

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6811094号
(P6811094)

(45) 発行日 令和3年1月13日 (2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月16日 (2020.12.16)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K 47/61 (2017.01)	A 6 1 K 47/61
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 O 1
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00

請求項の数 78 (全 200 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-568967 (P2016-568967)	(73) 特許権者	505369158
(86) (22) 出願日	平成27年5月22日 (2015.5.22)		アルナイラム ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2017-517511 (P2017-517511A)		, インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成29年6月29日 (2017.6.29)		ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/032099		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(87) 国際公開番号	W02015/179724		142, ケンブリッジ, サード ストリート 300
(87) 国際公開日	平成27年11月26日 (2015.11.26)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成30年5月21日 (2018.5.21)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	62/001, 731	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成26年5月22日 (2014.5.22)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	62/047, 978		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成26年9月9日 (2014.9.9)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンジオテンシノーゲン (AGT) iRNA組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内でのヒトアンジオテンシノーゲン (AGT) 発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (RNAi) 薬であって、ここで、該二本鎖 RNAi 薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

該センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列のヌクレオチド 2081-2104 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 19 個の連続ヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 19 個の連続ヌクレオチドを含み、そして

該センス鎖および該アンチセンス鎖が各々独立して 19~25 ヌクレオチド長であり、
該アンチセンス鎖は、センス鎖に実質的に相補的である、二本鎖 RNAi 薬。

【請求項 2】

該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであるか、該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであるか、または該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の二本鎖 RNAi 薬。

【請求項 3】

該センス鎖が、3' 末端で結合しているリガンドと複合体を形成している、請求項 1 または 2 に記載の二本鎖 RNAi 薬。

【請求項 4】

該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドである、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 5】

該アンチセンス鎖が、5' - UCUC C C C A C C U U U U C U U C U A A U - 3' (配列番号 537) の配列と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 19 個の連続ヌクレオチドを含む相補的な領域を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 6】

該修飾ヌクレオチドの少なくとも 1 つが、3' 末端デオキシチミン (dT) ヌクレオチド、2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、2' - デオキシ - 修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、非ロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束エチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2' - アミノ - 修飾ヌクレオチド、2' - アルキル - 修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホラミデート、ヌクレオチドを含む非天然塩基、5' - ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、およびコレステリルエステル誘導体またはドデカン酸ビスデシルアミド基に連結された末端ヌクレオチドからなる群より選択される、請求項 2 から 5 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの鎖が、少なくとも 1 つのヌクレオチドの 3' オーバーハングを含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの鎖が、少なくとも 2 つのヌクレオチドの 3' オーバーハングを含む、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 9】

二本鎖領域が 19 - 23 ヌクレオチド対の長さである、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 10】

二本鎖領域が、19 - 21 ヌクレオチド対の長さである、請求項 9 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 11】

二本鎖領域が、21 - 23 ヌクレオチド対の長さである、請求項 9 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 12】

リガンドが、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している 1 個またはそれ以上の GalNAc 誘導体である、請求項 3 から 11 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 13】

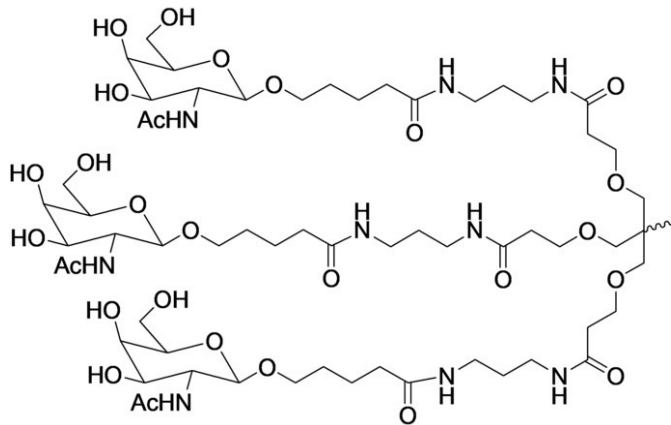
リガンドが、

10

20

30

【化 1】



10

である、請求項 3 から 1 2 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

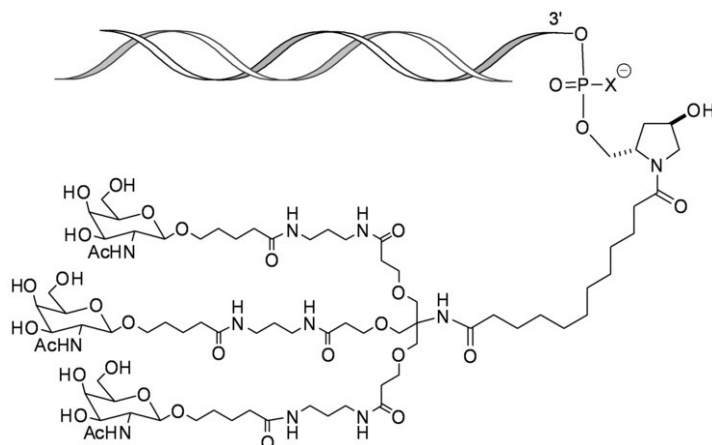
【請求項 1 4】

リガンドがセンス鎖の 3' 末端に結合している、請求項 3 から 1 3 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 1 5】

RNA i 薬が、以下：

【化 2】



20

30

[式中、Xは、OまたはSである。]

で示されるリガンドと複合体を形成している、請求項 1 4 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 1 6】

RNA i 薬が、少なくとも 1 つのホスホロチオエートまたはメチルヌクレオチド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む、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 1 7】

該ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が、1 つの鎖の 3' 末端にある、請求項 1 6 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

40

【請求項 1 8】

該鎖がアンチセンス鎖である、請求項 1 7 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 1 9】

該鎖がセンス鎖である、請求項 1 7 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 2 0】

該ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が、1 つの鎖の 5' 末端にある、請求項 1 6 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 2 1】

該鎖がアンチセンス鎖である、請求項 2 0 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

50

【請求項 22】

該鎖がセンス鎖である、請求項 20 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 23】

該ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が、1つの鎖の 5' 末端および 3' 末端の両方にある、請求項 16 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 24】

該鎖がアンチセンス鎖である、請求項 23 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 25】

該 RNA i 薬が、6-8 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 16 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

10

【請求項 26】

該アンチセンス鎖が、5' 末端に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および 3' 末端に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして該センス鎖が、5' 末端または 3' 末端のいずれかに少なくとも 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 25 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 27】

アンチセンス鎖の 5' 末端の位置 1 の塩基対が A U 塩基対である、請求項 1 から 26 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 28】

センス鎖が、5' - u s c s u c c c A f c C f U f U f u u c u u c u a a u - 3' (配列番号 1025) で示されるヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖が、5' - a s U f s u a g A f a g a a a g G f u G f g g a g a s c s u - 3' (配列番号 1026) で示されるヌクレオチド配列を含み、ここで、a、c、g、および u はそれぞれ 2' - O - メチル (2' - OMe) 修飾 A、C、G、および U ヌクレオチドであり、A f、C f、G f および U f は、2' - フルオロ修飾 A、C、G、および U であり、s はホスホロチオエート結合である、請求項 1 から 27 のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

20

【請求項 29】

ヒトアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (RNA i) 薬であって、

該二本鎖 RNA i 薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、該センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列のヌクレオチド 2081-2104 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 19 個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 19 個の連続ヌクレオチドを含み、

30

該センス鎖および該アンチセンス鎖が各々独立して 19~25 ヌクレオチド長であり、該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾および 2' - フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

該センス鎖は、5' 末端に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾および 2' - フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

40

該アンチセンス鎖は、5' 末端に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および 3' 末端に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして

該センス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して 3' 末端に結合している 1 個またはそれ以上の G a l N A c 誘導体と複合体を形成している、二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 30】

該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾を含む、請求項 29 に記載の二本鎖 RNA i 薬。

【請求項 31】

5' - U C U C C C A C C U U U U C U U C U A A U - 3' (配列番号 499) のヌク

50

レオチド配列を含むセンス鎖および 5' - A U U A G A A G A A A G G U G G G A G A C U - 3' (配列番号 537) のヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む二本鎖リボ核酸 (RNAi) 薬。

【請求項 32】

請求項 1 から 31 のいずれかに記載の二本鎖 RNAi 薬を含む、ベクター。

【請求項 33】

請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNAi 薬を含む、細胞。

【請求項 34】

請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNAi 薬、または請求項 32 に記載のベクターを含む、医薬組成物。

10

【請求項 35】

二本鎖 RNAi 薬が非緩衝液中に存在する、請求項 34 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

該非緩衝液が生理食塩水または水である、請求項 35 に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

該二本鎖 RNAi 薬が緩衝液中に存在する、請求項 34 に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

該緩衝液が、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロラミン、炭酸緩衝液、またはリン酸緩衝液、あるいはこれらの任意の組合せを含む、請求項 37 に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

該緩衝液が、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) である、請求項 38 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 40】

インビトロの細胞内でのアンジオテンシノーゲン (AGT) 発現を阻害する方法であって、

(a) 細胞を、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNAi 薬、請求項 32 に記載のベクター、または請求項 34 から 39 のいずれか一項に記載の医薬組成物と接触させること；そして

(b) 工程 (a) で製造された細胞を、AGT 遺伝子の mRNA 転写物が分解されるのに十分な時間維持して、細胞内での AGT 遺伝子の発現を阻害することを含む、方法。

30

【請求項 41】

AGT 発現が、少なくとも 50% 阻害される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

治療的有効量の、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の二本鎖 RNAi 薬、請求項 32 に記載のベクター、または請求項 34 から 39 のいずれか一項に記載の医薬組成物の、アンジオテンシノーゲン (AGT) 関連障害を有するヒト対象の処置のための医薬の製造のための使用。

【請求項 43】

治療的有効量の二本鎖リボ核酸 (RNAi) 薬の、アンジオテンシノーゲン (AGT) 関連障害を有する対象の処置のための医薬の製造のための使用であって、ここで、該二本鎖 RNAi 薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

40

該センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列のヌクレオチド 2081 - 2104 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 19 個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 19 個の連続ヌクレオチドを含み、

該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾および 2' - フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

該アンチセンス鎖は、5' 末端に 2 個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および

50

3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

該センス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして

該センス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して3'末端に結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成する、使用。

【請求項44】

該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾を含む、請求項43に記載の使用。

10

【請求項45】

対象がヒトである、請求項43または44に記載の使用。

【請求項46】

アンジオテンシノーゲン関連疾患が、高血圧、境界域高血圧、原発性高血圧、続発性高血圧、高血圧緊急症、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心内膜線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病、腎疾患、腎不全、全身性硬化症、子宮内胎児発育遅延（IUGR）、ならびに胎児発育不全からなる群より選択される、請求項43または44に記載の使用。

20

【請求項47】

アンジオテンシノーゲン関連疾患が妊娠関連高血圧である、請求項43または44に記載の使用。

【請求項48】

30

二本鎖RNAi薬が、体重1kg当たり約0.01mgから約10mgまたは約0.5mgから約50mgの用量で投与される、請求項43または44に記載の使用。

【請求項49】

二本鎖RNAi薬が、体重1kg当たり、約10mgから約30mgの用量で投与される、請求項48に記載の使用。

【請求項50】

二本鎖RNAi薬が、体重1kg当たり、約3mgの用量で投与される、請求項48に記載の使用。

【請求項51】

二本鎖RNAi薬が、体重1kg当たり、約10mgの用量で投与される、請求項48に記載の使用。

40

【請求項52】

二本鎖RNAi薬が、体重1kg当たり、約0.5mgの用量で週に2回投与される、請求項48に記載の使用。

【請求項53】

二本鎖RNAi薬が、体重1kg当たり、約10mgの用量で隔週投与される、請求項48に記載の使用。

【請求項54】

二本鎖RNAi薬が、体重1kg当たり、約0.5-1mgの用量で週に1回投与される、請求項48に記載の使用。

50

【請求項 5 5】

二本鎖RNA i 薬が皮下投与のために製剤される、請求項 4 8 に記載の使用。

【請求項 5 6】

二本鎖RNA i 薬が静脈内投与のために製剤される、請求項 4 8 に記載の使用。

【請求項 5 7】

対象がさらなる治療剤を投与されるものである、請求項 4 3 または 4 4 に記載の使用。

【請求項 5 8】

さらなる治療剤が、利尿剤、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、アンジオテンシン II 受容体アンタゴニスト、 β 遮断薬、血管拡張薬、カルシウムチャンネル遮断薬、アルドステロンアンタゴニスト、 α_2 -アゴニスト、レニン阻害剤、 α 遮断薬、末梢作用型アドレナリン作動薬、選択的D1受容体部分アゴニスト、非選択的 α -アドレナリンアンタゴニスト、合成したステロイド性の抗ミネラルコルチコイド薬、または上記の何れかの組合せ、および併用剤として製剤された高血圧治療薬からなる群より選択される、請求項 5 7 に記載の使用。

【請求項 5 9】

5'-uscsucccAfcCfUfUfuuucuuaau-3'（配列番号 1025）で示されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖、および5'-asUfsuagAfaagaaagGfuGfggagascsu-3'（配列番号 1026）で示されるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、ここで、a、c、g、およびuはそれぞれ2'-O-メチル（2'-OMe）修飾A、C、G、およびUヌクレオチドであり、Af、Cf、GfおよびUfは、2'-フルオロ修飾A、C、G、およびUであり、sはホスホチオエート結合である、を含む二本鎖RNA i 薬。

【請求項 6 0】

さらにリガンドを含む、請求項 5 9 に記載の二本鎖RNA i 薬。

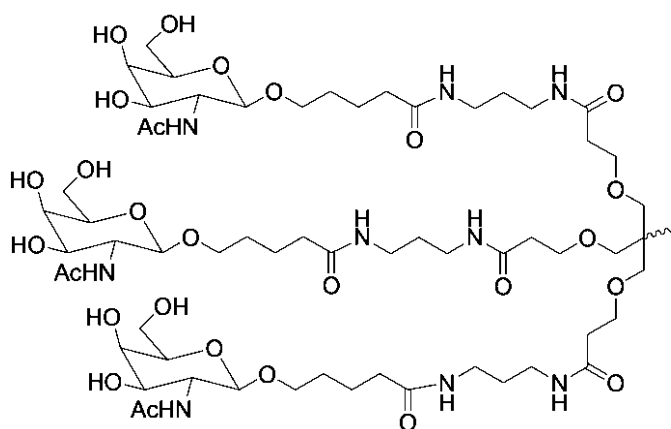
【請求項 6 1】

リガンドが、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体である、請求項 5 9 または 6 0 に記載の二本鎖RNA i 薬。

【請求項 6 2】

リガンドが、

【化 3】



である、請求項 5 9 から 6 1 のいずれかに記載の二本鎖RNA i 薬。

【請求項 6 3】

リガンドがセンス鎖の3'末端に結合している、請求項 5 9 から 6 2 のいずれかに記載の二本鎖RNA i 薬。

【請求項 6 4】

RNA i 薬が、以下：

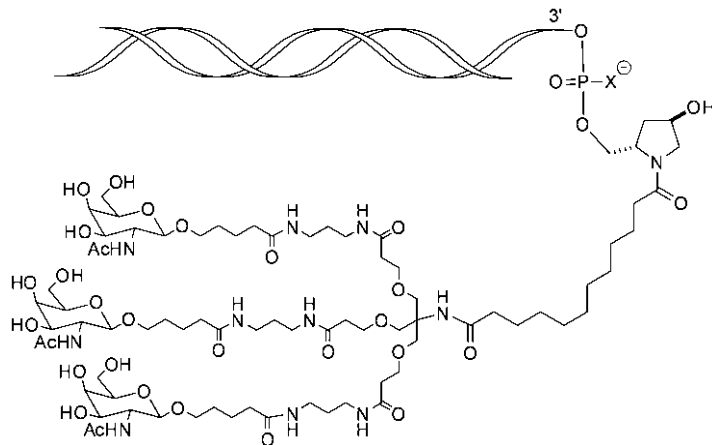
10

20

30

40

【化 4】



10

[式中、Xは、OまたはSである。]

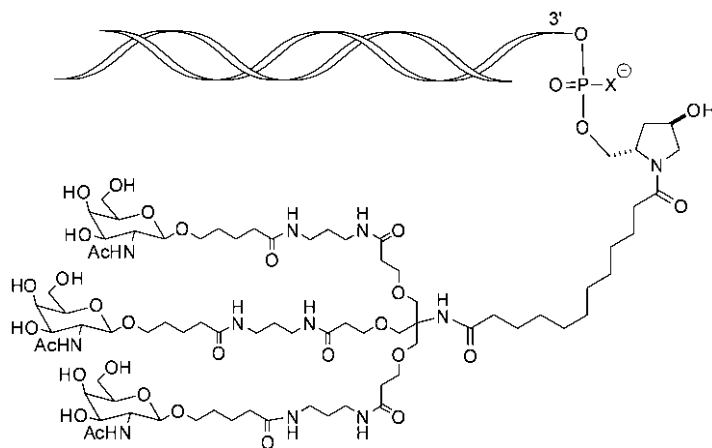
で示されるリガンドと複合体を形成している、請求項63に記載の二本鎖RNA i 薬。

【請求項65】

5'-uscsucccAfcCfUfUfuucuucuaau-3' (配列番号1025) で示されるヌクレオチド配列を含むセンス鎖、および5'-asUfsuagA f a g a a a a g G f u G f g g a g a s c s u - 3' (配列番号1026) で示されるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖、ここで、a、c、g、およびuはそれぞれ2'-O-メチル(2'-OMe)修飾A、C、G、およびUヌクレオチドであり、Af、Cf、GfおよびUfは、2'-フルオロ修飾A、C、G、およびUであり、sはホスホロチオエート結合である、を含む二本鎖RNA i 薬であって、以下：

20

【化 5】



30

[式中、Xは、Oである。]

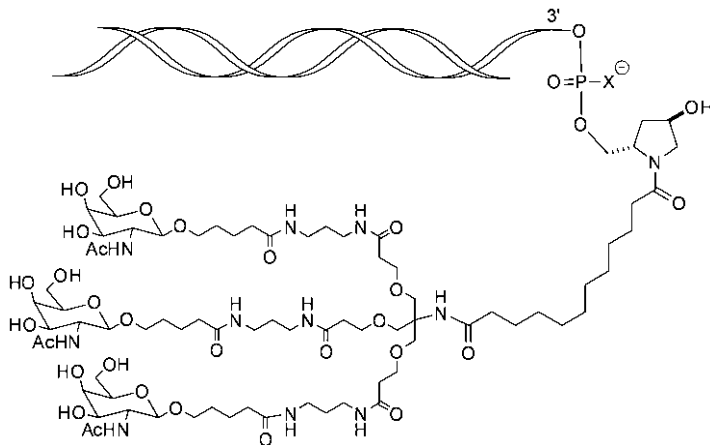
で示されるリガンドと複合体を形成している、二本鎖RNA i 薬。

【請求項66】

5'-uscsucccAfcCfUfUfuucuucuaau-3' (配列番号1025) で示されるヌクレオチド配列からなるセンス鎖、および5'-asUfsuagA f a g a a a a g G f u G f g g a g a s c s u - 3' (配列番号1026) で示されるヌクレオチド配列からなるアンチセンス鎖、ここで、a、c、g、およびuはそれぞれ2'-O-メチル(2'-OMe)修飾A、C、G、およびUヌクレオチドであり、Af、Cf、GfおよびUfは、2'-フルオロ修飾A、C、G、およびUであり、sはホスホロチオエート結合である、を含む二本鎖RNA i 薬であって、以下：

40

【化 6】



10

[式中、Xは、Oである。]

で示されるリガンドと複合体を形成している、二本鎖RNA i 薬。

【請求項 6 7】

請求項 6 5 または 6 6 に記載の二本鎖RNA i 薬を含む、医薬組成物。

【請求項 6 8】

二本鎖RNA i 薬が非緩衝液中に存在する、請求項 6 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 9】

該非緩衝液が生理食塩水または水である、請求項 6 8 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 7 0】

該二本鎖RNA i 薬が緩衝液中に存在する、請求項 6 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 7 1】

該緩衝液が、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロラミン、炭酸緩衝液、またはリン酸緩衝液、あるいはこれらの任意の組合せを含む、請求項 7 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 7 2】

該緩衝液が、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）である、請求項 7 1 に記載の医薬組成物。

。

【請求項 7 3】

治療的有効量の、請求項 6 5 または 6 6 に記載の二本鎖RNA i 薬、または請求項 6 7 から 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物の、アンジオテンシノーゲン（AGT）関連障害を有する対象の処置のための医薬の製造のための使用。

30

【請求項 7 4】

対象がヒトである、請求項 7 3 の使用。

【請求項 7 5】

アンジオテンシノーゲン関連疾患が、高血圧、境界域高血圧、原発性高血圧、続発性高血圧、高血圧緊急症、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心内膜線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病、腎疾患、腎不全、全身性硬化症、子宮内胎児発育遅延（IUGR）、ならびに胎児発育不全からなる群より選択される、請求項 7 3 または 7 4 に記載の使用。

40

【請求項 7 6】

アンジオテンシノーゲン関連疾患が高血圧である、請求項 7 3 または 7 4 に記載の使用

50

。

【請求項 77】

アンジオテンシノーゲン関連疾患が妊娠関連高血圧である、請求項 73 または 74 に記載の使用。

【請求項 78】

二本鎖 RNA が、体重 1 kg 当たり約 0.01 mg から約 10 mg または約 0.5 mg から約 50 mg の用量で投与される、請求項 73 または 74 に記載の使用。

【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、2014年5月22日出願の米国仮特許出願第62/001,731号、および2014年9月9日出願の米国仮特許出願第62/047978号に基づいて優先権を主張している。上記の各出願の内容全体は、引用により本明細書中に包含される。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出され、その全体が引用により本明細書中に包含される配列表を含む。2015年5月18日に作成されたASCIIコピーを、121301-01320__SL.txt と言い、サイズは318,688バイトである。

【背景技術】

20

【0003】

発明の背景

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAAS)は、血圧の調節に重要な役割を果たしている。RAASカスケードは、腎臓の傍糸球体細胞によるレニンの循環系への放出により始まる。レニン分泌は、遠位尿細管でのNa⁺の再吸収、β-交感神経刺激、および/または低下した腎臓灌流を含む、幾つかの要因によって刺激される。血漿中の活性型レニンは、アンジオテンシノーゲン(肝臓で産生される)を切断してアンジオテンシンIにし、その後、それは循環して、局所的に発現されたアンジオテンシン変換酵素(ACE)によりアンジオテンシンIIに変換される。RAASにおけるアンジオテンシンIIの作用のほとんどは、アンジオテンシンIIタイプ1受容体(AT₁R)へのその結合によって発揮され、増加したNa⁺再吸収または糸球体濾過比の調節などの、動脈血管収縮作用、尿細管作用および糸球体作用をもたらす。加えて、副腎皮質刺激ホルモン、抗利尿ホルモン、カテコールアミン、エンドセリン、セロトニン、ならびにMg²⁺およびK⁺濃度のような他の刺激と共に、AT₁R刺激は、アルドステロンの放出を誘導し、順に、腎臓の遠位尿細管におけるNa⁺およびK⁺の排出を促進する。

30

【0004】

例えば、過剰のアンジオテンシンII産生および/またはAT₁R刺激をもたらす、RAASの調節不全は、結果として、例えば、心臓、腎臓および予備動脈における酸化ストレスの増加、炎症の促進、肥大および線維症をもたらす得る高血圧をもたらす、そして、例えば、左心室線維症、動脈リモデリング、および糸球体硬化症をもたらす。

40

【0005】

高血圧は、先進国の中で最も高い有病率であり、コントロール可能な疾患であり、成人集団の20から50%が罹患している。それは、平均寿命の短縮、慢性腎疾患、卒中、心筋梗塞、心不全、動脈瘤(例えば、大動脈瘤)、末梢動脈疾患、心不全(例えば、心肥大(heart enlargement or hypertrophy)および他の心血管関連疾患、障害および/または病状のような、種々の疾患、障害および病状の主な危険因子である。加えて、高血圧は、心血管罹病率の重要な危険因子であることが示されており、卒中の全症例の62%および心疾患の全症例の49%を占めるか、またはそれに貢献する死亡原因である。

【0006】

高血圧を処置するための利用可能な降圧薬が多数あるにも関わらず、対象の3分の2以

50

上は、1つの降圧薬で制御されず、異なる薬剤クラスから選択される2つ以上の抗高血圧剤を必要とする。これはさらに、コンプライアンスおよび副作用が薬剤の増加に伴って増えるため、制御された血圧を有する対象者数を減少させる。

【0007】

従って、当技術分野において、アンジオテンシノーゲン関連疾患を有する対象のための別の療法および併用療法が必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

発明の概要

本発明は、アンジオテンシノーゲン（AGT）遺伝子のRNA転写物のRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）が介在する切断に影響するiRNA組成物を提供する。AGT遺伝子は、細胞内、例えば、ヒトなどの対象内の細胞内に存在し得る。

【0009】

本発明はまた、AGT遺伝子の発現を阻害するための、RNA転写産物のRNA誘導型サイレンシング複合体（RISC）が介在するAGT遺伝子の切断作用を有するiRNA組成物を用いて、AGT遺伝子の発現の阻害または低下により利点を有し得る障害、例えば、高血圧などのアンジオテンシノーゲン関連疾患を有する対象を処置するための方法および療法を提供する。

【0010】

従って、一面において、本発明は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む、アンジオテンシノーゲン（AGT）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（RNAi）薬であって、ここで、該センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、ここで、該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドであり、そして該センス鎖は、3'末端で結合しているリガンドと複合体を形成している、二本鎖リボ核酸（RNAi）薬を提供する。一態様において、該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。

【0011】

別の面において、本発明は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む、アンジオテンシノーゲン（AGT）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（RNAi）薬であって、ここで、該センス鎖が、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド2801-2101；803-843；834-859；803-859；803-875；834-875；847-875；1247-1271；1566-1624；1570-1624；1584-1624；1584-1624；1584-1621；2035-2144；2070-2144；2070-2103；2201-2223；2227-2360；2227-2304；2290-2318；2304-2350；2304-2326；2320-2342；2333-2360；2333-2358；485-503；517-535；560-578；635-653；803-821；814-832；822-840；825-843；834-852；837-855；841-859；855-873；967-985；1247-1265；1248-1266；1249-1267；1251-1269；1253-1271；1566-1584；1570-1588；1572-1590；1574-1592；1584-1602；1587-1605；1591-1609；1592-1610；1595-1613；1601-1619；1602-1620；1605-1623；1729-1747；1738-1756；1739-1757；1741-1769；1767-1785；1810-1828；1827-1845；1880-1989；1892-1914；1894-1914；1894-2012；2035-2053；2046-2064；2057-2075；2070-2088；2072-2090；2078-209

10

20

30

40

50

6 ; 2 0 7 8 - 2 1 0 7 ; 2 0 7 8 - 2 0 1 1 ; 2 0 8 0 - 2 0 9 8 ; 2 0 8 1 - 2 0 9
 9 ; 2 0 8 1 - 2 1 0 4 ; 2 0 8 1 - 2 0 1 1 ; 2 0 8 2 - 2 1 0 0 ; 2 0 8 4 - 2 1 0
 2 ; 2 0 8 4 - 2 0 1 1 ; 2 0 9 0 - 2 1 0 8 ; 2 1 0 0 - 2 1 1 8 ; 2 1 1 1 - 2 1 2
 9 ; 2 1 2 4 - 2 1 4 2 ; 2 1 2 5 - 2 1 4 3 ; 2 1 6 7 - 2 1 8 5 ; 2 1 7 9 - 2 1 9
 7 ; 2 2 0 1 - 2 2 1 9 ; 2 2 0 2 - 2 2 2 0 ; 2 2 0 3 - 2 2 2 1 ; 2 2 0 4 - 2 2 2
 2 ; 2 2 2 7 - 2 2 4 5 ; 2 2 3 0 - 2 2 4 8 ; 2 2 3 4 - 2 2 5 2 ; 2 2 4 4 - 2 2 6
 4 ; 2 2 5 5 - 2 2 7 3 ; 2 2 6 6 - 2 2 8 4 ; 2 2 6 8 - 2 2 8 6 ; 2 2 7 0 - 2 2 8
 8 ; 2 2 7 9 - 2 2 9 7 ; 2 2 8 1 - 2 2 9 9 ; 2 2 8 3 - 2 3 0 1 ; 2 2 8 4 - 2 3 0
 2 ; 2 2 8 5 - 2 3 0 3 ; 2 2 8 6 - 2 3 0 4 ; 2 2 8 8 - 2 3 0 6 ; 2 2 9 0 - 2 3 0
 8 ; 2 2 9 1 - 2 3 0 9 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 1 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 8 ; 2 2 9 1 - 2 3 1
 5 ; 2 2 9 2 - 2 3 1 0 ; 2 2 9 4 - 2 3 1 2 ; 2 2 9 6 - 2 3 1 4 ; 2 2 9 9 - 2 3 1
 7 ; 2 3 0 4 - 2 3 2 2 ; 2 3 0 4 - 2 3 2 9 ; 2 3 0 6 - 2 3 2 4 ; 2 3 0 7 - 2 3 2
 5 ; 2 3 0 9 - 2 3 2 7 ; 2 3 0 9 - 2 3 2 9 ; 2 3 0 9 - 2 3 4 2 ; 2 3 0 9 - 2 3 5
 0 ; 2 3 0 9 - 2 3 5 8 ; 2 3 1 4 - 2 3 3 2 ; 2 3 1 6 - 2 3 3 4 ; 2 3 1 7 - 2 3 3
 5 ; 2 3 2 0 - 2 3 3 8 ; 2 3 2 1 - 2 3 3 9 ; 2 3 2 3 - 2 3 4 1 ; 2 3 2 5 - 2 3 4
 3 ; 2 3 2 6 - 2 3 4 4 ; 2 3 2 8 - 2 3 4 6 ; 2 3 2 9 - 2 3 4 7 ; 2 3 3 1 - 2 3 4
 9 ; 2 3 3 3 - 2 3 5 1 ; 2 3 3 4 - 2 3 5 2 ; 2 3 3 5 - 2 3 5 3 ; 2 3 3 9 - 2 3 5
 7 ; 2 3 4 0 - 2 3 5 8 ; または、2 3 4 1 - 2 3 5 9 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる
 少なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドを含み、該アンチセンス鎖が、センス鎖における
 少なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドに実質的に相補的であるように、配列番号 2 のヌク
 レオチド配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少な
 くとも 1 5 個の連続ヌクレオチドを含む、二本鎖 RNA i 薬を提供する。任意の態様にお
 いて、センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。他の態様にお
 いて、アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。さら
 に他の態様において、両鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。
 一態様において、該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌク
 レオチドは、修飾ヌクレオチドである。一態様において、センス鎖は、3' 末端で結合し
 ているリガンドと複合体を形成している。一態様において、該センス鎖は、配列番号 1 の
 ヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 8 0 1 - 2 1 0 1 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる
 少なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドを含み、該アンチセンス鎖は、センス鎖における少
 なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドに実質的に相補的であるように、配列番号 2 のヌク
 レオチド配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少な
 くとも 1 5 個の連続ヌクレオチドを含む。

【0012】

一面において、本発明は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む
 、アンジオテンシノーゲン (A G T) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (RNA i)
) 薬であって、ここで、該センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列のヌクレオチド 8
 0 3 - 8 4 3 ; 8 3 4 - 8 5 9 ; 8 0 3 - 8 5 9 ; 1 2 4 7 - 1 2 7 1 ; 1 5 6 6 - 1 6
 2 4 ; 1 5 7 0 - 1 6 2 4 ; 1 5 8 4 - 1 6 2 4 ; 1 5 8 4 - 1 6 2 4 ; 1 5 8 4 - 1 6
 2 1 ; 2 0 3 5 - 2 1 4 4 ; 2 0 7 0 - 2 1 4 4 ; 2 0 7 0 - 2 1 0 3 ; 2 2 0 1 - 2 2
 2 3 ; 2 2 2 7 - 2 3 6 0 ; 2 2 2 7 - 2 3 0 4 ; 2 2 9 0 - 2 3 1 8 ; 2 3 0 4 - 2 3
 5 0 ; 2 3 0 4 - 2 3 2 6 ; 2 3 2 0 - 2 3 4 2 ; 2 3 3 3 - 2 3 6 0 ; 2 3 3 3 - 2 3
 5 8 ; 4 8 5 - 5 0 3 ; 5 1 7 - 5 3 5 ; 5 6 0 - 5 7 8 ; 6 3 5 - 6 5 3 ; 8 0 3 - 8
 2 1 ; 8 1 4 - 8 3 2 ; 8 2 2 - 8 4 0 ; 8 2 5 - 8 4 3 ; 8 3 4 - 8 5 2 ; 8 3 7 - 8
 5 5 ; 8 4 1 - 8 5 9 ; 8 5 5 - 8 7 3 ; 9 6 7 - 9 8 5 ; 1 2 4 7 - 1 2 6 5 ; 1 2 4
 8 - 1 2 6 6 ; 1 2 4 9 - 1 2 6 7 ; 1 2 5 1 - 1 2 6 9 ; 1 2 5 3 - 1 2 7 1 ; 1 5 6
 6 - 1 5 8 4 ; 1 5 7 0 - 1 5 8 8 ; 1 5 7 2 - 1 5 9 0 ; 1 5 7 4 - 1 5 9 2 ; 1 5 8
 4 - 1 6 0 2 ; 1 5 8 7 - 1 6 0 5 ; 1 5 9 1 - 1 6 0 9 ; 1 5 9 2 - 1 6 1 0 ; 1 5 9
 5 - 1 6 1 3 ; 1 6 0 1 - 1 6 1 9 ; 1 6 0 2 - 1 6 2 0 ; 1 6 0 5 - 1 6 2 3 ; 1 7 2
 9 - 1 7 4 7 ; 1 7 3 8 - 1 7 5 6 ; 1 7 3 9 - 1 7 5 7 ; 1 7 4 1 - 1 7 6 9 ; 1 7 6

7-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2080-2098; 2081-2099; 2082-2100; 2084-2102; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 2333-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 2340-2358; または、2341-2359と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖が、センス鎖における少なくとも15個の連続ヌクレオチドに実質的に相補的であるように、配列番号2のヌクレオチド配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸(RNAi)薬を提供する。任意の態様において、センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。他の態様において、アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。さらに他の態様において、両鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。一態様において、センス鎖は、3'末端で結合しているリガンドと複合体を形成している。

【0013】

一態様において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、表3、4、7、8、11、13および15の何れかの表に列記されるアンチセンス配列の何れか1つと3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含む、相補性の領域を含む。例えば、任意の態様において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、二本鎖(duplex)AD-52433.1、AD-52438.1、AD-52439.1、AD-52445.1、AD-52449.1、AD-52451.1、AD-52456.1、AD-52457.1、AD-52462.1、AD-52463.1、AD-52469.1、AD-52474.1、AD-55976.1、AD-55978.1、AD-55979.1、AD-55980.1、AD-55981.1、AD-55982.1、AD-55983.1、AD-55984.1、AD-55987.1、AD-55988.1、AD-55989.1、AD-55990.1、AD-55991.1、AD-55994.1、AD-55995.1、AD-55996.1、AD-55999.1、AD-56000.1、AD-56001.1、AD-56002.1、AD-56003.1、AD-56006.1、AD-56007.1、AD-56008.1、AD-56009.1、AD-56011.1、AD-56012.1、AD-56013.1、AD-56016.1、AD-56017.1、AD-56019.1、AD-56020.1、AD-56021.1、AD-56022.1、AD-56024.1、AD-56026.1、AD-56027.1、AD-56029.1、AD-56030.1、AD-56031.1、AD-56032.1、AD-56035.1、AD-56039.1、AD-56041.1、AD-56043.1、AD-56044.1、AD-56047.1、AD-56048.1、AD-56051.1、AD-56053.1、AD-56054.1、AD-56059.1、AD-56062.1、AD-56065.1、AD-56066.1、AD-60770.1、AD-60771.1、AD-6077

6. 1、AD-60777. 1、AD-60778. 1、AD-60779. 1、AD-60780. 1、AD-60781. 1、AD-60783. 1、AD-60784. 1、AD-60785. 1、AD-60788. 1、AD-60789. 1、AD-60791. 1、AD-60793. 1、AD-60795. 1、AD-60798. 1、AD-60801. 1、AD-67903. 1、AD-67906. 1、AD-67923. 1、AD-67924. 1、AD-67925. 1、AD-67926. 1、AD-67935. 1、AD-67965. 1、AD-67994. 1、AD-67995. 1、AD-67996. 1、AD-68017. 1、AD-68022. 1、AD-68035. 1、AD-68036. 1、AD-68037. 1、AD-68084. 2、AD-68085. 2、AD-68086. 2、AD-68087. 2、AD-68090. 2、AD-68091. 2、AD-68092. 2、AD-68093. 2、AD-68116. 1、AD-68117. 1、AD-68118. 1、AD-68124. 1、AD-68125. 1、またはAD-68126. 1のアンチセンス配列の何れか1つと3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含む、相補性の領域を含む。任意の態様において、センス鎖およびアンチセンス鎖は、二本鎖AD-52433. 1、AD-52438. 1、AD-52439. 1、AD-52445. 1、AD-52449. 1、AD-52451. 1、AD-52456. 1、AD-52457. 1、AD-52462. 1、AD-52463. 1、AD-52469. 1、AD-52474. 1、AD-55976. 1、AD-55978. 1、AD-55979. 1、AD-55980. 1、AD-55981. 1、AD-55982. 1、AD-55983. 1、AD-55984. 1、AD-55987. 1、AD-55988. 1、AD-55989. 1、AD-55990. 1、AD-55991. 1、AD-55994. 1、AD-55995. 1、AD-55996. 1、AD-55999. 1、AD-56000. 1、AD-56001. 1、AD-56002. 1、AD-56003. 1、AD-56006. 1、AD-56007. 1、AD-56008. 1、AD-56009. 1、AD-56011. 1、AD-56012. 1、AD-56013. 1、AD-56016. 1、AD-56017. 1、AD-56019. 1、AD-56020. 1、AD-56021. 1、AD-56022. 1、AD-56024. 1、AD-56026. 1、AD-56027. 1、AD-56029. 1、AD-56030. 1、AD-56031. 1、AD-56032. 1、AD-56035. 1、AD-56039. 1、AD-56041. 1、AD-56043. 1、AD-56044. 1、AD-56047. 1、AD-56048. 1、AD-56051. 1、AD-56053. 1、AD-56054. 1、AD-56059. 1、AD-56062. 1、AD-56065. 1、AD-56066. 1、AD-60770. 1、AD-60771. 1、AD-60776. 1、AD-60777. 1、AD-60778. 1、AD-60779. 1、AD-60780. 1、AD-60781. 1、AD-60783. 1、AD-60784. 1、AD-60785. 1、AD-60788. 1、AD-60789. 1、AD-60791. 1、AD-60793. 1、AD-60795. 1、AD-60798. 1、AD-60801. 1、AD-67903. 1、AD-67906. 1、AD-67923. 1、AD-67924. 1、AD-67925. 1、AD-67926. 1、AD-67935. 1、AD-67965. 1、AD-67994. 1、AD-67995. 1、AD-67996. 1、AD-68017. 1、AD-68022. 1、AD-68035. 1、AD-68036. 1、AD-68037. 1、AD-68084. 2、AD-68085. 2、AD-68086. 2、AD-68087. 2、AD-68090. 2、AD-68091. 2、AD-68092. 2、AD-68093. 2、AD-68116. 1、AD-68117. 1、AD-68118. 1、AD-68124. 1、AD-68125. 1、またはAD-68126. 1の何れか1つ相補性の領域の少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含む、相補性の領域を含む。

【0014】

一態様において、アンチセンス鎖は、AD-67327のアンチセンスヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列（5'－AUUAGAAGAAAAGGUGGGAGACU－3'；配列番号537）と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続する非修飾ヌクレオチドを含む、相補性の領域を含む。別の態様において、相補性の領域は、AD－67327のアンチセンス非修飾ヌクレオチド配列からなる（5'－AUUAGAAGAAAAGGUGGGAGACU－3'；配列番号537）。一態様において、dsRNAは、ヌクレオチド配列 5'－UCUCCCCACCUUUUCUUCUAAU－3'（配列番号499）からなるセンス鎖、およびヌクレオチド配列 5'－UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACU－3'（配列番号537）からなるアンチセンス鎖を含む。一態様において、二本鎖RNA i 薬は、AD－67327の修飾ヌクレオチド配列を含む（5'－uscsucccAfcCfUfUfuucuuucuaau－3'；配列番号1037および5'－asUfsuagAfaaaaaagGfuGfggagascsu－3'；配列番号1038）。

【0015】

ある態様において、修飾ヌクレオチド（複数可）は、2'－O－メチル修飾ヌクレオチド、2'－フルオロ修飾ヌクレオチド、5'－ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、およびコレステリルエステル誘導体またはドデカン酸ビスデシルアミド基（bisdecylamide group）と結合する末端ヌクレオチドからなる群より独立して選択される。さらなる態様において、修飾ヌクレオチドは、2'－デオキシ－2'－フルオロ修飾ヌクレオチド、2'－デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド（locked nucleotide）、非ロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束エチル（constrained ethyl）ヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'－アミノ修飾ヌクレオチド、2'－アルキル修飾ヌクレオチド、2'－O－アリル修飾ヌクレオチド、2'－C－アリル修飾ヌクレオチド、2'－ヒドロキシル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホラミデート、およびヌクレオチドを含む非天然塩基からなる群より選択される。

【0016】

二本鎖RNA i 薬の別の態様において、少なくとも1つの鎖は、少なくとも1個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。別の態様において、少なくとも1つの鎖は、少なくとも2個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。

【0017】

別の面において、本発明は、細胞におけるアンジオテンシノーゲン（AGT）の発現を阻害することができるRNA i 薬、例えば、二本鎖リボ核酸（RNA i）薬であって、ここで、二本鎖RNA i 薬は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGTをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、該二本鎖RNA i 薬は、式（III）：

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

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

[式中、i、j、kおよびlは、それぞれ独立して、0または1であり、

p、p'、qおよびq'は、それぞれ独立して、0－6であり、

各N_aおよびN_a'は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである0－25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各N_bおよびN_b'は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである0－10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

各n_p、n_p'、n_qおよびn_q'（それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい）は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、

10

20

30

40

50

N_b における修飾は、 Y における修飾とは異なり、 N_b' における修飾は、 Y' における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成している。]

で表される、二本鎖RNA i 薬を提供する。

【0018】

一態様において、 i は0であり、 j は0であるか； i は1であり、 j は1であるか； i および j の両方が0であるか；または、 i および j の両方が1である。別の態様において、 k は0であり、 l は0であるか； k は1であり、 l は1であるか； k および l の両方が0であるか；または、 k および l の両方が1である。

【0019】

一態様において、 XXX は、 $X'X'X'$ に相補的であり、 YYY は、 $Y'Y'Y'$ に相補的であり、そして ZZZ は、 $Z'Z'Z'$ に相補的である。

【0020】

一態様において、 YYY モチーフは、センス鎖の切断部位に、またはその近位に生じる。

【0021】

別の態様において、 $Y'Y'Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の5'末端から11位、12位および13位に生じる。

【0022】

一態様において、 Y' は2'-O-メチルである。

【0023】

一態様において、式(III)は、式(IIIa)：

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

アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q'$ 5' (IIIa) で表される。

【0024】

別の態様において、式(III)は、式(IIIb)：

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

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

[式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1-5個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。]

で表される。

【0025】

さらに別の態様において、式(III)は、式(IIIc)：

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

アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q'$ 5' (IIIc)

[式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1-5個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。]

で表される。

【0026】

さらなる態様において、式(III)は、式(IIId)：

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

アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q'$ 5' (IIId)

[式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1-5個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各 N_a および N_a' は、独立して、2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。]

10

20

30

40

50

で表される。

【0027】

一態様において、二本鎖領域は、15－30ヌクレオチド対の長さである。別の態様において、二本鎖領域は、17－23ヌクレオチド対の長さである。さらに別の態様において、二本鎖領域は、17－25ヌクレオチド対の長さである。さらなる態様において、二本鎖領域は、23－27ヌクレオチド対の長さである。別の態様において、二本鎖領域は、19－23ヌクレオチド対の長さである。別の態様において、二本鎖領域は、21－23ヌクレオチド対の長さである。さらに別の態様において、各鎖は、15－30個のヌクレオチドを有する。さらに別の態様において、各鎖は、19－30個のヌクレオチドを有する。

10

【0028】

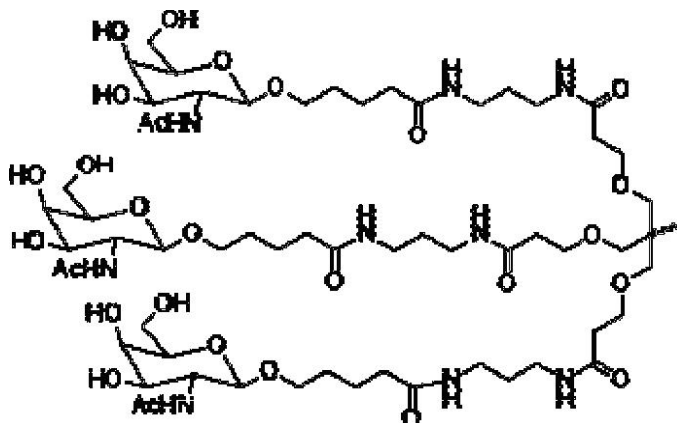
一態様において、ヌクレオチドにおける修飾は、LNA、UNA、CRN、cEt、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-アルキル、2'-O-アシル、2'-C-アシル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、およびそれらの組合せからなる群より選択される。別の態様において、ヌクレオチドにおける修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾である。

【0029】

一態様において、リガンドは、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体である。別の態様において、リガンドは、

20

【化1】



30

である。

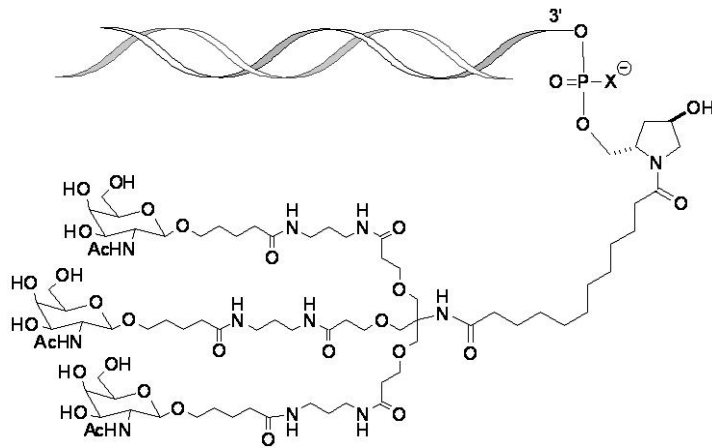
【0030】

一態様において、リガンドは、センス鎖の3'末端に結合している。

【0031】

別の態様において、RNAi薬は、以下：

【化 2】



10

〔式中、Xは、OまたはSである。〕

で示されるリガンドと複合体を形成している。特定の態様において、XはOである。

【0032】

一態様において、本発明の薬剤は、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合をさらに含む。

【0033】

20

さらなる態様において、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合は、1つの鎖の3'末端にある。別の態様において、該鎖はアンチセンス鎖である。別の態様において、該鎖はセンス鎖である。

【0034】

一態様において、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合は、1つの鎖の5'末端にある。別の態様において、該鎖はアンチセンス鎖である。さらなる態様において、該鎖はセンス鎖である。

【0035】

一態様において、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合は、1つの鎖の5'末端および3'末端の両方にある。別の態様において、該鎖はアンチセンス鎖である。

30

【0036】

別の態様において、二本鎖RNAは、6-8個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。さらなる態様において、アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そしてセンス鎖は、該センス鎖の5'末端または3'末端のいずれかに少なくとも2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

【0037】

一態様において、二本鎖のアンチセンス鎖の5'末端の1つの位置の塩基対は、AU塩基対である。別の態様において、Yヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾を含む。さらなる態様において、Y'ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を含む。

40

【0038】

一態様において、 $p' > 0$ である。別の態様において、 $p' = 2$ である。さらなる態様において、 $q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ 、および p' オーバーハングヌクレオチドは、標的mRNAに相補的である。さらなる態様において、 $q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ 、および p' オーバーハングヌクレオチドは、標的mRNAに相補的でない。

【0039】

一態様において、センス鎖は、合計21個のヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖は、合計23個のヌクレオチドを有する。

【0040】

50

別の態様において、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結されている。さらなる態様において、全ての n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結されている。

【0041】

別の態様において、RNAi薬は、表3、4、7、8、11、13および15の何れかに列記されるRNAi薬の群から選択される。

【0042】

一面において、本発明は、アンジオテンシノーゲン（AGT）の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸（RNAi）薬を提供する。二本鎖RNAi薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、該センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、そして、該アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、該センス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、該アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして、該センス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して3'末端に結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成している。

【0043】

一態様において、該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは、修飾を含む。

【0044】

別の面において、本発明は、細胞内でのAGT（アンジオテンシノーゲン）の発現を阻害することができるRNAi薬、例えば、二本鎖リボ核酸（RNAi）薬であって、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGTをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、該二本鎖RNAi薬は、式（III）：

$$\begin{aligned} \text{センス：} & 5' \quad n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q \quad 3' \\ \text{アンチセンス：} & 3' \quad n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' \quad 5' \quad (III) \end{aligned}$$

[式中、i、j、kおよびlは、それぞれ独立して、0または1であり、

p、p'、qおよびq'は、それぞれ独立して、0-6であり、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである0-25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである0-10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' （それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい）は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、

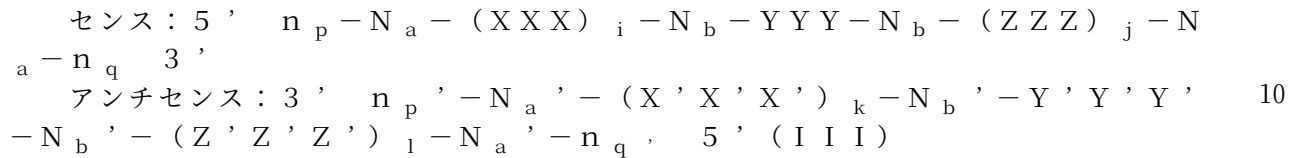
N_b における修飾は、Yにおける修飾とは異なり、 N_b' における修飾は、Y'における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成している。]

で表される、二本鎖RNA i 薬を提供する。

【0045】

さらに別の面において、本発明は、細胞内でのアンジオテンシノーゲン（AGT）の発現を阻害することができるRNA i 薬、例えば、二本鎖リボ核酸（RNA i）薬であって、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGTをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、該二本鎖RNA i 薬は、式（III）：



[式中、i、j、kおよびlは、それぞれ独立して、0または1であり、各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' （それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい）は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、p、qおよびq'は、それぞれ独立して、0-6であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、

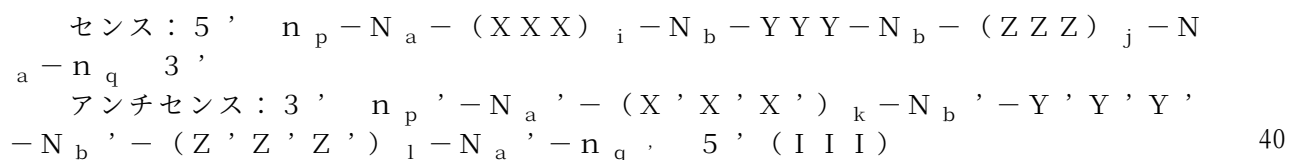
N_b における修飾は、Yにおける修飾とは異なり、 N_b' における修飾は、Y'における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成している。]

で表される、二本鎖RNA i 薬を提供する。

【0046】

さらなる面において、本発明は、細胞内でのアンジオテンシノーゲン（AGT）の発現を阻害することができるRNA i 薬、例えば、二本鎖リボ核酸（RNA i 薬）であって、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、ここで、該アンチセンス鎖は、AGTをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、該二本鎖RNA i 薬は、式（III）：



[式中、i、j、kおよびlは、それぞれ独立して、0または1であり、各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' （それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい）は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p、qおよびq'は、それぞれ独立して、0-6であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、または

30

40

50

その組合せのいずれかである、0-10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、

N_bにおける修飾は、Yにおける修飾とは異なり、N_b'における修飾は、Y'における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成しており、ここで該リガンドは、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体である。]

で表される、二本鎖RNA i薬を提供する。

【0047】

別の面において、本発明は、細胞内でのアンジオテンシノーゲン(AGT)の発現を阻害することができるRNA i薬、例えば、二本鎖リボ核酸(RNA i)薬であって、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、ここで、該アンチセンス鎖は、AGTをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、該二本鎖RNA i薬は、式(III)：

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

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

[式中、i、j、kおよびlは、それぞれ独立して、0または1であり、

各n_p、n_p'、n_qおよびn_q'(それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい)は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p、qおよびq'は、それぞれ独立して、0-6であり、

n_p'>0であり、少なくとも1つのn_p'は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各N_aおよびN_a'は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各N_bおよびN_b'は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、

N_bにおける修飾は、Yにおける修飾とは異なり、N_b'における修飾は、Y'における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成しており、ここで該リガンドは、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体である。]

で表される、二本鎖RNA i薬を提供する。

【0048】

さらに別の面において、本発明は、細胞内でのアンジオテンシノーゲン(AGT)の発現を阻害することができるRNA i薬、例えば、二本鎖リボ核酸(RNA i)であって、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、ここで、該アンチセンス鎖は、AGTをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、該二本鎖RNA i薬は、式(III)：

センス：5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q 3'

10

20

30

40

50

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

[式中、各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' (それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい) は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、それぞれ独立して、0-6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

Y Y Y および Y' Y' Y' は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、

該センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成しており、ここで該リガンドは、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上の GalNAc 誘導体である。]

で表される、二本鎖 RNAi 薬を提供する。

【0049】

別の面において、本発明は、表3、4、7、8、11、13および15のうち何れか1つに列記される RNAi 薬を含む二本鎖 RNAi 薬を提供する。

【0050】

別の面において、本発明は、修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド薬を含む組成物であって、該医薬が、細胞内でのアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害することができ、表3、4、7、8、11、13および15の何れか1つに列記される配列群より選択されるセンス配列に相補的な配列を含み、該ポリヌクレオチドが、約14から約30ヌクレオチド長である、組成物を提供する。

【0051】

本発明はまた、本発明の二本鎖 RNAi 薬を含む、細胞、ベクター、宿主細胞および医薬組成物を提供する。

【0052】

一態様において、細胞は二本鎖 RNAi 薬を含む。

【0053】

ある態様において、二本鎖 RNAi 薬または修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド薬を含む組成物は、医薬組成物を用いて投与される。

【0054】

一態様において、本発明の医薬組成物は、液体製剤、例えば XTC または MC3 を含む。

【0055】

好ましい態様において、二本鎖 RNAi 薬は、溶液で投与される。ある態様において、二本鎖 RNAi 薬は、非緩衝液で投与される。別の態様において、非緩衝液は、生理食塩水または水である。別の態様において、二本鎖 RNAi 薬は、緩衝液と共に投与される。さらに別の態様において、緩衝液は、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロタミン、炭酸緩衝液、またはリン酸緩衝液、あるいはこれらの任意の組合せを含む。ある態様において、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) である。

【0056】

別の面において、本発明は、細胞でのアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害する方法を提供する。該方法には、細胞と二本鎖 RNAi 薬、医薬組成物、修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド薬を含む組成物または RNAi 薬を含むベクターとを接触させること、およびそうして製造された細胞を AGT 遺伝子の mRNA 転写物が分解される

10

20

30

40

50

のに十分な時間維持して、細胞でのA G T遺伝子の発現を阻害することが含まれる。

【0057】

一態様において、細胞は対象内に存在する。さらなる態様において、対象はヒトである。さらなる態様において、対象はアンジオテンシノーゲン関連疾患に罹患している。

【0058】

一態様において、A G T発現は、少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%または約100%阻害される。

【0059】

一態様において、センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド2801
 -2101; 803-843; 834-859; 803-859; 803-875; 83
 4-875; 847-875; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1
 624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2
 144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2
 360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2
 326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-50
 3; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-83
 2; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-85
 9; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 12
 49-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 15
 70-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 15
 87-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 16
 01-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 17
 38-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 18
 10-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1892-1914; 18
 94-1914; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 20
 57-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 20
 78-2107; 2078-2011; 2080-2098; 2081-2099; 20
 81-2104; 2081-2011; 2082-2100; 2084-2102; 20
 84-2011; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 21
 24-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 22
 01-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 22
 27-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 22
 55-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 22
 79-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 22
 85-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 22
 91-2309; 2291-2311; 2291-2318; 2291-2315; 22
 92-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 23
 04-2322; 2304-2329; 2306-2324; 2307-2325; 23
 09-2327; 2309-2329; 2309-2342; 2309-2350; 23
 09-2358; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 23
 20-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 23
 26-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 23
 33-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 23
 40-2358; または、2341-2359と3個以下のヌクレオチドが異なる少なく
 とも15個の連続ヌクレオチドを含む。

【0060】

別の面において、本発明は、アンジオテンシノーゲン（A G T）関連障害を有する対象の処置法であって、治療的有効量の二本鎖RNA i薬、修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド薬を含む組成物、または二本鎖RNA i薬を含む医薬組成物を該対象に投与して、該対象を処置することを含む、処置法を提供する。

10

20

30

40

50

【0061】

別の面において、本発明は、治療的有効量の二本鎖リボ核酸（RNAi薬）を対象に皮下投与することを含む、アンジオテンシノーゲン（AGT）関連障害を有する対象の処置法であって、ここで、該二本鎖RNAi薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、該アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、該センス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして、該センス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して3'末端に結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成する、処置法を提供する。

10

【0062】

一態様において、センス鎖の全てのヌクレオチドおよびアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾を含む。

20

【0063】

別の面において、本発明は、治療的有効量の二本鎖リボ核酸（RNAi薬）を対象に投与することを含む、アンジオテンシノーゲン（AGT）関連障害を有する対象の処置法であって、ここで、該二本鎖RNAi薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド2801-2101；803-843；834-859；803-859；803-875；834-875；847-875；1247-1271；1566-1624；1570-1624；1584-1624；1584-1624；1584-1621；2035-2144；2070-2144；2070-2103；2201-2223；2227-2360；2227-2304；2290-2318；2304-2350；2304-2326；2320-2342；2333-2360；2333-2358；485-503；517-535；560-578；635-653；803-821；814-832；822-840；825-843；834-852；837-855；841-859；855-873；967-985；1247-1265；1248-1266；1249-1267；1251-1269；1253-1271；1566-1584；1570-1588；1572-1590；1574-1592；1584-1602；1587-1605；1591-1609；1592-1610；1595-1613；1601-1619；1602-1620；1605-1623；1729-1747；1738-1756；1739-1757；1741-1769；1767-1785；1810-1828；1827-1845；1880-1989；1892-1914；1894-1914；1894-2012；2035-2053；2046-2064；2057-2075；2070-2088；2072-2090；2078-2096；2078-2107；2078-2011；2080-2098；2081-2099；2081-2104；2081-2011；2082-2100；2084-2102；2084-2011；2090-2108；2100-2118；2111-2129；2124-2142；2125-2143；2167-2185；2179-2197；2201-2219；2202-2220；2203-2221；2204-2222；2227-2245；2230-2248；2234-2252；2244-2264；2255-2273；2266-2284；2268-2286；2270-2288；2279-2297；2281-2299；2283-2301；2284-2302；2285-2303；2286-2304；2288-2306；2290-2308；229

30

40

50

1-2309; 2291-2311; 2291-2318; 2291-2315; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2304-2329; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2309-2329; 2309-2342; 2309-2350; 2309-2358; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-2344; 2328-2346; 2329-2347; 2331-2349; 2333-2351; 2334-2352; 2335-2353; 2339-2357; 2340-2358; または、2341-2359と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖がセンス鎖の少なくとも15個の連続ヌクレオチドに実質的に相補的であるように、配列番号2のヌクレオチド配列の対応する位置に該ヌクレオチドと3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含む、処置法を提供する。任意の態様において、センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。他の態様において、アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。さらに他の態様において、両鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。一態様において、センス鎖の全てのヌクレオチドおよびアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。一態様において、センス鎖は、3'末端で結合しているリガンドと複合体を形成している。

10

【0064】

20

別の面において、本発明は、治療的有効量の二本鎖リボ核酸 (RNAi薬) を対象に投与することを含む、アンジオテンシノーゲン (AGT) 関連障害を有する対象の処置法であって、ここで、該二本鎖RNAi薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド803-843; 834-859; 803-859; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2080-2098; 2081-2099; 2082-2100; 2084-2102; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2314-2332; 2316-23

30

40

50

3 4 ; 2 3 1 7 - 2 3 3 5 ; 2 3 2 0 - 2 3 3 8 ; 2 3 2 1 - 2 3 3 9 ; 2 3 2 3 - 2 3 4 1 ; 2 3 2 5 - 2 3 4 3 ; 2 3 2 6 - 2 3 4 4 ; 2 3 2 8 - 2 3 4 6 ; 2 3 2 9 - 2 3 4 7 ; 2 3 3 1 - 2 3 4 9 ; 2 3 3 3 - 2 3 5 1 ; 2 3 3 4 - 2 3 5 2 ; 2 3 3 5 - 2 3 5 3 ; 2 3 3 9 - 2 3 5 7 ; 2 3 4 0 - 2 3 5 8 ; または、2 3 4 1 - 2 3 5 9 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖がセンス鎖の少なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドに実質的に相補的であるように、配列番号 2 のヌクレオチド配列の対応する位置に該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 1 5 個の連続ヌクレオチドを含む、処置法を提供する。任意の態様において、センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。他の態様において、アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。さらに他の態様において、両鎖の実質的に全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。一態様において、センス鎖は、3' 末端で結合しているリガンドと複合体を形成している。

10

【0065】

一態様において、対象はヒトである。

【0066】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は、高血圧、境界域高血圧、原発性高血圧、二次性高血圧、高血圧緊急症、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心内膜線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群 (reninoma)、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病、腎疾患、腎不全、全身性硬化症、子宮内胎児発育遅延 (IUGR)、ならびに胎児発育不全からなる群より選択される。

20

【0067】

別の態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は、高血圧、高血圧性心疾患、高血圧性腎症、妊娠関連高血圧、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、慢性腎臓病、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心内膜線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全、心筋梗塞、卒中、真性糖尿病、腎不全、ならびに全身性硬化症からなる群より選択される。

30

【0068】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は、妊娠関連高血圧（例えば、妊娠高血圧症候群、子癇前症、および子癇）であり、本発明の iRNA の対象への投与は、母体の血圧の低下；母体のアルブミン尿の減少；子宮胎盤単位重量の増加；胎児体重の増加；胎児の脳：肝臓比の正常化；母体の肝臓における AGT mRNA 発現の減少および胎盤での hAGT mRNA 発現の有意な減少なし；全体の胎盤サイズの増加；絨毛胎盤のサイズの増加；胎盤の栄養海綿体サイズの有意な変化なし；母体の腎臓における sFLT1 : PLGF mRNA 発現の比の低下；血清 sFLT1 : PLGF レベルの比の低下；および／または、AT1 に対するアゴニスト自己抗体のレベルの低下をもたらす。

40

【0069】

一態様において、二本鎖 RNA i 薬は、体重 1 kg 当たり、約 0.01 mg から約 10 mg または約 0.5 mg から約 50 mg の用量で投与される。好ましい態様において、二本鎖 RNA i 薬は、体重 1 kg 当たり、約 10 mg、約 30 mg、または約 3.0 mg の用量で投与される。一態様において、二本鎖 RNA i 薬は、体重 1 kg 当たり、約 10 m

50

g の用量で投与される。一態様において、二本鎖RNA i 薬は、体重1 kg 当たり、約0.5 mg の用量で週に2回投与される。別の態様において、二本鎖RNA i 薬は、体重1 kg 当たり、約10 mg の用量で隔週で投与される。別の態様において、二本鎖RNA i 薬は、体重1 kg 当たり、約0.5 – 1.0 mg の用量で週に1回投与される。別の態様において、RNA i 薬は、およそ週に1回、月に1回、2か月に1回または四半期に1回（すなわち、3か月に1回）、体重1 kg 当たり、約0.1 mg から約5.0 mg の用量で投与される。

【0070】

一態様において、二本鎖RNA i 薬は、皮下または静脈内に投与される。

【0071】

一態様において、RNA i 薬は、2以上の用量で投与される。

【0072】

一態様において、RNA i 薬は、約12時間毎、約24時間毎、約48時間毎、約72時間毎および約96時間毎に1回投与からなる群より選択される間隔で投与される。

【0073】

一態様において、RNA i 薬は週に2回投与される。

【0074】

一態様において、RNA i 薬は隔週で投与される。

【0075】

任意の態様において、RNA i 薬は、月に1回投与される。

【0076】

任意の態様において、RNA i 薬は2か月に1回投与される。

【0077】

任意の態様において、RNA i 薬は、四半期に1回（すなわち、3か月に1回）投与される。

【0078】

さらに別の態様において、該方法は、対象にさらなる治療剤を投与することをさらに含む。ある態様において、さらなる治療剤は、利尿剤、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、β遮断薬、血管拡張薬、カルシウムチャンネル遮断薬、アルドステロンアンタゴニスト、α₂-アゴニスト、レニン阻害剤、α遮断薬、末梢作用型アドレナリン作動薬、選択的D1受容体部分アゴニスト、非選択的アルファ-アドレナリンアンタゴニスト、合成したステロイド性の抗ミネラルコルチコイド薬、または上記の何れかの組合せ、および併用剤として製剤された高血圧治療薬からなる群より選択される。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】図1は、治療介入の標的にされてきた、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系（RAAS）における種々の時点の表示を含む該系の模式図である（Zaman, et al. (2002) Nat Rev Drug Disc 1:621より出展）。

【図2】図2Aは、AD-60771の投与後の、妊娠したトランスジェニックラットの平均動脈血圧の低下を示すグラフである。図2Bは、AD-60771の投与後の、妊娠したトランスジェニックラットの血清アルブミンの低下を示すグラフである。

【図3】図3Aは、AD-60771の母体投与後に胎児に現れる改善を証明する、AD-60771の母体投与後に増加した子宮胎盤単位重量を示すグラフである。図3Bは、AD-60771の母体投与後に胎児に現れる改善を証明する、AD-60771の母体投与後の胎児の体重増加を示すグラフである。図3Cは、AD-60771の母体投与後に胎児に現れる改善を証明する、AD-60771の母体投与後の胎児の脳：肝臓比の正常化を示すグラフである。

【図4】図4Aは、iRNAが胎盤関門を通過していないことを証明する、AD-60771の投与後の母体の肝臓におけるhAGT mRNAの減少を示すグラフである。図4

10

20

30

40

50

Bは、iRNAが胎盤関門を通過していないことを証明する、胎盤におけるhAGT mRNAの有意な減少がないことを示すグラフである。

【図5】図5は、母体の肝臓、胎盤および胎児の肝臓のAD-60771への組織暴露を示すグラフである。

【図6】図6Aは、サイトケラチンを免疫組織化学染色した妊娠中の野生型ラットの胎盤である。図6Bは、サイトケラチンを免疫組織化学染色した処理の妊娠中のPEラットの胎盤である。図6Cは、サイトケラチンを免疫組織化学染色した、AD-60771を投与した妊娠中のPEラットの胎盤である。図6Dは、AD-60771を投与した妊娠中のPEラットおよび未処理の妊娠中のPEラットの、子宮間膜の三角部(mesometrial triangle)の大きさを示すグラフである。図6Eは、AD-60771を投与した妊娠中のPEラットおよび未処理の妊娠中のPEラットの、栄養海綿体の大きさを示すグラフである。図6Fは、AD-60771を投与した妊娠中のPEラットおよび未処理の妊娠中のPEラットの、胎盤の大きさを示すグラフである。図6Gは、AD-60771を投与した妊娠中のPEラットおよび未処理の妊娠中のPEラットの、ラビリンス(labyrinth)の大きさを示すグラフである。

10

【図7】図7Aは、AD-60771の投与後の、母体の腎臓における抗血管形成因子sFLT1のmRNA量の減少を示すグラフである。図7Bは、AD-60771の投与後の、母体の腎臓における血管新生因子PLGFのmRNA量の減少を示すグラフである。図7Cは、AD-60771の母体投与後の、胎盤における抗血管形成因子sFLT1のmRNA量の減少を示すグラフである。図7Dは、AD-60771の母体投与後の、胎盤における血管新生因子PLGFのmRNA量の減少を示すグラフである。

20

【図8】図8は、対照PEラットおよび妊娠中のPEラットから単離されたAT1-AAの、新生仔ラットの心筋細胞の自発的な拍動速度への影響により評価されるように、AD-60771を投与したPEラットにおけるAT1-AAレベルの低下を示すグラフである。

【図9】図9Aは、妊娠していないPEラットおよび妊娠中の対照Sprague-Dawleyラットと比較した、AD-60771を投与した妊娠中のPEラットにおける血清アンジオテンシンII(Ang2-10)レベルの低下を示すグラフである。図9Bは、妊娠していないPEラットおよび妊娠中の対照Sprague-Dawleyラットと比較した、AD-60771を投与した妊娠中のPEラットにおける血清ヒトAGT(hAGT)レベルおよびラットAGT(rAGT)レベルの低下を示すグラフである。

30

【発明を実施するための形態】

【0080】

発明の詳細な説明

本発明は、アンジオテンシノーゲン(AGT)遺伝子のRNA転写物の、RNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)が介在する切断を行う、iRNA組成物を提供する。遺伝子は細胞内、例えば、ヒトのような対象内の細胞内に存在してよい。

【0081】

本発明はまた、RNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)が介在するAGT遺伝子のRNA転写物の切断を起こすiRNA組成物を用いる、AGT遺伝子の発現を阻害または低下させることにより利点を有し得る障害、例えば、高血圧または妊娠関連高血圧のようなアンジオテンシノーゲン関連疾患を有する対象の処置法を提供する。

40

【0082】

本発明のiRNAには、約30ヌクレオチド長またはそれ未満、例えば、15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、

50

20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23、または21-22ヌクレオチド長の領域（領域は、AGT遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である）を有するRNA鎖（アンチセンス鎖）が含まれる。任意の態様において、本発明のiRNAには、AGT遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である少なくとも19個の連続ヌクレオチドの領域を有する、より長い、例えば66ヌクレオチド長まで、例えば、36-66、26-36、25-36、31-60、22-43、27-53ヌクレオチド長であり得るRNA鎖（アンチセンス鎖）が含まれる。これらのより長いアンチセンス鎖を有するiRNAには、20-60ヌクレオチド長の第二のRNA鎖（センス鎖）であって、ここでセンス鎖およびアンチセンス鎖が18-30個の連続ヌクレオチドの二本鎖を形成する、RNA鎖（センス鎖）が含まれる。これらのiRNAの使用は、哺乳動物における対応する遺伝子（AGT遺伝子）のmRNAの標的化分解を可能にする。特に、本発明のiRNAの非常に低い投与量は、特異的かつ効率的にRNA干渉（RNAi）を介して、対応する遺伝子（AGT遺伝子）の発現を顕著に阻害することができる。インビトロアッセイおよびインビボアッセイを用いて、本発明者らは、アンジオテンシノーゲン遺伝子を標的とするiRNAが、RNAiを媒介して、AGTの発現の顕著な阻害をもたらし、ならびに妊娠関連高血圧（例えば、妊娠高血圧症候群、子癇前症、および子癇）などのアンジオテンシノーゲン関連疾患に関連する症状を軽減させ得ることを証明した。従って、これらのiRNAを含む方法および組成物は、高血圧などのアンジオテンシノーゲン関連疾患を有する対象を処置するのに有用である。

10

20

【0083】

以下の詳細な説明は、アンジオテンシノーゲン遺伝子の発現を阻害するiRNAを含む組成物の製造法および使用法、ならびにAGTの発現を阻害および／または低下することで利点を有し得る疾患および障害を有する対象の処置のための組成物、使用および方法もまた、記載されている。

【0084】

I. 定義

本発明がより容易に理解され得るようにするため、特定の用語を初めに定義する。加えて、パラメーターの値または範囲が記載されているときは、記載された値の中間の値および範囲も本発明の一部であることが意図されることが意図されていることが特記されるべきである。

30

【0085】

単数形の「1つの“a”」および「1つの“an”」は、本明細書中、該用語の文法上の目的語の1つまたは2以上（すなわち、少なくとも1つ）を意味するために用いられる。例えば、「1つの要素“an element”」は、1つの要素または2つ以上の要素、例えば複数の要素を意味する。

【0086】

用語“～を含む(including)”は、本明細書中、語句“～を含むが、これらに限定されない(including but not limited to)”を意味し、それと互換的に使用される。

40

【0087】

用語“または”は、本明細書中、他に明確にこれと異なる記載がなされない限り、用語“および／または”を意味し、これと互換的に使用される。

【0088】

用語“約”は、本明細書中、当技術分野で許容される一般的範囲内を意味するために使用される。用語“AGT”と互換的に使用される本明細書で用いる“アンジオテンシノーゲン”は、周知の遺伝子およびポリペプチドを意味し、セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードA、メンバー8；アルファ-1アンチプロテイナーゼ；アンチトリプシン；SERPINA8；アンジオテンシンI；セルピンA8；アンジオテンシンII；アルファ-1アンチプロテイナーゼアンジオテンシノーゲン；アンチトリプシン；プレーアンジオテン

50

シノーゲン2；ANHU；セリンプロテイナーゼ阻害剤；および、システインプロテイナーゼ阻害剤としても当技術分野で知られている。

【0089】

用語“AGT”は、ヒトAGT（そのアミノ酸およびその完全なコーディング配列は、例えば、GenBank登録番号GI：188595658（NM_000029.3；配列番号1）に見いだされ得る）；カニクイザルAGT（そのアミノ酸およびその完全なコーディング配列は、例えば、GenBank登録番号GI：90075391（AB170313.1；配列番号3）に見いだされ得る）；マウス（Mus musculus）AGT（そのアミノ酸およびその完全なコーディング配列は、例えば、GenBank登録番号GI：113461997（NM_007428.3；配列番号5）に見いだされ得る）；および、ラットAGT（Rattus norvegicus）AGT（そのアミノ酸およびその完全なコーディング配列は、例えばGenBank登録番号GI：51036672（NM_134432；配列番号7）に見いだされ得る）を含む。

10

【0090】

AGT mRNA配列のさらなる例としては、公に利用可能なデータベース、例えば、GenBank、UniProt、OMIM、およびMacacaマカカゲノムプロジェクトのwebサイトを用いて容易に利用可能である。

【0091】

本明細書で用いる用語“AGT”は、AGT遺伝子の天然に生じるDNA配列変異体、例えばAGT遺伝子における一塩基多型（SNP）もまた意味する。代表的なSNPは、利用可能なdbSNPデータベース中（www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=183）に見出すことができる。AGT遺伝子内の配列変異の非限定的な例には、例えば、米国特許第5,589,584号（その内容全体を引用により本明細書中に包含される）に記載されたものが含まれる。例えば、AGT遺伝子内の配列の変異は、位置-532（転写開始部位と比較して）でのC→T；位置-386でのG→A；位置-218でのG→A；位置-18でのC→T；位置-6および-10でのG→AおよびA→C；位置+10でのC→T（非翻訳）；位置+521でのC→T（T174M）；位置+597でのT→C（P199P）；位置+704でのT→C（M235T；例えば、Reference SNP（refSNP）Cluster Report：rs699、www.ncbi.nlm.nih.gov/SNPで利用可能、も参照のこと）；位置+743でのA→G（Y248C）；位置+813でのC→T（N271N）；位置+1017でのG→A（L339L）；位置+1075でのC→A（L359M）；および／または、位置+1162でのG→A（V388M）が含まれ得る。

20

30

【0092】

本明細書で用いる“標的配列”は、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含む、AGT遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続する部分を意味する。一態様において、配列の標的部分は、AGT遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の部分またはその近位のiRNA指向性切断のための基質として作用するのに少なくとも十分な長さであり得る。

【0093】

標的配列は、約9-36ヌクレオチド長、例えば、約15-30ヌクレオチド長であり得る。例えば、標的配列は、約15-30ヌクレオチド長、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23、または21-22ヌクレオチド長

40

50

であり得る。上記の範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であると考えられる。

【0094】

本明細書で用いる用語“配列を含む鎖”は、標準的なヌクレオチド命名法を使用して参照される配列によって記載されるヌクレオチドの鎖を含むオリゴヌクレオチドを意味する。

【0095】

“G”、“C”、“A”、“T”および“U”はそれぞれ一般的に、塩基としてグアニン、シトシン、アデニン、チミジンおよびウラシルをそれぞれ含むヌクレオチドを表す。しかしながら、用語“リボヌクレオチド”または“ヌクレオチド”は、以下に詳述されるように、修飾ヌクレオチド、または代理置換部分 (surrogate replacement moiety) も意味し得ることが理解されよう (例えば、表2参照)。当業者は、グアニン、シトシン、アデニンおよびウラシルが、そのような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対形成特性を実質的に変更することなく他の部分で置換され得ることを十分認識している。例えば、限定するものではないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシンまたはウラシルを含むヌクレオチドと塩基対を形成し得る。従って、ウラシル、グアニンまたはアデニンを含むヌクレオチドは、例えば、イノシンを含むヌクレオチドにより、本発明の dsRNA のヌクレオチド配列を置換されていてよい。別の例では、オリゴヌクレオチド中のどこかのアデニンおよびシトシンは、標的 mRNA と G-U ゆらぎ塩基対を形成するために、それぞれグアニンおよびウラシルで置換されていてよい。そのような置換部分を含む配列は、本発明の組成物および方法に好適である。

【0096】

本明細書中互換的に使用される用語“iRNA”、“RNAi薬”、“iRNA薬”、“RNA干渉薬”は、その用語が本明細書で定義されるRNAを含む薬剤であり、それは、RNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) 経路を介してRNA転写産物の標的化切断を仲介する。iRNAは、RNA干渉 (RNAi) として公知の方法を介してmRNAの配列特異的分解をもたらす。iRNAは、例えば、細胞、例えば、哺乳動物対象のような対象内の細胞においてAGTの発現を調節、例えば阻害する。

【0097】

一態様において、本発明のRNAi薬は、標的RNAの切断を行うために、標的RNA配列と相互作用する一本鎖RNA、例えば、AGT標的mRNA配列を含む。理論はともかく、細胞内に導入された長い二本鎖RNAは、Dicerとして公知のIII型エンドヌクレアーゼによりsiRNAに分解され则认为られている (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485)。Dicer (リボヌクレアーゼIII様酵素) は、dsRNAを処理して、特徴的な2個の塩基の3'オーバーハングを有する19-23塩基対の短い干渉RNAとする (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。その後、siRNAは、1つまたはそれ以上のヘリカーゼがsiRNA二本鎖を解くRNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) に組み込まれ、相補的なアンチセンス鎖が標的認識を誘導できるようにする (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。適当な標的mRNAに結合すると、RISC内の1つまたはそれ以上のエンドヌクレアーゼが標的を切断し、サイレンシングを誘導する (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。従って、一面において、本発明は、細胞内で生成された一本鎖RNA (siRNA) に関係し、それは、RISC複合体の形成を促進して、標的遺伝子、すなわちAGT遺伝子のサイレンシングを促進する。従って、用語“siRNA”はまた、本明細書中、上記のRNAiを意味するためにも使用される。

【0098】

任意の態様において、RNAi薬は、標的mRNAを阻害するために細胞または生物に導入される一本鎖siRNA (ssRNAi) であり得る。一本鎖RNAi薬は、RISCエンドヌクレアーゼ、アルゴノート2に結合し、その後、標的mRNAを切断する。一

本鎖 s i R N A は、一般的に、15－30ヌクレオチドであり、化学修飾されている。一本鎖 s i R N A の設計および試験は、米国特許第8,101,348号およびLima et al., (2012) Cell 150:883-894（その内容全体は、引用により本明細書中に包含される）に記載されている。本明細書に記載のアンチセンスヌクレオチド配列のいずれかは、本明細書に記載のように、またはLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載の方法により化学修飾されて、一本鎖 s i R N A として使用することができる。

【0099】

別の態様において、本発明の組成物、使用および方法に使用するための“i R N A”は、二本鎖R N Aであり、本明細書中、“二本鎖R N A i 薬”、“二本鎖R N A (d s R N A) 分子”、“d s R N A 薬”または“d s R N A”と記載される。用語“d s R N A”は、標的R N A、すなわち、A G T 遺伝子に対して“センス”および“アンチセンス”配向を有すると言われる、2つの逆平行のかつ実質的に相補的な核酸鎖を含む二本鎖構造を有するリボ核酸分子の複合体を意味する。本発明のある態様において、二本鎖R N A (d s R N A) は、本明細書中、R N A 干渉またはR N A i と言われる、転写後の遺伝子サイレンシング機序を介して、標的R N A、例えばm R N A の分解を誘発する。

【0100】

一般的に、d s R N A 分子の各鎖のヌクレオチドの大部分は、リボヌクレオチドであるが、本明細書に詳述するように、各鎖または両方の鎖は、1つまたはそれ以上の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドおよび／または修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。加えて、本明細書で用いるように、“R N A i 薬”は、化学修飾を有するリボヌクレオチドを含んでよく、R N A i 薬は、複数のヌクレオチドでの実質的な修飾を含んでいてよい。本明細書で用いる用語“修飾ヌクレオチド”は、独立して、修飾された糖部分、修飾されたヌクレオチド間結合、および／または修飾された核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。従って、修飾ヌクレオチドなる用語は、例えば、官能基もしくは原子、ヌクレオシド間結合、糖部分または核酸塩基の、置換、付加または除去を含む。本発明の薬剤に使用するのに適する修飾には、本明細書に記載の、または当技術分野で公知の全ての修飾のタイプが含まれる。s i R N A 型分子に使用されるかかる修飾は全て、本明細書および特許請求の範囲の目的に関して、“R N A i 薬”に包含される。

【0101】

d s R N A 分子の各鎖のヌクレオチドの大部分は、リボヌクレオチドであってよいが、本明細書に詳述するように、各鎖または両方の鎖は、1つまたはそれ以上の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドおよび／または修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。加えて、本明細書で用いるように、“R N A i 薬”は、化学修飾を有するリボヌクレオチドを含んでよく、R N A i 薬は、複数のヌクレオチドでの実質的な修飾を含んでいてよい。本明細書で用いる用語“修飾ヌクレオチド”は、独立して、修飾された糖部分、修飾されたヌクレオチド間結合、および／または修飾された核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。従って、修飾ヌクレオチドなる用語は、例えば、官能基もしくは原子、ヌクレオシド間結合、糖部分または核酸塩基の、置換、付加または除去を含む。本発明の薬剤に使用するのに適する修飾には、本明細書に記載の、または当技術分野で公知の全ての修飾のタイプが含まれる。s i R N A 型分子に使用されるかかる修飾は全て、本明細書および特許請求の範囲の目的に関して、“R N A i 薬”に包含される。

【0102】

二本鎖領域は、R I S C 経路を介して所望の標的R N A の特異的分解を可能にする任意の長さであってよく、約9から36塩基対の長さの範囲、例えば、約15から30塩基対の長さ、例えば、約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35または36塩基対の長さ、例えば約15－30、15－29、15－28、15－27、15－26、15－25、15－24、15－23、15－22、15－21、15－20、15－19、15－18、15－17、18－30、18－29、18－28、18－27、18－26、18－25、18－24、18－23、18－2

2、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23または21-22塩基対の長さの範囲であってよい。上記の範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であると考えられる。

【0103】

二本鎖構造を形成する2つの鎖は、1つのより大きなRNA分子の異なる部分であり得るか、またはそれらは、別個のRNA分子であり得る。2つの鎖が1つのより大きな分子の部分であり、従って、一方の鎖の3'末端と、二本鎖構造を形成する対応する他方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの中断されていない鎖により連結されているとき、連結RNA鎖は、“ヘアピンループ”と呼ばれる。ヘアピンループは、少なくとも1つの不對ヌクレオチドを含んでいてよい。ある態様において、ヘアピンループは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも23またはそれ以上の不對ヌクレオチドを含んでいてよい。

10

【0104】

dsRNAの2つの実質的に相補的な鎖が別個のRNA分子からなる場合、それらの分子は必要ないが、共有結合的に連結され得る。該2つの鎖が、一方の鎖の3'末端と、二本鎖構造を形成する対応する他方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの中断されていない鎖以外の手段により共有結合的に結合されている場合、結合構造は、“リンカー”と呼ばれる。RNA鎖は、同一または異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、dsRNAの最も短い鎖におけるヌクレオチド数から二本鎖中に存在する任意のオーバーハングを減算したものである。二本鎖構造に加えて、RNAiは、1つまたはそれ以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。

20

【0105】

任意の態様において、本発明のRNAi薬はdsRNAであり、その各鎖は、標的RNA配列、例えば、AGT遺伝子と相互作用する19-23ヌクレオチドを含み、理論はともかく、細胞内に導入された長い二本鎖RNAは、Dicerとして公知のIII型エンドヌクレアーゼによりsiRNAに分解される(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485)。Dicer(リボヌクレアーゼIII様酵素)は、dsRNAを処理して、特徴的な2個の塩基の3'オーバーハングを有する19-23塩基対の短い干渉RNAとする(Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。その後、siRNAは、1つまたはそれ以上のヘリカーゼがsiRNA二本鎖を解くRNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれ、相補的なアンチセンス鎖が標的認識を誘導できるようにする(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。適当な標的mRNAに結合すると、RISC内の1つまたはそれ以上のエンドヌクレアーゼが標的を切断し、サイレンシングを誘導する(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。

30

【0106】

一態様において、本発明のRNAi薬は、標的RNA配列、例えばAGT標的mRNA配列と相互作用して、標的RNAの切断をもたらす、24-30ヌクレオチドのdsRNAである。理論はともかく、細胞内に導入された長い二本鎖RNAは、Dicerとして公知のIII型エンドヌクレアーゼによりsiRNAに分解される(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485)。Dicer(リボヌクレアーゼIII様酵素)は、dsRNAを処理して、特徴的な2個の塩基の3'オーバーハングを有する19-23塩基対の短い干渉RNAとする(Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。その後、siRNAは、1つまたはそれ以上のヘリカーゼがsiRNA二本鎖を解くRNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれ、相補的なアンチセンス鎖が標的認識を誘導できるようにする(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。適当な標的mRNAに結合する

40

50

と、RISC内の1つまたはそれ以上のエンドヌクレアーゼが標的を切断し、サイレンシングを誘導する(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。

【0107】

本明細書で用いる用語“ヌクレオチドオーバーハング”は、iRNA、例えばdsRNAの二本鎖構造から突出する、少なくとも1つの不對ヌクレオチドを意味する。例えば、dsRNAの1つの鎖の3'末端が他方の鎖の5'末端を越えて伸びる、またはその逆の場合、ヌクレオチドオーバーハングがある。dsRNAは、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーハングを含んでいてよい。あるいは、該オーバーハングは、少なくとも2つのヌクレオチド、少なくとも3つのヌクレオチド、少なくとも4つのヌクレオチド、少なくとも5つのヌクレオチドまたはそれ以上を含んでいてよい。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド/ヌクレオシドを含む、ヌクレオチド/ヌクレオシド類縁体を含んでいてよい。オーバーハング(複数可)は、センス鎖、アンチセンス鎖、またはその任意の組合せ上にあり得る。さらに、オーバーハングのヌクレオチド(複数可)は、dsRNAのアンチセンス鎖またはセンス鎖のいずれかの5'末端、3'末端、または双方の末端上に存在し得る。

【0108】

一態様において、dsRNAのアンチセンス鎖は、例えば、3'末端および/または5'末端でオーバーハングする、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10ヌクレオチドなどの1~10ヌクレオチドを有する。一態様において、dsRNAのセンス鎖は、例えば、3'末端および/または5'末端でオーバーハングする、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10ヌクレオチドなどの1~10ヌクレオチドを有する。任意の態様において、センス鎖またはアンチセンス鎖または双方の鎖上のオーバーハングは、10ヌクレオチド以上の長さ、例えば、1-30ヌクレオチド、2-30ヌクレオチド、10-30ヌクレオチドまたは10-15ヌクレオチド長を含み得る。任意の態様において、伸長されたオーバーハングは、二本鎖のセンス鎖上にある。任意の態様において、伸長されたオーバーハングは、二本鎖のセンス鎖の3'末端に存在する。任意の態様において、伸長されたオーバーハングは、二本鎖のセンス鎖の5'末端に存在する。任意の態様において、伸長されたオーバーハングは、二本鎖のアンチセンス鎖上に存在する。任意の態様において、伸長されたオーバーハングは、二本鎖のアンチセンス鎖の3'末端に存在する。任意の態様において、伸長されたオーバーハングは、二本鎖のアンチセンス鎖の5'末端に存在する。任意の態様において、オーバーハング中の1つまたは複数のヌクレオチドは、チオリン酸ヌクレオシドで置換されている。

【0109】

“平滑化された(Blunt)”または“平滑末端(blunt end)”は、二本鎖RNA i薬の末端に不對ヌクレオチドが存在しないこと、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングが存在しないことを意味する。“平滑末端化された(blunt ended)”RNA i薬は、その全長に亘って二本鎖であるdsRNAであって、すなわち、分子の何れかの末端にヌクレオチドオーバーハングがない。本発明のRNA i薬には、一方の末端にヌクレオチドオーバーハングを有するRNA i薬(すなわち、一方の末端はオーバーハング、もう一方の末端は平滑である薬剤)または両方の末端にヌクレオチドオーバーハングを有するRNA i薬が含まれる。

【0110】

用語“アンチセンス鎖”または“ガイド鎖”は、例えばAGTmRNAなどの標的配列と実質的に相補的である領域を含む、例えばdsRNAなどのiRNAの鎖を意味する。本明細書で用いる用語“相補性の領域”は、標的配列、本明細書で定義する通り、例えばAGTヌクレオチド配列などの標的配列などの配列と実質的に相補的な、アンチセンス鎖上の領域を意味する。相補性の領域が標的配列に完全に相補的でない場合、分子の内部または末端領域にミスマッチがあり得る。一般的に、最も耐容されるミスマッチは、例えばiRNAの5'末端および/または3'末端の5、4、3または2ヌクレオチド内などの末端領域にある。

【0111】

本明細書で用いる用語“センス鎖”または“パッセンジャー鎖”は、該用語が本明細書で定義される通り、アンチセンス鎖の領域と実質的に相補的な領域を含む iRNA 鎖を意味する。

【0112】

本明細書で用いる用語“切断領域”は、切断部位にすぐ隣接して配置されている領域を意味する。切断部位とは、切断が起こる標的上の部位である。ある態様において、切断領域は、切断部位の一方の末端で、切断部位にすぐ隣接する 3 塩基を含む。ある態様において、切断領域は、切断部位の一方の末端で、切断部位にすぐ隣接する 2 塩基を含む。ある態様において、切断部位は、具体的には、アンチセンス鎖のヌクレオチド 10 および 11 によって結合される部位に生じ、切断領域はヌクレオチド 11、12 および 13 を含む。

10

【0113】

本明細書で用いる用語“相補的”は、他に別の記載がされない限り、第2のヌクレオチド配列との関連で第1のヌクレオチド配列を記述するのに使用される場合、当業者に理解され得るように、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、特定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとハイブリダイズして、二本鎖構造を形成する能力を意味する。そのような条件は、例えば、ストリンジェントな条件であってよく、ストリンジェントな条件としては、400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、50 °C または 70 °C で 12 – 16 時間、その後、洗浄することが含まれ得る（例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと）。生物内で生じ得る生理的条件などのその他の条件が、適用され得る。当業者は、ハイブリダイズしたヌクレオチドの最終用途に従って、2つの配列の相補性試験に最適な条件の組み合わせを決定することができる。

20

【0114】

例えば本明細書に記載される dsRNA 内などの iRNA 内の相補配列は、一方または両方のヌクレオチド配列全長にわたる、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとの塩基対合を含む。このような配列は、本明細書で互いに“完全に相補的”と称され得る。しかしながら、本明細書中、第1の配列が第2の配列に関して“実質的に相補的”と言われる場合、2つの配列は完全に相補的であり得て、またはそれらは30塩基対までの二本鎖のハイブリダイゼーションに際して、例えばRISC経路を介する遺伝子発現の阻害などのそれらの最終用途に最も妥当な条件下でハイブリダイズする能力を保ちながら、1つまたは複数であるが、一般的に5、4、3または2以下のミスマッチ塩基対を形成し得る。しかしながら、ハイブリダイゼーションに際して、1つまたは複数の一本鎖オーバーハングを形成するように、2つのオリゴヌクレオチドが設計される場合、このようなオーバーハングは、相補性の決定に関してミスマッチと見なされないものとする。例えば、21ヌクレオチド長の1つのオリゴヌクレオチドと、23ヌクレオチド長の別のオリゴヌクレオチドとを含み、より長いオリゴヌクレオチドがより短いオリゴヌクレオチドと完全に相補的な21ヌクレオチドの配列を含む dsRNA は、本明細書に記載される目的では、なおも“完全に相補的”と記載され得る。

30

40

【0115】

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

【0116】

本明細書中、用語“相補的”、“完全に相補的”および“実質的に相補的”は、それらが使用される文脈から理解され得るように、dsRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖との

50

間の、または i R N A 薬のアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基マッチングに関して使用され得る

【0117】

本明細書で用いるように、メッセンジャーRNA (mRNA) の“少なくとも一部に実質的に相補的”なポリヌクレオチドとは、目的のmRNA (例えば、AGTをコードするmRNA) の連続部分と実質的に相補的なポリヌクレオチドを意味する。例えば、ポリヌクレオチドは、該配列が、AGTをコードするmRNAの非中断部分と実質的に相補的であれば、AGT mRNAの少なくとも一部と相補的である。

【0118】

従って、ある態様において、本明細書に記載のアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、標的AGT配列に完全に相補的である。他の態様において、本明細書に記載のアンチセンス鎖ポリヌクレオチドは、標的AGT配列と実質的に相補的であり、配列番号1のヌクレオチド配列、または配列番号1のフラグメントに等価な領域に、その全長にわたって少なくとも約80%相補的な、例えば約85%、約90%、または約95%相補的な、連続ヌクレオチド配列を含む。

10

【0119】

一態様において、本発明のRNA i 薬は、アンチセンス鎖ポリヌクレオチドと実質的に相補的なセンス鎖を含み、そして標的AGT配列に相補的であり、センス鎖ポリヌクレオチドは、配列番号2のヌクレオチド配列、または配列番号2のフラグメントに等価な領域に、その全長にわたって少なくとも約80%相補的な、例えば約85%、約90%、または約95%相補的な、連続ヌクレオチド配列を含む。

20

【0120】

一般的に、各鎖のヌクレオチドの大部分はリボヌクレオチドであるが、本明細書で詳細に記載されるように、一方または両方の鎖は、例えばデオキシリボヌクレオチドおよび/または修飾ヌクレオチドなどの1つまたは複数の非リボヌクレオチドも含んでいてよい。さらに、“iRNA”としては、化学修飾を有するリボヌクレオチドが含まれる。このような修飾としては、本明細書に記載され、または当該技術分野で公知の、全てのタイプの修飾が含まれ得る。iRNA分子において使用される、任意のこのような修飾は、本明細書および特許請求の範囲の目的に関し“iRNA”に包含される。

【0121】

30

本発明の一面において、本発明の方法および組成物に使用するための薬剤は、アンチセンス阻害機序により標的mRNAを阻害する一本鎖アンチセンスRNA分子である。一本鎖アンチセンスRNA分子は、標的mRNA内の配列に相補的である。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、mRNAに対する塩基対形成により化学量論的な方法で、および物理的に翻訳機構を妨害して、翻訳を阻害し得る (Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355を参照のこと)。一本鎖アンチセンスRNA分子は、約15から約30ヌクレオチド長であり、標的配列に相補的な配列を有していてよい。例えば、一本鎖アンチセンスRNA分子は、本明細書に記載のアンチセンス配列のいずれか1つから少なくとも約15、16、17、18、19、20またはそれ以上連続するヌクレオチドである配列を含んでいてよい。

40

【0122】

本明細書で用いる用語“阻害する”は、“低下する”、“サイレンシング”、“下方制御”、“抑制”、およびその他の同様の用語と互換的に使用され、あらゆるレベルの阻害を含む。

【0123】

本明細書で用いる語句“AGTの発現を阻害する”には、任意のAGT遺伝子 (例えば、マウスAGT遺伝子、ラットAGT遺伝子、サルAGT遺伝子、またはヒトAGT遺伝子)、ならびにAGTタンパク質をコードするAGT遺伝子の変異体または突然変異体の発現の阻害が含まれる。

【0124】

50

“ A G T 遺伝子の発現の阻害 ” には、少なくとも約 2 0 % の阻害などの A G T 遺伝子の発現の少なくとも部分的抑制など A G T 遺伝子の任意のレベルの阻害が含まれる。任意の態様において、阻害は、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、または少なくとも約 9 9 % の阻害である。

【 0 1 2 5 】

10

A G T 遺伝子の発現は、例えば、A G T m R N A レベルまたは A G T タンパク質レベルなどの、A G T 遺伝子発現に関連する任意の可変レベルに基づいて評価され得る。阻害は、対照レベルと比較した、これらの変数の 1 つまたは複数の絶対または相対レベルの低下によって評価され得る。対照レベルは、例えば投与前ベースラインレベル、または未処置のもしくは対照（例えば、緩衝液のみの対照または非活性薬剤対照など）で処置された同様の対象、細胞またはサンプルから測定されたレベルなどの、当該技術分野で利用される任意のタイプの対照レベルであってもよい。

【 0 1 2 6 】

一態様において、A G T 遺伝子の発現の少なくとも部分的抑制は、第 1 の細胞または細胞群と実質的に同一であるが、処理されていない第 2 の細胞または細胞群（対照細胞）と比較して、そこで A G T 遺伝子が転写され、A G T 遺伝子の発現が阻害されるように処理されている、第 1 の細胞または細胞群から単離され、またはその中に検出され得る、A G T m R N A の量の低下によって評価される。阻害の程度は、以下を用いて表され得る。

20

【数 1】

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

【 0 1 2 7 】

本明細書で用いる語句、d s R N A などの“ R N A i 薬に細胞を接触させる ” には、あらゆる可能な手段によって細胞を接触させることが含まれる。R N A i 薬に細胞を接触させることは、インビトロで細胞を i R N A と接触させる、またはインビボで細胞を i R N A と接触させることを含む。接触は、直接または間接的に行われ得る。従って、例えば、方法を実施する個人が、R N A i 薬を細胞と物理的に接触させてもよく、あるいは、後に細胞との接触が可能になるか、または引き起こされる状況に、R N A i 薬を置いてよい。

30

【 0 1 2 8 】

インビトロでの細胞の接触は、例えば細胞を R N A i 薬と共にインキュベートして実施してもよい。インビボでの細胞の接触は、例えば細胞が位置する組織内にまたはその近辺に R N A i 薬を注射して実施してもよく、または例えば、後に接触させる細胞が位置する組織に R N A i 薬が到達するように、血流または皮下空隙などの別の領域に該薬剤を注射して実施してもよい。例えば R N A i 薬は、例えば肝臓などの目的の部位に R N A i 薬を誘導する G a l N A c 3 などのリガンドを含有し、および／またはそれと共役していてもよい。インビトロおよびインビボでの接触法の組み合わせもまた、可能である。例えば、細胞をインビトロで R N A i 薬と接触させて、その後対象に移植してもよい。

40

【 0 1 2 9 】

一態様において、細胞を i R N A と接触させることは、細胞内への取り込みまたは吸収を容易にし、またはそれを可能にすることで、“ i R N A を導入する ” または“ i R N A を細胞に送達する ” ことを含む。i R N A の吸収または取り込みは、助力を受けない拡散または能動的細胞過程を通じて、または助剤もしくは装置によって生じ得る。i R N A の

50

細胞内への導入は、インビトロおよび／またはインビボであり得る。例えば、インビボ導入のために、iRNAを組織部位に注射し、または全身投与し得る。インビボ送達または、米国特許第5,032,401号および同第5,607,677号および米国特許出願公開第2005/0281781号（それらの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）に記載されるようなβ-グルカン送達系によって実施され得る。細胞へのインビトロ導入としては、電気穿孔およびリポフェクションなどの当該技術分野で公知の方法が含まれる。さらなる方法は、本明細書で以下に記載され、および／または当該技術分野で公知である。

【0130】

用語“脂質ナノ粒子”または“LNP”は、例えばiRNAまたはiRNAがそれから転写されるプラスミドなどの核酸分子のような薬学的に活性な分子を封入する脂質層を含むビークルである。LNPは、例えば、米国特許第6,858,225号、同第6,815,432号、同第8,158,601号、および同第8,058,069号（その内容全体は、引用により本明細書中に包含される）に記載されている。

【0131】

本明細書で用いる“対象”は、霊長動物（ヒト、非ヒト霊長動物、例えばサルおよびチンパンジーなど）、非霊長動物（ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス、ウマ、およびクジラなど）を含む哺乳類、または鳥類（例えばアヒルまたはガチョウ）などの動物である。一態様では、対象は、AGT発現低下により利益を受ける、疾患、障害または病状を処置され、またはそれを評価されるヒト；AGT発現低下により利益を受ける、疾患、障害または病状のリスクがあるヒト；AGT発現低下により利益を受ける、疾患、障害または病状を有するヒト；および／または、本明細書に記載されるようにAGT発現低下により利益を受ける、疾患、障害または病状を処置されるヒトなどのヒトである。

【0132】

本明細書で用いる用語“処置する”または“処置”は、検出可能または検出不可能を問わない、望ましくないAGT発現に関連する1つまたは複数の症状、例えば、アンジオテンシンIIタイプ1受容体活性化(AT₁R)（例えば、高血圧、慢性腎臓病、卒中、心筋梗塞、心不全、動脈瘤、末梢動脈疾患、心疾患、増加した酸化ストレス、例えば、増加したスーパーオキシドの生成、炎症、血管収縮、ナトリウムおよび水の貯留、カリウムおよびマグネシウム欠乏、レニン分泌抑制(renin suppression)、筋肥大および平滑筋肥大、増加したコラーゲン合成、血管の刺激、心筋および腎線維症、心臓の増加した収縮速度および収縮力、変更された心拍数、例えば、増加した不整脈、プラスミノゲン活性化因子阻害剤1(PAI1)の刺激、交感神経系の活性化、および増加したエンドセリン分泌)、子宮内胎児発育遅延(IUGR)または胎児発育不全を含むが、これに限定されない、妊娠関連高血圧の症状（例えば、子癇前症および子癇）、悪性高血圧と関係する症状、高アルドステロン症に関連する症状の緩和または改善；望ましくないAT₁R活性化の程度の低下；慢性AT₁R活性化の状態の安定化（すなわち、悪化しない）；望ましくないAT₁R活性化の改善または緩和（例えば、高血圧、慢性腎臓病、卒中、心筋梗塞、心不全、動脈瘤、末梢動脈疾患、心疾患、増加した酸化ストレス、例えば、増加したスーパーオキシド生成、炎症、血管収縮、ナトリウムおよび水の貯留、カリウムおよびマグネシウム欠乏、レニン分泌抑制、筋肥大および平滑筋肥大、増加したコラーゲン合成、血管の刺激、心筋および腎線維症、心臓の増加した収縮速度および収縮力、変更された心拍数、例えば、増加した不整脈、プラスミノゲン活性化因子阻害剤1(PAI1)の刺激、交感神経系の活性化、および増加したエンドセリン分泌)を含むが、これに限定されるものではない、有益なまたは所望の結果を意味する。“処置”はまた、未処置での予測される生存期間と比較した生存期間の長期化も意味し得る。

【0133】

用語“より低い”とは、対象におけるAGTレベルまたは疾患マーカーおよび症状の文脈で、そのようなレベルの統計的に有意な低下を意味する。低下は、例えば、少なくとも

10

20

30

40

50

10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上であり得て、好ましくは、かかる障害がない個体の正常範囲内にあると認められたレベルに低下する。

【0134】

本明細書で用いる“予防”または“予防する”は、AGT遺伝子の発現低下から利益を受ける、疾患、障害またはその病状に関して使用されるとき、対象が、例えば高血圧、慢性腎臓病、卒中、心筋梗塞、心不全、動脈瘤、末梢動脈疾患、心疾患、増加した酸化ストレス、例えば、増加したスーパーオキシドの生成、炎症、血管収縮、ナトリウムおよび水の貯留、カリウムおよびマグネシウム欠乏、レニン分泌抑制（renin suppression）、筋肥大および平滑筋肥大、増加したコラーゲン合成、血管の刺激、心筋および腎線維症、心臓の増加した収縮速度および収縮力、変更された心拍数、例えば、増加した不整脈、プラスミノゲン活性化因子阻害剤1（PAI1）の刺激、交感神経系の活性化、および増加したエンドセリン分泌のような望ましくないAT₁R活性化の症状などの、このような疾患、障害または病状に関連する症状を発症する可能性の低下を意味する。例えば、高血圧を発症する可能性は、例えば、1つまたは複数の高血圧危険因子を有する個体が高血圧を発症しない場合に、または同一危険因子を有して本明細書に記載される処置を受けない集団と比較して重症度のより低い高血圧を発症する場合に、低下される。疾患、障害または病状を発症しないこと、またはこのような疾患、障害または病状に関連する症状の発症の低下（例えば、その疾患または障害の臨床的に認められた尺度で少なくとも約10%の低下）、または遅延した症状呈示（例えば、数日間、数週間、数ヶ月または数年間）が、効果的予防と考えられる。

【0135】

本明細書で用いる用語“アンジオテンシノーゲン関連疾患”または“AGT関連疾患”は、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系（RAAS）の活性化により引き起こされるか、またはそれと関連する疾患または障害、またはRAAS活性化に応答するか、それにより進行する疾患、障害または症状である。用語“アンジオテンシノーゲン関連疾患”には、AGT発現低下により利益を受ける疾患、障害または病状が含まれる。そのような疾患は、一般的に、高血圧と関連している。アンジオテンシノーゲン関連疾患の非限定的な例には、高血圧、例えば、境界域高血圧（高血圧前症としても公知）、原発性高血圧（本態性高血圧または特発性高血圧としても公知）、二次性高血圧（非本態性高血圧としても公知）、高血圧緊急症（悪性高血圧としても公知）、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧（例えば、子癇前症、子癇および出産後の子癇前症）、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧（腎性高血圧としても公知）、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害（末梢血管疾患を含む）、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心室線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺/副甲状腺疾患、心不全（例えば、左心室収縮機能障害）、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病（例えば、糖尿病性腎症）、腎疾患、例えば、要すれば妊娠に関連する慢性腎臓病または糖尿病性腎症、腎不全、例えば、慢性腎不全、認知機能障害（例えば、アルツハイマー）、および全身性硬化症（例えば、強皮症腎クリーゼ）が含まれる。任意の態様において、AGT関連疾患には、子宮内胎児発育遅延（IUGR）または胎児発育不全が含まれる。

【0136】

2回以上の来院中に好適に測定される着座血圧測定値の平均に基づいて、正常血圧を有する対象は、約90–119 mmHg（約12–15.9 kPa（kN/m²））の収縮期血圧および約60–79 mmHg（約8.0–10.5 kPa（kN/m²））の拡張期血圧を有する者であり、高血圧前症を有する対象は、約120–139 mmHg（約16.1–18.5 kPa（kN/m²））の収縮期血圧および約60–79 mmHg（約8.0–10.5 kPa（kN/m²））の拡張期血圧を有する者であり、高血圧（例えば、ステージIの高血圧）を有する対象は、約140–159 mmHg（約18.7–21.2 kPa（kN/m²））の収縮期血圧および約90–99 mmHg（約12.0–13.2 kPa（kN/m²））の拡張期血圧を有する者であり、そして高血圧（例えば、ステージIIの高血圧）を有する対象は、約 ≥ 160 mmHg（約 ≥ 21.3 kPa（kN/m²））の収縮期血圧および約 ≥ 100 mmHg（約 ≥ 13.3 kPa（kN/m²））の拡張期血圧を有する者である。1型または2型糖尿病または腎疾患と共に130/80 mmHg以上の血圧を有する対象は、高血圧を有すると考えられる。

【0137】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は原発性高血圧である。“原発性高血圧”は、環境および遺伝子的原因の結果（例えば、明らかな基礎疾患原因のない結果）である。

【0138】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は二次性高血圧である。“二次性高血圧”は、腎臓、血管および内分泌原因、例えば、実質性腎疾患（例えば、多嚢胞性腎、糸球体または間質性疾患）、腎血管疾患（例えば、腎動脈狭窄、線維筋性異形成）、内分泌障害（例えば、副腎皮質ステロイドまたはミネラルコルチコイド過剰、褐色細胞腫、甲状腺機能亢進症または甲状腺機能低下症、成長ホルモン過剰、副甲状腺機能亢進症）、大動脈狭窄症、または経口避妊薬の使用を含む複数の病因であり得る、識別可能な基礎疾患を有している。

【0139】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は高血圧緊急症であり、例えば、悪性高血圧および進行性高血圧である。“進行性高血圧”は、1またはそれ以上の末端臓器への直接的な損傷を含む重度の血圧の上昇（すなわち、収縮期180 mmHgまたは拡張期110 mmHgと同じか、またはそれ以上）である。血圧は、さらなる臓器の損傷を防ぐために直ぐに下げられなければならない。“悪性高血圧”は、1またはそれ以上の末端臓器および乳頭浮腫への直接的な損傷を含む重度の血圧の上昇（すなわち、収縮期180 mmHgまたは拡張期110 mmHgと同じか、またはそれ以上）である。血圧は、さらなる臓器の損傷を防ぐために直ぐに下げられなければならない。制御されない血圧に起因する神経末端器官の損傷は、高血圧性脳症、脳血管障害/脳梗塞；くも膜下出血、および/または頭蓋内出血を含み得る。心血管末端器官の損傷は、心筋虚血/梗塞、急性左室機能不全、急性肺浮腫、および/または大動脈解離を含み得る。他の器官系もまた、急性腎不全/機能不全、網膜症、子癇、または微小血管症性溶血性貧血につながり得る、制御されない高血圧の影響を受け得る。

【0140】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は高血圧急迫症である。“高血圧急迫症”は、1または複数の器官への直接的損傷のない、重度の血圧の上昇（すなわち、収縮期180 mmHgまたは拡張期110 mmHgと同じか、またはそれ以上）である。血圧は、数時間以内に安全に下げられる。

【0141】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は、妊娠関連高血圧、例えば、妊娠性慢性高血圧、妊娠高血圧症、子癇前症、子癇、慢性高血圧に加えて子癇前症、HELLP症候群、および妊娠性高血圧（妊娠の一過性高血圧、妊娠の後半で識別された慢性高血圧t、および妊娠高血圧症候群（PIH）としても公知）である。“妊娠性慢性高血圧”を有する対象は、妊娠前または妊娠20週より前に140/90 mmHgを超える血圧を

10

20

30

40

50

有する者である。“妊娠高血圧症”または“妊娠高血圧症候群”は、子癇前症の他の特徴なしに妊娠後期（＞妊娠20週）に発症する高血圧と、その後の出産後の血圧の正常化を意味する。“軽度の子癇前症”は、妊娠20週前に正常血圧であった女性における、末端器官損傷の形跡なしに、少なくとも6時間の間隔で、2回起こる高血圧（血圧 $\geq 140/90$ mmHg）の存在として定義される。本態性高血圧の既往歴を有する対象において、子癇前症は、収縮期血圧が30 mmHg増加するか、または拡張期血圧が15 mmHg増加した場合に、診断される。“重度の子癇前症”は、子癇前症の存在下で以下の症状または兆候の1つの存在として定義される；少なくとも6時間の間隔で2回起こる、160 mmHgもしくはそれ以上の収縮期血圧、または110 mmHgもしくはそれ以上の拡張期血圧；24時間収集で5 g以上の尿タンパクまたは少なくとも4時間の間隔で収集した2つの無作為の尿サンプルにおける30以上、肺浮腫もしくはチアノーゼ、尿量減少（24時間で < 400 mL）、永続的な頭痛、心窩部痛および／または肝機能障害、血小板減少症、羊水過少、胎児発育不全、または胎盤早期剥離。“子癇”は、子癇前症の女性における他の原因に起因し得ない発作のように定義される。“HELLP症候群”（浮腫－タンパク尿－B型妊娠高血圧症としても公知）は、妊娠した対象における、溶血、肝酵素の上昇、および低血小板レベルである。

10

【0142】

一態様において、アンジオテンシノーゲン関連疾患は治療抵抗性高血圧である。“抵抗性高血圧”は、そのうちの1つがチアジド利尿剤である異なるクラスの3つの降圧剤の同時使用にもかかわらず、目標（例えば、 $140/90$ mmHg）を超えたままの血圧である。血圧が4種またはそれ以上の薬剤を用いて制御されている対象も、治療抵抗性高血圧を有すると考えられる。

20

【0143】

本明細書で用いる“治療的有效量”は、アンジオテンシノーゲン関連疾患を有する対象に投与されると、（例えば、既存の疾患の、または1つまたは複数の疾患症状の低減、寛解または維持によって）疾患の治療をもたらすのに十分なRNAi薬の量を含むことが意図される。“治療的有效量”は、RNAi薬、薬剤投与方法、疾患とその重症度、および治療される対象の病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的体質、先行するまたは併用の治療薬の種類、もしあれば、その他の個人的特性に応じて変動してもよい。

【0144】

本明細書で用いる“予防的有效量”は、アンジオテンシノーゲン関連疾患を有する対象に投与されると、アンジオテンシノーゲン関連疾患、病気にかかりやすい対象、すなわち、1つまたはそれ以上の要因、例えば年齢、体重、妊娠により一般集団に比べて疾患により罹患しやすい対象における、疾患または該疾患の1もしくはそれ以上の症状の余郷または改善をもたらすのに十分なiRNAの量を含むことが意図される。疾患の改善には、疾患の経過の遅延またはより遅く発症した疾患の重症度の低下が含まれる。“予防的有效量”は、iRNA、薬剤投与方法、疾患リスクの程度、および治療される患者の病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝的体質、先行するまたは併用の治療薬の種類、もしあれば、その他の個人的特性に応じて変動してもよい。

30

【0145】

“治療的有效量”または“予防的有效量”にはまた、あらゆる治療薬に当てはまる妥当な利点／リスク比で、いくつかの所望の局所性または全身性効果を生じる、RNAi薬の量も含まれる。本発明の方法で用いられるiRNAは、このような治療に当てはまる妥当な利点／リスク比を生じるのに十分な量で、投与されてもよい。

40

【0146】

語句“薬学的に許容される”は、本明細書中、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー性応答がなく、またはその他の問題もしくは合併症が、妥当な利点／リスク比で釣り合う、ヒト対象および動物対象の組織との接触で使用するのに適する、化合物、材料、組成物、および／または剤形を意味するために用いられる。

【0147】

50

本明細書で用いる語句“薬学的に許容される担体”は、液体または固体充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、潤滑剤、滑石マグネシウム、ステアリン酸カルシウムまたはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸（s t e r i c a c i d）など）、または目的化合物を1つの臓器または身体の部分から、別の臓器または身体の部分に運搬または輸送するのに関与する溶媒封入材料などの、薬理的に許容される材料、組成物またはビークルを意味する。各担体は、製剤のその他の成分と適合し、処置される対象に有害でないと言う意味で、“許容される”はずである。薬学的に許容される担体として作用し得る材料のいくつかの例としては、（1）ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類；（2）コーンスターチおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；（3）カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロースとその誘導体；（4）粉末トラガカント；（5）麦芽；（6）ゼラチン；（7）ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルクなどの平滑剤；（8）カカオバターおよび坐薬ワックスなどの賦形剤；（9）落花生油、綿実油、紅花油、ゴマ油、オリーブ油、コーンオイルおよび大豆油などの油；（10）プロピレングリコールなどのグリコール；（11）グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；（12）オレイン酸エチルおよびエチルラウレートなどのエステル；（13）寒天；（14）水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；（15）アルギン酸；（16）発熱性物質非含有水；（17）等張生理食塩水；（18）リンゲル液；（19）エチルアルコール；（20）pH緩衝溶液；（21）ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ酸無水物；（22）ポリペプチドおよびアミノ酸などの増量剤；（23）血清アルブミン、HDL、およびLDLなどの血清成分；および（22）医薬製剤で用いられるその他の無毒の適合性物質が含まれる。

【0148】

本明細書で用いる用語“サンプル”は、対象から単離された同様の体液、細胞または組織の採取物、ならびに対象内に存在する体液、細胞、または組織を含む。生体液の例としては、血液、血清および漿液、血漿、脳脊髄液、眼液、リンパ液、尿、唾液などが挙げられる。組織サンプルとしては、組織、臓器または局在性領域からのサンプルが挙げられる。例えば、サンプルは、特定の臓器、臓器の部分もしくは体液またはこれらの臓器内の細胞に由来してもよい。任意の態様において、サンプルは、肝臓（例えば、肝臓全体または肝臓の特定部分、または例えば肝細胞などの肝臓の特定タイプの細胞）に由来してもよい。ある態様において、“対象に由来するサンプル”は、対象から採取された血液または血漿を意味する。

【0149】

II. 本発明の iRNA

本発明は、AGT遺伝子発現を阻害するiRNAを提供する。一態様において、iRNA薬は、アンジオテンシノーゲン関連疾患、例えば、高血圧を有するヒトのような、哺乳動物などの対象内の細胞などの細胞内で、AGT遺伝子発現を阻害する二本鎖リボ核酸（dsRNA）分子を含む。dsRNAは、AGT遺伝子発現において形成されるmRNAの少なくとも一部と相補的である、相補性領域を有するアンチセンス鎖を含む。相補性領域は、約30ヌクレオチド以下の長さ（例えば、約30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19または18ヌクレオチド以下の長さ）である。AGT遺伝子を発現する細胞との接触に際して、iRNAは、AGT遺伝子（例えばヒト、霊長動物、非霊長動物、または鳥類のAGT遺伝子）の発現を、例えばPCRまたは分枝状DNA（bdNA）ベースの方法による、または例えばウェスタンブロットティングまたはフローサイトメトリー技術を使用する免疫蛍光分析などのタンパク質ベースの方法によるアッセイで、少なくとも約10%阻害する。

【0150】

dsRNAは、相補的な2本のRNA鎖を含み、それらはdsRNAが使用される条件下でハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。dsRNAの1本の鎖（アンチセンス鎖）は相補性領域を含み、それは標的配列と実質的に相補的であり、一般に完全に相補的で

ある。標的配列は、A G T 遺伝子の発現中に形成される m R N A の配列に由来し得る。他方の鎖（センス鎖）は、好適な条件下で組み合わせると、2本の鎖がハイブリダイズして二本鎖構造を形成するように、アンチセンス鎖と相補的な領域を含む。本明細書の他の箇所に記載されるように、そして当該技術分野で公知のように、d s R N A の相補性配列はまた、別個のオリゴヌクレオチド上にあるものとは対照的に、単一核酸分子の自己相補性領域としても含有され得る。

【0151】

一般的に、二本鎖構造は、15から30塩基対の長さ、例えば、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23または21-22塩基対の長さである。上記の範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であることが意図される。

10

【0152】

同様に、標的配列に相補的な領域は、15から30ヌクレオチド長、例えば、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-30、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23または21-22ヌクレオチド長である。上記の範囲および長さの中間の範囲および長さもまた、本発明の一部であることが意図される。

20

30

【0153】

ある態様において、d s R N A は、約15から約20ヌクレオチド長、約25から約30ヌクレオチド長、または約15から約23ヌクレオチド長である。一般的に、d s R N A は、D i c e r 酵素の基質として作用するのに十分な長さである。例えば、約21~23ヌクレオチド長より長いd s R N A が、D i c e の基質として作用し得ることは、当該技術分野で周知である。当業者は認識するであろうように、切断標的とされるRNAの標的領域は、ほとんどの場合、より大きなRNA分子の一部であり、それはmRNA分子であることが多い。該当する場合、mRNA標的の“部分”は、RNA i 指向性切断（すなわち、R I S C 経路を介した切断）の基質となるのに十分長い、mRNA標的の連続配列である。

40

【0154】

当業者は、例えば、約9から36塩基対の二本鎖領域、例えば、約10-36、11-36、12-36、13-36、14-36、15-36、9-35、10-35、11-35、12-35、13-35、14-35、15-35、9-34、10-34、11-34、12-34、13-34、14-34、15-34、9-33、10-33、11-33、12-33、13-33、14-33、15-33、9-32、10-32、11-32、12-32、13-32、14-32、15-32、9-31、10-31、11-31、12-31、13-32、14-31、15-31、15-30、15-29、15-28、15-27、15-26、15-25、15-24、15-23、15-22、15-21、15-20、15-19、15-18、15-17、18-3

50

0、18-29、18-28、18-27、18-26、18-25、18-24、18-23、18-22、18-21、18-20、19-30、19-29、19-28、19-27、19-26、19-25、19-24、19-23、19-22、19-21、19-20、20-30、20-29、20-28、20-27、20-26、20-25、20-24、20-23、20-22、20-21、21-30、21-29、21-28、21-27、21-26、21-25、21-24、21-23、または21-22塩基対の二本鎖領域が、dsRNAの主要機能部分であることもまた認識する。従って、一態様において、それが例えば、所望のRNAを切断に標的化する15～30塩基対の機能性二本鎖にプロセシングされる範囲内で、30塩基対を超える二本鎖領域を有するRNA分子またはRNA分子複合体は、dsRNAである。従って、当業者は、一態様において、miRNAがdsRNAであることを認識し得る。別の態様において、dsRNAは、天然に存在するmiRNAでない。別の態様において、AGT発現を標的化するのに有用なiRNA薬は、より大きなdsRNAの切断によって標的細胞内で産生されない。

10

【0155】

本明細書に記載のdsRNAは、例えば1、2、3、または4ヌクレオチドなどの1つまたは複数の一本鎖ヌクレオチドオーバーハングをさらに含み得る。少なくとも1つのヌクレオチドオーバーハングを有するdsRNAは、それらの平滑末端相当物と比較して、予期しない優れた阻害特性を有し得る。ヌクレオチドオーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド／ヌクレオシドを含む、ヌクレオチド／ヌクレオシド類縁体を含み得るか、またはそれからなる。オーバーハング(複数可)は、センス鎖、アンチセンス鎖、またはその任意の組合せ上にあり得る。さらに、オーバーハングのヌクレオチド(複数可)は、dsRNAのアンチセンス鎖またはセンス鎖のいずれかの5'末端、3'末端、または双方の末端上に存在し得る。本明細書に記載のように、最大30ヌクレオチド長まで伸長したオーバーハングもまた、本発明の種々の態様において意図される。

20

【0156】

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

【0157】

本発明のiRNA化合物は、二段階法を使用して調製されてもよい。最初に、二本鎖RNA分子の個々の鎖を、別々に調製する。次に、各鎖をアニーリングする。siRNA化合物の個々の鎖を、溶液相もしくは固相有機合成または両方を使用して調製することができる。有機合成は、非天然または修飾ヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド鎖を容易に調製し得る利点を提供する。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、溶液相もしくは固相有機合成または両方を使用して調製することができる。

30

【0158】

一面において、本発明のdsRNAは、センス配列とアンチセンス配列の少なくとも2つのヌクレオチド配列を含む。センス鎖は、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つで提供される配列群から選択され、センス鎖に対応するアンチセンス鎖は、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つの配列群から選択される。この面では、2配列の一方は2配列の他方に相補的であり、配列の1つは、AGT遺伝子発現中に生じるmRNA配列と実質的に相補的である。従って、この面では、dsRNAは、2つのオリゴヌクレオチドを含み、ここで、1つのオリゴヌクレオチドは、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つのセンス鎖として説明され、第2のオリゴヌクレオチドは、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つのセンス鎖に対応するアンチセンス鎖として説明される。一態様において、dsRNAの実質的に相補的な配列は、別個のオリゴヌクレオチド上に含まれる。別の態様において、dsRNAの実質的に相補的な配列は、単一オリゴヌクレオチド上に含まれる。

40

【0159】

50

表3、4、7、8、11、13および15の配列の一部は、修飾および／または共役配列と説明されるが、例えば、本発明のdsRNAなどの本発明のiRNAのRNAは、未修飾、非共役、および／または本明細書に記載のものとは異なって修飾され、および／または共役している、表3、4、7、8、11、13および15に記載される配列のいずれか1つを含んでいてよいものと理解される。

【0160】

別の面において、アンジオテンシノーゲンの発現を阻害するための本発明の二本鎖リボ核酸(dsRNA)は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含むか、実質的にそれからなるか、またはそれからなり、ここで、センス鎖は、表3、4、7、8、11、13および15のセンス鎖のヌクレオチド配列を含み、アンチセンス鎖は、表3、4、7、8、11、13および15の対応するアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含む。

10

【0161】

当業者は、例えば21塩基対などの約20～23塩基対の二本鎖構造を有するdsRNAが、RNA干渉を誘発するのに特に効果的であるとして支持されていることを十分承知している(Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888)。しかしながら、他の当業者らは、より短いまたはより長いRNA二本鎖構造もまた、同様に効果的であり得ることを見出している(Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226)。上記の態様では、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つで提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質のために、本明細書に記載されるdsRNAは、最小で21ヌクレオチド長の少なくとも1つの鎖を含み得る。片方または両方の末端の数個のヌクレオチドのみが欠失している、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つの配列の1つを有するより短い二本鎖が、上記の通り、dsRNAと比較して同様に効果的であり得ることは、合理的に予想され得る。従って、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つの配列の1つに由来する、少なくとも15、16、17、18、19、20またはそれ以上の連続ヌクレオチドの配列を有するdsRNAであって、AGT遺伝子発現を阻害する能力が、完全長配列を含むdsRNAと、約5、10、15、20、25、または30%以下異なるdsRNAは、本発明の範囲内であることが意図される。

20

【0162】

さらに、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つで提供されるRNAは、RISC介在切断に対する感受性が高いAGT転写物中の部位(複数可)を同定する。従って、本発明は、iRNAこれらの部位の1つの内部を標的とするiRNAをさらに特徴とする。本明細書で用いるiRNAは、特定部位内のどこかで転写物の切断を促進する場合、iRNAはRNA転写物のその特定部位内を標的にすると言われる。このようなiRNAは、一般に、AGT遺伝子中の選択配列に隣接する領域からのさらなるヌクレオチド配列と連結する、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つで提供される配列の1つからの約15の連続ヌクレオチドを含む。

30

【0163】

標的配列は、一般的に、約15～30ヌクレオチド長であるが、この範囲内の特定の配列が、あらゆる所定の標的RNAの切断を誘導する適合性には、幅広い多様性がある。本明細書に記載の種々のソフトウェアパッケージおよびガイドラインは、あらゆる所定の遺伝子標的の最適標的配列を同定するためのガイダンスを提供するが、標的RNA配列に、所定のサイズの“ウィンドウ”または“マスク”(非限定的例として、21ヌクレオチド)を実際にまたは比喩的に(例えば、コンピュータ上を含む)配置させて、標的配列の役割を果たし得るサイズ範囲の配列を同定する、実験的アプローチもまた取り得る。配列“ウィンドウ”を最初の標的配列位置の1ヌクレオチド上流または下流に移動することで、選択された任意の所定の標的サイズについて完全な可能な配列セットが同定されるまで、次の可能性のある標的配列が同定され得る。このプロセスは、同定された配列の体系的合成、および(本明細書に記載されアッセイ法または当該技術分野で公知のアッセイ法を用いる)至適に機能する配列を同定する試験と相まって、iRNA薬で標的化した場合に、

40

50

標的遺伝子発現の最良の阻害を介するRNA配列を同定し得る。従って、例えば表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つ中で同定される配列が、効果的な標的配列を表す一方で、所定の配列の1ヌクレオチド上流または下流に、漸進的に“ウィンドウを移動させる”ことにより、同等またはより良好な阻害特性を有する配列を同定することで、阻害効率のさらなる最適化を達成し得ることが検討される。

【0164】

さらに、ヌクレオチドを体系的に付加または除去して、より長いまたはより短い配列を作成し、その位置から、標的RNAの上流または下流に、よりも長いまたはより短いサイズのウィンドウを移動させることで、これらの作成された配列を試験することにより、例えば表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つ中で同定される、任意の配列のさらなる最適化を達成し得ることが検討される。この場合も、この新しい標的候補を作成するアプローチと、当該技術分野で公知のおよび／または本明細書に記載される阻害アッセイにおける、これらの標的配列に基づくiRNAの有効性の試験とを組み合わせることにより、阻害効率にさらなる改善をもたらし得る。なおさらに、例えば本明細書に記載されまたは当該技術分野で公知の修飾ヌクレオチドの導入、オーバーハングの付加または変更、または当該技術分野で公知のおよび／または本明細書に記載のその他の修飾によって、発現阻害剤として分子をさらに最適化すること（例えば、血清安定性または循環半減期の増大、熱安定性の増大、膜貫通送達促進、特定位置または細胞型の標的化、サイレンシング経路酵素との相互作用の増大、エンドソームからの放出増大など）で、このような最適化配列を調節し得る。

【0165】

本明細書に記載のiRNAは、標的配列との1つまたは複数のミスマッチを含有し得る。一態様において、本明細書に記載されるiRNAは、3個以下のミスマッチを含有する。iRNAのアンチセンス鎖が、標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチの範囲は、相補性領域の中心に位置しないことが好ましい。iRNAのアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチは、相補性領域の5'または3'末端のいずれかから、最後の5ヌクレオチド内に限定されることが好ましい。例えばAGT遺伝子領域に相補的な23ヌクレオチドのiRNA薬の鎖は、一般的に、中心の13ヌクレオチド内にいかなるミスマッチも含有しない。本明細書に記載の方法または当該技術分野で公知の方法を使用して、標的配列とのミスマッチを含有するiRNAが、AGT遺伝子の発現阻害に効果があるかどうかを決定することができる。AGT遺伝子の発現阻害における、ミスマッチがあるiRNAの有効性の検討は、とりわけAGT遺伝子の特定の相補性領域が、集団内で多型配列バリエーションを有することが知られている場合に、重要である。

【0166】

III. 本発明の修飾iRNA

一態様において、本発明のiRNAのRNA、例えば、dsRNAは、未変性であり、例えば当該技術分野で公知であり本明細書に記載される、化学修飾および／または結合を含まない。別の態様において、本発明のiRNAのRNA、例えば、dsRNAを化学的に修飾して、安定性またはその他の有益な特性を高める。本発明の任意の態様において、本発明のiRNAの実質的に全てのヌクレオチドは修飾されている。本発明の他の態様において、本発明のiRNAの全てのヌクレオチドは、本発明の修飾iRNAであり、“実質的に全てのヌクレオチドが修飾されている”は、大部分であるが、完全に修飾されておらず、5、4、3、2または1以下の未修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0167】

本発明で特記する核酸は、“Current protocols in nucleic Acid chemistry,” Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA (引用により本明細書中に包含される)に記載されるものなどの、当該技術分野で確立された方法によって合成および／または修飾され得る。修飾には、例えば、5'末端修飾（リン酸化、共役結合、逆転結合）または3'末端修飾（共役結合、DNAヌクレオチド、逆転結合など

）などの末端修飾；例えば、安定化塩基での、不安定化塩基での、またはパートナーの伸長レパートリーと塩基対形成する塩基での置換、塩基除去（脱塩基ヌクレオチド）、または共役結合塩基などの塩基修飾；糖修飾（例えば2'位または4'位における）または糖置換；および／または、リン酸ジエステル結合の修飾または置換を含む、主鎖修飾が含まれる。本明細書に記載される態様で有用なiRNA化合物の特定の例としては、修飾された主鎖を含むRNA、または天然ヌクレオシド間結合を含有しないRNAが挙げられるが、これに限定されるものではない。修飾された主鎖を有するRNAとしては、特に主鎖中にリン原子を有しないものが挙げられる。本明細書の目的では、そして当技術分野で時に言及されるように、それらのヌクレオシド間主鎖中にリン原子を有しない修飾RNAもまた、オリゴヌクレオシドであると考えられる。ある態様において、修飾iRNAは、そのヌクレオシド間主鎖中にリン原子を有し得る。

10

【0168】

修飾RNA主鎖としては、例えばホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよびその他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホロアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダートを含むホスホラミデート、チオノホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、およびノルマル3'-5'結合、それらの2'-5'連結類縁体を有するボラノホスフェート、および隣接するヌクレオシド単位対が3'-5'から5'-3'、または2'-5'から5'-2'に連結する、逆転極性を有するボラノホスフェートが挙げられる。種々の塩、混合塩および遊離酸形態もまた包含される。

20

【0169】

上記リン含有結合の調製を教示する、代表的な米国特許としては、米国特許第3,687,808号；同第4,469,863号；同第4,476,301号；同第5,023,243号；同第5,177,195号；同第5,188,897号；同第5,264,423号；同第5,276,019号；同第5,278,302号；同第5,286,717号；同第5,321,131号；同第5,399,676号；同第5,405,939号；同第5,453,496号；同第5,455,233号；同第5,466,677号；同第5,476,925号；同第5,519,126号；同第5,536,821号；同第5,541,316号；同第5,550,111号；同第5,563,253号；同第5,571,799号；同第5,587,361号；同第5,625,050号；同第6,028,188号；同第6,124,445号；同第6,160,109号；同第6,169,170号；同第6,172,209号；同第6,239,265号；同第6,277,603号；同第6,326,199号；同第6,346,614号；同第6,444,423号；同第6,531,590号；同第6,534,639号；同第6,608,035号；同第6,683,167号；同第6,858,715号；同第6,867,294号；同第6,878,805号；同第7,015,315号；同第7,041,816号；同第7,273,933号；同第7,321,029号；および米国特許RE39464（それらの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0170】

リン原子を含まない修飾されたRNA主鎖は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子またはヘテロ環式ヌクレオシド間結合によって形成された主鎖を有する。これらには、モルホリノ結合（一部はヌクレオシドの糖部分から形成される）；シロキサン主鎖；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン主鎖；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネートおよびスルホンアミド主鎖；アミド主鎖を有するもの；お

50

よび、N、O、S、およびCH₂構成成分を混合して有するその他のものが含まれる。

【0171】

上記オリゴヌクレオシドの調製を教示する、代表的な米国特許としては、米国特許第5, 034, 506号；同第5, 166, 315号；同第5, 185, 444号；同第5, 214, 134号；同第5, 216, 141号；同第5, 235, 033号；同第5, 64, 562号；同第5, 264, 564号；同第5, 405, 938号；同第5, 434, 257号；同第5, 466, 677号；同第5, 470, 967号；同第5, 489, 677号；同第5, 541, 307号；同第5, 561, 225号；同第5, 596, 086号；同第5, 602, 240号；同第5, 608, 046号；同第5, 610, 289号；同第5, 618, 704号；同第5, 623, 070号；同第5, 663, 312号；同第5, 633, 360号；同第5, 677, 437号；および、同第5, 677, 439号（それらの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0172】

他の態様において、好適なRNA模倣体は、iRNAでの使用が検討され、そこで、糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち、ヌクレオチド単位の骨格が、新しい基に置換されている。塩基単位は、適当な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。このような1つのオリゴマー化合物であり、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているRNA模倣体は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物において、RNAの糖主鎖が、アミド含有主鎖、特にアミノエチルグリシン主鎖で置換されている。核酸塩基は保持されて、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子と直接または間接的に結合する。PNA化合物の調製を教示する、代表的な米国特許としては、米国特許第5, 539, 082号；同第5, 714, 331号；および同第5, 719, 262号（それらの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が挙げられるが、これに限定されない。さらに本発明のiRNA中で使用するのに適するPNA化合物は、例えばNielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に記載される。

【0173】

本発明で記載のいくつかの態様は、ホスホロチオエート主鎖を有するRNA、および特に、上記の米国特許第5, 489, 677号の—CH₂—NH—CH₂—、—CH₂—N(CH₃)—O—CH₂—[メチレン(メチルイミノ)またはMMI主鎖として公知]、—CH₂—O—N(CH₃)—CH₂—、—CH₂—N(CH₃)—N(CH₃)—CH₂—および—N(CH₃)—CH₂—CH₂—[式中、転環ホスホジエステル主鎖は、—O—P—O—CH₂—として表される]であるヘテロ原子主鎖を有する、および上記の米国特許第5, 602, 240号のアミド主鎖を有する、オリゴヌクレオシドを含む。ある態様において、本明細書に記載のRNAは、上記の米国特許第5, 034, 506号のモルホリノ主鎖構造を有する。

【0174】

修飾RNAはまた、1つまたは複数の置換糖部分を含有し得る。例えば本明細書に記載のdsRNAなどのiRNAは、2'位に、OH；F；O—、S—、またはN—アルキル；O—、S—、またはN—アルケニル；O—、S—、またはN—アルキニル；またはO—アルキル—O—アルキルの1つを含み得て、ここで、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換または非置換C₁～C₁₀アルキル、またはC₂～C₁₀アルケニルおよびアルキニルであり得る。例示的な好適な修飾としては、O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂、(式中、nおよびmは1から約10である)が挙げられる。他の態様において、dsRNAは、2'位に以下の1つを含む：C₁～C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリアル、アラキル、O—アルカリアルまたはO—アラキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリアル、アミノアルキルアミノ、ポ

リアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基(cleaving group)、レポーター基、インターカレーター、iRNAの薬物動態特性を改善する基、またはiRNAの薬力学的特性を改善する基、および同様の特性を有するその他の置換基。ある態様において、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても公知)(Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504)、すなわちアルコキシ-アルコキシ基を含む。別の例示的な修飾は、以下に本明細書の実施例で記載されるように、2'-DMAOEとしても知られている、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわちO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、および、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当技術分野で2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても公知)、すなわち2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂を含む。さらなる例示的修飾には、5'-Me-2'-Fヌクレオチド、5'-Me-2'-OMeヌクレオチド、5'-Me-2'-デオキシヌクレオチド、(これらの3つのファミリーのRおよびS異性体の両方)；2'-アルコキシアルキル；および、2'-NMA(N-メチルアセトアミド)が含まれる。

【0175】

他の修飾としては、2'-メトキシ(2'-OCH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)が含まれる。同様の修飾はまた、具体的には3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位、または2'-5'結合dsRNA中、および5'末端ヌクレオチドの5'位など、iRNAのRNA上のその他の位置でも可能である。iRNAはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有してもよい。上記修飾糖構造の調製を教示する、代表的な米国特許としては、米国特許第4,981,957号；同第5,118,800号；同第5,319,080号；同第5,359,044号；同第5,393,878号；同第5,446,137号；同第5,466,786号；同第5,514,785号；同第5,519,134号；同第5,567,811号；同第5,576,427号；同第5,591,722号；同第5,597,909号；同第5,610,300号；同第5,627,053号；同第5,639,873号；同第5,646,265号；同第5,658,873号；同第5,670,633号明細書；および米国特許第5,700,920号(特定のものは本出願と発明者が共通である)が挙げられるが、これに限定されるものではない。上記のそれぞれの内容全体は、引用により本明細書に包含される。

【0176】

iRNAはまた、核酸塩基(当技術分野では単に“塩基”と称されることが多い)修飾または置換を含み得る。本明細書で用いる“未修飾”または“天然”核酸塩基としては、プリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、およびピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)が挙げられる。修飾核酸塩基としては、5-メチルシトシン(5-me-C)；5-ヒドロキシメチルシトシン；キサントシン；ヒポキサントシン；2-アミノアデニン；アデニンおよびグアニンの6-メチルおよびその他のアルキル誘導体；アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよびその他のアルキル誘導体；2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン；5-ハロウラシルおよびシトシン；5-プロピニルウラシルおよびシトシン；6-アゾウラシル、シトシン、およびチミン；5-ウラシル(プソイドウラシル)；4-チオウラシル；8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよびその他の8置換アデニンおよびグアニン；5-ハロ、具体的には5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、およびその他の5置換ウラシルおよびシトシン；7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン；8-アザグアニンおよび8-アザアデニン；7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン(dazaadenine)；および3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどのその他の合成および天然核酸塩基が挙げられる。さらに核酸塩基としては、米国特許第3,687,808号明細書で開示されるもの；Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008で開示されるもの；The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschw

itz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990で開示されるもの; Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613によって開示されるもの; および Sanghvi, Y S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993によって開示されるものが挙げられる。これらの核酸塩基のいくつかは、本発明で取り上げるオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるのに特に有用である。これらには、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン類、6-アザピリミジン類、ならびにN-2、N-6およびO-6置換プリン類が含まれる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6~1.2℃増大させることが示されており (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、例示的な塩基置換であり、なおもより特に、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられた場合にそうである。

【0177】

上記の特定の修飾核酸塩基ならびにその他の修飾核酸塩基の調製を教示する、代表的な米国特許としては、上記の米国特許第3,687,808号;同第4,845,205号;同第5,130,30号;同第5,134,066号;同第5,175,273号;同第5,367,066号;同第5,432,272号;同第5,457,187号;同第5,459,255号;同第5,484,908号;同第5,502,177号;同第5,525,711号;同第5,552,540号;同第5,587,469号;同第5,594,121号;同第5,596,091号;同第5,614,617号;同第5,681,941号;同第5,750,692号;同第6,015,886号;同第6,147,200号;同第6,166,197号;同第6,222,025号;同第6,235,887号;同第6,380,368号;同第6,528,640号;同第6,639,062;6,617,438号;同第7,045,610号;同第7,427,672号;および、同第7,495,088号(その内容全体は、それぞれ引用によって本明細書中に包含される)が含まれるが、これらに限定されない。

【0178】

iRNAのRNAはまた、1つまたは複数のロックド核酸(LNA)を含むようにも修飾され得る。ロックド核酸は、修飾リボース部分を有するヌクレオチドであり、その中でリボース部分は、2'および4'炭素を結合する追加の架橋を含んでなる。この構造は、リボースを3'-エンド立体構造内に効果的に「ロック」する。siRNAへのロックド核酸の追加は、血清中のsiRNA安定性を増大させ、非特異的効果(オフターゲット作用)を低下させることが示されている(Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunwell, A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193)。

【0179】

ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、UNA(非ロックド核酸)ヌクレオチドである1つまたは複数の単量体を含む。UNAは、糖の結合のいずれかが除かれて、ロックされていない“糖”残基を形成する、ロックされていない非環状構造の核酸である。一例として、UNAは、C1'-C4'間の結合(すなわち、C1'とC4'炭素の間の共有炭素-酸素-炭素結合)が除かれた単量体も包含する。別の例において、糖のC2'-C3'結合(すなわち、C2'とC3'炭素との間の共有炭素-炭素結合)が除かれている(引用により本明細書中に包含される、*Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) および Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039を参照のこと)。

【0180】

iRNAのRNAはまた、1つまたは複数の二環式糖部分を含むようにも修飾され得る。“二環式糖”とは、2つの原子の架橋によって修飾されたフラノシル環である。“二環式ヌクレオシド”(“BNA”)は、糖環の2個の炭素原子を結合する架橋を含んでなり、それによって二環式環系を形成する糖部分を有するヌクレオシドである。任意の態様において、架橋は、糖環の4'-炭素と2'-炭素とを結合する。従って、ある態様におい

て、本発明の薬剤は、1つまたは複数のロックド核酸（LNA）を含み得る。ロックド核酸は、修飾リボース部分を有するヌクレオチドであり、その中でリボース部分は、2'および4'炭素を結合する追加の架橋を含んでなる。言い換えると、LNAは、4'-CH₂-O-2'架橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオチドである。この構造は、リボースを3'-エンド立体構造内に効果的に「ロック」する。siRNAへのロックド核酸の追加は、血清中のsiRNA安定性を増大させ、非特異的效果（オフターゲット作用）を低下させることが示されている（Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193）。本発明のポリヌクレオチドに使用するための二環式ヌクレオシドの例には、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子の間の架橋を含むヌクレオシドが含まれるが、これに限定されない。任意の態様において、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド薬には、4'から2'架橋を含む1つまたは複数の二環式ヌクレオシドが含まれる。かかる4'から2'架橋された二環式ヌクレオシドの例としては、4'-(CH₂)-O-2' (LNA)；4'-(CH₂)-S-2'；4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA)；4'-CH(CH₃)-O-2'（“拘束（constrained）エチル”または“cEt”とも言う）および4'-CH(CH₂OC H₃)-O-2'（およびその類縁体；例えば、米国特許第7,399,845号を参照のこと）；4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'（およびその類縁体；例えば、米国特許第8,278,283号を参照のこと）；4'-CH₂-N(OC H₃)-2'（およびその類縁体；例えば、米国特許第8,278,425号を参照のこと）；4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'（例えば、米国特許出願公開第2004/0171570号を参照のこと）；4'-CH₂-N(R)-O-2'（式中、Rは、H、C1-C12アルキル、または保護基である）（例えば、米国特許第7,427,672号を参照のこと）；4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'（例えば、Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照のこと）；および、4'-CH₂-C(=CH₂)-2'（およびその類縁体；例えば、米国特許第8,278,426号を参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない。上記のそれぞれの内容全体は、引用により本明細書中に包含される。

【0181】

ロックド核酸ヌクレオチドの調製を教示するさらなる代表的な米国特許および米国特許出願公開としては、以下の米国特許第6,268,490号；同第6,525,191号；同第6,670,461号；同第6,770,748号；同第6,794,499号；同第6,998,484号；同第7,053,207号；同第7,034,133号；同第7,084,125号；同第7,399,845号；同第7,427,672号；同第7,569,686号；同第7,741,457号；同第8,022,193号；同第8,030,467号；同第8,278,425号；同第8,278,426号；同第8,278,283号；米国特許出願公開第2008/0039618号；および、米国特許出願公開第2009/0012281号（それぞれの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が含まれるが、これに限定されない。

【0182】

上記の二環式ヌクレオシドのいずれかは、例えば、α-L-リボフラノースおよびβ-D-リボフラノースを含む、1つまたは複数の糖の立体化学的配置を有するように調製され得る（WO99/14226を参照のこと）。

【0183】

iRNAのRNAはまた、1つまたは複数の拘束エチルヌクレオチドを含むように修飾され得る。本明細書で用いる“拘束エチルヌクレオチド”または“cEt”は、4'-CH(CH₃)-O-2'架橋を含む二環式糖部分を含むロックされた核酸である。一態様において、S立体配座にある拘束エチルヌクレオチドは、本明細書中、“S-cEt”と言う。

【0184】

本発明の iRNA はまた、1 つまたは複数の“立体配座的に制限されたヌクレオチド” (“CRN”) を含む得る。CRN は、リボースの C2' および C4' 炭素またはリボースの C3 および C5' 炭素を連結するリンカーを有するヌクレオチド類縁体である。CRN は、リボース環を安定な立体構造にロックし、mRNA へのハイブリダイゼーションの親和性を高める。リンカーは、安定性および親和性に最適な位置に酸素を配置して、リボース環のパッキングを減らすのに十分な長さである。

【0185】

上記の CRN の任意の調製を教示する代表的な刊行物には、米国特許出願公開第 2013/0190383 号；および PCT 公開 WO2013/036868（それぞれの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が含まれるが、これに限定されない。

10

【0186】

本発明の iRNA のヌクレオチドの 1 つまたはそれ以上はまた、ヒドロキシメチル置換されたヌクレオチドを含む得る。“ヒドロキシメチル置換されたヌクレオチド”は、非環式 2'-3'-セコヌクレオチドであり、“非ロックド核酸” (“UNA”) 修飾とも称される。

【0187】

UNA の調製を教示する代表的な米国刊行物には、米国特許第 8,314,227 号；および米国特許出願公開第 2013/0096289 号；同第 2013/0011922 号；および同第 2011/0313020 号（それぞれの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が含まれるが、これに限定されない。

20

【0188】

RNA 分子末端に対する潜在的安定化修飾としては、N-(アセチルアミノカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール (Hyp-C6-NHAc)、N-(カプロイル-4-ヒドロキシプロリノール (Hyp-C6)、N-(アセチル-4-ヒドロキシプロリノール (Hyp-NHAc)、チミジン-2'-O-デオキシチミジン (エーテル)、N-(アミノカプロイル)-4-ヒドロキシプロリノール (Hyp-C6-アミノ)、2-デオキサノイル-ウリジン-3'-ホスフェート、逆転塩基 dT (idT) などが含まれ得る。この修飾の開示は、国際公開第 2011/005861 号に見いだされ得る。

【0189】

本発明の iRNA のヌクレオチドの他の修飾には、RNAi 薬のアンチセンス鎖上の、5'リン酸または 5'リン酸模倣物、例えば、5'-末端リン酸またはリン酸模倣物が含まれる。好適なリン酸模倣物は、例えば米国特許出願公開第 2012/0157511 号（そのよう全体の内容は、引用により本明細書中に包含される）に開示される。

30

【0190】

A. 本発明のモチーフを含む修飾 iRNA

本発明の任意の面において、本発明の二本鎖 RNAi 薬には、例えば、2011 年 11 月 18 日出願の米国仮特許出願第 61/561,710 8、または 2012 年 11 月 16 日出願の PCT/US2012/065691（それぞれの全体の内容は、引用により本明細書中に包含される）に開示された化学修飾を有する薬剤が含まれる。

【0191】

本明細書および仮出願番号 61/561,710 または PCT 出願公開第 PCT/US2012/065691 に示される通り、優れた結果は、RNAi 薬のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖中の 3 つの連続するヌクレオチド上に、特に切断部位またはその近位に、3 つの同一の修飾の 1 つまたは複数のモチーフを導入することにより得られ得る。ある態様において、RNAi 薬のセンス鎖およびアンチセンス鎖は、他の方法で完全に修飾されてもよい。これらのモチーフの導入は、存在する場合に、センスおよび/またはアンチセンス鎖の修飾パターンを中断する。RNAi 薬は、必要に応じて、例えば、センス鎖上の GalNAc 誘導リガンドと複合体を形成してよい。得られた RNAi 薬は、優れた遺伝子サイレンシング活性を示す。

40

【0192】

50

より具体的には、驚くべきことに、二本鎖RNA i 薬のセンス鎖およびアンチセンス鎖が、RNA i 薬の少なくとも1つの鎖の切断部位またはその近位に3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つまたは複数のモチーフを有するように完全に修飾されたとき、RNA i 薬の遺伝子サイレンシング活性が優位に増強されたことが発見されている。

【0193】

従って、本発明は、標的遺伝子（すなわち、アンジオテンシノーゲン（AGT）遺伝子）のインビボでの発現を阻害することができる二本鎖RNA i 薬を提供する。RNA i 薬は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。RNA i 薬の各鎖は、12-30ヌクレオチド長の範囲であり得る。例えば、各鎖は、14-30ヌクレオチド長、17-30ヌクレオチド長、25-30ヌクレオチド長、27-30ヌクレオチド長、17-23ヌクレオチド長、17-21ヌクレオチド長、17-19ヌクレオチド長、19-25ヌクレオチド長、19-23ヌクレオチド長、19-21ヌクレオチド長、21-25ヌクレオチド長、または21-23ヌクレオチド長の間の長さであり得る。

10

【0194】

センス鎖およびアンチセンス鎖は、一般的に、本明細書中、“RNA i 薬”とも記載される、二本鎖RNA (“dsRNA”) を形成している。RNA i 薬の二本鎖領域は、12-30ヌクレオチド対の長さであり得る。例えば、二本鎖領域は、14-30ヌクレオチド対の長さ、17-30ヌクレオチド対の長さ、27-30ヌクレオチド対の長さ、17-23ヌクレオチド対の長さ、17-21ヌクレオチド対の長さ、17-19ヌクレオチド対の長さ、19-25ヌクレオチド対の長さ、19-23ヌクレオチド対の長さ、19-21ヌクレオチド対の長さ、21-25ヌクレオチド対の長さ、または21-23ヌクレオチド対の長さの間であり得る。別の例において、二本鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26および27ヌクレオチド長から選択される。

20

【0195】

一態様において、RNA i 薬は、一方または両方の鎖の3'末端、5'末端、または両末端に、1つまたは複数のオーバーハング領域および／またはキャッピング基を含んでよい。オーバーハングは、1-6ヌクレオチド長、例えば2-6ヌクレオチド長、1-5ヌクレオチド長、2-5ヌクレオチド長、1-4ヌクレオチド長、2-4ヌクレオチド長、1-3ヌクレオチド長、2-3ヌクレオチド長、または1-2ヌクレオチド長であり得る。オーバーハングは、一方の鎖が他方の鎖よりも長くなるか、または互い違いに配置された同じ長さの2本の鎖をもたらし得る。オーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成することができるか、あるいは標的とされる遺伝子配列に相補的であり得るか、または別の配列であり得る。本明細書に記載の通り、30ヌクレオチド長までの伸長されたオーバーハングはまた、本発明の種々の態様において企図される。第一および第二の鎖はまた、例えば、ヘアピンを形成するための追加の塩基により、または他の非塩基リンカーにより、連結され得る。

30

【0196】

一態様において、RNA i 薬のオーバーハング領域中のヌクレオチドは、それぞれ独立して、修飾または非修飾ヌクレオチドであってよく、それらには、2'-糖修飾、例えば2'-F、2'-Oメチル、チミジン（T）、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン（Teo）、2'-O-メトキシエチルアデノシン（Aeo）、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン（m5Ceo）、およびそれらの任意の組合せが含まれるが、これに限定されない。例えば、TTは、いずれかの鎖のいずれか端オーバーハング配列であり得る。オーバーハングは、標的mRNAとのミスマッチを形成し得るか、またはそれは標的とされる遺伝子配列に相補的であり得るか、または別の配列であり得る。

40

【0197】

RNA i 薬のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'-または3'-オーバーハングは、リン酸化されていてよい。ある態様において、オーバーハング領域（複数可

50

）は、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエートを有する2つのヌクレオチドを含み、ここで、2つのヌクレオチドは、同一または異なっていてよい。一態様において、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端に存在する。一態様において、この3'-オーバーハングは、アンチセンス鎖中に存在する。一態様において、この3'-オーバーハングは、センス鎖中に存在する。

【0198】

RNAi薬は、その全体的な安定性に影響を与えることなく、RNAiの干渉活性を強力にし得る、単一のオーバーハングのみを含み得る。例えば、一本鎖オーバーハングは、センス鎖の3'末端に、あるいは、アンチセンス鎖の3'末端に位置していてもよい。RNAi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）またはその逆に位置する平滑末端を有していてもよい。一般的に、RNAi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'末端は平滑末端である。理論にとらわれることなく、アンチセンス鎖の5'末端およびアンチセンス鎖の3'末端オーバーハングにおける非対称平滑末端は、RISCプロセスにローディングされるガイド鎖を好む。

【0199】

一態様において、RNAi薬は、両端が平滑の19ヌクレオチド長の鎖であり、ここで、センス鎖は、5'末端からの位置7、8、9に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-F修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端からの位置11、12、13に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。

【0200】

別の態様において、RNAi薬は、両端が平滑の20ヌクレオチド長の鎖であり、ここで、センス鎖は、5'末端からの位置8、9、10に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-F修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端からの位置11、12、13に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。

【0201】

さらに別の態様において、RNAi薬は、両端が平滑の21ヌクレオチド長の鎖であり、ここで、センス鎖は、5'末端からの位置9、10、11に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-F修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端からの位置11、12、13に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。

【0202】

一態様において、RNAi薬は、21ヌクレオチドのセンス鎖および23ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、5'末端からの位置9、10、11に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-F修飾の少なくとも1つのモチーフを含み；アンチセンス鎖は、5'末端からの位置11、12、13に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含み、ここで、該RNAi薬の一方の末端は平滑であるが、他方の末端は、2ヌクレオチドのオーバーハングを含む。好ましくは、2ヌクレオチドのオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にある。

【0203】

2ヌクレオチドのオーバーハングがアンチセンス鎖の3'末端にあるとき、末端の3つのヌクレオチド間に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てよく、ここで、3つのヌクレオチドのうち2つは、オーバーハングヌクレオチドであり、そして3番目のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドの次の対になったヌクレオチドである。一態様において、RNAi薬はさらに、センス鎖の5'末端およびアンチセンス鎖の5'末端の両方の末端の3つのヌクレオチド間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する。一態様において、モチーフの一部であるヌクレオチドを含むRNAi薬のセンス鎖およびアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。一態様

において、各残基は、独立して、例えば、交互モチーフにおいて、2'-O-メチルまたは3'-フルオロで修飾されている。要すれば、RNAi薬は、リガンド（好ましくは、GalNAc₃）をさらに含む。

【0204】

一態様において、RNAi薬は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、25-30ヌクレオチド残基長であり、ここで、第一鎖の5'末端ヌクレオチド（位置1）から開始して位置1から23は、少なくとも8個のリボヌクレオチドを含み；アンチセンス鎖は、36-66ヌクレオチド残基長であり、3'末端ヌクレオチドから開始して、センス鎖の位置1から23と対になって二本鎖を形成する位置に少なくとも8個のリボヌクレオチドを含み；ここで、アンチセンス鎖の少なくとも3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対になっておらず、6個までの連続する3'末端ヌクレオチドは、センス鎖と対になっておらず、それ故に、1-6個のヌクレオチドの3'一本鎖オーバーハングを形成し；ここで、アンチセンス鎖の5'末端は、センス鎖と対になっていない10-30個の連続するヌクレオチドを含み、それ故に、10-30個のヌクレオチドの一本鎖5'オーバーハングを形成し；ここで、少なくともセンス鎖の5'末端および3'末端ヌクレオチドは、センス鎖およびアンチセンス鎖が最大相補性のために整列されたとき、アンチセンス鎖のヌクレオチドと塩基対を形成し、それ故に、センス鎖とアンチセンス鎖の間に実質的に二本鎖領域を形成し；そして、アンチセンス鎖は、二本鎖核酸が哺乳動物細胞に導入されるとき、標的遺伝子発現を低減させるアンチセンス鎖の長さの少なくとも19のリボヌクレオチドに沿って標的RNAに対して十分相補的であり；そして、センス鎖は、3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-F修飾の少なくとも1つのモチーフを含み、ここで、少なくとも1つのモチーフは、切断部位またはその近位に生じる。アンチセンス鎖は、切断部位またはその近位に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含む。

【0205】

一態様において、RNAi薬は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、RNAi薬は、少なくとも25ヌクレオチド長の、最大で29ヌクレオチド長の第一鎖、ならびに5'末端からの位置11、12、13に3つの連続するヌクレオチド上の3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを有する、最大で30ヌクレオチド長の第二鎖を含み；ここで、第一鎖の3'末端および第二鎖の5'末端は平滑末端を形成し、第二鎖は、第一の鎖よりも、その3'末端で1-4ヌクレオチド長く、ここで、二本鎖領域は、少なくとも25ヌクレオチド長の領域であり、第二鎖は、RNAi薬が哺乳動物細胞に導入されるとき、標的遺伝子発現を低減させる第二鎖の長さの少なくとも19のヌクレオチドに沿って標的RNAに対して十分相補的であり、ここで、RNAi薬のdicer切断は、優先的に、第二鎖の3'末端を含むsiRNAを生じ、それ故に、哺乳動物における標的遺伝子の発現を低下させる。要すれば、RNAi薬は、リガンドをさらに含む。

【0206】

一態様において、RNAi薬のセンス鎖は、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含み、ここで、該モチーフの1つは、センス鎖中の切断部位で生じる。

【0207】

一態様において、RNAi薬のアンチセンス鎖はまた、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含んでいてよく、ここで、該モチーフの1つは、アンチセンス鎖中の切断部位またはその近位に生じる。

【0208】

17-23ヌクレオチド長の二本鎖領域を有するRNAi薬について、アンチセンス鎖の切断部位は、一般的に、5'末端から10、11および12の位置の周りである。従って、3つの同一の修飾のモチーフは、アンチセンス鎖の5'末端から最初のヌクレオチドから数えて、またはアンチセンス鎖の5'末端から二本鎖領域内の最初の対になったヌクレオチドから開始して数えて、アンチセンス鎖の9、10、11の位置；10、11、1

2 の位置；1 1、1 2、1 3 の位置；1 2、1 3、1 4 の位置；または、1 3、1 4、1 5 の位置に生じ得る。アンチセンス鎖中の切断部位はまた、5 ' 末端からの RNA i の二本鎖領域の長さに応じて変更されてよい。

【0209】

RNA i 葉のセンス鎖は、鎖の切断部位に3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含んでいてよく；そして、アンチセンス鎖は、鎖の切断部位またはその近位に3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを有してよい。センス鎖およびアンチセンス鎖が dsRNA 二本鎖を形成するとき、該センス鎖およびアンチセンス鎖は、センス鎖上の3つのヌクレオチドの1つのモチーフおよびアンチセンス鎖上の3つのヌクレオチドの1つのモチーフが、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーラップを有するように、すなわち、センス鎖中のモチーフの3つのヌクレオチドの少なくとも1つが、アンチセンス鎖中のモチーフの3つのヌクレオチドの少なくとも1つと塩基対を形成するように、整列させることができる。あるいは、少なくとも2つのヌクレオチドが重複してよい、または3つすべてのヌクレオチドが重複してもよい。

10

【0210】

一態様において、RNA i 葉のセンス鎖は、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の2以上のモチーフを含んでいてよい。第一のモチーフは、鎖の切断部位またはその近位に生じ、他のモチーフは、ウイング修飾であり得る。用語“ウイング修飾”は、本明細書中、同一鎖の切断部位またはその近位でモチーフから分離される鎖の別の部分で生じるモチーフを意味する。ウイング修飾は、第一のモチーフに隣接しているか、または少なくとも1つまたはそれ以上のヌクレオチドにより分離されている。該モチーフが互いに直接隣接しているとき、該モチーフの化学的性質は互いに異なり、該モチーフが1つまたはそれ以上のヌクレオチドにより分離されているとき、その化学的性質は同じかまたは異なっていてよい。2個またはそれ以上のウイング修飾が存在してよい。例えば、2個のウイング修飾が存在するとき、各ウイング修飾は、切断部位またはその近位にある、またはリードモチーフのいずれかの側にある、第一モチーフに関して一方の端で起こり得る。

20

【0211】

センス鎖と同様に、RNA i 葉のアンチセンス鎖は、鎖の切断部位またはその近位に生じるモチーフの少なくとも1つと共に、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の2以上のモチーフを含んでいてよい。このアンチセンス鎖はまた、センス鎖上に存在してよいウイング修飾と同様のアライメントないに1つまたは複数のウイング修飾を含み得る。

30

【0212】

一態様において、RNA i 葉のセンス鎖またはアンチセンス鎖上のウイング修飾は、一般的に、鎖の3'末端、5'末端または両端に最初の1つまたは2つの末端ヌクレオチドを含まない。

【0213】

別の態様において、RNA i 葉のセンス鎖またはアンチセンス鎖のウイング修飾は、一般的に、鎖の3'末端、5'末端または両端に二本鎖領域内の最初の1つまたは2つの対になったヌクレオチドを含まない。

40

【0214】

RNA i 葉のセンス鎖およびアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも1つのウイング修飾を含むとき、該ウイング修飾は、二本鎖領域の同じ末端に存在してよく、1個、2個または3個のヌクレオチドの重複を有してよい。

【0215】

RNA i 葉のセンス鎖およびアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも2つのウイング修飾を含むとき、該センス鎖およびアンチセンス鎖は、1つの鎖からの各2つの修飾が、1個、2個または3個のヌクレオチドの重複を有する二本鎖領域の一方の末端にあるように；1つの鎖からの各2つの修飾が、1個、2個または3個のヌクレオチドの重複を有する

50

二本鎖領域の他方の末端にあるように；1つの鎖からの2つの修飾が、二本鎖領域中の1個、2個または3個のヌクレオチドの重複を有するリードモチーフの各側にあるように、整列（アライン）されてよい。

【0216】

一態様において、モチーフの一部であるヌクレオチドを含む、RNAi薬のセンス鎖およびアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは、修飾されていてよい。各ヌクレオチドは、同じかまたは異なる修飾で修飾されていてよく、それには、非結合リン酸酸素の一方または両方、および／または結合リン酸酸素の1つまたは複数の、1つまたはそれ以上の改変；リボース糖の構成成分、例えば、リボース糖の2'-ヒドロキシルの改変；リン酸部分の“脱ホスホ”リンカーでの大規模な置換；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-リン酸骨格の置換または修飾が含まれ得る。

10

【0217】

核酸をサブユニットのポリマーであるとして、修飾の多くは、核酸内で反復される位置、例えば、塩基の修飾、またはリン酸部分、またはリン酸部分の非結合Oに生じる。ある場合において、修飾は、核酸内の対象位置の全てで生じ得るが、多くの場合、そうはならない。一例として、修飾は、3'末端または5'末端位置でのみ、末端領域でのみ、例えば、鎖の末端ヌクレオチドまたは最後の2、3、4、5または10ヌクレオチド中の位置で生じ得る。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、または両方で起こり得る。修飾は、RNAの二本鎖領域内でのみ、またはRNAの一本鎖領域内でのみ起こり得る。例えば、非結合O位置でのホスホロチオエート修飾は、一方または両方の末端でのみ起こり得る、末端領域でのみ起こり得る、例えば、鎖の末端ヌクレオチドまたは最後の2、3、4、5または10ヌクレオチド中の位置で起こり得る、または二本鎖および一本鎖領域の、特に末端で起こり得る。5'末端または末端をリン酸化し得る。

20

【0218】

例えば、安定性を高めるために、一本鎖オーバーハングに、例えば、5'または3'オーバーハング、あるいは両方に、オーバーハング中に特定の塩基を含めること、あるいは修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチド代用物を含めることが可能である。例えば、オーバーハング中にプリンヌクレオチドを含むことが望ましいことがある。ある態様において、3'または5'オーバーハング中の塩基の全てまたはいくつかは、例えば本明細書に記載の修飾で修飾されていてよい。修飾には、例えば、当技術分野で公知の修飾を有するリボース糖の2'位置での修飾の使用、例えば、核酸塩基のリボ糖の代わりにデオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'-F）または2'-O-メチル修飾の使用、およびリン酸基における修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾が含まれ得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

30

【0219】

一態様において、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、独立して、LNA、CRN、cET、UNA、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、2'-ヒドロキシル、または2'-フルオロで修飾されている。鎖は、2以上の修飾を含み得る。一態様において、センス鎖およ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ている。

40

【0220】

少なくとも2個の異なる修飾が、一般的に、センス鎖およびアンチセンス鎖上に存在する。これらの2個の修飾は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロ修飾などであってよい。

【0221】

一態様において、N_aおよび／またはN_bは、交互パターンの修飾を含む。本明細書で用いる用語“交互(alternating)モチーフ”は、1つまたは複数の修飾を有するモチーフを意味し、各修飾は、一方の鎖の交互ヌクレオチドに生じる。交互ヌクレオチドは、他のヌクレオチド毎に1個または3個のヌクレオチド毎に1個、または同様のパターンを意味

50

し得る。例えば、A、BおよびCがそれぞれ、ヌクレオチドに対する1タイプの修飾を示す場合、交互モチーフは、“A B A B A B A B A B A B…”、“A A B B A A B B A A B B…”、“A A B A A B A A B A A B…”、“A A A B A A A B A A A B…”、“A A A B B B A A A B B B…”または“A B C A B C A B C A B C…”などであり得る。

【0222】

交互モチーフに含まれる修飾のタイプは、同じかまたは異なっていてよい。例えば、A、B、C、Dがそれぞれ、ヌクレオチドの修飾の1タイプを示す場合、交互パターン、すなわち、他のヌクレオチド毎の修飾は、同じであってよいが、センス鎖またはアンチセンス鎖のそれぞれは、“A B A B A B…”、“A C A C A C…”、“B D B D B D…”または“C D C D C D…”などのような交互モチーフ内の修飾のいくつかの可能性から選択され得る。

10

【0223】

一態様において、本発明のRNAi薬は、アンチセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンに相対的にセンス鎖上の交互モチーフの修飾パターンがシフトされるものを含む。シフトは、センス鎖のヌクレオチドの修飾基が、アンチセンス鎖のヌクレオチドの異なる修飾基に対応するように、またはその逆のようにしてもよい。例えば、センス鎖がdsRNA二本鎖中のアンチセンス鎖と対になるとき、センス鎖中の交互モチーフは、鎖の5' - 3'から“A B A B A B”で始まり、アンチセンス鎖中の交互モチーフは、二本鎖領域内の鎖の5' - 3'から“B A B A B A”で始まってよい。別の例として、センス鎖中の交互モチーフは、鎖の5' - 3'から“A A B B A A B B”で始まり、アンチセンス鎖中の交互モチーフは、二本鎖領域内の鎖の5' - 3'から“B B A A B B A A”で始まってよく、そのため、センス鎖とアンチセンス鎖の間の修飾パターンの完全なまたは部分的なシフトが存在することになる。

20

【0224】

一態様において、RNAi薬は、最初にセンス鎖上の2' - O - メチル修飾および2' - F修飾の交互モチーフのパターンが最初にアンチセンス鎖上の2' - O - メチル修飾および2' - F修飾の交互モチーフのパターンに対するシフトを有するものを含み、すなわち、センス鎖上の2' - O - メチル修飾ヌクレオチドは、アンチセンス鎖上の2' - F修飾ヌクレオチドと塩基対形成する、そしてその逆もある。センス鎖の位置1は2' - F修飾で始まり、アンチセンス鎖の位置1は、2' - O - メチル修飾で始まってよい。

30

【0225】

センス鎖および／またはアンチセンス鎖への3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つまたはそれ以上のモチーフの導入は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖中に存在する最初の修飾パターンを中断する。センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、該センス鎖および／またはアンチセンス鎖への3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つまたはそれ以上のモチーフの導入による修飾パターンのこの中断は、驚くべきことに、標的遺伝子に対する遺伝子サイレンシング活性を増強させる。

【0226】

一態様において、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾のモチーフがいずれかの鎖に導入されるとき、該モチーフの次のヌクレオチドの修飾は、該モチーフの修飾とは異なる修飾である。例えば、モチーフを含む配列の一部は、“…N_a Y Y Y N_b…”（式中、“Y”は、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾のモチーフの修飾を表し、“N_a”および“N_b”は、Yの修飾とは異なるモチーフ“Y Y Y”の次のヌクレオチドの修飾を表し、そして、N_aおよびN_bは、同じかまたは異なる修飾であってよい）である。あるいは、N_aおよび／またはN_bは、ウイング修飾が存在するとき、存在するか、または不存在であってよい。

40

【0227】

RNAi薬は、少なくとも1つのホスホロチオエート間結合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間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖または両方の鎖に、該鎖

50

のいずれかの位置で、いずれかのヌクレオチドに起こり得る。例えば、ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖上のヌクレオチド毎に起こり得る；各ヌクレオチド間結合修飾は、センス鎖および／またはアンチセンス鎖上に代替パターンで起こり得る；または、センス鎖またはアンチセンス鎖は、代替パターンで両方のヌクレオチド間結合修飾を含み得る。センス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の代替パターンは、アンチセンス鎖と同じかまたは異なっていてよく、センス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の代替パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間結合修飾の代替パターンと比べてシフトしていてもよい。一態様において、二本鎖RNA i 薬は、6－8個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。一態様において、アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、センス鎖は、5'末端または3'末端のいずれかに少なくとも2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

10

【0228】

一態様において、RNA i は、オーバーハング領域中にホスホロチオエート間結合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、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエート間結合またはメチルホスホネートヌクレオチド間結合を有する2個のヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチド間結合修飾はまた、オーバーハングヌクレオチドを、二本鎖領域内の末端の対になったヌクレオチドと結合させてもよい。例えば、少なくとも2、3、4個、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間結合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結合してよく、要すれば、オーバーハングヌクレオチドを、オーバーハングヌクレオチドの次の対になったヌクレオチドと連結する、さらなるホスホロチオエート間結合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てもよい。例えば、末端の3個のヌクレオチド間に少なくとも2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在してもよく、ここで、3個のヌクレオチドのうち2個はオーバーハングヌクレオチドであり、3個目は、オーバーハングヌクレオチドの次の対になったヌクレオチドである。これらの末端の3個のヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端、センス鎖の3'末端、アンチセンス鎖の5'末端、および／またはセンス鎖の5'末端に存在してもよい。

20

【0229】

一態様において、2個のヌクレオチドオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にあり、末端の3個のヌクレオチド間に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在し、ここで、3個のヌクレオチドのうち2個は、オーバーハングヌクレオチドであり、3個目のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドの次の対になったヌクレオチドである。要すれば、RNA i 薬は、センス鎖の5'末端およびアンチセンス鎖の5'末端の両方に、末端の3個のヌクレオチド間の2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合をさらに有している。

30

【0230】

一態様において、RNA i 薬は、標的とのミスマッチ（複数可）、二本鎖内のミスマッチ（複数可）、またはその組合せを含み得る。ミスマッチは、オーバーハング領域または二本鎖領域中で起こり得る。塩基対は、解離または融解を促進するそれらの傾向に基づいてランク付けされ得る（例えば、特定のペアリングの会合または解離の自由エネルギーについて、最も簡単な方法は、隣同士または同じ分析も使用できるが、個々の対毎に該対を調べることである）。解離を促進するという点では：A：Uは、G：Cより好ましく；G：Uは、G：Cより好ましく；そして、I：Cは、G：C（I＝イノシン）より好ましい。ミスマッチ、例えば、非標準的または標準的以外の対形成（本明細書の他の箇所に記載）は、標準的な対（A：T、A：U、G：C）より好ましく；ユニバーサル塩基を含む対形成は、標準的な対形成よりも好ましい。

40

【0231】

一態様において、RNA i 薬は、A：U、G：U、I：Cの群から独立して選択される、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の最初の1、2、3、4または5塩基対

50

の少なくとも1つ、ならびにミスマッチ対、例えば、非標準的対形成または標準的対形成もしくはユニバーサル塩基を含む対形成以外の対形成を含み、二本鎖の5'末端でのアンチセンス鎖の解離を促進する。

【0232】

一態様において、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の位置1のヌクレオチドは、A、dA、dU、UおよびdTからなる群より選択される。あるいは、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の最初の1、2または3塩基対の少なくとも1つは、AU塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の最初の塩基対はAU塩基対である。

【0233】

別の態様において、センス鎖の3'末端のヌクレオチドは、デオキシチミン(dT)である。別の態様において、アンチセンス鎖の3'末端のヌクレオチドは、デオキシチミン(dT)である。一態様において、デオキシチミンヌクレオチドの短い配列、例えば、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端上の2個のdTヌクレオチドが存在する。

【0234】

一態様において、センス鎖配列は、式(I)で示され得る：

$$5' \quad n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q \quad 3'$$

(I)

式中：

iおよびjは、それぞれ独立して、0または1であり；

pおよびqは、それぞれ独立して、0-6であり；

N_aは、それぞれ独立して、0-25個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列であり、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み；

N_bは、それぞれ独立して、0-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列であり；

n_pおよびn_qは、それぞれ独立して、オーバーハングヌクレオチドを示し；

ここで、N_bおよびYは、同じ修飾を有さず；そして

XXX、YYYおよびZZZは、それぞれ独立して、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを示す。好ましくは、YYYは、全て2'-F修飾ヌクレオチドである。

【0235】

一態様において、N_aおよび／またはN_bは、代替パターンの修飾を含む。

【0236】

一態様において、YYYモチーフは、センス鎖の切断部位またはその近位に生じる。例えば、RNAi薬が、17-23ヌクレオチド長の二本鎖領域を有するとき、YYYモチーフは、センス鎖の切断部位またはその近位に、5'末端から、位置1のヌクレオチドから数えて、または、要すれば、5'末端から、二本鎖領域内の位置1の対になったヌクレオチドから数えて、(例えば：位置6、7、8；7、8、9；8、9、10；9、10、11；10、11、12または11、12、13に)生じ得る。

【0237】

一態様において、iは1であり、jは0であるか、またはiは0であり、jは1であるか、またはiおよびjの両方が1である。従って、センス鎖は以下の式で表すことができる：

$$5' \quad n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q \quad 3' \quad (Ib) ;$$

$$5' \quad n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q \quad 3' \quad (Ic) ; \text{または}$$

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

。

【0238】

10

20

30

40

50

センス鎖が式 (I b) で表されるとき、 N_b は、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 または 0 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a はそれぞれ独立して、2-20、2-15、または 2-10 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し得る。

【0239】

センス鎖が式 (I c) で表されるとき、 N_b は、0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 または 0 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a は、それぞれ独立して、2-20、2-15、または 2-10 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し得る。

【0240】

センス鎖が式 (I d) で表されるとき、 N_b は、それぞれ独立して、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2 または 0 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5 または 6 である。 N_a は、それぞれ独立して、2-20、2-15、または 2-10 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し得る。

X、Y および Z はそれぞれ、互いに同じかまたは異なっていてよい。

【0241】

他の態様において、 i は 0 であり、 j は 0 であり、センス鎖は以下の式で表される：

$$5' \quad n_p - N_a - YYY - N_a - n_q \quad 3' \quad (I a)。$$

センス鎖が式 (I a) で表されるとき、 N_a は、それぞれ独立して、2-20、2-15、または 2-10 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し得る。

【0242】

一態様において、RNA i のアンチセンス鎖配列は、式 (I I) で表され得る：

$$5' \quad n_q' - N_a' - (Z'Z'Z')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (X'X'X')_l - N_a' - n_p' \quad 3' \quad (I I)$$

式中：

k および l は、それぞれ独立して、0 または 1 であり；

p' および q' は、それぞれ独立して、0-6 であり；

N_a' は、それぞれ独立して、0-25 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し、各配列は、少なくとも 2 個の異なる修飾ヌクレオチドを含み；

N_b' は、それぞれ独立して、0-10 個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し；

n_p' および n_q' は、それぞれ独立して、オーバーハングヌクレオチドを示し；

ここで、 N_b' および Y' は、同じ修飾を有さず；そして

$X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、それぞれ独立して、3 つの連続するヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つのモチーフを示す。

【0243】

一態様において、 N_a' および / または N_b' は、代替パターンの修飾を含む。

【0244】

$Y'Y'Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の切断部位またはその近位に生じる。例えば、RNA i 葉が、17-23 ヌクレオチド長の二本鎖領域を有するとき、 $Y'Y'Y'$ モチーフは、5' 末端から、位置 1 のヌクレオチドから数えて、または、要すれば、5' 末端から、二本鎖領域内の位置 1 の対になったヌクレオチドから数えて、アンチセンス鎖の位置 9、10、11；10、11、12；11、12、13；12、13、14；または 13、14、15 に生じ得る。好ましくは、 $Y'Y'Y'$ モチーフは、位置 11、12、13 に生じる。

【0245】

一態様において、 $Y'Y'Y'$ モチーフは全て 2'-OMe 修飾ヌクレオチドである。

【0246】

一態様において、 k は 1 であり、 l は 0 であるか、または k は 0 であり、 l は 1 である

10

20

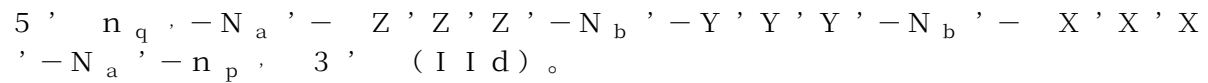
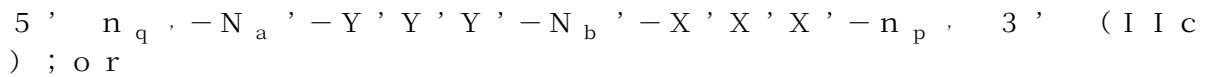
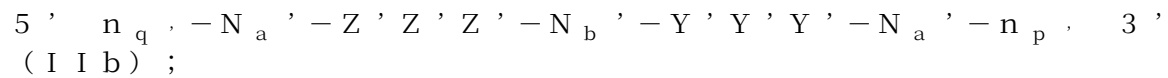
30

40

50

か、またはkおよびlの両方が1である。

従って、アンチセンス鎖は以下の式で表され得る：



【0247】

アンチセンス鎖が式 (I I b) で表されるとき、 N_b' は、0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2または0個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a' は、それぞれ独立して、2-20、2-15、または2-10この修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。

【0248】

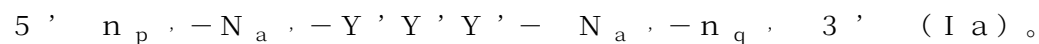
アンチセンス鎖が式 (I I c) で表されるとき、 N_b' は、0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2または0個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a' は、それぞれ独立して、2-20、2-15または2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。

【0249】

アンチセンス鎖が式 (I I d) で表されるとき、 N_b' は、それぞれ独立して、0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2または0個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a' は、それぞれ独立して、2-20、2-15または2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5または6である。

【0250】

他の態様において、kは0であり、lは0であり、アンチセンス鎖は以下の式で表され得る：



【0251】

アンチセンス鎖が式 (I I a) で表されるとき、 N_a' は、それぞれ独立して、2-20、2-15または2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。

X' 、 Y' および Z' はそれぞれ、互いに同じかまたは異なっていてよい。

【0252】

センス鎖およびアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、独立して、LNA、CRN、UNA、cEt、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-ヒドロキシル、または2'-フルオロで修飾されていてよい。例えば、センス鎖およびアンチセンス鎖のヌクレオチドは、それぞれ独立して、2'-O-メチルまたは2'-フルオロで修飾される。 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' および Z' はそれぞれ、特に、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾を示し得る。

【0253】

一態様において、RNAi薬のセンス鎖は、二本鎖領域が21塩基であるとき、5'末端から、位置1のヌクレオチドから数えて、または、要すれば、5'末端から、二本鎖領域内の位置1の対になったヌクレオチドから数えて、鎖の位置9、10および11に生じるYYYモチーフを含んでいてよく、ここで、Yは2'-F修飾である。センス鎖は、二本鎖領域の反対の末端にウイング修飾としてXXXモチーフまたはZZZモチーフをさらに含んでいてよく、ここで、XXXおよびZZZは、それぞれ独立して、2'-OMe修飾または2'-F修飾を示す。

【0254】

一態様において、アンチセンス鎖は、5'末端から、位置1のヌクレオチドから数えて

、または、要すれば、5'末端から、二本鎖領域内の位置1の対になったヌクレオチドから数えて、鎖の位置11、12、13に生じるY'Y'Y'モチーフを含んでいてよく、ここで、Y'は、2'-O-メチル修飾を示す。アンチセンス鎖は、二本鎖領域の反対の末端にウイング修飾としてX'X'X'モチーフまたはZ'Z'Z'モチーフをさらに含んでいてよく、ここで、X'X'X'およびZ'Z'Z'は、それぞれ独立して、2'-OMe修飾または2'-F修飾を示す。

【0255】

上記の式(Ia)、(Ib)、(Ic)および(Id)のいずれかで示されるセンス鎖は、それぞれ式(IIa)、(IIb)、(IIc)および(IId)のいずれか1つで示されるアンチセンス鎖と共に二本鎖を形成する。

10

【0256】

従って、本発明の方法において使用するためのRNAi薬は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含んでいてよく、各鎖は14から30ヌクレオチドを有し、RNAi二本鎖は、以下の式(III)で表される：

センス：5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'
 アンチセンス：3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5'
 (III)

式中：

20

i、j、kおよびlは、それぞれ独立して、0または1であり；

p、p'、qおよびq'は、それぞれ独立して、0-6であり；

N_aおよびN_a'は、それぞれ独立して、0-25個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み；

N_bおよびN_b'は、それぞれ独立して、0-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示し；

ここで、n_p'、n_p、n_q'およびn_qは（それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい）、それぞれ独立して、オーバーハングヌクレオチドを示し；そして

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'およびZ'Z'Z'は、それぞれ独立して、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを示す。

30

【0257】

一態様において、iは0であり、jは0であるか；または、iは1であり、jは0であるか；または、iは0であり、jは1であるか；またはiおよびjの両方は0であるか；またはiおよびjの両方は1である。別の態様において、kは0であり、lは0であるか；または、kは1であり、lは0であるか；kは0であり、lは1であるか；または、kおよびlの両方は0であるか；または、kおよびlの両方は1である。

【0258】

RNAi二本鎖を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖の組み合わせの例には、以下の式が含まれる：

5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q 3' (IIIa)
 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'
 5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (IIIb)
 3' n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q' 5'
 5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3' (IIIc)
 3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'
 5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (IIId)
 3' n_p'-N_a'-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a-n_q 5'

40

50

【0259】

RNA i 葉が式 (I I I a) で示されるとき、 N_a は、それぞれ独立して、2-20、2-15または2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。

【0260】

RNA i 葉が式 (I I I b) で示されるとき、 N_b は、それぞれ独立して、1-10、1-7、1-5または1-4個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a は、それぞれ独立して、2-20、2-15または2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。

【0261】

RNA i 葉が式 (I I I c) で示されるとき、 N_b 、 N_b' は、それぞれ独立して、0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2または0個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a は、それぞれ独立して、2-20、2-15、または2-10修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。

【0262】

RNA i 葉が式 (I I I d) で示されるとき、 N_b 、 N_b' は、それぞれ独立して、0-10、0-7、0-10、0-7、0-5、0-4、0-2または0個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a 、 N_a' は、それぞれ独立して、2-20、2-15、または2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を示す。 N_a 、 N_a' 、 N_b および N_b' は、それぞれ独立して、代替パターンの修飾を含む。

【0263】

式 (I I I)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I c) および (I I I d) 中の X、Y および Z はそれぞれ、互いに同じであるか、または異なっている。

【0264】

RNA i 葉が、式 (I I I)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I c) および (I I I d) で示されるとき、Yヌクレオチドの少なくとも1つはY'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成してよい。あるいは、Yヌクレオチドの少なくとも2つは、対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成するか；または、Yヌクレオチドの3つすべては、対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0265】

RNA i 葉が式 (I I I b) または (I I I d) で表されるとき、Zヌクレオチドの少なくとも1つは、Z'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成してよい。あるいは、Zヌクレオチドの少なくとも2つは、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成するか；または、3つすべてのZヌクレオチドは全て、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0266】

RNA i 葉が式 (I I I c) または (I I I d) で表されるとき、Xヌクレオチドの少なくとも1つは、X'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成してよい。あるいは、Xヌクレオチドの少なくとも2つは、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成するか；または、3つ全てのXヌクレオチドは全て、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0267】

一態様において、Yヌクレオチドの修飾は、Y'ヌクレオチドの修飾とは異なり、Zヌクレオチドの修飾は、Z'ヌクレオチドの修飾とは異なり、および／またはXヌクレオチドの修飾は、X'ヌクレオチドの修飾とは異なる。

【0268】

一態様において、RNA i 葉が式 (I I I d) で表されるとき、 N_a 修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾である。別の態様において、RNA i 葉が式 (I I I d) で表されるとき、 N_a 修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、そして少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合している。さらに別の態様において、RNA i 葉が式 (I I I d) で表されるとき、 N_a 修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修

10

20

30

40

50

飾であり、 $n_p' > 0$ であり、そして少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、かつセンス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して1つまたはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成している（下記）。別の態様において、RNAi薬が式（IIId）で表されるとき、 N_a 修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、そして少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、センス鎖は少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、そしてセンス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して1つまたはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成している。

【0269】

10

一態様において、RNAi薬が式（II Ia）で表されるとき、 N_a 修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、そして少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、センス鎖は少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、そしてセンス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して1つまたはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成している。

【0270】

一態様において、RNAi薬は、式（III）、（III a）、（III b）、（III c）および（III d）で表される少なくとも2つの二本鎖を含む多量体であり、ここで、該二本鎖はリンカーにより連結されている。リンカーは、切断可能であるか、または切断不可能である。要すれば、多量体は、リガンドをさらに含む。二本鎖のそれぞれは、同じ遺伝子または2つの異なる遺伝子を標的とし得るか；または、二本鎖のそれぞれは、2つの異なる標的部位にて同じ遺伝子を標的とし得る。

20

【0271】

一態様において、RNAi薬は、式（III）、（III a）、（III b）、（III c）および（III d）で表される、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の二本鎖を含む多量体であり、ここで、該二本鎖は、リンカーにより連結されている。リンカーは、切断可能であるか、または切断不可能である。要すれば、多量体は、リガンドをさらに含む。二本鎖のそれぞれは、同じ遺伝子または2つの異なる遺伝子を標的とし得るか；または、二本鎖のそれぞれは、2つの異なる標的部位にて同じ遺伝子を標的とし得る。

30

【0272】

一態様において、式（III）、（III a）、（III b）、（III c）および（III d）で表される2つのRNAi薬は、5'末端および3'末端の一方または両方の端部で互いに結合しており、要すればリガンドと複合体を形成している。各薬剤は、同じ遺伝子または2つの異なる遺伝子を標的とし得るか；または、各薬剤は、2つの異なる標的部位にて同じ遺伝子を標的とし得る。

【0273】

種々の文献が、本発明の方法に使用することができる多量体RNAi薬を記載している。かかる文献としては、WO2007/091269、米国特許第7858769号、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887およびWO2011/031520（それらの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が挙げられる。

40

【0274】

以下により詳しく記載するように、RNAi薬に1つまたは複数の炭水化物部分を結合させて含むRNAi薬は、該RNAi薬の1つまたは複数の特性を最適化することができる。多くの場合に、炭水化物部分は、RNAi薬の修飾サブユニットに結合され得る。例えば、dsRNA薬の1つまたはそれ以上のリボヌクレオチドサブユニットのリボース糖は、別の部分、例えば、炭水化物リガンドが結合された非炭水化物（好ましくは、環状）担体で置換され得る。サブユニットのリボース糖がそのように置換されているリボヌクレオチドサブユニットは、本明細書中、リボース置換修飾サブユニット（RRMS）と言う

50

。環状担体は、炭素環式環系であってよく、すなわち、全ての環原子が炭素原子であるか、またはヘテロ環式環系であってよく、すなわち、1個または複数の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、硫黄であってよい。環状担体は、単環式環系であってよい、または2つもしくは複数の環を含んでいてよく、例えば縮合環であってよい。環状担体は、完全に飽和した環系であってよく、またはそれは、1つまたは複数の二重結合を含んでいてよい。

【0275】

リガンドは、担体を仲介してポリヌクレオチドに結合されていてよい。担体は、(i) 少なくとも1つの“骨格結合点”、好ましくは、2個の“骨格結合点”、および(ii) 少なくとも1つの“テザリング(tethering)結合点”を含む。本明細書で用いる“骨格結合点”は、官能基、例えばヒドロキシル基を意味するか、または一般的に、骨格への担体の組み込み利用可能な結合、およびそれに適するもの、例えば、リボ核酸の、リン酸エステル、または修飾リン酸、例えば、硫黄含有骨格を意味する。ある態様において、“テザリング結合点”(TAP)は、選択された部分を結合する、環状担体、例えば、炭素原子またはヘテロ原子(骨格結合点を提供する原子とは異なる)の構成環原子を意味する。該部分は、例えば、炭水化物、例えば単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖および多糖類であり得る。要すれば、選択された部分は、環状担体に介在テザーによって連結されている。従って、環状担体は、官能基、例えばアミノ基を含むことが多い、または一般的に、構成環への別の化合物、例えば、リガンドの組み込みまたはテザリングに適する結合を提供する。

【0276】

RNA i薬は、担体を介してリガンドに連結されてよく、ここで、担体は、環状基または非環式基であってよい。好ましくは、環状基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1, 3] ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフリルおよびデカリンから選択される。好ましくは、非環式基は、セリノール骨格またはジエタノールアミン骨格から選択される。

【0277】

任意の特定の態様において、本発明の方法に使用するためのRNA i薬は、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つに記載の薬剤の群から選択される薬剤である。これらの薬剤は、リガンドをさらに含んでいてよい。

【0278】

IV. リガンド共役 iRNA

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

パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237) ; またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937) が挙げられるが、これに限定されない。

【0279】

一態様において、リガンドは、それが組み込まれた iRNA 薬の分布、標的化または寿命を変化させる。好ましい態様において、リガンドは、例えばこのようなりガンドが不在である化学種と比較して、例えば分子、細胞または細胞型、例えば細胞内または臓器内区画などの区画、身体の組織または臓器または領域などの選択された標的に対する改善された親和性を提供する。好ましいリガンドは、二本鎖核酸中の二本鎖対合形成に加わらない。

10

【0280】

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

20

【0281】

リガンドはまた、例えば、腎細胞などの特定の細胞タイプに結合するターゲティング基 (targeting group)、例えば、細胞または組織標的化剤、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば、抗体を含み得る。ターゲティング基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性プロテインA、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビタミンA、ビオチン、またはRGDペプチドまたはRGDペプチド模倣体であり得る。

30

【0282】

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

40

50

リアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカ、酵素、ハプテン（例えばビオチン）、輸送／吸収促進薬（例えばアスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えばイミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾール複合体、テトラアザ大環状化合物のEu³⁺複合体）、ジニトロフェニル、HRP、またはAPが挙げられる。

【0283】

リガンドは、例えば糖タンパク質などのタンパク質；または例えば共リガンドに特異的親和性を有する分子などのペプチド；または例えば肝臓細胞などの特定の細胞タイプに結合する抗体などの抗体であり得る。リガンドはまた、ホルモンおよびホルモン受容体を含んでもよい。それらはまた、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、または多価フコースなどの非ペプチド化学種を含み得る。リガンドは、例えばリボ多糖、p38 MAPキナーゼアクティベーター、またはNF-κBのアクティベーターであり得る。

10

【0284】

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

20

【0285】

ある態様において、本明細書に記載されるiRNAに付着するリガンドは、薬物動態学的モジュレーター（PKモジュレーター）として作用する。PKモジュレーターとしては、親油性物質、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類縁体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミンなどが挙げられる。例示的なPKモジュレーターとしては、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられるが、これらに限定されない。多数のホスホロチオエート結合を含んでなるオリゴヌクレオチドもまた、血清タンパク質に結合することが知られており、従って、例えば、主鎖中に複数のホスホロチオエート結合を含んでなる、約5塩基、10塩基、15塩基、または20塩基のオリゴヌクレオチドなどの短鎖オリゴヌクレオチドもまた、リガンドとして（例えばPK調節リガンドとして）本発明に適している。これに加えて、血清成分（例えば血清タンパク質）に結合するアプタマーもまた、本明細書に記載される態様において、PK調節リガンドとして使用するのに適する。

30

【0286】

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

40

【0287】

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

【0288】

本発明のリガンド共役オリゴヌクレオチド、およびリガンド分子を含有する配列特異的

50

結合ヌクレオシドにおいて、オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオシドは、標準ヌクレオチドまたはヌクレオシド前駆体、または既に結合部分を含有するヌクレオチドまたはヌクレオシド複合体前駆体、既にリガンド分子を保有するリガンドーヌクレオチドまたはヌクレオシドー複合体前駆体、または非ヌクレオシドリガンドを含有する構成要素を利用して、好適なDNA合成機上で組み立ててよい。

【0289】

既に結合部分を有するヌクレオチド複合体前駆体を使用する場合、配列特異的結合ヌクレオシドの合成は一般的に完了し、次にリガンド分子を結合部分と反応させて、リガンド共役オリゴヌクレオチドを形成する。ある態様において、本発明のオリゴヌクレオチドまたは結合ヌクレオシドは、市販されており、常套的にオリゴヌクレオチド合成で使用される、標準ホスホラミダイトおよび非標準ホスホラミダイトに加えて、リガンドーヌクレオシド複合体から誘導されるホスホラミダイトを使用して、自動合成装置によって合成される。

10

【0290】

A. 脂質複合体

一態様において、リガンドまたは複合体は、脂質または脂質ベースの分子である。このような脂質または脂質ベースの分子は、好ましくは、例えばヒト血清アルブミン(HSA)などの血清タンパク質と結合する。HSA結合リガンドは、例えば身体の方腎臓標的組織などの標的組織への複合体の分布を可能にする。例えば標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であり得る。HSAに結合し得る他の分子もまた、リガンドとして使用できる。例えばナプロキセンまたはアスピリンが使用できる。脂質または脂質ベースのリガンドは、(a)複合体の分解抵抗性を増大させ得て、(b)標的細胞または細胞膜の標的化またはそれへの輸送を増大させ得て、および/または(c)例えばHSAなどの血清タンパク質の結合を調節するのに使用できる。

20

【0291】

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

30

【0292】

好ましい態様において、脂質ベースのリガンドはHSAに結合する。好ましくは、それは、複合体が好ましくは非腎臓組織に分布するように、十分な親和性でHSAと結合する。しかしながら、親和性は、HSAリガンド結合が逆転され得ない程度にまで、強力ではないことが好ましい。

【0293】

別の好ましい態様において、複合体が好ましくは腎臓に分布するように、脂質ベースのリガンドは、HSAと弱く結合し、または全く結合しない。腎臓細胞を標的とするその他の部分もまた、脂質ベースのリガンドに代えて、またはそれに加えて使用できる。

【0294】

別の面において、リガンドは、例えば増殖細胞などの標的細胞により取り込まれるビタミンなどの部分である。これらは、例えば癌細胞などの悪性または非悪性型などの望ましくない細胞増殖によって特徴付けられる障害を処置するのに、特に有用である。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E、およびKが挙げられる。その他の例示的なビタミンとしては、例えば葉酸、B12、リボフラビン、ビオチン、ピリドキサルなどのBビタミン、または肝臓細胞などの標的細胞により取り込まれるその他のビタミン類または栄養素が挙げられる。また、HSAおよび低密度リポタンパク質(LDL)も挙げられる。

40

【0295】

B. 細胞透過剤

別の面において、リガンドは細胞透過剤であり、好ましくはヘリカル(helical)細胞

50

透過剤である。好ましくは、該薬剤は両親媒性である。例示的な薬剤は、t a tまたはアンテナペディア (a n t e n n o p e d i a) などのペプチドである。該薬剤がペプチドであるとき、それはペプチジル模倣薬、逆転異性体、非ペプチドまたはシュードーペプチド結合、およびD-アミノ酸の使用を含む、修飾を受け得る。ヘリカル剤は、好ましくは親油性相および疎油性相を有する α -ヘリカル剤である。

【0296】

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

【0297】

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

【0298】

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

【0299】

“細胞透過性ペプチド”は、例えば細菌または真菌細胞などの微生物細胞、またはヒト細胞などの哺乳動物細胞などの細胞に浸透できる。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば α -ヘリカル直鎖ペプチド（例えばLL-37またはセクロピン(Ceropin)P1）、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば α -デフェンシン、 β -デフェンシンまたはバクテネシン）、または1つもしくは2つの主要アミノ酸のみを含有するペプチド（例えばPR-39またはインドリシジン）であり得る。細胞透過性ペプチドはまた、核局在化シグナル(NLS)を含み得る。例えば、細胞透過性ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメインおよびSV40大型T抗原のNLSに由来する、MPGなどの二分(bipartite)両親媒性ペプチドであり得る(Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2

717-2724, 2003)。

【0300】

C. 炭水化物複合体

本発明の組成物および方法のいくつかの態様において、iRNAオリゴヌクレオチドは、炭水化物をさらに含んでなる。炭水化物共役iRNAは、本明細書に記載の通り、核酸ならびにインビボ治療用途に適する組成物のインビボ送達に有利である。本明細書で用いる“炭水化物”は、各炭素原子に結合する酸素、窒素または硫黄原子を含む少なくとも6個の炭素原子（直鎖、分枝または環状であり得る）を有する、1つまたは複数の単糖単位で構成される炭水化物自体；または、各炭素原子に結合する酸素、窒素またはイオウ原子を含む少なくとも6個の炭素原子（直鎖、分枝または環状であり得る）をそれぞれ有する、1つまたは複数の単糖単位で構成される炭水化物部分をその一部として有する化合物のいずれかである化合物を意味する。代表的な炭水化物としては、糖類（単糖類、二糖類、三糖類、および約4、5、6、7、8、または9個の単糖単位を含有するオリゴ糖類）、およびデンプン、グリコーゲン、セルロース、および多糖類ガムなどの多糖類が挙げられる。特定の単糖類としては、AGTおよび上記（例えば、AGT、C6、C7、またはC8）の糖類が挙げられ；二および三糖類としては、2または3個の単糖単位を有する糖類（例えばC5、C6、C7、またはC8）が挙げられる。

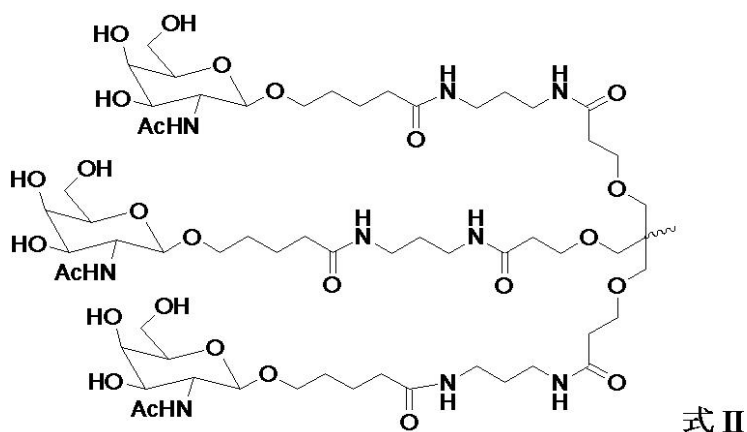
10

【0301】

一態様において、本発明の組成物および方法で使用される炭水化物複合体は単糖である。一態様において、単糖は、式II

20

【化3】



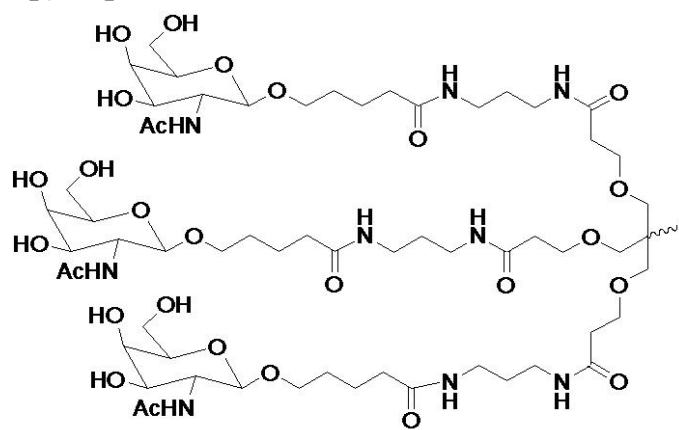
30

で示されるような、N-アセチルガラクトサミンである。

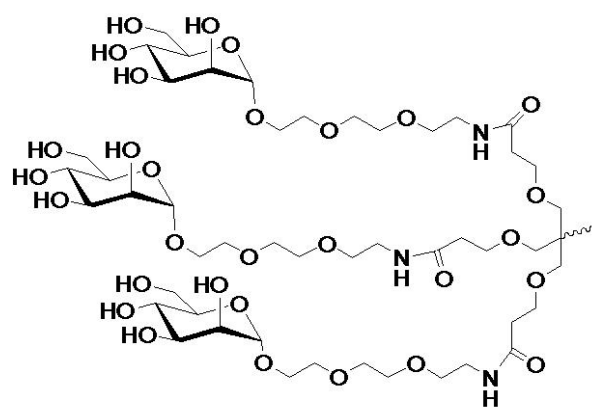
【0302】

別の態様において、本発明の組成物および方法で使用される炭水化物複合体は、以下からなる群より選択される。

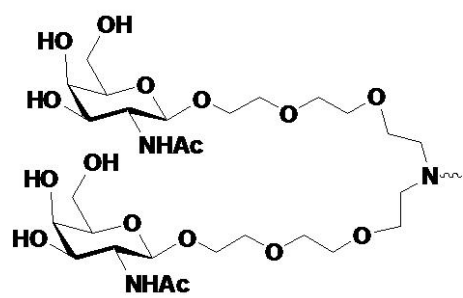
【化 4】



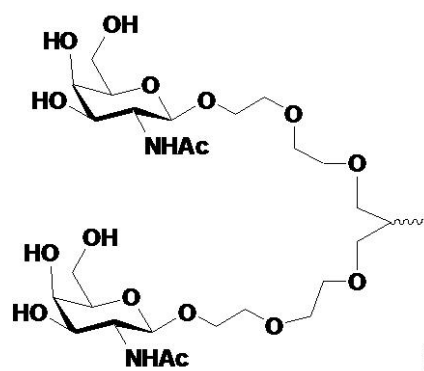
式 II,



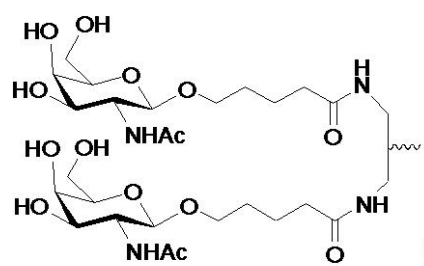
式 III,



式 IV,



式 V,



式 VI,

10

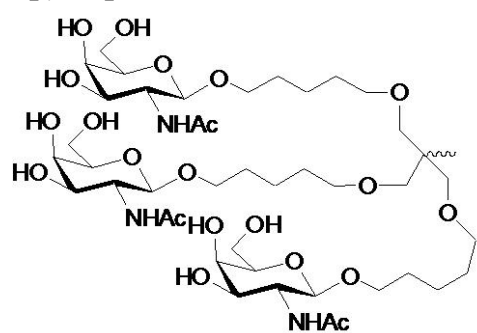
20

30

40

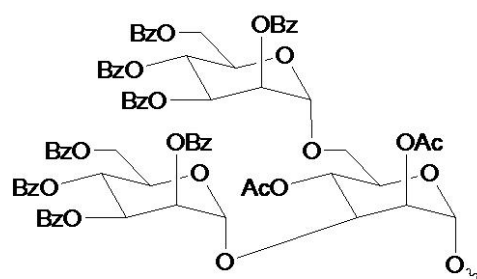
50

【化 5】

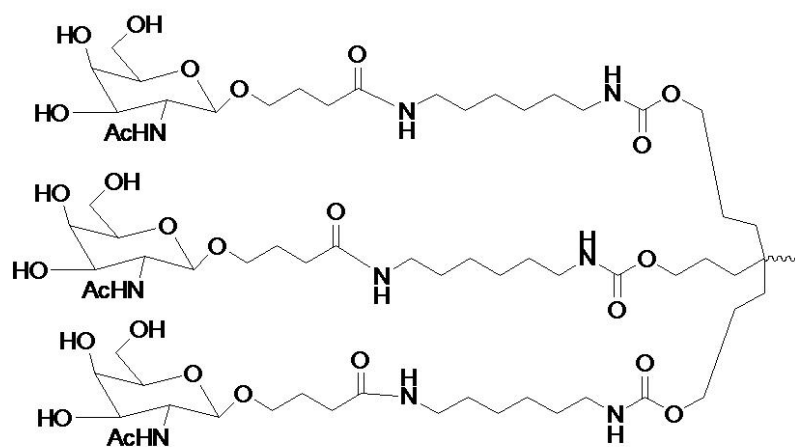


式 VII,

10

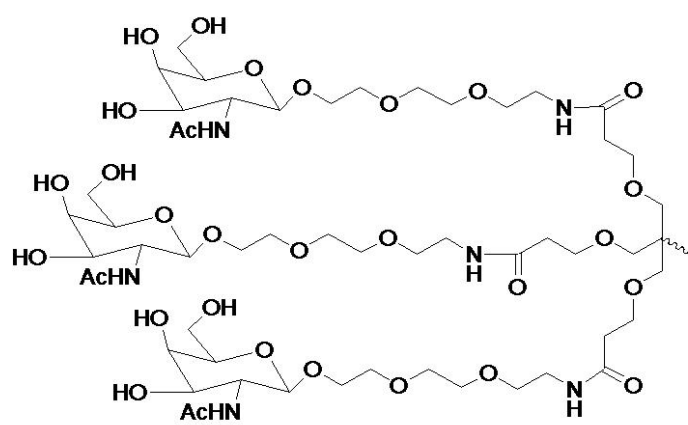


式 VIII,



式 IX,

20



式 X,

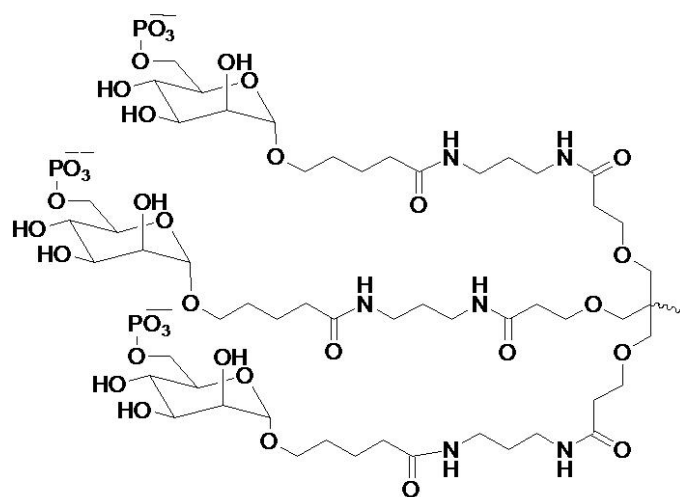
30

40

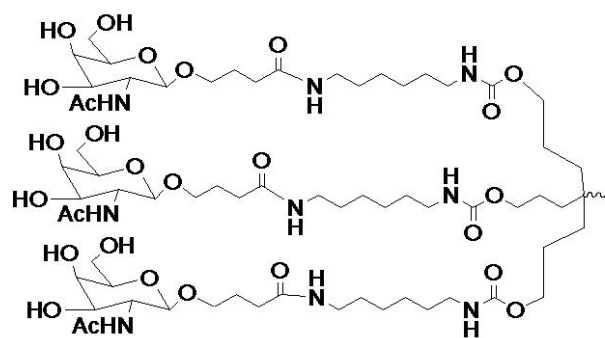
【 0 3 0 3 】

The chemical structure shows a branched polyether dendron. It consists of three glucose units, each with a phosphate group (PO₃⁻) attached to its C6 position. The glucose units are linked via their C1 positions to a central polyether chain. This chain is composed of repeating units of 2,2,5-trimethyl-1,3-dioxane-5,6-diol, which are connected by ether linkages. The terminal hydroxyl groups of the polyether chain are esterified with a long-chain fatty acid, specifically 1-octadecanoic acid, which is shown as a zigzag line. The overall structure is a highly branched, flexible molecule with multiple hydrophilic (glucose and phosphate) and hydrophobic (fatty acid) regions.

10

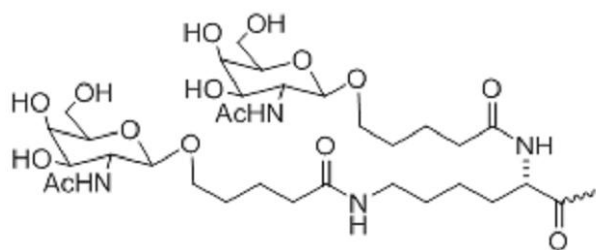


20

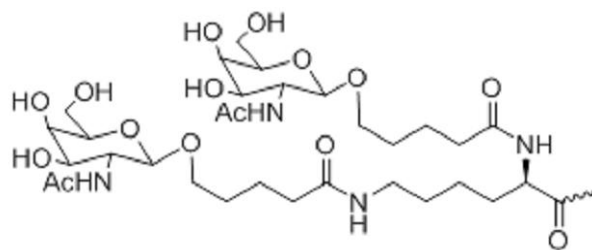


30

【化 7】



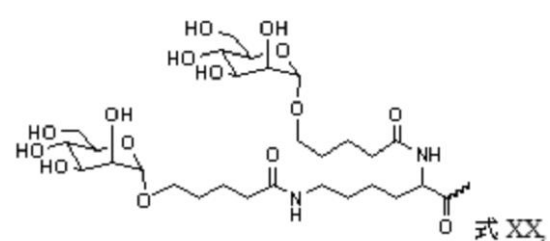
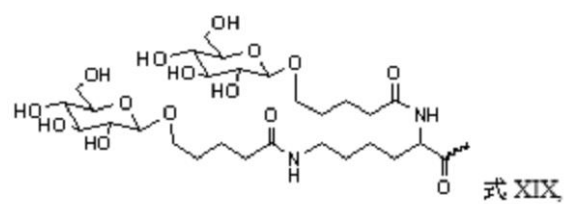
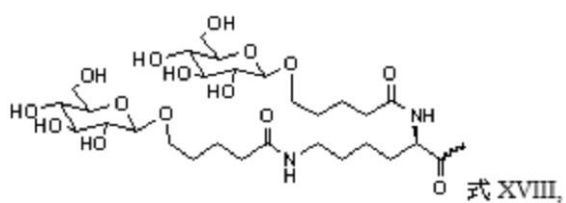
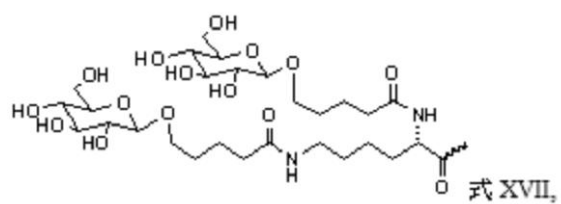
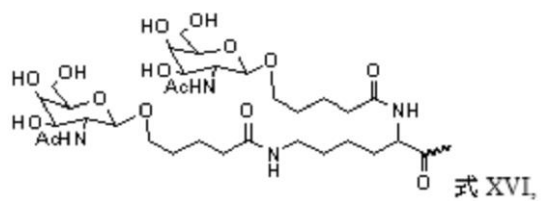
式 XIV,



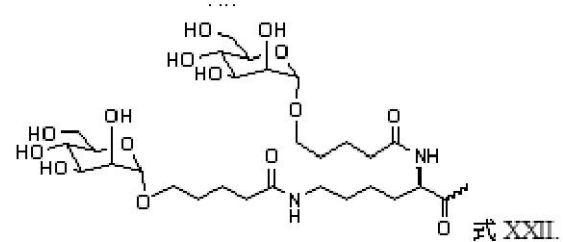
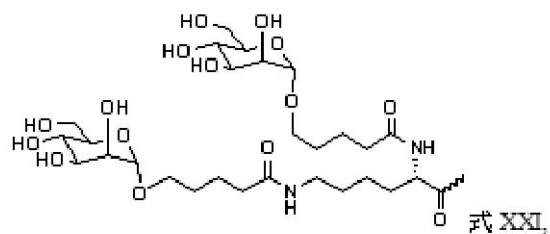
式 XV,

【 0 3 0 4 】

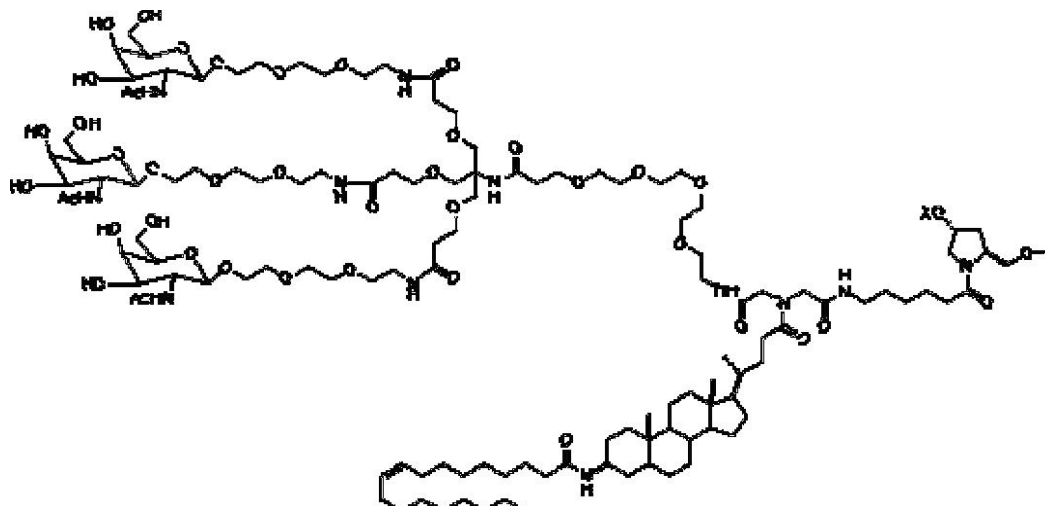
【化 8】



【化 9】



本明細書に記載される態様で使用するための別の代表的な炭水化物複合体としては、
【化10】



10

(式XXII)

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

【0306】

20

ある態様において、炭水化物複合体は、PKモジュレーターおよび／または細胞透過性ペプチドなどであるが、これに限定されない、上記の1つまたは複数の追加リガンドをさらに含んでなる。

【0307】

本発明の使用に適するさらなる炭水化物複合体（およびリンカー）としては、PCT公開WO2014/179620およびWO2014/179627（その内容全体は、引用により本明細書中に包含される）に記載のものが挙げられる。

【0308】

D. リンカー

ある態様において、本明細書に記載される複合体またはリガンドは、切断可能または切断不可能であり得る、種々のリンカーによって、iRNAオリゴヌクレオチドに結合され得る。

30

【0309】

用語“リンカー”または“連結基”という用語は、例えば化合物の2つの部分に共有結合するなどの、化合物の2つの部分を結合する有機部分を意味する。リンカーは、一般的に、直接結合、または酸素もしくは硫黄などの原子、NR₈、C(O)、C(O)NH、SO、SO₂、SO₂NHなどの単位、または置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル（alkylheterocyclylalkynyl）、アルケ

40

50

ニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリアル、アルケニルアリアル、アルキニルアリアル、アルキルヘテロアリアル、アルケニルヘテロアリアル、アルキニルヘテロアリアルなどであるが、これらに限定されない原子鎖を含んでなり、その1つまたは複数のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R₈)、C(O)、置換または非置換アリアル、置換または非置換ヘテロアリアル、置換または非置換ヘテロ環（ここで、R₈は水素、アシル、脂肪族または置換脂肪族である）によって中断されまたは終結され得る。一態様において、リンカーは、約1～24個の原子、2～24個の原子、3～24個の原子、4～24個の原子、5～24個の原子、6～24個の原子、6～18個の原子、7～18個の原子、7～17この原子、8～17個の原子、6～16個の原子、7～16個の原子、または、8～16個の原子である。

10

【0310】

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

20

【0311】

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

30

【0312】

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

【0313】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能な切断可能連結基を含み得る。リンカーに組み込まれる切断可能連結基のタイプは、標的とされる細胞に左右され得る。例えば肝臓を標的化するリガンドは、エステル基を含むリンカーを通じてカチオン性脂質に連結し得る。肝臓細胞はエステラーゼに富み、したがってリンカーは、エステラーゼが豊富でない細胞型よりも、肝臓細胞中でより効率的に切断される。エステラーゼに富む他の細胞型としては、肺、腎皮質、および精巣の細胞が挙げられる。

40

【0314】

ペプチド結合を含有するリンカーは、肝臓細胞および滑膜細胞などのペプチダーゼに富む細胞型を標的化する際に使用され得る。

【0315】

一般的に、切断可能連結基の候補の適合性は、候補連結基を切断する分解性物質（または条件）の能力を試験することで評価し得る。切断可能連結基の候補は、血中において、

50

またはその他の非標的組織との接触時に、切断に抵抗する能力についてもまた試験することもまた望ましい。従って、第1の条件が標的細胞中での切断を示すように選択され、第2の条件がその他の組織または例えば血液もしくは血清などの生体液中での切断を示すように選択される場合、第1および第2の条件間の切断の相対的感受性を決定し得る。評価は、無細胞系中、細胞中、細胞培養中、臓器または組織培養中、または全身の動物中で実施し得る。無細胞または培養条件で最初の評価を行い、全身の動物中でのさらなる評価によって確認することが有用なこともあり得る。好ましい態様において、有用な候補化合物は、血液または血清（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、細胞中（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）で、少なくとも約2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100倍より迅速に切断される。

10

【0316】

i. 酸化還元切断可能連結基

一態様において、切断可能連結基は、還元または酸化に際して切断される酸化還元切断可能連結基である。還元的切断可能連結基の一例は、ジスルフィド連結基（ $-S-S-$ ）である。切断可能連結基候補が、好適な“還元的切断可能連結基”か、または例えば特定のiRNA部分および特定の標的化合物と共に使用するのに適するかどうかを決定するために、当業者は、本明細書に記載される方法に頼ることができる。例えば候補は、例えば標的細胞などの細胞中で観察される切断速度を模倣する、当技術分野で公知の試薬を使用して、ジチオスレイトール（DTT）、またはその他の還元剤とのインキュベーションによって評価し得る。候補はまた、血液または血清条件を模倣するように選択される条件下で評価し得る。1つの候補化合物は、血中で最大で約10%切断される。他の態様において、有用な候補化合物は、血液（または細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、細胞中（または細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）で、少なくとも約2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90または約100倍より迅速に分解される。候補化合物の切断速度は、細胞内媒体を模倣するように選択された条件下で標準酵素動態アッセイを使用して、細胞外媒体を模倣するように選択された条件と比較して決定され得る。

20

【0317】

i i. リン酸ベースの切断可能連結基

別の態様において、切断可能なリンカーは、リン酸ベースの切断可能連結基を含んでなる。リン酸ベースの切断可能連結基は、リン酸基を分解または加水分解する物質によって切断され得る。細胞中でリン酸基を切断する物質の一例は、細胞内のホスファターゼなどの酵素である。リン酸ベースの連結基の例は、 $-O-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(SR_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-S-$ である。好ましい態様は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(SH)-O-$ 、 $-S-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(OH)-S-$ 、 $-S-P(O)(OH)-S-$ 、 $-O-P(S)(OH)-S-$ 、 $-S-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(H)-O-$ 、 $-O-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-O-$ 、 $-S-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-S-$ 、 $-O-P(S)(H)-S-$ である。好ましい態様は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ である。これらの候補は、上記のものと類似の方法を用いて評価し得る。

30

40

【0318】

i i i. 酸切断可能連結基

別の態様において、切断可能なリンカーは、酸切断可能連結基を含んでなる。酸切断可能連結基は、酸性条件下で切断される連結基である。好ましい態様において、酸切断可能

50

連結基は、約 6.5 以下（例えば、約 6.0、5.75、5.5、5.25、5.0 以下）の pH の酸性環境内において、または一般酸として作用し得る酵素などの物質によって切断される。細胞内では、エンドソームおよびリソソームなどの特定の低 pH 細胞小器官が、酸切断可能連結基の切断環境を提供し得る。酸切断可能連結基の例としては、ヒドラゾン、エステル、およびアミノ酸エステルが挙げられるが、これらに限定されない。酸切断可能基は、一般式 $-C=NN-$ 、 $C(O)O$ 、または $-OC(O)$ を有し得る。好ましい態様は、炭素がエステルの酸素に結合する場合（アルコキシ基）は、アリール基、置換アルキル基、またはジメチルペンチルまたはトープチルなどの三級アルキル基である。これらの候補は、上記のものと類似の方法を使用して評価し得る。

【0319】

10

i v. エステルベースの連結基

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

【0320】

v. ペプチドベースの切断基

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

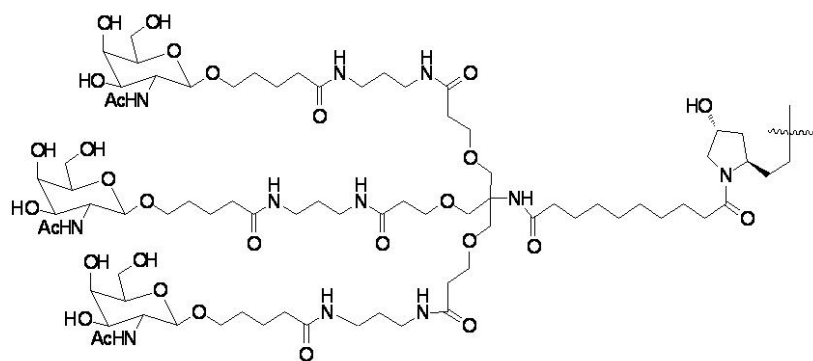
20

30

【0321】

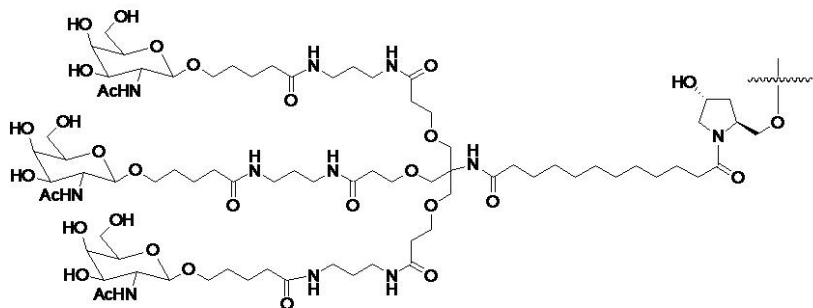
一態様において、本発明の iRNA は、リンカーを通じて炭水化物と共役する。本発明の組成物および方法のリンカーと共役する iRNA 炭水化物の非限定的例としては、以下

【化 1 1】



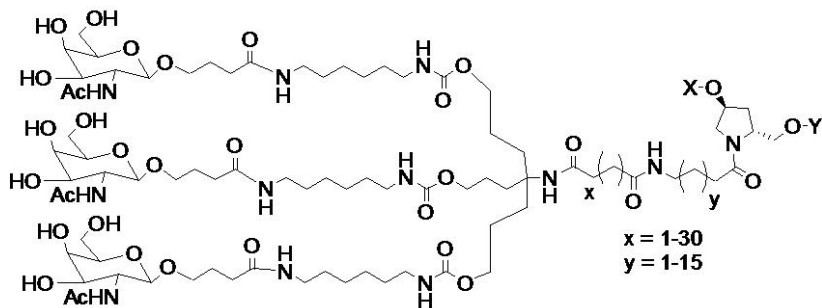
(式 XXIV),

10



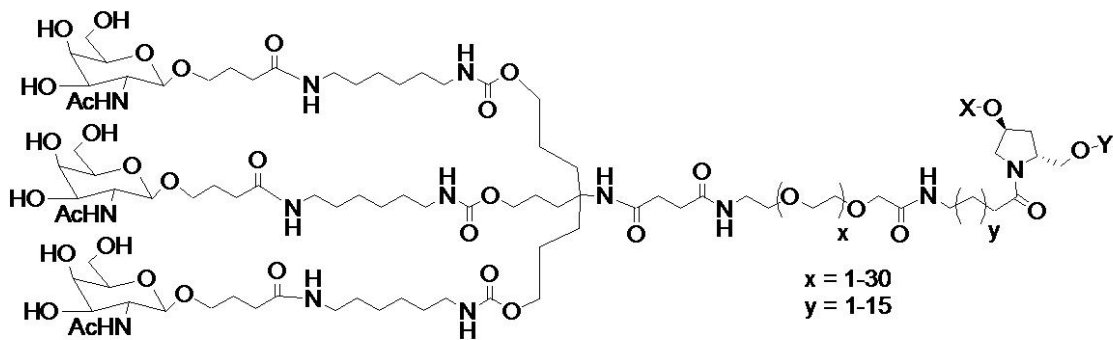
(式 XXV),

20



(式 XXVI),

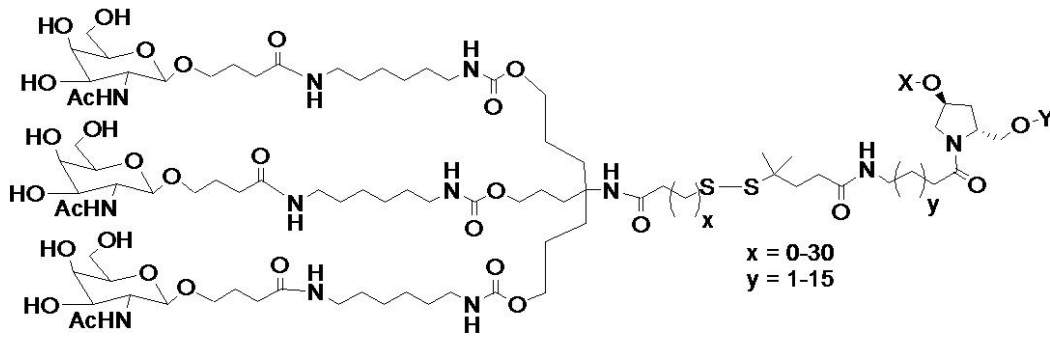
30



(式 XXVII),

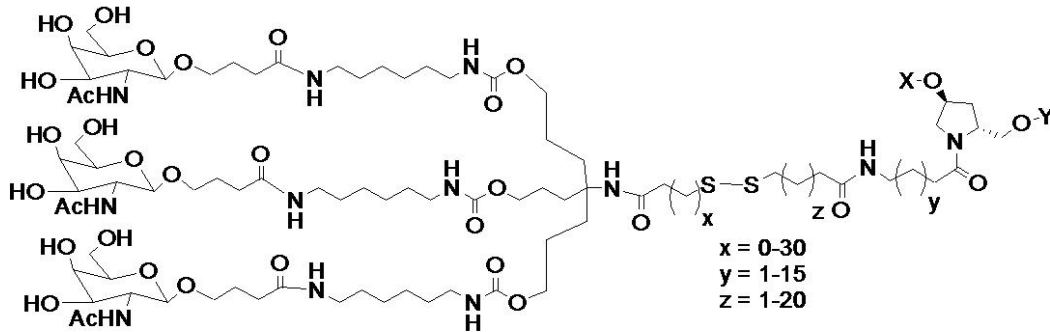
40

【化 1 2】



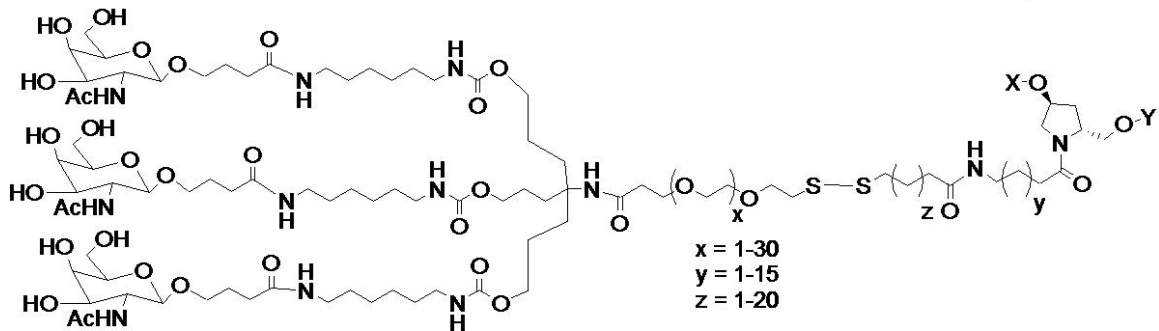
10

(式 XXVIII),



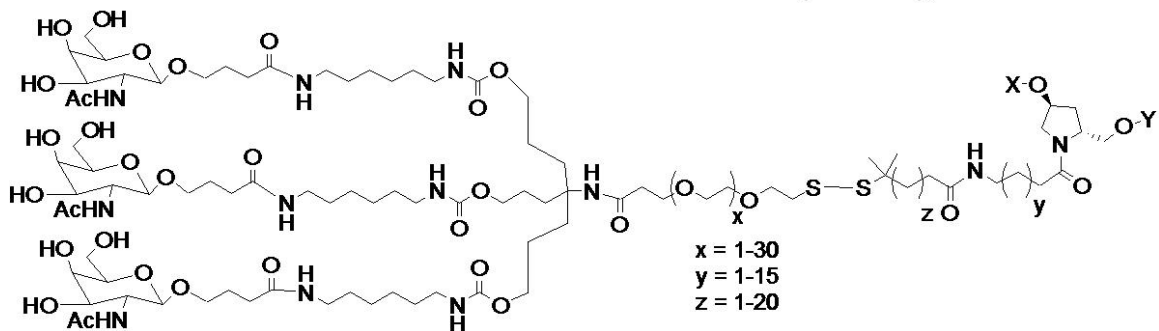
20

(式 XXIX),



30

(式 XXX), および



40

(式 XXXI),

(式中、XまたはYの一方はオリゴヌクレオチドであり、他方は水素である)
が挙げられるが、これらに限定されない。

【0322】

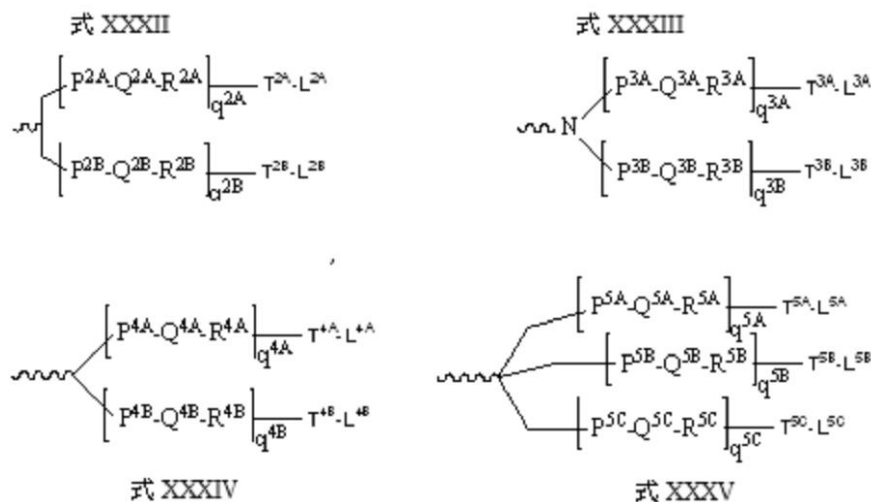
本発明の組成物および方法の任意の態様において、リガンドは、二価または三価の分枝リンカーを介して結合する1つまたは複数の“GalNAc”（N-アセチルガラクトサミン）誘導体である。

【0323】

一態様において、本発明のdsRNAは、以下の式(XXXII)～(XXXV)、

50

【化 1 3】



10

(式中、

q^{2A}、q^{2B}、q^{3A}、q^{3B}、q^{4A}、q^{4B}、q^{5A}、q^{5B}、および q^{5C}は、独立して、それぞれ 0～20 の出現を表し、反復単位は、同一であるかまたは異なってよく；

20

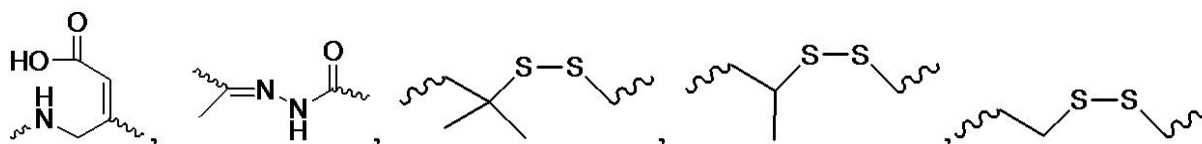
P^{2A}、P^{2B}、P^{3A}、P^{3B}、P^{4A}、P^{4B}、P^{5A}、P^{5B}、P^{5C}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C}は、各出現についてそれぞれ独立して、不在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NHまたはCH₂Oであり；

Q^{2A}、Q^{2B}、Q^{3A}、Q^{3B}、Q^{4A}、Q^{4B}、Q^{5A}、Q^{5B}、Q^{5C}は、各出現についてそれぞれ独立して、不在、アルキレン、置換アルキレンであり、1つまたは複数のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(RN)、C(R')=C(R'')、C≡CまたはC(O)の1つまたは複数によって中断または終結されてよく；

R^{2A}、R^{2B}、R^{3A}、R^{3B}、R^{4A}、R^{4B}、R^{5A}、R^{5B}、R^{5C}は、各出現についてそれぞれ独立して、不在、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

30

【化 1 4】

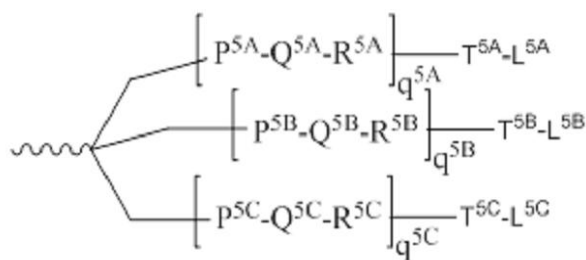


または、ヘテロシクリルであり；

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

40

【化 1 5】



式 XXXV

10

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

【0324】

GalNAc誘導体に共役する適切な二価および三価の分枝状リンカー基の例としては、式II、VII、XI、X、およびXIIIとして、上記の構造が挙げられるが、これらに限定されない。

【0325】

20

RNA複合体の調製を教示する、代表的な米国特許としては、米国特許第4,828,979号；同第4,948,882号；同第5,218,105号；同第5,525,465号；同第5,541,313号；同第5,545,730号；同第5,552,538号；同第5,578,717、5,580,731号；同第5,591,584号；同第5,109,124号；同第5,118,802号；同第5,138,045号；同第5,414,077号；同第5,486,603号；同第5,512,439号；同第5,578,718号；同第5,608,046号；同第4,587,044号；同第4,605,735号；同第4,667,025号；同第4,762,779号；同第4,789,737号；同第4,824,941号；同第4,835,263号；同第4,876,335号；同第4,904,582号；同第4,958,013号；同第5,082,830号；同第5,112,963号；同第5,214,136号；同第5,082,830号；同第5,112,963号；同第5,214,136号；同第5,245,022号；同第5,254,469号；同第5,258,506号；同第5,262,536号；同第5,272,250号；同第5,292,873号；同第5,317,098号；同第5,371,241、5,391,723号；同第5,416,203、5,451,463号；同第5,510,475号；同第5,512,667号；同第5,514,785号；同第5,565,552号；同第5,567,810号；同第5,574,142号；同第5,585,481号；同第5,587,371号；同第5,595,726号；同第5,597,696号；同第5,599,923号；同第5,599,928号および同第5,688,941号；同第6,294,664号；同第6,320,017号；同第6,576,752号；同第6,783,931号；同第6,900,297号；同第7,037,646号；同第8,106,022（それぞれの内容全体は、引用により本明細書中に包含される）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

40

【0326】

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

【0327】

“キメラ”iRNA化合物または“キメラ(chimeras)”は、本発明の文脈で、それぞれ少なくとも1つのモノマー単位から、すなわちdsRNA化合物の場合はヌクレオチドか

50

ら構成される、2つ以上の化学的に異なる領域を含有するiRNA化合物、好ましくはdsRNAである。これらのiRNAは、一般的に、iRNAに、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大、細胞内取り込みの増大、および／または標的核酸に対する結合親和性の増大を与えるようにRNAが修飾される、少なくとも1つの領域を含有する。iRNAの追加的な領域が、RNA:DNAハイブリッドまたはRNA:RNAハイブリッドを切断できる、酵素基質の役割を果たしてもよい。一例として、RNase Hは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。従って、RNase Hの活性化はRNA標的の切断をもたらし、それによって遺伝子発現のiRNA阻害効率を大幅に高める。その結果、同一標的領域とハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシdsRNAと比較して、キメラdsRNAが使用される場合、より短いiRNAによって、比較できる結果が得られることが多い。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動によって、そして必要ならば当技術分野で公知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって、常套的に検出し得る。

【0328】

場合によっては、iRNAのRNAは、非リガンド基によって修飾され得る。iRNAの活性、細胞分布または細胞内取り込みを高めるために、多数の非リガンド分子がiRNAに共役結合されており、このような共役結合を実施する手順は、学術文献で入手できる。このような非リガンド部分は、コレステロールなどの脂質部分(Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553)、コール酸(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053)、例えばヘキシル-S-トリチルチオールなどのチオエーテル(Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765)、チオコレステロール(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533)、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基などの脂肪族鎖(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49)、例えばジーヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1, 2-ジー-O-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-H-ホスホネートなどのリン脂質(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、パルミチル部分(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)を含む。このようなRNA複合体の調製を教示する代表的な米国特許は、上に列挙した。一般的な共役結合プロトコルは、配列の1つまたは複数の位置にアミノリンカーを有するRNAの合成を伴う。次に適当なカップリング剤または活性化試薬を使用して、アミノ基を共役結合する分子と反応させる。共役結合反応は、溶液相中で、RNAが固体支持体になおも結合する間に、またはRNAの切断に続いて実施することができる。HPLCによるRNA複合体の精製は、一般的に純粋な複合体を与える。

【0329】

V. 本発明のiRNAの送達

例えば、ヒト対象(例えば、アンジオテン関連疾患または状態を有する対象などの、それを必要とする対象)などの対象内の細胞などの細胞への本発明のiRNAの送達は、いくつかの異なる方法で達成し得る。例えば、送達は、インビトロまたはインビボのどちらかで、細胞を本発明のiRNAに接触させることで実施してもよい。インビボ送達はまた、例えばdsRNAなどのiRNAを含んでなる組成物を対象に投与することで直接実施してもよい。あるいは、インビボ送達は、iRNAをコードして発現を誘導する1つまたは複数のベクターを投与することで、間接的に実施してもよい。これらの代替案は、以下でさらに考察される。

【0330】

一般に、(インビトロまたはインビボで)核酸分子を送達するあらゆる方法が、本発明の*iRNA*で使用するために適応され得る(例えば、その内容全体を引用により本明細書に包含させる、Akhtar S.and Julian RL.(1992)*Trends Cell.Biol.*2(5):139-144および国際公開WO 94/02595を参照のこと)。インビボ送達では、*iRNA*分子を送達するために検討すべき要素としては、例えば、送達分子の生物学的安定性、非特異的効果の防止、および標的組織中の送達分子の蓄積が挙げられる。*iRNA*の非特異的効果は、例えば組織内への直接注射または移植、あるいは製剤を局所投与するなどの局所投与によって最小化し得る。処置部位への局所投与は、物質の局所濃度を最大化し;そうしなければ物質によって害を被り得るか、または物質を分解し得る、全身組織の作用物質への曝露を限定し;*iRNA*分子のより低い総用量での投与を可能にする。いくつかの研究は、*iRNA*が局所的に投与された場合に、成功裏の遺伝子産物ノックダウンを示している。例えばカニクイザルにおける硝子体内注射による(Tolentino, MJ., et al(2004)*Retina* 24:132-138)、およびマウスにおける網膜下注射による(Reich, SJ., et al(2003)*Mol.Vis.*9:210-216) *VEGF dsRNA*の眼内送達は、どちらも加齢黄斑変性の実験モデルで新血管形成を阻止することを示した。これに加えて、マウスにおける*dsRNA*の直接腫瘍内注射は、腫瘍体積を低下させ(Pille, J., et al(2005)*Mol.Ther.*11:267-274)、腫瘍を有するマウスの生存期間を延長することができた(Kim, WJ., et al(2006)*Mol.Ther.*14:343-350; Li, S., et al(2007)*Mol.Ther.*15:515-523)。RNA干渉は、直接注射によるCNSへの(Dorn, G., et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., et al (2005) *gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., et al (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., et al (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602)、および鼻腔内投与による肺への(Howard, KA., et al (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., et al (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) *Nat. Med.* 11:50-55)局所送達の成功が示されている。疾患を治療するために*iRNA*を全身的に投与するために、RNAは修飾され、あるいは薬物送達系を使用して送達され得て;どちらの方法も、インビボでエンドーおよびエキソヌクレアーゼによる*dsRNA*の迅速な分解を防止するように作用する。RNAまたは薬学的担体の修飾はまた、標的組織への*iRNA*組成物の標的化も可能にし得て、望ましくない非特異的効果が回避される。コレステロールなどの親油性基の化学的結合によって*iRNA*分子を修飾し、細胞内取り込みを高め分解を防止し得る。例えば親油性コレステロール部分に共役結合されたApoBに対抗する*iRNA*がマウスに全身注射され、肝臓および空腸の双方でApoB mRNAノックダウンがもたらされた(Soutschek, J., et al (2004) *Nature* 432:173-178)。*iRNA*のアプタマーへの共役結合は、前立腺がんのマウスモデルにおいて腫瘍増殖を抑制し、腫瘍退縮を媒介することが示されている(McNamara, JO., et al (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015)。別の態様において、*iRNA*は、ナノ粒子、デンドリマー、ポリマー、リポソーム、またはカチオン性送達系などの薬物送達システムを使用して送達され得る。正に帯電したカチオン性送達系は、*iRNA*分子(負に帯電)の結合を容易にして、負に帯電した細胞膜における相互作用もまた高めて、細胞による*iRNA*の効率的な取り込みを可能にする。カチオン性脂質、デンドリマー、またはポリマーは、*iRNA*に結合され、または*iRNA*を包む小胞またはミセルを形成するように誘導され得る(例えば、Kim SH., et al (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116を参照のこと)。小胞またはミセルの形成は、全身投与した際に*iRNA*の分解をさらに阻止する。カチオン性*iRNA*複合体を作製して投与する方法は、十分に当業者の能力の範囲内である(例えば、Sorensen, DR., et al (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205(引用によりその全体を本明細書中に包含される)を参照のこと)。*iRNA*の全身性送達に有用な薬物送達系のいくつかの非限定的例としては、DOTAP(Sorensen, DR., et al (2003), *supra*; Verma, UN., et al (2003),

10

20

30

40

50

前出)、オリゴフェクトアミン (Oligofectamine)、 “ 固体核酸脂質顆粒 (solid nucleic acid lipid particles) ” (Zimmermann, TS., et al (2006) Nature 441:111-114)、カルジオリピン (Chien, PY., et al (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A., et al (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091)、ポリエチレンイミン (Bonnet ME., et al (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487)、およびポリアミドアミン (Tomalia, DA., et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H., et al (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804) が挙げられる。ある態様において、全身投与のために、iRNAはシクロデキストリンと複合体を形成する。iRNAおよびシクロデキストリンの投与方法および医薬組成物は、
10 米国特許第7,427,605号(その内容全体を引用により本明細書中に包含させる)に見いだされる。

【0331】

A. 本発明のiRNAをコードするベクター

AGT遺伝子を標的化するiRNAは、DNAまたはRNAベクターに挿入された転写単位から発現され得る(例えば、Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., 国際公開WO00/22113; Conrad, 国際公開WO00/22114; およびConrad, 米国特許第6,054,299号を参照されたい)。発現は、使用される特定のコンストラクトおよび標的組織または細胞型によって変わり、一過性(数時間から数週間程度)または持続性(数週間から数ヶ月以上)であり得る。これらの導入遺伝子は、組み込み型または非組み込み型ベクターであり得る、直鎖コンストラクト、環状プラスミド、またはウイルスベクターとして導入され得る。導入遺伝子はまた、それが染色体外プラスミドとして遺伝するのを可能にするよう構築し得る (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292)。
20

【0332】

個々のiRNA鎖または鎖群は、発現ベクター上のプロモーターから転写され得る。2つの別個の鎖を発現させて、例えばdsRNAを作製する場合、(例えばトランスフェクションまたは感染によって)2つの別個の発現ベクターを標的細胞に同時導入し得る。あるいは、そのどちらも同一発現プラスミド上に位置するプロモーターによって、dsRNAの個々の鎖を転写し得る。一態様において、dsRNAは、dsRNAがステムループ構造を有するように、リンカーポリヌクレオチド配列によって連結する逆位反復ポリヌクレオチドとして発現される。
30

【0333】

iRNA発現ベクターは、一般的に、DNAプラスミドまたはウイルスベクターである。真核生物細胞に適合し、好ましくは脊椎動物細胞に適合する発現ベクターを使用して、本明細書に記載のiRNA発現のための組み換えコンストラクトを作製し得る。真核細胞発現ベクターは当技術分野で周知であり、多くの商業的供給元から入手できる。一般的にこのようなベクターは、所望の核酸断片を挿入するための都合よい制限酵素認識部位を含有させて、提供される。iRNA発現ベクターの送達は、静脈内または筋肉内投与などによる全身投与、または患者から外植された標的細胞への投与とそれに続く患者への再導入、または所望の標的細胞に導入できるようにする任意の他の手段などであり得る。
40

【0334】

iRNA発現プラスミドは、カチオン性脂質担体(例えばオリゴフェクトアミン)または非カチオン性脂質ベースの担体(例えばTransit-TKO(商標))との複合体として、標的細胞にトランスフェクトし得る。1週間以上の期間にわたって標的RNAの異なる領域を標的化する、iRNA媒介ノックダウンのための複数脂質トランスフェクションもまた、本発明により検討される。ベクターの宿主細胞への成功裏の導入は、種々の既知の方法を使用して観測し得る。例えば、一過性トランスフェクションは、緑色蛍光タンパク質(GFP)などの蛍光性マーカーなど、レポーターによって示し得る。エキスビ
50

ロマイシンB耐性などの特定環境要素（例えば、抗生物質および薬剤）耐性を提供するマーカーを使用して、確実にし得る。

【0335】

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

10

【0336】

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

20

【0337】

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

30

【0338】

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

40

【0339】

アデノウイルスもまた、本発明のiRNAの送達で使用するために検討される。アデノウイルスは、例えば呼吸上皮(Respiratory epithelium)に遺伝子を送達するために、特に魅力

50

的なベクターである。アデノウイルスは呼吸上皮に天然で感染して、軽症の疾患を引き起こす。アデノウイルスベクターの送達系その他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染できる利点を有する。Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993)は、アデノウイルスベクターの遺伝子療法のレビューを提示する。Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)は、遺伝子をアカゲザルの呼吸上皮に移入するための、アデノウイルスベクターの使用を実証した。遺伝子療法におけるアデノウイルスの使用のその他の例は、Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT公開W094/12649; および、Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995)に見いだされる。本発明で取り上げる iRNA を発現するための好適な AAV ベクター、組み換え AAV ベクターを構築する方法、およびベクターを標的細胞に送達する方法は、Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010 に記載される。

【0340】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターもまた、本発明の iRNA を送達するために使用できる (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号)。一態様において、iRNA は、例えば、U6 または H1 RNA プロモーター、またはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターのいずれかを有する、組み換え AAV ベクターからの 2 つの別個の相補的一本鎖 RNA 分子として発現され得る。本発明で取り上げる dsRNA を発現するのに好適な AAV ベクター、組み換え AAV ベクターを構築する方法、およびベクターを標的細胞に送達する方法は、Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; 米国特許第 5, 252, 479 号; 同第 5, 139, 941 号; 国際公開 W094/13788; および、国際公開 W093/24641 (その開示全体は、引用により本明細書中に包含される) に記載される。

【0341】

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

【0342】

ウイルスベクターの指向性 (tropism) は、必要に応じて、その他のウイルスからのエンベロープタンパク質またはその他の表面抗原でベクターをシュードタイピングすることで、または異なるウイルスからのカプシドタンパク質で置換することで、修飾し得る。例えば、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、狂犬病、エボラ、モコラなどからの表面タンパク質によって、レンチウイルスベクターをシュードタイピングし得る。AAV ベクターは、ベクターを遺伝子操作して、異なるカプシドタンパク質血清型を発現させることで、異なる細胞を標的化するようにできる; 例えば Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801 (その開示内容全体は引用により本明細書中に包含される) を参照のこと。

【0343】

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

【0344】

VI. 本発明の医薬組成物

本発明は、本発明の iRNA を含む医薬組成物および製剤もまた含む。一態様において、本発明で提供されるのは、本明細書に記載される iRNA と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物である。iRNA を含有する医薬組成物は、AGT 遺伝子の発現または活性に関連する、疾患または障害を治療するのに有用である。このような医薬組成物は

、送達様式に基づいて製剤される。一例としては、例えば皮下（S C）または静脈内（I V）送達による、非経腸送達による、全身投与のために製剤される組成物である。別の例は、例えば連続ポンプ輸液などの脳内点滴による、脳実質内への直接送達のために調合される組成物である。本発明の医薬組成物は、A G T遺伝子発現を阻害するのに十分な投与量で投与してもよい。一般的に、本発明のi R N Aの好適な用量は、1日あたり受容者の体重1キログラムあたり、約0.001～約200.0ミリグラムの範囲、一般的に1日あたり体重1キログラムあたり、約1～50mgの範囲である。例えばd s R N Aは、単回投与あたり、約0.01mg/kg、約0.05mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約1.5mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約10mg/kg、約20mg/kg、約30mg/kg、約40mg/kg、または約50mg/kg

10

【0345】

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

20

【0346】

別の態様において、d s R N Aは、約0.1から約50mg/kg、約0.25から約50mg/kg、約0.5から約50mg/kg、約0.75から約50mg/kg、約1から約50mg/kg、約1.5から約50mg/kg、約2から約50mg/kg、約2.5から約50mg/kg、約3から約50mg/kg、約3.5から約50mg/kg、約4から約50mg/kg、約4.5から約50mg/kg、約5から約50mg/kg、約7.5から約50mg/kg、約10から約50mg/kg、約15から約50mg/kg、約20から約50mg/kg、約20から約50mg/kg、約25から約50mg/kg、約25から約50mg/kg、約30から約50mg/kg、約35から約50mg/kg、約40から約50mg/kg、約45から約50mg/kg、約0.1から約45mg/kg、約0.25から約45mg/kg、約0.5から約45mg/kg、約0.75から約45mg/kg、約1から約45mg/kg、約1.5から約45mg/kg、約2から約45mg/kg、約2.5から約45mg/kg、約3から約45mg/kg、約3.5から約45mg/kg、約4から約45mg/kg、約4.5から約45mg/kg、約5から約45mg/kg、約7.5から約45mg/kg、約10から約45mg/kg、約15から約45mg/kg、約20から約45mg/kg、約20から約45mg/kg、約25から約45mg/kg、約25から約45mg/kg、約30から約45mg/kg、約35から約45mg/kg、約40から約45mg/kg、約0.1から約40mg/kg、約0.25から約40mg/kg、約0.5から約40mg/kg、約0.75から約40mg/kg、約1から約40mg/kg、約1.5から約40mg/kg、約2から約40mg/kg、約2.5から約40mg/kg、約3から約40mg/kg、約3.5から約40mg/kg、約4から約40mg/kg、約4.5から約40mg/kg、約5から約40mg/kg、約7.5から約40mg/kg、約10から約40mg/kg、約15から約40mg/kg、約20から約40mg/kg、約20から約40mg/kg、約25から約40mg/kg、約25から約40mg/kg、約30から約40mg/kg、約35から約40mg/kg

30

40

50

、約0.1から約30mg/kg、約0.25から約30mg/kg、約0.5から約30mg/kg、約0.75から約30mg/kg、約1から約30mg/kg、約1.5から約30mg/kg、約2から約30mg/kg、約2.5から約30mg/kg、約3から約30mg/kg、約3.5から約30mg/kg、約4から約30mg/kg、約4.5から約30mg/kg、約5から約30mg/kg、約7.5から約30mg/kg、約10から約30mg/kg、約15から約30mg/kg、約20から約30mg/kg、約25から約30mg/kg、約0.1から約20mg/kg、約0.25から約20mg/kg、約0.5から約20mg/kg、約0.75から約20mg/kg、約1から約20mg/kg、約1.5から約20mg/kg、約2から約20mg/kg、約2.5から約20mg/kg、約3から約20mg/kg、約3.5から約20mg/kg、約4から約20mg/kg、約4.5から約20mg/kg、約5から約20mg/kg、約7.5から約20mg/kg、約10から約20mg/kg、または約15から約20mg/kgの用量で投与される。記載された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

【0347】

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

20

【0348】

別の態様において、dsRNAは、約0.5から約50mg/kg、約0.75から約50mg/kg、約1から約50mg/kg、約1.5から約50mg/kg、約2から約50mg/kg、約2.5から約50mg/kg、約3から約50mg/kg、約3.5から約50mg/kg、約4から約50mg/kg、約4.5から約50mg/kg、約5から約50mg/kg、約7.5から約50mg/kg、約10から約50mg/kg、約15から約50mg/kg、約20から約50mg/kg、約25から約50mg/kg、約30から約50mg/kg、約35から約50mg/kg、約40から約50mg/kg、約45から約50mg/kg、約0.5から約45mg/kg、約0.75から約45mg/kg、約1から約45mg/kg、約1.5から約45mg/kg、約2から約45mg/kg、約2.5から約45mg/kg、約3から約45mg/kg、約3.5から約45mg/kg、約4から約45mg/kg、約4.5から約45mg/kg、約5から約45mg/kg、約7.5から約45mg/kg、約10から約45mg/kg、約15から約45mg/kg、約20から約45mg/kg、約25から約45mg/kg、約30から約45mg/kg、約35から約45mg/kg、約40から約45mg/kg、約0.5から約40mg/kg、約0.75から約40mg/kg、約1から約40mg/kg、約1.5から約40mg/kg、約2から約40mg/kg、約2.5から約40mg/kg、約3から約40mg/kg、約3.5から約40mg/kg、約4から約40mg/kg、約4.5から約40mg/kg、約5から約40mg/kg、約7.5から約40mg/kg、約10から約40mg/kg、約15から約40mg/kg、約20から約40mg/kg、約25

30

40

50

0 から約 40 mg/kg、約 25 から約 40 mg/kg、約 25 から約 40 mg/kg、約 30 から約 40 mg/kg、約 35 から約 40 mg/kg、約 0.5 から約 30 mg/kg、約 0.75 から約 30 mg/kg、約 1 から約 30 mg/kg、約 1.5 から約 30 mg/kg、約 2 から約 30 mg/kg、約 2.5 から約 30 mg/kg、約 3 から約 30 mg/kg、約 3.5 から約 30 mg/kg、約 4 から約 30 mg/kg、約 4.5 から約 30 mg/kg、約 5 から約 30 mg/kg、約 7.5 から約 30 mg/kg、約 10 から約 30 mg/kg、約 15 から約 30 mg/kg、約 20 から約 30 mg/kg、約 20 から約 30 mg/kg、約 25 から約 30 mg/kg、約 0.5 から約 20 mg/kg、約 0.75 から約 20 mg/kg、約 1 から約 20 mg/kg、約 1.5 から約 20 mg/kg、約 2 から約 20 mg/kg、約 2.5 から約 20 mg/kg、約 3 から約 20 mg/kg、約 3.5 から約 20 mg/kg、約 4 から約 20 mg/kg、約 4.5 から約 20 mg/kg、約 5 から約 20 mg/kg、約 7.5 から約 20 mg/kg、約 10 から約 20 mg/kg、または約 15 から約 20 mg/kg の用量で投与される。一態様において、dsRNA は、約 10 mg/kg から約 30 mg/kg の用量で投与される。記載された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

【0349】

例えば、対象は、例えば、皮下または静脈内に、約 0.1、0.125、0.15、0.175、0.2、0.225、0.25、0.275、0.3、0.325、0.35、0.375、0.4、0.425、0.45、0.475、0.5、0.525、0.55、0.575、0.6、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または約 50 mg/kg のような iRNA の単回治療量を投与され得る。記載された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

20

30

【0350】

ある態様において、対象は、例えば、皮下または静脈内に、約 0.1、0.125、0.15、0.175、0.2、0.225、0.25、0.275、0.3、0.325、0.35、0.375、0.4、0.425、0.45、0.475、0.5、0.525、0.55、0.575、0.6、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、

40

50

5. 8、5. 9、6. 1、6. 2、6. 3、6. 4、6. 5、6. 6、6. 7、6. 8、6. 9、7. 1、7. 2、7. 3、7. 4、7. 5、7. 6、7. 7、7. 8、7. 9、8. 1、8. 2、8. 3、8. 4、8. 5、8. 6、8. 7、8. 8、8. 9、9. 1、9. 2、9. 3、9. 4、9. 5、9. 6、9. 7、9. 8、9. 9、10. 1、10. 5、11. 1、11. 5、12. 1、12. 5、13. 1、13. 5、14. 1、14. 5、15. 1、15. 5、16. 1、16. 5、17. 1、17. 5、18. 1、18. 5、19. 1、19. 5、20. 1、20. 5、21. 1、21. 5、22. 1、22. 5、23. 1、23. 5、24. 1、24. 5、25. 1、25. 5、26. 1、26. 5、27. 1、27. 5、28. 1、28. 5、29. 1、29. 5、30. 1、31. 1、32. 1、33. 1、34. 1、35. 1、36. 1、37. 1、38. 1、39. 1、40. 1、41. 1、42. 1、43. 1、44. 1、45. 1、46. 1、47. 1、48. 1、49. 1、または約50mg/kgのような、iRNAの複数回治療量を投与される。複数用量レジメンは、iRNAの治療量を毎日、例えば2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、またはそれ以上投与することを含み得る。

10

【0351】

他の態様において、対象は、例えば、皮下または静脈内に、約0. 1、0. 125、0. 15、0. 175、0. 2、0. 225、0. 25、0. 275、0. 3、0. 325、0. 35、0. 375、0. 4、0. 425、0. 45、0. 475、0. 5、0. 525、0. 55、0. 575、0. 6、0. 625、0. 65、0. 675、0. 7、0. 725、0. 75、0. 775、0. 8、0. 825、0. 85、0. 875、0. 9、0. 925、0. 95、0. 975、1. 1、1. 1. 1、1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2. 1、2. 2、2. 3、2. 4、2. 5、2. 6、2. 7、2. 8、2. 9、3. 1、3. 2、3. 3、3. 4、3. 5、3. 6、3. 7、3. 8、3. 9、4. 1、4. 2、4. 3、4. 4、4. 5、4. 6、4. 7、4. 8、4. 9、5. 1、5. 2、5. 3、5. 4、5. 5、5. 6、5. 7、5. 8、5. 9、6. 1、6. 2、6. 3、6. 4、6. 5、6. 6、6. 7、6. 8、6. 9、7. 1、7. 2、7. 3、7. 4、7. 5、7. 6、7. 7、7. 8、7. 9、8. 1、8. 2、8. 3、8. 4、8. 5、8. 6、8. 7、8. 8、8. 9、9. 1、9. 2、9. 3、9. 4、9. 5、9. 6、9. 7、9. 8、9. 9、10. 1、10. 5、11. 1、11. 5、12. 1、12. 5、13. 1、13. 5、14. 1、14. 5、15. 1、15. 5、16. 1、16. 5、17. 1、17. 5、18. 1、18. 5、19. 1、19. 5、20. 1、20. 5、21. 1、21. 5、22. 1、22. 5、23. 1、23. 5、24. 1、24. 5、25. 1、25. 5、26. 1、26. 5、27. 1、27. 5、28. 1、28. 5、29. 1、29. 5、30. 1、31. 1、32. 1、33. 1、34. 1、35. 1、36. 1、37. 1、38. 1、39. 1、40. 1、41. 1、42. 1、43. 1、44. 1、45. 1、46. 1、47. 1、48. 1、49. 1、または約50mg/kgのような、iRNAの反復治療用量を投与される。反復用量レジメンは、1日おきに、3日に1回、4日に1回、週2回、週1回、隔週、または月1回のように定期的にiRNA治療量を投与することを含み得る。任意の態様において、iRNAは、約1月に1回から約四半期に1回（すなわち、約3月に1回）投与される。

20

30

【0352】

初期治療レジメン後、処置剤は、より少ない頻度で投与することができる。

40

【0353】

任意の態様において、例えば、本発明の組成物が、本明細書に記載のdsRNAおよび脂質を含むとき、対象は、約0. 01mg/kgから約5mg/kg、約0. 01mg/kgから約10mg/kg、約0. 05mg/kgから約5mg/kg、約0. 05mg/kgから約10mg/kg、約0. 1mg/kgから約5mg/kg、約0. 1mg/kgから約10mg/kg、約0. 2mg/kgから約5mg/kg、約0. 2mg/kgから約10mg/kg、約0. 3mg/kgから約5mg/kg、約0. 3mg/kgから約10mg/kg、約0. 4mg/kgから約5mg/kg、約0. 4mg/kgから約10mg/kg、約0. 5mg/kgから約5mg/kg、約0. 5mg/kgから約10mg/kg、約1mg/kgから約5mg/kg、約1mg/kgから約10mg/kg

50

／k g、約1.5 mg／k gから約5 mg／k g、約1.5 mg／k gから約10 mg／k g、約2 mg／k gから約2.5 mg／k g、約2 mg／k gから約10 mg／k g、約3 mg／k gから約5 mg／k g、約3 mg／k gから約10 mg／k g、約3.5 mg／k gから約5 mg／k g、約4 mg／k gから約5 mg／k g、約4.5 mg／k gから約5 mg／k g、約4 mg／k gから約10 mg／k g、約4.5 mg／k gから約10 mg／k g、約5 mg／k gから約10 mg／k g、約5.5 mg／k gから約10 mg／k g、約6 mg／k gから約10 mg／k g、約6.5 mg／k gから約10 mg／k g、約7 mg／k gから約10 mg／k g、約7.5 mg／k gから約10 mg／k g、約8 mg／k gから約10 mg／k g、約8.5 mg／k gから約10 mg／k g、約9 mg／k gから約10 mg／k g、または約9.5 mg／k gから約10 mg／k gのようなiRNAの治療量を投与され得る。記載された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

【0354】

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

20

【0355】

本発明の任意の態様において、例えば、二本鎖RNA i薬が、修飾（例えば、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つまたは複数のモチーフ）（薬剤の切断部位またはその近位にそのようなモチーフを含むものを含む）、6個のホスホロチオエート結合、およびリガンドを含むとき、かかる薬剤は、約0.01から約0.5 mg／k g、約0.01から約0.4 mg／k g、約0.01から約0.3 mg／k g、約0.01から約0.2 mg／k g、約0.01から約0.1 mg／k g、約0.01 mg／k gから約0.09 mg／k g、約0.01 mg／k gから約0.08 mg／k g、約0.01 mg／k gから約0.07 mg／k g、約0.01 mg／k gから約0.06 mg／k g、約0.01 mg／k gから約0.05 mg／k g、約0.02から約0.5 mg／k g、約0.02から約0.4 mg／k g、約0.02から約0.3 mg／k g、約0.02から約0.2 mg／k g、約0.02から約0.1 mg／k g、約0.02 mg／k gから約0.09 mg／k g、約0.02 mg／k gから約0.08 mg／k g、約0.02 mg／k gから約0.07 mg／k g、約0.02 mg／k gから約0.06 mg／k g、約0.02 mg／k gから約0.05 mg／k g、約0.03から約0.5 mg／k g、約0.03から約0.4 mg／k g、約0.03から約0.3 mg／k g、約0.03から約0.2 mg／k g、約0.03から約0.1 mg／k g、約0.03 mg／k gから約0.09 mg／k g、約0.03 mg／k gから約0.08 mg／k g、約0.03 mg／k gから約0.07 mg／k g、約0.03 mg／k gから約0.06 mg／k g、約0.03 mg／k gから約0.05 mg／k g、約0.04から約0.5 mg／k g、約0.04から約0.4 mg／k g、約0.04から約0.3 mg／k g、約0.04から約0.2 mg／k g、約0.04から約0.1 mg／k g、約0.04 mg／k gから約0.09 mg／k g、約0.04 mg／k gから約0.08 mg／k g、約0.04 mg／k gから約0.07 mg／k g、約0.04 mg／k gから約0.06 mg／k g、約0.05から約0.5 mg／k g、約0.05から約0.4 mg／k g、約0.05か

30

40

50

ら約0.3mg/kg、約0.05から約0.2mg/kg、約0.05から約0.1mg/kg、約0.05mg/kgから約0.09mg/kg、約0.05mg/kgから約0.08mg/kg、または約0.05mg/kgから約0.07mg/kgの用量で投与される。記載された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図され、例えば、RNAi薬は、約0.015mg/kgから約0.45mg/kgの用量で対象に投与され得る。

【0356】

例えばRNAi薬、例えば医薬組成物中のRNAi薬は、約0.01mg/kg、0.0125mg/kg、0.015mg/kg、0.0175mg/kg、0.02mg/kg、0.0225mg/kg、0.025mg/kg、0.0275mg/kg、0.03mg/kg、0.0325mg/kg、0.035mg/kg、0.0375mg/kg、0.04mg/kg、0.0425mg/kg、0.045mg/kg、0.0475mg/kg、0.05mg/kg、0.0525mg/kg、0.055mg/kg、0.0575mg/kg、0.06mg/kg、0.0625mg/kg、0.065mg/kg、0.0675mg/kg、0.07mg/kg、0.0725mg/kg、0.075mg/kg、0.0775mg/kg、0.08mg/kg、0.0825mg/kg、0.085mg/kg、0.0875mg/kg、0.09mg/kg、0.0925mg/kg、0.095mg/kg、0.0975mg/kg、0.1mg/kg、0.125mg/kg、0.15mg/kg、0.175mg/kg、0.2mg/kg、0.225mg/kg、0.25mg/kg、0.275mg/kg、0.3mg/kg、0.325mg/kg、0.35mg/kg、0.375mg/kg、0.4mg/kg、0.425mg/kg、0.45mg/kg、0.475mg/kg、または約0.5mg/kgの用量で投与され得る。記載された値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0357】

医薬組成物は、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、および21、22、23、24、または約25分間以上のような時間をかけて静脈内に投与され得る。投与は、例えば、1か月、2か月、3か月、4か月またはそれ以上の期間、週1回、隔週（すなわち、2週間に1回）、定期的に繰り返してもよい。初期治療レジメン後、処置剤は、より少ない頻度で投与することができる。例えば、3か月間、週1回または2週間に1回の投与後、投与を、6か月間または1年以上の期間、月に1回繰り返してよい。

【0358】

医薬組成物は、皮下投与により投与されてよい。

【0359】

医薬組成物は、毎日1回投与し得て、またはiRNAは、一日を通して適当な間隔で、2回、3回またはそれ以上の部分用量として投与し得て、または持続注入もしくは放出制御製剤を通じた送達さえも使用して、投与し得る。その場合、各部分用量に含有されるiRNAは、1日あたり総用量を達成するために、対応してより少量でなくてはならない。投与量単位はまた、例えば数日間にわたってiRNAの徐放を提供する、従来型の徐放性製剤を使用して、数日間にわたる送達のために配合し得る。徐放性製剤は当技術分野で周知であり、特に、本発明の薬剤を使用し得る、特定部位への該薬剤送達のために有用である。この態様では、投与量単位は、相当する複数の1日量を含有する。より高用量を最初に投与し（すなわち、負荷用量）、その後により低用量を持続期間で投与してよい。

【0360】

他の態様において、医薬組成物の単回投与は、引き続く用量が、3、4、または5日間以下の間隔で、または1、2、3、または4週間以下の間隔で投与されるように、長期にわたり続いてよい。本発明のいくつかの態様では、本発明の医薬組成物の単回用量は、週1回投与される。本発明の他の態様では、本発明の医薬組成物の単回用量は、月2回投与される。任意の態様において、iRNAは、約1か月に1回から約四半期に1回（すなわ

ち、約3カ月に1回)投与される。

【0361】

医薬組成物は、例えば、肥満により血圧が上昇中の、または高レベルのAGTの原因が存在する時期、例えば、妊娠高血圧中の対象に、無期限に投与される。

【0362】

当業者は、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の全般的な健康状態および／または年齢、および存在するその他の疾患を含むが、これに限定されない、特定の要因が、対象を効果的に治療するのに要求される投与量およびタイミングに影響し得ることを理解するであろう。さらに、治療有効量の組成物による対象の処置は、単回治療または一連の治療を含み得る。本発明に包含される個々のiRNAの有効投与量およびインビボ半減期は、本明細書の他の箇所で記載されるように、従来の手順を使用して、または適当な動物モデルを使用したインビボ試験に基づいて、行い得る。

【0363】

本発明の医薬組成物は、局所性または全身性の治療が所望されるかどうかに応じて、そして治療領域次第で、いくつかの方法で投与し得る。投与は、局所投与(例えば経皮パッチによる)、例えばネブライザーを含む、粉剤またはエアロゾル剤の吸入または吹き入れ(insufflation)による経肺投与;気管内投与、鼻腔内投与、経上皮および経皮投与、経口投与または非経腸投与であってもよい。非経腸投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または点滴;例えば埋め込みデバイスを通じた真皮下投与;または例えば脳実質内、クモ膜下腔内または脳室内などの頭蓋内投与が挙げられる。

【0364】

iRNAは、肝臓(例えば、肝臓の肝細胞)などの特定組織を標的化する様式で、送達され得る。

【0365】

局所投与のための医薬組成物および製剤としては、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐薬、スプレー、液体、および粉末が挙げられる。従来の薬学的担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが、必要でありまたは望ましいこともある。被覆コンドーム、手袋などもまた、有用であり得る。好適な局所製剤としては、本発明で取り上げるiRNAが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化剤、および界面活性剤などの局所送達作用物質との混和されるものが挙げられる。好適な脂質およびリポソームとしては、中性(例えばジオレオイルホスファチジルD O P Eエタノールアミン、ジミリスティルホスファチジルコリンD M P C、ジステアロリホスファチジル(distearolyphosphatidyl)コリン)、陰性(例えばジミリスティルホスファチジルグリセロールD M P G)およびカチオン性(例えばジオレオイルテトラメチルアミノプロピルD O T A PおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンD O T M A)が挙げられる。本発明で取り上げるiRNAは、リポソーム内にカプセル化されるか、またはそれと、特にカチオン性リポソームと複合体形成することができる。あるいは、iRNAは、脂質、特にカチオン性脂質と複合体形成することができる。好適な脂肪酸およびエステルとしては、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはC₁₋₂₀アルキルエステル(例えばイソプロピルミリスチン酸I P M)、モノグリセリド、ジグリセリド、または薬学的に許容可能なその塩)が挙げられるが、これに限定されない。局所製剤は、米国特許第6,747,014号(引用により本明細書中に包含される)に詳述される。

【0366】

A. 膜様分子アセンブリーを含んでなるiRNA製剤

本発明の組成物および方法で使用されるiRNAは、例えばリポソームまたはミセルなどの膜様分子アセンブリー内の送達のために製剤し得る。本明細書で用いる用語“リポソ

ーム”は、例えば1つの二重層または複数の二重層などの、少なくとも1つの二重層に配列された両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。リポソームは、親油性材料と水性内部から形成される膜を有する、単層膜小胞および多重膜小胞を含む。水性部分は、iRNA組成物を含有する。親油性材料は、水性内部を水性外部から隔離し、水性外部は、一般的にiRNA組成物を含まないが、場合によっては含んでもよい。リポソームは、活性成分の作用部位への移行と送達のために有用である。リポソーム膜は生体膜と構造的に類似するため、リポソームを組織に適用すると、リポソーム性二重層は細胞膜の二重層と融合する。リポソームと細胞の融合が進むにつれて、iRNAを含む内部水性内容物が細胞内に送達され、そこではiRNAが標的RNAに特異的に結合し得て、iRNAを媒介し得る。場合によっては、リポソームもまた特異的に標的化され、例えばiRNAを特定の細胞型に誘導する。

10

【0367】

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

20

【0368】

必要ならば、例えば凝縮を助ける担体化合物を、制御された添加によって縮合反応中に添加し得る。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えば、スペルミンまたはスペルミジン）であり得る。pHも調節することができ、凝縮を補助し得る。

【0369】

送達ビークルの構造的構成要素としてポリヌクレオチド／カチオン性脂質複合体を組み込む、安定したポリヌクレオチド送達ビークルを作製する方法は、例えばWO96/37194（その内容全体を引用により本明細書中に包含する）にさらに記載される。リポソーム形成は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; 米国特許第4,897,355号; 米国特許第5,171,678号; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; および、Fukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984に記載される例示的な方法の1つまたは複数の面も含み得る。送達ビークルとして使用される好適なサイズの脂質凝集体を調製する一般に使用される技術としては、超音波処理、および凍結解凍と押出の組み合わせが挙げられる（例えば、Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986を参照のこと）。一貫して小型（50～200nm）で比較的均一な凝集体が所望される場合は、顕微溶液化（microfluidization）を使用し得る（Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984）。これらの方法は、リポソーム内のiRNA薬調製物の包埋に容易に適應される。

30

40

【0370】

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

【0371】

pH感受性または負電荷のリポソームは、核酸と複合体を形成せず、むしろそれを封入

50

する。核酸と脂質は、どちらも同様の荷電を持つため、複合体形成ではなく反発が起きる。それでもなおいくらかの核酸は、これらのリボソームの水性内部に封入される。pH感受性リボソームは、培養中で、チミジンキナーゼ遺伝子をコードする核酸を細胞単層に送達するのに使用されている。外来性遺伝子の発現は、標的細胞内で検出された(Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。

【0372】

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

10

【0373】

インビトロおよびインビボでリボソームを細胞内に導入するその他の方法の例としては、米国特許第5,283,185号;同第5,171,678号;国際公開WO94/00569号;国際公開WO93/24640号;国際公開WO91/16024号;Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; および、Strauss EMBO J. 11:417, 1992が挙げられる。

20

【0374】

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

30

【0375】

リボソームはまた、“立体的安定化”リボソームを含み、本明細書で用いるこの用語は、1つまたは複数の特殊化された脂質を含んでなるリボソームを意味し、それは、リボソーム中に組み込まれると、このような特殊化された脂質を欠くりボソームと比較して、増強された循環寿命をもたらす。立体的安定化リボソームの例は、リボソームの小胞形成脂質部分の一部が、(A) モノシアロガングリオシド G_{M1} などの1つまたは複数の糖脂質を含んでなり、または(B) ポリエチレングリコール(PEG)部分などの1つまたは複数の親水性ポリマーで誘導体化されているものである。いかなる特定の理論にとらわれることなく、当技術分野では、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはPEG誘導体化脂質を含有する立体的安定化リボソームでは、これらの立体的安定化リボソームの循環半減期の延長は、細網内皮系(RES)の細胞への取り込み低下に由来するものと考えられる(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., 癌 Research, 1993, 53, 3765)。

40

【0376】

1つまたは複数の糖脂質を含んでなる種々のリボソームが、当技術分野で公知である。Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)は、モノシアロガングリオシド G_{M1} 、ガラクトセレブロシドサルフェートおよびホスファチジイノシトールが、リボソームの血液半減期を改善する能力を報告している。これらの知見は、Gabizon

50

ら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949)によって詳しく説明された。どちらも Allenらに付与された、米国特許第 4, 837, 028 号および WO 88/04924 は、(1) スフィンゴミエリン、および(2) ガングリオシド G_{M1} またはガラクトセレブロシド硫酸エステルを含んでなる、リポソームを開示する。米国特許第 5, 543, 152 号(Webbら)は、スフィンゴミエリンを含んでなるリポソームを開示する。1, 2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含んでなるリポソームは、WO 97/13499 (Limら) に開示される。

【0377】

一態様において、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合できる利点を有する。非カチオン性リポソームは、原形質膜と効率的に融合できないが、インビボでマクロファージに取り込まれ、iRNA 薬をマクロファージに送達するのに使用され得る。

10

【0378】

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

20

【0379】

正に帯電した合成カチオン性脂質である N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)を使用して、小型リポソームを形成し得て、それは核酸と自発的に相互作用して、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合できる脂質-核酸複合体を形成し、iRNA 薬送達をもたらす(DOTMA およびその DNA との併用の説明については、例えば Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 および米国特許第 4, 897, 355 号を参照のこと)。

【0380】

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

30

40

【0381】

その他の報告されたカチオン性脂質化合物としては、2つの脂質タイプの1つと共役するカルボキシスペルミンを含む、多様な部分と共役しているものが挙げられ、例えば、5-カルボキシスペルミルグリシンジオクタオレオイルアミド("DOGS")(Transfectam(商標), Promega, Madison, Wisconsin) およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン 5-カルボキシスペルミルアミド("DPPEs")などの化合物が挙げられる(例えば米国特許第 5, 171, 678 号を参照のこと)。

【0382】

別のカチオン性脂質複合体は、DOPe と組み合わせられてリポソームに製剤されている

50

コレステロール (“DC-Chol”) による、脂質の誘導体化を含む (Gao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991を参照のこと)。ポリリジン をDOPEに共役させて生成されるリポポリリジンが、血清存在下における形質移入に効果的であると報告されている (Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991)。特定の細胞系では、共役するカチオン性脂質を含有するこれらのリポソームは、DOTMA含有組成物より低い毒性を示し、より効率的な形質移入を提供すると言われている。その他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIEおよびDMRIE-HP (Vical, La Jolla, California)、およびリポフェクトアミン (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland) が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に適したその他のカチオン性脂質は、WO98/39359およびWO96/37194に記載される。

10

【0383】

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

20

【0384】

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

30

【0385】

iRNAを含むリポソームは、高度に変形可能に作製され得る。このような変形能は、リポソームの平均半径よりも小さい孔を通り抜けて、リポソームが浸透できるようにし得る。例えばトランスファーソームは、変形可能なリポソームの一種である。トランスファーソーム (Transferosomes) は、通常は界面活性剤である表面エッジアクティベーターを、標準リポソーム組成物に添加して、作製し得る。iRNA薬を含むトランスファーソームは、皮膚内のケラチノサイトにiRNA薬を送達するために、例えば感染によって皮下送達し得る。無傷の哺乳動物皮膚を通過するために、脂質小胞は、適切な経皮勾配の影響下で、それぞれ直径が50nm未満の一連の細孔を通過しなくてはならない。さらに脂質特性のために、これらのトランスファーソーム (Transferosomes) は、自己最適化し (例えば皮膚孔の形状に適応する)、自己修復し得て、断片化することなく頻繁にそれらの標的に到達し得て、自己装填することが多い。

40

【0386】

本発明を適用できるその他の製剤は、2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61/018,616号; 2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61/018,611号; 2008年3月26日に出願された米国仮特許出願第61/039,748号; 2008年4月22日に出願された米国仮特許出願第61/047,087号、

50

および2008年5月8日に出願された米国仮特許出願第61/051,528号に記載される。2007年10月3日に出願されたPCT出願PCT/US2007/080331号もまた、本発明を適用できる製剤を記載する。

【0387】

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

10

【0388】

界面活性剤には、（マイクロエマルジョンを含む）エマルジョンおよびリポソームなどの製剤における、幅広い適用がある。天然および合成双方の多数の異なる界面活性剤タイプの特性の分類および格付けの最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（HLB）の使用による。親水性基（“ヘッド”としても公知）の性質は、製剤中で使用される異なる界面活性剤を分類する、最も有用な手段を提供する（Rieger, in “Pharmaceutical Dosage Forms”, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285）。

20

【0389】

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

30

【0390】

界面活性剤分子が、水への溶解または分散時に負電荷を有する場合、界面活性剤はアニオン性に分類される。アニオン性界面活性剤としては、石鹼などのカルボン酸塩、ラクチル酸アシル、アミノ酸のアシルアミド、硫酸アルキルおよびエトキシ化硫酸アルキルなどの硫酸エステル、アルキルベンゼンスルホネートなどのスルホネート、イセチオン酸アシル、タウリン酸アシルおよびスルホコハク酸アシル、およびリン酸アシルが挙げられる。アニオン性界面活性剤クラスの最も重要な構成成分は、硫酸アルキルおよび石鹼である。

40

【0391】

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

【0392】

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

【0393】

50

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

【0394】

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

【0395】

経皮膜を通じた送達に適した混合ミセル製剤は、siRNA 組成物、アルカリ金属 C_{18} ~ C_{22} アルキル硫酸塩、およびミセル形成化合物の水溶液を混合して、調製してもよい。例示的なミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容可能な塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレアート、モノラウレート、ルリヂサ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシンとその薬学的に許容可能な塩、グリセリン、ポリグリセリン、リジン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテルおよびその類縁体、ポリドカノールアルキルエーテルおよびその類縁体、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、およびそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属アルキル硫酸塩の添加と同時に、またはその後に、添加してもよい。混合ミセルは、成分を実質的にどのように混合しても形成するが、より小型のミセルを提供するためには、激しく混合される。

【0396】

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

【0397】

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

【0398】

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

【0399】

噴射剤としては、水素含有クロロフルオロカーボン、水素含有フルオロカーボン、ジメチルエーテル、およびジエチルエーテルが挙げられる。任意の態様において、HFA 134a (1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン) を使用してもよい。

【0400】

必須成分の特定濃度は、比較的簡単な実験法によって決定され得る。口腔を通じた吸収のためには、注射を通じた用量、または胃腸管を通じた投与の、例えば少なくとも2倍または3倍に増大させることが、望ましいことが多い。

【0401】

B. 脂質粒子

10

20

30

40

50

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

【0402】

本明細書で用いる用語“LNP”は、安定核酸-脂質粒子を意味する。LNPは、一般的に、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を妨げる脂質（例えばPEG脂質複合体）を含有する。LNPは、静脈内（i.v.）注射後に長期循環寿命を示し、遠位部位（例えば、投与部位から物理的に離れた部位）に蓄積するので、全身的使用のために極めて有用である。LNPとしては、国際公開第00/03683号に記載のカプセル化縮合剤-核酸複合体を含む“pSPLP”が挙げられる。本発明の粒子は、一般的に約50nm～約150nm、より一般的に約60nm～約130nm、より一般的に約70nm～約110nm、最も一般的に約70nm～約90nmの平均径を有して、実質的に無毒である。これに加えて、本発明の核酸-脂質粒子中に存在する場合、核酸は、水溶液中でヌクレアーゼ分解耐性である。核酸-脂質粒子、およびそれらを調製する方法は、例えば米国特許第5,976,567号；同第5,981,501号；同第6,534,484号；同第6,586,410号；同第6,815,432号；米国特許出願公開第2010/0324120号；および国際公開第96/40964号で開示される。

【0403】

一態様において、脂質と薬剤の比率（質量／質量比）（例えば脂質対dsRNA比）は、約1：1～約50：1、約1：1～約25：1、約3：1～約15：1、約4：1～約10：1、約5：1～約9：1、または約6：1～約9：1の範囲である。上記の範囲の中間にある範囲も、本発明の一部と考えられる。

【0404】

カチオン性脂質は、例えばN,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）、N,N-ジステアイル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド（DDAB）、N-（I-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTAP）、N-（I-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシプロピルアミン（DODMA）、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLenDMA）、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-C-DAP）、1,2-ジリノレイルオキシ（Dilinoleoxy）-3-（ジメチルアミノ）アセトキシプロパン（DLin-DAC）、1,2-ジリノレイルオキシ（Dilinoleoxy）-3-モルホリノプロパン（DLin-MA）、1,2-ジリノレイル-3-ジメチルアミノプロパン（DLinDAP）、1,2-ジリノレイルチオール-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-S-DMA）、1-リノレイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-2-DMAP）、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩（DLin-TMA.Cl）、1,2-ジリノレイル-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩（DLin-TAP.Cl）、1,2-ジリノレイルオキシ-3-（N-メチルピペラジノ）プロパン（DLin-MPZ）、または3-（N,N-ジリノレイルアミノ）-1,2-プロパンジオール（DLinAP）、3-（N,N-ジオレイルアミノ）-1,2-プロパンジオール（propanedio）（DOAP）、1,2-ジリノレイルオキシ-3-（2-N,N-ジメチルアミノ）エトキシプロパン（DLin-EG-DMA）、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン（DLin-K-DMA）またはその類縁体、（3aR,5s,6aS）-N,N-ジメチル-2,2-ジ（（9Z,12Z）-オクタデカ-9,12-ジエニル）テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン（ALN100）、（6Z,9Z,28Z,31Z）-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル-4-（ジメチルアミノ）ブタン酸（MC3）、1,1'-（2-（4-（2-（（2

ー（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチルアザンジイル）ジドデカン－２－オール（Tech G1）、またはその混合物であり得る。カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約２０モル％～約５０モル％または約４０モル％を構成し得る。

【０４０５】

別の態様において、化合物２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－〔１，３〕－ジオキソランを使用して、脂質－siRNAナノ粒子を作成し得る。２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－〔１，３〕－ジオキソランの合成は、引用によって本明細書に包含させる、２００８年１０月２３日に出願された米国仮特許出願第６１／１０７，９９８号に記載される。

【０４０６】

一態様において、脂質－siRNA粒子は、４０％の２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－〔１，３〕－ジオキソラン：１０％のDSPC：４０％のコレステロール：１０％のPEG-C-DMG（モル百分率）を含み、粒度 63.0 ± 20 nmおよびsiRNA／脂質比０．０２７である。

【０４０７】

イオン性／非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセリン（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセリン（DPPG）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン－４－（N－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸（DOPE-mal）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジミリスチルホスホエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（DSPE）、１６－Ｏ－モノメチルPE、１６－Ｏ－ジメチルPE、１８－１－trans PE、１－ステアロイル－２－オレオイル－ホスファチジエタノールアミン（SOPE）、コレステロール、またはその混合物を含むが、これに限定されない、アニオン性脂質または中性脂質とすることもできる。コレステロールが含まれる場合、非カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約５モル％～約９０モル％、約１０モル％、または約５８モル％であり得る。

【０４０８】

粒子の凝集を阻害する複合型脂質（conjugated lipid）は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）－ジアシルグリセロール（DAG）、PEG－ジアルキルオキシプロピル（DAA）、PEG－リン脂質、PEG－セラミド（Cer）を含むが、これに限定されない、PEG－脂質、またはその混合物であり得る。PEG－DAA複合体は、例えばPEG－ジラウリルオキシプロピル（Ci₂）、PEG－ジミリスチルオキシプロピル（Ci₄）、PEG－ジパルミチルオキシプロピル（Ci₆）、またはPEG－ジステアリルオキシプロピル（Ci₈）であり得る。粒子の凝集を妨げる複合型脂質は、粒子中に存在する総脂質の０モル％～約２０モル％または約２モル％であり得る。

【０４０９】

ある態様において、核酸－脂質粒子は、例えば、粒子中に存在する総脂質の約１０モル％～約６０モル％または約４８モル％のコレステロールをさらに含む。

【０４１０】

一態様において、リピドイドND98・4HCl（MW 1487）（２００８年３月２６日に米国特許出願第１２／０５６，２３０号（引用により本明細書中に包含させる）を参照のこと）、コレステロール（Sigma-Aldrich）、およびPEG－セラミドC16（Avanti Polar Lipids）を使用して、脂質－dsRNAナノ粒子（すなわちLNPO1粒子）を作製し得る。エタノール中の各原液は、次のように調製し得る：ND98、１３３ mg／ml；コレステロール、２５ mg／ml；PEG－セラミドC16、１

10

20

30

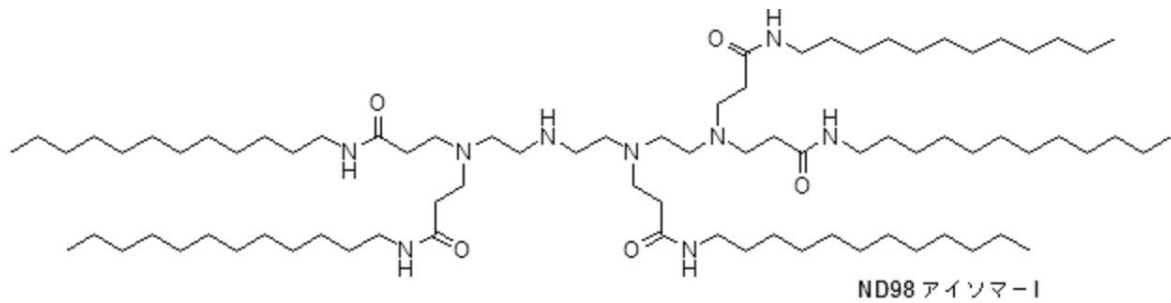
40

50

00 mg/ml。次にND98、コレステロール、およびPEG-セラミドC16の原液を、例えば42:48:10のモル比で合わせ得る。合わせた脂質溶液は、最終エタノール濃度が約35~45%で最終酢酸ナトリウム濃度が約100~300mMになるように、(例えばpH5の酢酸ナトリウム中で)水性dsRNAと混合し得る。脂質-dsRNAナノ粒子は、一般的に、混合に際して自然発生的に形成する。所望の粒度分布に依存して、結果として生じるナノ粒子混合物は、例えばLipex Extruder (Northern Lipids, Inc)などのサーモバレル押出機を使用して、ポリカーボネートメンブラン(例えば、100nmカットオフ)を通じて押出し得る。ある場合において、押出ステップは省かれ得る。エタノール除去および同時緩衝液交換は、例えば透析またはタンジェンシャルフロー濾過によって達成し得る。緩衝液は、例えば約pH6.9、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、または約pH7.4など、約pH7のリン酸緩衝食塩水(PBS)で交換し得る。

10

【化16】



20

式1

【0411】

LNP01製剤は、例えば引用により本明細書中に包含させる、WO2008/042973号に記載される。

【0412】

さらなる例示的脂質dsRNA製剤は、表1に記載される。

【0413】

【表 1 - 1】

表 1

	イオン性／カチオン性脂質	カチオン性脂質／非カチオン性脂質／コレステロール／PEG-脂質複合体 脂質：siRNA 比
SNALP-1	1, 2-ジリノレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質：siRNA ~ 7:1
2-XTC	2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質：siRNA ~ 7:1
LNP05	2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質：siRNA ~ 6:1
LNP06	2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質：siRNA ~ 11:1
LNP07	2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質：siRNA ~ 6:1
LNP08	2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質：siRNA ~ 11:1
LNP09	2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン (XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10:1
LNP10	(3aR, 5s, 6aS)-N, N-ジメチル-2, 2-ジ((9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエニル) テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1, 3]ジオキサール-5-アミン (ALN100)	ALN100/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10:1

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	イオン性／カチオン性脂質	カチオン性脂質／非カチオン性脂質／コレステロール／PEG－脂質複合体 脂質：siRNA 比
LNP11	(6 Z, 9 Z, 28 Z, 31 Z)－ヘプタトリアコンター6, 9, 28, 31－テトラエン－19－イル－4－(ジメチルアミノ)ブタン酸(MC3)	MC-3/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10:1
LNP12	1, 1'－(2－(4－(2－((2－(ビス(2－ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2－ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン－1－イル)エチルアザンジイル)ジドデカン－2－オール(Tech G1)	Tech G1/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質：siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質：siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA: 10:1

10

20

30

40

【表 1 - 3】

	イオン性／カチオン性脂質	カチオン性脂質／非カチオン性脂質／コレステロール／PEG-脂質複合体 脂質：siRNA 比
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂質：siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質：siRNA: 10:1

【0414】

DSPC：ジステアロイルホスファチジルコリン

DPPC：ジアリミトイルホスファチジルコリン

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

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

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

SNALP（1，2-ジリノレニルオキシ-N，N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA））を含んでなる製剤は、2009年4月15日に出願された国際公開WO2009/127060号（引用により本明細書中に包含させる）に記載される。

XTCを含んでなる製剤は、例えば、2009年1月29日に出願された米国仮出願第61/148,366号；2009年3月2日に出願された米国仮出願第61/156,851号；2009年6月10日に出願された米国仮出願第 号；2009年7月24日に出願された米国仮出願第61/228,373号；2009年9月3日に出願された米国仮出願第61/239,686号、および2010年1月29日に出願された国際出願第PCT/US2010/022614号（それらは、引用により本明細書中に包含される）に記載される。

MC3を含んでなる製剤は、例えば、2010年6月10日に出願された米国特許出願公開第2010/0324120号に記載される（その内容全体を引用により本明細書中に包含させる）。

ALNY-100を含む製剤は、例えば、2009年11月10日に出願された、国際出願PCT/US第09/63933号（引用により本明細書中に包含させる）に記載される。

C 1 2 - 2 0 0 を含有する製剤は、2 0 0 9 年 5 月 5 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 1 7 5 , 7 7 0 号、および 2 0 1 0 年 5 月 5 日に出願された国際出願 P C T / U S 1 0 / 3 3 7 7 7 号（それらは、引用により本明細書中に包含される）に記載される。

【0 4 1 5】

イオン性／カチオン性脂質の合成

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

【0 4 1 6】

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

【0 4 1 7】

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

【0 4 1 8】

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

【0 4 1 9】

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

【0 4 2 0】

“ヘテロ環”は、下のヘテロ環のいずれかがベンゼン環に融合する二環を含む、窒素、酸素および硫黄から独立して選択される1または2個のヘテロ原子を含有する、飽和、不飽和または芳香族のいずれかの5～7員の単環、または7～10員の二環、ヘテロ環式環を意味し、ここで、窒素および硫黄ヘテロ原子は所望により酸化されていてよく、窒素ヘテロ原子は所望により四級化されていてよい。ヘテロ環は、あらゆるヘテロ原子または炭素原子を介して付着し得る。ヘテロ環としては、以下に定義されるヘテロアリールが挙げられる。ヘテロ環としては、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル(piperidinyl)、ピペリジニル(piperizynyl)、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロプイミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニルなどが挙げられる。

【0 4 2 1】

用語“置換されていてよいアルキル”、“置換されていてよいアルケニル”、“置換されていてよいアルキニル”、“置換されていてよいアシル”および“置換されていてよいヘテロ環”は、置換されるとき、少なくとも1つの水素原子が置換基で置換されていることを意味する。オキシ置換基(=O)の場合、2つの水素原子が置換される。

この点において、置換基としては、オキソ、ハロゲン、ヘテロ環、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}_x$ 、 $-\text{NR}_x\text{R}_y$ 、 $-\text{NR}_x\text{C}(=\text{O})\text{R}_y$ 、 $-\text{NR}_x\text{SO}_2\text{R}_y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_x\text{R}_y$ 、 $-\text{SONR}_x$ 、および $-\text{SONNR}_x\text{R}_y$ が挙げられ、式中、 n は0、1または2であり、 R_x および R_y は同じかまたは異なり、独立して水素、アルキルまたはヘテロ環であり、該アルキルおよびヘテロ環置換基のそれぞれは、1つまたは複数のオキソ、ハロゲン、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、アルキル、 $-\text{OR}_x$ 、ヘテロ環、 $-\text{NR}_x\text{R}_y$ 、 $-\text{NR}_x\text{C}(=\text{O})\text{R}_y$ 、 $-\text{NR}_x\text{SO}_2\text{R}_y$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_x$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_x\text{R}_y$ 、 $-\text{SONR}_x$ 、および $-\text{SONNR}_x\text{R}_y$ によってさらに置換されていてよい。

【0422】

10

“ハロゲン”は、フルオロ、クロロ、ブロモ、およびヨードを意味する。

【0423】

ある態様において、本発明の方法は、保護基の使用を必要とし得る。保護基の手順は、当業者に周知である（例えばProtective Groups in 有機合成, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999を参照のこと）。要約すれば、本発明の文脈では、保護基は、官能基の望ましくない反応性を低下させまたは排除する、任意の基である。保護基は官能基に付加されて、特定の反応中にその反応性をマスクし、その後、除去されて元の官能基を曝露し得る。いくつかの態様では、“アルコール保護基”が使用される。“アルコール保護基”は、アルコール官能基の望ましくない反応性を低下させまたは排除する、任意の基である。保護基は、当技術分野で周知の技術を使用して、付加され、そして除去され得る。

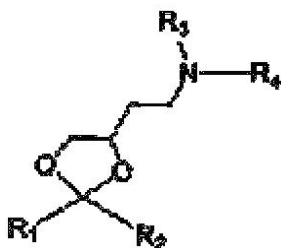
20

【0424】

式Aの合成

ある態様において、本発明の核酸脂質粒子は、式A、

【化17】



30

（式中、 R_1 および R_2 は、独立して、それぞれ置換されていてもよい、アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり、 R_3 および R_4 は、独立して、低級アルキルであるか、または R_3 および R_4 は、一体となって、置換されていてもよいヘテロ環式環を形成し得る）のカチオン性脂質を使用して製剤される。ある態様において、カチオン性脂質は、XTC(2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1, 3]-ジオキソラン)である。一般に、上の式Aの脂質は、他に特記しない限り、全ての置換基が上で定義されたとおりである、以下の反応スキーム1または2によって作成され得る。

40

【0425】

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

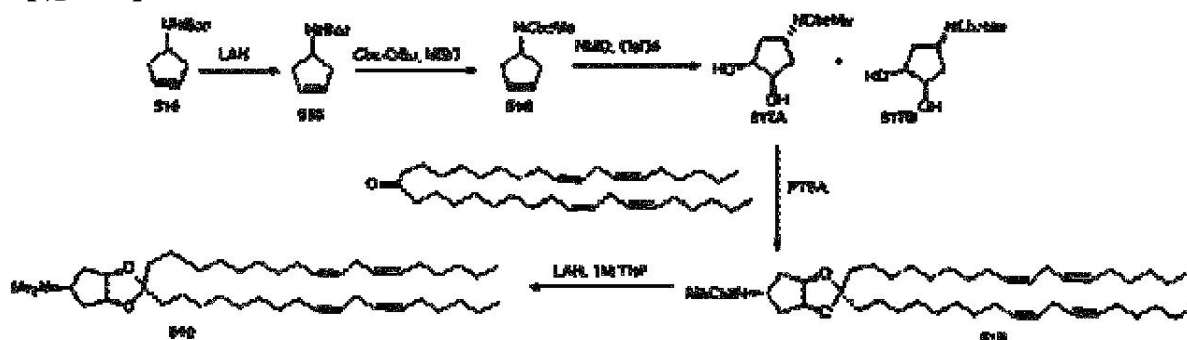
10

【0428】

ALNY-100の合成

以下のスキーム 3 を用いて、ケタール 519 [ALNY-100] の合成を実施した。

【化20】



20

【0429】

515の合成

ニ口RBF (1 L) 内の、200 mL の無水THF中のLiAlH₄ (3.74 g、0.09852 mol) の攪拌懸濁液に、70 mL のTHF中の514 (10 g、0.04926 mol) の溶液を0~0℃において窒素雰囲気下でゆっくり添加した。添加完了後、反応混合物を室温に加熱し、次に4時間加熱還流した、反応の進捗は、TLCによってモニターした。反応完了 (TLCによる) 後、混合物を0~0℃に冷却し、飽和Na₂SO₄ 溶液の慎重な添加によってクエンチした。反応混合物を室温で4時間攪拌し、濾過した。残渣をTHFでよく洗浄した。濾液および洗浄液を混合し、400 mL のジオキサンおよび26 mL の濃HClで希釈して、室温で20分間攪拌した。揮発性 (volatiles) を真空下で取り除き、515の塩酸塩を白色固体として得た。収量: 7.12 g 1H-NMR (DMSO, 400 MHz): δ = 9.34 (broad, 2H)、5.68 (s, 2H)、3.74 (m, 1H)、2.66-2.60 (m, 2H)、2.50-2.45 (m, 5H)。

30

【0430】

516の合成

250 mL のニ口RBF中、100 mL の乾燥DCM中の化合物515の攪拌溶液に、NEt₃ (37.2 mL、0.2669 mol) を添加して、窒素雰囲気下で0~0℃に冷却した。50 mL の乾燥DCM中、N-(ベンジルオキシカルボニルオキシ)-スクシンイミド (20 g、0.08007 mol) をゆっくり添加後、反応混合物が室温に暖まるまで放置した。反応完了後 (TLCにより、2~3時間後)、混合物を1N HCl 溶液 (1×100 mL) および飽和NaHCO₃ 溶液 (1×50 mL) で連続的に洗浄した。次いで、無水Na₂SO₄ 上で有機層を乾燥させ、溶媒を蒸発させて粗製物を得て、それをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、516を粘着性塊として得た。収量: 11 g (89%) 1H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.36-7.27 (m, 5H)、5.69 (s, 2H)、5.12 (s, 2H)、4.96 (

40

50

b r . 、 1 H) 、 2 . 7 4 (s 、 3 H) 、 2 . 6 0 (m 、 2 H) 、 2 . 3 0 - 2 . 2 5 (m 、 2 H) 。 L C - M S [M + H] - 2 3 2 . 3 (9 6 . 9 4 %) 。

【0431】

517Aおよび517Bの合成

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

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

【0432】

518の合成

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

【0433】

化合物519の合成の基本手順

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

【0434】

標準法または押出のない方法のいずれかによって調製された製剤は、同様の方法で特徴付けることができる。例えば製剤は、典型的に外観検査によって特徴付けられる。それらは凝集体または沈降物を含まない、白みがあった半透明溶液であるべきである。脂質-ナノ粒子の粒度および粒度分布は、例えばMalvern Zetasizer Nano ZS（Malvern, USA）を使用して、光散乱によって測定し得る。粒度は、例えば40~100nmなどの、約20~300nmであるべきである。粒度分布は、単峰

型分布であるべきである。製剤ならびに封入画分中の総dsRNA濃度は、色素排除アッセイを使用して推定された。製剤されたdsRNAのサンプルを、例えば0.5% Triton-X 100などの製剤破壊性界面活性剤の存在または不在下で、Ribogreen (Molecular Probes)などのRNA結合色素と共にインキュベートし得る。製剤中の総dsRNAは、標準曲線と比較して、界面活性剤含有サンプルからのシグナルによって決定され得る。封入画分は、総dsRNA含量から、“遊離”dsRNA含量(界面活性剤不在下のシグナルにより測定される)を減じて決定される。封入dsRNA割合は、典型的に>85%である。SNALP製剤では、粒度は、少なくとも30nm、少なくとも40nm、少なくとも50nm、少なくとも60nm、少なくとも70nm、少なくとも80nm、少なくとも90nm、少なくとも100nm、少なくとも110nm、および少なくとも120nmである。好適な範囲は、一般的に、少なくとも約50nmから少なくとも約110nm、少なくとも約60nmから少なくとも約100nm、または少なくとも約80nmから少なくとも約90nmである。

【0435】

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

10

20

30

40

50

NAの経口製剤およびそれらの調製は、米国特許第6,887,906号、米国特許出願公開第20030027780号、および米国特許第6,747,014号（それらは各々、引用により本明細書中に包含される）に詳細に記載される。

【0436】

非経腸、脳実質内（脳内）、クモ膜下腔内、脳室内または肝臓内投与のための組成物および製剤は、滅菌水溶液を含んでいてよく、それはまた、緩衝液と、希釈剤と、ならびに浸透促進剤、担体化合物、およびその他の薬学的に許容される担体または賦形剤などを含むが、これに限定されない、その他の好適な添加剤とを含有し得る。

【0437】

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

【0438】

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

【0439】

本発明の組成物は、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐薬、および浣腸などであるが、これに限定されない、多数の可能な投与量形態のいずれかに製剤され得る。本発明の組成物は、また、水性、非水性または混合媒体中の懸濁液として製剤され得る。水性懸濁液は、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールおよび／またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増大させる物質をさらに含有し得る。懸濁液は、安定化剤もまた含有し得る。

【0440】

C. 追加的な製剤

i. エマルジョン

本発明の組成物は、エマルジョンとして調製し製剤され得る。エマルジョンは、一般的に、通常、直径が0.1 μmを超える小滴形態で、別の液体中に分散する1種の不均一液体である（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301を参照のこと）。エマルジョンは、密接に混合して互いに分散する、2つの不混和性液体相を含んでなる、二相性システムであることが多い。一般的に、エマルジョンは、油中水型（w/o）または水中油型（o/w）のいずれかであり得る。水性相がバルク油相中に微細分散して、微小滴として分散される場合、得られた組成物は、油中水型（w/o）エマルジョンと称される。あるいは、油性相がバルク水相中に微細分散して、微小滴として分散される場合、得られた組成物は、水中油型（o/w）エマルジョンと称される。エマルジョンは、分散相と、水性相および油性相いずれかの中の溶液として、またはそれ自体が別個の相として存在し得る、活性薬剤とに加えて、さらなる成分を含有し得る。乳化剤、安定化剤、染料、および抗酸化物質などの医薬品賦形剤はまた、必要に応じてエマルジョン中に存在し得る。医薬品エマルジョンはまた、例えば油中水中油型（o/w/o）および水中油中水型（w

10

20

30

40

50

／o／w) エマルジョンなどの場合、3つ以上の相を含んでなる複数エマルジョンであり得る。このような複合体製剤は、単純な二成分エマルジョンが提供しない、特定の利点を提供することが多い。その中でo／wエマルジョンの個々の油滴が小さな水滴を囲い込む複数エマルジョンは、w／o／wエマルジョンを構成する。同様に、水の小球中に封入されて、油性連続相内で安定化される油滴システムは、o／w／oエマルジョンを提供する。

【0441】

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

【0442】

界面活性剤としてもまた知られている合成界面活性剤は、エマルジョン製剤において幅広い用途があり、文献で概説されている（例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199)を参照のこと）。界面活性剤は、一般的に両親媒性であり、親水性および疎水性部分を含んでなる。界面活性剤の親水性と疎水性の比率は、親水性／親油性バランス（HLB）と称され、製剤の調製において界面活性剤を分類し選択する上で有益な手段である。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて、異なるクラスに分類され得る：非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性（例えばAnsel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285を参照のこと）。

【0443】

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

【0444】

多岐にわたる非乳化材料もまたエマルジョン製剤に含まれて、エマルジョンの特性に寄与する。これらとしては、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪酸エステル、湿潤剤、親水性コロイド、防腐剤および抗酸化剤が挙げられる（Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, I

10

20

30

40

50

nc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0445】

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

10

【0446】

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

20

【0447】

皮膚、経口、および非経腸経路を通じたエマルジョン製剤の適用と、それらを製造する方法については、文献で概説されている。（例えば、Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照のこと）。経口送達のためのエマルジョン製剤は、製剤の容易さ、ならびに吸収およびバイオアベイラビリティの観点からの効率のために、幅広く使用されている（例えば、Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照のこと）。鉱物油ベースの緩下剤、油溶性ビタミン、および高脂肪栄養剤は、一般にo/wエマルジョンとして経口投与されている材料の一つである。

30

【0448】

i i. マイクロエマルジョン

40

本発明の一態様において、iRNAと核酸の組成物は、マイクロエマルジョンとして製剤される。マイクロエマルジョンは、単一の光学的に等方性で熱力学的に安定している溶液である、水、油、および両親媒性物質のシステムと定義され得る（例えば、Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245を参照のこと）。一般的に、マイクロエマルジョンは、最初に油を水性界面活性剤溶液に分散して、次に一般に中間鎖長のアルコールである、十分な量の第4の成分を添加し、透明なシステムを形成することで、調製されるシステムである。従って、マイクロエマルジョンは、界面活性分子の界面

50

膜によって安定化された、2つの不混和性液体の熱力学的に安定した等方的に透明な分散体として記述されている (Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215)。マイクロエマルジョンは、通常、油、水、界面活性剤、共界面活性剤、および電解質を含む、3～5成分の組み合わせを通じて調製される。マイクロエマルジョンが、油中水型 (w/o) または水中油型 (o/w) であるかどうかは、使用される油および界面活性剤の特性と、界面活性剤分子の極性頭部および炭化水素尾部の構造および幾何学的充填とに左右される (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0449】

状態図を利用した現象学的アプローチは、広範に研究されており、マイクロエマルジョンの製剤法に関する包括的知識が、当業者にもたらされている (例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335を参照のこと)。従来のエマルジョンと比較して、マイクロエマルジョンは、水不溶性薬剤を自然発生的に形成される熱力学的に安定した小滴の配合物に可溶化する利点を提供する。

【0450】

マイクロエマルジョンの調製で使用される界面活性剤としては、単独のまたは共界面活性剤と組み合わせられた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート (ML310)、テトラグリセロールモノオレアート (MO310)、ヘキサグリセロールモノオレアート (PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレアート (PO500)、デカグリセロールモノカプレート (MCA750)、デカグリセロールモノオレアート (MO750)、デカグリセロールセキオレアート (sequioleate) (SO750)、デカグリセロールデカオレアート (DAO750) が挙げられるが、これに限定されない。通常、エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノールなどの短鎖アルコールである共界面活性剤は、界面活性剤塗膜に浸透することにより界面流動性を増大させるのに役立ち、その結果、界面活性剤分子間に生じる隙間に起因する不規則塗膜を作り出す。しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用なしに調製され得、アルコール非含有自己乳化マイクロエマルジョン系は、当技術分野で公知である。水性相は、一般的に、水、薬剤水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコール誘導体であり得るが、これに限定されない。油性相としては、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8-C12) モノ、ジ、およびトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化グリセリド、飽和ポリグリコール化C8-C10グリセリド、植物油、およびシリコン油などの材料が挙げられるが、これに限定されない。

【0451】

マイクロエマルジョンは、薬剤可溶化と薬剤吸収改善の観点から、特に興味深い。脂質ベースのマイクロエマルジョン (o/wおよびw/oの両方) が、ペプチドを含む薬剤の経口バイオアベイラビリティを高めるために、提案されている (例えば、米国特許第6,191,105号; 同第7,063,860号; 同第7,070,802号; 同第7,157,099号; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205を参照のこと)。マイクロエマルジョンは、薬剤可溶化改善、酵素加水分解からの薬剤保護、界面活性剤が誘発する膜の流動性と透過度の変化に起因する予想される薬剤吸収増強、調製の容易さ、

10

20

30

40

50

固体投与量形態に比した経口投与の容易さ、臨床効力改善、および毒性低下の利点をもたらす（例えば、米国特許第6,191,105号；同第7,063,860号；同第7,070,802号；同第7,157,099号；Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385；Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143を参照のこと）。マイクロエマルジョンは多くの場合、それらの成分を環境温度で共に合わせた場合に、自然発生的に形成することができる。これは、熱不安定性薬剤、ペプチドまたはiRNAを製剤する場合に、特に有利となり得る。マイクロエマルジョンは、美容および医薬用途の両方で、活性成分の経皮送達に効果的であった。本発明のマイクロエマルジョン組成物および製剤は、iRNAおよび核酸の胃腸管からの全身性吸収の増大を容易にし、ならびにiRNAおよび核酸の局所性細胞内取り込みを改善することが期待される。

10

【0452】

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

【0453】

i i i. 微粒子

20

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

【0454】

i v. 浸透促進剤

一態様において、本発明は、種々の浸透促進剤を用いて、核酸、特にiRNAの動物皮膚への効率的な送達をもたらす。ほとんどの薬剤は、イオン化および非イオン化形態の両方で、溶液中に存在する。しかし通常、脂質可溶性または親油性薬剤のみが、細胞膜を容易に通過する。通過する膜が浸透促進剤で処理されれば、非親油性薬剤でさえも細胞膜を通過し得ることが発見されている。細胞膜横切る非親油性薬剤の拡散を助けるのに加えて、浸透促進剤はまた、親油性薬剤の透過性を高める。

30

【0455】

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

【0456】

界面活性剤（または“表面活性剤”）は、水溶液に溶解すると、溶液の表面張力、または水溶液と別の液体との界面張力を低下させて、粘膜を通じたiRNA吸収の改善をもたらす、化学物質である。胆汁塩と脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤としては、例えばラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル（例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002；Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92を参照のこと）；およびFC-43などのペルフルオロ化合物エマルジョン。Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252）が挙げられる。

40

【0457】

浸透促進剤として作用する種々の脂肪酸およびそれらの誘導体としては、例えばオレイ

50

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

10

【0458】

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

20

30

【0459】

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

40

50

in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51を参照のこと)。

【0460】

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

【0461】

細胞レベルのiRNA取り込みを高める作用物質もまた、本発明の医薬およびその他の組成物に添加し得る。例えばリポフェクチンなどのカチオン性脂質(Junichiらの、米国特許第5,705,188号)、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリリジンなどのポリカチオン性分子(Lolloらの、国際公開第97/30731号)もまた、dsRNAの細胞内取り込みを高めることが知られている。市販される形質移入試薬の例としては、例えば特に、Lipofectamine(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、293fectin(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、Cellfectin(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、DMRIE-C(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、FreeStyle(商標) MAX(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000 CD(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、Lipofectamine(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、iRNAMAX(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、Oligofectamine(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、Optifect(商標)(Invitroge(商標); Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2形質移入試薬(Roche; Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOTAP Liposomal形質移入試薬(Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOSPER Liposomal形質移入試薬(Grenzacherstrasse, Switzerland)、またはFugene(Grenzacherstrasse, Switzerland)、Transfectam(登録商標)試薬(Promega(登録商標); Madison, WI)、TransFast(商標)形質移入試薬(Promega(登録商標); Madison, WI)、Tfx(商標)-20試薬(Promega(登録商標); Madison, WI)、Tfx(商標)-50試薬(Promega(登録商標); Madison, WI)、DreamFect(商標)(OZ Biosciences; Marseille, France)、EcoTransfect(OZ Biosciences; Marseille, France)、TransPass(商標)D1形質移入試薬(New England Biolabs(商標); Ipswich, MA, USA)、Lyove(商標)/LipoGen(商標)(Invitroge(商標); San Diego, CA, USA)、PerFectin形質移入試薬(Genlantis(商標); San Diego, CA, USA)、NeuroPORTER(登録商標)形質移入試薬(Genlantis(商標); San Diego, CA, USA)、GenePORTER(登録商標)形質移入試薬(Genlantis(商標); San Diego, CA, USA)、GenePORTER(登録商標)2形質移入試薬(Genlantis(商標); San Diego, CA, USA)、Cytofectin形質移入試薬(Genlantis(商標); San Diego, CA, USA)、BaculoPORTER(登録商標)形質移入試薬(Genlantis(商標); San Diego, CA, USA)、TroganPORTER(商標)形質移入試薬(Genlantis(商標); San Diego, CA, USA)、RiboFect(Biolin(商標); Taunton, MA, USA)、PlasFect(Biolin(商標); Taunton, MA, USA)、UniFECTOR(B-Bridge International(商標); Mountain View, CA, USA)、SureFECTOR(B-Bridge International(商標); Mountain View, CA, USA)、またはHiFect(商標)(B-Bridge International(商標); Mountain View, CA, USA)などが挙げられる。

【0462】

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

【0463】

v. 担体

本発明の特定の組成物は、また製剤中に担体化合物が組み込まれる。本明細書で用いる“担体化合物”または“担体”は、不活性（すなわちそれ自体は生物学的活性を有しない）であるが、例えば生物学的に活性の核酸を分解し、またはその循環からの除去を促進することで、生物学的活性を有する核酸のバイオアベイラビリティを低下させる、インビボ過程によって核酸と認識される、核酸またはその類縁体を意味し得る。核酸および担体化合物の、一般的に、後者の物質の過剰量での同時投与は、恐らく通常受容体に対する担体化合物と核酸間の競合のために、肝臓、腎臓またはその他の循環外貯蔵器で回収される核酸量の実質的低下をもたらし得る。例えば肝臓組織内の部分的ホスホロチオエート dsRNA の回収は、それが、ポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジック (polycytidic) 酸または4-アセトアミド-4'-イソチオシアノースチルベン-2, 2'-ジスルホン酸と同時投与された場合に、低下し得る (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

【0464】

vi. 賦形剤

担体化合物とは対照的に、“薬学的担体”または“賦形剤”は、1つまたは複数の核酸を動物に送達するための、薬学的に許容される溶媒、懸濁化剤または任意の他の薬理学的に不活性なビークルである。賦形剤は液体または固体であり得て、核酸および所定の医薬組成物のその他の成分と組み合わせた際に、所望のバルク、粘稠度などを提供するように、計画される投与様式をもとに選択される。一般的な薬学的担体としては、結合剤（例えば、 α 化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；充填剤（例えば、ラクトースおよびその他の糖類、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレートまたはリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、二酸化ケイ素のコロイド、ステアリン酸、ステアリン酸金属塩、硬化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど）；および湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0465】

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

【0466】

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

【0467】

好適な薬学的に許容される賦形剤としては、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン (viscous paraffin)、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0468】

v i i . その他の成分

本発明の組成物は、医薬組成物中に従来法で見られるその他の補助剤成分を、技術分野で確立されたそれらの使用レベルで、さらに含有し得る。従って、例えば組成物は、例えば、痒み止め (antipruritics)、収斂剤 (astringent)、局所麻酔薬または抗炎症剤などのさらなる適合性の薬理的に活性な材料を含有することができ、または染料、香味剤、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、濃化剤、および安定化剤などの本発明の組成物の種々の剤形を物理的に製剤する上で有用な追加的材料を含有し得る。しかしこのような材料は、添加した場合に、本発明の組成物の成分の生物学的活性に過度に干渉すべきでない。製剤は滅菌され得て、所望ならば、製剤の核酸(複数可)と有害に相互作用しない、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧圧力に影響を及ぼす塩、緩衝液、着色料、香料および／または芳香族物質などの助剤と混合される。

10

【0469】

水性懸濁液は、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールおよび／またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増大させる物質を含有し得る。懸濁液は、安定剤もまた含有し得る。

【0470】

ある態様において、本発明で取り上げる医薬組成物は、(a) 1つまたは複数の iRNA 化合物、および (b) 非 iRNA 機序によって機能し、溶血性障害の治療に有用な 1つまたは複数の薬剤を含む。このような薬剤の例としては、抗炎症剤、抗脂肪症薬、抗ウイルス剤、および／または抗線維症薬が挙げられるが、これらに限定されない。それに加えて、シリマリンなどの肝臓を保護するのに一般に使用されるその他の物質もまた、本明細書に記載される iRNA と併用し得る。肝臓疾患の治療に有用なその他の薬剤としては、テルビブジンと、エンテカビルと、テラプレビルおよび例えば Tungらの米国特許出願公開第 2005/0148548 号、米国特許出願公開第 2004/0167116 号、および米国特許出願公開第 2003/0144217 号；および Haleらの、米国特許出願公開第 2004/0127488 号で開示されたものなどのプロテアーゼ阻害剤が挙げられる。

20

【0471】

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

30

【0472】

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

40

【0473】

本明細書で取り上げる iRNA は、上記で考察されるそれらの投与に加えて、AGT 発現によって媒介される病理過程の治療に効果的なその他の既知の作用物質と組み合わせて、投与され得る。いずれにしても処置を行う医師は、当技術分野で公知のまたは本明細書

50

に記載される、有効性の標準的手段を使用して観察される結果に基づいて、iRNA投与の量およびタイミングを調節し得る。

【0474】

VII. 発明の方法

本発明はまた、本発明のiRNAを含む医薬組成物、または本発明のiRNAを含むベクターを、AGT関連疾患、障害、および／または病状（例えば、高血圧）を有するか、またはそれを発症し易い対象に投与することを含む、治療法および予防法を提供する。

【0475】

一面において、本発明は、AGT発現の低下により利点を有し得る障害、例えば、AGT関連疾患、例えば高血圧、例えば、境界域高血圧（高血圧前症としても公知）、原発性高血圧（本態性高血圧または特発性高血圧としても公知）、二次性高血圧（非本態性高血圧としても公知）、高血圧緊急症（悪性高血圧としても公知）、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧（例えば、子癇前症、子癇および出産後の子癇前症）、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧（腎性高血圧としても公知）、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害（末梢血管疾患を含む）、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心室線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全（例えば、左心室収縮機能障害）、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病（例えば、糖尿病性腎症）、腎疾患、例えば、要すれば妊娠に関連する慢性腎臓病または糖尿病性腎症、腎不全、例えば、慢性腎不全、認知機能障害（例えば、アルツハイマー）、および全身性硬化症（例えば、強皮症腎クリーゼ）を有する対象の処置法を提供する。任意の態様において、AGT関連疾患には、子宮内胎児発育遅延（IUGR）または胎児発育不全が含まれる。本発明の処置法（および使用）は、対象、例えばヒトに、治療的有效量の、AGT遺伝子を標的とするiRNA薬またはAGT遺伝子を標的とするiRNA薬を含む医薬組成物を投与して、それによりAGT発現の低下により利点を有し得る障害を有する対象を処置することを含む。

【0476】

一面において、本発明は、AGT発現の低下により利点を有し得る障害を有する対象における少なくとも1つの症状、例えば、AGT関連疾患、例えば、高血圧、例えば、境界域高血圧（高血圧前症としても公知）、原発性高血圧（本態性高血圧または特発性高血圧としても公知）、二次性高血圧（非本態性高血圧としても公知）、高血圧緊急症（悪性高血圧としても公知）、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧（例えば、子癇前症、子癇および出産後の子癇前症）、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧（腎性高血圧としても公知）、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害（末梢血管疾患を含む）、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心室線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全（例えば、左心室収縮機能障害）、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病（例えば、糖尿病性腎症）、腎疾患、例えば、要すれば妊娠に関連する慢性腎臓病または糖尿病性腎症、腎不全、例えば、慢性腎不全、認知機能障害（例えば、アルツハイマー）、および全身性硬化症（例えば、強皮症腎クリーゼ）を阻止する方法を提供する。任意の態様において、AGT関連疾患には、子宮内胎児発育遅延（IUGR）または胎児発育不全が含まれる。この方法は

、対象に、治療的有効量の、本発明の i R N A 薬、例えば d s R N A、またはベクターを投与して、それにより A G T 発現の低下により利点を有し得る障害を有する対象における少なくとも 1 つの症状を阻止することを含む。

【0477】

別の面において、本発明は、対象、例えば、A G T 発現の低下および／または阻害により利点を有し得る障害を有する対象の処置のための、治療的有効量の本発明の i R N A 薬の使用を提供する。

【0478】

さらなる面において、本発明は、対象、例えば、A G T 発現の低下により利点を有し得る障害、例えば、A G T 関連疾患、例えば高血圧、例えば、境界域高血圧（高血圧前症としても公知）、原発性高血圧（本態性高血圧または特発性高血圧としても公知）、二次性高血圧（非本態性高血圧としても公知）、高血圧緊急症（悪性高血圧としても公知）、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧（例えば、子癇前症、子癇および出産後の子癇前症）、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧（腎性高血圧としても公知）、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害（末梢血管疾患を含む）、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心室線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルコルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全（例えば、左心室収縮機能障害）、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病（例えば、糖尿病性腎症）、腎疾患、例えば、要すれば妊娠に関連する慢性腎臓病または糖尿病性腎症、腎不全、例えば、慢性腎不全、認知機能障害（例えば、アルツハイマー）、および全身性硬化症（例えば、強皮症腎クリーゼ）などを有する対象などの、A G T 発現の低下および／または阻害により利点を有し得る障害を有する対象を処置するための医薬の製造における、A G T 遺伝子を標的とする本発明の i R N A 薬、例えば、d s R N A、または A G T 遺伝子を標的とする i R N A 薬を含む医薬組成物の使用を提供する。任意の態様において、A G T 関連疾患は、子宮内胎児発育遅延（I U G R）または胎児発育不全を含む。

【0479】

別の面において、本発明は、A G T 発現の低下および／または阻害により利点を有し得る障害、例えば A G T 関連疾患、例えば、高血圧、例えば、境界域高血圧（高血圧前症としても公知）、原発性高血圧（本態性高血圧または特発性高血圧としても公知）、二次性高血圧（非本態性高血圧としても公知）、高血圧緊急症（悪性高血圧としても公知）、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧（例えば、子癇前症、子癇および出産後の子癇前症）、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧（腎性高血圧としても公知）、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害（末梢血管疾患を含む）、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心室線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルコルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全（例えば、左心室収縮機能障害）、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病（例えば、糖尿病性腎症）、腎疾患、例えば、要すれば妊娠に関連する慢性腎臓病または糖尿病性腎症、腎不全、例えば、慢性腎不全、認知機能障害（例えば、アルツハイマー）、および全身性硬化症（例えば、強皮症腎クリーゼ）などを有する対象における少なくとも 1 つの症状を阻止するための、本発明の i R N A、例えば d s R N A の使用を提供する。任意の態様において、A G T 関連疾患は、子宮内

10

20

30

40

50

胎児発育遅延（IUGR）または胎児発育不全を含む。

【0480】

さらなる面において、本発明は、AGT発現の低下および／または阻害により利点を有し得る障害、例えばAGT関連疾患、例えば、高血圧、例えば、境界域高血圧（高血圧前症としても公知）、原発性高血圧（本態性高血圧または特発性高血圧としても公知）、二次性高血圧（非本態性高血圧としても公知）、高血圧緊急症（悪性高血圧としても公知）、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、妊娠関連高血圧（例えば、子癇前症、子癇および出産後の子癇前症）、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎血管性高血圧（腎性高血圧としても公知）、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害（末梢血管疾患を含む）、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心室線維症、クッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色細胞腫、レニン腫症候群（reninoma）、続発性アルドステロン症および他のミネラルコルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全（例えば、左心室収縮機能障害）、心筋梗塞、狭心症、卒中、真性糖尿病（例えば、糖尿病性腎症）、腎疾患、例えば、要すれば妊娠に関連する慢性腎臓病または糖尿病性腎症、腎不全、例えば、慢性腎不全、認知機能障害（例えば、アルツハイマー）、および全身性硬化症（例えば、強皮症腎クリーゼ）などを有する対象における少なくとも1つの症状の阻止のための医薬の製造における、本発明のiRNA薬の使用を提供する。任意の態様において、AGT関連疾患は、子宮内胎児発育遅延（IUGR）または胎児発育不全を含む。

【0481】

一態様において、AGTを標的とするiRNA薬は、該dsRNA薬をAGT関連疾患を有する対象に投与するとき、例えば、対象の細胞、組織、血液またはその他の組織または体液中のAGTレベルを、少なくとも約10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも約99%以上低下させるように、該対象に投与される。好ましい態様において、AGTレベルは少なくとも20%低下される。

【0482】

本発明の方法および使用は、標的AGT遺伝子の発現が、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、または約80時間に亘って低下するように、本明細書に記載の組成物を投与することを含む。一態様において、標的AGT遺伝子の発現は、少なくとも約2、3、4、5、6、7日間以上、例えば約1週間、2週間、3週間、または約4週間以上などの長期間にわたって低下する。

【0483】

本発明の方法および使用に従うdsRNAの投与は、AGT関連疾患を有する対象において、このような疾患または障害の重症度、徴候、症状および／またはマーカーの低下をもたらしてもよい。“低下”とは、この文脈中、このようなレベルの統計的に有意な低下を意味する。低下は、例えば、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または約100%であり得る。好ましい態様において、

A G Tレベルは少なくとも20%低下される。

【0484】

疾患の治療または予防の効能は、例えば、疾患進行、疾患寛解、症状重症度、疼痛減少、生活の質、治療効果維持に必要な薬剤用量、疾病マーカレベルまたは治療されるもしくは予防目標である所定の疾患に適する任意の他の測定可能パラメータレベルを測定することで評価し得る。このようなパラメーターのいずれか1つ、またはパラメーターの任意の組み合わせを測定することで、治療または予防有効性をモニターすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば異脂肪血症高血圧治療の効能は、例えば血圧を周期的にモニターすることで、評価してもよい。最初の読み取りと後の読み取りの比較は、治療が効果的かどうかの指標を医師に提供する。このようなパラメーターのいずれか1つ、またはパラメーターの任意の組み合わせを測定することで、治療または予防有効性をモニターすることは、十分に当業者の能力の範囲内である。A G Tを標的にするi R N Aまたはその医薬組成物の投与との関連で、A G T関連疾患“に対して効果的”とは、臨床的に適当な様式での投与が、少なくとも統計学的に有意な割合の患者に、症状改善、治癒、疾患低減、延命、生活の質の改善、またはA G T関連疾患および関連原因の治療に精通している医者によって、好ましいと一般に認められているその他の効果などの有益な効果をもたらすことを意味する。

10

【0485】

病態の1つまたは複数のパラメーターに統計的に有意な改善がある場合、または処置がなければ予期される症状悪化または発症の欠如によって、治療または予防効果は明らかである。一例として、疾患の測定可能なパラメーターの少なくとも10%の、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%以上の好ましい変化は、効果的な治療を示唆し得る。所定のi R N A薬またはその薬剤の製剤の有効性はまた、当技術分野で公知の所定の疾患のための実験動物モデルを使用して、判定し得る。実験動物モデルを使用する場合、治療の有効性は、マーカーまたは症状の統計的に有意な低下が観察される場合に、証明される。アンジオテンシノーゲン関連疾患、例えば、高血圧の好適な動物モデルには、例えば、高血圧の遺伝的モデル、例えば、B P H / 2 マウス、高血圧自然発症ラット (S H R)、ダール塩感受性ラット (D S)、腎臓内レニンが抑制されたT G R (m R E N 2) 27トランスジェニックラット、および境界線高血圧ラット (B H R)、高血圧症の実験的に誘発モデル、例えば、腎性高血圧の実験的に誘発モデル、腎臓誘発性実験的高血圧のゴールドブラットモデル、腎臓垂全摘モデル、およびアンジオテンシン I I 誘導性高血圧 (例えば、Dornal and Silva (2011) J Biosci 36:731を参照のこと) が含まれる。好適な妊娠関連高血圧の動物モデルには、例えば、遺伝的モデル、例えば、境界高血圧マウス (例えば、B P H / 5 マウス)、ヒトレニンをコードする導入遺伝子およびヒトアンジオテンシノーゲンをコードする導入遺伝子を担持するラットおよび/またはマウス、ならびに実験的に誘導されたモデル、例えば、s F l t - 1 注入モデル、A T ₁ - A A - 誘導モデル、子宮内灌流圧低下 (R U P P) モデル (例えば、McCarthy, et al. (2011) 胎盤 32:413-419を参照のこと) が含まれる。

20

30

【0486】

対象には、約0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.15mg/kg、0.2mg/kg、0.25mg/kg、0.3mg/kg、0.35mg/kg、0.4mg/kg、0.45mg/kg、0.5mg/kg、0.55mg/kg、0.6mg/kg、0.65mg/kg、0.7mg/kg、0.75mg/kg、0.8mg/kg、0.85mg/kg、0.9mg/kg、0.95mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kgのdsRNA、2.6mg/kgのdsRNA、2.7mg/kgのdsRNA、2.8mg/kgのdsRNA、2.9mg/kgのdsRNA、3.

40

50

0 mg/kg の dsRNA、3. 1 mg/kg の dsRNA、3. 2 mg/kg の dsRNA、3. 3 mg/kg の dsRNA、3. 4 mg/kg の dsRNA、3. 5 mg/kg の dsRNA、3. 6 mg/kg の dsRNA、3. 7 mg/kg の dsRNA、3. 8 mg/kg の dsRNA、3. 9 mg/kg の dsRNA、4. 0 mg/kg の dsRNA、4. 1 mg/kg の dsRNA、4. 2 mg/kg の dsRNA、4. 3 mg/kg の dsRNA、4. 4 mg/kg の dsRNA、4. 5 mg/kg の dsRNA、4. 6 mg/kg の dsRNA、4. 7 mg/kg の dsRNA、4. 8 mg/kg の dsRNA、4. 9 mg/kg の dsRNA、5. 0 mg/kg の dsRNA、5. 1 mg/kg の dsRNA、5. 2 mg/kg の dsRNA、5. 3 mg/kg の dsRNA、5. 4 mg/kg の dsRNA、5. 5 mg/kg の dsRNA、5. 6 mg/kg の dsRNA、5. 7 mg/kg の dsRNA、5. 8 mg/kg の dsRNA、5. 9 mg/kg の dsRNA、6. 0 mg/kg の dsRNA、6. 1 mg/kg の dsRNA、6. 2 mg/kg の dsRNA、6. 3 mg/kg の dsRNA、6. 4 mg/kg の dsRNA、6. 5 mg/kg の dsRNA、6. 6 mg/kg の dsRNA、6. 7 mg/kg の dsRNA、6. 8 mg/kg の dsRNA、6. 9 mg/kg の dsRNA、7. 0 mg/kg の dsRNA、7. 1 mg/kg の dsRNA、7. 2 mg/kg の dsRNA、7. 3 mg/kg の dsRNA、7. 4 mg/kg の dsRNA、7. 5 mg/kg の dsRNA、7. 6 mg/kg の dsRNA、7. 7 mg/kg の dsRNA、7. 8 mg/kg の dsRNA、7. 9 mg/kg の dsRNA、8. 0 mg/kg の dsRNA、8. 1 mg/kg の dsRNA、8. 2 mg/kg の dsRNA、8. 3 mg/kg の dsRNA、8. 4 mg/kg の dsRNA、8. 5 mg/kg の dsRNA、8. 6 mg/kg の dsRNA、8. 7 mg/kg の dsRNA、8. 8 mg/kg の dsRNA、8. 9 mg/kg の dsRNA、9. 0 mg/kg の dsRNA、9. 1 mg/kg の dsRNA、9. 2 mg/kg の dsRNA、9. 3 mg/kg の dsRNA、9. 4 mg/kg の dsRNA、9. 5 mg/kg の dsRNA、9. 6 mg/kg の dsRNA、9. 7 mg/kg の dsRNA、9. 8 mg/kg の dsRNA、9. 9 mg/kg の dsRNA、9. 0 mg/kg の dsRNA、10 mg/kg の dsRNA、15 mg/kg の dsRNA、20 mg/kg の dsRNA、25 mg/kg の dsRNA、30 mg/kg の dsRNA、35 mg/kg の dsRNA、40 mg/kg の dsRNA、45 mg/kg の dsRNA、または約 50 mg/kg の dsRNA などの治療量の iRNA を投与し得る。上記の値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0487】

任意の態様において、例えば本発明の組成物が、本明細書に記載される dsRNA と、脂質とを含んでなる場合、対象に、約 0. 01 mg/kg から約 5 mg/kg、約 0. 01 mg/kg から約 10 mg/kg、約 0. 05 mg/kg から約 5 mg/kg、約 0. 05 mg/kg から約 10 mg/kg、約 0. 1 mg/kg から約 5 mg/kg、約 0. 1 mg/kg から約 10 mg/kg、約 0. 2 mg/kg から約 5 mg/kg、約 0. 2 mg/kg から約 10 mg/kg、約 0. 3 mg/kg から約 5 mg/kg、約 0. 3 mg/kg から約 10 mg/kg、約 0. 4 mg/kg から約 5 mg/kg、約 0. 4 mg/kg から約 10 mg/kg、約 0. 5 mg/kg から約 5 mg/kg、約 0. 5 mg/kg から約 10 mg/kg、約 1 mg/kg から約 5 mg/kg、約 1 mg/kg から約 10 mg/kg、約 1. 5 mg/kg から約 5 mg/kg、約 1. 5 mg/kg から約 10 mg/kg、約 2 mg/kg から約 2. 5 mg/kg、約 2 mg/kg から約 10 mg/kg、約 3 mg/kg から約 5 mg/kg、約 3 mg/kg から約 10 mg/kg、約 3. 5 mg/kg から約 5 mg/kg、約 4 mg/kg から約 5 mg/kg、約 4. 5 mg/kg から約 5 mg/kg、約 4 mg/kg から約 10 mg/kg、約 4. 5 mg/kg から約 10 mg/kg、約 5 mg/kg から約 10 mg/kg、約 5. 5 mg/kg から約 10 mg/kg、約 6 mg/kg から約 10 mg/kg、約 6. 5 mg/kg から約 10 mg/kg、約 7 mg/kg から約 10 mg/kg、約 7. 5 mg/kg から約 10

mg/kg、約8mg/kgから約10mg/kg、約8.5mg/kgから約10mg/kg、約9mg/kgから約10mg/kg、または約9.5mg/kgから約10mg/kgなどの治療量のiRNAを投与し得る。上記の値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

【0488】

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

【0489】

他の態様において、例えば本発明の組成物が、本明細書に記載されるdsRNAと、N-アセチルガラクトサミンとを含んでなる場合、対象に、約0.1から約50mg/kg、約0.25から約50mg/kg、約0.5から約50mg/kg、約0.75から約50mg/kg、約1から約50mg/kg、約1.5から約50mg/kg、約2から約50mg/kg、約2.5から約50mg/kg、約3から約50mg/kg、約3.5から約50mg/kg、約4から約50mg/kg、約4.5から約50mg/kg、約5から約50mg/kg、約7.5から約50mg/kg、約10から約50mg/kg、約15から約50mg/kg、約20から約50mg/kg、約20から約50mg/kg、約25から約50mg/kg、約25から約50mg/kg、約30から約50mg/kg、約35から約50mg/kg、約40から約50mg/kg、約45から約50mg/kg、約0.1から約45mg/kg、約0.25から約45mg/kg、約0.5から約45mg/kg、約0.75から約45mg/kg、約1から約45mg/kg、約1.5から約45mg/kg、約2から約45mg/kg、約2.5から約45mg/kg、約3から約45mg/kg、約3.5から約45mg/kg、約4から約45mg/kg、約4.5から約45mg/kg、約5から約45mg/kg、約7.5から約45mg/kg、約10から約45mg/kg、約15から約45mg/kg、約20から約45mg/kg、約20から約45mg/kg、約25から約45mg/kg、約25から約45mg/kg、約30から約45mg/kg、約35から約45mg/kg、約40から約45mg/kg、約0.1から約40mg/kg、約0.25から約40mg/kg、約0.5から約40mg/kg、約0.75から約40mg/kg、約1から約40mg/kg、約1.5から約40mg/kg、約2から約40mg/kg、約2.5から約40mg/kg、約3から約40mg/kg、約3.5から約40mg/kg、約4から約40mg/kg、約4.5から約40mg/kg、約5から約40mg/kg、約7.5から約40mg/kg、約10から約40mg/kg、約15から約40mg/kg、約20から約40mg/kg、約20から約40mg/kg、約25から約40mg/kg、約25から約40mg/kg、約30から約40mg/kg、約35から約40mg/kg、約40から約40mg/kg、約0.1から約30mg/kg、約0.25から約30mg/kg、約0.5から約30mg/kg、約0.75から約30mg/kg、約1から約30mg/kg、約1.5から約30mg/kg、約2から約30mg/kg、約2.5から約30mg/kg、約3から約30mg/kg、約3.5から約30mg/kg、約4から約30mg/kg、約4.5から約30mg/kg、約5から約30mg/kg、約7.5から約30mg/kg、約10から約30mg/kg、約15から約30mg/kg、

10

20

30

40

50

約20から約30mg/kg、約20から約30mg/kg、約25から約30mg/kg、約0.1から約20mg/kg、約0.25から約20mg/kg、約0.5から約20mg/kg、約0.75から約20mg/kg、約1から約20mg/kg、約1.5から約20mg/kg、約2から約20mg/kg、約2.5から約20mg/kg、約3から約20mg/kg、約3.5から約20mg/kg、約4から約20mg/kg、約4.5から約20mg/kg、約5から約20mg/kg、約7.5から約20mg/kg、約10から約20mg/kg、または約15から約20mg/kgの用量などの治療量のiRNAを投与し得る。一態様において、本発明の組成物が本明細書に記載のdsRNAおよびN-アセチルガラクトサミンを含む場合、対象には、約10～約30mg/kgの治療量のdsRNAが投与され得る。上記の値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

10

【0490】

例えば、対象には、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25、25.5、26、26.5、27、27.5、28、28.5、29、29.5、30、31、32、33、34、34.5、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または約50mg/kgなどの治療量のiRNAを投与し得る。上記の値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

20

【0491】

本発明の任意の態様において、例えば、二本鎖RNA i 薬が修飾（例えば、3つの連続するヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つまたはそれ以上のモチーフ）を有して、該薬剤の切断部位またはその近位にそのようなモチーフ、6個のホスホロチオエート結合およびリガンドを含む場合、このような薬剤は、約0.01から約0.5mg/kg、約0.01から約0.4mg/kg、約0.01から約0.3mg/kg、約0.01から約0.2mg/kg、約0.01から約0.1mg/kg、約0.01mg/kgから約0.09mg/kg、約0.01mg/kgから約0.08mg/kg、約0.01mg/kgから約0.07mg/kg、約0.01mg/kgから約0.06mg/kg、約0.01mg/kgから約0.05mg/kg、約0.02から約0.5mg/kg、約0.02から約0.4mg/kg、約0.02から約0.3mg/kg、約0.02から約0.2mg/kg、約0.02から約0.1mg/kg、約0.02mg/kgから約0.09mg/kg、約0.02mg/kgから約0.08mg/kg、約0.02mg/kgから約0.07mg/kg、約0.02mg/kgから約0.06mg/kg、約0.02mg/kgから約0.05mg/kg、約0.03から約0.5mg/kg、約0.03から約0.4mg/kg、約0.03から約0.3mg/kg、約0.03から約0.2mg/kg、約0.03から約0.1mg/kg、約0.03mg/kgから約0.09mg/kg、約0.03mg/kgから約0.08mg/kg、約0.03mg/kgから約0.07mg/kg、約0.03mg/kgから約0.06mg/kg、約0.03mg/kgから約0.05mg/kg、約0.04から約0.5mg/kg、約0.04から約0.4mg/kg、約0.04から約0.3mg/kg、約0.04から約

30

40

50

0.2 mg/kg、約0.04から約0.1 mg/kg、約0.04 mg/kgから約0.09 mg/kg、約0.04 mg/kgから約0.08 mg/kg、約0.04 mg/kgから約0.07 mg/kg、約0.04 mg/kgから約0.06 mg/kg、約0.05から約0.5 mg/kg、約0.05から約0.4 mg/kg、約0.05から約0.3 mg/kg、約0.05から約0.2 mg/kg、約0.05から約0.1 mg/kg、約0.05 mg/kgから約0.09 mg/kg、約0.05 mg/kgから約0.08 mg/kg、または約0.05 mg/kgから約0.07 mg/kgの用量で投与される。上記の値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図され、例えば、RNAi薬は、約0.015 mg/kgから約0.45 mg/kgの用量で対象に投与され得る。

10

【0492】

例えば、RNAi薬、例えば、医薬組成物中のRNAi薬は、約0.01 mg/kg、0.0125 mg/kg、0.015 mg/kg、0.0175 mg/kg、0.02 mg/kg、0.0225 mg/kg、0.025 mg/kg、0.0275 mg/kg、0.03 mg/kg、0.0325 mg/kg、0.035 mg/kg、0.0375 mg/kg、0.04 mg/kg、0.0425 mg/kg、0.045 mg/kg、0.0475 mg/kg、0.05 mg/kg、0.0525 mg/kg、0.055 mg/kg、0.0575 mg/kg、0.06 mg/kg、0.0625 mg/kg、0.065 mg/kg、0.0675 mg/kg、0.07 mg/kg、0.0725 mg/kg、0.075 mg/kg、0.0775 mg/kg、0.08 mg/kg、0.0825 mg/kg、0.085 mg/kg、0.0875 mg/kg、0.09 mg/kg、0.0925 mg/kg、0.095 mg/kg、0.0975 mg/kg、0.1 mg/kg、0.125 mg/kg、0.15 mg/kg、0.175 mg/kg、0.2 mg/kg、0.225 mg/kg、0.25 mg/kg、0.275 mg/kg、0.3 mg/kg、0.325 mg/kg、0.35 mg/kg、0.375 mg/kg、0.4 mg/kg、0.425 mg/kg、0.45 mg/kg、0.475 mg/kg、または約0.5 mg/kgの用量で投与され得る。上記の値の中間の値および範囲もまた、本発明の一部であることが意図される。

20

【0493】

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

30

【0494】

iRNA投与は、例えば患者の細胞、組織、血液、尿またはその他のコンパートメント中で、AGTレベルを少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または少なくとも約99%以上低下させ得る。

40

【0495】

iRNAの総用量の投与前に、5%輸液などのより少ない用量を患者に投与して、アレ

50

ルギー反応などの悪影響についてモニターし得る。他の例では、サイトカイン（例えばTNF- α またはINF- α ）レベルの増大などの望まれない免疫賦活性効果について、患者をモニターし得る。

【0496】

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

【0497】

本発明のiRNAは、“裸の(naked)”の形態で投与してもよく、ここで、修飾または非修飾iRNA薬は、“遊離iRNA”として、水溶液または好適な緩衝溶媒中に直接懸濁される。遊離iRNAは、医薬組成物の不存在下で投与される。遊離iRNAは、好適な緩衝溶液にあっててもよい。緩衝液は、酢酸エステル、クエン酸塩、プロタミン、炭酸、またはリン酸、またはそれらの任意の組み合わせを含んでなってもよい。一態様において、緩衝溶液は、リン酸緩衝食塩水(PBS)である。iRNAを含有する緩衝溶液のpHおよびモル浸透圧濃度は、対象への投与に適するように調節され得る。

【0498】

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

【0499】

AGT遺伝子発現の低下および／または阻害により利点を有し得る対象は、本明細書に記載のAGT関連疾患または障害を有する者である。

【0500】

AGT遺伝子発現の低下および／または阻害により利点を有し得る対象の処置は、治療的および予防的処置を含む。

【0501】

本発明は、AGT遺伝子発現の低下および／または阻害により利点を有し得る対象、例えばAGT関連疾患を有する対象を治療するための、iRNA薬またはその医薬組成物の、他の医薬品および／または他の治療法、例えば、これらの障害の処置のために現在しようされるものなどの公知の医薬品および／または公知の治療法と組み合わせた、方法および使用をさらに提供する。例えば、任意の態様において、AGTを標的とするiRNAは、例えば、本明細書の他の箇所に記載されるAGT関連疾患の処置に有用な薬剤と組み合わせて投与される。例えば、AGT発現の低下により利点を有し得る対象、例えばAGT関連疾患を有する対象を治療するのに適する追加の治療薬および治療法には、血管形成術、大動脈腎動脈バイパス、腎除神経、経皮経管腎血管形成術(PTRA)およびステント留置術、外科的血行再建術、カテーテルベースの腎交感神経除神経、ならびに褐色細胞腫またはレニン腫症候群(reninoma)の外科的除去、副腎摘出、利尿剤、例えば、チアジド系利尿剤、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、クロルタリドン、メトラゾン、およびインダパミド、カリウム保持性利尿薬、例えばトリウムテレンおよびアミロライド、ループ利尿薬、例えばフロセミド、トルセミド、エタクリン酸、およびブメタニド；アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤、例えば、ホシノプリル、カプトプリル、ラミプリル、エナラプリル、リシノプリルおよびキナプリル；アンジオテンシンII受容体拮抗薬(アンジオテンシン受容体遮断薬としても公知)、例えばロサルタン、バルサルタン、オルメサルタン、エプロサルタンおよびアジルサルタン； β 遮断薬、例えば β -1選択的 β 遮断薬、例えばアテノロール、メトプロロール、プロプラノロール、ビソプロロールおよびチモロール、アルファ1受容体 β 遮断薬、例えばラベタロール、エスモロールおよびカルベジロール、内因性交感神経刺激性 β 遮断薬、例えばアセブトロールおよびピンドロール；血管拡張薬、例えばヒドララジン、ミノキシジル、ニトロプルシドナトリウムおよびニトログリセリン；カルシウムチャネル遮断薬、例えばニフェジピン、クレビジピン、アムロジピン、フェロジピン、ジルチアゼム、ニカルジピンおよびベラパミル；アルドステロン拮抗薬、例えば、選択的アルドステロン拮抗薬、例えばエプレレノンおよびスピロノラクトン； α_2 -アゴニスト、例えば中枢性 α_2 -アゴニスト、例えばメチルドパ、クロニ

10

20

30

40

50

ジン、およびグアンファシン、レニン阻害剤、例えば、アリスキレン； α 遮断薬、例えばプラゾシン、テラゾシンおよびドキサゾシン；末梢作用アドレナリン作動剤、例えばレセルピン；選択的D₁受容体部分アゴニスト、例えばフェノルドパムメシル酸；非選択的 α アドレナリン作動性アンタゴニスト、例えばフェントラミン；合成ステロイド系アンチミネラルコルチコイド（antimineralocorticoid）剤、例えば、スピロノラクトン、または上記のいずれかの組み合わせ；および、薬剤の組み合わせとして製剤された治療剤、例えば、アムロジピン／ベナゼプリル（Lotrel）、アムロジピン／オルメサルタン（Azor）、アムロジピン／テルミサルタン（Twynsta）、アムロジピン／バルサルタン（Exforge）、アムロジピン／バルサルタン／ヒドロクロロチアジド（Exforge HCT）、アムロジピン／アリスキレン（Tekamlo）、アムロジピン／アリスキレン／ヒドロクロロチアジド（Amtur 10
nide）、オルメサルタン／アムロジピン／ヒドロクロロチアジド（Tribenzor）、トラン
ドラプリル／ベラパミル（Tarka）、ベナゼプリル／ヒドロクロロチアジド（Lotensin HC
T）、カプトプリル／ヒドロクロロチアジド（Capozide）、エナラプリル／ヒドロクロロ
チアジド（Vaseretic）、フォシノプリル／ヒドロクロロチアジド、リシノプリル／ヒド
ロクロロチアジド（Prinzide、Zestoretic）、モエキシプリル／ヒドロクロロチアジド（
Uniretic）、キナプリル／ヒドロクロロチアジド（Accuretic）、カンデサルタン／ヒド
ロクロロチアジド（Atacand HCT）、エプロサルタン／ヒドロクロロチアジド（Teveten H
CT）、イルベサルタン／ヒドロクロロチアジド（Avalide）、ロサルタン／ヒドロクロロ
チアジド（Hyzaar）、オルメサルタン／ヒドロクロロチアジド（Benicar HCT）、テルミ
サルタン／ヒドロクロロチアジド（Micardis HCT）、バルサルタン／ヒドロクロロチアジ
ド（Diovan HCT）、アテノロール／クロルタリドン（Tenoretic）、ビソプロロール／ヒ
ドロクロロチアジド（Ziac）、メトプロロール／ヒドロクロロチアジド（Lopressor HCT
）、ナドロール／ベンドロフルメサイアザイド（Corzide）、プロプラノロール／ヒドロ
クロロチアジド、アリスキレン／ヒドロクロロチアジド（Tekturna HCT）、クロニジン／
クロルタリドン（Clorpres）、スピロノラクトン／ヒドロクロロチアジド（Aldactazide
）、トリアムテレン／ヒドロクロロチアジド（Dyazide、Maxzide）、メチルドパ／ヒドロ
クロロチアジド、およびアミロライド／ヒドロクロロチアジド、またはAGT関連疾患の
処置のための他の治療剤による治療が含まれる。

【0502】

iRNA薬および追加の治療薬および／または処置剤は、同時におよび／または同一の 30
組み合わせで、例えば、非経腸的に投与することができるか、またはさらなる治療剤は、
別個の組成物の一部として、または別々の時間におよび／または当技術分野で公知のもし
くは本明細書に記載の他の方法によって投与することができる。

【0503】

本発明はまた、細胞内のAGT発現を低下および／または阻害するために、本発明の i
RNA薬および／または本発明の iRNA薬を含む組成物を使用する方法を提供する。他の
の面において、本発明は、細胞内でのAGT発現を低下および／または阻害するのに使用
するための、本発明の iRNAおよび／または本発明の iRNAを含む組成物を提供する
。さらに他の面において、細胞内でのAGT発現を低下および／または阻害するための医
薬の製造のための、本発明の iRNAおよび／または本発明の iRNAを含む組成物の使用 40
を提供する。

【0504】

方法および使用には、細胞を、本発明の iRNA、例えばdsRNAと接触させ、AG
T遺伝子のmRNA転写物の分解を得るのに十分な時間、該細胞を維持し、それにより細
胞内でのAGT遺伝子の発現を阻害することが含まれる。

【0505】

遺伝子発現の低下は、遺伝子発現の減少は、当技術分野で公知の任意の方法によって評
価することができる。例えば、AGT発現の低下は、当業者の常套法、例えば、ノーザン
ブロット法、qRT-PCRを用いてAGTのmRNA発現レベルを測定することにより
、または当業者の常套法、例えばウェスタンブロッティング、免疫学的技術、フローサイ 50

トメトリー法、E L I S Aを用いてA G Tのタンパク質レベルを決定することにより、および／またはA G Tの生物学的活性を測定することにより、決定することができる。

【0506】

本発明の方法および使用において、細胞は、インビトロまたはインビボで接触させることができる、すなわち、細胞は、対象内であってもよい。

【0507】

本発明の方法を用いる処置に好適な細胞は、A G T遺伝子を発現する任意の細胞であり得る。本発明の方法および使用における使用に適する細胞は、哺乳動物細胞、例えば、霊長動物細胞（ヒト細胞または非ヒト霊長動物細胞、例えば、サル細胞またはチンパンジー細胞など）、非霊長動物細胞（ウシ細胞、ブタ細胞、ラクダ細胞、ラマ細胞、ウマ細胞、ヤギ細胞、ウサギ細胞、ヒツジ細胞、ハムスター、モルモット細胞、ネコ細胞として、イヌ細胞、ラット細胞、マウス細胞、ライオンセル、トラ細胞、クマ細胞、または水牛細胞など）、鳥類細胞（例えば、アヒル細胞またはガチョウ細胞など）、またはクジラ細胞であり得る。一態様において、細胞はヒト細胞、例えばヒト肝細胞である。

【0508】

A G T発現は、細胞中、少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または約100%阻害され得る。好ましい態様において、A G Tレベルは、少なくとも20%低下される。

【0509】

本発明のインビボ方法および使用は、i R N Aを含む組成物を対象に投与することを含んでいてよく、ここで、i R N Aは、処置すべき哺乳動物のA G T遺伝子のR N A転写物の少なくとも一部と相補的であるヌクレオチド配列を含む。処置すべき生物がヒトである場合、組成物は、頭蓋内（例えば、脳内、脳実質内および髄腔内）、筋肉内、経皮、気道（エアロゾル）、鼻腔、直腸、および局所（頬および舌下を含む）投与を含む、皮下、静脈内、経口、腹腔内、または非経腸投与を含むが、これらに限定されない、公知の何らかの手段で投与できる。任意の態様において、組成物は、皮下または静脈内注入または注射によって投与される。

【0510】

ある態様において、投与は、デポー注射により行われる。デポー注射は、長時間にわたって一定した方法でi R N Aを放出することができる。従って、デポー注射は、所望の効果、例えば、A G Tの所望の阻害、または治療もしくは予防効果を得るために必要な投薬頻度を減少させることができる。デポー注射は、より一定の血清濃度を提供することができる。デポー注射は、皮下注射または筋肉内注射を含み得る。好ましい態様において、デポー注射は、皮下注射である。

【0511】

ある態様において、投与はポンプを介して行われる。ポンプは、外部ポンプまたは外科的に埋め込まれたポンプであってもよい。任意の態様において、ポンプは、皮下に埋め込まれた浸透圧ポンプである。他の態様において、ポンプは、輸液ポンプである。輸液ポンプは、静脈内、皮下、動脈または硬膜外注入のために使用できる。好ましい態様において、輸液ポンプは、皮下注入ポンプである。他の態様において、ポンプは、肝臓へi R N A

を送達する外科的に埋め込まれたポンプである。

【0512】

より高用量が、最初に投与され（すなわち、負荷用量）、続いてより低用量が持続期間のために投与されてよい。

【0513】

投与方法は、局所処置または全身処置が望ましいかどうか、および治療すべき領域に基づいて選択することができる。投与経路および部位は、標的化を増強するために選択され得る。

【0514】

一面において、本発明はまた、哺乳動物、例えばヒトにおいて、A G T 遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。本発明はまた、哺乳動物においてA G T 遺伝子の発現を阻害するのに使用するための、哺乳動物細胞中でA G T 遺伝子を標的とする、i R N A、例えばd s R N Aを含む組成物を提供する。別の面において、本発明は、哺乳動物においてA G T 遺伝子の発現を阻害するための医薬の製造における、哺乳動物細胞中でA G T 遺伝子を標的とする、i R N A、例えばd s R N Aの使用を提供する。

【0515】

該方法および使用には、哺乳動物、例えばヒトに、哺乳動物細胞中でA G T 遺伝子を標的とする、i R N A、例えばd s R N Aを含む組成物を投与し、そしてA G T 遺伝子のm R N A 転写物の分解を得るのに十分な時間、哺乳動物を維持し、それにより哺乳動物におけるA G T 遺伝子の発現を阻害することが含まれる。

【0516】

遺伝子発現の低下は、本明細書に記載の、当技術分野で公知の任意の方法、例えばq R T - P C Rにより、i R N Aを投与した対象の末梢血サンプルにおいて評価できる。タンパク質産生の減少は、当技術分野で公知の任意の方法および本明細書に記載の方法、例えばE L I S Aまたはウェスタンブロッティング法により、評価できる。一態様において、肝生検サンプルは、A G T 遺伝子および／またはタンパク質発現の減少を観察するための組織材料としての役割を果たす。別の態様において、血液サンプルは、A G T 遺伝子および／またはタンパク質発現の減少を観察するための組織材料としての役割を果たす。

【0517】

一態様において、i R N A 薬投与後のインビボでの標的のR I S Cが介在する切断の確認は、5' - R A C Eまたは当技術分野で公知のプロトコルの改善法により行われる（Lasham A et al., (2010) Nucleic Acid Res., 38 (3) p-e19）（Zimmermann et al. (2006) Nature 441: 111-4）。

【0518】

本発明は、以下の実施例によりさらに説明され、それらは本発明を限定するものと意図されるべきではない。本明細書で言及される、全ての文献、特許および特許出願の内容全体、ならびに図面および配列表は、引用により本明細書中に包含される。

【実施例】

【0519】

実施例

実施例1. i R N A 合成

試薬供給元

試薬の供給元が本明細書で具体的に示されていない場合、そのような試薬は、分子生物学用途の品質／純度規格の分子生物学用試薬の如何なる供給業者から調達されてもよい。

【0520】

転写物

s i R N A デザインを実施して、N C B I 遺伝子データベース（www. n c b i. n l m. n i h. g o v / g e n e /）でアノテートされた(annotated)ヒト(Homo sapiens)、アカゲザル（カニクイザル；以下、“c y n o”と記載）、マウス(Mus musculus)、およびラット(Rattus norvegicus)のA G T 転写物を標的とするs i R N Aを同定した。

10

20

30

40

50

デザインは、NCBIからの以下の転写物を使用した：ヒト—NM_000029.3；サル—AB170313.1；マウス—NM_007428.3。アカゲザル転写物は、肝臓由来のcDNAライブラリーから得られた配列を用いて伸長された。高度な霊長動物／齧歯動物配列多様性のために、siRNA二本鎖は、二本鎖整合ヒトおよびサル転写物のみ、およびマウス転写物のみ、を含有するバッチを含むが、これに限定されない、いくつかの別個のバッチでデザインされた。全てのsiRNA二本鎖は、各デザインバッチで考察された、列挙されたヒト転写物およびその他の種の転写物と100%の同一性を共有するようにデザインされた。

【0521】

siRNAデザイン、特異性、および効能予測

10

全ての可能な19量体（mer）の予測された特異性は、各配列から予測された。次に、7ヌクレオチドよりも長い反復を欠く、候補19量体を選択した。これらの706の候補ヒト／サルsiRNAおよび1815のマウスsiRNAを、pythonスクリプト‘BruteForce.py’中で実装される網羅的な“総当たり攻撃”アルゴリズムを使用する、好適なトランスクリプトーム（ヒト、サルまたはマウスNCBI RefSeqセット内のNM_およびXM_recordsセットと定義される）に対する包括的検索で使

次にスクリプトは、転写物—オリゴアライメントを解析し、siRNAとあらゆる可能な“オフターゲット”転写物とのミスマッチの配置および数に基づいて、スコアを作成した。オフターゲットスコアを重み付けして、分子の5'末端から2～9位で、siRNAの“シード”領域内の違いを強調した。総当たり攻撃検索からの各オリゴ転写物対には、個々のミスマッチスコアを加算することでミスマッチスコアが与えられ；2～9位のミスマッチは2.8と見なされ、10～11位の切断部位のミスマッチは1.2と見なされ、領域12～19のミスマッチは1.0と見なされた。さらに、3つの異なる各オリゴのシード由来六量体由来する七量体および八量体の発生頻度を比較することで、オフターゲット予測を実施した。5'開始点に対する2～7位からの六量体を使用して、2つの七量体および1つの八量体を作成した。“七量体1”は、六量体に3'-Aを付加して作製し；“七量体2”は、六量体に5'-Aを付加して作製し；“八量体”は、六量体の5'および3'末端の両方にAを付加して作製した。ヒト、サルまたはマウス3'UTRome（NCBIのRefSeqデータベースからのトランスクリプトームの部分配列と定義され、コード領域末端‘CDS’は明確に画定されている）中の八量体および七量体の発生頻度は、予め計算された。八量体発生頻度は、八量体頻度範囲からの中央値を使用して、七量体発生頻度について正規化した。次に（（3×正規化八量体数）+（2×七量体2数）+（1×七量体1数））の合計を計算することで、“mirSeedScore”を計算した。

20

30

【0522】

計算スコアに従って、双方のsiRNA鎖を特異性カテゴリーに割り当てた。3を超えるスコアは高度に特異的であり、3に等しいスコアは特異的であり、2.2～2.8のスコアは中程度に特異的であると認定された。二本鎖を、アンチセンス鎖の特異性によって分類した。アンチセンスオリゴが1位のGCを欠き、13位と14位双方のGを欠き、シード領域に3つ以上のUまたはAを有する（高度に予測される効果を有する二本鎖の特徴）ヒト／サルセットおよびマウスセットからの二本鎖を選択した。

40

【0523】

それぞれセンスおよびアンチセンス鎖上の21および23ヌクレオチド長の、候補GalNAcと複合体形成した二本鎖を、アンチセンス19量体を3'方向にのさらに4ヌクレオチド伸長することによりデザインした（標的転写物との完全な相補性を維持する）。センス鎖は、アンチセンス23量体の最初の21ヌクレオチドの逆相補体として特定された。二本鎖は、全ての23ヌクレオチドのすべての選択された種の転写産物への完全一致を維持して選択された。

【0524】

siRNA配列選択

50

合計 117 のセンスおよび 117 のアンチセンス由来ヒト／サル s i R N A 19 量体オリゴ、および 42 のセンスおよび 42 のアンチセンス由来マウス s i R N A 19 量体オリゴを合成し、G a l N A c と複合体形成した二本鎖を形成した。合計 38 のセンスおよび 38 のアンチセンス由来ヒト／サル 21／23 量体オリゴおよび合計 26 のマウス 21／23 量体オリゴを合成し、G a l N A c と複合体形成した二本鎖を形成した。

【0525】

修飾されていない 19 量体の A G T センス鎖およびアンチセンス鎖配列の詳細なリストを表 3 に示す。

【0526】

修飾された 19 量体の A G T センス鎖およびアンチセンス鎖配列の詳細なリストを表 4 に示す。

【0527】

修飾されていない 21／23 量体の A G T センス鎖およびアンチセンス鎖配列の詳細なリストを表 7 に示す。

【0528】

修飾された 21／23 量体の A G T センス鎖およびアンチセンス鎖配列の詳細なリストを表 8 に示す。

【0529】

修飾されていない 19 量体の A G T センス鎖およびアンチセンス鎖配列の詳細なリストを表 11 に示す。

【0530】

修飾されていない 21／23 量体の A G T センス鎖およびアンチセンス鎖配列の詳細なリストを表 13 に示す。

【0531】

修飾された 21／23 量体の A G T センス鎖およびアンチセンス鎖配列の詳細なリストを表 15 に示す。

【0532】

s i R N A 合成

b. 一般的小規模および中規模 R N A 合成手順

R N A オリゴヌクレオチドを、標準固相オリゴヌクレオチド合成プロトコルに従って、市販の、ウリジンの 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 2' - O - t - ブチルジメチルシリル - 3' - O - (2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピル) ホスホラミダイトモノマー、4 - N - アセチルシチジン、6 - N - ベンゾイルアデノシンおよび 2 - N - イソブチルグアノシン、および対応する 2' - O - メチルおよび 2' - フルオロホスホラミダイトを使用して、0.2 ~ 500 μ mol の規模で合成した。アミダイト溶液を、0.1 ~ 0.15 M 濃度で調製し、5 - エチルチオ - 1 H - テトラゾール (アセトニトリル中の 0.25 ~ 0.6 M) をアクティベーターとして使用した。酸化工程のために、合成中に、ルチジン：アセトニトリル (1 : 1) (v ; v) 中の 0.2 M フェニルアセチルジスルフィド (PADS)、またはピリジン中の 0.1 M 3 - (ジメチルアミノメチレン) アミノ - 3 H - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 5 - チオン (DDTT) を使用して、ホスホロチオエート主鎖の修飾を導入した。合成完了後、配列を固体支持体から切断し、メチルアミンとそれに続くトリエチルアミン・3 H F を使用して脱保護し、存在する全ての 2' - O - t - ブチルジメチルシリル保護基を除去した。

【0533】

5 ~ 500 μ mol 規模の完全 2' 修飾配列 (2' - フルオロおよび／または 2' - O - メチルまたはそれらの組み合わせ) の合成のために、35 $^{\circ}$ C にて 16 時間または 55 $^{\circ}$ C にて 5.5 時間のいずれかで、3 : 1 (v / v) エタノールおよび濃縮 (28 ~ 32 %) 水性アンモニアを使用して、オリゴヌクレオチドを脱保護した。アンモニア脱保護に先だって、固体支持体上で 20 分間、アセトニトリル中の 0.5 M ピペリジンで、オリゴヌクレオチドを処理した。LC - MS およびアニオン交換 HPLC (IEX - HPLC) によ

10

20

30

40

50

って、粗製オリゴヌクレオチドを分析した。20 mMのリン酸、10%～15% ACN、pH=8.5 (緩衝液A)、および20 mMのリン酸、10%～15% ACN、1 MのNaBr、pH=8.5 (緩衝液B) を使用して、IEX HPLCによってオリゴヌクレオチド精製を実施した。分析HPLCによって、画分を純度について分析した。好適な純度の生成物含有画分を貯留し、脱塩に先だって回転蒸発器上で濃縮した。サイズ排除クロマトグラフィーによってサンプルを脱塩し、凍結乾燥した。1×PBS緩衝液中で、等モル量のセンスおよびアンチセンス鎖をアニーリングして、対応するsiRNA二本鎖を調製した。

【0534】

小規模(0.2～1 μmol)では、96ウェル構成のMerMade 192合成機上で合成を実施した。完全2'-修飾配列(2'-フルオロおよび/または2'-O-メチルまたはそれらの組み合わせ)の場合は、室温で30～60分間のメチルアミンと、それに続く60℃で30分間のインキュベーションを使用して、または室温で30～60分間の3:1(v/v)エタノールおよび濃縮(28～32%)水性アンモニアと、それに続く40℃で1.5時間のインキュベーションを使用して、オリゴヌクレオチドを脱保護した。次に、粗製オリゴヌクレオチドをアセトニトリル:アセトン(9:1)溶液中で沈殿させて、遠心分離によって単離し、上清を傾斜法で除去した。粗製オリゴヌクレオチドペレットを20 mMのNaOAc緩衝液に再懸濁し、LC-MSおよびアニオン交換HPLCによって分析した。5 mL HiTrapセファデックスG25カラム(GE Healthcare)上の96深型ウェルプレート内で、粗製オリゴヌクレオチド配列を脱塩した。各ウェル内に、個々の配列に対応する約1.5 mLのサンプルを収集した。LC-MSおよびアニオン交換クロマトグラフィーによって、これらの精製脱塩オリゴヌクレオチドを分析した。Tecanロボット上で、等モル量のセンスおよびアンチセンス配列をアニーリングして、二本鎖を調製した。1×PBS緩衝液中で、二本鎖の濃度を10 μMに調節した。

【0535】

インビボ分析のためのGalNAc共役オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチド合成のための4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)保護一級ヒドロキシ基を保有するY型リンカーと、係留を通じて付着するGalNAcリガンドとが、予め装填された固体支持体を使用して、0.2～500 μmolの規模で、GalNAcリガンドと3'末端で複合体形成するオリゴヌクレオチドを合成した。

【0536】

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

【0537】

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

【0538】

実施例2. siRNA二本鎖のインビトロスクリーニング
細胞培養および96ウェル形質移入

37℃および5%CO₂雰囲気下で、10%FBS、ストレプトマイシンおよびグルタミン(ATCC)が添加されたイーグルの最少必須培地(ATCC)中で、Hep3B細胞(ATCC, Manassas, VA)をコンフルエント近くまで培養した後、トリプシン処理によってプレートから遊離させた。細胞を洗浄し、0.125×10⁶細胞/mlで再懸濁した。トランスフェクション中、細胞を、1ウェル当たり約20,000細胞で96ウェルプレートに播種した。

【0539】

10

96ウェルプレートの個々のウェル内の各5μlのsiRNA二本鎖に、1ウェルあたり14.8μlのOpti-MEMと0.2μlのLipofectamine RNAiMax (Invitroge(商標)、Carlsbad CA; カタログ番号13778-150)を添加することで、トランスフェクションを実施した。次に混合物を室温で20分間インキュベートした。次に適当な数の細胞を含有する、抗生物質を含まない80μlの完全増殖培地を、siRNA混合物に添加した。細胞を、RNA精製に先だって、24時間インキュベートした。

【0540】

単回投与試験を、10nMおよび0.01nMの終濃度の二本鎖で行った。用量応答試験を、10、1.67、0.28、0.046、0.0077、0.0013、0.00021、0.000036nMの終濃度の二本鎖で行った。

20

【0541】

細胞培養およびトランスフェクション

37℃で5%CO₂雰囲気下で、10%FBS、ストレプトマイシンおよびグルタミン(ATCC (登録商標))が添加されたイーグルの最少必須培地(ATCC (登録商標))中で、Hep3B細胞(ATCC, Manassas, VA)をコンフルエント近くまで培養した後、トリプシン処理によってプレートから遊離させた。細胞を洗浄し、0.125×10⁶細胞/mlで再懸濁した。トランスフェクション中、細胞を、1ウェル当たり約5,000細胞細胞で384ウェルプレートに播種した。

【0542】

30

96ウェルプレートの個々のウェル内の各5μlのsiRNA二本鎖に、1ウェルあたり4.9μlのOpti-MEMと0.1μlのLipofectamine RNAiMax (Invitroge(商標)、Carlsbad CA; カタログ番号13778-150)を添加することで、トランスフェクションを実施した。次に混合物を室温で20分間インキュベートした。次に適当な数の細胞を含有する、抗生物質を含まない40μlの完全増殖培地を、siRNA混合物に添加した。細胞を、RNA精製に先だって、24時間インキュベートした。

【0543】

単回投与試験を、10nMおよび0.01nMの終濃度の二本鎖で行った。用量応答試験を、10、1.67、0.28、0.046、0.0077、0.0013、0.00021、0.000036nMの終濃度の二本鎖で行った。

40

【0544】

DYNABEADS mRNA単離キット (Invitroge(商標)、パーツ番号: 610-12)を用いた全RNA単離-96ウェル単離

細胞を収集して150μlの溶解/結合緩衝液に溶解し、次いで、Eppendorfサーモミキサーを用いて、850rpmで5分間混合した(混合速度は処理全体にわたり同一であった)。10マイクロリットルの磁性ビーズと80μlの溶解/結合緩衝液混合物を丸底プレートに入れて、1分間混合した。磁性スタンドを使用して磁性ビーズを捕捉し、ビーズをかき乱すことなく上清を除去した。上清を除去した後、溶解細胞を残留ビーズに入れて、5分間混合した。上清を除去した後、磁性ビーズを150μlの洗浄緩衝液

50

Aで2回洗浄して、1分間混合した。ビーズを再度捕捉して、上清を除去した。次にビーズを150 μ lの洗浄緩衝液Bで洗浄し、捕捉して上清を除去した。次にビーズを150 μ lの溶出緩衝液で洗浄し、捕捉して上清を除去した。ビーズを2分間乾燥させた。乾燥後、50 μ lの溶出緩衝液を添加して、70℃で5分間混合した。ビーズを磁石上に5分間捕捉した。40 μ lの上清を取り出して、別の96ウェルプレートに入れた。

【0545】

ABI高容量cDNA逆転写キット (Applied Biosystems, Foster City, CA、カタログ番号4368813)を用いたcDNA合成

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

【0546】

DYNABEADS mRNA単離キット (Invitroge(商標)、パーツ番号：610-12)を用いた全RNA単離-384ウェル抽出

細胞を50 μ lの溶解/結合緩衝液に溶解した。磁性ビーズ (Dynabeads)を溶解/結合緩衝液で洗浄し、それに再懸濁した。次いで、1ウェル当たり、2 μ lのDynabeadsを含む25 μ lの溶解/結合緩衝液を添加した。Vibratranslator (UnionScientific)の“7”で10分間プレートを振盪後、自動プレート洗浄システムを利用した (Biostackerを備えるBiotek EL406、および磁性捕捉プレート)。次いで、プレートを96ウェルでの方法に記載のものと同様の方法で洗浄した：緩衝液A (90 μ l)で2回洗浄、緩衝液B (90 μ l)で1回洗浄、そして緩衝液C (100 μ l)で2回洗浄。最後の洗浄液をプレートから除去し、cDNA合成を直ちに開始した。

【0547】

ABI高容量cDNA逆転写キット (Applied Biosystems, Foster City, CA、カタログ番号4368813)を用いたcDNA合成-384ウェル合成

反応あたり、2 μ lの10 $\times$ 緩衝液、0.8 μ lの25 $\times$ dNTP、2 μ lのランダムプライマー、1 μ lの逆転写酵素、1 μ lのRNase阻害剤、および13.2 μ lのH₂Oのマスターミックスを、抽出したRNAおよび磁性ビーズのみを含む384ウェルプレート (総容量20 μ l)のウェルに添加した。cDNAは、25℃で10分間、37℃で120分間、そして85℃で8分間のインキュベーションにより作製した。

【0548】

リアルタイムPCR：

384ウェルプレート (Roche；カタログ番号04887301001)の1ウェルあたり、0.5 μ lのヒトGAPDH TaqManプローブ (Applied Biosystems；カタログ番号4326317E)、0.5 μ lのヒトAGT TaqManプローブ (Applied Biosystems；カタログ番号Hs00174854m1)、2 μ lの核酸不含有水および5 μ lのLightcycler 480プローブマスター混合物 (Roche；カタログ番号04887301001)を含むマスター混合物に、2 μ lのcDNAを添加した。qPCRをLightCycler 480リアルタイムPCR機 (Roche)で行った。相対的な変化倍を計算するために、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いてデータを分析し、10 nM AD-1955またはモックでトランスフェクトした細胞を用いて実施したアッセイに対して標準化を行った。IC₅₀値を、XLFitを用いて4パラメーターフィットモデルを用いて計算し、AD-1955またはモックでトランスフェクトした細胞に対して標準化を行った。

【0549】

AD-1955のセンスおよびアンチセンス配列は、以下の通りである：

センス：cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTs dT (配列番号13)

アンチセンス：U C G A A G u A C U c A G C G u A A G d T s d T （配列番号 14）。

【0550】

表5は、示された19量体のAGT iRNAを、96ウェル法を用いてトランスフェクトされたHe p 3 B細胞における単一用量スクリーニングの結果を示す。データは、未処理細胞と比較して、残ったmRNAの割合として表される。

【0551】

表6は、示された19量体のAGT iRNAを、96ウェル法を用いてトランスフェクトされたHe p 3 B細胞の用量応答を示す。示されたIC₅₀値は、未処理細胞と比較したIC₅₀値を表す。

10

【0552】

表9は、示された21／23量体の複合体AGT iRNAを、384ウェル法を用いてトランスフェクトされたHe p 3 B細胞における単一用量スクリーニングの結果を示す。データは、未処理細胞と比較して、残ったmRNAの割合として表される。

【0553】

表10は、示された21／23量体の複合体AGT iRNAを、384ウェル法を用いてトランスフェクトされたHe p 3 B細胞の用量応答を示す。示されたIC₅₀値は、未処理細胞と比較したIC₅₀値を表す。

【0554】

表12は、示された19量体のAGT iRNAを、96ウェル法を用いてトランスフェクトされたHe p 3 B細胞における単一用量スクリーニングの結果を示す。データは、未処理細胞と比較して、残ったmRNAの割合として表される。

20

【0555】

表14は、hAGTを発現するAAVベクターを感染させたマウスにおける、示された21／23量体の複合体AGT iRNAを用いたhAGTノックダウンの単回投与、用量応答スクリーニングの結果を示す。

【0556】

表16は、hAGTを発現するAAVベクターを感染させたマウスにおける、示された21／23量体の複合体AGT iRNAを用いたhAGTノックダウンの単回投与、用量応答スクリーニングの結果を示す。

30

【0557】

【表 2－1】

表 2. 核酸配列の表現で使用するヌクレオチドモノマーの略語。これらのモノマーは、オリゴヌクレオチド中に存在する場合、5'－3'－ホスホジエステル結合により相互に連結されるものと理解される。

略語	ヌクレオチド
A	アデノシン－3'－ホスフェート
A f	2'－フルオロアデノシン－3'－ホスフェート
A f s	2'－フルオロアデノシン－3'－ホスホロチオエート
A s	アデノシン－3'－ホスホロチオエート
C	シチジン－3'－ホスフェート
C f	2'－フルオロシチジン－3'－ホスフェート
C f s	2'－フルオロシチジン－3'－ホスホロチオエート
C s	シチジン－3'－ホスホロチオエート
G	グアノシン－3'－ホスフェート
G f	2'－フルオログアノシン－3'－ホスフェート
G f s	2'－フルオログアノシン－3'－ホスホロチオエート
G s	グアノシン－3'－ホスホロチオエート
T	5'－メチルウリジン－3'－ホスフェート
T f	2'－フルオロ－5－メチルウリジン－3'－ホスフェート
T f s	2'－フルオロ－5－メチルウリジン－3'－ホスホロチオエート
T s	5－メチルウリジン－3'－ホスホロチオエート
U	ウリジン－3'－ホスフェート
U f	2'－フルオロウリジン－3'－ホスフェート
U f s	2'－フルオロウリジン－3'－ホスホロチオエート
U s	ウリジン－3'－ホスホロチオエート
N	何れかのヌクレオチド (G、A、C、TまたはU)
a	2'－O－メチルアデノシン－3'－ホスフェート
a s	2'－O－メチルアデノシン－3'－ホスホロチオエート
c	2'－O－メチルシチジン－3'－ホスフェート
c s	2'－O－メチルシチジン－3'－ホスホロチオエート

10

20

30

【表 2 - 2】

表 2 つづき

g	2' - O - メチルグアノシン - 3' - ホスフェート
g s	2' - O - メチルグアノシン - 3' - ホスホロチオエート
t	2' - O - メチル - 5 - メチルウリジン - 3' - ホスフェート
t s	2' - O - メチル - 5 - メチルウリジン - 3' - ホスホロチオエート
u	2' - O - メチルウリジン - 3' - ホスフェート
u s	2' - O - メチルウリジン - 3' - ホスホロチオエート
s	ホスホロチオエート結合
L 9 6	N - [トリス (G a l N A c - アルキル) - アミドデカノイル] - 4 - ヒドロキシプロリノール H y p - (G a l N A c - アルキル) 3
(d t) また は d T	デオキシチミン
d C	2' - デオキシシチジン - 3' - ホスフェート
Y 4 4	反転脱塩基 DNA (2 - ヒドロキシメチル - テトラヒドロフラン - 5 - ホスフェート)
(T g n)	チミジン - グリコール核酸 (G N A) S - 異性体
P	ホスフェート
V P	ビニル - ホスフェート
(A a m)	2' - O - (N - メチルアセトアミド) アデノシン - 3' - ホスフェート
(A a m s)	2' - O - (N - メチルアセトアミド) アデノシン - 3' - ホスホロチオエート
(T g n)	チミジン - グリコール核酸 (G N A) S - 異性体
(C g n)	シチジン - グリコール核酸 (G N A)

10

20

【 0 5 5 8】

30

【表 3 - 1】

表 3. AGT dsRNA の未修飾センスおよびアンチセンス鎖配列 (19 量体)

二本鎖名称	NM_000029.3 と比較した位 置	センス名称	センス配列	配列 番号	アンチセン ス名称	NM_000029.3 と比較した位 置	アンチセンス配列	配列 番号
UM AD-56041.1	485-503	A-115161.1	UUCUGGGUACUACAGCAGA	15	A-115162.1	485-503	UCUGCUGUAGUACCCAGAA	131
UM AD-52431.1	491-509	A-107992.1	GUACUACAGCAGAGGGUA	16	A-107993.1	491-509	UACCCUUCUGCUGUAGUAC	132
UM AD-56057.1	606-624	A-115229.1	GUGACCGGGUGUACAUACA	17	A-115230.1	606-624	UGUAUGUACACCCGGUAC	133
UM AD-56047.1	635-653	A-115163.1	CUCGUCAUCCACAAUGAGA	18	A-115164.1	635-653	UCUCAUUGUGGAUGACGAG	134
UM AD-52437.1	643-661	A-107994.1	CCACAUGAGAGUACCCUGU	19	A-107995.1	643-661	ACAGGUACUCUCAUUGUGG	135
UM AD-56064.1	644-662	A-115247.1	CACAUGAGAGUACCCUGU	20	A-115248.1	644-662	CACAGGUACUCUCAUUGUG	136
UM AD-56021.1	658-676	A-115123.1	CUGAGCAGCUGGCCAAG	21	A-115124.1	658-676	CUUGCCAGCUGCUCACAG	137
UM AD-56067.1	741-759	A-115201.1	CUGUGGAUGAAAAGGCCU	22	A-115202.1	741-759	AGGGCCUUUUAUCCACAG	138
UM AD-56030.1	822-840	A-115173.1	UGGUCGGGAGUCUGGCCAA	23	A-115174.1	822-840	UUGGCCAGCAUCCCGACCA	139
UM AD-56034.1	825-843	A-115237.1	UCGGGAGUCUGGCCAACUU	24	A-115238.1	825-843	AAGUUGGCCAGCAUCCCGA	140
UM AD-52443.1	828-846	A-107996.1	GGAUGCUGGCCAACUUCUU	25	A-107997.1	828-846	AAGAAGUUGGCCAGCAUCC	141
UM AD-56017.1	834-852	A-115153.1	UGGCCAACUUCUUGGGCUU	26	A-115154.1	834-852	AAGCCCAAGAAUUGGCCA	142
UM AD-52449.1	841-859	A-107998.1	CUUCUUGGGCUUCCGUUAUA	27	A-107999.1	841-859	UAUACGGAAGCCCAAGAA	143
UM AD-52455.1	844-862	A-108000.1	CUUGGGCUUCCGUUAUAUA	28	A-108001.1	844-862	AUAUAUACGGAAGCCCAAG	144
UM AD-52461.1	849-867	A-108002.1	GCUUCCGUUAUAUUGGCAU	29	A-108003.1	849-867	AUGCCAUAUAUACGGAAGC	145
UM AD-56025.1	855-873	A-115187.1	GUUAUAUGGCAUGCACAG	30	A-115188.1	855-873	CUGUGCAUGCCAUAUAUAC	146
UM AD-52467.1	863-881	A-108004.1	GGCAUGCACAGUAGCUAU	31	A-108005.1	863-881	AUAGCUCACUGUGCAUUGCC	147
UM AD-56061.1	878-896	A-115199.1	CUAUGGGGCGUGGUCCAUG	32	A-115200.1	878-896	C AUGGACCACGCCCCAUAG	148
UM AD-52473.1	910-928	A-108006.1	CUCCCAACGGCUGUCUUU	33	A-108007.1	910-928	AAAGACAGCCGUUGGGGAG	149
UM AD-56063.1	911-929	A-115231.1	UCCCCAACGGCUGUCUUUG	34	A-115232.1	911-929	CAAAGACAGCCGUUGGGGA	150
UM AD-56046.1	1002-1020	A-115241.1	CUUGGAAGGACAAAGAACUG	35	A-115242.1	1002-1020	CAGUUCUUGUCCUUCCAAAG	151
UM AD-52432.1	1214-1232	A-108008.1	CCACGCUCUCUGGACUUA	36	A-108009.1	1214-1232	UGAAGUCCAGAGAGCGUGG	152
UM AD-52438.1	1247-1265	A-108010.1	GCUGCUGAGAAAGAUUGACA	37	A-108011.1	1247-1265	UGUCAUUCUUCUCAGCAGC	153

10

20

30

40

【表 3 - 2】

二本鎖名称	NM_000029.3 と比較した位 置	センス名称	センス配列	配列 番号	アンチセン ス名称	NM_000029.3 と比較した位 置	アンチセン ス配列	配列 番号
UM AD-56059.1	1248-1266	A-115167.1	CUGCUGAGAAGAUUGACAG	38	A-115168.1	1248-1266	CUGUCAAUCUUCUCAGCAG	154
UM AD-56016.1	1249-1267	A-115137.1	UGCUGAGAAGAUUGACAGG	39	A-115138.1	1249-1267	CCUGUCAUCUUCUCAGCA	155
UM AD-56068.1	1250-1268	A-115217.1	GCUGAGAAGAUUGACAGGU	40	A-115218.1	1250-1268	ACCUGUCAAUCUUCUCAGC	156
UM AD-55989.1	1251-1269	A-115081.1	CUGAGAAGAUUGACAGGUU	41	A-115082.1	1251-1269	AACCUGUCAUCUUCUCAG	157
UM AD-56040.1	1260-1278	A-115239.1	UUGACAGGUUCAUGCAGGC	42	A-115240.1	1260-1278	GCCUGCAUGAACCUUGCAA	158
UM AD-56069.1	1277-1295	A-115233.1	GCUGGACAGGAUGGAAGA	43	A-115234.1	1277-1295	UCUCCAUCCUGUCACAGC	159
UM AD-52444.1	1403-1421	A-108012.1	GAGUUCUGGGUGGACAACA	44	A-108013.1	1403-1421	UGUUGUCCACCCAGAACUC	160
UM AD-56033.1	1408-1426	A-115221.1	CUGGUGGACAACAGCACC	45	A-115222.1	1408-1426	GGUGCUGUUGUCCACCCAG	161
UM AD-56058.1	1413-1431	A-115245.1	UGGACAACAGCACCUCAGU	46	A-115246.1	1413-1431	ACUGAGGUGCUGUUGUCCA	162
UM AD-52450.1	1417-1435	A-108014.1	CAACAGCACCCUCAGUGUCU	47	A-108015.1	1417-1435	AGACACUGAGGUGCUGUUG	163
UM AD-55981.1	1566-1584	A-115141.1	UGGACAAGGUGGAGGGUCU	48	A-115142.1	1566-1584	AGACCCUCCACCCUUGUCCA	164
UM AD-56032.1	1570-1588	A-115205.1	CAAGGUGGAGGUGUCACU	49	A-115206.1	1570-1588	AGUGAGACCCUCCACCUUG	165
UM AD-56066.1	1572-1590	A-115185.1	AGGUGGAGGUGUCACUUCU	50	A-115186.1	1572-1590	AAAGUGAGACCCUCCACCU	166
UM AD-52456.1	1587-1605	A-108016.1	CUUUCAGCAAAACUCCCU	51	A-108017.1	1587-1605	AGGAGUUUUGCUGGAAAG	167
UM AD-56054.1	1591-1609	A-115181.1	CCAGCAAAACUCCCUCAAC	52	A-115182.1	1591-1609	GUUGAGGGAGUUUUGCUGG	168
UM AD-56035.1	1592-1610	A-115159.1	CAGCAAAACUCCCUCAACU	53	A-115160.1	1592-1610	AGUUGAGGGAGUUUUGCUG	169
UM AD-52462.1	1595-1613	A-108018.1	CAAAACUCCCUCAACUGGA	54	A-108019.1	1595-1613	UCCAGUUAGGGAGUUUUG	170
UM AD-56026.1	1601-1619	A-115203.1	UCCCUCAACUGGAUGAAGA	55	A-115204.1	1601-1619	UCUUCAUCCAGUUGAGGGA	171
UM AD-56022.1	1602-1620	A-115139.1	CCCUCAACUGGAUGAAGAA	56	A-115140.1	1602-1620	UUCUUCAUCCAGUUGAGGG	172
UM AD-55983.1	1605-1623	A-115079.1	UCAACUGGAUGAAGAAACU	57	A-115080.1	1605-1623	AGUUUCUUAUCCAGUUGA	173
UM AD-56028.1	1728-1746	A-115235.1	CCGAGCUGAACCUUGCAAAA	58	A-115236.1	1728-1746	UUUUGCAGGUUCAGCUCGG	174
UM AD-55980.1	1729-1747	A-115125.1	CGAGCUGAACCUUGCAAAA	59	A-115126.1	1729-1747	UUUUUGCAGGUUCAGCUCG	175
UM AD-56036.1	1735-1753	A-115175.1	GAAACUGCAAAAAUUGAGC	60	A-115176.1	1735-1753	GCUCAAUUUUUGCAGGUUC	176
UM AD-56014.1	1737-1755	A-115105.1	ACCUGCAAAAAUUGAGCAA	61	A-115106.1	1737-1755	UUGCUCAAUUUUUUGCAGGU	177

10

20

30

40

【表 3 - 3】

二本鎖名称	NM_000029.3 と比較した位 置	センサ名称	センサ配列	配列 番号	アンチセン ス名称	NM_000029.3 と比較した位 置	アンチセンサ配列	配列 番号
UM AD-56007.1	1738-1756	A-115087.1	CCUGCAAAAUAUUGAGCAAU	62	A-115088.1	1738-1756	AUUGCUCAAUUUUUGCAGG	178
UM AD-56012.1	1739-1757	A-115073.1	CUGCAAAAUAUUGAGCAAUG	63	A-115074.1	1739-1757	CAUUGCUCAAUUUUUGCAG	179
UM AD-56055.1	1740-1758	A-115197.1	UGCAAAAUAUUGAGCAAUGA	64	A-115198.1	1740-1758	UCAUUGCUCAAUUUUUGCA	180
UM AD-56029.1	1741-1759	A-115157.1	GCAAAAUAUUGAGCAAUGAC	65	A-115158.1	1741-1759	GUCAUUGCUCAAUUUUUGC	181
UM AD-52469.1	1767-1785	A-108036.1	GGUGGGGGAGGUGCUGAA	66	A-108037.1	1767-1785	UUCAGCACCUCCCCACCC	182
UM AD-56053.1	1810-1828	A-115165.1	GGAUGAGAGAGAGCCACA	67	A-115166.1	1810-1828	UGUGGGCUCUCUCUCAUCC	183
UM AD-52468.1	1879-1897	A-108020.1	CGGCCAUUCCUGUUUGCU	68	A-108021.1	1879-1897	AGCAACAGGAAUGGGCGG	184
UM AD-56045.1	1885-1903	A-115225.1	AUUCUGUUUGCUGUGUAU	69	A-115226.1	1885-1903	AUACACAGCAACACAGGAU	185
UM AD-56056.1	1887-1905	A-115213.1	UCCUGUUUGCUGUGUAUGA	70	A-115214.1	1887-1905	UCAUACACAGCAACACAGGA	186
UM AD-56010.1	1891-1909	A-115135.1	GUUUGCUGUGUAUGAUCAA	71	A-115136.1	1891-1909	UUGAUCAUACACAGCAAAAC	187
UM AD-56015.1	1892-1910	A-115121.1	UUUGCUGUGUAUGAUCAAA	72	A-115122.1	1892-1910	UUUGAUCAUACACAGCAAA	188
UM AD-56039.1	2070-2088	A-115223.1	CCCCCAGUCCACCACUUU	73	A-115224.1	2070-2088	AAAGGUGGAGACUGGGGG	189
UM AD-55991.1	2080-2098	A-115113.1	CCCACCUUUUCUUAUUG	74	A-115114.1	2080-2098	CAUUAGAAAGAAAGGUGG	190
UM AD-52474.1	2081-2099	A-108022.1	CCACCUUUUCUUAUUGA	75	A-108023.1	2081-2099	UCAUUAGAAAGAAAGGUGG	191
UM AD-56024.1	2082-2100	A-115171.1	CACCUUUUCUUAUUGAG	76	A-115172.1	2082-2100	CUCAUUAGAAAGAAAGGUG	192
UM AD-52433.1	2125-2143	A-108024.1	GUUUCUCCUUGGUCUAGU	77	A-108025.1	2125-2143	ACUUAGACCAAGGAGAAAC	193
UM AD-56037.1	2199-2217	A-115191.1	UUGCUGGGUUUAUUUAGA	78	A-115192.1	2199-2217	UCUAAAAUAAACCCAGCAA	194
UM AD-56049.1	2200-2218	A-115195.1	UGCUGGGUUUAUUUAGAG	79	A-115196.1	2200-2218	CUCUAAAAUAAACCCAGCA	195
UM AD-52439.1	2201-2219	A-108026.1	GCUGGGUUUAUUUAGAGA	80	A-108027.1	2201-2219	UCUCUAAAAUAAACCCAGC	196
UM AD-55978.1	2202-2220	A-115093.1	CUGGGUUUAUUUAGAGAA	81	A-115094.1	2202-2220	UUCUCUAAAAUAAACCCAG	197
UM AD-55999.1	2203-2221	A-115147.1	UGGGUUUAUUUAGAGAAU	82	A-115148.1	2203-2221	AUUCUCUAAAAUAAACCCA	198
UM AD-56050.1	2206-2224	A-115211.1	GUUUUUUUUAGAGAAUGGG	83	A-115212.1	2206-2224	CCCAUUCUCUAAAAUAAAC	199
UM AD-56031.1	2209-2227	A-115189.1	UAUUUUUAGAGAAUGGGGU	84	A-115190.1	2209-2227	ACCCCAUUCUCUAAAAUUA	200
UM AD-56027.1	2227-2245	A-115219.1	UGGGGAGGCAAGAACCAGU	85	A-115220.1	2227-2245	ACUGGUUUCUUGCCUCCCA	201

【表 3 - 4】

二本鎖名称	NM_000029.3 と比較した位 置	センス名称	センス配列	配列 番号	アンチセン ス名称	NM_000029.3 と比較した位 置	アンチセンス配列	配列 番号
UM AD-55987.1	2230-2248	A-115143.1	GGAGGCAAGAACACAGUGUU	86	A-115144.1	2230-2248	AACACUGGUUUCUUGCCUCC	202
UM AD-56043.1	2266-2284	A-115193.1	UCCAAAAAGAAUCCAAACC	87	A-115194.1	2266-2284	GGUUGGAAUUCUUUUUGGA	203
UM AD-56001.1	2268-2286	A-115085.1	CAAAAAGAAUCCAAACCGA	88	A-115086.1	2268-2286	UCGGUUGGAAUUCUUUUUG	204
UM AD-52445.1	2279-2297	A-108028.1	CCAACCGACAGCUUGUUU	89	A-108029.1	2279-2297	AAACAAGCUGGUCGGUUGG	205
UM AD-52451.1	2283-2301	A-108030.1	CCGACCAGCUUGUUUGUGA	90	A-108031.1	2283-2301	UCACAAACAAGCUGGUCGG	206
UM AD-52457.1	2284-2302	A-108032.1	CGACCAGCUUGUUUGUGAA	91	A-108033.1	2284-2302	UUCACAAACAAGCUGGUCG	207
UM AD-52463.1	2285-2303	A-108034.1	GACCAGCUUGUUUGUGAAA	92	A-108035.1	2285-2303	UUUCACAAACAAGCUGGUC	208
UM AD-55982.1	2290-2308	A-115063.1	GCUUGUUUGUGAAACAAAA	93	A-115064.1	2290-2308	UUUUGUUUCACAAACAAGC	209
UM AD-56019.1	2291-2309	A-115091.1	CUUGUUUGUGAAACAAAA	94	A-115092.1	2291-2309	UUUUUGUUUCACAAACAAG	210
UM AD-55988.1	2292-2310	A-115065.1	UUGUUUGUGAAACAAAAA	95	A-115066.1	2292-2310	UUUUUGUUUCACAAACA	211
UM AD-55994.1	2294-2312	A-115067.1	GUUGUGAAACAAAAAAGU	96	A-115068.1	2294-2312	ACUUUUUGUUUCACAAAC	212
UM AD-56013.1	2296-2314	A-115089.1	UUGUGAAACAAAAAAGUGU	97	A-115090.1	2296-2314	ACACUUUUUUUGUUUCACAA	213
UM AD-56065.1	2299-2317	A-115169.1	UGAAACAAAAAAGUGUCC	98	A-115170.1	2299-2317	GGAACACUUUUUUUGUUUCA	214
UM AD-56008.1	2304-2322	A-115103.1	CAAAAAAGUGUCCCUUUU	99	A-115104.1	2304-2322	AAAAGGGAACACUUUUUUUG	215
UM AD-56048.1	2306-2324	A-115179.1	AAAAAGUGUCCCUUUUCA	100	A-115180.1	2306-2324	UGAAAAGGGAACACUUUUU	216
UM AD-56003.1	2307-2325	A-115117.1	AAAAGUGUCCCUUUUCA	101	A-115118.1	2307-2325	UUGAAAAGGGAACACUUUU	217
UM AD-56051.1	2314-2332	A-115227.1	UUCUUUUUCAAGUUUGAGA	102	A-115228.1	2314-2332	UCUCAACUUUGAAAAGGGA	218
UM AD-56044.1	2317-2335	A-115209.1	CCUUUUCAGUUGAGAACAA	103	A-115210.1	2317-2335	UGUUCUCAACUUUGAAAAGG	219
UM AD-55996.1	2320-2338	A-115099.1	UUUCAAGUUUGAGAACAAAA	104	A-115100.1	2320-2338	UUUUGUUCUCAACUUUGAAA	220
UM AD-56002.1	2321-2339	A-115101.1	UUCAGUUUGAGAACAAAA	105	A-115102.1	2321-2339	UUUUUGUUCUCAACUUUGAA	221
UM AD-55976.1	2323-2341	A-115061.1	CAAGUUUGAGAACAAAAUU	106	A-115062.1	2323-2341	AAUUUUUGUUUCUACAACUUG	222
UM AD-56062.1	2325-2343	A-115215.1	AGUUGAGAACAAAAAUUGG	107	A-115216.1	2325-2343	CCAAUUUUUGUUUCUACAACU	223
UM AD-56011.1	2326-2344	A-115151.1	GUUGAGAACAAAAAUUGGG	108	A-115152.1	2326-2344	CCCAUUUUUGUUUCUACAAC	224
UM AD-56009.1	2328-2346	A-115119.1	UGAGAACAAAAAUUGGGUU	109	A-115120.1	2328-2346	AACCCAAUUUUUUUGUUCUCA	225

10

20

30

40

【表 3 - 5】

二本鎖名称	NM_000029.3 と比較した位 置	センサ名称	センサ配列	配列 番号	アンチセン ス名称	NM_000029.3 と比較した位 置	アンチセンス配列	配列 番号
UM AD-56020.1	2329-2347	A-115107.1	GAGAACAAAAUUGGUAU	110	A-115108.1	2329-2347	AAACCCAAUUUUUGUUCUC	226
UM AD-55979.1	2331-2349	A-115109.1	GAACAAAAUUUGGUAUUA	111	A-115110.1	2331-2349	UAAAAACCCAAUUUUUGUUC	227
UM AD-55997.1	2332-2350	A-115115.1	AACAAAAUUUGGUAUUA	112	A-115116.1	2332-2350	UUAAAAACCCAAUUUUUGUUC	228
UM AD-56000.1	2333-2351	A-115069.1	ACAAAAUUGGUAUUA	113	A-115070.1	2333-2351	UUAAAAACCCAAUUUUUGUUC	229
UM AD-56006.1	2334-2352	A-115071.1	CAAAAAUUGGUAUUA	114	A-115072.1	2334-2352	UUAAAAACCCAAUUUUUGUUC	230
UM AD-55990.1	2339-2357	A-115097.1	AUUGGUAUUAUUA	115	A-115098.1	2339-2357	UUUAUUUUAAAAACCCAAU	231
UM AD-55984.1	2340-2358	A-115095.1	UUGGUAUUAUUAUUA	116	A-115096.1	2340-2358	UUUAUUUUAAAAACCCAA	232
UM AD-55995.1	2341-2359	A-115083.1	UGGUAUUAUUAUUA	117	A-115084.1	2341-2359	ACUUUAUUUUAAAAACCCAA	233
UM AD-56004.1	2346-2364	A-115133.1	UUUAUUUAUUAUUA	118	A-115134.1	2346-2364	UGUAUUAUUUAUUAUUA	234
UM AD-56042.1	2347-2365	A-115177.1	UUAAAAUUAUUAUUA	119	A-115178.1	2347-2365	AUGUAUUAUUUAUUAUUA	235
UM AD-55992.1	2384-2402	A-115129.1	UUUAUUUAUUAUUA	120	A-115130.1	2384-2402	UUCAAAGACACUAAUUA	236
UM AD-55977.1	2385-2403	A-115077.1	UGUAUUUAUUAUUA	121	A-115078.1	2385-2403	AUCAAAGACACUAAUUA	237
UM AD-56005.1	2391-2409	A-115149.1	UAGUGUAUUAUUAUUA	122	A-115150.1	2391-2409	UCUUACAUAUUAUUAUUA	238
UM AD-56052.1	2397-2415	A-115243.1	CUUGAAUUAUUAUUA	123	A-115244.1	2397-2415	UCAUGUAUUAUUAUUA	239
UM AD-55985.1	2398-2416	A-115111.1	UUUGAAUUAUUAUUA	124	A-115112.1	2398-2416	GUCUAUUAUUAUUAUUA	240
UM AD-56038.1	2439-2457	A-115207.1	CUUAUUUUUUUUAUUA	125	A-115208.1	2439-2457	AUCUGUGGAAAAAAUUA	241
UM AD-56023.1	2450-2468	A-115155.1	CCACAGUAUUAUUAUUA	126	A-115156.1	2450-2468	AAUUCACAAGCAUUAUUA	242
UM AD-56018.1	2452-2470	A-115075.1	ACAGUAUUAUUAUUA	127	A-115076.1	2452-2470	AAAAUUCACAAGCAUUAUUA	243
UM AD-56060.1	2497-2515	A-115183.1	CUGAUUUUUUUUAUUA	128	A-115184.1	2497-2515	CAUUCAAAAACAGAAUUA	244
UM AD-55993.1	2519-2537	A-115145.1	AACCAUUAUUAUUAUUA	129	A-115146.1	2519-2537	GAAUUAACCAAGCAUUAUUA	245
UM AD-55986.1	2521-2539	A-115127.1	CCAUAGCUUUAUUAUUA	130	A-115128.1	2521-2539	GAGAAUUAACCAAGCAUUAUUA	246

【 0 5 6 0 】

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表 4. AGT dsRNA の修飾センスおよびアンチセンス鎖配列 (19 量体)

二本鎖名称	センス名称	センス配列	配列番号	アンチセンス名称	アンチセンス配列	配列番号
AD-56041.1	A-115161.1	uuuuGGGuAuuAcAGcAGAdTsdT	247	A-115162.1	UCUGCUGuAGuACcCAGAAAdTsdT	363
AD-52431.1	A-107992.1	GuAuuAcAGcAGcAGAGGGuAdTsdT	248	A-107993.1	uACCCUUCUGCUGuAGuACdTsT	364
AD-56057.1	A-115229.1	GuGAccGGGuGuAcAuAcAdTsdT	249	A-115230.1	UGuAUGuAcACCCGGUcACdTsT	365
AD-56047.1	A-115163.1	cucGucAuccAcAuGAGAdTsdT	250	A-115164.1	UCUcAUUGUGGAGUACGAGdTsT	366
AD-52437.1	A-107994.1	ccAcAAuGAGAGuAuccGudTsT	251	A-107995.1	AcAGGuACUCUcAUUGUGGdTsT	367
AD-56064.1	A-115247.1	cAcAAuGAGAGuAuccGudTsT	252	A-115248.1	cAcAGGuACUCUcAUUGUGdTsT	368
AD-56021.1	A-115123.1	cuGuGAGcAGcuGGcAAAGdTsT	253	A-115124.1	CUUUGCcAGCUGCUcAcAGdTsT	369
AD-56067.1	A-115201.1	cuGuGGAuGAAAGGccudTsT	254	A-115202.1	AGGGCCUUUUcAUCCCGAcAdTsT	370
AD-56030.1	A-115173.1	uGGucGGGAuGcuGGcAdTsT	255	A-115174.1	UUUGCcAGcAUCCCGAcAdTsT	371
AD-56034.1	A-115237.1	ucGGGAuGcuGGcAAcuudTsT	256	A-115238.1	AAGUUGGCcAGcAUCCCGAdTsT	372
AD-52443.1	A-107996.1	GGAuGcuGGcAAcuuudTsT	257	A-107997.1	AAGAAGUUGGCcAGcAUCCdTsT	373
AD-56017.1	A-115153.1	uGGccAAcuuuGGGcuudTsT	258	A-115154.1	AAGCCcAAGAAAGUUGGCcAdTsT	374

10

20

30

40

【表 4 - 2】

二本鎖名称	センサ名称	センサ配列	配列 番号	アンチセンス 名称	アンチセンス配列	配列 番号
AD-52449.1	A-107998.1	cucuuGGGcuuGcAuAdTsdT	259	A-107999.1	uAuACGGAAGCCcAAAGAAgGdTsdt	375
AD-52455.1	A-108000.1	cuuGGGcuuGcAuAuAdTsdT	260	A-108001.1	AuAuAuACGGAAGCCcAAAGdTsdt	376
AD-52461.1	A-108002.1	GcuuGcAuAuAuGcAuAdTsdT	261	A-108003.1	AUGCcAuAuAuACGGAAGCdtTsdt	377
AD-56025.1	A-115187.1	GuAuAuAuGcAuGcAcAGdTsdt	262	A-115188.1	CUGUGcAuUGCcAuAuAuAcCdTsdt	378
AD-52467.1	A-108004.1	GGcAuGcAcAGuGAGcuAdTsdT	263	A-108005.1	AuAGCUcACUGUGcAuUGCCdtTsdt	379
AD-56061.1	A-115199.1	cuAuGGGcGcGuGGuGcAuGdTsdt	264	A-115200.1	cAUGGACcACGCCcAuAGdTsdt	380
AD-52473.1	A-108006.1	cucccAAcGGcuGcuuudTsdt	265	A-108007.1	AAAGAcAGCCGUUGGGGAGdTsdt	381
AD-56063.1	A-115231.1	uccccAAcGGcuGcuuudTsdt	266	A-115232.1	cAAAGAcAGCCGUUGGGGAdTsdt	382
AD-56046.1	A-115241.1	cuuGGAAGGAcAAAGAAcuGdTsdt	267	A-115242.1	cAGUUCUUGUCCUUCcAAAGdTsdt	383
AD-52432.1	A-108008.1	ccAcGcuGcuGGAcuAdTsdt	268	A-108009.1	UGAAGUCcAGAGAGCGUGGdTsdt	384
AD-52438.1	A-108010.1	GcuGcuGAGAAAGAAuGAcAdTsdt	269	A-108011.1	UGUcAAUCUUCUcAGcAGCdTsdt	385
AD-56059.1	A-115167.1	cuGcuGAGAAAGAAuGAcAGdTsdt	270	A-115168.1	CUGUcAAUCUUCUcAGcAGdTsdt	386
AD-56016.1	A-115137.1	uGcuGAGAAAGAAuGAcAGGdTsdt	271	A-115138.1	CCUGUcAAUCUUCUcAGcAdTsdt	387
AD-56068.1	A-115217.1	GcuGAGAAAGAAuGAcAGGudTsdt	272	A-115218.1	ACCUGUcAAUCUUCUcAGCdTsdt	388
AD-55989.1	A-115081.1	cuGAGAAAGAAuGAcAGGudTsdt	273	A-115082.1	AACCUGUcAAUCUUCUcAGdTsdt	389
AD-56040.1	A-115239.1	uuGAcAGGcuGcAuGAcAGGdTsdt	274	A-115240.1	GCCUGcAUGAACCUUGUcAAAdTsdt	390
AD-56069.1	A-115233.1	GcuGcGAcAGGAAuGGAAGAdTsdt	275	A-115234.1	UCUUCcAUCUUCUcAGCdTsdt	391
AD-52444.1	A-108012.1	GAGcuGcGcGcGcGcAcAdTsdt	276	A-108013.1	UGUUGUcACCCcAGAAcUCdTsdt	392
AD-56033.1	A-115221.1	cuGGGcGcGcGcGcAcAdTsdt	277	A-115222.1	GGUGCUUGUcACCCcAGdTsdt	393
AD-56058.1	A-115245.1	uGGAcAAcAGcAccuGAdTsdt	278	A-115246.1	ACUGAGGUGCUUGUcAcAdTsdt	394
AD-52450.1	A-108014.1	cAAcAGcAccuGcGcGcAdTsdt	279	A-108015.1	AGAcACUGAGGUGCUUGUdTsdt	395
AD-55981.1	A-115141.1	uGGAcAAcGcGcGcGcGcAdTsdt	280	A-115142.1	AGACCCUcACCCUUGUcAcAdTsdt	396
AD-56032.1	A-115205.1	cAAGGcGcGcGcGcGcAcAdTsdt	281	A-115206.1	AGUGAGACCCUcACCCUUGdTsdt	397

10

20

30

40

【表 4 - 3】

二本鎖名称	センサ名称	センサ配列	配列 番号	アンチセンス 名称	アンチセンス配列	配列 番号
AD-56066.1	A-115185.1	AGGuGGAGGGueucAuuuudTsdT	282	A-115186.1	AAAGUGAGACCCUcACCuTdTsdt	398
AD-52456.1	A-108016.1	cuuuuccAGcAAAAAcuccuudTsdT	283	A-108017.1	AGGAGUUUUGcUGGAAAGdTsdT	399
AD-56054.1	A-115181.1	ccAGcAAAAAcuccuucAAcdTsdT	284	A-115182.1	GUUGAGGGAGUUUUGcUGGdTsdT	400
AD-56035.1	A-115159.1	cAGcAAAAAcuccuucAAcdTsdT	285	A-115160.1	AGUUGAGGGAGUUUUGcUGdTsdT	401
AD-52462.1	A-108018.1	cAAAACuccuucAAcuGGAdTsdT	286	A-108019.1	UCcAGUUUGAGGGAGUUUUGdTsdT	402
AD-56026.1	A-115203.1	uccuucAAcuGGAuGAGAGAdTsdT	287	A-115204.1	UCUUcAUcCAGUUUGAGGGAdTsdT	403
AD-56022.1	A-115139.1	ccuucAAcuGGAuGAGAGAdTsdT	288	A-115140.1	UUUUcAUcCAGUUUGAGGGdTsdT	404
AD-55983.1	A-115079.1	ucAAcuGGAuGAGAGAAcudTsdT	289	A-115080.1	AGUUUCUUcAUcCAGUUUGAdTsdT	405
AD-56028.1	A-115235.1	ccGAGGuGAAAcuGcGcAAAAdTsdT	290	A-115236.1	UUUUcAGGUUcAGCUCGGdTsdT	406
AD-55980.1	A-115125.1	cGAGGuGAAAcuGcGcAAAAdTsdT	291	A-115126.1	UUUUcAGGUUcAGCUCGGdTsdT	407
AD-56036.1	A-115175.1	GAAccuGcAAAuGAGGcdTsdT	292	A-115176.1	GCUCAAUUUUUGcAGGUUCdTsdT	408
AD-56014.1	A-115105.1	AccuGcAAAuGAGGcGcAAAdTsdT	293	A-115106.1	UUUGCUcAAUUUUUGcAGGUdTsdT	409
AD-56007.1	A-115087.1	ccuGcAAAuGAGGcGcAAAdTsdT	294	A-115088.1	AUUGCUcAAUUUUUGcAGGUdTsdT	410
AD-56012.1	A-115073.1	cuGcAAAuGAGGcGcAAuGdTsdT	295	A-115074.1	cAUUGCUcAAUUUUUGcAGdTsdT	411
AD-56055.1	A-115197.1	uGcAAAuGAGGcGcAAuGdTsdT	296	A-115198.1	UcAUUGCUcAAUUUUUGcAdTsdT	412
AD-56029.1	A-115157.1	GcAAAuGAGGcGcAAuGAdTsdT	297	A-115158.1	GUcAUUGCUcAAUUUUUGCdTsdT	413
AD-52469.1	A-108036.1	GGGuGGGGGAGGuGcGcAAAdTsdT	298	A-108037.1	UUcAGcACCUCCcCACCdTsdT	414
AD-56053.1	A-115165.1	GGAuGAGAGAGAGGcccAcAdTsdT	299	A-115166.1	UGUGGGCUcUCUCUcAUCCdTsdT	415
AD-52468.1	A-108020.1	ccGcccAuuccuGuuuGcuuTsdT	300	A-108021.1	AGcAAAAGGAAUUGGGCGGdTsdT	416
AD-56045.1	A-115225.1	AuuuccuGuuuGcuGuAuTsdT	301	A-115226.1	AuAcAcAGcAAAcAGGAUdTsdT	417
AD-56056.1	A-115213.1	uccuGuuuGcuGuGuAuGAdTsdT	302	A-115214.1	UcAuAcAcAGcAAAcAGGAdTsdT	418
AD-56010.1	A-115135.1	GuuuGcuGuGuAuGaucAAAdTsdT	303	A-115136.1	UUUGAUcAuAcAcAGcAAAcAdTsdT	419
AD-56015.1	A-115121.1	uuuuGcuGuGuAuGaucAAAdTsdT	304	A-115122.1	UUUGAUcAuAcAcAGcAAAcAdTsdT	420

【 0 5 6 1】

10

20

30

40

【表 4 - 4】

二本鎖名称	センソス名称	センソス配列	配列 番号	アンチセンソ 名称	アンチセンソ配列	配列 番号
AD-56039.1	A-115223.1	ccccAGueccccAccuudTsdT	305	A-115224.1	AAAGGUGGGAGACUGGGGGdTsdT	421
AD-55991.1	A-115113.1	cccAccuuuuuuuuAuGdTsdT	306	A-115114.1	cAUuAGAAAGAAAGGUUGGGdTsdT	422
AD-52474.1	A-108022.1	ccAccuuuuuuuuAuGAdTsdT	307	A-108023.1	UcAUuAGAGAGAAAAGGUUGdTsdT	423
AD-56024.1	A-115171.1	cAccuuuuuuuuAuGAGdTsdT	308	A-115172.1	CUcAUuAGAAAGAAAAGGUUGdTsdT	424
AD-52433.1	A-108024.1	GuuuuccuuGGGueuAAGudTsdT	309	A-108025.1	ACUuAGACcAAAGGAGAAACdTsdT	425
AD-56037.1	A-115191.1	uuGcuGGGuuuAuuuuAGAdTsdT	310	A-115192.1	UCuAAAuAAACcAGcAAAdTsdT	426
AD-56049.1	A-115195.1	uGcuGGGuuuAuuuuAGAGdTsdT	311	A-115196.1	CUCuAAAAuAAACcAGcAdTsdT	427
AD-52439.1	A-108026.1	GcuGGGuuuAuuuuAGAGAdTsdT	312	A-108027.1	UCUCuAAAAuAAACcAGCdTsdT	428
AD-55978.1	A-115093.1	cuGGGuuuAuuuuAGAGAdTsdT	313	A-115094.1	UUCUCuAAAuAAACcAGdTsdT	429
AD-55999.1	A-115147.1	uGGGuuuAuuuuAGAGAAudTsdT	314	A-115148.1	AUUCUCuAAAuAAACcAdTsdT	430
AD-56050.1	A-115211.1	GuuuAuuuuAGAGAAuGGGdTsdT	315	A-115212.1	CCcAUUCUCuAAAuAAACdTsdT	431
AD-56031.1	A-115189.1	uAuuuuAGAGAAuGGGGudTsdT	316	A-115190.1	ACCCcAUUCUCuAAAuAdTsdT	432
AD-56027.1	A-115219.1	uGGGGAGGcAAAGAAccAGudTsdT	317	A-115220.1	ACUGGUUCUUGCCUCCcAdTsdT	433
AD-55987.1	A-115143.1	GGAGGcAAAGAAccAGuGuudTsdT	318	A-115144.1	AAcACUGGUUCUUGCCUCCdTsdT	434
AD-56043.1	A-115193.1	uccAAAAAGAAuuuccAAccdTsdT	319	A-115194.1	GGUUGGAAUUCUUCUUGGAdTsdT	435
AD-56001.1	A-115085.1	cAAAAAGAAuuuccAAccGAdTsdT	320	A-115086.1	UCGGUUGGAAUUCUUCUUGdTsdT	436
AD-52445.1	A-108028.1	ccAAccGAccAGcuuGuuudTsdT	321	A-108029.1	AAAcAAGCUGGUGGUUGGdTsdT	437
AD-52451.1	A-108030.1	ccGAccAGcuuGuuuGuGAdTsdT	322	A-108031.1	UcAcAAAcAAGCUGGUGGdTsdT	438
AD-52457.1	A-108032.1	cGAccAGcuuGuuuGuGAAAdTsdT	323	A-108033.1	UUCAcAAAcAAGCUGGUGGdTsdT	439
AD-52463.1	A-108034.1	GAccAGcuuGuuuGuGAAAdTsdT	324	A-108035.1	UUUCAcAAAcAAGCUGGUCdTsdT	440
AD-55982.1	A-115063.1	GcuuGuuuGuGAAAcAAAAAdTsdT	325	A-115064.1	UUUUGUUUcAcAAAcAAGCdTsdT	441
AD-56019.1	A-115091.1	cuuGuuuGuGAAAcAAAAAdTsdT	326	A-115092.1	UUUUUGUUUcAcAAAcAAGdTsdT	442
AD-55988.1	A-115065.1	uuGuuuGuGAAAcAAAAAdTsdT	327	A-115066.1	UUUUUUGUUUcAcAAAcAAdTsdT	443

10

20

30

40

【表 4 - 5】

二本鎖名称	センサ名称	センサ配列	配列 番号	アンチセンス 名称	アンチセンス配列	配列 番号
AD-55994.1	A-115067.1	GuuuGuGAAAcAAAAAGudTsdT	328	A-115068.1	ACUUUUUUUUUcAcAAACdTsdt	444
AD-56013.1	A-115089.1	uuGuGAAAcAAAAAGuGudTsdT	329	A-115090.1	AcACUUUUUUUcAcAAAdTsdt	445
AD-56065.1	A-115169.1	uGAAAcAAAAAGuGuuccdTsdT	330	A-115170.1	GGAAcACUUUUUUUGUUcAdTsdt	446
AD-56008.1	A-115103.1	cAAAAAGuGuuccuuuudTsdt	331	A-115104.1	AAAAGGGAACUUUUUUUGdTsdT	447
AD-56048.1	A-115179.1	AAAAAGuGuuccuuuucAdTsdt	332	A-115180.1	UGAAAAAGGGAACUUUUUUdTsdT	448
AD-56003.1	A-115117.1	AAAAAGuGuuccuuuucAAAdTsdt	333	A-115118.1	UUGAAAAAGGGAACUUUUUUdTsdT	449
AD-56051.1	A-115227.1	uuuccuuuucAAGuuGAGAdTsdt	334	A-115228.1	UCUcAACUUUGAAAAAGGGAAdTsdt	450
AD-56044.1	A-115209.1	ccuuuucAAGuuGAGAAcAdTsdt	335	A-115210.1	UGUUCUcAACUUUGAAAAAGGdTsdT	451
AD-55996.1	A-115099.1	uuucAAGuuGAGAAcAAAAdTsdt	336	A-115100.1	UUUUGUUCUcAACUUUGAAAAAdTsdt	452
AD-56002.1	A-115101.1	uucAAGuuGAGAAcAAAAAdTsdt	337	A-115102.1	UUUUUGUUCUcAACUUUGAAAdTsdt	453
AD-55976.1	A-115061.1	cAAGuuGAGAAcAAAAAuudTsdt	338	A-115062.1	AAUUUUUGUUCUcAACUUUGdTsdT	454
AD-56062.1	A-115215.1	AGuuGAGAAcAAAAAuGGdTsdT	339	A-115216.1	CcAAUUUUUGUUCUcAACUdTsdT	455
AD-56011.1	A-115151.1	GuuGAGAAcAAAAAuGGGdTsdT	340	A-115152.1	CCcAAUUUUUGUUCUcAACdTsdt	456
AD-56009.1	A-115119.1	uGAGAAcAAAAAuGGGuudTsdt	341	A-115120.1	AACCcAAUUUUUGUUCUcAdTsdt	457
AD-56020.1	A-115107.1	GAGAAcAAAAAuGGGuuudTsdt	342	A-115108.1	AAACCcAAUUUUUGUUCUCdTsdT	458
AD-55979.1	A-115109.1	GAAcAAAAAuGGGuuuAdTsdt	343	A-115110.1	uAAAAACCcAAUUUUUGUUCdTsdT	459
AD-55997.1	A-115115.1	AAcAAAAAuGGGuuuuAAAdTsdt	344	A-115116.1	UUAAAAACCcAAUUUUUGUUdTsdT	460
AD-56000.1	A-115069.1	AcAAAAAuGGGuuuuAAAdTsdt	345	A-115070.1	UUuAAAAACCcAAUUUUUGUdTsdT	461
AD-56006.1	A-115071.1	cAAAAAuGGGuuuuAAAdTsdt	346	A-115072.1	UUUUAAAAACCcAAUUUUUGdTsdT	462
AD-55990.1	A-115097.1	AuuGGGuuuuAAAAAuAdTsdt	347	A-115098.1	UUuAAUUUUuAAAAACCcAAUdTsdT	463
AD-55984.1	A-115095.1	uuGGGuuuuAAAAAuAAAGdTsdT	348	A-115096.1	CUUUuAAUUUUuAAAAACCcAAAdTsdt	464
AD-55995.1	A-115083.1	uGGGuuuuAAAAAuAAAGudTsdt	349	A-115084.1	ACUUuAAUUUUuAAAAACCcAdTsdt	465
AD-56004.1	A-115133.1	uuuAAAAAuAAAGuAuAcAdTsdt	350	A-115134.1	UGuAuACUUUUuAAUUUUuAAAdTsdt	466

10

20

30

40

【表 4 - 6】

二本鎖名称	センス名称	センス配列	配列 番号	アンチセンス 名称	アンチセンス配列	配列 番号
AD-56042.1	A-115177.1	uuAAAuAAAGuAuAcAudTsdT	351	A-115178.1	AUGuAuACUuAAUuUuAAAdTsdT	467
AD-55992.1	A-115129.1	uuGuAuuuAGuGuuuGAAAdTsdT	352	A-115130.1	UUcAAGAcACuAAAUcAAAdTsdT	468
AD-55977.1	A-115077.1	uGuAuuuAGuGuuuGAAAdTsdT	353	A-115078.1	AUUcAAGAcACuAAAUcAAAdTsdT	469
AD-56005.1	A-115149.1	uAGuGuuuuGAuGuAAAGAdTsdT	354	A-115150.1	UCUuAcAUUcAAAGAcACuAdTsdT	470
AD-56052.1	A-115243.1	cuuGAAuGuAAGAAcAuGAdTsdT	355	A-115244.1	UcAUUUUCUuAcAUUcAAAGdTsdT	471
AD-55985.1	A-115111.1	uuGAAuGuAAGAAcAuGAdTsdT	356	A-115112.1	GUcAUGUUUCUuAcAUUcAAAdTsdT	472
AD-56038.1	A-115207.1	cuuAGuuuuuccAcAGAdTsdT	357	A-115208.1	AUCUGUGGAAAAAACuAAAGdTsdT	473
AD-56023.1	A-115155.1	ccAcAGAuGeuuGuGAuuudTsdT	358	A-115156.1	AAAUcAcAAGcAUCUGUGGdTsdT	474
AD-56018.1	A-115075.1	AcAGAuGeuuGuGAuuuuudTsdT	359	A-115076.1	AAAAUcAcAAGcAUCUGUdTsdT	475
AD-56060.1	A-115183.1	cuGAuuuuGuuuGAuGdTsdT	360	A-115184.1	cAUUcAAAcAGAAAUUcAGdTsdT	476
AD-55993.1	A-115145.1	AAccAuAGeuGGuuAuuuudTsdT	361	A-115146.1	GAAAUcAcAGCuAUGGUUdTsdT	477
AD-55986.1	A-115127.1	ccAuAGeuGGuuAuuuuudTsdT	362	A-115128.1	GAGAAuAAcAcAGCuAUGGdTsdT	478

【 0 5 6 2 】

10

20

30

40

【表 5 - 1】

表 5. Hep3B 細胞における AGT 単回投与スクリーニング

	10nM Avg	10nM SD	0.1nM Avg	0.1nM SD	0.01nM Avg	0.01nM SD	NM_000029.3 と 比べた開始点
AD-52457.1	9.4	0.6	13.3	1.3	15.1	2.3	2284
AD-52438.1	3.4	0.1	12.2	1.8	17.7	1.7	1247
AD-52463.1	9.8	0.9	16.9	2.9	19.3	2.1	2285
AD-52433.1	7.4	1.5	14.4	1.0	24.8	1.3	2125
AD-52439.1	15.1	1.1	23.9	0.2	29.9	1.4	2201
AD-52449.1	5.7	0.6	22.7	1.2	42.4	5.3	841
AD-52451.1	10.4	0.5	29.0	1.1	47.4	1.1	2283
AD-52474.1	5.0	0.3	30.6	2.2	49.1	1.9	2081
AD-52462.1	6.1	0.1	23.7	2.7	50.8	1.6	1595
AD-52445.1	11.0	0.3	24.2	1.4	55.1	0.4	2279
AD-52456.1	11.9	0.3	38.7	0.5	71.7	1.4	1587
AD-52469.1	15.9	0.6	40.6	3.1	84.1	0.8	1767
AD-52461.1	62.8	1.1	78.5	0.3	85.0	0.6	849
AD-52443.1	16.9	0.0	49.4	2.0	88.4	3.0	828
AD-52468.1	27.6	1.5	85.1	3.7	91.6	1.4	1879
AD-52431.1	24.6	3.7	75.2	1.8	92.3	3.1	491
AD-52444.1	67.0	2.8	74.4	0.3	94.1	0.2	1403
AD-52455.1	57.0	0.5	89.5	4.1	94.4	1.6	844
AD-52432.1	70.6	2.3	93.6	8.2	95.7	3.7	1214
AD-52473.1	46.4	0.2	75.6	0.2	95.8	0.1	910
AD-52450.1	20.3	1.7	53.0	2.5	96.3	4.8	1417
AD-52437.1	36.3	4.1	86.6	0.6	96.6	0.9	643
AD-52467.1	59.5	0.8	94.5	1.7	102.9	5.1	863
AD-55976.1			3.6	5.8			2323
AD-55977.1			77.2	70.0			2385
AD-55978.1			8.3	11.8			2202
AD-55979.1			7.7	9.1			2331
AD-55980.1			14.1	17.4			1729
AD-55981.1			21.2	29.4			1566
AD-56023.1			74.1	77.1			2450
AD-56024.1			17.6	27.8			2082
AD-56025.1			66.5	75.0			855
AD-56026.1			13.7	20.2			1601
AD-56027.1			16.9	22.2			2227
AD-56028.1			63.8	74.0			1728
AD-55982.1			22.9	26.1			2290
AD-55983.1			6.2	8.7			1605
AD-55984.1			52.0	59.9			2340
AD-55985.1			70.1	65.1			2398
AD-55986.1			80.5	79.3			2521
AD-55987.1			12.5	15.5			2230

10

20

30

40

【表 5 - 2】

	10nM Avg	10nM SD	0.1nM Avg	0.1nM SD	0.01nM Avg	0.01nM SD	NM_000029.3 と 比べた開始点
AD-56029.1			51.3	62.2			1741
AD-56030.1			53.3	58.0			822
AD-56031.1			38.1	43.7			2204
AD-56032.1			12.6	15.3			1570
AD-56033.1			99.8	100.7			1408
AD-56034.1			87.8	93.0			825
AD-55988.1			46.4	49.5			2292
AD-55989.1			5.8	9.7			1251
AD-55990.1			6.5	5.0			2339
AD-55991.1			50.4	38.2			2080
AD-55992.1			76.4	60.5			2384
AD-55993.1			66.5	62.9			2519
AD-56035.1			17.9	17.6			1592
AD-56036.1			47.7	59.9			1735
AD-56037.1			80.8	83.5			2199
AD-56038.1			84.8	90.4			2439
AD-56039.1			47.9	66.7			2070
AD-56040.1			95.0	98.3			1260
AD-55994.1			3.6	5.5			2294
AD-55995.1			31.4	47.8			2341
AD-55996.1			5.1	5.0			2320
AD-55997.1			83.3	76.6			2332
AD-55999.1			74.6	75.0			2203
AD-56041.1			21.9	21.4			485
AD-56042.1			73.3	73.5			2347
AD-56043.1			53.1	57.8			2266
AD-56044.1			12.0	13.9			2317
AD-56045.1			41.7	48.8			1885
AD-56046.1			83.0	90.1			1002
AD-56000.1			13.3	20.3			2333
AD-56001.1			4.7	5.7			2268
AD-56002.1			5.4	6.6			2321
AD-56003.1			4.2	4.4			2307
AD-56004.1			54.0	68.5			2346
AD-56005.1			60.2	62.2			2391
AD-56047.1			24.7	28.2			635
AD-56048.1			7.1	7.4			2306
AD-56049.1			73.0	62.6			2200
AD-56050.1			96.4	102.1			2206
AD-56051.1			17.4	23.0			2314
AD-56052.1			85.1	102.5			2397
AD-56006.1			8.1	10.7			2334

10

20

30

40

【表 5 - 3】

	10nM Avg	10nM SD	0.1nM Avg	0.1nM SD	0.01nM Avg	0.01nM SD	NM_000029.3 と 比べた開始点
AD-56007.1			17.8	19.1			1738
AD-56008.1			5.4	4.8			2304
AD-56009.1			12.2	14.4			2328
AD-56010.1			62.1	69.0			1891
AD-56011.1			35.3	40.3			2326
AD-56053.1			5.0	6.7			1810
AD-56054.1			30.9	35.5			1591
AD-56055.1			61.4	50.9			1740
AD-56056.1			83.6	94.0			1887
AD-56057.1			85.7	97.9			606
AD-56058.1			68.6	87.4			1413
AD-56012.1			35.0	47.1			1739
AD-56013.1			49.2	57.6			2296
AD-56014.1			54.4	60.3			1737
AD-56015.1			42.2	46.7			1892
AD-56016.1			11.2	15.6			1249
AD-56017.1			10.6	12.9			834
AD-56059.1			37.3	45.2			1248
AD-56060.1			94.1	94.3			2497
AD-56061.1			99.8	94.6			878
AD-56062.1			19.2	32.2			2325
AD-56063.1			102.2	102.8			911
AD-56064.1			80.2	92.3			644
AD-56018.1			72.0	74.5			2452
AD-56019.1			25.2	27.7			2291
AD-56020.1			10.2	15.3			2329
AD-56021.1			36.0	40.9			658
AD-56022.1			37.5	52.7			1602
AD-56065.1			56.5	71.9			2299
AD-56066.1			12.3	18.9			1572
AD-56067.1			64.9	81.8			741
AD-56068.1			68.6	82.1			1250
AD-56069.1			48.9	72.7			1277

【 0 5 6 3】

【表 6 - 1】

表 6 - Hep3B 細胞における AGT IC₅₀ データ

二本鎖名称	IC ₅₀ (nM)
AD-52431	5.719
AD-52432	>10nM
AD-52433	0.057
AD-52437	>10nM
AD-52438	0.063
AD-52439	0.192

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

AD-52443	0.504
AD-52444	>10nM
AD-52445	0.183
AD-52449	0.211
AD-52450	2.052
AD-52451	0.318
AD-52455	>10nM
AD-52456	1.569
AD-52461	>10nM
AD-52462	0.242
AD-52463	0.112
AD-52467	>10nM
AD-52468	>10nM
AD-52469	0.540
AD-52473	>10nM
AD-52474	0.323
AD-55983	0.017
AD-55983	0.020
AD-55989	0.017
AD-55989	0.019
AD-56016	0.018
AD-56016	0.019
AD-56017	0.027
AD-56017	0.031
AD-56053	0.007
AD-56053	0.009

10

20

【 0 5 6 4】

30

【表 7 - 1】

表 7. AGT dsRNA の未修飾セセンスおよびアンチセセンス鎖配列 (21/23 量体)

二本鎖名称	NM_000029.3と比較した位置	セセンス名称	セセンス配列	配列番号	アンチセセンス名称	アンチセセンスと比較した位置	アンチセセンス配列	配列番号
UM AD-60803.1	830-850	A-122599.1	CGGGAUGCUGGCCAACUUCUU	479	A-122600.1	828-850	AAGAAGUUGGCCAGCAUCCCGAC	517
UM AD-60775.1	843-863	A-122541.1	AACUUCUUGGGCUUCCGUUAU	480	A-122542.1	841-863	UAUACGGAAGCCCAAGAAAGUUGG	518
UM AD-60779.1	855-875	A-122605.1	UUCCGUAUAUAGGCAUGCAA	481	A-122606.1	853-875	UUGCAUGCCAUUAUACGGAAGC	519
UM AD-60797.1	857-877	A-122581.1	CCGUUAUAUAGGCAUGCACAA	482	A-122582.1	855-877	UUGUCAUGCCAUUAUACGGAA	520
UM AD-60806.1	880-900	A-122585.1	AGCUAUGGGCGUGGUCCAUA	483	A-122586.1	878-900	UAUGGACACGCCCAUAGCUCA	521
UM AD-60787.1	912-932	A-122577.1	CUCUCCCCAACGGCUGUCUUU	484	A-122578.1	910-932	AAAGACAGCCGUUGGGGAGAGGA	522
UM AD-60807.1	913-933	A-122601.1	UCUCCCCAACGGCUGUCUUUA	485	A-122602.1	911-933	UAAAGACAGCCGUUGGGGAGAGG	523
UM AD-60794.1	1276-1296	A-122611.1	UGCAGGCUUGUGACAGGAUGGA	486	A-122612.1	1274-1296	UCCAUCUUGUCACAGCCUUGCAUG	524
UM AD-60796.1	1568-1588	A-122565.1	CCUGGACAAAGGUGGAGGGUCU	487	A-122566.1	1566-1588	AGACCCUCCACCUUGUCCAGGUC	525
UM AD-60778.1	1572-1592	A-122589.1	GACAAGGUGGAGGGUUCACU	488	A-122590.1	1570-1592	AGUGAGACCCUCCACCUUGUCCA	526
UM AD-60792.1	1574-1594	A-122579.1	CAAGGUGGAGGGUUCACUUU	489	A-122580.1	1572-1594	AAAGUGAGACCCUCCACCUUGUC	527
UM AD-60772.1	1594-1614	A-122571.1	UCCAGCAAAACUCCUCAACU	490	A-122572.1	1592-1614	AGUUGAGGGAGUUUUGCUGGAAA	528
UM AD-60773.1	1603-1623	A-122587.1	ACUCCUCAACUGGAUGAAGA	491	A-122588.1	1601-1623	UCUUCAUCCAGUUGAGGGAGUUU	529
UM AD-60782.1	1737-1757	A-122575.1	CUGAACCUUGCAAAAUUGAGA	492	A-122576.1	1735-1757	UCUCAUUUUUGCAGGUUCAGCU	530
UM AD-60800.1	1739-1759	A-122551.1	GAACCUGCAAAAUUGAGCAA	493	A-122552.1	1737-1759	UUGCUCAAUUUUUGCAGGUUCAG	531
UM AD-60785.1	1741-1761	A-122545.1	ACCUGCAAAAUUGAGCAAUA	494	A-122546.1	1739-1761	UAUUGCUCAAUUUUUGCAGGUUC	532
UM AD-60802.1	1742-1762	A-122583.1	CCUGCAAAAUUGAGCAAUGA	495	A-122584.1	1740-1762	UCAUUGCUCAAUUUUUGCAGGUU	533
UM AD-60799.1	1812-1832	A-122613.1	GCGGAUGAGAGAGAGCCACA	496	A-122614.1	1810-1832	UGUGGGCUCUCUCUCAUCCGCUU	534
UM AD-60781.1	1894-1914	A-122559.1	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAA	497	A-122560.1	1892-1914	UUUGAUCAUACACAGCAAAACAGG	535
UM AD-60793.1	2072-2092	A-122595.1	CACCCCAGUCUCCACCUUU	498	A-122596.1	2070-2092	AAAGGUGGAGACUGGGGGUGAC	536
UM AD-60784.1	2081-2101	A-122607.1	UCUCCACCUUUUUCUUAUU	499	A-122608.1	2079-2101	AUUAGAAAGAAAGGUGGGAGACU	537

10

20

30

40

【表 7 - 2】

二本鎖名称	NM_00002 9.3と比較 した位置	センズ名称	センズ配列	配列 番号	アンチセンス 名称	NM_000029.3と 比較した位置	アンチセンス配列	配列 番号
UM AD-60777.1	2084-2104	A-122573.1	CCCACCUUUUUCUUAAGAA	500	A-122574.1	2082-2104	UUCAUUAGAAAGAAAAGGUGGGAG	538
UM AD-60795.1	2270-2290	A-122549.1	UCCAAAAAGAAUCCAAACCGA	501	A-122550.1	2268-2290	UCGGUUGGAAUUCUUUUUGGAAC	539
UM AD-60783.1	2281-2301	A-122591.1	UUCCAACCGACGACUUGUUU	502	A-122592.1	2279-2301	AAACAAGCUGGUCGGUUGGAAUU	540
UM AD-60788.1	2286-2306	A-122593.1	ACCGACGCUUGUUUGUGAA	503	A-122594.1	2284-2306	UUCACAAACAAGCUGGUCGGUUG	541
UM AD-60789.1	2291-2311	A-122609.1	CCAGCUUGUUUGUGAAACAAA	504	A-122610.1	2289-2311	UUUGUUUCACAAACAAGCUGGUC	542
UM AD-60770.1	2292-2312	A-122539.1	CAGCUUGUUUGUGAAACAAA	505	A-122540.1	2290-2312	UUUUGUUUCACAAACAAGCUGGU	543
UM AD-60776.1	2309-2329	A-122557.1	AAAAAGUUGUCCUUUUCAA	506	A-122558.1	2307-2329	UUGAAAAGGGAACACUUUUUUGU	544
UM AD-60798.1	2316-2336	A-122597.1	UGUUCUUUUUCAAGUUGAGA	507	A-122598.1	2314-2336	UCUCAACUUGAAAAAGGGAACACU	545
UM AD-60801.1	2328-2348	A-122567.1	AAGUUGAGAACAAAAAUUGGA	508	A-122568.1	2326-2348	UCCAAUUUUUUGUUCUCAACUUGA	546
UM AD-60791.1	2329-2349	A-122563.1	AGUUGAGAACAAAAAUUGGGU	509	A-122564.1	2327-2349	ACCCAAUUUUUUGUUCUCAACUUG	547
UM AD-60771.1	2334-2354	A-122555.1	AGAACAAAAAUUGGUUUUAA	510	A-122556.1	2332-2354	UUAAAAACCCAAUUUUUUGUUCUCA	548
UM AD-60780.1	2335-2355	A-122543.1	GAACAAAAAUUGGUUUUAAA	511	A-122544.1	2333-2355	UUUAAAACCCAAUUUUUUGUUCUC	549
UM AD-60786.1	2386-2406	A-122561.1	GUUUGUAUUUAGUGUCUUUGAA	512	A-122562.1	2384-2406	UUCAAGACACUAAAAUACAAACCG	550
UM AD-60790.1	2387-2407	A-122547.1	UUUGUAUUUAGUGUCUUGAAU	513	A-122548.1	2385-2407	AUUCAAAGACACUAAAAUACAAACC	551
UM AD-60774.1	2399-2419	A-122603.1	GUUUUGAAUGUAAGAACAUGA	514	A-122604.1	2397-2419	UCAUGUUCUUACAUUCAAGACAC	552
UM AD-60804.1	2400-2420	A-122553.1	UCUUUGAAUGUAAGAACAUGAA	515	A-122554.1	2398-2420	UUCAUGUUCUUACAUUCAAGACA	553
UM AD-60805.1	2452-2472	A-122569.1	UUCCACAGAUUCUUUGAUUU	516	A-122570.1	2450-2472	AAAUACAAGCAUCUCUGUGGAAAA	554

10

20

30

40

【表 8 - 1】

表 8. AGT dsRNA の修飾 センソスおよびアンチセンス鎖配列 (21/23 量体)

二本鎖名称	センソス名称	センソス配列	配列番号	アンチセンソス名称	アンチセンス配列	配列番号
AD-60770.1	A-122539.1	CfsasGfcUfuGfuUfuGfuGfaAfaCfaAfaAfl.96	555	A-122540.1	usUfsuUfgUfuUfcAfaaaAfaAfaGfcUfggsu	593
AD-60771.1	A-122555.1	AfsgsAfaCfaAfaAfaUfuGfgGfuUfuUfaAfl.96	556	A-122556.1	usUfsaAfaAfaCfcAfaauUfuUfuCfscsa	594
AD-60772.1	A-122571.1	UfscsCfaGfcAfaAfaCfcUfcCfuCfaAfaUfl.96	557	A-122572.1	asGfsuUfgAfgGfaAfguuUfuGfcUfgGfasasa	595
AD-60773.1	A-122587.1	AfscsUfcCfcUfcAfaCfuGfaAfuGfaAfaAfl.96	558	A-122588.1	usCfsuUfcAfuCfcAfguuGfaGfgGfaGfususu	596
AD-60774.1	A-122603.1	GfsusCfuUfgAfaUfuGfuAfaAfaCfaUfgAfl.96	559	A-122604.1	usCfsaUfgUfuCfuUfaaUfuCfaAfaAfgAfcasac	597
AD-60775.1	A-122541.1	AfsasCfuUfcUfuGfgGfcUfuCfcGfuAfaUfl.96	560	A-122542.1	usAfsuAfcGfgAfaGfccAfaGfaAfgUfsgsg	598
AD-60776.1	A-122557.1	AfsasAfaAfaGfuGfuUfcCfcUfuUfuCfaAfl.96	561	A-122558.1	usUfsgAfaAfaGfgGfaacAfcUfuUfuUfsgsu	599
AD-60777.1	A-122573.1	CfscsCfaCfcUfuUfuUfuUfuUfaAfuGfaAfl.96	562	A-122574.1	usUfscAfuUfaGfaAfgaaAfaGfgUfgGfgsasg	600
AD-60778.1	A-122589.1	GfsasCfaAfgGfuGfgAfaGfgUfcUfcAfcUfl.96	563	A-122590.1	asGfsuGfaGfaCfcCfuuccAfcCfuUfgUfscsa	601
AD-60779.1	A-122605.1	UfsusCfcGfuAfaUfuAfuAfuGfgCfaUfgCfaAfl.96	564	A-122606.1	usUfsgCfaUfgCfcAfuauAfuAfcGfgAfaagsc	602
AD-60780.1	A-122543.1	GfsasAfcAfaAfaAfuUfuGfgUfuUfaAfaAfl.96	565	A-122544.1	usUfsuAfaAfaCfcCfaauUfuUfuGfuUfcsusc	603
AD-60781.1	A-122559.1	UfsgsUfuUfgCfuGfuUfgGfuAfuGfaUfcAfaAfl.96	566	A-122560.1	usUfsuGfaUfcAfuAfaAfaCfaAfaCfasgsg	604
AD-60782.1	A-122575.1	CfsusGfaAfcCfuGfgCfaAfaAfaUfuUfgAfgAfl.96	567	A-122576.1	usCfsuCfaAfuUfuUfugcAfgGfuUfcAfgscsu	605
AD-60783.1	A-122591.1	UfsusCfcAfaCfcGfaCfcAfgCfuUfgUfuUfl.96	568	A-122592.1	asAfsaCfaAfgCfuGfgucGfgUfuGfgAfasusu	606
AD-60784.1	A-122607.1	UfscsUfcCfcAfcCfuUfuUfuUfuCfuAfaUfl.96	569	A-122608.1	asUfsuAfgAfaGfaAfaagGfuGfgGfaGfascu	607
AD-60785.1	A-122545.1	AfscsCfuGfcAfaAfaAfuUfgAfgCfaAfaUfl.96	570	A-122546.1	usAfsuUfgCfuCfaAfaauUfuGfcAfgGfususc	608
AD-60786.1	A-122561.1	GfsusUfuGfuAfuUfuAfuUfgUfuUfuGfaAfl.96	571	A-122562.1	usUfscAfaGfaCfaCfuauAfuAfaAfaAfcscsg	609
AD-60787.1	A-122577.1	CfsusCfuCfcCfcAfaCfcGfgUfuUfuUfl.96	572	A-122578.1	asAfsaGfaCfaGfcCfuuuGfgGfgAfgAfgsgsa	610
AD-60788.1	A-122593.1	AfscsCfaAfcCfaGfcUfuGfuUfuGfuGfaAfl.96	573	A-122594.1	usUfscAfcAfaAfaAfaAfaCfcGfgGfusug	611
AD-60789.1	A-122609.1	CfscsAfgCfuUfgUfuUfuUfgUfgAfaAfaAfl.96	574	A-122610.1	usUfsuGfuUfuCfaCfaaaCfaAfgCfuGfgsusc	612

10

20

30

40

【表 8 - 2】

二本鎖名称	センサ名称	センサ配列	配列番号	アンチセンス名称	アンチセンス配列	配列番号
AD-60790.1	A-122547.1	UfsusUfgUfaUfuUfAfgGfuGfuCfuUfgAfaUfl.96	575	A-122548.1	asUfsuCfaAfgAfcAfcuaAfaUfaCfaAfasesc	613
AD-60791.1	A-122563.1	AfsgsUfuGfaGfaAfcAfaAfaAfuUfgGfuUfl.96	576	A-122564.1	asCfscCfaAfaUfuUfuguUfcAfaCfusug	614
AD-60792.1	A-122579.1	CfsasAfgGfuGfgAfgGfgUfcAfcUfuUfl.96	577	A-122580.1	asAfsaGfuGfaGfaCfcuAfcAfcUfUfgsusc	615
AD-60793.1	A-122595.1	CfsasCfcCfcCfaGfuUfcUfcCfaCfcUfuUfl.96	578	A-122596.1	asAfsaGfgUfgGfgAfgacUfgGfgGfgUfgsasc	616
AD-60794.1	A-122611.1	UfsgsCfaGfgCfuGfuUfgGfaGfaGfuGfaAfl.96	579	A-122612.1	usCfscAfuCfcUfgUfgUfgacAfgCfcUfgCfasug	617
AD-60795.1	A-122549.1	UfscsCfaAfaAfaGfaAfaUfcCfaAfcCfgAfl.96	580	A-122550.1	usCfsgGfuUfgGfaAfuUfuUfgGfasasc	618
AD-60796.1	A-122565.1	CfscsUfgGfaCfaAfgGfuGfgAfgGfgUfcUfl.96	581	A-122566.1	asGfscCfcCfuCfcAfcuUfgUfcCfaGfgsusc	619
AD-60797.1	A-122581.1	CfscsGfuAfaAfaUfuUfgGfgCfaUfgCfaCfaAfl.96	582	A-122582.1	usUfsgUfgCfaUfgCfcuAfuAfuAfcGfgsasa	620
AD-60798.1	A-122597.1	UfsgsUfuCfcCfuUfuUfcAfaGfuUfgAfgAfl.96	583	A-122598.1	usCfsuCfaAfcUfuGfaaaAfgGfgAfaCfascsu	621
AD-60799.1	A-122613.1	GfscsGfgAfuGfaGfaGfaGfaGfaGfcAfcAfl.96	584	A-122614.1	usGfsuGfgGfcUfcUfcucUfcAfuCfcGfcsusu	622
AD-60800.1	A-122551.1	GfscsAfcCfuGfcAfaAfaAfaUfgAfgCfaAfl.96	585	A-122552.1	usUfsgCfuCfaAfuUfuUfguuGfcAfgGfuUfcsasg	623
AD-60801.1	A-122567.1	AfsasGfuUfgAfgAfgAfcfaAfaUfuGfgAfl.96	586	A-122568.1	usCfscAfaUfuUfuUfguuCfuCfaAfcUfugsasa	624
AD-60802.1	A-122583.1	CfscsUfgCfaAfaAfaUfuGfaGfcAfaUfgAfl.96	587	A-122584.1	usCfscAfuGfcUfcAfaauUfuUfgCfaGfgsusu	625
AD-60803.1	A-122599.1	CfsgsGfgAfuGfcUfgGfcCfaAfcUfuUfl.96	588	A-122600.1	asAfgAfaGfuUfgGfcAfaGfcAfuCfcCfsgasc	626
AD-60804.1	A-122553.1	UfscsUfuGfaAfuGfuUfaGfaAfcAfuGfaAfl.96	589	A-122554.1	usUfscAfuGfuUfcUfuacAfuUfcAfaGfasasa	627
AD-60805.1	A-122569.1	UfsusCfcAfcAfgAfuUfgGfcUfuGfuGfaUfuUfl.96	590	A-122570.1	asAfsaUfcAfcAfaGfcuAfuGfuGfgAfasasa	628
AD-60806.1	A-122585.1	AfsgsCfuAfuGfgGfgGfgUfgGfuCfcAfuAfl.96	591	A-122586.1	usAfsuGfgAfcCfaCfscCfcAfuAfgCfusasa	629
AD-60807.1	A-122601.1	UfscsUfcCfcCfaAfcGfgCfuGfuCfuAfl.96	592	A-122602.1	usAfsaAfgAfcAfgCfcguUfgGfgGfaGfasgsg	630

【表 9】

表 9. Hep3B 細胞における AGT 単回投与スクリーニング (21/23 量体)

二本鎖名称	10nM Avg	10nM SD	0.1nM Avg	0.1nM SD	NM_000029.3 と 比べた開始点
AD-60770.1	4.7	0.7	27.4	7.4	2292
AD-60771.1	4.6	1.2	10.9	5.9	2334
AD-60772.1	14.8	7.9	63.7	13.2	1594
AD-60773.1	43.9	8.7	88.8	5.4	1603
AD-60774.1	64.0	3.8	79.1	4.2	2399
AD-60775.1	8.4	2.8	62.2	8.8	843
AD-60776.1	5.9	2.8	11.1	5.1	2309
AD-60777.1	4.3	1.7	26.7	5.3	2084
AD-60778.1	11.5	7.4	52.5	15.5	1572
AD-60779.1	5.2	2.8	24.1	4.1	855
AD-60780.1	5.7	2.3	12.0	5.2	2335
AD-60781.1	6.9	2.1	18.5	3.1	1894
AD-60782.1	9.2	5.0	47.0	8.6	1737
AD-60783.1	15.9	9.0	35.7	7.6	2281
AD-60784.1	5.6	1.0	12.3	2.5	2081
AD-60785.1	6.1	0.9	29.7	13.7	1741
AD-60786.1	56.9	5.4	74.0	5.1	2386
AD-60787.1	94.4	0.7	104.4	6.0	912
AD-60788.1	10.5	3.6	49.8	4.8	2286
AD-60789.1	5.2	2.0	25.3	16.0	2291
AD-60790.1	70.4	3.3	86.3	19.7	2387
AD-60791.1	7.8	3.7	33.4	18.0	2329
AD-60792.1	17.0	3.3	72.8	9.0	1574
AD-60793.1	18.4	5.6	58.3	12.5	2072
AD-60794.1	54.3	11.5	101.6	4.3	1276
AD-60795.1	6.2	3.4	36.3	8.6	2270
AD-60796.1	41.6	3.3	100.9	8.6	1568
AD-60797.1	72.5	2.8	97.1	6.1	857
AD-60798.1	13.2	4.8	29.1	16.4	2316
AD-60799.1	29.7	7.5	86.2	4.2	1812
AD-60800.1	31.0	7.5	81.8	11.2	1739
AD-60801.1	10.9	2.2	35.4	11.3	2328
AD-60802.1	14.8	5.5	52.8	9.7	1742
AD-60803.1	29.2	10.9	71.4	9.6	830
AD-60804.1	39.2	2.9	75.6	6.1	2400
AD-60805.1	60.3	10.1	97.4	2.3	2452
AD-60806.1	89.3	11.8	92.8	6.5	880
AD-60807.1	64.1	3.7	91.5	10.1	913

【表 10】

表 10 Hep3B 細胞における AGT IC₅₀ データ (21/23 量体)

二本鎖名称	IC ₅₀ (nM)
AD-60771.1	0.028
AD-60776.1	0.033
AD-60780.1	0.038
AD-60784.1	0.045
AD-60781.1	0.089

10

20

30

40

50

【0566】

実施例2. インビボでのAGTサイレンシングー子癇前症後遺症の改善

完全なゲノムのヒトAGT遺伝子を保持するトランスジェニック雌Sprague-Dawleyラット（例えば、[TGR(hAGT)L1623]（例えば、Bohlender J, et al. (1996) Hypertension 27: 535-540 および Bohlender J, et al. (2000) J Am Soc Nephrol 11: 2056-2061を参照のこと））に、遠隔測定により血圧を測定する装置を外科的に移植した。移植術からの回復後、これらのラットを、全ゲノムヒトREN遺伝子を保持するトランスジェニック雄Sprague-Dawleyラット（例えば、[TGR(hREN)L10J]（例えば、Bohlender J, et al. (1997) Hypertension 29: 428-434 および Bohlender J, et al. (2000) J Am Soc Nephrol 11: 2056-2061を参照のこと））と交配させた。この交雑のメス子孫（本明細書中、“PEラット”という）は、子癇前症のモデルであり、アルブミン尿および子宮内胎児発育遅延（IUGR）を発症し、そして妊娠13日目辺りに始まる血圧スパイクを有している（例えば、図2A参照）。10

【0567】

妊娠中のPEラットの下位集団への、10mg/kgのsiRNAを標的とするhAGT(AD-60771)の投与を、妊娠3日目に開始した。妊娠PEラットの第2の下位集団を未処理対照とした。投薬を、妊娠15日目まで3日毎に継続した。該ラットを妊娠19日目に屠殺し、血液および組織サンプルを母親ラットおよび胎仔から採取した。

【0568】

母体血圧を、遠隔で血圧を測定するために外科的に移植された装置により、試験中、測定した。図2Aは、AD-60771の投与後に、母体の平均動脈血圧が顕著に低下したことを示す。加えて、血清アルブミンのELISA分析により決定されるように、母体のアルブミン尿は、AD-60771の投与後に顕著に低下した（図2B）。これらの2つの状態は、子癇前症の特徴である。低下した血圧は、疾患に関連する心血管事象を減少させ、一方、低下したアルブミン尿は、改善された腎機能の指標である。20

【0569】

子癇前症はまた、おそらく不十分な血液循環に関連する、縮小した胎盤サイズに関連している。この状態の結果、胎仔の成長が損なわれる。しかし、母体へのAD-60771の投与後、子宮胎盤単位重量（図3A）および胎仔重量（図3B）が増加し、そして胎仔の脳：肝臓比（図3C）が正常化し、それらは全て、より正常な胎盤および胎仔発達の指標である。30

【0570】

母体の肝臓および胎盤における、hAGTのmRNA発現のRT-qPCR分析により決定される通り、母体の肝臓では、hAGTの有意なサイレンシングがあるが（図4A）、胎盤では有意なサイレンシングはない（図4B）ことが示された。このことは、胎盤へのiRNAの浸透の欠如を示している。

【0571】

さらに、4つの母体肝臓サンプル、4つの胎盤サンプル、および8つの胎仔肝臓サンプルの分析は、胎仔肝臓のiRNAへの暴露は、組織1g当たり、約1.2ngのsiRNA（検出限界以下、組織1g当たり、1.3ngのsiRNA）であり、母体肝臓のiRNAへの暴露は、胎盤のiRNAへの暴露よりも約265倍高かった（図5）ことを示した。組織暴露は、既報の通り（例えば、Landesman, Y., et al. (2010) Silence 1:16を参照のこと）、ステムループqPCRにより決定した。40

【0572】

従って、hAGTを標的とするiRNAでの母体の処理は、ACE阻害剤などの小分子レニン-アンジオテンシン阻害剤、およびアンジオテンシン受容体遮断薬（これらの化合物は、胎盤を通過し、胎仔毒性がある）での母体処理よりも優れている。

【0573】

胎盤は胎仔への栄養素のための導管として働き、胎仔から老廃物を排せつする導管として作用するため、その組成は重要である。従って、胎盤の病理を評価した（すなわち、サ 50

イトケラチンを免疫組織化学的に染色した組織切片の面積を測定することにより)。図6は、胎盤(子宮間膜の三角部;図6D)および栄養海綿体(分化した栄養芽細胞の前駆体である細胞の均一な層;図6E)の母体部分は、AD-60771の投与により変化しないが、全体の胎盤サイズは増加した(図6B、6Cおよび6Fならびに図6A参照)ことを示す。特に、胎仔と母体の血液との間の栄養素の交換部分であるラビリンスのサイズは、母体のAD-60771での処理により増大した(図6G)。

【0574】

アンジオテンシンによって調節される、抗血管形成可溶性fms様チロシンキナーゼ-1(sFLT1)および血管新生胎盤増殖因子(PLGF)は、子癇前症において重要な役割を果たし、それらは、胎盤から母体の血流へ放出されて、内皮機能不全を引き起こす。sFLT-1は、主に胎盤から母体の血流中に放出され、内皮機能不全を引き起こす。PLGFは、胎盤由来であり、血管形成を促進する。sFLT-1:PLGFの比は診断に用いられ、より高いsFLT-1:PLGF比は、より重度の疾患に関連する。

【0575】

RT-qPCR分析によるsFLT1およびPLGFのmRNA発現の評価は、sFLT1およびPLGFの両方のレベルが、AD-60771の母体投与後に、母体の腎臓で有意に低下したが(それぞれ、図7Aおよび7B)、胎盤では変化しないままであった(それぞれ、図7Cおよび7D)ことを実証した。しかしながら、sFLT-1は、母体の腎臓においてPLGFよりも大幅に減少したため、血清中のsFLT-1:PLGF比を向上させることができた。

【0576】

アンジオテンシンII受容体タイプI(AT1)に対するアゴニスト自己抗体は、子癇前症の女性(メス)で同定されている。妊娠中のげっ歯動物をAT1自己抗体に暴露するとき、子癇前症様症候群を発症する。AT1の活性化は、血管収縮作用ならびにアルドステロン分泌およびsFLT-1産生に関連するため、AT1自己抗体の減少は、子癇前症の表現型を軽減することが期待される。従って、AT1受容体に対するアゴニスト自己抗体(AT1-AA)の産生レベルは、バイオクロマトグラフィーおよびその後の単離された抗体のバイオアッセイによっても評価できる。AT1-AAレベルは、既報の通り、単離され、精製されたAT1-AA抗体の、新生ラットの心筋細胞の自発的な拍動速度に対する影響を評価することにより測定した(例えば、Dechend, et al. (2005) Hypertension 45:742-746)。図8は、妊娠中のPEラットへのAD-60771の投与後にAT1-AAレベルの有意な減少があったことを示している。

【0577】

実施例3. 子癇前症のトランスジェニックラットモデルにおけるインビボでのAGTサイレンシング

AD-60771二本鎖を、実施例2に記載した妊娠中のPEラットにおけるhAGT発現のサイレンシングの能力について試験した。妊娠中のPEラットの下位集団への、10mg/kgのsiRNAを標的とするhAGT(AD-60771)の投与を、妊娠3日目に開始した。肝臓および血液を妊娠21日目に採取し、hAGTおよびrAGTタンパク質およびmRNAのレベルをアッセイし、未処理の、妊娠中のトランスジェニックラット、妊娠中のSprague-Dawleyラットおよび妊娠していないSprague-Dawleyラット中に存在するhAGTおよびrAGTタンパク質およびmRNAのレベルと比較した。これらのアッセイ結果を図9Aおよび9Bに示し、対照の妊娠中のPEラットと比較して、AD-60771で処理した妊娠中のPEラットにおいて、循環AT2の80%の低下および循環hAT1の95%の低下があったことが実証されている。ラットAT2の約45%の減少もまた、対照の妊娠中のPEラットと比較して、AD-60771で処理した妊娠中のPEラットで観察された。肝臓AGT mRNAの95%サイレンシングが、対照の妊娠中のPEラットと比較して、AD-60771で処理した妊娠中のPEラットで観察された。図9Aおよび9Bはまた、妊娠中のPEラットへのAD-60771の投与後に、AT1およびAT2の血清レベルの大幅な減少があったこと

も実証している。

【0578】

【表11-1】

表 11. AGT dsRNA の未修飾センスおよびアンチセンス鎖配列 (21/23 量体)

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-67864.1	A-135936.1	CGGGCAGCAGGGUCAGAAA	A-135937.1	UUUCUGACCCUUCUGCCCG	828	10-28
AD-67865.1	A-135938.1	UCAGAAAGUGGCCCCCGUGU	A-135939.1	ACACGGGGGCCACUUCUGA	829	22-40 as
AD-67866.1	A-135940.1	CCCGUUGUUGCCUAAGCAA	A-135941.1	UUUGCUUAGGCAACACGGG	830	34-52 G19A as
AD-67867.1	A-135948.1	UGCACCUCCGGCCUGCAUA	A-135949.1	UAUGCAGGCCGGAGGUGCA	831	76-94 G19A as
AD-67868.1	A-135950.1	UGCAUGUCCUUGUGGCCUA	A-135951.1	UAGGCCACAGGGACAUGCA	832	89-107
AD-67869.1	A-135952.1	UGUGGCCUCUUGGGGUAA	A-135953.1	UUACCCCCAAGAGGCCACA	833	99-117
AD-67870.1	A-135958.1	GGUCAGAAAGGCCUUGGUGA	A-135959.1	UCACCCAGGCCUUCUGACC	834	132- 150 G19A as
AD-67871.1	A-135960.1	UGGGUGGUUGGCCUCAGGA	A-135961.1	UCCUGAGGCCAACCAACCA	835	144-162
AD-67872.1	A-135962.1	CCUCAGGCUGUCACACACA	A-135963.1	UGUGUGUGACAGCCUAGG	836	155-173
AD-67873.1	A-135964.1	CACACACCUAGGGAGAUCA	A-135965.1	UCAUCUCCCUAGGUGUGU	837	166-184
AD-67874.1	A-135966.1	AGGGAGAUUGCUCUCCGUUA	A-135967.1	UAAACGGGAGCAUCUCCCU	838	175-193
AD-67875.1	A-135968.1	CCGUUUCUGGGAAACCUUGA	A-135969.1	UCAAGGUUCCAGAAACGG	839	187- 205 G19A as
AD-67876.1	A-135970.1	AACCUUGGCCCCGACUCCU	A-135971.1	AGGAGUCGGGCCCAAGGUU	840	198-216 as
AD-67877.1	A-135972.1	CGACUCCUGCAAACUUCGA	A-135973.1	UCGAAGUUUUGCAGGAGUCG	841	209- 227 G19A as
AD-67878.1	A-135974.1	AACUUCGGUAAAUUGUGUAA	A-135975.1	UUACACAUUUAACCGAAGUU	842	220-238 as
AD-67879.1	A-135976.1	UGUGUAAACUCGACCCUGCA	A-135977.1	UGCAGGUGCGAGUACACA	843	232-250 as
AD-67880.1	A-135978.1	ACCCUGCACCCGGCUCACUA	A-135979.1	UAGUGAGCCGGUGCAGGGU	844	243-261
AD-67881.1	A-135980.1	GCUCACUCUGUUCAGCAGU	A-135981.1	ACUGCUGAACAGAGUGAGC	845	254-272 as
AD-67882.1	A-135982.1	UUCAGCAGUGAAACUCUGA	A-135983.1	UCAGAGUUUUCACUCUGAA	846	264-282

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-67883.1	A-135984.1	AAACUCUGCAUCGAUCACU	650	A-135985.1	AGUGAUCGAUGCAGAGUUU	847	274-292_as
AD-67884.1	A-135986.1	CGAUCACUAAGACUUCUUA	651	A-135987.1	UAGGAAGUCUUAGUGAUCG	848	285- 303_G19A_as
AD-67885.1	A-135990.1	GAGUCCCCAGCGUGAGUGU	652	A-135991.1	ACACUCACGUGGGACCCUC	849	307-325_as
AD-67886.1	A-135994.1	UUCUGGCAUCUGUCCUUCU	653	A-135995.1	AGAAAGGACAGAUGCCAGAA	850	329-347_as
AD-67887.1	A-135996.1	CCUUCUGGCCAGCCUGUGA	654	A-135997.1	UCACAGGCUUGGCCAGAAAGG	851	342- 360_G19A_as
AD-67888.1	A-135998.1	AGCCUGUGGUCUGGCCAAA	655	A-135999.1	UUUGGCCAGACACACAGGCU	852	352- 370_G19A_as
AD-67889.1	A-136000.1	GGCCAAGUGAUGUAACCCU	656	A-136001.1	AGGUAACAUCACUUGGCC	853	364-382_as
AD-67890.1	A-136002.1	UGUAACCCUCCUCUCCAGA	657	A-136003.1	UCUGGAGAGGAGGGUUAACA	854	374-392 385-
AD-67891.1	A-136004.1	UCUCCAGCCUGUGCACACAGA	658	A-136005.1	UCUGUGCACAGGCUGGAGA	855	403_G19A_as
AD-67892.1	A-136006.1	UGCACAGGCAGCCUGGGAA	659	A-136007.1	UUCCAGGCUGCCUGUGCA	856	396-414_as
AD-67893.1	A-136008.1	CCUGGGAACAGCUCCAUCA	660	A-136009.1	UGAUGGAGCUGUCCCCAGG	857	407-425
AD-67894.1	A-136010.1	UCCAUCCCCACCCUCCAGA	661	A-136011.1	UCUGAGGGGUGGGGAUGGA	858	419-437 430-
AD-67895.1	A-136012.1	CCCUCAGCUAUAAAUAGGA	662	A-136013.1	UCCUAUUUAUAGCUGAGGG	859	448_G19A_as
AD-67896.1	A-136014.1	UAAAUAGGGCAUCGUGACA	663	A-136015.1	UGUCACGAUGCCCCUAUUUA	860	440-458 450-
AD-67897.1	A-136016.1	AUCGUGACCCGGCCGGGA	664	A-136017.1	UCCCCGGCCGGGUCACGAU	861	468_G19A_as
AD-67898.1	A-136018.1	CCGGGGGAAGAAAGCUGCCA	665	A-136019.1	UGGCAGCUUCUUCUCCCCGG	862	462- 480_G19A_as
AD-67899.1	A-136020.1	AGCUGCCGUGUGUUCUGGU	666	A-136021.1	ACCCAGAACAACGGCAGCU	863	473-491_as

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-67900.1	A-136022.1	UUCUGGGUACUACAGCAGA	667	A-136023.1	UCUGCUGUAGUACCCAGAA	864	484-502 as
AD-67901.1	A-136024.1	UACAGCAGAAAGGUUAUGCA	668	A-136025.1	UGCAUACCCUUCUCUGCUGUA	865	494- 512 G19A as
AD-67902.1	A-136026.1	UAUGCGGAAGCGAGCACCA	669	A-136027.1	UGGUGCUCGCUUCCGCAUA	866	507-525
AD-67903.1	A-136028.1	CGAGCACCCAGUCUGAGA	670	A-136029.1	UCUCAGACUGGGGUGCUCG	867	517-535 as
AD-67904.1	A-136032.1	CUCCUGCCGGUGUGAGCCU	671	A-136033.1	AGGCUACACCCGGCAGGAG	868	539-557 as
AD-67905.1	A-136034.1	UGUGAGCCUGAGGGCCACA	672	A-136035.1	UGUGGCCCCUCAGGCUCACA	869	549-567
AD-67906.1	A-136036.1	GGGCCACCAUCCUCUGCCU	673	A-136037.1	AGGCAGAGGAUGGUGGCC	870	560-578 as
AD-67907.1	A-136038.1	CUGCCUCCUGGCCUGGCU	674	A-136039.1	AGCCCAGGCCAGGAGGCAG	871	573-591 as
AD-67908.1	A-136042.1	CCUGGCUGCAGGUGACCGA	675	A-136043.1	UCGGUCACCCUGCAGCCAGG	872	594- 612 G19A as
AD-67909.1	A-136044.1	UGACCGGGUGUACAUAACA	676	A-136045.1	UUGUAUGUACACCCGGUCA	873	606-624
AD-67910.1	A-136046.1	UACAUACACCCCUUCCACA	677	A-136047.1	UGUGGAAAGGGUGUAUGUA	874	616-634
AD-67911.1	A-136048.1	UUCCACCUCGUAUCCACA	678	A-136049.1	UGUGGAUGACGAGGUGGAA	875	628-646 as
AD-67912.1	A-136050.1	UCAUCCACAAUGAGAGUAA	679	A-136051.1	UUACUCUCAUUGUGGAUGA	876	638-656
AD-67913.1	A-136056.1	AAAGGCCAAUGCCGGGAAA	680	A-136057.1	UUUCCCGGCAUUGGCCUUU	877	672- 690 G19A as
AD-67914.1	A-136058.1	CCGGGAAGCCCAAGACCA	681	A-136059.1	UGGUCUUUUGGGCUUCCCGG	878	683-701
AD-67915.1	A-136060.1	AAAGACCCCAACCUUCAUAA	682	A-136061.1	UUUAAGAGGUGGGGUCUUU	879	694-712
AD-67916.1	A-136062.1	CCUUAUACCUUCUCCAAU	683	A-136063.1	AUUGGAGCAGGUAUGAAGG	880	704-722 as
AD-67917.1	A-136064.1	CUCCAAUUCAGGCCAAGAA	684	A-136065.1	UUCUUGGCCUGAAUUGGAG	881	716-734
AD-67918.1	A-136066.1	AGGCCAAGACAUCCCCUGU	685	A-136067.1	ACAGGGGAUGUCUUGGCCU	882	725-743 as
AD-67919.1	A-136068.1	UCCCCUGUGGAUGAAAAGA	686	A-136069.1	UCUUUUAUCCACACAGGGA	883	736-

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-67920.1	A-136070.1	AAAAAGGCCCUACAGGACCA	687	A-136071.1	UGGUCCUGUAGGGCCUUUU	884	754_G19A_as
AD-67921.1	A-136072.1	UACAGGACCAAGCUGGUGCU	688	A-136073.1	AGCACACGUGGUCCUGUA	885	758-776 as
AD-67922.1	A-136078.1	UUGACACCGAAGACAAGUU	689	A-136079.1	AACUUUGUCUUCGGUGUCAA	886	791-809 as
AD-67923.1	A-136080.1	ACAAGUUGAGGGCCGCAAU	690	A-136081.1	AUUGCGGCCCUCAACUUGU	887	803-821 as
AD-67924.1	A-136082.1	GCCGCAUUGUCGGGAUGA	691	A-136083.1	UCAUCCCGACCAUUGCGGC	888	814-832
AD-67925.1	A-136084.1	CGGGAUGCUGGCCAACUUA	692	A-136085.1	UAAGUUGGCCAGCAUCCCG	889	825-843
AD-67926.1	A-136086.1	CAACUUCUUGGGCUUCCGU	693	A-136087.1	ACGGAAGCCCAAGAAUUG	890	837-855 as
AD-67927.1	A-136088.1	GGCUUCCGUUAUAUUGGCA	694	A-136089.1	UGCCAUAUAUACGGAAAGCC	891	847-865 as
AD-67928.1	A-136090.1	UAUGGCAUGCACAGUGAGA	695	A-136091.1	UCUCACUGUGCAUGCCAU	892	859-877
AD-67929.1	A-136092.1	ACAGUGAGCUAUGGGGCGU	696	A-136093.1	ACGCCCCAUAGCUCACUGU	893	869-887 as
AD-67930.1	A-136098.1	CGUCCUCUCCCCAACGGCU	697	A-136099.1	AGCCGUUGGGGAGAGGACG	894	903-921 as
AD-67931.1	A-136102.1	UUUGGCACCCUGGCCUCUA	698	A-136103.1	UAGAGGCCAGGGUGCCAAA	895	925-943
AD-67932.1	A-136104.1	CUGGCCUCUCUUAUCUGA	699	A-136105.1	UCAGAUAGAGAGAGGCCAG	896	934- 952_G19A_as
AD-67933.1	A-136106.1	UAUCUGGGAGCCUUGGACA	700	A-136107.1	UGUCCAAGGCUCCCAUAUA	897	946-964
AD-67934.1	A-136108.1	UUGGACCACACAGCUGACA	701	A-136109.1	UGUCAGCUGUGUGGUCCAA	898	958-976 as
AD-67935.1	A-136110.1	ACAGCUGACAGGCCUACAGA	702	A-136111.1	UCUGUAGCCUGUCAGCUGU	899	967- 985_G19A_as
AD-67936.1	A-136112.1	UACAGGCAAUCCUGGGUGU	703	A-136113.1	ACACCCAGGAUUGCCUGUA	900	980-998 as
AD-67937.1	A-136114.1	UCCUGGGUGUUCUUGGAA	704	A-136115.1	UCCAAAGGAACACCCAGGA	901	989-1007 as
AD-67938.1	A-136116.1	UUGGAAGGACAAGAACUGA	705	A-136117.1	UCAGUUCUUGUCCUCCCAA	902	1002-1020
AD-67939.1	A-136118.1	AGAAUCUGCACCUCCCGGCU	706	A-136119.1	AGCCGGGAGGUGCAGUUCU	903	1013-1031 as

【0 5 7 9】

10

20

30

40

【表 1 1 - 5】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-67940.1	A-136122.1	UGCGCACAAGGUCCUGUCU	707	A-136123.1	AGACAGGACCUUUGUCGCA	904	1035-1053 as
AD-67947.1	A-136126.1	CUGCAGGCUUACAGGGCA	708	A-136127.1	UGCCUUGUACAGCCUGCAG	905	1057-1075
AD-67948.1	A-136128.1	UACAGGGCCUGCUAGUGGA	709	A-136129.1	UCCACUAGCAGGCCCUUGUA	906	1067-1085
AD-67949.1	A-136130.1	UAGUGGCCCAGGGCAGGGA	710	A-136131.1	UCCUUGCCCCUGGGCCACUA	907	1079-1097
AD-67950.1	A-136132.1	AGGGCAGGGCUGAUAGCCA	711	A-136133.1	UGGCUAUCAGCCCCUGCCCU	908	1088-1106 as
AD-67951.1	A-136134.1	UAGCCAGGCCCAGCUGCUA	712	A-136135.1	UAGCAGCUGGGCCUGGCUA	909	1101- 1119 G19A as
AD-67952.1	A-136136.1	AGCUGCUGCUGUCCACGGU	713	A-136137.1	ACCGUGGACAGCAGCAGCU	910	1112-1130 as
AD-67954.1	A-136140.1	UGGGCGUGUUCACAGCCCA	714	A-136141.1	UGGGCUGUGAAACACGCCCA	911	1133-1151
AD-67955.1	A-136142.1	CACAGCCCCAGGCCUGCAA	715	A-136143.1	UUGCAGGCCUGGGGCUUGUG	912	1143-1161
AD-67956.1	A-136144.1	CUGCACCCUGAAAGCAGCCGU	716	A-136145.1	ACGGCUGCUUCAGGUGCAG	913	1156-1174 as
AD-67957.1	A-136146.1	AGCAGCCGUUUGUGCAGGA	717	A-136147.1	UCCUGCACAAACGGCUGCU	914	1166- 1184 G19A as
AD-67958.1	A-136148.1	UGCAGGGCCUGGCUCUCUA	718	A-136149.1	UAGAGAGCCAGGCCUUGCA	915	1178-1196 as
AD-67959.1	A-136150.1	UGGCUCUCUAUACCCUUGU	719	A-136151.1	ACAGGGGUAUAGAGAGCCA	916	1187-1205 as
AD-67960.1	A-136152.1	ACCCUUGUGGUCCUCCCAA	720	A-136153.1	UUGGGAGGACCACAGGGGU	917	1198-1216 1222-
AD-67962.1	A-136156.1	CUGGACUUCACAGAAACUGA	721	A-136157.1	UCAGUUCUGUGAAGUCCAG	918	1240 G19A as
AD-67963.1	A-136158.1	AGAACUGGAUGUUGCUGCU	722	A-136159.1	AGCAGCAACAUCCAGUUCU	919	1233-1251 as
AD-67964.1	A-136160.1	UUGCUGCUGAGAAGAUUGA	723	A-136161.1	UCAAUCUUCUCAGCAGCAA	920	1244-1262 as
AD-67965.1	A-136162.1	AGAAAGAUUGACAGGUUCAU	724	A-136163.1	AUGAACCUUGUCAAUUCUUCU	921	1253-1271 as
AD-67966.1	A-136164.1	AGGUUCAUGCAGGCCUGUGA	725	A-136165.1	UCACAGCCUGCAUGAACCU	922	1264-1282 as
AD-67967.1	A-136166.1	GCUGUGACAGGAUGGAAGA	726	A-136167.1	UCUUCCAUCCUGUCACAGC	923	1276-1294 as

10

20

30

40

【表 1 1 - 6】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-67968.1	A-136168.1	UGGAAGACUGGCUGCUCCA	727	A-136169.1	UGGAGCAGCCAGUCUCCA	924	1288-1306
AD-67970.1	A-136172.1	AUGGGAGCCAGUGUGACA	728	A-136173.1	UGUCCACACUGGCUCUCCA	925	1309-1327 _{as}
AD-67971.1	A-136174.1	UGUGGACAGCACCCUGGCU	729	A-136175.1	AGCCAGGUGCUGUCCACA	926	1320-1338 _{as}
AD-67972.1	A-136176.1	CCUGGCUUCAACACACCUAA	730	A-136177.1	UUAGGUGUUUGAAAGCCAGG	927	1332-1350
AD-67973.1	A-136178.1	CAACACCUACGUCCACUUA	731	A-136179.1	UAAUGGACGUAGGUGUUG	928	1341-1359
AD-67974.1	A-136180.1	CACUCCAAAGGAAGAUGA	732	A-136181.1	UCAUCUCCCUUGGAAGUG	929	1354-1372 _{as}
AD-67975.1	A-136182.1	GGGAAGAUGAAGGGCUUCU	733	A-136183.1	AGAAAGCCCUUCAUCUCCC	930	1363-1381 _{as}
AD-67976.1	A-136184.1	GUUCUCCUCCUGCUGGCCGA	734	A-136185.1	UCGGCCAGCAGGAGAGAGC	931	1376-1394 _{as}
AD-67978.1	A-136188.1	CCAGGAGUUCUGGGUGGAA	735	A-136189.1	UUCACCCAGAACUCCUGG	932	1398-1416
AD-67979.1	A-136190.1	UGGGUGGACAAACAGCACCU	736	A-136191.1	AGGUGCUGUUGUCCACCCA	933	1408-1426 _{as}
AD-67980.1	A-136192.1	ACAGCACCUACAGUUCUGU	737	A-136193.1	ACAGACACUGAGGUGCUGU	934	1418-1436 _{as}
AD-67981.1	A-136194.1	UGUCUGUUCUCCAUUCUUA	738	A-136195.1	UAGAGCAUGGGAACAGACA	935	1430-1448
AD-67982.1	A-136196.1	CAUGCUCUCUGGCAUGGGA	739	A-136197.1	UCCCAUGCCAGAGAGCAUG	936	1440-1458
AD-67983.1	A-136198.1	AUGGGCACCUUCCAGCACU	740	A-136199.1	AGUGCUGGAAGGUGCCCAU	937	1453-1471 _{as}
AD-67984.1	A-136200.1	UUCAGCACUGGAGUGACA	741	A-136201.1	UGUCACUCCAGUGUGGAA	938	1462-1480 _{as}
AD-67986.1	A-136204.1	AGGACACUUCUCGGUGAA	742	A-136205.1	UUCACCCGAGAAGUUGUCCU	939	1484-1502
AD-67987.1	A-136206.1	UCGGUGACUCAAAGUCCCU	743	A-136207.1	AGGGCACUUGAGUACCCGA	940	1495-1513 _{as}
AD-67988.1	A-136208.1	UGCCCUUCACUGAGAGCGA	744	A-136209.1	UCGCUCUCAGUGAAGGGCA	941	1508-1526
AD-67989.1	A-136210.1	UGAGAGCGCCUGCCUGCUA	745	A-136211.1	UAGCAGGCAGGCGCUCUCA	942	1518- 1536 G19A _{as}
AD-67990.1	A-136212.1	CCUGCUGCUGAUCACAGCCU	746	A-136213.1	AGGCUGGAUCAGCAGCAGG	943	1530-1548 _{as}
AD-67991.1	A-136214.1	AUCCAGCCUACAUUGCCU	747	A-136215.1	AGGCAUAGUGAGGCUGGAU	944	1540-1558 _{as}

10

20

30

40

【表 1 1 - 7】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-67992.1	A-136216.1	UAUGCCUCUGACCUGGACA	748	A-136217.1	UGUCCAGGUCAGAGGCAUA	945	1552-1570 as
AD-67993.1	A-136218.1	ACCUGGACAAGGUGGAGGA	749	A-136219.1	UCCUCCACCUUUGUCCAGGU	946	1562- 1580 G19A as
AD-67994.1	A-136220.1	UGGAGGUCUCACUUUCCA	750	A-136221.1	UGGAAAGUGAGACCCUCCA	947	1574-1592 as
AD-67995.1	A-136222.1	CACUUUCCAGCAAAACUCA	751	A-136223.1	UGAGUUUUGCUGGAAAAGUG	948	1584-1602
AD-67996.1	A-136224.1	AAACUCCCCUCACUGGAU	752	A-136225.1	AUCCAGUUUGAGGGAGUUUU	949	1595-1613 as
AD-67997.1	A-136226.1	AAUUGGAUGAAGAAACUAU	753	A-136227.1	AUAGUUUUCUUCAUCCAGUU	950	1606-1624 as
AD-67998.1	A-136228.1	AAACUAUCUCCCCCGGACCA	754	A-136229.1	UGGUCCCGGGGAGAUAGUUU	951	1618-1636 as
AD-67999.1	A-136230.1	CCGGACCAUCCACCUAGACA	755	A-136231.1	UGUCAGGUGGAUGGUCCGG	952	1629-1647
AD-68001.1	A-136234.1	UGCCCCAACUGGUGCUGCA	756	A-136235.1	UGCAGCACCAAGUUUGGGCA	953	1649-1667 as
AD-68002.1	A-136236.1	UGCUGCAAGGAUCUUUAUGA	757	A-136237.1	UCAUAAGAUCUUGCAGCA	954	1661-1679 as
AD-68003.1	A-136238.1	UCUUAUGACCUGCAGGACA	758	A-136239.1	UGUCCUGCAGGUCUAAGA	955	1672-1690
AD-68004.1	A-136240.1	UGCAGGACCUUCUCGCCCA	759	A-136241.1	UGGGCGAGCAGGUCCUGCA	956	1682-1700 as
AD-68005.1	A-136242.1	UCGCCCAGGCUAGCUGCA	760	A-136243.1	UGCAGCUCAGCCUGGGCGA	957	1694-1712
AD-68006.1	A-136244.1	UGAGCUGCCCGCCAUUCUA	761	A-136245.1	UAGAAUGGCGGGCAGCUCA	958	1704- 1722 G19A as
AD-68009.1	A-136250.1	UGCAAAA AUUGAGCAAUGA	762	A-136251.1	UCAUUGCUC AAUUUUUGCA	959	1739-1757 as
AD-68010.1	A-136252.1	AGCAAUGACCGCAUCAGGA	763	A-136253.1	UCCUGAUGCGGUCAUUUGCU	960	1750- 1768 G19A as
AD-68011.1	A-136254.1	CAUCAGGGUGGGGGAGGUA	764	A-136255.1	UACCUCCCCCACCCUGAUG	961	1761- 1779 G19A as
AD-68012.1	A-136256.1	GGGGAGGUGUCUGAACAGCA	765	A-136257.1	UGCUGUUCAGCACCCUCCCC	962	1771-1789 as
AD-68013.1	A-136258.1	AACAGCAUUUUUUUUUGAGA	766	A-136259.1	UCUCAAAAAAAA AUGCUGUU	963	1783-1801

10

20

30

40

【表 1 1 - 8】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-68014.1	A-136260.1	UUUUUGAGCUUGAAGCGGA	767	A-136261.1	UCCGCUUCAAGCUCAAAA	964	1793-1811 as
AD-68017.1	A-136266.1	AGAGUCUACCCACACAGCUU	768	A-136267.1	AAGCUGUUGGGUAGACUCU	965	1827-1845 as
AD-68018.1	A-136268.1	CAACAGCUUAACAAGCCUA	769	A-136269.1	UAGGCUUUGUUAAGCUGUUG	966	1837- 1855 G19A as
AD-68019.1	A-136270.1	CAAGCCUGAGGUCUUGGAA	770	A-136271.1	UUCCAAGACCCUCAGGCUUG	967	1848- 1866 G19A as
AD-68020.1	A-136272.1	CUUGGAGGUGACCCUGAAA	771	A-136273.1	UUUCAGGGUCACCUCCAAAG	968	1860-1878
AD-68021.1	A-136274.1	ACCCUGAACCGCCCAUUA	772	A-136275.1	UGAAUGGGCGGUUCAGGGU	969	1870-1888
AD-68022.1	A-136276.1	GCCCAUCCUGUUGCUGU	773	A-136277.1	ACAGCAAAACAGGAUUGGGC	970	1880-1898 as
AD-68025.1	A-136284.1	CACUUCUUGGGCCGCGUGA	774	A-136285.1	UCACGCGGCCCAGGAAGUG	971	1924- 1942 G19A as
AD-68026.1	A-136286.1	CGCGUGGCCAACCCGCUGA	775	A-136287.1	UCAGCGGGUUGGCCACGCG	972	1936-1954 as
AD-68027.1	A-136288.1	ACCCGCUAGACACAGCAUA	776	A-136289.1	UAUGCUGUGCUCAGCGGGU	973	1946- 1964 G19A as
AD-68028.1	A-136290.1	ACAGCAUGAGGCCAGGGCA	777	A-136291.1	UGCCUUGGCCUCAUGCUGU	974	1957-1975
AD-68029.1	A-136292.1	CAGGGCCCCAGAACACAGU	778	A-136293.1	ACUGUGUUCUGGGGCCCCUG	975	1969-1987 as
AD-68032.1	A-136298.1	UCUGCCCCUGGCCUUUGAA	779	A-136299.1	UUCAAAAGGCCAGGGCAGA	976	2001- 2019 G19A as
AD-68033.1	A-136300.1	UUUGAGGCCAAAGGCCAGCA	780	A-136301.1	UGCUGGCCUUUGCCUCAA	977	2014-2032 as
AD-68034.1	A-136302.1	AGGCCAGCAGCAGAUAAACA	781	A-136303.1	UGUUAUCUGCUGCUGGCCU	978	2024-2042 as
AD-68035.1	A-136304.1	AGAUAAACAACCCCGACAA	782	A-136305.1	UUUCCCGGGUUUGUUAUCU	979	2035-2053 as
AD-68036.1	A-136306.1	CCGGACAAAUCACGCGAUGU	783	A-136307.1	ACAUCGCUGAUUUGUCCGG	980	2046-2064 as
AD-68037.1	A-136308.1	AGCGAUGUGUCACCCCCAA	784	A-136309.1	UUGGGGGUGACACAUCGCU	981	2057- 2075 G19A as

10

20

30

40

【表 1 1 - 9】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-68084.2	A-136314.1	UUCUAAUGAGUCGACUUUA	785	A-136315.1	UAAAGUCGACUCAUAGAA	982	2090- 2108_G19A_as
AD-68085.2	A-136320.1	GUUUCUCCUUGGUCUAGU	786	A-136321.1	ACUUAGACCAAGGAGAAC	983	2124-2142_as
AD-68086.2	A-136328.1	AGCCUGCAGCGGCACAAAU	787	A-136329.1	AUUUGUGCCGCGCAGGCU	984	2167-2185_as
AD-68087.2	A-136330.1	CACAAUGCACCUCUCCAGU	788	A-136331.1	ACUGGGAGGUGCAUUUGUG	985	2179-2197_as
AD-68088.2	A-136332.1	ACCUCUCCAGUUUGCUGGGU	789	A-136333.1	ACCCAGCAAAACUGGGAGGU	986	2188-2206_as
AD-68089.2	A-136334.1	UGCUGGGUUUAUUUAGAA	790	A-136335.1	UUCUAAAAUAAACCCAGCA	987	2199- 2217_G19A_as
AD-68090.2	A-136340.1	CAAGAACCCAGUGUUUAGCA	791	A-136341.1	UGCUAAACACUGGUUCUUG	988	2234- 2252_G19A_as
AD-68091.2	A-136354.1	AGUGUCCCUUUCUAAAGU	792	A-136355.1	AACUUGAAAAGGGAACACU	989	2309-2327_as
AD-68092.2	A-136356.1	UUCAAAGUUGAGAACAAAAA	793	A-136357.1	UUUUUGUUUCUACUUGAA	990	2320-2338_as
AD-68093.2	A-136358.1	CAAAAUUUGGUUUUAAAAA	794	A-136359.1	UUUUAAAAACCCAAUUUUUG	991	2333-2351_as
AD-68094.2	A-136362.1	AAAGUAUACAUUUUUGCAU	795	A-136363.1	AUGCAAAAUGUAUACUUU	992	2354-2372_as
AD-68095.2	A-136368.1	UUUAGUGUCUUGAAUGUAA	796	A-136369.1	UUACAUUCAAGACACUAAA	993	2388-2406_as
AD-68096.2	A-136370.1	GAAUGUAAGAACAUAGACCU	797	A-136371.1	AGGUCAUGUUCUUAACAUUC	994	2399-2417_as
AD-68097.2	A-136374.1	UGUAGUGUCUGUAAUACCU	798	A-136375.1	AGGUAAUUAACAGACACUACA	995	2421-2439_as
AD-68098.2	A-136376.1	UGUAAUACCUUAGUUUUU	799	A-136377.1	AAAAACUAAGGUUUUACA	996	2430-2448_as
AD-68099.2	A-136378.1	UUUUUUCCACAGAUGCUGA	800	A-136379.1	UAAAGCAUCUGUGGAAAAAA	997	2443- 2461_G19A_as
AD-68100.2	A-136382.1	UUUUUUGAACAAUACGUGAA	801	A-136383.1	UUCACGUAAUUGUUCAAAAA	998	2465-2483_as
AD-68101.2	A-136392.1	ACCAUAGCUGGUUAUUUCU	802	A-136393.1	AGAAAUAAACCAGCUAUGGU	999	2519-2537_as
AD-68102.2	A-136394.1	UUUUUUUCUCCCUUGUGUUA	803	A-136395.1	UAAACACAAAGGGAGAAAAUA	1000	2530-2548_as

10

20

30

40

【表 1 1 - 1 0】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-68116.1	A-136312.1	UCCACCUUUCUUCUAAU	A-136313.1	AUUAGAAGAAAAGGUGGA	1001	2078-2096 as
AD-68117.1	A-136316.1	UCGACUUUGAGCUGGAAAG	A-136317.1	CUUCCAGCUCAAAAGUCGA	1002	2100-2118 as
AD-68118.1	A-136318.1	CUGGAAAAGCAGCCGUUUCU	A-136319.1	AGAAACGGCUGCUUUCAG	1003	2111-2129 as
AD-68119.1	A-136322.1	UGGUCUAAAGUGCUGCAU	A-136323.1	AUGCAGCACUUAGACCA	1004	2133-2151 as
AD-68120.1	A-136324.1	GCUGCAUGGAGUGAGCAGU	A-136325.1	ACUGCUCACUCCAUAGCAGC	1005	2145-2163 as
AD-68121.1	A-136326.1	UGAGCAGUAGAAAGCCUGCA	A-136327.1	UGCAGGCUUCUACUGCUCA	1006	2156-2174 as
AD-68122.1	A-136336.1	UUAGAGAAUGGGGUGGGA	A-136337.1	UCCACCCCCCAUUCUCUAA	1007	2212- 2230 G19A as
AD-68123.1	A-136338.1	GGUGGGGAGGCAAGAAACA	A-136339.1	UGUUCUUGCCUCCCCACCC	1008	2223-2241
AD-68124.1	A-136342.1	UGUUUAGCGCGGACUACU	A-136343.1	AGUAGUCCCCGCGCUAAACA	1009	2244-2262 as
AD-68125.1	A-136344.1	GGACUACUGUUCGAAAG	A-136345.1	CUUUUGGAACAGUAGUCC	1010	2255-2273 as
AD-68126.1	A-136350.1	AGCUGUUUUGUGAAACAAA	A-136351.1	UUUGUUUCACAAACAAGCU	1011	2288-2306 as
AD-68127.1	A-136352.1	AAACAAAAGUGUCCCU	A-136353.1	AGGGAACACUUUUUUGUUU	1012	2300-2318 as
AD-68128.1	A-136360.1	UUUUAAA AUUAAAGUAAUAA	A-136361.1	UUUAUACUUUAAUUUUA AAA	1013	2344-2362
AD-68129.1	A-136364.1	UUUUGCAUUGCCUUCGGUU	A-136365.1	AACCGAAGGCAAUAGCAAAA	1014	2365-2383 as
AD-68130.1	A-136366.1	UUCGGUUUUGUAUUUAGUGU	A-136367.1	ACACUAAAUACAACCCGAA	1015	2377-2395 as
AD-68131.1	A-136372.1	AACAUGACCUCCGUGUAGU	A-136373.1	ACUACACGGAGGUCUUGUU	1016	2408-2426 as
AD-68132.1	A-136380.1	CAGAUGCUUGUGAUUUUUA	A-136381.1	UAAAAAUACAAAGCAUCUG	1017	2452- 2470 G19A as
AD-68133.1	A-136384.1	UACGUGAAAGAUAGCAAGCA	A-136385.1	UGCUGCAUCUUUUCACGUA	1018	2476-2494 as
AD-68134.1	A-136386.1	UGCAAGCACCCUGAAUUUCU	A-136387.1	AGAAAUUCAGGUGCUUGCA	1019	2487-2505 as
AD-68135.1	A-136388.1	GAAUUUCUGUUUUGAAUGCA	A-136389.1	UGCAUUCAAAACAGAAAUUC	1020	2498- 2516 G19A as

10

20

30

40

【表 1 1 - 1 1】

二本鎖名称	センスオリ ゴ名称	配列	配列 番号	アンチセンス オリゴ名称	配列	配列 番号	NM_000029.3 上 の位置
AD-68136.1	A-136390.1	UUUGAAUGCGGAACCAUAA	824	A-136391.1	UUAUGGUUCCGCAUUCAAA	1021	2507- 2525 G19A as
AD-68137.1	A-136396.1	UUUGUUUAGUAAUAAACGU	825	A-136397.1	ACGUUUUAUUAACUAAACACAA	1022	2541-2559 as
AD-68138.1	A-136398.1	AUAAACGUCUUUGCCACAAU	826	A-136399.1	AUUGUGGCAAGACGUUUAU	1023	2552-2570 as
AD-68139.1	A-136400.1	UGCCACAUAAGCCUCCAA	827	A-136401.1	UUGGAGGCUUAUUGUGGCA	1024	2562-2580 as

【0 5 8 0】

10

20

30

40

【表 12 - 1】

表 12. Hep3B 細胞における AGT 単回投与スクリーニング (21/23 量体)

二本鎖名称	10nM Avg	10 nM SD	0.1 nM Avg	0.1nM SD
AD-67864.1	86.08	0.42	100.66	4.93
AD-67865.1	90.98	0.44	97.56	4.30
AD-67866.1	107.85	3.17	108.20	1.59
AD-67867.1	96.24	5.18	96.22	4.24
AD-67868.1	92.25	0.45	93.87	0.92
AD-67869.1	107.24	8.40	96.54	3.78
AD-67870.1	89.43	1.75	96.84	0.47
AD-67871.1	100.66	4.93	96.91	5.22
AD-67872.1	92.27	2.26	87.75	7.73
AD-67873.1	118.49	6.38	105.63	3.10
AD-67874.1	98.36	8.18	99.57	1.46
AD-67875.1	98.55	2.89	100.76	14.27
AD-67876.1	98.951	5.33	105.24	0.51
AD-67877.1	104.94	5.14	100.97	2.47
AD-67878.1	101.79	7.47	100.61	0.98
AD-67879.1	99.66	6.34	101.66	0.49
AD-67880.1	99.23	1.94	93.79	9.63
AD-67881.1	95.84	0.93	104.16	2.04
AD-67882.1	97.52	1.43	98.09	9.60
AD-67883.1	94.53	1.85	95.88	3.75
AD-67884.1	110.16	5.39	105.25	1.54
AD-67885.1	101.70	4.48	97.94	5.75
AD-67886.1	107.09	2.09	102.03	3.00
AD-67887.1	95.51	0.46	94.24	4.15
AD-67888.1	105.98	1.55	101.03	5.44
AD-67889.1	89.42	0.87	102.44	5.52
AD-67890.1	96.51	0.94	99.34	6.81
AD-67891.1	89.73	0.43	102.01	0.99
AD-67892.1	85.81	3.36	91.97	3.60
AD-67893.1	104.89	2.05	93.25	3.65
AD-67894.1	95.95	6.57	100.61	0.98
AD-67895.1	87.61	3.43	92.99	5.92
AD-67896.1	102.36	0.50	102.37	1.50
AD-67897.1	89.23	6.55	101.66	1.49
AD-67898.1	87.68	6.01	97.89	3.83
AD-67899.1	10.98	1.28	28.08	7.87
AD-67900.1	16.91	2.47	42.49	5.81
AD-67901.1	51.36	1.00	73.53	10.77
AD-67902.1	32.91	6.25	49.54	4.60
AD-67903.1	8.23	3.73	25.89	8.71

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

二本鎖名称	10nM Avg	10 nM SD	0.1 nM Avg	0.1nM SD
AD-67904.1	76.02	3.35	92.35	5.88
AD-67905.1	99.22	0.97	103.21	7.58
AD-67906.1	12.68	6.52	31.29	0.76
AD-67907.1	25.24	0.86	68.71	0.67
AD-67908.1	15.32	6.82	41.71	0.40
AD-67909.1	57.21	2.52	81.72	1.60
AD-67910.1	11.66	3.10	54.68	6.68
AD-67911.1	40.57	0.39	60.72	4.16
AD-67912.1	21.45	0.84	50.16	2.70
AD-67913.1	44.86	5.26	69.55	5.78
AD-67914.1	13.41	4.82	14.58	2.84
AD-67915.1	38.73	3.41	62.81	7.67
AD-67916.1	5.21	2.70	19.28	6.84
AD-67917.1	16.92	1.57	50.03	3.91
AD-67918.1	52.71	4.38	95.29	6.53
AD-67919.1	86.98	0.85	96.94	6.17
AD-67920.1	28.31	8.20	62.46	8.84
AD-67921.1	40.44	1.38	65.06	20.38
AD-67922.1	37.99	0.93	68.09	5.00
AD-67923.1	9.52	0.97	31.95	1.09
AD-67924.1	20.28	2.28	53.38	6.78
AD-67925.1	15.78	1.46	35.24	4.82
AD-67926.1	12.85	0.88	28.20	0.41
AD-67927.1	39.78	2.72	70.72	17.16
AD-67928.1	48.92	8.11	76.56	4.12
AD-67929.1	95.53	3.27	103.52	6.08
AD-67930.1	7.70	3.25	38.13	1.12
AD-67931.1	62.59	2.14	83.32	7.74
AD-67932.1	12.85	4.97	48.21	4.95
AD-67933.1	75.51	4.06	99.92	1.95
AD-67934.1	95.55	4.21	95.85	1.87
AD-67935.1	6.92	0.06	26.43	22.43
AD-67936.1	30.62	3.29	64.66	5.06
AD-67937.1	11.89	1.33	46.23	25.91
AD-67938.1	84.08	4.94	94.19	0.46
AD-67939.1	49.09	0.24	76.31	13.39
AD-67940.1	77.85	0.76	90.12	5.29
AD-67947.1	81.74	5.60	89.68	3.07
AD-67948.1	57.40	3.93	75.94	12.96
AD-67949.1	89.04	1.30	98.84	4.35
AD-67950.1	30.38	6.93	50.01	4.40

10

20

30

40

【表 1 2 - 3】

二本鎖名称	10nM Avg	10 nM SD	0.1 nM Avg	0.1nM SD
AD-67951.1	57.60	12.32	84.26	2.89
AD-67952.1	30.08	9.84	71.83	1.76
AD-67954.1	63.41	2.17	83.16	5.29
AD-67955.1	66.78	1.30	88.74	2.60
AD-67956.1	48.82	4.54	84.38	7.02
AD-67957.1	66.79	1.96	96.46	3.78
AD-67958.1	11.88	6.31	28.49	7.58
AD-67959.1	50.08	5.87	78.05	1.14
AD-67960.1	53.33	9.104	72.41	9.90
AD-67962.1	17.29	5.41	54.30	13.17
AD-67963.1	19.63	2.11	49.27	15.43
AD-67964.1	14.83	0.14	46.79	6.40
AD-67965.1	15.94	9.26	36.16	16.09
AD-67966.1	41.84	9.95	80.28	3.54
AD-67967.1	20.10	2.94	45.85	6.71
AD-67968.1	24.10	0.47	45.77	0.22
AD-67970.1	41.61	6.09	59.36	1.16
AD-67971.1	92.20	3.16	97.48	4.29
AD-67972.1	24.48	3.46	60.84	2.68
AD-67973.1	67.49	2.31	93.19	4.56
AD-67974.1	22.421	0.76	62.87	17.33
AD-67975.1	20.05	2.157	52.74	5.93
AD-67976.1	19.21	5.30	54.84	6.96
AD-67978.1	17.36	1.10	60.49	14.96
AD-67979.1	104.18	7.14	104.08	3.06
AD-67980.1	17.85	4.84	43.65	9.34
AD-67981.1	28.91	4.09	63.61	0.62
AD-67982.1	91.54	0.44	103.34	
AD-67983.1	76.45	1.87	97.09	0.95
AD-67984.1	23.20	0.34	75.39	8.84
AD-67986.1	10.16	2.32	43.00	0.21
AD-67987.1	82.21	0.80	90.90	10.66
AD-67988.1	22.56	7.80	59.12	9.52
AD-67989.1	34.16	10.22	67.14	9.83
AD-67990.1	24.33	3.68	36.35	3.20
AD-67991.1	81.13	3.97	100.55	3.94
AD-67992.1	56.20	3.30	97.78	1.91
AD-67993.1	29.38	5.01	78.86	13.08
AD-67994.1	20.30	4.44	30.93	
AD-67995.1	13.97	2.72	37.27	5.82
AD-67996.1	14.48	0.49	30.62	6.25

10

20

30

40

【表 1 2 - 4】

二本鎖名称	10nM Avg	10 nM SD	0.1 nM Avg	0.1nM SD
AD-67997.1	35.60	7.78	70.86	12.09
AD-67998.1	29.38	5.01	62.37	15.13
AD-67999.1	58.52	6.58	86.27	9.70
AD-68001.1	39.90	11.75	68.76	5.38
AD-68002.1	70.36	2.41	87.50	1.61
AD-68003.1	31.65	2.78	86.01	2.10
AD-68004.1	23.47	1.60	42.71	1.04
AD-68005.1	30.41	6.21	68.42	1.00
AD-68006.1	20.44	8.64	41.45	5.87
AD-68009.1	26.59	6.45	50.87	12.58
AD-68010.1	18.01	2.98	41.65	11.68
AD-68011.1	48.64	4.28	75.01	10.99
AD-68012.1	21.28	0.41	66.82	13.98
AD-68013.1	101.46	9.93	109.28	4.28
AD-68014.1	43.62	7.44	71.82	0.35
AD-68017.1	16.05	11.61	38.14	14.23
AD-68018.1	14.74	0.57	62.02	9.38
AD-68019.1	20.85	3.66	84.24	1.23
AD-68020.1	31.12	4.86	70.58	16.45
AD-68021.1	18.98	3.8	56.30	10.96
AD-68022.1	16.41	9.93	27.87	15.96
AD-68025.1	86.91	1.70	99.51	3.41
AD-68026.1	26.43	9.50	73.34	1.79
AD-68027.1	39.43	0.38	72.57	1.42
AD-68028.1	56.98	3.34	80.52	
AD-68029.1	49.97	3.42	85.43	2.93
AD-68032.1	71.12	3.48	91.96	6.30
AD-68033.1	102.29	2.50	99.13	0.97
AD-68034.1	15.54	3.32	32.03	3.91
AD-68035.1	19.40	6.88	49.77	6.32
AD-68036.1	16.23	8.62	29.22	4.28
AD-68037.1	20.40	5.24	49.31	9.13
AD-68084.2	15.14	3.24	42.67	5.63
AD-68085.2	17.11	5.52	30.76	11.20
AD-68086.2	8.96	0	21.05	2.98
AD-68087.2	22.54	14.44	26.79	37.89
AD-68088.2	34.54	2.19	76.58	1.87
AD-68089.2	27.02	5.91	59.45	13.85
AD-68090.2	19.90	0.97	35.94	7.00
AD-68091.2	15.18	0.74	32.19	3.77
AD-68092.2	13.21	0.25	40.48	1.38

10

20

30

40

【表 1 2 - 5】

二本鎖名称	10nM Avg	10 nM SD	0.1 nM Avg	0.1nM SD
AD-68093.2	13.94	3.11	52.91	25.17
AD-68094.2	48.22	7.06	89.18	25.43
AD-68095.2	83.02	5.69	81.51	1.19
AD-68096.2	74.34	5.82	75.78	1.21
AD-68097.2	88.32	4.32	86.30	7.18
AD-68098.2	69.49	0.34	69.49	1.02
AD-68099.2	95.96	3.76	51.05	72.19
AD-68100.2	81.51	1.19	92.05	3.60
AD-68101.2	76.34	2.99	74.83	5.13
AD-68102.2	71.02	4.52	76.99	6.78
AD-68116.1	9.94	0.38	31.41	3.53
AD-68117.1	18.24	0.62	51.01	7.96
AD-68118.1	16.61	0.32	31.54	7.50
AD-68119.1	48.03	3.76	77.61	12.49
AD-68120.1	20.17	11.80	72.58	10.63
AD-68121.1	16.25	4.55	57.64	25.65
AD-68122.1	57.36	5.33	97.32	4.76
AD-68123.1	15.84	1.24	45.55	2.00
AD-68124.1	24.62	8.40	51.57	19.72
AD-68125.1	18.71	9.38	35.98	6.14
AD-68126.1	13.13	6.42	47.97	1.41
AD-68127.1	41.04	12.66	85.58	2.93
AD-68128.1	62.20	16.27	107.38	9.46
AD-68129.1	79.00		81.25	3.18
AD-68130.1	72.97	2.50	88.00	3.88
AD-68131.1	134.88	9.24	92.09	5.41
AD-68132.1	81.05	5.95	89.85	3.96
AD-68133.1	85.28	2.50	104.25	2.04
AD-68134.1	62.63	0.92	83.94	6.98
AD-68135.1	72.95	0.35	79.05	3.87
AD-68136.1	74.86	10.60	88.88	
AD-68137.1	85.08	6.24	90.50	4.87
AD-68138.1	76.05	1.11	76.34	2.99
AD-68139.1	102.25	8.01	99.42	6.81

【0 5 8 1】

実施例 4：h A G T を発現するマウスにおけるインビボでの A G T サイレンシング

一連の試験を、強力な肝向性(liver tropism)を有する A A V 8 発現ベクターからヒト A G T (h A G T) を発現するマウスにおける、h A G T を標的とするノックダウンを評価するために行った。まとめると、マウスに、構成的プロモーターの制御下に h A G T のための発現構築物を含む、 1×10^{11} の A A V 8 粒子を感染させた。感染の 2 週間後、マウスに、 3.0 mg/kg 、 1.0 mg/kg 、 0.3 mg/kg 、または 0.1 mg/kg の h A G T を標的とする s i R N A (A D - 6 7 3 2 7. 2 または A D - 6 7 3 3 5. 2)、または対照として P B S (1 群当たり、 $n = 4$) を単回投与した。これらの試験で評価される薬剤のヌクレオチド配列を表 1 3 に示す。

【0582】

【表13】

表 13. AGT dsRNA の修飾センスおよびアンチセンス鎖配列 (21/23 量体)

二本鎖名称	NM_000029.3 上の位置	センス鎖/アン チセンス鎖	センス配列/アンチセンス配列	配列 番号	親二本鎖
AD-67327	2081-2101	A-134527	uscsucccAfcCfUfUfuuccuuaauL96	1025	AD-60784
	2079-2101	A-134528	asUfsuagAfagaaaagGfuGfggagascsu	1026	
AD-67335	1894-1914	A-134536	usgsuuugCfuGfUfGfuaugaucaaaL96	1027	AD-60781
	1892-1914	A-134538	usUfsugaUfcAfUfacacAfgCfaaacasgsg	1028	

【0583】

10

薬剤投与後、0日目、3日目、7日目および14日目に、採血し、hAGTの前採血レベルに対するhAGT mRNA発現のレベルを決定するために、血清を調製した。これらの試験結果を表14に示す。

【0584】

【表14】

表 14. hAGTを発現するマウスにおける、hAGT単回投与用量応答スクリーニング

二本鎖	用量 mpk	0日目		3日目		7日目		14日目	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
	PBS	1.00	0.00	1.29	0.28	0.91	0.17	0.65	0.05
AD-67327	3	1.00	0.00	0.42	0.09	0.16	0.04	0.11	0.04
	1	1.00	0.00	0.63	0.05	0.44	0.04	0.31	0.06
	0.3	1.00	0.00	1.04	0.13	0.90	0.12	0.77	0.06
	0.1	1.00	0.00	0.91	0.06	0.88	0.07	0.74	0.15
AD-67335	3	1.00	0.00	0.58	0.14	0.42	0.13	0.37	0.10
	1	1.00	0.00	0.59	0.41	0.64	0.03	0.56	0.12
	0.3	1.00	0.00	1.06	0.28	0.81	0.14	0.80	0.07
	0.1	1.00	0.00	1.18	0.18	1.02	0.10	0.85	0.08

20

30

【0585】

実施例5：hAGTを発現するマウスにおけるインビボでのAGTサイレンシング

一連の試験を、強力な肝向性(liver tropism)を有するAAV8発現ベクターからヒトAGT(hAGT)を発現するマウスにおける、hAGTを標的とするノックダウンを評価するために行った。まとめると、マウスに、構成的プロモーターの制御下にhAGTのための発現構築物を含む、 1×10^{11} のAAV8粒子を感染させた。AAV8ウイルスでの感染の2週間後、マウスに、 1 mg/kg のhAGTを標的とするsiRNA、または対照としてPBS(1群当たり、 $n=3$)を単回投与した。これらの試験で評価される二本鎖のヌクレオチド配列を表15に示す。

40

【0586】

【表 15】

表 15. AGT dsRNA の修飾センスおよびアンチセンス鎖配列 (21/23 量体)

二本鎖名称	NM_000029.3 上の位置	センス鎖/アン チセンス鎖	センス配列/アンチセンス配列	配列 番号	親二本鎖
AD-68577	855-875	A-137778	ususcguAfuAfUfAfuggcaugcaaL96	1029	AD-60779
	853-875	A-137779	usUfsgcaUfgCfCfauauAfuAfcggaasgsc	1030	
AD-68581	1741-1761	A-137784	ascscugcAfaAfAfAfugagcaauaL96	1031	AD-56029
	1739-1761	A-137785	usAfsuugCfuCfAfauuuUfuGfcaggususc	1032	
AD-68582	1741-1761	A-137784	ascscugcAfaAfAfAfugagcaauaL96	1033	AD-56029
	1739-1761	A-137786	usAfsuugCfucauuuuUfuGfcaggususc	1034	
AD-67335	1894-1914	A-134536	usgsuugCfuGfUfGfuugaucaaaL96	1035	AD-60781
	1892-1914	A-134538	usUfsgauUfcAfUfacacAfgCfaacassgsg	1036	
AD-67327	2081-2101	A-134527	uscsuccAfcCfUfUfuucuuucaaL96	1037	AD-52474
	2079-2101	A-134528	asUfsuagAfagaaaagGfuGfggagascsu	1038	
AD-68575	2084-2104	A-137775	cscscaccUfuUfUfCfuucuaauggaaL96	1039	AD-60777
	2082-2104	A-137776	usUfscauUfaGfAfagaaAfaGfgugggsasg	1040	
AD-68576	2084-2104	A-137775	cscscaccUfuUfUfCfuucuaauggaaL96	1041	AD-60777
	2082-2104	A-137777	usUfscauUfagaagaaAfaGfgugggsasg	1042	
AD-68583	2291-2311	A-137787	cscsagcuUfgUfUfUfgugaacaaaL96	1043	AD-56019
	2289-2311	A-137788	usUfsuguUfuCfAfcaaaCfaAfgcuggsusc	1044	
AD-68584	2291-2311	A-137787	cscsagcuUfgUfUfUfgugaacaaaL96	1045	AD-56019
	2289-2311	A-137789	usUfsuguUfucacaaaCfaAfgcuggsusc	1046	
AD-67313	2309-2329	A-134509	asasaaaaGfuGfUfUfccccuuucaaL96	1047	AD-60776
	2307-2329	A-134510	usUfsgaaAfaggggaacAfcUfuuuuusgsu	1048	
AD-67314	2309-2329	A-134509	asasaaaaGfuGfUfUfccccuuucaaL96	1049	AD-60776
	2307-2329	A-134511	usUfsgaaAfaGfGfgaacAfcUfuuuuusgsu	1050	

10

20

【0587】

薬剤投与の7日後、採血し、hAGTの前採血レベルに対するhAGT mRNA発現のレベルを決定するために、血清を調製した。これらの試験結果を表16に示す。

【0588】

【表 16】

表 16. hAGT を発現するマウスにおける hAGT 単回投与用量応答スクリーニング

二本鎖	平均	SD
PBS	98.6	8.7
AD-68577	65.1	7.7
AD-68581	53.1	3.3
AD-68582	44.8	11.1
AD-67335	60.5	3.1
AD-67327	43.0	1.0
AD-68575	48.0	9.4
AD-68576	47.4	5.9
AD-68583	51.3	7.7
AD-68584	61.0	2.1
AD-67313	70.8	7.6
AD-67314	66.2	5.7

30

40

【0589】

均等物

当業者は、本明細書に記載の特定の態様および方法に対する多くの均等物を認識するか、または常套的な実験のみを用いて確認することが可能である。そのような均等物は、本明細書に添付する特許請求の範囲の範囲内に包含されることが意図される。

例示的な態様

50

本願発明の例示的な態様を以下に示す。

(1) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン (A G T) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (R N A i) 薬であって、ここで、該二本鎖 R N A i 薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続ヌクレオチドを含み、

該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドであり、そして

該センス鎖は、3' 末端で結合しているリガンドと複合体を形成している、二本鎖 R N A i 薬。

10

(2) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン (A G T) 発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (R N A i) 薬であって、ここで、該二本鎖 R N A i 薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

該センス鎖は、配列番号 1 のヌクレオチド配列のヌクレオチド 2 8 0 1 - 2 1 0 1 ; 8 0 3 - 8 4 3 ; 8 3 4 - 8 5 9 ; 8 0 3 - 8 5 9 ; 8 0 3 - 8 7 5 ; 8 3 4 - 8 7 5 ; 8 4 7 - 8 7 5 ; 1 2 4 7 - 1 2 7 1 ; 1 5 6 6 - 1 6 2 4 ; 1 5 7 0 - 1 6 2 4 ; 1 5 8 4 - 1 6 2 4 ; 1 5 8 4 - 1 6 2 4 ; 1 5 8 4 - 1 6 2 1 ; 2 0 3 5 - 2 1 4 4 ; 2 0 7 0 - 2 1 4 4 ; 2 0 7 0 - 2 1 0 3 ; 2 2 0 1 - 2 2 2 3 ; 2 2 2 7 - 2 3 6 0 ; 2 2 2 7 - 2 3 0 4 ; 2 2 9 0 - 2 3 1 8 ; 2 3 0 4 - 2 3 5 0 ; 2 3 0 4 - 2 3 2 6 ; 2 3 2 0 - 2 3 4 2 ; 2 3 3 3 - 2 3 6 0 ; 2 3 3 3 - 2 3 5 8 ; 4 8 5 - 5 0 3 ; 5 1 7 - 5 3 5 ; 5 6 0 - 5 7 8 ; 6 3 5 - 6 5 3 ; 8 0 3 - 8 2 1 ; 8 1 4 - 8 3 2 ; 8 2 2 - 8 4 0 ; 8 2 5 - 8 4 3 ; 8 3 4 - 8 5 2 ; 8 3 7 - 8 5 5 ; 8 4 1 - 8 5 9 ; 8 5 5 - 8 7 3 ; 9 6 7 - 9 8 5 ; 1 2 4 7 - 1 2 6 5 ; 1 2 4 8 - 1 2 6 6 ; 1 2 4 9 - 1 2 6 7 ; 1 2 5 1 - 1 2 6 9 ; 1 2 5 3 - 1 2 7 1 ; 1 5 6 6 - 1 5 8 4 ; 1 5 7 0 - 1 5 8 8 ; 1 5 7 2 - 1 5 9 0 ; 1 5 7 4 - 1 5 9 2 ; 1 5 8 4 - 1 6 0 2 ; 1 5 8 7 - 1 6 0 5 ; 1 5 9 1 - 1 6 0 9 ; 1 5 9 2 - 1 6 1 0 ; 1 5 9 5 - 1 6 1 3 ; 1 6 0 1 - 1 6 1 9 ; 1 6 0 2 - 1 6 2 0 ; 1 6 0 5 - 1 6 2 3 ; 1 7 2 9 - 1 7 4 7 ; 1 7 3 8 - 1 7 5 6 ; 1 7 3 9 - 1 7 5 7 ; 1 7 4 1 - 1 7 6 9 ; 1 7 6 7 - 1 7 8 5 ; 1 8 1 0 - 1 8 2 8 ; 1 8 2 7 - 1 8 4 5 ; 1 8 8 0 - 1 9 8 9 ; 1 8 9 2 - 1 9 1 4 ; 1 8 9 4 - 1 9 1 4 ; 1 8 9 4 - 2 0 1 2 ; 2 0 3 5 - 2 0 5 3 ; 2 0 4 6 - 2 0 6 4 ; 2 0 5 7 - 2 0 7 5 ; 2 0 7 0 - 2 0 8 8 ; 2 0 7 2 - 2 0 9 0 ; 2 0 7 8 - 2 0 9 6 ; 2 0 7 8 - 2 1 0 7 ; 2 0 7 8 - 2 0 1 1 ; 2 0 8 0 - 2 0 9 8 ; 2 0 8 1 - 2 0 9 9 ; 2 0 8 1 - 2 1 0 4 ; 2 0 8 1 - 2 0 1 1 ; 2 0 8 2 - 2 1 0 0 ; 2 0 8 4 - 2 1 0 2 ; 2 0 8 4 - 2 0 1 1 ; 2 0 9 0 - 2 1 0 8 ; 2 1 0 0 - 2 1 1 8 ; 2 1 1 1 - 2 1 2 9 ; 2 1 2 4 - 2 1 4 2 ; 2 1 2 5 - 2 1 4 3 ; 2 1 6 7 - 2 1 8 5 ; 2 1 7 9 - 2 1 9 7 ; 2 2 0 1 - 2 2 1 9 ; 2 2 0 2 - 2 2 2 0 ; 2 2 0 3 - 2 2 2 1 ; 2 2 0 4 - 2 2 2 2 ; 2 2 2 7 - 2 2 4 5 ; 2 2 3 0 - 2 2 4 8 ; 2 2 3 4 - 2 2 5 2 ; 2 2 4 4 - 2 2 6 4 ; 2 2 5 5 - 2 2 7 3 ; 2 2 6 6 - 2 2 8 4 ; 2 2 6 8 - 2 2 8 6 ; 2 2 7 0 - 2 2 8 8 ; 2 2 7 9 - 2 2 9 7 ; 2 2 8 1 - 2 2 9 9 ; 2 2 8 3 - 2 3 0 1 ; 2 2 8 4 - 2 3 0 2 ; 2 2 8 5 - 2 3 0 3 ; 2 2 8 6 - 2 3 0 4 ; 2 2 8 8 - 2 3 0 6 ; 2 2 9 0 - 2 3 0 8 ; 2 2 9 1 - 2 3 0 9 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 1 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 8 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 5 ; 2 2 9 2 - 2 3 1 0 ; 2 2 9 4 - 2 3 1 2 ; 2 2 9 6 - 2 3 1 4 ; 2 2 9 9 - 2 3 1 7 ; 2 3 0 4 - 2 3 2 2 ; 2 3 0 4 - 2 3 2 9 ; 2 3 0 6 - 2 3 2 4 ; 2 3 0 7 - 2 3 2 5 ; 2 3 0 9 - 2 3 2 7 ; 2 3 0 9 - 2 3 2 9 ; 2 3 0 9 - 2 3 4 2 ; 2 3 0 9 - 2 3 5 0 ; 2 3 0 9 - 2 3 5 8 ; 2 3 1 4 - 2 3 3 2 ; 2 3 1 6 - 2 3 3 4 ; 2 3 1 7 - 2 3 3 5 ; 2 3 2 0 - 2 3 3 8 ; 2 3 2 1 - 2 3 3 9 ; 2 3 2 3 - 2 3 4 1 ; 2 3 2 5 - 2 3 4 3 ; 2 3 2 6 - 2 3 4 4 ; 2 3 2 8 - 2 3 4 6 ; 2 3 2 9 - 2 3 4 7 ; 2 3 3 1 - 2 3 4 9 ; 2 3 3 3 - 2 3 5 1 ; 2 3 3 4 - 2 3 5 2 ; 2 3 3 5 - 2 3 5 3 ; 2 3 3 9 - 2 3 5 7 ; 2 3 4 0 - 2 3 5 8 ; または、2 3 4 1 - 2 3 5 9 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連

20

30

40

50

続ヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続ヌクレオチドを含み、そして

該アンチセンス鎖は、センス鎖に実質的に相補的である、二本鎖 RNA i 薬。

(3) 該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであるか、該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであるか、または該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、(2) に記載の二本鎖 RNA i 薬。

(4) 該センス鎖が、3' 末端で結合しているリガンドと複合体を形成している、(2) に記載の二本鎖 RNA i 薬。

(5) 該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドである、(1) から (4) のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

(6) 該センス鎖および該アンチセンス鎖が、表 3、4、7、8、11、13 および 15 のうち何れか 1 つに列記される配列の何れか 1 つと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 個の連続ヌクレオチドを含む相補的な領域を含む、(1) から (4) のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

(7) 該修飾ヌクレオチドの少なくとも 1 つが、3' 末端デオキシチミン (dT) ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ-修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、非ロックドヌクレオチド、立体配座的に制限されたヌクレオチド、拘束エチルヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2'-アミノ-修飾ヌクレオチド、2'-アルキル-修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホラミデート、ヌクレオチドを含む非天然塩基、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、およびコレステリルエステル誘導体またはドデカン酸ビスデシルアミド基に連結された末端ヌクレオチドからなる群より選択される、(1) および (3) から (6) のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

(8) 少なくとも 1 つの鎖が、少なくとも 1 つのヌクレオチドの 3' オーバーハングを含む、(1) から (7) のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

(9) 少なくとも 1 つの鎖が、少なくとも 2 つのヌクレオチドの 3' オーバーハングを含む、(1) から (7) のいずれかに記載の二本鎖 RNA i 薬。

(10) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害することのできる二本鎖リボ核酸 (RNA i) 薬であって、ここで、該二本鎖 RNA i 薬は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGT をコードする mRNA の一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、該二本鎖 RNA i 薬は、式 (III) :

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

アンチセンス : 3' $n_{p'} - N_{a'} - (X'X'X')_k - N_{b'} - Y'Y'Y' - N_{b'} - (Z'Z'Z')_l - N_{a'} - n_{q'}$ 5' (III)

[式中、i、j、k および l は、それぞれ独立して、0 または 1 であり、

p、p'、q および q' は、それぞれ独立して、0-6 であり、

各 N_a および $N_{a'}$ は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである 0-25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および $N_{b'}$ は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである 0-10 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

各 n_p 、 $n_{p'}$ 、 n_q および $n_{q'}$ (それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい) は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y' および Z'Z'Z' は、それぞれ独立して、3 個の連続ヌクレオチドにおける 3 個の同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、

10

20

30

40

50

N_b における修飾は、 Y における修飾とは異なり、 N_b' における修飾は、 Y' における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成している。]

で表される、二本鎖RNA i 葉。

(11) i が0であり、 j が0であるか、 i が1であり、 j が1であるか、 i および j の両方が0であるか、または i および j の両方が1である、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(12) k が0であり、 l が0であるか、 k が1であり、 l が1であるか、 k および l の両方が0であるか、または k および l の両方が1である、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(13) XXXがX'X'X'に相補的であり、YYYがY'Y'Y'に相補的であり、そしてZZZがZ'Z'Z'に相補的である、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(14) YYYモチーフが、センス鎖の切断部位に、またはその近位に生じる、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(15) Y'Y'Y'モチーフが、アンチセンス鎖の5'末端から11位、12位および13位に生じる、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(16)

Y' が2'-O-メチルである、(15)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(17)

式(III)が、式(IIIa)：

センス：5' $n_p - N_a - YYY - N_a - n_q$ 3'
アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q'$ 5' (IIIa) で表される、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(18) 式(III)が、式(IIIb)：

センス：5' $n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q$ 3'
アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q'$ 5' (IIIb)

[式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1-5個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。]

で表される、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(19) 式(III)が、式(IIIc)：

センス：5' $n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q$ 3'
アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q'$ 5' (IIIc)

[式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1-5個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。]

で表される、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(20) 式(III)が、式(IIId)：

センス：5' $n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q$ 3'
アンチセンス：3' $n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q'$ 5' (IIId)

[式中、各 N_b および N_b' は、独立して、1-5個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各 N_a および N_a' は、独立して、2-10個の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。]

で表される、(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(21) 二本鎖領域が15-30ヌクレオチド対の長さである、(1)から(4)のいずれかまたは(10)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(22) 二本鎖領域が、17-23ヌクレオチド対の長さである、(21)に記載の二本鎖RNA i 葉。

10

20

30

40

50

(23) 二本鎖領域が、17-25ヌクレオチド対の長さである、(21)に記載の二本鎖RNA i薬。

(24) 二本鎖領域が、23-27ヌクレオチド対の長さである、(21)に記載の二本鎖RNA i薬。

(25) 二本鎖領域が、19-21ヌクレオチド対の長さである、(21)に記載の二本鎖RNA i薬。

(26) 二本鎖領域が、21-23ヌクレオチド対の長さである、(21)に記載の二本鎖RNA i薬。

(27) 各鎖が15-30個のヌクレオチドを有する、(1)から(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i薬。

(28) 各鎖が19-30個のヌクレオチドを有する、(1)から(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i薬。

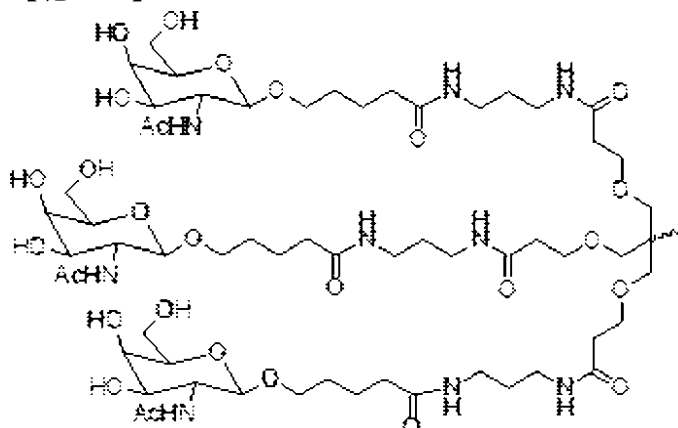
(29) ヌクレオチドにおける修飾が、LNA、CRN、cET、UNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-アルキル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、およびそれらの組合せからなる群より選択される、(10)に記載の二本鎖RNA i薬。

(30) ヌクレオチドにおける修飾が、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾である、(29)に記載の二本鎖RNA i薬。

(31) リガンドが、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体である、(1)、(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i薬。

(32) リガンドが、

【化21】



である、(1)、(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i薬。

(33) リガンドがセンス鎖の3'末端に結合している、(1)、(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i薬。

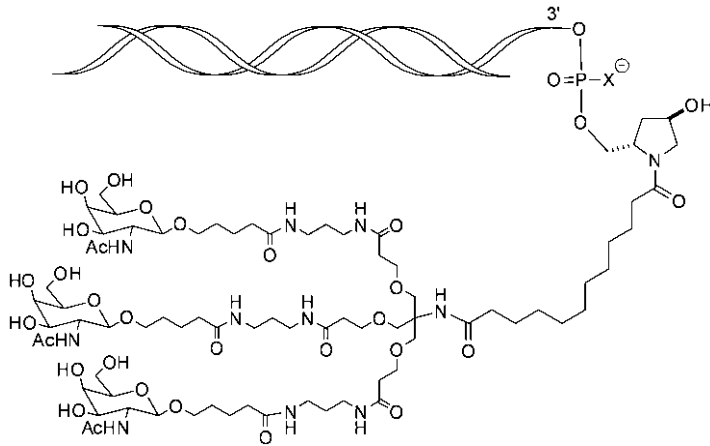
(34) RNA i薬が、以下：

10

20

30

【化 2 2】



10

[式中、Xは、OまたはSである。]

で示されるリガンドと複合体を形成している、(33)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(35) RNA i 薬が、少なくとも1つのホスホロチオエートまたはメチルヌクレオチド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む、(1)から(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i 薬。

(36) 該ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が、1つの鎖の3'末端にある、(35)に記載の二本鎖RNA i 薬。

20

(37) 該鎖がアンチセンス鎖である、(36)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(38) 該鎖がセンス鎖である、(36)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(39) 該ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が、1つの鎖の5'末端にある、(35)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(40) 該鎖がアンチセンス鎖である、(39)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(41) 該鎖がセンス鎖である、(39)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(42) 該ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオチド間結合が、1つの鎖の5'末端および3'末端の両方にある、(35)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(43) 該鎖がアンチセンス鎖である、(42)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(44) 該RNA i 薬が、6-8個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、(35)に記載の二本鎖RNA i 薬。

30

(45) 該アンチセンス鎖が、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして該センス鎖が、5'末端または3'末端のいずれかに少なくとも2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、(44)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(46) アンチセンス鎖の5'末端の1つの位置の塩基対がAU塩基対である、(1)から(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i 薬。

(47) Yヌクレオチドが、2'-フルオロ修飾を含む、(10)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(48) Y'ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾を含む、(10)に記載の二本鎖RNA i 薬。

40

(49) $p' > 0$ である、(10)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(50) $p' = 2$ である、(10)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(51) $q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ 、そして p' オーバーハングヌクレオチドが、標的mRNAに相補的である、(50)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(52) $q' = 0$ 、 $p = 0$ 、 $q = 0$ 、そして p' オーバーハングヌクレオチドが、標的mRNAに相補的でない、(50)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(53) センス鎖が合計21個のヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖が、合計23個のヌクレオチドを有する、(50)に記載の二本鎖RNA i 薬。

(54) 少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチ

50

ドに連結されている、(49)から(53)のいずれかに記載の二本鎖RNA i 葉。

(55) 全ての n_p ' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに連結されている、(54)に記載の二本鎖RNA i 葉。

(56) 該RNA i 葉が、表3、4、7、8、11、13および15のいずれか1つに列記されたRNA i 葉の群より選択される、(1)から(4)および(10)のいずれかに記載の二本鎖RNA i 葉。

(57) アンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (RNA i) 葉であって、

該二本鎖RNA i 葉は、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、ここで、該センス鎖は、配列番号1のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖は、配列番号2のヌクレオチド配列と3個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15個の連続ヌクレオチドを含み、

該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

該センス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

該アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして

該センス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して3'末端に結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成している、二本鎖RNA i 葉。

(58) センス鎖が、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド2801-2101; 803-843; 834-859; 803-859; 803-875; 834-875; 847-875; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1892-1914; 1894-1914; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2078-2107; 2078-2011; 2080-2098; 2081-2099; 2081-2104; 2081-2011; 2082-2100; 2084-2102; 2084-2011; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2

10

20

30

40

50

3 0 9 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 1 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 8 ; 2 2 9 1 - 2 3 1 5 ; 2 2 9 2 - 2
 3 1 0 ; 2 2 9 4 - 2 3 1 2 ; 2 2 9 6 - 2 3 1 4 ; 2 2 9 9 - 2 3 1 7 ; 2 3 0 4 - 2
 3 2 2 ; 2 3 0 4 - 2 3 2 9 ; 2 3 0 6 - 2 3 2 4 ; 2 3 0 7 - 2 3 2 5 ; 2 3 0 9 - 2
 3 2 7 ; 2 3 0 9 - 2 3 2 9 ; 2 3 0 9 - 2 3 4 2 ; 2 3 0 9 - 2 3 5 0 ; 2 3 0 9 - 2
 3 5 8 ; 2 3 1 4 - 2 3 3 2 ; 2 3 1 6 - 2 3 3 4 ; 2 3 1 7 - 2 3 3 5 ; 2 3 2 0 - 2
 3 3 8 ; 2 3 2 1 - 2 3 3 9 ; 2 3 2 3 - 2 3 4 1 ; 2 3 2 5 - 2 3 4 3 ; 2 3 2 6 - 2
 3 4 4 ; 2 3 2 8 - 2 3 4 6 ; 2 3 2 9 - 2 3 4 7 ; 2 3 3 1 - 2 3 4 9 ; 2 3 3 3 - 2
 3 5 1 ; 2 3 3 4 - 2 3 5 2 ; 2 3 3 5 - 2 3 5 3 ; 2 3 3 9 - 2 3 5 7 ; 2 3 4 0 - 2
 3 5 8 ; または、2 3 4 1 - 2 3 5 9 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 1 5
 個の連続ヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖は、配列番号 2 のヌクレオチド配列の対応
 する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 1 5 個の連続
 ヌクレオチドを含み、そして

該アンチセンス鎖は、センス鎖に実質的に相補的である、(57)に記載の二本鎖 RNA i 薬。

(59) 該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾を含む、(57)または(58)に記載の二本鎖 RNA i 薬。

(60) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害することができる二本鎖リボ核酸 (RNA i) 薬であって、該二本鎖 RNA i 薬は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGT をコードする mRNA の一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、該二本鎖 RNA i 薬は、式 (III) :

センス : 5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'
 アンチセンス : 3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5' (III)

[式中、i、j、k および l は、それぞれ独立して、0 または 1 であり、

p、p'、q および q' は、それぞれ独立して、0 - 6 であり、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである 0 - 25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである 0 - 10 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

各 n_p、n_p'、n_q および n_q' (それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい) は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y' および Z'Z'Z' は、それぞれ独立して、3 個の連続ヌクレオチドにおける 3 個の同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または 2'-フルオロ修飾であり、

N_b における修飾は、Y における修飾とは異なり、N_b' における修飾は、Y' における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも 1 つのリガンドと複合体を形成している。]

で表される、二本鎖 RNA i 薬。

(61) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害することができる二本鎖リボ核酸 (RNA i) 薬であって、該二本鎖 RNA i 薬は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGT をコードする mRNA の一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、該二本鎖 RNA i 薬は、式 (III) :

センス : 5' n_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q 3'
 アンチセンス : 3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'

$-N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' \quad 5' (III)$

[式中、 i 、 j 、 k および l は、それぞれ独立して、0または1であり、
各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' （それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい）
は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、それぞれ独立して、0-6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、

N_b における修飾は、 Y における修飾とは異なり、 N_b' における修飾は、 Y' における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成している。]

で表される、二本鎖RNA i 葉。

(62) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン(AGT)の発現を阻害することができる二本鎖リボ核酸(RNA i)葉であって、該二本鎖RNA i 葉は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGTをコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約14から約30ヌクレオチド長であり、該二本鎖RNA i 葉は、式(III)：

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

アンチセンス： $3' \quad n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' \quad 5' (III)$

[式中、 i 、 j 、 k および l は、それぞれ独立して、0または1であり、

各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' （それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい）
は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p 、 q および q' は、それぞれ独立して、0-6であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも2個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-10個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ および $Z'Z'Z'$ は、それぞれ独立して、3個の連続ヌクレオチドにおける3個の同一の修飾の1つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または2'-フルオロ修飾であり、

N_b における修飾は、 Y における修飾とは異なり、 N_b' における修飾は、 Y' における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成しており、ここで該リガンドは、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体である。]

で表される、二本鎖RNA i 葉。

(63) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害することができる二本鎖リボ核酸 (RNAi) 薬であって、該二本鎖 RNAi 薬は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGT をコードする mRNA の一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、該二本鎖 RNAi 薬は、式 (III) :

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

アンチセンス : $3' \quad n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' \quad 5' \quad (III)$

[式中、i、j、k および l は、それぞれ独立して、0 または 1 であり、

各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' (それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい) は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p、q および q' は、それぞれ独立して、0-6 であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも 1 つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

各 N_b および N_b' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-10 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y' および Z'Z'Z' は、それぞれ独立して、3 個の連続ヌクレオチドにおける 3 個の同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、

該修飾は、2'-O-メチル修飾または 2'-フルオロ修飾であり、

N_b における修飾は、Y における修飾とは異なり、 N_b' における修飾は、Y' における修飾とは異なり、そして

該センス鎖は、少なくとも 1 つのホスホロチオエート結合を含み、

該センス鎖は、少なくとも 1 つのリガンドと複合体を形成しており、ここで該リガンドは、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している 1 個またはそれ以上の GalNAc 誘導体である。]

で表される、二本鎖 RNAi 薬。

(64) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン (AGT) の発現を阻害することができる二本鎖リボ核酸 (RNAi) 薬であって、該二本鎖 RNAi 薬は、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、AGT をコードする mRNA の一部に相補的な領域を含み、各鎖は、約 14 から約 30 ヌクレオチド長であり、該二本鎖 RNAi 薬は、式 (IIII) :

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

アンチセンス : $3' \quad n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' \quad 5' \quad (IIII)$

[式中、各 n_p 、 n_p' 、 n_q および n_q' (それらは各々、存在しても、存在しなくてもよい) は、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し、

p、q および q' は、それぞれ独立して、0-6 であり、

$n_p' > 0$ であり、少なくとも 1 つの n_p' は、ホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドに結合しており、

各 N_a および N_a' は、独立して、修飾されているか、または修飾されていないか、またはその組合せのいずれかである、0-25 個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 個の異なる修飾ヌクレオチドを含み、

YYY および Y'Y'Y' は、それぞれ独立して、3 個の連続ヌクレオチドにおける 3 個の同一の修飾の 1 つのモチーフを表し、該修飾は、2'-O-メチル修飾または 2'-フルオロ修飾であり、

10

20

30

40

50

該センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、
 該センス鎖は、少なくとも1つのリガンドと複合体を形成しており、ここで該リガンドは、
 二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して結合している1個またはそれ以上のG a l N A c 誘導体である。]

で表される、二本鎖RNA i 薬。

(65) センス鎖およびアンチセンス鎖を含む二本鎖リボ核酸(RNA i)薬であって、
 該センス鎖および該アンチセンス鎖が、表3、4、7、8、11、13および15のうち
 何れか1つに列記される配列の何れか1つからなる群より選択される配列を含む、二本
 鎖RNA i 薬。

(66) 修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド薬を含む組成物であって、該医薬が
 、細胞内でのAGTの発現を阻害することができ、そして表3、4、7、8、11、13
 および15の何れか1つに列記される配列群より選択されるセンス配列に相補的な配列を
 含み、該ポリヌクレオチドが、約14から約30ヌクレオチド長である、組成物。

(67) (2)に記載の二本鎖RNA i 薬を含む、ベクター。

(68) (1) - (4)、(10)、(57)、(58)および(60) - (65)の
 いずれかに記載の二本鎖RNA i 薬を含む、細胞。

(69) (1) - (4)、(10)、(57)、(58)および(60) - (65)の
 いずれかに記載の二本鎖RNA i 薬を含む医薬組成物、または(66)に記載の修飾され
 たアンチセンスポリヌクレオチド薬を含む組成物、または(67)に記載のベクター

(70) 二本鎖RNA i 薬が非緩衝液で投与される、(69)に記載の医薬組成物。

(71) 該非緩衝液が生理食塩水または水である、(70)に記載の医薬組成物。

(72) 該二本鎖RNA i 薬が緩衝液と共に投与される、(69)に記載の医薬組成物
 。

(73) 該緩衝液が、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロラミン、炭酸緩衝液、または
 リン酸緩衝液、あるいはこれらの任意の組合せを含む、(72)に記載の医薬組成物。

(74) 該緩衝液が、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である、(73)に記載の医薬
 組成物。

(75) 細胞内でのアンジオテンシノーゲン(AGT)発現を阻害する方法であって、
 (a)細胞を、(1) - (4)、(10)、(57)、(58)および(60) - (65)
)のいずれかに記載の二本鎖RNA i 薬、または(66)に記載の修飾されたアンチセン
 スポリヌクレオチド薬を含む組成物、(67)に記載のベクター、または(69) - (7
 4)のいずれかに記載の医薬組成物と接触させること；そして

(b)工程(a)で製造された細胞を、AGT遺伝子のmRNA転写物が分解されるのに
 十分な時間維持して、細胞内でのAGT遺伝子の発現を阻害すること
 を含む、方法。

(76) 該細胞が対象内に存在する、(75)に記載の方法。

(77) 対象がヒトである、(76)に記載の方法。

(78) 対象がアンジオテンシノーゲン関連疾患に罹患している、(77)に記載の方
 法。

(79) AGT発現が、少なくとも約30%、約40%、約50%、約60%、約70
 %、約80%、約90%、約95%、約98%または約100%阻害される、(75)か
 ら(78)のいずれかに記載の方法。

(80) 治療の有効量の、(1) - (4)、(10)、(57)、(58)および(6
 0) - (65)のいずれかに記載の二本鎖RNA i 薬、または(66)に記載の修飾され
 たアンチセンスポリヌクレオチド薬を含む組成物、(67)に記載のベクター、または(6
 9) - (74)のいずれかに記載の医薬組成物を対象に投与し、該対象を処置すること
 を含む、アンジオテンシノーゲン(AGT)関連障害を有する対象の処置法。

(81) 治療の有効量の二本鎖リボ核酸(RNA i)薬を対象に皮下投与し、それによ
 り対象を処置することを含む、アンジオテンシノーゲン(AGT)関連障害を有する対象
 の処置法であって、

10

20

30

40

50

ここで、該二本鎖RNAは、二本鎖領域を形成するセンス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

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

該アンチセンス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

該アンチセンス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合および3'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

該センス鎖の実質的に全てのヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾および2'-フルオロ修飾からなる群より選択される修飾を含み、

該センス鎖は、5'末端に2個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、そして

該センス鎖は、二価のリンカーまたは三価の分枝状リンカーを介して3'末端に結合している1個またはそれ以上のGalNAc誘導体と複合体を形成する、

方法。

(82) 該センス鎖が、配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド2801-2101; 803-843; 834-859; 803-859; 803-875; 834-875; 847-875; 1247-1271; 1566-1624; 1570-1624; 1584-1624; 1584-1624; 1584-1621; 2035-2144; 2070-2144; 2070-2103; 2201-2223; 2227-2360; 2227-2304; 2290-2318; 2304-2350; 2304-2326; 2320-2342; 2333-2360; 2333-2358; 485-503; 517-535; 560-578; 635-653; 803-821; 814-832; 822-840; 825-843; 834-852; 837-855; 841-859; 855-873; 967-985; 1247-1265; 1248-1266; 1249-1267; 1251-1269; 1253-1271; 1566-1584; 1570-1588; 1572-1590; 1574-1592; 1584-1602; 1587-1605; 1591-1609; 1592-1610; 1595-1613; 1601-1619; 1602-1620; 1605-1623; 1729-1747; 1738-1756; 1739-1757; 1741-1769; 1767-1785; 1810-1828; 1827-1845; 1880-1989; 1892-1914; 1894-1914; 1894-2012; 2035-2053; 2046-2064; 2057-2075; 2070-2088; 2072-2090; 2078-2096; 2078-2107; 2078-2011; 2080-2098; 2081-2099; 2081-2104; 2081-2011; 2082-2100; 2084-2102; 2084-2011; 2090-2108; 2100-2118; 2111-2129; 2124-2142; 2125-2143; 2167-2185; 2179-2197; 2201-2219; 2202-2220; 2203-2221; 2204-2222; 2227-2245; 2230-2248; 2234-2252; 2244-2264; 2255-2273; 2266-2284; 2268-2286; 2270-2288; 2279-2297; 2281-2299; 2283-2301; 2284-2302; 2285-2303; 2286-2304; 2288-2306; 2290-2308; 2291-2309; 2291-2311; 2291-2318; 2291-2315; 2292-2310; 2294-2312; 2296-2314; 2299-2317; 2304-2322; 2304-2329; 2306-2324; 2307-2325; 2309-2327; 2309-2329; 2309-2342; 2309-2350; 2309-2358; 2314-2332; 2316-2334; 2317-2335; 2320-2338; 2321-2339; 2323-2341; 2325-2343; 2326-

10

20

30

40

50

2 3 4 4 ; 2 3 2 8 - 2 3 4 6 ; 2 3 2 9 - 2 3 4 7 ; 2 3 3 1 - 2 3 4 9 ; 2 3 3 3 -
2 3 5 1 ; 2 3 3 4 - 2 3 5 2 ; 2 3 3 5 - 2 3 5 3 ; 2 3 3 9 - 2 3 5 7 ; 2 3 4 0 -
2 3 5 8 ; または、2 3 4 1 - 2 3 5 9 と 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 1
5 個の連続ヌクレオチドを含み、そして該アンチセンス鎖が、配列番号 2 のヌクレオチド
配列の対応する位置にて該ヌクレオチドと 3 個以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 1
5 個の連続ヌクレオチドを含み、そして

該アンチセンス鎖が、センス鎖に実質的に相補的である、(81)に記載の方法。

(83) 該センス鎖の全てのヌクレオチドおよび該アンチセンス鎖の全てのヌクレオチ
ドが修飾を含む、(81)または(82)に記載の方法。

(84) 対象がヒトである、(81) - (83) のいずれかに記載の方法。

(85) アンジオテンシノーゲン関連疾患が、高血圧、境界域高血圧、原発性高血圧、
二次性高血圧、高血圧緊急症、高血圧急迫症、孤立性収縮期高血圧または拡張期高血圧、
妊娠関連高血圧、糖尿病性高血圧、治療抵抗性高血圧、難治性高血圧、発作性高血圧、腎
血管性高血圧、ゴールドブラット高血圧、眼性高血圧、緑内障、肺高血圧、門脈圧亢進症
、体静脈高血圧、収縮期高血圧、不安定高血圧；高血圧性心疾患、高血圧性腎症、アテロ
ーム性動脈硬化症、動脈硬化症、血管障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、慢性心不全
、心筋症、糖尿病性心筋症、糸球体硬化症、大動脈狭窄症、大動脈瘤、心内膜線維症、ク
ッシング症候群、および慢性ステロイド療法を含む他のグルココルチコイド過剰状態、褐色
細胞腫、レニン腫症候群 (reninoma)、続発性アルドステロン症および他のミネラルコ
ルチコイド過剰状態、睡眠時無呼吸症、甲状腺／副甲状腺疾患、心不全、心筋梗塞、狭心
症、卒中、真性糖尿病、腎疾患、腎不全、全身性硬化症、子宮内胎児発育遅延 (IUGR)
、ならびに胎児発育不全からなる群より選択される、(81) から (83) のいずれかに
に記載の方法。

(86) アンジオテンシノーゲン関連疾患が妊娠関連高血圧である、(81) から (8
3) のいずれかに記載の方法。

(87) 二本鎖 RNA i 薬が、体重 1 k g 当たり約 0. 0 1 m g から約 1 0 m g または
約 0. 5 m g から約 5 0 m g の用量で投与される、(81) から (83) のいずれかに記
載の方法。

(88) 二本鎖 RNA i 薬が、体重 1 k g 当たり、約 1 0 m g から約 3 0 m g の用量で
投与される、(87) に記載の方法。

(89) 二本鎖 RNA i 薬が、体重 1 k g 当たり、約 3 m g の用量で投与される、(8
7) に記載の方法。

(90) 二本鎖 RNA i 薬が、体重 1 k g 当たり、約 1 0 m g の用量で投与される、(
87) に記載の方法。

(91) 二本鎖 RNA i 薬が、体重 1 k g 当たり、約 0. 5 m g の用量で週に 2 回投与
される、(87) に記載の方法。

(92) 二本鎖 RNA i 薬が、体重 1 k g 当たり、約 1 0 m g の用量で隔週投与される
、(87) に記載の方法。

(93) 二本鎖 RNA i 薬が、体重 1 k g 当たり、約 0. 5 - 1 m g の用量で週に 1 回
投与される、(87) に記載の方法。

(94) 二本鎖 RNA i 薬が皮下投与される、(87) に記載の方法。

(95) 二本鎖 RNA i 薬が静脈内投与される、(87) に記載の方法。

(96) 該 RNA i 薬が 2 以上の用量で投与される、(87) に記載の方法。

(97) 該 RNA i 薬が、約 1 2 時間毎、約 2 4 時間毎、約 4 8 時間毎、約 7 2 時間毎
および約 9 6 時間毎に 1 回投与からなる群より選択される間隔で投与される、(96) に
記載の方法。

(98) 該 RNA i 薬が週に 2 回投与される、(96) に記載の方法。

(99) 該 RNA i 薬が隔週で投与される、(96) に記載の方法。

(100) 対象にさらなる治療剤を投与することを含む、(81) から (83) のいづ
れかに記載の方法。

10

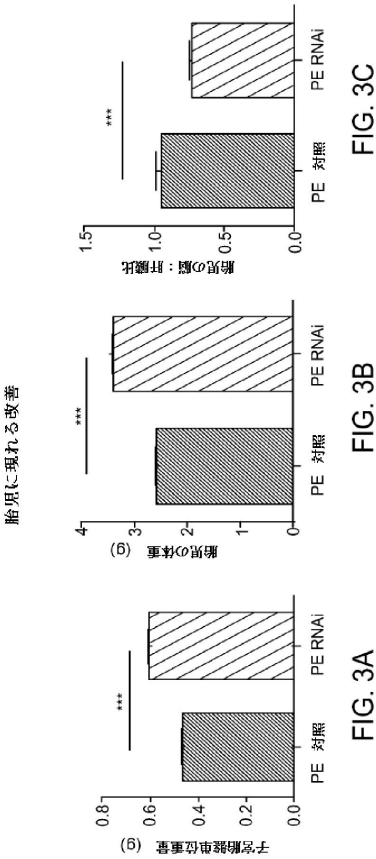
20

30

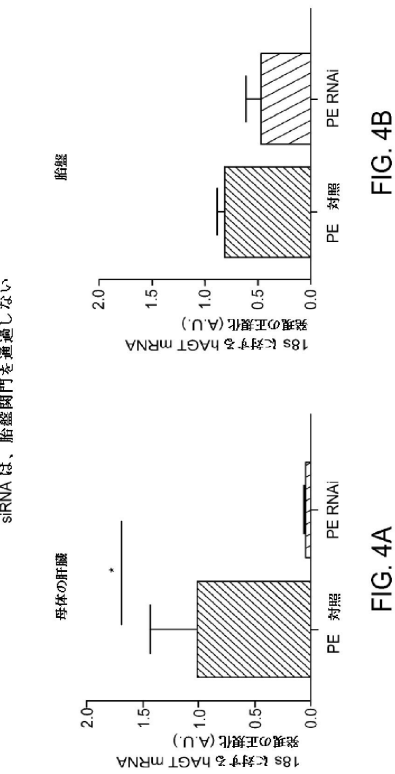
40

50

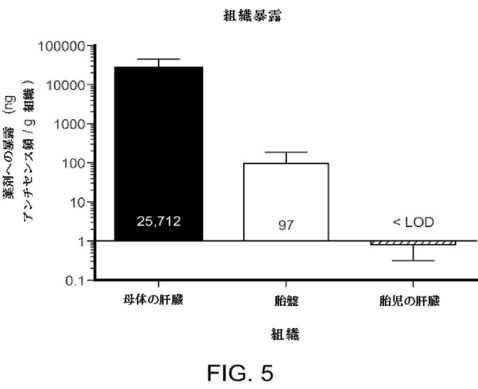
【図 3】



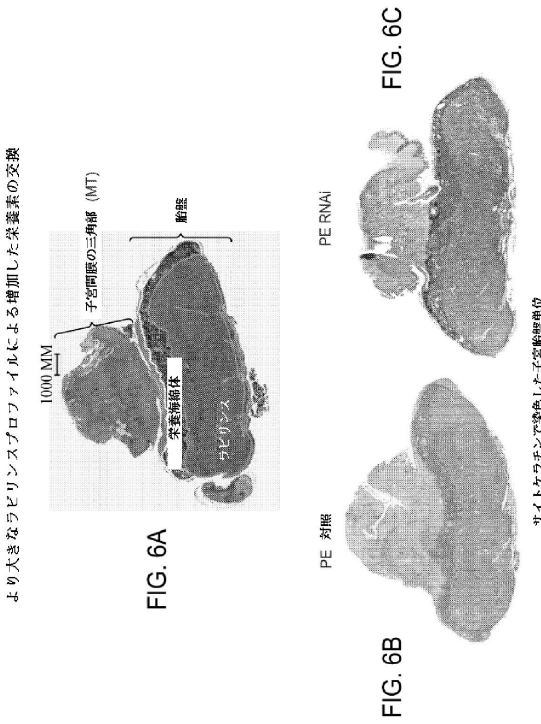
【図 4】



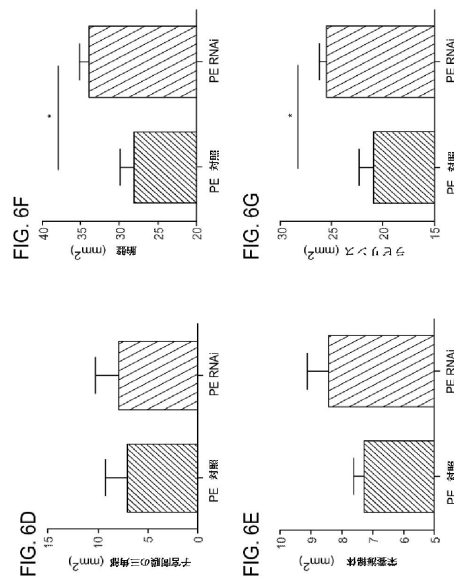
【図 5】



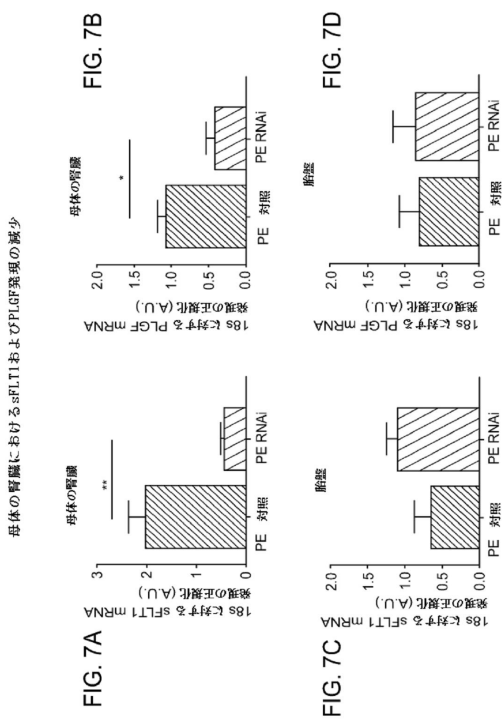
【図 6 - 1】



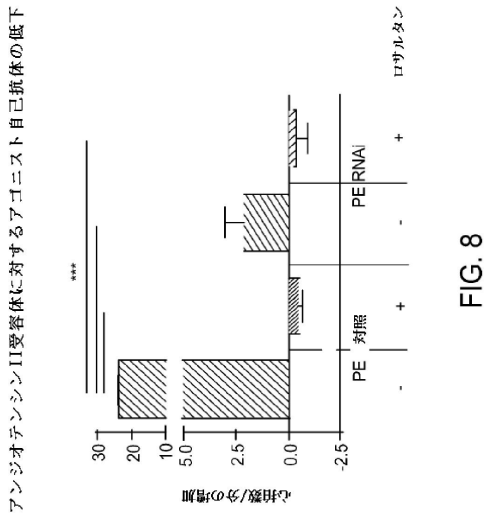
【図 6 - 2】



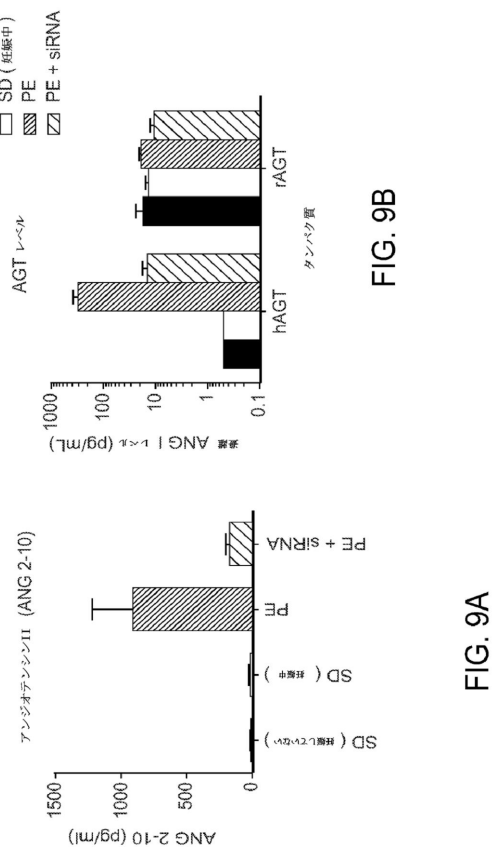
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

0006811094000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/113 (2010.01) C 1 2 N 15/113 Z

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ドナルド・フォスター

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

(72)発明者 ブライアン・ベッテンコート

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

(72)発明者 クラウス・カリセ

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

(72)発明者 グレゴリー・ヒンクル

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

(72)発明者 サティアナラヤーナ・クチマンチ

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

(72)発明者 マルティン・マイアー

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

(72)発明者 スチュアート・ミルスタイン

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

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 特表2011-505425 (JP, A)

JEFFREY OLEARCZYK, TARGETING OF HEPATIC ANGIOTENSINOGEN USING CHEMICALLY MODIFIED SIRTAS RESULTS IN 以下備考, HYPERTENSION RESEARCH, 2013年12月12日, VOL:37, NR:5,, PAGE(S):405 - 412, SIGNIFICANT AND SUSTAINED BLOOD PRESSURE LOWERING IN A RAT MODEL OF HYPERTENSION, URL, <http://dx.doi.org/10.1038/hr.2013.155>
Drug Delivery System, 2004年, Vol.19. No.4, p.348-355

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00

C12N 15/00

CAPLUS/REGISTRY (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq