

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-515996

(P2025-515996A)

(43)公表日 令和7年5月23日(2025.5.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	1 3 0 Z 4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/113	Z N A 4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/43	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全304頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-560406(P2024-560406)	(71)出願人	522149186
(86)(22)出願日	令和5年4月14日(2023.4.14)		アロ・バイオセラピューティクス・カン
(85)翻訳文提出日	令和6年12月5日(2024.12.5)		パニー
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065812		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191
(87)国際公開番号	WO2023/201362		06・フィラデルフィア・スイート74
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)		0・ウォルナット・ストリート601
(31)優先権主張番号	63/330,797	(74)代理人	100127926
(32)優先日	令和4年4月14日(2022.4.14)		弁理士 結田 純次
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100216105
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,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,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(72)発明者	スワップニル・クルカルニ
	最終頁に続く		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191
			06・フィラデルフィア・スイート74
			0・ウォルナット・ストリート601
		(72)発明者	ラッセル・アデイス
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酵素補充療法を用いたFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート

(57)【要約】

本開示は、酵素補充療法と組み合わせて、siRNA分子及びそれにコンジュゲートされたFN3ドメインなどの組成物、ならびにそれらを作製及び使用する方法に関する。

【選択図】図1

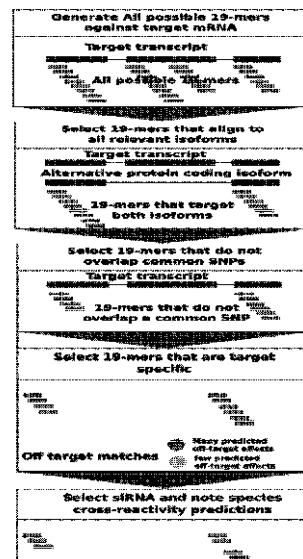


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A に連結された 1 つ以上の F N 3 ドメインを含む組成物であって、前記 s i R N A が、G y s 1 を標的とする、前記組成物と、

前記グリコーゲン貯蔵疾患を治療するために使用される酵素補充療法（E R T）と、の投与を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記グリコーゲン貯蔵疾患が、ポンペ病（G S D 2、グルコシダーゼアルファ酸（G A A）欠損症）、コリ病またはフォーブス病（G S D 3、グリコーゲン脱分岐酵素（A G L）欠損症）、アンデルセン病（G S D 4、グリコーゲン分岐酵素（G B E 1）欠損症）、マッカードル病（G S D 5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）欠損症）、タルイ病（G S D 7、筋ホスホフルクトキナーゼ（P F K M）欠損症）、アルドラーゼ A 欠損症（G S D 1 2、アルドラーゼ A（A L D O A）欠損症）、I I 型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 E R T が、グルコシダーゼアルファ酸（G A A）、グリコーゲン脱分岐酵素（A G L）、グリコーゲン分岐酵素（G B E 1）、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）、筋ホスホフルクトキナーゼ（P F K M）、アルドラーゼ A（A L D O A）、マリリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ（G Y S 2）、グルコース－6－ホスファターゼ（G 6 P C / S L C 3 7 A 4）、ホスホリラーゼキナーゼ（P H K A 2 / P H K B / P H K G 2 / P H K A 1）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（P G A M 2）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（L D H A）、グルコース輸送体（G L U T 2）、β－エンノラーゼ（E N O 3）、及びグリコゲンニン－1（G Y G 1）からなる群から選択される 1 つ以上の酵素を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 1 つ以上の F N 3 ドメインが、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

G y s 1 を標的とする前記 s i R N A が、G Y S 1 の発現を低減する s i R N A である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

G y s 1 を標的とする前記 s i R N A が、G Y S 1 の発現を低減する s i R N A である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記グリコーゲン貯蔵疾患が、ポンペ病であり、

前記 F N 3 ドメインが、C D 7 1 に結合するポリペプチドであり、

前記 E R T が、グルコシダーゼアルファ酸（G A A）を投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記グリコーゲン貯蔵疾患が、ラフォラ病であり、

前記 F N 3 ドメインが、C D 7 1 に結合するポリペプチドであり、

前記 E R T が、マリリン、ラフォリン、またはその両方を投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 s i R N A が、前記 s i R N A の前記センス鎖または前記アンチセンス鎖に共有結合した化学リンカーを介して前記 F N 3 ドメインに共有結合している、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記 s i R N A 分子が、O O O O、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、A A、B B、C C、D D、E E、F F、G G、H H、I I、J J、K K、L L、M M、N N、O O、P P、Q Q、R R、S S、T T、U U、V V、W W、X X、Y Y、Z Z、A A A、B B B、C C C、D D D、E E E、F F F、G G G、H H H、I I I、J J J、K K K、L L L、M M M、N N N、O O O、P P P、Q Q Q、R R R、S S S、T T T、U U U、V V V、W W W、X X X、Y Y Y、Z Z Z、A A A A、B B B B、C C C C、D D D D、E E E E、F F F F、G G G G、H H H H、I I I I、J J J J、K K K K、L L L L、M M M M、N N N N、P P P P に記載されるような、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に記載されるような、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む前記 s i R N A 対を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記 F N 3 ドメインに連結された前記 s i R N A が、前記 F N 3 ドメインのシステイン残基にコンジュゲートされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 F N 3 ドメイン内の前記システインが、配列番号 7 1 3 に基づく前記アミノ酸配列を含む前記 F N 3 ドメインの残基 6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、または 93 に対応する位置にある、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記システインが、配列番号 7 1 3 の前記アミノ酸配列の残基 6、53、または 88 に対応する位置に位置する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 F N 3 ドメインが、配列番号 509、708、及び 710 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 F N 3 ドメインが、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 16】

C D 7 1 に結合する前記 F N 3 ドメインが、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 のアミノ酸を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための薬学的組成物であって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A に連結された 1 つ以上の F N 3 ドメインと、前記グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための酵素補充療法 (E R T) と、を含む、組成物を含む、前記薬学的組成物。

40

【請求項 18】

グリコーゲン貯蔵疾患を治療するためのキットであって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A に連結された 1 つ以上の F N 3 ドメインを含む薬学的組成物を含む第 1 の容器と、前記グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための酵素補充療法 (E R T) を含む薬学的組成物を含む第 2 の容器と、を含む、前記キット。

【請求項 19】

前記 1 つ以上の F N 3 ドメインが、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインを含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

s i R N A が、G y s 1 を標的とする、請求項 18 に記載のキット。

50

【請求項 21】

前記 1 つ以上の FN3 ドメインが、CD71 に結合する FN3 ドメインを含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 22】

前記グリコーゲン貯蔵疾患が、ポンベ病 (GSD2、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA) 欠損症)、コリ病またはフォブス病 (GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL) 欠損症)、アンデルセン病 (GSD4、グリコーゲン分岐酵素 (GBE1) 欠損症)、マッカードル病 (GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM) 欠損症)、タルイ病 (GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM) 欠損症)、アルドラーゼ A 欠損症 (GSD12、アルドラーゼ A (ALDOA) 欠損症)、II 型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 23】

前記 ERT が、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA)、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL)、グリコーゲン分岐酵素 (GBE1)、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM)、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM)、アルドラーゼ A (ALDOA)、マリリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ (GYS2)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC37A4)、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM2)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA)、グルコース輸送体 (GLUT2)、 β -エンノラーゼ (ENO3)、及びグリコゲンニン-1 (GYG1)、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 24】

前記 ERT が、GAA、マリリン、ラフォリン、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 25】

前記第 1 の容器が、Gys1 を標的とする siRNA に連結された CD71 に結合する FN3 ドメインを含む薬学的組成物を含み、前記第 2 の容器が、前記 GAA の酵素を含む薬学的組成物を含む、請求項 18 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 4 月 14 日に提出された米国仮出願第 63 / 330,797 号の優先権を主張し、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本実施形態は、コンジュゲートしたフィブロネクチン III 型ドメイン (FN3) であり得る siRNA 分子、及び酵素補充療法と組み合わせて当該分子を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

治療用核酸としては、例えば、低分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激核酸、アンチセンス、アンタゴmir、アンチmir、マイクロ RNA 模倣体、スーパーmir、U1 アダプター、及びアプタマーが挙げられる。siRNA または miRNA の場合、これらの核酸は、RNA 干渉 (RNAi) と呼ばれるプロセスを通じて、特異的タンパク質の細胞内レベルを下方制御することができる。siRNA 及び miRNA 構築物は、標的タンパク質に対する任意のヌクレオチド配列を用いて合成することができるため、RNAi の治療用途は非常に広範である。これまでのところ、siRNA 構築物は、インビトロモデル及びインビボモデルの両方において標的タンパク質を特異的に下方制御する能

力を示している。加えて、s i R N A構築物は、現在のところ、臨床研究において評価されており、様々な疾患に対して承認されている。

【0004】

しかしながら、s i R N A構築物が現在直面している2つの問題は、第1には、それらが血漿中でのヌクレアーゼ消化に対して感受性であること、第2には、遊離s i R N Aまたはm i R N Aとして全身性に投与される場合、それらがR I S C (RNA誘導サイレンシング複合体)に結合することができる細胞内区画へのアクセスを得る能力に制限があることである。コレステロール及びP E G脂質、炭水化物 (G a l N a c三量体など)などの他の脂質成分を有するカチオン性脂質から形成される脂質ナノ粒子などのある特定の送達システムは、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを促進するために使用されている。しかしながら、これらは、肝臓以外の組織においてs i R N Aをその意図される標的に効率的かつ効果的に送達することに成功することが示されていない。

10

【0005】

s i R N Aをその意図された細胞標的に送達するための組成物及び方法が、依然として必要である。さらに、必要とされるのは、C D 7 1に特異的に結合することができる臨床使用のための最適化された特性を有するF N 3ドメイン、及びC D 7 1の受容体媒介内在化を介した細胞内アクセスを可能にする新規の治療薬のためにそのような分子を使用する方法である。本実施形態は、これらの必要性及び他の必要性を満たす。

【発明の概要】

【0006】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含むs i R N A分子に連結された1つ以上のF N 3ドメインを含む組成物と、酵素補充療法 (E R T) と、の投与を含む。

20

【0007】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、ポンペ病 (G S D 2、グルコシダーゼアルファ酸 (G A A) 欠損症)、コリ病またはフォーブス病 (G S D 3、グリコーゲン脱分岐酵素 (A G L) 欠損症)、アンデルセン病 (G S D 4、グリコーゲン分岐酵素 (G B E 1) 欠損症)、マッカードル病 (G S D 5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (P Y G M) 欠損症)、タルイ病 (G S D 7、筋ホスホフルクトキナーゼ (P F K M) 欠損症)、アルドラーゼA欠損症 (G S D 1 2、アルドラーゼA (A L D O A) 欠損症)、I I型糖尿病/糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。

30

【0008】

いくつかの実施形態では、E R Tは、グルコシダーゼアルファ酸 (G A A)、グリコーゲン脱分岐酵素 (A G L)、グリコーゲン分岐酵素 (G B E 1)、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (P Y G M)、筋ホスホフルクトキナーゼ (P F K M)、アルドラーゼA (A L D O A)、マリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ (G Y S 2)、グルコース-6-ホスファターゼ (G 6 P C / S L C 3 7 A 4)、ホスホリラーゼキナーゼ (P H K A 2 / P H K B / P H K G 2 / P H K A 1)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (P G A M 2)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H A)、グルコース輸送体 (G L U T 2)、β-エンノラーゼ (E N O 3)、及びグリコゲンニン-1 (G Y G 1) からなる群から選択される1つ以上の酵素を含む。

40

【0009】

いくつかの実施形態では、C D 7 1タンパク質に結合するF N 3ドメインにコンジュゲートされたs i R N Aが、提供される。

【0010】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される任意のF N 3ドメインのアミノ酸配列を含むF N 3ドメインが、提供される。いくつかの実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に結合する。いくつかの実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に特異的に結

50

合する。

【0011】

いくつかの実施形態では、組成物は、可撓性リンカーなどのリンカーによって接続される2つのFN3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、2つのFN3ドメインは、異なる標的に結合する。いくつかの実施形態では、第1のFN3ドメインは、CD71に結合する。いくつかの実施形態では、第2のFN3ドメインは、CD71ではない異なる標的に結合する。

【0012】

いくつかの実施形態では、dsRNAまたはsiRNA分子などのオリゴヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書において提供される修飾の有無にかかわらず、本明細書において提供される配列を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、薬学的組成物などの組成物において提供される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ポリペプチドにコンジュ

10

【0013】

いくつかの実施形態では、siRNA分子にコンジュゲートされた1つ以上のFN3ドメインを含む組成物が、提供される。

【0014】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

20

【0015】

いくつかの実施形態では、 $C - (X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4$ の式を有する組成物であって、式中、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

30

【0016】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4 - C$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

【0017】

いくつかの実施形態では、 $X4 - L - (X1)_n - (X2)_q - (X3)_y$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

40

【0018】

いくつかの実施形態では、 $C - X4 - L - (X1)_n - (X2)_q - (X3)_y$ の式を有する組成物であって、式中、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

50

【0019】

いくつかの実施形態では、 $X4-L-(X1)_n-(X2)_q-(X3)_y-C$ の式を有する組成物であって、式中、 $X1$ は、第1のFN3ドメインであり、 $X2$ は、第2のFN3ドメインであり、 $X3$ は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 $X4$ は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

【0020】

いくつかの実施形態では、 $C-(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y$ の式を有する組成物であって、式中、 $X1$ は、第1のFN3ドメインであり、 $X2$ は、第2のFN3ドメインであり、 $X3$ は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 $X4$ は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

10

【0021】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y-C$ の式を有する組成物であって、式中、 $X1$ は、第1のFN3ドメインであり、 $X2$ は、第2のFN3ドメインであり、 $X3$ は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 $X4$ は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

20

【0022】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される組成物のうちの1つ以上を含む薬学的組成物が、提供される。

【0023】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される組成物の使用、または本明細書において提供される状態を治療するための薬学的組成物もしくは薬剤の調製におけるいずれかの使用が、提供される。

【0024】

いくつかの実施形態では、骨格筋におけるGYS1 mRNA及びタンパク質を選択的に低下させ、本明細書に提供される酵素を投与する方法が、提供される。ある特定の実施形態では、GYS1 mRNA及びタンパク質は、肝臓及び／または腎臓において低下しないか、または著しく低下しない。

30

【0025】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるFN3ドメインをコードする単離されたポリヌクレオチドが、提供される。

【0026】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むベクターが、提供される。

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞が、提供される。

40

【0028】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインを生成する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、FN3ドメインをコードまたは発現するベクターを含む宿主細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、FN3ドメインを精製することをさらに含む。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合する。

【0029】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子に連結されたCD71に結合するF

50

N3ドメインと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物が、提供される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子の有無にかかわらず、FN3ドメインのうちの1つ以上を含むキットが、提供される。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】 siRNAスクリーニングのために評価及び考慮される特性を表すフローチャートである。

【図2】細胞をsiRNA対HHHでトランスフェクトした後のトランスクリプトームの変化を識別するRNAシーケンシング実験のグラフであり、矢印は、GYS1転写産物の有意な減少を識別する。

【図3】プロテオームアレイ内の6,000を超える受容体を使用する標的結合アッセイの結果を提供し、データは、CD71がFN3ドメインの排他的結合標的であることを示す。

【図4A】ビヒクル単独と比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋におけるGYS1 mRNAのノックダウンを示す。

【図4B】ビヒクル単独と比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋におけるGYS1タンパク質のノックダウンを示す。

【図5】異なる標的(AHA-1)に対するsiRNAと比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用して、GYS1ノックダウンが骨格筋に対して高度に特異的であることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「a」、「an」、及び「the」は、別途内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞」への言及は、2つ以上の細胞の組み合わせなどを含む。

【0032】

「フィブロネクチンIII型(FN3)ドメイン」(FN3ドメイン)は、フィブロネクチン、テナシン、細胞内細胞骨格タンパク質、サイトカイン受容体、及び原核酵素を含むタンパク質においてしばしば生じるドメインを指す(Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci. USA, 1992, 89:8990-8994, Meinke et al., J Bacteriol., 1993, 175:1910-1918, Watanabe et al., J Biol Chem., 1990, 265:15659-15665)。例示的なFN3ドメインは、例えば、米国特許第8,278,419号に記載されているように、ヒトテナシンCに存在する15個の異なるFN3ドメイン、ヒトフィブロネクチン(FN)に存在する15個の異なるFN3ドメイン、及び非天然合成FN3ドメインである。個々のFN3ドメインは、ドメイン番号及びタンパク質名、例えば、テナシンの第3のFN3ドメイン(TN3)、またはフィブロネクチンの第10のFN3ドメイン(FN10)によって参照される。全体を通して使用されるように、「センチリン」はまた、FN3ドメインを指す。さらに、本明細書に記載されるFN3ドメインは、可変重鎖(V_H)及び／または軽鎖(V_L)の構造を有しないため、抗体ではない。

【0033】

本明細書で使用される場合、「自己免疫疾患」は、個体の免疫応答が個体自身の成分に対して向けられ、望ましくなく、しばしば衰弱していく状態をもたらす病状及び病態を指す。本明細書で使用される場合、「自己免疫疾患」は、自己免疫状態、症候群などをさらに含むことを意図している。自己免疫疾患としては、アジソン病、アレルギー、アレルギー性鼻炎、強直性脊椎炎、喘息、アテローム性動脈硬化症、耳の自己免疫疾患、眼の自己免疫疾患、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性耳下腺炎、自己免疫性ブドウ膜炎、セリアック病、原発性胆汁性肝硬変、良性リンパ球性血管炎、COPD、大腸炎、冠状動脈性心疾患、クローン病、糖尿病(I型)、うつ病、

10

20

30

40

50

糖尿病（1型及び／または2型糖尿病を含む）、精巣上体炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレイブス病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患（IBD）、組換え製剤に対する免疫応答、例えば、血友病の第ⅤⅢ因子、若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、男性不妊症、混合性結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、腫瘍学、変形性関節症、疼痛、原発性粘液浮腫、天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、乾癬、乾癬性関節炎、反応性関節炎、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、交感性眼炎、T細胞リンパ腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、精巣抗中心性T細胞リンパ腫、甲状腺炎、移植による拒絶反応、潰瘍性結腸炎、自己免疫性ブドウ膜炎、及び血管炎が挙げられるが、これらに限定されない。自己免疫疾患には、影響を受ける組織が一次標的であり、場合によっては二次標的である状態が含まれるが、これらに限定されない。そのような状態としては、エイズ、アトピー性アレルギー、気管支喘息、湿疹、ハンセン病、統合失調症、遺伝性うつ病、組織及び臓器の移植、慢性疲労症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳卒中、自閉症、てんかん、アルサス現象、アナフィラキシー、ならびにアルコール及び薬物中毒が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0034】

本明細書で使用される場合、「捕捉剤」は、特定のタイプの細胞に結合し、その細胞を他の細胞から単離することを可能にする物質を指す。例示的な捕捉剤は、磁気ビーズ、強磁性流体、カプセル化試薬、特定の細胞型に結合する分子などである。

【0035】

20

本明細書で使用される場合、「試料」は、対象から単離された同様の流体、細胞、または組織、ならびに対象内に存在する流体、細胞、または組織の集合を指す。例示的な試料は、組織生検、細針吸引、外科的に切除された組織、臓器培養物、細胞培養物、及び血液、血清及び血清液、血漿、リンパ、尿、唾液、囊胞液、涙液、糞便、痰、分泌組織及び臓器の粘膜分泌物、膈分泌物、腹水、胸膜、心膜、腹膜、腹腔及び他の体腔の液体、気管支洗浄によって収集された液体、滑液、対象または生物学的源と接触した液体溶液、例えば、細胞または臓器調節媒体及び洗浄液などを含む細胞及び臓器培養培地である。

【0036】

「置換すること」または「置換された」または「変異すること」または「変異したこと」は、その配列のバリエーションを生成するために、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列中の1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドを改変、欠失、または挿入することを指す。

30

【0037】

「バリエーション」は、1つ以上の修飾、例えば、置換、挿入、または欠失によって参照ポリペプチドまたは参照ポリヌクレオチドとは異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指す。

【0038】

「特異的に結合する」または「特異的結合」とは、約 1×10^{-6} M以下、例えば、約 1×10^{-7} M以下、約 1×10^{-8} M以下、約 1×10^{-9} M以下、約 1×10^{-10} M以下、約 1×10^{-11} M以下、約 1×10^{-12} M以下、または約 1×10^{-13} M以下の解離定数（ K_D ）で、FN3ドメインがその標的、例えばCD71に結合する能力を指す。代替的に、「特異的結合」は、標準溶液ELISAアッセイにおいて、陰性対照よりも少なくとも5倍、FN3ドメインがその標的（例えば、CD71）に結合する能力を指す。特異的結合はまた、本明細書に記載され、図3に示されるプロテオームアレイを使用して実証することができる。いくつかの実施形態では、陰性対照は、CD71に結合しないFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、他の関連抗原、例えば、Macaca Fascicularis（カニクイザル、cyno）またはPan troglodytes（チンパンジー）などの他の種（ホモログ）からの同じ所定の抗原に交差反応性を有し得る。

40

【0039】

50

「ライブラリ」は、バリエーションの一群を指す。ライブラリは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドバリエーションから構成され得る。

【0040】

「安定性」は、その正常な機能的活性のうちの少なくとも1つ、例えば、CD71などの所定の抗原への結合を保持するように、生理学的条件下で折り畳み状態を維持する分子の能力を指す。

【0041】

「CD71」は、配列番号2または5のアミノ酸配列を有するヒトCD71タンパク質を指す。いくつかの実施形態では、配列番号2は、完全長ヒトCD71タンパク質である。いくつかの実施形態では、配列番号5は、ヒトCD71の細胞外ドメインである。

10

【0042】

「テンコン」とは、配列番号1に示されるコンセンサス配列（LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSEFLIQYQESSEKVGAEINLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYTVSIVGVKGGHRSNPLSAEFTT）を有し、米国特許公開第2010/0216708号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される合成フィブロネクチンIII型（FN3）ドメインを指す。

【0043】

「がん細胞」または「腫瘍細胞」は、新しい遺伝物質の取り込みを必ずしも伴わない、自発的または誘導された表現型変化を有する、インビボ、エクスピボ、及び組織培養のいずれかのがん性、前がん性、または形質転換された細胞を指す。形質転換は、形質転換ウイルスによる感染及び新たなゲノム核酸の組み込み、または外因性核酸の取り込みから生じ得るが、それはまた、自然にまたは発がん性物質への曝露後にも生じ得るものであり、それによって内因性の遺伝子を変異させるものである。形質転換／がんは、例えば、インビトロ、インビボ、及びエクスピボの形態的变化、細胞の不死化、異常な成長制御、病巣形成、増殖、悪性腫瘍、腫瘍特異的マーカーレベル、侵襲性、ヌードマウスなどの好適な動物宿主における腫瘍成長または抑制などによって実証される（Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)）。

20

【0044】

「樹状細胞」は、適応免疫系において重要な役割を形成する一種の抗原提示細胞（APC）を指す。樹状細胞の主な機能は、Tリンパ球に抗原を提示することと、免疫応答を直接的または間接的にさらに調節し得るサイトカインを分泌することである。樹状細胞は、不活性または静止しているナイーブTリンパ球において一次免疫応答を誘導する能力を有する。

30

【0045】

「免疫細胞」は、リンパ球（T細胞、B細胞、及びNK細胞）、好中球、または単球／マクロファージとして分類される免疫系の細胞を指す。これらは、あらゆるタイプの白血球である。

【0046】

筋細胞は、様々な筋肉組織を構成する細胞であり、骨格、平滑、及び心筋細胞として分類される。骨格筋細胞は、多核であり、線状である。平滑筋細胞は、単核であり、線状ではない。心筋細胞は、単核であり、線状であり、心臓にのみ見られる。本明細書で 사용되는場合、「筋肉細胞」は、骨格筋細胞及び平滑筋細胞を指し、心筋細胞を指さない。本明細書で 사용되는場合、「心臓細胞」は、心筋細胞のみを指す。

40

【0047】

「ベクター」は、生体系内で複製可能な、またはそのような系間を移動することができる、ポリヌクレオチドを指す。ベクターポリヌクレオチドは、典型的には、生体系におけるこれらのポリヌクレオチドの複製または維持を促進するように機能する、複製起点、ポリアデニル化シグナル、または選択マーカーなどの要素を含有する。そのような生体系の例は、ベクターを複製することができる生物学的要素を利用して細胞、ウイルス、動物、

50

植物、及び再構成された生体系を含み得る。ベクターを含むポリヌクレオチドは、DNAもしくはRNA分子、またはこれらのハイブリッドであり得る。

【0048】

「発現ベクター」は、発現ベクター中に存在するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの翻訳を指示するために、生体系または再構成された生体系において利用することができるベクターを指す。

【0049】

「ポリヌクレオチド」は、糖-リン酸骨格または他の等価な共有結合化学によって共有結合しているヌクレオチド鎖を含む合成分子を指す。cDNAは、典型的な例のポリヌクレオチドである。

【0050】

「ポリペプチド」または「タンパク質」は、ペプチド結合によって連結されてポリペプチドを形成する少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を指す。約50アミノ酸未満の小さいポリペプチドは、「ペプチド」と称され得る。

【0051】

「価」は、分子内の抗原における特異的な特定数の結合部位の存在を指す。したがって、「一価の」、「二価の」、「四価の」、及び「六価の」という用語は、それぞれ、分子内の抗原に特異的な1つ、2つ、4つ、及び6つの結合部位の存在を指す。

【0052】

「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」としては、例えば、哺乳動物及び非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの全ての脊椎動物が挙げられる。注記されている場合を除き、「患者」または「対象」という用語は、互換的に使用される。

【0053】

「単離された」とは、分子が産生される系の他の成分、例えば、組換え細胞、ならびに少なくとも1つの精製または単離ステップに供されたタンパク質から実質的に分離及び／または精製された分子（例えば、合成ポリヌクレオチドまたはFN3ドメインなどのポリペプチド）の均質集団を指す。「単離されたFN3ドメイン」は、他の細胞材料及び／または化学物質を実質的に含まず、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%純度などのより高い純度に単離されたFN3ドメインを包含するFN3ドメインを指す。

【0054】

「酵素補充療法」または「ERT」は、対象に1つ以上の酵素を含む対象に投与される薬学的組成物の使用を指す。いくつかの実施形態では、酵素は、いくつかの態様では、対象における欠損または不足している酵素を補充または置き換えるために投与される。典型的には、療法に関与する1つ以上の酵素は、1つ以上の酵素を含む薬学的組成物の静脈内注入によって対象に投与される。本明細書に記載されるように、酵素補充療法は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、mRNA、cDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）などの追加の治療剤に連結されることができるFN3ドメインを含む組成物とともに投与することができる。いくつかの実施形態では、酵素補充療法の投与は、本明細書において提供される追加の治療薬に連結されたFN3ドメインを含む組成物の投与前、投与中、または投与後であり得る。

【0055】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子と連結され得るFN3ドメインを含むポリペプチドなどのポリペプチドを含む組成物が、提供される。オリゴヌクレオチド分子は、例えば、siRNA分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、mRNAなどであり得る。

【0056】

したがって、いくつかの実施形態では、siRNAは、標的遺伝子の発現を阻害するこ

10

20

30

40

50

とができる二本鎖RNAi (dsRNA) 剤である。dsRNA 剤は、センス鎖 (パッセンジャー鎖) 及びアンチセンス鎖 (ガイド鎖) を含む。いくつかの実施形態では、dsRNA 剤の各鎖は、12~40ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。例えば、各鎖は、長さが14~40ヌクレオチド、長さが17~37ヌクレオチド、長さが25~37ヌクレオチド、長さが27~30ヌクレオチド、長さが17~23ヌクレオチド、長さが17~21ヌクレオチド、長さが17~19ヌクレオチド、長さが19~25ヌクレオチド、長さが19~23ヌクレオチド、長さが19~21ヌクレオチド、長さが21~25ヌクレオチド、または長さが21~23ヌクレオチドであり得る。

【0057】

いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、典型的には、二重鎖dsRNAを形成する。dsRNA 剤の二重鎖領域は、長さが12~40ヌクレオチド対であり得る。例えば、二重鎖領域は、長さが14~40ヌクレオチド対、長さが17~30ヌクレオチド対、長さが25~35ヌクレオチド対、長さが27~35ヌクレオチド対、長さが17~23ヌクレオチド対、長さが17~21ヌクレオチド対、長さが17~19ヌクレオチド対、長さが19~25ヌクレオチド対、長さが19~23ヌクレオチド対、長さが19~21ヌクレオチド対、長さが21~25ヌクレオチド対、または長さが21~23ヌクレオチド対であり得る。別の例では、二重鎖領域は、長さが15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、及び27ヌクレオチド対から選択される。

【0058】

いくつかの実施形態では、dsRNAは、鎖の3'末端もしくは5'末端または両方の末端にて、dsRNA 剤の1つ以上のオーバーハング領域及び／またはキャッピング基を含む。オーバーハングは、長さが1~10ヌクレオチド、長さが1~6ヌクレオチド、例えば、長さが2~6ヌクレオチド、長さが1~5ヌクレオチド、長さが2~5ヌクレオチド、長さが1~4ヌクレオチド、長さが2~4ヌクレオチド、長さが1~3ヌクレオチド、長さが2~3ヌクレオチド、または長さが1~2ヌクレオチドであり得る。オーバーハングは、一方の鎖がもう一方よりも長い結果、または同じ長さの2本の鎖がねじれている結果であり得る。このオーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得るか、または標的とする遺伝子配列に対して相補的であり得るか、または別の配列であり得る。第1及び第2の鎖はまた、例えば、ヘアピンを形成するための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連結することもできる。

【0059】

いくつかの実施形態では、dsRNA 剤のオーバーハング領域内のヌクレオチドは、各々独立して、例えば、2'-F、2'-Oメチル、2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-O-(2-メトキシエチル)、及びこれらの任意の組み合わせなどの2'-糖修飾を含むが、これらに限定されない修飾または非修飾ヌクレオチドであり得る。例えば、TT(UU)は、いずれかの鎖上のいずれかの末端のためのオーバーハング配列であり得る。このオーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得るか、または標的とする遺伝子配列に対して相補的であり得るか、または別の配列であり得る。

【0060】

dsRNA 剤のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖における5'-または3'-オーバーハングは、リン酸化され得る。いくつかの実施形態では、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、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、またはメシルホスホラミデートを有する2つのヌクレオチドを含有し、2つのヌクレオチドは、同一であり得るか、または異なり得る。一実施形態では、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に存在する。一実施形態では、この3'オーバーハングは、アンチセンス鎖内に存在する。一実施形態では、この3'オーバーハングは、センス鎖内に存在する。

【0061】

10

20

30

40

50

d s R N A 剤は、その全体的な安定性に影響を及ぼすことなく、d s R N A の干渉活性を強化することができる単一のオーバーハングのみを含み得る。例えば、一本鎖のオーバーハングは、センス鎖の 3' 末端に、または代替的に、アンチセンス鎖の 3' 末端に位置する。d s R N A はまた、アンチセンス鎖の 5' 末端（またはセンス鎖の 3' 末端）に位置する、またはその逆も同じである、平滑末端を有し得る。概して、d s R N A のアンチセンス鎖は、3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5' 末端は平滑である。理論に拘束されることを望むことなく、こうした非対称であるアンチセンス鎖の 5' 末端にある平滑末端及びアンチセンス鎖の 3' 末端オーバーハングであることが、R I S C へのガイド鎖挿入に好都合である。例えば、単一のオーバーハングは、長さが少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 ヌクレオチドを含む。

10

【0062】

いくつかの実施形態では、d s R N A 剤はまた、d s R N A 二本鎖の両端に 2 つの平滑末端を有し得る。

【0063】

いくつかの実施形態では、d s R N A 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖内の全てのヌクレオチドは、修飾され得る。各ヌクレオチドは、同じまたは異なる修飾で修飾され得、この修飾は、非連結リン酸酸素及び／または結合リン酸酸素のうちの 1 つ以上の一方または両方の 1 つ以上の変更、リボース糖の成分、例えば、リボース糖における 2 ヒドロキシルの成分の変更、リン酸部分の「脱リン酸」リンカーでの大量の置換、天然に存在する塩基の修飾または置換、ならびにリボースーリン酸骨格の置換または修飾を含み得る。

20

【0064】

いくつかの実施形態では、3' または 5' オーバーハング内の塩基の全てまたはいくつかは、例えば、本明細書に記載される修飾によって修飾され得る。修飾は、例えば、当該技術分野で既知の修飾、例えば、デオキシリボヌクレオチドの使用、核酸塩基のリボ糖の代わりに修飾された 2'-デオキシ-2'-フルオロ (2'-F) または 2'-O-メチルの使用、及びリン酸基の修飾、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、またはメシルホスホラミデート修飾によるリボース糖の 2' 位での修飾の使用を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

【0065】

いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、L N A 30、H N A、C e N A、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'-フルオロで修飾される。鎖は、1 つを超える修飾を含有し得る。一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、2'-O-メチルまたは 2'-フルオロで修飾される。

【0066】

いくつかの実施形態では、少なくとも 2 つの異なる修飾が、典型的には、センス鎖及びアンチセンス鎖に存在する。これらの 2 つの修飾は、2'-デオキシ、2'-O-メチルまたは 2'-フルオロ修飾、非環式ヌクレオチドまたは他のものであり得る。

【0067】

一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、各々、2'-フルオロ、2'-O-メ 40チル、または 2'-デオキシから選択される 2 つの異なる修飾ヌクレオチドを含む。

【0068】

d s R N A 剤は、少なくとも 1 つのホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合をさらに含み得る。ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾は、鎖の任意の位置にあるセンス鎖もしくはアンチセンス鎖、またはその両方の任意のヌクレオチド上で生じ得る。例えば、ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖上の全てのヌクレオチド上で生じ得、各ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上で交互のパターンで生じ得るか、またはセンス

50

鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターンで両方のヌクレオチド間結合修飾を含む。センス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一であり得るか、異なり得、センス鎖上のヌクレオチド間結合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結合修飾の交互パターンと比較してシフトを有し得る。

【0069】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、オーバーハング領域に、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、または2つのヌクレオチド間のメチルホスホネートヌクレオチド間結合を有する2つのヌクレオチドを含む。ヌクレオチド間結合修飾はまた、オーバーハングヌクレオチドを二重鎖領域内の末端対合ヌクレオチドと連結させるために行われ得る。例えば、少なくとも2、3、4つ、または全てのオーバーハングヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホロジトエート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合を介して連結され得、任意選択的に、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に隣接した対合ヌクレオチドと連結する、追加のホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が存在し得る。例えば、末端の3つ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結合が存在し得、3つのヌクレオチドのうちの2つが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に隣接した対合ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、これらの末端の3つのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端にあり得る。

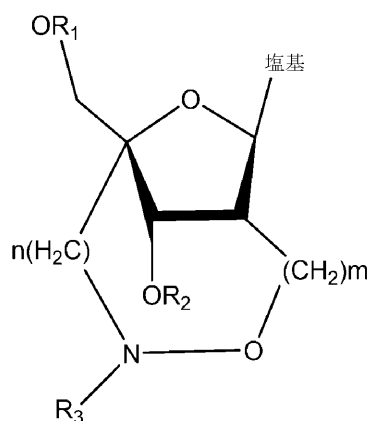
【0070】

いくつかの実施形態では、dsRNA組成物は、米国特許第7,427,672号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される修飾塩基またはヌクレオシド類似体によって連結される。いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、本明細書に記載される式において、リンカーまたはLと称される。

【0071】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、

【化1】



(化学式I)

式中、塩基は、置換基を任意選択的に有する芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、 R_1 及び R_2 は、同一または異なるものであり、各々が、水素原子、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラールキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基で保護されたリン酸基、または $-P(R_4)R_5$ （式中、 R_4 と R_5 は同一または

異なる)を表し、各々が、ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基で保護されたヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基、1～5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、1～6個の炭素原子を有するシアノアルコキシ基、または1～5個の炭素原子を有するアルキル基で置換されたアミノ基を表し、 R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、または機能分子単位の置換基を表し、 m は、0～2の整数を表し、 n は、0～3の整数を表す。いくつかの実施形態では、 m 及び n は、0である。

【0072】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、またはシリル基である。

10

【0073】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、*p*-トルエンスルホニル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または*tert*-ブチルジフェニルシリル基である。

20

【0074】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基で保護されたリン酸基である。

【0075】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、*p*-トルエンスルホニル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、*tert*-ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または2-クロロフェニルもしくは4-クロロフェニルホスフェート基である。

30

【0076】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、1～5個の炭素原子を有するアルケニル基、6～14個の炭素原子を有するアリール基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、メタンスルホニル基または*p*-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族または芳香族スルホニル基、アセチル基などの1～5個の炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である。

40

【0077】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_3 としての機能分子単位の置換基は、蛍光または化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、または細胞内もしくは核内移動シグナルペプチドである。

【0078】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩

50

に示される構造を有し、式中、塩基は、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、または以下の α 基から選択される置換基を有するプリン-9-イル基もしくは2-オキソピリミジン-1-イル基である： α 基：ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基で保護されたヒドロキシル基、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基で保護されたメルカプト基、1～5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基によって置換されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、及びハロゲン原子。

【0079】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I 及びその塩に示される構造を有し、式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル（すなわち、アデニニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル（すなわち、グアニニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、シトシニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、ウラシニル）、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、チミニル）、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、5-メチルシトシニル）、または核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである。

【0080】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I 及びその塩に示される構造を有し、式中、mは、0であり、nは、1である。

【0081】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I I に示される構造を有するヌクレオシド類似体の1つ以上のタイプの単位構造、またはその薬理学的に許容される塩のうちの1つまたは2つ以上を含有するDNAオリゴヌクレオチドまたはRNAオリゴヌクレオチド類似体であるが、但し、オリゴヌクレオチド類似体中のそれぞれのヌクレオシド間の結合の形態が、天然核酸中のものと同じのホスホジエステル結合[$-\text{O}-\text{P}(\text{O}_2^-)-\text{O}-$]に加えて、1つまたは2つ以上のホスホロチオエート結合[$-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{S}^-)-\text{O}-$]、ホスホロジチオエート結合[$-\text{O}_2\text{PS}_2-$]、ホスホネート結合[$-\text{P}(\text{OH})_2-$]、ホスホラミデート結合[$-\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2-$]、またはメシルホスホラミデート結合[$-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{N})(\text{SO}_2)(\text{CH}_3)-$]を含有し得、1つ以上のタイプのこれらの構造のうちの2つ以上が含ま

10

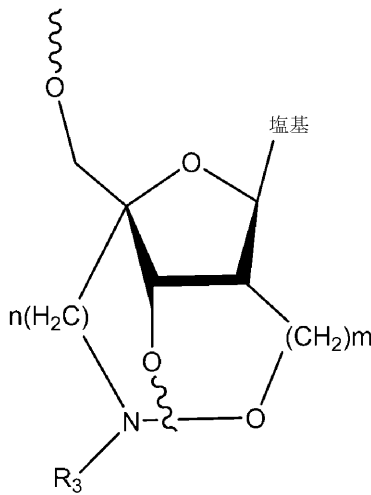
20

30

40

50

れている場合、塩基は、以下のこれらの構造間で同一であり得るか、または異なり得、
【化 2】



10

式中、塩基は、置換基を任意選択的に有する芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、 R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、または機能分子単位の置換基を表し、 m は、 $0 \sim 2$ の整数を表し、 n は、 $0 \sim 3$ の整数を表す。いくつかの実施形態では、 m 及び n は、 0 である。

20

【0082】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式 I I に示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、 $1 \sim 3$ 個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する $1 \sim 3$ 個のアリール基によって置換されたメチル基、またはシリル基である。

【0083】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式 I I に示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または $tert$ -ブチルジフェニルシリル基である。

30

【0084】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式 I I に示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、 $1 \sim 3$ 個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する $1 \sim 3$ 個のアリール基によって置換されたメチル基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基で保護されたリン酸基である。

40

【0085】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式 I I に示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、 $tert$ -ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または 2 -クロロフェニルもしくは 4 -クロロフェニルホスフェート基である。

50

【0086】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、1～5個の炭素原子を有するアルケニル基、6～14個の炭素原子を有するアリール基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、メタンスルホニル基またはp-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族または芳香族スルホニル基、アセチル基などの1～5個の炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である。

【0087】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_3 としての機能分子単位の置換基は、蛍光または化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、または細胞内もしくは核内移動シグナルペプチドである。

10

【0088】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、塩基は、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、または以下の α 基から選択される置換基を有するプリン-9-イル基もしくは2-オキソピリミジン-1-イル基である： α 基：ヒドロキシシル基、核酸合成のための保護基で保護されたヒドロキシシル基、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基で保護されたメルカプト基、1～5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基によって置換されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、及びハロゲン原子。

20

【0089】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル（すなわち、アデニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する6-アミノプリン-9-イル、2,6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル（すなわち、グアニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2,6-ジメトキシプリン-9-イル、2,6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、シトシニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシプリン-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、ウラシニル）、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、チミニル）、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、5-メチルシトシ

30

40

50

ニル)、または核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イルである。

【0090】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、mは、0であり、nは、1である。

【0091】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ポリマー(ポリマー部分C)をさらに含む。場合によっては、ポリマーは、分岐または非分岐モノマーの長鎖、及び/または2次元もしくは3次元のモノマーの架橋ネットワークからなる、天然または合成ポリマーである。場合によっては、ポリマーは、多糖類、リグニン、ゴム、またはポリアルキレンオキシド(例えば、ポリエチレングリコール)を含む。場合によっては、少なくとも1つのポリマーとしては、アルファー、オメガ-ジヒドロキシルポリエチレングリコール、生分解性ラクトン系ポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリラクチド酸(PLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタラット(PET、PETG)、ポリエチレンテレフタレート(PETE)、ポリテトラメチレングリコール(PTG)、またはポリウレタン、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、混合物は、ブロックコポリマーに関してだけでなく、同じ化合物内での異なるポリマーの使用を指す。ある場合には、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも1つの部分が別のポリマーのモノマーから構築されるポリマーである。場合によっては、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。場合によっては、ポリマーは、PEGを含む。場合によっては、ポリマーは、ポリエチレンイミド(PEI)またはヒドロキシエチルデンブロン(HES)を含む。

10

20

【0092】

場合によっては、Cは、PEG部分である。場合によっては、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の5'末端でコンジュゲートされるが、結合部分は、オリゴヌクレオチド分子の3'末端でコンジュゲートされる。場合によっては、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の3'末端でコンジュゲートされるが、結合部分は、オリゴヌクレオチド分子の5'末端でコンジュゲートされる。場合によっては、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の内部部位にコンジュゲートされる。場合によっては、PEG部分、結合部分、またはそれらの組み合わせは、オリゴヌクレオチド分子の内部部位にコンジュゲートされる。場合によっては、コンジュゲーションは、直接コンジュゲーションである。場合によっては、コンジュゲーションは、ネイティブライゲーションを介して行われる。

30

【0093】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド(例えばPEG)は、多分散または単分散化合物である。場合によっては、多分散材料は、平均重量(重量平均)サイズ及び分散性によって特徴付けられる、材料の異なる分子量の分散分布を含む。場合によっては、単分散PEGは、1つのサイズの分子を含む。いくつかの実施形態では、Cは、多分散または単分散ポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)であり、示される分子量は、ポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)分子の分子量の平均を表す。

40

【0094】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)の分子量は、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000Daである。

50

【0095】

いくつかの実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。場合によっては、Cの分子量は、約200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1100 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1450 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2100 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3250 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3350 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3750 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4250 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4750 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約5000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約5500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約6000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約6500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約7000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約7500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約8000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約10,000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約12,000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約20,000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約35,000 Daである。場合によっては、Cの分子

10

20

30

40

50

量は、約 40,000 Da である。場合によっては、C の分子量は、約 50,000 Da である。場合によっては、C の分子量は、約 60,000 Da である。場合によっては、C の分子量は、約 100,000 Da である。

【0096】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、別個の PEG であり、別個の PEG は、1 つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマー PEG である。場合によっては、別個の PEG（dPEG）は、2～60、2～50、または 2～48 個の反復エチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEG は、約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50 個またはそれ以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 2 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 3 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 4 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 5 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 6 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 7 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 8 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 9 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 10 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 11 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 12 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 13 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 14 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 15 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 16 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 17 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 18 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 19 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 20 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 22 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 24 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 26 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 28 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 30 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 35 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 40 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 42 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 48 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEG は、約 50 個またはそれ以上の反復エチレンオキシド単位を含む。ある場合には、dPEG は、段階的な方法において純粋な（例えば、約 95%、98%、99%、または 99.5%）出発材料（starting material）から単一の分子量化合物として合成される。ある場合には、dPEG は、平均分子量ではなく、特定の分子量を有する。ある場合には、本明細書に記載される dPEG は、Quanta Biodesign、LMD の dPEG である。

【0097】

いくつかの実施形態では、C は、アルブミン結合ドメインである。ある特定の態様では、アルブミン結合ドメインは、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）に特異的に結合して、ドメインまたはアルブミン結合ドメインが関連するかまたは結合している別の治療薬の半減期を延長する。いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミン結合ドメインは、分子の N 末端に連結された開始剤メチオニン（Met）を含む。いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミン結合ドメインは、ドメインの C 末端または N 末端に連結されたシステイン（Cys）を含む。N 末端 Met 及び／または C 末端 Cys の添加

は、PEG、Fc領域などの別の半減期延長分子であり得る、別の分子への発現及び／またはコンジュゲーションを促進し得る。

【0098】

いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、以下の表1に提供される、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメイン（タンパク質）は、単離される。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含むが、但し、タンパク質は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に相当する置換を有するものとする。いくつかの実施形態では、置換は、A10Vである。いくつかの実施形態では、置換は、A10G、A10L、A10I、A10T、またはA10Sである。いくつかの実施形態では、10位の置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、単離されたアルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と比較した場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14の置換を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、置換は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の位置10に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、提供されるFN3ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の残基位置6、11、22、25、26、52、53、61、88、または位置6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、もしくは93に対応する少なくとも1つの残基位置に、またはC末端でシステイン残基を含む。位置は一連に列挙されているが、各位置はまた、個別に選択され得る。いくつかの実施形態では、システインは、位置6、53、または88に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインの追加の例は、米国特許第10,925,932号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1

配列番号	配列
101	MLPAPKNLVASRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
102	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
103	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFAIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
104	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNISYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
105	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYAEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDL TGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
106	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEAGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
107	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPAGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
108	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGAGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
109	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIAGEAIWLRVPGSERSYDL TGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
110	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIALRVPGSERSYDL TGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
111	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLAVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
112	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
113	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVAIHGVKGGASSPPLIARFTT
114	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIAGVKGGASSPPLIARFTT
115	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGSSPPLIARFTT
116	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGAASPPLIARFTT
117	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSAPLIARFTT

10

20

30

40

【表 1 - 2】

118	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLAARFTT
119	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIAAFTT

50

【0099】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、標的との、二本鎖内の、またはそれらの組み合わせとのミスマッチ（複数可）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で生じ得る。塩基対は、解離または融解（例えば、特定の対合の結合または解離の自由エネルギーに対してであり、最も単純なアプローチは、個々の対ベースで対を評価することであるが、類縁または同様の分析を用いることもできる）を促進するそれらの傾向に基づいてランク付けすることができる。解離の促進に関しては、A：Uは、G：Cよりも好ましく、G：Uは、G：Cよりも好ましく、I：Cは、G：Cよりも好ましい（I＝イノシン）。ミスマッチ、例えば、非正準な対合または正準以外の対合（本明細書の他の箇所に記載される）は、正準な対合（A：T、A：U、G：C）よりも好ましく、ユニバーサル塩基を含む塩基対は、正準な対合よりも好ましい。

10

【0100】

いくつかの実施形態では、dsRNA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むことができる。5'末端リン含有基は、5'末端リン酸塩（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'-PS₂）、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（MeP_{hos}）、5'末端メシルホスホラミデート（5'-MsPA）、または5'-デオキシ-5'-C-マロニルであり得る。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、トランス-ビニルホスフェートまたはシス-ビニルホスフェートなどの5'-E-VP異性体、またはそれらの混合物のいずれかであり得る。これらの修飾の代表的な構造は、例えば、米国特許第10,233,448号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

20

【0101】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド類似体または合成ヌクレオチド塩基は、リボース部分の2'ヒドロキシル基に修飾を有する核酸を含む。場合によっては、修飾は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、またはCNを含み、式中、Rは、アルキル部分である。例示的なアルキル部分としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、C₁-C₁₀鎖長の直鎖及び分岐鎖の両方が挙げられるが、これらに限定されない。場合によっては、アルキル部分は、修飾をさらに含む。場合によっては、修飾は、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシル基、ニトロ基、ニトロソ基、ニトリル基、複素環（例えば、イミダゾール、ヒドラジンもしくはヒドロキシルアミノ）基、イソシアネートもしくはシアネート基、または硫黄含有基（例えば、スルホキシド、スルホン、スルフィド、及びジスルフィド）を含む。場合によっては、アルキル部分は、O、S、N、Seなどの追加のヘテロ原子をさらに含み、これらのヘテロ原子の各々は、上記のようなアルキル基でさらに置換され得る。場合によっては、複素環式基の炭素は、窒素、酸素、または硫黄によって置換される。場合によっては、複素環の置換としては、モルホリノ、イミダゾール、及びピロリジノが挙げられるが、これらに限定されない。

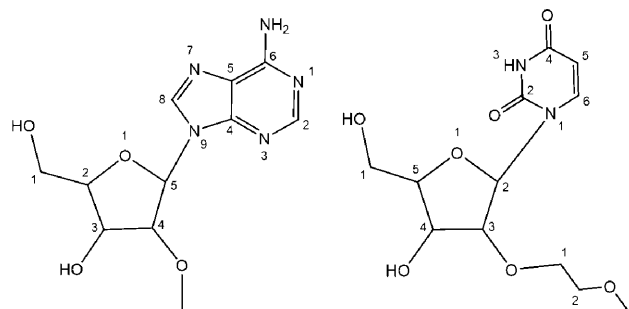
30

【0102】

場合によっては、2'ヒドロキシル基における修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）修飾である。アデノシン分子の2'-O-メチル修飾及びウリジンの2'-O-メトキシエチル修飾の例示的な化学構造を、以下に示す。

40

【化 3】



2' -O-メチル-アデノシン

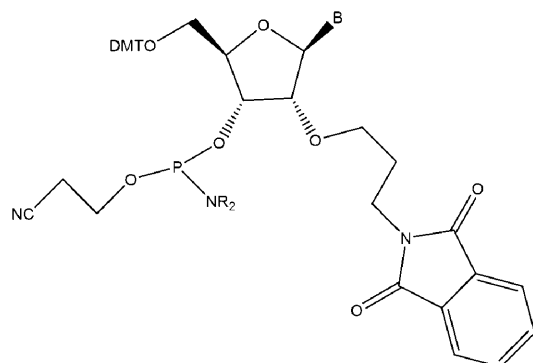
2' -O-メトキシエチルウリジン

10

【0103】

場合によっては、2' ヒドロキシル基における修飾は、プロピルリンカーを含む伸長アミン基がアミン基を2' 酸素に結合する2' -O-アミノプロピル修飾である。場合によっては、この修飾は、1糖当たりアミン基から1つの正電荷を導入することによって、オリゴヌクレオチド分子のリン酸由来の全体的な負電荷を中和し、それによって、その双性イオン特性に起因する細胞取り込み特性を改善する。2' -O-アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイトの例示的な化学構造を、以下に示す。

【化 4】



2' -O-アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイト

20

30

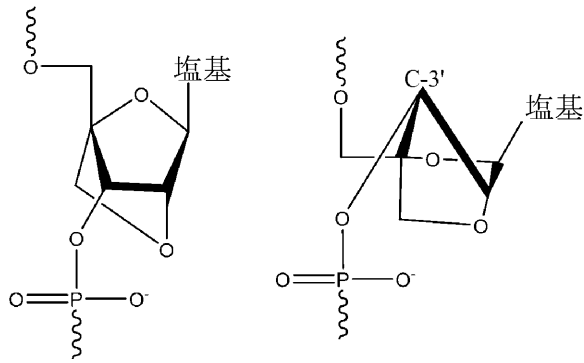
【0104】

場合によっては、2' ヒドロキシル基における修飾は、2' 炭素で結合された酸素分子がメチレン基によって4' 炭素に結合し、したがって、2' -C、4' -C-オキシーメチレン結合二環式リボヌクレオチドモノマーを形成する、ロックまたは架橋リボース修飾（例えば、ロック核酸またはLNA）である。LNAの化学構造の例示的な描図を、以下に示す。左方に示した描図は、LNAモノマーの化学連結性を強調する。右方に示した描図は、LNAモノマーのフラノース環のロックされた3'-エンド（3E）コンフォメーションを強調する。

40

50

【化 5】



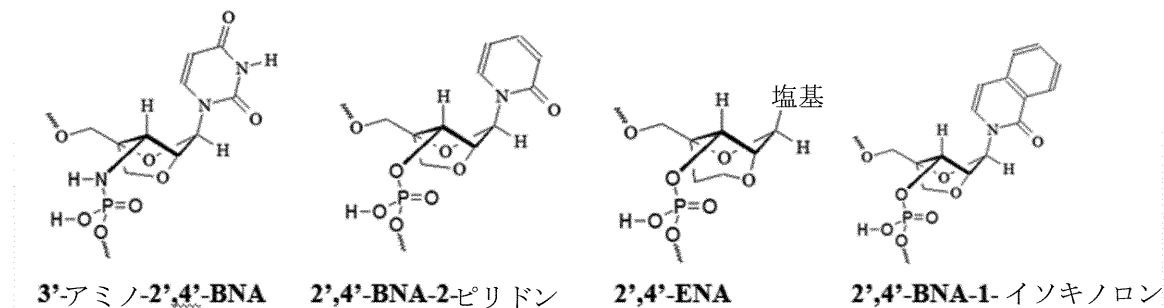
LNA (ロック核酸)

10

【0105】

場合によっては、2' ヒドロキシル基における修飾は、例えば、2' - 4' - エチレン架橋核酸などのエチレン核酸 (ENA) を含み、これは、糖コンフォメーションを C 3' - エンド糖バックリング (puckering) コンフォメーションの中へロックする。ENA は、LNA も含む修飾核酸の架橋型核酸群の一部である。ENA 及び架橋核酸の例示的な化学構造を、以下に示す。

【化 6】



20

【0106】

いくつかの実施形態では、2' ヒドロキシル基における追加の修飾には、2' - デオキシ、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O - AP)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - DMAOE)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - DMAP)、2' - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - DMAEOE)、または 2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - NMA) が含まれる。

【0107】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド類似体は、5 - プロピニルウリジン、5 - プロピニルシチジン、6 - メチルアデニン、6 - メチルグアニン、N, N, - ジメチルアデニン、2 - プロピルアデニン、2 - プロピルグアニン、2 - アミノアデニン、1 - メチルイノシン、3 - メチルウリジン、5 - メチルシチジン、5 - メチルウリジン及び 5 位に修飾を有する他のヌクレオチド、5 - (2 - アミノ) プロピルウリジン、5 - ハロシチジン、5 - ハロウリジン、4 - アセチルシチジン、1 - メチルアデノシン、2 - メチルアデノシン、3 - メチルシチジン、6 - メチルウリジン、2 - メチルグアノシン、7 - メチルグアノシン、2, 2 - ジメチルグアノシン、5 - メチルアミノエチルウリジン、5 - メチルオキシウリジン、7 - デアザアデノシンなどのデアザヌクレオチド、6 - アズリジン、6 - アゾシチジン、6 - アゾチミジン、5 - メチル - 2 - チオウリジン、2 - チオウリジン及び 4 - チオウリジン及び 2 - チオシチジンなどの他のチオ塩基、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチル及び置換ナフチル基、任意の O - 及び N - アルキル化プリン及びピリミジン、例えば、N 6 - メチルアデノシン、5 - メ

30

40

50

チルカルボニルメチルウリジン、ウリジン 5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル及び修飾フェニル基、例えば、アミノフェノールまたは 2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、G-c l a m pヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8-置換アデニン及びグアニン、5-置換ウラシル及びチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、ならびにアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドなどであるが、これらに限定されない、修飾塩基を含む。修飾ヌクレオチドはまた、糖部分に関して修飾されたヌクレオチド、ならびにリボシルではない糖またはその類似体を有するヌクレオチドも含まれる。例えば、糖部分は、場合によっては、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、及び他の糖、複素環、または炭素環であるか、またはそれに基づいている。ヌクレオチドという用語には、当該技術分野でユニバーサル塩基として知られているものも含まれる。例として、ユニバーサル塩基には、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネブラリンが含まれるが、これらに限定されない。

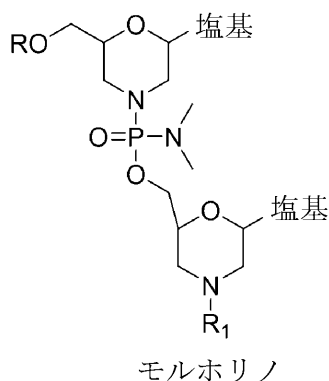
10

【0108】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド類似体は、モルホリノ、ペプチド核酸 (PNA)、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロ N3-P5'-ホスホラミダイト、1', 5'-アンヒドロヘキシトール核酸 (HNA)、またはそれらの組み合わせをさらに含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴ (PMO) は、その構造が通常の糖及びリン酸構造からの逸脱によって天然の核酸構造を模倣する合成分子を含む。場合によっては、5員リボース環は、4個の炭素、1個の窒素、及び1個の酸素を含有する6員モルホリノ環で置換される。ある場合には、リボースモノマーは、リン酸基の代わりにホスホロジアミデート基によって連結される。そのような場合、骨格改変は、全ての正及び負の電荷を除去して、モルホリノを、荷電性オリゴヌクレオチドによって使用されるような細胞送達剤の手助けなしに細胞膜を横断することができる中性分子にすることを可能にする。

20

【化7】



30

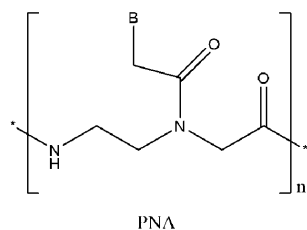
【0109】

いくつかの実施形態では、ペプチド核酸 (PNA) は、糖環またはリン酸結合を含まず、塩基は、オリゴグリシン様分子に付いて、それによって適切に整えられるので、骨格電荷を消失させる。

40

50

【化 8】



【0110】

10

いくつかの実施形態では、1つ以上の修飾は、任意選択的に、ヌクレオチド間結合において生じる。場合によっては、修飾ヌクレオチド間結合としては、ホスホロチオエート、メシルホスホルアミデート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、5'-メチルホスホネート、3'-アルキレンホスホネート、三フッ化ホウ素、3'-5'結合または2'-5'結合のボラノリン酸エステル及びセレノホスフェート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸水素結合、アルキルホスホネート、アルキルホスホチオエート、アリールホスホチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスフィネート、ホスホラミデート、3'-アルキルホスホラミデート、アミノアルキルホスホラミデート、チオノホスホラミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホロアニルチオエート、ホスホロアニリデート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、炭酸塩、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノス、メチレンメチルイミノ、チオアミデート、リボアセチル基との結合、アミノエチルグリシン、シリルまたはシロキサン結合、例えば、飽和もしくは不飽和及び／または置換される及び／またはヘテロ原子を含む1～10個の炭素のヘテロ原子の有無にかかわらず、アルキルまたはシクロアルキル結合、モルホリノ構造との結合、アミド、塩基が骨格のアザニトロゲンに直接的または間接的に結合しているポリアミド、ならびにそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド (P S A S O) は、ホスホロチオエート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。メシルホスホラミデートアンチセンスオリゴヌクレオチド (M s P A A S O) は、メシルホスホラミデート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

30

【0111】

場合によっては、修飾は、メチルホスホネート、メシルホスホラミデート、またはチオールホスホネート修飾などのメチルまたはチオール修飾である。場合によっては、修飾ヌクレオチドは、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含むが、これに限定されない。

【0112】

場合によっては、修飾ヌクレオチドは、ヘキシトール核酸（または1', 5'-アンヒドロヘキシトール核酸 (H N A)）を含むが、これに限定されない。

40

【0113】

いくつかの実施形態では、1つ以上の修飾は、任意選択的に、リボース部分、リン酸骨格及びヌクレオシドの修飾、または3'もしくは5'末端におけるヌクレオチド類似体の修飾をさらに含む。例えば、3'末端は、任意選択的に、3'カチオン基を含むか、または3'-3'結合を有する3'末端でヌクレオシドを反転させることによって。別の代替において、3'末端は、任意選択的に、アミノアルキル基、例えば、3' C5-アミノアルキル d Tとコンジュゲートされる。さらなる代替において、3'末端は、任意選択的に、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位または脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。場合によっては、5'末端は、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アルキルアミノ置換基とコンジュゲートされる。ある場合には、5'末端は、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位ま

50

たは脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。

【0114】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、もしくは2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、もしくは2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、チオールホスホネートヌクレオチドを含む。

【0115】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、約5%~約100%の修飾、約10%~約100%の修飾、約20%~約100%の修飾、約30%~約100%の修飾、約40%~約100%の修飾、約50%~約100%の修飾、約60%~約100%の修飾、約70%~約100%の修飾、約80%~約100%の修飾、及び約90%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、100%修飾を含む。

【0116】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約90%の修飾、約20%~約90%の修飾、約30%~約90%の修飾、約40%~約90%の修飾、約50%~約90%の修飾、約60%~約90%の修飾、約70%~約90%の修飾、及び約80%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0117】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約80%の修飾、約20%~約80%の修飾、約30%~約80%の修飾、約40%~約80%の修飾、約50%~約80%の修飾、約60%~約80%の修飾、及び約70%~約80%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0118】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約70%の修飾、約20%～約70%の修飾、約30%～約70%の修飾、約40%～約70%の修飾、約50%～約70%の修飾、及び約60%～約70%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0119】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約60%の修飾、約20%～約60%の修飾、約30%～約60%の修飾、約40%～約60%の修飾、及び約50%～約60%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0120】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約50%の修飾、約20%～約50%の修飾、約30%～約50%の修飾、及び約40%～約50%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

10

【0121】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約40%の修飾、約20%～約40%の修飾、及び約30%～約40%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0122】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約30%の修飾、及び約20%～約30%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0123】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約20%の修飾を含む。

20

【0124】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約15%～約90%、約20%～約80%、約30%～約70%、または約40%～約60%の修飾を含む。

【0125】

追加の場合には、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の修飾を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40の修飾を含む。

30

【0127】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0128】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約5%～約100%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約5%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約10%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約15%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約20%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴ

40

50

ヌクレオチド分子の約 25% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 30% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 35% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 40% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 45% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 50% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 55% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 60% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 65% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 70% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 75% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 80% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 85% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 90% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 95% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 96% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 97% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 98% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 99% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 100% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-APP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または 2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) 修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロ N3-P5'-ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせを含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 1~約 25 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 1 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 2 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 3 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 4 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 5 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 6 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 7 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 8 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。い

50

ド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 39 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 40 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。

【0130】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、2つの別個のポリヌクレオチドから組み立てられ、1つのポリヌクレオチドは、センス鎖を含み、第2のポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド分子のアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖は、リンカー分子を介してアンチセンス鎖に接続されており、場合によっては、ポリヌクレオチドリナーまたは非ヌクレオチドリナーである。

10

【0131】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖に存在するピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖に存在するプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

【0132】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

【0134】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、複数の（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上など）2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、複数の2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つは、連続したヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、連続した2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する。いくつかの実施形態では、連続した2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の3'末端に位置する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、その5'末端及び／または3'末端に、あるいは、その両方で少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、そのような実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、ポリヌクレオチドの5'末端で少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドの3'末端で、またはポリヌクレオチドの3'末端で少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドの5'末端で、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。また、任意選択的に、そのような少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、連続したヌクレオチドである。

30

40

50

【0135】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の3'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、プリンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドである。

10

【0136】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの1つは、5'末端に位置する少なくとも2つの連続した2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有するが、別の鎖は、5'末端に位置する少なくとも2つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、鎖は、5'末端に位置する少なくとも2つの連続した2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する場合、鎖はまた、少なくとも2つの連続した2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドの3'末端に少なくとも2つの、少なくとも3つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドも含む。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の1つは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有し、その5'末端及び／または3'末端に2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドに連結されている。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの1つは、交互に2'-O-メチル修飾ヌクレオチド及び2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する少なくとも4つ、少なくとも5つのヌクレオチドを有する。

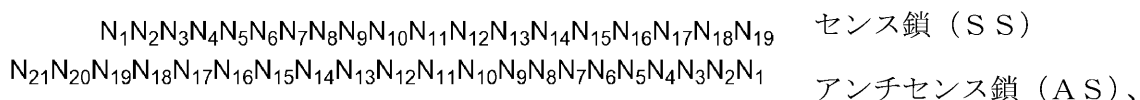
20

【0137】

いくつかの実施形態では、s i R N Aなどのオリゴヌクレオチド分子は、式Iに示されており、

【化9】

30



ここで、Nで表される各ヌクレオチドは、独立して、A、U、C、もしくはG、または本明細書で提供されるものなどの修飾ヌクレオチド塩基である。センス鎖及びアンチセンス鎖のN₁ヌクレオチドは、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確にするために、式Iは、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方でN₁、N₂、N₃などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同一である必要はなく、同一であることが意図されていない。式Iに示されるs i R N Aは、標的配列に相補的であろう。

40

【0138】

例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖は、N₁及びN₂にホスホロチオエート (P S) 修飾骨格を有する2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、N₃、N₇、N₈、N₉、N₁₂、及びN₁₇に2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₄、N₅、N₆、N₁₀、N₁₁、N₁₃、N₁₄、N₁₅、N₁₆、N₁₈、及びN₁₉に2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0139】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、N₁に結合したビニルホスホネート部分、N₂にホスホロチオエート (P S) 修飾骨格を有する2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、

50

N₃、N₄、N₅、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₀、N₁₁、N₁₂、N₁₃、N₁₅、N₁₆、N₁₇、N₁₈、及びN₁₉に2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、N₄に2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₂₀及びN₂₁にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0140】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、センス鎖の5'末端、3'末端、または5'末端及び3'末端の両方に末端キャップ部分を含む。他の実施形態では、末端キャップ部分は、逆デオキシ脱塩基性部分である。

【0141】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端にグリセリル修飾を含む。

【0142】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上）の2'-デオキシ基、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または約1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含み、アンチセンス鎖は、約1～約10個、またはそれ以上、具体的には、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス及び／またはアンチセンス鎖の1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、またはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または同じもしくは異なる鎖に存在する、3'末端、5'末端、または3'末端及び5'末端の両方で、末端キャップ分子の有無にかかわらず、2'-デオキシ、2'-O-メチル、及び／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾される。

【0143】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、約1～約25個、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含み、アンチセンス鎖は、約1

～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-オ-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス及び／またはアンチセンス鎖の1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、約1～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または同じもしくは異なる鎖に存在する、3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子の有無にかかわらず、2'-デオキシ、2'-オ-メチル、及び／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾される。

10

【0144】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／またはセンス鎖及び／またはアンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、約1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-オ-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、約1～約10個以上、具体的には、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-オ-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス及び／またはアンチセンス鎖の1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または同じもしくは異なる鎖に存在する、3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子の有無にかかわらず、2'-デオキシ、2'-オ-メチル、及び／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾される。

20

30

40

【0145】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、約1～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2

50

、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含み、アンチセンス鎖は、約1～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホロアミデート、もしくはメシルホスホロアミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス及び／またはアンチセンス鎖の1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、約1～約5個、例えば、約1、2、3、4、5個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または同じもしくは異なる鎖に存在する、3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で末端キャップ分子の有無にかかわらず、2'-デオキシ、2'-O-メチル、及び／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾される。

10

20

【0146】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子の各鎖において、約1～約25個、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合を有する、化学修飾された低分子干渉核酸分子である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端にリン酸骨格修飾を含む。代替的及び／または追加的に、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端にリン酸骨格修飾を含む。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホロチオエートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホロジチオエートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホネートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホラミデートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、メシルホスホラミデートである。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのホスホロチオエート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのホスホロジチオエート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのホスホネート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのホスホラミデート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのメシルホスホラミデート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。

30

40

【0147】

別の実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、2'-5'ヌク

50

レオチド間結合を含む。場合によっては、2' - 5' ヌクレオチド間結合（複数可）は、一方または両方の配列鎖の3' 末端、5' 末端、または3' 末端及び5' 末端の両方にある。場合によっては、2' - 5' ヌクレオチド間結合（複数可）は、一方または両方の配列鎖内の様々な他の位置に存在し、例えば、オリゴヌクレオチド分子の一方または両方の鎖のピリミジンヌクレオチドの全てのヌクレオチド間結合を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むか、またはオリゴヌクレオチド分子の一方または両方の鎖のプリンヌクレオチドの全てのヌクレオチド間結合を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含む。

【0148】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、細胞内のRNAi活性を媒介するか、またはインビトロ系で再構成される一本鎖分子であり、ここで、オリゴヌクレオチド分子は、標的核酸配列と相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、オリゴヌクレオチド分子中に存在する1つ以上のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全てのピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、または交互に複数のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、オリゴヌクレオチド分子中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチド（例えば、全てのプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドであるか、または交互に複数のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドである）、及びアンチセンス配列の3' 末端、5' 末端、または3' 末端及び5' 末端の両方に任意選択的に存在する末端キャップ修飾であり、オリゴヌクレオチド分子は、任意選択的に、オリゴヌクレオチド分子の3' 末端に、約1〜約4個（例えば、約1、2、3、または4個）の末端2' - デオキシヌクレオチドをさらに含み、末端ヌクレオチドは、1個以上（例えば、1、2、3、または4個）のホスホロチオエートまたはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合をさらに含み、オリゴヌクレオチド分子は、任意選択的に、5' 末端リン酸基などの末端リン酸基をさらに含む。

【0149】

場合によっては、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上は、天然ポリ核酸分子及びエンドヌクレアーゼと比較した場合、ヌクレアーゼ、例えば、RNAse Hなどのリボヌクレアーゼ、DNAseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または5' - 3' エキソヌクレアーゼ及び3' - 5' エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼに対して耐性がある。場合によっては、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル（2' - O - MOE）、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、2' - デオキシ-2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル（2' - O - AP）、2' - O - ジメチルアミノエチル（2' - O - DMAOE）、2' - O - ジメチルアミノプロピル（2' - O - DMAP）、2' - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル（2' - O - DMAEOE）、または2' - O - N - メチルアセトアミド（2' - O - NMA）修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メシルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2' - フルオロN3 - P5' - ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせを含む合成ヌクレオチド類似体は、ヌクレアーゼ、例えば、RNAse Hなどのリボヌクレアーゼ、DNAseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または5' - 3' エキソヌクレアーゼ及び3' - 5' エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼに対して耐性がある。場合によっては、2' - O - メチル修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNAse H、DNAse、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、または3' - 5' エキソヌクレアーゼ耐性）である。場合によっては、2' - O - メトキシエチル（2' - O - MOE）修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNAse H、DNAse、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、または3' - 5' エキソヌクレアーゼ耐性）である。場合によっては、2' - O - アミノプロピル修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNAse H、DNAse、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、または3' - 5' 50

エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-デオキシ修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、HNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、モルホリノは、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、メチルホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、チオールホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-フルオロN3'-P5'-ホスホラミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、本明細書に記載される5'コンジュゲートは、5'-3'エキソヌクレオチド分解切断を阻害する。場合によっては、本明細書に記載される3'コンジュゲートは、3'-5'エキソヌクレオチド分解切断を阻害する。

【0150】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチル

ホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、または2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含む合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-メチル修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-アミノプロピル修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-デオキシ修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、HNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、モルホリノ修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、メチルホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、チオールホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。ある場合には、増加した親和性は、より低いKd、より高い融解温度(Tm)、またはそれらの組み合わせで示されている。

10

20

30

40

【0151】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、キラル純粋な(またはステレオ純粋な)ポリ核酸分子、または単一の鏡像異性体を含むポリ核酸分子である。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、L-ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、D-ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子組成物は、その鏡像異性体の30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子組成物は、ラセミ混合物の30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下含む。

50

【0152】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、アプタマー共役部分を含むようにさらに修飾される。場合によっては、アプタマー共役部分は、DNAアプタマー共役部分である。場合によっては、アプタマー結合部分は、特異的な細胞表面標的を認識するアプタマー部分、及び循環抗体に結合するための特異的なエピトープを提示する部分を含むアルファマーである。

【0153】

追加の実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増加させるように修飾される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、RNA（例えば、siRNA）である。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増加させるために、上記の修飾のうちの1つ以上によって修飾される。ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、例えば、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）、または2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）修飾によって、またはロックもしくは架橋リボースコンフォメーション（例えば、LNAもしくはENA）によって、2'-ヒドロキシル位置で修飾される。ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル及び／または2'-O-メトキシエチルリボースによって修飾される。ある場合には、オリゴヌクレオチド分子はまた、その安定性を増加させるために、モルホリノ、PNA、HNA、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、及び／または2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトも含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、キラル純粋な（またはステレオ純粋な）オリゴヌクレオチド分子である。場合によっては、キラル純粋な（またはステレオ純粋な）オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増加させるように修飾される。送達のための安定性を増加させるためのRNAへの好適な修飾は、当業者には明らかであろう。

【0154】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、2'修飾を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖の5'末端から位置3、7、8、9、12、及び17でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾で修飾されない。いくつかの実施形態では、センス鎖の5'末端から位置3、7、8、9、12、及び17でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置2及び14でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾で修飾されない。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置2及び14でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドのうちのいずれも、5'-ホスホロチオエート基修飾をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、センス鎖の5'末端から位置1及び2でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置1、2、20、及び21でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンスまたはアンチセンス鎖の5'末端は、ビニルホスホネート修飾をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置1でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、ビニルホスホネート修飾で修飾される。

【0155】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性センス及びアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であり、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。場合によっては、オリ

ゴヌクレオチド分子は、2つの別個のポリヌクレオチドから組み立てられ、一方の鎖は、センス鎖であり、もう一方の鎖は、アンチセンス鎖及びセンス鎖が自己相補的であり（例えば、各鎖は、他の鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、例えば、アンチセンス鎖及びセンス鎖が、二重鎖または二本鎖構造を形成する場合、例えば、二本鎖領域が、約19、20、21、22、23個、またはそれ以上の塩基対である）、アンチセンス鎖は、標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を含む。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ、オリゴヌクレオチド分子の自己相補性センス及びアンチセンス領域は、核酸ベースまたは非核酸ベースのリンカー（複数可）によって連結される。

10

【0156】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補的センス及びアンチセンス領域を有する、二重鎖、非対称二重鎖、ヘアピンまたは非対称ヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであり、アンチセンス領域は、別個の標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。他の場合には、オリゴヌクレオチド分子は、2つ以上のループ構造を有する環状一本鎖ポリヌクレオチド、及び自己相補的センス及びアンチセンス領域を含むステムであり、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部分のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、及び標的核酸配列またはその一部分に対応するヌクレオチド配列を有するセンス領域を含み、環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロのいずれかで処理されて、RNAiを媒介することができる活性オリゴヌクレオチド分子を生成する。追加の場合には、オリゴヌクレオチド分子はまた、標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドも含み（例えば、そのようなオリゴヌクレオチド分子が、その標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列のオリゴヌクレオチド分子内での存在を必要としない場合）、その一本鎖ポリヌクレオチドは、末端リン酸基、例えば、5'-リン酸基、または5', 3'-二リン酸基をさらに含む。

20

【0157】

場合によっては、非対称ヘアピンは、アンチセンス領域と、ヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むループ部分と、センス領域が、アンチセンス領域と塩基対に対して十分な相補的なヌクレオチドを有し、ループを用いて二重鎖を形成する程度まで、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含むセンス領域とを含む線形オリゴヌクレオチド分子である。例えば、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子は、細胞またはインビトロ系におけるRNAiを媒介するのに十分な長さ（例えば、約19〜約22ヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、約4〜約8ヌクレオチドを含むループ領域と、アンチセンス領域に相補的な約3〜約18ヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。ある場合には、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子はまた、化学修飾された5'末端リン酸基も含む。追加の場合には、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子のループ部分は、ヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカー分子、または共役分子を含む。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、非対称二重鎖は、センス領域及びアンチセンス領域を含む2つの別個の鎖を有するオリゴヌクレオチド分子であり、センス領域は、センス領域がアンチセンス領域と塩基対を有し、二重鎖を形成するのに十分な相補的なヌクレオチドを有する程度まで、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含む。例えば、非対称二重鎖オリゴヌクレオチド分子は、細胞またはインビトロ系におけるRNAiを媒介するのに十分な長さ（例えば、約19〜約22ヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、アンチセンス領域に相補的な約3〜約19ヌクレオチドを有するセンス領域と、を含む。

40

【0159】

ある場合には、ユニバーサル塩基は、天然のDNA/RNA塩基の各々と、それらの間でほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を指す。ユニバーサル塩

50

基の非限定的な例としては、当該技術分野で周知であるように、C-フェニル、C-ナフチル、及び他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、ならびに3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、及び6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体が挙げられる。

【0160】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、5'ホスホリル化されるか、または5'プライム末端にホスホリル類似体を含む。5'ホスフェート修飾は、RISC媒介遺伝子サイレンシングと適合するものを含む。好適な修飾としては、以下が挙げられる：5'-リボン酸塩（ $(\text{HO}_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$ ）；5'-ニリン酸塩（ $(\text{HO}_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ）；5'-三リン酸塩（ $(\text{HO}_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ）；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化）（ $7\text{m-G-O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$ ）；5'-アデノシンキャップ（Appp）；及び任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造（ $\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$ ）；5'-モノチオホスフェート（ホスホロチオエート）； $(\text{HO}_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5')$ ；5'-モノジチオホスフェート（ホスホロジチオエート）； $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ）；5'-ホスホロチオエート（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$ ）；ホスホロジチオエート $[-\text{O}_2\text{PS}_2-]$ ；ホスホネート $[-\text{PO}(\text{OH})_2-]$ ；ホスホラミデート $[-\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2-]$ ；メシルホスホラミデート $(\text{CH}_3)(\text{SO}_2)(\text{N})\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-5'$ ）；酸素／硫黄置換ーリン酸塩、ニリン酸塩、及び三リン酸塩（例えば、5'-アルファーチオトリホスフェート、5'-ガンマーチオトリホスフェートなど、5'-ホスホラミデート（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ ）；5'-アルキルホスホネート（ $\text{R}=\text{アルキル}=\text{メチル}$ 、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ 、5'-アルケニルホスホネート（すなわち、ビニル、置換ビニル）、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$ ）、5'-アルキルホスホネート（ $\text{R}=\text{アルキルエーテル}=\text{メトキシメチル}(\text{MeOCH}_2-)$ 、エトキシメチルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ ）。いくつかの実施形態では、修飾は、dsRNA剤のアンチセンス鎖に配置することができる。

【0161】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子の配列は、GYS1の標的配列に少なくとも40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または99.5%相補的である。いくつかの実施形態では、GYS1の標的配列は、GYS1における約10~50塩基対長、約15~50塩基対長、15~40塩基対長、15~30塩基対長、または15~25塩基対長配列の核酸配列であり、標的配列の第1のヌクレオチドは、コード領域におけるGYS1 mRNA転写産物における、または5'もしくは3'非翻訳領域（UTR）における任意のヌクレオチドで開始する。例えば、標的配列の第1のヌクレオチドは、それがGYS1 mRNAのコードまたは非コード領域（5'または3'非翻訳領域）内の核酸位置（nal、GYS1 mRNAの完全長の5'末端から始まる数、例えば、5'末端の第1のヌクレオチドがnal.1である）1、nal 2、nal 3、nal 4、nal 5、nal 6、nal 7、nal 8、nal 9、nal 10、nal 11、nal 12、nal 13、nal 14、nal 15、nal 15、nal 16、nal 17、または任意の他の核酸位置で始まるように選択することができる。いくつかの実施形態では、標的配列の第1のヌクレオチドは、それがnal 10~nal 15、nal 10~nal 20、nal 50~nal 60、nal 55~nal 65、nal 75~nal 85、nal 95~nal 105、nal 135~nal 145、nal 155~nal 165、nal 225~nal 235、nal 265~nal 275、nal 275~nal 245、nal 245~nal

255、nal 285～nal 335、nal 335～nal 345、nal
 385～nal 395、nal 515～nal 525、nal 665～nal
 675、nal 675～nal 685、nal 695～nal 705、nal
 705～nal 715、nal 875～nal 885、nal 885～nal
 895、nal 895～nal 905、nal 1035～nal 1045、na
 l 1045～nal 1055、nal 1125～nal 1135、nal 11
 35～nal 1145、nal 1145～nal 1155、nal 1155～n
 al 1165、nal 1125～nal 1135、nal 1155～nal 1
 165、nal 1225～nal 1235、nal 1235～nal 1245、
 nal 1275～nal 1245、nal 1245～nal 1255、nal
 1265～nal 1275、nal 1125～nal 1135、nal 1155
 ～nal 1165、nal 1225～nal 1235、nal 1235～nal
 1245、nal 1275～nal 1245、nal 1245～nal 1255
 、nal 1265～nal 1275、nal 1275～nal 1285、nal
 1335～nal 1345、nal 1345～nal 1355、nal 1525
 ～nal 1535、nal 1535～nal 1545、nal 1605～nal
 1615、nal 1615～c. 1625、nal 1625～nal 1635、n
 al 1635～1735、nal 1735～1835、nal 1835～1935
 、nal. 1836～1856、nal 1935～2000、nal 2000～21
 00、nal 2100～2200、nal 2200～2260、nal 2260～
 2400、nal 2400～2500、nal 2500～2600、nal 260
 0～2700、nal 2700～2800、nal 2800～2500、nal 2
 500～2600、nal 2600～2700、nal 2700～2800、nal
 2800～2860などの内で、またはその間で位置で始まるように選択することができ
 る。いくつかの実施形態では、GYS1 mRNAの配列は、NCBI参照配列：NM__
 002103として提供される。

10

20

30

40

【0162】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤のアンチセンス鎖は、標的RNAに100%相
 補的であり、それにハイブリダイズし、RNA干渉を介してその発現を阻害する。標的R
 NAは、細胞中で発現される任意のRNAであり得る。別の実施形態では、細胞は、腫瘍
 細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、または中枢神経系の細胞で
 ある。別の実施形態では、dsRNA剤のアンチセンス鎖は、標的RNAに対して少なく
 とも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、95%、少なく
 とも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70
 %、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、または少なくとも50%
 相補的である。いくつかの実施形態では、標的RNAは、GYS1 RNAである。いく
 つかの実施形態では、siRNA分子は、GYS1の発現を低減させるsiRNAである
 。いくつかの実施形態では、siRNA分子は、本明細書に記載されるアッセイにおいて
 、本明細書に記載される200nm以下の濃度で、GYSの発現を低減させ、他のRNA
 の発現を50%を超えて低減させないsiRNAである。

【0163】

siRNAは、目的の任意の遺伝子またはRNA（例えば、mRNA）転写産物を標的
 とすることができる。

【0164】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、米国特許第10,233,448号（参照によ
 り本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0165】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、Anderson et al. (Nucle
 ic Acids Research, 2021, 49(16), 9026-9041)
 （参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

50

【0166】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、国際特許出願公開第WO2021/030778号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0167】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、国際特許出願公開第WO2021/030763号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0168】

いくつかの実施形態では、s i R N Aは、F N 3ドメインなどのタンパク質に連結されている。s i R N Aは、同じ標的タンパク質または異なる標的タンパク質に結合する複数のF N 3ドメインに連結され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、センス鎖に結合され、これは、F N 3ドメインへのセンス鎖の連結を容易にするために使用される。

10

【0169】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、X1は、第1のF N 3ドメインであり、X2は、第2のF N 3ドメインであり、X3は、第3のF N 3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、s i R N A分子などであるが、これらに限定されない、核酸分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である。いくつかの実施形態では、X1、X2、及びX3は、異なる標的タンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、yは、0である。いくつかの実施形態では、nは、1であり、qは、0であり、yは、0である。いくつかの実施形態では、nは、1であり、qは、1であり、yは、0である。いくつかの実施形態では、nは、1であり、qは、1であり、yは、1である。いくつかの実施形態では、第3のF N 3ドメインは、X3を持たない分子と比較して、全体として分子の半減期を増大させる。いくつかの実施形態では、半減期延長部分は、アルブミンに結合するF N 3ドメインである。そのようなF N 3ドメインの例としては、米国特許出願公開第20170348397号及び米国特許第9,156,887号（参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。F N 3ドメインは、例えば、共有結合相互作用を介して他のサブユニットを組み込み得る。いくつかの実施形態では、F N 3ドメインは、半減期延長部分をさらに含む。例示的な半減期延長部分は、アルブミン、アルブミンバリエーション、アルブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、トランスフェリン及びその断片及び類似体、ならびにFc領域である。ヒトFc領域のアミノ酸配列は、周知であり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、及びIgE Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、F N 3ドメインは、本明細書に記載される半減期延長部分のうちのいずれかを含むが、これらに限定されない、分子全体の半減期を延長する分子に結合する第2のF N 3ドメインを組み込み得る。いくつかの実施形態では、第2のF N 3ドメインは、アルブミン、アルブミンバリエーション、アルブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、ならびにそれらの断片及び類似体に結合する。

20

30

【0170】

いくつかの実施形態では、 $(X1) - (X2) - L - (X4)$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、X1は、第1のF N 3ドメインであり、X2は、第2のF N 3ドメインであり、Lは、リンカーであり、X4は、核酸分子である。いくつかの実施形態では、X4は、s i R N A分子である。いくつかの実施形態では、X1は、C D 7 1のうちの1つに結合するF N 3ドメインである。いくつかの実施形態では、X2は、C D 7 1のうちの1つに結合するF N 3ドメインである。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、同じ標的タンパク質に結合しない。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、同じ標的タンパク質に結合するが、タンパク質上の異なる結合部位で結合する。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、同じ標的タンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、C D 7 1に結合するF N 3ドメインである。いくつかの実施形態では、組成物は、A S G P Rに結合する化合物またはタンパク質を含まない（例えば、それがない）。

40

50

【0171】

いくつかの実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

【0172】

いくつかの実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] - (X_3)_y - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

10

【0173】

いくつかの実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] L - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

20

【0174】

いくつかの実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] L - (X_3)_y - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

【0175】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - F_1$ の式を有し、

30

C は、PEG などのポリマーであり、

L_1 及び L_2 は、各々独立して、リンカーであり、

X_S は、二本鎖 siRNA 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、

X_{AS} は、二本鎖 siRNA 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、

F_1 は、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、

式中、 X_S 及び X_{AS} は、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、組成物／複合体を形成する。

【0176】

いくつかの実施形態では、 C は、分子の半減期を延長する分子であり得る。そのような部分の例を、本明細書に記載する。いくつかの実施形態では、 C はまた、エンドポーター、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリジン、または両親媒性ペプチドでもあり得る。これらの部分は、本明細書に提供される他の半減期延長部分の代わりに、またはそれに加えて使用することができる。いくつかの実施形態では、 C は、複合体を細胞、エンドソーム、または ER に送達する分子であり得、当該分子は、以下の表 2 に列挙されるそれらのペプチドから選択される。

40

【表 2】

表 2

配列番号	名称	配列
1043	TAT	RKKRRQRRR
1044	ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK
1045	トランスポーター	GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL
1046	MAP	KLALKLALKALKAAALKLA
1047	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
1048	KDEL	KDEL
1049	GALA	WEAALAEALAEHLAEALAEALEALAA
1050	HA2	GDIMGEWGNEIFGAIAGFLGC
1051	Aurine 1.2	GLFDIHKIAESF
1052	MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKSKRKV
1053	TP-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
1054	EB-1	LIRLWSHLIHIWFQNRRLKWKKK
1055	HA2-ペネトラチン	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRRMKWKK
1056	エンドソーム分解	FFKKLAHALHLLALLALHLAHLKKA
1057	エンドソーム分解	LFEAIEGFIENGWGMIDGWYG
1058	エンドソーム分解	LFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGRKKRRQRRR
1059	エンドソーム分解	IGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
1060	ER 標的	MKLAVTLTLVTLALSSSSASA
1061	ER 標的	RLIEDICLPRWGCLWEDDKDEL
1062	ER 標的	MIRTLTLLSTLVAGALSK
1063	ER 標的	ILSSLTVTQLLRRLHQWIK
1064	ER 標的	MIRTLTLLSTLVAGALSKDEL

10

20

30

40

【0177】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 X_s の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - F_1$ の式を有する。

【0178】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する。

【0179】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、本明細書に提供されるセンス鎖である。

【0180】

50

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、本明細書に提供されるアンチセンス鎖である。

【0181】

いくつかの実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、GYS1を標的とする二本鎖 siRNA 分子を形成する。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、長さが約 21～23 ヌクレオチド塩基対である。ある特定の実施形態では、C は、任意選択的である。

【0182】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有し、 F_1 は、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、 L_1 及び L_2 は、各々独立して、リンカーであり、 C は、PEG などのポリマーであり、 X_S は、二本鎖 siRNA 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、 X_{AS} は、二本鎖 siRNA 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、

式中、 X_S 及び X_{AS} は、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、組成物／複合体を形成する。ある特定の実施形態では、C は、任意選択的である。

【0183】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 X_S の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有する。

【0184】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する。

【0185】

いくつかの実施形態では、C は、分岐または非分岐モノマーの長鎖、及び／または 2 次元もしくは 3 次元のモノマーの架橋ネットワークからなる、天然または合成ポリマーである。場合によっては、ポリマーは、多糖類、リグニン、ゴム、またはポリアルキレンオキシド（例えばポリエチレングリコールであり得る）を含む。いくつかの例では、少なくとも 1 つのポリマーとしては、アルファー、オメガージヒドロキシルポリエチレングリコール、生分解性ラクトン系ポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリラクチド酸（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタラット（PET、PETG）、ポリエチレン-B-B テレフタレート（PETE）、ポリテトラメチレングリコール（PTG）、またはポリウレタン、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、混合物は、ブロックコポリマーに関してだけでなく、同じ化合物内での異なるポリマーの使用を指す。ある場合には、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも 1 つの部分が別のポリマーのモノマーから構築されるポリマーである。場合によっては、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。場合によっては、ポリマーは、PEG を含む。場合によっては、ポリマーは、ポリエチレンイミド（PEI）またはヒドロキシエチルデンプン（HES）を含む。

【0186】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば PEG）は、多分散または単分散化合物である。場合によっては、多分散材料は、平均重量（重量平均）サイズ及び分散性によって特徴付けられる、材料の異なる分子量の分散分布を含む。場合によっては、単分散 PEG は、1 つのサイズの分子を含む。いくつかの実施形態では、C は、多分散または単分散ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、示される分子量は、ポリアルキレンオキシド、例えば、PEG 分子の分子量の平均を表す。

【0187】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）の分子量は、約

200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daである。

【0188】

いくつかの実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。場合によっては、Cの分子量は、約200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1100 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1450 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2100 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3250 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3350 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3750 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4250 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4600 Daである。場合によっては、Cの分子

10

20

30

40

50

量は、約 4 7 5 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 5 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 5 5 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 6 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 6 5 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 7 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 7 5 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 8 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 1 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 1 2 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 2 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 3 5 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 4 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 5 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 6 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 1 0 0 , 0 0 0 D a である。

10

【0189】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、P E G）は、別個の P E G であり、別個の P E G は、1 つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマー P E G である。場合によっては、別個の P E G（d P E G）は、2 ～ 6 0、2 ～ 5 0、または 2 ～ 4 8 個の反復エチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は、約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50 個またはそれ以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 2 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 3 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 4 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 5 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 6 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 7 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 8 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 9 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 10 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 11 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 12 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 13 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 14 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 15 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 16 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 17 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 18 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 19 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 20 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 22 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 24 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 26 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 28 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 30 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 35 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 40 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 42 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 48 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。ある場合には、d P E G は、段階的な方法において純粋な（例えば、約 95 %、98 %、99 %、または 99.5 %）出発材料（starting material）から単一の分子量化合物として合成される。ある場合には、d P E G は、平均分子量ではなく、特定の分子量を有する。ある場合には、本明細書に記載される d P E G は、Q u a n t a B i o d e s i g n、L M D の d P E G である。

20

30

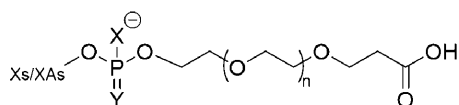
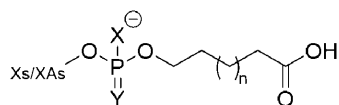
40

50

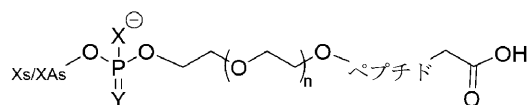
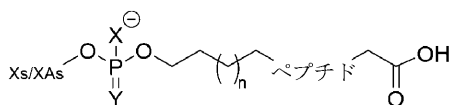
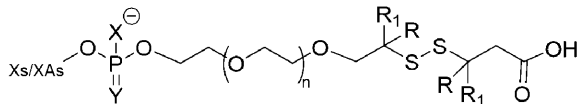
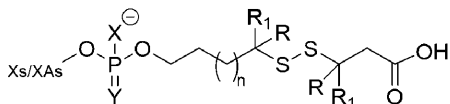
【0190】

いくつかの実施形態では、 L_1 は、ポリマーCをセンス鎖 X_S に連結するか、または F_1 のポリペプチドをセンス鎖 X_S に連結するために使用することができる任意のリンカーである。いくつかの実施形態では、 L_1 は、以下の式を有し：

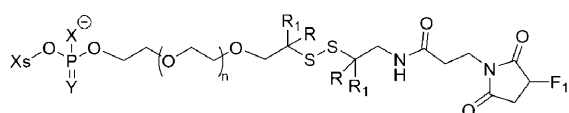
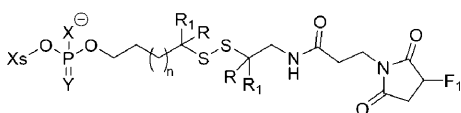
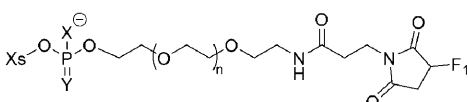
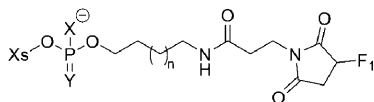
【化10】



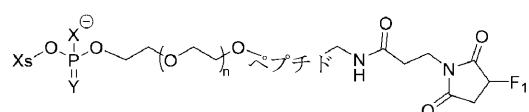
10



20



30



式中、 X_S 、 X_{AS} 、及び F_1 は、上記で定義される通りである。

【0191】

いくつかの実施形態では、 n が、0～20である。いくつかの実施形態では、 R 及び R_1 は、独立して、メチルである。いくつかの実施形態では、 R 及び R_1 は、独立して、存在するか、または両方とも存在しない。いくつかの実施形態では、 X 及び Y は、独立して、 S である。いくつかの実施形態では、 X 及び Y は、独立して、存在するか、または存在しない。いくつかの実施形態では、ペプチドは、例えば、Val-Cit、Val-Alaなどであるが、これらに限定されない、酵素的に切断可能なペプチドである。

40

【0192】

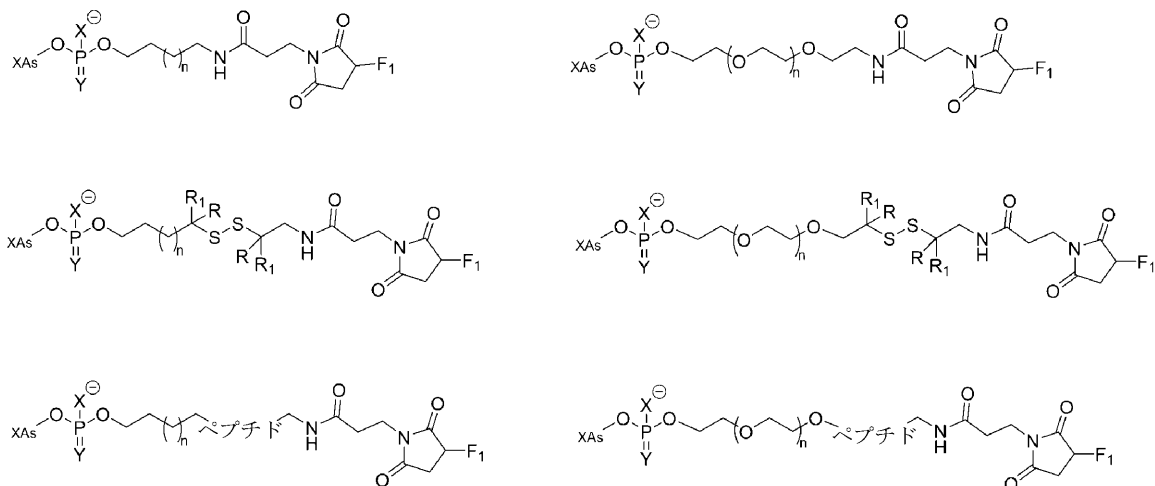
いくつかの実施形態では、 L_2 は、 F_1 のポリペプチドをアンチセンス鎖 X_{AS} に連結するか、またはポリマーCをアンチセンス鎖 X_{AS} に連結するために使用することができる任意のリンカーである。

【0193】

いくつかの実施形態では、 L_2 は、以下の複合体中の式を有し：

50

【化 1 1】



10

式中、 X_{As} 及び F_1 は、上記で定義される通りである。

【0194】

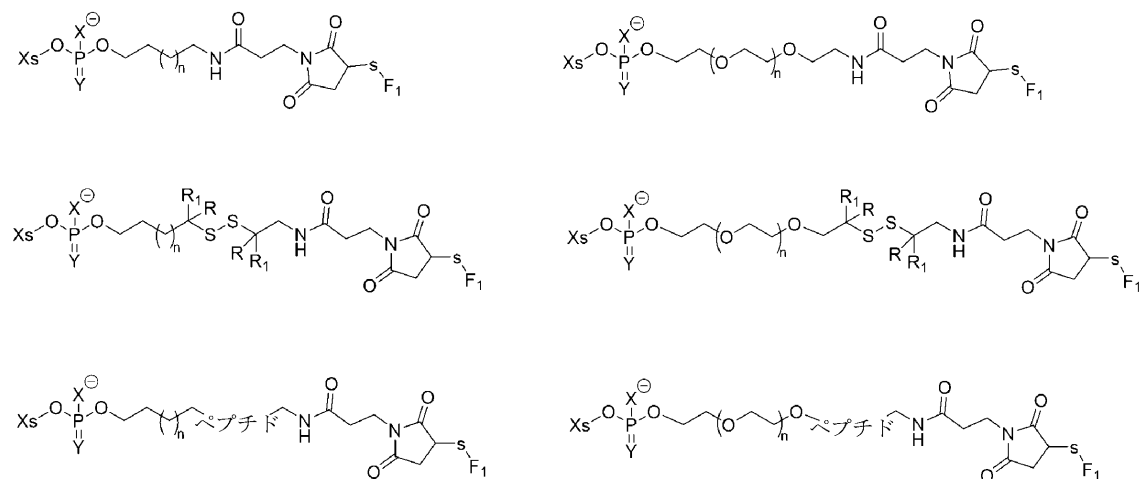
いくつかの実施形態では、 n が、 $0 \sim 20$ である。いくつかの実施形態では、 R 及び R_1 は、独立して、メチルである。いくつかの実施形態では、 R 及び R_1 は、独立して、存在するか、または両方とも存在しない。いくつかの実施形態では、 X 及び Y は、独立して、 S である。いくつかの実施形態では、 X 及び Y は、独立して、存在するか、または存在しない。いくつかの実施形態では、ペプチドは、例えば、*Val-Cit*、*Val-Ala* などであるが、これらに限定されない、酵素的に切断可能なペプチドである。

20

【0195】

いくつかの実施形態では、リンカーは、 F_1 に存在するシステイン残基を介して F_1 に共有結合し、これを以下のように示すことができる。

【化 1 2】



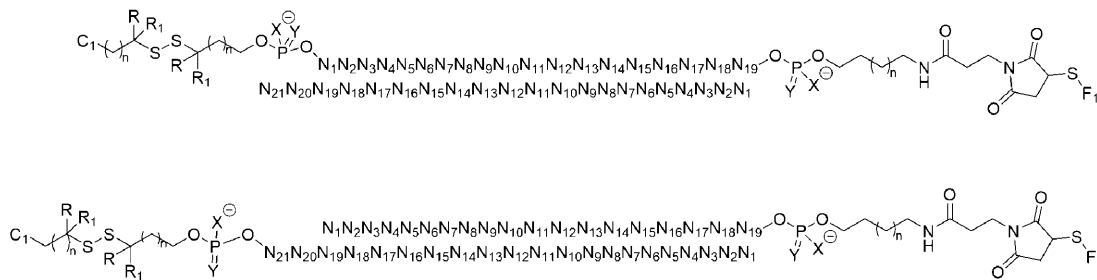
30

40

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ は、以下の式を有し：

50

【化 1 3】



10

式中、Cは、本明細書に提供されるように、PEGなどのポリマー、エンドポーター、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリジン、両親媒性ペプチド、または表2に列挙されるペプチドであり、X_Sは、二本鎖siRNA分子の5'から3'オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、X_Aは、二本鎖siRNA分子の3'から5'オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、F₁は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり、X_S及びX_Aは、二本鎖siRNA分子を形成する。センス鎖及びアンチセンス鎖は、「N」表記で表され、Nで表される各ヌクレオチドは、独立して、A、U、C、もしくはG、または本明細書に提供されるものなどの修飾された核酸塩基である。センス鎖及びアンチセンス鎖のN₁ヌクレオチドは、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確にするために、式Iは、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方でN₁、N₂、N₃などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同一である必要はなく、同一であることが意図されていない。式Iに示されるsiRNAは、標的配列に相補的であろう。

20

【0196】

例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖は、N₁及びN₂にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'オームethyl修飾ヌクレオチド、N₃、N₇、N₈、N₉、N₁₂、及びN₁₇に2'フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₄、N₅、N₆、N₁₀、N₁₁、N₁₃、N₁₄、N₁₅、N₁₆、N₁₈、及びN₁₉に2'オームethyl修飾ヌクレオチドを含む。

【0197】

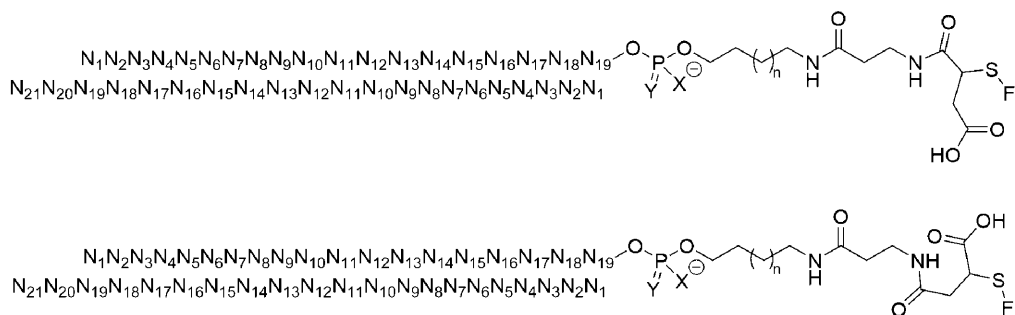
いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、N₁に結合したビニルホスホネート部分、N₂にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'フルオロ修飾ヌクレオチド、N₃、N₄、N₅、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₀、N₁₁、N₁₂、N₁₃、N₁₅、N₁₆、N₁₇、N₁₈、及びN₁₉に2'オームethyl修飾ヌクレオチド、N₄に2'フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₂₀及びN₂₁にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'オームethyl修飾ヌクレオチドを含む。

30

【0198】

いくつかの実施形態では、以下の式を有する化合物であり、

【化 1 4】



40

式中、F₁は、少なくとも1つのFN3ドメインを含み、リンカーL₁にコンジュゲート

50

されているポリペプチドであり、 L_1 は、 X_5 に連結され、 X_5 は、二本鎖 siRNA 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、 αX_5 は、二本鎖 siRNA 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、 αX 及び X_{AS} は、二本鎖 siRNA 分子を形成する。上記のリンカーは、非限定的な例であり、他のタイプのリンカーが、使用され得る。

【0199】

いくつかの実施形態では、 F_1 は、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式を有するポリペプチドを含み、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1であるが、但し、 n 、 q 、及び y のうちの少なくとも1つが、1であるものとする。いくつかの実施形態では、 n 、 q 、及び y は、各々、1である。いくつかの実施形態では、 n 及び q は、1であり、 y は、0である。いくつかの実施形態では、 n 及び y は、1であり、 q は、0である。

【0200】

いくつかの実施形態では、 X_1 は、本明細書で提供するものなどの、CD71 FN3 結合ドメインである。いくつかの実施形態では、 X_2 は、CD71 FN3 結合ドメインである。いくつかの実施形態では、 X_1 及び X_2 は、異なるCD71 FN3 結合ドメインである。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、同じである。いくつかの実施形態では、 X_3 は、ヒト血清アルブミンに結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、 X_3 は、タンパク質の半減期を延長するエフェクター機能を有しないFcドメインである。いくつかの実施形態では、 X_1 は、第1のCD71 結合ドメインであり、 X_2 は、第2のCD71 結合ドメインであり、 X_3 は、FN3アルブミン結合ドメインである。そのようなポリペプチドの例は、本明細書及び以下に提供される。いくつかの実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 C は、PEGなどのポリマー、エンドポーター、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリジン、両親媒性ペプチド、または表2に提供されるペプチドであり、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0201】

いくつかの実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4 - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0202】

いくつかの実施形態では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0203】

いくつかの実施形態では、 $C - X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 C は、ポリマーであり、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0204】

いくつかの実施形態では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X

10

20

30

40

50

2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり、X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり、L は、リンカーであり、X 4 は、核酸分子であり、C は、ポリマーであり、n、q、及び y は、各々独立して、0 または 1 である。

【0205】

いくつかの実施形態では、G Y S 1 s i R N A 対は、センス鎖 (5' - 3') n s n s n n n n N f N f N f n n n n n n n n s n s a 及びアンチセンス鎖 (5' - 3') U f s N f s n n n n N f n n n n n n n n N f n N f n n n s u s u、の配列に従い得、式中、(n) が、2' - O - Me (メチル) であり、(N f) が、2' - F (フルオロ) であり、(s) が、ホスホロチオエート骨格修飾である。センス鎖及びアンチセンス鎖の両方の各ヌクレオチドは、独立して、またはリボ糖及び核酸塩基の位置で組み合わせて修飾される。

10

【0206】

いくつかの実施形態では、s i R N A 分子は、表 3 A または 3 B からの配列対を含む。

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 A : s i R N A センシ及びアンチセンス配列

siRN A 対	配列 番号	センス鎖 5' -3'	配列 番号	アンチセンス鎖 5' -3'
A	10	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	11	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
B	12	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][T]	13	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
C	14	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG][fC][fC][mU][fG][mG][mA][mU][fG][mA][fU][mU][mA][T]	15	[mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][fU][fC][mC][fA][mG][mG][mC][fU][mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*mU]
D	16	[mG][*mC][*fG][mA][mC][mU][fG][fC][fC][mU][mG][fU][mA][mG][mC][mA][fA][mC][mA][idT]	17	[fU][*fG][*mU][mU][mG][mC][mU][mA][mC][mA][mG][mG][mC][fA][mG][mU][mC][mG][mC][*mU][*mU]
E	18	[mU][*mU][*fU][mA][mU][mG][fG][fG][fC][mA][mU][fC][mU][mG][mG][mA][fC][mU][mA][idT]	19	[fU][*fA][*mG][mU][mC][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mC][mC][fC][mA][mU][mA][mA][mA][*mU][*mU]
F	20	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA][fC][mA][mA][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	21	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][mU][mG][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]
G	22	[mG][*mG][*fA][mC][mC][mA][fA][fC][fA][mA][mU][fU][mU][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	23	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][fU][mG][mG][mU][mC][mC][*mU][*mU]
H	24	[mA][*mC][*fC][mA][mA][mC][fA][fA][fU][mU][mU][fC][mA][mA][mC][mG][fU][mG][mA][idT]	25	[fU][*fC][*mA][mC][mG][mU][mU][mG][mA][mA][mA][mU][mU][fG][mU][mU][mG][mG][mU][*mU][*mU]
I	26	[mG][*mC][*fG][mC][mA][mA][fA][fC][fA][mG][mC][fU][mU][mU][mG][mG][fG][mA][mA][idT]	27	[fU][*fU][*mC][mC][mC][mA][mA][mA][mG][mC][mU][mG][mU][fU][mU][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

J	28	[mA][*mG][*fA][mG][mC][mC][fA][fU][fC][mU][mU][fU][mG][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	29	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][mU][fG][mG][mC][mU][mC][mU][*mU][*mU]
K	30	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]	31	[fU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
L	32	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][mG][fC][mA][mA][idT]	33	[fU][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]
M	34	[mC][*mC][*fA][mU][mC][mU][fU][fU][fG][mC][mA][fA][mC][mG][mC][mA][fG][mC][mA][idT]	35	[fU][*fG][*mC][mU][mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][fA][mG][mA][mU][mG][mG][*mU][*mU]
N	36	[mA][*mC][*fG][mC][mA][mG][fC][fG][fG][mC][mA][fG][mU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	37	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mG][mA][mC][mU][mG][mC][mC][mG][fC][mU][mG][mC][mG][mU][*mU][*mU]
O	38	[mU][*mG][*fA][mC][mC][mA][fC][fC][fA][mU][mC][fC][mG][mC][mC][mG][fA][mA][mA][idT]	39	[fU][*fU][*mU][mC][mG][mG][mC][mG][mG][mA][mU][mG][mG][fU][mG][mG][mU][mC][mA][*mU][*mU]
P	40	[mC][*mG][*fA][mA][mU][mC][fG][fG][fC][mC][mU][fC][mU][mU][mC][mA][fA][mU][mA][idT]	41	[fU][*fA][*mU][mU][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mG][mC][mC][fG][mA][mU][mU][mC][mG][*mU][*mU]
Q	42	[mC][*mU][*fU][mC][mA][mA][fU][fA][fG][mC][mA][fG][mU][mG][mC][mC][fG][mA][mA][idT]	43	[fU][*fU][*mC][mG][mG][mC][mA][mC][mU][mG][mC][mU][mA][fU][mU][mG][mA][mA][mG][*mU][*mU]
R	44	[mC][*mA][*fG][mU][mA][mU][fC][fU][fC][mC][mA][fC][mC][mA][mA][mU][fC][mU][mA][idT]	45	[fU][*fA][*mG][mA][mU][mU][mG][mG][mU][mG][mG][mA][mG][fA][mU][mA][mC][mU][mG][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

S	46	[mC][*mC][*fA][mC][mC][mA] [fA][fU][fC][mU][mC][fU][mC] [mC][mG][mG][fC][mU][mA][i dT]	47	[fU][*fA][*mG][mC][mC][mG][m G][mA][mG][mA][mG][mA][mU][fU][mG][mG][mU][mG][mG][*mU][*mU]
T	48	[mC][*mA][*fC][mC][mA][mA] [fU][fC][fU][mC][mU][fC][mC] [mG][mG][mC][fU][mU][mA][i dT]	49	[fU][*fA][*mA][mG][mC][mC][m G][mG][mA][mG][mA][mG][mA][fU][mU][mG][mG][mU][mG][*mU][*mU]
U	50	[mC][*mC][*fC][mC][mU][mC] [fA][fG][fC][mU][mU][fA][mC] [mG][mG][mU][fA][mU][mA][i dT]	51	[fU][*fA][*mU][mA][mC][mC][m G][mU][mA][mA][mG][mC][mU][f G][mA][mG][mG][mG][mG][*mU] [*mU]
V	52	[mC][*mC][*fC][mU][mC][mA] [fG][fC][fU][mU][mA][fC][mG] [mG][mU][mA][fU][mC][mA][i dT]	53	[fU][*fG][*mA][mU][mA][mC][m C][mG][mU][mA][mA][mG][mC][f U][mG][mA][mG][mG][mG][*mU] [*mU]
W	54	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG] [fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC] [mA][mU][mU][fC][mU][mA][i dT]	55	[fU][*fA][*mG][mA][mA][mU][m G][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
X	56	[mG][*mG][*fA][mA][mC][mC] [fG][fC][fA][mC][mG][fG][mA] [mG][mC][mG][fC][mC][mA][i dT]	57	[fU][*fG][*mG][mC][mG][mC][m U][mC][mC][mG][mU][mG][mC][f G][mG][mU][mU][mC][mC][*mU] [*mU]
Y	58	[mA][*mC][*fG][mG][mA][mG] [fC][fG][fC][mC][mU][fC][mU] [mC][mC][mG][fA][mC][mA][i dT]	59	[fU][*fG][*mU][mC][mG][mG][m A][mG][mA][mG][mG][mC][mG][f C][mU][mC][mC][mG][mU][*mU] [*mU]
Z	60	[mA][*mG][*fC][mA][mA][mG] [fC][fG][fC][mA][mA][fC][mU] [mC][mU][mG][fU][mG][mA][i dT]	61	[fU][*fC][*mA][mC][mA][mG][m A][mG][mU][mU][mG][mC][mG][f C][mU][mU][mG][mC][mU][*mU] [*mU]
AA	62	[mC][*mA][*fG][mA][mU][mG] [fG][fU][fC][mC][mU][fC][mC] [mA][mU][mU][fU][mC][mA][i dT]	63	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][m G][mG][mA][mG][mG][mA][mC][f C][mA][mU][mC][mU][mG][*mU] [*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

BB	64	[mU][*mC][*fU][mA][mG][mA][fU][fC][fU][mG][mG][fA][mA][mC][mC][mU][fU][mA][mA][idT]	65	[fU][*fU][*mA][mA][mG][mG][mU][mU][mC][mC][mA][mG][mA][fU][mC][mU][mA][mG][mA][*mU][*mU]
CC	66	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][mA][fG][mG][mA][idT]	67	[fU][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][mA][mA][mA][fU][mG][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]
DD	68	[mA][*mC][*fC][mG][mC][mU][fU][fG][fG][mU][mU][fU][mG][mC][mA][mG][fU][mU][mA][idT]	69	[fU][*fA][*mA][mC][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mC][mC][mA][fA][mG][mC][mG][mG][mU][*mU][*mU]
EE	600	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mG][mA][T]	601	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
FF	602	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mA][fG][mG][mA][T]	603	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
GG	604	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fG][mA][fG][mG][mA][T]	605	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
HH	606	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	607	[fU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][fC][fA][fU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*fU]
II	608	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	609	[mU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*mU]
JJ	610	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][*fU][idT]	611	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][*mG][*fU][*mU]
KK	612	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][idT]	613	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
LL	614	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]	615	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

MM	616	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mG][mA][idT]	617	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
NN	618	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fG][mA][mA][idT]	619	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
OO	620	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mA][fU][mA][mA][idT]	621	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
PP	622	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mA][idT]	623	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
QQ	624	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mG][idT]	625	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
RR	626	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]	627	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
SS	628	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mG][idT]	629	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
TT	630	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mA][mA][idT]	631	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
UU	632	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fA][mC][mA][idT]	633	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
VV	634	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mA][fG][mC][mA][idT]	635	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

WW	636	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mA][idT]	637	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
XX	638	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mG][idT]	639	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
YY	640	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][idT]	641	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
ZZ	642	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mG][idT]	643	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
AAA	644	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mG][mA][idT]	645	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
BBB	646	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fG][mU][mA][idT]	647	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
CCC	648	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	649	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
DDD	650	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	651	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
EEE	652	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mA][idT]	653	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

FFF	654	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mG][idT]	655	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
GGG	656	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]	657	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
HHH	704	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA]	705	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]

10

【0207】

略語キー：（n / N = 任意のヌクレオチド） m N = 2' - O - メチル残基、f N = 2' - F 残基、* = ホスホロチオエート及び（idT） = 反転 D t、（VP）2' - O メチルビニルホスホネートウリジン。括弧は、個々の塩基を示す。

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 3 B

配列番号	センス鎖(5' -3')	配列番号	アンチセンス鎖(5' -3')
801	caggggugcg gucuugcaa	861	uugcaagacc gcaccccuu u
802	ggugcggucu ugcaauagg	862	ccuauugcaa gaccgcaccu u
803	gugcggucuu gcaauagga	863	uccuauugca agaccgcacu u
804	agccaugccu uuaaaccgc	864	gcgguuuaaa ggcauggcuu u
805	augccuuuaa accgcacuu	865	aagugcgguu uaaaggcauu u
806	ugggagggaug aaucgacc	866	ggucgaauuc auccuccau u
807	aacgcagugc ucuucgaag	867	cuucgaagag cacugcguuu u
808	ggacgaugg ggcgacaac	868	guugucgccc cauucguccu u
809	ggcgacugcc uguagcaac	869	guugcuacag gcagucgcuu u
810	cacgcugcug gggcgcuac	870	guagcgcccc agcagcgugu u
811	ugcgcuacg ucuucacua	871	uagugaagac gugagcgcau u
812	ccuauauacu cuuuauagc	872	gcgauaaaga aguauaaggu u
813	cuuuauagcc ggccgcuaa	873	auagcggccg gcgauaaagu u
814	ucgccggccg cuauagauu	874	aacucauagc ggccggcgau u
815	gccgcuauga guucuccaa	875	uuggagaacu cauagcggcu u
816	ccgcuaugag uucuccaac	876	guuggagaac ucuaugcggu u
817	ggcucggcuc aacuaucug	877	cagauaguug agccgagccu u
818	gcucggcuca acuauucgc	878	gcagauaguu gagccgagcu u
819	ucggcucaac uaucugcuc	879	gagcagauag uugagccgau u
820	ccagcgcgga ccaacaauu	880	aauguuuggu ccgcgcuggu u
821	agcgcggacc aacaauuuc	881	gaaaauuguug guccgcgcuu u
822	ucgggaggaa gcuuuuga	882	ucauaaagcu uccuccgau u
823	acgcagcggc agucuucc	883	ggaaagacug ccgcugcggu u
824	gaccaccauc cgccgauc	884	gauucggcgg auggugguu u
825	ccgaauaggc cucuucuu	885	auugaagagg ccgaauucgu u
826	aaucggccuc uucauagc	886	gcuaauagaag aggccgauuu u
827	cauagcagu gccgacagg	887	ccugucggca cugcuauugu u
828	aggaguuguu ccguggcug	888	cagccacgga caaacuccuu u
829	cggcugagug cagguuuau	889	auaaccgugc acucagccgu u
830	ugggaaucuu cagauucuc	890	gagauacugg ggauuccau u
831	cagacccuc agcuuacgg	891	ccguaagcug aggggucugu u
832	cccucagcu uacgguuac	892	gauaccguua gcugaggguu u
833	cucagcuuac gguauucac	893	guagauaccg uaagcugagu u
834	gcuuacggua ucuacuuc	894	gaauguagau accguaagcu u
835	ccggcgagc cguaucac	895	gaugauacgc ugccgcccgu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

836	agcguaucan ccagcgga	896	uuccgcugga ugauacguu u
837	gcguaucauc cagcggaac	897	guuccgcugg augauacgu u
838	uaccuagcc gguacuaua	898	uauaguaccg gccuagguau u
839	cuagcgccgu acuaauugu	899	acauauagua ccggccuagu u
840	aggccgguac uauaugucu	900	agacauauag uaccggccu u
841	ggccgguacu auaugucug	901	cagacauaua guaccggccu u
842	gccgguacua uaugucugc	902	gcagacauau aguaccggcu u
843	cgguacuaua ugucugcgc	903	gcgcagacau auaguaccgu u
844	gguacuauau gucugcgcg	904	cgcgcagaca uauaguaccu u
845	cuauaugucu gcgcgccac	905	guaggcgcga gacauauagu u
846	uauugucgc gcgcacau	906	caugugcgc gcagacauu u
847	augucugcgc gccacaug	907	ccaugugcgc gcagacauu u
848	ucgcccucgc ugucacgac	908	gucgugacag cgaggcgau u
849	cggcgagcgc uacgaugag	909	cucaucguag cgcucgccu u
850	caaggaccgg cgcaaac	910	gaugugcgc cgguccuugu u
851	acauccguc accagagug	911	cacucgug caggauuu u
852	cuggcgagg agcguaacu	912	aguuaacguc cucgccagu u
853	ggcgaggag cguaacuaa	913	uuaguacgc uccucgccu u
854	gcgaggagcg uaacuagu	914	acuuaguua gcuccucgu u
855	gaggagcgua acuaagucc	915	ggacuaguu acgcuuccu u
856	aguccgcaa acacuccac	916	guggaguguu uggcgacuu u
857	ggcgaucaag uccagacc	917	ggcucggac uugaucguu u
858	ccuaaccug gcuauucc	918	ggaauagcc agguuaggu u
859	ugugaaacca cuagguucu	919	agaaccuagu gguuacau u
860	accacuaggu ucuaggucc	920	ggaccuagaa ccuagguu u
921	caggggugcg gucuugcaa	981	uugcaagacc gcacccugu u
922	ggugcgguu ugcauaga	982	ucuauugcaa gaccgaccu u
923	gugcgguu gcauagga	983	uccauuugca agaccgacu u
924	agccaugcc uuaaaccga	984	ucgguuuaa ggcaugguu u
925	augccuuua accgcacua	985	uagugcggu uaaaggcau u
926	ugggaggaug aaucgaca	986	ugucgaauu auccuccau u
927	aacgcaguc ucuucgaaa	987	uuucgaagag cacugguu u
928	ggacgaugg ggcgacaaa	988	uuugcgccc cauucguu u
929	ggcgacugc uguagcaaa	989	uuugcuacag gcagugcuu u
930	cacgcugcug gggcguaa	990	uuagcgccc agcagcggu u
931	ugcgucacg ucuucacua	991	uagugaagac gugagcgau u
932	ccuauacu uuuuacga	992	ucgauaaaga aguuaaggu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

933	cuuuauccgcc ggccgcuaaa	993	uuagcggcgcg gcgauaaaagu u
934	ucgccggccg cuaugagua	994	uacucauagc ggccggcgau u
935	gccgcuauga guucuccaa	995	uuggagaacu cauagcggcu u
936	ccgcuaugag uucuccaaa	996	uuuggagaac ucauagcggg u
937	ggcucggcuc aacuauca	997	uagauaguug agccgagccu u
938	gcucggcuca acuaucuga	998	ucagauaguu gagccgagcu u
939	ucggcucaac uaucugcua	999	uagcagauag uugagccgau u
940	ccagcgcgga ccaacaaua	1000	uauuguuugu ccgcgcuggu u
941	agcgcggacc aacaauua	1001	uaauuuuguu guccgcgcuu u
942	ucgggaggaa gcuuuaua	1002	ucauaaagcu uccucccgau u
943	acgcagcggc agucuuuca	1003	ugaaagacug ccgcgcguu u
944	gaccaccauc cgccgaaua	1004	uaucggcggc augguggucu u
945	ccgaauccgc cucuucaaa	1005	uuugaagagg ccgauucggg u
946	aaucggccuc uucaauaga	1006	ucuaauagaag aggccgauuu u
947	caauagcagu gccgacaga	1007	ucugucggca cugcuauugu u
948	aggaguuugu ccguggcua	1008	uagccacgga caaacuccu u
949	cggcugagug caggguuaa	1009	uaaacggugc acucagccgu u
950	ugggaaucac caguauca	1010	uagauacugg ggauuccau u
951	cagacccuc agcuuacga	1011	ucguaagcug aggggucugu u
952	ccccacagcu uacgguaa	1012	uaauaccguaa gcugaggggu u
953	cucagcuuac gguaucaaa	1013	uuagauaccg uaagcugagu u
954	gcuuacggu ucuacauua	1014	uaauugauag accguaagcu u
955	ccggcggcag cguaucua	1015	uaugauacgc ugccgccggg u
956	agcguaucac ccagcggaa	1016	uuccgcugga ugauacgcu u
957	gcguaucauc cagcggaaa	1017	uuuccgcugg augauacgu u
958	uaccuaggcc gguacuua	1018	uaauaguaccg gccuagguau u
959	cuaggccggg acuaauaga	1019	ucauaauaga ccggccuagu u
960	aggccgggac uauauguca	1020	ugacauauag uaccggccuu u
961	ggccggguacu auaugucua	1021	uagacauaua guaccggccu u
962	gccggguacu uaugucuga	1022	ucagacauau aguaccggcu u
963	cgguacuaua ugucugcga	1023	ucgcagacau auaguaccgu u
964	gguacuauau gucugcgca	1024	ugcgagaca uauaguaccu u
965	cuauaugucu gcgcgcaa	1025	uuggcgcgca gacauauagu u
966	uauugucgcg gcgcacaua	1026	uauugggcgc gcagacauu u
967	augucugcgc gccacaua	1027	ucaugggcgc gcagacauu u
968	ucgccucgc ugucacgaa	1028	uucgugacag cgaggcgau u
969	cggcgagcgc uacgaugaa	1029	uucaucguag cgcucgccgu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

970	caaggaccgg cgcaacaua	1030	uauguugcgc cgguccuugu u
971	acauccgugc accagagua	1031	uacucuggug cacggauguu u
972	cugggcgagg agcguaaca	1032	uguuacgcuc cugcccagu u
973	gggcgaggag cguaacuaa	1033	uuaguuaagc uccucgccc u
974	gcgaggagcg uaacuaaga	1034	ucuuaguuaac gcuccucgcu u
975	gaggagcgua acuaaguca	1035	ugacuuaguu acgcuccucu u
976	aguccgcaa acacuccaa	1036	uuggaguguu uggcggacuu u
977	ggcgaucaag uccagagca	1037	ugcucuggac uugaucgcu u
978	cccuaaccug gcuuuuca	1038	ugaauaagcc agguuagggu u
979	ugugaaacca cuagguuca	1039	ugaaccuagu gguuucacau u
980	accacuaggu ucuagguca	1040	ugaccuagaa ccuagugguu u
1041	uggacuuaaccuagacaa	1042	uugucuagguugaaguccauu
1043	cugggaggaugaauucgaa	1044	uucgaaucauccucccaguu
1045	gggugacaacuacuaucua	1046	uagauaguaguugucacccuu
1047	cugggaggaugaauucgaa	1048	uucgaaucauccucccaguu
1049	caagguggguggcaucuaa	1050	uuagaugccaccaccuuguu
1051	uccgcagccuggaugauua	1052	uaaucauccaggcugcggaau
1065	uuacgguaucuacauucua	1066	uagauguagauaccguaauu

10

20

【0208】

いくつかの実施形態では、上記に例示されるポリヌクレオチドは、*s i R N A*のアンチセンス鎖上の5'ヌクレオチドとして2'-Oメチルビニリルホスホネートウリジンを含まないものを含む。 30

【0209】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に提供されるようなものである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖を含む部分を形成するための第1の鎖及び第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、表3Aまたは3Bに示される配列を含む。いくつかの実施形態では、表3Aまたは3Bに示される配列を含むが、塩基修飾は含まない。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に提供される*s i R N A*対を含む。いくつかの実施形態では、当該*s i R N A*対は、FN3ドメインにコンジュゲートされていない。 40

【0210】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、当該技術分野で既知の手順を使用した化学合成及び／または酵素ライゲーション反応を使用して構築される。例えば、オリゴヌクレオチド分子は、天然に存在するヌクレオチド、または当該分子の生物学的安定性を高めるか、またはオリゴヌクレオチド分子と標的核酸との間に形成される二重鎖の物理的安定性を高めるように設計された様々な修飾されたヌクレオチドを使用して化学的に合成される。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子がアンチセンス配向でサブクロニングされた発現ベクターを使用して生物学的に生成される（すなわち、挿入されたオリゴヌクレオチド分子から転写されたRNAは、目的の標的ポリ核酸分子に対してアンチセンス配向である）。 50

【0211】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、タンデム合成方法によって合成され、両方の鎖は、単一の連続したオリゴヌクレオチド断片または切断可能なリンカーによって分離された鎖として合成され、その後切断されて、ハイブリダイゼーションし、二重鎖の精製を可能にする別個の断片または鎖を提供する。

【0212】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子はまた、2つの異なる核酸鎖または断片からも組み立てられ、1つの断片は、センス領域を含み、第2の断片は、分子のアンチセンス領域を含む。

【0213】

場合によっては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、またはメシルホスホラミデートの結合とのオリゴヌクレオチド分子ヌクレオチド間結合の化学修飾は、安定性を改善する。過度の修飾は、毒性または活性の低下を引き起こすことがある。したがって、核酸分子を設計するとき、ある場合には、これらのヌクレオチド間結合の量は、最小化される。そのような場合には、これらの結合の濃度の低下は、毒性を低減させ、これらの分子の有効性及びより高い特異性を増加させる。

【0214】

本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのセンス鎖の5'末端にリンカーを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのアンチセンス鎖の5'末端にビニルホスホネートまたは修飾ビニルホスホネートを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのセンス鎖の3'末端にリンカーを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのアンチセンス鎖の3'末端にビニルホスホネートを含むように修飾され得る。リンカーは、dsRNAをFN3ドメインに連結するために使用され得る。リンカーは、例えば、天然に存在するか、または本明細書に記載されるように、及び例えば、米国特許第10,196,446号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に置換されているFN3ドメイン上のシステイン残基に共有結合することができる。dsRNAのそのような修飾鎖の非限定的な例を、以下の表4に示す。

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 4：リンカー及び／またはビニルホスホネートとの対

siR NA 対	配 列 番 号	センス鎖 5' -3'	配 列 番 号	アンチセンス鎖 5' -3'	リンカー
III 0	7	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][mG][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][mG][fA][mA]-L	7 1	[VP][*fU][*mU][fC][mA][fU][mU][fA][mA][fG][mG][fC][mC][fA][mC][fG][mA][fG][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
JJJ 2	7	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA]-L	7 3	[VP][*fU][*mC][mG][mA][mA][mU][mU][mC][mA][mU][mC][mC][fU][mC][mC][mC][mA][mG][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
KK K 4	7 4	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA]-L	7 5	[VP][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
LLL 6	7 6	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA][fC][mA][mA][mU][mU][fU][mC][mA]-L	7 7	[VP][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][mU][mG][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
MM M 8	7 8	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA]-L	7 9	[VP][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
NN N 0	8 0	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][mG][fC][mA][mA]-L	8 1	[VP][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
OO O 2	8 2	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA]-L	8 3	[VP][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -
PPP 4	8 4	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][mA][fG][mG][mA]-L	8 5	[VP][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][mA][mA][mA][fU][mG][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

QQ	8	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][m	8	[VP][*fU][*mU][fC][mA][fU][mU][fA][	Mal-
Q	6	G][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][m	7	mA][fG][mG][fC][mC][fA][mC][fG][m	C ₂ H ₄ C(O)(NH
		G][mG][mA]-L		A][fG][mA][*mU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
RR	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
R	5	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	5	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	8	[fU][mA][mA][idT]-L	9	][mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
SSS	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	0	[fU][mA][mG][idT]-L	1	][mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
TTT	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	2	[fU][mG][mA][idT]-L	3	][mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
UU	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
U	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	4	[fG][mA][mA][idT]-L	5	][mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
VV	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
V	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mA]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	6	[fU][mA][mA][idT]-L	7	][mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
W	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
W	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC	C ₂ H ₄ C(O)(NH
W	8	[fU][mA][mA][idT]-L	9	][mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
XX	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
X	7	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC]	7	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	0	[fU][mA][mG][idT]-L	1	][mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
YY	6	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][f	6	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][m	Mal-
Y	7	C][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][	7	G][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][m	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	2	mC][fG][mC][mA][idT]-L	3	G][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

ZZZ	6 7 4	[mG][*mA][*fG][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mG][idT]-L	6 7 5	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
AA AA	6 7 6	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mA][mA][idT]-L	6 7 7	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
BB BB	6 7 8	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fA][mC][mA][idT]-L	6 7 9	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
CC CC	6 8 0	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mA][fG][mC][mA][idT]-L	6 8 1	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
DD DD	6 8 2	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mA][idT]-L	6 8 3	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
EEE E	6 8 4	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mG][idT]-L	6 8 5	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
FFF F	6 8 6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][idT]-L	6 8 7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
GG GG	6 8 8	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mG][idT]-L	6 8 9	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
HH HH	6 9 0	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mG][mA][idT]-L	6 9 1	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

III	6 9 2	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fG][mU][mA][idT]-L	6 9 3	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
JJJ	6 9 4	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]-L	6 9 5	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
KK KK	6 9 6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]-L	6 9 7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
LLL L	6 9 8	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mA][idT]-L	6 9 9	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
MM MM	7 0 0	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mG][idT]-L	7 0 1	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
NN NN	7 0 2	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]-L	7 0 3	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
OO OO	7 0 6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA]-L	7 0 7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
PPP P	7 1 1	[mU][*mG][*fG][mA][mC][mU][fU][fC][fA][mA][mC][fC][mU][mA][mG][mA][fC][mA][mA]-L	7 1 2	[VP][mU][*fU][*mG][mU][mC][mU][mA][mG][mG][mU][mU][mG][mA][fA][mG][mU][mC][mC][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
QQ QQ	1 0 5 3	[mG][*mG][*fG][mU][mG][mA][fC][fA][fA][mC][mU][fA][mC][mU][mA][mU][fC][mU][mA]	1 0 5 4	[VP][mU][fA][*mG][*mA][mU][mA][mG][mU][mA][mG][mU][mU][mG][fU][mC][mA][mC][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

RR	1	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG]	1	[VP][mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][mU][f	Mal-
RR	0	[mG][fA][mU][fG][mA][fA][mU][fU][	0	U][mC][fA][mU][fC][mC][fU][mC][fC][m	C ₂ H ₄ C(O)(
	5	mC][fG][mA][fA]	5	C][fA][mG][*fU][*mU]	NH)-
	5		6		(CH ₂) ₆ -
SSS	1	[fC][*mA][[*fA][mG][fG][mU][fG]	1	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][mG][f	Mal-
S	0	[mG][fG][mU][fG][mG][fC][mA][fU][	0	C][mC][fA][mC][fC][mC][fA][mC][fC][m	C ₂ H ₄ C(O)(
	5	mC][fU][mA][fA]	5	U][fU][mG][*fU][*mU]	NH)-
	7		8		(CH ₂) ₆ -
TTT	1	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG]	1	[VP][mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][mU][f	Mal-
T	0	[mC][fC][mU][fG][mG][fA][mU][fG][	0	C][mC][fA][mG][fG][mC][fU][mG][fC][m	C ₂ H ₄ C(O)(
	5	mA][fU][mU][fA]	6	G][fG][mA][*fU][*mU]	NH)-
	9		0		(CH ₂) ₆ -
UU	7	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][m	1	[VP][fU][*mU][*fC][mA][fU][mU][fA][m	Mal-
UU	0	G][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][m	0	A][fG][mG][fC][mC][fA][mC][fG][mA][f	C ₂ H ₄ C(O)(
		G][fA][mA]-L	6	G][mA][*mU][*mU]	NH)-
			7		(CH ₂) ₆ -
VV	7	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG]	1	[VP][fU][*mC][*mG][mA][mA][mU][mU]	Mal-
VV	2	[fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC]	0	[mC][mA][mU][mC][mC][fU][mC][mC][	C ₂ H ₄ C(O)(
		[fG][mA][mA]-L	6	mC][mA][mG][*mU][*mU]	NH)-
			8		(CH ₂) ₆ -
WW	7	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	1	[VP][fU][*mA][*fG][mA][fU][fG][fC][mC]	Mal-
WW	4	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	0	][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU	C ₂ H ₄ C(O)(
		[fU][mA][mA]-L	6	][mG][*fU][*mU]	NH)-
			9		(CH ₂) ₆ -
XX	7	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][f	1	[VP][fG][*mA][*mA][mA][mU][mU][mG]	Mal-
XX	6	C][fC][mA][mA][fC][mA][mA][mU][	0	][mU][mU][mG][mG][mU][fC][mC][mG][	C ₂ H ₄ C(O)(
		mU][fU][mC][mA]-L	7	mC][mG][mC][*mU][*mU]	NH)-
			0		(CH ₂) ₆ -
YY	7	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][f	1	[VP][fG][*mC][*mG][mU][mU][mG][mC]	Mal-
YY	8	C][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][	0	[mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][	C ₂ H ₄ C(O)(
		mC][fG][mC][mA]-L	7	mC][mU][mC][*mU][*mU]	NH)-
			1		(CH ₂) ₆ -
ZZZ	8	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][f	1	[VP][fU][*mG][*mC][mG][mU][mU][mG]	Mal-
Z	0	U][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][	0	[mC][mA][mA][mA][mG][fA][mU][mG][	C ₂ H ₄ C(O)(
		mG][fC][mA][mA]-L	7	mG][mC][mU][*mU][*mU]	NH)-
			2		(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

AA	8	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	1	[VP][fA][*mG][*mA][mA][mU][mG][mU	Mal-
AA	2	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][	0	][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][	C ₂ H ₄ C(O)(
A		mU][fC][mU][mA]-L	7	mU][mA][mA][*mU][*mU]	NH)-
			3		(CH ₂) ₆ -
BB	8	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][f	1	[VP][fC][*mC][*mU][mC][mG][mA][mG]	Mal-
BB	4	U][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][	0	[mG][mU][mA][mA][mA][fU][mG][mU][	C ₂ H ₄ C(O)(
B		mA][fG][mG][mA]-L	7	mG][mG][mG][*mU][*mU]	NH)-
			4		(CH ₂) ₆ -
CC	8	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][m	1	[VP][fU][*mU][*fC][mA][fU][mU][fA][m	Mal-
CC	6	G][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][m	0	A][fG][mG][fC][mC][fA][mC][fG][mA][f	C ₂ H ₄ C(O)(
C		G][mG][mA]-L	7	G][mA][*mU][*mU]	NH)-
			5		(CH ₂) ₆ -

10

【0215】

いくつかの実施形態では、上記に提供される A ~ P P P P の s i R N A 対は、センス鎖の 3' 末端にリンカーを含む。いくつかの実施形態では、上記に提供される A ~ P P P P の s i R N A 対は、センス鎖の 5' 末端にビニルホスホネートを含む。

20

【0216】

略語キー：(n / N = 任意のヌクレオチド) mN = 2' - O - メチル残基、fN = 2' - F 残基、* = ホスホロチオエート及び (i d T) = 反転 D t、(VP) 2' - O - メチルビニルホスホネートウリジン、B M P S = プロピルマレイミド。

【0217】

リンカー (L) の構造は、以下の表 5 に示す通りである。

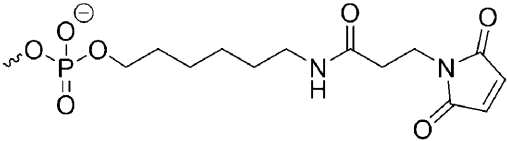
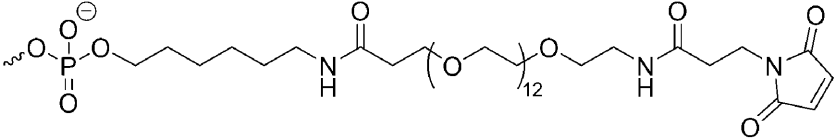
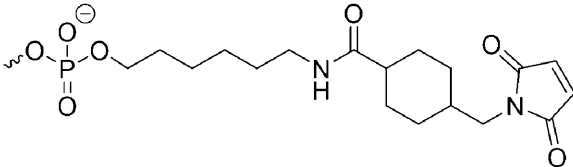
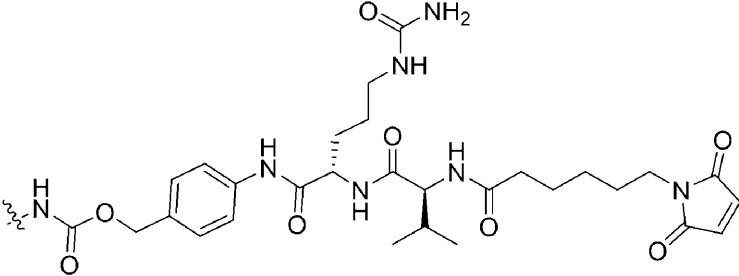
30

40

50

【表 6】

表 5：リンカー（L）の代表例

リンカー構造	リンカー名
	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)- (CH ₂) ₆
	Mal- (PEG) ₁₂ (NH)(CH ₂) ₆
	Mal-NH-(CH ₂) ₆ または アミノヘキシルリン カー-(CH ₂) ₆ -
	Val-Cit-PABA

【0218】

他のリンカー、例えば、クリック化学で形成されたリンカー、アミドカップリング、還元的アミノ化、オキシム、トランスグルタミナーゼなどの酵素カップリング、及び s o r t a g e コンジュゲーションも使用することができる。本明細書に提供されるリンカーは、本質的に例示的であり、他のそのような方法で作製される他のリンカーも使用することができる。

【0219】

s i R N A に接続される場合、構造、L - (X 4) は、以下の式で表すことができる：

10

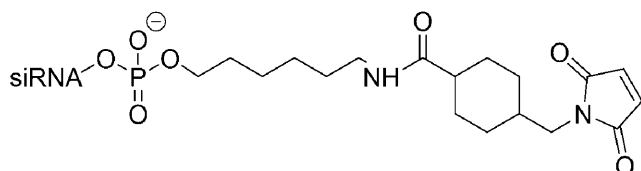
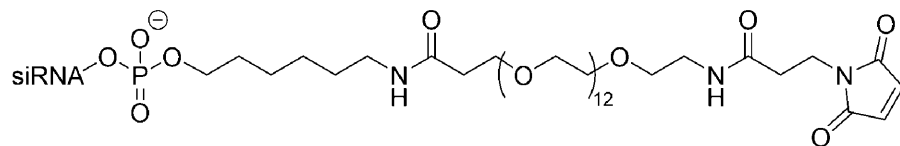
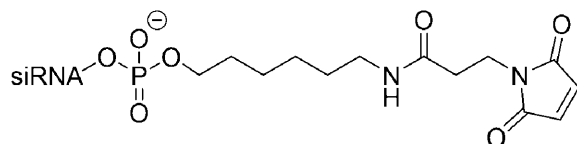
20

30

40

50

【化 1 5】



10

【0220】

20

ある特定の siRNA 配列が、ある特定の修飾核酸塩基で本明細書に示されているが、そのような修飾を有さない配列も、本明細書に提供される。すなわち、配列は、いかなる修飾も有さない、本明細書に提供される表に例示される配列を含むことができる。非修飾 siRNA 配列は、依然として、いくつかの実施形態では、dsRNA のセンス鎖の 5' 末端にリンカーを含むことができる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNA のアンチセンス鎖の 5' 末端にビニルホスホネートを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNA のセンス鎖の 3' 末端にリンカーを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNA のアンチセンス鎖の 3' 末端にビニルホスホネートを含むように修飾され得る。リンカーは、本明細書で提供されるようなものであり得る。

30

【0221】

いくつかの実施形態では、CD71 に結合するポリペプチドを含むポリペプチドを含む FN3 タンパク質が、提供される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、CD71 に結合する FN3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 の配列を含むポリペプチドが、提供される。いくつかの実施形態では、CD71 に結合するポリペプチドは、配列番号 301～301、310、312～572、592～599、または 708～710 の配列を含む。ポリペプチドが結合することができる CD71 タンパク質の配列は、例えば、配列番号 2 または 3 であり得る。いくつかの実施形態では、CD71 に結合する FN3 ドメインは、CD71 に特異的に結合する。

40

【0222】

いくつかの実施形態では、CD71 に結合する FN3 ドメインは、配列番号 1 の Tenc on 配列または配列番号 4 の Tenc on 27 配列 (LPAPKNLVVSRVTE DSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVG EAI VLTVP GSERS YDLTGLKPGTEYT VSIYGVKG GHR SNPLSAIFTT) に基づいており、任意選択的に、残基位置 11、14、17、37、46、73、または 86 で置換を有する (配列番号 4 に対応する残基の番号付け)。

【0223】

いくつかの実施形態では、CD71 に結合する単離された FN3 ドメインは、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 7

50

08～710のアミノ酸配列を含む。

【0224】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドを含むタンパク質は、配列番号273のアミノ酸配列を含む。配列番号273は、配列番号288、配列番号289、配列番号290、及び配列番号291の配列に基づくコンセンサス配列である。配列番号273の配列は、MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSEERSYDLTG LKPGTEYX₁₀VX₁₁IX₁₂X₁₃VKG GX₁₄X₁₅SX₁₆PLX₁₇AX₁₈FTTであり、式中、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、各々独立して、メチオニンまたはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、

10

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され、

X₂は、Y、G、A、またはVから選択され、

X₃は、I、T、L、A、またはHから選択され、

X₄は、S、Y、またはPから選択され、

X₅は、Y、G、Q、またはRから選択され、

X₆は、GまたはPから選択され、

X₇は、A、Y、P、D、またはSから選択され、

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され、

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され、

X₁₂は、D、Q、H、またはVから選択され、

20

X₁₃は、GまたはSから選択され、

X₁₄は、R、G、F、L、またはDから選択され、

X₁₅は、W、S、P、またはLから選択され、かつ

X₁₆は、T、V、M、またはSから選択される。

【0225】

いくつかの実施形態では、

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され、

X₂は、G、A、またはVから選択され、

X₃は、T、L、A、またはHから選択され、

X₄は、YまたはPから選択され、

30

X₅は、G、Q、またはRから選択され、

X₆は、GまたはPから選択され、

X₇は、Y、P、D、またはSから選択され、

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され、

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され、

X₁₂は、Q、H、またはVから選択され、

X₁₃は、GまたはSから選択され、

X₁₄は、G、F、L、またはDから選択され、

X₁₅は、S、P、またはLから選択され、かつ

X₁₆は、V、M、またはSから選択される。

40

【0226】

いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号288の配列に示される通りである。いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号289の配列に示される通りである。いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号290の配列に示される通りである。いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号291の配列に示される通りである。

50

【0227】

いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンではない。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アラニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アルギニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アスパラギンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アスパラギン酸である。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、システインである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、グルタミンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、グルタミン酸である。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、グリシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、ヒスチジンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、イソロイシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、ロイシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、リジンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、フェニルアラニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、セリンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、トレオニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、トリプトファンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、チロシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、バリンである。

【0228】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号288の配列に示される通りに示されている。

【0229】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号289の配列に示される通りに示されている。

【0230】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号290の配列に示される通りに示されている。

【0231】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号291の配列に示される通りに示されている。

いくつかの実施形態では、ポリペプチドを含むタンパク質は、配列番号273の配列と少なくとも62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%

10

20

30

40

50

、 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 99 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号 273 の配列と少なくとも 85 %、 86 %、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 または 99 % 同一である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号 273 の配列と少なくとも 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 または 99 % 同一である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号 273 の配列と少なくとも 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 または 99 % 同一である。

10

【0232】

パーセントアイデンティティは、NCBI ウェブサイトから入手可能な BlastP を使用して 2 つの配列をアラインメントするために、デフォルトパラメータを使用して決定することができる。

【0233】

いくつかの実施形態では、ヒト CD71 タンパク質（配列番号 2 または 5）に結合する、または特異的に結合するフィブロネクチン III 型（FN3）ドメインが、提供される。本明細書に提供されるように、FN3 ドメインは、CD71 タンパク質に結合することができる。また、明示的に記載されていなくても、ドメインはまた、CD71 タンパク質と特異的に結合することができることも、提供される。したがって、例えば、CD71 に結合する FN3 ドメインはまた、CD71 に特異的に結合する FN3 ドメインタンパク質も包含する。これらの分子は、例えば、治療及び診断用途ならびに画像化に使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される FN3 ドメインまたはその相補的核酸をコードするポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、ならびにそれらを作製及び使用方法が、提供される。

20

【0234】

いくつかの実施形態では、CD71 に結合する、または特異的に結合する単離された FN3 ドメインが、提供される。

【0235】

いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、リンカーによって接続された 2 つの FN3 ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。リンカーは、本明細書に記載されるものなどの短ペプチド配列であり得る。例えば、リンカーは、G/S リンカーなどであり得る。

30

【0236】

いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、本明細書に提供されるものなどのリンカーによって接続された 2 つの FN3 ドメインを含む。例示的なリンカーとしては、(GS)₂、(配列番号 720)、(GGGS)₂ (配列番号 721)、(GGGGS)₁₋₅ (配列番号 722)、(AP)₁₋₂₀；(AP)₂ (配列番号 723)、(AP)₅ (配列番号 724)、(AP)₁₀ (配列番号 725)、(AP)₂₀ (配列番号 726)、A(EAAAK)₅AAA (配列番号 727)、または(EAAAK)₁₋₅ (配列番号 728) が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK (配列番号 729)、GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号 730)、APAPAPAPAP (配列番号 731)、または EAAAK (配列番号 732) のアミノ酸配列を含むか、またはそれである。

40

【0237】

いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、当業者によって実践されるように、表面プラズモン共鳴または Kinexa 法によって決定されるように、約 1×10^{-7} M 未満、例えば、約 1×10^{-8} M 未満、約 1×10^{-9} M 未満、約 1×10^{-10} M 未満、約 1×10^{-11} M 未満、約 1×10^{-12} M 未満、または約 1×10^{-13} M 未満の解離定数 (K_D) で CD71 に結合し得る。特定の FN3 ドメイン-抗原相互作用の測定された

50

親和性は、異なる条件（例えば、浸透圧濃度、pH）下で測定された場合に、変化し得る。したがって、親和性及び他の抗原結合パラメータ（例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off} ）の測定は、タンパク質足場及び抗原の標準化された溶液、ならびに本明細書に記載される緩衝液などの標準化された緩衝液を用いて行われる。

【0238】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、標準溶液ELISAアッセイにおいて陰性対照について得られたシグナルが少なくとも5倍超えるCD71に結合し得る。

【0239】

いくつかの実施形態では、CD71に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、分子のN末端に連結された開始剤メチオニン（Met）を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、FN3ドメインのC末端に連結されたシステイン（Cys）を含む。N末端Met及び／またはC末端Cysの添加は、半減期を延長し、分子の他の機能を提供するために、発現及び／またはコンジュゲーションを促進し得る。

【0240】

FN3ドメインはまた、米国特許第10,196,446号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどのシステイン置換も含むことができる。簡潔には、いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリペプチドは、米国特許第10,196,446号の配列番号1、または本明細書に記載されるような、配列番号4に基づくFN3ドメインの残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、及び93からなる群から選択される位置、ならびに関連するFN3ドメインにおける等価位置に少なくとも1つのシステイン置換を含むことができる。

【0241】

米国特許第10,196,446号の配列番号1のアミノ酸配列は、

L P A P K N L V V S E V T E D S L R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E
K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R
S N P L S A E F T T（本明細書では、配列番号713）である。

【0242】

いくつかの実施形態では、置換は、残基6にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基8にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基10にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基11にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基14にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基15にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基16にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基20にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基30にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基34にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基38にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基40にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基41にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基45にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基47にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基48にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基53にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基54にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基59にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基60にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基62にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基64にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基70にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基88にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基89にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基90にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基91にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基93にある。

【0243】

ドメインまたはタンパク質内のある位置におけるシステイン置換は、システイン残基による既存のアミノ酸残基の置き換えを含む。いくつかの実施形態では、置換の代わりに、システインは、上記の位置に隣接する配列に挿入される。システイン修飾の他の例は、例

例えば、米国特許出願公開第20170362301号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において見出され得る。配列のアラインメントは、例えばNCBIウェブサイトでデフォルトパラメータを使用してBlastPを使用して行うことができる。

【0244】

いくつかの実施形態では、システイン残基は、ドメインまたはタンパク質内の任意の位置に挿入される。

【0245】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するFN3ドメインは、細胞内に内在化される。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞への検出可能な標識または治療薬の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞への細胞毒性剤の送達を促進し得る。細胞毒性剤は、治療薬として作用することができる。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞への本明細書に開示される任意の検出可能な標識剤、治療剤、及び／または細胞毒性剤の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、肝細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、筋肉細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、樹状細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、中枢神経系の細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、心臓細胞である。

【0246】

いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含む。

【0247】

いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号301のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号302のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号303のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号304のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号305のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号306のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号307のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号310のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号312のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号313のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号314のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号315のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号316のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号317のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号318のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号319のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号320のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号321のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号322のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号323のアミノ酸配列を含む。

50

[illegible]

50

40

50

50

20

50

50

実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号549のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号550のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号551のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号552のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号553のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号554のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号555のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号556のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号557のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号558のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号559のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号560のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号561のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号562のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号563のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号564のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号565のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号566のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号567のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号568のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号569のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号570のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号571のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号572のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号708のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号709のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号710のアミノ酸配列を含む。

10

20

30

【0248】

いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、分子のN末端に連結された開始剤メチオニン (Met) を含む。

いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列のうちの1つと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99%同一であるアミノ酸配列を含む。パーセントアイデンティティは、NCBIウェブサイトから入手可能なBLASTPを使用して2つの配列をアラインメントするために、デフォルトパラメータを使用して決定することができる。CD71に結合するFN3ドメインの配列は、例えば、以下の表6において見出され得る。

40

50

【表 7 - 1】

表 6 : CD 7 1 に結合する FN 3 ドメイン配列

配列番号	CD71 に結合する FN3 ドメインのアミノ酸配列
301	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPITYIEAVVLGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVGISGVKGGHNSMPLSAIFTT
302	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFMINYSELFWMGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVVRIKGVKGGKGSWPLHAHFTT
303	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFIEYAETRWDYGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVVPIDGVKGGIASKPLSAIFTT
304	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYRDQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
305	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWVYIWGVKGGKPSFPLRAGFTT
306	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPHYMETFSRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYRVPIGGVKGGSSCPLSAIFTT
307	MLPAPKNLVVSDVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
310	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPKIAYIETATRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVPPIGVKGGNTSSPLSAIFTT
312	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIYAEPSTGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
313	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYPEDGFRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVPIGVKGGGGSGPLSAIFTT
314	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIYYVENVWGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYWEVIIGVKGGQCSRPLSAIFTT
315	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTECPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
316	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYREFRPSGEAIVLTVPGSER SYDLTVETGYRNEVVICGVKGGPWGSGPLSAIFTT
317	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIYTECVYRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYHVPITGVKGGGGSWPLSAIFTT
318	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPNIMYHEIYVGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVPIEGVKGGGTSGPLSAIFTT
319	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIYTEAALCGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVPINGVKGGGTSGPLSAIFTT
320	MLPAPKNLVVARVTEDSARLSWTAPDAAIDSPIDYSEYWWGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVLITGVKGGYRSGPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

321	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSIRYNEFIVAGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYDVPIAGVKGGGASWPLSAIFTT
322	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWYLELQFAGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYNVPITGVKGGHISFPLSAIFTT
323	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIWEHYGDGEAIVLTVPG SERSYDLTGPKPGTEYRVRISGVKGGFESGPLSAIFTT
324	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFMIRYQEGTRWGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYIVMIAGVKGGQISLPLSAIFTT
325	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIWYLEKSYQGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYVVPPIGVKGGGRDSCPLSAIFTT
326	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPWVIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
327	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFRISYAETVRQGEAIVLTVPGSE RSYDLTVETGYRNWVMILGVKGGPGSLPLSAIFTT
328	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVVRAFDSEFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPWVIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
329	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIEYWEAVGFGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGYLSAPLSAIFTT
330	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIIHYVEQQLIGEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPITGVKGGACSWPLSAIFTT
331	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIEYSEHPIDGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVRIHGVKGGWFHPLWAFFTT
332	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVTIAGVKGGWRSKPLNAESTT
333	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFGIAYVESYWYGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVPIYGVKGGDGSGLSAIFTT
334	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYITYVELNLAGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYVPILGVKGGSLSQPLSAIFTT
335	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPISYIESIADGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWVAIVGVKGGPFSWSLSAIFTT
336	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVPTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPPIAGVKGGGPSAPLSAIFTT
337	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSEFPIYYWEVTITGEAIYLSVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPDIPGVKGGASPPLSAIFTT
338	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPILYLEHTVRSEIVLTVPGSE RSYDLTDLKPGTEYCVPIDGVKGGRLSRPLSAIFTT
339	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIPYTEPPDPGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYLVTLGVKGGSMSVPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

340	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTIDYWENRCPGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYCVWISGVKGGYSSWPLSAIFTT
341	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGHLSPLSAIVTT
342	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTLIPYAETSPSGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSEPLSAIFTT
343	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVVYETRFGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYTPIDGVKGGGRSSPLSAIFTT
344	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIPYAEPSPTEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIVTT
345	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
346	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIIPYAEVRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGKLSPLSAIFTT
347	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYLEMMVTGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYDVPIGVKGGTRSVPLSAIFTT
348	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTLIYYEEGYLEYYSGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVGVIVGVKGGGLSGPLSAISTT
349	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDWLPLSAIFTT
350	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTIHYREFQLSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYDVPIEGVKGGPGSRPLSAIFTT
351	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE CSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
352	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIDYDELAIFYGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
353	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
354	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFAIAYGEHIVIGEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYMPVPIAGVKGGPISLPLSAIFTT
355	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIPYAEPSPTEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
356	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFISIGYVELVLLGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYDVLIPGVKGGSLRPLSAIFTT
357	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFAIPYAELSRNGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVLIHGVKGGCLSDPLSAIFTT
358	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIEYLELSRHGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYWVMIFGVKGGGPKPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

359	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEVYNEVHWIGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGHWSKPLSAIFTT
360	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIDYDELAIFYGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
361	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFQIVYSELWIKGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYQVPIPIGVKGGGRNSFPLSAIFTT
362	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIRYTETRSIGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYCVPIGGVKGGDSSWPLSAISTT
363	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFCISYYERMGRGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYMVYIFGVKGGGLNSLPLSAIFTT
364	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIVYAEPIPNGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGRNSDPLSAIFTT
365	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGLSSPLSAIFTT
366	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIDYDEPRSPGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYRVFIWGIKGGDTSFPLSAIFTT
367	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTILYAEQAQFGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPITGVKGGTRSGPLSAISTT
368	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIIPYAEVRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
369	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFHIAYEETATSGEAIYLRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVIEGVKGGARSRLYADFTT
370	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGDLNPLSAIFTT
371	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPISYLELSLYGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVGIAGVKGGVVSRLPLSAIFTT
372	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIGYREWYWGGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVPISGVKGGDLSPPLSAIFTT
373	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
374	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFSITYLEWWNLGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYMTIPGVKGGMSSYPLSAIFTT
375	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTISYGEEALIGEAIYLRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYYVHIEGVKGGWSQPLAAFTT
376	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIEYYENIGIGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVPIVGVKGGPYSHPLSAIFTT
377	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGLSSPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

378	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFGIGYYEHKRFGEAIQLSVPG SERSYDLTGLKPGTEYEVDIEGVKGGVLSWPLFAEFTT
379	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFVIEYTERFWSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVPIDGVKGGQCSTPLSAIFTT
380	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFVIDYEEGVIGEAIYLHVP SERSYDLTGLKPGTEYVVKIHGVKGGHPSHPLVAVFTT
381	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYVELRHLGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
382	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFLIPYAETSPSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSSPLSAIFTT
383	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
384	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFSILYLELTPKGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
385	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIIIEYFEPIPIGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYAVNIYGVKGGYLSHPLSAIFTT
386	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ECSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
387	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIEYTEFLYSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYGVPIGVKGGFVSPPLSAIVTT
388	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIKYREVLRCGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYTPITGVKGGFGSSPLSAIFTT
389	MLPAPENLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIEYYEGVIQGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYFVAIWGVKGGKWSVPLSAIFTT
390	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAEFTT
391	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFQIHYWETQGFGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYPPVLIPGVKGGPSSLPLSAIFTT
392	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIPYAEPSPTGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSDPLSAIFTT
393	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIEYYEPPPAGEAIYLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYDVTIYGVKGGYYSHPLFASFTT
394	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAIFTT
395	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
396	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYLEVFEYEGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYQVPIEGVKGGAMSLPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

397	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIWYEEETTIGEAIYLVHVP GSE RSYDLTGLKPGTEYEVHITGVKGGPYSRPLFANFTT
398	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFGIAYDEWPEFGEAIVLTVPG S ERSYDLTGLKPGDTEYIVEIYGVKGGWFSWPLSAIFTT
399	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIPYAEPSTGEAIVLTVPG S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSVIFTT
400	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIWEVVMYLGEAIVLTVPG S ERSYDLTGLKPGTEYNVPIPGVKGGHSSPPLSAIFTT
401	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHILYEELFLVGEAIVLTVPG S RSYDLTGLKPGTEYKVPISGVKGGPVSRPLSAIFTT
402	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPG S RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
403	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIWLHVP G S ERSYDLTGLKPGTEYEVGIVSVKGGDLSVPLVAFFTT
404	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLLVP G S ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAVFTT
405	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIFLVVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHANFTT
406	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLDVP G S ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYASFSTT
407	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLYVP G S ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
408	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIQLRVPG S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
409	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFHISYEEDYTFGEAIYLRVP G S RSYDLTGLKPGTEYRVVIGGVKGGWFSEPLLAFTT
410	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIYLVPG S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLDASFTT
411	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIDLGVPG S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLDPLEAYFTT
412	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLLVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
413	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAINLQVP G S ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFSTT
414	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAISLQVP G S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSSPLFAVFTT
415	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIELHVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

416	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLVVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
417	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAITLDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
418	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVASFTT
419	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAINLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
420	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLSVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
421	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIALWVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMLSAIFTT
422	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIILVVPVGS RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT
423	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIQLWVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLGAVFTT
424	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLHVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLASFTT
425	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIALHVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
426	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLHVPVGS RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLHANFTT
427	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIFLGVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
428	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLRVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIASFTT
429	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAINLVVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
430	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFVIEYFEWTLNGEAIVLTVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVQIYGVKGGCLSRPLSAIFTT
431	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLWVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAHFTT
432	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIPYAEPSPTGEAIVLTVPVGS RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT
433	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIYLYVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAFTT
434	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLQVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

435	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIQLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAFFTT
436	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIWLHVP GS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLIAFTT
437	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIVLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
438	MLPTPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIQLRVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHASFTT
439	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIQLGVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLNANFTT
440	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIQLEVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAFTT
441	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIFLGVP GS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAFFTT
442	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIGLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLKAQFTT
443	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAILLFVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAHFTT
444	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIGLYVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGAFFTT
445	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAILLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAFTT
446	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAITLHVP GS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
447	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIVLEVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAHFTT
448	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIALHVP G SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAVFTT
449	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIQLWVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
450	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSRTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIVLIVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
451	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIQLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSRPLQAHFTT
452	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAITLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAFTT
453	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIALHVP G SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

454	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIGLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLIAHFTT
455	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIWL VVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLHARFTT
456	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIFLQVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLAAVFTT
457	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAILLHVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLSAISTT
458	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIIQLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLSAVFTT
459	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIYLVKPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLVAHFTT
460	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLLAYFTT
461	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIIHLHVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLEAKFTT
462	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIKLEVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLAIFTT
463	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEP QPPGEAIYLEVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKG GGFSPFLKAAFTT
464	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIIILRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLVAIFTT
465	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIVLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLAAWFTT
466	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIFLQVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLNAFTT
467	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEP QPPGEAIIILGVPGSER SYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLHAYSTT
468	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIIILDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLSAIFTT
469	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIIILLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLSAVFTT
470	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIIHLLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLLAHFTT
471	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEP RPDGEAIQLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKG GLLSSPLDAYFTT
472	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEP QPPGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKG GGFPSMPLASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

473	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIVYHEPRPSGEAIHLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLSAFFT
474	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFT
475	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRISYCETFYHGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAKFTT
476	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWLKVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
477	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWLKVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
478	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
479	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFFT
480	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALLVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAQFTT
481	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIIHVPVS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAKFTT
482	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIDLHVPVS SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHALFTT
483	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGFPSMPLSAIFT
484	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIDLAVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSFTT
485	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIYLVPGS SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAKFTT
486	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFT
487	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAISLLVPDS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLKFTT
488	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
489	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLTVPGS ERSYDLTGPKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLVAYFTT
490	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEASFTT
491	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAII LAVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSLPLVASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

492	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSDIGYTEYGGYGEAIYLSVP GSERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
493	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAISLSVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIANFTT
494	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAIALLV GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
495	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAII LDVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSSIFTT
496	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAIVLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRASFTT
497	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAIKLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFFTT
498	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAII LEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
499	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAIIHLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHADFTT
500	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAIWLEVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVADFTT
501	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAISLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAHFTT
502	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSDIGYTEYGGYGEAILHVP SERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
503	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsffigYLEPQPPGEAIVLLVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPVPLAAFTT
504	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsffigYLEPQPPGEAII LWVP SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPQFTT
505	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsffigYLEPQPPGEAII LGVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMLHPLVALFTT
506	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAIGLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
507	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAIIHLSVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAAYFTT
508	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsffigYLEPQPPGEAIVLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPSYPLVAAFTT
509	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsfyIAYAEPRPDGEAII LQVP GSCRSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAIFTT
510	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDsffigYLEPQPPGEAINLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPFPLSAVFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

511	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLHVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
512	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLAVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAQFTT
513	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLGVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
514	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLCAEFTT
515	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAEFTT
516	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPPKFTT
517	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIILEVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAVFTT
518	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLVVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
519	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLKVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAIFTT
520	MLPAPKNPVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLKRLSPPVVTITITMAVCRKPVAEN LSQTLS
521	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIFLDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSPLTAFFTT
522	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIVLDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLAAFTT
523	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIGLAVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLQANFTT
524	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
525	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLQVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSASFTT
526	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLHVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTASFTT
527	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLRVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
528	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLRVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 3】

529	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAHFTT
530	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAFFTT
531	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLYVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPDPLDAVFTT
532	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIYLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSTFTT
533	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLFVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLKAYFTT
534	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLVVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
535	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIQLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSLPLSADFTT
536	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLQVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAEFTT
537	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLAVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYASFTT
538	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTTPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIRLQVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLGFTT
539	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLVVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAIFTT
540	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHAKFTT
541	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT
542	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAAFTT
543	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLAAVFTT
544	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLQVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLGAHFTT
545	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIALWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVASFTT
546	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAFFTT
547	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLRASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 4】

548	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWLGVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHATFTT
549	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHANFTT
550	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLRVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAKFTT
551	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSDPLQAVFTT
552	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLHVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAFFTT
553	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIIHVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAYFTT
554	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAKFTT
555	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLFVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSTPLSASFTT
556	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHAYFTT
557	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLRAYFTT
558	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAFFTT
559	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLLAVFTT
560	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLRVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMPLSAFTT
561	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLIAKFTT
562	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLHVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLQAIFTT
563	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALVVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAANFTT
564	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAINLSVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAYFTT
565	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLTASFTT
566	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIRLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLGASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 5】

567	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLVWPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
568	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIYLEVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
569	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
570	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIEYCETKMCGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYRVPIPGVKGGTASLPLSAIFTT
571	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIYYIESYPAGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
572	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIYYIESYPAGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
592	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
593	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGGS GGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVL VPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
594	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKEAAAKEAAK EAAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
595	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKLPAPKNLVVSR VTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
596	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPG SCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPK NLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
597	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPG SCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 6】

598	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVL VPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
599	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKLPAPKNLVVS RTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
708	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
709	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
710	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLGVPGSC RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT

10

20

【 0 2 4 9】

本明細書に提供されるように、いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインは、配列番号 2（ヒト成熟 C D 7 1）または配列番号 5（ヒト成熟 C D 7 1 細胞外ドメイン）に結合し、各々の配列を、以下の表 7 において提供される。

【表 8】

表 7

配列番号	配列
2	MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKGPQQPLLQRLCSGPRLLLLSLGLSLLL LVVVCVIGSQNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNVGRKMK SLESQLEKQQKDLSEDHSSLLLHVKKQFVSDLRSLSCQMAALQGNGSERTCC PVNWVEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQ HHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDDWYGHGL GGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL
5	QNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNVGRKMKSLLESQLEKQ QKDLSEDHSSLLLHVKKQFVSDLRSLSCQMAALQGNGSERTCCPVNWVEHE RSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTW MGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDDWYGHGLGGGEDCAHF TDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

30

40

【 0 2 5 0】

いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインは、リンカーによって接続された 2 つの F N 3 ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。リンカーは、本明細書に記載されるものなどの短ペプチド配列であり得る。例えば、リンカーは、G / S または G / A リンカーなどであり得る。本明細書に提供されるように、リンカーは、(G S)₂、(

50

配列番号 720)、(GGGS)₂(配列番号 721)、(GGGS)₅(配列番号 722)、(AP)₂₋₂₀、(AP)₂(配列番号 723)、(AP)₅(配列番号 724)、(AP)₁₀(配列番号 725)、(AP)₂₀(配列番号 726)、及び A(EAAAK)₅AAA(配列番号 727)または(EAAAK)₁₋₅(配列番号 728)であり得る。これらは、非限定的な例であり、他のリンカーも使用することができる。GGGSまたはGGGA反復の数はまた、1、2、3、4、または5であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGS反復及び1つ以上のGGGA反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK(配列番号 729)、GGGS GGGS GGGS GGGS(配列番号 730)、APAPAPAPAP(配列番号 731)、またはEAAAK(配列番号 732)を含む。

10

【0251】

いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号593のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号594のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号595のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号596のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号597のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号598のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号599のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592～599のうちの1つのアミノ酸配列を有する。

20

【0252】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、当業者によって実践されるように、表面プラズモン共鳴またはKinexa法によって決定されるように、該当する場合、約 1×10^{-7} M未満、例えば、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 1×10^{-12} M未満、または約 1×10^{-13} M未満の解離定数(K_D)を有するCD71に結合し得る。特定のFN3ドメイン-抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件(例えば、浸透圧濃度、pH)下で測定された場合に、変化し得る。したがって、親和性及び他の抗原結合パラメータ(例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、タンパク質足場及び抗原の標準化された溶液、ならびに本明細書に記載される緩衝液などの標準化された緩衝液を用いて行われる。

30

【0253】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、標準溶液ELISAアッセイにおいて陰性対照について得られたシグナルが少なくとも5倍超えるその標的タンパク質に結合し得る。

40

【0254】

いくつかの実施形態では、その標的タンパク質に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、分子のN末端に連結された開始剤メチオニン(Met)を含む。いくつかの実施形態では、その標的タンパク質に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、FN3ドメインのC末端に連結されたシステイン(Cys)を含む。N末端Met及び／またはC末端Cysの添加は、半減期延長分子の発現及び／またはコンジュゲーションを促進し得る。

【0255】

50

F N 3 ドメインはまた、米国特許第 10, 196, 446 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどのシステイン置換も含むことができる。簡潔には、いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインを含むポリペプチドは、システインで置換された残基を有する F N 3 ドメインを有し得、これは、システイン操作されたフィブロネクチン III 型（F N 3）ドメインと称され得る。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインは、米国特許第 10, 196, 446 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の配列番号 1（LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEINLTVPGSERSYDLTG L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R S N P L S A E F T T、配列番号 713）に基づいて、F N 3 ドメインの残基 6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、及び 93 からなる群から選択される位置、ならびに関連する F N 3 ドメインにおける同等の位置に少なくとも 1 つのシステイン置換を含む。ドメインまたはタンパク質内のある位置におけるシステイン置換は、システイン残基による既存のアミノ酸残基の置き換えを含む。システイン修飾の他の例は、例えば、米国特許出願公開第 20170362301 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において見出され得る。配列のアラインメントは、例えば NCBI ウェブサイトでのデフォルトパラメータを使用して BlastP を使用して行うことができる。

10

いくつかの実施形態では、標的タンパク質に結合する F N 3 ドメインは、細胞内に内在化される。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインの内在化は、細胞への検出可能な標識または治療薬の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインの内在化は、細胞への細胞毒性剤の送達を促進し得る。細胞毒性剤は、治療薬として作用することができる。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインの内在化は、細胞への本明細書に開示される任意の検出可能な標識剤、治療剤、及び／または細胞毒性剤の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、肝臓細胞、肺細胞、筋肉細胞、免疫細胞、樹状細胞、CNS の細胞、または心臓細胞である。いくつかの実施形態では、治療薬は、本明細書に提供される siRNA 分子である。検出可能な標識にコンジュゲートされた CD71 に結合する F N 3 ドメインは、インビボまたはインビトロで腫瘍組織などの試料上の CD71 の発現を評価するために使用することができる。検出可能な標識にコンジュゲートされた CD71 に結合する F N 3 ドメインは、インビボまたはインビトロで試料血液、免疫細胞、筋肉細胞、または樹状細胞上の CD71 の発現を評価するために使用することができる。

20

30

【0256】

本明細書で提供されるように、siRNA 分子に連結される異なる F N 3 ドメインはまた、異なる標的に結合する別の F N 3 ドメインにコンジュゲートまたは連結することができる。これにより、分子は、例えば、第 1 の標的及び別の標的に結合するように、多重特異的（例えば、二重特異的、三重特異的など）であることが可能になる。いくつかの実施形態では、第 1 の F N 3 結合ドメインは、腫瘍細胞によって発現される抗原（腫瘍抗原）に結合する別の F N 3 ドメインに連結されている。

【0257】

いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインは、二価の F N 3 ドメインを形成するために、リンカーによって一緒に連結され得る。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、G/S リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、2、3、または 4 回の G/S 反復を有する。G/S 反復単位は、4 つのグリシン、続いてセリン、例えば、GGGGS である。リンカーの他の例を、本明細書に提供し、使用することもできる。

40

【0258】

いくつかの実施形態では、リンカーは、(GS)₂、(配列番号 720)、(GGGS)₂ (配列番号 721)、(GGGGS)₅ (配列番号 722)、(AP)₂₋₂₀、(AP)₂ (配列番号 723)、(AP)₅ (配列番号 724)、(AP)₁₀ (配列番号

50

725)、(AP)₂₀(配列番号726)、及びA(EAAAK)₅AAA(配列番号727)または(EAAAK)₁₋₅(配列番号728)のポリペプチドである。これらは、非限定的な例であり、他のリンカーも使用することができる。GGGGSまたはGGGA反復の数はまた、1、2、3、4、または5であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGGS反復及び1つ以上のGGGA反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGGS反復及び1つ以上のEAAAK反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGGS反復及び1つ以上の「AP」反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE(配列番号729)、GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS(配列番号730)、APAPAPAPAP(配列番号731)、またはEAAAK(配列番号732)を含む。

10

【0259】

任意の特定の理論に拘束されることなく、いくつかの実施形態では、核酸分子に連結されるFN3ドメインは、1つ以上のFN3ドメインの結合パートナー(例えば、腫瘍細胞)を発現し、その中に核酸分子の細胞内蓄積をもたらす、細胞への治療剤の標的送達において使用され得る。これにより、siRNA分子は、細胞機構と適切に相互作用して、標的遺伝子の発現を阻害し、有効性を改善することができ、いくつかの実施形態では、同じsiRNA分子の非標的投与によって生じ得る毒性も回避する。

【0260】

それらの特異的標的タンパク質に結合する本明細書に記載されるFN3ドメインは、例えば、標的分子結合の価及びしたがって結合力を増加させる手段として、または2つ以上の異なる標的分子に同時に結合する二重特異性もしくは多重特異性足場を生成する手段として、単量体、二量体、または多量体として生成され得る。二量体及び多量体は、単一特異性、二重特異性、または多重特異性タンパク質足場を連結することによって、例えば、アミノ酸リンカー、例えば、ポリグリシン、グリシン及びセリン、またはアラニン及びプロリンを含有するリンカーを包含することによって生成され得る。例示的なリンカーは、(GS)₂、(配列番号720)、(GGGS)₂(配列番号721)、(GGGGS)₅(配列番号722)、(AP)₂₋₂₀、(AP)₂(配列番号723)、(AP)₅(配列番号724)、(AP)₁₀(配列番号725)、(AP)₂₀(配列番号726)、及びA(EAAAK)₅AAA(配列番号727)または(EAAAK)₁₋₅(配列番号728)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE(配列番号729)、GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS(配列番号730)、APAPAPAPAP(配列番号731)、またはEAAAK(配列番号732)のアミノ酸配列を含むか、またはそれである。

20

30

【0261】

二量体及び多量体は、NからCの方向で互いに連結され得る。ポリペプチドを新規の連結した融合ポリペプチドに接続するための天然に存在するペプチドリナー及び合成ペプチドリナーの使用は、文献で周知である。例えば、Hall et al. (J Biol Chem., 1989, 264: 5260-5268)、Alfthan et al. (Protein Eng., 1995, 8: 725-731)、Robinson & Sauer (Biochemistry, 1996, 35: 109-116)、及び米国特許第5,856,456号を参照されたい。この段落に記載のリンカーは、本明細書及び上記で提供される式において提供されるドメインを連結するためにも使用され得る。

40

【0262】

半減期延長部分

【0263】

FN3ドメインはまた、いくつかの実施形態では、例えば共有結合相互作用を介して他のサブユニットを組み込み得る。いくつかの実施形態では、半減期延長部分をさらに含むFN3ドメイン。例示的な半減期延長部分は、アルブミン、アルブミンバリエーション、アル

50

ブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、トランスフェリン及びその断片及び類似体、ならびにFc領域である。ヒトFc領域のアミノ酸配列は、周知であり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、及びIgE Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、アルブミン、アルブミンバリエーション、アルブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、ならびにその断片及び類似体に結合する。分子全体の半減期を延長する。

【0264】

いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメイン（タンパク質）は、単離される。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含むが、但し、タンパク質は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の位置10に対応する置換を有するものとする。いくつかの実施形態では、置換は、A10Vである。いくつかの実施形態では、置換は、A10G、A10L、A10I、A10T、またはA10Sである。いくつかの実施形態では、10位の置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、単離されたアルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と比較した場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14個の置換を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、置換は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の位置10に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、提供されるFN3ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の残基位置6、11、22、25、26、52、53、61、88、または位置6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、もしくは93に対応する少なくとも1つの残基位置に、またはC末端でシステイン残基を含む。位置は一連に列挙されているが、各位置はまた、個別に選択され得る。いくつかの実施形態では、システインは、位置6、53、または88に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインの追加の例は、米国特許第10,925,932号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0265】

抗体定常領域の全てまたは一部は、抗体様特性、特に、Fc領域と関連した特性、例えば、補体活性、半減期などを付与するために、FN3ドメインに付着され得、例えば、C1q結合、補体依存性細胞毒性（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）、食作用、細胞表面受容体の下方調節（例えば、B細胞受容体；BCR

10

20

30

40

50

）などのFcエフェクター機能は、これらの活性に関与するFc中の残基を修飾することによってさらに修飾され得る（概観のために、Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20, 685-691, 2009を参照されたい）。

【0266】

例えば、PEG5000またはPEG20,000などのポリエチレングリコール（PEG）分子、異なる鎖長の脂肪酸及び脂肪酸エステル、例えば、ラウレート、ミリスレート、ステアレート、アラキダート、ベヘネート、オレエート、アラキドナート、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸など、ポリリジン、オクタン、炭水化物（デキストラン、セルロース、オリゴ類または多糖類）など、追加の部分が、所望の特性のために、FN3ドメインに組み込まれ得る。これらの部分は、タンパク質足場コード配列との直接融合であってもよく、標準的なクローニング及び発現技術によって生成され得る。代替的に、部分を本明細書に開示される組換え技術によって産生された分子にその部分を付着させるために、周知の化学的結合方法が、使用され得る。

【0267】

PEG部分は、例えば、システイン残基を分子のC末端に組み込むこと、またはシステインを分子の結合面から離れた残基位置に操作すること、及び周知の方法を使用して、PEG基をシステインに結合させることによって、FN3ドメインに付加され得る。

【0268】

追加の部分を組み込んだFN3ドメインは、いくつかの周知のアッセイによって機能性について比較され得る。例えば、Fcドメイン及び／またはFcドメインバリエーションの組み込みに起因する改変された特性は、FcγRI、FcγRII、FcγRIII、またはFcRn受容体などの受容体の可溶性形態を使用して、または例えばADCCもしくはCDCを測定する、またはインビボモデルにおいて本明細書に開示される分子の薬物動態特性を評価する周知の細胞ベースのアッセイを使用して、Fc受容体結合アッセイでアッセイされ得る。

【0269】

本明細書に提供される組成物は、FN3タンパク質及び核酸分子を調製し、それらを一緒に連結することによって調製することができる。タンパク質を核酸分子に連結するための技術は、既知であり、任意の方法が、使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、核酸分子は、本明細書に提供されるリンカーなどのリンカーで修飾され、次いでタンパク質は、リンカーを含む核酸分子と混合されて、組成物を形成する。例えば、いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、チオール-マレイミド化学を使用してsiRNAシステインにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、システイン含有FN3ドメインは、例えば、還元剤（例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP））を用いてリン酸緩衝生理食塩水（または任意の他の適切な緩衝液）中で還元されて、遊離チオールを得ることができる。次いで、いくつかの実施形態では、遊離チオール含有FN3ドメインを、マレイミド連結-修飾siRNA二重鎖と混合し、条件下でインキュベートして、連結した複合体を形成した。いくつかの実施形態では、混合物を、0～5時間、または約1、2、3、4、または5時間、室温でインキュベートする。反応は、例えば、N-エチルマレイミドでクエンチすることができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、親和性クロマトグラフィー及びイオン交換を使用して精製することができる。他の方法も使用することができ、これは、単なる1つの非限定的な実施形態である。

【0270】

FN3タンパク質を作製する方法は、既知であり、任意の方法は、タンパク質を生成するために使用することができる。実施例は、参照により本明細書に組み込まれる参考文献に提供される。

【0271】

いくつかの実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、または70

8～710のアミノ酸配列を含み、精製の容易さのためにポリペプチドのN末端またはC末端に、ヒスチジンタグが付加されている。いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグ（Hisタグ）は、6個のヒスチジン残基を含む。さらなる実施形態では、Hisタグは、少なくとも1つのグリシン残基または約2～約4つのグリシン残基によってFN3ドメインに接続される。したがって、FN3ドメインの精製及びポリペプチドからのHisタグの切断後、1つ以上のグリシンが、N末端またはC末端に残留し得る。いくつかの実施形態では、HisタグがN末端から除去される場合、全てのグリシンが、除去される。いくつかの実施形態では、HisタグがC末端から除去される場合、グリシンのうちの1つ以上が、保持される。

【0272】

いくつかの実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含み、N末端のメチオニンは、FN3ドメインの精製後に保持される。

【0273】

キット

【0274】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物を含むキットが、提供される。

【0275】

本キットは、治療用途のために、及び診断キットとして使用され得る。

【0276】

いくつかの実施形態では、本キットは、核酸分子にコンジュゲートされたFN3ドメインを含む。

【0277】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するためのキットが、提供される。いくつかの実施形態では、キットは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含むsiRNAに連結された1つ以上のFN3ドメインを含む薬学的組成物を含む第1の容器と、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための酵素補充療法（ERT）を含む薬学的組成物を含む第2の容器と、を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のFN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、siRNAは、Gys1を標的とする。いくつかの実施形態では、1つ以上のFN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、ポンペ病（GSD2、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）欠損症）、コリ病またはフォーブス病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（GSD12、アルドラーゼA（ALDOA）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）、アルドラーゼA（ALDOA）、マリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC／SLC37A4）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2／PHKB／PHKG2／PHKA1）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）、グルコース輸送体（GLUT2）、 β -エンノラーゼ（ENO3）、及びグリコゲンニン-1（GYG1）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、GAA、マリン、ラフォリン、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、第1の容器は、Gys1を標的とするsiRNAに連結されたCD71に結合するFN3ドメインを含む薬学的組成物を含み、第2の容器は、GAAの酵素を含む薬学的組成物を

10

20

30

40

50

含む。

【0278】

共役体FN3ドメインの使用

【0279】

本明細書に提供される組成物は、細胞、組織、臓器、流体、または概して、宿主におけるヒト疾患または特定の病理を診断する、モニタリングする、調節する、治療する、緩和する、その発生の防止またはその症状の軽減を助けるために使用することができる。

【0280】

いくつかの実施形態では、骨格筋におけるGYS1 mRNA及びタンパク質を選択的に低下させる方法。ある特定の実施形態では、GYS1 mRNA及びタンパク質は、肝臓及び／または腎臓において低下しない。

10

【0281】

いくつかの実施形態では、GYS1 mRNA及びタンパク質の低下は、本明細書に記載されるコンジュゲートの投与後、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、または5週間を超えて持続する。

【0282】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、筋肉疾患の治療のためにCD71陽性組織（例えば、骨格筋、平滑筋）への送達を促進することができる。

【0283】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、免疫学的疾患の治療のために、活性化リンパ球、樹状細胞、または他の免疫細胞への送達を促進することができる。

20

【0284】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患の治療を必要とする対象における自己免疫疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫甲状腺炎、セリアック病、1型真性糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、及び免疫血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。

30

【0285】

いくつかの実施形態では、ポンペ病（GSD2、酸アルファーグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を有する対象を治療する方法が、提供され、本方法は、対象に、本明細書に提供される組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。

40

【0286】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、本明細書に提供される組成物を投与することを含む、方法が、提供される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、コリ病またはフォース病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、アルドラーゼA欠損症GSD12、ラフォラ病、低酸素症、アンデル

50

セン病（GSD 4、グリコーゲン脱分岐酵素（GBE 1）欠損症）、タルイ病（GSD 7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ（GYS 2）欠損症（GSD 0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC / SLC 37 A 4）欠損症（GSD 1、フォン・ギアケ病）、ハース病（GSD 6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）または筋ホスホグリセレートムターゼ（PGAM 2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA 2 / PHKB / PHKG 2 / PHKA 1）欠損症（GSD 9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM 2）欠損症（GSD 10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD 11）、ファンコニービッセル症候群（GSD 11）、グルコーストランスポーター（GLUT 2）欠損症、アルドラーゼA欠損症（GSD 12）、 β -エノラーゼ（ENO 3）欠損症（GSD 13）、及びグリコゲンニン-1（GYG 1）欠損症（GSD 15）からなる群から選択される。

10

【0287】

いくつかの実施形態では、がんを治療するための薬学的組成物または薬剤の調製における、本明細書に提供される組成物またはのいずれかの使用が、提供される。いくつかの実施形態では、がんは、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、胃癌、透明細胞腎細胞癌、乳房の透明細胞癌、子宮内膜の透明細胞癌、卵巣の透明細胞癌、子宮の明細胞癌、肝細胞癌、膵臓癌、前立腺癌、軟組織癌、ユーイング肉腫、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される。

20

【0288】

いくつかの実施形態では、CD 71細胞は、CNS疾患、MSなどの炎症性／免疫性疾患、及び脳の感染症に関与する細胞である。いくつかの実施形態では、CD 71に結合するポリペプチドは、中枢神経系に向けられる。いくつかの実施形態では、神経学的状態及び／または脳腫瘍の治療を必要とする対象における神経学的状態及び／または脳腫瘍を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD 71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD 71に結合するFN 3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくは

30

【0289】

いくつかの実施形態では、がんを有する対象を治療する方法が、提供され、本方法は、対象に、本明細書に提供される組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD 71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD 71に結合するFN 3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。

40

【0290】

いくつかの実施形態では、対象は、固形腫瘍を有する。

【0291】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、黒色腫である。

50

【0292】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、肺癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、非小細胞肺癌（NSCLC）である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、扁平上皮非小細胞肺癌（NSCLC）である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、非扁平上皮NSCLCである。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、肺腺癌である。

【0293】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、腎細胞癌（RCC）である。

【0294】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、中皮腫である。

【0295】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、上咽頭癌（NPC）である。

【0296】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、結腸直腸癌である。

【0297】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、前立腺癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、去勢抵抗性前立腺癌である。

【0298】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、胃癌である。

【0299】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、卵巣癌である。

【0300】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、胃癌である。

【0301】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、肝臓癌である。

【0302】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、膵臓癌である。

【0303】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、甲状腺癌である。

【0304】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、頭頸部の扁平上皮癌である。

【0305】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、食道または胃腸管の癌腫である。

【0306】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、乳癌である。

【0307】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、卵管癌である。

【0308】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、脳腫瘍である。

【0309】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、尿道癌である。

【0310】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、泌尿生殖器癌である。

【0311】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、子宮内膜症である。

【0312】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、子宮頸癌である。

【0313】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、がんの転移性病変である。

【0314】

いくつかの実施形態では、対象は、血液悪性腫瘍を有する。

10

20

30

40

50

【0315】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、骨髄腫、または白血病である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、B細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、バーキットリンパ腫である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、ホジキンリンパ腫である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、非ホジキンリンパ腫である。

【0316】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、骨髄異形成症候群である。

【0317】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄性白血病（CML）である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄単球性白血病（CMML）である。

【0318】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、多発性骨髄腫（MM）である。

【0319】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、形質細胞腫である。

【0320】

いくつかの実施形態では、がんは、軟組織癌である。いくつかの実施形態では、軟組織癌は、ユーイング肉腫である。

【0321】

いくつかの実施形態では、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の使用は、がんを治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、本組成物は、がんを治療するために使用することができる。

【0322】

いくつかの実施形態では、ポンペ病（GSD2、酸性α-グルコシダーゼ（GAA）欠損症）の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の使用は、ポンペ病（GSD2、酸性α-グルコシダーゼ（GAA）欠損症）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、この組成物は、ポンペ病（GSD2、酸性α-グルコシダーゼ（GAA）欠損症）を治療するために使用することができる。

【0323】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の使用は、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、本組成物は、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するために使用することができる。

【0324】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、本明細書に提供される組成物を投与することを含む、当該方法が、提供される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、コリ病またはフォーブス病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、アルドラーゼA欠損症GSD12、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン脱分岐酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、及び成人ポリグルコサン小体病

からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC/SLC37A4）欠損症（GSD1、フォン・ギアケ病）、ハース病（GSD6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）または筋ホスホグリセレートムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症（GSD10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD11）、ファンコニービッケル症候群（GSD11）、グルコーストランスポーター（GLUT2）欠損症、アルドラーゼA欠損症（GSD12）、β-エンノラーゼ（ENO3）欠損症（GSD13）、及びグリコゲンニン-1（GYG1）欠損症（GSD15）からなる群から選択される。

10

【0325】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、中枢神経系に向けられる。いくつかの実施形態では、神経学的状態及び／または脳腫瘍の治療を必要とする対象における神経学的状態及び／または脳腫瘍を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、脳腫瘍は、非悪性、良性、及び悪性の脳腫瘍からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調症、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギランバレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、片頭痛、脳炎、敗血症、及び重症筋無力症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象における神経学的状態及び／または脳腫瘍を治療する方法であって、本方法が、対象に、CD71に結合するFN3ドメインを投与することを含み、FN3ドメインは、治療剤（例えば、細胞毒性剤、siRNA、ASOなどのオリゴヌクレオチド、別の標的に結合するFN3ドメインなど）にコンジュゲートされる。

20

30

【0326】

いくつかの実施形態では、ポンペ病の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、対象におけるポンペ病を治療する方法であって、本方法が、対象に、CD71に結合するFN3ドメインを投与することを含み、FN3ドメインは、治療剤（例えば、細胞毒性剤、siRNA、ASOなどのオリゴヌクレオチド、別の標的に結合するFN3ドメインなど）にコンジュゲートされる。

40

【0327】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患の治療を必要とする対象における自己免疫疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521

50

～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫甲状腺炎、セリアック病、1型真性糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、及び免疫血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象における自己免疫疾患を治療する方法であって、本方法が、対象に、CD71に結合するFN3ドメインを投与することを含み、FN3ドメインは、治療剤（例えば、細胞毒性剤、siRNA、ASOなどのオリゴヌクレオチド、別の標的に結合するFN3ドメインなど）にコンジュゲートされる。

【0328】

いくつかの実施形態では、細胞における標的遺伝子の発現を低減する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物を用いて細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、エクスピボである。いくつかの実施形態では、細胞は、インピボである。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、GYS1である。しかしながら、本明細書に提供される証拠は、siRNA分子がFN3ドメインにコンジュゲートされたときに効率的に送達され得ることを実証するため、標的遺伝子は、任意の標的遺伝子であり得る。いくつかの実施形態では、GYS1を標的とするsiRNAは、FN3ドメインに連結されている。いくつかの実施形態では、FN3ポリペプチド（ドメイン）は、CD71に結合するものである。いくつかの実施形態では、FN3ポリペプチドは、本明細書に提供されるか、またはPCT出願第PCT/US20/55509号、米国出願第17/070,337号、PCT出願第PCT/US20/55470号、または米国出願第17/070,020号に提供され、これらの各々は、本明細書に参照によりその全体が組み込まれる。いくつかの実施形態では、siRNAは、FN3ドメインにコンジュゲートされていない。

【0329】

いくつかの実施形態では、細胞における標的遺伝子の発現を低減させる方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物を用いて細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、エクスピボである。いくつかの実施形態では、細胞は、インピボである。いくつかの実施形態では、標的遺伝子の発現を低減させる方法は、標的遺伝子の発現を約99%、90～99%、50～90%、または10～50%の低減をもたらす。

【0330】

いくつかの実施形態では、GYS1の発現を低減させる方法が、提供される。いくつかの実施形態では、低減された発現は、GYS1 mRNAの発現（量）である。いくつかの実施形態では、GYS1の発現を低減させる方法は、GYS1の発現の約99%、90～99%、50～90%、または10～50%の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、低減された発現は、GYS1タンパク質の発現（量）である。いくつかの実施形態では、低減されたタンパク質は、グリコーゲンである。いくつかの実施形態では、グリコーゲンの低減は、筋肉細胞において生じる。いくつかの実施形態では、グリコーゲンの低減は、心臓細胞において生じる。いくつかの実施形態では、本方法は、GYS1を標的とする本明細書に提供されるsiRNA分子を用いて細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態では、siRNAは、FN3ドメインにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、本明細書に提供されるようなものである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合する2つのFN3ドメインの二量体である。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、同じである。いくつかの実施形態では、2つのFN3ドメインは、異なっている、すなわち、CD71の異なる領域またはアミノ酸残基、すなわち、異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象（患者）に、本明細書に提供されるものなどのGYS1 siRNA分子を投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象に投与されるGYS1 siRNAは、F

10

20

30

40

50

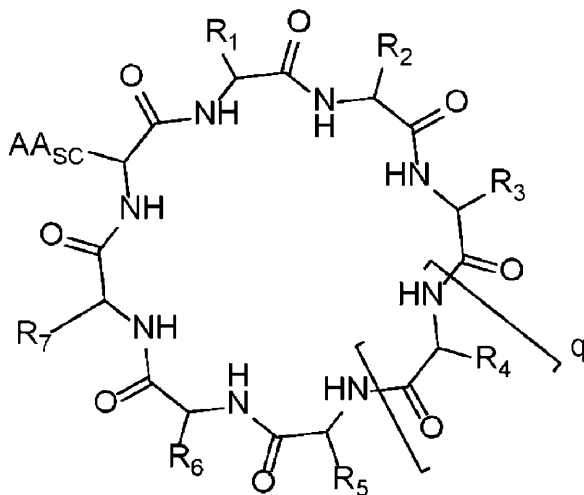
N3ドメインにコンジュゲートされるか、または連結される。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、本明細書に提供されるようなものである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合する2つのFN3ドメインの二量体である。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、同じである。いくつかの実施形態では、2つのFN3ドメインは、異なっている、すなわち、CD71の異なる領域またはアミノ酸残基、すなわち、異なるエпитープに結合する。いくつかの実施形態では、CD71結合ドメインは、本明細書に提供されるポリペプチドである。

【0331】

いくつかの実施形態では、siRNAは、化学式IIIの環状ペプチド：

10

【化16】



20

(化学式III)

またはそのプロトン化形態にコンジュゲートされ、式中、R₁、R₂、及びR₃は、各々独立して、Hまたはアミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、R₁、R₂、及びR₃の少なくとも1つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、R₄、R₅、R₆、R₇は、独立して、Hまたはアミノ酸側鎖であり、R₄、R₅、R₆、R₇の少なくとも1つは、3-グアニジノ-2-アミノプロピオン酸、4-グアニジノ-2-アミノブタン酸、アルギニン、ホモアルギニン、N-メチルアルギニン、N,N-ジメチルアルギニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、リジン、N-メチルリジン、N,N-ジメチルリジン、N-エチルリジン、N,N,N-トリメチルリジン、4-グアニジノフェニルアラニン、シトルリン、N,N-ジメチルリジン、b-ホモアルギニン、3-(1-ピペリジニル)アラニンの側鎖であり、AA_{Sc}は、アミノ酸側鎖であり、qは、1、2、3、または4であり、国際特許公開第WO2022/213118号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において開示されるように、式@@の環状ペプチドは、FfΦRrRrEではない。「FfΦRrRrE」は、「F」が、L-Pheであり、「f」が、D-Pheであり、「Φ」が、L-2-ナフチルアラニンであり、「R」が、L-アルギニンであり、「r」が、D-アルギニンである構造を指す。「FfΦRrRrE」はまた、Soudah et al. ("Antimicrobial-155 Cyclic Peptide-PNA Conjugate: Synthesis, Cellular Uptake, and Biological Activity", ACS Omega, 2019, 4(9):13954-13961)においても記載され、これにより、参照によりその全体が組み込まれる。

30

40

【0332】

いくつかの実施形態では、siRNA分子を対象における細胞に送達する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される組成物を含

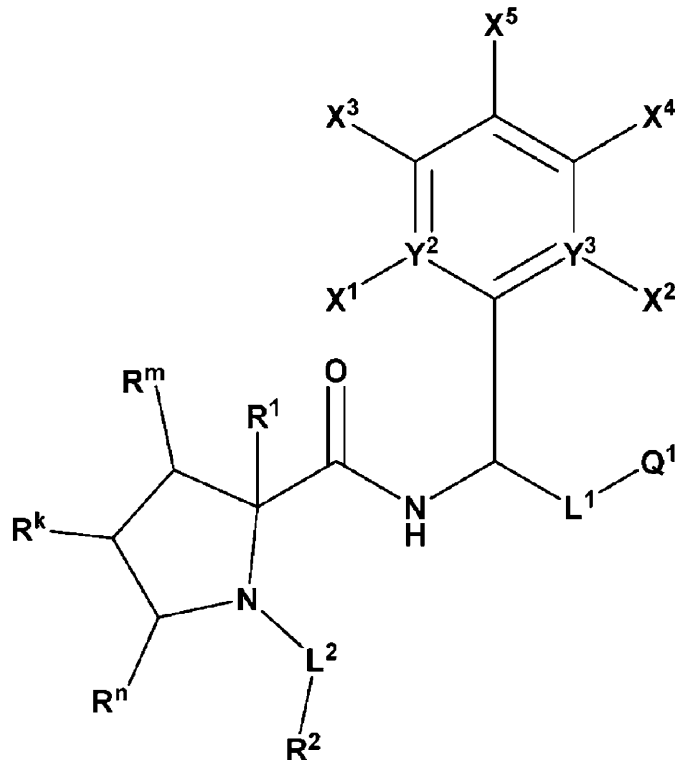
50

む薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、CD71陽性細胞である。タンパク質に関する「陽性細胞」という用語は、タンパク質を発現する細胞を指す。いくつかの実施形態では、タンパク質は、細胞表面上で発現される。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝臓細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、筋肉細胞、CNSの細胞、または血液脳関門内の細胞である。いくつかの実施形態では、siRNAは、細胞における標的遺伝子の発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、GYS1である。

【0333】

いくつかの実施形態では、国際特許公開第WO2022/198196号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、化学式IVの化合物、

【化17】



(化学式IV)

またはその立体異性体もしくは互変異性体を含む組成物、または前述のうちのいずれかの薬学的に許容される塩が、本明細書に提供され、式中、Y²及びY³が、各々、Cであるか、またはY²及びY³の一方が、Nであり、Y²及びY³のもう一方が、Cであり、X¹及びX²が、各々独立して、H、C₁₋₆アルキル、またはC₁₋₆アルコキシであり、X³及びX⁴が、各々独立して、H、ハロ、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ、または5~20員ヘテロアリールであり、式中、X³及びX⁴のC₁₋₆アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換され、X⁵が、H、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ、またはC₃₋₁₀シクロアルキルであり、いずれか(1) L¹が存在せず、Q¹は、(i)~(iv): (i) フェニル（式中、Q¹のフェニルが、1つ以上のハロ、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、-NH₂、-NH-C(O)-(C₁₋₆アルキル)、-NH-C(O)-(3~15員ヘテロシクリル)、C₃₋₁₀シクロアルキル、または5~20員ヘテロアリールで置換され、式中、C₁₋₆アルキルが、1つ以上のハロ、-NH-C(O)-NH(C₁₋₆アルキル)、-NH-C(O)-C₁₋₆アルキル、または-NH-C(O)-C₁₋₆アルコキシで任意選択的に置換され、C₃₋₁₀シクロアルキルが、1つ以上のハロまたはC₁₋₆アルキルで任意選択的に置換され、5~20員ヘテロアリールが、1つ以上のC₁₋₆アルキルで任意選択的に置換される)、(ii) 3~15員ヘテロシクリル（式中、Q¹の3~15員ヘテロシクリルが、1つ以上のオ

キソ、または C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換される)、 (iii) 5～20 員ヘテロアリール (式中、 Q^1 の 5～20 員ヘテロアリールが、1つ以上のハロ、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-NH_2$ 、または C_{3-10} シクロアルキルで任意選択的に置換され、式中、 C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換され、 C_{3-10} シクロアルキルは、1つ以上のハロまたは C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換される)、及び (iv) C_{3-10} シクロアルキル、から選択されるか、あるいは (2) L^1 が、 $-CH_2-$ であり、 Q^1 が、 C_{3-10} シクロアルキルであり、 L^2 が、 $-C(O)-$ もしくは $-S(O)_2-$ であり、 R^1 が、 H もしくは C_{1-6} アルキルであり、 R^k が、 H 、ハロ、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、もしくは $-NH-C(O)-C_{1-6}$ アルキルであり、 R^m が、 H 、 $-OH$ 、または C_{1-6} アルキルであり、 R^n が、 H 、 C_{1-6} アルキル、もしくは C_{3-10} シクロアルキルであるか、または R^n が、それが結合する炭素原子と一緒にあって、 C_{3-5} シクロアルキルを形成するか、または R^k が、 R^m もしくは R^n のいずれかと一緒にあって、それらが結合する原子と一緒にあって、シクロプロピルを形成し、 R^2 が、 $(i) \sim (vii)$: (i) C_{1-6} アルキル (式中、 R^2 の C_{1-6} アルキルが、1つ以上の R^a で任意選択的に置換され、式中、 R^a が、 (a) $-OH$ 、 (b) シアノ、 (c) C_{2-6} アルキニル、 (d) C_{6-20} アリール (式中、 R^a の C_{6-20} アリールが、1つ以上のハロ、シアノ、 C_{1-6} アルコキシ、もしくは $-NH-C(O)-C_{1-6}$ アルキルで任意選択的に置換される)、 (e) 3～15 員ヘテロシクリル (式中、 R^a の 3～15 員ヘテロシクリルが、1つ以上の R^c で任意選択的に置換され、式中、 R^c が、ハロ、オキソ、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、もしくは $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシであり、式中、 R^c の C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロまたは C_{2-6} アルキニルで任意選択的に置換され、 R^c の $-C(O)-C_{1-6}$ が、1つ以上のハロで任意選択的に置換される)、 (f) $-N(R^c)(R^d)$ (式中、 $-N(R^c)(R^d)$ の R^c 及び R^d が、互いに独立して、 H 、 C_{1-6} アルキル、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシ、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_{1-6}$ アルキル)、 $-C(O)-N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル)、 $-CH_2-C(O)-NH_2$ 、3～15 員ヘテロシクリル、もしくは 5～20 員ヘテロアリールであり、式中、 R^c または R^d の C_{1-6} アルキルが、1つ以上の $-C(O)-NH_2$ で任意選択的に置換され、 R^c または R^d の $-C(O)-C_{1-6}$ アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換され、 R^c または R^d の 3～15 員ヘテロシクリル及び 5～20 員ヘテロアリールが、独立して、1つ以上の C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 R^c または R^d の $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル) が、1つ以上のハロ、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシ、もしくは C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロ、 C_{1-6} アルコキシ、または C_{3-10} シクロアルキル、及び C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 R^c または R^d の $-C(O)-N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ が、互いに独立して、1つ以上のハロもしくは C_{6-20} アリールで任意選択的に置換される)、 (g) $-O-R^e$ (式中、 R^e が、 C_{1-6} アルキル、 C_{6-20} アリール、 $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル)、 $-C(O)-N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、もしくは 5～20 員ヘテロアリールであり、 R^e の C_{1-6} アルキルが、1つ以上の C_{1-6} アルコキシで任意選択的に置換され、 C_{1-6} アルコキシが、1つ以上の C_{2-6} アルキニルで任意選択的に置換され、 R^e の C_{6-20} アリールが、1つ以上の C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 R^e の $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル) が、1つ以上の C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、もしくは $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシで任意選択的に置換され、 C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロ、 C_{1-6} アルコキシ、もしくは C_{3-10} シクロアルキルで任意選択的に置換される) (h) $-C(O)-R^e$ (式中、 R^e が、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、もしくは 3～15 員ヘテロシクリルである)、あるいは (i) $-S(O)_2-R^f$ (式中、 R^f が、 C_{1-6} アルキルもしくは 3～15 員ヘテロシクリルである) が、但し、 R^2 が、非置換メチルである場合、いずれか (1) Q^1 が、5～20 員ヘテロアリールであり、式中、 Q^1 の 5～20

10

20

30

40

50

員ヘテロアリールが、1つ以上のハロ、C₁-6アルキル、C₂-6アルケニル、C₁-6アルコキシ、-NH₂、C₃-10シクロアルキル、もしくは-OHで任意選択的に置換され、Q¹が、非置換ピリジルではないか、あるいは(2) Q¹が、フェニルであり、Q¹のフェニルが、(i) 少なくとも1つのC₃-6アルキルであって、少なくとも1つのC₃-6アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換された、少なくとも1つのC₃-6アルキル、または(ii) 少なくとも1つのC₃-10シクロアルキルであって、少なくとも1つのC₃-10シクロアルキルが、1つ以上のハロまたはC₁-6アルキルで任意選択的に置換された、少なくとも1つのC₃-10シクロアルキル、または(iii) 少なくとも1つの5~20員ヘテロアリールであって、少なくとも1つの5~20員のヘテロアリールが、1つ以上のC₁-6アルキルで任意選択的に置換された、少なくとも1つの5~20員ヘテロアリール、で置換されることを条件とし、(iii) C₃-10シクロアルキル(R²のC₃-10シクロアルキルが、1つ以上のR⁹で任意選択的に置換され、R⁹が、5~20員のヘテロアリールもしくはC₆-20アリールであり、R⁹のC₆-20アリールが、1つ以上のC₁-6アルコキシで任意選択的に置換される)、(iii) 3~15員ヘテロシクリル(式中、R²の3~15員のヘテロシクリルが、1つ以上のハロ、オキソ、C₁-6アルキル、-C(O)-C₁-6アルキル、もしくは5~20員ヘテロアリールで任意選択的に置換される)、(iv) 5~20員のヘテロアリールまたは-(C₁-4アルキル)(5~20員ヘテロアリール)(式中、C₁-4アルキルが、1つ以上の-OH、ハロ、-NH₂、-NH(C₁-6アルキル)、-N(C₁-6アルキル)₂で任意選択的に置換され、5~20員ヘテロアリールが、1つ以上のR^sで任意選択的に置換され、R^sが、ハロ、C₁-6アルキル、C₁-6アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁-6アルキル)、-N(C₁-6アルキル)₂、-NH-C(O)-C₁-6アルキル、C₆-20アリール、C₃-10シクロアルキル、3~15員ヘテロシクリル、5~20員ヘテロアリール、もしくは-C(O)-C₁-6アルコキシであり、R^sのC₁-6アルキルが、1つ以上のハロ、C₁-6アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁-6アルキル)、-N(C₁-6アルキル)₂、-NH-C(O)-C₁-6アルキル、もしくは-NH-C(O)-C₁-6アルコキシで任意選択的に置換され、R^sの3~15員ヘテロシクリルが、1つ以上のハロもしくは-C(O)-C₁-6アルコキシで任意選択的に置換され、(v) -N(R^g)(R^h)(式中、R^g及びR^hは、独立して、HまたはC₁-6アルキルである)、(vi) -C(O)-R^j(式中、R^jは、C₃-10シクロアルキル、-NH(C₁-6アルキル)、-N(C₁-6アルキル)₂、または-NH(5~20員ヘテロアリール)である)、及び(vii) C₆-20アリール(式中、R²のC₆-20アリールが、1つ以上の5~20員ヘテロアリールまたは-O-R^pで任意選択的に置換され、R^pが、3~15員ヘテロシクリルであり、R^pの3~15員ヘテロシクリルが、1つ以上の-C(O)-C₁-6アルキルで任意選択的に置換される)、から選択される。

【0334】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物は、細胞、組織、臓器、流体、または概して、宿主におけるヒト疾患または特定の病理を診断する、モニタリングする、調節する、治療する、緩和する、その発生の防止またはその症状の軽減を助け、血液脳関門を横断することができる特性も示すために使用することができる。血液脳関門(BBB)は、ほとんどの巨大分子(例えば、DNA、RNA、及びポリペプチド)ならびに多くの小分子が脳に入るのを防止する。BBBは、主に、高度に制限的な密着結合を有する特殊な内皮細胞で構成されているため、血液から中枢神経系への物質の大小の通過は、BBBによって制御される。この構造は、多くの治療剤が所望の効率でBBBを横断して送達することができないため、神経疾患及び障害(例えば、脳腫瘍)を有する患者の治療及び管理を困難にする。BBBの混乱を伴う追加の状態には、脳卒中、糖尿病、発作、高血圧性脳症、後天性免疫不全症候群、外傷性脳損傷、多発性硬化症、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、パーキンソン病(PD)、及びアルツハイマー病が含まれる。この能力は、例えば、星状細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、神経膠腫、上皮細胞腫、生殖細

胞腫（松果体腫）、多形性膠芽腫、乏突起神経膠腫、神経鞘腫、網膜芽腫、及び先天性腫瘍、または脊髄癌、例えば、神経繊維腫、髄膜腫、神経膠腫、及び肉腫を含む脳腫瘍を治療するために特に有用である。これは、ポンベ病及び／またはグリコーゲン貯蔵疾患の治療においてさらに有用である。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、例えば、血液脳関門を横断して治療剤または細胞毒性剤を送達するために使用することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、例えば、筋肉内に治療剤または細胞毒性剤を送達するために使用することができる。

【0335】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、本明細書に提供される組成物を投与することを含む、当該方法が、提供される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、コリ病またはフォース病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、アルドラーゼA欠損症GSD12、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン脱分岐酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC/SLC37A4）欠損症（GSD1、フォン・ギアケ病）、ハース病（GSD6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）または筋ホスホグリセレートムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症（GSD10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD11）、ファンコニービッケル症候群（GSD11）、グルコーストランスポーター（GLUT2）欠損症、アルドラーゼA欠損症（GSD12）、β-エンノラーゼ（ENO3）欠損症（GSD13）、及びグリコゲンニン-1（GYG1）欠損症（GSD15）からなる群から選択される。

【0336】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物は、筋ジストロフィー、DMDなどの筋肉疾患を治療するために使用することができる。

【0337】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物は、単独で、または他の治療薬と組み合わせて、すなわち、同時に、または連続的に投与され得る。いくつかの実施形態では、他のまたは追加の治療薬は、他の抗腫瘍剤または治療薬である。腫瘍の異なる腫瘍タイプ及び病期は、がんの治療に有用な様々な補助化合物の使用を必要とし得る。例えば、本明細書に提供される組成物は、とりわけ、タキソール、チロシンキナーゼ阻害剤、ロイコボリン、フルオロウラシル、イリノテカン、ホスファターゼ阻害剤、MEK阻害剤などの様々な化学療法剤と組み合わせて使用され得る。本組成物はまた、とりわけ、抗PD-1または抗CTLA-4などの腫瘍に対する免疫応答を調節する薬物と組み合わせても使用され得る。追加の治療は、免疫系を調節する薬剤、例えばPD-1またはPD-L1を標的とする抗体であり得る。

【0338】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物は、酵素補充療法（ERT）と組み合わせて投与され得る。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するように設計されたERTである。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、ポンベ病（GSD2、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）欠損症）、コリ病またはフォース病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（

GSD12、アルドラーゼA (ALDOA) 欠損症)、II型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ (GYS2) 欠損症 (GSD0)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC37A4) 欠損症 (GSD1、フォン・ギアケ病)、ハース病 (GSD6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGL) または筋ホスホグリセレートムターゼ (PGAM2) 欠損症)、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1) 欠損症 (GSD9)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM2) 欠損症 (GSD10)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA) 欠損症 (GSD11)、ファンコニービッケル症候群 (GSD11)、グルコーストランスポーター (GLUT2) 欠損症、アルドラーゼA欠損症 (GSD12)、 β -エンノラーゼ (ENO3) 欠損症 (GSD13)、及びグリコゲンニン-1 (GYG1) 欠損症 (GSD15) からなる群から選択される。

10

【0339】

したがって、いくつかの実施形態では、ERTは、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA)、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL)、グリコーゲン分岐酵素 (BGE1)、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM)、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM)、アルドラーゼA (ALDOA)、マリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ (GYS2)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC37A4)、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM2)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA)、グルコース輸送体 (GLUT2)、 β -エンノラーゼ (ENO3)、グリコゲンニン-1 (GYG1)、またはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上の酵素または遺伝子置換産物の投与を含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲン分岐酵素 (BGE1) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、アルドラーゼA (ALDOA) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、マリンを投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、ラフォリンを投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲンシンターゼ (GYS2) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC37A4) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM2) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコーストランスポーター (GLUT2) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、 β -エンノラーゼ (ENO3) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコゲンニン-1 (GYG1) を投与することを含む。

20

30

40

【0340】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する組成物及びERTの使用は、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド (例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど) などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成

50

物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

【0341】

いくつかの実施形態では、ポンペ病の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物ならびにグルコシダーゼアルファ酸（G A A）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグルコシダーゼアルファ酸（G A A）を含むE R Tの使用は、ポンペ病を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるF N 3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

10

【0342】

いくつかの実施形態では、コリ病またはフォブス病（G S D 3）の治療を必要とする対象におけるコリ病またはフォブス病（G S D 3）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びグリコーゲン脱分岐酵素（A G L）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグリコーゲン脱分岐酵素（A G L）を含むE R Tの使用は、コリ病またはフォブス病（G S D 3）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるF N 3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

20

【0343】

いくつかの実施形態では、アンデルセン病（G S D 4）の治療を必要とする対象におけるアンデルセン病（G S D 4）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びグリコーゲン分岐酵素（G B E 1）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグリコーゲン分岐酵素（G B E 1）を含むE R Tの使用は、アンデルセン病（G S D 4）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるF N 3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

30

40

【0344】

いくつかの実施形態では、マッカードル病（G S D 5）の治療を必要とする対象におけるマッカードル病（G S D 5）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及び筋グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及び筋グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）を含むE R Tの使用は、マッカードル病（G S D 5）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これら

50

に限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

【0345】

いくつかの実施形態では、タリイ病（GSD7）の治療を必要とする対象におけるタリイ病（GSD7）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及び筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及び筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）を含むERTの使用は、タリイ病（GSD7）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

10

【0346】

いくつかの実施形態では、アルドラーゼA欠損症（GSD12）の治療を必要とする対象におけるアルドラーゼA欠損症（GSD12）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びアルドラーゼA（ALDOA）を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びアルドラーゼA（ALDOA）を含むERTの使用は、アルドラーゼA欠損症（GSD12）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

20

30

【0347】

いくつかの実施形態では、ラフォラ病の治療を必要とする対象におけるラフォラ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物、及びマリリン、ラフォリン、またはその両方を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びマリリン、ラフォリン、またはその両方を含むERTの使用は、ラフォラ病を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

40

【0348】

いくつかの実施形態では、成人ポリグルコサン小体病の治療を必要とする対象における成人ポリグルコサン小体病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びグリコーゲン分岐酵素（BGE1）を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグリコーゲン分岐酵素（BGE1）を含むERTの使用は、成人ポリグルコサン小体病を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、FN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態

50

では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

【0349】

「治療する」または「治療」は、治療的治療及び予防措置を指し、その目的は、がんの発症または拡散などの望ましくない生理学的変化または障害を予防または減速（軽減）することである。いくつかの実施形態では、有益または所望の臨床結果としては、検出可能であろうとまたは検出不可能であろうと、症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の安定した（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延または鈍化、疾患状態の改善または緩和、ならびに及び寛解（部分的であろうとまたは全体的であろうと）が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けていなかった場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延長することも意味し得る。治療を必要とする者としては、病態もしくは障害を既に有する者、及び病態もしくは障害を有する傾向にある者、または病態もしくは障害を予防する必要がある者が挙げられる。

10

【0350】

「治療有効量」とは、必要な投与量で必要な期間にわたって所望の治療結果を達成するために有効な量を指す。本明細書に提供される組成物の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重などの要因によって異なり得る。有効量の例示的な指標は、患者の健康状態の改善、腫瘍のサイズの減少もしくは縮小、腫瘍の成長の停止もしくは減速、及び／または体内の他の場所へのがん細胞の転移の不在である。

20

【0351】

投与／薬学的組成物

【0352】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の薬学的組成物及び薬学的に許容される担体が、提供される。治療的使用のために、本組成物は、薬学的に許容される担体中の活性成分として有効量のドメインまたは分子を含有する薬学的組成物として調製され得る。「担体」は、活性化合物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのようなビヒクルは、ピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油などの、石油、動物、植物、または合成物起源のものを含む、水及び油などの液体であり得る。例えば、0.4%生理食塩水及び0.3%グリシンを使用することができる。これらの溶液は、滅菌され、一般には粒子状物質を含まない。これらは、従来の周知の滅菌技術（例えば、濾過）によって滅菌され得る。組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整剤及び緩衝剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤及び着色剤などを含有し得る。このような医薬製剤中の本明細書に開示される分子の濃度は、大幅に異なってもよく、すなわち、約0.5重量%未満、通常は少なくとも約1重量%から最大15重量%または20重量%までであってもよく、選択される特定の投与方法に従って、必要とされる用量、流体の体積、粘度などに主に基づいて選択される。他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む好適なビヒクル及び製剤は、例えば、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D. B. ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092に記載され、特にpp. 958~989を参照されたい。

30

40

【0353】

本明細書に開示される組成物の治療的使用のための投与方法は、当該技術分野において周知であるように、錠剤、カプセル、溶液、粉末、ゲル、粒子中の製剤を使用して、非経口投与、例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内または皮下、肺、経粘膜（経口、鼻内、膈内、直腸）などの、薬剤を宿主に送達する任意の好適な経路であり得、注射器、移植デバイス、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ、または当業者によって理解され

50

る他の手段に含まれる。部位特異的な投与は、例えば、関節内、気管支内、腹腔内（*intrabdominal*）、嚢内、軟骨内、腔内（*intracavitary*）、腔内（*intracellular*）、小脳内、側脳室内、結腸内、子宮頸部内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内（*intraperitoneal*）、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、関節滑液嚢内、胸郭内、子宮内、膀胱内、病巣内、膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内、または経皮送達によって達成され得る。

【0354】

薬学的組成物は、本明細書に記載される薬学的組成物を含む容器を含むキットとして提供することができる。薬学的組成物は、例えば、単回投与もしくは複数回投与のための注射可能な溶液の形態で、または注射の前に再構成される滅菌粉末として提供され得る。代替的に、そのようなキットは、薬学的組成物の投与のための乾燥粉末分散器、液体エアロゾル発生器、またはネブライザーを含むことができる。そのようなキットは、薬学的組成物の適応症及び使用に関する書面による情報をさらに含むことができる。

【0355】

さらに、以下の実施形態も、提供される。

【0356】

1. グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む *siRNA* 分子（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された1つ以上の FN3 ドメインを含む組成物と、

酵素補充療法（ERT）と、の投与を含む、前記方法。

【0357】

2. 前記グリコーゲン貯蔵疾患が、ポンベ病（GSD 2、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）欠損症）、コリ病またはフォーブス病（GSD 3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、アンデルセン病（GSD 4、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）欠損症）、マッカードル病（GSD 5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、タルイ病（GSD 7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、アルドラーゼ A 欠損症（GSD 12、アルドラーゼ A（ALDOA）欠損症）、II 型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される、実施形態 1 に記載の方法。

【0358】

3. 前記 ERT が、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）、アルドラーゼ A（ALDOA）、マリニン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC / SLC37A4）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）、グルコース輸送体（GLUT2）、 β -エンノラーゼ（ENO3）、及びグリコゲンニン-1（GYG1）からなる群から選択される1つ以上の酵素を含む、実施形態 1 または 2 に記載の方法。

【0359】

4. *siRNA* に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、前記 ERT の投与前に、前記対象に投与される、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0360】

5. *siRNA* に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、前記 ERT の投与中に、前記対象に投与される、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0361】

6. *siRNA* に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、前記 ERT の投与後

に、前記対象に投与される、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0362】

7. ポンペ病の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法であって、
本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グルコシダーゼアルファ酸（G A A）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0363】

8. コリ病（フォーブス病としても知られている）の治療を必要とする対象におけるコリ病を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲン脱分岐酵素（A G L）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0364】

9. アンデルセン病（G S D 4）の治療を必要とする対象におけるアンデルセン病（G S D 4）を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲン分岐酵素（G B E 1）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0365】

10. マッカードル病（G S D 5）の治療を必要とする対象におけるマッカードル病（G S D 5）を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0366】

11. タルイ病（G S D 7）の治療を必要とする対象におけるタルイ病（G S D 7）を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

筋ホスホフルクトキナーゼ（P F K M）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0367】

12. アルドラーゼ A 欠損症（G S D 12）の治療を必要とする対象におけるアルドラーゼ A 欠損症（G S D 12）を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

アルドラーゼ A（A L D O A）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0368】

13. ラフォラ病の治療を必要とする対象におけるラフォラ病を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

マリン、ラフォリン、またはその両方を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0369】

10

20

30

40

50

14. 成人ポリグルコサン小体病の治療を必要とする対象における成人ポリグルコサン小体病を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲン分岐酵素（B G E 1）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0370】

15. 少なくとも1つの追加の E R T をさらに含む、実施形態7～14のいずれか1つに記載の方法。

【0371】

16. s i R N A に連結された F N 3 ドメインを含む前記組成物が、前記 E R T の投与前に、前記対象に投与される、実施形態7～15のいずれか1つに記載の方法。

【0372】

17. s i R N A に連結された F N 3 ドメインを含む前記組成物が、前記 E R T の投与中に、前記対象に投与される、実施形態7～15のいずれか1つに記載の方法。

【0373】

18. s i R N A に連結された F N 3 ドメインを含む前記組成物が、前記 E R T の投与後に、前記対象に投与される、実施形態7～15のいずれか1つに記載の方法。

【0374】

19. 前記1つ以上の F N 3 ドメインが、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインを含む、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

【0375】

20. 前記 s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）分子が、G Y S 1 の発現を低減する s i R N A である、実施形態1～19のいずれか1つに記載の方法。

【0376】

21. 前記 s i R N A が、いかなる修飾核酸塩基も含有しない、実施形態1～20のいずれか1つに記載の方法。

【0377】

22. 前記 s i R N A が、前記 s i R N A の前記センス鎖または前記アンチセンス鎖に共有結合したリンカーをさらに含む、実施形態1～21のいずれか1つに記載の方法。

【0378】

23. 前記リンカーが、前記センス鎖または前記アンチセンス鎖の前記5'末端または前記3'末端に結合している、実施形態22に記載の方法。

【0379】

24. 前記 s i R N A が、前記センス鎖または前記アンチセンス鎖上のビニルホスホネート修飾をさらに含む、実施形態1～23のいずれか1つに記載の方法。

【0380】

25. 前記ビニルホスホネート修飾が、前記センス鎖または前記アンチセンス鎖の前記5'末端または前記3'末端に結合している、実施形態24に記載の方法。

【0381】

26. 前記センス鎖が、配列番号10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、600、602、604、606、608、610、612、614、616、618、620、622、624、626、628、630、632、634、636、638、640、642、644、646、648、650、652、654、656、658、660、662、664、666、668、670、672、674、676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、696、698、700、702、704、706、801～860、921

10

20

30

40

50

～ 980 の、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に記載されるような、配列を含む、実施形態 1 ～ 25 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0382】

27. 前記アンチセンス鎖が、配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、690、691、693、695、697、699、701、703、705、707、861～920、981～1042 の、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に記載されるような、配列を含む、実施形態 1 ～ 26 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0383】

28. 前記 siRNA 分子が、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH、II、JJ、KK、LL、MM、NN、OO、PP、QQ、RR、SS、TT、UU、VV、WW、XX、YY、ZZ、AAA、BBB、CCC、DDD、EEE、FFF、GGG、HHH、III、JJJ、KKK、LLL、MMM、NNN、OOO、PPP、QQQ、RRR、SSS、TTT、UUU、VVV、WWW、XXX、YYY、ZZZ、AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEE、FFFF、GGGG、HHHH、IIII、JJJJ、KKKK、LLLL、MMMM、NNNN、OOOO、PPPP の、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に記載されるような、前記 siRNA 対を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0384】

29. 前記センス鎖が、19ヌクレオチドを含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0385】

30. 前記アンチセンス鎖が、21ヌクレオチドを含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

30

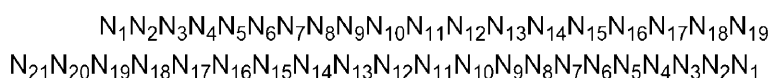
【0386】

31. 前記組成物が、表 4 に提供される、前記 siRNA 対を、表 5 に記載されるような、リンカー及び／またはビニルホスホネート修飾とともに含む、実施形態 1 ～ 30 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0387】

32. 前記 siRNA 分子が、式 I に例示される式を有し、

【化 18】



センス鎖 (SS)

アンチセンス鎖 (AS)、

40

ここで、N で表される各ヌクレオチドは、独立して、A、U、C、もしくは G、または本明細書で提供されるものなどの修飾ヌクレオチド塩基である、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0388】

33. 前記センス鎖が、N₁ 及び N₂ にホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を有する 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₂、及び N₁₇ に 2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N₄、N₅、N₆、N₁₀、N₁₁、N₁₃、N₁₄、

50

N₁₅、N₁₆、N₁₈、及びN₁₉に2'オームethyl修飾ヌクレオチドを含む、実施形態32に記載の方法。

【0389】

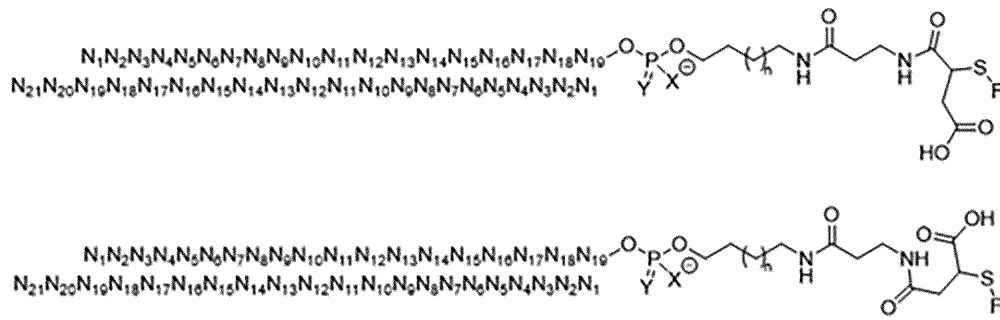
34. 前記アンチセンス鎖が、N₁に結合したビニルホスホネート部分、N₂にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'フルオロ修飾ヌクレオチド、N₃、N₄、N₅、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₀、N₁₁、N₁₂、N₁₃、N₁₅、N₁₆、N₁₇、N₁₈、及びN₁₉に2'オームethyl修飾ヌクレオチド、N₄に2'フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₂₀及びN₂₁にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'オームethyl修飾ヌクレオチドを含む、実施形態32に記載の方法。

【0390】

35. 前記アンチセンス鎖のN₁に結合したビニルホスホネート部分である、実施形態32に記載の方法。

【0391】

36. 前記siRNA分子が、式Iに例示される式を有し、
【化19】



式中、F₁が、少なくとも1つのFN3ドメインを含み、リンカーL₁にコンジュゲートされているポリペプチドであり、L₁が、X_Sに連結され、X_Sが、二本鎖siRNA分子の5'から3'オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、X_Sが、二本鎖siRNA分子の3'から5'オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、X_S及びX_ASが、二本鎖siRNA分子を形成する、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0392】

37. F₁が、(X₁)_n-(X₂)_q-(X₃)_yの式を有するポリペプチドを含み、式中、X₁が、第1のFN3ドメインであり、X₂が、第2のFN3ドメインであり、X₃が、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、n、q、及びyが、各々独立して、0または1であるが、但し、n、q、及びyのうちの少なくとも1つが、1であるものとする、実施形態36に記載の方法。

【0393】

38. 前記FN3ドメインが、前記FN3ドメイン上のシステインを介して前記siRNA分子にコンジュゲートされる、先述実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0394】

39. 前記システインが、本明細書に記載される位置にある、実施形態38に記載の方法。

【0395】

40. 前記FN3ドメイン内の前記システインが、配列番号713に基づくアミノ酸配列を含む前記FN3ドメインの残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、または93に対応する位置にある、実施形態38または39に記載の方法。

【0396】

41. 前記システインが、残基6、53、または88に対応する位置に位置する、実施

10

20

30

40

50

形態 40 に記載の方法。

【0397】

42. 前記 FN3 ドメインが、配列番号 509、708、及び 710 からなる群から選択される配列を有する、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0398】

43. 1 つ以上の FN3 ドメインが、ペプチドリンカーによって連結された少なくとも 2 つの FN3 ドメインを含む、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0399】

44. 前記組成物が、第 1 の FN3 ドメイン及び第 2 の FN3 ドメインを含む、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0400】

45. 前記第 1 の FN3 ドメイン及び前記第 2 の FN3 ドメインが、異なるタンパク質に結合する、実施形態 44 に記載の方法。

【0401】

46. 前記第 1 の FN3 ドメイン及び前記第 2 の FN3 ドメインが、同じタンパク質に結合する、実施形態 44 に記載の組成物。

【0402】

47. 前記第 1 の FN3 ドメインが、CD71 に結合する、実施形態 44～46 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0403】

48. 前記第 2 の FN3 ドメインが、CD71 に結合しない異なる標的に結合する、実施形態 44～46 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0404】

49. 前記 FN3 ドメインが、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 の配列と少なくとも 87% 同一であるか、またはそれと同一である配列を含む、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0405】

50. 第 3 の FN3 ドメインをさらに含む、実施形態 43～49 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0406】

51. 前記第 3 の FN3 ドメインが、CD71 またはアルブミンに結合する FN3 ドメインである、実施形態 50 に記載の方法。

【0407】

52. CD71 に結合する前記 FN3 ドメインが、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 を含むが、これらに限定されない、本明細書に提供されるアミノ酸配列、またはそれらの結合断片を有する、実施形態 51 に記載の方法。

【0408】

53. アルブミンに結合する前記 FN3 が、配列番号 101～119 を含むが、これらに限定されない、本明細書に提供されるアミノ酸配列、またはそれらの結合断片を有する、実施形態 51 に記載の方法。

【0409】

54. siRNA に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ 、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - (X_3)_y$ 、 $(X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - (X_3)_y - C$ 、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - L - (X_3)_y$ 、または $(X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - L - (X_3)_y - C$ から選択される式を有し、

式中、

X_1 が、第 1 の FN3 ドメインであり、

10

20

30

40

50

X_2 が、第 2 の FN3 ドメインであり、
 X_3 が、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり、
 L が、リンカーであり、
 X_4 が、核酸分子（例えば、前記 siRNA の 1 つまたは複数の鎖）であり、
 C が、PEG などのポリマー、アルブミン結合タンパク質であり、
 n 、 q 、及び y が、各々独立して、0 または 1 である、実施形態 1 に記載の方法。

【0410】

55. X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同じまたは異なる標的タンパク質に結合する、実施形態 54 に記載の方法。

【0411】

56. y が、0 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0412】

57. n が、1 であり、 q が、0 であり、 y が、0 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0413】

58. n が、1 であり、 q が、1 であり、 y が、0 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0414】

59. n が、1 であり、 q が、1 であり、 y が、1 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0415】

60. 前記第 3 の FN3 ドメインが、 X_3 を持たない分子と比較して、全体として分子の半減期を増大させる、実施形態 54 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0416】

61. 前記第 3 の FN3 ドメインが、アルブミンに結合する FN3 ドメインである、実施形態 54 に記載の方法。

【0417】

62. 前記リンカーが、本明細書に提供されるリンカーである、実施形態 54 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0418】

63. 前記 FN3 ドメインが、ペプチドリンカーによって接続される、実施形態 54 ~ 62 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0419】

64. 前記ペプチドリンカーが、 $(GS)_2$ 、(配列番号 720)、 $(GGGS)_2$ (配列番号 721)、 $(GGGGS)_5$ (配列番号 722)、 $(AP)_{2-20}$ 、 $(AP)_2$ (配列番号 723)、 $(AP)_5$ (配列番号 724)、 $(AP)_{10}$ (配列番号 725)、 $(AP)_{20}$ (配列番号 726)、及び $A(EAAAK)_5AAA$ (配列番号 727)、または $(EAAAK)_{1-5}$ (配列番号 728)、またはこれらの任意の組み合わせである、実施形態 63 に記載の方法。

【0420】

65. 前記第 1、第 2、または第 3 の FN3 ドメインが、本明細書に提供されるアミノ酸配列を有する、実施形態 54 ~ 64 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0421】

66. X_4 が、前記 siRNA 分子である、実施形態 54 ~ 65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0422】

67. 前記 siRNA 分子が、本明細書で提供される siRNA 分子である、実施形態 66 に記載の方法。

【0423】

68. 前記 siRNA 分子が、GYS1 の発現を低減させる siRNA である、実施形

10

20

30

40

50

態 6 6 に記載の方法。

【 0 4 2 4 】

6 9 . 前記 s i R N A 分子が、 G Y S 1 の発現を特異的に低減する s i R N A である、実施形態 6 6 に記載の方法。

【 0 4 2 5 】

7 0 . 前記 s i R N A 分子が、 G Y S 1 の発現を低減させ、他の R N A の発現を有意に低減させない s i R N A である、実施形態 6 6 に記載の方法。

【 0 4 2 6 】

7 1 . 前記 s i R N A 分子が、本明細書に記載されるアッセイにおいて、本明細書に記載される 2 0 0 n m 以下の濃度で、 G Y S 1 の発現を低減させ、他の R N A の発現を 5 0 % を超えて低減させない s i R N A である、実施形態 6 6 に記載の方法。

【 0 4 2 7 】

7 2 . 前記 s i R N A 分子が、 G Y S 1 の発現を低減させ、 G Y S 1 タンパク質の濃度を低減させる s i R N A である、実施形態 6 6 に記載の方法。

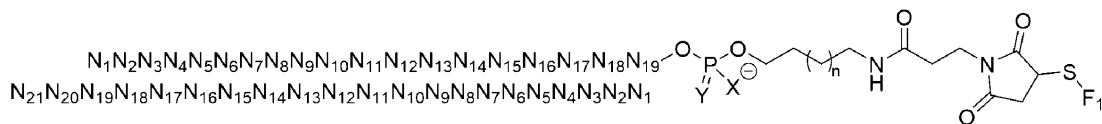
【 0 4 2 8 】

7 3 . 前記 s i R N A 分子が、 G Y S 1 の発現を低減させ、筋肉細胞におけるグリコーゲンの濃度を低減させる s i R N A である、実施形態 6 6 に記載の方法。

【 0 4 2 9 】

7 4 . 前記 s i R N A が、以下の式に提供される s i R N A 対である、実施形態 5 4 ~ 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【化 2 0 】



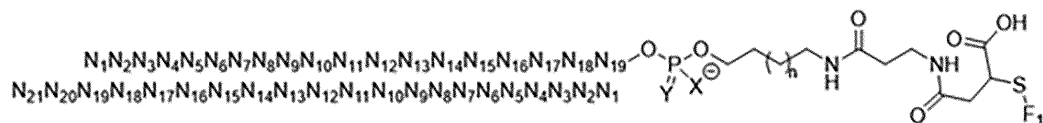
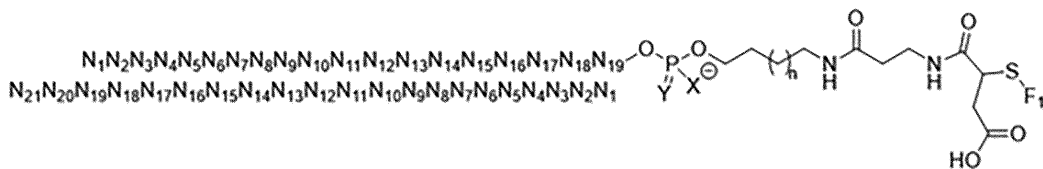
【 0 4 3 0 】

7 5 . 前記アンチセンス鎖の N 1 が、ビニルホスホネート修飾を含む、実施形態 7 4 に記載の方法。

【 0 4 3 1 】

7 6 . マレイミドが、以下の化合物の混合物、または各化合物の一方もしくは両方、または前記化合物の一方のみを形成するために加水分解される、実施形態 7 4 に記載の方法。

【化 2 1 】



【 0 4 3 2 】

7 7 . 前記 s i R N A が、本明細書に提供される s i R N A 対、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に提供される群から選択される s i R N A 対である、実施形態 5 4 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 4 3 3 】

10

20

30

40

50

78. 前記 *siRNA* に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、 $A_1 - B_1$ の式を有し、式中、 A_1 が、 $(C)_n - (L_1)_t - X_S$ の式を有し、 B_1 が、 $X_{AS} - (L_2)_q - (F_1)_y$ の式を有し、

C が、PEG などのポリマー、アルブミン結合タンパク質であり、

L_1 及び L_2 が、各々独立して、リンカーであり、

X_S が、二本鎖 *siRNA* 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、

X_{AS} が、二本鎖 *siRNA* 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、

F_1 が、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、

n 、 t 、 q 、及び y が、各々独立して、0 または 1 であり、

X_S 及び X_{AS} が、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、前記組成物／複合体を形成する、実施形態 1 に記載の方法。

10

【0434】

79. 前記 *siRNA* に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、 $A_1 - B_1$ の式を有し、式中、 A_1 が、 $(F_1)_n - (L_1)_t - X_S$ の式を有し、 B_1 が、 $X_{AS} - (L_2)_q - (C)_y$ の式を有し、

C が、PEG などのポリマー、アルブミン結合タンパク質であり、

L_1 及び L_2 が、各々独立して、リンカーであり、

X_S が、二本鎖 *siRNA* 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、

X_{AS} が、二本鎖 *siRNA* 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、

20

F_1 が、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、

n 、 t 、 q 、及び y が、各々独立して、0 または 1 であり、

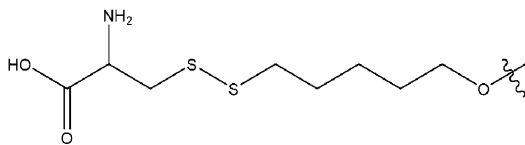
X_S 及び X_{AS} が、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、前記組成物／複合体を形成する、実施形態 1 に記載の方法。

【0435】

80. L_1 が、以下の式を有する、実施形態 78 または 79 に記載の方法。

【化 2 2】

30

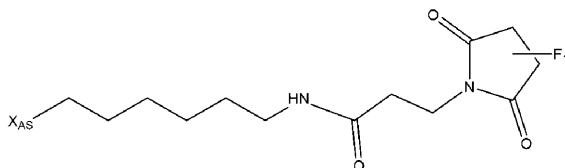


【0436】

81. L_2 が、以下の式を有する、実施形態 78 または 79 に記載の方法。

【化 2 3】

40

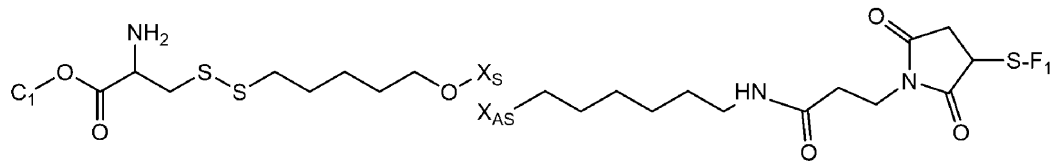


【0437】

82. $A_1 - B_1$ が、以下の式を有する、実施形態 78 または 79 に記載の方法。

50

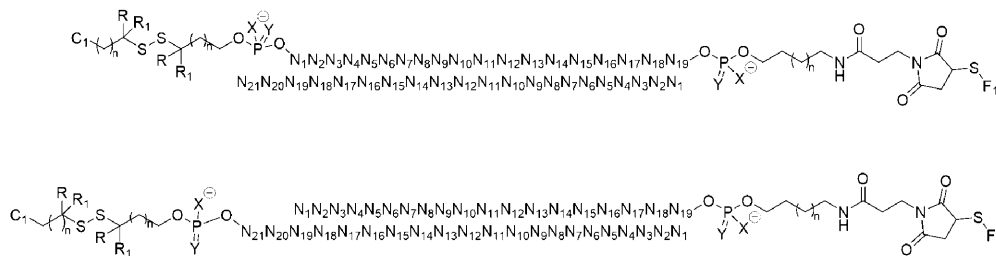
【化 2 4】



【 0 4 3 8】

83. A1-B1が、以下の式を有する、実施形態78または79に記載の方法。

【化 2 5】



【0445】

90. X_{AS} が、配列番号11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、690、691、693、695、697、699、701、703、705、707、861～920、981～1042の、または表3A、表3B、もしくは表4に記載されるような、配列を含む、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

10

【0446】

91. X_S 及び X_{AS} が、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH、II、JJ、KK、LL、MM、NN、OO、PP、QQ、RR、SS、TT、UU、VV、WW、XX、YY、ZZ、AAA、BBB、CCC、DDD、EEE、FFF、GGG、HHH、III、JJJ、KKK、LLL、MMM、NNN、OOO、PPP、QQQ、RRR、SSS、TTT、UUU、VVV、WWW、XXX、YYY、ZZZ、AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEE、FFFF、GGG、HHHH、IIII、JJJJ、KKKK、LLLL、MMMM、NNNN、OOOO、PPPPからなる群から選択される、または表3A、表3B、もしくは表4に記載されるような、siRNA対を形成する、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

20

【0447】

92. F_1 が、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710の配列と少なくとも87%同一であるか、またはそれと同一である配列を含む、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

【0448】

93. F_1 が、アルブミンに結合するポリペプチドを含む、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

30

【実施例】

【0449】

以下の実施例は、本明細書に開示される実施形態を説明する。これらの実施例は、例示のためにのみ提供され、実施形態は、これらの実施例に限定されると決して解釈されるべきではなく、本明細書に提供される教示の結果として明らかになる任意かつ全ての変更を包含すると解釈されるべきである。当業者であれば、本質的に同様な結果をもたらすために変更または修正ができるであろう様々な重要性の低いパラメータがあることを容易に認識することになる。

【0450】

実施例1：GYS1 siRNA配列ID及び特徴付け

40

【0451】

siRNAのコンピュータによるスクリーニング：コンピュータによるsiRNAのスクリーニングを実施して、ヒトGYS1 mRNAに相補的なヒトsiRNAを識別した（図1を参照のこと）。全ての可能な19量体アンチセンス配列を、ヒトGYS1 siRNA配列（NM_001161587）から生成し、各19量体を、他のヒトGYS1アイソフォーム、ならびに潜在的な交差反応性マウス、ラット、及びカニクイザルに対する活性について評価した。ヒトsiRNA標的部位を、dbSNP（b155 v2）を使用して、一般的なヒトSNP（MAF>1%）について評価した。共通の対立遺伝子を標的とする配列を、破棄した。次に、siRNAオフターゲット遺伝子を、全ての関連す

50

るモデル生物におけるセンス鎖及びアンチセンス鎖について評価した。この選択により、200の潜在的な候補が得られ、これらはさらに、インビトロでのノックダウンスクリーニングによって定義された。主な siRNA 候補は、表 3 A 及び 3 B にある。システイン操作されたセンチリンへのコンジュゲーションのための GYS1 siRNA リンカーを、表 5 に記載されるように調製した。

【0452】

HEK293T細胞を、未処理の対照細胞とともに24時間、10nM ABXO-HHH (siRNA 対 HHH) でリポフェクトした (処理群当たり6回の複製)。mRNA は、細胞から選択された poly A+ であり、Illumina HiSeq プラットフォーム上で非鎖 2 × 150 bp 対合末端配列決定に供して、平均的深さを3000万超の読み取りにした。

10

【0453】

図2 ABXO-HHH 対未処理細胞の DESeq2 の結果を示す火山プロット。X 軸は、全ての遺伝子についての遺伝子発現における $\log_2$ の倍率変化 (ABXO-HHH を未処理で割ったもの) を表す。Y 軸は、調整された P 値を変換した負の $\log_{10}$ を示す。色付きのドットは、BLAST を介して検出された ABXO-HHH に対して有意な相補性を有する遺伝子を表す。

【0454】

RNA-seq ライブラリ品質を、FastQC を使用して検査した。ライブラリを、Kallisto を使用して GRCh38 ヒトトランスクリプトームに擬似整列させた。トランスクリプトームに整列した平均90%超の読み取りを有する例外的な読み取りアラインメントを達成した。次いで、ABXO-HHH で処理した細胞をリポフェクタミンのみで処理した細胞と比較した DESeq2 を使用して、差別的発現を評価した。

20

【0455】

DESeq の結果は、GYS1 標的の実質的かつ有意なノックダウンを示した。ABXO-HHH で処理した試料中の GYS1 発現は、未処理試料の31%まで下方調節された (図2)。GYS1 は、ABXO-HHH 処理下で差次的に発現した (DE) 全ての遺伝子について、最も下方調節されたタンパク質コード遺伝子であった。GYS1 はまた、圧倒的に、最も低い p 値を有する DE 遺伝子でもあり、調節された p 値は、 $1e \sim 87.7$ であり、次の最も低い調節された p 値より30桁以上小さかった。

30

【0456】

BLAST を使用して、潜在的なオフターゲット効果のコンピュータによる予測を行った。ABXO-HHH センス及びアンチセンス配列を、GRCh38 トランスクリプトームから構築された内部 BLAST データベースに対して BLAST アラインメントされた。BLAST によって識別された全ての潜在的なオフターゲット効果のうち、RAP2C のみが、ABXO-HHH の存在下で有意に下方調節され (図2)、 $\log_2$ の f 倍率変化が -1 未満の DE 閾値を超えることができなかった。

【0457】

これらのデータを合わせると、ABXO-HHH が、ヒトトランスクリプトームにおいて比較的高い濃度であっても、非常に特異的な siRNA であることが示される。

40

【0458】

オリゴヌクレオチド合成、脱保護、及びアニーリングプロトコル：

【0459】

オリゴヌクレオチドの合成は、アセトニトリル中の0.1M濃度のホスホラミダイトを用いた500 Å 制御された細孔ガラス (CPG) 上で標準的なホスホラミダイト化学を使用して、MerMade 12 合成器で行った。THF/ピリジン/水 (0.02 M) 中の E2 は、活性化剤として0.6 M ETT (5-エチルチオテトラゾール) を有する酸化剤であった。ピリジン中の0.09 M の N, N-ジメチル-N'-(3-チオキソ-3H-1, 2, 4-ジチアゾール-5-イル) メタニミドアミド (DDTT) を、ホスホロチオエート (PS) 結合の導入のための硫化試薬として使用した。ジクロロメタン中の3

50

% (v / v) ジクロロ酢酸を、デブロッキング溶液として使用した。マレイミドを含まない全ての一本鎖を、緩衝液 A として pH 8.5 で 20 mM のリン酸塩、及び緩衝液 B として pH 8.5 で 20 mM のリン酸塩、及び 1 M の臭化ナトリウムを用いたイオン交換クロマトグラフィー (IEX) によって精製した。精製後、オリゴヌクレオチド画分をプールし、濃縮し、脱塩した。次いで、脱塩された試料を、乾燥するまで凍結乾燥させて、-20 °C で保管した。

【0460】

アンチセンス鎖の脱保護

【0461】

合成後、支持体を、アセトニトリル (ACN) で洗浄し、真空下でカラム内で乾燥させ、しっかりと密封し、アンモニア水溶液中の 5 % ジエチルアミンの溶液で 65 °C で 5 時間振盪させ得る 1 mL のスクリュキャップに移した。粗オリゴの切断及び脱保護を、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) によって確認し、その後、IEX-HPLC によって精製した。

【0462】

マレイミド含有オリゴヌクレオチドの合成及び脱保護

【0463】

マレイミド含有オリゴを、3' アミノ修飾 CPG 固体支持体または 5' アミノ修飾剤ホスホラミダイトのいずれかを使用して作製した。支持体を、密封し得る 1 mL のバイアルに移し、50 / 50 (v / v) 40 % のメチルアミン水溶液及びアンモニア水溶液 (AM A) で室温で 2 時間または 65 °C で 10 分間インキュベートして、切断及び脱保護した。一本鎖を、IEX クロマトグラフィーによって精製し、マレイミドを添加する前にアンチセンスと同じ条件で脱塩した。

【0464】

pH 7.1 の 0.05 M リン酸緩衝液中の約 20 mg / mL のアミン修飾センス鎖を作製し、これに、ACN に溶解した 10 当量のマレイミド N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルを添加した。NHS エステル溶液を、オリゴヌクレオチド水溶液に添加し、室温で 3 時間振盪した。イオン交換緩衝液条件下でのマレイミド加水分解を防止するために、今度はマレイミド共役オリゴヌクレオチドを、逆相クロマトグラフィー (緩衝液 B 中の 80 % アセトニトリルを含む 20 mM 酢酸トリエチルアンモニウム) によって精製した。

【0465】

精製後、オリゴヌクレオチド画分を、プールし、濃縮し、脱塩した。

【0466】

マレイミドの加水分解を回避するために、脱塩された各一本鎖の等モル量を使用して、凍結乾燥を介してセンス鎖及びアンチセンス鎖の二本鎖化を行った。

【0467】

s i RNA へのセンチリンコンジュゲーション、コンジュゲート精製、及び分析：

【0468】

センチリンを、マレイミドを介してシステインに特異的な化学によって s i RNA にコンジュゲートした。

【0469】

50 ~ 200 μM で PBS 中にシステインを含有するセンチリンを、10 mM のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) で室温 (30 分) で還元して、遊離チオールを得た。次いで、遊離チオール含有センチリンを、直前に約 1.5 : 1 のセンチリン : s i RNA のモル比で水中でマレイミド含有 s i RNA 二重鎖と混合する。室温または 37 °C で 2 時間インキュベーションした後、N-エチルマレイミド (反応混合物中の 1 mM の最終 NEM 濃度) で反応をクエンチし、コンジュゲートを 2 つのステップで精製した。ステップ I 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (タグ付きタンパク質用) または疎水性相互作用クロマトグラフィー (タグなしタンパク質用) のいずれか；未反

10

20

30

40

50

応のS i R N A リンカーを除去する。ステップI I - C a p t o - D E A E ; 未反応のセンチリンを除去する。コンジュゲートを含有する画分を、プールし、透析を使用した脱塩によってH B S に交換し、必要に応じて濃縮した。

【0470】

センチリン-s i R N A コンジュゲートの分析的特徴付け：

【0471】

センチリン-s i R N A コンジュゲートを、分析技術の組み合わせによって特徴付けた。S D S - P A G E を使用して、遊離タンパク質へのコンジュゲートの量を比較した。S D S - P A G E の場合、4 ~ 20 % の M i n i - P R O T E A N (登録商標) T G X S t a i n - F r e e (商標) タンパク質ゲル (B i o R a d) を、S D S 緩衝液中で1時間、100Vで実行した。ゲルをUV光下で可視化した。分析用S E C (S u p e r d e x - 7 5 5 / 1 5 0 G L カラム-G E) を使用して、センチリン-s i R N A コンジュゲートの純度及び凝集状態を解析した。液体クロマトグラフィー/質量分析 (L C M S) を使用して、コンジュゲートの同一性及び純度を確認した。試料を、W a t e r s A c u i t y U P L C / X e v o G 2 - X S T O F 質量分析計システムを使用して解析した。装置を、負の電気スプレーイオン化モードで操作し、m / z 200 から3000までスキャンした。コンジュゲートは、アンチセンス及びセンス-センチリンの2つの断片として見られた。

【0472】

s i R N A へのセンチリンコンジュゲーション、コンジュゲート精製、及び分析：センチリンを、マレイミドを介してシステインに特異的な化学によってs i R N A にコンジュゲートした。50 ~ 200 μ M で P B S 中にシステインを含有するセンチリンを、10 m M のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) で室温 (30分) で還元して、遊離チオールを得た。次いで、遊離チオール含有センチリンを、直前に約1.5 : 1のセンチリン : s i R N A のモル比で水中でマレイミド含有s i R N A 二重鎖と混合する。室温または37℃で2時間インキュベーションした後、N-エチルマレイミド (反応混合物中の1 m M の最終N E M 濃度) で反応をクエンチし、コンジュゲートを2つのステップで精製した。ステップI 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (タグ付きタンパク質用) または疎水性相互作用クロマトグラフィー (タグなしタンパク質用) のいずれか ; 未反応のS i R N A リンカーを除去する。ステップI I - C a p t o - D E A E ; 未反応のセンチリンを除去する。コンジュゲートを含有する画分を、プールし、透析を使用した脱塩によってH B S に交換し、必要に応じて濃縮した。

【0473】

図6 : タグ付きタンパク質のためのI M A C クロマトグラフィー。I M A C には、C y t i v a からのH i s t r a p H P カラム (1 m l、5 m l) を、使用した。H i s t r a p 緩衝液A (結合緩衝液) は、1型H2O中の50 m M のT r i s p H 7.4、500 m M のN a C l 及び10 m M のイミダゾールであり、H i s t r a p 緩衝液B (溶出緩衝液) : 1型H2O中の50 m M のT r i s p H 7.4、500 m M のN a C l、及び250 m M のイミダゾールであった。反応試料を、試料ループまたは試料ポンプを介してカラムに直接注入した。試料塗布後、カラムを、5 ~ 10 C V の緩衝液Aで洗浄する。溶出は、典型的には、ステップ勾配 (0 ~ 100 %) で開始される。画分コレクター及びピークフラグメンテーションを使用して、UV読み取りが50 m A U 以上である場合に、画分を収集した。

【0474】

図7 : タグなしタンパク質のためのH I C (s i R N A の過剰の除去)。H I C には、C y t i v a からのH i T r a p プチルH P カラム (1 m l、5 m l) を使用した。H I C 緩衝液A (結合緩衝液) は、1型H2O中の2 M の硫酸アンモニウム、25 m M のリン酸ナトリウムp H 7.0であり、一方、H I C 緩衝液B (溶出緩衝液) : 1型H2O中の25 m M のリン酸ナトリウムp H 7.0であった。コンジュゲーション反応試料を、1 : 1の比率で緩衝液Aで希釈する。上記で調製した試料を、試料ループまたは試料ポンプを

介してカラムに注入した。試料塗布後、カラムを、5 C Vの緩衝液Aで洗浄する。溶出は、典型的には、0.0% Bで開始され、次いで、以下の表8のような勾配で開始される。画分コレクター及びピークフラグメンテーションを使用して、UV読み取りが50 mAU以上である場合に、画分を収集した。

【表9】

表8

	種類	%B	長さ (CV)
1	線形	30～90	3.00
2	線形	35.0	10.00
3	線形	100.0	10.00
4	線形	100.0	5.00

10

【0475】

開環－レトロマイケル反応による積荷損失を避けるために、マレイミド環加水分解が行われる。histrap（タグ付きタンパク質）またはHIC（タグなしタンパク質）のいずれかからのプールされた画分を、25 mMのTris pH 8.9 緩衝液中に透析する。この緩衝液では、反応物を、37℃のインキュベーターシェーカーに72時間置く。LC-MSによって反応の完了をモニターした。

20

【0476】

図8：イオン交換クロマトグラフィー（IEX）－タグ付き及びタグなしのタンパク質（過剰な未反応のセンチリンの除去）。IEXクロマトグラフィーには、CytivaからのHiTrap Captop DEAEカラム（1 ml、5 ml）を使用した。Captop DEAE 緩衝液A（結合緩衝液）は、1型H₂O中の25 mMのTris pH 8.8であり、一方、使用されたCaptop DEAE 緩衝液B（溶出緩衝液）は、1型H₂O中の25 mMのTris pH 8.8、1 MのNaClであった。

30

【0477】

開環後の試料を、試料ループまたは試料ポンプを介してカラムに直接注入した。試料塗布後、カラムを、5～10 CVの緩衝液Aで洗浄する。溶出は、典型的には、0.0% Bで開始され、次いで、以下の表9のような勾配で開始される。

【0478】

未反応のタンパク質は、典型的には、第1のピークであり、第2のピークは、典型的には、純粋なコンジュゲートである、フロースルーで溶出される。全ての画分が、収集され、プールされる。プールの濃度は、収率計算のためにナノドロップを使用して、A260を測定することによって決定される。

【表10】

40

表9

1	線形	20	5
2	線形	100	15
3	線形	100	5

【0479】

50

図9：センチリン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの分析SECの例。センチリン-siRNAコンジュゲートを、分析技術の組み合わせによって特徴付けた。分析用SECを使用して、センチリン-siRNAコンジュゲートの純度及び凝集状態を分析した。Waters ACQUITY UPLCタンパク質BEH SECカラム、125 Å、1.7 µm、4.6×150mmとともに、Waters H-class UPLCをルーチンSEC分析のために使用した。典型的には、2~5 µlの試料を、オートサンプラーを使用して注入し、流量は、0.25 mL/分であり、使用された移動相は、1X PBSまたは100 mM、pH 7.2リン酸緩衝液のいずれかであった。

【0480】

図10：コンジュゲートのSDS PAGEゲルの例。SDS-PAGEを使用して、遊離タンパク質へのコンジュゲートの量を比較した。SDS-PAGEゲルを実行するために、Invitrogen Mini Gel tank、PowerEase（商標）Touch 600Wの電源及び115 VACを使用した。Invitrogen-NuPAGE（商標）4~12% Bis-Trisタンパク質ゲル（1.0mm）を、20×NuPAGE（登録商標）MES SDSランニングバッファー及びSeeBlue（商標）予め染色したタンパク質スタンダードとともに使用した。試料は、超純水によって約0.5 mg/mLに正規化された。非還元ゲルの場合、10 µLの正規化された試料を、10 µLの2×Laemmli試料緩衝液と1対1の比率で混合する。ゲルを還元するために、2×Laemmli試料緩衝液を、95対1の比率でβ-メルカプトエタノールと混合し、次いで10 µLの試料と1対1の比率で混合する。得られた試料混合物を、95℃で5分間沸騰させ、次いでサーモサイクラーで冷却した。15 µLの試料及びタンパク質ラダーを適切なウェルに充填し、電圧を200 Vに設定し、ランタイムを約30分に設定した。ゲルランが完了したら、それを、クーマシーブルーまたはSYBRグリーンまたはメチレンブルーによって可視化した。最も左側のレーンは、タンパク質ラダーであり、次にセンチリン自体であり、最後は、センチリン-siRNAコンジュゲートである。

【0481】

候補siRNA配列を、ある範囲の濃度でヒト細胞（H358）にトランスフェクトした。RNAを、トランスフェクションから24時間後に採取し、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を介してGYS1レベルについて分析した。18SリボソームRNAを、RT-PCR内因性対照遺伝子として使用した。ノックダウンのレベルを、未処理細胞と比較した。EC50値を、Graphpad Prismソフトウェアを使用して計算し、Emax値は、観察されたGYS1 mRNAの最大ノックダウンパーセントを表す（表10）。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 0

siRNA	Ref.	EC50(pM)	E _{max} (%)
A	ABXO8	3.841	70
B	ABXO9	10.02	70.2
C	ABXO12	12.62	71.5
D	ABXO110	21.73	87.9
E	ABXO113	23.74	82.1
F	ABXO114	6.716	75.5
G	ABXO115	4.5	75.2
H	ABXO116	0.7542	69.4
I	ABXO117	20.87	93.8
J	ABXO122	8.93	65.6
K	ABXO123	4.049	75.5
L	ABXO124	2.642	70.5
M	ABXO125	0.8761	53.3
N	ABXO128	2.549	76.3
O	ABXO129	0.4961	64.3
P	ABXO139	0.6143	70.6
Q	ABXO142	23.19	80.3
R	ABXO150	58.88	96.1
S	ABXO151	1.502	75.6
T	ABXO152	24.76	91.1
U	ABXO155	5.893	60.2
V	ABXO156	0.6893	57.6
W	ABXO160	0.787	80.1
X	ABXO168	8.662	75.7
Y	ABXO171	38.82	69.2
Z	ABXO191	54.2	75.4
AA	ABXO197	19.8	77.1
BB	ABXO201	7.1	75.6
CC	ABXO203	5.7	74.9
DD	ABXO205	9.8	80.4

他の s i R N A も、上記のように試験されており、それらの E C 5 0 が、表 1 1 に提供される。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 1

siRNA 対	EC50(pM)
EE	1.8
FF	6
GG	5.9
HH	15.1
II	8.2
JJ	25.2
KK	
LL	1.35
MM	3.74
NN	5.66
OO	5.56
PP	6.34
QQ	11.76
RR	2.85
SS	3.35
TT	5.67
UU	0.4
VV	3.72
WW	3.15
XX	2.57
YY	1.64
ZZ	1.56
AAA	ND
BBB	4.87
CCC	2.65
DDD	2.66
EEE	1.21
FFF	1.31
GGG	NA

10

20

30

40

【0 4 8 2】

候補 s i R N A 配列の選択性は、s i R N A を、ある範囲の濃度でヒト細胞（H E K - 2 9 3）にトランスフェクションすることによって評価した。細胞生存率を、C e l l T i t e r G l o を使用して、トランスフェクションから 7 2 時間後に評価した。E m a x 値は、試験した最高 s i R N A 濃度（1 0 n M）での細胞の生存の最大減少パーセントとして報告される（表 1 2）。

50

【表 1 3】

表 1 2

siRNA 対	Ref.	E _{max} 、%(10nM で)
A	ABXO8	5.52
B	ABXO9	-0.3
C	ABXO12	31.67
D	ABXO110	25.68
E	ABXO113	22.83
F	ABXO114	-1.1
G	ABXO115	30.85
H	ABXO116	29.27
I	ABXO117	35.19
J	ABXO122	28.25
K	ABXO123	17.21
L	ABXO124	24.09
M	ABXO125	71.45
N	ABXO128	42.41
O	ABXO129	58.02
P	ABXO139	34.44
Q	ABXO142	8.94
R	ABXO150	16.06
S	ABXO151	60.95
T	ABXO152	42.84
U	ABXO155	54.4
V	ABXO156	34.1
W	ABXO160	-4.59
X	ABXO168	51.66
Y	ABXO171	4.79
Z	ABXO191	46.41
AA	ABXO197	25.01
BB	ABXO201	46.92
CC	ABXO203	15.18
DD	ABXO205	60.13

10

20

30

40

【0483】

実施例 2：CD71 に結合するフィブロネクチン III 型（FN3）ドメインの選択

【0484】

CD71 へのトランスフェリン結合を阻害しない CD71 に結合する FN3 ドメインを識別するためのパニング及び生化学的スクリーニング方法。CD71 に特異的に結合し、CD71 へのトランスフェリン結合を阻害しない FN3 ドメインをスクリーニングするために、ストレプトアビジンでコーティングされた Maxisorp プレート（Nunc カタログ 436110）を、開始ブロック T20（Pierce）で 1 時間ブロッキングし、次いで、ビオチン化 CD71（パニングと同じ抗原を使用して）または陰性対照（無

50

関係な Fc 融合組換えタンパク質及びヒト血清アルブミン) で、トランスフェリンの存在下で、または CD71 トランスフェリン結合部位に結合する FN3 タンパク質を用いて、1 時間コーティングする。トランスフェリンの濃度は、最大 35 μ M である。任意の特定の理論に拘束されることなく、トランスフェリンまたは CD71 トランスフェリン結合部位に結合する FN3 タンパク質の包含は、FN3 ドメインの選択を、CD71 へのトランスフェリン結合と競合または阻害しないものに押し進める。プレートを、TBST ですすぎ、希釈した溶解物を、プレートに 1 時間塗布する。追加のすすぎの後、ウェルを HRP でコンジュゲートされた抗 V5 タグ抗体 (Abcam、ab1325) で 1 時間処理し、次いで POD (Roche、11582950001) でアッセイする。ストレプトアビジン対照の少なくとも 10 倍以上の ELISA シグナルを有するシグナルを有する FN3 ドメイン溶解物からの DNA を配列決定し、スクリーニングから単離した FN3 ドメイン配列をもたらす。

10

【0485】

実施例 3: CD71 に結合し、トランスフェリンと競合しないフィブロネクチン III 型 (FN3) ドメインの選択

【0486】

トランスフェリンと競合しない、または最小限に競合する CD71 結合 FN3 ドメインを識別するために、バイアスをかけた CIS ディスプレイ戦略を設計した。要するに、ヒト CD71 の ECD 上で 5 ラウンドのパンニング後に回復した出力を使用する (実施例 3)。実施例 3 に記載されるように、追加のラウンドのオフプレート選択を行い、1) 最終的な溶出ステップの前にトランスフェリンと同じ部位で結合したセンチリンを溶出させるために、ヒトホロトランスフェリンを用いた洗浄ステップ、または 2) モノクローナル抗体 OKT9 を用いた FN3 ドメイン結合剤のいずれかを加えた。トランスフェリン洗浄戦略及び OKT9 溶出戦略から回収した FN3 ドメインを PCR 増幅し、前述のように pET ベクターにクローニングした。huCD71 に特異的に結合した 228 個の FN3 ドメインを、huCD71 ECD への結合について ELISA によって確認した。独自の結合剤のサブセットを、SEC によって分析し、MMAF にコンジュゲートし、SKBR-3 細胞 + / - ホロヒトトランスフェリンにおける細胞生存アッセイを介して内在化について評価した。ポリペプチドは、受容体によって内在化されることが見出された。

20

【0487】

配列番号 509 の配列を含むポリペプチドと、ヒト膜タンパク質のライブラリに対する siRNA 対 OOOO に記載の配列及びリンカーを含むリンカー番号を有する siRNA 対に連結される配列番号 509 を含むポリペプチドと、の特異性をプロファイルするために、膜プロテオームアレイ (MPA) アッセイを行った。MPA ライブラリは、GPCR、イオンチャネル、及びトランスポーターを含む全てのシングルパス、マルチパス、及び GPI アンカータンパク質の 94% を含む 6000 を超えるヒト膜タンパク質を含み、各膜タンパク質は、鳥類 QT6 細胞バックグラウンドにおいて独特に発現する。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞において個々に発現される膜タンパク質へのリガンド (FN3 ドメイン) 結合を直接検出する。

30

【0488】

配列番号 509 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、siRNA 対 OOOO に記載の配列及びリンカーを含むリンカー番号を有する siRNA 対に連結される配列番号 509 のアミノ酸配列を含むペプチドと、を、MPA に対してそれぞれ、1.25 μ g/ml、1.25 μ g/ml、及び 0.31 μ g/ml の最適なシグナル/バックグラウンドノイズ比を有する濃度でスクリーニングした。スクリーニングで識別された膜タンパク質標的を、リガンド連続希釈を使用して検証手順でフォローアップし、細胞を識別された標的で個別にトランスフェクトした。スクリーニングは、ポリペプチドが CD71 への結合に特異的であることを決定し、ポリペプチドにコンジュゲートされた siRNA の付加は、特異性を変化させなかった。

40

【0489】

50

実施例 4：CD71 FN3ドメインーオリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用した筋肉細胞におけるmRNAのノックダウン

【0490】

muCD71結合FN3ドメインは、FN3ドメイン内に独自に操作されたシステインを介して、マレイミド化学を使用してsiRNAオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)にコンジュゲートされる。システイン置換は、本明細書に提供されるもののようなものであり得、米国特許出願公開第20150104808号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)にも提供されるようなものであり得る。siRNAまたはASOは、標準的な化学修飾で修飾され、標的mRNAのインビトロでのノックダウンを可能にすることが確認される。FN3ドメインーオリゴヌクレオチドコンジュゲートを、最大10mg/kgのオリゴヌクレオチドペイロード用量でマウスにおいて静脈内に投与する。投与後の様々な時点で、マウスを殺処分し、骨格筋、心筋、及び様々な他の組織を回収し、必要になるまでRNAlater(商標)(Sigma Aldrich)に保存する。標的遺伝子ノックダウンは、標準的なqPCR $\Delta\Delta C_T$ 法、ならびに標的遺伝子及び対照遺伝子に特異的なプライマーを使用して評価される。標的遺伝子は、筋肉内でノックダウンされることが見出され、そのようなノックダウンは、siRNAまたはASOをCD71 FN3結合ドメインにコンジュゲートすることによって増強される。

10

【0491】

試験したFN3-siRNAコンジュゲートは、以下の表13に記載される通りである。

20

【表14】

表13

コンジュゲート	CD71 FN3 ドメイン (センチリン)	GYS1 siRNA 対
ABXC-1	配列番号 572	RRRR
ABXC-2	配列番号 572	SSSS
ABXC-3	配列番号 572	TTTT
ABX1005	配列番号 572	非 GYS1 標的/対照
ABXC-27	配列番号 572	A
ABXC-28	配列番号 572	QQQQ
ABXC-29	配列番号 572	PPPP

30

【0492】

図4Aは、ビヒクル単独と比較して、3つの異なるFN3ドメインーsiRNAコンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋におけるGYS1 mRNAのノックダウンを示す。有効性研究について、雄GAA-マウス(4~5週齢)を、Jackson Laboratoriesから得た。全ての動物を、IACUCプロトコルに従って処置した。5匹の動物が、5.4mg/kgの3つの異なるFN3ドメインーsiRNAコンジュゲート(3mpkのGys1 siRNA)またはビヒクルのいずれかの単一の尾静脈静脈内ボラス注射を受けた。単回投与から4週間後、マウスを殺処分し、腓腹筋をRNAlaterに採取し、4℃で一晩保存し、-80℃で凍結した。総RNAを、QiagenのRNeasy線維組織キットを使用して、腓腹筋から単離した。標的Gys1及び内因性対照(Pgk1、Ubc、Hprt1、及びAha1)の発現レベルを、リアルタイムの定量的PCRを用いて解析した。データを、ビヒクル単独で投与された対照動物に正規

40

50

化する $\Delta\Delta Ct$ 法を使用して分析した。FN3ドメイン-siRNAコンジュゲート処理群におけるGys1 mRNAのノックダウンパーセンテージを、残りのGys1 mRNAレベルのパーセンテージを100減算することによって測定した。GraphPad Prismソフトウェアにおけるダネットの多重比較検定を伴う一元配置分散分析を使用して、統計的有意性を計算した。統計的有意性は、アスタリスク***が $p < 0.001$ である、図に表示される。

【0493】

図4Bは、ビヒクル単独と比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋におけるGYS1タンパク質のノックダウンを示す。腓腹筋におけるGys1タンパク質の定量は、RIPA緩衝液中で腓腹筋を均質化することによって行った。腓腹筋におけるタンパク質濃度を、Bradfordアッセイを使用して測定した。Gys1レベルを、12~230kDaのJesS分離モジュール(SM-W004)の製造元の標準方法を使用して定量化した。タンパク質を、プロテインSimple独自の光活性化捕捉化学を使用して、毛細血管上で固定化することによって分離した。抗Gys1一次抗体を、1:100の希釈で使用した。化学発光の暴露は、過酸化物質/ルミノール-Sを使用して確立した。毛細血管の化学発光のデジタル画像は、高さ(化学発光強度)、面積、及びシグナル/ノイズ比を自動的に測定するCompassのSimple Westernソフトウェアを使用して捕捉した。各実行には内部システムが含まれた。FN3ドメイン-siRNAコンジュゲート処理群のピーク面積値を、ビヒクル処置組織に対して正規化し、処理群におけるGys1タンパク質のノックダウンパーセンテージを、残りのGys1タンパク質レベルのパーセンテージを100減算することによって測定した。GraphPad Prismソフトウェアにおけるダネットの多重比較検定を伴う一元配置分散分析を使用して、統計的有意性を計算した。統計的有意性は、アスタリスク***が $p < 0.001$ である、図に表示される。

【0494】

図5は、異なる標的(AHA-1)に対するsiRNAと比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用して、GYS1ノックダウンが骨格筋に対して高度に特異的であることを示す。雄GAA-マウス(8~9週齢)を、Jackson Laboratoriesから得た。全ての動物を、IACUCプロトコルに従って処置した。3匹の動物が、17.9mg/kgの3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mpkのGys1 siRNA)、17.9mg/kgの1つのFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mpkのAha1 siRNA)またはビヒクルのいずれかの単一の尾静脈静脈内ボラス注射を受けた。単回投与から2週間後、マウスを殺処分した。腓腹筋、大腿四頭筋、横隔膜、心臓、肝臓、及び腎臓組織を、RNAlater中に収集し、4℃で一晩保存し、-80℃で凍結した。総RNAを、QiagenのRNeasy線維組織キットを使用して、組織から単離した。標的Gys1/Aha1及び内因性対照(Pgk1)の発現レベルを、リアルタイムの定量的PCRを用いて分析した。データを、ビヒクル単独で投与された対照動物に正規化する $\Delta\Delta Ct$ 法を使用して分析した。

【0495】

実施例5: ABX-HHH処理細胞と未処理細胞とを比較するRNA-seq実験。

【0496】

HEK293T細胞を10nMのABXO-HHHで24時間リポフェクトした後、polyA+選択されたmRNAに対してmRNA配列決定を行った。1処理当たり6回の反復を、平均的深さを3000万超の読み取りまで配列決定した。90%超のマッピング率を有するKallistoを使用して、ライブラリを、GRCh38トランスクリプトームに擬似アラインメントした。この火山プロットの値は、DESeq2を使用して生成し、未処理細胞に対してABXO-HHH処理RNA-seqライブラリを比較した。図2のプロットにおける各ドットは、遺伝子における測定された発現変化を表す。X軸は、全ての遺伝子についての遺伝子発現における $\log_2$ の倍率変化(ABXO-HHHを未

10

20

30

40

50

処理で割ったもの)を表す。Y軸は、調整されたP値を変換した負の $\log_{10}$ を示す。黒い矢印は、プロット上のGYS1を指す。

【0497】

実施例6：CD71 FN3ドメインs iRNAコンジュゲートの結合特異性。

【0498】

膜プロテオームアレイ(MPA)アッセイを実施して、ヒト膜タンパク質のライブラリに対するCD71 FN3ドメイン及びCD71 FN3ドメインs iRNAコンジュゲートの特異性をプロファイルした(図3)。MPAは、GPCR、イオンチャネル、及びトランスポーターを含む全てのシングルパス、マルチパス、及びGPIアンカータンパク質の94%に及ぶ6000を超えるヒト膜タンパク質を含み、各膜タンパク質は、鳥類QT6細胞バックグラウンドにおいて独特に発現する。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞において個々に発現される膜タンパク質へのFN3ドメイン結合を直接検出した。

【0499】

MPAに対して、FN3ドメイン及びFN3ドメイン-s iRNAコンジュゲートを、最適なシグナル/バックグラウンドノイズ比、それぞれ、 $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $0.31 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でスクリーニングした。スクリーニングで識別された膜タンパク質標的を、識別された標的を独自に発現する細胞上でリガンド連続希釈を使用して検証した。

【0500】

実施例7：酵素補充療法(ERT)と共投与されるCD71に結合するフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含む組成物によるグリコーゲン貯蔵疾患の治療

【0501】

ポンペ病に罹患している対象は、酵素グルコシダーゼアルファ酸(GAA)とともに、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメインを含む組成物を共投与される。酵素補充療法のみを受けた対象と比較して、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメイン及びグルコシダーゼアルファ酸ERTの両方を受けた対象は、ERTとしてのGAAのみの投与と比較して増強された応答を有し、症状のより大きな軽減を有する。

【0502】

実施例8：酵素補充療法(ERT)と共投与されるCD71に結合するフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含む組成物によるグリコーゲン貯蔵疾患の治療

【0503】

コリ病に罹患している対象は、グリコーゲン脱分岐酵素(AGL)とともに、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメインを含む組成物を共投与される。酵素補充療法のみを受けた対象と比較して、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメイン及びグリコーゲン脱分岐酵素ERTの両方を受けた対象は、AGL ERTの投与と比較して増強された応答を有し、症状のより大きな軽減を有する。

【0504】

実施例9：酵素補充療法(ERT)とともに、CD71に結合するフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含む組成物を共投与することの薬力学的効果を評価するための反復用量研究

【0505】

単剤療法として、または酵素補充療法と組み合わせて、CD71結合FN3ドメインの薬力学的効果を評価するために、反復用量研究を行った。

【0506】

実験条件：ABXC-29は、げっ歯類特異的GYS1 s iRNA ABXO-371(配列番号711のセンス鎖、及び配列番号712のアンチセンス鎖)に化学的にコンジュゲートされる、げっ歯類CD71結合センチリン(配列番号572)から構成される

10

20

30

40

50

。ABXC-29は、ヒト特異的GYS1 siRNA（配列番号706のセンス鎖及び配列番号707のアンチセンス鎖）に化学的にコンジュゲートされる、ヒトCD71結合センチリン（配列番号509）から構成される、ヒトCD71に結合するポリペプチドを含む巨大分子への代理物としてマウスにおいて使用された。組換えヒト酸α-グルコシダーゼ（rhGAA）は、GAA媒介またはGAA関連疾患を治療するための酵素補充療法において使用される。本研究は、20匹の雄GAA-/-マウス（B6；129-Gata^{tm1Rabn}；J株、ストック番号004154；6^{ne}；Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）及び5匹の野生型マウス（C57BL/6J、ストック番号000664；Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）で実施した。5匹の野生型マウス及び5匹のGAA-/-マウスを、ビヒクル（HBS）のみで処置した。5匹のGAA-/-マウスを、単剤療法としてABXC-29の反復静脈内投与で処置した。5匹のGAA-/-マウスを、単剤療法としてrhGAAの反復用量で処置した。5匹のGAA-/-マウスを、併用療法としてrhGAAと組み合わせてABXC-29で処置した。

10

20

40

50

【0507】

治療後の筋肉細胞及び心臓細胞におけるグリコーゲン合成酵素1 mRNAの発現：その結果を、以下の表14に示し、GAA-/-マウスにおけるビヒクルのパーセントとして表す。3mg/kgのABXC-29の反復投与から2週間後、Gys1 mRNAの発現は、横隔膜において83%、大腿四頭筋において81%、ならびに腓腹筋及び心臓の両方において84%低減した。rhGAAを単剤療法として投与した場合、Gys1 mRNAの発現への影響は、観察されなかった。ABXC-29及びrhGAAを併用療法として投与した場合、Gys1 mRNAの発現は、横隔膜において79%、腓腹筋において84%、及び大腿四頭筋において83%低減し、rhGAAの投与が筋肉細胞におけるABXC-29の活性に影響を及ぼさなかったことを示した。対照的に、心臓細胞において、ABXC-29及びrhGAAの同時投与は、Gys1 mRNAの発現の22%の低減をもたらし、臨床的に関連し得る心臓細胞におけるABCX-29の活性へのより少ない影響を示唆した。

【表15】

表14

	腓腹筋での Gys1 mRNA の低減%	大腿四頭筋での Gys1 mRNA の低減%	心臓での Gys1 mRNA の低減%	横隔膜での Gys1 mRNA の低減%
ABXC-29(10mg/kg)	84%	81%	76%	NA
ABXC-29 (3mg/kg)	84%	81%	84%	83%
rhGAA	NS	NS	NS	NS
ABXC-29(3mg/kg)+rhGAA	84%	83%	22%	79%

NS=有意ではない、NA=該当なし

【0508】

治療後の筋肉細胞におけるグリコーゲンレベル：その結果を、以下の表15に示し、μgのグリコーゲン/mgの組織として表す。単剤療法としての3mg/kgのABXC-29の反復用量の投与は、腓腹筋においてグリコーゲンレベルを23%低減し、大腿四頭筋において67%低減した。単剤療法としてのrhGAAの投与は、腓腹筋においてグリ

コーゲンを 33% 低減し、大腿四頭筋において 35% 低減した。併用療法としての ABXC-29 (3 mg/kg) 及び rhGAA の投与は、腓腹筋においてグリコーゲンを 48% 低減し、大腿四頭筋においてグリコーゲンを 42% 低減した。これらの結果は、2つの治療法の相乗効果を実証する。以下に示すように、2つの治療剤の併用は、10 mg/kg の用量の ABXC-29 の単独療法用量に類似した応答を生じさせ、3 mg/kg の用量の ABXC-29 の単独療法用量の応答を上回り、rhGAA 単独療法用量を上回った。これらの結果は、予測することができなかった。

【表 16】

表 15

	腓腹筋でのグリコーゲン レベルの低減%	大腿四頭筋でのグリコー ゲンレベルの低減%
ABXC-29(10mg/kg)	53%	67%
ABXC-29(3mg/kg)	23%	27%
rhGAA	33%	35%
ABXC-29(3mg/kg)+rhGAA	48%	42%

10

【0509】

一般的な方法

20

【0510】

分子生物学における標準的な方法は、Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、Wu (1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA) に記載されている。標準的な方法はまた、Ausbel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NYにも掲載され、これは、細菌性細胞におけるクローニング及びDNA突然変異生成 (1巻)、哺乳動物細胞及び酵母におけるクローニング (2巻)、複合糖質及びタンパク質の発現 (3巻)、ならびにバイオインフォマティクス (4巻) が記載されている。

30

【0511】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、及び結晶化を含む、タンパク質精製のための方法が、記載されている (Coligan, et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York)。化学分析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の産生、タンパク質のグリコシル化が、記載されている (例えば、Coligan, et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York、Ausubel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17、Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, S

40

50

t. Louis, MO; pp. 45-89, Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N. J., pp. 384-391を参照のこと)。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の産生、精製、及び断片化が、記載されている (Coligan, et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York, Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Harlow and Lane, 上記を参照)。リガンド／受容体相互作用を特徴付けるための標準的な技術が、利用可能である (例えば、Coligan, et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York)。

10

【0512】

本明細書に引用される全ての参考文献は、各個々の刊行物、データベースエントリ (例えば、Genbank 配列または GeneID エントリ)、特許出願、または特許が具体的かつ個別に参照により組み込まれると示されているのと同程度に、参照により組み込まれる。参照による組み込みのこの陳述は、37 C. F. R. § 1.57 (b) (1) に従って、個々の刊行物、データベースエントリ (例えば、Genbank 配列または GeneID エントリ)、特許出願、または特許のいずれにも関係することが出願人によって意図されており、これらは各々、たとえそのような引用が参照による組み込みの専用の陳述に直接隣接していないとしても、37 C. F. R. § 1.57 (b) (2) に従って明らかに識別される。何かしら存在する場合に、参照による援用についての専用の記載が本明細書内に含まれることは、参照による援用についてのこの一般的な記載を、いかなる方法においても弱めるものではない。本明細書での参考文献の引用は、当該参考文献が、適切な先行技術を参照するものであるということを認めるためのものでもなければ、それらの公報または文書の内容または日付について、何かしら認めるものでもない。

20

【0513】

本実施形態は、本明細書において記載される特定の実施形態による範囲に限定されない。実際、本明細書に記載されるものに加えて、実施形態の様々な修正は、前述の説明から当業者に明らかであろう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

30

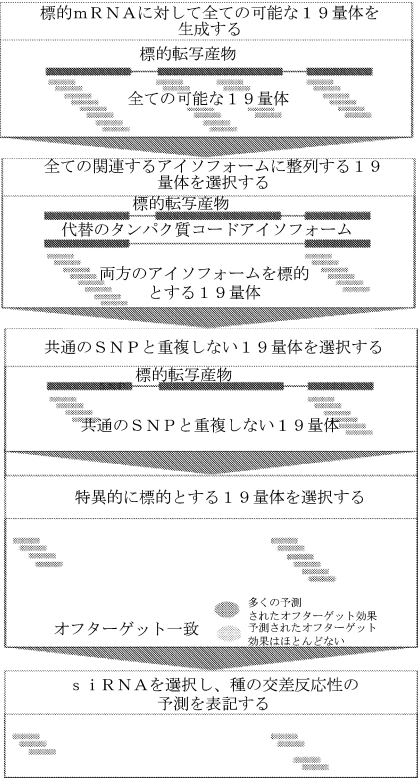
【0514】

前述の書面による明細書は、当業者が実施形態を実施することを可能にするのに十分であると考えられる。本明細書に示され、記載されるものに加えて、実施形態の様々な修正は、前述の説明から当業者に明らかであり、添付の特許請求の範囲内に入るであろう。

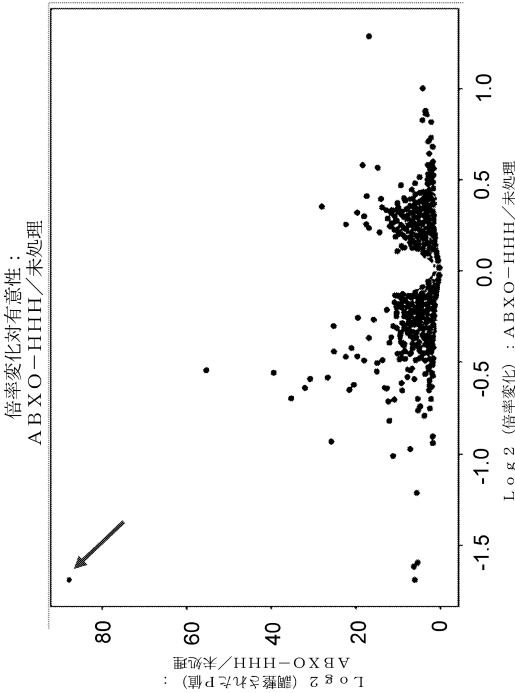
40

50

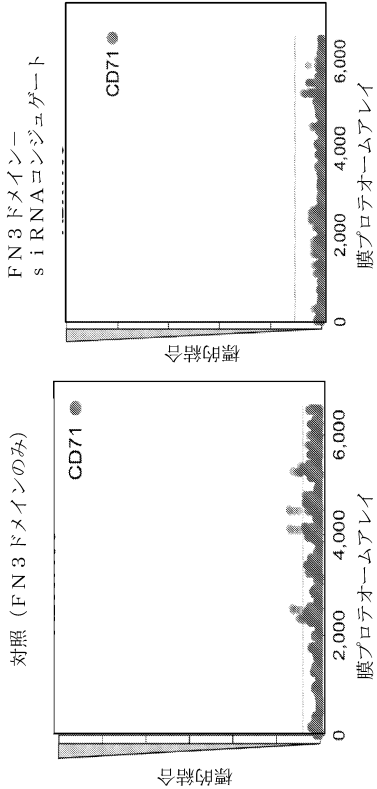
【図面】
【図 1】



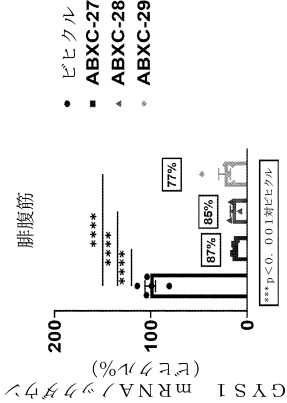
【図 2】



【図 3】



【図 4 A】



10

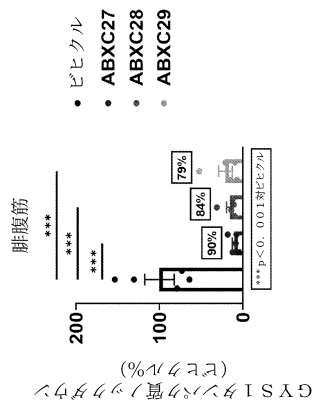
20

30

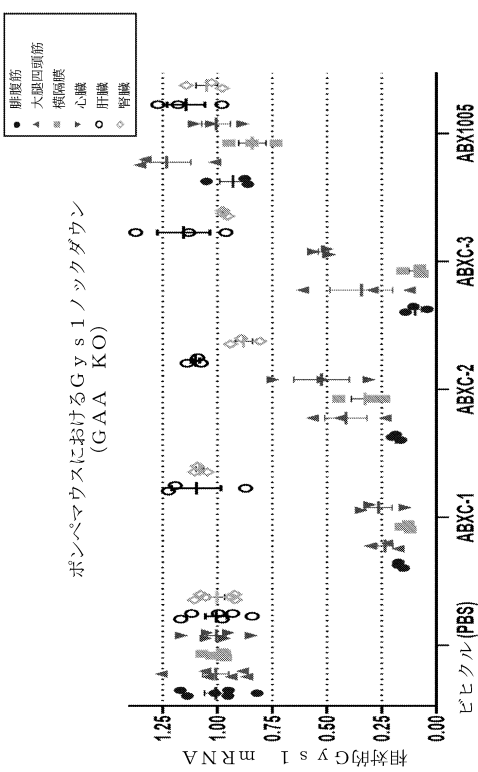
40

50

【図 4 B】



【図 5】



【配列表】

202551599600001.xml

【手続補正書】

【提出日】令和5年7月18日(2023.7.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

関連出願の相互参照

本出願は、2022年4月14日に提出された米国仮出願第63/330,797号の優先権を主張し、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子配列表への参照

本出願は、XMLフォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。配列表は、「ROO-030US_SL.xml」と名付けられ、2023年6月20日に作成され、サイズは2,074,533バイトである。

【0003】

本実施形態は、コンジュゲートしたフィブロネクチンIII型ドメイン(FN3)であり得るsiRNA分子、及び酵素補充療法と組み合わせて当該分子を使用する方法に関する。

20

【背景技術】

【0004】

治療用核酸としては、例えば、低分子干渉RNA(siRNA)、マイクロRNA(miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激核酸、アンチセンス、アンタゴmir、アンチmir、マイクロRNA模倣体、スーパーmir、U1アダプター、及びアプタマーが挙げられる。siRNAまたはmiRNAの場合、これらの核酸は、RNA干渉(RNAi)と呼ばれるプロセスを通じて、特異的タンパク質の細胞内レベルを下方制御することができる。siRNA及びmiRNA構築物は、標的タンパク質に対する任意のヌクレオチド配列を用いて合成することができるため、RNAiの治療用途は非常に広範である。これまでのところ、siRNA構築物は、インビトロモデル及びインビボモデルの両方において標的タンパク質を特異的に下方制御する能力を示している。加えて、siRNA構築物は、現在のところ、臨床研究において評価されており、様々な疾患に対して承認されている。

30

【0005】

しかしながら、siRNA構築物が現在直面している2つの問題は、第1には、それらが血漿中でのヌクレアーゼ消化に対して感受性であること、第2には、遊離siRNAまたはmiRNAとして全身性に投与される場合、それらがRISC(RNA誘導サイレンシング複合体)に結合することができる細胞内区画へのアクセスを得る能力に制限があることである。コレステロール及びPEG脂質、炭水化物(GalNAc三量体など)などの他の脂質成分を有するカチオン性脂質から形成される脂質ナノ粒子などの特定の送達システムは、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを促進するために使用されている。しかしながら、これらは、肝臓以外の組織においてsiRNAをその意図される標的に効率的かつ効果的に送達することに成功することが示されていない。

40

【0006】

siRNAをその意図された細胞標的に送達するための組成物及び方法が、依然として必要である。さらに、必要とされるのは、CD71に特異的に結合することができる臨床使用のための最適化された特性を有するFN3ドメイン、及びCD71の受容体媒介内化を介した細胞内アクセスを可能にする新規の治療薬のためにそのような分子を使用する

50

方法である。本実施形態は、これらの必要性及び他の必要性を満たす。

【発明の概要】

【0007】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む *siRNA* 分子に連結された1つ以上の FN3 ドメインを含む組成物と、酵素補充療法 (ERT) と、の投与を含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、ポンペ病 (GSD 2、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA) 欠損症)、コリ病またはフォーブス病 (GSD 3、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL) 欠損症)、アンデルセン病 (GSD 4、グリコーゲン分岐酵素 (GBE 1) 欠損症)、マッカードル病 (GSD 5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM) 欠損症)、タルイ病 (GSD 7、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM) 欠損症)、アルドラーゼ A 欠損症 (GSD 12、アルドラーゼ A (ALDOA) 欠損症)、II 型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。

【0009】

いくつかの実施形態では、ERT は、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA)、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL)、グリコーゲン分岐酵素 (GBE 1)、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM)、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM)、アルドラーゼ A (ALDOA)、マリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ (GYS 2)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC 37A 4)、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA 2 / PHKB / PHKG 2 / PHKA 1)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM 2)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA)、グルコース輸送体 (GLUT 2)、 β -エンノラーゼ (ENO 3)、及びグリコゲンニン-1 (GYG 1) からなる群から選択される1つ以上の酵素を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、CD 71 タンパク質に結合する FN3 ドメインにコンジュゲートされた *siRNA* が、提供される。

【0011】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される任意の FN3 ドメインのアミノ酸配列を含む FN3 ドメインが、提供される。いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、CD 71 に結合する。いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、CD 71 に特異的に結合する。

【0012】

いくつかの実施形態では、組成物は、可撓性リンカーなどのリンカーによって接続される2つの FN3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、2つの FN3 ドメインは、異なる標的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の FN3 ドメインは、CD 71 に結合する。いくつかの実施形態では、第2の FN3 ドメインは、CD 71 ではない異なる標的に結合する。

【0013】

いくつかの実施形態では、dsRNA または *siRNA* 分子などのオリゴヌクレオチドが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書において提供される修飾の有無にかかわらず、本明細書において提供される配列を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、薬学的組成物などの組成物において提供される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ポリペプチドにコンジュゲートされる。

【0014】

いくつかの実施形態では、*siRNA* 分子にコンジュゲートされた1つ以上の FN3 ドメインを含む組成物が、提供される。

【0015】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

【0016】

いくつかの実施形態では、 $C - (X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4$ の式を有する組成物であって、式中、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4 - C$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、 $X4 - L - (X1)_n - (X2)_q - (X3)_y$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

【0019】

いくつかの実施形態では、 $C - X4 - L - (X1)_n - (X2)_q - (X3)_y$ の式を有する組成物であって、式中、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

30

【0020】

いくつかの実施形態では、 $X4 - L - (X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - C$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

40

【0021】

いくつかの実施形態では、 $C - (X1)_n - (X2)_q [L - X4] - (X3)_y$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2のFN3ドメインであり、X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、オリゴヌクレオチド分子であり、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン(ABD)であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である、組成物が、提供される。

【0022】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n - (X2)_q [L - X4] - (X3)_y - C$ の式を有する組成物であって、式中、X1は、第1のFN3ドメインであり、X2は、第2の

50

F N 3 ドメインであり、X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり、L は、リンカーであり、X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、C は、ポリマーまたはアルブミン結合ドメイン (A B D) であり、n、q、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

【0023】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される組成物のうちの 1 つ以上を含む薬学的組成物が、提供される。

【0024】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される組成物の使用、または本明細書において提供される状態を治療するための薬学的組成物もしくは薬剤の調製におけるいずれかの使用が、提供される。

【0025】

いくつかの実施形態では、骨格筋における G Y S 1 mRNA 及びタンパク質を選択的に低下させ、本明細書に提供される酵素を投与する方法が、提供される。ある特定の実施形態では、G Y S 1 mRNA 及びタンパク質は、肝臓及び／または腎臓において低下しないか、または著しく低下しない。

【0026】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される F N 3 ドメインをコードする単離されたポリヌクレオチドが、提供される。

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むベクターが、提供される。

【0028】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞が、提供される。

【0029】

いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインを生成する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、F N 3 ドメインをコードまたは発現するベクターを含む宿主細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、F N 3 ドメインを精製することをさらに含む。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインは、C D 7 1 に結合する。

【0030】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子に連結された C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物が、提供される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子の有無にかかわらず、F N 3 ドメインのうちの 1 つ以上を含むキットが、提供される。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図 1】 s i R N A スクリーニングのために評価及び考慮される特性を表すフローチャートである。

【図 2】 細胞を s i R N A 対 H H H でトランスフェクトした後のトランスクリプトームの変化を識別する R N A シーケンシング実験のグラフであり、矢印は、G Y S 1 転写産物の有意な減少を識別する。

【図 3】 プロテオームアレイ内の 6, 0 0 0 を超える受容体を使用する標的結合アッセイの結果を提供し、データは、C D 7 1 が F N 3 ドメインの排他的結合標的であることを示す。

【図 4 A】 ビヒクル単独と比較して、3 つの異なる F N 3 ドメイン-s i R N A コンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋における G Y S 1 mRNA のノックダウンを示す。

【図 4 B】 ビヒクル単独と比較して、3 つの異なる F N 3 ドメイン-s i R N A コンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋における G Y S 1 タンパク質のノックダウンを示す。

10

20

30

40

50

【図5】異なる標的（AHA-1）に対するsiRNAと比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用して、GYS1ノックダウンが骨格筋に対して高度に特異的であることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「a」、「an」、及び「the」は、別途内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞」への言及は、2つ以上の細胞の組み合わせなどを含む。

【0033】

「フィブロネクチンIII型（FN3）ドメイン」（FN3ドメイン）は、フィブロネクチン、テナシン、細胞内細胞骨格タンパク質、サイトカイン受容体、及び原核酵素を含むタンパク質においてしばしば生じるドメインを指す（Bork and Doolittle, Proc Nat Acad Sci. USA, 1992, 89: 8990-8994、Meinke et al., J Bacteriol., 1993, 175: 1910-1918、Watanabe et al., J Biol Chem., 1990, 265: 15659-15665）。例示的なFN3ドメインは、例えば、米国特許第8,278,419号に記載されているように、ヒトテナシンCに存在する15個の異なるFN3ドメイン、ヒトフィブロネクチン（FN）に存在する15個の異なるFN3ドメイン、及び非天然合成FN3ドメインである。個々のFN3ドメインは、ドメイン番号及びタンパク質名、例えば、テナシンの第3のFN3ドメイン（TN3）、またはフィブロネクチンの第10のFN3ドメイン（FN10）によって参照される。全体を通して使用されるように、「センチリン」はまた、FN3ドメインを指す。さらに、本明細書に記載されるFN3ドメインは、可変重鎖（V_H）及び／または軽鎖（V_L）の構造を有しないため、抗体ではない。

【0034】

本明細書で使用される場合、「自己免疫疾患」は、個体の免疫応答が個体自身の成分に対して向けられ、望ましくなく、しばしば衰弱していく状態をもたらす病状及び病態を指す。本明細書で使用される場合、「自己免疫疾患」は、自己免疫状態、症候群などをさらに含むことを意図している。自己免疫疾患としては、アジソン病、アレルギー、アレルギー性鼻炎、強直性脊椎炎、喘息、アテローム性動脈硬化症、耳の自己免疫疾患、眼の自己免疫疾患、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性耳下腺炎、自己免疫性ブドウ膜炎、セリアック病、原発性胆汁性肝硬変、良性リンパ球性血管炎、COPD、大腸炎、冠状動脈性心疾患、クローン病、糖尿病（I型）、うつ病、糖尿病（1型及び／または2型糖尿病を含む）、精巣上体炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレイブス病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患（IBD）、組換え製剤に対する免疫応答、例えば、血友病の第VII因子、若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、男性不妊症、混合性結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、腫瘍学、変形性関節症、疼痛、原発性粘液浮腫、天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、乾癬、乾癬性関節炎、反応性関節炎、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、交感性眼炎、T細胞リンパ腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、精巣抗中心性T細胞リンパ腫、甲状腺炎、移植による拒絶反応、潰瘍性結腸炎、自己免疫性ブドウ膜炎、及び血管炎が挙げられるが、これらに限定されない。自己免疫疾患には、影響を受ける組織が一次標的であり、場合によっては二次標的である状態が含まれるが、これらに限定されない。そのような状態としては、エイズ、アトピー性アレルギー、気管支喘息、湿疹、ハンセン病、統合失調症、遺伝性うつ病、組織及び臓器の移植、慢性疲労症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳卒中、自閉症、てんかん、アルサス現象、アナフィラキシー、ならびにアルコール及び薬物中毒が挙げられるが、これらに限定されない。

【0035】

本明細書で使用される場合、「捕捉剤」は、特定のタイプの細胞に結合し、その細胞を

他の細胞から単離することを可能にする物質を指す。例示的な捕捉剤は、磁気ビーズ、強磁性流体、カプセル化試薬、特定の細胞型に結合する分子などである。

【0036】

本明細書で使用される場合、「試料」は、対象から単離された同様の流体、細胞、または組織、ならびに対象内に存在する流体、細胞、または組織の集合を指す。例示的な試料は、組織生検、細針吸引、外科的に切除された組織、臓器培養物、細胞培養物、及び血液、血清及び血清液、血漿、リンパ、尿、唾液、囊胞液、涙液、糞便、痰、分泌組織及び臓器の粘膜分泌物、腔分泌物、腹水、胸膜、心膜、腹膜、腹腔及び他の体腔の液体、気管支洗浄によって収集された液体、滑液、対象または生物学的源と接触した液体溶液、例えば、細胞または臓器調節媒体及び洗浄液などを含む細胞及び臓器培養培地である。

10

【0037】

「置換すること」または「置換された」または「変異すること」または「変異したこと」は、その配列のバリエーションを生成するために、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列中の1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドを改変、欠失、または挿入することを指す。

【0038】

「バリエーション」は、1つ以上の修飾、例えば、置換、挿入、または欠失によって参照ポリペプチドまたは参照ポリヌクレオチドとは異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指す。

【0039】

「特異的に結合する」または「特異的結合」とは、約 1×10^{-6} M 以下、例えば、約 1×10^{-7} M 以下、約 1×10^{-8} M 以下、約 1×10^{-9} M 以下、約 1×10^{-10} M 以下、約 1×10^{-11} M 以下、約 1×10^{-12} M 以下、または約 1×10^{-13} M 以下の解離定数 (K_D) で、FN3ドメインがその標的、例えばCD71に結合する能力を指す。代替的に、「特異的結合」は、標準溶液ELISAアッセイにおいて、陰性対照よりも少なくとも5倍、FN3ドメインがその標的（例えば、CD71）に結合する能力を指す。特異的結合はまた、本明細書に記載され、図3に示されるプロテオームアレイを使用して実証することができる。いくつかの実施形態では、陰性対照は、CD71に結合しないFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、他の関連抗原、例えば、Macaca Fascicularis（カニクイザル、cyno）またはPan troglodytes（チンパンジー）などの他の種（ホモログ）からの同じ所定の抗原に交差反応性を有し得る。

20

30

【0040】

「ライブラリ」は、バリエーションの一群を指す。ライブラリは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドバリエーションから構成され得る。

【0041】

「安定性」は、その正常な機能的活性のうちの少なくとも1つ、例えば、CD71などの所定の抗原への結合を保持するように、生理学的条件下で折り畳み状態を維持する分子の能力を指す。

【0042】

「CD71」は、配列番号2または5のアミノ酸配列を有するヒトCD71タンパク質を指す。いくつかの実施形態では、配列番号2は、完全長ヒトCD71タンパク質である。いくつかの実施形態では、配列番号5は、ヒトCD71の細胞外ドメインである。

40

【0043】

「テンコン」とは、配列番号1に示されるコンセンサス配列（LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFD SFLIQYQESSEKVG EAINLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVS IYGVKG GHR SNPLSAEFTT）を有し、米国特許公開第2010/0216708号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される合成フィブロネクチンIII型（FN3）ドメインを指す。

【0044】

50

「がん細胞」または「腫瘍細胞」は、新しい遺伝物質の取り込みを必ずしも伴わない、自発的または誘導された表現型変化を有する、インビボ、エクスピボ、及び組織培養のいずれかのがん性、前がん性、または形質転換された細胞を指す。形質転換は、形質転換ウイルスによる感染及び新たなゲノム核酸の組み込み、または外因性核酸の取り込みから生じ得るが、それはまた、自然にまたは発がん性物質への曝露後にも生じ得るものであり、それによって内因性の遺伝子を変異させるものである。形質転換／がんは、例えば、インビトロ、インビボ、及びエクスピボの形態的变化、細胞の不死化、異常な成長制御、病巣形成、増殖、悪性腫瘍、腫瘍特異的マーカーレベル、侵襲性、ヌードマウスなどの好適な動物宿主における腫瘍成長または抑制などによって実証される (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994))。

10

【0045】

「樹状細胞」は、適応免疫系において重要な役割を形成する一種の抗原提示細胞 (APC) を指す。樹状細胞の主な機能は、Tリンパ球に抗原を提示することと、免疫応答を直接的または間接的にさらに調節し得るサイトカインを分泌することである。樹状細胞は、不活性または静止しているナイーブTリンパ球において一次免疫応答を誘導する能力を有する。

【0046】

「免疫細胞」は、リンパ球 (T細胞、B細胞、及びNK細胞)、好中球、または単球／マクロファージとして分類される免疫系の細胞を指す。これらは、あらゆるタイプの白血球である。

20

【0047】

筋細胞は、様々な筋肉組織を構成する細胞であり、骨格、平滑、及び心筋細胞として分類される。骨格筋細胞は、多核であり、線状である。平滑筋細胞は、単核であり、線状ではない。心筋細胞は、単核であり、線状であり、心臓にのみ見られる。本明細書で 사용되는場合、「筋肉細胞」は、骨格筋細胞及び平滑筋細胞を指し、心筋細胞を指さない。本明細書で 사용되는場合、「心臓細胞」は、心筋細胞のみを指す。

【0048】

「ベクター」は、生体系内で複製可能な、またはそのような系間を移動することができる、ポリヌクレオチドを指す。ベクターポリヌクレオチドは、典型的には、生体系におけるこれらのポリヌクレオチドの複製または維持を促進するように機能する、複製起点、ポリアデニル化シグナル、または選択マーカーなどの要素を含有する。そのような生体系の例は、ベクターを複製することができる生物学的要素を利用して細胞、ウイルス、動物、植物、及び再構成された生体系を含み得る。ベクターを含むポリヌクレオチドは、DNAもしくはRNA分子、またはこれらのハイブリッドであり得る。

30

【0049】

「発現ベクター」は、発現ベクター中に存在するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの翻訳を指示するために、生体系または再構成された生体系において利用することができるベクターを指す。

【0050】

「ポリヌクレオチド」は、糖-リン酸骨格または他の等価な共有結合化学によって共有結合しているヌクレオチド鎖を含む合成分子を指す。cDNAは、典型的な例のポリヌクレオチドである。

40

【0051】

「ポリペプチド」または「タンパク質」は、ペプチド結合によって連結されてポリペプチドを形成する少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を指す。約50アミノ酸未満の小さいポリペプチドは、「ペプチド」と称され得る。

【0052】

「価」は、分子内の抗原における特異的な特定数の結合部位の存在を指す。したがって、「一価の」、「二価の」、「四価の」、及び「六価の」という用語は、それぞれ、分子

50

内の抗原に特異的な1つ、2つ、4つ、及び6つの結合部位の存在を指す。

【0053】

「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」としては、例えば、哺乳動物及び非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの全ての脊椎動物が挙げられる。注記されている場合を除き、「患者」または「対象」という用語は、互換的に使用される。

【0054】

「単離された」とは、分子が産生される系の他の成分、例えば、組換え細胞、ならびに少なくとも1つの精製または単離ステップに供されたタンパク質から実質的に分離及び／または精製された分子（例えば、合成ポリヌクレオチドまたはFN3ドメインなどのポリペプチド）の均質集団を指す。「単離されたFN3ドメイン」は、他の細胞材料及び／または化学物質を実質的に含まず、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%純度などのより高い純度に単離されたFN3ドメインを包含するFN3ドメインを指す。

【0055】

「酵素補充療法」または「ERT」は、対象に1つ以上の酵素を含む対象に投与される薬学的組成物の使用を指す。いくつかの実施形態では、酵素は、いくつかの態様では、対象における欠損または不足している酵素を補充または置き換えるために投与される。典型的には、療法に関与する1つ以上の酵素は、1つ以上の酵素を含む薬学的組成物の静脈内注入によって対象に投与される。本明細書に記載されるように、酵素補充療法は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、mRNA、cDNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）などの追加の治療剤に連結されることができるFN3ドメインを含む組成物とともに投与することができる。いくつかの実施形態では、酵素補充療法の投与は、本明細書において提供される追加の治療薬に連結されたFN3ドメインを含む組成物の投与前、投与中、または投与後であり得る。

【0056】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子と連結され得るFN3ドメインを含むポリペプチドなどのポリペプチドを含む組成物が、提供される。オリゴヌクレオチド分子は、例えば、siRNA分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、mRNAなどであり得る。

【0057】

したがって、いくつかの実施形態では、siRNAは、標的遺伝子の発現を阻害することができる二本鎖RNAi(dsRNA)剤である。dsRNA剤は、センス鎖（パッセンジャー鎖）及びアンチセンス鎖（ガイド鎖）を含む。いくつかの実施形態では、dsRNA剤の各鎖は、12～40ヌクレオチドの長さの範囲であり得る。例えば、各鎖は、長さが14～40ヌクレオチド、長さが17～37ヌクレオチド、長さが25～37ヌクレオチド、長さが27～30ヌクレオチド、長さが17～23ヌクレオチド、長さが17～21ヌクレオチド、長さが17～19ヌクレオチド、長さが19～25ヌクレオチド、長さが19～23ヌクレオチド、長さが19～21ヌクレオチド、長さが21～25ヌクレオチド、または長さが21～23ヌクレオチドであり得る。

【0058】

いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、典型的には、二重鎖dsRNAを形成する。dsRNA剤の二重鎖領域は、長さが12～40ヌクレオチド対であり得る。例えば、二重鎖領域は、長さが14～40ヌクレオチド対、長さが17～30ヌクレオチド対、長さが25～35ヌクレオチド対、長さが27～35ヌクレオチド対、長さが17～23ヌクレオチド対、長さが17～21ヌクレオチド対、長さが17～19ヌクレオチド対、長さが19～25ヌクレオチド対、長さが19～23ヌクレオチド対、長さが19～21ヌクレオチド対、長さが21～25ヌクレオチド対、または長さが21～23ヌクレオチド対であり得る。別の例では、二重鎖領域は、長さが15、16、17、1

10

20

30

40

50

8、19、20、21、22、23、24、25、26、及び27ヌクレオチド対から選択される。

【0059】

いくつかの実施形態では、dsRNAは、鎖の3'末端もしくは5'末端または両方の末端にて、dsRNA剤の1つ以上のオーバーハング領域及び／またはキャッピング基を含む。オーバーハングは、長さが1～10ヌクレオチド、長さが1～6ヌクレオチド、例えば、長さが2～6ヌクレオチド、長さが1～5ヌクレオチド、長さが2～5ヌクレオチド、長さが1～4ヌクレオチド、長さが2～4ヌクレオチド、長さが1～3ヌクレオチド、長さが2～3ヌクレオチド、または長さが1～2ヌクレオチドであり得る。オーバーハングは、一方の鎖がもう一方よりも長い結果、または同じ長さの2本の鎖がねじれている結果であり得る。このオーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得るか、または標的とする遺伝子配列に対して相補的であり得るか、または別の配列であり得る。第1及び第2の鎖はまた、例えば、ヘアピンを形成するための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連結することもできる。

10

【0060】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤のオーバーハング領域内のヌクレオチドは、各々独立して、例えば、2'-F、2'-Oメチル、2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-O-(2-メトキシエチル)、及びこれらの任意の組み合わせなどの2'-糖修飾を含むが、これらに限定されない修飾または非修飾ヌクレオチドであり得る。例えば、TT(UU)は、いずれかの鎖上のいずれかの末端のためのオーバーハング配列であり得る。このオーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成し得るか、または標的とする遺伝子配列に対して相補的であり得るか、または別の配列であり得る。

20

【0061】

dsRNA剤のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖における5'-または3'-オーバーハングは、リン酸化され得る。いくつかの実施形態では、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、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、またはメシルホスホラミデートを有する2つのヌクレオチドを含有し、2つのヌクレオチドは、同一であり得るか、または異なり得る。一実施形態では、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に存在する。一実施形態では、この3'オーバーハングは、アンチセンス鎖内に存在する。一実施形態では、この3'オーバーハングは、センス鎖内に存在する。

30

【0062】

dsRNA剤は、その全体的な安定性に影響を及ぼすことなく、dsRNAの干渉活性を強化することができる単一のオーバーハングのみを含み得る。例えば、一本鎖のオーバーハングは、センス鎖の3'末端に、または代替的に、アンチセンス鎖の3'末端に位置する。dsRNAはまた、アンチセンス鎖の5'末端（またはセンス鎖の3'末端）に位置する、またはその逆も同じである、平滑末端を有し得る。概して、dsRNAのアンチセンス鎖は、3'末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5'末端は平滑である。理論に拘束されることを望むことなく、こうした非対称であるアンチセンス鎖の5'末端にある平滑末端及びアンチセンス鎖の3'末端オーバーハングであることが、RISCへのガイド鎖挿入に好都合である。例えば、単一のオーバーハングは、長さが少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドを含む。

40

【0063】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤はまた、dsRNA二本鎖の両端に2つの平滑末端を有し得る。

【0064】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖内の全てのヌクレオチドは、修飾され得る。各ヌクレオチドは、同じまたは異なる修飾で修飾され得、この修飾は、非連結リン酸酸素及び／または結合リン酸酸素のうちの1つ以上の一方または

50

両方の1つ以上の変更、リボース糖の成分、例えば、リボース糖における2ヒドロキシルの成分の変更、リン酸部分の「脱リン酸」リンカーでの大量の置換、天然に存在する塩基の修飾または置換、ならびにリボースーリン酸骨格の置換または修飾を含み得る。

【0065】

いくつかの実施形態では、3'または5'オーバーハング内の塩基の全てまたはいくつかは、例えば、本明細書に記載される修飾によって修飾され得る。修飾は、例えば、当該技術分野で既知の修飾、例えば、デオキシリボヌクレオチドの使用、核酸塩基のリボ糖の代わりに修飾された2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F)または2'-O-メチルの使用、及びリン酸基の修飾、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、またはメシルホスホラミデート修飾によるリボース糖の2'位での修飾の使用を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

【0066】

いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アシル、2'-C-アシル、2'-デオキシ、または2'-フルオロで修飾される。鎖は、1つを超える修飾を含有し得る。一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、2'-O-メチルまたは2'-フルオロで修飾される。

【0067】

いくつかの実施形態では、少なくとも2つの異なる修飾が、典型的には、センス鎖及びアンチセンス鎖に存在する。これらの2つの修飾は、2'-デオキシ、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾、非環式ヌクレオチドまたは他のものであり得る。

【0068】

一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、各々、2'-フルオロ、2'-O-メチル、または2'-デオキシから選択される2つの異なる修飾ヌクレオチドを含む。

【0069】

dsRNA剤は、少なくとも1つのホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合をさらに含み得る。ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾は、鎖の任意の位置にあるセンス鎖もしくはアンチセンス鎖、またはその両方の任意のヌクレオチド上で生じ得る。例えば、ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖及び/またはアンチセンス鎖上の全てのヌクレオチド上で生じ得、各ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖もしくはアンチセンス鎖上で交互のパターンで生じ得るか、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は、交互パターンで両方のヌクレオチド間結合修飾を含む。センス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同一であり得るか、異なり得、センス鎖上のヌクレオチド間結合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結合修飾の交互パターンと比較してシフトを有し得る。

【0070】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、オーバーハング領域に、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、または2つのヌクレオチド間のメチルホスホネートヌクレオチド間結合を有する2つのヌクレオチドを含む。ヌクレオチド間結合修飾はまた、オーバーハングヌクレオチドを二重鎖領域内の末端対合ヌクレオチドと連結させるために行われ得る。例えば、少なくとも2、3、4つ、または全てのオーバーハングヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホロジトエート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合を介して連結され得、任意選択的に、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に隣接した対合ヌクレオチドと連結する、追加のホスホロチオエート、ホスホロジトエート、ホスホネ

ート、ホスホラミデート、メシルホスホラミデート、またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が存在し得る。例えば、末端の3つ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結合が存在し得、3つのヌクレオチドのうちの2つが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に隣接した対合ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、これらの末端の3つのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端にあり得る。

【0071】

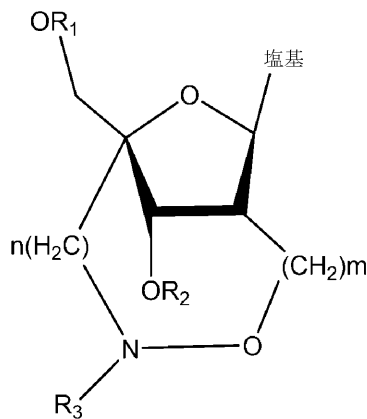
いくつかの実施形態では、dsRNA組成物は、米国特許第7,427,672号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される修飾塩基またはヌクレオシド類似体によって連結される。いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、本明細書に記載される式において、リンカーまたはLと称される。

10

【0072】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、

【化1】



(化学式I)

20

式中、塩基は、置換基を任意選択的に有する芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、 R_1 及び R_2 は、同一または異なるものであり、各々が、水素原子、核酸合成のためのヒドロキシル基の保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基で保護されたリン酸基、または $-P(R_4)R_5$ （式中、 R_4 と R_5 は同一または異なる）を表し、各々が、ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基で保護されたヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基、1～5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、1～6個の炭素原子を有するシアノアルコキシ基、または1～5個の炭素原子を有するアルキル基で置換されたアミノ基を表し、 R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、または機能分子単位の置換基を表し、 m は、0～2の整数を表し、 n は、0～3の整数を表す。いくつかの実施形態では、 m 及び n は、0である。

30

40

【0073】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、またはシリル基である。

【0074】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンス

50

ルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、またはtert-ブチルジフェニルシリル基である。

【0075】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基で保護されたリン酸基である。

10

【0076】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OC_2H_5)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または2-クロロフェニルもしくは4-クロロフェニルホスフェート基である。

【0077】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、1～5個の炭素原子を有するアルケニル基、6～14個の炭素原子を有するアリール基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、メタンスルホニル基またはp-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族または芳香族スルホニル基、アセチル基などの1～5個の炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である。

20

【0078】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、 R_3 としての機能分子単位の置換基は、蛍光または化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、または細胞内もしくは核内移動シグナルペプチドである。

30

【0079】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、塩基は、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、または以下の α 基から選択される置換基を有するプリン-9-イル基もしくは2-オキソピリミジン-1-イル基である： α 基：ヒドロキシシル基、核酸合成のための保護基で保護されたヒドロキシシル基、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基で保護されたメルカプト基、1～5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基によって置換されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、及びハロゲン原子。

40

【0080】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式I及びその塩に示される構造を有し、式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル（すなわち、アデニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する6-アミノプリン-9-イル、2,6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-ア

50

ミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル（すなわち、グアニニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、シトシニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、ウラシニル）、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、チミニル）、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、5-メチルシトシニル）、または核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである。

10

20

【0081】

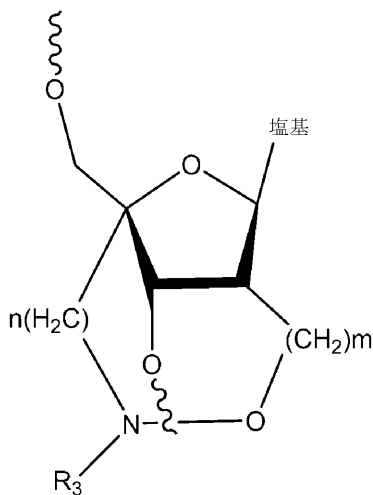
いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I 及びその塩に示される構造を有し、式中、m は、0 であり、n は、1 である。

【0082】

いくつかの実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 II に示される構造を有するヌクレオシド類似体の 1 つ以上のタイプの単位構造、またはその薬理学的に許容される塩のうちの 1 つまたは 2 つ以上を含有する DNA オリゴヌクレオチドまたは RNA オリゴヌクレオチド類似体であるが、但し、オリゴヌクレオチド類似体中のそれぞれのヌクレオシド間の結合の形態が、天然核酸中のものと同じのホスホジエステル結合 [—OP(O₂⁻)O—] に加えて、1 つまたは 2 つ以上のホスホロチオエート結合 [—OP(O)(S⁻)O—]、ホスホロジチオエート結合 [—O₂PS₂—]、ホスホネート結合 [—PO(OH)₂—]、ホスホラミデート結合 [—O=P(OH)₂—]、またはメシルホスホラミデート結合 [—OP(O)(N)(SO₂)(CH₃)O—] を含有し得、1 つ以上のタイプのこれらの構造のうちの 2 つ以上が含まれている場合、塩基は、以下のこれらの構造間で同一であり得るか、または異なり得、

30

【化 2】



(化学式 I I)

40

50

式中、塩基は、置換基を任意選択的に有する芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、 R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、または機能分子単位の置換基を表し、 m は、0～2の整数を表し、 n は、0～3の整数を表す。いくつかの実施形態では、 m 及び n は、0である。

【0083】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、またはシリル基である。

10

【0084】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または $tert$ -ブチルジフェニルシリル基である。

【0085】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族または芳香族スルホニル基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基によって置換されたアリール環を有する1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基で保護されたリン酸基である。

20

【0086】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、 $tert$ -ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OC_2H_3)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または2-クロロフェニルもしくは4-クロロフェニルホスフェート基である。

30

【0087】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、1～5個の炭素原子を有するアルケニル基、6～14個の炭素原子を有するアリール基、1～3個のアリール基によって置換されたメチル基、メタンスルホニル基または p -トルエンスルホニル基などの低級脂肪族または芳香族スルホニル基、アセチル基などの1～5個の炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である。

40

【0088】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、 R_3 としての機能分子単位の置換基は、蛍光または化学発光標識分子、核酸切断活性官能基、または細胞内もしくは核内移動シグナルペプチドである。

【0089】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、塩基は、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、または以下の α 基から選択される置換基を有するプリン-9

50

ーイル基もしくは2-オキソピリミジン-1-イル基である：α基：ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基で保護されたヒドロキシル基、1～5個の炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基で保護されたメルカプト基、1～5個の炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基によって置換されたアミノ基、1～5個の炭素原子を有するアルキル基、及びハロゲン原子。

【0090】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル（すなわち、アデニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル（すなわち、グアニル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、シトシル）、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシプリン-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、ウラシル）、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、チミシル）、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、5-メチルシトシル）、または核酸合成のための保護基で保護されたアミノ基を有する4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである。

【0091】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体またはその薬理学的に許容される塩は、化学式ⅠⅠに示される構造を有し、式中、mは、0であり、nは、1である。

【0092】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物は、ポリマー（ポリマー部分C）をさらに含む。場合によっては、ポリマーは、分岐または非分岐モノマーの長鎖、及び／または2次元もしくは3次元のモノマーの架橋ネットワークからなる、天然または合成ポリマーである。場合によっては、ポリマーは、多糖類、リグニン、ゴム、またはポリアルキレンオキシド（例えば、ポリエチレングリコール）を含む。場合によっては、少なくとも1つのポリマーとしては、アルファー、オメガ-ジヒドロキシルポリエチレングリコール、生分解性ラクトン系ポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリラクチド酸（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート（PET、PETG）、ポリエチレンテレフタレート（PETE）、ポリテトラメチレングリコール（PTG）、またはポリウレタン、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これ

らに限定されない。本明細書で使用される場合、混合物は、ブロックコポリマーに関してだけでなく、同じ化合物内での異なるポリマーの使用を指す。ある場合には、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも1つの部分が別のポリマーのモノマーから構築されるポリマーである。場合によっては、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。場合によっては、ポリマーは、PEGを含む。場合によっては、ポリマーは、ポリエチレンイミド（PEI）またはヒドロキシエチルデンプン（HES）を含む。

【0093】

場合によっては、Cは、PEG部分である。場合によっては、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の5'末端でコンジュゲートされるが、結合部分は、オリゴヌクレオチド分子の3'末端でコンジュゲートされる。場合によっては、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の3'末端でコンジュゲートされるが、結合部分は、オリゴヌクレオチド分子の5'末端でコンジュゲートされる。場合によっては、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の内部部位にコンジュゲートされる。場合によっては、PEG部分、結合部分、またはそれらの組み合わせは、オリゴヌクレオチド分子の内部部位にコンジュゲートされる。場合によっては、コンジュゲーションは、直接コンジュゲーションである。場合によっては、コンジュゲーションは、ネイティブライゲーションを介して行われる。

【0094】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えばPEG）は、多分散または単分散化合物である。場合によっては、多分散材料は、平均重量（重量平均）サイズ及び分散性によって特徴付けられる、材料の異なる分子量の分散分布を含む。場合によっては、単分散PEGは、1つのサイズの分子を含む。いくつかの実施形態では、Cは、多分散または単分散ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、示される分子量は、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）分子の分子量の平均を表す。

【0095】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）の分子量は、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daである。

【0096】

いくつかの実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの

分子量を有する。場合によっては、Cの分子量は、約200Daである。場合によっては、Cの分子量は、約300Daである。場合によっては、Cの分子量は、約400Daである。場合によっては、Cの分子量は、約500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約600Daである。場合によっては、Cの分子量は、約700Daである。場合によっては、Cの分子量は、約800Daである。場合によっては、Cの分子量は、約900Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1100Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1200Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1300Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1400Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1450Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1600Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1700Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1800Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1900Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2100Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2200Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2300Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2400Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2600Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2700Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2800Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2900Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3250Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3350Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3750Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4250Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4600Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4750Daである。場合によっては、Cの分子量は、約5000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約5500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約6000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約6500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約7000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約7500Daである。場合によっては、Cの分子量は、約8000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約10,000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約12,000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約20,000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約35,000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約40,000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約50,000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約60,000Daである。場合によっては、Cの分子量は、約100,000Daである。

10

20

30

40

50

【0097】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、別個のPEGであり、別個のPEGは、1つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマーPEGである。場合によっては、別個のPEG（dPEG）は、2～60、2～50、または2～48個の反復エチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50個またはそれ以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、約2個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、約3個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、約4個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、約5個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、約6個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、約7個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、dPEGは、約8個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、

、d P E Gは、約9個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約10個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約11個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約12個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約13個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約14個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約15個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約16個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約17個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約18個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約19個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約20個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約22個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約24個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約26個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約28個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約30個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約35個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約40個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約42個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約48個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E Gは、約50個またはそれ以上の反復エチレンオキシド単位を含む。ある場合には、d P E Gは、段階的な方法において純粋な（例えば、約95%、98%、99%、または99.5%）出発材料（starting material）から単一の分子量化合物として合成される。ある場合には、d P E Gは、平均分子量ではなく、特定の分子量を有する。ある場合には、本明細書に記載されるd P E Gは、Quanta Biodesign、LMDのd P E Gである。

10

20

【0098】

いくつかの実施形態では、Cは、アルブミン結合ドメインである。ある特定の態様では、アルブミン結合ドメインは、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）に特異的に結合して、ドメインまたはアルブミン結合ドメインが関連するかまたは結合している別の治療薬の半減期を延長する。いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミン結合ドメインは、分子のN末端に連結された開始剤メチオニン（Met）を含む。いくつかの実施形態では、ヒト血清アルブミン結合ドメインは、ドメインのC末端またはN末端に連結されたシステイン（Cys）を含む。N末端Met及び／またはC末端Cysの添加は、P E G、Fc領域などの別の半減期延長分子であり得る、別の分子への発現及び／またはコンジュゲーションを促進し得る。

30

【0099】

いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、以下の表1に提供される、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメイン（タンパク質）は、単離される。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一

40

50

であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含むが、但し、タンパク質は、配列番号 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に相当する置換を有するものとする。いくつかの実施形態では、置換は、A10Vである。いくつかの実施形態では、置換は、A10G、A10L、A10I、A10T、またはA10Sである。いくつかの実施形態では、10位の置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、単離されたアルブミン結合ドメインは、配列番号 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と比較した場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14の置換を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、置換は、配列番号 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の位置10に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、提供されるFN3ドメインは、配列番号 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の残基位置6、11、22、25、26、52、53、61、88、または位置6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、もしくは93に対応する少なくとも1つの残基位置に、またはC末端でシステイン残基を含む。位置は一連に列挙されているが、各位置はまた、個別に選択され得る。いくつかの実施形態では、システインは、位置6、53、または88に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインの追加の例は、米国特許第10,925,932号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1

配列番号	配列
101	MLPAPKNLVASRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
102	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
103	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFAIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
104	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNISYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
105	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYAEPGIGGEAIWLRVPGSERSYDL TGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
106	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEAGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
107	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPAGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
108	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGAGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
109	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIAGEAIWLRVPGSERSYDL TGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
110	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIALRVPGSERSYDL TGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
111	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLAVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
112	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
113	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
114	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIAGVKGGASSPPLIARFTT
115	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGSSPPLIARFTT
116	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGAASPPLIARFTT
117	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSAPLIARFTT

10

20

30

40

【表 1 - 2】

118	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLAARFTT
119	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIWLRVPGSERSYD LTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIAAFTT

50

【0100】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、標的との、二本鎖内の、またはそれらの組み合わせとのミスマッチ（複数可）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で生じ得る。塩基対は、解離または融解（例えば、特定の対合の結合または解離の自由エネルギーに対してであり、最も単純なアプローチは、個々の対ベースで対を評価することであるが、類縁または同様の分析を用いることもできる）を促進するそれらの傾向に基づいてランク付けすることができる。解離の促進に関しては、A：Uは、G：Cよりも好ましく、G：Uは、G：Cよりも好ましく、I：Cは、G：Cよりも好ましい（I＝イノシン）。ミスマッチ、例えば、非正準な対合または正準以外の対合（本明細書の他の箇所に記載される）は、正準な対合（A：T、A：U、G：C）よりも好ましく、ユニバーサル塩基を含む塩基対は、正準な対合よりも好ましい。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、dsRNA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むことができる。5'末端リン含有基は、5'末端リン酸塩（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'-PS₂）、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）、5'末端メシルホスホラミデート（5'-MsPA）、または5'-デオキシ-5'-C-マロニルであり得る。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、トランス-ビニルホスフェートまたはシス-ビニルホスフェートなどの5'-E-VP異性体、またはそれらの混合物のいずれかであり得る。これらの修飾の代表的な構造は、例えば、米国特許第10,233,448号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

20

【0102】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド類似体または合成ヌクレオチド塩基は、リボース部分の2'ヒドロキシル基に修飾を有する核酸を含む。場合によっては、修飾は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、またはCNを含み、式中、Rは、アルキル部分である。例示的なアルキル部分としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、C₁-C₁₀鎖長の直鎖及び分岐鎖の両方が挙げられるが、これらに限定されない。場合によっては、アルキル部分は、修飾をさらに含む。場合によっては、修飾は、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシル基、ニトロ基、ニトロソ基、ニトリル基、複素環（例えば、イミダゾール、ヒドラジンもしくはヒドロキシルアミノ）基、イソシアネートもしくはシアネート基、または硫黄含有基（例えば、スルホキシド、スルホン、スルフィド、及びジスルフィド）を含む。場合によっては、アルキル部分は、O、S、N、Seなどの追加のヘテロ原子をさらに含み、これらのヘテロ原子の各々は、上記のようなアルキル基でさらに置換され得る。場合によっては、複素環式基の炭素は、窒素、酸素、または硫黄によって置換される。場合によっては、複素環の置換としては、モルホリノ、イミダゾール、及びピロリジノが挙げられるが、これらに限定されない。

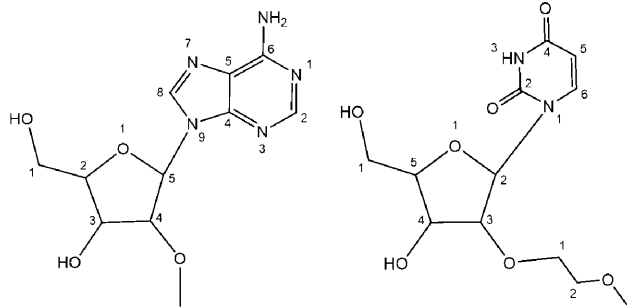
30

【0103】

場合によっては、2'ヒドロキシル基における修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）修飾である。アデノシン分子の2'-O-メチル修飾及びウリジンの2'-O-メトキシエチル修飾の例示的な化学構造を、以下に示す。

40

【化 3】



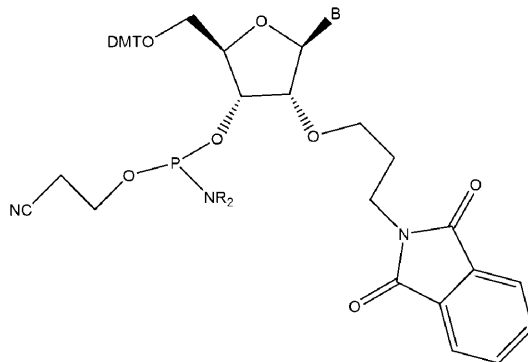
2' -O-メチル-アデノシン 2' -O-メトキシエチルウリジン

10

【0104】

場合によっては、2' ヒドロキシル基における修飾は、プロピルリンカーを含む伸長アミン基がアミン基を2' 酸素に結合する2' -O-アミノプロピル修飾である。場合によっては、この修飾は、1糖当たりアミン基から1つの正電荷を導入することによって、オリゴヌクレオチド分子のリン酸由来の全体的な負電荷を中和し、それによって、その双性イオン特性に起因する細胞取り込み特性を改善する。2' -O-アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイトの例示的な化学構造を、以下に示す。

【化 4】



2' -O-アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイト

20

30

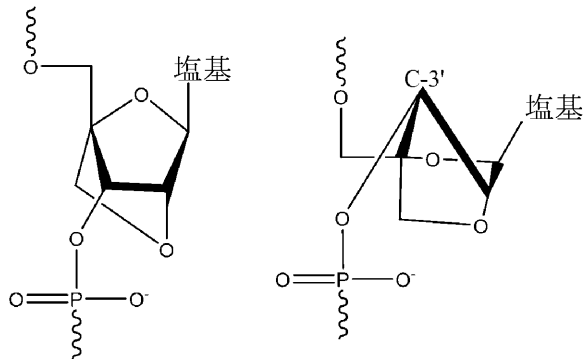
【0105】

場合によっては、2' ヒドロキシル基における修飾は、2' 炭素で結合された酸素分子がメチレン基によって4' 炭素に結合し、したがって、2' -C、4' -C-オキシーメチレン結合二環式リボヌクレオチドモノマーを形成する、ロックまたは架橋リボース修飾（例えば、ロック核酸またはLNA）である。LNAの化学構造の例示的な描図を、以下に示す。左方に示した描図は、LNAモノマーの化学連結性を強調する。右方に示した描図は、LNAモノマーのフラノース環のロックされた3'-エンド（3E）コンフォメーションを強調する。

40

50

【化 5】



LNA (ロック核酸)

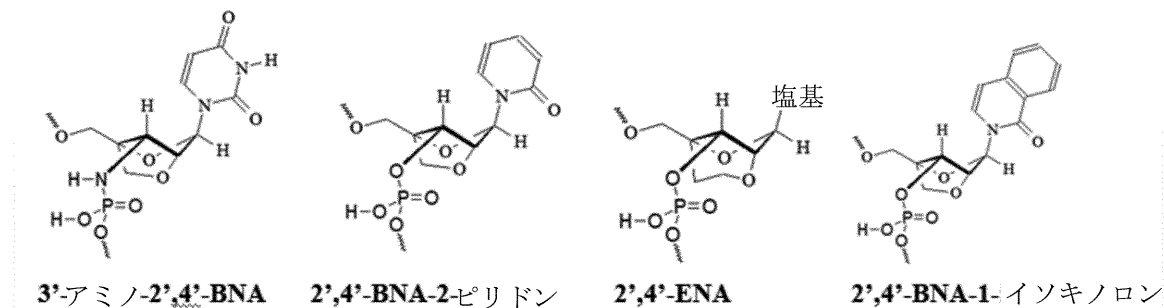
10

【0106】

場合によっては、2' ヒドロキシル基における修飾は、例えば、2' - 4' - エチレン架橋核酸などのエチレン核酸 (ENA) を含み、これは、糖コンフォメーションを C 3' - エンド糖バックリング (puckering) コンフォメーションの中へロックする。ENA は、LNA も含む修飾核酸の架橋型核酸群の一部である。ENA 及び架橋核酸の例示的な化学構造を、以下に示す。

【化 6】

20



30

【0107】

いくつかの実施形態では、2' ヒドロキシル基における追加の修飾には、2' - デオキシ、2' - デオキシ-2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O - AP)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - DMAOE)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - DMAP)、2' - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - DMAEOE)、または 2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - NMA) が含まれる。

【0108】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド類似体は、5 - プロピニルウリジン、5 - プロピニルシチジン、6 - メチルアデニン、6 - メチルグアニン、N, N, - ジメチルアデニン、2 - プロピルアデニン、2 - プロピルグアニン、2 - アミノアデニン、1 - メチルイノシン、3 - メチルウリジン、5 - メチルシチジン、5 - メチルウリジン及び 5 位に修飾を有する他のヌクレオチド、5 - (2 - アミノ) プロピルウリジン、5 - ハロシチジン、5 - ハロウリジン、4 - アセチルシチジン、1 - メチルアデノシン、2 - メチルアデノシン、3 - メチルシチジン、6 - メチルウリジン、2 - メチルグアノシン、7 - メチルグアノシン、2, 2 - ジメチルグアノシン、5 - メチルアミノエチルウリジン、5 - メチルオキシウリジン、7 - デアザアデノシンなどのデアザヌクレオチド、6 - アズリジン、6 - アゾシチジン、6 - アゾチミジン、5 - メチル-2 - チオウリジン、2 - チオウリジン及び 4 - チオウリジン及び 2 - チオシチジンなどの他のチオ塩基、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチル及び置換ナフチル基、任意の O - 及び N - アルキル化プリン及びピリミジン、例えば、N 6 - メチルアデノシン、5 - メ

40

50

チルカルボニルメチルウリジン、ウリジン 5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル及び修飾フェニル基、例えば、アミノフェノールまたは 2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、G-c l a m p ヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8-置換アデニン及びグアニン、5-置換ウラシル及びチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、ならびにアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドなどであるが、これらに限定されない、修飾塩基を含む。修飾ヌクレオチドはまた、糖部分に関して修飾されたヌクレオチド、ならびにリボシルではない糖またはその類似体を有するヌクレオチドも含まれる。例えば、糖部分は、場合によっては、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、及び他の糖、複素環、または炭素環であるか、またはそれに基づいている。ヌクレオチドという用語には、当該技術分野でユニバーサル塩基として知られているものも含まれる。例として、ユニバーサル塩基には、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネブラリンが含まれるが、これらに限定されない。

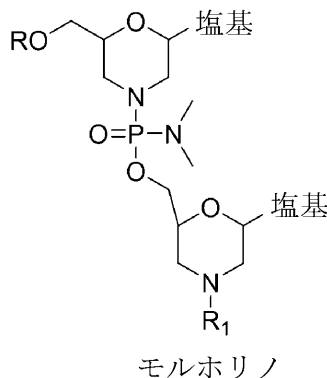
10

【0109】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド類似体は、モルホリノ、ペプチド核酸 (PNA)、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロ N3-P5'-ホスホラミダイト、1', 5'-アンヒドロヘキシトール核酸 (HNA)、またはそれらの組み合わせをさらに含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴ (PMO) は、その構造が通常の糖及びリン酸構造からの逸脱によって天然の核酸構造を模倣する合成分子を含む。場合によっては、5員リボース環は、4個の炭素、1個の窒素、及び1個の酸素を含有する6員モルホリノ環で置換される。ある場合には、リボースモノマーは、リン酸基の代わりにホスホロジアミデート基によって連結される。そのような場合、骨格改変は、全ての正及び負の電荷を除去して、モルホリノを、荷電性オリゴヌクレオチドによって使用されるような細胞送達剤の手助けなしに細胞膜を横断することができる中性分子にすることを可能にする。

20

【化7】



30

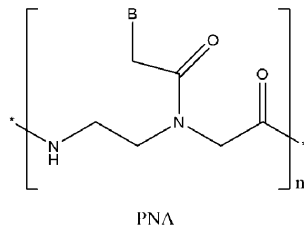
【0110】

いくつかの実施形態では、ペプチド核酸 (PNA) は、糖環またはリン酸結合を含まず、塩基は、オリゴグリシン様分子に付いて、それによって適切に整えられるので、骨格電荷を消失させる。

40

50

【化 8】



【0111】

10

いくつかの実施形態では、1つ以上の修飾は、任意選択的に、ヌクレオチド間結合において生じる。場合によっては、修飾ヌクレオチド間結合としては、ホスホロチオエート、メシルホスホルアミデート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、5'-メチルホスホネート、3'-アルキレンホスホネート、三フッ化ホウ素、3'-5'結合または2'-5'結合のボラノリン酸エステル及びセレノホスフェート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸水素結合、アルキルホスホネート、アルキルホスホチオエート、アリールホスホチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスフィネート、ホスホラミデート、3'-アルキルホスホラミデート、アミノアルキルホスホラミデート、チオノホスホラミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホロアニルチオエート、ホスホロアニリデート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、炭酸塩、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノス、メチレンメチルイミノ、チオアミデート、リボアセチル基との結合、アミノエチルグリシン、シリルまたはシロキサン結合、例えば、飽和もしくは不飽和及び／または置換される及び／またはヘテロ原子を含む1～10個の炭素のヘテロ原子の有無にかかわらず、アルキルまたはシクロアルキル結合、モルホリノ構造との結合、アミド、塩基が骨格のアザニトロゲンに直接的または間接的に結合しているポリアミド、ならびにそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド (P S A S O) は、ホスホロチオエート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。メシルホスホラミデートアンチセンスオリゴヌクレオチド (M s P A A S O) は、メシルホスホラミデート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

30

【0112】

場合によっては、修飾は、メチルホスホネート、メシルホスホラミデート、またはチオールホスホネート修飾などのメチルまたはチオール修飾である。場合によっては、修飾ヌクレオチドは、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含むが、これに限定されない。

【0113】

場合によっては、修飾ヌクレオチドは、ヘキシトール核酸（または1', 5'-アンヒドロヘキシトール核酸 (H N A)）を含むが、これに限定されない。

40

【0114】

いくつかの実施形態では、1つ以上の修飾は、任意選択的に、リボース部分、リン酸骨格及びヌクレオシドの修飾、または3'もしくは5'末端におけるヌクレオチド類似体の修飾をさらに含む。例えば、3'末端は、任意選択的に、3'カチオン基を含むか、または3'-3'結合を有する3'末端でヌクレオシドを反転させることによって。別の代替において、3'末端は、任意選択的に、アミノアルキル基、例えば、3' C5-アミノアルキル d Tとコンジュゲートされる。さらなる代替において、3'末端は、任意選択的に、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位または脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。場合によっては、5'末端は、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アルキルアミノ置換基とコンジュゲートされる。ある場合には、5'末端は、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位ま

50

たは脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。

【0115】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、もしくは2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、もしくは2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせから選択される、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25個、またはそれを超える、チオールホスホネートヌクレオチドを含む。

【0116】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、約5%~約100%の修飾、約10%~約100%の修飾、約20%~約100%の修飾、約30%~約100%の修飾、約40%~約100%の修飾、約50%~約100%の修飾、約60%~約100%の修飾、約70%~約100%の修飾、約80%~約100%の修飾、及び約90%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、100%修飾を含む。

【0117】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約90%の修飾、約20%~約90%の修飾、約30%~約90%の修飾、約40%~約90%の修飾、約50%~約90%の修飾、約60%~約90%の修飾、約70%~約90%の修飾、及び約80%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0118】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約80%の修飾、約20%~約80%の修飾、約30%~約80%の修飾、約40%~約80%の修飾、約50%~約80%の修飾、約60%~約80%の修飾、及び約70%~約80%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0119】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約70%の修飾、約20%～約70%の修飾、約30%～約70%の修飾、約40%～約70%の修飾、約50%～約70%の修飾、及び約60%～約70%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0120】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約60%の修飾、約20%～約60%の修飾、約30%～約60%の修飾、約40%～約60%の修飾、及び約50%～約60%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0121】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約50%の修飾、約20%～約50%の修飾、約30%～約50%の修飾、及び約40%～約50%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

10

【0122】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約40%の修飾、約20%～約40%の修飾、及び約30%～約40%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0123】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約30%の修飾、及び約20%～約30%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0124】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約10%～約20%の修飾を含む。

20

【0125】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、約15%～約90%、約20%～約80%、約30%～約70%、または約40%～約60%の修飾を含む。

【0126】

追加の場合には、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の修飾を含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40の修飾を含む。

30

【0128】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、または約40個の修飾ヌクレオチドを含む。

【0129】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約5～約100%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約5%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約10%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約15%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約20%は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴ

40

50

ヌクレオチド分子の約 25% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 30% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 35% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 40% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 45% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 50% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 55% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 60% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 65% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 70% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 75% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 80% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 85% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 90% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 95% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 96% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 97% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 98% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 99% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子の約 100% は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-APP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または 2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) 修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロ N3-P5'-ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせを含む。

【0130】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 1~約 25 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 1 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 2 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 3 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 4 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 5 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 6 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 7 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 8 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。い

50

ド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 39 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、約 40 個の修飾を含み、その修飾は、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体を含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、2つの別個のポリヌクレオチドから組み立てられ、1つのポリヌクレオチドは、センス鎖を含み、第2のポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド分子のアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖は、リンカー分子を介してアンチセンス鎖に接続されており、場合によっては、ポリヌクレオチドリナーまたは非ヌクレオチドリナーである。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖中のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖に存在するピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖に存在するプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。

20

【0134】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、当該アンチセンス鎖中に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

【0135】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、複数の（例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上など）2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、複数の2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つは、連続したヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、連続した2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する。いくつかの実施形態では、連続した2'-O-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の3'末端に位置する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、その5'末端及び／または3'末端に、あるいは、その両方で少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。任意選択的に、そのような実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、ポリヌクレオチドの5'末端で少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドの3'末端で、またはポリヌクレオチドの3'末端で少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドの5'末端で、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。また、任意選択的に、そのような少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、連続したヌクレオチドである。

30

40

50

【0136】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の3'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、プリンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、センス鎖及び／またはアンチセンス鎖の5'末端に位置する2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドである。

10

【0137】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの1つは、5'末端に位置する少なくとも2つの連続した2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有するが、別の鎖は、5'末端に位置する少なくとも2つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、鎖は、5'末端に位置する少なくとも2つの連続した2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する場合、鎖はまた、少なくとも2つの連続した2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドの3'末端に少なくとも2つの、少なくとも3つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドも含む。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の1つは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有し、その5'末端及び／または3'末端に2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドに連結されている。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖のうちの1つは、交互に2'-O-メチル修飾ヌクレオチド及び2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する少なくとも4つ、少なくとも5つのヌクレオチドを有する。

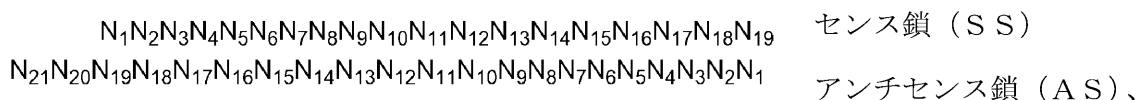
20

【0138】

いくつかの実施形態では、s i R N Aなどのオリゴヌクレオチド分子は、式Iに示されており、

【化9】

30



ここで、Nで表される各ヌクレオチドは、独立して、A、U、C、もしくはG、または本明細書で提供されるものなどの修飾ヌクレオチド塩基である。センス鎖及びアンチセンス鎖のN₁ヌクレオチドは、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確にするために、式Iは、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方でN₁、N₂、N₃などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同一である必要はなく、同一であることが意図されていない。式Iに示されるs i R N Aは、標的配列に相補的であろう。

40

【0139】

例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖は、N₁及びN₂にホスホロチオエート (P S) 修飾骨格を有する2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、N₃、N₇、N₈、N₉、N₁₂、及びN₁₇に2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₄、N₅、N₆、N₁₀、N₁₁、N₁₃、N₁₄、N₁₅、N₁₆、N₁₈、及びN₁₉に2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0140】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、N₁に結合したビニルホスホネート部分、N₂にホスホロチオエート (P S) 修飾骨格を有する2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、

50

【 0 1 4 1 】

【 0 1 4 2 】

【 0 1 4 3 】

【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、約1〜約25個、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホルアミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含み、アンチセンス鎖は、約1

50

～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス及び／またはアンチセンス鎖の1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、約1～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または同じもしくは異なる鎖に存在する、3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子の有無にかかわらず、2'-デオキシ、2'-O-メチル、及び／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾される。

10

【0145】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／またはセンス鎖及び／またはアンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、約1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、約1～約10個以上、具体的には、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス及び／またはアンチセンス鎖の1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または同じもしくは異なる鎖に存在する、3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子の有無にかかわらず、2'-デオキシ、2'-O-メチル、及び／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾される。

20

30

40

【0146】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、約1～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2

50

、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含み、アンチセンス鎖は、約1～約25個、またはそれ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホロアミデート、もしくはメシルホスホロアミデートヌクレオチド間結合、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び／または1個以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上）のユニバーサル塩基修飾ヌクレオチド、ならびに任意選択的に、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス及び／またはアンチセンス鎖の1個以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、約1～約5個、例えば、約1、2、3、4、5個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合、及び／または同じもしくは異なる鎖に存在する、3'末端、5'末端、または3'及び5'末端の両方で末端キャップ分子の有無にかかわらず、2'-デオキシ、2'-O-メチル、及び／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾される。

10

20

30

40

【0147】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子の各鎖において、約1～約25個、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、もしくはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合を有する、化学修飾された低分子干渉核酸分子である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端にリン酸骨格修飾を含む。代替的及び／または追加的に、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端にリン酸骨格修飾を含む。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホロチオエートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホロジチオエートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホネートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、ホスホラミデートである。場合によっては、リン酸骨格修飾は、メシルホスホラミデートである。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのホスホロチオエート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのホスホロジチオエート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのホスホネート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。いくつかの実施形態では、センスまたはアンチセンス鎖は、2つのメシルホスホラミデート骨格を介して結合する3つの連続したヌクレオシドを有する。

【0148】

別の実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、2'-5'ヌク

50

レオチド間結合を含む。場合によっては、2' - 5' ヌクレオチド間結合（複数可）は、一方または両方の配列鎖の3' 末端、5' 末端、または3' 末端及び5' 末端の両方にある。場合によっては、2' - 5' ヌクレオチド間結合（複数可）は、一方または両方の配列鎖内の様々な他の位置に存在し、例えば、オリゴヌクレオチド分子の一方または両方の鎖のピリミジンヌクレオチドの全てのヌクレオチド間結合を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むか、またはオリゴヌクレオチド分子の一方または両方の鎖のプリンヌクレオチドの全てのヌクレオチド間結合を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、細胞内のRNAi 活性を媒介するか、またはインビトロ系で再構成される一本鎖分子であり、ここで、オリゴヌクレオチド分子は、標的核酸配列と相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、オリゴヌクレオチド分子中に存在する1つ以上のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全てのピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、または交互に複数のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、オリゴヌクレオチド分子中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチド（例えば、全てのプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドであるか、または交互に複数のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドである）、及びアンチセンス配列の3' 末端、5' 末端、または3' 末端及び5' 末端の両方に任意選択的に存在する末端キャップ修飾であり、オリゴヌクレオチド分子は、任意選択的に、オリゴヌクレオチド分子の3' 末端に、約1〜約4個（例えば、約1、2、3、または4個）の末端2' - デオキシヌクレオチドをさらに含み、末端ヌクレオチドは、1個以上（例えば、1、2、3、または4個）のホスホロチオエートまたはメシルホスホラミデートヌクレオチド間結合をさらに含み、オリゴヌクレオチド分子は、任意選択的に、5' 末端リン酸基などの末端リン酸基をさらに含む。

【0150】

場合によっては、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上は、天然ポリ核酸分子及びエンドヌクレアーゼと比較した場合、ヌクレアーゼ、例えば、RNAse Hなどのリボヌクレアーゼ、DNAse などのデオキシリボヌクレアーゼ、または5' - 3' エキソヌクレアーゼ及び3' - 5' エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼに対して耐性がある。場合によっては、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル（2' - O - MOE）、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、2' - デオキシ-2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル（2' - O - AP）、2' - O - ジメチルアミノエチル（2' - O - DMAOE）、2' - O - ジメチルアミノプロピル（2' - O - DMAP）、2' - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル（2' - O - DMAEOE）、または2' - O - N - メチルアセトアミド（2' - O - NMA）修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メシルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2' - フルオロN3 - P5' - ホスホラミダイト、またはそれらの組み合わせを含む合成ヌクレオチド類似体は、ヌクレアーゼ、例えば、RNAse Hなどのリボヌクレアーゼ、DNAse などのデオキシリボヌクレアーゼ、または5' - 3' エキソヌクレアーゼ及び3' - 5' エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼに対して耐性がある。場合によっては、2' - O - メチル修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNAse H、DNAse、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、または3' - 5' エキソヌクレアーゼ耐性）である。場合によっては、2' - O - メトキシエチル（2' - O - MOE）修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNAse H、DNAse、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、または3' - 5' エキソヌクレアーゼ耐性）である。場合によっては、2' - O - アミノプロピル修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNAse H、DNAse、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、または3' - 5' 50

エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-デオキシ修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、HNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、モルホリノは、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、メチルホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、チオールホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNase H、DNase、5'-3'エキソヌクレアーゼ、または3'-5'エキソヌクレアーゼ耐性)である。場合によっては、本明細書に記載される5'コンジュゲートは、5'-3'エキソヌクレオチド分解切断を阻害する。場合によっては、本明細書に記載される3'コンジュゲートは、3'-5'エキソヌクレオチド分解切断を阻害する。

【0151】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチル

ホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、または2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含む合成ヌクレオチド類似体のうちの1つ以上は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-メチル修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-アミノプロピル修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-デオキシ修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、それらのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、HNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価の天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、モルホリノ修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、メチルホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、チオールホスホネートヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。場合によっては、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、等価な天然ポリ核酸分子と比較して、そのmRNA標的に対する結合親和性が増加している。ある場合には、増加した親和性は、より低いKd、より高い融解温度(Tm)、またはそれらの組み合わせで示されている。

【0152】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、キラル純粋な(またはステレオ純粋な)ポリ核酸分子、または単一の鏡像異性体を含むポリ核酸分子である。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、L-ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、D-ヌクレオチドを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子組成物は、その鏡像異性体の30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子組成物は、ラセミ混合物の30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下含む。

【0153】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、アプタマー共役部分を含むようにさらに修飾される。場合によっては、アプタマー共役部分は、DNAアプタマー共役部分である。場合によっては、アプタマー結合部分は、特異的な細胞表面標的を認識するアプタマー部分、及び循環抗体に結合するための特異的なエピトープを提示する部分を含むアルファマーである。

【0154】

追加の実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増加させるように修飾される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、RNA（例えば、siRNA）である。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増加させるために、上記の修飾のうちの1つ以上によって修飾される。ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、例えば、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）、または2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）修飾によって、またはロックもしくは架橋リボースコンフォメーション（例えば、LNAもしくはENA）によって、2'-ヒドロキシル位置で修飾される。ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル及び／または2'-O-メトキシエチルリボースによって修飾される。ある場合には、オリゴヌクレオチド分子はまた、その安定性を増加させるために、モルホリノ、PNA、HNA、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、及び／または2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトも含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、キラル純粋な（またはステレオ純粋な）オリゴヌクレオチド分子である。場合によっては、キラル純粋な（またはステレオ純粋な）オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増加させるように修飾される。送達のための安定性を増加させるためのRNAへの好適な修飾は、当業者には明らかであろう。

【0155】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、2'修飾を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖の5'末端から位置3、7、8、9、12、及び17でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾で修飾されない。いくつかの実施形態では、センス鎖の5'末端から位置3、7、8、9、12、及び17でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置2及び14でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾で修飾されない。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置2及び14でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドのうちのいずれも、5'-ホスホロチオエート基修飾をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、センス鎖の5'末端から位置1及び2でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置1、2、20、及び21でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基修飾で修飾される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンスまたはアンチセンス鎖の5'末端は、ビニルホスホネート修飾をさらに含んでもよい。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から位置1でのオリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、ビニルホスホネート修飾で修飾される。

【0156】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性センス及びアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であり、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。場合によっては、オリ

ゴヌクレオチド分子は、2つの別個のポリヌクレオチドから組み立てられ、一方の鎖は、センス鎖であり、もう一方の鎖は、アンチセンス鎖及びセンス鎖が自己相補的であり（例えば、各鎖は、他の鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、例えば、アンチセンス鎖及びセンス鎖が、二重鎖または二本鎖構造を形成する場合、例えば、二本鎖領域が、約19、20、21、22、23個、またはそれ以上の塩基対である）、アンチセンス鎖は、標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を含む。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ、オリゴヌクレオチド分子の自己相補性センス及びアンチセンス領域は、核酸ベースまたは非核酸ベースのリンカー（複数可）によって連結される。

10

【0157】

ある場合には、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補的センス及びアンチセンス領域を有する、二重鎖、非対称二重鎖、ヘアピンまたは非対称ヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであり、アンチセンス領域は、別個の標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。他の場合には、オリゴヌクレオチド分子は、2つ以上のループ構造を有する環状一本鎖ポリヌクレオチド、及び自己相補的センス及びアンチセンス領域を含むステムであり、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部分のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、及び標的核酸配列またはその一部分に対応するヌクレオチド配列を有するセンス領域を含み、環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロのいずれかで処理されて、RNAiを媒介することができる活性オリゴヌクレオチド分子を生成する。追加の場合には、オリゴヌクレオチド分子はまた、標的核酸分子またはその一部におけるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドも含み（例えば、そのようなオリゴヌクレオチド分子が、その標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列のオリゴヌクレオチド分子内での存在を必要としない場合）、その一本鎖ポリヌクレオチドは、末端リン酸基、例えば、5'-リン酸基、または5', 3'-二リン酸基をさらに含む。

20

【0158】

場合によっては、非対称ヘアピンは、アンチセンス領域と、ヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むループ部分と、センス領域が、アンチセンス領域と塩基対に対して十分な相補的なヌクレオチドを有し、ループを用いて二重鎖を形成する程度まで、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含むセンス領域とを含む線形オリゴヌクレオチド分子である。例えば、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子は、細胞またはインビトロ系におけるRNAiを媒介するのに十分な長さ（例えば、約19～約22ヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、約4～約8ヌクレオチドを含むループ領域と、アンチセンス領域に相補的な約3～約18ヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。ある場合には、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子はまた、化学修飾された5'末端リン酸基も含む。追加の場合には、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子のループ部分は、ヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカー分子、または共役分子を含む。

30

【0159】

いくつかの実施形態では、非対称二重鎖は、センス領域及びアンチセンス領域を含む2つの別個の鎖を有するオリゴヌクレオチド分子であり、センス領域は、センス領域がアンチセンス領域と塩基対を有し、二重鎖を形成するのに十分な相補的なヌクレオチドを有する程度まで、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含む。例えば、非対称二重鎖オリゴヌクレオチド分子は、細胞またはインビトロ系におけるRNAiを媒介するのに十分な長さ（例えば、約19～約22ヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、アンチセンス領域に相補的な約3～約19ヌクレオチドを有するセンス領域と、を含む。

40

【0160】

ある場合には、ユニバーサル塩基は、天然のDNA/RNA塩基の各々と、それらの間でほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を指す。ユニバーサル塩

50

基の非限定的な例としては、当該技術分野で周知であるように、C-フェニル、C-ナフチル、及び他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、ならびに3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、及び6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体が挙げられる。

【0161】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤は、5'ホスホリル化されるか、または5'プライム末端にホスホリル類似体を含む。5'ホスフェート修飾は、RISC媒介遺伝子サイレンシングと適合するものを含む。好適な修飾としては、以下が挙げられる：5'-リボン酸塩（ $(\text{HO}_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$ ）；5'-ニリン酸塩（ $(\text{HO}_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ）；5'-三リン酸塩（ $(\text{HO}_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$ ）；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化または非メチル化）（ $7\text{m-G-O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$ ）；5'-アデノシンキャップ（Appp）；及び任意の修飾または非修飾ヌクレオチドキャップ構造（ $\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ ）；5'-モノチオホスフェート（ホスホロチオエート）； $(\text{HO}_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5')$ ；5'-モノジチオホスフェート（ホスホロジチオエート）； $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$ ）；5'-ホスホロチオエート（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$ ）；ホスホロジチオエート $[-\text{O}_2\text{PS}_2-]$ ；ホスホネート $[-\text{PO}(\text{OH})_2-]$ ；ホスホラミデート $[-\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2-]$ ；メシルホスホラミデート $(\text{CH}_3)(\text{SO}_2)(\text{N})\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-5'$ ）；酸素／硫黄置換ーリン酸塩、ニリン酸塩、及び三リン酸塩（例えば、5'-アルファーチオトリホスフェート、5'-ガンマーチオトリホスフェートなど、5'-ホスホラミデート（ $(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ ）；5'-アルキルホスホネート（ $\text{R}=\text{アルキル}=\text{メチル}$ 、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ 、5'-アルケニルホスホネート（すなわち、ビニル、置換ビニル）、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$ ）、5'-アルキルホスホネート（ $\text{R}=\text{アルキルエーテル}=\text{メトキシメチル}(\text{MeOCH}_2-)$ 、エトキシメチルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ ）。いくつかの実施形態では、修飾は、dsRNA剤のアンチセンス鎖に配置することができる。

【0162】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子の配列は、GYS1の標的配列に少なくとも40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または99.5%相補的である。いくつかの実施形態では、GYS1の標的配列は、GYS1における約10~50塩基対長、約15~50塩基対長、15~40塩基対長、15~30塩基対長、または15~25塩基対長配列の核酸配列であり、標的配列の第1のヌクレオチドは、コード領域におけるGYS1 mRNA転写産物における、または5'もしくは3'非翻訳領域（UTR）における任意のヌクレオチドで開始する。例えば、標的配列の第1のヌクレオチドは、それがGYS1 mRNAのコードまたは非コード領域（5'または3'非翻訳領域）内の核酸位置（nal、GYS1 mRNAの完全長の5'末端から始まる数、例えば、5'末端の第1のヌクレオチドがnal.1である）1、nal 2、nal 3、nal 4、nal 5、nal 6、nal 7、nal 8、nal 9、nal 10、nal 11、nal 12、nal 13、nal 14、nal 15、nal 15、nal 16、nal 17、または任意の他の核酸位置で始まるように選択することができる。いくつかの実施形態では、標的配列の第1のヌクレオチドは、それがnal 10~nal 15、nal 10~nal 20、nal 50~nal 60、nal 55~nal 65、nal 75~nal 85、nal 95~nal 105、nal 135~nal 145、nal 155~nal 165、nal 225~nal 235、nal 265~nal 275、nal 275~nal 245、nal 245~nal

255、nal 285～nal 335、nal 335～nal 345、nal
 385～nal 395、nal 515～nal 525、nal 665～nal
 675、nal 675～nal 685、nal 695～nal 705、nal
 705～nal 715、nal 875～nal 885、nal 885～nal
 895、nal 895～nal 905、nal 1035～nal 1045、na
 l 1045～nal 1055、nal 1125～nal 1135、nal 11
 35～nal 1145、nal 1145～nal 1155、nal 1155～n
 al 1165、nal 1125～nal 1135、nal 1155～nal 1
 165、nal 1225～nal 1235、nal 1235～nal 1245、
 nal 1275～nal 1245、nal 1245～nal 1255、nal
 1265～nal 1275、nal 1125～nal 1135、nal 1155
 ～nal 1165、nal 1225～nal 1235、nal 1235～nal
 1245、nal 1275～nal 1245、nal 1245～nal 1255
 、nal 1265～nal 1275、nal 1275～nal 1285、nal
 1335～nal 1345、nal 1345～nal 1355、nal 1525
 ～nal 1535、nal 1535～nal 1545、nal 1605～nal
 1615、nal 1615～c. 1625、nal 1625～nal 1635、n
 al 1635～1735、nal 1735～1835、nal 1835～1935
 、nal. 1836～1856、nal 1935～2000、nal 2000～21
 00、nal 2100～2200、nal 2200～2260、nal 2260～
 2400、nal 2400～2500、nal 2500～2600、nal 260
 0～2700、nal 2700～2800、nal 2800～2500、nal 2
 500～2600、nal 2600～2700、nal 2700～2800、nal
 2800～2860などの内で、またはその間で位置で始まるように選択することができ
 る。いくつかの実施形態では、GYS1 mRNAの配列は、NCBI参照配列：NM__
 002103として提供される。

10

20

30

40

【0163】

いくつかの実施形態では、dsRNA剤のアンチセンス鎖は、標的RNAに100%相
 補的であり、それにハイブリダイズし、RNA干渉を介してその発現を阻害する。標的R
 NAは、細胞中で発現される任意のRNAであり得る。別の実施形態では、細胞は、腫瘍
 細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、または中枢神経系の細胞で
 ある。別の実施形態では、dsRNA剤のアンチセンス鎖は、標的RNAに対して少なく
 とも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、95%、少なく
 とも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70
 %、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、または少なくとも50%
 相補的である。いくつかの実施形態では、標的RNAは、GYS1 RNAである。いく
 つかの実施形態では、siRNA分子は、GYS1の発現を低減させるsiRNAである
 。いくつかの実施形態では、siRNA分子は、本明細書に記載されるアッセイにおいて
 、本明細書に記載される200nm以下の濃度で、GYSの発現を低減させ、他のRNA
 の発現を50%を超えて低減させないsiRNAである。

【0164】

siRNAは、目的の任意の遺伝子またはRNA（例えば、mRNA）転写産物を標的
 とすることができる。

【0165】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、米国特許第10,233,448号（参照によ
 り本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0166】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、Anderson et al. (Nucle
 ic Acids Research, 2021, 49(16), 9026-9041)
 （参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

50

【0167】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、国際特許出願公開第WO2021/030778号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0168】

他の修飾及び修飾パターンは、例えば、国際特許出願公開第WO2021/030763号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0169】

いくつかの実施形態では、s i R N Aは、F N 3ドメインなどのタンパク質に連結されている。s i R N Aは、同じ標的タンパク質または異なる標的タンパク質に結合する複数のF N 3ドメインに連結され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、センス鎖に結合され、これは、F N 3ドメインへのセンス鎖の連結を容易にするために使用される。

10

【0170】

いくつかの実施形態では、 $(X1)_n - (X2)_q - (X3)_y - L - X4$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、X1は、第1のF N 3ドメインであり、X2は、第2のF N 3ドメインであり、X3は、第3のF N 3ドメインまたは半減期延長分子であり、Lは、リンカーであり、X4は、s i R N A分子などであるが、これらに限定されない、核酸分子であり、n、q、及びyは、各々独立して、0または1である。いくつかの実施形態では、X1、X2、及びX3は、異なる標的タンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、yは、0である。いくつかの実施形態では、nは、1であり、qは、0であり、yは、0である。いくつかの実施形態では、nは、1であり、qは、1であり、yは、0である。いくつかの実施形態では、nは、1であり、qは、1であり、yは、1である。いくつかの実施形態では、第3のF N 3ドメインは、X3を持たない分子と比較して、全体として分子の半減期を増大させる。いくつかの実施形態では、半減期延長部分は、アルブミンに結合するF N 3ドメインである。そのようなF N 3ドメインの例としては、米国特許出願公開第20170348397号及び米国特許第9,156,887号（参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。F N 3ドメインは、例えば、共有結合相互作用を介して他のサブユニットを組み込み得る。いくつかの実施形態では、F N 3ドメインは、半減期延長部分をさらに含む。例示的な半減期延長部分は、アルブミン、アルブミンバリエーション、アルブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、トランスフェリン及びその断片及び類似体、ならびにFc領域である。ヒトFc領域のアミノ酸配列は、周知であり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、及びIgE Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、F N 3ドメインは、本明細書に記載される半減期延長部分のうちのいずれかを含むが、これらに限定されない、分子全体の半減期を延長する分子に結合する第2のF N 3ドメインを組み込み得る。いくつかの実施形態では、第2のF N 3ドメインは、アルブミン、アルブミンバリエーション、アルブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、ならびにそれらの断片及び類似体に結合する。

20

30

【0171】

いくつかの実施形態では、 $(X1) - (X2) - L - (X4)$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、X1は、第1のF N 3ドメインであり、X2は、第2のF N 3ドメインであり、Lは、リンカーであり、X4は、核酸分子である。いくつかの実施形態では、X4は、s i R N A分子である。いくつかの実施形態では、X1は、C D 7 1のうちの1つに結合するF N 3ドメインである。いくつかの実施形態では、X2は、C D 7 1のうちの1つに結合するF N 3ドメインである。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、同じ標的タンパク質に結合しない。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、同じ標的タンパク質に結合するが、タンパク質上の異なる結合部位で結合する。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、同じ標的タンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、X1及びX2は、C D 7 1に結合するF N 3ドメインである。いくつかの実施形態では、組成物は、A S G P Rに結合する化合物またはタンパク質を含まない（例えば、それがない）。

40

50

【0172】

いくつかの実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

【0173】

いくつかの実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] - (X_3)_y - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

10

【0174】

いくつかの実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] L - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

20

【0175】

いくつかの実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q [L - X_4] L - (X_3)_y - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0 または 1 である、組成物が、提供される。

【0176】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - F_1$ の式を有し、

30

C は、PEGなどのポリマーであり、

L_1 及び L_2 は、各々独立して、リンカーであり、

X_S は、二本鎖 siRNA 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、

X_{AS} は、二本鎖 siRNA 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、

F_1 は、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、

式中、 X_S 及び X_{AS} は、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、組成物／複合体を形成する。

【0177】

いくつかの実施形態では、 C は、分子の半減期を延長する分子であり得る。そのような部分の例を、本明細書に記載する。いくつかの実施形態では、 C はまた、エンドポーター、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリジン、または両親媒性ペプチドでもあり得る。これらの部分は、本明細書に提供される他の半減期延長部分の代わりに、またはそれに加えて使用することができる。いくつかの実施形態では、 C は、複合体を細胞、エンドソーム、または ER に送達する分子であり得、当該分子は、以下の表 2 に列挙されるそれらのペプチドから選択される。

40

【表 2】

表 2

配列番号	名称	配列
1043	TAT	RKKRRQRRR
1044	ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK
1045	トランスポーター	GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL
1046	MAP	KLALKLALKALKAAALKLA
1047	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
1048	KDEL	KDEL
1049	GALA	WEAALAEALAEHLAEALAEALEALAA
1050	HA2	GDIMGEWGNEIFGAIAGFLGC
1051	Aurine 1.2	GLFDIHKIAESF
1052	MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKSKRKV
1053	TP-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
1054	EB-1	LIRLWSHLIHIWFQNRRLLKWKKK
1055	HA2-ペネトラチン	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRRMKWKK
1056	エンドソーム分解	FFKKLAHALHLLALLALHLAHLKKA
1057	エンドソーム分解	LFEAIEGFIENGWGMIDGWYG
1058	エンドソーム分解	LFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGRKKRRQRRR
1059	エンドソーム分解	IGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
1060	ER 標的	MKLAVTLTLVTLALSSSSASA
1061	ER 標的	RLIEDICLPRWGCLWEDDKDEL
1062	ER 標的	MIRTLTLSTLVAGALSK
1063	ER 標的	ILSSLTVTQLLRRLHQWIK
1064	ER 標的	MIRTLTLSTLVAGALSKDEL

10

20

30

40

【0178】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 X_s の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - F_1$ の式を有する。

【0179】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する。

【0180】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、本明細書に提供されるセンス鎖である。

【0181】

50

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、本明細書に提供されるアンチセンス鎖である。

【0182】

いくつかの実施形態では、センス及びアンチセンス鎖は、GYS1を標的とする二本鎖 siRNA 分子を形成する。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、長さが約 21～23 ヌクレオチド塩基対である。ある特定の実施形態では、C は、任意選択的である。

【0183】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有し、 F_1 は、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、 L_1 及び L_2 は、各々独立して、リンカーであり、 C は、PEG などのポリマーであり、 X_S は、二本鎖 siRNA 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、 X_{AS} は、二本鎖 siRNA 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、式中、 X_S 及び X_{AS} は、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、組成物／複合体を形成する。ある特定の実施形態では、C は、任意選択的である。

10

【0184】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 X_S の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有する。

20

【0185】

いくつかの実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式を有する組成物または複合体が、提供され、式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する。

【0186】

いくつかの実施形態では、C は、分岐または非分岐モノマーの長鎖、及び／または 2 次元もしくは 3 次元のモノマーの架橋ネットワークからなる、天然または合成ポリマーである。場合によっては、ポリマーは、多糖類、リグニン、ゴム、またはポリアルキレンオキシド（例えばポリエチレングリコールであり得る）を含む。いくつかの例では、少なくとも 1 つのポリマーとしては、アルファー、オメガージヒドロキシルポリエチレングリコール、生分解性ラクトン系ポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリラクチド酸（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタラット（PET、PETG）、ポリエチレン-B-Bテレフタレート（PETE）、ポリテトラメチレングリコール（PTG）、またはポリウレタン、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、混合物は、ブロックコポリマーに関してだけでなく、同じ化合物内での異なるポリマーの使用を指す。ある場合には、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも 1 つの部分が別のポリマーのモノマーから構築されるポリマーである。場合によっては、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。場合によっては、ポリマーは、PEG を含む。場合によっては、ポリマーは、ポリエチレンイミド（PEI）またはヒドロキシエチルデンプン（HES）を含む。

30

40

【0187】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば PEG）は、多分散または単分散化合物である。場合によっては、多分散材料は、平均重量（重量平均）サイズ及び分散性によって特徴付けられる、材料の異なる分子量の分散分布を含む。場合によっては、単分散 PEG は、1 つのサイズの分子を含む。いくつかの実施形態では、C は、多分散または単分散ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、示される分子量は、ポリアルキレンオキシド、例えば、PEG 分子の分子量の平均を表す。

【0188】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）の分子量は、約

50

200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daである。

【0189】

いくつかの実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。場合によっては、Cの分子量は、約200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1100 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1450 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約1900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2100 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2200 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2300 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2400 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2600 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2700 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2800 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約2900 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3250 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3350 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約3750 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4000 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4250 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4500 Daである。場合によっては、Cの分子量は、約4600 Daである。場合によっては、Cの分子

10

20

30

40

50

量は、約 4 7 5 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 5 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 5 5 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 6 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 6 5 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 7 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 7 5 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 8 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 1 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 1 2 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 2 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 3 5 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 4 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 5 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 6 0 , 0 0 0 D a である。場合によっては、C の分子量は、約 1 0 0 , 0 0 0 D a である。

10

【0190】

いくつかの実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、P E G）は、別個の P E G であり、別個の P E G は、1 つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマー P E G である。場合によっては、別個の P E G（d P E G）は、2 ~ 6 0、2 ~ 5 0、または 2 ~ 4 8 個の反復エチレンオキシド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は、約 2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 2、2 4、2 6、2 8、3 0、3 5、4 0、4 2、4 8、5 0 個またはそれ以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 2 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 3 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 4 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 5 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 6 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 7 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 8 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 9 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 0 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 1 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 2 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 3 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 4 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 5 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 6 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 7 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 8 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 1 9 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 2 0 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 2 2 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 2 4 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 2 6 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 2 8 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 3 0 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 3 5 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 4 0 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 4 2 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 4 8 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、d P E G は、約 5 0 個以上の反復エチレンオキシド単位を含む。ある場合には、d P E G は、段階的な方法において純粋な（例えば、約 9 5 %、9 8 %、9 9 %、または 9 9 . 5 %）出発材料（s t a r t i n g m a t e r i a l）から単一の分子量化合物として合成される。ある場合には、d P E G は、平均分子量ではなく、特定の分子量を有する。ある場合には、本明細書に記載される d P E G は、Q u a n t a B i o d e s i g n、L M D の d P E G である。

20

30

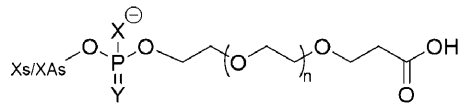
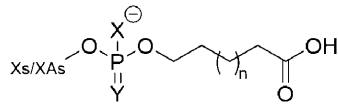
40

50

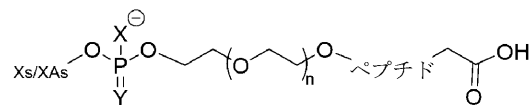
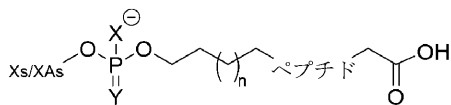
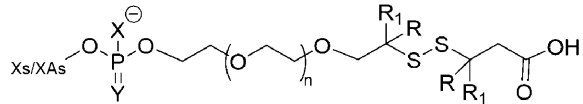
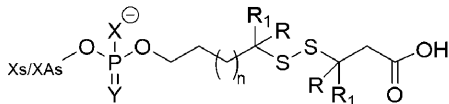
【0191】

いくつかの実施形態では、 L_1 は、ポリマーCをセンス鎖 X_S に連結するか、または F_1 のポリペプチドをセンス鎖 X_S に連結するために使用することができる任意のリンカーである。いくつかの実施形態では、 L_1 は、以下の式を有し：

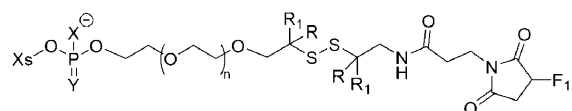
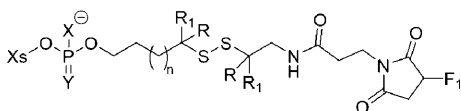
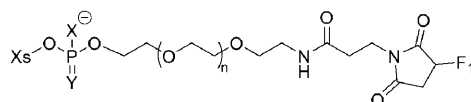
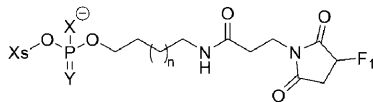
【化10】



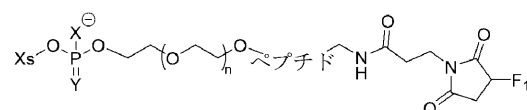
10



20



30



式中、 X_S 、 X_{AS} 、及び F_1 は、上記で定義される通りである。

【0192】

いくつかの実施形態では、 n が、0～20である。いくつかの実施形態では、 R 及び R_1 は、独立して、メチルである。いくつかの実施形態では、 R 及び R_1 は、独立して、存在するか、または両方とも存在しない。いくつかの実施形態では、 X 及び Y は、独立して、 S である。いくつかの実施形態では、 X 及び Y は、独立して、存在するか、または存在しない。いくつかの実施形態では、ペプチドは、例えば、Val-Cit、Val-Alaなどであるが、これらに限定されない、酵素的に切断可能なペプチドである。

40

【0193】

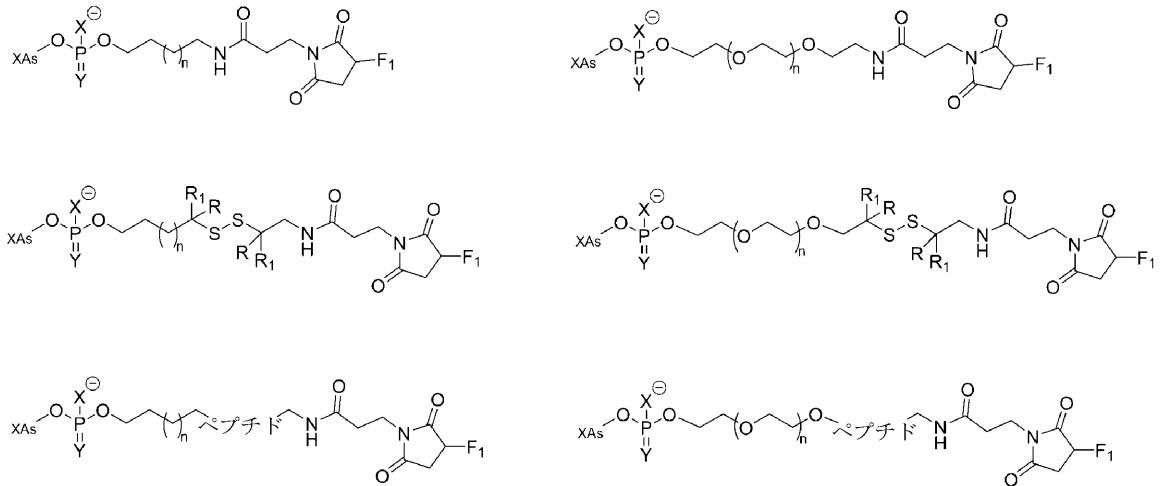
いくつかの実施形態では、 L_2 は、 F_1 のポリペプチドをアンチセンス鎖 X_{AS} に連結するか、またはポリマーCをアンチセンス鎖 X_{AS} に連結するために使用することができる任意のリンカーである。

【0194】

いくつかの実施形態では、 L_2 は、以下の複合体中の式を有し：

50

【化 1 1】



10

式中、XAs及びF₁は、上記で定義される通りである。

【0195】

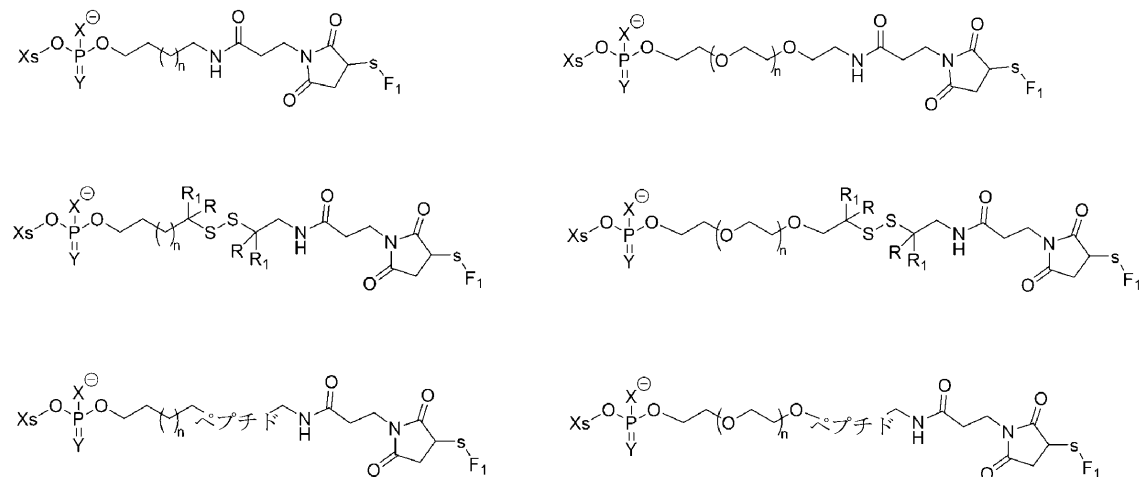
いくつかの実施形態では、nが、0～20である。いくつかの実施形態では、R及びR₁は、独立して、メチルである。いくつかの実施形態では、R及びR₁は、独立して、存在するか、または両方とも存在しない。いくつかの実施形態では、X及びYは、独立して、Sである。いくつかの実施形態では、X及びYは、独立して、存在するか、または存在しない。いくつかの実施形態では、ペプチドは、例えば、Val-Cit、Val-Alaなどであるが、これらに限定されない、酵素的に切断可能なペプチドである。

20

【0196】

いくつかの実施形態では、リンカーは、F₁に存在するシステイン残基を介してF₁に共有結合し、これを以下のように示すことができる。

【化 1 2】



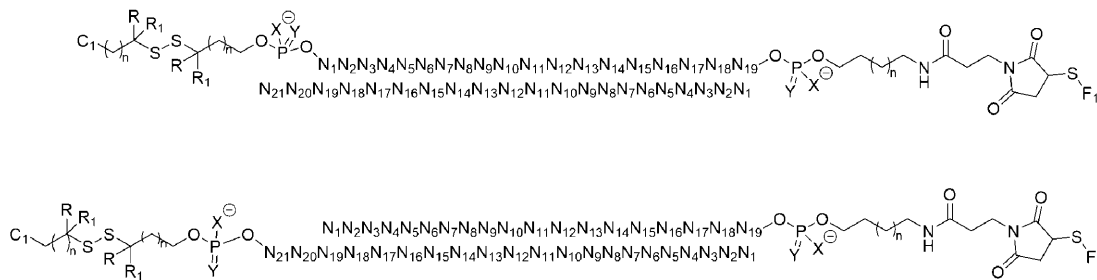
30

40

いくつかの実施形態では、A1-B1は、以下の式を有し：

50

【化 1 3】



10

式中、Cは、本明細書に提供されるように、PEGなどのポリマー、エンドポーター、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリジン、両親媒性ペプチド、または表2に列挙されるペプチドであり、X_Sは、二本鎖siRNA分子の5'から3'オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、X_Aは、二本鎖siRNA分子の3'から5'オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、F₁は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり、X_S及びX_Aは、二本鎖siRNA分子を形成する。センス鎖及びアンチセンス鎖は、「N」表記で表され、Nで表される各ヌクレオチドは、独立して、A、U、C、もしくはG、または本明細書に提供されるものなどの修飾された核酸塩基である。センス鎖及びアンチセンス鎖のN₁ヌクレオチドは、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確にするために、式Iは、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方でN₁、N₂、N₃などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同一である必要はなく、同一であることが意図されていない。式Iに示されるsiRNAは、標的配列に相補的であろう。

20

【0197】

例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖は、N₁及びN₂にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'オームethyl修飾ヌクレオチド、N₃、N₇、N₈、N₉、N₁₂、及びN₁₇に2'フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₄、N₅、N₆、N₁₀、N₁₁、N₁₃、N₁₄、N₁₅、N₁₆、N₁₈、及びN₁₉に2'オームethyl修飾ヌクレオチドを含む。

【0198】

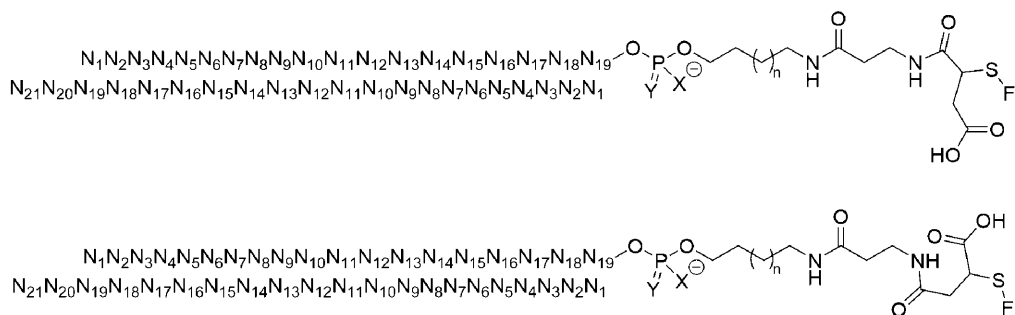
いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、N₁に結合したビニルホスホネート部分、N₂にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'フルオロ修飾ヌクレオチド、N₃、N₄、N₅、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₀、N₁₁、N₁₂、N₁₃、N₁₅、N₁₆、N₁₇、N₁₈、及びN₁₉に2'オームethyl修飾ヌクレオチド、N₄に2'フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₂₀及びN₂₁にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'オームethyl修飾ヌクレオチドを含む。

30

【0199】

いくつかの実施形態では、以下の式を有する化合物であり、

【化 1 4】



40

式中、F₁は、少なくとも1つのFN3ドメインを含み、リンカーL₁にコンジュゲート

50

されているポリペプチドであり、 L_1 は、 X_5 に連結され、 X_5 は、二本鎖 *s i R N A* 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、 αX_5 は、二本鎖 *s i R N A* 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、 αX 及び X_{AS} は、二本鎖 *s i R N A* 分子を形成する。上記のリンカーは、非限定的な例であり、他のタイプのリンカーが、使用され得る。

【0200】

いくつかの実施形態では、 F_1 は、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式を有するポリペプチドを含み、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1であるが、但し、 n 、 q 、及び y のうちの少なくとも1つが、1であるものとする。いくつかの実施形態では、 n 、 q 、及び y は、各々、1である。いくつかの実施形態では、 n 及び q は、1であり、 y は、0である。いくつかの実施形態では、 n 及び y は、1であり、 q は、0である。

【0201】

いくつかの実施形態では、 X_1 は、本明細書で提供するものなどの、CD71 FN3結合ドメインである。いくつかの実施形態では、 X_2 は、CD71 FN3結合ドメインである。いくつかの実施形態では、 X_1 及び X_2 は、異なるCD71 FN3結合ドメインである。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、同じである。いくつかの実施形態では、 X_3 は、ヒト血清アルブミンに結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、 X_3 は、タンパク質の半減期を延長するエフェクター機能を有しないFcドメインである。いくつかの実施形態では、 X_1 は、第1のCD71結合ドメインであり、 X_2 は、第2のCD71結合ドメインであり、 X_3 は、FN3アルブミン結合ドメインである。そのようなポリペプチドの例は、本明細書及び以下に提供される。いくつかの実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 C は、PEGなどのポリマー、エンドポーター、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリジン、両親媒性ペプチド、または表2に提供されるペプチドであり、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0202】

いくつかの実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4 - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 C は、ポリマーであり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0203】

いくつかの実施形態では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0204】

いくつかの実施形態では、 $C - X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 C は、ポリマーであり、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X_2 は、第2のFN3ドメインであり、 X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、 L は、リンカーであり、 X_4 は、核酸分子であり、 n 、 q 、及び y は、各々独立して、0または1である。

【0205】

いくつかの実施形態では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - C$ の式を有する組成物が、本明細書に提供され、式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり、 X

10

20

30

40

50

2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり、X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり、L は、リンカーであり、X 4 は、核酸分子であり、C は、ポリマーであり、n、q、及び y は、各々独立して、0 または 1 である。

【0206】

いくつかの実施形態では、G Y S 1 s i R N A 対は、センス鎖 (5' - 3') n s n s n n n n N f N f N f n n n n n n n n s n s a 及びアンチセンス鎖 (5' - 3') U f s N f s n n n N f n n n n n n n n N f n N f n n n s u s u、の配列に従い得、式中、(n) が、2' - O - Me (メチル) であり、(N f) が、2' - F (フルオロ) であり、(s) が、ホスホロチオエート骨格修飾である。センス鎖及びアンチセンス鎖の両方の各ヌクレオチドは、独立して、またはリボ糖及び核酸塩基の位置で組み合わせて修飾される。

10

【0207】

いくつかの実施形態では、s i R N A 分子は、表 3 A または 3 B からの配列対を含む。

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 A : s i R N A センシ及びアンチセンス配列

siRN A 対	配列 番号	センス鎖 5' -3'	配列 番号	アンチセンス鎖 5' -3'
A	10	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	11	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
B	12	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][T]	13	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
C	14	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG][fC][fC][mU][fG][mG][mA][mU][fG][mA][fU][mU][mA][T]	15	[mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][fU][fC][mC][fA][mG][mG][mC][fU][mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*mU]
D	16	[mG][*mC][*fG][mA][mC][mU][fG][fC][fC][mU][mG][fU][mA][mG][mC][mA][fA][mC][mA][idT]	17	[fU][*fG][*mU][mU][mG][mC][mU][mA][mC][mA][mG][mG][mC][fA][mG][mU][mC][mG][mC][*mU][*mU]
E	18	[mU][*mU][*fU][mA][mU][mG][fG][fG][fC][mA][mU][fC][mU][mG][mG][mA][fC][mU][mA][idT]	19	[fU][*fA][*mG][mU][mC][mC][mA][mG][mA][mU][mG][mC][mC][fC][mA][mU][mA][mA][mA][*mU][*mU]
F	20	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA][fC][mA][mA][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	21	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][mU][mG][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]
G	22	[mG][*mG][*fA][mC][mC][mA][fA][fC][fA][mA][mU][fU][mU][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	23	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][fU][mG][mG][mU][mC][mC][*mU][*mU]
H	24	[mA][*mC][*fC][mA][mA][mC][fA][fA][fU][mU][mU][fC][mA][mA][mC][mG][fU][mG][mA][idT]	25	[fU][*fC][*mA][mC][mG][mU][mU][mG][mA][mA][mA][mU][mU][fG][mU][mU][mG][mG][mU][*mU][*mU]
I	26	[mG][*mC][*fG][mC][mA][mA][fA][fC][fA][mG][mC][fU][mU][mU][mG][mG][fG][mA][mA][idT]	27	[fU][*fU][*mC][mC][mC][mA][mA][mA][mG][mC][mU][mG][mU][fU][mU][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

J	28	[mA][*mG][*fA][mG][mC][mC][fA][fU][fC][mU][mU][fU][mG][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	29	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][mU][fG][mG][mC][mU][mC][mU][*mU][*mU]
K	30	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]	31	[fU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
L	32	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][mG][fC][mA][mA][idT]	33	[fU][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]
M	34	[mC][*mC][*fA][mU][mC][mU][fU][fU][fG][mC][mA][fA][mC][mG][mC][mA][fG][mC][mA][idT]	35	[fU][*fG][*mC][mU][mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][fA][mG][mA][mU][mG][mG][*mU][*mU]
N	36	[mA][*mC][*fG][mC][mA][mG][fC][fG][fG][mC][mA][fG][mU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	37	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mG][mA][mC][mU][mG][mC][mC][mG][fC][mU][mG][mC][mG][mU][*mU][*mU]
O	38	[mU][*mG][*fA][mC][mC][mA][fC][fC][fA][mU][mC][fC][mG][mC][mC][mG][fA][mA][mA][idT]	39	[fU][*fU][*mU][mC][mG][mG][mC][mG][mG][mA][mU][mG][mG][fU][mG][mG][mU][mC][mA][*mU][*mU]
P	40	[mC][*mG][*fA][mA][mU][mC][fG][fG][fC][mC][mU][fC][mU][mU][mC][mA][fA][mU][mA][idT]	41	[fU][*fA][*mU][mU][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mG][mC][mC][fG][mA][mU][mU][mC][mG][*mU][*mU]
Q	42	[mC][*mU][*fU][mC][mA][mA][fU][fA][fG][mC][mA][fG][mU][mG][mC][mC][fG][mA][mA][idT]	43	[fU][*fU][*mC][mG][mG][mC][mA][mC][mU][mG][mC][mU][mA][fU][mU][mG][mA][mA][mG][*mU][*mU]
R	44	[mC][*mA][*fG][mU][mA][mU][fC][fU][fC][mC][mA][fC][mC][mA][mA][mU][fC][mU][mA][idT]	45	[fU][*fA][*mG][mA][mU][mU][mG][mG][mU][mG][mG][mA][mG][fA][mU][mA][mC][mU][mG][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

S	46	[mC][*mC][*fA][mC][mC][mA] [fA][fU][fC][mU][mC][fU][mC] [mC][mG][mG][fC][mU][mA][i dT]	47	[fU][*fA][*mG][mC][mC][mG][m G][mA][mG][mA][mG][mA][mU][fU][mG][mG][mU][mG][mG][*mU][*mU]
T	48	[mC][*mA][*fC][mC][mA][mA] [fU][fC][fU][mC][mU][fC][mC] [mG][mG][mC][fU][mU][mA][i dT]	49	[fU][*fA][*mA][mG][mC][mC][m G][mG][mA][mG][mA][mG][mA][fU][mU][mG][mG][mU][mG][*mU][*mU]
U	50	[mC][*mC][*fC][mC][mU][mC] [fA][fG][fC][mU][mU][fA][mC] [mG][mG][mU][fA][mU][mA][i dT]	51	[fU][*fA][*mU][mA][mC][mC][m G][mU][mA][mA][mG][mC][mU][f G][mA][mG][mG][mG][mG][*mU] [*mU]
V	52	[mC][*mC][*fC][mU][mC][mA] [fG][fC][fU][mU][mA][fC][mG] [mG][mU][mA][fU][mC][mA][i dT]	53	[fU][*fG][*mA][mU][mA][mC][m C][mG][mU][mA][mA][mG][mC][f U][mG][mA][mG][mG][mG][*mU] [*mU]
W	54	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG] [fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC] [mA][mU][mU][fC][mU][mA][i dT]	55	[fU][*fA][*mG][mA][mA][mU][m G][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
X	56	[mG][*mG][*fA][mA][mC][mC] [fG][fC][fA][mC][mG][fG][mA] [mG][mC][mG][fC][mC][mA][i dT]	57	[fU][*fG][*mG][mC][mG][mC][m U][mC][mC][mG][mU][mG][mC][f G][mG][mU][mU][mC][mC][*mU] [*mU]
Y	58	[mA][*mC][*fG][mG][mA][mG] [fC][fG][fC][mC][mU][fC][mU] [mC][mC][mG][fA][mC][mA][i dT]	59	[fU][*fG][*mU][mC][mG][mG][m A][mG][mA][mG][mG][mC][mG][f C][mU][mC][mC][mG][mU][*mU] [*mU]
Z	60	[mA][*mG][*fC][mA][mA][mG] [fC][fG][fC][mA][mA][fC][mU] [mC][mU][mG][fU][mG][mA][i dT]	61	[fU][*fC][*mA][mC][mA][mG][m A][mG][mU][mU][mG][mC][mG][f C][mU][mU][mG][mC][mU][*mU] [*mU]
AA	62	[mC][*mA][*fG][mA][mU][mG] [fG][fU][fC][mC][mU][fC][mC] [mA][mU][mU][fU][mC][mA][i dT]	63	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][m G][mG][mA][mG][mG][mA][mC][f C][mA][mU][mC][mU][mG][*mU] [*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

BB	64	[mU][*mC][*fU][mA][mG][mA][fU][fC][fU][mG][mG][fA][mA][mC][mC][mU][fU][mA][mA][idT]	65	[fU][*fU][*mA][mA][mG][mG][mU][mU][mC][mC][mA][mG][mA][fU][mC][mU][mA][mG][mA][*mU][*mU]
CC	66	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][mA][fG][mG][mA][idT]	67	[fU][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][mA][mA][mA][fU][mG][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]
DD	68	[mA][*mC][*fC][mG][mC][mU][fU][fG][fG][mU][mU][fU][mG][mC][mA][mG][fU][mU][mA][idT]	69	[fU][*fA][*mA][mC][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mC][mC][mA][fA][mG][mC][mG][mG][mU][*mU][*mU]
EE	600	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mG][mA][T]	601	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
FF	602	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mA][fG][mG][mA][T]	603	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
GG	604	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fG][mA][fG][mG][mA][T]	605	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
HH	606	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	607	[fU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][fC][fA][fU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*fU]
II	608	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	609	[mU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*mU]
JJ	610	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][*fU][idT]	611	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][*mG][*fU][*mU]
KK	612	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][idT]	613	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
LL	614	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]	615	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

MM	616	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mG][mA][idT]	617	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
NN	618	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fG][mA][mA][idT]	619	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
OO	620	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mA][fU][mA][mA][idT]	621	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
PP	622	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mA][idT]	623	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
QQ	624	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mG][idT]	625	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
RR	626	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]	627	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
SS	628	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mG][idT]	629	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
TT	630	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mA][mA][idT]	631	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
UU	632	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fA][mC][mA][idT]	633	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
VV	634	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mA][fG][mC][mA][idT]	635	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

WW	636	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mA][idT]	637	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
XX	638	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mG][idT]	639	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
YY	640	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][idT]	641	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
ZZ	642	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mG][idT]	643	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
AAA	644	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mG][mA][idT]	645	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
BBB	646	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fG][mU][mA][idT]	647	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
CCC	648	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	649	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
DDD	650	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	651	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
EEE	652	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mA][idT]	653	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

FFF	654	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mG][idT]	655	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
GGG	656	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]	657	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
HHH	704	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA]	705	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]

10

【0208】

略語キー：（n / N = 任意のヌクレオチド） m N = 2' - O - メチル残基、f N = 2' - F 残基、* = ホスホロチオエート及び（idT） = 反転 D t、（VP） 2' - O メチルビニルホスホネートウリジン。括弧は、個々の塩基を示す。

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 3 B

配列番号	センス鎖(5' -3')	配列番号	アンチセンス鎖(5' -3')
801	caggggugcg gucuugcaa	861	uugcaagacc gcaccccuu u
802	ggugcggucu ugcaauagg	862	ccuauugcaa gaccgcaccu u
803	gugcggucuu gcaauagga	863	uccuauugca agaccgcacu u
804	agccaugccu uuaaaccgc	864	gcgguuuaaa ggcauggcuu u
805	augccuuuaa accgcacuu	865	aagugcgguu uaaaggcauu u
806	ugggagggaug aaucgacc	866	ggucgaauuc auccuccau u
807	aacgcagugc ucuucgaag	867	cuucgaagag cacugcguuu u
808	ggacgaugg ggcgacaac	868	guugucgccc cauucguccu u
809	ggcgacugcc uguagcaac	869	guugcuacag gcagucgcuu u
810	cacgcugcug gggcgcuac	870	guagcgcccc agcagcgugu u
811	ugcgcuacg ucuucacua	871	uagugaagac gugagcgcau u
812	ccuauauacu cuuuauagc	872	gcgauaaaga aguauaaggu u
813	cuuuauagcc ggccgcuaa	873	auagcggccg gcgauaaagu u
814	ucgccggccg cuauagauu	874	aacucauagc ggccggcgau u
815	gccgcuauga guucuccaa	875	uuggagaacu cauagcggcu u
816	ccgcuaugag uucuccaac	876	guuggagaac ucuaugcggu u
817	ggcucggcuc aacuaucug	877	cagauaguug agccgagccu u
818	gcucggcuca acuauugc	878	gcagauaguu gagccgagcu u
819	ucggcucaac uaucugcuc	879	gagcagauag uugagccgau u
820	ccagcgcgga ccaacaauu	880	aauguuuggu ccgcgcuggu u
821	agcgcggacc aacaauuuc	881	gaaaauuggu guccgcgcuu u
822	ucgggaggaa gcuuuuga	882	ucauaaagcu uccuccgau u
823	acgcagcggc agucuucc	883	ggaaagacug ccgcugcggu u
824	gaccaccauc cgccgauc	884	gauucggcgg auggugguu u
825	ccgaauaggc cucuucuu	885	auugaagagg ccgaauccgu u
826	aaucggccuc uucauagc	886	gcuaauaga aggccgaauu u
827	cauagcagu gccgacagg	887	ccugucggca cugcuauugu u
828	aggaguugu ccguggcug	888	cagccacgga caaacuccu u
829	cggcugagug cagguuau	889	auaaccgugc acucagccgu u
830	ugggaauccc cagauuc	890	gagauacug ggauuccau u
831	cagacccuc agcuuacgg	891	ccguaagcug aggggucugu u
832	cccucagcu uacgguau	892	gauaccguua gcugagggu u
833	cucagcuac gguauuc	893	guagauaccg uaagcugagu u
834	gcuuacggua ucuauuc	894	gaauguagau accguuagcu u
835	ccggcggcag cguauuc	895	gaugauacgc ugccgcccgu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

836	agcguaucan ccagcgga	896	uuccgcugga ugauacguu u
837	gcguaucauc cagcggaac	897	guuccgcugg augauacgu u
838	uaccuagcc gguacuaua	898	uauaguaccg gccuagguau u
839	cuagcgccgu acuaauugu	899	acauauagua ccggccuagu u
840	aggccgguac uauaugucu	900	agacauauag uaccggccuu u
841	ggccgguacu auaugucug	901	cagacauaua guaccggccu u
842	gccgguacua uaugucugc	902	gcagacauau aguaccggcu u
843	cgguacuaua ugucugcgc	903	gcgcagacau auaguaccgu u
844	gguacuauau gucugcgcg	904	cgcgcagaca uauaguaccu u
845	cuauaugucu gcgcgccac	905	guaggcgcca gacauauagu u
846	uauugucgc gcgcacau	906	caugugcgcg gcagacauu u
847	augucugcg gccacaugg	907	ccaugugcg cgagacauu u
848	ucgcccucgc ugucacgac	908	gucgugacag cgaggcgau u
849	cggcgagcgc uacgaugag	909	cucaucguag cgcucgccu u
850	caaggaccgg cgcaaac	910	gaugugcgcg cgguccuuu u
851	acauccguc accagagug	911	cacucgugug caggaguu u
852	cuggcgagg agcguaacu	912	aguuaacguc cucgccagu u
853	ggcgaggag cguaacuaa	913	uuaguacgc ucccgccu u
854	gcgaggagcg uaacuagu	914	acuuaguuac gcuccucgu u
855	gaggagcgua acuaagucc	915	ggacuaguu acgcuuccu u
856	aguccgcaa acacuccac	916	guggaguguu uggcgacuu u
857	ggcgaucaag uccagacc	917	ggcucggac uugaucguu u
858	ccuaaccug gcuauucc	918	ggaauagcc agguuagggu u
859	ugugaaacca cuagguucu	919	agaaccuagu gguuacau u
860	accacuaggu ucuaggucc	920	ggaccuagaa ccuaguguu u
921	caggggugcg gucuugcaa	981	uugcaagacc gcacccugu u
922	ggugcgguu ugcauaga	982	ucuauugcaa gaccgaccu u
923	gugcgguu gcauagga	983	uccauuugca agaccgacu u
924	agccaugcc uuaaaccga	984	ucgguuuuu ggcaugguu u
925	augccuuua accgcacua	985	uagugcggu uaaaggcau u
926	ugggaggau aauucgaca	986	ugucgaauc auccuccau u
927	aacgcaguc ucuucgaaa	987	uuucgaagag cacugguu u
928	ggacgaugg ggcgacaaa	988	uuugugccc cauucguu u
929	ggcgacugc uguagcaaa	989	uuugcuacag gcagugcuu u
930	cagcugcug gggcgcuua	990	uuagcgccc agcagcggu u
931	ugcgcucacg ucuucacua	991	uagugaagac gugagcgau u
932	ccuauacu uuuuacga	992	ucgauaaaga aguuaaggu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

933	cuuuauccgcc ggccgcuaaa	993	uuagcggcgcg gcgauaaagu u
934	ucgccggccg cuaugagua	994	uacucauagc ggccggcgau u
935	gccgcuauga guucuccaa	995	uuggagaacu cauagcggcu u
936	ccgcuaugag uucuccaaa	996	uuuggagaac ucauagcggg u
937	ggcucggcuc aacuaua	997	uagauaguug agccgagccu u
938	gcucggcuca acuaucuga	998	ucagauaguu gagccgagcu u
939	ucggcucaac uaucugcua	999	uagcagauag uugagccgau u
940	ccagcgcgga ccaacaaua	1000	uauuguuggu ccgcgcuggu u
941	agcgcggacc aacaauua	1001	uaauuguug guccgcgcu u
942	ucgggaggaa gcuuauga	1002	ucauaaagcu uccuccgau u
943	acgcagcggc agucuuca	1003	ugaaagacug ccgcugcgu u
944	gaccaccau cgccgaaua	1004	uaucggcggc augguggcu u
945	ccgaauccgc cucuucaaa	1005	uuugaagagg ccgauucggu u
946	aaucggccuc uucaauaga	1006	ucuaauaga aggccgauuu u
947	caauagcagu gccgacaga	1007	ucugucggca cugcuauugu u
948	aggaguuugu ccguggcua	1008	uagccacgga caaacuccu u
949	cggcugagug caggguuaa	1009	uaaacggugc acucagccgu u
950	ugggaaucac caguaua	1010	uagauacugg ggauuccau u
951	cagacccuc agcuuacga	1011	ucguaagcug aggggucgu u
952	ccccacgcu uacgguaa	1012	uaauaccgua gcugaggggu u
953	cucagcuuac gguaucaaa	1013	uuagauaccg uaagcugagu u
954	gcuuacggu ucuacaua	1014	uaauaguagu accguaagcu u
955	ccggcggcag cguaucua	1015	uaugauacgc ugccgccggu u
956	agcguaucac ccagcgga	1016	uuccgcugga ugauacgcu u
957	gcguauacac cagcgga	1017	uuuccgcug augauacgu u
958	uaccuagcc gguacuua	1018	uaauaguaccg gccuagguu u
959	cuaggccggu acuaauaga	1019	ucauaugua ccggccuagu u
960	aggccggua uauaugua	1020	ugacauauag uaccggccu u
961	ggccggua cuauugua	1021	uagacaua guaccggcu u
962	gccggua cuauugua	1022	ucagacaua aguaccggcu u
963	cgguacuua ugucgcga	1023	ucgcagacu auaguaccgu u
964	gguacuaua ugucgcga	1024	ugcgagaca uauaguaccu u
965	cuauauguc gcgcgcaa	1025	uuggcgcgc gacauaua u
966	uauugucgc gcgcacua	1026	uauuggcgc gcagacaua u
967	augucgcgc gccacaua	1027	ucauuggcgc gcagacaua u
968	ucgccucgc ugucagaa	1028	uucgucagc cgaggcgau u
969	cggcgagcgc uacgauga	1029	uucaucguag cgucgcgcu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

970	caaggaccgg cgcaacaua	1030	uauguugcgc cgguccuugu u
971	acauccgugc accagagua	1031	uacucuggug cacggauguu u
972	cugggcgagg agcguaaca	1032	uguuacgcuc cugcccagu u
973	gggcgaggag cguaacuaa	1033	uuaguuaagc uccucgccc u
974	gcgaggagcg uaacuaaga	1034	ucuuaguuaac gcuccucgcu u
975	gaggagcgua acuaaguca	1035	ugacuuagu acgcuccucu u
976	aguccgcaa acacuccaa	1036	uuggaguguu uggcggacuu u
977	ggcgaucaag uccagagca	1037	ugcucuggac uugaucgcu u
978	cccuaaccug gcuuuuca	1038	ugaauaagcc agguuagggu u
979	ugugaaacca cuagguuca	1039	ugaaccuagu gguuucacau u
980	accacuaggu ucuagguca	1040	ugaccuagaa ccuagugguu u
1041	uggacuuaaccuagacaa	1042	uugucuagguagaaguccauu
783	cugggaggaugaauucgaa	784	uucgaaucauccuccaguu
785	gggugacaacuacuaucua	786	uagauaguaguuguccacuu
787	cugggaggaugaauucgaa	788	uucgaaucauccuccaguu
789	caagguggguggcaucuaa	790	uuagaugccaccaccuuguu
791	uccgcagccuggaugauua	792	uaaucauccaggcugcggaau
1065	uuacgguaucuaucuaucua	1066	uagauguagauaccguaauu

10

20

【0209】

いくつかの実施形態では、上記に例示されるポリヌクレオチドは、*s i R N A*のアンチセンス鎖上の5'ヌクレオチドとして2'-Oメチルビニリルホスホネートウリジンを含まないものを含む。 30

【0210】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に提供されるようなものである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖を含む部分を形成するための第1の鎖及び第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、表3Aまたは3Bに示される配列を含む。いくつかの実施形態では、表3Aまたは3Bに示される配列を含むが、塩基修飾は含まない。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、本明細書に提供される*s i R N A*対を含む。いくつかの実施形態では、当該*s i R N A*対は、FN3ドメインにコンジュゲートされていない。 40

【0211】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド分子は、当該技術分野で既知の手順を使用した化学合成及び／または酵素ライゲーション反応を使用して構築される。例えば、オリゴヌクレオチド分子は、天然に存在するヌクレオチド、または当該分子の生物学的安定性を高めるか、またはオリゴヌクレオチド分子と標的核酸との間に形成される二重鎖の物理的安定性を高めるように設計された様々な修飾されたヌクレオチドを使用して化学的に合成される。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子がアンチセンス配向でサブクロニングされた発現ベクターを使用して生物学的に生成される（すなわち、挿入されたオリゴヌクレオチド分子から転写されたRNAは、目的の標的ポリ核酸分子に対してアンチセンス配向である）。 50

【0212】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、タンデム合成方法によって合成され、両方の鎖は、単一の連続したオリゴヌクレオチド断片または切断可能なリンカーによって分離された鎖として合成され、その後切断されて、ハイブリダイゼーションし、二重鎖の精製を可能にする別個の断片または鎖を提供する。

【0213】

場合によっては、オリゴヌクレオチド分子はまた、2つの異なる核酸鎖または断片からも組み立てられ、1つの断片は、センス領域を含み、第2の断片は、分子のアンチセンス領域を含む。

【0214】

場合によっては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、またはメシルホスホラミデートの結合とのオリゴヌクレオチド分子ヌクレオチド間結合の化学修飾は、安定性を改善する。過度の修飾は、毒性または活性の低下を引き起こすことがある。したがって、核酸分子を設計するとき、ある場合には、これらのヌクレオチド間結合の量は、最小化される。そのような場合には、これらの結合の濃度の低下は、毒性を低減させ、これらの分子の有効性及びより高い特異性を増加させる。

【0215】

本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのセンス鎖の5'末端にリンカーを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのアンチセンス鎖の5'末端にビニルホスホネートまたは修飾ビニルホスホネートを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのセンス鎖の3'末端にリンカーを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、dsRNAのアンチセンス鎖の3'末端にビニルホスホネートを含むように修飾され得る。リンカーは、dsRNAをFN3ドメインに連結するために使用され得る。リンカーは、例えば、天然に存在するか、または本明細書に記載されるように、及び例えば、米国特許第10,196,446号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に置換されているFN3ドメイン上のシステイン残基に共有結合することができる。dsRNAのそのような修飾鎖の非限定的な例を、以下の表4に示す。

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 4：リンカー及び／またはビニルホスホネートとの対

siRNA 対	配列番号	センス鎖 5' -3'	配列番号	アンチセンス鎖 5' -3'	リンカー
III 0	7	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][mG][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][mG][fA][mA]-L	7 1	[VP][*fU][*mU][fC][mA][fU][mU][fA][mA][fG][mG][fC][mC][fA][mC][fG][mA][fG][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
JJJ 2	7	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA]-L	7 3	[VP][*fU][*mC][mG][mA][mA][mU][mU][mC][mA][mU][mC][mC][fU][mC][mC][mC][mA][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
KK K 4	7 4	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA]-L	7 5	[VP][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
LLL 6	7 6	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA][fC][mA][mA][mU][mU][fU][mC][mA]-L	7 7	[VP][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][mU][mG][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
MM M 8	7 8	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][fU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA]-L	7 9	[VP][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
NN N 0	8 0	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][mG][fC][mA][mA]-L	8 1	[VP][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
OO O 2	8 2	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA]-L	8 3	[VP][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -
PPP 4	8 4	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][mA][fG][mG][mA]-L	8 5	[VP][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][mA][mA][mA][fU][mG][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH)-(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

QQ	8	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][m	8	[VP][*fU][*mU][fC][mA][fU][mU][fA][	Mal-
Q	6	G][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][m	7	mA][fG][mG][fC][mC][fA][mC][fG][m	C ₂ H ₄ C(O)(NH
		G][mG][mA]-L		A][fG][mA][*mU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
RR	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
R	5	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	5	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	8	[fU][mA][mA][idT]-L	9	[mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
SSS	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	0	[fU][mA][mG][idT]-L	1	[mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
TTT	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	2	[fU][mG][mA][idT]-L	3	[mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
UU	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
U	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	4	[fG][mA][mA][idT]-L	5	[mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
VV	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
V	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mA]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	6	[fU][mA][mA][idT]-L	7	[mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
W	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
W	6	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC]	6	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]	C ₂ H ₄ C(O)(NH
W	8	[fU][mA][mA][idT]-L	9	[mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
XX	6	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	6	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][	Mal-
X	7	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC]	7	fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	0	[fU][mA][mG][idT]-L	1	[mU][fU][mG][*fU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -
YY	6	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][f	6	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][m	Mal-
Y	7	C][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][	7	G][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][m	C ₂ H ₄ C(O)(NH
	2	mC][fG][mC][mA][idT]-L	3	G][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	)-(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

ZZZ	6 7 4	[mG][*mA][*fG][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mG][idT]-L	6 7 5	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
AA AA	6 7 6	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mA][mA][idT]-L	6 7 7	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
BB BB	6 7 8	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fA][mC][mA][idT]-L	6 7 9	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
CC CC	6 8 0	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mA][fG][mC][mA][idT]-L	6 8 1	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
DD DD	6 8 2	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mA][idT]-L	6 8 3	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
EEE E	6 8 4	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mG][idT]-L	6 8 5	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
FFF F	6 8 6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][idT]-L	6 8 7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
GG GG	6 8 8	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mG][idT]-L	6 8 9	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -
HH HH	6 9 0	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mG][mA][idT]-L	6 9 1	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal- C ₂ H ₄ C(O) (NH)- (CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

III	6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	6	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU]	Mal-
	9	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][	9	[mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][m	C ₂ H ₄ C(
	2	mU][fG][mU][mA][idT]-L	3	A][mA][*mU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
JJJ	6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	6	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU]	Mal-
	9	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][	9	[mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][m	C ₂ H ₄ C(
	4	mG][fC][mU][mA][idT]-L	5	A][mA][*mU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
KK KK	6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	6	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU]	Mal-
	9	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][	9	[mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][m	C ₂ H ₄ C(
	6	mG][fC][mU][mA][idT]-L	7	A][mA][*mU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
LLL L	6	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	6	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU]	Mal-
	9	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][	9	[mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][m	C ₂ H ₄ C(
	8	mU][fC][mU][mA][idT]-L	9	A][mA][*mU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
MM MM	7	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU]	Mal-
	0	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][	0	[mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][m	C ₂ H ₄ C(
	0	mU][fC][mU][mG][idT]-L	1	A][mA][*mU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
NN NN	7	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	7	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC]	Mal-
	0	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	0	[fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][	C ₂ H ₄ C(
	2	[fU][mA][mG][idT]-L	3	*fU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
OO OO	7	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	7	[VP][mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU]	Mal-
	0	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][	0	[mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][m	C ₂ H ₄ C(
	6	mU][fC][mU][mA]-L	7	A][mA][*mU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
PPP P	7	[mU][*mG][*fG][mA][mC][mU][fU][f	7	[VP][mU][*fU][*mG][mU][mC][mU][mA][mG][	Mal-
	1	C][fA][mA][mC][fC][mU][mA][mG][	1	mG][mU][mU][mG][mA][fA][mG][mU][mC][m	C ₂ H ₄ C(
	1	mA][fC][mA][mA]-L	2	C][mA][*mU][*mU]	O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
QQ QQ	7	[mG][*mG][*fG][mU][mG][mA][fC][f	7	[VP][mU][fA][*mG][*mA][mU][mA][mG][mU]	Mal-
	9	A][fA][mC][mU][fA][mC][mU][mA][	9	[mA][mG][mU][mU][mG][fU][mC][mA][mC][	C ₂ H ₄ C(
	3	mU][fC][mU][mA]	4	mC][mC][*mU][*mU]	O)(NH)- (CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

RR	7	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG]	7	[VP][mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][mU][fU][m	Mal-
RR	9	[mG][fA][mU][fG][mA][fA][mU][fU][	9	C][fA][mU][fC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG	C ₂ H ₄ C(
	5	mC][fG][mA][fA]	6	][*fU][*mU]	O)(NH)
					-(CH ₂) ₆ -
SSS	7	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG]	7	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][mG][fC][m	Mal-
S	9	[mG][fG][mU][fG][mG][fC][mA][fU][	9	C][fA][mC][fC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG	C ₂ H ₄ C(
	7	mC][fU][mA][fA]	8	][*fU][*mU]	O)(NH)
					-(CH ₂) ₆ -
TTT	7	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG]	8	[VP][mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][mU][fC][mC	Mal-
T	9	[mC][fC][mU][fG][mG][fA][mU][fG][	0	][fA][mG][fG][mC][fU][mG][fC][mG][fG][mA][	C ₂ H ₄ C(
	9	mA][fU][mU][fA]	0	*fU][*mU]	O)(NH)
					-(CH ₂) ₆ -
UU	7	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][m	1	[VP][fU][*mU][*fC][mA][fU][mU][fA][mA][fG	Mal-
UU	0	G][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][m	0	][mG][fC][mC][fA][mC][fG][mA][fG][mA][*m	C ₂ H ₄ C(
		G][fA][mA]-L	6	U][*mU]	O)(NH)
			7		-(CH ₂) ₆ -
VV	7	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG]	1	[VP][fU][*mC][*mG][mA][mA][mU][mU][mC]	Mal-
VV	2	[fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC]	0	[mA][mU][mC][mC][fU][mC][mC][mA][m	C ₂ H ₄ C(
		[fG][mA][mA]-L	6	G][*mU][*mU]	O)(NH)
			8		-(CH ₂) ₆ -
WW	7	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG]	1	[VP][fU][*mA][*fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][	Mal-
WW	4	[fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC]	0	mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU]	C ₂ H ₄ C(
		[fU][mA][mA]-L	6	[*mU]	O)(NH)
			9		-(CH ₂) ₆ -
XX	7	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][f	1	[VP][fG][*mA][*mA][mA][mU][mU][mG][mU]	Mal-
XX	6	C][fC][mA][mA][fC][mA][mA][mU][	0	[mU][mG][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][m	C ₂ H ₄ C(
		mU][fU][mC][mA]-L	7	C][*mU][*mU]	O)(NH)
			0		-(CH ₂) ₆ -
YY	7	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][f	1	[VP][fG][*mC][*mG][mU][mU][mG][mC][mA]	Mal-
YY	8	C][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][	0	[mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][	C ₂ H ₄ C(
		mC][fG][mC][mA]-L	7	mC][*mU][*mU]	O)(NH)
			1		-(CH ₂) ₆ -
ZZZ	8	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][f	1	[VP][fU][*mG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC]	Mal-
Z	0	U][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][	0	[mA][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][	C ₂ H ₄ C(
		mG][fC][mA][mA]-L	7	mU][*mU][*mU]	O)(NH)
			2		-(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

AA	8	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][f	1	[VP][fA][*mG][*mA][mA][mU][mG][mU][mA]	Mal-
AA	2	A][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][	0	[mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][	C ₂ H ₄ C(
A		mU][fC][mU][mA]-L	7	mA][*mU][*mU]	O)(NH)
			3		-(CH ₂) ₆ -
BB	8	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][f	1	[VP][fC][*mC][*mU][mC][mG][mA][mG][mG][	Mal-
BB	4	U][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][	0	mU][mA][mA][mA][fU][mG][mU][mG][mG][m	C ₂ H ₄ C(
B		mA][fG][mG][mA]-L	7	G][*mU][*mU]	O)(NH)
			4		-(CH ₂) ₆ -
CC	8	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][m	1	[VP][fU][*mU][*fC][mA][fU][mU][fA][mA][fG]	Mal-
CC	6	G][fC][mC][fU][mU][fA][mA][fU][m	0	][mG][fC][mC][fA][mC][fG][mA][fG][mA][*m	C ₂ H ₄ C(
C		G][mG][mA]-L	7	U][*mU]	O)(NH)
			5		-(CH ₂) ₆ -

【0216】

いくつかの実施形態では、上記に提供される A ~ P P P P の s i R N A 対は、センス鎖の 3' 末端にリンカーを含む。いくつかの実施形態では、上記に提供される A ~ P P P P の s i R N A 対は、センス鎖の 5' 末端にビニルホスホネートを含む。

【0217】

略語キー：(n / N = 任意のヌクレオチド) mN = 2' - O - メチル残基、fN = 2' - F 残基、* = ホスホロチオエート及び (i d T) = 反転 D t、(VP) 2' - O - メチルビニルホスホネートウリジン、B M P S = プロピルマレイミド。

【0218】

リンカー (L) の構造は、以下の表 5 に示す通りである。

10

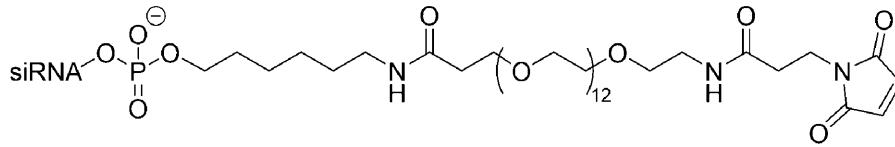
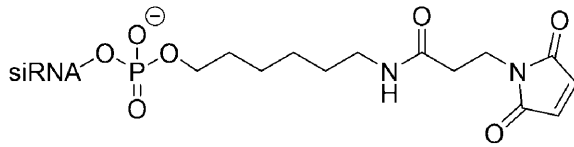
20

30

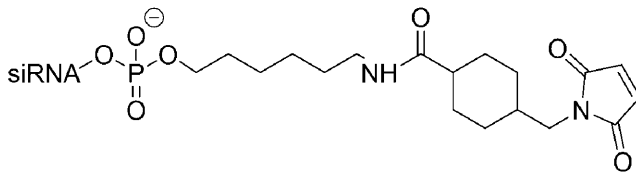
40

50

【化 1 5】



10



【0 2 2 1】

20

ある特定の s i R N A 配列が、ある特定の修飾核酸塩基で本明細書に示されているが、そのような修飾を有さない配列も、本明細書に提供される。すなわち、配列は、いかなる修飾も有さない、本明細書に提供される表に例示される配列を含むことができる。非修飾 s i R N A 配列は、依然として、いくつかの実施形態では、d s R N A のセンス鎖の 5' 末端にリンカーを含むことができる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、d s R N A のアンチセンス鎖の 5' 末端にビニルホスホネートを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、d s R N A のセンス鎖の 3' 末端にリンカーを含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、d s R N A のアンチセンス鎖の 3' 末端にビニルホスホネートを含むように修飾され得る。リンカーは、本明細書で提供されるようなものであり得る。

30

【0 2 2 2】

いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合するポリペプチドを含むポリペプチドを含む F N 3 タンパク質が、提供される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、配列番号 2 7 3、2 8 8 ~ 2 9 1、3 0 1 ~ 3 1 0、3 1 2 ~ 5 7 2、5 9 2 ~ 5 9 9、または 7 0 8 ~ 7 1 0 の配列を含むポリペプチドが、提供される。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合するポリペプチドは、配列番号 3 0 1 ~ 3 0 1、3 1 0、3 1 2 ~ 5 7 2、5 9 2 ~ 5 9 9、または 7 0 8 ~ 7 1 0 の配列を含む。ポリペプチドが結合することができる C D 7 1 タンパク質の配列は、例えば、配列番号 2 または 3 であり得る。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインは、C D 7 1 に特異的に結合する。

40

【0 2 2 3】

いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインは、配列番号 1 の T e n c o n 配列または配列番号 4 の T e n c o n 2 7 配列 (L P A P K N L V V S R V T E D S A R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R S N P L S A I F T T) に基づいており、任意選択的に、残基位置 1 1、1 4、1 7、3 7、4 6、7 3、または 8 6 で置換を有する (配列番号 4 に対応する残基の番号付け)。

【0 2 2 4】

いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 2 7 3、2 8 8 ~ 2 9 1、3 0 1 ~ 3 1 0、3 1 2 ~ 5 7 2、5 9 2 ~ 5 9 9、または 7

50

08～710のアミノ酸配列を含む。

【0225】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドを含むタンパク質は、配列番号273のアミノ酸配列を含む。配列番号273は、配列番号288、配列番号289、配列番号290、及び配列番号291の配列に基づくコンセンサス配列である。配列番号273の配列は、MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFX₁IX₂YX₃EX₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSE RSYDLTG LKPGTEYX₁₀VX₁₁IX₁₂X₁₃VKG GX₁₄X₁₅SX₁₆PLX₁₇AX₁₈FTTであり、式中、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、各々独立して、メチオニンまたはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、

10

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され、

X₂は、Y、G、A、またはVから選択され、

X₃は、I、T、L、A、またはHから選択され、

X₄は、S、Y、またはPから選択され、

X₅は、Y、G、Q、またはRから選択され、

X₆は、GまたはPから選択され、

X₇は、A、Y、P、D、またはSから選択され、

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され、

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され、

20

X₁₂は、D、Q、H、またはVから選択され、

X₁₃は、GまたはSから選択され、

X₁₄は、R、G、F、L、またはDから選択され、

X₁₅は、W、S、P、またはLから選択され、かつ

X₁₆は、T、V、M、またはSから選択される。

【0226】

いくつかの実施形態では、

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され、

X₂は、G、A、またはVから選択され、

X₃は、T、L、A、またはHから選択され、

X₄は、YまたはPから選択され、

30

X₅は、G、Q、またはRから選択され、

X₆は、GまたはPから選択され、

X₇は、Y、P、D、またはSから選択され、

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され、

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され、

X₁₂は、Q、H、またはVから選択され、

X₁₃は、GまたはSから選択され、

X₁₄は、G、F、L、またはDから選択され、

X₁₅は、S、P、またはLから選択され、かつ

X₁₆は、V、M、またはSから選択される。

40

【0227】

いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号288の配列に示される通りである。いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号289の配列に示される通りである。いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号290の配列に示される通りである。いくつかの実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、及びX₁₆は、配列番号291の配列に示される通りである。

50

【0228】

いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンではない。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アラニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アルギニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アスパラギンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、アスパラギン酸である。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、システインである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、グルタミンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、グルタミン酸である。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、グリシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、ヒスチジンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、イソロイシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、ロイシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、リジンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、フェニルアラニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、セリンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、トレオニンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、トリプトファンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、チロシンである。いくつかの実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈は、独立して、バリンである。

【0229】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号288の配列に示される通りに示されている。

【0230】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号289の配列に示される通りに示されている。

【0231】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号290の配列に示される通りに示されている。

【0232】

いくつかの実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、及びX₁₈の位置に対応する位置が、上記のような任意の他のアミノ酸残基であり得ることを除いて、いくつかの実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除いて、配列番号291の配列に示される通りに示されている。

いくつかの実施形態では、ポリペプチドを含むタンパク質は、配列番号273の配列と少なくとも62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%

10

20

30

40

50

、 7 1 %、 7 2 %、 7 3 %、 7 4 %、 7 5 %、 7 6 %、 7 7 %、 7 8 %、 7 9 %、 8 0 %、 8 1 %、 8 2 %、 8 3 %、 8 4 %、 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号 2 7 3 の配列と少なくとも 8 5 %、 8 6 %、 8 7 %、 8 8 %、 8 9 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 または 9 9 % 同一である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号 2 7 3 の配列と少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 または 9 9 % 同一である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、配列番号 2 7 3 の配列と少なくとも 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 または 9 9 % 同一である。

10

【 0 2 3 3 】

パーセントアイデンティティは、NCBI ウェブサイトから入手可能な Blast P を使用して 2 つの配列をアラインメントするために、デフォルトパラメータを使用して決定することができる。

【 0 2 3 4 】

いくつかの実施形態では、ヒト CD 7 1 タンパク質（配列番号 2 または 5）に結合する、または特異的に結合するフィブロネクチン III 型（FN3）ドメインが、提供される。本明細書に提供されるように、FN3 ドメインは、CD 7 1 タンパク質に結合することができる。また、明示的に記載されていなくても、ドメインはまた、CD 7 1 タンパク質と特異的に結合することができることも、提供される。したがって、例えば、CD 7 1 に結合する FN3 ドメインはまた、CD 7 1 に特異的に結合する FN3 ドメインタンパク質も包含する。これらの分子は、例えば、治療及び診断用途ならびに画像化に使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される FN3 ドメインまたはその相補的核酸をコードするポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、ならびにそれらを作製及び使用方法が、提供される。

20

【 0 2 3 5 】

いくつかの実施形態では、CD 7 1 に結合する、または特異的に結合する単離された FN3 ドメインが、提供される。

【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、リンカーによって接続された 2 つの FN3 ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。リンカーは、本明細書に記載されるものなどの短ペプチド配列であり得る。例えば、リンカーは、G / S リンカーなどであり得る。

30

【 0 2 3 7 】

いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、本明細書に提供されるものなどのリンカーによって接続された 2 つの FN3 ドメインを含む。例示的なリンカーとしては、(GS)₂、(配列番号 7 2 0)、(GGGS)₂ (配列番号 7 2 1)、(GGGGS)₁₋₅ (配列番号 7 2 2)、(AP)₁₋₂₀；(AP)₂ (配列番号 7 2 3)、(AP)₅ (配列番号 7 2 4)、(AP)₁₀ (配列番号 7 2 5)、(AP)₂₀ (配列番号 7 2 6)、A(EAAAK)₅AAA (配列番号 7 2 7)、または(EAAAK)₁₋₅ (配列番号 7 2 8) が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK (配列番号 7 2 9)、GGGGSGGGSGGGSGGGGS (配列番号 7 3 0)、APAPAPAPAP (配列番号 7 3 1)、または EAAAK (配列番号 7 3 2) のアミノ酸配列を含むか、またはそれである。

40

【 0 2 3 8 】

いくつかの実施形態では、FN3 ドメインは、当業者によって実践されるように、表面プラズモン共鳴または Kinexa 法によって決定されるように、約 1×10^{-7} M 未満、例えば、約 1×10^{-8} M 未満、約 1×10^{-9} M 未満、約 1×10^{-10} M 未満、約 1×10^{-11} M 未満、約 1×10^{-12} M 未満、または約 1×10^{-13} M 未満の解離定数 (K_D) で CD 7 1 に結合し得る。特定の FN3 ドメイン-抗原相互作用の測定された

50

親和性は、異なる条件（例えば、浸透圧濃度、pH）下で測定された場合に、変化し得る。したがって、親和性及び他の抗原結合パラメータ（例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off} ）の測定は、タンパク質足場及び抗原の標準化された溶液、ならびに本明細書に記載される緩衝液などの標準化された緩衝液を用いて行われる。

【0239】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、標準溶液ELISAアッセイにおいて陰性対照について得られたシグナルが少なくとも5倍超えるCD71に結合し得る。

【0240】

いくつかの実施形態では、CD71に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、分子のN末端に連結された開始剤メチオニン（Met）を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、FN3ドメインのC末端に連結されたシステイン（Cys）を含む。N末端Met及び／またはC末端Cysの添加は、半減期を延長し、分子の他の機能を提供するために、発現及び／またはコンジュゲーションを促進し得る。

【0241】

FN3ドメインはまた、米国特許第10,196,446号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどのシステイン置換も含むことができる。簡潔には、いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリペプチドは、米国特許第10,196,446号の配列番号1、または本明細書に記載されるような、配列番号4に基づくFN3ドメインの残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、及び93からなる群から選択される位置、ならびに関連するFN3ドメインにおける等価位置に少なくとも1つのシステイン置換を含むことができる。

【0242】

米国特許第10,196,446号の配列番号1のアミノ酸配列は、

L P A P K N L V V S E V T E D S L R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E
K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R
S N P L S A E F T T（本明細書では、配列番号713）である。

【0243】

いくつかの実施形態では、置換は、残基6にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基8にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基10にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基11にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基14にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基15にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基16にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基20にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基30にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基34にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基38にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基40にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基41にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基45にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基47にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基48にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基53にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基54にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基59にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基60にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基62にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基64にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基70にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基88にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基89にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基90にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基91にある。いくつかの実施形態では、置換は、残基93にある。

【0244】

ドメインまたはタンパク質内のある位置におけるシステイン置換は、システイン残基による既存のアミノ酸残基の置き換えを含む。いくつかの実施形態では、置換の代わりに、システインは、上記の位置に隣接する配列に挿入される。システイン修飾の他の例は、例

例えば、米国特許出願公開第20170362301号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において見出され得る。配列のアラインメントは、例えばNCBIウェブサイトでのデフォルトパラメータを使用してBlastPを使用して行うことができる。

【0245】

いくつかの実施形態では、システイン残基は、ドメインまたはタンパク質内の任意の位置に挿入される。

【0246】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するFN3ドメインは、細胞内に内在化される。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞への検出可能な標識または治療薬の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞への細胞毒性剤の送達を促進し得る。細胞毒性剤は、治療薬として作用することができる。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞への本明細書に開示される任意の検出可能な標識剤、治療剤、及び／または細胞毒性剤の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、FN3ドメインの内在化は、細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、肝細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、筋肉細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、免疫細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、樹状細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、中枢神経系の細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、心臓細胞である。

【0247】

いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含む。

【0248】

いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号301のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号302のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号303のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号304のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号305のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号306のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号307のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号310のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号312のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号313のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号314のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号315のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号316のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号317のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号318のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号319のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号320のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号321のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号322のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CD71に結合する単離されたFN3ドメインは、配列番号323のアミノ酸配列を含む。

50

50

50

10

20

30

40

50

50

50

る単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 4 9 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 0 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 3 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 4 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 5 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 6 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 7 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 8 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 5 9 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 0 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 3 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 4 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 5 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 6 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 7 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 8 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 6 9 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 7 0 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 7 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 5 7 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 7 0 8 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 7 0 9 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、配列番号 7 1 0 のアミノ酸配列を含む。

【 0 2 4 9 】

いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、分子の N 末端に連結された開始剤メチオニン (M e t) を含む。

いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する単離された F N 3 ドメインは、2 7 3、2 8 8 ~ 2 9 1、3 0 1 ~ 3 1 0、3 1 2 ~ 5 7 2、5 9 2 ~ 5 9 9、または 7 0 8 ~ 7 1 0 のアミノ酸配列のうちの 1 つと 6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む。パーセントアイデンティティは、N C B I ウェブサイトから入手可能な B l a s t P を使用して 2 つの配列をアラインメントするために、デフォルトパラメータを使用して決定することができる。C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインの配列は、例えば、以下の表 6 において見出され得る。

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 6 : CD 7 1 に結合する FN 3 ドメイン配列

配列番号	CD71 に結合する FN3 ドメインのアミノ酸配列
301	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPITYIEAVVLGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVGISGVKGGHNSMPLSAIFTT
302	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFMINYSELFWMGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVVRIKGVKGGKGSWPLHAHFTT
303	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFIEYAETRWEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVVPIDGVKGGIASKPLSAIFTT
304	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYRDQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
305	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWVYIWGVKGGKPSFPLRAGFTT
306	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPHIYMETFSRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYRVPIGGVKGGSSCPLSAIFTT
307	MLPAPKNLVVSDVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
310	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEKIAIYETATRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVVPPIGVKGGNTSSPLSAIFTT
312	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIPYAEPSTGEAIVLTVPGSERS YDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSGPLSAISTT
313	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFLIAYPEDGFRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVPIGVKGGGGSGPLSAIFTT
314	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEPIYYVENVWGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYWEVIIGVKGGQCSRPLSAIFTT
315	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTECPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
316	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIAYREFRPSGEAIVLTVPGSER SYDLTVETGYRNEVVICGVKGGPWGSGPLSAIFTT
317	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPLYTECVYRGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYHVPITGVKGGGGSWPLSAIFTT
318	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFNIMYHEIIVGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVPIEGVKGGGTSGPLSAIFTT
319	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAITYTEAALCGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYPVPINGVKGGGTSGPLSAIFTT
320	MLPAPKNLVVARVTEDSARLSWTAPDAAIDSEFPIDYSEYWWGGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVLITGVKGGYRSGPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

321	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIRYNEFIVAGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYDVPIAGVKGGGASWPLSAIFTT
322	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWYLELQFAGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYNVPITGVKGGHISFPLSAIFTT
323	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIWEYHEWYGDGEAIVLTVPG SERSYDLTGPKPGTEYRVRISGVKGGFESGPLSAIFTT
324	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFMIRYQEGTRWGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYIVMIAGVKGGQISLPLSAIFTT
325	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIWYLEKSYQGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYVVPPIHGVKGGGRDSCPLSAIFTT
326	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPWVIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
327	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFRISYAETVRQGEAIVLTVPGSE RSYDLTVETGYRNWVMILGVKGGPGSLPLSAIFTT
328	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVVRAFDSEFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPWVIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
329	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIEYWEAVGFGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGYLSAPLSAIFTT
330	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIIHYVEQQLIGEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPVITGVKGGACSWPLSAIFTT
331	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIEYSEHPIDGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYVRIHGVKGGWFSHPLWAFFTT
332	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVTIAGVKGGWRSKPLNAESTT
333	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFGIAYVESYWYGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVPIYGVKGGDGSGLPLSAIFTT
334	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYITYVELNLAGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYVPVILGVKGGSLSQPLSAIFTT
335	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPISYIESIADGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYWVAIVGVKGGPFSWSLSAIFTT
336	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVPTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPPIAGVKGGGPSAPLSAIFTT
337	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSEFPIYYWEVTITGEAIYLSVPGSE RSYDLTGLKPGTEYVPDIPGVKGGASPPLSAIFTT
338	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPILYLEHTVRSEIVLTVPGSE RSYDLTDLKPGTEYCVPIDGVKGGRLSRPLSAIFTT
339	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIPYTEPPDPGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYLVITLGVKGGSMSVPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

340	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTIDYWENRCPGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYCVWISGVKGGYSSWPLSAIFTT
341	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGHLSPLSAIVTT
342	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDNFLIPYAETSPSGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSEPLSAIFTT
343	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVVYETRFGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYTPIDGVKGGGRSSPLSAIFTT
344	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIPYAEPSPTEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIVTT
345	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
346	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIPYAEPSPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGKLSPLSAIFTT
347	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYLEMMVTGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYDVPIGVKGGTRSVPLSAIFTT
348	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYLEEGYLEYYSGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVGVIVGVKGGGLSGPLSAISTT
349	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIPYAEPSPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDWLPLSAIFTT
350	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYREFQLSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYDVPIGVKGGGSRPLSAIFTT
351	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE CSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
352	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIDYDELAIFYGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
353	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
354	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYGEHIVIGEIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYMPVPIAGVKGGPISLPLSAIFTT
355	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIPYAEPSPTEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
356	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYVELVLLGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYDVLIPIGVKGGSLRPLSAIFTT
357	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYAEPSRNGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYTVLIHGVKGGCLSDPLSAIFTT
358	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTFIVYELSRHGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYWVIMFIVGVKGGGSKPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

359	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEVYNEVHWIGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGHWSKPLSAIFTT
360	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIDYDELAIFYGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
361	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFQIVYSELWIKGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYQVPIPIGVKGGGRNSFPLSAIFTT
362	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIRYTETRSIGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYCVPIGGVKGGDSSWPLSAISTT
363	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFCISYYERMGRGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYMVYIFGVKGGGLNSLPLSAIFTT
364	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIVYAEPIPNGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGRNSDPLSAIFTT
365	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGLSSPLSAIFTT
366	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIDYDEPRSPGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYRVFIWGIKGGDTSFPLSAIFTT
367	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTILYAEQAQFGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPITGVKGGTRSGPLSAISTT
368	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIIPYAEVRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
369	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFHIAYEETATSGEAIYLRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYGVIEGVKGGARSRLYADFTT
370	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGDLNPLSAIFTT
371	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPISYLELSLYGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVGIAGVKGGVVSRLPLSAIFTT
372	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIGYREWYWGGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVPISGVKGGDLSPPLSAIFTT
373	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
374	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFSITYLEWWNLGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYMTIPGVKGGMSSYPLSAIFTT
375	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTISYGEEALIGEAIYLRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYYVHIEGVKGGWSQPLAAFTT
376	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFTIEYYENIGIGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVPIVGVKGGPYSHPLSAIFTT
377	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGLSSPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

378	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFGIGYYEHKRFGEAIQLSVPG SERSYDLTGLKPGTEYEVLDIEGVKGGVLSWPLFAEFTT
379	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFVIEYTERFWSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVPIDGVKGGQCSTPLSAIFTT
380	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFVIDYEEGVIGEAIYLHVP SERSYDLTGLKPGTEYVVKIHGVKGGHPSHPLVAVFTT
381	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYVELRHLGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
382	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFLIPYAETSPSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSSPLSAIFTT
383	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYAEPRPDGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
384	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFSILYLELTPKGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
385	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFIIYEFPIPIGEAIVLTVPGSER SYDLTGLKPGTEYAVNIYGVKGGYLSHPLSAIFTT
386	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ECSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
387	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIEYTEFLYSGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYGVPIGVKGGFVSPPLSAIVTT
388	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIKYREVLRCGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYTPITGVKGGFGSSPLSAIFTT
389	MLPAPENLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFWIEYYEGVIQGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYFVAIWGVKGGKWSVPLSAIFTT
390	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAEFTT
391	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFQIHYWETQGFGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYPPVLIPGVKGGPSSLPLSAIFTT
392	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIPYAEPSTGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSDPLSAIFTT
393	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIEYYEPPPAGEAIYLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYDVTIYGVKGGYYSHPLFASFTT
394	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAIFTT
395	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYPPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
396	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFPIAYLEVFEYGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYQVPIEGVKGGAMSLPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

397	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIWYEEETTIGEAIYLVHVP GSE RSYDLTGLKPGTEYEVHITGVKGGPYSRPLFANFTT
398	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIAIYDEWPEFGEAIVLTVPG S ERSYDLTGLKPGTEYIVEIYGVKGGWFSWPLSAIFTT
399	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIFIPYAEPSTGEAIVLTVPG S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSVIFTT
400	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIWYEEVMYLGEAIVLTVPG S ERSYDLTGLKPGTEYNVPIPGVKGGHSSPPLSAIFTT
401	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHILYEELFLVGEAIVLTVPG S RSYDLTGLKPGTEYKVPISGVKGGPVSRLSAIFTT
402	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLTVPG S RSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
403	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIWLHVP G S ERSYDLTGLKPGTEYEVGIVSVKGGDLSVPLVAFFTT
404	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAISLLVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAVFTT
405	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAIFLVVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHANFTT
406	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAILLDVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYASFSTT
407	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAISLYVP G S ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
408	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAIQLRVPG S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMPLSAIFTT
409	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAIYLRVP G S RSYDLTGLKPGTEYRVVIGGVKGGWFSEPLLAFTT
410	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAIYLVVP G S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPYPLDASFTT
411	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAIDLGVPG S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMPLDPLEAYFTT
412	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAILLLVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
413	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAINLQVP G S ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFSTT
414	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAISLQVP G S RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSSPLFAVFTT
415	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIIAYAEPRPDGEAIELHVP G S RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

416	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLVVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
417	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAITLDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
418	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVASFTT
419	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAINLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
420	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLSVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
421	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIALWVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMPLSAIFTT
422	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIILVVPVGS RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT
423	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIQLWVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLGAVFTT
424	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLHVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLASFTT
425	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIALHVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
426	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLHVPVGS RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLHANFTT
427	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIFLGVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
428	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLRVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIASFTT
429	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAINLVVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
430	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFVIEYFEWTLNGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVQIYGVKGGCLSRPLSAIFTT
431	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLWVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAHFTT
432	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIPYAEPSPTGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT
433	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIYLYVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAFTT
434	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLQVPVGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

435	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIQLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAFFTT
436	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIWLHVP GS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLIAFTT
437	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIVLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
438	MLPTPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIQLRVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHASFTT
439	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIQLGVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLNANFTT
440	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIQLEVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAFTT
441	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIFLGVP GS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAFTT
442	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIGLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLKAQFTT
443	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAILLFVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAHFTT
444	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIGLYVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGAFTT
445	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAILLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAFTT
446	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAITLHVP GS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
447	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIVLEVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAHFTT
448	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIALHVP G SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAVFTT
449	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIQLWVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
450	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSRTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIVLIVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
451	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFFIGYLEPQPPGEAIQLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSRPLQAHFTT
452	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAITLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAFTT
453	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFYIAYAEPRPDGEAIALHVP G SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

454	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLVVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAHFTT
455	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLVVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHARFTT
456	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIFLQVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAAVFTT
457	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLHVPGE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
458	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLQVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAVFTT
459	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIYLVKVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAHFTT
460	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAYFTT
461	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLHVPGE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAKFTT
462	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIKLEVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAIFTT
463	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIYLEVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPFLKAAFTT
464	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
465	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAAWFTT
466	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIFLQVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLNAFTT
467	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILGVPGSER SYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAYSTT
468	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
469	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAVFTT
470	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAHFTT
471	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
472	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMLASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

473	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIHLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLSAFFT
474	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIQLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFT
475	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIQLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAKFTT
476	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIWLKVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
477	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIWLKVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
478	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIQLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
479	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIQLQVPG ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFFT
480	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIALLVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAQFTT
481	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIHLHVP ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAKFTT
482	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIHLHVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHALFTT
483	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAILLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGFPSMPLSAIFT
484	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAILLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSFTT
485	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIYLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAKFTT
486	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIQLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFT
487	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAISLLVPDS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLKFTT
488	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIGLVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
489	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAIQLTVPGS ERSYDLTGPKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLVAYFTT
490	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAISLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEASFTT
491	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEHIVYHEPRPSGEAISLDVPGS ERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSLPLVASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

492	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDIGYTEYGGYGEAIYLSVP GSERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
493	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLSVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIANFTT
494	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIALLV GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
495	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAII LDVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSSIFTT
496	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRASFTT
497	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIKLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFFTT
498	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAII LEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
499	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIIHLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHADFTT
500	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLEVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVADFTT
501	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAHFTT
502	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDIGYTEYGGYGEAILHVP GSERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
503	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIVLLVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLAAFTT
504	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAII LWVP SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSQFTT
505	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAII LGVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLHPLVALFTT
506	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLDVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
507	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIIHLSVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAAYFTT
508	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIVLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLVAAFTT
509	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAII LQVP GSCRSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAIFTT
510	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAINLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSFPLSAVFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

511	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLHVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAIFTT
512	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLAVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHAQFTT
513	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLGVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLFTT
514	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLQVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLCAEFTT
515	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLWVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLIAEFTT
516	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPPKFTT
517	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIILEVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLRAVFTT
518	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLVVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
519	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLKVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLEAIFTT
520	MLPAPKNPVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIHLLVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLKRLSPPVVTITITMAVCRKPVAEN LSQTLS
521	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIFLDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSPLTAFFTT
522	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIVLDVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLAAFTT
523	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIGLAVPGSE RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLQANFTT
524	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLRVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAEFTT
525	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLQVPGSE RSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSASFTT
526	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLHVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLTASFTT
527	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLRVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
528	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLRVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 3】

529	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAHFTT
530	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAFFTT
531	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLYVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSDPLDAVFTT
532	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIYLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSTFTT
533	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLFVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLKAYFTT
534	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLVVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
535	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIQLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSLPLSADFTT
536	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLQVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAEFTT
537	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIVLAVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYASFTT
538	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTTPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIRLQVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLGFTT
539	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLVVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAIFTT
540	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHAKFTT
541	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT
542	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLLVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAAFTT
543	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIGYLEPQPPGEAIHLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLAAVFTT
544	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAISLQVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLGAHFTT
545	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIALWVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVASFTT
546	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIQLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAFFTT
547	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAILLHVP GSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLRASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 4】

548	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWLGVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHATFTT
549	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHANFTT
550	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLRVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAKFTT
551	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSDPLQAVFTT
552	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLHVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAFFTT
553	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIIHVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAYFTT
554	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLAVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAKFTT
555	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLFVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSTPLSASFTT
556	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHAYFTT
557	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLRAYFTT
558	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAFFTT
559	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLGVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLLAVFTT
560	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLRVPG SERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
561	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLIAKFTT
562	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLHVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLQAIFTT
563	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALVVP SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAANFTT
564	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAINLSVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAYFTT
565	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLEVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLTASFTT
566	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIRLQVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLGASFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 5】

567	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIGLVWPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
568	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIYLEVPGS ERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
569	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFYIAYAEPRPDGEAIWLDVPG SERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
570	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIEYCETKMCGEAIVLTVPG SERSYDLTGLKPGTEYRVPIPGVKGGTASLPLSAIFTT
571	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIYYIESYPAGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
572	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFFIYYIESYPAGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
592	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPKN LVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLT GLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
593	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGGS GGGGSLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVL VPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
594	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKEAAAKEAAK EAAAKLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
595	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKLPAPKNLVVS RTEDSARLSWTAPDAAFDSEFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPG TEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
596	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPG SCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTAPAPAPAPAPLPAPK NLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTT
597	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPG SCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTGGGGSGGGSGGGG SGGGSLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSEFKIEYFEYVGYGEAIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 6】

598	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKEAAAKEAAAK EAAAKLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVL VPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
599	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKLPAPKNLVVS RTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIEYFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYYVAIYGVKGGWYSRPLSAIFTT
708	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS CRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
709	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGSE RSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
710	MLPAPKNLVVSRTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLGVPGSC RSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT

10

20

【 0 2 5 0】

本明細書に提供されるように、いくつかの実施形態では、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインは、配列番号 2（ヒト成熟 C D 7 1）または配列番号 5（ヒト成熟 C D 7 1 細胞外ドメイン）に結合し、各々の配列を、以下の表 7 において提供される。

【表 8】

表 7

配列番号	配列
2	MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKGPQQPLLQRLCSGPRLLLLSLGLSLLL LVVVCVIGSQNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNVGRKMK SLESQLEKQQKDLSEDHSSLLLHVKKQFVSDLRSLSCQMAALQGNGSERTCC PVNWVEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQ HHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDDWYGHGL GGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL
5	QNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNVGRKMKSLLESQLEKQ QKDLSEDHSSLLLHVKKQFVSDLRSLSCQMAALQGNGSERTCCPVNWVEHE RSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTW MGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDDWYGHGLGGGEDCAHF TDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

30

40

【 0 2 5 1】

いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインは、リンカーによって接続された 2 つの F N 3 ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。リンカーは、本明細書に記載されるものなどの短ペプチド配列であり得る。例えば、リンカーは、G / S または G / A リンカーなどであり得る。本明細書に提供されるように、リンカーは、(G S)₂、(

50

配列番号 720)、(GGGS)₂(配列番号 721)、(GGGS)₅(配列番号 722)、(AP)₂₋₂₀、(AP)₂(配列番号 723)、(AP)₅(配列番号 724)、(AP)₁₀(配列番号 725)、(AP)₂₀(配列番号 726)、及び A(EAAAK)₅AAA(配列番号 727)または(EAAAK)₁₋₅(配列番号 728)であり得る。これらは、非限定的な例であり、他のリンカーも使用することができる。GGGSまたはGGGA反復の数はまた、1、2、3、4、または5であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGS反復及び1つ以上のGGGA反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK(配列番号 729)、GGGS GGGS GGGS GGGS(配列番号 730)、APAPAPAPAP(配列番号 731)、またはEAAAK(配列番号 732)を含む。

10

【0252】

いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号593のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号594のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号595のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号596のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号597のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号598のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号599のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、リンカーによって接続された2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592～599のうちの1つのアミノ酸配列を有する。

20

【0253】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、当業者によって実践されるように、表面プラズモン共鳴またはKinexa法によって決定されるように、該当する場合、約 1×10^{-7} M未満、例えば、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 1×10^{-12} M未満、または約 1×10^{-13} M未満の解離定数(K_D)を有するCD71に結合し得る。特定のFN3ドメイン-抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件(例えば、浸透圧濃度、pH)下で測定された場合に、変化し得る。したがって、親和性及び他の抗原結合パラメータ(例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、タンパク質足場及び抗原の標準化された溶液、ならびに本明細書に記載される緩衝液などの標準化された緩衝液を用いて行われる。

30

【0254】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、標準溶液ELISAアッセイにおいて陰性対照について得られたシグナルが少なくとも5倍超えるその標的タンパク質に結合し得る。

40

【0255】

いくつかの実施形態では、その標的タンパク質に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、分子のN末端に連結された開始剤メチオニン(Met)を含む。いくつかの実施形態では、その標的タンパク質に結合する、または特異的に結合するFN3ドメインは、FN3ドメインのC末端に連結されたシステイン(Cys)を含む。N末端Met及び／またはC末端Cysの添加は、半減期延長分子の発現及び／またはコンジュゲーションを促進し得る。

【0256】

50

F N 3 ドメインはまた、米国特許第 10, 196, 446 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどのシステイン置換も含むことができる。簡潔には、いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインを含むポリペプチドは、システインで置換された残基を有する F N 3 ドメインを有し得、これは、システイン操作されたフィブロネクチン III 型（F N 3）ドメインと称され得る。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインは、米国特許第 10, 196, 446 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の配列番号 1（LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEINLTVPGSERSYDLTG L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R S N P L S A E F T T、配列番号 713）に基づいて、F N 3 ドメインの残基 6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、及び 93 からなる群から選択される位置、ならびに関連する F N 3 ドメインにおける同等の位置に少なくとも 1 つのシステイン置換を含む。ドメインまたはタンパク質内のある位置におけるシステイン置換は、システイン残基による既存のアミノ酸残基の置き換えを含む。システイン修飾の他の例は、例えば、米国特許出願公開第 20170362301 号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において見出され得る。配列のアラインメントは、例えば NCBI ウェブサイトでのデフォルトパラメータを使用して B l a s t P を使用して行うことができる。

10

いくつかの実施形態では、標的タンパク質に結合する F N 3 ドメインは、細胞内に内在化される。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインの内在化は、細胞への検出可能な標識または治療薬の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインの内在化は、細胞への細胞毒性剤の送達を促進し得る。細胞毒性剤は、治療薬として作用することができる。いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインの内在化は、細胞への本明細書に開示される任意の検出可能な標識剤、治療剤、及び／または細胞毒性剤の送達を促進し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、肝臓細胞、肺細胞、筋肉細胞、免疫細胞、樹状細胞、C N S の細胞、または心臓細胞である。いくつかの実施形態では、治療薬は、本明細書に提供される s i R N A 分子である。検出可能な標識にコンジュゲートされた C D 71 に結合する F N 3 ドメインは、インビボまたはインビトロで腫瘍組織などの試料上の C D 71 の発現を評価するために使用することができる。検出可能な標識にコンジュゲートされた C D 71 に結合する F N 3 ドメインは、インビボまたはインビトロで試料血液、免疫細胞、筋肉細胞、または樹状細胞上の C D 71 の発現を評価するために使用することができる。

20

30

【0257】

本明細書で提供されるように、s i R N A 分子に連結される異なる F N 3 ドメインはまた、異なる標的に結合する別の F N 3 ドメインにコンジュゲートまたは連結することができる。これにより、分子は、例えば、第 1 の標的及び別の標的に結合するように、多重特異的（例えば、二重特異的、三重特異的など）であることが可能になる。いくつかの実施形態では、第 1 の F N 3 結合ドメインは、腫瘍細胞によって発現される抗原（腫瘍抗原）に結合する別の F N 3 ドメインに連結されている。

【0258】

いくつかの実施形態では、F N 3 ドメインは、二価の F N 3 ドメインを形成するために、リンカーによって一緒に連結され得る。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、G / S リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、1、2、3、または 4 回の G / S 反復を有する。G / S 反復単位は、4 つのグリシン、続いてセリン、例えば、G G G G S である。リンカーの他の例を、本明細書に提供し、使用することもできる。

40

【0259】

いくつかの実施形態では、リンカーは、(G S)₂、(配列番号 720)、(G G G S)₂ (配列番号 721)、(G G G G S)₅ (配列番号 722)、(A P)₂₋₂₀、(A P)₂ (配列番号 723)、(A P)₅ (配列番号 724)、(A P)₁₀ (配列番号

50

725)、(AP)₂₀(配列番号726)、及びA(EAAAK)₅AAA(配列番号727)または(EAAAK)₁₋₅(配列番号728)のポリペプチドである。これらは、非限定的な例であり、他のリンカーも使用することができる。GGGGSまたはGGGA反復の数はまた、1、2、3、4、または5であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGGS反復及び1つ以上のGGGA反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGGS反復及び1つ以上のEAAAK反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上のGGGGS反復及び1つ以上の「AP」反復を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE(配列番号729)、GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS(配列番号730)、APAPAPAPAP(配列番号731)、またはEAAAK(配列番号732)を含む。

10

【0260】

任意の特定の理論に拘束されることなく、いくつかの実施形態では、核酸分子に連結されるFN3ドメインは、1つ以上のFN3ドメインの結合パートナー(例えば、腫瘍細胞)を発現し、その中に核酸分子の細胞内蓄積をもたらす、細胞への治療剤の標的送達において使用され得る。これにより、siRNA分子は、細胞機構と適切に相互作用して、標的遺伝子の発現を阻害し、有効性を改善することができ、いくつかの実施形態では、同じsiRNA分子の非標的投与によって生じ得る毒性も回避する。

【0261】

それらの特異的標的タンパク質に結合する本明細書に記載されるFN3ドメインは、例えば、標的分子結合の価及びしたがって結合力を増加させる手段として、または2つ以上の異なる標的分子に同時に結合する二重特異性もしくは多重特異性足場を生成する手段として、単量体、二量体、または多量体として生成され得る。二量体及び多量体は、単一特異性、二重特異性、または多重特異性タンパク質足場を連結することによって、例えば、アミノ酸リンカー、例えば、ポリグリシン、グリシン及びセリン、またはアラニン及びプロリンを含有するリンカーを包含することによって生成され得る。例示的なリンカーは、(GS)₂、(配列番号720)、(GGGS)₂(配列番号721)、(GGGGS)₅(配列番号722)、(AP)₂₋₂₀、(AP)₂(配列番号723)、(AP)₅(配列番号724)、(AP)₁₀(配列番号725)、(AP)₂₀(配列番号726)、及びA(EAAAK)₅AAA(配列番号727)または(EAAAK)₁₋₅(配列番号728)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE(配列番号729)、GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS(配列番号730)、APAPAPAPAP(配列番号731)、またはEAAAK(配列番号732)のアミノ酸配列を含むか、またはそれである。

20

30

【0262】

二量体及び多量体は、NからCの方向で互いに連結され得る。ポリペプチドを新規の連結した融合ポリペプチドに接続するための天然に存在するペプチドリナー及び合成ペプチドリナーの使用は、文献で周知である。例えば、Hall et al. (J Biol Chem., 1989, 264: 5260-5268)、Alfthan et al. (Protein Eng., 1995, 8: 725-731)、Robinson & Sauer (Biochemistry, 1996, 35: 109-116)、及び米国特許第5,856,456号を参照されたい。この段落に記載のリンカーは、本明細書及び上記で提供される式において提供されるドメインを連結するためにも使用され得る。

40

【0263】

半減期延長部分

【0264】

FN3ドメインはまた、いくつかの実施形態では、例えば共有結合相互作用を介して他のサブユニットを組み込み得る。いくつかの実施形態では、半減期延長部分をさらに含むFN3ドメイン。例示的な半減期延長部分は、アルブミン、アルブミンバリエーション、アル

50

ブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、トランスフェリン及びその断片及び類似体、ならびにFc領域である。ヒトFc領域のアミノ酸配列は、周知であり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、及びIgE Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、アルブミン、アルブミンバリエーション、アルブミン結合タンパク質及び／またはドメイン、ならびにその断片及び類似体に結合する。分子全体の半減期を延長する。

【0265】

いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメイン（タンパク質）は、単離される。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはそれであるアミノ酸配列を含むが、但し、タンパク質は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の位置10に対応する置換を有するものとする。いくつかの実施形態では、置換は、A10Vである。いくつかの実施形態では、置換は、A10G、A10L、A10I、A10T、またはA10Sである。いくつかの実施形態では、10位の置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、単離されたアルブミン結合ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と比較した場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14個の置換を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、置換は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の位置10に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、提供されるFN3ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の残基位置6、11、22、25、26、52、53、61、88、または位置6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、もしくは93に対応する少なくとも1つの残基位置に、またはC末端でシステイン残基を含む。位置は一連に列挙されているが、各位置はまた、個別に選択され得る。いくつかの実施形態では、システインは、位置6、53、または88に対応する位置にある。いくつかの実施形態では、アルブミン結合ドメインの追加の例は、米国特許第10,925,932号（参照により本明細書に組み込まれる）において見出され得る。

【0266】

抗体定常領域の全てまたは一部は、抗体様特性、特に、Fc領域に関連した特性、例えば、補体活性、半減期などを付与するために、FN3ドメインに付着され得、例えば、C1q結合、補体依存性細胞毒性（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）、食作用、細胞表面受容体の下方調節（例えば、B細胞受容体；BCR

10

20

30

40

50

）などのFcエフェクター機能は、これらの活性に関与するFc中の残基を修飾することによってさらに修飾され得る（概観のために、Strohl, Curr Opin Biotechnol. 20, 685-691, 2009を参照されたい）。

【0267】

例えば、PEG5000またはPEG20,000などのポリエチレングリコール（PEG）分子、異なる鎖長の脂肪酸及び脂肪酸エステル、例えば、ラウレート、ミリスレート、ステアレート、アラキダート、ベヘネート、オレエート、アラキドナート、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸など、ポリリジン、オクタン、炭水化物（デキストラン、セルロース、オリゴ類または多糖類）など、追加の部分が、所望の特性のために、FN3ドメインに組み込まれ得る。これらの部分は、タンパク質足場コード配列との直接融合であってもよく、標準的なクローニング及び発現技術によって生成され得る。代替的に、部分を本明細書に開示される組換え技術によって産生された分子にその部分を付着させるために、周知の化学的結合方法が、使用され得る。

【0268】

PEG部分は、例えば、システイン残基を分子のC末端に組み込むこと、またはシステインを分子の結合面から離れた残基位置に操作すること、及び周知の方法を使用して、PEG基をシステインに結合させることによって、FN3ドメインに付加され得る。

【0269】

追加の部分を組み込んだFN3ドメインは、いくつかの周知のアッセイによって機能性について比較され得る。例えば、Fcドメイン及び／またはFcドメインバリエーションの組み込みに起因する改変された特性は、FcγRI、FcγRII、FcγRIII、またはFcRn受容体などの受容体の可溶性形態を使用して、または例えばADCCもしくはCDCを測定する、またはインビボモデルにおいて本明細書に開示される分子の薬物動態特性を評価する周知の細胞ベースのアッセイを使用して、Fc受容体結合アッセイでアッセイされ得る。

【0270】

本明細書に提供される組成物は、FN3タンパク質及び核酸分子を調製し、それらを一緒に連結することによって調製することができる。タンパク質を核酸分子に連結するための技術は、既知であり、任意の方法が、使用することができる。例えば、いくつかの実施形態では、核酸分子は、本明細書に提供されるリンカーなどのリンカーで修飾され、次いでタンパク質は、リンカーを含む核酸分子と混合されて、組成物を形成する。例えば、いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、チオール-マレイミド化学を使用してsiRNAシステインにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、システイン含有FN3ドメインは、例えば、還元剤（例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP））を用いてリン酸緩衝生理食塩水（または任意の他の適切な緩衝液）中で還元されて、遊離チオールを得ることができる。次いで、いくつかの実施形態では、遊離チオール含有FN3ドメインを、マレイミド連結-修飾siRNA二重鎖と混合し、条件下でインキュベートして、連結した複合体を形成した。いくつかの実施形態では、混合物を、0～5時間、または約1、2、3、4、または5時間、室温でインキュベートする。反応は、例えば、N-エチルマレイミドでクエンチすることができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、親和性クロマトグラフィー及びイオン交換を使用して精製することができる。他の方法も使用することができ、これは、単なる1つの非限定的な実施形態である。

【0271】

FN3タンパク質を作製する方法は、既知であり、任意の方法は、タンパク質を生成するために使用することができる。実施例は、参照により本明細書に組み込まれる参考文献に提供される。

【0272】

いくつかの実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、または70

10

20

30

40

50

8～710のアミノ酸配列を含み、精製の容易さのためにポリペプチドのN末端またはC末端に、ヒスチジントグが付加されている。いくつかの実施形態では、ヒスチジントグ（His-タグ）は、6個のヒスチジン残基を含む。さらなる実施形態では、Hisタグは、少なくとも1つのグリシン残基または約2～約4つのグリシン残基によってFN3ドメインに接続される。したがって、FN3ドメインの精製及びポリペプチドからのHisタグの切断後、1つ以上のグリシンが、N末端またはC末端に残留し得る。いくつかの実施形態では、HisタグがN末端から除去される場合、全てのグリシンが、除去される。いくつかの実施形態では、HisタグがC末端から除去される場合、グリシンのうちの1つ以上が、保持される。

【0273】

いくつかの実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含み、N末端のメチオニンは、FN3ドメインの精製後に保持される。

【0274】

キット

【0275】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組成物を含むキットが、提供される。

【0276】

本キットは、治療用途のために、及び診断キットとして使用され得る。

【0277】

いくつかの実施形態では、本キットは、核酸分子にコンジュゲートされたFN3ドメインを含む。

【0278】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するためのキットが、提供される。いくつかの実施形態では、キットは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含むsiRNAに連結された1つ以上のFN3ドメインを含む薬学的組成物を含む第1の容器と、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための酵素補充療法（ERT）を含む薬学的組成物を含む第2の容器と、を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のFN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、siRNAは、Gys1を標的とする。いくつかの実施形態では、1つ以上のFN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、ポンペ病（GSD2、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）欠損症）、コリ病またはフォーブス病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（GSD12、アルドラーゼA（ALDOA）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）、アルドラーゼA（ALDOA）、マリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC／SLC37A4）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2／PHKB／PHKG2／PHKA1）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）、グルコース輸送体（GLUT2）、β-エノラーゼ（ENO3）、及びグリコゲンニン-1（GYG1）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、GAA、マリン、ラフォリン、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、第1の容器は、Gys1を標的とするsiRNAに連結されたCD71に結合するFN3ドメインを含む薬学的組成物を含み、第2の容器は、GAAの酵素を含む薬学的組成物を

10

20

30

40

50

含む。

【0279】

共役体FN3ドメインの使用

【0280】

本明細書に提供される組成物は、細胞、組織、臓器、流体、または概して、宿主におけるヒト疾患または特定の病理を診断する、モニタリングする、調節する、治療する、緩和する、その発生の防止またはその症状の軽減を助けるために使用することができる。

【0281】

いくつかの実施形態では、骨格筋におけるGYS1 mRNA及びタンパク質を選択的に低下させる方法。ある特定の実施形態では、GYS1 mRNA及びタンパク質は、肝臓及び／または腎臓において低下しない。

10

【0282】

いくつかの実施形態では、GYS1 mRNA及びタンパク質の低下は、本明細書に記載されるコンジュゲートの投与後、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、または5週間を超えて持続する。

【0283】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、筋肉疾患の治療のためにCD71陽性組織（例えば、骨格筋、平滑筋）への送達を促進することができる。

【0284】

いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、免疫学的疾患の治療のために、活性化リンパ球、樹状細胞、または他の免疫細胞への送達を促進することができる。

20

【0285】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患の治療を必要とする対象における自己免疫疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫甲状腺炎、セリアック病、1型真性糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、及び免疫血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。

30

【0286】

いくつかの実施形態では、ポンペ病（GSD2、酸アルファーグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を有する対象を治療する方法が、提供され、本方法は、対象に、本明細書に提供される組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。

40

【0287】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、本明細書に提供される組成物を投与することを含む、方法が、提供される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、コリ病またはフォブス病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、アルドラーゼA欠損症GSD12、ラフォラ病、低酸素症、アンデル

50

セン病（GSD 4、グリコーゲン脱分岐酵素（GBE 1）欠損症）、タルイ病（GSD 7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ（GYS 2）欠損症（GSD 0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC / SLC 37 A 4）欠損症（GSD 1、フォン・ギアケ病）、ハース病（GSD 6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）または筋ホスホグリセレートムターゼ（PGAM 2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA 2 / PHKB / PHKG 2 / PHKA 1）欠損症（GSD 9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM 2）欠損症（GSD 10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD 11）、ファンコニービッセル症候群（GSD 11）、グルコーストランスポーター（GLUT 2）欠損症、アルドラーゼ A 欠損症（GSD 12）、 β -エンノラーゼ（ENO 3）欠損症（GSD 13）、及びグリコゲンニン-1（GYG 1）欠損症（GSD 15）からなる群から選択される。

10

【0288】

いくつかの実施形態では、がんを治療するための薬学的組成物または薬剤の調製における、本明細書に提供される組成物またはのいずれかの使用が、提供される。いくつかの実施形態では、がんは、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、胃癌、透明細胞腎細胞癌、乳房の透明細胞癌、子宮内膜の透明細胞癌、卵巣の透明細胞癌、子宮の明細胞癌、肝細胞癌、脾臓癌、前立腺癌、軟組織癌、ユーイング肉腫、及び非小細胞肺癌からなる群から選択される。

20

【0289】

いくつかの実施形態では、CD 71 細胞は、CNS 疾患、MS などの炎症性／免疫性疾患、及び脳の感染症に関与する細胞である。いくつかの実施形態では、CD 71 に結合するポリペプチドは、中枢神経系に向けられる。いくつかの実施形態では、神経学的状態及び／または脳腫瘍の治療を必要とする対象における神経学的状態及び／または脳腫瘍を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD 71 に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD 71 に結合する FN 3 ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 301 ~ 301、310、312 ~ 519、521 ~ 572、592 ~ 599、もしくは 708 ~ 710 などの配列、または治療剤に連結もしくは

30

【0290】

いくつかの実施形態では、がんを有する対象を治療する方法が、提供され、本方法は、対象に、本明細書に提供される組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD 71 に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD 71 に結合する FN 3 ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 301 ~ 301、310、312 ~ 519、521 ~ 572、592 ~ 599、もしくは 708 ~ 710 などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。

40

【0291】

いくつかの実施形態では、対象は、固形腫瘍を有する。

【0292】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、黒色腫である。

50

【0293】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、肺癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、非小細胞肺癌（NSCLC）である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、扁平上皮非小細胞肺癌（NSCLC）である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、非扁平上皮NSCLCである。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、肺腺癌である。

【0294】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、腎細胞癌（RCC）である。

【0295】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、中皮腫である。

【0296】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、上咽頭癌（NPC）である。

【0297】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、結腸直腸癌である。

【0298】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、前立腺癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、去勢抵抗性前立腺癌である。

【0299】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、胃癌である。

【0300】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、卵巣癌である。

【0301】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、胃癌である。

【0302】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、肝臓癌である。

【0303】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、膵臓癌である。

【0304】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、甲状腺癌である。

【0305】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、頭頸部の扁平上皮癌である。

【0306】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、食道または胃腸管の癌腫である。

【0307】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、乳癌である。

【0308】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、卵管癌である。

【0309】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、脳腫瘍である。

【0310】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、尿道癌である。

【0311】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、泌尿生殖器癌である。

【0312】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、子宮内膜症である。

【0313】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、子宮頸癌である。

【0314】

いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、がんの転移性病変である。

【0315】

いくつかの実施形態では、対象は、血液悪性腫瘍を有する。

10

20

30

40

50

【0316】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、骨髄腫、または白血病である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、B細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、バーキットリンパ腫である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、ホジキンリンパ腫である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、非ホジキンリンパ腫である。

【0317】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、骨髄異形成症候群である。

【0318】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄性白血病（CML）である。いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄単球性白血病（CMML）である。

【0319】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、多発性骨髄腫（MM）である。

【0320】

いくつかの実施形態では、血液悪性腫瘍は、形質細胞腫である。

【0321】

いくつかの実施形態では、がんは、軟組織癌である。いくつかの実施形態では、軟組織癌は、ユーイング肉腫である。

【0322】

いくつかの実施形態では、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の使用は、がんを治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、本組成物は、がんを治療するために使用することができる。

【0323】

いくつかの実施形態では、ポンペ病（GSD2、酸性α-グルコシダーゼ（GAA）欠損症）の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の使用は、ポンペ病（GSD2、酸性α-グルコシダーゼ（GAA）欠損症）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、この組成物は、ポンペ病（GSD2、酸性α-グルコシダーゼ（GAA）欠損症）を治療するために使用することができる。

【0324】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の使用は、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、本組成物は、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するために使用することができる。

【0325】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、本明細書に提供される組成物を投与することを含む、当該方法が、提供される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、コリ病またはフォブス病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、アルドラーゼA欠損症GSD12、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン脱分岐酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、及び成人ポリグルコサン小体病

10

20

30

40

50

からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC/SLC37A4）欠損症（GSD1、フォン・ギアケ病）、ハース病（GSD6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）または筋ホスホグリセレートムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症（GSD10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD11）、ファンコニービッケル症候群（GSD11）、グルコーストランスポーター（GLUT2）欠損症、アルドラーゼA欠損症（GSD12）、 β -エンノラーゼ（ENO3）欠損症（GSD13）、及びグリコゲンニン-1（GYG1）欠損症（GSD15）からなる群から選択される。

10

【0326】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、中枢神経系に向けられる。いくつかの実施形態では、神経学的状態及び／または脳腫瘍の治療を必要とする対象における神経学的状態及び／または脳腫瘍を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、脳腫瘍は、非悪性、良性、及び悪性の脳腫瘍からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調症、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギランバレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、片頭痛、脳炎、敗血症、及び重症筋無力症からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象における神経学的状態及び／または脳腫瘍を治療する方法であって、本方法が、対象に、CD71に結合するFN3ドメインを投与することを含み、FN3ドメインは、治療剤（例えば、細胞毒性剤、siRNA、ASOなどのオリゴヌクレオチド、別の標的に結合するFN3ドメインなど）にコンジュゲートされる。

20

30

【0327】

いくつかの実施形態では、ポンペ病の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、対象におけるポンペ病を治療する方法であって、本方法が、対象に、CD71に結合するFN3ドメインを投与することを含み、FN3ドメインは、治療剤（例えば、細胞毒性剤、siRNA、ASOなどのオリゴヌクレオチド、別の標的に結合するFN3ドメインなど）にコンジュゲートされる。

40

【0328】

いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞に向けられる。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患の治療を必要とする対象における自己免疫疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、CD71に結合するポリペプチドまたは薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、そのポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521

50

～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤に連結もしくはコンジュゲートされる、本明細書に提供されるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫甲状腺炎、セリアック病、1型真性糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、及び免疫血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象における自己免疫疾患を治療する方法であって、本方法が、対象に、CD71に結合するFN3ドメインを投与することを含み、FN3ドメインは、治療剤（例えば、細胞毒性剤、siRNA、ASOなどのオリゴヌクレオチド、別の標的に結合するFN3ドメインなど）にコンジュゲートされる。

【0329】

いくつかの実施形態では、細胞における標的遺伝子の発現を低減する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物を用いて細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、エクスピボである。いくつかの実施形態では、細胞は、インスピボである。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、GYS1である。しかしながら、本明細書に提供される証拠は、siRNA分子がFN3ドメインにコンジュゲートされたときに効率的に送達され得ることを実証するため、標的遺伝子は、任意の標的遺伝子であり得る。いくつかの実施形態では、GYS1を標的とするsiRNAは、FN3ドメインに連結されている。いくつかの実施形態では、FN3ポリペプチド（ドメイン）は、CD71に結合するものである。いくつかの実施形態では、FN3ポリペプチドは、本明細書に提供されるか、またはPCT出願第PCT/US20/55509号、米国出願第17/070,337号、PCT出願第PCT/US20/55470号、または米国出願第17/070,020号に提供され、これらの各々は、本明細書に参照によりその全体が組み込まれる。いくつかの実施形態では、siRNAは、FN3ドメインにコンジュゲートされていない。

【0330】

いくつかの実施形態では、細胞における標的遺伝子の発現を低減させる方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物を用いて細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、エクスピボである。いくつかの実施形態では、細胞は、インスピボである。いくつかの実施形態では、標的遺伝子の発現を低減させる方法は、標的遺伝子の発現を約99%、90～99%、50～90%、または10～50%の低減をもたらす。

【0331】

いくつかの実施形態では、GYS1の発現を低減させる方法が、提供される。いくつかの実施形態では、低減された発現は、GYS1 mRNAの発現（量）である。いくつかの実施形態では、GYS1の発現を低減させる方法は、GYS1の発現の約99%、90～99%、50～90%、または10～50%の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、低減された発現は、GYS1タンパク質の発現（量）である。いくつかの実施形態では、低減されたタンパク質は、グリコーゲンである。いくつかの実施形態では、グリコーゲンの低減は、筋肉細胞において生じる。いくつかの実施形態では、グリコーゲンの低減は、心臓細胞において生じる。いくつかの実施形態では、本方法は、GYS1を標的とする本明細書に提供されるsiRNA分子を用いて細胞に送達することを含む。いくつかの実施形態では、siRNAは、FN3ドメインにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、本明細書に提供されるようなものである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合する2つのFN3ドメインの二量体である。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、同じである。いくつかの実施形態では、2つのFN3ドメインは、異なっている、すなわち、CD71の異なる領域またはアミノ酸残基、すなわち、異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象（患者）に、本明細書に提供されるものなどのGYS1 siRNA分子を投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象に投与されるGYS1 siRNAは、F

10

20

30

40

50

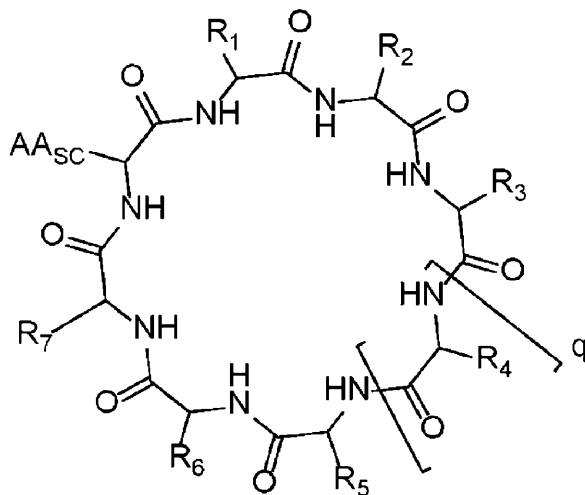
N3ドメインにコンジュゲートされるか、または連結される。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、本明細書に提供されるようなものである。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合する2つのFN3ドメインの二量体である。いくつかの実施形態では、FN3ドメインは、同じである。いくつかの実施形態では、2つのFN3ドメインは、異なっている、すなわち、CD71の異なる領域またはアミノ酸残基、すなわち、異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、CD71結合ドメインは、本明細書に提供されるポリペプチドである。

【0332】

いくつかの実施形態では、siRNAは、化学式IIIの環状ペプチド：

10

【化16】



20

(化学式III)

またはそのプロトン化形態にコンジュゲートされ、式中、R₁、R₂、及びR₃は、各々独立して、Hまたはアミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、R₁、R₂、及びR₃の少なくとも1つは、アミノ酸の芳香族またはヘテロ芳香族側鎖であり、R₄、R₅、R₆、R₇は、独立して、Hまたはアミノ酸側鎖であり、R₄、R₅、R₆、R₇の少なくとも1つは、3-グアニジノ-2-アミノプロピオン酸、4-グアニジノ-2-アミノブタン酸、アルギニン、ホモアルギニン、N-メチルアルギニン、N,N-ジメチルアルギニン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、リジン、N-メチルリジン、N,N-ジメチルリジン、N-エチルリジン、N,N,N-トリメチルリジン、4-グアニジノフェニルアラニン、シトルリン、N,N-ジメチルリジン、b-ホモアルギニン、3-(1-ピペリジニル)アラニンの側鎖であり、AA_{Sc}は、アミノ酸側鎖であり、qは、1、2、3、または4であり、国際特許公開第WO2022/213118号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において開示されるように、式@@の環状ペプチドは、FfΦRrRrEではない。「FfΦRrRrE」は、「F」が、L-Pheであり、「f」が、D-Pheであり、「Φ」が、L-2-ナフチルアラニンであり、「R」が、L-アルギニンであり、「r」が、D-アルギニンである構造を指す。「FfΦRrRrE」はまた、Soudah et al. (“Antimicrobial-155 Cyclic Peptide-PNA Conjugate: Synthesis, Cellular Uptake, and Biological Activity”, ACS Omega, 2019, 4(9):13954-13961)においても記載され、これにより、参照によりその全体が組み込まれる。

30

40

【0333】

いくつかの実施形態では、siRNA分子を対象における細胞に送達する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される組成物を含

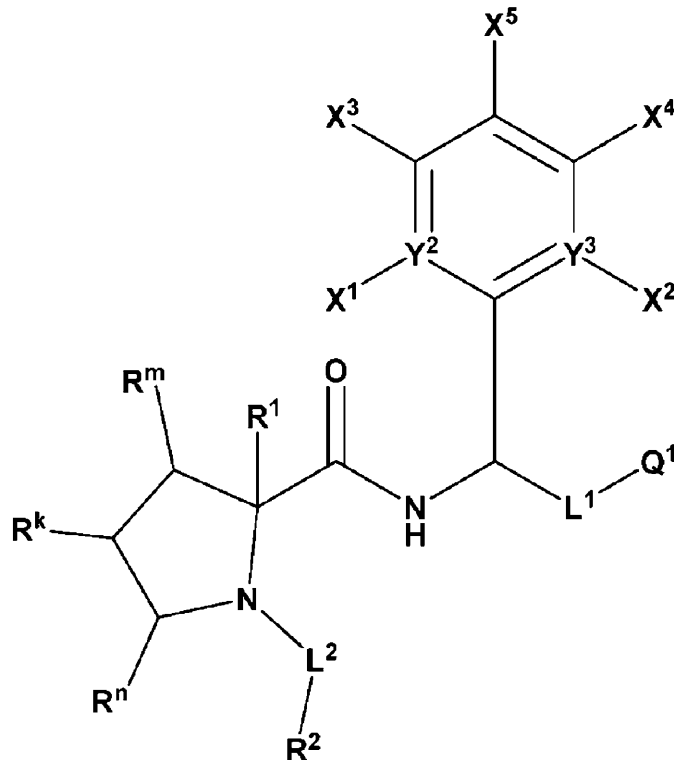
50

む薬学的組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、CD71陽性細胞である。タンパク質に関する「陽性細胞」という用語は、タンパク質を発現する細胞を指す。いくつかの実施形態では、タンパク質は、細胞表面上で発現される。いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝臓細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、筋肉細胞、CNSの細胞、または血液脳関門内の細胞である。いくつかの実施形態では、siRNAは、細胞における標的遺伝子の発現を下方制御する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、GYS1である。

【0334】

いくつかの実施形態では、国際特許公開第WO2022/198196号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、化学式IVの化合物、

【化17】



(化学式IV)

またはその立体異性体もしくは互変異性体を含む組成物、または前述のうちのいずれかの薬学的に許容される塩が、本明細書に提供され、式中、Y²及びY³が、各々、Cであるか、またはY²及びY³の一方が、Nであり、Y²及びY³のもう一方が、Cであり、X¹及びX²が、各々独立して、H、C₁–6アルキル、またはC₁–6アルコキシであり、X³及びX⁴が、各々独立して、H、ハロ、C₁–6アルキル、C₁–6アルコキシ、または5～20員ヘテロアリールであり、式中、X³及びX⁴のC₁–6アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換され、X⁵が、H、C₁–6アルキル、C₁–6アルコキシ、またはC₃–10シクロアルキルであり、いずれか(1) L¹が存在せず、Q¹は、(i)～(iv)：(i)フェニル（式中、Q¹のフェニルが、1つ以上のハロ、C₁–6アルキル、C₂–6アルケニル、–NH₂、–NH–C(O)–(C₁–6アルキル)、–NH–C(O)–(3～15員ヘテロシクリル)、C₃–10シクロアルキル、または5～20員ヘテロアリールで置換され、式中、C₁–6アルキルが、1つ以上のハロ、–NH–C(O)–NH(C₁–6アルキル)、–NH–C(O)–C₁–6アルキル、または–NH–C(O)–C₁–6アルコキシで任意選択的に置換され、C₃–10シクロアルキルが、1つ以上のハロまたはC₁–6アルキルで任意選択的に置換され、5～20員ヘテロアリールが、1つ以上のC₁–6アルキルで任意選択的に置換される)、(ii)3～15員ヘテロシクリル（式中、Q¹の3～15員ヘテロシクリルが、1つ以上のオ

キソ、または C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換される)、 (iii) 5～20員ヘテロアリール(式中、 Q^1 の5～20員ヘテロアリールが、1つ以上のハロ、 C_{1-6} アルキル、 C_{2-6} アルケニル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-NH_2$ 、または C_{3-10} シクロアルキルで任意選択的に置換され、式中、 C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換され、 C_{3-10} シクロアルキルは、1つ以上のハロまたは C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換される)、及び (iv) C_{3-10} シクロアルキル、から選択されるか、あるいは (2) L^1 が、 $-CH_2-$ であり、 Q^1 が、 C_{3-10} シクロアルキルであり、 L^2 が、 $-C(O)-$ もしくは $-S(O)_2-$ であり、 R^1 が、 H もしくは C_{1-6} アルキルであり、 R^k が、 H 、ハロ、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、もしくは $-NH-C(O)-C_{1-6}$ アルキルであり、 R^m が、 H 、 $-OH$ 、または C_{1-6} アルキルであり、 R^n が、 H 、 C_{1-6} アルキル、もしくは C_{3-10} シクロアルキルであるか、または R^n が、それが結合する炭素原子と一緒にあって、 C_{3-5} シクロアルキルを形成するか、または R^k が、 R^m もしくは R^n のいずれかと一緒にあって、それらが結合する原子と一緒にあって、シクロプロピルを形成し、 R^2 が、 $(i) \sim (vii)$: (i) C_{1-6} アルキル(式中、 R^2 の C_{1-6} アルキルが、1つ以上の R^a で任意選択的に置換され、式中、 R^a が、 $(a) -OH$ 、 (b) シアノ、 (c) C_{2-6} アルキニル、 (d) C_{6-20} アリール(式中、 R^a の C_{6-20} アリールが、1つ以上のハロ、シアノ、 C_{1-6} アルコキシ、もしくは $-NH-C(O)-C_{1-6}$ アルキルで任意選択的に置換される)、 (e) 3～15員ヘテロシクリル(式中、 R^a の3～15員ヘテロシクリルが、1つ以上の R^c で任意選択的に置換され、式中、 R^c が、ハロ、オキソ、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、もしくは $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシであり、式中、 R^c の C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロまたは C_{2-6} アルキニルで任意選択的に置換され、 R^c の $-C(O)-C_{1-6}$ が、1つ以上のハロで任意選択的に置換される)、 $(f) -N(R^c)(R^d)$ (式中、 $-N(R^c)(R^d)$ の R^c 及び R^d が、互いに独立して、 H 、 C_{1-6} アルキル、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルキル、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシ、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_{1-6}$ アルキル)、 $-C(O)-N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル)、 $-CH_2-C(O)-NH_2$ 、3～15員ヘテロシクリル、もしくは5～20員ヘテロアリールであり、式中、 R^c または R^d の C_{1-6} アルキルが、1つ以上の $-C(O)-NH_2$ で任意選択的に置換され、 R^c または R^d の $-C(O)-C_{1-6}$ アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換され、 R^c または R^d の3～15員ヘテロシクリル及び5～20員ヘテロアリールが、独立して、1つ以上の C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 R^c または R^d の $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル)が、1つ以上のハロ、 $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシ、もしくは C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロ、 C_{1-6} アルコキシ、または C_{3-10} シクロアルキル、及び C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 R^c または R^d の $-C(O)-N(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ が、互いに独立して、1つ以上のハロもしくは C_{6-20} アリールで任意選択的に置換される)、 $(g) -O-R^e$ (式中、 R^e が、 C_{1-6} アルキル、 C_{6-20} アリール、 $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル)、 $-C(O)-N-(C_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、もしくは5～20員ヘテロアリールであり、 R^e の C_{1-6} アルキルが、1つ以上の C_{1-6} アルコキシで任意選択的に置換され、 C_{1-6} アルコキシが、1つ以上の C_{2-6} アルキニルで任意選択的に置換され、 R^e の C_{6-20} アリールが、1つ以上の C_{1-6} アルキルで任意選択的に置換され、 R^e の $-C(O)-(3 \sim 15$ 員ヘテロシクリル)が、1つ以上の C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、もしくは $-C(O)-C_{1-6}$ アルコキシで任意選択的に置換され、 C_{1-6} アルキルが、1つ以上のハロ、 C_{1-6} アルコキシ、もしくは C_{3-10} シクロアルキルで任意選択的に置換される) $(h) -C(O)-R^e$ (式中、 R^e が、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、もしくは3～15員ヘテロシクリルである)、あるいは $(i) -S(O)_2-R^f$ (式中、 R^f が、 C_{1-6} アルキルもしくは3～15員ヘテロシクリルである)が、但し、 R^2 が、非置換メチルである場合、いずれか (1) Q^1 が、5～20員ヘテロアリールであり、式中、 Q^1 の5～20

10

20

30

40

50

員ヘテロアリアルが、1つ以上のハロ、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、C₁₋₆アルコキシ、-NH₂、C₃₋₁₀シクロアルキル、もしくは-OHで任意選択的に置換され、Q¹が、非置換ピリジルではないか、あるいは(2) Q¹が、フェニルであり、Q¹のフェニルが、(i) 少なくとも1つのC₃₋₆アルキルであって、少なくとも1つのC₃₋₆アルキルが、1つ以上のハロで任意選択的に置換された、少なくとも1つのC₃₋₆アルキル、または(ii) 少なくとも1つのC₃₋₁₀シクロアルキルであって、少なくとも1つのC₃₋₁₀シクロアルキルが、1つ以上のハロまたはC₁₋₆アルキルで任意選択的に置換された、少なくとも1つのC₃₋₁₀シクロアルキル、または(iii) 少なくとも1つの5~20員ヘテロアリアルであって、少なくとも1つの5~20員のヘテロアリアルが、1つ以上のC₁₋₆アルキルで任意選択的に置換された、少なくとも1つの5~20員ヘテロアリアル、で置換されることを条件とし、(iii) C₃₋₁₀シクロアルキル(R²のC₃₋₁₀シクロアルキルが、1つ以上のR⁹で任意選択的に置換され、R⁹が、5~20員のヘテロアリアルもしくはC₆₋₂₀アリアルであり、R⁹のC₆₋₂₀アリアルが、1つ以上のC₁₋₆アルコキシで任意選択的に置換される)、(iii) 3~15員ヘテロシクリル(式中、R²の3~15員のヘテロシクリルが、1つ以上のハロ、オキソ、C₁₋₆アルキル、-C(O)-C₁₋₆アルキル、もしくは5~20員ヘテロアリアルで任意選択的に置換される)、(iv) 5~20員のヘテロアリアルまたは-(C₁₋₄アルキル)(5~20員ヘテロアリアル)(式中、C₁₋₄アルキルが、1つ以上の-OH、ハロ、-NH₂、-NH(C₁₋₆アルキル)、-N(C₁₋₆アルキル)₂で任意選択的に置換され、5~20員ヘテロアリアルが、1つ以上のR^sで任意選択的に置換され、R^sが、ハロ、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁₋₆アルキル)、-N(C₁₋₆アルキル)₂、-NH-C(O)-C₁₋₆アルキル、C₆₋₂₀アリアル、C₃₋₁₀シクロアルキル、3~15員ヘテロシクリル、5~20員ヘテロアリアル、もしくは-C(O)-C₁₋₆アルコキシであり、R^sのC₁₋₆アルキルが、1つ以上のハロ、C₁₋₆アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁₋₆アルキル)、-N(C₁₋₆アルキル)₂、-NH-C(O)-C₁₋₆アルキル、もしくは-NH-C(O)-C₁₋₆アルコキシで任意選択的に置換され、R^sの3~15員ヘテロシクリルが、1つ以上のハロもしくは-C(O)-C₁₋₆アルコキシで任意選択的に置換され、(v) -N(R^g)(R^h)(式中、R^g及びR^hは、独立して、HまたはC₁₋₆アルキルである)、(vi) -C(O)-R^j(式中、R^jは、C₃₋₁₀シクロアルキル、-NH(C₁₋₆アルキル)、-N(C₁₋₆アルキル)₂、または-NH(5~20員ヘテロアリアル)である)、及び(vii) C₆₋₂₀アリアル(式中、R²のC₆₋₂₀アリアルが、1つ以上の5~20員ヘテロアリアルまたは-O-R^pで任意選択的に置換され、R^pが、3~15員ヘテロシクリルであり、R^pの3~15員ヘテロシクリルが、1つ以上の-C(O)-C₁₋₆アルキルで任意選択的に置換される)、から選択される。

【0335】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物は、細胞、組織、臓器、流体、または概して、宿主におけるヒト疾患または特定の病理を診断する、モニタリングする、調節する、治療する、緩和する、その発生の防止またはその症状の軽減を助け、血液脳関門を横断することができる特性も示すために使用することができる。血液脳関門(BBB)は、ほとんどの巨大分子(例えば、DNA、RNA、及びポリペプチド)ならびに多くの小分子が脳に入るのを防止する。BBBは、主に、高度に制限的な密着結合を有する特殊な内皮細胞で構成されているため、血液から中枢神経系への物質の大小の通過は、BBBによって制御される。この構造は、多くの治療剤が所望の効率でBBBを横断して送達することができないため、神経疾患及び障害(例えば、脳腫瘍)を有する患者の治療及び管理を困難にする。BBBの混乱を伴う追加の状態には、脳卒中、糖尿病、発作、高血圧性脳症、後天性免疫不全症候群、外傷性脳損傷、多発性硬化症、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、パーキンソン病(PD)、及びアルツハイマー病が含まれる。この能力は、例えば、星状細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、神経膠腫、上皮細胞腫、生殖細

胞腫（松果体腫）、多形性膠芽腫、乏突起神経膠腫、神経鞘腫、網膜芽腫、及び先天性腫瘍、または脊髄癌、例えば、神経繊維腫、髄膜腫、神経膠腫、及び肉腫を含む脳腫瘍を治療するために特に有用である。これは、ポンベ病及び／またはグリコーゲン貯蔵疾患の治療においてさらに有用である。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、例えば、血液脳関門を横断して治療剤または細胞毒性剤を送達するために使用することができる。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、例えば、筋肉内に治療剤または細胞毒性剤を送達するために使用することができる。

【0336】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、本明細書に提供される組成物を投与することを含む、当該方法が、提供される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、コリ病またはフォブス病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、アルドラーゼA欠損症GSD12、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン脱分岐酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC/SLC37A4）欠損症（GSD1、フォン・ギアケ病）、ハース病（GSD6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）または筋ホスホグリセレートムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症（GSD10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD11）、ファンコニービッケル症候群（GSD11）、グルコーストランスポーター（GLUT2）欠損症、アルドラーゼA欠損症（GSD12）、β-エンノラーゼ（ENO3）欠損症（GSD13）、及びグリコゲンニン-1（GYG1）欠損症（GSD15）からなる群から選択される。

【0337】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物は、筋ジストロフィー、DMDなどの筋肉疾患を治療するために使用することができる。

【0338】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物は、単独で、または他の治療薬と組み合わせて、すなわち、同時に、または連続的に投与され得る。いくつかの実施形態では、他のまたは追加の治療薬は、他の抗腫瘍剤または治療薬である。腫瘍の異なる腫瘍タイプ及び病期は、がんの治療に有用な様々な補助化合物の使用を必要とし得る。例えば、本明細書に提供される組成物は、とりわけ、タキソール、チロシンキナーゼ阻害剤、ロイコボリン、フルオロウラシル、イリノテカン、ホスファターゼ阻害剤、MEK阻害剤などの様々な化学療法剤と組み合わせて使用され得る。本組成物はまた、とりわけ、抗PD-1または抗CTLA-4などの腫瘍に対する免疫応答を調節する薬物と組み合わせても使用され得る。追加の治療は、免疫系を調節する薬剤、例えばPD-1またはPD-L1を標的とする抗体であり得る。

【0339】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物は、酵素補充療法（ERT）と組み合わせて投与され得る。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するように設計されたERTである。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、ポンベ病（GSD2、グルコシダーゼアルファ酸（GAA）欠損症）、コリ病またはフォブス病（GSD3、グリコーゲン脱分岐酵素（AGL）欠損症）、アンデルセン病（GSD4、グリコーゲン分岐酵素（GBE1）欠損症）、マッカードル病（GSD5、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、タルイ病（GSD7、筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（

GSD12、アルドラーゼA (ALDOA) 欠損症)、II型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患は、グリコーゲンシンターゼ (GYS2) 欠損症 (GSD0)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC37A4) 欠損症 (GSD1、フォン・ギアケ病)、ハース病 (GSD6、肝グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGL) または筋ホスホグリセレートムターゼ (PGAM2) 欠損症)、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1) 欠損症 (GSD9)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM2) 欠損症 (GSD10)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA) 欠損症 (GSD11)、ファンコニービッケル症候群 (GSD11)、グルコーストランスポーター (GLUT2) 欠損症、アルドラーゼA欠損症 (GSD12)、 β -エンノラーゼ (ENO3) 欠損症 (GSD13)、及びグリコゲンニン-1 (GYG1) 欠損症 (GSD15) からなる群から選択される。

10

【0340】

したがって、いくつかの実施形態では、ERTは、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA)、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL)、グリコーゲン分岐酵素 (BGE1)、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM)、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM)、アルドラーゼA (ALDOA)、マリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ (GYS2)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC37A4)、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1)、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM2)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA)、グルコース輸送体 (GLUT2)、 β -エンノラーゼ (ENO3)、グリコゲンニン-1 (GYG1)、またはこれらの任意の組み合わせからなる群から選択される1つ以上の酵素または遺伝子置換産物の投与を含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコシダーゼアルファ酸 (GAA) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲン脱分岐酵素 (AGL) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲン分岐酵素 (BGE1) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、アルドラーゼA (ALDOA) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、マリンを投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、ラフォリンを投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコーゲンシンターゼ (GYS2) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC / SLC37A4) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、ホスホリラーゼキナーゼ (PHKA2 / PHKB / PHKG2 / PHKA1) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、ホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM2) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グルコーストランスポーター (GLUT2) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、 β -エンノラーゼ (ENO3) を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ERTは、グリコゲンニン-1 (GYG1) を投与することを含む。

20

30

40

【0341】

いくつかの実施形態では、グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供する組成物及びERTの使用は、グリコーゲン貯蔵疾患を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド (例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど) などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成

50

物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

【0342】

いくつかの実施形態では、ポンペ病の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物ならびにグルコシダーゼアルファ酸（G A A）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグルコシダーゼアルファ酸（G A A）を含むE R Tの使用は、ポンペ病を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるF N 3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

10

【0343】

いくつかの実施形態では、コリ病またはフォブス病（G S D 3）の治療を必要とする対象におけるコリ病またはフォブス病（G S D 3）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びグリコーゲン脱分岐酵素（A G L）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグリコーゲン脱分岐酵素（A G L）を含むE R Tの使用は、コリ病またはフォブス病（G S D 3）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるF N 3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

20

【0344】

いくつかの実施形態では、アンデルセン病（G S D 4）の治療を必要とする対象におけるアンデルセン病（G S D 4）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びグリコーゲン分岐酵素（G B E 1）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグリコーゲン分岐酵素（G B E 1）を含むE R Tの使用は、アンデルセン病（G S D 4）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるF N 3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、E R Tの投与後に、対象に投与される。

30

40

【0345】

いくつかの実施形態では、マッカードル病（G S D 5）の治療を必要とする対象におけるマッカードル病（G S D 5）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及び筋グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）を含むE R Tを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及び筋グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）を含むE R Tの使用は、マッカードル病（G S D 5）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、s i R N A、アンチセンス、m R N A、m i R N A、c D N Aなど）などであるが、これら

50

に限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

【0346】

いくつかの実施形態では、タリイ病（GSD7）の治療を必要とする対象におけるタリイ病（GSD7）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及び筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及び筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）を含むERTの使用は、タリイ病（GSD7）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

10

【0347】

いくつかの実施形態では、アルドラーゼA欠損症（GSD12）の治療を必要とする対象におけるアルドラーゼA欠損症（GSD12）を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びアルドラーゼA（ALDOA）を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びアルドラーゼA（ALDOA）を含むERTの使用は、アルドラーゼA欠損症（GSD12）を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

20

30

【0348】

いくつかの実施形態では、ラフォラ病の治療を必要とする対象におけるラフォラ病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物、及びマリリン、ラフォリン、またはその両方を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びマリリン、ラフォリン、またはその両方を含むERTの使用は、ラフォラ病を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、アンチセンス、mRNA、miRNA、cDNAなど）などであるが、これらに限定されない、追加の治療薬に連結することができるFN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

40

【0349】

いくつかの実施形態では、成人ポリグルコサン小体病の治療を必要とする対象における成人ポリグルコサン小体病を治療する方法が、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、対象に、本明細書に提供される任意の組成物及びグリコーゲン分岐酵素（BGE1）を含むERTを投与することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物及びグリコーゲン分岐酵素（BGE1）を含むERTの使用は、成人ポリグルコサン小体病を治療するための薬学的組成物または薬剤の調製において提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、FN3ドメインを含む組成物である。いくつかの実施形態

50

では、組成物は、ERTの投与前に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与中に、対象に投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、ERTの投与後に、対象に投与される。

【0350】

「治療する」または「治療」は、治療的治療及び予防措置を指し、その目的は、がんの発症または拡散などの望ましくない生理学的変化または障害を予防または減速（軽減）することである。いくつかの実施形態では、有益または所望の臨床結果としては、検出可能であろうとまたは検出不可能であろうと、症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の安定した（すなわち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延または鈍化、疾患状態の改善または緩和、ならびに及び寛解（部分的であろうとまたは全体的であろうと）が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」はまた、治療を受けていなかった場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延長することも意味し得る。治療を必要とする者としては、病態もしくは障害を既に有する者、及び病態もしくは障害を有する傾向にある者、または病態もしくは障害を予防する必要がある者が挙げられる。

10

【0351】

「治療有効量」とは、必要な投与量で必要な期間にわたって所望の治療結果を達成するために有効な量を指す。本明細書に提供される組成物の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重などの要因によって異なり得る。有効量の例示的な指標は、患者の健康状態の改善、腫瘍のサイズの減少もしくは縮小、腫瘍の成長の停止もしくは減速、及び／または体内の他の場所へのがん細胞の転移の不在である。

20

【0352】

投与／薬学的組成物

【0353】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物の薬学的組成物及び薬学的に許容される担体が、提供される。治療的使用のために、本組成物は、薬学的に許容される担体中の活性成分として有効量のドメインまたは分子を含有する薬学的組成物として調製され得る。「担体」は、活性化合物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのようなビヒクルは、ピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油などの、石油、動物、植物、または合成物起源のものを含む、水及び油などの液体であり得る。例えば、0.4%生理食塩水及び0.3%グリシンを使用することができる。これらの溶液は、滅菌され、一般には粒子状物質を含まない。これらは、従来の周知の滅菌技術（例えば、濾過）によって滅菌され得る。組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整剤及び緩衝剤、安定化剤、増粘剤、潤滑剤及び着色剤などを含有し得る。このような医薬製剤中の本明細書に開示される分子の濃度は、大幅に異なってもよく、すなわち、約0.5重量%未満、通常は少なくとも約1重量%から最大15重量%または20重量%までであってもよく、選択される特定の投与方法に従って、必要とされる用量、流体の体積、粘度などに主に基づいて選択される。他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む好適なビヒクル及び製剤は、例えば、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D. B. ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092に記載され、特にpp. 958~989を参照されたい。

30

40

【0354】

本明細書に開示される組成物の治療的使用のための投与方法は、当該技術分野において周知であるように、錠剤、カプセル、溶液、粉末、ゲル、粒子中の製剤を使用して、非経口投与、例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内または皮下、肺、経粘膜（経口、鼻内、膈内、直腸）などの、薬剤を宿主に送達する任意の好適な経路であり得、注射器、移植デバイス、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ、または当業者によって理解され

50

る他の手段に含まれる。部位特異的な投与は、例えば、関節内、気管支内、腹腔内（*intrabdominal*）、嚢内、軟骨内、腔内（*intracavitary*）、腔内（*intracellular*）、小脳内、側脳室内、結腸内、子宮頸部内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内（*intraperitoneal*）、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、関節滑液嚢内、胸郭内、子宮内、膀胱内、病巣内、膣、直腸、頬側、舌下、鼻腔内、または経皮送達によって達成され得る。

【0355】

薬学的組成物は、本明細書に記載される薬学的組成物を含む容器を含むキットとして提供することができる。薬学的組成物は、例えば、単回投与もしくは複数回投与のための注射可能な溶液の形態で、または注射の前に再構成される滅菌粉末として提供され得る。代替的に、そのようなキットは、薬学的組成物の投与のための乾燥粉末分散器、液体エアロゾル発生器、またはネブライザーを含むことができる。そのようなキットは、薬学的組成物の適応症及び使用に関する書面による情報をさらに含むことができる。

10

【0356】

さらに、以下の実施形態も、提供される。

【0357】

1. グリコーゲン貯蔵疾患の治療を必要とする対象におけるグリコーゲン貯蔵疾患を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む *siRNA* 分子（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された1つ以上の *FN3* ドメインを含む組成物と、

20

酵素補充療法（*ERT*）と、の投与を含む、前記方法。

【0358】

2. 前記グリコーゲン貯蔵疾患が、ポンベ病（*GSD2*、グルコシダーゼアルファ酸（*GAA*）欠損症）、コリ病またはフォーブス病（*GSD3*、グリコーゲン脱分岐酵素（*AGL*）欠損症）、アンデルセン病（*GSD4*、グリコーゲン分岐酵素（*GBE1*）欠損症）、マッカードル病（*GSD5*、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（*PYGM*）欠損症）、タルイ病（*GSD7*、筋ホスホフルクトキナーゼ（*PFKM*）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（*GSD12*、アルドラーゼA（*ALDOA*）欠損症）、*II*型糖尿病／糖尿病性腎症、ラフォラ病、低酸素症、及び成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される、実施形態1に記載の方法。

30

【0359】

3. 前記 *ERT* が、グルコシダーゼアルファ酸（*GAA*）、グリコーゲン脱分岐酵素（*AGL*）、グリコーゲン分岐酵素（*GBE1*）、筋グリコーゲンホスホリラーゼ（*PYGM*）、筋ホスホフルクトキナーゼ（*PFKM*）、アルドラーゼA（*ALDOA*）、マリン、ラフォリン、グリコーゲンシンターゼ（*GYSS2*）、グルコース-6-ホスファターゼ（*G6PC/SLC37A4*）、ホスホリラーゼキナーゼ（*PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1*）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（*PGAM2*）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（*LDHA*）、グルコース輸送体（*GLUT2*）、 β -エンノラーゼ（*ENO3*）、及びグリコゲンニン-1（*GYG1*）からなる群から選択される1つ以上の酵素を含む、実施形態1または2に記載の方法。

40

【0360】

4. *siRNA* に連結された *FN3* ドメインを含む前記組成物が、前記 *ERT* の投与前に、前記対象に投与される、実施形態1～3のいずれか1つに記載の方法。

【0361】

5. *siRNA* に連結された *FN3* ドメインを含む前記組成物が、前記 *ERT* の投与中に、前記対象に投与される、実施形態1～3のいずれか1つに記載の方法。

【0362】

6. *siRNA* に連結された *FN3* ドメインを含む前記組成物が、前記 *ERT* の投与後

50

に、前記対象に投与される、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0363】

7. ポンペ病の治療を必要とする対象におけるポンペ病を治療する方法であって、
本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A (またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される) に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グルコシダーゼアルファ酸 (G A A) を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0364】

8. コリ病 (フォーブス病としても知られている) の治療を必要とする対象におけるコリ病を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A (またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される) に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲン脱分岐酵素 (A G L) を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0365】

9. アンデルセン病 (G S D 4) の治療を必要とする対象におけるアンデルセン病 (G S D 4) を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A (またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される) に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲン分岐酵素 (G B E 1) を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0366】

10. マッカードル病 (G S D 5) の治療を必要とする対象におけるマッカードル病 (G S D 5) を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A (またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される) に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲンホスホリラーゼ (P Y G M) を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0367】

11. タルイ病 (G S D 7) の治療を必要とする対象におけるタルイ病 (G S D 7) を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A (またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される) に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

筋ホスホフルクトキナーゼ (P F K M) を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0368】

12. アルドラーゼ A 欠損症 (G S D 1 2) の治療を必要とする対象におけるアルドラーゼ A 欠損症 (G S D 1 2) を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A (またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される) に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

アルドラーゼ A (A L D O A) を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0369】

13. ラフォラ病の治療を必要とする対象におけるラフォラ病を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A (またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される) に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

マリニン、ラフォリン、またはその両方を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0370】

10

20

30

40

50

14. 成人ポリグルコサン小体病の治療を必要とする対象における成人ポリグルコサン小体病を治療する方法であって、

本明細書に提供されるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）に連結された F N 3 ドメインを含む組成物と、

グリコーゲン分岐酵素（B G E 1）を含む E R T と、の投与を含む、前記方法。

【0371】

15. 少なくとも1つの追加の E R T をさらに含む、実施形態7～14のいずれか1つに記載の方法。

【0372】

16. s i R N A に連結された F N 3 ドメインを含む前記組成物が、前記 E R T の投与前に、前記対象に投与される、実施形態7～15のいずれか1つに記載の方法。

【0373】

17. s i R N A に連結された F N 3 ドメインを含む前記組成物が、前記 E R T の投与中に、前記対象に投与される、実施形態7～15のいずれか1つに記載の方法。

【0374】

18. s i R N A に連結された F N 3 ドメインを含む前記組成物が、前記 E R T の投与後に、前記対象に投与される、実施形態7～15のいずれか1つに記載の方法。

【0375】

19. 前記1つ以上の F N 3 ドメインが、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインを含む、実施形態1～18のいずれか1つに記載の方法。

【0376】

20. 前記 s i R N A（またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のオリゴヌクレオチド、またはそうでなければ本明細書に提供される）分子が、G Y S 1 の発現を低減する s i R N A である、実施形態1～19のいずれか1つに記載の方法。

【0377】

21. 前記 s i R N A が、いかなる修飾核酸塩基も含有しない、実施形態1～20のいずれか1つに記載の方法。

【0378】

22. 前記 s i R N A が、前記 s i R N A の前記センス鎖または前記アンチセンス鎖に共有結合したリンカーをさらに含む、実施形態1～21のいずれか1つに記載の方法。

【0379】

23. 前記リンカーが、前記センス鎖または前記アンチセンス鎖の前記5'末端または前記3'末端に結合している、実施形態22に記載の方法。

【0380】

24. 前記 s i R N A が、前記センス鎖または前記アンチセンス鎖上のビニルホスホネート修飾をさらに含む、実施形態1～23のいずれか1つに記載の方法。

【0381】

25. 前記ビニルホスホネート修飾が、前記センス鎖または前記アンチセンス鎖の前記5'末端または前記3'末端に結合している、実施形態24に記載の方法。

【0382】

26. 前記センス鎖が、配列番号10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、600、602、604、606、608、610、612、614、616、618、620、622、624、626、628、630、632、634、636、638、640、642、644、646、648、650、652、654、656、658、660、662、664、666、668、670、672、674、676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、696、698、700、702、704、706、801～860、921

10

20

30

40

50

～ 980 の、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に記載されるような、配列を含む、実施形態 1 ～ 25 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0383】

27. 前記アンチセンス鎖が、配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、690、691、693、695、697、699、701、703、705、707、861～920、981～1042 の、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に記載されるような、配列を含む、実施形態 1 ～ 26 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0384】

28. 前記 siRNA 分子が、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH、II、JJ、KK、LL、MM、NN、OO、PP、QQ、RR、SS、TT、UU、VV、WW、XX、YY、ZZ、AAA、BBB、CCC、DDD、EEE、FFF、GGG、HHH、III、JJJ、KKK、LLL、MMM、NNN、OOO、PPP、QQQ、RRR、SSS、TTT、UUU、VVV、WWW、XXX、YYY、ZZZ、AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEE、FFFF、GGGG、HHHH、IIII、JJJJ、KKKK、LLLL、MMMM、NNNN、OOOO、PPPP の、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に記載されるような、前記 siRNA 対を含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0385】

29. 前記センス鎖が、19ヌクレオチドを含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0386】

30. 前記アンチセンス鎖が、21ヌクレオチドを含む、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

30

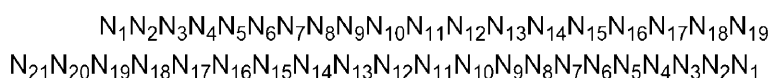
【0387】

31. 前記組成物が、表 4 に提供される、前記 siRNA 対を、表 5 に記載されるような、リンカー及び／またはビニルホスホネート修飾とともに含む、実施形態 1 ～ 30 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0388】

32. 前記 siRNA 分子が、式 I に例示される式を有し、

【化 18】



センス鎖 (SS)

40

アンチセンス鎖 (AS)、

ここで、N で表される各ヌクレオチドは、独立して、A、U、C、もしくは G、または本明細書で提供されるものなどの修飾ヌクレオチド塩基である、先行実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0389】

33. 前記センス鎖が、N₁ 及び N₂ にホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を有する 2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₂、及び N₁₇ に 2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N₄、N₅、N₆、N₁₀、N₁₁、N₁₃、N₁₄、

50

N₁₅、N₁₆、N₁₈、及びN₁₉に2' O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、実施形態32に記載の方法。

【0390】

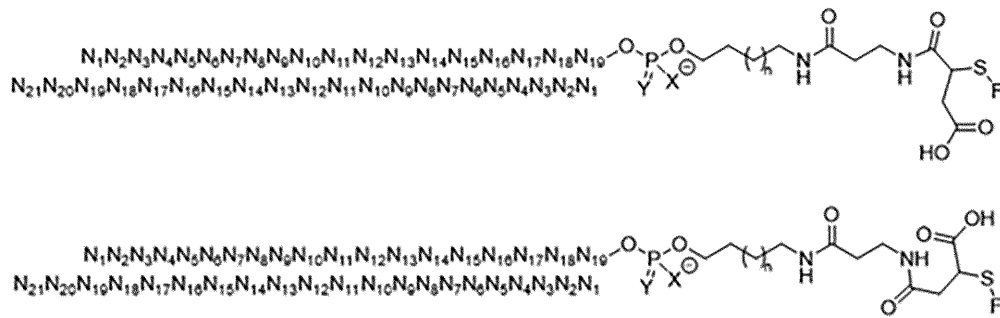
34. 前記アンチセンス鎖が、N₁に結合したビニルホスホネート部分、N₂にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2'フルオロ修飾ヌクレオチド、N₃、N₄、N₅、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₀、N₁₁、N₁₂、N₁₃、N₁₅、N₁₆、N₁₇、N₁₈、及びN₁₉に2' O-メチル修飾ヌクレオチド、N₄に2'フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₂₀及びN₂₁にホスホロチオエート（PS）修飾骨格を有する2' O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、実施形態32に記載の方法。

【0391】

35. 前記アンチセンス鎖のN₁に結合したビニルホスホネート部分である、実施形態32に記載の方法。

【0392】

36. 前記siRNA分子が、式Iに例示される式を有し、
【化19】



式中、F₁が、少なくとも1つのFN3ドメインを含み、リンカーL₁にコンジュゲートされているポリペプチドであり、L₁が、X_Sに連結され、X_Sが、二本鎖siRNA分子の5'から3'オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、X_Sが、二本鎖siRNA分子の3'から5'オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、X_S及びX_Aが、二本鎖siRNA分子を形成する、先行実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0393】

37. F₁が、(X₁)_n-(X₂)_q-(X₃)_yの式を有するポリペプチドを含み、式中、X₁が、第1のFN3ドメインであり、X₂が、第2のFN3ドメインであり、X₃が、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり、n、q、及びyが、各々独立して、0または1であるが、但し、n、q、及びyのうちの少なくとも1つが、1であるものとする、実施形態36に記載の方法。

【0394】

38. 前記FN3ドメインが、前記FN3ドメイン上のシステインを介して前記siRNA分子にコンジュゲートされる、先述実施形態のいずれか1つに記載の方法。

【0395】

39. 前記システインが、本明細書に記載される位置にある、実施形態38に記載の方法。

【0396】

40. 前記FN3ドメイン内の前記システインが、配列番号713に基づくアミノ酸配列を含む前記FN3ドメインの残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、または93に対応する位置にある、実施形態38または39に記載の方法。

【0397】

41. 前記システインが、残基6、53、または88に対応する位置に位置する、実施

10

20

30

40

50

形態 40 に記載の方法。

【0398】

42. 前記 FN3 ドメインが、配列番号 509、708、及び 710 からなる群から選択される配列を有する、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0399】

43. 1 つ以上の FN3 ドメインが、ペプチドリンカーによって連結された少なくとも 2 つの FN3 ドメインを含む、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0400】

44. 前記組成物が、第 1 の FN3 ドメイン及び第 2 の FN3 ドメインを含む、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0401】

45. 前記第 1 の FN3 ドメイン及び前記第 2 の FN3 ドメインが、異なるタンパク質に結合する、実施形態 44 に記載の方法。

【0402】

46. 前記第 1 の FN3 ドメイン及び前記第 2 の FN3 ドメインが、同じタンパク質に結合する、実施形態 44 に記載の組成物。

【0403】

47. 前記第 1 の FN3 ドメインが、CD71 に結合する、実施形態 44～46 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0404】

48. 前記第 2 の FN3 ドメインが、CD71 に結合しない異なる標的に結合する、実施形態 44～46 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0405】

49. 前記 FN3 ドメインが、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 の配列と少なくとも 87% 同一であるか、またはそれと同一である配列を含む、先述実施形態のいずれか 1 つに記載の方法。

【0406】

50. 第 3 の FN3 ドメインをさらに含む、実施形態 43～49 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0407】

51. 前記第 3 の FN3 ドメインが、CD71 またはアルブミンに結合する FN3 ドメインである、実施形態 50 に記載の方法。

【0408】

52. CD71 に結合する前記 FN3 ドメインが、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 を含むが、これらに限定されない、本明細書に提供されるアミノ酸配列、またはそれらの結合断片を有する、実施形態 51 に記載の方法。

【0409】

53. アルブミンに結合する前記 FN3 が、配列番号 101～119 を含むが、これらに限定されない、本明細書に提供されるアミノ酸配列、またはそれらの結合断片を有する、実施形態 51 に記載の方法。

【0410】

54. siRNA に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ 、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - (X_3)_y$ 、 $(X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - (X_3)_y - C$ 、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - L - (X_3)_y$ 、または $(X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - L - (X_3)_y - C$ から選択される式を有し、

式中、

X_1 が、第 1 の FN3 ドメインであり、

10

20

30

40

50

X_2 が、第 2 の FN3 ドメインであり、
 X_3 が、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり、
 L が、リンカーであり、
 X_4 が、核酸分子（例えば、前記 siRNA の 1 つまたは複数の鎖）であり、
 C が、PEG などのポリマー、アルブミン結合タンパク質であり、
 n 、 q 、及び y が、各々独立して、0 または 1 である、実施形態 1 に記載の方法。

【0411】

55. X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同じまたは異なる標的タンパク質に結合する、実施形態 54 に記載の方法。

【0412】

56. y が、0 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0413】

57. n が、1 であり、 q が、0 であり、 y が、0 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0414】

58. n が、1 であり、 q が、1 であり、 y が、0 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0415】

59. n が、1 であり、 q が、1 であり、 y が、1 である、実施形態 54 または 55 に記載の方法。

【0416】

60. 前記第 3 の FN3 ドメインが、 X_3 を持たない分子と比較して、全体として分子の半減期を増大させる、実施形態 54 ~ 59 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0417】

61. 前記第 3 の FN3 ドメインが、アルブミンに結合する FN3 ドメインである、実施形態 54 に記載の方法。

【0418】

62. 前記リンカーが、本明細書に提供されるリンカーである、実施形態 54 ~ 61 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0419】

63. 前記 FN3 ドメインが、ペプチドリinkerによって接続される、実施形態 54 ~ 62 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0420】

64. 前記ペプチドリinkerが、 $(GS)_2$ 、(配列番号 720)、 $(GGGS)_2$ (配列番号 721)、 $(GGGGS)_5$ (配列番号 722)、 $(AP)_{2-20}$ 、 $(AP)_2$ (配列番号 723)、 $(AP)_5$ (配列番号 724)、 $(AP)_{10}$ (配列番号 725)、 $(AP)_{20}$ (配列番号 726)、及び $A(EAAAK)_5AAA$ (配列番号 727)、または $(EAAAK)_{1-5}$ (配列番号 728)、またはこれらの任意の組み合わせである、実施形態 63 に記載の方法。

【0421】

65. 前記第 1、第 2、または第 3 の FN3 ドメインが、本明細書に提供されるアミノ酸配列を有する、実施形態 54 ~ 64 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0422】

66. X_4 が、前記 siRNA 分子である、実施形態 54 ~ 65 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0423】

67. 前記 siRNA 分子が、本明細書で提供される siRNA 分子である、実施形態 66 に記載の方法。

【0424】

68. 前記 siRNA 分子が、GYS1 の発現を低減させる siRNA である、実施形

10

20

30

40

50

態 66 に記載の方法。

【0425】

69. 前記 s i R N A 分子が、G Y S 1 の発現を特異的に低減する s i R N A である、実施形態 66 に記載の方法。

【0426】

70. 前記 s i R N A 分子が、G Y S 1 の発現を低減させ、他の R N A の発現を有意に低減させない s i R N A である、実施形態 66 に記載の方法。

【0427】

71. 前記 s i R N A 分子が、本明細書に記載されるアッセイにおいて、本明細書に記載される 200 nm 以下の濃度で、G Y S 1 の発現を低減させ、他の R N A の発現を 50 % を超えて低減させない s i R N A である、実施形態 66 に記載の方法。

10

【0428】

72. 前記 s i R N A 分子が、G Y S 1 の発現を低減させ、G Y S 1 タンパク質の濃度を低減させる s i R N A である、実施形態 66 に記載の方法。

【0429】

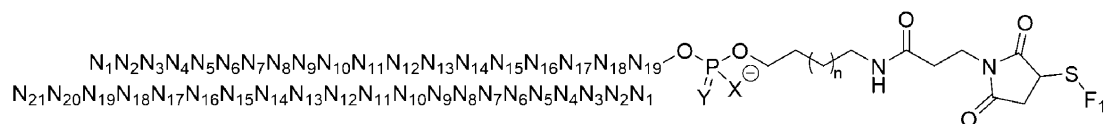
73. 前記 s i R N A 分子が、G Y S 1 の発現を低減させ、筋肉細胞におけるグリコーゲンの濃度を低減させる s i R N A である、実施形態 66 に記載の方法。

【0430】

74. 前記 s i R N A が、以下の式に提供される s i R N A 対である、実施形態 54 ~ 73 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【化20】



【0431】

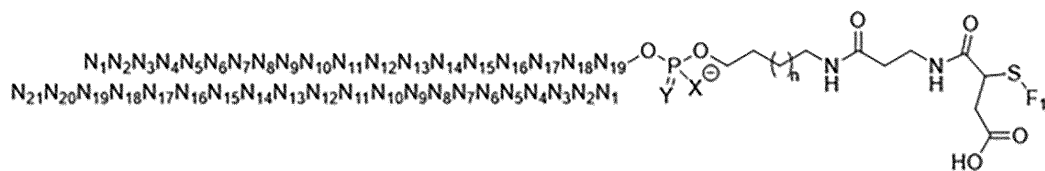
75. 前記アンチセンス鎖の N₁ が、ビニルホスホネート修飾を含む、実施形態 74 に記載の方法。

30

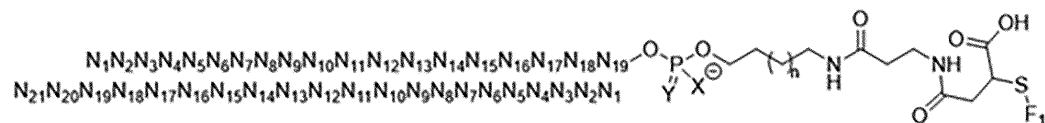
【0432】

76. マレイミドが、以下の化合物の混合物、または各化合物の一方もしくは両方、または前記化合物の一方のみを形成するために加水分解される、実施形態 74 に記載の方法。

【化21】



40



【0433】

77. 前記 s i R N A が、本明細書に提供される s i R N A 対、または表 3 A、表 3 B、もしくは表 4 に提供される群から選択される s i R N A 対である、実施形態 54 ~ 76 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0434】

50

78. 前記 *siRNA* に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、 A_1-B_1 の式を有し、式中、 A_1 が、 $(C)_n-(L_1)_t-X_S$ の式を有し、 B_1 が、 $X_{AS}-(L_2)_q-(F_1)_y$ の式を有し、

C が、PEG などのポリマー、アルブミン結合タンパク質であり、

L_1 及び L_2 が、各々独立して、リンカーであり、

X_S が、二本鎖 *siRNA* 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、

X_{AS} が、二本鎖 *siRNA* 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、

F_1 が、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、

n 、 t 、 q 、及び y が、各々独立して、0 または 1 であり、

X_S 及び X_{AS} が、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、前記組成物／複合体を形成する、実施形態 1 に記載の方法。

10

【0435】

79. 前記 *siRNA* に連結された FN3 ドメインを含む前記組成物が、 A_1-B_1 の式を有し、式中、 A_1 が、 $(F_1)_n-(L_1)_t-X_S$ の式を有し、 B_1 が、 $X_{AS}-(L_2)_q-(C)_y$ の式を有し、

C が、PEG などのポリマー、アルブミン結合タンパク質であり、

L_1 及び L_2 が、各々独立して、リンカーであり、

X_S が、二本鎖 *siRNA* 分子の 5' から 3' オリゴヌクレオチドセンス鎖であり、

X_{AS} が、二本鎖 *siRNA* 分子の 3' から 5' オリゴヌクレオチドアンチセンス鎖であり、

20

F_1 が、少なくとも 1 つの FN3 ドメインを含むポリペプチドであり、

n 、 t 、 q 、及び y が、各々独立して、0 または 1 であり、

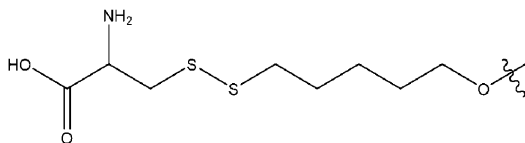
X_S 及び X_{AS} が、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成して、前記組成物／複合体を形成する、実施形態 1 に記載の方法。

【0436】

80. L_1 が、以下の式を有する、実施形態 78 または 79 に記載の方法。

【化 2 2】

30

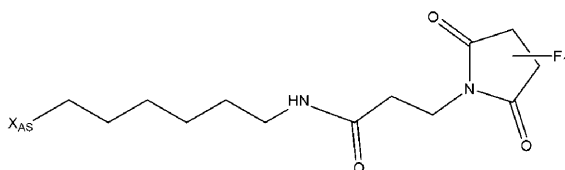


【0437】

81. L_2 が、以下の式を有する、実施形態 78 または 79 に記載の方法。

【化 2 3】

40

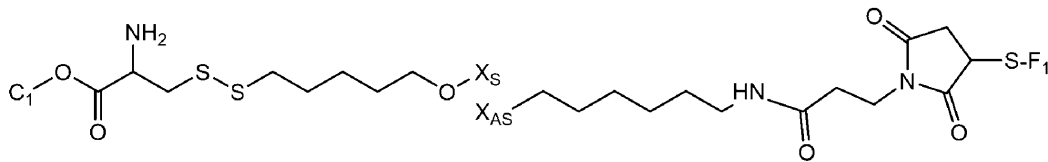


【0438】

82. A_1-B_1 が、以下の式を有する、実施形態 78 または 79 に記載の方法。

50

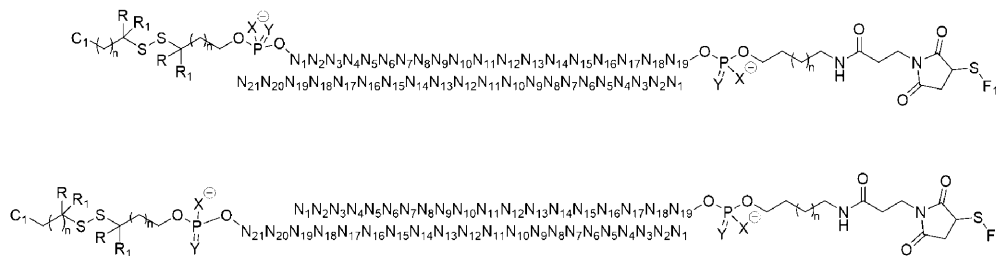
【化 2 4】



【0 4 3 9】

8 3 . A 1 - B 1 が、以下の式を有する、実施形態 7 8 または 7 9 に記載の方法。

【化 2 5】



【0446】

90. X_{AS} が、配列番号11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、690、691、693、695、697、699、701、703、705、707、861～920、981～1042の、または表3A、表3B、もしくは表4に記載されるような、配列を含む、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

10

【0447】

91. X_S 及び X_{AS} が、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH、II、JJ、KK、LL、MM、NN、OO、PP、QQ、RR、SS、TT、UU、VV、WW、XX、YY、ZZ、AAA、BBB、CCC、DDD、EEE、FFF、GGG、HHH、III、JJJ、KKK、LLL、MMM、NNN、OOO、PPP、QQQ、RRR、SSS、TTT、UUU、VVV、WWW、XXX、YYY、ZZZ、AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEE、FFFF、GGG、HHHH、IIII、JJJJ、KKKK、LLLL、MMMM、NNNN、OOOO、PPPPからなる群から選択される、または表3A、表3B、もしくは表4に記載されるような、siRNA対を形成する、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

20

【0448】

92. F_1 が、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710の配列と少なくとも87%同一であるか、またはそれと同一である配列を含む、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

【0449】

93. F_1 が、アルブミンに結合するポリペプチドを含む、実施形態78～88のいずれか1つに記載の方法。

30

【実施例】

【0450】

以下の実施例は、本明細書に開示される実施形態を説明する。これらの実施例は、例示のためにのみ提供され、実施形態は、これらの実施例に限定されると決して解釈されるべきではなく、本明細書に提供される教示の結果として明らかになる任意かつ全ての変更を包含すると解釈されるべきである。当業者であれば、本質的に同様な結果をもたらすために変更または修正ができるであろう様々な重要性の低いパラメータがあることを容易に認識することになる。

【0451】

実施例1：GYS1 siRNA配列ID及び特徴付け

40

【0452】

siRNAのコンピュータによるスクリーニング：コンピュータによるsiRNAのスクリーニングを実施して、ヒトGYS1 mRNAに相補的なヒトsiRNAを識別した（図1を参照のこと）。全ての可能な19量体アンチセンス配列を、ヒトGYS1 siRNA配列（NM_001161587）から生成し、各19量体を、他のヒトGYS1アイソフォーム、ならびに潜在的な交差反応性マウス、ラット、及びカニクイザルに対する活性について評価した。ヒトsiRNA標的部位を、dbSNP（b155 v2）を使用して、一般的なヒトSNP（MAF>1%）について評価した。共通の対立遺伝子を標的とする配列を、破棄した。次に、siRNAオフターゲット遺伝子を、全ての関連す

50

るモデル生物におけるセンス鎖及びアンチセンス鎖について評価した。この選択により、200の潜在的な候補が得られ、これらはさらに、インビトロでのノックダウンスクリーニングによって定義された。主な siRNA 候補は、表 3 A 及び 3 B にある。システイン操作されたセンチリンへのコンジュゲーションのための GYS1 siRNA リンカーを、表 5 に記載されるように調製した。

【0453】

HEK293T細胞を、未処理の対照細胞とともに24時間、10nM ABXO-HHH (siRNA 対 HHH) でリポフェクトした (処理群当たり6回の複製)。mRNA は、細胞から選択された polyA+ であり、Illumina HiSeq プラットフォーム上で非鎖 2 × 150 bp 対合末端配列決定に供して、平均的深さを 3000 万超の読み取りにした。

10

【0454】

図2 ABXO-HHH 対未処理細胞の DESeq2 の結果を示す火山プロット。X 軸は、全ての遺伝子についての遺伝子発現における $\log_2$ の倍率変化 (ABXO-HHH を未処理で割ったもの) を表す。Y 軸は、調整された P 値を変換した負の $\log_{10}$ を示す。色付きのドットは、BLAST を介して検出された ABXO-HHH に対して有意な相補性を有する遺伝子を表す。

【0455】

RNA-seq ライブラリ品質を、FastQC を使用して検査した。ライブラリを、Kallisto を使用して GRCh38 ヒトトランスクリプトームに擬似整列させた。トランスクリプトームに整列した平均 90% 超の読み取りを有する例外的な読み取りアラインメントを達成した。次いで、ABXO-HHH で処理した細胞をリポフェクタミンのみで処理した細胞と比較した DESeq2 を使用して、差別的発現を評価した。

20

【0456】

DESeq の結果は、GYS1 標的の実質的かつ有意なノックダウンを示した。ABXO-HHH で処理した試料中の GYS1 発現は、未処理試料の 31% まで下方調節された (図2)。GYS1 は、ABXO-HHH 処理下で差次的に発現した (DE) 全ての遺伝子について、最も下方調節されたタンパク質コード遺伝子であった。GYS1 はまた、圧倒的に、最も低い p 値を有する DE 遺伝子でもあり、調節された p 値は、 $1e \sim 87.7$ であり、次の最も低い調節された p 値より 30 桁以上小さかった。

30

【0457】

BLAST を使用して、潜在的なオフターゲット効果のコンピュータによる予測を行った。ABXO-HHH センス及びアンチセンス配列を、GRCh38 トランスクリプトームから構築された内部 BLAST データベースに対して BLAST アラインメントされた。BLAST によって識別された全ての潜在的なオフターゲット効果のうち、RAP2C のみが、ABXO-HHH の存在下で有意に下方調節され (図2)、 $\log_2$ の f 倍率変化が -1 未満の DE 閾値を超えることができなかった。

【0458】

これらのデータを合わせると、ABXO-HHH が、ヒトトランスクリプトームにおいて比較的高い濃度であっても、非常に特異的な siRNA であることが示される。

40

【0459】

オリゴヌクレオチド合成、脱保護、及びアニーリングプロトコル：

【0460】

オリゴヌクレオチドの合成は、アセトニトリル中の 0.1 M 濃度のホスホラミダイトを用いた 500 Å 制御された細孔ガラス (CPG) 上で標準的なホスホラミダイト化学を使用して、MerMade 12 合成器で行った。THF/ピリジン/水 (0.02 M) 中の I2 は、活性化剤として 0.6 M ETT (5-エチルチオテトラゾール) を有する酸化剤であった。ピリジン中の 0.09 M の N, N-ジメチル-N'-(3-チオキソ-3H-1, 2, 4-ジチアゾール-5-イル) メタニミドアミド (DDTT) を、ホスホロチオエート (PS) 結合の導入のための硫化試薬として使用した。ジクロロメタン中の 3

50

% (v / v) ジクロロ酢酸を、デブロッキング溶液として使用した。マレイミドを含まない全ての一本鎖を、緩衝液 A として pH 8.5 で 20 mM のリン酸塩、及び緩衝液 B として pH 8.5 で 20 mM のリン酸塩、及び 1 M の臭化ナトリウムを用いたイオン交換クロマトグラフィー (IEX) によって精製した。精製後、オリゴヌクレオチド画分をプールし、濃縮し、脱塩した。次いで、脱塩された試料を、乾燥するまで凍結乾燥させて、-20 °C で保管した。

【0461】

アンチセンス鎖の脱保護

【0462】

合成後、支持体を、アセトニトリル (ACN) で洗浄し、真空下でカラム内で乾燥させ、しっかりと密封し、アンモニア水溶液中の 5 % ジエチルアミンの溶液で 65 °C で 5 時間振盪させ得る 1 mL のスクリュキャップに移した。粗オリゴの切断及び脱保護を、液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) によって確認し、その後、IEX-HPLC によって精製した。

【0463】

マレイミド含有オリゴヌクレオチドの合成及び脱保護

【0464】

マレイミド含有オリゴを、3' アミノ修飾 CPG 固体支持体または 5' アミノ修飾剤ホスホラミダイトのいずれかを使用して作製した。支持体を、密封し得る 1 mL のバイアルに移し、50 / 50 (v / v) 40 % のメチルアミン水溶液及びアンモニア水溶液 (AM A) で室温で 2 時間または 65 °C で 10 分間インキュベートして、切断及び脱保護した。一本鎖を、IEX クロマトグラフィーによって精製し、マレイミドを添加する前にアンチセンスと同じ条件で脱塩した。

【0465】

pH 7.1 の 0.05 M リン酸緩衝液中の約 20 mg / mL のアミン修飾センス鎖を作製し、これに、ACN に溶解した 10 当量のマレイミド N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルを添加した。NHS エステル溶液を、オリゴヌクレオチド水溶液に添加し、室温で 3 時間振盪した。イオン交換緩衝液条件下でのマレイミド加水分解を防止するために、今度はマレイミド共役オリゴヌクレオチドを、逆相クロマトグラフィー (緩衝液 B 中の 80 % アセトニトリルを含む 20 mM 酢酸トリエチルアンモニウム) によって精製した。

【0466】

精製後、オリゴヌクレオチド画分を、プールし、濃縮し、脱塩した。

【0467】

マレイミドの加水分解を回避するために、脱塩された各一本鎖の等モル量を使用して、凍結乾燥を介してセンス鎖及びアンチセンス鎖の二本鎖化を行った。

【0468】

s i R N A へのセンチリンコンジュゲーション、コンジュゲート精製、及び分析：

【0469】

センチリンを、マレイミドを介してシステインに特異的な化学によって s i R N A にコンジュゲートした。

【0470】

50 ~ 200 μ M で P B S 中にシステインを含有するセンチリンを、10 mM のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) で室温 (30 分) で還元して、遊離チオールを得た。次いで、遊離チオール含有センチリンを、直前に約 1.5 : 1 のセンチリン : s i R N A のモル比で水中でマレイミド含有 s i R N A 二重鎖と混合する。室温または 37 °C で 2 時間インキュベーションした後、N-エチルマレイミド (反応混合物中の 1 mM の最終 NEM 濃度) で反応をクエンチし、コンジュゲートを 2 つのステップで精製した。ステップ I 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (タグ付きタンパク質用) または疎水性相互作用クロマトグラフィー (タグなしタンパク質用) のいずれか；未反

10

20

30

40

50

応のS i R N A リンカーを除去する。ステップI I - C a p t o - D E A E ; 未反応のセンチリンを除去する。コンジュゲートを含有する画分を、プールし、透析を使用した脱塩によってH B S に交換し、必要に応じて濃縮した。

【0471】

センチリン-s i R N A コンジュゲートの分析的特徴付け：

【0472】

センチリン-s i R N A コンジュゲートを、分析技術の組み合わせによって特徴付けた。S D S - P A G E を使用して、遊離タンパク質へのコンジュゲートの量を比較した。S D S - P A G E の場合、4 ~ 20 % の M i n i - P R O T E A N (登録商標) T G X S t a i n - F r e e (商標) タンパク質ゲル (B i o R a d) を、S D S 緩衝液中で1時間、100Vで実行した。ゲルをUV光下で可視化した。分析用S E C (S u p e r d e x - 7 5 5 / 1 5 0 G L カラム-G E) を使用して、センチリン-s i R N A コンジュゲートの純度及び凝集状態を解析した。液体クロマトグラフィー/質量分析 (L C M S) を使用して、コンジュゲートの同一性及び純度を確認した。試料を、W a t e r s A c u i t y U P L C / X e v o G 2 - X S T O F 質量分析計システムを使用して解析した。装置を、負の電気スプレーイオン化モードで操作し、m / z 200 から3000までスキャンした。コンジュゲートは、アンチセンス及びセンス-センチリンの2つの断片として見られた。

【0473】

s i R N A へのセンチリンコンジュゲーション、コンジュゲート精製、及び分析：センチリンを、マレイミドを介してシステインに特異的な化学によってs i R N A にコンジュゲートした。50 ~ 200 μ M で P B S 中にシステインを含有するセンチリンを、10 m M のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) で室温 (30分) で還元して、遊離チオールを得た。次いで、遊離チオール含有センチリンを、直前に約1.5 : 1 のセンチリン : s i R N A のモル比で水中でマレイミド含有s i R N A 二重鎖と混合する。室温または37℃で2時間インキュベーションした後、N-エチルマレイミド (反応混合物中の1 m M の最終N E M 濃度) で反応をクエンチし、コンジュゲートを2つのステップで精製した。ステップI 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (タグ付きタンパク質用) または疎水性相互作用クロマトグラフィー (タグなしタンパク質用) のいずれか ; 未反応のS i R N A リンカーを除去する。ステップI I - C a p t o - D E A E ; 未反応のセンチリンを除去する。コンジュゲートを含有する画分を、プールし、透析を使用した脱塩によってH B S に交換し、必要に応じて濃縮した。

【0474】

図6 : タグ付きタンパク質のためのI M A C クロマトグラフィー。I M A C には、C y t i v a からのH i s t r a p H P カラム (1 m l、5 m l) を、使用した。H i s t r a p 緩衝液A (結合緩衝液) は、1型H2O中の50 m M のT r i s p H 7.4、500 m M のN a C l 及び10 m M のイミダゾールであり、H i s t r a p 緩衝液B (溶出緩衝液) : 1型H2O中の50 m M のT r i s p H 7.4、500 m M のN a C l、及び250 m M のイミダゾールであった。反応試料を、試料ループまたは試料ポンプを介してカラムに直接注入した。試料塗布後、カラムを、5 ~ 10 C V の緩衝液Aで洗浄する。溶出は、典型的には、ステップ勾配 (0 ~ 100 %) で開始される。画分コレクター及びピークフラグメンテーションを使用して、UV読み取りが50 m A U 以上である場合に、画分を収集した。

【0475】

図7 : タグなしタンパク質のためのH I C (s i R N A の過剰の除去)。H I C には、C y t i v a からのH i T r a p プチルH P カラム (1 m l、5 m l) を使用した。H I C 緩衝液A (結合緩衝液) は、1型H2O中の2 M の硫酸アンモニウム、25 m M のリン酸ナトリウムp H 7.0であり、一方、H I C 緩衝液B (溶出緩衝液) : 1型H2O中の25 m M のリン酸ナトリウムp H 7.0であった。コンジュゲーション反応試料を、1 : 1の比率で緩衝液Aで希釈する。上記で調製した試料を、試料ループまたは試料ポンプを

介してカラムに注入した。試料塗布後、カラムを、5 C Vの緩衝液Aで洗浄する。溶出は、典型的には、0.0% Bで開始され、次いで、以下の表8のような勾配で開始される。画分コレクター及びピークフラグメンテーションを使用して、UV読み取りが50 mAU以上である場合に、画分を収集した。

【表9】

表8

	種類	%B	長さ (CV)
1	線形	30～90	3.00
2	線形	35.0	10.00
3	線形	100.0	10.00
4	線形	100.0	5.00

10

【0476】

開環－レトロマイケル反応による積荷損失を避けるために、マレイミド環加水分解が行われる。histrap（タグ付きタンパク質）またはHIC（タグなしタンパク質）のいずれかからのプールされた画分を、25 mMのTris pH 8.9 緩衝液中に透析する。この緩衝液では、反応物を、37℃のインキュベーターシェーカーに72時間置く。LC-MSによって反応の完了をモニターした。

20

【0477】

図8：イオン交換クロマトグラフィー（IEX）－タグ付き及びタグなしのタンパク質（過剰な未反応のセンチリンの除去）。IEXクロマトグラフィーには、CytivaからのHiTrap Captop DEAEカラム（1 ml、5 ml）を使用した。Captop DEAE 緩衝液A（結合緩衝液）は、1型H₂O中の25 mMのTris pH 8.8であり、一方、使用されたCaptop DEAE 緩衝液B（溶出緩衝液）は、1型H₂O中の25 mMのTris pH 8.8、1 MのNaClであった。

【0478】

開環後の試料を、試料ループまたは試料ポンプを介してカラムに直接注入した。試料塗布後、カラムを、5～10 CVの緩衝液Aで洗浄する。溶出は、典型的には、0.0% Bで開始され、次いで、以下の表9のような勾配で開始される。

30

【0479】

未反応のタンパク質は、典型的には、第1のピークであり、第2のピークは、典型的には、純粋なコンジュゲートである、フロースルーで溶出される。全ての画分が、収集され、プールされる。プールの濃度は、収率計算のためにナノドロップを使用して、A260を測定することによって決定される。

【表10】

40

表9

1	線形	20	5
2	線形	100	15
3	線形	100	5

【0480】

50

図9：センチリン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの分析SECの例。センチリン-siRNAコンジュゲートを、分析技術の組み合わせによって特徴付けた。分析用SECを使用して、センチリン-siRNAコンジュゲートの純度及び凝集状態を分析した。Waters ACQUITY UPLCタンパク質BEH SECカラム、125 Å、1.7 µm、4.6×150mmとともに、Waters H-class UPLCをルーチンSEC分析のために使用した。典型的には、2~5 µlの試料を、オートサンプラーを使用して注入し、流量は、0.25 mL/分であり、使用された移動相は、1X PBSまたは100 mM、pH 7.2リン酸緩衝液のいずれかであった。

【0481】

図10：コンジュゲートのSDS PAGEゲルの例。SDS-PAGEを使用して、遊離タンパク質へのコンジュゲートの量を比較した。SDS-PAGEゲルを実行するために、Invitrogen Mini Gel tank、PowerEase（商標）Touch 600Wの電源及び115 VACを使用した。Invitrogen-NuPAGE（商標）4~12% Bis-Trisタンパク質ゲル（1.0mm）を、20×NuPAGE（登録商標）MES SDSランニングバッファー及びSeeBlue（商標）予め染色したタンパク質スタンダードとともに使用した。試料は、超純水によって約0.5 mg/mLに正規化された。非還元ゲルの場合、10 µLの正規化された試料を、10 µLの2×Laemmli試料緩衝液と1対1の比率で混合する。ゲルを還元するために、2×Laemmli試料緩衝液を、95対1の比率でβ-メルカプトエタノールと混合し、次いで10 µLの試料と1対1の比率で混合する。得られた試料混合物を、95℃で5分間沸騰させ、次いでサーモサイクラーで冷却した。15 µLの試料及びタンパク質ラダーを適切なウェルに充填し、電圧を200 Vに設定し、ランタイムを約30分に設定した。ゲルランが完了したら、それを、クーマシーブルーまたはSYBRグリーンまたはメチレンブルーによって可視化した。最も左側のレーンは、タンパク質ラダーであり、次にセンチリン自体であり、最後は、センチリン-siRNAコンジュゲートである。

【0482】

候補siRNA配列を、ある範囲の濃度でヒト細胞（H358）にトランスフェクトした。RNAを、トランスフェクションから24時間後に採取し、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を介してGYS1レベルについて分析した。18SリボソームRNAを、RT-PCR内因性対照遺伝子として使用した。ノックダウンのレベルを、未処理細胞と比較した。EC50値を、Graphpad Prismソフトウェアを使用して計算し、Emax値は、観察されたGYS1 mRNAの最大ノックダウンパーセントを表す（表10）。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 0

siRNA	Ref.	EC50(pM)	E _{max} (%)
A	ABXO8	3.841	70
B	ABXO9	10.02	70.2
C	ABXO12	12.62	71.5
D	ABXO110	21.73	87.9
E	ABXO113	23.74	82.1
F	ABXO114	6.716	75.5
G	ABXO115	4.5	75.2
H	ABXO116	0.7542	69.4
I	ABXO117	20.87	93.8
J	ABXO122	8.93	65.6
K	ABXO123	4.049	75.5
L	ABXO124	2.642	70.5
M	ABXO125	0.8761	53.3
N	ABXO128	2.549	76.3
O	ABXO129	0.4961	64.3
P	ABXO139	0.6143	70.6
Q	ABXO142	23.19	80.3
R	ABXO150	58.88	96.1
S	ABXO151	1.502	75.6
T	ABXO152	24.76	91.1
U	ABXO155	5.893	60.2
V	ABXO156	0.6893	57.6
W	ABXO160	0.787	80.1
X	ABXO168	8.662	75.7
Y	ABXO171	38.82	69.2
Z	ABXO191	54.2	75.4
AA	ABXO197	19.8	77.1
BB	ABXO201	7.1	75.6
CC	ABXO203	5.7	74.9
DD	ABXO205	9.8	80.4

他の s i R N A も、上記のように試験されており、それらの E C 5 0 が、表 1 1 に提供される。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 1

siRNA 対	EC50(pM)
EE	1.8
FF	6
GG	5.9
HH	15.1
II	8.2
JJ	25.2
KK	
LL	1.35
MM	3.74
NN	5.66
OO	5.56
PP	6.34
QQ	11.76
RR	2.85
SS	3.35
TT	5.67
UU	0.4
VV	3.72
WW	3.15
XX	2.57
YY	1.64
ZZ	1.56
AAA	ND
BBB	4.87
CCC	2.65
DDD	2.66
EEE	1.21
FFF	1.31
GGG	NA

10

20

30

40

【0 4 8 3】

候補 s i R N A 配列の選択性は、s i R N A を、ある範囲の濃度でヒト細胞（H E K - 2 9 3）にトランスフェクションすることによって評価した。細胞生存率を、C e l l T i t e r G l o を使用して、トランスフェクションから 7 2 時間後に評価した。E m a x 値は、試験した最高 s i R N A 濃度（1 0 n M）での細胞の生存の最大減少パーセントとして報告される（表 1 2）。

50

【表 1 3】

表 1 2

siRNA 対	Ref.	E _{max} 、%(10nM で)
A	ABXO8	5.52
B	ABXO9	-0.3
C	ABXO12	31.67
D	ABXO110	25.68
E	ABXO113	22.83
F	ABXO114	-1.1
G	ABXO115	30.85
H	ABXO116	29.27
I	ABXO117	35.19
J	ABXO122	28.25
K	ABXO123	17.21
L	ABXO124	24.09
M	ABXO125	71.45
N	ABXO128	42.41
O	ABXO129	58.02
P	ABXO139	34.44
Q	ABXO142	8.94
R	ABXO150	16.06
S	ABXO151	60.95
T	ABXO152	42.84
U	ABXO155	54.4
V	ABXO156	34.1
W	ABXO160	-4.59
X	ABXO168	51.66
Y	ABXO171	4.79
Z	ABXO191	46.41
AA	ABXO197	25.01
BB	ABXO201	46.92
CC	ABXO203	15.18
DD	ABXO205	60.13

10

20

30

40

【0484】

実施例 2：CD71 に結合するフィブロネクチン III 型（FN3）ドメインの選択

【0485】

CD71 へのトランスフェリン結合を阻害しない CD71 に結合する FN3 ドメインを識別するためのパニング及び生化学的スクリーニング方法。CD71 に特異的に結合し、CD71 へのトランスフェリン結合を阻害しない FN3 ドメインをスクリーニングするために、ストレプトアビジンでコーティングされた Maxisorp プレート（Nunc カタログ 436110）を、開始ブロック T20（Pierce）で 1 時間ブロッキングし、次いで、ビオチン化 CD71（パニングと同じ抗原を使用して）または陰性対照（無

50

関係な F c 融合組換えタンパク質及びヒト血清アルブミン) で、トランスフェリンの存在下で、または C D 7 1 トランスフェリン結合部位に結合する F N 3 タンパク質を用いて、1 時間コーティングする。トランスフェリンの濃度は、最大 3 5 μ M である。任意の特定の理論に拘束されることなく、トランスフェリンまたは C D 7 1 トランスフェリン結合部位に結合する F N 3 タンパク質の包含は、F N 3 ドメインの選択を、C D 7 1 へのトランスフェリン結合と競合または阻害しないものに押し進める。プレートを、T B S T ですすぎ、希釈した溶解物を、プレートに 1 時間塗布する。追加のすすぎの後、ウェルを H R P でコンジュゲートされた抗 V 5 タグ抗体 (A b c a m、a b 1 3 2 5) で 1 時間処理し、次いで P O D (R o c h e、1 1 5 8 2 9 5 0 0 0 1) でアッセイする。ストレプトアビジン対照の少なくとも 1 0 倍以上の E L I S A シグナルを有するシグナルを有する F N 3 ドメイン溶解物からの D N A を配列決定し、スクリーニングから単離した F N 3 ドメイン配列をもたらす。

10

【 0 4 8 6 】

実施例 3 : C D 7 1 に結合し、トランスフェリンと競合しないフィブロネクチン I I I 型 (F N 3) ドメインの選択

【 0 4 8 7 】

トランスフェリンと競合しない、または最小限に競合する C D 7 1 結合 F N 3 ドメインを識別するために、バイアスをかけた C I S ディスプレイ戦略を設計した。要するに、ヒト C D 7 1 の E C D 上で 5 ラウンドのパンニング後に回復した出力を使用する (実施例 3) 。実施例 3 に記載されるように、追加のラウンドのオフプレート選択を行い、1) 最終的な溶出ステップの前にトランスフェリンと同じ部位で結合したセンチリンを溶出させるために、ヒトホロトランスフェリンを用いた洗浄ステップ、または 2) モノクローナル抗体 O K T 9 を用いた F N 3 ドメイン結合剤のいずれかを加えた。トランスフェリン洗浄戦略及び O K T 9 溶出戦略から回収した F N 3 ドメインを P C R 増幅し、前述のように p E T ベクターにクローニングした。h u C D 7 1 に特異的に結合した 2 2 8 個の F N 3 ドメインを、h u C D 7 1 E C D への結合について E L I S A によって確認した。独自の結合剤のサブセットを、S E C によって分析し、M M A F にコンジュゲートし、S K B R - 3 細胞 + / - ホロヒトトランスフェリンにおける細胞生存アッセイを介して内在化について評価した。ポリペプチドは、受容体によって内在化されることが見出された。

20

【 0 4 8 8 】

配列番号 5 0 9 の配列を含むポリペプチドと、ヒト膜タンパク質のライブラリに対する s i R N A 対 O O O O に記載の配列及びリンカーを含むリンカー番号を有する s i R N A 対に連結される配列番号 5 0 9 を含むポリペプチドと、の特異性をプロファイルするために、膜プロテオームアレイ (M P A) アッセイを行った。M P A ライブラリは、G P C R、イオンチャネル、及びトランスポーターを含む全てのシングルパス、マルチパス、及び G P I アンカータンパク質の 9 4 % を含む 6 0 0 0 を超えるヒト膜タンパク質を含み、各膜タンパク質は、鳥類 Q T 6 細胞バックグラウンドにおいて独特に発現する。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞において個々に発現される膜タンパク質へのリガンド (F N 3 ドメイン) 結合を直接検出する。

30

【 0 4 8 9 】

配列番号 5 0 9 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、s i R N A 対 O O O O に記載の配列及びリンカーを含むリンカー番号を有する s i R N A 対に連結される配列番号 5 0 9 のアミノ酸配列を含むペプチドと、を、M P A に対してそれぞれ、1 . 2 5 μ g / m l、1 . 2 5 μ g / m l、及び 0 . 3 1 μ g / m l の最適なシグナル / バックグラウンドノイズ比を有する濃度でスクリーニングした。スクリーニングで識別された膜タンパク質標的を、リガンド連続希釈を使用して検証手順でフォローアップし、細胞を識別された標的で個別にトランスフェクトした。スクリーニングは、ポリペプチドが C D 7 1 への結合に特異的であることを決定し、ポリペプチドにコンジュゲートされた s i R N A の付加は、特異性を変化させなかった。

40

【 0 4 9 0 】

50

実施例 4：CD71 FN3ドメインーオリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用した筋肉細胞におけるmRNAのノックダウン

【0491】

muCD71結合FN3ドメインは、FN3ドメイン内に独自に操作されたシステインを介して、マレイミド化学を使用してsiRNAオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)にコンジュゲートされる。システイン置換は、本明細書に提供されるもののようなものであり得、米国特許出願公開第20150104808号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)にも提供されるようなものであり得る。siRNAまたはASOは、標準的な化学修飾で修飾され、標的mRNAのインビトロでのノックダウンを可能にすることが確認される。FN3ドメインーオリゴヌクレオチドコンジュゲートを、最大10mg/kgのオリゴヌクレオチドペイロード用量でマウスにおいて静脈内に投与する。投与後の様々な時点で、マウスを殺処分し、骨格筋、心筋、及び様々な他の組織を回収し、必要になるまでRNAlater(商標)(Sigma Aldrich)に保存する。標的遺伝子ノックダウンは、標準的なqPCR $\Delta\Delta C_T$ 法、ならびに標的遺伝子及び対照遺伝子に特異的なプライマーを使用して評価される。標的遺伝子は、筋肉内でノックダウンされることが見出され、そのようなノックダウンは、siRNAまたはASOをCD71 FN3結合ドメインにコンジュゲートすることによって増強される。

10

【0492】

試験したFN3-siRNAコンジュゲートは、以下の表13に記載される通りである。

20

【表14】

表13

コンジュゲート	CD71 FN3 ドメイン (センチリン)	GYS1 siRNA 対
ABXC-1	配列番号 572	RRRR
ABXC-2	配列番号 572	SSSS
ABXC-3	配列番号 572	TTTT
ABX1005	配列番号 572	非 GYS1 標的/対照
ABXC-27	配列番号 572	A
ABXC-28	配列番号 572	QQQQ
ABXC-29	配列番号 572	PPPP

30

【0493】

図4Aは、ビヒクル単独と比較して、3つの異なるFN3ドメインーsiRNAコンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋におけるGYS1 mRNAのノックダウンを示す。有効性研究について、雄GAA-マウス(4~5週齢)を、Jackson Laboratoriesから得た。全ての動物を、IACUCプロトコルに従って処置した。5匹の動物が、5.4mg/kgの3つの異なるFN3ドメインーsiRNAコンジュゲート(3mpkのGys1 siRNA)またはビヒクルのいずれかの単一の尾静脈静脈内ボラス注射を受けた。単回投与から4週間後、マウスを殺処分し、腓腹筋をRNAlaterに採取し、4℃で一晩保存し、-80℃で凍結した。総RNAを、QiagenのRNeasy線維組織キットを使用して、腓腹筋から単離した。標的Gys1及び内因性対照(Pgk1、Ubc、Hprt1、及びAha1)の発現レベルを、リアルタイムの定量的PCRを用いて解析した。データを、ビヒクル単独で投与された対照動物に正規

40

50

化する $\Delta\Delta Ct$ 法を使用して分析した。FN3ドメイン-siRNAコンジュゲート処理群におけるGys1 mRNAのノックダウンパーセンテージを、残りのGys1 mRNAレベルのパーセンテージを100減算することによって測定した。GraphPad Prismソフトウェアにおけるダネットの多重比較検定を伴う一元配置分散分析を使用して、統計的有意性を計算した。統計的有意性は、アスタリスク***が $p < 0.001$ である、図に表示される。

【0494】

図4Bは、ビヒクル単独と比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用した、マウス腓腹筋におけるGYS1タンパク質のノックダウンを示す。腓腹筋におけるGys1タンパク質の定量は、RIPA緩衝液中で腓腹筋を均質化することによって行った。腓腹筋におけるタンパク質濃度を、Bradfordアッセイを使用して測定した。Gys1レベルを、12~230kDaのJesS分離モジュール(SM-W004)の製造元の標準方法を使用して定量化した。タンパク質を、プロテインSimple独自の光活性化捕捉化学を使用して、毛細血管上で固定化することによって分離した。抗Gys1一次抗体を、1:100の希釈で使用した。化学発光の暴露は、過酸化物質/ルミノール-Sを使用して確立した。毛細血管の化学発光のデジタル画像は、高さ(化学発光強度)、面積、及びシグナル/ノイズ比を自動的に測定するCompassのSimple Westernソフトウェアを使用して捕捉した。各実行には内部システムが含まれた。FN3ドメイン-siRNAコンジュゲート処理群のピーク面積値を、ビヒクル処置組織に対して正規化し、処理群におけるGys1タンパク質のノックダウンパーセンテージを、残りのGys1タンパク質レベルのパーセンテージを100減算することによって測定した。GraphPad Prismソフトウェアにおけるダネットの多重比較検定を伴う一元配置分散分析を使用して、統計的有意性を計算した。統計的有意性は、アスタリスク***が $p < 0.001$ である、図に表示される。

【0495】

図5は、異なる標的(AHA-1)に対するsiRNAと比較して、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用して、GYS1ノックダウンが骨格筋に対して高度に特異的であることを示す。雄GAA-マウス(8~9週齢)を、Jackson Laboratoriesから得た。全ての動物を、IACUCプロトコルに従って処置した。3匹の動物が、17.9mg/kgの3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mpkのGys1 siRNA)、17.9mg/kgの1つのFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mpkのAha1 siRNA)またはビヒクルのいずれかの単一の尾静脈静脈内ボラス注射を受けた。単回投与から2週間後、マウスを殺処分した。腓腹筋、大腿四頭筋、横隔膜、心臓、肝臓、及び腎臓組織を、RNAlater中に収集し、4℃で一晩保存し、-80℃で凍結した。総RNAを、QiagenのRNeasy線維組織キットを使用して、組織から単離した。標的Gys1/Aha1及び内因性対照(Pgk1)の発現レベルを、リアルタイムの定量的PCRを用いて分析した。データを、ビヒクル単独で投与された対照動物に正規化する $\Delta\Delta Ct$ 法を使用して分析した。

【0496】

実施例5: ABX-HHH処理細胞と未処理細胞とを比較するRNA-seq実験。

【0497】

HEK293T細胞を10nMのABXO-HHHで24時間リポフェクトした後、polyA+選択されたmRNAに対してmRNA配列決定を行った。1処理当たり6回の反復を、平均的深さを3000万超の読み取りまで配列決定した。90%超のマッピング率を有するKallistoを使用して、ライブラリを、GRCh38トランスクリプトームに擬似アラインメントした。この火山プロットの値は、DESeq2を使用して生成し、未処理細胞に対してABXO-HHH処理RNA-seqライブラリを比較した。図2のプロットにおける各ドットは、遺伝子における測定された発現変化を表す。X軸は、全ての遺伝子についての遺伝子発現における $\log_2$ の倍率変化(ABXO-HHHを未

10

20

30

40

50

処理で割ったもの)を表す。Y軸は、調整されたP値を変換した負の $\log_{10}$ を示す。黒い矢印は、プロット上のGYS1を指す。

【0498】

実施例6：CD71 FN3ドメインs iRNAコンジュゲートの結合特異性。

【0499】

膜プロテオームアレイ(MPA)アッセイを実施して、ヒト膜タンパク質のライブラリに対するCD71 FN3ドメイン及びCD71 FN3ドメインs iRNAコンジュゲートの特異性をプロファイルした(図3)。MPAは、GPCR、イオンチャネル、及びトランスポーターを含む全てのシングルパス、マルチパス、及びGPIアンカータンパク質の94%に及ぶ6000を超えるヒト膜タンパク質を含み、各膜タンパク質は、鳥類QT6細胞バックグラウンドにおいて独特に発現する。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞において個々に発現される膜タンパク質へのFN3ドメイン結合を直接検出した。

10

【0500】

MPAに対して、FN3ドメイン及びFN3ドメイン-s iRNAコンジュゲートを、最適なシグナル/バックグラウンドノイズ比、それぞれ、 $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $0.31 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でスクリーニングした。スクリーニングで識別された膜タンパク質標的を、識別された標的を独自に発現する細胞上でリガンド連続希釈を使用して検証した。

【0501】

実施例7：酵素補充療法(ERT)と共投与されるCD71に結合するフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含む組成物によるグリコーゲン貯蔵疾患の治療

20

【0502】

ポンペ病に罹患している対象は、酵素グルコシダーゼアルファ酸(GAA)とともに、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメインを含む組成物を共投与される。酵素補充療法のみを受けた対象と比較して、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメイン及びグルコシダーゼアルファ酸ERTの両方を受けた対象は、ERTとしてのGAAのみの投与と比較して増強された応答を有し、症状のより大きな軽減を有する。

【0503】

実施例8：酵素補充療法(ERT)と共投与されるCD71に結合するフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含む組成物によるグリコーゲン貯蔵疾患の治療

30

【0504】

コリ病に罹患している対象は、グリコーゲン脱分岐酵素(AGL)とともに、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメインを含む組成物を共投与される。酵素補充療法のみを受けた対象と比較して、GYS1を標的とするs iRNAに連結されたCD71結合FN3ドメイン及びグリコーゲン脱分岐酵素ERTの両方を受けた対象は、AGL ERTの投与と比較して増強された応答を有し、症状のより大きな軽減を有する。

【0505】

実施例9：酵素補充療法(ERT)とともに、CD71に結合するフィブロネクチンIII型(FN3)ドメインを含む組成物を共投与することの薬力学的効果を評価するための反復用量研究

40

【0506】

単剤療法として、または酵素補充療法と組み合わせて、CD71結合FN3ドメインの薬力学的効果を評価するために、反復用量研究を行った。

【0507】

実験条件：ABXC-29は、げっ歯類特異的GYS1 s iRNA ABXO-371(配列番号711のセンス鎖、及び配列番号712のアンチセンス鎖)に化学的にコンジュゲートされる、げっ歯類CD71結合センチリン(配列番号572)から構成される

50

。ABXC-29は、ヒト特異的GYS1 siRNA（配列番号706のセンス鎖及び配列番号707のアンチセンス鎖）に化学的にコンジュゲートされる、ヒトCD71結合センチリン（配列番号509）から構成される、ヒトCD71に結合するポリペプチドを含む巨大分子への代理物としてマウスにおいて使用された。組換えヒト酸 α -グルコシダーゼ（rhGAA）は、GAA媒介またはGAA関連疾患を治療するための酵素補充療法において使用される。本研究は、20匹の雄GAA-/-マウス（B6；129-Gata^{tm1Rabn}；J株、ストック番号004154；6^{ne}；Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）及び5匹の野生型マウス（C57BL/6J、ストック番号000664；Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME）で実施した。5匹の野生型マウス及び5匹のGAA-/-マウスを、ビヒクル（HBS）のみで処置した。5匹のGAA-/-マウスを、単剤療法としてABXC-29の反復静脈内投与で処置した。5匹のGAA-/-マウスを、単剤療法としてrhGAAの反復用量で処置した。5匹のGAA-/-マウスを、併用療法としてrhGAAと組み合わせてABXC-29で処置した。

10

20

40

50

【0508】

治療後の筋肉細胞及び心臓細胞におけるグリコーゲン合成酵素1 mRNAの発現：その結果を、以下の表14に示し、GAA-/-マウスにおけるビヒクルのパーセントとして表す。3mg/kgのABXC-29の反復投与から2週間後、Gys1 mRNAの発現は、横隔膜において83%、大腿四頭筋において81%、ならびに腓腹筋及び心臓の両方において84%低減した。rhGAAを単剤療法として投与した場合、Gys1 mRNAの発現への影響は、観察されなかった。ABXC-29及びrhGAAを併用療法として投与した場合、Gys1 mRNAの発現は、横隔膜において79%、腓腹筋において84%、及び大腿四頭筋において83%低減し、rhGAAの投与が筋肉細胞におけるABXC-29の活性に影響を及ぼさなかったことを示した。対照的に、心臓細胞において、ABXC-29及びrhGAAの同時投与は、Gys1 mRNAの発現の22%の低減をもたらし、臨床的に関連し得る心臓細胞におけるABCX-29の活性へのより少ない影響を示唆した。

【表15】

表14

	腓腹筋での Gys1 mRNA の低減%	大腿四頭筋での Gys1 mRNA の低減%	心臓での Gys1 mRNA の低減%	横隔膜での Gys1 mRNA の低減%
ABXC-29(10mg/kg)	84%	81%	76%	NA
ABXC-29 (3mg/kg)	84%	81%	84%	83%
rhGAA	NS	NS	NS	NS
ABXC-29(3mg/kg)+rhGAA	84%	83%	22%	79%

NS=有意ではない、NA=該当なし

【0509】

治療後の筋肉細胞におけるグリコーゲンレベル：その結果を、以下の表15に示し、 μ gのグリコーゲン/mgの組織として表す。単剤療法としての3mg/kgのABXC-29の反復用量の投与は、腓腹筋においてグリコーゲンレベルを23%低減し、大腿四頭筋において67%低減した。単剤療法としてのrhGAAの投与は、腓腹筋においてグリ

コーゲンを 33% 低減し、大腿四頭筋において 35% 低減した。併用療法としての ABXC-29 (3 mg/kg) 及び rhGAA の投与は、腓腹筋においてグリコーゲンを 48% 低減し、大腿四頭筋においてグリコーゲンを 42% 低減した。これらの結果は、2つの治療法の相乗効果を実証する。以下に示すように、2つの治療剤の併用は、10 mg/kg の用量の ABXC-29 の単独療法用量に類似した応答を生じさせ、3 mg/kg の用量の ABXC-29 の単独療法用量の応答を上回り、rhGAA 単独療法用量を上回った。これらの結果は、予測することができなかった。

【表 16】

表 15

	腓腹筋でのグリコーゲン レベルの低減%	大腿四頭筋でのグリコー ゲンレベルの低減%
ABXC-29(10mg/kg)	53%	67%
ABXC-29(3mg/kg)	23%	27%
rhGAA	33%	35%
ABXC-29(3mg/kg)+rhGAA	48%	42%

10

【0510】

一般的な方法

20

【0511】

分子生物学における標準的な方法は、Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、Wu (1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA) に記載されている。標準的な方法はまた、Ausbel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NYにも掲載され、これは、細菌性細胞におけるクローニング及びDNA突然変異生成 (1巻)、哺乳動物細胞及び酵母におけるクローニング (2巻)、複合糖質及びタンパク質の発現 (3巻)、ならびにバイオインフォマティクス (4巻) が記載されている。

30

【0512】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、及び結晶化を含む、タンパク質精製のための方法が、記載されている (Coligan, et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York)。化学分析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の産生、タンパク質のグリコシル化が、記載されている (例えば、Coligan, et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York、Ausubel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17、Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, S

40

50

t. Louis, MO; pp. 45-89, Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N. J., pp. 384-391を参照のこと)。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の産生、精製、及び断片化が、記載されている (Coligan, et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York, Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Harlow and Lane, 上記を参照)。リガンド／受容体相互作用を特徴付けるための標準的な技術が、利用可能である (例えば、Coligan, et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York)。

10

【0513】

本明細書に引用される全ての参考文献は、各個々の刊行物、データベースエントリ (例えば、Genbank 配列または GeneID エントリ)、特許出願、または特許が具体的かつ個別に参照により組み込まれると示されているのと同程度に、参照により組み込まれる。参照による組み込みのこの陳述は、37 C. F. R. § 1.57 (b) (1) に従って、個々の刊行物、データベースエントリ (例えば、Genbank 配列または GeneID エントリ)、特許出願、または特許のいずれにも関係することが出願人によって意図されており、これらは各々、たとえそのような引用が参照による組み込みの専用の陳述に直接隣接していないとしても、37 C. F. R. § 1.57 (b) (2) に従って明らかに識別される。何かしら存在する場合に、参照による援用についての専用の記載が本明細書内に含まれることは、参照による援用についてのこの一般的な記載を、いかなる方法においても弱めるものではない。本明細書での参考文献の引用は、当該参考文献が、適切な先行技術を参照するものであるということを認めるためのものでもなければ、それらの公報または文書の内容または日付について、何かしら認めるものでもない。

20

【0514】

本実施形態は、本明細書において記載される特定の実施形態による範囲に限定されない。実際、本明細書に記載されるものに加えて、実施形態の様々な修正は、前述の説明から当業者に明らかであろう。かかる修正は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

30

【0515】

前述の書面による明細書は、当業者が実施形態を実施することを可能にするのに十分であると考えられる。本明細書に示され、記載されるものに加えて、実施形態の様々な修正は、前述の説明から当業者に明らかであり、添付の特許請求の範囲内に入るであろう。

40

50

【国際調査報告】

CORRECTED VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. A61K 47/64; A61K 31/712; A61K 31/713; A61K 47/55; C07K 14/78; C12N 15/113 (2023.01) ADD. A61P 3/00 (2023.01)		
CPC - INV. A61K 47/64; A61K 31/712; A61K 31/713; A61K 47/549; A61K 47/55; C07K 14/78; C12N 15/113 ADD. A61P 3/00		
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 database consulted during the international search (name of database 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.
A	US 2021/0108201 A1 (ARO BIOTHERAPEUTICS COMPANY) 15 April 2021; paragraphs [0022], [0061]-[0062], [0109]-[0110], [0129], [0225]; claims 1, 92	1-25
A	(COUTINHO, MF et al.) Genetic Substrate Reduction Therapy: A Promising Approach for Lysosomal Storage Disorders. Diseases, Vol. 4, No. 4, 9 November 2016, publication 33, doi: 10.3390/diseases4040033, pages 1-15; abstract; page 8, second and third paragraphs; page 9, first paragraph	1-25
A	WO 2021/226107 A1 (AVIDITY BIOSCIENCES INC.) 11 November 2021; paragraphs [0004], [0006], [0015], [0037]-[0038], [0113], [0387]	1-25
A	(ALMODOVAR-PAYA, A et al.) Preclinical Research in Glycogen Storage Diseases: A Comprehensive Review of Current Animal Models. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 21, No. 24, 17 December 2020, publication 9621, doi: 10.3390/ijms21249621, pages 1-48; abstract; page 13, table 5; page 14, table 5; page 18, second, third and fourth paragraphs	1-25
A	US 2018/0127485 A1 (NOVARTIS AG) 10 May 2018; abstract; paragraphs [0081], [0136], [0164]	1-25
A	US 2008/287386 A1 (MOR, O et al.) 20 November 2008; abstract; paragraphs [0026], [0058]; claims 1, 28	1-25
P,Y	WO 2022/221550 A1 (ARO BIOTHERAPEUTICS COMPANY) 20 October 2022; entire publication	1
☐ 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 06 November 2023 (06.11.2023)		Date of mailing of the international search report
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/65812

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/US23/65812

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.:
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:
-***-Please See Supplemental Page-***-

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.:
Groups I+, claims 1-25, SEQ ID NOs: 706-707 [OOOO] (siRNA sense/antisense pair), SEQ ID NO: 509 (FN3 domain), SEQ ID NO: 273 (CD71-binding sequence).

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/US23/65812

-***-Continued From 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 examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, claims 1-25, SEQ ID NOs: 706-707 [O O O O] (siRNA sense/antisense pair), SEQ ID NO: 509 (FN3 domain), SEQ ID NO: 273 (CD71-binding sequence), are directed to methods, compositions, and kits for treating a glycogen storage disease utilizing FN3 domains linked to an siRNA to target Gys1 and enzyme replacement therapy.

The methods, compositions, and kits of Claims 1-9, 10 (in-part), 11-13, 14-16 (each in-part), and 17-25 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they comprise an siRNA sense/antisense pair encompassing SEQ ID NOs: 706-707 [O O O O] (first exemplary siRNA sense/antisense pair), and an FN3 domain comprising SEQ ID NO: 509 (first exemplary FN3 domain) and SEQ ID NO: 273 (first exemplary CD71-binding sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 10 and 14-16 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional siRNA sense/antisense pairs, FN3 domains, and CD71-binding sequences, with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected sequence(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/examined. An exemplary election would be SEQ ID NOs: 10-11 [A] (siRNA sense/antisense pair), SEQ ID NO: 708 (FN3 domain), SEQ ID NO: 288 (CD71-binding sequence).

No technical features are shared between the siRNA, FN3, and CD71-binding sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a method of treating a glycogen storage disease in a subject in need thereof, the method comprising the administration of a composition comprising one or more FN3 domains linked to an siRNA comprising a sense strand and antisense strand, wherein the siRNA targets Gys1, and an enzyme replacement therapy (ERT) used to treat the glycogen storage disease; a pharmaceutical composition for treating a glycogen storage disease comprising a composition comprising one or more FN3 domains linked to an siRNA comprising a sense strand and antisense strand, and an enzyme replacement therapy (ERT) to treat the glycogen storage disease; and a kit for treating a glycogen storage disease, the kit comprising a first container comprising a pharmaceutical composition comprising one or more FN3 domains linked to an siRNA comprising a sense strand and antisense strand, and a second container comprising a pharmaceutical composition comprising an enzyme replacement therapy (ERT) to treat the glycogen storage disease; these shared technical features are previously disclosed by the publication entitled "Preclinical Research in Glycogen Storage Diseases: A Comprehensive Review of Current Animal Models" by Almodóvar-Payá, et al. (hereinafter "Almodóvar-Payá") in view of US 2021/0108201 A1 to Aro Biotherapeutics Company (hereinafter "Aro").

Almodóvar-Payá discloses a method of treating a glycogen storage disease in a subject in need thereof (enzyme replacement therapy for GSD Type II, Pompe disease; page 18, paragraphs 3-4), the method comprising the administration of a composition comprising an enzyme replacement therapy (ERT) used to treat the glycogen storage disease (infusions of recombinant human GAA; page 18, paragraph 4); and a pharmaceutical composition for treating a glycogen storage disease comprising a composition comprising an enzyme replacement therapy (ERT) to treat the glycogen storage disease (enzyme replacement therapy for GSD Type II, Pompe disease, comprising infusions of recombinant human GAA; page 18, paragraphs 3-4), and siRNA (antisense oligonucleotide treatment; page 19, paragraph 11) that targets Gys1 (Gys1-/- mouse models; page 33, paragraph 2). Almodóvar-Payá does not disclose a composition comprising one or more FN3 domains linked to an siRNA comprising a sense strand and antisense strand, wherein the siRNA targets Gys1, a pharmaceutical composition for treating a glycogen storage disease comprising a composition comprising one or more FN3 domains linked to an siRNA comprising a sense strand and antisense strand; and a kit for treating a glycogen storage disease comprising a first container comprising a pharmaceutical composition comprising one or more FN3 domains linked to an siRNA comprising a sense strand and antisense strand.

Aro discloses administration of a composition comprising one or more FN3 domains linked to an siRNA (composition comprising FN3 domains conjugated to siRNA; paragraph [0008]) comprising a sense strand and antisense strand (comprises a sense strand and an antisense strand; paragraph [0062]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have combined the method of treating glycogen storage disorders disclosed by Almodóvar-Payá with the FN3 domain linked to siRNA disclosed by Aro, in order to target the siRNA to knockdown mutant GYS1 and provide replacement enzyme therapy, as well as to package the compositions of the FN3 domain linked to siRNA and the ERT composition into a kit in order to provide a convenient article of sale.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the combination of the Almodóvar-Payá and Aro references, unity of invention is lacking.

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)

A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 K	38/45	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	38/47	(2006.01)	A 6 1 K	47/64	
			A 6 1 K	38/45	
			A 6 1 K	38/47	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,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,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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,VN,WS,ZA,ZM,ZW
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 . フィラデルフィア . スイート 7 4 0 . ウォルナット・ストリート 6 0 1

(72)発明者 ステューブン・ナドラー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 . フィラデルフィア . スイート 7 4 0 . ウォルナット・ストリート 6 0 1

(72)発明者 ヤオ・シン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 . フィラデルフィア . スイート 7 4 0 . ウォルナット・ストリート 6 0 1

(72)発明者 ジャンナ・ドルジーナ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 . フィラデルフィア . スイート 7 4 0 . ウォルナット・ストリート 6 0 1

(72)発明者 カリン・オニール

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 . フィラデルフィア . スイート 7 4 0 . ウォルナット・ストリート 6 0 1

(72)発明者 ロバート・コラコウスキー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 . フィラデルフィア . スイート 7 4 0 . ウォルナット・ストリート 6 0 1

(72)発明者 ステューブン・アンダーソン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 6 . フィラデルフィア . スイート 7 4 0 . ウォルナット・ストリート 6 0 1

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC21 CC41 EE41 EE59 FF63

4C084 AA02 AA13 DC22 DC25 NA03 NA14 ZC01 ZC21 ZC35 ZC75

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA03 NA13 ZC01 ZC35 ZC75