'-ホスホロチオエート
N	任意のヌクレオチド(G, A, C, T または U)
a	2'-O-メチルアデノシン-3'-ホスフェート
as	2'-O-メチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
c	2'-O-メチルシチジン-3'-ホスフェート
cs	2'-O-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
g	2'-O-メチलगアノシン-3'-ホスフェート
gs	2'-O-メチलगアノシン-3'-ホスホロチオエート
t	2'-O-メチル-5'-メチルウリジン-3'-ホスフェート
ts	2'-O-メチル-5'-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
u	2'-O-メチルウリジン-3'-ホスフェート
us	2'-O-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
s	ホスホロチオエート連結

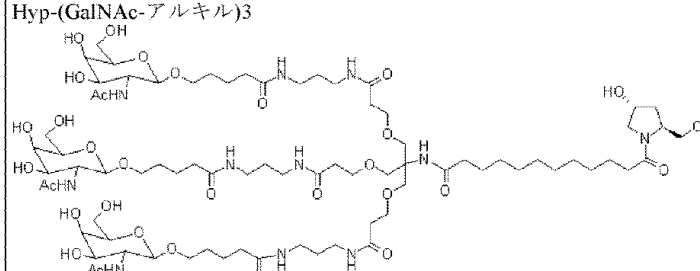
10

20

30

40

50

略語	ヌクレオチド
L96 ¹	N-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミノデカノイル]-4-ヒドロキシプロリノール Hyp-(GalNAc-アルキル)₃  すなわち、(2S,4R)-1-[29-[[2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ]-14,14-ビス[[3-[[3-[[5-[[2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル]オキシ]-1-オキソペンチル]アミノ]プロピル]アミノ]-3-オキソプロポキシ]メチル]-1,12,19,25-テトラオキソ-16-オキサ-13,20,24-トリアザノナコス-1-イル]-4-ヒドロキシ-2-ヒドロキシメチルピロリジン
P	ホスフェート
VP	ビニル-ホスフェート
dA	2'-デオキシアデノシン-3'-ホスフェート
dAs	2'-デオキシアデノシン-3'-ホスホロチオエート
dC	2'-デオキシシチジン-3'-ホスフェート
dCs	2'-デオキシシチジン-3'-ホスホロチオエート
dG	2'-デオキシグアノシン-3'-ホスフェート
dGs	2'-デオキシグアノシン-3'-ホスホロチオエート
dT	2'-デオキシチミジン-3'-ホスフェート
dTs	2'-デオキシチミジン-3'-ホスホロチオエート
dU	2'-デオキシウリジン
dUs	2'-デオキシウリジン-3'-ホスホロチオエート
Y34	2-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-4-メトキシ-3-ホスフェート (脱塩基 2'-Omc フラノース)
Y44	逆脱塩基 DNA (2-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5-ホスフェート)
(Agn)	アデノシン-グリコール核酸 (GNA)
(Cgn)	シチジン-グリコール核酸 (GNA)
(Ggn)	グアノシン-グリコール核酸 (GNA)
(Tgn)	チミジン-グリコール核酸 (GNA) S-異性体
(Aam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3'-ホスフェート
(Aams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3'-ホスホロチオエート
(Gam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3'-ホスフェート
(Gams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3'-ホスホロチオエート
(Tam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-ホスフェート
(Tams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-ホスホロチオエート
(Aeo)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-ホスフェート
(Aeos)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
(Geo)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-ホスフェート
(Geos)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-ホスホロチオエート
(Teo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-ホスフェート
(Teos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート

10

20

30

40

50

略語	ヌクレオチド
(m5Ceo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-ホスフェート
(m5Ceos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
(A3m)	3'-O-メチルアデノシン-2'-ホスフェート
(A3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルアデノシン-2'-ホスフェート
(G3m)	3'-O-メチルグアノシン-2'-ホスフェート
(G3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルグアノシン-2'-ホスフェート
(C3m)	3'-O-メチルシチジン-2'-ホスフェート
(C3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルシチジン-2'-ホスフェート
(U3m)	3'-O-メチルウリジン-2'-ホスフェート
(U3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルウリジン-2'-ホスフェート
(m5Cam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-ホスフェート
(m5Cams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
(Chd)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-ホスフェート
(Chds)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-ホスホロチオエート
(Uhd)	2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-ホスフェート
(Uhds)	2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-ホスホロチオエート
(pshe)	ヒドロキシエチルホスホロチオエート
(A2p)	アデノシン-2'-ホスフェート
(A2ps)	アデノシン-2'-ホスホロチオエート
(C2p)	シチジン-2'-ホスフェート
(C2ps)	シチジン-2'-ホスホロチオエート
(G2p)	グアノシン-2'-ホスフェート
(G2ps)	グアノシン-2'-ホスホロチオエート
(T2p)	チミジン 2'-ホスフェート
(T2ps)	チミジン 2'-ホスホロチオエート
(U2p)	ウリジン-2'-ホスフェート
(U2ps)	ウリジン-2'-ホスホロチオエート

10

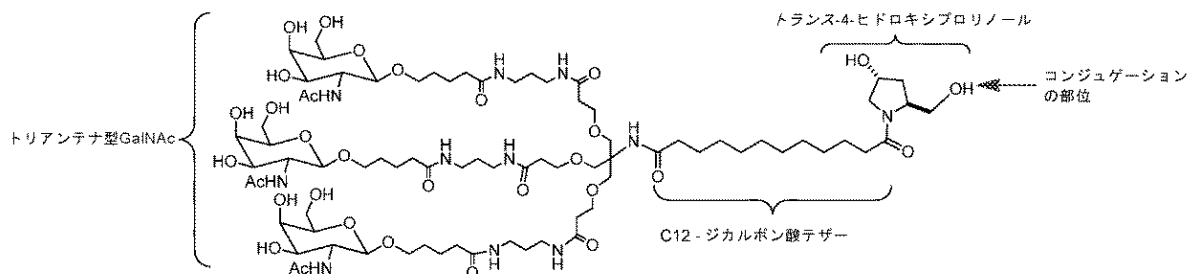
20

30

¹L96 の化学構造は以下の通りである:

【 0 8 5 2 】

【 化 4 0 】



40

【 0 8 5 3 】

試薬の供給源

試薬の供給源が本明細書において具体的に与えられない場合には、このような試薬は、分子生物学において適用するための品質／純度基準で分子生物学のための試薬の任意の供給者から得ることができる。

【 0 8 5 4 】

転写物

ヒトミオシン調節軽鎖相互作用タンパク質 (MYLIP) 遺伝子 (ヒトNCBI re

50

f s e q I D : N M _ 0 1 3 2 6 2 . 4 、 N C B I G e n e I D : 2 9 1 1 6)
を標的とする s i R N A のセットをカスタム R および P y t h o n スクリプトを用いて設計した。いずれの s i R N A 設計もヒト M Y L I P 転写物に対する完全にマッチを有する。ヒト N M _ 0 1 3 2 6 2 . 4 R E F S E Q m R N A は、3 0 7 2 塩基の長さを有する。

【0855】

s i R N A 合成

s i R N A を、当該技術分野において公知のルーチンの方法を使用して合成およびアニーリングした。

【0856】

手短には、s i R N A を、固体支持体で媒介されたホスホラミダイト化学を使用して M e r m a d e 1 9 2 合成装置 (B i o A u t o m a t i o n) 上にて 1 μ m o l スケールで合成した。固体支持体は、カスタム G a l N A c リガンドまたは汎用固体支持体 (A M b i o c h e m i c a l) を搭載した、制御された細孔ガラス (5 0 0 Å) とした。補助的な合成試薬、2' - F および 2' - O - メチル RNA およびデオキシホスホラミダイトを T h e r m o - F i s h e r (ウィスコンシン州 M i l w a u k e e) および H o n g e n e (中国) から入手した。対応するホスホラミダイトを使用して、2' - F 2' - O - メチル、G N A (グリコール核酸)、5' ホスフェートおよび他の修飾を導入した。3' G a l N A c がコンジュゲートされた一本鎖の合成を、G a l N A c 修飾された C P G 支持体上で実施した。カスタム C P G 汎用固体支持体を、アンチセンス一本鎖の合成のために使用した。5 - エチルチオ - 1 H - テトラゾール (E T T) を活性化剤 (アセトニトリル中 0 . 6 M) として採用して、すべてのホスホラミダイト (アセトニトリル中 1 0 0 m M) についてのカップリング時間を 5 分とした。無水アセトニトリル / ピリジン (1 : 1 v / v) 中 3 - ((ジメチルアミノ - メチリデン) アミノ) - 3 H - 1 , 2 , 4 - ジチアゾール - 3 - チオン (D D T T 、 C h e m g e n e s (米国マサチューセッツ州 W i l m i n g t o n) から入手) を使用して、ホスホロチオエート連結を生成した。酸化時間は 3 分であった。いずれの配列も D M T 基の最終的除去 (「 D M T オフ」) により合成した。

【0857】

固相合成が完了すると、オリゴリボヌクレオチドを固体支持体から切断し、2 0 0 μ L メチルアミン水溶液試薬を使用して、密封された 9 6 ディープウェルプレートにおいて 6 0 ° C で 2 0 分脱保護した。t e r t - ブチルジメチルシリル (T B D M S) 基で保護された 2' リボ残基 (2' - O H) を含む配列については、T E A . 3 H F (トリエチルアミントリヒドロフルオリド) 試薬を使用して、第 2 の工程の脱保護を実施した。メチルアミン脱保護溶液に対して、2 0 0 μ L のジメチルスルホキシド (D M S O) および 3 0 0 μ L の T E F 試薬を添加し、溶液を 6 0 ° C においてさらに 2 0 分インキュベートした。切断および脱保護工程の終了時に、合成プレートを室温とし、1 m L のアセトニトリル : エタノール混合物 (9 : 1) の添加によって析出させた。プレートを - 8 0 ° C において 2 時間冷却し、多重管ピペットを利用して上清を注意深く移した。オリゴヌクレオチドペレットを 2 0 m M の N a O A c 緩衝剤に再懸濁させ、A 9 0 5 オートサンプラーおよび F r a c 9 5 0 分別捕集器が装着された A K T A ピュリファイヤシステム上で 5 m L H i T r a p サイズ排除カラム (G E H e a l t h c a r e) を使用して脱塩した。脱塩されたサンプルを 9 6 ウェルプレートに収集した。各配列からのサンプルを、それが何であることを確認するために L C - M S 、定量のための U V (2 6 0 n m) によって分析し、選択されたサンプルのセットを、純度を決定するために I E X クロマトグラフィーによって分析した。

【0858】

一本鎖のアニーリングをテカン液ハンドリングロボット上で実施した。センスおよびアンチセンス一本鎖の等モル混合物と一緒にし、9 6 ウェルプレートにおいてアニーリングした。相補的一本鎖と一緒にした後、9 6 ウェルプレートをしっかりと密封し、1 0 0 ° C で 1 0 分オープンにおいて加熱し、2 ~ 3 時間の時間をかけて徐々に室温に戻した。各二

10

20

30

40

50

重鎖の濃度を 1 X P B S 中 1 0 μ M に正規化し、次いでインビトロスクリーニングアッセイに供した。

【 0 8 5 9 】

センス鎖およびアンチセンス鎖配列の未修飾のヌクレオチド配列の詳細なリストが表 3 に示される。

【 0 8 6 0 】

センス鎖およびアンチセンス鎖配列の修飾されたヌクレオチド配列の詳細なリストが表 4 に示される。

【 0 8 6 1 】

【表 3】

10

表 3. ヒト MYLIP dsRNA 剤の未修飾センスおよびアンチセンス鎖配列

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲
AD-1753226	CGCAGAGCUGCAGC CUUCGAU	17	113-133	AUCGAAGGCUGC AGCUCUGCGGA	152	111-133
AD-1753250	GGUCCCACCAGUGA CAAGGCU	18	161-181	AGCCUUGUCACU GGUGGGACCCA	153	159-181
AD-1753259	GCGCACACCAAAGA GAAGGCU	19	190-210	AGCCUUCUCUUU GGUGUGCGCGG	154	188-210
AD-1753324	GCCAUGCUGUGUUA UGUGACU	20	235-255	AGUCACAUAAACA CAGCAUGGCUG	155	233-255
AD-1753346	GCGGUGCUGAUGGA GGUGGAU	21	265-285	AUCCACCUCCAU CAGCACC GCGU	156	263-285
AD-1753413	GUGGAGGCGAAAGC CAACGGU	22	286-306	ACCGUUGGCUUU CGCCUCCACCU	157	284-306
AD-1753439	CUGCCUCAACCAGG UGUGCAU	23	312-332	AUGCACACCUGG UUGAGGCAGUC	158	310-332
AD-1753456	GCAGGCGACUGGGA AUCAUAU	24	329-349	AUAUGAUUCCCA GUCGCCUGCAC	159	327-349
AD-1753520	AUCAUAGAAGUUGA CUAUUUU	25	343-363	AAAAUAGUCAAC UUCUAUGAUUC	160	341-363
AD-1753536	AUUUUGGACUGCAG UUUACGU	26	359-379	ACGUAAACUGCA GUCCAAAAUAG	161	357-379
AD-1753557	GUAGCAAAGGUGAA AGUUUAU	27	380-400	AUAAACUUUCAC CUUUGCUACCC	162	378-400
AD-1753624	UUUAUGGCUAAACCU GAGAAAU	28	397-417	AUUUCUCAGGUU UAGCCAUAAAC	163	395-417
AD-1753651	UCCCAGCAGAUGGA UGGGCUU	29	424-444	AAGCCCAUCCAU CUGCUGGGAGA	164	422-444
AD-1753661	AGGCUUAAACUUAG AGUCAAU	30	454-474	AUUGACUCUAAG UUUAAGCCUGU	165	452-474
AD-1753725	AGUCAAGUUCUUCG UGGAGCU	31	468-488	AGCUCCACGAAG AACUUGACUCU	166	466-488
AD-1753744	CCUCAUCUCAUCUU ACAGGAU	32	487-507	AUCCUGUAAGAU GAGAUGAGGCU	167	485-507
AD-1753813	AGCAGACUAGGCAU AUCUUUU	33	506-526	AAAAGAU AUGCC UAGUCUGCUCC	168	504-526
AD-1753827	AUCUUUUUCUUGCA CAUCAAU	34	520-540	AUUGAUGUGCAA GAAAAAGAUAU	169	518-540
AD-1753844	CAAGGAGGCCCCUCU UGGCAGU	35	537-557	ACUGCCAAGAGG GCCUCCUUGAU	170	535-557
AD-1753860	GCAGGCCACCUCUU GUGUUCU	36	553-573	AGAACACAAGAG GUGGCCUGCCA	171	551-573
AD-1753917	CAGGCAGUGGAACU CAGUGCU	37	580-600	AGCACUGAGUUC CACUGCCUGCU	172	578-600
AD-1753949	ACCAAGUUUGGAGA CUACAAU	38	613-633	AUUGUAGUCUCC AAACUUGGUCU	173	611-633
AD-1754026	ACUGCCAAGUAUAA CUAUGAU	39	640-660	AUCAUAGUUAUA CUUGGCAGUGU	174	638-660
AD-1754053	UGUGCCAAGGAGCU CUCCUCU	40	667-687	AGAGGAGAGCUC CUUGGCACAGA	175	665-687
AD-1754117	CUCCUCUGCCACCU UGAACAU	41	681-701	AUGUUCAAGGUG GCAGAGGAGAG	176	679-701
AD-1754133	AACAGCAUUGUUGC AAAACAU	42	697-717	AUGUUUUGCAAC AAUGCUGUUCA	177	695-717

20

30

40

50

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲
AD-1754147	AAAACAUAAGGAGU UGGAGGU	43	711-731	ACCUCCAACUCC UUAUGUUUUGC	178	709-731
AD-1754162	CAGCUGAAUACCAA GUUUUGU	44	746-766	ACAAAACUUGGU AUUCAGCUGAA	179	744-766
AD-1754226	GUUUUGCAGAUUGU GUCGGCU	45	760-780	AGCCGACACAAU CUGCAAAACUU	180	758-780
AD-1754240	GUCGGCAAUGGAAA ACUAUGU	46	774-794	ACAUAGUUUUCC AUUGCCGACAC	181	772-794
AD-1754255	CUAUGGCAUAGAAU GGCAUUU	47	789-809	AAAUGCCAUUCU AUGCCAUAGUU	182	787-809
AD-1754327	GUGCGGGAUAGCGA AGGGCAU	48	811-831	AUGCCCUUCGCU AUCCCGCACAG	183	809-831
AD-1754342	GGGCAGAAACUGCU CAUUGGU	49	826-846	ACCAAUGAGCAG UUUCUGCCCUU	184	824-846
AD-1754353	AAGGAAUCUCAUU UGUAAAA	50	857-877	AUUUACAAAUUG AGAUUCCUUA	185	855-877
AD-1754420	AAAGAUGACUUUAG CCCAAUU	51	874-894	AAUUGGGCUAAA GUCAUCUUUAC	186	872-894
AD-1754434	CCCAAUUAAUAGGA UAGCUUU	52	888-908	AAAGCUAUCCUA UUAUUUGGGCU	187	886-908
AD-1754450	GCUUAUCCUGUGGU GCAGAUU	53	904-924	AAUCUGCACCAC AGGAUAAGCUA	188	902-924
AD-1754530	UCAGGAAAGAAUGU AUUUUUU	54	934-954	AAAAUAUACAUU CUUUCUGACU	189	932-954
AD-1754550	GACGGUCACCAAGG AAUCUGU	55	954-974	ACAGAUUCCUUG GUGACCGUCAA	190	952-974
AD-1754618	UGGGAACAGCAUCG UGCUCUU	56	972-992	AAGAGCACGAUG CUGUCCCAGA	191	970-992
AD-1754637	UUGUUUAAAUGAU CAGCACU	57	991-1011	AGUGCUGAUCAU UUUAAACAAGA	192	989-1011
AD-1754661	UCUACCGAGCGAUA ACAGAGU	58	1028-1048	ACUCUGUUAUCG CUCGGUAGAGC	193	1026-1048
AD-1754735	ACGCAUUCUACAGG UGUGACU	59	1052-1072	AGUCACACCUGU AGAAUGCGUGC	194	1050-1072
AD-1754749	UGUGACACAGUGAC CAGCGCU	60	1066-1086	AGCGCUGGUCAC UGUGUCACACC	195	1064-1086
AD-1754818	CCGUGAUGAUGCAG UAUAGCU	61	1085-1105	AGCUAUACUGCA UCAUCACGGCG	196	1083-1105
AD-1754838	CGUGACUUGAAGGG CCACUUU	62	1105-1125	AAAGUGGCCCCU CAAGUCACGGC	197	1103-1125
AD-1754862	UCUCUGUUUCUGAA UGAAAAU	63	1129-1149	AUUUUCAUUCAG AAACAGAGAUG	198	1127-1149
AD-1754939	CUUGGCAAGAAAUA UGUCUUU	64	1156-1176	AAAGACAUAUUU CUUGCCAAGGU	199	1154-1176
AD-1755013	CAUCAAAAGGAGGUG UAUGACU	65	1190-1210	AGUCAUACACCU CCUUUGAUGUU	200	1188-1210
AD-1755046	CUCUGUACAAUGCU GGCGUUU	66	1223-1243	AAACGCCAGCAU UGUACAGAGCC	201	1221-1243
AD-1755120	ACCUCGUUUCAAGA AACAACU	67	1247-1267	AGUUGUUUCUUG AAACGAGGUCC	202	1245-1267
AD-1755141	AGAGCCCUUCACAC UCGCCUU	68	1268-1288	AAGGCGAGUGUG AAGGGCUCUGG	203	1266-1288
AD-1755155	UCGCCUCUGAAGUC CUCAGAU	69	1282-1302	AUCUGAGGACUU CAGAGGCGAGU	204	1280-1302

10

20

30

40

50

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲
AD-1755219	CUCAGAAAGCAGCA UGAACUU	70	1296-1316	AAGUUCAUGCUG CUUUCUGAGGA	205	1294-1316
AD-1755326	CUGCAGGAGAAGCU ACGCAAU	71	1357-1377	AUUGCGUAGCUU CUCCUGCAGCA	206	1355-1377
AD-1755340	ACGCAAGCUGAAGG AAGCCAU	72	1371-1391	AUGGCUUCCUUC AGCUUGCUGUAG	207	1369-1391
AD-1755358	CAUGCUGUGCAUGG UGUGCUU	73	1389-1409	AAGCACACCAUG CACAGCAUGGC	208	1387-1409
AD-1755435	GGAGAUCAACUCCA CCUUCUU	74	1416-1436	AAGAAGGUGGAG UUGAUCUCCUC	209	1414-1436
AD-1755451	UUCUGUCCUGUGG CCACACU	75	1432-1452	AGUGUGGCCACA GGGACAGAAGG	210	1430-1452
AD-1755515	CCACACUGUGUGCU GUGAGAU	76	1446-1466	AUCUCACAGCAC ACAGUGUGGCC	211	1444-1466
AD-1755539	CCCAGCUACAGUCA UGUCCCU	77	1475-1495	AGGGACAUGACU GUAGCUGGGCG	212	1473-1495
AD-1755554	GUCCCGUCUGCAGG UCGCGUU	78	1490-1510	AACGCGACCUGC AGACGGGACAU	213	1488-1510
AD-1755621	CGUGUGGAGCAUGU CCAGCAU	79	1507-1527	AUGCUGGACAUG CUCCACACGCG	214	1505-1527
AD-1755636	CAGCACGUCUAUCU GCCAACU	80	1522-1542	AGUUGGCAGAU GACGUGCUGGA	215	1520-1542
AD-1755650	GCCAACGCACACCA GUCUUCU	81	1536-1556	AGAAGACUGGUG UGCGUUGGCAG	216	1534-1556
AD-1755714	GUCUUCUCAAUCUG ACUGUAU	82	1550-1570	AUACAGUCAGAU UGAGAAGACUG	217	1548-1570
AD-1755734	AUCUAAUCUGUUGU GCUUUUU	83	1570-1590	AAAAAGCACAAAC AGAUUAGAUUA	218	1568-1590
AD-1755747	GCUUUUGUUGGACU UGGCAUU	84	1584-1604	AAUGCCAAGUCC AACAAAAGCAC	219	1582-1604
AD-1755761	UGGCAUGUUUCCAU GAACUGU	85	1598-1618	ACAGUUCAUGGA AACAUGCCAAG	220	1596-1618
AD-1755827	ACUGCACUAUUUA AACUAUU	86	1614-1634	AAUAGUUUAUAA UAGUGCAGUUC	221	1612-1634
AD-1755830	AUUAAAAUGAUAGA UUGUGGU	87	1632-1652	ACCACAAUCUAU CAUUUUAUAG	222	1630-1652
AD-1755845	UGUGGAGAAAGUAA UUAAUUCU	88	1647-1667	AGAAUAAUACU UUCUCCACAAU	223	1645-1667
AD-1755859	UUAUUCCAACACCC AUCUGCU	89	1661-1681	AGCAGAUGGGUG UUGGAAUAAUU	224	1659-1681
AD-1755923	AUCUGCCAUGCGAU GUUAAAU	90	1675-1695	AUUUAACAUCGC AUGGCAGAUGG	225	1673-1695
AD-1755943	AAUAACACAGCUAC UCCUCAU	91	1714-1734	AUGAGGAGUAGC UGUGUUAUUUU	226	1712-1734
AD-1756028	CAUGCGUAGAAUCA ACAACUU	92	1749-1769	AAGUUGUUGAUU CUACGCAUGGA	227	1747-1769
AD-1756044	AACUCCAGUCAUGG GACCAGU	93	1765-1785	ACUGGUCCCAUG ACUGGAGUUGU	228	1763-1785
AD-1756131	AGACACAUUCCUUG GAUGUUU	94	1802-1822	AAACAUCCAAGG AAUGUGUCUGC	229	1800-1822
AD-1756146	AUGAUCUAGUAAAG GAAUAGU	95	1832-1852	ACUAUUCUUUA CUAGAUCAUAA	230	1830-1852
AD-1756219	AAGUCUUUGAUGUC AGUGAAU	96	1855-1875	AUUCACUGACAU CAAAGACUUUA	231	1853-1875

10

20

30

40

50

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲
AD-1756236	GAAGUGGCAACAUA GCCAAAU	97	1872-1892	AUUUGGCUAUGU UGCCACUUCAC	232	1870-1892
AD-1756319	UUUAGGAAAUGAUG UUGUAAU	98	1905-1925	AUUACAACAUCU UUUCCUAAAAG	233	1903-1925
AD-1756335	GUAAGUCUCCUUA UGUAUCU	99	1921-1941	AGAUACAUAAG GAGACUUACAA	234	1919-1941
AD-1756354	CCUGAGGUAAGUUU CCUACUU	100	1940-1960	AAGUAGGAAACU UACCUCAGGAU	235	1938-1960
AD-1756429	CAGAUUUUGUAAGA AUUACUU	101	1965-1985	AAGUAAUUCUUA CAAAAUUCUGCU	236	1963-1985
AD-1756439	CAUUCUUUUUGUAU GGUCAUU	102	1996-2016	AAUGACCAUACA AAAAGAAUGAA	237	1994-2016
AD-1756514	UCCAACCAUUUUUA AUAGGAU	103	2021-2041	AUCCUAUUAAAA AUGGUUGGAGC	238	2019-2041
AD-1756533	AAAGUCUUUUUGUA AUUGUUU	104	2040-2060	AAACA AUUUA AAAGACUUUCC	239	2038-2060
AD-1756552	UGUCGUUUUAAUGU CAUUUCU	105	2059-2079	AGAAAUGACAUU AAAACGACAAC	240	2057-2079
AD-1756616	CAUUUCUGUCUUUA UAACUUU	106	2073-2093	AAAGUUAUAAAG ACAGAAAUGAC	241	2071-2093
AD-1756631	AACUUGAUAAGAA UGAUUGU	107	2088-2108	ACAAUCAUUCUU GAUCAAGUUAU	242	2086-2108
AD-1756653	AGGCAAACAGGUUU ACAAAUU	108	2110-2130	AAUUUGUAAACC UGUUUGCCUUC	243	2108-2130
AD-1756718	CAAAUCAAUUCUGU GACUUUU	109	2125-2145	AAAAGUCACAGA AUUGAUUUUGUA	244	2123-2145
AD-1756749	AAUGUUGUCAGAUU UAAACCU	110	2157-2177	AGGUUUAAAUCU GACAACAUUGU	245	2155-2177
AD-1756814	AAACCAGUGUGGCU AGUAAAAU	111	2172-2192	AUUUACUAGCCA CACUGGUUUAA	246	2170-2192
AD-1756834	AAGCAGCUCACUCA AUGUGGU	112	2192-2212	ACCACAUUGAGU GAGCUGCUUUU	247	2190-2212
AD-1756858	CUCCCUAUUCCUUU ACGCUCU	113	2216-2236	AGAGCGUAAAGG AAUAGGGAGCC	248	2214-2236
AD-1756915	GCCUUUCGAUUAUA AAAUACU	114	2256-2276	AGUAUUUUUAUA UCGAAAGGCUU	249	2254-2276
AD-1756932	ACCAAUCUUGUUAU AAGAUUU	115	2277-2297	AAAUCUUAUAAC AAGAUUGGUAG	250	2275-2297
AD-1756947	GAUUACUGUGGAGU AGUCAAU	116	2293-2313	AUUGACUACUCC ACAGUAAUCUU	251	2291-2313
AD-1757019	UGGUGGAAUAUUUU AUUUCAU	117	2335-2355	AUGAAAUAUUUU AUUCCACCAGC	252	2333-2355
AD-1757032	AUUUCAGACUGAAA ACAGAGU	118	2349-2369	ACUCUGUUUUCA GUCUGAAAUAU	253	2347-2369
AD-1757052	AGCACUCUCCUUGG GAAGGGU	119	2369-2389	ACCCUCCCAAG GAGAGUGCUCU	254	2367-2389
AD-1757124	GAGCUUGCUGAGUG AGAGAUU	120	2395-2415	AAUCUCUCACUC AGCAAGCUCCG	255	2393-2415
AD-1757146	AGCCUCAUGGUGUA CAACUGU	121	2417-2437	ACAGUUGUACAC CAUGAGGCUCC	256	2415-2437
AD-1757171	AGUUAACUCAUCAC UUCUCCU	122	2442-2462	AGGAGAAGUGAU GAGUUAACUAC	257	2440-2462
AD-1757191	CAAGCACUCGAUCC CAGCUUU	123	2462-2482	AAAGCUGGGAUC GAGUGCUUGGG	258	2460-2482

10

20

30

40

50

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲
AD-1757211	CACCCACUGGUGUU GCUUUUGU	124	2482-2502	ACAAAGCAACAC CAGUGGGUGAA	259	2480-2502
AD-1757225	GCUUUGCUUGAACU GUUCAAU	125	2496-2516	AUUGAACAGUUC AAGCAAAGCAA	260	2494-2516
AD-1757242	CAAGCCUUUUUAUAG CCUUACU	126	2513-2533	AGUAAGGCUAUA AAAGGCUUGAA	261	2511-2533
AD-1757258	UUACCAUAAGUAUU UAGAUAU	127	2529-2549	AUAUCUAAAUAC UUAUGGUAAGG	262	2527-2549
AD-1757274	GAUAUGGUGUCCUU UUCUGUU	128	2545-2565	AACAGAAAAGGA CACCAUAUCUA	263	2543-2565
AD-1757278	UGUUUUUUUAAAAGU AAGUGCU	129	2587-2607	AGCACUUACUUU AAAAAAACACA	264	2585-2607
AD-1757292	AAGUGCUUAAGUAU UAACUUU	130	2601-2621	AAAGUUAUUACU UAAGCACUUAC	265	2599-2621
AD-1757308	GCUUCUGUUUUUCUU AAACAUU	131	2666-2686	AAUGUUUAAGAA AACAGAAGCAA	266	2664-2686
AD-1757323	ACAUGUUUUUCCACU CCCACUU	132	2682-2702	AAGUGGGAGUGG AAAACAUGUUU	267	2680-2702
AD-1757337	CCCACUUGGGCAUU UUGGAAU	133	2696-2716	AUUCCAAAUAUGC CCAAGUGGGAG	268	2694-2716
AD-1757361	GUCAGCUAGCAGGU UUUCUGU	134	2720-2740	ACAGAAAACCGUG CUAGCUGACCA	269	2718-2740
AD-1757377	UCUGGGAUGUCGGG AGACCUU	135	2736-2756	AAGGUCUCCCGA CAUCCAGAAA	270	2734-2756
AD-1757391	AGACCUAGAUGACC UUAUCGU	136	2750-2770	ACGAUAAGGUCU UCUAGGUCUCC	271	2748-2770
AD-1757418	UACUAGCUAAGGUA AAGCUAU	137	2777-2797	AUAGCUUUACCU UAGCUAGUAUU	272	2775-2797
AD-1757434	GCUAGAAACCUACA CUGUCAU	138	2793-2813	AUGACAGUGUAG GUUUCUAGCUU	273	2791-2813
AD-1757449	UGUCACUUUACUGA GAUUUCU	139	2808-2828	AGAAAUCUCAGU AAAGUGACAGU	274	2806-2828
AD-1757464	AUUUCUGAGUAUAC UUUUCAU	140	2823-2843	AUGAAAAGUAUA CUCAGAAAUCU	275	2821-2843
AD-1757478	UUUUCAUAUUGCCU UAAUGUU	141	2837-2857	AACAUUAAGGCA AUAUGAAAAGU	276	2835-2857
AD-1757495	UGUAGCAGUAAUGU GUUUAAU	142	2854-2874	AAUAAACACAUU ACUGCUACAUU	277	2852-2874
AD-1757509	GUUUUAGCAUUUGU UUCUUUU	143	2868-2888	AAAAGAAACAAA UGCAUAAACAC	278	2866-2888
AD-1757532	CAGACAUUUUUGUCA AAUAUUU	144	2891-2911	AAUAUUUUGACA AAAUGUCUGUG	279	2889-2911
AD-1757544	UACUUUUUUUAUGGC ACAUAAU	145	2918-2938	AAUAUGUGCCAU AAAAAAGUAGA	280	2916-2938
AD-1757564	UAGCAUAUAAGCCU UUAUUCU	146	2938-2958	AGAAUUAAGGCU UAUAUGCUAUU	281	2936-2958
AD-1757583	CAAGAGGUAAUUAAU UUUUUCU	147	2958-2978	AGAAAAAUAAA UACCUCUUGGA	282	2956-2978
AD-1757603	CCACGUAAGAACU CUGUUAU	148	2999-3019	AUAACAGAGUUC UUUACGUGGAA	283	2997-3019
AD-1757617	CUGUUAUAUCCUAG AGGACUU	149	3013-3033	AAGUCCUCUAGG AUAUAACAGAG	284	3011-3033
AD-1757634	ACUCUGUCUUUUAAU AUUCGGU	150	3030-3050	ACCGAAUAUAAA AGACAGAGUCC	285	3028-3050

10

20

30

40

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	NM_013262 .4 における 範囲
AD-1757649	UUCGGGAUAAUAAA GACUUUU	151	3045-3065	AAAAGUCUUUAAU UAUCCCGAAUA	286	3043-3065

【表 4】

表 4. ヒト MYLIP dsRNA 剤の修飾されたセンスおよびアンチセンス鎖配列

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	mRNA 標的配列 5'~3'	配列 番号:
AD-1753226	csgscagaGfcUfGfCfa gccuucgauL96	287	asUfscgaAfgGfCfugc aGfcUfcugcgsgsa	422	UCCGCAGAGCUG CAGCCUUCGAG	557
AD-1753250	gsgsucceAfcCfAfGf ugacaaggcuL96	288	asGfscuUfgUfCfacu gGfuGfggaccscsa	423	UGGGUCCCACCA GUGACAAGGCG	558
AD-1753259	gscscgacAfcCfAfAfa gagaaggcuL96	289	asGfscuUfcUfCfuuu gGfuGfugcgsgsg	424	CCGCGCACACCA AAGAGAAGGCG	559
AD-1753324	gscscaugCfuGfUfGf uuauugugacuL96	290	asGfsucaCfaUfAfacac AfgCfaugcgcsusg	425	CAGCCAUGCUGU GUUAUGUGACG	560
AD-1753346	gscsggugCfuGfAfUf ggagguggauL96	291	asUfscacCfcUfCfauc AfgCfaccgcsusu	426	ACGCGGUGCUGA UGGAGGUGGAG	561
AD-1753413	gsusggagGfcGfAfAf agccaacggcuL96	292	asCfscguUfgGfCfuuu cGfcCfuccacscsu	427	AGGUGGAGGCGA AAGCCAACGCG	562
AD-1753439	csusgccuCfaAfcCfCfa ggugugcauL96	293	asUfsgcaCfaCfCfugg uUfgAfggcagsusc	428	GACUGCCUCAAC CAGGUGUGCAG	563
AD-1753456	gscsaggeCfaCfGfGf ggaucauauL96	294	asUfsaugAfuUfCfcca gUfcGfccugcsasc	429	GUGCAGGCGACU GGGAAUCAUAG	564
AD-1753520	asuscauaGfaAfgGfUf ugacuauuuuL96	295	asAfsaauAfgUfCfaac uUfcUfaugaususc	430	GAAUCAUAGAAG UUGACUAUUUU	565
AD-1753536	asusuuugGfaCfUfGf caguuuacguL96	296	asCfsguaAfaCfUfgca gUfcCfaaausag	431	CUAUUUUGGACU GCAGUUUACGG	566
AD-1753557	gsusagcaAfaAfcGfUf gaaaguuuuL96	297	asUfsaaaCfuUfUfcacc UfuUfgcuacscsc	432	GGGUAGCAAAGG UGAAAGUUUUAU	567
AD-1753624	ususauggCfuAfAfAf ccugagaaauL96	298	asUfsuucUfcAfGfguu uAfgCfcauasasc	433	GUUUUAUGGCUAA ACCUGAGAAAC	568
AD-1753651	uscscagCfaGfAfUfg gaugggcuuL96	299	asAfsgccCfaUfCfcauc UfgCfugggagsa	434	UCUCCCAGCAGA UGGAUGGGCUA	569
AD-1753661	asgsgcuuAfaAfcCfUf uagagucaauL96	300	asUfsugaCfuCfUfaag uUfuAfgccusgsu	435	ACAGGCUUAAAC UUAGAGUCAAG	570
AD-1753725	asgsucaGfuUfCfUf ucguggagcuL96	301	asGfscucCfaCfGfaaga AfcUfugacscsu	436	AGAGUCAAGUUC UUCGUGGAGCC	571
AD-1753744	cscscauCfuCfAfUfc uuacaggauL96	302	asUfscuGfuAfAfgau gAfgAfuaggscsu	437	AGCCUCAUCUCA UCUUACAGGAG	572
AD-1753813	asgscagaCfaAfcGfCf auaucuuuuL96	303	asAfsaagAfuAfUfgcc uAfgUfcugcuscsc	438	GGAGCAGACUAG GCAUAUCUUUU	573
AD-1753827	asuscuuUfuCfUfUf gcacaucauL96	304	asUfsugaUfgUfGfcaa gAfaAfaagausasu	439	AUAUCUUUUUCU UGCACAUCAAG	574
AD-1753844	csasaggaGfgCfCfCfu cuuggcaguL96	305	asCfsugcCfaAfGfagg gCfcUfccuugsasu	440	AUCAAGGAGGCC CUCUUGGCAGG	575
AD-1753860	gscsaggeCfaCfCfUfc uuguguuucuL96	306	asGfsaacAfcAfAfgag gUfgGfccugscsa	441	UGGCAGGCCACC UCUUGUGUUC	576
AD-1753917	csasggcaGfuGfGfAf acucagugcuL96	307	asGfscacUfgAfGfuuc cAfcUfgccugscsu	442	AGCAGGCAGUGG AACUCAGUGCC	577
AD-1753949	ascscagUfuUfGfGfa gacuacaauL96	308	asUfsuguAfgUfCfuuc aAfaCfuugguscsu	443	AGACCAAGUUUG GAGACUACAAC	578
AD-1754026	ascsgccAfaGfUfAf uaacuauL96	309	asUfscuAfgUfUfaua cUfuGfgcagugsu	444	ACACUGCCAAGU AUAACUAUGAG	579
AD-1754053	usgsugccAfaGfGfAf gcucuccucuL96	310	asGfsaggAfgAfGfcuc cUfuGfgcacasgsa	445	UCUGUGCCAAGG AGCUCUCCUCU	580
AD-1754117	csusccucUfgCfCfAfc cuugaacauL96	311	asUfsguuCfaAfGfgug gCfaGfaggagsag	446	CUCUCCUCUGCC ACCUUGAACAG	581
AD-1754133	asascagCfuUfGfUf ugcaaaacauL96	312	asUfsguuUfuGfCfaac aAfuGfcuguuscsa	447	UGAACAGCAUUG UUGCAAAACAU	582

10

20

30

40

50

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	mRNA 標的配列 5'~3'	配列 番号:
AD-1754147	asasaacaUfaAfGfGfa guuggagguL96	313	asCfscucCfaAfCfuccu UfaUfguuuugsgsc	448	GCAAAACAUAAG GAGUUGGAGGG	583
AD-1754162	csasgcugAfaUfAfCfc aaguuuuguL96	314	asCfsaaaAfcUfUfggu aUfuCfagcugsasa	449	UUCAGCUGAAUA CCAAGUUUUGC	584
AD-1754226	gsusuuugCfaGfAfUf ugugucggcuL96	315	asGfscgcAfcAfCfaau cUfgCfaaaacsusu	450	AAGUUUUGCAGA UUGUGUCGGCA	585
AD-1754240	gsusgcgcAfaUfGfGf aaaacuauuL96	316	asCfsauaGfuUfUfucc aUfuGfccgacsasc	451	GUGUCGGCAAUG GAAAACUAUGG	586
AD-1754255	csusauggCfaUfAfGf aauaggcauuL96	317	asAfsaugCfcAfUfucu aUfgCfcuaggsusu	452	AACUAUGGCAUA GAAUGGCAUUC	587
AD-1754327	gsusgcgcGfaUfAfGf cgaaggcgcuL96	318	asUfsgccCfuUfCfucu aUfcCfcgcacsasg	453	CUGUGCGGGAUA CGGAAGGGCAG	588
AD-1754342	gsusgcgcAfaAfCfUf gcuaauugguL96	319	asCfscuaUfgAfGfcag uUfuCfugcccsusu	454	AAGGGCAGAAAC UGCUCAUUGGG	589
AD-1754353	asasggaaUfcUfCfAfa uuuguuaauL96	320	asUfsuuaCfaAfAfuug aGfaUfuccuussca	455	UGAAGGAAUCUC AAUUUGUAAAG	590
AD-1754420	asasagauGfaCfUfUf agcccauuL96	321	asAfsuugGfgCfUfaaa gUfcAfucuuasasc	456	GUAAAGAUGACU UUAGCCCAAUU	591
AD-1754434	csescuuUfaUfUfAfG gauagcuuL96	322	asAfsagcUfaUfCfcua uUfaAfuugggscsu	457	AGCCCAUUUAU AGGAUAGCUUA	592
AD-1754450	gsesuuaUfcUfGfUf ggugcagauL96	323	asAfsucuGfcAfCfcac aGfgAfuagcsusa	458	UAGCUUAUCCUG UGGUGCAGAUG	593
AD-1754530	uscsaggaAfaGfAfAf uguauuuuuL96	324	asAfsaauAfuAfCfaau cUfuUfcugascsu	459	AGUCAGGAAAGA AUGUAUAUUUG	594
AD-1754550	gsasgcguCfaCfCfAfa ggaaucuguL96	325	asCfsagaUfuCfCfuug gUfgAfcgucsasa	460	UUGACGGUCACC AAGGAAUCUGG	595
AD-1754618	usgsaggaaCfaGfCfAf ucgugcucuL96	326	asAfsagcCfaCfGfaug cUfgUfuccasgsa	461	UCUGGGAACAGC AUCGUGCUCUU	596
AD-1754637	usuguuuAfaAfAfUf gaucagcacuL96	327	asGfsugcUfgAfUfcau uUfuAfaacaasgsa	462	UCUUGUUUAAAA UGAUCAGCACC	597
AD-1754661	uscsuaccGfaGfCfGfa uaacagaguL96	328	asCfsucuGfuUfAfucg cUfcGfguagsgsc	463	GCUCUACCGAGC GAUAACAGAGA	598
AD-1754735	ascsgcauUfcUfAfCfa ggugugacuL96	329	asGfsucaCfaCfCfugu aGfaAfuugcugsgsc	464	GCACGCAUUCUA CAGGUGUGACA	599
AD-1754749	usgsugacAfcAfGfUf gaccagccuL96	330	asGfscgcUfgGfUfcac uGfuGfucacascsc	465	GGUGUGACACAG UGACCAGCGCC	600
AD-1754818	csesgugaUfgAfUfGf caguauaguL96	331	asGfscuaUfaCfUfgca uCfaUfcagggscsg	466	CGCCGUGAUGAU GCAGUAUAGCC	601
AD-1754838	csugagcUfuGfAfAf gggcccacuuL96	332	asAfsaguGfgCfCfcuu cAfaGfucacgsgsc	467	GCCGUGACUUGA AGGGCCACUUG	602
AD-1754862	uscsucugUfuUfCfUf gaugaaaauL96	333	asUfsuuuCfaUfUfcag aAfaCfagagasusg	468	CAUCUCUGUUUC UGAAUGAAAC	603
AD-1754939	csusuggcAfaGfAfAf auaugcuuuL96	334	asAfsagaCfaUfAfuuu cUfuGfccagsgsu	469	ACCUUGGCAAGA AAUAUGUCUUU	604
AD-1755013	csasucaaAfgGfAfGf guguauagacuL96	335	asGfsucaUfaCfAfccu cCfuUfugaugsusu	470	AACAUCAAAGGA GGUGUAUGACC	605
AD-1755046	csuscuguAfcAfAfUf gcuggcguuL96	336	asAfsacgCfcAfGfcu uGfuAfcagagsgsc	471	GGCUCUGUACAA UGCUGGCGUUG	606
AD-1755120	ascscucgUfuUfCfAfa gaaacaacuL96	337	asGfsuugUfuUfCfuug aAfaCfagaggsgsc	472	GGACCUCGUUUC AAGAAACAACC	607
AD-1755141	asgsagccCfuUfCfAf acucgcuuL96	338	asAfsaggCfaGfUfgug aAfgGfgcucugsg	473	CCAGAGCCCUUC ACACUCGCCUC	608
AD-1755155	uscsccuCfuGfAfAf guccucagauL96	339	asUfscugAfgGfAfcuu cAfgAfgcgagsgsu	474	ACUCGCCUCUGA AGUCCUCAGAA	609
AD-1755219	csuscagaAfaGfCfAfg caugaacuuL96	340	asAfsguuCfaUfGfcug cUfuUfcugagsgsa	475	UCCUCAGAAAGC AGCAUGAACUG	610

10

20

30

40

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	mRNA 標的配列 5'~3'	配列 番号:
AD-1755326	csusgcagGfaGfAfAf gcuaacgcauL96	341	asUfsugcGfuAfGfcuu cUfcCfugcagcsa	476	UGCUGCAGGAGA AGCUACGCAAG	611
AD-1755340	ascsagcaaGfcUfGfAfa ggaagccauL96	342	asUfsggcUfuCfCfuuc aGfcUfugcgusag	477	CUACGCAAGCUG AAGGAAGCCAU	612
AD-1755358	csasugcuGfuGfCfAf uggugugcuL96	343	asAfsagcaCfaCfCfaugc AfcAfgcaugsgsc	478	GCCAUGCUGUGC AUGGUGUGCUG	613
AD-1755435	gsagsagauCfaAfCfUfc caccuucuuL96	344	asAfsagaaGfgUfGfgag uUfgAfucuccsusc	479	GAGGAGAUCAAC UCCACCUUCUG	614
AD-1755451	ususcuguCfcCfUfGf uggccacacuL96	345	asGfsuguGfgCfCfaca gGfgAfcagaasgsg	480	CCUUCUGUCCCU GUGGCCACACU	615
AD-1755515	csesacacUfgUfGfUfg cugugagauL96	346	asUfscucAfcAfGfcac aCfaGfugggscsc	481	GGCCACACUGUG UGCUGUGAGAG	616
AD-1755539	csescagcUfaCfAfGfu caugncccuL96	347	asGfsggaCfaUfGfacu gUfaGfcugggscsg	482	CGCCAGCUACA GUCAUGUCCCG	617
AD-1755554	gsuscccgUfcUfGfCfa ggucgcguuL96	348	asAfsagcGfaCfCfugc aGfaCfuggacsasu	483	AUGUCCCGUCUG CAGGUCGCGUG	618
AD-1755621	csugsugGfaGfCfAf uguccagcauL96	349	asUfsgcuGfgAfCfaugc cUfcCfacacgscsg	484	CGCGUGUGGAGC AUGUCCAGCAC	619
AD-1755636	csasgcacGfuCfUfAf cugccaacuL96	350	asGfsuugGfcAfGfaaa gAfcGfugcugsgsa	485	UCCAGCACGUCU AUCUGCCAACG	620
AD-1755650	gsescaacGfcAfCfAfc cagucuuuL96	351	asGfsaagAfcUfGfgug uGfcGfuuggcsasg	486	CUGCCAACGCAC ACAGUCUUCU	621
AD-1755714	gsuseuucUfcAfAfUf cugacugauL96	352	asUfsacaGfuCfAfgau uGfaGfaagacsug	487	CAGUCUUCUCAA UCUGACUGUAA	622
AD-1755734	asuscuuaUfcUfGfUf ugugcuuuuL96	353	asAfsaaaGfcAfCfaaca GfaUfuagausus	488	UAAUCUAAUCUG UUGUGCUUUUG	623
AD-1755747	gsesuuiuGfuUfGfGf acuuggcauuL96	354	asAfsugcCfaAfGfucc aAfcAfaaacsasc	489	GUGCUUUUGUUG GACUUGGCAUG	624
AD-1755761	usgsgcauGfuUfUfCf caugaacuguL96	355	asCfsaguUfcAfUfaga aAfcAfuagccasag	490	CUUGGCAUGUUU CCAUGAACUGC	625
AD-1755827	ascsugcaCfuAfUfUfa uaaacaauuL96	356	asAfsuagUfuUfAfuaa uAfgUfagcagusc	491	GAACUGCACUAU UAUAAACUAUU	626
AD-1755830	asusuaaaAfuGfAfUf agauuggguL96	357	asCfscacAfaUfCfuau AfuUfuuaasag	492	CUAUUAAAAUGA UAGAUUGUGGA	627
AD-1755845	usgsuggaGfaAfAfGf uaauuaauuL96	358	asGfsaauAfaUfUfacu uUfcUfccacasasu	493	AUUGUGGAGAAA GUAAUUAUCC	628
AD-1755859	ususaauCfaAfCfAfc ccaucugcuL96	359	asGfscagAfuGfGfgug uUfgGfaauaasusu	494	AAUUAUCCAAC ACCAUCUGCC	629
AD-1755923	asuscugcCfaUfGfCf auguuuuuL96	360	asUfsuuaAfcAfUfagc aUfgGfcagausgsg	495	CCAUCUGCCAUG CGAUGUUAAAA	630
AD-1755943	asasaacAfcAfGfCfu acuccucauL96	361	asUfsgagGfaGfUfagc uGfuGfuuaususu	496	AAAAUAAACACAG CUACUCCUCAC	631
AD-1756028	csasugcgUfaGfAfAf ucaacaacuL96	362	asAfsuguGfuUfGfaaa cUfaCfcaugsgsa	497	UCCAUGCUGAGA AUCAACAACUC	632
AD-1756044	asascuccAfgUfCfAf gggaccaguL96	363	asCfsuggUfcCfCfaug aCfuGfgaguusgsu	498	ACAACUCCAGUC AUGGGACCAAG	633
AD-1756131	asgsacacAfuUfCfCfu uggauguuuL96	364	asAfsacaUfcCfAfaag aAfuGfugucsgsc	499	GCAGACACAUUC CUUGGAUGUUG	634
AD-1756146	asusgaucUfaGfUfAf aaggaauguL96	365	asCfsuanUfcCfUfuaa cUfaGfaucausasa	500	UUAUGAUCUAGU AAAGGAAUAGG	635
AD-1756219	asasgucuUfuGfAfUf gucagugauL96	366	asUfsucaCfuGfAfcau cAfaAfgacuususa	501	UAAAGUCUUUGA UGUCAGUGAAG	636
AD-1756236	gsasagugGfcAfAfCf auagccaaauL96	367	asUfsuugGfcUfAfugu uGfcCfacuacsasc	502	GUGAAGUGGCAA CAUAGCCAAAA	637
AD-1756319	ususuaggAfaAfUfGf auguugaaauL96	368	asUfsuacAfaCfAfuca uUfuCfuaaasag	503	CUUUUAGGAAAU GAUGUUGUAG	638

10

20

30

40

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	mRNA 標的配列 5'~3'	配列 番号:
AD-1756335	gsusaaguCfuCfCfUf uaauaguaauL96	369	asGfsauaCfaUfUfaag gAfgAfcuuacsasa	504	UUGUAAGUCUCC UUA AUGUAUCC	639
AD-1756354	cscsugagGfuAfAfGf uuuccuacuuL96	370	asAfsguaGfgAfAfacu uAfcCfucaggsasu	505	AUCCUGAGGUAA GUUUCCUACUG	640
AD-1756429	csasgauuUfuGfUfAf agaauuacuuL96	371	asAfsguaAfUfCfuua cAfaAfaucugsesu	506	AGCAGAUUUUGU AAGAAUUAUUU	641
AD-1756439	csasuucUfuUfUfGf uauggucauuL96	372	asAfsugaCfcAfUfaca aAfaAfgaugsasa	507	UUCAUUCUUUUU GUAUGGUCAUG	642
AD-1756514	uscscaacCfaUfUfUf uaauaggauL96	373	asUfscuUfuUfAfaaa aUfgGfuuggasgsc	508	GUCCCAACCAUU UUUAAUAGGAA	643
AD-1756533	asasagucUfuUfUfGf uaauuauuL96	374	asAfsacaAfUfUfaca aAfaGfauuuscsc	509	GGAAAGUCUUUU GUAAAUGUUG	644
AD-1756552	usgsucguUfuUfAfAf ugucauuuuL96	375	asGfsaaaUfgAfCfaau aAfaAfcgacasasc	510	GUUGUCGUUUUA AUGUCAUUUCU	645
AD-1756616	csasuucUfgUfCfUf uuauaacuuL96	376	asAfsaguUfaUfAfaag aCfaGfaaugsasc	511	GUCAUUCUGUC UUUAUAACUUG	646
AD-1756631	asascuugAfUfCfAfAf gaugauuguL96	377	asCfsaauCfaUfUfcuu gAfuCfaaguusasu	512	AUAACUUGAUCA AGAAUGAUUGG	647
AD-1756653	asgsucaAfcAfGfGf uuuacaaauL96	378	asAfsuuUgfuAfAfacc uGfuUfugccususc	513	GAAGGCCAAACAG GUUUACAAAUU	648
AD-1756718	csasaucAfUfUfCfUf gugacuuuL96	379	asAfsaagUfcAfCfaga aUfuGfauuugsasa	514	UACAAAUCAAUU CUGAGACUUUU	649
AD-1756749	asasuguUgfuCfAfGf auuuuacuuL96	380	asGfsguuUfaAfAfuc gAfcAfacaugsasu	515	ACAAUGUUGUCA GAUUUAAACCA	650
AD-1756814	asasaccaGfuGfUfGf cuaguuauL96	381	asUfsuuaCfuAfGfcca cAfcUfgguuasasa	516	UUAAACCAGUGU GGCUAGUAAAA	651
AD-1756834	asasgcagCfuCfAfCf caugugguL96	382	asCfscacAfUfUfgagu gAfgCfugcuususu	517	AAAAGCAGCUCA CUCAAUGUGGG	652
AD-1756858	csusccuUfuUfCfCfUf uuacgcucuL96	383	asGfsageGfuAfAfagg aAfuAfgggagsgsc	518	GGCUCUUAUUC CUUUACGCUCU	653
AD-1756915	gsccsuuUfgAfUfUf auaaaauacL96	384	asGfsuauUfuUfAfuaa uCfgAfaagcsusu	519	AAGCCUUCGAU UAUAAAAUACU	654
AD-1756932	ascscuuUfuUfGfUf auaagauuL96	385	asAfsaucUfuAfUfaac aAfgAfuuggusag	520	CUACCAUCUUG UUUAUAGAUAU	655
AD-1756947	gsasuuaUfgUfGfGf aguagucuuL96	386	asUfsugaCfuAfCfuac aCfaGfuauucsusu	521	AAGAUAUCUGUG GAGUAGUCAAG	656
AD-1757019	usgsuggAfUfAfUfUf uuuuuuuacL96	387	asUfsgaaAfUfAfafau aUfuCfcaccasgsc	522	GCUGGUGGAAUA UUUUUUUUCAG	657
AD-1757032	asusuuaGfCfUfGfA aaacagaguL96	388	asCfsucuGfuUfUfaca gUfcUfgaausasa	523	UUUUUUCAGACU GAAAACAGAGA	658
AD-1757052	asgscacuCfuCfCfUf gggaaggguL96	389	asCfscuUfcCfCfaagg AfgAfgucuscusu	524	AGAGCACUCUCC UUGGGAAGGGA	659
AD-1757124	gsasguUgfuUfGfAf gugagaguuL96	390	asAfsucuCfuCfAfcuc aGfcAfagcuscsc	525	CGGAGCUUGCUG AGUGAGAGAUG	660
AD-1757146	asgscucAfUfGfUfUf guacaacuuL96	391	asCfsaguUfgUfAfcac cAfuGfagcuscsc	526	GGAGCCUCAUGG UGUACAACUGA	661
AD-1757171	asgsuuuAfcCfAfUfCf acuucuccuL96	392	asGfsgagAfaGfUfgau gAfgUfuaacusasc	527	GUAGUUAACUCA UCACUUCUCCC	662
AD-1757191	csasagcaCfuCfGfAf cccagcuuL96	393	asAfsageUfgGfGfauc gAfgUfgcuugsgsg	528	CCCAAGCACUCG AUCCAGCUUC	663
AD-1757211	csasccaCfuGfGfUfGf uugcuuuguL96	394	asCfsaaaGfcAfAfcacc AfgUfgggugsasa	529	UUCACCCACUGG UGUUGCUUUGC	664
AD-1757225	gsccsuuUgfuUfGfAf acuguuacuuL96	395	asUfsugaAfcAfGfuuc aAfgCfaaagcsasa	530	UUGCUUUGCUUG AACUGUUAAG	665
AD-1757242	csasagccUfuUfUfAf uagccuuacL96	396	asGfsuuaGfgCfUfaaa aAfaGfgcuugsasa	531	UUCAAGCCUUUU AUAGCCUUAAC	666

10

20

30

40

50

二重鎖 ID	センス配列 5'~3'	配列 番号:	アンチセンス配列 5'~3'	配列 番号:	mRNA 標的配列 5'~3'	配列 番号:
AD-1757258	ususaccaUfaAfGfUfa uuuagauauL96	397	asUfsaucUfaAfAfuac uUfaUfgguasgsg	532	CCUUACCAUAAG UAUUUAGAUAU	667
AD-1757274	gsasuauGfuGfUfCf cuuuucuguL96	398	asAfsacgAfaAfAfgga cAfcCfauaucsusa	533	UAGAUUAGGUGU CCUUUUCUGUU	668
AD-1757278	usgsuuuuUfuUfAfAf aguaagugcuL96	399	asGfscacUfuAfCfuuu aAfaAfaaacascsa	534	UGUGUUUUUUUA AAGUAAGUGCU	669
AD-1757292	asasgugcUfuAfAfGf uaauaacuuuL96	400	asAfsaguUfaAfUfacu uAfaGfcacuuasasc	535	GUAAGUGCUUAA GUAUUAACUUU	670
AD-1757308	gsesuucuGfuUfUfUf cuuaaacauL96	401	asAfsuguUfuAfAfgaa aAfcAfgaagsasa	536	UUGCUUCUGUUU UCUAAAACAUG	671
AD-1757323	ascsauguUfuUfCfCf cuccacuuL96	402	asAfsugGfgAfGfugg aAfaAfaugusus	537	AAACAUGUUUUC CACUCCACUU	672
AD-1757337	cscscacuUfgGfCfCf uuuuggaauL96	403	asUfsuccAfaAfAfgc cCfaAfguggsasg	538	CUCCACUUGGG CAUUUUGGAAG	673
AD-1757361	gsuscagcUfaGfCfAf gguuuucuguL96	404	asCfsagaAfaAfCfcug cUfaGfcugacscsa	539	UGGUCAGCUAGC AGGUUUUCUGG	674
AD-1757377	uscsugggAfuGfUfCf gggagaccuuL96	405	asAfsuggCfuCfCfcga cAfuCfccagasasa	540	UUUCUGGGAUGU CGGGAGACCUA	675
AD-1757391	asgsaccuAfgAfUfGf accuuaucgL96	406	asCfsgauAfaGfGfuca uCfuAfggucuscsc	541	GGAGACCUAGAU GACCUUAUCGG	676
AD-1757418	usascuagCfuUfAfGf guaaagcuauL96	407	asUfsagcUfuUfAfcu uAfgCfuaguasusu	542	AAUACUAGCUAA GUAAAAGCUAG	677
AD-1757434	gsesuagaAfaCfCfUfa cacugucauL96	408	asUfsgacAfgUfGfuag gUfuUfcuagcsusu	543	AAGCUAGAAACC UACACUGUCAC	678
AD-1757449	usgsucacUfuUfAfCf ugagauuucuL96	409	asGfsaaaUfcUfCfagu aAfaGfugacagsu	544	ACUGUCACUUUA CUGAGAUUUCU	679
AD-1757464	asusuucuGfaGfUfAf uacuuuucuuL96	410	asUfsgaaAfaGfUfaa cUfcAfgaauscsc	545	AGAUUUCUGAGU AUACUUUUCAU	680
AD-1757478	ususuucaUfaUfUfGf ccuuaauguuL96	411	asAfscauUfaAfGfgca aUfaUfgaaaaasgsu	546	ACUUUUCAUAUU GCCUUAAUGUA	681
AD-1757495	usgsuagcAfgUfAfAf uguguuuuuL96	412	asAfsuaaAfcAfCfaau aCfuGfcuacassu	547	AAUGUAGCAGUA AUGUGUUUAUG	682
AD-1757509	gsusuauGfcAfUfUf uguuuucuuuL96	413	asAfsaagAfaAfCfaaa uGfcAfuaaacsasc	548	GUGUUUAUGCAU UUGUUUCUUUG	683
AD-1757532	csasgacaUfuUfUfGf ucaaaauuuL96	414	asAfsauaUfuUfGfaca aAfaUfgucugsusg	549	CACAGACAUUUU GUCAAUAUUA	684
AD-1757544	usascuuUfuUfAfUf ggcacauuuL96	415	asAfsuauGfuGfCfcu aAfaAfaaguasgsa	550	UCUACUUUUUUA UGGCACAUUU	685
AD-1757564	usasgcAuAfuAfAfGf ccuuuauucuL96	416	asGfsaauAfaAfGfgcu uAfuAfgcuasasu	551	AUUAGCAUAUAA GCCUUUAUUC	686
AD-1757583	csasagagGfuAfUfUf uaauuuuuuL96	417	asGfsaaaAfaAfUfaaa uAfcCfucugsgsa	552	UCCAAGAGGUAAU UUAUUUUUUA	687
AD-1757603	cscsacguAfaAfGfAfa cucuguuuL96	418	asUfsaacAfgAfGfuuc uUfuAfcguggsasa	553	UCCACGUAAAG AACUCUGUUAU	688
AD-1757617	csusguuaUfaUfCfCf uagaggacuuL96	419	asAfsugcCfuCfUfagg aUfaUfaacagsasg	554	CUCUGUUAUAUC CUAGAGGACUC	689
AD-1757634	ascsucugUfcUfUfUf uaauuucggL96	420	asCfscgaAfuAfUfaaa aGfaCfagaguscsc	555	GGACUCUGUCUU UUAUAUUCGGG	690
AD-1757649	ususcgggAfuAfAfUf aaagacuuuL96	421	asAfsaagUfcUfUfuau uAfuCfccgaasusa	556	UAUUCGGGAUAA UAAAGACUUUA	691

10

20

30

40

【実施例 2】

【0863】

インビトロ (In vitro) スクリーニング法

細胞培養およびトランスフェクション

Hepa1-6 マウス肝細胞 (ATCC) に、各 siRNA 二重鎖について 4 連で、Opti-MEM で希釈した 1 ng / μ L の各 siRNA 二重鎖 5 μ L、100 ng の V181 ヒト MYLIP レポーターコンストラクト、および 0.5 μ L のリポフェクタミン 2000 を 96 ウェルプレートの個々のウェルに添加することによってトランスフェクトした。混合物を室温で 15 分間インキュベートした。その後、各ウェルの siRNA 混合物に

50

、約 2×10^4 個の Hepa 1-6 細胞を含む抗生物質無添加の完全増殖培地 $100 \mu\text{L}$ を添加した。細胞を 24 時間インキュベートした後、ホタル（トランスフェクション対照）およびレニラ（Renilla）（標的配列に融合）のルシフェラーゼを測定した。単回用量実験を 10 nM の最終二重鎖濃度で実施した。非標的化 siRNA（AHSA1）を陰性対照として用い、RLuc 指向性 siRNA を陽性対照として用いた。

【0864】

Hep G2 細胞（ATCC、Manassas、VA）は、トリプシン処理によってプレートから放出する前に、 10% FBS（ATCC）が補給されたイーグル最小必須培地（Gibco）中、 5% CO_2 雰囲気中、 37°C でコンフルエンス付近まで成長させる。トランスフェクションは、各 siRNA 二重鎖について 4 連で、ウェルあたり $14.8 \mu\text{L}$ の Opti-MEM + $0.2 \mu\text{L}$ のリポフェクタミン RNAiMax（Invitrogen、カリフォルニア州 Carlsbad、カタログ番号 13778-150）を、 $5 \mu\text{L}$ の各 siRNA 二重鎖に、96 ウェルプレートの個々のウェルに加えて実施した。この混合物を室温で 15 分間インキュベートする。その後、約 2×10^4 個の Hep G2 細胞を含む抗生物質無添加の完全増殖培地 $80 \mu\text{L}$ を siRNA 混合物に添加する。RNA の精製の前に細胞を 24 時間インキュベートする。単回用量実験は、最終二重鎖濃度 10 nM および 0.1 nM で行った。

【0865】

Cos-7（ATCC）に、各 siRNA 二重鎖について 4 連で、1 ウェルあたり Opti-MEM で希釈した $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の $5 \mu\text{L}$ の MYLIP psiCHECK2 ベクター（Blue Heron Biotechnology）、 $4.9 \mu\text{L}$ の Opti-MEM + $0.1 \mu\text{L}$ のリポフェクタミン 2000（Invitrogen、カリフォルニア州 Carlsbad、カタログ番号 11668-019）を、1 ウェルあたり $5 \mu\text{L}$ の siRNA 二重鎖に、384 ウェルプレート中に添加することによってトランスフェクトし、室温で 15 分間インキュベートする。その後、約 5×10^3 個の細胞を含むダルベッコ変法イーグル培地（ThermoFisher） $35 \mu\text{L}$ を siRNA 混合物に添加する。細胞を 48 時間インキュベートした後、ホタル（トランスフェクション対照）およびレニラ（標的配列に融合）のルシフェラーゼを測定する。単回用量実験は 50 nM 、 10 nM 、 1 nM 、および 0.1 nM で行う。

【0866】

初代ヒト肝細胞（BioIVT）に、各 siRNA 二重鎖について 4 連で、1 ウェルあたり $4.9 \mu\text{L}$ の Opti-MEM + $0.1 \mu\text{L}$ のリポフェクタミン RNAiMAX（Invitrogen、カリフォルニア州 Carlsbad カタログ番号 13778-150）を、1 ウェルあたり $5 \mu\text{L}$ の siRNA 二重鎖に、384 ウェルプレート中に添加することによってトランスフェクトし、室温で 15 分間インキュベートする。その後、約 1.5×10^3 個の細胞を含む In Vitro GRO CP プレーティング培地（BioIVT） $35 \mu\text{L}$ を siRNA 混合物に添加する。細胞は RNA 精製の前に 48 時間インキュベートされる。単回用量実験は 50 nM で行う。

【0867】

初代カニクイザル肝細胞（BioIVT）に、各 siRNA 二重鎖について 4 連で、1 ウェルあたり $4.9 \mu\text{L}$ の Opti-MEM + $0.1 \mu\text{L}$ の RNAiMAX（Invitrogen、カリフォルニア州 Carlsbad カタログ番号 13778-150）を、1 ウェルあたり $5 \mu\text{L}$ の siRNA 二重鎖に、384 ウェルプレート中に添加することによってトランスフェクトし、室温で 15 分間インキュベートする。その後、約 5×10^3 個の細胞を含む In Vitro GRO CP プレーティング培地（BioIVT） $35 \mu\text{L}$ を siRNA 混合物に添加する。細胞は RNA 精製の前に 48 時間インキュベートされる。単回用量実験は 50 nM で行う。

【0868】

DYNABEADS mRNA 単離キットを使用する全 RNA 単離

DYNABEAD（INVITROGEN（商標）、カタログ番号 610-12）を使

10

20

30

40

50

用するBioTek-EL406プラットフォームで自動化プロトコルを使用してRNAを単離する。手短には、細胞を有するプレートに、70 μ Lの溶解／結合バッファーおよび3 μ Lの磁性ビーズを含有する10 μ Lの溶解バッファーを添加する。プレートを、電磁シェーカー上で室温で10分間インキュベートし、次いで、磁性ビーズを捕捉し、上清を除去する。次いで、ビーズが結合しているRNAを、150 μ Lの洗浄バッファーAを用いて2回および洗浄バッファーBを用いて1回洗浄する。次いで、150 μ Lの溶出バッファーを用いてビーズを洗浄し、再捕捉し、上清を除去する。

【0869】

ABI大容量cDNA逆転写キット（Applied Biosystems、カリフォルニア州、フォスターシティ、カタログ番号4368813）を使用するcDNA合成

上記で単離されたRNAに、反応あたり1 μ Lの10×バッファー、0.4 μ Lの25× dNTP、1 μ Lの10×ランダムプライマー、0.5 μ Lの逆転写酵素、0.5 μ LのRNアーゼ阻害剤および6.6 μ LのH₂Oを含有する10 μ Lのマスターミックスを添加する。プレートを密閉し、混合し、電磁シェーカー上で室温において10分インキュベートした後、37℃で2hインキュベートする。

【0870】

リアルタイムPCR

2 μ LのcDNAおよび5 μ LのLightcycler 480プローブマスターミックス（Roche、カタログ番号04887301001）を、384ウェルプレート（Roche、カタログ番号048887301001）において、ウェルあたり0.5 μ LのヒトGAPDH TaqManプローブ（4326317E）および0.5 μ LのMYLIPヒトプローブ、または0.5 μ LのCyno GAPDHプローブおよび0.5 μ LのMYLIP Cynoプローブに添加する。LightCycler 480リアルタイムPCRシステム（Roche）においてリアルタイムPCRを行う。各二重鎖を少なくとも2回試験し、非標的化対照siRNAをトランスフェクトされた細胞に対してデータを正規化する。相対変化倍数を算出するために、 $\Delta\Delta C_t$ 法を使用してリアルタイムデータを分析し、非標的化対照siRNAでトランスフェクトされた細胞を用いて実施されたアッセイに対して正規化する。

【0871】

結果

例示的なヒトMYLIP siRNAを用いたHepa1-6細胞における単回用量スクリーニングの結果を表5に示す。実験は最終二重鎖濃度10 nMで行い、データは非標的化対照に対する、残留するMYLIP mRNAの百分率で表す。

【0872】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. Hepa1-6 細胞における 10nM 用量のヒト MYLIP siRNA のインビトロスクリーニング

二重鎖	平均 mRNA 残留%	SD
AD-1757649.1	52.104	0.910
AD-1757634.1	39.976	1.147
AD-1757617.1	34.395	1.825
AD-1757603.1	24.722	0.720
AD-1757583.1	27.647	0.805
AD-1757564.1	25.427	1.226
AD-1757544.1	34.965	1.176
AD-1757532.1	23.649	1.500
AD-1757509.1	23.764	0.604
AD-1757495.1	29.279	0.852
AD-1757478.1	39.059	1.235
AD-1757464.1	16.636	0.777
AD-1757449.1	23.883	1.003
AD-1757434.1	34.700	1.515
AD-1757418.1	73.168	3.130
AD-1757391.1	46.481	1.760
AD-1757377.1	74.027	3.387
AD-1757361.1	44.387	3.389
AD-1757337.1	39.250	1.593
AD-1757323.1	34.050	1.952
AD-1757308.1	22.568	0.719
AD-1757292.1	19.320	0.314
AD-1757278.1	25.084	0.933
AD-1757274.1	18.034	0.473
AD-1757258.1	27.747	1.429
AD-1757242.1	21.651	0.609
AD-1757225.1	22.361	1.210
AD-1757211.1	41.575	2.475
AD-1757191.1	48.361	3.706
AD-1757171.1	24.192	0.913
AD-1757146.1	34.967	2.735
AD-1757124.1	40.246	1.447
AD-1757052.1	56.244	3.699
AD-1757032.1	28.747	0.752
AD-1757019.1	31.013	1.069
AD-1756947.1	28.204	0.931
AD-1756932.1	52.050	1.049
AD-1756915.1	37.857	0.829
AD-1756858.1	42.123	1.017
AD-1756834.1	60.554	0.994
AD-1756814.1	79.642	2.025
AD-1756749.1	20.269	1.579
AD-1756718.1	15.625	0.769
AD-1756653.1	23.512	1.835
AD-1756631.1	21.959	0.395
AD-1756616.1	19.613	1.137
AD-1756552.1	18.571	0.851
AD-1756533.1	25.136	0.751
AD-1756514.1	40.678	1.023
AD-1756439.1	30.394	0.860
AD-1756429.1	19.505	0.619
AD-1756354.1	21.946	1.846

10

20

30

40

50

AD-1756335.1	23.884	1.170
AD-1756319.1	17.077	0.204
AD-1756236.1	39.098	2.368
AD-1756219.1	21.469	0.669
AD-1756146.1	27.219	1.246
AD-1756131.1	35.853	1.568
AD-1756044.1	52.385	3.619
AD-1756028.1	44.510	0.496
AD-1755943.1	37.121	1.498
AD-1755923.1	37.363	2.622
AD-1755859.1	32.517	1.270
AD-1755845.1	38.449	1.591
AD-1755830.1	32.167	1.706
AD-1755827.1	31.861	1.262
AD-1755761.1	28.904	0.568
AD-1755747.1	24.040	1.533
AD-1755734.1	31.915	1.164
AD-1755714.1	29.293	1.411
AD-1755650.1	32.144	1.529
AD-1755636.1	48.228	4.269
AD-1755621.1	71.118	5.937
AD-1755554.1	56.673	3.817
AD-1755539.1	32.962	1.068
AD-1755515.1	64.254	5.145
AD-1755451.1	75.935	5.466
AD-1755435.1	48.834	4.430
AD-1755358.1	53.884	3.972
AD-1755340.1	49.024	1.157
AD-1755326.1	43.448	1.982
AD-1755219.1	47.169	2.185
AD-1755155.1	39.297	3.330
AD-1755141.1	69.755	4.046
AD-1755120.1	50.051	2.401
AD-1755046.1	49.263	3.721
AD-1755013.1	33.607	2.425
AD-1754939.1	21.621	0.692
AD-1754862.1	21.002	0.802
AD-1754838.1	56.338	3.704
AD-1754818.1	49.249	2.757
AD-1754749.1	71.497	7.505
AD-1754735.1	46.992	4.426
AD-1754661.1	44.846	3.491
AD-1754637.1	27.607	2.881
AD-1754618.1	34.031	2.789
AD-1754550.1	30.910	1.422
AD-1754530.1	14.934	0.528
AD-1754450.1	44.473	2.999
AD-1754434.1	29.784	1.224
AD-1754420.1	20.440	1.778
AD-1754353.1	17.530	0.649
AD-1754342.1	58.792	4.442
AD-1754327.1	45.471	4.225
AD-1754255.1	20.543	0.245
AD-1754240.1	29.049	2.109
AD-1754226.1	17.773	1.105
AD-1754162.1	24.783	1.212
AD-1754147.1	59.563	5.804

10

20

30

40

50

AD-1754133.1	21.515	0.968
AD-1754117.1	34.419	1.972
AD-1754053.1	55.758	4.709
AD-1754026.1	22.914	1.638
AD-1753949.1	44.864	4.571
AD-1753917.1	53.328	5.680
AD-1753860.1	43.053	3.423
AD-1753844.1	74.227	3.247
AD-1753827.1	22.439	0.685
AD-1753813.1	20.905	1.330
AD-1753744.1	32.949	1.813
AD-1753725.1	39.661	1.592
AD-1753661.1	16.036	0.770
AD-1753651.1	52.358	5.006
AD-1753624.1	14.586	1.165
AD-1753557.1	25.093	2.941
AD-1753536.1	14.876	0.530
AD-1753520.1	14.047	1.221
AD-1753456.1	37.903	2.885
AD-1753439.1	43.143	1.697
AD-1753413.1	89.871	4.490
AD-1753346.1	63.260	2.730
AD-1753324.1	25.297	1.040
AD-1753259.1	67.305	4.141
AD-1753250.1	86.971	5.277
AD-1753226.1	97.751	4.370
陽性対照	1.095	0.127

10

20

30

40

50

【 0 8 7 3 】

N M _ 0 1 3 2 6 2 . 4 のヌクレオチド 3 4 1 ~ 4 1 7 は、A D - 1 7 5 3 6 2 4、A D - 1 7 5 3 5 5 7、A D - 1 7 5 3 5 3 6、および A D - 1 7 5 3 5 2 0 が標的化するホットスポット領域を含むことが明示的に想到されている。

【 0 8 7 4 】

M Y L I P 配列

SEQ ID NO: 1

>NM_013262.4 Homo sapiens myosin regulatory light chain interacting protein (MYLIP), mRNA (3,072 nucleotides)

AGTTGGGCTGCTGGAGTGC GGCGCCACCGCGGAGGACAGGGGCAGCTGGCGGGCAGCGGGTGAGGGGGTGGCGGGGAC
GCGAGTGGCGGGCCGCGGGGCCCCGGACAAGGGTCCGCAGAGCTGCAGCCTTCGAGGGCCAGCCCTCTCCGAGTCCGGG
GCTGGGTCCCACCAGTGACAAGGCGGCAGCCCCGCGCACACCAAAGAGAAGGCGGCTGTGGCGGCAGCGGCAGCCCCA
GCCATGCTGTGTTATGTGACGAGGCGGACGCGGTGCTGATGGAGGTGGAGGTGGAGGCCAAAGCCAACGGCGAGGAC
TGCCTCAACCAGGTGTGCAGGCGACTGGGAATCATAGAAGTTGACTATTTTGGACTGCAGTTTACGGGTAGCAAAGGT
GAAAGTTTATGGCTAAACCTGAGAAACCGGATCTCCAGCAGATGGATGGGCTAGCCCCCTTACAGGCTTAAACTTAGA
GTCAAGTTCTTCGTGGAGCCTCATCTCATCTTACAGGAGCAGACTAGGCATATCTTTTCTTGACATCAAGGAGGCC
CTCTTGGCAGGCCACCTCTTGTGTTCCCCAGAGCAGGCAGTGGAAGTCAAGTGCCTCCTGGCCCAGACCAGTTTGGA
GACTACAACCAGAACACTGCCAAGTATAACTATGAGGAGCTCTGTGCCAAGGAGCTCTCCTCTGCCACCTTGAACAGC
ATTGTTGCAAAACATAAGGAGTTGGAGGGGACCAGCCAGGCTTCAGCTGAATACCAAGTTTTCAGATTGTGTGGCA
ATGGAAAACATATGGCATAGAATGGCATTCTGTGCGGGATAGCGAAGGGCAGAACTGCTCATTGGGGTTGGACCTGAA
GGAATCTCAATTTGTAAAGATGACTTTAGCCCCAATTAATAGGATAGCTTATCCTGTGGTGCAGATGGCCACCCAGTCA
GGAAAGAATGTATATTTGACGGTCACCAAGGAATCTGGGAACAGCATCGTGCTCTTGTTTAAATGATCAGCACCAGG
GCGGCCAGCGGGCTCTACCGAGCGATAACAGAGACGCGCAGCATTCTACAGGTGTGACACAGTGACCAGCGCCGTGATG
ATGCAGTATAGCCGTGACTTGAAGGGCCACTTGGCATCTCTGTTTCTGAATGAAAACATTAACCTTGGCAAGAAATAT
GTCTTTGATATTAAGAAACATCAAAGGAGGTGTATGACCATGCCAGGAGGGCTCTGTACAATGCTGGCGTTGTGGAC

10

200

20

30

40

50

WO 2023/108020

PCT/US2022/081113

CTCGTTTCAAGAAACAACAGAGCCCTTCACACTCGCCTCTGAAGTCTCAGAAAGCAGCATGAACTGCAGCAGCTGC
GAGGGCCTCAGCTGCCAGCAGACCCGGGTGCTGCAGGAGAAGCTACGCAAGCTGAAGGAAGCCATGCTGTGCATGGTG
TGCTGCGAGGAGAGATCAACTCCACCTTCTGTCCCTGTGGCCACACTGTGTGCTGTGAGAGCTGCGCCGCCAGCTA
CAGTCATGTCCCGTCTGCAGTCCGGTGTGGAGCATGTCCAGCACGCTATCTGCGCAACGCACACAGCTCTTCTCAAT
5 CTGACTGTAACTCTAATCTGTTGTGCTTTGTTGGACTTGGCATGTTTCCATGAACTGCATATTATAAATATATAAA
TGATAGATTGTGGAGAAAGTAATATTCCAACACCCATCTGCCATGCGATGTAAAAAAGGAAGAAAAAT
AACACAGCATCTCTCTCACTGCAAAAACATATCCATGCGTAGAATCAACAACCTCCAGTCATGGGACGAGGAGCTCT
GGGACGCAGACACATTCTCTGGATGTTGATTTTTTTTATGATCTAGTAAAGGAATAGGTAAAGCTCTTTGATGTCAGTG
AAGTGGCAACATAGCCAAAAGTTGGGTACCTTTTAGGAAATGATGTTGTAAGTCTCTTAATGTATCCTGAGGTAAG
10 TTTCTACTGGCAGCAGATTTTGAAGAATTACTTTAAGAATTTCAATCTTTTTGTATGGTCATGGAGCTCCAACCA
TTTTTAATAGGAAAGCTTTTGTAAATGTTGTGCTTTTAAATGTCAATTTCTGTCTTTATAACTTGATCAAGAATGATT
GGAAGGCAACACAGGTTTACAAATCAATCTGTGACTTTTAAAAAGTTGACAAATGTTGTGAGATTAAACAGTGTTGGC
TAGTAAAAAGCAGCTCACTCAATGTGGGTGGCTCCCTATTCCTTTACGCTCCCCCTATCCCTACCCACAAAGCCTTTC
GATTATAAAATACTACCAATCTTGTATAAGATTACTGTGGAGTAGTCAAGTACTCCCCGGGCTTTCTGAGCTGGTGG
15 AATATTTTATTTAGACTGAAACAGAGAGCACTCTCCTTGGGAAGGGAAGCGAGCTTGCTGAGTGAGAGATGGAG
CCTCATGGTGTACAACCTGAGGGTAGTTAAGTCATCACTTCTCCAAGCACTCGATCCAGCTTCAACCACTGGTGTTG
CTTTGCTTGAAGTGTCAAGCCTTTTATAGCCTTACCATAAGTATTTAGATATGGTGCTCTTTCTGTTTTTGGGGG
GGAGTTTTGTTGTGTTTTTTTAAAGTAAGTGCTTAAGTATTAACTTTGGGTTGTCCCTCTGTATGTTTCGAAGGGGT
TTTGTTCTTTTTGCTTCTGTTTTCTTAAACATGTTTTCCACTCCCACTTGGGCATTTGGAAGCTGGTCAGTAGCA
20 GGTTTTTCTGGGATGTGGGAGACCTAGTAGACCTTATCGGTGCAATACTAGCTAAGGTAAAGCTAGAAACCTACACT
GTCACCTTACTGAGATTTCTGAGTATATCTTTCATATGCTTAAATGTAGCAGTAATGTGTTTATGCACTTTGTTCTT
TGCACAGACATTTTGTCAAAATATTAAGCTCTACTTTTTTATGGCACATATTAGCATATAAGCCTTTATTTCCAAGAGG
TATTTATTTTTCTACTTGTAAAAAATATGTTTCCACGTAAGAAGCTCTGTTATATCTAGAGGAGCTGTCTTTTA
TATTCGGGATAATAAAGACTTTAAAGCAAA

25 SEQ ID NO: 2
>Reverse Complement of SEQ ID NO:1 (3,072 nucleotides)
TTTGCTTTAAAGTCTTTATTATCCGAATATAAAGACAGAGTCCCTAGGATATAACAGAGTTCTTTACGTGGAAAC
ATTATTTTTTTTACAAGTGAAAAATAAATACCTCTTGGAAATAAAGGCTTATATGCTAATATGTGCCATAAAAAAGTAG
30 AGTTTTTAATATTTGACAAAATGTCTGTGCAAAAGAAACAAATGCATAAACACATTACTGCTACATTAAGGCAATATGAA
AAGTATCTCAGAAATCTCAGTAAAGTGACAGTGTAGGTTTCTAGCTTTACCTTAGCTAGTATTGCACCCGATAAGGT
CATCTAGGTCTCCCGACATCCCGAAGAACCTGCTAGCTGACCAAGCTTCCAAATGCCCAGTGGGAGTGGAAACATG
TTTAAGAAAACAGAAAGCAAAAGAACCAAAACCCCTTCGAAACATACAGAGGGGACAAACCAAGTTAATACTTAAGC
ACTTACTTTTAAAAAACAACAACAAACCTCCCCCCCCAAAAACAGAAAAGGACACCATATCTAAATACTTATGGTAAGG
35 CTATAAAAGGCTTGAACAGTTCAAGCAAAAGCAACCAAGTGGGTGAAGCTGGGATCGAGTGCTTGGGAGAAGTGATGA
GTAAACTACCTCAGTTGTACACCATGAGGCTCCATCTCTCACTCAGCAAGCTCCGCTTCCCTTCCCAAGGAGAGTG
CTCTCTGTTTTCAGTCTGAATAAAATATTTCCACCAGCTCAGAAGGCCCGGGAGTACTTGACTACTCCACAGTAATC
TTATAACAAGATTGGTAGTATTTTATAATCGAAAGGCTTGTGGGTAGGATAGGGGAGCGTAAAGGAATAGGGAGC
CACCACATTTGAGTGAGCTGCTTTTTACTAGCCCACTGGTTTAAATCTGACAACTTTGTCAACTTTTTAAAAAGTCAC
40 AGAATTGATTTGTAAACCTGTTTGCCTTCCAATCATCTTGTATCAAGTTATAAAGACAGAAATGACATTTAAACGACA
ACAATTTACAAAAGACTTTCTTATTAATAATGGTTGGAGCTCCATGACCATACAAAAAGAAATGAAATTTCTTAAAGTA
ATTCTTACAAAATCTGCTGCCAGTAGGAACTTACCTCAGGATACATTAAAGGAGCTTACAACATCATTTCTTAAAG
GTACCCAACTTTTTGGCTATGTTGCCACTTCACTGACATCAAAGACTTTACCTATTCTCTTACTAGATCATAAAAAA
ATCAACATCCAAGGAATGTGCTCGCTCCAGAGCTCCTCCTGGTCCCATGACTGGAGTTGTTGATTTCTACGCATGGA
45 TATGTTTTTGCAGTGAGGAGTAGCTGTGTTATTTTTCTTCTTTTTTTTTTTTAAACATCGCATGGCAGATGGGTGT
TGGAAATTAATTAATTTCTCCACAATCTATCATTTTAATAGTTTATAAATAGTGCAGTTTATGGAACATGCCAAGTCCAA
CAAAAGCAACAGATTAGATTACAGTCAGATTGAGAAGCTGGTGTGCGTTGGCAGATAGACGTGCTGGACATGCTC
CACACGCCACCTGCAGACGGGACATGACTGTAGCTGGGCGGCCAGCTCTCACAGCACACAGTGTGGCCACAGGGACA
GAAGTGGAGTTGATCTCTCTCGCAGCACACCATGCACAGCATGGCTTCTTCACTTGGTGTAGCTTCTCTCGCAG
50 CACCCGGGTCTGCTGGCAGCTGAGGCCCTCGCAGCTGCTGCAGTTTATGCTGCTTTCTGAGGACTTCAGAGGCGAGTG
TGAAGGGCTCTGGTTGTTTCTTGAACGAGGTCCACAACGCCAGCATTTGACAGAGCCCTCTGGCATGGTCATACAC
CTCCTTTGATGTTCTTTAATATCAAAAGCATATTTCTTGCCAAAGTTAATGTTTTCATTGAGAAACAGAGATGCCAA
GTGGCCCTTCAAGTCACGGCTATCTGCATCATCACGGCGCTGGTCACTGTGTCAACCTGTAGAATGCGTGTGCTC
TGTATTCGCTCGTAGAGCCCGCTGGCCGCCCTGGTGTGATCATTTTAAACAAGAGCACGATGCTGTTCCAGATTTC
55 CTTGGTGACCGTCAATATACATTCTTTCTGACTGGGTGGCCATCTGCACCACAGGATAAGCTATCCTATTAATTGG
GCTAAAGTCATCTTTACAAATTTAGATTCTTTCAGGTCCAACCCCAATGAGCAGTTTCTGCGCTTCCGCTATCCCGCAC
AGAAATGCCATTCTATGCCATAGTTTTCCATTGCCGACAACTCTGCAAACTTGGTATTCAGCTGAAGCCTGGCTGGT
CCCCCTCAACTCCTTATGTTTTGCAACAATGCTGTTCAAGGTGGCAGAGGAGAGCTCCTTGGCACAGAGCTCCTCATA
GTTATACCTTGGCAGTGTCTGGTTGTAGTCTCCAACTTGGTGTGGGCCAGGAGGCGACTGAGTTCCACTGCTGCTC
60 TGGGGAAACAAAGAGTGGCCTGCCAAGAGGGCCCTCTTGATGTGCAAGAAAAAGATATGCCTAGTCTGCTCCTGTAA
GATGAGATGAGGCTCCACGAAGAACTTGACTTAAGTTTAAAGCTGTAAGGGGCTAGGCCATCCATCTGCTGGGAGAT
CCGGTTTCTCAGGTTTAGCCATAAACTTTCACCTTGTCTACCGTAACTGCAGTCCAAAATAGTCAACTTCTATGAT

201

10

20

30

40

50

PCT/US2022/081113

SEQ ID NO: 3
>NM_153789.3 Mus musculus myosin regulatory light chain interacting protein
(MyIip), mRNA (2,983 nucleotides)

AGTAGGGCTGTCCGAGACCGCGCCGCTGTAGCTCCCGGGAACCTGGCTGTCTGTGGGGGTGGCGGGGACGCGAGTGGCG
GCTCGTGTGGGGTGCAGGGGGGTGGCCGACGGCTGCACCTTCTCAGGAGCGCGAGTGCACCTTGAGAGCAATTGCG
GTGAGGCGACAGCTCCGGCGACACCCGAGAAAGCGCGGTGGCGCGCGCCCGACCGACTCTGCTGCTATGTGACGA
GGCCCGACCGGTGCTGATGGAGGTAGAGTGGAGGCAAAAGCAACGCGCAGGAGACTGTCTCAACGGGTGTGCAGCG
CTGTAGGAGTCATCTCGAGCTGTGATTTTGGGCTGCAGTTACCGGGAGCAAAAGTGAGAGCTTATGGCTGAATCTGT
GAAACCGGATCTCCACGAGATGGATGGGCTGGCACCTTACCGGCTTAACTGAGGCTCAAGTTTGTCGAGGACCTC
ATCTCATCTTACAGGAGCAGACAAGGCATATCTTTTCTTGCACATTAAGAGTCCCTCTTGGCAGGCCACCTCCAST
GTCTCCCGACGAGCGCGCTGGAACATCAGTGCCCTCTGGGTCAGACCAAAATTTGGAGAGTCAACCGAGAACCGCCGC
AATAACGCTATGAGGACCTGTGTGAGAAAGAGCTCTCAGACTCACTTTGAACACAGCTGTTGGGAGAGATTAAGAGG
TGAGGGGATCAGGACGGCCTCTGCCGATGACAGGTTCTCGACGATTGTCTGACGATCGAGAAATACGGCATAGAGT
GGCATCTGTGAGGAGACGGAAGACAGAAATCTCTATTGGGGTCGAGCATGAAAGGCATCTGCATCTGAAAGAGG
ACTTTAGCCGATTAAACAGATAGTCTTATCTCTGTGTGCAGATGGCCACCCAGTCAGGAAGAGTGTCTACTTTGACCG
TCACCAAGGATTCGGGCAACAGCATGTGCTCTCTTTTAAGATGATCAGCACAGAGCAAGGCGGCTCTACGAGG
CCATCACCGAAACATGCTATCTATAGTGTGACACATGACCCAGTGGCGTCTGATGCGATACAGTCCGCGACCTGA
AGGGCGACTTGGCGCTCTGTTTCTGACGAAAAAACAATTAACCTGGGTGTAAGAAATACGCTCTCGCATCAAGAGAATCT
CCAAAGAGGCTTGATGACCATGCCAGGAGGGCTCTGTACAAACGCGCGGATTTGGACACTGTCTCTCGAAGTGCACAGA
GCCGCCCGAGCTCACCCCTGAAGTCTCTCAGACAGCAGCATGAGCTGCAGCAGCTGTGAGGGGCTCAGCTGCCAGCA
CGCGGGTGTGCAGAGGAAGTGGCGCAAGCTGAGGAAGCCATGCTGTGATGGCGTCTGCGGAGGAGAGATCAACT
CCACCTCTTGCCCTCTGGCGGCACTATGTTGTGTGCGAGAGCTGTGCAGCCGCAAGTGTGAGTCTGTGTCGGTCTGCAGAT
CCGCTGTGGAGAGTGTCCAGCAGCTTACTCTGCCCAACCAACAGCTCTCTCAATCTGACTGTGATCTGATGCGCTTC
TGCACTCGATGGACAAGCCATGTCCCCAAGCTGCAGTATTGTAACCTATAAGATAATAACTTTGTGAAGAGCTAT
TTCACTCTCAACACCCTCTGCCCATGAGACATTTTCAGAAACAAGGAGGAAAAACAAGAAATGTGACCACACCTC
TTCGCTGAGGAGGAAGCAACGAGGCTCTGGCCCAACGAGAAAGCACTTGGGACAGGCACATCTTCCTGAACTTAGGG
TGTGTTTTTTTTTTAATGATCAAGTAAGAAGATAGATAGAACTGCTCTCTCATGTCAGTCAAGTGGCCAACTGGCCAAAC
GTGGGCACTTTTTAGGAATAAGCATCTATGTTCTCTCTCATTTTTTCCCGGGGACAGAGATTTGTAAGTGTTTTTAAG
GATTTCTCTGGTTCTTTTTGTATGGTCTAGGAGCGCTGAATATTTTATAGGAGATTTTTTTTCTAAAAAATAATGT
CTATTATAAAGTCAATCTGTCTTTTAACTCATTTCAAGAACCACTGGAAAGCTGGGACATGAAAAAAAAG
CAATCTGTGTCATCTCCCAAGGGTTGACAGCAATTTGTTCAGATTGCAAGAGCTCTGGCTGAGGCAATAGAGTAACCT
ACCGTGGGTGACTTCTCTTAGAGCGCTTCCGTTTCCCCCTCATTCGACACCCCATGCTTTTACGATATAAAATGCT
ACCAATTTGGTTTAAGAGCATACATGGTAGAGTCAAGCACTCTCTGGGCTTTGGAGATTGGAAAGCAGAGATAGCTCT
CTTGAAGGAAATAAGATGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATAGTACGAC
AGAGCGCTCATGATGCCGAGTGGTCTCTCACTTTCCAAGCATCATCAGCTGAGGACAGCTGGGTGTGCGCTTGT
TGAAGATCAACTTTCTACAGCTTATAGGTTTCTAGATAGTGTCTCTTTTGTGTGATGTTCTGTTTCTGTTGTGTT
CGAGTTTTCCTATGTTCAGTGGTCTCATACTCAITGCTCGGCCCTCGTGTCTTCAGAGGTAGGGCTAGTCTTTTA
TGTTTCCATATCTCAAGTTTTCACCCGCTTGGGCAATTTTGGAAAGCTAGTGAGCTAGGGGGTTTCTTAGGTTGTCAG
GAAACCTAGCTGACCTCATCGGGTGAATAGTAAAGCTAGAAGCCTACAGCTGCACTTACTGAGTATTT
CTGAGTCTAGTTTCTATGTGCCTTAATGTAGCAGTAATGTGTTTATGACTTTGTTCTTGCACAGACATTTGTCA
GATAATAAAACTCTACTTTTATATGGGCATATATGACATATAAGCCTTTATTCAGAGGATATTTATTTTTCAGTTG
TAAAAAATAATGTTCC

```

50 SEQ ID NO: 4
   >Reverse Complement of SEQ ID NO: 3 (2,983 nucleotides)
      GGAACACTATTFTTTTTTACAAGTAAAAAATAAATACCTCTTGAATAAAGCGTTATATGCTAATATGTGCCATAAA
      AAATGAGAGTTTAAATATCTGCAAAAATCTGTCTGCAAGAAACAATGCATAAACAACCTACTGCTACATAAAGCA
      ATATGAACCTAGACATCAGAAATCTCAATGAATGACAGTTAGGCTCTAGCTTTAACTAGCTAGTATTGCACCCG
55 ATGAGGTGAGTCTAGGTTTCTGACACCCCTAGAAAACCCCTAGCTCACTAGCTTCCAAAATGCCCAAGTGGGGTGAA
      AACTTAGAATATGGAACATAAAGAGTAGCCCTACCTCTGGAAGACACCGAGGGGGCAGGACCAATGAGTATGGAGG
      ACTGACATAGAGAAATCTCGAACAAGTGAACCAAGACATACCAAAAAGAGACACTATTAGAAACCTATAAGGCTT
      TAGAAAGTTTGATCTTCAAGCAAGGGCACAACCTTGGGTGAGCTGGAGTAGGCTCTGGGAAGTGAAGAACCACTC
      GGCATACCTAGAGGGCTCTCTGGCTCATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
60 CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
      GTCTCTTAACCAACATGCTAGTACATTTTATACGTGAAGAGCAATGGGGTGGTAATGAGGGAACAAGCGAAGGCTCTAG
      GAAAGAACTCCACCAACGCTGAGTTACCTATTGGCTCTACGACAGACTGCTCCAATCTGACAACTATGCTGTCAACC

```

WO 2023/108020

PCT/US2022/081113

TTGGGAAGTCACAGGATTGCTTTTTTTTTTCAATCTGCCAGCTTTCCAGTTGTTCTTGAATGAGTTATAAAGACAG
AAATGACTTTTATATAGGACTATTTCTTTAAGAAAAAAATCCCTATTAAAAATATTACAGCGCTCCATGACCATAC
AAAAAGAACCAAGGAAATCCTTAAACACTTACAAAAATCTGCTGCCCGGGGAAAAAGTGAAGGAGCATATGACGTCA
TTTCTCTAAAAGGTGCCACGGTTGGGCCATGTTGCCACTTGACTGACGAAGACGATTCTATCTACTCCTTTACTTGAT
5 CATTAAAAAAAACCAACCTTAAGTTCAAGGAATGTGTCCTGTGCCAGAGTTCTTCCTGGTGGCCATGGGGCCT
GTTGCTTCTCCTCACGGAAGAGGTGTGTCACATTCTTGTTCCTTTCCCTTGTTCCTGAAAATGTCTCATGGCA
GATGGGTGTTGAGAGTGAAATAGCTCTTACAAAGTTATTATTCTTATAGTTTACAATACTGCAGCTTGTGGGGACAT
GGCTTGTCCATCGAGTGACGAGCATCAGATGACAGTCAGATTGAGGAGACTGGTGGGTGGGCAGGTAGACGTGC
TGGACATGCTCCACACGGGATCTGCAGACCGGACAGGACTGCAGCTGGGCTGCACAGCTCTCGCAGCACACAGTGTGG
10 CGCAGGGGACAGAGTGGAGTTGATCTCCTCCTCGCAGCAGCCATACACAGCATGGCTTCCTCAGCTTGCAGCAGC
TTCTCCTGCAGCACC CGGCTGTGCTGGCAGCTGAGGCCCTCACAGCTGCTGCAGCTCATGTCTGTCTGAGGACTTC
AGGGGTGAGCTGGGGGGGCTGTGCTCACTTCGAGAGACAAGGTCACACACCGCGGCTTGCACAGAGCCCTCCTGGCA
TGGTCATAGACCTCTTTGGATGTTCTCTTGATGTGGAAGACGTAATTTCTTACCAAGGTTAATGTTTTCGTTCAAGAAC
AGAGACCGCAAGTGGCCCTTCAAGTCGCGACTGTACTGCATCATGACGGCACTGGTACTGTGTACACCTATAGAAT
15 GCATGTGTTTCGGTGATGGCTCGGTAGAGGCCGCTGGCTGCTGTGGTGTGATCATCTTAAACAGGAGCAGATGCTG
ACGGCGGACTCTTGGGGAACACTGGAGGTGGCCTGCCAAGAGGGAATCTTCTGACTGGGTGGCCATCTGCACACAGGATAAGCTATC
CTGTAAATAGGGCTAAAGTCTCTTTACAGATCGAGATGCCTTCAAGTCCGACCCCAATGAGGAGTTTCTGTCTCTCG
CTGTCCCTCACAGCATGCCACTCTATGCCGTAGTTCTCCATGCTGACACAATCTGCAGAACCTGGTACTCGGCAGAG
GGCTGGCTGATGCCCTTCAGCTCCTTATGCTTCGCAACGATGCTGTTCAAAGTGGAGCTGGAGAGCTCTTCTCACAC
20 AGGTCTCATAGCTGTATTGGCGGTGTTCTGGTTGTAGTCTCCAAATTTGGTCTGAGCCAGGAGGGCACTGAGTTCC
TGGCCGACTCTCTGGGGAACACTGGAGGTGGCCTGCCAAGAGGGAATCTTAAATGTGCAAGAAAAAGATATGCCCTGTG
TGCTCCTGTAAGATGAGATGAGGCTCCACAAAGAACTTGACCTCAGTTTAAAGCGGTAAAGTGCCAGCCCATCCATC
TGCTGGGAGATCCGGTTCTCAGATTACAGCCATAAGCTCTCACCTTTGCTCCCCGTGAATGCAGCCCAAAATATCA
AGCTCGATGATCCCTAGACCTCTGCACACCTGGTTGAGACAGTCCTCGCCGTTGGCTTTTGCTCCACCTCTACCTCC
25 ATCAGCACCCGGGTCCGGCTCGTACATAGCAGCAGATGGCTGGGGCCCGCCGACCCGCGCTCTTCTCGGGTGTGC
GCCGAGGTCTTCGCTCAGCCCAATTTGCTCAAGTCGACTCCGGGCTCCGTGAGGAAGGTGCAGCCGTGCGGCCACCC
GCCCTGCACCCACGCGAGCCGCTCTCGCTCCCGCCACCCACGACAGCCAGTTCCCGGAGCTACACGCGCCG
CCGCTCCGACAGCCCTACT

30 SEQ ID NO: 5
>NM_001107344.2 Rattus norvegicus myosin regulatory light chain interacting
protein (MyIip), mRNA (3,069 nucleotides)
CAGTGGGCTGTGCGAGCGCGCGGCGGTGATAGCTCCCGGGAACGGCTGTGCTGGGGGTGGCGGGGACGCGAGTGG
CGGCTGCTGGGGTGAGGGGGGTGACCGACGGCTGCACCTTCTCGCGGTGCCCGAGCCGACTTGGAGCAATTTG
35 CAGTGAGCGACAGCCCGCGGCACACCGGAGAAAGCGGCGGTGGCGGCGGTGGCGGCGCCGACCATGCTGTG
CTATGTGACGAGCCGCGGCGGTGCTGATGGAGGTGGAGGTGGAGGCAAAAGCCAAAGCGGAGGACTGTCTCAACA
GGTGTGACGGCATTGGGAATCATAGAAGTTGATTATTTTGGGCTGCAGTTTACCGGGTAGCAAGGTGAAAGCTTATG
GCTGAATCTGAGAAACCGGATCTCCAGCAGATGATGGGCTGGCACCCTTACCGGCTTAACTGAGGGTCAAGTTCTT
TGTGGAGCCCCATCTCATCTACAGGAGCAGACAAGGCATATCTTTTCTTGACATTAAGAGTCCCTCTTGGCAGG
40 CCACCTCCAGTGTTCCTCAGAGCAGGCACTGGAACTTAGTGCCCTCCTGGCCACAGCAATTCGGAGACTACAACCA
GAACACTGCCAATACAGCTATGAGGACCTGTGTGAGAAAGAGCTCTCCAGCTCCACATTGAACAGCATTTGTTGGGAA
GCATAAGAGCTGGAGGCACTGAGCAGGCTTCTGCAGAAATACCAAGTTCTGCAGATTGTGTGAGCAATGGAGAACTA
CGGCATAGAGTGGCATGCCGTGAGGACAGCGAAGGACAGAACTCCTCATTGGGGTCCGACCTGAAGGCATCTCAAT
TTGTAAGAGGACTTTAGCCCTATTAACAGGATAGCTTATCCTGTGGTGCAGATGGCCACCCAGTCAGGAAAGAAATGT
45 CTACTTGACCGTCACCAAGGAGTCCGGTAACAGCATCGTGCTCCTGTTTAAATGATCAGCACCAGAGCTGCCAGTGG
GCTCTACCGAGCTATCAGGAAACACATGCATTCTACAGGTGTGACACAGTCACCAAGTGCCGTCTATGATGCAGTACAG
TCGTGACTTGAAGGGCCACTTGGCGTCTCTGTTCTGAATGAGAACATTAATCTTGGCAAGAAATATGTCTTTGATAT
TAAAGAACATCCAAAGAGGTATATGACCATGCCAGGAGGCTCTGTACAACGCCGCTTGTGTGGACCTTGTCTCTCG
50 AAATGACCAGAGCCCTCCAGCTCGCTCTGAAGTCTCTGACAGCAGCATGAGCTGCAGCAGCTGCCAGGGCTCAG
CTGCCAGCAGACAGAGTGCTGCAGGAGAAGCTGCCAACTGAAGGAAGCCATGCTGTGCATGGTGTGTGCGAGGA
GGAGATCAACTCTACCTTTTGGCCCTGTGGCCATACTGTGTGCTGTGAGAGCTGTGCAGCCAGCTGCAGTCATGTCC
CGTCTGCAGATCAGGTGTGGAACATGTCCAGCAGCTTACCTGCCACCCACACAGTCTTCTCAATCTGACTGTCTCAT
CTAATGCGTCTCTGCTTACTGGGCATGCCATGTCCCCACAAGCTGCAGTATTTGTAAGTGAAGAAAGAGTAACCTCTG
55 TGAAGAAATAGTTCACTCTCAACACCCATTTGCCATGAGCCTTTCAGAAACGAGGAGGAAGAAAGAAATGCGACC
ACACCTCTTCTGTGAGGAGAAGCAACAGTTCCCATGGCAACAGGAAGAGATCTGGAACATGGACACATTCCTTGGGC
TTTTGGGTTTTTTTAAATGATCAAGTAAAGGAGTAGATAAAATTTGTCTCTGTCACTCAAGTGGCAACATGGCCCAACCG
TGGGCACCTTAAAGGAAATGATGTATATGTCTCCTTCACTTGTCCCGAGGCAGCAGATTTTGTAAAGTTTTTAAAGGA
TTTCTTGGTTCTTTTGTATGGTCATGGAGCGCTGAACATTTTAAATAGGATTTTTTTTTTTTGTCTTAAAGAAAT
60 AGTCTCATTAGAAAGTCATTTCTGTCTTATAACTCATCAAGAACTGGAAGAGTGGTATTTGGAAGCAATC
CCGTGACTTCTCAAGGTTGAGAGCAACGTGGTCAGATTGGAACAGTCTGGCTGAGAGTCAACAGGTAACCCACCGT
GGGTGACTTCTGCTCCAGTCCCTGTTCCCTCACTCCACATCCCATGCCTTCACTGATAAAATGCTACCAAGTTT
GGTTACATACATGGATGGTCAAGCACTCCCTGGGCTTTGGAGCTAGTGGACTATTTGCAGATCGGAAGGGGAGGTG

PCT/US2022/081113

10

20

30

WO 2023/108020

PCT/US2022/081113

CCAGACCAAGTTTGGAGACTACAACCAGAACACTGCCAAGTATACTATGAGGAGCTGTGTGCCAAGGAGCTCTCCTC
TGCCACCTTGAACAGCATTGTTGCAAAACATAAGGAGTTAGAGGGGACCGCCAGGCTTCAGCTGAATACCAAGTTT
GCAGATTGTGTGGCAATGGAAAACATATGGCATAGAAATGGCATTCTGTGAGGGATAGCGAAGGGCAGAACTGCTCAT
TGGGGTTGGACCTGAAGGAATCTCAATTTGTAAGATGACTTTAGCCCAATTAATAGGATAGCTTATCCTGTGGTGCA
5 GATGGCCACCCAGTCAGGAAGAATGTATATTTGACGGTCACCAAGGAGCTCTGGGAACAGCATTGTGCTCTTGTTTAA
AATGATCAGCACCAGGGGGCCAGCGGGCTCTACAGAGCGATAACAGAGACGCGCCGCTCTACAGGTGTGACACAGT
GACCGCGCCGTGATGTCAGTATAGCCGTGACTTGAAGGGCCACTTGGCATCTCTGTTTCTGAATGAAAACATTAA
CCTTGGCAAGAAATATGCTCTTATATTTAAAGAACATCAAAGGAGGTGTATGACCATGCCAGGAGGGCTCTGTACAA
10 TGCTGGCGTTGTGGACCTCGTTTCAAGAAGCAACCAGAGCCCTTACACTCGCCTCTGAAGTCTCAGAAAGCAGCAT
GAATGCGACAGCTGTGAGGGCTCAGCTGCCAGCAGACCCGGGCGCTGCAGGAGAAGCTGCGCAAGCTGAAGGAAGC
CATGCTGTGCATGGTGTGCTGCGAGGAGGAGATCAACTCCACCTTCTGTCCCTGTGGCCATACTGTGTGTGTGAGAG
CTGGCCACCCAGCTACAGTCATGTCCCGTCTGCAAGGTGCGATGTGGAGCAGCTCCAGCACGTCTATCTGCCAACC
CACCAGTCTCTCAATCTGACTGTAATCTAATCTGTTGTGCTTTATTGGACTTGCCATGTTTCCATGAATGCACATA
15 TTATAAACTATAAAATGATAGATTGTGGAGAAATTAATTACTCCAACCCCATCTG

SEQ ID NO: 8
>Reverse Complement of SEQ ID NO: 7 (1,461 nucleotides)
CAGATGGGTGTGGAGTAATTAATCTTCTCCACAATCTATCATTTTATAGTTTATAATAGTGCAGTTTCATGAAACAT
GGCAAGTCCAAATAAAGCACACAGATTAGATTACAGTCAGATTGAGAAGACTGGTGGGTGGCAGATAGACGTCG
20 TGGAGCTGCTCCCATGCGACCTGCAGACGGGACATGACTGTAGCTGGGTGGCGCAGCTCTCACAGCACACAGTATGG
CCACAGGGACAGAAAGTGGAGTTGATCTCCTCCTCGACGACACCATGCACAGCATGGCTTCTTCAAGCTTGGCAGC
TTCTCCTGCAGCGCCCGGCTGTGCTGGCAGCTGAGGCCCTCACAGCTGCTGCAGTTTCATGCTGCTTTCTGAGGACTTC
AGAGGCGAGTGTGAAGGGCTGTGTTGCTTCTTGAAGCAGGTCCACAACGCCAGCATTTGTACAGAGCCCTCTGGCA
TGGTCATACAGCTCCTTTGATGTTCTTTTAATATCAAAGACATATTTCTTGCCTAAGGTTAATGTTTTCATTGAGAAC
25 AGAGATGCCAAGTGGCCCTTCAAGTCACGGCTATAGTGCATCATGACGGCGCTGGTCACTGTGTGCACACCTGTAGAAC
GGCTGCGTCTCTGTTATCGCTCTGTAGAGCCCGCTGGCGCGCTGGTGTGCTGATCATTTTAAACAAGAGCAATGCTG
TTCCAGACTCCTTGTGACCGTCAAATATACATTCTTCTGACTGGTGGCCATCTGCACCACAGGATAAGCTATC
CTATTAATTTGGGCTAAAGTCATCTTTACAAATTGAGATTCCTTCAGGTCCAAACCCCAATGAGCAGTTTCTGCCCTTCG
CTATCTCCACAGAAATGCCATTCTATGCCATAGTTTTCATTGCCGACACATCTGCAAAACTTGGTATTCAGCTGAA
30 GGCTGGCTGTGCTCCCTCTCAATCTCTATGTTTTCACAAATGCTGTTCAAGGTGGCAGAGGAGAGCTCCTTGGCACAC
AGCTCCTCATAGTTAATCTTGGCAGTGTCTGGTTGTAGTCTCCAAACTTGGTCTGGCCAGGAGGGCACTGAGTTCC
ACTGCTGCTCTGGGGAACACAAAGGTGGCTGCCAAGAGGGCTCCTTGTATGTCAGAAAAAGATATGCTAGTCT
TGCTCCTGTAAAGATGAGATGAGGCTCCACGAAGAACTTGACTCTCAGTTTAAAGCTGTAAAGGGCTAGCCCATCTATC
TGCTGGGAGATCCGGTTCTCAGGTTTACCCATAAACTTTCAGCTTGTGCTACCCGTAAGCTGCAGTCCAAAAATATCA
35 ACTTCTATGATTTCCAGTCCGCTGCACACCTGGTTGAGGAGTCTCAGCGCTTGGCTTTCGCTCCAGCTCCACCTCC
ATCAGCACCCGCTCCGGCTCGTACATTAACACAGCATGGCTGGGGCTCCGCTGCG

SEQ ID NO: 9
>XM_005553979.2 PREDICTED: Macaca fascicularis myosin regulatory light chain
40 interacting protein (MYLIP), transcript variant X1, mRNA (3,111 nucleotides)
GCTATATCAGAAGAGTCCCTGTGCGGGCGCAGGCACTTGAAGTGTGGAGTGGCGGCCACCGCGGAGGACAGGGGA
GCTGGCGGGCAGCGGTGAGGGGTGGCGGGGACGCGAGTGGCGCGCGGGGCGCAGGACAGGGTCCGAGAGCTG
CAGCCTTCGAGGGCCAGCCCTCTCCAGTCCGGGGTGGGTCCAGCGGTGACAAGGGGGCAGCCCTGCGCACACCAA
AGAGAAGGCGGCTGGGAGCGGCGAGCCCGAGCCATGCTGTGTTATGTGACGAGGCGGAGCGGCTGCTGATGGAGGTGG
45 AGGTGGAGGCGAAAGCCACGGCGAGGACTGCCTCAACCAGGTGTGACGGCGACTGGGAATCATAGAAGTTGATTATT
TTGGACTGCAGTTTACGGGTAGCAAGGTGAAAGTTTATGGCTAAACCTGAGGAACCGGATCTCCAGCAGATGGATG
GGCTAGCCCTTACAGGCTTAACTGAGAGTCAAGTCTTTCGTGGAGCCTCATCTCATCTTACAGGAGCAGACTAGGC
ATATCTTTTCTTTCGACATCAAGGAGGCCCTCTTGGCAGGCCACCTTTGTGTTTCCAGAGCAGGCACTGGAATCA
50 GTGCCCTCCTGGCCAGACCAAGTTTGGAGACTACAACAGAACACTGCCAAGTATACTATGAGGAGCTGTGTGCCA
AGGAGCTCTCCTCTGCCACCTTGAACAGCATTGTTGCAAAACATAAGGAGTTAGAGGGGACCGCCAGGCTTCAGCTG
AATACCAAGTTTTCAGATTGTGTCGGCAATGGAAAACATATGGCATAGAATGGCATTCTGTGAGGATAGCGAAGGGC
AGAAACTGCTCATTGGGGTTGGACCTGAAGGAATCTCAATTTGTAAGATGACTTTAGCCCAATTAATAGGATAGCTT
ATCCTGTGGTGCAGATGGCCACCCAGTCAGGAAGAATGTATATTTGACGGTCACCAAGGAGTCTGGGAACAGCATTG
55 TGCTCTGTTTAAATGATCAGCACCAAGGCGGCCAGCGGCTCTACAGAGCGATAACAGAGACGACGCGTTCTACA
GGTGTGACACAGTGACAGCGCCGTGATGTCAGTATAGCCGTGACTTGAAGGGCCACTTGGCATCTCTGTTTCTGA
ATGAAAACATTAACTTGGCAAGAAATATGCTTTGATATTTAAAGAACATCAAAGGAGGTGTATGACCATGCCAGGA
GGGCTCTGTACATGCTGGCGTTGTGGACCTCGTTTCAAGAAGCAACAGAGCCCTTACACTCGCCTCTGAAAGTCTT
CAGAAAGCAGCATGAATCTGAGCAGCTGTGAGGGCTCAGCTGCCAGCAGACCCGGGCGCTGCAGGAGAAGCTGCGCA
60 AGCTGAAGGAAGCCATGCTGTGATGGTGTGCTGCGAGGAGGAGATCAACTCCACCTTCTGTCCCTGTGGCCATAGTG
TGTGCTGTGAGAGCTGTGCCACCCAGCTACAGTCATGTCCCGTCTGCAAGTGCATGTGGAGCAGCTCCAGCACGCTCT
ATCTGCCAACCACCCAGTCTTCTCAATCTGACTGTAATCTAATCTGTTGTGCTTTATTGGACTTGCCATGTTTCC
ATGAAGTGCATATTATAAACTATAAAATGATAGATTGTGGAGAAATTAATTACTCCAACCCCATCTGCCACGCGA

WO 2023/108020

PCT/US2022/081113

TGTTAAAAAAGGAAGAAAAATAACACAGCTACTCCTCACCACAAAAACATATCCATGTGTAGAATCAAC
AACTGCAGTGGTGGGACCCAGGAGGAGCTCTGGGACGCAGACAGCTTCCTGGATGTTGATTTTTTTATGATCAAGT
AAAAGAAATAGGTAAAGTCTTTGATGTCAAGTGGCAACATAGCCAAAAAGTTGGGPACCTTTTAGGAAATGACGT
TGTAAGTCTCCTTAATGTATCCCGAGGTAAAGTTTCTACTGGCAGCAGATTTGTAAAGATTACTTTTAAGAAATTCG
5 TTCTTTTGTATGGTCATGGAGCTCCAACCATTTTATAGGAAAGTTTCCGTAAGTCGTCGTTTTAATGTCAATTC
TGTCTTTATAAATGTATCAAGAATGATTGGAAGGCAACAGATTACAAATCAATTTCTGTGACTTTAAAAAGTTGAA
GATGTCAGATCTAAACCAAGTGTGGCTAGTAAAAAGCAGCTCACTCAATGTGGGTGGCTCCCTATTCCCTTATGCTCCC
TCTATCCCTACCCCAAGGCTTTCGATATATAAAATACACCAATTTTGTATAAGATTACTGTGGAGTAGTCAAGG
ACTCCCCGGGCTTCTGCGCTGGTGGAAATTTTATTTTCGGACTGAAAACAGAGAGCACTCTCCTTGGGAAGGAAAG
10 CAGAGCTTGTGAGTGAAGAGCGGAGCTCATGGTGTACAACAGGGGTAGTTAACTCATCACTCTCTCCCAAGCACTC
GATCCAGCTTCAACCACTGGTGTGCTTTCTTGAACGTCAAGCCTTTTATAGCCTTACCATAAGTATTTAGATATT
GTGTCTTTTCTGTGTTTTGTTTTCTTTGGGGGTGGGGGTGGGGGAGGTTTTGTTGTAAAGTAACTGCTTAAGTAT
TAACTTTGGGTGTCCTCTGTATGTTTCAAAGGGGTTTTGGTTCTTTTGTCTGTCTGATTTCTTAAACATGTTTTCC
ACTCCCACTGGGCAATTTGGAAGCTGGTCAGCTAGCAGGTTTTCTGGGATGTCGGGAGACCTAGATGACCTTATCGG
15 GTGCAATACTAGCTGAGGTAAAGCTAGAAACCTACACTGTCACTTTACTGAGATTCTGAGTATACTTTTCATATTGC
CTTAATGTAGCAGTAATGTGTGATGCAATTTGTTTCTTGCACAGACATTTGTCAAAATATTAAGCTTACTTTTTT
ATGGCACATATTAGCATATAAGCCTTTATTTCCAAGAGGTATTTATTTTTTCACTTTGTAATAAATAATGTTTCCACGT
AAAGAACTCTGTATATCTAGAGGACTCTGTCTTTTATATTACAGGATAATAAGACTTTAAAGCAAA

20 SEQ ID NO: 10
>Reverse Complement of SEQ ID NO: 9 (3,111 nucleotides)
TTTGCCTTTAAAGTCTTTATATCTGAATATAAAAAGACAGAGTCTCTAGGATATAACAGAGTTCTTTACGTGGAAA
CATTTATTTTTTAAAGTGAAGAAATAAATACCTCTTGAATAAAGGCTTATATGCTAATATGTGCCATAAAAAAGTA
GAGTTTAAATATTTGCAAAATGTCTGTGCAAGAAACAAATGCATACACACATTACTGCTACATTAAGGCAATATGA
25 AAAGTATACTCAGAAATCTCAGTAAAGTGACAGTGTAGGTTTCTAGCTTTACCTCAGCTAGTATTGCACCCGATAAGG
TCATCTAGGTCCTCCGACATCCGAAAAACCTGCTAGCTGACCAGCTTCCAAAATGCCAAGTGGGAGTGGAAAAACAT
GTTTAAAGATACAGAAGCAAAAGAACCAAAACCCCTTTGAAACATACAGAGGGGACACCCAAAGTTAATACTTAAG
CAGTTACTTTACAAACAAACCTCCCCCAACCCCAACCCCAAGAAAAACAAAAACAGAAAGGACACAAATATCTAA
ATACTTATGTAAAGGCTATFAAAGGCTTGACAGTTCAAGGAAAGCAACACCAAGTGGTGAAGCTGGATCGAGTGGCTG
30 GGAGAAAGTGTAGTGTAACTACCTCAGTTGTACACCATGAGGCTCCGCTCTCACTCAGCAAGCTCTGCTTTCCCTT
CCCAAGGAGTCTCTCTGTTTTAGTCCGAAATAAAATATTCCACCAGCGCAGAAAGGCCGGGGAGTCTTGACTA
CTCCACAGTAATCTTATAACAAATTTGTTAGTATTTTATAATCGAAAGCCTTTGTGGGGGTAGGGATAGAGGGAGCATA
AAGGAATAGGGAGCCACCCACATTTGAGTGAGCTGCTTTTACTAGCCACACTGGTTAGATCTGACATCTTCAACTTT
35 TTAAGAGTACACAAATTTGATTTGTAATCTGTTTGCCTTCCAATCATCTTGATCAAGTTATAAAGACAGAAATGACA
TTAAACACGACGCTTACGGAAACCTTTCCTATTAATAATGGTTGAGGCTCCATGACCATACAAAAAGCAAGAAATCT
TAAAAGTAATTTCTTACAAATCTGCTGCCAGTAGGAAACTTACCTCGGGATACATTAAGGAGACTTACAACGTCATTT
CCTAAAGGTAACCAACTTTTGGCTATGTTGCCACTTCACTGACATCAAGACTTTACCTATTCTTTACTTTGATCA
TAAAAAAATCAACATCCAGGAACGTGCTGCGTCCAGAGCTCCTCCTGGTCCCAACCACTGCAGTTGTTGATTCT
40 ACACATGGATATGTTTTGCGGTGAGGAGTAGCTGTGTTATTTTCTTCTTTTCTTTTAAACATCGCGTGGC
AGATGGGTGTTGGAGTAATTTCTTCCACAATCTATCATTTTATAGTTTATAATAGTGCAGTTCAATGGAAACATG
GCAAGTCCAATAAAGCACAACAGATTAGATTACAGTCAGATTGAGAAGACTGGTGTGGGTTGGCAGATAGACGTGCT
GGACGTGCTCCACATGCGACCTGCGACGGGACATGACTGTAGCTGGGTGGCAGCTCTCAGCAGCAGATATGGC
CAGAGGACAGAAGGTGGAATGATCTCCTCCTCGCAGCACCATGACAGCATGGCTTCCCTCAGCTTGGCGCAGCT
45 TCTCCTGCAGCGCCCGGCTGCTGCTGCGAGCTGAGGCCCTCACAGCTGCTGCAGTTTCTGAGGACTTCA
GAGGCGAGTGTGAAGGGCTCTGGTGTCTTCTTGAACGAGGTCACCAACGCCAGCATTTGACAGAGCCCTCTGGCAT
GGTCATACACCTCCTTTGATGTTCTTTTAAATATCAAGACATATTTCTTGCCAAAGTTAATGTTTTCTTCAAGAAACA
GAGATGCCAAGTGGCCCTTCAAGTCAAGGCTATATCTGCATCATGACGGCGCTGGTCACTGTGTACACCTGTAGAACG
50 CGTGCCTCTCTGTTATCGCTCTGTAGAGCCCGCTGGCCGCCCTGGTGTGATCATTTTAAACAAGAGCACAATGCTGT
TCCCAGACTCCTTGGTGACCGTCAAAATATACATTTCTTCTGACTGGGTGGCCATCTGCACCACAGGATAAGCTATCC
TATTAATTTGGGCTAAAGTCACTTTTACAAATTTAGATTTCCTCAGGTCACAGCCCAATGAGCAGTTTCTGCCCTTCCG
TATCCCTCAGAGAAATGCCATTCTATGCCATAGTTTTCCATTGCCGACACAATCTGCAAAACCTTGATTTCACTGAAG
CCTGGCTGGTCCCTCTAATCTCTTATGTTTGAACAATGCTGTTCAAGGTGGCAGAGGAGAGCTCCTTGGCACACA
55 GCTCCTCATAGTTATACTTGGCAGTGTCTGGTTGAGTCTCCAAACTTGGTCTGGGCCAGGAGGCACTGAGTTCCA
CTGCCCTGCTCTGGGACACAAAAGGTGGCCTGCCAAGAGGCGCTCCTTGATGTGCAAGAAAGATATGCCTAGTCT
GCTCCTGTAAGATGAGATGAGGCTCCACGAAGAACTTGACTCTCAGTTTAAAGCCTGTAAGGGGCTAGCCCATCCATCT
GCTGGGAGATCCCGTTCTCAGGTTTAGCCATAAACTTTACCTTTGCTACCCGTAACCTGCAGTCCAAAATAATCAA
CTTCTATGATTTCCAGTCCGCTGCACACCTGGTTGAGGAGTCTCCTGCCGTTGGCTTCCGCTCCACCTCCACCTCCA
TCAGCCCGCTCCGGCTCGTCAATAACACAGCATGGCTGGGGCTGCCGCTCCAGCCGCTTCTCTTTGGTGTGC
60 GCAGGCTTGGCGCTTGTACGGCTGGGACCCAGCCCGGACTCGGAGAGGGCTGGCCCTCGAAGGCTGCAGCTCTGC
GGACCTTGTCTGCGCCGCGCGCGGACTCGCGTCCCGCCACCCCTCACCGCTGCGCGCAGCTCCCGCTGT
CTCTCGCGGTGGCGCGCACTCCAGAGCTCAACTGCTGCGCGCGCAGGGAATCTCTGATATAGC

WO 2023/108020

PCT/US2022/081113

SEQ ID NO: 11

>XM_005553980.2 PREDICTED: Macaca fascicularis myosin regulatory light chain interacting protein (MYLIP), transcript variant X2, mRNA (2,946 nucleotides)

5 GCTATATCAGAAGAGTCCCCTGTCGCGGCGCAGGCAGTTFAGCTGCTGGAGTGCGGCGCCACCGCGGAGGACAGGGGGA
GCTGGCGGGCAGCGGGTGAGGGGGTGGCGGGACGCGAGTTCGCGCGCCGCGGGCGCAGGACAGGGGTCCGCAGAGCTG
CAGCCCTTCGAGGGCCAGCCCTCTCCGAGTCCGGGGCTGGGTCCAGCCGTGACAAAGCGGCGAGCCCTGCCACACCAA
AGAGAAGCGGCTGGGAGCGCGACGCCAGCCATGCTGTGTTATGTGACGAGGCGGACGCGGTGCTGATGGAGGTGG
AGGTGGAGGCGAAGCCAAAGCGGAGGACTGCCTCAACAGGTGTGACGGCGACTGGGAATCATAGAAGTTGATTATT
TTGGACTGCAGTTTACGGGTAGCAAGGTGAAAGTTTATGGCTAAACCTGAGGAACCGGATCTCCAGCAGATGGATG
10 GGCTAGCCCCCTTACAGGCTTAACTGAGAGTCAAGTTCCTCGTGGAGCCCTCATCTCATCTTACAGGAGCAGACTAGGC
ATATCTTTTTCTGACATCAAGAGAGCCCTCTTGGCAGGCCACCTTTTGTGTTCCCCAGAGCAGGCACTGGAATCA
GTGCCCTCCTGGCCCCAGACCAAGTTTGGAGACTACAACAGAACACTGCCAAGTATAACTATGAGGAGCTGTGTGCCA
AGGAGCTCTCCTCTGCCACCTTGAACAGCATTGTTGCAAAACATAAGGAGTTAGAGGGGACAGCCAGGCTTCAGCTG
AATACCAAGTTTTCAGAGATTGTGTCGGCAATGGAAAACTATGGCATAGAATGGCATTCTGTGAGGGATAGCGAAGGGC
15 AGAAACTGCTCATTGGGGTGGACCTGAAGGAATCTCAATTTGTAAGATGACTTTAGCCCAATTAATAGGTGTGACA
AGAGTGTGCCACCCAGCTACAGTCATGTCCGCTCTGCAGGTGCGATGTGGAGCAGTCCAGCAGCTCATCTGCCCAA
TTAACTTGGCAAGAAATATGTCTTTGATATTAAGAAACATCAAAGGAGGTGTATGACCATGCCAGGAGGGCTCTGT
ACAATGTCTGGCGTTGTGACCTCTGTTTCAAGAAAGCAACAGAGCCCTTCACTCGCCTCTGAACTCTCAGAAAGCA
20 AAGGAGCTGTGTCATGTTGTGCTGCGAGGAGGAGATCACTCCACCTTCTGTCCCTGTGGCCATACCTGTGTGCTGTG
AAGCCATGTCGTCATGTTGTGCTGCGAGGAGGAGATCACTCCACCTTCTGTCCCTGTGGCCATACCTGTGTGCTGTG
AGAGTGTGCCACCCAGCTACAGTCATGTCCGCTCTGCAGGTGCGATGTGGAGCAGTCCAGCAGCTCATCTGCCCAA
CCCACACAGTCTTCTCAATCTGACTGTAACTCAATCTGTTGTGCTTTTATTTGAGCTTGGCATGTTTCCATGAATGCTGC
ACTATATATAACTATATAAATGATAGATTGTGGAGAAAGTAATTAATCTCAACACCCATCTGCCACGCGATGTTAAAAA
25 AAAAAAAGGAGAGAAATAAACAAGCTACTCTCACCAGCAAAACATATCCATGTGTGAATCAACAACTGCAGT
GGTGGGACAGGAGAGCTCTGGGACGACAGCAGTTCCTTGGATGTTGATTTTTTTTATGATCAAGTAAAAAGATA
GGTAAAGTCTTTTATGTCAGTGAAGTGGCAACATAGCCAAAAAGTTGGGTACCTTTTAGGAAATGACGTTGTAAAGTCT
30 CCTTAATGTATCCCGAGGTAAAGTTCTCTACTGGCAGCAGATTTTGTAAAGATTACTTTTAAGAAATTCGTTCTTTTG
TATGTCATGGAGCTCCAACATTTTAAATAGGAAAGTTTTCGTAAGTCGTCGTTTAAATGTCATTCTGTCTTTAT
AECTTGATCAAGAAATGATTGGAAGGCAACAGATTACAAATCAATCTGTGACTTTTAAAAAGTTGAAGATGTCAGA
35 TCTAAACCAAGTGTGGCTAGTAAAAAGCAGCTCACTCAATGTGGGTGGCTCCCTATTCTTATGCTCCCTATACCCCT
ACCCACCAAGGCTTTCCAGTTATAAATACTACCAATTTTGTATAAGATTACTGTGGAGTAGTCAAGGACTCCCGGG
GCCTTCTGGCTGGTGGATATTTTATTTTGGACTGAAAAACAGAGCACTCTCCTTGGGAGGGGAAAGCAGAGCTTG
CTGAGTGAGAGCGGAGCCTCATGGTGTCAACTGAGGAGTAACTCATCACTTCTCCCAAGCACTCGATCCAGCT
35 TCACCCACTGGTGCTGCTTCTTCTGAACTGTCAAGCTTTTATAGCCTTACCATAAGTATTTAGATATTTGTGCTTTT
TCTGTGTTTTGTTTTCTTTGGGGGTGGGGGTGGGGGGAGGTTTTGTTGTAAGTAACCTGCTTAAGTATTAACCTTTGG
GTTGCTCCCTCTGTATGTTTCAAAGGGGTTTTGGTTCTTTTGTCTCTGTATTTCTAAACATGTTTTCCACTCCCACT
40 TGGGCAATTTGGAAGCTGGTCACTAGCAGGTTTTCTGGGATGTCGGGAGACCTAGATGACCTTATCGGGTCAATAC
TAGCTGAGGTAAAGCTAGAAACCTTACACTGTCACTTTACTGAGATTTCTGAGTATACCTTTATATTGGCTTAATGTA
GCAGTAATGTGTGATGCAATTTGTTCTTTGACAGACATTTTGTCAAATATTAAGACTTACTTTTTTATGGCAGAT
45 ATAGCATATAAGCCTTTATTCAGAGGTATTTATTTTCTACTGTAAAAAATAATGTTTCCAGGTAAAGAACTC
TGTATATCTAGAGGACTCTGTCTTTTATATTACAGGATAATAAGACTTTAAAGCAAA

SEQ ID NO: 12

>Reverse Complement of SEQ ID NO: 11 (2,946 nucleotides)

45 TTTGCTTTAAAGTCTTTATATCTGAATATAAAAAAGACAGAGTCTCTAGGATATAACAGAGTCTTTACGTGGAAA
CATTATTTTTTTTCAAGTGAAAAATAAATACCTCTTGGAAATAAGGCTTATATGCTAATATGTGCCATAAAAAAGTA
GAGTTTTTAAATATTGACAAATGTCTGTGCAAGAAACCAATGCATACACATTAATGCTACATTAAAGCAATATGA
50 AAAGTATACTCAGAAATCTCAGTAAAGTGACAGTGTAGGTTTCTAGCTTTACCTCAGCTAGTATTGCACCCGATAAGG
TCATCTAGGTCTCCGACATCCAGAAAACCTGCTAGCTGACCAGCTTCCAAAATGCCCAAGTGGGAGTGGAAAAAT
GTTTAAAGATACAGAAGCAAAAAAGAACCAAAACCCCTTTGAAACATACAGAGGGGACAACCCAAAGTTAATACTTAAAG
CAGTTACTTTTACAACAAAACCTCCCCCAACCCCAACCAAGAAAAACAAAAACAGAAAGGACACAATATCTAA
55 ATACTTATGGTAAGGCTATAAAAGGCTTGACAGTTCAAGGAAAGCAACACAGTGGGTGAAGCTGGATCGAGTGCTTG
GGAGAAGTGATGAGTTAACTACCTCAGTTGTACACCATGAGGCTCCGTCTCTCACTCAGCAAGCTCTGCTTTCCCTT
CCCCAAGGAGAGTCTCTCTGTTTTCTAGTCCGAAATAAAATATPCCACAGCGCAGAGGCCCGGGGAGTCTTTGACTA
60 CTCACAGTAATCTTATAACAAAATTTGGTAGTATTTTATAATCGAAAGCCCTTGTGGGGTAGGGATAGAGGGAGCATA
AAGGAATAGGGAGCCACCCACATTTGAGTGAGCTGCTTTTACTAGCCACACTGGTTTAGATCTGACATCTTCAACTTT
TTAAAGTACAGAAATGATTGTTGTAATCTGTTTGCCTTCCAATCATTCTTGATCAAGTTATAAAGACAGAAATGACA
TTAAACACGACGACTTACGAAAACTTTCTATTAATAAATGGTTGGAGCTCCATGACCATACAAAAAGAACGAAATTTCT
TAAAGTAATTTCTACAAATCTGCTGCCAGTAGGAACTTACCTCGGGATACATTAAAGGAGACTTACAAGCTCAATTT
65 CCTAAAGGTACCAACTTTTTGGCTATGTTGCCACTTCACTGACATCAAGAGCTTTAGCTATTCTTTTACTTGATCA
TAAAAAAATCAACATCCAAAGAACGTGTCTGCGTCCAGAGCTCCTCTGGTCCCAACCTGCAAGTTGTTGATTCT
ACACATGGATATGTTTTGCGGTGAGGAGTAGCTGTGTATTTTTTCTCCCTTTTTTTTTTTTAAACATCGGGTGGC

WO 2023/108020

PCT/US2022/081113

AGATGGGTGTTGGAGTAATTACTTTCTCCACAATCTATCATTTTATAGTTTATAAATAGTGCAGTTCATGGAAACATG
GCNAGTCCNNTNANAGCACMCAGATTAGATTACAGTCAAGATTGAGNAGACTGGTGTGGTTGGCAGATAGACGTGCT
GGACGTGCTCCACATGCGACCTGACAGACGGGACATGACTGTAGCTGGGTGGCACAAGCTCTCACAGCACACAGTATGGC
CACAGGGACAGAAAGGTGGAGTTGATCTCCTCCTCGCAGCACACCATGACAGCATGGCTTCCTTCAGCTTGGCGAGCT
5 TCTCCTGCAGCGCCCGGGTCTGCTGGCAGCTGAGGCCCTCACAGCTGCTGCAGTTCATGCTGCTTCTGAGGACTTCA
GAGCGGAGTGTGAAGGGCTCTGCTTGCCTTCTGAAACGAGGTCCACNAGCCAGCATTTGTACAGAGCCCTCCTGGCAT
GGTCATACACCTCCTTTGATGTTCTTTAATATCMAAGACATATTTCTTGCCNAGGTTAATGTTTTCATTACAGAAACA
GAGATGCCAAGTGGCCCTTCAAGTCACGGCTATACTGCATCATGACGGCGCTGGTCACTGTGTCACACCTATTAAATTG
GGCTAAAGTCATCTTTACAAATTGAGATTCTTCAGGTCCAACCCCAATGAGCAGTTTCTGCCCTTCGCTATCCCTCA
10 CAGAAATGCCATTCTATGCCATAGTTTCCATTGCCGACACAACTCTGCANAACTTGGTATTCAGCTGAAGCCTGGCTGG
TCCCCCTCAACTCCTTATGTTTTGCAACAATGCTGTTCAAGGTGGCAGAGAGAGCTCCTTGGCACACAGCTCCTCAT
AGTTTAACTTGGCAGTGTCTGGTTGTAGTCTCCAAACTTGGTCTGGGCCAGGAGGGCACTGAGTTCCTACTGCCCTGCT
CTGGGGAACACAAAAGGTGGCTGCCAAGAGGGCTCCTTGATGTGCAAGAAAAAGATATGCCCTAGTCTGCTCCTGTA
AGATGAGATGAGGCTCCACGAAAGAACTTGAATCTCAGTTTAAGCCTGTAAAGGGCTAGCCCATCCATCTGCTGGGAGA
15 TCCGCTTCTCAGGTTTAGCCATAAAGTTTACCTTTGCTACCCGTAAACTGCAGTCCAAAATAATCAACTTCTATGA
TTCCAGTTCGCTGCACACCTGGTTGAGGCAGTCTCGCCGTTGGCTTTCGCCCTCCACCTCCACCTCCATCAGCACCG
CGTCCGGCTCGTACATAACACAGCATGGCTGGGGCTGCCGCTCCAGCCGCTTCTCTTTGGTGTGCGCAGGGCTG
CCGCTTGTACGGCTGGGACCCAGCCCGGACTCGGAGAGGGCTGGCCCTCGAAGGCTGCAGCTCTCGGGACCCCTTG
TCTTGGCCCCCGCGGCGCGACTCGCGTCCCGCCACCCCTCACCCGCTGCCCGCCAGCTCCCCCTGTCTCCCGCGG
20 TGGCGCGCACTCCAGCAGCTCAACTGCCTGCGCGCGCACAGGCACTTCTGTATATAGC

10

20

30

208

40

50

【配列表】
2025503397000001.xml

【手続補正書】

【提出日】令和5年9月6日(2023.9.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0002】

配列リスト

本願は、XMLフォーマットにおいて電子的に提出された配列リストを含んでおり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2023年8月25日に作成されたXMLコピーは、A108868__1560WO__SL.XMLと命名され、4,094,358バイトのサイズである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2025503397000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N 15/113, A61K 48/00 (2023.01) IPC - ADD. C07H 21/02, C12N 15/85, A61K 31/711 (2023.01) INV. C12N 15/1137, C12N 15/113, A61K 48/00 CPC - ADD. A61K 31/713, A61K 31/7125, C07H 21/04, C12N 2310/14, C12N 2310/351 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0298122 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 13 October 2016 (13.10.2016) Claim 1, para [0011], [0315], Table 3, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21	1, 3/1, 86
Y		7-10, 30-43, 59-67, 73-79
A		2, 3/2, 29, 82
Y	US 2021/0332367 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 28 October 2021 (28.10.2021) abstract, para [0011], [0178], Claim 25, Claim 26, Claim 27, Claim 28, Claim 29, Claim 30, Claim 32, Claim 33, Claim 34, Claim 35, Claim 36, Claim 41, Claim 43, Claim 59, Claim 62, Claim 63, Claim 64, Claim 65, Claim 66, Claim 67, Claim 68, Claim 70, Claim 72, Claim 73, Claim 74, Claim 75, Claim 76,	7-10, 30-43, 59-67, 73-79
A	US 2005/0246794 A1 (KHVOROVA et al.) 03 November 2005 (03.11.2005) Claim 1, SEQ ID NO: 612415	2, 3/2, 29, 82
A	US 2005/0255487 A1 (KHVOROVA et al.) 17 November 2005 (17.11.2005) Claim 1, SEQ ID NO: 1031910	2, 3/2, 29, 82
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 April 2023 (15.04.2023)		Date of mailing of the international search report MAY 25 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81113

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81113

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-6, 11-28, 44-58, 68-72, 80-81, 83-85, 87-127
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
- see extra sheet for Box No. III Observations where unity of invention is lacking -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 7-10, 29-43, 59-67, 73-79, 82, 86, limited to AD-1753226, SEQ ID NOs: 17, 152; and AD-1753226, SEQ ID NOs: 287, 422

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81113

Continuation of:
A. Classification of Subject Matter

CPC: ADD. C12N 2310/346

Continuation of:
Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-3, 7-10, 29-43, 59-67, 73-79, 82, 86, drawn to a double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agent for inhibiting expression of myosin regulatory light chain interacting protein (MYLIP) in a cell. The composition will be searched to the extent that the dsRNA encompasses the first named duplex in Tables 3 (AD-1753226, SEQ ID NOs: 17 and 152) and the corresponding modified duplex in Table 4 (AD-1753226, SEQ ID NOs: 287 and 422). This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-3, 7-10, 29-43, 59-67, 73-79, 82, 86 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 17, 152, 287 and 422. Additional dsRNA(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected dsRNA(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a dsRNA comprising duplex AD-1753259 (SEQ ID NOs: 19, 154, 289 and 424) (Claims 1-3, 7-10, 29-43, 59-67, 73-79, 82, 86.).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

No technical features are shared between the polynucleotide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+ share the technical feature of a dsRNA agent for inhibiting expression of MYLIP in a cell

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2016/0298122 A1 to Alnylam Pharmaceuticals, Inc. (hereinafter "Alnylam '122").

Alnylam '122 teaches (instant claim 1) a double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agent for inhibiting expression of myosin regulatory light chain interacting protein (MYLIP) in a cell, wherein the dsRNA agent comprises a sense strand and an antisense strand, wherein the sense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the nucleotide sequence of SEQ

ID NO: 1, and the antisense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 2 (Claim 1, A double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for inhibiting expression of Mytip/dol, wherein said dsRNA comprises a sense strand and an antisense strand, wherein the sense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 20 and the antisense strand comprises at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from the corresponding antisense nucleotide sequence of SEQ ID NO: 21.; Table 3, Sense strand, SEQ ID NO: 20 "GCUUGUGUUAUGACGAGG" and Antisense strand SEQ ID NO: 21 "CCUCGUCACAUACACAGC"; Note, SEQ ID NO: 20 is 100% match to nucleotides 240-258 of SEQ ID NO: 1 of instant claim.; Note, SEQ ID NO: 21 is 100% match to nucleotides 2815-2833 of SEQ ID NO: 2 of instant claim.).

—continued on next sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81113

Continuation of:

Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

Some inventions of Groups I+ share the technical feature of a dsRNA agent represented by formula (I).

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2021/0332367 A1 to Alnylam Pharmaceuticals, Inc. (hereinafter "Alnylam '367").

Alnylam '367 teaches (Instant claim 30) a double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agent represented by formula (II):

sense: 5' np -Na - (X'X'X')i -Nb - Y'Y'Y' -Nb - (Z'Z'Z')j -Na - nq 3'

antisense: 3' np' -Na' - (X'X'X')k -Nb' - Y'Y'Y' -Nb' - (Z'Z'Z')l -Na' - nq' 5' (II), wherein:

i, k, and l are each independently 0 or 1;

p, p', q, and q' are each independently 0-6;

each Na and Na' independently represents an oligonucleotide sequence comprising 0-25 nucleotides which are either modified or unmodified or combinations thereof, each sequence comprising at least two differently modified nucleotides;

each Nb and Nb' independently represents an oligonucleotide sequence comprising 0-10 nucleotides which are either modified or unmodified or combinations thereof;

each np, np', nq, and nq', each of which may or may not be present, independently represents an overhang nucleotide;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', and Z'Z'Z' each independently represent one motif of three identical modifications on three consecutive nucleotides;

modifications on Nb differ from the modification on Y and modifications on Nb' differ from the modification on Y'; and wherein the sense strand is conjugated to at least one ligand (Claim 25, A double stranded ribonucleic acid (dsRNA) agent.....is represented by formula (III):

sense: 5' np - Na - (XXX)i - Nb - YYY - Nb - (ZZZ)j - Na - nq 3'

antisense: 3' np' - Na' - (X'X'X')k - Nb' - Y'Y'Y' - Nb' - (Z'Z'Z')l - Na' - nq' 5' (III), wherein:

i, k, and l are each independently 0 or 1;

p, p', q, and q' are each independently 0-6;

each Na and Na' independently represents an oligonucleotide sequence comprising 0-25 nucleotides which are either modified or unmodified or combinations thereof, each sequence comprising at least two differently modified nucleotides;

each Nb and Nb' independently represents an oligonucleotide sequence comprising 0-10 nucleotides which are either modified or unmodified or combinations thereof;

each np, np', nq, and nq', each of which may or may not be present, independently represents an overhang nucleotide;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', and Z'Z'Z' each independently represent one motif of three identical modifications on three consecutive nucleotides;

modifications on Nb differ from the modification on Y and modifications on Nb' differ from the modification on Y'; and

wherein the sense strand is conjugated to at least one ligand.).

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):

Claims 4-6, 11-28, 44-58, 68-72, 80-81, 83-85, 87-127 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	3/04 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
		C 1 2 N	15/88	Z

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL
,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V
N,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B R I J
2. L A B R A S O L
3. T R I T O N
4. P Y T H O N

(72)発明者 ウォード， ルーク

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、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア、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 ディートン， エイミー

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、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア、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 ズーバー， ジェフリー

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、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア、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 シュリーゲル， マーク ケイ

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、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア、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 カストレノ， アダム

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、ウエスト・ケンドール・ストリート
6 7 5、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア、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

Fターム (参考)	4B065	AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y BA02
	4C076	AA12 BB11 BB13 BB15 BB16 CC11 CC21 CC29 DD25Z DD26Z DD41Z DD43Z EE41Z FF61
	4C084	AA19 MA02 MA17 MA66 NA05 ZA361 ZA362 ZA451 ZA452 ZA701 ZA702 ZC021 ZC022 ZC331 ZC332 ZC751
	4C086	AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA17 MA66 NA05 NA14 ZA36 ZA45 ZA70 ZC02 ZC33 ZC75