

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5704741号

(P5704741)

(45) 発行日 平成27年4月22日 (2015. 4. 22)

(24) 登録日 平成27年3月6日 (2015. 3. 6)

(51) Int. Cl.	F I			
C 1 2 N 15/113 (2010. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A G		
A 6 1 K 31/7105 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7105			
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00			
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00			
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1		
請求項の数 17 (全 72 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2009-503309 (P2009-503309)	(73) 特許権者	505369158
(86) (22) 出願日	平成19年3月30日 (2007. 3. 30)		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2009-532036 (P2009-532036A)		, インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成21年9月10日 (2009. 9. 10)		A L N Y L A M P H A R M A C E U T I
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/065636		C A L S, I N C.
(87) 国際公開番号	W02007/115168		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(87) 国際公開日	平成19年10月11日 (2007. 10. 11)		142, ケンブリッジ, サード スト
審査請求日	平成21年10月22日 (2009. 10. 22)		リート 300
審判番号	不服2013-15663 (P2013-15663/J1)	(74) 代理人	100078282
審判請求日	平成25年8月13日 (2013. 8. 13)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/787, 762	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成18年3月31日 (2006. 3. 31)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/870, 259		
(32) 優先日	平成18年12月15日 (2006. 12. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 E g 5 遺伝子発現の抑制のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞におけるヒト E g 5 遺伝子の発現を抑制するための 2 本鎖リボ核酸 (d s R N A) であって、ここで、該 d s R N A は相互に相補的な配列少なくとも 2 つを含み、そしてここでセンス鎖は第 1 の配列を含み、そしてアンチセンス鎖は E g 5 をコードする m R N A の少なくとも一部分に完全に相補的な相補性の領域を含む第 2 の配列を含み、そしてここで該相補性の領域は 19 ~ 24 ヌクレオチド長であり、そして、該 d s R N A は該 E g 5 を発現する細胞に接触すると該 E g 5 遺伝子の発現を抑制し、E g 5 をコードする m R N A の該一部分は、U C G A G A A U C U A A A C U A A C U である、2 本鎖リボ核酸。

【請求項 2】

前記第 1 の配列は配列番号 135 の配列であり、前記第 2 の配列は配列番号 136 の配列である請求項 1 記載の d s R N A。

【請求項 3】

前記 d s R N A が修飾されたヌクレオチド少なくとも 1 つを含む請求項 1 または 2 記載の d s R N A。

【請求項 4】

前記修飾されたヌクレオチドが 2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、5' - ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、コレステリル誘導体又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、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、無塩基ヌクレオチド、2' -

アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミデート及び非天然塩基含有ヌクレオチドの群から選択される請求項3記載のdsRNA。

【請求項5】

請求項1記載のdsRNAを含む細胞。

【請求項6】

請求項1または2記載のdsRNAを含むEg5遺伝子の発現を抑制するための医薬組成物。

【請求項7】

VEGF遺伝子の発現を抑制するdsRNAを更に含む請求項6記載の医薬組成物であって、該dsRNAは相互に相補的な配列少なくとも2つを含み、そしてここでセンス鎖は第1の配列を含み、そしてアンチセンス鎖はVEGFをコードするmRNAの少なくとも一部分に完全に相補的な相補性の領域を含む第2の配列を含み、そしてここで該相補性の領域は19～24ヌクレオチド長であり、そして、該dsRNAは該VEGFを発現する細胞に接触すると該VEGF遺伝子の発現を抑制し、VEGFをコードするmRNAの該一部分は、GCACAUAAGGAGAGAUGAGCである医薬組成物。

【請求項8】

細胞におけるEg5遺伝子の発現を抑制するためのインビトロでの方法であって、該方法が下記工程：

(a) 請求項1記載のdsRNAを該細胞に導入すること；及び、

(b) Eg5遺伝子のmRNA転写物の分解を達成するために十分な時間、工程(a)で生成した細胞を維持することにより、該細胞におけるEg5遺伝子の発現を抑制すること、を含む方法。

【請求項9】

VEGFの発現を抑制する第2のdsRNAが前記細胞に導入される請求項8記載の方法であって、該dsRNAは相互に相補的な配列少なくとも2つを含み、そしてここでセンス鎖は第1の配列を含み、そしてアンチセンス鎖はVEGFをコードするmRNAの少なくとも一部分に完全に相補的な相補性の領域を含む第2の配列を含み、そしてここで該相補性の領域は19～24ヌクレオチド長であり、そして、該dsRNAは該VEGFを発現する細胞に接触すると該VEGF遺伝子の発現を抑制し、VEGFをコードするmRNAの該一部分は、GCACAUAAGGAGAGAUGAGCである方法。

【請求項10】

Eg5の発現により媒介される病理学的プロセスを治療、予防又は管理するための請求項1または2記載のdsRNA。

【請求項11】

VEGFの発現を抑制する第2のdsRNAと組み合わせて投与されるものであることを特徴とする請求項10記載のdsRNAであって、該第2のdsRNAは相互に相補的な配列少なくとも2つを含み、そしてここでセンス鎖は第1の配列を含み、そしてアンチセンス鎖はVEGFをコードするmRNAの少なくとも一部分に完全に相補的な相補性の領域を含む第2の配列を含み、そしてここで該相補性の領域は19～24ヌクレオチド長であり、そして、該dsRNAは該VEGFを発現する細胞に接触すると該VEGF遺伝子の発現を抑制し、VEGFをコードするmRNAの該一部分は、GCACAUAAGGAGAGAUGAGCであるdsRNA。

【請求項12】

細胞におけるEg5遺伝子の発現を抑制するためのベクターであって、該ベクターはdsRNAの鎖少なくとも1つをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節配列を含み、ここで該dsRNAの鎖の1つはEg5をコードするmRNAの少なくとも一部分に完全に相補的であり、そしてここで該dsRNAは19～24塩基対長であり、そしてここで該dsRNAは該Eg5を発現する細胞に接触すると該Eg5遺伝子の発現を

10

20

30

40

50

少なくとも40%抑制し、Eg5をコードするmRNAの該一部分は、UCGAGAAUCUAAACUAAACUである、ベクター。

【請求項13】

請求項12記載のベクターを含む細胞。

【請求項14】

前記第1の配列が配列番号1242の配列であり、前記第2の配列が配列番号1243の配列である請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項15】

前記第1の配列が配列番号1242の配列であり、前記第2の配列が配列番号1243の配列である請求項9に記載の方法。

10

【請求項16】

前記第1の配列が配列番号1242の配列であり、前記第2の配列が配列番号1243の配列である請求項11に記載のdsRNA。

【請求項17】

前記ヌクレオチド配列は配列番号135または配列番号136の配列である請求項12に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

20

本願は、2006年3月31日に出願された米国仮特許出願第60/787,762号および2006年12月15日に出願された米国仮特許出願第60/870,259号の利益を主張する。先願は両方とも、本明細書中にその全体が参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は2本鎖リボ核酸(dsRNA)及びEg5遺伝子の発現を抑制するためにRNA干渉を媒介する場合におけるその使用、及び、単独又はdsRNAターゲティング血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と組み合わせた、Eg5発現により媒介される病理学的プロセス、例えば癌を治療するためのdsRNAの使用に関する。

【背景技術】

30

【0003】

(発明の背景)

生物内部の細胞集団の維持は細胞分裂及びプログラムされた細胞死の細胞プロセスにより支配されている。正常細胞内部では各プロセスの開始及び終了に関連する細胞事象は高度に調節される。癌のような増殖性疾患においては、これらのプロセスの一方又は両方が混乱している場合がある。例えば癌細胞は、正の調節物質の過剰発現、又は恐らくは突然変異による負の調節物質の喪失の何れかを介して細胞分裂周期のその調節(チェックポイント制御)を喪失していると考えられる。

【0004】

或いは、癌細胞は負の調節物質の過剰発現を介してプログラムされた細胞死を起こす能力を喪失していると考えられる。従って、チェックポイント制御及びプログラムされた細胞死のプロセスを癌細胞に復活させる新しい化学療法剤の開発が必要とされている。

40

【0005】

ヒトの癌の治療の1つのアプローチは細胞周期の進行のために必須な蛋白をターゲティングすることである。細胞周期が1つの期から次に進行するためには、特定の要件事象が完了されなければならない。細胞周期には事象及び期の適切な順番を強制させるチェックポイントが存在する。そのようなチェックポイントの1つは有糸分裂の中期の段階に起こる紡錘体チェックポイントである。有糸分裂において必須の機能を有する蛋白をターゲティングする小分子は紡錘体チェックポイントを開始することにより有糸分裂における細胞を停止させる。有糸分裂において細胞を停止させる小分子のうち、臨床において抗腫瘍活

50

性を示すものは、プログラムされた細胞死に関連する形態学的変化であるアポトーシスも誘導する。即ち癌の治療のための有効な化学療法剤はチェックポイント制御及びプログラムされた細胞死を誘導するものであってよい。残念なことに、細胞内でこれらのプロセスを制御するために使用できる化合物はほとんど存在しない。有糸分裂停止およびアポトーシス活性を引き起こすことが知られている大半の化合物は、チューブリン結合剤として作用する。これらの化合物は微小管の動的不安定性を改編し、そして有糸分裂紡錘体の機能／構造を間接的に改変することにより有糸分裂を停止させる。これらの化合物の大部分はすべての微小管の成分であるチューブリン蛋白を特異的にターゲティングするため、それらは又、微小管が役割を果たしている多くの正常な細胞プロセスの1つ以上にも影響する場合がある。従ってまた、増殖中の細胞に関連する蛋白をより特異的にターゲティングする小分子が必要とされている。

10

【0006】

Eg5は有糸分裂紡錘体に局在し、双極性の有糸分裂紡錘体の形成及び／又は機能のために必要であることが分かっている数種のカイネシン様モーター蛋白の1つである。最近、有糸分裂紡錘体の双極性をかく乱する小分子が報告されている（非特許文献1、参照により本明細書に組み込まれる）。より詳細には、小分子は異常な有糸分裂紡錘体の形成を誘導し、その場合、中心体の中央の対から微小管のモノアストラル型のアレイが発生し、染色体は微小管の遠位の末端に連結している。小分子はモノアストラルアレイにちなんで「モノストロール」と称されている。このモノアストラルアレイの表現型はEg5のモーター蛋白が免疫枯渇している有糸分裂細胞において以前に観察されている。この区別可能な固有のモノアストラルアレイの表現型がEg5の潜在的抑制剤としてのモノストロールの同定を促進している。実際、モノストロールは更に、インビトロの試験において微小管のEg5モーター駆動運動性を抑制することが分かっている。Eg5抑制剤モノストロールは関連するカイネシンモーターに対して、又は、細胞内のゴルジ体の運動を担っているモーターに対しても明らかな作用を有していない。Eg5の免疫枯渇又はEg5のモノストロール抑制の何れかを介してモノアストラルアレイ表現型を示す細胞は細胞周期のM期において停止する。しかしながら、Eg5の免疫枯渇又は抑制の何れかにより誘導された有糸分裂停止は一過性である（非特許文献2）。モノアストラルアレイ表現型及びモノストロールにより誘導された有糸分裂における細胞周期の停止は共に可逆である。細胞は回復して正常な双極性有糸分裂紡錘体を形成し、有糸分裂を完了し、そして細胞周期を通過して正常な細胞増殖に到る。これらのデータは一過性の有糸分裂停止を誘導したEg5の小分子抑制剤が癌細胞の増殖の治療のために有効ではないかもしれないことを示唆している。しかしなお、モノストロールが有糸分裂停止を誘発するという発見は興味深いものであり、従って、ヒトの癌の治療において有効である態様においてEg5モーター蛋白をモジュレートするために使用できる化合物を更に研究して同定する必要性がある。他の抗新生物剤と組み合わせたこれらの化合物の使用を研究する必要性もある。

20

30

【0007】

VEGF（血管透過性因子VPFとしても知られている）は血管形成、上皮細胞増殖及び内皮細胞生存を刺激する多機能性サイトカインである。VEGFは多くの種類の組織により生産され、そしてその過剰発現又は異常な発現は種々の障害、例えば癌及び網膜障害、例えば加齢関連黄斑変性及び他の血管形成障害をもたらす場合がある。

40

【0008】

最近、2本鎖RNA分子(dsRNA)がRNA干渉(RNAi)として知られている高度に保存された調節機序において遺伝子発現をブロックすることがわかった。WO99/32619(Fireら)はC.elegansにおける遺伝子発現を抑制するための少なくとも25ヌクレオチド長のdsRNAの使用を開示している。dsRNAは又他の生物、例えば植物(特許文献1、Waterhouseら；及び特許文献2、Heifeitzら参照)、ショウジョウバエ(例えば非特許文献3参照)、及び哺乳類(特許文献3、Limmer；及び特許文献4、Kreutzerら参照)においても標的RNAを分解することが分かっている。この天然の機序は現在では遺伝子の異常又は望ましくない調

50

節により誘発される障害を治療するための新しいクラスの医薬品の開発のために注目されている。

【0009】

RNAiの分野における顕著な進歩及びEg5発現により媒介される病理学的プロセスの治療における進歩にもかかわらず、高い生物学的活性及びインビボの安定性の両方を有する細胞自身のRNAi機序を用いてEg5遺伝子を選択的及び効率的にサイレント化することができる、そして、Eg5発現により媒介される病理学的プロセスを治療する場合に使用するための標的Eg5遺伝子の発現を効果的に抑制することができる薬剤の必要性が残存している。

【特許文献1】国際公開第99/53050号パンフレット

10

【特許文献2】国際公開第99/61631号パンフレット

【特許文献3】国際公開第00/44895号パンフレット

【特許文献4】独国特許第10100586.5号明細書

【非特許文献1】Mayer, T. U. ら、1999、Science 286 (5441) 971-4

【非特許文献2】Kapoor, T. M., 2000、J Cell Biol 150 (5) 975-80

【非特許文献3】Yang, D. ら、Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200

【発明の開示】

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は2本鎖リボ核酸(dsRNA)、並びにそのようなdsRNAを単独又はdsRNAターゲティングVEGFと組み合わせて使用することにより細胞又は哺乳類におけるEg5遺伝子の発現を抑制するための組成物及び方法を提供する。本発明は又、癌のようなEg5遺伝子の発現により誘発される病理学的状態および疾患を治療するための組成物及び方法を提供する。本発明のdsRNAは30ヌクレオチド長未満、一般的に19~24ヌクレオチド長であり、そしてEg5遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部分に実質的に相補である領域を有するRNA鎖(アンチセンス鎖)を含む。

30

【0011】

1つの実施形態において、本発明はEg5遺伝子の発現を抑制するための2本鎖リボ核酸(dsRNA)分子を提供する。dsRNAは相互に相補である少なくとも2つの配列を含む。dsRNAは第1の配列を含むセンス鎖及び第2の配列を含むアンチセンス鎖を含む。アンチセンス鎖はEg5をコードするmRNAの少なくとも一部分に実質的に相補であるヌクレオチド配列を含み、そして相補性の領域は30ヌクレオチド長未満、一般的に19~24ヌクレオチド長である。dsRNAはEg5を発現する細胞に接触すると少なくとも40%Eg5遺伝子の発現を抑制する。

【0012】

例えば本発明のdsRNA分子は表1~3のセンス配列よりなる群から選択されるdsRNAの第1の配列、及び、表1~3のアンチセンス配列よりなる群から選択されるdsRNAの第2の配列を含むことができる。本発明のdsRNA分子は天然に存在するヌクレオチドを含むことができるか、又は、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド、例えば2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、及びコレステリル誘導体に連結された末端ヌクレオチドを含むことができる。或いは、修飾されたヌクレオチドは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、無塩基ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミデート及び非天然塩基含有ヌクレオチドの群から選択してよい。一般的にそのような修飾配列は表1~3のセンス配列よりなる群から選択される該dsRNAの第1の配列

40

50

、及び、表 1 ～ 3 のアンチセンス配列よりなる群から選択される第 2 の配列に基づくことになる。

【0013】

別の実施形態においては、本発明は本発明の d s R N A の 1 つを含む細胞を提供する。細胞は一般的に哺乳類細胞、例えばヒト細胞である。

【0014】

別の実施形態においては、本発明は本発明の d s R N A 1 つ以上、及び、製薬上許容しうる担体又は送達ベヒクルを含む、生物、一般的にヒト対象における E g 5 遺伝子の発現を抑制するための医薬組成物を提供する。

【0015】

別の実施形態において、本発明は下記工程：

(a) 2 本鎖リボ核酸 (d s R N A) を細胞内に導入すること、ここで d s R N A は相互に相補である配列少なくとも 2 つを含むものであること。d s R N A は第 1 の配列を含むセンス鎖及び第 2 の配列を含むアンチセンス鎖を含む。アンチセンス鎖は E g 5 をコードする m R N A の少なくとも一部分に実質的に相補的な相補性領域を含み、そしてここで、相補性領域は 30 ヌクレオチド長未満、一般的に 19 ～ 24 ヌクレオチド長であり、そしてここで d s R N A は、該 E g 5 を発現する細胞に接触すると、E g 5 遺伝子の発現を少なくとも 40 % 抑制するものであること；そして、

(b) E g 5 遺伝子の m R N A 転写物の分解を達成するために十分な時間、工程 (a) で生成した細胞を維持することにより、細胞における E g 5 遺伝子の発現を抑制すること、を含む細胞における E g 5 の発現を抑制するための方法を提供する。

【0016】

別の実施形態においては、本発明は E g 5 の発現により媒介される病理学的プロセス、例えば癌を治療、予防又は管理する方法であって、本発明の d s R N A 1 つ以上の治療又は予防有効量をそのような治療、予防又は管理を必要とする患者に投与することを含む上記方法を提供する。

【0017】

別の実施形態においては、本発明は、本発明の d s R N A 1 つの鎖少なくとも 1 つをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節配列を含む、細胞における E g 5 遺伝子の発現を抑制するためのベクターを提供する。

【0018】

別の実施形態においては、本発明は細胞中の E g 5 遺伝子の発現を抑制するためのベクターを含む細胞を提供する。ベクターは本発明の d s R N A の 1 つの鎖少なくとも 1 つをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した調節配列を含む。

【0019】

別の実施形態においては、本発明は V E G F m R N A をターゲティングする第 2 の d s R N A と組み合わせた上記 E g 5 d s R N A 及びその使用を提供する。E g 5 をターゲティングする d s R N A 及び V E G F をターゲティングする第 2 の d s R N A の組み合わせは過剰増殖性障害、特に肝臓癌を治療するための補足的及び相乗作用的な活性を提供する。

【0020】

(図面の簡単な説明)

図面なし。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

(発明の詳細な説明)

本発明は d s R N A を用いた細胞又は哺乳類における E g 5 遺伝子の発現を抑制するための 2 本鎖リボ核酸 (d s R N A) 並びに組成物及び方法を提供する。本発明は又 d s R N A を使用した E g 5 遺伝子の発現により誘導される哺乳類における病理学的状態及び疾患を治療するための組成物及び方法を提供する。d s R N A は R N A 干渉 (R N A i) と

10

20

30

40

50

して知られているプロセスを介してmRNAの配列特異的分解を指向する。本発明は更にVEGF遺伝子の発現を抑制する第2のdsRNAと組み合わせた本dsRNAを提供する。

【0022】

本発明のdsRNAは30ヌクレオチド長未満、一般的に19～24ヌクレオチド長であり、Eg5遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部分に実質的に相補である領域を有するRNA鎖（アンチセンス鎖）を含む。これらのdsRNAの使用は哺乳類における癌細胞の複製及び／又は維持において関与が示唆されている遺伝子のmRNAのターゲティングされた分解を可能とする。細胞系及び動物試験を用いた場合、本発明は、これらのdsRNAの極めて低い用量がRNAiを特異的及び効率的に媒介し、Eg5遺伝子の発現の顕著な抑制をもたらすことを明らかにしている。即ち、これらのdsRNAを含む本発明の方法及び組成物は、有糸分裂に関与する遺伝子をターゲティングすることにより例えば癌のようなEg5発現により媒介される病理学的プロセスを治療するために有用である。

10

【0023】

以下の詳細な説明はEg5遺伝子の発現を抑制するためのdsRNA及びdsRNAを含有する組成物の作成及び使用の方法、並びに、単独又はVEGF遺伝子をターゲティングする第2のdsRNAと組み合わせた、癌のようなEg5の発現により誘発される疾患及び障害を治療するための組成物及び方法を開示する。本発明の医薬組成物は、製薬上許容しうる担体と共に、30ヌクレオチド長未満、一般的に19～24ヌクレオチド長であり、Eg5遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部分に実質的に相補である相補性領域を含むアンチセンス鎖を有するdsRNA、および製薬上許容しうる担体を含む。上記した通り、そのような組成物はさらにVEGFをターゲティングする第2のdsRNAを更に包含することができる。

20

【0024】

従って、本発明の特定の特徴は製薬上許容しうる担体と共に本発明のdsRNAを含む医薬組成物、Eg5遺伝子の発現を抑制するための組成物の使用方法、及び、Eg5遺伝子の発現により誘発される疾患を治療するために医薬組成物を使用する方法を提供する。本発明は更にVEGFの発現を抑制するように設計された第2のdsRNAを更に含有する上記医薬組成物を提供する。

30

【0025】

I. 定義

便宜上、本明細書、実施例及び添付の請求項において使用する特定の用語及び表現の意味を以下に提示する。本明細書の他の部分におけるある用語の用法と、本セクションにおいて提示されるその定義の間に明らかな不一致がある場合は、本セクションにおける定義が優先する。

【0026】

「G」、「C」、「A」及び「U」は各々一般的にグアニン、シトシン、アデニン及びウラシルをそれぞれ塩基として含有するヌクレオチドを表す。しかしながら、「リボヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」という用語はまた、後に詳述する通り、修飾されたヌクレオチド又は代理置き換え部分を指すこともできる。当業者の知る通り、グアニン、シトシン、アデニン及びウラシルは他の部分で置き換えられてもよく、その際、そのような置き換え部分を担持するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対形成特性は大きく改変されないものとする。例えば、限定しないが、イノシンを自身の塩基として含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン又はウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対形成してよい。従って、ウラシル、グアニン又はアデニンを含有するヌクレオチドは、例えばイノシンを含有するヌクレオチドにより、本発明のヌクレオチド配列において置き換えられてよい。そのような置き換え部分を含む配列は本発明の実施形態である。

40

【0027】

本明細書においては、「Eg5」とは、ヒトカイネシンのファミリーメンバー11を指

50

し、これは又K I F 1 1、E g 5、H K S P、K N S L 1又はT R I P 5としても知られている。E g 5の配列はN C B I G e n e I D：3 8 3 2、H G N C I D：H G N C：6 3 8 8及び参考配列I D番号：N M _ 0 0 4 5 2 3として記載されている。

【0028】

本明細書においては、「標的配列」とは一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを包含するE g 5遺伝子の転写の間に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の隣接部分を指す。

【0029】

本明細書においては、血管透過性因子としても知られているVEGFは血管形成成長因子である。VEGFは、少なくとも3つの異なるアイソフォームで存在する、ホモ二量体45kDa糖タンパク質である。VEGFアイソフォームは内皮細胞中で発現される。VEGF遺伝子は189アミノ酸蛋白アイソフォームを発現する8エクソンを含有する。165アミノ酸アイソフォームはエクソン6によりコードされる残基を欠いており、121アミノ酸アイソフォームはエクソン6及び7によりコードされる残基を欠いている。VEGF145は145アミノ酸を含有し、エクソン7を欠いていると予測されるアイソフォームである。VEGFはFlt-1 (VEGFR-1)又はKDR/flk-1 (VEGFR-2)のような内皮チロシンキナーゼ受容体への結合により内皮細胞に対して作用できる。VEGFR-2は内皮細胞中で発現され、そして内皮細胞の分化および脈管形成に関与している。第3の受容体VEGFR-3はリンパ形成に関与しているとされている。

【0030】

種々のアイソフォームが異なる生物学的活性及び臨床的意義を有している。例えばVEGF145は血管形成を誘導し、そしてVEGF189と同様（しかしVEGF165とは異なり）VEGF145は細胞外のマトリックス関連ヘパリンスルフェートに依存しない機序により細胞外マトリックスに効率的に結合する。VEGFは内皮細胞有糸分裂及びインビトロの化学誘引剤としての活性を示し、そして血管の透過性及び血管形成をインビボで誘導する。VEGFは広範な種類の癌細胞型により分泌され、そして腫瘍関連脈管形成の発生を誘導することにより腫瘍の生育を増進する。VEGF機能の抑制は免疫無防備状態のマウスにおいて原発実験的腫瘍の生育と転移の発生率の両方を制限することが分かっている。VEGFに指向された種々のdsRNAが参照により本明細書に組み込まれる同時係属中の米国特許出願11/078,073及び11/340,080に記載されている。

【0031】

本明細書においては、「配列を含む鎖」という用語は標準的なヌクレオチドの命名法を用いて言及される配列により説明されるヌクレオチドの鎖を含むオリゴヌクレオチドを指す。

【0032】

本明細書においては、そして特段の記載が無い限り、「相補」という用語は第1のヌクレオチド配列を第2のヌクレオチド配列との関連において説明するために使用する場合、当業者に知られる通り、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと、特定の条件下、ハイブリダイズしてデュプレックスを形成する第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの能力を指す。そのような条件は、ストリンジェントな条件であることができ、その場合ストリンジェントな条件は400mMNaCl、40mMPIPESpH6.4、1mMEDTA、50℃又は70℃12～16時間の後洗浄を包含してよい。他の条件、例えば生物体内で遭遇する場合がある生理学的に該当する条件も適用できる。当業者であれば、ハイブリダイズしたヌクレオチドの最終的用途に従って2つの配列の相補性の試験のために最も適切な条件のセットを決定できる。

【0033】

これは第1及び第2のヌクレオチド配列の全長に渡る第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドへの第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチド又はポリヌクレオチドの塩基対形成を包含する。そのような配列は本明細書においては相互に関して「完全に相補」と称される。しかしながら、本明細書においては第1の配列が第2の配列に関して「実質的に相補」と称される場合、2つの配列は完全に相補であることができるか、又は、それらはハイブリダイズにより1つ以上、一般的には4、3又は2つ以下のミスマッチの塩基対を形成してよいが、それらの最終的な用途に最も該当する条件下ではハイブリダイズする能力を保持している。しかしながら2つのオリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションにより1つ以上の1本鎖オーバーハングを形成するように設計される場合は、そのようなオーバーハングは相補性の決定に関してはミスマッチと見なしてはならない。例えば、21ヌクレオチド長の1つのオリゴヌクレオチド及び23ヌクレオチド長の別のオリゴヌクレオチドを含むdsRNAは、より長いオリゴヌクレオチドがより短いオリゴヌクレオチドに対して完全に相補である21ヌクレオチドの配列を含む場合、本発明の目的のためにはなお「完全に相補」と称してよい。

10

【0034】

「相補」な配列は本明細書においては、ハイブリダイズするそれらの能力に関する上記要件が満足される限り、非ワトソンクリック型塩基対及び／又は非天然の修飾されたヌクレオチドから形成された塩基対を包含するか、又はそれから完全に形成されてよい。

【0035】

「相補」、「完全に相補」及び「実質的に相補」という用語は、本明細書においては、それらの使用の内容から理解される通り、dsRNAのセンス及びアンチセンス鎖の間、又はdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列の間の塩基のマッチングに関して使用してよい。

20

【0036】

本明細書においては、メッセンジャーRNA (mRNA) の「少なくとも一部分に対して実質的に相補」であるポリヌクレオチドは、目的の（例えばEg5をコードしている）mRNAの隣接部分に対して実質的に相補であるポリヌクレオチドを指す。例えばポリヌクレオチドは、配列がEg5をコードするmRNAの非中断部分に実質的に相補である場合に、Eg5 mRNAの少なくとも一部分に相補となる。

【0037】

「2本鎖RNA」又は「dsRNA」という用語は本明細書においては、2つの非平行の、上記した通り実質的に相補的な核酸鎖を含むデュプレックス構造を有するリボ核酸分子の複合体を指す。デュプレックス構造を形成する2つの鎖は1つのより大きいRNA分子の異なる部分であってよく、或いは、それらは別個のRNA分子であってよい。2つの鎖が1つのより大きい分子の部分であり、そしてそのため、ある鎖の3'末端とデュプレックス構造を形成する対応するもう一方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの非中断鎖により連結されている場合、連結するRNA鎖は「ヘアピンループ」と称される。2つの鎖が、ある鎖の3'末端とデュプレックス構造を形成する対応するもう一方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの非中断鎖以外の集団により共有結合的に連結されている場合、連結する構造は「リンカー」と称される。RNA鎖は同じか又は異なるヌクレオチドの数量を有してよい。塩基対の最大数はdsRNAの最も短い鎖中ヌクレオチドの数—デュプレックス中に存在する何れかのオーバーハングである。デュプレックス構造以外に、dsRNAはヌクレオチドオーバーハング1つ以上を含んでよい。

30

40

【0038】

本明細書においては、「ヌクレオチドオーバーハング」とは、dsRNAの一方の鎖の3'末端はもう一方の鎖の5'末端を超えて伸長しているか又はその逆の場合の、未対形成のヌクレオチド又はdsRNAのデュプレックス構造から突出しているヌクレオチドを指す。「平滑」又は「平滑末端」とは、dsRNAのその末端において未対形成のヌクレオチドが存在しない、即ちヌクレオチドオーバーハングがないことを意味する。「平滑末端」dsRNAはその完全長に渡って2本鎖である、即ち分子の何れの末端にもヌクレオチドオーバーハングがないdsRNAである。

【0039】

50

「アンチセンス鎖」という用語は標的配列に実質的に相補である領域を包含する d s R N A の鎖を指す。本明細書においては、「相補性の領域」という用語は本明細書において定義するとおり、配列、例えば標的配列に実質的に相補であるアンチセンス鎖上の領域を指す。相補性の領域が標的配列に完全に相補でない場合は、ミスマッチは末端領域において最も耐容され、そして存在する場合は、一般的に、末端領域、又は例えば 5' 及び／又は 3' 末端の 6、5、4、3 又は 2 ヌクレオチド内の領域にある。

【0040】

「センス鎖」という用語はアンチセンス鎖の領域に実質的に相補である領域を包含する d s R N A の鎖を指す。

【0041】

「細胞内に導入する」とは、d s R N A に言及している場合、当該分野で知られる通り、細胞内への取り込み又は吸収を促進することを意味する。d s R N A の吸収又は取り込みは未支援の拡散性又は能動性の細胞プロセスを介するか、又は、副次的な薬剤又は装置により生じることができる。この用語の意味はインビトロの細胞に限定されず；d s R N A は、細胞が生体の一部である場合に「細胞内に導入」されてもよい。そのような場合、細胞内への導入は生物への送達を包含する。例えば、インビボの送達においては、d s R N A は組織部位内に注射されるか、全身投与されることができる。インビトロの細胞内への導入はエレクトロポレーション及びリポフェクションのような当該分野で知られた方法を包含する。

【0042】

「サイレント化する」及び「発現を抑制する」という用語は、それらが E g 5 遺伝子に言及している限り、本明細書においては、内部で E g 5 遺伝子が転写され、そして E g 5 遺伝子の発現が抑制されるように処理されている第 1 の細胞又は細胞群から単離されてよい E g 5 遺伝子から転写された m R N A の量が、第 1 の細胞又は細胞群と実質的に同一であるがそのように処理されていない第 2 の細胞又は細胞群（対照細胞）と比較した場合に低減されていることにより顕在化される、E g 5 遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を指す。抑制の程度は通常は以下：

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

を用いて表される。

【0043】

或いは、抑制の程度は、E g 5 遺伝子転写に関数として関連付けられているパラメータの低減に関して、例えば細胞により分泌された E g 5 遺伝子によりコードされる蛋白の量、又は、特定の表現型、例えばアポトーシスを呈する細胞の数として示してもよい。原則として、E g 5 遺伝子のサイレント化は、構成的に、又はゲノム操作により標的を発現している何れかの細胞内において、又は何れかの適切な試験により、測定してよい。しかしながら、ある d s R N A が特定の程度まで E g 5 遺伝子の発現を抑制しており、そのために本発明の範囲内に包含されるかどうかを決定するためにレファレンスが必要である場合は、後述する実施例に記載する試験をそのようなレファレンスとして使用できる。

【0044】

例えば、特定の例においては、E g 5 遺伝子（又は V E G F 遺伝子）の発現は本発明の 2 本鎖オリゴヌクレオチドの投与により少なくとも約 20%、25%、35%、又は 50% 抑制される。一部の実施形態においては、E g 5 遺伝子は本発明の 2 本鎖オリゴヌクレオチドの投与により少なくとも約 60%、70%、又は 80% 抑制される。一部の実施形態においては、E g 5 遺伝子は本発明の 2 本鎖オリゴヌクレオチドの投与により少なくとも約 85%、90%、又は 95% 抑制される。表 1～3 は種々の濃度において種々の E g 5 d s R N A 分子を用いた場合の発現の抑制に関する数値を示す。

【0045】

E g 5 の発現に関連して本明細書において用いる場合、「治療する」、「治療」等の用語は、E g 5 発現により媒介される病理学的プロセスからの緩解又は軽減を指す。本発明

10

20

30

40

50

の関連においては、後に記載する他の状態の何れか（E g 5 発現により媒介される病理学的プロセス以外）に関連する限りにおいて、「治療する」、「治療」等の用語は、そのような状態に関連する症状少なくとも1つを緩解又は軽減すること、又は、そのような状態の進行を緩徐化又は逆行させること、例えば肝臓癌の進行を緩徐化させることを意味する。

【0046】

本明細書においては、「治療有効量」及び「予防有効量」という表現は、（単独又はV E G F 発現と組み合わせた）E g 5 発現により媒介される病理学的プロセス、又はE g 5 発現により媒介される病理学的プロセスの明らかな症状の治療、予防又は管理において治療上の利益をもたらす量を指す。治療上有効な特定の量は通常の医療従事者により容易に決定できるものであり、そして当該分野で知られた要因、例えばE g 5 発現により媒介される病理学的プロセスの型、患者の病歴及び年齢、E g 5 発現により媒介される病理学的プロセスの段階、及び、他の抗E g 5 発現媒介非病理学的プロセス剤の投与に応じて変動してよい。

10

【0047】

本明細書においては、「医薬組成物」はd s R N A の薬理学的有効量及び製薬上許容しうる担体を含む。本明細書においては、「薬理学的有効量」、「治療有効量」又は単に「有効量」とは、意図される薬理学的、治療的又は予防的な結果をもたらすために有効なR N A の量を指す。例えば、疾患又は障害に関連する測定可能なパラメーターの少なくとも25%低減があった場合に所定の臨床的処置が有効とみなされるとすれば、その疾患又は障害の治療のための薬剤の治療有効量はそのパラメーターの少なくとも25%低減を起こすために必要な量である。

20

【0048】

「製薬上許容しうる担体」という用語は治療薬の投与のための担体を指す。そのような担体は限定しないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及びこれらの組み合わせを包含する。用語は典型的には細胞培養用の培地は除外する。薬剤を経口投与する場合は、製薬上許容しうる担体は限定しないが、製薬上許容しうる賦形剤、例えば不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、甘味剤、フレーバー剤、着色剤及び保存料を包含する。適当な不活性希釈剤は、ナトリウム及びカルシウムの炭酸塩、ナトリウム及びカルシウムのリン酸塩、及び乳糖を包含し、コーンスターチ及びアルギン酸が適当な崩壊剤である。結合剤は澱粉及びゼラチンを包含し、潤滑剤を存在させる場合は、それは一般的にステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクである。所望により、錠剤は胃腸管における吸収を遅延させるためにグリセリルモノステアレート又はグリセリルジステアレートのような物質でコーティングしてよい。

30

【0049】

本明細書においては、「形質転換細胞」とはd s R N A 分子の発現元となってよいベクターが導入されている細胞である。

【0050】

I I. 2本鎖リボ核酸（d s R N A）

1つの実施形態において、本発明は細胞又は哺乳類においてE g 5 遺伝子の発現を抑制するための2本鎖リボ核酸（d s R N A）分子を（単独又はV E G F の発現を抑制するための第2のd s R N A と組み合わせて）提供し、この場合、d s R N A はE g 5 遺伝子の発現において形成されたm R N A の少なくとも一部分に相補である相補性の領域を含むアンチセンス鎖を含み、そしてここで相補性の領域は30ヌクレオチド長未満、一般的に19~24ヌクレオチド長であり、そしてここで該d s R N A は該E g 5 遺伝子を発現する細胞と接触すると、該E g 5 遺伝子の発現を少なくとも40%抑制する。d s R N A はハイブリダイズしてデュプレックス構造を形成するために十分相補である2つのR N A 鎖を含む。d s R N A の一方の鎖（アンチセンス鎖）はE g 5 遺伝子の発現の間に形成されたm R N A の配列から誘導された標的配列に対して実質的に相補、そして一般的に完全に相補である相補性の領域を含み、もう一方の鎖（センス鎖）は、適当な条件下で組み合わせ

40

50

られた場合に2つの鎖がハイブリダイズしてデュプレックス構造を形成するように、アンチセンス鎖に対して相補である領域を含む。一般的にデュプレックス構造は15～30、より一般的には18～25、更に一般的には19～24、そして最も一般的には19～21塩基対長である。同様に、標的配列に対して相補性の領域は15～30、より一般的には18～25、更に一般的には19～24、そして最も一般的には19～21ヌクレオチド長である。本発明のdsRNAは更に1つ以上の1本鎖ヌクレオチドオーバーハングを含んでよい。dsRNAは後述するような当該分野で知られた標準的な方法により、例えば自動DNA合成装置、例えばBiosearch, Applied Biosystems, Inc. より販売されているものを用いることにより合成できる。好ましい実施形態においては、Eg5遺伝子はヒトEg5遺伝子である。特定の実施形態においては、dsRNAのアンチセンス鎖は表1～3のセンス鎖を含み、そして第2の配列は表1～3のアンチセンス配列よりなる群から選択される。表1～3に示す標的配列中の何所かをターゲットにする代替のアンチセンス剤は、標的配列及びフランキングしたEg5配列を用いながら容易に決定できる。VEGFをターゲットにする第2のdsRNAを使用する実施形態においては、そのような薬剤は実施例及び参照により本明細書に組み込まれる同時係属中の米国特許出願11/078,073及び11/340,080において例示されている。

10

【0051】

dsRNAは表1～3に示した配列の群から選択されるヌクレオチド配列少なくとも2つを含むことになる。2配列の一方は2配列のもう一方に相補的であり、配列の一方はEg5遺伝子の発現において形成されたmRNAの配列に実質的に相補である。即ち、dsRNAは2オリゴヌクレオチドを含むことになり、その場合、一方のオリゴヌクレオチドは表1～3においてセンス鎖として記載され、そして第2のオリゴヌクレオチドは表1～3においてアンチセンス鎖として記載される。

20

【0052】

当業者の知る通り、20～23、特に21塩基対のデュプレックス構造を含むdsRNAは、RNA干渉の誘導において特に有効であるものとして認められている(Elbashiriら、EMBO2001, 20:6877-6888)。しかしながら、より短い、又は長いdsRNAも同様に有効であり得ることを発見している者もある。上記した実施形態においては、表1～3に示したオリゴヌクレオチド配列の性質のために、本発明のdsRNAは最低限でも21ntの長さの鎖少なくとも1つを含むことができる。表1～3の配列の1つから一端又は両端上のヌクレオチド僅か数個を減らしたものを含むより短いdsRNAは、上記したdsRNAと比較して同様に有効であると期待することは合理的である。従って、表1～3の配列の1つに由来する少なくとも15、16、17、18、19、20以上の隣接ヌクレオチドの部分配列を含み、そして完全配列を含むdsRNAとは、5、10、15、20、25、又は30%抑制以下の分だけ、下記のFACS試験においてEg5遺伝子の発現を抑制するその能力において異なっているdsRNAは、本発明の意図するものである。表1～3に示した標的配列内で切断する別のdsRNAは、Eg5配列及び提供された標的配列を用いながら容易に作成できる。

30

【0053】

更に又、表1～3に示したRNAi剤はRNAi系の切断に感受性のEg5mRNAにおける部位を発見する。即ち、本発明は本発明の薬剤の1つによりターゲットされる配列内でターゲットにするRNAi剤を更に包含する。本明細書においては、第2のRNAi剤は第2のRNAi剤が、第1のRNAi剤のアンチセンス鎖に相補であるmRNA内の何れかの場所のメッセージを切断する場合に第1のRNAi剤の配列内でターゲットिंगすると言える。そのような第2の薬剤は一般的にEg5遺伝子における選択された配列に隣接する領域から取った、追加的ヌクレオチド配列にカップリングされた表1～3に示した配列の1つに由来する少なくとも15隣接ヌクレオチドよりなる。例えば、配列番号:1の最後の15ヌクレオチドを標的Eg5遺伝子に由来する次の6ヌクレオチドと組み合わせたものは、表1～3に示す配列の1つに基づいた21ヌクレオチドの1本鎖の

40

50

薬剤を生成する。

【0054】

本発明のdsRNAは標的配列に対してミスマッチ1つ以上を含有できる。好ましい実施形態においては、本発明のdsRNAは3つを超えるミスマッチは含有しない。dsRNAのアンチセンス鎖が標的配列に対するミスマッチを含有する場合、ミスマッチの区域は相補性の領域の中心には位置しないことが好ましい。dsRNAのアンチセンス鎖が標的配列に対するミスマッチを含有する場合、ミスマッチは各末端から5ヌクレオチド、例えば相補性領域の5'又は3'末端の何れかから5、4、3、2、又は1ヌクレオチドに制限されることが好ましい。例えば、Eg5遺伝子のある領域に相補である23ヌクレオチドのdsRNA鎖の場合、dsRNAは一般的に中央の13ヌクレオチド内には如何なるミスマッチも含有しない。本発明に記載した方法は、標的配列に対するミスマッチを含有するdsRNAがEg5遺伝子の発現を抑制する場合に有効であるかどうかを調べるために使用できる。Eg5遺伝子の発現を抑制する場合にミスマッチを有するdsRNAの薬効を考慮することは、特にEg5遺伝子の相補性の特定の領域が集団内の多形配列変動を有することが分かっている場合に、重要となる。

10

【0055】

1つの実施形態において、dsRNAの少なくとも1つの末端は1~4、一般的に1または2ヌクレオチドの1本鎖ヌクレオチドオーバーハングを有する。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はその平滑末端の対応物よりも予想外に優れた抑制特性を有する。更に又、本発明者等は、僅か1つのヌクレオチドオーバーハングの存在が、その全体的な安定性に影響することなく、dsRNAの干渉活性を強力化することを発見した。僅か1つのオーバーハングを有するdsRNAはインビボにおいて、並びに種々の細胞、細胞培養用培地、血液および血清中において特に安定であり有効であることが明らかにされた。一般的に、1本鎖オーバーハングはアンチセンス鎖の3'末端、或いはセンス鎖の3'末端に位置する。dsRNAは又、一般的にはアンチセンス鎖の5'末端に位置する平滑末端を有してよい。そのようなdsRNAは向上した安定性及び抑制活性を有するため、低い用量において、即ち一日当たりレシピエントの体重kg当たり5mg未満において、投与可能とする。一般的に、dsRNAのアンチセンス鎖は3'末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、そして5'末端は平滑である。別の実施形態においては、オーバーハングのヌクレオチド1つ以上がヌクレオシドチオホスフェートにより置き換えられている。

20

30

【0056】

更に別の実施形態においては、dsRNAは安定性を向上させるために化学的に修飾される。本発明の核酸は例えば参照により本明細書に組み込まれる「Current protocols in nucleic acid chemistry」, Beaucage, S. I. ら(編)、John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されているもののような、当該分野でよく知られている方法により合成及び／又は修飾してよい。本発明において有用な好ましいdsRNA化合物の特定の例は、修飾された骨格を含有するか、天然のヌクレオシド間連結を有さないdsRNAを包含する。本明細書において定義した通り、修飾された骨格を有するdsRNAは骨格中にリン原子を保持しているもの、及び、骨格中にリン原子を有さないものを包含する。本明細書の目的のため、そして当該分野で場合により参照される通り、自身のヌクレオシド間骨格にリン原子を有さない修飾されたdsRNAも又、オリゴヌクレオシドと見なすことができる。

40

【0057】

好ましい修飾されたdsRNA骨格は、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、メチル及び他のアルキルホスホネート、例えば3'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホロアミデート、例えば3'-アミノホスホロアミデート、及びアミノアルキルホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、チ

50

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、及び3'－5'通常連結部を有するボラノホスフェート、これらの2'－5'連結類縁体、及びヌクレオシド単位の隣接対が3'－5'～5'－3'又は2'－5'～5'－2'で連結している反転極性を有するものを包含する。種々の塩、混合塩、及び遊離の酸の形態も包含される。

【0058】

上記したリン含有連結部の製造を教示している代表的な米国特許は、限定しないが、米国特許3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,195;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,316;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;及び5,625,050を包含し、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0059】

リン原子を自身に包含しない好ましい修飾されたdsRNA骨格は、短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合型のヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間連結、又は1つ以上の短鎖ヘテロ原子又は複素環ヌクレオシド間連結により形成された骨格を有する。これらにはモルホリノ連結部を有するもの（ヌクレオシドの糖部分から部分的には形成される）；シロキサ骨格；スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格；及び混合型のN、O、S及びCH₂成分の部分を含む他のものが包含される。

20

【0060】

上記したオリゴヌクレオシドの製造を教示している代表的な米国特許は、限定しないが、米国特許5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,64,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;及び5,677,439を包含し、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0061】

他の好ましいdsRNAミメティックにおいて、ヌクレオチド単位の糖及びヌクレオシド間連結部の両方、即ち骨格が新しい基により置き換えられる。塩基単位は適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。そのようなオリゴマー化合物の1つである、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが分かっているdsRNAミメティックはペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物においては、dsRNAの糖骨格はアミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格により置き換えられる。ヌクレオ塩基は保持されており、そして骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接的に結合している。PNA化合物の製造を教示している代表的な米国特許は、限定しないが、米国特許5,539,082;5,714,331;及び5,719,262を包含し、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。PNA化合物の別の教示はNielsenら、Science, 1991, 254, 1497-1500に記載されている。

40

【0062】

本発明の最も好ましい実施形態はホスホロチオエート骨格を有するdsRNA、及びヘテロ原子骨格、そして特に上記参照した米国特許5,489,677の-CH₂-NH-

50

CH₂—、—CH₂—N(CH₃)—O—CH₂—[メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られている]、—CH₂—O—N(CH₃)—O—CH₂—、—CH₂—N(CH₃)—N(CH₃)—CH₂—、及び—N(CH₃)—CH₂—CH₂—[ここでネイティブのホスホジエステル骨格は—O—P—O—CH₂—として示される]、そして上記参照した米国特許5,602,240のアミド骨格を有するオリゴヌクレオシドである。同様に好ましいものは上記参照した米国特許5,034,506のモルホリノ骨格構造を有するdsRNAである。

【0063】

修飾されたdsRNAは又置換された糖部分1つ以上を含有してよい。好ましいdsRNAは2'位に以下のもの：即ち、OH；F；O—、S—又はN—アルキル；O—、S—又はN—アルケニル；O—、S—又はN—アルキニル；又はO—アルキル—O—アルキル、ここでアルキル、アルケニル及びアルキニルは置換又は未置換のC₁～C₁₀アルキル、又はC₂～C₁₀アルケニル及びアルキニルであるもの、の1つを含んでいる。特に好ましいものはO[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、及びO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂、ここでn及びmは1～約10であるもの、である。他の好ましいdsRNAは2'位に以下のもの：即ち、C₁～C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O—アルカリル又はO—アラルキル、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ル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、dsRNAの薬物動態特性を向上させるための基、又はdsRNAの薬力学的特性を向上させる基、及び他の同様の特性を有する置換基の1つを含んでいる。好ましい修飾は2'—メトキシエトキシ(2'—O—CH₂CH₂OCH₃、2'—O—(2—メトキシエチル)又は2'—MOEとしても知られている)(Martínら、Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486—504)、即ちアルコキシ—アルコキシ基を包含する。別の好ましい修飾は2'—ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち後述する実施例に記載の2'—DMAOEとしても知られている即ちO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、及び2'—ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該分野では2'—O—ジメチルアミノエトキシエチル又は2'—DMAEOEとしても知られている)、即ちやはり後述する実施例に記載の2'—O—CH₂—O—CH₂—N(CH₂)₂を包含する。

【0064】

他の好ましい修飾は2'—メトキシ(2'—OCH₃)、2'—アミノプロポキシ(2'—OCH₂CH₂CH₂NH₂)及び2'—フルオロ(2'—F)を包含する。同様の修飾は又dsRNAの他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上の糖の3'位上において、又は2'—5'連結dsRNA及び5'末端ヌクレオチドの5'位において行ってもよい。dsRNAは又ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖ミメティックを有してもよい。そのような修飾された糖構造の製造を教示している代表的な米国特許は、限定しないが、米国特許4,981,957；5,118,800；5,319,080；5,359,044；5,393,878；5,446,137；5,466,786；5,514,785；5,519,134；5,567,811；5,576,427；5,591,722；5,597,909；5,610,300；5,627,053；5,639,873；5,646,265；5,658,873；5,670,633；及び5,700,920を包含し、その特定の者は本出願と共通して保有されており、そしてその各々は参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0065】

dsRNAは又、ヌクレオ塩基(当該分野では単に「塩基」と称される場合が多い)の修飾又は置換を包含してよい。本明細書においては、「未修飾」又は「天然」のヌクレオ塩基はプリン塩基アデニン(A)及びグアニン(G)、及びピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を包含する。修飾されたヌクレオ塩基は他の合成及

10

20

30

40

50

び天然のヌクレオ塩基、例えば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシン、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換されたアデニン及びグアニン、5-ハロ特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換されたウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンを包含する。他のヌクレオ塩基は米国特許3,687,808に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, p. 858-859, Kroschwitz, J. L. 編、John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、Englischら、Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されているもの、及び、Sanghvi, Y. S., Chapter 15, DsRNA Research and Applications, p. 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B. 編、CRC Press, 1993に開示されているものを包含する。これらのヌクレオ塩基の特定のもの本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるために特に有用である。それらは5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6及び0-6置換プリン、例えばアミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを包含する。5-メチルシトシン置換は0.6~1.2℃まで核酸デュプレックスの安定性を増大させることが分かっており(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B 編, DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boea Raton, 1993, p. 276-278)、そして現在では、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合に尚更特に好ましい塩基置換である。

【0066】

上記した修飾されたヌクレオ塩基及び他の修飾されたヌクレオ塩基の製造を教示している代表的な米国特許は、限定しないが、上記した米国特許3,687,808、並びに各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許4,845,205;5,130,300;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121,5,596,091;5,614,617;及び5,681,941、及びやはり参照により本明細書に組み込まれる米国特許5,750,692を包含する。

【0067】

本発明のdsRNAの他の修飾はdsRNAの活性、細胞分布又は細胞取り込みを増強する部分又はコンジュゲート1つ以上をdsRNAに化学的に連結することを包含する。そのような部分は、限定しないが、脂質部分、例えばコレステロール部分(Letsinger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553-6556)、コール酸(Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、チオエーテル、例えばベリル-S-トリチルチオール(Manoharanら、Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309;Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauserら、Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えばドデカンジオール又はウンデシル残基(Saison-Behmoarasら、EMBO J., 1991, 10, 1111-1118;Kabanovら、FEBS

Lett. , 1990, 259, 327-330; Svinarchukら、Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えばジヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチル-アンモニウム1, 2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-ホスホナート(Manoharanら、Tetrahedron Lett. , 1995, 36, 3651-3654; Sheaら、Nucl. Acids Res. , 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖(Manoharanら、Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、又はアダマンタン酢酸(Manoharanら、Tetrahedron Lett. , 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分(Mishraら、Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、又はオクタデシルアミン又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ら、J. Pharmacol. Exp. Ther. , 1996, 277, 923-937)を包含する。

【0068】

そのようなdsRNAコンジュゲートの製造を教示している代表的な米国特許は、限定しないが、米国特許4, 828, 979; 4, 948, 882; 5, 218, 105; 5, 525, 465; 5, 541, 313; 5, 545, 730; 5, 552, 538; 5, 578, 717, 5, 580, 731; 5, 591, 584; 5, 109, 124; 5, 118, 802; 5, 138, 045; 5, 414, 077; 5, 486, 603; 5, 512, 439; 5, 578, 718; 5, 608, 046; 4, 587, 044; 4, 605, 735; 4, 667, 025; 4, 762, 779; 4, 789, 737; 4, 824, 941; 4, 835, 263; 4, 876, 335; 4, 904, 582; 4, 958, 013; 5, 082, 830; 5, 112, 963; 5, 214, 136; 5, 082, 830; 5, 112, 963; 5, 214, 136; 5, 245, 022; 5, 254, 469; 5, 258, 506; 5, 262, 536; 5, 272, 250; 5, 292, 873; 5, 317, 098; 5, 371, 241; 5, 391, 723; 5, 416, 203; 5, 451, 463; 5, 510, 475; 5, 512, 667; 5, 514, 785; 5, 565, 552; 5, 567, 810; 5, 574, 142; 5, 585, 481; 5, 587, 371; 5, 595, 726; 5, 597, 696; 5, 599, 923; 5, 599, 928及び5, 688, 941を包含し、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【0069】

所定の化合物のすべての位置が均一に修飾される必要はなく、そして実際は、上記した修飾の1つより多くが単一の化合物中に、又はdsRNA内の単一のヌクレオシドにおいてさえも、取り込まれてよい。本発明は又キメラ化合物であるdsRNA化合物も包含する。「キメラ」dsRNA化合物又は「キメラ」とは、本発明に関する場合、dsRNA化合物、特に、少なくとも1つの単量体単位、即ちdsRNA化合物の場合はヌクレオチドから各々が形成された化学的に別々の領域2つ以上を含有するdsRNAである。これらのdsRNAは典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する増大した耐性、増大した細胞取り込み、及び／又は標的核酸に対する増大した結合親和性をdsRNAに付与できるようにdsRNAが修飾されている領域少なくとも1つを含有する。dsRNAの別の領域はRNA:DNA又はRNA:RNAハイブリッドを切断することが可能な酵素のための基質として作用してよい。例示すればRNase HはRNA:DNAデュプレックスの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、これにより遺伝子発現のdsRNA抑制の効率を大きく増大させる。結果として、キメラdsRNAを使用する場合は、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシdsRNAと比較した場合に、より短いdsRNAで同等な結果を得ることができる場合が多い。RNA標的の切断はゲル電気泳動、及び必要に応じて当該分野で知られた関連の核酸ハイブリダイゼーション手法により定型的に検出することができる。

【0070】

特定の例においては、dsRNAは非リガンド基により修飾されてよい。多くの非リガンド分子がdsRNAの活性、細胞分布又は細胞取り込みを増大させるためにdsRNAにコンジュゲートされており、そのようなコンジュゲーションを行うための操作法は学術文献に記載されている。そのような非リガンド部分は脂質部分、例えばコレステロール（Letsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553）、コール酸（Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053）、チオエーテル、例えばヘキシルーS-トリチルチオール（Manoharanら、Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306; Manoharanら、Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765）、チオコレステロール（Oberhauser等、Nucleic Acids Res., 1992, 20, 533）、脂肪族鎖、例えばドデカンジオール又はウンデシル残基（Saison-Behmoaras等、EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanovら、FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchukら、Biochimie, 1993, 75:49）、リン脂質、例えばジヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチルアンモニウム1,2-ジオ-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-H-ホスホナート（Manoharanら、Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Sheaら、Nucleic Acids Res., 1990, 18:3777）、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖（Manoharanら、Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969）、又はアダマンタン酢酸（Manoharanら、Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651）、パルミチル部分（Mishraら、Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229）、又はオクタデシルアミン又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等、J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923）を包含する。そのようなdsRNAコンジュゲートの製造を教示している代表的な米国特許は上記した通りである。典型的なコンジュゲーションプロトコルでは配列の位置1つ以上においてアミノリンカーを担持しているdsRNAの合成を行う。次にアミノ基を適切なカップリング又は活性化試薬を用いてコンジュゲートされた分子と反応させる。コンジュゲーション反応は固体支持体になお結合しているdsRNAを用いるか、又は溶液相におけるdsRNAの切断の後に実施してよい。HPLCによるdsRNAコンジュゲートの精製は典型的には純粋なコンジュゲートを与える。

【0071】

ベクターコードRNAi剤

本発明のdsRNAは又インビボの細胞内で組み換えウィルスベクターから発現させることができる。本発明の組み換えウィルスベクターは本発明のdsRNAをコードする配列及びdsRNA配列を発現するための何れかの適当なプロモーターを含む。適当なプロモーターは例えばU6又はH1RNA pol IIIプロモーター配列及びサイトメガロウィルスプロモーターを包含する。他の適当なプロモーターの選択は当該分野の技術の範囲内である。本発明の組み換えウィルスベクターは又特定の組織において、又は特定の細胞内環境においてdsRNAの発現のための誘導又は調節可能なプロモーターを含むことができる。インビボで細胞に本発明のdsRNAを送達するための組み換えウィルスベクターの使用は後により詳細に考察する。

【0072】

本発明のdsRNAは2つの別個の相補のRNA分子として、又は、2つの相補領域を有する単一のRNA分子として、組み換えウィルスベクターから発現させることができる。

【0073】

発現すべきdsRNA分子のためのコーディング配列を受容することができる何れかのウィルスベクターを使用することができ、例えば、アデノウィルス（AV）、アデノ関連

ウィルス（AAV）；レトロウィルス（例えばレンチウィルス（LV）、ラブドウィルス、ネズミ白血病ウィルス）；ヘルペスウィルス等から誘導したベクターが挙げられる。ウィルスベクターの向性は、エンベロープ蛋白又は他のウィルス由来の他の表面抗原を用いてベクターを偽型化することにより、又は、異なるウィルスカプシド蛋白で適切に置換することにより、修飾できる。

【0074】

例えば本発明のレンチウィルスベクターは水疱性口内炎ウィルス（VSV）、狂犬病、エボラ、モコラなどに由来する表面蛋白を用いて偽型化できる。本発明のAAVベクターは異なるカプシド蛋白血清型を発現するようにベクターを操作することにより異なる細胞をターゲティングするように作成できる。例えば血清型2ゲノム上に血清型2カプシドを発現するAAVベクターはAAV2/2と称される。AAV2/2ベクターにおけるこの血清型2カプシド遺伝子を血清型5カプシド遺伝子で置き換えることによりAAV2/5ベクターを作成できる。異なるカプシド蛋白血清型を発現するAAVベクターを構築するための手法は当該分野の技術の範囲内であり；例えば参照により全体が本明細書に組み込まれる（Rabinowitz J Eら（2002）、J Virol 76：791-801）を参照されたい。

10

【0075】

本発明における使用に適する組み換えウィルスベクターの選択、ベクター内にdsRNAを発現させるための核酸配列を挿入するための方法、及び目的の細胞にウィルスベクターを送達する方法は当該分野の技術の範囲内である。例えば参照により開示全体が本明細書に組み込まれる、Domburg R（1995）、Gene Therap. 2：301-310；Eglitis M A（1988）、Biotechniques 6：608-614；Miller A D（1990）、Hum Gene Therap. 1：5-14；Anderson W F（1998）、Nature 392：25-30；及びRubinson D Aら、Nat. Genet. 33：401-406を参照されたい。

20

【0076】

好ましいウィルスベクターはAVおよびAAVから誘導されたものである。特に好ましい実施形態においては、本発明のdsRNAは、例えばU6又はH1RNAプロモーター又はサイトメガロウィルス（CMV）プロモーターのいずれかを含む組み換えAAVベクターから2つの別個の相補の1本鎖RNA分子として発現される。

30

【0077】

本発明のdsRNAを発現するための適当なAVベクター、組み換えAVベクターを構築するための方法、及び標的細胞内にベクターを送達するための方法は、Xia Hら（2002）、Nat. Biotech. 20：1006-1010に記載されている。

【0078】

本発明のdsRNAを発現するための適当なAAVベクター、組み換えAVベクターを構築するための方法、及び標的細胞内にベクターを送達するための方法は、参照により開示全体が本明細書に組み込まれるSamulski Rら、（1987）、J. Virol. 61：3096-3101；Fisher K Jら、（1996）、J. Virol. 70：520-532；Samulski Rら、（1989）、J. Virol. 63：3822-3826；米国特許5, 252, 479；米国特許5, 139, 941；国際特許出願WO 94/13788；及び国際特許出願WO 93/24641に記載されている。

40

【0079】

III. dsRNAを含む医薬組成物

1つの実施形態において、本発明は本明細書に記載したdsRNA及び製薬上許容しうる担体を含む医薬組成物を提供する。dsRNAを含む医薬組成物はEg5遺伝子の発現又は活性の関連する疾患又は障害、例えばEg5発現により媒介される病理学的プロセスを治療するために有用である。そのような医薬組成物は送達の様式に基づいて製剤する。

50

一例は非経口送達を介した全身投与のために製剤される組成物である。

【0080】

別の実施形態においては、そのような組成物は更に VEGF 発現を抑制する第 2 の dsRNA を含む。VEGF に指向された dsRNA は実施例及び同時係属中の米国特許出願 11/078, 073 及び 11/340, 080 に記載されている。

【0081】

本発明の医薬組成物は E g 5 遺伝子の発現（及び第 2 の dsRNA を包含させる場合は VEGF 発現）を抑制するために十分な用量で投与される。一般的に、dsRNA の適当な用量は一日当たりレシピエントの体重キログラム当たり 0.01～5.0 ミリグラムの範囲、一般的に一日当たり体重キログラム当たり 1 マイクログラム～1 mg の範囲となる。医薬組成物は 1 日 1 回投与してよく、或いは、dsRNA は一日に渡って適切な間隔において 2、3 又はそれより多いサブ用量として、更には、連続注入又は制御放出製剤を介した送達を用いながら、投与してよい。そのような場合、各サブ用量に含有される dsRNA は総量の日当たり投薬量を達成するためには相応により少量となるはずである。投薬単位は、例えば数日間の期間に渡って dsRNA の持続放出をもたらす従来の持続放出製剤を用いながら、数日間に渡る送達のために調整することができる。持続放出製剤は当該分野でよく知られており、そして、例えば本発明の薬剤と共に使用される場合のように、特定の部位における薬剤の送達のために特に有用である。本実施形態においては、投薬単位は一日当たり用量の相当する倍数量を含有する。

【0082】

当業者の知る通り、特定の要因、例えば限定しないが、疾患又は障害の重症度、以前の治療、対象の全身健康状態及び／又は年齢、及び存在する他の疾患が、対象を効果的に治療するために必要な用量及び時期に影響する。更に又、組成物の治療有効量を用いた対象の治療は単回の治療又は一連の治療を包含できる。本発明に含まれる個々の dsRNA に関する有効用量及びインビボの半減期の推定は、従来の方法を用いて、又は、適切な動物モデルを用いたインビボの試験に基づいて、本明細書の何れかの個所に記載した通り行うことができる。

【0083】

マウス遺伝子学の進歩は種々のヒトの疾患、例えば E g 5 発現により媒介される病理学的プロセスの研究のための多くのマウスモデルを発生させている。そのようなモデルは dsRNA のインビボの試験のため、並びに、治療有効量を決定するために使用される。

【0084】

本発明は又本発明の dsRNA 化合物を包含する医薬組成物及び製剤を包含する。本発明の医薬組成物は局所又は全身治療の何れが望まれるかに応じて、そして治療すべき箇所に応じて、多くの態様において投与してよい。投与は局所、肺、例えば粉末又はエアロゾルの吸入又は通気により、例えばネブライザーにより；気管内、鼻内、上皮及び経皮、経口又は非経口であってよい。非経口投与は静脈内、動脈内、皮下、腹腔内又は筋肉内注射又は注入；又は頭蓋内、例えば髄腔内又は脳室内投与を包含する。

【0085】

局所投与用の医薬組成物及び製剤は経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、座薬、スプレー、液体及び粉末を包含してよい。従来の薬学的担体、水性、粉末又は油性の基剤、増粘剤等が必要又は望ましい場合がある。コーティングされたコンドーム剤、グローブ剤等も有用である。好ましい局所用製剤は本発明の dsRNA が局所用送達剤、例えば脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート形成剤および界面活性剤との添加混合物となっているものを包含する。好ましい脂質及びリポソームは中性（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 トイルホスファチジルコリン D M P C、ジステアロリルホスファチジルコリン）陰性（例えばジミリス トイルホスファチジルグリセロール D M P C）及びカチオン性（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 及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）を包含する。本発明の dsRNA はリポソーム内にカプセル化し

てよく、或いは、それとの、特にカチオン性リポソームとの複合体を形成してよい。或いはdsRNAは脂質、特にカチオン性脂質との複合体を形成してよい。好ましい脂肪酸及びエステルは限定しないが、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウリン、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、又はC₁₋₁₀アルキルエステル（例えばイソプロピルミリステートIPM）、モノグリセリド、ジグリセリド又はその製薬上許容しうる塩を包含する。局所用製剤は、参照により全体が本明細書に組み込まれる1999年5月20日出願の米国特許出願09/315,298において詳細に説明されている。

10

【0086】

経口投与のための組成物及び製剤は粉末又は顆粒、微粒子、ナノ粒子、水又は非水性の媒体中の懸濁液又は溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシェ剤、錠剤又はミニ錠剤を包含する。増粘剤、フレーバー剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤又は結合剤が望ましい場合がある。好ましい経口用製剤は、浸透性増強界面活性剤及びキレート形成剤の1つ以上と組み合わせて本発明のdsRNAを投与するものである。好ましい界面活性剤は脂肪酸及び/又はそのエステル又は塩、胆汁酸及び/又はその塩を包含する。好ましい胆汁酸/塩はケノデオキシコール酸(CDCA)及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、ナトリウムタウロー24,25-ジヒドロフシデート、及びナトリウムグリコジヒドロフシデートを包含する。好ましい脂肪酸はアラキドン酸、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、モノグリセリド、ジグリセリド又はその製薬上許容しうる塩（例えば、ナトリウム）を包含する。同様に好ましいものは浸透性増強剤の組み合わせ、例えば胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩である。特に好ましい組み合わせはラウリン酸のナトリウム塩、カプリン酸、及びUDCAである。その他の浸透性増強剤はポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルを包含する。本発明のdsRNAは顆粒形態、例えば噴霧乾燥粒子中で経口送達してよく、或いは、複合体化してマイクロ又はナノ粒子を形成してよい。dsRNA複合体化剤はポリアミノ酸；ポリイミン；ポリアクリレート；ポリアルキルアクリレート、ポリオキセタン、ポリアルキルシアノアクリレート；カチオン化ゼラチン、アルブミン、澱粉、アクリレート、ポリエチレングリコール類(PEG)及び澱粉；ポリアルキルシアノアクリレート；DEAE誘導ポリイミン、プルラン、セルロース及び澱粉を包含する。特に好ましい複合体化剤は、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスベルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレンP(TDAE)、ポリアミノスチレン（例えばp-アミノ）、ポリ(メチルシアノアクリレート)、ポリ(エチルシアノアクリレート)、ポリ(ブチルシアノアクリレート)、ポリ(イソブチルシアノアクリレート)、ポリ(イソヘキシルシアノアクリレート)、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-アルブミン及びDEAE-デキストラン、ポリメチルアクリレート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ(D,L-ラクト酸)、ポリ(D,L-ラクト-コグリコール酸(PLGA)、アルギネート、及びポリエチレングリコール(PEG)を包含する。dsRNAの経口用製剤及びその製造は、各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願08/886,829(1997年7月1日出願)、09/108,673(1998年7月1日出願)、09/256,515(1999年2月23日出願)、09/082,624(1998年5月21日出願)、及び09/315,298(1999年5月20日出願)に詳細に記載されている。

20

30

40

50

【0087】

非経口、髄腔内、脳室内又は肝臓内の投与のための組成物及び製剤は、緩衝剤、希釈剤および他の適当な添加剤、例えば限定しないが、透過性増強剤、担体化合物及び他の製薬上許容しうる担体又は賦形剤も含有してよい滅菌された水溶液を包含してよい。

【0088】

本発明の医薬組成物は限定しないが、溶液、乳液及びリポソーム含有製剤を包含する。これらの組成物は種々の成分、例えば限定しないが、予め作成された液体、自己乳化型固体及び自己乳化型半固体から形成してよい。特に好ましいものは肝臓癌のような肝臓障害を治療する場合に肝臓をターゲティングする製剤である。

【0089】

単位剤型で好都合に提示してよい本発明の医薬品製剤は医薬品産業においてよく知られた従来の手法に従って製造してよい。そのような手法は製薬上許容しうる担体又は賦形剤と活性成分を会合させる工程を包含する。一般的に製剤は、液体担体又は微細分割固体担体又は両方を活性成分と均一及び緊密に会合させること、そして次に必要に応じて製品を形状化することにより製造される。

【0090】

本発明の組成物は多くの可能な剤型の何れか、例えば限定しないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトジェル、座薬及び浣腸剤に製剤してよい。本発明の組成物は又、水性、非水性又は混合媒体中の懸濁液として製剤してよい。水性懸濁液は更に、懸濁液の粘度を増大させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソ

【0091】

乳液

本発明の組成物は乳液として調製及び製剤してよい。乳液は典型的には1つの液体がもう1つの中に、通常は直径0.1 μm 超の液滴の形態において分散した不均質な系である (Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199; Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Volume 1, p. 245; Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 2, p. 335; Higuchiら, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301)。乳液は相互に緊密に混合され分散し合った2つの非混和性の液相を含む二相系である場合が多い。一般的に乳液は油中水 (w/o) 又は水中油 (o/w) の種類の何れかであってよい。塊状の油相内に微小な液滴として水相を細密分割して分散させる場合、得られる組成物は油中水 (w/o) 乳液と称される。或いは塊状の水相内に微小な液滴として油相を細密分割して分散させる場合、得られる組成物は水中油 (o/w) 乳液と称される。乳液は分散相、及び水相、油相の何れかの溶液として、又は自身別個の相として存在してよい活性薬に加えて、追加的な成分を含有してよい。乳化剤、安定化剤、染料及び抗酸化剤のような医薬品賦形剤も又、必要に応じて乳液中に存在してよい。医薬品乳液は例えば油中水中油 (o/w/o) 及び水中油中水 (w/o/w) 乳液の場合のように2相より多くを含む多重乳液であってもよい。そのような複雑な製剤は単なる二元の乳液が与えない特定の利点を与える場合が多い。o/w乳液の個々の油液滴が小水滴を封入している多重乳液はw/o/w乳液を構成する。同様に、油性の連続相中に安定化された水の小球内に封入された油液滴の系はo/w/o乳液を与える。

10

20

30

40

50

【0092】

乳液は熱力学的安定性が殆ど又は全くないことを特徴とする。頻繁には乳液の分散又は不連続の相は外部又は連続相の内部に十分分散され、そして乳化剤又は製剤の粘度という手段を介してその形態に維持される。乳液の相の何れかは乳液型の軟膏基剤及びクリームの場合のように、半固体又は固体であってよい。乳液を安定化するための他の手段は乳液の何れかの相内に取り込まれてよい乳化剤の使用を包含する。乳化剤は大きくは以下の4カテゴリー、即ち合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収基剤、及び微細分散固体に分類してよい (Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199)。

10

【0093】

表面活性物質としても知られている合成の界面活性剤は乳液製剤において広範な用途を有しており、そして文献でも考察されている (Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, volume 1, p. 199)。界面活性剤は典型的には両親媒性であり、親水性及び疎水性の部分を含む。界面活性剤の親水性の疎水性に対する比は親水性／親油性バランス (HLB) と称されており、そして製剤の製造における界面活性剤を分類及び選択する場合の価値ある手段となっている。界面活性剤は親水性の基の性質に基づいて異なるクラス：即ちノニオン性、アニオン性、カチオン性及び両性に分類される (Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 285)。

20

【0094】

乳液製剤中で使用される天然に存在する乳化剤はラノリン、蜜蝋、ホスファチド、レシチン及びアカシアを包含する。吸収基剤は、それらが水を吸収してw/o乳液を形成することができるが、なお半固体のコンシステンシーを保持するような親水性を保有しており、例えば無水ラノリン及び親水性のワセリンが挙げられる。微細分割固体も又、良好な乳化剤として、特に界面活性剤と組み合わせて、そして粘稠な調製品中において使用されている。これらには極性の無機固体、例えば重金属の水酸化物、非膨潤性の粘土、例えばベントナイト、アタプルガイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウム、及びコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウム、顔料及び非極性の固体、例えば炭素又はトリステアリン酸グリセリルが包含される。

30

【0095】

広範な種類の非乳化性物質も又、乳液製剤中に包含され、乳液の性質に寄与する。これらには脂肪、油脂、ワックス、脂肪酸、脂肪族アルコール、脂肪族エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存料及び抗酸化剤が包含される (Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199)。

40

【0096】

親水性コロイド、即ちヒドロコロイドは天然に存在するガム類、及び合成の重合体、例えば多糖類 (例えばアカシア、寒天、アルギン酸、カラギーナン、グアガム、カラヤガム

50

、及びトラガカント）、セルロース誘導体（例えばカルボキシメチルセルロース、及びカルボキシプロピルセルロース）、及び合成重合体（例えばカーボマー、セルロースエーテル及びカルボキシビニル重合体）を包含する。これらが水中で分散又は膨潤することによりコロイド状溶液を形成し、これは分散相の液滴の周囲に強力な界面フィルムを形成することにより、そして、外部の相の粘度を増大させることにより、乳液を安定化させる。

【0097】

乳液は頻繁には微生物の生育を容易に支援し得る炭水化物、蛋白、ステロール及びホスファチドのような多くの成分を含有するため、これらの製剤には保存料を配合する場合が多い。乳液製剤中に一般的に使用されている保存料はメチルパラベン、プロピルパラベン、第4級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、及びホウ酸を包含する。抗酸化剤も又、乳液製剤の劣化を防止するために製剤中に一般的に添加される。使用される抗酸化剤はフリーラジカルスカベンジャー、例えばトコフェロール、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、又は還元剤、例えばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム、及び抗酸化剤相乗作用物質、例えばクエン酸、酒石酸及びレシチンであってよい。

【0098】

皮膚科用、口腔及び非経口の経路を介した乳液製剤の適用及びそれらの製造方法は文献において考察されている（Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199）。経口送達用の乳液製剤は製剤が容易であること、並びに吸収及び生体利用性の見地からの効能のために、極めて広範に使用されている（Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Volume 1, p. 245; Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 199）。鉱物油の緩下剤、脂溶性ビタミン、及び高脂肪栄養調製品が、一般的にo/w乳液として経口投与される物質として挙げられる。

【0099】

本発明の1つの実施形態において、dsRNA及び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光学的等方性であり熱力学的に安定な液体溶液である水、油及び両親媒性の系として定義される場合がある（Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Volume 1, p. 245）。典型的には、マイクロエマルジョンは、先ず水性の界面活性剤溶液中に油脂を分散させ、そして次に第4の成分、一般的には中鎖長のアルコールの十分な量を添加して透明な系を形成することにより製造される。従って、マイクロエマルジョンは表面活性の分子の界面フィルムにより安定化されている2つの非混和性の液体の熱力学的に安定で、等方性的には透明な分散体としても説明されている（Leung and Shah, Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., 編, 1989, VCH Publishers, New York, p185-215）。マイクロエマルジョンは一般的に油脂、水、界面活性剤、共界面活性剤及び電解質を包含する3～5種の成分の組み合わせを介して製造される。マイクロエマルジョンが油中水(w/o)又は水中油(w/o)の型の何れであるかは、使用される油脂及び界面活性剤の特性に応じて、そして、界面活性剤分子の極性のヘッド部及び炭化水素のテール部の構造及び幾何学的充填状態に応じて決定される（Schott, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mac

10

20

30

40

50

k Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0100】

相ダイアグラムを利用した現象学的なアプローチが広汎に研究されており、そしてどのようにしてマイクロエマルジョンを製剤するかに関する当該分野の包括的知見が得られている (Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245; Block, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 335)。従来の乳液と比較して、マイクロエマルジョンは自発的に形成される熱力学的に安定な液滴の製剤において水不溶性の薬剤を可溶化することの利点を与えるものである。

【0101】

マイクロエマルジョンの調製品において使用される界面活性剤は、限定しないが、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、ポリグリコール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート (ML310)、テトラグリセロールモノオレエート (MO310)、ヘキサグリセロールモノオレエート (PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート (PO500)、デカグリセロールモノカプレート (MCA750)、デカグリセロールモノオレエート (MO750)、デカグリセロールセキオレエート (SO750)、デカグリセロールデカオレエート (DAO750) を包含し、単独又は共界面活性剤と組み合わせて使用される。共界面活性剤、通常は短鎖アルコール、例えばエタノール、1-プロパノール、及び1-ブタノール等は界面活性剤のフィルムを貫通して結果的には界面活性剤分子内に形成された空隙により無秩序化されたフィルムを生じさせることにより、界面の流動性を増大させる作用を有する。しかしながらマイクロエマルジョンは共界面活性剤を使用することなく製造してよく、そしてアルコール非含有自己乳化型マイクロエマルジョン系は当該分野で知られている。水相は典型的には、限定しないが、水、薬剤の水溶液、グリセロール、PEG 300、PEG 400、ポリグリセロール、プロピレングリコール及びエチレングリコールの誘導体であってよい。油相は、限定しないが、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8-C12) モノ、ジ、及びトリグリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪族アルコール、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、植物油及びシリコンオイルを包含してよい。

【0102】

マイクロエマルジョンは薬剤可溶化及び薬剤の増強された吸収の観点から特に有利である。脂質系のマイクロエマルジョン (o/w 及び w/o の両方) がペプチドを包含する薬剤の経口生体利用性を増強することが提案されている (Constantinidesら、Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205)。マイクロエマルジョンは進歩した薬剤の可溶化、酵素的加水分解からの薬剤の保護、膜の流動性及び透過性における界面活性剤誘導改編に起因する薬剤吸収の増強の可能性、製造の容易さ、固体剤型よりも経口投与が容易であること、向上した臨床的効能、及び低下した毒性という利点を与える (Constantinidesら、Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Hoら、J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143)。マイクロエマルジョンはその成分が周囲温度において混合された場合に自発的に形成される場合が多い。このことは熱不安定性の薬剤、ペプチド又は dsRNA を製剤する場合に特に好都合となる。マイクロエマルジョンは又化粧品及び医薬品の用途の両方において活性化化合物の経皮送達において有効とされている。本発明のマイクロエマルジョン組成物及び製剤は胃腸管からの dsRNA 及び核酸の増大した全身吸収を促進し、同時に、dsRNA 及び核

酸の局所的細胞取り込みも向上させることが期待される。

【0103】

本発明のマイクロエマルジョンは又、追加的な成分及び添加剤、例えばソルビタンモノステアレート (Grill3)、Labrasol及び浸透性増強剤を含有することにより製剤の特性を向上させたり、本発明のdsRNA及び核酸の吸収を増強してよい。本発明のマイクロエマルジョンにおいて使用される浸透性増強剤は5種の広範なカテゴリー：即ち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート形成剤、及び非キレート形成性非界面活性剤のうちの1つに属するものとして分類してよい (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。これらのクラスの各々は上記考察した通りである。

10

【0104】

リポソーム

薬剤の製剤のために研究及び使用されているマイクロエマルジョン以外の多くの組織化された界面活性剤の構造が存在する。これらには単層、ミセル、2相及び小胞が包含される。小胞、例えばリポソームは薬剤送達の見地から、それらの特異性及びそれらが示す作用持続時間のために、多大な関心を持たれている。本発明において使用する場合は、「リポソーム」という用語は球状の2相内に配置された両親媒性の脂質を含む小胞を意味する。

【0105】

リポソームは単層又は多層の小胞であり、親油性物質から形成された膜及び水性の内部を有する。水性の部分は送達すべき組成物を含有する。カチオン性リポソームは細胞壁に融合することができるという利点を保有している。非カチオン性リポソームは細胞壁に効率的に融合できないがインビボでマクロファージにより取り込まれる。

20

【0106】

未損傷の哺乳類の皮膚を通過するためには、脂質小胞は適当な経皮勾配の影響下に各々50nm未満の直径の一連の微小な細孔を通過することが必要である。従って、高度に変形可能であり、このような微小な細孔を通過できるリポソームを使用することが望ましい。

【0107】

リポソームの他の利点として、天然のリン脂質から得られたリポソームは生体適合性及び生体分解性であり；リポソームは広範な種類の水溶性及び脂溶性薬剤を取り込むことができ；リポソームはその内部のコンパートメント中にカプセル化された薬剤を代謝及び分解から保護することができる (Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (編), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の製造における注意事項は脂質表面の電荷、小胞の大きさ及びリポソームの水性の容量である。

30

【0108】

リポソームは作用部位への活性成分の転移及び送達のために有用である。リポソーム膜は構造的に生体膜と同様であるため、リポソームを組織に適用すると、リポソームは細胞膜に併合し始め、そしてリポソームと細胞の併合が進行するに従って、リポソームの内容物は細胞内に吐出され、そこで活性剤が作用できるようになる。

40

【0109】

リポソーム製剤は多くの薬剤の送達の様式として広範な研究の対象となっている。局所投与の場合、リポソームは他の製剤よりも有利な点を幾つか呈することを示す証拠が増えつつある。そのような利点は、投与された薬剤の高い全身吸収に関連する副作用の低減、所望の標的における投与された薬剤の蓄積の増大、及び皮膚内に親水性及び疎水性の両方の種々の薬剤を投与する能力を包含する。

【0110】

数文献が皮膚内に高分子量DNAを包含する薬剤を送達するリポソームの能力を詳述し

50

ている。鎮痛剤、抗体、ホルモン及び高分子量DNAを包含する化合物が皮膚に投与されている。適用の大多数は上部表皮のターゲティングをもたらしている。

【0111】

リポソームは概ね2種類に分類される。カチオン性リポソームは負荷電のDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成する正荷電のリポソームである。正荷電DNA／リポソーム複合体は負荷電の細胞表面に結合し、エンドソーム内に内在化される。エンドソーム内は酸性pHであるため、リポソームは破壊され、その内容物を細胞の細胞質内に放出する(Wangら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985)。

【0112】

pH感受性又は負荷電のリポソームはDNAと複合体形成するよりもむしろDNAを捕獲する。DNA及び脂質の両方が同様に荷電するため、複合体形成よりもむしろ反発が生じる。しかしなお一部のDNAはこれらのリポソームの水性の内部に捕獲される。pH感受性リポソームは培養物中の細胞単層にチミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを送達するために使用されている。外因性遺伝子の発現が標的細胞において検出されている(Zhouら、Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。

【0113】

他の主要なリポソーム組成物は天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質を包含する。例えば中性のリポソーム組成物はジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)又はジパルミチルホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は一般的に、ジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成されるが、アニオン性融合誘導性リポソームは主にジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から形成される。別の型のリポソーム組成物はホスファチジルコリン(PC)、例えば大豆PC及び卵PCから形成される。別の型はリン脂質及び／又はホスファチジルコリン及び／又はコレステロールの混合物から形成される。

【0114】

いくつかの試験が皮膚へのリポソーム薬剤製剤の局所送達を評価している。モルモット皮膚へのインターフェロン含有リポソームの適用は皮膚ヘルペスの炎症を低減させたのに対し、他の手段(例えば溶液又は乳液)を介したインターフェロンの送達は無効であった(Weinerら、Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410)。更に又、別の試験が水性の系を用いたインターフェロンの投与に対して、リポソーム製剤の部分として投与されるインターフェロンの効果を試験しており、その結果、リポソーム製剤は水性の投与より優れていた(duplessisら、Antiviral Research, 1992, 18, 259-265)。

【0115】

非イオン性リポソーム系は又、特に非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系において、皮膚への薬剤の送達におけるそれらの有用性を測定するために検討されている。NovasomeTM I (グリセリルジラウレート／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)及びNovasomeTM II (グリセリルジステアレート／コレステロール／ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル)を含む非イオン性リポソーム製剤はマウス皮膚の真皮にシクロスポリンAを送達するために使用されている。結果によれば、このような非イオン性リポソーム系は皮膚の種々の層内へのシクロスポリンAの付着を促進する場合に有効であることがわかった(Huら、S. T. P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

【0116】

リポソームは又本明細書においてはリポソーム内に取り込まれた場合に特殊化された脂質を欠いているリポソームと相対比較して増強された循環系中寿命を与えるそのような特殊化された脂質1つ以上を含むリポソームを指す用語である、「立体的に安定化された」リポソームも包含する。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞形成

10

20

30

40

50

性脂質部分の一部が(A)モノシアログングリオシド G_{M1} のような糖脂質1つ以上を含む、又は(B)ポリエチレングリコール(PEG)部分のような親水性重合体1つ以上で誘導体化されているものである。如何なる特定の理論にも制約されないが、当該分野においては、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン又はPEG誘導体化脂質を含有する立体的に安定化されたりポソームのためには、これらの立体的に安定化されたりポソームの増強された循環系中半減期は網内皮細胞系(RES)の細胞への低減された取り込みに起因していると考えられている(Allenら、FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wuら、Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

【0117】

糖脂質1つ以上を含む種々のリポソームが当該分野で知られている。Papahadjopoulosら(Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)はリポソームの血中半減期を向上させるモノシアログングリオシド G_{M1} 、ガラクトセレブロシドスルフェート及びホスファチジルイノシトールの能力を報告している。これらの発見は、Gabizonらによって詳説されている(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988, 85, 6949)。ともにAllenらへの米国特許4, 837, 028及びWO88/04924は(1)スフィンゴミエリン及び(2)ガングリオシド G_{M1} 又はガラクトセレブロシドスルフェートエステルを含むリポソームを開示している。米国特許5, 543, 152(Webbら)はスフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。1, 2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含むリポソームがWO97/13499(Limら)において開示されている。

【0118】

親水性重合体1つ以上で誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム及びその製造方法が当該分野で知られている。Sunamotoら(Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778)はPEG部分を含有する非イオン性洗剤 $2C_{12}15G$ を含むリポソームを記載している。Illumら(FEBS Lett., 1984, 167, 79)は重合体グリコールによるポリスチレン粒子の親水性コーティングが有意に増強された血中半減期をもたらすことを記載している。ポリアルキレングリコール(例えばPEG)のカルボキシル基の結合により修飾された合成リン脂質がSears(米国特許4, 426, 330及び4, 534, 899)により記載されている。Klibanovら(FEBS Lett., 1990, 268, 235)はPEG又はPEGステアレートで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン(PE)を含むリポソームが血中循環系半減期の有意な増大を有することを示す実験を記載している。Blumeら(Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91)はそのような観察結果を他のPEG誘導体化リン脂質、例えばジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)及びPEGの組み合わせから形成したDSPE-PEGに延長している。自身の外部表面に共有結合PEG部分を有するリポソームがFisherへの欧州特許EP0445131B1及びWO90/04384に記載されている。PEGにより誘導体化されたPE1~20モルパーセントを含有するリポソーム組成物及びその使用方法がWoodleら(米国特許5, 013, 556及び5, 356, 633)及びMartinら(米国特許5, 213, 804及び欧州特許EP0496813B1)に記載されている。他の脂質重合体コンジュゲートの多くを含むリポソームはWO91/05545及び米国特許5, 225, 212(共にMartinら)及びWO94/20073(Zalipskyら)に開示されている。PEG修飾セラミド脂質を含むリポソームがWO96/10391(Choiら)に記載されている。米国特許5, 540, 935(Miyazakiら)及び5, 556, 948(Tagawaら)は自身の表面上の機能的部分で更に誘導体化することができるPEG含有リポソームを記載している。

【0119】

核酸を含むリポソームの限定された数は当該分野で周知である。Thierryらへの

10

20

30

40

50

WO 96/40062 はリポソーム内に高分子量核酸をカプセル化するための方法を開示している。Tagawa らへの US 5, 264, 221 は蛋白結合リポソームを開示しており、そしてそのようなリポソームの内容物は dsRNA を包含してよいことを明示している。Rahman らへの米国特許 5, 665, 710 はリポソーム内にオリゴデオキシヌクレオチドをカプセル化する特定の方法を記載している。Love らへの WO 97/04787 は raf 遺伝子にターゲティングされた dsRNA を含むリポソームを開示している。

【0120】

トランスフェルソーム (transfersome) は別の型のリポソームであり、そして薬剤送達ビヒクルの興味深い候補である高度に変形可能な脂質凝集塊である。トランスフェルソームは液滴よりも小型である細孔を容易に通過できるほど高度に変形可能な脂質液滴として説明することができる。トランスフェルソームはそれらが使用される環境に適合することができ、例えばそれらは自己最適化 (皮膚中の細孔の形状に適合できる)、自己修復性であり、頻繁にはフラグメント化することなくその標的に到達し、そして自己積載性である場合が多い。トランスフェルソームを作成するためには標準的なリポソーム組成物に通常は界面活性剤である表面端部活性化剤を添加することが可能である。トランスフェルソームは皮膚への血清アルブミンの送達のために使用されている。血清アルブミンのトランスフェルソーム媒介送達は血清アルブミンを含有する溶液の皮下注射として有効であることがわかっている。

【0121】

界面活性剤は乳液 (マイクロエマルジョンを含む) 及びリポソームのような製剤において広範な用途を有する。天然及び合成の両方の界面活性剤の多くの異なる型の特性を分類及び順位付けする最も一般的な方法は親水性/親油性バランス (HLB) の使用による。親水性の基 (「ヘッド部」としても知られている) の性質は製剤中に使用される種々の界面活性剤を分類するもっとも有用な手段を提供する (Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285)。

【0122】

界面活性剤分子をイオン化しない場合は、それは非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は医薬品及び化粧品中に広範な用途を有し、そして広範な範囲の pH 値に渡って使用可能である。一般的に、それらの HLB 値はそれらの構造に従って 2 ~ 約 18 の範囲となる。非イオン性界面活性剤は非イオン性エステル、例えばエチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、及びエトキシ化エステルを包含する。非イオン性のアルカノールアミド及びエーテル、例えば脂肪族アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、及びエトキシ化/プロポキシ化ブロック重合体も又、このクラスに包含される。ポリオキシエチレン界面活性剤は非イオン性界面活性剤クラスの最も良く知られたメンバーである。

【0123】

界面活性剤分子が水中に溶解又は分散されると負電荷を担持する場合、界面活性剤はアニオン性と分類される。アニオン性界面活性剤は、カルボキシレート、例えば石鹸、アシルラクチレート、アミノ酸のアシルアミド、硫酸のエステル、例えばアルキルスルフェートおよびエトキシ化アルキルスルフェート、スルホネート、例えばアルキルベンゼンスルホネート、アシルイセチオネート、アシルタウレートおよびスルホスクシネート及びホスフェートを包含する。アニオン性界面活性剤クラスの最も重要なメンバーはアルキルスルフェート及び石鹸である。

【0124】

界面活性剤分子が水中に溶解又は分散されると正電荷を担持する場合、界面活性剤はカチオン性と分類される。カチオン性界面活性剤は、第 4 級アンモニウム塩及びエトキシ化アミンを包含する。第 4 級アンモニウム塩はこのクラスの最も使用されているメンバー

である。

【0125】

界面活性剤分子が正電荷又は負電荷の何れかを担持する能力を有する場合、界面活性剤は両親媒性に分類される。両親媒性界面活性剤はアクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタイン及びホスファチドを包含する。

【0126】

薬剤製品、製剤中、及び乳液中の界面活性剤の使用は検討されている (Rieger, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, p. 285)。

【0127】

浸透性増強剤

1つの実施形態において、本発明は動物の皮膚への核酸、特にdsRNAの効率的送達を行うために種々の浸透性増強剤を使用する。大部分の薬剤はイオン化又は非イオン化の形態の両方において溶液中に存在する。しかしながら、通常は脂溶性又は親油性の薬剤のみが容易に細胞膜を通過できる。非親油性の薬剤であっても、通過すべき膜が浸透性増強剤で処理されていれば、細胞膜を通過する場合があることがわかっている。細胞膜を通過する非親油性薬剤の拡散を支援することに加えて、浸透性増強剤は親油性薬剤の透過性も増強する。

【0128】

浸透性増強剤は5種の広範なカテゴリー、即ち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート形成剤、及び非キレート形成性非界面活性剤のうちの1つに属するものとして分類してよい (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。浸透性増強剤の上記クラスの各々は以下により詳細に考察する。

【0129】

界面活性剤：本発明との関連においては、界面活性剤 (又は「表面活性剤」) は水溶液中に溶解した場合溶液の表面張力又は水溶液と他の液体との間の界面の張力を低減し、これにより粘膜を通過するdsRNAの吸収を増強する化学的実体である。胆汁酸塩及び脂肪酸のほかに、これらの浸透性増強剤は例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル及びポリオキシエチレン-20-セチルエーテル (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92) ; 及びパーフルオロ化学乳液、例えばFC-43 (Takahashiら、J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252) を包含する。

【0130】

脂肪酸：浸透性増強剤として作用する種々の脂肪酸及びその誘導体は、例えばオレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸 (n-デカン酸)、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン (1-モノオレオイル-rac-グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらのC₁₋₁₀アルキルエステル (例えばメチル、イソプロピル、及びt-ブチル) 及びそのモノ及びジグリセリド (即ちオレート、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、リノリエート等) を包含する (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Haririら、J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654)。

【0131】

胆汁酸塩：胆汁の生理学的役割は脂質及び脂溶性ビタミンの分散及び吸収の促進を包含

10

20

30

40

50

する (Brunton, Chapter 38: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardmanら編、McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935)。種々の天然の胆汁酸塩及びその合成誘導体が浸透性増強剤として作用する。即ち、「胆汁酸塩」という用語は胆汁の天然に存在する成分並びにそれらの合成誘導体の何れも包含する。本発明の胆汁酸塩は例えばコール酸 (又は製薬上許容しうるナトリウム塩、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)、ナトリウムタウロー-24, 25-ジヒドロフシデート (STDHF)、ナトリウムグリコジヒドロフシデート及びポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル (POE) を包含する (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92; Swinyard, Chapter 39, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, 編、Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, p. 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamotoら、J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashitaら、J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583)。

【0132】

キレート形成剤：キレート形成剤は、本発明との関連において使用する場合、金属イオンを溶液からそれとの複合体形成により除去し、これにより粘膜を通過するdsRNAの吸収を増強する化合物として定義される。本発明における浸透性増強剤としてのそれらの使用に関しては、キレート形成剤はDNase阻害剤としても作用するという追加的利点を有しているが、その理由は大部分の特性化されたDNAヌクレアーゼは触媒作用のために2価の金属イオンを必要とし、このため、キレート形成剤により阻害されるためである (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339)。本発明のキレート形成剤は限定しないが、エチレンジアミン4酢酸二ナトリウム (EDTA)、クエン酸、サリシレート (例えばナトリウムサリシレート、5-メトキシサリシレート及びホモバニレート)、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9及びベータ-ジケトンのN-アミノアシル誘導体 (エナミン) を包含する (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buurら、J. Control Rel., 1990, 14, 43-51)。

【0133】

非キレート形成性非界面活性剤：本明細書においては、非キレート形成性非界面活性剤の浸透性増強化合物はキレート形成剤として、又は界面活性剤としては僅かな活性しか示さないが、しかしなお、栄養粘膜を通過するdsRNAの吸収を増強する化合物として定義できる (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33)。浸透性増強剤のこのクラスは例えば不飽和環状尿素、1-アルキル-及び1-アルケニルアザシクロアルカノン誘導体 (Leeら、Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92) ; 及び非ステロイド抗炎症剤、例えばジクロフェナックナトリウム、インドメタシ

ン及びフェニルブタゾン（Yamashitaら、J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626）を包含する。

【0134】

細胞レベルにおいてdsRNAの取り込みを増強する薬剤も又、本発明の医薬組成物又は他の組成物に添加してよい。例えばカチオン性脂質、例えばリポフェクチン（Junichira、米国特許5,705,188）、カチオン性グリセロール誘導体、及びポリカチオン性分子、例えばポリリジン（Lolloら、PCT出願WO97/30731）も又、dsRNAの細胞取り込みを増強することが分かっている。

【0135】

他の薬剤、例えばグリコール類、例えばエチレングリコール及びプロピレングリコール、ピロール類、例えば2-ピロール、アゾン類及びテルペン類、例えばリモネン及びメントンも投与された核酸の浸透性を増強するために利用してよい。

【0136】

担体

本発明の特定の組成物はまた製剤中に担体化合物を配合する。本明細書においては、「担体化合物」又は「担体」とは、不活性である（即ち自体生物学的活性を有さない）が例えば生物学的に活性な核酸を分解するか、又は循環系からのその除去を増進することにより生物学的活性を有する核酸の生体利用性を低減するインビボのプロセスにより核酸として認識される核酸又はその類縁体を指す場合がある。核酸および担体化合物、典型的には後者の物質を過剰量とする同時投与は、恐らくは共通の受容体に対する担体化合物及び核酸の間の競合のため、肝臓、腎臓又は他の循環系外の貯留場所において回収される核酸の量を実質的に低減することができる。例えば、肝臓組織中の部分的にホスホロチオエートのdsRNAの回収はそれがポリイノシン酸、デキストランスルフェート、ポリシチジン酸、又は4-アセトアミド-4'-イソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸と同時投与されれば低減することができる（Miyaoら、DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakuraら、DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183）。

【0137】

賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬品用担体」又は「賦形剤」とは製薬上許容しうる溶媒、懸濁剤又は動物に核酸1個以上を送達するための何れかの他の薬理学的に不活性なビヒクルである。賦形剤は液体又は固体であってよく、そして所定の医薬組成物の核酸及び他の成分と組み合わせた場合に所望の嵩、コンシステンシー等を与えるように、予定される投与様式のものを選択する。典型的な医薬品用担体は限定しないが、結合剤（例えば予備ゼラチン化されたトウモロコシ澱粉、ポリビニルピロリドン又はヒトドキシプロピルメチルセルロース等）；充填剤（例えば乳糖及び他の糖類、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、又はリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）；崩壊剤（例えば澱粉、ナトリウム澱粉グリコレート等）；及び水和剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム等）を包含する。

【0138】

核酸と望ましくない反応を起こさない非経口投与以外に適する製薬上許容しうる有機又は無機の賦形剤も又、本発明の組成物を製剤するために使用してよい。適当な製薬上許容しうる担体は限定しないが、水、塩溶液、アルコール類、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等を包含する。

【0139】

核酸の局所投与のための製剤は、滅菌及び非滅菌の水溶液、アルコールのような一般的

溶媒中の非水溶液、又は液体又は固体の油脂基剤中の核酸の溶液を包含してよい。溶液は又緩衝液、希釈剤及び他の適当な添加剤を含有してよい。核酸と望ましくない反応を起こさない非経口投与以外に適する製薬上許容しうる有機又は無機の賦形剤も使用できる。

【0140】

適当な製薬上許容しうる賦形剤は限定しないが、水、塩溶液、アルコール類、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等を包含する。

【0141】

他の成分

本発明の組成物は更に医薬組成物中従来存在している他の副次的成分を、それらの当該分野で確立されている使用レベルにおいて含有してよい。即ち、組成物は追加的な、適合性のある、薬学的に活性な物質、例えば痒み止め、収斂剤、局所麻酔剤又は抗炎症剤を含有してよく、或いは、本発明の組成物の種々の剤型を物理的に製剤する場合に有用な他の物質、例えば染料、フレーバー剤、保存料、抗酸化剤、不透明化剤、増粘剤及び安定化剤を含有してよい。しかしながらこれらの物質を添加する場合は、本発明の組成物の成分の生物学的活性を不用意に妨害してはならない。製剤は滅菌することができ、そして所望により、補助剤、例えば潤滑剤、保存料、安定化剤、水和剤、乳化剤、浸透圧調整のための塩、緩衝液、着色料、フレーバー剤、及び／又は芳香性物質等、製剤の核酸と有害な相互作用を示さないものと混合することができる。

【0142】

水性懸濁液は懸濁液の粘度を増大させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール及び／又はデキストランを含有してよい。懸濁液は安定化剤も含有してよい。

【0143】

本発明の特定の実施形態は（a）アンチセンス化合物1つ以上、及び（b）非アンチセンス機序により機能する他の化学療法剤1つ以上を含有する医薬組成物を提供する。そのような化学療法剤の例は限定しないが、ダウノルビシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、エソルビシン、ブレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシンアラビノシド、ビスクロロエチルニトロソ尿素、ブスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニソン、ヒドロキシprogesteron、テストステロン、タモキシフェン、デカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、マイトキサントロン、アムサクリン、クロランブシル、メチルシクロヘキシルニトロソ尿素、窒素マスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシパーオキシシクロホスファミド、5-フルオロウラシル（5-FU）、5-フルオロデオキシウリジン（5-FUdR）、メトトレキセート（MTX）、コルヒチン、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド（VP-16）、トリメトトレキセート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタビン、テニポシド、シスプラチン及びジエチルスチルベストロール（DES）を包含する。一般的にThe Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., 1987, pp. 1206-1228, Berkowら編、Rahway, N. J. を参照されたい。本発明の化合物と共に使用する場合、そのような化学療法剤は個々に（例えば5-FU及びオリゴヌクレオチド）、逐次的に（例えば5-FU及びオリゴヌクレオチドをある期間、その後、MTX及びオリゴヌクレオチド）、又は別のそのような化学療法剤1つ以上と組み合わせて（例えば5-FU、MTX及びオリゴヌクレオチド、又は5-FU、放射線療法及びオリゴヌクレオチド）使用してよい。抗炎症剤、例えば限定しないが、非ステロイド抗炎症剤及びコルチコステロイド、及び抗ウィルス剤、例えば限定しないが、リビビリン、ビダラビン、アシクロビル及びゲンシクロビルも又、本発明の組成物中に組み合わせてよ

10

20

30

40

50

い。一般的にそれぞれ The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., Berkowら編、1987, Rahway, N. J., p. 2499-2506 及び 46-49 を参照されたい。他の非アンチセンス化学療法剤も又本発明の範囲に包含される。2つ以上の組み合わせられる化合物は共に、又は逐次的に使用してよい。

【0144】

そのような化合物の毒性及び治療効果は例えば LD50（集団の50%に対して致死的な用量）及び ED50（集団の50%に対して治療上有効な用量）を測定するための細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的操作法により測定することができる。毒性及び治療効果の間の用量比は治療指数であり、そしてそれは比 LD50/ED50 として表示できる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。

10

【0145】

細胞培養試験及び動物実験から得られたデータを人における使用のための用量の範囲として製剤中で使用できる。本発明の組成物の用量は一般的に毒性が殆ど、又は全くない ED50 を包含する循環系中濃度の範囲内にある。投薬量は使用する投薬形態及び使用する投与経路に応じてこの範囲内で変動してよい。本発明の方法において使用される何れの化合物に関しても、治療有効用量は細胞培養試験から最初は推定できる。用量は、細胞培養において決定された IC50（即ち症状の半最大抑制を達成するための被験化合物の濃度）を包含する化合物の、或いは、適宜、標的配列のポリペプチド産物（例えばポリペプチドの低下した濃度を達成する）の循環血漿中濃度範囲を達成するために動物モデルにおいて製剤してよい。そのような情報を使用して更に正確にヒトにおける有用用量を決定することができる。血漿中のレベルは例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定してよい。

20

【0146】

上記した個別又は複数で投与することの他に、本発明の dsRNA は Eg5 発現により媒介される病理学的プロセスの治療において効果的な他の知られた薬剤と組み合わせて投与できる。何れの場合も、担当医は、当該分野で知られた、又は本明細書に記載した薬効の標準的尺度を用いながら観察された結果に基づいて dsRNA 投与の量及び時期を調節することができる。

【0147】

Eg5 の発現により誘発される疾患を治療するための方法

本発明は特に癌の治療のため、例えば腫瘍の生育及び腫瘍の転移を抑制するための、dsRNA 又はそれから製造した医薬組成物の使用に関する。例えば、dsRNA 又はそれから製造した医薬組成物は固形腫瘍、例えば乳癌、肺癌、頭部頸部癌、脳の癌、腹部の癌、結腸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃腸の癌、神経膠腫、肝臓癌、舌癌、神経芽腫、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽腫、ウィルムス腫瘍、多発性骨髄腫の治療のため、及び、皮膚癌、例えば黒色腫の治療のため、リンパ腫及び血液の癌の治療のために使用してよい。本発明は更に、Eg5 発現を抑制するため、及び／又は種々の癌、例えば乳癌、肺癌、頭部の癌、頸部の癌、脳の癌、腹部の癌、結腸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃腸の癌、神経膠腫、肝臓癌、舌癌、神経芽腫、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、網膜芽腫、ウィルムス腫瘍、多発性骨髄腫、皮膚癌、黒色腫、リンパ腫及び血液の癌において腹水及び胸水の蓄積を抑制するための本発明の dsRNA 又はそれから製造した医薬組成物の使用に関する。Eg5 発現に対する抑制作用のために、本発明の dsRNA 又はそれから製造した医薬組成物はクオリティーオブライフを向上させることができる。

40

【0148】

本発明は更に、他の医薬品及び／又は治療方法と、例えば知られた医薬品及び／又は知られた治療方法、例えば癌を治療するため、及び／又は腫瘍転移を予防するために現在使用されているものと組み合わせた、例えば癌の治療のため、又は腫瘍転移を予防するための dsRNA 又はその医薬組成物の使用に関する。放射線療法と化学療法剤、例えばシスプラチン、シクロホスファミド、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、ダウノルビ

50

シン又はタモキシフェンとの組み合わせが好ましい。他の実施形態はV E G Fの発現を抑制するために使用される第2のd s R N Aの使用を包含する。

【0149】

本発明は又、別の抗癌化学療法剤、例えば何れかの従来の化学療法剤又はV E G F発現を抑制するために使用される別のd s R N Aと組み合わせて、特定のR N A i 剤と共に包含することにより実施することができる。そのような他の薬剤との特定の結合剤の組み合わせは化学療法プロトコルを強化することができる。多くの化学療法プロトコルは本発明の方法に組み込むことができるものとして当業者が想到するものである。何れかの化学療法剤、例えばアルキル化剤、代謝拮抗剤、ホルモン及び拮抗剤、放射性同位体並びに天然産物を使用することができる。例えば、本発明の化合物は抗生物質、例えばドキソルビン、及び他のアントラサイクリン類縁体、窒素マスタード、例えばシクロホスファミド、ピリミジン類縁体、例えば5-フルオロウラシル、シスプラチン、ヒドロキシ尿素、タキソール及びその天然および合成の誘導体等と共に投与することができる。別の例として、腫瘍がゴナドトロピン依存性及びゴナドトロピン非依存性の細胞を包含する乳房の腺癌のような混合型の腫瘍の場合は、化合物はロイプロリド又はゴセレリン（L H-R Hの合成ペプチド類縁体）と組み合わせて投与することができる。他の抗新生物剤のプロトコルはテトラサイクリン化合物を他の治療モダリティ、例えば手術、放射線等と共に使用することを包含し、これは本明細書においては「付随的抗新生物モダリティ」とも称する。即ち、本発明の方法は副作用を低減し、薬効を増強するという利点を有するこのような従来の治療法と共に使用できる。

【0150】

E g 5 遺伝子の発現を抑制する方法

別の特徴において、本発明は哺乳類におけるE g 5 遺伝子の発現を抑制する方法を提供する。方法は標的E g 5 遺伝子の発現がサイレント化されるように哺乳類に本発明の組成物を投与することを含む。その高い特異性のため、本発明のd s R N Aは標的E g 5 遺伝子のR N A（一次又はプロセッシング後）を特異的にターゲティングする。d s R N Aを用いたこれらのE g 5 遺伝子の発現を抑制するための組成物及び方法は本明細書に記載の通り実施できる。

【0151】

1つの実施形態において、方法はd s R N Aを含む組成物を投与することを含み、ここでd s R N Aは治療すべき哺乳類のE g 5 遺伝子のR N A転写物の少なくとも一部分に相補であるヌクレオチド配列を含む。治療すべき生物が哺乳類、例えばヒトである場合、組成物は当該分野で知られた何れかの手段により、例えば限定しないが、経口又は非経口の経路、例えば静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、経鼻、直腸及び局所（口内及び舌下を包含）の投与により投与してよい。好ましい実施形態において、組成物は静脈内の注入又は注射により投与される。

【0152】

特段の記載が無い限り、本明細書において使用する全ての専門技術用語は本発明が属する分野の当業者により共通に理解されているものと同様の意味を有する。本明細書に記載した方法及び材料と同様又は等価であるものを本発明の実施及び試験において使用できるが、適当な方法及び材料を以下に記載する。本明細書において言及した全ての出版物、特許出願、特許及び他の参考文献は、参照により全体が本明細書に組み込まれる。矛盾が生じる場合は、定義を含む本明細書が優先する。更に又、材料、方法及び実施例は説明目的のみであり、限定する意図はない。

【実施例】

【0153】

E g 5 遺伝子の遺伝子ウォーキング

初期スクリーニングセット

s i R N A設計はE g 5をターゲティングするs i R N Aを同定するために実施した（K I F 1 1、H S K P、K N S L 1及びT R I P 5としても知られている）。E g 5に対

するヒトmRNA配列、参考配列番号：NM_004523を使用した。

【0154】

ヒト及びマウスのEG5に対して交差反応性のsiRNAデュプレックスを設計した。24デュプレックスをスクリーニング用に合成した(表1)。

【0155】

増殖スクリーニングセット

第2のスクリーニングセットはヒトEG5をターゲティングする266siRNA並びにそのアカゲザルオースログを用いて定義した(表2)。増殖させたスクリーニングセットはヒトEG5をターゲティングする328siRNAを用いて選択し、他の種の何れかのEG5mRNAをヒットする必要はないものとした(表3)。

10

【0156】

ヒト及び部分的アカゲザルのEG5mRNAの配列をNCBIヌクレオチドデータベースからダウンロードし、ヒト配列は更にレファレンス配列として使用した(ヒトEG5：NM_004523.2、4908bp及びアカゲザルEG5：XM_001087644.1、878bp(ヒトEG5の5'部分のみ))。

【0157】

別のアカゲザルEG5配列の同定のために、ヒト配列のメガブラスト検索をアカゲザルのレファレンスゲノムに対してNCBIにおいて実施した。ダウンロードしたアカゲザルの配列及びブラストヒットのヒット領域を組み立てて完全長に渡ってヒトEG5に対して～92%の同一性を有するアカゲザルコンセンサス配列とした。

20

【0158】

全ての可能な19量体をヒトmRNA配列から抽出し、ヒト反応性EG5siRNAの4890(センス鎖)配列に相当する候補標的部位のプールを得た。

【0159】

ヒトアカゲザルの交差反応性は本候補プールから生じる最初のスクリーニングセットに関するsiRNAのインシリコ選択のための前提条件とした。アカゲザル反応性siRNAを調べるために、各候補のsiRNA標的部位を組み立てられたアカゲザル配列内の存在に関して検索した。更に又、siRNAの予測された特異性を、他のヒトmRNAではなくヒトEG5mRNA配列をターゲティングすることにより顕在化するヒトアカゲザル交差反応性siRNAのプールからの選択基準とした。

30

【0160】

siRNAの特異性は「オフターゲット遺伝子」と称される他の遺伝子をターゲティングするその潜在性を介して表示することができる。

【0161】

siRNAのオフターゲット潜在性を予測するために、以下の仮定を立てた。

1) 鎖のオフターゲット潜在性はオフターゲットに対するミスマッチの数及び分布から推定することができる。

2) 最も関連するオフターゲット、すなわちミスマッチの耐容性のためにサイレント化される可能性が最も高いと予測される遺伝子が、鎖のオフターゲット潜在性を決定する。

3) 鎖の2～9位(5'から3'の方向に数える)(シード領域)は残りの配列(即ちノンシード及び切断部位の領域)よりもオフターゲット潜在性により高度に寄与する場合がある。

40

4) 鎖の10及び11位(5'から3'の方向に数える)(切断部位領域)はノンシード領域(即ち5'から3'の方向に数えて12～18位)よりもオフターゲット潜在性により高度に寄与する場合がある。

5) 各鎖の1～19位はオフターゲット相互作用に関連しない。

6) オフターゲット潜在性は仮定3)～5)を考慮しながらオフターゲット遺伝子における最も相同である領域に対する鎖のミスマッチの数及び位置に基づいて計算された最も関連するオフターゲットのオフターゲット評点により表示することができる。

7) アンチセンス及びセンス鎖のオフターゲット潜在性は関連することになるが、導入さ

50

れた内部の修飾によるセンス鎖活性の潜在的削減があり得る。

【0162】

低いオフターゲット潜在性を有する s i R N A が好ましいものとして定義され、そしてより特異的であるものと仮定される。

【0163】

ヒト E G 5 特異的 s i R N A を発見するために、全て潜在的オフターゲットであるとみなされた全ての他のヒト転写物を、ヒトアカゲザル交差反応性 19 量体センス鎖配列並びに相補のアンチセンス鎖に関する潜在的標的領域があるものを得るべく検索した。このために、ファースト A アルゴリズムを用いてヒト参照配列データベースの各配列における最も相同なヒット領域を決定し、これを本発明者等は包括的ヒトトランスクリプトームを表すものと仮定した。

10

【0164】

仮定 3) ~ 5) に従って全ての潜在的オフターゲットを順位付けするために、そしてこれにより最も関連するオフターゲット遺伝子及びそのオフターゲット評点を同定するために、ファースト A アウトプットファイルをパールスクリプトにより更に分析した。

【0165】

スクリプトは各 19 量体のインプット配列及び各オフターゲット遺伝子について以下のオフターゲット特性を抽出することによりオフターゲット評点を計算した。

【0166】

ノンシード領域におけるミスマッチの数。

20

【0167】

シード領域におけるミスマッチの数。

【0168】

切断部位の領域におけるミスマッチの数。

【0169】

オフターゲット評点は以下の通り仮定 3) ~ 5) を考慮することにより計算した。

【0170】

オフターゲット評点 = シードミスマッチ数 * 10
+ 切断部位ミスマッチ数 * 1.2
+ ノンシードミスマッチ数 * 1

30

各 19 量体の配列に関する最も関連するオフターゲット遺伝子は最低オフターゲット評点を有する遺伝子として定義した。従って、最低オフターゲット評点は鎖のオフターゲット潜在性を代表するものとして定義した。

【0171】

表 2 に示すスクリーニングセットについて、アンチセンス鎖に対する 3 以上、及び、センス鎖に対する 2 以上のオフターゲット評点を s i R N A の選択のための前提条件として選択し、4 つ以上の連続する G を含有する配列（ポリ G 配列）の全てを除外した。特異性の基準をパスした 266 ヒトアカゲザル交差反応性配列をこのカットオフに基づいて選択した（表 2 参照）。

【0172】

増殖したスクリーニングセットの定義に関しては、アカゲザルに対する交差反応性を無視し、新しく入手するヒト参照配列データベースに基づいて予測される特異性を再計算し、そして、アンチセンス及びセンス鎖に対して 2.2 以上のオフターゲット評点を有する 328 非ポリ G s i R N A のみを選択した（表 3 参照）。

40

【0173】

表について：符号：A、G、C、U—リボヌクレオチド：T—デオキシチミジン：u，c—2'-O—メチルヌクレオチド：s—ホスホロチオエート連結部。

【0174】

dsRNA 合成

試薬入手元

50

本明細書において試薬の入手元を特定しない場合は、その試薬は分子生物学における用途のための標準的な品質／純度における分子生物学のための試薬の何れかの供給元から入手してよい。

【0175】

siRNA合成

1本鎖RNAはExpedite 8909合成装置 (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany) 及び固体支持体としてのコントロールされた細孔のガラス (CPG、500 Å、Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany) を用いて1 μモルのスケールにおける固相合成により製造した。RNA及び2'-O-メチルヌクレオチドを含有するRNAは、相当するホスホロアミダイト及び2'-O-メチルホスホロアミダイトをそれぞれ用いながら固相合成により形成した (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany)。これらのビルディングブロックを、Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S. L. ら (編), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載のもののような標準的なヌクレオシドホスホロアミダイト化学を用いてオリゴヌクレオチド鎖の配列内の選択された部位に取り込んだ。ホスホロチオエート連結部はアセトニトリル中のBeaucage試薬 (Chruachem, Ltd, Glasgow, UK) の溶液 (1%) でヨウ素酸化剤溶液を置き換えることにより導入した。その他の副次的試薬はMallinckrodt Baker (Griesheim, Germany) より入手した。

【0176】

アニオン交換HPLCによる粗製オリゴリボヌクレオチドの脱保護及び精製は確立された操作法に従って実施した。収率及び濃度は分光光度計 (DU640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Germany) を用いて260 nmの波長においてそれぞれのRNAの溶液のUV吸光度により測定した。2本鎖RNAはアニーリング緩衝液 (20 mMリン酸ナトリウム、pH 6.8; 100 mM塩化ナトリウム) 中の相補鎖の等モル溶液を混合することにより形成し、これは3分間85～90℃のウォーターバス中で加熱し、そして3～4時間かけて室温に冷却した。アニーリングされたRNA溶液は使用時まで-20℃で保存した。

【0177】

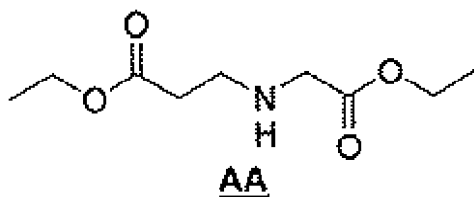
3'-コレステロールコンジュゲートsiRNA (本明細書においてはChol-3' と称する) の合成のためには、適切に修飾された固体支持体をRNA合成のために使用した。修飾された固体支持体は以下の通り製造した。

【0178】

ジエチルー2-アザブタン-1, 4-ジカルボキシレート AA

【0179】

【化1】



水酸化ナトリウムの4.7 M水溶液 (50 mL) を水 (50 mL) 中の塩酸エチルグリシネート (32.19 g, 0.23 モル) の攪拌氷冷溶液内に添加した。次に、エチルアクリレート (23.1 g, 0.23 モル) を添加し、反応終了がTLCにより確認されるまで混合物を室温で攪拌した。19時間後、溶液をジクロロメタン (3×100 mL) とに分配した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、蒸発させた。残留物を蒸留

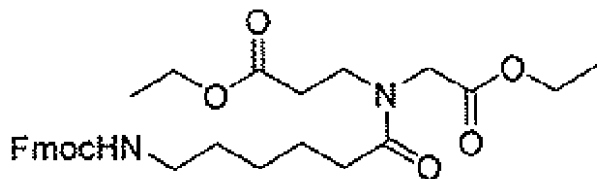
してA A (28.8 g, 61%)を得た。

【0180】

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

【0181】

【化2】



10

AB

Fmoc-6-アミノヘキサン酸 (9.12 g, 25.83ミリモル) をジクロロメタン (50 mL) 中に溶解し、氷冷した。ジイソプロピルカルボジイミド (3.25 g, 39.9 mL, 25.83ミリモル) を0℃で溶液に添加した。次にジエチルアザブタン-1, 4-ジカルボキシレート (5 g, 24.6ミリモル) 及びジメチルアミノピリジン (0.305 g, 2.5ミリモル) を添加した。溶液を室温とし、更に6時間攪拌した。反応終了はTLCにより確認した。反応混合物を真空下に濃縮し、酢酸エチルを添加することによりジイソプロピル尿素を沈殿させた。懸濁液を濾過した。濾液を5%水性塩酸、5%重炭酸ナトリウム及び水で洗浄した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上に乾燥し、濃縮して得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィー (50% EtOAc / ヘキサン) により精製し、AB 11.87 g (88%) を得た。

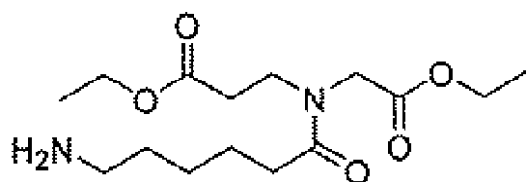
20

【0182】

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

【0183】

【化3】



30

AC

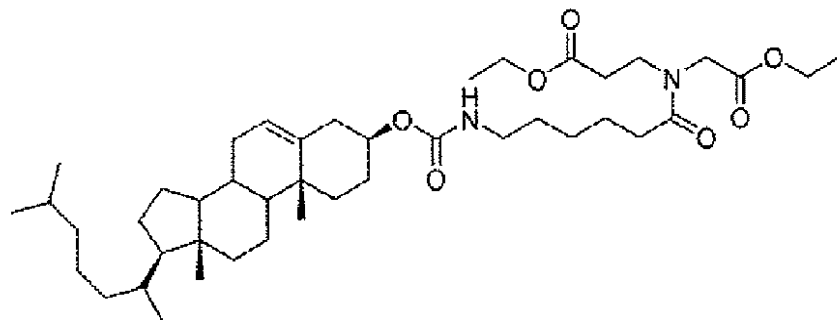
3- {エトキシカルボニルメチル- [6- (9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-ヘキサノイル]-アミノ}-プロピオン酸エチルエステルA B (11.5 g, 21.3ミリモル) を0℃でジメチルホルムミド中20%ピペリジンに溶解した。溶液を1時間攪拌した。反応混合物を真空下に濃縮し、水を残留物に添加し、そして生成物を酢酸エチルで抽出した。粗生成物をその塩酸塩に変換することにより精製した。

40

3- ({6- [17- (1, 5-ジメチルヘキシル)-10, 13-ジメチル-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ [a] フェナントレン-3-イルオキシカルボニルアミノ]-ヘキサノイル} エトキシカルボニルメチルアミノ)-プロピオン酸エチルエステルA D

【0184】

【化 4】

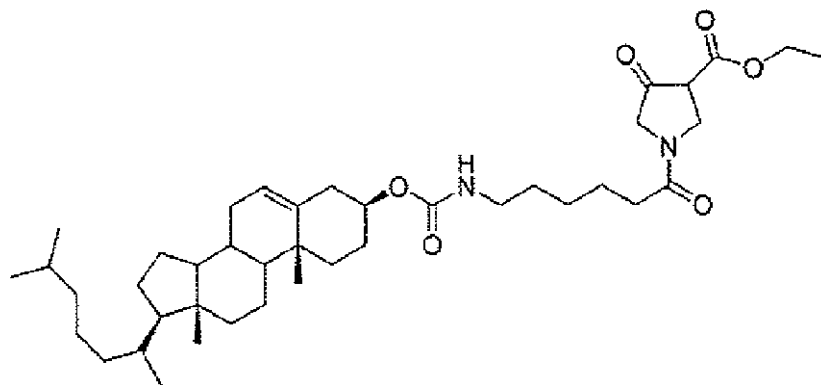
**AD**

3-[(6-アミノヘキサノイル)-エトキシカルボニルメチルアミノ]-プロピオン酸エチルエステルAC(4.7g、14.8ミリモル)の塩酸塩をジクロロメタン中に取り上げた。懸濁液を氷上で0℃まで冷却した。懸濁液にジイソプロピルエチルアミン(3.87g、5.2mL、30ミリモル)を添加した。得られた溶液にコレステリルクロロホルメート(6.675g、14.8ミリモル)を添加した。反応混合物を一夜攪拌した。反応混合物をジクロロメタンで希釈し、10%塩酸で洗浄した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した(10.3g、92%)。

1-{6-[17-(1,5-ジメチルヘキシル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イルオキシカルボニルアミノ]-ヘキサノイル}-4-オキソ-ピロリジン-3-カルボン酸エチルエステルAE

【0185】

【化 5】

**AE**

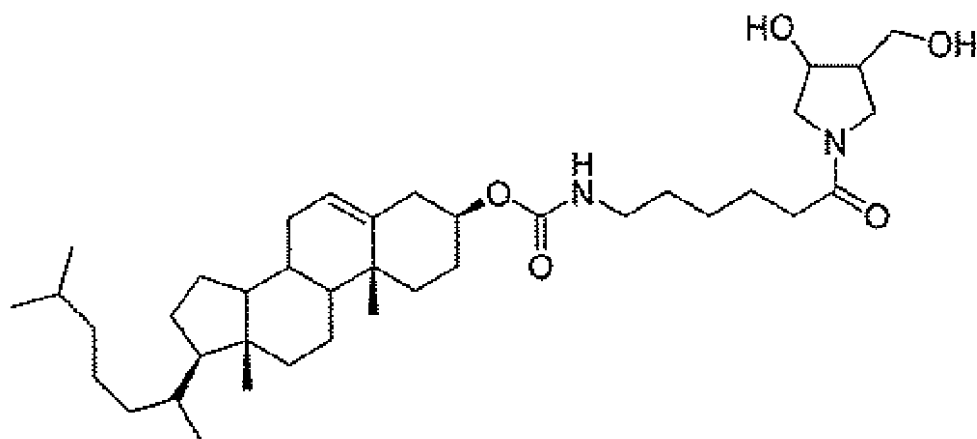
カリウムt-ブトキシド(1.1g、9.8ミリモル)を乾燥トルエン30mL中にスラリー化した。混合物を氷上で0℃に冷却し、そしてジエステルAD5g(6.6ミリモル)を20分以内に攪拌しながら緩徐に添加した。添加中の温度は5℃未満に維持した。攪拌を0℃で30分間継続し、そして氷酢酸1mLを添加し、その直後に水40mL中の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4gを添加した。得られた混合物を各々ジクロロメタン100mLで2回抽出し、そして合わせた有機抽出液を各々リン酸塩緩衝液10mLで2回洗浄し、乾燥し、蒸発乾固させた。残留物をトルエン60mLに溶解し、0℃に冷却し、各50mLの冷pH9.5炭酸塩緩衝液で3回抽出した。水性抽出液をリン酸でpH3に調節し

、各 40 ml のクロロホルムで 5 回抽出し、これらを合わせ、乾燥し、蒸発乾固させた。残留物を 25% 酢酸エチル／ヘキサンを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製し、b-ケートエステル 1.9 g を得た (39%)。

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

【0186】

【化6】



AF

メタノール (2 ml) をテトラヒドロフラン (10 ml) 中の b-ケートエステル AE (1.5 g、2.2 ミリモル) 及びナトリウムボロハイドライド (0.226 g、6 ミリモル) の還流混合物に 1 時間かけて滴下した。攪拌を 1 時間還流温度で継続した。室温に冷却したのち、1 N HCl (12.5 ml) を添加し、混合物を酢酸エチル (3 × 40 ml) で抽出した。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム上に乾燥し、真空下に濃縮し、得られた生成物をカラムクロマトグラフィーで精製した (10% MeOH/CHCl₃) (89%)。

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

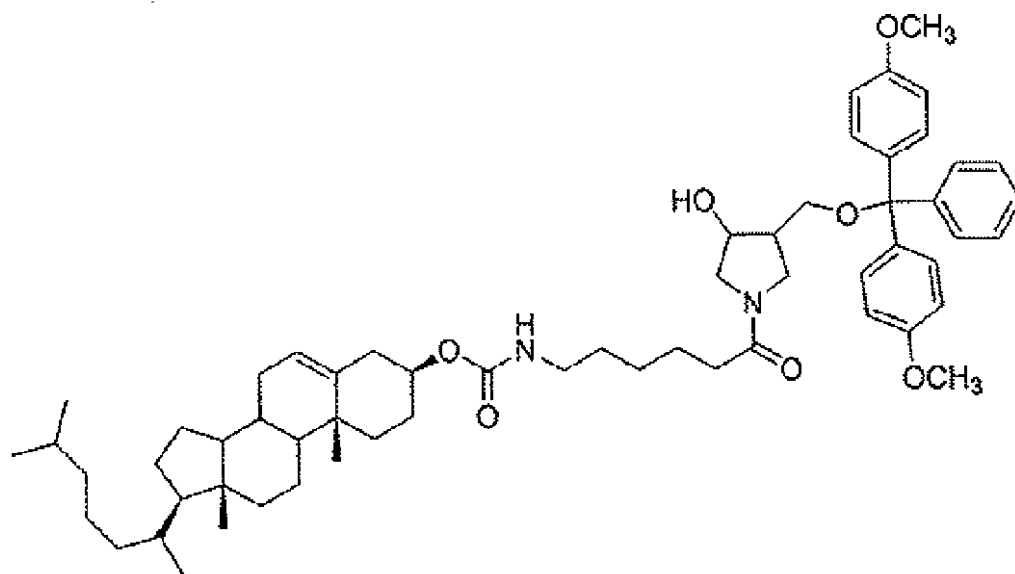
【0187】

10

20

30

【化 7】

**AG**

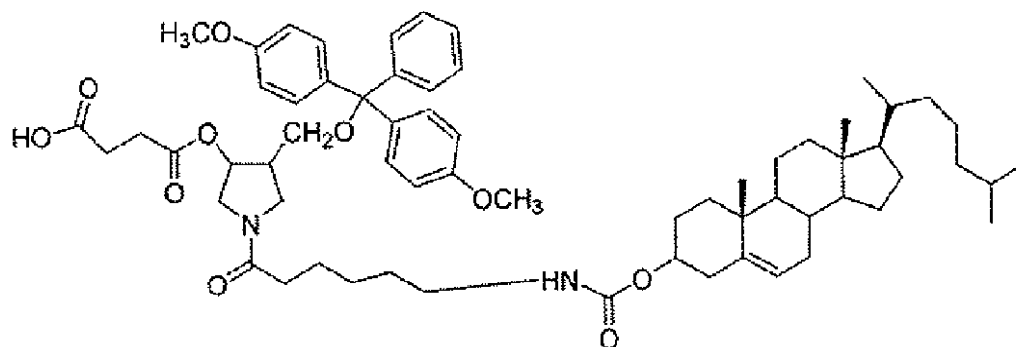
ジオールAF (1.25 g、1.994ミリモル) を真空下にピリジン (2×5 mL) と共に蒸発させることにより乾燥させた。無水ピリジン (10 mL) 及び4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (0.724 g、2.13ミリモル) を攪拌しながら添加した。反応は一夜室温で実施した。メタノールを添加することにより反応をクエンチングした。反応混合物を真空下に濃縮し、残留物にジクロロメタン (50 mL) を添加した。有機層を1 M水性重炭酸ナトリウムで洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上に乾燥し、濾過し、濃縮した。残留物のピリジンをトルエンと共に蒸発させることにより回収した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー (2% MeOH/クロロホルム、5% MeOH/CHCl₃ 中でR_f=0.5) で精製した (1.75 g、95%)。

【0188】

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

【0189】

【化 8】

**AH**

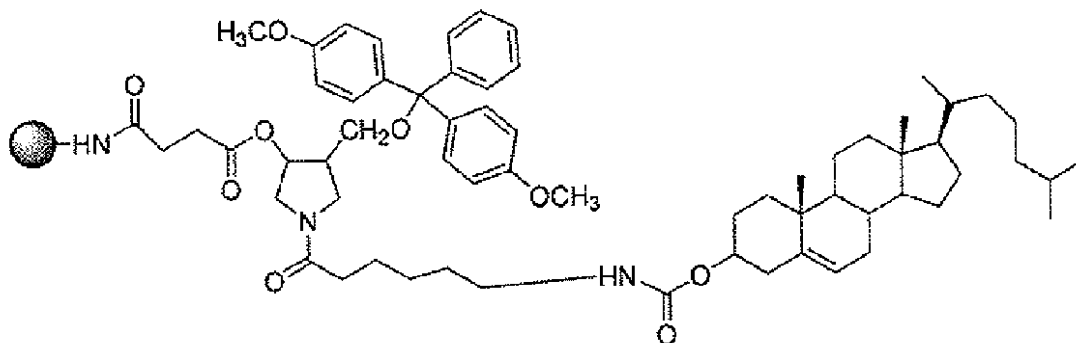
化合物AG（1.0g、1.05ミリモル）を無水コハク酸（0.150g、1.5ミリモル）及びDMAP（0.073g、0.6ミリモル）と混合し、一夜40℃で真空下に乾燥した。混合物を無水ジクロロエタン（3mL）中に溶解し、トリエチルアミン（0.318g、0.440mL、3.15ミリモル）を添加し、そして溶液を16時間アルゴン雰囲気下室温で攪拌した。次にこれをジクロロメタン（40mL）で希釈し、氷冷水性クエン酸（5wt%、30mL）及び水（2×20mL）で洗浄した。有機相を無水硫酸ナトリウム上に乾燥し、濃縮乾固した。残留物をそのまま次の工程に使用した。

コレステロール誘導体化CPGAI

【 0 1 9 0 】

【化 9】

10



20

AI

スクシネートAH (0.254 g、0.242ミリモル) をジクロロメタン／アセトニトリル (3:2、3 mL) の混合物中に溶解した。この溶液に、アセトニトリル (1.25 mL) 中のDMA P (0.0296 g、0.242ミリモル)、アセトニトリル／ジクロロエタン (3:1、1.25 mL) 中の2, 2'-ジチオービス (5-ニトロピリジン) (0.075 g、0.242ミリモル) を順次添加した。得られた溶液に、アセトニトリル (0.6 mL) 中のトリフェニルホスフィン (0.064 g、0.242ミリモル) を添加した。反応混合物は明橙色に変色した。溶液は手首動作型振とう器を用いて短時間攪拌した (5分)。長鎖アルキルアミン-C P G (L C A A-C P G) (1.5 g、61 mM) を添加した。懸濁液を2時間攪拌した。C P Gを焼結漏斗を通して濾過し、アセトニトリル、ジクロロメタン及びエーテルで順次洗浄した。未反応のアミノ基を無水酢酸／ピリジンを用いてマスクングした。達成されたC P G負荷はUV測定により測定した (37 mM/g)。

30

【 0 1 9 1 】

5'-12-ドデカン酸ビスデシルアミド基（本明細書においては5'-C32-と称する）又は5'-コレステリル誘導体基（本明細書においては5'-Chol-と称する）を担持したsiRNAの合成は、コレステリル誘導体に関して酸化工程をBeaucage試薬を用いながら実施することにより核酸オリゴマーの5'末端においてホスホロチオエート連結部を導入した以外は、WO2004/065601に記載の通り実施した。

40

【 0 1 9 2 】

核酸配列は標準的命名法及び特に表4の略記法を用いて以下の通り示した。

【 0 1 9 3 】

【表 4】

表4: 核酸配列表記において使用したヌクレオチド単量体の略記法。これらの単量体はオリゴヌクレオチド中に存在する場合5'ー3'ーホスホジエステル結合により相互に連結されている。

略記法 ^a	ヌクレオチド
A, a	2'ーデオキシーアデノシンー5'ーホスフェート、アデノシンー5'ーホスフェート
C, c	2'ーデオキシーシチジンー5'ーホスフェート、シチジンー5'ーホスフェート
G, g	2'ーデオキシーグアノシンー5'ーホスフェート、グアノシンー5'ーホスフェート
T, t	2'ーデオキシーチミジンー5'ーホスフェート、チミジンー5'ーホスフェート
U, u	2'ーデオキシーウリジンー5'ーホスフェート、ウリジンー5'ーホスフェート
N, n	何れかの2'ーデオキシーヌクレオチド／ヌクレオチド (G、A、C又はT、g、a、c又はu)
Am	2'ーOーメチルアデノシンー5'ーホスフェート
Cm	2'ーOーメチルシチジンー5'ーホスフェート
Gm	2'ーOーメチルグアノシンー5'ーホスフェート
Tm	2'ーOーメチルチミジンー5'ーホスフェート
Um	2'ーOーメチルウリジンー5'ーホスフェート
Af	2'ーフルオロー2'ーデオキシーアデノシンー5'ーホスフェート
Cf	2'ーフルオロー2'ーデオキシーシチジンー5'ーホスフェート
Gf	2'ーフルオロー2'ーデオキシーグアノシンー5'ーホスフェート
Tf	2'ーフルオロー2'ーデオキシーチミジンー5'ーホスフェート
Uf	2'ーフルオロー2'ーデオキシーウリジンー5'ーホスフェート
<u>A, C, G, T, U, a, c, g, t, u</u>	下線: ヌクレオシドー5'ーホスホリチオエート
<u>am, cm, gm, tm, um</u>	下線: 2'ーOーメチルヌクレオシドー5'ーホスホリチオエート

^a大文字は2'ーデオキシリボヌクレオチド(DNA)を示し、小文字はリボヌクレオチド(RNA)を示す。

dsRNA発現ベクター

本発明の別の特徴において、Eg5遺伝子発現活性をモジュレートするEg5特異的dsRNA分子はDNA又はRNAベクター内に挿入された転写ユニットから発現される(例えばCouture, A., ら、TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., ら、国際PCT公開WO00/22113, Conrad, 国際PCT公開WO00/22114及びConrad, 米国特許6,054,299参照)。これらのトランスジーンは宿主ゲノム内に取り込まれ、そして組み込まれたトランスジーンとして受け継がれることができる線状コンストラクト、環状プラスミド、又はウィルスベクターとして導入することができる。トランスジーンは又それが染色体外プラスミドとして受け継がれることができるように構築することもできる(Gassmann, ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292)。

【0194】

dsRNAの個々の鎖は2つの別個の発現ベクター上のプロモーターにより転写され、そして標的細胞内に同時トランスフェクトされることができる。或いはdsRNAの各々個々の鎖は同じ発現プラスミド上に両方が位置するプロモーターにより転写されることができる。好ましい実施形態においては、dsRNAはdsRNAがステムアンドループ構造を有するようにリンカーポリヌクレオチド配列により連結された反転リピートとして発

現される。

【0195】

組み換え dsRNA 発現ベクターは一般的には DNA プラスミド又はウィルスベクターである。dsRNA 発現ウィルスベクターは、限定しないが、アデノ関連ウィルス（参考文献は Muzyczka, ら、Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129）；アデノウィルス（例えば Berkner, ら、BioTechniques (1998) 6:616, Rosenfeld ら (1991, Science 252:431-434), 及び Rosenfeld ら (1992), Cell 68:143-155) 参照）；又はアルファウィルス並びに当該分野で知られる他のものに基づいて構築することができる。レトロウィルスはインビトロ及び／又はインビボで上皮細胞を包含する多種の異なる細胞型内に種々の遺伝子を導入するために使用されている（例えば Egglitis, ら、Science (1985) 230:1395-1398; Danos and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464; Wilson ら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano ら、1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber ら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry ら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury ら、1991, Science 254:1802-1805; van Beusechem, ら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7641; Kay ら、1992, Human Gene Therapy 3:641-647; Dai ら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu ら、1993, J. Immunol. 150:4104-4115; 米国特許 4, 868, 116; 米国特許 4, 980, 286; PCT 出願 WO 89/07136; PCT 出願 WO 89/02468; PCT 出願 WO 89/05345; 及び PCT 出願 WO 92/07573 参照）。細胞のゲノムに挿入された遺伝子を形質導入して発現できる組み換えレトロウィルスベクターは PA317 及び Psi-CRIP のような適当なパッケージング細胞系統内に組み換えレトロウィルスゲノムをトランスフェクトすることにより製造できる（Comette ら、1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone ら、1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349）。組み換えアデノウィルスベクターは感受性宿主（例えばラット、ハムスター、イヌ、及びチンパンジー）における広範な種類の細胞及び組織を感染させるために使用でき（Hsu ら、1992, J. Infectious Disease, 166:769）、そして又感染のために有糸分裂的に活動性の細胞を必要としないという利点も有する。

【0196】

本発明の DNA プラスミド又はウィルスベクターの何れかにおける dsRNA 発現を駆動するプロモーターは真核生物 RNA ポリメラーゼ I（例えばリボソーム RNA プロモーター）、RNA ポリメラーゼ II（例えば CMV 初期プロモーター又はアクチンプロモーター又は U1 snRNA プロモーター）又は一般的には RNA ポリメラーゼ III プロモーター（例えば U6 snRNA 又は 7SK RNA プロモーター）又は原核生物プロモーター、例えば T7 プロモーターであってよいが、ただし発現プラスミドは T7 プロモーターからの転写に必要な T7 RNA ポリメラーゼもコードするものとする。プロモーターは又トランスジーン発現を膀胱に指向させることができる（例えば膀胱に関するインスリン調節配列参照（Bucchini ら、1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515））。

【0197】

更に又、トランスジーン発現は例えば誘導調節配列及び発現系、例えば特定の生理学的調節物質、例えば循環系中グルコース濃度又はホルモンに対して感受性の調節配列を用いることにより厳密に調節できる（Docherty ら、1994, FASEB J. 8:

20-24)。細胞における、又は哺乳類におけるトランスジーン発現の制御のために適するそのような誘導発現系は、エクジソンによる、エストロゲン、プロゲステロン、テトラサイクリン、2量体の化学的誘導物質、及びイソプロピルーベーターD1-チオガラクトピラノシド(EP TG)による調節を包含する。当業者はdsRNAトランスジーンの意図する使用に基づいて適切な調節／プロモーター配列を選択することができる。

【0198】

一般的に、dsRNA分子を発現することができる組み換えベクターは後述する通り送達され、そして標的細胞内に定着する。或いは、dsRNA分子の一過性発現をもたらすウィルスベクターを使用できる。そのようなベクターは必要に応じて反復して投与できる。発現後、dsRNAは標的RNAに結合し、そしてその機能又は発現を調節する。dsRNA発現ベクターの送達は、全身、例えば静脈内又は筋肉内投与によるか、患者から移出した標的細胞への投与とその後の患者内への再導入によるか、又は所望の標的細胞内への導入を可能にする何れかの他の手段により行うことができる。

【0199】

dsRNA発現DNAプラスミドは典型的にはカチオン性脂質担体(例えばオリゴフェクタミン)又は非カチオン性脂質系担体(例えばTransit-TKOTM)との複合体として標的細胞内にトランスフェクトされる。1週間以上の期間に渡る単一のEg5遺伝子の異なる領域又は多数のEg5遺伝子をターゲティングするdsRNA媒介ノックダウンのための多重脂質トランスフェクションも又、本発明の意図するものである。宿主細胞内への本発明のベクターの良好な導入は種々の周知の方法を用いてモニタリングできる。例えば一過性のトランスフェクションは緑色蛍光蛋白(GFP)のような蛍光マーカーのようなレポーターを用いてシグナル化できる。エクスピボの細胞の安定なトランスフェクションは特定の環境因子(例えば抗生物質及び薬剤)に対する耐性、例えばハイグロマイシンB耐性を有するトランスフェクトされた細胞を与えるマーカーを使用しながら確保することができる。

【0200】

Eg5特異的dsRNA分子はまたベクター内に挿入してヒト患者のための遺伝子療法ベクターとして使用することもできる。遺伝子療法ベクターは例えば静脈内注射、局所投与により(米国特許5,328,470参照)、或いは定位注射により(例えばChenら、(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057参照)対象に送達することができる。遺伝子療法ベクターの薬学的調製品は許容される希釈剤中に遺伝子療法ベクターを包含することができ、或いは、遺伝子送達ビヒクルが包埋された緩徐放出マトリックスを含むことができる。或いは、完全遺伝子送達ベクターを組み換え細胞から未損傷で製造できる場合、例えばレトロウィルスベクターの場合は、薬学的調製品は遺伝子送達系を生産する細胞1個以上を包含できる。

【0201】

細胞増殖を介したEg5 siRNAインビトロスクリーニング

Eg5のサイレント化は有糸分裂停止を誘発することがわかっている(Weil, D.ら、[2002]Biotechniques 33:1244-8)ため、細胞生存性試験をsiRNA活性スクリーニングのために使用した。HeLa細胞(ウェル当たり14000[スクリーン1及び3]又はウェル当たり10000[スクリーン2])を96穴プレートに播種し、そして30nMのウェル中最終siRNA濃度において、そして50nM(第1スクリーン)及び25nM(第2スクリーン)の終濃度において、リポフェクタミン2000(Invitrogen)で同時トランスフェクトした。デュプレックスのサブセットを第3のスクリーン中25nMで試験した(表5)。

【0202】

トランスフェクション後72時間において、培地にWST-1試薬(Roche)を添加し、その後450nmにおける吸光度を測定することにより細胞増殖を試験した。対照(非トランスフェクト)細胞に関する吸光度値を100パーセントとみなし、siRNAでトランスフェクトしたウェルの吸光度を対照値と比較した。試験は3スクリーンの各々

について6連で実施した。s i R N Aのサブセットを更に、所定の範囲のs i R N A濃度において試験した。試験はH e L a細胞において実施した（ウェル当たり14000；方法は上記と同様、表5）。

【0203】

【表5-1】

	450nmにおける相対的吸光度					
	スクリーン I		スクリーン II		スクリーン III	
デュプレックス	平均	sd	平均	sd	平均	Sd
AL-DP-6226	20	10	28	11	43	9
AL-DP-6227	66	27	96	41	108	33
AL-DP-6228	56	28	76	22	78	18
AL-DP-6229	17	3	31	9	48	13
AL-DP-6230	48	8	75	11	73	7
AL-DP-6231	8	1	21	4	41	10
AL-DP-6232	16	2	37	7	52	14
AL-DP-6233	31	9	37	6	49	12
AL-DP-6234	103	40	141	29	164	45
AL-DP-6235	107	34	140	27	195	75
AL-DP-6236	48	12	54	12	56	12
AL-DP-6237	73	14	108	18	154	37
AL-DP-6238	64	9	103	10	105	24
AL-DP-6239	9	1	20	4	31	11
AL-DP-6240	99	7	139	16	194	43

【0204】

【表 5 - 2】

AL-DP-6241	43	9	54	12	66	19
AL-DP-6242	6	1	15	7	36	8
AL-DP-6243	7	2	19	5	33	13
AL-DP-6244	7	2	19	3	37	13
AL-DP-6245	25	4	45	10	58	9
AL-DP-6246	34	8	65	10	66	13
AL-DP-6247	53	6	78	14	105	20
AL-DP-6248	7	0	22	7	39	12
AL-DP-6249	36	8	48	13	61	7

表5

表5において最大の生育抑制を示した9種のsiRNAデュプレックスをHeLa細胞においてある範囲のsiRNA濃度において再試験した。試験したsiRNA濃度は100nM、33.3nM、11.1nM、3.70nM、1.23nM、0.41nM、0.14nM及び0.046nMであった。試験は6連で実施し、細胞増殖の50%抑制をもたらす各siRNA濃度（IC₅₀）を計算した。この用量応答分析は各デュプレックスに関して2～4回実施した。平均のIC₅₀値（nM）を表6に示す。

【0205】

【表 6】

デュプレックス	平均 IC ₅₀
AL-DP-6226	15.5
AL-DP-6229	3.4
AL-DP-6231	4.2
AL-DP-6232	17.5
AL-DP-6239	4.4
AL-DP-6242	5.2
AL-DP-6243	2.6
AL-DP-6244	8.3
AL-DP-6248	1.9

表 6

細胞増殖を介した E g 5 s i R N A インビトロスクリーニング

トランスフェクションの直前において、H e l a S 3 (ATCC 番号: C C L - 2 . 2 , L C G P r o m o c h e m G m b H , W e s e l , G e r m a n y) 細胞を生育培地 (H a m ' s F 1 2 、 1 0 % ウシ胎児血清、1 0 0 u ペニシリン / 1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン、全て B i o c h e m A G , B e r l i n , G e r m a n y より入手) 7 5 μ l 中、9 6 穴プレート (G r e i n e r B i o - O n e G m b H , F r i c k e n h a u s e n , G e r m a n y) 上において 1.5×10^4 個 / ウェルの細胞密度で播種した。トランスフェクションは 4 連で実施した。各ウェルにつき、0.5 μ l リポフェクタミン 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n , G m b H , K a r l s r u h e , G e r m a n y) を 1 2 μ l の O p t i - M E M (I n v i t r o g e n) と混合し、室温で 1 5 分間インキュベートした。s i R N A 濃度が 1 0 0 μ l のトランスフェクション容量中 5 0 n M となるために、5 μ M s i R N A 1 μ l をウェル当たり O p t i - M E M 1 1 . 5 μ l と混合し、リポフェクタミン 2 0 0 0 - O p t i - M E M 混合物と合わせ、そして再度室温で 1 5 分間インキュベートした。s i R N A - リポフェクタミン 2 0 0 0 複合物を完全に (ウェル当たり 2 5 μ l) 細胞に適用し、そして細胞を湿潤インキュベーター中 3 7 ° C 及び 5 % C O ₂ において 2 4 時間インキュベートした (H e r a c u s G m b H , H a n a u) 。単用量スクリーンをそれぞれ 5 0 n M 及び 2 5 n M において実施した。

【0206】

細胞は溶解混合物 (Genospectra, Fremont, USAより入手したQuant i Gene bDNAキットの内容物) 50 μ lを生育培地100 μ lの入った各ウェルに適用することにより採取し、そして30分間53℃において溶解した。その後、溶解物50 μ lをヒトEg5及びヒトGAPDHに特異的なプローブセットと共にインキュベートし、そしてQuant i Geneに関する製造元のプロトコルに従って処理した。終了時において、ケミルミネセンスをVictor 2-Light (Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany) 中でRLU (相対光単位) として測定し、そしてhEg5プローブセットを用いて得られた値を各ウェルにつき対応するGAPDH値に対して規格化した。Eg5に対して指向されたsiRNAを用いて得られた値を100%に設定した非特異的siRNA (HCVに対して指向) を用いて得られた値と関連付けた (表1、2及び3)。

10

【0207】

スクリーンに由来する有効なsiRNAを用量応答曲線により更に特性化した。用量応答曲線のトランスフェクションは以下の濃度：即ち、100 nM、16.7 nM、2.8 nM、0.46 nM、77ピコM、12.8ピコM、2.1ピコM、0.35ピコM、59.5 fM、9.9 fM及びブランク (siRNA非含有) において実施し、そして上記プロトコルに従ってOpt i-MEMで終濃度12.5 μ lに希釈した。データ分析はマイクロソフトエクセルアドインソフトウェアXL-フィット4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, UK) を用いながら、そして用量応答モデル205番を適用しながら実施した (表1、2及び3)。

20

【0208】

主要なsiRNAであるAD12115を更にRocheのWST増殖試験を適用しながら分析した (前述)。

【0209】

最大活性を示した表2の34デュプレックスのサブセットを100 nM~10 fMの範囲の終濃度におけるHeLa細胞におけるトランスフェクションにより試験した。トランスフェクションは4連で実施した。2つの用量応答試験を各デュプレックスについて実施した。KSPmRNAの20% (IC20)、50% (IC50) 及び80% (IC80) 低下を与える濃度を各デュプレックスについて計算した (表7)。

30

【0210】

【表 7 - 1】

濃度はpMで示す

	IC20s		IC50		IC80	
デュプレックス名	第1スクリーン	第2スクリーン	第1スクリーン	第2スクリーン	第1スクリーン	第2スクリーン
AD12077	1.19	0.80	6.14	10.16	38.63	76.16
AD12078	25.43	25.43	156.18	156.18	ND	ND
AD12085	9.08	1.24	40.57	8.52	257.68	81.26
AD12095	1.03	0.97	9.84	4.94	90.31	60.47
AD12113	4.00	5.94	17.18	28.14	490.83	441.30
AD12115	0.60	0.41	3.79	3.39	23.45	23.45
AD12125	31.21	22.02	184.28	166.15	896.85	1008.11
AD12134	2.59	5.51	17.87	22.00	116.36	107.03
AD12149	0.72	0.50	4.51	3.91	30.29	40.89
AD12151	0.53	6.84	4.27	10.72	22.88	43.01
AD12152	155.45	7.56	867.36	66.69	13165.27	ND
AD12157	0.30	26.23	14.60	92.08	14399.22	693.31
AD12166	0.20	0.93	3.71	3.86	46.28	20.59
AD12180	28.85	28.85	101.06	101.06	847.21	847.21
AD12185	2.60	0.42	15.55	13.91	109.80	120.63

【 0 2 1 1 】

10

20

30

【表 7 - 2】

AD12194	2.08	1.11	5.37	5.09	53.03	30.92
AD12211	5.27	4.52	11.73	18.93	26.74	191.07
AD12257	4.56	5.20	21.68	22.75	124.69	135.82
AD12280	2.37	4.53	6.89	20.23	64.80	104.82
AD12281	8.81	8.65	19.68	42.89	119.01	356.08
AD12282	7.71	456.42	20.09	558.00	ND	ND
AD12285	ND	1.28	57.30	7.31	261.79	42.53
AD12292	40.23	12.00	929.11	109.10	ND	ND
AD12252	0.02	18.63	6.35	68.24	138.09	404.91
AD12275	25.76	25.04	123.89	133.10	1054.54	776.25
AD12266	4.85	7.80	10.00	32.94	41.67	162.65
AD12267	1.39	1.21	12.00	4.67	283.03	51.12
AD12264	0.92	2.07	8.56	15.12	56.36	196.78
AD12268	2.29	3.67	22.16	25.64	258.27	150.84
AD12279	1.11	28.54	23.19	96.87	327.28	607.27
AD12256	7.20	33.52	46.49	138.04	775.54	1076.76
AD12259	2.16	8.31	8.96	40.12	50.05	219.42
AD12276	19.49	6.14	89.60	59.60	672.51	736.72
AD12321	4.67	4.91	24.88	19.43	139.50	89.49

(ND=測定せず)

表7

L N P 0 1 製剤 s i R N A の単回瞬時投与後の幼若ラットにおける肝 E g 5 / K S P のサイレント化

出生時～約 2 3 日齢において、成長中のラット肝臓において E g 5 / K S P 発現を検出することができる。製剤化された E g 5 / K S P s i R N A を用いた標的のサイレント化を幼若ラットにおいて評価した。

【 0 2 1 2 】

試験した K S P デュプレックス

【 0 2 1 3 】

【化 1 0】

デュプレックスID 標的 センス

アンチセンス

AD6248 VEGF AccGAAGuGuuGuuuGuccTsT(配列番号1238) GGAcAAAcAAcACUUCGGUTsT(配列番号1239)

方法

10

20

30

50

動物の投薬：雄性幼若 Sprague-Dawley ラット（19日齢）に尾静脈注射によりリポイド（LNPO1）製剤化 siRNA の単回用量を投与した。10匹の群に AD6248 又は非特異的 siRNA の何れかを体重キログラム当たり 10 ミリグラム（mg/kg）の用量で投与した。用量レベルは製剤中において投与された siRNA デュプレックスの量を指す。第3の群にはリン酸塩緩衝食塩水を投与した。siRNA 投与後2日に動物を屠殺した。肝臓を摘出し、液体窒素中に急速冷凍し、粉碎して粉末とした。

【0214】

mRNA 測定。Eg5/KSP mRNA のレベルを全治療群由来の肝臓において測定した。各肝臓粉末の試料（約 10 ミリグラム）を、プロテイナーゼ K を含有する組織溶解緩衝液中でホモゲナイズした。Eg5/KSP 及び GAPDH mRNA のレベルは Quantigene 分枝鎖 DNA 試験（Genospectra）を用いて各試料について3連で測定した。Eg5/KSP の平均値を各試料について平均の GAPDH 値に対して規格化した。群平均を求め、各実験について PBS 群に対して規格化した。

10

【0215】

統計学的分析。ANOVA、次いで Tukey post-hoc 試験により有意性を求めた。

【0216】

結果

データのまとめ

Eg5/KSP mRNA に関する平均値（±標準偏差）を示す。PBS 群に対する統計学的有意性（p 値）を示す（ns、有意差無し [p > 0.05]）。

20

【0217】

【化11】

実験1

	VEGF/GAPDH	p値
PBS	1.0±0.47	
AD6248 10 mg/kg	0.47±0.12	<0.001
非特異的 10 mg/kg	1.0±0.26	ns

30

肝臓 Eg5/KSP mRNA の統計学的に有意な低減は 10 mg/kg の用量における製剤化 AD6248 での治療後に観察された。

LNPO1 製剤化 siRNA デュプレックスの静脈内注入後のラット肝 VEGF のサイレント化

2種の siRNA の等モル量混合物を含む「リポイド」製剤をラットに投与した。1つの siRNA（AD3133）は VEGF に対して指向させた。もう一方の siRNA（AD12115）は Eg5/KSP に対して指向させた。Eg5/KSP 発現は成熟ラット肝臓では殆ど検出できないため、VEGF レベルのみが siRNA 治療後に測定された。

40

【0218】

投与した siRNA デュプレックス

【0219】

【化 1 2】

デュプレックスID 標的

センス

アンチセンス

AD12115 Eg5/KSP ucGAGAAucuaAAAcuAAcuTsT (配列番号1240)

AGUuAGUUuAGAUCUCGATsT (配列番号1241)

AD3133 VEGF GcAcAuAGGAGAGAuGAGCUsU (配列番号1242)

AAGCUcAUCUCUCCuAuGuGCusG (配列番号1243)

符号：A、G、C、U—リボヌクレオチド；c、u—2'—O—Me リボヌクレオチド；s—ホスホロチオエート

方法

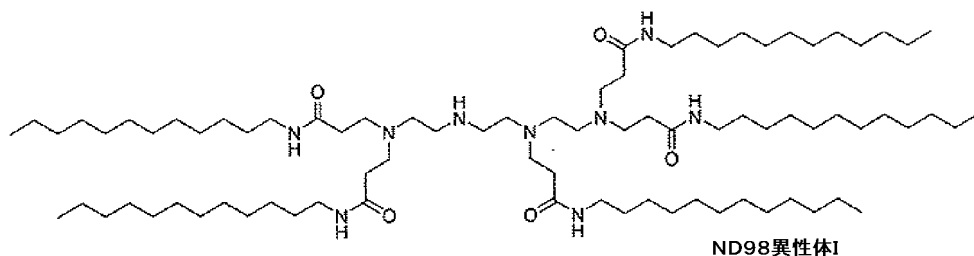
動物の投薬。成熟雌性 Sprague-Dawley ラットの大腿動脈内への2時間の注入によりリポイド (LNP01) 製剤化 siRNA を投与した。4匹の群に製剤化 siRNA の体重キログラム当たり5、10及び15ミリグラム (mg/kg) の用量を投与した。用量レベルは製剤中において投与された siRNA デュプレックスの総量を指す。第4の群にはリン酸塩緩衝食塩水を投与した。siRNA 注入終了後72時間に動物を屠殺した。肝臓を摘出し、液体窒素中に急速冷凍し、粉碎して粉末とした。

製剤手順

リポイドND98：4HCl (MW1487) (式1)、コレステロール (Sigma-Aldrich) 及びPEG-セラミドC16 (Avanti Polar Lipids) を用いて脂質 siRNA ナノ粒子を製造した。エタノール中の各々の保存溶液をND98、133mg/mL；コレステロール、25mg/mL、PEG-セラミドC16、100mg/mLとなるように製造した。次にND98、コレステロール及びPEGセラミドC16保存溶液を42：48：10モルの比において合わせた。合わせた脂質溶液は、最終エタノール濃度35～45%、最終酢酸ナトリウム濃度100～300mMとなるように、水性 siRNA (酢酸ナトリウム pH5 中) と急速混合した。形成された脂質-siRNA ナノ粒子は混合により自発的に形成された。所望の粒径分布に応じて、得られたナノ粒子混合物を場合によりサーモバレル押出器を用いてポリカーボネート膜 (100nmカットオフ) を通して押し出した (Lipex, Extruder, Northern Lipids, Inc)。他の場合においては、押し出し工程を省略した。エタノール除去及び同時緩衝液交換を透析又は接線流動濾過の何れかにより行った。緩衝液はリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) pH7.2に交換した。

【0220】

【化 1 3】



式 1

製剤の特性化

標準的又は押し出しを行わない方法の何れかにより製造された製剤を同様の態様において特性化した。製剤はまず目視による検査により特性化した。凝集塊又は沈降物質を含有しない白色系の透明溶液であるべきとした。脂質ナノ粒子の粒径及び粒径分布はMalvern Zetasizer NanoZS (Malvern, USA) を用いた動的光散乱法により測定した。粒子は20～300nm、理想的には40～100nmのサイズ

であるべきとした。粒径分布は単モードであるべきとした。製剤中の総 s i R N A 濃度、並びに捕獲された画分は染料排出試験を用いて推定される。製剤化された s i R N A の試料を R N A 結合染料リボグリーン (M o l e c u l a r P r o b e s) と共に製剤崩壊性界面活性剤 0.5% T r i t o n - X 100 の存在下及び非存在下においてインキュベートする。製剤中の総 s i R N A は標準曲線と相対比較した場合の界面活性剤含有試料からのシグナルにより測定される。捕獲された画分は総 s i R N A 含有量から「遊離の」 s i R N A 含有量 (界面活性剤非存在下におけるシグナルにより測定される) を差し引くことにより求められる。パーセント捕獲 s i R N A は典型的には > 85 % である。

【0221】

mRNA 測定。各肝臓粉末の試料 (約 10 ミリグラム) をプロテイナーゼ K を含有する組織溶解緩衝液中でホモゲナイズした。V E G F 及び G A P D H mRNA のレベルは Q u a n t i g e n e 分枝鎖 DNA 試験 (G e n o S p e c t r a) を用いて各試料について 3 連で測定した。V E G F の平均値を各試料について平均の G A P D H 値に対して規格化した。群平均を求め、各実験について P B S 群に対して規格化した。

【0222】

蛋白の測定。各肝臓粉末の試料 (約 60 ミリグラム) を 1 m l の R I P A 緩衝液中でホモゲナイズした。M i c r o B C A 蛋白試験キット (P i e r c e) を用いながら総蛋白濃度を測定した。各動物の総蛋白の試料を用いながら、V E G F E L I S A 試験 (R & D システムズ) を使用して V E G F 蛋白レベルを測定した。群平均を求め、各実験について P B S 群に対して規格化した。

統計学的分析。A N O V A、次いで T u k e y p o s t - h o c 試験により有意性を求めた。

【0223】

結果

データのまとめ

mRNA (V E G F / G A P D H) 及び蛋白 (r e l . V E G F) に関する平均値 (± 標準偏差) を各治療群について示す。各実験に関する P B S 群に対する統計学的有意性 (p 値) を示す)。

【0224】

【化14】

	VEGF/GAPDH	p値	rel VEGF	p値
PBS	1.0±0.17		1.0±0.17	
5 mg/kg	0.74±0.12	<0.05	0.23±0.03	<0.001
10 mg/kg	0.65±0.12	<0.005	0.22±0.03	<0.001
15 mg/kg	0.49±0.17	<0.001	0.20±0.04	<0.001

肝 V E G F mRNA 及び蛋白の統計学的に有意な低減が全 3 段階の s i R N A 用量レベルにおいて測定された。

【0225】

【表 1】

【0226】

ヒトアケセシ
ョン番号にお
ける位置

総23量体標的部位の配列

表 1

ヒトアケセシ ョン番号にお ける位置	総23量体標的部位の配列	配列1、センス配列 (5'-3')	配列1、アンチセンス配列 (5'-3')	デュプレックス名	単用量スクリー ン、25nM リーン(4連 [%残存mR 中) NA]	SD第2ス タック
385-407	ACCGAAGUGUUGUUGCCAAUU	1 cGAAGuGuuGuuuGuccAAATsT	2 UUGGACAAAACAAcAUUCGTsT	AL-DP-6226	23%	3%
347-369	UAUGGUGUUGGAGCAUCUACUA	3 uGGuGuuuGGAGcAucUAcTsT	4 GuAGAUcGUCcAAAcACcATsT	AL-DP-6227	69%	10%
1078-1100	AAUCUAAACUAAcUAAGAAUCCUC	5 ucUAAAcUAcUAAGAAUccTsT	6 GGAUUCuAGUuAGUuAGATsT	AL-DP-6228	33%	2%
1067-1089	UCCUUAUCGAGAAUCUAAACUAA	7 cuuAUcGAGAAucUAAAcuTsT	8 AGUuAGAUUCUCGAAuAAgTsT	AL-DP-6229	2%	2%
374-396	GAUUGAUUUUACCGAAAGUGUUG	9 uuGauGuuuAccGAAGuGuTsT	10 AcACUUCGGuAAAcAUcAAATsT	AL-DP-6230	66%	11%
205-227	UGGUGAGUcGAGACCAUUUAAU	11 GuGAGAUcGAGAcAUuuATsT	12 uAAUUGGUCcAUcUcAcTsT	AL-DP-6231	17%	1%
1176-1198	AcUCUGAGUACAUUGGAUVAUGC	13 ucUGAGuAcAUuGGAAuATsT	14 AuAUUCcAAUGuAcUcAGATsT	AL-DP-6232	9%	3%
386-408	CCGAAAGUGUUGUUGUCCAAUUC	15 GAAGuGuuGuuuGuccAAuTsT	16 AUUGGACAAAACAcACUUCTsT	AL-DP-6233	24%	6%
416-438	AGUUAUUAUGGGCUAAUUAUGCA	17 uuAUuAUGGGcuAAuAuGTsT	18 cAAUuAUAGCCcAAuAAuATsT	AL-DP-6234	91%	2%
485-507	GGAAGGUGAAAAGGUCACCUA AUG	19 AAGGuGAAAGGcUAcCUAATsT	20 UuAGGUGACCUUUCACCUUTsT	AL-DP-6235	112%	4%
476-498	UUUACAAUGGAAAGGUGAAAGGU	21 uuAcAAuGGAAGGUGAAAGTsT	22 CUUUCACCUUCcAUUGuAAATsT	AL-DP-6236	69%	4%
486-508	GAAAGGUGAAAAGGUCACCUAAUGA	23 AGGuGAAAGGUGAcCUAAuTsT	24 AUuAGGUGACCUUUCACCUTsT	AL-DP-6237	42%	2%
487-509	AAGGUGAAAGGUCACCUAAUGAA	25 GGUGAAAGGUGAcCUAAuGTsT	26 cAUuAGGUGACCUUUCACCTsT	AL-DP-6238	45%	2%
1066-1088	UUCCUUAUCGAGAAUCUAAACUA	27 ccuuAUcGAGAAucUAAAcTsT	28 GUUuAGAUUCUGAAuAAgTsT	AL-DP-6239	2%	1%
1256-1278	AGCUCUUAUUAAGGAGUAUACGG	29 cucuuAUuAAAGGAGuAAcTsT	30 GuAUAcUCCUuAAuAAAGATsT	AL-DP-6240	48%	2%
2329-2351	CAGAGAGAUUCUGUGCUUUGGAG	31 GAGAGAUucUGuGcuuUGTsT	32 CcAAAGAcAGAAUCUCUCTsT	AL-DP-6241	41%	2%
1077-1099	GAAUCUAAACUAAcUAGAAUCCU	33 AUcuAAAcUAAcUAGAAucTsT	34 GAUUCuAGUuAGUuAGAUTsT	AL-DP-6242	8%	2%
1244-1266	AcUCACCAAAAAGCUCUUAUUA	35 ucAcCAAAAAGcucuuAUtsT	36 AuAAAGAGCUUUUUGGUGATsT	AL-DP-6243	7%	1%
637-659	AAGACUUUUUGAUUCUUAUUAU	37 GAGcuuuuuGaucuucuuATsT	38 uAAGAAAGUcAAAAGCUCTsT	AL-DP-6244	6%	2%
1117-1139	GGCGUACAGAAcUAUCUAUAUU	39 cGUAcAGAAcAUcuAAuATsT	40 UuAAAGAUUUCUUGuACGTsT	AL-DP-6245	12%	2%
373-395	AGAUGAUUUUACCGAAGUGUU	41 AUuAGUuuuAccGAAGuGTsT	42 cACUUCGGuAAAcAUcAAUTsT	AL-DP-6246	28%	3%
1079-1101	AUCUAAACUAAcUAGAAUCCUCC	43 cuAAAcUAAcUAGAAuccuTsT	44 AGGAUUCuAGUuAGUuAGTsT	AL-DP-6247	71%	4%
383-405	UUACCGAAGUGUUGUUGUCCAA	45 AccGAAAGuGuuGuuUGuccTsT	46 GGAcAAAcAAcACUUCGGUTsT	AL-DP-6248	5%	2%
200-222	GGUGGUGGUGAGAUcGAGACCAU	47 uGGUGGUGAGAUcGAGAcTsT	48 GGUCUGcAUUCcACcACcATsT	AL-DP-6249	28%	3%

10

20

30

40

【表 2 - 1】

表 2

ヒトアクセ ション番号に おける位置	全19番体標的配列の配列	配列 ID	センス配列 (5' - 3')	アンチセンス配列 (5' - 3')	デュプレッ ク名	第1単用量ス クリン、 50nM [%残存 mRNA]	SD第1ス クリン (4連中)	第2単用量ス クリン、 25nM [%残存 mRNA]	SD第2ス クリン (4連中)	第3単用量 スクリ ン、25nM	SD第3ス クリン (4連中)
829-847	CAUACUCUAGUCGUUCCCA	49	CAUACUCUAGUCGUUCCCAU	UGGGAACGACUAGAGUAU	AD-12072	65%	2%	82%	5%		
246-264	AGCGCCCAUACAAGUAG	51	AGCGCCCAUACAAGUAGT	CUCUAUUGAUAUGGGCCU	AD-12073	84%	1%	61%	6%		
238-256	GGAAAGCUAGCGCCCAUUC	53	GGAAAGCUAGCGCCCAUUC	GAAUUGGGCCUAGGUUCC	AD-12074	51%	3%	36%	9%		
239-257	GAAAGCUAGCGCCCAUUC	55	GAAAGCUAGCGCCCAUUC	UGAUAUGGGCCUAGGUUCC	AD-12075	56%	4%	36%	4%		
878-896	AGAAACUACGAUUGAUGGA	57	AGAAACUACGAUUGAUGGA	UCCAUCAUUGGUUUCU	AD-12076	21%	4%	13%	3%		
1064-1082	UGUUCUUUUCGGAUAUCU	59	UGUUCUUUUCGGAUAUCU	AGAUUCUGGAUAAGGAAC	AD-12077	11%	2%	6%	1%		
3278-3296	CAGAUAUACUUGCGAGGC	61	CAGAUAUACUUGCGAGGC	GGUUCGAGAGGAUAUUCU	AD-12078	22%	3%	9%	2%		
247-265	GGCGCCCAUCCAUAUAGUA	63	GGCGCCCAUCCAUAUAGUA	UCUACUAUUGAUAUGGGCC	AD-12079	22%	10%	15%	7%		
434-452	UUGCACUAUCUUUGCGUAU	65	UUGCACUAUCUUUGCGUAU	AUACGCAAGAAUAGUGCA	AD-12080	68%	4%	52%	13%		
232-250	CAGAGCGGAAGCUAGCGC	67	CAGAGCGGAAGCUAGCGC	GGCUAGCUUUCGCUUCU	AD-12081	34%	8%	35%	24%		
1831-1849	AGACCUUAUUGGUAUUCU	69	AGACCUUAUUGGUAUUCU	AGAUACCAAAUAGGUCU	AD-12082	20%	2%	92%	5%		
1105-1123	AUUCUUGAGAGGGGUAC	71	AUUCUUGAGAGGGGUAC	GUACGCCUCCAGAGAAU	AD-12083	85%	6%	63%	10%		
536-554	GGUGGUUAUAUCCACGU	73	GGUGGUUAUAUCCACGU	ACUGGAUAUAUACACGCT	AD-12084	18%	6%	17%	4%		
236-254	GGGAAAGCUAGCGCCCAU	75	GGGAAAGCUAGCGCCCAU	AUGGGGCUAGCUUUCGCT	AD-12085	13%	4%	12%	4%		
435-453	UGCACUAUCUUUGCGUAUG	77	UGCACUAUCUUUGCGUAUG	CAGACCAAGAAUAGUGCA	AD-12086	26%	5%	17%	3%		
541-559	GUUAUAUCCACGUACCCU	79	GUUAUAUCCACGUACCCU	AGGGUACGUGGAUAUAUAC	AD-12087	95%	4%	80%	4%		
1076-1094	AGAAUAUAACUAACUAGA	81	AGAAUAUAACUAACUAGA	UCUAGUAUUAUUAUUCU	AD-12088	29%	6%	29%	2%		
1432-1450	AGGAGCTGAAUAGGGUUA	83	AGGAGCTGAAUAGGGUUA	GUACCCUAUUCAGCUUCU	AD-12089	69%	5%	64%	7%		
1821-1839	GAAGUACAUAAGACCUUAU	85	GAAGUACAUAAGACCUUAU	AUAAGGUCUAUUGUACUUC	AD-12090	46%	15%	34%	5%		
2126-2144	GACAGUGCGCGAUAAGAUA	87	GACAGUGCGCGAUAAGAUA	UAUCUUAUCGGCCACUGUC	AD-12091	16%	6%	17%	3%		
2373-2391	AAACCAUAUAGUAGUCC	89	AAACCAUAUAGUAGUCC	GGACACUAUAAGUGGUU	AD-12092	82%	26%	63%	5%		
4026-4044	UCCCUAGACUUCCUAUUU	91	UCCCUAGACUUCCUAUUU	AAAUAGGGAAGUCUAGGGA	AD-12093	84%	4%	70%	4%		
4030-4048	UAGACUUCGUUAUUGCGU	93	UAGACUUCGUUAUUGCGU	AGCGAAUAAGGAAGUCUA	AD-12094	46%	3%	34%	1%		
144-162	GGUGCGAGCAAAUUCGU	95	GGUGCGAGCAAAUUCGU	ACGAUUGGGCCUGGAGCT	AD-12095	14%	2%	13%	1%		
242-260	AGCUAGCGCCCAUUCAAUA	97	AGCUAGCGCCCAUUCAAUA	UAUUGAAUGGGCCUAGCU	AD-12096	26%	11%	17%	1%		
879-897	GAAACUACGAUUGAGGAG	99	GAAACUACGAUUGAGGAG	CUCUAUCAAUCCGUAUUC	AD-12097	23%	2%	21%	1%		
2134-2152	CCGAUAAGAUAAGAUAUA	101	CCGAUAAGAUAAGAUAUA	UGAUUCUAUCUUAUCGCT	AD-12098	41%	14%	17%	3%		
245-263	UAGCGCCCAUCCAUAUAUA	103	UAGCGCCCAUCCAUAUAUA	UAUAUAUAGUAGGCGUA	AD-12099	57%	2%	48%	6%		
444-462	UUUGGUUAUGGCCAAACUG	105	UUUGGUUAUGGCCAAACUG	CAGUUGGCCAAUACGCAAT	AD-12100	101%	11%	98%	8%		
550-568	CACGUACCCUUAUCAAAAU	107	CACGUACCCUUAUCAAAAU	AUUUGAUGAAGGGAUACGU	AD-12101	46%	7%	32%	2%		
442-460	UCUUUGCGUAUGGCCAAAC	109	UCUUUGCGUAUGGCCAAAC	GUUUGGCCAAUACGCAAGAT	AD-12102	96%	17%	88%	18%		

【 0 2 2 7 】

【表 2 - 2】

表 2

ヒトアケセツ シヨウ番号に おける位置	全19量体標的部位の配列	配列 ID	センズ配列 (5'-3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5'-3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリーン、 50nM(%)残存 mRNA]	SD第1ス クリーン (4連中)	第2単用量ス クリーン、 25nM(%)残存 mRNA]	SD第2ス クリーン (4連中)	第3単用量 スクリー ン、25nM	SD第3ス クリーン (4連中)
386-404	CCGAAGUGUGUUGUCCA	111	CCGAAGUGUGUUGUCCATST	112	UGACAAACACACUUCGGTST	AD-12103	19%	5%	20%	2%		
233-251	AGAGCGGAAAGUAGCGCC	113	AGAGCGGAAAGUAGCGCTST	114	GGCGCAGCUUUCGCGCUTST	AD-12104	40%	8%	24%	2%		
243-261	GCTAGCGCCCAUUCAAUAG	115	GCTAGCGCCCAUUCAAUAGTST	116	CTAUAUAGAAUGGCGCCTAGCTST	AD-12105	39%	2%	36%	10%		
286-304	AAGUUAGUGUACGAAUCUGG	117	AAGUUAGUGUACGAAUCUGTST	118	CGAGUUCGUAACACUAACUUTST	AD-12106	87%	6%	79%	19%		
294-312	GUACGAACUGGAGGAUUGG	119	GUACGAACUGGAGGAUUGGTST	120	CCAAUCCUCCAGUUCGUAUCTST	AD-12107	29%	2%	32%	16%		
296-314	ACGAACUGGAGGAUUGGU	121	ACGAACUGGAGGAUUGGUTST	122	AGCCAAUCCUCCAGUUCGUTST	AD-12108	38%	4%	39%	8%		
373-391	AGAUAUGUUAUACCGAAG	123	AGAUAUGUUAUACCGAATST	124	CUUCGGUAAACAUCAUUCUTST	AD-12109	49%	3%	44%	10%		
422-440	UAUGGGCUAUAUUGCACU	125	UAUGGGCUAUAUUGCACUTST	126	AGUGCAUAUAUAGCCCAUAATST	AD-12110	85%	5%	80%	14%		
441-459	AUCUUUGCGUAUGGCCAAA	127	AUCUUUGCGUAUGGCCAAATST	128	UUUGGCCAUAACGCAAGAUATST	AD-12111	64%	6%	71%	18%		
832-850	ACUCUAGUCGUUCCACUC	129	ACUCUAGUCGUUCCACUCTST	130	GAGUGGGAACGACUAAGAGUTST	AD-12112	48%	4%	41%	5%		
881-899	AACUACGAUUGAUGGAGAA	131	AACUACGAUUGAUGGAGATST	132	UUCUCCAUCAUUCGUAUUTST	AD-12113	13%	0%	14%	3%		
975-993	GAUAAGAGAGCUCGGGAAG	133	GAUAAGAGAGCUCGGGAATST	134	CUUCCGAGCUCUCUAUUCTST	AD-12114	32%	6%	16%	4%		
1073-1091	UCGAGAUCUUAACUAACU	135	UCGAGAUCUUAACUAACUTST	136	AGUAUAUAUAUUCUUGATST	AD-12115	8%	4%	7%	5%		
1084-1102	AACUAAACUAGAUCUCCCA	137	AACUAAACUAGAUCUCCATST	138	UGGAGAUUCUAAGUAUUTST	AD-12116	74%	5%	61%	7%		
1691-1709	GGAUCGUAAAGAGGCCAGUU	139	GGAUCGUAAAGAGGCCAGUUTST	140	AAACUGCUUCUAACGAUUCTST	AD-12117	21%	4%	20%	2%		
1693-1711	AUCGUAAAGAGGCCAGUUA	141	AUCGUAAAGAGGCCAGUUGATST	142	UCAAACUGCUUCUAACGAUTST	AD-12118	44%	4%	42%	6%		
1702-1720	AGCGAGUUGACCAACACAA	143	AGCGAGUUGACCAACAAATST	144	UUGUGUUGUUAACUCCUUTST	AD-12119	37%	4%	24%	3%		
2131-2149	UGGCCGUAUAAGUAGAAGA	145	UGGCCGUAUAAGUAGAATST	146	UCUUCUAUAUAUUGGCCATST	AD-12120	22%	2%	15%	4%		
2412-2430	UCUAAGGAUAUAGUCAACA	147	UCUAAGGAUAUAGUCAACATST	148	UGUGACUAUAUCCUUAAGATST	AD-12121	32%	1%	22%	2%		
2859-2877	ACUAAAGCUUAUUGCUUUC	149	ACUAAAGCUUAUUGCUUUCTST	150	GAAAGCAUAUAAGCUAAGUTST	AD-12122	36%	16%	19%	5%		
3294-3312	GCCCAGAUCAACCUUAUAU	151	GCCCAGAUCAACCUUAUATST	152	AUAAGAGGUGAUCUGGCUUTST	AD-12123	28%	1%	16%			
223-241	UUUAUUUGGCAGAGCGGAA	153	UUUAUUUGGCAGAGCGGAATST	154	UUCCGCUCUGCCAAAUAATST	AD-12124	28%	2%	16%			
1070-1088	UUUUGGAGAUUCUAACTUA	155	UUUUGGAGAUUCUAACTUATST	156	UAGUUAUAUUCUGUAUAATST	AD-12125	15%	1%	14%			
244-262	CUAGCGCCCAUUCUAAUAGU	157	CUAGCGCCCAUUCUAAUAGUTST	158	ACUAUUGAAUGGGCGCUAGTST	AD-12126	51%	22%	27%			
257-275	AAUAGUAGAAUUGUGAUCCU	159	AAUAGUAGAAUUGUGAUCCUTST	160	AGGAUCACAUUCUAUAUUTST	AD-12127	54%	4%	42%	9%		
277-295	UACGAAAGAGAGUUAUGUGU	161	UACGAAAGAGAGUUAUGUTST	162	ACACUAACUUCUUAUUCGUAATST	AD-12128	29%	1%	20%	2%		
284-302	AGAAGUUAUGUAGAGACU	163	AGAAGUUAUGUAGAGACUTST	164	AGUUCGUAACACUAACUUCUTST	AD-12129	22%	3%	19%	3%		
366-384	ACUAAACAGAUUGAUGUUU	165	ACUAAACAGAUUGAUGUUTST	166	AAACAUCAUUCUGUUAUAGUTST	AD-12130	53%	6%	42%	7%		
443-461	CUUUGCGUAUGGCCAAACU	167	CUUUGCGUAUGGCCAAACUTST	168	AGUUUGGCCAUAACGCAAGTST	AD-12131	28%	5%	22%	3%		
504-522	AAUGAAGAGUAUACCUUGGG	169	AAUGAAGAGUAUACCUUGGTST	170	CCAGGUAUAACUUCUUAUUTST	AD-12132	88%	2%	90%	18%		
543-561	AUAUAUCCACGUAUCCUUC	171	AUAUAUCCACGUAUCCUUCTST	172	GAAGGGAUAGGGAUAUAUTST	AD-12133	34%	2%	26%	6%		

【 0 2 2 8 】

【表 2 - 3】

表 2

ヒトアッセ クション番号に おける位置	全19量体標的配列	配列 ID	セン配列 (5'-3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5'-3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリン、 50nM[％残存 mRNA]	SD第1ス クリン (4連中)	第2単用量ス クリン、 25nM[％残存 mRNA]	SD第2ス クリン (4連中)	第3単用量 スクリン、 25nM	SD第3ス クリン (4連中)
551-569	ACGUACCCUUCACUAAAUU	173	AcGUACccuucaucAAAuuTsT	174	AAUUUGAAGGGAAGGUAUUTsT	AD-12134	18%	3%	14%	2%		
552-570	CGUACCCUUCACUAAAUU	175	cGUACccuucaucAAAuuTsT	176	AAUUUGAAGGGAAGGUAUUTsT	AD-12135	50%	6%	37%	4%		
553-571	GUACCCUUCACUAAAUUU	177	GuACccuucaucAAAuuuTsT	178	AAAUUUGAAGGGAAGGUAUUTsT	AD-12136	42%	19%	22%	2%		
577-595	AACUUAUCGUAUAUUGGUAC	179	AACuuAucGuAAuUGGuAcTsT	180	GuACcAuUuUcAGuAAGUUTsT	AD-12137	85%	12%	92%	4%		
602-620	UUCAGUCAAAGUGUCUCUG	181	uuCAgucAAAGUGucucUGTsT	182	cAGAGAcACUuUGAGUGAAuTsT	AD-12138	47%	6%	49%	1%		
652-670	UUCUUAUCCAUCAUCUGA	183	uuCuUAUccAuCAuCuGATsT	184	UcAGAUcAGGUAuUAcGATsT	AD-12139	80%	5%	72%	4%		
747-765	ACAGUACAAACAGGAUG	185	AcAGuAcAAcAGgAGuTsT	186	GAUCCUUGUGUGuACUGuTsT	AD-12140	97%	22%	67%	9%		
877-895	AAGAAACUACGAUUGAUGG	187	AAGAAAcuAcGAuUGAGGTsT	188	CcAUcAAUCGUAAGUUCUUTsT	AD-12141	120%	4%	107%	10%		
880-898	AAACUACGAUUGAUGGAGA	189	AAAcuAcGAuUGAGGAGTsT	190	UCUCcAUcAAUCGUAAGUUTsT	AD-12142	55%	8%	33%	4%		
965-983	UGGAGCUGUGAUAAGAGA	191	uGGAGcuGUgUAaAGAGATsT	192	UCUCUuAUcAcAcAGCUCcATsT	AD-12143	64%	34%	19%	2%		
1086-1104	CUAACUAGAAUCCUCCAGG	193	cuAAcUAGAAUccUccAGTsT	194	CCUGAGGAAUUCUAGUuAGTsT	AD-12144	58%	29%	17%	2%		
1191-1209	GAUAUGCUCUAAGAGCAA	195	GAUAUGCuCAAGAGcATsT	196	UUGCUCuAUAGAGcAUUcTsT	AD-12145	27%	8%	18%	2%		
1195-1213	AUGCUCUAAGAGCAAAGAA	197	AuGcuCAuAGAGcAAAGATsT	198	UUCUUGCUCuAUAGAGcAUUTsT	AD-12146	19%	20%	15%	1%		
1412-1430	AAAAUUGGUGCUGUGAG	199	AAAAUuUGGUGcuUGAGTsT	200	CUCcAAcAGcACcAAUuUUTsT	AD-12147	29%	9%	35%	3%		
1431-1449	GAGGAGCUGAAUAGGGUUA	201	GAGGAGcuGAUAGGGuATsT	202	UAACCCuAUUCAGCUCcUUTsT	AD-12148	30%	3%	56%	5%		
1433-1451	GGAGCUGUAUAGGGUUA	203	GGAGCuGUAuAGGGuATsT	204	UGUAACCCuAUUCAGCUCcTsT	AD-12149	8%	2%	12%	3%		
1434-1452	GAGCUGAUAAGGGUUA	205	GAGCuGAUAAGGGuAcATsT	206	CUGUAACCCuAUUCAGCUCcTsT	AD-12150	31%	2%	31%	7%		
1435-1453	AGCUGAUAAGGGUUA	207	AGCuGAUAAGGGuAcATsT	208	UCUGUAACCCuAUUCAGCUCcTsT	AD-12151	9%	5%	14%	2%		
1436-1454	GCUGAUAAGGGUUA	209	GcuGAUAAGGGuAcAGTsT	210	CUCUGUAACCCuAUUCAGCUCcTsT	AD-12152	3%	3%	23%	3%		
1684-1702	CCAAACUGGAUCCGUAAGAA	211	cCAAAcUGGAUccGUAGATsT	212	UUCUcACGUAUCCAGUUGGTsT	AD-12153	20%	6%	34%	4%		
1692-1710	GAUCGUAAGAGGCAGUUG	213	GAUCGUAGAGGcAGUUGTsT	214	CAACUGCCUUCUuAcGACUcTsT	AD-12154	24%	7%	44%	3%		
1833-1851	ACCUUAUUGGUAUUGC	215	AcCUUAUUGGUAuUGcTsT	216	GcAGAUUAcCAAAUAAGGUTsT	AD-12155	33%	6%	53%	11%		
1872-1890	UUAGUAACCAUUAUACAG	217	uuAGUAACCAuUAuAcATsT	218	CUGUAAGAAUGGUAUcUAATsT	AD-12156	35%	5%	40%	5%		
1876-1894	AUACCAUUAUACAGUAGC	219	AuAcCAUUAuAcAGuAGcTsT	220	GCUAcUGUAAGAAUAGGUAUTsT	AD-12157	8%	3%	23%	4%		
1883-1901	UACUACAGUAGCACAUGGA	221	uAcUAcAGUAAGcAcuGGATsT	222	UCCAAAGUGGUACUGUAGGATsT	AD-12158	13%	2%	22%	5%		
1987-2005	AAAGUAABAAACUGUACUACA	223	AAAGUAABAAcUGuAcuAcTsT	224	UGUAAGUAAGUUAUAcUUTsT	AD-12159	34%	6%	46%	5%		
2022-2040	CUCAGACUGAUCUUA	225	cuCAgAcUGAUcuUUAATsT	226	UuAGAGAUcAGUCUUGAGTsT	AD-12160	19%	3%	31%	4%		
2124-2142	UUGACAGUGGCCGUAAGAA	227	uuGAcAGUGGCCGUAAGATsT	228	UCUUAUCGGCgACUGUGcATsT	AD-12161	88%	4%	83%	7%		
2125-2143	UGACAGUGGCCGUAAGAAU	229	UGAcAGUGGCCGUAAGATsT	230	AUCUUAUCGGCgACUGUGcATsT	AD-12162	26%	7%	32%	7%		
2246-2264	GCAAUUGGAAACCUAACU	231	GcAAUUGGAAAcCUAcuTsT	232	AGUAAGGUUUCcAcAUUGcTsT	AD-12163	55%	9%	40%	3%		
2376-2394	CCACUUAAGUAGUGUCCAGG	233	ccAcUUAAGUAguGUccAGTsT	234	CCUGGAcACUAcUAAGGUTsT	AD-12164			21%	3%		

【 0 2 2 9 】

【表 2 - 4】

表 2

ヒトクセッ ション番号に おける位置	全19量体標的部位の配列	配列 ID	センシ配列 (5'-3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5'-3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリーン、 50nM[も残存 mRNA]	SD第1ス クリーン (4連中)	第2単用量ス クリーン、 25nM[も残存 mRNA]	SD第2ス クリーン (4連中)	第3単用量 スクリー ン、25nM	SD第3ス クリーン (4連中)
2504-2522	AGAAAGGUAACAAAUUGGUU	235	AGAAAGGUAACAAAUUGGUU	236	AACCAUUUUUGAACCUUCU	AD-12165	30%	3%	41%	4%		
2852-2870	UGGUUUGACUAAGCUCUAAU	237	UGGUUUGACUAAGCUCUAAU	238	AUAAGCUCUAAGCUCUAAU	AD-12166	9%	10%	22%	9%		
2853-2871	GGUUUGACUAAAGCUCUAAU	239	GGUUUGACUAAAGCUCUAAU	240	AAUUAAGCUCUAAAGCUCU	AD-12167	26%	3%	30%	2%		
3110-3128	UCUAAGUCUAAGAGCCAUUC	241	UCUAAGUCUAAGAGCCAUUC	242	AGAUGGUCUCUAGACUUAAG	AD-12168	54%	4%	59%	20%		
3764-3782	UCAUCCCUAUAAGUUCACUU	243	UCAUCCCUAUAAGUUCACUU	244	AAUGUAAACUAAGGGAUGAT	AD-12169	41%	4%	51%	16%		
3765-3783	CAUCCCUAUAAGUUCACUUU	245	CAUCCCUAUAAGUUCACUUU	246	AAAGUGAACUAAGGGAUGAT	AD-12170	43%	4%	52%	20%		
4027-4045	CCCUAGACUCCCUAUAUUC	247	CCCUAGACUCCCUAUAUUC	248	GAUAAGGGAAGUUCUAGGAT	AD-12171	67%	3%	73%	25%		
4031-4049	AGACUUCUCCCUAUAUUCGU	249	AGACUUCUCCCUAUAUUCGU	250	AAGCGAAUAAGGGAAGUUCU	AD-12172	53%	15%	37%	2%		
4082-4100	UCACCAAAACCAUUGUAGA	251	UCACCAAAACCAUUGUAGA	252	UCUACAAUUGGUUUGUGAT	AD-12173	39%	0%	39%	0%		
4272-4290	UCCUUUAAGAGGCCUACUC	253	UCCUUUAAGAGGCCUACUC	254	AGUUAGGCCUCUUAAGGAT	AD-12174	41%	5%	27%	0%		
4275-4293	UUUAAGAGGCCUAAACUACU	255	UUUAAGAGGCCUAAACUACU	256	AUGAUUAAGGCCUCUAAAT	AD-12175	29%	0%	38%	14%		
4276-4294	UUUAAGAGGCCUAAACUACU	257	UUUAAGAGGCCUAAACUACU	258	AAUGAGUUAAGGCCUCUAA	AD-12176	43%	2%	56%	25%		
4282-4300	GGCCUAACTUCAUCCACCCU	259	GGCCUAACTUCAUCCACCCU	260	AGGUGUAAGAGUUAAGGCT	AD-12177	68%	6%	74%	30%		
4571-4589	UGGUUAUUUGAUCUGGCA	261	UGGUUAUUUGAUCUGGCA	262	UGCCAGAUCAAAAUAACCA	AD-12178	41%	4%	41%	6%		
4677-4695	AGUUUAAGUGUUAAGUUU	263	AGUUUAAGUGUUAAGUUU	264	AAACUUUAACACUAAACU	AD-12179	53%	5%	44%	5%		
152-170	GCCAAAUUCGUCUGCGAG	265	GCCAAAUUCGUCUGCGAG	266	CUUCGACGACGAUUAUGCT	AD-12180	16%	2%	13%	4%		
156-174	AAUUCGUCUGCGAAGAGA	267	AAUUCGUCUGCGAAGAGA	268	UCUUCUUGCGACGACGAU	AD-12181	19%	3%	14%	2%		
491-509	UGAAAGGUCACCUAAUGAA	269	UGAAAGGUCACCUAAUGAA	270	UUCAUUAGGUGACCUUUGAT	AD-12182	16%	4%	18%	8%		
215-233	CAGACCAUUUAUUUGGCA	271	CAGACCAUUUAUUUGGCA	272	UGCCAAUUAUUAUUGGCU	AD-12183	26%	3%	19%	4%		
216-234	AGACCAUUUAUUUGGCA	273	AGACCAUUUAUUUGGCA	274	CUGCCAAUUAUUAUUGGCU	AD-12184	54%	2%	77%	8%		
416-434	AGUUUAUUGGCUUAUAU	275	AGUUUAUUGGCUUAUAU	276	AUAUAAGCCCAUAUAACU	AD-12185	8%	1%	9%	1%		
537-555	GCUGGUUAUUAUCCAGUA	277	GCUGGUUAUUAUCCAGUA	278	UACGUGGAUAUAUACGCT	AD-12186	36%	3%	41%	6%		
221-239	AUUUAUUUGGACAGCGG	279	AUUUAUUUGGACAGCGG	280	CCGCUUCGCAAAUUAUAU	AD-12187	34%	17%	27%	1%		
222-240	UUUAUUUGGACAGCGGA	281	UUUAUUUGGACAGCGGA	282	UCCGCUUGGCAAAUUAUA	AD-12188	30%	3%	27%	4%		
227-245	UUUGGACAGCGGAAAGCU	283	UUUGGACAGCGGAAAGCU	284	AGCUUUCGCUUGGCAAAAT	AD-12189	51%	4%	48%	5%		
476-494	UUUUAACAUGGAAGUGAA	285	UUUUAACAUGGAAGUGAA	286	UUCACCUUCCAUUGUAAT	AD-12190	33%	2%	26%	4%		
482-500	AAUGGAAGUGAAAGGUCA	287	AAUGGAAGUGAAAGGUCA	288	UGACCUUUCACCUUCUAU	AD-12191	20%	2%	13%	0%		
208-226	UGAGAUGCAGACCAUUUA	289	UGAGAUGCAGACCAUUUA	290	UUAUUGGUCUGACUUAAT	AD-12192	21%	1%	23%	10%		
147-165	UCGACGCCAAAUCUGUCUG	291	UCGACGCCAAAUCUGUCUG	292	CAGACGAAUUGGCGUGGAT	AD-12193	64%	8%	98%	6%		
426-444	GGCUAUAUUGCACAUCUC	293	GGCUAUAUUGCACAUCUC	294	AGAAUUGGCAAAUUAAGCT	AD-12194	8%	2%	15%	4%		
2123-2141	AUUGACAGUGGCCGUAAG	295	AUUGACAGUGGCCGUAAG	296	CUUAUCGGCACUGUCAU	AD-12195	34%	2%	48%	3%		

【 0 2 3 0 】

【表 2 - 5】

表 2

ヒトアクセシ ョン番号に おける位置	全 19 番体標的配列	配列 ID	センシ配列 (5' - 3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5' - 3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリン、 50nM[*]残存 mRNA]	SD第1ス クリン (4連中)	第2単用量ス クリン、 25nM[*]残存 mRNA]	SD第2ス クリン (4連中)	第3単用量 スクリン、 25nM	SD第3ス クリン (4連中)
4029-4047	CUAGACUUCUUAUUGGC	297	CUAGACUUCUUAUUGGC	298	GCAGAAUAGGGAGUCUAGTST	AD-12196	34%	2%	51%	3%		
438-456	ACUACUUCUGGCUAUGGCC	299	ACUACUUCUGGCUAUGGCC	300	GGCCACACGCAAAAGUAAGUTST	AD-12197	75%	4%	93%	6%		
830-848	AUACUCUAGGCGUUCGCCAC	301	AUACUCUAGGCGUUCGCCAC	302	GUGGGACGACUAGAGUAUTST	AD-12198	55%	5%	48%	2%		
876-894	AAAGAAACUACGAUUGAUG	303	AAAGAAACUACGAUUGAUG	304	CAUCACUUCUAGUUCUUTST	AD-12199	102%	6%	118%	9%		
115-133	GCCUUGAUUUUUGCGGG	305	GCCUUGAUUUUUGCGGG	306	CCCGCAAAAAAUCAAGCTST	AD-12200	75%	6%	60%	12%		
248-266	CGCCCAUUCUAUAGUAGAA	307	CGCCCAUUCUAUAGUAGAA	308	UUCUACUUAUUGAUGGCGTST	AD-12201	42%	3%	16%	4%		
1834-1852	CCUUAUUUGGUAUUCUGCU	309	CCUUAUUUGGUAUUCUGCU	310	AGCAGAUACCAAAUAGGTST	AD-12202	29%	4%	9%	3%		
3050-3068	AGAGACAAUUCGGAUGUG	311	AGAGACAAUUCGGAUGUG	312	CACAUCCGGAUUGUCUUTST	AD-12203	114%	14%	89%	20%		
4705-4723	UGACUUUGAUGCUAAAUU	313	UGACUUUGAUGCUAAAUU	314	AAUUAAGCUAUGAAAGUCATST	AD-12204	64%	7%	26%	5%		
229-247	UGGCAGAGCGGAAGCUAG	315	UGGCAGAGCGGAAGCUAG	316	CUAGCUUCCGUCUGCCATST	AD-12205	66%	12%	35%	4%		
234-252	GAGCGGAAAGCUAGCGCC	317	GAGCGGAAAGCUAGCGCC	318	GGCGCUAGCUUUCGCUCTST	AD-12206	46%	3%	32%	12%		
282-300	AAAGAAUUAUGUACGAA	319	AAAGAAUUAUGUACGAA	320	UUCGACACUAACUUCUUTST	AD-12207	57%	5%	40%	6%		
433-451	AUUGCACUACUUGCGUA	321	AUUGCACUACUUGCGUA	322	UACGCAAGAAUAGUGCAADTST	AD-12208	30%	8%	10%	5%		
540-558	GGUAUAUUCACAGUACCC	323	GGUAUAUUCACAGUACCC	324	GGUACUGUGAAUUAUACCTST	AD-12209	101%	6%	102%	23%		
831-849	UACUCUAGUGUUCGCCU	325	UACUCUAGUGUUCGCCU	326	AGUGGAAAGCAUAGAGUAUTST	AD-12210	38%	11%	27%	14%		
872-890	UAUGAAAGAAACUACGAU	327	UAUGAAAGAAACUACGAU	328	AAUCGUAUUUUCUUAUTST	AD-12211	16%	6%	10%	5%		
1815-1833	AUGCUAGAAUACUAAGA	329	AUGCUAGAAUACUAAGA	330	UCUUAUGACUUCUAGCAUTST	AD-12212	59%	8%	65%	5%		
1822-1840	AAGUACAUAAGACCUUAU	331	AAGUACAUAAGACCUUAU	332	AAUAAGUCUUAUGUACUUTST	AD-12213	24%	9%	12%	2%		
3002-3020	ACAGCCUGAGCUGUUAUG	333	ACAGCCUGAGCUGUUAUG	334	CAUUAACAGCUCAGGCUUTST	AD-12214	67%	14%	70%	12%		
3045-3063	AAAGAAAGACAAUUCGG	335	AAAGAAAGACAAUUCGG	336	CCGGAUUGUCUCUUCUUTST	AD-12215	29%	13%	13%	4%		
3224-3242	CACACUGGAGGUCUAAA	337	CACACUGGAGGUCUAAA	338	UUUAGACCCUUCAGUGUTST	AD-12216	36%	4%	13%	1%		
3226-3244	CACUGGAGGUCUAAAGU	339	CACUGGAGGUCUAAAGU	340	ACUUUAGACUUCUAGUTST	AD-12217	36%	9%	11%	2%		
3227-3245	ACUGGAGGUCUAAAGUG	341	ACUGGAGGUCUAAAGUG	342	CACUUAAGACUUCUAGUTST	AD-12218	35%	5%	17%	3%		
145-163	CUUCGACGACAAAUUCGUC	343	CUUCGACGACAAAUUCGUC	344	GACGAUUUUGGUCGACGUTST	AD-12219	41%	9%	14%	1%		
1700-1718	GAAGGACUUGACCAACAC	345	GAAGGACUUGACCAACAC	346	GUGUGGUCACUUGCUUTST	AD-12220	37%	5%	23%	3%		
4291-4309	CAUUCACCCUGACAGAU	347	CAUUCACCCUGACAGAU	348	AACTUCUGACGGGUAUUTST	AD-12221	58%	7%	39%	6%		
4278-4296	AAGAGGCCUACUACUUA	349	AAGAGGCCUACUACUUA	350	UGAAUAGGUAGGCCUUTST	AD-12222	74%	9%	53%	3%		
3051-3069	GAGACAAUUCGGAUGUGG	351	GAGACAAUUCGGAUGUGG	352	CCACAUCCGGAAUUGUCUTST	AD-12223	74%	10%	67%	7%		
3058-3076	UUCGGGAUGGGAUGUAGA	353	UUCGGGAUGGGAUGUAGA	354	UCUACAUCCACAUCCGGAAATST	AD-12224	24%	2%	11%	2%		
241-259	AAGCUAGCGCCCAUUCAAU	355	AAGCUAGCGCCCAUUCAAU	356	AUUGAUGGGCGCUAGCUUTST	AD-12225	75%	5%	76%	14%		
285-303	GAAGUUAUGUACGAACUG	357	GAAGUUAUGUACGAACUG	358	CAGUUCGACACUAACUUTST	AD-12226	45%	8%	40%	3%		

【 0 2 3 1 】

【表 2 - 6】

表 2

ヒトアクセシ ョン番号に おける位置	全19量体標的部位の配列	配列 ID	ゼンス配列 (5'-3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5'-3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリーン、 50nM[%残存 mRNA]	SD第1ス クリーン (4連中)	第2単用量ス クリーン、 25nM[%残存 mRNA]	SD第2ス クリーン (4連中)	第3単用量 スクリー ン、25nM	SD第3ス クリーン (4連中)
542-560	UAUAUUCACAGUACCCUU	359	UAUAUUCACAGUACCCUUTST	360	AAGGGUACUGGGAUAUAUATST	AD-12227	61%	6%	47%	5%		
2127-2145	ACAGUGGCCGUAUAGAUAG	361	ACAGUGGCCGUAUAAGAUAGTST	362	CUAUCUUAUCGGCCACUGUTST	AD-12228	28%	3%	25%	5%		
3760-3778	UCUGUCACCCCUAUAUAGUUC	363	UCUGUCACCCCUAUAUAGUUCTST	364	GAACUAUAAGGGUAGACAGATST	AD-12229	54%	13%	37%	6%		
3993-4011	UUCUUGCUAUGACUUUGUGU	365	UUCUUGCUAUGACUUUGUGUTST	366	ACACAGUCUAUAAGCAAGATST	AD-12230	70%	17%	65%	4%		
1696-1714	GUAAAGAGCGAGUUGACCA	367	GUAAAGAGCGAGUUGACCATST	368	UGGUCACUGCCUUCUUAUACTST	AD-12231	32%	12%	22%	6%		
2122-2140	CAUUGACAGUGGCCGAUAA	369	CAUUGACAGUGGCCGAUAATST	370	UAUCGGCCACUGUGCAUUGTST	AD-12232	30%	3%	17%	2%		
2371-2389	AGAAACCAUUAUAGUAGUGU	371	AGAAACCAUUAUAGUAGUTST	372	ACACUACUAAGUGGUUUCUTST	AD-12233	38%	2%	32%	3%		
3143-3161	GGAUUGUDCAUCAAUUGGC	373	GGAUUGUUAUCAUAUUGCTST	374	GCCAAUUGAUGAACAAUCCCTST	AD-12234	90%	5%	95%	7%		
4277-4295	UAAGAGGCCUUAACUCAUUC	375	UAAGAGGCCUUAACUUAUUCTST	376	GAAGAGUUAAGGCCUUAUATST	AD-12235	57%	7%	46%	3%		
287-305	AGUUAUGUACGAACTUGGA	377	AGUUAUGUACGAACTUGGATST	378	UCCAGUUCGUACACUAACUTST	AD-12236	34%	8%	16%	2%		
1823-1841	AGUACAUAAGACCUUAUUU	379	AGUACAUAAGACCUUAUUUTST	380	AAAUAAAGGUCUUAUGUACUTST	AD-12237	42%	9%	32%	8%		
3379-3397	UGAGCCUUGUGUAUAGAUU	381	UGAGCCUUGUGUAUAGAUUTST	382	AAUCUAUAACAAAGGCUCATST	AD-12238	42%	6%	34%	6%		
4273-4291	CCUUUAAGAGGCCUUAACUC	383	CCUUUAAGAGGCCUUAACUCTST	384	GAGUUAAGGCCUUAAGAGTST	AD-12239	42%	3%	40%	4%		
2375-2393	ACCACUUAUGUAGUGUCCAG	385	ACCACUUAUGUAGUGUCCAGTST	386	CUGGACUACUUAAGUGUGUTST	AD-12240	47%	6%	36%	5%		
4439-4457	GAACUUCCAAUAUAGUCU	387	GAACUUCCAAUAUAGUCUTST	388	AGACAAAUUUGGAAGUUAUUCTST	AD-12241	69%	5%	70%	8%		
827-845	UGCAUACUCUAGUGGUUCC	389	UGCAUACUCUAGUGGUCCCTST	390	GGACGCUAGAGUAUGCATST	AD-12242	61%	2%	47%	3%		
1699-1717	AGAAGGCAGUUGACCAACA	391	AGAAGGCAGUUGACCAACATST	392	UGUUGGCACACUGCCUUCUTST	AD-12243	26%	7%	15%	1%		
1824-1842	GUACAUAAGACCUUAUUUG	393	GUACAUAAGACCUUAUUUGTST	394	CAAAUAAGGUCUUAUGUAUACTST	AD-12244	25%	6%	15%	1%		
429-447	UAUAUUGGCACUAUCUUUG	395	UAUAUUGGCACUAUCUUUCTST	396	CAAGACAAGGCAAAUUAUATST	AD-12245	65%	6%	83%	13%		
856-874	UCUCUGUUAACAAUACAUAU	397	UCUCUGUUAACAAUACAUAUTST	398	AAUAGUAUUGUAACAGAGATST	AD-12246	29%	7%	31%	6%		
1194-1212	UAUGCUCUAAGACCAAGA	399	UAUGCUCUAAGACCAAGATST	400	UCUUUGCUCUAUGACCAUATST	AD-12247	57%	13%	50%	3%		
392-410	UGUUGUUUGCCAAUUCUG	401	UGUUGUUUGCCAAUUCUGTST	402	CAGAAUUGGACCAAAACACATST	AD-12248	36%	8%	20%	3%		7%
1085-1103	ACUACUAGAAUCCUCCAG	403	ACUACUAGAAUCCUCCAGTST	404	CUGGAGAUUUCUAGUUAUUTST	AD-12249	44%	3%	70%	11%		34%
2069-2087	UGUGUGUCUUAUCUGAAA	405	UGUGUGUCUUAUCUGAATST	406	UUUCAGUAUAGACCAACACATST	AD-12250	47%	5%	18%	5%		4%
4341-4359	UAUUAUGGAGACCAACCCA	407	UAUUAUGGAGACCAACCCATST	408	UGGUGUGUCCCAUAUAUATST	AD-12251	121%	28%	35%	8%		42%
759-777	AAGGAUGAAGUCUAUACAAA	409	AAGGAUGAAGUCUAUACAAATST	410	UUUGAUAAGACUUAUCCUUTST	AD-12252	94%	19%	8%	3%		3%
973-991	UUGAUAAGAGGUCUCCGGA	411	UUGAUAAGAGGUCUCCGGATST	412	UCCGAGACUUCUUAUACATST	AD-12253	94%	33%	42%	8%		27%
1063-1081	AUGUCCUUAUCGAGAAUC	413	AUGUCCUUAUCGAGAAUCTST	414	GAUUCUGGAUAAGGAAUUTST	AD-12254	101%	58%	70%	5%		32%
1190-1208	GGAAUAUUGCUCAUAGAGCA	415	GGAAUAUUGCUCAUAGAGCATST	416	UGCUUAUAGGCAUAUUGCTST	AD-12255	163%	27%	28%	6%		10%
1679-1697	CCAUCCAAACUGGAUCGU	417	CCAUCCAAACUGGAUCGUTST	418	ACCGUCCAGUUUGGAUUGTST	AD-12256	112%	62%	18%	3%		4%
1703-1721	GGCAGUGGACCAACACAUAU	419	GGCAGUGGACCAACACAUAUTST	420	AUUGUGUGUGGCAACUCCCTST	AD-12257	10%	4%	9%	2%		2%

【 0 2 3 2 】

【表 2 - 7】

表 2

ヒトアクセシ ョン番号に おける位置	全19量体標的部位の配列	配列 ID	センシ配列 (5'-3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5'-3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリン、 50nM[*]残存 mRNA]	SD第1ス クリン (4連中)	第2単用量ス クリン、 25nM[*]残存 mRNA]	SD第2ス クリン (4連中)	第3単用量 スクリン (25nM (4連中)	SD第3ス クリン (4連中)
1814-1832	CAUGCUAGAGUACUAAG	421	CAUGCUAGAGUACUAAGTST	422	CUAUGCUAGAGUACUAAGTST	AD-12258	27%	9%	18%	3%	20%	6%
1818-1836	CUAGAAGUACUAAGACCU	423	CUAGAAGUACUAAGACCUU	424	AGGCUUAAGUACUUCUAGTST	AD-12259	20%	5%	12%	2%	13%	5%
1897-1915	UUGGAUCUCUACAUACU	425	UUGGAUCUCUACAUACU	426	AUAGAUGUGAGAGAUCCAAATST	AD-12260	22%	7%	81%	7%	65%	13%
2066-2084	AACUGUGUGUCUAUACUG	427	AACUGUGUGUCUAUACUGTST	428	CAGUAGAAGACCAAGUUTST	AD-12261	122%	11%	66%	7%	80%	22%
2121-2139	UCAUUGACAGUGGCCGAUA	429	UCAUUGACAGUGGCCGAUA	430	UAUGGCCACUGUCAUAGATST	AD-12262	97%	30%	33%	6%	4%	18%
2280-2298	AUAAGACAGCCCAUCC	431	AUAAGACAGCCCAUCCCTST	432	GGGAUUGGUCUGCUUAUUTST	AD-12263	177%	57%	85%	11%	8%	15%
2369-2387	ACAGAACCCACUUAUAGU	433	ACAGAACCCACUUAUAGU	434	ACUACUAAGUGUUCUGUTST	AD-12264	37%	6%	10%	1%	10%	4%
2372-2390	GAACACCUUAUAGUGUC	435	GAACACCUUAUAGUGUC	436	GACACUACUAAGUGUUCU	AD-12265	40%	8%	17%	1%	20%	10%
2409-2427	AAAUCAAGGAUAUAGUCA	437	AAAUCAAGGAUAUAGUCA	438	UGACUAUACCUUAAGAUUTST	AD-12266	33%	9%	9%	1%	8%	4%
2933-2951	UUUUUAUACCAUCAACA	439	UUUUUAUACCAUCAACA	440	UGUUAUGGCUUAUUAUAAATST	AD-12267	34%	13%	11%	1%	6%	2%
3211-3229	ACAGAGCCAUUAACACACU	441	ACAGAGCCAUUAACACACU	442	AGUGUUAUUAUCCUUGUTST	AD-12268	34%	6%	11%	1%	9%	2%
3223-3241	ACACACUGGAGAGGUCUAA	443	ACACACUGGAGAGGUCUAA	444	UAAGACCUUCUACAGUGUTST	AD-12269	54%	6%	33%	4%	29%	7%
3225-3243	ACACUGGAGAGGUCUAAAG	445	ACACUGGAGAGGUCUAAAG	446	CUUAAGACCUUCUACAGUTST	AD-12270	52%	5%	29%	4%	27%	6%
3291-3309	CGAGCCACAGAUCAACCUU	447	CGAGCCACAGAUCAACCUU	448	AAAGUGUACUUGGCUUGUTST	AD-12271	53%	7%	27%	3%	19%	6%
4036-4054	UCCCUAUUUGCUUUCUCC	449	UCCCUAUUUGCUUUCUCC	450	GGAGAAGCGAAUUAAGGATST	AD-12272	85%	15%	57%	7%	51%	16%
4180-4198	UCUAAAUUCACUGUCACAA	451	UCUAAAUUCACUGUCACAA	452	UGUUGACAGUUAUUAAGATST	AD-12273	36%	6%	26%	2%	30%	5%
151-169	AGCCAAUUCGUCUGGAA	453	AGCCAAUUCGUCUGGAA	454	UUCGACAGCAAUUUGGUTST	AD-12274	75%	21%	40%	2%	50%	19%
250-268	CCCAUUAUAGUAGAUG	455	CCCAUUAUAGUAGAUG	456	CAUUCUACUAUUAAGGUTST	AD-12275	29%	9%	8%	1%	8%	4%
821-839	GAUGAAUGCAUACUUAU	457	GAUGAAUGCAUACUUAU	458	ACUAGAGUAGCAUUAUUTST	AD-12276	45%	19%	15%	2%	16%	12%
1060-1078	CUCAUGUUCUUAUCGAGA	459	CUCAUGUUCUUAUCGAGA	460	UCUGAAUAGGAUUAAGATST	AD-12277	58%	17%	32%	2%	55%	14%
1075-1093	GAGAAUUAACUAACUAG	461	GAGAAUUAACUAACUAG	462	CUAGUUAUUAAGAUUCUUTST	AD-12278	120%	35%	96%	10%	12%	38%
1819-1837	UAGAAGUACUAUAGACCU	463	UAGAAGUACUAUAGACCU	464	AAAGUUAUUAAGUUAUUAUTST	AD-12279	47%	29%	17%	1%	12%	4%
3003-3021	CAGCCUAGGCUUUAUAGA	465	CAGCCUAGGCUUUAUAGA	466	UUAUAACAGCUACAGGUTST	AD-12280	2%	0%	3%	1%		
3046-3064	AAGAAGACAAUUCGGA	467	AAGAAGACAAUUCGGA	468	UCCGAAUUGUCUUCUUTST	AD-12281	2%	0%	5%	2%		
3134-3152	UUCUGUGUGAUUUAUUA	469	UUCUGUGUGAUUUAUUA	470	UGAACAAUUAACAGGATST	AD-12282	3%	0%	25%	5%		
155-173	AAAUUCGUCUGCGAGAAG	471	AAAUUCGUCUGCGAGAAG	472	CUUCUUGCAGACGAAUUTST	AD-12283	3%	1%	35%	4%		
4596-4614	UUUCUGAAGUUGAGAUU	473	UUUCUGAAGUUGAGAUU	474	ACAUUCACUUAUUAAGATST	AD-12284	5%	2%	49%	8%		
365-383	UACUAAACAGAUUAGUUU	475	UACUAAACAGAUUAGUUU	476	AAACUAUUCUUAUUAUUAUTST	AD-12285	7%	7%	21%	26%		
374-392	GAUUGAUUUUACCGAAGU	477	GAUUGAUUUUACCGAAGU	478	ACUUCGUAUUAUUAUUAUTST	AD-12286	28%	34%	12%	7%		
436-454	GCACUAUUCUUGCGUAGG	479	GCACUAUUCUUGCGUAGG	480	CCAAUUGCAUUAUUAUUAUTST	AD-12287	40%	21%	51%	23%		
539-557	UGGUUAUAUCCACGUACC	481	UGGUUAUAUCCACGUACC	482	GGUACGUGGAUUAUUAUUAUTST	AD-12288	26%	7%	155%	146%		

【 0 2 3 3 】

【表 2 - 8】

表 2

ヒトアセツ ション番号に おける位置	全19量体標的部位の配列	配列 ID	センシ配列 (5'-3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5'-3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリーン、 50nM[％残存 mENA]	SD第1ス クリーン (4連中)	第2単用量ス クリーン、 25nM[％残存 mENA]	SD第2ス クリーン (4連中)	第3単用量 スクリー ン、25nM	SD第3ス クリーン (4連中)
1629-1647	AGCAAGCTGCUUAAACACAG	483	AGCAAGGCGUUAACAAGTstT	484	CUGGUUAAAGCAGCUGGCUUstT	AD-12289	43%	21%	220%	131%		
2370-2388	CAGAAACACCUUAGUGUG	485	CAGAAACCAUUAAGUGTstT	486	CACUUAAGUGGUUUCUGTstT	AD-12290	2%	1%	81%	23%		
2676-2694	AACUUAUUGGAGGUUGAA	487	AACUUAUUGGAGGUUGAATstT	488	UUAACAACCCUCAAUAAGUUTstT	AD-12291	4%	1%	70%	3%		
3228-3246	CUGGAGAGGUCUAAAAGUGG	489	CUGGAGAGGUCUAAAAGUGTstT	490	CACUUAAGACCUCUCCAGTstT	AD-12292	2%	1%	6%	2%		
3703-3721	AAAAAAGUAUAAGGCAGU	491	AAAAAAGUAUAAGGCAGUstT	492	ACTGCCUUAUAUCUUUUUstT	AD-12293	4%	2%	36%	3%		
3737-3755	GAUUUUUAUAUACCCCA	493	GAUUUUUAUAUACCCCAstT	494	UGGUUAGAUAUCAAUAUUCstT	AD-12294	10%	6%	38%	3%		
4573-4591	GUUUUUUAUUCUGGCAC	495	GUUUUUUAUUCUGGCACstT	496	GUUGCCAGAUCAAAAUAUACTstT	AD-12295	29%	31%	37%	3%		
526-544	AGGAUCCCUUGGCUUGUAU	497	AGGAUCCCUUGGCUUGUAstT	498	AUAACAAGCCAAAGGGAUCCUstT	AD-12296	82%	4%	89%	2%		
527-545	GGAUCCCUUGGCUUGUAUA	499	GGAUCCCUUGGCUUGUAstT	500	UAUAACAAGCCAAAGGGAUCCstT	AD-12297	75%	3%	65%	2%		
256-274	CAUAUAGUAUAUUGAUCC	501	CAUAUAGUAUAUUGAUCCstT	502	GGAUCAACAUAUCUAUUGstT	AD-12298	73%	4%	60%	3%		
427-445	GCUAUAUUGCACUAUUCU	503	GCUAUAUUGCACUAUUCstT	504	AAGAUAUGCAUAUAUAGCTstT	AD-12299	76%	4%	66%	4%		
554-572	UACCCUUAUCAAUUUUU	505	UACCCUUAUCAAUUUUstT	506	AAAAUUUAUGAAGGGUAstT	AD-12300	36%	4%	15%	1%		
1210-1228	AGAACAUUUGAAUAAGCC	507	AGAACAUUUGAAUAAGCCstT	508	GGCUUAUCAAUAUUGUCUstT	AD-12301	33%	4%	18%	2%		
1414-1432	AAAUUGGUGUGUUGAGGA	509	AAAUUGGUGUGUUGAGGstT	510	UCCUACAACAGCACCAAUUstT	AD-12302	66%	5%	65%	3%		
1438-1456	UGAAUAGGGUUACAGAUU	511	UGAAUAGGGUUACAGAUstT	512	AACUCUGUAACCCUAUUCstT	AD-12303	35%	6%	17%	2%		
1516-1534	AAGAUCUGAAACCAUCA	513	AAGAUCUGAAACCAUCAstT	514	UGAGUGGUUUAAGUUCUstT	AD-12304	70%	8%	70%	6%		
2279-2297	AUAUAGCAGACCCAUUCC	515	AUAUAGCAGACCCAUUCCstT	516	GGAAUGGUGUGCUUAUUTstT	AD-12305	63%	8%	80%	7%		
2939-2957	AUACCCAUCAACUGGUA	517	AUACCCAUCAACUGGUAstT	518	UACCAGUGUGUAGUGGUUstT	AD-12306	23%	6%	20%	3%		
3142-3160	UGGAUUGUUAUUAUUGG	519	UGGAUUGUUAUUAUUGGstT	520	CACAUUGAUGAACAAUUCstT	AD-12307	78%	10%	58%	5%		
3229-3247	UGGAGAGGUCUAAAAGUGA	521	UGGAGAGGUCUAAAAGUGstT	522	UCCACUUAAGACCUCUCCstT	AD-12308	27%	8%	15%	2%		
3763-3781	GUCAUCCCUUAUUGUACU	523	GUCAUCCCUUAUUGUACstT	524	AGUGAACUAUAGGGAUGACTstT	AD-12309	58%	11%	42%	3%		
4801-4819	AUAUUGGCUUAUUUCUC	525	AUAUUGGCUUAUUUCUCstT	526	GAGAAUAUAAGCCAUUAUstT	AD-12310	106%	23%	80%	2%		
529-547	AUCCUUGGCUUGGUUAUU	527	AUCCUUGGCUUGGUUAUstT	528	AUAUAACAGCCCAAGGGAUstT	AD-12311	73%	12%	60%	2%		
425-443	GGGCUUAUAUUGCACUAUC	529	GGGCUUAUAUUGCACUAstT	530	GAUAUGGCAAUUAUAAGCCstT	AD-12312	39%	3%	36%	3%		
1104-1122	GAUUCUUGGAGGGGCUA	531	GAUUCUUGGAGGGGCUstT	532	UACGCCUCCAAAGAGAAUstT	AD-12313	64%	9%	49%	6%		
1155-1173	GCAUCUCAAUCUUGAGG	533	GCAUCUCAAUCUUGAGGstT	534	CCUACAAGUUGAGAGUstT	AD-12314	28%	7%	14%	6%		
2403-2421	CACGAGAUAUUAAGUAUA	535	CACGAGAUAUUAAGUAstT	536	UAUCCUUAUAUUCUUGCUGstT	AD-12315	31%	7%	13%	2%		
3115-3133	GUCAGAGCAUCUGUGAUA	537	GUCAGAGCAUCUGUGAstT	538	UCUAAGAUGGCUUCUUGACTstT	AD-12316	42%	5%	14%	2%		
3209-3227	AAACAGAGGCAUUAACACA	539	AAACAGAGGCAUUAACACAstT	540	UGUGUAUAUGCCUUCUGUstT	AD-12317	34%	9%	15%	5%		
3293-3311	AGCCAGAUCAACCUUUA	541	AGCCAGAUCAACCUUUAstT	542	UUAAGGUGAUCUGUGGCUstT	AD-12318	46%	4%	28%	4%		
4574-4592	UAUUUUUAUUCUGCAACC	543	UAUUUUUAUUCUGCAACCstT	544	GGUUGCCAGAUCAAAAUAstT	AD-12319	77%	3%	56%	4%		

【 0 2 3 4 】

【表 2 - 9】

表 2

ヒトアケセツ ション番号に おける位置	全 19 量体標的部位的配列	配列 ID	センス配列 (5' - 3')	配列 ID	アンチセンス配列 (5' - 3')	デュプレック ス名	第1単用量ス クリーン、 50nM [$\times$ 残存 mRNA]	SD第1ス クリーン (4連中)	第2単用量ス クリーン、 25nM [$\times$ 残存 mRNA]	SD第2ス クリーン (4連中)	第3単用量 スクリー ン、25nM	SD第3ス クリーン (4連中)
352-370	UGUUUGAGCAUCUACUAA	545	UGUUUGAGCAUCUACUAAATST	546	UAGAGAGAGGUCcAAACATST	AD-12320	55%	7%	41%	3%		
741-759	GAAAUACAGUACACACA	547	GAAAUACAGUACACACAATST	548	UGUUGUGAGGUGuAAUUCATST	AD-12321	21%	3%	10%	2%		
1478-1496	ACUUGACCAGUGUAAAUU	549	ACUUGACCAGUGUAAAUUCATST	550	AGAUAUACACUGGUGuAAUUTST	AD-12322	27%	8%	30%	12%		
1483-1501	ACCAGUGUAAAUUCUGACCU	551	ACCAGUGUAAAUUCUGACCUATST	552	AGGUCAGAUUACACUGGUTST	AD-12323	26%	7%	35%	18%		
1967-1985	AGAACAAUUAUAGCAGCA	553	AGAACAAUUAUAGCAGCATST	554	UGCUGCUAAUGAUUUGUUCUTST	AD-12324	27%	8%	27%	14%		
2247-2285	CRAUGUGGAAACCUAACUG	555	CRAUGUGGAAACCUAACUGTST	556	CAGUUAAGGUUUCcACAUGTST	AD-12325	32%	12%	32%	22%		
2500-2518	ACCAAGAGGUACAAAUAU	557	ACCAAGAGGUACAAAUAUTST	558	AAUUUUUGAACCUUCUUGGUTST	AD-12326	42%	22%	45%	41%		
2508-2526	GGUACAAAUAUUGUUGAAG	559	GGUACAAAUAUUGUUGAAGTST	560	CUUCACCAAUUUUUGuACCTST	AD-12327	36%	14%	37%	32%		
3138-3156	GGUGUGAUGUUCUACAA	561	GGUGUGAUGUUCUACAAATST	562	UUGAUGAACAAUCCACACCTST	AD-12328	45%	2%	31%	3%		
4304-4322	AGAGUUCACAAAAGCCCA	563	AGAGUUCACAAAAGCCCATST	564	UGGGCUUUUUGUGAACUCUTST	AD-12329	61%	4%	34%	3%		
4711-4729	UGAUAGCUAAAUUAAACCA	565	UGAUAGCUAAAUUAAACCATST	566	UGGUUUAAUUUAAGCUAUCATST	AD-12330	63%	5%	39%	4%		
1221-1239	AAUAGCCUGAAGUGAAUC	567	AAUAGCCUGAAGUGAAUCATST	568	GAUUCACUUCcAGGCUuAUUTST	AD-12331	50%	2%	26%	5%		
1705-1723	CAGUUGACCAACACAAUGC	569	CAGUUGACCAACACAAUGCATST	570	GCAUUGUGUUGGUCcAACUGUTST	AD-12332	80%	4%	51%	7%		
3137-3155	UGGUGUGGAUUGUUCAUCA	571	UGGUGUGGAUUGUUCAUCATST	572	UGAUGAACAAUCCcACACCATST	AD-12333	34%	6%	12%	2%		
4292-4310	AUUCACCCUGACAGAGUUC	573	AUUCACCCUGACAGAGUUCATST	574	GAACUCUGUCcAGGGUGAAUTST	AD-12334	27%	2%	18%	3%		
1829-1847	UAGAGCCUUAUUUGGUAAU	575	UAGAGCCUUAUUUGGUAAUTST	576	AUUACcAAAUAGGUCUuATST	AD-12335	84%	6%	60%	7%		
2244-2262	AAGCAUUGUGGAAACCUAA	577	AAGCAUUGUGGAAACCUAATST	578	UAGGUUUCcACAUGGCUUTST	AD-12336	45%	4%	36%	4%		
2888-2906	UCUGAAACUGGAUAUCCCA	579	UCUGAAACUGGAUAUCCCATST	580	UGGGAUAUCCcAGUUUcACATST	AD-12337	30%	7%	19%	2%		

【 0 2 3 5 】

10

20

30

40

【表 3 - 1】

表3

配列 (5'-3')	配列ID	配列 (5'-3')	配列ID	デュプレックス名	単用量スクリーン、25nM [% 残存mRNA]	SD 第2スクリーン(4連中)
ccAuuAcuAcAGuAGcAcuTsT	582	AGUGCuACUGuAGuAAUGGTsT	583	AD-14085	19%	1%
AucuGGcAAccAuAuuucuTsT	584	AGAAAuAUGGUUGCcAGAUTsT	585	AD-14086	38%	1%
GAuAGcuAAAuAAAccAATsT	586	UUGGUUuAAUuAGCuAUCTsT	587	AD-14087	75%	10%
AGAuAccAuAcuAcAGuATsT	588	uACUGuAGuAAUGGuAUCUTsT	589	AD-14088	22%	8%
GAuuGuucAuAAuuGGcGTsT	590	CGCcAAUUGAUGAAcAAUCTsT	591	AD-14089	70%	12%
GcuuuccucccGGcucAcuTsT	592	AGuGAGCCGAGGAGAAAGCTsT	593	AD-14090	79%	11%
GGAGGAuuGGcuGAcAAGATsT	594	UCUUGUcAGCcAAUCCUCCTsT	595	AD-14091	29%	3%
uAAuGAAGAGuAuAccuGGTsT	596	CcAGGuAuACUCUUAuATsT	597	AD-14092	23%	2%
uuucAccAAAccAuuGuATsT	598	uAcAAUUGGUUUGGUGAAATsT	599	AD-14093	60%	2%
cuuAuuAAGGAGuAuAcGGTsT	600	CCGuAuACUCCUuAAuAAGTsT	601	AD-14094	11%	3%
GAAuAcAGAuGGAcGuAAGTsT	602	CUuACGUcAUCUGAUUUCTsT	603	AD-14095	10%	2%
cAGAuGucAGcAuAAGcGATsT	604	UCGCUuAUGCUGAcAUCUGTsT	605	AD-14096	27%	2%
AucuAAcccuAGuuGuAucTsT	606	GAuAcACuAAGGUuAGAUtsT	607	AD-14097	45%	6%
AAGAGcuuGuuAAAuAcGGTsT	608	CCGAUUuAAcAAGCUUUTsT	609	AD-14098	50%	10%
uuAAGGAGuAuAcGGAGGATsT	610	UCCUCCGuAuACUCCUuAATsT	611	AD-14099	12%	4%
uuGcAAuGuAAuAcGuAuTsT	612	AuACGuAUUuAcAUUGcAATsT	613	AD-14100	49%	7%
ucuAAcccuAGuuGuAuccTsT	614	GGAuAcAAcAAGGUuAGATsT	615	AD-14101	36%	1%
cAuGuAucuuuuucucGAuTsT	616	AUCGAGAAAAAGAuAcAUGTsT	617	AD-14102	49%	3%
GAuGucAGcAuAAGcGAuGTsT	618	cAUCGCUuAUGCUGAcAUCTsT	619	AD-14103	74%	5%
ucccAAcAGGuAcGAcAccTsT	620	GGUGUGGuACCUGUUGGGATsT	621	AD-14104	27%	3%
uGcucAcGAuGAGuuuAGuTsT	622	ACuAAACUcAUCGUGAGcATsT	623	AD-14105	34%	4%
AGAGcuuGuuAAAuAcGGATsT	624	UCCGAUUuAAcAAGCUCUTsT	625	AD-14106	9%	2%
GcGuAcAAGAAcAucuAuATsT	626	uAuAGAUGUUCUGuACGCTsT	627	AD-14107	5%	1%
GAGGuuGuAAGccAAuGuTsT	628	AAcAUUGGCUuAcAACCUCTsT	629	AD-14108	15%	1%
AAcAGGuAcGAcAccAcAGTsT	630	CUGUGGUGUGGuACCUGUUTsT	631	AD-14109	91%	2%
AAcccuAGuuGuAuccccTsT	632	GAGGGAuAcAAcAAGGUUTsT	633	AD-14110	66%	5%
GcAuAAGcGAuGGAuAAuATsT	634	uAUuAUCcAUCGCUuAUGCTsT	635	AD-14111	33%	3%
AAGcGAuGGAuAAuAccuATsT	636	uAGGuAUuAUCcAUCGCUUTsT	637	AD-14112	51%	3%
uGAuccuGuAAcGAAAGATsT	638	UUCUUUCGuAcAGGAUcATsT	639	AD-14113	22%	3%
AAAACuuuGGccGuucGGTsT	640	CcAGAACGGCcAAUGUUUTsT	641	AD-14114	117%	8%
cuuGGAGGGcGuAcAAGAATsT	642	UUCUUGuACGCCUcAAGTsT	643	AD-14115	50%	8%
GGcGuAcAAGAAcAucuAuTsT	644	AuAGAUGUUCUGuACGCCTsT	645	AD-14116	14%	3%
AcucuGAGuAcAuuGGAuTsT	646	AUUCcAAUGuACUcAGAGUTsT	647	AD-14117	12%	4%
uuAuuAAGGAGuAuAcGGATsT	648	UCCGuAuACUCCUuAAuAATsT	649	AD-14118	26%	4%
uAAGGAGuAuAcGGAGGATsT	650	CUCCUCCGuAuACUCCUuATsT	651	AD-14119	24%	5%
AAAuCAAuAGuAcAAuAAATsT	652	UUuAGUUGACuAUUGAUUUTsT	653	AD-14120	8%	1%
AAuCAAuAGuAcAAuAAAGTsT	654	CUUuAGUUGACuAUUGAUUUTsT	655	AD-14121	24%	2%
uucucAGuAuAcuGuGuAATsT	656	UUAcAcAGuAuACUGAGAATsT	657	AD-14122	10%	1%
uGuGAAAcAcucuGAuAAATsT	658	UUuAUcAGAGUGUUUcAcATsT	659	AD-14123	8%	1%
AGAuGuGAAucucuGAATsT	660	UGUUcAGAGAUUcAcAUCUTsT	661	AD-14124	9%	2%
AGGuuGuAAGccAAuGuuGTsT	662	cAAcAUUGGCUuAcAACCUCTsT	663	AD-14125	114%	6%
uGAGAAuAcAGAuGGAcGuTsT	664	ACGUcAUCUGAUUUCUcATsT	665	AD-14126	9%	1%
AGAAuAcAGAuGGAcGuAATsT	666	UuACGUcAUCUGAUUUCUTsT	667	AD-14127	57%	6%
AuAuucccAAcAGGuAcGAcTsT	668	GUCGuACCUGUUGGGAuAUTsT	669	AD-14128	104%	6%
cccAAcAGGuAcGAcAccATsT	670	UGGUGUGGuACCUGUUGGGTsT	671	AD-14129	21%	2%
AGuAuAcuGAAAGAccucuTsT	672	AGAGGUUCUcAGuAuACUTsT	673	AD-14130	57%	6%
AuAuAuAucAGccGGGcGcTsT	674	GCGCCCGCUGAuAuAuAUTsT	675	AD-14131	93%	6%
AAucuAAcccuAGuuGuAuTsT	676	AuAcAAcAAGGUuAGAUUTsT	677	AD-14132	75%	8%
cuAAcccuAGuuGuAucccTsT	678	GGGAuAcAAcAAGGUuAGTsT	679	AD-14133	66%	4%
cuAGuuGuAuuccuccuuTsT	680	AAAGGAGGGAuAcAAcAGTsT	681	AD-14134	44%	6%
AGAcAucGAcuAAuGGcuTsT	682	AGCcAUuAGUcAGAUGUCUTsT	683	AD-14135	55%	6%

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

【表 3 - 2】

表3

GAAGcucAcAAuGAuuuAATsT	684	UuAAAUCuAUGUGAGCUUCTsT	685	AD-14136	29%	3%
AcAuGuAucuuuuucucGATsT	686	UCGAGAAAAAGAuAcAUGUTsT	687	AD-14137	40%	3%
ucGAuucAAAucuuAAccctTsT	688	GGGUuAAGAUUUGAAUCGATsT	689	AD-14138	39%	5%
ucuuAAcccuuAGGAcucuTsT	690	AGAGUCCuAAGGGUuAAGATsT	691	AD-14139	71%	11%
GcucAcGAuGAGuuuAGuGTsT	692	cACuAAACUCuAUCGUGAGCTsT	693	AD-14140	43%	15%
cAuAAGcGAuGGAuAAuAcTsT	694	GuAUuAUCcAUCGCUuAUGTsT	695	AD-14141	33%	6%
AuAAGcGAuGGAuAAuAccTsT	696	GGuAUuAUCcAUCGCUuAUTsT	697	AD-14142	51%	14%
ccuAAuAAAcuGcccucAGTsT	698	CUGAGGGcAGUuUuAuAGGTsT	699	AD-14143	42%	1%
ucGGAAAGuuGAACuuGGuTsT	700	ACcAAGUUCuACUUUCCGATsT	701	AD-14144	4%	4%
GAAAACuuGGccGuucugTsT	702	cAGAACGGCcAAUGUUUUCTsT	703	AD-14145	92%	5%
AAGAcuGAucuuuAAGuuTsT	704	AACUuAGAAGAUcAGUCUUTsT	705	AD-14146	13%	2%
GAGcuuGuuAAAAucGGAATsT	706	UUCGGAUUUuAAcAAGCUCTsT	707	AD-14147	8%	1%
cAuuuGGccGuucUGGAGTsT	708	GCUCcAGAACGGCcAAUGUTsT	709	AD-14148	80%	7%
AAGAAcAucAuAAuGcATsT	710	UGcAAUuAuAGAUGUUCUUTsT	711	AD-14149	44%	7%
AAuGuGucuAcucAuGuuTsT	712	AAcAUGAGuAGAcAcAUUUTsT	713	AD-14150	32%	29%
uGucuAcucAuGuuucucATsT	714	UGAGAAAcAUGAGuAGAcATsT	715	AD-14151	75%	11%
GuAuAcuGuGuAAcAAucUTsT	716	AGAUGUuAcAcAGuAuACTsT	717	AD-14152	8%	5%
uAuAcuGuGuAAcAAucUTsT	718	uAGAUGUuAcAcAGuAuATsT	719	AD-14153	17%	11%
cuuAGuAGuGuccAGGAAATsT	720	UUUCCUGGAcAcuAcuAAGTsT	721	AD-14154	16%	4%
ucAGAuGGAcGuAAGGcAGTsT	722	CUGCCUuACGUcAUCUGATsT	723	AD-14155	11%	1%
AGAuAAAuuGAuAGcAcAATsT	724	UUGUGCuAUcAAUuAuAUCUTsT	725	AD-14156	10%	1%
cAAcAGGuAcGAcAccAcATsT	726	UGUGGUGUGCuACCUGUUTsT	727	AD-14157	29%	3%
uGcAAuGuAAAuAcGuuUTsT	728	AAuACGuAUUuAcAUGcATsT	729	AD-14158	51%	3%
AGucAGAAuuuuAucAGATsT	730	UCuAGAuAAAAUUCUGACUTsT	731	AD-14159	53%	5%
cuAGAAuucuuuuAAcAccTsT	732	GGUGUuAAAAGAUUUCuAGTsT	733	AD-14160	40%	3%
AAuAAAucuuAAcccuAGuuTsT	734	AACuAGGGUuAGAUuAuUTsT	735	AD-14161	83%	7%
AAuuuucGucAcGAuGATsT	736	UcAUCGUGAGcAGAAAAUUTsT	737	AD-14162	44%	6%
GccucAGuAAAuccAuGGTsT	738	CcAUGGAUUuACUGAGGGCTsT	739	AD-14163	57%	3%
AcGuuuAAAAcGAGAuucUTsT	740	AAGAUCUGUUUuAAACGUTsT	741	AD-14164	4%	1%
AGGAGuAGAAcGuuuAAATsT	742	UUuAAACGUUCuAUCUCCUTsT	743	AD-14165	11%	1%
GAccGucAuGGcGucGcAGTsT	744	CUGCGACGcAuGACGGUCTsT	745	AD-14166	90%	5%
AccGucAuGGcGucGcAGcTsT	746	GCUGCGACGcAuGACGGUTsT	747	AD-14167	49%	1%
GAAcGuuuAAAAcGAGAuTsT	748	GAUCUCGUUUuAAACGUUCTsT	749	AD-14168	12%	2%
uuGAGcuuAAcAuAGGuAATsT	750	UuACCuAUGUuAAGCUcAATsT	751	AD-14169	66%	4%
AcuAAAuuGAucucGuAGATsT	752	UCuACGAGAUcAAUuAuAGUTsT	753	AD-14170	52%	6%
ucGuAGAAuuAucuuAAuATsT	754	uAUuAAGAuAAUUCuACGATsT	755	AD-14171	42%	4%
GGAGAuAGAAcGuuuAAAATsT	756	UUuAAACGUUCuAUCUCCTsT	757	AD-14172	3%	1%
AcAAcuuAuGGAGGuuGuTsT	758	AcAACCUcAAuAAGUUGUTsT	759	AD-14173	29%	2%
uGAGcuuAAcAuAGGuAAATsT	760	UUuACCuAUGUuAAGCUcATsT	761	AD-14174	69%	2%
AucucGuAGAAuuAucuuATsT	762	uAGAuAAUUCuACGAGAUTsT	763	AD-14175	53%	3%
cuGcGuGcAGucGGuccucTsT	764	GAGGACCGACUGcACGcAGTsT	765	AD-14176	111%	4%
cAcGcAGcGcccGAGAGuATsT	766	uACUCUGGGCGCUGCGUGTsT	767	AD-14177	87%	6%
AGuAccAGGGAGAcuccGGTsT	768	CCGGAGUCUCCUGGUACUTsT	769	AD-14178	59%	2%
AGGAGGAGAuAGAAcGuuTsT	770	AACGUUCuAUCUCCUCCGUTsT	771	AD-14179	9%	2%
AGAAcGuuuAAAAcGAGAuTsT	772	AUCUGGUUUuAAACGUUCUTsT	773	AD-14180	43%	2%
AAcGuuuAAAAcGAGAuTsT	774	AGAUCUGGUUUuAAACGUUTsT	775	AD-14181	70%	10%
AGcuuGAGcuuAAcAuAGGTsT	776	CCuAUGUuAAGCUcAAGCUTsT	777	AD-14182	100%	7%
AGcuuAAcAuAGGuAAuATsT	778	uAUUuACCuAUGUuAAGCUTsT	779	AD-14183	60%	5%
uAGAGcuAcAAAAccuAucTsT	780	GAuAGGUUUUGuAGCUcATsT	781	AD-14184	129%	6%
uAGuuGuAuccuccuuuATsT	782	uAAAGGAGGGAuAcAACuATsT	783	AD-14185	62%	4%
AccAcccAGAcAucUGAcuTsT	784	AGUcAGAUGUCUGGGUGGUTsT	785	AD-14186	42%	3%
AGAAAcuAAAuuGAucucGTsT	786	CGAGAUcAAUuAuAGUUCUTsT	787	AD-14187	123%	12%
ucucGuAGAAuuAucuuAATsT	788	UuAAGAuAAUUCuACGAGATsT	789	AD-14188	38%	2%
cAAcuuAuGGAGGuuGuATsT	790	uAcAACCUcAAuAAGUUGTsT	791	AD-14189	13%	1%
uuGuAuccuccuuuAAGuTsT	792	ACUuAAAGGAGGGAuAcAATsT	793	AD-14190	59%	3%
ucAcAAcuuAuGGAGGuuTsT	794	AACCUCcAAuAAGUUGAGATsT	795	AD-14191	93%	3%

【 0 2 3 7 】

10

20

30

40

【表 3 - 3】

表3

AGAAcuGuAcucuucucAGTsT	796	CUGAGAAGAGuAcAGUUCUTsT	797	AD-14192	45%	5%
GAGcuuAaAuAGGuAAATsT	798	AUUuACCuAUGUuAAGCUTsT	799	AD-14193	57%	3%
cAccAaAuGuGuccuuAGTsT	800	CuAAGGAcAGAUGUUGGUGTsT	801	AD-14194	51%	4%
AAAGcccAcuuuAGAGuAuTsT	802	AuACUCuAAAGUGGGCUUUTsT	803	AD-14195	77%	5%
AAGcccAcuuuAGAGuAuTsT	804	uAuACUCuAAAGUGGGCUUUTsT	805	AD-14196	42%	6%
GAccuuAuuuGGuAAucGTsT	806	cAGAUuAcAAAuAAGGUCTsT	807	AD-14197	15%	2%
GAuuAAuGuAcucAAGAcuTsT	808	AGUCUUGAGuAcAuAAUcTsT	809	AD-14198	12%	2%
cuuuAAGAGGccuAAucATsT	810	UGAGUuAGGCCUCUuAAAGTsT	811	AD-14199	18%	2%
uuAAAccAAAcccuAuGATsT	812	UcAAuAGGGUUUGGUuAATsT	813	AD-14200	72%	9%
ucuGuuGGAGuAuAAuTsT	814	AUuAuAGAUUCcAAcAGATsT	815	AD-14201	9%	3%
cuAuGuuuuCuGAGAGAcuTsT	816	AGUCUCuAGAAAcAuAGTsT	817	AD-14202	25%	3%
GcAuAcucuAGucGuuccTsT	818	GGGAACGACuAGAGuAUGCTsT	819	AD-14203	21%	1%
GuuccuuAucGAGAAucATsT	820	uAGAUUCUGAuAAGGAAGTsT	821	AD-14204	4%	2%
GcAcuuGGAGucucAcAuTsT	822	AUGUGAGAGUcAAGUGCTsT	823	AD-14205	5%	1%
AAAAAGGAACuAGAuGGcTsT	824	GCcAUCuAGUUCUUUUUTsT	825	AD-14206	79%	6%
AGAGcAGAuAccucuGcGTsT	826	CGcAGAGGuAAUCUGCUCUTsT	827	AD-14207	55%	2%
AGcAGAuAccucuGcGAGTsT	828	CUCGcAGAGGuAAUCUGCUCUTsT	829	AD-14208	100%	4%
cccuGAcAGAGuAcAAATsT	830	UUUGAGACUCUGUcAGGGTsT	831	AD-14209	34%	3%
GuuuAccGAAGuGuuGuuTsT	832	AAAcAAcACUUCGGuAAATsT	833	AD-14210	13%	2%
uuAcAGuAcAcAAcAAGATsT	834	UCCUUGUUGUGuACUGuAATsT	835	AD-14211	9%	1%
AcuGGAucGuAAGAGGcATsT	836	UGCCUUCUuACGAUcAGUTsT	837	AD-14212	20%	3%
GAGcAGAuAccucuGcGATsT	838	UCGcAGAGGuAAUCUGCUCUTsT	839	AD-14213	48%	5%
AAAAGAAGuuAGuGuAcGATsT	840	UCGuAcACuAAUCUUCUUUTsT	841	AD-14214	28%	18%
GAccAuuuAAuuuGGcAGATsT	842	UCUGCcAAAUuAAUUGGUCTsT	843	AD-14215	132%	0%
GAGAGAGuGuAAuuAAATsT	844	UUuAAUuAUcACUCCUCUCUTsT	845	AD-14216	3%	0%
cuGGAGAGuuGGcuGAcAATsT	846	UUGUcAGCcAAUCCUCcAGTsT	847	AD-14217	19%	1%
cucuAGucGuucccAcucATsT	848	UGAGUGGGAACGACuAGAGTsT	849	AD-14218	67%	8%
GAuAccAuAcuAcAGuAGTsT	850	CuACUGuAGuAAUGGuAUCTsT	851	AD-14219	76%	4%
uucGucuGcGAAGAAGAAATsT	852	UUUCUUCUUGcGACGAAATsT	853	AD-14220	33%	8%
GAAAAGAGuuAGuGuAcGTsT	854	CGuAcACuAAUCUUCUUUCTsT	855	AD-14221	25%	2%
uGAuGuuuAccGAAGuGuTsT	856	AAcACUUCGGuAAAcAUCATsT	857	AD-14222	7%	2%
uGuuuGuccAAuuuGGAuTsT	858	AUCcAGAAUUGGAcAAAcATsT	859	AD-14223	19%	2%
AuGAAGAGuAuAccuGGGATsT	860	UCCcAGGuAuACUCUUCAUTsT	861	AD-14224	13%	1%
GcuAcucuGAuGAAuGcAuTsT	862	AUGcAUUcAUcAGAGuAGCTsT	863	AD-14225	15%	2%
GcccuuGuGAAAGAAcAcTsT	864	GUGUUCUUUCuAcAAGGGCTsT	865	AD-14226	11%	0%
ucAuGuuccuuAucGAGATsT	866	UUCUCGauAAGGAACuAGATsT	867	AD-14227	5%	1%
GAAuAGGGuuAcAGAGuuGTsT	868	cAACUCUGuAACCCuAUUCTsT	869	AD-14228	34%	3%
cAAAcuGGAuGuAAGAGTsT	870	CUUCUuACGAUcAGUUGTsT	871	AD-14229	15%	2%
cuuAuuuGGuAAucGcuGTsT	872	cAGcAGAUuAcAAAUAGTsT	873	AD-14230	20%	1%
AGcAAuGuGGAACcuAAcTsT	874	GUuAGGUUUCcAcAUUGCUTsT	875	AD-14231	18%	1%
AcAAuAAAGcAGAccAuTsT	876	AAUGGGUCUGCUUuAUUGUTsT	877	AD-14232	21%	1%
AAccAcuuAGuAGuGuccATsT	878	UGGAcACuAcuAAGUGGUUTsT	879	AD-14233	106%	12%
AGucAAGAGccAucGuAGTsT	880	CuAcAGAUcGUCUUGACUTsT	881	AD-14234	35%	3%
cucccuAGAcuuccuAuTsT	882	AAuAGGGAAGUCuAGGGAGTsT	883	AD-14235	48%	4%
AuAGcuAAAUuAAAccAAATsT	884	UUUGGUUuAAUUuAGCuAUTsT	885	AD-14236	23%	3%
uGGcuGGuAuAAuuccAcGTsT	886	CGUGGAAUuAuAcAGCcATsT	887	AD-14237	79%	9%
uuAuuuGGuAAucGcuGuTsT	888	AcAGcAGAUuAcAAAUATsT	889	AD-14238	92%	7%
AAcuAGAuGGcuuucucAGTsT	890	CUGAGAAAGCcAUCuAGUUTsT	891	AD-14239	20%	2%
ucAuGGcGucGcAGccAAATsT	892	UUUGGCUGCGACGcAUGATsT	893	AD-14240	71%	6%
AcuGGAGGAuuGGcuGAcATsT	894	UGUcAGCcAAUCCUCcAGUTsT	895	AD-14241	14%	1%
cuAuAAuGcAcuAucuuuTsT	896	AAAGAuAGUGcAAUuAuAGTsT	897	AD-14242	11%	2%
AAAGGucAccuAAuGAAGATsT	898	UCUUCAUuAGGUGACCUUUTsT	899	AD-14243	11%	1%
AuGAuGcAuAcucuAGucTsT	900	GACuAGAGuAUGcAUUCAUTsT	901	AD-14244	15%	2%
AAcAuAuGAAuAAGccuGTsT	902	cAGGCUuAUUCAAuAUGUUTsT	903	AD-14245	80%	7%
AAGAAGGcAGuuGAccAAcTsT	904	GUUGGUcAACUGCCUUCUUTsT	905	AD-14246	57%	5%
GAuAcuAAAAGAAcAAucATsT	906	UGAUUGUUCUUuAGuAUCTsT	907	AD-14247	9%	3%

【 0 2 3 8 】

【表 3 - 4】

表3

AuAcuGAAAuAcAAuAGucTsT	908	GACuAUUGAUUUUcAGuAUTsT	909	AD-14248	39%	4%
AAAAAGGAuAcuAGuAGGcuTsT	910	AGCcAUCuAGUUCUUUUUTsT	911	AD-14249	64%	2%
GAAcuAGAuGGcuuucucATsT	912	UGAGAAAGCcAUCuAGUUCTsT	913	AD-14250	18%	2%
GAAAccuAAcuGAAGAccuTsT	914	AGGUCUUCAGUuAGGUUUCTsT	915	AD-14251	56%	6%
uAcccAucAAcAcuGGuAATsT	916	UuACcAGUGUUGAUGGGuATsT	917	AD-14252	48%	6%
AuuuuGAuAucAcuAAuTsT	918	AAUGGGuAGAuAUCAAAUTsT	919	AD-14253	39%	5%
AucccuAuAGuucAcuuuGTsT	920	cAAAGUGAACuAuAGGGAUTsT	921	AD-14254	44%	8%
AuGGGcuAuAAuGcAcuATsT	922	uAGUGcAAUuAuAGCCcAUTsT	923	AD-14255	108%	8%
AGAuAcccuGcGAGcccTsT	924	GGGCUcGcAGAGGuAAUCUTsT	925	AD-14256	108%	6%
uAAuuccAcGuAcccuuATsT	926	UGAAGGGuACGUUGGAUuATsT	927	AD-14257	23%	2%
GucGuucccAcucAGuuuuTsT	928	AAAACuGAGuGGGAACGACTsT	929	AD-14258	21%	3%
AAAuCAAucccuGuuGAcuTsT	930	AGUcAAcAGGGAUUGAUUUTsT	931	AD-14259	19%	2%
ucAuAGAGcAAAGAAcAuATsT	932	uAUGUUCUUUGCUCuAUGATsT	933	AD-14260	10%	1%
uuAcuAcAGuAGcAcuuGGTsT	934	CcAAGUGCuACUGuAGuAATsT	935	AD-14261	76%	3%
AuGuGGAAAccuAAcuGAATsT	936	UUcAGUuAGGUUUCcAcAUTsT	937	AD-14262	13%	2%
uGuGGAAAccuAAcuGAAGTsT	938	CUUcAGUuAGGUUUCcAcATsT	939	AD-14263	14%	2%
ucuuccuuAAAuGAAAGGGTsT	940	CCCuuUcAUUuAAGGAAGATsT	941	AD-14264	65%	3%
uGAAGAAccucuAAGucAATsT	942	UUGACUuAGAGGUUCUcATsT	943	AD-14265	13%	1%
AGAGGucAAAuGGAAGATsT	944	UCUUCcACUuAGACCUCUTsT	945	AD-14266	18%	3%
AuAucuAcccAuuuuucGTsT	946	cAGAAAAUUGGGuAGAuAUTsT	947	AD-14267	50%	9%
uAAGccuGAAGuGAAucAGTsT	948	CUGAUUcACUUCAGGCUuATsT	949	AD-14268	13%	3%
AGAuGcAGAcAAuuuAAuTsT	950	AAUuAAAUGGUCUGcAUCUTsT	951	AD-14269	19%	4%
AGuGuuGuuGuccAAuucTsT	952	GAAUUGGAcAAAcAAcACUTsT	953	AD-14270	11%	2%
cuAuAAuGAAGAGcuuuuTsT	954	AAAAGCUCUUCcAUuAuAGTsT	955	AD-14271	11%	1%
AGAGGAGuGAuAAuAAAGTsT	956	CUUuAAUuAuACUCCUCUTsT	957	AD-14272	7%	1%
uuucucuGuuAcAAuAcAuTsT	958	AUGuAUUGuAAcAGAGAAATsT	959	AD-14273	14%	2%
AAcAucuAuAAuGcAAcATsT	960	UGUUGcAAUuAuAGAUGUUTsT	961	AD-14274	73%	4%
uGcuAGAAGuAcAuAAGAcTsT	962	GUCUuAUGuACUUCuAGcATsT	963	AD-14275	10%	1%
AAuGuAcucAAGAcuGAucTsT	964	GAUcAGUCUUGAGuAcAUUTsT	965	AD-14276	89%	2%
GuAcucAAGAcuGAucuuTsT	966	GAAGAUcAGUCUUGAGuACTsT	967	AD-14277	7%	1%
cAcucuGAuAAAcuAAuGTsT	968	cAUUGAGUuAuAcAGAGUGTsT	969	AD-14278	12%	1%
AAGAGcAGAuAccucuGcTsT	970	GcAGAGGuAAUCUGCUCUUTsT	971	AD-14279	104%	3%
ucuGcGAGcccAGuAcAAcTsT	972	GUUGAUCUGGGCUCGcAGATsT	973	AD-14280	21%	2%
AAcuuGAGccuGuGuAuATsT	974	uAuAcAcAAGGCUCcAAGUUTsT	975	AD-14281	43%	3%
GAAuAuAuAuAucAGccGGTsT	976	CCGGCUGAuAuAuAuUUCTsT	977	AD-14282	45%	6%
uGucAuucccuAuAGuucAcTsT	978	GUGAACuAuAGGGAUGAcATsT	979	AD-14283	35%	5%
GAucuGcAAccAuAuuuTsT	980	GAAAuAUGGUUGCcAGAUCTsT	981	AD-14284	58%	3%
uGGcAAccAuAuuuuGcGATsT	982	UCcAGAAAuAUGGUUGCcATsT	983	AD-14285	48%	3%
GAuGuuAccGAAGuGuuGTsT	984	cAAcACUUCGGuAAAcAUCTsT	985	AD-14286	49%	3%
uuccuuAucGAGAAuAcuAATsT	986	UuAGAUUCUGGAuAAGGAATsT	987	AD-14287	6%	1%
AGcuuAAuGcuuucGcGATsT	988	UCcAGAAAGcAAUuAAGCUTsT	989	AD-14288	50%	2%
uuGcuAuAuAGGAGAccATsT	990	UGGUCUCCcAAuAAuAGcAATsT	991	AD-14289	48%	1%
GucAuGGcGucGcAGccAATsT	992	UUGGCUGCGAGCCcAUGACTsT	993	AD-14290	112%	7%
uAAuuGcAcuAucuuuGcGTsT	994	CGcAAAGAuAGUGcAAUuATsT	995	AD-14291	77%	2%
cuAucuuuGcGuAuGGccATsT	996	UGGCcAuACGcAAAGAuAGTsT	997	AD-14292	80%	6%
ucccuAuAGuucAcuuuGuTsT	998	AcAAAGUGAACuAuAGGGATsT	999	AD-14293	58%	2%
ucAAccuuuAAuucAcuuGTsT	1000	cAAGUGAAUuAAAGGUUGATsT	1001	AD-14294	77%	2%
GGcAAccAuAuuuuGGAATsT	1002	UUCcAGAAAuAUGGUUGCCTsT	1003	AD-14295	62%	2%
AuGuAcucAAGAcuGAucTsT	1004	AGAUcAGUCUUGAGuAcAUTsT	1005	AD-14296	59%	4%
GcAGAccAuuuAAuuuGGcTsT	1006	GCCAAAUuAAAUGGUCUGCTsT	1007	AD-14297	37%	1%
ucuGAGAGAcuAcAGAuGuTsT	1008	AcAUCUGuAGUCUCUcAGATsT	1009	AD-14298	21%	1%
uGcucAuAGAGcAAAGAAcTsT	1010	GUUCUUUGCUCuAUGAGcATsT	1011	AD-14299	6%	1%
AcAuAAGAccuuAuuuGGuTsT	1012	ACcAAAUuAAGGUCUuAUGUTsT	1013	AD-14300	17%	2%
uuuGuGcuGAuucGuAuGGTsT	1014	CcAUcAGAAUcAGcAcAAATsT	1015	AD-14301	97%	6%
ccAucAAcAcuGGuAAGAATsT	1016	UUCUuACcAGUGUUGAUGGTsT	1017	AD-14302	13%	1%
AGAcAAuuccGGAuGuGGATsT	1018	UCcAcAUCCGGAUUGUCUTsT	1019	AD-14303	13%	3%

【 0 2 3 9 】

【表 3 - 5】

表3

GAACuuGAGccuuGuGuAuTsT	1020	AuAcAcAAGGCuAAGUUCTsT	1021	AD-14304	38%	2%
uAAuuuGGcAGAGcGGAAATsT	1022	UUUCCGCUCUGCcAAAUuATsT	1023	AD-14305	14%	2%
uGGAuGAAGuuAuAuGGGTsT	1024	CCcAuAAuAACUUCaUCCaTsT	1025	AD-14306	22%	4%
AucUAcAuGAACuAcAAGATsT	1026	UCUUGuAGUUCaUGuAGAUTsT	1027	AD-14307	26%	6%
GGuAuuuuuuGaucuGGcAATsT	1028	UUGCcAGAUcAAAAuACCTsT	1029	AD-14308	62%	8%
cuAAuGAAGAGuAuAccuGTsT	1030	cAGGuAuACUCUUCaUuAGTsT	1031	AD-14309	52%	5%
uuuGAGAAAcuuAcuGAuATsT	1032	uAUcAGuAAGUUUCcAAATsT	1033	AD-14310	32%	3%
cGAuAAGAuAGAAGAuCATsT	1034	UUGAUCUUCuAUCUuAUCGTsT	1035	AD-14311	23%	2%
cuGGcAAccAuAuuuuGGTsT	1036	CcAGAAuAuAUGGUUGCcAGTsT	1037	AD-14312	49%	6%
uAGAuAccAuAuAcAGuTsT	1038	ACUGuAGuAAGGUuAUCuATsT	1039	AD-14313	69%	4%
GuAuuuAAuuuGGGuuucAuTsT	1040	AUGAAACCCAAUuuAAuACTsT	1041	AD-14314	52%	3%
AAGAccuuAuuuGGuAAuTsT	1042	GAUuACcAAuAAGGUCUUTsT	1043	AD-14315	66%	4%
GcuGuuGAuAAGAGAGcucTsT	1044	GAGCUCUCUuAUCaAcAGCTsT	1045	AD-14316	19%	4%
uAcucAuGuuuucAGAuTsT	1046	AAUCUGAGAAcAUGAGuATsT	1047	AD-14317	16%	5%
cAGAuGGAcGuAAGGcAGcTsT	1048	GCUGCCUuACGUCcAUCUGTsT	1049	AD-14318	52%	11%
uAucccAAcAGGuAcGAcATsT	1050	UGUCGuACCUGUUGGGAuATsT	1051	AD-14319	28%	11%
cAuUGcuAuAuAAGGAGAcTsT	1052	GUCUCCcAuAAuAGcAAUGTsT	1053	AD-14320	52%	10%
ccucAGuAAAuccAuGuTsT	1054	ACcAUGGAUuACUGAGGGTsT	1055	AD-14321	53%	6%
GGucAuAuAcuGccuuGuATsT	1056	uAcAAGGGcAGuAAGACCTsT	1057	AD-14322	20%	2%
AAccAcucAAAAcAuuuGTsT	1058	cAAUGUUUUUGAGUGGUUTsT	1059	AD-14323	116%	6%
uuuGcAAGuuAAuGAuAuTsT	1060	AGAUCcAUuAACUUGcAAATsT	1061	AD-14324	14%	2%
uuAuuuuAGuAGucAGAATsT	1062	UUCUGACuACUGAAAAuAATsT	1063	AD-14325	50%	2%
uuuucucGAuucAAuAuTsT	1064	AAGAUuGAUcGAGAAAAATsT	1065	AD-14326	47%	3%
GuAcGAAAAAGAuAuGATsT	1066	cACuAACUUCUUUUCGACTsT	1067	AD-14327	18%	2%
uuuAAAAGAGAuucGuTsT	1068	AGcAAGAUCUCGUUuAAATsT	1069	AD-14328	19%	1%
GAAuGAAuAAuGuAcuATsT	1070	UGAGuAcAUuAAUcAAUUCTsT	1071	AD-14329	94%	10%
GAUGGAcGuAAGGcAGcucTsT	1072	GAGCUGCCUuACGUcAUCTsT	1073	AD-14330	60%	4%
cAuCuGAcuAAuGGcucucTsT	1074	cAGAGCcAUuAGUcAGAUGTsT	1075	AD-14331	54%	7%
GuGAuccuGuAcGAAAGATsT	1076	UCUUUUCGuAcAGGAUcACTsT	1077	AD-14332	22%	4%
AGcucuuAuAAGGAGuAuTsT	1078	AuACUCCUuAAuAAGAGCUTsT	1079	AD-14333	70%	10%
GcucuuAuAAGGAGuAuATsT	1080	uAuACUCCUuAAuAAGAGCTsT	1081	AD-14334	18%	3%
ucuuAuAAGGAGuAuAcGTsT	1082	CGuAuACUCCUuAAuAAGATsT	1083	AD-14335	38%	6%
uAuAAGGAGuAuAcGGAGTsT	1084	CUCCGuAuACUCCUuAAuATsT	1085	AD-14336	16%	3%
cuGcAGcccGuGAGAAAAATsT	1086	UUUUUCUcACGGGcUGcAGTsT	1087	AD-14337	65%	4%
ucAAGAcuGAuucuuAAGTsT	1088	CUuAGAAGAUcAGUCUUGATsT	1089	AD-14338	18%	0%
cuuucAAGuucAcuGGAAATsT	1090	UUUCcAGUGAACUuAGAAGTsT	1091	AD-14339	20%	4%
uGcAAGuuAAuGAuAuTsT	1092	AAAGAUcAUuAACUUGcATsT	1093	AD-14340	24%	1%
AAuCuAAGGAGuAuAGucAATsT	1094	UUGACuAuAUCCUuAGAUUTsT	1095	AD-14341	27%	3%
AucucuGAACAcAAGAAcATsT	1096	UGUUCUUGUGUUCaAGAUTsT	1097	AD-14342	13%	1%
uuCuGAACAGuGGGuAuTsT	1098	AGAuACCcACUGUUCAGAATsT	1099	AD-14343	19%	1%
AGuuAuuuAuAcccAuCATsT	1100	UUGAUGGGuAuAAuAACUTsT	1101	AD-14344	23%	2%
AuGcuAAAcuGuucAGAAATsT	1102	UUUCUGAACAGUuAGcAUTsT	1103	AD-14345	21%	4%
cuAcAGAGcAcuGGGuAcTsT	1104	GuAACcAAGUGCUCUGuAGTsT	1105	AD-14346	18%	2%
uAuAuAuAcAGcGGGcGcTsT	1106	CGCGCCCGGcUGAuAuAuATsT	1107	AD-14347	67%	2%
AuGuAAuAcGuAuuuuATsT	1108	uAGAAuACGuAUUuAcAUTsT	1109	AD-14348	39%	3%
uuuuucucGAuucAAuAuTsT	1110	AGAuuGAUcGAGAAAAATsT	1111	AD-14349	83%	6%
AAuCuAAccuuAGGAcuTsT	1112	AGUCCuAAGGGuAAGAUUTsT	1113	AD-14350	54%	2%
ccuuAGGAcucGuGuAuTsT	1114	AAuAACcAGAGUCCuAAGGTsT	1115	AD-14351	57%	8%
AAuAAAcuGccucAGuAATsT	1116	UuACUGAGGGcAGUuAUUTsT	1117	AD-14352	82%	3%
GAuccuGuAcGAAAGAGTsT	1118	CUUCUUUUCGuAcAGGAUCTsT	1119	AD-14353	2%	1%
AAuGuGAuccuGuAcGAAATsT	1120	UUUCGuAcAGGAUcAcAUUTsT	1121	AD-14354	18%	11%
GuGAAAcAuGGcGuucTsT	1122	GAACGGCcAAUGUUUUCACTsT	1123	AD-14355	2%	1%
cuuGAGGAAAcucGAGuATsT	1124	uACUcAGAGUUUCCUcAAGTsT	1125	AD-14356	8%	2%
cGuuuAAAcGAGAuCuGTsT	1126	cAAGAUCUGUUUuAAACGTsT	1127	AD-14357	6%	3%
uuAAAAcGAGAuCuGcGTsT	1128	cAGcAAGAUCUGUUuAATsT	1129	AD-14358	98%	17%
AAAGAuGuAuCuGGucucTsT	1130	GGAGACcAGAuAcAUUUUTsT	1131	AD-14359	10%	1%

【 0 2 4 0 】

10

20

30

40

【表 3 - 6】

表3

cAGAAAAuGuGucuAcucATsT	1132	UGAGuAGAcAcAUUUUCUGTsT	1133	AD-14360	6%	4%
cAGGAAuuGAuuAAuGuAcTsT	1134	GuAcAUuAAUcAAUUCUGTsT	1135	AD-14361	30%	5%
AGucAAcuAAAGcAuAuuuTsT	1136	AAAuAUGCUUuAGUUGACUTsT	1137	AD-14362	28%	2%
uGuGuAAcAAucAcAuGATsT	1138	UcAUGuAGAUUGUuAcAcATsT	1139	AD-14363	60%	6%
AuAccAuuuGuucuuGGuTsT	1140	ACcAAGGAACAAAUGGuAUTsT	1141	AD-14364	12%	9%
GcAGAAuAucAAGGAuAuATsT	1142	uAuAUCCUuAGAUUUUCUGTsT	1143	AD-14365	5%	2%
uGGcuucucAcAGGAucTsT	1144	GAGUCCUGUGAGAAGCcATsT	1145	AD-14366	28%	5%
GAGAuGuGAuucucuGAATsT	1146	GUUcAGAGAUUcAcAUCUCTsT	1147	AD-14367	42%	4%
uGuAAGccAAuGuuGuGAGTsT	1148	CUCcAAcAAUUGGCuAcATsT	1149	AD-14368	93%	12%
AGccAAuGuuGuGAGGcuuTsT	1150	AAGCCUcAcAAcAUUGGCUTsT	1151	AD-14369	65%	4%
uuGuGAGGcuucAAGuAcTsT	1152	UGAACUUGAAGCCUcAcATsT	1153	AD-14370	5%	2%
AGGcAGcucAuGAGAAAcATsT	1154	UGUUUCUcAUGAGCUGCCUTsT	1155	AD-14371	54%	5%
AuAAAuuGAuAGcAcAAATsT	1156	UUUGUGCUuAUCAAUUuAUTsT	1157	AD-14372	4%	1%
AcAAAuAucAAGAAcuuAAuTsT	1158	AUuAAGUUCuAGAUUUUGUTsT	1159	AD-14373	5%	1%
GAuAucccAAcAGGuAcGATsT	1160	UCGuACCUGUUGGGAuAUTsT	1161	AD-14374	92%	6%
AAGuuAuuuAuAcccAuATsT	1162	UGAUGGGuAuAAAuAACUUTsT	1163	AD-14375	76%	4%
uGuAAAuAcGuAuuucuAGTsT	1164	CuAGAAuACGuAUUuAcATsT	1165	AD-14376	70%	5%
ucuAGuuuuAuAuAAAGuTsT	1166	ACUUuAuAUGAAAACuAGATsT	1167	AD-14377	48%	4%
AuAAAGuAGuuuuuuAuATsT	1168	uAuAAAAGAACuACUUuAUTsT	1169	AD-14378	48%	3%
ccAuuuGuAGAGCuAcAAATsT	1170	UUUGuAGCUCuAcAAUUGTsT	1171	AD-14379	44%	5%
uAuuuuAGuAGuAGAAuTsT	1172	AUUCUGACuACUGAAAAuATsT	1173	AD-14380	35%	16%
AAuAucAuccuAGuGuATsT	1174	uAcAACuAGGGUuAGAUUUTsT	1175	AD-14381	44%	5%
cuuuAGAGuAuAcAuGcuTsT	1176	AGcAAUGuAuACUCuAAAGTsT	1177	AD-14382	28%	1%
AucuGAcuAAuGGGcuGuTsT	1178	AcAGAGCcAUuAGUcAGAUTsT	1179	AD-14383	55%	11%
cAcAAuGAuuuAAGGAcuGTsT	1180	cAGUCCUuAAAuAcUUGUGTsT	1181	AD-14384	48%	9%
ucuuuuucucGAuucAAuTsT	1182	AUUuGAUUCGAGAAAAAGATsT	1183	AD-14385	36%	2%
cuuuuucucGAuucAAuTsT	1184	GAUUuGAUUCGAGAAAAAGTsT	1185	AD-14386	41%	7%
AuuuucGucAcGAuGAGTsT	1186	CUCcAUCGUGAGcAGAAAAuTsT	1187	AD-14387	38%	3%
uuucGucAcGAuGAGuTsT	1188	AACUcAUCGUGAGcAGAAATsT	1189	AD-14388	50%	4%
AGAGCuAcAAAcuAuccTsT	1190	GGAuAGGUUUUGuAGCUCUTsT	1191	AD-14389	98%	6%
GAGccAAAGGuAcAccAcuTsT	1192	AGUGGUGuACCUUUGGCUCTsT	1193	AD-14390	43%	8%
GccAAAGGuAcAccAcuTsT	1194	GuAGUGGUGuACCUUUGGCTsT	1195	AD-14391	48%	4%
GAAcuGuAcuucucAGcTsT	1196	GCUGAGAAGAGuAcAGUUCTsT	1197	AD-14392	44%	3%
AGGuAAuAucAccAAcAuTsT	1198	AUGUUGGUGuAUUuACCUTsT	1199	AD-14393	37%	2%
AGcuAcAAAcuAuccuTsT	1200	AAGGAuAGGUUUUGuAGCUTsT	1201	AD-14394	114%	7%
uGuGAAAGcAuuuAAuuccTsT	1202	GGAAUuAAAUGCUUUCAcATsT	1203	AD-14395	55%	4%
GcccAcuuuAGAGuAuAcATsT	1204	UGuAuACUCuAAAGUGGGCTsT	1205	AD-14396	49%	5%
uGuGccAcAcuccAAGAcTsT	1206	GGUCUUGGAGUGUGGcAcATsT	1207	AD-14397	71%	6%
AAAcuAAuuGAucGuATsT	1208	uACGAGAUcAAUUuAGUUUTsT	1209	AD-14398	81%	7%
uGAucucGuAGAAuuAucTsT	1210	AGAuAAUUCuACGAGAUcATsT	1211	AD-14399	38%	4%
GcGuGcAGucGGuccucATsT	1212	UGGAGGACCGACUGcACGCTsT	1213	AD-14400	106%	8%
AAAGuuuAGAGAcAucGATsT	1214	UcAGAUUCUCuAAACUUUTsT	1215	AD-14401	47%	3%
cAGAAGGAuAuGuAcAAATsT	1216	UUUGuAcAuAUUCCUUCUGTsT	1217	AD-14402	31%	1%
GcGccGAGAGuAccAGGGATsT	1218	UCCUGGuACUCUGGGCGTsT	1219	AD-14403	105%	4%
cGGAGGAGuAGAAcGuuTsT	1220	AAACGUUCuAUCUCCUCCGTsT	1221	AD-14404	3%	1%
AGAuAGAAcGuuuAAAcGTsT	1222	CGUUUuAAACGUUUCuAUCUTsT	1223	AD-14405	15%	1%
GGAAcAGGAACuucAcAcTsT	1224	GUuGuGAAGUUCcuGUUCCTsT	1225	AD-14406	44%	5%
GuGAGccAAAGGuAcAccATsT	1226	UGGUGuACCUUUGGCuAcTsT	1227	AD-14407	41%	4%
AuccuccuAGAcuuccuTsT	1228	AGGGAAGUCuAGGGAGGAUTsT	1229	AD-14408	104%	3%
cAcAcuccAAGAccuGuGcTsT	1230	GcAcAGGUCUUGGAGUGUGTsT	1231	AD-14409	67%	4%
AcAGAAGGAuAuGuAcAATsT	1232	UUGuAcAuAUUCCUUCUGUTsT	1233	AD-14410	22%	1%
uuAGAGAcAucGAcuuuGTsT	1234	cAAAGUcAGAUUCUCuAATsT	1235	AD-14411	29%	3%
AAuuGAucucGuAGAAuuATsT	1236	uAAUUCuACGAGAUcAAUUTsT	1237	AD-14412	31%	4%

【配列表】

0005704741000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1

(72)発明者 バムクロット, デイビッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02478, ベルモント, レスター ロード 30

(72)発明者 タン, パメラ
 ドイツ国 95326 クルムバハ, カルテ マルテル 8

(72)発明者 フォルンロッシャー, ハンスーペーター
 ドイツ国 95448 パイロイト, アルベルトーアインシュタインーリング 43アー

(72)発明者 ガイック, アンケ
 ドイツ国 95447 パイロイト, ヘルダーリナンラゲ 12

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 ▲高▼ 美葉子

審判官 鈴木 恵理子

(56)参考文献 国際公開第05/14782号 (WO, A1)
 米国特許出願公開第2004/115201号明細書 (US, A1)
 WEIL, BIOTECHNIQUES, 2002年, Vol. 33 No. 6, p. 1244
 -1248
 Methods, 2002年, Vol. 26, p. 199-213
 Comput Methods Programs Biomed., 2004年, Vol. 7
 5, p. 67-73
 Bioorg Med Chem., 2005年, Vol. 13, p. 6094-6111
 Cell Motil Cytoskeleton., 2004年, Vol. 58, p. 10-
 16
 Biochemistry, 2004年, Vol. 43, p. 15258-15266

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 IPC C12N 15/00-15/90
 CA/REGISTRY (STN)