(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-525800
(P2024-525800A)
(43)公表日　令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　15/113(2010.01)		Ｃ１２Ｎ	15/113	ＺＺＮＡ　４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　48/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	48/00	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ　31/713(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/713	
Ａ６１Ｐ　3/06　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	3/06	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全102頁）

(21)出願番号　特願2024-502055(P2024-502055)
(86)(22)出願日　令和4年6月30日(2022.6.30)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月13日(2024.3.13)
(86)国際出願番号　PCT/CN2022/103049
(87)国際公開番号　WO2023/284559
(87)国際公開日　令和5年1月19日(2023.1.19)
(31)優先権主張番号　202110807464.3
(32)優先日　令和3年7月16日(2021.7.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517452453
スーチョウ リボ ライフ サイエンス カンパニー、リミテッド
ＳＵＺＨＯＵ ＲＩＢＯ ＬＩＦＥ ＳＣＩＥＮＣＥ ＣＯ．，ＬＴＤ．
中華人民共和国 チアンスー ２１５３００、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアンフォン ロード ナンバー １６８
(74)代理人　110000729
弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(72)発明者　リャン、ツーツァイ
中華人民共和国 チアンスー ２１５３００、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアンフォン ロード ナンバー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　核酸、当該核酸を含む組成物及び複合体ならびに調製方法と使用

(57)【要約】
本開示は、アポリポタンパク質Ｃ３（ＡＰＯＣ３）遺伝子の発現を抑制できるｓｉＲＮＡを提供する。ｓｉＲＮＡは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ１９個の修飾又は未修飾のヌクレオチドからなるヌクレオチド配列Ｉ又はヌクレオチド配列ＩＩを含み、前記ヌクレオチド配列Ｉと前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的に逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的にＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の１つのヌクレオチド配列と逆相補的であり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第３～６位のヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、安定化修飾ヌクレオチドである。本開示により提供されるｓｉＲＮＡ及び当該ｓｉＲＮＡを含む医薬組成物とｓｉＲＮＡ複合体は、ＡＰＯＣ３遺伝子の発現に関連する疾患又は症状を効果的に治療及び／又は予防し、かつオフターゲット効果を顕著に低下させることができる。
【選択図】図１Ａ

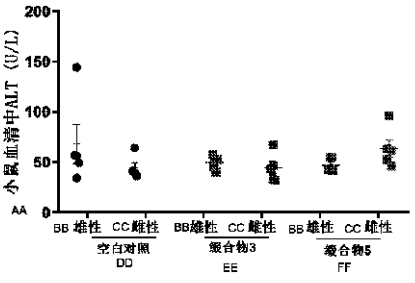


图 1A

AA ALT in mouse serum
BB Male
CC Female
DD Blank control
EE Conjugate 3
FF Conjugate 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｓｉＲＮＡであって、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ｉを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩを含み、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩは、いずれも１９個のヌクレオチドからなり、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の各ヌクレオチドは、修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的に逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的に第１ヌクレオチド配列と逆相補的であり、前記第１ヌクレオチド配列は、アポリポタンパク質Ｃ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、長さが１９個のヌクレオチドであるヌクレオチド配列であり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第３～６位のヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、安定化修飾ヌクレオチドであり、前記安定化修飾ヌクレオチドとは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが安定化修飾基で置換されたヌクレオチドを指し、対応する位置のヌクレオチドが未修飾のヌクレオチドであるｓｉＲＮＡと比較して、前記安定化修飾ヌクレオチドを含むｓｉＲＮＡは、熱安定性が増加し、かつ前記安定化修飾基の立体障害が２’－Ｏ－メチルよりも大きい、ｓｉＲＮＡ。
【請求項２】
５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第３位又は第５位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドである、請求項１に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３】
５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第３～９位のヌクレオチドのうちの２個以下のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドである、請求項１又は２に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項４】
前記ｓｉＲＮＡの熱安定性が増加するとは、前記ｓｉＲＮＡのＴｍが上昇することを指し、Ｔｍは、ｓｉＲＮＡの二本鎖熱解離温度である、請求項１～３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項５】
前記ｓｉＲＮＡの熱安定性が増加するとは、前記ｓｉＲＮＡのＴｍが少なくとも０．０５℃上昇することを指す、請求項４に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項６】
前記ｓｉＲＮＡの熱安定性が増加するとは、前記ｓｉＲＮＡのＴｍが０．１～６℃上昇することを指す、請求項４に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項７】
前記ｓｉＲＮＡの熱安定性が増加するとは、前記ｓｉＲＮＡのＴｍが０．５～４℃上昇することを指す、請求項４に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項８】
各前記安定化修飾基は独立して、－Ｘ－Ｒに示される構造を有し、Ｘは、Ｏ、ＮＲ’、Ｓ又はＳｉＲ’$_2$であり、Ｒは、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、置換されたＣ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、置換されたＣ$_6$－Ｃ$_8$アリールのうちの１つであり、各Ｒ’は独立して、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、置換されたＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、置換されたＣ$_6$－Ｃ$_8$アリールのうちの１つであり、前記置換されたＣ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、置換されたＣ$_6$－Ｃ$_8$アリール又は置換されたＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルとは、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、又はＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキル中の１又は複数の水素原子が置換基で置換された基を指し、前記置換基は、Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルコキシ、ハロゲン、オキシサブユニット、及びスルフィドサブユニットから選択される１又は複数である、請求項１～７のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項９】
各前記安定化修飾基は、２’－Ｏ－メトキシエチル、２’－Ｏ－アリル、２’－Ｃ－アリ

ル、２’－Ｏ－２－Ｎ－メチルアミノ－２－オキシイリデンエチル、２’－Ｏ－２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチル、２’－Ｏ－３－アミノプロピル、及び２’－Ｏ－２，４－ジニトロフェニルから独立して選択される１つである、請求項８に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項１０】

各前記安定化修飾基は、２’－Ｏ－メトキシエチルである、請求項９に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項１１】

前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、

５’－ＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_1－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、

５’－Z_2ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、

ただし、Z_1はＡであり、Z_2はＵであり、前記ヌクレオチド配列Ｉに、位置がZ_1に対応するヌクレオチドZ_3が含まれ、前記ヌクレオチド配列ＩＩに、位置がZ_2に対応するヌクレオチドZ_4が含まれ、前記Z_4は、前記アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、

５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_5－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）、

５’－Z_6ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６）、

ただし、Z_5はＵであり、Z_6はＡであり、前記ヌクレオチド配列Ｉに、位置がZ_5に対応するヌクレオチドZ_7が含まれ、前記ヌクレオチド配列ＩＩに、位置がZ_6に対応するヌクレオチドZ_8が含まれ、前記Z_8は、前記アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、

５’－ＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_9－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５）、

５’－Z_{10}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６）、

ただし、Z_9はＵであり、Z_{10}はＡであり、前記ヌクレオチド配列Ｉに、位置がZ_9に対応するヌクレオチドZ_{11}が含まれ、前記ヌクレオチド配列ＩＩに、位置がZ_{10}に対応するヌクレオチドZ_{12}が含まれ、前記Z_8は、前記アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドである、請求項１～１０のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項１２】

前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列であるか、又は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列であるか、又は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列である、請求項１１に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項１３】

前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、

或いは、前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列ＩＩ

とＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、
　或いは、前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下である、請求項１１又は１２に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項１４】
　前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_4の位置の差異を含み、Z_4は、Ａ、Ｇ又はＣから選択され、
　或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_8の位置の差異を含み、Z_8は、Ｇ、Ｃ又はＵから選択され、
　或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_{12}の位置の差異を含み、Z_{12}は、Ｇ、Ｃ又はＵから選択される、請求項１３に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項１５】
　前記Z_3は、Z_4と相補的なヌクレオチドであり、或いは、前記Z_5は、Z_6と相補的なヌクレオチドであり、或いは、前記Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドである、請求項１１～１４のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項１６】
　前記ヌクレオチド配列ＩＩと前記第１ヌクレオチド配列は、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に３つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に１つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記完全に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間にミスマッチがないことを指す、請求項１～１５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項１７】
　５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２～１９位のヌクレオチドと前記第１ヌクレオチド配列の第１～１８位のヌクレオチドとは、完全に逆相補的である、請求項１６に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項１８】
　前記ヌクレオチド配列ＩＩと前記ヌクレオチド配列Ｉとは、完全に逆相補的であり、或いは、５’末端から３’末端に向かう前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第２位のヌクレオチドと、３’末端から５’末端に向かう前記ヌクレオチド配列Ｉ中の第２位のヌクレオチドとの間に塩基ミスマッチが存在する、請求項１７に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項１９】
　前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが１９～２３個のヌクレオチドであり、アンチセンス鎖の長さが１９～２６個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Ｉは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３に示されるヌクレオチド配列であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４に示されるヌクレオチド配列であり、
　５’－ＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_3－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、
　５’－Z_4ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、
　ただし、Z_3は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_4は、Z_3と相補的なヌクレオチドであり、
　或いは、前記ヌクレオチド配列Ｉは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７に示されるヌクレオチド配列であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８に示されるヌクレオチド配列であり、
　５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７）、

５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８）、
ただし、Z_7は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ヌクレオチド配列Ｉは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７に示されるヌクレオチド配列であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８に示されるヌクレオチド配列であり、
５’－ＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_{11}－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７）、
５’－Z_{12}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８）、
ただし、Z_{11}は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_{12}は、Z_{11}と相補的なヌクレオチドである、請求項１～１８のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２０】
Z_3はＡであり、Z_4はＵであり、或いは、Z_7はＵであり、Z_8はＡであり、或いは、Z_{11}はＵであり、Z_{12}はＡである、請求項１９に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２１】
５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２、６、１４、１６位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドではない場合、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項１～２０のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２２】
前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の全てのヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の全てのヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２、６、１４、１６位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドではない場合、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の他のヌクレオチドは、それぞれ独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つである、請求項２１に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２３】
５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Ｉの第７～９位のヌクレオチドは、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項１～２２のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２４】
前記ヌクレオチド配列Ｉ中の全てのヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Ｉの第７～９位のヌクレオチドは、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項２３に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２５】
前記ヌクレオチド配列Ｉ中の全てのヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Ｉの第７～９位のヌクレオチドは、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Ｉ中の他のヌクレオチドは、それぞれ独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つである、請求項２４に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２６】
前記センス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩＩを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＶを更に含み、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩ及び前記ヌクレオチド配列ＩＶの各ヌクレオチドは独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つであり、かつ前記安定化修飾ではなく、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの長さは、１個、２個、３個、４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶと前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとは、長さが等しく、かつ実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩは、前記ヌクレオチド配列Ｉの５’末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ＩＶは、前記ヌクレオチド配列ＩＩの３’末端に結合され、かつ前記ヌクレオチド配列ＩＶは、

第２ヌクレオチド配列と実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該第２ヌクレオチド配列とは、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、第１ヌクレオチド配列に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列ＩＶと同じであるヌクレオチド配列を指す、請求項１～２５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２７】

前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも１個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基は、Ｃであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基は、Ｇであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも２個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＣＣであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＧＧであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとの長さは、いずれも３個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＵＣＣであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＧＧＡであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶの長さは、いずれも４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＣＵＣＣであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＧＧＡＧである、請求項２６に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２８】

前記第２ヌクレオチド配列は、長さが１個、２個、３個又は４個のヌクレオチドであり、塩基組成がそれぞれＣ、ＣＣ、ＵＣＣ又はＣＵＣＣである、請求項２７に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項２９】

前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも１個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基は、Ｃであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基は、Ｇであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも２個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＧＣであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＧＣであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとの長さは、いずれも３個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＵＧＣであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＧＣＡであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＵＵＧＣであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＧＣＡＡである、請求項２６に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項３０】

前記第２ヌクレオチド配列は、長さが１個、２個、３個又は４個のヌクレオチドであり、塩基組成がそれぞれＣ、ＧＣ、ＧＣＡ又はＧＣＡＡである、請求項２９に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項３１】

前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも１個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基は、Ｇであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基は、Ｃであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも２個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＡＧであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＣＵであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも３個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＡＡＧであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＣＵＵであり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＡＡＡＧであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＣＵＵＵである、

請求項２６に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３２】
前記第２ヌクレオチド配列は、長さが１個、２個、３個又は４個のヌクレオチドであり、塩基組成がそれぞれＧ、ＡＧ、ＡＡＧ又はＡＡＡＧである、請求項３１に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３３】
前記ｓｉＲＮＡは、オリゴヌクレオチド配列Ｖを更に含み、前記オリゴヌクレオチド配列Ｖの各ヌクレオチドは独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つであり、かつ前記安定化修飾ヌクレオチドではなく、前記ヌクレオチド配列Ｖは、長さが１～３個のヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の３’末端に結合されて、前記アンチセンス鎖の３’オーバーハング端を構成する、請求項１～３２のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３４】
前記ヌクレオチド配列Ｖは、長さが２個のヌクレオチドであり、かつ５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Ｖは、連続した２個のチミンデオキシリボヌクレオチドであり、連続した２個のウラシルリボヌクレオチドであり、又は第３ヌクレオチド配列と完全に逆相補的であり、前記第３ヌクレオチド配列は、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、第１ヌクレオチド配列又は第２ヌクレオチド配列に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列Ｖと等しいヌクレオチド配列を指す、請求項３３に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３５】
前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列を有し、前記第３ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＣＣであり、或いは、前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列を有し、前記第３ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＧＣであり、或いは、前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列を有し、前記第３ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＡＧである、請求項３４に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３６】
前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_3－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、
５’－Z_4ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧＧＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、
ただし、前記Z_4は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_3は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_4は、Z_3と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＣＣＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_3－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）、
５’－Z_4ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧＧＧＡＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）、
ただし、前記Z_4は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_3は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、かつZ_4は、Z_3と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５０に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）、
５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５０）、

ただし、前記Z_8は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_7は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５２に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＧＣＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１）、
５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５２）、
ただし、前記Z_8は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_7は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）、
５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＵＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９）、
ただし、前記Z_8は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_7は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５０に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＧＣＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１）、
５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣＵＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５０）、
ただし、前記Z_8は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_7は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１０に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_{11}－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９）、
５’－Z_{12}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１０）、
ただし、前記Z_{12}は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_{11}は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_{12}は、Z_{11}と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_{11}－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１）、
５’－Z_{12}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２）、
ただし、前記Z_{12}は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_{11}は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_{12}は、Z_{11}と相補的なヌクレオチドである、請求項１～３５のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項３７】

各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド、又はヌクレオチドアナログから独立して選択される

１つである、請求項１～３６のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３８】
各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、いずれもメトキシ修飾ヌクレオチドであり、前記メトキシ修飾ヌクレオチドとは、リボースの２’－ヒドロキシがメトキシで置換されたヌクレオチドを指す、請求項１～３７のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項３９】
前記ｓｉＲＮＡは、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１、及びｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２のうちの１つである、請求項１～３８に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項４０】
前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖のうちの少なくとも１つの一本鎖のリン酸－糖骨格中のリン酸エステルのうちの少なくとも１つは、修飾基を有するリン酸エステルであり、前記修飾基を有するリン酸エステルは、
前記センス鎖の５’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、
前記センス鎖の５’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間、
前記センス鎖の３’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、
前記センス鎖の３’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間、
前記アンチセンス鎖の５’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、
前記アンチセンス鎖の５’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間、
前記アンチセンス鎖の３’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、及び
前記アンチセンス鎖の３’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間からなる群から選択される少なくとも１つに存在する、請求項１～３８のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項４１】
前記ｓｉＲＮＡは、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１Ｓ及びｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２Ｓのうちの１つである、請求項４０に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項４２】
前記アンチセンス鎖の５’末端のヌクレオチドは、５’－リン酸ヌクレオチド又は５’－リン酸アナログ修飾ヌクレオチドである、請求項１～３８及び４０のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ。
【請求項４３】
前記ｓｉＲＮＡは、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３

ｂ３－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１ＳＰ１、及びｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２ＳＰ１のうちの１つである、請求項４２に記載のｓｉＲＮＡ。

【請求項４４】

請求項１～４３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項４５】

請求項１～４３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ及び当該ｓｉＲＮＡに複合して結合される複合基を含み、前記複合基は、リンカー及び薬学的に許容される標的基を含み、前記ｓｉＲＮＡ、前記リンカー、及び前記標的基は、順に共有結合的に又は非共有結合的に結合され、各前記標的基は、細胞表面受容体に結合できるリガンドから選択される、ｓｉＲＮＡ複合体。

【請求項４６】

請求項１～４３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ、及び／又は、請求項４４に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項４５に記載のｓｉＲＮＡ複合体の、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状を治療及び／又は予防する薬物の調製における使用。

【請求項４７】

前記ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状は、脂質異常症である、請求項４６に記載の使用。

【請求項４８】

ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状の治療及び／又は予防方法であって、請求項１～４３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ、及び／又は、請求項４４に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項４５に記載のｓｉＲＮＡ複合体を、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

【請求項４９】

前記ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状は、脂質異常症である、請求項４８に記載の方法。

【請求項５０】

細胞中のＡＰＯＣ３遺伝子の発現レベルの抑制方法であって、請求項１～４３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ、及び／又は、請求項４４に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項４５に記載のｓｉＲＮＡ複合体の有効量を前記細胞と接触させることを含む、方法。

【請求項５１】

請求項１～４３のいずれか一項に記載のｓｉＲＮＡ、及び／又は、請求項４４に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項４５に記載のｓｉＲＮＡ複合体を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本開示は、オフターゲット効果を低下させ、アポリポタンパク質Ｃ３（ＡＰＯＣ３）遺伝子発現を抑制できる核酸、当該核酸を含む組成物と複合体に関する。本開示は更に、これらの核酸、組成物及び複合体の調製方法と使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

脂質異常症は、高脂血症とも呼ばれ、脂肪代謝又は作動の異常により、血漿脂質が正常値より高くなる全身性疾患であり、全世界の患者の健康に深刻な脅威を与えている。アポ

リポタンパク質Ｃ３（ＡＰＯＣ３）は、脂質代謝において重要な役割を果たし、ＡＰＯＣ３変異遺伝子を保有する人は、血液循環中のＡＰＯＣ３の発現量が４６％低下し、血漿中のトリグリセリドレベルが一般の人と比較して３９％低下する。したがって、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ）を用いて遺伝子レベルで遺伝子発現をサイレンシングさせ、ＡＰＯＣ３を遮断することができれば、ＡＰＯＣ３に関連する脂質異常症を治療する理想的な手段となることに疑いはない。近年、ＡＰＯＣ３遺伝子の発現を抑制するｓｉＲＮＡ医薬品の開発においてかなりの進展があった。

【０００３】

ｓｉＲＮＡ医薬品の開発研究において、オフターゲット効果は、毒性に関連する重要な副作用の１つである。現在、前臨床の薬学的研究で優れた薬学的活性を示す多くのｓｉＲＮＡは、オフターゲット効果による毒性のため、実際の薬物研究開発に用いることが困難である。実際に患者に投与される薬物の調製に用いられることが期待される理想的なｓｉＲＮＡは、オフターゲット効果による低毒性を含めて、疑いなく低毒性であるべきである。したがって、本分野において、低いオフターゲット効果を有するｓｉＲＮＡをどのように取得するかについては、更に深く探索する必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

オフターゲット効果を顕著に低下させ、ＡＰＯＣ３遺伝子を抑制できるｓｉＲＮＡを開発するために、本発明者らは、配列の特定の位置に安定化修飾ヌクレオチドを有するｓｉＲＮＡが、対応する位置に安定化修飾ヌクレオチドを有していないｓｉＲＮＡよりも顕著に低いオフターゲット効果を示すことを、予想外に見出した。更に、配列の特定の位置に安定化修飾ヌクレオチドを有するいくつかのｓｉＲＮＡは、顕著に低いオフターゲット効果を有するとともに、安定化修飾ヌクレオチドを有していないｓｉＲＮＡと比較して明らかに低下していないか又はそれに相当するＡＰＯＣ３遺伝子抑制活性を示す。そこで、本発明者らは、以下の発明を行った。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

一態様において、本開示は、ｓｉＲＮＡを提供し、前記ｓｉＲＮＡは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ｉを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩを含み、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩは、いずれも１９個のヌクレオチドからなり、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の各ヌクレオチドは、修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的に逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的に第１ヌクレオチド配列と逆相補的であり、前記第１ヌクレオチド配列は、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、長さが１９個のヌクレオチドであるヌクレオチド配列であり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第３～６位のヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、安定化修飾ヌクレオチドであり、前記安定化修飾ヌクレオチドとは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが安定化修飾基で置換されたヌクレオチドを指し、対応する位置のヌクレオチドが未修飾のヌクレオチドであるｓｉＲＮＡと比較して、前記安定化修飾ヌクレオチドを含むｓｉＲＮＡは、熱安定性が増加し、かつ前記安定化修飾基の立体障害が２’－Ｏ－メチルよりも大きい。

【０００６】

別の態様において、本開示は、医薬組成物を更に提供し、当該医薬組成物は、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ及び薬学的に許容される担体を含む。

【０００７】

更に別の態様において、本開示は、ｓｉＲＮＡ複合体を更に提供し、前記ｓｉＲＮＡ複合体は、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ及び当該ｓｉＲＮＡに複合して結合される複合基を含み、前記複合基は、リンカー及び薬学的に許容される標的基を含み、前記ｓｉＲ

ＮＡ、前記リンカー、及び前記標的基は、順に共有結合的に又は非共有結合的に結合され、各前記標的基は、細胞表面受容体に結合できるリガンドから選択される。

【０００８】

更に別の態様において、本開示は、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及びｓｉＲＮＡ複合体の、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状を治療及び／又は予防する薬物の調製における使用を更に提供する。

【０００９】

更に別の態様において、本開示は、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状の治療及び／又は予防方法を更に提供し、前記方法は、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を、それを必要とする被験体に投与することを含む。

【００１０】

更に別の態様において、本開示は、細胞中のＡＰＯＣ３遺伝子の発現レベルの抑制方法を更に提供し、前記方法は、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体の有効量を前記細胞と接触させることを含む。

【００１１】

また、本開示は、キットを更に提供し、前記キットは、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を含む。

【００１２】

［引用による組み込み］

本明細書で言及される全ての出版物、特許及び特許出願は、各々の出版物、特許又は特許出願が特別にかつ個別に引用により本明細書に組み込まれるのと同じ程度に、引用により本明細書に組み込まれる。

【発明の効果】

【００１３】

本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体は、良好な安定性を有し、低いオフターゲット効果を有し、良好なＡＰＯＣ３遺伝子発現抑制活性を有し、かつ良好な脂質低下効果を示す。以下、具体的に説明する。

【００１４】

第一に、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体は、インビトロ又はインビボにおいて、より低いオフターゲット効果及び／又はオフターゲット効果による毒性反応を有し得る。特に、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を投与したマウスは、参照ｓｉＲＮＡ複合体の場合と比較して、顕著に低い血液生化学的結果及び明らかな毒性優位性を示した。例えば、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を１００ｍｇ／ｋｇの用量で投与したマウスにおいては、血液生化学的指標が顕著に低下し、ブランク対照群と比較して明らかな異常がなく、また、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を投与したマウスにおいては、参照ｓｉＲＮＡ複合体と比較して、中程度以上の炎症性細胞浸潤及び壊死が示されず、組織病理学的に顕著に低い毒性反応を示した。また、例えば３００ｍｇ／ｋｇの高用量でも、血清ＡＬＴはブランク対照群と比較して明らかな差異がなく、また、参照複合体を投与したマウスのうちの６匹のマウスの組織病理切片において、いずれも炎症性細胞浸潤を示したのと比べて、本開示の複合体を投与したマウスのうち、炎症性細胞浸潤を示したのは３匹のみで、炎症性細胞浸潤を示したマウスの数は明らかに低下した。また、例えば本開示のｓｉＲＮＡ複合体は低いオフターゲット効果を有し、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は優れたオンターゲット目的配列抑制活性を示し、IC_{50}値が４．５０ｐＭ～１１．３ｐＭであり、また、試験したｓｉＲＮＡ濃度の全範囲内でのオフターゲット目的配列抑制率はいずれも５０％未満であり、低いオフターゲット効果を示した。また、例えば、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を毎週３００ｍｇ／ｋｇの高用量で３週間連続投与したマウスにおいて、血清ＡＬＴ及びＡＳＴ濃度はブランク対照群のレベルに相当する。更に、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を投与したマウスの病理切片においては、肝脂肪変性及び炎症に関して同様にブランク対照群に近い反応を示し、顕著な異常がなく、本開

示のｓｉＲＮＡ複合体が非常に低い肝毒性を有することが示された。

【００１５】

第二に、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体は、インビトロとインビボの実験において優れたＡＰＯＣ３遺伝子発現調節活性を示す。例えば、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ複合体は、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において、非常に高い目的配列抑制活性を示し、IC_{50}が６．８９～８．５５ｐＭの間にあり、また、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照ｓｉＲＮＡ複合体と比較して近い目的配列抑制活性を有する。また、例えば、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ複合体は、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において、非常に高い目的配列抑制活性を有する。０．０１ｎＭの低濃度では、目的配列発現抑制率は少なくとも３８．９２％、最大６７．５４％に達し、０．１ｎＭの濃度では、目的配列発現抑制率は８４．７３～８９．３５％に達する。また、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照ｓｉＲＮＡ複合体に近い、又はそれらと比較して顕著に低下しない目的配列抑制活性レベルを有する。

【００１６】

第三に、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体は、インビボで良好な脂質ＴＧ低下効果を示す。例えば、投与後の異なる時点で、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができ、かつ対応する安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照ｓｉＲＮＡ複合体に近い、又は顕著に低下しない脂質レベル低下効果を示した。特に、３ｍｇ／ｋｇの用量で、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、最大５０日間の全投与時間内に一貫して非常に高い脂質ＴＧ低下効果を示し、最大抑制率が９０．２％に達することができる。また、例えば、投与後の異なる時点で、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができ、かつ対応する安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照ｓｉＲＮＡ複合体に近い脂質レベル低下効果を示した。特に、３ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇの用量で、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、最大５０日間の全投与時間内に一貫して非常に高い脂質ＴＧ低下効果を示し、最大抑制率が９２．０％に達することができる。また、例えば、投与後の異なる時点で、異なる濃度の本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、いずれもマウス血清中のＴＧレベルを低下させることができ、特に、９ｍｇ／ｋｇの投与量で、１回だけ投与した後、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、６４日間の長期間にわたって一貫して５０％を超えるＴＧレベル抑制率を保持することができ、かつ抑制率が最大８９．５％に達することができ、優れた脂質抑制能力を示した。また、例えば、投与後の異なる時点で、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができる。また、実験期間の４３日間内に一貫して高い抑制効果を保持し、特に、３ｍｇ／ｋｇ用量の本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、マウスに対して、いずれも優れた脂質抑制効果を示し、血清ＴＧの最大抑制率がいずれも８８％よりも高く、血清ＣＨＯの最大抑制率は５１．１８％～５７．４１％である。また、例えば、投与後の異なる時点で、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができ、また、実験期間の２２日間内に一貫して高い抑制効果を保持し、かつ対応する安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照ｓｉＲＮＡ複合体に近い脂質レベル低下効果を示した。

【００１７】

これにより、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及びｓｉＲＮＡ複合体は、顕著に低いオフターゲット効果及びオフターゲット効果による毒性反応、特に肝毒性反応を有するとともに、インビボとインビトロでＡＰＯＣ３遺伝子の発現を効果的に抑制し、良好な脂質低下活性を示すことができるため、顕著に高い安全性を有するとともに、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患症状、特に脂質異常症を効果的に治療及び／又は予防することができ、応用において明るい見通しを有する。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１Ａ－１Ｂ】それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを毎週３００ｍｇ／ｋｇで３週間連続投与した後の、マウス血清中のＡＬＴ及びＡＳＴ濃度の散布図である。

【図２】目的配列を含むプラスミドとｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣをコトランスフェクションした後の、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系における目的配列の相対的発現レベルのヒストグラムである。
【図３Ａ－３Ｂ】それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体、参照ｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。
【図４Ａ－４Ｂ】それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体、参照ｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。
【図５Ａ－５Ｂ】それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。
【図６】異なる濃度の本開示のｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。
【図７Ａ－７Ｂ】それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。
【図８Ａ－８Ｂ】それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体、参照ｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１９】
以下、本開示の具体的な実施形態を詳細に説明する。ここで記述した具体的な実施形態は、本開示を説明し解釈するためのものに過ぎず、本開示を限定するものではないことを理解されたい。
【００２０】
本開示において、他の説明がない限り、ＡＰＯＣ３　ｍＲＮＡ又は「ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ」とは、Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号ＮＭ＿０００００４０．３に示される配列を有するｍＲＮＡを指し、ＡＰＯＣ３遺伝子とは、上記ＡＰＯＣ３ｍＲＮＡを転写する遺伝子を指す。
【００２１】
＜定義＞
文脈において、特に説明がない限り、大文字Ｃ、Ｇ、Ｕ、Ａは、ヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字ｍは、当該文字ｍの左側に隣接する１個のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字ｆは、当該文字ｆの左側に隣接する１個のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字ｓは、当該文字ｓの左右に隣接する２個のヌクレオチド間がチオリン酸エステルにより結合されていることを表し、Ｐ１は、当該Ｐ１の右側に隣接する１個のヌクレオチドが５’－リン酸ヌクレオチド又は５’－リン酸アナログ修飾ヌクレオチドであることを表し、いくつかの実施形態において、Ｐ１は、具体的に修飾されたＶＰ、Ｐｓ又はＰであり、組合せ文字ＶＰは、当該組合せ文字ＶＰの右側に隣接する１個のヌクレオチドがビニルリン酸エステル（５’－（Ｅ）－ｖｉｎｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ、Ｅ－ＶＰ）修飾ヌクレオチドであることを表し、組合せ文字Ｐｓは、当該組合せ文字Ｐｓの右側に隣接する１個のヌクレオチドがチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、大文字Ｐは、当該文字Ｐの右側に隣接する１個のヌクレオチドが５’－リン酸ヌクレオチドであることを表す。
【００２２】
文脈において、前記「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシがフッ素で置換されたヌクレオチドを指し、「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。「ヌクレオチドアナログ」とは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデ

オキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指し、例えば、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド（ｂｒｉｄｇｅｄ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ、ＢＮＡと略称される）又は非環式ヌクレオチドがある。前記「メトキシ修飾ヌクレオチド」とは、リボースの２’－ヒドロキシがメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。

【００２３】

本明細書の文脈において、用語「相補的」又は「逆相補的」は、互換的に使用されてもよく、当業者に周知の意味、即ち、二本鎖核酸分子において、一方の鎖の塩基と他方の鎖上の塩基とが相補的に対合するという意味を有する。ＤＮＡにおいて、プリン塩基であるアデニン（Ａ）は、常にピリミジン塩基であるチミン（Ｔ）（又は、ＲＮＡにおいてウラシル（Ｕ）である）と対合し、プリン塩基であるグアニン（Ｃ）は、常にピリミジン塩基であるシトシン（Ｇ）と対合する。各塩基対は、いずれも１つのプリンと１つのピリミジンを含む。一方の鎖上のアデニンが常に他方の鎖上のチミン（又はウラシル）と対合するとともに、グアニンが常にシトシンと対合する場合、両方の鎖同士が相補的である、またその相補的な鎖の配列から当該鎖の配列を推知できると考えられる。これに応じて、「ミスマッチ」は、本分野において、二本鎖核酸において、対応する位置の塩基が相補的に対合して存在しないことを意味する。

【００２４】

文脈において、特に説明がない限り、「基本的に逆相補的」とは、関連する２つのヌクレオチド配列間に３つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、「実質的に逆相補的」とは、２つのヌクレオチド配列間に１つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、「完全に逆相補的」とは、２つのヌクレオチド配列間に塩基ミスマッチが存在しないことを指す。

【００２５】

文脈において、特に本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、又はｓｉＲＮＡ複合体の調製方法を説明する際に、特に説明がない限り、前記ヌクレオシドモノマー（ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ　ｍｏｎｏｍｅｒ）とは、調製対象のｓｉＲＮＡ又はｓｉＲＮＡ複合体におけるヌクレオチドの種類と順序に応じてホスホルアミダイト固相合成に用いられる修飾又は未修飾のヌクレオシドホスホルアミダイトモノマー（ｕｎｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｏｒ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ＲＮＡ　ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｉｔｅｓ。ＲＮＡ　ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｉｔｅｓをＮｕｃｌｅｏｓｉｄｅ　ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｉｔｅｓということもある）を指す。ホスホルアミダイト固相合成は、当業者に公知のＲＮＡ合成に用いられる方法である。本開示に用いられるヌクレオシドモノマーは、いずれも市販品を購入可能である。

【００２６】

１又は複数の置換基を含む任意の基に関して、これらの基が、立体的に非現実的な、合成上実行不可能な及び／又は本質的に不安定な、いかなる置換又は置換パターンも導入することは意図されないと、当業者に理解される。

【００２７】

本明細書で用いられる場合、「アルキル」とは、特定の数の炭素原子を有する直鎖と分岐鎖を指し、前記特定の数は、通常１～２０個の炭素原子、例えば、１～８個又は１～６個などの１～１０個の炭素原子である。例えば、C_1－C_6アルキルは、１～６個の炭素原子の直鎖と分岐鎖アルキルを含む。特定の数の炭素を有するアルキル残基を命名する場合、当該数の炭素を有する全ての分岐鎖及び直鎖形式を含むことを意図する。したがって、例えば、「ブチル」は、ｎ－ブチル、ｓｅｃ－ブチル、イソブチル及びｔｅｒｔ－ブチルを含むことを意味し、「プロピル」は、ｎ－プロピル及びイソプロピルを含む。アルキレンは、アルキルのサブセットであり、アルキルと同じであるが２つの結合点を有する残基を指す。

【００２８】

本明細書で用いられる場合、「アルケニル」とは、少なくとも１つの炭素－炭素二重結合を有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキルを指し、前記炭素－炭素二重結合は、親アルキ

ルの隣接する炭素原子から１つの水素分子を除去することにより得られる。当該基は、二重結合のシス又はトランス配置にあってもよい。典型的なアルケニルとしては、ビニルと、プロパ－１－エン－１－イル、プロパ－１－エン－２－イル、プロパ－２－エン－１－イル（アリル）、プロパ－２－エン－２－イルなどのプロペニルと、ブタ－１－エン－１－イル、ブタ－１－エン－２－イル、２－メチルプロパ－１－エン－１－イル、ブタ－２－エン－１－イル、ブタ－２－エン－２－イル、ブタ－１，３－ジエン－１－イル、ブタ－１，３－ジエン－２－イルなどのブテニルと、を含むが、これらに限定されない。ある実施形態において、アルケニルは、２～２０個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、２～１０個、２～８個又は２～６個の炭素原子を有する。アルケニレンは、アルケニルのサブセットであり、アルケニルと同じであるが２つの結合点を有する残基を指す。

【００２９】

本明細書で用いられる場合、「アルキニル」とは、少なくとも１つの炭素－炭素三重結合を有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキルを指し、前記炭素－炭素三重結合は、親アルキルの隣接する炭素原子から２つの水素分子を除去することにより得られる。典型的なアルキニルとしては、エチニルと、プロパ－１－イン－１－イル、プロパ－２－イン－１－イルなどのプロピニルと、ブタ－１－イン－１－イル、ブタ－１－イン－３－イル、ブタ－３－イン－１－イルなどのブチニルと、を含むが、これらに限定されない。ある実施形態において、アルキニルは、２～２０個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、２～１０、２～８又は２～６個の炭素原子を有する。アルキニレンは、アルキニルのサブセットであり、アルキニルと同じであるが２つの結合点を有する残基を指す。

【００３０】

本明細書で用いられる場合、「アルコキシ」とは、酸素橋により結合された特定の数の炭素原子のアルキルを指し、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ｎ－ブトキシ、ｓｅｃ－ブトキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシ、ペンチルオキシ、２－ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、ネオペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、２－ヘキシルオキシ、３－ヘキシルオキシ、３－メチルペンチルオキシなどがある。アルコキシは、通常１～１０個、１～８個、１～６個又は１～４個の、酸素橋により結合された炭素原子を有する。

【００３１】

本明細書で用いられる場合、「アリール」とは、芳香族単環式又は多環式炭化水素環系から誘導される、環炭素原子から水素原子を除去して形成された基を指す。前記芳香族単環式又は多環式炭化水素環系は、水素及び６～１８個の炭素原子の炭素のみを含有し、前記環系中の環のうちの少なくとも１つは、完全不飽和であり、即ち、それは、ヒュッケル理論に従う環状、非局在化（４ｎ＋２）π－電子系を含む。アリールとしては、フェニル、フルオレニル及びナフチルなどの基を含むが、これらに限定されない。アリーレンは、アリールのサブセットであり、アリールと同じであるが２つの結合点を有する残基を指す。

【００３２】

「ヘテロアリール」とは、２個～１７個の炭素原子と、窒素、酸素及び硫黄から選択される１～６個のヘテロ原子とを含む、３～１８員芳香環ラジカルから誘導される基を指す。本明細書で用いられる場合、ヘテロアリールは、単環、二環、三環又は四環系であってもよく、この環系中の環のうちの少なくとも１つは、完全不飽和であり、即ち、それは、ヒュッケル理論に従う環状、非局在化（４ｎ＋２）π－電子系を含む。ヘテロアリールは、縮合環又は架橋環系を含む。いくつかの実施形態において、ヘテロアリール中のヘテロ原子は、酸化されたヘテロ原子である。いくつかの実施形態において、ヘテロアリールは、１又は複数の窒素原子を含む。いくつかの実施形態において、ヘテロアリール中の窒素原子のうちの１又は複数は、４級化された窒素原子である。ヘテロアリールは、環中の任意の原子を介して分子の残りの部分に結合される。ヘテロアリールの実例としては、アゼピニル、アクリジニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾインドール、１，３－ベンゾジオキサゾリル、ベンゾフリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾ［ｄ］チアゾリル、ベンゾチアジ

アゾリル、ベンゾ［ｂ］［１，４］ジオキセピニル（ｂｅｎｚｏ［ｂ］［１，４］ｄｉｏｘｅｐｉｎｙｌ）、ベンゾ［ｂ］［１，４］オキサジニル（ｂｅｎｚｏ［ｂ］［１，４］ｏｘａｚｉｎｙｌ）、１，４－ベンゾジオキサン（１，４－ｂｅｎｚｏｄｉｏｘａｎｙｌ）、ベンゾナフトフラニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾジオキソリル（ｂｅｎｚｏｄｉｏｘｏｌｙｌ）、ベンゾジオキシニル（ｂｅｎｚｏｄｉｏｘｉｎｙｌ）、ベンゾピラニル、ベンゾピロニル、ベンゾフリル、ベンゾフラノニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチエノ［３，２－ｄ］ピリミジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾ［４，６］イミダゾ［１，２－ａ］ピリジル、カルバゾリル、シンノリル（ｃｉｎｎｏｌｉｎｙｌ）、シクロペンタ［ｄ］ピリミジニル、６，７－ジヒドロ－５Ｈ－シクロペンタ［４，５］チエノ［２，３－ｄ］ピリミジニル、５，６－ジヒドロベンゾ［ｈ］キナゾリニル（５，６－ｄｉｈｙｄｒｏｂｅｎｚｏ［ｈ］ｑｕｉｎａｚｏｌｉｎｙｌ）、５，６－ジヒドロベンゾ［ｈ］シンノリニル（５，６－ｄｉｈｙｄｒｏｂｅｎｚｏ［ｈ］ｃｉｎｎｏｌｉｎｙｌ）、６，７－ジヒドロ－５Ｈ－ベンゾ［６，７］シクロヘプタ［１，２－ｃ］ピリダジニル、ジベンゾフリル、ジベンゾチオフェニル、フリル、フラノニル、フロ［３，２－ｃ］ピリジル、５，６，７，８，９，１０－ヘキサヒドロシクロオクタ［ｄ］ピリミジニル、５，６，７，８，９，１０－ヘキサヒドロシクロオクタ［ｄ］ピリダジニル、５，６，７，８，９，１０－ヘキサヒドロシクロオクタ［ｄ］ピリジル、イソチアゾリル、イミダゾリル、インダゾリル（ｉｎｄａｚｏｌｙｌ）、インドール、イソインドール、インドリニル、イソインドリニル、イソキノリル、インドリジニル（ｉｎｄｏｌｉｚｉｎｙｌ）、イソオキサゾリル、５，８－メタノ－５，６，７，８－テトラヒドロキナゾリニル（５，８－ｍｅｔｈａｎｏ－５，６，７，８－ｔｅｔｒａｈｙｄｒｏｑｕｉｎａｚｏｌｉｎｙｌ）、ナフチリジニル（ｎａｐｈｔｈｙｒｉｄｉｎｙｌ）、１，６－ナフチリジノニル（１，６－ｎａｐｈｔｈｙｒｉｄｉｎｏｎｙｌ）、オキサジアゾリル、２－オキソアゼピニル（２－ｏｘｏａｚｅｐｉｎｙｌ）、オキサゾリル、オキシラニル（ｏｘｉｒａｎｙｌ）、５，６，６ａ，７，８，９，１０，１０ａ－オクタヒドロベンゾ［Ｈ］キナゾリニル、１－フェニル－１Ｈ－ピロリル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル、フタラジニル（ｐｈｔｈａｌａｚｉｎｙｌ）、プテリジニル（ｐｔｅｒｉｄｉｎｙｌ）、プリニル、ピロリル、ピラゾリル、ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジニル、ピリジル、ピリド［３，２－ｄ］ピリミジニル、ピリド［３，４－ｄ］ピリミジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、ピロリル、キナゾリニル、キノキサリニル（ｑｕｉｎｏｘａｌｉｎｙｌ）、キノリル、テトラヒドロキノリル、５，６，７，８－テトラヒドロキナゾリニル、５，６，７，８－テトラヒドロベンゾ［４，５］チエノ［２，３－ｄ］ピリミジニル、６，７，８，９テトラヒドロ－５Ｈ－シクロヘプタ［４，５］チエノ［２，３－ｄ］ピリミジニル、５，６，７，８－テトラヒドロピリド［４，５－ｃ］ピリダジニル、チアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、トリアジニル、チエノ［２，３－ｄ］ピリミジニル、チエノ［３，２－ｄ］ピリミジニル、チエノ［２，３－ｃ］プリジニル（ｔｈｉｅｎｏ［２，３－ｃ］ｐｒｉｄｉｎｙｌ）、及びチオフェニル（ｔｈｉｏｐｈｅｎｙｌ／ｔｈｉｅｎｙｌ）を含むが、これらに限定されない。

【００３３】

本開示において各種のヒドロキシ保護基を用いることができる。一般的には、保護基は、化学官能性を特定の反応条件に不敏感にすることができ、かつ分子の残りの部分を実質的に損傷することなく分子中の当該官能基に付加するか又はそれから除去することができる。代表的なヒドロキシ保護基は、Ｂｅａｕｃａｇｅら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ １９９２，４８，２２２３－２３１１、及びＧｒｅｅｎｅａｎｄ Ｗｕｔｓ，Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｃｈａｐｔｅｒ ２，２ｄ ｅｄ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９９１に開示されており、引用により、上記文献は、全体として本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、保護基は、塩基性条件で安定しているが、酸性条件で除去することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で使用できるヒドロキシ保護基の非排他的実例としては、ジメトキシトリチル（ＤＭＴ）、モノメトキシトリチル、９－フェ

ニルキサンテン－９－イル（Ｐｉｘｙｌ）、及び９－（ｐ－メトキシフェニル）キサンテン－９－イル（Ｍｏｘ）を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で使用できるヒドロキシ保護基の非排他的実例としては、Ｔｒ（トリチル）、ＭＭＴｒ（４－メトキシトリチル）、ＤＭＴｒ（４，４’－ジメトキシトリチル）、及びＴＭＴｒ（４，４’，４’’－トリメトキシトリチル）を含む。

【００３４】

用語「被験体」は、本明細書で用いられる場合、任意の動物、例えば、哺乳動物又は有袋動物を指す。本開示の被験体としては、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、アカゲザル又は他の種類のマカク属のサル）、マウス、ブタ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ラット及び任意の種類の家禽を含むが、これらに限定されない。

【００３５】

本明細書で使用されるように、「治療」とは、有益な又は所望の結果を得る方法を指し、治療効果を含むが、これに限定されない。「治療効果」は、治療される潜在的障害を根絶又は改善することを意味する。また、治療効果は、被験体が依然として潜在的障害の苦痛を受ける可能性があるにもかかわらず、潜在的障害に関連する１又は複数の生理的症状を根絶又は改善することにより、被験体に改善が観察されて得られる。

【００３６】

本明細書で用いられる場合、「予防」は、有益な又は所望の結果を得る方法を指し、予防効果を含むが、これに限定されない。「予防効果」を得るために、特定の疾患に対する診断が行っていないかもしれないが、二本鎖ｓｉＲＮＡ、医薬組成物又はｓｉＲＮＡ複合体を、当該疾患に罹患するリスクのある被験体に投与するか、又は当該疾患の１又は複数の生理的症状が報告された被験体に投与することができる。

【００３７】

本開示のｓｉＲＮＡ

一態様において、本開示は、高いＡＰＯＣ３遺伝子抑制活性を有し、かつ低いオフターゲット効果を有するｓｉＲＮＡを提供する。

【００３８】

本開示のｓｉＲＮＡは、基本的な構造単位としてヌクレオチド基を含み、前記ヌクレオチド基がリン酸基、リボース基及び塩基を含むことは、当業者に公知であるので、ここでは説明を省略する。

【００３９】

本開示のｓｉＲＮＡは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ｉを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩを含み、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩは、いずれも１９個のヌクレオチドからなり、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の各ヌクレオチドは、修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Ｉ及び前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的に逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列ＩＩは、少なくとも部分的に第１ヌクレオチド配列と逆相補的であり、前記第１ヌクレオチド配列は、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、長さが１９個のヌクレオチドであるヌクレオチド配列であり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列２の第３～６位のヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、安定化修飾ヌクレオチドであり、前記安定化修飾ヌクレオチドとは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが安定化修飾基で置換されたヌクレオチドを指し、対応する位置のヌクレオチドが未修飾のヌクレオチドであるｓｉＲＮＡと比較して、前記安定化修飾ヌクレオチドを含むｓｉＲＮＡは、熱安定性が増加し、かつ前記安定化修飾基の立体障害が２’－Ｏ－メチルよりも大きい。

【００４０】

いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第３位又は第５位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中

の第３～９位のヌクレオチドのうちの２個以下のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドである。特定の位置における安定化修飾ヌクレオチドの個数を限定することにより、本開示のｓｉＲＮＡは、薬学的活性と低いオフターゲット効果との最適なバランスを取ることができるとともに、優れた安定性を有する。いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第３位及び／又は第５位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第３位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第５位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドである。

【００４１】

本開示のｓｉＲＮＡでは、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第３～９位のヌクレオチド以外のヌクレオチドは、いずれも安定化修飾ヌクレオチドではない。ヌクレオチド配列ＩＩ中の第３～６位のヌクレオチドのうちの少なくとも１つが安定化修飾ヌクレオチドであるとともに、第３～９位のヌクレオチド以外に安定化修飾ヌクレオチドが含まれている場合、当該ｓｉＲＮＡの目的配列の発現レベルの調節能力に顕著に影響を与える可能性がある。

【００４２】

いくつかの実施形態において、「ｓｉＲＮＡの熱安定性が増加する」とは、前記ｓｉＲＮＡの熱解離温度（Ｔｍ）が上昇することを指す。いくつかの実施形態において、「二本鎖ｓｉＲＮＡの熱安定性が増加する」とは、前記ｓｉＲＮＡのＴｍが少なくとも０．０５℃上昇することを指し、いくつかの実施形態において、０．１～６℃上昇することを指し、いくつかの実施形態において、Ｔｍが０．５～４℃上昇することを指す。理論的な解釈に限定されることなく、特定の位置に安定化修飾ヌクレオチドを含むことにより、本開示のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡとの結合能力がほとんど影響を受けず、オフターゲット目的ｍＲＮＡとの結合が顕著に低下し、それにより、オフターゲット効果を低下ないし除去する。

【００４３】

いくつかの実施形態において、各前記安定化修飾基は独立して、－Ｘ－Ｒに示される構造を有し、Ｘは、Ｏ、ＮＲ’、Ｓ又はＳｉＲ$_2$’であり、Ｒは、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、置換されたＣ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、置換されたＣ$_6$－Ｃ$_8$アリールのうちの１つであり、各Ｒ’は独立して、Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、置換されたＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、置換されたＣ$_6$－Ｃ$_8$アリールのうちの１つであり、前記置換されたＣ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、置換されたＣ$_6$－Ｃ$_8$アリール又は置換されたＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキルとは、Ｃ$_2$－Ｃ$_6$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、又はＣ$_1$－Ｃ$_6$アルキル中の１又は複数の水素原子が置換基で置換された基を指し、前記置換基は、Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルキル、Ｃ$_6$－Ｃ$_8$アリール、Ｃ$_1$－Ｃ$_3$アルコキシ、ハロゲン、オキシサブユニット、及びスルフィドサブユニットから選択される１又は複数である。なお、本開示は、上記構造を満たす全ての修飾基をカバーすることを意図せず、ｓｉＲＮＡの熱安定性の増加を実現できる安定化修飾基のみに関し、いくつかの実施形態において、各前記安定化修飾基は、２’－Ｏ－メトキシエチル、２’－Ｏ－アリル、２’－Ｃ－アリル、２’－Ｏ－２－Ｎ－メチルアミノ－２－オキシイリデンエチル、２’－Ｏ－２－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチル、２’－Ｏ－３－アミノプロピル、及び２’－Ｏ－２，４－ジニトロフェニルから独立して選択される１つである。いくつかの実施形態において、各前記安定化修飾基は、いずれも２’－Ｏ－メトキシエチルである。

【００４４】

いくつかの実施形態において、本開示の安定化ヌクレオチドを有するｓｉＲＮＡは、以下の第１種、第２種、第３種のｓｉＲＮＡであってもよく、以下、各種のｓｉＲＮＡをそれぞれ説明する。

【００４５】

第１種のｓｉＲＮＡ

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡは、第１種のｓｉＲＮＡである。前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、

５’－ＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_1－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、

５’－Z_2ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、

ただし、Z_1はＡであり、Z_2はＵであり、

また、前記ヌクレオチド配列Ｉに、位置がZ_1に対応するヌクレオチドZ_3が含まれ、前記ヌクレオチド配列ＩＩに、位置がZ_2に対応するヌクレオチドZ_4が含まれ、前記Z_4は、前記アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドである。前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列である。ただし、各Ｕは、任意にＴで置換される。本開示の文脈において、「位置が対応する」とは、ヌクレオチド配列の同一端から、ヌクレオチド配列において同じ位置にあることを指す。例えば、ヌクレオチド配列Ｉの３’端の第１位のヌクレオチドは、位置がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１の第１位のヌクレオチドに対応するヌクレオチドである。

【００４６】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ｉのみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩのみを含む。

【００４７】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下である。

【００４８】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_4の位置の差異を含み、Z_4は、Ａ、Ｇ又はＣから選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、Z_4の位置の差異であり、Z_4は、Ａ、Ｇ又はＣから選択される。いくつかの実施形態において、Z_3は、Z_4と相補的なヌクレオチドである。これらのヌクレオチド差異は、ｓｉＲＮＡの標的遺伝子抑制能力を顕著に低下させたり、ｓｉＲＮＡのオフターゲット効果を向上させたりすることがなく、これらのヌクレオチド差異を含むｓｉＲＮＡも、本開示の保護範囲内にある。

【００４９】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ｉと前記ヌクレオチド配列ＩＩは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に３つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に１つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記完全に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間にミスマッチがないことを指す。

【００５０】

いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２～１９位のヌクレオチドと前記第１ヌクレオチド配列の第１～１８位のヌクレオチドとは、完全に逆相補的である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩと前記ヌクレオチド配列Ｉとは、完全に逆相補的であり、或いは、５’末端から３’末端に向かう前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第２位のヌクレオチドと、３’末端から５’末端に向かう前記ヌクレオチド配列Ｉ中の第２位のヌクレオチドとの間に塩基ミスマッチが存在する。当該塩基ミスマッチを含むことにより、低いオフターゲット効果を保持するとともに、本開示のｓｉＲＮＡの目的遺伝子発現抑制活性を更に向上させることができる。

【００５１】
いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列Ｉは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列ＩＩは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４に示されるヌクレオチド配列であり、
５’－ＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_3－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）、
５’－Z_4ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）、
ただし、Z_3は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_4は、Z_3と相補的なヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、Z_3はＡであり、Z_4はＵである。
【００５２】
また、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが１９～２３個のヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の長さが１９～２６個のヌクレオチドである。このように、本開示により提供されるｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／１９、１９／２０、１９／２１、１９／２２、１９／２３、１９／２４、１９／２５、１９／２６、２０／２０、２０／２１、２０／２２、２０／２３、２０／２４、２０／２５、２０／２６、２１／２０、２１／２１、２１／２２、２１／２３、２１／２４、２１／２５、２１／２６、２２／２０、２２／２１、２２／２２、２２／２３、２２／２４、２２／２５、２２／２６、２３／２０、２３／２１、２３／２２、２３／２３、２３／２４、２３／２５又は２３／２６であってもよい。いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／２１、２１／２３又は２３／２５である。
【００５３】
いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩＩを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＶを更に含み、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶの各ヌクレオチドは独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つであり、かつ前記安定化修飾ではなく、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶとは、長さがそれぞれ１～４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶと前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとは、長さが等しく、かつ実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩは、前記ヌクレオチド配列Ｉの５’末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ＩＶは、前記ヌクレオチド配列ＩＩの３’末端に結合される。また、前記ヌクレオチド配列ＩＶと第２ヌクレオチド配列は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該第２ヌクレオチド配列とは、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、前述の第１ヌクレオチド配列に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列ＩＶと同じであるヌクレオチド配列を指す。
【００５４】
いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも１個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基は、Ｃであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基は、Ｇであり、前記第２ヌクレオチド配列の塩基は、Ｃであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２０／２０であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも２個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＣＣであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＧＧであり、前記第２ヌクレオチド配列の組成は、ＣＣであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２１／２１であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも３個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＵＣＣであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＧＧＡであり、前記第２ヌクレオチド配列の組成は、ＵＣＣであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２２／２２であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＣＵＣＣであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＧＧＡＧであり、前記第２ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＣＵＣＣであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２１／２１である。

【００５５】
いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶとは、完全に逆相補的であるため、ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成が与えられると、ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成も決定される。
【００５６】
第２種のｓｉＲＮＡ
いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡは、第２種のｓｉＲＮＡである。前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、
５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_5－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５）、
５’－Z_6ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６）、
ただし、Z_5はＵであり、Z_6はＡであり、
また、前記ヌクレオチド配列Ｉに、位置がZ_5に対応するヌクレオチドZ_7が含まれ、前記ヌクレオチド配列ＩＩに、位置がZ_6に対応するヌクレオチドZ_8が含まれ、前記Z_8は、前記アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドである。前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列である。ただし、各Ｕは、任意にＴで置換される。
【００５７】
いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ｉのみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩのみを含む。
【００５８】
いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下である。
【００５９】
いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４６に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_8の位置の差異を含み、Z_8は、Ｕ、Ｇ又はＣから選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、Z_8の位置の差異であり、Z_8は、Ｕ、Ｇ又はＣから選択される。いくつかの実施形態において、Z_7は、Z_8と相補的なヌクレオチドである。これらのヌクレオチド差異は、ｓｉＲＮＡの標的遺伝子抑制能力を顕著に低下させたり、ｓｉＲＮＡのオフターゲット効果を向上させたりすることがなく、これらのヌクレオチド差異を含むｓｉＲＮＡも、本開示の保護範囲内にある。
【００６０】
いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ｉと前記ヌクレオチド配列ＩＩは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に３つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に１つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記完全に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間にミスマッチがないことを指す。
【００６１】
いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２～１９位のヌクレオチドと前記第１ヌクレオチド配列の第１～１８位のヌクレオチドとは、完全に逆相補的である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩと前記ヌクレオチド配列Ｉとは、完全に逆相補的であり、或いは、５’末端から３’末端に向かう前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第２位のヌクレオチドと、３’末端から５’末端に向かう前記ヌクレオチド配列Ｉ中の第２位のヌクレオチドとの間に塩基ミスマッチが

存在する。当該塩基ミスマッチを含むことにより、低いオフターゲット効果を保持するとともに、本開示のｓｉＲＮＡの目的遺伝子発現抑制活性を更に向上させることができる。

【００６２】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列Ｉは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列ＩＩは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８に示されるヌクレオチド配列であり、

５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７）、

５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８）、

ただし、Z_7は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、Z_7はＵであり、Z_8はＡである。

【００６３】

また、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが１９～２３個のヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の長さが１９～２６個のヌクレオチドである。このように、本開示により提供されるｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／１９、１９／２０、１９／２１、１９／２２、１９／２３、１９／２４、１９／２５、１９／２６、２０／２０、２０／２１、２０／２２、２０／２３、２０／２４、２０／２５、２０／２６、２１／２０、２１／２１、２１／２２、２１／２３、２１／２４、２１／２５、２１／２６、２２／２０、２２／２１、２２／２２、２２／２３、２２／２４、２２／２５、２２／２６、２３／２０、２３／２１、２３／２２、２３／２３、２３／２４、２３／２５又は２３／２６であってもよい。いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／２１、２１／２３又は２３／２５である。

【００６４】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩＩを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＶを更に含み、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶの各ヌクレオチドは独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つであり、かつ前記安定化修飾ではなく、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶとは、長さがそれぞれ１～４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶと前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとは、長さが等しく、かつ実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩは、前記ヌクレオチド配列Ｉの５’末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ＩＶは、前記ヌクレオチド配列ＩＩの３’末端に結合される。また、前記ヌクレオチド配列ＩＶと第２ヌクレオチド配列は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該第２ヌクレオチド配列とは、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、前述の第１ヌクレオチド配列に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列ＩＶと同じであるヌクレオチド配列を指す。

【００６５】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも１個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基は、Ｃであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基は、Ｇであり、前記第２ヌクレオチド配列の塩基は、Ｃであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２０／２０であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも２個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＧＣであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＧＣであり、前記第２ヌクレオチド配列の組成は、ＧＣであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２１／２１であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも３個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＵＧＣであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＧＣＡであり、前記第２ヌクレオチド配列の組成は、ＧＣＡであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２２／２２であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＵＵＧＣであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＧＣＡＡであり、前記第２ヌクレオチ

ド配列の塩基組成は、ＧＣＡＡであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２１／２１である。

【００６６】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶとは、完全に逆相補的であるため、ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成が与えられると、ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成も決定される。

【００６７】

第３種のｓｉＲＮＡ

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡは、第３種のｓｉＲＮＡである。前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、かつヌクレオチド差異が３個以下であり、

５’－ＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_9－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５）、

５’－Z_{10}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６）、

ただし、Z_9はＵであり、Z_{10}はＡであり、

また、ヌクレオチド配列Ｉに、位置がZ_9に対応するヌクレオチドZ_{11}が含まれ、前記ヌクレオチド配列ＩＩに、位置がZ_{10}に対応するヌクレオチドZ_{12}が含まれ、前記Z_8は、前記アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドである。前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列である。ただし、各Ｕは、任意にＴで置換される。

【００６８】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ｉのみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩのみを含む。

【００６９】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６に示されるヌクレオチド配列との間にヌクレオチド差異が１個以下である。

【００７０】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩとＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０６に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_{12}の位置の差異を含み、Z_{12}は、Ｇ、Ｃ又はＵから選択される。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド差異は、Z_{12}の位置の差異であり、Z_{12}は、Ｇ、Ｃ又はＵから選択される。いくつかの実施形態において、Z_{11}は、Z_{12}と相補的なヌクレオチドである。これらのヌクレオチド差異は、ｓｉＲＮＡの標的遺伝子抑制能力を顕著に低下させたり、ｓｉＲＮＡのオフターゲット効果を向上させたりすることがなく、これらのヌクレオチド差異を含むｓｉＲＮＡも、本開示の保護範囲内にある。

【００７１】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ｉと前記ヌクレオチド配列ＩＩは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に３つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間に１つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記完全に逆相補的とは、２つのヌクレオチド配列間にミスマッチがないことを指す。

【００７２】

いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２～１９位のヌクレオチドと前記第１ヌクレオチド配列の第１～１８位のヌクレ

オチドとは、完全に逆相補的である。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩと前記ヌクレオチド配列Ｉとは、完全に逆相補的であり、或いは、５’末端から３’末端に向かう前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の第２位のヌクレオチドと、３’末端から５’末端に向かう前記ヌクレオチド配列Ｉ中の第２位のヌクレオチドとの間に塩基ミスマッチが存在する。当該塩基ミスマッチを含むことにより、低いオフターゲット効果を保持するとともに、本開示のｓｉＲＮＡの目的遺伝子発現抑制活性を更に向上させることができる。

【００７３】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列Ｉは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列ＩＩは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８に示されるヌクレオチド配列であり、

５’－ＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_{11}－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０７）、

５’－Z_{12}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８）、

ただし、Z_{11}は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_{12}は、Z_{11}と相補的なヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、Z_{11}はＵであり、Z_{12}はＡである。

【００７４】

また、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが１９～２３個のヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の長さが１９～２６個のヌクレオチドである。このように、本開示により提供されるｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／１９、１９／２０、１９／２１、１９／２２、１９／２３、１９／２４、１９／２５、１９／２６、２０／２０、２０／２１、２０／２２、２０／２３、２０／２４、２０／２５、２０／２６、２１／２０、２１／２１、２１／２２、２１／２３、２１／２４、２１／２５、２１／２６、２２／２０、２２／２１、２２／２２、２２／２３、２２／２４、２２／２５、２２／２６、２３／２０、２３／２１、２３／２２、２３／２３、２３／２４、２３／２５又は２３／２６であってもよい。いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／２１、２１／２３又は２３／２５である。

【００７５】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＩＩを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ＩＶを更に含み、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶの各ヌクレオチドは独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つであり、かつ前記安定化修飾ではなく、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶとは、長さがそれぞれ１～４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶと前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとは、長さが等しく、かつ実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩは、前記ヌクレオチド配列Ｉの５’末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ＩＶは、前記ヌクレオチド配列ＩＩの３’末端に結合される。また、前記ヌクレオチド配列ＩＶと第２ヌクレオチド配列は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該第２ヌクレオチド配列とは、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、前述の第１ヌクレオチド配列に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列ＩＶと同じであるヌクレオチド配列を指す。

【００７６】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも１個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基は、Ｃであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基は、Ｇであり、前記第２ヌクレオチド配列の塩基は、Ｃであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２０／２０であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも２個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＡＧであり、前記ヌクレオチド配列ＩＶの塩基組成は、ＣＵであり、前記第２ヌクレオチド配列の組成は、ＡＧであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２１／２１であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも３個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩ

の塩基組成は、ＡＡＧであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＣＵＵであり、前記第２ヌクレオチド配列の組成は、ＡＡＧであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２２／２２であり、或いは、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩとＩＶとは、長さがいずれも４個のヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基組成は、ＡＡＡＧであり、前記ヌクレオチドＩＶの塩基組成は、ＣＵＵＵであり、前記第２ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＡＡＡＧであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、２１／２１である。

【００７７】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列ＩＩＩとヌクレオチド配列ＩＶは、完全に逆相補的であるため、ヌクレオチド配列ＩＩＩの塩基が与えられると、ヌクレオチド配列ＩＶの塩基も決定される。

【００７８】

以下、ヌクレオチド配列Ｖ、ｓｉＲＮＡ中のヌクレオチド修飾及び修飾配列の説明は、上記本開示のｓｉＲＮＡ、例えば、第１種のｓｉＲＮＡ、第２種のｓｉＲＮＡ又は第３種のｓｉＲＮＡに適用される。即ち、特に明記されていない場合、以下、ｓｉＲＮＡの説明は、上記本開示のｓｉＲＮＡ、例えば、第１種のｓｉＲＮＡ、第２種のｓｉＲＮＡ及び第３種のｓｉＲＮＡを１つずつ説明したものとみなされるべきである。例えば、具体的なｓｉＲＮＡが指定されていない場合、「前記ｓｉＲＮＡがヌクレオチド配列Ｖを更に含む」とは、「本開示のｓｉＲＮＡ、例えば、上記第１種のｓｉＲＮＡ、第２種のｓｉＲＮＡ又は第３種のｓｉＲＮＡがヌクレオチド配列Ｖを更に含む」ことを意味する。

【００７９】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが異なり、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列Ｖを更に含み、ヌクレオチド配列Ｖの各ヌクレオチドは独立して、非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つであり、かつ前記安定化修飾ヌクレオチドではなく、ヌクレオチド配列Ｖは、長さが１～３個のヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の３’末端に結合されて、アンチセンス鎖の３’オーバーハング端を構成する。これにより、本開示により提供されるｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／２０、１９／２１、１９／２２、２０／２１、２０／２２、２０／２３、２１／２２、２１／２３、２１／２４、２２／２３、２２／２４、２２／２５、２３／２４、２３／２５又は２３／２６であってもよい。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ｖは、長さが２個のヌクレオチドであり、これにより、本開示により提供されるｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖との長さ比は、１９／２１、２１／２３又は２３／２５であってもよい。

【００８０】

前記ヌクレオチド配列Ｖ中の各ヌクレオチドは、任意のヌクレオチドであってもよく、容易に合成し、かつコストを節約するために、前記ヌクレオチド配列Ｖは、連続した２個のチミンデオキシリボヌクレオチド（ｄＴｄＴ）、または連続した２個のウラシルリボヌクレオチド（ＵＵ）であり、或いは、ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖とターゲットｍＲＮＡとの親和性を向上させるために、ヌクレオチド配列Ｖと第３ヌクレオチド配列とは、完全に逆相補的であり、前記第３ヌクレオチド配列とは、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の、第１ヌクレオチド配列又は第２ヌクレオチド配列に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列Ｖに等しいヌクレオチド配列を指す。したがって、いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、１９／２１又は２１／２３であり、このとき、本開示のｓｉＲＮＡがより良好なｍＲＮＡサイレンシング活性を有する。

【００８１】

いくつかの実施形態において、前記第１種のｓｉＲＮＡについて、前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１に示されるヌクレオチド配列を有し、前記第３ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＣＣであり、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ

ＩＤ　ＮＯ：６に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_3－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）、
５’－Z_4ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧＧＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＣＣＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡZ_3－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）、
５’－Z_4ＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧＧＧＡＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）、
ただし、前記Z_4は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_3は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_4は、Z_3と相補的なヌクレオチドである。

【００８２】

いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）、
５’－ＵＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧＧＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＣＣＣＡＡＵＡＡＡＧＣＵＧＧＡＣＡＡＧＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１）、
５’－ＵＵＣＵＵＧＵＣＣＡＧＣＵＵＵＡＵＵＧＧＧＡＧ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２）。

【００８３】

いくつかの実施形態において、前記第２種のｓｉＲＮＡについて、前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４５に示されるヌクレオチド配列を有し、前記第３ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＧＣである。前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５０に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）、
５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５０）、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５２に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＧＣＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１）、
５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５２）、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９に示されるヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９に示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９）、
５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＵＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９）、
或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１に示されるヌクレオ

チド配列を含み、前記アンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５０に示されるヌクレオチド配列を含み、

５’－ＧＣＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣZ_7－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５１）、

５’－Z_8ＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣＵＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５０）、

ただし、前記Z_8は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_7は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_8は、Z_7と相補的なヌクレオチドである。

【００８４】

いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５３に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５４に示されるヌクレオチド配列を含み、

５’－ＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５３）、

５’－ＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５４）、

或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５５に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５６に示されるヌクレオチド配列を含み、

５’－ＧＣＵＵＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５５）、

５’－ＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵＵＡＡＧＣＡＡ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５６）。

【００８５】

いくつかの実施形態において、前記第３種のｓｉＲＮＡについて、前記第１ヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５に示されるヌクレオチド配列を有し、前記第３ヌクレオチド配列の塩基組成は、ＡＧである。前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９に示されるヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１０に示されるヌクレオチド配列を含み、

５’－ＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_{11}－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０９）、

５’－Z_{12}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１０）、

或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１に示されるヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２に示されるヌクレオチド配列を含み、

５’－ＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣZ_{11}－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１）、

５’－Z_{12}ＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２）、

ただし、前記Z_{12}は、アンチセンス鎖の５’末端の第１位のヌクレオチドであり、Z_{11}は、Ａ、Ｕ、Ｇ又はＣから選択され、Z_{12}は、Z_{11}と相補的なヌクレオチドである。

【００８６】

いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１３に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１４に示されるヌクレオチド配列を含み、

５’－ＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１３）、

５’－ＡＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１４）、

或いは、前記ｓｉＲＮＡのセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１５に示されるヌクレオチド配列を含み、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１６に

示されるヌクレオチド配列を含み、
５’－ＡＧＧＧＡＣＡＧＵＡＵＵＣＵＣＡＧＵＧＣＵ－３’（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１５）、
５’－ＡＧＣＡＣＵＧＡＧＡＡＵＡＣＵＧＵＣＣＣＵＵＵ－３’（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１１６）。

【００８７】

前述のように、本開示のｓｉＲＮＡ中のヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡ中の一部又は全部のヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドであり、ヌクレオチド基上のこれらの修飾により、本開示のｓｉＲＮＡがＡＰＯＣ３遺伝子発現を抑制する機能を明らかに弱めるか又は喪失させることがない。

【００８８】

本開示の文脈において、用いられる用語「修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが他の基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ、或いは、ヌクレオチド上の塩基が修飾された塩基であるヌクレオチドを指す。前記修飾ヌクレオチドにより、ｓｉＲＮＡが遺伝子発現を抑制する機能を明らかに弱めるか又は喪失させることがない。例えば、Ｊ．Ｋ． Ｗａｔｔｓ，Ｇ．Ｆ． Ｄｅｌｅａｖｅｙ，ａｎｄ Ｍ．Ｊ． Ｄａｍｈａ，Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｓｉＲＮＡ：ｔｏｏｌｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｏｄａｙ，２００８，１３（１９－２０）：８４２－５５に開示された修飾ヌクレオチドを選択してもよい。

【００８９】

いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２、６、１４、１６位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドではない場合、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の全てのヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２、６、１４、１６位のヌクレオチドは、前記安定化修飾ヌクレオチドではない場合、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ＩＩ中の他のヌクレオチドは、それぞれ独立して非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つである。いくつかの実施形態において、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Ｉの第７～９位のヌクレオチドは、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ｉ中の全てのヌクレオチドは、いずれも修飾ヌクレオチドであり、５’末端から３’末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Ｉの第７～９位のヌクレオチドは、２’－フルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Ｉ中の他のヌクレオチドは、それぞれ独立して非フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの１つである。本開示のｓｉＲＮＡは、上記修飾を有することにより、遺伝子発現調節活性とインビボ安定性との良好なバランスを実現することができる。

【００９０】

本開示の文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシがフッ素で置換された、以下の式（７）に示される構造を有するヌクレオチドを指す。「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドのリボースの２’位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから独立して選択される１つである。

【００９１】

これらのリボースの２’位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチドは、当業者に公知であり、これらのヌクレオチドは、２’－アルコキシ修飾ヌクレオチド、２’－アルキル修飾ヌクレオチド、２’－置換アルキル修飾ヌクレオチド、２’－アミノ修飾ヌク

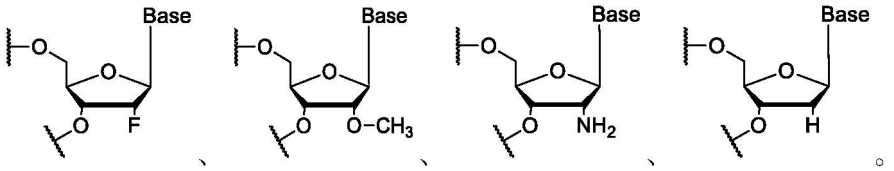
レオチド、２’－置換アミノ修飾ヌクレオチド、２’－デオキシヌクレオチドから選択される１つであってもよい。

【００９２】

いくつかの実施形態において、２’－アルコキシ修飾ヌクレオチドは、式（８）に示されるメトキシ修飾ヌクレオチド（２’－ＯＭｅ）である。いくつかの実施形態において、２’－アミノ修飾ヌクレオチド（２’－NH_2）は、式（９）に示される。いくつかの実施形態において、２’－デオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）は、式（１０）に示される。

【００９３】

【化１】



式（７）、式（８）、式（９）、式（１０）。

【００９４】

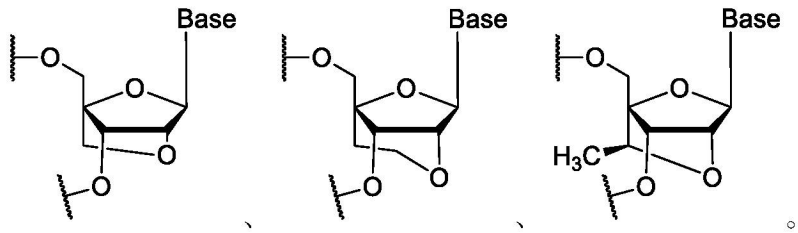
ヌクレオチドアナログとは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデオキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指す。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド（ｂｒｉｄｇｅｄ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ、ＢＮＡと略称される）又は非環式ヌクレオチドであってもよい。

【００９５】

ＢＮＡとは、拘束された又は近づけないヌクレオチドを指す。ＢＮＡは、五員環、六員環、又は七員環の、「固定された」Ｃ３’－エンド糖パッカリングを有する架橋構造を含んでもよい。通常、当該橋を当該リボースの２’－、４’－位に導入して２’，４’－ＢＮＡヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、ＢＮＡは、式（１２）に示されるＬＮＡ、式（１３）に示されるＥＮＡ、式（１４）に示されるｃＥＴ　ＢＮＡなどであってもよい。

【００９６】

【化２】



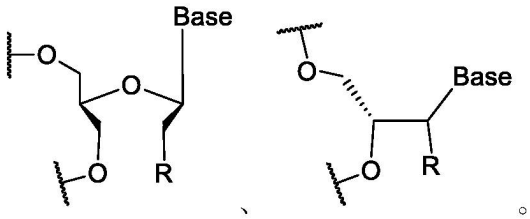
式（１２）、式（１３）、式（１４）。

【００９７】

非環式ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖環が開環されたヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非環式ヌクレオチドは、式（１５）に示されるアンロックド核酸（ＵＮＡ）、又は式（１６）に示されるグリセロール核酸（ＧＮＡ）であってもよい。

【００９８】

【化３】



式（１５）　　式（１６）

【００９９】

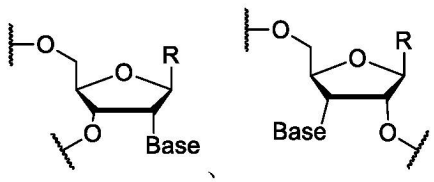
上記式（１５）及び式（１６）において、Ｒは、Ｈ、ＯＨ又はアルコキシ（Ｏ－アルキル）から選択される。

【０１００】

イソヌクレオチドとは、ヌクレオチドにおいて塩基のリボース環における位置が変化した化合物を指す。いくつかの実施形態において、イソヌクレオチドは、式（１７）又は（１８）に示される、塩基がリボース環の１’－位から２’－位又は３’－位に移行した化合物であってもよい。

【０１０１】

【化４】



式（１７）　　式（１８）

【０１０２】

上記式（１７）及び式（１８）の化合物において、Ｂａｓｅは、Ａ、Ｕ、Ｇ、Ｃ又はＴなどの核酸塩基を表し、Ｒは、Ｈ、ＯＨ、Ｆ又は上述した非フッ素基から選択される。

【０１０３】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、ＬＮＡ、ＥＮＡ、ｃＥＴ、ＵＮＡ及びＧＮＡから選択される１つである。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、いずれもメトキシ修飾ヌクレオチドであり、文脈において、前記メトキシ修飾ヌクレオチドは、リボースの２’－ヒドロキシがメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。

【０１０４】

文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」、「２’－フルオロ修飾ヌクレオチド」、「リボース基の２’－ヒドロキシがフッ素で置換されたヌクレオチド」及び「２’－フルオロリボースを有するヌクレオチド」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドの２’－ヒドロキシがフッ素で置換された、式（７）に示される構造を有する化合物を指し、「メトキシ修飾ヌクレオチド」、「２’－メトキシ修飾ヌクレオチド」、「リボースの２’－ヒドロキシがメトキシで置換されたヌクレオチド」及び「２’－メトキシリボースを有するヌクレオチド」は、意味が同じであり、いずれもヌクレオチドのリボースの２’－ヒドロキシがメトキシで置換された、式（８）に示される構造を有する化合物を指す。

【０１０５】

いくつかの実施形態において、本開示の安定化修飾ヌクレオチドを含むｓｉＲＮＡは、以下の修飾を有するｓｉＲＮＡである。５’末端から３’末端に向かって、前記センス鎖において、前記ヌクレオチド配列Ｉの第７、８、９位又は第５、７、８、９位のヌクレオチドは、フルオロ修飾ヌクレオチドであり、他の位置のヌクレオチドは、メトキシ修飾ヌク

レオチドであり、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列ＩＩの第２、６、１４、１６位又は第２、６、８、９、１４、１６位のヌクレオチドは、フルオロ修飾ヌクレオチドであり、第３位又は第５位のヌクレオチドは、安定化修飾ヌクレオチドであり、他の位置のヌクレオチドは、メトキシ修飾ヌクレオチドである。

【０１０６】

上記修飾を有するｓｉＲＮＡは、コストが低いだけでなく、血液中のリボヌクレアーゼで核酸を切断しにくくすることができ、これにより、核酸の安定性を向上させ、核酸により強いヌクレアーゼ加水分解耐性という性能を持たせる。また、上記修飾は、ｓｉＲＮＡのオフターゲット効果を低下させるが、ｓｉＲＮＡの抑制性能を顕著に低下させることがない。

【０１０７】

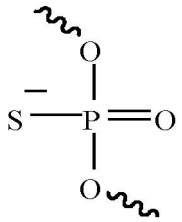
いくつかの実施形態において、本開示により提供されるｓｉＲＮＡは、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１、及びｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２のうちの１つである。

【０１０８】

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖において、少なくとも１本の一本鎖のリン酸－糖骨格中のリン酸エステルのうちの少なくとも一部は、修飾基を有するリン酸エステルである。いくつかの実施形態において、修飾基を有するリン酸エステルは、リン酸エステルにおけるリン酸ジエステル結合中の少なくとも１つの酸素原子が硫黄原子で置換されたチオリン酸エステルである。いくつかの実施形態において、前記修飾基を有するリン酸エステルは、式（１）に示される構造を有するチオリン酸エステルである。

【０１０９】

【化５】



式（１）。

【０１１０】

このような修飾により、ｓｉＲＮＡの二本鎖構造を安定化させ、塩基対合の高い特異性と高い親和力を維持することができる。

【０１１１】

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるｓｉＲＮＡにおいて、チオリン酸エステルは、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意の一端の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意の一端の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも１つに結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステルは、センス鎖の５’末端を除く全ての上記位置に結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステルは、センス鎖の３’末端を除く全ての上記位置に結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステルは、

前記センス鎖の５’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、

前記センス鎖の５’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間、

前記センス鎖の３’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、
前記センス鎖の３’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間、
前記アンチセンス鎖の５’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、
前記アンチセンス鎖の５’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間、
前記アンチセンス鎖の３’末端端部の第１位のヌクレオチドと第２位のヌクレオチドとの間、及び
前記アンチセンス鎖の３’末端端部の第２位のヌクレオチドと第３位のヌクレオチドとの間から選択される少なくとも１つに結合されて存在する。

【０１１２】

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるｓｉＲＮＡは、表１ａ～表１ｃに示される、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２Ｓ、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１Ｓ及びｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２Ｓのうちの１つである。

【０１１３】

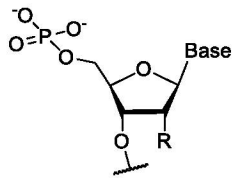
いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖の５’末端のヌクレオチドは、５’－リン酸ヌクレオチド又は５’－リン酸アナログ修飾ヌクレオチドである。

【０１１４】

通常用いられる前記５’－リン酸ヌクレオチド又は５’－リン酸アナログ修飾ヌクレオチドは、当業者に公知であり、例えば、５’－リン酸ヌクレオチドは、以下の構造を有してもよい。

【０１１５】

【化６】



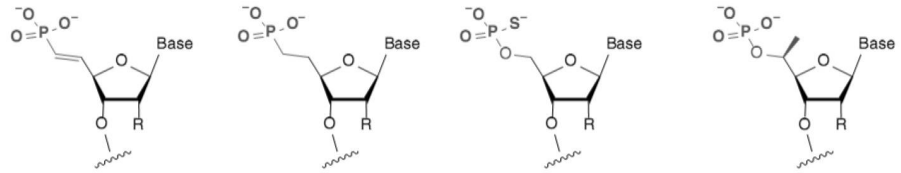
式（２）

【０１１６】

また、例えば、Ａｎａｓｔａｓｉａ Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｊｏｎａｔｈａｎ Ｋ．Ｗａｔｔｓ，Ｔｈｅ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｔｈｅｒａｐｉｅｓ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｕｔｉｌｉｔｙ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０１７，３５（３）：２３８－４８には、以下の４種類の５’－リン酸アナログ修飾ヌクレオチドが開示されている。

【０１１７】

【化７】



式（３） 式（４） 式（５） 式（６）

【０１１８】
ただし、Ｒは、Ｈ、ＯＨ、メトキシ、フッ素から選択され、Ｂａｓｅは、Ａ、Ｕ、Ｃ、Ｇ又はＴから選択される核酸塩基を表す。
【０１１９】
いくつかの実施形態において、５’－リン酸ヌクレオチドは、式（２）に示される、５’－リン酸修飾を含むヌクレオチドであり、５’－リン酸アナログ修飾ヌクレオチドは、式（３）に示される、ビニルリン酸エステル（５’－（Ｅ）－ｖｉｎｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ、Ｅ－ＶＰ）修飾を含むヌクレオチドであり、又は、式（５）に示される、チオリン酸エステル修飾ヌクレオチドである。
【０１２０】
いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡは、以下の表１ａ～表１ｃに示される、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ１－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ２－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ３－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｂ４－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２Ｐ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ１ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ１－Ｍ２ＳＰ１、ｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ１ＳＰ１、及びｓｉＡＰＯＣ３ｃ２－Ｍ２ＳＰ１のうちの１つである。
【０１２１】
本開示の発明者は、本開示により提供されるｓｉＲＮＡが、顕著に向上した血漿及びリソソームの安定性と、顕著に低いオフターゲット効果とを有するとともに、非常に高い遺伝子抑制活性を保持することを意外にも見出した。
【０１２２】
本開示により提供されるｓｉＲＮＡは、本分野における通常のｓｉＲＮＡ調製方法（例えば、固相合成方法及び液相合成方法）により得ることができる。ここで、固相合成は、既に商用カスタマイズサービスが行われている。対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを用いることにより修飾ヌクレオチドを本開示に記載されたｓｉＲＮＡに導入することができ、対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを調製する方法、及び修飾ヌクレオチドをｓｉＲＮＡに導入する方法も、当業者によく知られている。
【０１２３】
医薬組成物
本開示は、医薬組成物を提供し、前記医薬組成物は、活性成分としての上述したｓｉＲＮＡと、薬学的に許容される担体とを含む。
【０１２４】
前記薬学的に許容される担体は、ｓｉＲＮＡ投与分野で通常用いられる担体であってもよく、例えば、磁性ナノ粒子（ｍａｇｎｅｔｉｃ　ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ、例えば、Fe_3O_4又はFe_2O_3に基づくナノ粒子）、カーボンナノチューブ（ｃａｒｂｏｎ　ｎａｎｏｔｕｂｅｓ）、メソポーラスシリコン（ｍｅｓｏｐｏｒｏｕｓ　ｓｉｌｉｃｏｎ）、リン酸カルシウムナノ粒子（ｃａｌｃｉｕｍ　ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ）、ポリエチレンイミン（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｉｍｉｎｅ、ＰＥＩ）、ポリアミドアミンデンドリマー（ｐｏｌｙａｍｉｄｏａｍｉｎｅ　（ＰＡＭＡＭ）　ｄｅｎｄｒｉｍｅｒ）、ポリリジン（ｐｏｌｙ（Ｌ－ｌｙｓｉｎｅ）、ＰＬＬ）、キトサン（ｃｈｉｔｏｓａｎ）、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウムプロパン（１，２－ｄｉｏｌｅｏｙｌ－３－ｔｒｉｍｅｔｈｙｌａｍｍｏｎｉｕｍ－ｐｒｏｐａｎｅ、

ＤＯＴＡＰ）、ポリＤ－又はＬ－乳酸／グリコール酸共重合体（ｐｏｌｙ（Ｄ＆Ｌ－ｌａｃｔｉｃ／ｇｌｙｃｏｌｉｃ ａｃｉｄ）ｃｏｐｏｌｙｍｅｒ、ＰＬＧＡ）、ポリ（アミノエチルエチレンリン酸エステル）（ｐｏｌｙ（２－ａｍｉｎｏｅｔｈｙｌ ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）、ＰＰＥＥＡ）及びポリ（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノエチルメタクリレート）（ｐｏｌｙ（２－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｅｔｈｙｌ ｍｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ）、ＰＤＭＡＥＭＡ）並びにこれらの誘導体のうちの１又は複数があるが、これらに限定されない。

【０１２５】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物において、ｓｉＲＮＡと薬学的に許容される担体の含有量について特に要件がなく、いくつかの実施形態において、ｓｉＲＮＡと薬学的に許容される担体の重量比は、１：（１～５００）であってもよい。いくつかの実施形態において、上記重量比は、１：（１～５０）である。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物には、薬学的に許容される他の添加剤が含まれてもよく、当該添加剤は、本分野で通常用いられる各種の製剤又は化合物のうちの１又は複数であってもよい。例えば、前記薬学的に許容される他の添加剤は、ｐＨ緩衝液、保護剤及び浸透圧調節剤のうちの少なくとも１つを含んでもよい。

【０１２７】

前記ｐＨ緩衝液は、ｐＨ７．５～８．５のトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩緩衝液及び／又はｐＨ５．５～８．５のリン酸塩緩衝液であってもよく、例えば、ｐＨ５．５～８．５のリン酸塩緩衝液であってもよい。

【０１２８】

前記保護剤は、イノシトール、ソルビトール、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース及びグルコースのうちの少なくとも１つであってもよい。前記医薬組成物の全重量を基準とし、前記保護剤の含有量は、０．０１～３０重量％であってもよい。

【０１２９】

前記浸透圧調節剤は、塩化ナトリウム及び／又は塩化カリウムであってもよい。前記浸透圧調節剤の含有量は、前記医薬組成物の浸透圧が２００～７００ミリオスモル／キログラム（ｍＯｓｍ／ｋｇ）となるように決定される。所望の浸透圧により、当業者は、前記浸透圧調節剤の含有量を容易に決定することができる。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物から製造された製剤の投与過程における用量は、投与方式によって調整される。

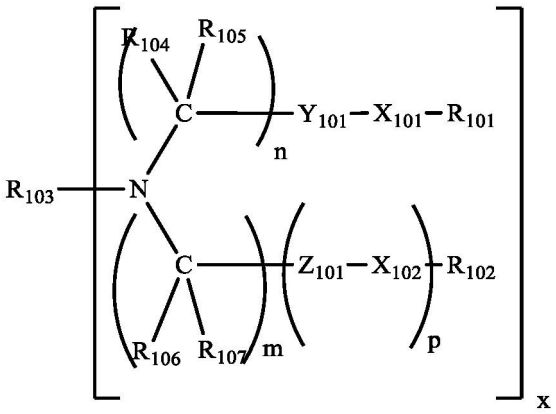
【０１３０】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、注射液などの液体製剤であってもよく、凍結乾燥粉末注射剤として、投与時に液体添加剤と混合し、液体製剤としてもよい。前記液体製剤は、皮下、筋肉又は静脈注射投与に用いることができるが、これらに限定されず、噴霧により肺に投与されるか、又は噴霧により肺を通して他の臓器組織（例えば、肝臓）に投与されるか、又は口腔吸入若しくは鼻腔投与などの方式で前記医薬組成物を送達することもできるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、噴霧により投与される。

【０１３１】

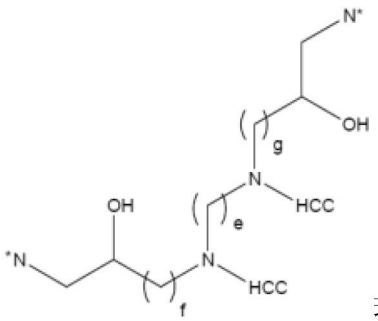
いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、リポソーム製剤の形式であってもよい。いくつかの実施形態において、前記リポソーム製剤に用いられる薬学的に許容される担体は、アミン含有トランスフェクション化合物（以下、有機アミンともいう）、補助脂質及び／又はポリエチレングリコール化脂質を含む。ここで、前記有機アミン、補助脂質及びポリエチレングリコール化脂質は、それぞれ中国特許出願公開第１０３３８０１１３号明細書（引用によりその全体を本明細書に組み込む）に記載されたアミン含有トランスフェクション化合物又はその薬学的に許容される塩若しくは誘導体、補助脂質及びポリエチレングリコール化脂質からそれぞれ選択される１又は複数であってもよい。

【０１３２】
いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、中国特許出願公開第１０３３８０１１３号明細書に記載された、式（２０１）に示される化合物又はその薬学的に許容される塩であってもよい。
【０１３３】
【化８】

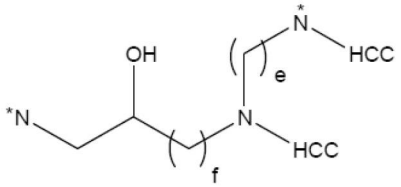


式（２０１）

ただし、
X_{101}及びX_{102}は、それぞれ独立してＯ、Ｓ、Ｎ－Ａ又はＣ－Ａであり、Ａは、水素又はC_1－C_{20}炭化水素鎖であり、
Y_{101}及びZ_{101}は、それぞれ独立してＣ＝Ｏ、Ｃ＝Ｓ、Ｓ＝Ｏ、ＣＨ－ＯＨ又はSO_2であり、
R_{101}、R_{102}、R_{103}、R_{104}、R_{105}、R_{106}及びR_{107}は、それぞれ独立して水素、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖脂肪族基、環式又は非環式の、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロ脂肪族基、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アシル、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アリール、置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖ヘテロアリールであり、
ｘは、１～１０の整数であり、
ｎは、１～３の整数であり、ｍは、０～２０の整数であり、ｐは、０又は１であり、ここで、ｍ＝ｐ＝０である場合、R_{102}は、水素であり、
ｎ及びｍのうちの少なくとも１つが２である場合、R_{103}と式（２０１）における窒素とは、式（２０２）又は式（２０３）に示される構造を形成する。
【０１３４】
【化９】



式（２０２）、



式（２０３）、

ただし、ｇ、ｅ及びｆは、それぞれ独立して１～６の整数であり、「ＨＣＣ」は、炭化水素鎖を表し、各＊Ｎは、式（２０１）における窒素原子を表す。
【０１３５】
いくつかの実施形態において、R_{103}は、ポリアミンである。他の実施形態において

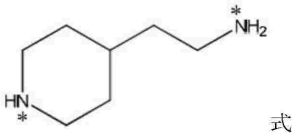
、Ｒ１０３は、ケタールである。いくつかの実施形態において、式（２０１）におけるＲ１０１及びＲ１０２のそれぞれは、独立して、置換又は無置換の、任意の分岐鎖又は直鎖アルキル又はアルケニルであり、前記アルキル又はアルケニルは、３～約２０個の炭素原子、例えば、８～約１８個の炭素原子、及び０～４個の二重結合、例えば、０～２個の二重結合を有する。

【０１３６】

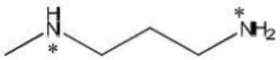
いくつかの実施形態において、ｎとｍのそれぞれは、独立して１又は３の値である場合、Ｒ１０３は、下記式（２０４）～式（２１３）のいずれか１つであってもよい。

【０１３７】

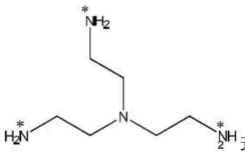
【化１０】



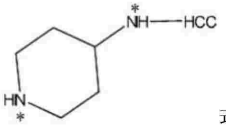
式（２０４）、



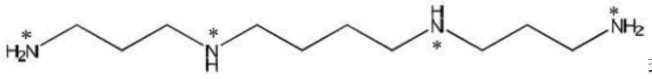
式（２０５）、



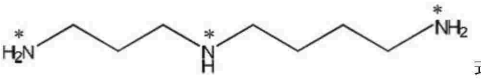
式（２０６）、



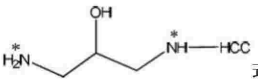
式（２０７）、



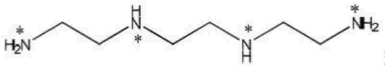
式（２０８）、



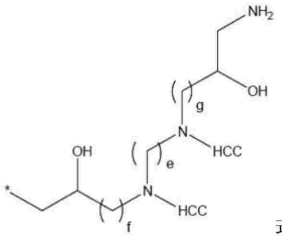
式（２０９）、



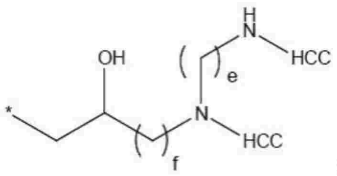
式（２１０）、



式（２１１）、



式（２１２）及び



式（２１３）

【０１３８】

式（２０４）～式（２１３）中、ｇ、ｅ及びｆは、それぞれ独立して、１～６の整数であり、各「ＨＣＣ」は、炭化水素鎖を表し、各＊は、Ｒ１０３と式（２０１）における窒素原子との結合可能点を示し、任意の＊位置上の各Ｈは、式（２０１）における窒素原子との結合を実現するために置換されてもよい。

【０１３９】

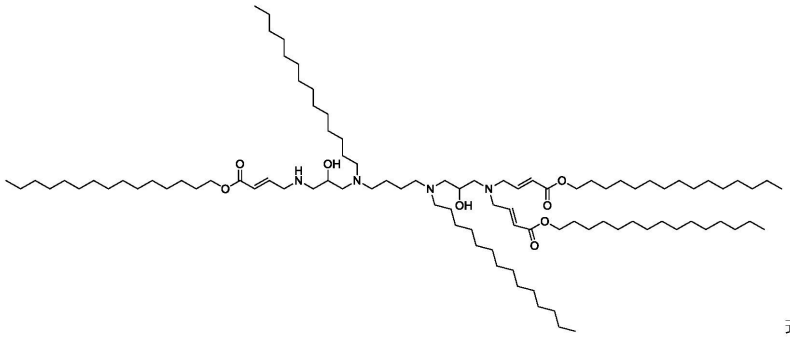
式（２０１）に示される化合物は、中国特許出願公開第１０３３８０１１３号明細書の記載により調製されてもよい。

【０１４０】

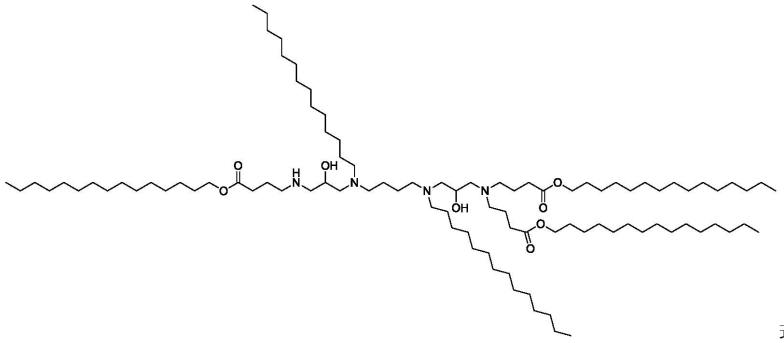
いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、式（２１４）に示される有機アミン及び／又は式（２１５）に示される有機アミンである。

【０１４１】

【化１１】



式（２１４）、



式（２１５）

【０１４２】

前記補助脂質は、コレステロール、コレステロールのアナログ及び／又はコレステロールの誘導体であり、

前記ポリエチレングリコール化脂質は、１，２－ジパルミトアミド－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）］－２０００である。

【０１４３】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物において、前記有機アミン、前記補助脂質及び前記ポリエチレングリコール化脂質のモル比は、（１９．７～８０）：（１９．７～８０）：（０．３～５０）であり、例えば、（５０～７０）：（２０～４０）：（３～２０）であってもよい。

【０１４４】

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡと上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された医薬組成物粒子は、約３０ｎｍ～約２００ｎｍの平均径を有し、一般的に約４０ｎｍ～約１３５ｎｍであり、より一般的には、当該リポソーム粒子の平均径は、約５０ｎｍ～約１２０ｎｍ、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、約６０ｎｍ～約９０ｎｍ又は約７０ｎｍ～約９０ｎｍであり、例えば、当該リポソーム粒子の平均径は、約３０、４０、５０、６０、７０、７５、８０、８５、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０又は１６０ｎｍである。

【０１４５】

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡと上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された医薬組成物において、ｓｉＲＮＡと全脂質（例えば有機アミン、補助脂質及び／又はポリエチレングリコール化脂質）の重量比（重量／重量比）は、約１：１～約１：５０、約１：１～約１：３０、約１：３～約１：２０、約１：４～約１：１８、約１：５～約１：１７、約１：５～約１：１５、約１：５～約１：１２、約１：６～約１：１２又は約１：６～約１：１０の範囲内にあり、例えば、本開示のｓｉＲＮＡと全脂質の重量比は、約１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７又は１：１８である。

【０１４６】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、市販時に各成分が独立して存在して

もよく、使用時に液体製剤として存在してもよい。いくつかの実施形態において、本開示により提供されるｓｉＲＮＡと上記薬学的に許容される担体により形成された医薬組成物は、既知の各種の方法に従い調製されてもよく、従来のｓｉＲＮＡの代わりに本開示により提供されるｓｉＲＮＡを用いればよい。いくつかの実施形態において、以下の方法に従い調製されてもよい。

【０１４７】

有機アミン、補助脂質及びポリエチレングリコール化脂質を上記モル比でアルコールに懸濁させ均一に混合して脂質溶液を得る。アルコールの用量は、得られた脂質溶液の総質量濃度が２～２５ｍｇ／ｍＬ、例えば、８～１８ｍｇ／ｍＬとなるように決定される。前記アルコールは、薬学的に許容されるアルコール、例えば、エタノール、プロピレングリコール、ベンジルアルコール、グリセリン、ポリエチレングリコール２００、ポリエチレングリコール３００、ポリエチレングリコール４００などの、室温付近で液体であるアルコールから選択される１又は複数であり、例えばエタノールであってもよい。

【０１４８】

本開示により提供されるｓｉＲＮＡを緩衝塩溶液に溶解し、ｓｉＲＮＡ水溶液を得る。緩衝塩溶液の濃度は、０．０５～０．５Ｍであり、例えば、０．１～０．２Ｍであってもよく、緩衝塩溶液のｐＨは、４．０～５．５に調節され、例えば、５．０～５．２であってもよく、緩衝塩溶液の用量は、ｓｉＲＮＡの濃度が０．６ｍｇ／ｍＬ以下、例えば、０．２～０．４ｍｇ／ｍＬとなるように決定される。前記緩衝塩は、可溶性酢酸塩、可溶性クエン酸塩から選択される１又は複数であり、例えば、酢酸ナトリウム及び／又は酢酸カリウムであってもよい。

【０１４９】

脂質溶液とｓｉＲＮＡ水溶液を混合した後、得られた生成物を４０～６０℃で少なくとも２分間、例えば、５～３０分間インキュベートし、インキュベートしたリポソーム製剤を得る。脂質溶液とｓｉＲＮＡ水溶液の体積比は、１：（２～５）であり、例えば、１：４であってもよい。

【０１５０】

インキュベートしたリポソーム製剤を濃縮又は希釈し、不純物を除去し、除菌し、本開示により提供される医薬組成物を得る。その物理化学的パラメータとしては、ｐＨが６．５～８であり、封入効率が８０％以上であり、粒子径が４０～２００ｎｍであり、多分散指数が０．３０以下であり、浸透圧が２５０～４００ｍＯｓｍ／ｋｇであり、例えば、物理化学的パラメータとしては、ｐＨが７．２～７．６、封入効率が９０％以上、粒子径が６０～１００ｎｍ、多分散指数が０．２０以下、浸透圧が３００～４００ｍＯｓｍ／ｋｇであってもよい。

【０１５１】

ここで、濃縮又は希釈は、不純物を除去する前、不純物を除去した後又は同時に行われてもよい。不純物を除去する方法としては、従来の各種の方法を用いてもよく、例えば、タンジェンシャルフロー系、中空糸カラムを用い、１００Ｋ　Ｄａの条件で限外濾過し、限外濾過交換溶液をｐＨ７．４のリン酸塩緩衝液（ＰＢＳ）としてもよい。除菌方法としては、従来の各種の方法を用いてもよく、例えば、０．２２μｍのフィルターで濾過して除菌してもよい。

【０１５２】

ｓｉＲＮＡ複合体

本開示は、ｓｉＲＮＡ複合体を提供し、前記ｓｉＲＮＡ複合体は、本開示により提供されるｓｉＲＮＡと、当該ｓｉＲＮＡに複合して結合される複合基とを含む。いくつかの実施形態において、前記複合基は、リンカーと、薬学的に許容される標的基及び／又は送達補助基とを含み、前記ｓｉＲＮＡ、前記リンカー、前記標的基又は前記送達補助基は、順に共有結合的又は非共有結合的に結合され、各前記標的基は、細胞表面受容体に結合できるリガンドから選択され、各送達補助基は、送達目的器官又は組織における前記ｓｉＲＮＡ複合体の生体適合性を向上させることができる基から選択される。

【０１５３】
本開示の文脈において、特に説明がない限り、「複合」とは、それぞれ特定の機能を有する２つ以上の化学部分間が共有結合的に互いに結合されることを指し、これに応じて、「複合」とは、当該各化学部分間が共有結合的に結合されることにより形成された化合物を指す。更に、「ｓｉＲＮＡ複合体」は、特定の機能を有する１又は複数の化学部分がｓｉＲＮＡに共有結合的に結合されて形成された化合物を表す。ｓｉＲＮＡ複合体は、文脈により、複数のｓｉＲＮＡ複合体の総称、又はある化学式に示されるｓｉＲＮＡ複合体であると理解されるべきである。本開示の文脈において、「複合分子」は、反応することによりｓｉＲＮＡに複合され、最終的に本開示のｓｉＲＮＡ複合体を形成することができる特定の化合物であると理解されるべきである。

【０１５４】
一般的には、前記複合基は、薬学的に許容される少なくとも１つの標的基及び任意のリンカー（ｌｉｎｋｅｒ）を含み、前記ｓｉＲＮＡ、前記リンカー及び前記標的基は、順に結合されている。いくつかの実施形態において、前記標的基は、１～６個である。いくつかの実施形態において、前記標的基は、２～４個である。前記ｓｉＲＮＡ分子は、前記複合基に非共有結合的又は共有結合的に複合されてもよく、例えば、前記複合基に共有結合的に複合されてもよい。ｓｉＲＮＡと複合基との複合部位は、ｓｉＲＮＡのセンス鎖の３’端又は５’端にあってもよく、アンチセンス鎖の５’端にあってもよく、ｓｉＲＮＡの内部配列にあってもよい。いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡと複合基との複合部位は、ｓｉＲＮＡのセンス鎖の３’末端にある。

【０１５５】
いくつかの実施形態において、前記複合基は、ヌクレオチドのリン酸基、２’－位のヒドロキシ又は塩基に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、前記複合基は、３’－位のヒドロキシに結合されてもよく、この場合、ヌクレオチド間が２’－５’リン酸ジエステル結合により結合されている。複合基は、ｓｉＲＮＡ鎖の末端に結合される場合、通常ヌクレオチドのリン酸基に結合され、ｓｉＲＮＡの内部配列に結合される場合、通常リボース糖環又は塩基に結合される。各種の結合方法については、Ｍｕｔｈｉａｈ Ｍａｎｏｈａｒａｎ ｅｔ．ａｌ．ｓｉＲＮＡ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｃａｒｒｙｉｎｇ ｓｅｑｕｅｎｔｉａｌｌｙ ａｓｓｅｍｂｌｅｄ ｔｒｉｖａｌｅｎｔ Ｎ－ａｃｅｔｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ ｌｉｎｋｅｄ ｔｈｒｏｕｇｈ ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ｅｌｉｃｉｔ ｒｏｂｕｓｔ ｇｅｎｅ ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ ｉｎ ｖｉｖｏ ｉｎ ｈｅｐａｔｏｃｙｔｅｓ．ＡＣＳ Ｃｈｅｍｉｃａｌ ｂｉｏｌｏｇｙ，２０１５，１０（５）：１１８１－７を参照することができる。

【０１５６】
標的基は、適切なリンカーを介してｓｉＲＮＡ分子に結合されてもよく、当業者は、標的基の具体的な種類により適切なリンカーを選択することができる。これらのリンカー、標的基の種類及びｓｉＲＮＡへの結合方法については、国際公開第２０１５００６７４０号の開示内容を参照してもよく、引用によりその内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【０１５７】
いくつかの実施形態において、前記標的基は、ｓｉＲＮＡ投与分野で通常用いられるリガンド、例えば、国際公開第２００９０８２６０７号に記載された各種のリガンドであってもよく、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【０１５８】
いくつかの実施形態において、少なくとも１つ又は各前記標的基は、前記ＡＰＯＣ３遺伝子を発現する細胞表面受容体に結合できるリガンドから選択される。

【０１５９】
いくつかの実施形態において、少なくとも１つ又は各前記標的基は、哺乳動物の肝の実質細胞表面の受容体（ＡＳＧＰＲ）に結合できるリガンドから選択される。いくつかの実施形態において、各前記標的基は独立して、哺乳動物の肝細胞表面のアシアロ糖タンパク

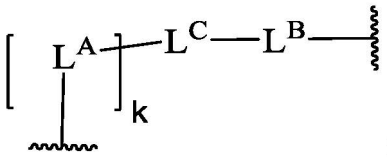
質受容体と親和性のあるリガンドである。いくつかの実施形態において、各前記標的基は独立して、アシアロ糖タンパク質又は糖である。いくつかの実施形態において、各前記標的基は独立して、アシアロ糖タンパク質、例えば、アシアロオロソムコイド（ａｓｉａｌｏｏｒｏｓｏｍｕｃｏｉｄ、ＡＳＯＲ）又はアシアロフェチュイン（ａｓｉａｌｏｆｅｔｕｉｎ、ＡＳＦ）である。いくつかの実施形態において、各前記標的基は、Ｄ－マンノピラノース、Ｌ－マンノピラノース、Ｄ－アラビノース、Ｄ－キシロフラノース、Ｌ－キシロフラノース、Ｄ－グルコース、Ｌ－グルコース、Ｄ－ガラクトース、Ｌ－ガラクトース、α－Ｄ－マンノフラノース、β－Ｄ－マンノフラノース、α－Ｄ－マンノピラノース、β－Ｄ－マンノピラノース、α－Ｄ－グルコピラノース、β－Ｄ－グルコピラノース、α－Ｄ－グルコフラノース、β－Ｄ－グルコフラノース、α－Ｄ－フルクトフラノース、α－Ｄ－フルクトピラノース、α－Ｄ－ガラクトピラノース、β－Ｄ－ガラクトピラノース、α－Ｄ－ガラクトフラノース、β－Ｄ－ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、ガラクトサミン、Ｎ－アセチルガラクトサミン、Ｎ－トリフルオロアセチルガラクトサミン、Ｎ－プロピオニルガラクトサミン、Ｎ－ｎ－ブチリルガラクトサミン、Ｎ－イソブチリルガラクトサミン、２－アミノ－３－Ｏ－［（Ｒ）－１－カルボキシエチル］－２－デオキシ－β－Ｄ－グルコピラノース、２－デオキシ－２－メチルアミノ－Ｌ－グルコピラノース、４，６－ジデオキシ－４－ホルミルアミノ－２，３－ジ－Ｏ－メチル－Ｄ－マンノピラノース、２－デオキシ－２－スルホアミノ－Ｄ－グルコピラノース、Ｎ－グリコリル－α－ノイラミン酸、５－チオ－β－Ｄ－グルコピラノース、メチル２，３，４－トリ－Ｏ－アセチル－１－チオ－６－Ｏ－トリチル－α－Ｄ－グルコピラノシド、４－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノース、エチル３，４，６，７－テトラ－Ｏ－アセチル－２－デオキシ－１，５－ジチオ－α－Ｄ－グルコヘプトピラノシド、２，５－アンヒドロ－Ｄ－アロニトリル、リボース、Ｄ－リボース、Ｄ－４－チオリボース、Ｌ－リボース、Ｌ－４－チオリボースから独立して選択される１つである。いくつかの実施形態において、少なくとも１つ又は各前記標的基は、ガラクトース又はＮ－アセチルガラクトサミンである。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体におけるリンカーは、式（３０１）に示される構造を有する。

【０１６１】

【化１２】



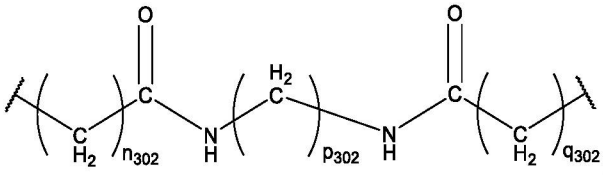
式（３０１）

ただし、ｋは、１～３の整数であり、

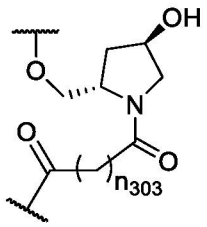
L^Aは、式（３０２）に示されるアミド結合を含む構造を有し、L^Bは、式（３０３）に示されるＮ－アシルピロリジンを含む構造を有し、カルボニルと酸素原子とを含み、L^Cは、ヒドロキシメチルアミノメタン、ジヒドロキシメチルアミノメタン又はトリヒドロキシメチルアミノメタンに基づく結合基である。

【０１６２】

【化１３】



式（３０２）



式（３０３）

ただし、n_{302}、q_{302}及びp_{302}は、それぞれ独立して、２～６の整数であり、好ましくは、n_{302}、q_{302}及びp_{302}は、それぞれ独立して、２又は３であり、n_{303}は、４～１６の整数であり、好ましくは、n_{303}は、８～１２の整数であり、

は、基が共有結合的に結合される部位を表す。

【０１６３】

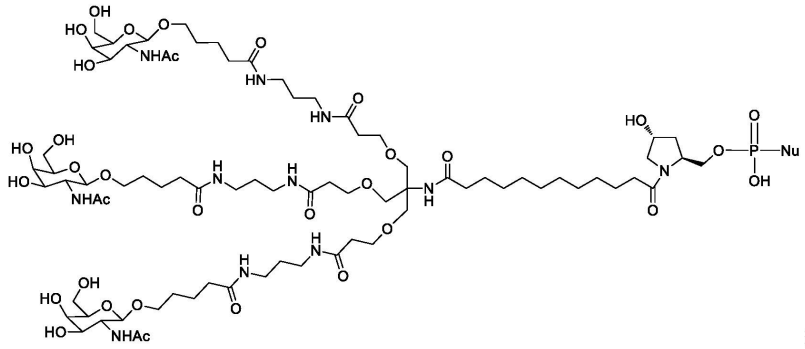
前記リンカーにおいて、L^Aは、それぞれ、１つの前記標的基とエーテル結合により結合され、L^C部分におけるヒドロキシの酸素原子がL^C部分とエーテル結合を形成することにより結合され、L^Bは、式（３０３）中のカルボニルがL^C部分におけるアミノの窒素原子とアミド結合を形成することにより結合され、式（３０３）中の酸素原子が前記ｓｉＲＮＡと酸素原子を介してリン酸エステル結合又はチオリン酸エステル結合を形成することにより結合される。

【０１６４】

いくつかの実施形態において、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ複合体は、式（３０５）に示される構造を有する。

【０１６５】

【化１４】



式（３０５）

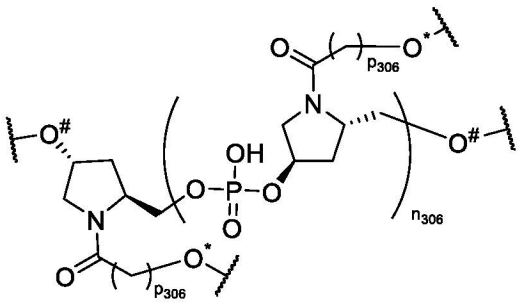
ただし、Ｎｕは、本開示により提供されるｓｉＲＮＡを表す。

【０１６６】

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体におけるリンカーは、式（３０６）に示される構造を有する。

【０１６７】

【化１５】



式（３０６）

ただし、n_{306}は、０～３の整数であり、各p_{306}は独立して、１～６の整数であり、

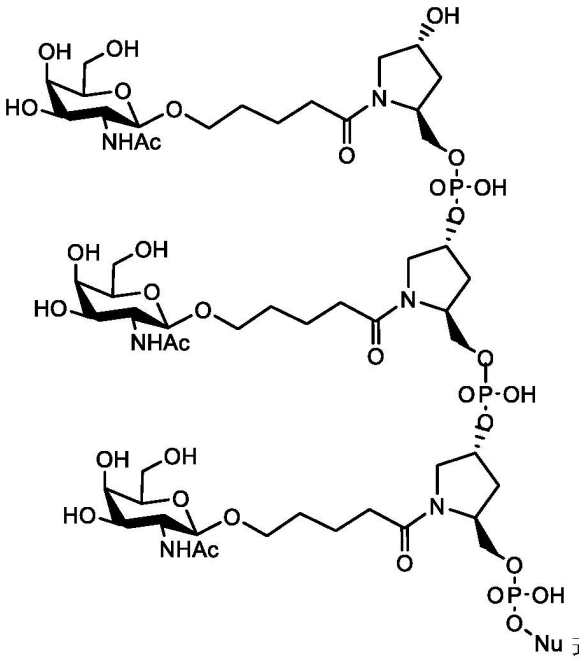
は、基が共有結合的に結合される部位を表し、前記結合基は、＊で示される酸素原子が前記標的基とエーテル結合を形成することにより結合され、前記結合基は、＃で示される酸素原子のうちの少なくとも１つが前記ｓｉＲＮＡとリン酸エステル結合又はチオリン酸エステル結合を形成することにより結合され、＃で示される酸素原子が水素原子に結合されてヒドロキシを形成するか、又はC_1－C_3アルキルに結合されてC_1－C_3アルコキシ基を形成する。

【０１６８】

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、式（３０７）に示される構造を有する。

【０１６９】

【化１６】



式（３０７）

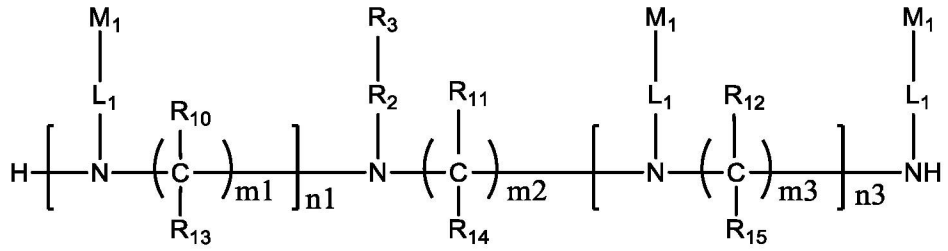
ただし、Ｎｕは、本開示により提供されるｓｉＲＮＡを表す。

【０１７０】

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、式（３０８）に示される構造を有する。

【０１７１】

【化１７】



式（３０８）

ただし、

ｎ１は、１～３から選択される整数であり、ｎ３は、０～４から選択される整数であり、

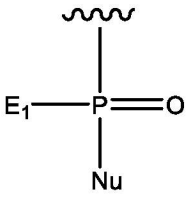
ｍ１、ｍ２及びｍ３は、それぞれ独立して、２～１０から選択される整数であり、

R_{10}、R_{11}、R_{12}、R_{13}、R_{14}又はR_{15}は、それぞれ独立して、Ｈであるか、又はＣ１－Ｃ１０アルキル、Ｃ１－Ｃ１０ハロゲン化アルキル及びＣ１－Ｃ１０アルコキシからなる群から選択され、

R_3は、式Ａ５９に示される構造を有する。

【０１７２】

【化１８】



（Ａ５９）

ただし、E_1は、ＯＨ、ＳＨ又はBH_2であり、Ｎｕは、本開示により提供されるｓｉＲＮＡであり、

R_2は、長さが１～２０個の炭素原子の直鎖アルキレンであり、１又は複数の炭素原子は、Ｃ（Ｏ）、ＮＨ、Ｏ、Ｓ、ＣＨ＝Ｎ、Ｓ（Ｏ）$_2$、Ｃ$_2$－Ｃ１０アルケニレン、Ｃ$_2$－Ｃ１０アルキニレン、Ｃ６－Ｃ１０アリーレン、Ｃ３－Ｃ１８ヘテロシクリレン及びＣ５－Ｃ１０ヘテロアリーレンからなる群から選択される１又は複数で任意に置換され、R_2は、Ｃ１－Ｃ１０アルキル、Ｃ６－Ｃ１０アリール、Ｃ５－Ｃ１０ヘテロアリール、Ｃ１－Ｃ１０ハロゲン化アルキル、－ＯＣ１－Ｃ１０アルキル、－ＯＣ１－Ｃ１０アルキルフェニル、－Ｃ１－Ｃ１０アルキル－ＯＨ、－ＯＣ１－Ｃ１０ハロゲン化アルキル、－ＳＣ１－Ｃ１０アルキル、－ＳＣ１－Ｃ１０アルキルフェニル、－Ｃ１－Ｃ１０アルキル－ＳＨ、－ＳＣ１－Ｃ１０ハロゲン化アルキル、ハロゲン置換基、－ＯＨ、－ＳＨ、－ＮＨ$_2$、－Ｃ１－Ｃ１０アルキル－ＮＨ$_2$、－Ｎ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＮＨ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－Ｎ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）（Ｃ１－Ｃ１０アルキルフェニル）、－ＮＨ（Ｃ１－Ｃ１０アルキルフェニル）、シアノ、ニトロ、－ＣＯ$_2$Ｈ、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＣＯＮ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＣＯＮＨ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＣＯＮＨ$_2$、－ＮＨＣ（Ｏ）（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＮＨＣ（Ｏ）（フェニル）、－Ｎ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）Ｃ（Ｏ）（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－Ｎ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）Ｃ（Ｏ）（フェニル）、－Ｃ（Ｏ）Ｃ１－Ｃ１０アルキル、－Ｃ（Ｏ）Ｃ１－Ｃ１０アルキルフェニル、－Ｃ（Ｏ）Ｃ１－Ｃ１０ハロアルキル、－ＯＣ（Ｏ）Ｃ１－Ｃ１０アルキル、－ＳＯ$_2$（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＳＯ$_2$（フェニル）、－ＳＯ$_2$（Ｃ１－Ｃ１０ハロゲン化アルキル）、－ＳＯ$_2$ＮＨ$_2$、－ＳＯ$_2$ＮＨ（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＳＯ$_2$ＮＨ（フェニル）、－ＮＨＳＯ$_2$（Ｃ１－Ｃ１０アルキル）、－ＮＨＳＯ$_2$（フェニル）及び－ＮＨＳＯ$_2$（Ｃ１－Ｃ１０ハロゲン化アルキル）からなる群のうちの１又は複数の置換基を任意に有

してもよく、
各L_1は、長さが１～７０個の炭素原子の直鎖アルキレンであり、１又は複数の炭素原子は、Ｃ（Ｏ）、ＮＨ、Ｏ、Ｓ、ＣＨ＝Ｎ、Ｓ（Ｏ）$_2$、C_2－C_{10}アルケニレン、C_2－C_{10}アルキニレン、C_6－C_{10}アリーレン、C_3－C_{18}ヘテロシクリレン及びC_5－C_{10}ヘテロアリーレンからなる群から選択される１又は複数で任意に置換され、L_1は、C_1－C_{10}アルキル、C_6－C_{10}アリール、C_5－C_{10}ヘテロアリール、C_1－C_{10}ハロゲン化アルキル、－ＯC_1－C_{10}アルキル、－ＯC_1－C_{10}アルキルフェニル、－C_1－C_{10}アルキル－ＯＨ、－ＯC_1－C_{10}ハロゲン化アルキル、－ＳC_1－C_{10}アルキル、－ＳC_1－C_{10}アルキルフェニル、－C_1－C_{10}アルキル－ＳＨ、－ＳC_1－C_{10}ハロゲン化アルキル、ハロゲン置換基、－ＯＨ、－ＳＨ、－NH_2、－C_1－C_{10}アルキル－NH_2、－Ｎ（C_1－C_{10}アルキル）（C_1－C_{10}アルキル）、－ＮＨ（C_1－C_{10}アルキル）、－Ｎ（C_1－C_{10}アルキル）（C_1－C_{10}アルキルフェニル）、－ＮＨ（C_1－C_{10}アルキルフェニル）、シアノ、ニトロ、－CO_2H、－Ｃ（Ｏ）Ｏ（C_1－C_{10}アルキル）、－ＣＯＮ（C_1－C_{10}アルキル）（C_1－C_{10}アルキル）、－ＣＯＮＨ（C_1－C_{10}アルキル）、－ＣＯＮH_2、－ＮＨＣ（Ｏ）（C_1－C_{10}アルキル）、－ＮＨＣ（Ｏ）（フェニル）、－Ｎ（C_1－C_{10}アルキル）Ｃ（Ｏ）（C_1－C_{10}アルキル）、－Ｎ（C_1－C_{10}アルキル）Ｃ（Ｏ）（フェニル）、－Ｃ（Ｏ）C_1－C_{10}アルキル、－Ｃ（Ｏ）C_1－C_{10}アルキルフェニル、－Ｃ（Ｏ）C_1－C_{10}ハロアルキル、－ＯＣ（Ｏ）C_1－C_{10}アルキル、－ＳO_2（C_1－C_{10}アルキル）、－ＳO_2（フェニル）、－ＳO_2（C_1－C_{10}ハロゲン化アルキル）、－ＳO_2ＮＨ$_2$、－ＳO_2ＮＨ（C_1－C_{10}アルキル）、－ＳO_2ＮＨ（フェニル）、－ＮＨＳO_2（C_1－C_{10}アルキル）、－ＮＨＳO_2（フェニル）及び－ＮＨＳO_2（C_1－C_{10}ハロゲン化アルキル）からなる群のいずれか１又は複数の置換基を任意に有してもよく、

は、基が共有結合的に結合される部位を表し、
M_1は、標的基を表し、その定義及び選択可能な範囲は、上記と同じである。いくつかの実施形態において、各M_1は、哺乳動物の肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体に対して親和力を有するリガンドから独立して選択される１つである。

【０１７３】
便宜上、L_1は、線形アルキルとして定義されるが、例えば上述の取替及び／又は置換によって生じるアミノ又はアルケニルであり、線形基ではないか、又は名称が異なる可能性があることは、当業者に理解される。本開示内容の目的のために、L_1の長さは、２つの結合点を結合する鎖における原子数である。この目的のために、前記直鎖アルキレンの炭素原子を置換して得られた環（例えば、ヘテロシクリレン又はヘテロアリーレン）を、１個の原子とする。

【０１７４】
M_1が哺乳動物の肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体に対して親和力を有するリガンドである場合、いくつかの実施形態において、ｎ１は、１～３の整数であってもよく、ｎ３は、０～４の整数であってもよく、前記複合体におけるM_1リガンドの個数が少なくとも２であることを確保する。いくつかの実施形態において、ｎ１＋ｎ３≧２であり、これにより、M_1リガンドの個数が少なくとも３であり、M_1リガンドと肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体をより容易に結合させ、更に前記複合体が細胞内取込み作用により細胞に取り込まれることを促進することができる。実験から分かるように、M_1リガンドの個数が３個以上である場合、M_1リガンドと肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体との結合の容易さの向上が明らかではないので、合成の容易さ、構造／プロセスコスト及び送達効率などの多方面を総合的に考慮すると、いくつかの実施形態において、ｎ１は、１～２の整数であり、ｎ３は、０～１の整数であり、また、ｎ１＋ｎ３＝２～３である。

【０１７５】

いくつかの実施形態において、ｍ１、ｍ２及びｍ３が２～１０の整数から独立して選択される場合、複数のＭ$_1$リガンド間の空間位置を、Ｍ$_1$リガンドと肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体との結合に適合させることができる。本開示により提供される複合体をより簡略化し、より容易に合成し、及び／又はコストを低下させるために、いくつかの実施形態において、ｍ１、ｍ２及びｍ３は、それぞれ独立して２～５の整数であり、いくつかの実施形態において、ｍ１＝ｍ２＝ｍ３である。

【０１７６】

Ｒ$_{10}$、Ｒ$_{11}$、Ｒ$_{12}$、Ｒ$_{13}$、Ｒ$_{14}$及びＲ$_{15}$が、それぞれＨ、Ｃ$_1$－Ｃ$_{10}$アルキル、Ｃ$_1$－Ｃ$_{10}$ハロゲン化アルキル及びＣ$_1$－Ｃ$_{10}$アルコキシから独立して選択される１つである場合、いずれも本開示の複合体の性質を変化させることなく、本開示の目的を実現することができることは、当業者に理解され得る。いくつかの実施形態において、Ｒ$_{10}$、Ｒ$_{11}$、Ｒ$_{12}$、Ｒ$_{13}$、Ｒ$_{14}$及びＲ$_{15}$は、それぞれＨ、メチル及びエチルから独立して選択される。いくつかの実施形態において、Ｒ$_{10}$、Ｒ$_{11}$、Ｒ$_{12}$、Ｒ$_{13}$、Ｒ$_{14}$及びＲ$_{15}$は、いずれもＨである。

【０１７７】

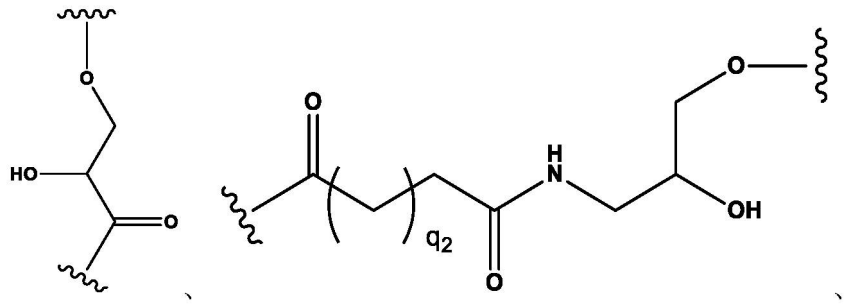
本開示により提供されるｓｉＲＮＡ複合体によれば、Ｒ$_3$は、式Ａ５９に示される構造の基であり、ただし、Ｅ$_1$は、ＯＨ、ＳＨ又はＢＨ$_2$であり、調製原料の入手しやすさを考慮すると、いくつかの実施形態において、Ｅ$_1$は、ＯＨ又はＳＨである。

【０１７８】

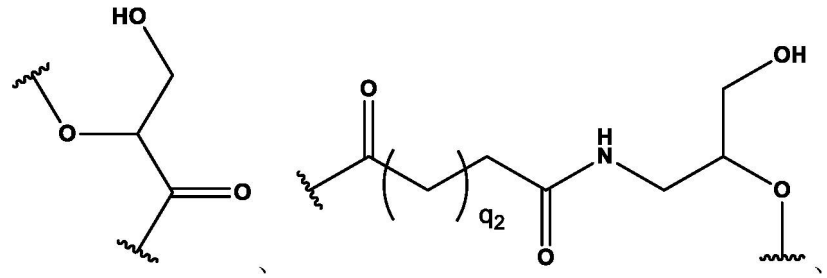
いくつかの実施形態において、Ｒ$_2$は、窒素含有骨格上のＮとＡ５９との結合を実現するために選択される。本開示の文脈において、「窒素含有骨格」とは、Ｒ$_{10}$、Ｒ$_{11}$、Ｒ$_{12}$、Ｒ$_{13}$、Ｒ$_{14}$及びＲ$_{15}$が結合された炭素原子とＮが互いに結合されている鎖状構造を指す。したがって、Ｒ$_2$は、適当な方法でＡ５９の基を窒素含有骨格上のＮに結合することができる任意の結合基であってもよい。いくつかの実施形態において、固相合成プロセスにより本開示のｓｉＲＮＡ複合体を調製する場合に、Ｒ$_2$には、窒素含有骨格上のＮに結合される結合部位及びＲ$_3$におけるＰに結合される結合部位がともに含まれる必要がある。いくつかの実施形態において、Ｒ$_2$における前記窒素含有骨格上のＮに結合される部位は、Ｎとアミド結合を形成し、前記Ｒ$_3$上のＰに結合される部位は、Ｐとリン酸エステル結合を形成する。いくつかの実施形態において、Ｒ$_2$は、Ｂ５、Ｂ６、Ｂ５’又はＢ６’である。

【０１７９】

【化１９】



（Ｂ５）　　（Ｂ６）



（Ｂ５’）　　（Ｂ６’）

ただし、

は、基が共有結合的に結合される部位を表す。

【０１８０】

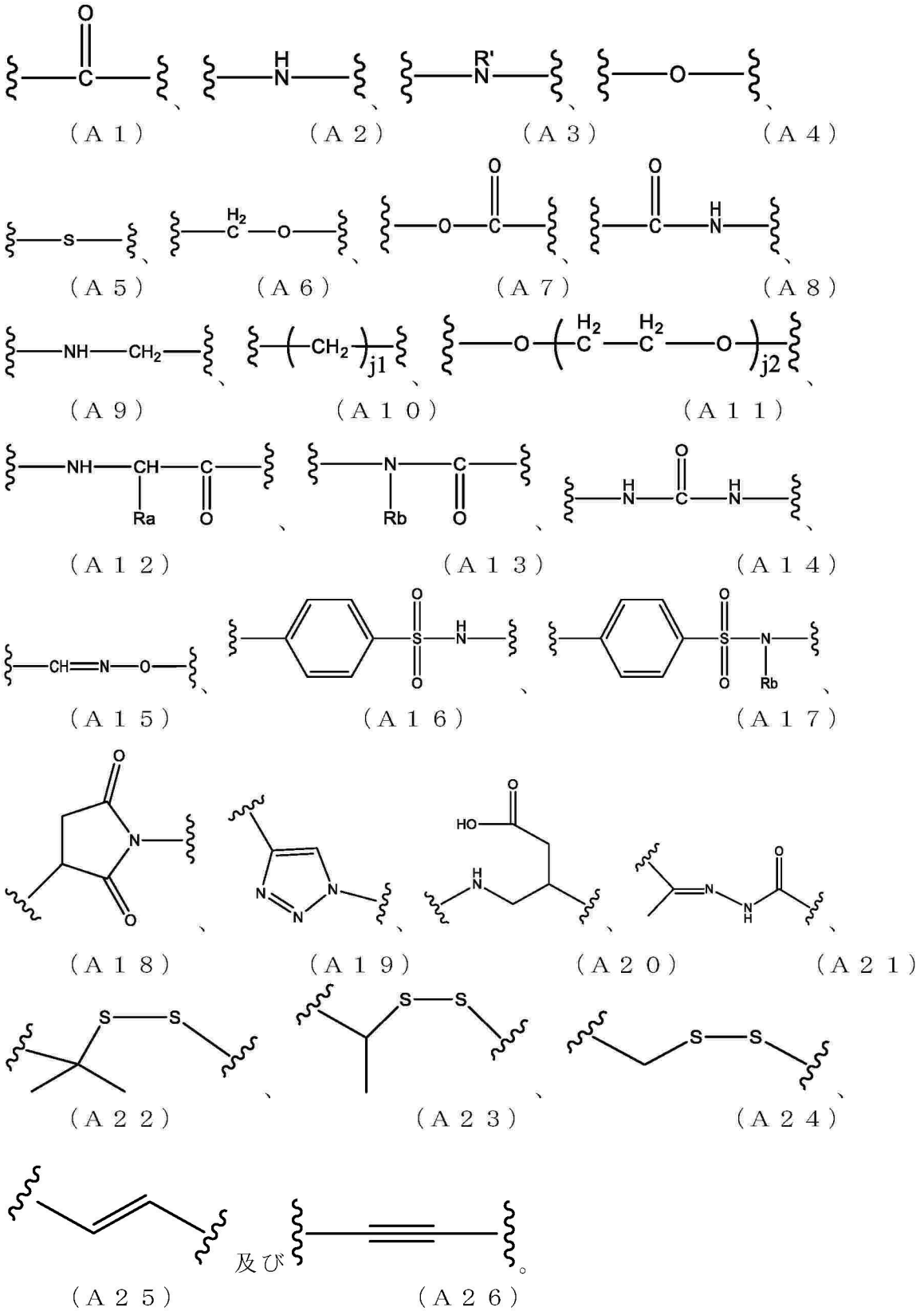
ｑ$_2$の値の範囲は、１～１０の整数であってもよく、いくつかの実施形態において、ｑ$_2$は１～５の整数である。

【０１８１】

Ｌ$_1$は、Ｍ$_1$リガンドを窒素含有骨格上のＮに結合し、本開示のｓｉＲＮＡ複合体に標的機能を提供するという役割を果たす。いくつかの実施形態において、Ｌ$_1$は、式Ａ１～Ａ２６の基から選択される１又は複数の結合の組合せである。いくつかの実施形態において、Ｌ$_1$は、Ａ１、Ａ４、Ａ５、Ａ６、Ａ８、Ａ１０、Ａ１１及びＡ１３から選択される１又は複数の結合の組合せであり、いくつかの実施形態において、Ｌ$_1$は、Ａ１、Ａ４、Ａ８、Ａ１０及びＡ１１から選択される少なくとも２つの結合の組合せであり、いくつかの実施形態において、Ｌ$_1$は、Ａ１、Ａ８、Ａ１０から選択される少なくとも２つの結合の組合せである。

【０１８２】

【化２０】



【０１８３】

いくつかの実施形態において、Ｌ１の長さは、３～２５個の原子、３～２０個の原子、４～１５個の原子又は５～１２個の原子であってもよい。いくつかの実施形態において、Ｌ１の長さは、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、

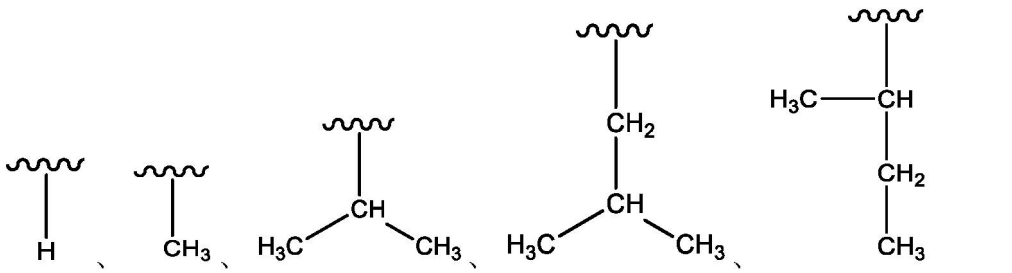
１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個、６０個の原子である。

【０１８４】

いくつかの実施形態において、ｊ１は、２～１０の整数であり、いくつかの実施形態において、ｊ１は、３～５の整数である。いくつかの実施形態において、ｊ２は、２～１０の整数であり、いくつかの実施形態において、ｊ２は、３～５の整数である。Ｒ’は、C_1－C_4アルキルであり、いくつかの実施形態において、Ｒ’は、メチル、エチル及びイソプロピルのうちの１つである。Ｒａは、Ａ２７、Ａ２８、Ａ２９、Ａ３０及びＡ３１のうちの１つであり、いくつかの実施形態において、Ｒａは、Ａ２７又はＡ２８である。Ｒｂは、C_1－C_5アルキルであり、いくつかの実施形態において、Ｒｂは、メチル、エチル、イソプロピル及びブチルのうちの１つである。いくつかの実施形態において、式Ａ１～Ａ２６において、ｊ１、ｊ２、Ｒ’、Ｒａ、Ｒｂをそれぞれ選択することにより、M_1リガンドと窒素含有骨格上のＮとの結合を実現し、M_1リガンド間の空間位置を、M_1リガンドと肝表面のアシアロ糖タンパク質受容体との結合により適合させる。

【０１８５】

【化２１】



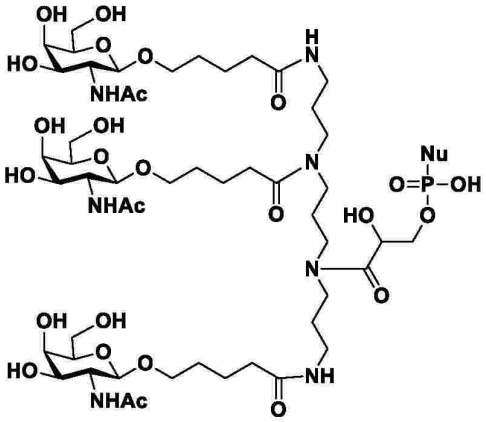
（Ａ２７）（Ａ２８）（Ａ２９）（Ａ３０）（Ａ３１）

【０１８６】

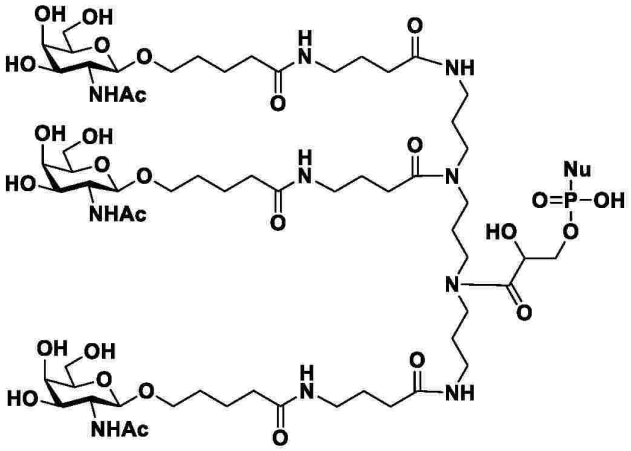
いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、式（４０３）、（４０４）、（４０５）、（４０６）、（４０７）、（４０８）、（４０９）、（４１０）、（４１１）、（４１２）、（４１３）、（４１４）、（４１５）、（４１６）、（４１７）、（４１８）、（４１９）、（４２０）、（４２１）又は（４２２）に示される構造を有する。

【０１８７】

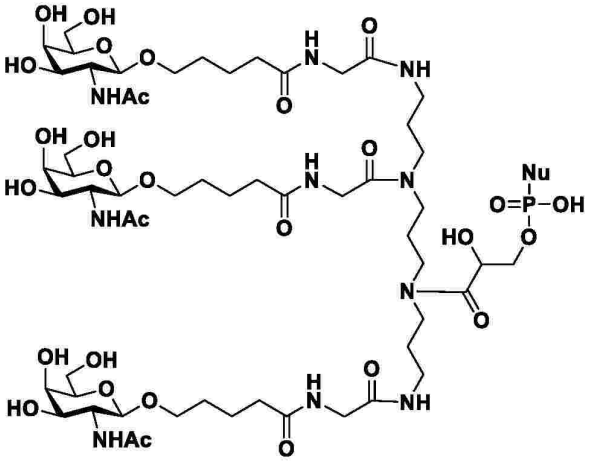
【化２２】



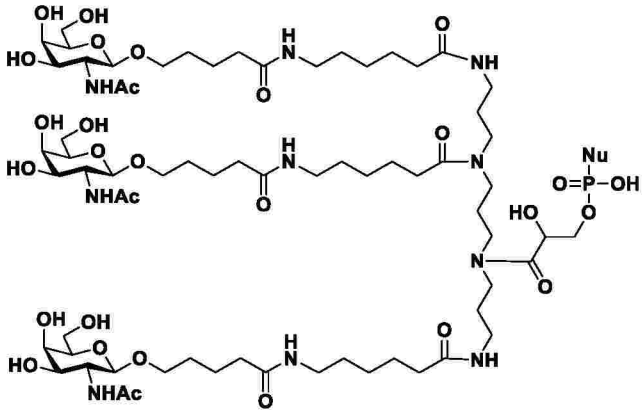
式（４０３）



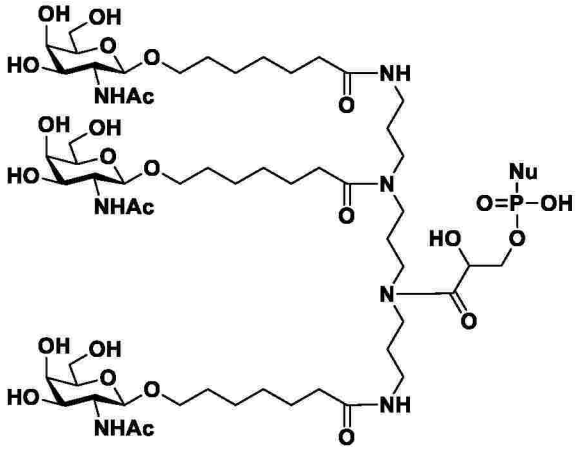
式（４０４）



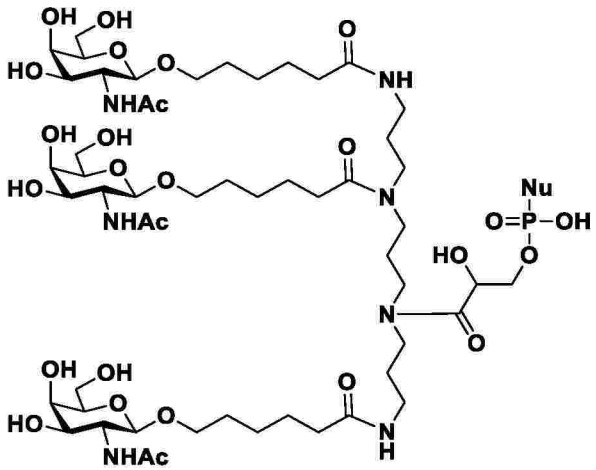
式（４０５）



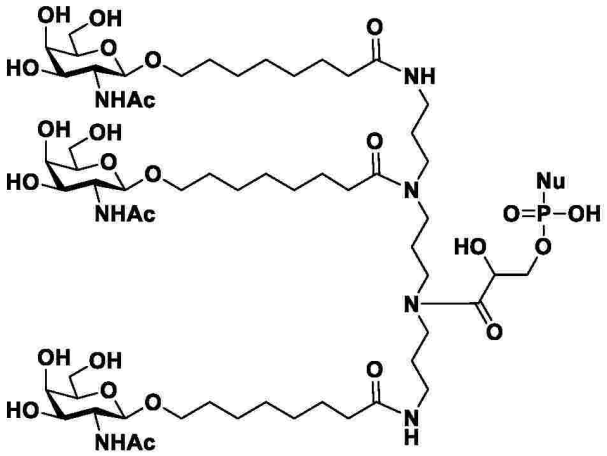
式（４０６）



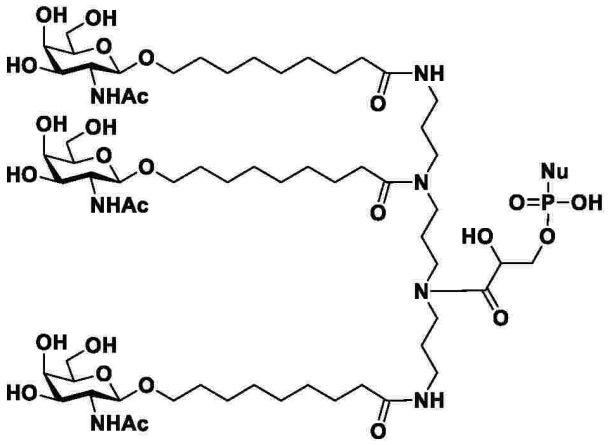
式（４０７）



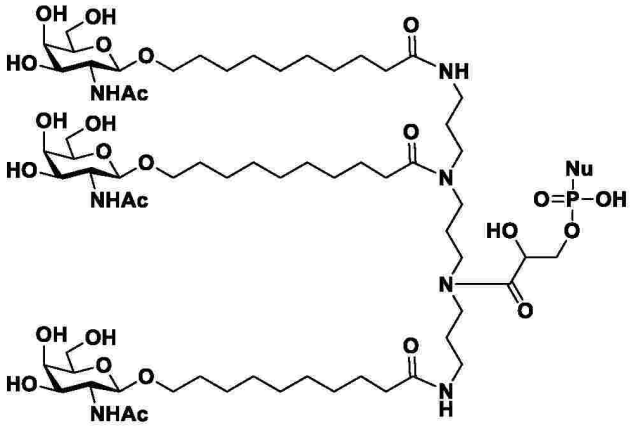
式（４０８）



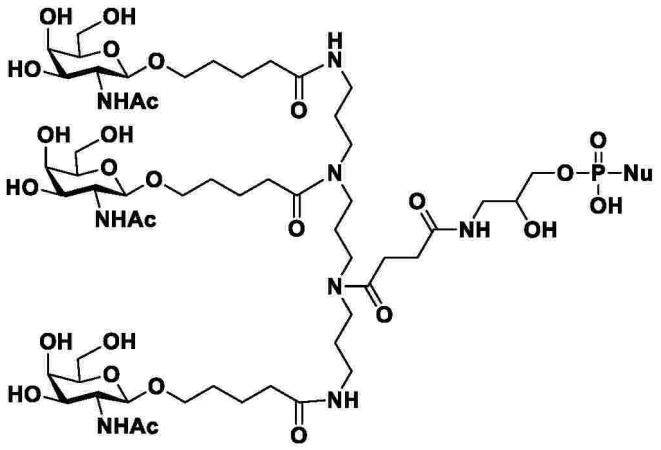
式（４０９）



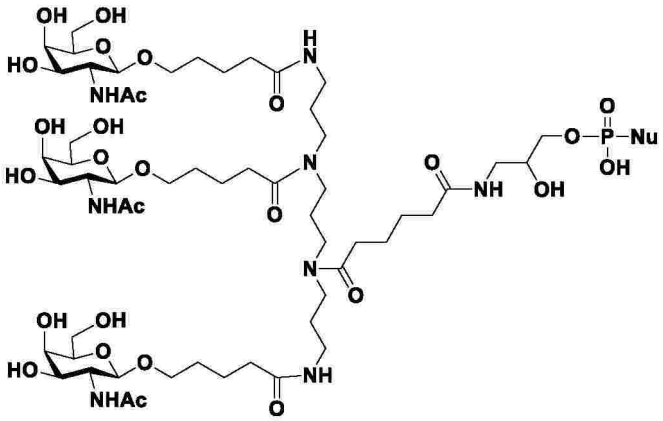
式（４１０）



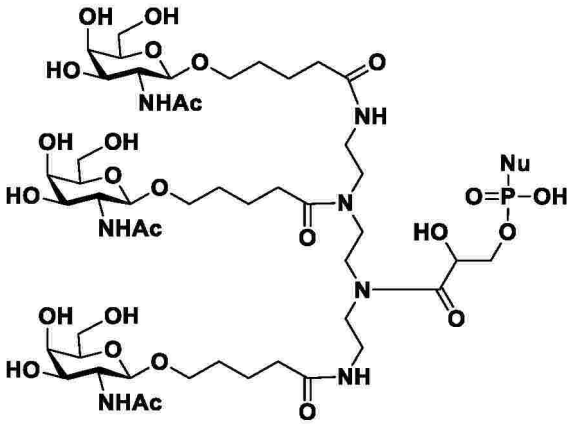
式（４１１）



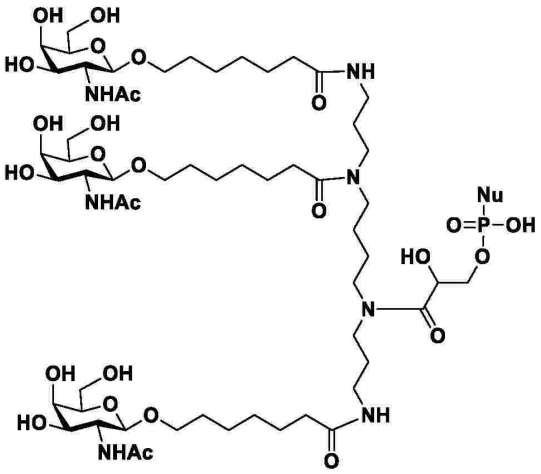
式（４１２）



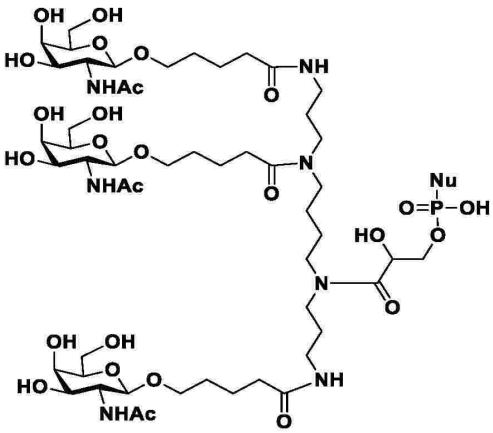
式（４１３）



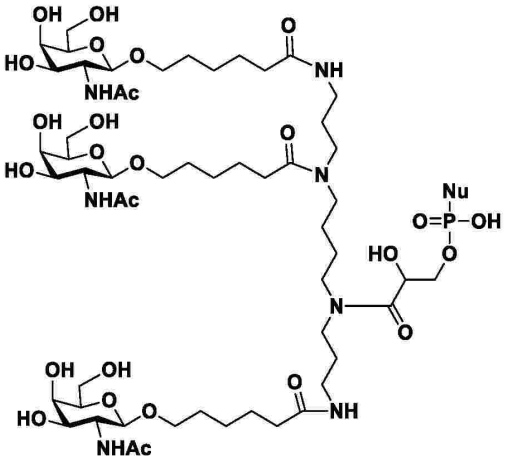
式（４１４）



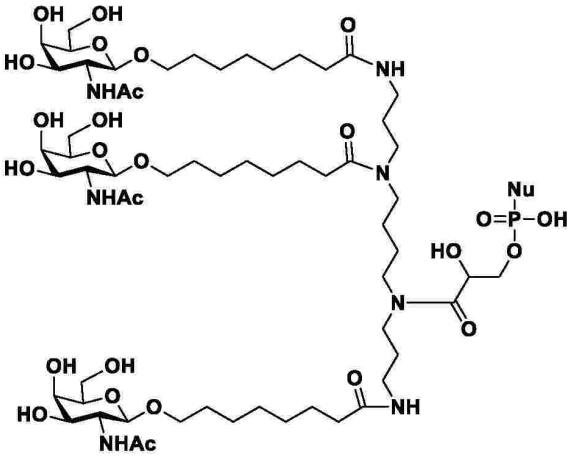
式（４１５）



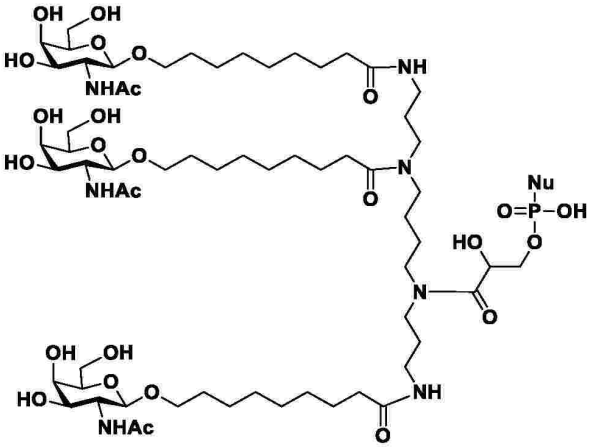
式（４１６）



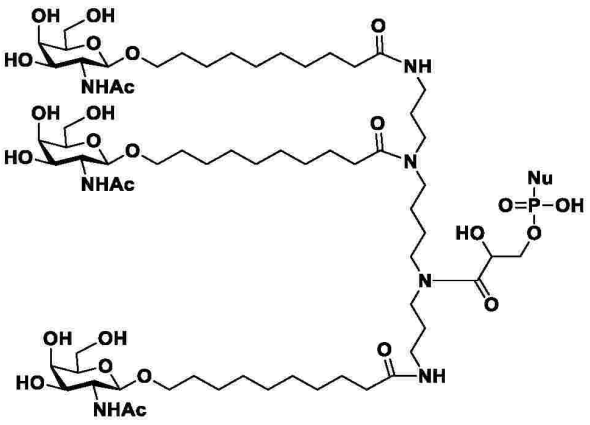
式（４１７）



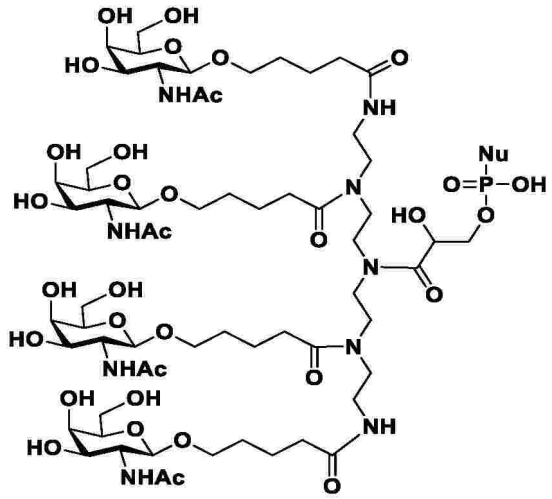
式（４１８）



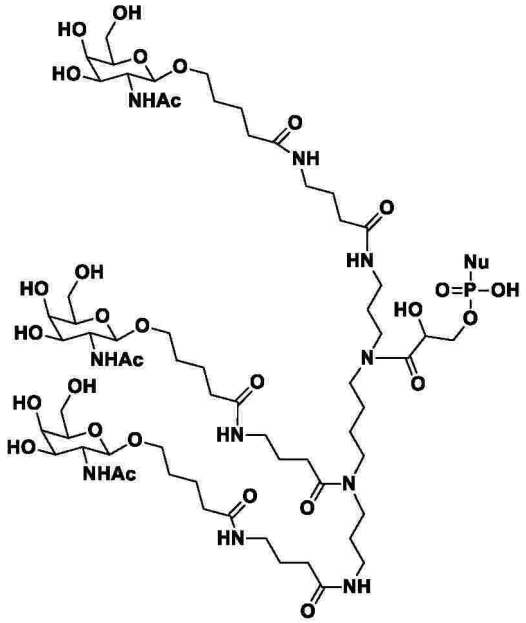
式（４１９）



式（４２０）



式（４２１）



式（４２２）。

【０１８８】

いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡ配列中の任意の可能な位置に結合されてもよく、例えば、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれか１個のヌクレオチドに結合されてもよく、いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖のいずれか１個のヌクレオチドに結合される。いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖又はアンチセンス鎖の端部に結合され、いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖の端部に結合される。前記端部とは、前記センス鎖又は前記アンチセンス鎖におけるその一端からの前の４個のヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖又はアンチセンス鎖の末端に結合され、いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖の３’末端に結合される。ｓｉＲＮＡのセンス鎖の上記位置に結合された場合、本開示により提供される複合体は、細胞に入り込んだ後、巻き戻されるときに、単独のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖を放出し、ＲＮＡｉメカニズムにより標的遺伝子の発現を抑制することができる。

【０１８９】

式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡ中のヌクレオチド上の任意の可能な位置、例えば、

ヌクレオチドの５’位、ヌクレオチドの２’位、ヌクレオチドの３’位又はヌクレオチドの塩基に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、リン酸ジエステル結合を形成することにより前記ｓｉＲＮＡ中のヌクレオチドの２’位、３’位又は５’位に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖の３’末端のヌクレオチドの３’ヒドロキシを脱水素した酸素原子に結合され、或いは、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖における１個のヌクレオチドの２’－ヒドロキシ中の水素を置換することによりヌクレオチドに結合され、或いは、式Ａ５９におけるＰは、ｓｉＲＮＡのセンス鎖の５’末端のヌクレオチドの５’ヒドロキシ中の水素を置換することによりヌクレオチドに結合される。

【０１９０】

いくつかの実施形態において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体に含まれるｓｉＲＮＡは、例えば、表１ａ、１ｂ又は１ｃに示される任意のｓｉＲＮＡであってもよい。これらのｓｉＲＮＡを含むｓｉＲＮＡ複合体は、低いオフターゲット効果と高いＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡに対する抑制活性を示す。

【０１９１】

表１ａ　本開示の第１種のｓｉＲＮＡ配列

【表１】

ｓｉＲＮＡ番号	ＳＥＱ　ＩＤ ＮＯ：	配列方向５’－３’
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１	１３	ＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	１４	ＵｍＵｆＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２	１５	ＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	１６	ＵｍＵｆＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１	１７	ＣｍＣｍＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	１８	ＵｍＵｆＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍＡｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２	１９	ＣｍＣｍＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	２０	ＵｍＵｆＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍＡｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１Ｓ	２１	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	２２	ＵｍｓＵｆｓＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２Ｓ	２３	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	２４	ＵｍｓＵｆｓＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１Ｓ	２５	ＣｍｓＣｍｓＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	２６	ＵｍｓＵｆｓＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍｓＡｍｓＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２Ｓ	２７	ＣｍｓＣｍｓＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	２８	ＵｍｓＵｆｓＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍｓＡｍｓＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１Ｐ１	２９	ＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	３０	Ｐ１ＵｍＵｆＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２Ｐ１	３１	ＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	３２	Ｐ１ＵｍＵｆＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１Ｐ１	３３	ＣｍＣｍＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	３４	Ｐ１ＵｍＵｆＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍＡｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２Ｐ１	３５	ＣｍＣｍＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	３６	Ｐ１ＵｍＵｆＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍＡｍＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ１ＳＰ１	３７	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	３８	Ｐ１ＵｍｓＵｆｓＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ１－Ｍ２ＳＰ１	３９	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	４０	Ｐ１ＵｍｓＵｆｓＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ１ＳＰ１	４１	ＣｍｓＣｍｓＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	４２	Ｐ１ＵｍｓＵｆｓＣＳＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍｓＡｍｓＧｍ
ｓｉＡＰＯＣ３ａ２－Ｍ２ＳＰ１	４３	ＣｍｓＣｍｓＣｍＡｍＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ
	４４	Ｐ１ＵｍｓＵｆｓＣｍＵｍＵＳＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍＧｍＧｍｓＡｍｓＧｍ

【０１９２】

表１ｂ　本開示の第２種のｓｉＲＮＡ配列

【表２】

siRNA番号	SEQ ID NO：	配列方向５’－３’
siAPOC3b1－M1	57	UmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	58	AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCm
siAPOC3b1－M2	59	UmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	60	AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCm
siAPOC3b2－M1	61	GmCmUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	62	AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmAmAm
siAPOC3b2－M2	63	GmCmUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	64	AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmAmAm
siAPOC3b1－M1S	65	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	66	AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsGmsCm
siAPOC3b1－M2S	67	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	68	AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsGmsCm
siAPOC3b2－M1S	69	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	70	AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsAmsAm
siAPOC3b2－M2S	71	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	72	AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsAmsAm
siAPOC3b1－M1P1	73	UmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	74	P1AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCm
siAPOC3b1－M2P1	75	UmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	76	P1AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCm
siAPOC3b2－M1P1	77	GmCmUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	78	P1AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmAmAm
siAPOC3b2－M2P1	79	GmCmUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	80	P1AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmAmAm
siAPOC3b1－M1SP1	81	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	82	P1AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsGmsCm
siAPOC3b1－M2SP1	83	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	84	P1AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsGmsCm
siAPOC3b2－M1SP1	85	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	86	P1AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsAmsAm
siAPOC3b2－M2SP1	87	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	88	P1AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsAmsAm

siAPOC3b3－M1	57	UmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	89	AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmUmUm
siAPOC3b3－M2	59	UmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	90	AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmUmUm
siAPOC3b4－M1	61	GmCmUmUmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	91	AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmUmUm
siAPOC3b4－M2	63	GmCmUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	92	AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmUmUm
siAPOC3b3－M1S	65	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	93	AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsUmsUm
siAPOC3b3－M2S	67	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	94	AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsUmsUm
siAPOC3b4－M1S	69	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	95	AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsUmsUm
siAPOC3b4－M2S	71	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	96	AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsUmsUm
siAPOC3b3－M1P1	73	UmUmAmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	97	P1AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmUmUm
siAPOC3b3－M2P1	75	UmUmAmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	98	P1AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmUmUm
siAPOC3b4－M1P1	77	GmCmUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	99	P1AmGfASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmUmUm
siAPOC3b4－M2P1	79	GmCmUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	100	P1AmGfAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmUmUm
siAPOC3b3－M1SP1	81	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	101	P1AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsUmsUm
siAPOC3b3－M2SP1	83	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	102	P1AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmsUmsUm
siAPOC3b4－M1SP1	85	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	103	P1AmsGfsASAmUmAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsUmsUm
siAPOC3b4－M2SP1	87	GmsCmsUmUmAmAmAmAmGfGfGfAmCmAmGmUmAmUmUmCmUm
	104	P1AmsGfsAmAmUSAfCmUmGmUmCmCmCmUfUmUfUmAmAmGmCmsUmsUm

【０１９３】

表１ｃ　本開示の第３種のｓｉＲＮＡ配列

【表３】

siRNA番号	SEQ ID NO：	配列方向５’－３’
siAPOC3c1－M1	１１７	GmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１１８	AmGfCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUm
siAPOC3c1－M2	１１９	GmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１２０	AmGfCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUm
siAPOC3c2－M1	１２１	AmGmGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１２２	AmGfCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmUmUm
siAPOC3c2－M2	１２３	AmGmGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１２４	AmGfCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUmUmUm
siAPOC3c1－M1S	１２５	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１２６	AmsGfsCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmsCmsUm
siAPOC3c1－M2S	１２７	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１２８	AmsGfsCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmsCmsUm
siAPOC3c2－M1S	１２９	AmsGmsGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１３０	AmsGfsCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUmsUmsUm
siAPOC3c2－M2S	１３１	AmsGmsGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１３２	AmsGfsCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUmsUmsUm
siAPOC3c1－M1P1	１３３	GmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１３４	P1AmGfCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUm
siAPOC3c1－M2P1	１３５	GmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１３６	P1AmGfCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUm
siAPOC3c2－M1P1	１３７	AmGmGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１３８	P1AmGfCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUmUmUm
siAPOC3c2－M2P1	１３９	AmGmGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１４０	P1AmGfCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUmUmUm
siAPOC3c1－M1SP1	１４１	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１４２	P1AmsGfsCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmsCmsUm
siAPOC3c1－M2SP1	１４３	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１４４	P1AmsGfsCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmsCmsUm
siAPOC3c2－M1SP1	１４５	AmsGmsGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１４６	P1AmsGfsCSAmCmUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUmsUmsUm
siAPOC3c2－M2SP1	１４７	AmsGmsGmGmAmCmAmGmUfAfUfUmCmUmCmAmGmUmGmCmUm
	１４８	P1AmsGfsCmAmCSUfGmAmGmAmAmUmAmCfUmGfUmCmCmCmUmsUmsUm

【０１９４】

ただし、大文字Ｃ、Ｇ、Ｕ、Ａは、ヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字ｍは、当該文字ｍの左側に隣接する１個のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字ｆは、当該文字ｆの左側に隣接する１個のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、下線で示される大文字Ｓは、当該文字Ｓの左側に隣接する１個のヌクレオチドが安定化修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字ｓは、当該文字ｓの左右の２個のヌクレオチド間がチオリン酸エステルにより結合されていることを表し、Ｐ１は、当該Ｐ１の右側に隣接する１個のヌクレオチドが５’－リン酸ヌクレオチド又は５’－リン酸アナログ修飾ヌクレオチドであることを表す。いくつかの実施形態において、Ｓ

は、具体的な安定化修飾、例えばｍｏｅを表し、下線で示される組合せ文字ｍｏｅは、当該組合せ文字ｍｏｅの左側に隣接する１個のヌクレオチドが２’－Ｏ－メトキシエチル修飾を有するヌクレオチドであることを表す。いくつかの実施形態において、Ｐ１は、具体的に修飾されたＶＰ、Ｐｓ又はＰであることを表し、組合せ文字ＶＰは、当該組合せ文字ＶＰの右側に隣接する１個のヌクレオチドがビニルリン酸エステル（５’－（Ｅ）－ｖｉｎｙｌｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ、Ｅ－ＶＰ）修飾ヌクレオチドであることを表し、組合せ文字Ｐｓは、当該組合せ文字Ｐｓの右側に隣接する１個のヌクレオチドがチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、大文字Ｐは、当該文字Ｐの右側に隣接する１個のヌクレオチドが５’－リン酸ヌクレオチドであることを表す。また、上記表１ａ～１ｃに示される配列中の各Ｕは、任意にＴで置換されてもよく、ｓｉＲＮＡの活性又はオフターゲット効果に明らかな影響を与えない。

【０１９５】

本開示のｓｉＲＮＡ複合体の調製

上記ｓｉＲＮＡ複合体は、従来技術において既に詳しく記載された方法により合成されてもよい。例えば、国際公開第２０１５００６７４０号には、複数種のｓｉＲＮＡ複合体の調製方法が詳しく記載されている。当業者によく知られている方法により、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を得ることもできる。例えば、国際公開第２０１４０２５８０５号には、式（３０５）に示される構造の調製方法が記載されており、Ｒａｊｅｅｖらは、ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ ２０１５，１６，９０３－９０８に式（３０７）に示される構造の調製方法を記載した。中国特許出願公開第１１０９５９０１１号明細書にも、式（３０８）に示されるｓｉＲＮＡ複合体の調製方法が詳細に開示されている。上記文献内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１９６】

本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、薬学的に許容される他の添加剤と併用してもよく、当該添加剤は、本分野で通常用いられる各種の製剤又は化合物のうちの１又は複数であってもよく、詳細については、上述した本開示の医薬組成物に関する記載を参照することができる。

【０１９７】

本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物及びｓｉＲＮＡ複合体の使用

いくつかの実施形態において、本開示は、本開示のｓｉＲＮＡ、及び／又は医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体の、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状を治療及び／又は予防する薬物の調製における使用を提供する。いくつかの実施形態において、前記ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状は、脂質異常症である。いくつかの実施形態において、前記脂質異常症は、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症又はアテローム性動脈硬化である。

【０１９８】

いくつかの実施形態において、本開示は、ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状の治療及び／又は予防方法を提供し、前記方法は、本開示のｓｉＲＮＡ、及び／又は医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を、それを必要とする被験体に投与することを含む。いくつかの実施形態において、前記ＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡレベルに関連する疾患又は症状は、脂質異常症である。いくつかの実施形態において、前記脂質異常症は、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症又はアテローム性動脈硬化である。

【０１９９】

いくつかの実施形態において、本開示は、細胞中のＡＰＯＣ３遺伝子の発現レベルの抑制方法を更に提供し、前記方法は、本開示のｓｉＲＮＡ、及び／又は医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡの有効量を前記細胞と接触させることを含む。

【０２００】

本開示により提供されるｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を、それ

を必要とする被験体に投与することで遺伝子の発現を調節するメカニズムにより、細胞中の特定の遺伝子の発現に起因する病理学的状態又は疾患を予防及び／又は治療するという目的を達成することができる。したがって、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体は、前記病理学的状態又は疾患の予防及び／又は治療に用いられてもよく、本明細書に記載の病理学的状態又は疾患を予防及び／又は治療する薬物の調製に用いられてもよい。

【０２０１】

本明細書で用いられる用語「薬剤投与／投与」とは、ｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を少なくとも部分的に所望の部位に局在化して所望の効果を生じさせる方法又は経路により、ｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を被験体の体内に入れることを指す。本開示の方法に適した投与経路は、局所投与と全身投与を含む。一般的には、局所投与により、被験体全身よりも多くのｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体が特定の部位に送達されるが、全身投与により、前記ｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体が被験体のほぼ全身に送達される。本開示が肝細胞中の特定の遺伝子の発現に起因する病理学的状態又は疾患の予防及び／又は治療手段を提供することを意図することを考慮すると、いくつかの実施形態において、薬物を肝臓に送達することができる投与方法である。

【０２０２】

本分野で既知の任意の適切な経路で被験体に投与することができ、前記経路は、経口投与又は胃腸外経路（非経口経路）、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、気管内投与（エアロゾル）、肺部投与、鼻部投与、直腸投与及び局所投与（口腔内投与と舌下投与を含む）を含むが、これらのみに限定されない。投与頻度は、１日、１週間、２週間、３週間、１ヶ月又は１年に１回若しくは複数回であってもよい。

【０２０３】

本開示に記載されたｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体の用量は、本分野における一般的な用量であってもよく、前記用量は、各種のパラメータ、特に被験体の年齢、体重及び性別により決定されてもよい。細胞培養又は実験動物で標準薬学的手順により毒性と治療効果を測定し、例えば、ＬＤ５０（５０％の群体を死亡させる用量）及びＥＤ$_{50}$（定量的反応において、５０％の最大反応強度を引き起こすことができる用量を指し、定性的反応において、５０％の実験対象に陽性反応が発生する場合の用量を指す）を測定してもよい。細胞培養分析及び動物研究により得られたデータに基づいてヒト用量の範囲を得ることができる。

【０２０４】

本開示に記載されたｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を投与する場合、例えば、雄性又は雌性、６～１２週齢、体重１８～２５ｇのＣ５７ＢＬ／６Ｊ又はＣ３Ｈ／ＨｅＮＣｒｌＶｒマウスに対して、前記ｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体中のｓｉＲＮＡの量として、ｓｉＲＮＡと薬学的に許容される複合分子とで形成されるｓｉＲＮＡ複合体について、そのｓｉＲＮＡの用量が０．００１～１００ｍｇ／ｋｇ体重であってもよく、いくつかの実施形態において、０．０１～５０ｍｇ／ｋｇ体重であり、更なる実施形態において、０．０５～２０ｍｇ／ｋｇ体重であり、より更なる実施形態において、０．１～１５ｍｇ／ｋｇ体重であり、また更なる実施形態において、０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重である。本開示に記載されたｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を投与する場合、上記用量が好ましい。

【０２０５】

また、本開示のｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を、特定の遺伝子が異常に発現する細胞に導入することにより、遺伝子の発現を調節するメカニズムにより、細胞中の当該特定の遺伝子の発現を抑制するという目的を達成することもできる。いくつかの実施形態において、前記細胞は、肝細胞である。いくつかの実施形態において、前記肝細胞は、Ｈｅｐ３Ｂ、ＨｅｐＧ２、Ｈｕｈ７などの肝癌細胞系から選択される細胞又は単離された初代肝細胞であってもよく、いくつかの実施形態において、初代肝細胞で

ある。
【０２０６】
本開示により提供される方法により、特定の遺伝子の細胞での発現を抑制し、提供されるｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又はｓｉＲＮＡ複合体中のｓｉＲＮＡの用量は、当業者が得ようとする効果に基づいて容易に確定するものである。例えば、いくつかの実施形態において、提供されるｓｉＲＮＡ複合体中のｓｉＲＮＡの用量は、一般的に、標的遺伝子の発現を低減でき、標的細胞表面では１ｐＭ～１μＭ、０．０１ｎＭ～１００ｎＭ、０．０５ｎＭ～５０ｎＭ、又は０．０５ｎＭ～約５ｎＭの細胞外濃度となる量である。当該局所濃度を達成するのに必要な量は、送達方法、送達部位、送達部位と標的細胞又は組織との間の細胞層の数、送達するのが局所か全身かなどを含む各種の因子により変化する。送達部位における濃度は、標的細胞又は組織の表面における濃度よりも顕著に高くてもよい。
【０２０７】
キット
本開示は、キットを提供し、前記キットは、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又はｓｉＲＮＡ複合体を含む。
【０２０８】
いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、ｓｉＲＮＡ、医薬組成物及び／又は複合体を１つの容器で提供することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、薬学的に許容される賦形剤を提供する容器を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットには、他の成分、例えば、安定化剤又は防腐剤などが含まれてもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、本明細書に記載されたｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又は複合体を提供する容器とは別の容器で少なくとも１種の他の治療剤を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットは、ｓｉＲＮＡ、医薬組成物、及び／又は複合体と薬学的に許容される担体及び／又は添加剤又は他の成分（存在する場合）を混合するための説明書を含んでもよい。
【０２０９】
本開示のキットにおいて、前記ｓｉＲＮＡ、薬学的に許容される担体及び／又は添加剤、並びに前記医薬組成物及び／又は複合体、及び／又は薬学的に許容される添加剤は、任意の形態、例えば液体形態、乾燥形態又は凍結乾燥形態で提供することができる。いくつかの実施形態において、前記ｓｉＲＮＡ及び薬学的に許容される担体及び／又は添加剤、並びに前記医薬組成物及び／又は複合体及び任意の薬学的に許容される添加剤は、基本的にクリーン及び／又は無菌である。いくつかの実施形態において、本開示のキットで無菌水を提供することができる。
【０２１０】
以下に実施例により本開示を更に説明するが、本開示は、これによって何ら制限されない。
【０２１１】
＜実施例＞
特に説明がない限り、以下の実施例で用いられる試薬、培地は、いずれも市販品であり、用いられる核酸電気泳動、ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ＰＣＲなどの操作は、いずれもＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９８９））に記載された方法を参照して行われる。
【０２１２】
調製例１～７：本開示により提供されるｓｉＲＮＡ複合体の合成
中国特許出願公開公報第１１０９５９０１１号明細書の調製例１に記載された調製方法により、以下の表２における複合体１～７を調製して得た。相違点は以下のみである。各ｓｉＲＮＡ複合体に含まれるｓｉＲＮＡのセンス鎖及びアンチセンス鎖がそれぞれ表２に示され、核酸配列中の、表２における番号が複合体１～複合体７であるｓｉＲＮＡの核酸

配列に従って、ｓｉＲＮＡのセンス鎖及びアンチセンス鎖をそれぞれ合成した。超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ超純水装置、抵抗率１８．２ＭΩ＊ｃｍ（２５℃））を用いて各ｓｉＲＮＡ複合体を濃度０．２ｍｇ／ｍＬ（ｓｉＲＮＡとして）に希釈した後、液体クロマトグラフィー質量分析計（ＬＣ－ＭＳ、Ｌｉｑｕｉｄ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ－Ｍａｓｓ　Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ、Ｗａｔｅｒｓ社から購入、型番：ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ）を用いて、分子量を検出した。実測値が理論値と一致しており、合成された複合体１～７が目的設計の二本鎖核酸配列であることが示された。各ｓｉＲＮＡ複合体は、それぞれ式（４０３）に示される構造を有し、かつ当該ｓｉＲＮＡ複合体に含まれるｓｉＲＮＡは、それぞれ表２における複合体１～７に対応するｓｉＲＮＡ配列を有する。例えば、複合体５の分子量（ｍｗ）のセンス鎖の理論値が７５８１．４２であり、実測値が７５８１．２２であり、アンチセンス鎖の理論値が６９４８．５５であり、実測値が６９４８．７２であり、実測値が理論値と一致しており、当該複合体が式（４０３）に示される構造を有し、かつ当該複合体が表２における複合体５に対応するｓｉＲＮＡ配列を有することが示された。

【０２１３】

表２　ｓｉＲＮＡ複合体中のｓｉＲＮＡ配列

【表４】

調製例の番号	ｓｉＲＮＡ番号	配列方向５’－３’		ＳＥＱＩＤＮＯ
調製例１	複合体１	センス鎖	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ	３７
		アンチセンス鎖	ＰＵｍｓＵｆｓＣ<u>ｍｏｅ</u>ＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ	１５１
調製例２	複合体２	センス鎖	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ	３９
		アンチセンス鎖	ＰＵｍｓＵｆｓＣｍＵｍＴ<u>ｍｏｅ</u>ＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ	１５２
調製例３	複合体３	センス鎖	ＵｍｓＵｍｓＡｍＡｍＡｍＡｍＧｆＧｆＧｆＡｍＣｍＡｍＧｍＵｍＡｍＵｍＵｍＣｍＵｍ	８１
		アンチセンス鎖	ＰＡｍｓＧｆｓＡ<u>ｍｏｅ</u>ＡｍＵｍＡｆＣｍＵｍＧｍＵｍＣｍＣｍＣｍＵｆＵｍＵｆＵｍＡｍＡｍｓＧｍｓＣｍ	１５３
調製例４	複合体４	センス鎖	ＵｍｓＵｍｓＡｍＡｍＡｍＡｍＧｆＧｆＧｆＡｍＣｍＡｍＧｍＵｍＡｍＵｍＵｍＣｍＵｍ	８３
		アンチセンス鎖	ＰＡｍｓＧｆｓＡｍＡｍＴ<u>ｍｏｅ</u>ＡｆＣｍＵｍＧｍＵｍＣｍＣｍＣｍＵｆＵｍＵｆＵｍＡｍＡｍｓＧｍｓＣｍ	１５４
調製例５	複合体５	センス鎖	ＵｍｓＵｍｓＡｍＡｍＡｍＡｍＧｆＧｆＧｆＡｍＣｍＡｍＧｍＵｍＡｍＵｍＵｍＣｍＵｍ	６５
		アンチセンス鎖	ＡｍｓＧｆｓＡ<u>ｍｏｅ</u>ＡｍＵｍＡｆＣｍＵｍＧｍＵｍＣｍＣｍＣｍＵｆＵｍＵｆＵｍＡｍＡｍｓＵｍｓＵｍ	１５５
調製例６	複合体６	センス鎖	ＧｍｓＧｍｓＡｍＣｍＡｍＧｍＵｆＡｆＵｆＵｍＣｍＵｍＣｍＡｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵｍ	１４１
		アンチセンス鎖	ＰＡｍｓＧｆｓＣ<u>ｍｏｅ</u>ＡｍＣｍＵｆＧｍＡｍＧｍＡｍＡｍＵｍＡｍＣｆＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍｓＣｍｓＵｍ	１５６
調製例７	複合体７	センス鎖	ＧｍｓＧｍｓＡｍＣｍＡｍＧｍＵｆＡｆＵｆＵｍＣｍＵｍＣｍＡｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵｍ	１４３
		アンチセンス鎖	ＰＡｍｓＧｆｓＣｍＡｍＣ<u>ｍｏｅ</u>ＵｆＧｍＡｍＧｍＡｍＡｍＵｍＡｍＣｆＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍｓＣｍｓＵｍ	１５７
比較調製例１	参照複合体１	センス鎖	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ	３７
		アンチセンス鎖	ＰＵｍｓＵｆｓＣｍＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ	１５８
比較調製例２	参照複合体２	センス鎖	ＵｍｓＵｍｓＡｍＡｍＡｍＡｍＧｆＧｆＧｆＡｍＣｍＡｍＧｍＵｍＡｍＵｍＵｍＣｍＵｍ	６５
		アンチセンス鎖	ＰＡｍｓＧｆｓＡｍＡｍＵｍＡｆＣｍＵｍＧｍＵｍＣｍＣｍＣｍＵｆＵｍＵｆＵｍＡｍＡｍｓＧｍｓＣｍ	１５９
比較調製例３	参照複合体３	センス鎖	ＧｍｓＧｍｓＡｍＣｍＡｍＧｍＵｆＡｆＵｆＵｍＣｍＵｍＣｍＡｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵｍ	１２５
		アンチセンス鎖	ＰＡｍｓＧｆｓＣｍＡｍＣｍＵｆＧｍＡｍＧｍＡｍＡｍＵｍＡｍＣｆＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍｓＣｍｓＵｍ	１６０
調製例８	ｓｉＲＮＡ１	センス鎖	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ	２１
		アンチセンス鎖	ＵｍｓＵｆｓＣｍｏｅＵｍＵｍＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ	２２
調製例９	ｓｉＲＮＡ２	センス鎖	ＣｍｓＡｍｓＡｍＵｍＡｍＡｍＡｆＧｆＣｆＵｍＧｍＧｍＡｍＣｍＡｍＡｍＧｍＡｍＡｍ	２３
		アンチセンス鎖	ＵｍｓＵｆｓＣｍＵｍＵｍｏｅＧｆＵｍＣｍＣｍＡｍＧｍＣｍＵｍＵｆＵｍＡｆＵｍＵｍＧｍｓＧｍｓＧｍ	２４
調製例１０	ｓｉＲＮＡ３	センス鎖	ＵｍｓＵｍｓＡｍＡｍＡｍＡｍＧｆＧｆＧｆＡｍＣｍＡｍＧｍＵｍＡｍＵｍＵｍＣｍＵｍ	６５
		アンチセン	ＡｍｓＧｆｓＡｍｏｅＡｍＵｍＡｆＣｍＵｍ	６６

		ス鎖	GmUmCmCmCmUfUmUfUmAm AmsGmsCm	
調製例１１	ｓｉＲＮＡ４	センス鎖	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGf AmCmAmGmUmAmUmUmCmUm	６７
		アンチセンス鎖	AmsGfsAmAmUmoeAfCmUm GmUmCmCmCmUfUmUfUmAm AmsGmsCm	６８
調製例１２	ｓｉＲＮＡ５	センス鎖	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGf AmCmAmGmUmAmUmUmCmUm	６５
		アンチセンス鎖	AmsGfsAmoeAmUmAfCmUm GmUmCmCmCmUfUmUfUmAm AmsUmsUm	９３
調製例１３	ｓｉＲＮＡ６	センス鎖	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUf UmCmUmCmAmGmUmGmCmUm	１２５
		アンチセンス鎖	AmsGfsCmoeAmCmUfGmAm GmAmAmUmAmCfUmGfUmCm CmsCmsUm	１２６
調製例１４	ｓｉＲＮＡ７	センス鎖	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUf UmCmUmCmAmGmUmGmCmUm	１２７
		アンチセンス鎖	AmsGfsCmAmCmoeUfGmAm GmAmAmUmAmCfUmGfUmCm CmsCmsUm	１２８
比較調製例４	参照ｓｉＲＮＡ１	センス鎖	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCf UmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	２１
		アンチセンス鎖	UmsUfsCUmUmGfUmCmCmA mGmCmUmUfUmAfUmUmGms GmsGm	１７１
比較調製例５	参照ｓｉＲＮＡ２	センス鎖	CmsAmsAmUmAmAmAfGfCf UmGmGmAmCmAmAmGmAmAm	２３
		アンチセンス鎖	UmsUfsCmUmUGfUmCmCmA mGmCmUmUfUmAfUmUmGms GmsGm	１７２
比較調製例６	参照ｓｉＲＮＡ３	センス鎖	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGf AmCmAmGmUmAmUmUmCmUm	６５
		アンチセンス鎖	AmsGfsAAmUmAfCmUmGmU mCmCmCmUfUmUfUmAmAms GmsCm	１７３
比較調製例７	参照ｓｉＲＮＡ４	センス鎖	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGf AmCmAmGmUmAmUmUmCmUm	６７
		アンチセンス鎖	AmsGfsAmAmUAfCmUmGmU mCmCmCmUfUmUfUmAmAms GmsCm	１７４
比較調製例８	参照ｓｉＲＮＡ５	センス鎖	UmsUmsAmAmAmAmGfGfGf AmCmAmGmUmAmUmUmCmUm	６５
		アンチセンス鎖	AmsGfsAAmUmAfCmUmGmU mCmCmCmUfUmUfUmAmAms UmsUm	１７５
比較調製例９	参照ｓｉＲＮＡ６	センス鎖	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUf UmCmUmCmAmGmUmGmCmUm	１２５
		アンチセンス鎖	AmsGfsCAmCmUfGmAmGmA mAmUmAmCfUmGfUmCmCms CmsUm	１７６
比較調製例１０	参照ｓｉＲＮＡ７	センス鎖	GmsGmsAmCmAmGmUfAfUf UmCmUmCmAmGmUmGmCmUm	１２７
		アンチセンス鎖	AmsGfsCmAmCUfGmAmGmA mAmUmAmCfUmGfUmCmCms CmsUm	１７７

【０２１４】

ここで、大文字Ｃ、Ｇ、Ｕ、Ａ、Ｔは、ヌクレオチドの塩基組成を表し、小文字ｍは、当該文字ｍの左側に隣接する１個のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字ｆは、当該文字ｆの左側に隣接する１個のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、下線で示された組合せ文字ｍｏｅは、当該組合せ文字ｍｏｅの左側に隣接する１個のヌクレオチドがリボース２’－Ｏ－メトキシエチル修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字ｓは、当該文字ｓの左右の２個のヌクレオチド間がチオフォスフェートにより結合されていることを表し、Ｐは、当該文字Ｐの右側の１個のヌクレオチドが５’－リン酸ヌクレオチドであることを表す。

【０２１５】

比較調製例１－３：参照ｓｉＲＮＡ複合体の合成

中国特許出願公開公報第１１０９５９０１１号明細書の調製例１に記載の調製方法により、以下の表２における番号が参照複合体１～３である参照ｓｉＲＮＡ複合体を調製したが、各参照ｓｉＲＮＡ複合体に含まれるｓｉＲＮＡのセンス鎖及びアンチセンス鎖がそれ

ぞれ表２に示され、以下の表２における番号が参照複合体１～３であるｓｉＲＮＡの核酸配列に従って、ｓｉＲＮＡのセンス鎖及びアンチセンス鎖をそれぞれ合成したことのみが異なる。超純水（Ｍｉｌｌｉ－Ｑ超純水装置、抵抗率１８．２ＭΩ＊ｃｍ（２５℃））を用いて各参照ｓｉＲＮＡ複合体を濃度０．２ｍｇ／ｍＬ（ｓｉＲＮＡとして）に希釈した後、液体クロマトグラフィー質量分析計（ＬＣ－ＭＳ、Ｌｉｑｕｉｄ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ－Ｍａｓｓ　Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ、Ｗａｔｅｒｓ社から購入、型番：ＬＣＴ　Ｐｒｅｍｉｅｒ）を用いて、分子量を検出した。実測値が理論値と一致しており、合成された参照複合体１～３がそれぞれ目的設計の二本鎖核酸配列を有することが示された。各参照ｓｉＲＮＡ複合体は、式（４０３）に示される構造を有し、かつ含まれるｓｉＲＮＡは、それぞれ表２における参照複合体１～３に対応するｓｉＲＮＡ配列を有し、これらのｓｉＲＮＡ配列には安定化修飾ヌクレオチドが含まれていない。

【０２１６】

比較調製例４：参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣの合成

国際公開第２０１９１０５４１８号の調製例１に記載された方法により、固相合成方法で以下の参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣを合成したが、ＤＥＰＣ水を用いて、互いに相補的なＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６１に示されるセンス鎖及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６２に示されるアンチセンス鎖を等モル溶解し、その後にアニーリングして参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣを得たことのみが異なる。

【０２１７】

５’－ＵｍｓＵｍｓＣｍＵｍＣｍＣｍＧｆＡｆＡｆＣｍＧｍＵｍＧｍＵｍＣｍＡｍＣｍＧｍＵｍ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６１）、

５’－ＡｍｓＣｆｓＧｍＵｍＧｍＡｆＣｍＡｍＣｍＧｍＵｍＵｍＣｍＧｆＧｍＡｆＧｍＡｍＡｍｓＣｍｓＵｍ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６２）。

【０２１８】

調製例８～１４：本開示により提供されるｓｉＲＮＡの合成

国際公開第２０１９１０５４１８号の調製例１に記載された方法により、固相合成方法で表２に示されるｓｉＲＮＡ配列をそれぞれ合成したが、ＤＥＰＣ水を用いて、表２における互いに相補的なセンス鎖とアンチセンス鎖を等モル溶解し、その後にアニーリングして、配列が表２に示されている、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ１～ｓｉＲＮＡ７を得たことのみが異なる。

【０２１９】

比較調製例４～１０

調製例８～１４と同じ方法により、参照ｓｉＲＮＡ１～参照ｓｉＲＮＡ７を調製した。

【０２２０】

実験例１：マウスでのｓｉＲＮＡ複合体の毒性効果

複合体１、複合体２及び参照複合体１をそれぞれＰＢＳで１０ｍｇ／ｍｌの溶液（ｓｉＲＮＡ複合体として）に溶解した。ＩＣＲマウス（雌雄半々、体重１８～２２ｇ、５～６週齢、斯貝福公司から購入）をランダムに群分けし、１群当たり６匹のマウス（雌雄半々）とし、それぞれ番号を付けた。試験群として、各マウスに上記ｓｉＲＮＡ複合体溶液を１０ｍＬ／ｋｇの投与体積で項部皮下注射の方式で投与し、また、ブランク対照群として、１群の各マウスにＰＢＳを１０ｍＬ／ｋｇの投与体積で投与した。

【０２２１】

投与時点を１日目とし、８日目に試験群及びブランク対照群の各マウスに対して眼窩から０．６ｍＬの採血量で採血し、採血した後、３７℃で６０ｍｉｎインキュベートし、そして４℃で、３０００ｒｐｍの回転数で１５ｍｉｎ遠心分離して血清を得た。更に、ＰＭ１Ｐ０００／３全自動血清生化学分析装置（ＳＡＢＡ、イタリア）を用いて血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の濃度を検出した。結果を表１に示す。

【０２２２】

更に、８日目に採血した後、マウスを致死させて剖検し、１０％の中性緩衝ホルマリン

固定液中で保存して病理切片を作製した。病理切片における、肝脂肪変性及び炎症の重症度を評価して等級付けした。

【０２２３】

表１　ｓｉＲＮＡ複合体を投与したマウスの血液生化学的結果

【表５】

実験群	参照複合体１	複合体１	複合体２
用量	１００ｍｇ／ｋｇ	１００ｍｇ／ｋｇ	１００ｍｇ／ｋｇ
ＡＬＴ	４２０％	１１６％	１１８％
ＡＳＴ	１２６％	－	３２％

【０２２４】

表１において、％及びその前の数字は、マウス血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）又はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の濃度とブランク対照群の血清中の濃度との差の、ブランク対照群の血清中の濃度に対する百分率を表す。例えば、表１における４２０％は、参照複合体１を１００ｍｇ／Ｋｇで投与したマウスのインビボでのアラニンアミノトランスフェラーゼの濃度がブランク対照群よりも４２０％高いことを表す。

【０２２５】

表１の結果から分かるように、ブランク対照と比較して、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体１を投与したマウスは、明らかな血液生化学的指標の変化を示し、ＡＬＴの濃度が４２０％上昇し、ＡＳＴの濃度が１２６％上昇した。本開示のｓｉＲＮＡ複合体１又は２を投与したマウスにおいて、ＡＬＴの濃度は、それぞれ１１６％及び１１８％だけ上昇し、ＡＳＴの濃度は、３２％だけ上昇し、顕著に低下した血液生化学的指標を示した。

【０２２６】

病理切片の結果から分かるように、ブランク対照と比較して、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体１を投与した６匹のマウスのうち、１匹のマウスが中程度の肝細胞炎症反応を示し、具体的な症状としては、その肝小葉には少量のびまん性炎症性細胞浸潤が見られ、肝洞には線維細胞のびまん性増殖が見られ、３匹のマウスが軽度の肝細胞炎症反応のみを示し、局所的な肝小葉には炎症性細胞の小巣状浸潤が見られ、１匹のマウスが局所的な肝小葉の炎症性壊死と個別の肝細胞の点状壊死を示した。本開示の複合体１を投与したマウスのうち、２匹のマウスのみが軽度の肝細胞炎症反応を示し、少量の炎症性細胞浸潤が見られ、中程度以上の炎症反応及び壊死が示されなかった。本開示の複合体２を投与したマウスのうち、１匹のマウスのみが軽度の肝細胞炎症反応を示し、中程度以上の炎症反応及び壊死が示されなかった。参照複合体１と比較して、複合体１及び２は、顕著に低い毒性反応を示した。

【０２２７】

上記結果から明らかなように、参照複合体と比較して、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、オフターゲット効果による肝毒性反応を効果的に低下させることができるため、脂質異常症関連疾患又は症状の治療及び／又は予防のための薬物の調製において、顕著に高い安全性を示し、優れた開発の見通しを有する。

【０２２８】

実験例２：マウスでのｓｉＲＮＡ複合体の毒性効果

複合体６、複合体７及び参照複合体３をそれぞれＰＢＳで１０ｍｇ／ｍｌ及び３０ｍｇ／ｍｌの溶液（ｓｉＲＮＡ複合体として）に溶解した。ＩＣＲマウス（雄雌半々、体重１８～２２ｇ、５～６週齢、斯貝福公司から購入）をランダムに群分けし、それぞれ番号を

付けた。各濃度の各複合体について、２週間群と４週間群の２群の動物に分け、１群当たり６匹のマウス（雌雄半々）とした。試験群として、各マウスに上記ｓｉＲＮＡ複合体溶液を１０ｍＬ／ｋｇの投与体積で項部皮下注射の方式で投与し、また、それぞれブランク対照群の２週間群又は４週間群として、２群の各マウスにＰＢＳを１０ｍＬ／ｋｇの投与体積で投与した。

【０２２９】

投与時点を１日目とし、１５日目後、３００ｍｇ／ｋｇ濃度の複合体の２週間群の６匹のマウスを致死させて剖検し、それぞれ１０％の中性緩衝ホルマリン固定液中で保存して病理切片を作製した。２９日目に試験群及びブランク対照群の４週間群における６匹のマウスに対してそれぞれ眼窩から０．６ｍＬの採血量で採血し、採血した後、３７℃で６０ｍｉｎインキュベートし、そして４℃で、３０００ｒｐｍの回転数で１５ｍｉｎ遠心分離して血清を得た。更に、ＰＭ１Ｐ０００／３全自動血清生化学分析装置（ＳＡＢＡ、イタリア）を用いて血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の濃度を検出し、かつブランク対照群と対照し、結果を表２に示す。病理切片における、炎症性細胞浸潤と肝細胞壊死の重症度を評価して等級付けし、相対比較を行った。

【０２３０】

表２　ｓｉＲＮＡ複合体を投与したマウスの血液生化学的結果

【表６】

実験群		参照複合体３		複合体６		複合体７	
用量		１００ｍｇ／ｋｇ	３００ｍｇ／ｋｇ	１００ｍｇ／ｋｇ	３００ｍｇ／ｋｇ	１００ｍｇ／ｋｇ	３００ｍｇ／ｋｇ
ＡＬＴ	Ｄ２９	－	Ｆ：２１２％	－	－	－	Ｆ：１３０％
ＡＳＴ	Ｄ２９	－	Ｆ：３６％	－	－	－	Ｆ：３２％

【０２３１】

表２において、Ｆは、雌性マウスを表し、％及びその前の数字は、マウス血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）又はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の濃度とブランク対照群の血清中の濃度との差の、ブランク対照群の血清中の濃度に対する百分率を表す。例えば、表２におけるＦ：２１２％は、参照複合体３を３００ｍｇ／Ｋｇで投与した雌性マウスのインビボでのアラニンアミノトランスフェラーゼの濃度がブランク対照群よりも２１２％高いことを表す。

【０２３２】

表２の結果から分かるように、ブランク対照と比較して、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体３を投与したマウスは、明らかな血液生化学的指標の変化を示し、３００ｍｇ／Ｋｇの高用量で、雌性マウスのインビボでのＡＬＴ及びＡＳＴの濃度は、それぞれ２１２％及び３６％上昇した。同じ用量で、本開示の複合体７を投与した雌性マウスのインビボでのＡＬＴ及びＡＳＴの濃度は、それぞれ１３０％及び３２％上昇し、参照複合体３と比較して、ＡＬＴの濃度は、明らかに低下し、本開示の複合体６を投与したマウスのインビボでのＡＬＴ及びＡＳＴの濃度の上昇は、見られていないが、参照複合体３と比較して、血液生化学的指標の変化程度は、明らかに低下した。

【０２３３】

病理切片の結果から分かるように、ブランク対照と比較して、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体３を投与したマウスは、明らかな肝炎症反応を示し、６匹のマウス

は、いずれも炎症性細胞浸潤を示した。複合体６を投与したマウスのうち、３匹のマウスのみが炎症性細胞浸潤を示した。複合体７を投与したマウスのうち、３匹のマウスのみが炎症性細胞浸潤を示した。参照複合体と比較して、本開示の複合体の場合に、炎症性細胞浸潤を示すマウスの数も組織病理学的に顕著に減少した。

【０２３４】

上記結果から明らかなように、参照複合体と比較して、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、オフターゲット効果による肝毒性反応を効果的に低下させることができるため、脂質異常症関連疾患又は症状の治療及び／又は予防のための薬物の調製において、顕著に高い安全性を示し、優れた開発の見通しを有する。

【０２３５】

実験例３：マウスでのｓｉＲＮＡ複合体の毒性効果

実験例２の方法により、マウスでのｓｉＲＮＡ複合体の毒性効果を検証したが、複合体３及び参照複合体２を用いて試験したことのみが異なる。複合体をそれぞれＰＢＳで１０ｍｇ／ｍｌの溶液（ｓｉＲＮＡ複合体として）に溶解し、２週間群及び４週間群（表１９において、それぞれＤ１５群及びＤ２９群とした）に分け、１群当たり３匹のマウスとし、いずれも雄性とする。即ち、マウスでの１００ｍｇ／ｋｇの用量の複合体１３及び参照複合体２の毒性効果を試験した。

【０２３６】

表３　ｓｉＲＮＡ複合体を投与したマウスの血液生化学的結果

【表７】

実験群		参照複合体２	複合体３
用量		１００ｍｇ／ｋｇ	１００ｍｇ／ｋｇ
ＡＬＴ	Ｄ１５	７１％	－
	Ｄ２９	１１８％	－
ＡＳＴ	Ｄ１５	５４％	－
	Ｄ２９	９４％	－

【０２３７】

表３において、％及びその前の数字は、マウス血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）又はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の濃度とブランク対照群の血清中の濃度との差の、ブランク対照群の血清中の濃度に対する百分率を表す。

【０２３８】

表３の結果から分かるように、ブランク対照と比較して、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体２を投与したマウスは、明らかな血液生化学的指標の変化を示し、投与後１５日目に、血清中のＡＬＴ及びＡＳＴの濃度は、それぞれ７１％及び５４％上昇し、投与後２９日目に、血清中のＡＬＴ及びＡＳＴの濃度は、それぞれ１１８％及び９４％上昇した。複合体３を同じ用量で投与したマウスにおいて、血清中のＡＬＴ及びＡＳＴ濃度の上昇は、見られなかった。本開示の複合体３は、顕著に低い血液生化学的指標を示す。

【０２３９】

病理切片の結果から分かるように、ブランク対照と比較して、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体２を投与したマウスのうち、１匹のマウスが組織病理学的結果において重度の肝細胞変性を示し、具体的な症状としては、肝細胞が広範囲に腫れ、細胞質が緩んで薄く染色されており、一部の肝細胞が空胞変性を伴い、細胞質内に小さな丸い空胞が見られ、２匹が中程度の肝細胞変性を示し、具体的な症状としては、多数から広範な肝

細胞の細胞質が緩んでおり、一部の肝細胞が空胞変性を伴い、細胞質内に小さな丸い空胞が見られた。本開示のｓｉＲＮＡ複合体３を投与したマウスのうち、３匹のマウスが軽度の肝細胞変性を示し、細胞質が緩んでいる肝細胞の数がより少ない。参照複合体と比較して、肝細胞の変性程度が組織病理学的に明らかに低下し、顕著に低い毒性反応を示した。

【０２４０】

上記結果から明らかなように、参照複合体と比較して、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、オフターゲット効果による肝毒性反応を効果的に低下させることができるため、脂質異常症関連疾患又は症状の治療及び／又は予防のための薬物の調製において、顕著に高い安全性を示し、優れた開発の見通しを有する。

【０２４１】

実験例４：マウスでのｓｉＲＮＡ複合体の毒性効果

複合体３及び複合体５をそれぞれＰＢＳで３０ｍｇ／ｍｌの溶液（ｓｉＲＮＡ複合体として）に溶解した。ＩＣＲマウス（雌雄半々、体重１８～２２ｇ、５～６週齢、斯貝福公司から購入）をランダムに群分けし、１群当たり１０匹のマウス（雌雄半々）とし、それぞれ番号を付けた。試験群として、各マウスに上記ｓｉＲＮＡ複合体溶液を１０ｍＬ／ｋｇの投与体積で項部皮下注射の方式で投与し、また、ブランク対照群として、１群の各マウスにＰＢＳを１０ｍＬ／ｋｇの投与体積で投与した。

【０２４２】

初回投与時点を１日目とし、８日目と１５日目にそれぞれ各マウスに繰り返して投与し、用いられたｓｉＲＮＡ複合体溶液（又はＰＢＳ）の濃度と投与体積は、初回投与と同じである。１６日目に試験群及びブランク対照群の各マウスに対して眼窩から０．６ｍＬの採血量で採血し、採血した後、３７℃で６０ｍｉｎインキュベートし、そして４℃で、３０００ｒｐｍの回転数で１５ｍｉｎ遠心分離して血清を得た。更に、ＰＭ１Ｐ０００／３全自動血清生化学分析装置（ＳＡＢＡ、イタリア）を用いて血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の濃度を検出した。結果を図１Ａ、図１Ｂに示す。

【０２４３】

図１Ａ、図１Ｂは、それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを毎週３００ｍｇ／ｋｇで３週間連続投与した後の、マウス血清中のＡＬＴ及びＡＳＴ濃度の散布図である。図１Ａ及び図１Ｂから分かるように、ブランク対照群と比較して、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を投与した後、血清中のＡＬＴ及びＡＳＴの濃度は、ブランク対照群のレベルと同等であり、本開示のｓｉＲＮＡ複合体が非常に低い肝毒性を有することが示された。

【０２４４】

更に、採血した後、マウスを致死させて剖検し、１０％の中性緩衝ホルマリン固定液中で保存して病理切片を作製し、相対比較を行った。病理切片から分かるように、本開示のｓｉＲＮＡ複合体３又は複合体５を投与したマウスは、肝脂肪変性及び炎症のいずれにおいてもブランク対照群に近い反応を示し、顕著な異常がない。同様に、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、非常に低い肝毒性を有することが示された。

【０２４５】

上記結果から明らかなように、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、オフターゲット効果による肝毒性反応を効果的に低下させることができるため、脂質異常症関連疾患又は症状の治療及び／又は予防のための薬物の調製において、顕著に高い安全性を示し、優れた開発の見通しを有する。

【０２４６】

実験例４：インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系におけるｓｉＲＮＡ複合体の抑制活性

本実験例において、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系を用いて、複合体１、複合体２、複合体３、複合体４、複合体６、複合体７、参照複合体１、参照複合体２、参照複合体３又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣのインビトロｓｉｃｈｅｃｋ系における目的配列抑制活性を検出した。

【０２４７】

［１］検出プラスミドの構築

ｐｓｉＣＨＥＣＫ^{TM}－２（Ｐｒｏｍｅｇａ^{TM}）プラスミドを用いて検出プラスミドを構築し、前記プラスミドに１つの目的配列１、即ちｓｉＲＮＡ標的配列が含まれる。試験対象のｓｉＲＮＡ複合体について、目的配列１を以下に示す。

【０２４８】

ＴＧＣＴＣＡＧＴＴＣＡＴＣＣＣＴＡＧＡＧＧＣＡＧＣＴＧＣＴＣＣＡＧＧＡＡＣＡＧＡＧＧＴＧＣＣＡＴＧＣＡＧＣＣＣＣＧＧＧＴＡＣＴＣＣＴＴＧＴＴＧＴＴＧＣＣＣＴＣＣＴＧＧＣＧＣＴＣＣＴＧＧＣＣＴＣＴＧＣＣＣＧＡＧＣＴＴＣＡＧＡＧＧＣＣＧＡＧＧＡＴＧＣＣＴＣＣＣＴＴＣＴＣＡＧＣＴＴＣＡＴＧＣＡＧＧＧＴＴＡＣＡＴＧＡＡＧＣＡＣＧＣＣＡＣＣＡＡＧＡＣＣＧＣＣＡＡＧＧＡＴＧＣＡＣＴＧＡＧＣＡＧＣＧＴＧＣＡＧＧＡＧＴＣＣＣＡＧＧＴＧＧＣＣＣＡＧＣＡＧＧＣＣＡＧＧＧＧＣＴＧＧＧＴＧＡＣＣＧＡＴＧＧＣＴＴＣＡＧＴＴＣＣＣＴＧＡＡＡＧＡＣＴＡＣＴＧＧＡＧＣＡＣＣＧＴＴＡＡＧＧＡＣＡＡＧＴＴＣＴＣＴＧＡＧＴＴＣＴＧＧＧＡＴＴＴＧＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＧＡＣＣＡＡＣＴＴＣＡＧＣＣＧＴＧＧＣＴＧＣＣＴＧＡＧＡＣＣＴＣＡＡＴＡＣＣＣＣＡＡＧＴＣＣＡＣＣＴＧＣＣＴＡＴＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＡＧＣＴＣＣＴＴＧＧＧＴＣＣＴＧＣＡＡＴＣＴＣＣＡＧＧＧＧＣＴＧＣＣＣＣＴＧＴＡＧＧＴＴＧＣＴＴＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＴＡＴＴＣＴＣＡＧＴＧＣＴＣＴＣＣＴＡＣＣＣＣＡＣＣＴＣＡＴＧＣＣＴＧＧＣＣＣＣＣＣＴＣＣＡＧＧＣＡＴＧＣＴＧＧＣＣＴＣＣＣＡＡＴＡＡＡＧＣＴＧＧＡＣＡＡＧＡＡＧＣＴＧＣＴＡＴＧ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６３）

【０２４９】

当該目的配列１は、検出されたｓｉＲＮＡの標的ヒトＡＰＯＣ３遺伝子によって発現されるｍＲＮＡ中の１つのヌクレオチド配列であるため、各ｓｉＲＮＡ複合体の目的配列１に対する抑制効果は、検出されたｓｉＲＮＡ複合体中のｓｉＲＮＡのＡＰＯＣ３遺伝子発現抑制能力を反映することができる。目的配列１及びその相補的な配列をｐｓｉＣＨＥＣＫ^{TM}－２プラスミドのＸｈｏ　Ｉ／Ｎｏｔ　Ｉ部位にクローニングした。

【０２５０】

［２］トランスフェクション

２０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ、Ｈｙｃｌｏｎｅ社）及び０．２体積％のペニシリン－ストレプトマイシン（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ、Ｇｉｂｃｏ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を添加したＤＭＥＭ完全培地（Ｈｙｃｌｏｎｅ社）でＨＥＫ２９３Ａ細胞（南京科佰生物技術有限公司から購入）を３７℃で５％CO_2／９５％空気含有インキュベーターにおいて培養した。

【０２５１】

ＨＥＫ２９３Ａ細胞を８×１０^{3}個の細胞／ウェルで９６ウェルプレートに接種し、１６時間後に細胞増殖密度が７０～８０％に達したとき、培養ウェル中のＨ－ＤＭＥＭ完全培地を全て吸引し、各ウェルに８０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地（ＧＩＢＣＯ社）を添加して培養を１．５時間継続した。

【０２５２】

ＤＥＰＣ水を用いて上記検出プラスミドを希釈して２００ｎｇ／μＬの検出プラスミド希釈標準溶液とし、ＤＥＰＣ水を用いて以下のｓｉＲＮＡ複合体中のそれぞれ又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣを調製してそれぞれ１０ｎＭ、３ｎＭ、１ｎＭの計３種類の異なる濃度（ｓｉＲＮＡとして）のｓｉＲＮＡ複合体希釈標準溶液又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣ希釈標準溶液とし、用いられるｓｉＲＮＡ複合体は、それぞれ上記調製で得られた複合体１、複合体２、複合体３、複合体４、複合体６、複合体７、参照複合体１、参照複合体２、参照複合体３である。

【０２５３】

各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣについて、１Ａ１～１Ａ３溶液をそれぞれ調製し、１部の１Ａ１～１Ａ３溶液は、それぞれ１μＬの上記３種類の濃度のｓｉＲＮＡ複合体希釈標準溶液又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣ希釈標準溶液、０．０５μＬの検出プラスミド希釈標準溶液（検出プラスミド１０ｎｇを含む）及び１０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ

培地を順に含む。
【０２５４】
１Ｂ溶液を調製し、１部の１Ｂ溶液は、０．２μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ™２０００及び１０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を含む。
【０２５５】
１Ｃ溶液を調製し、１部の１Ｃ溶液は、０．０５μＬの検出プラスミド希釈標準溶液（検出プラスミド１０ｎｇを含む）及び１０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を含む。
【０２５６】
それぞれ１部の１Ｂ溶液を１部の得られた各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣの１Ａ１～１Ａ３溶液と混合し、それぞれ室温で２０ｍｉｎインキュベートして、各ｓｉＲＮＡ複合体及び参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣのトランスフェクション複合体１Ｘ１～１Ｘ３溶液を得た。
【０２５７】
１部の１Ｂ溶液を１部の１Ｃ溶液と混合し、室温で２０ｍｉｎインキュベートして、ブランクトランスフェクション複合体１Ｘ４を得た。
【０２５８】
培養ウェルに、各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣのトランスフェクション複合体１Ｘ１～１Ｘ３をそれぞれ２０μＬ／ウェルの添加量で添加して均一に混合し、各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣの、最終濃度がそれぞれ約０．１ｎＭ、０．０３ｎＭ及び０．０１ｎＭ（ｓｉＲＮＡとして）であるトランスフェクション複合体を得て、各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣのトランスフェクション複合体１Ｘ１～１Ｘ３をそれぞれ３つの培養ウェルにトランスフェクションし、ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣを含むコトランスフェクション混合物を得て、試験群とした。
【０２５９】
各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣについて、他の３つの培養ウェルに、トランスフェクション複合体１Ｘ４をそれぞれ２０μＬ／ウェルの添加量で添加し、ｓｉＲＮＡを含まないトランスフェクション混合物を得て、ブランク対照群とした。
【０２６０】
ｓｉＲＮＡを含むコトランスフェクション混合物とｓｉＲＮＡを含まないコトランスフェクション混合物をそれぞれ培養ウェルに４時間トランスフェクションした後、各ウェルに２０％のＦＢＳを含むＨ－ＤＭＥＭ完全培地を１００μＬ追加した。９６ウェルプレートをCO_2インキュベーターに置いて培養を２４時間継続した。
【０２６１】
［３］検出
培養ウェル中の培地を吸引し、各ウェルに１５０μＬのＤｕａｌ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ試薬とＨ－ＤＭＥＭ混合溶液（体積比１：１）を添加し、十分かつ均一に混合し、室温で１０ｍｉｎインキュベートした後、１２０μＬの混合溶液を９６ウェルのマイクロプレートに移し、Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＩＩ多機能マイクロプレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ社）を用いて９６ウェルのマイクロプレートの各培養ウェル中のＦｉｒｅｆｌｙ化学発光値（Ｆｉｒ）を読み取り、更に９６ウェルのマイクロプレートの各ウェルに６０μＬのＤｕａｌ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｓｔｏｐ　＆　Ｇｌｏ（登録商標）試薬を添加し、十分かつ均一に混合し、室温で１０ｍｉｎインキュベートした後、Ｆｉｒを読み取る並び順に従って、マイクロプレートリーダーを用いて９６ウェルのマイクロプレートの各培養ウェル中のＲｅｎｉｌｌａの化学発光値（Ｒｅｎ）を読み取った。
【０２６２】
９６ウェルのマイクロプレートの各ウェルの発光比Ｒａｔｉｏ＝Ｒｅｎ／Ｆｉｒを計算し、各試験群又は対照群の発光比Ｒａｔｉｏ（試験）又はＲａｔｉｏ（対照）は、３つの培養ウェルＲａｔｉｏの平均値であり、対照群の発光比を基準とし、各試験群の発光比を正規化し、Ｒｅｎｉｌｌａレポーター遺伝子の相対的発現レベル、即ち、残留活性を示すためのＲａｔｉｏ（試験）／Ｒａｔｉｏ（対照）の比Ｒを得た。目的配列１に対する各ｓ

ｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣの抑制率＝（１－Ｒ）×１００％。

【０２６３】

目的配列１に対する各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣの抑制効果を図２に示す。図２は、目的配列１を含むプラスミドと試験対象のｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣをコトランスフェクションした後の、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系における目的配列１の相対的発現レベルのヒストグラムである。更に、目的配列１に対する各ｓｉＲＮＡ複合体又は参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣの発現抑制率を表３にまとめた。

【０２６４】

表４　インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系における目的配列１の発現抑制率

【表８】

ｓｉＲＮＡ複合体の番号（参照ｓｉＲＮＡの番号）	目的配列４の発現抑制率（％）		
	０．１ｎＭ	０．０３ｎＭ	０．０１ｎＭ
複合体６	８５．１７	６６．６４	３８．９２
複合体７	８８．３２	７４．６１	５２．０８
参照複合体３	８８．８０	７３．８１	４５．１２
複合体３	８８．７２	７７．９０	５５．５２
複合体４	８８．５０	７７．８５	５２．６１
参照複合体２	９１．０４	８２．４７	６４．６５
複合体１	８９．３５	８３．３３	６７．５４
複合体２	８４．７３	７４．３６	５０．１３
参照複合体１	８６．２０	７８．９５	５９．６９
参照ｓｉＲＮＡ　ＮＣ	３．１５	－１１．５６	８．６８

【０２６５】

図２及び表４の結果から分かるように、本開示により提供されるｓｉＲＮＡ複合体は、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において、非常に高い目的配列抑制活性を有する。０．０１ｎＭの低濃度では、目的配列１の発現抑制率は少なくとも３８．９２％、最大６７．５４％に達し、０．１ｎＭの濃度では、目的配列１の発現抑制率は少なくとも８４．７３％、最大８９．３５％に達する。また、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体１、参照複合体２又は参照複合体３に近い目的配列抑制活性レベルを有する。

【０２６６】

実験例６：インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系におけるｓｉＲＮＡ複合体の抑制活性

本実験例において、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系を用いて、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系における複合体６、複合体７又は参照複合体３の目的配列抑制活性を検出した。

【０２６７】

Ｋｕｍｉｃｏ　Ｕｉ－Ｔｅｉ　ｅｔ．ａｌ．，Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｓｉＲＮＡ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｂｙ　ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ　ＤＮＡ　ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎ：　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　ｓｉＲＮＡ　ｗｉｔｈ　ａ　ＤＮＡ　ｓｅｅｄ　ａｒｍ　ｉｓ　ａ　ｐｏｗｅｒｆｕｌ　ｔｏｏｌ　ｆｏｒ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｇｅｎｅ　ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ　ｗｉｔｈ　ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔｌｙ　ｒｅｄｕｃｅｄ　ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ　ｅｆｆｅｃｔ．　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００８．３６（７），２１３６－２１５１に記載された方法に基づいて、検出プラスミドを構築し、前記検出プラスミドを試験対象の複合体と共にＨＥＫ２９３Ａ細胞にコトランスフェクションし、デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現レベルにより、ｓｉＲＮＡの目的配列抑制活性を反映する。具体的なステップは、以下のとおりである。

【０２６８】

［１］検出プラスミドの構築

ｐｓｉＣＨＥＣＫ^{TM}－２（Ｐｒｏｍｅｇａ^{TM}）プラスミドを用いて検出プラスミド

を構築し、前記プラスミドに１つの目的配列２、即ち、ｓｉＲＮＡ複合体の標的配列が含まれる。試験対象のｓｉＲＮＡ複合体について、目的配列２を以下に示す。

【０２６９】

ＴＴＧＣＴＴＡＡＡＡＧＧＧＡＣＡＧＴＡＴＴＣＴＣＡＧＴＧＣＴＣＴＣＣＴＡＣＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６４）

【０２７０】

当該目的配列２は、検出されたｓｉＲＮＡ複合体中のアンチセンス鎖と完全に相補的な配列であるため、目的配列１に対する各ｓｉＲＮＡ複合体の抑制効果は、検出されたｓｉＲＮＡ複合体の目的遺伝子発現抑制能力を反映することができる。目的配列２及びその相補的な配列をｐｓｉＣＨＥＣＫ^{TM}－２プラスミドのＸｈｏ　Ｉ／Ｎｏｔ　Ｉ部位にクローニングした。

【０２７１】

［２］トランスフェクション

２０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ、Ｈｙｃｌｏｎｅ社）及び０．２体積％のペニシリン－ストレプトマイシン（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ、Ｇｉｂｃｏ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を添加したＤＭＥＭ完全培地（Ｈｙｃｌｏｎｅ社）でＨＥＫ２９３Ａ細胞（南京科佰生物技術有限公司から購入）を３７℃で５％CO_2／９５％空気含有インキュベーターにおいて培養した。

【０２７２】

ＨＥＫ２９３Ａ細胞を８×１０^{3}個の細胞／ウェルで９６ウェルプレートに接種し、１６時間後に細胞増殖密度が７０～８０％に達したとき、培養ウェル中のＨ－ＤＭＥＭ完全培地を全て吸引し、各ウェルに８０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地（ＧＩＢＣＯ社）を添加して培養を１．５時間継続した。

【０２７３】

ＤＥＰＣ水を用いて上記検出プラスミドを希釈して２００ｎｇ／μＬの検出プラスミド希釈標準溶液とし、ＤＥＰＣ水を用いて表４における各ｓｉＲＮＡ複合体を調製してそれぞれ１．００μＭ、０．３３０μＭ、０．１１０μＭ、０．０３７０μＭ、０．０１２３μＭ、０．００４１２μＭ、０．００１３７μＭ、０．０００４５７μＭ、０．０００１５２μＭ、０．０００５０８μＭ及び０．０００１６９μＭ（ｓｉＲＮＡ複合体中のｓｉＲＮＡの量として）の計１１種類の異なる濃度のｓｉＲＮＡ複合体希釈標準溶液とした。用いられるｓｉＲＮＡ複合体は、それぞれ上記調製で得られた複合体６、複合体７及び参照複合体３である。

【０２７４】

各ｓｉＲＮＡ複合体について、２Ａ１～２Ａ１１溶液をそれぞれ調製し、１部の２Ａ１～２Ａ１１溶液は、それぞれ１μＬの上記１１種類の濃度のｓｉＲＮＡ希釈標準溶液、０．０５μＬの検出プラスミド希釈標準溶液（検出プラスミド１０ｎｇを含む）及び１０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を順に含む。

【０２７５】

２Ｂ溶液を調製し、１部の２Ｂ溶液は、０．２μＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ^{TM} ２０００及び１０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を含む。

【０２７６】

２Ｃ溶液を調製し、１部の２Ｃ溶液は、０．０５μＬの検出プラスミド希釈標準溶液（検出プラスミド１０ｎｇを含む）及び１０μＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を含む。

【０２７７】

それぞれ１部の２Ｂ溶液を１部の得られた各ｓｉＲＮＡ複合体の２Ａ１～２Ａ１１溶液と混合し、それぞれ室温で２０ｍｉｎインキュベートして、各ｓｉＲＮＡ複合体のトランスフェクション複合体２Ｘ１～２Ｘ１１溶液を得た。

【０２７８】

１部の２Ｂ溶液を１部の２Ｃ溶液と混合し、室温で２０ｍｉｎインキュベートし、ブランクトランスフェクション複合体２Ｘ１２を得た。

【０２７９】
培養ウェルに、各ｓｉＲＮＡ複合体のトランスフェクション複合体２Ｘ１～２Ｘ１１をそれぞれ２０μＬ／ウェルの添加量で添加して均一に混合し、各ｓｉＲＮＡ複合体の、最終濃度がそれぞれ約０．０１μＭ、０．００３３μＭ、０．００１１μＭ、０．０００３７μＭ、０．０００１２３μＭ、０．０００４１２μＭ、０．０００１３７μＭ、０．００００４５７μＭ、０．０００００１５２μＭ、０．００００００５０８μＭ及び０．００００００１６９μＭ（ｓｉＲＮＡ複合体中のｓｉＲＮＡの量として）であるトランスフェクション複合体を得て、各ｓｉＲＮＡ複合体のトランスフェクション複合体２Ｘ１～２Ｘ１１をそれぞれ３つの培養ウェルにトランスフェクションし、ｓｉＲＮＡ複合体を含むコトランスフェクション混合物を得て、試験群とした。

【０２８０】
各ｓｉＲＮＡ複合体について、他の３つの培養ウェルに、それぞれトランスフェクション複合体２Ｘ１２を２０μＬ／ウェルの添加量で添加し、ｓｉＲＮＡ複合体を含まないトランスフェクション混合物を得て、ブランク対照群とした。

【０２８１】
ｓｉＲＮＡ複合体を含むコトランスフェクション混合物とｓｉＲＮＡ複合体を含まないコトランスフェクション混合物をそれぞれ培養ウェルに４時間トランスフェクションした後、各ウェルに２０％のＦＢＳを含むＨ－ＤＭＥＭ完全培地を１００μＬ追加した。９６ウェルプレートをCO_2インキュベーターに置いて培養を２４時間継続した。

【０２８２】
［３］検出
培養ウェル中の培地を吸引し、各ウェルに１５０μＬのＤｕａｌ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ試薬とＨ－ＤＭＥＭ混合溶液（体積比１：１）を添加し、十分かつ均一に混合し、室温で１０ｍｉｎインキュベートした後、１２０μＬの混合溶液を９６ウェルのマイクロプレートに移し、Ｓｙｎｅｒｇｙ　ＩＩ多機能マイクロプレートリーダー（ＢｉｏＴｅｋ社）を用いて９６ウェルのマイクロプレートの各培養ウェル中のＦｉｒｅｆｌｙ化学発光値（Ｆｉｒ）を読み取り、更に９６ウェルのマイクロプレートの各ウェルに６０μＬのＤｕａｌ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｓｔｏｐ　＆　Ｇｌｏ（登録商標）試薬を添加し、十分かつ均一に混合し、室温で１０ｍｉｎインキュベートした後、Ｆｉｒを読み取る並び順に従って、マイクロプレートリーダーを用いて９６ウェルのマイクロプレートの各培養ウェル中のＲｅｎｉｌｌａの化学発光値（Ｒｅｎ）を読み取った。

【０２８３】
９６ウェルのマイクロプレートの各ウェルの発光比Ｒａｔｉｏ＝Ｒｅｎ／Ｆｉｒを計算し、各試験群又は対照群の発光比Ｒａｔｉｏ（試験）又はＲａｔｉｏ（対照）は、３つの培養ウェルＲａｔｉｏの平均値であり、対照群の発光比を基準とし、各試験群の発光比を正規化し、Ｒｅｎｉｌｌａレポーター遺伝子の相対的発現レベル、即ち、残留活性を示すためのＲａｔｉｏ（試験）／Ｒａｔｉｏ（対照）の比Ｒを得た。目的配列に対するｓｉＲＮＡの抑制率＝（１－Ｒ）×１００％。

【０２８４】
異なる濃度の試験対象のｓｉＲＮＡをトランスフェクションした後、ＨＥＫ２９３Ａ細胞中のＲｅｎｉｌｌａの相対残留活性に基づいて、Ｇｒａｐｈｐａｄ　５．０ソフトウェアの非線形回帰分析機能を利用してｌｏｇ（ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ）　ｖｓ．　ｒｅｓｐｏｎｓｅ－Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｓｌｏｐｅ　（ｆｏｕｒ　ｐａｒａｍｅｔｅｒｓ）用量－効果曲線をフィッティングした。

【０２８５】
フィッティングされた用量－効果曲線に対応する関数に基づいて、試験対象のｓｉＲＮＡ標的目的配列のIC_{50}値を計算し、前記関数は、以下のとおりである。

【０２８６】
【数１】

$$Y = Bot + \frac{Top-Bot}{1+10^{(X'-X)\times HillSlope}}$$

式中、
Ｙは、比Ｒ、即ち、Ｒｅｎｉｌｌａの相対残留活性であり、
Ｘは、トランスフェクションされたｓｉＲＮＡの濃度の対数値であり、
Ｂｏｔは、定常期の最低のＹ値であり、
Ｔｏｐは、定常期の最高のＹ値であり、
Ｘ’は、Ｙが底部と頂部との間の半分にあるときに対応するＸ値であり、ＨｉｌｌＳｌｏｐｅは、Ｘ’における曲線の傾きである。

【０２８７】
当該用量－効果曲線と対応する関数から、Ｙ＝５０％のときに対応するＸ$_{50}$値を確定し、各ｓｉＲＮＡのＩＣ$_{50}$値＝１０＾Ｘ$_{50}$（ｎＭ）を計算し、ＩＣ$_{50}$値を表５にまとめた。

【０２８８】
表５　ｐｓｃｈｅｃｋ系におけるｓｉＲＮＡ複合体のＩＣ$_{50}$

【表９】

複合体の番号	ＩＣ$_{50}$
複合体６	８．５５ｐＭ
複合体７	６．８９ｐＭ
参照複合体３	６．６８ｐＭ

【０２８９】
表５の結果から分かるように、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において、非常に高い目的配列抑制活性を有し、ＩＣ$_{50}$は、６．８９～８．５５ｐＭの間にある。また、残りの配列と同じであるが、安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体３に近い目的配列抑制活性を有する。

【０２９０】
実験例７：インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系におけるｓｉＲＮＡ複合体の抑制活性
実験例６の方法により、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系における複合体３及び複合体６のオフターゲット配列抑制活性を試験した。試験されるｓｉＲＮＡ複合体の代わりに複合体３又は複合体６を用いて検出し、複合体６について、用いられる目的配列が目的配列２であるか、又は目的配列２の代わりにそれぞれ以下に示す目的配列３～５を用い、複合体３について、用いられる目的配列が目的配列２であるか、又は目的配列２の代わりにそれぞれ以下に示す目的配列６～８を用いたことのみが異なる。

【０２９１】
目的配列３：
ＴＡＧＧＣＣＣＴＴＴＣＡＡＧＴＡＴＴＣＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６５）
目的配列４：
ＡＧＡＡＴＡＣＴＧＴＣＣＣＴＴＴＴＡＡＧＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６６）
目的配列５：
ＣＴＣＣＧＣＡＧＴＧＡＡＡＴＴＴＴＡＡＧＣ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６７）
目的配列６：
ＣＴＴＴＣＡＣＴＧＣＧＧＡＴＣＡＧＴＧＣＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６８）
目的配列７：
ＡＧＣＡＣＴＧＡＧＡＡＴＡＣＴＧＴＣＣＣＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６９）
目的配列８：
ＣＴＡＣＡＧＴＣＴＣＣＧＣＣＴＧＴＣＣＣＴ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１７０）

【０２９２】
目的配列２には、複合体３及び複合体６中のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖と完全に相補的な配列が含まれるため、目的配列２に対する複合体３又は６の抑制効果は、複合体３又は６のＡｐｏＣ３　ｍＲＮＡ抑制活性を反映することができ、目的配列３には、複合体６中のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖と部分に相補的な配列が含まれ、目的配列４には、複合体６中のｓｉＲＮＡのセンス鎖と完全に相補的な配列が含まれ、目的配列５には、複合体６中のｓｉＲＮＡのセンス鎖と部分に相補的な配列が含まれるため、目的配列３、４又は５に対する複合体６の抑制効果は、オフターゲット効果の程度を反映することができる。即ち、抑制効果が高いほど、複合体６は、オフターゲットが発生する可能性が高くなる。同様に、目的配列６には、複合体３中のｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖と部分に相補的な配列が含まれ、目的配列７には、複合体３中のｓｉＲＮＡのセンス鎖と完全に相補的な配列が含まれ、目的配列８には、複合体３中のｓｉＲＮＡのセンス鎖と部分に相補的な配列が含まれるため、目的配列６、目的配列７又は目的配列８に対する複合体３の抑制効果は、オフターゲット効果の程度を反映することができる。即ち、抑制効果が高いほど、複合体３は、オフターゲットが発生する可能性が高くなる。
【０２９３】
その結果、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において、複合体６の目的配列２に対する抑制ＩＣ$_{50}$が１１．３ｐＭであり、目的配列３、４又は５に対する、試験したｓｉＲＮＡ濃度の全範囲内での抑制率がいずれも５０％未満であり、即ち、いずれもオフターゲットが発生せず、複合体３の目的配列２に対する抑制ＩＣ$_{50}$が４．５０ｐＭであり、目的配列６、７又は８に対する、試験したｓｉＲＮＡ濃度の全範囲内での抑制率がいずれも５０％未満であり、即ち、いずれもオフターゲットが発生しなかった。
【０２９４】
以上から分かるように、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、優れたオンターゲット目的配列抑制活性を示し、ＩＣ$_{50}$値は、４．５０ｐＭ～１１．３ｐＭであり、また、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、低いオフターゲット効果を有する。
【０２９５】
実験例８：インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系におけるｓｉＲＮＡ複合体の抑制活性
実験例６の方法により、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系における複合体５の抑制活性を試験したが、試験されたｓｉＲＮＡ複合体の代わりに複合体５を用いて試験したことのみが異なる。その結果、複合体５は、インビトロｓｉｃｈｅｃｋ系において高い目的配列抑制活性を示し、ＩＣ$_{50}$は、４９．８ｐＭである。
【０２９６】
実験例９：マウスのインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）でのｓｉＲＮＡ複合体の脂質低下効果
血清ＴＧの含有量＞２ｍｍｏｌ／ＬのヒトＡＰＯＣ３トランスジェニックマウスＴｇ（ＡＰＯＣ３）３７０７Ｂｒｅｓ（米国Ｊａｃｋｓｏｎラボラトリーから購入）をランダムに群分けし、１群当たり６匹とし、雌雄半々とした。各群のマウスに複合体６、参照複合体３及びＰＢＳブランク対照をそれぞれ投与した。全ての動物に対して、体重に応じて投与量を計算し、皮下注射の方式で単回投与し、各ｓｉＲＮＡ複合体の投与量（ｓｉＲＮＡの量として）が３ｍｇ／ｋｇマウス体重であり、投与体積が５ｍｌ／ｋｇである。各ｓｉＲＮＡ複合体は、それぞれＰＢＳ水溶液で提供され、投与量及び投与体積に基づいて、複合体の調製すべき濃度を計算した。別の１群のマウスのそれぞれに１×ＰＢＳを５ｍｌ／ｋｇの投与体積で投与し、ブランク対照群とした。
【０２９７】
投与時点を１日目とし、１日目、９日目、１５日目にそれぞれマウスの眼窩静脈叢から毎回１００μＬ採血した。採血した後、室温で３０ｍｉｎ放置し、そして４℃で、３０００ｒｐｍの回転数で１５ｍｉｎ遠心分離して血清を得た。更に、ＰＭ１Ｐ０００／３全自動血清生化学分析装置（ＳＡＢＡ、イタリア）を用いて血清中の総コレステロール（ＣＨＯ）及びトリグリセリド（ＴＧ）の含有量を検出した。

【０２９８】
標準化された脂質レベル＝（薬剤投与後の試験群における脂質の含有量／薬剤投与前の試験群における脂質の含有量）×１００％。
【０２９９】
脂質レベルの抑制率＝（１－薬剤投与後の試験群における脂質の含有量／薬剤投与前の試験群における脂質の含有量）×１００％。
【０３００】
脂質とは、総コレステロール（ＣＨＯ）又はトリグリセリド（ＴＧ）を指す。
【０３０１】
図３Ａ及び図３Ｂは、それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体、参照ｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。更に、各時点での血清ＴＧ抑制率及び血清ＣＨＯ抑制率を以下の表６Ａ及び表６Ｂにまとめた。
【０３０２】
表６Ａ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＴＧ抑制率
【表１０】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＴＧレベルの抑制率（％）	
		Ｄ９	Ｄ１５
ブランク対照	／	８．２	１９．２
参照複合体３	３	８８．２	８９．０
複合体６	３	７７．３	８２．８

【０３０３】
表６Ｂ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＣＨＯ抑制率
【表１１】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＣＨＯレベルの抑制率（％）	
		Ｄ９	Ｄ１５
ブランク対照	／	－１．９	９．５
参照複合体３	３	５２．２	５４．８
複合体６	３	４６．９	４２．０

【０３０４】
図３Ａ、図３Ｂ及び表６Ａ、表６Ｂの結果から明らかなように、投与後の異なる時点で、複合体６は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができ、かつ対応する安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体３と比較して１１％以下の脂質レベル低下効果を示した。
【０３０５】
実験例１０：マウスのインビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）でのｓｉＲＮＡ複合体の脂質低下効果
実験例９の方法でマウスのインビボでの本開示の複合体７の脂質低下効果を調べた。各群のマウスに複合体７、参照複合体３及びＰＢＳブランク対照をそれぞれ投与したことのみが異なる。全ての動物に対して、体重に応じて投与量を計算し、皮下注射の方式で単回投与し、各ｓｉＲＮＡ複合体の投与量（ｓｉＲＮＡの量として）が３ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇマウス体重であり、投与体積が５ｍｌ／ｋｇである。投与時点を１日目とし、１日目、９日目、１５日目、２２日目、２９日目、３６日目、５０日目にそれぞれマウスの眼窩静脈叢から採血した。
【０３０６】
図４Ａ及び図４Ｂは、それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体、参照ｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グ

ラフである。更に、各時点での血清ＴＧ抑制率及び血清ＣＨＯ抑制率を以下の表７Ａ及び表７Ｂにまとめた。

【０３０７】

表７Ａ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＴＧ抑制率

【表１２】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＴＧレベルの抑制率（％）					
		Ｄ９	Ｄ１５	Ｄ２２	Ｄ２９	Ｄ３６	Ｄ５０
ブランク対照	／	８．２	１９．２	－３．６	３．５	３．７	－１６．３
参照複合体３	３	８８．２	８９．０	８８．６	８５．９	８６．９	８５．４
	１	８６．１	８６．５	８３．７	７８．１	８０．５	７０．０
複合体７	３	９０．２	８８．６	８８．２	８６．５	８６．１	８２．７
	１	８３．９	８０．８	７６．５	７４．３	６７．０	５４．０

【０３０８】

表７Ｂ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＣＨＯ抑制率

【表１３】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＣＨＯレベルの抑制率（％）					
		Ｄ９	Ｄ１５	Ｄ２２	Ｄ２９	Ｄ３６	Ｄ５０
ブランク対照	／	－１．９	９．５	２．８	２．１	－１．５	－１．３
参照複合体３	３	５２．２	５４．８	５６．３	５３．２	５０．８	５３．２
	１	４７．５	４４．２	３９．５	４２．８	４４．６	４１．５
複合体７	３	５１．４	４３．８	５３．２	４７．６	４６．０	４７．３
	１	５１．８	４５．８	５１．２	４５．５	４０．７	３９．１

【０３０９】

図４Ａ、図４Ｂ及び表７Ａ、表７Ｂの結果から明らかなように、投与後の異なる時点で、複合体７は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができ、かつ対応する安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体３と比較して、同等又はそれ以上の脂質レベル低下効果を示した。特に、３ｍｇ／ｋｇの用量で、複合体７は、最大５０日間の全投与時間内に一貫して非常に高い脂質ＴＧ低下効果を示し、最大抑制率が９０．２％に達することができる。

【０３１０】

実験例１１：マウスのインビボ（ｉｎ ｖｉｖｏ）でのｓｉＲＮＡ複合体の脂質低下効果

実験例９の方法により、マウスのインビボでのｓｉＲＮＡ複合体の脂質低下効果を検出したが、用いられるｓｉＲＮＡ複合体が複合体３又は複合体４であることのみが異なる。結果を図９Ａ及び図９Ｂに示す。

【０３１１】

図９Ａ及び図９Ｂは、それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。更に、各時点での血清ＴＧ抑制率及び血清ＣＨＯ抑制率を以下の表８Ａ及び表８Ｂにまとめた。

【０３１２】

表８Ａ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＴＧ抑制率

【表１４】

群別	用量ｍｇ／ｋｇ	ＴＧレベルの抑制率（％）					
		Ｄ９	Ｄ１５	Ｄ２２	Ｄ２９	Ｄ３６	Ｄ５０
ブランク対照	／	８．２	１９．２	－３．６	３．５	３．７	－１６．３
複合体３	３	８７．５	８７．１	８５．３	７７．８	６３．２	５５．９
	１	８１．７	８２．２	８０．８	６５．３	５８．８	３１．２
複合体４	３	９０．５	９２．０	９０．３	８２．５	８１．３	６６．０
	１	８５．２	８９．５	８０．１	６９．２	５７．２	５３．０

【０３１３】

表８Ｂ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＣＨＯ抑制率

【表１５】

群別	用量ｍｇ／ｋｇ	ＣＨＯレベルの抑制率（％）					
		Ｄ９	Ｄ１５	Ｄ２２	Ｄ２９	Ｄ３６	Ｄ５０
ブランク対照	／	－１．９	９．５	２．８	２．１	－１．５	－１．３
複合体３	３	５３．４	４８．５	５３．６	４５．７	４７．６	４０．６
	１	５０．７	４８．９	５０．７	３７．６	４０．９	２４．９
複合体４	３	４７．１	４３．７	５１．１	４５．２	５３．２	４２．０
	１	５３．０	４８．３	４８．１	４２．２	４０．１	３９．８

【０３１４】

図５Ａ、図５Ｂ及び表８Ａ、表８Ｂの結果から明らかなように、投与後の異なる時点で、複合体３及び複合体４は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができる。特に、３ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇの用量で、複合体４は、最大５０日間の全投与時間内に一貫して非常に高い脂質ＴＧ低下効果を示し、最大抑制率が９２．０％に達することができる。

【０３１５】

実験例１２　マウスのインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）での脂質に対するｓｉＲＮＡ複合体の低下効果

実験例９の方法により、マウスのインビボでのｓｉＲＮＡ複合体の脂質低下効果を検出したが、用いられるｓｉＲＮＡ複合体が複合体３であり、各ｓｉＲＮＡ複合体の投与量（ｓｉＲＮＡの量として）が９ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．２５ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ又は０．０５ｍｇ／ｋｇマウス体重であり、投与体積が５ｍｌ／ｋｇであることのみが異なる。各ｓｉＲＮＡ複合体は、それぞれＰＢＳ水溶液で提供され、投与量及び投与体積に基づいて、複合体の調製すべき濃度を計算した。投与時点を１日目とし、１日目、８日目、１５日目、２２日目、２９日目、３６日目、４３日目、５０日目、５７日目及び６４日目にそれぞれマウスの眼窩静脈叢から採血して血清中のＴＧレベルを検出した。結果を図６に示す。

【０３１６】

図６は、異なる濃度の複合体３又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。更に、各時点での血清ＴＧ抑制率を以下の表９にまとめた。

【０３１７】

表９　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＴＧ抑制率

【表１６】

群別	用量	ＴＧレベルの抑制率（％）								
	ｍｇ／ｋｇ	Ｄ８	Ｄ１５	Ｄ２２	Ｄ２９	Ｄ３６	Ｄ４３	Ｄ５０	Ｄ５７	Ｄ６４
ブランク対照	／	２７．１	１３．１	４．０	８．２	２２．７	１５．３	１７．４	－０．３	１７．４
複合体３	９	８９．５	８８．５	８９．０	８７．９	８８．３	８６．６	７１．３	５９．７	５４．７
	３	８８．３	８６．１	８７．４	７９．８	７０．７	６３．１	４５．２	３０．６	２４．５
	１	７６．３	６８．２	５４．４	６３．１	５７．９	３９．８	１５．５	５．０	７．０
	０．５	６７．４	５１．９	４５．３	３７．７	３０．３	１３．１	１１．７	０．８	１６．１
	０．２５	３２．６	１８．３	３２．１	３４．７	２５．０	１５．２	７．３	５．３	５．３
	０．１	３９．１	３９．４	２３．６	３５．１	２７．４	１３．５	１９．９	１．７	１０．９
	０．０５	４７．８	３８．７	５．６	１７．０	１４．６	－３．７	－２１．６	－１３．２	－１２．５

【０３１８】

図６及び表９の結果から明らかなように、投与後の異なる時点で、異なる濃度の複合体３は、いずれもマウス血清中のＴＧレベルを低下させることができ、特に、９ｍｇ／ｋｇの投与量で、１回だけ投与した後、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、６４日間の長期間にわたって一貫して５０％を超えるＴＧレベル抑制率を保持することができ、かつ抑制率が最大８９．５％に達することができ、優れた脂質抑制能力を示した。

【０３１９】

実験例１３　マウスのインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）でのｓｉＲＮＡ複合体の脂質低下効果

血清ＴＧの含有量＞２ｍｍｏｌ／ＬのヒトＡＰＯＣ３トランスジェニックマウスＴｇ（ＡＰＯＣ３）３７０７Ｂｒｅｓ（米国Ｊａｃｋｓｏｎラボラトリーから購入）をランダムに群分けし、１群当たり８匹とし、雌雄半々とした。各群のマウスに複合体３、複合体５及びＰＢＳブランク対照をそれぞれ投与した。全ての動物に対して、体重に応じて投与量を計算し、皮下注射の方式で単回投与し、各ｓｉＲＮＡ複合体の投与量（ｓｉＲＮＡの量として）が３ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇマウス体重であり、投与体積が５ｍｌ／ｋｇである。各ｓｉＲＮＡ複合体は、それぞれＰＢＳ水溶液で提供され、投与量及び投与体積に基づいて、複合体の調製すべき濃度を計算した。別の１群のマウスのそれぞれに１×ＰＢＳを投与し、投与体積が５ｍｌ／ｋｇであり、ブランク対照群とした。

【０３２０】

投与時点を１日目とし、１日目、８日目、１５日目、２２日目、２９日目、３６日目、４３日目にそれぞれ１００μＬずつマウスの眼窩静脈叢から採血した。採血した後、室温で３０ｍｉｎ放置した後、４℃で、３０００ｒｐｍの回転数で１５ｍｉｎ遠心分離して血清を得た。更に、ＰＭ１Ｐ０００／３全自動血清生化学分析装置（ＳＡＢＡ、イタリア）を用いて血清中の総コレステロール（ＣＨＯ）及びトリグリセリド（ＴＧ）の含有量を検出した。

【０３２１】

標準化された脂質レベル＝（薬剤投与後の試験群における脂質の含有量／薬剤投与前の試験群における脂質の含有量）×１００％。

【０３２２】

脂質レベルの抑制率＝（１－薬剤投与後の試験群における脂質の含有量／薬剤投与前の試験群における脂質の含有量）×１００％。

【０３２３】

脂質とは、総コレステロール（ＣＨＯ）又はトリグリセリド（ＴＧ）を指す。

【０３２４】

図７Ａ及び図７Ｂは、それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。更に、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を投与した後の、各時点でのマウス血清ＴＧ抑制率及び血清ＣＨＯ抑制率を以下の表１０Ａ及び表１０Ｂにまとめた。

【０３２５】

表１０Ａ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＴＧ抑制率

【表１７】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＴＧレベルの抑制率（％）					
		Ｄ８	Ｄ１５	Ｄ２２	Ｄ２９	Ｄ３６	Ｄ４３
複合体３	3	８８．２６	８４．２２	８９．３３	８８．２２	８１．６０	６４．８７
	1	８０．６５	７５．０７	７０．７８	５６．３５	４１．９４	４４．２３
複合体５	3	８８．５７	８６．９９	８７．５９	８８．６１	８０．１８	６０．１３
	1	８６．０９	８３．６７	７０．６３	４５．５１	３５．３１	１２．１７

【０３２６】

表１０Ｂ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＣＨＯ抑制率

【表１８】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＣＨＯレベルの抑制率（％）					
		Ｄ８	Ｄ１５	Ｄ２２	Ｄ２９	Ｄ３６	Ｄ４３
複合体３	3	４７．９２	４４．１５	４９．１４	５１．０２	５１．１８	４０．１９
	1	４１．８３	３６．７４	３９．４２	３７．９４	２２．０４	２９．０８
複合体５	3	５２．９５	５３．４６	５５．１７	５７．４１	４７．９８	３９．９６
	1	４５．０３	４４．２３	３８．２７	２９．１８	２９．０８	１０．０６

【０３２７】

図７Ａ、図７Ｂ及び表１０Ａ、表１０Ｂの結果を分析して分かるように、投与後の異なる時点で、複合体３及び複合体５は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができる。また、実験期間の４３日間内に一貫して高い抑制効果を保持した。特に、３ｍｇ／ｋｇ用量の複合体３及び複合体５は、マウスに対して、いずれも優れた脂質抑制効果を示し、血清ＴＧの最大抑制率は、いずれも８８％よりも高く、血清ＣＨＯの最大抑制率は、それぞれ５１．１８％及び５７．４１％である。上記結果から明らかなように、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、長期間内に脂質レベルを効果的に低下させることができ、脂質異常症関連疾患又は症状の治療及び／又は予防のための薬物の調製において優れた開発の見通しを示す。

【０３２８】

実験例１４　マウスのインビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）での脂質に対するｓｉＲＮＡ複合体の低下効果

血清ＴＧの含有量＞２ｍｍｏｌ／ＬのヒトＡＰＯＣ３トランスジェニックマウスＴｇ（ＡＰＯＣ３）３７０７Ｂｒｅｓ（米国Ｊａｃｋｓｏｎラボラトリーから購入）をランダムに群分けし、１群当たり６匹で、雌雄半々とした。各群のマウスに複合体１、複合体２、参照複合体１及びＰＢＳブランク対照をそれぞれ投与した。全ての動物に対して、体重に応じて投与量を計算し、皮下注射の方式で単回投与し、各ｓｉＲＮＡ複合体の投与量（ｓｉＲＮＡの量として）が３ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇマウス体重であり、投与体積が５ｍｌ／ｋｇである。各ｓｉＲＮＡ複合体は、それぞれＰＢＳ水溶液で提供され、投与量及び投与体積に基づいて、複合体の調製すべき濃度を計算した。別の１群のマウスのそれぞれに１×ＰＢＳを５ｍｌ／ｋｇの投与体積で投与し、ブランク対照群とした。

【０３２９】

投与時点を１日目とし、１日目、８日目、１５日目、２２日目にそれぞれマウスの眼窩静脈叢から毎回１００μＬ採血した。採血した後、室温で３０ｍｉｎ放置し、そして４℃で、３０００ｒｐｍの回転数で１５ｍｉｎ遠心分離して血清を得た。更に、ＰＭ１Ｐ００

０／３全自動血清生化学分析装置（ＳＡＢＡ、イタリア）を用いて血清中の総コレステロール（ＣＨＯ）及びトリグリセリド（ＴＧ）の含有量を検出した。

【０３３０】

標準化された脂質レベル＝（薬剤投与後の試験群における脂質の含有量／薬剤投与前の試験群における脂質の含有量）×１００％。

【０３３１】

脂質レベルの抑制率＝（１－薬剤投与後の試験群における脂質の含有量／薬剤投与前の試験群における脂質の含有量）×１００％。

【０３３２】

脂質とは、総コレステロール（ＣＨＯ）又はトリグリセリド（ＴＧ）を指す。

【０３３３】

図８Ａ及び図８Ｂは、それぞれ本開示のｓｉＲＮＡ複合体、参照ｓｉＲＮＡ複合体又はＰＢＳを投与した後の、血清ＴＧレベル又は血清ＣＨＯレベルの経時変化を示す折れ線グラフである。更に、本開示のｓｉＲＮＡ複合体を投与した後の、各時点でのマウス血清ＴＧ抑制率及び血清ＣＨＯ抑制率を以下の表１１Ａ及び表１１Ｂにまとめた。

【０３３４】

表１１Ａ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＴＧ抑制率

【表１９】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＴＧレベルの抑制率（％）		
		Ｄ９	Ｄ１５	Ｄ２２
ブランク対照	／	１７．３	－３．８	－３．２
参照複合体１	３	９２．２	９０．６	８５．７
	１	８４．７	８０．６	８０．６
複合体１	３	９２．０	９２．３	９０．０
	１	７６．１	７４．６	６７．６
複合体２	３	９２．９	９２．３	８９．９
	１	８２．８	７９．３	８２．３

【０３３５】

表１１Ｂ　トランスジェニックマウスでのｓｉＲＮＡ複合体の血清ＣＨＯ抑制率

【表２０】

群別	用量 ｍｇ／ｋｇ	ＣＨＯレベルの抑制率（％）		
		Ｄ９	Ｄ１５	Ｄ２２
ブランク対照	／	１９．４	－２．６	１．７
参照複合体１	３	５１．６	４４．３	４２．７
	１	５２．１	４５．５	５０．８
複合体１	３	５７．５	５７．３	４７．２
	１	４９．３	４３．９	４２．４
複合体２	３	５４．９	５０．０	５５．４
	１	５０．９	４４．０	４６．７

【０３３６】

図８Ａ、図８Ｂ及び表１１Ａ、表１１Ｂの結果から明らかなように、投与後の異なる時点で、複合体１及び複合体２は、マウス血清中のＴＧ及びＣＨＯレベルを明らかに低下させることができる。また、実験期間の２２日間内に一貫して高い抑制効果を保持し、かつ対応する安定化修飾ヌクレオチドを含まない参照複合体１に近い脂質レベル低下効果を示した。

【０３３７】

特に、３ｍｇ／ｋｇ用量の複合体１及び複合体２は、マウスに対して、いずれも優れた脂質抑制効果を示し、血清ＴＧの最大抑制率は、いずれも９２％よりも高く、血清ＣＨＯの最大抑制率は、それぞれ５７．５％及び５４．９％である。上記結果から明らかなように、本開示のｓｉＲＮＡ複合体は、長期間内に脂質レベルを効果的に低下させることができ、脂質異常症関連疾患又は症状の治療及び／又は予防のための薬物の調製において優れた開発の見通しを示す。

【０３３８】

実験例１５：二本鎖熱解離温度Ｔｍの測定

１ＸＰＢＳ緩衝液を用いて、上記調製したｓｉＲＮＡ１～ｓｉＲＮＡ７及び参照ｓｉＲＮＡ１～参照ｓｉＲＮＡ７をそれぞれ０．０２ｍｇ／ｍＬの溶液に調製し、試験対象溶液とした。加熱プログラムを記憶したＡｇｉｌｅｎｔ　ｃａｒｙ３００　ＵＶ分光光度計における１０ｍｍ経路長の石英キュベットに試験対象溶液を添加し、２６０ｎｍ波長で温度－吸光率曲線をモニタリングし、加熱速度を０．５℃／ｍｉｎとし、２０．０℃から９５℃まで昇温した。分光光度計の説明書に基づいて温度－吸光率曲線の一次導関数から二本鎖熱解離温度Ｔｍを計算した。Ｔｍ値の結果を以下の表１２に示す。

【０３３９】

表１２　二本鎖熱解離温度Ｔｍ

【表２１】

ｓｉＲＮＡ	Ｔｍ（℃）	参照ｓｉＲＮＡ	Ｔｍ（℃）	ΔTm（℃）
ｓｉＲＮＡ１	８０．９７	参照ｓｉＲＮＡ１	７８．０６	２．９１
ｓｉＲＮＡ２	８０．０２	参照ｓｉＲＮＡ２	７８．１２	１．９０
ｓｉＲＮＡ３	７９．０７	参照ｓｉＲＮＡ３	７６．３２	２．７５
ｓｉＲＮＡ４	８０．１７	参照ｓｉＲＮＡ４	７７．９８	２．１９
ｓｉＲＮＡ５	７８．２２	参照ｓｉＲＮＡ５	７６．２６	１．９６
ｓｉＲＮＡ６	８９．２６	参照ｓｉＲＮＡ６	８７．９３	１．３３
ｓｉＲＮＡ７	９０．０７	参照ｓｉＲＮＡ７	８７．９８	２．０９

【０３４０】

参照ｓｉＲＮＡ１～参照ｓｉＲＮＡ７は、順に、ｓｉＲＮＡ１～ｓｉＲＮＡ７と同じ塩基配列を有するが、ｓｉＲＮＡ１～ｓｉＲＮＡ７において安定化修飾ヌクレオチドを有する位置に、いかなる修飾ヌクレオチドを有していないｓｉＲＮＡである。

【０３４１】

ΔＴｍ値（試験対象のｓｉＲＮＡ）＝Ｔｍ（ｓｉＲＮＡ）－Ｔｍ（参照ｓｉＲＮＡ）。

【０３４２】

表１２の結果から分かるように、同じ位置が未修飾のヌクレオチドである場合と比較して、本開示の安定化修飾ヌクレオチドを含む二本鎖オリゴヌクレオチド及びその複合体は、より高い二本鎖熱解離温度を有し、二本鎖熱解離温度が少なくとも１．３３℃上昇し、その中で最も上昇したのは、ｓｉＲＮＡ１であり、それは参照ｓｉＲＮＡと比較して２．９１℃上昇した。

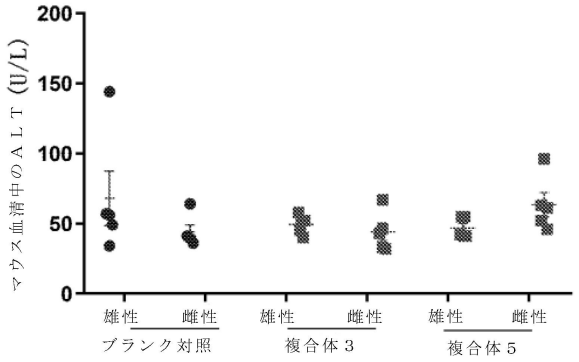
【０３４３】

以上、本開示のいくつかの実施形態を詳しく記載したが、本開示は、上記実施形態の具体的な細部に限定されず、本開示の技術的思想の範囲で、本開示の技術的解決手段に対して複数の簡単な変形を行うことができ、これらの簡単な変形は、いずれも本開示の保護範囲に属する。

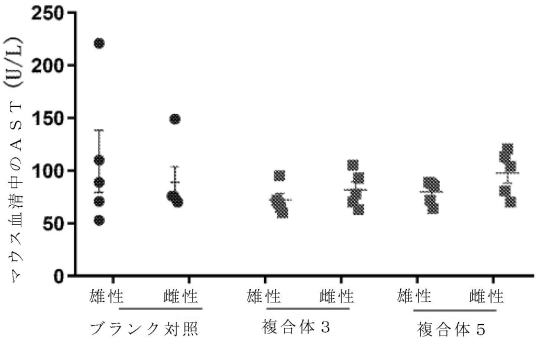
【０３４４】

なお、上記いくつかの実施形態に記載された各具体的な技術的特徴は、矛盾しない場合に、いずれの適当な方式によって組み合わせることができ、不要な重複を回避するために、本開示は、可能なあらゆる組合せ方式を別途に説明しない。

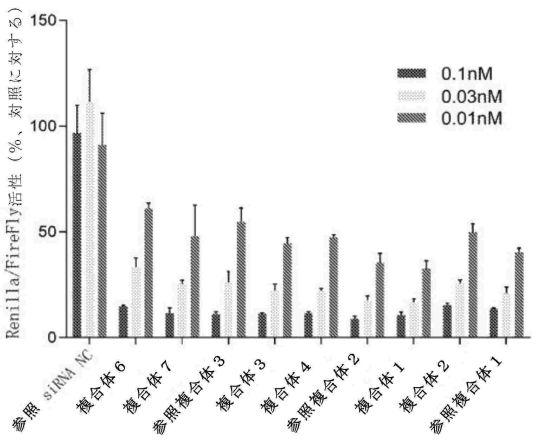
【０３４５】
また、本開示の様々な実施形態は、任意に組み合わせることができ、本開示の思想から逸脱しない限り、本開示に開示されている内容とみなすべきである。
【図面】
【図１Ａ】



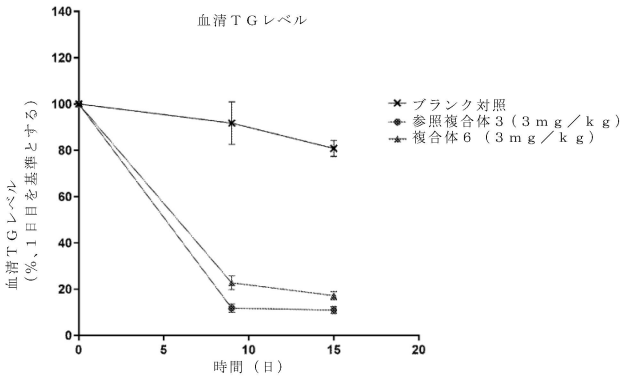
【図１Ｂ】



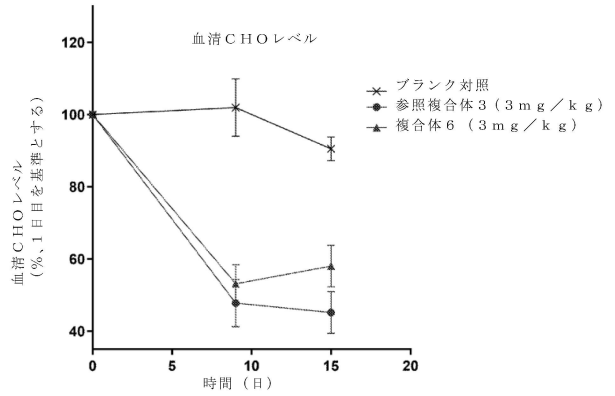
【図２】



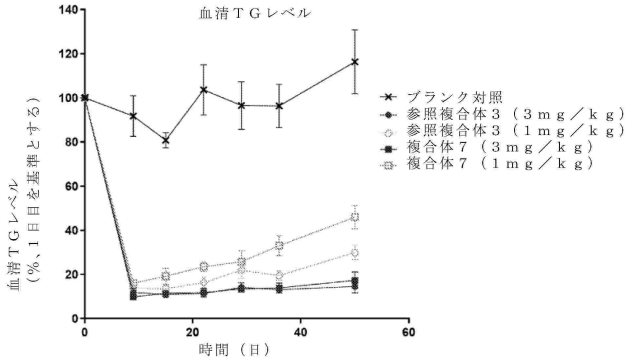
【図３Ａ】



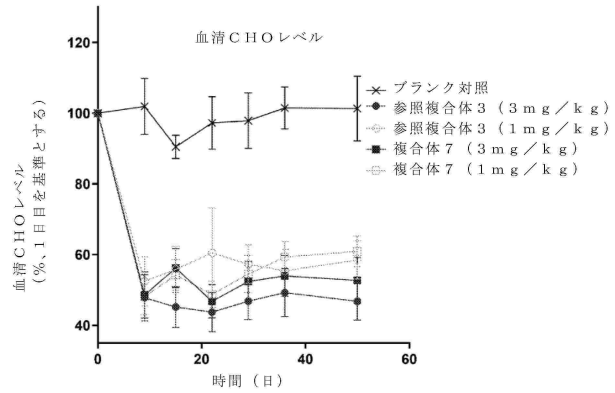
【図３Ｂ】



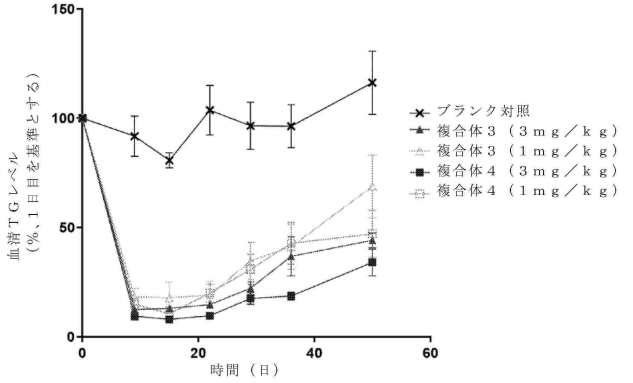
【図４Ａ】



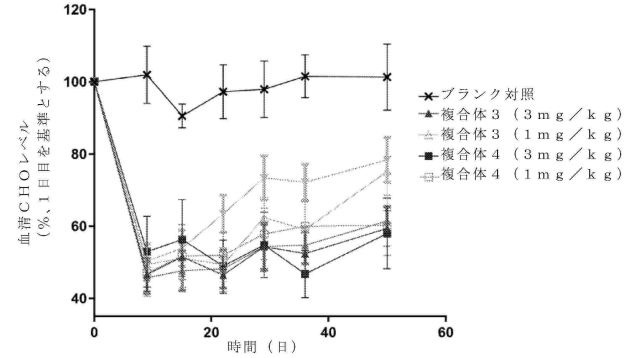
【図４Ｂ】



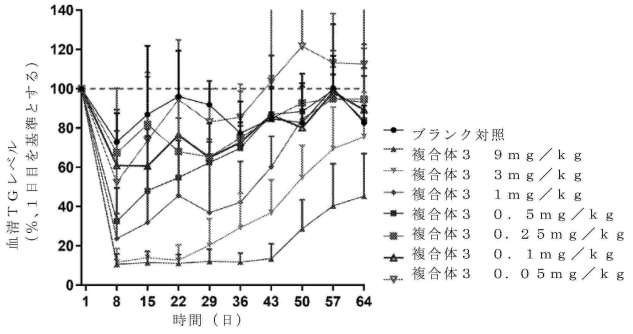
【図５Ａ】



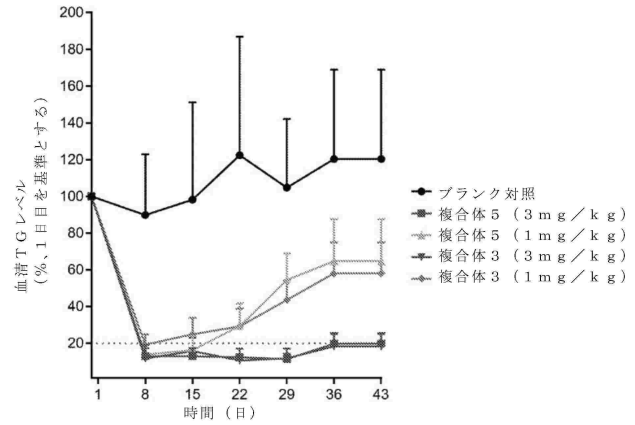
【図５Ｂ】



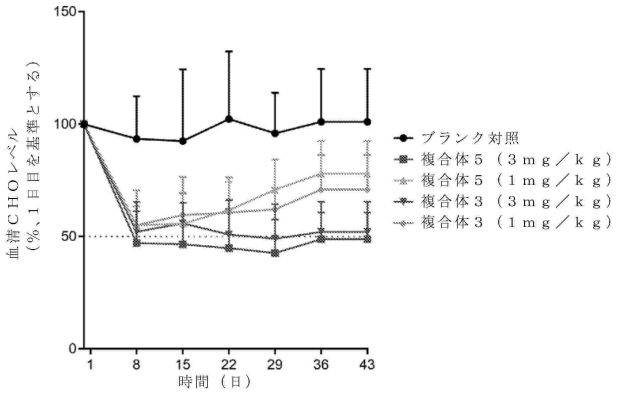
【図６】



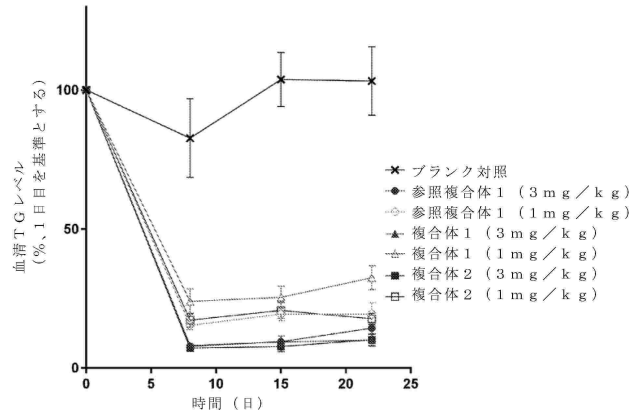
【図７Ａ】



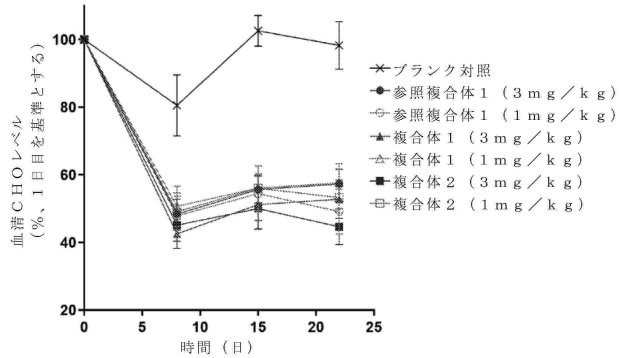
【図７Ｂ】



【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【配列表】

2024525800000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/103049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K, A61P,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, WANFANG, EBI, NCBI, 百度, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED, STN, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 苏州瑞博生物技术股份有限公司, 粱子才, 张鸿雁, 高山, 甲氧基乙基, 甲基乙基, 甲氧乙基, 烯丙基, 二甲基氨基乙基, 氨基丙基, 二硝基苯基, MOE, 2'-MOE, RNA, siRNA, 载脂蛋白C3, 载脂蛋白, APOC, APOC3, 2'-O-甲氧基乙基, 2'-MOE, 2'-O-methoxyethyl, 2'-O-(2-Methoxyethyl), CH2CH2OCH3, 2'-OCH2CH2OCH3, 空间位阻, 2'-O-烯丙基, 2'-C-烯丙基, 2'-O-2-N-甲基氨基-2-氧亚基乙基, 2'-O-2-N, N-二甲基氨基乙基, 2'-O-3-氨基丙基, 2'-O-2,4-二硝基苯基

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020360522 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 19 November 2020 (2020-11-19) abstract, SEQ ID NOs: 1-3, 6-7, 10-11, 14-15, 18-19, 22-23, 26, 28, 30, 32, and 60, and description, paragraph [0101]	1-51
Y	WO 2020135673 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 02 July 2020 (2020-07-02) abstract, SEQ ID NOs: 1-2, 5-6, 9-10, 19-20, 23-24, 49-50, 53-54, 57-58, 61-62, 65-66, 69-70, 75-76, 109-110, 113-114, 121-122, 125-126, 129-130, 135-136, 139-140, and 143-144, and description, p. 15, lines 35-36	1-51
Y	CN 111164091 A (WAVE LIFE SCIENCES LTD. et al.) 15 May 2020 (2020-05-15) abstract, description, paragraphs [0378] and [1862], and figure 1	1-51
A	US 2012184595 A1 (PROTIVE BIOTHERAPEUTICS INC.) 19 July 2012 (2012-07-19) entire document	1-51

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 September 2022	**08 October 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/103049

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017137814 A1 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC.) 18 May 2017 (2017-05-18) entire document	1-51
A	US 2018245076 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS INC.) 30 August 2018 (2018-08-30) entire document	1-51
A	WO 2019051402 A1 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS INC.) 14 March 2019 (2019-03-14) entire document	1-51

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/103049

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/103049

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **48-49**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] claims 48-49 relate to a method for treating diseases, and therefore do not comply with PCT Rule 39.1(iv). The present report was formed on the basis that claims 48-49 are amended to be pharmaceutical use claims.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/103049

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020360522	A1	19 November 2020	TW	201925471	A	01 July 2019
				EP	3719127	A1	07 October 2020
				WO	2019105419	A1	06 June 2019
				JP	2021503929	A	15 February 2021
				CN	110997917	A	10 April 2020
WO	2020135673	A1	02 July 2020	US	2022062427	A1	03 March 2022
				EP	3903830	A1	03 November 2021
				KR	20210110839	A	09 September 2021
				JP	2022515503	A	18 February 2022
CN	111164091	A	15 May 2020	WO	2018223073	A1	06 December 2018
				EP	3630788	A1	08 April 2020
				JP	2020522265	A	30 July 2020
				US	2021198305	A1	01 July 2021
				TW	201908483	A	01 March 2019
US	2012184595	A1	19 July 2012	EP	2405921	A1	18 January 2012
				US	2015315584	A1	05 November 2015
				WO	2010083615	A1	29 July 2010
				CA	2750561	A1	29 July 2010
US	2017137814	A1	18 May 2017	EP	3736334	A1	11 November 2020
				WO	2016011123	A1	21 January 2016
				EP	3169784	A1	24 May 2017
				US	2019233817	A1	01 August 2019
US	2018245076	A1	30 August 2018	MX	2017011009	A	20 October 2017
				HK	1248522	A1	19 October 2018
				RU	2017133142	A	28 March 2019
				BR	112017015307	A2	16 January 2018
				KR	20170122769	A	06 November 2017
				EP	3270931	A1	24 January 2018
				JP	2018511555	A	26 April 2018
				IL	253346	D0	28 September 2017
				CN	107405358	A	28 November 2017
				CA	2977971	A1	01 September 2016
				US	2020095581	A1	26 March 2020
				WO	2016138355	A1	01 September 2016
				AU	2016222548	A1	27 July 2017
WO	2019051402	A1	14 March 2019	CL	2020000593	A1	25 September 2020
				PH	12020500332	A1	28 September 2020
				JP	2020533334	A	19 November 2020
				SG	11201912178V	A	30 January 2020
				UY	37871	A	29 March 2019
				US	2019078088	A1	14 March 2019
				US	2020299690	A1	24 September 2020
				EC	SP20017905	A	30 June 2020
				KR	20200044013	A	28 April 2020
				CR	20200108	A	28 June 2020
				JO	P20200054	A1	11 March 2019
				CO	2020002586	A2	01 April 2020
				BR	112020002413	A2	28 July 2020
				CN	111107853	A	05 May 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/103049

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		AU	2018329190	A1	23 April 2020
		TN	2020000039	A1	04 October 2021
		TW	201920227	A	01 June 2019
		CA	3074303	A1	14 March 2019
		PE	20201283	A1	24 November 2020
		EP	3681516	A1	22 July 2020
		IL	273172	A	30 April 2020
		US	2022064646	A1	03 March 2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/103049

A. 主题的分类

C12N 15/113(2010.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61P 3/06(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N, A61K, A61P,

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, EBI, NCBI, 百度, ISI Web of Knowledge, PUBMED, STN, 中国专利生物序列检索系统：苏州瑞博生物技术股份有限公司，梁子才，张鸿雁，高山，甲氧基乙基，甲基乙基，甲氧乙基，烯丙基，二甲基氨基乙基， 氨基丙基，二硝基苯基， MOE, 2'-MOE, RNA, siRNA ，载脂蛋白C3，载脂蛋白，APOC，APOC3，2'-O-甲氧基乙基，2'-MOE，2'-O-methoxyethyl，2'-O-(2-Methoxyethyl) ，CH2CH2OCH3，2' -OCH2CH2OCH3，空间位阻，2'-O-烯丙基，2'-C-烯丙基，2'-O-2-N-甲基氨基-2-氧亚基乙基，2'-O-2-N,N-二甲基氨基乙基，2'-O-3-氨基丙基，2'-O-2,4-二硝基苯基

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	US 2020360522 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 2020年11月19日 (2020-11-19) 摘要，SEQ ID NOs:1-3，6-7，10-11，14-15，18-19，22-23，26，28，30，32，60，说明书第【0101】段	1-51
Y	WO 2020135673 A1 (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 2020年7月2日 (2020-07-02) 摘要，SEQ ID NOs: 1-2，5-6，9-10，19-20，23-24，49-50，53-54，57-58，61-62，65-66，69-70，75-76，109-110，113-114，121-122，125-126，129-130，135-136，139-140，143-144，说明书第15页第35-36行	1-51
Y	CN 111164091 A (波涛生命科学有限公司等) 2020年5月15日 (2020-05-15) 摘要，说明书第【0378】、【1862】段，附图1	1-51
A	US 2012184595 A1 (PROTIVE BIOTHERAPEUTICS, INC.) 2012年7月19日 (2012-07-19) 全文	1-51

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年9月16日	2022年10月8日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 李娟娟 电话号码 86-(10)-53962095

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/103049

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2017137814 A1 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS, INC.) 2017年5月18日 (2017-05-18) 全文	1-51
A	US 2018245076 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS, INC.) 2018年8月30日 (2018-08-30) 全文	1-51
A	WO 2019051402 A1 (ARROWHEAD PHARMACEUTICALS, INC.) 2019年3月14日 (2019-03-14) 全文	1-51

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/103049

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的:
   ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   ☐ 纸件或图形文件形式
b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的:
c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
   ☐ 附件C/ST.25文本文件形式(细则13之三.1(a))
   ☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三.1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/103049

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 48-49
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求48-49涉及疾病的治疗方法，因此不符合PCT细则第39.1(iv)的规定。本报告基于其修改为制药用途权利要求而作出。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/103049

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
US	2020360522	A1	2020年11月19日	TW	201925471	A	2019年7月1日
				EP	3719127	A1	2020年10月7日
				WO	2019105419	A1	2019年6月6日
				JP	2021503929	A	2021年2月15日
				CN	110997917	A	2020年4月10日
WO	2020135673	A1	2020年7月2日	US	2022062427	A1	2022年3月3日
				EP	3903830	A1	2021年11月3日
				KR	20210110839	A	2021年9月9日
				JP	2022515503	A	2022年2月18日
CN	111164091	A	2020年5月15日	WO	2018223073	A1	2018年12月6日
				EP	3630788	A1	2020年4月8日
				JP	2020522265	A	2020年7月30日
				US	2021198305	A1	2021年7月1日
				TW	201908483	A	2019年3月1日
US	2012184595	A1	2012年7月19日	EP	2405921	A1	2012年1月18日
				US	2015315584	A1	2015年11月5日
				WO	2010083615	A1	2010年7月29日
				CA	2750561	A1	2010年7月29日
US	2017137814	A1	2017年5月18日	EP	3736334	A1	2020年11月11日
				WO	2016011123	A1	2016年1月21日
				EP	3169784	A1	2017年5月24日
				US	2019233817	A1	2019年8月1日
US	2018245076	A1	2018年8月30日	MX	2017011009	A	2017年10月20日
				HK	1248522	A1	2018年10月19日
				RU	2017133142	A	2019年3月28日
				BR	112017015307	A2	2018年1月16日
				KR	20170122769	A	2017年11月6日
				EP	3270931	A1	2018年1月24日
				JP	2018511555	A	2018年4月26日
				IL	253346	D0	2017年9月28日
				CN	107405358	A	2017年11月28日
				CA	2977971	A1	2016年9月1日
				US	2020095581	A1	2020年3月26日
				WO	2016138355	A1	2016年9月1日
				AU	2016222548	A1	2017年7月27日
WO	2019051402	A1	2019年3月14日	CL	2020000593	A1	2020年9月25日
				PH	12020500332	A1	2020年9月28日
				JP	2020533334	A	2020年11月19日
				SG	11201912178V	A	2020年1月30日
				UY	37871	A	2019年3月29日
				US	2019078088	A1	2019年3月14日
				US	2020299690	A1	2020年9月24日
				EC	SP20017905	A	2020年6月30日
				KR	20200044013	A	2020年4月28日
				CR	20200108	A	2020年6月28日
				JO	P20200054	A1	2019年3月11日
				CO	2020002586	A2	2020年4月1日
				BR	112020002413	A2	2020年7月28日
				CN	111107853	A	2020年5月5日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/103049

检索报告引用的专利文件	公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
		AU	2018329190	A1	2020年4月23日
		TN	2020000039	A1	2021年10月4日
		TW	201920227	A	2019年6月1日
		CA	3074303	A1	2019年3月14日
		PE	20201283	A1	2020年11月24日
		EP	3681516	A1	2020年7月22日
		IL	273172	A	2020年4月30日
		US	2022064646	A1	2022年3月3日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

１６８
(72)発明者　チャン、ホンイェン
中華人民共和国 チアンスー ２１５３００、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアンフォン ロード ナンバー １６８
(72)発明者　カオ、シャン
中華人民共和国 チアンスー ２１５３００、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアンフォン ロード ナンバー １６８

Ｆターム（参考）　4C084　AA13 MA66 NA14 ZC331 ZC332
4C086　AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZC33