

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5791505号
(P5791505)

(45) 発行日 平成27年10月7日(2015.10.7)

(24) 登録日 平成27年8月14日(2015.8.14)

(51) Int.Cl.

F 1

| | | | | | |
|--------|--------|-----------|--------|-------|---------|
| C 12 N | 15/113 | (2010.01) | C 12 N | 15/00 | Z N A G |
| C 12 N | 1/15 | (2006.01) | C 12 N | 1/15 | |
| C 12 N | 1/19 | (2006.01) | C 12 N | 1/19 | |
| C 12 N | 1/21 | (2006.01) | C 12 N | 1/21 | |
| C 12 N | 5/10 | (2006.01) | C 12 N | 5/00 | 1 O 1 |

請求項の数 30 (全 128 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2011-533279 (P2011-533279) |
| (86) (22) 出願日 | 平成21年10月20日(2009.10.20) |
| (65) 公表番号 | 特表2012-506254 (P2012-506254A) |
| (43) 公表日 | 平成24年3月15日(2012.3.15) |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2009/061381 |
| (87) 国際公開番号 | W02010/048228 |
| (87) 国際公開日 | 平成22年4月29日(2010.4.29) |
| 審査請求日 | 平成24年10月16日(2012.10.16) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/242,783 |
| (32) 優先日 | 平成21年9月15日(2009.9.15) |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/156,670 |
| (32) 優先日 | 平成21年3月2日(2009.3.2) |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) |

| | |
|-----------|---|
| (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 A L N Y L A M P H A R M A C E U T I C A L S, I N C. アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 142, ケンブリッジ, サード スト リート 300 |
| (74) 代理人 | 100081422 弁理士 田中 光雄 |
| (74) 代理人 | 100084146 弁理士 山崎 宏 |
| (74) 代理人 | 100122301 弁理士 富田 慎史 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスチレチンの発現を阻害するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスチレチン(T T R)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(d s R N A)であって、前記 d s R N A は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、トランスチレチン(T T R)をコードする m R N A の一部に相補的である領域を含み、前記相補性の領域は、19ヌクレオチド長であり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 170 を含み、かつ、前記 d s R N A の各々の鎖が、19、20、21、22、23または24ヌクレオチド長である、二本鎖リボ核酸(d s R N A)。

【請求項 2】

(a) 前記センス鎖は、配列番号 449 からなり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 450 からなり； 10

(b) 前記センス鎖は、配列番号 729 からなり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 730 からなり； または

(c) 前記センス鎖は、GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT(配列番号 1009)からなり、前記アンチセンス鎖は、AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT(配列番号 1010)からなり、ここで、u は2'-0-メチルウリジン-3'-リン酸であり、c は2'-0-メチルシチジン-3'-リン酸であり、dT は2'-デオキシチミジン-3'-リン酸である、

請求項 1 に記載の d s R N A 。

【請求項 3】

センス鎖が配列番号 169 を含む、請求項 1 に記載の d s R N A 。

【請求項 4】

請求項 1 または 3 に記載の d s R N A であって、
 (a) 配列番号 1 3 3 1 の 6 3 7 位のアデニンヌクレオチドと配列番号 1 3 3 1 の 6 3 8 位のグアニンヌクレオチドとの間で、 T T R の m R N A を切断しない；
 (b) 配列番号 1 3 3 1 の 6 3 6 位のグアニンヌクレオチドと配列番号 1 3 3 1 の 6 3 7 位のアデニンヌクレオチドとの間で、 T T R の m R N A を切断する；および / または
 (c) 配列番号 1 3 3 1 の 6 2 8 位のグアニンヌクレオチドと配列番号 1 3 3 1 の 6 4 6 位のウラシルヌクレオチドとの間で、 T T R の m R N A にアニール化される、
 d s R N A 。

【請求項 5】

前記 d s R N A は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の d s R N A 。

【請求項 6】

前記修飾ヌクレオチドの少なくとも 1 個は、 2 ' - O - メチル修飾ヌクレオチド、 5 ' - ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、コレステリル誘導体基またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される終端ヌクレオチド、 2 ' - デオキシ - 2 ' - フルオロ修飾ヌクレオチド、 2 ' - デオキシ - 修飾ヌクレオチド、ロックされたヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、 2 ' - アミノ - 修飾ヌクレオチド、 2 ' - アルキル - 修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミデート、およびヌクレオチドを含む非天然塩基の群から選択される、請求項 5 に記載の d s R N A 。

【請求項 7】

前記 d s R N A は、リガンドに共役される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の d s R N A 。

【請求項 8】

前記 d s R N A は、脂質製剤に製剤化される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の d s R N A 。

【請求項 9】

脂質ナノ粒子 (L N P) 製剤に製剤化される、請求項 8 に記載の d s R N A 。

【請求項 10】

L N P 製剤が (6 Z , 9 Z , 2 8 Z , 3 1 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 2 8 , 3 1 - テトラエン - 1 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (M C 3) を含む、請求項 9 に記載の d s R N A 。

【請求項 11】

L N P 製剤が (6 Z , 9 Z , 2 8 Z , 3 1 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 2 8 , 3 1 - テトラエン - 1 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (M C 3) 、 D S P C 、コレステロールおよび P E G - D M G を含む、請求項 10 に記載の d s R N A 。

【請求項 12】

L N P 製剤が 5 0 / 1 0 / 3 8 . 5 / 1 . 5 モル % の比で (6 Z , 9 Z , 2 8 Z , 3 1 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 2 8 , 3 1 - テトラエン - 1 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (M C 3) / D S P C / コレステロール / P E G - D M G を含む 、請求項 11 に記載の d s R N A 。

【請求項 13】

トランスチレチン (T T R) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) であって、前記 d s R N A は、配列番号 1 3 3 1 のヌクレオチド 6 2 8 ~ 6 4 6 の 1 9 ヌクレオチドに相補的な領域を含むアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 1 3 3 1 の 6 2 8 位でグアニンと塩基対形成し、かつ、前記 d s R N A の各々の鎖が、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 または 2 4 ヌクレオチド長である、二本鎖リボ核酸 (d s R N A) 。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の d s R N A の両方の鎖をコードするヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列を含む、ベクター。

【請求項 15】

(a) 請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の d s R N A を含有する；または

(b) 請求項 14 に記載のベクターを含む

細胞であって、ヒト内で形質転換された宿主細胞ではない、細胞。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の d s R N A または請求項 14 に記載のベクター、および薬剤として許容される担体を含む、T T R 遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物。

【請求項 17】

細胞内の T T R 発現をインビトロで阻害する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の d s R N A または請求項 14 に記載のベクターと前記細胞をインビトロで接触させることと、

(b) T T R 遺伝子の m R N A 転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ (a) において產生された前記細胞を維持し、それによって前記細胞内の前記 T T R 遺伝子の発現を阻害することと、を含むが、但し、ヒトまたは動物体の治療によるいかなる方法も除かれる、方法。

【請求項 18】

ヒトにおける T T R 発現によって媒介された障害の治療のための、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の d s R N A または請求項 14 に記載のベクターを含む医薬組成物。

【請求項 19】

障害がトランスクレチンアミロイドーシスである、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

障害が、家族性アミロイド神経障害 (F A P)、家族性アミロイド心筋症 (F A C)、髄膜 / C N S アミロイドーシス、老年性全身アミロイドーシス (S S A) および老年性心アミロイドーシス (S C A) からなる群より選択される、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

障害が家族性アミロイド神経障害 (F A P) である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記 d s R N A が、0 . 0 1 、0 . 1 、0 . 3 、0 . 5 、1 . 0 、2 . 5 、または 5 . 0 m g / k g で前記ヒトに投与される、請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記 d s R N A が、0 . 1 ~ 1 m g / k g で前記ヒトに投与される、請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 24】

前記 d s R N A が、0 . 2 ~ 1 . 5 m g / k g で前記ヒトに投与される、請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 25】

前記 d s R N A が、0 . 3 ~ 0 . 5 m g / k g で前記ヒトに投与される、請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記 d s R N A が、0 . 3 m g / k g で前記ヒトに投与される、請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 27】

前記ヒトが、T T R アミロイドーシスを治療するための別の治療方法をさらに受けている、請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 28】

前記さらなる治療方法が、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシ

10

20

30

40

50

ン受容体遮断薬、透析療法および肝臓移植からなる群より選択される、請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 29】

前記 d s R N A が、1、2、3 もしくは 4 週間を超えない間隔で前記ヒトに投与される、請求項 18 ~ 28 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記 d s R N A が、静脈内に、または静脈内注入によって投与される、請求項 18 ~ 29 のいずれかに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、トランスチレチン (TTR) 遺伝子を標的とする二本鎖リボ核酸 (d s R N A)、および TTR の発現を阻害するための d s R N A を使用する方法に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本願は、2008年10月20日出願の米国仮出願第 61 / 106,956 号、および 2008 年 11 月 18 日出願の米国仮出願第 61 / 115,738 号、および 2009 年 3 月 2 日出願の米国仮出願第 61 / 156,670 号、および 2009 年 6 月 9 日出願の米国仮出願第 61 / 185,545 号、および 2009 年 9 月 15 日出願の米国仮出願第 61 / 242,783 号、および 2009 年 9 月 22 日出願の米国仮出願第 61 / 244,794 号の利益を主張し、それらの全ては、全ての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0003】

配列表への言及

本願は、2009 年 _____ に作成された、_____ バイトの大きさで、_____. t x t と名づけられたテキストファイルとして、電子的に提出された配列表を含む。該配列表は、参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

トランスチレチン (TTR) は、分泌された甲状腺ホルモン結合タンパク質である。TTR は、血漿および脳脊髄液中のレチノール結合タンパク質 (RBP) / ビタミン A、および血清チロキシン (T4) に結合し、輸送する。

30

【0005】

通常配列の TTR および変異配列 TTR は共に、アミロイドーシスを引き起こす。通常配列の TTR は、高齢者における心アミロイドーシスを引き起こし、これは老年性全身アミロイドーシス (SSA) (老年性心アミロイドーシス (SCA) とも呼ばれる) と称される。SSA は、しばしば、多くの他の器官において、微細な沈着物を伴う。TTR の変異は、TTR のアミロイド形成の過程を加速し、臨床的意義のある TTR アミロイドーシス (ATTR (アミロイドーシス - トランスチレチン型) とも呼ばれる) の発症に対する最も重要な危険因子である。85 個以上のアミロイド生成性 TTR 変異体が、全身家族性アミロイドーシスを引き起こすことが知られる。肝臓は、TTR の発現の主要部位である。発現の他の重要な部位には、脈絡叢、網膜、および脾臓が含まれる。

40

【0006】

TTR アミロイドーシスは、種々の形態で現れる。末梢神経系が、さらに著しく影響を受ける場合、該疾患は、家族性アミロイド神経障害 (FAP) と称される。心臓が主に関与するが、神経系は関与しない場合、該疾患は、家族性アミロイド心筋症 (FAC) と称される。TTR アミロイドーシスの第 3 の主要型は、髄膜 / CNS (中秋神経系) アミロイドーシスと称される。

【0007】

二本鎖 R N A 分子 (d s R N A) が、R N A 干渉 (R N A i) として知られる、高度に

50

保存された調節機序で遺伝子発現を遮断することが示されている。国際公開WO第99/32619号(Fireら)は、線虫における遺伝子の発現を阻害するための、少なくとも25ヌクレオチド長のdsRNAの使用を開示している。また、dsRNAは、植物(例えば、国際公開WO第99/53050号、Waterhouseら、および国際公開WO第99/61631号、Heifetzらを参照)、ショウジョウバエ(例えば、Yang, D., et al., Curr. Biol. (2000) 10: 1191-1200を参照)、ならびに哺乳動物(国際公開WO第00/44895号、Limmer、および独国特許DE第101 00 586.5号、Kreutzerらを参照)を含む、他の生物において標的RNAを分解することが示されている。

【0008】

10

米国特許第20070207974号は、機能性および過機能性siRNAを開示する。米国特許第20090082300号は、TTTRを対象とするアンチセンス分子を開示する。米国特許第7,250,496号は、TTTRを対象とするミクロRNAを開示する。

【発明の概要】

【0009】

20

一実施形態において、本発明は、トランスチレチン(TTTR)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)を提供し、前記dsRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、トランスチレチン(TTTR)をコードするmRNAの一部に相補的である領域を含み、該相補性の領域は、30ヌクレオチド長未満であり、該アンチセンス鎖は、配列番号170、配列番号450、配列番号730、または配列番号1010の15個以上の連続するヌクレオチドを含む。関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号169、配列番号449、配列番号729、または配列番号1009の15個以上の連続するヌクレオチドを含む。なお別の関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号449からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号450からなる。なお別の関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号729からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号730からなる。さらに別の関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号1009からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号1010からなる。なお別の関連実施形態において、該dsRNAは、表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択されるセンス鎖と、表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択されるアンチセンス鎖と、を含む。

30

【0010】

ある実施形態において、該dsRNAの該アンチセンス鎖とトランスチレチンをコードする該mRNAとの間の該相補性の領域は、19ヌクレオチド長である。別の実施形態において、該相補性の領域は、配列番号169からなる。他の実施形態において、該dsRNAのそれぞれの鎖は、19、20、21、22、23、または24ヌクレオチド長である。さらに別の実施形態において、それぞれの鎖は、21ヌクレオチド長である。

【0011】

40

ある実施形態において、トランスチレチンの発現を阻害するための該dsRNAは、配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドと配列番号1331の638位のグアニンヌクレオチドとの間で、TTTRのmRNAを切断しない。他の実施形態において、該dsRNAは、配列番号1331の636位のグアニンヌクレオチドと配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドとの間で、TTTRのmRNAを切断する。ある実施形態において、該dsRNAは、配列番号1331の628位のグアニンヌクレオチドと配列番号1331の646位のウラシルヌクレオチドとの間で、TTTRのmRNAにアニール化する。

【0012】

さらに他の関連実施形態において、本発明は、トランスチレチンの発現を阻害するための上記のdsRNAを提供し、該dsRNAは、1個以上の修飾ヌクレオチドを含む。関連実施形態において、少なくとも1個の修飾ヌクレオチド(またはヌクレオチド)は、2

50

' - O - メチル修飾ヌクレオチド、5' - ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、およびコレステリル誘導体基またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される終端ヌクレオチドからなる群から選択される。別の関連実施形態において、該修飾ヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、2' - デオキシ - 修飾ヌクレオチド、ロックされたヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2' - アミノ - 修飾ヌクレオチド、2' - アルキル - 修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミデート、およびヌクレオチドを含む非天然塩基の群から選択される。ある実施形態において、該 d s RNA は、少なくとも 1 個の 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0013】

他の実施形態において、トランスチレチンの発現を阻害するための上記の d s RNA は、リガンドに共役されるか、または脂質製剤に製剤化される。ある実施形態において、該脂質製剤は、LNP 製剤、LNP01 製剤、XTC-SNALP 製剤、または SNALP 製剤に製剤化される。関連実施形態において、該 XTC-SNALP 製剤は、以下のとおりである：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 (XTC) を、57.1 / 7.1 / 34.4 / 1.4 の比の XTC / DPPC / コレステロール / PEG - cDMA と、約 7 : 1 の比の脂質 : siRNA で使用する。さらに他の関連実施形態において、該 d s RNA の該センス鎖は、配列番号 1009 からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号 1010 からなり、該 d s RNA は、以下のように XTC - SNALP 製剤に製剤化される：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 (XTC) を、57.1 / 7.1 / 34.4 / 1.4 の比の XTC / DPPC / コレステロール / PEG - cDMA、および約 7 : 1 の比の脂質 : siRNA で使用する。代替として、上記のもの等の d s RNA は、以下のように LNP09 製剤に製剤化され得る：50 / 10 / 38.5 / 1.5 モル% の比で、XTC / DSPC / Chol / PEG₂₀₀₀ - C14 および約 11 : 1 の比の脂質 : siRNA を使用する。別の変形において、該 d s RNA は、以下のように LNP11 製剤に製剤化される：50 / 10 / 38.5 / 1.5 モル% の比で、MC3 / DSPC / Chol / PEG₂₀₀₀ - C14 および約 11 : 1 の比の脂質 : siRNA 比を使用する。さらに別の実施形態において、該 d s RNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、PBS 対照群と比較して、0.3 mg / kg の用量で、TTR の mRNA レベルを約 85 ~ 90 % 低下させる。なお別の実施形態において、該 d s RNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、PBS 対照群と比較して、0.1 mg / kg の用量で、TTR の mRNA レベルを約 50 % 低下させる。なお別の実施形態において、該 d s RNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、ウエスタンプロットによって測定して、PBS 対照群と比較して、用量依存的な様式で、TTR のタンパク質レベルを低下させる。なお別の実施形態において、該 d s RNA は、以下のように SNALP 製剤に製剤化される：DLinDMA を、57.1 / 7.1 / 34.4 / 1.4 の比の DLinDMA / DPPC / コレステロール / PEG2000 - cDMA と、約 7 : 1 の比の脂質 : siRNA で使用する。

【0014】

ある実施形態において、本発明は、トランスチレチンの発現を阻害するための、上記のもの等の d s RNA を提供し、細胞への該 d s RNA の投与は、リアルタイム PCR アッセイによって測定して、TTR の mRNA 発現の約 95 % の阻害をもたらし、該細胞は、HepG2 細胞または Hep3B 細胞であり、該 d s RNA の濃度は、10 nM である。関連実施形態において、細胞への該 d s RNA の投与は、分岐 DNA アッセイによって測定して、TTR の mRNA 発現の約 74 % の阻害をもたらし、該細胞は、HepG2 細胞または Hep3B 細胞であり、該 d s RNA の濃度は、10 nM である。他の関連実施形態において、該 d s RNA は、HepG2 細胞内で、10 pM 未満の IC50 を有し、該 d s RNA の濃度は、10 nM である。さらに他の関連実施形態において、該 d s RNA は、約 1 mg / kg の ED50 を有する。さらに他の関連実施形態において、該 d s RNA の投与は、カニクイザルの肝臓中の TTR の mRNA を約 80 % 低下させ、該 d s RNA

10

20

30

40

50

Aの濃度は、3 mg / kgである。さらに他の関連実施形態において、該d s RNAの投与は、IFN-αおよびTNF-αELISAアッセイによって測定して、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)内の免疫刺激活性をもたらさない。さらに他の関連実施形態において、該d s RNAの投与は、肝臓TTRのmRNAレベルを約97%、または血清TTRのタンパク質レベルを約90%低下させ、該d s RNAの濃度は、6 mg / kgである。さらに他の関連実施形態において、該d s RNAの投与は、肝臓TTRのmRNAレベルおよび/または血清TTRのタンパク質レベルを最長22日間低下させ、該d s RNAの濃度は、6 mg / kgまたは3 mg / kgである。さらに他の関連実施形態において、該d s RNAは、それを必要とする対象に、1 mg / kgまたは3 mg / kgで投与する時に、血清TTRのタンパク質レベルを、処置後14日目まで抑制する。さらに他の関連実施形態において、該d s RNAは、リアルタイムPCRによって測定して、0.1 nMの濃度で、Hep3B細胞内のTTRの発現を98.9%低下させる。さらに他の関連実施形態において、該d s RNAは、リアルタイムPCRによって測定して、10 nMの濃度で、Hep3B細胞内のTTRの発現を99.4%低下させる。

【0015】

他の実施形態において、本発明は、トランスチレチン(TTR)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(d s RNA)を提供し、前記d s RNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、トランスチレチン(TTR)をコードするmRNAの一部に相補的である領域を含み、前記相補性の領域は、30ヌクレオチド長未満であり、該d s RNAは、表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択されるセンス鎖と、表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択されるアンチセンス鎖と、を含む。

【0016】

別の実施形態において、本発明は、トランスチレチン(TTR)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(d s RNA)を提供し、前記d s RNAは、配列番号1331のヌクレオチド618～648のうちの15～30ヌクレオチドに相補的な領域を含む、アンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号1331の628位でグアニンと塩基対形成する。

【0017】

ある実施形態において、本発明は、上記の発明の概要に記載のd s RNAのうちのいずれかを含有する細胞を提供する。ある他の実施形態において、本発明は、上記の発明の概要に記載のd s RNAのうちのいずれかの少なくとも1本の鎖をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。ある実施形態において、該ベクターは、細胞内にある。

【0018】

他の実施形態において、本発明は、上記の発明の概要に記載のd s RNAのうちのいずれか、および薬剤として許容される担体を含むTTR遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物を提供する。関連実施形態において、本発明は、d s RNAおよびSNALP製剤を含むTTR遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物を提供し、該d s RNAは、30ヌクレオチド長未満のアンチセンス鎖を含み、配列番号170、配列番号450、配列番号730、または配列番号1010の15個以上の連続するヌクレオチドを含み、該SNALP製剤は、57.1/7.1/34.4/1.4の比で、それぞれ、DlinDMA、DPGPC、コレステロール、およびPEG2000-cDMAを含む。

【0019】

なお別の実施形態において、本発明は、細胞内のTTRの発現を阻害する方法を提供し、該方法は、(a)上記の発明の概要に記載のd s RNAのいずれかと該細胞を接触させることと、(b)TTR遺伝子のmRNA転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ(a)において産生された該細胞を維持し、それによって、該細胞内の該TTR遺伝子の発現を阻害することと、を含む。

【0020】

なお別の実施形態において、本発明は、TTRの発現によって媒介された障害を治療す

10

20

30

40

50

る方法であって、かかる治療を必要とするヒトに治療上有効な量の、上記の発明の概要に記載される d s R N A のいずれかを投与することを含む、方法を提供する。関連実施形態において、該 d s R N A は、約 0 . 0 1 、 0 . 1 、 0 . 5 、 1 . 0 、 2 . 5 、または 5 . 0 m g / k g で、該ヒトに投与される。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A は、約 1 . 0 m g / k g で、該ヒトに投与される。なお別の関連実施形態において、処置される該ヒトは、トランスクレチニアミロイドーシス、および / または肝臓疾患に罹患する。関連実施形態において、該ヒトは、肝臓移植をさらに提供される。なお別の実施形態において、該 d s R N A の投与は、ヒト肝臓中の T T R の m R N A を約 8 0 % 低下させ、該 d s R N A の濃度は、 3 m g / k g である。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A の投与は、 I F N - α および T N F - E L I S A アッセイによって測定して、該ヒトにおいて、免疫刺激活性をもたらさない。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A の投与は、肝臓 T T R の m R N A レベルを約 9 7 % 、または血清 T T R のタンパク質レベルを約 9 0 % 低下させ、該 d s R N A の濃度は、 6 m g / k g である。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A の投与は、肝臓 T T R の m R N A レベルおよび / または血清 T T R のタンパク質レベルを、最長 2 2 日間低下させ、該 d s R N A の濃度は、 6 m g / k g または 3 m g / k g である。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A は、以下のように L N P 0 9 製剤に製剤化される： 5 0 / 1 0 / 3 8 . 5 / 1 . 5 モル % の比で、 X T C / D S P C / C h o l / P E G ₂₀₀₀ - C 1 4 および約 1 1 : 1 の比の脂質 : s i R N A を使用する。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A は、以下のように L N P 1 1 製剤に製剤化される： 5 0 / 1 0 / 3 8 . 5 / 1 . 5 モル % の比で、 M C 3 / D S P C / C h o l / P E G ₂₀₀₀ - C 1 4 および約 1 1 : 1 の比の脂質 : s i R N A を使用する。さらに別の関連実施形態において、該 d s R N A は、 L N P 0 9 製剤または L N P 1 1 製剤に製剤化され、 P B S 対照群と比較して、 0 . 3 m g / k g の用量で、 T T R の m R N A レベルを約 8 5 ~ 9 0 % 低下させる。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A は、 L N P 0 9 製剤または L N P 1 1 製剤に製剤化され、 P B S 対照群と比較して、 0 . 1 m g / k g の用量で、 T T R の m R N A レベルを約 5 0 % 低下させる。さらに別の関連実施形態において、該 d s R N A の投与は、ヒトに、 1 m g / k g または 3 m g / k g で投与する時に、血清 T T R のタンパク質レベルを、処置後 1 4 日目まで抑制する。さらに別の関連実施形態において、該 d s R N A は、以下のように S N A L P 製剤に製剤化される： D l i n D M A を、 5 7 . 1 / 7 . 1 / 3 4 . 4 / 1 . 4 の比の D l i n D M A / D P P C / コレステロール / P E G ₂₀₀₀ - c D M A で、および約 7 : 1 の比の脂質 : s i R N A 比で使用する。

【 0 0 2 1 】

別の実施形態において、本発明は、 T T R の発現によって媒介された障害を治療するための d s R N A の使用であって、かかる治療を必要とするヒトに、治療上有効な量の、上記の発明の概要に記載される d s R N A のいずれかを投与することを含む、使用を提供する。関連実施形態において、該 d s R N A は、約 0 . 0 1 、 0 . 1 、 0 . 5 、 1 . 0 、 2 . 5 、または 5 . 0 m g / k g で、該ヒトに投与される。特定の関連実施形態において、該 d s R N A は、約 1 . 0 m g / k g で、該ヒトに投与される。別の関連実施形態において、該ヒトは、トランスクレチニアミロイドーシス、および / または肝臓疾患に罹患する。本発明によって提供される使用のなお別の実施形態において、該処置されたヒトは、肝臓移植をさらに提供される。

【 0 0 2 2 】

なお別の実施形態において、本発明は、細胞内の T T R の発現を阻害するための方法において、 d s R N A の使用を提供し、該方法は、(a) 上記の発明の概要に記載の d s R N A と該細胞を接触させることと、(b) T T R 遺伝子の m R N A 転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ(a)において產生された該細胞を維持し、それによって、該

細胞内の該 TTR 遺伝子の発現を阻害することと、が含まれる。

【0023】

本発明の 1 つ以上の実施形態の詳細は、以下の説明に説明される。本発明の他の特長、目的、利点は、説明および図面から、および特許請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図 1】TTR の siRNA での形質移入後、培養したヒト PBMC における、TNF および IFN レベルのグラフである。

【図 2】図 2A および 2B は HepG2 細胞内の AD - 18324 および AD - 18328 のそれぞれにおける用量反応曲線である。

10

【図 3】HepG2 細胞内の AD - 18246 における用量反応曲線である。

【図 4 A】LNP01 に製剤化された TTR - dsRNA (AD - 18324、AD - 18328、および AD - 18246) の静脈内ボーラス投与による、遺伝子導入 H129 - mTTR - KO / iNOS - KO / hTTR マウスにおける、肝臓 mRNA および血漿タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。

【図 4 B】LNP01 に製剤化された TTR - dsRNA (AD - 18324、AD - 18328、および AD - 18246) の静脈内ボーラス投与による、遺伝子導入 H129 - mTTR - KO / iNOS - KO / hTTR マウスにおける、肝臓 mRNA および血漿タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。

【図 5】SNALP に製剤化された TTR - dsRNA (AD - 18324 および AD - 18328) の 15 分間の静脈内注入後の非ヒト靈長類の肝臓中の TTR の mRNA レベルの測定の概要を示すグラフである。

20

【図 6 A】SNALP - 18328 の静脈内ボーラス投与による遺伝子導入マウスにおける、ヒト V30M TTR 肝臓 mRNA および血清タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。群平均が決定され、PBS 対照群に対して正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。PBS と比較した、群平均の低下の割合 (%) が、SNALP - 1955 および SNALP - 18328 群に対して示される。 (* * * p < 0.001、一元配置 ANOVA および Dunn の事後検定)

【図 6 B】SNALP - 18328 の静脈内ボーラス投与による遺伝子導入マウスにおける、ヒト V30M TTR 肝臓 mRNA および血清タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。群平均が決定され、PBS 対照群に対して正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。PBS と比較した、群平均の低下の割合 (%) が、SNALP - 1955 および SNALP - 18328 群に対して示される。 (* * * p < 0.001、一元配置 ANOVA および Dunn の事後検定)

30

【図 7 A】SNALP - 18328 の単回静脈内ボーラス投与から 22 日にわたる、遺伝子導入マウスにおける、ヒト V30M TTR 肝臓 mRNA および血清タンパク質レベルのそれぞれの低下の持続性を示す。群平均を決定した。TTR / GAPDH の mRNA レベルは、0 日目のレベルに正規化され、プロットされた。各時点における SNALP - 1955 と比較して、正規化された TTR の mRNA レベルの割合の低下が、算出され、SNALP - 18328 群に対して示される。 (* * * p < 0.001、一元配置 ANOVA および Dunn の事後検定)

40

【図 7 B】SNALP - 18328 の単回静脈内ボーラス投与から 22 日にわたる、遺伝子導入マウスにおける、ヒト V30M TTR 肝臓 mRNA および血清タンパク質レベルのそれぞれの低下の持続性を示す。群平均を決定した。TTR / GAPDH の mRNA レベルは、0 日目のレベルに正規化され、プロットされた。各時点における SNALP - 1955 と比較して、正規化された TTR の mRNA レベルの割合の低下が、算出され、SNALP - 18328 群に対して示される。 (* * * p < 0.001、一元配置 ANOVA および Dunn の事後検定)

【図 8】SNALP - 18328 の 15 分間の単回静脈内注入から 14 日にわたる、非ヒト靈長類における、TTR の血清タンパク質レベルの時間経過を示す。

50

【図9】S N A L P - 1 8 3 2 8の静脈内ボーラス投与後の、ヒトV 3 0 M T T R / H S F - 1 ノックアウトマウスの種々の組織中のT T R - 免疫反応性の低下を示す。E:食道；S:胃；I 1:腸／十二指腸；I 4:腸／結腸；N:神経；D:後根神経節。

【図10】X T C - S N A L P - 1 8 3 2 8の15分間の単回静脈内注入後の、非ヒト靈長類の肝臓中のT T Rのm R N Aレベルの測定値を示す。

【図11A】L N P 0 9 - 1 8 3 2 8またはL N P 1 1 - 1 8 3 2 8の15分間の静脈内注入後の、非ヒト靈長類の肝臓中のT T Rのm R N Aおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの測定値を示す。

【図11B】L N P 0 9 - 1 8 3 2 8またはL N P 1 1 - 1 8 3 2 8の15分間の静脈内注入後の、非ヒト靈長類の肝臓中のT T Rのm R N Aおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの測定値を示す。10

【図11C】P B S対照群と比較した時の、0.3mg/kgのL N P 0 9 - 1 8 3 2 8の15分間の静脈内注入から28日間にわたる、T T Rの血清タンパク質レベルの時間経過を示す。

【図12】ヒトT T Rのm R N Aの配列（参照配列N M _ 0 0 0 3 7 1 . 3、配列番号1331）を示す。

【図13】ヒトおよびラットT T Rのm R N Aのそれぞれの配列である。図13Aは、ヒトT T Rのm R N Aの配列（参照配列N M _ 0 0 0 3 7 1 . 2、配列番号1329）である。図13Bは、ラットT T Rのm R N Aの配列（参照配列N M _ 0 1 2 6 8 1 . 1、配列番号1330）である。20

【図14】N M _ 0 0 0 3 7 1 . 3、N M _ 0 0 0 3 7 1 . 2、およびA D - 1 8 3 2 8のスクレオチドアライメントを示す。

【図15】家族性アミロイド神経障害、家族性アミロイド心筋症、およびC N Sアミロイドーシスと関連するT T Rにおける、症状および変異を図示する。

【図16】異なるT T Rの注入継続時間での、S N A L P - 1 8 5 3 4を用いた肝臓における、m R N Aレベルの低下を示す。動物群（n = 4 / 群）は、15分間、または1、2、または3時間の注入を介して1mg/kgのS N A L P - 1 8 5 3 4を投与した。48時間後、ラットは、安樂死させ、肝臓が採集された。T T RおよびG A P D Hのm R N Aレベルが、Q u a n t i g e n e b D N Aアッセイを使用して、肝臓溶解物から測定された。T T Rのm R N AレベルとG A P D Hのm R N Aレベルとの比が、各動物について算出された。群平均が決定され、P B S対照群に正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。（*** p < 0.001、P B Sと比較した、一元配置A N O V AおよびB o n f e r r o n iの事後検定）30

【図17】L N P 0 7 - 1 8 5 3 4またはL N P 0 8 - 1 8 5 3 4の15分にわたる静脈内注入後の、ラットの肝臓中のT T Rのm R N Aレベルの測定値を示す。

【図18】L N P 0 9 - 1 8 5 3 4またはL N P 1 1 - 1 8 5 3 4の15分にわたる静脈内注入後の、S p r a g u e - D a w l e yラットの肝臓中の内因性T T Rのm R N Aレベルのインビボ阻害を示す。動物群（n = 4 / 群）は、15分間の注入を介して、0.01、0.03、0.1、または0.3mg/kgのL N P 0 9 - 1 8 5 3 4、L N P - 1 1 - 1 8 5 3 4、またはP B Sを静脈内に投与した。48時間後、動物は、安樂死させ、肝臓を採集した。T T RおよびG A P D Hのm R N Aレベルを、Q u a n t i g e n e b D N Aアッセイを使用して、肝臓生検の溶解物から測定した。T T Rのm R N AレベルとG A P D Hのm R N Aレベルとの比が、各動物について算出された。群平均が決定され、P B S対照群に対して正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。40

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 5】

本発明は、d s R N A、およびd s R N AがT T R遺伝子を標的とする、細胞または哺乳動物における、T T R遺伝子の発現を阻害するためのd s R N Aを使用する方法を提供する。本発明はまた、T T R遺伝子の発現によって引き起こされる、哺乳動物における、50

TTRアミロイドーシス等の病態および疾患を治療するための、組成物および方法も提供する。dsRNAは、RNA干渉(RNAi)として知られる過程を通じてmRNAの配列に特異的な分解を導く。

【0026】

本明細書で取り上げられる組成物のdsRNAは、30ヌクレオチド長未満、一般に、19～24ヌクレオチド長である、領域を有するRNA鎖(アンチセンス鎖)を含み、TTR遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である。これらのdsRNAの使用は、哺乳動物における、TTRの発現に関連する病理学に関する遺伝子のmRNAの標的化分解を可能にする。特に、TTRのdsRNAの非常に低い投薬量は、特異的かつ効率的にRNAiを媒介することができ、TTR遺伝子の発現の著しい阻害をもたらす。細胞に基づくアッセイを用いて、本発明者は、TTRを標的とするdsRNAが、RNAiを特異的かつ効率的に媒介することができ、TTR遺伝子の発現の著しい阻害をもたらす事を実証した。したがって、これらのdsRNAを含む方法および組成物は、肝臓疾患またはTTRアミロイドーシス、例えば、FAPの治療において等、TTRを下方調節することによって媒介され得る病理過程を治療するのに有用である。10

【0027】

TTRのdsRNAを含有する方法および組成物は、TTRアミロイドーシス等のTTRの発現によって媒介される病理過程を治療するのに有用である。1つの実施形態において、TTRの発現によって媒介される障害を治療する方法には、TTRを標的とした、治療上有効な量のdsRNAを、かかる処置を必要とするヒトに投与することが含まれる。20
1つの実施形態において、dsRNAは、約0.01、0.1、0.5、1.0、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25mg/kgで、ヒトに投与される。

【0028】

以下の詳細な説明は、TTR遺伝子の発現を阻害するための、dsRNAを含有する組成物の作製方法および使用方法、ならびにこの遺伝子の発現によって引き起こされる疾患および障害を治療するための、組成物および方法を開示する。本発明で取り上げられる医薬組成物は、薬剤として許容される担体と共に、30ヌクレオチド長未満、一般に19～24ヌクレオチド長であり、TTR遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を含むアンチセンス鎖を有するdsRNAを含む。また、本発明で取り上げられる医薬組成物は、30ヌクレオチド長未満、一般に19～24ヌクレオチド長であり、TTR遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を有するアンチセンス鎖を有するdsRNAも含む。30

【0029】

dsRNAのセンス鎖は、配列番号169、配列番号449、配列番号729、または配列番号1009の15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含むことができる。dsRNAのアンチセンス鎖は、配列番号170、配列番号450、配列番号730、または配列番号1010の15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含むことができる。40
1つの実施形態において、dsRNAのセンス鎖は、配列番号449またはそのフラグメントからなり得、該アンチセンス鎖は、配列番号450またはそのフラグメントからなり得る。1つの実施形態において、dsRNAのセンス鎖は、配列番号729またはそのフラグメントからなり得、該アンチセンス鎖は、配列番号730またはそのフラグメントからなり得る。1つの実施形態において、dsRNAのセンス鎖は、配列番号1009またはそのフラグメントからなり得、該アンチセンス鎖は、配列番号1010またはそのフラグメントからなり得る。

【0030】

1つの実施形態において、dsRNAは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の修飾ヌクレオチドを含むことができる。1つの実施形態50

において、修飾ヌクレオチドは、2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、5' - ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、および / またはコレステリル誘導体基またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される終端ヌクレオチドを含むことができる。1つの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、2' - デオキシ - 修飾ヌクレオチド、ロックされたヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、2' - アミノ - 修飾ヌクレオチド、2' - アルキル - 修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミデート、および / またはヌクレオチドを有する非天然塩基を含むことができる。

【0031】

1つの実施形態において、d s RNAの該相補性の領域は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上のヌクレオチド長である。1つの実施形態において、該相補性の領域は、配列番号169の10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含む。

【0032】

1つの実施形態において、d s RNAのそれぞれの鎖は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、またはそれ以上のヌクレオチド長である。1つの実施形態において、該d s RNAは、表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択される、センス鎖、または10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは21個のそのヌクレオチドフラグメント、ならびに表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択される、アンチセンス鎖、または10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは21個のそのヌクレオチドフラグメントを含む。

【0033】

1つの実施形態において、細胞へのd s RNAの投与は、リアルタイムPCRアッセイによって測定して、TTTのmRNA発現の約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞へのd s RNAの投与は、リアルタイムPCRアッセイによって測定して、TTTのmRNA発現の約40%～45%、45%～50%、50%～55%、55%～60%、60%～65%、65%～70%、70%～75%、75%～80%、80%～85%、85%～90%、90%～95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞へのd s RNAの投与は、分岐DNAアッセイによって測定して、TTTのmRNA発現の約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞へのd s RNAの投与は、分岐DNAアッセイによって測定して、TTTのmRNA発現の約40%～45%、45%～50%、50%～55%、55%～60%、60%～65%、65%～70%、70%～75%、75%～80%、80%～85%、85%～90%、90%～95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。

【0034】

1つの実施形態において、d s RNAは、0.01pM、0.1pM、1pM、5pM、10pM、100pM、または1000pM未満のIC50を有する。1つの実施形態において、d s RNAは、約0.01、0.1、1、5、または10mg/kgのED50を有する。

【0035】

1つの実施形態において、d s RNAの投与は、カニクイザルにおける、TTTのmRNAを約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、またはそれ以上低下させることができる。1つの実施形態において、d s RNAの投与は、肝臓TTTのmRNAレベルを、約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上、また

10

20

30

40

50

は血清 TTR のタンパク質レベルを、約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベル、および / または血清 TTR のタンパク質レベルを最長 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 日、もしくはそれ以上の日数、低下させる。

【0036】

1つの実施形態において、dsRNA は、LNP 製剤に製剤化され、PBC 対照群と比較して、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、もしくは 1mg / kg の用量で、TTR の mRNA レベルを、約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNA は、LNP 製剤に製剤化され、ウエスタンプロットによって測定して、PBC 対照群と比較して、TTR のタンパク質レベルを、約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNA は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25mg / kg で、それを必要とする対象に投与する時、処置してから最長 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは 25 日目まで、血清 TTR のタンパク質レベルを抑制する。

10

20

【0037】

したがって、幾つかの態様において、TTR の dsRNA および薬剤として許容される担体を含有する医薬組成物、TTR 遺伝子の発現を阻害するために組成物を使用する方法、および TTR 遺伝子の発現によって引き起こされる疾患を治療するために医薬組成物を使用する方法が、本発明で取り上げられる。

【0038】

I. 定義

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される、特定の用語および語句の意味を以下に提供する。本明細書の他の部分の用語の用法と、本項で提供されるその定義との間に明らかな相違がある場合、本項の定義が優先される。

30

【0039】

「G」、「C」、「A」、および「U」のそれぞれは、一般に、塩基としてそれぞれグアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルを含有するヌクレオチドを表す。「T」および「dT」は、本明細書で交換可能に使用され、核酸塩基がチミン、例えば、デオキシリボチミン (deoxyribo thymine) 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」または「ヌクレオチド」または「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、以下でさらに詳述する修飾ヌクレオチド、または代替の置換部分も指すことができる事が理解されよう。当業者は、グアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルが、かかる置換部分を担持するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対形成性を実質的に変化させることなく、他の部分によって置換可能であることを十分認識している。例えば、限定されないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン、またはウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対を形成することができる。したがって、ウラシル、グアニン、またはアデニンを含有するヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド配列において、例えば、イノシンを含有するヌクレオチドと置換され得る。かかる置換部分を含む配列は、本発明の実施形態である。

40

【0040】

本明細書で使用される、「トランスクレチン」(「TTR」)とは、細胞内の遺伝子を指す。TTR はまた、ATTTR、HsT2651、PALB、プレアルブミン、TBPA、およびトランスクレチン(プレアルブミン、アミロイドーシス I 型)としても知られている。ヒト TTR の mRNA 転写物の配列は、NM_000371 で見出され得る。マウ

50

ス T T R の m R N A の配列は、 N M _ 0 1 3 6 9 7 . 2 で見出され得る。ラット T T R の m R N A の配列は、 N M _ 0 1 2 6 8 1 . 1 で見出され得る。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される、「標的配列」は、一次転写産物の R N A プロセシングの産物である m R N A を含む、 T T R 遺伝子の転写の間に形成される、 m R N A 分子のヌクレオチド配列の連続する部分を指す。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される、「配列を含む鎖」という用語は、標準的なヌクレオチド命名法を使用して言及される配列によって説明される、ヌクレオチド鎖を含む、オリゴヌクレオチドを指す。

10

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、別途記載のない限り、第 2 のヌクレオチド配列に関連して第 1 のヌクレオチド配列を説明するために使用される時の「相補的」という用語は、当業者には理解されるように、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もしくはポリヌクレオチドとハイブリダイズして二本鎖構造を形成する、第 1 のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの能力を指す。かかる条件は、例えば、ストリングエントな条件であり得、ストリングエントな条件は、 4 0 0 m M N a C l 、 4 0 m M P I P E S p H 6 . 4 、 1 m M E D T A 、 1 2 ~ 1 6 時間 5 0 もしくは 7 0 、その後の洗浄を含み得る。生物内で遭遇され得る、生理的に適切な条件等の他の条件を適用することができる。当業者は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的な用途に応じて、 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よう。

20

【 0 0 4 4 】

これには、第 1 および第 2 のヌクレオチド配列の全長にわたる、第 2 のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドに対する、第 1 のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの塩基対形成が含まれる。かかる配列は、本明細書において、互いに対して「完全に相補的」と呼ぶことができる。しかしながら、本明細書において、第 1 の配列が第 2 の配列に対して「実質的に相補的」であると言われる場合、 2 つの配列は完全に相補的であり得るか、あるいはそれらの最終的な用途に最も適した条件下でハイブリダイズする能力を保持しながら、ハイブリダイズ時に、 1 個以上であるが、一般に 4 、 3 、または 2 個を超えないミスマッチ塩基対を形成してもよい。しかし、 2 つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイズ時に 1 つ以上の単鎖のオーバーハングを形成するように設計される場合、かかるオーバーハングは、相補性の決定に関してミスマッチとは見なされないものとする。例えば、 2 1 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドと、 2 3 ヌクレオチド長の別のオリゴヌクレオチドとを含む d s R N A であって、より長いオリゴヌクレオチドが、より短いオリゴヌクレオチドに完全に相補的である 2 1 ヌクレオチドの配列を含む d s R N A は、本明細書に記載の目的上、やはり「完全に相補的」であるとして言及され得る。

30

【 0 0 4 5 】

また、本明細書で使用される、「相補的」な配列は、それらのハイブリダイズ能に関する上記の要件が満たされる限り、非ワトソンクリック塩基対、および / または非天然および修飾ヌクレオチドから形成される塩基対を含み得るか、または完全にそれらから形成され得る。かかる非ワトソンクリック塩基対には、 G - U ゆらぎまたはフーグスティーン型塩基対が含まれるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 4 6 】

本明細書における「相補的」、「完全に相補的」、および「実質的に相補的」という用語は、これらが使用される文脈から理解されるように、 d s R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖との間、または d s R N A のアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基一致に対して使用され得る。

【 0 0 4 7 】

50

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」である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)、または3'UTRを含む、対象となるmRTA(例えば、TTTをコードするmRTA)の連続する部分に実質的に相補的である、ポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、配列が、TTTをコードするmRTAの中止されていない部分に実質的に相補的である場合、TTTのmRTAの少なくとも一部に相補的である。

【0048】

本明細書で使用される、「二本鎖RNA」または「dsRNA」という用語は、逆平行で、上で定義されるように実質的に相補的である、2本の核酸鎖を含む二本鎖構造を有する、リボ核酸分子の複合体を指す。一般に、各鎖のヌクレオチドの大半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、それともしくは両方の鎖は、少なくとも1個の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチドおよび/または修飾ヌクレオチドも含み得る。加えて、本明細書で使用される「dsRNA」は、複数のヌクレオチドでの大幅な修飾を含み、本明細書で開示されるか、または当該技術分野において既知であるあらゆる種類の修飾を含む、リボヌクレオチドへの化学修飾を含み得る。siRNA型分子内で使用される、このようないずれの修飾も、本明細書および特許請求の範囲の目的上、「dsRNA」によって包含される。

【0049】

二本鎖構造を形成する2本の鎖は、より長い1つのRNA分子の異なる部分であってもよく、あるいはそれらは別個のRNA分子であってもよい。2本の鎖がより長い1つの分子の一部であり、したがって二本鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の中止されていないヌクレオチド鎖によって接続される場合、接続するRNA鎖は、「ヘアピンループ」と称される。2本の鎖が、二本鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の、中止されていないヌクレオチド鎖以外の手段によって共有結合的に接続される場合、該接続構造は、「リンカー」と称される。該RNA鎖は、同一または異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、二本鎖内に存在するいずれかのオーバーハングを差し引いた、dsRNAの最も短い鎖内のヌクレオチド数である。二本鎖構造に加えて、dsRNAは、1つ以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。また、「siRNA」という用語は、上に記載の通り、dsRNAを指すように本明細書に使用される。

【0050】

本明細書で使用される、「ヌクレオチドオーバーハング」とは、不対ヌクレオチド、またはdsRNAの1本の鎖の3'末端がもう一方の鎖の5'末端を越えて延びるか、またはその逆である時に、dsRNAの二本鎖構造から突出するヌクレオチドを指す。「平滑」または「平滑末端」は、dsRNAのその末端に不対ヌクレオチドがない、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングがないことを意味する。「平滑末端の」dsRNAは、その長さ全体にわたって二本鎖であるdsRNAであり、すなわち、該分子のいずれの末端にもヌクレオチドオーバーハングがない。

【0051】

「アンチセンス鎖」という用語は、標的配列に実質的に相補的である領域を含む、dsRNAの鎖を指す。本明細書で使用される、「相補性の領域」という用語は、配列、例えば本明細書において定義される標的配列に実質的に相補的である、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相補的ではない場合、該ミスマッチは、該末端領域内に最も許容され、存在する場合、一般に、終端領域内、例えば、5'および/または3'終端の6、5、4、3、もしくは2ヌクレオチド内にある。

【0052】

本明細書で使用される、「センス鎖」という用語は、アンチセンス鎖の領域に実質的に相補的である領域を含む、dsRNAの鎖を指す。

【0053】

本明細書で使用される、「SNALP」という用語は、安定な核酸脂質粒子を指す。S

10

20

30

40

50

N A L P は、 d s R N A 、または d s R N A が転写されるプラスミド等の核酸を含む、少量の水性内部をコーティングする、脂質の小胞を表す。 S N A L P は、例えば、米国特許出願公開第 20060240093 号、第 20070135372 号、および 2008 年 4 月 15 日に出願の第 U S S N 61 / 045 , 228 号に説明されている。これらの出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0054 】

d s R N A について言及する際、「細胞への導入」とは、当業者には理解されるように、細胞への取り込みまたは吸収を促進することを意味する。 d s R N A の吸収または取り込みは、支援を伴わない拡散過程もしくは細胞の能動的過程を通じて、または補助的な薬剤もしくは装置によって発生し得る。この用語の意味は、インビトロでの細胞に限定されず、 d s R N A は、生命体の一部である「細胞に導入」することもできる。そのような場合、細胞への導入は、該生物への送達を含む。例えば、インビオ送達については、 d s R N A を組織部位に注射するか、または全身投与ができる。細胞へのインビトロでの導入には、電気穿孔法およびリポフェクション法等の当該技術分野において既知の方法が含まれる。さらなるアプローチは、本明細書に説明されているか、または当該技術分野において既知である。

【 0055 】

「発現停止させる」、「～の発現を阻害する」、「～の発現を下方制御する」、および「～の発現を抑制する」等の用語は、それらが T T R 遺伝子について言及する限り、本明細書において、第 1 の細胞もしくは細胞群と実質的に同一であるが、そのように処置されていない第 2 の細胞もしくは細胞群（対照細胞）と比較して、 T T R 遺伝子が転写され、 T T R 遺伝子の発現が阻害されるように処置された第 1 の細胞もしくは細胞群から単離され得る、および／または検出され得る、 m R N A の量の低下によって現れる、 T T R 遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を指す。阻害の程度は、通常、以下で表される。

【 数 1 】

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

【 0056 】

代替として、阻害の程度は、 T T R 遺伝子の発現に機能的に結び付けられるパラメータ、例えば細胞によって分泌される T T R 遺伝子によってコードされるタンパク質の量、または特定の表現型、例えばアポトーシスを提示する細胞の数の低下に関して出されてもよい。原則的に、 T T R 遺伝子の発現停止は、構成的に、またはゲノム工学によってのいずれか、ならびに任意の適切なアッセイによって、該標的を発現する任意の細胞において決定することができる。しかし、ある d s R N A が特定の程度、 T T R 遺伝子の発現を阻害し、したがって本発明に包含されるかどうかを決定するために参照が必要とされる場合、以下の実施例で提供されるアッセイが、かかる参照の役割を果たす。

【 0057 】

例えば、特定の場合において、 T T R 遺伝子の発現は、本発明で取り上げられる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 5 % 、 10 % 、 15 % 、 20 % 、 25 % 、 30 % 、 35 % 、 40 % 、 45 % 、または 50 % 抑制される。幾つかの実施形態において、 T T R 遺伝子は、本発明で取り上げられる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 60 % 、 70 % 、または 80 % 抑制される。幾つかの実施形態において、 T T R 遺伝子は、本発明で取り上げられる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 % 、または 95 % 抑制される。

【 0058 】

T T R の発現の文脈において本明細書で使用される、「治療する」、「治療」等の用語は、 T T R の発現によって媒介される病理過程の軽減または緩和を指す。本発明の文脈において、本明細書で以下に列挙される他の病態のうちのいずれかに関連する限り（ T T R

10

20

30

40

50

の発現によって媒介される病理過程以外)、「治療する」、「治療」等の用語は、かかる病態に関連する少なくとも1つの症状の軽減もしくは緩和、またはF A P等のT T Rアミロイドーシスの進行の遅延等の、かかる病態の進行の遅延もしくは逆行を意味する。T T Rアミロイドーシスの症状には、神経障害(例えば、知覚障害、遠位部の感覚鈍麻)、自律性神経障害(例えば、胃潰瘍または起立性低血圧症等の胃腸障害)、運動神経障害、発作、認知症、ミエロパシー、多発性神経障害、手根管症候群、自律神経不全症、心筋症、硝子体混濁、腎不全、腎症、実質的に減少したm B M I(修正ボディー・マス・インデックス)、脳神経障害、および角膜格子状変性が含まれる。

【0059】

本明細書で使用される、「治療上有効な量」および「予防上有効な量」という句は、T T Rの発現によって媒介される病理過程の処置、阻止、もしくは管理、またはT T Rの発現によって媒介される病理過程の明らかな症状において、治療的有用性を提供する量を指す。治療上有効である具体的な量は、普通の開業医が容易に決定することができ、例えば、T T Rの発現によって媒介される病理過程の種類、患者の病歴および年齢、T T Rの発現によって媒介される病理過程のステージ、ならびに他のT T Rの発現によって媒介される病理過程に抗する薬剤の投与等の、当該技術分野において既知の因子に依存して異なり得る。

【0060】

本明細書で使用される、「医薬組成物」は、薬理学上有効な量のd s R N Aと、薬剤として許容される担体とを含む。本明細書で使用される、「薬理学上有効な量」、「治療上有効な量」、または単に「有効量」は、目的とする薬理学的、治療的、または阻止的結果を產生するのに効果的なR N Aの量を指す。例えば、ある臨床的治療が、疾患または障害に関連する測定可能なパラメータにおいて、少なくとも25%の低下がある時に有効であると見なされる場合、該疾患または障害を治療するための薬物の治療上有効な量は、該パラメータにおける少なくとも25%の低下をもたらすために必要な量である。例えば、T T Rを標的とするd s R N Aの治療上有効な量は、T T Rの血清レベルを少なくとも25%低下させることができる。別の例において、T T Rを標的とするd s R N Aの治療上有効な量は、肝機能または腎機能を少なくとも25%向上させることができる。

【0061】

「薬剤として許容される担体」という用語は、治療薬を投与するための担体を指す。かかる担体には、食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。該用語は、明確に、細胞培養基を除く。経口投与される薬物について、薬剤として許容される担体には、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、甘味剤、香味剤、着色剤、および防腐剤等の薬剤として許容される賦形剤が含まれるが、これらに限定されない。好適な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムおよびカルシウム、リン酸ナトリウムおよびカルシウム、ならびにラクトースが含まれ、コーンスタークおよびアルギン酸が好適な崩壊剤である。結合剤にはデンプンおよびゼラチンを含むことができ、一方滑沢剤が存在する場合は、概してステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクであろう。所望の場合、錠剤をモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の材料でコーティングして、消化管内での吸収を遅らせることができる。

【0062】

本明細書で使用される、「形質転換細胞」は、ベクターが導入されて、そこからd s R N A分子を発現することができる細胞である。

【0063】

I I . 二本鎖リボ核酸(d s R N A)

本明細書でより詳細に記載されるように、本発明は、細胞または哺乳動物内、例えば、アミロイドーシスに罹患しているヒトのT T R遺伝子の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(d s R N A)分子を提供し、該d s R N Aは、T T R遺伝子の発現において形成されるm R N Aの少なくとも一部に相補的である相補性の領域を有する、アンチセンス鎖を

10

20

30

40

50

含み、該相補性の領域は、30ヌクレオチド長未満、一般に19～24ヌクレオチド長であり、該d s R N Aは、該T T R遺伝子を発現する細胞と接触すると、例えば、P C Rまたは分枝D N A(b D N A)ベースの方法によって、またはウエスタンプロット等によるタンパク質ベースの方法によってアッセイして、該T T R遺伝子の発現を少なくとも30%阻害する。T T R遺伝子の発現は、以下の実施例で説明されるようにアッセイによって測定して、少なくとも30%軽減され得る。例えば、H e p 3 B細胞等の細胞培養内のT T R遺伝子の発現は、b D N AまたはT a q M a nアッセイ等によるT T Rのm R N Aレベルを測定することによって、またはE L I S Aアッセイ等によるタンパク質レベルを測定することによってアッセイされる等により、アッセイされ得る。本発明のd s R N Aは、1本以上の単鎖のヌクレオチドのオーバーハングをさらに含み得る。

10

【0064】

該d s R N Aは、以下でさらに説明されるように、当該技術分野において既知の標準的な方法、例えば、B i o s e a r c h , A p p l i e d B i o s y s t e m s , I n c .から市販されるもの等の自動D N A合成装置の使用によって、合成することができる。該d s R N Aは、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成するのに十分相補的である、2本のR N A鎖を含む。該d s R N Aの1本の鎖(アンチセンス鎖)は、T T R遺伝子の発現の間に形成されたm R N Aの配列から派生した標的配列に実質的に相補的であり、一般に完全に相補的である、相補性の領域を含み、もう一方の鎖(センス鎖)は、アンチセンス鎖に相補的である領域を含み、その結果、2本の鎖は、好適な条件下で組み合わされると、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。一般に、二本鎖構造は、15～30、または25～30、または18～25、または19～24、または19～21、または19、20もしくは21塩基対長である。一実施形態において、二本鎖は19塩基対長である。別の実施形態において、二本鎖は21塩基対長である。2本の異なるs i R N Aを組み合わせて使用する場合、二本鎖の長さは同一であってもよく、または異なってもよい。

20

【0065】

本発明のd s R N Aのそれぞれの鎖は、一般に15～30、または18～25、または18、19、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド長である。他の実施形態において、それぞれの鎖は25～30ヌクレオチド長である。二本鎖のそれぞれの鎖は、同一長さであってもよく、または異なる長さであってもよい。2本の異なるs i R N Aを組み合わせて使用する場合、各s i R N Aのそれぞれの鎖の長さは、同一であってもよく、または異なってもよい。

30

【0066】

本発明のd s R N Aは、1個以上のヌクレオチドの1つ以上の単鎖のオーバーハングを含むことができる。一実施形態において、該d s R N Aの少なくとも一端は、1～4、一般には1または2個のヌクレオチドの、単鎖のヌクレオチドオーバーハングを有する。別の実施形態において、該d s R N Aのアンチセンス鎖は、センス鎖の3'末端および5'末端のそれぞれに、1～10個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。さらなる実施形態において、該d s R N Aのセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端および5'末端のそれぞれに、1～10個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。

【0067】

40

少なくとも1つのヌクレオチドオーバーハングを有するd s R N Aは、平滑末端の対応物より予想外に優れた阻害特性を有し得る。幾つかの実施形態において、1つのみのヌクレオチドオーバーハングの存在により、その全体的な安定性に影響を及ぼすことなく、d s R N Aの干渉活性が強化される。1つのみのオーバーハングを有するd s R N Aは、インビボ、ならびに種々の細胞、細胞培養基、血液、および血清内で特に安定および効果的であることが判明している。一般に、単鎖のオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'終端、または代替として、センス鎖の3'終端に位置する。該d s R N Aは、一般にアンチセンス鎖の5'末端に位置する、平滑末端も有し得る。かかるd s R N Aは改善された安定性および阻害活性を有し得、したがって、低投薬量、すなわち、1日当たり受容者の体重1k gにつき5m g未満の投与を可能にする。一般に、該d s R N Aのアンチセンス鎖

50

は、3'末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5'末端は平滑である。別の実施形態において、オーバーハング内のヌクレオチドのうちの1つ以上が、ヌクレオシドチオリン酸と置換される。

【0068】

一実施形態において、TTR遺伝子はヒトTTR遺伝子である。特定の実施形態において、該dsRNAのセンス鎖は、表3A、3B、4、6A、6B、または7からのセンス配列のうちの1つであり、該アンチセンス鎖は、表3A、3B、4、6A、6B、または7からのセンス配列のうちの1つである。表3A、3B、4、6A、6B、または7に提供される標的配列のいずれかの箇所を標的とする代替のアンチセンス剤を、標的配列および隣接するTTR配列を使用して、容易に決定することができる。

10

【0069】

当業者は、20~23だが、特に21個の塩基対の二本鎖構造を有するdsRNAが、RNA干渉の誘発に特に効果的であるとして称賛を得ていることをよく認識している(E1bashir et al., EMBO 2001, 20: 6877-6888)。しかし、他の者は、より短いもしくはより長いdsRNAが、同様に効果的であり得ることを見出している。上記の実施形態において、表3A、3B、4、6A、6B、または7に提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質のために、本発明で取り上げられるdsRNAは、本明細書に記載の長さの少なくとも1本の鎖を含むことができる。一端または両端のわずかな数のヌクレオチドを差し引いた、表3A、3B、4、6A、6B、または7の配列のうちの1つを有するより短いdsRNAが、上記のdsRNAと比較して、同様に効果的であり得ることは、妥当に予想され得る。したがって、表3、4、6、または7の配列のうちの1つからの、少なくとも15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドの部分的配列を有するdsRNAは、本明細書で以下に記載されるアッセイにおいて、TTR遺伝子の発現を阻害するそれらの能力が、完全な配列を含むdsRNAと阻害の5、10、15、20、25、もしくは30%以下の異なるdsRNAが、本発明によって企図される。さらに、所望のTTR標的配列内で切断するdsRNAを、対応するTTRアンチセンス配列および相補的なセンス配列を用いて容易に作製することができる。

20

【0070】

加えて、表3A、3B、4、6A、6B、または7に提供されるdsRNAは、RNAiに基づく切断の影響を受けやすい、TTR内の部位を特定する。したがって、本発明は、本発明の薬剤のうちの1つによって標的とされる配列内を標的とする、dsRNAをさらに特徴とする。本明細書で使用される、第2のdsRNAは、第2のdsRNAが、第1のdsRNAのアンチセンス鎖に相補的であるmRNA内のいずれかの箇所でメッセージを切断する場合、第1のdsRNAの配列内を標的とすると言われる。かかる第2のdsRNAは、一般に、TTR遺伝子内の選択した配列に隣接する領域から取られたさらなるヌクレオチド配列に連結される、表3A、3B、4、6A、6B、または7に提供される配列のうちの1つからの少なくとも15個の連続するヌクレオチドからなる。

30

【0071】

本発明で取り上げられるdsRNAは、標的配列との1つ以上のミスマッチを含有してもよい。一実施形態において、本発明で取り上げられるdsRNAは、3つ以下のミスマッチを含有する。dsRNAのアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチの範囲が、相補性の領域の中心に位置しないことが好ましい。該dsRNAのアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチは、いずれかの末端から5ヌクレオチド、例えば、相補性の領域の5'もしくは3'末端のいずれかから5、4、3、2、もしくは1ヌクレオチドに制限されることが好ましい。例えば、TTR遺伝子の領域に相補的である23ヌクレオチドのdsRNA鎖について、該dsRNAは、一般には、中央の13個のヌクレオチド内にはいかなるミスマッチも含有しない。本発明内で記載される方法を使用して、標的配列とのミスマッチを含有するdsRNAが、TTR遺伝子の発現の阻害に効果的であるかどうかを判定することができる。TTR遺伝子

40

50

の発現の阻害における、ミスマッチを有する d s R N A の有効性を考慮することは、特に T T R 遺伝子内の特定の相補性の領域が、集団内に多型の配列多様性を有することが既知である場合、重要である。

【 0 0 7 2 】

修飾

また別の実施形態において、該 d s R N A は、安定性を亢進させるために化学修飾される。本発明で取り上げられる核酸は、「Current protocols in nucleic acid chemistry」、Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA に記載されるもの等の、当該技術分野において十分確立された方法によって、合成および／または修飾することができ、該文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明において有用である d s R N A 化合物の具体例には、修飾された骨格を含むか、または天然のヌクレオシド間結合を含まない d s R N A が含まれる。本明細書で定義されるように、修飾された骨格を有する d s R N A には、該骨格にリン原子を保持するもの、および該骨格にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書の目的上、また当該技術分野において時折言及されるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾された d s R N A も、オリゴヌクレオシドであると見なすことができる。10

【 0 0 7 3 】

修飾された d s R N A 骨格には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3' - アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3' - アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、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、ならびに正常な 3' - 5' 結合を有するボラノホスフェート、2' - 5' 結合したこれらの類似体、そしてヌクレオシド単位の隣接する対が 3' - 5' から 5' - 3' へ、または 2' - 5' から 5' - 2' へ結合する、逆向きの極性を有するものが含まれる。また、種々の塩、混合塩、および遊離酸形態も含まれる。20

【 0 0 7 4 】

上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第 3,687,808 号、第 4,469,863 号、第 4,476,301 号、第 5,023,243 号、第 5,177,195 号、第 5,188,897 号、第 5,264,423 号、第 5,276,019 号、第 5,278,302 号、第 5,286,717 号、第 5,321,131 号、第 5,399,676 号、第 5,405,939 号、第 5,453,496 号、第 5,455,233 号、第 5,466,677 号、第 5,476,925 号、第 5,519,126 号、第 5,536,821 号、第 5,541,316 号、第 5,550,111 号、第 5,563,253 号、第 5,571,799 号、第 5,587,361 号、および第 5,625,050 号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。30

【 0 0 7 5 】

その中にリン原子を含まない、修飾された d s R N A 骨格は、单鎖アルキルも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およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または 1 個以上の单鎖ヘテロ原子もしくは複素環式ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらには、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た)、シロキサン骨格、硫化物、スルホキシド、およびスルホン骨格、ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファミン酸骨格、メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格、スルホネートおよびスルホンアミド骨格、アミド骨格、ならびに N、O、S、および C H₂ を混合した構成成分を有する他のもの、を有するものが含まれる。4050

【0076】

上記オリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,034,506号、第5,166,315号、第5,185,444号、第5,214,134号、第5,216,141号、第5,235,033号、第5,64,562号、第5,264,564号、第5,405,938号、第5,434,257号、第5,466,677号、第5,470,967号、第5,489,677号、第5,541,307号、第5,561,225号、第5,596,086号、第5,602,240号、第5,608,046号、第5,610,289号、第5,618,704号、第5,623,070号、第5,663,312号、第5,633,360号、第5,677,437号、および第5,677,439号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。10

【0077】

他の好適なd s RNA模倣体において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち、骨格が、新規の基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とハイブリダイズするために維持される。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そのようなオリゴマー化合物の1つであるd s RNA模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物では、d s RNAの糖骨格が、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置換される。核酸塩基は保持され、該骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,539,082号、第5,714,331号、および第5,719,262号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。20

【0078】

本発明の他の実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するd s RNA、およびヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシドであり、特に上述の米国特許第5,489,677号の $\cdots\text{CH}_2\cdots\text{NH}\cdots\text{CH}_2\cdots$ 、 $\cdots\text{CH}_2\cdots\text{N}(\text{CH}_3)\cdots\text{O}\cdots\text{CH}_2\cdots$ [メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として知られる]、 $\cdots\text{CH}_2\cdots\text{O}\cdots\text{N}(\text{CH}_3)\cdots\text{CH}_2\cdots$ 、 $\cdots\text{CH}_2\cdots\text{N}(\text{CH}_3)\cdots\text{N}(\text{CH}_3)\cdots\text{CH}_2\cdots$ 、および $\cdots\text{N}(\text{CH}_3)\cdots\text{CH}_2\cdots\text{CH}_2\cdots$ [式中、天然のホスホジエステル骨格は、 $\cdots\text{O}\cdots\text{P}\cdots\text{O}\cdots\text{CH}_2\cdots$ として表される]、および上述の米国特許第5,602,240号のアミド骨格である。30

【0079】

また、修飾されたd s RNAは、1つ以上の置換糖部分も含有することができる。好ましいd s RNAは、2'位に、OH; F; O-、S-、もしくはN-アルキル; O-、S-、もしくはN-アルケニル; O-、S-、もしくはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含み、ここで、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換もしくは非置換のC₁~C₁₀アルキルまたはC₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルであり得る。O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂が特に好ましく、式中、nおよびmは1~約10である。他の好ましいd s RNAは、2'位に、C₁~C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、もしくはO-アラルキル、SH、SC_H₃、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、介入物、d s RNAの薬物動態特性を改善するための基、またはd s RNAの薬力学的特性を改善するための基、ならびに類似した特性を有する他の置換基のうちの1つを含む。好ましい修飾には、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃であって、4050

2' - O - (2 - メトキシエチル) または 2' - MOE としても知られる) (Martini et al., Helvetica Chimica Acta, 1995, 78, 486 - 504) すなわち、アルコキシ - アルコキシ基が含まれる。好ましいさらなる修飾には、本明細書において以下の実施例に記載される、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、すなわち、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ 基、ならびに、同様に、本明細書において以下の実施例に記載される、2' - ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野で2' - O - ジメチルアミノエトキシエチルもしくは2' - DMAE OE としても知られる)、すなわち、2' - O - - CH₂ - - O - - CH₂ - - N(CH₂)₂ が含まれる。

【0080】

他の好ましい修飾には、2' - メトキシ(2' - OCH₃)、2' - アミノプロポキシ(2' - OCH₂CH₂CH₂NH₂)、および2' - フルオロ(2' - F)が含まれる。同様の修飾を、dsRNAの他の位置、特に3' 終端ヌクレオチドもしくは2' - 5' 結合dsRNA内の糖の3' 位、および5' 終端ヌクレオチドの5' 位で作製することもできる。また、dsRNAは、ペントフラノシリル糖の代わりに、シクロブチル部分等の糖模倣体を有してもよい。かかる修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第4,981,957号、第5,118,800号、第5,319,080号、第5,359,044号、第5,393,878号、第5,446,137号、第5,466,786号、第5,514,785号、第5,519,134号、第5,567,811号、第5,576,427号、第5,591,722号、第5,597,909号、第5,610,300号、第5,627,053号、第5,639,873号、第5,646,265号、第5,658,873号、第5,670,633号、および第5,700,920号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のうちのあるものは本出願によつて共同所有され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0081】

dsRNAは、核酸塩基(当該技術分野ではしばしば単に「塩基」と称される)修飾または置換をも含み得る。本明細書で使用される、「非修飾」もしくは「天然」の核酸塩基には、プリン塩基、アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基、チミン(T)、シトシン(C)、およびウラシル(U)が含まれる。修飾された核酸塩基には、5 - メチルシトシン(5 - me - C)、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6 - メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2 - プロピルおよび他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび2 - チオシトシン、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニルウラシルおよびシトシン、6 - アゾのウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル(シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシルおよび他の8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ、特に5 - ブロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン、8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニン、ならびに3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニン等の、他の合成および天然の核酸塩基が含まれる。さらなる核酸塩基には、米国特許第3,687,808号で開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 - 859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990で開示されるもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613で開示されるもの、およびSanghvi, Y. S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289 - 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993で開示されるものが含まれる。これらの核酸塩基のうちの特定のものは、本発明で取り上げられるオリゴ

10

20

30

40

50

マー化合物の結合親和性を高めるために、特に有用である。これらには、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル、および5 - プロピニルシトシンを含む、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、ならびにN - 2、N - 6、およびO - 6置換プリンが含まれる。5 - メチルシトシン置換は、核酸二本鎖の安定性を0.6 ~ 1.2 増加させることができ(Sanghvi , Y. S. , Crooke , S. T. and Lebleu , B. , Eds. , DsRNA Research and Applications , CRC Press , Boca Raton , 1993 , pp. 276 - 278)、例示的な塩基置換であり、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わされると、さらに特に好ましい。

【0082】

10

上記の修飾された核酸塩基の特定のもの、ならびに他の修飾された核酸塩基の調製を教示する代表的な米国特許には、上記の米国特許第3,687,808号、ならびに米国特許第4,845,205号、第5,130,30号、第5,134,066号、第5,175,273号、第5,367,066号、第5,432,272号、第5,457,187号、第5,459,255号、第5,484,908号、第5,502,177号、第5,525,711号、第5,552,540号、第5,587,469号、第5,594,121号、第5,596,091号、第5,614,617号、および第5,681,941号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれ、米国特許第5,750,692号も、参照により本明細書に組み込まれる。

【0083】

20

共役体

本発明のdsRNAの別の修飾は、該dsRNAの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させる、1つ以上の部分または共役体の該dsRNAへの化学的結合を伴う。かかる部分には、コレステロール部分(Letsinger et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 1999 , 86 , 6553 - 6556)、コール酸(Manoharan et al. , Biorg. Med. Chem. Lett. , 1994 , 4 , 1053 - 1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシリ-S-トリチルチオール(Manoharan et al. , Ann. N. Y. Acad. Sci. , 1992 , 660 , 306 - 309)、Manoharan et al. , Biorg. Med. Chem. Lett. , 1993 , 3 , 2765 - 2770)、チオコレステロール(Oberhauser et al. , Nucl. Acids Res. , 1992 , 20 , 533 - 538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al. , EMBO J. , 1991 , 10 , 1111 - 1118)、Kabanov et al. , FEBS Lett. , 1990 , 259 , 327 - 330)、Svinarchuk et al. , Biochimie , 1993 , 75 , 49 - 54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-Hホスホネート(Manoharan et al. , Tetrahedron Lett. , 1995 , 36 , 3651 - 3654)、Shea et al. , Nucleic Acids Res. , 1990 , 18 , 3777 - 3783)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al. , Nucleosides & Nucleotides , 1995 , 14 , 969 - 973)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al. , Tetrahedron Lett. , 1995 , 36 , 3651 - 3654)、パルミチル部分(Mishra et al. , Biochim. Biophys. Acta , 1995 , 1264 , 229 - 237)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシリアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分(Crooke et al. , J. Pharmacol. Exp. Ther. , 1996 , 277 , 923 - 937)等の脂質部分が含まれるが、これらに限定されない。

【0084】

50

かかるd s RNA共役体の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第4,828,979号、第4,948,882号、第5,218,105号、第5,525,465号、第5,541,313号、第5,545,730号、第5,552,538号、第5,578,717号、第5,580,731号、第5,591,584号、第5,109,124号、第5,118,802号、第5,138,045号、第5,414,077号、第5,486,603号、第5,512,439号、第5,578,718号、第5,608,046号、第4,587,044号、第4,605,735号、第4,667,025号、第4,762,779号、第4,789,737号、第4,824,941号、第4,835,263号、第4,876,335号、第4,904,582号、第4,958,013号、第5,082,830号、第5,112,963号、第5,214,136号、第5,082,830号、第5,112,963号、第5,214,136号、第5,245,022号、第5,254,469号、第5,258,506号、第5,262,536号、第5,272,250号、第5,292,873号、第5,317,098号、第5,371,241号、第5,391,723号、第5,416,203号、第5,451,463号、第5,510,475号、第5,512,667号、第5,514,785号、第5,565,552号、第5,567,810号、第5,574,142号、第5,585,481号、第5,587,371号、第5,595,726号、第5,597,696号、第5,599,923号、第5,599,928号、および第5,688,941号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、
参考により本明細書に組み込まれる。
20

【0085】

ある化合物の全ての位置が均一に修飾されている必要はなく、実際、前述の修飾のうちの1つ以上を单一化合物に、あるいはさらにはd s RNA内の单一ヌクレオシドに組み込むことができる。また、本発明は、キメラ化合物であるd s RNA化合物も含む。本発明の文脈において、「キメラ(chimeric)」d s RNA化合物または「キメラ(chimera)」は、d s RNA化合物であり、特に2つ以上の化学的にはっきりと異なる領域を含有し、それぞれ、少なくとも1つのモノマー単位、すなわち、d s RNA化合物の場合のヌクレオチドからなる、d s RNAである。これらのd s RNAは、典型的には、該d s RNAは、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取り込みの増加、および/または標的核酸に対する結合親和性の増加を該d s RNAに付与するように、修飾される、少なくとも1つの領域を含有する。d s RNAのさらなる領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断することができる酵素に対する基質としての役割を果たすことができる。一例として、RNアーゼHは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。RNアーゼHの活性化は、したがって、RNA標的の切断をもたらし、それにより遺伝子発現のd s RNA阻害の効率を大きく亢進させる。それ故、キメラd s RNAが使用される場合、同一標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシd s RNAと比較して、しばしばより短いd s RNAによって匹敵する結果を得ることができる。
30

【0086】

RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要であれば、当該技術分野において既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技法によって、日常的に検出することができる。d s RNAの標的m RNAにおける切断部位は、一般に、当業者に既知の方法、例えば、Soutschek et al., Nature; 2004, Vol. 432, pp. 173-178に記載の5'-RACE法(全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる)を用いて決定することができる。1つの実施形態において、Soutschekらによって記載の5'-RACE法を用いて、ALN-18328が、配列番号1331(NM_000371.3)の636位のグアニンヌクレオチドと配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドとの間で、TTRのm RNAを切断することが確認された。1つの実施形態において、ALN-18328が、配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドと配列番号1331の638位のグアニンヌクレオチドとの間で、
40
50

TTRのmRNAを切斷しないことが確認された。

【0087】

特定の場合において、該dsRNAは、非リガンド基によって修飾されてもよい。多くの非リガンド分子が、dsRNAの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させるためにdsRNAに共役されており、かかる共役を行うための手順は、科学文献で入手可能である。かかる非リガンド部分には、コレステロール(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553)、コール酸(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053)、チオエーテル、例えば、ヘキシリ-S-トリチルチオール(Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660: 306、Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3: 2765)、チオコレステロール(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10: 111、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259: 327、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75: 49)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18: 3777)、ポリアミンもしくはポリエチレンギリコール鎖(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14: 969)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651)、パルミチル部分(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264: 229)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシリアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277: 923)等の脂質部分が含まれている。かかるdsRNA共役体の調製を教示する代表的な米国特許は、上に列記されている。典型的な共役プロトコルは、配列の1つ以上の位置にアミノリンカーを有するdsRNAの合成を伴う。次いで、アミノ基を、適切なカップリングもしくは活性化試薬を使用して、共役される分子と反応させる。共役反応は、依然として固体支持体に結合されたdsRNAを用いて、または溶液相中でのdsRNAの切斷後のいずれかに実行することができる。典型的には、HPLCによってdsRNA共役体を精製して、純粋な共役体が得られる。

【0088】

ベクターによりコードされるdsRNA

別の態様では、TTRのdsRNA分子が、DNAもしくはRNAベクターに挿入された転写単位から発現される(例えばCouture, A, et al., TIG. (1996), 12: 5-10、Skillern, Aらの国際PCT公開WO第00/22113号、Conradの国際PCT公開WO第00/22114号、およびConradの米国特許第6,054,299号を参照されたい)。これらの導入遺伝子は、線状構築物、環状プラスミド、またはウイルスベクターとして導入することができ、宿主ゲノムに統合される導入遺伝子として導入されて、受け継がれ得る。また、導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして受け継がれるの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)。

【0089】

dsRNAの個々の鎖を、2つの個別の発現ベクター上のプロモーターを用いて転写し、標的細胞に同時形質移入することができる。あるいは、dsRNAのそれぞれ個々の鎖

10

20

30

40

50

を、いずれも同一発現プラスミド上に位置するプロモーターを用いて転写してもよい。一実施形態において、d s RNAは、d s RNAがステムアンドループ構造を有するよう¹⁰に、リンカーポリヌクレオチド配列によって接合される逆方向反復として発現される。

【0090】

組換えd s RNA発現ベクターは、一般に、D N Aプラスミドまたはウイルスベクターである。d s RNAを発現するウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（概説として、Muzyczka, et al., Curr. Topics Microbiol. Immunol. (1992) 158: 97 - 129を参照）、アデノウイルス（例えば、Berkner, et al., Biotechniques (1998) 6: 616）、Rosenfeld et al. (1991, Science 252: 431 - 434)、およびRosenfeld et al. (1992)、Cell 68: 143 - 155を参照））、またはアルファウイルス、ならびに当該技術分野において既知の他のものに基づいて構築することができるが、これらに限定されない。種々の遺伝子を、上皮細胞を含む多くの異なる細胞型にインビトロおよび/またはインビボで導入するために、レトロウイルスが使用されている（例えば、Eglitis, et al., Science (1985) 230: 1395 - 1398、Danos and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85: 6460 - 6464、Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3014 - 3018、Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 61416145、Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8039 - 8043、Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8377 - 8381、Chowdhury et al., 1991, Science 254: 1802 - 1805、van Beusechem. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7640 - 19、Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3: 641 - 647、Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10892 - 10895、Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150: 4104 - 4115、米国特許第4,868,116号、米国特許第4,980,286号、PCT出願WO第89/07136号、PCT出願WO第89/02468号、PCT出願WO第89/05345号、およびPCT出願WO第92/07573号を参照）。細胞のゲノムに挿入された遺伝子を形質導入して発現することができる組換えレトロウイルスベクターは、組換えレトロウイルスゲノムを、PA317およびPsi-CRIP等の好適なパッケージング細胞系に形質移入することによって³⁰、產生することができる（Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2: 5 - 10、Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6349）。感受性宿主（例えば、ラット、ハムスター、イヌ、およびチンパンジー）内の多岐にわたる細胞および組織を感染させるために、組換えアデノウイルスベクターを使用することができ（Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166: 769）、これは、感染に有糸分裂的に活性な細胞を必要としない利点も有する。⁴⁰

【0091】

発現されるd s RNA分子のコード配列を受け入れることができる任意のウイルスベクターを使用することができ、例としては、アデノウイルス(AV)、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス(LV)、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス）、ヘルペスウイルス等に由来するベクターである。ウイルスベクターの指向性は、エンベロープタンパク質もしくは他のウイルスからの他の表面抗原を用いて該ベクターをシードタイピングすることにより、または異なるウイルスのキャプシドタンパク質を適宜置換することによって、修正することができる。

【0092】

例えば、本発明で取り上げられるレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、狂犬病、エボラ、モコラ等からの表面タンパク質でシュードタイピングすることができる。本発明で取り上げられるAAVベクターは、ベクターが異なるキャプシドタンパク質の血清型を発現するように操作することにより、異なる細胞を標的とするようになることができる。例えば、血清型2のゲノム上に血清型2のキャプシドを発現するAAVベクターは、AAV2/2と称される。AAV2/2ベクター内のこの血清型2のキャプシド遺伝子を、血清型5のキャプシド遺伝子と置換して、AAV2/5ベクターを產生することができる。異なるキャプシドタンパク質血清型を発現するAAVベクターを構築するための技法は、当該技術分野の技能内であり、例えば、Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76: 791-801を参照されたく、その開示全体が、参考により本明細書に組み込まれる。10

【0093】

本発明における使用に好適な組換えウイルスベクターの選択、dsRNAの発現のために核酸配列を該ベクターに挿入するための方法、および該ウイルスベクターを対象となる細胞に送達する方法は、当該技術分野の技能内である。例えば、Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310, Egliitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614, Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14, Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30、およびRubinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406を参照されたく、それらの開示全体が、参考により本明細書に組み込まれる。20

【0094】

ウイルスベクターは、AVおよびAAVに由来し得る。一実施形態において、本発明で取り上げられるdsRNAは、例えば、U6もしくはH1 RNAプロモーター、またはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターのいずれかを有する組換えAAVベクターから、2つの別個の相補的な単鎖RNA分子として発現される。

【0095】

本発明のdsRNAを発現するために好適なAVベクター、組換えAVベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010に記載されている。30

【0096】

本発明で取り上げられるdsRNAを発現するために好適なAAVベクター、組換えAVベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101, Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532, Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826、米国特許第5,252,479号、米国特許第5,139,941号、国際特許出願WO第94/13788号、および国際特許出願WO第93/24641号に記載され、それらの開示全体が、参考により本明細書に組み込まれる。40

【0097】

本発明で取り上げられるDNAプラスミドもしくはウイルスベクターのいずれか内でdsRNAの発現を駆動するプロモーターは、真核生物RNAポリメラーゼI（例えばリボソームRNAプロモーター）、RNAポリメラーゼII（例えばCMV初期プロモーター、もしくはアクチンプロモーター、もしくはU1 snRNAプロモーター）、または一般にRNAポリメラーゼIIIプロモーター（例えばU6 snRNAもしくは7SK RNAプロモーター）、あるいは原核生物プロモーター、例えば、発現プラスミドもT7プロモーターからの転写に必要なT7 RNAポリメラーゼをコードするという条件で、T7プロモーターであり得る。該プロモーターは、臍臓への導入遺伝子の発現を導くこともできる（例えば、the insulin regulatory sequence50

for pancreas (Buccchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2511 - 2515) を参照)。

【0098】

さらに、導入遺伝子の発現は、例えは、特定の生理的調節因子、例えは、循環ブドウ糖レベル、またはホルモンに感受性である調節配列等の、誘発可能な調節配列および発現系を使用することによって、正確に調節することができる (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8: 20 - 24)。細胞または哺乳動物内の導入遺伝子の発現を制御するために好適である、かかる誘発可能な発現系には、エクジソン、エストロゲン、プロゲステロン、テトラサイクリン、二量化の化学誘発物質、およびイソプロピル - ベータ - D1 - チオガラクトピラノシド (EPTG) による調節が含まれる。当業者は、dsRNA導入遺伝子の目的とする用途に基づいて、適切な調節 / プロモーター配列を選択することができよう。当業者は、dsRNA導入遺伝子の目的とする用途に基づいて、適切な調節 / プロモーター配列を選択することができよう。10

【0099】

一般に、dsRNA分子を発現することができる組換えベクターは、以下に記載するように送達され、標的細胞内に生き残る。代替として、dsRNA分子の一過性発現を提供するウイルスベクターを使用することができる。かかるベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。発現すると、dsRNAは標的RNAに結合し、その機能または発現を調節する。dsRNAを発現するベクターの送達は、静脈内もしくは筋肉内投与等によって全身的、患者から外植された標的細胞に投与後、該患者へ再導入することによって、または所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段等によって、であり得る。20

【0100】

dsRNA発現DNAプラスミドは、典型的には、カチオン性脂質担体（例えはオリゴフェクタミン (Oligofectamine)）、または非カチオン性脂質に基づく担体（例えはTransit-TKO（商標））との複合体として、標的細胞に形質移入される。1週間以上の期間にわたって、単一のLTR遺伝子の異なる領域または複数のLTR遺伝子を標的とする、dsRNAによって媒介されるノックダウンのための複数回の脂質の形質移入もまた、本発明によって企図される。ベクターの宿主細胞への導入の成功は、種々の既知の方法を使用して監視することができる。例えは、一過性形質移入は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 等の蛍光マーカー等のレポーターを用いて示すことができる。エクスピボ細胞の安定な形質移入は、形質移入細胞に、ハイグロマイシンB耐性等の、特定の環境因子（例えは、抗生素質および薬物）に対する耐性を提供するマーカーを使用して、保証することができる。30

【0101】

また、LTRに特異的なdsRNA分子は、ベクターに挿入して、ヒト患者に対する遺伝子療法ベクターとして使用することもできる。遺伝子療法ベクターは、例えは、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照）、または定位固定注射（例えは、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054 - 3057を参照）によって、対象に送達することができる。遺伝子療法ベクターの医薬調製物は、許容される希釈剤中の遺伝子療法ベクターを含んでもよく、または遺伝子送達媒体が中に埋め込まれる徐放性マトリックスを含んでもよい。代替として、組換え細胞、例えは、レトロウイルスベクターから、完全な遺伝子送達ベクターを無傷で產生することができる場合、医薬調製物は、遺伝子送達系を產生する1つ以上の細胞を含んでもよい。40

【0102】

I I I . dsRNAを含有する医薬組成物

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるdsRNAと、薬剤として許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。該dsRNAを含有する医薬組成物は、LTRの発現によって媒介される病理過程等の、LTR遺伝子の発現もしくは活性に関連50

する疾患もしくは障害の治療に有用である。かかる医薬組成物は、送達様式に基づいて製剤化される。一例は、非経口投与を介して、例えば、静脈（IV）送達による全身投与用に製剤化される組成物である。別の例は、例えば、持続ポンプ注入等による脳への注入によって、脳実質への直接送達用に製剤化される組成物である。

【0103】

本明細書で取り上げられる医薬組成物は、TTT遺伝子の発現を阻害するために十分な投薬量で投与される。

【0104】

一般に、dsRNAの好適な用量は、1日当たり受容者の体重1キログラムにつき0.01～200.0ミリグラムの範囲、一般には、1日当たり体重1キログラムにつき1～50mgの範囲であろう。例えば、該dsRNAは、単回用量当たり0.0059mg/kg、0.01mg/kg、0.0295mg/kg、0.05mg/kg、0.0590mg/kg、0.163mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.543mg/kg、0.5900mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.628mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5.0mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、または50mg/kgで投与することができる。10

【0105】

一実施形態において、該投薬量は、0.01～0.2mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.3mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.10mg/kg、0.11mg/kg、0.12mg/kg、0.13mg/kg、0.14mg/kg、0.15mg/kg、0.16mg/kg、0.17mg/kg、0.18mg/kg、0.19mg/kg、または0.20mg/kgの用量で投与することができる。20

【0106】

一実施形態において、該投薬量は、0.005mg/kg～1.628mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.0059mg/kg、0.0295mg/kg、0.0590mg/kg、0.163mg/kg、0.543mg/kg、0.5900mg/kg、または1.628mg/kgの用量で投与することができる。30

【0107】

一実施形態において、該投薬量は、0.2mg/kg～1.5mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、または1.5mg/kgの用量で投与することができる。

【0108】

該医薬組成物は、1日1回投与することができ、あるいは、該dsRNAは、1日にわたって適切な間隔で、2、3、またはそれ以上の分割用量(sub-dose)として、さらに、持続注入または放出制御製剤による送達を用いて投与されてもよい。その場合、各分割用量に含有されるdsRNAは、1日当たりの総投薬量を達成するように、対応してより小さくなければならない。投薬量単位は、例えば、数日間にわたって該dsRNAの持続放出を提供する、従来の持続放出製剤を使用して、数日間にわたる送達用に配合することができる。持続放出製剤は当該技術分野において周知であり、本発明の薬剤を用いて使用され得る部位等の特定の部位での薬剤の送達に特に有用である。本実施形態では、投薬量単位は、対応する複数の1日量を含む。40

【0109】

TTTレベルに対する単回用量の効果は長く続き、その後の用量は、3、450

、もしくは5日の間隔より多くなく、または1、2、3、もしくは4週間の間隔より多くなく、または5、6、7、8、9、もしくは10週間の間隔より多くない量で投与される。

【0110】

当業者には、限定されないが、疾患もしくは障害の重症度、以前の処置、総体的な健康、および／または対象の年齢、ならびに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とされる投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得ることが理解されよう。さらに、治療上有効な量の組成物を用いた対象の治療には、単回処置または一連の治療が含まれ得る。本発明により包含される個々のdsRNAに対する効果的な投薬量およびインビオ半減期の推定は、従来の方法を使用して、または本明細書のいずれかの箇所で記載される適切な動物モデルを使用したインビオ試験に基づいて、行うことができる。10

【0111】

マウス遺伝学における進歩によって、TTTの発現によって媒介される病理過程等の種々のヒト疾患の研究用に、多くのマウスモデルが生成されている。かかるモデルは、dsRNAのインビオ試験、ならびに治療上有効な用量を決定するために使用される。好適なマウスモデルは、例えば、ヒトTTTを発現するプラスミドを含有するマウスである。別の好適なマウスモデルは、ヒトTTTを発現する導入遺伝子を保有する遺伝子導入マウスである。

【0112】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための一連の投薬量の処方決定に使用することができる。本発明で取り上げられる組成物の投薬量は、一般に、ほとんどまたは全く毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なってもよい。本発明で取り上げられる方法において使用されるいずれの化合物についても、治療上有効な用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、IC50（すなわち、症状の半値阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む、化合物、または適切な場合は、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲（例えば、該ポリペプチドの濃度の低下を達成する）を達成するように、処方決定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。20

【0113】

本発明で取り上げられるdsRNAは、標的遺伝子の発現によって媒介される病理過程の処置に効果的な他の既知の薬剤と組み合わせて投与することができる。いずれの場合においても、投与する医師は、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載される、標準的な有効性の測定値を使用して得られた結果に基づいて、dsRNA投与の量およびタイミングを調整することができる。

【0114】

投与

本発明はまた、本発明で取り上げられるdsRNA化合物を含む医薬組成物および製剤も含む。本発明の医薬組成物は、局所的または全身的な処置が所望されるか、および処置される範囲に依存して、多くの方法で投与することができる。投与は、局所的、噴霧器によってを含む、例えば、粉末もしくは噴霧剤の吸入もしくは吹送による経肺、気管内、鼻腔内、表皮および経皮、経口もしくは非経口であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腔内、もしくは筋肉内注射もしくは注入、または頭蓋内、例えば、実質内、くも膜下腔内、もしくは脳室内投与が含まれる。40

【0115】

該dsRNAは、肝臓（例えば、肝臓の肝細胞）等の特定の組織を標的とする様態で送達することができる。50

【0116】

本発明は、脳に直接注射することによって送達することができる医薬組成物が含まれる。該注射は、脳の特定領域（例えば、黒質、皮質、海馬、線条体、もしくは淡蒼球）への定位固定注射によるものであり得、該 d s R N A は、中枢神経系への複数領域（例えば、脳、および / または脊髄への複数領域）に送達され得る。該 d s R N A は、脳の拡散領域に送達（例えば、脳の皮質への拡散送達）され得る。

【0117】

一実施形態において、T T R を標的とする d s R N A は、カニューレ、または例えば、脳等の組織（例えば、脳の黒質、皮質、海馬、線条体、もしくは淡蒼球）内に埋め込まれた一端を有する他の送達デバイスを経由して送達され得る。該カニューレは、該 d s R N A 組成物の貯蔵容器に接続することができる。流入または送達は、ポンプ、例えば、A l z e t ポンプ等の浸透圧ポンプもしくはミニポンプによって媒介され得る（D u r e c t , C u p e r t i n o , C A ）。一実施形態において、ポンプおよび貯蔵容器は、組織から離れたエリア、例えば腹部内に埋め込まれ、送達は、ポンプまたは貯蔵所から放出部位に誘導する導管によって達成される。該 d s R N A 組成物の脳への注入は、数時間にわたって、または数日間、例えば、1、2、3、5、もしくは7日間、もしくはそれ以上であり得る。脳への送達用のデバイスは、例えば、米国特許第 6,093,180 号、および第 5,814,014 号に記載されている。

【0118】

局所投与用の医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、グリーム、ゲル、ドロップ剤、坐薬、スプレー、液体、および粉末が含まれ得る。従来の医薬用担体、水性、粉末、もしくは油性基剤、増粘剤等が必要であるか、または望ましくあり得る。被覆したコンドーム、手袋等も有用であり得る。好適な局所製剤には、本発明で取り上げられる d s R N A が、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤、および界面活性剤等の局所送達剤と混合されるものが含まれる。好適な脂質およびリポソームには、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジル（D O P E ）エタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン（D M P C ）、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（D M P G ））、ならびにカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル（D O T A P ）、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（D O T M A ））が含まれる。本発明で取り上げられる d s R N A は、リポソーム内にカプセル化されてもよく、あるいはそれ、特にカチオン性リポソームと複合体を形成してもよい。代替として、d s R N A は、脂質、特にカチオン性脂質と複合されてもよい。好適な脂肪酸およびエステルには、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、バルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプリン酸、トリカプリン酸、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、または C₁ ~ C₁₀ アルキルエステル（例えば、ミリスチン酸イソプロピル（I P M ））、モノグリセリド、ジグリセリド、あるいはその薬剤として許容される塩が含まれるが、これらに限定されない。局所製剤は、米国特許第 6,747,014 号に詳細に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0119】

リポソーム製剤

薬物の製剤化用に研究されて、使用されているマイクロエマルジョンの他に、組織立った多くの界面活性剤の構造がある。これらには、単層、ミセル、二重層、および小胞が含まれる。リポソーム等の小胞は、薬物送達の観点からの、それらが提示する特異性および作用の持続時間から、大きな関心を集めている。本発明において使用される、「リポソーム」という用語は、球状の 1 つまたは複数の二重層に配置された両親媒性脂質の小胞を意味する。

【0120】

10

20

30

40

50

リポソームは、親油性材料および水性の内部から形成される膜を有する、単層状または多層状の小胞である。水性部分が、送達される組成物を含有する。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合することができる利点を有する。非カチオン性のリポソームは、細胞壁とさほど効率的に融合することはできないが、マクロファージによってインビボで取り込まれる。

【0121】

哺乳動物の無傷の皮膚を横断するために、脂質小胞は、好適な経皮勾配の影響下、それぞれ50 nm未満の直径を有する、一連の微細孔を通過しなければならない。したがって、高度に変形可能で、そのような微細孔を通過することができるリポソームを使用することが望ましい。

10

【0122】

リポソームのさらなる利点には、天然のリン脂質から得られたリポソームは、生体適合性および生分解性であること、リポソームは、広範な水溶性および脂溶性の薬物を組み込むことができること、リポソームは、それらの内部区画でカプセル化された薬物を、代謝および分解から保護できること、が含まれる (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製において考慮すべき重要な事項は、脂質の表面電荷、小胞の大きさ、およびリポソームの水性容積である。

20

【0123】

リポソームは、作用部位への活性成分の移送および送達に有用である。リポソーム膜は、構造的に生体膜と同様であるため、リポソームが組織に適用されると、リポソームは細胞膜との融合を開始し、リポソームと細胞との融合が進行するに従って、リポソームの内容物が細胞内へ出て、そこで活性薬剤が作用し得る。

【0124】

リポソーム製剤は、多くの薬物のための送達様式として、広範な調査の焦点となっている。局所投与について、リポソームが他の製剤に勝る幾つかの利点を提示するという証拠が増えつつある。かかる利点には、投与された薬物の高度な体内吸収に関連する副作用の減少、投与された薬物の所望の標的での蓄積の増加、ならびに親水性および疎水性の両方の多岐にわたる薬物を皮膚へ投与する能力が含まれる。

30

【0125】

幾つかの報告は、高分子量のDNAを含む薬剤を皮膚へ送達するリポソームの能力について詳述している。鎮痛剤、抗体、ホルモン、および高分子量のDNAを含む化合物が、皮膚に投与されている。大半の適用が、表皮上層の標的化をもたらした。

【0126】

リポソームは、広義の2つのクラスに分類される。カチオン性リポソームは、負に荷電したDNA分子と相互に作用し、安定な複合体を形成する、正に荷電したリポソームである。正に荷電したDNA / リポソーム複合体は、負に荷電した細胞表面に結合し、エンドソーム内に取り入れられる。エンドソーム内の酸性pHにより、リポソームが破裂し、その内容物を細胞の細胞質内に放出する (Wang et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980 - 985)。

40

【0127】

pH感受性であるか、または負に荷電したリポソームは、DNAと複合するのではなく、それを捕捉する。DNAおよび脂質は共に同様に荷電されているため、複合体形成ではなく反発が生じる。それでもなお、DNAの一部は、これらのリポソームの水性内部内に捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養下の細胞単層へ送達するために、pH感受性リポソームが使用されている。外因性遺伝子の発現が、標的細胞中で検出された (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269 - 274)。

50

【0128】

リポソーム組成物の1つの主要な種類には、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質が含まれる。例えば、中性のリポソーム組成物は、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、またはジパルミトイールホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性の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、一方アニオン性の膜融合性リポソームは、主にジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から形成される。リポソーム組成物の別の種類は、例えば、大豆ホスファチジルコリン、および卵ホスファチジルコリン等のホスファチジルコリン(PC)から形成される。別の種類は、リン脂質、および/またはホスファチジルコリン、および/またはコレステロールの混合物から形成される。

10

【0129】

幾つかの研究が、リポソーム製剤の皮膚への局所送達を評価している。インターフェロンを含有するリポソームのモルモット皮膚への適用は、皮膚ヘルペス炎の軽減をもたらし、一方他の手段(例えば、溶液またはエマルジョンとして)を介したインターフェロンの送達は効果がなかった(Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410)。さらに、さらなる研究は、リポソーム製剤の一部として投与されたインターフェロンの、水性系を使用するインターフェロンの投与に対する有効性を試験し、リポソーム製剤は水溶性投与より優れていると結論付けた(du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265)。

20

【0130】

また、非イオン性のリポソーム系は、特に非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む系における、薬物の皮膚への送達の実用性を決定するために調べられている。Novasome(商標)I(ジラウリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル)およびNovasome(商標)II(ジステアリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル)を含む非イオン性のリポソーム製剤が、シクロスボリンAをマウス皮膚の真皮に送達するために使用された。結果は、かかる非イオン性のリポソーム系が、皮膚の異なる層へのシクロスボリンAの沈着の促進に効果的であることを示した(Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

30

【0131】

また、リポソームには、「立体的に安定化された」リポソームが含まれ、該用語は、本明細書で使用される場合、1つ以上の特定化された脂質を含むリポソームを指し、リポソームに組み込まれると、かかる特定化された脂質を欠くリポソームと比較して、循環寿命の向上をもたらす。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞を形成する脂質部分の一部が、(A)モノシアロガングリオシドG_{M1}等の1つ以上の糖脂質を含むか、または(B)ポリエチレングリコール(PEG)部分等の1つ以上の親水性ポリマーで誘導体化されるものである。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはPEG誘導体化脂質を含有する立体的に安定化されたリポソームについて、これらの立体的に安定化されたリポソームの循環半減期の増加は、細網内皮系(RES)の細胞内への取り込みの減少に由来すると、当該技術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

【0132】

1つ以上の糖脂質を含む種々のリポソームが当該技術分野において既知である。Papahadjopoulos(Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)は、モノシアロガングリオシドG_{M1}、ガラクトセレブロシド硫酸、およ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について報告した。これらの所見は、Gabizonら(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.

50

A . , 1988 , 85 , 6949)によって詳しく説明されている。共に A l l e n らによる、米国特許第 4 , 837 , 028 号および国際公開 WO 第 88 / 04924 号は、(1)スフィンゴミエリン、および(2)ガングリオシド G_M1 もしく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(Webb ら)は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。 1 , 2 - s n - デミリストイルホスファチジルコリンを含むリポソームは、国際公開 WO 第 97 / 13499 号(Lim ら)に開示されている。

【 0133 】

1 つ以上の親水性ポリマーによって誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム、およびその調製方法は、当該技術分野において既知である。 Sunamoto ら(Bull. Chem. Soc. Jpn. , 1980 , 53 , 2778)は、 PEG 部分を含有する非イオン性界面活性剤、 2C1215G を含むリポソームについて記載している。 I l l um ら(FEBS Lett. , 1984 , 167 , 79)は、ポリスチレン粒子のポリマーゲリコールによる親水性コーティングが、血中半減期の著しい増加をもたらすことを指摘している。ポリアルキレンゲリコール(例えば、 PEG)のカルボン酸基の結合によって修飾された合成リン脂質が、 Sears (米国特許第 4 , 426 , 330 号、および第 4 , 534 , 899 号) によって記載されている。 K libanov ら(FEBS Lett. , 1990 , 268 , 235)は、 PEG またはステアリン酸 PEG によって誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン(PE)を含むリポソームが、血中循環半減期の著しい増加を有することを示す実験について記載している。 Blume ら(Bioc himica et Biophysica Acta , 1990 , 1029 , 91)は、このような観察を、他の PEG 誘導体化リン脂質、 例えば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)と PEG との組み合わせから形成される DSPE - PEG に広げた。外部表面に共有結合された PEG 部分を有するリポソームが、欧州特許 EP 第 0 445 131 B1 号および国際公開 WO 第 90 / 04384 号(Fishe r)に記載されている。 PEG によって誘導体化された 1 ~ 20 モルパーセントの PE を含有するリポソーム組成物、およびその使用方法が、 Woodle ら(米国特許第 5 , 013 , 556 号、および第 5 , 356 , 633 号)、ならびに Martin ら((米国特許第 5 , 213 , 804 号および欧州特許 EP 第 0 496 813 B1 号) によって記載されている。他の多くの脂質 - ポリマー共役体を含むリポソームが、国際公開 WO 第 91 / 05545 号および米国特許第 5 , 225 , 212 号(共に Martin らによる)、ならびに国際公開 WO 第 94 / 20073 号(Zalipsky ら)に開示されている。 PEG 修飾セラミド脂質を含むリポソームが、国際公開 WO 第 96 / 10391 号(Choi ら)に記載されている。米国特許第 5 , 540 , 935 号(Miyazaki ら)および米国特許第 5 , 556 , 948 号(Tagawa ら)は、表面に官能基部分をさらに誘導体化することができる PEG 含有リポソームについて記載している。

【 0134 】

核酸を含む多くのリポソームが当該技術分野において既知である。 Thieerry らによる国際公開 WO 第 96 / 40062 号は、高分子量の核酸をリポソーム中にカプセル化するための方法を開示している。 Tagawa らによる米国特許第 5 , 264 , 221 号は、タンパク質結合リポソームを開示し、かかるリポソームの内容物には dsRNA が含まれると主張している。 Rahmann らによる米国特許第 5 , 665 , 710 号は、オリゴデオキシヌクレオチドをリポソーム中にカプセル化する特定の方法について記載している。 Love らによる国際公開 WO 第 97 / 04787 号は、 raf 遺伝子を標的とする dsRNA を含むリポソームを開示している。

【 0135 】

トランスファーソームはさらに別の種類のリポソームであり、薬物送達媒体の興味を引く候補者である、高度に変形可能な脂質凝集物である。トランスファーソームは脂質小滴として記載されてもよく、これは、高度に変形可能であるため、この小滴より小さな孔に容易に浸透することができる。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適合

10

20

30

40

50

可能であり、例えば、自己最適性（皮膚の孔の形状に適合する）、自己修復性であり、しばしば断片化されることなく標的に到達し、しばしば自己負荷性（self-loading）である。トランスファーソームを作製するために、標準的なリポソーム組成物に対して、表面エッジアクチベータ（surface edge-activator）、通常界面活性剤を添加することができる。トランスファーソームは、血清アルブミンを皮膚へ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ァーソームによって媒介される送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注射と同様に効果的であることが示されている。

【0136】

界面活性剤は、エマルジョン（マイクロエマルジョンを含む）およびリポソーム等の製剤中に幅広い用途を見出す。天然および合成の両方の、多くの異なる種類の界面活性剤の性質を分類および順位付ける最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（HLB）の使用によるものである。親水性基（「頭部基」としても知られる）の性質が、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）。

【0137】

界面活性剤分子がイオン化されていない場合、これは、非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、医薬品および化粧品に幅広い用途を見出し、広範なpH値にわたって使用可能である。一般に、それらのHLB値は、その構造に依存して、2～約18の範囲である。非イオン性界面活性剤には、エチレングリコールエステル、ブロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシ化エステル等の非イオン性エステルが含まれる。脂肪アルコールエトキシ化物（ethoxylate）、プロポキシ化（propoxylated）アルコール、およびエトキシ化／プロポキシ化ブロックポリマー等の非イオン性アルカノールアミドおよびエーテルも、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤が、非イオン性界面活性剤のクラスのうちで最も一般的な構成物質である。

【0138】

界面活性剤分子が水中に溶解または分散された時に負の電荷を保有する場合、その界面活性剤は、アニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤には、石鹼等のカルボン酸塩、アシルラクチレート（lactylate）、アミノ酸のアシルアミド、アルキル硫酸塩およびエトキシ化アルキル硫酸塩等の硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホネート、アシルイセチオネート（isethionate）、アシルタウレート（taurate）、およびスルホコハク酸塩等のスルホネート、ならびにリン酸塩が含まれる。アニオン性界面活性剤のクラスのうちで最も重要な構成物質は、アルキル硫酸塩および石鹼である。

【0139】

界面活性剤分子が正の荷電を保有する場合、それが水中に溶解または分散されると、その界面活性剤はカチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤には、第四アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが含まれる。第四アンモニウム塩がこのクラスで最も使用される構成物質である。

【0140】

界面活性剤分子が正または負の電荷のいずれをも保有する能力を有する場合、その界面活性剤は、両性として分類される。両性界面活性剤には、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタイン、およびフォスファチドが含まれる。

【0141】

薬品、製剤、およびエマルジョン中の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）。

10

20

30

40

50

【0142】

核酸脂質粒子

一実施形態において、本発明で取り上げられるTTRのdsRNAは、脂質製剤中に完全にカプセル化されて、SPLP、pSPLP、SNALP、または他の核酸脂質粒子を形成する。本明細書で使用される、「SNALP」という用語は、SPLPを含む安定な核酸脂質粒子を指す。本明細書で使用される、「SPLP」という用語は、脂質小胞内にカプセル化されたプラスミドDNAを含む核酸脂質粒子を指す。SNALPおよびSPLPは、典型的には、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を阻止する脂質（例えば、PEG脂質共役体）を含有する。SNALPおよびSPLPは、静脈内（i.v.）注射後に長時間の循環寿命を呈し、遠位の部位（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、全身適用に非常に有用である。SPLPには、「pSPLP」が含まれ、これには、PCT公開WO第00/03683号に記載されるカプセル化された縮合剤と核酸との複合体が含まれる。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70～約90nmの平均直径を有し、実質的に無毒である。さらに、該核酸は、本発明の核酸脂質粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に抵抗性である。核酸脂質粒子およびその調製方法は、例えば、米国特許第5,976,567号、第5,981,501号、第6,534,484号、第6,586,410号、第6,815,432号、およびPCT公開WO第96/40964号に開示されている。

10

20

【0143】

一実施形態において、脂質の薬物に対する比率（質量／質量比率）（例えば、脂質のdsRNAに対する比率）は、約1：1～約50：1、約1：1～約25：1、約3：1～約15：1、約4：1～約10：1、約5：1～約9：1、または約6：1～約9：1の範囲内であろう。

【0144】

カチオン性脂質は、例えば、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルクロライド(DODAC)、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド(DDAB)、N-(I-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルクロライド(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(Dilinoleyl oxy)-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLindDMA)、1,2-ジリノレニルオキシ(Dilinolenyl oxy)-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLendDMA)、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ(Dilinoleyl carbamoyl oxy)-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(Dilinoleyoxy)-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-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(Dilinoleyl thio)-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(linoleyl oxy)-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.C1)、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.C1)、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン(DLin-MPZ)、または3-(N,N-ジリノレイルアミノ)(Dioleyl amino)-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(propandieno)(DOAP)、1,2-ジリノレイルオキソ(Dilinoleyl oxo)-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

30

40

50

オキシ - N , N - ジメチルアミノプロパン (D L i n D M A) 、 2 , 2 - ジリノレイル (D i l i n o l e y l) - 4 - ジメチルアミノメチル - [1 , 3] - ジオキソラン (D L i n - K - D M A) 、 またはそれらの類似体、 (3 a R , 5 s , 6 a S) - N , N - ジメチル - 2 , 2 - ジ ((9 Z , 1 2 Z) - オクタデカ - 9 , 1 2 - ジエニル) テトラヒドロ - 3 a H - シクロペンタ [d] [1 , 3] ジオキソール - 5 - アミン (A L N 1 0 0) 、 (6 Z , 9 Z , 2 8 Z , 3 1 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6 , 9 , 2 8 , 3 1 - テトラエン - 1 9 - イル 4 - (ジメチルアミノ) ブタノエート (M C 3) 、 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) エチルアザネジイル) ジドデカン - 2 - オール (T e c h G 1) 、 あるいはそれらの混合物であり得る。カチオン性脂質は 10 、粒子中に存在する総脂質の約 2 0 モル % ~ 約 5 0 モル % 、または約 4 0 モル % からなり得る。

【 0 1 4 5 】

別の実施形態では、脂質 s i R N A ナノ粒子を調製するために、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については、2 0 0 8 年 1 0 月 2 3 日出願の米国仮特許出願第 6 1 / 1 0 7 , 9 9 8 号に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 4 6 】

一実施形態において、脂質 s i R N A 粒子には、 4 0 % の 2 , 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1 , 3] - ジオキソラン、 1 0 % の D S P C 、 4 0 % のコレステロール、 1 0 % の P E G - C - D O M G (モルパーセント) が含まれ、粒径 6 3 . 0 ± 2 0 n m および 0 . 0 2 7 の s i R N A / 脂質比である。

【 0 1 4 7 】

非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) 、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C) 、ジバルミトイールホスファチジルコリン (D P P C) 、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (D O P G) 、ジバルミトイールホスファチジルグリセロール (D P P G) 、ジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン (D O P E) 、バルミトイールオレオイルホスファチジルコリン (P O P C) 、バルミトイールオレオイルホスファチジルエタノールアミン (P O P E) 、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 (D O P E - m a l) 、ジバルミトイールホスファチジルエタノールアミン (D P P E) 、ジミリストイルホスホエタノールアミン (D M P E) 、ジステアロイル - ホスファチジル - エタノールアミン (D S P E) 、 1 6 - O - モノメチル P E 、 1 6 - O - ジメチル P E 、 1 8 - 1 - トランス P E 、 1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジエタノールアミン (S O P E) 、コレステロール、 またはそれらの混合物を含むが、これらに限定されない、アニオン性脂質または中性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、コレステロールが含まれる場合、粒子中に存在する総脂質の約 5 モル % ~ 約 9 0 モル % 、約 1 0 モル % 、または約 5 8 モル % であり得る。

【 0 1 4 8 】

粒子の凝集を阻害する共役された脂質は、例えば、制限されないが、 P E G - ジアシルグリセロール (D A G) 、 P E G - ジアルキルオキシプロピル (D A A) 、 P E G - リン脂質、 P E G - セラミド (C e r) 、 またはそれらの混合物を含む、ポリエチレングリコール (P E G) - 脂質であり得る。 P E G - D A A 共役体は、例えば、 P E G - ジラウリルオキシプロピル (C i 2) 、 P E G - ジミリストイルオキシプロピル (C i 4) 、 P E G - ジバルミチルオキシプロピル (C i 6) 、 または P E G - ジステアリルオキシプロピル (C i 8) であり得る。粒子の凝集を阻止する共役された脂質は、粒子中に存在する総脂質の 0 モル % ~ 約 2 0 モル % 、または約 2 モル % であり得る。

【 0 1 4 9 】

幾つかの実施形態において、該核酸脂質粒子には、例えば、粒子中に存在する総脂質の

10

20

30

40

50

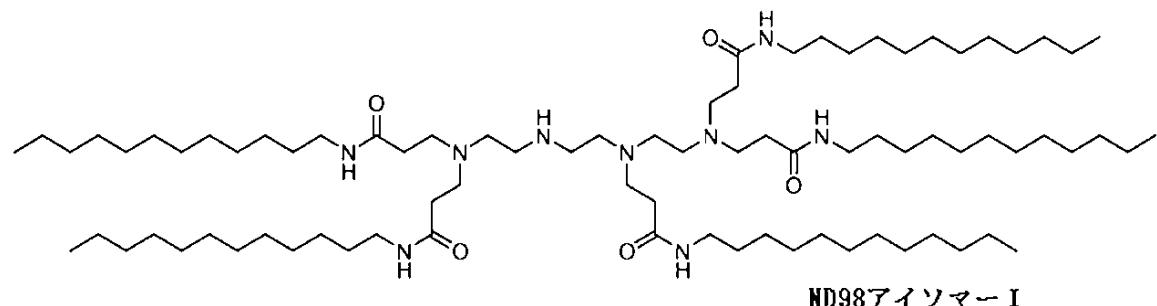
約10モル%～約60モル%、または約48モル%のコレステロールがさらに含まれる。

【0150】

L N P 0 1

一実施形態において、脂質様 (lipidoid) ND98-4HCl (MW1487) (式1)、コレステロール (Sigma-Aldrich)、およびPEG-Ceramide C16 (Avanti Polar Lipids) を使用して、脂質 siRNA ナノ粒子 (すなわち、LNP01粒子) を調製することができる。それぞれエタノール中の原液を、ND98、133mg/mL；コレステロール、25mg/mL；PEG-Ceramide C16、100mg/mL のように調製することができる。次いで、ND98、コレステロール、およびPEG-Ceramide C16 の原液を、例えば、42:48:10のモル比に混合することができる。混合された脂質溶液は、最終エタノール濃度が約35～45%、および最終酢酸ナトリウム濃度が約100～300mM になるように、(例えば、酢酸ナトリウム(pH5)中の) siRNA 水溶液と混合することができる。脂質 siRNA ナノ粒子は、典型的には、混合時に自然発生的に形成される。所望の粒径分布に依存して、得られたナノ粒子混合物は、例えば、Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc) 等のサーモバレル押出機 (thermobarrel extruder) を使用して、ポリカーボネート膜 (例えば、100nm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、押出ステップは割愛されてもよい。エタノール除去および同時の緩衝液交換は、例えば、透析また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、または約pH7.4のリン酸緩衝食塩水 (PBS) と交換することができる。

【化1】



式1

LNP01 製剤については、例えば、国際出願公開WO第2008/042973号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0151】

さらなる例示的な脂質 siRNA 製剤は、以下の通りである。

【表 1 A - 1】

| | カチオン性脂質 | カチオン性脂質/非カチオン性脂質/コレステロール/PEG 脂質共役体 脂質:siRNA比 | 過程 |
|-----------|---|---|---------|
| SNALP | 1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン(DLinDMA) | DLinDMA/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質:siRNA 約7:1 | |
| SNALP-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 | 押出 |
| 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 | 押出 |
| 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 | インライン混合 |
| 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 | インライン混合 |

10

20

30

【表1A-2】

| | | | |
|-------|--|---|---------------|
| LNP09 | 2,2-ジリノイル-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 | インライン混合 |
| LNP10 | (3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエンイル)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 | インライン混合 10 |
| 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)ブタノエート(MC3) | MC-3/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1 | インライン混合 |
| 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)ペペラジン-1-イル)エチルアザネジイル)ジドデカン-2-オール(Tech G1) | Tech G1/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1 | インライン混合 20 |

【0152】

LNP09製剤およびXTCを含む製剤は、例えば、2009年9月3日出願の米国仮出願第61/239,686号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。LNP11製剤およびMC3を含む製剤は、例えば、2009年9月22日出願の米国仮出願第61/244,834号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0153】

標準的な方法、または押出を伴わない方法のうちのいずれかによって調製された製剤を同様の様態で特徴付けることができる。例えば製剤は、典型的には、目視検査によって特徴付けられる。それらは、凝集物または沈降物のない、白っぽい半透明の溶液であるべきである。脂質ナノ粒子の粒径および粒径分布は、例えば、Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern (USA))を使用して、光散乱によって測定することができる。粒子は、40~100nm等の約20~300nmの粒径であるべきである。粒径分布は、単峰型であるべきである。製剤中、ならびに捕捉された画分中の総siRNA濃度は、色素排除アッセイを使用して推定される。製剤化されたsiRNAの試料を、製剤を分裂させる界面活性剤、例えば、0.5%のTriton-X100の存在または不在下、Ribogreen (Molecular Probes)等のRNAに結合する色素を用いてインキュベートすることができる。製剤中の総siRNAは、標準曲線に対する、該界面活性剤を含有する試料からのシグナルによって決定することができる。捕捉された画分を、総siRNA含有量からsiRNAを「含まない」含有量（界面活性剤の不在下のシグナルによって測定される）を差し引くことによって決定する。捕捉されたsiRNAのパーセントは、典型的には85%超である。SNALP製剤については、粒径は、少なくとも30nm、少なくとも40nm、少なくとも50nm、少なくとも60nm、少なくとも70nm、少なくとも80nm、少なくとも90nm、少なくとも100nm、少なくとも110nm、および少なくとも120nmである。好適な範囲

10

20

30

40

50

は、典型的には少なくとも約 50 nm ~ 少なくとも約 110 nm、少なくとも約 60 nm ~ 少なくとも約 100 nm、または少なくとも約 80 nm ~ 少なくとも約 90 nm である。

【0154】

経口投与用の組成物および製剤には、粉末もしくは顆粒、微粒子、ナノ粒子、水もしくは疎水性媒体中の懸濁液もしくは溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシェット、錠剤、またはミニタブレットが含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましくあり得る。幾つかの実施形態において、経口製剤とは、本発明で取り上げられる dsRNA が、1つ以上の浸透促進剤、界面活性剤、およびキレート化剤と併用して投与されるものである。好適な界面活性剤には、脂肪酸および / またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および / またはその塩が含まれる。好適な胆汁酸 / 塩には、ケノデオキシコール酸 (CDC A) およびウルソデオキシケノデオキシコール酸 (UDCA)、コレル酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸 (gluholic acid)、グリコール酸 (glycolic acid)、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、ならびにグリコジヒドロフシジン酸ナトリウムが含まれる。好適な脂肪酸には、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、トリカプリン酸、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、またはモノグリセリド、ジグリセリド、もしくはその薬剤として許容される塩 (例えば、ナトリウム) が含まれる。幾つかの実施形態において、浸透促進剤の組み合わせが使用され、例えば、胆汁酸 / 塩と組み合わせた脂肪酸 / 塩が挙げられる。例示的な1つの組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、および U D C A のナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤には、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 - セチルエーテルが含まれる。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経口的に送達されるか、または微小もしくはナノ粒子を形成するように複合されてもよい。dsRNA 複合剤には、ポリ - アミノ酸類；ポリイミン類；ポリアクリレート類；ポリアルキルアクリレート類、ポリオキセタン類、ポリアルキルシアノアクリレート類；カチオン化ゼラチン類、アルブミン類、デンプン類、アクリレート類、ポリエチレングリコール類 (PEG)、およびデンプン類；ポリアルキルシアノアクリレート類；D E A E 誘導体化ポリイミン類、ポルラン (polulan) 類、セルロース類、およびデンプン類が含まれる。好適な複合剤には、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レート)、D E A E - メタクリレート、D E A E - ヘキシルアクリレート、D E A E - アクリルアミド、D E A E - アルブミンおよび D E A E - 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 (D L - 乳酸 - co - グリコール酸 (PLGA)、アルギン酸塩、ならびにポリエチレングリコール (PEG) が含まれる。dsRNA 用の経口製剤およびそれらの調製は、米国特許第 6,887,906 号、米国特許公開第 20030027780 号、および米国特許第 6,747,014 号に詳細に記載され、これらはそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0155】

非経口、実質内 (脳内への)、くも膜下腔内、脳室内、または肝内投与用の組成物および製剤には、滅菌水溶液が含まれてもよく、これも、限定されないが、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬剤として許容される担体もしくは賦形剤等の緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤を含有し得る。

10

20

30

40

50

【0156】

本発明の医薬組成物には、溶液、エマルジョン、およびリポソームを含有する製剤が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物は、予め形成された液体、自己乳化型固体および、自己乳化型半固体を含む種々の構成成分から生成することができるが、これらに限定されない。肝臓癌等の肝障害を処置する際に肝臓を標的とする製剤が特に好ましい。

【0157】

本発明の医薬製剤は、簡便に単位剤形で提示することができ、医薬産業において周知である従来の技法によって、調製することができる。かかる技法には、活性成分を1つもしくは複数の医薬用担体または1つもしくは複数の賦形剤と合わせるステップが含まれる。一般に、該製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体、あるいはその両方と均一かつ密接に関連させ、次いで必要であれば該産物を成形することによって調製される。

10

【0158】

本発明の組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐薬、および浣腸等の考えられる多くの剤形のうちのいずれかに製剤化することができる。また、本発明の組成物は、水性、疎水性、または混合媒体中の懸濁液として製剤化することもできる。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、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質をさらに含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

20

【0159】

エマルジョン

本発明の組成物は、エマルジョンとして調製および製剤化することができる。エマルジョンは、典型的には、1つの液体が、通常直径 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ を超える液滴の形態の別の液体中に分散された多相系である (Edson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199, Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245, Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Bunker (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)。エマルジョンは、しばしば、互いに密接に混合および分散される、2つの非混溶性の液相を含む二相系である。一般に、エマルジョンは、油中水(w/o)型または水中油(o/w)型のいずれかの種類であり得る。水相が、大部分を占める油相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、油中水(w/o)型エマルジョンと称される。あるいは、油相が、大部分を占める水相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、水中油(o/w)型エマルジョンと称される。エマルジョンは、分散相に加えてさらなる構成成分と、水相または油相のいずれか中の溶液として、またはそれ自体別個の相として存在し得る、活性薬物とを含有することができる。また、乳化剤、安定剤、染料、および抗酸化剤等の医薬用賦形剤が、必要に応じてエマルジョン中に存在してもよい。また、医薬用エマルジョンは、例えば、油中水中油(o/w/o)型および水中油中水(w/o/w)型エマルジョンの場合等の、2つを超える相を含む、多重エマルジョンであってもよい。このような複合製剤は、しばしば、単純な二元エマルジョンは提供しない、特定の利点を提供する。o/w型エマルジョンの個々の油滴が小さな水滴を囲む多重エマルジョンは、w/o/w型エマルジョンを構成

30

40

50

する。同様に、油の連続相中で安定化された水の小球内に囲まれた油滴の系は、o / w / o型エマルジョンを提供する。

【0160】

エマルジョンは、熱力学的安定性によってほとんどまたは全く特徴付けられない。しばしば、エマルジョンの分散相または不連続相が、外相または連続相中に良好に分散され、乳化剤の手段または製剤の粘度によってこの形態が維持される。エマルジョンの相のいずれも、エマルジョン型軟膏基剤およびクリームの場合のように、半固体または固体であり得る。エマルジョンを安定化する他の手段は、エマルジョンのいずれかの相に組み込むことができる乳化剤の使用を必要とする。乳化剤は、大きく、合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収基剤、および微細に分散された固体の4つのカテゴリーに分類することができる(Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。
10

【0161】

合成界面活性剤は、表面活性剤としても知られ、エマルジョン製剤における広範な適用性が見出されており、文献で概説されている(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)。界面活性剤は、典型的には両親媒性であり、親水性および疎水性の部分を含む。界面活性剤の、親水性の疎水性に対する比率は、親水性／親油性バランス(HLB)と称されており、製剤の調製時の界面活性剤の分類および選択における、貴重なツールである。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて、非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性の異なるクラスに分類することができる(Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。
20
30

【0162】

エマルジョン製剤に使用される天然に存在する乳化剤には、ラノリン、蜜蝋、フォスファチド類、レシチン、およびアカシアが含まれる。吸収基剤は、水を吸収してw/o型エマルジョンを形成するが、依然として無水ラノリンおよび親水性ペトロラタム等のそれらの半固体の稠度を保持することができる、親水性を有する。微細に分割された固体も、特に界面活性剤と組み合わせて、また粘性の調製物中で、良好な乳化剤として使用されている。これらには、極性の無機固体、例えば、重金属水酸化物、非膨張性粘土、例えば、ベントナイト、アタバーリジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド性ケイ酸アルミニウムおよびコロイド性ケイ酸アルミニウムマグネシウム、顔料、ならびに非極性固体、例えば、炭素もしくはトリステアリン酸グリセリルが含まれる。
40

【0163】

また、多岐にわたる非乳化材料もエマルジョン製剤に含まれ、エマルジョンの性質に寄与する。これらには、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、防腐剤、および抗酸化剤が含まれる(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 Dekke
50

r, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

【0164】

親水性コロイドまたは親水コロイドには、多糖類（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲニン、グアーガム、カラヤガム、およびトラガカント）、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース）、および合成ポリマー（例えば、カルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー）等の、天然に存在するガムおよび合成ポリマーが含まれる。これらは、水中で分散または膨張して、分散相の液滴の周りに強い界面薄膜を形成し、外相の粘度を増加させることによってエマルジョンを安定化させる、コロイド溶液を形成する。

【0165】

エマルジョンは、しばしば、微生物の成長を容易に支持することができる炭水化物、タンパク質、ステロール、およびフォスファチド等の多くの成分を含有するため、これらの製剤には、しばしば防腐剤が組み込まれる。エマルジョン製剤に含まれる一般的に使用される防腐剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸が含まれる。また、製剤の劣化を阻止するために、抗酸化剤も一般的にエマルジョン製剤に添加される。使用される抗酸化剤は、フリーラジカルスカベンジャー、例えば、トコフェロール、アルキルガレート、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、または還元剤、例えば、アスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウム、ならびに抗酸化剤シナージスト、例えば、クエン酸、酒石酸、およびレシチンであり得る。

【0166】

皮膚、経口、および非経口経路を介するエマルジョン製剤の適用、ならびにそれらを製造するための方法は、文献で概説されている (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。経口送達用のエマルジョン製剤は、製剤化の容易さ、ならびに吸収および生物学的利用能の見地からの有効性から、非常に広範に使用されている (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)。鉱油基材の緩下剤、油溶性ビタミン、および高脂肪栄養調製物が、o/w型エマルジョンとして一般的に経口投与されている材料に含まれる。

【0167】

本発明の一実施形態において、dsRNAおよび核酸の組成物が、マイクロエマルジョンとして製剤化される。マイクロエマルジョンは、水、油、および单一の、光学的に等方性かつ熱力学的に安定な液体溶液である両親媒性物質の系として定義することができる (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。典型的には、マイクロエマルジョンは、まず油を界面活性剤水溶液中に分散し、次に十分な量の第4の構成成分、一般には中間鎖長の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。したがって、マイクロエマルジョンは、表面活性分子の界面薄膜によって安定化される、2つの非混和液の熱力学的に安定で等方的な、透明の分散物質としても記載されている (Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VC 40

10

20

30

40

50

H Publishers, New York, pages 185 - 215)。マイクロエマルジョンは、一般的に、油、水、界面活性剤、共界面活性剤、および電解質を含む、3~5つの構成成分の組み合わせを通じて調製される。マイクロエマルジョンが油中水(w/o)型、または水中油(o/w)型であるかは、使用される油および界面活性剤の性質、ならびに界面活性剤分子の極性頭部および炭化水素尾部の構造および幾何学的な畳み込みに依存する(Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0168】

相図を利用する現象論的手法が広範に研究されており、マイクロエマルジョンを製剤化する方法についての包括的な知識を当業者にもたらしている(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)。従来のエマルジョンと比較して、マイクロエマルジョンは、自然発生的に形成される熱力学的に安定な液滴の製剤において、不水溶性薬物を可溶化する利点を提示する。

【0169】

マイクロエマルジョンの調製に使用される界面活性剤には、単独、または共界面活性剤と組み合わせた、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート(ML310)、テトラグリセロールモノオレエート(MO310)、ヘキサグリセロールモノオレエート(PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート(PO500)、デカグリセロールモノカブレート(MCA750)、デカグリセロールモノオレエート(MO750)、デカグリセロールセクイオレエート(sequence)(SO750)、デカグリセロールデカオレエート(DAO750)が含まれるが、これらに限定されない。共界面活性剤は、通常、エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノール等の短鎖アルコールであるが、界面活性剤の薄膜中に浸透し、その結果、界面活性剤分子の間に生成される空隙のために不規則な薄膜を形成することによって、界面流動性を増加させる役目を果たす。しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用を伴わずに調製することができ、アルコールを含まない自己乳化型のマイクロエマルジョン系が、当該技術分野において既知である。水相は、典型的には、水、該薬物の水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコールの誘導体であり得るが、これらに限定されない。油相には、Captev 300、Captev 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖(C8~C12)のモノ、ジ、およびトリ-グリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリ糖化(polyglycolized)グリセリド、飽和ポリ糖化C8~C10グリセリド、植物油、ならびにシリコーンオイル等の材料が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0170】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化および薬物吸収の亢進の見地から、特に興味深い。ペプチドを含む薬物の経口での生物学的利用能を亢進させるために、脂質基剤のマイクロエマルジョン(o/w型およびw/o型の両方)が提案されている(Constandinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385~1390、Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205)。マイクロエマルジョンは、改善された薬物の可溶化、酵素的加水分解からの薬物の保護、界面活性剤が誘発する膜流動性および透過性における変化による薬物吸収の潜在的な亢進、調製の容易さ、固形剤

10

20

30

40

50

形を超える経口投与の容易さ、改善された臨床的効力、および低減した毒性の利点を提供する (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385, Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143)。しばしば、マイクロエマルジョンは、その構成成分が周囲温度で引き合わされると、自然発生的に形成され得る。これは、熱不安定性の薬物、ペプチド、または dsRNA を製剤化する際に特に有利であり得る。また、マイクロエマルジョンは、化粧用途および医薬用途の双方における活性構成成分の経皮送達に効果的である。本発明のマイクロエマルジョン組成物および製剤は、消化管からの dsRNA および核酸の向上された体内吸収を促進し、dsRNA および核酸の局所的な細胞取り込みを改善することが期待される。

10

【0171】

また、本発明のマイクロエマルジョンは、製剤の特性を改善し、本発明の dsRNA および核酸の吸収を亢進させるための、モノステアリン酸ソルビタン (Gri l l 3)、Labrasol、および浸透促進剤等のさらなる構成成分および添加剤を含有することができる。本発明のマイクロエマルジョンに使用される浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するもの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)。これらのクラスのそれぞれが、上述されている。

20

【0172】

浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、核酸、特に dsRNA の、動物の皮膚への効率的な送達を達成させるために、種々の浸透促進剤を用いる。ほとんどの薬物は、イオン化および非イオン化の両方の形態で溶液中に存在する。しかしながら、通常脂溶性または親油性の薬物のみが、容易に細胞膜を横断する。横断される膜が浸透促進剤で処理されている場合、非親油性薬物でさえも、細胞膜を横断し得ることが発見されている。非親油性薬物の細胞膜を横断する拡散の補助に加えて、浸透促進剤は、親油性薬物の透過性も亢進する。

【0173】

浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するもの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)。浸透促進剤の前述のクラスのそれぞれについて、以下により詳細に記載する。

30

【0174】

界面活性剤：本発明に関連して、界面活性剤（または「表面活性剤」）とは、水溶液中に溶解されると、溶液の表面張力または該水溶液と別の液体との間の界面張力を減少させ、粘膜を通る dsRNA の吸収が亢進されるという結果をもたらす、化学物質である。胆汁塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤には、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン - 20 - セチルエーテル (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)、ならびに FC - 43 等のペルフルオロ化合物エマルジョンが含まれる (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252)。

40

【0175】

脂肪酸：浸透促進剤として作用する種々の脂肪酸およびそれらの誘導体には、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリチン酸 (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、ジカプリチン酸、トリカプリチン酸、モノオレイン (1 - モノオレオイル - rac - グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン

50

酸、グリセロール 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、それらの C₁ - C₁₀ アルキルエステル（例えば、メチル、イソプロピル、および t - ブチル）、ならびにそれらのモノおよびジ - グリセリド（すなわち、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、リノール酸塩等）が含まれる（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）。 10

【0176】

胆汁塩：胆汁の生理学的役割には、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が含まれる（Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934 - 935）。種々の天然胆汁塩、およびそれらの合成誘導体は、浸透促進剤として作用する。したがって、「胆汁塩」という用語には、胆汁の天然に存在する構成成分のうちのいずれも、ならびにそれらの合成誘導体のうちのいずれもが含まれる。好適な胆汁塩には、例えば、コレ酸（もしくはその薬剤として許容されるナトリウム塩、コレ酸ナトリウム）、デヒドロコレ酸（デヒドロコレ酸ナトリウム）、デオキシコレ酸（デオキシコレ酸ナトリウム）、グルコレ酸（グルコレ酸ナトリウム（sodium glucolate））、グリコレ酸（グリコレ酸ナトリウム）、グリコデオキシコレ酸（グリコデオキシコレ酸ナトリウム）、タウロコレ酸（タウロコレ酸ナトリウム）、タウロデオキシコレ酸（タウロデオキシコレ酸ナトリウム）、ケノデオキシコレ酸（ケノデオキシコレ酸ナトリウム）、ウルソデオキシコレ酸（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、およびポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル（POE）が含まれる（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）。 20

【0177】

キレート剤：本発明に関連して使用されるキレート剤は、金属イオンとの複合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、粘膜を通る ds RNA の吸収の亢進という結果をもたらす化合物として、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使用に関して、ほとんどの特徴付けられた DNA ヌクレアーゼは触媒作用に二価金属イオンを必要とすることから、キレート剤によって阻害されるため、キレート剤は、DNA アーゼ阻害剤としても機能するさらなる利点を有する（Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315 - 339）。好適なキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）、クエン酸、サリチル酸塩（例えば、サリチル酸ナトリウム、5 - メトキシサリチル酸塩、およびホモバニレート（homovanilicate））、コラーゲンの N - アシル誘導体、ラウレス - 9、およびベータ - ジケトンの N - アミノアシル誘導体（エナミン）が含まれるが、これらに限定されない（Lee e 40

10

20

30

30

40

50

t 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)。

【0178】

非キレート非界面活性剤：本明細書で使用される、非キレート非界面活性剤の浸透促進化合物は、キレート剤または界面活性剤としてわずかな活性しか示さないが、それにもかかわらず消化器粘膜を通じての dsRNA の吸収を亢進する化合物として、定義することができる (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33)。¹⁰ このクラスの浸透促進剤には、例えば、不飽和環状尿素、1-アルキル-および1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体 (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92)、ならびにジクロフェナクナトリウム、インドメタシン、およびフェニルブタゾン等の非ステロイド性抗炎症薬 (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626) が含まれる。

【0179】

担体²⁰

また、本発明の特定の組成物には、製剤中に担体化合物が組み込まれる。本明細書で使用される、「担体化合物」または「担体」は、不活性（すなわち、それ自体生物活性を有さない）であるが、例えば、生物活性のある核酸の分解、または循環からのその除去の促進によって、生物活性を有する核酸の生物学的利用能を減少させるインビボ過程によって、核酸として認識される、核酸、またはその類似体を指すことができる。核酸と担体化合物との同時投与は、典型的には後者の物質を過剰に伴い、おそ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、または他の循環外の貯蔵所で回収される核酸の量の著しい減少をもたらし得る。例えば、肝組織中の部分的ホスホロチオエート dsRNA の回収は、それがポリイノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジン酸 (poly cytidic acid)、または 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場合、減少され得る (Miya et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121、Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。³⁰

【0180】

賦形剤⁴⁰

担体化合物とは対照的に、「医薬用担体」または「賦形剤」は、1つ以上の核酸を動物に送達するための、薬剤として許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性な媒体である。賦形剤は液体または固体であり得、核酸および所定の医薬組成物の他の構成成分と組み合わされた時に、所望の用量、軟度等を提供するように、計画された投与の様態を念頭において選択される。典型的な医薬用担体には、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース等）、充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖、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、またはリン酸水素カルシウム等）、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、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、コーンスターーチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、崩壊剤（例えば、デンプン、デンブングリコール酸ナトリウム等）、ならびに湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等）が含まれるが、これらに限定されない。

【0181】

10

20

30

40

50

また、核酸と有害に反応しない、経口 (non-parenteral) 投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を、本発明の組成物を製剤化するために使用することができる。好適な薬剤として許容される担体には、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が含まれるが、これらに限定されない。

【0182】

核酸の局所投与用の製剤には、滅菌および非滅菌水溶液、アルコール等の一般的な溶媒中の非水溶液、または液体もしくは固体の油基剤中の核酸の溶液が含まれ得る。該溶液は、緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤も含有し得る。核酸と有害に反応しない、経口 (non-parenteral) 投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を使用することができる。10

【0183】

好適な薬剤として許容される賦形剤には、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が含まれるが、これらに限定されない。

【0184】

他の構成成分

本発明の組成物は、医薬組成物中に従来認められる他の補助的な構成成分を、それらの当該技術分野において確立された使用量レベルで、さらに含有することができる。したがって、例えば、本組成物は、さらに、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬、または抗炎症薬等の、適合性の、薬剤として活性な材料を含有してもよく、あるいは、染料、香味剤、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤等の、本発明の組成物の種々の剤形に物理的に製剤化するために有用な、さらなる材料を含有してもよい。しかし、かかる材料は、添加された時に、本発明の組成物の構成成分の生物活性を過度に妨げてはならない。該製剤を滅菌し、所望される場合、補助的な薬剤、例えば、該製剤の1つまたは複数の核酸と有害に相互作用しない滑沢剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝液、着色物質、香味物質、および/または芳香物質等と混合してもよい。20

【0185】

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、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

【0186】

幾つかの実施形態において、本発明で取り上げられる医薬組成物には、(a) 1つ以上のdsRNA化合物および(b) 非RNAi機序によって機能する1つ以上の抗サイトカイン生物剤が含まれる。かかる生物学の例には、IL1 (例えばアンキンラ)、IL6 (トリリズマブ)、またはTNF (エタネルセプト、インフリキシマブ、アドリムマブ、もしくはセルトリズマブ) を標的とする生物学が含まれる。40

【0187】

かかる化合物の毒性および治療効果は、例えば、LD50 (集団の50%に致死的な用量)、およびED50 (集団の50%に治療上有効な用量) を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的な医薬的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、LD50 / ED50 比として表すことができる。高い治療指数を呈する化合物が好ましい。

【0188】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータを、ヒトにおける使用のための一連の投薬量の処方決定に使用することができる。本発明で取り上げられる組成物の投薬量は、一般に、ほとんどまたは全く毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内にある。投50

薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なり得る。本発明で取り上げられる方法において使用されるいずれの化合物についても、治療上有効な用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、I C 5 0 (すなわち、症状の半値阻害を達成する試験化合物の濃度)を含む、化合物、または適切な場合は、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲(例えば、該ポリペプチドの濃度の低下を達成する)を達成するよう、処方決定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0189】

10

それらの投与に加えて、上述のように、本発明で取り上げられるd s R N Aは、T T Rの発現によって媒介される病理過程の処置に効果的な他の既知の薬剤と組み合わせて投与することができる。いずれの場合においても、投与する医師は、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載される、標準的な有効性の測定値を使用して得られた結果に基づいて、d s R N A投与の量およびタイミングを調整することができる。

【0190】

T T R遺伝子の発現によって引き起こされる疾患を治療するための方法

本発明は、特に、T T Rを標的とするd s R N A、およびT T R媒介性障害もしくは疾患の治療のための少なくとも1つのかかるd s R N Aを含有する組成物の使用に関する。例えば、T T R遺伝子を標的とするd s R N Aは、家族性アミロイド神経障害(F A P)、家族性アミロイド心筋症(F A C)、髄膜/C N Sアミロイドーシス、アミロイドーシスV I I型(髄膜もしくは脳血管性アミロイドーシスとしても知られている)、高サイロキシン血症、および心アミロイドーシス(老年性全身アミロイドーシス(S S A)および老年性心アミロイドーシス(S C A)とも称される)等のT T Rアミロイドーシスの治療のために有用であり得る。

20

【0191】

図15は、家族性アミロイド神経障害、家族性アミロイド心筋症、およびC N Sアミロイドーシスと関連するT T Rにおける、症状および変異を図示する。本発明には、これらの疾患および症状の治療のための組成物および方法が含まれ、T T Rのこれらの変異型を対象とする。

30

【0192】

T T R遺伝子を標的とするd s R N Aはまた、T T Rアミロイドーシス等の症状および障害の治療にも使用される。かかるアミロイドーシスと関連する症状には、例えば、発作、認知症、ミエロバシー、多発性神経障害、手根管症候群、自律神経不全症、心筋症、胃腸障害(例えば、胃潰瘍、下痢、便秘、または吸收不良)、体重の減少、肝腫大、リンパ節腫脹症、甲状腺腫、硝子体混濁、腎不全(タンパク尿および腎機能障害を含む)、腎症、脳神経障害、角膜格子状変性、および全身衰弱を伴ううっ血性心不全、ならびに体液の停滞による呼吸困難が含まれる。

【0193】

T T Rの発現に対する阻害効果により、本発明に従う組成物またはそこから調製される医薬組成物は、生活の質を向上させることができる。

40

【0194】

本発明は、さらに、例えば、これらの障害を治療するために現在用いられているもの等の、他の医薬品および/または他の治療方法、例えば、既知の医薬品および/または既知の治療方法と併用して、例えば、T T Rアミロイドーシスを治療するための、d s R N Aまたはその医薬組成物の使用に関する。一例では、T T Rを標的とするd s R N Aは、肝臓移植との併用で投与することができる。他の例では、T T Rを標的とするd s R N Aは、例えば、腎機能の管理のために、利尿薬、A C E(アンジオテンシン変換酵素)阻害剤、アンジオテンシン受容体遮断薬(A R B)、または透析療法等の、T T R疾患の症状を治療するための医薬的または治療方法と併用して、投与することができる。

50

【0195】

d s R N A およびさらなる治療薬は、同様の併用で、例えば、非経口で投与することができるか、またはさらなる治療薬は、別個の組成物の一部として、または本明細書に記載の別の方針によって投与することができる。

【0196】

本発明は、T T R アミロイドーシス、例えば、F A P 等のT T R の発現によって媒介される疾患または障害を有する患者に、T T R を標的とするd s R N A を投与する方法を取り上げる。該d s R N A の投与は、例えば、F A P に罹患している患者において、末梢神経系の機能を安定させ、向上させることができる。患者は、治療量のd s R N A 、例えば、0 . 1 m g / k g 、0 . 2 m g / k g 、0 . 5 m g / k g 、1 . 0 m g / k g 、1 . 5 m g / k g 、2 . 0 m g / k g 、または2 . 5 m g / k g のd s R N A を投与することができる。該d s R N A は、一定期間、例えば、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、60分間、120分間、または180分間にわたって投与することができる。例えば、定期的に、例えば、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、またはそれ以上の期間、隔週で（すなわち、2週間ごとに）、反復投与される。初期治療レジメン後、該治療は、より低い頻度で、投与することができる。例えば、隔週で3ヶ月間、投与した後、6ヶ月間、またはそれ以上の期間、1ヶ月に1回、反復投与することができる。該d s R N A の投与は、患者における血液中または尿のT T R レベルを、少なくとも20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%もしくはそれ以上軽減することができる。

10

20

【0197】

総量の該d s R N A を投与する前に、患者は、総量の5%用量等の少量の用量を投与し、アレルギー反応または肝機能の変化等の副作用を監視することができる。例えば、肝機能の変化に対して監視される患者において、L F T (肝機能検査)の変化の低い発生率(例えば、L F T の10~20%発生率)は、許容される(例えば、可逆的な、A L T (アラニンアミノトランスフェラーゼ)および/またはA S T (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)レベルの3倍の増加)。

【0198】

多くのT T R 関連の疾病および障害は、遺伝性である。したがって、T T R のd s R N A を必要とする患者は、家族歴を得ることによって特定することができる。医者、看護師、または家族等のヘルスケア提供者は、T T R のd s R N A を処方する、または投与する前に家族歴を得ることができる。D N A テストもまた、T T R のd s R N A を患者に投与する前に、T T R 遺伝子の変異を同定するために、該患者に実施され得る。

30

【0199】

該患者は、T T R のd s R N A を受ける前に実施される生検を有し得る。該生検は、例えば、胃粘膜、末梢神経、皮膚、腹部脂肪、肝臓、もしくは腎臓等の組織上にあり得、該生検は、T T R によって媒介される障害を示す、アミロイド斑を示し得る。アミロイド斑を確認すると、患者は、T T R のd s R N A が投与される。

【0200】**T T R 遺伝子の発現を阻害するための方法**

40

さらに別の態様において、本発明は、哺乳動物における、T T R 遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。該方法は、標的T T R 遺伝子の発現が停止されるように、本発明で取り上げられる組成物を該哺乳動物に投与することを含む。

【0201】

処置される生物がヒト等の哺乳動物である場合、本組成物は、頭蓋内(例えば脳室内、脳実質内、およびくも膜下腔)、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道(噴霧剤)、経鼻、直腸、ならびに局所(口腔および舌下を含む)投与を含む、経口または非経口の経路を含むが、これらに限定されない、当該技術分野において既知の任意の手段によって投与することができる。ある実施形態において、本組成物は、静脈内注入もしくは注射によって投与される。

50

【0202】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および化学用語は、本発明が属する分野における当業者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本発明で取り上げられる d s R N A および方法の実践または試験に際して、本明細書に記載されるものと同様または等価の方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合は、定義を含み、本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および例は例示に過ぎず、限定するものではない。

【実施例】

10

【0203】

実施例実施例 1 . d s R N A 合成試薬の供給源

試薬の供給源が本明細書に具体的に与えられていない場合、かかる試薬は、分子生物学の用途に標準的な質 / 純度で、分子生物学用の試薬の任意の供給業者から得ることができる。

【0204】

s i R N A 合成

Expedite 8909合成機 (Applied Biosystems, App 20
lera Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany) 、および固体支持体として制御細孔ガラス (CPG、500 、 Proligo Bio
chemie GmbH (Hamburg, Germany)) を使用して、1 μモルの
規模で固相合成によって单鎖 R N A を生成した。R N A および 2' - O - メチルヌクレオ
チドを含有する R N A を、対応するホスホラミダイトおよび 2' - O - メチルホスホラミ
ダイト (Proligo Biochemie GmbH (Hamburg, Germa
ny)) をそれぞれ用いて、固相合成によって生成した。これらの構成要素を、Current
protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley &
Sons, Inc., New York, NY, USA に記載されるような、標準的なヌ
クレオシドホスホラミダイト化学反応を用いて、オリゴリボヌクレオチド鎖の配列内の選
択された部位に組み込んだ。ヨウ素酸化剤溶液を、アセトニトリル (1%) 中の Beaucage
試薬 (Chruachem Ltd (Glasgow, UK)) の溶液と置き換
えて、ホスホロチオエート結合を導入した。さらなる補助試薬を Mallinckrodt
Baker (Griesheim, Germany) から入手した。

【0205】

確立された手順に従い、陰イオン交換 HPLC によって、粗オリゴリボヌクレオチドの脱保護および精製を行った。収量および濃度を、分光光度計 (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, (Unterschleissheim, Germ
any)) を使用した、260 nm の波長でのそれぞれの R N A の溶液の UV 吸収によつ
て判定した。アニーリング緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8)、100
mM 塩化ナトリウム) 中で相補鎖の等モル溶液を混合し、3 分間 85 ~ 90 の湯浴中
で加温し、3 ~ 4 時間かけて室温に冷却することによって、二本鎖 R N A を生成した。ア
ニールされた R N A 溶液は、使用するまで -20 で保管した。

【0206】

40

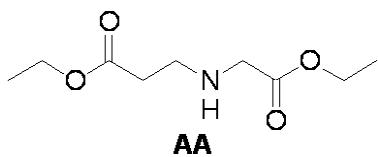
3' - コレスステロールで共役した s i R N A (本明細書で - Chol - 3' と称される) の合成には、R N A 合成のために適切に改質された固体支持体が使用された。改質され
た固体支持体は、以下のように調製した。

【0207】

ジエチル - 2 - アザブタン - 1 , 4 - ジカルボキシレート A A

50

【化2】

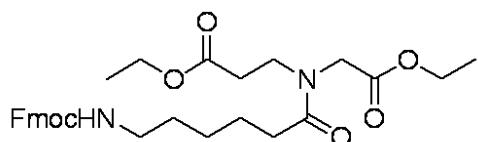


水酸化ナトリウムの4.7Mの水溶液(50mL)を、水(50mL)中のグリシンエチル塩酸塩(32.19g、0.23モル)の、攪拌して氷冷した溶液に添加した。次いで、エチルアクリレート(23.1g、0.23モル)を添加し、混合物を、反応の完了がTLCによって確認されるまで、室温で攪拌した。19時間後、該溶液をジクロロメタン(3×100mL)で分配した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を蒸留して、AA(28.8g、61%)を得た。

【0208】

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

【化3】



10

20

AB

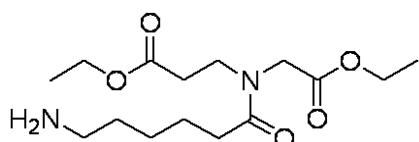
Fmoc-6-アミノ-ヘキサン酸(9.12g、25.83ミリモル)をジクロロメタン(50mL)に溶解し、氷冷した。ジイソプロピルカルボジイミド(3.25g、3.99mL、25.83ミリモル)を該溶液に0で添加した。その後、ジエチル-アザブタン-1,4-ジカルボキシレート(5g、24.6ミリモル)、およびジメチルアミノピリジン(0.305g、2.5ミリモル)を添加した。該溶液が室温になるようにし、さらに6時間攪拌した。反応の完了をTLCで確認した。反応混合物を真空下で濃縮し、酢酸エチルを添加して、ジイソプロピル尿素を沈殿させた。この懸濁液を濾過した。濾液を5%塩酸水溶液、5%飽和重炭酸ナトリウム、および水で洗浄した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させて濃縮し、粗生成物を得て、カラムクロマトグラフィー(50% EtOAC/ヘキサン)で精製し、11.87g(88%)のABを得た。

30

【0209】

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

【化4】



40

AC

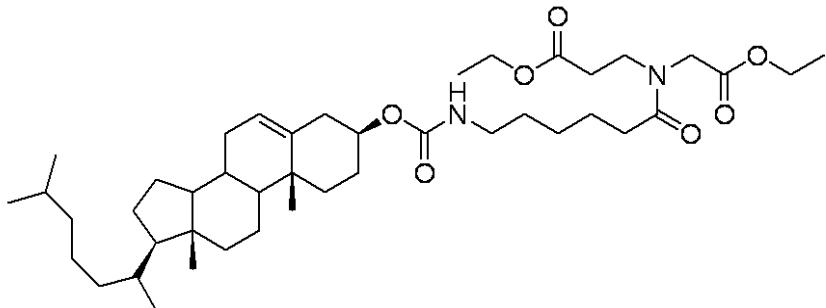
3-[エトキシカルボニルメチル-[6-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-ヘキサノイル]-アミノ]-プロピオン酸エチルエステルAB(11.5g、21.3ミリモル)を、0のジメチルホルムアミド中の20%ビペリジンに溶解した。この溶液を1時間攪拌し続けた。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣に水を添加し、酢酸エチルで生成物を抽出した。この粗生成物をその塩酸塩に変換することによって精製した。

50

【0210】

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

【化5】



10

AD

3 - [(6 - アミノ - ヘキサノイル) - エトキシカルボニルメチル - アミノ] - プロピオン酸エチルエステル A C (4 . 7 g、 14 . 8 ミリモル) の塩酸塩をジクロロメタンに取り込んだ。この懸濁液を氷上で 0 ℃ に冷却した。この懸濁液にジイソプロピルエチルアミン (3 . 87 g、 5 . 2 mL、 30 ミリモル) を添加した。得られた溶液に、コレステリルクロロホルムート (6 . 675 g、 14 . 8 ミリモル) を添加した。反応混合物を終夜攪拌した。反応混合物をジクロロメタンで希釈し、 10 % 塩酸で洗浄した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した (10 . 3 g、 92 %)。

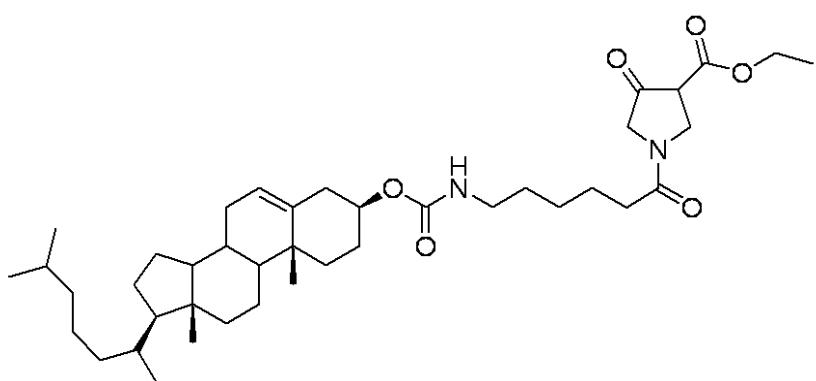
20

【0211】

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

30

【化6】



40

AE

カリウム t - ブトキシド (1 . 1 g、 9 . 8 ミリモル) を 30 mL の乾燥トルエンでスラリーにした。この混合物を氷上で 0 ℃ に冷却し、 5 g (6 . 6 ミリモル) のジエステル A D を 20 分以内のうちに、攪拌しながらゆっくりと添加した。添加の間、温度は 5 ℃ 未満に維持した。攪拌を 0 ℃ で 30 分間継続し、 1 mL の氷酢酸、その直後に 40 mL の水中の 4 g の NaH₂PO₄ H₂O を添加した。得られた混合物を 2 回、それぞれ 100 mL のジクロロメタンで抽出し、合わせた有機抽出物を 2 回、それぞれ 10 mL のリン酸緩和液で洗浄した。

50

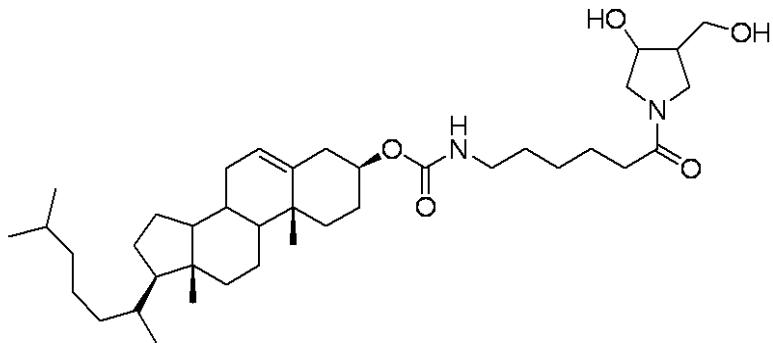
衝液で洗浄し、乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を 60 mL のトルエンに溶解し、0℃に冷却し、それぞれ 50 mL の、

pH 9.5 の冷炭酸塩緩衝液で 3 回抽出した。水性抽出液をリン酸で pH 3 に調整し、それぞれ 40 mL のクロロホルムで 5 回抽出し、合わせて乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を 25% 酢酸エチル / ヘキサンを使用して、カラムクロマトグラフィーで精製し、1.9 g の b - ケトエステルを得た (39%)。

【0212】

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

【化7】



10

20

A F

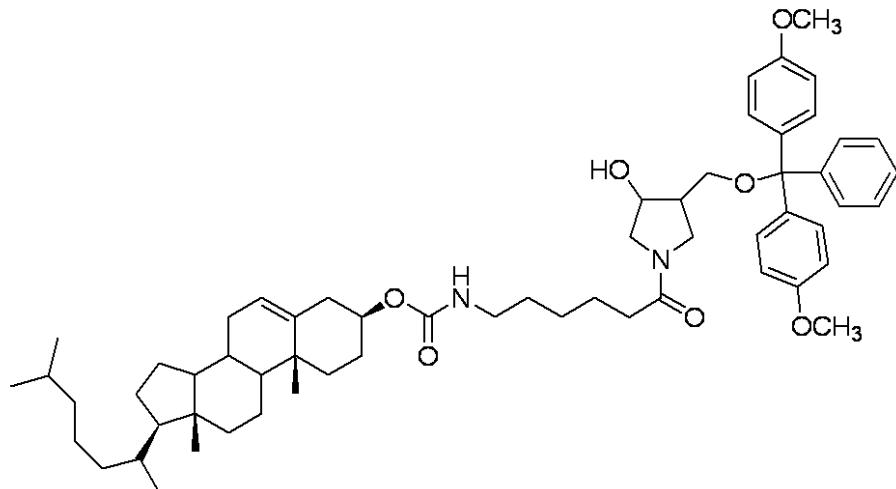
メタノール (2 mL) を、b - ケトエステル A E (1.5 g、2.2 ミリモル) と、テトラヒドロフラン (10 mL) 中の水素化ホウ素ナトリウム (0.226 g、6 ミリモル) との還流混合物に、1 時間かけて滴下した。攪拌を還流温度で 1 時間継続した。室温に冷却後、1 N の HCl (12.5 mL) を添加し、混合物を酢酸エチルで抽出した (3 × 40 mL)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮して生成物を得て、カラムクロマトグラフィー (10% MeOH / CHCl₃) で精製した (89%)。

30

【0213】

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

【化 8】



10

AG

ジオール A F (1.25 g、1.994ミリモル)を、真空中でピリジン (2 × 5 mL) を用いて蒸発乾固した。無水ピリジン (10 mL) および4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (0.724 g、2.13ミリモル) を攪拌しながら添加した。反応は、終夜室温で行われた。メタノールを添加して反応を停止させた。反応混合物を真空中で濃縮し、残渣にジクロロメタン (50 mL) を添加した。この有機層を1Mの飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。トルエンを蒸発させて残渣のピリジンを除去した。この粗生成物をカラムクロマトグラフィー (2% MeOH / クロロホルム、5% MeOH / CHCl₃ 中 Rf = 0.5) で精製した (1.75 g、95%)。

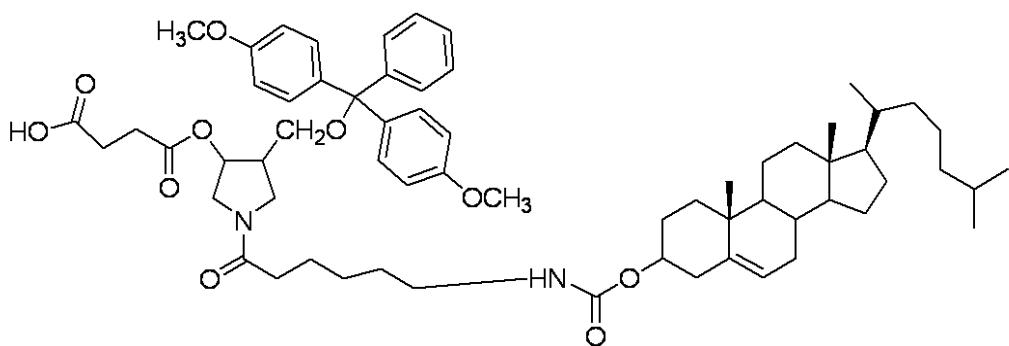
20

【0214】

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

30

【化 9】



40

AH

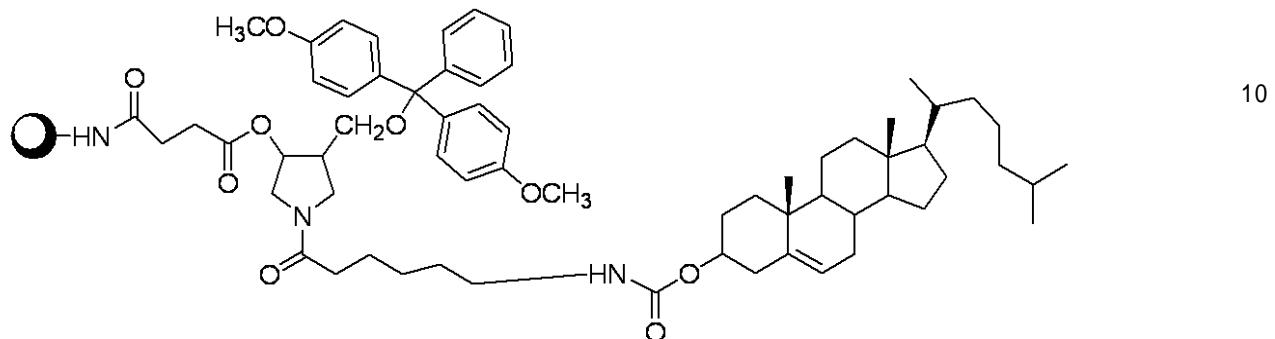
化合物 A G (1.0 g、1.05ミリモル)を無水コハク酸 (0.150 g、1.5ミリモル) および DMAP (0.073 g、0.6ミリモル) と混合し、終夜 40 の真空中で乾燥させた。該混合物を無水ジクロロエタン (3 mL) に溶解し、トリエチルアミン (0.318 g、0.440 mL、3.15ミリモル) を添加し、この溶液をアルゴン雰

50

圧気下で 16 時間、室温で攪拌した。次いで、これをジクロロメタン (40 mL) で希釈し、氷冷クエン酸水溶液 (5重量%、30 mL) および水 (2 × 20 mL) で洗浄した。該有機相を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮乾固した。残渣をそのまま次のステップに使用した。

【0215】

コレステロール誘導体化 CPG A I
【化10】



A I

コハク酸 A H (0.254 g、0.242ミリモル) を、ジクロロメタン / アセトニトリル (3:2、3 mL) の混合物に溶解した。その溶液に、アセトニトリル (1.25 mL) 中の DMAP (0.0296 g、0.242ミリモル)、アセトニトリル / ジクロロエタン (3:1、1.25 mL) 中の 2,2'-ジチオ-ビス(5-ニトロピリジン) (0.075 g、0.242ミリモル) を順次添加した。得られた溶液に、アセトニトリル (0.6 mL) 中のトリフェニルホスフィン (0.064 g、0.242ミリモル) を添加した。反応混合物の色が鮮やかな橙色に変わった。この溶液を、手首動作式振盪機 (wrist-action shaker) を使用して短く攪拌した (5分)。長鎖アルキルアミン - CPG (LCAA-CPG) (1.5 g、61 mM) を添加した。懸濁液を2時間攪拌した。焼結漏斗を通して CPG を濾過し、アセトニトリル、ジクロロメタン、およびエーテルで順次洗浄した。無水酢酸 / ピリジンを使用して未反応のアミノ基を遮蔽した。達成された CPG の装填を、UV 測定値を取ることによって測定した (37 mM/g)。

【0216】

5'-12-ドデカン酸ビスデシリアルアミド (bis decyl amide) 基 (本明細書で「5'-C32-」と称される) または 5'-コレステリル誘導体基 (本明細書で「5'-Chol-」と称される) を担持する siRNA の合成は、コレステリル誘導体について、酸化ステップが、核酸オリゴマーの 5' 末端にホスホロチオエート結合を導入するため、Beaucage 試薬を使用して行われたことを除いて、国際公開 WO 第 2004/065601 号に記載されるように行った。

【0217】

核酸配列を、標準的なヌクレオチド命名法、具体的には、表 1 の略語を使用して、以下に示す。

【表1】

表1：核酸配列に使用されるヌクレオチドモノマーの略語の説明
 これらのモノマーは、オリゴヌクレオチドが存在する場合、5' - 3' - ホスホジエステル結合によって相互に結合することが理解されよう。

| 略語 | ヌクレオチド |
|--------|--------------------------------|
| A | アデノシン-3' -リン酸 |
| C | シチジン-3' -リン酸 |
| G | グアノシン-3' -リン酸 |
| T | 5-メチルウリジン-3' -リン酸 |
| U | ウリジン-3' -リン酸 |
| N | 任意のヌクレオチド(G、A、C、またはT) |
| a | 2' -O-メチルアデノシン-3' -リン酸 |
| c | 2' -O-メチルシチジン-3' -リン酸 |
| g | 2' -O-メチルグアノシン-3' -リン酸 |
| u | 2' -O-メチルウリジン-3' -リン酸 |
| dT | 2' -デオキシチミジン-3' -リン酸 |
| sT、sdT | 2' -デオキシ-チミジン-5' リン酸-ホスホロチオエート |

10

【0218】

20

実施例2 A. TTRのsiRNA設計転写物

siRNA設計は、ヒト（記号TTR）およびラット（記号Ttr）からの遺伝子トランスクレチンを標的とするsiRNAを同定するように行われた。該設計は、NCBI Refseq収集からのTTRの転写物NM_000371.2（配列番号1329）（ヒト）およびNM_012681.1（配列番号1330）（ラット）を使用した。それらのそれぞれのTTR遺伝子に100%同一性がある、siRNA二本鎖を設計した。

【0219】

siRNA設計および特異性の予測

全ての可能な19量体の予測された特異性を、それぞれの配列に対して決定した。TTRのsiRNAを、FASTAアルゴリズムを用いて、ヒトおよびラットのトランスクリプトーム（NCBI Refseqセット内のNM_およびXM_の記録のセットとして定義される）に対する包括的検索において使用した。次いで、Pythonスクリプト「オフターゲットFastaa.py」を使用して、整列を解析し、siRNAと任意の潜在的「オフターゲット」転写物との間のミスマッチの位置および数に基づいてスコアを得た。該オフターゲットスコアは、分子の5'末端から2~9位での、siRNAの「播種」領域の差異を強調するように重み付けする。該オフターゲットスコアは、以下のとおり算出される。オリゴと転写物との間のミスマッチに、ペナルティーを課す。オリゴの2~9位での、播種領域のミスマッチには、2.8のペナルティーを課し、推定切断部位10および11のミスマッチには、1.2のペナルティーを課し、12~19位でのミスマッチには、1のペナルティーを課す。1位でのミスマッチは、考慮されない。次いで、それぞれのオリゴ転写物対のオフターゲットスコアが、ミスマッチのペナルティーを合計することによって計算される。次いで、全てのオリゴ転写物対からの最小オフターゲットスコアを決定し、オリゴのその後の分類に使用する。両方のsiRNA鎖を、算出したスコアに従って、特異性のカテゴリーに割り当てた。3を超えるスコアは、高度の特異性があり、3に等しいスコアは、特異性があり、2.2~2.8のスコアは、中程度の特異性があると見なす。どのオリゴが合成されるべきか選択するときに、アンチセンス鎖のオフターゲットスコアを、降順に並べ、ヒトからの最良の144個（最小オフターゲットスコア）オリゴ対、およびラットからの最良の26個の対を選択した。

30

【0220】

40

50

s i R N A の配列選択

ヒト TTR に由来する合計 140 個のセンスおよび 140 個のアンチセンスの s i R N A オリゴを合成し、二本鎖に形成した。ラット TTR に由来する合計 26 個のセンスおよび 26 個のアンチセンスの s i R N A オリゴを合成し、二本鎖に形成した。該オリゴに含まれた二本鎖を、表 2 ~ 4 (ヒト TTR) および表 5 ~ 7 (ラット TTR) に示す。

【0221】

【表 2 - 1】

表2. ヒトTTRのd s RNA用の認識番号
オリゴの配列および修飾については、表4を参照されたい。

| 二本鎖# | センス オリゴ# | アンセンス オリゴ# |
|----------|----------|------------|
| AD-18243 | A-32153 | A-32154 |
| AD-18244 | A-32155 | A-32156 |
| AD-18245 | A-32157 | A-32158 |
| AD-18246 | A-32159 | A-32160 |
| AD-18247 | A-32163 | A-32164 |
| AD-18248 | A-32165 | A-32166 |
| AD-18249 | A-32167 | A-32168 |
| AD-18250 | A-32169 | A-32170 |
| AD-18251 | A-32171 | A-32172 |
| AD-18252 | A-32175 | A-32176 |
| AD-18253 | A-32177 | A-32178 |
| AD-18254 | A-32179 | A-32180 |
| AD-18255 | A-32181 | A-32182 |
| AD-18256 | A-32183 | A-32184 |
| AD-18257 | A-32187 | A-32188 |
| AD-18258 | A-32189 | A-32190 |
| AD-18259 | A-32191 | A-32192 |
| AD-18260 | A-32193 | A-32194 |
| AD-18261 | A-32195 | A-32196 |
| AD-18262 | A-32199 | A-32200 |
| AD-18263 | A-32201 | A-32202 |
| AD-18264 | A-32203 | A-32204 |
| AD-18265 | A-32205 | A-32206 |
| AD-18266 | A-32207 | A-32208 |
| AD-18267 | A-32211 | A-32212 |
| AD-18268 | A-32213 | A-32214 |
| AD-18269 | A-32215 | A-32216 |
| AD-18270 | A-32217 | A-32218 |
| AD-18271 | A-32219 | A-32220 |
| AD-18272 | A-32221 | A-32222 |
| AD-18273 | A-32223 | A-32224 |
| AD-18274 | A-32225 | A-32226 |
| AD-18275 | A-32227 | A-32228 |
| AD-18276 | A-32229 | A-32230 |
| AD-18277 | A-32231 | A-32232 |
| AD-18278 | A-32233 | A-32234 |
| AD-18279 | A-32235 | A-32236 |
| AD-18280 | A-32237 | A-32238 |
| AD-18281 | A-32239 | A-32240 |
| AD-18282 | A-32241 | A-32242 |
| AD-18283 | A-32243 | A-32244 |

10

20

30

40

【表 2 - 2】

| 二本鎖# | センス オリゴ# | アンセンス オリゴ# |
|----------|----------|------------|
| AD-18284 | A-32247 | A-32248 |
| AD-18285 | A-32249 | A-32250 |
| AD-18286 | A-32251 | A-32252 |
| AD-18287 | A-32253 | A-32254 |
| AD-18288 | A-32255 | A-32256 |
| AD-18289 | A-32259 | A-32260 |
| AD-18290 | A-32261 | A-32262 |
| AD-18291 | A-32263 | A-32264 |
| AD-18292 | A-32265 | A-32266 |
| AD-18293 | A-32267 | A-32268 |
| AD-18294 | A-32269 | A-32270 |
| AD-18295 | A-32271 | A-32272 |
| AD-18296 | A-32273 | A-32274 |
| AD-18297 | A-32275 | A-32276 |
| AD-18298 | A-32277 | A-32278 |
| AD-18299 | A-32279 | A-32280 |
| AD-18300 | A-32281 | A-32282 |
| AD-18301 | A-32283 | A-32284 |
| AD-18302 | A-32285 | A-32286 |
| AD-18303 | A-32287 | A-32288 |
| AD-18304 | A-32289 | A-32290 |
| AD-18305 | A-32291 | A-32292 |
| AD-18306 | A-32295 | A-32296 |
| AD-18307 | A-32297 | A-32298 |
| AD-18308 | A-32299 | A-32300 |
| AD-18309 | A-32301 | A-32302 |
| AD-18310 | A-32303 | A-32304 |
| AD-18311 | A-32307 | A-32308 |
| AD-18312 | A-32309 | A-32310 |
| AD-18313 | A-32311 | A-32312 |
| AD-18314 | A-32313 | A-32314 |
| AD-18315 | A-32315 | A-32316 |
| AD-18316 | A-32319 | A-32320 |
| AD-18317 | A-32321 | A-32322 |
| AD-18318 | A-32323 | A-32324 |
| AD-18319 | A-32325 | A-32326 |
| AD-18320 | A-32327 | A-32328 |
| AD-18321 | A-32331 | A-32332 |
| AD-18322 | A-32333 | A-32334 |
| AD-18323 | A-32335 | A-32336 |
| AD-18324 | A-32337 | A-32338 |
| AD-18325 | A-32339 | A-32340 |
| AD-18326 | A-32341 | A-32342 |
| AD-18327 | A-32343 | A-32344 |

10

20

30

40

【表 2 - 3】

| 二本鎖# | センス オリゴ# | アンチセンス オリゴ# |
|----------|----------|-------------|
| AD-18328 | A-32345 | A-32346 |
| AD-18329 | A-32347 | A-32348 |
| AD-18330 | A-32349 | A-32350 |
| AD-18331 | A-32351 | A-32352 |
| AD-18332 | A-32353 | A-32354 |
| AD-18333 | A-32355 | A-32356 |
| AD-18334 | A-32357 | A-32358 |
| AD-18335 | A-32359 | A-32360 |
| AD-18336 | A-32363 | A-32364 |
| AD-18337 | A-32367 | A-32368 |
| AD-18338 | A-32369 | A-32370 |
| AD-18339 | A-32371 | A-32372 |
| AD-18340 | A-32373 | A-32374 |
| AD-18341 | A-32375 | A-32376 |
| AD-18342 | A-32379 | A-32380 |
| AD-18343 | A-32381 | A-32382 |
| AD-18344 | A-32383 | A-32384 |
| AD-18345 | A-32385 | A-32386 |
| AD-18346 | A-32387 | A-32388 |
| AD-18347 | A-32391 | A-32392 |
| AD-18348 | A-32393 | A-32394 |
| AD-18349 | A-32395 | A-32396 |
| AD-18350 | A-32397 | A-32398 |
| AD-18351 | A-32399 | A-32400 |
| AD-18352 | A-32401 | A-32402 |
| AD-18353 | A-32403 | A-32404 |
| AD-18354 | A-32405 | A-32406 |
| AD-18355 | A-32407 | A-32408 |
| AD-18356 | A-32409 | A-32410 |
| AD-18357 | A-32411 | A-32412 |
| AD-18358 | A-32415 | A-32416 |
| AD-18359 | A-32417 | A-32418 |
| AD-18360 | A-32419 | A-32420 |
| AD-18361 | A-32421 | A-32422 |
| AD-18362 | A-32423 | A-32424 |
| AD-18363 | A-32427 | A-32428 |
| AD-18364 | A-32429 | A-32430 |
| AD-18446 | A-32161 | A-32162 |
| AD-18447 | A-32173 | A-32174 |
| AD-18448 | A-32185 | A-32186 |
| AD-18449 | A-32197 | A-32198 |
| AD-18450 | A-32209 | A-32210 |
| AD-18451 | A-32245 | A-32246 |
| AD-18452 | A-32257 | A-32258 |

10

20

30

40

【表 2 - 4】

| 二本鎖# | センス オリゴ# | アンセンス オリゴ# |
|----------|----------|------------|
| AD-18453 | A-32293 | A-32294 |
| AD-18454 | A-32305 | A-32306 |
| AD-18455 | A-32317 | A-32318 |
| AD-18456 | A-32329 | A-32330 |
| AD-18457 | A-32361 | A-32362 |
| AD-18458 | A-32365 | A-32366 |
| AD-18459 | A-32377 | A-32378 |
| AD-18460 | A-32389 | A-32390 |
| AD-18461 | A-32401 | A-32402 |
| AD-18462 | A-32413 | A-32414 |
| AD-18463 | A-32425 | A-32426 |

【0222】

【表3A-1】

表3A ヒトTTRのdsRNAのセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖: s=センス、as=アンチセンス

位置: 転写物 (NM_000371.2,配列番号1329) における5'位の塩基

| 鎖 | 位置 | 配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 | 3'のジヌクレオチド オーバーハンギングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 |
|----|-----|----------------------|----------|--|----------|
| s | 100 | CCGGUGAAUCCAAGUGUCC | 1 | CCGGUGAAUCCAAGUGUCCNN | 281 |
| as | 116 | GGACACUUGGAUUCACCGG | 2 | GGACACUUGGAUUCACCGGNN | 282 |
| s | 11 | ACUCAUUCUUGGCAGGAUG | 3 | ACUCAUUCUUGGCAGGAUGNN | 283 |
| as | 29 | CAUCCUGCCAAGAAUGAGU | 4 | CAUCCUGCCAAGAAUGAGUNN | 284 |
| s | 111 | AAGUGUCCUCUGAUGGUCA | 5 | AAGUGUCCUCUGAUGGUCA NN | 285 |
| as | 129 | UGACCAUCAGAGGACACUU | 6 | UGACCAUCAGAGGACACUUNN | 286 |
| s | 13 | UCAUUCUUGGCAGGAUGGC | 7 | UCAUUCUUGGCAGGAUGGCNN | 287 |
| as | 31 | GCCAUCCUGCCAAGAAUGA | 8 | GCCAUCCUGCCAAGAAUGANN | 288 |
| s | 130 | AAGUUUCUAGAUGCUGUCCG | 9 | AAGUUUCUAGAUGCUGUCCGN N | 289 |
| as | 148 | CGGACAGCAUCUAGAACUU | 10 | CGGACAGCAUCUAGAACUUNN | 290 |
| s | 132 | GUUCUAGAUGCUGUCCGAG | 11 | GUUCUAGAUGCUGUCCGAGNN | 291 |
| as | 150 | CUCGGACAGCAUCUAGAAC | 12 | CUCGGACAGCAUCUAGAACNN | 292 |
| s | 135 | CUAGAUGCUGUCCGAGGCA | 13 | CUAGAUGCUGUCCGAGGCNN | 293 |
| as | 153 | UGCCUCUGGACAGCAUCUAG | 14 | UGCCUCUGGACAGCAUCUAGNN | 294 |
| s | 138 | GAUGCUGUCCGAGGCAGUC | 15 | GAUGCUGUCCGAGGCAGUCNN | 295 |
| as | 156 | GACUGCCUCGGACAGCAUC | 16 | GACUGCCUCGGACAGCAUCNN | 296 |
| s | 14 | CAUUCUUGGCAGGAUGGCU | 17 | CAUUCUUGGCAGGAUGGCUNN | 297 |
| as | 32 | AGCCAUCCUGCCAAGAAUG | 18 | AGCCAUCCUGCCAAGAAUGNN | 298 |
| s | 140 | UGCUGUCCGAGGCAGUCCU | 19 | UGCUGUCCGAGGCAGUCCUNN | 299 |
| as | 158 | AGGACUGCCUCGGACAGCA | 20 | AGGACUGCCUCGGACAGCANN | 300 |
| s | 146 | CCGAGGCAGUCCUGGCCAUC | 21 | CCGAGGCAGUCCUGGCCAUCNN | 301 |
| as | 164 | GAUGGCAGGCACUGCCUCGG | 22 | GAUGGCAGGCACUGCCUCGGNN | 302 |
| s | 152 | CAGUCCUGCCAUCAAUGUG | 23 | CAGUCCUGCCAUCAAUGUGNN | 303 |
| as | 170 | CACAUUGAUGGCAGGACUG | 24 | CACAUUGAUGGCAGGACUGNN | 304 |
| s | 164 | CAAUGUGGCCGUGCAUGUG | 25 | CAAUGUGGCCGUGCAUGUGNN | 305 |
| as | 182 | CACAUGCACGCCACAUUG | 26 | CACAUGCACGCCACAUUGNN | 306 |
| s | 178 | AUGUGUUCAGAAAGGCUGC | 27 | AUGUGUUCAGAAAGGCUGCNN | 307 |
| as | 196 | GCAGCCUUUCUGAACACAU | 28 | GCAGCCUUUCUGAACACAUUNN | 308 |
| s | 2 | CAGAAGUCCACUCAUUCUU | 29 | CAGAAGUCCACUCAUUCUUNN | 309 |

10

20

30

【表3A-2】

| 鎖 | 位置 | 配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 | 3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 |
|----|-----|----------------------|----------|--|----------|
| as | 20 | AAGAAUGAGUGGACUUCUG | 30 | AAGAAUGAGUGGACUUCUGNN | 310 |
| s | 21 | GCCAGGAUGGCUUUCUCAUC | 31 | GGCAGGAUGGCUUUCUCAUCNN | 311 |
| as | 39 | GAUGAGAAGCCAUCUCUGC | 32 | GAUGAGAAGCCAUCUCUGCNN | 312 |
| s | 210 | GAGCCAUUUGCCUCUGGG | 33 | GAGCCAUUUGCCUCUGGGANN | 313 |
| as | 228 | UCCCAGAGCCTAAUUGCUC | 34 | UCCCAGAGCCTAAUUGCUCNN | 314 |
| s | 23 | CAGGAUGGCUUUCUCAUCGU | 35 | CAGGAUGGCUUUCUCAUCGUIN | 315 |
| as | 41 | ACGAUGAGAAGCCAUCUCUG | 36 | ACGAUGAGAAGCCAUCUCUGNN | 316 |
| s | 24 | AGGAUGGCUUUCUCAUCGU | 37 | AGGAUGGCUUUCUCAUCGUIN | 317 |
| as | 42 | GACGAUGAGAAGCCAUCCU | 38 | GACGAUGAGAAGCCAUCCUIN | 318 |
| s | 245 | AGAGCUCGAUGGGCUCACA | 39 | AGAGCUCGAUGGGCUCACANN | 319 |
| as | 263 | UGUGAGCCCCTAUGCAGCUC | 40 | UGUGAGCCCCTAUGCAGCUCNN | 320 |
| s | 248 | GCUGCAUGGGCUCACAACU | 41 | GCUGCAUGGGCUCACAACUIN | 321 |
| as | 266 | AGUUGUGAGGCCCAUGCAGC | 42 | AGUUGUGAGGCCCAUGCAGCIN | 322 |
| s | 25 | GGAAUGGCUUUCUCAUCGU | 43 | GGAAUGGCUUUCUCAUCGUIN | 323 |
| as | 43 | AGACGAUGAGAAGCCAUC | 44 | AGACGAUGAGAAGCCAUCIN | 324 |
| s | 251 | GCAUGGGCUCACAACUGAG | 45 | GCAUGGGCUCACAACUGAGNN | 325 |
| as | 269 | CUCAGUUGUGAGGCCCAUGC | 46 | CUCAGUUGUGAGGCCCAUGCIN | 326 |
| s | 253 | AUGGGCUCACAACUGAGGA | 47 | AUGGGCUCACAACUGAGGANN | 327 |
| as | 271 | UCCUCAGUUGUGAGGCCAU | 48 | UCCUCAGUUGUGAGGCCAUNN | 328 |
| s | 254 | UGGGCUCACAACUGAGGA | 49 | UGGGCUCACAACUGAGGAGNN | 329 |
| as | 272 | CUCCUCAGUUGUGAGGCCA | 50 | CUCCUCAGUUGUGAGGCCAANN | 330 |
| s | 270 | GAGGAUUUUGUAGAAGGG | 51 | GAGGAUUUUGUAGAAGGGANN | 331 |
| as | 288 | UCCCCUUCUACAAUUCUC | 52 | UCCCCUUCUACAAUUCUCNN | 332 |
| s | 276 | UUUGUAGAAGGGAUUAACAA | 53 | UUUGUAGAAGGGAUUAACANN | 333 |
| as | 294 | UGUUAUACCCUUUCUACAA | 54 | UGUUAUACCCUUUCUACAAIN | 334 |
| s | 277 | UUGUAGAAGGGAUUAACAA | 55 | UUGUAGAAGGGAUUAACAIN | 335 |
| as | 295 | UUGUUAUACCCUUUCUACAA | 56 | UUGUUAUACCCUUUCUACAIN | 336 |
| s | 278 | UGUAGAAGGGAUUAACAA | 57 | UGUAGAAGGGAUUAACAAIN | 337 |
| as | 296 | UUUGUUAUACCCUUUCUAC | 58 | UUUGUUAUACCCUUUCUACAIN | 338 |
| s | 281 | AGAAGGGAUUAACAAAGUG | 59 | AGAAGGGAUUAACAAAGUGNN | 339 |
| as | 299 | CACUUUGUUAUACCCUUUC | 60 | CACUUUGUUAUACCCUUUCIN | 340 |
| s | 295 | AAGUGGAAAUAAGACACCAA | 61 | AAGUGGAAAUAAGACACCAANN | 341 |
| as | 313 | UUGGUGUCURUUUCCACUU | 62 | UUGGUGUCURUUUCCACUIN | 342 |
| s | 299 | GGAAAUAGACACCAAAUCU | 63 | GGAAAUAGACACCAAAUCUNN | 343 |
| as | 317 | AGAUUUGGUGUCUAUUUCC | 64 | AGAUUUGGUGUCUAUUUCCNN | 344 |
| s | 300 | GAAGUAGACACCAAAUCU | 65 | GAAGUAGACACCAAAUCUIN | 345 |
| as | 318 | AGAUUUGGUGUCUAUUUC | 66 | AGAUUUGGUGUCUAUUUCIN | 346 |
| s | 303 | AUAGACACCAAAUCUUACU | 67 | AUAGACACCAAAUCUUACUNN | 347 |
| as | 321 | AGUAAGAUUUGGUGUCUAU | 68 | AGUAAGAUUUGGUGUCUAUNN | 348 |
| s | 304 | UAGACACCAAAUCUUACUG | 69 | UAGACACCAAAUCUUACUGNN | 349 |
| as | 322 | CAGUAPAGAUUUGGUGUCUA | 70 | CAGUAPAGAUUUGGUGUCUIN | 350 |
| s | 305 | AGACACCAAAUCUUACUGG | 71 | AGACACCAAAUCUUACUGGIN | 351 |
| as | 323 | CCAGUAAGAUUUGGUGUCU | 72 | CCAGUAAGAUUUGGUGUCUNN | 352 |
| s | 317 | UUACUGGAAGGCACUUGGC | 73 | UUACUGGAAGGCACUUGGCNN | 353 |
| as | 335 | GCCAAGUGCCUUCCAGUAA | 74 | GCCAAGUGCCUUCCAGUAANN | 354 |
| s | 32 | UUCUCAUCGUCUGCUCCUC | 75 | UUCUCAUCGUCUGCUCCUCNN | 355 |
| as | 50 | GAGGAGCCAGACGAUGAGAA | 76 | GAGGAGCCAGACGAUGAGAANN | 356 |
| s | 322 | GGAGGGCACUUGGCAUCUC | 77 | GGAGGGCACUUGGCAUCUCNN | 357 |
| as | 340 | GAGAUGCCAAGUGCCUUC | 78 | GAGAUGCCAAGUGCCUUCIN | 358 |

10

20

30

40

【表3A-3】

| 鎖 | 位置 | 配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 | 3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 |
|----|-----|-----------------------|----------|--|----------|
| s | 326 | GGCACUUGGCAUCUCCCCA | 79 | GGCACUUGGCAUCUCCCCA(N) | 359 |
| as | 344 | UGGGGAGAUGCCAAGUGCC | 80 | UGGGGAGAUGCCAAGUGCC(N) | 360 |
| s | 333 | GGCAUCUCCCCAUUCCAUG | 81 | GGCAUCUCCCCAUUCCAUG(N) | 361 |
| as | 351 | AUGGAUAGGGGAGAUGCCTT | 82 | AUGGAUAGGGGAGAUGCCTT(N) | 362 |
| s | 334 | GCAUCUCCCCAUUCCAUGA | 83 | GCAUCUCCCCAUUCCAUGA(N) | 363 |
| as | 352 | UCAUGGAAUGGGGAGAUGC | 84 | UCAUGGAAUGGGGAGAUGC(N) | 364 |
| s | 335 | CAUCUCCCCAUUCCAUGAG | 85 | CAUCUCCCCAUUCCAUGAG(N) | 365 |
| as | 353 | CUCAUUGGAAUGGGGAGAUG | 86 | CUCAUUGGAAUGGGGAGAUG(N) | 366 |
| s | 336 | AUCUCCCCAUUCCAUGAGC | 87 | AUCUCCCCAUUCCAUGAGC(N) | 367 |
| as | 354 | GCUCAUGGAAUGGGGAGAU | 88 | GCUCAUGGAAUGGGGAGAU(N) | 368 |
| s | 338 | CUCCCCACAUUCCAUGAGCAU | 89 | CUCCCCACAUUCCAUGAGCAU(N) | 369 |
| as | 356 | AUGCUCAUGGAAUGGGGAG | 90 | AUGCUCAUGGAAUGGGGAG(N) | 370 |
| s | 341 | CCCAUUCCAUGAGCAUGCA | 91 | CCCAUUCCAUGAGCAUGC(N) | 371 |
| as | 359 | UGCAUGCUCAUGGAAUGGG | 92 | UGCAUGCUCAUGGAAUGGG(N) | 372 |
| s | 347 | CCAUGAGCAUGCAGAGGUG | 93 | CCAUGAGCAUGCAGAGGUG(N) | 373 |
| as | 365 | CACCUCUGCAUGCUCAUGG | 94 | CACCUCUGCAUGCUCAUGG(N) | 374 |
| s | 352 | AGCAUGGAGAGGUGGUUU | 95 | AGCAUGGAGAGGUGGUUU(N) | 375 |
| as | 370 | AAUACCACCUUCUGCAUGCU | 96 | AAUACCACCUUCUGCAUGC(N) | 376 |
| s | 354 | CAUGCAGAGGUGGUUAUCA | 97 | CAUGCAGAGGUGGUUAUCA(N) | 377 |
| as | 372 | UGAAUACCACCUUCUGCAUG | 98 | UGAAUACCACCUUCUGCAUG(N) | 378 |
| s | 355 | AUGCAGAGGUGGUUAUUCAC | 99 | AUGCAGAGGUGGUUAUUCAC(N) | 379 |
| as | 373 | GUGAAUACCACCUUCUGCAU | 100 | GUGAAUACCACCUUCUGCAU(N) | 380 |
| s | 362 | GGUGGUAAUUCACAGCCAAC | 101 | GGUGGUAAUUCACAGCCAAC(N) | 381 |
| as | 380 | GUUGGCUGUGAAUACCACC | 102 | GUUGGCUGUGAAUACCACC(N) | 382 |
| s | 363 | GUGGUAAUUCACAGCCAACG | 103 | GUGGUAAUUCACAGCCAACG(N) | 383 |
| as | 381 | CGUUGGCUGUGAAUACCAC | 104 | CGUUGGCUGUGAAUACCAC(N) | 384 |
| s | 364 | UGGUAAUUCACAGCCAACGA | 105 | UGGUAAUUCACAGCCAACG(N) | 385 |
| as | 382 | UCGUUGGCUGUGAAUACCA | 106 | UCGUUGGCUGUGAAUACCA(N) | 386 |
| s | 365 | GGUAUUCACAGCCAACGAC | 107 | GGUAUUCACAGCCAACGAC(N) | 387 |
| as | 383 | GUCGUUGGCUGUGAAUACC | 108 | GUCGUUGGCUGUGAAUACC(N) | 388 |
| s | 366 | GUAAUUCACAGCCAACGACU | 109 | GUAAUUCACAGCCAACGACU(N) | 389 |
| as | 384 | AGUCGUUGGCUGUGAAUAC | 110 | AGUCGUUGGCUGUGAAUAC(N) | 390 |
| s | 367 | UAUUCACAGCCAACGACUC | 111 | UAUUCACAGCCAACGACUC(N) | 391 |
| as | 385 | GAGUCGUUGGCUGUGAAUA | 112 | GAGUCGUUGGCUGUGAAU(N) | 392 |
| s | 370 | UCACAGCCAACGACUCCGG | 113 | UCACAGCCAACGACUCCGG(N) | 393 |
| as | 388 | CCGGAGUCGUUGGCUGUGA | 114 | CCGGAGUCGUUGGCUGUGA(N) | 394 |
| s | 390 | CCCCGCCGCUACACCAUUG | 115 | CCCCGCCGCUACACCAUUG(N) | 395 |
| as | 408 | CAAUGGUGUAGCGGGGGGG | 116 | CAAUGGUGUAGCGGGGGGG(N) | 396 |
| s | 4 | GAAGUCCACUCAUUCUUGG | 117 | GAAGUCCACUCAUUCUUGG(N) | 397 |
| as | 22 | CCAAAGAAUAGAGUGGACUUC | 118 | CCAAAGAAUAGAGUGGACUUC(N) | 398 |
| s | 412 | CCCUGCUGAGCCCCUACUC | 119 | CCCUGCUGAGCCCCUACUC(N) | 399 |
| as | 430 | GAGUAGGGGCUCAGCAGGG | 120 | GAGUAGGGGCUCAGCAGGG(N) | 400 |
| s | 417 | CUGAGCCCCUACUCCUAUU | 121 | CUGAGCCCCUACUCCUAUU(N) | 401 |
| as | 435 | AAUAGGAGUAGGGGCUCAG | 122 | AAUAGGAGUAGGGGCUCAG(N) | 402 |
| s | 418 | UGAGCCCCUACUCCUAUUC | 123 | UGAGCCCCUACUCCUAUUC(N) | 403 |
| as | 436 | GAUAGGAGUAGGGGCUCUA | 124 | GAUAGGAGUAGGGGCUCUA(N) | 404 |
| s | 422 | CCCCUACUCCUAUUCCACCC | 125 | CCCCUACUCCUAUUCCACCC(N) | 405 |
| as | 440 | GGUGGAAUAGGAGUAGGGG | 126 | GGUGGAAUAGGAGUAGGGG(N) | 406 |
| s | 425 | CUACUCCUAUUCCACCCACG | 127 | CUACUCCUAUUCCACCCACG(N) | 407 |

10

20

30

40

【表3A-4】

| 鎖 | 位置 | 配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 | 3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 |
|----|-----|-------------------------|----------|--|----------|
| as | 443 | CGUGGUGGAUAGGAGUAG | 128 | CGUGGUGGAUAGGAGUAGNN | 408 |
| s | 426 | UACUCCUAUUCCACCACGG | 129 | UACUCCUAUUCCACCACGGNN | 409 |
| as | 444 | CCGUGGUGGAUAGGAGUA | 130 | CCGUGGUGGAUAGGAGUANN | 410 |
| s | 427 | ACUCCUAUUCCACCACGGC | 131 | ACUCCUAUUCCACCACGGCNN | 411 |
| as | 445 | GCCGUGGUGGAUAGGAGU | 132 | GCCGUGGUGGAUAGGAGUANN | 412 |
| s | 429 | UCCUAUUCCACCACGGCUG | 133 | UCCUAUUCCACCACGGCUGNN | 413 |
| as | 447 | CAGCCGUGGUGGAUAGGA | 134 | CAGCCGUGGUGGAUAGGAGNN | 414 |
| s | 432 | UAUUCACCACCGCUGUCG | 135 | UAUUCACCACCGCUGUCGNN | 415 |
| as | 450 | CGACAGCCGUGGUGGAUA | 136 | CGACAGCCGUGGUGGAUAINN | 416 |
| s | 433 | AUUCCACCACGGCUGUCGU | 137 | AUUCCACCACGGCUGUCGUINN | 417 |
| as | 451 | ACGACAGCCGUGGUGGAAU | 138 | ACGACAGCCGUGGUGGAAUINN | 418 |
| s | 437 | CACCA CGG CUG UCG UCACC | 139 | CACCA CGG CUG UCG UCACCHN | 419 |
| as | 455 | GGUGACGACAGCCGUGGUG | 140 | GGUGACGACAGCCGUGGUGNN | 420 |
| s | 438 | ACCACGGCUGUCGUACCA | 141 | ACCACGGCUGUCGUACCAANN | 421 |
| as | 456 | UGGUGACGACAGCCGUGGU | 142 | UGGUGACGACAGCCGUGGUINN | 422 |
| s | 439 | CCACGGCUGUCGUACCAA | 143 | CCACGGCUGUCGUACCAAANN | 423 |
| as | 457 | UUGGUGACGACAGCCGUGG | 144 | UUGGUGACGACAGCCGUGGN | 424 |
| s | 441 | ACGGCUGUCGUACCAAUC | 145 | ACGGCUGUCGUACCAAUCNN | 425 |
| as | 459 | GAUUGGUGACGACAGCCGU | 146 | GAUUGGUGACGACAGCCGUINN | 426 |
| s | 442 | CGGCUGUCGUACCAAUC | 147 | CGGCUGUCGUACCAAUCNN | 427 |
| as | 460 | GGAUUGGUGACGACAGCCG | 148 | GGAUUGGUGACGACAGCCGNN | 428 |
| s | 449 | CGUCACCAAUCCCAAGGAA | 149 | CGUCACCAAUCCCAAGGAAINN | 429 |
| as | 467 | UUCCUUGGGAUUGGUGACG | 150 | UUCCUUGGGAUUGGUGACGN | 430 |
| s | 465 | CAAUCCAAGGAUAGAGGG | 151 | CAAUCCAAGGAUAGAGGGNN | 431 |
| as | 473 | CCCUCAUUCCUUGGGAUUG | 152 | CCCUCAUUCCUUGGGAUUGNN | 432 |
| s | 491 | CCUGAAGGACGAGGGAUUG | 153 | CCUGAAGGACGAGGGAUUGNN | 433 |
| as | 509 | CCAUCCCUCGUCCUUCAGG | 154 | CCAUCCCUCGUCCUUCAGGN | 434 |
| s | 497 | GGACGAGGGAUUGGAAUUC | 155 | GGACGAGGGAUUGGAAUUCNN | 435 |
| as | 515 | GAAAUCCAUCCCCUCGUCC | 156 | GAAAUCCAUCCCCUCGUCCNN | 436 |
| s | 5 | AAGUCCACUCAUUCUUGGC | 157 | AAGUCCACUCAUUCUUGGN | 437 |
| as | 23 | GCCAAAGAAUGAGUGGACUU | 158 | GCCAAAGAAUGAGUGGACUUNN | 438 |
| s | 508 | GGGAUUUCAUGUAACCAAG | 159 | GGGAUUUCAUGUAACCAAGNN | 439 |
| as | 526 | CUUGGUUACAUGAAAUCCC | 160 | CUUGGUUACAUGAAAUCCNN | 440 |
| s | 509 | GGAAUUCAUGUAACCAAGA | 161 | GGAAUUCAUGUAACCAAGAINN | 441 |
| as | 527 | UCUUGGUUACAUGAAAUC | 162 | UCUUGGUUACAUGAAAUCNN | 442 |
| s | 514 | UCAUGUAACCAAGAGGUAU | 163 | UCAUGUAACCAAGAGGUAUINN | 443 |
| as | 532 | AAUACUCUUGGUACAUAGA | 164 | AAUACUCUUGGUACAUAGNN | 444 |
| s | 516 | AUGUAACCAAGAGGUAUUCC | 165 | AUGUAACCAAGAGGUAUUCCNN | 445 |
| as | 534 | GGAAUACUCUUGGUUACAU | 166 | GGAAUACUCUUGGUUACAINN | 446 |
| s | 517 | UGUAACCAAGAGGUAUUCC | 167 | UGUAACCAAGAGGUAUUCCNN | 447 |
| as | 535 | UGGAUAACUCUUGGUUAC | 168 | UGGAUAACUCUUGGUUACAINN | 448 |
| s | 518 | GUACCAAGAGGUAUUCCAU | 169 | GUACCAAGAGGUAUUCCAINN | 449 |
| as | 536 | AUGGAAUACUCUUGGUUAC | 170 | AUGGAAUACUCUUGGUUACNN | 450 |
| s | 54 | UGCCUUGCUGGACUGGUAU | 171 | UGCCUUGCUGGACUGGUAUINN | 451 |
| as | 72 | AUACCAGUCCAGCAAGGC | 172 | AUACCAGUCCAGCAAGGCNN | 452 |
| s | 543 | UAAAGCAGUGUUUUCACCU | 173 | UAAAGCAGUGUUUUCACCUINN | 453 |
| as | 561 | AGGUGAAAACACUGGUUUA | 174 | AGGUGAAAACACUGGUUUAINN | 454 |
| s | 55 | GCCUUGCUGGACUGGUAUU | 175 | GCCUUGCUGGACUGGUAUINN | 455 |
| as | 73 | AAUACCAGUCCAGCAAGGC | 176 | AAUACCAGUCCAGCAAGGCNN | 456 |

10

20

30

40

【表3A-5】

| 鎖 | 位置 | 配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 | 3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 |
|----|-----|-----------------------|----------|--|----------|
| s | 551 | UGUUUUACCUCAUAUGCU | 177 | UGUUUUCACCUCAUUAUGCUNN | 457 |
| as | 569 | AGCAU AUGAGGUGAAAACA | 178 | AGCAUADGAGGUGAAAACANN | 458 |
| s | 552 | GUUUUCACCUCAUUAUGCUA | 179 | GUUUUCACCUCAUUAUGCUANN | 459 |
| as | 570 | UAGCAU AUGAGGUGAAAAC | 180 | UAGCAU AUGAGGUGAAAACNN | 460 |
| s | 553 | UUUUCACCUCAUUAUGCUAU | 181 | UUUUCACCUCAUUAUGCUAUNN | 461 |
| as | 571 | AUAGCAU AUGAGGUGAAAA | 182 | AUAGCAU AUGAGGUGAAAANN | 462 |
| s | 555 | UUCACCUCAUUAUGCUAUGU | 183 | UUCACCUCAUUAUGCUAUGUNN | 463 |
| as | 573 | ACAUAGCAU AUGAGGUGAA | 184 | ACAUAGCAU AUGAGGUGAANN | 464 |
| s | 557 | CACCUCAU AUGCUAUGUUA | 185 | CACCUCAU AUGCUAUGUUANN | 465 |
| as | 575 | UAACAUAGCAU AUGAGGUG | 186 | UAACAUAGCAU AUGAGGUGNN | 466 |
| s | 56 | CCUUGCUGGACUGGUAUUU | 187 | CCUUGCUGGACUGGUAUUUNN | 467 |
| as | 74 | AAA UACCAGUCCAGCAAGG | 188 | AAA UACCAGUCCAGCAAGGIN | 468 |
| s | 563 | AUAUGCUAUGUUAGAAGUC | 189 | AUAUGCUAUGUUAGAAGUCNN | 469 |
| as | 581 | GACUUCUACAUAGCAUAU | 190 | GACUUCUACAUAGCAUUNN | 470 |
| s | 564 | UAUGCUAUGUUAGAAGUCC | 191 | UAUGCUAUGUUAGAAGUCNN | 471 |
| as | 582 | GGACUU CUAACAUAGCAUA | 192 | GGACUU CUAACAUAGCAUANN | 472 |
| s | 566 | UGC UAU GGUAGAAGUCCAG | 193 | UGC UAU GGUAGAAGUCCAGNN | 473 |
| as | 584 | CUGGACUUCUACAUAGCA | 194 | CUGGACUUCUACAUAGCANN | 474 |
| s | 57 | CUUGCUGGACUGGUAUUUG | 195 | CUUGCUGGACUGGUAUUUGNN | 475 |
| as | 75 | CAAAUACCAGUCCAGCAAG | 196 | CAAAUACCAGUCCAGCAAGIN | 476 |
| s | 578 | AGUCCAGGCAGAGACAAUA | 197 | AGUCCAGGCAGAGACAAUANN | 477 |
| as | 596 | AUUGUCUCUGCCUGGACUTT | 198 | AUUGUCUCUGCCUGGACUTTNN | 478 |
| s | 580 | UCCAGGGCAGAGACAAUAAA | 199 | UCCAGGGCAGAGACAAUAAAANN | 479 |
| as | 598 | UUUAUUJUGUCUCUGCCUGGA | 200 | UUUAUUJUGUCUCUGCCUGGNN | 480 |
| s | 607 | GUGAAAGGCACUUUUCAUU | 201 | GUGAAAGGCACUUUUCAUUNN | 481 |
| as | 625 | AAUGAAAAGUGCCUUUCAC | 202 | AAUGAAAAGUGCCUUUCACNN | 482 |
| s | 62 | UGGACUGGUAUUIJUGUCU | 203 | UGGACUGGUAUUIJUGUCUNN | 483 |
| as | 80 | AGACACAAA UACCAGUCCA | 204 | AGACACAAA UACCAGCANN | 484 |
| s | 77 | GUCUGAGGCUGGCCUACG | 205 | GUCUGAGGCUGGCCUACGIN | 485 |
| as | 95 | CGUAGGGCCAGCCUCAGAC | 206 | CGUAGGGCCAGCCUCAGACNN | 486 |
| s | 79 | CUGAGGCUGGCCUACGGG | 207 | CUGAGGCUGGCCUACGGGN | 487 |
| as | 97 | CCCGUAGGGCCAGCCUCAG | 208 | CCCGUAGGGCCAGCCUCAGNN | 488 |
| s | 81 | GAGGCUGGCCUACGGGCAC | 209 | GAGGCUGGCCUACGGGCANN | 489 |
| as | 99 | UGCCCGUAGGGCCAGGCCUC | 210 | UGCCCGUAGGGCCAGCCUCNN | 490 |
| s | 82 | AGGCUGGCCUACGGGCAC | 211 | AGGCUGGCCUACGGGCACNN | 491 |
| as | 100 | GUGCCCGUAGGGCCAGCCU | 212 | GUGCCCGUAGGGCCAGCCUNN | 492 |
| s | 84 | GCUGGCCUACGGGCACCG | 213 | GCUGGCCUACGGGCACCGNN | 493 |
| as | 102 | CGGUGCCCGUAGGGCCAGC | 214 | CGGUGCCCGUAGGGCCAGCIN | 494 |
| s | 85 | CUGGCCUACGGGCACCGG | 215 | CUGGCCUACGGGCACCGGNN | 495 |
| as | 103 | CGGGUGCCCGUAGGGCCAG | 216 | CGGGUGCCCGUAGGGCCAGNN | 496 |
| s | 87 | GGCCCUACGGGCACCGGUG | 217 | GGCCCUACGGGCACCGGUNN | 497 |
| as | 105 | CACCGGUGCCCGUAGGGCC | 218 | CACCGGUGCCCGUAGGGCCIN | 498 |
| s | 9 | CCACUCAUUCUUGGCAGGA | 219 | CCACUCAUUCUUGGCAGGNN | 499 |
| as | 27 | UCCUGCCAAGAAUGAGUGG | 220 | UCCUGCCAAGAAUGAGUGGN | 500 |
| s | 90 | CCUACGGGCACCGGUGAAU | 221 | CCUACGGGCACCGGUGAAUNN | 501 |
| as | 108 | AUUCACCGGUGCCCGUAGG | 222 | AUUCACCGGUGCCCGUAGGIN | 502 |
| s | 91 | CUACGGGCACCGGUGAAUC | 223 | CUACGGGCACCGGUGAAUCNN | 503 |
| as | 109 | GAUUCACCGGUGCCCGUAG | 224 | GAUUCACCGGUGCCCGUAGIN | 504 |
| s | 92 | UACGGGCACCGGUGAAUCC | 225 | UACGGGCACCGGUGAAUCCNN | 505 |

10

20

30

40

【表3A-6】

| 鎖 | 位置 | 配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 | 3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 |
|----|-----|-----------------------|----------|--|----------|
| as | 110 | GGAUUCACCGGUGCCGUUA | 226 | GGAUUCACCGGUGCCGUANN | 506 |
| s | 93 | ACGGGCACCGGUGAAUCCA | 227 | ACGGGCACCGGUGAAUCCANN | 507 |
| as | 111 | UGGAUUCACCGGUGCCGU | 228 | UGGAUUCACCGGUGCCGUUN | 508 |
| s | 97 | GCACCGGUGAAUCCAAGUG | 229 | GCACCGGUGAAUCCAAGUGNN | 509 |
| as | 115 | CACUUGGAAUUCACCGGUGC | 230 | CACUUGGAAUUCACCGGUGCN | 510 |
| s | 98 | CACCGGUGAAUCCAAGUGU | 231 | CACCGGUGAAUCCAAGUGUNN | 511 |
| as | 116 | ACACUUGGAAUUCACCGGUG | 232 | ACACUUGGAAUUCACCGGUGNN | 512 |
| s | 167 | UGUGGCCAUGCAUGGUUC | 233 | UGUGGCCAUGCAUGGUUCNN | 513 |
| as | 185 | GAACACAUGCAUGGCCACA | 234 | GAACACAUGCAUGGCCACANN | 514 |
| s | 168 | GUGGCCAUGCAUGGUUCUA | 235 | GUGGCCAUGCAUGGUUCUANN | 515 |
| as | 186 | UGAACACACAUGCAUGGCCAC | 236 | UGAACACACAUGCAUGGCCACNN | 516 |
| s | 171 | GCCAUUGCAUGUGUUACAGAA | 237 | GCCAUUGCAUGUGUUACAGAANN | 517 |
| as | 189 | UUCUGAACACAUUGCAUGGC | 238 | UUCUGAACACAUUGCAUGGCNN | 518 |
| s | 432 | UAUUCACCACCGGUGCUA | 239 | UAUUCACCACCGGUGCUANN | 519 |
| as | 449 | UGACAGCCGUGGUUGGAUAA | 240 | UGACAGCCGUGGUUGGAUAIN | 520 |
| s | 447 | GUCAUCACCAAUCCCAAGG | 241 | GUCAUCACCAAUCCCAAGGN | 521 |
| as | 465 | CCUUGGGAUUGGUGAUGAC | 242 | CCUUGGGAUUGGUGAUGACNN | 522 |
| s | 115 | GUCCUCUGAUGGUCAAAGU | 243 | GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN | 523 |
| as | 133 | ACUUUUGACCAUCAGAGGAC | 244 | ACUUUUGACCAUCAGAGGACNN | 524 |
| s | 122 | GAUGGUCAAAGUUCUAGAU | 245 | GAUGGUCAAAGUUCUAGAUNN | 525 |
| as | 140 | AUCUAGAACUUUGACCAUC | 246 | AUCUAGAACUUUGACCAUCNN | 526 |
| s | 139 | AUGCUGUCGGAGGCAGUCC | 247 | AUGCUGUCGGAGGCAGUCCNN | 527 |
| as | 157 | GGACUGCCUCGGACAGCAU | 248 | GGACUGCCUCGGACAGCAUNN | 528 |
| s | 172 | CCGUGCAUGGUUCAGAAA | 249 | CCGUGCAUGGUUCAGAAANN | 529 |
| as | 190 | UUUCUGAACACAUUGCACGG | 250 | UUUCUGAACACAUUGCACGGNN | 530 |
| s | 238 | AGUCUGGAGAGCUGCAUGG | 251 | AGUCUGGAGAGCUGCAUGGN | 531 |
| as | 256 | CCAUGCAGCUCUCCAGACU | 252 | CCAUGCAGCUCUCCAGACUNN | 532 |
| s | 252 | CAUGGGCUCACAACUGAGG | 253 | CAUGGGCUCACAACUGAGGN | 533 |
| as | 270 | CCUCAGUUGUGAGGCCAUG | 254 | CCUCAGUUGUGAGGCCAUGNN | 534 |
| s | 33 | UCUCAUCGUCUGCUCCUCC | 255 | UCUCAUCGUCUGCUCCUCCNN | 535 |
| as | 51 | GGAGGAGCAGACGAUGAGA | 256 | GGAGGAGCAGACGAUGAGANN | 536 |
| s | 340 | CCCCAUUCCAUAGAGCAUGC | 257 | CCCCAUUCCAUAGAGCAUGCN | 537 |
| as | 358 | GCAUGCUCAUAGGAUAGGGG | 258 | GCAUGCUCAUAGGAUAGGGGN | 538 |
| s | 421 | GCCCCUACUCCUAUUCCAC | 259 | GCCCCUACUCCUAUUCCACNN | 539 |
| as | 439 | GUGGAAUAGGAGUAGGGG | 260 | GUGGAAUAGGAGUAGGGGN | 540 |
| s | 431 | CUAUUCCACCAACGGCUGUC | 261 | CUAUUCCACCAACGGCUGUCH | 541 |
| as | 449 | GACAGCCGUGGUUGGAAUAG | 262 | GACAGCCGUGGUUGGAAUAGNN | 542 |
| s | 440 | CACGGCUGUCUGACACCAAU | 263 | CACGGCUGUCUGACACCAAUNN | 543 |
| as | 458 | AUUGGUGACGACAGCCGUG | 264 | AUUGGUGACGACAGCCGUGNN | 544 |
| s | 496 | AGGACGAGGGGAUGGGAUU | 265 | AGGACGAGGGGAUGGGAUUUNN | 545 |
| as | 514 | AAAUCCAUCCCUCGUCCU | 266 | AAAUCCAUCCCUCGUCCUNN | 546 |
| s | 556 | UCACCUCAUAUGCUAUGUU | 267 | UCACCUCAUAUGCUAUGUUNN | 547 |
| as | 574 | AACAUAGCAUAUGAGGUGA | 268 | AACAUAGCAUAUGAGGUGNN | 548 |
| s | 559 | CCUCAUAUGCUAUGUUAGA | 269 | CCUCAUAUGCUAUGUUAGNN | 549 |
| as | 577 | UCUAACAUAGCAUAUGAGG | 270 | UCUAACAUAGCAUAUGAGGN | 550 |
| s | 570 | AUGUUAGAAGGUCCAGGCAG | 271 | AUGUUAGAAGGUCCAGGCAGNN | 551 |
| as | 588 | CUGCCUGGACUUCUAACAU | 272 | CUGCCUGGACUUCUAACUNN | 552 |
| s | 78 | UCUGAGGCUGGCCUACGG | 273 | UCUGAGGCUGGCCUACGGNN | 553 |
| as | 96 | CCGUAGGGCCAGCCUCAGA | 274 | CCGUAGGGCCAGCCUCAGANN | 554 |

【表3A-7】

| 鎖 | 位置 | 配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 | 3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列 番号 |
|----|-----|---------------------|----------|--|----------|
| s | 87 | GGCCCUACGGGCACCGGUG | 275 | GGCCCUACGGGCACCGGUGNN | 555 |
| as | 105 | CACCGGUGGCCGUAGGGCC | 276 | CACCGGUGGCCGUAGGGCCNN | 556 |
| s | 95 | GGGCACCGGUGAAUCCAAG | 277 | GGGCACCGGUGAAUCCAAGNN | 557 |
| as | 113 | CUUGGAUUCACCGGUGCC | 278 | CUUGGAUUCACCGGUGCCNN | 558 |
| s | 167 | CCAUGCAUGUGUUCAGAAA | 279 | CCAUGCAUGUGUUCAGAAAANN | 559 |
| as | 185 | UUUCUGAACACAUGCAUGG | 280 | UUUCUGAACACAUGCAUGGNN | 560 |

【0223】

【表3B-1】

表3B. ヒトTTRのd s RNAのセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖: s = センス、as = アンチセンス

位置: 転写物(NM_000371.2、配列番号1329)における5'位の塩基

| 鎖 | 位置 | 3'のテキストミシングオーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|-----|---|------|
| s | 100 | CCGGUGAAUCCAAGUGUCCdTdT | 561 |
| as | 118 | GGACACUUUUGGAUUCACCGGdTdT | 562 |
| s | 11 | ACUCAUUCUUGGCAGGAUGdTdT | 563 |
| as | 29 | CAUCCUGCCAAGAAUGAGdTdT | 564 |
| s | 111 | AAGUGUCCUCUGAUGGUCAdTdT | 565 |
| as | 129 | UGACCAUCAGAGGACACUUDdTdT | 566 |
| s | 13 | UCAUUCUUGGCAGGAUGGCdTdT | 567 |
| as | 31 | GCCAUCCUGCCAAGAAUGAGdTdT | 568 |
| s | 130 | AAGUUCUAGAUGCUGUCCGdTdT | 569 |
| as | 148 | CGGACAGCAUCUAGAACUdTdT | 570 |
| s | 132 | GUUCUAGAUGCUGUCCGAGdTdT | 571 |
| as | 150 | CUCGGACAGCAUCUAGAACdTdT | 572 |
| s | 135 | CUAGAUGCUGUCCGAGGCdTdT | 573 |
| as | 153 | UGCCUCGGACAGCAUCUAGdTdT | 574 |
| s | 138 | GAUGCUGUCCGAGGCAGUCdTdT | 575 |
| as | 156 | GACUGCCUCGGACAGCAUCdTdT | 576 |
| s | 14 | CAUUCUUGGCAGGAUGGCdTdT | 577 |
| as | 32 | AGCCAUCUCCUGCCAAGAAUGdTdT | 578 |
| s | 140 | UGCUGUCCGAGGCAGGUCCUDdTdT | 579 |
| as | 158 | AGGACUGCCUCGGACAGCAdTdT | 580 |
| s | 146 | CCGAGGCAGUCCUGCCAUCdTdT | 581 |
| as | 164 | GAUGGCAGGACUGCCUCGGdTdT | 582 |
| s | 152 | CAGUCCUGCCAUCAAUGUGdTdT | 583 |
| as | 170 | CACAUUGAUGGCAGGACUGdTdT | 584 |
| s | 164 | CAAUGUGGCCGUGCAUGUGdTdT | 585 |
| as | 182 | CACAUUGCACGCCACAUUGdTdT | 586 |
| s | 178 | AUGUGUUCAGAAAGGCUGCdTDt | 587 |
| as | 196 | GCAGCCUUUCUGAACACAUDdTdT | 588 |
| s | 2 | CAGAAGUCCACUCUCAUUCUDdTdT | 589 |
| as | 20 | AAGAAUGAGUGGACUUUCUGdTdT | 590 |
| s | 21 | GGCAGGAUGGCUUCUCAUCdTdT | 591 |
| as | 39 | GAUGAGAAGCCAUCUCCUGCCdTdT | 592 |
| s | 210 | GAGCCAUUJUGGCCUCUGGGAdTdT | 593 |
| as | 228 | UCCCAGAGGCAAAUGGCUCdTdT | 594 |
| s | 23 | CAGGAUGGCCUUCUCAUCGUdTdT | 595 |
| as | 41 | ACGAUGAGAAGCCAUCUCCUGdTdT | 596 |
| s | 24 | AGGAUGGCCUUCUCAUCGUCDdTdT | 597 |
| as | 42 | GACGAUGAGAAGCCAUCUCCUDdTdT | 598 |
| s | 245 | AGAGCUGCAUGGGCUCACAdTdT | 599 |
| as | 263 | UGUGAGCCCAUGCAGCUCUDdTdT | 600 |
| s | 248 | GCUGCAUGGGCUCACAAACUDdTdT | 601 |

【表 3 B - 2】

| 鎖 | 位置 | 3' のテオキシチミシンオーハー・ランク ² を有する配列 (5' から 3' の方向) | 配列番号 |
|----|-----|--|------|
| as | 266 | AGUUUGUGAGGCCAUGCAGCdTdT | 602 |
| s | 25 | GGAUGGCUUCUCAUCGUCdTdT | 603 |
| as | 43 | AGACGAUGAGAACGCCAUCCdTdT | 604 |
| s | 251 | GCAUGGGCUCACAACUGAGCdTdT | 605 |
| as | 269 | CUCAGUUGUGAGGCCAUGCdTdT | 606 |
| s | 253 | AUGGGCUCACAACUGAGGAdTdT | 607 |
| as | 271 | UCCUCAGUUGUGAGGCCAUCdTdT | 608 |
| s | 254 | UGGGCUCACAACUGAGGAGdTdT | 609 |
| as | 272 | CUCCUCAGUUGUGAGGCCAdTdT | 610 |
| s | 270 | GAGGAUUUUGUAGAAGGGAdTdT | 611 |
| as | 288 | UCCCUCUACAAAUCUCCdTdT | 612 |
| s | 276 | UUUGUAGAAGGGAUUAUCAdTdT | 613 |
| as | 294 | UGUUAUACCCUUCUACAAAdTdT | 614 |
| s | 277 | UUGUAGAAGGGAUUAUACAAAdTdT | 615 |
| as | 295 | UUGUUAUACCCUUCUACAAAdTdT | 616 |
| s | 278 | UGUAGAAGGGAUUAUACAAAdTdT | 617 |
| as | 296 | UUUGUUAUACCCUUCUACAdTdT | 618 |
| s | 281 | AGAAGGGAUUAUACAAAGUGdTdT | 619 |
| as | 299 | CACUUUGUUAUACCCUUCdTdT | 620 |
| s | 295 | AAGUGGAAAUAGACACCAAdTdT | 621 |
| as | 313 | UUGCHUCUJAUUUCACUdTdT | 622 |
| s | 299 | GGAAAAGACACCAAACUdTdT | 623 |
| as | 317 | AGAUUUGGUGUCUAAUUCdTdT | 624 |
| s | 300 | GAAGAAGACACCAAACUdTdT | 625 |
| as | 318 | AAGAUUUGGUGUCUAAUUCdTdT | 626 |
| s | 303 | AUAGACACCAAACUdTdT | 627 |
| as | 321 | AGUAAGAUUJUGGUGUCUAUdTdT | 628 |
| s | 304 | UAGACACCAAACUdTdT | 629 |
| as | 322 | CAGUAAGAUUUGGUGUCdTdT | 630 |
| s | 305 | AGACACCAAACUdTdT | 631 |
| as | 323 | CCAGUAAGAUUUGGUGUCdTdT | 632 |
| s | 317 | UUAUGGAAAGGCACUUGGdTdT | 633 |
| as | 335 | GCCAAGUGCCUUCAGUAAdTdT | 634 |
| s | 32 | UUCUCAUUGCUGCUGCUCCdTdT | 635 |
| as | 50 | GAGGAGCAGACGAUGAGAAdTdT | 636 |
| s | 322 | GGAGGACACUUGGCAUCUCdTdT | 637 |
| as | 340 | GAGAUGGCAAGUGCCUUCdTdT | 638 |
| s | 326 | GCCACUUGGCAUCUCCCCAdTdT | 639 |
| as | 344 | UGGGGAGAUGCCAAGUGCCdTdT | 640 |
| s | 333 | GCGCAUCUCCCCAUUCCAUdTdT | 641 |
| as | 351 | AUGGAAUGGGGAGAUGCCTdTdT | 642 |
| s | 334 | GCAUCUCCCCAUUCCAUdTdT | 643 |
| as | 352 | UCAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT | 644 |
| s | 335 | CAUCUCCCCAUUCCAUdTdT | 645 |
| as | 353 | CUCAUGGAAUGGGGAGAUGdTdT | 646 |
| s | 336 | AUCUCCCCAUUCCAUdTdT | 647 |
| as | 354 | GCUCUAGGAAUGGGGAGAUdTdT | 648 |
| s | 338 | CUCCCCAUUCCAUdTdT | 649 |
| as | 356 | AUGCUCUAGGAAUGGGGAGdTdT | 650 |
| s | 341 | CCCCAUUCCAUdTdT | 651 |
| as | 359 | UGCAUCUCAUGGAAUGGGdTdT | 652 |
| s | 347 | CCAUGAGCAUGCAGAGGUGdTdT | 653 |
| as | 365 | CACCUCUGCAUGCUCUAGGdTdT | 654 |
| s | 352 | AGCAUGCAGAGGUGGUUUdTdT | 655 |
| as | 370 | AAUACCACCUUCUGCAUGCdTdT | 656 |
| s | 354 | CAUGCAGAGGUGGUUUUCdTdT | 657 |
| as | 372 | UGAUACCACCUUCUGCAUGdTdT | 658 |

【表 3 B - 3】

| 鎖 | 位置 | 3' のテオキシミシンオーハー-ランクを有する配列 (5' から 3' の方向) | 配列番号 |
|----|-----|---|------|
| s | 355 | AUGCAGAGGUGGUUAUCACdTdT | 659 |
| as | 373 | GUGAAUACCACUCUGCAUdTdT | 660 |
| s | 362 | GGUGGUAAUUCACAGCCAACdTdT | 661 |
| as | 380 | GUUGGCUGUGAAUACCACCDdTdT | 662 |
| s | 363 | GUGGUAAUUCACAGCCAACGdTdT | 663 |
| as | 381 | CQUUCCUGUGAUUACCAACdTdT | 664 |
| s | 364 | UGGUAAUUCACAGCCACCGAdTdT | 665 |
| as | 382 | UCGUUCCUGUGAAUACCAACdTdT | 666 |
| s | 365 | GGUAAUUCACAGCCAACGACdTdT | 667 |
| as | 383 | GUCCUUGGCUGUGAAUACCDdTdT | 668 |
| s | 366 | GUAAUUCACAGCCAACGGACdTdT | 669 |
| as | 384 | AGUCGUUGGCUGUGAAUACCdTdT | 670 |
| s | 367 | UAUUCACAGCCAACGACUCdTdT | 671 |
| as | 385 | GAGUCGUUGGCUGUGAAUAdTdT | 672 |
| s | 370 | UCACAGCCAACGACUCCGGdTdT | 673 |
| as | 388 | CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT | 674 |
| s | 390 | CCCCGCCCUACACCAAUUGdTdT | 675 |
| as | 408 | CAAUGGUAGCGGGGGGdTdT | 676 |
| s | 4 | GAAGUCCACUCUAAUUCUUGGdTdT | 677 |
| as | 22 | CCAAGAAUAGAGUGGACUUdTdT | 678 |
| s | 412 | CCCUGCIUGAGCCCCUACUCdTdT | 679 |
| as | 430 | GAGUAGGGCUCAGCAGGGdTdT | 680 |
| s | 417 | CUGAGCCCCUACUCCUAAUdTdT | 681 |
| as | 435 | AAUAGGAGUAGGGGCUCAGdTdT | 682 |
| s | 418 | UGAGCCCCUACUCCUAAUUCdTdT | 683 |
| as | 436 | GAAUAGGAGUAGGGGCUCAdTdT | 684 |
| s | 422 | CCUCUACUCCUAAUCCACCDdTdT | 685 |
| as | 440 | GGUGGAUAGGAGUAGGGGdTdT | 686 |
| s | 425 | CUACUCCUAAUCCACACGdTdT | 687 |
| as | 443 | CGUGGUGGAUAGGAGUAGdTdT | 688 |
| s | 426 | UACUCCUAAUCCACACGGdTdT | 689 |
| as | 444 | CGUGGUGGAUAGGAGUAdTdT | 690 |
| s | 427 | ACUCCUAAUCCACACGGCdTdT | 691 |
| as | 445 | GCGUGGUGGAUAGGAGUdTdT | 692 |
| s | 429 | UCCUAAUCCACACGGCUGdTdT | 693 |
| as | 447 | CAGCCUGGUGGAUAGGAdTdT | 694 |
| s | 432 | UAUUCCACCAACGGCUGUCGdTdT | 695 |
| as | 450 | CGACAGCCUGGUGGAAUAdTdT | 696 |
| s | 433 | AUUCCACCAACGGCUGUCGdTdT | 697 |
| as | 451 | ACGACAGCCUGGUGGAAUdTdT | 698 |
| s | 437 | CACCAACGGCUGUCGUACCDdTdT | 699 |
| as | 455 | GGUQACGACAGCCUGGUGdTdT | 700 |
| s | 438 | ACCACGGCUGUCGUACCAACdTdT | 701 |
| as | 456 | UGGUGACGACAGCCUGGGdTdT | 702 |
| s | 439 | CCACGGCUGUCGUACCAACdTdT | 703 |
| as | 457 | UUGGUGACGACAGCCUGGdTdT | 704 |
| s | 441 | ACGGCUGCUGUCACCAAUdTdT | 705 |
| as | 459 | GAUUGGUGACGACAGCCGdTdT | 706 |
| s | 442 | CGGCUGUGCGUACCAAUCCdTdT | 707 |
| as | 460 | GGAUUGGUGACGACAGCCGdTdT | 708 |
| s | 449 | CGUCACCAAUCCACCGAAdTdT | 709 |
| as | 467 | UUCUUGGGAUUGGUGACGdTdT | 710 |
| s | 455 | CAAUCCCAAGGAAUAGGAGGGdTdT | 711 |
| as | 473 | CCCUCAUCCUUGGAAUUGdTdT | 712 |
| s | 491 | CCUGAAGGACGAGGGAUUGGdTdT | 713 |
| as | 509 | CCAUCCUCGUCCUUCAGGdTdT | 714 |
| s | 497 | GGACGAGGGAUUGGAAUUCdTdT | 715 |

10

20

30

40

【表3B-4】

| 鎖 | 位置 | 3' のテ'オキシチミンオール'ー配列を有する配列 (5' から 3' の方向) | 配列番号 |
|----|-----|---|------|
| as | 515 | GAAAUCCAUCCUCGUCCdTdT | 716 |
| s | 5 | AAGUCCACUCAUDCUUGGdTdT | 717 |
| as | 23 | GCCAAGAAUGAGUGGACUdTdT | 718 |
| s | 508 | GGGAUUUCAUGUAACCAAGdTdT | 719 |
| as | 526 | CUUGGUACAUAGAAUCCCdTdT | 720 |
| s | 509 | GGAAUUUCAUGUAACCAAGdTdT | 721 |
| as | 527 | UCUUGGUACAUAGAAUCCCdTdT | 722 |
| s | 514 | UCAUGUAACCAAGAGUAUUdTdT | 723 |
| as | 532 | AAUACUCUUGGUACAUAGdTdT | 724 |
| s | 516 | AUGUAACCAAGAGUAUCCCdTdT | 725 |
| as | 534 | GGAAUACUCUUGGUACAUdTdT | 726 |
| s | 517 | UGUAACCAAGAGUAUCCCdTdT | 727 |
| as | 635 | UGGAAUACUCUUGGUACAGdTdT | 728 |
| s | 518 | GUACCAAGAGUAUCCCdTdT | 729 |
| as | 536 | AUGGAAUACUCUUGGUACdTdT | 730 |
| s | 54 | UGCCUUGCUGGACUGGUAUdTdT | 731 |
| as | 72 | AUACCAGUCCAGCAAGGCdTdT | 732 |
| s | 543 | UAAAGCAGUGUUUUCACCUdTdT | 733 |
| as | 561 | AGGUGAAAACACUGCUUAdTdT | 734 |
| s | 55 | GCCUUGCUGGACUGGUAUdTdT | 735 |
| as | 73 | AAUACCAGUCCAGCAAGGCdTdT | 736 |
| s | 551 | UGUUUUACCUCAUAUGCUdTdT | 737 |
| as | 569 | AGCAUAUGAGGUGAAAACAdTdT | 738 |
| s | 552 | GUUUUCACCUCAJUAGCUAdTdT | 739 |
| as | 570 | UAGCAUAUGAGGUGAAAACdTdT | 740 |
| s | 553 | UUUUCACCUCAUAUGCUAdTdT | 741 |
| as | 571 | AUAGCAUAUGAGGUGAAAAdTdT | 742 |
| s | 555 | UUCACCUCAUAUGCUAUGUdTdT | 743 |
| as | 573 | ACAUAGCAUAUGAGGUGAdTdT | 744 |
| s | 557 | CACCUCAUAUGCUAUGUAdTdT | 745 |
| as | 575 | UAACAUAGCAUAUGAGGUGdTdT | 746 |
| s | 56 | CCUUGCUGGACUGGUAUUdTdT | 747 |
| as | 74 | AAAUACCAGUCCAGCAAGGdTdT | 748 |
| s | 563 | AUAUGCUAUGUUAGAACUdTdT | 749 |
| as | 581 | GACUUCUAACAUAGCAUAUdTdT | 750 |
| s | 564 | UAUGCUAUGUUAGAACUdTdT | 751 |
| as | 582 | GGACUUCAACAUAGCAUAdTdT | 752 |
| s | 566 | UGCUAUGUUAGAACUdTdT | 753 |
| as | 584 | CUGGACUUCUAACAUAGCAAdTdT | 754 |
| s | 57 | CUUGCUGGACUGGUAUUUGdTdT | 755 |
| as | 75 | CAAAUACCAGUCCAGCAAGdTdT | 756 |
| s | 578 | AGUCCAGGCAGAGACAAUAdTdT | 757 |
| as | 596 | AUUGUCUCUGCCUGGACUTTdT | 758 |
| s | 580 | UCCAGGCAGAGACAAUAAAAdTdT | 759 |
| as | 598 | UUUAAUUGUCUCUGCCUGGAdTdT | 760 |
| s | 607 | GUGAAAGGCACUUUCAUdTdT | 761 |
| as | 625 | AAUGAAAAGGCCUUUCACdTdT | 762 |
| s | 62 | UGGACUGGUAUUUGUGCUdTdT | 763 |
| as | 80 | AGACACAAUACCAGUCCAdTdT | 764 |
| s | 77 | GUCUGAGGCUGGCCUACGdTdT | 765 |
| as | 95 | CGUAGGGCCAGGCCUACGACdTdT | 766 |
| s | 79 | CUGAGGCUGGCCUACGGGdTdT | 767 |
| as | 97 | CCCGUAGGGCCAGGCCUACGdTdT | 768 |
| s | 81 | GAGGCUGGCCUACGGGCAGdTdT | 769 |
| as | 99 | UGCCCGUAGGGCCAGGCCUACdTdT | 770 |
| s | 82 | AGGCUGGCCUACGGGCAGCCdTdT | 771 |
| as | 100 | GUGCCCGUAGGGCCAGCCdTdT | 772 |

10

20

30

40

【表3B-5】

| 鎖 | 位置 | 3'のテ'オキシチミンオーハ'ールング'を有する配列 (5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|-----|---|------|
| s | 84 | GCUGGCCUACGGGCACCGdTdT | 773 |
| as | 102 | CGGUGCCGUAGGGCAGCdTdT | 774 |
| s | 85 | CUGGCCUACGGGCACCGdTdT | 775 |
| as | 103 | CCGGUGCCGUAGGGCAGdTdT | 776 |
| s | 87 | GGCCCUACGGGCACCGGUdTdT | 777 |
| as | 105 | CACCGGUGGCCGUAGGGCdTdT | 778 |
| s | 9 | CCACUCAUUCUUGGCAGGdTdT | 779 |
| as | 27 | UCCUGCCAAGAAUGAGUGGdTdT | 780 |
| s | 90 | CCUACGGGCACCGGUdTdT | 781 |
| as | 108 | AUUCACCGGUGGCCGUAGGdTdT | 782 |
| s | 91 | CUACGGGCACCGGUdTdT | 783 |
| as | 109 | GAUUCACCGGUGGCCGUAGGdTdT | 784 |
| s | 92 | UACGGGCACCGGUdTdT | 785 |
| as | 110 | GGAUUCACCGGUdTdT | 786 |
| s | 93 | ACGGGCACCGGUdTdT | 787 |
| as | 111 | UGGAUUCACCGGUdTdT | 788 |
| s | 97 | GCACCGGUdTdT | 789 |
| as | 115 | CACUUGGAUUCACCGGUdTdT | 790 |
| s | 98 | CACCGGUdTdT | 791 |
| as | 116 | ACACUUGGAUUCACCGGUdTdT | 792 |
| s | 167 | UGUGGCCAUGCAGGUdTdT | 793 |
| as | 185 | GAACACAUGCAUGGCACAdTdT | 794 |
| s | 168 | GUGGCCAUGCAGGUdTdT | 795 |
| as | 186 | UGAACACAUGCAUGGCCACdTdT | 796 |
| s | 171 | GCGAUGCAGGUdTdT | 797 |
| as | 189 | UUCUGAACACAUGCAUGGdTdT | 798 |
| s | 432 | UAUUCACCACGGCUGUCAdTdT | 799 |
| as | 449 | UGACAGCCGUGGUdTdT | 800 |
| s | 447 | GUCAUCACCAAUCCCAAGGdTdT | 801 |
| as | 465 | CCUUGGGAUUGGUdTdT | 802 |
| s | 115 | GUCCUCUGAUGGUdTdT | 803 |
| as | 133 | ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT | 804 |
| s | 122 | GAUGGUCAAAGUUCUAGAUdTdT | 805 |
| as | 140 | AUCUAGAACUUUGACCAUCdTdT | 806 |
| s | 139 | AUGCUGGUCCGAGGCAUGCdTdT | 807 |
| as | 157 | GGACUGCCUCGGACAGCAUGdTdT | 808 |
| s | 172 | CGUGCAUGGUdTdT | 809 |
| as | 190 | UUUCUGAACACAUGCACGGdTdT | 810 |
| s | 238 | AGUCUGGAGAGCUGCAUGGdTdT | 811 |
| as | 256 | CCAUGCAGCUCUCCAGACUdTdT | 812 |
| s | 252 | CAUGGGCUCACAACUGAGGdTdT | 813 |
| as | 270 | CCUCAGUUGUGAGGCCAUGGdTdT | 814 |
| s | 33 | UCUCAUCGUCUGCUCUCCdTdT | 815 |
| as | 51 | GGAGGAGCAGACGAUGAGAdTdT | 816 |
| s | 340 | CCCCAUUCCAAUGAGCAUGCdTdT | 817 |
| as | 358 | GCAUGCUCUCAUGGAAUGGGGdTdT | 818 |
| s | 421 | GCCCCUACUCCUAAUCCACdTdT | 819 |
| as | 439 | GUGGAAUAGGAGUAGGGGdTdT | 820 |
| s | 431 | CUAUUCCACCACGGCUGUCdTdT | 821 |
| as | 449 | GACAGCCGUGGUdTdT | 822 |
| s | 440 | CACGGCUGUCGUdTdT | 823 |
| as | 458 | AUUGGUGACGACAGCCGUGdTdT | 824 |
| s | 496 | AGGACGAGGGGAUGGGAUUdTdT | 825 |
| as | 514 | AAAUCCAUCCCUCGUCCdTdT | 826 |
| s | 556 | UCACCUCAUAUGCUCAGGUdTdT | 827 |
| as | 574 | AAACAUAGCAUAUGAGGUGAdTdT | 828 |
| s | 559 | CCUCAUAUGCUAUGGUAGAdTdT | 829 |

10

20

30

40

【表 3 B - 6】

| 鎖 | 位置 | 3' のテ'オキシチミシンオーハ'ー配列 (5' から 3' の方向) | 配列番号 |
|----|-----|--|------|
| as | 577 | UCUAACAUAGCAU AUGAGGdTdT | 830 |
| s | 570 | AUGUUAGAAGGUCCAGGCAGdTdT | 831 |
| as | 588 | CUGCCUGGACUUCUAACAUdTdT | 832 |
| s | 78 | UCUGAGGCUGGCCUACGGdTdT | 833 |
| as | 96 | CCGUAGGGCCAGCCUCAGAdTdT | 834 |
| s | 87 | GGCCCACGGGCACCGGUGdTdT | 835 |
| as | 105 | CACCGGUGGCCGUAGGGCCdTdT | 836 |
| s | 95 | GGGCACCGGUGAAUCCAAGdTdT | 837 |
| as | 113 | CUUGGAUUCACC GGUGGCCdTdT | 838 |
| s | 167 | CCAUGCAUGUGUUCAGAAAAdTdT | 839 |
| as | 185 | UUUCUGAACACAU GCAUGGdTdT | 840 |

10

【0224】

【表4-1】

表4. ヒトTTRのd s RNAの化学修飾したセンスおよびアンチセンス鎖配列
二本鎖番号については、表2を参照されたい。

鎖：s = センス、as = アンチセンス

位置：転写物(NM_000371.2、配列番号1329)における5'位の塩基

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|--------------------------|------|
| s | A-32153 | 100 | ccGGGuGAAuccAAGuGuccdTdT | 841 |
| as | A-32154 | 118 | GGAcACUUGGAUUcACCGGdTdT | 842 |
| s | A-32155 | 11 | AcucAuucuuGGcAGGAuGdTdT | 843 |
| as | A-32156 | 29 | cAUCCUGCcAAGAAUGAGUdTdT | 844 |
| s | A-32157 | 111 | AAGuGuccucuGAuGGucAddTdT | 845 |
| as | A-32158 | 129 | UGACcAUcAGAGGAcACUUDdTdT | 846 |
| s | A-32163 | 13 | ucAuucuuGGcAGGAuGGcdTdT | 847 |
| as | A-32164 | 31 | GCcAUCCUGCcAAGAAUGAddTdT | 848 |
| s | A-32165 | 130 | AAGuucuAGAuGcuGuccGdTdT | 849 |
| as | A-32166 | 148 | CGGAcAGcAUCuAGAACUUDdTdT | 850 |
| s | A-32167 | 132 | GuucuAGAuGcuGuccGAGdTdT | 851 |
| as | A-32168 | 150 | CUCGGAcAGcAUCuAGAACdTdT | 852 |
| s | A-32169 | 135 | cuAGAuGcuGuccGAGGcAddTdT | 853 |
| as | A-32170 | 153 | UGCCUCGGAcAGcAUCuAGdTdT | 854 |
| s | A-32171 | 138 | GAuGcuGuccGAGGcAGucdTdT | 855 |
| as | A-32172 | 156 | GACUGCUCGGAcAGcAUCdTdT | 856 |
| s | A-32175 | 14 | cAuucuuGGcAGGAuGGcdTdT | 857 |
| as | A-32176 | 32 | AGCcAUCCUGCcAAGAAUGdTdT | 858 |
| s | A-32177 | 140 | uGcuGuccGAGGcAGuccudTdT | 859 |
| as | A-32178 | 158 | AGGACUGCCUCGGAcAGcAddTdT | 860 |
| s | A-32179 | 146 | ccGAGGcAGuccuGccAucdTdT | 861 |
| as | A-32180 | 164 | GAUGGcAGGACUGCCUCGGdTdT | 862 |
| s | A-32181 | 152 | cAGuccuGccAucAAuGuGdTdT | 863 |
| as | A-32182 | 170 | cAcAUUGAUGGcAGGACUGdTdT | 864 |
| s | A-32183 | 164 | cAAuGuGGccGuGcAuGuGdTdT | 865 |
| as | A-32184 | 182 | cAcAUGcACGGCcAcAUUGdTdT | 866 |
| s | A-32187 | 178 | AuGuGuucAGAAAGGcuGcdTdT | 867 |
| as | A-32188 | 196 | GcAGGCCUUUCUGAAcAcAUdTdT | 868 |
| s | A-32189 | 2 | cAGAAAGuccAcucAuucuudTdT | 869 |
| as | A-32190 | 20 | AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT | 870 |
| s | A-32191 | 21 | GGcAGGAuGGcuucucAucdTdT | 871 |
| as | A-32192 | 39 | GAUGAGAAGCcAUCCUGCCdTdT | 872 |
| s | A-32193 | 210 | GAGccAuuuGccucuGGGAdTdT | 873 |
| as | A-32194 | 228 | UCCcAGAGGcAAAUGGCUCdTdT | 874 |
| s | A-32195 | 23 | cAGGAuGGcuucucAucGudTdT | 875 |
| as | A-32196 | 41 | ACGAUGAGAAGCcAUCCUGdTdT | 876 |

10

20

30

40

【表4-2】

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|--------------------------|------|
| s | A-32199 | 24 | AGGAuGGcuucucAucGucdTdT | 877 |
| as | A-32200 | 42 | GACGAUGAGAACGcAUCCUdTdT | 878 |
| s | A-32201 | 245 | AGAGcuGcAuGGGcucAcAdTdT | 879 |
| as | A-32202 | 263 | UGUGAGCCcAUGcAGCUCUdTdT | 880 |
| s | A-32203 | 248 | GcuGcAuGGGcucAcAAcudTdT | 881 |
| as | A-32204 | 266 | AGUUGUGAGCCcAUGcAGCdTdT | 882 |
| s | A-32205 | 25 | GGauGGcuucucAucGucudTdT | 883 |
| as | A-32206 | 43 | AGACGAUGAGAACGcAUCCdTdT | 884 |
| s | A-32207 | 251 | GcAuGGGcucAcAAcudTdT | 885 |
| as | A-32208 | 269 | CUCAGUUGUGAGGCCcAUGCdTdT | 886 |
| s | A-32211 | 253 | AuGGGcucAcAAcudTdT | 887 |
| as | A-32212 | 271 | UCCUcAGUUGUGAGGCCcAUdTdT | 888 |
| s | A-32213 | 254 | uGGGcucAcAAcudTdT | 889 |
| as | A-32214 | 272 | CUCCUcAGUUGUGAGCCcAdTdT | 890 |
| s | A-32215 | 270 | GAGGAuuuGuAGAAGGGAdTdT | 891 |
| as | A-32216 | 288 | UCCCUUCuAcAAAUCUdTdT | 892 |
| s | A-32217 | 276 | uuuGuAGAAGGGAuAuAcAdTdT | 893 |
| as | A-32218 | 294 | UGuAuAUCCCUCuAcAAAdTdT | 894 |
| s | A-32219 | 277 | uuGuAGAAGGGAuAuAcAdTdT | 895 |
| as | A-32220 | 295 | UUGuAuAUCCCUUCuAcAAAdTdT | 896 |
| s | A-32221 | 278 | uGuAGAAGGGAuAuAcAAAdTdT | 897 |
| as | A-32222 | 296 | UUUGuAuAUCCCUUCuAcAdTdT | 898 |
| s | A-32223 | 281 | AGAAGGGAuAuAcAAAGuGdTdT | 899 |
| as | A-32224 | 299 | cACUUUGuAuAUCCCUUCUdTdT | 900 |
| s | A-32225 | 295 | AAGuGGAAuAGAcAccAAAdTdT | 901 |
| as | A-32226 | 313 | UUGGUGUCuAUUUCcACUUdTdT | 902 |
| s | A-32227 | 299 | GGAAAuAGAcAccAAAucudTdT | 903 |
| as | A-32228 | 317 | AGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT | 904 |
| s | A-32229 | 300 | GAAAAGAcAccAAAucuudTdT | 905 |
| as | A-32230 | 318 | AAGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT | 906 |
| s | A-32231 | 303 | AuAGAcAccAAAucuuAcudTdT | 907 |
| as | A-32232 | 321 | AGuAGAUUUGGUGUCuAUdTdT | 908 |
| s | A-32233 | 304 | uAGAcAccAAAucuuAcuGdTdT | 909 |
| as | A-32234 | 322 | cAGuAAGAUUUGGUGUCuAdTdT | 910 |
| s | A-32235 | 305 | AGAcAccAAAucuuAcuGGdTdT | 911 |
| as | A-32236 | 323 | CcAGuAAGAUUUGGUGUCUdTdT | 912 |
| s | A-32237 | 317 | uuAcuGGAAGGcAcuuGGdTdT | 913 |
| as | A-32238 | 335 | GCcAAGUGCCUUCcAGuAAAdTdT | 914 |
| s | A-32239 | 32 | uucucAucGucuGcuccucdTdT | 915 |
| as | A-32240 | 50 | GAGGAGcAGACGAUGAGAAdTdT | 916 |
| s | A-32241 | 322 | GGAGGAGcAcuuGGcAucuadTdT | 917 |
| as | A-32242 | 340 | GAGAUGCCcAAGUGCCUUCdTdT | 918 |
| s | A-32243 | 326 | GCcAcuuGGcAucucccccAdTdT | 919 |
| as | A-32244 | 344 | UGGGGAGAUGCcAAGUGCCdTdT | 920 |
| s | A-32247 | 333 | GGcAucuccccAuuccAuGdTdT | 921 |
| as | A-32248 | 351 | cAUGGAAUGGGGAGAUGCCdTdT | 922 |
| s | A-32249 | 334 | GcAUCUCCCCAuuccAuGAdTdT | 923 |
| as | A-32250 | 352 | UcAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT | 924 |
| s | A-32251 | 335 | cAucuccccAuuccAuGAGdTdT | 925 |
| as | A-32252 | 353 | CUCaUGGAAUGGGGAGAUGdTdT | 926 |
| s | A-32253 | 336 | AucuccccAuuccAuGAGcdTdT | 927 |
| as | A-32254 | 354 | GCUCaUGGAAUGGGGAGAUGdTdT | 928 |
| s | A-32255 | 338 | cuccccAuuccAuGAGcAudTdT | 929 |
| as | A-32256 | 356 | AUGCuCUGGAAUGGGGAGdTdT | 930 |
| s | A-32259 | 341 | cccAuuccAuGAGcAuGcAdTdT | 931 |
| as | A-32260 | 359 | UGcAUGCUCaUGGAAUGGGdTdT | 932 |
| s | A-32261 | 347 | ccAuGAGcAuGcAGAGGuGdTdT | 933 |
| as | A-32262 | 365 | cACCUUCUGcAUGCUCaUGGdTdT | 934 |

10

20

30

40

【表4-3】

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|--------------------------|------|
| s | A-32263 | 352 | AGcAuGcAGAGGuGGuAuudTdT | 935 |
| as | A-32264 | 370 | AAuACcACCUCUGcAUGCdTdT | 936 |
| s | A-32265 | 354 | cAUGcAGAGGuGGuAuucAdTdT | 937 |
| as | A-32266 | 372 | UGAAuACcACCUCUGcAUGdTdT | 938 |
| s | A-32267 | 355 | AuGcAGAGGuGGuAuucAccTdT | 939 |
| as | A-32268 | 373 | GUGAAuACcACCUCUGcAUdTdT | 940 |
| s | A-32269 | 362 | GGuGGuAuucAcAGccAAcdTdT | 941 |
| as | A-32270 | 380 | GUUGGCUGUGAAuACcACCdTdT | 942 |
| s | A-32271 | 363 | GuGGuAuucAcAGccAAcGdTdT | 943 |
| as | A-32272 | 381 | CGUUGGCUGUGAAuACcACdTdT | 944 |
| s | A-32273 | 364 | uGGuAuucAcAGccAAcGAdTdT | 945 |
| as | A-32274 | 382 | UCGUUGGCUGUGAAuACeAdTdT | 946 |
| s | A-32275 | 365 | GGuAuucAcAGccAAcGAcdTdT | 947 |
| as | A-32276 | 383 | GUCGUUGGCUGUGAAuACCdTdT | 948 |
| s | A-32277 | 366 | GuAuucAcAGccAAcGAudTdT | 949 |
| as | A-32278 | 384 | AGUCGUUGGCUGUGAAuACdTdT | 950 |
| s | A-32279 | 367 | uAuucAcAGccAAcGAucdTdT | 951 |
| as | A-32280 | 385 | GAGUCGUUGGCUGUGAAuAdTdT | 952 |
| s | A-32281 | 370 | uAcAGccAAcGAuccGGdTdT | 953 |
| as | A-32282 | 388 | CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT | 954 |
| s | A-32283 | 390 | ccccGccGcuAcAccAuuGdTdT | 955 |
| as | A-32284 | 408 | CAAUGGUGuAGCGGCGGGGdTdT | 956 |
| s | A-32285 | 4 | GAAGuccAcucAuucuuGGdTdT | 957 |
| as | A-32286 | 22 | CcAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT | 958 |
| s | A-32287 | 412 | cccuGcuGAGccccuAcucdTdT | 959 |
| as | A-32288 | 430 | GAGuAGGGGCUcAGcAGGGdTdT | 960 |
| s | A-32289 | 417 | cuGAGccccuAcuccuAuudTdT | 961 |
| as | A-32290 | 435 | AAuAGGAGuAGGGGCUcAGdTdT | 962 |
| s | A-32291 | 418 | uGAGccccuAcuccuAuucdTdT | 963 |
| as | A-32292 | 436 | GAAuAGGAGuAGGGGCUcAdTdT | 964 |
| s | A-32295 | 422 | ccccuAcuccuAuuccAccdTdT | 965 |
| as | A-32296 | 440 | GGUGGAAuAGGAGuAGGGdTdT | 966 |
| s | A-32297 | 425 | cuAcuccuAuuccAccAcGdTdT | 967 |
| as | A-32298 | 443 | CGUGGUGGAAuAGGAGuAGdTdT | 968 |
| s | A-32299 | 426 | uAcuccuAuuccAccAcGGdTdT | 969 |
| as | A-32300 | 444 | CCGUGGUGGAAuAGGAGuAdTdT | 970 |
| s | A-32301 | 427 | AcuccuAuuccAccAcGGcdTdT | 971 |
| as | A-32302 | 445 | GCCGUGGUGGAAuAGGAGdTdT | 972 |
| s | A-32303 | 429 | uccuAuuccAccAcGGcuGdTdT | 973 |
| as | A-32304 | 447 | cAGCCGUGGUGGAAuAGGAdTdT | 974 |
| s | A-32307 | 432 | uAuuccAccAcGGcuGucGdTdT | 975 |
| as | A-32308 | 450 | CGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT | 976 |
| s | A-32309 | 433 | AuuccAccAcGGcuGucGudTdT | 977 |
| as | A-32310 | 451 | ACGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT | 978 |
| s | A-32311 | 437 | cAccAcGGcuGucGucAccAdTdT | 979 |
| as | A-32312 | 455 | GGUGACGAcAGCCGUGGUGdTdT | 980 |
| s | A-32313 | 438 | AccAcGGcuGucGucAccAdTdT | 981 |
| as | A-32314 | 456 | UGGUGACGAcAGCCGUGGUDTdT | 982 |
| s | A-32315 | 439 | ccAcGGcuGucGucAccAAdTdT | 983 |
| as | A-32316 | 457 | UUGGUGACGAcAGCCGUGGdTdT | 984 |
| s | A-32319 | 441 | AcGGcuGucGucAccAAucdTdT | 985 |
| as | A-32320 | 459 | GAUUGGUGACGAcAGCCGUDTdT | 986 |
| s | A-32321 | 442 | cGGcuGucGucAccAAuccdTdT | 987 |
| as | A-32322 | 460 | GGAUUGGUGACGAcAGCCGdTdT | 988 |
| s | A-32323 | 449 | cGucAccAAuuccAAGGAAdTdT | 989 |
| as | A-32324 | 467 | UUCCUUGGGAUUGGUGACGdTdT | 990 |
| s | A-32325 | 455 | CAAucccAAGGAAuGAGGGdTdT | 991 |
| as | A-32326 | 473 | CCCUcAUUCCUUGGGAUUGdTdT | 992 |

10

20

30

40

【表4-4】

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|---------------------------|------|
| s | A-32327 | 491 | ccUGAAGGAcGAGGGAuGGdTdT | 993 |
| as | A-32328 | 509 | CcAUCCCUCGUCCUuAGGdTdT | 994 |
| s | A-32331 | 497 | GGAcGAGGGAuGGAuucdTdT | 995 |
| as | A-32332 | 515 | GAAUCCcAUCCCUCGUCCdTdT | 996 |
| s | A-32333 | 5 | AAGUccAcucAuucuuGGcdTdT | 997 |
| as | A-32334 | 23 | GCcAAGAAUGAGUGGACUdTdT | 998 |
| s | A-32335 | 508 | GGGAAuucAuGuAAAccAAAGdTdT | 999 |
| as | A-32336 | 526 | CUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT | 1000 |
| s | A-32337 | 509 | GGAAuucAuGuAAAccAAGAdTdT | 1001 |
| as | A-32338 | 527 | UCUUGGUuAcAUGAAAUCdTdT | 1002 |
| s | A-32339 | 514 | uCAuGuAAAccAAGAGuAuudTdT | 1003 |
| as | A-32340 | 532 | AAuACUCUUGGUuAcAUGAdTdT | 1004 |
| s | A-32341 | 516 | AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT | 1005 |
| as | A-32342 | 534 | CGAAuACUCUUGGUuAcAUdTdT | 1006 |
| s | A-32343 | 517 | uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT | 1007 |
| as | A-32344 | 535 | UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT | 1008 |
| s | A-32345 | 518 | GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT | 1009 |
| as | A-32346 | 536 | AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT | 1010 |
| s | A-32347 | 54 | uGccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT | 1011 |
| as | A-32348 | 72 | AuACcAGUCCAGcAAGGcAdTdT | 1012 |
| s | A-32349 | 543 | uAAAGcAGuGuuuucAccudTdT | 1013 |
| as | A-32350 | 561 | AGGUGAAAACACUGCUUuAdTdT | 1014 |
| s | A-32351 | 55 | GccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT | 1015 |
| as | A-32352 | 73 | AAuACcAGUCCAGcAAGGcdTdT | 1016 |
| s | A-32353 | 551 | uGuuuucAccucAuAuGcudTdT | 1017 |
| as | A-32354 | 569 | AGcAuAUGAGGUGAAAAcAdTdT | 1018 |
| s | A-32355 | 552 | GuuuucAccucAuAuGcudTdT | 1019 |
| as | A-32356 | 570 | uAGcAuAUGAGGUGAAAAcTdT | 1020 |
| s | A-32357 | 553 | uGuuuucAccucAuAuGcudTdT | 1021 |
| as | A-32358 | 571 | AuAGcAuAUGAGGUGAAAAAdTdT | 1022 |
| s | A-32359 | 555 | uucAccucAuAuGcudTdT | 1023 |
| as | A-32360 | 573 | AcAuAGcAuAUGAGGUGAAdTdT | 1024 |
| s | A-32363 | 557 | cAccucAuAuGcudTdT | 1025 |
| as | A-32364 | 575 | uAACAuAGcAuAUGAGGUGdTdT | 1026 |
| s | A-32367 | 56 | ccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT | 1027 |
| as | A-32368 | 74 | AAauACcAGUCCAGcAAGGdTdT | 1028 |
| s | A-32369 | 563 | AuAuGcudTdT | 1029 |
| as | A-32370 | 581 | GACUUuCuAAcAuAGcAuAUdTdT | 1030 |
| s | A-32371 | 564 | uAuGcudTdT | 1031 |
| as | A-32372 | 582 | GGACUUuCuAAcAuAGcAuAdTdT | 1032 |
| s | A-32373 | 566 | uGcudTdT | 1033 |
| as | A-32374 | 584 | CUGGACUUuCuAAcAuAGcAdTdT | 1034 |
| s | A-32375 | 57 | cuuGcudTdT | 1035 |
| as | A-32376 | 75 | cAAuACcAGUCCAGcAAAGdTdT | 1036 |
| s | A-32379 | 578 | AGuccAGGcAGAGAcAAuAdTdT | 1037 |
| as | A-32380 | 596 | uAUUGUCUCUGGCCUGGACUdTdT | 1038 |
| s | A-32381 | 580 | uccAGGcAGAGAcAAuAAAdTdT | 1039 |
| as | A-32382 | 598 | UUuAUUGUCUCUGGCCUGGAdTdT | 1040 |
| s | A-32383 | 607 | GuGAAAGGcAcuuuuuGuuudTdT | 1041 |
| as | A-32384 | 625 | AAUGAAAAGUGCCUUuAcCdTdT | 1042 |
| s | A-32385 | 62 | uGGAcuGGuAuuuGuGcudTdT | 1043 |
| as | A-32386 | 80 | AGAcAcAAuACcAGUCCAdTdT | 1044 |
| s | A-32387 | 77 | GucuGAGGcucGGccuAcGdTdT | 1045 |
| as | A-32388 | 95 | CGuAGGGCcAGCCUcAGACdTdT | 1046 |
| s | A-32391 | 79 | cuGAGGcucGGccuAcGGdTdT | 1047 |
| as | A-32392 | 97 | CCCGuAGGGCcAGCCUcAGdTdT | 1048 |
| s | A-32393 | 81 | GAGGcucGGccuAcGGGcAdTdT | 1049 |
| as | A-32394 | 99 | UGCCCGuAGGGCcAGCCUcdTdT | 1050 |

10

20

30

40

【表4-5】

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|---------------------------|------|
| s | A-32395 | 82 | AGGCUGGccuAcGGGcAcdTdT | 1051 |
| as | A-32396 | 100 | GUGCCCGuAGGGCcAGCCUdTdT | 1052 |
| s | A-32397 | 84 | CcuGGccuAcGGGcAccGdTdT | 1053 |
| as | A-32398 | 102 | CGGUUGCCCGuAGGGCcAGCdTdT | 1054 |
| s | A-32399 | 85 | cuGGccuAcGGGcAccGGdTdT | 1055 |
| as | A-32400 | 103 | CCGGUGCCCCGuAGGGCcAGdTdT | 1056 |
| s | A-32401 | 87 | GGccuAcGGGcAccGGuGdTdT | 1057 |
| as | A-32402 | 105 | CACCGGUGCCCCGuAGGGCcTdT | 1058 |
| s | A-32403 | 9 | ccAcuAuuuuGGcAGGAdTdT | 1059 |
| as | A-32404 | 27 | UCCUGCcAAGAAUGAGUGGdTdT | 1060 |
| s | A-32405 | 90 | ccuAcGGGcAccGGuGAudTdT | 1061 |
| as | A-32406 | 108 | AUucACC GGUGCCCCGuAGGdTdT | 1062 |
| s | A-32407 | 91 | cuAcGGGcAccGGuGAucdTdT | 1063 |
| as | A-32408 | 109 | GAUuAcCCGGUGCCCCGuAGdTdT | 1064 |
| s | A-32409 | 92 | uACGGGcAccGGuGAuuccdTdT | 1065 |
| as | A-32410 | 110 | GGAUUcACCGGUGGCCGuAdTdT | 1066 |
| s | A-32411 | 93 | AcGGGcAccGGuGAuuccdTdT | 1067 |
| as | A-32412 | 111 | UGGAUUcACCGGUGGCCGudTdT | 1068 |
| s | A-32415 | 97 | GcAccGGuGAuuccAAGuGdTdT | 1069 |
| as | A-32416 | 115 | cACUUGGAAUuAccGGGUGCdTdT | 1070 |
| s | A-32417 | 98 | CAccGGuGAuuccAAGuGudTdT | 1071 |
| as | A-32418 | 116 | AcACUUGGAAUuAccGGGUGdTdT | 1072 |
| s | A-32419 | 167 | uGuGGccAuGcAuGuGuuCdTdT | 1073 |
| as | A-32420 | 185 | GAACAcAUGCACGGCcAcAdTdT | 1074 |
| s | A-32421 | 168 | GuGGccAuGcAuGuGuuCdTdT | 1075 |
| as | A-32422 | 186 | UGAACAcAUGCACGGCcACdTdT | 1076 |
| s | A-32423 | 171 | GccAuGcAuGuGuuAcGAAdTdT | 1077 |
| as | A-32424 | 189 | UUUCUGAACAcAUGCACGGCdTdT | 1078 |
| s | A-32427 | 432 | uAuuccAccAccGGcuGucAdTdT | 1079 |
| as | A-32428 | 449 | UGAcAGCCGUGCUGGAAuAdTdT | 1080 |
| s | A-32429 | 447 | GucAucAccAAuuccAAGGdTdT | 1081 |
| as | A-32430 | 465 | CCUUGGGAUUUGGUGAUGACdTdT | 1082 |
| s | A-32159 | 115 | GuccucuGAuGGGucAAAGudTdT | 1083 |
| as | A-32160 | 133 | ACUUUGACCAuCAGAGGACdTdT | 1084 |
| s | A-32161 | 122 | GAuGGGucAAAGuucuAGAudTdT | 1085 |
| as | A-32162 | 140 | AUCuAGAACUUUGACCAuCdTdT | 1086 |
| s | A-32173 | 139 | AuGcuGuccGAGGcAGuccdTdT | 1087 |
| as | A-32174 | 157 | GGACUGCCUCGGAcAGcAUdTdT | 1088 |
| s | A-32185 | 172 | ccGuGcAuGuGuuAGAAAdTdT | 1089 |
| as | A-32186 | 190 | UUUCUGAACAcAUGCACGGdTdT | 1090 |
| s | A-32197 | 238 | AGucuGGAGAGGcuGcAuGGdTdT | 1091 |
| as | A-32198 | 256 | CcAUGcAGCUCUCcAGACUdTdT | 1092 |
| s | A-32209 | 252 | cAuGGGcucAcAAcuGAGGdTdT | 1093 |
| as | A-32210 | 270 | CCUcAGUUGUGAGCCcAUGdTdT | 1094 |
| s | A-32245 | 33 | ucucAucGucuGuccuccdTdT | 1095 |
| as | A-32246 | 51 | GGAGGAGcAGACGAUGAGAdTdT | 1096 |
| s | A-32257 | 340 | ccccAuuccAuGAGcAuGcdTdT | 1097 |
| as | A-32258 | 358 | GcAUGCUCuAUGGAAUUGGGdTdT | 1098 |
| s | A-32293 | 421 | GcccuAcuccuAuuccAcdTdT | 1099 |
| as | A-32294 | 439 | GUGGAAuAGGAQuAGGGGcdTdT | 1100 |
| s | A-32305 | 431 | cuAuuccAccAccGGcuGucdTdT | 1101 |
| as | A-32306 | 449 | GACAGCCGUGGUGGAAuAGdTdT | 1102 |
| s | A-32317 | 440 | cAccGGcuGucGucAccAAudTdT | 1103 |
| as | A-32318 | 458 | AUUGGUGACGAcAGCCGUGdTdT | 1104 |
| s | A-32329 | 496 | ACGAcGAGGGAuGGGAuudTdT | 1105 |
| as | A-32330 | 514 | AAAUCCcAUCCCUCGUCCUdTdT | 1106 |
| s | A-32361 | 556 | ucAccucAuAuGcuAuGuudTdT | 1107 |
| as | A-32362 | 574 | AAcAuAGcAuAUGAGGUGAdTdT | 1108 |

10

20

30

40

【表4-6】

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|--------------------------|------|
| s | A-32365 | 559 | ccucAuAuGcuAuGuuAGAdTdT | 1109 |
| as | A-32366 | 577 | UCuAAcAuAGcAuAUGAGGdTdT | 1110 |
| s | A-32377 | 570 | AuGuuAGAACGuccAGGcAGdTdT | 1111 |
| as | A-32378 | 588 | CUGCUCGGACUUcUAACAUdTdT | 1112 |
| s | A-32389 | 78 | ucuGAGGcGGccccuAcGGdTdT | 1113 |
| as | A-32390 | 96 | CCGuAGGGCcAGCCUcAGAdTdT | 1114 |
| s | A-32401 | 87 | GGccccuAcGGGcAccGGuGdTdT | 1115 |
| as | A-32402 | 105 | cACCGGUGGCCGuAGGGCCdTdT | 1116 |
| s | A-32413 | 95 | GGGcAccGGuGAAuccAAGdTdT | 1117 |
| as | A-32414 | 113 | CUUGGAUUcACCGGUGGCCdTdT | 1118 |
| s | A-32425 | 167 | ccAuGcAuGuGuucAGAAAAdTdT | 1119 |
| as | A-32426 | 185 | UUUCUGAACAcAUGcAUGGdTdT | 1120 |

【0225】

【表5-1】

表5：ラットTTRのd s RNAの認識番号

配列については、表7を参照されたい。

| 二本鎖# | センスオリゴ# | アンチセンスオリゴ# |
|----------|---------|------------|
| AD-18529 | A-32745 | A-32746 |
| AD-18530 | A-32747 | A-32748 |
| AD-18531 | A-32749 | A-32750 |
| AD-18532 | A-32751 | A-32752 |
| AD-18533 | A-32753 | A-32754 |
| AD-18534 | A-32755 | A-32756 |
| AD-18535 | A-32757 | A-32758 |
| AD-18536 | A-32759 | A-32760 |
| AD-18537 | A-32761 | A-32762 |
| AD-18538 | A-32763 | A-32764 |
| AD-18539 | A-32159 | A-32160 |
| AD-18540 | A-32765 | A-32766 |
| AD-18541 | A-32767 | A-32768 |
| AD-18542 | A-32769 | A-32770 |
| AD-18543 | A-32771 | A-32772 |
| AD-18544 | A-32773 | A-32774 |
| AD-18545 | A-32775 | A-32776 |
| AD-18546 | A-32777 | A-32778 |
| AD-18547 | A-32779 | A-32780 |
| AD-18548 | A-32781 | A-32782 |
| AD-18549 | A-32783 | A-32784 |
| AD-18550 | A-32785 | A-32786 |
| AD-18551 | A-32787 | A-32788 |
| AD-18552 | A-32791 | A-32792 |
| AD-18553 | A-32793 | A-32794 |
| AD-18554 | A-32795 | A-32796 |

10

20

30

【0226】

40

【表 6 A - 1】

表 6 A. ラット TTR の d s RNA のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖: s = センス, a s = アンチセンス

位置: 転写物 (NM_012681.1、配列番号 1330) における 5' 位の塩基

| 鎖 | 位置 | 配列 (5' から 3' の方向) | 配列番号 | 3' のシヌクレオチドハイ-ランク ^a を有する配列 (5' から 3' の方向) | 配列番号 |
|----|-----|----------------------|------|--|------|
| s | 115 | GUCCUCUGAUGGUCAAAGU | 1121 | GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN | 1173 |
| as | 133 | ACUUUGACCAUCAGAGGAC | 1122 | ACUUUGACCAUCAGAGGACNN | 1174 |
| s | 537 | UUCUDGCUUAUAAAACCGU | 1123 | UUCUUGCUCUUAUAAAACCGUNN | 1175 |
| as | 555 | ACGGUUUAUAGAGCAAGAA | 1124 | ACGGUUUAUAGAGCAAGAANN | 1176 |
| s | 543 | CUCUAAAACCUGUGUUAGC | 1125 | CUCUAAAACCUGUGUUAGCUNN | 1177 |
| as | 561 | GCUAACACGGUUUAUAGAG | 1126 | GCUAACACGGUUUAUAGAGNN | 1178 |
| s | 392 | UCGCCACUACACCAUCGCA | 1127 | UCGCCACUACACCAUCGCANN | 1179 |
| as | 410 | UGCAGUGGUGUAGUGGCGA | 1128 | UGCAGUGGUGUAGUGGCGANN | 1180 |
| s | 538 | UCUUGCUCUAAAACCGUG | 1129 | UCUUGCUCUAAAACCGUGNN | 1181 |
| as | 556 | CACGGUUUAUAGAGCAAGA | 1130 | CACGGUUUAUAGAGCAAGAANN | 1182 |
| s | 541 | UGCUCUAAAACCGUGUUA | 1131 | UGCUCUAAAACCGUGUUAANN | 1183 |
| as | 559 | UAAACACGGUUUAUAGAGCA | 1132 | UAAACACGGUUUAUAGAGCANN | 1184 |
| s | 532 | CAGUGUUCUUGCUCUUA | 1133 | CAGUGUUCUUGCUCUUAANN | 1185 |
| as | 550 | UUAUAGAGCAAGAACACUG | 1134 | UUAUAGAGCAAGAACACUGNN | 1186 |
| s | 542 | GCUCUAAAACCGUGUUA | 1135 | GCUCUAAAACCGUGUUAUGNN | 1187 |
| as | 560 | CUAACACGGUUUAUAGAGC | 1136 | CUAACACGGUUUAUAGAGCNN | 1188 |
| s | 134 | CCUGGAUGCUGGUCCGAGGC | 1137 | CCUGGAUGCUGGUCCGAGGCNN | 1189 |
| as | 152 | GCCUCGGACAGCAUCCAGG | 1138 | GCCUCGGACAGCAUCCAGGNN | 1190 |
| s | 119 | UCUGAUGGUCAAAGUCCUG | 1139 | UCUGAUGGUCAAAGUCCUGNN | 1191 |
| as | 137 | CAGGACUUUGACCAUCAGA | 1140 | CAGGACUUUGACCAUCAGAANN | 1192 |
| s | 241 | CUGGAGAGCUGCACGGGCU | 1141 | CUGGAGAGCUGCACGGGCUUNN | 1193 |
| as | 259 | AGCCCGUGCAGCUCUCCAG | 1142 | AGCCCGUGCAGCUCUCCAGNN | 1194 |
| s | 544 | UCUAAAACCGUGUUAAGCA | 1143 | UCUAAAACCGUGUUAAGCANN | 1195 |
| as | 562 | UGCACACCGGUUUUAUAGA | 1144 | UGCACACCGGUUUUAUAGANN | 1196 |
| s | 530 | AACAGUGUUCUUGCUCUAU | 1145 | AACAGUGUUCUUGCUCUAUUNN | 1197 |
| as | 548 | AUAGAGCAAGAACACUGUU | 1146 | AUAGAGCAAGAACACUGUUNN | 1198 |
| s | 118 | CUCUGAUGGUCAAAGUCCU | 1147 | CUCUGAUGGUCAAAGUCCUNN | 1199 |
| as | 136 | AGGACUUUGACCAUCAGAG | 1148 | AGGACUUUGACCAUCAGAGNN | 1200 |
| s | 140 | UGCUGUCCGAGGCAGCCC | 1149 | UGCUGUCCGAGGCAGCCUNN | 1201 |
| as | 158 | AGGGCUGCCUOOGCACAGCA | 1150 | AGGGCUGCCUOOGCACAGCANN | 1202 |
| s | 239 | GUCUGGAGAGCUCCACGGG | 1151 | GUCUGGAGAGCUCCACGGGN | 1203 |
| as | 257 | CCCGUGCAGCUCUCCAGAC | 1152 | CCCGUGCAGCUCUCCAGACNN | 1204 |
| s | 531 | ACAGUGUUCUUGCUCUUA | 1153 | ACAGUGUUCUUGCUCUUAANN | 1205 |
| as | 549 | UUUAGAGCAAGAACACUGU | 1154 | UUUAGAGCAAGAACACUGUNN | 1206 |
| s | 117 | CCUCUGAUGGUCAAAGUCC | 1155 | CCUCUGAUGGUCAAAGUCCNN | 1207 |
| as | 135 | GGACUUUGACCAUCAGAGG | 1156 | GGACUUUGACCAUCAGAGGNN | 1208 |
| s | 131 | AGUCCUGGAUGGUUCGGCA | 1157 | AGUCCUGGAUGGUUCGGCA | 1209 |
| as | 149 | UCGGACAGCAUCCAGGACU | 1158 | UCGGACAGCAUCCAGGACUNN | 1210 |
| s | 217 | UUGCCUCUGGGAAAGACCG | 1159 | UUGCCUCUGGGAAAGACCGNN | 1211 |
| as | 235 | GCGGUCUUCGCCAGAGGCAA | 1160 | GCGGUCUUCGCCAGAGGCAANN | 1212 |
| s | 242 | UGGAGAGCUGCACGGGCU | 1161 | UGGAGAGCUGCACGGGCUUNN | 1213 |
| as | 260 | GAGCCCCUGCAGCUCUCA | 1162 | GAGCCCCUGCAGCUCUCCANN | 1214 |
| s | 244 | GAGAGCUGCACGGGCUAC | 1163 | GAGAGCUGCACGGGCUACNN | 1215 |
| as | 262 | GUGAGCCCUGCGAGCUCUC | 1164 | GUGAGCCCUGCGAGCUCUCHN | 1216 |
| s | 246 | GAGCUGCACGGGCUACCA | 1165 | GAGCUGCACGGGCUACCCANN | 1217 |
| as | 264 | UGGUGAGCCCGUGCAGCUC | 1166 | UGGUGAGCCCGUGCAGCUCNN | 1218 |
| s | 399 | UACACCAUCGCAAGCCCUG | 1167 | UACACCAUCGCAAGCCCUGNN | 1219 |
| as | 417 | GCAGGGCUGCGAUGGUGUA | 1168 | GCAGGGCUGCGAUGGUGUANN | 1220 |
| s | 132 | GUCCUGGAUGCUGGUCCGAG | 1169 | GUCCUGGAUGCUGGUCCGAGNN | 1221 |
| as | 150 | CUCGGACAGCAUCCAGGAC | 1170 | CUCGGACAGCAUCCAGGACNN | 1222 |

10

20

30

40

【表 6 A - 2】

| 鎖 | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 | 3'のジヌクレオチドオーバーランクを有する配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|-----|---------------------|------|------------------------------------|------|
| s | 245 | AGAGCUGCACGGGCUCACC | 1171 | AGAGCUGCACGGGCUCACCNN | 1223 |
| as | 263 | GGUGAGCCCGUGCAGCUCU | 1172 | GGUGAGCCCGUGCAGCUCUNN | 1224 |

【0227】

【表 6 B - 1】

表 6 B. ラット TTR の d s RNA のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖: s = センス、as = アンチセンス

位置: 転写物(NM_012681.1, 配列番号1330)における 5' 位の塩基

| 鎖 | 位置 | 3' のデオキシミシンオーハーバンクを有する配列 (5' から 3' の方向) | 配列番号 |
|----|-----|--|------|
| s | 115 | GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT | 1225 |
| as | 133 | ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT | 1226 |
| s | 537 | UUCUUGCUCUAUAAAACCUGdTdT | 1227 |
| as | 555 | ACGGUUUAUAGAGCAAGAACdTdT | 1228 |
| s | 543 | CUCUAAAACCGUGUUUAGAGdTdT | 1229 |
| as | 561 | GCUAACACGGUUUAUAGAGdTdT | 1230 |
| s | 392 | UCGCCACUACACCAUOGCAdTdT | 1231 |
| as | 410 | UGCAGUGGUAGUGGGCGAdTdT | 1232 |
| s | 538 | UCUUGCUCUAUAAAACCUGdTdT | 1233 |
| as | 556 | CACGGUUUAUAGAGCAAGAdTdT | 1234 |
| s | 541 | UGCUCUAUAAAACCGUGUUAdTdT | 1235 |
| as | 559 | UAACACGGUUUAUAGAGCAdTdT | 1236 |
| s | 532 | CAGUGUUCUUGCUCUAUAdTdT | 1237 |
| as | 550 | UUUAUAGAGCAAGAACACUGdTdT | 1238 |
| s | 542 | GCUCUADAAAACCGUGUUAGdTdT | 1239 |
| as | 560 | CUAACACGGUUUAUAGAGCdTdT | 1240 |
| s | 134 | CCUGGAUGCUGGUCCGAGGdTdT | 1241 |
| as | 152 | GCCUCGGACAGCAUCCAGGdTdT | 1242 |
| s | 119 | UCUGAUGGUCAAAGUCCUGdTdT | 1243 |
| as | 137 | CAGGACUUUQACCAUCAGAdTdT | 1244 |
| s | 241 | CUGGAGAGCUGCACGGGCUdTdT | 1245 |
| as | 259 | AGCCCGUGCAGCUCUCCAGdTdT | 1246 |
| s | 544 | UCUAAAACCGUGUUAGCAdTdT | 1247 |
| as | 562 | UGCUAACACGGUUUAUAGAdTdT | 1248 |
| s | 530 | AACAGUGUUCUUGCUCUAUdTdT | 1249 |
| as | 548 | AUAGAGCAAGAACACUGUdTdT | 1250 |
| s | 118 | CUCUGAUGGUCAAAGUCCUdTdT | 1251 |
| as | 136 | AGGACUUUUGACCAUCAGAGdTdT | 1252 |
| s | 140 | UGCUGUCCGAGGCAGGCCUdTdT | 1253 |
| as | 158 | AGGGCUGCCUCGGACAGCAdTdT | 1254 |
| s | 239 | GUCUGGAGAGCUGCACGGGdTdT | 1255 |
| as | 257 | CCCGUGCAGCUCUCCAGACdTdT | 1256 |
| s | 531 | ACAGUGUUCUUGCUCUAUAdTdT | 1257 |
| as | 549 | UAUAGAGCAAGAACACUGUdTdT | 1258 |
| s | 117 | CCUCUGAUGGUCAAAGUCCdTdT | 1259 |
| as | 135 | GGACUUUUGACCAUCAGAGdTdT | 1260 |
| s | 131 | AGUCCUGGAUGCUGGUCCAdTdT | 1261 |
| as | 149 | UCGGACAGCAUCCAGGACUdTdT | 1262 |
| s | 217 | UUGCCUCUGGGAAGACCGGdTdT | 1263 |
| as | 235 | GCGGUCUUCCCAGAGGCCAdTdT | 1264 |
| s | 242 | UGGAGAGCUGCACGGGCUCdTdT | 1265 |
| as | 260 | GAGCCCUGCAGCUCUCCAdTdT | 1266 |
| s | 244 | GAGAGCUGCACGGGCUCACdTdT | 1267 |
| as | 262 | GUGAGCCCGUGCAGCUCUAdTdT | 1268 |
| s | 246 | GAGCUGCACGGGCUCACCAAdTdT | 1269 |

10

20

30

40

【表 6 B - 2】

| 鎖 | 位置 | 3'のテ'オキシチミシンオーハ'ールク'を有する配列 (5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|-----|---|------|
| as | 264 | UGGUGAGCCCGUGCAGCUCdTdT | 1270 |
| s | 399 | UACACCAUCGCAGCCCCUGCdTdT | 1271 |
| as | 417 | GCAGGGCUGCAGCGAUGGUAdTdT | 1272 |
| s | 132 | GUCCUGGAUGCUGGUCCGAGdTdT | 1273 |
| as | 150 | CUCGGACAGCAUCCAGGACdTdT | 1274 |
| s | 245 | AGAGCUQCACGGGCUCACCdTdT | 1275 |
| as | 263 | GGUGAGCCCUGCAGCUCUDdTdT | 1276 |

【0228】

【表7-1】

表7. ラットTTRのdsRNAの化学修飾したセンスおよびアンチセンス鎖配列
 二本鎖# (dsRNA名)については、表5を参照されたい。

鎖: s=センス、as=アンチセンス

位置: 転写物(NM_012681.1、配列番号1330)における5'位の塩基

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|--------------------------|------|
| s | A-32159 | 115 | GuccucuGAuGGGucAAAGudTdT | 1277 |
| as | A-32160 | 133 | ACUUUGACcAUcAGAGGACdTdT | 1278 |
| s | A-32745 | 537 | uucuuGcucuAuAAAaccGudTdT | 1279 |
| as | A-32746 | 555 | ACGGUuAuAGAGcAAGAdTdT | 1280 |
| s | A-32747 | 543 | cucuAuAAAaccGuGuuAGcdTdT | 1281 |
| as | A-32748 | 561 | GCuAACACGGUUuAuAGAGdTdT | 1282 |
| s | A-32749 | 392 | ucGccAcuAcAccAucGcAdTdT | 1283 |
| as | A-32750 | 410 | UGCGAUUGUGuAGUGGCGAdTdT | 1284 |
| s | A-32751 | 538 | ucuuGcucuAuAAAaccGuGdTdT | 1285 |
| as | A-32752 | 556 | cACGGUuAuAGAGcAAGAdTdT | 1286 |
| s | A-32753 | 541 | uGcucuAuAAAaccGuGuuAdTdT | 1287 |
| as | A-32754 | 559 | uAAcACGGUUuAuAGAGcAdTdT | 1288 |
| s | A-32755 | 532 | cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT | 1289 |
| as | A-32756 | 550 | UuAuAGAGcAAGAACACUGdTdT | 1290 |
| s | A-32757 | 542 | GcucuAuAAAaccGuGuuAGdTdT | 1291 |
| as | A-32758 | 560 | CuAAcACGGUUuAuAGAGCdTdT | 1292 |
| s | A-32759 | 134 | ccuGGAuGcuGuccGAGGcdTdT | 1293 |
| as | A-32760 | 152 | GCCUCGGAcAGcAUCCcAGGdTdT | 1294 |
| s | A-32761 | 119 | ucuGAuGGucAAAGuccuGdTdT | 1295 |
| as | A-32762 | 137 | cAGGACUUUGACcAUcAGAdTdT | 1296 |
| s | A-32763 | 241 | cuGGAGAGcGcAcGGGcudTdT | 1297 |
| as | A-32764 | 259 | AGCCCGUGcAGCUCUCcAGdTdT | 1298 |
| s | A-32765 | 544 | ucuAuAAAaccGuGuuAGcAdTdT | 1299 |
| as | A-32766 | 562 | UGCuAAcACGGUUuAuAGAdTdT | 1300 |
| s | A-32767 | 530 | AAcAGuGuucuuGcucuAudTdT | 1301 |
| as | A-32768 | 548 | AuAGAGcAAGAACACUGUdTdT | 1302 |
| s | A-32769 | 118 | cucuGAuGGucAAAGuccudTdT | 1303 |
| as | A-32770 | 136 | AGGACUUUGACcAUcAGAGdTdT | 1304 |
| s | A-32771 | 140 | uGcuGuccGAGGcAGcccudTdT | 1305 |
| as | A-32772 | 158 | AGGGCUGGCCUCGGAcAGcAdTdT | 1306 |
| s | A-32773 | 239 | GucuGGAGAGcGcAcGGGdTdT | 1307 |
| as | A-32774 | 257 | CCCGUGcAGCUCUCcAGACdTdT | 1308 |
| s | A-32775 | 531 | AcAGuGuucuuGcucuAuAdTdT | 1309 |
| as | A-32776 | 549 | uAuAGAGcAAGAACACUGUDdT | 1310 |
| s | A-32777 | 117 | ccucuGAuGGucAAAGuccdTdT | 1311 |
| as | A-32778 | 135 | GGACUUUGACcAUcAGAGGdTdT | 1312 |
| s | A-32779 | 131 | AGGuccuGGAuGcuGuccGAdTdT | 1313 |
| as | A-32780 | 149 | UCGGAcAGcAUCCcAGGACUdTdT | 1314 |
| s | A-32781 | 217 | uuGccucuGGGAAGAccGcdTdT | 1315 |
| as | A-32782 | 235 | GCGGUCUUCCcAGAGGcAAdTdT | 1316 |
| s | A-32783 | 242 | uGGAGAGcGcAcGGGcudTdT | 1317 |
| as | A-32784 | 260 | GAGCCCGUGcAGCUCUCcAdTdT | 1318 |

【表 7 - 2】

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 配列(5'から3'の方向) | 配列番号 |
|----|---------|-----|--------------------------|------|
| s | A-32785 | 244 | GAGAGcuGcAcGGGcucAcdTdT | 1319 |
| as | A-32786 | 262 | GUGAGCCCGUGcAGCUCUCdTdT | 1320 |
| s | A-32787 | 245 | GAGcuGcAcGGGcucAccAdTdT | 1321 |
| as | A-32788 | 264 | UGGUGAGCCCGUGcAGCUCdTdT | 1322 |
| s | A-32791 | 399 | uAcAccAucGcAGccuGcdTdT | 1323 |
| as | A-32792 | 417 | GcAGGGCUGCAGUGGUuAdTdT | 1324 |
| s | A-32793 | 132 | GuccuGGGAuGcuGuccGAGdTdT | 1325 |
| as | A-32794 | 150 | CUCGGAcAGcAUCCAGGACdTdT | 1326 |
| s | A-32795 | 245 | AGAGcuGcAcGGGcucAccdTdT | 1327 |
| as | A-32796 | 263 | GGUGAGCCCGUGcAGCUCUdTdT | 1328 |

【0229】

T T R 配列の合成

1 μモルの規模で、M e r M a d e 1 9 2 合成機において、T T R 配列を合成した。配列表の全ての配列については、「エンドライト」化学反応を以下の詳細のように適用した。

- ・センス鎖内の全てのピリミジン（シトシンおよびウリジン）は、対応する2' - O - メチル塩基（2' - O - メチルCおよび2' - O - メチルU）と置換された。
- ・アンチセンス鎖では、リボAスクレオシドに隣接する（5'位に向かって）ピリミジンは、それらの対応する2 - O - メチルスクレオシドと置換された。
- ・センスおよびアンチセンス配列の両方の3'末端で、2つの塩基d T d T の拡張を導入した。
 - ・配列ファイルをテキストファイルに変換し、M e r M a d e 1 9 2 合成ソフトウェアにおける負荷に対して互換性を保つようにした。

【0230】

T T R 配列の合成は、ホスホラミダイト化学反応を用いて、固定支持されたオリゴスクレオチド合成を使用した。96 ウェルプレート中の1 μmの規模で、上記の配列の合成を行った。アミダイト溶液を、0 . 1 M 濃度で調製し、エチルチオテトラゾール（アセトニトリル中0 . 6 M）を活性剤として使用した。

【0231】

合成した配列を切断し、第1のステップにおいてメチルアミン、および第2のステップにおいて、トリエチルアミン3 H F を用いて、96 ウェルプレート中に脱保護した。このようにして得られた粗配列を、アセトンとエタノールの混合液を用いて、沈殿させ、ペレットを、0 . 5 M 酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁させた。それぞれの配列からのサンプルを、L C - M S によって分析し、得られる大量データにより配列の同一性を確認した。サンプルの選択されたセットはまた、I E Xクロマトグラフィーによっても分析した。

【0232】

過程における次のステップは、精製であった。全ての配列は、S o u r c e 1 5 Q カラムを用いて、A K T A e x p l o r e r 精製システムにおいて精製した。完全長配列に対応する単一ピークを、溶離液中に収集し、続いて、イオン交換クロマトグラフィーによって純度について分析した。

【0233】

A K T A 精製器を用いて、S e p h a d e x G 2 5 カラム上に精製された配列を、脱塩したT T R 配列を、濃度および純度について分析した。次いで、T T R - d s R N A を形成するために、单鎖をアニールした。

【0234】

実施例2B : m R N A 抑制に対するT T R のs i R N A のインビトロスクリーニング

10

20

30

40

50

d s R N A を標的とするヒト T T R (表 2)について、T T R の m R N A を定量化するために、q P C R (リアルタイム P C R) および b D N A (分岐D N A) アッセイを用いて、H e p G 2 および H e p 3 B 細胞内の内因性 T T R の発現の阻害のアッセイを行った。d s R N A を標的とする齧歯類 T T R (表 5)を合成し、b D N A アッセイを用いて、H . 4 . I I . E 細胞内の内因性 T T R の発現の阻害のアッセイを行った。単回用量アッセイからの結果は、I C 5 0 を計算するための用量反応実験用のT T R の d s R N A 二本鎖のサブセットを選択するために使用した。I C 5 0 の結果は、さらなる試験用のT T R の d s R N A を選択するために使用した。

【 0 2 3 5 】

細胞培養および形質移入 :

肝細胞株のH e p G 2 、H e p 3 B 、および H . 4 . I I . E 細胞 (A T C C 、M a n a s s a s , V A)を、トリプシン処理によりプレートから放出される前に、1 0 % F B S 、ストレプトマイシン、およびグルタミン (A T C C)で補完されるダルベッコ改変イーグル培地 (A T C C)中の5 % C O ₂ の雰囲気下で、3 7 でほぼコンフルエントまで増殖した。また、H . 4 . I I . E 細胞も、イーグル最小必須培地内で増殖した。逆転写は、1 0 μ L のO p t i - M E Mに加えて、ウェル当たり0 . 2 μ L のL i p o f e c t a m i n e R N A i M a x (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d C A . c a t # 1 3 7 7 8 - 1 5 0)と一緒に、9 6 ウェルプレート中に5 μ L のO p t i - M E Mをウェル当たり5 μ L のs i R N A 二本鎖に添加することによって行われ、室温で1 5 分間インキュベートした。次いで、4 × 1 0 ⁴ (H e p G 2) 、2 × 1 0 ⁴ (H e p 3 B) 、または2 × 1 0 ⁴ (H . 4 . I I . E) 細胞を含有する、抗生物質を含有しない、8 0 μ L の完全成長培地を添加した。R N A 精製前に、細胞を、2 4 時間インキュベートした。1 0 n M の最終2倍濃度で単回用量実験を行い、1 0 、1 、0 . 5 、0 . 1 、0 . 0 5 、0 . 0 1 、0 . 0 0 5 、0 . 0 0 1 、0 . 0 0 0 5 、0 . 0 0 0 1 n M で用量反応実験を行った。

【 0 2 3 6 】

M a g M A X - 9 6 総 R N A 単離キット (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y C A , 部品番号# : A M 1 8 3 0) を用いた総 R N A 単離 :

細胞は、採集され、1 4 0 μ L の溶解 / 結合溶液中で溶解され、次いで、E p p e n d o r f T h e r m o m i x e r を用いて8 5 0 r p m で1 分間混合した（混合速度は、過程を通して同一であった）。2 0 マイクロリットルの磁気ビーズを、細胞溶解物に添加し、5 分間混合した。磁気ビーズは、磁気スタンドを用いて捕捉し、ビーズを妨害することなく、浮遊物を除去した。浮遊物を除去した後、磁気ビーズを洗浄液1（イソプロパノールを添加）で洗浄し、1 分間混合した。ビーズを再度捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、ビーズを1 5 0 μ L の洗浄液2（エタノールを添加）で洗浄し、捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、5 0 μ L のD N A ターゼ混合物 (M a g M a x t u r b o D N a s e B u f f e r およびT u r b o D N a s e)をビーズに添加し、それらを1 0 ~ 1 5 分間混合した。混合後、1 0 0 μ L のR N A 再生溶液を添加し、3 分間混合した。浮遊物を除去し、磁気ビーズを1 5 0 μ L の洗浄液2で再度洗浄し、1 分間混合し、浮遊物を完全に除去した。磁気ビーズを2 分間混合し、R N A を5 0 μ L の水で溶離する前に乾燥させた。

【 0 2 3 7 】

A B I 高性能 c D N A 逆転写キット (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A , C a t # 4 3 6 8 8 1 3) を用いた c D N A 合成 :

2 μ L の1 0 × 緩衝液、0 . 8 μ L の2 5 × d N T P 、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R N a s e 阻害剤、および反応当たり3 . 2 μ L のH ₂ O のマスター ミックスを、1 0 μ L の総R N A に添加した。以下のステップを通して、B i o - R a d C - 1 0 0 0 またはS - 1 0 0 0 のサーマルサイクラー (H e r c u l e s , C A)を用いて、c D N A を生成した。2 5 で1 0 分間、3 7 で1 2 0 分間、8 5 で5 秒間、4 で保持。

【0238】

リアルタイムPCR:

2 μ LのcDNAを、MicroAmp Optical 96ウェルプレート(Applied Biosystems cat# 4326659)中のウェル当たり1 μ Lの18S TaqManプローブ(Applied Biosystems Cat# 4319413E)、1 μ LのTTR TaqManプローブ(Applied Biosystems cat# HS00174914 M1)、および10 μ LのTaqMan Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems Cat# 4324018)のマスターMixを添加した。Ct(RQ)アッセイを用いて、ABI 7000 PrismまたはABI 7900 HTリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)において、リアルタイムPCRを行った。全ての反応を、3重に行った。

【0239】

Ct法を用いて、リアルタイムデータを分析し、倍率変化を計算するために、10 nM Block IT 蛍光オリゴ(Invitrogen Cat# 2013)または10 nM AD-1955(非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照二本鎖)で形質移入した細胞から行われたアッセイにたいして正規化した。

【0240】

分岐DNAアッセイ - Quantigene 1.0 (Panomics, Fremont, CA. cat# : QG0004) - 齧歯類特異的な二本鎖をスクリーニングするために使用

H.4.II.E細胞(ATCC)を、10 nM siRNAで形質移入した。培地を除去した後、H.4.II.Eを、100 uLの希釈した溶解混合物(1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20 mg/mLの最終濃度に対して1mL当たり10 uLのプロテイナーゼKの混合物)で溶解し、次いで、65 \pm 35分間インキュベートした。次いで、80 μ Lの作業プローブセット(TTRまたはGAPDHプローブの混合物)および20 uLの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを、53 \pm 1で終夜(約16~20時間)インキュベートした。捕捉プレートは、1×洗浄緩衝液(ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2の混合物)で3回洗浄し、次いで、1000 rpmで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100 μ Lの増幅作業用試薬を捕捉プレートに添加し、次いで、これを密閉し、46 \pm 1で1時間インキュベートした。洗浄および乾燥ステップを、1時間インキュベートした後に繰り返し、100 μ Lの標識溶液試薬を添加した。次いで該プレートを洗浄し、乾燥させ、100 μ Lの基質(ラウリル硫酸リチウムと基質溶液の混合物)を添加した。捕捉プレートを46 \pm 1で30分間インキュベーター中に入れた。次いで、捕捉プレートをインキュベーターから取り出し、室温で30分間インキュベートした。最終的に、Victor Luminometer(Perkin Elmer, Waltham, MA)を用いて、捕捉プレートを読み取った。

【0241】

分岐DNAアッセイ - Quantigene 2.0 (Panomics cat# : QS0011) : 全ての他の二本鎖をスクリーニングするために使用

提示された用量で、24時間インキュベートした後、培地を取り出し、細胞を、100 uLの溶解混合物(1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20 mg/mLの最終濃度に対して10 uLのプロテイナーゼK / mLの混合物)中で溶解し、次いで、65 \pm 35分間インキュベートした。次いで、20 μ Lの作業プローブセット(遺伝子標的用のTTRプローブおよび内因性対照用のGAPDH)および80 μ Lの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを55 \pm 1で(約16~20時間)インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1×洗浄緩衝液(ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2)で3回洗浄し、次いで、240 gで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100 μ Lの事前増

幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、 55 ± 1 で 1 時間インキュベートした。1時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、 $100 \mu\text{L}$ の増幅作業試薬を添加した。1時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、 $100 \mu\text{L}$ の標識プローブを添加した。捕捉プレートを、 50 ± 1 で 1 時間インキュベートした。次いで、該プレートを $1 \times$ 洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、次いで、 $100 \mu\text{L}$ の基質を捕捉プレートに添加した。5~15分間インキュベートした後、SpectraMax Luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて、捕捉プレートを読み取った。

【0242】

bDNAデータ分析：

10

bDNAデータは、(i) それぞれの3重の試料から平均バックグラウンドを減算し、(ii) 得られる3重のGAPDH(対照プローブ)およびTTR(実験プローブ)値を平均し、次いで、(iii) 比：(実験プローブ - バックグラウンド) / (対照プローブ - バックグラウンド)を得ることによって分析された。

【0243】

結果

TTR-dsRNA(TTRのsiRNA)における単回用量およびIC50の結果の概要を、下表8に示す。単回用量の結果は、HepG2細胞においてアッセイした、対照に対するTTRのmRNAの割合(%)として表す。IC50は、表示されるように、HepG2および/またはHep3B細胞において決定した。

20

【0244】

【表 8 - 1】

表8. TTRのs i RNAのインピトロスクリーニングの単回用量およびIC50の結果
ND:データなし; *は、2つの実験の平均を表す結果を示す。

| 二本鎖# | 対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%) | | IC50 (nM) | | | |
|----------|------------------------------|--------|-----------|-------|-------|-------|
| | HepG2 | | HepG2 | | Hep3B | |
| | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA |
| AD-18243 | 50.35 | 141.53 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18244 | 64.26 | 158.55 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18245 | 56.89 | 107.22 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18246 | 10.53 | 32.51* | 0.265 | 0.086 | ND | ND |
| AD-18247 | 125.56 | 69.57 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18248 | 127.78 | 66.97 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18249 | 48.77 | 48.76 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18250 | 96.94 | 86.42 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18251 | 170.41 | 129.15 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18252 | 73.52 | 81.90 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18253 | 25.25 | 61.25 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18254 | 95.13 | 103.96 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18255 | 119.46 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18256 | 42.64 | 95.67 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18257 | 146.25 | 141.75 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18258 | 10.20 | 13.41* | 0.007 | 0.005 | 0.004 | 0.005 |
| AD-18259 | 9.30 | 20.91* | 0.102 | 0.005 | ND | ND |
| AD-18260 | 125.37 | 81.36 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18261 | 14.27 | 19.40* | 0.210 | ND | ND | ND |
| AD-18262 | 84.95 | 104.05 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18263 | 16.32 | 23.25* | 0.110 | ND | ND | ND |
| AD-18264 | 104.18 | 83.69 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18265 | 41.62 | 64.87 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18266 | 39.98 | 110.53 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18267 | 149.64 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18268 | 152.93 | 174.04 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18269 | 37.27 | 92.28 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18270 | 99.44 | 164.75 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18271 | 18.89 | 28.33* | 0.503 | 0.004 | ND | ND |
| AD-18272 | 128.32 | 132.58 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18273 | 115.78 | 201.95 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18274 | 8.97 | 20.04* | 0.009 | 0.176 | 0.036 | 0.012 |
| AD-18275 | 4.09 | 22.25* | 0.026 | 0.118 | ND | ND |
| AD-18276 | 19.73 | 45.22* | 0.198 | 0.677 | ND | ND |
| AD-18277 | 10.55 | 26.31* | 0.121 | 0.426 | ND | ND |
| AD-18278 | 108.86 | 116.26 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18279 | 66.59 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18280 | 103.26 | 170.52 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18281 | 87.98 | 123.88 | ND | ND | ND | ND |

10

20

30

40

【表 8 - 2】

| 二本鎖# | 対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%) | | IC50 (nM) | | | |
|----------|------------------------------|---------|-----------|-------|-------|------|
| | HepG2 | | HepG2 | | Hep3B | |
| | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA |
| AD-18282 | 82.47 | 140.32 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18283 | 106.54 | 182.78 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18284 | 106.93 | 151.78 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18285 | 26.58 | 60.05* | ND | 0.089 | ND | ND |
| AD-18286 | 109.95 | 173.66 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18287 | 54.23 | 155.45 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18288 | 73.52 | 174.09 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18289 | 103.36 | 174.76 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18290 | 17.06 | 52.04* | 1.253 | 0.181 | ND | ND |
| AD-18291 | 7.71 | 169.29* | 1.304 | 0.019 | ND | ND |
| AD-18292 | 7.51 | 210.03* | 0.604 | 0.005 | ND | ND |
| AD-18293 | 3.61 | 62.53* | 0.078 | 0.003 | ND | ND |
| AD-18294 | 111.53 | 107.56 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18295 | 115.88 | 105.37 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18296 | 57.03 | 38.03 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18297 | 87.69 | 73.87 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18298 | 10.39 | 7.25* | 0.455 | 0.008 | ND | ND |
| AD-18299 | 18.79 | 18.06* | 0.895 | 0.014 | ND | ND |
| AD-18300 | 108.70 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18301 | 114.22 | 70.50 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18302 | 116.19 | 122.40 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18303 | 124.89 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18304 | 132.99 | 89.54 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18305 | 153.10 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18306 | 159.22 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18307 | 116.83 | 84.57 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18308 | 156.72 | 87.80 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18309 | 113.22 | 101.97 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18310 | 132.33 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18311 | 161.68 | 92.92 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18312 | 103.01 | 71.17 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18313 | 120.65 | 53.26 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18314 | 116.33 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18315 | 115.13 | ND | ND | ND | ND | ND |
| AD-18316 | 118.73 | 122.34 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18317 | 114.03 | 121.10 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18318 | 80.85 | 122.57 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18319 | 119.14 | 148.87 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18320 | 22.86 | 55.43* | ND | 0.023 | 0.403 | ND |
| AD-18321 | 6.44 | 31.56* | 0.001 | 0.033 | ND | ND |
| AD-18322 | 54.21 | 100.46 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18323 | 6.37 | 28.71* | 0.005 | 0.023 | ND | ND |

10

20

30

40

【表 8 - 3】

| 二本鎖# | 対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%) | | IC50 (nM) | | | |
|----------|------------------------------|--------|-----------|-------|-------|-------|
| | HepG2 | | HepG2 | | Hep3B | |
| | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA |
| AD-18324 | 2.53 | 15.98* | 0.002 | 0.006 | 0.005 | 0.014 |
| AD-18325 | 2.52 | 11.96* | 0.001 | 0.016 | ND | ND |
| AD-18326 | 18.34 | 43.16* | 0.025 | 0.186 | ND | ND |
| AD-18327 | 18.28 | 13.90* | 0.044 | 0.215 | ND | ND |
| AD-18328 | 4.53 | 26.04* | 0.003 | 0.004 | 0.006 | 0.006 |
| AD-18329 | 96.93 | 131.54 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18330 | 11.80 | 45.18* | 0.0004 | 0.010 | 0.020 | ND |
| AD-18331 | 117.77 | 163.07 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18332 | 11.53 | 35.09* | 0.001 | 0.076 | 0.065 | ND |
| AD-18333 | 12.24 | 46.94* | 0.001 | 0.115 | 0.075 | ND |
| AD-18334 | 16.27 | 55.28* | 0.0004 | 0.181 | 1.071 | ND |
| AD-18335 | 53.52 | 112.80 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18336 | 6.39 | 33.00* | 0.001 | 0.112 | 0.081 | ND |
| AD-18337 | 51.77 | 105.33 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18338 | 48.21 | 102.86 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18339 | 6.48 | 26.56* | 0.004 | 0.002 | 0.018 | 0.029 |
| AD-18340 | 4.53 | 30.76* | 0.002 | 0.002 | ND | ND |
| AD-18341 | 31.27 | 100.41 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18342 | 7.60 | 42.89* | ND | 0.016 | 0.076 | ND |
| AD-18343 | 3.42 | 17.45* | ND | 0.001 | ND | ND |
| AD-18344 | 75.08 | 134.31 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18345 | 13.62 | 42.75* | 0.002 | 0.013 | ND | ND |
| AD-18346 | 59.25 | 121.10 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18347 | 91.23 | 139.54 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18348 | 89.95 | 159.29 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18349 | 108.01 | 144.96 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18350 | 123.65 | 125.87 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18351 | 108.36 | 104.02 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18352 | 87.82 | 128.72 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18353 | 14.40 | 65.77 | 0.012 | 0.027 | ND | ND |
| AD-18354 | 99.27 | 123.53 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18355 | 135.04 | 150.88 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18356 | 100.76 | 178.96 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18357 | 125.30 | 162.85 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18358 | 103.15 | 136.01 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18359 | 34.74 | 140.48 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18360 | 103.86 | 146.86 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18361 | 105.74 | 152.74 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18362 | 106.96 | 188.22 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18363 | 124.22 | 58.46 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18364 | 113.75 | 66.87 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18446 | 29.73 | 13.30 | ND | ND | ND | ND |

10

20

30

40

【表 8 - 4】

| 二本鎖# | 対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%) | | IC50 (nM) | | | |
|----------|------------------------------|-------|-----------|------|-------|------|
| | HepG2 | | HepG2 | | Hep3B | |
| | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA | qPCR | bDNA |
| AD-18447 | 109.74 | 53.63 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18448 | 22.96 | 8.81 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18449 | 112.59 | 50.11 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18450 | 89.41 | 34.89 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18451 | 74.35 | 23.88 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18452 | 125.25 | 54.86 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18453 | 126.98 | 56.31 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18454 | 113.88 | 52.48 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18455 | 163.00 | 48.89 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18456 | 15.70 | 10.52 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18457 | 12.86 | 8.22 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18458 | 13.00 | 7.00 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18459 | 14.41 | 10.72 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18460 | 121.16 | 74.87 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18461 | 100.53 | 71.87 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18462 | 47.75 | 29.35 | ND | ND | ND | ND |
| AD-18463 | 58.98 | 44.79 | ND | ND | ND | ND |

10

20

30

【0245】

5つのTTR-dsRNA(AD-18258、AD-18274、AD-18324、AD-18328、およびAD-18339)に対するIC50を特定するために使用された用量反応データを、下表9に詳細に示す。全て5つのsiRNAが、pM単位のIC50を有することが確認された。表8中のdsRNAに対するIC50データは、下表9に表したデータの要約である。

【0246】

【表9】

表9. 5つのTTR-のdsRNAに対する用量反応データ

| | | 対照AD-1955と比較した、阻害率(%) | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|
| | | 二本鎖の用量(nM) | | | | | | | | | | | | |
| 細胞型 | 検出方法 | 10 | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 | 0.005 | 0.001 | 0.0005 | 0.0001 | 0.00005 | 0.00001 | IC50(nM) |
| HepG2 | qPCR | 14.4 | 14.1 | 16.2 | 23.9 | 27.26 | 40.19 | 68.46 | 78.1 | 74.48 | 104.37 | 98.28 | 113.68 | 0.007 |
| HepG2 | bDNA | 14.3 | 14.5 | 11.1 | 12.8 | 18.82 | 19.77 | 51.21 | 56.03 | 63.63 | 58.35 | 43.64 | 51.05 | 0.005 |
| Hep3B | qPCR | 11.9 | 8.62 | 12.4 | 16.4 | 28.35 | 30.49 | 58.36 | 54.57 | 81.26 | 89.43 | 81.85 | 101.87 | 0.004 |
| Hep3B | bDNA | 7.65 | 7.5 | 11.3 | 12.6 | 28.85 | 27.89 | 64.57 | 73.48 | 72.03 | 91.44 | 86.71 | 89.31 | 0.005 |

| | | 対照AD-1955と比較した、阻害率(%) | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-----------------------|------|------|------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|
| | | 二本鎖の用量(nM) | | | | | | | | | | | | |
| 細胞型 | 検出方法 | 10 | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 | 0.005 | 0.001 | 0.0005 | 0.0001 | 0.00005 | 0.00001 | IC50(nM) |
| HepG2 | qPCR | 6.68 | 8.45 | 11.7 | 24.2 | 42.08 | 49.89 | 56.95 | 62.99 | 64.47 | 54.92 | 67.39 | 72.67 | 0.009 |
| HepG2 | bDNA | 27.5 | 69 | 25.2 | 34.2 | 73.03 | 103.4 | 121.57 | 97.31 | 154.93 | 156.7 | Nd | 152.25 | 0.176 |
| Hep3B | qPCR | 7.58 | 17 | 15.6 | 43.9 | 42.22 | 60.55 | 78.8 | 77.81 | 79.97 | 85.84 | 86.13 | 83.99 | 0.036 |
| Hep3B | bDNA | 3.77 | 4.92 | 7.51 | 15 | 35.21 | 51.66 | 72.45 | 70.12 | 78.31 | 77.52 | 90.72 | 83.01 | 0.012 |

| | | 対照AD-1955と比較した、阻害率(%) | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|
| | | 二本鎖の用量(nM) | | | | | | | | | | | | |
| 細胞型 | 検出方法 | 10 | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 | 0.005 | 0.001 | 0.0005 | 0.0001 | 0.00005 | 0.00001 | IC50(nM) |
| HepG2 | qPCR | 2.07 | 2.27 | 2.74 | 6.36 | 8.18 | 15.23 | 28.82 | 52.79 | 90.86 | 94.72 | 116.07 | 98.97 | 0.002 |
| HepG2 | bDNA | 14.5 | 7.88 | 11.8 | 15.9 | 17.2 | 46.44 | 40.4 | 91.86 | 0 | 95.57 | 0 | 52.15 | 0.006 |
| Hep3B | qPCR | 2.07 | 3.48 | 5.76 | 16.2 | 18.73 | 44.54 | 49.77 | 68.88 | 63.48 | 76.61 | 74.7 | 77.83 | 0.005 |
| Hep3B | bDNA | 3.48 | 3.8 | 5.15 | 15.2 | 30.84 | 55.36 | 74.75 | 99.39 | 88.89 | 110.83 | 96.55 | 110.26 | 0.014 |

| | | 対照AD-1955と比較した、阻害率(%) | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|
| | | 二本鎖の用量(nM) | | | | | | | | | | | | |
| 細胞型 | 検出方法 | 10 | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 | 0.005 | 0.001 | 0.0005 | 0.0001 | 0.00005 | 0.00001 | IC50(nM) |
| HepG2 | qPCR | 5.85 | 3.97 | 3.32 | 5.62 | 8 | 16.75 | 55.01 | 39.76 | 122.41 | 102.37 | 114.02 | 124.09 | 0.003 |
| HepG2 | bDNA | 12.3 | 10.7 | 10.7 | 11.9 | 20.06 | 25 | 69.52 | 57.29 | 112.28 | 98.14 | 142.26 | 148.92 | 0.004 |
| Hep3B | qPCR | 3.17 | 5.52 | 11.7 | 13.8 | 27.68 | 39.58 | 61.21 | 61.87 | 90.51 | 87.56 | 106.03 | 108.72 | 0.006 |
| Hep3B | bDNA | 3.08 | 3.66 | 4.19 | 7.25 | 21.05 | 22.1 | 73.74 | 63.19 | 105.55 | 96.27 | 105.97 | 96.46 | 0.006 |

| | | 対照AD-1955と比較した、阻害率(%) | | | | | | | | | | | | |
|-------|------|-----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|----------|
| | | 二本鎖の用量(nM) | | | | | | | | | | | | |
| 細胞型 | 検出方法 | 10 | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.05 | 0.01 | 0.005 | 0.001 | 0.0005 | 0.0001 | 0.00005 | 0.00001 | IC50(nM) |
| HepG2 | qPCR | 6.27 | 7.28 | Nd | 11 | 15.25 | 38.69 | 38.78 | 71.7 | 84.09 | 62.2 | 75.61 | 85.46 | 0.004 |
| HepG2 | bDNA | 15.1 | 8.14 | 5.13 | 6.89 | 12.17 | 32.14 | 42.98 | 64.01 | 60.76 | 79.95 | 81.97 | 95.43 | 0.003 |
| Hep3B | qPCR | 8.3 | 9.47 | 13.2 | 34.5 | 44.54 | 77.38 | 81.04 | 81.41 | 93.95 | 81.04 | 75.61 | 78.28 | 0.018 |
| Hep3B | bDNA | 10.5 | 9.43 | 11.7 | 27.1 | 44.88 | 72.32 | 79.88 | 79.6 | 87.46 | 96.53 | 95.13 | 89.88 | 0.029 |

齧歯類特異的なTTR-dsRNA(TTRのsiRNA)に対する単回用量の結果の概要を、下表10に表す。単回用量の結果は、対照に対するTTRのmRNAの割合(%)として表し、10nMで齧歯類特異的なTTRのsiRNAを形質移入した後、ラットH.I.I.E細胞においてアッセイした。これらの結果は、幾つかの齧歯類特異的なTTRのsiRNAが、インビトロで内因性ラットTTRのmRNAを抑制するのに効果的であることを示す。

【0247】

10

20

30

40

【表10】

表10. 齧歯類に特異的なTTR-dsRNA (TTRのsiRNA) のインピトロスクリーニングの単回用量の結果

| 二本鎖# | 10nMにおける対照に対する割合(%) | 二本鎖# | 10nMにおける対照に対する割合(%) |
|----------|---------------------|----------|---------------------|
| AD-18529 | 19.83 | AD-18542 | 6.3 |
| AD-18530 | 44.49 | AD-18543 | 16.46 |
| AD-18531 | 6.01 | AD-18544 | 17.55 |
| AD-18532 | 24.06 | AD-18545 | 3.53 |
| AD-18533 | 37.78 | AD-18546 | 2.75 |
| AD-18534 | 8.19 | AD-18547 | 7.01 |
| AD-18535 | 10.18 | AD-18548 | 5.02 |
| AD-18536 | 16.13 | AD-18549 | 1.61 |
| AD-18537 | 15.88 | AD-18550 | 9.58 |
| AD-18538 | 19.93 | AD-18551 | 7.74 |
| AD-18539 | 49.24 | AD-18552 | 3.74 |
| AD-18540 | 2.99 | AD-18553 | 50.39 |
| AD-18541 | 1.32 | AD-18554 | 111.06 |

10

20

【0248】

実施例3. TNF-αおよびIFN-βの分泌の誘発に対するTTRのsiRNAのインピトロアッセイ

免疫刺激に対する潜在性を評価するために、TNF-αおよびIFN-βの分泌の誘発に対するTTRのsiRNAを、インピトロでアッセイした。

【0249】

ヒトPBMCは、標準フィコールハイパック (Ficoll-Hyque) 密度遠心分離によって、健常なドナーから得た新たに回収したバフィーコート (Research Blood Components, Inc., Boston, MA) から単離された。新たに単離された細胞 (1×10^5 /ウェル / $100 \mu\text{L}$) を、96ウェルプレートに播種し、10% 加熱不活性化したウシ胎仔血清および1% 抗生物質 / 抗真菌 (Invitrogen) で補完される RPMI 1640 Glutamax 培地 (Invitrogen) で培養した。

30

【0250】

DOTAP形質移入試薬 (Roche Applied Science) を用いて、siRNAをPBMCに形質移入した。DOTAPは、まず、siRNAを含有する等容量のOpti-MEMと混合する前に、5分間Opti-MEM (Invitrogen) 中で希釈した。製造業者の取扱説明書によって規定されるように、siRNA / DOTAP複合体をインキュベートし、続いて、PBMC ($50 \mu\text{L}$ /ウェル) に添加し、次いで、これを24時間培養した。陽性および陰性対照 siRNAを、全てのアッセイに含んだ。AD-5048を、陽性対照 siRNAとして使用した。AD-5048は、ヒトアボリポタンパク質B (Soutschek et al., 2004) を標的とする配列に対応し、このアッセイにおいて、IFN-βおよびTNF-βの両方の分泌を引き起こす。このアッセイにおいて、IFN-βおよびTNF-βの分泌を引き起こさない、AD-1955を、陰性対照 siRNAとして使用した。全ての siRNAを、 133nM の最終濃度で使用した。RNAの形質移入試薬に対する比は、DOTAPの $1 \mu\text{g}$ 当たり 16.5pM モルであった。

40

【0251】

両方とも Bender MedSystems (Vienna, Austria) からのIFN-β (BMS216INST) およびTNF-β (BMS223INST) 用の

50

市販の E L I S A キットを用いて、培養浮遊物中のサイトカインを、検出し、定量化した。 T T R の s i R N A のサイトカイン誘発は、陽性対照 s i R N A A D - 5 0 4 8 に対する、產生した I F N - または T N F - の割合として表される。

【 0 2 5 2 】

多くの T T R の s i R N A に対する I F N - および T N F - の刺激結果を、図 1 (4重のウェル ± 標準偏差の平均) および下表 1 1 (A D - 5 0 4 8 と比較した割合) に表す。 T T R の s i R N A は、培養したヒト P B M C による誘発した有意な T N F - または I F N - の分泌は、評価されなかった。

【表 1 1】

表 1 1. T T R の s i R N A に対する I F N - α および T N F - α の刺激結果

| 二本鎖# | I FN- α (AD-5048に対する割合(%)) | T NF- α (AD-5048に対する割合 (%)) |
|----------|--------------------------------------|--|
| AD-18246 | 0 | 4 |
| AD-18258 | 0 | 0 |
| AD-18259 | 0 | 0 |
| AD-18261 | 0 | 0 |
| AD-18263 | 0 | 0 |
| AD-18271 | 0 | 0 |
| AD-18274 | 2 | 1 |
| AD-18275 | 0 | 0 |
| AD-18276 | 0 | 0 |
| AD-18277 | 0 | 0 |
| AD-18285 | 0 | 0 |
| AD-18290 | 0 | 0 |
| AD-18291 | 0 | 0 |
| AD-18292 | 0 | 0 |
| AD-18293 | 0 | 0 |
| AD-18298 | 0 | 0 |
| AD-18299 | 0 | 0 |
| AD-18320 | 0 | 0 |
| AD-18321 | 0 | 0 |
| AD-18323 | 0 | 0 |
| AD-18324 | 0 | 0 |
| AD-18325 | 0 | 0 |
| AD-18326 | 0 | 0 |
| AD-18327 | 0 | 0 |
| AD-18328 | 0 | 0 |
| AD-18330 | 0 | 0 |
| AD-18332 | 1 | 0 |
| AD-18333 | 0 | 1 |
| AD-18334 | 0 | 1 |
| AD-18336 | 1 | 0 |
| AD-18339 | 0 | 0 |
| AD-18340 | 0 | 0 |
| AD-18342 | 0 | 0 |
| AD-18343 | 0 | 0 |
| AD-18345 | 0 | 0 |
| AD-18353 | 0 | 0 |
| AD-18448 | 0 | 0 |
| AD-18456 | 0 | 0 |
| AD-18457 | 0 | 0 |
| AD-18458 | 0 | 0 |
| AD-18459 | 0 | 0 |

【 0 2 5 3】

5 つの T T R を標的とするリード d s R N A (T T R の s i R N A) を、ヒト肝細胞株 H e p G 2 および H e p 3 B において、および免疫刺激活性の不在下で、p M 範囲の I C 5 0 に基づいて選択した。いずれのミスマッチもない二本鎖は、オリゴと m R N A との間でミスマッチがある二本鎖よりも標的転写物の有意なノックダウンを達成する可能性が高い。交差種毒生物学的データのより良好な翻訳を可能にし、ヒト患者に対して広範な適用性

10

20

30

40

50

を有するために、ラット、カニクイザル、およびヒトからのオーソロガス遺伝子において 100% 同一性を有し、既知の多型を有する領域を標的としない、二本鎖が、一般に好ましい。5つのリード化合物は、pM範囲の肝細胞株における IC50 に基づいて、免疫刺激活性の不在下で、ヒト TTR 転写物への特異性、および二本鎖によって標的とされる mRNA の領域内で、既知の多型（突然変異）の不在下で選択された。TTR の場合は、ヒト、ラット、およびカニクイザルにおいて、完全な同一性がある、19 塩基オリゴは見出されなかった。これらのデータの概要を、表 12 に表し、これにはまた、二本鎖および交差種反応性によって標的とされる領域内の既知の TTR 突然変異の情報も含まれる。

【0254】

【表 12】

10

表 12. 5 つの最も有力な TTR の dsRNA に対するデータの概要

| 二本鎖# | IC50 (qPCR): nM HepG2 | IC50 (bDNA): nM HepG2 | IFNa/ TNFa | 網羅されて いない変異 | 交差種 反応性 |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|---------------|---|---|
| AD-18258 | 0.007 | 0.005 | 陰性 | なし (非コーディング領域) | サル:A~G の14位で 1 つのミスマッチ ラット:いず れの位置で も相同性な し |
| AD-18274 | 0.009 | 0.176 | 陰性 | Lys70Asn; Val71Ala; Ile73Val; Asp74His | サル:ミスマッチなし ラット:いず れの位置で も相同性な し |
| AD-18324 | 0.002 | 0.006 | 陰性 | なし (非コーディング領域) | サル:ミスマッチなし ラット:いず れの位置で も相同性な し |
| AD-18328 | 0.003 | 0.004 | 陰性 | なし (非コーディング領域) | サル:ミスマッチなし ラット:7つ のミスマッチ |
| AD-18339 | 0.004 | 0.002 | 陰性 | なし (非コーディング領域) | なし |

20

30

40

【0255】

実施例 4. 遺伝子導入マウスにおける、LNP01-18324、LNP01-18328、および LNP01-18246 による肝臓 TTR の mRNA および血漿 TTR タンパク質のインビボの低下

2 つの TTR の siRNA である AD-18324 および AD-18328 を、インビ

50

ボ評価のために選択した。これらの二本鎖は、肝細胞株（例えば、HepG2）における、インビボで有力な用量依存的な発現停止を示した。図2Aおよび図2Bは、AD-18324（図2A）またはAD-18328（図2B）で形質移入した後の、HepG2細胞内の用量反応を示し、ここで、該用量は、x軸上にnMで表し、反応は、y軸上に、対照と比較した、画分TTRのmRNAの残存として表す。HepG2細胞では、AD-18324およびAD-18328のIC50は、それぞれ、2pMおよび3pMであると確認された。両方のリードdsRNA候補に対するTTR標的部位は、TTRのmRNAの3'非翻訳領域、文献で報告された突然変異がない領域内にある。

【0256】

表からの2つのリード候補のそれぞれの鎖の配列を、以下に再現する。

10

鎖：s = センス、as = アンチセンス

位置：NM_000371.2の転写物における5'位の塩基

【表12B】

| 二本鎖# | 鎖 | オリゴ# | 位置* | 5'から3'への方向の配列 | 配列番号 |
|----------|----|---------|-----|-------------------------|------|
| AD-18324 | s | A-32337 | 509 | GGAuucAuGuAAccAAGAdTdT | 1001 |
| AD-18324 | as | A-32338 | 527 | UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT | 1002 |
| AD-18328 | s | A-32345 | 518 | GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT | 1009 |
| AD-18328 | as | A-32346 | 536 | AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT | 1010 |

20

加えて、齧歯類交差反応性TTRのdsRNA、AD-18246をインビボでさらなる評価のために選択した。AD-18246は、オープンリーディングフレームの88位で開始する配列を標的とし、ここに、文献中に報告された3つの変異がある。HepG2細胞内のAD-18246に対する用量反応曲線を図3に示す。AD-18246は、実質的には、AD-18324およびAD-18328よりも有力ではなく、AD-18246のIC50は、265pMであると決定した。

【0257】

AD-18324、AD-18328、およびAD-18246を、LNP01に製剤化した後、遺伝子導入マウスに投与した。3~5月齢のH129-mTTR-KO/INOS-KO/hTTRの遺伝子導入マウス（マウストランスチレチンのノックアウト/誘導一酸化窒素シンターゼノックアウト/ヒトのトランスチレチン遺伝子導入）に、siRNAのAD-18324およびAD-18328に対して、1.0mg/kg、3.0mg/kg、または6.0mg/kgで、siRNAのAD-18246に対して、3.0mg/kgで、およびsiRNAのAD-1955に対して、6.0mg/kgの濃度で、尾静脈を介して、200μLのLNP01に製剤化したトランスチレチンに特異的なsiRNA（AD-18324、AD-18328、またはAD-18246）、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とするLNP01に製剤化した対照siRNA（AD-1955）、またはPBSを静脈内（IV）投与した。LNP01は、ND98、コレステロール、およびPEG-Ceramide C16からなる脂質様製剤である。

30

【0258】

約40時間後、マウスに、200μLのケタミンで麻酔をかけ、次いで、右側の尾動脈を切断することによって採血した。全血は単離され、血漿は単離され、アッセイするまで-80°で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80°で保存された。

40

【0259】

処置の有効性は、(i)投薬から48時間後、肝臓におけるTTRのmRNAの測定、ならびに(ii)前採血および投薬から48時間後、血漿中のTTRタンパク質の測定によって評価された。TTR肝臓のmRNAレベルは、分岐DNAアッセイ-Quantigene 2.0 (Panomics cat#: QSO011)を利用してアッセイされた。簡潔に言えば、マウス肝臓の試料を粉碎し、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物

50

(1容量の溶解混合物、2容量のスクレアーゼを含有しない水、および20mg/mLの最終濃度に対して10μlのプロティナーゼK/mLの混合物)を、65°で35分間インキュベートした。次いで、20μLの作業プローブセット(遺伝子標的用のTTRプローブおよび内因性対照用のGAPDH)および80μLの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを55±1°で(約16~20時間)インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1×洗浄緩衝液(スクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2)で3回洗浄し、次いで、240gで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100μlの事前増幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、55±1°で1時間インキュベートした。1時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、100μLの増幅作業試薬を添加した。1時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、100μLの標識プローブを添加した。捕捉プレートを、50±1°で1時間インキュベートした。次いで、該プレートを1×洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、100μLの基質を捕捉プレートに添加した。5~15分間インキュベートした後、SpectraMax Luminometerを用いて、捕捉プレートを読み取った。bDNAデータは、それぞれの3重の試料から平均バックグラウンドを減算し、得られる3重のGAPDH(対照プローブ)およびTTR(実験プローブ)値を平均し、次いで、比:(実験プローブ-バックグラウンド)/(対照プローブ-バックグラウンド)をコンピュータで計算することによって分析された。

【0260】

TTR血漿中レベルは、製造業者のガイドラインに従って、市販のキットの「Assay MaxヒトプレアルブミンELISAキット」(Assay Pro, St. Charles, MO, Catalog # E P 3 0 1 0 - 1)を利用して、アッセイした。簡潔に言えば、マウス血漿は、1×混合希釈液中で1:10,000に希釈し、標準キットと共に前被覆されたプレートに添加し、室温で2時間インキュベートし、続いて、キットの洗浄緩衝液で5回洗浄した。50マイクロリットルのビオチン化プレアルブミン抗体を、それぞれのウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、続いて、洗浄緩衝液で5回洗浄した。50マイクロリットルのストレプトアビシン-ペルオキシダーゼ共役体を、それぞれのウェルに添加し、室温で30分間インキュベートし、続いて、前述のように洗浄した。50μL/ウェルの停止溶液を添加することによって反応の停止を伴い、50μL/ウェルの発色基質を添加し、室温で10分間インキュベートすることによって、反応を生じさせた。450nmでの吸光度を、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上で読み取り、データを、Softmax 4.6ソフトウェアパッケージ(Molecular Devices)を利用して分析した。

【0261】

LNP01-18324およびLNP01-18328は、IVボーラス投与を伴う用量依存的な様式で、肝臓TTRのmRNA(図4A)および血漿TTRタンパク質(図4B)レベルを低下することが見出された。LNP01-18328のmRNA ED50は、約1mg/kgであると決定され、一方、LNP01-18324のED50は、約2mg/kgであることが確認された。6mg/kgでの対照のLNP01-1955が、PBS群と比較して、肝臓TTRのmRNAレベルに有意に影響を及ぼさなかつたため、LNP01-18324およびLNP01-18328の効果は特異的であった。LNP01-18324およびLNP01-18328は、PBS群と比較して、TTRのmRNAレベルにおけるものと同様の効力を有する、血漿TTRタンパク質レベルを低下させた。3mg/kgで、LNP01-18246は、3mg/kgのLNP01-18324またはLNP01-18328よりも少ない程度で肝臓TTRのmRNAレベルを低下させた。

【0262】

これらの結果は、IVボーラスにより投与された、LNP01-18324およびLNP01-18328が、実質的には、遺伝子導入マウス肝臓によって発現されたヒトT

10

20

30

40

50

R の m R N A を低下させ、血中循環中のヒト T T R タンパク質の低下をもたらすことを実証する。

【 0 2 6 3 】

実施例 5 . S N A L P - 1 8 3 2 4 および S N A L P - 1 8 3 2 8 による非ヒト靈長類の肝臓中の野生型 T T R の m R N A のインビボの低下

非ヒト靈長類における、肝臓 T T R の m R N A レベルの T T R s i R N A の A D - 1 8 3 2 4 および A D - 1 8 3 2 8 の有効性を評価するために、該 s i R N A は、 S N A L P に製剤化され、15分間の I V 注入によって投与された。カニクイザル (M a c a c a f a s c i c u l a r i s) (2 ~ 5 k g 、 1 群当たり 3 匹の動物) に、 S N A L P - 1 8 3 2 4 (0 . 3 、 1 . 0 、 もしくは 3 . 0 m g / k g) 、 S N A L P - 1 8 3 2 8 (0 . 3 、 1 、 もしくは 3 m g / k g) 、 または S N A L P - 1 9 5 5 (3 m g / k g 、 非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照 s i R N A A D - 1 9 5 5 を有する) を 15 分間の I V 注入で投与した。投薬から 48 時間後、サルに、ペントバルビタールナトリウムで麻酔をかけ、失血させた。T T R の m R N A 決定に対する肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで - 8 0 で保存された。

【 0 2 6 4 】

特注の分岐 D N A アッセイを利用して、および Q u a n t i G e n e 1 . 0 技術を利用して、肝臓中の T T R の m R N A レベルを、アッセイした。簡潔に言えば、サル肝臓の試料を粉碎し、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物 (1 容量の溶解混合物、 2 容量の又クレアーゼを含有しない水、および 2 0 m g / m L の最終濃度に対して 1 0 u l のプロテイナーゼ K / m L の混合物) を、 6 5 で 3 5 分間インキュベートした。次いで、 2 0 μ L の作業プローブセット (遺伝子標的用の T T R プローブおよび内因性対照用の G A P D H) および 8 0 μ L の細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを 5 5 \pm 1 で (約 1 6 ~ 2 0 時間) インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、 1 × 洗浄緩衝液 (又クレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分 1 、および洗浄緩衝液の構成成分 2) で 3 回洗浄し、次いで、 2 4 0 g で 1 分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。 1 0 0 μ L の事前增幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、 5 5 \pm 1 で 1 時間インキュベートした。 1 時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、 1 0 0 μ L の増幅作業試薬を添加した。 1 時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、 1 0 0 μ L の標識プローブを添加した。捕捉プレートを、 5 0 \pm 1 で 1 時間インキュベートした。次いで、該プレートを 1 × 洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、次いで、 1 0 0 μ L の基質を捕捉プレートに添加した。 5 ~ 1 5 分間インキュベートした後、 S p e c t r a M a x L u m i n o m e t e r を用いて、捕捉プレートを読み取った。 b D N A データは、 (i) それぞれの 3 重の試料から平均バックグラウンドを減算し、 (i i) 得られる G A P D H (対照プローブ) および T T R (実験プローブ) 値を平均し、次いで、 (i i i) 比 : (実験プローブ - バックグラウンド) / (対照プローブ - バックグラウンド) を得ることによって分析された。

【 0 2 6 5 】

結果を図 5 に示す。 S N A L P - 1 8 3 2 4 および S N A L P - 1 8 3 2 8 は、陰性対照 S N A L P - 1 9 5 5 と比較して、用量依存的な様式で、肝臓中の T T R の m R N A レベルを低下させた。 S N A L P - 1 8 3 2 8 および S N A L P - 1 8 3 2 4 の m R N A E D 5 0 は、それぞれ、約 0 . 3 および約 1 m g / k g であると決定した。

【 0 2 6 6 】

これらの結果は、 S N A L P - 1 8 3 2 4 および S N A L P - 1 8 3 2 8 が、 I V 注入による投与時に、非ヒト靈長類肝臓中の野生型 T T R の m R N A を抑制するのに効果的であることを実証する。

【 0 2 6 7 】

実施例 6 . 遺伝子導入マウスにおける、 S N A L P - 1 8 3 2 8 による変異 (V 3 0 M) T T R の m R N A およびタンパク質のインビボの低下

肝臓中の変異 (V 3 0 M) T T R の m R N A および血清中の変異 (V 3 0 M) T T R タ

ンパク質における、TTRのsiRNA AD-18328の有効性を評価するために、AD-18328を、SNALPに製剤化し、V30M hTTR遺伝子導入マウスに、IVボーラスにより投与した。8～12週齢のV30M hTTR遺伝子導入マウス(5匹の動物/群)に、200μLのSNALP-18328(0.03、0.3、もしくは3mg/kg)、SNALP-1955(3mg/kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照siRNA AD-1955を有する)、またはPBSを静脈内(IV)投与した。使用したマウスは、Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, PortugalからのMus musculus株H129-hTTR KOであった。簡潔に言えば、hTTR H129遺伝子導入マウスを、H129内因性TTR KOマウス(ヌルマウス)のバックグラウンドにおいて、H129-hTTR遺伝子導入マウスを生成するためのヌルマウス(Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17-20.)と交配した。

【0268】

注射してから48時間後、全て5つの処置群の動物に、致死量のケタミン/キシラジンを与えた。血清試料は、収集され、分析するまで-80で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

【0269】

TTRのmRNA定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、PBS処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、TTRのmRNA発現の相対レベルを得た。

【0270】

TTRタンパク質の定量化については、製造業者のプロトコルに従って、Assay Pro(St. Charles, MO)のAssaymax PreAlbumin ELLISAキットを用いて、血清をアッセイした。

【0271】

肝臓mRNAおよび血清タンパク質における結果を、それぞれ、図6Aおよび図6Bに示す。SNALP-18328で処置したV30M hTTR遺伝子導入マウスは、PBS対照群と比較して、肝臓TTRのmRNAレベルにおいて、用量依存的、かつ有意な低下があり、SNALP-18328の3mg/kgで、97%(p<0.001)の最大低下率、およびSNALP-18328の約0.15mg/kgで、50%低下(ED50)に達した。血清TTRタンパク質はまた、SNALP-18328の3mg/kgで、(投薬前のレベルと比較して)血清TTRタンパク質の99%(p<0.01)の最大低下率を有する、用量依存的な様式で抑制され、これは、TTRのmRNAレベルの低下と一致した。3mg/kgでのSNALP-1955は、PBSと比較して、TTRのmRNAあるいはタンパク質レベルのいずれかにおいて統計的に有意な効果がなかった。

【0272】

これらの結果は、IV投与した時、SNALP-18328が、遺伝子導入マウス肝臓中の変異V30M TTRのmRNAを抑制するのに活性があり、血中循環中の変異V30M TTRタンパク質の低下をもたらすことを実証する。

【0273】

実施例7. 遺伝子導入マウスにおける、SNALP-18328によるTTRのmRN

10

20

30

40

50

およびタンパク質抑制の持続性

S N A L P - 1 8 3 2 8 による T T R の m R N A およびタンパク質抑制の持続性を評価するため、AD - 1 8 3 2 8 を S N A L P に製剤化し、V 3 0 M h T T R 遺伝子導入マウスに I V ボーラス投与した。投薬後の種々の時点で、肝臓 T T R の m R N A レベルおよび血清 T T R のタンパク質レベルを定量化した。8 ~ 1 2 週齢の V 3 0 M h T T R 遺伝子導入マウス(4匹の動物/群)に、2 0 0 μ L の S N A L P - 1 8 3 2 8 (1 mg / kg)、または S N A L P - 1 9 5 5 (1 mg / kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照 siRNA AD - 1 9 5 5 を有する)を静脈内(I V)投与した。使用したマウスは、Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, Portugal からの Mus musculus 株 H 1 2 9 - h T T R KO であった。簡潔に言えば、h T T R H 1 2 9 遺伝子導入マウスを、H 1 2 9 内因性 T T R KO マウス(ヌルマウス T T R のバックグラウンドにおいて、H 1 2 9 - h T T R 遺伝子導入マウスを生成するためのヌルマウス(Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17 - 20)と交配した。投薬から3日目、8日目、15日目、または22日目に、両方の処置群の動物は、致死量のケタミン/キシラジンを与えられた。血清試料は、収集し、分析するまで - 8 0 で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで - 8 0 で保存された。10 20

【0274】

T T R の m R N A 定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHの m R N A レベルと比較した T T R の m R N A レベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中の m R N A レベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。T T R の m R N A の平均レベルを、それぞれの試料に対する GAPDH の m R N A の平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、P B S 処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、T T R の m R N A 発現の相対レベルを得た。30

【0275】

T T R タンパク質の定量化については、製造業者のプロトコルに従って、Assay Pro (St. Charles, MO) の Assaymax PreAlbumin ELLISA キットを用いて、血清をアッセイした。

【0276】

肝臓 m R N A および血清タンパク質における結果を、それぞれ、図 7 A および図 7 B に示す。h T T R V 3 0 M 遺伝子導入マウスにおいて、S N A L P - 1 8 3 2 8 の単回 I V ボーラス投与は、肝臓中の T T R の m R N A レベルおよび血清中の T T R タンパク質レベルの持続的な阻害をもたらした。対照群(1 mg / mL S N A L P - 1 9 5 5)と比較して、1 mg / kg での S N A L P - 1 8 3 2 8 の単回 I V 投与は、投薬から3日目、8日目、15日目、および22日目の相対的 T T R の m R N A レベルを、それぞれ、9 6 % ($p < 0.001$)、9 0 % ($p < 0.001$)、8 2 % ($p < 0.001$)、および 7 3 % ($p < 0.001$) で有意に低下させ、研究の終了時(投薬から22日目)に、基線レベルに戻らなかった。タンパク質レベルはまた、投薬から3日目で、(S N A L P - 1 9 5 5 と比較して) 9 7 % ($p < 0.001$) の血清 T T R の最大の低下を伴い減少した。投薬から8日目、15日目、および22日目で、T T R タンパク質レベルは、S N A L P - 1 9 5 5 と比較して、それぞれ、7 2 % ($p < 0.05$)、3 2 % ($p < 0.05$)、および 4 0 % ($p < 0.001$) で抑制された。これらの結果は、S N A L P - 1 8 3 2 8 の単回 I V 投与は、V 3 0 M h T T R 遺伝子導入マウスにおいて、標的肝臓 m R N A および血清タンパク質レベルの持続的な抑制を生じ、投薬から22日目で、肝臓 T T 40 50

R の m R N A および血清 T T R タンパク質の有意な低下を得ることを実証する。

【 0 2 7 7 】

実施例 8 . 非ヒト靈長類における、 S N A L P - 1 8 3 2 8 による血清 T T R タンパク質抑制の持続性

S N A L P - 1 8 3 2 8 による血清 T T R タンパク質抑制の持続性を評価するために、 A D - 1 8 3 2 8 を S N A L P に製剤化し、非ヒト靈長類に I V 注入により投与した。投薬後の種々の時点で、血清 T T R のタンパク質レベルを定量化した。

【 0 2 7 8 】

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) (S N A L P - 1 8 3 2 8 群用の n = 5 匹の動物 / 群および S N A L P - 1 9 5 5 群および P B S 群用の n = 3 匹の動物 / 群) に、 S N A L P - 1 8 3 2 8 (0.3、 1、 もしくは 3 mg / kg)、 S N A L P - 1 9 5 5 (3 mg / kg、 非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、 隕性対照 s i R N A A D - 1 9 5 5 を有する)、 または P B S を 15 分間の I V 注入で投与した。投与期の 0 日目、 1 日目、 2 日目、 3 日目、 4 日目、 5 日目、 7 日目、 10 日目、 および 14 日目で、 血清試料は、 収集され、 分析まで - 80 で保存された。

【 0 2 7 9 】

ウエスタンプロット分析を使用して、 血清試料中の T T R タンパク質レベルを評価した。 それぞれの群からの血清試料は、 プールされ、 L a e m m l i 試料緩衝液を用いて 1 : 1 に希釈した (- メルカプトエタノールを 1 : 20 の希釈で添加した)。 該試料を 95 で 10 分間加熱した。 12.5 μL のそれぞれの試料を、 10 ~ 20 % C r i t e r i o n (B i o r a d , H e r c u l e s , C A) 調製用ゲルのそれぞれのレーンに装填し、 120 V で 1.5 時間、 S D S - P A G E により分離し、 次いで、 15 V で 1 時間、 セミドライシステムを用いて、 ニトロセルロース膜に移動した。 1 × P B S を用いて 1 : 1 に希釈した L i C O R (L i n c o l n , N E) ブロックング緩衝液中で、 該膜を、 終夜 4 でブロックした。 まず、 ロッカー (r o c k e r) 上で室温で 1 時間、 L i C O R ブロックング緩衝液 / P B S 中で 1 : 1 0 0 0 に希釈した希釈液で、 該プロットを、 一次抗体 (S a n t a C r u z (S a n t a C r u z , C A) からのヤギ抗 T T R) でプローブした。 プロットは、 P B S + 0.2 % T w e e n 2 0 を用いて 4 回洗浄した (洗浄当たり 10 分間)。 蛍光標識二次抗体 (I n v i t r o g e n (C a r l s b a d , C A) からの抗ヤギ 680 nm) を、 L i C O R ブロックング緩衝液 / P B S 中で 1 : 1 0 , 0 0 0 の希釈液で添加し、 該プロットを室温で 1 時間インキュベートした。 インキュベートした後、 プロットを、 P B S + 0.2 % T w e e n 2 0 で 4 回洗浄し、 続いて、 1 ラ P B S で 1 回洗浄した。 L i - C O R 社の O d y s s e y I n f r a r e d I m a g i n g S y s t e m を使用して、 タンパク質バンドを検出した。 T T R モノマーは、 15 k D a で移動する。

【 0 2 8 0 】

結果を図 8 に示す。 血清 T T R のタンパク質レベルは、 投薬前 (0 日目) のレベルと比較した場合、 1 または 3 mg / kg の S N A L P - 1 8 3 2 8 で用量依存的な低下を示した。 S N A L P - 1 8 3 2 8 の単回 I V 投与後の、 抑制の持続性は、 1 または 3 mg / kg の S N A L P - 1 8 3 2 8 での処置から少なくとも 14 日間である。

【 0 2 8 1 】

これらの結果は、 S N A L P - 1 8 3 2 8 の単回 I V 投与は、 非ヒト靈長類 (カニクイザル (*Macaca fascicularis*)) において、 血中循環中の T T R タンパク質の持続的な抑制を生じ、 投薬から 14 日目で、 T T R タンパク質の有意な低下を得ることを実証する。

【 0 2 8 2 】

実施例 9 : 遺伝子導入マウスにおける、 S N A L P - 1 8 3 2 8 による末梢組織中の突然変異 (V 3 0 M) T T R のインビボの低下

末梢組織中の T T R を低下させる際の S N A L P - 1 8 3 2 8 の有効性を評価するためには、 h T T R V 3 0 M / H S F - 1 ノックアウトマウスを、 T T R に対する免疫組織化

10

20

30

40

50

学染色で評価した。2月齢のhTTR V30M / HSF - 1ノックアウトマウス (Meda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17 - 20) に、0日目、14日目、28日目、および42日目での合計4回の投薬のために、2週間に1回の3mg / kgのSNALP - 18328 (12匹の動物)、3mg / kgのSNALP - 1955 (非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照 siRNA AD - 1955 を有する、4匹の動物)、またはPBS (4匹の動物) をIVボーラス投与した。複数の末梢組織中のTTR肝臓mRNAレベルおよびTTR免疫活性は、56日目の、第1の投薬から8週間で評価された。

10

【0283】

マウスに、1mg / kgのメデトミジンで麻酔をかけ、致死量のケタミンを与えた。対象となる組織および臓器を収集した。免疫組織化学のために、食道 (E)、胃 (S)、腸 (十二指腸 (I1) および結腸 (I4))、神経 (N)、ならびに後根神経節 (D) を、中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィンで包埋した。TTR検出のために、ウサギ抗ヒトTTR一次抗体 (1:1000, DAKO, Denmark)、および抗ウサギビオチン共役二次抗体 (1:20 Sigma, USA) を、TTRタンパク質に染色するために、extravidin 標識体 (1:20, Sigma, USA) が続いた。反応は、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、AEC (Sigma, USA) を用いて生じさせた。基質の反応色によって占められる領域を測定し、総画像領域に対してこの値を正規化する、Scion image quant プログラムを用いて、免疫組織化学スライドの半定量分析を行った。占領領域の割合 (%) の平均値は、対応する標準偏差と共に表示する。それぞれの動物組織を、4つの異なる領域において評価した。胃および腸の副交感神経節中のヒトTTRの存在は、一次抗体としてウサギ抗ヒトTTR (1:1000, DAKO, Denmark) およびマウス抗PGP9.5 (1:40, Serotec, USA) で染色する二重免疫蛍光によって検査され、二次抗体は、それぞれ、抗ウサギ Alexa Fluor 488 (Molecular probes, UK) およびヤギ抗マウス Alexa Fluor 568 (Molecular probes, UK) であった。スライドは、vectashield (Vector)と共に実装され、FITC およびローダミン用のフィルターを装備するZeiss Cell Observer System顕微鏡 (Carl Zeiss, Germany) 中で可視化された。

20

【0284】

結果を図9に図示する。PBSおよびSNALP - 1955で処置した動物と比較して、SNALP - 18328で処置した動物は、検査した全ての組織 (食道 (E)、胃 (S)、腸 (十二指腸 (I1) および結腸 (I4))、神経 (N)、ならびに後根神経節 (D))において、TTRの免疫活性の有意な低下を得た。

30

【0285】

これらの結果は、hTTR V30M / HSF - 1ノックアウトマウスへのSNALP - 18328投与は、食道、胃、腸 (十二指腸および結腸)、神経、および後根神経節を含む、末梢組織および臓器において、TTRタンパク質の有意な低下を生じることを実証する。

40

【0286】

実施例10. XTC - SNALP - 18328による非ヒト靈長類の肝臓中の野生型TTRのmRNAのインピボの低下

非ヒト靈長類において、siRNAの送達についての新規の脂質ナノ粒子製剤XTC - SNALPの有効性を評価するために、TTRのsiRNA AD - 18328を、XTC - SNALP (XTC - SNALP - 18328) に製剤化し、15分間のIV注入により投与し、肝臓TTRのmRNAを定量化した。カニクイザル (Macaca fascicularis) に、XTC - SNALP - 18328 (0.03, 0.1, 0.3

50

、または $1\text{ mg} / \text{kg}$) または XTC - SNALP - 1955 ($1\text{ mg} / \text{kg}$ 、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照 siRNA AD - 1955 を有する) を 15 分間の IV 注入で投与した。投薬から 48 時間後、サルに、ペントバルビタールナトリウムで麻酔をかけ、失血させた。TTR の mRNA 決定に対する肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで -80° で保存された。肝組織中の TTR の mRNA の定量化のために使用される方法は、上記の実施例 5 に記載されるものと同様であった。

【0287】

結果を図 10 に示す。XTC - SNALP - 18328 は、陰性対照 XTC - SNALP - 1955 と比較して、用量依存的様式で、肝臓中の TTR の mRNA レベルを低下させた。mRNA ED50 は、約 $0.1\text{ mg} / \text{kg}$ XTC - SNALP - 18328 であると決定した。
10

【0288】

これらの結果は、XTC - SNALP - 18328 が、IV 注入による投与時に、非ヒト靈長類肝臓中の野生型 TTR の mRNA を抑制するのに効果的であることを実証する。

【0289】

実施例 11 : LNP09 - 18328 および LNP11 - 18328 による非ヒト靈長類肝臓中の野生型 TTR の mRNA のインピボの低下

非ヒト靈長類において、siRNA の送達のために、2 つの新規の脂質ナノ粒子製剤の LNP09 および LNP11 の有効性を評価するために、TTR の siRNA AD - 18328 を、LNP09 (LNP09 - 18328) または LNP11 (LNP11 - 18328) に製剤化し、15 分間の IV 注入により投与し、肝臓 TTR の mRNA および血清 TTR のタンパク質レベルをアッセイした。カニクイザル (Macaca fascicularis) に、LNP09 - 18328 (0.03, 0.1, もしくは $0.3\text{ mg} / \text{kg}$) 、LNP11 - 18328 (0.03, 0.1, もしくは $0.3\text{ mg} / \text{kg}$) 、または PBS を、15 分間の IV 注入により投与した。肝臓生検試料は、投薬から 48 時間後に収集され、急速冷凍され、処理するまで -80° で保存された。血清は、投薬する前 (採血前) 、および投薬から 1 日目、2 日目、4 日目、7 日目、14 日目、21 日目、および 28 日目に、収集され、処理するまで -80° で保存された。肝組織および血清 TTR タンパク質の評価における TTR の mRNA の定量化に使用された方法は、上記の実施例 5 および 8 に記載のものと同様であった。
20
30

【0290】

結果は、mRNA については、図 11A 、およびタンパク質については、図 11B および図 11C に示す。LNP09 - 18328 および LNP11 - 18328 で処置した動物は、肝臓中の TTR の mRNA レベルの用量依存的な低下を示し、PBS 対照と比較して、 $0.3\text{ mg} / \text{kg}$ で、約 85% (LNP09 - 18328) および約 90% (LNP11 - 18328) の mRNA の最大低下率に達した。mRNA ED50 は、LNP09 - 18328 および LNP11 - 18328 の両方において、約 $0.02\text{ mg} / \text{kg}$ であると決定した。投薬から 7 日目で、血清試料もまた、PBS 対照レベルと比較して、0.1 および $0.3\text{ mg} / \text{kg}$ の LNP09 - 18328 および LNP11 - 18328 に対して、TTR タンパク質の用量依存的な低下を示した。図 11C は、LNP09 - 18328 の $0.3\text{ mg} / \text{kg}$ の用量を有する TTR タンパク質レベルの減少が、PBS 対照群と比較して、および採血前の試料と比較して、投薬から少なくとも 28 日間にわたって存続することを示す。
40

【0291】

これらの結果は、LNP09 - 18328 および LNP11 - 18328 が、IV 注入による投与時に、非ヒト靈長類肝臓中の野生型 TTR の mRNA および血中循環中の野生型 TTR タンパク質を抑制するのに効果的であることを実証する。さらになお、LNP09 - 18328 による抑制は、持続し、IV 注入から少なくとも 28 日間存続する。

【0292】

実施例 12 . TTR が並べられた配列の合成

A D - 1 8 3 2 8 の標的領域付近で T T R 遺伝子を標的とされる、T T R 二本鎖（「並べられた二本鎖」）のセットを設計し、これは、N M _ 0 0 0 3 7 1 . 3 のヌクレオチド 6 2 8 で開始するヒト T T R 遺伝子を標的とする。

【 0 2 9 3 】

下の実施例では、転写物上の s i R N A の 5' 位の塩基を示す番号付けは、N M _ 0 0 0 3 7 1 . 3 (図 1 2 、配列番号 1 3 3 1) に基づく。上記の実施例では、ヒト s i R N A を標的とする s i R N A の番号付けは、N M _ 0 0 0 3 7 1 . 2 (図 1 3 A) に基づく。N M _ 0 0 0 3 7 1 . 3 は、図 1 4 に示すように、N M _ 0 0 0 3 7 1 . 2 と比較して、1 1 0 塩基まで 5' U T R の配列を延在する。したがって、一例として、A D - 1 8 3 2 8 の開始位置は、N M _ 0 0 0 3 7 1 . 3 上の 6 2 8 および N M _ 0 0 0 3 7 1 . 2 上の 5 1 8 である (図 1 4) 。 10

【 0 2 9 4 】

1 μ モルの規模で、M e r M a d e 1 9 2 合成機において、T T R が並べられた配列を合成した。配列表の全ての配列については、「エンドライト」化学反応を以下の詳細のように適用した。

- ・センス鎖内の全てのピリミジン (シトシンおよびウリジン) は、2' - O - メチル塩基 (2' - O - メチル C および 2' - O - メチル U) を含有した。

- ・アンチセンス鎖では、リボ A ヌクレオシドに隣接する (5' 位に向かって) ピリミジンは、それらの対応する 2 - O - メチルヌクレオシドと置換された。

- ・センスおよびアンチセンス配列の両方の 3' 末端で、2 つの塩基 d T d T の拡張を導入した。 20

- ・配列ファイルをテキストファイルに変換し、M e r M a d e 1 9 2 合成ソフトウェアにおける負荷に対して互換性を保つようにした。

【 0 2 9 5 】

合成、切断、および脱保護 :

T T R 配列の合成は、ホスホラミダイト化学反応を用いて、固定支持されたオリゴヌクレオチド合成を使用した。9 6 ウェルプレート中の 1 u m の規模で、配列の合成を行った。アミダイト溶液を、0 . 1 M 濃度で調製し、エチルチオテトラゾール (アセトニトリル中 0 . 6 M) を活性剤として使用した。合成した配列を切断し、第 1 のステップにおいてメチルアミン、および第 2 のステップにおいて、フッ化物試薬を用いて、9 6 ウェルプレート中に脱保護した。粗配列は、アセトン : エタノール (8 0 : 2 0) の混合液を用いて、沈殿させ、ペレットを、0 . 2 M 酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁させた。それぞれの配列からの試料を、定量化のための紫外線の同一性を確認するために、L C - M S によって、および純度を決定するために、I E X クロマトグラフィーによって選択された試料のセットを分析した。 30

【 0 2 9 6 】

精製および脱塩 :

T T R が並べられた配列は、S o u r c e 1 5 Q カラムを用いて、A K T A e x p l o r e r 精製システムにおいて精製した。6 5 のカラム温度を精製中維持した。試料の注射および収集を、9 6 ウェル (1 . 8 m L の深いウェル) プレート中で行った。完全長配列に対応する単一ピークを、溶離液中に収集した。A K T A 精製器を用いて、S e p h a d e x G 2 5 カラム上に精製された配列を、脱塩した。濃度 (A 2 6 0 での紫外線測定によって) および純度 (イオン交換 H P L C によって) のために、脱塩した T T R 配列を、分析した。次いで、アニーリングのために单鎖を提出した。 40

【 0 2 9 7 】

T T R の单鎖および二本鎖 :

T T R が並べられた二本鎖および対応する单鎖 (センスおよびアンチセンス) の詳細な表を、下表 (表 1 3) に示す。

【表 13 - 1】

表13: TTRが並べられた二本鎖および対応する単鎖

鎖: s = センス、as = アンチセンス

位置: 転写物(NM_000371.3、配列番号1331)における5'位の塩基

| 二本鎖# | 位置 | オリゴ# | 鎖 | 配列(5'から3'への方向) | 配列番号 |
|----------|-----|---------|----|---------------------------|------|
| AD-18323 | 618 | A-32335 | S | GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT | 1332 |
| | | A-32336 | AS | CUUGGUuAcAUGAAAUCCCdTdT | 1333 |
| AD-18324 | 619 | A-32337 | S | GGAUuucAuGuAAccAAGAddTdT | 1334 |
| | | A-32338 | AS | UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT | 1335 |
| AD-23000 | 620 | A-42927 | S | GAuuucAuGuAAccAAGAGdTdT | 1336 |
| | | A-42928 | AS | CUCUUGGUuAcAUGAAAUCdTdT | 1337 |
| AD-23001 | 621 | A-42929 | S | AuuucAuGuAAccAAGAGuddTdT | 1338 |
| | | A-42930 | AS | ACUCUUGGUuAcAUGAAAUDdTdT | 1339 |
| AD-23002 | 622 | A-42931 | S | uuucAuGuAAccAAGAGuAddTdT | 1340 |
| | | A-42932 | AS | uACUCUUGGUuAcAUGAAAAddTdT | 1341 |
| AD-23003 | 623 | A-42933 | S | uucAuGuAAccAAGAGuAuddTdT | 1342 |
| | | A-42934 | AS | AuACUCUUGGUuAcAUGAAAddTdT | 1343 |
| AD-18325 | 624 | A-32339 | S | ucAuGuAAccAAGAGuAuudTdT | 1344 |
| | | A-32340 | AS | AAuACUCUUGGUuAcAUGAddTdT | 1345 |
| AD-23004 | 625 | A-42935 | S | cAuGuAAccAAGAGuAuucdTdT | 1346 |
| | | A-42936 | AS | GAuACUCUUGGUuAcAUGdTdT | 1347 |
| AD-18326 | 626 | A-32341 | S | AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT | 1348 |
| | | A-32342 | AS | GGAuACUCUUGGUuAcAUdTdT | 1349 |
| AD-18327 | 627 | A-32343 | S | uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT | 1350 |
| | | A-32344 | AS | UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT | 1351 |
| AD-23005 | 628 | A-42937 | S | uAAccAAGAGuAuuccAuudTdT | 1352 |
| | | A-42938 | AS | AAUGGAAuACUCUUGGUuAdTdT | 1353 |
| AD-23006 | 629 | A-42939 | S | AAccAAGAGuAuuccAuuudTdT | 1354 |
| | | A-42940 | AS | AAAUGGAAuACUCUUGGUUdTdT | 1355 |
| AD-23007 | 631 | A-42941 | S | AccAAGAGuAuuccAuuuudTdT | 1356 |
| | | A-42942 | AS | AAAAUGGAAuACUCUUGGUdTdT | 1357 |
| AD-23008 | 632 | A-42943 | S | ccAAGAGuAuuccAuuuuudTdT | 1358 |

10

20

30

【表 1 3 - 2】

| 二本鎖# | 位置 | オリゴ# | 鎖 | 配列(5'から3'への方向) | 配列番号 |
|----------|-----|---------|----|---------------------------|------|
| | | A-42944 | AS | AAAAAUGGAAuACUCUUGGdTdT | 1359 |
| AD-23009 | 633 | A-42945 | S | cAAGAGuAuuccAuuuuuAdTdT | 1360 |
| | | A-42946 | AS | uAAAAAUGGAAuACUCUUGdTdT | 1361 |
| AD-23010 | 634 | A-42947 | S | AAGAGuAuuccAuuuuuAcdTdT | 1362 |
| | | A-42948 | AS | GuAAAAAUGGAAuACUCU UdTdT | 1363 |
| AD-23011 | 635 | A-42949 | S | AGAGuAuuccAuuuuuAcudTdT | 1364 |
| | | A-42950 | AS | AGuAAAAAUGGAAuACUCUdTdT | 1365 |
| AD-23012 | 636 | A-42951 | S | GAGuAuuccAuuuuuAcuAdTdT | 1366 |
| | | A-42952 | AS | uAGuAAAAAUGGAAuACUCdTdT | 1367 |
| AD-23013 | 637 | A-42953 | S | AGuAuuccAuuuuuAcuAAdTdT | 1368 |
| | | A-42954 | AS | UuAGuAAAAAUGGAAuACUDdTdT | 1369 |
| AD-23014 | 638 | A-42955 | S | GuAuuccAuuuuuAcuAAAdTdT | 1370 |
| | | A-42956 | AS | UUuAGuAAAAAUGGAAuACdTdT | 1371 |
| AD-23015 | 639 | A-42957 | S | uAuuccAuuuuuAcuAAAGdTdT | 1372 |
| | | A-42958 | AS | CUUuAGuAAAAAUGGAAuAdTdT | 1373 |
| AD-23016 | 640 | A-42959 | S | AuuccAuuuuuAcuAAAGcdTdT | 1374 |
| | | A-42960 | AS | GCUUuAGuAAAAAUGGAUdTdT | 1375 |
| AD-23017 | 641 | A-42961 | S | uuccAuuuuuAcuAAAGcAdTdT | 1376 |
| | | A-42962 | AS | UGCUUuAGuAAAAAUGGAAdTdT | 1377 |
| AD-23018 | 642 | A-42963 | S | uccAuuuuuAcuAAAGcAGdTdT | 1378 |
| | | A-42964 | AS | CUGCUUuAGuAAAAAUGGAdTdT | 1379 |
| AD-23019 | 643 | A-42965 | S | ccAuuuuuAcuAAAGcAGudTdT | 1380 |
| | | A-42966 | AS | ACUGCUUuAGuAAAAU GGdTdT | 1381 |
| AD-23020 | 644 | A-42967 | S | cAuuuuuAcuAAAGcAGuGdTdT | 1382 |
| | | A-42968 | AS | cACUGCUUuAGuAAAAUGdTdT | 1383 |
| AD-23021 | 645 | A-42969 | S | AuuuuuAcuAAAGcAGuGudTdT | 1384 |
| | | A-42970 | AS | AcACUGCUUuAGuAAAAU dTdT | 1385 |
| AD-23022 | 646 | A-42971 | S | uuuuuAcuAAAGcAGuGuudTdT | 1386 |
| | | A-42972 | AS | AAcACUGCUUuAGuAAAAAdTdT | 1387 |
| AD-23023 | 647 | A-42973 | S | uuuuuAcuAAAGcAGuGuuudTdT | 1388 |
| | | A-42974 | AS | AAAcACUGCUUuAGuAAA AdTdT | 1389 |
| AD-23024 | 648 | A-42975 | S | uuuAcuAAAGcAGuGuuuudTdT | 1390 |
| | | A-42976 | AS | AAAAcACUGCUUuAGuAAA AdTdT | 1391 |
| AD-23025 | 649 | A-42977 | S | uuAcuAAAGcAGuGuuuucdTdT | 1392 |
| | | A-42978 | AS | GAAA AcACUGCUUuAGuAAdTdT | 1393 |
| AD-23026 | 650 | A-42979 | S | uAcuAAAGcAGuGuuuucAdTdT | 1394 |
| | | A-42980 | AS | UGAAAAcACUGCUUuAGuAdTdT | 1395 |
| AD-23027 | 651 | A-42981 | S | AcuAAAGcAGuGuuuucAcdTdT | 1396 |
| | | A-42982 | AS | GUGAAA AcACUGCUUuAGUdTdT | 1397 |
| AD-23028 | 652 | A-42983 | S | cuAAAGcAGuGuuuucAccdTdT | 1398 |
| | | A-42984 | AS | GGUGAAA AcACUGCUUuAGdTdT | 1399 |
| AD-18330 | 653 | A-32349 | S | uAAAGcAGuGuuuucAccudTdT | 1400 |
| | | A-32350 | AS | AGGUGAAA AcACUGCUUuAdTdT | 1401 |
| AD-23029 | 654 | A-42985 | S | AAAGcAGuGuuuucAccucdTdT | 1402 |
| | | A-42986 | AS | GAGGUGAAA AcACUGCUU UdTdT | 1403 |
| AD-23030 | 655 | A-42987 | S | AAGcAGuGuuuucAccucAdTdT | 1404 |
| | | A-42988 | AS | UGAGGUGAAA AcACUGCUUdTdT | 1405 |
| AD-23031 | 656 | A-42989 | S | AGcAGuGuuuucAccucA udTdT | 1406 |
| | | A-42990 | AS | AUGAGGUGAAA AcACUGCUdTdT | 1407 |

【表 13 - 3】

| 二本鎖# | 位置 | オリゴ# | 鎖 | 配列(5'から3'への方向) | 配列番号 |
|----------|-----|---------|----|-------------------------|------|
| AD-18328 | 628 | A-32345 | S | GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT | 1408 |
| | | A-32346 | AS | AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT | 1409 |

【0298】

実施例 13 . TTR が並べられた siRNA のインピトロスクリーニング

TTR が並べられた二本鎖を、リアルタイム PCR アッセイを用いて、内因性 TTR の発現の阻害のために、Hep3B 細胞内でアッセイした。

【0299】

細胞培養および形質移入： Hep3B 細胞 (ATCC, Manassas, VA) を、トリプシン処理によりプレートから放出される前に、10% FBS、ストレプトマイシン、およびグルタミン (ATCC) で補完されるイーグル最小必須培地 (EMEM, ATCC) 中の 5% CO₂ の霧囲気下で、37° でほぼコンフルエントまで増殖した。96 ウェルプレートの個々のウェル中に、5 μL の Opti-MEM を 5 μL のそれぞれの siRNA に添加することによって、逆転写を実行した。これに、10 μL の Opti-MEM に加えて、0.2 μL の Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) を、ウェル当たり添加し、混合物を室温で 15 分間インキュベートした。次いで、上記のものであるが、2.0 × 10⁴ Hep3B 細胞を含有する抗生素質を含有しない、80 μL の完全成長培地を添加した。RNA 精製前に、細胞を、24 時間インキュベートした。0.1 または 10 nM の最終 2 重濃度で実験を行った。

【0300】

MagMAX-96 総 RNA 単離キット (Applied Biosystems, Foster City CA, 部品番号 # : AM1830) を用いた総 RNA 単離：細胞は、採取され、140 μL の溶解 / 結合溶液中で溶解され、次いで、Eppendorf Thermomixer を用いて 850 rpm で 1 分間混合した（混合速度は、過程を通して同一であった）。20 マイクロリットルの電磁ビーズおよび溶解 / 結合エンハンサーの混合物を、細胞溶解物に添加し、5 分間混合した。磁気ビーズは、磁気スタンドを用いて捕捉し、ビーズを妨害することなく、浮遊物を除去した。浮遊物を除去した後、磁気ビーズを洗浄液 1 (イソプロパノールを添加) で洗浄し、1 分間混合した。ビーズを再度捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、ビーズを 150 μL の洗浄液 2 (エタノールを添加) で洗浄し、捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、50 μL の DNase 混合物 (Mag Max turbo DNase Buffer および Turbo DNase) をビーズに添加し、それらを 10 ~ 15 分間混合した。混合後、100 μL の RNA 再生溶液を添加し、3 分間混合した。浮遊物を除去し、磁気ビーズを 150 μL の洗浄液 2 で再度洗浄し、1 分間混合し、浮遊物を完全に除去した。磁気ビーズを 2 分間混合し、RNA を 50 μL の水で溶離する前に乾燥させた。

【0301】

ABI 高性能 cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat # 4368813) を用いた cDNA 合成： 2 μL の 10 × 緩衝液、0.8 μL の 25 × dNTP、2 μL のランダムプライマー、1 μL の逆転写酵素、1 μL の RNase 阻害剤、および反応当たり 3.2 μL の H₂O のマスター ミックスを、10 μL の総 RNA に添加した。以下のステップを通して、Bio-Rad C-1000 または S-1000 のサーマルサイクラー (Hercules, CA) を用いて、cDNA を生成した。25° で 10 分間、37° で 120 分間、85° で 5 秒間、4° で保持。

【0302】

リアルタイム PCR : 2 μL の cDNA を、LightCycler 480 384 ウェルプレート (Roche cat # 0472974001) 中のウェル当たり、0.

10

20

30

40

50

5 μL の GAPDH TaqMan プローブ (Applied Biosystems Cat # 4326317E)、0.5 μL の TTR TaqMan プローブ (Applied Biosystems cat# HS00174914 M1)、および 10 μL の Roche Probes Master Mix (Roche Cat # 04887301001) を含有するマスター ミックスに添加した。LightCycler 480 リアルタイム PCR 機械 (Roche) において、リアルタイム PCRを行った。それぞれの二本鎖を、2つの独立した形質移入において試験し、それぞれの形質移入を二重でアッセイした。

【0303】

Ct 法を用いて、リアルタイムデータを分析した。それぞれの試料を、GAPDH の発現に対して正規化し、非標的二本鎖 AD - 1955 で形質移入した細胞と比較してノックダウンを評価した。表14は、siRNA を用いた、TTR のノックダウンを示す。データは、AD - 1955 で標的とされた細胞に対して、メッセージの残存する割合(%)として表される。

【0304】

AD - 18328 のほぼ標的である TTR を標的とする、多数ではあるが、全てではない並べられた TTR - dsRNA は、0.1 nM で、Hep3B 細胞に形質移入される場合、TTR の mRNA 少なくとも 70% 低下した。

【表14-1】

表14：AD - 18328 のほぼ標的である TTR を標的とする並べられた dsRNA による TTR の阻害

| 二本鎖# | 0.1nMにてメッセージを残存する割合(%) | 0.1nMにて標準偏差の割合(%) | 10nMにてメッセージを残存する割合(%) | 10nMにて標準偏差の割合(%) |
|----------|------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|
| AD-18323 | 6.7 | 1.90 | 1.7 | 0.02 |
| AD-18324 | 1.8 | 0.58 | 0.9 | 0.10 |
| AD-23000 | 5.5 | 0.93 | 2.1 | 0.87 |
| AD-23001 | 15.2 | 4.89 | 4.9 | 1.74 |
| AD-23002 | 3.1 | 1.12 | 1.4 | 0.55 |
| AD-23003 | 17.3 | 3.13 | 1.7 | 0.06 |
| AD-18325 | 1.5 | 0.27 | 1.4 | 0.66 |
| AD-23004 | 9.0 | 0.15 | 10.5 | 0.96 |
| AD-18326 | 22.0 | 1.85 | 7.6 | 0.78 |
| AD-18327 | 11.6 | 2.64 | 9.6 | 1.67 |
| AD-18328 | 1.1 | 0.70 | 0.6 | 0.16 |
| AD-23005 | 0.8 | 0.31 | 0.6 | 0.21 |
| AD-23006 | 1.5 | 0.46 | 1.2 | 0.43 |
| AD-23007 | 2.4 | 0.91 | 1.9 | 0.46 |
| AD-23008 | 0.6 | 0.10 | 0.8 | 0.26 |
| AD-23009 | 1.0 | 0.13 | 0.9 | 0.22 |
| AD-23010 | 60.1 | 15.66 | 66.2 | 22.71 |
| AD-23011 | 56.5 | 16.99 | 53.6 | 4.70 |
| AD-23012 | 7.7 | 2.36 | 7.7 | 3.25 |

10

20

30

40

【表14-2】

| 二本鎖# | 0.1nMにてメッセージを残存する割合(%) | 0.1nMにて標準偏差の割合(%) | 10nMにてメッセージを残存する割合(%) | 10nMにて標準偏差の割合(%) |
|----------|------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|
| AD-23013 | 7.0 | 0.64 | 8.0 | 1.06 |
| AD-23014 | 0.7 | 0.01 | 0.6 | 0.10 |
| AD-23015 | 15.4 | 0.25 | 16.5 | 7.07 |
| AD-23016 | 27.1 | 0.37 | 6.7 | 1.80 |
| AD-23017 | 4.5 | 1.26 | 1.4 | 0.40 |
| AD-23018 | 44.6 | 9.45 | 7.5 | 1.09 |
| AD-23019 | 2.2 | 0.68 | 0.8 | 0.10 |
| AD-23020 | 52.7 | 6.45 | 29.7 | 1.17 |
| AD-23021 | 95.4 | 16.16 | 45.0 | 3.00 |
| AD-23022 | 70.1 | 3.01 | 60.8 | 12.11 |
| AD-23023 | 2.7 | 1.12 | 1.8 | 0.07 |
| AD-23024 | 1.7 | 0.30 | 1.8 | 0.33 |
| AD-23025 | 64.2 | 13.21 | 10.5 | 1.34 |
| AD-23026 | 1.9 | 0.15 | 1.9 | 0.78 |
| AD-23027 | 2.5 | 0.21 | 1.6 | 0.49 |
| AD-23028 | 6.7 | 4.41 | 1.2 | 0.50 |
| AD-18330 | 6.0 | 0.56 | 5.7 | 1.15 |
| AD-23029 | 4.5 | 0.47 | 1.6 | 0.10 |
| AD-23030 | 3.9 | 0.25 | 3.3 | 0.84 |
| AD-23031 | 3.4 | 0.78 | 1.7 | 0.02 |

10

20

30

【0305】

実施例14. Sprague-Dawleyラットにおいて、SNALP-18534の単回静脈内投与の有効性における注入期間の評価

目的

Sprague-Dawleyラットにおいて、肝臓TTRのmRNAレベルにおけるSNALP-18534の単回IV注入の有効性における注入期間の効果を決定すること。

【表15】

表15：使用した略語および定義

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| SNALP-18534 | SNALPに製剤化された齧歯類トランスクレチンに特異的なsiRNA |
| SNALP-1955 | SNALPに製剤化された非哺乳動物のルシフェラーゼに特異的なsiRNA |

40

上表からのAD-18534のセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を、以下に再現する。

【表 15 B】

| 鎖 | オリゴ# | 位置 | 5' から 3' への方向の配列 | 配列番号 |
|----|---------|-----|-----------------------------|------|
| s | A-32755 | 532 | cAGuGuucuuGcucuAuAAdTd T | 1289 |
| as | A-32756 | 550 | UuAuAGAGcAAGAACACUGd TdT | 1290 |

研究材料試験物質

10

S N A L P - 1 8 5 3 4 は、標的組織に送達するために、安定な核酸脂質粒子（S N A L P）に製剤化される、齧歯類 T T R のm R N A（A D - 1 8 5 3 4）を標的とする s i R N A からなる。S N A L P 製剤（脂質粒子）は、新規のアミノ脂質（D L i n D M A）、P E G 化脂質（m P E G 2 0 0 0 - C - D M A）、中性脂質（D P P C）、およびコレステロールからなる。S N A L P 製剤中の脂質：核酸の比は、約 5 . 8 : 1 (w : w) である。S N A L P - 1 9 5 5 は、S N A L P - 1 8 5 3 4 として同一の脂質粒子で製剤化される、非哺乳動物のルシフェラーゼm R N A を標的とする s i R N A を含有し、非薬理学的に活性な対照としての役割を果たす。用量レベルは、s i R N A 含有量の重量に基づいて、m g / k g として表す。

【0306】

20

研究設計 & 手順動物および試験物質の投与：

研究は、S p r a g u e - D a w l e y ラットの 9 つの群（4 匹の雄 / 群）からなった。動物は、研究前の少なくとも 2 日間の順応期間が与えられ、全ての動物は、投薬開始時、7 週齢であった。投与された用量は、1 日目の投薬前に収集された体重データに基づいて計算された。試験および対照物質は、B a x t e r A S 4 0 A 注射器ポンプに 2 7 G

テルモ翼状針を介して接続された B a x t e r 注射部位の隔膜で密閉された 2 4 G 3/4" のカニューレを用いて、尾静脈を介して、単回 1 5 分間、1 時間、2 時間、または 3 時間の I V 注入として投与された。投与容量は、3 m L / k g であり、注入速度は、1 2 m L / k g / 時であり、動物は、投薬中、ケージ内で自由に行動していた。ラットは、9 つの処置群に分割され、表 1 6 に示されるように、S N A L P - 1 8 5 3 4 、S N A L P - 1 9 5 5 、または P B S の単回 I V 注入で投与した。

30

【表 16】

表 1 6 : 試験動物の用量群

| 群 | N | 試験物質 | 注入の持続時間 | 用量 |
|---|---|-----------------------|---------|---------|
| A | 4 | PBS | 15 分間 | --- |
| B | 4 | PBS | 3 時間 | --- |
| C | 4 | S N A L P - 1 9 5 5 | 1 時間 | 1 mg/kg |
| D | 4 | S N A L P - 1 9 5 5 | 2 時間 | 1 mg/kg |
| E | 4 | S N A L P - 1 9 5 5 | 3 時間 | 1 mg/kg |
| F | 4 | S N A L P - 1 8 5 3 4 | 15 分間 | 1 mg/kg |
| G | 4 | S N A L P - 1 8 5 3 4 | 1 時間 | 1 mg/kg |
| H | 4 | S N A L P - 1 8 5 3 4 | 2 時間 | 1 mg/kg |
| I | 4 | S N A L P - 1 8 5 3 4 | 3 時間 | 1 mg/kg |

40

【0307】

組織収集およびR N A 単離：

0 日目に、イソフルレン吸入で動物に麻酔をかけ、投薬前の血液試料を、r e t r o -

50

*orbital bleed*により血清分離管に収集した。4で遠心分離を行う前に、室温で約30分間、血液試料を凝固させた。次いで、血清試料は、分析が行われるまで、-80で保存された。3日目に、全ての9つの処置群の動物に、致死量のケタミン／キシラジンを与えた。後大静脈を介して血清分離管に血液を収集し、次いで、4で遠心分離を行う前に、室温で約30分間、凝固させた。血清試料は、分析が行われるまで、-80で保存された。肝組織は、収穫され、ドライアイス上で瞬間凍結された。凍結された肝組織は、粉碎され、組織溶解物は、肝臓mRNAの定量化のために調製された。

【0308】

TTRのmRNAの定量化：

分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。

【0309】

TTRのmRNAの発現の相対レベルを得るために、15分間、1時間、および2時間の注入時間でのSNALP-1955およびSNALP-18534処置群に対する群平均値は、次いで、15分間の注入時間でのPBS処置群に対する平均値に対して正規化され、一方、3時間の注入時間でのSNALP-1955およびSNALP-18534処置群に対する群平均値は、次いで、3時間の注入時間でのPBS処置群に対する平均値に対して正規化された。

【0310】

結果

図16に示されるように、15分間～3時間の異なる注入時間での1mg/kg SNALP-18534の単回IV注入は、投薬から2日後に測定された肝臓TTRのmRNAレベルに匹敵する阻害をもたらす。1mg/kg SNALP-18534の単回IV注入はまた、SNALP-1955対照と比較した場合、15分間の単回IV注入から29日間にわたって持続的なTTRの下方調節を示した(データは示さず)。PBS処置群と比較して、1mg/kgにて、SNALP-18534の単回15分間、1時間、2時間、または3時間のIV注入は、相対TTRのmRNA発現レベルを、それぞれ、94%(p<0.001)、94%(p<0.001)、92%(p<0.001)、および93%(p<0.001)有意に低下させた。SNALP-18534活性の特異性は、同一の用量レベルで、1時間、2時間、または3時間のIV注入でのSNALP-1955投与による有意な標的阻害の欠如により実証される。

【0311】

結論

本研究は、15分間から最長3時間の異なる注入時間が、肝臓中のTTRのmRNAレベルの低下により評価されるように、ラットにおいて、1mg/kg SNALP-18534の単回IV投与の有効性に影響を及ぼさないことを実証する。

【0312】

実施例15. LNP07-18534およびLNP08-18534によるラット肝臓中の野生型TTRのmRNAのインピボの低下

ラットにおいて、siRNAの送達のための2つの新規の脂質ナノ粒子製剤のLNP07およびLNP08の有効性を評価するために、齧歯類特異的なTTRのsiRNA、AD-18534が、LNP07(LNP07-18534)またはLNP08(LNP08-18534)に製剤化され、15分間のIV注入により投与され、肝臓TTRのmRNAが定量化された。Sprague-Dawleyラット(群当たり4匹の動物)に、LNP07-18534(0.03, 0.1, 0.3、もしくは1mg/kg)、LNP

08-18534(0.01、0.03、もしくは0.1mg/kg)、または非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする陰性対照 siRNA AD-1955を含有するLNP07-1955(1mg/kg)もしくはLNP08-1955(0.1mg/kg)の15分間のIV注入により投与された。48時間後、動物に麻酔をかけ、肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

【0313】

TTTのmRNA定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTTのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTTのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、PBS処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、TTTのmRNA発現の相対レベルを得た。
10

【0314】

結果を図17に示す。LNP07-18534は、用量依存的な様式で、肝臓中のTTTのmRNAレベルを低下させ、1mg/kgでTTTのmRNAの94%抑制を得た。1mg/kgで陰性対照LNP07-1955が、PBS対照と比較して、TTTのmRNAレベルに大きな影響を及ぼさなかったため、効果は、特異的であった。mRNA ED50は、約0.05mg/kgのLNP07-18534であることが確認された。LNP08-18534は、用量依存的な様式で、肝臓中のTTTのmRNAレベルを低下させ、0.1mg/kgでTTTのmRNAの86%抑制を得た。0.1mg/kgで陰性対照LNP08-1955が、PBS対照と比較して、TTTのmRNAレベルに大きな影響を及ぼさなかったため、効果は、特異的であった。mRNA ED50は、約0.02mg/kgのLNP08-18534であることが確認された。
20

【0315】

これらの結果は、LNP07-18534およびLNP08-18534が、IV注入により投与された場合、ラット肝臓中の野生型TTTのmRNAを抑制するのに効果的であり、LNP07およびLNP08が、肝臓にsiRNAを送達するために効果的な製剤であることを実証する。
30

【0316】

実施例16：Sprague-Dawleyラットにおいて、LNP09-18534またはLNP11-18534の単回静脈内投与によるTTT肝臓のmRNAの低下
目的：

内因性(野生型)肝臓TTTのmRNAレベルを低下させることに対する、Sprague-Dawleyラットにおける、齧歯類TTT特異的なsiRNAのAD-18534の送達のための2つの新規の脂質ナノ粒子(LNP)製剤の有効性を評価すること。ラットに、0.01、0.03、0.1、もしくは0.3mg/kgのLNP09-18534、LNP11-18534、またはリン酸緩衝食塩水(PBS)のいずれかで15分間の注入を介して静脈内に投与し、TTT肝臓のmRNAレベルを、処置から48時間後にアッセイした。
40

【0317】

材料および方法：

LNP09製剤：(XTC/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14)=50/10/38.5/1.5モル%、脂質：siRNA 約11:1。LNP11製剤：(MC3/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14)=50/10/38.5/1.5モル%、脂質：siRNA 約11.1

組織収集およびRNA単離：3日目に、全ての処置群の動物に、致死量のケタミン/キシリジンを与えた。後大静脈を介して血清分離管に血液を収集し、次いで、4で遠心分
50

離を行う前に、室温で約30分間、凝固させた。血清試料は、分析が行われるまで、-80で保存された。肝組織は、収穫され、ドライアイス上で瞬間凍結された。凍結された肝組織は、粉碎され、組織溶解物は、肝臓mRNAの定量化のために調製された。

【0318】

TTRのmRNAの定量化：分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、群平均値は、PBS処置群に対する平均値に対して正規化され、TTRのmRNA発現の相対レベルを得た。

【0319】

結果：

図18に示されるように、PBS処置動物と比較して、LNP09-18534およびLNP11-18534で処置した動物は、肝臓中のTTRのmRNAレベルの有意な用量依存的な低下を有し、PBC対照群と比較して、0.3mg/kgで、LNP09およびLNP11製剤化群の両方に対して、約90%のmRNAの最大低下率に達し、用量は、LNP11-18534の0.03mg/kg未満で、LNP09-18534の0.1mg/kg未満で、50%低下(ED_{50})に達した。

【0320】

結論

本研究は、Sprague-Dawleyラットにおいて、LNP09-18534またはLNP11-18534の単回15分間のIV注入が、肝臓TTRのmRNAの用量依存的な低下をもたらすことを実証する。これらのデータは、LNP09-18328およびLNP11-18328の内因性発現した(野生型)TTRのmRNAを低下させることにおける有効性を、それぞれ、LNP11-18534およびLNP09-18534で、0.03mg/kg未満および0.1mg/kg未満の ED_{50} レベルで実証する。

【0321】

実施例17：ヒトにおけるTTRの阻害

ヒト対象は、病態を治療するために、TTR遺伝子の発現を阻害するためのTTR遺伝子を標的とするdsRNAにより処置される。

【0322】

治療を必要とする対象を選択または特定する。該対象は、肝臓疾患、トランスチレチンアミロイドーシス、および/または移植肝臓を有し得る。

【0323】

該対象の特定は、臨床的状況において、または他の場所、例えば、対象自身が自己試験キットの使用を通して対象の自宅で、行い得る。

【0324】

ゼロ時点で、好適な第1の用量の抗TTRのsiRNAを対象に投与する。該dsRNAは、本明細書に記載の通り製剤化する。第1の投与後、一定期間、例えば、7日、14日、および21日後、例えば、肝機能を測定することによって、対象の病態を評価する。この測定には、前記対象におけるTTRの発現、および/またはTTRのmRNAの成功したsiRNA標的の産物の測定を伴ってもよい。また、他の関連する基準を測定してもよい。用量の回数および強度は、対象の必要性に従って調整する。

【0325】

処置後、対象の腫瘍増殖率は、処置前に既存の比率、または同様に罹患するが、無処置である対象において測定された比率と比較して低下する。

10

20

30

40

【図1】

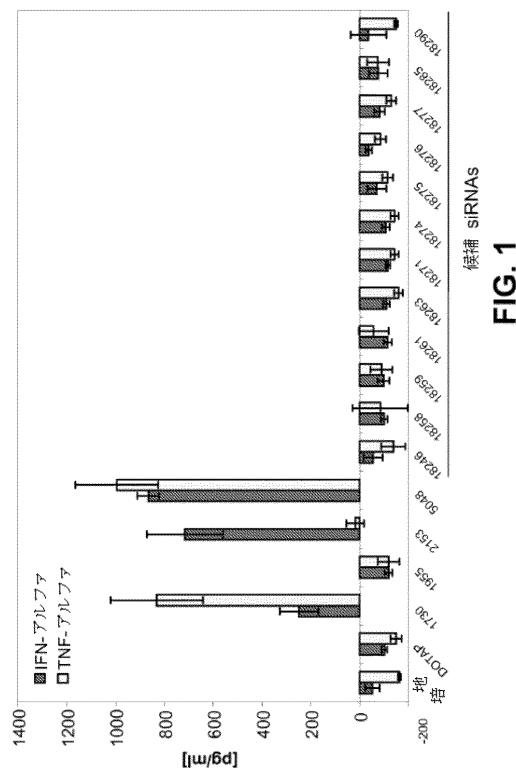


FIG. 1

【図2】

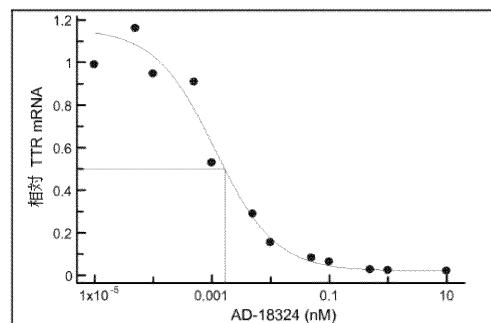


FIG. 2A

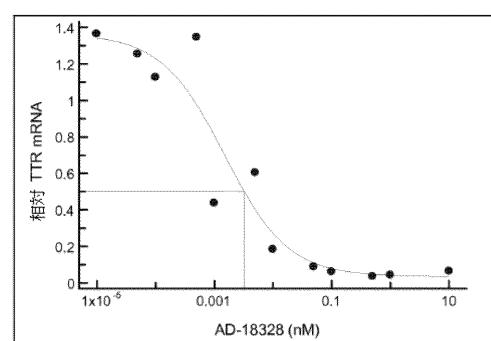


FIG. 2B

【図3】

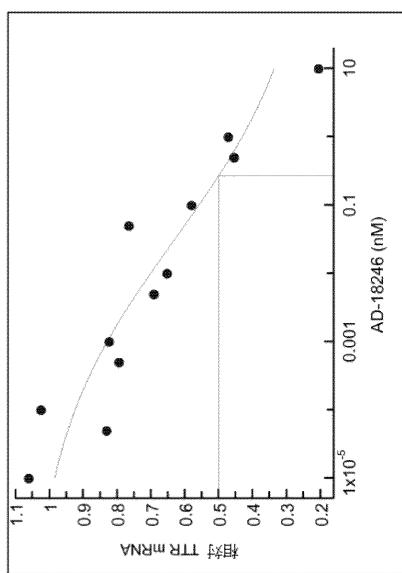


FIG. 3

【図4A】

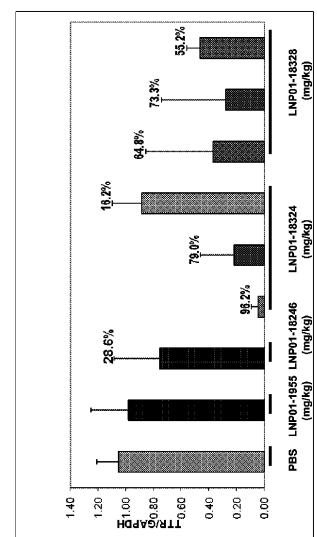


FIG. 4A

【図4B】

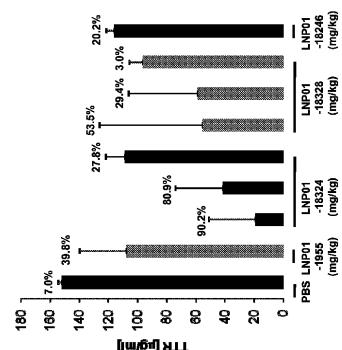


FIG. 4B

【図5】

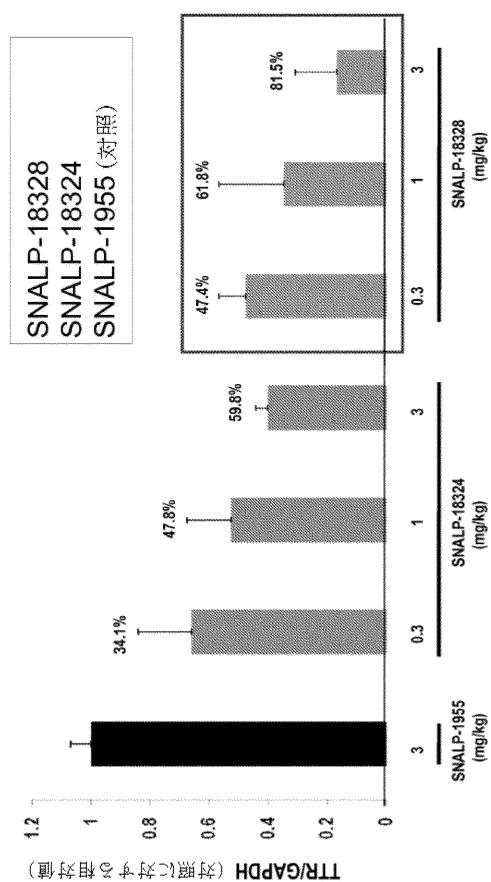


FIG. 5

【図6A】

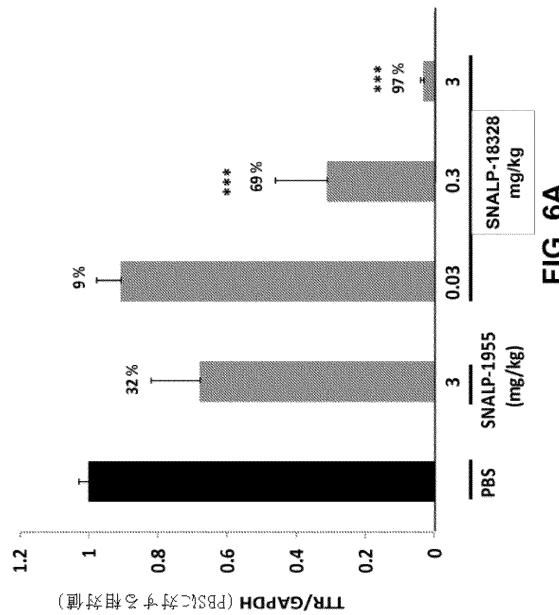


FIG. 6A

【図6B】

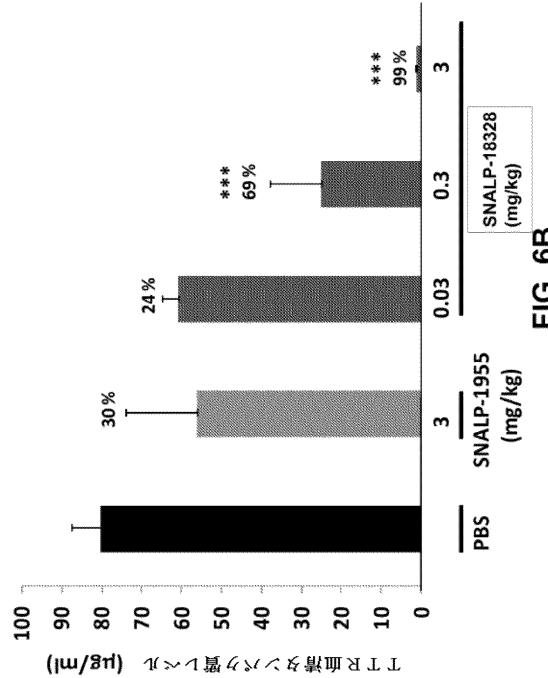


FIG. 6B

【図 7 A】

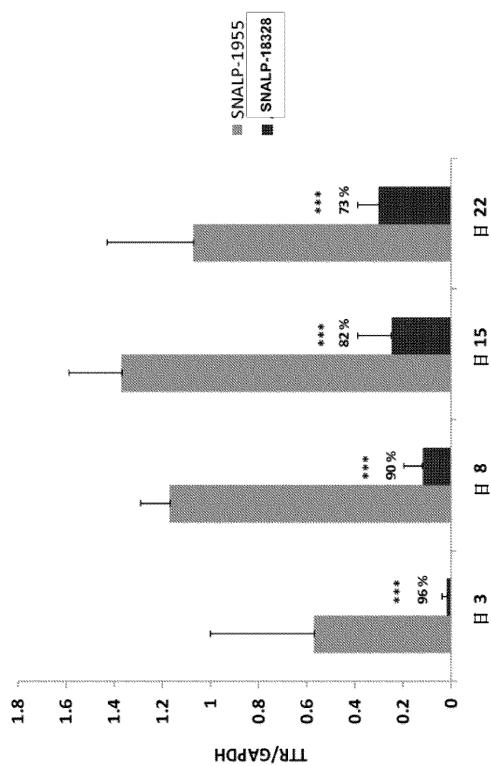


FIG. 7A

【図 7 B】

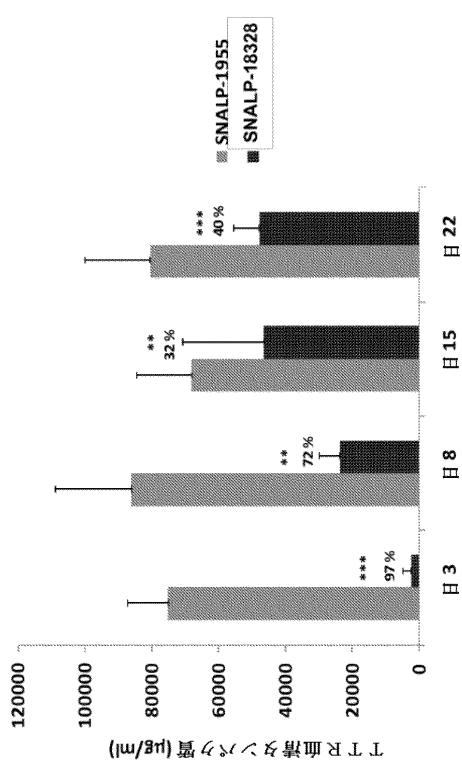


FIG. 7B

【図 8】

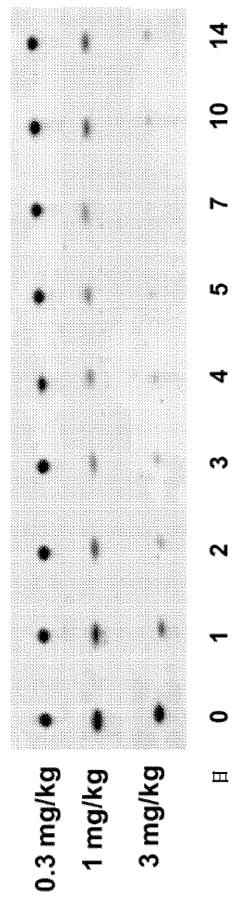


FIG. 9

【図 9】

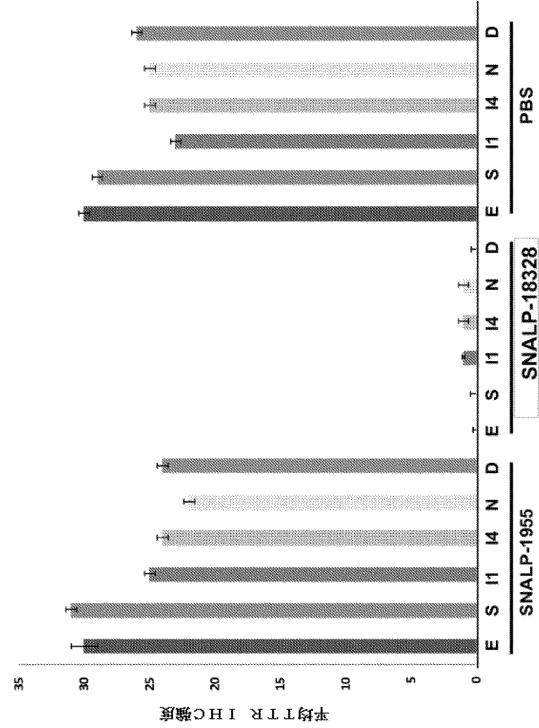


FIG. 9

【図 10】

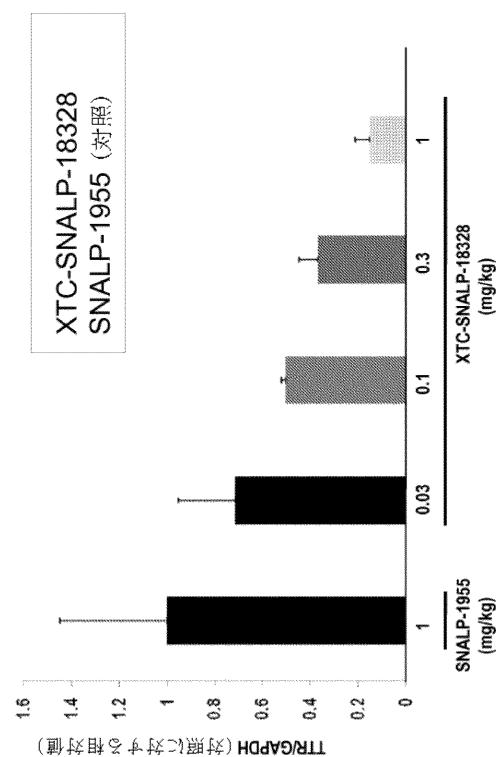


FIG. 10

【図 11 A】

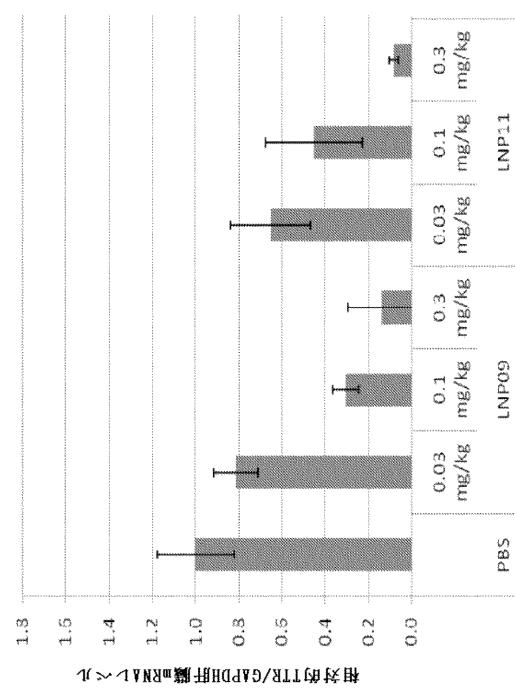


FIG. 11A

【図 11 B】

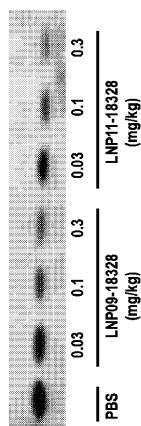


FIG. 11B

【図 11 C】

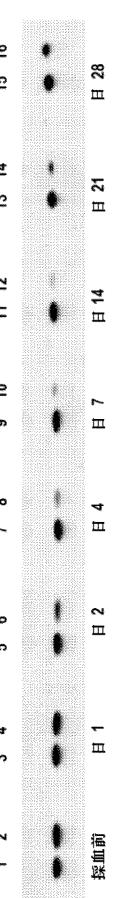


FIG. 11C

1-->1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, && 15: PBS 動物
1-->2, 4, 6, 8, 10, 14, && 16: 0.3 mg/kg LNP09-18328

【図12】

| | | |
|-------------|-------------|-------------|
| gttgcactaa | tcaataatca | gaatcagcag |
| gtttgcagtc | agattggcag | ggataagcag |
| cctagctcg | gagaagttag | tataaaaaggc |
| ccaggctgg | agcggccatc | acagaagtcc |
| actcatttt | ggcaggatgg | cttctcatcg |
| tctgctcctc | ctctgccttg | ctggactggt |
| atttgtgtct | gaggctggcc | ctacgggcac |
| cggtaatcc | aagtgtcctc | tgatggtcaa |
| agttcttagat | gctgtccgag | gcagtctcgc |
| catcaatgt | gccgtgcatt | tgttcagaaaa |
| ggctgctgtat | gacacctggg | agccatttgc |
| ctctggggaaa | accagttagt | ctggagagct |
| gcatgggctc | acaactgagg | aggaatttgt |
| agaagggata | tacaaaagtgg | aaatagacac |
| caaattctac | tggaaaggcac | ttggcatctc |
| cccattccat | gagcatgcag | aggttgttat |
| cacagccaaac | gactccggcc | ccgcgcgtca |
| caccatttgc | gccccgtgtg | gcccctactc |
| ctattccacc | acggctgtcg | tcaccaatcc |
| caaggaatga | gggacttctc | ctccagtgtat |
| cctgaaaggac | gagggatggg | atttcatgtat |
| accaaagagta | ttccatttttt | actaaaggcag |
| tgttttccacc | tcatatgtta | tgttagaagt |
| ccaggcagag | acaataaaaac | attccctgtat |
| aaggcactt | tcattccact | ttaacttgat |
| tttttaaatt | cccttattgt | cccttccaaa |
| aaaaagagaa | tcaaaatttt | acaaagaatc |
| aaaggaattc | tagaaagtat | ctgggcagaa |
| cgttagggaa | gatcccaattt | tccattgtct |
| tgcagaagaaa | gcacgttatta | aatatgatct |
| gcagccattt | aaaagacaca | ttctgtaaaa |
| aaaaaaaaaa | (配列番号1331) | |

FIG. 12

【図13】

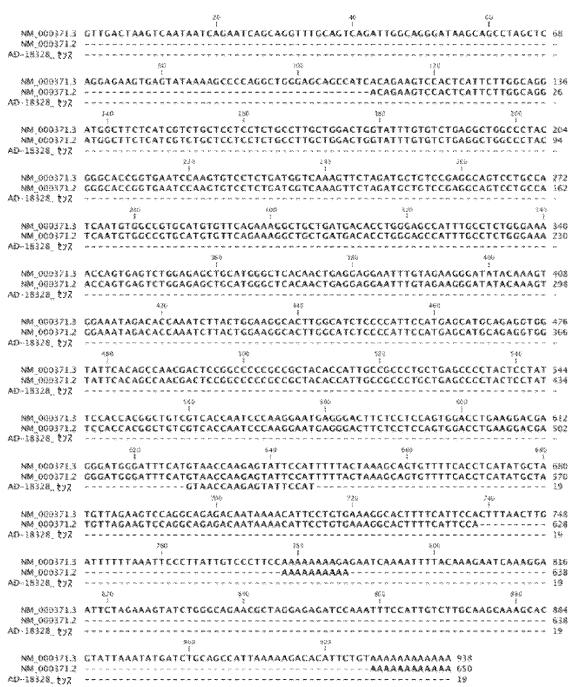
FIG. 13A

ACAGAAAGTCCACTCATCTGGCAGGATGGCTCTCATCGCTGCCTCCT
 CTGCCCTTGTCTGGACTGGATTGGTCTGAAGGCTGGCCCTACGGGACCCGGT
 GAATCCAAGTGTCTCTGTGTCAAAGGTTCTAGATGCTGTCGGAGGACGTC
 CTGCCATCAATGTCGGCGTGTGTCAGTGTGTCAGAAGGGCTGCTGATGACACTG
 GGAGGCCATTGGCTCTGGAAAACCAGTGAGTCGGAGAGCTGCGATGGGCTC
 ACAACTGAGGAGGAATTGTAGAAGGGATATACAAGTGGAAATAGACACCA
 AATCTTACTGGAGGACTTGGCATCTCCCCATTCTCATGGAGCATGGCAGAGGT
 GHGATTCTCACGCCAACGACTCTGGCCCCCCCCTGCATCACCTTGGCCCTG
 CTGAGGCCCTACTCTTCTTACCCACGGCTGTCGTGTCACCAAATCCAAGGAAT
 GAGGGACTCTCTCCAGTGACCTGAAGGACGAGGGATGGATTCTATGTA
 ACCAAAGAGTATCTCCATTTTACTAAAGCAGTGGTCTCACCTCATATGCTATG
 TTAGAAGTCCAGGCGAGACAATAAACATCTCTGTGAAAGGCACTTTCTAT
 CTCAAAAAAAAAAAAAA (配列番号1329)

FIG. 13B

CTTGACAGGTGGCTTCCCTTCGCTGTCTCTGCCTCGCTGGACTGA
TATTTCGCTCTGAAAGCTGGGCCCTGGGGCTCTGGAGAATCAAGTCCTCT
GATGGCTAACAGTCCTGGATCTGTCAGCAGGGCAGCCCCTGTCGATGTGGCC
GTGAAAGTTGTCAAAAGGACTCTGAGCAGGAAGCTGGGACCGTTGCTCTCG
GGAAGACCGCCGAGCTGGAGAGCTGCACGGGCTCACACAGATGAGAAGTT
CACGGAAGGGGTGACAGGGTAGAACCTGGACACCAAATCATACTGGAAAGCT
CTTGGCATTCTCCCCATTCTCATGAATAACCGACAGGGTGGTTACAGCCAATG
ACTCTGGCATCTGCCAACACTAACCATCGCACCCCTGTCAGGCCCTACTCTA
CAGCACCAACTCTGTCGTCAGTAACCCCCAGAACACTGAGGGACCCAGCCCCACG
AGGACCAAGATCTTGCCAAAGCAGTAGCTCCATTGTACTGAAACAGTGGT
CTTGGCTCTATAAACCGTGTAGCAACTCGGGAAGATGCGCTGAAACAGTCTT
ATTAACCCACCTTTATTCATTC
(配列番号 1330)

【图 1-4】



【図15】

| 表現型 | 特徴 | 遺伝子型(TTRにおいて関連する突然変異) | | | |
|------------------------------|---|--|--|--|--|
| 家族性 アロイド 神経障害 (FAP) | 早期：感覺運動不能 脚部の多発性神經障害 手根管症候群 自律神經機能障害 便秘／下痢 後期：心筋症 硝子体混濁 腎症 | V28M L58H V30M L58R K70N Y78F I84S Y114H V30A K35N G47V S50R T60A Y114C | | | |
| 家族性 アロイド 心筋症 (FAC) | 心肥大 鬱血性心不全 伝導以上 不整脈 狭心症 突然死 | D18N P24S E42D S50I H56R Q92K R103S L111M V122I T60A | D18E P24S A45T S50I I68L A81T | V20I T49P A81T L111M V122I | |
| CNS アロイド・ーシス (CNSA) | 認知症、運動失調、痴性、 発作、出血（小脳内 及び／又はくも膜下）、精神病、 うつ病 | L12P V30G F64S | D18G A36P Y69H | A25T G53E Y114C | |

【図 16】

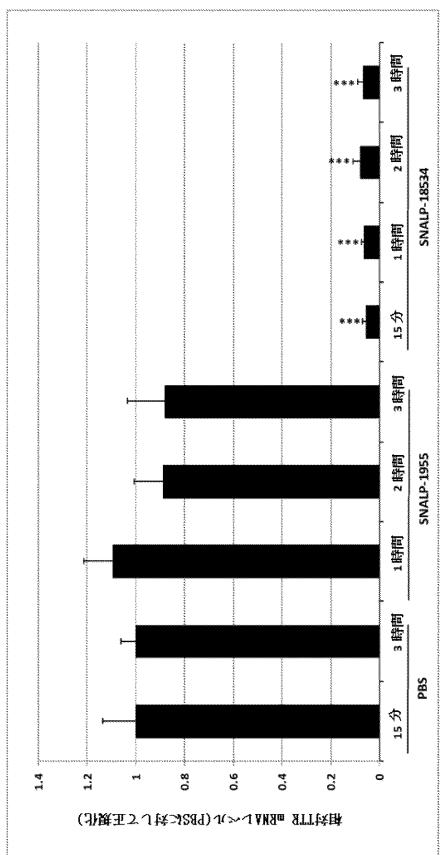


FIG. 16

【図 17】

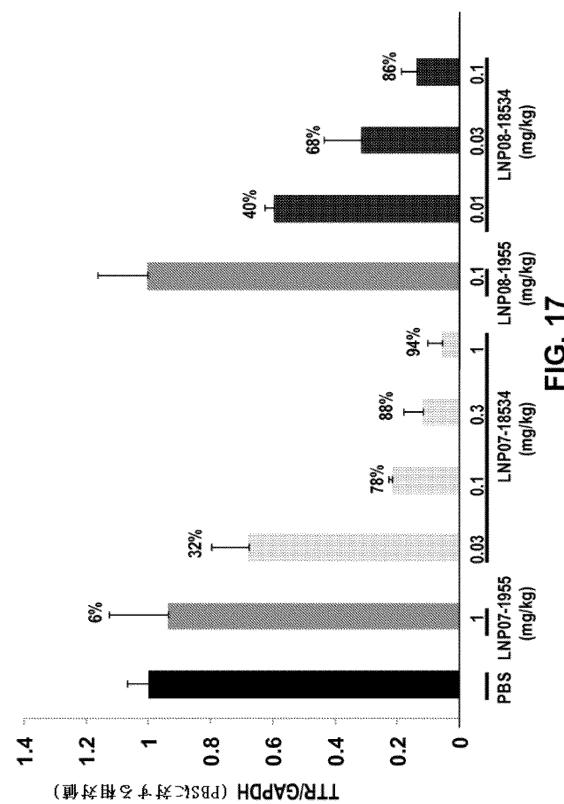


FIG. 17

【図 18】

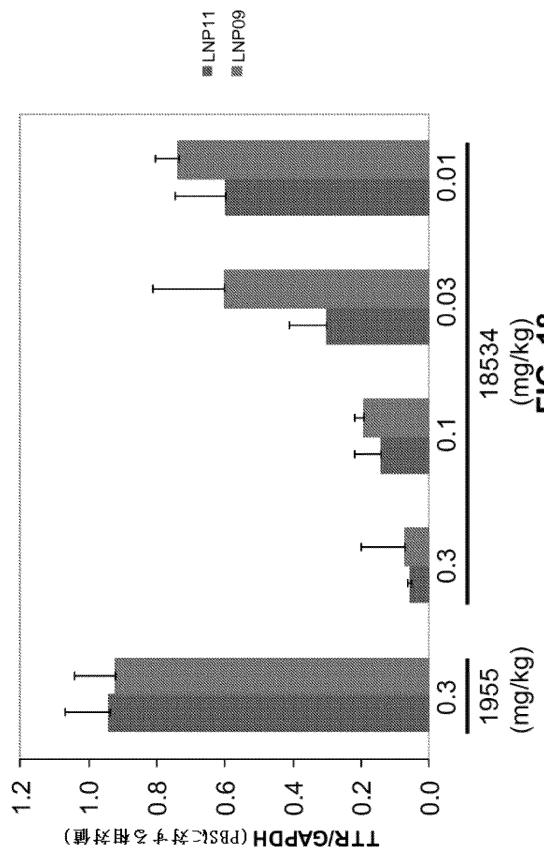


FIG. 18

【配列表】

0005791505000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I |
|-------------|--------|----------------|
| A 6 1 K | 31/713 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 1/16 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 1/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 5/14 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 9/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 13/12 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 25/00 | (2006.01) |
| A 6 1 P | 27/02 | (2006.01) |
| | | A 6 1 K 31/713 |
| | | A 6 1 P 1/16 |
| | | A 6 1 P 1/00 |
| | | A 6 1 P 5/14 |
| | | A 6 1 P 9/00 |
| | | A 6 1 P 13/12 |
| | | A 6 1 P 25/00 |
| | | A 6 1 P 27/02 |

(31)優先権主張番号 61/185,545
 (32)優先日 平成21年6月9日(2009.6.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/115,738
 (32)優先日 平成20年11月18日(2008.11.18)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/106,956
 (32)優先日 平成20年10月20日(2008.10.20)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/244,794
 (32)優先日 平成21年9月22日(2009.9.22)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100144923
 弁理士 中川 将之
 (74)代理人 100156111
 弁理士 山中 伸一郎
 (74)代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生
 (74)代理人 100170520
 弁理士 笹倉 真奈美
 (72)発明者 ダイナ・ウェン・イー・サー
 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・フロアー、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内
 (72)発明者 グレゴリー・ヒンクル
 アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、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内
 (72)発明者 レネ・アルバレス
 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・フロアー、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内
 (72)発明者 スチュアート・ミルスタイン
 アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、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内
 (72)発明者 チエン・キンミン
 アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・フロアー、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内

(56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0031844(US, A1)

臨床病理, 2008年2月, 第56巻, 114-120ページ

PALANINATHAN SK et al., Database GenBank[online], Accession No.NM_000371, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/167736363?sat=12&satkey=8748419>>, 05-OCT-2008 uploaded, 15-APR-2014 retrieved, Title: Homo sapiens transthyretin (TTR), mRNA

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15 / 113

A 61 K 31 / 713

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI DS
(STN)

PubMed

Science Direct