

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7337044号

(P7337044)

(45)発行日 令和5年9月1日(2023.9.1)

(24)登録日 令和5年8月24日(2023.8.24)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/713(2006.01)

A 6 1 K

31/713

Z N A

A 6 1 P 3/00 (2006.01)

A 6 1 P

3/00

Z M D

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 0 5

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K

47/54

A 6 1 K 47/04 (2006.01)

A 6 1 K

47/04

請求項の数 17 (全101頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-501279(P2020-501279)

(86)(22)出願日 平成30年7月12日(2018.7.12)

(65)公表番号 特表2020-526553(P2020-526553
A)

(43)公表日 令和2年8月31日(2020.8.31)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/041891

(87)国際公開番号 WO2019/014491

(87)国際公開日 平成31年1月17日(2019.1.17)

審査請求日 令和3年7月5日(2021.7.5)

(31)優先権主張番号 62/646,285

(32)優先日 平成30年3月21日(2018.3.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/532,176

(32)優先日 平成29年7月13日(2017.7.13)

最終頁に続く

(73)特許権者 505369158

アルナイラム ファーマシューティカル

ズ, インコーポレイテッド

ALNYLAM PHARMACEUT

ICALS, INC.

アメリカ合衆国02142マサチューセ

ッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンド

ール・ストリート675、ヘンリ・エイ

・ターミア・スクエア

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

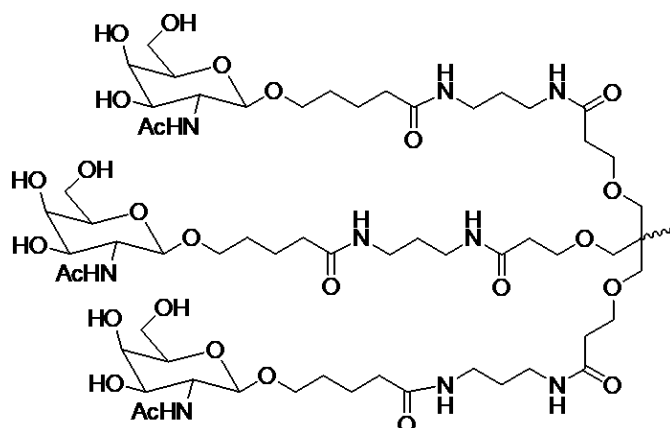
(54)【発明の名称】 H A O 1 (ヒドロキシ酸オキシダーゼ 1 (グリコール酸オキシダーゼ)) 遺伝子発現の阻
害方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

原発性高シュウ酸尿症1型(PH1)を有するヒト対象を処置するための方法において
 使用するための皮下投与のための医薬組成物であって、組成物は、体重1kg当たり少な
 くとも3.0mgまたは体重1kg当たり少なくとも6mgのヒドロキシ酸オキシダーゼ
 1(HAO1)の発現を阻害する二本鎖リボ核酸(dsRNA)剤を含み、
 dsRNA剤は、ヌクレオチド配列 5'-gsascuuuUcfUfCfCfugga
 aaauaa-3' (配列番号14)を含むセンス鎖およびヌクレオチド配列 5'-us
 AfsuauUfUcfCfaggaUfgAfaagucscsa-3' (配列番号1
 5)を含むアンチセンス鎖を含み、
 センス鎖の3'末端は、

【化 1】



10

である N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 3 リガンドにコンジュゲートされており、

a、c、g および u は、それぞれ、2' - O - メチル (2' - O M e) A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f は、それぞれ、2' - フルオロ A、C、G および U であり；s は、ホスホロチオエート結合であり、そして

組成物は、負荷相の後に持続相を含む投与計画に基づいて投与され、組成物の体重 1 k g 当たり 3 . 0 m g の用量または体重 1 k g 当たり 6 m g の用量が、負荷相において 3 ヶ月間にわたって 1 か月に 1 回対象に投与され、そして組成物の体重 1 k g 当たり 3 . 0 m g の用量または体重 1 k g 当たり 6 m g の用量が、持続相において 1 か月に 1 回または 3 か月に 1 回対象に投与される、

20

医薬組成物。

【請求項 2】

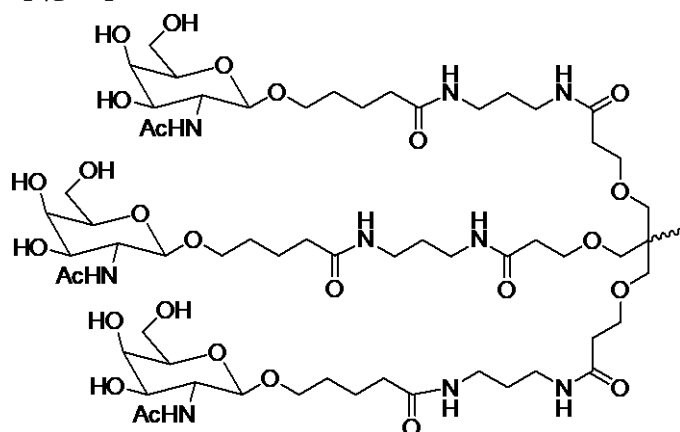
原発性高シュウ酸尿症 1 型 (P H 1) を有するヒト対象においてヒドロキシ酸オキシダーゼ 1 (H A O 1) 酵素を阻害するための方法において使用するための皮下投与のための医薬組成物であって、組成物は、体重 1 k g 当たり少なくとも 3 . 0 m g または体重 1 k g 当たり少なくとも 6 m g の H A O 1 の発現を阻害する二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 剤を含み、

30

d s R N A 剤は、ヌクレオチド配列 5' - g s a s c u u u C f a U f C f C f u g g a a a u a u a - 3' (配列番号 1 4) を含むセンス鎖およびヌクレオチド配列 5' - u s A f s u a u U f u C f C f a g g a U f g A f a a g u c s c s a - 3' (配列番号 1 5) を含むアンチセンス鎖を含み、

センス鎖の 3' 末端は、

【化 2】



40

である N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 3 リガンドにコンジュゲートされており、

50

a、c、g および u は、それぞれ、2'-O-メチル(2'-OMe)A、C、G および U であり；A f、C f、G f および U f は、それぞれ、2'-フルオロA、C、G および U であり；s は、ホスホロチオエート結合であり、そして

組成物は、負荷相の後に持続相を含む投与計画に基づいて投与され、組成物の体重 1 k g 当たり 3 . 0 m g の用量または体重 1 k g 当たり 6 m g の用量が、負荷相において 3 ヶ月間にわたって 1 か月に 1 回対象に投与され、そして組成物の体重 1 k g 当たり 3 . 0 m g の用量または体重 1 k g 当たり 6 m g の用量が、持続相において 1 か月に 1 回または 3 か月に 1 回対象に投与される、

医薬組成物。

【請求項 3】

対象の血漿中グリコール酸塩レベルを決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

対象における尿中シュウ酸塩排泄を決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

対象における G O 酵素阻害を決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

組成物が、非緩衝液中に二本鎖 R N A i 剤またはその塩を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

非緩衝液が、生理食塩水または水である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

組成物が、緩衝液中に二本鎖 R N A i 剤またはその塩を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

緩衝液が、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩、リン酸塩、又はこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

緩衝液が、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

対象の尿中シュウ酸塩排泄が、医薬組成物の投与後に少なくとも 50 % 減少される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

対象の血漿中グリコール酸塩レベルが、医薬組成物の投与後に少なくとも 75 日目まで増加し、維持される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

対象の H A O 1 酵素が、医薬組成物の投与前と比較して医薬組成物の投与後に少なくとも 90 % 阻害される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

対象が医薬組成物の投与前に $\geq 0 . 70 \text{ mmol} / 24 \text{ 時間} / 1 . 73 \text{ m}^2$ の尿中シュウ酸塩排泄を有する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

対象が処置前に $> 45 \text{ ml} / \text{分} / 1 . 73 \text{ m}^2$ の e G F R 推定糸球体濾過率(eGFR)を有する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

対象が処置前に末期腎不全(ESRD)を有する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

対象の H A O 1 遺伝子における突然変異を同定することをさらに含む、請求項 1 ~ 1.6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、それぞれ参照によりそれらの全開示内容が本明細書に組み入れられる、2017年7月13日出願の米国仮特許出願第62/532,176号明細書、2017年11月3日出願の同第62/581,565号明細書、2018年3月21日出願の同第62/646,285号明細書及び2018年5月7日出願の同第62/682,020号明細書の利益を請求するものである。

10

【0002】

配列表

本出願は、本出願とともに A S C I I 形式で電子的に提出された15の配列を含む配列表を含み、この配列表は、参照によりその全てが本明細書に組み入れられるものとする。2018年7月12日に作成された前記 A S C I I コピーは、40491WO__sequence listing .txt という名称が付され、そのサイズは、8045バイトである。

【背景技術】

【0003】

20

原発性シュウ酸尿症1型(PH1)は、グリオキシル酸代謝の常染色体劣性障害である。肝臓グリオキシル酸の解毒が、A G X T 遺伝子の変異によって妨げられ、この A G X T 遺伝子は、肝臓ペルオキシソームアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ(A G T)酵素をコードする。A G T 1は、ヒドロキシプロリンの代謝分解における最終酵素である。中間代謝産物グリオキシル酸をグリシンに変換する A G T 機能の喪失により、グリオキシル酸が蓄積し、グリオキシル酸は、ヒドロキシ酸オキシダーゼ(H A O 1)としても知られる酵素グリコール酸オキシダーゼ(G O)によってシュウ酸塩に酸化されるグリコール酸に還元される。

【0004】

グリオキシル酸塩、シュウ酸塩の重要な前駆体の調節が、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、及びサイトゾルを含む多数の細胞内の部位で生じる。PH1患者における過剰なシュウ酸塩は、腎臓によって十分に排出することができないため、シュウ酸カルシウム結晶が形成され、腎臓及び尿路に蓄積する。シュウ酸による尿細管毒性、腎石灰沈着、及び石による腎臓の閉塞の組み合わせによって腎障害が引き起こされる。30%を超える患者が、末期腎不全(E S R D)に進行する。

30

【0005】

H A O 1 遺伝子は、グリコール酸オキシダーゼ(「G O」)としても知られる酵素ヒドロキシ酸オキシダーゼ1をコードする。H A O 1 タンパク質は、主に肝臓で発現され、且つグリコール酸に対して最も活性が高い2-ヒドロキシ酸オキシダーゼである。

【0006】

40

A G T 1 遺伝子が欠失されたPH1のマウスモデルでは、H A O 1 遺伝子が欠失された場合に尿中シュウ酸塩のレベルが低下する。

【0007】

PH1、A G X T、及びH A O 1は、(非特許文献1~4)に記載されている。組成物及び方法は、2015年10月9日出願の(特許文献1)に記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】国際出願P C T / U S 2 0 1 5 / 0 5 4 8 8 1号明細書

【非特許文献】

50

【0009】

【文献】Angel L. Pey, Armando Albert, and Eduardo Salido, "Protein Homeostasis Defects of Alanine-Glyoxylate Aminotransferase: New Therapeutic Strategies in Primary Hyperoxaluria Type I," BioMed Research International, vol. 2013, Article ID 687658, 15 pages, 2013. doi:10.1155/2013/687658

Cochat and Rumsby (2013) NEJM 369:7

Salido et al (2006) PNAS 103:18249

Baker et al (2004) American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology Published 1 October 2004 Vol. 287 no. 4, H1771-H1779 DOI: 10.1152/ajpheart.00234.2004

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、HAO1発現を阻害するため、HAO1関連障害、例えばPH1を処置するため、及びヒト対象の血漿中グリコール酸塩を増加させて尿中シュウ酸塩を減少させるために、HAO1を標的とするRNAi剤、例えば二本鎖iRNA剤を使用する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、ヒト(Homo sapiens)HAO1 mRNAのヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。

【図2】図2は、ヒト(Homo sapiens)HAO1 mRNAのヌクレオチド配列の逆相補体(配列番号2)を示す。

【図3】図3は、初代カニクイザル肝細胞でのALN-65585によるHAO1 mRNAの用量依存性阻害を示すグラフである。

【図4】図4は、マウスにおけるALN-GO1での単回投与処置後のHAO1 mRNA及び血清中グリコール酸塩のレベルを示す2つのグラフである。

【図5】図5は、マウスにおけるALN-GO1での単回投与処置後のHAO1 mRNAサイレンシングの期間を示すグラフである。

【図6】図6は、ラットにおけるALN-GO1での単回投与処置後のHAO1 mRNA及び血清中グリコール酸塩のレベルを示すグラフである。

【図7】図7は、ALN-GO1の単回投与後の原発性シュウ酸尿症I型のマウスモデルでの尿中シュウ酸塩及びグリコール酸塩のレベルを示す2つのグラフである。

【図8A】図8Aは、ALN-GO1の単回投与後の原発性シュウ酸尿症I型のラットモデルでのHAO1 mRNAのレベルを示すグラフである。

【図8B】図8Bは、ALN-GO1の単回投与後の原発性シュウ酸尿症I型のラットモデルでの尿中シュウ酸塩のレベルを示すグラフである。

【図9】図9は、ALN-GO1の反復投与後の原発性シュウ酸尿症I型のラットモデルでのHAO1 mRNA及び尿中シュウ酸塩のレベルを示す2つのグラフである。

【図10】図10は、非ヒト霊長類での反復投与後のHAO1 mRNA及び尿中グリコール酸塩のレベルを示す2つのグラフである。

【図11】図11は、HAO1 siRNA ALN-GO1で処置された健康なヒト対象の血漿中グリコール酸塩レベルを示すグラフである。

【図12】図12は、HAO1 siRNA ALN-GO1で処置された健康なヒト対象の血漿中グリコール酸塩の回復期間を示すグラフである。

【図13】図13は、ALN-GO1の投与後のコホート1における24時間の尿中シュ

ウ酸塩レベルを示すグラフである。

【図 1 4】図 1 4 は、A L N - G O 1 の投与の 2 9 日後のコホート 2 における 2 4 時間の尿中シュウ酸塩レベルを示すグラフである。

【図 1 5】図 1 5 は、A L N - G O 1 の投与後の患者における尿中シュウ酸塩レベルの減少を示すグラフである。

【図 1 6】図 1 6 は、診断後の年数と E S R D を示すグラフである。

【図 1 7】図 1 7 は、P K - P D モデルを使用したグラフであり、血漿中グリコール酸塩レベルの用量依存的増加を示している。

【図 1 8】図 1 8 は、P K - P D モデルを使用して、P H 1 患者におけるシュウ酸塩応答を示すグラフである。実線 = 中央値；網掛け部分 = 5 ~ 9 5 パーセンタイル；矢印 = 用量投与；シンボル = 観察値。負の時間値は、活発な A L N - G O 1 投与計画の開始前の時間を表す。シミュレーションは、ベースライン尿中シュウ酸塩中央値を $1.7 \text{ (mmol / 24 時間 / 1.73 m}^2\text{)}$ と仮定して行われた。

10

【図 1 9】図 1 9 は、P K - P D モデルを使用して、P H 1 患者における投与量と定常状態の G O 酵素阻害との関係を予測するグラフである。実線 = 中央値；網掛け部分 = 5 ~ 9 5 パーセンタイル。グルコール酸の酸化速度及びシュウ酸塩の分解速度のモデル推定阻害は、G O 酵素阻害と同じであると考えられる。

【図 2 0】図 2 0 は、P K - P D モデルを使用して、P H 1 患者における投与量と定常状態の尿中シュウ酸塩の減少との関係を予測するグラフである。薄い点線 = $1.5 \times$ シュウ酸塩の U L N : $0.7 \text{ mmol / 24 時間 / 1.73 m}^2$ ；濃い点線 = 尿中シュウ酸塩の U L N : $0.46 \text{ mmol / 24 時間 / 1.73 m}^2$ ；実線 = 中央値；網掛け部分 = 5 ~ 9 5 パーセンタイル。

20

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、H A O 1 を標的とする R N A i 剤、例えば、二本鎖 R N A i 剤を含む組成物を提供する。本発明はまた、H A O 1 の発現を阻害するため、及び H A O 1 関連障害を処置するために本発明の組成物を使用する方法も提供する。

【0013】

I. 定義

本発明をより容易に理解できるようにするために、まず特定の用語を定義する。加えて、パラメーターの数値又は数値範囲が述べられる場合は必ず、述べられる値に対する中間の値及び範囲も本発明の一部であるものとすることに留意されたい。

30

【0014】

冠詞「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、1つ又は2つ以上の(即ち、少なくとも1つの)文法的な目的語である物品を指すために本明細書で使用される。例として、「1つの要素」は、1つの要素又は2つ以上の要素、例えば、複数の要素を意味する。

【0015】

「含む」という語は、「限定されるものではないが、~を含む」という句を意味し、この句と互換的に本明細書で使用される。

【0016】

「又は」という語は、本明細書では、明確に否定する記載がない限り、「及び/又は」という語を意味し、且つ「及び/又は」と互換的に使用される。

40

【0017】

本明細書で使用される「H A O 1」は、酵素ヒドロキシ酸オキシダーゼ 1 をコードする遺伝子を指す。他の遺伝子名としては、G O、G O X、G O X 1、及び H A O X 1 が挙げられる。このタンパク質は、グリコール酸オキシダーゼ及び(S)-2-ヒドロキシ酸オキシダーゼとしても知られている。ヒト H A O 1 mRNA の G e n B a n k アクセッション番号は、NM_017545.2 であり；カニクイザル(M a c a c a f a s c i c u l a r i s) H A O 1 mRNA は、XM_005568381.1 であり；ハツカネズミ(M u s m u s c u l u s) H A O 1 mRNA は、NM_010403.2 であ

50

り；ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) HAO1 mRNAは、XM_006235096.1である。

【0018】

本明細書で使用される「HAO1」という語は、自然に存在するHAO1遺伝子のDNA配列変異体、例えば、HAO1遺伝子における一塩基多型 (SNP) も指す。例示的なSNPは、www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNPで利用可能なNCBI dbSNP Short Genetic Variationsデータベースで確認することができる。

【0019】

本明細書で使用される「標的配列」は、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含む、HAO1遺伝子の転写の際に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続した部分を指す。

10

【0020】

本明細書で使用される「配列を含む鎖」という語は、標準的なヌクレオチド命名法を用いて参照されるこの配列によって示されるヌクレオチド鎖を含むオリゴヌクレオチドを指す。

【0021】

「G」、「C」、「A」、及び「U」はそれぞれ、一般に、塩基としてグアニン、シトシン、アデニン、及びウラシルを含むヌクレオチドの略号である。「T」及び「dT」は、本明細書では互換的に使用され、核酸塩基がチミジン、例えば、デオキシリボチミン、2'-デオキシチミジン、又はチミジンであるデオキシリボヌクレオチドを指す。しかしながら、「リボヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、又は「デオキシリボヌクレオチド」という語は、詳細が後述される修飾ヌクレオチド、又は代理置換部分 (surrogate replacement moiety) も指すことがあることを理解されたい。当業者であれば、グアニン、シトシン、アデニン、及びウラシルを、このような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対の特性を実質的に変更することなく、他の部分によって置換できることを十分に認識している。例えば、限定されるものではないが、塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン、又はウラシルを含むヌクレオチドと塩基対を形成し得る。従って、ウラシル、グアニン、又はアデニンを含むヌクレオチドは、例えば、イノシンを含むヌクレオチドによって本発明のヌクレオチド配列において置換することができる。このような置換部分を含む配列は、本発明の実施形態である。

20

30

【0022】

本明細書で互換的に使用される「iRNA」、「RNAi剤」、「iRNA剤」及び「RNA干渉剤」という語は、本明細書で定義されるRNAを含む作用剤を指し、且つRNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) 経路によってRNA転写物の標的の切断を媒介する。iRNAは、RNA干渉 (RNAi) としてのプロセスによってmRNAの配列特異的分解を誘導する。iRNAは、細胞、例えば、対象の細胞、例えば、哺乳動物対象の細胞におけるHAO1の発現を調節、例えば、阻害する。

【0023】

40

一実施形態では、本発明のRNAi剤は、標的RNA配列、例えば、HAO1標的mRNA配列と相互作用して標的RNAの切断を誘導する一本鎖RNAを含む。理論に拘束されることを望むものではないが、細胞内に導入される長い二本鎖RNAは、Dicerとして知られているIII型エンドヌクレアーゼによってsiRNAに分解され则认为られている (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485)。Dicer、リボヌクレアーゼIII様酵素は、dsRNAを処理して、2塩基3'オーバーハングを特徴とする19~23塩基対の短い干渉RNAにする (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363)。次いで、siRNAは、RNA誘導型サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれ、そこで、1つ以上のヘリカーゼが、siRNA二重鎖を巻き戻し、相補的なアンチセンス鎖が、標的の認識をガイド

50

できるようになる (Nykänen, et al., (2001) Cell 107:309)。適切な標的 mRNA に結合すると、RISC 内の 1 つ以上のエンドヌクレアーゼが、標的を切断してサイレンシングを誘導する (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。従って、一態様では、本発明は、細胞内で生成されて、RISC 複合体の形成を促進して標的遺伝子、例えば、HAO1 遺伝子のサイレンシングを行う一本鎖 RNA (siRNA) に関する。従って、「siRNA」という語は、本明細書では、上記の RNAi を指すためにも使用される。

【0024】

別の実施形態では、RNAi 剤は、標的 mRNA を阻害するために細胞又は器官に導入される一本鎖 siRNA であっても良い。一本鎖 RNAi 剤は、後に標的 mRNA を切断する RISC エンドヌクレアーゼ Argonaute 2 に結合する。一本鎖 siRNA は、一般に、15 ~ 30 のヌクレオチドであり、化学修飾されている。一本鎖 siRNA のデザイン及び試験は、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 8,101,348 号明細書及び Lima et al., (2012) Cell 150:883-894 に記載されている。本明細書に記載されるいずれのアンチセンスヌクレオチド配列も、本明細書に記載される一本鎖 siRNA として使用する、又は Lima et al., (2012) Cell 150:883-894 に記載されている方法によって化学修飾することができる。

【0025】

なお別の実施形態では、本発明は、HAO1 を標的とする一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子を提供する。「一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子」は、標的 mRNA (即ち、HAO1) 内の配列に相補的である。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、mRNA に塩基対合して翻訳機構を物理的に妨害することによって化学量論的に翻訳を阻害することができる。Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355 を参照されたい。或いは、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、標的にハイブリダイズして、RNase H 切断事象によって標的を切断することによって標的 mRNA を阻害する。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、約 10 ~ 約 30 ヌクレオチド長であり得、且つ標的配列に相補的な配列を有する。例えば、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、本明細書に記載のいずれか 1 つのアンチセンスヌクレオチド配列、例えば、表 1 又は表 2 のいずれか 1 つに示される配列の少なくとも約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は 20 以上の連続したヌクレオチドである配列を含むことができる、又は本明細書に記載の任意の標的部位に結合することができる。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、修飾 RNA、DNA、又はこれらの組み合わせを含み得る。

【0026】

別の実施形態では、本発明の組成物、使用、及び方法に使用される「iRNA」は、二本鎖 RNA であり、本明細書では、「二本鎖 RNAi 剤」、「二本鎖 RNA (dsRNA) 分子」、「dsRNA 剤」、又は「dsRNA」と呼ばれる。「dsRNA」という語は、標的 RNA、即ち、HAO1 遺伝子に対して「センス」及び「アンチセンス」の向きを有するとされる、2 つの逆平行及び実質的に相補的な核酸鎖を含む二重鎖構造を有する、リボ核酸分子の複合体を指す。本発明の一部の実施形態では、二本鎖 RNA (dsRNA) が、本明細書では RNA 干渉又は RNAi と呼ばれる転写後遺伝子サイレンシング機構によって標的 RNA、例えば、mRNA の分解を引き起こす。

【0027】

一般に、dsRNA 分子の各鎖のヌクレオチドの大部分は、リボヌクレオチドであるが、本明細書で詳細に説明されるように、それぞれの鎖又は両方の鎖が、1 つ以上の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチド及び / 又は修飾ヌクレオチドも含み得る。加えて、本明細書で使用される「RNAi 剤」は、化学修飾を有するリボヌクレオチドを含み得る；RNAi 剤は、多数のヌクレオチドの実質的な修飾を含み得る。このような修飾は、本明細書に開示される又は当分野で公知のあらゆるタイプの修飾を含み得る。s

10

20

30

40

50

iRNA型分子で使われるこのような修飾はいずれも、本明細書及び特許請求の範囲において「RNAi剤」に包含される。

【0028】

二重鎖構造を形成する2本の鎖は、1つの大きいRNA分子の異なる部分でも良いし、又は別個のRNA分子でも良い。2本の鎖が、1つの大きい分子の一部であり、従って、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端と他方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの連続した鎖によって接続されている場合、接続するRNA鎖は、「ヘアピンループ」と呼ばれる。2本の鎖が、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端と他方の鎖の5'末端との間のヌクレオチドの連続した鎖以外の手段によって共有結合で接続されている場合、この接続構造は「リンカー」と呼ばれる。RNA鎖は、同数又は異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、dsRNAの最も短い鎖のヌクレオチドの数から二重鎖に存在する全てのオーバーハングを減じた値である。二重鎖構造に加えて、RNAi剤は、1つの以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。本明細書で使われる「siRNA」という語も、上記のようなRNAi剤を指す。

【0029】

一実施形態では、本発明のRNAi剤は、標的RNA配列、例えば、HAO1標的mRNA配列と相互作用して標的RNAの切断を誘導する24～30ヌクレオチドのdsRNAである。理論に拘束されることを望むものではないが、細胞内に導入される長い二本鎖RNAは、Dicerとして知られているIII型エンドヌクレアーゼによってsiRNAに分解される(Sharp et al., (2001) Genes Dev. 15: 485)。Dicer、リボヌクレアーゼIII様酵素は、dsRNAを処理して、2つの塩基3'オーバーハングを特徴とする19～23塩基対の短い干渉RNAにする(Bernstein, et al., (2001) Nature 409: 363)。次いで、siRNAは、RNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)に取り込まれ、そこで、1つ以上のヘリカーゼが、siRNA二重鎖を巻き戻し、相補的なアンチセンス鎖が、標的の認識をガイドできるようになる(Nykanen, et al., (2001) Cell 107: 309)。適切な標的mRNAに結合すると、RISC内の1つ以上のエンドヌクレアーゼが、標的を切断してサイレンシングを誘導する(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15: 188)。

【0030】

本明細書で使われる「ヌクレオチドオーバーハング」は、RNAi剤の一方の鎖の3'末端が他方の鎖の5'末端を越えて延びている場合又はその逆の場合に、塩基対を形成していないヌクレオチド、又はRNAi剤の二重鎖構造から突き出たヌクレオチドを指す。「平滑」又は「平滑末端」とは、二本鎖RNAi剤の端部に塩基対を形成していないヌクレオチドが存在しない、即ち、ヌクレオチドオーバーハングが存在しないことを意味する。「平滑末端」RNAi剤とは、その全長に亘って二本鎖である、即ち、分子のいずれの端部にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないdsRNAのことである。本発明のRNAi剤は、一端にヌクレオチドオーバーハング(即ち、一端がオーバーハングで、他端が平滑末端)を有する、又は両端にヌクレオチドオーバーハングを有するRNAi剤を含む。

【0031】

「アンチセンス鎖」という語は、標的配列(例えば、ヒトHAO1 mRNA)に実質的に相補的な領域を含む二本鎖RNAi剤の鎖を指す。本明細書で使われる「HAO1をコードするmRNAの一部に相補的な領域」という語は、HAO1 mRNA配列の一部に実質的に相補的なアンチセンス鎖の領域を指す。相補性の領域が、標的配列に完全には相補的でない場合、ミスマッチは、末端領域で最も許容され、存在する場合は、一般に末端領域、又は、例えば、5'及び/又は3'末端の6、5、4、3、若しくは2ヌクレオチド以内の領域である。

【0032】

本明細書で使われる「センス鎖」という語は、アンチセンス鎖の領域に実質的に相補的な領域を含むdsRNAの鎖を指す。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される「切断領域」という語は、切断部位のすぐ近傍に位置する領域を指す。切断部位は、切断が起こる標的上の部位である。一部の実施形態では、切断領域は、切断部位のいずれかの端部及びこの切断部位のすぐ近傍の3つの塩基を含む。一部の実施形態では、切断領域は、切断部位のいずれかの端部及びこの切断部位のすぐ近傍の2つの塩基を含む。一部の実施形態では、切断部位は、アンチセンス鎖のヌクレオチド10及び11によって結合された部位に特異的に存在し、切断領域は、ヌクレオチド11、12、及び13を含む。

【 0 0 3 4 】

特段の記載がない限り、本明細書で使用される「相補的な」という語は、第2のヌクレオチド配列に対する第1のヌクレオチド配列を説明するために使用される場合、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、特定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとハイブリダイズして二重鎖構造を形成する能力を指し、当業者には理解される。このような条件は、例えば、ストリンジェント条件とすることができ、このストリンジェント条件は：400 mMのNaCl、40 mMのPIPES pH 6.4、1 mMのEDTA、50 °C又は70 °Cで12 ~ 16時間、これに続く洗浄を含み得る。他の条件、例えば、生物体内で遭遇し得る生理的に適切な条件を適用することができる。例えば、相補的な配列は、例えば、RNAiになるために核酸の関連機能を果たすのに十分である。当業者であれば、ハイブリダイズしたヌクレオチドの最終的な適用に従った2つの配列の相補性の試験に最も適切な一連の条件を決定することができる。

【 0 0 3 5 】

第1及び第2のヌクレオチド配列の全長に亘って、第1のヌクレオチド配列のヌクレオチドと第2のヌクレオチド配列のヌクレオチドとの塩基対合が存在する場合、配列は、互いに対して「完全に相補的」であり得る。しかしながら、本明細書では、第1の配列が、第2の配列に対して「実質的に相補的」であると述べられる場合、2つの配列が、完全に相補的であり得る、又は2つの配列が、最終的な適用に対して最も適した条件下でハイブリダイズする能力を維持したまま、ハイブリダイゼーション時に4つ、3つ、又は2つを超えない、1つ以上のミスマッチの塩基対を形成し得る。しかしながら、2つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーション時に1つ以上の一本鎖オーバーハングを形成するようにデザインされている場合、このようなオーバーハングは、相補性の決定に係るミスマッチとは見なされるべきではない。例えば、21ヌクレオチド長さの1つのオリゴヌクレオチドと、23ヌクレオチド長さの別のオリゴヌクレオチドを含み、長い方のオリゴヌクレオチドが、短い方のオリゴヌクレオチドに完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むdsRNAはなお、本明細書に記載される目的のために「完全に相補的」であると言うことができる。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される「相補的な」配列は、相補的な配列のハイブリダイズする能力についての上記の要件が満たされるのであれば、非ワトソン・クリック塩基対及び/又は非天然の修飾ヌクレオチドから形成された塩基対も含んでも良いし、又はワトソン・クリック塩基対及び/又は非天然の修飾ヌクレオチドから形成された塩基対から完全に形成されても良い。このような、非ワトソン・クリック塩基対としては、限定されるものではないが、G : Uゆらぎ塩基対形成又はフーグスタイン塩基対形成 (Hoogsteen base pairing) が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

本明細書の「相補的な」、「完全に相補的な」、及び「実質的に相補的な」という語は、これらの使用の文脈から分かるように、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の塩基のマッチ、又はdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基のマッチに対して使用することができる。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される、メッセンジャーRNA (mRNA) の「少なくとも一部に実質的に相補的な」ポリヌクレオチドは、5' UTR、オープンリーディングフレーム (ORF)、又は3' UTRを含む目的のmRNA (例えば、HAO1をコードするmRNA) の連続した部分に実質的に相補的なポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、その配列が、HAO1をコードするmRNAの連続した部分に実質的に相補的である場合、HAO1 mRNAの少なくとも一部に相補的である。

【0039】

本明細書で使用される「阻害する」という語は、「減少させる」、「サイレンシングする」、「下方制御する」、「抑制する」、及び他の同様の語と互換的に使用され、あらゆるレベルの阻害を含む。

10

【0040】

本明細書で使用される「HAO1の発現を阻害する」という句は、あらゆるHAO1遺伝子 (例えば、マウスHAO1遺伝子、ラットHAO1遺伝子、サルHAO1遺伝子、又はヒトHAO1遺伝子など) 及びHAO1遺伝子の変異体 (例えば、自然に存在する変異体) 又は突然変異体の発現の阻害を含む。従って、HAO1遺伝子は、野生型HAO1遺伝子、突然変異HAO1遺伝子、又は遺伝子操作された細胞、細胞群、若しくは生物の文脈における遺伝子組換えHAO1遺伝子であっても良い。

【0041】

「HAO1遺伝子の発現を阻害する」は、HAO1遺伝子の任意のレベルの阻害、例えば、HAO1遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制、例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の阻害を含む。

20

【0042】

HAO1遺伝子の発現を、HAO1遺伝子の発現に関連した任意の変数のレベル、例えば、組織でのHAO1 mRNAのレベル又はHAO1タンパク質のレベル、及び/又は尿中シュウ酸塩のレベルなどに基づいて評価することができる。阻害は、対照レベルと比較した1つ以上のこれらの変数の絶対レベル又は相対レベルの低下によって評価することができる。対照レベルは、当分野で利用されているあらゆるタイプの対照レベル、例えば、投薬前ベースラインレベル、又は未処置若しくは対照 (例えば、緩衝液のみの対照若しくは不活性剤の対照) で処置された類似の対象、細胞、若しくはサンプルから決定されるレベルであり得る。

30

【0043】

本明細書で使用される「細胞に二本鎖RNAi剤を接触させる」という句は、任意の可能な手段によって細胞に接触させることを含む。細胞に二本鎖RNAi剤を接触させるは、*in vitro*で細胞にRNAi剤を接触させること、又は*in vivo*で細胞にRNAi剤を接触させることを含む。このような接触は、直接的又は間接的に行うことができる。従って、例えば、RNAi剤を、方法を行う個人によって細胞に物理的に接触させることができる、或いは、RNAi剤を、後に細胞への接触を可能にする又は接触させる状況に置くことができる。

40

【0044】

*in vitro*での細胞の接触は、例えば、細胞をRNAi剤と共にインキュベートすることによって行うことができる。*in vivo*での細胞の接触は、例えば、細胞が位置する組織若しくはその近傍にRNAi剤を注入することによって、又は接触させられる細胞が位置する組織にRNAi剤が後に到達するように別の領域、血流若しくは皮下腔にRNAi剤を注入することによって行うことができる。例えば、RNAi剤は、RNA

50

i 剤を目的の部位、例えば、肝臓に誘導するリガンド、例えば、GalNAc₃リガンドを含んでも良いし、且つ/又はリガンドに結合しても良い。接触させる *in vitro* 法と *in vivo* 法の組み合わせも可能である。本発明の方法に関連して、細胞を *in vitro* で RNAi 剤に接触させて、後に対象に移植することができる。

【0045】

本明細書で使用される「対象」は、ヒト又は非ヒト動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳動物を含む。対象は、トランスジェニック生物を含み得る。最も好ましくは、対象は、ヒト、例えば、HAO1 関連障害に罹患している又はこの障害を発症しやすいヒトである。

【0046】

本明細書で使用される「患者」又は「対象」は、ヒト又は非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、例えば、ヒト又はサルを含むものとする。最も好ましくは、対象又は患者はヒトである。

【0047】

本明細書で使用される「HAO1 関連障害」は、HAO1 の発現を阻害することによって、処置若しくは防止することができるあらゆる障害、又は緩和することができる症状を含むものとする。例としては、限定されるものではないが、原発性シュウ酸尿症 1 型 (PH1) が挙げられる。

【0048】

本明細書で使用される「治療有効量」は、HAO1 関連疾患を治療するために患者に投与されたときに、この疾患を治療する（例えば、既存の疾患又は疾患の 1 つ以上の症状を軽減する、改善する、又は維持する）のに十分な RNAi 剤の量を含むものとする。「治療有効量」は、RNAi 剤、RNAi 剤が投与される方法、疾患及びその重症度と病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、HAO1 発現によって媒介される病的過程の段階、以前の治療又は併用療法の種類（存在する場合）、及び治療される患者の他の個人的な特徴によって異なり得る。

【0049】

本明細書で使用される「予防有効量」は、HAO1 関連疾患に罹患していない、又はその症状を示していないがこの疾患に罹患する可能性がある患者に投与されたときに、この疾患又はその 1 つ以上の症状を防止又は改善するのに十分な RNAi 剤の量を含むものとする。この疾患を改善することは、疾患の進行を遅延させること、又は後に発症する疾患の重症度を軽減することを含む。「予防有効量」は、RNAi 剤、RNAi 剤が投与される方法、疾患のリスクの程度、及び病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、以前の治療又は併用療法の種類（存在する場合）、及び治療される患者の他の個人的な特徴によって異なり得る。

【0050】

「治療有効量」又は「予防有効量」はまた、あらゆる治療に適用可能な妥当な効果/リスク比である程度の望ましい局所効果又は全身効果が得られる RNAi 剤の量も含む。本発明の方法に利用される RNAi 剤は、このような治療に適用可能な妥当な効果/リスク比をもたらす十分な量を投与することができる。

【0051】

本明細書で使用される「サンプル」という語は、対象から単離される同様の液体、細胞、又は組織の採取物、及び対象の体内に存在する液体、細胞、又は組織を含む。生体液の例として、血液、血清、及び漿膜液、血漿、脳脊髄液、眼液、リンパ液、尿、及び唾液などが挙げられる。組織サンプルとしては、組織、器官、又は局所領域からのサンプルを挙げることができる。例えば、サンプルは、特定の器官、器官の一部、又はこれらの器官内の液体若しくは細胞に由来し得る。特定の実施形態では、サンプルは、肝臓（例えば、全肝臓、肝臓の特定の部分、若しくは肝臓の特定の種類の細胞、例えば、肝細胞）に由来し得る。一部の実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象から採取された血液又は血漿を指す。さらなる実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象に由来する

10

20

30

40

50

肝組織（若しくはその小成分）を指す。

【0052】

II. 本発明の dsRNA iRNA 剤

細胞、例えば、対象、例えば、哺乳動物、例えば、HAO1 関連障害を有するヒトの細胞での HAO1 遺伝子の発現を阻害する二本鎖 RNA i 剤、及びこのような二本鎖 RNA i 剤の使用が、本明細書に記載されている。

【0053】

従って、本発明は、in vivo での標的遺伝子（即ち、HAO1 遺伝子）の発現を阻害することができる化学修飾を有する二本鎖 RNA i 剤を提供する。

【0054】

以下により詳細に示されているように、本発明の特定の態様では、本発明の iRNA のヌクレオチドの実質的に全てが修飾されている。本発明の他の実施形態では、本発明の iRNA のヌクレオチドの全てが修飾されている。「ヌクレオチドの実質的に全てが修飾されている」本発明の iRNA は、大部分が修飾されているが全てが修飾されているのではなく、5 つ以下、4 つ以下、3 つ以下、2 つ以下、又は 1 つ以下の非修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0055】

RNA i 剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。RNA i 剤の各鎖は、12 ~ 30 ヌクレオチド長の範囲であり得る。例えば、各鎖は、14 ~ 30 ヌクレオチド長、17 ~ 30 ヌクレオチド長、19 ~ 30 ヌクレオチド長、25 ~ 30 ヌクレオチド長、27 ~ 30 ヌクレオチド長、17 ~ 23 ヌクレオチド長、17 ~ 21 ヌクレオチド長、17 ~ 19 ヌクレオチド長、19 ~ 25 ヌクレオチド長、19 ~ 23 ヌクレオチド長、19 ~ 21 ヌクレオチド長、21 ~ 25 ヌクレオチド長、又は 21 ~ 23 ヌクレオチド長であり得る。

【0056】

各鎖は、12 ヌクレオチド長、13 ヌクレオチド長、14 ヌクレオチド長、15 ヌクレオチド長、16 ヌクレオチド長、17 ヌクレオチド長、18 ヌクレオチド長、19 ヌクレオチド長、20 ヌクレオチド長、21 ヌクレオチド長、22 ヌクレオチド長、23 ヌクレオチド長、24 ヌクレオチド長、25 ヌクレオチド長、26 ヌクレオチド長、27 ヌクレオチド長、28 ヌクレオチド長、29 ヌクレオチド長、又は 30 ヌクレオチド長であり得る。RNA i 剤の各鎖は、同じ長さであっても良いし、又は異なる長さであっても良い。

【0057】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、典型的には二重鎖の二本鎖 RNA (dsRNA) を形成し、本明細書では RNA i 剤とも呼ばれる。RNA i 剤の二重鎖領域は、12 ~ 30 ヌクレオチド対の長さであり得る。例えば、二重鎖領域は、14 ~ 30 ヌクレオチド対の長さ、17 ~ 30 ヌクレオチド対の長さ、27 ~ 30 ヌクレオチド対の長さ、17 ~ 23 ヌクレオチド対の長さ、17 ~ 21 ヌクレオチド対の長さ、17 ~ 19 ヌクレオチド対の長さ、19 ~ 25 ヌクレオチド対の長さ、19 ~ 23 ヌクレオチド対の長さ、19 ~ 21 ヌクレオチド対の長さ、21 ~ 25 ヌクレオチド対の長さ、又は 21 ~ 23 ヌクレオチド対の長さであり得る。別の例では、二重鎖領域は、15 ヌクレオチド対の長さ、16 ヌクレオチド対の長さ、17 ヌクレオチド対の長さ、18 ヌクレオチド対の長さ、19 ヌクレオチド対の長さ、20 ヌクレオチド対の長さ、21 ヌクレオチド対の長さ、22 ヌクレオチド対の長さ、23 ヌクレオチド対の長さ、24 ヌクレオチド対の長さ、25 ヌクレオチド対の長さ、26 ヌクレオチド対の長さ、及び 27 ヌクレオチド対の長さから選択される。

【0058】

一実施形態では、RNA i 剤は、一方又は両方の鎖の 3' 末端、5' 末端、又は両末端に 1 つ以上のオーバーハング領域及び/又はキャッピング基を含み得る。オーバーハングは、1 ~ 6 ヌクレオチド長、例えば、2 ~ 6 ヌクレオチド長、1 ~ 5 ヌクレオチド長、2 ~ 5 ヌクレオチド長、1 ~ 4 ヌクレオチド長、2 ~ 4 ヌクレオチド長、1 ~ 3 ヌクレオチド長、2 ~ 3 ヌクレオチド長、又は 1 ~ 2 ヌクレオチド長であり得る。オーバーハングは、一方の鎖が他方の鎖よりも長いこと、又は同じ長さの 2 本の鎖がずれていることで生じ得

10

20

30

40

50

る。オーバーハングは、標的 mRNA とミスマッチを形成し得る、又はオーバーハングは、標的である遺伝子配列に相補的であり得る、又は別の配列であり得る。第 1 の鎖及び第 2 の鎖は、例えば、追加の塩基によって連結してヘアピンを形成しても良いし、又は他の非塩基リンカーによって連結しても良い。

【0059】

一実施形態では、RNAi 剤のオーバーハング領域におけるヌクレオチドはそれぞれ独立して、限定されるものではないが、2' - 糖修飾、例えば、2 - F、2' - O - メチル、チミジン (T)、2' - O - メトキシエチル - 5 - メチルウリジン (Teo)、2' - O - メトキシエチルアデノシン (Aeo)、2' - O - メトキシエチル - 5 - メチルシチジン (m5Ceo)、及びこれらの任意の組み合わせを含め、修飾されたヌクレオチドであっても良いし、又は非修飾ヌクレオチドであっても良い。例えば、TT は、いずれかの鎖のいずれかの末端のオーバーハング配列とすることができる。オーバーハングは、標的 mRNA とのミスマッチを形成し得る、又はオーバーハングは、標的とされる遺伝子配列に相補的であっても良いし、若しくは別の配列であっても良い。

【0060】

RNAi 剤のセンス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖における 5' 又は 3' オーバーハングは、リン酸化されても良い。一部の実施形態では、オーバーハング領域は、間にホスホロチオエートを有する 2 つのヌクレオチドを含み、この 2 つのヌクレオチドは、同じヌクレオチドでも良いし、異なるヌクレオチドでも良い。一実施形態では、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の 3' 末端に存在する。一実施形態では、この 3' オーバーハングは、アンチセンス鎖に存在する。一実施形態では、この 3' オーバーハングは、センス鎖に存在する。

【0061】

RNAi 剤は、その全体的な安定性に影響を与えることなく、RNAi の干渉活性を強めることができる 1 つのオーバーハングのみを含み得る。例えば、一本鎖オーバーハングは、センス鎖の 3' 末端、或いはアンチセンス鎖の 3' 末端に位置し得る。RNAi は、アンチセンス鎖の 5' 末端 (又はセンス鎖の 3' 末端) (或いはその逆) に位置する平滑末端も有し得る。一般に、RNAi のアンチセンス鎖は、3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5' 末端が平滑である。理論に拘束されることを望むものではないが、アンチセンス鎖の 5' 末端の非対称平滑末端及びアンチセンス鎖の 3' 末端オーバーハングは、RISC プロセスに付加されるガイド鎖を好む。

【0062】

合成及び修飾

本発明で取り上げられる任意の核酸、例えば、RNAi は、当分野で十分に確立された方法、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、“Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA に記載されているような方法によって合成及び/又は修飾することができる。修飾としては、例えば、末端修飾、例えば、5' 末端修飾 (リン酸化、結合、逆連結) 又は 3' 末端修飾 (結合、DNA ヌクレオチド、逆連結など); 塩基修飾、例えば、安定化塩基、不安定化塩基、若しくは幅広いレパートリーのパートナーと塩基対合する塩基での置換、塩基の除去 (脱塩基ヌクレオチド)、又は共役塩基; ホスホジエステル結合の修飾若しくは置換を含む糖修飾 (例えば、2' 位置若しくは 4' 位置) 又は糖の置換; 及び/又は主鎖の修飾が挙げられる。本明細書に記載の実施形態に有用な iRNA 化合物の特定の例としては、限定されるものではないが、修飾主鎖又は非天然ヌクレオシド間結合を含む RNA が挙げられる。修飾主鎖を有する RNA としては、特に、主鎖にリン原子を有していない RNA が挙げられる。本明細書においては、当分野で時々言及されるように、そのヌクレオシド間主鎖にリン原子を有していない修飾 RNA は、オリゴヌクレオシドと見なすこともできる。一部の実施形態では、修飾 iRNA は、そのヌクレオシド間主鎖にリン原子を有する。

10

20

30

40

50

【0063】

修飾RNA主鎖としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3' - アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むメチル及び他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3' - アミノホスホラミデート及びアミノアルキルホスホラミデートを含むホスホラミデート、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、及び直鎖状の3' - 5' 結合を有するボラノホスフェート、これらの2' - 5' 結合類似体、及びヌクレオシド単位の隣接対が3' - 5' から5' - 3' 又は2' - 5' から5' - 2' に結合されている逆の極性を有するものが挙げられる。様々な塩、混合塩、及び遊離酸型も含まれる。

10

【0064】

上記のリン含有結合の形成を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、米国特許第3, 687, 808号明細書；同第4, 469, 863号明細書；同第4, 476, 301号明細書；同第5, 023, 243号明細書；同第5, 177, 195号明細書；同第5, 188, 897号明細書；同第5, 264, 423号明細書；同第5, 276, 019号明細書；同第5, 278, 302号明細書；同第5, 286, 717号明細書；同第5, 321, 131号明細書；同第5, 399, 676号明細書；同第5, 405, 939号明細書；同第5, 453, 496号明細書；同第5, 455, 233号明細書；同第5, 466, 677号明細書；同第5, 476, 925号明細書；同第5, 519, 126号明細書；同第5, 536, 821号明細書；同第5, 541, 316号明細書；同第5, 550, 111号明細書；同第5, 563, 253号明細書；同第5, 571, 799号明細書；同第5, 587, 361号明細書；同第5, 625, 050号明細書；同第6, 028, 188号明細書；同第6, 124, 445号明細書；同第6, 160, 109号明細書；同第6, 169, 170号明細書；同第6, 172, 209号明細書；同第6, 239, 265号明細書；同第6, 277, 603号明細書；同第6, 326, 199号明細書；同第6, 346, 614号明細書；同第6, 444, 423号明細書；同第6, 531, 590号明細書；同第6, 534, 639号明細書；同第6, 608, 035号明細書；同第6, 683, 167号明細書；同第6, 858, 715号明細書；同第6, 867, 294号明細書；同第6, 878, 805号明細書；同第7, 015, 315号明細書；同第7, 041, 816号明細書；同第7, 273, 933号明細書；同第7, 321, 029号明細書；米国再特許第39464号明細書が挙げられる。

20

30

【0065】

リン原子を含んでいない修飾RNA主鎖は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、又は1つ以上の短鎖ヘテロ原子若しくは複素環ヌクレオシド間結合によって形成される主鎖を有する。これらの修飾RNA主鎖としては、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）を有する主鎖；シロキサン主鎖；スルフィド、スルホキシド、及びスルホン主鎖；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネート及びスルホンアミド主鎖；アミド主鎖；並びに混合されたN、O、S、及びCH₂構成成分を有する他の主鎖が挙げられる。

40

【0066】

上記のオリゴヌクレオシドの形成を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、米国特許第5, 034, 506号明細書；同第5, 166, 315号明細書；同第5, 185, 444号明細書；同第5, 214, 134号明細書；同第5, 216, 141号明細書；同第5, 235, 033号明細書；同第5, 64, 562号明細書；同第5, 264, 564号明細書；同第5, 405, 938号明細書；同第5, 434, 257号明細書；同第

50

5, 466, 677号明細書；同第5, 470, 967号明細書；同第5, 489, 677号明細書；同第5, 541, 307号明細書；同第5, 561, 225号明細書；同第5, 596, 086号明細書；同第5, 602, 240号明細書；同第5, 608, 046号明細書；同第5, 610, 289号明細書；同第5, 618, 704号明細書；同第5, 623, 070号明細書；同第5, 663, 312号明細書；同第5, 633, 360号明細書；同第5, 677, 437号明細書；及び同第5, 677, 439号明細書が挙げられる。

【0067】

他の実施形態では、iRNAに使用されるように企図され、このように使用される場合、適切なRNA模倣物が、ヌクレオチド単位の糖及びヌクレオシド間結合、即ち、主鎖の両方が新規な基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのこのようなオリゴマー化合物、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているRNA模倣物は、ペプチド核酸(PNA)と呼ばれる。PNA化合物では、RNAの糖主鎖が、アミド含有主鎖、特にアミノエチルグリシン主鎖で置換されている。核酸塩基は、維持され、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子に直接的又は間接的に結合されている。PNA化合物の形成を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる米国特許第5, 539, 082号明細書；同第5, 714, 331号明細書；及び同第5, 719, 262号明細書が挙げられる。本発明のiRNAに使用するのに適したさらなるPNA化合物は、例えば、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に記載されている。

【0068】

本発明で取り上げられる一部の実施形態は、ホスホロチオエート主鎖を有するRNA、並びにヘテロ原子主鎖、特に、上記参照した米国特許第5, 489, 677号明細書の $-CH_2-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ [メチレン(メチルイミノ)又はMMI主鎖として知られている]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 及び $N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ [天然ホスホジエステル主鎖は、 $-O-P-O-CH_2-$ として表される]、及び上記参照した米国特許第5, 602, 240号明細書のアミド主鎖を有するオリゴヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、本明細書で取り上げられるRNAは、上記参照した米国特許第5, 034, 506号明細書のモルホリノ主鎖構造を有する。

【0069】

修飾RNAは、1つ以上の置換糖部分も含み得る。本発明で取り上げられるiRNA、例えば、dsRNAは、2'位置に以下の1つを含み得る：OH；F；O-、S-、若しくはN-アルキル；O-、S-、若しくはN-アルケニル；O-、S-、若しくはN-アルキニル；又はO-アルキル-O-アルキル、ここで、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換若しくは非置換 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルであり得る。例示的且つ適切な修飾は、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ を含み、式中、n及びmは、1～約10である。他の実施形態では、dsRNAは、2'位置に以下の1つを含む： $G_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、又はO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカラーター、iRNAの薬理学的特性を改善するための基、又はiRNAの薬理学的特性を改善するための基、及び同様の特性を有する他の置換基を含む。一部の実施形態では、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-C₂H₄CH₂OCH₃、2'-O-(2'-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られている)(Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78: 486-504)

、即ち、アルコキシ - アルコキシ基を含む。別の例示的な修飾は、以下の本明細書の実施例で説明される、2' - DMAOEとしても知られる、2' - ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基、及び2' - ジメチルアミノエトキシエトキシ（当分野では2' - O - ジメチルアミノエトキシエチル又は2' - DMAEOEとしても知られている）、即ち、 $2' - O - CH_2 - O - CH_2 - N(CH_2)_2$ である。

【0070】

他の修飾は、2' - メトキシ（2' - OC_3H_7 ）、2' - アミノプロポキシ（2' - $OC_2H_4CH_2CH_2NH_2$ ）、及び2' - フルオロ（2' - F）を含む。同様の修飾を、iRNAのRNAにおける他の位置、特に、3'末端ヌクレオチドの糖の3'位置又は2' - 5'結合dsRNA、及び5'末端ヌクレオチドの5'位置にも設けることができる。iRNAは、例えば、ペントフラノシル糖の代わりに糖模倣物、例えば、シクロブチル部分を有することもできる。このような修飾糖構造の形成を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、米国特許第4,981,957号明細書；同第5,118,800号明細書；同第5,319,080号明細書；同第5,359,044号明細書；同第5,393,878号明細書；同第5,446,137号明細書；同第5,466,786号明細書；同第5,514,785号明細書；同第5,519,134号明細書；同第5,567,811号明細書；同第5,576,427号明細書；同第5,591,722号明細書；同第5,597,909号明細書；同第5,610,300号明細書；同第5,627,053号明細書；同第5,639,873号明細書；同第5,646,265号明細書；同第5,658,873号明細書；同第5,670,633号明細書；及び同第5,700,920号明細書が挙げられ、これらの一部は、所有者が本出願人である。これらの各特許の開示内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0071】

iRNAは、核酸塩基（当分野では単純に「塩基」と呼ばれることが多い）修飾又は置換も含み得る。本明細書で使用される「非修飾」又は「天然」核酸塩基は、プリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、及びピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）を含む。修飾核酸塩基は、他の合成及び天然核酸塩基、例えば、デオキシ - チミン（dT）、5 - メチルシトシン（5 - me - C）、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6 - メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2 - プロピル及び他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン及び2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル及びシトシン、5 - プロピニルウラシル及びシトシン、6 - アゾウラシル、6 - アゾシトシン、及び6 - アゾチミン、5 - ウラシル（偽ウラシル）、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシル、及び他の8 - 置換アデニン及びグアニン、5 - ハロ、特に5 - プロモ、5 - トリフルオロメチル及び他の5 - 置換ウラシル及びシトシン、7 - メチルグアニン及び7 - メチルアデニン、8 - アザグアニン及び8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン及び7 - デアザアデニン、並びに3 - デアザグアニン及び3 - デアザアデニンを含む。さらなる核酸塩基は、米国特許第3,687,808号に開示されている核酸塩基、Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley - VCH, 2008に開示されている核酸塩基；The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 - 859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されている核酸塩基、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されている核酸塩基、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289 - 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993に開示されている核酸塩基を含む。これらの特定の核酸塩基は、本発明で取り

上げられるオリゴマー化合物の結合親和性を高めるのに特に有用である。これらは、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、並びに2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル、及び5 - プロピニルシトシンを含むN - 2、N - 6、及び0 - 6置換プリンを含む。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6 ~ 1.2 高めることが示され (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276 - 278)、特に2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられると、さらに例示的な塩基置換である。

【0072】

上記の特定の修飾核酸塩基及び他の修飾核酸塩基の形成を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、上記の米国特許第3,687,808号明細書；同第4,845,205号明細書；同第5,130,30号明細書；同第5,134,066号明細書；同第5,175,273号明細書；同第5,367,066号明細書；同第5,432,272号明細書；同第5,457,187号明細書；同第5,459,255号明細書；同第5,484,908号明細書；同第5,502,177号明細書；同第5,525,711号明細書；同第5,552,540号明細書；同第5,587,469号明細書；同第5,594,121号明細書；同第5,596,091号明細書；同第5,614,617号明細書；同第5,681,941号明細書；同第5,750,692号明細書；同第6,015,886号明細書；同第6,147,200号明細書；同第6,166,197号明細書；同第6,222,025号明細書；同第6,235,887号明細書；同第6,380,368号明細書；同第6,528,640号明細書；同第6,639,062号明細書；同第6,617,438号明細書；同第7,045,610号明細書；同第7,427,672号明細書；及び同第7,495,088号明細書が挙げられる。

【0073】

iRNAのRNAは、1つ以上のロックド核酸 (LNA) を含むように修飾することもできる。ロックド核酸は、修飾リボース部分を有するヌクレオチドであり、このリボース部分は、2' と4' 炭素を結合するさらなる架橋を含む。この構造は、リボースを3' 内部構造の立体構造に効果的に「ロック」する。ロックド核酸のsiRNAへの付加は、血清中でのsiRNAの安定性を高め、且つ標的外の影響を低減することが示されている (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1): 439 - 447; Mook, O. R. et al., (2007) Mol. Cell Ther. 6(3): 833 - 843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12): 3185 - 3193)。

【0074】

ロックド核酸ヌクレオチドの形成を教示する代表的な米国特許としては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、米国特許第6,268,490号明細書；同第6,670,461号明細書；同第6,794,499号明細書；同第6,998,484号明細書；同第7,053,207号明細書；同第7,084,125号明細書；及び同第7,399,845号明細書。

【0075】

潜在的に安定させるRNA分子の末端の修飾は、N - (アセチルアミノカプロイル) - 4 - ヒドロキシプロリノール (Hyp - C6 - NHAc)、N - (カプロイル - 4 - ヒドロキシプロリノール (Hyp - C6)、N - アセチル - 4 - ヒドロキシプロリノール (Hyp - NHAc)、チミジン - 2' - O - デオキシチミジン (エーテル)、N - (アミノカプロイル) - 4 - ヒドロキシプロリノール (Hyp - C6 - アミノ)、2 - ドコサノイル - ウリジン - 3' - ホスフェート、及び逆塩基dT (idT) などを含み得る。この修飾の開示は、PCT国際公開特許第2011/005861号パンフレットで確認すること

10

20

30

40

50

ができる。

【0076】

本発明のモチーフを含む修飾 iRNA

本発明の特定の態様では、本発明の二本鎖RNAi剤は、例えば、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、2011年11月18日に出願の米国仮特許出願第61/561,710号明細書、又は2012年11月16日に出願され、国際公開第2013075035 A1号パンフレットとして公開された国際出願PCT/US2012/065691号明細書に開示されているような化学修飾を有する作用剤を含む。

【0077】

本明細書及び米国仮特許出願第61/561,710号明細書に示されているように、3つの連続したヌクレオチドの3つの同一の修飾の1つ以上のモチーフをRNAi剤のセンス鎖及び/又はアンチセンス鎖、特に切断部位又はその近傍に導入することによって優れた結果を得ることができる。一部の実施形態では、RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、別の方法で完全に修飾することができる。これらのモチーフの導入により、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の修飾パターンが存在する場合は、これを中断することができる。RNAi剤は、任意選択により、例えばセンス鎖にあるGalNAc誘導体リガンドにコンジュゲートされ得る。得られるRNAi剤は、優れた遺伝子サイレンシング活性を示す。

10

【0078】

より詳細には、驚くべきことに、二本鎖RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖が、RNAi剤の少なくとも一方の鎖の切断部位又はその近傍における3つの連続したヌクレオチドの3つの同一の修飾の1つ以上のモチーフを有するように修飾された場合、RNAi剤の遺伝子サイレンシング活性が最高に高められることが見出された。

20

【0079】

一実施形態では、RNAi剤は、19のヌクレオチド長さの平滑末端二本鎖(double ended bluntmer)であり、センス鎖は、5'末端の7位、8位、9位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。

【0080】

30

別の実施形態では、RNAi剤は、20のヌクレオチド長さの平滑末端二本鎖であり、センス鎖は、5'末端の8位、9位、10位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。

【0081】

また別の実施形態では、RNAi剤は、21のヌクレオチド長さの平滑末端二本鎖であり、センス鎖は、5'末端の9位、10位、11位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含む。

40

【0082】

一実施形態では、RNAi剤は、21ヌクレオチドのセンス鎖及び23ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、このセンス鎖は、5'末端の9位、10位、11位における3つの連続したヌクレオチドの3つの2'-F修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含み；このアンチセンス鎖は、5'末端の11位、12位、13位における3つの連続したヌクレオチドの3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含み、RNAi剤の一端は平滑であるが、他端は、2ヌクレオチドのオーバーハングを含む。好ましくは、2ヌクレオチドのオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にある。2ヌクレオチドのオーバーハングが、アンチセンス鎖の3'末端にある場合は、末端の3つのヌクレオチド間

50

に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在し得、3つのヌクレオチドのうちの2つが、オーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドに隣接した対合ヌクレオチドである。一実施形態では、RNAi剤は、センス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の5'末端の両方における末端の3つのヌクレオチド間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合をさらに有する。一実施形態では、RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、モチーフの一部であるヌクレオチドを含め、修飾ヌクレオチドである。一実施形態では、各残基は、例えば交互モチーフにおいて、2'-O-メチル又は3'-フルオロで独立に修飾されている。任意選択により、RNAi剤は、リガンド(好ましくはGalNAc₃)をさらに含む。

【0083】

一実施形態では、RNAi剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、RNAi剤は、少なくとも25、最大で29のヌクレオチド長さを有する第1の鎖、及び5'末端から11位、12位、13位にある3つの連続したヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾からなる少なくとも1つのモチーフを有する、最大で30のヌクレオチド長さを有する第2の鎖を含み；第1の鎖の3'末端及び第2の鎖の5'末端は、平滑末端を形成し、第2の鎖は、3'末端で第1の鎖よりも1~4ヌクレオチド長く、二重鎖領域は、少なくとも25のヌクレオチド長さであり、第2の鎖は、RNAi剤が哺乳動物の細胞に導入されたときに標的遺伝子の発現を低減するように、第2の鎖の長さの少なくとも19のヌクレオチドに沿って標的mRNAに十分に相補的であり、RNAi剤のダイサー切断(dicer cleavage)が、優先的に第2の鎖の3'末端を含むsiRNAをもたらし、これにより、哺乳動物における標的遺伝子の発現が低減する。任意選択で、RNAi剤は、リガンドをさらに含む。

【0084】

一実施形態では、RNAi剤のセンス鎖は、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含み、モチーフの1つは、センス鎖の切断部位に存在する。

【0085】

一実施形態では、RNAi剤のアンチセンス鎖も、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含んでも良く、モチーフの1つは、アンチセンス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。

【0086】

17~23のヌクレオチド長さの二重鎖領域を有するRNAi剤では、アンチセンス鎖の切断部位は、典型的には、5'末端から10位、11位、及び12位の付近である。従って、3つの同一の修飾からなるモチーフは、アンチセンス鎖の9位、10位、11位；10位、11位、12位；11位、12位、13位；12位、13位、14位；13位、14位、15位に存在しても良く、この位置は、アンチセンス鎖の5'末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる、又はアンチセンス鎖の5'末端の二重鎖領域内の最初の対を形成したヌクレオチドから数え始められる。アンチセンス鎖の切断部位はまた、5'末端のRNAi剤の二重鎖領域の長さに従って変更され得る。

【0087】

RNAi剤のセンス鎖は、その鎖の切断部位の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを含むことができ；アンチセンス鎖は、その鎖の切断部位又はその近傍の3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる少なくとも1つのモチーフを有し得る。センス鎖とアンチセンス鎖がdsRNA二重鎖を形成する場合は、センス鎖とアンチセンス鎖は、センス鎖の3つのヌクレオチドからなる1つのモチーフ及びアンチセンス鎖の3つのヌクレオチドからなる1つのモチーフが、少なくとも1つのヌクレオチドのオーバーラップ、即ち、センス鎖のモチーフの3つのヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、アンチセンス鎖のモチーフの3つのヌクレオチドのうちの少なくとも1つと塩基対を形成するように整列させることができる。或いは、少なくとも2つのヌクレオチドがオーバーラップする、又は3つ全てのヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドがオーバーラップしても良い。

【0088】

一実施形態では、RNAi 剤のセンス鎖は、3つの連続したヌクレオチドの3つの同一の修飾からなる2つ以上のモチーフを含むことができる。第1のモチーフは、センス鎖の切断部位又はその近傍に存在することがあり、他方のモチーフは、ウィング修飾 (wing modification) であっても良い。本明細書の「ウィング修飾」という語は、鎖の切断部位又はその近傍のモチーフから離れた同じ鎖の別の部分に存在するモチーフを指す。ウィング修飾は、第1のモチーフの近傍であるか、又は少なくとも1つ以上のヌクレオチドによって離隔している。モチーフが、その性質化学的よりも互いに接近している場合は、モチーフは互いに異なり、モチーフが、その化学的性質よりも1つ以上のヌクレオチドによって離隔している場合は、モチーフは、同じであるか、又は異なることもある。2つ以上のウィング修飾が存在しても良い。例えば、2つのウィング修飾が存在する場合、各ウィング修飾は、切断部位若しくはその近傍の第1のモチーフに対する一端に、又はリードモチーフ (lead motif) のいずれかの側に存在し得る。

10

【0089】

センス鎖と同様に、RNAi 剤のアンチセンス鎖は、3つの連続したヌクレオチドの3つの同一の修飾からなる2つ以上のモチーフを含み得、少なくとも1つのモチーフは、アンチセンス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。このアンチセンス鎖はまた、センス鎖に存在し得るウィング修飾と同様の配列で1つ以上のウィング修飾も含み得る。

【0090】

20

一実施形態では、RNAi 剤のセンス鎖又はアンチセンス鎖のウィング修飾は、典型的には、鎖の3'末端、5'末端、又は両方の末端の最初の1つ又は2つの末端ヌクレオチドを含まない。

【0091】

別の実施形態では、RNAi 剤のセンス鎖又はアンチセンス鎖のウィング修飾は、典型的には、鎖の3'末端、5'末端、又は両方の末端の二重鎖領域内の最初の1つ又は2つの塩基対形成ヌクレオチドを含まない。

【0092】

RNAi 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも1つのウィング修飾を含む場合、このウィング修飾は、二重鎖領域の同じ末端に存在しても良く、1つ、2つ、又は3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する。

30

【0093】

RNAi 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも2つのウィング修飾を含む場合、センス鎖及びアンチセンス鎖は、1つの鎖の2つの修飾がそれぞれ、二重鎖領域の一端に位置して1つ、2つ、又は3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する；1つの鎖の2つの修飾がそれぞれ、二重鎖領域の他端に位置して1つ、2つ、又は3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する；1つの鎖の2つの修飾が、リードモチーフの各側に位置して、二重鎖領域に1つ、2つ、又は3つのヌクレオチドのオーバーラップを有する、ように整列させることができる。

【0094】

40

一実施形態では、モチーフの一部であるヌクレオチドを含む、RNAi 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖における各ヌクレオチドを修飾しても良い。各ヌクレオチドは、同じ又は異なる修飾で修飾しても良く、この修飾は、非結合リン酸酸素及び/又は1つ以上の結合リン酸酸素の一方又は両方の1つ以上の変更；リボース糖の成分、例えば、リボース糖の2'ヒドロキシルの変更；リン酸部分の「脱リン酸」リンカー (“dephospho” linker) での大量の置換；天然の塩基の修飾又は置換；及びリボース-リン酸骨格の置換又は修飾を含み得る。

【0095】

核酸がサブユニットの重合体であるため、多くの修飾、例えば、塩基、リン酸部分、又はリン酸部分の非結合Oの修飾は、核酸内の繰り返される位置に存在する。場合によって

50

は、修飾は、核酸内の全ての目的の位置に存在するが、多くの場合はそうではない。一例として、修飾は、3'又は5'末端位置のみに存在しても良く、末端領域、例えば、末端ヌクレオチドの位置又は鎖の最後の2つ、3つ、4つ、5つ、又は10のヌクレオチドのみに存在しても良い。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、又は両方に存在し得る。修飾は、RNAの二本鎖領域のみに存在しても良いし、又はRNAの一本鎖領域のみに存在しても良い。例えば、非結合酸素位置でのホスホロチオエート修飾は、一方若しくは両方の末端のみに存在しても良いし、末端領域、例えば、末端ヌクレオチドのある位置、又は鎖の最後の2つ、3つ、4つ、5つ、若しくは10のヌクレオチドのみに存在しても良いし、或いは二本鎖領域及び一本鎖領域、特に末端に存在しても良い。5'末端又は両末端は、リン酸化されても良い。

10

【0096】

例えば、安定性を高めること、オーバーハングに特定の塩基を含めること、或いは一本鎖オーバーハング、例えば、5'若しくは3'オーバーハング、又は両方のオーバーハングに修飾ヌクレオチド若しくはヌクレオチド代用物を含めることが可能であろう。例えば、オーバーハングにプリンヌクレオチドを含めることが望ましい場合もある。一部の実施形態では、3'又は5'オーバーハングの全て又は一部の塩基を、例えば、本明細書に記載される修飾で修飾しても良い。修飾は、例えば、当分野で公知の修飾を用いたリボース糖の2'位での修飾の使用、例えば、核酸塩基のリボ糖ではなくデオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F)、又は2'-O-メチル修飾の使用、及びリン酸基の修飾、例えば、ホスホチオエート修飾を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

20

【0097】

一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は独立して、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、又は2'-フルオロで修飾される。センス鎖及びアンチセンス鎖は、2つ以上の修飾を含み得る。一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は独立して、2'-O-メチル又は2'-フルオロで修飾される。

【0098】

少なくとも2つの異なる修飾が、典型的には、センス鎖及びアンチセンス鎖に存在する。これらの2つの修飾は、2'-O-メチル若しくは2'-フルオロ、又は他のものであっても良い。

30

【0099】

一実施形態では、 N_a 及び N_b 又は N_b は、交互パターンの修飾を含む。本明細書で使用する「交互モチーフ」という語は、各修飾が1つの鎖の交互ヌクレオチドに存在する1つ以上の修飾を有するモチーフを指す。交互ヌクレオチドは、1つおきのヌクレオチドに1つ、3つおきのヌクレオチドに1つ、又は同様のパターンを指し得る。例えば、A、B、及びCがそれぞれ、ヌクレオチドに対する1種類の修飾を表す場合、交互モチーフは、「A B A B A B A B A B . . .」、「A A B B A A B B A A B B . . .」、「A A B A A B A A B A A B . . .」、「A A A B A A A B A A A B . . .」、「A A A B B B A A A B B B . . .」、又は「A B C A B C A B C A B C . . .」などであり得る。

40

【0100】

交互モチーフに含まれる修飾の種類は、同じであっても良いし、又は異なっても良い。例えば、A、B、C、Dがそれぞれ、ヌクレオチドの1種類の修飾を表す場合、交互パターン、即ち、1つおきのヌクレオチドの修飾は、同じでも良いが、センス鎖又はアンチセンス鎖はそれぞれ、交互モチーフ、例えば、「A B A B A B . . .」、「A C A C A C . . .」、「B D B D B D . . .」、又は「C D C D C D . . .」などの内部の修飾のいくつかの可能性から選択することができる。

【0101】

一実施形態では、本発明のRNAi剤は、アンチセンス鎖における交互モチーフの修飾パターンに対してシフトしている、センス鎖における交互モチーフの修飾パターンを含む

50

。このシフトは、センス鎖のヌクレオチドの修飾基が、アンチセンス鎖のヌクレオチドの異なる修飾基に対応するようなシフトであっても良いし、この逆のシフトでも良い。例えば、センス鎖は、dsRNA二重鎖におけるアンチセンス鎖と塩基対を形成した場合、センス鎖における交互モチーフが、センス鎖の5'から3'へ「A B A B A B」で始まり、アンチセンス鎖における交互モチーフが、二重鎖領域内のアンチセンス鎖の5'から3'へ「B A B A B A」で始まり得る。別の例として、センス鎖における交互モチーフは、センス鎖の5'から3'へ「A A B B A A B B」で始まり、アンチセンス鎖における交互モチーフは、二重鎖領域内のアンチセンス鎖の5'から3'へ「B B A A B B A A」で始まり得るため、センス鎖とアンチセンス鎖との間の修飾パターンの完全な、又は部分的なシフトが存在する。

10

【0102】

一実施形態では、RNAi剤は、最初に、センス鎖における2'-O-メチル修飾と2'-F修飾との交互モチーフのパターンを有し、このパターンは、最初に、アンチセンス鎖における2'-O-メチル修飾と2'-F修飾との交互モチーフのパターンに対してシフトを有する、即ち、センス鎖における2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、アンチセンス鎖における2'-F修飾ヌクレオチドと塩基対を形成し、逆の場合も同様である。センス鎖の1位は、2'-F修飾で始まることができ、アンチセンス鎖の1位は、2'-O-メチル修飾で始まることできる。

【0103】

3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフのセンス鎖及び/又はアンチセンス鎖への導入は、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖に存在する最初の修飾パターンを中断する。3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフのセンス鎖及び/又はアンチセンス鎖への導入による、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖に存在する最初の修飾パターンのこの中断は、標的遺伝子に対する遺伝子サイレンシング活性を驚くほど高める。

20

【0104】

一実施形態では、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなるモチーフが、いずれの鎖に導入される場合も、モチーフの次のヌクレオチドの修飾は、モチーフの修飾とは異なる修飾である。例えば、モチーフを含む配列の一部は、「...N_aY Y Y N_b...」であり、「Y」は、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなるモチーフの修飾を表し、「N_a」及び「N_b」は、Yの修飾とは異なる、モチーフ「Y Y Y」の次のヌクレオチドの修飾を表し、N_a及びN_bは、同じ修飾でも異なる修飾でも良い。或いは、N_a及び/又はN_bは、ウィング修飾が存在する場合は、存在しても存在しなくても良い。

30

【0105】

RNAi剤は、少なくとも1つのホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間結合をさらに含み得る。ホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖及び/若しくはアンチセンス鎖、又は両鎖のいずれかの位置のどのヌクレオチドにも存在し得る。例えば、ヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖及びアンチセンス鎖のどのヌクレオチドにも存在し得る；各ヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖及び/若しくはアンチセンス鎖における交互パターンに存在し得る；或いはセンス鎖若しくはアンチセンス鎖は、交互パターンにおける両方のヌクレオチド間結合の修飾を含み得る。センス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じでも異なっても良く、センス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互パターンに対してシフトを有しても良い。

40

【0106】

一実施形態では、RNAi剤は、オーバーハング領域にホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間結合の修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間結合を

50

有する2つのヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチド間結合の修飾は、オーバーハングヌクレオチドを二重鎖領域内の末端の塩基対形成ヌクレオチドに結合させるために形成することもできる。例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、又は全てのオーバーハングヌクレオチドを、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間結合によって結合することができ、任意選択で、オーバーハングヌクレオチドをその次の塩基対形成ヌクレオチドに結合する追加的なホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオチド間結合が存在しても良い。例えば、末端の3つのヌクレオチド間に少なくとも2つのホスホロチオエートのヌクレオチド間結合が存在しても良く、この末端の3つのヌクレオチドのうちの2つは、オーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドの次の塩基対形成ヌクレオチドである。これらの末端の3つのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端、センス鎖の3'末端、アンチセンス鎖の5'末端、及び/又はアンチセンス鎖の5'末端であり得る。

10

【0107】

一実施形態では、2ヌクレオチドのオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にあり、末端の3つのヌクレオチド間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在し、3つのヌクレオチドのうちの2つが、オーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドに隣接した対合ヌクレオチドである。任意選択により、RNAi剤は、センス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の5'末端の両方における末端の3つのヌクレオチド間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合をさらに有し得る。

20

【0108】

一実施形態では、RNAi剤は、標的とのミスマッチ、二重鎖内のミスマッチ、又はこれらの組み合わせを含む。ミスマッチは、オーバーハング領域、又は二重鎖領域で生じ得る。塩基対は、解離又は融解（例えば、特定の対合の結合又は解離の自由エネルギーに対してであり、最も単純なアプローチは、個々の塩基対ベースで塩基対を評価することであるが、類縁又は同様の分析を用いることもできる）を促進する傾向に基づいてランク付けしてもよい。解離の促進に関しては、A:Uは、G:Cよりも好ましく；G:UはG:Cよりも好ましく；I:CはG:Cよりも好ましい（I = イノシンである）。ミスマッチ、例えば、非正準な対合又は正準以外の対合（本明細書の他の部分に記載）は、正準な対合（A:T、A:U、G:C）よりも好ましく；ユニバーサル塩基を含む塩基対は、正準な対合よりも好ましい。

30

【0109】

一実施形態では、RNAi剤は、A:U、G:U、I:Cの群から選択されるアンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の最初の1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つの塩基対の少なくとも1つ、及び二重鎖の5'末端におけるアンチセンス鎖の解離を促進するためのミスマッチ対合、例えば、非正準な対合若しくは正準以外の対合、又はユニバーサル塩基を含む対合を含む。

【0110】

一実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の1位にあるヌクレオチドは、A、dA、dU、U、及びdTからなる群から選択される。或いは、アンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の最初の1つ、2つ、又は3つの塩基対の少なくとも1つは、AU塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'末端からの二重鎖領域内の最初の塩基対は、AU塩基対である。

40

【0111】

一実施形態では、センス鎖配列は、式(I)で表すことができる：

$$5' \text{ } \eta \text{p} - \text{N}_a - (\text{XXX})_i - \text{N}_b - \text{YYY} - \text{N}_b - (\text{ZZZ})_j - \text{N}_a - \text{nq} 3' \quad (\text{I})$$
 式中、

i及びjはそれぞれ独立して、0又は1であり；

p及びqはそれぞれ独立して、0～6であり；

各N_aは独立して、0～25の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

50

各配列は、少なくとも2つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み；

各 N_b は独立して、0～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

各 n_p 及び n_q は独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

N_b 及び Y は、同じ修飾を有しておらず；且つ

XXX 、 YYY 、及び ZZZ はそれぞれ独立して、3つの連続したヌクレオチドにおける3つの同一の修飾からなる1つのモチーフを表している。好ましくは、 YYY は、2' - F 修飾ヌクレオチドである。

【0112】

一実施形態では、 N_a 及び N_b は、交互パターンの修飾を含む。

【0113】

一実施形態では、 YYY モチーフは、センス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。例えば、 $RNAi$ 剤が、17～23のヌクレオチド長さの二重鎖領域を有する場合、 YYY モチーフは、センス鎖の切断部位又はその近傍に存在し得（例えば、6位、7位、8位；7位、8位、9位；8位、9位、10位；9位、10位、11位；10位、11位、12位；又は11位、12位、13位に存在し得）、この位置は、5'末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる；又は任意選択で、5'末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められる。

【0114】

一実施形態では、 i が1で j が0である、 i が0で j が1である、又は i と j の両方が1である。従って、センス鎖は、以下の式で表すことができる：

5' $\eta_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (I b)

5' $\eta_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'$ (I c)；又は

5' $\eta_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'$ (I d)。

【0115】

センス鎖が、式(I b)で表される場合、 N_b は、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2、又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a は独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表すことができる。

【0116】

センス鎖が、式(I c)で表される場合、 N_b は、0～10、0～7、0～10、0～5、0～4、0～2、又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a は独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表すことができる。

【0117】

センス鎖が、式(I d)で表される場合、各 N_b は独立して、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2、又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5、又は6である。各 N_a は独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表すことができる。

【0118】

X 、 Y 、及び Z はそれぞれ、互いに同じであっても良いし、又は異なっても良い。

【0119】

他の実施形態では、 i は0であり、 j は0であり、且つセンス鎖は、式で表すことができる：

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

【0120】

センス鎖が、式(I a)で表される場合、各 N_a は独立に、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し得る。

【0121】

一実施形態では、 $RNAi$ 剤のアンチセンス鎖配列は、式(II)によって表すことが

10

20

30

40

50

できる：

$$5' \text{ } n_q \text{ } \text{---} N_a \text{ } \text{---} (Z' Z' Z' \text{ } N_b \text{ } \text{---} Y' Y' Y' \text{ } N (X' X' X' \text{ } N_a \text{ } \text{---} n_p \text{ } 3' \text{ } (II))$$

式中、

k 及び l はそれぞれ独立して、0 又は 1 であり；

p' 及び q' はそれぞれ独立して、0 ~ 6 であり；

各 N_a ' は独立して、0 ~ 25 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、

各配列は、少なくとも 2 つの異なって修飾されたヌクレオチドを含み；

各 N_b ' は独立して、0 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

各 n_p ' 及び n_q ' は独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

10

N_b ' 及び Y ' は、同じ修飾を有しておらず；且つ

$X' X' X'$ 、 $Y' Y' Y'$ 、及び $Z' Z' Z'$ はそれぞれ独立して、3 つの連続したヌクレオチドにおける 3 つの同一の修飾からなる 1 つのモチーフを表している。

【0122】

一実施形態では、 N_a ' 及び / 又は N_b ' は、交互パターンの修飾を含む。

【0123】

$Y' Y' Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。例えば、RNAi 剤は、17 ~ 23 のヌクレオチド長さの二重鎖領域を有し、 $Y' Y' Y'$ モチーフは、アンチセンス鎖の 9 位、10 位、11 位；10 位、11 位、12 位；11 位、12 位、13 位；12 位、13 位、14 位；又は 13 位、14 位、15 位に存在し得、この位置は、5' 末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる；又は任意選択で、5' 末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められる。好ましくは、 $Y' Y' Y'$ モチーフは、11 位、12 位、13 位に存在する。

20

【0124】

一実施形態では、 $Y' Y' Y'$ モチーフは、2' - OMe 修飾ヌクレオチドである。

【0125】

一実施形態では、k が 1 で l が 0 である、k が 0 で l が 1 である、又は k と l の両方が 1 である。

【0126】

従って、アンチセンス鎖は、以下の式で表すことができる：

30

$$5' \text{ } n_q \text{ } \text{---} N_a \text{ } \text{---} Z' Z' Z' \text{ } N_b \text{ } \text{---} Y' Y' Y' \text{ } N_p \text{ } 3' \text{ } (IIb) ;$$

$$5' \text{ } n_q \text{ } \text{---} N_a \text{ } \text{---} Y' Y' Y' \text{ } N_b \text{ } \text{---} X' X' X' \text{ } N_p \text{ } 3' \text{ } (IIc) ; \text{ 又は}$$

$$5' \text{ } n_q \text{ } \text{---} N_a \text{ } \text{---} Z' Z' Z' \text{ } N_b \text{ } \text{---} Y' Y' Y' \text{ } N_b \text{ } \text{---} X' X' X' \text{ } N_p \text{ } 3' \text{ } (IId) .$$

【0127】

アンチセンス鎖が、式 (IIb) で表される場合、 N_b ' は、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2、又は 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a ' は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15、又は 2 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0128】

40

アンチセンス鎖が、式 (IIc) で表される場合、 N_b ' は、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2、又は 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a ' は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15、又は 2 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

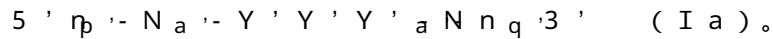
【0129】

アンチセンス鎖が、式 (IId) で表される場合、各 N_b ' は独立に、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2、又は 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a ' は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15、又は 2 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5、又は 6 である。

50

【0130】

他の実施形態では、 k は 0 であり、 l は 0 であり、且つアンチセンス鎖は、式で表すことができる：



【0131】

アンチセンス鎖が、式 (IIa) で表される場合、各 N_a' は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15、又は 2 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0132】

X' 、 Y' 、及び Z' はそれぞれ、互いに同じであっても良いし、又は異なっても良い。

【0133】

センス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは独立して、LNA、HNA、CeNA、2' - メトキシエチル、2' - O - メチル、2' - O - アリル、2' - C - アリル、2' - ヒドロキシル、又は 2' - フルオロで修飾され得る。例えば、センス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは独立して、2' - O - メチル又は 2' - フルオロで修飾される。特に、 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 、及び Z' はそれぞれ、2' - O - メチル修飾又は 2' - フルオロ修飾を表すことができる。

【0134】

一実施形態では、RNAi 剤のセンス鎖は、二重鎖領域が 21 のヌクレオチドである場合にセンス鎖の 9 位、10 位、及び 11 位に存在する YYY モチーフを含むことができ、この位置は、5' 末端から、最初のヌクレオチドから数え始められ、又は任意選択で、5' 末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められ；且つ Y は、2' - F 修飾を表している。センス鎖は、二重鎖領域の反対の末端におけるウィング修飾として XXX モチーフ又は ZZZ モチーフを追加的に含むことができ；且つ XXX 及び ZZZ はそれぞれ独立して、2' - OMe 修飾又は 2' - F 修飾を表している。

【0135】

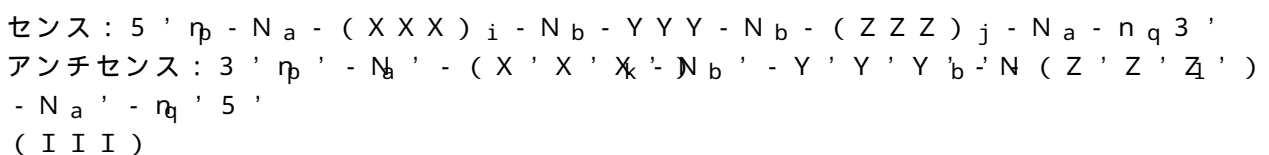
一実施形態では、アンチセンス鎖は、このセンス鎖の 11 位、12 位、及び 13 位に存在する $Y'Y'Y'$ モチーフを含むことができ、この位置は、5' 末端から、最初のヌクレオチドから数え始められる、又は任意選択で、5' 末端から、二重鎖領域内の最初の塩基対形成ヌクレオチドから数え始められ；且つ Y' は、2' - O - メチル修飾を表している。アンチセンス鎖は、二重鎖領域の反対の末端におけるウィング修飾として $X'X'X'$ モチーフ又は $Z'Z'Z'$ モチーフを追加的に含むことができ；且つ $X'X'X'$ 及び $Z'Z'Z'$ はそれぞれ独立して、2' - OMe 修飾又は 2' - F 修飾を表している。

【0136】

上記の式 (Ia)、(Ib)、(Ic)、及び (Id) の何れか 1 つによって表されるセンス鎖はそれぞれ、式 (IIa)、(IIb)、(IIc)、及び (IId) の何れか 1 つによって表されるアンチセンス鎖と二重鎖を形成する。

【0137】

従って、本発明の方法に使用される RNAi 剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み得、各鎖は、14 ~ 30 のヌクレオチドを有し、RNAi 二重鎖は、式 (III) で表される：



式中：

i 、 j 、 k 、及び l は、それぞれ独立に 0 又は 1 であり；

p 、 p' 、 q 、及び q' は、それぞれ独立に 0 ~ 6 であり；

各 N_a 及び N_a' は独立に、0 ~ 25 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列は、少なくとも 2 つの異なる修飾ヌクレオチドを含み；

各 N_b 及び N_b' は独立に、0 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を

10

20

30

40

50

表し；

各 n_p' 、 n_p 、 n_q' 、及び n_q は、それぞれ存在しても存在しなくても良く、独立にオーバーハングヌクレオチドを表し；且つ

$X X X$ 、 $Y Y Y$ 、 $Z Z Z$ 、 $X' X' X'$ 、 $Y' Y' Y'$ 、 $Z' Z' Z'$ はそれぞれ独立に、3つの連続したヌクレオチドの3つの同一の修飾からなる1つのモチーフを表す。

【0138】

一実施形態では、 i は0であり、 j は0である；又は i は1であり、 j は0である；又は i は0であり、 j は1である；又は i 及び j の両方が0である；又は i 及び j の両方が1である。別の実施形態では、 k は0であり、 l は0である；又は k は1であり、 l は0である； k は0であり、 l は1である；又は k 及び l の両方が0である；又は k 及び l の両方が1である。

10

【0139】

RNA i 二重鎖を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の例示的な組み合わせは、以下の式を含む：

5' n_p - N_a - $Y Y Y$ - N_a - $n_q 3'$

3' n_p' - N_b' - $Y' Y' Y'_a$ - N_q' 5'

(I I I a)

5' n_p - N_a - $Y Y Y$ - N_b - $Z Z Z$ - N_a - $n_q 3'$

3' n_p' - N_b' - $Y' Y' Y'_b$ - $N Z' Z' Z'_a$ - N_q' 5'

(I I I b)

20

5' n_p - N_a - $X X X$ - N_b - $Y Y Y$ - N_a - $n_q 3'$

3' n_p' - N_b' - $X' X' X'_b$ - $N Y' Y' Y'_a$ - $N n_q'$ 5'

(I I I c)

5' n_p - N_a - $X X X$ - N_b - $Y Y Y$ - N_b - $Z Z Z$ - N_a - $n_q 3'$

3' n_p' - N_b' - $X' X' X'_b$ - $N Y' Y' Y'_b$ - $N Z' Z' Z'_a$ - $N n_q'$ 5'

(I I I d)

【0140】

RNA i 剤が、式 (I I I a) で表される場合、各 N_a は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15、又は2 ~ 10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0141】

30

RNA i 剤が、式 (I I I b) で表される場合、各 N_b は独立に、1 ~ 10、1 ~ 7、1 ~ 5、又は1 ~ 4の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は独立に、2 ~ 20、2 ~ 15、又は2 ~ 10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0142】

RNA i 剤が、式 (I I I c) で表される場合、各 N_b 、 N_b' は独立して、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2、又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a は独立して、2 ~ 20、2 ~ 15、又は2 ~ 10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。

【0143】

40

RNA i 剤が、式 (I I I d) で表される場合、各 N_b 、 N_b' は独立して、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2、又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。各 N_a 、 N_a' は独立して、2 ~ 20、2 ~ 15、又は2 ~ 10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表している。それぞれの N_a 、 N_a' 、 N_b 、 N_b' は独立して、交互パターンの修飾を含む。

【0144】

式 (I I I)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I c)、及び (I I I d) における X 、 Y 、及び Z はそれぞれ、互いに同じであっても良いし、又は異なっても良い。

【0145】

RNA i 剤が、式 (I I I)、(I I I a)、(I I I b)、(I I I c)、及び (I

50

II d) で表される場合、Yヌクレオチドの少なくとも1つが、Y'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。或いは、Yヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成する；又はYヌクレオチドの3つ全てが、対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0146】

RNAi剤が、式(III b)又は(III d)で表される場合、Zヌクレオチドの少なくとも1つが、Z'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。或いは、Zヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する；又はZヌクレオチドの3つ全てが、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0147】

RNAi剤が、式(III c)又は(III d)で表される場合、Xヌクレオチドの少なくとも1つが、X'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。或いは、Xヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する；又はXヌクレオチドの3つ全てが、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0148】

一実施形態では、Yヌクレオチドの修飾は、Y'ヌクレオチドの修飾とは異なり、Zヌクレオチドの修飾は、Z'ヌクレオチドの修飾とは異なり、且つ/又はXヌクレオチドの修飾は、X'ヌクレオチドの修飾とは異なる。

【0149】

一実施形態では、RNAi剤が、式(III d)で表される場合、N_a修飾は、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾である。別の実施形態では、RNAi剤が、式(III d)で表される場合、N_a修飾は、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾であり、 $n_{p'} > 0$ であり、少なくとも1つの $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート結合によって隣接ヌクレオチドに連結される。なお別の実施形態では、RNAi剤が、式(III d)で表される場合、N_a修飾は、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾であり、 $p_{n'} > 0$ であり、少なくとも1つの $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート結合によって隣接ヌクレオチドに連結され、センス鎖が、二価又は三価の分岐リンカーによって付着された1つ以上のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。別の実施形態では、RNAi剤が、式(III d)で表される場合、N_a修飾は、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾であり、 $p_{n'} > 0$ であり、少なくとも1つの $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート結合によって隣接ヌクレオチドに連結され、センス鎖が、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、センス鎖が、二価又は三価の分岐リンカーによって付着された1つ以上のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。

【0150】

一実施形態では、RNAi剤が、式(III a)で表される場合、N_a修飾は、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾であり、 $n_{p'} > 0$ であり、少なくとも1つの $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート結合によって隣接ヌクレオチドに連結され、センス鎖が、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、センス鎖が、二価又は三価の分岐リンカーによって付着された1つ以上のGalNAc誘導体にコンジュゲートされる。

【0151】

一実施形態では、RNAi剤は、式(III)、(III a)、(III b)、(III c)、及び(III d)で表される少なくとも2つの二重鎖を含む多量体であり、この二重鎖はリンカーによって結合されている。このリンカーは、切断可能であっても良いし、又は切断不可能であっても良い。任意選択で、この多量体は、リガンドをさらに含む。二重鎖はそれぞれ、同じ遺伝子又は2つの異なる遺伝子を標的としても良いし；或いは二重鎖はそれぞれ、2つの異なる標的部位における同じ遺伝子を標的としても良い。

【0152】

一部の実施形態では、RNAi剤は、式(III)、(III a)、(III b)、(III c)、及び(III d)で表される3つ、4つ、5つ、6つ、又はそれ以上の二重鎖を含む多量体であり、この二重鎖は、リンカーによって結合されている。このリンカー

10

20

30

40

50

は、切断可能であっても良いし、又は切断不可能であっても良い。任意選択で、この多量体は、リガンドをさらに含む。二重鎖はそれぞれ、同じ遺伝子又は2つの異なる遺伝子を標的としても良いし；或いは二重鎖はそれぞれ、2つの異なる標的部位における同じ遺伝子を標的としても良い。

【0153】

一実施形態では、式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、及び(IIId)で表される2つのRNAi剤は、5'末端で互いに結合され、3'末端の一方又は両方が、任意選択で、リガンドによってコンジュゲートされる。RNAi剤はそれぞれ、同じ遺伝子又は2つの異なる遺伝子を標的としても良いし；或いはRNAi剤はそれぞれ、2つの異なる標的部位における同じ遺伝子を標的としても良い。

10

【0154】

様々な刊行物が、多量体RNAi剤について記載しており、本発明の方法に使用することができる。このような刊行物としては、参照によりそれらの全開示内容がそれぞれ本明細書に組み入れられる、国際公開第2007/091269号パンフレット、米国特許第7858769号明細書、国際公開第2010/141511号パンフレット、同第2007/117686号パンフレット、同第2009/014887号パンフレット、及び同第2011/031520号パンフレットが挙げられる。

【0155】

1つ以上の糖質部分のRNAi剤に対するコンジュゲーションを含むRNAi剤は、このRNAi剤の1つ以上の特性を最適化し得る。多くの場合、糖質部分は、RNAi剤の修飾サブユニットに付着する。例えば、dsRNA剤の1つ以上のリボヌクレオチドサブユニットのリボース糖を、別の部分、例えば、糖質リガンドが付着する非糖質担体（好ましくは環状）で置換することができる。サブユニットのリボース糖がこのように置換されたリボヌクレオチドサブユニットは、本明細書では、リボース置換修飾サブユニット(RRMS)と呼ばれる。環状担体は、炭素環系、即ち全ての環原子が炭素原子である環系であっても良いし、又は複素環系、即ち1つ以上の環原子が、ヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、硫黄であり得る環系であっても良い。環状担体は、単環系であっても良いし、又は2つ以上の環、例えば、融合環を含んでも良い。環状担体は、完全に飽和した環系であっても良いし、又は1つ以上の二重結合を含んでも良い。

20

【0156】

リガンドは、担体によってポリヌクレオチドに付着することができる。担体は、(i)少なくとも1つの「骨格付着点(backbone attachment point)」、好ましくは2つの「骨格付着点」、及び(ii)少なくとも1つの「テザー付着点(tethering attachment point)」を含む。本明細書で使用される「骨格付着点」は、官能基、例えば、ヒドロキシル基、又は一般に、リボ核酸の骨格、例えば、リン酸塩の骨格、若しくは、例えば、硫黄を含有する修飾リン酸塩の骨格への担体の組み込みに利用可能であり、且つ適した結合を指す。「テザー付着点」(TAP)は、一部の実施形態では、選択された部分を接続する環状担体の構成環原子、例えば、炭素原子又はヘテロ原子（骨格付着点を提供する原子とは異なる）を指す。この選択された部分は、例えば、糖質、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、及び多糖であり得る。任意選択で、選択された部分は、介在テザー(intervening tether)によって環状担体に接続される。従って、環状担体は、しばしば、官能基、例えば、アミノ基を含む、又は、一般に、別の化学物質、例えば、リガンドの構成環への組み込み又は連結(tethering)に適した結合を可能にする。

30

40

【0157】

RNAi剤は、担体によってリガンドにコンジュゲートすることができ、この担体は、環状基又は非環状基であり；好ましくは、環状基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1,3]ジオキサラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジニル、テトラヒドロフリル、及

50

びデカリンから選択され；好ましくは、非環状基は、セリノール骨格又はジエタノールアミン骨格から選択される。

【0158】

ある特定の実施形態では、本発明の方法に使用されるRNAi剤は、表1及び表2のいずれか一方に列記されている作用剤の群から選択される作用剤である。一実施形態では、作用剤が、表1に列記されている作用剤である場合、作用剤は、末端dTを欠失し得る。

【0159】

本発明は、アンチセンス鎖に5'リン酸塩又はリン酸塩模倣物を含む、表1又は表2のいずれか一方に列記された配列のいずれか1つを含む二本鎖RNAi剤をさらに含む（例えば、PCT国際公開特許第2011005860号パンフレットを参照されたい）。さらに、本発明は、センス鎖の5'末端の2'-OMe基の代わりに2'フルオロ基を含む、表1又は表2のいずれか一方に列記されているいずれか1つの配列を含む二本鎖RNAi剤を含む。

10

【0160】

さらなるモチーフ

特定の態様では、本明細書に記載される二本鎖RNAi剤は、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、11未満、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、又は5未満の2'-デオキシフルオロを含む。

【0161】

特定の態様では、本明細書に記載される二本鎖RNAi剤は、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、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

20

【0162】

特定の態様では、本明細書に記載される二本鎖RNAi剤は、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、10未満の2'-デオキシフルオロ及び6未満のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

【0163】

特定の態様では、本明細書に記載される二本鎖RNAi剤は、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、8未満の2'-デオキシフルオロ及び6未満のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

30

【0164】

特定の態様では、本明細書に記載される二本鎖RNAi剤は、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、9未満の2'-デオキシフルオロ及び6未満のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

【0165】

リガンド

本発明の二本鎖RNAi剤は、任意選択により、1つ以上のリガンドにコンジュゲートされ得る。リガンドは、3'末端、5'末端、又は両末端でセンス鎖、アンチセンス鎖、又は両鎖に付着され得る。例えば、リガンドは、センス鎖にコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端にコンジュゲートされる。一実施形態では、リガンドは、GalNAcリガンドである。特定の一部の実施形態では、リガンドはGalNAc₃である。このリガンドは、介在テザーを介して直接的又は間接的に結合される、好ましくは共有結合される。

40

【0166】

一部の実施形態では、リガンドは、このリガンドが取り込まれる分子の分布、標的化、又は寿命を変更する。一部の実施形態では、リガンドは、例えば、このようなリガンドが存在しない種と比較して、選択される標的、例えば、分子、細胞若しくは細胞型、区画、受容体、例えば、細胞若しくは器官の区画、組織、器官、又は体の領域に対する親和性を高める。選択される標的に対する親和性を高めるリガンドは、標的化リガンドとも呼ばれる。

50

【0167】

一部のリガンドは、エンドソーム溶解特性を有し得る。エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームの溶解、及び/又は本発明の組成物若しくはその成分のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する。エンドソーム溶解リガンドは、pH依存性の膜活性及び融合性を示すポリアニオン性ペプチド又はペプチド模倣体であっても良い。一実施形態では、エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームのpHでその活性型立体構造をとると推定される。「活性型」立体構造とは、エンドソーム溶解リガンドが、エンドソームの溶解、及び/又は本発明の組成物若しくはその成分のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する立体構造のことである。例示的なエンドソーム溶解リガンドとしては、GALAペプチド(Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972)、EALAペプチド(Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586)、及びこれらの誘導体(Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56-68)が挙げられる。一実施形態では、エンドソーム溶解成分は、pHの変化に応じて電荷又はプロトン化の変化を起こす化学基(例えば、アミノ酸)を含み得る。エンドソーム溶解成分は、直鎖であっても、分岐鎖であっても良い。

10

【0168】

リガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション、及び特異性の特性を向上させることができ、結果として得られる天然オリゴリボヌクレオチド若しくは修飾オリゴリボヌクレオチド、又は本明細書に記載されるモノマー及び/若しくは天然リボヌクレオチド若しくは修飾リボヌクレオチドの任意の組み合わせを含むポリマー分子のヌクレアーゼ耐性も向上させることができる。

20

【0169】

リガンドは、一般に、例えば、取り込みを増強するための治療用修飾因子;例えば、分布を監視するための診断化合物又はレポーター基;架橋剤;及びヌクレアーゼ耐性を付与する部分を含み得る。一般的な例として、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タンパク質、ペプチド、ポリアミン、及びペプチド模倣体が挙げられる。

【0170】

リガンドとしては、天然に存在する物質、例えば、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、低密度リボタンパク質(LDL)、高密度リボタンパク質(HDL)、若しくはグロブリン);糖質(例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、若しくはヒアルロン酸);又は脂質を挙げることができる。リガンドは、組換え分子又は合成分子、例えば、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド(例えば、アプタマー)であっても良い。ポリアミノ酸を含むポリアミノ酸としては、ポリリジン(PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コ-グリコリエド(glycolide))コポリマー、ジビニルエーテル無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、又はポリホスファジンが挙げられる。ポリアミンの例として、ポリエチレンイミン、ポリリジン(PLL)、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、擬似ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポリフィリン、ポリアミンの第四級塩、又はアルファヘリックスペプチドが挙げられる。

30

40

【0171】

リガンドとして、標的化基、例えば、細胞標的化剤又は組織標的化剤、例えば、腎臓細胞などの特定の細胞型に結合するレクチン、糖タンパク質、脂質、若しくはタンパク質、例えば、抗体も挙げることができる。標的化基は、チロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質A、ムチン糖質、多価ラクトース、多価ガラ

50

クトース、N - アセチル - ガラクトサミン、N - アセチル - グルコサミン (g u l u c o s a m i n e)、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸塩、ポリアスパラギン酸塩、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸塩、ビタミン B 1 2、ピオチン、R G D ペプチド、R G D ペプチド模倣体、又はアブタマーであっても良い。

【 0 1 7 2 】

リガンドの他の例として、色素、挿入剤 (例えば、アクリジン)、架橋剤 (例えば、ブソラレン、マイトマイシン C)、ポルフィリン (T P P C 4、テキサフィリン、サフィリン)、多環式芳香族炭化水素 (例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン)、人工エンドヌクレアーゼ又はキレート剤 (例えば、E D T A)、親油性分子、例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1 - ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1, 3 - ビス - O (ヘキサデシル) グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1, 3 - プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O 3 - (オレオイル) リトコール酸、O 3 - (オレオイル) コレン酸、ジメトキシトリチル、若しくはフェノキサジン) 及びペプチドコンジュゲート (例えば、アンテナペディアペプチド、T a t ペプチド)、アルキル化剤、リン酸塩、アミノ、メルカプト、P E G (例えば、P E G - 4 0 K)、M P E G、[M P E G]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン (例えば、ピオチン)、輸送ノ吸収促進剤 (例えば、アスピリン、ビタミン E、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ (例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン - イミダゾールコンジュゲート、テトラアザマクロ環の E u 3 + 複合体)、ジニトロフェニル、H R P、又は A P が挙げられる。

【 0 1 7 3 】

リガンドは、タンパク質、例えば、糖タンパク質、又はペプチド、例えば、共リガンドに対して特異的な親和性を有する分子、又は抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞、若しくは骨細胞などの特定の細胞型に結合する抗体であっても良い。リガンドとして、ホルモン及びホルモン受容体も挙げることができる。リガンドとして、非ペプチド種、例えば、脂質、レクチン、糖質、ビタミン、コファクター、多価ラクトース、多価ガラクトース、N - アセチル - ガラクトサミン、N - アセチル - グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、又はアブタマーも挙げることができる。リガンドは、例えば、リポ多糖、p 3 8 M A P キナーゼの活性化因子、又は N F - B の活性化因子であっても良い。

【 0 1 7 4 】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格を破壊することによって、例えば、細胞の微小管、マイクロフィラメント、及び/又は中間径フィラメントを破壊することによって、i R N A 剤の細胞内への取り込みを増大させることができる物質、例えば、薬物であっても良い。薬物は、例えば、タクソン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド (j a p l a k i n o l i d e)、ラトランクリン A、ファロイジン、スウィンホリド A、インダノシン、又はミオセルビン (m y o s e r v i n) であっても良い。

【 0 1 7 5 】

リガンドは、例えば、炎症反応を活性化することによって、オリゴヌクレオチドの細胞への取り込みを増加させることができる。このような効果を有し得る例示的なリガンドとしては、腫瘍壊死因子 (T N F)、インターロイキン - 1、又は インターフェロンが挙げられる。

【 0 1 7 6 】

一態様では、リガンドは、脂質又は脂質ベースの分子である。このような脂質又は脂質ベースの分子は、好ましくは血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン (H S A) に結合する。H S A 結合リガンドは、コンジュゲートが、標的組織、例えば、体の非腎臓標的組織に分布するのを可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であっても良い。H S A に結合し得る他の分子もリガンドとして使用することができる。例え

10

20

30

40

50

ば、ナプロキセン又はアスピリンを使用することができる。脂質又は脂質ベースのリガンドは、(a) コンジュゲートの分解に対する耐性を増大させ、(b) 標的細胞又は細胞膜への標的化又は輸送を増大させることができ、且つ/又は(c) 血清タンパク質、例えば、HSAに対する結合を調節するために使用することができる。

【0177】

脂質ベースのリガンドは、標的組織に対するコンジュゲートの結合を調節、例えば、制御するために使用することができる。例えば、HSAにより強く結合する脂質又は脂質ベースのリガンドは、腎臓を標的とする可能性が低く、従って、体内から除去される可能性が低い。HSAにそれほど強く結合しない脂質又は脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートが腎臓を標的にするように使用することができる。

10

【0178】

一実施形態では、脂質ベースのリガンドはHSAに結合する。好ましくは、脂質ベースのリガンドは、このコンジュゲートが、好ましくは非腎臓組織に分散するように十分な親和性でHSAに結合する。一実施形態では、この親和性は、HSA-リガンド結合が反転され得るような親和性である。別の実施形態では、脂質ベースのリガンドは、HSAに弱く結合するか、又は全く結合しないため、このコンジュゲートは、好ましくは腎臓に分散される。腎臓細胞を標的とする他の部分も、脂質ベースのリガンドの代わりに、又はこれに加えて使用することができる。

【0179】

別の態様では、リガンドは、標的細胞、例えば、増殖細胞によって取り込まれる部分、例えば、ビタミンである。これらは、例えば、悪性型又は非悪性型、例えば、癌細胞の望ましくない細胞増殖を特徴とする障害を治療するのに特に有用である。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E、及びKが挙げられる。他の例示的なビタミンとしては、ビタミンB、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサル、又は癌細胞によって取り込まれる他のビタミン若しくは栄養素が挙げられる。また、HAS、低密度リポタンパク質(LDL)、及び高密度リポタンパク質(HDL)もが挙げられる。

20

【0180】

別の態様では、リガンドは、細胞透過剤、好ましくはヘリックス型の細胞透過剤である。好ましくは、作用剤は両親媒性である。例示的な作用剤は、ペプチド、例えば、tat又はアンテナペディア(antennopedia)である。作用剤がペプチドである場合、ペプチド模倣体、反転異性体、非ペプチド結合又は偽ペプチド結合、及びD-アミノ酸の使用を含む修飾を施すことができる。好ましくは、このヘリックス型の細胞透過剤は、好ましくは親油性相及び疎油性相を有するアルファヘリックス型の作用剤である。

30

【0181】

リガンドは、ペプチド又はペプチド模倣体であっても良い。ペプチド模倣体(本明細書ではオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる)は、天然ペプチドと同様の定められた3次元構造に折り畳むことができる分子である。ペプチド部分又はペプチド模倣体部分は、約5~50のアミノ酸長さ、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は50のアミノ酸長さであっても良い。ペプチド又はペプチド模倣体は、例えば、細胞透過ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、又は疎水性ペプチド(例えば、主にTyr、Trp、若しくはPheから構成される)であっても良い。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、拘束ペプチド、又は架橋ペプチドであっても良い。別の代替では、ペプチド部分は、疎水性の膜輸送配列(MTS)を含み得る。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列AAVALLPVLLALLAP(配列番号:3)を有するRFGFである。疎水性MTSを含有するRFGF類似体(例えば、アミノ酸配列AALLPVLLAAP(配列番号:4))も標的化部分であっても良い。ペプチド部分は、「送達」ペプチドであっても良く、この送達ペプチドは、ペプチド、オリゴヌクレオチド、及びタンパク質を含む大きな極性分子を、細胞膜を通過して運搬することができる。例えば、HIV Tatタンパク質由来の配列(GRKKRRQRPPQ)(配列番号:5)及びショウジョウバエアンテナペディアタンパク質由来の配列(RQIKIW

40

50

FQNRMRMKWKK) (配列番号: 6) は、送達ペプチドとして機能できることが分かっている。ペプチド又はペプチド模倣体、例えば、ファージディスプレイライブラリー、又は1ピーズ1化合物(OBOC)コンビナトリアルライブラリーから特定されたペプチドは、DNAのランダム配列によってコードされても良い(Lam et al., Nature, 354: 82-84, 1991)。好ましくは、組み込まれたモノマー単位を介してiRNA剤に連結されたペプチド又はペプチド模倣体は、細胞標的化ペプチド、例えば、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)-ペプチド又はRGD模倣体である。ペプチド部分は、約5つのアミノ酸長さ~約40のアミノ酸長さの範囲とすることができる。ペプチド部分は、例えば、安定性又は直接的な立体構造特性を高めるための、構造変化を有し得る。下記の構造変化のいずれも利用することができる。RGDペプチド部分は、内皮腫瘍細胞又は乳癌腫瘍細胞などの腫瘍細胞を標的とするために使用することができる(Zitzmann et al., Cancer Res., 62: 5139-43, 2002)。RGDペプチドは、肺、腎臓、脾臓、又は肝臓を含む種々の他の組織の腫瘍に対するiRNA剤の標的化を促進することができる(Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8: 783-787, 2001)。好ましくは、RGDペプチドは、腎臓に対するiRNA剤の標的化を促進する。RGDペプチドは、直鎖又は環状であっても良く、特定の組織に対する標的化を促進するために修飾する、例えば、グリコシル化又はメチル化することができる。例えば、グリコシル化RGDペプチドは、 α_3 を発現する腫瘍細胞にiRNA剤を送達することができる(Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42: 326-336, 2001)。増殖細胞に豊富なマーカーを標的とするペプチドを使用することができる。例えば、RGD含有ペプチド及びRGD含有ペプチド模倣体は、癌細胞、特に、インテグリンを提示する細胞を標的とすることができる。従って、RGDペプチド、RGDを含有する環状ペプチド、D-アミノ酸を含むRGDペプチド、及び合成RGD模倣体を使用することができる。RGDに加えて、インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使用することもできる。一般に、このようなリガンドは、増殖細胞及び血管新生(angio genesis)を制御するために使用することができる。この種のリガンドの一部のコンジュゲートは、PECAM-1、VEGF、又は他の癌遺伝子、例えば、本明細書に記載される癌遺伝子を標的とする。

【0182】

「細胞透過ペプチド」は、細胞、例えば、微生物細胞、例えば、細菌細胞若しくは真菌細胞、又は哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を透過することができる。微生物細胞を透過するペプチドは、例えば、 α -ヘリックス直鎖ペプチド(例えば、LL-37若しくはセロピンP1)、ジスルフィド結合含有ペプチド(例えば、 α -ディフェンシン、 β -ディフェンシン、若しくはバクテネシン)、又は1種若しくは2種の優勢なアミノ酸のみを含有するペプチド(例えば、PR-39若しくはインドリシジン)であっても良い。細胞透過ペプチドは、核局在化シグナル(NLS)も含み得る。例えば、細胞透過ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメイン及びSV40ラージT抗原のNLSに由来する二部両親媒性ペプチド、例えば、MPGであっても良い(Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31: 2717-2724, 2003)。

【0183】

一実施形態では、標的化ペプチドは、両親媒性 α -ヘリックスペプチドであっても良い。例示的な両親媒性 α -ヘリックスペプチドとしては、限定されるものではないが、セクロピン、リコトキシン(lycotoxin)、パラダキシン(paradaxin)、ブフォリン、CPF、ボンピニン-様ペプチド(BLP)、カテリシジン、セラトトキシン(cerato toxin)、エボヤ(S. clava)ペプチド、メクラウナギ腸抗菌ペプチド(HFIIAP)、マガイニン、プレビニン-2、デルマセプチン、メリチン、プレウロシジン、H₂Aペプチド、アフリカツメガエルペプチド、エスクレンチニス-1(esculentinis-1)、及びカエリンが挙げられる。好ましくは、多数の因子が、ヘリックス安定性の完全性を維持すると見なされる。例えば、最大数のヘリックス

安定化残基（例えば *l e u*、*a l a*、又は *l y s*）を利用し、最小数のヘリックス不安定化残基（例えばプロリン、又は環状モノマー単位を利用する。キャッピング残基も考慮される（例えば、*G l y* は、例示的な *N*-キャッピング残基であり、且つ／又は *C* 末端アミド化は、追加的な水素結合を実現してヘリックスを安定させるために使用することができる。 $i \pm 3$ 位、又は $i \pm 4$ 位離間した、反対の電荷を有する残基間の塩架橋の形成によって安定させることができる。カチオン性残基、例えば、リジン、アルギニン、ホモ - アルギニン、オルニチン、又はヒスチジンは、アニオン性残基であるグルタミン酸又はアスパラギン酸と塩架橋を形成し得る。

【0184】

ペプチドリガンド及びペプチド模倣体リガンドとしては、天然ペプチド又は修飾ペプチド、例えば、*D* ペプチド若しくは *L* ペプチド； ペプチド、 ペプチド、若しくは ペプチド； *N*-メチルペプチド；アザペプチド；1つ以上の尿素結合、チオ尿素結合、カルバミン酸結合、若しくはスルホニル尿素結合で置換された1つ以上のアミド結合、即ち、ペプチ結合を有するペプチド；又は環状ペプチドを有するリガンドが挙げられる。

10

【0185】

標的化リガンドは、特定の受容体を標的とすることができるあらゆるリガンドであっても良い。例として、葉酸塩、*G a l N A c*、ガラクトース、マンノース、マンノース - 6 *P*、糖クラスター、例えば、*G a l N A c* クラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスター、又はアプタマーが挙げられる。クラスターは、2つ以上の糖単位の組み合わせである。標的化リガンドは、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、*P S M A*、エンドセリン、*G C P I I*、ソマトスタチン、*L D L* リガンド、及び *H D L* リガンドも含む。リガンドは、核酸、例えば、アプタマーをベースにしても良い。アプタマーは、未修飾でも良いし、又は本明細書に開示される修飾の任意の組み合わせを有しても良い。

20

【0186】

エンドソーム放出剤としては、イミダゾール、ポリ又はオリゴイミダゾール、*P E I*、ペプチド、融合性ペプチド、ポリカーボキシレート (*p o l y c a b o x y l a t e*)、ポリカチオン (*p o l y a c a t i o n*)、マスクオリゴ又はポリカチオン又はアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール／ポリケチアル (*p o l y k e t y a l*)、オルトエステル、マスク又は非マスクカチオン又はアニオン電荷を有するポリマー、マスク又は非マスクカチオン又はアニオン電荷を有するデンドリマーが挙げられる。

30

【0187】

P K モジュレーターとは、薬物動態学的モジュレーターのことである。*P K* モジュレーターとしては、脂肪親和物、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、*P E G*、ビタミンなどが挙げられる。例示的な *P K* モジュレーターとしては、限定されるものではないが、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミン *E*、ビオチンなどが挙げられる。多数のホスホロチオエート連結を含むオリゴヌクレオチドも、血清タンパク質に結合することが知られており、したがって、骨格に多数のホスホロチオエート連結を含む短鎖オリゴヌクレオチド、例えば、約5塩基、10塩基、15塩基、又は20塩基のオリゴヌクレオチドも、リガンドとして（例えば、*P K* 調節リガンドとして）本発明に適用可能である。

40

【0188】

加えて、血清成分（例えば、血清タンパク質）に結合するアプタマーも、*P K* 調節リガンドとして本発明に適用可能である。

【0189】

本発明に適用可能な他のリガンドコンジュゲートは、参照によりそれらの全開示内容が本明細書に組み入れられる、2004年8月10日出願の米国特許出願第10/916,185号明細書；2004年9月21日出願の同第10/946,873号明細書；2007年8月3日出願の同第10/833,934号明細書；2005年4月27日出願の

50

同第 11 / 115 , 989 号明細書、及び 2007 年 11 月 21 日出願の同第 11 / 944 , 227 号明細書に記載されている。

【0190】

2 つ以上のリガンドが存在する場合、リガンドは、全て同じ特性を有しても良いし、全てが異なる特性を有しても良く、又は一部のリガンドが、同じ特性を有する一方、他のリガンドが異なる特性を有しても良い。例えば、リガンドは、標的化特性を有しても良いし、エンドソーム的活性を有して良いし、又は PK 調節特性を有しても良い。一実施形態では、全てのリガンドが異なる特性を有する。

【0191】

リガンドは、様々な位置、例えば 3' 末端、5' 末端、及び / 又は内部位置で、オリゴヌクレオチドに結合することができる。一部の実施形態では、リガンドは、介在テザー、例えば、本明細書に記載される担体を介してオリゴヌクレオチドに結合している。モノマーが成長している鎖に組み込まれる場合、リガンド又はテザーリガンドは、このモノマーに存在しても良い。一部の実施形態では、リガンドは、「前駆体」モノマーが、成長している鎖に組み込まれた後で、この「前駆体」モノマーへの結合によって組み込むことができる。例えば、末端がアミノであるテザー（即ち、リガンドが結合されていない）、例えば、 $\text{TAP} - (\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ を有するモノマーを、成長しているオリゴヌクレオチド鎖に組み込むことができる。これに続く作業、即ち、前駆体モノマーが鎖に組み込まれた後で、リガンドの求電子基と前駆体モノマーのテザーの末端求核基との結合によって、求電子基、例えば、ペンタフルオロフェニルエステル又はアルデヒド基を有するリガンドを、その後、前駆体モノマーに結合させることができる。

【0192】

別の例では、クリック化学反応に参加するのに適した化学基を有するモノマーを、例えば、末端がアジド又はアルキンのテザー / リンカーに組み込むことができる。これに続く作業、即ち、前駆体モノマーが鎖に組み込まれた後で、相補的な化学基、例えば、アルキン又はアジドを有するリガンドを、アルキン及びアジドを共に結合することによって前駆体モノマーに結合することができる。

【0193】

一部の実施形態では、リガンドは、核酸分子の核酸塩基、糖部分、又はヌクレオシド間結合にコンジュゲートすることができる。プリン核酸塩基又はその誘導体に対するコンジュゲーションは、環内原子及び環外原子を含む任意の位置に生じ得る。一部の実施形態では、プリン核酸塩基の 2 位、6 位、7 位、又は 8 位が、コンジュゲート部分に結合している。また、ピリミジン核酸塩基又はその誘導体に対するコンジュゲーションは、どの位置で生じてても良い。一部の実施形態では、ピリミジン核酸塩基の 2 位、5 位、及び 6 位を、コンジュゲート部分と置換することができる。ヌクレオシドの糖部分に対するコンジュゲーションは、どの炭素原子で生じてても良い。コンジュゲート部分に結合することができる糖部分の炭素原子の例には、2'、3'、及び 5' 炭素原子が挙げられる。1' 位も、コンジュゲート部分、例えば、脱塩基残基に結合することができる。ヌクレオシド間結合も、コンジュゲート部分を保持することができる。リン含有結合（例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート（*phosphorodithiote*）、及びホスホロアミデートなど）の場合、コンジュゲート部分は、リン原子に直接結合する、又はリン原子に結合している O、N、又は S 原子に結合することができる。アミン又はアミドを含有するヌクレオシド間結合（例えば、PNA）の場合、コンジュゲート部分は、アミン又はアミドの窒素原子に、又は隣接する炭素原子に結合することができる。

【0194】

Ga1NAc リガンド及びリンカー

一部の実施形態では、HAO1 遺伝子を標的とする siRNA は、炭水化物、例えば、単糖（例えば、Ga1NAc）、二糖、三糖、四糖、多糖にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、siRNA は、N - アセチルガラクトサミン（Ga1NAc）リガンドにコンジュゲートされる。これは、皮下投与後の肝細胞への効率的な送達を促進する。炭

10

20

30

40

50

水化物、例えば、N - アセチルガラクトサミンの、例えば、s i R N A への結合の方法は、当業者に周知である。例は、米国特許第 8 , 1 0 6 , 0 2 2 号明細書及び国際公開第 2 0 1 4 / 0 2 5 8 0 5 号パンフレットで確認することができる。

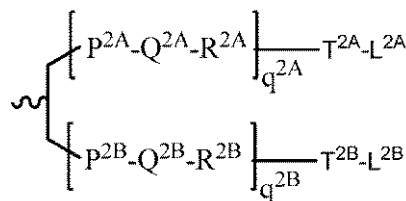
【 0 1 9 5 】

一部の実施形態では、H A O 1 遺伝子を標的とする s i R N A は、リンカーを介してリガンド、例えば、G a l N A c にコンジュゲートされる。例えば、リガンドは、二価又は三価の分岐リンカーによって付着された 1 つ以上の G a l N A c (N - アセチルグルコサミン) 誘導体であり得る。

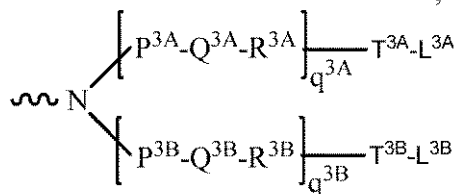
【 0 1 9 6 】

一実施形態では、本発明の d s R N A は、次の式 (V) ~ (V I I) の何れかに示されている構造を含む二価及び三価の分岐リンカーにコンジュゲートする：

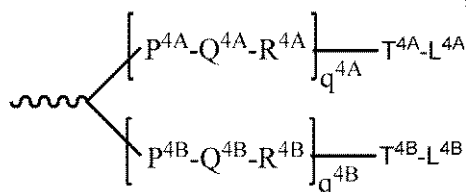
【 化 1 】



式 (IV)

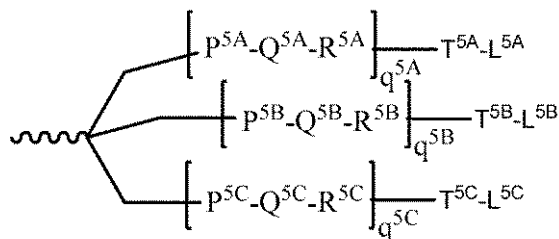


式 (V)



式 (VI)

又は



式 (VII)

式中、

q^{2A}、q^{2B}、q^{3A}、q^{3B}、q^{4A}、q^{4B}、q^{5A}、q^{5B}、及び q^{5C} は存在ごとに独立して、0 ~ 20 を表し、反復単位は、同じであっても良いし、異なっても良く；p^{2A}、p^{2B}、p^{3A}、p^{3B}、p^{4A}、p^{4B}、p^{5A}、p^{5B}、p^{5C}、T^{2A}、T^{2B}、T^{3A}、T^{3B}、T^{4A}、T^{4B}、T^{4A}、T^{5B}、T^{5C} はそれぞれ存在ごとに独立して、存在しないか、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH

10

20

30

40

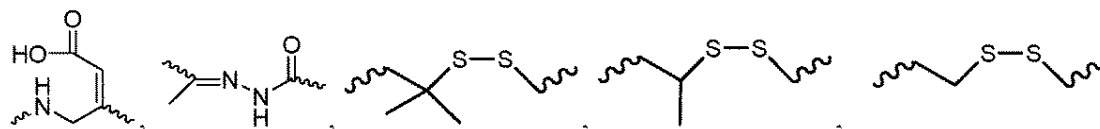
50

、又は CH_2O を表し；

$\text{Q}^{2\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{2\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{3\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{4\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{A}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{B}}$ 、 $\text{Q}^{5\text{C}}$ は存在ごとに独立して、存在しないか、アルキレン、置換アルキレンを表し、1つ以上のメチレンは、 O 、 S 、 $\text{S}(\text{O})$ 、 SO_2 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{N}})$ 、 $\text{C}(\text{R}') = \text{C}(\text{R}'')$ 、 $\text{C}-\text{C}$ 、又は $\text{C}(\text{O})$ の1つ以上によって中断又は終了させることができ；

$\text{R}^{2\text{A}}$ 、 $\text{R}^{2\text{B}}$ 、 $\text{R}^{3\text{A}}$ 、 $\text{R}^{3\text{B}}$ 、 $\text{R}^{4\text{A}}$ 、 $\text{R}^{4\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{A}}$ 、 $\text{R}^{5\text{B}}$ 、 $\text{R}^{5\text{C}}$ はそれぞれ存在ごとに独立して、 NH 、 O 、 S 、 CH_2 、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 $\text{NHCH}(\text{R}^{\text{a}})\text{C}(\text{O})$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{NH}-$ 、 CO 、 $\text{CH}=\text{N}-\text{O}$ 、

【化2】



10

、又はヘテロシクリルを表し；

$\text{L}^{2\text{A}}$ 、 $\text{L}^{2\text{B}}$ 、 $\text{L}^{3\text{A}}$ 、 $\text{L}^{3\text{B}}$ 、 $\text{L}^{4\text{A}}$ 、 $\text{L}^{4\text{B}}$ 、 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ 、及び $\text{L}^{5\text{C}}$ は、リガンドを表す；即ち、それぞれ存在ごとに独立して、単糖（例えば、 GalNAc ）、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、又は多糖を表し；且つ

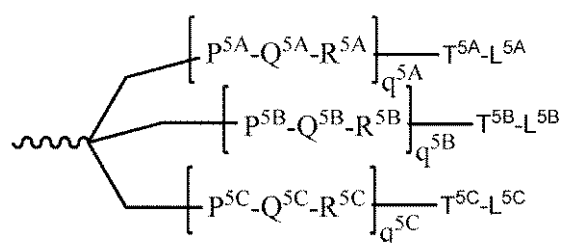
R^{a} は、 H 又はアミノ酸側鎖である。

20

【0197】

三価コンジュゲート GalNAc 誘導体、例えば、式(VII)のような誘導体は、標的遺伝子の発現を阻害するための RNAi 剤と共に使用すると特に有用である：

【化3】



式(VII)

30

式中、 $\text{L}^{5\text{A}}$ 、 $\text{L}^{5\text{B}}$ 、及び $\text{L}^{5\text{C}}$ は、単糖、例えば、 GalNAc 誘導体を表している。

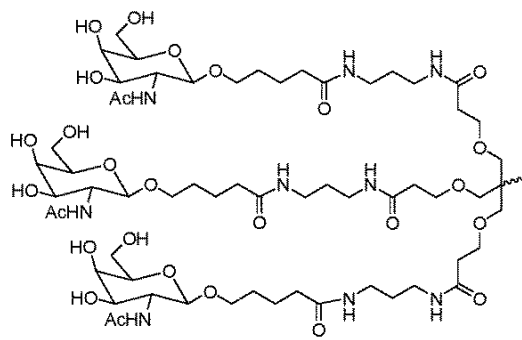
【0198】

適切な二価及び三価分岐リンカー基コンジュゲート GalNAc 誘導体は、限定されるものではないが、以下の化合物を含む：

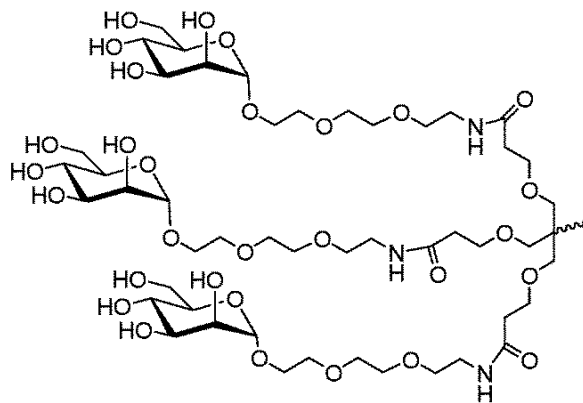
40

50

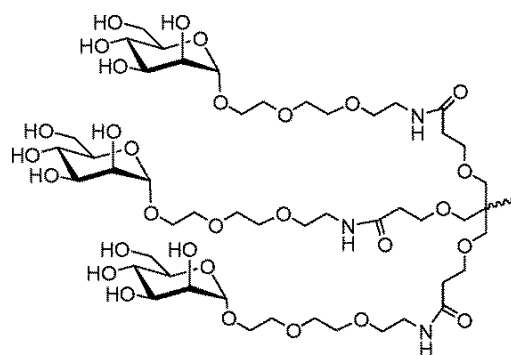
【化 4】



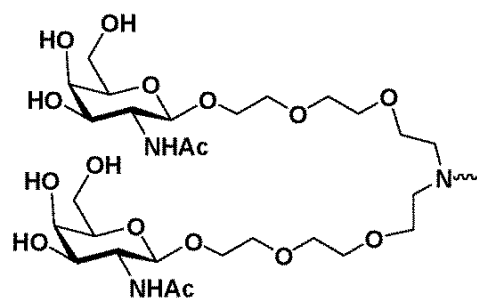
10



20



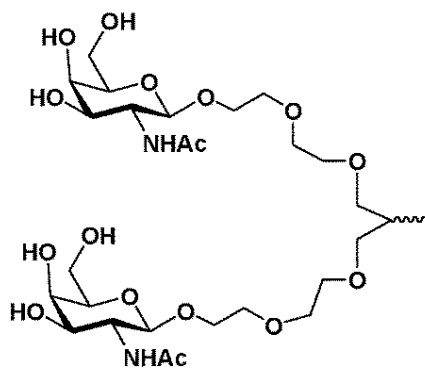
30



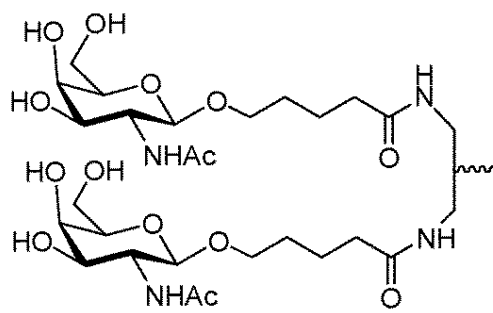
40

50

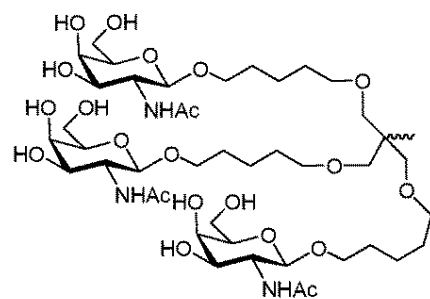
【化 5】



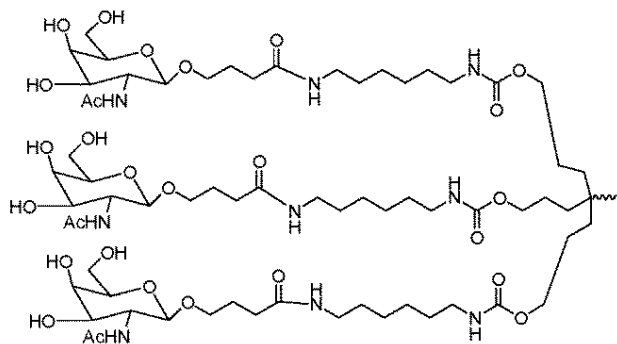
10



20



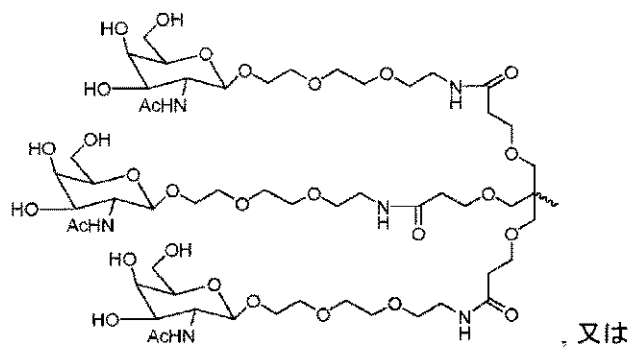
30



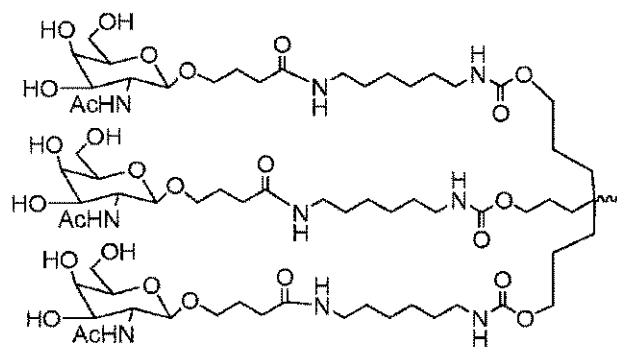
40

50

【化 6】



10



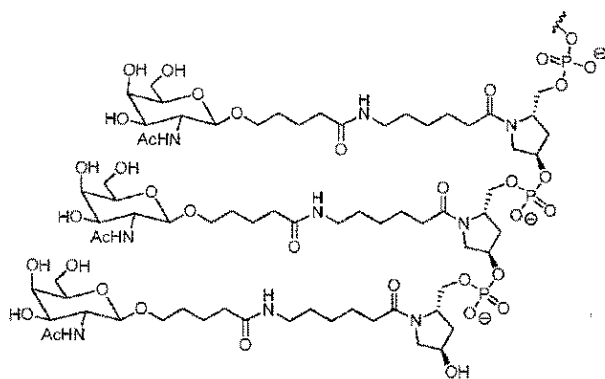
20

【 0 1 9 9 】

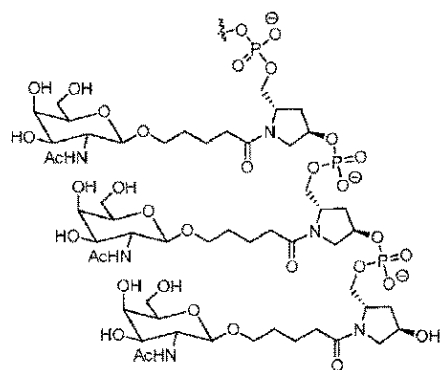
さらなるリガンド

一部の実施形態では、リガンドは、以下の 1 つから選択される：

【化 7】



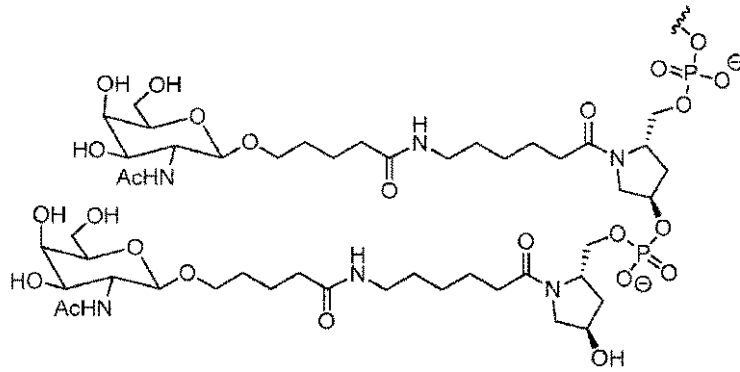
30



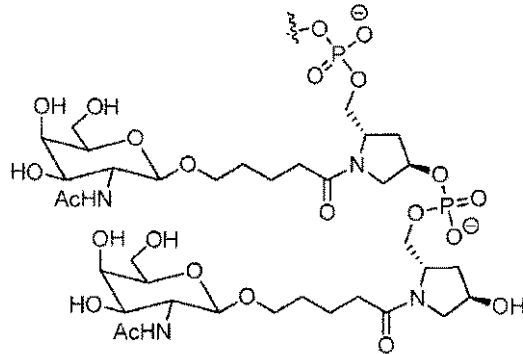
40

50

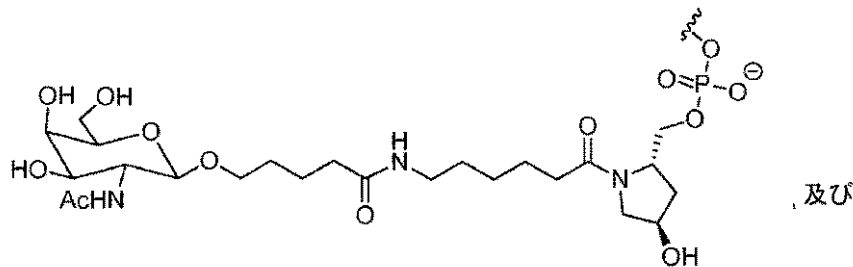
【化 8】



10

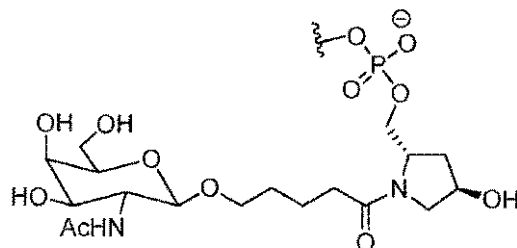


20



, 及び

30



【 0 2 0 0 】

I I I . 本発明の i R N A の送達

40

本発明の i R N A 剤の細胞、例えば、対象の細胞、例えば、ヒト対象（例えば、i R N A 剤の送達を必要とする対象、例えば、H A O 1 関連障害を有する対象）の細胞への送達は、様々な方法で達成することができる。例えば、*in vitro* 又は *in vivo* で本発明の i R N A を細胞に接触させることによって送達を行うことができる。*in vivo* 送達は、i R N A、例えば、d s R N A を含む組成物を対象に投与することによって直接行うこともできる。或いは、*in vivo* 送達は、i R N A をコードし、且つ i R N A の発現を誘導する 1 つ以上のベクターを投与することによって間接的に行うことができる。これらの代替案を以下にさらに説明する。

【 0 2 0 1 】

一般に、核酸分子を（*in vitro* 又は *in vivo*）送達するあらゆる方法は、

50

本発明の*iRNA*に使用するために適合させることができる（例えば、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、Akhtar S. and Julian R L. (1992) Trends Cell Biol. 2(5): 139-144及び国際公開第94/02595号パンフレットを参照されたい）。*in vivo*送達では、*iRNA*分子を送達するために考慮する因子としては、例えば、送達される分子の生物学的安定性、非特異的な影響の防止、及び標的組織への送達分子の蓄積が挙げられる。*iRNA*の非特異的な影響は、局所投与によって、例えば、組織への直接注入若しくは植え込み、又は製剤の局所的な投与によって最小限にすることができる。処置部位への局所投与は、作用剤の局所濃度を最大にし、通常なら作用剤によって傷つけられ得る又は作用剤を劣化させ得る、全身組織への作用剤の曝露を制限し、且つ投与されるべき*iRNA*分子の総用量を低減することができる。いくつかの研究は、*iRNA*が局所投与されたときの遺伝子産物のノックダウンの成功を示した。例えば、カニクイザルでの硝子体内注入(Tolentino, M J., et al (2004) Retina 24: 132-138)及びマウスでの網膜下注入(Reich, S J., et al (2003) Mol. Vis. 9: 210-216)によるVEGF dsRNAの眼内送達は共に、加齢黄斑変性の実験モデルで新血管形成を防止することを示した。加えて、マウスでのdsRNAの直接腫瘍内注入は、腫瘍の体積を減少させ(Pille, J., et al (2005) Mol. Ther. 11: 267-274)、そして腫瘍を有するマウスの生存期間を延ばすことができる(Kim, W J., et al (2006) Mol. Ther. 14: 343-350; Li, S., et al (2007) Mol. Ther. 15: 515-523)。RNA干渉は、直接注入によるCNSへの局所送達(Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32: e49; Tan, P H., et al (2005) Gene Ther. 12: 59-66; Makimura, H., et al (2002) BMC Neurosci. 3: 18; Shishkina, G T., et al (2004) Neuroscience 129: 521-528; Thakker, E R., et al (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101: 17270-17275; Akaneya, Y., et al (2005) J. Neurophysiol. 93: 594-602)、及び鼻腔内投与による肺への送達(Howard, K A., et al (2006) Mol. Ther. 14: 476-484; Zhang, X., et al (2004) J. Biol. Chem. 279: 10677-10684; Bitko, V., et al (2005) Nat. Med. 11: 50-55)にも成功したことを示している。疾患の処置のために*iRNA*を全身投与する場合、RNAを修飾する、或いは薬物送達システムを用いて送達することができ；これらの両方の方法は、*in vivo*でのエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによるdsRNAの迅速な分解を防止するように作用する。RNA又は薬学的担体の修飾は、*iRNA*組成物の標的組織への標的化を可能にすると共に、不所望の標的外的影響を回避することもできる。*iRNA*分子は、細胞内取り込みを促進して分解を防止するために、親油性基、例えば、コレステロールへの化学的結合によって修飾することができる。例えば、親油性コレステロール部分にコンジュゲートしたApoBに向けられる*iRNA*をマウスに全身注射し、その結果として、肝臓及び空腸の両方でapoB mRNAのノックダウンが起きた(Soutschek, J., et al (2004) Nature 432: 173-178)。*iRNA*のアプタマーへの結合は、前立腺癌のマウスモデルにおいて腫瘍の成長を阻害して腫瘍退縮を媒介することを示した(McNamara, J O., et al (2006) Nat. Biotechnol. 24: 1005-1015)。代替の一実施形態では、*iRNA*は、薬物送達システム、例えば、ナノ粒子、 dendriマー、ポリマー、リボソーム、又は陽イオン送達システムを用いて送達することができる。正電荷陽イオン送達システムは、*iRNA*分子(負に帯電した)の結合を促進すると共に、負に帯電した細胞膜での相互作用も促進して細胞による*iRNA*の効率的な取り込みも可能にする。陽イオン性の脂質、 dendriマー、又はポリマーは、*iRNA*に結合する、又は誘導されて*iRNA*を包囲する小胞若しくはミセルを形成することが

10

20

30

40

50

できる（例えば、Kim S H . , et al (2008) Journal of Controlled Release 129 (2) : 107 - 116 を参照されたい）。小胞又はミセルの形成は、全身投与されるとき*i*RNAの分解をさらに防止する。陽イオン-*i*RNA複合体の形成及び投与の方法は、十分に当業者の能力の範囲内である（例えば、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、Sorensen, D R . , et al (2003) J. Mol. Biol. 327 : 761 - 766 ; Verma, U N . , et al (2003) Clin. Cancer Res. 9 : 1291 - 1300 ; Arnold, A S et al (2007) J. Hypertens. 25 : 197 - 205 を参照されたい）。*i*RNAの全身送達に有用な薬物送達システムのいくつかの非限定の例としては、DOTAP (Sorensen, D R . , et al (2003), 前記 ; Verma, U N . , et al (2003), 前記)、Oligofectamine、「固体核酸脂質粒子」(Zimmermann, T S . , et al (2006) Nature 441 : 111 - 114), cardiolipin (Chien, P Y . , et al (2005) Cancer Gene Ther. 12 : 321 - 328 ; Pal, A . , et al (2005) Int. J. Oncol. 26 : 1087 - 1091)、ポリエチレンイミン (Bonnet M E . , et al (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print ; Aigner, A . (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド (Liu, S . (2006) Mol. Pharm. 3 : 472 - 487)、及びポリアミドアミン (Tomalia, D A . , et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35 : 61 - 67 ; Yoo, H . , et al (1999) Pharm. Res. 16 : 1799 - 1804) が挙げられる。一部の実施形態では、*i*RNAは、全身投与のためにシクロデキストリンと複合体を形成する。*i*RNA及びシクロデキストリンの投与方法及び医薬組成物は、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる、米国特許第7,427,605号明細書で確認することができる。

【0202】

本発明の*i*RNAをコードするベクター

HAO1遺伝子を標的とする*i*RNAは、DNA又はRNAベクターに挿入される転写単位から発現させることができる（例えば、Couture, A, et al . , TIG. (1996), 12 : 5 - 10 ; Skillern, A . , et al . , PCT国際公開特許第00/22113号パンフレット、Conrad, PCT国際公開特許第00/22114号パンフレット、及びConrad, 米国特許第6,054,299号明細書を参照されたい）。発現は、使用される特定の構築物及び標的組織又は細胞型によって一過性（数時間から数週間の範囲）又は持続性（数週間から数か月以上）であり得る。これらの導入遺伝子は、線形構築物、円形プラスミド、又は組込み型若しくは非組込み型ベクターであり得るウイルスベクターとして導入することができる。導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして遺伝することを可能にするように構築することもできる (Gassmann, et al . , Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92 : 1292)。

【0203】

*i*RNAの個々の鎖又は複数の鎖を、発現ベクターのプロモーターから転写することができる。例えば、dsRNAを形成するために2つの別個の鎖が発現される場合、2つの別個の発現ベクターを、標的細胞に（例えば、トランスフェクション又は注入によって）同時に導入することができる。或いは、dsRNAのそれぞれの個々の鎖を、共に同じ発現プラスミドに位置するプロモーターによって転写することができる。一実施形態では、dsRNAは、このdsRNAがステム及びループ構造を有するようにリンカーポリヌクレオチド配列によって連結された逆方向反復ポリヌクレオチドとして発現される。

【0204】

*i*RNA発現ベクターは、一般に、DNAプラスミド又はウイルスベクターである。真

核細胞に適合した発現ベクター、好ましくは脊椎動物細胞に適合した発現ベクターを使用して、本明細書に記載される*iRNA*の発現用の組換え構築物を作製することができる。真核細胞発現ベクターは、当分野で周知であり、多数の商業的供給源から入手可能である。典型的には、所望の核酸セグメントの挿入に便利な制限部位を含むこのようなベクターが提供される。*iRNA*発現ベクターの送達は、例えば、静脈内若しくは筋内投与によって、患者から取り出された標的細胞への投与及びこれに続く患者への再導入によって、又は所望の標的細胞への導入を可能にするその他の手段によって全身送達にすることができる。

【0205】

*iRNA*発現プラスミドは、陽イオン性脂質担体（例えば、*Oligofectamine*）又は非陽イオン性脂質ベースの担体（例えば、*Transit-TKO*（商標））との複合体として標的細胞にトランスフェクトすることができる。1週間以上の期間に亘って標的*RNA*の異なる領域を標的とする*iRNA*媒介ノックダウンのための複数の脂質トランスフェクションも、本発明によって企図される。宿主細胞へのベクターの導入の達成は、様々な既知の方法を用いて監視することができる。例えば、一過性のトランスフェクションは、レポーター、例えば、蛍光マーカー、例えば、緑色蛍光タンパク質（*GFP*）によって知らせることができる。*ex vivo*での細胞の安定したトランスフェクションは、特定の環境因子（例えば、抗生物質及び薬物）に対する耐性、例えば、ハイグロマイシンB耐性を有するトランスフェクト細胞を提供するマーカーを用いて確認することができる。

【0206】

本明細書に記載される方法及び組成物と共に利用することができるウイルスベクター系としては、限定されるものではないが、（a）アデノウイルスベクター；（b）限定されるものではないが、レンチウイルスベクター、*moloney*マウス白血病ウイルスなどを含むレトロウイルスベクター；（c）アデノ関連ウイルスベクター；（d）ヘルペス単純ウイルスベクター；（e）*SV40*ベクター；（f）ポリオーマウイルスベクター；（g）パピローマウイルスベクター；（h）ピコルナウイルスベクター；（i）オルソポックスウイルスなどのポックスウイルスベクター、例えば、ワクシニアウイルスベクター又はアビポックス、例えば、カナリア痘又は鶏痘；及び（j）ヘルパー依存性又はガットレスアデノウイルスが挙げられる。複製欠損ウイルスも有利であり得る。様々なベクターが、細胞のゲノムに組み込まれる、又は組み込まれない。構築物は、所望に応じて、トランスフェクションのためのウイルス配列を含み得る。或いは、構築物を、エピソームの複製を可能にするベクター、例えば、*EPV*及び*EBV*ベクターに組み込むことができる。*iRNA*の組換え発現のための構築物は、一般に、標的細胞での*iRNA*の発現を確実にするために調節要素、例えば、プロモーター、エンハンサーなどを必要とする。ベクター及び構築物を考察するための他の態様を、以下にさらに説明する。

【0207】

*iRNA*の送達に有用なベクターには、所望の標的細胞又は組織での*iRNA*の発現に十分な調節要素（プロモーター、エンハンサーなど）が含まれる。調節要素は、構成的又は調節/誘導発現を提供するために選択することができる。

【0208】

*iRNA*の発現は、例えば、特定の生理的調節因子、例えば、循環血糖値又はホルモンに感受性が高い誘導性調節配列を用いることによって正確に調節することができる（*Docherty et al.*, 1994, *FASEB J.* 8: 20-24）。細胞又は哺乳動物での*dsRNA*発現の調節に適したこのような誘導発現系は、例えば、エクジソンによる調節、エストロゲン、プロゲステロン、テトラサイクリン、化学誘導物質の二量体化、及びイソプロピル - D1 - チオガラクトピラノシド（*IPTG*）による調節を含む。当業者であれば、*iRNA*導入遺伝子の意図する使用に基づいて適切な調節/プロモーター配列を選択することができるであろう。

【0209】

10

20

30

40

50

iRNAをコードする核酸配列を含むウイルスベクターを使用することができる。例えば、レトロウイルスベクターを使用することができる(Miller et al., Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)を参照されたい)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正確なパッケージング及び宿主細胞DNAへの組み込みに必要な構成要素を含む。iRNAをコードする核酸配列が、核酸の患者への送達を促進する1つ以上のベクターにクローニングされる。レトロウイルスベクターについてのさらなる詳細は、例えば、Boesen et al., Biotherapy 6: 291-302 (1994)で確認することができ、この文献は、幹細胞の化学療法に対する耐性を高めるためのレトロウイルスベクターを使用したmdr1遺伝子の造血幹細胞への送達を説明している。遺伝子療法におけるレトロウイルスベクターの使用を例示する他の参考文献としては: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); 及び Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114 (1993)が挙げられる。使用が企図されるレンチウイルスベクターとしては、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,143,520号明細書; 同第5,665,557号明細書; 及び同第5,981,276号明細書に記載されているHIVベースのベクターが挙げられる。

【0210】

アデノウイルスも、本発明のiRNAの送達での使用に企図される。アデノウイルスは、例えば、遺伝子の気道上皮への送達で特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、軽度の疾患を引き起こす気道上皮に自然感染する。アデノウイルスベースの送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経、内皮細胞、及び筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染できるという利点を有する。Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 (1993)は、アデノウイルスベースの遺伝子療法の概説を述べている。Bout et al., Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994)は、アデノウイルスベクターを使用したアカゲザルの気道上皮への遺伝子の導入を実証した。遺伝子療法におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeld et al., Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68: 143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91: 225-234 (1993); PCT国際公開特許第94/12649号パンフレット; 及びWang, et al., Gene Therapy 2: 775-783 (1995)で確認することができる。本発明で取り上げられるiRNAを発現するための適切なAVベクター、組換えAVベクターを構築する方法、及びベクターの標的細胞への送達の方法は、Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010に記載されている。

【0211】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターも、本発明のiRNAを送達するために使用することができる(Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号明細書)。一実施形態では、iRNAは、例えば、U6又はH1 RNAプロモーター又はサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを有する組換えAAVベクターから2つの別個の相補的な一本鎖RNA分子として発現され得る。本発明で取り上げられるdsRNAを発現するための適切なAAVベクター、組換えAVベクターを構築する方法、及びベクターの標的細胞への送達の方法は、参照によりそれぞれの全開示内容が本明細書に組み入れられる、Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 6

3 : 3 8 2 2 - 3 8 2 6 ; 米国特許第 5 , 2 5 2 , 4 7 9 号明細書 ; 米国特許第 5 , 1 3 9 , 9 4 1 号明細書 ; 国際特許出願の国際公開第 9 4 / 1 3 7 8 8 号パンフレット ; 及び国際特許出願の国際公開第 9 3 / 2 4 6 4 1 号パンフレットに記載されている。

【 0 2 1 2 】

本発明の i R N A の送達に適した別のウイルスベクターは、ボックスウイルス、例えば、ワクシニアウイルス、例えば、減弱ワクシニア、例えば、改変ウイルスアンカラ (M V A) 又は N Y V A C 、アピボックス、例えば、カナリア痘又は鶏痘である。

【 0 2 1 3 】

ウイルスベクターの親和性は、適宜、他のウイルスからのエンベロープタンパク質若しくは他の表面抗原でベクターを偽型にすることによって、又は様々なウイルスカプシドタンパク質を置換することによって変更することができる。例えば、レンチウイルスベクターは、水泡性口内炎ウイルス (V S V) 、狂犬病、エボラ、及び M o k o l a などからの表面タンパク質で偽型にすることができる。A A V ベクターは、様々なカプシドタンパク質血清型を発現するベクターをエンジニアリングすることによって様々な細胞を標的にするように作製することができる : 例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる、R a b i n o w i t z J E e t a l . (2 0 0 2) , J V i r o l 7 6 : 7 9 1 - 8 0 1 を参照されたい。

【 0 2 1 4 】

ベクターの医薬品は、許容され得る希釈剤中のベクターを含み得る、又は遺伝子送達ヒクルが埋め込まれた徐放性マトリックスを含み得る。或いは、完全な遺伝子送達ベクターを、組換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターから無傷で作製できる場合、医薬品は、遺伝子送達システムを形成する 1 つ以上の細胞を含み得る。

【 0 2 1 5 】

I V . 本発明の医薬組成物

本発明は、本発明の i R N A を含む医薬組成物及び医薬製剤も含む。一実施形態では、本明細書で記載される i R N A 及び薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物が本明細書で提供される。i R N A を含む医薬組成物は、H A O 1 関連疾患又は障害の処置に有用である。このような医薬組成物は、送達の方式に基づいて製剤することができる。

【 0 2 1 6 】

本発明の R N A i 剤を含む医薬組成物は、例えば、緩衝剤を含む若しくは含まない溶液、又は薬学的に許容され得る担体を含む組成物とすることができる。このような組成物としては、例えば、水溶性又は結晶性組成物、リボソーム製剤、ミセル製剤、エマルション、及び遺伝子治療ベクターが挙げられる。

【 0 2 1 7 】

本発明の方法では、R N A i 剤は、溶液に溶解して投与することができる。遊離 R N A i 剤を、非緩衝液、例えば、生理食塩水又は水に溶解して投与することができる。或いは、遊離 s i R N A は、適切な緩衝液に溶解して投与しても良い。緩衝液としては、酢酸塩、クエン酸塩、プロラミン、炭酸塩、リン酸塩、又はこれらの任意の組み合わせを挙げることができる。一実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) である。R N A i 剤を含む緩衝液の p H 及びオスモル濃度は、対象に投与するのに適するように調整することができる。

【 0 2 1 8 】

一部の実施形態では、緩衝液は、オスモル濃度が、所望の値、例えば、ヒト血漿の生理値に維持されるように、溶液のオスモル濃度を制御するための作用剤をさらに含む。オスモル濃度を制御するために緩衝液に添加することができる溶質としては、限定されるものではないが、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、非代謝性ポリマー、ビタミン、イオン、糖、代謝産物、有機酸、脂質、又は塩が挙げられる。一部の実施形態では、溶液のオスモル濃度を制御するための作用剤は塩である。特定の実施形態では、溶液のオスモル濃度を制御するための作用剤は、塩化ナトリウム又は塩化カリウムである。

【 0 2 1 9 】

10

20

30

40

50

【 0 2 2 0 】

いくつかの実施形態では、*siRNA*、すなわち *ALN-GO1* は、患者の体重 1 kg 当たり少なくとも 2.0 mg 、少なくとも 3.0 mg 、少なくとも 4.0 mg 、又は少なくとも 5.0 mg の *siRNA* の用量で患者に投与される。

【 0 2 2 1 】

一般に、本発明の iRNA の適切な用量は、1日にレシピエントの体重 1 kg 当たり約 0.001 ~ 約 200.0 mg の範囲であり、一般的には 1日に体重 1 kg 当たり約 0.1 ~ 10 mg 又は 1 ~ 50 mg の範囲である。例えば、dsRNA は、1回の投与で約 0.01 mg / kg、約 0.05 mg / kg、約 0.5 mg / kg、約 1 mg / kg、約 1.5 mg / kg、約 2 mg / kg、約 3 mg / kg、約 4 mg / kg、約 5 mg / kg、約 6 mg / kg、約 7 mg / kg、約 8 mg / kg、約 9 mg / kg、約 10 mg / kg、約 20 mg / kg、約 30 mg / kg、約 40 mg / kg、又は約 50 mg / kg を投与することができる。

【 0 2 2 2 】

いくつかの実施形態では、s i R N A は、少なくとも 2 . 0 m g / k g 又は少なくとも 5 . 0 m g / k g の用量で投与される。

【 0 2 2 3 】

[illegible]

約 20 mg / kg、約 0.25 ~ 約 20 mg / kg、約 0.5 ~ 約 20 mg / kg、約 0.75 ~ 約 20 mg / kg、約 1 ~ 約 20 mg / kg、約 1.5 ~ 約 20 mg / kg、約 2 ~ 約 20 mg / kg、約 2.5 ~ 約 20 mg / kg、約 3 ~ 約 20 mg / kg、約 3.5 ~ 約 20 mg / kg、約 4 ~ 約 20 mg / kg、約 4.5 ~ 約 20 mg / kg、約 5 ~ 約 20 mg / kg、約 7.5 ~ 約 20 mg / kg、約 10 ~ 約 20 mg / kg、又は約 15 ~ 約 20 mg / kg の用量で投与される。列挙された値に対する中間の値及び範囲も、本発明の一部であるものとする。

【0224】

例えば、RNAi 剤、例えば、dsRNA は、0.01 mg / kg、0.02 mg / kg、0.03 mg / kg、0.04 mg / kg、0.05 mg / kg、0.06 mg / kg、0.07 mg / kg、0.08 mg / kg、0.09 mg / kg、0.1 mg / kg、0.2 mg / kg、0.3 mg / kg、0.4 mg / kg、0.5 mg / kg、0.6 mg / kg、0.7 mg / kg、0.8 mg / kg、0.9 mg / kg、1.0 mg / kg、1.1 mg / kg、1.2 mg / kg、1.3 mg / kg、1.4 mg / kg、1.5 mg / kg、1.6 mg / kg、1.7 mg / kg、1.8 mg / kg、1.9 mg / kg、2.0 mg / kg、2.1 mg / kg、2.2 mg / kg、2.3 mg / kg、2.4 mg / kg、2.5 mg / kg、2.6 mg / kg、2.7 mg / kg、2.8 mg / kg、2.9 mg / kg、3.0 mg / kg、3.1 mg / kg、3.2 mg / kg、3.3 mg / kg、3.4 mg / kg、3.5 mg / kg、3.6 mg / kg、3.7 mg / kg、3.8 mg / kg、3.9 mg / kg、4.0 mg / kg、4.1 mg / kg、4.2 mg / kg、4.3 mg / kg、4.4 mg / kg、4.5 mg / kg、4.6 mg / kg、4.7 mg / kg、4.8 mg / kg、4.9 mg / kg、5.0 mg / kg、5.1 mg / kg、5.2 mg / kg、5.3 mg / kg、5.4 mg / kg、5.5 mg / kg、5.6 mg / kg、5.7 mg / kg、5.8 mg / kg、5.9 mg / kg、6.0 mg / kg、6.1 mg / kg、6.2 mg / kg、6.3 mg / kg、6.4 mg / kg、6.5 mg / kg、6.6 mg / kg、6.7 mg / kg、6.8 mg / kg、6.9 mg / kg、7.0 mg / kg、7.1 mg / kg、7.2 mg / kg、7.3 mg / kg、7.4 mg / kg、7.5 mg / kg、7.6 mg / kg、7.7 mg / kg、7.8 mg / kg、7.9 mg / kg、8.0 mg / kg、8.1 mg / kg、8.2 mg / kg、8.3 mg / kg、8.4 mg / kg、8.5 mg / kg、8.6 mg / kg、8.7 mg / kg、8.8 mg / kg、8.9 mg / kg、9.0 mg / kg、9.1 mg / kg、9.2 mg / kg、9.3 mg / kg、9.4 mg / kg、9.5 mg / kg、9.6 mg / kg、9.7 mg / kg、9.8 mg / kg、9.9 mg / kg、10 mg / kg、10.5 mg / kg、11 mg / kg、11.5 mg / kg、12 mg / kg、12.5 mg / kg、13 mg / kg、13.5 mg / kg、14 mg / kg、14.5 mg / kg、15 mg / kg、15.5 mg / kg、16 mg / kg、16.5 mg / kg、17 mg / kg、17.5 mg / kg、18 mg / kg、18.5 mg / kg、19 mg / kg、19.5 mg / kg、20 mg / kg、20.5 mg / kg、21 mg / kg、21.5 mg / kg、22 mg / kg、22.5 mg / kg、23 mg / kg、23.5 mg / kg、24 mg / kg、24.5 mg / kg、25 mg / kg、25.5 mg / kg、26 mg / kg、26.5 mg / kg、27 mg / kg、27.5 mg / kg、28 mg / kg、28.5 mg / kg、29 mg / kg、29.5 mg / kg、30 mg / kg、31 mg / kg、32 mg / kg、33 mg / kg、34 mg / kg、34 mg / kg、35 mg / kg、36 mg / kg、37 mg / kg、38 mg / kg、39 mg / kg、40 mg / kg、41 mg / kg、42 mg / kg、43 mg / kg、44 mg / kg、45 mg / kg、46 mg / kg、47 mg / kg、48 mg / kg、49 mg / kg、又は約 50 mg / kg の用量で投与することができる。列挙された値に対する中間の値及び範囲も、本発明の一部であるものとする。

【0225】

本発明の特定の実施形態では、例えば、二本鎖 RNAi 剤が、修飾（例えば、3 つの連

10

20

30

40

50

続したヌクレオチドの3つの同一の修飾からなる1つ以上のモチーフであって、作用剤の切断部位又はその近傍にこのような1つのモチーフを含む)、6つのホスホロチオエート結合、及びリガンドを含む場合は、このような作用剤は、 $0.01 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \sim 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \text{ mg/kg} \sim 0.09 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \text{ mg/kg} \sim 0.08 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \text{ mg/kg} \sim 0.07 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \text{ mg/kg} \sim 0.06 \text{ mg/kg}$ 、 $0.01 \text{ mg/kg} \sim 0.05 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \sim 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \text{ mg/kg} \sim 0.09 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \text{ mg/kg} \sim 0.08 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \text{ mg/kg} \sim 0.07 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \text{ mg/kg} \sim 0.06 \text{ mg/kg}$ 、 $0.02 \text{ mg/kg} \sim 0.05 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \sim 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \text{ mg/kg} \sim 0.09 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \text{ mg/kg} \sim 0.08 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \text{ mg/kg} \sim 0.07 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \text{ mg/kg} \sim 0.06 \text{ mg/kg}$ 、 $0.03 \text{ mg/kg} \sim 0.05 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \sim 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \text{ mg/kg} \sim 0.09 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \text{ mg/kg} \sim 0.08 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \text{ mg/kg} \sim 0.07 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \text{ mg/kg} \sim 0.06 \text{ mg/kg}$ 、 $0.04 \text{ mg/kg} \sim 0.05 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 \sim 0.4 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 \sim 0.3 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 \sim 0.2 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 \sim 0.1 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 \text{ mg/kg} \sim 0.09 \text{ mg/kg}$ 、 $0.05 \text{ mg/kg} \sim 0.08 \text{ mg/kg}$ 、又は $0.05 \text{ mg/kg} \sim 0.07 \text{ mg/kg}$ の用量で投与される。前述の列挙された値に対する中間の値及び範囲も、本発明の一部であるものとし、例えば、RNAi剤は、 $0.015 \text{ mg/kg} \sim 0.45 \text{ mg/kg}$ の用量で対象に投与することができる。

【0226】

例えば、RNAi剤、例えば、医薬組成物中のRNAi剤は、 0.01 mg/kg 、 0.0125 mg/kg 、 0.015 mg/kg 、 0.0175 mg/kg 、 0.02 mg/kg 、 0.0225 mg/kg 、 0.025 mg/kg 、 0.0275 mg/kg 、 0.03 mg/kg 、 0.0325 mg/kg 、 0.035 mg/kg 、 0.0375 mg/kg 、 0.04 mg/kg 、 0.0425 mg/kg 、 0.045 mg/kg 、 0.0475 mg/kg 、 0.05 mg/kg 、 0.0525 mg/kg 、 0.055 mg/kg 、 0.0575 mg/kg 、 0.06 mg/kg 、 0.0625 mg/kg 、 0.065 mg/kg 、 0.0675 mg/kg 、 0.07 mg/kg 、 0.0725 mg/kg 、 0.075 mg/kg 、 0.0775 mg/kg 、 0.08 mg/kg 、 0.0825 mg/kg 、 0.085 mg/kg 、 0.0875 mg/kg 、 0.09 mg/kg 、 0.0925 mg/kg 、 0.095 mg/kg 、 0.0975 mg/kg 、 0.1 mg/kg 、 0.125 mg/kg 、 0.15 mg/kg 、 0.175 mg/kg 、 0.2 mg/kg 、 0.225 mg/kg 、 0.25 mg/kg 、 0.275 mg/kg 、 0.3 mg/kg 、 0.325 mg/kg 、 0.35 mg/kg 、 0.375 mg/kg 、 0.4 mg/kg 、 0.425 mg/kg 、 0.45 mg/kg 、 0.475 mg/kg 、又は 0.5 mg/kg の用量で投与することができる。前述の列挙された値に対する中間の値も、本発明の一部であるものとする。

【0227】

処置計画

医薬組成物、例えばsiRNAは、1日に1回投与しても良いし、又はiRNAは、1日の間に適切な間隔で2回又は3回以上の部分用量を投与しても良いし、又は放出制御製剤によって連続注入若しくは連続送達を用いても良い。この場合、各部分用量中に含まれるiRNAは、1日の総用量を達成するために相応に少なくしなければならない。用量単

位は、例えば、数日の期間に亘って *iRNA* の持続放出を提供する従来の持続放出製剤を用いて、数日間に亘る送達のために調合することもできる。持続放出製剤は、当分野で周知であり、且つ特定の部位での作用剤の送達に特に有用であり、例えば、本発明の作用剤と共に使用することができる。この実施形態では、用量単位は、対応する複数の日用量を含む。

【0228】

他の実施形態では、医薬組成物の単回投与は、持続し得るため、次の投与は、3日間以下、4日間以下、若しくは5日間以下の間隔で、又は1週間以下、2週間以下、3週間以下、若しくは4週間以下の間隔で行われる。本発明の一部の実施形態では、本発明の医薬組成物の単回投与は、1週間に1回行われる。本発明の他の実施形態では、本発明の医薬組成物の単回投与は、1カ月おきに行われる。

10

【0229】

いくつかの実施形態では、医薬組成物、例えば *siRNA* の単回用量は、1か月に1回、例えば3ヶ月間にわたって1か月に1回投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物、例えば *siRNA* の単回用量は、例えば少なくとも2四半期、少なくとも3四半期、少なくとも4四半期にわたって四半期ごとに、例えば四半期に1回に投与される。

【0230】

いくつかの実施形態では、*siRNA*、すなわち *ALN-GO1* は、患者の体重 1 kg 当たり少なくとも 2.0 mg 、少なくとも 3.0 mg 、少なくとも 4.0 mg 、又は少なくとも 5.0 mg の *siRNA* の用量で四半期ごとに患者に投与される。

20

【0231】

当業者であれば、限定されるものではないが、疾患又は障害の重症度、以前の処置、対象の全体的な健康及び/又は年齢、及び存在する他の疾患を含む特定の因子が、対象を効果的に処置するために必要な用量及びタイミングに影響を与え得ることが理解されよう。さらに、治療効果のある量の組成物での対象の処置は、1回の処置又は一連の処置を含み得る。本発明に包含される個々の *iRNA* の有効量及び *in vivo* 半減期の推定は、従来の方法論を用いて行うことができる。

【0232】

本発明に包含される個々の *iRNA* の有効量及び *in vivo* 半減期の推定は、適切な動物モデルを用いる *in vivo* 試験に基づいて行うこともできる。例えば、マウス遺伝学の進展により、様々なヒトの疾患、例えば、*HAO1* の発現に関連した障害の研究のために多数のマウスモデルが作製されるようになった。このようなモデルは、*iRNA* の *in vivo* 試験及び治療有効量の決定に使用することができる。適切なマウスモデルは、当分野で公知であり、例えば、本明細書に記載される動物モデルを含む。

30

【0233】

投与方法

本発明の医薬組成物は、局所投与若しくは全身処置が望まれるかどうかによって、及び処置されるべき領域によって様々な方法で投与することができる。投与は、局所（例えば、経皮パッチ）、例えば粉末若しくはエアロゾルの噴霧機によるものを含む吸入又は注入による経肺；気管内、鼻腔内、表皮及び経皮、経口、又は非経口であり得る。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹膜内若しくは筋肉内注射若しくは注入；例えば、植え込み装置による皮下；又は、例えば、実質内、クモ膜下腔内、若しくは脳室内による頭蓋内の投与が含まれる。いくつかの実施形態では、投与方法は皮下である。

40

【0234】

iRNA は、特定の組織、例えば、肝臓を標的とする方式で送達することができる。

【0235】

製剤

本発明の医薬組成物としては、限定されるものではないが、溶液、エマルション、及び製剤を含むリボソームが挙げられる。これらの組成物は、限定されるものではないが、既製の液体、自己乳化型固体、及び自己乳化型半固体を含む様々な成分から調製することが

50

できる。

【0236】

単位剤形で便利に提供することができる本発明の医薬製剤は、医薬産業で周知の従来の技術によって調製することができる。このような技術は、活性成分を医薬担体又は賦形剤に結合させるステップを含む。一般に、製剤は、活性成分を液体担体又は微細化固体担体、又は両方に均一且つ均密に結合させ、そして必要に応じて生成物を成形することによって調製される。

【0237】

本発明の組成物は、様々な可能な剤形、例えば、限定されるものではないが、タブレット、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、座薬、及び浣腸剤のいずれかに製剤することができる。本発明の組成物は、水性、非水性、又は混合媒体中での懸濁液として製剤することもできる。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、及び／又はデキストランを含む、懸濁液の粘度を高める物質をさらに含み得る。懸濁液は、安定剤も含み得る。

【0238】

本発明の組成物は、経口投与用；非経口用、実質内（脳内）用、クモ膜下腔内用、脳室内若しくは肝臓内投与用、及び／又は局所投与用に製剤することができる。

【0239】

経口投与用の組成物及び製剤としては、粉末若しくは顆粒、微粒子、ナノ粒子、水若しくは非水性媒体中の懸濁液若しくは溶液、カプセル、ゲルカプセル、小袋、タブレット、又はミニタブレットが挙げられる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤、又は結合剤が望ましいであろう。一部の実施形態では、経口製剤は、本発明で取り上げられる dsRNA が 1 つ以上の浸透促進界面活性剤及びキレート剤と共に投与される経口製剤である。適切な界面活性剤としては、脂肪酸及び／又はエステル又はその塩、胆汁酸及び／又はその塩が挙げられる。適切な胆汁酸／塩としては、ケノデオキシコール酸（CDCA）及びウルソデオキシケノデオキシコール酸（UDCA）、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸、グリコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロ - 24, 25 - ジヒドロフシジン酸ナトリウム、及びグリコジヒドロフシジン酸ナトリウムが挙げられる。適切な脂肪酸としては、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸塩、トリカプリン酸塩、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル 1 - モノカプリン酸、1 - ドデシルアザシクロヘプタン - 2 - オン、アシルカルニチン、アシルコリン、又はモノグリセリド、ジグリセリド、又はこれらの薬学的に許容される塩（例えば、ナトリウム）が挙げられる。一部の実施形態では、浸透促進剤の組み合わせ、例えば、胆汁酸／塩と組み合わせられた脂肪酸／塩が使用される。例示的な 1 つの組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、及び UDCA のナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤としては、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン - 20 - セチルエーテルが挙げられる。本発明で取り上げられる dsRNA は、噴霧乾燥粒子を含む顆粒形態で、又は微粒子若しくはナノ粒子を形成するために複合体化して、経口送達することができる。dsRNA 複合体形成剤としては、ポリアミノ酸；ポリイミン；ポリアクリレート；ポリアルキルアクリレート；ポリオキセタン（polyoxethane）、ポリアルキルシアノアクリレート；カチオン化ゼラチン、アルブミン、デンプン、アクリレート、ポリエチレングリコール（PEG）、及びデンプン；ポリアルキルシアノアクリレート；DEAE 誘導体化ポリイミン、プルラン、セルロース、及びデンプンが挙げられる。適切な複合体形成剤としては、キトサン、N - トリメチルキトサン、ポリ - L - リジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスペルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレン P（TDAE）、ポリアミノスチレン（例えば、p - アミノ）、ポリ（メチルシアノアクリレート）、ポリ（エチルシアノアクリレート）、ポリ（ブチルシアノアクリレート）、ポリ（イソブチルシアノアクリレート）、ポリ（イソヘキシルシアノアクリ

10

20

30

40

50

レート)、DEAE-メタクリレート、DEAE-ヘキシルアクリレート、DEAE-アクリルアミド、DEAE-アルブミン、及びDEAE-デキストラン、ポリメチルアクリレート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ(D、L-乳酸)、ポリ(DL-乳酸-グリコール酸(PLGA))、アルギン酸塩、及びポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。dsRNAの経口製剤及びその調製は、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,887,906号明細書、米国特許出願公開第20030027780号明細書、及び米国特許第6,747,014号明細書に詳細に記載されている。

【0240】

非経口投与用、実質内(脳内)投与用、クモ膜下腔内投与用、脳室内投与用、又は肝臓内投与用の組成物及び製剤は、緩衝液、希釈剤、及び他の適切な添加剤、例えば、限定されるものではないが、浸透促進剤、担体化合物、及び他の薬学的に許容され得る担体又は賦形剤も含み得る滅菌水溶液を含み得る。

10

【0241】

局所投与用の医薬組成物及び製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、座薬、スプレー、液体、及び粉末を含み得る。従来の医薬担体、水性、粉末、又は油性基剤、及び増粘剤などが、必要又は望ましいであろう。被覆コンドーム及び手袋なども有用であり得る。適切な局所製剤としては、本発明で取り上げられるiRNAが、局所送達剤、例えば、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤、及び界面活性剤と混合されている局所製剤が挙げられる。適切な脂質及びリポソームとしては、中性(例えば、ジオレオイルホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリスティルホスファチジルコリンDMPC、ジステアロリフォスファチジルコリン(distearolyphosphatidyl choline)、陰性(例えば、ジミリスティルホスファチジルグリセロールDMPG)、及び陽イオン性(例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAP及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA)が挙げられる。本発明で取り上げられるiRNAは、リポソーム内に封入しても良いし、又はリポソーム、特に陽イオン性リポソームと複合体を形成しても良い。或いは、iRNAは、脂質、特に陽イオン性脂質と複合体を形成することができる。適切な脂肪酸及びエステルとしては、限定されるものではないが、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸塩、トリカプリン酸塩、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプリン酸、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、又はC₁-20アルキルエステル(例えば、ミリスチン酸イソプロピルIPM)、モノグリセリド、ジグリセリド、又はこれらの薬学的に許容される塩)が挙げられる。局所製剤は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,747,014号明細書に詳細に記載されている。

20

30

【0242】

膜状分子集合体を含むiRNA製剤

本発明の組成物及び方法に使用されるiRNAは、膜状分子集合体、例えば、リポソーム又はミセルで送達するために製剤することができる。本明細書で使用される「リポソーム」という語は、少なくとも1つの二重層、例えば、1つの二重層又は複数の二重層で構成された両親媒性脂質からなる小胞を指す。リポソームは、親油性材料及び水性内部から形成される膜を有する単層小胞及び多層小胞を含む。水性部分は、RNAi組成物を含む。親油性材料は、水性内部を水性外部から隔離し、この水性外部は、典型的にはRNAi組成物を含まないが、一部の例では含むこともある。リポソームは、活性成分の作用部位への移送及び送達に有用である。リポソーム膜は、生体膜に構造的に類似しているため、リポソームが組織に接触すると、リポソーム二重層が、細胞膜の二重層と融合する。リポソームと細胞との一体化が進むと、RNAiを含む内部水性成分が、細胞内に送達され、そこで、RNAiは、標的RNAに特異的に結合して、RNAiを媒介することができる。場合によって、リポソームは、特異的に標的化され、例えば、RNAiを特定の細胞型に誘導する。

40

50

【0243】

RNAi剤を含むリポソームは、様々な方法で調製することができる。一例では、リポソームの脂質成分は、洗剤に溶解され、これにより、ミセルが脂質成分で形成される。例えば、脂質成分は、両親媒性カチオン脂質又は脂質コンジュゲートとすることができる。洗剤は、高い臨界ミセル濃度を有することができ、非イオン性であり得る。例示的な洗剤としては、コール酸塩、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸塩、及びラウロイルサルコシンが挙げられる。次いで、RNAi剤調製物が、脂質成分を含むミセルに添加される。脂質上のカチオン基が、RNAi剤と相互作用して、RNAi剤の周りに凝縮してリポソームを形成する。凝縮後、洗剤が、例えば、透析によって除去され、RNAi剤のリポソーム調製物が得られる。

10

【0244】

必要に応じて、凝縮を補助する担体化合物を、例えば、制御された添加によって、凝縮反応中に添加することができる。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えば、スペルミン又はスペルミジン）とすることができる。pHを、凝縮に適するように調整することもできる。

【0245】

送達ビヒクルの構成成分としてポリヌクレオチド/カチオン脂質複合体を包含する安定なポリヌクレオチド送達ビヒクルを形成するための方法が、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる国際公開第96/37194号パンフレットにさらに記載されている。リポソームの形成は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; 米国特許第4,897,355号明細書; 同第5,171,678号明細書; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; 及びFukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984に記載されている例示的な方法の1つ以上の態様も含み得る。送達ビヒクルとして使用するのに適切なサイズの脂質凝集体を調製するために一般的に使用される技術は、超音波処理及び凍結融解と押し出しを含む（例えば、Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986を参照されたい）。一貫して小さく（50~200nm）比較的均一な凝集体が望ましい場合は、微小流動化を使用することができる（Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984）。このような方法は、RNAi剤調製物をリポソームの中にパッケージングするために容易に適合される。

20

30

【0246】

リポソームは、大きく2つに分類される。陽イオン性リポソームは、負に帯電した核酸分子と相互作用して安定した複合体を形成する正に帯電したリポソームである。正に帯電した核酸/リポソーム複合体は、負に帯電した細胞表面に結合して、エンドソーム内に取り込まれる。エンドソーム内の酸性pHにより、リポソームが破裂して、それらの内容物が細胞質内に放出される（Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985）。

40

【0247】

pH感受性又は負に帯電したリポソームは、核酸と複合体を形成するのではなく核酸を取り込む。核酸及び脂質の両方が同じように帯電しているため、複合体の形成ではなく反発が起こる。とはいえ、一部の核酸が、これらのリポソームの水性内部に取り込まれる。pH感受性リポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードする核酸を培養中の細胞単層に送達するために使用されている。外来遺伝子の発現が標的細胞で検出された（Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992

50

, 19, 269 - 274)。

【0248】

1つの重要な種類のリポソーム組成物は、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性リポソーム組成物は、例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)又はジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、一般に、ジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成され、アニオン性融合性リポソームは、主として、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から形成される。別の種類のリポソーム組成物は、ホスファチジルコリン(PC)、例えば、大豆PC及び卵PCなどから形成される。別の種類は、リン脂質及び/又はホスファチジルコリン及び/又はコレステロールの混合物から形成される。

10

【0249】

リポソームをin vitro及びin vivoで細胞に導入する他の方法の例として、米国特許第5,283,185号明細書；同第5,171,678号明細書；国際公開第94/00569号パンフレット；同第93/24640号パンフレット；同第91/16024号パンフレット；Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994；Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993；Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992；Gershon, Biochem. 32:7143, 1993；及びStrauss EMBO J. 11:417, 1992が挙げられる。

20

【0250】

非イオン性リポソーム系、特に非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系も、薬物の皮膚への送達におけるその有用性を決定するために試験された。Novasome(商標)I(ジラウリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステリルエーテル)及びNovasome(商標)II(ジステアリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステリルエーテル)を含む非イオン性リポソーム製剤を使用して、シクロスポリンAをマウスの皮膚の真皮に送達した。結果は、このような非イオン性リポソーム系が、シクロスポリンAの皮膚の様々な層への堆積の促進に有効であることを示した(Huet al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6)466)。

30

【0251】

リポソームは、「立体的に安定した」リポソームも含み、本明細書で使用されるこの語は、リポソーム内に取り込まれると、特殊な脂質が欠如したりリポソームと比較して循環寿命が長い、1つ以上のこのような特殊な脂質を含むリポソームを指す。立体的に安定したリポソームの例としては、(A)リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、1つ以上の糖脂質、例えば、モノシアロガングリオシドGM₁を含むリポソーム、又は(B)1つ以上の親水性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)部分で誘導体化されるリポソームが挙げられる。いかなる特定の理論に拘束されることを望むものではないが、少なくとも、ガングリオシド、スフィンゴミエリン、又はPEG誘導体化脂質を含む立体的に安定したリポソームでは、これらの立体的に安定したリポソームの循環半減期の改善が、細網内皮系(RES)の細胞内への取り込みの減少によるものであると当分野では考えられている(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42；Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

40

【0252】

1つ以上の糖脂質を含む様々なリポソームは、当分野で公知である。Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)が、モノシアロガングリオシドGM₁、ガラクトセレブロシド硫酸、及びホスファチジルイノシトールのリポソームの血中半減期を改善する能力を報告した。これらの発見は、Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.

50

A. , 1988, 85, 6949) によって詳述された。共に Allen et al. に付与された国際公開第 88/04924 号パンフレット及び米国特許第 4,837,028 号明細書は、(1) スフィンゴミエリン及び(2) ガングリオシド GM₁ 又はガラクトセレブロシド硫酸エステルを含むリポソームを開示している。米国特許第 5,543,152 号明細書 (Webb et al.) は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。1,2-sn-ジミリスチルホスファチジルコリンを含むリポソームが、国際公開第 97/13499 号パンフレット (Lim et al.) に開示されている。

【0253】

一実施形態では、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合できるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、効率的には原形質膜と効率的に融合することができないが、in vivo でマクロファージによって取り込まれるため、RNAi 剤をマクロファージに送達するために使用することができる。

10

【0254】

リポソームのさらなる利点としては：天然リン脂質から得られるリポソームが、生体適合性且つ生体分解性であること；リポソームが、種々の水溶性及び脂溶性薬物を取り込むことができること；リポソームが、内部区画内に取り込まれた RNAi 剤を代謝及び分解から保護できること (Rosoff, in "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger 及び Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245) が挙げられる。リポソーム製剤の調製における重要な考慮すべき事項は、脂質表面の電荷、小胞サイズ、及びリポソームの水中体積である。

20

【0255】

正に帯電した合成カチオン性脂質、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA) を使用して、核酸と自然に相互作用して脂質-核酸複合体を形成する小型リポソームを形成することができ、この脂質-核酸複合体は、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合し、結果として RNAi 剤を送達することができる (例えば、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987、並びに DOTMA 及びその DNA との使用が記載されている米国特許第 4,897,355 号明細書を参照されたい)。

【0256】

DOTMA 類似体、1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニア)プロパン (DOTAP) をリン脂質と組み合わせて使用して、DNA と複合体を形成する小胞を形成することができる。Lipofectin (商標) Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) は、高度にアニオン性の核酸を生きた組織培養細胞に送達するための有効な作用剤であり、この組織培養細胞は、負に帯電したポリヌクレオチドと自然に相互作用して複合体を形成する正に帯電した DOTMA リポソームを含む。十分に正に帯電したリポソームが使用されると、得られる複合体の正味荷電も正である。このように調製される正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自然に付着し、原形質膜に融合し、そして機能性核酸を、例えば、組織培養細胞に有効に送達する。別の市販のカチオン性脂質、1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3,3-(トリメチルアンモニア)プロパン (「DOTAP」) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) は、オレオイル部分が、エーテル結合ではなくエステルによって結合されているという点で DOTMA とは異なる。

30

40

【0257】

他の報告されているカチオン性脂質化合物は、例えば、2種類のうちの1種類の脂質にコンジュゲートして、化合物、例えば、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタレオイルアミド (「DOGS」) (Transfectam (商標)、Promega, Madison, Wisconsin) 及びジバルミトイルホスファチジルエタノールアミン 5-カルボキシスベルミル-アミド (「DPPEs」) を含むカルボキシスベルミンを

50

含め、様々な部分にコンジュゲートしたものを含む（例えば、米国特許第 5, 171, 678 号明細書を参照されたい）。

【0258】

別のカチオン性脂質コンジュゲートは、DOPE と組み合わせてリポソーム内に含まれて製剤されたコレステロール（「DC-Chol」）による脂質の誘導体を含む（Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179: 280, 1991 を参照されたい）。ポリリシンを DOPE にコンジュゲートさせることによって形成されたリポポリリジンは、血清の存在下でのトランスフェクションに有効であることが報告されている（Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065: 8, 1991）。特定の細胞株では、コンジュゲートカチオン性脂質を含むこのようなリポソームは、DOTMA 含有組成物よりも低い毒性を示し、且つより効率的なトランスフェクションを実現されている。他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIE 及び DMRIE-HP（Vical, La Jolla, California）及び Lipofectamine（DOSP A）（Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland）が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に適した他のカチオン性脂質は、国際公開第 98/39359 号明細書及び同第 96/37194 号明細書に記載されている。

10

【0259】

リポソーム製剤は、局所投与に特に適しており、リポソームには、他の製剤よりもいくつかの利点が存在する。このような利点は、投与された薬物の高い全身吸収に関連した副作用の低下、所望の標的における投与された薬物の蓄積の増加、及び RNAi 剤を皮膚に投与する能力が挙げられる。一部の実施では、リポソームは、RNAi 剤を上皮細胞に送達するために、そして RNAi 剤の皮膚組織、例えば、皮膚への浸透を促進するためにも使用される。例えば、リポソームは、局所的に適用することができる。リポソームとして製剤された薬物の皮膚への局所送達の実証されている（例えば、Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 and du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6: 682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56: 267-276, 1987; Nicolaou, C. et al. *Meth. Enz.* 149: 157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101: 512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7851-7855, 1987 を参照されたい）。

20

30

【0260】

非イオン性リポソーム系もまた、特に、非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系において、薬物の皮膚への送達における実用性を決定するために試験された。Novasome I（ジラウリル酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）及び Novasome II（ジステアリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム製剤が、マウスの皮膚の真皮に薬物を送達するために使用された。RNAi 剤を含むこのような製剤は、皮膚障害を治療するのに有用である。

40

【0261】

RNAi を含むリポソームは、高度に変形可能に形成することができる。このような変形性は、リポソームの平均半径よりも小さい孔にリポソームが進入するのを可能にし得る。例えば、トランスファーソームは、変形可能なりポソームの 1 種である。トランスファーソームは、表面縁活性化因子、通常は界面活性剤を標準的なりポソーム組成物に添加することによって作製することができる。RNAi 剤を含むトランスファーソームは、RN

50

A i 剤を皮膚内のケラチノサイトに送達するために、例えば、皮下注射によって送達することができる。無傷の哺乳動物の皮膚を通過するためには、脂質小胞は、適当な経皮勾配の影響下で、直径がそれぞれ50nm未満の一連の微孔を通過して通過しなければならない。加えて、脂質の特性により、このようなトランスファーソームは、自己最適化性（例えば、皮膚の孔の形状に適応すること）、自己修復性であり得ると共に、多くの場合、断片化されずに標的に到達することができ、しばしば自己負荷性（self-loading）であり得る。

【0262】

本発明に適用可能な他の製剤は、2008年1月2日出願の米国仮特許出願第61/018,616号明細書；2008年1月2日出願の同第61/018,611号明細書；2008年3月26日出願の同第61/039,748号明細書；2008年4月22日出願の同第61/047,087号明細書；及び2008年5月8日出願の同第61/051,528号明細書に記載されている。2007年10月3日出願の国際出願PCT/US2007/080331号パンフレットにも、本発明に適用可能な製剤が記載されている。

10

【0263】

トランスフェロソームは、さらに別のタイプのリポソームであり、且つ薬物送達ビヒクルの魅力的な候補である高度に変形可能な脂質凝集体である。トランスフェロソームは、脂質小滴よりも小さい孔を容易に貫通できるほど高度に変形可能である液体小滴として説明することができる。トランスフェロソームは、トランスフェロソームが使用される環境、例えば、トランスフェロソームが自己最適化する（皮膚の孔の形状に適合する）、自己修復する、断片化することなく頻繁に標的に到達する、及び多くの場合自己付加する環境に適応可能である。トランスフェロソームを形成するために、表面縁-活性化剤、通常は界面活性剤を標準的なリポソーム組成物に付加することが可能である。トランスフェロソームは、血清アルブミンを皮膚に送達するために使用されている。血清アルブミンのトランスフェロソーム媒介送達は、血清アルブミンを含む溶液の皮下注射として有効であることが示されている。

20

【0264】

界面活性剤は、製剤、例えば、エマルション（マイクロエマルションを含む）及びリポソームにおいて広範な適用例が見出される。天然及び合成の両方の多数の異なるタイプの界面活性剤の特性の分類及び等級付けの最も一般的な方法は、親水性/親油性バランス（HLB）の使用によるものである。親水性基（「頭部」としても知られている）の性質は、製剤に使用される異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手段を提供する（Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285）。

30

【0265】

界面活性剤分子がイオン化されない場合、この界面活性剤分子は、非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、薬学的製品及び化粧製品において幅広い用途が見出されており、広範囲のpH値に対して使用可能である。一般に、これらのHLB値は、その構造によって2～約18の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、非イオン性エステル、例えば、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、及びエトキシ化エステルが挙げられる。非イオン性アルカノールアミド及びエーテル、例えば、脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、及びエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーもこのクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤クラスのうち最も一般的なメンバーである。

40

【0266】

界面活性剤分子が、水に溶解又は分散されたときに負の電荷を有する場合、この界面活性剤分子は、アニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤としては、カルボン酸塩、例えば、石鹸、アシル乳酸塩、アミノ酸のアシルアミド、硫酸のエステル、例えば、

50

硫酸アルキル及び硫酸エトキシ化アルキル、スルホン酸塩、例えば、アルキルベンゼンスルホン酸塩、アシルイセチオン酸塩、アシルタウレート、及びスルホコハク酸塩、並びにリン酸塩が挙げられる。アニオン性界面活性剤クラスのうち最も重要なメンバーは、硫酸アルキル及び石鹸である。

【0267】

界面活性剤分子が、水に溶解又は分散されたときに正の電荷を有する場合、この界面活性剤分子は、カチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤としては、四級アンモニウム塩及びエトキシ化アミンが挙げられる。四級アンモニウム塩は、このクラスのうちで最も使用されるメンバーである。

【0268】

界面活性剤分子が、正又は負のいずれの電荷も有する場合、この界面活性剤分子は、両性として分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N - アルキルピタイン、及びホスファチドが挙げられる。

【0269】

薬物製品、製剤、及びエマルションにおける界面活性剤の使用が概説されている (Rieger, in "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

【0270】

本明細書で使用されるRNAiは、ミセル製剤としても提供することができる。「ミセル」は、本明細書では、特定の種類の分子集合体として定義され、この分子集合体では、両親媒性分子の全ての疎水性部分が内側を向き、親水性部分が周囲の水相に接触するように両親媒性分子が球体構造に構成されている。環境が疎水性である場合は、反対の構成で存在する。

【0271】

経皮膜を通る送達に適した混合ミセル製剤は、siRNA組成物の水溶液とアルカリ金属C₈~C₂₂アルキル硫酸塩とミセル形成化合物との混合によって調製することができる。例示的なミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容され得る塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレエート、モノラウレート、ルリヂサ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシン及びその薬学的に許容され得る塩、グリセリン、ポリグリセリン、リジン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテル及びその類似体、ポリドカノールアルキルエーテル及びその類似体、ケノデオキシコール酸塩、デオキシコール酸塩、及びこれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属アルキル硫酸塩と同時に又は添加後に、添加することができる。混合ミセルは、実質的にあらゆる種類の成分の混合で形成されるが、より小さいサイズのミセルを提供するためには激しい混合が行われる。

【0272】

一方法では、siRNA組成物及び少なくともアルカリ金属アルキル硫酸塩を含有する第1のミセル組成物が調製される。次いで、第1のミセル組成物が、少なくとも3種類のミセル形成化合物と混合されて混合ミセル組成物が形成される。別の方法では、ミセル組成物は、siRNA組成物とアルカリ金属アルキル硫酸塩と少なくとも1種類のミセル形成化合物と混合され、次いで、残りのミセル形成化合物を添加して激しく混合することによって調製される。

【0273】

フェノール及びノ又はm - クレゾールを混合ミセル組成物に添加して、製剤を安定させて、細菌の増殖から保護することができる。或いは、フェノール及びノ又はm - クレゾールは、ミセル形成成分と共に添加しても良い。等張剤、例えば、グリセリンを、混合ミセル組成物の形成後に添加しても良い。

【0274】

ミセル製剤を噴霧として送達するために、製剤をエアロゾルディスペンサーに入れるこ

10

20

30

40

50

とができ、このディスペンサーに噴霧剤を充填する。加圧下の噴霧剤は、ディスペンサー内で液体の形態である。水相と噴霧剤相とが1つになる、即ち、1つの相のみが存在するように、成分比が調整される。2つの相が存在する場合、内容物の一部を、例えば、計量弁によってディスペンスする前にディスペンサーを振盪する必要がある。医薬品のディスペンス量が、計量弁から微細な霧状で噴霧される。

【0275】

噴霧剤としては、水素含有クロロフルオロカーボン、水素含有フルオロカーボン、ジメチルエーテル、及びジエチルエーテルを挙げることができる。特定の実施形態では、HFA 134a (1, 1, 1, 2テトラフルオロエタン)を使用しても良い。

【0276】

必須成分の特定濃度を、比較的簡単な実験によって決定することができる。口腔からの吸収では、多くの場合、注射による投与又は胃腸管を介した投与の投与量を、例えば、少なくとも2倍又は3倍に増量するのが望ましい。

【0277】

脂質粒子

本発明のiRNA、例えば、dsRNAは、脂質製剤、例えば、LNP又は他の核酸-脂質粒子内に完全に封入することができる。

【0278】

本明細書で使用される「LNP」という語は、安定した核酸-脂質粒子を指す。LNPは、陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、及び粒子の凝集を防止する脂質(例えば、PEG-脂質コンジュゲート)を含む。LNPは、静脈内(i.v.)注射後に長い循環寿命を示し、且つ遠位部位(例えば、投与部位から物理的に離れた部位)に蓄積するため、全身適用例に非常に有用である。LNPは、PCT国際公開特許第00/03683号パンフレットに記載されている、封入された縮合剤-核酸複合体を含む「pSPLP」を含む。本発明の粒子は、典型的には約50nm~約150nm、より典型的には約60nm~約130nm、より典型的には約70nm~約110nm、最も典型的には約70nm~約90nmの平均直径を有し、実質的に非毒性である。加えて、本発明の核酸-脂質粒子中に存在するときの核酸は、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に対して耐性がある。核酸-脂質粒子及びその調製方法は、例えば、米国特許第5,976,567号明細書;同第5,981,501号明細書;同第6,534,484号明細書;同第6,586,410号明細書;同第6,815,432号明細書;米国特許出願公開第2010/0324120号明細書、及びPCT国際公開特許第96/40964号パンフレットに開示されている。

【0279】

一実施形態では、脂質と薬物の比(質量/質量比(例えば、脂質とdsRNAの比))は、約1:1~約50:1、約1:1~約25:1、約3:1~約15:1、約4:1~約10:1、約5:1~約9:1、又は約6:1~約9:1の範囲である。上記の列挙された範囲に対する中間の範囲も、本発明の一部であると考えられる。

【0280】

陽イオン性脂質は、例えば、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロライド(DODAC)、N,N-ジステアシル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド(DDAB)、N-(I-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド(DOTAP)、N-(I-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド(DOTMA)、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ)プロピルアミン(DODMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLenDMA)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン(DLin-DAC)、1,2-ジリノレイオキシ-3-モルホリノプロパン(DLin-MA)、1,2

10

20

30

40

50

- ジリノレオイル - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLinDAP)、1, 2 - ジリノレイルチオ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin-S-DMA)、1 - リノレオイル - 2 - リノレイルオキシ - 3 - ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMAP)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - トリメチルアミノプロパンクロライド塩 (DLin-TMA.Cl)、1, 2 - ジリノレオイル - 3 - トリメチルアミノプロパンクロライド塩 (DLin-TAP.Cl)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (N - メチルピペラジノ) プロパン (DLin-MPZ)、又は 3 - (N, N - ジリノレイルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオール (DLinAP)、3 - (N, N - ジオレイルアミノ) - 1, 2 - プロパンジオール (DOAP)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - 3 - (2 - N, N - ジメチルアミノ) エトキシプロパン (DLin-EG-DMA)、1, 2 - ジリノレニルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノメチル - [1, 3] - ジオキソラン (DLin-K-DMA) 又はその類似体、(3aR, 5s, 6aS) - N, N - ジメチル 1 - 2, 2 - ジ (9Z, 12Z) - オクタデカ - 9, 12 - ジエニル) テトラヒドロ - 3aH - シクロペンタ [d] [1, 3] ジオキソール - 5 - アミン (ALN100)、(6Z, 9Z, 28Z, 31Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (MC3) 1, 1' - (2 - (4 - (2 - (2 - (ビス (2 - ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) (2 - ヒドロキシドデシル) アミノ) エチル) ピペラジン - 1 - イル) エチルアザンジイル) ジドデカン - 2 - オール (Tech G1)、又はこれらの混合物であり得る。陽イオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約 20 mol % ~ 約 50 mol %、又は約 40 mol % を含む得る。

【0281】

別の実施形態では、化合物 2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソランを使用して、脂質 - siRNA ナノ粒子を調製することができる。2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソランの合成は、参照により本明細書に組み入れられる、国際公開第 2010/048536 号パンフレットとして公開された国際出願 PCT/US2009/061897 号明細書に記載されている。

【0282】

一実施形態では、脂質 - siRNA 粒子は、40 % 2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソラン：10 % DSPC：40 % コレステロール：10 % PEG-C-DOMG (モルパーセント) を含み、粒径が 63.0 ± 2.0 nm であり、0.027 の siRNA / 脂質である。

【0283】

イオン化 / 非陽イオン性脂質は、限定されるものではないが、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPPE)、ジステアロイル - ホスファチジル - エタノールアミン (DSPE)、16 - O - モノメチル PE、16 - O - ジメチル PE、18 - 1 - トランス PE、1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (SOPE)、コレステロール、又はこれらの混合物を含む陰イオン性脂質又は中性脂肪であり得る。非陽イオン性脂質は、コレステロールが含まれている場合、粒子中に存在する総脂質の約 5 mol % ~ 約 90 mol %、約 10 mol %、又は約 58 mol % であり得る。

【0284】

10

20

30

40

50

粒子の凝集を阻害するコンジュゲート脂質は、例えば、限定されるものではないが、PEG - ジアシルグリセロール (DAG)、PEG - ジアルキルオキシプロピル (DAA)、PEG - リン脂質、PEG - セラミド (Cer)、又はこれらの混合物を含むポリエチレングリコール (PEG) - 脂質であり得る。PEG - DAAコンジュゲートは、例えば、PEG - ジラウリルオキシプロピル (Ci₂)、PEG - ジミリスチルオキシプロピル (Ci₄)、PEG - ジパルミチルオキシプロピル (Ci₆)、又はPEG - ジステアリルオキシプロピル (C₁₈) であり得る。粒子の凝集を防止するコンジュゲート脂質は、粒子中に存在する総脂質の0 mol % ~ 約20 mol %、又は約2 mol %であり得る。

【0285】

一部の実施形態では、核酸 - 脂質粒子は、例えば、粒子中に存在する総脂質の約10 mol % ~ 約60 mol %、又は約48 mol %のコレステロールをさらに含む。

10

【0286】

一実施形態では、リピドイドND98・4HCl (MW 1487) (参照により本明細書に組み入れられる、2008年3月26日出願の米国特許出願第12/056,230号明細書を参照されたい)、コレステロール (Sigma - Aldrich)、及びPEG - セラミドC16 (Avanti Polar Lipids) を使用して、脂質 - dsRNAナノ粒子 (即ち、LNP01粒子) を調製することができる。それぞれエタノール中、ストック溶液を次のように調製することができる: ND98、133 mg/ml; コレステロール、25 mg/ml、PEG - セラミドC16、100 mg/ml。次いで、ND98、コレステロール、及びPEG - セラミドC16ストック溶液を、例えば、42:48:10のモル比で混合することができる。混合脂質溶液を、最終エタノール濃度が約35~45%、且つ最終酢酸ナトリウム濃度が約100~300 mMとなるように (例えば、pH5の酢酸ナトリウム中で) 水性dsRNAと混合することができる。脂質 - dsRNAナノ粒子は、典型的には混合時に自然に生じる。所望の粒径分布によって、得られるナノ粒子混合物を、サーモバレル押出し機 (thermobarrel extruder)、例えば、Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc) を用いてポリカーボネート膜 (例えば、100 nmのカットオフ) を通して押し出すことができる。場合によっては、押出しステップを省略することができる。エタノール除去及び同時の緩衝液交換は、例えば、透析又は接線流濾過によって達成することができる。緩衝液は、例えば、約pH7、例えば、約pH6.9、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、又は約pH7.4のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と交換することができる。LNP01製剤は、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、国際公開第2008/042973号パンフレットに記載されている。

20

30

【0287】

さらなる例示的な脂質 - dsRNA製剤が表Aに示されている。

【0288】

40

50

【表 1】

表 A. 例示的な脂質 dsRNA 製剤

	イオン化/陽イオン性脂質	陽イオン性脂質/非陽イオン性脂質/ コレステロール/PEG-脂質コンジュゲート 脂質:siRNA 比
LNP_DLinDMA	1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質:siRNA 約 7:1
2-XTC	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質:siRNA 約 7:1
LNP05	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約 6:1
LNP06	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約 11:1
LNP07	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約 6:1
LNP08	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約 11:1
LNP09	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル) テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン (ALN100)	ALN100/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)プタノエート (MC3)	MC-3/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチルアザンジイル)ジドデカン-2-オール(C12-200>	Tech G1/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1

【 0 2 8 9 】

10

20

30

40

50

【表 2】

LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 33:1	10
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質:siRNA: 11:1	
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG- DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質:siRNA: 11:1	
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1	
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1	
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 12:1	20
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂質:siRNA: 8:1	
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1	
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1	30
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1	

【0290】

表Aの省略形は以下を含む：DSPC：ジステアロイルホスファチジルコリン；DPPC：ジパルミトイルホスファチジルコリン；PEG-DMG：PEG-ジジミリストイルグリセロール（C14-PEG、又はPEG-C14）（平均2000分子量のPEG）；PEG-DSG：PEG-ジスチリルグリセロール（C18-PEG、又はPEG-C18）（平均2000分子量のPEG）；PEG-cDMA：PEG-カルバモイル-1,2-ジミリスチルオキシプロピルアミン（平均2000分子量のPEG）。

【0291】

製剤を含むDLinDMA（1,2-ジリノレニルオキシ-N、N-ジメチルアミノプロパン）は、参照により本明細書に組み入れられる、2009年4月15日出願の国際公開第2009/127060号パンフレットに記載されている。

【0292】

製剤を含むXTCは、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、2009年1月29日出願の米国仮特許出願第61/148,366号明細書、2009年3月2日出願の同第61/156,851号明細書、2009年6月10日出願の米国仮特許出願、2009年7月24日出願の同第61/228,373号明細書、2009年9月3日出願の同第61/239,686号明細書、2010年1月29日出願の国際出願PCT/US2010/022614号明細書に記載されている。

【0293】

製剤を含むMC3は、例えば、参照によりその全開示内容が本明細書に組み入れられる、2010年6月10日出願の米国特許出願公開第2010/0324120号明細書に記載されている。

【0294】

製剤を含むALNY-100は、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、2009年11月10日出願の国際出願PCT/US09/63933号明細書に記載されている。

【0295】

製剤を含むC12-200は、参照により本明細書に組み入れられる、2009年5月5日出願の米国仮特許出願第61/175,770号明細書及び2010年5月5日出願の国際出願PCT/US10/33777号明細書に記載されている。

【0296】

さらなる製剤

i. エマルション

本発明の組成物は、エマルションとして調製し、製剤することができる。エマルションは、典型的には、一方の液体が、通常は直径が $0.1\mu\text{m}$ を超える小滴の形態で他方の液体に分散された不均一系である（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301を参照されたい）。エマルションは、均密に混合されて互いに分散された2つの不混和液体相を含む二相系の場合が多い。一般に、エマルションは、油中水(w/o)型又は水中油(o/w)型であり得る。水相が微細化されて、微小滴として大量の油相に分散される場合は、得られる組成物は、油中水(w/o)型エマルションと呼ばれる。或いは、油相が微細化されて、大量の水相に微小滴として分散される場合は、得られる組成物は、水中油型(o/w)エマルションと呼ばれる。エマルションは、分散相に加えてさらなる成分、及び活性剤を含み得、この活性剤は、水相、油相中に溶液として、又はそれ自体が別個の相として存在し得る。医薬賦形剤、例えば、乳化剤、安定剤、染料、及び酸化防止剤が、必要に応じてエマルション中に存在しても良い。医薬エマルションは、例えば、油中水中油(o/w/o)型及び水中油中水(w/o/w)型エマルションなどの場合に、3つ以上の相から構成される多重エマルションでもあり得る。このような複合体製剤は、単純な二相エマルションにはない特定の利点を提供する場合が多い。o/wエマルションの個々の油滴が小さい水滴を包囲する多重エマルションは、w/o/wエマルションを構成する。同様に、油性連続相で安定化された水の小球に包囲された油滴の系は、o/w/oエマルションとなる。

【0297】

エマルションは、熱力学的安定性が殆ど又は全くないことによって特徴付けられる。多くの場合、エマルションの分散又は不連続相は、外部又は連続相の中で十分に分散され、

10

20

30

40

50

乳化剤又は製剤の粘度によってこの形態に維持される。エマルションのいずれかの相は、エマルション型軟膏基剤及びクリームの場合のように半固体又は固体であり得る。エマルションを安定化させる他の手段は、エマルションのいずれかの相に含めることができる乳化剤の使用を伴う。乳化剤は、大きく4つの種類に分類することができる：合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収性基剤、及び微細分散固体（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照されたい）。

10

【0298】

表面活性剤としても知られている合成界面活性剤は、エマルションの製剤において広範な適用例が見出され、文献で考察されている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199を参照されたい）。界面活性剤は、典型的には両親媒性であり、且つ親水性タンパク質及び疎水性タンパク質を含む。界面活性剤の親水性の疎水性に対する比率は、親水性／親油性バランス（HLB）と呼ばれ、製剤の調製における界面活性剤の分類及び選択において有益な手段である。界面活性剤は、親水性基の性質：非イオン性、陰イオン性、陽イオン性、及び両性に基づいて異なるクラスに分類することができる（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Form s and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285を参照されたい）。

20

30

【0299】

エマルション製剤に使用される天然に存在する乳化剤としては、ラノリン、蜜蝋、ホスファチド、レシチン、及びアカシアが挙げられる。吸収性基剤、例えば、脱水ラノリン及び親水性ワセリンは、親水性を有するため、水を吸収してw/oエマルションを形成し、なお半固体の硬度を維持することができる。微細化された固体は、特に界面活性剤と組み合わせ、粘稠製剤において良好な乳化剤としても使用されている。これらの例としては、極性無機固体、例えば、重金属水酸化物、非膨張性粘土、例えば、ベントナイト、アタパルサイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウム及びコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウム、顔料、及び非極性固体、例えば、炭素又はグリセリルトリスチアレートが挙げられる。

40

【0300】

多種多様な非乳化材料も、エマルション製剤に含められ、エマルションの特性に寄与している。これらの例としては、脂肪、油、蠟、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、

50

湿潤剤、親水性コロイド、防腐剤、及び酸化防止剤が挙げられる (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0301】

親水性コロイド又は親水コロイドとしては、天然に存在するゴム及び合成ポリマー、例えば、多糖（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲナン、グアーガム、カラヤガム、及びトラガカント）、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロース及びカルボキシプロピルセルロース）、及び合成ポリマー（例えば、カルボマー、セルロースエーテル、及びカルボキシビニルポリマー）が挙げられる。これらは、水中で分散又は膨張して、分散相の小滴の周りに強い界面膜を形成して、外部相の粘度を高めることによってエマルジョンを安定させるコロイド溶液を形成する。

10

【0302】

エマルジョンは、多くの場合、微生物の成長を容易に支え得る多数の成分、例えば、炭水化物、タンパク質、ステロール、及びホスファチドを含むため、これらの製剤は、防腐剤を含む場合が多い。エマルジョン製剤に含められる、一般的に使用される防腐剤としては、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、及びホウ酸が挙げられる。酸化防止剤も、製剤の劣化を防止するためにエマルジョン製剤に一般的に添加される。使用される酸化防止剤は、フリーラジカルスカベンジャー、例えば、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、又は還元剤、例えば、アスコルビン酸及びメタ亜硫酸ナトリウム、及び抗酸化相乗剤、例えば、クエン酸、酒石酸、及びレシチンであり得る。

20

【0303】

皮膚、経口、及び非経口経路によるエマルジョン製剤の適用、並びにそれらの製造の方法が、文献で考察されている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照されたい）。経口送達用のエマルジョン製剤は、製剤の容易さ並びに吸収及びバイオアベイラビリティの観点からの有効性のために、非常に広範に使用されている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照されたい）。ミネラルオイルベースの下剤、油性ピタミン、及び高脂肪栄養剤は、特に、o/wエマルジョンとして一般的に経口投与されている材料である。

30

40

【0304】

50

i i . マイクロエマルジョン

本発明の一実施形態では、i RNA 及び核酸の組成物は、マイクロエマルジョンとして製剤される。マイクロエマルジョンは、単一光学的等方性及び熱力学的に安定な溶液である水、油、及び両親媒性物質の系として定義することができる（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245 を参照されたい）。典型的には、マイクロエマルジョンは、まず水性界面活性剤溶液中に油を分散させ、次いで十分な量の第4の成分、一般的には中間鎖長アルコールを添加して透明な系を形成することによって調製される系である。従って、マイクロエマルジョンは、表面活性分子の界面膜によって安定化される2つの不混和液体の熱力学的に安定した等方的に透明な分散液であるとしても説明されている（Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185 - 215）。マイクロエマルジョンは、3～5の成分の組み合わせによって一般的に調製され、これらの成分としては、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤、及び電解質が挙げられる。マイクロエマルジョンが油中水（w/o）型であるか又は水中油（o/w）型であるかは、使用される油及び界面活性剤の特性並びに界面活性剤分子の極性頭部及び炭化水素尾部の構造及び幾何学的パッキングによって決まる（Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271）。

【0305】

相図を利用した現象論的アプローチは、広範に研究されており、どのようにマイクロエマルジョンを製剤するかという包括的な知識を当業者に与えた（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335 を参照されたい）。従来のエマルジョンと比較すると、マイクロエマルジョンは、自発的に形成される、熱力学的に安定な小滴の製剤中に水不溶性薬物を溶解するという利点を提供する。

【0306】

マイクロエマルジョンの調製に使用される界面活性剤としては、限定されるものではないが、単独又は補助界面活性剤と組み合わせられる、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、脂肪酸ポリグリセロールエステル、モノラウリン酸テトラグリセロール（ML310）、モノオレイン酸テトラグリセロール（MO310）、モノオレイン酸ヘキサグリセロール（PO310）、ペンタオレイン酸ヘキサグリセロール（PO500）、モノカプリン酸デカグリセロール（MCA750）、モノオレイン酸デカグリセロール（MO750）、セスキオレイン酸デカグリセロール（SO750）、デカオレイン酸デカグリセロール（DAO750）が挙

げられる。補助界面活性剤、通常は、短鎖アルコール、例えば、エタノール、1-プロパノール、及び1-ブタノールは、界面活性剤分子間に形成された間隙空間により、界面活性剤膜に浸透し、結果として不規則な膜を形成することによって界面の流動性を高めるように作用する。しかしながら、マイクロエマルションは、補助界面活性剤を使用せずに調製することができ、アルコールフリーの自己乳化マイクロエマルション系は、当分野で公知である。水相は、典型的には、限定されるものではないが、水、薬物の水溶液、グリセロール、PEG 300、PEG 400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、及びエチレングリコールの誘導体であり得る。油相は、限定されるものではないが、材料、例えば、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖(C8~C12)モノグリセリド、ジグリセリド、及びトリグリセリド、ポリオキシエチレン化脂肪酸グリセリルエステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化グリセリド、飽和ポリグリコール化C8~C10グリセリド、植物油、及びシリコン油を含み得る。

【0307】

マイクロエマルションは、薬物可溶化及び薬物吸収の増大の観点から特に重要である。脂質ベースのマイクロエマルション(o/w及びw/oの両方)は、ペプチドを含む、薬物の経口バイオアベイラビリティを高めるために提案されている(例えば、米国特許第6,191,105号明細書;同第7,063,860号明細書;同第7,070,802号明細書;同第7,157,099号明細書;Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390;Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205を参照されたい)。マイクロエマルションは、改善された薬物可溶化、酵素的加水分解による薬物の保護、界面活性剤による膜流動性及び透過性の変化に起因する薬物吸収の促進の可能性、調製の容易さ、固形用量形態よりも容易な経口投与、改善された臨床の有効性、及び毒性の低減(例えば、米国特許第6,191,105号明細書;同第7,063,860号明細書;同第7,070,802号明細書;同第7,157,099号明細書;Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385;Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143を参照されたい)の利点を提供する。多くの場合、マイクロエマルションは、それらの成分が周囲温度で混合されたときに自然に形成され得る。これは、熱不安定性の薬物、ペプチド、又はiRNAを製剤する際に特に有利であり得る。マイクロエマルションはまた、化粧品及び医薬の適用例の双方において活性成分の経皮送達に有効である。本発明のマイクロエマルション組成物及び製剤は、胃腸管からのiRNA及び核酸の全身吸収の増大を促進すると共に、iRNA及び核酸の局所細胞の取り込みを改善することが期待されている。

【0308】

本発明のマイクロエマルションはまた、製剤の特性を改善して本発明のiRNA及び核酸の吸収を増大するために、添加成分及び添加剤、例えば、ソルビタンモノステアレート(Grill 3)、ラブラゾール、及び浸透促進剤も含み得る。本発明のマイクロエマルションで使用される浸透促進剤は、5つの広い分類-界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、及び非キレート非界面活性剤の1つに属するとして分類することができる(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。これらクラスのそれぞれは上述されている。

【0309】

iii. 微粒子

本発明のRNA i剤は、粒子、例えば、微粒子内に含めることができる。微粒子は、噴霧乾燥によって形成することができるが、凍結乾燥、蒸発、流動床乾燥、真空乾燥、又はこれらの技術の組み合わせを含む他の方法によって形成することもできる。

【0310】

i v . 浸透促進剤

一実施形態では、本発明は、核酸、特に iRNA の動物の皮膚への効率的な送達を行うために様々な浸透促進剤を利用する。殆どの薬物は、イオン化形態及び非イオン化形態の両方で溶液中に存在する。しかしながら、通常は、脂溶性薬物又は親油性薬物のみが、細胞膜を容易に通過する。非親油性薬物でも、通過されるべき細胞膜が浸透促進剤で処置されると、細胞膜を通過できることが見出された。非親油性薬物の細胞膜を通過する拡散の手助けに加えて、浸透促進剤は、親油性薬物の透過性も促進する。

【0311】

浸透促進剤は、5つの広い分類、即ち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、及び非キレート非界面活性剤の1つに属するとして分類することができる(例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92を参照されたい)。浸透促進剤の上述のクラスのそれぞれは、以下に詳細に説明される。

【0312】

界面活性剤(又は「表面活性剤」)は、水溶液に溶解されると、この水溶液の表面張力又はこの水溶液と別の液体との間の界面張力を減少させ、その結果、粘膜を通る iRNA の吸収を促進する化学物質である。胆汁酸塩及び脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、及びポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる(例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92): 及び perfluorochemical emulsions, such as FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252を参照されたい)。

【0313】

浸透促進剤として作用する様々な脂肪酸及びそれらの誘導体としては、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸(n-デカン酸)、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸塩、トリカプリン酸、塩モノオレイン(1-モノオレイル-rac-グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらのC₁₋₂₀アルキルエステル(例えば、メチル、イソプロピル、及びt-ブチル)、並びにそれらのモノ及びジグリセリド(例えば、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、カプリン酸塩、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、リノール酸塩など)が挙げられる(例えば、Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654を参照されたい)。

【0314】

胆汁の生理学的役割としては、脂質及び脂溶性ビタミンの分散及び吸収の促進が挙げられる(例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman

10

20

30

40

50

n & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934 - 935を参照されたい)。様々な天然の胆汁塩及びその合成の誘導体は、浸透促進剤として作用する。従って、「胆汁塩」という語は、自然に存在する胆汁の任意の成分、及びそれらの任意の合成誘導体を含む。適切な胆汁塩としては、例えば、コール酸（又はその薬学的に許容され得るナトリウム塩、コール酸ナトリウム）、デヒドロコール酸（デヒドロコール酸ナトリウム）、デオキシコール酸（デオキシコール酸ナトリウム）、グルコール酸（グルコール酸ナトリウム）、グリコール酸（グリコール酸ナトリウム）、グリコデオキシコール酸（グリコデオキシコール酸ナトリウム）、タウロコール酸（タウロコール酸ナトリウム）、タウロデオキシコール酸（タウロデオキシコール酸ナトリウム）、ケノデオキシコール酸（ケノデオキシコール酸ナトリウム）、ウルソデオキシコール酸（UDCA）、タウロ - 24, 25 - ジヒドロ - フシジン酸ナトリウム（STDHF）、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、及びポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル（POE）が挙げられる（例えば、Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782 - 783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 - 33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579 - 583を参照されたい）。

【0315】

本発明に関連して使用されるキレート剤は、金属イオンと錯体を形成することによって溶液から金属イオンを除去し、結果として粘膜を介したiRNAの吸収を促進する化合物として定義することができる。本発明における浸透促進剤としてのキレート剤の使用に関して、キレート剤は、最も特徴付けられたDNAヌクレアーゼが、触媒のための二価の金属イオンを必要とし、従って、キレート剤によって阻害されるため、DNase阻害剤としても作用するというさらなる利点を有する（Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315 - 339）。適切なキレート剤としては、限定されるものではないが、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）二ナトリウム、クエン酸、サリチル酸塩（例えば、サリチル酸ナトリウム、5 - メトキシサリチル酸、及びホモバニリン酸塩）、コラーゲンのN - アシル誘導体、ラウレス - 9、及び - ジケトンのN - アミノアシル誘導体（エナミン）が挙げられる（例えば、Katdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 - 33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43 - 51を参照されたい）。

【0316】

本明細書中で使用される非キレート性非界面活性剤浸透促進化合物は、キレート剤又は界面活性剤として僅かな活性しか示さないが、それでも消化器粘膜を通るiRNAの吸収を促進する化合物として定義することができる（例えば、Muranishi, Crit

ical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33を参照されたい)。このクラスの浸透促進剤としては、例えば、不飽和環式尿素、1-アルキル-アルカノン誘導体及び1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体 (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); 並びに非ステロイド抗炎症剤、例えば、ジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、及びフェニルブタゾンが挙げられる (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)。

【0317】

細胞レベルでiRNAの取り込みを促進する作用剤も、本発明の医薬組成物及び他の組成物に添加することができる。例えば、陽イオン性脂質、例えば、リポフェクチン (Junichiらによる米国特許第5,705,188号明細書)、陽イオン性グリセロール誘導体、及びポリカチオン性分子、例えば、ポリリジン (LolloらによるPCT国際特許WO97/30731)も、dsRNAの細胞取り込みを促進することが知られている。市販のトランスフェクション試薬の例としては、例えば、特に、Lipofectamine (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000 (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、293fectin (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Cellfectin (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、DMR1E-C (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、FreeStyle (商標) MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine (商標) 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Oligofectamine (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、Optifect (商標) (Invitrogen; Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2トランスフェクション試薬 (Roche; Grenzachstrasse, Switzerland)、DOTAPリボソームトランスフェクション試薬 (Grenzacherstrasse, Switzerland)、DOSPERリボソームトランスフェクション試薬 (Grenzacherstrasse, Switzerland)、又はFugene (Grenzacherstrasse, Switzerland)、Transfectam (登録商標) 試薬 (Promega; Madison, WI)、TransFast (商標) トランスフェクション試薬 (Promega; Madison, WI)、Tfx (商標) - 20 試薬 (Promega; Madison, WI)、Tfx (商標) - 50 試薬 (Promega; Madison, WI)、DreamFect (商標) (OZ Biosciences; Marseille, France)、EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France)、TransPass^a D1トランスフェクション試薬 (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA)、LyoVec (商標) / LipoGen (商標) (Invitrogen; San Diego, CA, USA)、PerFectinトランスフェクション試薬 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、NeuroPORTERトランスフェクション試薬 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTERトランスフェクション試薬 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER 2トランスフェクション試薬 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、Cytfectinトランスフェクション試薬 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、BaculoPORTERトランスフェクション試薬 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、TrojanPORTER (商標) トランスフェクション試薬 (Genlantis; San Diego, CA, USA)、RiboFect (Bioline; Taunton, M

10

20

30

40

50

A, USA)、PlasFect (Bioline; Taunton, MA, USA)、UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、又はHiFect (商標) (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA) が挙げられる。

【0318】

グリコール、例えば、エチレングリコール及びプロピレングリコール、ピロール、例えば、2-ピロール、アゾン、並びにテルペン、例えば、リモネン及びメントンを含む他の試薬を、投与される核酸の浸透を促進するために利用することができる。

10

【0319】

v. 担体

本発明の特定の組成物は、製剤中に担体化合物も含む。本明細書中で使用される担体化合物又は「担体」は、核酸又はそれらの類似体を指すことがあり、これらは、不活性である（即ち、それ自体生物活性を有していない）が、例えば、生物学的に活性な核酸の分解又は循環からのその除去の促進によって生物学的活性を有する核酸のバイオアベイラビリティを低下させる *in vivo* プロセスにより核酸として認識される。核酸と担体化合物の同時投与は、典型的には後者の物質が過剰であり、恐らく共通の受容体に対する担体化合物と核酸との間の競合により、肝臓、腎臓、又は他の体外循環貯蔵部で回収される核酸の量が実質的に減少し得る。例えば、肝臓組織における部分的にホスホロチオエートの dsRNA の回収率は、ポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジン酸、又は 4-アセトアミド-4'-イソチオシアノ-スチルベン-2, 2'-ジスルホン酸と同時投与されると低下し得る (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nuc l. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

20

【0320】

vi. 賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬担体」又は「賦形剤」は、薬学的に許容され得る溶媒、懸濁剤、又は動物に 1 つ以上の核酸を送達するためのその他の薬理学的に不活性なビヒクルである。賦形剤は、液体でも固体でも良く、核酸及び所与の医薬組成物の他の成分と組み合わせられる場合は、所望の嵩、粘稠度などを提供するように考慮した、計画された投与方式で選択される。典型的な医薬担体としては、限定されるものではないが、結合剤（例えば、予めゼラチン化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、又はヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；充填剤（例えば、ラクトース及び他の糖、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、又はリン酸水素カルシウムなど）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、ステアリン酸金属、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど）；及び湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が挙げられる。

30

40

【0321】

核酸と有害に反応しない、非経口投与に適切な薬学的に許容され得る有機又は無機賦形剤も、本発明の組成物の製剤に使用することができる。適切な薬学的に許容され得る担体としては、限定されるものではないが、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、及びポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

【0322】

核酸の局所投与用の製剤としては、限定されるものではないが、滅菌及び非滅菌水溶液、一般的な溶媒、アルコール中の非水溶液、又は液体若しくは固体油ベース中の核酸溶液

50

を挙げることができる。これらの溶液は、緩衝剤、希釈剤、及び他の適切な添加剤も含み得る。核酸と有害に反応しない、非経口投与に適切な薬学的に許容され得る有機又は無機賦形剤を使用することができる。

【0323】

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

【0324】

v i i . 他の成分

本発明の組成物は、医薬組成物中に従来見られる他のアジュバント成分を、当分野で確立された使用レベルでさらに含み得る。従って、例えば、この組成物は、さらなる適合性の薬学的に活性な物質、例えば、痒み止め、収斂薬、局所麻酔剤、若しくは抗炎症剤を含み得るか、又は本発明の組成物の様々な剤形の物理的な製剤に有用なさらなる物質、例えば、染料、香味剤、防腐剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤、及び安定剤を含み得る。しかしながら、このような物質は、添加されたときに本発明の組成物の成分の生物学的活性を過度に阻害するべきではない。これらの製剤は、安定化させることができ、所望に応じて、製剤の核酸と有害に相互作用しない補助剤、例えば、滑沢剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩、緩衝剤、着色料、香味剤、及び/又は芳香物質などと混合することができる。

【0325】

水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、及び/又はデキストランを含む、懸濁液の粘性を増加させる物質を含み得る。懸濁液は、安定剤も含み得る。

【0326】

一部の実施形態では、(a) 1つ以上のiRNA化合物、及び(b)非RNAi機構によって機能し、且つ処置、例えば、PH1に有用である1つ以上の作用剤を含む、本発明で取り上げられる医薬組成物が提供される。

【0327】

組成物の試験

このような化合物の毒性及び治療効果は、例えば、LD50(集団の50%が致死する用量)及びED50(集団の50%で治療効果のある用量)を決定するために、細胞培養又は実験動物での標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒作用と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、これは、比LD50/ED50として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。

【0328】

細胞培養アッセイ及び動物実験から得られるデータは、ヒトに使用される用量の範囲の処方に使用することができる。本発明における、本明細書で取り上げられる組成物の用量は、一般的に、殆ど又は全く毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内である。用量は、利用される剤形及び利用される投与経路によってこの範囲内で様々であり得る。本発明で取り上げられる方法で使用される任意の化合物では、治療効果のある用量を細胞培養アッセイからまず推定することができる。用量は、細胞培養で決定されるIC50(即ち、症状の半数最大阻害を達成する試験化合物の濃度)を有する化合物、又は適切である場合はこのIC50を有する標的配列(例えば、ポリペプチドの濃度の低下を達成する)のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲を達成するために動物モデルで処方することができる。このような情報は、ヒトに有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0329】

これらの投与に加えて、上記のように、本発明で取り上げられるiRNAを、鉄過剰負

10

20

30

40

50

荷によって媒介され、且つH A O 1の発現の阻害によって処置することができる病理学的プロセスの処置に有効な他の既知の作用剤と組み合わせて投与することができる。いずれの場合も、投与する医師は、当分野で公知の又は本明細書に記載の有効性の標準的な測定を用いて観察された結果に基づいてi R N Aの投与の量及びタイミングを調整することができる。

【0330】

V. H A O 1の発現を阻害する方法

本発明は、細胞でのH A O 1（ヒドロキシ酸オキシダーゼ1、例えばG O）の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、細胞でのH A O 1の発現を阻害するのに有効な量のR N A i 剤、例えば、二本鎖R N A i 剤を細胞に接触させ、これにより細胞でのH A O 1の発現を阻害するステップを含む。

10

【0331】

細胞への二本鎖R N A i 剤の接触を、i n v i t r o又はi n v i v oで行うことができる。i n v i v oで細胞にR N A i 剤を接触させるステップは、対象、例えば、ヒト対象の体内の細胞又は細胞群にR N A i 剤を接触させるステップを含む。i n v i t r oとi n v i v oの接触させる方法の組み合わせも可能である。接触は、上述のように直接的又は間接的に行うことができる。さらに、細胞を接触させるステップは、本明細書に記載の又は当分野で公知の任意のリガンドを含む標的リガンドによって達成することができる。一部の実施形態では、標的リガンドは、炭水化物部分、例えば、G a l N A c₃リガンド、又はR N A i 剤を目的の部位、例えば、対象の肝臓に誘導するその他のリガンドである。

20

【0332】

本明細書で使用される「阻害する」という語は、「低下させる」、「サイレンシングする」、「下方制御する」、及び他の同様の語と互換的に使用され、任意のレベルの阻害を含む。

【0333】

「H A O 1の発現を阻害する」という句は、任意のH A O 1遺伝子（例えば、マウスH A O 1遺伝子、ラットH A O 1遺伝子、サルH A O 1遺伝子、又はヒトH A O 1遺伝子）及びH A O 1遺伝子の変異体又は突然変異体の発現を阻害することを指すものとする。従って、H A O 1遺伝子は、遺伝子操作された細胞、細胞群、又は生物との関連における野生型H A O 1遺伝子、突然変異体H A O 1遺伝子、又はトランスジェニックH A O 1遺伝子であり得る。

30

【0334】

「H A O 1遺伝子の発現を阻害する」は、H A O 1遺伝子の任意のレベルの阻害、例えば、H A O 1遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を含む。H A O 1遺伝子の発現は、H A O 1遺伝子の発現に関連した任意の変数のレベル、例えば、H A O 1 m R N Aのレベル、H A O 1タンパク質のレベル、又はこのレベルの変化に基づいて評価することができる。このレベルは、例えば、対象に由来するサンプルを含む、個々の細胞又は細胞群で評価することができる。

【0335】

阻害は、H A O 1の発現に関連した1つ以上の変数のコントロールレベルに対する絶対又は相対レベルの低下によって評価することができる。コントロールレベルは、当分野で利用されるあらゆる種類のコントロールレベル、例えば、投薬前基準レベル、又は未処置若しくはコントロール（例えば、緩衝液のみのコントロール又は不活性剤のコントロール）で処置された類似の対象、細胞、若しくはサンプルから決定されるレベルであっても良い。

40

【0336】

本発明の方法の一部の実施形態では、H A O 1遺伝子の発現は、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少

50

なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99% 阻害される。

【0337】

H A O 1 遺伝子の発現の阻害は、第 1 の細胞又は細胞群（このような細胞は、例えば、対象に由来するサンプル中に存在し得る）によって発現される m R N A の量の減少によって示すことができる。この第 1 の細胞又は細胞群は、H A O 1 遺伝子が記述され、且つ H A O 1 遺伝子の発現が、第 1 の細胞又は細胞群と実質的に同一であるが処置されていない第 2 の細胞又は細胞群（コントロール細胞）と比較して阻害されるように処置されている（例えば、1 つ又は複数の細胞に本発明の R N A i 剤を接触させることによって、又は本発明の R N A i 剤を、この細胞が存在する、若しくは存在した対象に投与することによって）。一部の実施形態では、この阻害は、以下の式を用いて、コントロール細胞における m R N A のレベルのパーセンテージとして、処置された細胞における m R N A のレベルを表すことによって評価される：

【数 1】

$$\frac{(\text{コントロール細胞における mRNA}) - (\text{処置細胞における mRNA})}{(\text{コントロール細胞における mRNA})} \cdot 100\%$$

【0338】

或いは、H A O 1 遺伝子の発現の阻害は、H A O 1 遺伝子の発現に機能的に連結されたパラメーター、例えば、H A O 1 タンパク質の発現の低下に関して評価することができる。H A O 1 遺伝子サイレンシングは、構成的に又はゲノム操作により H A O 1 を発現する任意の細胞で、当分野で公知の任意のアッセイによって決定することができる。肝臓が、H A O 1 の発現の主な部位である。発現の他の重要な部位には、腎臓及び子宮が含まれる。

【0339】

H A O 1 タンパク質の発現の阻害は、細胞又は細胞群によって発現される H A O 1 タンパク質のレベル（例えば、対象に由来するサンプルで発現されるタンパク質のレベル）の低下によって示すことができる。m R N A の抑制の評価について上記説明されたように、処置された細胞又は細胞群におけるタンパク質の発現レベルの阻害は、コントロール細胞又はコントロール細胞群におけるタンパク質のレベルのパーセンテージとして同様に表すことができる。

【0340】

H A O 1 遺伝子の発現の阻害を評価するために使用できるコントロール細胞又はコントロール細胞群は、本発明の R N A i 剤に接触されていない細胞又は細胞群を含む。例えば、コントロール細胞又はコントロール細胞群は、対象が R N A i 剤で処置される前の個々の対象（例えば、ヒト又は動物対象）に由来し得る。

【0341】

細胞又は細胞群によって発現される H A O 1 m R N A のレベルを、m R N A の発現を評価するために当分野で公知の任意の方法を用いて決定することができる。一実施形態では、サンプルにおける H A O 1 の発現レベルは、転写されたポリヌクレオチド、例えば、H A O 1 遺伝子の m R N A、又はその一部を検出することによって決定される。R N A は、R N A 抽出技術、例えば、酸性フェノール/グアニジンイソチオシアネート抽出 (R N A z o l B ; B i o g e n e s i s)、R N e a s y R N A 調製キット (Q i a g e n)、又は P A X g e n e (P r e A n a l y t i x , S w i t z e r l a n d) を用いて細胞から抽出することができる。リボ核酸ハイブリダイゼーションを利用する典型的なア

ッセイ形式としては、核ランオンアッセイ (nuclear run-on assay)、RT-PCR、RNA 分解酵素保護アッセイ (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035)、ノーザンブロット法、in situ ハイブリダイゼーション、及びマイクロアッセイ分析が挙げられる。

【0342】

一実施形態では、HAO1 の発現レベルは、核酸プローブを用いて決定される。本明細書で使用される「プローブ」という語は、特定の HAO1 に選択的に結合することができるあらゆる分子を指す。プローブは、当業者が合成しても良いし、又は適切な生物学的標本に由来しても良い。プローブは、標識されるように特別にデザインしても良い。プローブとして利用することができる分子の例として、限定されるものではないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、及び有機分子が挙げられる。

10

【0343】

単離 mRNA を、限定されるものではないが、サザン分析、ノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 分析、及びプローブアッセイを含むハイブリダイゼーション又は増幅アッセイに使用することができる。mRNA レベルの決定のための 1 つの方法では、単離 mRNA を、HAO1 mRNA にハイブリダイズすることができる核酸分子 (プローブ) に接触させる。一実施形態では、mRNA を、固体表面に固定し、例えば、単離 mRNA をアガロースゲル上を移動させて mRNA をゲルから膜、例えば、ニトロセルロースに移すことによってプローブに接触させる。代替の実施形態では、プローブを固体表面に固定し、mRNA を、例えば、Affymetrix 遺伝子チップアレイのプローブに接触させる。当業者であれば、HAO1 mRNA のレベルの決定に使用するために公知の mRNA 検出方法を容易に適応させることができる。

20

【0344】

サンプルにおける HAO1 の発現レベルを決定するための代替の方法では、サンプルにおける、例えば、mRNA の核酸増幅及び / 又は逆転写酵素 (cDNA を調製するため) のプロセスが、例えば、RT-PCR (Mullis, 1987, 米国特許第 4,683,202 号明細書に記載されている実験の実施形態)、リガーゼ連鎖反応 (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193)、自立的配列複製 (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製 (Lizardi et al., 米国特許第 5,854,033 号明細書)、又は任意の他の核酸増幅法によって行われ、続いて、当業者に周知の技術を用いて増幅された分子の検出が行われる。これらの検出スキームは、このような分子の存在数が非常に少ない場合は、核酸分子の検出に特に有用である。本発明の特定の態様では、HAO1 の発現レベルは、定量蛍光 RT-PCR (即ち、TaqMan (商標) システム) によって決定される。

30

【0345】

HAO1 mRNA の発現レベルは、膜ブロット (ハイブリダイゼーション分析に使用されるようなもの、例えば、ノーザン、サザン、及びドット)、又はマイクロウェル、サンプルチューブ、ゲル、ビーズ、若しくはファイバー (又は結合した核酸を含む任意の固体支持体) を用いて監視することができる。参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第 5,770,722 号明細書、同第 5,874,219 号明細書、同第 5,744,305 号明細書、同第 5,677,195 号明細書、及び同第 5,445,934 号明細書を参照されたい。HAO1 の発現レベルの決定は、溶液中の核酸プローブを使用することも含み得る。

40

【0346】

一部の実施形態では、mRNA の発現レベルは、分岐 DNA (bDNA) アッセイ又はリアルタイム PCR (qPCR) を用いて評価される。このような方法の使用は、本明細

50

書に記載される実施例で説明され、例示される。

【0347】

H A O 1 タンパク質の発現レベルは、タンパク質レベルの測定用の当分野で公知の任意の方法を用いて決定することができる。このような方法としては、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー (H P L C)、薄層クロマトグラフィー (T L C)、高拡散クロマトグラフィー、液体又はゲル沈降反応、吸光分光法、比色分析、分光学的定量法、フローサイトメトリー、免疫拡散法 (一元又は二重)、免疫電気泳動法、ウェスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素結合免疫測定法 (E L I S A)、免疫蛍光分析、及び電気化学発光分析などが挙げられる。

【0348】

本明細書で使用される「サンプル」という語は、対象から単離された同様の液体、細胞、又は組織の集合体、及び対象の体内に存在する液体、細胞、又は組織を指す。生体液の例としては、血液、血清及び漿膜液、血漿、リンパ液、尿、脳脊髄液、唾液、及び眼液などが挙げられる。組織サンプルは、組織、器官、又は局所領域からのサンプルを含み得る。例えば、サンプルは、特定の器官、器官の一部、又はこれらの器官内の液体若しくは細胞に由来し得る。特定の実施形態では、サンプルは、肝臓 (例えば、全肝又は肝臓の特定の部分、又は肝臓の特定のタイプの細胞、例えば、肝細胞など) に由来し得る。一部の実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象から得られた血液又は血漿を指す。さらなる実施形態では、「対象に由来するサンプル」は、対象に由来する肝組織を指す。

【0349】

本発明の方法の一部の実施形態では、R N A i 剤は、この R N A i 剤が対象の体内の特定の部位に送達されるように対象に投与される。H A O 1 の発現の阻害は、対象の体内の特定の部位からの液体又は組織に由来するサンプル中の H A O 1 m R N A 又は H A O 1 タンパク質のレベルの測定又はレベルの変化を用いて評価することができる。一部の実施形態では、この部位は肝臓である。この部位はまた、前述の部位のいずれか 1 つからの細胞の小区分又は小群であり得る。この部位は、特定のタイプの受容体を発現する細胞も含み得る。

【0350】

V I . H A O 1 関連障害を治療又は防止するための方法

本発明は、H A O 1 遺伝子の発現によって調節することができる疾患及び状態を処置又は防止するための方法も提供する。例えば、本明細書に記載される組成物を使用して、P H 1 に関連したあらゆる障害を処置することができる。

【0351】

疾患の処置又は予防の有効性は、例えば、疾患の進行、疾患の緩解、症状の重症度、傷みの軽減、生活の質、治療効果を維持するために必要な薬剤の用量、疾患マーカーのレベル、又は予防のために処置される若しくは標的とされる所与の疾患に適切なその他の測定可能なパラメーターの測定によって評価することができる。このようなパラメーターのいずれか 1 つ又はパラメーターの任意の組み合わせの測定によって処置又は予防の有効性を監視することは、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0352】

処置又は予防の効果は、疾患状態の 1 つ以上のパラメーターにおける統計的に有意な改善が存在する場合に、又は通常であれば予想され得る症状の悪化若しくは発症が起きないことによって明らかになる。一例として、疾患の測定可能なパラメーターにおける少なくとも 10 %、好ましくは少なくとも 20 %、30 %、40 %、又は 50 % 以上の有利な変化は、有効な処置であることを示唆し得る。所与の i R N A 薬物の有効性又はこの薬物の処方も、当分野で公知の所与の疾患の実験動物モデルを用いて評価することができる。実験動物モデルを用いる場合、処置の有効性は、マーカー又は症状における統計的に有意な減少が観察された場合に明らかになる。

【0353】

或いは、有効性は、臨床的に許容される疾患の重症度の評価尺度に基づいた診断である

10

20

30

40

50

、当業者によって決定される疾患の重症度の低下によって測定することができる。

【0354】

本発明の方法の一部の実施形態では、HAO1の発現は、長期間、例えば、少なくとも1週間、2週間、3週間、又は4週間、又はそれ以上に亘って減少する。例えば、特定の場合には、HAO1遺伝子の発現は、本明細書に記載されるiRNA剤の投与によって少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は100%抑制される。一部の実施形態では、HAO1遺伝子は、iRNA剤の投与によって少なくとも約60%、70%、又は80%抑制される。一部の実施形態では、HAO1遺伝子は、二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって少なくとも約85%、90%、又は95%抑制される。別の実施形態では、HAO1遺伝子は、投与後7日間、10日間、20日間、又は30日間以上に亘って抑制されたままである。

10

【0355】

いくつかの実施形態では、有効性は、血漿中グリコール酸塩レベル及び/又は尿中シュウ酸塩排泄及び/又はGO酵素阻害によって測定される。

【0356】

いくつかの実施形態では、血漿中グリコール酸塩レベルは、投与後20~40日目まで若しくは投与後29日目まで増加する；又は投与後75日目又は85日目又は95日目まで増加し、持続された。いくつかの実施形態では、血漿中グリコール酸塩レベルは、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、若しくは10倍増加する。

20

【0357】

いくつかの実施形態では、対象の尿中シュウ酸塩排泄は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は少なくとも1分の1、2分の1、3分の1、4分の1、5分の1、6分の1、7分の1、8分の1、9分の1、若しくは10分の1に減少する。

【0358】

いくつかの実施形態では、GO酵素は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、若しくは10倍阻害される。

30

【0359】

投与

本発明のRNAi剤は、例えば、限定されるものではないが、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、眼内投与、気管支内投与、胸膜内投与、腹腔内投与、動脈内投与、リンパ管投与、脳脊髄投与、及びこれらの任意の組み合わせを含む、当分野で公知の任意の投与方式で投与することができる。一部の実施形態では、RNAi剤は、皮下投与される。

【0360】

一部の実施形態では、投与は蓄積注射によって行われる。蓄積注射は、長期間に亘ってRNAi剤を一貫して放出することができる。従って、蓄積注射は、所望の効果、例えば、HAO1の所望の阻害、又は治療効果若しくは予防効果を得るために必要な投与の頻度を下げることができる。蓄積注射は、より一定の血清濃度を実現することもできる。蓄積注射としては、皮下注射又は筋肉注射を挙げることができる。一部の実施形態では、蓄積注射は、皮下注射である。

40

【0361】

一部の実施形態では、投与は、ポンプによって行われる。ポンプは、外部ポンプであっても良いし、又は外科的に移植されたポンプであっても良い。特定の実施形態では、ポンプは、皮下移植された浸透圧ポンプである。他の実施形態では、ポンプは輸液ポンプである。輸液ポンプは、静脈内注射、皮下注射、動脈注射、又は硬膜外注射に使用することができる。一部の実施形態では、輸液ポンプは、皮下注入ポンプである。他の実施形態では

50

、ポンプは、RNAi剤を肝臓に送達する、外科的に移植されたポンプである。

【0362】

他の投与方式としては、硬膜外投与、脳内投与、脳室内投与、経鼻投与、動脈内投与、心臓内投与、骨内注入、くも膜下腔投与、硝子体内投与、及び肺内投与が挙げられる。投与方式は、局所治療又は全身治療が望ましいか、及び治療される領域に基づいて選択することができる。投与の経路及び部位は、標的化を向上させるために選択することができる。

【0363】

この方法は、iRNA剤を投与する、例えば、少なくとも5日間、好ましくは7日間、10日間、14日間、21日間、25日間、30日間、又は40日間に亘ってHAO1 mRNAのレベルを抑制するのに十分な用量投与するステップ；及び、任意選択により、第2の1回量のdsRNAを投与するステップを含み、この第2の1回量は、第1の1回量が投与されてから少なくとも5日後、好ましくは7日後、10日後、14日後、21日後、25日後、30日後、又は40日後に投与され、これにより対象におけるHAO1遺伝子の発現が阻害される。

【0364】

一実施形態では、本発明のiRNA剤の用量は、4週間に1回以下、3週間に1回以下、2週間に1回以下、又は1週間に1回以下で投与される。別の実施形態では、投与は、1カ月、2カ月、3カ月、又は6か月、又は1年以上に亘って継続することができる。別の実施形態では、本発明のiRNA剤の用量は、3週間に亘って1週間に1回投与される。

【0365】

一般に、iRNA剤は、免疫系を活性化させない、例えば、サイトカインレベル、例えば、TNF- α 又はIFN- γ のレベルを上昇させない。例えば、アッセイ、例えば、本明細書に記載されているようなin vitro PBMCアッセイによって測定すると、TNF- α 又はIFN- γ のレベルの上昇は、対照dsRNA、例えば、HAO1を標的としないdsRNAで処置された対照細胞の30%未満、20%未満、又は10%未満である。

【0366】

例えば、対象に、治療量のiRNA剤、例えば、0.3mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、又は3mg/kgのdsRNAを投与することができる。iRNA剤は、一定期間に亘って、例えば、5分間、10分間、15分間、20分間、又は25分間の期間に亘って静脈内注射によって投与することができる。投与は、例えば、定期的に、例えば、1か月、2か月、3か月、又は4か月以上の間に隔週で（即ち、2週間ごとに）繰り返される。最初の処置計画後は、処置は、少ない頻度で施すことができる。例えば、3か月間の隔週の投与後は、投与を、6か月間又は1年間以上の間、1か月に1回繰り返すことができる。iRNA剤の投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、尿、又は他の区画のHAO1のレベルを、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%以上低下させることができる。

【0367】

全用量のiRNA剤の投与前に、患者は、少量、例えば、5%未満の注入反応となる量を投与し、悪影響、例えば、アレルギー反応、又は脂質レベル若しくは血圧の上昇を監視することができる。別の例では、患者は、不所望の免疫活性化作用、例えば、サイトカイン（例えば、TNF- α 又はIFN- γ ）のレベルの上昇を監視することができる。

【0368】

HAO1 RNAi剤を必要とする患者を、家族歴を聴取することによって特定することができる。医療提供者、例えば、医師、看護師、又は家族の一員が、HAO1 dsRNAを処方又は投与する前に家族歴を聴取することができる。HAO1 RNAi剤が患者に投与される前に、DNA試験も患者に対して行って、AGT1遺伝子における突然変異を同定することができる。PH1の診断は、当業者に周知の任意の試験によって確定す

10

20

30

40

50

ることができる。

【0369】

治療効果又は予防効果は、疾患状態の1つ以上のパラメーターに統計的に有意な改善が存在する場合に、又は通常であれば予想され得る症状の悪化若しくは発症が起きないことによって明らかになる。一例として、疾患の測定可能なパラメーターにおける少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、又は50%以上の有利な変化は、有効な処置であることを示唆し得る。本発明の所与のiRNA剤の有効性又はこのiRNA剤の処方も、当分野で公知の所与の疾患の実験動物モデルを用いて評価することができる。実験動物モデルを用いる場合、処置の有効性は、マーカー又は症状における統計的に有意な減少が観察された場合に明らかになる。

10

【0370】

対象に投与されるRNAi剤の用量は、例えば、HAO1遺伝子抑制の所望のレベル（例えば、HAO1 mRNA抑制、HAO1タンパク質の発現、又はシュウ酸塩レベルの低下に基づいて評価される）又は所望の治療効果又は予防効果を達成すると同時に所望の副作用を回避するために、特定の用量のリスクと利益をバランスさせるように調整することができる。

【0371】

一部の実施形態では、RNAi剤は、2回以上に分けて投与される。反復的又は頻繁な注入を容易にしたい場合は、送達装置、例えば、ポンプ、半永久ステントの植え込み（例えば、静脈内、腹腔内、脳槽内、又は嚢内）、又はレザバーが望ましいであろう。一部の実施形態では、続く投与の回数又は量は、所望の効果、例えば、HAO1遺伝子の抑制の達成、又は治療若しくは予防効果、例えば、鉄過剰負荷の低減の達成によって決まる。一部の実施形態では、RNAi剤は、スケジュールに従って投与される。例えば、RNAi剤は、1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、1週間に4回、又は1週間に5回投与することができる。一部の実施形態では、スケジュールは、規則的な間隔での投与、例えば、1時間ごと、4時間ごと、6時間ごと、8時間ごと、12時間ごと、毎日、2日ごと、3日ごと、4日ごと、5日ごと、毎週、2週間ごと、又は毎月の投与を含む。他の実施形態では、スケジュールは、短い間隔での投与、及びこれに続く作用剤が投与されていないより長い期間を含む。例えば、スケジュールは、比較的短い期間（例えば、約6時間ごと、約12時間ごと、約24時間ごと、約48時間ごと、又は約72時間ごと）で投与される最初の投与セット、及びこれに続くRNAi剤が投与されないより長い期間（例えば、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、又は約8週間）を含み得る。一実施形態では、RNAi剤が、最初は1時間ごとに投与され、後により長い間隔（例えば、1日1回、1週間に1回、2週間に1回、又は1か月に1回）で投与される。別の実施形態では、RNAi剤は、最初は毎日投与され、後により長い間隔（例えば、1週間に1回、2週間に1回、又は1か月に1回）で投与される。特定の実施形態では、より長い期間は、時間と共に長くなる、又は所望の効果の達成に基づいて決定される。特定の一実施形態では、RNAi剤は、最初の1週間は1日1回投与され、続いて投与の8日目から1週間に1回の投与が始まる。別の特定の実施形態では、RNAi剤は、最初の1週間は1日おきに投与され、続いて投与の8日目から1週間に1回の投与が始まる。

20

30

40

【0372】

一部の実施形態では、RNAi剤は、投与計画に基づいて投与され、この投与計画は、短い投与間隔の「負荷相」を含み、この負荷相の後に、RNAi剤がより長い間隔で投与される「持続相」が続いても良い。一実施形態では、負荷相は、最初の1週間におけるRNAi剤の1日5回の投与を含む。別の実施形態では、持続相は、1週間に1回又は2回のRNAi剤の投与を含む。さらなる実施形態では、持続相は、5週間続く。

【0373】

これらの任意のスケジュールは、任意選択により、1回以上の反復で繰り返すことができる。反復の回数は、所望の効果、例えば、HAO1遺伝子の抑制の達成、及び/又は治

50

療効果若しくは予防効果、例えば、シュウ酸塩のレベルの低下若しくはPH1の症状の軽減の達成によって決めることができる。

【0374】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載のiRNA剤をどのように投与するかを最終使用者、例えば、介護士又は対象を指導するための方法を取り上げる。この方法は、任意選択により、1回量以上のiRNA剤を最終使用者に提供するステップ、及びiRNA剤を本明細書に記載の計画で投与するように最終使用者を指導し、これにより最終使用者を指導するステップを含む。

【0375】

VII. キット

本発明は、任意のiRNA剤を使用するため、及び/又は本発明の任意の方法を行うためのキットも提供する。このようなキットは、1つ以上のRNAi剤及び使用説明書、例えば、HAO1の発現を阻害するのに有効な量のRNAi剤を細胞に接触させることによって細胞でのHAO1の発現を阻害するための取扱説明書を含む。キットは、任意選択により、細胞にRNAi剤を接触させるための手段（例えば、注入装置）、又はHAO1の阻害を測定するための手段（例えば、HAO1 mRNA又はタンパク質の阻害を測定するための手段）をさらに含み得る。HAO1の阻害を測定するためのこのような手段は、対象からのサンプル、例えば、血漿サンプルを得るための手段を含み得る。本発明のキットは、任意選択により、RNAi剤を対象に投与するための手段、又は治療有効量若しくは予防有効量を決定するための手段をさらに含み得る。

【0376】

VII. PH1及び関連した状態の診断マーカー

本明細書には、シュウ酸塩の過剰産生によって引き起こされる疾患状態、特にPH1及び関連した状態の診断のためのマーカー及び方法、並びに前記状態の処置のための作用剤も記載されている。

【0377】

別の態様によると、本発明は、対象のPH1の状態（結石症、特にPH1）の処置のための方法に関する。診断方法は、（a）対象におけるHAO1の発現をノックダウンするステップ、（b）前記対象から生物学的血清を得るステップ；及び（b）前記血清中のグリコール酸塩のレベルを決定するステップを含む。陰性対照と比較した、血清中のグリコール酸塩のレベルの上昇は、PH1の状態によって引き起こされるシュウ酸塩の産生を防止するグリコール酸オキシダーゼ酵素の阻害を示唆することを理解されたい。

【0378】

一実施形態では、PH1の状態の診断のためのキットが本明細書に記載され、前記キットは、以下を含む：（a）血清中の目的の分析物の存在を決定するための作用剤であって、前記目的の分析物がグリコール酸塩の1つである、作用剤；及び（b）較正手段。例えば、前記目的の分析物はグリコール酸塩であり、前記作用剤は、HAO1を標的とするsiRNAである。

【0379】

特段の記載がない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明の属する分野の一般的な技術者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の方法及び材料と同様又は同等の方法及び材料は、本発明で取り上げられるiRNA及び方法の実施又は試験に使用することができるが、適切な方法及び材料は以下に記載される。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりそれらの全開示内容が本明細書に組み入れられる。対立する場合は、定義を含む本明細書が優先される。加えて、材料、方法、及び例は、単に例示目的であり、限定を意図するものではない。

【実施例】

【0380】

材料及び方法

10

20

30

40

50

以下の材料及び方法は、実施例で使用された。本明細書で使用する「H A O」及び「G O」は互換的に使用される。

【0381】

siRNAの合成

一本鎖RNAを、Expedite 8909合成機(Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany)及び固体支持体としての細孔性ガラス(controlled pore glass)(CPG, 500, Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany)を用いた1 μ moleのスケールでの固相合成によって作製した。RNA、及び2'-O-メチルヌクレオチドを含むRNAをそれぞれ、対応するホスホラミダイト及び2'-O-メチルホスホラミダイトを利用する固相合成によって作製した(Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany)。これらのビルディングブロックを、核酸化学の現在のプロトコル、Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されているような標準的なヌクレオシドホスホラミダイト化学を用いてオリゴリボヌクレオチド鎖の配列内の選択された部位に含めた。ホスホロチオエート結合を、アセトニトリル(1%)中、Beaucage試薬(Chruac hem Ltd, Glasgow, UK)の溶液でヨウ素酸化剤溶液を交換することによって導入した。さらなる補助試薬をMallinckrodt Baker(Griesheim, Germany)から得た。

【0382】

陰イオン交換HPLCによる粗オリゴリボヌクレオチドの脱保護及び精製を、確立された手順に従って行った。収率及び濃度を、分光光度計(DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Germany)を用いて260nmの波長でのそれぞれのRNAの溶液のUV吸光度によって決定した。

【0383】

二本鎖RNAを、アニーリング緩衝液(20mM リン酸ナトリウム、pH 6.8; 100mM 塩化ナトリウム)中、相補鎖の等モル溶液を混合し、85~95℃の水槽で3分間加熱し、そして3~4時間かけて室温に冷却して作製した。アニールされたRNA溶液を、使用するまで-20℃で保存した。

【0384】

場合によっては、二重鎖(dsRNA)を2回以上合成した。異なるバッチには、異なる拡張子を付した。例えば、AD-62933.1及びAD-62933.2が、同じ二重鎖の異なるバッチである。

【0385】

細胞培養及びトランスフェクション

初代カニクイザル肝細胞(PCH)及び初代マウス肝細胞(PMH)を使用した。PCH(Cellsis #M003055, lot CBT)又はPMH(新鮮分離)を、96ウェルプレートの1ウェルにつき5 μ lのsiRNA二重鎖に対して1ウェルにつき14.8 μ lのOpti-MEMと0.2 μ lのLipofectamine RNAi Max(Invitrogen, Carlsbad CA, cat #13778-150)を添加し、そして室温で15分間インキュベートすることによってトランスフェクトした。次いで、約 2×10^4 のPCH又はPMH細胞を含む80 μ lのIn Vitro GRO CP Rat培地(In Vitro Technologies)をsiRNA混合物に加えた。RNAの精製の前に、細胞を24時間インキュベートした。単回投与実験を、10又は20 nM及び0.1又は0.2 nMの最終二重鎖濃度で行い、用量反応実験を、8、6倍希釈で、10 nM~36 fMの最終二重鎖濃度の用量範囲で行った。

【0386】

全RNAの単離

全RNAを、DYNABEADS mRNA単離キット(Invitrogen, pa

10

20

30

40

50

rt # : 610 - 12) を用いて単離した。細胞を収集し、150 μ l の溶解 / 結合緩衝液で溶解し、次いで Eppendorf Thermomixer を用いて 850 rpm で 5 分間混合した (混合速度は、プロセスの間同一とした)。10 μ l の磁気ビーズと 80 μ l の溶解 / 結合緩衝液の混合物を丸底プレートに加えて、1 分間混合した。磁気ビーズを磁気スタンドで捕捉し、そして上清を、ビーズを乱さずに除去した。上清の除去後、溶解細胞を残りのビーズに添加して、5 分間混合した。上清を除去後、磁気ビーズを 150 μ l の洗浄緩衝液 A で 2 回洗浄して、1 分間混合した。ビーズを再び捕捉して、上清を除去した。次いで、ビーズを 150 μ l の洗浄緩衝液 B で洗浄し、捕捉し、そして上清を除去した。次に、ビーズを 150 μ l の溶出緩衝液で洗浄し、捕捉し、そして上清を除去した。ビーズを 2 分間乾燥させた。乾燥後、50 μ l の溶出緩衝液を添加して、70

10

【0387】

cDNA の合成

cDNA の合成を、ABI 高性能 cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat # 4368813) を用いて行った。

【0388】

1 反応当たり、2 μ l の 10 \times 緩衝液、0.8 μ l の 25 \times dNTP、2 μ l のランダムプライマー、1 μ l の逆転写酵素、1 μ l の RNA 分解酵素阻害剤、及び 3.2 μ l の H₂O のマスターミックスを 10 μ l の全 RNA に添加した。Bio-Rad C-1000 又は S-1000 サーマルサイクラー (Hercules, CA) を用いて、次のステップによって cDNA を作製した：25 で 10 分間、37 で 120 分間、85 で 5 秒、4 での保持。

20

【0389】

リアルタイム PCR

2 μ l の cDNA を、384 ウェル 50 プレート (Roche cat # 04887301001) における各ウェルのマスターミックス (0.5 μ l のマウス GAPDH (cat # 4352339E Life Technologies) 又は特注設計のカニクイザル GAPDH TaqMan プローブ：(F-GCATCCTGGGCTACA CTGA (配列番号 7)、R-TGGGTGTCTGCTGTTGAAGTC (配列番号 8)、プローブ-CCAGGTGGTCTCTCTCC (配列番号 9))、0.5 μ l のヒト又はマウス HAO1 (カニクイザル HAO1 と交差反応性の HS00213909_M1、マウスのアッセイ用の Mm 00439249_m1、life technologies)、及び 5 μ l の Lightcycler 480 プローブマスターミックス (Roche Cat # 04887301001) を含む) に添加した。リアルタイム PCR を、Ct (RQ) アッセイを用いて LightCycler 480 リアルタイム PCR システム (Roche) で行った。要約表に特段の記載がない限り、各二重鎖を、2 つの独立したトランスフェクションで試験し、各トランスフェクションを 2 連でアッセイした。

30

【0390】

相対的倍数変化を計算するために、リアルタイムデータを、Ct 法を用いて分析し、10 nM AD-1955 でトランスフェクトされた細胞又は模擬トランスフェクト細胞で行ったアッセイに対して正規化した。IC50 を、XL Fit を用いる 4 パラメーターフィットモデルで計算し、AD-1955 でトランスフェクトされた細胞又はナイーブ細胞に対して正規化した。

40

【0391】

AD-1955 のセンス配列及びアンチセンス配列は：SENSE : 5' - cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTs dT - 3' (配列番号 10) ; 及び ANTISENSE : 5' - UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTs dT - 3' (配列番号 11) である。

50

【 0 3 9 2 】

【 表 3 】

表 B: 核酸配列の表現に使用されるヌクレオチド単量体の省略形

省略形	ヌクレオチド
A	アデノシン-3'-リン酸塩
Ab	β -L-アデノシン-3'-リン酸塩
Af	2'-フルオロアデノシン-3'-リン酸塩
Afs	2'-フルオロアデノシン-3'-ホスホロチオエート
As	アデノシン-3'-ホスホロチオエート
C	シチジン-3'-リン酸塩
Cb	β -L-シチジン-3'-リン酸塩
Cf	2'-フルオロシチジン-3'-リン酸塩
Cfs	2'-フルオロシチジン-3'-ホスホロチオエート
Cs	シチジン-3'-ホスホロチオエート
G	グアノシン-3'-リン酸塩
Gb	β -L-グアノシン-3'-リン酸塩
Gbs	β -L-グアノシン-3'-ホスホロチオエート

10

【 0 3 9 3 】

20

30

40

50

【表 4】

省略形	ヌクレオチド
Gf	2'-フルオログアノシン-3'-リン酸塩
Gfs	2'-フルオログアノシン-3'-ホスホロチオエート
Gs	グアノシン-3'-ホスホロチオエート
T	5'-メチルウリジン-3'-リン酸塩
Tf	2'-フルオロ-5-メチルウリジン-3'-リン酸塩
Tfs	2'-フルオロ-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
Ts	5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
U	ウリジン-3'-リン酸塩
Uf	2'-フルオロウリジン-3'-リン酸塩
Ufs	2'-フルオロウリジン-3'-ホスホロチオエート
Us	ウリジン-3'-ホスホロチオエート
N	任意のヌクレオチド(G, A, C, T 又は U)
a	2'-O-メチルアデノシン-3'-リン酸塩
as	2'-O-メチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
c	2'-O-メチルシチジン-3'-リン酸塩
cs	2'-O-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
g	2'-O-メチルグアノシン-3'-リン酸塩
gs	2'-O-メチルグアノシン-3'-ホスホロチオエート
t	2'-O-メチル-5-メチルウリジン-3'-リン酸塩
ts	2'-O-メチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
u	2'-O-メチルウリジン-3'-リン酸塩
us	2'-O-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
dT	2'-デオキシチミジン
dTs	2'-デオキシチミジン-3'-ホスホロチオエート
dU	2'-デオキシウリジン
s	ホスホロチオエート結合
L96	N-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミドデカノイル]-4-ヒドロキシブロリノール Hyp-(GalNAc-アルキル)3
(Aeo)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-リン酸塩
(Aeos)	2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
(Geo)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-リン酸塩
(Geos)	2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-ホスホロチオエート
(Teo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-リン酸塩
(Teos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
(m5Ceo)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-リン酸塩
(m5Ceos)	2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
(A3m)	3'-O-メチルアデノシン-2'-リン酸塩
(A3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルアデノシン-2'-リン酸塩
(G3m)	3'-O-メチルグアノシン-2'-リン酸塩
(G3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルグアノシン-2'-リン酸塩
(C3m)	3'-O-メチルシチジン-2'-リン酸塩
(C3mx)	3'-O-メチル-キシロフラノシルシチジン-2'-リン酸塩
(U3m)	3'-O-メチルウリジン-2'-リン酸塩
(U3mx)	3'-O-メチルキシロウリジン-2'-リン酸塩
(Chd)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸塩
(pshe)	ヒドロキシエチルホスホロチオエート
(Uhd)	2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-リン酸塩

10

20

30

40

【 0 3 9 4 】

50

【表 5】

省略形	ヌクレオチド
(Tgn)	チミジン-グリコール核酸(GNA) S-異性体
(Cgn)	シチジン-グリコール核酸(GNA)
(Chd)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸塩
(Ggn)	2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸塩
(Agn)	アデノシン-グリコール核酸(GNA)
P	5'-リン酸塩
(m5Cam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-リン酸塩
(m5Cams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
(Tam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-リン酸塩
(Tams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-ホスホロチオエート
(Aam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3'-リン酸塩
(Aams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3'-ホスホロチオエート
(Gam)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3'-リン酸塩
(Gams)	2'-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3'-ホスホロチオエート
Y34	脱塩基 2'-O-メチル
Y44	2-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5-リン酸塩

10

【0395】

20

実施例 1：ALN-65585

AD-65585 は、ヒト HAO1 遺伝子のヌクレオチド 1341～1363 を標的とする二本鎖 siRNA である。「ALN-GO1」は、AD-65585 の改変された GalNAc バージョンを指す。ヌクレオチド単量体の省略形は表 B に示されている。

【0396】

各鎖の配列は次の通りである。

【0397】

【表 6】

二重鎖	配列番号	配列 5'-3'	鎖
AD-65585 非改変	12	GACUUUCAUCCUGGAAAUUAUA	センス
AD-65585 非改変	13	UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA	アンチセンス
AD-65585 改変	14	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaual96	センス
AD-65585 改変	15	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucsesa	アンチセンス

30

【0398】

実施例 2：ALN-65585 を用いた薬理学的試験

肝細胞中の HAO1 阻害

40

初代カニクイザル肝細胞を、RNAimax (Invitrogen) を用いて段階希釈 AD-65585 (ALN-65585、「ALN-GO1」) 又は非標的 mRNA Luciferase 対照 (AD1955) で、10 nM でトランスフェクトした。HAO1 mRNA の相対レベルを、リアルタイム RT-PCR によって定量化された GAPDH mRNA レベルに対して正規化することによって決定した。データをプロットして、10 pM の IC50 値を計算した。この結果は、図 3 に示されている。

【0399】

AD-65585 の in vitro トランスフェクションは、初代カニクイザル肝細胞での約 10 pM の ED50 を実証している。

【0400】

50

マウスにおける単回投与の薬理

A L N - G O 1 の薬理を、肝臓の H A O 1 m R N A 及び血清中グリコール酸塩のレベルを定量化することによってマウスで評価した (図 4) 。 A L N - G O 1 の単回 S C 投与により、 1 0 m g / k g の用量での H A O 1 m R N A の用量依存性抑制が、 E D 9 0 サイレンシングとなる。マウスにおける G O 1 サイレンシングの E D 5 0 用量は、 0 . 3 m g / k g と推定された。血清中グリコール酸塩のレベルは、ベースラインレベルの約 4 倍を超える最大レベルで用量反応的に増加した。この結果は、図 4 に示され、 C 5 7 B L / 6 マウスにおける A L N - 6 5 5 8 5 の単回皮下投与の 1 0 日後の肝臓の H A O 1 m R N A 及び血清中グリコール酸塩のレベルを例示している。バーは、 3 匹又は 4 匹の動物の平均を表し、エラーバーは、標準偏差を示している。

10

【 0 4 0 1 】

マウスにおける単回投与の期間

G O 1 サイレンシングは、持続的であり、単回 S C 投与後に可逆的であった (図 5) 。マウスにおける A L N - G O 1 の 3 m g / k g での単回 S C 投与により、約 6 週間に亘って 7 0 % 以上の m R N A サイレンシングが続き、その後、投与から 1 2 週間で m R N A レベルがベースラインレベルに戻った。この結果は、図 5 に示されている： C 5 7 B L / 6 マウスへの A L N - 6 5 5 8 5 の単回皮下投与後の複数の時点での肝臓の H A O 1 m R N A のレベル。各データ点は、 3 匹の動物の平均を表し、エラーバーは、標準偏差を示している。

【 0 4 0 2 】

20

ラットにおける単回投与の薬理

A L N - G O 1 の薬理を、肝臓の H A O 1 m R N A のレベルを定量化することによってラットでも評価した (図 6) 。雄 S p r a g u e D a w l e y ラットへの A L N - G O 1 の単回 S C 投与により、 3 m g / k g 以上での H A O 1 m R N A の用量依存性抑制が、 E D 9 0 サイレンシングとなる。この結果は、図 6 に示されている： S p r a g u e D a w l e y ラットへの A L N - 6 5 5 8 5 の単回皮下投与の 1 0 日後の肝臓での H A O 1 m R N A のレベル。バーは、 3 匹の動物の平均を表し、エラーバーは、標準偏差を示している。ラットにおける G O 1 サイレンシングの E D 5 0 用量は、 0 . 3 m g / k g と推定された。

【 0 4 0 3 】

30

A G X T K O マウスにおける単回投与の薬理

シュウ酸塩のレベルに対する A L N - G O 1 の影響を、 P H 1 の A G X T K O マウスモデルで評価した。この結果は、図 7 に示されている： A L N - 6 5 5 8 5 の単回皮下投与後の A g x t K O マウスの 2 4 時間の尿中のシュウ酸塩 (上部) 及びグリコール酸塩 (底部) の排泄量。異なる文字は、それぞれの特定の週における 3 つの投与群 (1 投与に付き n = 3) 間の有意差を意味する。尿中排泄量は、 P B S 対照動物 (n = 1) では時間が経過しても有意には変化しなかった。

【 0 4 0 4 】

尿中シュウ酸塩のレベルは、 A L N - G O 1 の単回投与後に用量依存性の低下を示し、 3 m g / k g の用量で最大約 5 0 % のシュウ酸塩の低下であり、この低下は、投薬前のレベルに戻るまで 3 週間以上かかった。尿中グリコール酸塩のレベルは、 A L N - G O 1 の単回投与後に用量依存性の増加を示し、 3 m g / k g の用量で最大約 5 倍の増加であり、この増加は、 4 週間以上続いた。

40

【 0 4 0 5 】

P H 1 誘発ラットモデルにおける単回投与の薬理

肝臓 A G X T を s i R N A を用いてラットで阻害し、シュウ酸塩のレベルをエチレンジリコールで刺激して、第 2 の P H 1 げっ歯類モデルで A L N - G O 1 を評価した (図 8 A 及び図 8 B) 。肝臓 H A O 1 m R N A 及び 2 4 時間の尿中シュウ酸塩を定量化して、最大のシュウ酸塩の低下に必要な H A O 1 低下の程度を決定した。この結果は、図 8 A 及び図 8 B に示されている： A L N - 6 5 5 8 5 の単回皮下投与の 1 4 日後及び A F - 0 1 1

50

A G X T s i R N A の毎週の投与 (1 m g / k g の 2 回の投与) 後の P H 1 のラット誘発モデルにおける肝臓の H A O 1 m R N A のレベル。24 時間の尿中シュウ酸塩を尿中クレアチニンに対して正規化した。バーは、3 匹の動物の平均を表し、エラーバーは、標準偏差を示している。m R N A とシュウ酸塩の低下の相関プロットは、複数の実験の個々の動物を表している。

【 0 4 0 6 】

このモデルにおける A L N - G O 1 の単回投与は、用量反応性の m R N A 及び尿中シュウ酸塩の低下を実証し、A L N - G O 1 の最大の用量で、約 85 % の最大 m R N A の低下及び約 90 % の最大尿中シュウ酸塩の低下が観察された (図 8 A 及び図 8 B)。この P H 1 の誘発ラットモデルでは、m R N A 及び尿中シュウ酸塩の低下は、1 : 1 の相関となった。

10

【 0 4 0 7 】

P H 1 誘発ラットモデルにおける複数回投与の薬理

A L N - G O 1 の効力を、肝臓の H A O 1 m R N A 及び 24 時間の尿中シュウ酸塩の定量化によって、A G X T の活性及びエチレングリコールが阻害された正常なラット (P H 1 の誘発モデル) における試験で評価した。この結果は、図 9 に示されている : A L N - 65585 の反復皮下投与及び A F - 011 - A G X T s i R N A の反復 I V 投与 (1 m g / k g の 4 回の投与) の 28 日後の P H 1 のラット誘発モデルにおける肝臓の H A O 1 m R N A のレベル。24 時間の尿中シュウ酸塩を、尿中クレアチニンに対して正規化した。バーは、2 匹又は 3 匹の動物の平均を表し、エラーバーは、標準偏差を示している。

20

【 0 4 0 8 】

A L N - G O 1 での処置により、約 3 週間に亘って全ての処置群で尿中シュウ酸塩の低下が持続された。A L N - G O 1 の反復投与 (及び A F - 011 - A G X T の 4 回の投与) の 28 日後に、全ての群が、95 % を超える m R N A の低下、85 % を超える尿中シュウ酸塩の低下を示した。

【 0 4 0 9 】

N H P における複数回投与の薬理

A L N - G O 1 の薬理を、肝生検での H A O 1 m R N A の定量化及び血清中グリコール酸塩のレベルによってカニクイザル (非ヒト霊長類 (N H P)) で評価した。以下の表は、投与レベル及び投与計画を詳述する N H P 薬理学的試験の概要を示している。

30

【 0 4 1 0 】

【 表 7 】

群番号	被験物質	用量レベル(mg/kg)	投与回数
1	PBS	Na	QM x 6
2	AD-65585	0.25	QM x 8
3	AD-65585	1	QM x 8
4	AD-65585	1	QM x 6
5	AD-65585	2	QM x 6
6	AD-65585	4	QM x 6
7	AD-65585	2 -> 1	QM x 4 -> QM x 5

40

【 0 4 1 1 】

この結果は、図 10 に示されている。全ての群における N H P の血清中グリコール酸塩のレベルを 85 日目まで出し、データは、1 群当たり 3 匹の動物の群平均を表し、線は標準偏差を示している。29 日目の肝生検での H A O 1 m R N A であり、線は群の平均を表し、記号は、29 日目の P B S 対照に対する個々の動物の m R N A のレベルを表している。

50

【 0 4 1 2 】

最初の 1 か月の投与後 (2 9 日目) に、用量反応性 m R N A サイレンシングが全ての群で観察され、毎月 4 m g / k g 又は毎週 2 m g / k g で投与された群 6 及び 7 で最大 9 9 % の m R N A サイレンシングであった。約 7 0 μ M の最大に上昇した血清中グリコール酸塩のレベルが、毎月 4 m g / k g で投与された群 6 で少なくとも 3 週間持続した。

【 0 4 1 3 】

実施例 3 : ヒト対象における A L N - G O 1 フェーズ 1 / 2 試験

皮下投与される A D - 6 5 5 8 5 (A L N - 6 5 5 8 5 、 「 A L N - G O 1 」) 又はプラセボを用いて、単回漸増用量 (S A D) 試験を 3 2 人の健康な成人ボランティアヒト対象で行った。投与スケジュールは以下の通りとした。

0 . 3 m g / k g \times 1 S C 、 N = 8

1 . 0 m g / k g \times 1 S C 、 N = 8

3 . 0 m g / k g \times 1 S C 、 N = 8

6 . 0 m g / k g \times 1 S C 、 N = 8

【 0 4 1 4 】

安全性、薬物動態、及び薬力学を評価した。重篤な有害事象又は有害事象による中止は起きなかった。肝機能、腎機能、又は血液パラメーターのその他の臨床的に有意な変化は観察されなかった。

【 0 4 1 5 】

本明細書に記載の方法及び / 又は当業者に周知の方法を使用して、血清中グリコール酸塩レベルを決定した。結果を図 1 1 及び図 1 2 に示す。血清中グリコール酸塩レベルは、用量依存的に増加し、高用量での最短の活性の開始が投与後 2 9 日目までに明らかになり、8 5 日目まで持続した。グリコール酸塩の増加が認められる最低用量は 1 m g / k g であった。

【 0 4 1 6 】

結果は、対象の血漿中グリコール酸塩レベルを増加させる方法を実証し、この方法は、対象に有効量の A L N - G O 1 s i R N A を投与し、これにより対象の血漿中グリコール酸塩レベルを増加させることを含む。有効量は、1 . 0 m g / k g 、 3 . 0 m g / k g 、又は 6 . 0 m g / k g であり得る。A L N - G O 1 s i R N A は皮下投与することができる。

【 0 4 1 7 】

実施例 4 : P H 1 患者における A L N - G O 1 フェーズ 1 / 2 試験

ランダム化 3 : 1、単盲検、プラセボ対照試験で皮下投与されるルマシラン (L u m a s i r a n) 、例えば A D - 6 5 5 8 5 (A L N - 6 5 5 8 5 、 「 A L N - G O 1 」) 又はプラセボを使用して、複数回の漸増用量 (M A D) 試験を P H 1 患者で行った。

【 0 4 1 8 】

投与スケジュールは以下の通りとした。

1 . 0 m g / k g 、 q 2 8 d \times 3 S C 、 N = 4

3 . 0 m g / k g 、 q 2 8 d \times 3 S C 、 N = 4

3 . 0 m g / k g 、 q 8 4 d \times 2 S C 、 N = 4

【 0 4 1 9 】

P H 1 患者は、年齢が 6 ~ 6 4 歳であり ; e G F R (推定糸球体濾過率) が 4 5 m l / 分 / 1 . 7 3 m ² 超であり ; 且つ尿中シュウ酸塩排泄が 0 . 7 0 m m o l / 2 4 時間 / 1 . 7 3 m ² 以上であった。

【 0 4 2 0 】

コホート 1 及び 2 はそれぞれ、以下の人口構成である。

【 0 4 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 8】

特徴	N = 8
年齢範囲	6-19
性別	
男性	5
女性	3
人種	
白人	4
アジア人	2
アラビア人	1
インド人	1

10

【0422】

安全性を評価した。重篤な有害事象又は有害事象による中止は起こらなかった。

【0423】

20

コホート1には、次の投与スケジュールを使用してALN-GO1を投与した：1 mg / kg q 28 d × 3 用量。本明細書に記載の方法及び／又は当業者に周知の方法を使用して、尿中シュウ酸塩排泄レベルを決定した。結果を図13に示す。ALN-GO1の投与により、尿中シュウ酸塩排泄が50%超減少した。

【0424】

コホート2には、次の投与スケジュールを使用してALN-GO1を投与した：3 mg / kg q 28 d × 3 用量。本明細書に記載の方法及び／又は当業者に周知の方法を使用して、尿中シュウ酸塩排泄レベルを決定した。結果を図14に示す。ALN-GO1又はプラセボの最初の投与後、29日目の平均尿中シュウ酸塩排泄は平均50%超減少した。進行中の試験で患者が盲検化されたままであるため、プラセボが要約に含まれていた。

30

【0425】

すべての患者について、ALN-GO1の投与により、尿中シュウ酸塩が、1.6 mmol / 1.73 m² / 24 時間以上のベースライン排泄に対して、1.1 mmol / 1.73 m² / 24 時間未満に低下した。診断時にESRDを有していなかったPH患者では、腎生存率推定値が、最高レベルの尿中シュウ酸塩排泄の患者で低下したことが示されている(Zhao et al. CJASN 2016; 11: 119 - 126)。

【0426】

この試験は、薬物に関連するSAE又は研究の中止が起きることなく、PH1患者が、AD-65585の複数回投与(ALN-65585、「ALN-GO1」)を十分に許容できることを実証している。薬物処置により、処置したすべての患者の尿中シュウ酸塩レベルが大幅に低下し、RNAiを介したグリコール酸塩オキシダーゼ阻害による基質減少療法の可能性が強調された。

40

【0427】

最初の結果の部分B：PH1患者でのALN-GO1フェーズ1/2試験

部分Bは、PH1患者におけるルマシランのランダム化(3:1 薬物：プラセボ)、単盲検、プラセボ対照評価である。コホート1及び2にはそれぞれ、ルマシラン(ALN-65585、「ALN-GO1」)を1 mg / kg又は3 mg / kgで3カ月に1回投与し；コホート3には、3 mg / kgの用量で四半期に2回投与した。追加の8人の患者に、最初の2つのコホートのそれぞれの拡大で、ルマシランを非盲検投与し、合計20人の患者を登録した。プラセボ群にランダム化された患者にも、プラセボの投与後に続いて

50

ルマシランを皮下投与した。患者の平均年齢は14.9歳（範囲：6～43歳）であり、平均推定糸球体濾過率（eGFR）は77mL/分/1.73m²（範囲：42～131mL/分/1.73m²）であった。

【0428】

試験対象患者基準は次の通りとした：PH1；年齢6～64歳；eGFR 45mL/分/1.73m²超；尿中シュウ酸塩排泄 0.70mmol/24時間/1.73m²以上。患者の人口構成は次の通りであった。

【0429】

【表9】

特徴	結果(N=20)
平均年齢(範囲)	14.9 (6-43)
18歳未満	80 %
性別、女性	65 %
平均体重(kg) (範囲)	49.9 (21.3-111.0)
平均 eGFR, mL/分/1.73m ² (範囲)	77 (42-131)

10

20

【0430】

結果：ルマシランは、コホート1～3（N=12）に登録された患者において尿中シュウ酸塩の65%の平均最大減少率を示し、これらの患者全員が、末期腎疾患へのより遅い進行速度に関連する閾値（データは示していない）である0.7mmol/24時間/1.73m²未満への尿中シュウ酸塩の低下を経験した。85日目に、利用可能なデータ（N=9）を用いてルマシランが投与された患者は、尿中シュウ酸塩の63%（範囲：49～73%）の平均減少率を維持した。

【0431】

図15及び図16に示されているように、ルマシランは、ベースライン排泄が1.6mmol/24時間/1.73m²以上であるすべての患者において、UOx（尿中シュウ酸塩）を1.1mmol/24時間/1.73m²未満に低下させた。腎生存率を、診断時の尿中シュウ酸塩（UOx）排泄（mmol/24時間/1.73m²）の四分位数によって検査した。診断時にESRDを有していなかったPH患者のうち、腎生存率の推定値は、尿中シュウ酸塩排泄が最高レベルの患者で低かった。

30

【0432】

以下の試験対象患者基準も使用する。若い患者の処置は、生後6年未満を含み；12か月齢以上の場合はeGFRが45mL/分/1.73m²超であり；12ヶ月未満であるか又は全身性シュウ酸塩症の証拠がある場合は腎機能障害がない。進行腎疾患患者の処置は、全年齢を含み、12か月齢以上の場合はeGFRが45mL/分/1.73m²以下であり、12ヶ月未満であるか又は全身性シュウ酸塩症の臨床的証拠がある場合は腎機能障害がある。

40

【0433】

ルマシラン（ALN-GO1）は、原発性高シュウ酸尿症1型（PH1）患者の肝臓でのシュウ酸塩産生を減少させる皮下投与される治験RNAi治療薬である。薬物に関連するSAE又は試験の中止が起きることなく、PH1患者が、ルマシランの複数回投与を十分に許容する。ルマシランが投与された患者は、尿中シュウ酸塩の実質的且つ持続的な減少を経験し、この恐ろしい疾患におけるシュウ酸塩の病的過剰産生を軽減するための強力な治療薬としてのグリコール酸塩オキシダーゼのRNAi媒介阻害が裏付けられた。尿中シュウ酸塩の強力且つ持続的な低減は、四半期に1回の皮下投与計画を支援する。GO阻

50

害は、肝臓のシュウ酸塩産生レベルを低下させて正常化し、PH1疾患の進行を停止させる。

【0434】

実施例5：原発性高シュウ酸尿症1型(PH1)の治験RNAi治療薬であるALN-GO1の薬物動態-薬力学的(PK-PD)モデル

この試験の目的は、ヒトの肝臓のALN-GO1及びRISC濃度-時間プロファイルを予測し、健康なボランティアの血漿中グリコール酸塩上昇及びPH1患者の尿中シュウ酸塩減少に関するALN-GO1用量反応を定量化することであった。

【0435】

健康なボランティアのグリコール酸塩応答プロファイルは、フェーズI試験(上記)の結果によって提供され、図17に示されているようにPK-PDモデルによって適切に説明された。健康なボランティアでは、血漿中グリコール酸塩レベルの用量依存的増加が観察された。6mg/kgの用量で、ベースラインからグリコール酸塩の約6.5倍の増加が予測され、対応する予測GO抑制は約85%である。

10

【0436】

フェーズI試験(上記)の結果によって提供されたPH1患者のシュウ酸塩応答は、図18に示されているようにPK-PDモデルによって適切に説明された。ALN-GO1で処置したすべての患者は、尿中シュウ酸塩レベルの低下を示した。毎月3回の1mg/kgの投与後、ピーク尿中シュウ酸塩の低下が、最後の投与から2か月で起こり、その後ベースラインまでゆっくり回復することが予測される。毎月3回の1mg/kgのALN-GO1の投与後、モデルの予測された尿中シュウ酸塩の最大低下の中央値は56%である。

20

【0437】

PK-PDモデルは、PH1患者における投与量と定常状態のGO酵素阻害との関係を予測した。図19に示されているように、毎月の2mg/kg以上の投与及び四半期の5mg/kg以上の投与は、GO酵素の90%超の阻害をもたらすと予想される。

【0438】

PK-PDモデルは、PH1患者における投与量と定常状態の尿中シュウ酸塩減少との関係を予測した。図20に示されているように、毎月の2mg/kg以上の投与及び四半期の5mg/kg以上の投与は、PH1患者において尿中シュウ酸塩のほぼ最大の抑制をもたらすと期待される。シミュレーションは、ベースライン尿中シュウ酸塩の中央値を2.0(mmol/24時間/1.73m²)と仮定して行った。

30

【0439】

PK-PDモデルは、健康なボランティアでの血漿中グリコール酸塩の増加とPH1患者での尿中シュウ酸塩の減少について、観察された時間経過及び個人間の変動を適切に説明した。毎月2mg/kg又は四半期に5mg/kgのALN-GO1を投与は、GO酵素を90%超阻害し、結果としての尿中シュウ酸塩のほぼ最大の減少をもたらし得る。

40

【図 5】

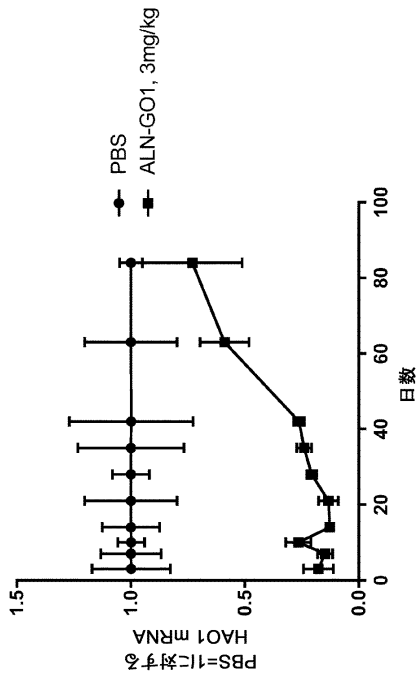


図 5

【図 6】

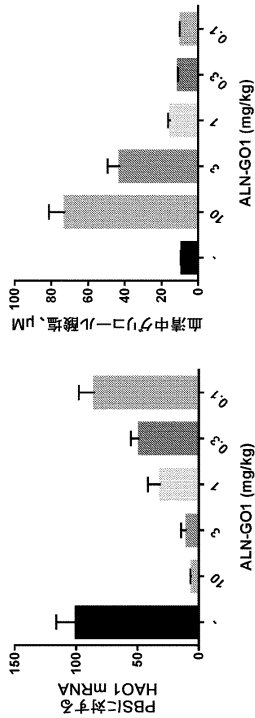
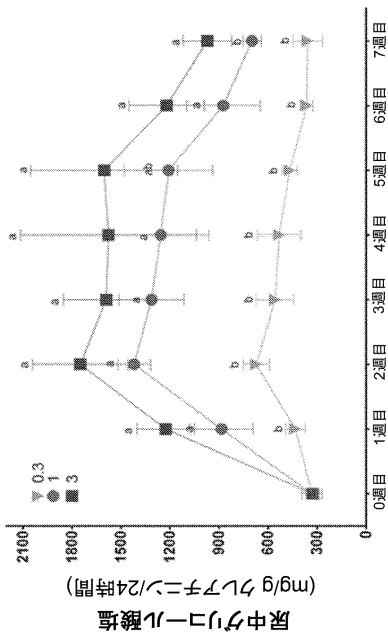


図 6

【図 7 - 1】



【図 7 - 2】

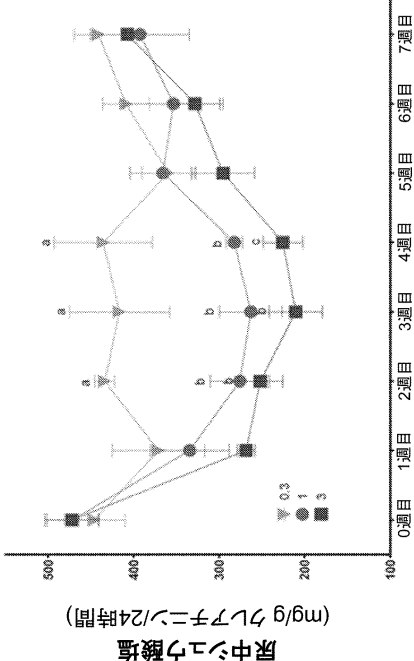


図 7 (続き)

図 7

10

20

30

40

50

【図 8 A】

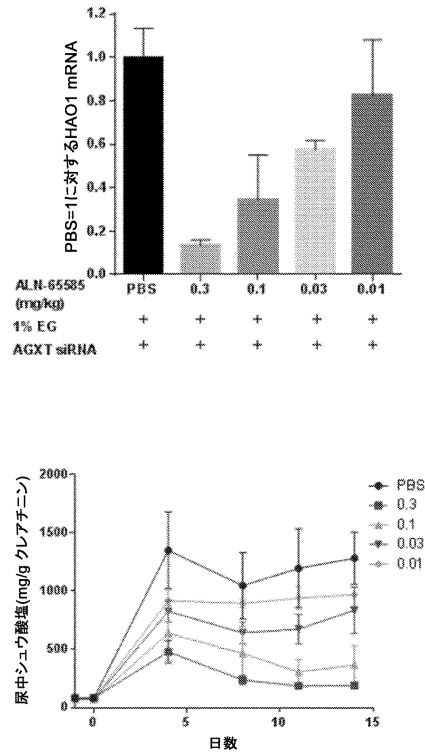


図 8A

【図 8 B】

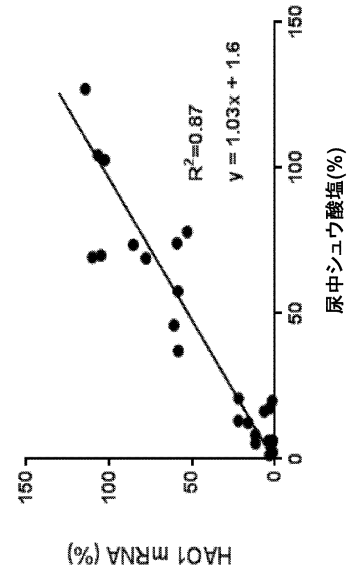


図 8B

【図 9】

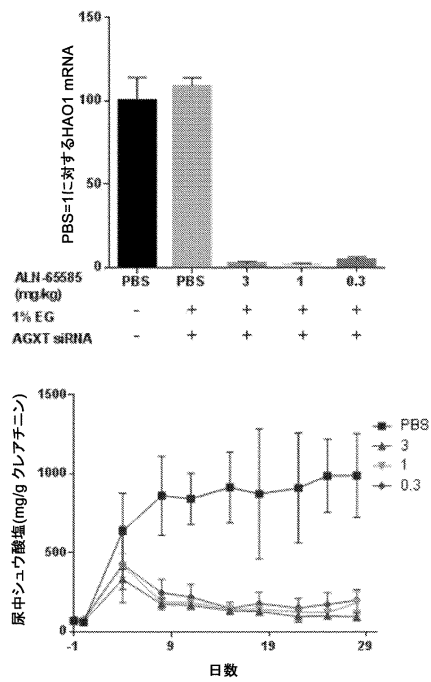


図 9

【図 10】

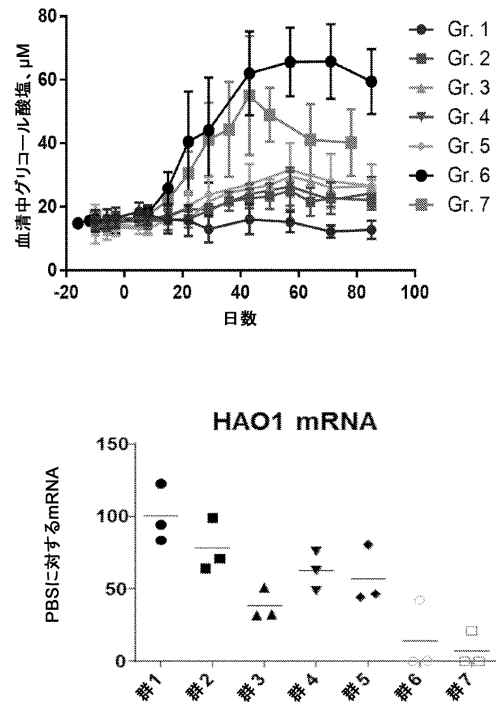


図 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

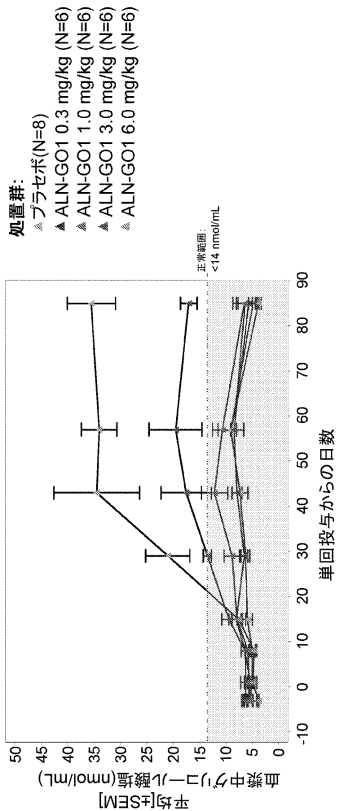


図 11

【図 1 2】

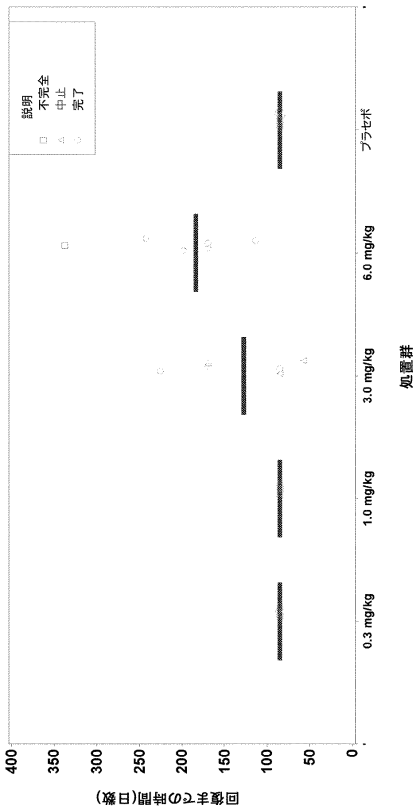


図 12

【図 1 3】

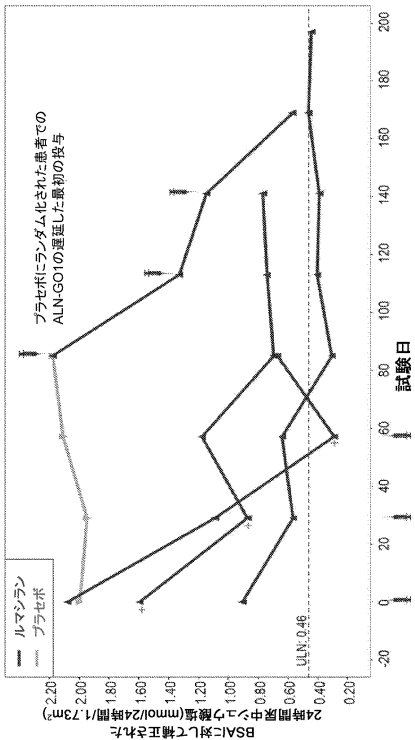


図 13

【図 1 4】

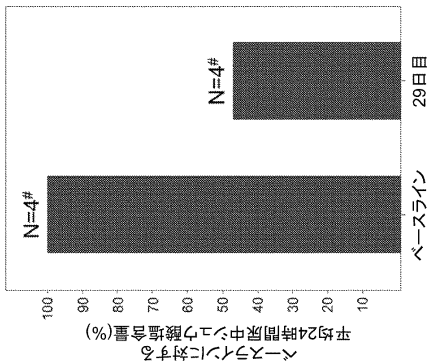


図 14

10

20

30

40

50

【 図 1 5 】

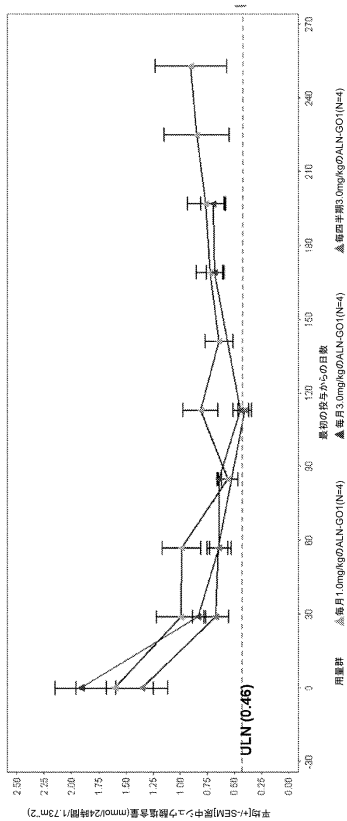


図 15

【 図 1 6 】

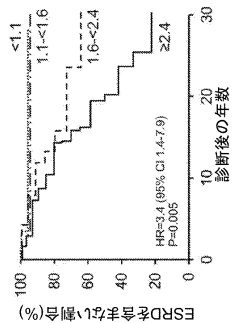


図 16

【 図 1 7 】

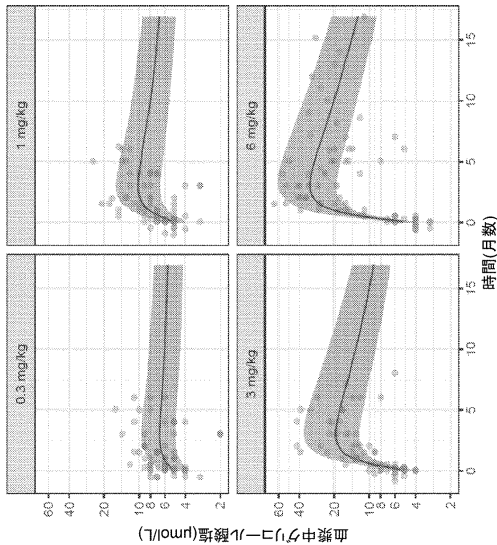


図 17

【 図 1 8 】

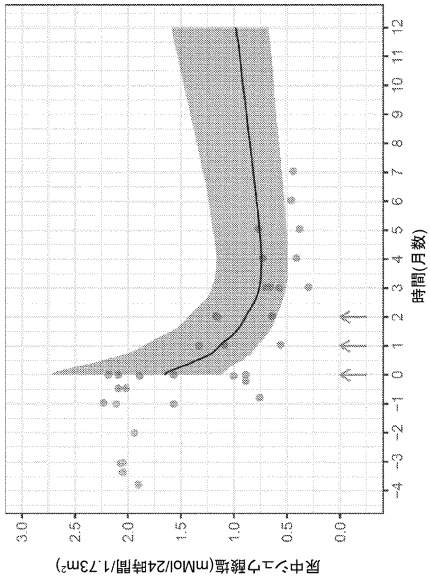


図 18

10

20

30

40

50

【図 19】

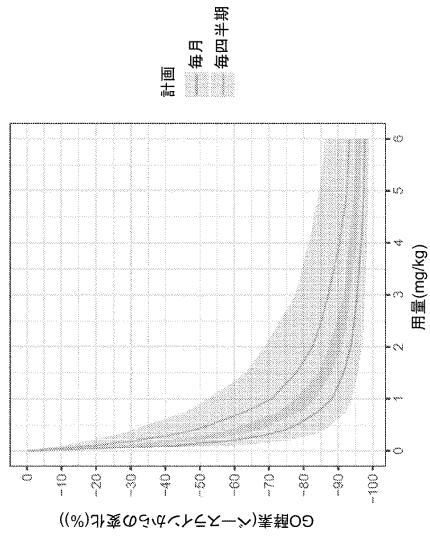


図19

【図 20】

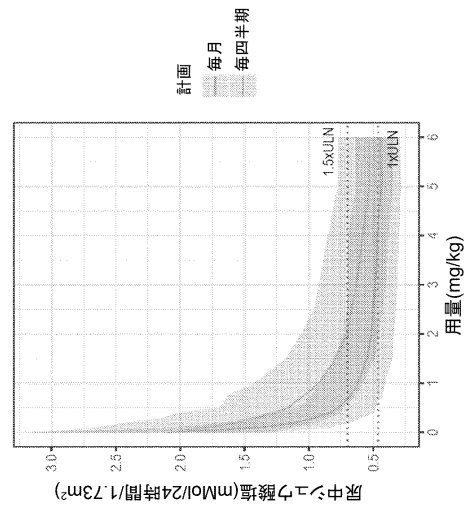


図20

【配列表】

0007337044000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/12 (2006.01)

A 6 1 K 47/12

A 6 1 K 47/42 (2017.01)

A 6 1 K 47/42

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/581,565

(32)優先日 平成29年11月3日(2017.11.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/682,020

(32)優先日 平成30年6月7日(2018.6.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 デイビッド・ブイ・アープ

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、アル
ナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 トレイシー・エル・マックレガー

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、アル
ナイラム・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 国際公開第2016/057893(WO, A1)

J. Am. Soc. Nephrol., Vol.28, 2017年02月, pp.494-503

J. Am. Chem. Soc., 2014年, Vol.136, pp.16958-16961

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)