

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-514266
(P2024-514266A)

(43)公表日 令和6年3月29日(2024.3.29)

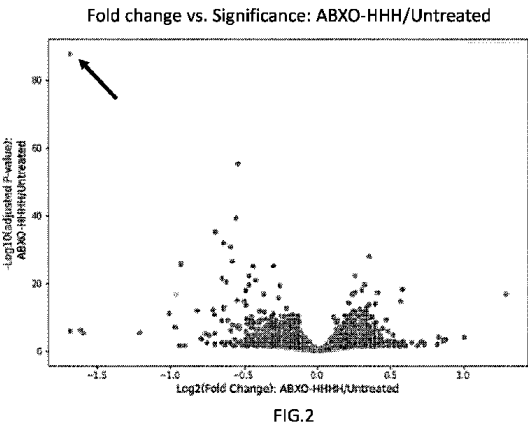
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00		4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全261頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2023-562948(P2023-562948)	(71)出願人	522149186	(74)代理人	
(86)(22)出願日	令和4年4月14日(2022.4.14)		アロ・バイオセラピューティクス・カン		
(85)翻訳文提出日	令和5年11月30日(2023.11.30)		パニー		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/024846		アメリカ合衆国ペンシルベニア州191		
(87)国際公開番号	WO2022/221550		06. フィラデルフィア. スイート74	(74)代理人	
(87)国際公開日	令和4年10月20日(2022.10.20)		0. ウォルナット・ストリート601		
(31)優先権主張番号	63/174,776		100127926		
(32)優先日	令和3年4月14日(2021.4.14)		弁理士 結田 純次		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		100140132	(74)代理人	
(31)優先権主張番号	63/203,776		弁理士 竹林 則幸		
(32)優先日	令和3年7月30日(2021.7.30)		100216105		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 守安 智		
(31)優先権主張番号	63/324,437		(72)発明者	(72)発明者	
			スワップニル・クルカルニ		
			アメリカ合衆国ペンシルベニア州191		
			04. フィラデルフィア. スイート20		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 FN3ドメイン-s iRNAコンジュゲートおよびその使用

(57)【要約】

本開示は、s iRNA分子、およびs iRNA分子へとコンジュゲートされたFN3ドメインなどの組成物のほか、これらの分子を作製し、使用する方法に関する。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組成物であって、本明細書で提示されるセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む s i R N A を含む組成物。

【請求項 2】

s i R N A は、修飾ヌクレオ塩基を含有しない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

s i R N A は、s i R N A のセンス鎖またはアンチセンス鎖へと共有結合的に接合されたリンカーをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

リンカーは、センス鎖またはアンチセンス鎖の 5' 末端または 3' 末端へと接合されている、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

s i R N A は、センス鎖またはアンチセンス鎖上のビニルホスホン酸修飾をさらに含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

ビニルホスホン酸修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖の 5' 末端または 3' 末端へと接合されている、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

センス鎖は、配列番号 10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、600、602、604、606、608、610、612、614、616、618、620、622、624、626、628、630、632、634、636、638、640、642、644、646、648、650、652、654、656、658、660、662、664、666、668、670、672、674、676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、696、698、700、702、704、706、801～860、921～980 の配列、または表 1 A、表 1 B、もしくは表 2 に明示された配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

アンチセンス鎖は、配列番号 11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、690、691、693、695、697、699、701、703、705、707、861～920、981～1042 の配列、または表 1 A、表 1 B、もしくは表 2 に明示された配列を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

s i R N A 分子は、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH、II、JJ、KK、LL、MM、NN、OO、PP、QQ、RR、SS、TT、UU、VV、WW、XX、YY、ZZ、AAA、BBB、CCC、DDD、EEE、FFF、GGG、HHH、III、JJJ、KKK、LLL、MMM、NNN、OOO、PPP、QQQ、RRR、SSS、TTT、UUU、VVV、WWW、XXX、YYY、ZZZ、AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEE、FFFF、GGGG、H

H H H、I I I I、J J J J、K K K K、L L L L、M M M M、N N N N、O O O O、P P P Pのs i R N A対、または表1 A、表1 B、もしくは表2に明示されたs i R N A対を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項10】

センス鎖は、19のヌクレオチドを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項11】

アンチセンス鎖は、21のヌクレオチドを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項12】

表3に明示されたリンカーおよび／またはビニルホスホン酸修飾を伴う、表2に提示されたs i R N A対を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項13】

s i R N A分子は、式I：

N₁N₂N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁N₁₂N₁₃N₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉：センス鎖（S S）

N₂₁N₂₀N₁₉N₁₈N₁₇N₁₆N₁₅N₁₄N₁₃N₁₂N₁₁N₁₀N₉N₈N₇N₆N₅N₄N₃N₂N₁：アンチセンス鎖（A S）

【式中、Nにより表される、各ヌクレオチドは、独立に、A、U、C、またはG、または本明細書で提示される修飾ヌクレオチド塩基などの修飾ヌクレオチド塩基である】

に例示される式を有する、請求項1～12のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

センス鎖は、N₁およびN₂における、ホスホロチオエート（P S）修飾骨格を伴う2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₂、およびN₁₇における、2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₄、N₅、N₆、N₁₀、N₁₁、N₁₃、N₁₄、N₁₅、N₁₆、N₁₈、およびN₁₉における2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

アンチセンス鎖は、N₁へと接合されたビニルホスホン酸部分、N₂における、ホスホロチオエート（P S）修飾骨格を伴う2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、N₆、N₄、N₅、N₆、N₇、N₈、N₉、N₁₀、N₁₁、N₁₂、N₁₃、N₁₅、N₁₆、N₁₇、N₁₈、およびN₁₉における、2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、N₄における、2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびにN₂₀およびN₂₁における、ホスホロチオエート（P S）修飾骨格を伴う2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項16】

ビニルホスホン酸部分は、アンチセンス鎖のN₁へと接合されている、請求項13に記載の組成物。

【請求項17】

s i R N A分子は、式I：

10

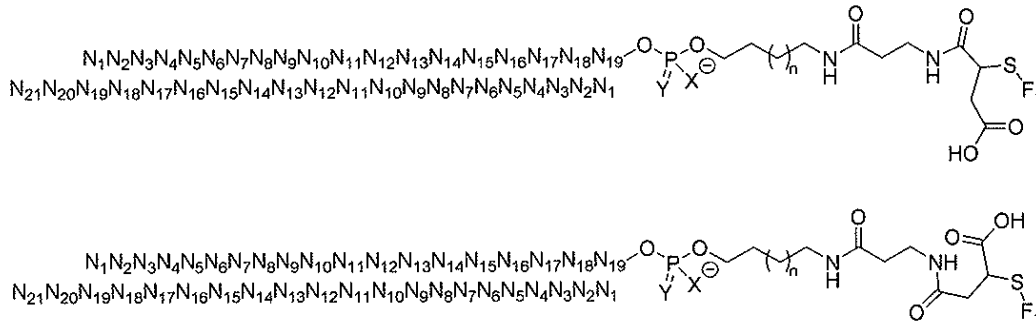
20

30

40

50

【化 1】



10

【式中、 F_1 は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり、リンカーへとコンジュゲートされ、 L_1 は、 X_S へと連結され、 X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5' - 3' オリゴヌクレオチドであり、 X_A は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3' - 5' オリゴヌクレオチドであり； X および X_A は、二本鎖siRNA分子を形成する】

に例示される式を有する、請求項1～16のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項18】

F_1 は、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式【式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； n 、 q 、および y は、 n 、 q 、および y のうちの少なくとも1つが、1であることを条件として、各々独立に、0または1である】を有するポリペプチドを含む、請求項17に記載の組成物。

20

【請求項19】

組成物であって、センス鎖およびアンチセンス鎖を含むsiRNAへとコンジュゲートされた、1つまたはそれ以上のFN3ドメインを含む組成物。

【請求項20】

siRNAは、修飾ヌクレオ塩基を含有しない、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

siRNAは、リンカーをさらに含む、請求項19または20に記載の組成物。

30

【請求項22】

リンカーは、センス鎖またはアンチセンス鎖へと共有結合的に接合されている、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

リンカーは、センス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端または3'末端へと接合されている、請求項21または22に記載の組成物。

【請求項24】

siRNAは、センス鎖またはアンチセンス鎖上のビニルホスホン酸修飾をさらに含む、請求項19～23のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項25】

ビニルホスホン酸修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端または3'末端へと接合されている、請求項24に記載の組成物。

40

【請求項26】

センス鎖は、配列番号10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、600、602、604、606、608、610、612、614、616、618、620、622、624、626、628、630、632、634、636、638、640、642、644、646、648、650、652、654、656、658、660、662、664、666、668、670、672、674、

50

676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、696、698、700、702、704、706、801～860、921～980の配列、または表1A、表1B、もしくは表2に明示された配列を含む、請求項19～25のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項27】

アンチセンス鎖は、配列番号11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、690、691、693、695、697、699、701、703、705、707、861～920、981～1042の配列、または表1A、表1B、もしくは表2に明示された配列を含む、請求項19～25のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項28】

s iRNA分子は、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH、II、JJ、KK、LL、MM、NN、OO、PP、QQ、RR、SS、TT、UU、VV、WW、XX、YY、ZZ、AAA、BBB、CCC、DDD、EEE、FFF、GGG、HHH、III、JJJ、KKK、LLL、MMM、NNN、OOO、PPP、QQQ、RRR、SSS、TTT、UUU、VVV、WWW、XXX、YYY、ZZZ、AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEE、FFFF、GGGG、HHHH、IIII、JJJJ、KKKK、LLLL、MMMM、NNNN、OOOO、PPPPのs iRNA対、または表1A、表1B、もしくは表2に明示されたs iRNA対を含む、請求項19～25のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項29】

表3に明示されたリンカーおよび／またはビニルホスホン酸修飾を伴う、表2に提示されたs iRNA対を含む、請求項19～25のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項30】

FN3ドメインは、FN3ドメイン上のシステインを介して、s iRNA分子へとコンジュゲートされている、請求項19～29のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項31】

システインは、本明細書に記載される位置にある、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

FN3ドメイン内のシステインは、米国特許第10,196,446号の配列番号1に基づくFN3ドメインの残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、または93に対応する位置にある、請求項30または31に記載の組成物。

40

【請求項33】

システインは、残基6、53、または88に対応する位置に配置される、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

1つまたはそれ以上のFN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインを含む、請求項19～33のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項35】

FN3ドメインは、配列番号509、708、および710からなる群から選択される配列を有する、請求項19～34のいずれか1項に記載の組成物。

50

【請求項 36】

1つまたはそれ以上のFN3ドメインは、CD71に結合するFN3ドメインを含み、ペプチドリinkerにより連結された、少なくとも2つのFN3ドメインを含む、請求項19～35のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 37】

第1のFN3ドメインと、第2のFN3ドメインとを含む、請求項36に記載の組成物。

【請求項 38】

第1のFN3ドメインと、第2のFN3ドメインとは、異なるタンパク質に結合する、請求項37に記載の組成物。

【請求項 39】

第1のFN3ドメインと、第2のFN3ドメインとは、同じタンパク質に結合する、請求項37に記載の組成物。

【請求項 40】

第1のFN3ドメインは、CD71に結合する、請求項36～39のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 41】

第2のFN3ドメインは、CD71に結合しない異なる標的に結合する、請求項36～39のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 42】

FN3ドメインは、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710の配列と、少なくとも87%同一であるか、またはこれと同一である配列を含む、請求項19～41のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 43】

第3のFN3ドメインをさらに含む、請求項19～42のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 44】

第3のFN3ドメインは、CD71またはアルブミンに結合するFN3ドメインである、請求項43に記載の組成物。

【請求項 45】

CD71に結合するFN3ドメインは、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、もしくは708～710、またはこれらの結合性断片を含むがこれらに限定されない、本明細書で提示されるアミノ酸配列を有する、請求項44に記載の組成物。

【請求項 46】

アルブミンに結合するFN3ドメインは、配列番号101～119、またはこれらの結合性断片を含むがこれらに限定されない、本明細書で提示されるアミノ酸配列を有する、請求項44に記載の組成物。

【請求項 47】

FN3ドメインは、本明細書で提示されるシステイン置換を有する、請求項45～46のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 48】

組成物であって、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ 、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - (X_3)_y$ 、 $(X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - (X_3)_y - C$ 、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - L - (X_3)_y$ 、または $(X_1)_n - (X_2)_q - L - X_4 - L - (X_3)_y - C$

[式中、

X_1 は、第1のFN3ドメインであり；

X_2 は、第2のFN3ドメインであり；

X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり；

10

20

30

40

50

L は、リンカーであり；

X₄ は、核酸分子であり；

C は、PEG などのポリマー、アルブミン結合性タンパク質であり；

n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である]

から選択される式を有する組成物。

【請求項 49】

X₁ と、X₂ と、X₃ とは、同じ標的タンパク質、または異なる標的タンパク質に結合する、請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 50】

y は、0 である、請求項 48 または 49 に記載の組成物。

10

【請求項 51】

n は、1 であり、q は、0 であり、y は、0 である、請求項 48 または 49 に記載の組成物。

【請求項 52】

n は、1 であり、q は、1 であり、y は、0 である、請求項 48 または 49 に記載の組成物。

【請求項 53】

n は、1 であり、q は、1 であり、y は、1 である、請求項 48 または 49 に記載の組成物。

【請求項 54】

第 3 の FN3 ドメインは、X₃ を伴わない分子と比較して、分子全体としての半減期を延長する、請求項 48～53 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 55】

第 3 の FN3 ドメインは、アルブミンに結合する FN3 ドメインである、請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 56】

リンカーは、本明細書で提示されるリンカーである、請求項 48～55 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 57】

FN3 ドメインは、ペプチドリinkerにより接続されている、請求項 48～56 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 58】

ペプチドリinkerは、(GS)₂、(配列番号 720)、(GGGS)₂ (配列番号 721)、(GGGGS)₅ (配列番号 722)、(AP)₂₋₂₀、(AP)₂ (配列番号 723)、(AP)₅ (配列番号 724)、(AP)₁₀ (配列番号 725)、(AP)₂₀ (配列番号 726)、および A(EAAAK)₅AAA (配列番号 727)、または (EAAAK)₁₋₅ (配列番号 728)、またはこれらの任意の組合せである、請求項 57 に記載の組成物。

【請求項 59】

第 1 の FN3 ドメイン、第 2 の FN3 ドメイン、または第 3 の FN3 ドメインは、本明細書で提示されるアミノ酸配列を有する、請求項 48～58 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 60】

X₄ は、siRNA 分子である、請求項 48～59 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 61】

siRNA 分子は、本明細書で提示される siRNA 分子である、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 62】

siRNA 分子は、GYS1 の発現を低減する siRNA である、請求項 61 に記載の組成物。

50

【請求項 6 3】

s i R N A 分子は、G Y S 1 の発現を特異的に低減する s i R N A である、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

s i R N A 分子は、G Y S 1 の発現を低減するが、他の R N A の発現はそれほど低減しない s i R N A である、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

s i R N A 分子は、本明細書で記載される通り、濃度を 2 0 0 n M 以下とする、本明細書で記載されるアッセイにおいて、G Y S 1 の発現を低減するが、他の R N A の発現は 5 0 % を超えて低減しない s i R N A である、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

s i R N A 分子は、G Y S 1 の発現を低減し、G Y S 1 タンパク質の濃度を低減する s i R N A である、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 7】

s i R N A 分子は、G Y S 1 の発現を低減し、細胞内のグリコーゲン濃度を低減する s i R N A である、請求項 6 1 に記載の組成物。

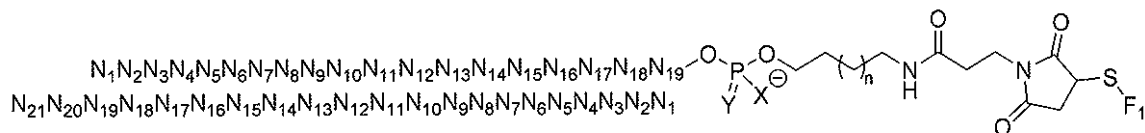
【請求項 6 8】

細胞は、筋細胞または心臓細胞である、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 9】

s i R N A は、以下の式：

【化 2】



に提示される s i R N A 対である、請求項 5 4 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

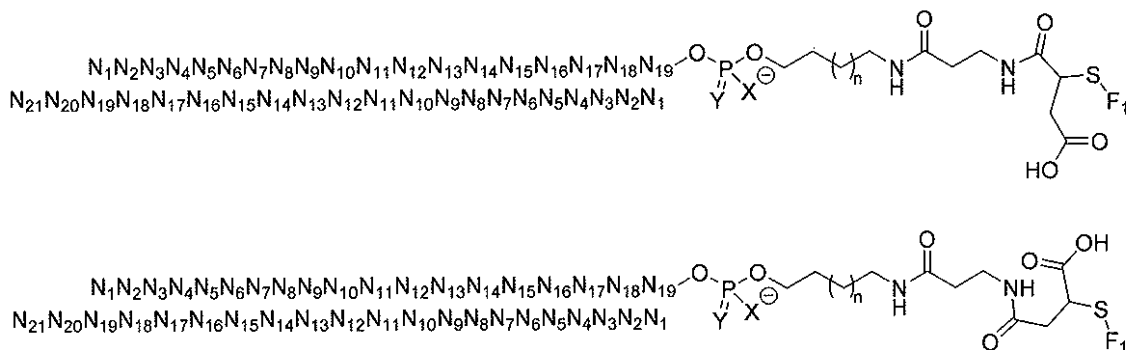
【請求項 7 0】

アンチセンス鎖の N 1 は、ビニルホスホン酸修飾を含む、請求項 6 9 に記載の組成物。

【請求項 7 1】

マレイミドは、以下の化合物：

【化 3】



の混合物、または各化合物の一方もしくは両方、または化合物のうちの 1 つだけを形成するように加水分解されている、請求項 6 9 に記載の組成物。

【請求項 7 2】

s i R N A は、本明細書で提示される s i R N A 対、または表 1 A、表 1 B、もしくは表 2 に提示される s i R N A 対である、請求項 4 8 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 3】

10

20

30

40

50

式： A_1-B_1 [式中、 A_1 は、 $(C)_n-(L_1)_t-X_S$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS}-(L_2)_q-(F_1)_y$ の式を有し、
 C は、PEGなどのポリマー、アルブミン結合性タンパク質であり；
 L_1 および L_2 は、各々独立に、リンカーであり；
 X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5'-3'オリゴヌクレオチドであり；
 X_{AS} は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3'-5'オリゴヌクレオチドであり；
 F_1 は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり；
 n 、 t 、 q 、および y は、各々独立に、0または1であり；
 X_S および X_{AS} は、組成物／複合体を形成するように、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成する]
 を有する組成物。

10

【請求項74】

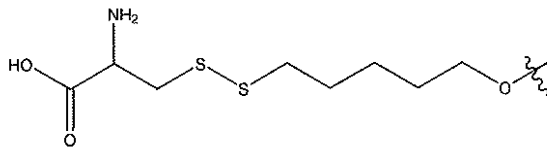
式： A_1-B_1 [式中、 A_1 は、 $(F_1)_n-(L_1)_t-X_S$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS}-(L_2)_q-(C)_y$ の式を有し、
 C は、PEGなどのポリマー、アルブミン結合性タンパク質であり；
 L_1 および L_2 は、各々独立に、リンカーであり；
 X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5'-3'オリゴヌクレオチドであり；
 X_{AS} は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3'-5'オリゴヌクレオチドであり；
 F_1 は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり；
 n 、 t 、 q 、および y は、各々独立に、0または1であり；
 X_S および X_{AS} は、組成物／複合体を形成するように、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成する]
 を有する組成物。

20

【請求項75】

L_1 は、式：

【化4】



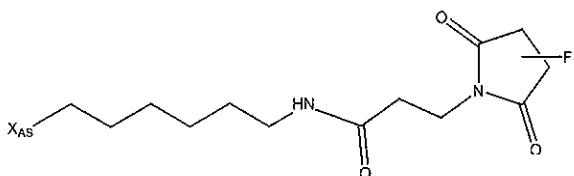
30

を有する、請求項73または74に記載の組成物。

【請求項76】

L_2 は、式：

【化5】



40

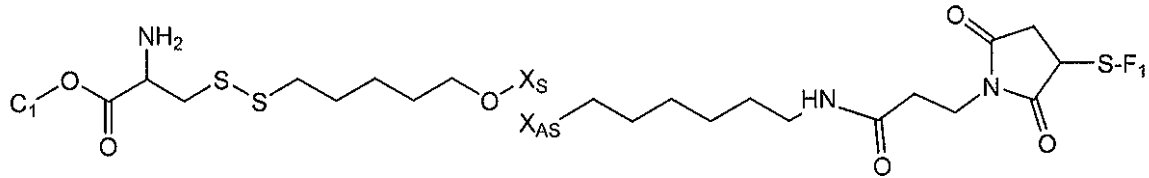
を有する、請求項73または74に記載の組成物。

【請求項77】

A_1-B_1 は、

50

【化 6】

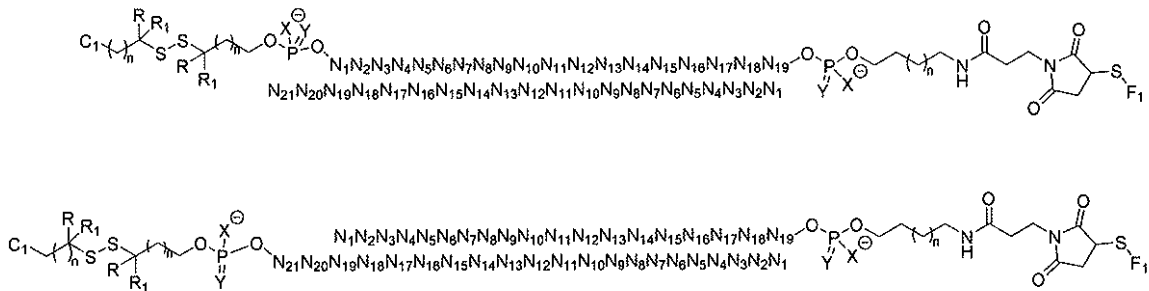


の式を有する、請求項 73 または 74 に記載の組成物。

【請求項 78】

A 1 - B 1 は、

【化 7】



の式を有する、請求項 73 または 74 に記載の組成物。

【請求項 79】

F₁ は、(X₁)_n - (X₂)_q - (X₃)_y の式 [式中、X₁ は、第 1 の FN3 ドメインであり；X₂ は、第 2 の FN3 ドメインであり；X₃ は、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり；n、q、および y は、n、q、および y のうちの少なくとも 1 つが、1 であることを条件として、各々独立に、0 または 1 である] を有するポリペプチドを含む、請求項 73 または 74 に記載の組成物。

【請求項 80】

X₁ は、FN3 の CD71 結合性ドメインである、請求項 73 または 74 に記載の組成物。

【請求項 81】

X₂ は、FN3 の CD71 結合性ドメインである、請求項 73 または 74 に記載の組成物。

【請求項 82】

X₃ は、ヒト血清アルブミンに結合する FN3 ドメインである、請求項 73 または 74 に記載の組成物。

【請求項 83】

X₃ は、タンパク質の半減期を延長するエフェクター機能を伴わない Fc ドメインである、請求項 73 または 74 に記載の組成物。

【請求項 84】

X_S は、配列番号 10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、600、602、604、606、608、610、612、614、616、618、620、622、624、626、628、630、632、634、636、638、640、642、644、646、648、650、652、654、656、658、660、662、664、666、668、670、672、674、676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、69

10

20

30

40

50

6、698、700、702、704、706、801～860、921～980の配列、または表1A、表1B、もしくは表2に明示された配列を含む、請求項73～83のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項85】

X_{AS}は、配列番号11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、601、603、605、607、609、611、613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、659、661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、690、691、693、695、697、699、701、703、705、707、861～920、981～1042の配列、または表1A、表1B、もしくは表2に明示された配列を含む、請求項73～83のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項86】

X_SおよびX_{AS}は、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、BB、CC、DD、EE、FF、GG、HH、II、JJ、KK、LL、MM、NN、OO、PP、QQ、RR、SS、TT、UU、VV、WW、XX、YY、ZZ、AAA、BBB、CCC、DDD、EEE、FFF、GGG、HHH、III、JJJ、KKK、LLL、MMM、NNN、OOO、PPP、QQQ、RRR、SSS、TTT、UUU、VVV、WWW、XXX、YYY、ZZZ、AAAA、BBBB、CCCC、DDDD、EEEE、FFFF、GGGG、HHHH、IIII、JJJJ、KKKK、LLLL、MMMM、NNNN、OOOO、PPPP、または表1A、表1B、もしくは表2に明示されたs i R N A対からなる群から選択されるs i R N A対を形成する、請求項73～83のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項87】

F₁は、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710の配列と、少なくとも87%同一であるか、またはこれと同一である配列を含む、請求項73～83のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項88】

F₁は、アルブミンに結合するポリペプチドを含む、請求項73～83のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項89】

医薬組成物であって、請求項1～88のいずれか1項に記載の組成物を含む医薬組成物。

【請求項90】

キットであって、請求項1～88のいずれか1項に記載の組成物を含むキット。

【請求項91】

それを必要とする対象における、筋疾患、免疫疾患、がん、ポンペ病、または糖原病を処置する方法であって、対象へと、請求項1～88のいずれか1項に記載の組成物、または本明細書で提示される任意の組成物を投与する工程を含む方法。

40

【請求項92】

筋疾患、免疫疾患、がん、ポンペ病、または糖原病を処置するための医薬組成物または医薬の調製における、本明細書で提示される組成物、または請求項1～88のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項93】

筋疾患、免疫疾患、がん、ポンペ病、または糖原病を処置するための、本明細書で提示される組成物、または請求項1～88のいずれか1項に記載の組成物の使用。

50

【請求項 9 4】

細胞内の標的遺伝子の発現を低減する方法であって、細胞を、請求項 1～88 のいずれか 1 項に記載の組成物、または本明細書で提示される組成物と接触させる工程を含む方法。

【請求項 9 5】

標的遺伝子は、G Y S 1 である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

G Y S 1 は、突然変異を有する、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

s i R N A 分子を、対象における細胞へと送達する方法であって、対象へと、請求項 1～88 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む医薬組成物を投与する工程を含む方法。 10

【請求項 9 8】

細胞は、C D 7 1 陽性細胞である、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

細胞は、腫瘍細胞、肝細胞、筋細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、C N S 細胞、または血液脳関門内部の細胞である、請求項 9 7～98 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

s i R N A は、細胞内の標的遺伝子の発現を下方調節する、請求項 9 7～99 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

標的遺伝子の発現の下方調節は、約 99%、90～99%、50～90%、または 10～50% の低減を結果としてもたらす、請求項 1 0 0 に記載の方法。 20

【請求項 1 0 2】

標的遺伝子は、G Y S 1 である、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

G Y S 1 は、突然変異を有する、請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

標的遺伝子およびタンパク質の低減は、グリコーゲンの低減を結果としてもたらす、請求項 1 0 0～1 0 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

グリコーゲンの低減は、ポンペ病および任意の糖原病など、疾患状態の改善をもたらす、請求項 1 0 4 に記載の方法。 30

【請求項 1 0 6】

糖原病は、コーリー病またはフォーブズ病（G S D 3；グリコーゲン脱分枝酵素（A G L）欠損症）、マッカードル病（G S D 5；筋グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G M）欠損症）、I I 型糖尿病／糖尿病性腎症、G S D 1 2 であるアルドラーゼ A 欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（G S D 4；グリコーゲン脱分枝酵素（G B E 1）欠損症）、タルイ病（G S D 7；筋ホスホフルクトキナーゼ（P F K M）欠損症）、成人ポリグルコサン小体病、グリコーゲンシンターゼ（G Y S 2）欠損症（G S D 0）、グルコース 6-ホスファターゼ（G 6 P C／S L C 3 7 A 4）欠損症（G S D 1；フォンギールケ病）、ハース病（G S D 6；肝グリコーゲンホスホリラーゼ（P Y G L）欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ（P G A M 2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（P H K A 2／P H K B／P H K G 2／P H K A 1）欠損症（G S D 9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（P G A M 2）欠損症（G S D 1 0）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（L D H A）欠損症（G S D 1 1）、ファンコーニービッケル症候群（G S D 1 1；グルコース輸送体（G L U T 2）欠損症）、アルドラーゼ A 欠損症（G S D 1 2）、β-エノラーゼ（E N O 3）欠損症（G S D 1 3）、およびグリコゲニン-1（G Y G 1）欠損症（G S D 1 5）からなる群から選択される、請求項 9 1～93 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、参照によってそれらの全体を本明細書に組み入れる、2021年4月14日に出願された、米国特許仮出願第63/174,776号、2021年7月30日に出願された、米国特許仮出願第63/203,776号、および2022年3月28日に出願された、米国特許仮出願第63/324,437号に対する優先権を主張する。

【0002】

分野

本実施形態は、フィブロネクチンIII型ドメイン(FN3)へとコンジュゲートされているsiRNA分子、ならびに分子を作製および使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

治療用核酸は、例えば、低分子干渉RNA(siRNA)、マイクロRNA(miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激性核酸、アンチセンス、アンタゴミル、アンチミル、マイクロRNA模倣剤、スーパーミル、U1アダプター、およびアプタマーを含む。siRNAまたはmiRNAの場合、これらの核酸は、RNA干渉(RNAi)と称する過程を介して、特異的タンパク質の細胞内レベルを下方調節しうる。siRNA構築物およびmiRNA構築物は、標的タンパク質に対して方向付けられた、任意のヌクレオチド配列により合成されるので、RNAiの治療適用は、極めて広範である。現在のところ、siRNA構築物は、in vitroおよびin vivoモデルのいずれにおいても、標的タンパク質を特異的に下方調節する能力を示している。加えて、siRNA構築物は、現在のところ、臨床研究において査定されており、様々な疾患について承認されている。

【0004】

しかし、現在のところ、siRNA構築物が直面している2つの問題は、第1に、血漿中のヌクレアーゼによるそれらの消化に対する感受性であり、第2に、遊離siRNAまたはmiRNAとして全身投与された場合にそれらがRISC(RNA-induced silencing complex)に結合しうる細胞内コンパートメントへのアクセスを得るそれらの能力の限定である。コレステロールおよびPEG脂質など、他の脂質成分を伴うカチオン性脂質から形成される脂質ナノ粒子、炭水化物(GalNAc三量体など)など、ある特定の送達系が、細胞内への、オリゴヌクレオチドの取込みを容易とするのに使用されている。しかし、これらは、siRNAの、肝臓以外の組織内の、その意図された標的への、効率的、かつ、有効な送達に成功することが示されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

siRNAを、その意図される細胞標的へと送達するための組成物および方法が、依然として必要とされている。さらに、必要とされるものは、CD71に特異的に結合し、臨床使用のために特性が最適化されたFN3ドメイン、および受容体媒介性のCD71の内部化を介して、細胞内へのアクセスを可能とする、新規の治療剤のために、このような分子を使用する方法である。本実施形態は、これらの必要ならびに他の必要を満たす。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一部の実施形態では、CD71に結合するFN3ドメインタンパク質へとコンジュゲートされたsiRNAが提供される。

【0007】

一部の実施形態では、本明細書で提示される、任意のFN3ドメインのアミノ酸配列を含むFN3ドメインが提供される。一部の実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合する。一部の実施形態では、FN3ドメインは、CD71に特異的に結合する。

【0008】

一部の実施形態では、組成物は、可撓性リンカーなどのリンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含む。一部の実施形態では、2つのFN3ドメインは、異なる標的に結合する。一部の実施形態では、第1のFN3ドメインは、CD71に結合する。一部の実施形態では、第2のFN3ドメインは、CD71でない、異なる標的に結合する。

【0009】

本明細書の一部の実施形態では、dsRNA分子またはsiRNA分子などのオリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書で提示される修飾を伴うか、またはこれを伴わない、本明細書で提示される配列を有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、医薬組成物などの組成物により提供される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ポリペプチドへとコンジュゲートされる。

10

【0010】

一部の実施形態では、siRNA分子へとコンジュゲートされた、1つまたはそれ以上のFN3ドメインを含む組成物が提供される。

【0011】

一部の実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0012】

一部の実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、 C は、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン(ABD)であり； X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

20

【0013】

一部の実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4 - C$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり； C は、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン(ABD)であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

30

【0014】

一部の実施形態では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0015】

一部の実施形態では、 $C - X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 C は、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン(ABD)であり； X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、オリゴヌクレオチド分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

40

【0016】

一部の実施形態では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - C$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、

50

オリゴヌクレオチド分子であり；Cは、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン（ABD）であり；n、q、およびyは、各々独立に、0または1である」を有する組成物が提供される。

【0017】

一部の実施形態では、 $C-(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y$ の式〔式中、X1は、第1のFN3ドメインであり；X2は、第2のFN3ドメインであり；X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり；Lは、リンカーであり；X4は、オリゴヌクレオチド分子であり；Cは、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン（ABD）であり；n、q、およびyは、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

10

【0018】

一部の実施形態では、 $(X1)_n-(X2)_q[L-X4]-(X3)_y-C$ の式〔式中、X1は、第1のFN3ドメインであり；X2は、第2のFN3ドメインであり；X3は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり；Lは、リンカーであり；X4は、オリゴヌクレオチド分子であり；Cは、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン（ABD）であり；n、q、およびyは、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0019】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちの1つまたはそれ以上を含む医薬組成物が提供される。

20

【0020】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるポンペ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。

【0021】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォブズ病（GSD3；グリコーゲン脱分枝酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5；筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、GSD12であるアルドラーゼA欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4；グリコーゲン脱分枝酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7；筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC／SLC37A4）欠損症（GSD1；フォンギールケ病）、ハース病（GSD6；肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2／PHKB／PHKG2／PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症（GSD10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD11）、ファンコーニービッケル症候群（GSD11；グルコース輸送体（GLUT2）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（GSD12）、β-エノラーゼ（ENO3）欠損症（GSD13）、およびグリコゲニン-1（GYG1）欠損症（GSD15）からなる群から選択される。

30

40

【0022】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。

【0023】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における神経学的状態および／または脳腫瘍を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋委縮

50

性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギラン・バレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、偏頭痛、脳炎、敗血症、および重症筋無力症からなる群から選択される。

【0024】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における自己免疫疾患を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、1型糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、および免疫性血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。

10

【0025】

一部の実施形態では、がんを処置するための医薬組成物または医薬の調製における、本明細書で提示される組成物の使用が提供される。一部の実施形態では、がんは、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、胃がん、明細胞性腎細胞癌、明細胞性乳癌、明細胞性子宮内膜癌、明細胞性卵巣癌、明細胞性子宮癌、肝細胞癌、膵臓がん、前立腺がん、軟部組織がん、ユーイング肉腫、および非小細胞肺癌からなる群から選択される。

【0026】

一部の実施形態では、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する方法であって、細胞を、本明細書で提示される組成物と接触させる工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝細胞、筋細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、またはCNS細胞である。

20

【0027】

一部の実施形態では、骨格筋内の、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質を選択的に低減する方法が提供される。ある特定の実施形態では、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質は、肝臓内および／または腎臓内で低減されない。

【0028】

一部の実施形態では、本明細書で記載される、FN3ドメインをコードする単離ポリヌクレオチドが提供される。

【0029】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

30

【0030】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0031】

一部の実施形態では、FN3ドメインを作製する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、FN3ドメインをコードするか、またはこれを発現させるベクターを含む宿主細胞を培養する工程を含む。一部の実施形態では、方法は、FN3ドメインを精製する工程をさらに含む。一部の実施形態では、FN3ドメインは、CD71に結合する。

【0032】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子へと連結された、CD71に結合するFN3ドメインと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子を伴うか、またはこれを伴わない、FN3ドメインのうちの1つまたはそれ以上を含むキットが提供される。

40

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】 siRNAスクリーニングのために評価および検討された特性を表すフローチャートを示す図である。

【図2】 細胞が、siRNA対であるHHHをトランスフェクトされた後における、トランスクリプトームの変化を同定する、RNAシーケンシング実験についてのグラフであり、この場合、矢印は、GYS1転写物の、有意な減少を同定する。

50

【図3】プロテオームアレイにおいて、6,000を超える受容体を使用する、標的結合アッセイの結果を提示する図であり、この場合、データは、CD71が、FN3ドメインの排他的結合標的であることを裏付ける。

【図4】図4Aは、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、GYS1 mRNAの、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける図である。図4Bは、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、GYS1タンパク質の、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける図である。

【図5】3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用し、異なる標的(AHA-1)に対するsiRNAと比較されたGYS1ノックダウンが、骨格筋に、高度に特異的であることを裏付ける図である。

10

【図6】コンジュゲート(タグ付きタンパク質)の精製のための、Histrapクロマトグラムの例を示す図である。

【図7】コンジュゲート(タグなしタンパク質)の精製のための、HICクロマトグラムの例を示す図である。

【図8】コンジュゲート(タグ付き/タグなしタンパク質)の精製のための、イオン交換クロマトグラムの例を示す図である。

【図9】センチリン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートについての、解析用SECの例を示す図である。

【図10】コンジュゲートについての、SDS PAGEゲルの例を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0034】

内容が、そうでないことを、明らかに指示しない限りにおいて、本明細書および附属の特許請求の範囲で使用される、単数形の「ある(a)」「ある(an)」、および「その」は、複数形の指示対象を含む。したがって、例えば、「ある細胞」への言及は、2つまたはこれを超える細胞の組合せなどを含む。

【0035】

「フィブロネクチンIII型(FN3)ドメイン」(FN3ドメイン)とは、フィブロネクチン、テネイシン、細胞内細胞骨格タンパク質、サイトカイン受容体、および原核生物酵素を含むタンパク質内において、高頻度で生じるドメインを指す(BorkおよびDoolittle、Proc Nat Acad Sci USA、89:8990~8994、1992;Meinkeら、J Bacteriol、175:1910~1918、1993;Watanabeら、J Biol Chem、265:15659~15665、1990)。例示的FN3ドメインは、ヒトテネイシンC内に存在する、15の異なるFN3ドメイン、ヒトフィブロネクチン(FN)内に存在する、15の異なるFN3ドメイン、および、例えば、米国特許第8,278,419号において記載されている、非天然の合成FN3ドメインである。個々のFN3ドメインは、ドメイン番号およびタンパク質名、例えば、テネイシンの第3のFN3ドメイン(TN3)、またはフィブロネクチンの第10のFN3ドメイン(FN10)により言及される。本明細書を通して使用される通り、「センチリン」もまた、FN3ドメインを指す。さらに、本明細書で記載されるFN3ドメインは、可変重(V_H)鎖および/または可変軽(V_L)鎖の構造を有さないもので、抗体ではない。

30

40

【0036】

本明細書で使用された、「自己免疫疾患」とは、疾患状態(condition)、および個体の免疫応答が、個体自身の構成要素に対して方向付けられる結果として、非所望であり、かつ、しばしば消耗性である状態(condition)をもたらす状態(state)を指す。本明細書で使用された、「自己免疫疾患」は、自己免疫状態、自己免疫症候群などをさらに含むことが意図される。自己免疫疾患は、アジソン病、アレルギー、アレルギー性鼻炎、強直性脊椎炎、喘息、アテローム性動脈硬化、自己免疫性耳疾患、自己免疫性眼疾患、自己免疫萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免

50

疫性耳下腺炎、自己免疫性ブドウ膜炎、セリアック病、原発性胆汁性肝硬変、良性リンパ球性血管炎、COPD、大腸炎、冠動脈性心疾患、クローン病、糖尿病（Ⅰ型）、うつ病、Ⅰ型糖尿病および／またはⅡ型糖尿病を含む糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患（IBD）、組換え医薬品に対する免疫応答、例えば、血友病における第ⅤⅠⅠ因子、若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、男性不妊症、混合性結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、腫瘍科疾患、骨関節炎、疼痛、原発性粘液水腫、天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、乾癬、乾癬性関節炎、反応性関節炎、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、交感性眼炎、T細胞リンパ腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、精巣血管中心性T細胞リンパ腫、甲状腺炎、移植拒絶、潰瘍性大腸炎、自己免疫性ブドウ膜炎、および血管炎を含むがこれらに限定されない。自己免疫疾患は、罹患組織が、一次標的であり、場合によって、二次標的である状態を含むがこれらに限定されない。このような状態は、AIDS、アトピー性アレルギー、気管支喘息、湿疹、ハンセン病、統合失調症、遺伝性うつ病、組織／臓器移植、慢性疲労症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳卒中、自閉症、てんかん、アルツス現象、アナフィラキシー、およびアルコール／薬物中毒を含むがこれらに限定されない。

10

【0037】

「捕捉剤」という用語は、特定の種類の細胞に結合し、他の細胞からの、この細胞の分離を可能とする物質を指す。例示的捕捉剤は、磁気ビーズ、強磁性流体、封入試薬、特定の細胞型に結合する分子などである。

20

【0038】

「試料」とは、対象から分離された、同様の体液、細胞、または組織のほか、対象内に存在する、体液、細胞、または組織の回収物を指す。例示的試料は、組織生検、細針吸引、手術切除組織、臓器培養物、細胞培養物、ならびに血液、血清および漿液、血漿、リンパ、尿、唾液、囊胞液、涙液、糞便、痰、分泌性組織／臓器の粘液性分泌物、腔分泌物、腹水、胸水、心膜腔液、腹膜腔液、腹腔液、および他の体腔液、気管支洗浄により回収された体液、滑液、対象または生物学的供給源と接触した液体、例えば、細胞馴致培地または臓器馴致培地を含む細胞／臓器培養培地、および洗浄液などの体液である。

【0039】

「～を置換すること」または「置換された」または「～を突然変異させること」または「突然変異させられた」とは、ポリペプチド配列内またはポリヌクレオチド配列内の1つまたはそれ以上のアミノ酸またはヌクレオチドを、この配列の変異体を作成するように変更するか、欠失させるか、または挿入することを指す。

30

【0040】

「変異体」とは、1つまたはそれ以上の修飾、例えば、置換、挿入、または欠失により、参照ポリペプチドまたは参照ポリヌクレオチドと異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指す。

【0041】

「～に特異的に結合する」または「～に特異的結合すること」とは、FN3ドメインが、約 1×10^{-6} Mもしくはこれ未満、例えば、約 1×10^{-7} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-8} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-9} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-10} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-11} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-12} Mもしくはこれ未満、または約 1×10^{-13} Mもしくはこれ未満の解離定数（ K_D ）で、CD71など、その標的に結合する能力を指す。代替的に、「～に特異的結合すること」とは、標準溶液ELISAアッセイにおいて、FN3ドメインが、その標的（例えば、CD71）に、陰性対照の、少なくとも5倍の強さで結合する能力を指す。特異的結合はまた、本明細書で記載され、図3に示された、プロテオームアレイを使用しても裏付けられる。一部の実施形態では、陰性対照は、CD71に結合しないFN3ドメインである。一部の実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、他の類縁の抗原、例えば、

40

50

Macaca Fascicularis (カニクイザル、cyno) または Pan troglodytes (チンパンジー) など、他の種 (相同体) に由来する、同じ所定の抗原に対する交差反応性を有しうる。

【0042】

「ライブラリー」とは、変異体のコレクションを指す。ライブラリーは、ポリペプチド変異体またはポリヌクレオチド変異体から構成される。

【0043】

「安定性」とは、それが、その通常の機能活性のうちの少なくとも1つ、例えば、CD71 など、所定の抗原への結合を保持するように、分子が、生理学的条件下で、フォールディング状態を維持する能力を指す。

【0044】

「CD71」とは、配列番号2または5のアミノ酸配列を有する、ヒトCD71タンパク質を指す。一部の実施形態では、配列番号2は、全長ヒトCD71タンパク質である。一部の実施形態では、配列番号5は、ヒトCD71の細胞外ドメインである。

【0045】

「Tencon」とは、配列番号1

L P A P K N L V V S E V T E D S L R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E
K V G E A I N L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R
S N P L S A E F T T

に示され、米国特許公開第2010/0216708号において記載されているコンセンサス配列を有する、合成フィブロネクチンIII型 (FN3) ドメインを指す。

【0046】

「がん細胞」または「腫瘍細胞」とは、新たな遺伝物質の取込みを必ずしも伴わない、自発性または誘導性の表現型変化を有する、in vivo、ex vivoにおける、がん性細胞、前がん性細胞、または形質転換細胞、および組織培養物中のこれらの細胞を指す。形質転換は、形質転換ウイルスによる感染、および新たなゲノム核酸の組込み、または外因性核酸の取込みから生じうるが、形質転換はまた、自発的に、または発がん物質への曝露後に生じる場合もあり、これにより、内因性遺伝子を突然変異させる場合もある。形質転換／がんは、例えば、in vitro、in vivo、およびex vivoなど、ヌードマウスなどの適切な動物宿主における、形状変化、細胞の不死化、増殖制御の異常、病巣形成、増殖、悪性腫瘍、腫瘍特異的マーカーレベル、浸潤性、腫瘍の増殖または抑制により例示される (Freshney、*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (3版、1994))。

【0047】

「樹状細胞」とは、適応免疫系において、重要な役割を果たす抗原提示細胞 (APC) の種類を指す。樹状細胞の主要な機能は、抗原を、Tリンパ球へと提示し、免疫応答を、直接的にまたは間接的に、さらにモジュレートしうるサイトカインを分泌することである。樹状細胞は、不活性Tリンパ球内、または休眠ナイーブTリンパ球内において、一次免疫応答を誘導する能力を有する。

【0048】

「免疫細胞」とは、リンパ球 (T細胞、B細胞、およびNK細胞)、好中球、または単球／マクロファージとして類別される、免疫系の細胞を指す。これらは、全ての種類の白血球である。

【0049】

「ベクター」とは、生体系内の複製が可能であるか、またはこのような系の間で移動されるポリヌクレオチドを指す。ベクターのポリヌクレオチドは、典型的に、生体系内のこれらのポリヌクレオチドの複製または維持を容易とするように機能する、複製起点、ポリアデニル化シグナル、または選択マーカーなどのエレメントを含有する。このような生体系の例は、細胞、ウイルス、動物、植物、およびベクターを複製することが可能な、生物

10

20

30

40

50

学的構成要素を利用する、再構成された生体系を含みうる。ベクターを含むポリヌクレオチドは、DNAの場合もあり、RNA分子の場合もあり、これらのハイブリッド体の場合もある。

【0050】

「発現ベクター」とは、生体系内、または発現ベクター内に存在するポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの翻訳を方向付けるように再構成された生体系内において利用されるベクターを指す。

【0051】

「ポリヌクレオチド」とは、糖リン酸骨格または他の同等の共有結合的化学反应により、共有結合的に連結されたヌクレオチド鎖を含む合成分子を指す。cDNAは、ポリヌクレオチドの典型例である。

【0052】

「ポリペプチド」または「タンパク質」とは、ポリペプチドを形成するように、ペプチド結合により連結された、少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を指す。約50アミノ酸未満の小型のポリペプチドは、「ペプチド」と称される。

【0053】

「～価」とは、分子内の抗原に特異的な、一定数の結合性部位の存在を指す。このように、「一価」、「二価」、「四価」、および「六価」とは、それぞれ、分子内の抗原に特異的な、1つ、2つ、4つ、および6つの結合性部位の存在を指す。

【0054】

「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」は、非ヒト霊長動物、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両性類、爬虫類など、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物を含む。注記される場合を除き、「患者」または「対象」という用語は、互換的に使用される。

【0055】

「単離された」とは、組換え細胞など、分子がその中で産生される系の他の構成要素から、実質的に分離および／または精製された分子（FN3ドメインなどの合成ポリヌクレオチドまたはポリペプチドなど）のほか、少なくとも1つの精製工程または単離工程にかけられたタンパク質の均質集団を指す。「単離FN3ドメイン」とは、他の細胞素材および／または化学物質を実質的に含まないFN3ドメインを指し、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の純度までなどの高純度まで単離されたFN3ドメインを包含する。

【0056】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子へと連結されたFN3ドメインを含むポリペプチドなどのポリペプチドを含む組成物が提供される。オリゴヌクレオチド分子は、例えば、siRNA分子でありうる。

【0057】

したがって、一部の実施形態では、siRNAは、標的遺伝子の発現を阻害することが可能な二本鎖RNAi（dsRNA）剤である。dsRNA剤は、センス鎖（パッセンジャー鎖）およびアンチセンス鎖（ガイド鎖）を含む。一部の実施形態では、dsRNA剤の各鎖は、12～40ヌクレオチドの長さの範囲でありうる。例えば、各鎖は、14～40ヌクレオチドの長さ、17～37ヌクレオチドの長さ、25～37ヌクレオチドの長さ、27～30ヌクレオチドの長さ、17～23ヌクレオチドの長さ、17～21ヌクレオチドの長さ、17～19ヌクレオチドの長さ、19～25ヌクレオチドの長さ、19～23ヌクレオチドの長さ、19～21ヌクレオチドの長さ、21～25ヌクレオチドの長さ、または21～23ヌクレオチドの長さでありうる。

【0058】

一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖は、典型的に、二重鎖dsRNAを形成する。dsRNA剤の二重鎖領域は、12～40ヌクレオチド対の長さでありうる

10

20

30

40

50

。例えば、二重鎖領域は、14～40ヌクレオチド対の長さ、17～30ヌクレオチド対の長さ、25～35ヌクレオチドの長さ、27～35ヌクレオチド対の長さ、17～23ヌクレオチド対の長さ、17～21ヌクレオチド対の長さ、17～19ヌクレオチド対の長さ、19～25ヌクレオチド対の長さ、19～23ヌクレオチド対の長さ、19～21ヌクレオチド対の長さ、21～25ヌクレオチド対の長さ、または21～23ヌクレオチド対の長さでありうる。別の例では、二重鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、および27ヌクレオチド対の長さから選択される。

【0059】

一部の実施形態では、dsRNAは、鎖の3'末端もしくは5'末端またはこれらの両末端において、dsRNA剤の、1つまたはそれ以上の突出領域および／またはキャッピング基を含む。突出は、1～10ヌクレオチドの長さ、1～6ヌクレオチドの長さ、例えば、2～6ヌクレオチドの長さ、1～5ヌクレオチドの長さ、2～5ヌクレオチドの長さ、1～4ヌクレオチドの長さ、2～4ヌクレオチドの長さ、1～3ヌクレオチドの長さ、2～3ヌクレオチドの長さ、または1～2ヌクレオチドの長さでありうる。突出は、一方の鎖が、他方の鎖より長いことの結果である場合もあり、同じ長さの2つの鎖が、ずらされていることの結果である場合もある。突出は、標的mRNAとミスマッチを形成する場合もあり、ターゲティングされる遺伝子配列と相補性である場合もあり、他の配列である場合もある。第1の鎖と、第2の鎖とはまた、例えば、ヘアピンを形成するように、さらなる塩基により接合される場合もあり、他の非塩基リンカーにより接合される場合もある。

【0060】

一部の実施形態では、dsRNA剤の突出領域内のヌクレオチドは、各々、独立に、2'-F、2'-O-メチル、2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-O-(2-メトキシエチル)、およびこれらの任意の組合せなどの2'-糖修飾ヌクレオチドを含むがこれらに限定されない、修飾ヌクレオチドの場合もあり、非修飾ヌクレオチドの場合もある。例えば、TT(UU)は、いずれかの鎖上のいずれかの末端について、突出配列でありうる。突出は、標的mRNAとミスマッチを形成する場合もあり、ターゲティングされる遺伝子配列と相補性である場合もあり、他の配列である場合もある。

【0061】

dsRNA剤のセンス鎖、アンチセンス鎖、またはこれらの両方の鎖における、5'突出または3'突出は、リン酸化される場合がある。一部の実施形態では、突出領域は、2つのヌクレオチドの間に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートを有する、2つのヌクレオチドを含有し、この場合、2つのヌクレオチドは、同じ場合もあり、異なる場合もある。一実施形態では、突出は、センス鎖、アンチセンス鎖、またはこれらの両方の鎖の3'末端に存在する。一実施形態では、この3'突出は、アンチセンス鎖内に存在する。一実施形態では、この3'突出は、センス鎖内に存在する。

【0062】

dsRNA剤は、その全体的安定性に影響を及ぼさずに、dsRNAの干渉活性を強化しうる、単一の突出だけを含む。例えば、一本鎖突出は、センス鎖の3'末端に、または、代替的に、アンチセンス鎖の3'末端に配置される。dsRNAはまた、アンチセンス鎖の5'末端（またはセンス鎖の3'末端）に配置された平滑末端を有する場合もあり、この逆の場合もある。一般に、dsRNAのアンチセンス鎖は、3'末端において、ヌクレオチド突出を有し、5'末端は、平滑末端である。理論に束縛されずに述べると、アンチセンス鎖の5'末端における非対称平滑末端およびアンチセンス鎖の3'末端突出は、RISCへの、ガイド鎖のローディングに好適である。例えば、単一突出は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長を含む。

【0063】

一部の実施形態では、dsRNA剤はまた、dsRNA二重鎖の両末端において、2つ

の平滑末端を有する場合もある。

【0064】

一部の実施形態では、dsRNA剤のセンス鎖内およびアンチセンス鎖内のあらゆるヌクレオチドは、修飾される場合がある。各ヌクレオチドは、非連結型リン酸酸素の一方もしくは両方、および／または連結型リン酸酸素のうちの1つもしくはそれ以上の、1つまたはそれ以上の変更を含みうる、同じであるか、または異なる修飾；リボース糖の構成要素、例えば、リボース糖上の2つのヒドロキシルの変更；リン酸部分の、「脱リン酸化」リンカーによる全面的置きかえ；天然に存在する塩基の修飾または置きかえ；ならびにリボース-リン酸骨格の置きかえまたは修飾により修飾される。

【0065】

一部の実施形態では、3'突出内または5'突出内の塩基の全部または一部は、例えば、本明細書で記載される修飾により修飾される。修飾は、例えば、リボース糖の2'位における、当技術分野で公知の修飾による修飾の使用、例えば、ヌクレオ塩基のリボ糖に代えた、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F)修飾デオキシリボヌクレオチド、または2'-O-メチル修飾デオキシリボヌクレオチドの使用、およびリン酸基内の修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾、ホスホロジチオエート修飾、ホスホン酸修飾、ホスホルアミデート修飾、またはメシルホスホルアミデート修飾を含みうる。突出は、標的配列と相同である必要はない。

【0066】

一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-デオキシ、または2'-フルオロにより、独立に修飾される。鎖は、1つを超える修飾を含有しうる。一実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロにより、独立に修飾される。

【0067】

一部の実施形態では、少なくとも2つの異なる修飾は、典型的に、センス鎖上およびアンチセンス鎖上に存在する。これらの2つの修飾は、2'-デオキシ修飾、2'-O-メチル修飾、もしくは2'-フルオロ修飾、非環状ヌクレオチド、または他の修飾でありうる。

【0068】

一実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖は、各々、2'-フルオロ、2'-O-メチル、または2'-デオキシから選択される、異なる形で修飾された、2つのヌクレオチドを含む。

【0069】

dsRNA剤は、少なくとも1つのホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結をさらに含みうる。ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結修飾は、鎖の任意の位置における、センス鎖もしくはアンチセンス鎖、またはこれらの両方の、任意のヌクレオチド上で生じうる。例えば、ヌクレオチド間連結の修飾は、センス鎖上および／またはアンチセンス鎖上の、あらゆるヌクレオチド上で生じる場合もあり；各ヌクレオチド間連結修飾は、センス鎖上またはアンチセンス鎖上において、交互パターンで生じる場合もあり；センス鎖またはアンチセンス鎖は、いずれもが、ヌクレオチド間連結の修飾を、交互パターンで含む。センス鎖上のヌクレオチド間連結の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じ場合もあり、異なる場合もあり、センス鎖上のヌクレオチド間連結の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間連結の修飾の交互パターンと比べて、シフトを有する場合もある。

【0070】

一部の実施形態では、dsRNA剤は、突出領域内に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結修飾を含む。例えば、突出領域は、2つのヌク

10

20

30

40

50

レオチドの間に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結を有する、2つのヌクレオチドを含む。ヌクレオチド間連結修飾はまた、二重鎖領域内の末端対合ヌクレオチドで、突出ヌクレオチドを連結するようにも施される。例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、または全ての突出ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結を介して連結されるが、場合により、突出ヌクレオチドを、突出ヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドと連結する、さらなるホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結も存在しうる。例えば、3つの末端ヌクレオチドの間に、少なくとも2つのホスホロチオエートによるヌクレオチド間連結が存在する場合があります、この場合、3つのヌクレオチドのうちの2つは、突出ヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、突出ヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドである。一部の実施形態では、これらの3つの末端ヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端にある場合がある。

10

【0071】

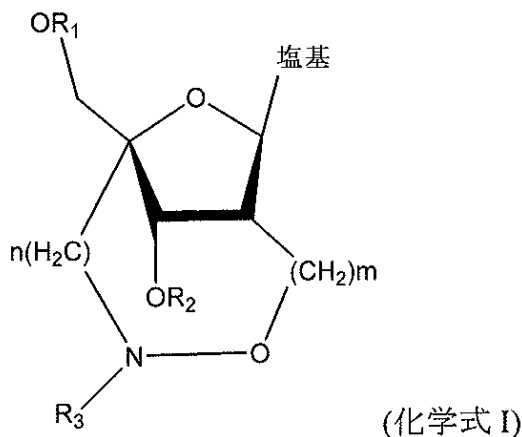
一部の実施形態では、dsRNA組成物は、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第7,427,672号に記載された、修飾塩基またはヌクレオシド類似体により連結される。一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、本明細書で記載される式で、リンカーまたはLと称される。

20

【0072】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Iに示される構造およびその塩：

【化1】



30

〔式中、塩基は、場合により、置換基を有する、芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、R₁およびR₂は、同一であるか、または異なり、各々は、水素原子、核酸合成のためのヒドロキシル基に対する保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラールキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基により保護されたリン酸基、または-P(R₄)R₅〔式中、R₄およびR₅は、同一であるか、または異なり、各々は、ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基により保護されたヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基により保護されたメルカプト基、アミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルコキシ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキルチオ基、1つ～6つの炭素原子を有するシアノアルコキシ基、または1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基により置換されたアミノ基を表し、R₃は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラールキル基、アシル基、スルホニル基、または機能的分子単位置換基を表し、mは、0～2

40

50

の整数を表示し、 n は、 $0 \sim 3$ の整数を表示する]を表す]を有する。一部の実施形態では、 m および n は、 0 である。

【0073】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、 R_1 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、またはシアノ基、またはシリル基により置換されたアリール環を有する、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基である]において示される構造およびその塩を有する。

【0074】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または $tert$ -ブチルジフェニルシリル基である]において示される構造およびその塩を有する。

【0075】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基により保護されたリン酸基により置換されたアリール環を有する、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基である]において示される構造およびその塩を有する。

【0076】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、 $tert$ -ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OCH_2CH_2CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または2-クロロフェニル基もしくは4-クロロフェニルリン酸基である]において示される構造およびその塩を有する。

【0077】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルケニル基、6つ～14の炭素原子を有するアリール基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、メタンスルホニル基もしくは p -トルエンスルホニル基などの低級脂肪族スルホニル基もしくは芳香族スルホニル基、アセチル基など、1つ～5つの炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である]において示される構造およびその塩を有する。

【0078】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、 R_3 としての機能的分子単位置換基は、蛍光標識化分子もしくは化学発光標識化分子、核酸切断活性官能基、または細胞内シグナルペプチドもしくは核移行シグナルペプチドである]において示される構造およびその塩を有する。

【0079】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、塩基は、以下の α 基：ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基により保護されたヒドロキシル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基により保護されたメルカプト基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基により置換されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、お

10

20

30

40

50

よびハロゲン原子から選択される置換基を有する、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、もしくはプリン-9-イル基、または2-オキソピリミジン-1-イル基である]において示される構造およびその塩を有する。

【0080】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Ⅰ[式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル(すなわち、アデニル)、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する6-アミノプリン-9-イル、2,6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(すなわち、グアニル)、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2,6-ジメトキシプリン-9-イル、2,6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル(すなわち、シトシル)、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル(すなわち、ウラシル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル(すなわち、チミル)、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル(すなわち、5-メチルシトシル)、または核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イルである]において示される構造およびその塩を有する。

【0081】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Ⅰ[式中、mは、0であり、nは、1である]において示される構造およびその塩を有する。

【0082】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、オリゴヌクレオチド類似体内の、それぞれのヌクレオシドの間の連結の形態が、天然核酸内のホスホジエステル結合と同一のホスホジエステル結合 $[-OP(O_2^-)O-]$ 以外に、1つもしくは2つまたはこれを超えるホスホロチオエート結合 $[-OP(O)(S^-)O-]$ 、ホスホロジチオエート結合 $[-O_2PS_2-]$ 、ホスホン酸結合 $[-PO(OH)_2-]$ 、ホスホルアミデート結合 $[-O=P(OH)_2-]$ 、またはメシルホスホルアミデート結合 $[-OP(O)(N)(SO_2)(CH_3)O-]$ を含有する場合があります、1つまたはそれ以上の種類の、これらの構造のうちの、2つまたはこれを超える構造が含有される場合、塩基は、これらの構造：

10

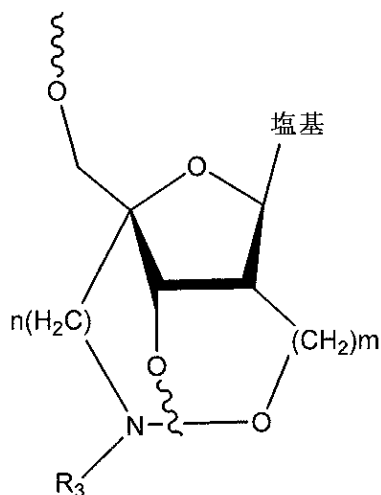
20

30

40

50

【化 2】



(化学式 II)

〔式中、塩基は、場合により、置換基を有する、芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、 R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、または機能的分子単位置換基を表し、 m は、 $0 \sim 2$ の整数を表示し、 n は、 $0 \sim 3$ の整数を表示する〕の間で、同一の場合もあり、異なる場合もあることを条件として、化学式 I I において示される構造、または薬学的に許容可能なその塩を有する、ヌクレオシド類似体の、1 つまたはそれ以上の種類の単位構造のうちの、1 つもしくは 2 つまたはこれを超える構造を含有する、DNA オリゴヌクレオチド類似体または RNA オリゴヌクレオチド類似体である。一部の実施形態では、 m および n は、 0 である。

【0083】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式 I I 〔式中、 R_1 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1 つ～3 つのアリール基により置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、またはシアノ基、またはシリル基により置換されたアリール環を有する、1 つ～3 つのアリール基により置換されたメチル基である〕において示される構造を有する。

【0084】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式 I I 〔式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または $tert$ -ブチルジフェニルシリル基である〕において示される構造を有する。

【0085】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式 I I 〔式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1 つ～3 つのアリール基により置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基により保護されたリン酸基により置換されたアリール環を有する、1 つ～3 つのアリール基により置換されたメチル基である〕において示される構造を有する。

【0086】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式 I I 〔式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、メタンスルホニル基、 p -トルエンスルホニル基、 $tert$ -ブチル

ジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OC_2H_5)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または2-クロロフェニル基もしくは4-クロロフェニルリン酸基である]において示される構造を有する。

【0087】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式II [式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルケニル基、6つ～14の炭素原子を有するアリール基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、メタンスルホニル基もしくはp-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族スルホニル基もしくは芳香族スルホニル基、アセチル基など、1つ～5つの炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である]において示される構造を有する。

10

【0088】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式II [式中、 R_3 としての機能的分子単位置換基は、蛍光標識化分子もしくは化学発光標識化分子、核酸切断活性官能基、または細胞内シグナルペプチドもしくは核移行シグナルペプチドである]において示される構造を有する。

【0089】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式II [式中、塩基は、以下の α 基：ヒドロキシシル基、核酸合成のための保護基により保護されたヒドロキシシル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基により保護されたメルカプト基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基により置換されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、およびハロゲン原子から選択される置換基を有する、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、もしくはプリン-9-イル基、または2-オキソピリミジン-1-イル基である]において示される構造を有する。

20

【0090】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式II [式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル (すなわち、アデニル)、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル (すなわち、グアニル)、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル (すなわち、シトシル)、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル (すなわち、ウラシル)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジ

30

40

50

ン-1-イル（すなわち、チミニル）、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、5-メチルシトシニル）、または核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである」において示される構造を有する。

【0091】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、mは、0であり、nは、1である〕において示される構造を有する。

【0092】

一部の実施形態では、本明細書で記載される組成物は、ポリマー（ポリマー部分C）をさらに含む。一部の場合に、ポリマーは、分枝状単量体もしくは非分枝状単量体の長鎖、および／または二次元もしくは三次元における、単量体の架橋ネットワークからなる、天然ポリマーまたは合成ポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、多糖、リグニン、ゴム、またはポリアルキレンオキシド（例えば、ポリエチレングリコール）を含む。一部の場合に、少なくとも1つのポリマーは、アルファ-ジヒドロキシルポリエチレングリコール、オメガ-ジヒドロキシルポリエチレングリコール、生体分解性ラクトンベースのポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート（PET、PETG）、ポリエチレンテレフタレート（PETE）、ポリテトラメチレングリコール（PTG）、またはポリウレタンのほか、これらの混合物を含むがこれらに限定されない。本明細書で使用される混合物は、同じ化合物中における、異なるポリマーの使用を指すほか、ブロックコポリマーを指す。場合によって、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも1つの区画が、別のポリマーの単量体から構築されるポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。一部の場合に、ポリマーは、PEGを含む。一部の場合に、ポリマーは、ポリエチレンイミド（PEI）またはヒドロキシエチルデンプン（HES）を含む。

10

20

【0093】

一部の場合に、Cは、PEG部分である。一部の場合に、PEG部分が、オリゴヌクレオチド分子の5'末端においてコンジュゲートされるのに対して、結合性部分は、オリゴヌクレオチド分子の3'末端においてコンジュゲートされる。一部の場合に、PEG部分が、オリゴヌクレオチド分子の3'末端においてコンジュゲートされるのに対して、結合性部分は、オリゴヌクレオチド分子の5'末端においてコンジュゲートされる。一部の場合に、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の内部部位へとコンジュゲートされる。一部の場合に、PEG部分、結合性部分、またはこれらの組合せは、オリゴヌクレオチド分子の内部部位へとコンジュゲートされる。一部の場合に、コンジュゲーションは、直接的コンジュゲーションである。一部の場合に、コンジュゲーションは、天然のライゲーションを介するコンジュゲーションである。

30

【0094】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、多分散化合物または単分散化合物である。一部の場合に、多分散材料は、平均値重量（重量平均）によるサイズ、および二分散性により特徴づけられる、分子量が異なる材料の二分散分布を含む。一部の場合に、単分散PEGは、1つのサイズの分子を含む。一部の実施形態では、Cは、多分散化ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）、または単分散化ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、表示の分子量は、ポリアルキレンオキシド分子、例えば、PEG分子の分子量の平均を表す。

40

【0095】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）の分子量は、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、

50

2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、
4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、
6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000
、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Da
aである。

【0096】

一部の実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の場合に、Cの分子量は、約200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1100 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1450 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2100 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3250 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3350 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3750 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4250 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4750 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約5000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約5500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約6000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約6500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約7000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約7500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約8000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約10,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約12,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約20,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約35,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約40,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約50,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約60,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約100,000 Daである。

10

20

30

40

50

。一部の場合に、Cの分子量は、約8000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約10,000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約12,000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約20,000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約35,000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約40,000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約50,000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約60,000Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約100,000Daである。

【0097】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、1つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマーPEGである、ディスクリートPEGである。一部の場合に、ディスクリートPEG（dPEG）は、2つ～60、2つ～50、または2つ～48の反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50、またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約2つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約3つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約4つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約5つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約6つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約7つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約8つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約9つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約10またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約11またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約12またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約13またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約14またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約15またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約16またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約17またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約18またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約19またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約20またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約22またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約24またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約26またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約28またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約30またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約35またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約40またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約42またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約48またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約50またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。場合によって、dPEGは、純粋（例えば、約95%、98%、99%、または99.5%）出発材料から、段階的に、単一分子量化合物として合成される。場合によって、dPEGは、平均分子量ではなく、特異的分子量を有する。場合によって、本明細書で記載されるdPEGは、Quantabio Biodesign, LMD製のdPEGである。

【0098】

一部の実施形態では、Cは、アルブミン結合性ドメインである。ある特定の態様では、アルブミン結合性ドメインは、アルブミン結合性ドメインが、会合しているか、または連結されたドメインまたは別の治療剤の半減期を延長するように、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）に特異的に結合する。一部の実施形態では、ヒト血清アルブミン結合性ドメインは、分子のN末端へと連結された、イニシエーターメチオニン（Met）を含む。一部の実施形態では、ヒト血清アルブミン結合性ドメインは、ドメインのC末端またはN末端へと連結されたシステイン（Cys）を含む。N末端Metおよび／またはC末端Cysの付加は、発現、および／またはPEG、Fc領域など、別の半減期延長分子でありうる別の分子とのコンジュゲーションを容易としうる。

【0099】

一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、表8に提示された、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメイン（タンパク質）は、単離アルブミン結合性ドメイン（タンパク質）である。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質が、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に対応する置換を有することを条件として、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、A10Vである。一部の実施形態では、置換は、A10G、A10L、A10I、A10T、またはA10Sである。一部の実施形態では、10位における置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。一部の実施形態では、単離アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と比較した場合に、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、または14の置換を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に対応する位置にある。一部の実施形態では、提供されるFN3ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、もしくは119の、残基位置6、11、22、25、26、52、53、61、88、もしくは6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、もしくは93位に対応する、少なくとも1つの残基位置、またはC末端において、システイン残基を含む。一連の位置が列挙されるが、各位置はまた、個別にも選出される。一部の実施形態では、システインは、6、53、または88位に対応する位置にある。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインのさらなる例は、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第10,925,932号において見出される。

【0100】

【表 1】

表 8

配列 番号	配列
101	MLPAPKNLVASRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
102	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
103	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFAIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
104	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNISYWEPGIGGEAIWL RVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
105	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAAYAEPGIGGEAIWL RVPGSRSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
106	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEAGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
107	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPAGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
108	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGAGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
109	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIAGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
110	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIAL RVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
111	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LAVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
112	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
113	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVAIHGVKGGASSPPLIARFTT
114	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIAGVKGGASSPPLIARFTT
115	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGSSPPLIARFTT
116	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASPPLIARFTT
117	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSAPLIARFTT
118	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLAARFTT
119	MLPAPKNLVVSRVTEDESARLSWTAPDAAFDSFNIAYWEPGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIAAFTT

【0101】

一部の実施形態では、dsRNA剤は、二重鎖内の標的とのミスマッチ、またはその組合せを含む。ミスマッチは、突出領域内で生じる場合もあり、二重鎖領域内で生じる場合もある。塩基対は、解離または溶解を促進するそれらの傾向に基づきランク付けされる（例えば、特定の対合についての、会合または解離の自由エネルギーに基づきランク付けされ、最近隣解析または同様の解析もまた、使用されるが、最も簡単な手法は、個別対ベースで、対を検討する手法である）。解離の促進に関して述べると：A：Uが、G：Cに対して優先され；G：Uが、G：Cに対して優先され；I：Cが、G：C（I＝イノシン）に対して優先される。ミスマッチ、例えば、非カノニカルな対合、またはカノニカルな対

合以外の対合（本明細書の他の箇所で記載される）が、カノニカルの（A：T、A：U、G：C）対合に対して優先され；ユニバーサル塩基を含む対合が、カノニカルの対合に対して優先される。

【0102】

一部の実施形態では、dsRNA剤は、センス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端におけるリン含有基を含みうる。5'末端リン含有基は、5'末端リン酸（5'-P）、5'末端ホスホロチオエート（5'-PS）、5'末端ホスホロジチオエート（5'-PTS）、5'末端ビニルホスホン酸（5'-VP）、5'末端メチルホスホン酸（MePhos）、5'末端メシルホスホルアミデート（5'-MsPA）、または5'-デオキシ-5'-C-マロニルでありうる。5'末端リン含有基が、5'末端ビニルホスホン酸（5'-VP）である場合、5'-VPは、trans-ビニルリン酸もしくはcis-ビニルリン酸などの5'-E-VP異性体、またはこれらの混合物でありうる。これらの修飾の代表的構造は、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第10,233,448号において見出される。

【0103】

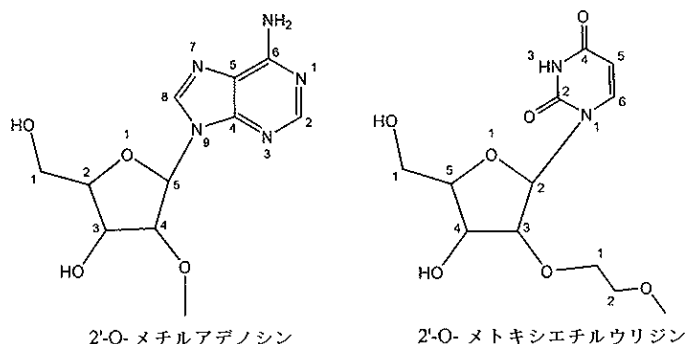
一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体または合成ヌクレオチド塩基は、リボース部分の2'ヒドロキシル基における修飾を伴う核酸を含む。一部の場合に、修飾は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、もしくはCN〔式中、Rは、アルキル部分である〕を含む。例示的アルキル部分は、鎖長C₁~C₁₀であり、直鎖状および分枝状のいずれでもある、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、tert-ブチルを含むがこれらに限定されない。一部の場合に、アルキル部分は、修飾をさらに含む。一部の場合に、修飾は、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシル基、ニトロ基、ニトロソ基、ニトリル基、複素環（例えば、イミダゾール、ヒドラジン、またはヒドロキシルアミノ）基、イソシアン酸もしくはシアン酸基、または硫黄含有基（例えば、スルホキシド、スルホン、スルフィド、およびジスルフィド）を含む。一部の場合に、アルキル部分は、O、S、N、Seなどのさらなるヘテロ原子をさらに含み、これらのヘテロ原子の各々は、上記で記載されたアルキル基により、さらに置換される。一部の場合に、複素環基の炭素は、窒素、酸素、または硫黄により置換される。一部の場合に、複素環置換は、モルホリノ、イミダゾール、およびピロリジノを含むがこれらに限定されない。

【0104】

一部の場合に、2'ヒドロキシル基における修飾は、2'-O-メチル修飾、または2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）修飾である。アデノシン分子の2'-O-メチル修飾、およびウリジンの2'-O-メトキシエチル修飾の例示的化学構造が、下記に例示される。

【0105】

【化3】



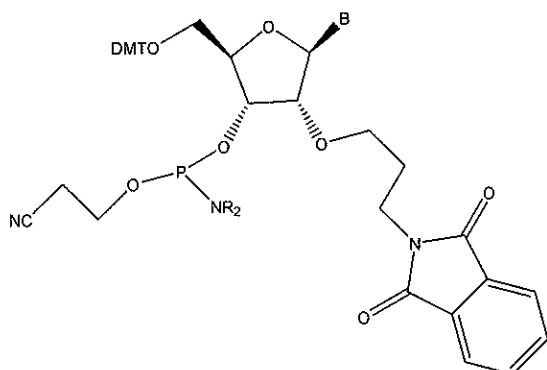
【0106】

一部の場合に、2'ヒドロキシル基における修飾は、プロピルリンカーを含む拡張アミ

ン基が、アミン基を、2' 酸素へと結合させる、2' -O-アミノプロピル修飾である。一部の場合に、この修飾は、アミン基に由来する、糖1つ当たり1つの陽性電荷を導入することにより、オリゴヌクレオチド分子の、リン酸に由来する全体的陰性電荷を中和し、これにより、その両性イオン特性に起因する細胞取込み特性を改善する。2' -O-アミノプロピルヌクレオシドホスホルアミダイトの例示的化学構造が、下記に例示される。

【0107】

【化4】



2'-O-アミノプロピルヌクレオシドホスホルアミダイト

10

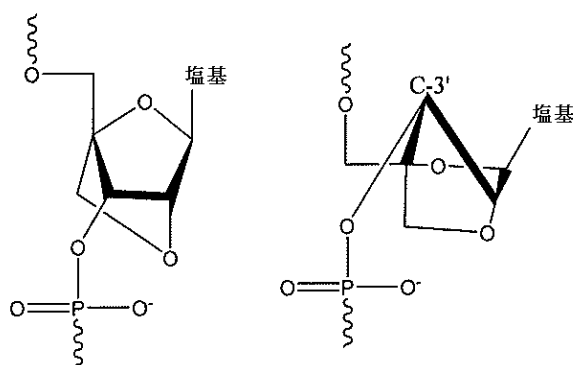
【0108】

一部の場合に、2' ヒドロキシル基における修飾は、2' 炭素において結合された酸素分子が、メチレン基により、4' 炭素へと連結され、これにより、2' -C, 4' -C-オキシメチレン結合型二環式リボヌクレオチド単量体を形成する、ロックトリボース修飾または架橋リボース修飾（例えば、ロック核酸またはLNA）である。LNAの例示的化学構造が、下記に例示される。左側に示された表示は、LNA単量体の化学結合度を強調する。右側に示された表示は、LNA単量体のフラノース環の、ロックト3'-endo (3E) コンフォメーションを強調する。

20

【0109】

【化5】



LNA (ロックト核酸)

30

40

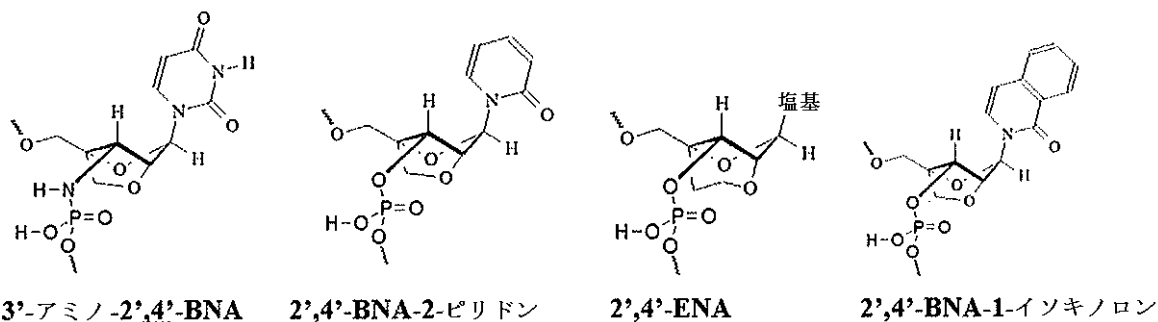
【0110】

一部の場合に、2' ヒドロキシル基における修飾は、例えば、糖コンフォメーションを、C3'-endo糖パッキングコンフォメーションへとロックする、2'-4'-エチレン架橋核酸などのエチレン核酸（ENA）を含む。ENAは、LNAもまた含む、修飾核酸の、架橋核酸クラスの一部である。ENAおよび架橋核酸の例示的化学構造が、下記に例示される。

【0111】

50

【化 6】



10

【0112】

一部の実施形態では、2'ヒドロキシル基における、さらなる修飾は、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)を含む。

【0113】

一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体は、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N,N-ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、1-メチルイノシン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジン、および5位において修飾を有する他のヌクレオチドである、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2,2-ジメチルグアノシン、5-メチルアミノエチルウリジン、5-メチルオキシウリジン、7-デアザアデノシンなどのデアザヌクレオチド、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、6-アゾチミジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジンおよび4-チオウリジンおよび2-チオシチジンなど、他のチオ塩基、ジヒドロウリジン、シュドウリジン、ケウオシン、アルケオシン、ナフチル基および置換ナフチル基、N6-メチルアデノシンなど、任意のO-アルキル化プリンおよびO-アルキル化ピリミジン、ならびにN-アルキル化プリンおよびN-アルキル化ピリミジン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、アミノフェノールまたは2,4,6-トリメトキシベンゼンなど、フェニル基および修飾フェニル基、G-クランプヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8-置換アデニンおよび8-置換グアニン、5-置換ウラシルおよび5-置換チミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシルアルキルヌクレオチド、カルボキシルアルキルアミノアルキルヌクレオチド、およびアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドなどであるがこれらに限定されない、修飾塩基を含む。修飾ヌクレオチドはまた、糖部分に関する修飾ヌクレオチドのほか、糖またはリボシルではないその類似体を有するヌクレオチドも含む。例えば、場合によって、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、および他の糖、複素環、または炭素環であるか、またはこれらに基づく。ヌクレオチドという用語はまた、当技術分野で、ユニバーサル塩基として公知のヌクレオチドも含む。例として述べると、ユニバーサル塩基は、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネブラリンを含むがこれらに限定されない。

20

30

40

【0114】

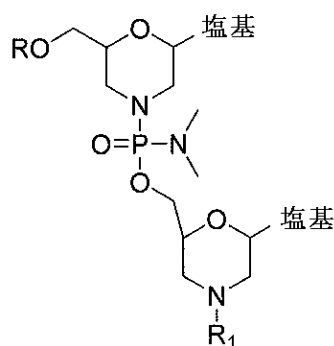
一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体は、モルホリノ、ペプチド核酸(PNA)、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、1',5'-アンヒドロヘキシトール核酸(HNA)、またはこれらの組合せをさらに含む。モルホリノ、またはホスホロジアミデートモルホリ

50

ノオリゴ（PMO）は、その構造が、通常、糖構造およびリン酸構造からの逸脱により、天然核酸構造を模倣する合成分子を含む。一部の場合に、5環員リボース環は、4つの炭素、1つの窒素、および1つの酸素を含有する、6環員モルホリノ環で置換される。場合によって、リボース単量体は、リン酸基ではなく、ホスホロジアミデート基により連結される。このような場合、骨格変更は、帯電オリゴヌクレオチドにより使用される細胞内送達剤などの細胞内送達剤の補助を伴わずに、細胞膜を通過することが可能な中性分子であるモルホリノをもたらす、全ての正電荷および負電荷を除去する。

【0115】

【化7】



モルホリノ

10

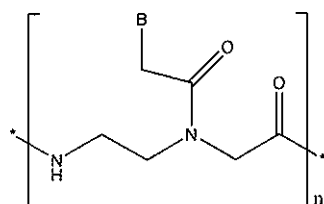
20

【0116】

一部の実施形態では、ペプチド核酸（PNA）は、糖環またはリン酸連結を含有せず、塩基は、接合され、オリゴグリシン様分子により、適切に隔てられるので、骨格電荷を消失させる。

【0117】

【化8】



PNA

30

【0118】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の修飾は、場合により、ヌクレオチド間連結において生じる。一部の場合に、修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート、メシルホスホルアミデート、ホスホロジチオエート、メチルホスホン酸、5'-アルキレンホスホン酸、5'-メチルホスホン酸、3'-アルキレンホスホン酸、ボロントリフルオリド 40
エート、3'-5'連結または2'-5'連結のボラノリン酸エステルおよびセレノリン酸エステル、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、水素ホスホン酸連結、アルキルホスホン酸、アルキルホスホノチオエート、アリールホスホノチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3'-アルキルホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、カーボネート、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチリミノ、チオアミデート、リボアセチル基を伴う連結、アミノエチルグリシン、シリル連結またはシロキサン連結、飽和もしくは不飽和であり、か 50

つ／または置換され、かつ／またはヘテロ原子を含有する、例えば、1つ～10の炭素の、ヘテロ原子を伴うか、またはこれを伴わない、アルキル連結またはシクロアルキル連結、モルホリノ構造、アミド、ポリアミドを伴う連結であって、塩基が、直接的に、または間接的に、アザ窒素骨格へと接合される連結、ならびにこれらの組合せを含むがこれらに限定されない。ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド (P S A S O) は、ホスホロチオエート連結を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。メシルホスホルアミデートアンチセンスオリゴヌクレオチド (M s P A A S O) は、メシルホスホルアミデート連結を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0119】

一部の場合に、修飾は、メチルホスホン酸修飾、メシルホスホルアミデート修飾、またはチオールホスホン酸修飾などのメチル修飾またはチオール修飾である。一部の場合に、修飾ヌクレオチドは、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイトを含むがこれらに限定されない。

10

【0120】

一部の場合に、修飾ヌクレオチドは、ヘキシトール核酸（または1', 5'-アンヒドロヘキシトール核酸 (H N A)）を含むがこれらに限定されない。

【0121】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の修飾は、場合により、リボース部分、リン酸骨格、およびヌクレオシドの修飾、または3'末端または5'末端における、ヌクレオチド類似体による修飾をさらに含む。例えば、3'末端は、場合により、3'カチオン基、または3'-3'連結を介する3'末端におけるヌクレオシドの反転を含む。別の代替法では、3'末端は、場合により、アミノアルキル基、例えば、3'-C5-アミノアルキルdTとコンジュゲートされる。さらなる代替法では、3'末端は、場合により、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位または脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。一部の場合に、5'末端は、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アルキルアミノ置換基とコンジュゲートされる。場合によって、5'末端は、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位または脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。

20

【0122】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体のうちの1つまたはそれ以上を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体のうちの、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) により修飾された、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、またはこれらの組合せを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) により修飾された、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、またはこれらの組合せから選択される、合成ヌクレオチド類似体のうちの、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6

30

40

50

つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える、チオールホスホン酸ヌクレオチドを含む。

10

【0123】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、約5%~約100%の修飾、約10%~約100%の修飾、約20%~約100%の修飾、約30%~約100%の修飾、約40%~約100%の修飾、約50%~約100%の修飾、約60%~約100%の修飾、約70%~約100%の修飾、約80%~約100%の修飾、および約90%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、100%の修飾を含む。

【0124】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約90%の修飾、約20%~約90%の修飾、約30%~約90%の修飾、約40%~約90%の修飾、約50%~約90%の修飾、約60%~約90%の修飾、約70%~約90%の修飾、および約80%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

20

【0125】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約80%の修飾、約20%~約80%の修飾、約30%~約80%の修飾、約40%~約80%の修飾、約50%~約80%の修飾、約60%~約80%の修飾、および約70%~約80%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0126】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約70%の修飾、約20%~約70%の修飾、約30%~約70%の修飾、約40%~約70%の修飾、約50%~約70%の修飾、および約60%~約70%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

30

【0127】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約60%の修飾、約20%~約60%の修飾、約30%~約60%の修飾、約40%~約60%の修飾、および約50%~約60%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0128】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約50%の修飾、約20%~約50%の修飾、約30%~約50%の修飾、および約40%~約50%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

40

【0129】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約40%の修飾、約20%~約40%の修飾、および約30%~約40%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0130】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約30%の修飾、および約20%~約30%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0131】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約20%の修飾を含む。

【0132】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約15%~約90%、約20%~約80%

50

、約 30 %～約 70 %、または約 40 %～約 60 %の修飾を含む。

【0133】

さらなる場合に、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約 15 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、または 99 %の修飾を含む。

【0134】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約 1 つ、約 2 つ、約 3 つ、約 4 つ、約 5 つ、約 6 つ、約 7 つ、約 8 つ、約 9 つ、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、または約 40 の修飾を含む。

10

【0135】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約 1 つ、約 2 つ、約 3 つ、約 4 つ、約 5 つ、約 6 つ、約 7 つ、約 8 つ、約 9 つ、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、または約 40 の修飾ヌクレオチドを含む。

【0136】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 5～約 100 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 100 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 5 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 10 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 15 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 20 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 25 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 30 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 35 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 40 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 45 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 50 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 55 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 60 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 65 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 70 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 75 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 80 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 85 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 90 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 95 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部

20

30

40

50

の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 96% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 97% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 98% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 99% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 100% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または 2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) により修飾された、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、またはこれらの組合せを含む。

【0137】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 1 つ～約 25 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 1 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 2 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 3 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 4 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 5 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 6 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 7 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 8 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 9 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 10 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 11 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 12 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 13 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 14 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 15 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 16 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 17 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 18 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 19 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 20 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 21 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオ

チド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 22 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 23 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 24 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 25 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 26 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 27 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 28 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 29 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 30 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 31 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 32 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 33 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 34 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 35 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 36 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 37 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 38 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 39 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 40 の修飾を含む。

10

20

【0138】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、1つのポリヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖を含み、第2のポリヌクレオチドが、アンチセンス鎖を含み、2つの個別のポリヌクレオチドからアセンブルされる。他の実施形態では、センス鎖は、場合によって、ポリヌクレオチドリンカーまたは非ヌクレオチドリンカーである、リンカー分子を介して、アンチセンス鎖へと接続される。

30

【0139】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、センス鎖内のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖内のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、センス鎖内に存在するピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含み、この場合、センス鎖内に存在するプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

40

【0140】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。

【0141】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'

50

ーデオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、この場合、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

【0142】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、複数の（例えば、2つまたはこれを超える、3つまたはこれを超える、4つまたはこれを超える、5つまたはこれを超える、6つまたはこれを超える、7つまたはこれを超える、8つまたはこれを超えるなど）、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、複数の2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つは、連続ヌクレオチドである。一部の実施形態では、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置される。一部の実施形態では、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端に配置される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、その5'末端および／もしくは3'末端、またはこれらの両方において、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドを含む。場合により、このような実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、ポリヌクレオチドの5'末端における、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドの3'末端、またはポリヌクレオチドの3'末端における、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドの5'末端において、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。これもまた場合により、このような少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、連続ヌクレオチドである。

【0143】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、プリンヌクレオチドである。一部の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドである。

【0144】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの1つが、5'末端に配置された、少なくとも2つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドを有するのに対し、別の鎖は、5'末端に配置された、少なくとも2つの2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドを有する。鎖が、5'末端に配置された、少なくとも2つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドを有する、一部の実施形態では、鎖はまた、少なくとも2つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドの3'末端において、少なくとも2つ、少なくとも3つの2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドも含む。一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの1つは、その5'末端および／または3'末端において、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドへと連結された、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つの2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、センス鎖お

よびアンチセンス鎖のうちの1つは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドと、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドとを交互に有する、少なくとも4つ、少なくとも5つのヌクレオチドを有する。

【0145】

一部の実施形態では、siRNAなどのオリゴヌクレオチド分子は、式I：

$N_1 N_2 N_3 N_4 N_5 N_6 N_7 N_8 N_9 N_{10} N_{11} N_{12} N_{13} N_{14} N_{15} N_{16} N_{17} N_{18} N_{19}$ ：センス鎖 (SS)

$N_{21} N_{20} N_{19} N_{18} N_{17} N_{16} N_{15} N_{14} N_{13} N_{12} N_{11} N_{10} N_9 N_8 N_7 N_6 N_5 N_4 N_3 N_2 N_1$ ：アンチセンス鎖 (AS)

〔式中、Nにより表される、各ヌクレオチドは、独立に、A、U、C、またはG、または本明細書で提示される修飾ヌクレオチド塩基などの修飾ヌクレオチド塩基である〕 10

に例示される式を有する。センス鎖およびアンチセンス鎖のヌクレオチドである N_1 は、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確さのために述べると、式Iは、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれにおいても、 N_1 、 N_2 、 N_3 などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同じである必要はなく、同じであることが意図されない。式Iに例示されたsiRNAであれば、標的配列と相補性であろう。

【0146】

例えば、一部の実施形態では、センス鎖は、 N_1 および N_2 における、ホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_3 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{12} 、および N_{17} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{13} 、 N_{14} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{18} 、および N_{19} における2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。 20

【0147】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、 N_1 へと接合されたビニルホスホン酸部分、 N_2 における、ホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を伴う2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{12} 、 N_{13} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{17} 、 N_{18} 、および N_{19} における、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_{14} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_{20} および N_{21} における、ホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0148】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、センス鎖は、センス鎖の、5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方において、末端キャップ部分を含む。他の実施形態では、末端キャップ部分は、逆位デオキシ脱塩基部分である。 30

【0149】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端において、グリセリル修飾を含む。

【0150】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖が、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または約1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含み；アンチセンス鎖 40 50

が、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約10であるか、もしくは、より具体的に述べると、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上である、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上である、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または末端キャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

10

20

【0151】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖が、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含み；アンチセンス鎖が、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25またはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25もしくはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはこれを超えるホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または末端キ

30

40

50

ャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

【0152】

一部の実施形態では、センス鎖は、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または約1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）、2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約10であるか、もしくは、より具体的に述べると、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または末端キャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

【0153】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖が、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25またはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含み；アンチセンス鎖が、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25またはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホ

ン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、10約1つ～約5、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結および／または末端キャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

【0154】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子の各鎖内に、約1つ～約25、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結を有する、化学修飾された短鎖干渉核酸分子である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端において、リン酸骨格修飾を含む。代替的におよび／または加えて、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端において、リン酸骨格修飾を含む。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホロチオエートである。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホロジチオエートである。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホン酸である。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホルアミデートである。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、メシルホスホルアミデートである。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホロチオエート骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホロジチオエート骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホン酸骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホルアミデート骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのメシルホスホルアミデート骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。

【0155】

別の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、2'-5'ヌクレオチド間連結を含む。一部の場合に、2'-5'ヌクレオチド間連結は、一方または両方の配列鎖の、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方にある。さらなる場合に、2'-5'ヌクレオチド間連結は、一方または両方の配列鎖内の、他の多様な位置に存在する、例えば、オリゴヌクレオチド分子の一方もしくは両方の鎖内のピリミジンヌクレオチドのあらゆるヌクレオチド間連結を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはこれを超えるヌクレオチド間連結は、2'-5'ヌクレオチド間連結を含むか、またはオリゴヌクレオチド分子の一方もしくは両方の鎖内のプリンヌクレオチドのあらゆるヌクレオチド間連結を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはこれを超えるヌクレオチド間連結は、2'-5'ヌクレオチド間連結を含む。

10

20

30

40

50

、 $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の
の場合に、 $2'$ – O –ジメチルアミノエチル($2'$ – O –DMAOE)修飾オリゴヌクレオ
チド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$
エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、 $2'$ – O –ジメチルアミノプロピル($2'$ – O –DMAP)修飾オリゴヌクレオチド分
子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキ
ソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、 $2'$ – O –ジメチルアミノエチルオキシエチル($2'$ – O –DMAEOE)修飾オリゴヌクレ
オチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ –
 $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の 10
場合に、 $2'$ – O – N –メチルアセトアミド($2'$ – O –NMA)修飾オリゴヌクレオチド
分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキ
ソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、
DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ
耐性)である。一部の場
合に、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性
(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、また
は $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、HNA修飾オリゴヌクレオ
チド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$
エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場 20
合に、モルホリノは、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$
– $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部
の場合に、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼに対して耐性(例えば、
RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$
エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、メチルホスホン酸ヌクレオチド修飾オ
リゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐
性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である
。一部の場
合に、チオールホスホン酸ヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌク
レアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアー
ゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、 $2'$ –フルオ 30
ロ– $N3$ – $P5'$ –ホスホルアミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ
耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、
または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、本明細書で記載される
、 $5'$ 側コンジュゲートは、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。一部の場
合に、
本明細書で記載される、 $3'$ 側コンジュゲートは、 $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ切断を
阻害する。

【0158】

一部の実施形態では、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体のうちの1つま
たはそれ以上は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、
結合アフィニティーを増大させている。 $2'$ – O –メチル、 $2'$ – O –メトキシエチル($2'$ 40
– O –MOE)、 $2'$ – O –アミノプロピル、 $2'$ –デオキシ、 $2'$ –デオキシ– $2'$ –フル
オロ、 $2'$ – O –アミノプロピル($2'$ – O –AP)、 $2'$ – O –ジメチルアミノエチル($2'$
– O –DMAOE)、 $2'$ – O –ジメチルアミノプロピル($2'$ – O –DMAP)、 $2'$
– O –ジメチルアミノエチルオキシエチル($2'$ – O –DMAEOE)、または $2'$ – O –
 N –メチルアセトアミド($2'$ – O –NMA)により修飾された、LNA、ENA、PNA
、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオ
チド、または $2'$ –フルオロ– $N3$ – $P5'$ –ホスホルアミダイトを含む、合成ヌクレオチド
類似体のうちの1つまたはそれ以上は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポ
リ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場
合に、 $2'$ – O –
メチル修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポ 50

リ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE) 修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-O-アミノプロピル修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-デオキシ修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP) 修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE) 修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP) 修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE) 修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) 修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、HNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、モルホリノ修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、メチルホスホン酸ヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、チオールホスホン酸ヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、2'-フルオロ-N³-P^{5'}-ホスホルアミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場合に、アフィニティーの増大は、K_dの低下、融点 (T_m) の上昇、またはこれらの組合せにより例示される。

【0159】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、キラル的に純粋な (または立体的に純粋な) ポリ核酸分子、または単一のエナンチオマーを含むポリ核酸分子である。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、L-ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、D-ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子組成物は、30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、もしくはこれ未満の、その鏡像エナンチオマーを含む。場合によっては、オリゴヌクレオチド分子組成物は、30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、もしくはこれ未満のラセミ混合物を含む。

【0160】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、アプタマーコンジュゲート部分を含むように、さらに修飾される。一部の場合に、アプタマーコンジュゲート部分は、DNAアプタマーコンジュゲート部分である。一部の場合に、アプタマーコンジュゲート部分は、循環抗体への接合のための特異的エピトープを提示する、特異的細胞表面標的および特異的細胞表面部分を認識するアプタマー部分を含む、Alphamerである。

【0161】

さらなる実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増大させるように修飾される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、RNA（例えば、siRNA）である。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増大させるように、上記で記載された修飾のうちの1つまたはそれ以上により修飾される。場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル修飾、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）修飾、2'-O-アミノプロピル修飾、2'-デオキシ修飾、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）修飾、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）修飾、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）修飾、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）修飾、または2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）修飾などにより、2'ヒドロキシル位置において修飾されるか、またはロックトリボースコンフォメーションもしくは架橋リボースコンフォメーション（例えば、LNAまたはENA）により、2'ヒドロキシル位置において修飾される。場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチルリボースおよび／または2'-O-メトキシエチルリボースにより修飾される。場合によって、オリゴヌクレオチド分子はまた、その安定性を増大させるように、モルホリノ、PNA、HNA、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、および／または2'-フルオロ-N³-P⁵-ホスホルアミダイトも含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、キラル的に純粋な（または立体的に純粋な）オリゴヌクレオチド分子である。一部の場合に、キラル的に純粋な（または立体的に純粋な）オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増大させるように修飾される。当業者には、送達のための安定性を増大させるのに適する、RNAへの修飾が明らかであろう。

【0162】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、2'修飾を含む。一部の実施形態では、センス鎖の5'末端から、3、7、8、9、12、および17位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾により修飾されない。一部の実施形態では、センス鎖の5'末端から、3、7、8、9、12、および17位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾により修飾される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から、2および14位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾により修飾されない。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から、2および14位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾により修飾される。一部の実施形態では、ヌクレオチドのうちのいずれかは、5'-ホスホロチオエート基による修飾をさらに含む。一部の実施形態では、センス鎖の5'末端から、1および2位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基による修飾により修飾される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から、1、2、20、および21位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基による修飾により修飾される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端は、ビニルホスホン酸修飾をさらに含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から1位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、ビニルホスホン酸修飾により修飾される。

【0163】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性のセンス領域およびアンチセン

ス領域を含む、二本鎖ポリヌクレオチド分子であり、この場合、アンチセンス領域は、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を有する。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、2つの個別のポリヌクレオチドからアセンブルされ、この場合、一方の鎖は、センス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖と、センス鎖とは、自己相補性であり（例えば、アンチセンス鎖と、センス鎖とが、二重鎖構造または二本鎖構造を形成する、例えば、二本鎖領域が、約19、20、21、22、23、またはこれを超える塩基対である場合など、各鎖は、他の鎖内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み）；アンチセンス鎖は、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス鎖は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を含む。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、単一のオリゴヌクレオチドからアセンブルされ、この場合、オリゴヌクレオチド分子の、自己相補性のセンス領域と、アンチセンス領域とは、核酸ベースのリンカー、または非核酸ベースのリンカーにより連結される。

10

20

30

40

50

【0164】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域を有し、二重鎖、非対称二重鎖、ヘアピン、または非対称ヘアピンによる二次構造を伴うポリヌクレオチドであり、この場合、アンチセンス領域は、個別の標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を有する。他の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域を含む、2つまたはこれを超えるループ構造およびステムを有する、環状一本鎖ポリヌクレオチドであり、この場合、アンチセンス領域は、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、RNAiを媒介することが可能である、活性のオリゴヌクレオチド分子を作出するように、*in vivo*または*in vitro*においてプロセッシングされる。さらなる場合に、オリゴヌクレオチド分子はまた、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド（例えば、ここで、このようなオリゴヌクレオチド分子は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列の、オリゴヌクレオチド分子内における存在を要求しない）も含み、この場合、一本鎖ポリヌクレオチドは、5'リン酸、または5'ニリン酸、3'ニリン酸などの末端リン酸基をさらに含む。

【0165】

一部の場合に、非対称ヘアピンは、アンチセンス領域と、ヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むループ部分と、センス領域が、アンチセンス領域と塩基対合し、ループとの二重鎖を形成するのに十分である、相補性ヌクレオチドを有する限りにおいて、アンチセンス領域より少数のヌクレオチドを含むセンス領域とを含む、直鎖状オリゴヌクレオチド分子である。例えば、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子は、細胞または*in vivo*系において、RNAiを媒介するのに十分な長さ（例えば、約19～約22のヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、約4つ～約8つのヌクレオチドを含むループ領域と、アンチセンス領域と相補性である、約3つ～約18のヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。場合によって、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子はまた、化学的に修飾された5'末端リン酸基も含む。さらなる場合に、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子のループ部分は、ヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカー分子、またはコンジュゲート分子を含む。

【0166】

一部の実施形態では、非対称二重鎖は、センス領域と、アンチセンス領域とを含む、2つの個別の鎖を有するオリゴヌクレオチド分子であり、この場合、センス領域は、センス領域が、アンチセンス領域と塩基対合し、二重鎖を形成するのに十分である、相補性ヌクレオチドを有する限りにおいて、アンチセンス領域より少数のヌクレオチドを含む。例え

ば、非対称二重鎖オリゴヌクレオチド分子は、細胞または *in vitro* 系において、RNAi を媒介するのに十分な長さ（例えば、約 19 ～ 約 22 のヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、アンチセンス領域と相補性である、約 3 つ ～ 約 19 のヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。

【0167】

場合によって、ユニバーサル塩基は、それらの間でほとんど識別されることなく、天然の DNA/RNA 塩基の各々と、塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を指す。ユニバーサル塩基の非限定例は、C-フェニル、C-ナフチル、および他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、ならびに当技術分野で公知の 3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および 6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体を含む。

【0168】

一部の実施形態では、dsRNA 剤は、5'リン酸化されるか、または 5'プライム末端において、ホスホリル類似体を含む。5'リン酸修飾は、RISC 媒介遺伝子サイレンシングと適合性である修飾を含む。適切な修飾は、5'-リン酸 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$) ; 5'-ニリン酸 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-三リン酸 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-グアノシンキャップ (7-メチル化または非メチル化) ($7\text{m}-\text{G}-\text{O}-5'-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-アデノシンキャップ (Appp)、および任意の修飾ヌクレオチドキャップ構造または非修飾ヌクレオチドキャップ構造 ($\text{N}-\text{O}-5'-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-モノチオリン酸 (ホスホロチオエート; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$) ; 5'-モノジチオリン酸 (ホスホロジチオエート; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-ホスホロチオレート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$) ; ホスホロジチオエート [$-\text{O}_2\text{PS}_2-$] ; ホスホン酸 [$-\text{PO}(\text{OH})_2-$] ; ホスホルアミデート [$-\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2-$] ; メシルホスホルアミデート ($\text{CH}_3)(\text{SO}_2)(\text{N})\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-5'$) ; 酸素/硫黄で置きかえられた、一リン酸、ニリン酸、および三リン酸の、任意のさらなる組合せ（例えば、5'-アルファーチオ三リン酸、5'-ガンマチオ三リン酸など）、5'-ホスホルアミデート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-アルキルホスホン酸 ($\text{R}=\text{アルキル}=\text{メチル}$ 、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$ 、5'-アルケニルホスホン酸（すなわち、ビニル、置換ビニル）、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$ ）、5'-アルキルエーテルホスホン酸 ($\text{R}=\text{アルキルエーテル}=\text{メトキシメチル}(\text{MeOCH}_2-)$ 、エトキシメチルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$) を含む。一部の実施形態では、修飾は、dsRNA のアンチセンス鎖中に施される。

【0169】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子の配列は、GYS1 の標的配列に対して、少なくとも 40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または 99.5% 相補性である。一部の実施形態では、GYS1 の標的配列は、標的配列の最初のヌクレオチドが、コード領域内の GYS1 mRNA 転写物内、または 5'非翻訳領域 (UTR) 内もしくは 3'UTR 内の、任意のヌクレオチドで始まる、GYS1 内の、約 10 ～ 50 塩基対の長さ、約 15 ～ 50 塩基対の長さ、15 ～ 40 塩基対の長さ、15 ～ 30 塩基対の長さ、または 15 ～ 25 塩基対の長さの配列の核酸配列である。例えば、標的配列の最初のヌクレオチドは、GYS1 mRNA のコード領域内または非コード領域 (5'側非翻訳領域または 3'側非翻訳領域) 内の核酸位置 (nal; 全長 GYS1 mRNA の 5'末端から始まる数であり、例えば、5'末端最初のヌクレオチドは、nal 1 である) 1、nal 2、nal 3、nal 4、nal 5、nal 6、nal 7、nal 8、nal 9、nal 10、nal 11、nal 12、nal 13、nal 14、nal 15、nal 1

10

20

30

40

50

5、nal 16、nal 17、または他の任意の核酸位置で始まるように選択される。一部の実施形態では、標的配列の最初のヌクレオチドは、nal 10~nal 15、nal 10~nal 20、nal 50~nal 60、nal 55~nal 65、nal 75~nal 85、nal 95~nal 105、nal 135~nal 145、nal 155~nal 165、nal 225~nal 235、nal 265~nal 275、nal 275~nal 245、nal 245~nal 255、nal 285~nal 335、nal 335~nal 345、nal 385~nal 395、nal 515~nal 525、nal 665~nal 675、nal 675~nal 685、nal 695~nal 705、nal 705~nal 715、nal 875~nal 885、nal 885~nal 895、nal 895~nal 905、nal 1035~nal 1045、nal 1045~nal 1055、nal 1125~nal 1135、nal 1135~nal 1145、nal 1145~nal 1155、nal 1155~nal 1165、nal 1125~nal 1135、nal 1155~nal 1165、nal 1225~nal 1235、nal 1235~nal 1245、nal 1275~nal 1245、nal 1245~nal 1255、nal 1265~nal 1275、nal 1125~nal 1135、nal 1155~nal 1165、nal 1225~nal 1235、nal 1235~nal 1245、nal 1275~nal 1245、nal 1245~nal 1255、nal 1265~nal 1275、nal 1275~nal 1285、nal 1335~nal 1345、nal 1345~nal 1355、nal 1525~nal 1535、nal 1535~nal 1545、nal 1605~nal 1615、nal 1615~c. 1625、nal 1625~nal 1635、nal 1635~1735、nal 1735~1835、nal 1835~1935、nal 1836~1856、nal 1935~2000、nal 2000~2100、nal 2100~2200、nal 2200~2260、nal 2260~2400、nal 2400~2500、nal 2500~2600、nal 2600~2700、nal 2700~2800、nal 2800~2500、nal 2500~2600、nal 2600~2700、nal 2700~2800、nal 2800~2860などの中の位置、またはこれらの間の位置で始まるように選択される。一部の実施形態では、GYS1 mRNAの配列は、NCBI参照配列：NM_002103として提示される。

10

20

30

40

【0170】

一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖剤は、それとハイブリダイズし、RNA干渉を介して、その発現を阻害するように、標的RNAと、100%相補性である。標的RNAは、細胞内で発現される、任意のRNAでありうる。別の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝細胞、筋細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、または中枢神経系細胞である。別の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖剤は、標的RNAと、少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、または少なくとも50%相補性である。一部の実施形態では、標的RNAは、GYS1 RNAである。一部の実施形態では、siRNA分子は、GYS1の発現を低減するsiRNAである。一部の実施形態では、siRNA分子は、本明細書で記載されるアッセイにおいて、本明細書で記載される通り、200nM以下の濃度で、GYSの発現を低減し、他のRNAの発現を、50%を超えて低減しないsiRNAである。

【0171】

siRNAは、任意の遺伝子、または目的のRNA（例えば、mRNA）転写物に対してターゲティングされる。

【0172】

50

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第10,233,448号において見出される。

【0173】

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、Andersonら、Nucleic Acids Research、2021、49(16)、9026～9041において見出される。

【0174】

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、PCT公開第WO2021/030778号において見出される。

【0175】

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、PCT公開第WO2021/030763号において見出される。

【0176】

一部の実施形態では、siRNAは、FN3ドメインなどのタンパク質へと連結される。siRNAは、同じ標的タンパク質、または異なる標的タンパク質に結合する、複数のFN3ドメインへと連結される。一部の実施形態では、リンカーは、センス鎖の、FN3ドメインへの連結を容易とするのに使用されるセンス鎖へと接合される。

【0177】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、siRNA分子などであるがこれらに限定されない核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。一部の実施形態では、 X_1 と、 X_2 と、 X_3 とは、異なる標的タンパク質に結合する。一部の実施形態では、 y は、0である。一部の実施形態では、 n は、1であり、 q は、0であり、 y は、0である。一部の実施形態では、 n は、1であり、 q は、1であり、 y は、0である。一部の実施形態では、 n は、1であり、 q は、1であり、 y は、1である。一部の実施形態では、第3のFN3ドメインは、 X_3 を伴わない分子と比較して、分子全体としての半減期を延長する。一部の実施形態では、半減期延長部分は、アルブミンに結合するFN3ドメインである。このようなFN3ドメインの例は、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第20170348397号、および米国特許第9,156,887号において記載されたFN3ドメインを含むがこれらに限定されない。FN3ドメインは、例えば、共有結合的相互作用を介して、他のサブユニットを組み込みうる。一部の実施形態では、FN3ドメインは、半減期延長部分をさらに含む。例示的半減期延長部分は、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合性タンパク質および／またはアルブミン結合性ドメイン、トランスフェリンならびにその断片および類似体、ならびにFc領域である。ヒトFc領域のアミノ酸配列は、周知であり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgEのFc領域を含む。一部の実施形態では、FN3ドメインは、本明細書で記載される半減期延長部分のうちのいずれかなどであるがこれらに限定されない、分子全体の半減期を延長する分子に結合する、第2のFN3ドメインを組み込みうる。一部の実施形態では、第2のFN3ドメインは、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合性タンパク質および／またはアルブミン結合性ドメイン、ならびにこれらの断片および類似体に結合する。

【0178】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X_1) - (X_2) - L - (X_4)$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； L は、リンカーであり； X_4 は、核酸分子である〕を有する組成物が提供される。一部の実施形態では、 X_4 は、siRNA分子である。一部の実施形態では、 X_1 は、CD71のうちの1つに結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、 X_2 は、CD71のうちの1つに結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、 X_1 および X_2 は、同じ標

10

20

30

40

50

的タンパク質に結合しない。一部の実施形態では、X 1 および X 2 は、同じ標的タンパク質に結合するが、タンパク質上の、異なる結合性部位において結合する。一部の実施形態では、X 1 および X 2 は、同じ標的タンパク質に結合する。一部の実施形態では、X 1 および X 2 は、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインである。一部の実施形態では、組成物は、A S G P R に結合する化合物またはタンパク質を含まない（例えば、これらが非含有である）。

【0179】

一部の実施形態では、本明細書では、 $C - (X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] - (X 3)_y$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

10

【0180】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] - (X 3)_y - C$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

【0181】

一部の実施形態では、本明細書では、 $C - (X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] L - (X 3)_y$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

20

【0182】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] L - (X 3)_y - C$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

30

【0183】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式 [式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{As} - L_2 - F_1$ の式を有し、
C は、PEG などのポリマーであり；
 L_1 および L_2 は、各々独立に、リンカーであり；
 X_s は、二本鎖 siRNA 分子のセンス鎖である 5' - 3' オリゴヌクレオチドであり；
 X_{As} は、二本鎖 siRNA 分子のアンチセンス鎖である 3' - 5' オリゴヌクレオチドであり；
 F_1 は、少なくとも 1 つの F N 3 ドメインを含むポリペプチドであり；
 X_s および X_{As} は、組成物／複合体を形成するように、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成する]
を有する組成物または複合体が提供される。

40

【0184】

一部の実施形態では、C は、分子の半減期を延長する分子でありうる。本明細書では、このような部分について記載される。一部の実施形態では、C はまた、Endopporter、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリシン、または両親媒性ペプチドでもありうる。これらの部分は、本明細書で提示される、他の半減期延長部分に代えて、またはこれらに加えて使用される。一部の実施形態では、C は、複合体を、細胞、エンドソーム、または ER へと送達する分子の場合があり、前記分子は、表 9 に列挙されたペプチドから選択される：

50

【0185】

【表2】

配列番号	名称	配列
1043	TAT	RKKRRQRRR
1044	ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK
1045	トランスポルタン	GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL
1046	MAP	KLALKLALKALKAAALKLA
1047	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
1048	KDEL	KDEL
1049	GALA	WEAALAEALAEHLAEALAEALEALAA
1050	HA2	GDIMGEWGNIEFGAIAAGFLGC
1051	アウリン1.2	GLFDIIKKIAESF
1052	MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKSKRKV
1053	TP-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL
1054	EB-1	LIRLWSHLIHIWFQNRRRLKWKKK
1055	HA2-ペネトラチン	GLFGAIAAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRRMKWKK
1056	エンドソーム溶解剤	FFKKLAHALHLLALLALHLAHLALKKA
1057	エンドソーム溶解剤	LFEAIEGFIENGWGMIDGWYG
1058	エンドソーム溶解剤	LFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGRKKRRQRRR
1059	エンドソーム溶解剤	IGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
1060	ERターゲットティング剤	MKLAVTLTLVTLALSSSSASA
1061	ERターゲットティング剤	RLIEDICLPRWGCLWEDDKDEL
1062	ERターゲットティング剤	MIRTLTLLSTLVAGALSK
1063	ERターゲットティング剤	ILSSLTVTQLLRRLHQWIK
1064	ERターゲットティング剤	MIRTLTLLSTLVAGALSKDEL

【0186】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式〔式中、 A_1 は、 X_s の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - F_1$ の式を有する〕を有する組成物または複合体が提供される。

【0187】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式〔式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する〕を有する組成物または複合体が提供される。

【0188】

一部の実施形態では、センス鎖は、本明細書で提示されるセンス鎖である。

【0189】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、本明細書で提示されるアンチセンス鎖である。

【0190】

一部の実施形態では、センス鎖と、アンチセンス鎖とは、 $GY S_1$ をターゲットティングする、二本鎖 $s i R N A$ 分子を形成する。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、約21～23のヌクレオチド塩基対の長さである。ある特定の実施形態では、 C は、場合により用いられる。

【0191】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式〔式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有し、

10

20

30

40

50

F_1 は、少なくとも1つの $FN3$ ドメインを含むポリペプチドであり；

L_1 および L_2 は、各々独立に、リンカーであり；

C は、 PEG などのポリマーであり；

X_S は、二本鎖 $siRNA$ 分子のセンス鎖である $5' - 3'$ オリゴヌクレオチドであり；

X_{AS} は、二本鎖 $siRNA$ 分子のアンチセンス鎖である $3' - 5'$ オリゴヌクレオチドであり；

X_S および X_{AS} は、組成物／複合体を形成するように、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成する]

を有する組成物または複合体が提供される。ある特定の実施形態では、 C は、場合により用いられる。

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式 [式中、 A_1 は、 X_S の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有する] を有する組成物または複合体が提供される。

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式 [式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する] を有する組成物または複合体が提供される。

【0192】

一部の実施形態では、 C は、分枝状単量体もしくは非分枝状単量体の長鎖、および／または二次元もしくは三次元における、単量体の架橋ネットワークからなる、天然ポリマーまたは合成ポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、多糖、リグニン、ゴム、または例えば、ポリエチレングリコールでありうるポリアルキレンオキシドを含む。一部の場合に、少なくとも1つのポリマーは、アルファージヒドロキシルポリエチレングリコール、オメガージヒドロキシルポリエチレングリコール、生体分解性ラクトンベースのポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリ乳酸 (PLA)、ポリ (グリコール酸) (PGA)、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート (PET 、 $PETG$)、ポリエチレンテレフタレート ($PETE$)、ポリテトラメチレングリコール (PTG)、またはポリウレタンのほか、これらの混合物を含むがこれらに限定されない。本明細書で使用される混合物は、同じ化合物中における、異なるポリマーの使用を指すほか、ブロックコポリマーを指す。場合によって、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも1つの区画が、別のポリマーの単量体から構築されるポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。一部の場合に、ポリマーは、 PEG を含む。一部の場合に、ポリマーは、ポリエチレンイミド (PEI) またはヒドロキシエチルデンプン (HES) を含む。

【0193】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド (例えば、 PEG) は、多分散化合物または単分散化合物である。一部の場合に、多分散材料は、平均値重量 (重量平均) によるサイズ、および二分散性により特徴づけられる、分子量が異なる材料の二分散分布を含む。一部の場合に、単分散 PEG は、1つのサイズの分子を含む。一部の実施形態では、 C は、多分散化ポリアルキレンオキシド (例えば、 PEG)、または単分散化ポリアルキレンオキシド (例えば、 PEG) であり、表示の分子量は、ポリアルキレンオキシド分子、例えば、 PEG 分子の分子量の平均を表す。

【0194】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド (例えば、 PEG) の分子量は、約 200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または 100,000 Da である。

【0195】

一部の実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の場合に、Cの分子量は、約200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1100 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1450 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2100 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3250 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3350 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3750 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4250 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4750 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約5000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約5500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約6000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約6500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約7000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約7500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約8000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約10,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約12,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約20,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約35,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約40,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約50,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約60,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約100,000 Daである。

10

20

30

40

50

ある。

【0196】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、1つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマーPEGである、ディスクリートPEGである。一部の場合に、ディスクリートPEG（dPEG）は、2つ～60、2つ～50、または2つ～48の反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50、またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約2つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約3つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約4つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約5つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約6つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約7つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約8つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約9つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約10またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約11またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約12またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約13またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約14またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約15またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約16またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約17またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約18またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約19またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約20またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約22またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約24またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約26またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約28またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約30またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約35またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約40またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約42またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約48またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。場合によって、dPEGは、純粋（例えば、約95%、98%、99%、または99.5%）出発材料から、段階的に、単一分子量化合物として合成される。場合によって、dPEGは、平均分子量ではなく、特異的分子量を有する。場合によって、本明細書で記載されるdPEGは、Quantabio Biodesign, LMD製のdPEGである。

【0197】

一部の実施形態では、L₁は、ポリマーであるCを、センス鎖であるX_Sへと連結するか、またはF₁のポリペプチドを、センス鎖であるX_Sへと連結するのに使用される、任意のリンカーである。一部の実施形態では、L₁は、

10

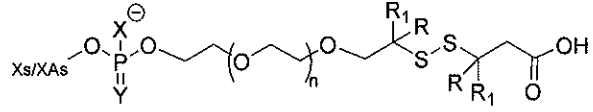
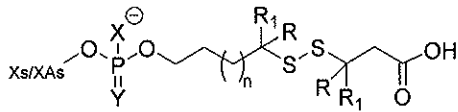
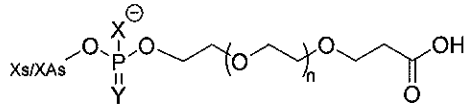
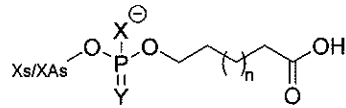
20

30

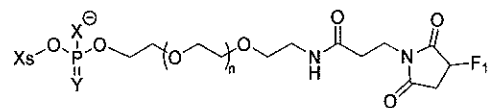
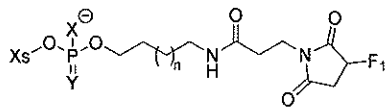
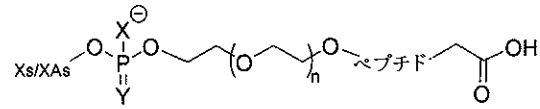
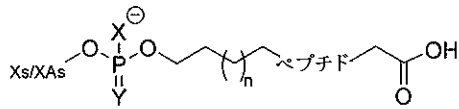
40

50

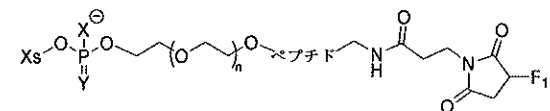
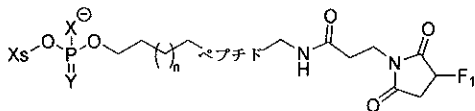
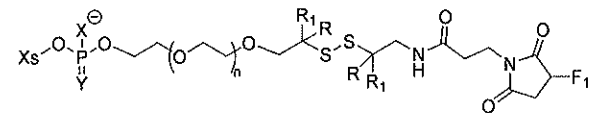
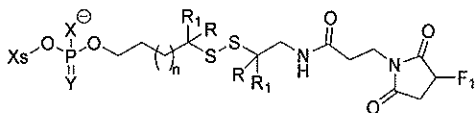
【化 9】



10



20



30

の式〔式中、Xs、XAs、およびF₁は、上記で規定された通りである〕を有する。

【0198】

一部の実施形態では、n = 0 ~ 20である。一部の実施形態では、RおよびR₁は、独立に、メチルである。一部の実施形態では、RおよびR₁は、独立に、存在するか、またはいずれも存在しない。一部の実施形態では、XおよびYは、独立に、Sである。一部の実施形態では、XおよびYは、独立に、存在するか、または存在しない。一部の実施形態では、ペプチドは、Val-Cit、Val-Alaなどであるがこれらに限定されない、酵素切断型ペプチドである。

【0199】

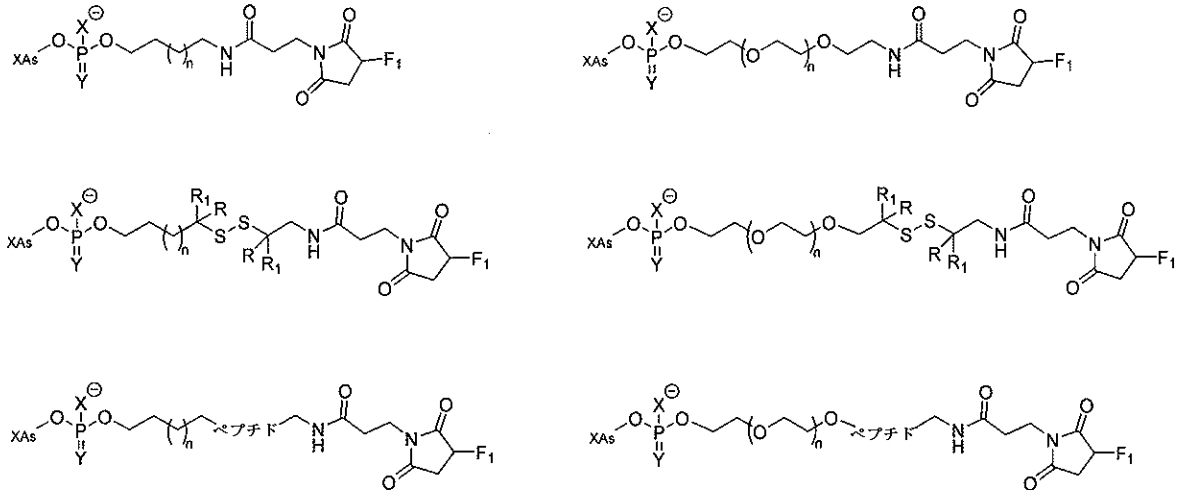
一部の実施形態では、L₂は、F₁のポリペプチドを、アンチセンス鎖であるXAsへと連結するか、またはポリマーであるCを、アンチセンス鎖であるXAsへと連結するのに使用される、任意のリンカーである。

【0200】

一部の実施形態では、L₂は、

40

【化 1 0】



10

の式〔式中、 X_{As} および F_1 は、上記で規定された通りである〕を有する。

【0201】

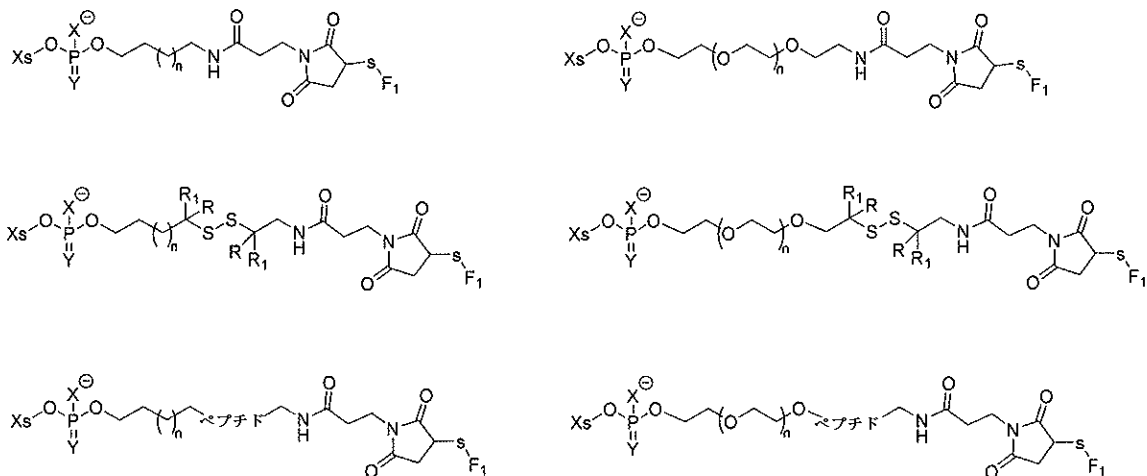
一部の実施形態では、 $n = 0 \sim 20$ である。一部の実施形態では、 R および R_1 は、独立に、メチルである。一部の実施形態では、 R および R_1 は、独立に、存在するか、またはいずれも存在しない。一部の実施形態では、 X および Y は、独立に、 S である。一部の実施形態では、 X および Y は、独立に、存在するか、または存在しない。一部の実施形態では、ペプチドは、*Val-Cit*、*Val-Ala*などであるがこれらに限定されない、酵素切断型ペプチドである。

20

【0202】

一部の実施形態では、リンカーは、以下：

【化 1 1】

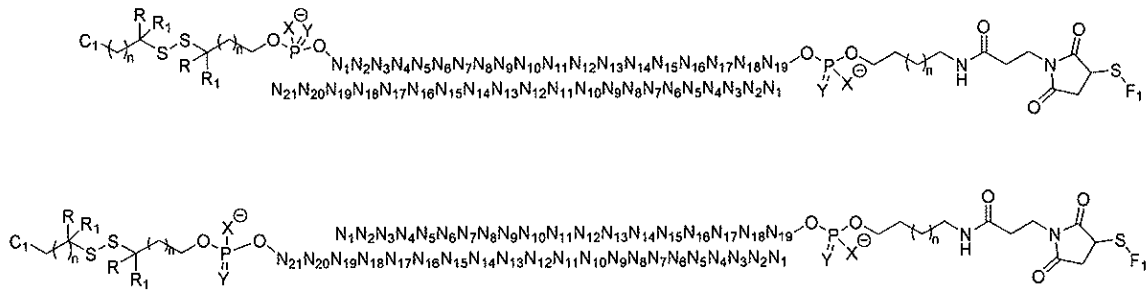


30

40

の通りに例示される F_1 上に存在するシステイン残基を介して、 F_1 へと共有結合的に接合される。一部の実施形態では、 A_1-B_1 は、

【化 1 2】



10

の式〔式中、Cは、PEGなどのポリマー、Endopporter、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリシン、両親媒性ペプチド、または本明細書で提示される、表9に列挙されたペプチドであり； X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5'-3'オリゴヌクレオチドであり； X_A は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3'-5'オリゴヌクレオチドであり； $1F$ は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり； X_S および X_A は、二本鎖siRNA分子を形成する〕を有する。センス鎖およびアンチセンス鎖は、「N」表記により表され、この場合、Nにより表される、各ヌクレオチドは、独立に、A、U、C、もしくはG、または本明細書で提示される修飾ヌクレオチド塩基などの修飾ヌクレオチド塩基である。センス鎖およびアンチセンス鎖のヌクレオチドである N_1 は、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確さのために述べると、式Iは、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれにおいても、 N_1 、 N_2 、 N_3 などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同じである必要はなく、同じであることが意図されない。式Iに例示されたsiRNAであれば、標的配列と相補性であろう。

20

【0203】

例えば、一部の実施形態では、センス鎖は、 N_1 および N_2 における、ホスホロチオエート(PS)修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_8 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{12} 、および N_{17} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{13} 、 N_{14} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{18} 、および N_{19} における2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

30

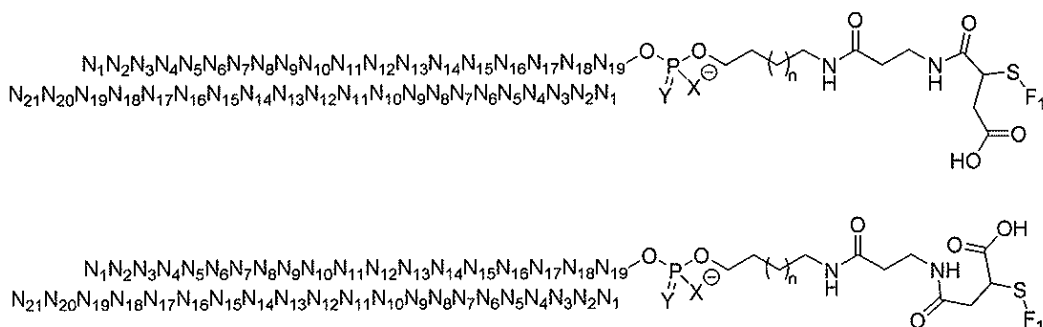
【0204】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、 N_1 へと接合されたビニルホスホン酸部分、 N_2 における、ホスホロチオエート(PS)修飾骨格を伴う2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{12} 、 N_{13} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{17} 、 N_{18} 、および N_{19} における、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_{14} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_{20} および N_{21} における、ホスホロチオエート(PS)修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0205】

本明細書の一部の実施形態では、

【化 1 3】



50

の式〔式中、 F_1 は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり、リンカーへとコンジュゲートされ、 L_1 、 L_1 は、 X_S へと連結され、 X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5' - 3'オリゴヌクレオチドであり、 $\bar{X}_S$ は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3' - 5'オリゴヌクレオチドであり； $\bar{X}$ および X_{AS} は、二本鎖siRNA分子を形成する〕

を有する化合物が提供される。上記で例示されたリンカーは、非限定例であり、他の種類のリンカーも使用される。

【0206】

一部の実施形態では、 F_1 は、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； n 、 q 、および y は、 n 、 q 、および y のうちの少なくとも1つが、1であることを条件として、各々独立に、0または1である〕を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、 n 、 q 、および y は、各々、1である。一部の実施形態では、 n および q は、1であり、 y は、0である。一部の実施形態では、 n および y は、1であり、 q は、0である。

【0207】

一部の実施形態では、 X_1 は、本明細書で提示される、FN3のCD71結合性ドメインなどのFN3のCD71結合性ドメインである。一部の実施形態では、 X_2 は、FN3のCD71結合性ドメインである。一部の実施形態では、 X_1 と、 X_2 とは、FN3の異なるCD71結合性ドメインである。一部の実施形態では、結合性ドメインは、同じ結合性ドメインである。一部の実施形態では、 X_3 は、ヒト血清アルブミンに結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、 X_3 は、タンパク質の半減期を延長するエフェクター機能を伴わないFcドメインである。一部の実施形態では、 X_1 は、第1のCD71結合性ドメインであり、 X_2 は、第2のCD71結合性ドメインであり、 X_3 は、FN3のアルブミン結合性ドメインである。このようなポリペプチドの例は、本明細書および下記で提示される。一部の実施形態では、本明細書では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、 C は、PEGなどのポリマー、Endopporter、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリシン、両親媒性ペプチド、または表9に提示されたペプチドであり； X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり；および X_4 は、核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0208】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4 - C$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、核酸分子であり；および C は、ポリマーであり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0209】

一部の実施形態では、本明細書では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり；および X_4 は、核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0210】

一部の実施形態では、本明細書では、 $C - X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 C は、ポリマーであり； X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり；および X_4 は、核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0211】

一部の実施形態では、本明細書では、 $X_4-L-(X_1)_n-(X_2)_q-(X_3)_y-C$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、核酸分子であり；および C は、ポリマーであり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0212】

一部の実施形態では、GYS1 siRNA対は、以下の配列：センス鎖（5' - 3'）
nsnsnnnnNfNfNfnnnnnnnnnsnsa、およびアンチセンス鎖（5' - 3'）
UfsNfsnnnnNfnnnnnnnnNfnNfnnnsusu〔配列中、（
n）は、2'-O-Me（メチル）であり、（Nf）は、2'-F（フルオロ）であり、（
s）は、ホスホロチオエート骨格修飾である〕を有する。各ヌクレオチドは、センス鎖
およびアンチセンス鎖のいずれにおいても、リボ糖位置およびヌクレオ塩基位置において
、独立に修飾されるか、または組み合わせて修飾される。

【0213】

一部の実施形態では、siRNA分子は、表1Aまたは1Bに由来する配列対を含む。

【0214】

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1A:siRNA のセンス配列およびアンチセンス配列

siRNA 対	配列 番号	5'-3'におけるセンス鎖	配列 番号	5'-3'におけるアンチセンス鎖
A	10	[fC][*mU][*fG][mG][fG][m A][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	11	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU] [fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU] mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
B	12	[fC][*mA][*fA][mG][fG][m U][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][T]	13	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG] [fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA] mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
C	14	[fU][*mC][*fC][mG][fC][m A][fG][fC][fC][mU][fG][mG][mA][mU][fG][mA][fU][mU][mA][T]	15	[mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][fU] [fC][mC][fA][mG][mG][mC][fU] mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*mU]
D	16	[mG][*mC][*fG][mA][mC][mU][fG][fC][fC][mU][mG][f U][mA][mG][mC][mA][fA][mC][mA][idT]	17	[fU][*fG][*mU][mU][mG][mC][m U][mA][mC][mA][mG][mC][fA][mG][mU][mC][mG][mC][*mU][*mU]
E	18	[mU][*mU][*fU][mA][mU][mG][fG][fG][fC][mA][mU][f C][mU][mG][mG][mA][fC][mU][mA][idT]	19	[fU][*fA][*mG][mU][mC][mC][m A][mG][mA][mU][mG][mC][mC] fC][mA][mU][mA][mA][mA][*m U][*mU]
F	20	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA][f C][mA][mA][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	21	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][m U][mG][mU][mU][mG][mG][mU] fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]
G	22	[mG][*mG][*fA][mC][mC][mA][fA][fC][fA][mA][mU][f U][mU][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	23	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][m A][mA][mA][mU][mU][mG][mU] fU][mG][mG][mU][mC][mC][*mU][*mU]
H	24	[mA][*mC][*fC][mA][mA][mC][fA][fA][fU][mU][mU][f C][mA][mA][mC][mG][fU][mG][mA][idT]	25	[fU][*fC][*mA][mC][mG][mU][m U][mG][mA][mA][mA][mU][mU] fG][mU][mU][mG][mG][mU][*m U][*mU]
I	26	[mG][*mC][*fG][mC][mA][mA][fA][fC][fA][mG][mC][f U][mU][mU][mG][mG][fG][mA][mA][idT]	27	[fU][*fU][*mC][mC][mC][mA][m A][mA][mG][mC][mU][mG][mU] fU][mU][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]
J	28	[mA][*mG][*fA][mG][mC][mC][fA][fU][fC][mU][mU][f U][mG][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	29	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][m C][mA][mA][mA][mG][mA][mU] fG][mG][mC][mU][mC][mU][*mU][*mU]
K	30	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][f G][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]	31	[fU][*fG][*mC][mG][mU][mU][m G][mC][mA][mA][mA][mG][mA] fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

L	32	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][mG][fC][mA][mA][idT]	33	[fU][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]
M	34	[mC][*mC][*fA][mU][mC][mU][fU][fU][fG][mC][mA][fA][mC][mG][mC][mA][fG][mC][mA][idT]	35	[fU][*fG][*mC][mU][mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][fA][mG][mA][mU][mG][mG][*mU][*mU]
N	36	[mA][*mC][*fG][mC][mA][mG][fC][fG][fG][mC][mA][fG][mU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	37	[fU][*fG][*mA][mA][mG][mA][mC][mU][mG][mC][mC][mG][fC][mU][mG][mC][mG][mU][*mU][*mU]
O	38	[mU][*mG][*fA][mC][mC][mA][fC][fC][fA][mU][mC][fC][mG][mC][mC][mG][fA][mA][mA][idT]	39	[fU][*fU][*mU][mC][mG][mG][mC][mG][mG][mA][mU][mG][mG][fU][mG][mG][mU][mC][mA][*mU][*mU]
P	40	[mC][*mG][*fA][mA][mU][mC][fG][fG][fC][mC][mU][fC][mU][mU][mC][mA][fA][mU][mA][idT]	41	[fU][*fA][*mU][mU][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mC][mC][fG][mA][mU][mU][mC][mG][*mU][*mU]
Q	42	[mC][*mU][*fU][mC][mA][mA][fU][fA][fG][mC][mA][fG][mU][mG][mC][mC][fG][mA][mA][idT]	43	[fU][*fU][*mC][mG][mG][mC][mA][mC][mU][mG][mC][mU][mA][fU][mU][mG][mA][mA][mG][*mU][*mU]
R	44	[mC][*mA][*fG][mU][mA][mU][fC][fU][fC][mC][mA][fC][mC][mA][mA][mU][fC][mU][mA][idT]	45	[fU][*fA][*mG][mA][mU][mU][mG][mG][mU][mG][mG][mA][mG][fA][mU][mA][mC][mU][mG][*mU][*mU]
S	46	[mC][*mC][*fA][mC][mC][mA][fA][fU][fC][mU][mC][fU][mC][mC][mG][mG][fC][mU][mA][idT]	47	[fU][*fA][*mG][mC][mC][mG][mG][mA][mG][mA][mG][mA][mU][fU][mG][mG][mU][mG][mG][*mU][*mU]
T	48	[mC][*mA][*fC][mC][mA][mA][fU][fC][fU][mC][mU][fC][mC][mG][mG][mC][fU][mU][mA][idT]	49	[fU][*fA][*mA][mG][mC][mC][mG][mG][mA][mG][mA][mG][mA][fU][mU][mG][mG][mU][mG][*mU][*mU]
U	50	[mC][*mC][*fC][mC][mU][mC][fA][fA][fG][fC][mU][mU][fA][mC][mG][mG][mU][fA][mU][mA][idT]	51	[fU][*fA][*mU][mA][mC][mC][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mU][fG][mA][mG][mG][mG][*mU][*mU]
V	52	[mC][*mC][*fC][mU][mC][mA][fG][fC][fU][mU][mA][fC][mG][mG][mU][mA][fU][mC][mA][idT]	53	[fU][*fG][*mA][mU][mA][mC][mC][mG][mU][mA][mA][mG][mC][fU][mG][mA][mG][mG][*mU][*mU]
W	54	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][idT]	55	[fU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
X	56	[mG][*mG][*fA][mA][mC][mC][fG][fC][fA][mC][mG][fG][mA][mG][mC][mG][fC][mC][mA][idT]	57	[fU][*fG][*mG][mC][mG][mC][mU][mC][mC][mG][mU][mG][mC][fG][mG][mU][mU][mC][mC][*mU][*mU]
Y	58	[mA][*mC][*fG][mG][mA][mG][fC][fG][fC][mC][mU][f	59	[fU][*fG][*mU][mC][mG][mG][mA][mG][mA][mG][mG][mC][mG][

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

		C][mU][mC][mC][mG][fA][mC][mA][idT]		fC][mU][mC][mC][mG][mU][*mU][*mU]
Z	60	[mA][*mG][*fC][mA][mA][mG][fC][fG][fC][mA][mA][fC][mU][mC][mU][mG][fU][mG][mA][idT]	61	[fU][*fC][*mA][mC][mA][mG][mA][mG][mU][mU][mG][mC][mG][fC][mU][mU][mG][mC][mU][*mU][*mU]
AA	62	[mC][*mA][*fG][mA][mU][mG][fG][fU][fC][mC][mU][fC][mC][mA][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	63	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][mG][mG][mA][mG][mA][mC][fC][mA][mU][mC][mU][mG][*mU][*mU]
BB	64	[mU][*mC][*fU][mA][mG][mA][fU][fC][fU][mG][mG][fA][mA][mC][mC][mU][fU][mA][mA][idT]	65	[fU][*fU][*mA][mA][mG][mG][mU][mU][mC][mC][mA][mG][mA][fU][mC][mU][mA][mG][mA][*mU][*mU]
CC	66	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][mA][fG][mG][mA][idT]	67	[fU][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][mA][mA][mA][fU][mG][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]
DD	68	[mA][*mC][*fC][mG][mC][mU][fU][fG][fG][mU][mU][fU][mG][mC][mA][mG][fU][mU][mA][idT]	69	[fU][*fA][*mA][mC][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mC][mC][mA][fA][mG][mC][mG][mG][mU][*mU][*mU]
EE	600	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mG][mA][T]	601	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
FF	602	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mA][fG][mG][mA][T]	603	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
GG	604	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fG][mA][fG][mG][mA][T]	605	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
HH	606	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	607	[fU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][fC][fA][fU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*fU]
II	608	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	609	[mU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*mU]
JJ	610	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][*fU][idT]	611	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][*mG][*fU][*mU]
KK	612	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][idT]	613	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
LL	614	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]	615	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]

10

20

30

40

50

10

20

【表 3 - 5】

		A][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mG][idT]		A][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
AAA	644	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mG][mA][idT]	645	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
BBB	646	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fG][mU][mA][idT]	647	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	10
CCC	648	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	649	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
DDD	650	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	651	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
EEE	652	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mA][idT]	653	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	20
FFF	654	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mG][idT]	655	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
GGG	656	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]	657	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	
HHH	704	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA]	705	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	30

略号解:(n/N=任意のヌクレオチド)、mN=2'-O-メチル残基、fN=2'-F 残基、*=ホスホロチオエート、および(idT)=idT(inverted dT)、(VP)2'-O-メチルビニルホスホン酸ウリジンである。カッコは、個別の塩基を指し示す。

【 0 2 1 5 】

【表 4 - 1】

表 1B

配列番号	センス鎖(5'-3')	配列番号	アンチセンス鎖(5'-3')
801	caggggugcg gucuugcaa	861	uugcaagacc gcacccug u
802	ggugcggucu ugcaauagg	862	ccuauugcaa gaccgcaccu u
803	gugcggucuu gcaauagga	863	uccuauugca agaccgcacu u
804	agccaugccu uuaaacgc	864	gcgguuuaaa ggcauggcuu u
805	augccuuuaa accgcacuu	865	aagugcgguu uaaaggcau u
806	ugggaggau g aaucgacc	866	ggucgaauc auccuccau u
807	aacgcagugc ucuucgaag	867	cuucgaagag cacugcguu u
808	ggacgaaugg ggcgacaac	868	guugucgccc cauucguccu u
809	ggcgacugcc uguagcaac	869	guugcuacag gcagucgccu u
810	cacgcugcug gggcgcuac	870	guagcgcccc agcagcgugu u
811	ugcgucacg ucuucacua	871	uagugaagac gugagcgcau u
812	ccuauuacuu cuuuauagc	872	gcgauaaaga aguauaaggu u
813	cuuuauagcc ggccgcua u	873	auagcggccg gcgauaaagu u
814	ucgccggccg cuauagagu	874	aacucauagc ggccggcgau u
815	gccgcuauga guucuccaa	875	uuggagaacu cauagcggu u
816	ccgcuaugag uucuccaac	876	guuggagaac ucauagcggu u
817	ggcucggcuc aacuaucug	877	cagauaguug agccgagccu u
818	gcucggcuca acuaucugc	878	gcagauaguu gagccgagcu u
819	ucggcucaac uaucugcuc	879	gagcagauag uugagccgau u
820	ccagcgcgga ccaacaauu	880	aauguuggu ccgcguggu u
821	agcgcggacc aacaauuuc	881	gaauguug guccgcgcu u
822	ucgggaggaa gcuuuuga	882	ucauaaagcu uccuccgau u
823	acgcagcggc agucuuucc	883	ggaaagacug ccgcugcgu u
824	gaccaccauc cgccgauc	884	gauucggcgg augguggu u
825	ccgaucggc cucuucuu	885	auugaagg ccgauucgu u
826	aaucggcuc uucauagc	886	gcuauugaag aggccgauu u
827	caauagcagu gccgacagg	887	ccugucggca cugcuauugu u
828	aggaguugu ccguggcug	888	cagccacgga caaacuccu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

829	cggcugagug cacgguuau	889	auaaccgugc acucagccgu u
830	ugggaauccc caguaucuc	890	gagauacugg ggauucccau u
831	cagacccuc agcuuacgg	891	ccguaagcug aggggucugu u
832	ccccucagcu uacgguauc	892	gauaccguua gcugaggggu u
833	cucagcuuac gguaucuauc	893	guagauaccg uaagcugagu u
834	gcuuacggua ucuacauc	894	gaaguagau accguaagcu u
835	ccggcggcag cguaucuauc	895	gaugauacgc ugccgccggu u
836	agcguaucua ccagcgga	896	uuccgcugga ugauacgcu u
837	gcguaucauc cagcggaac	897	guuccgcugg augauacgcu u
838	uaccuaggcc gguaucua	898	uauaguaccg gccuagguau u
839	cuaggccggu acuauaugu	899	acauauagua ccggccuagu u
840	aggccggua uauaugucu	900	agacauauag uaccggccu u
841	ggccgguauc auaugucug	901	cagacauua guaccggccu u
842	gccgguaucua uaugucugc	902	gcagacauau aguaccggcu u
843	cgguaucua ugucugcgc	903	gcgcagacau auaguaccgu u
844	gguaucuaug gucugcgcg	904	cgcgagaca uauaguaccu u
845	cuauaugucu gcgcgccac	905	guggcgcgca gacauauagu u
846	uauugucg cgccacaug	906	caugugcgcg gcagacauu u
847	augucugcgc gccacaugg	907	ccaugugcg cgagacauu u
848	ucgccucgc ugucacgac	908	gucgugacag cgaggcgau u
849	cgccgagcgc uacgaugag	909	cuaucguag gcucgccgu u
850	caaggaccgg cgcaacauc	910	gauguugcgc cgguccuugu u
851	acauccgugc accagagug	911	cacucuggug cacggauguu u
852	cugggcgagg agcguaacu	912	aguuaagcuc cucgccagu u
853	ggcgaggag cguaacuaa	913	uuaguuaagc uccucgccu u
854	gcgaggagcg uaacuaagu	914	acuuaguua gcuccugcu u
855	gaggagcgua acuaagucc	915	ggacuuaugu acgcuccu u
856	aguccgcaa acacuccac	916	guggaguguu uggcggaacu u
857	ggcgaucaag uccagagcc	917	ggcucuggac uugaucgcu u
858	ccuaaccug gcuuaucc	918	ggaauaagcc agguuagggu u
859	ugugaaacca cuagguucu	919	agaaccuagu gguuacau u
860	accacuaggu ucuaggucc	920	ggaccuagaa ccuagguu u
921	caggggugcg gucuugcaa	981	uugcaagacc gcaccucgu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

922	ggugcggucu ugcaauaga	982	ucuauugcaa gaccgcaccu u
923	gugcggucuu gcaauagga	983	uccuauugca agaccgcacu u
924	agccaugccu uuaaaccga	984	ucgguuuaaa ggcauggcuu u
925	augccuuuaa accgcacua	985	uagugcgguu uaaaggcauu u
926	ugggaggau gaaucgaca	986	ugucgaauc auccuccau u
927	aacgcagugc ucuucgaaa	987	uuucgaagag cacugcguu u
928	ggacgaagg ggcgacaaa	988	uuugucgcc cauucguccu u
929	ggcgacugcc uguagcaaa	989	uuugcuacag gcagucgccu u
930	cacgcugcug gggcgcuaa	990	uuagcgcgcc agcagcgugu u
931	ugcgucacg ucuucacua	991	uagugaagac gugagcgau u
932	ccuuauacuu cuuuaucga	992	ucgauaaaga aguauaaggu u
933	cuuuaucgcc ggccgcuaa	993	uuagcggccg gcgauaaagu u
934	ucgccggccg cuaugagua	994	uacucauagc ggccggcgau u
935	gccgcuauga guucuccaa	995	uuggagaacu cauagcggu u
936	ccgcuaugag uucuccaaa	996	uuuggagaac ucauagcggu u
937	ggcucggcuc aacuaucua	997	uagauaguug agccgagccu u
938	gucgggcua acuaucuga	998	ucagauagu gagccgagcu u
939	ucggcucaac uaucugcua	999	uagcagauag uugagccgau u
940	ccagcgcgga ccaacaaua	1000	uauuguuggu ccgcgcuggu u
941	agcgcggaac aacaauua	1001	uaauuguug guccgcgcuu u
942	ucgggaggaa gcuuuauga	1002	ucauaaagcu uccuccgau u
943	acgcagcggc agucuuuca	1003	ugaaagacug ccgcgcguu u
944	gaccaccauc cgccgaaua	1004	uauucggcgg auggugguu u
945	ccgaaucggc cucuucaaa	1005	uuugaagagg ccgaaucggu u
946	aaucggccuc uucaauaga	1006	ucuauugaag aggccgauu u
947	caauagcagu gccgacaga	1007	ucugucggca cugcuauugu u
948	aggaguuugu ccguggcua	1008	uagccacgga caaacuccu u
949	cggcugagug cacgguuaa	1009	uuaacgcugc acucagccgu u
950	ugggaauccc caguaucua	1010	uagauacugg ggauuccau u
951	cagacccuc agcuuacga	1011	ucguaagcug aggggucugu u
952	cccucagcu uacgguaa	1012	uauaccguaa gcugagggu u
953	cucagcuuac gguaucuaa	1013	uuagauaccg uaagcugagu u
954	gcuuacggua ucuacaua	1014	uaauguagau accguaagcu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

955	ccggcgagcag cguaucua	1015	uaugauacgc ugccgccggu u
956	agcguaucua ccagcgga	1016	uuccgcugga ugauacgcu u
957	gcguaucua cagcgga	1017	uuuccgcugg augauacgu u
958	uaccuaggcc gguacuua	1018	uauaguaccg gccuagguau u
959	cuaggccggu acuaauaga	1019	ucauaauaga ccggccuagu u
960	aggccgguac uauauguca	1020	ugacauauag uaccggccuu u
961	ggccgguacu auaugucua	1021	uagacauua guaccggccu u
962	gccgguacua uaugucuga	1022	ucagacauau aguaccggcu u
963	cgguaucua ugucugcga	1023	ucgcagacau auaguaccgu u
964	gguacuauau gucugcgca	1024	ugcgagaca uauaguaccu u
965	cuauaugucu gcgcgcaa	1025	uuggcgcgca gacauauagu u
966	uaugucugcg cgccacua	1026	uauguggcg gcagacauu u
967	augucugcg gccacuga	1027	ucauguggcg cgagacauu u
968	ucgccucgc ugucacga	1028	uucgugacag cgaggcgau u
969	cggcgagcg uacgauga	1029	uucaucguag cgcugccgu u
970	caaggaccgg cgcaacua	1030	uauguugcg cgguccuugu u
971	acaucgugc accagagua	1031	uacucuggug cacggaugu u
972	cuggcgagg agcguaaca	1032	uguuacguc cucgccagu u
973	ggcgaggag cguaacua	1033	uuaguacgc uccugcccu u
974	gcgaggagcg uaacuaaga	1034	ucuuaguac gcuccugcu u
975	gaggagcgu acuaaguc	1035	ugacuuagu acgcucccu u
976	aguccgcaa acacucca	1036	uuggagugu uggcggaau u
977	ggcgaucaag uccagagca	1037	ugcucuggac ugaucgcu u
978	ccuaaccug gcuuauca	1038	ugaauaagc agguuaggu u
979	ugugaaacca cuagguca	1039	ugaaccuagu gguuacau u
980	accacuaggu ucuagguca	1040	ugaccuaga ccuaguggu u
1041	uggacuuaaccuagacaa	1042	uugcuagguagaaguccau
1043	cugggaggaugaauucga	1044	uucgaaucuccuccaguu
1045	gggugacaacuacuaucua	1046	uagauaguaguugacccuu
1047	cugggaggaugaauucga	1048	uucgaaucuccuccaguu
1049	caaggugggugcaucua	1050	uuagaugccaccaccuugu
1051	uccgcagccuggaugaua	1052	uaaucauccagcguggaau

10

20

30

40

【0216】

一部の実施形態では、上記で例示されたポリヌクレオチドは、s i R N A のアンチセンス鎖上における 5' ヌクレオチドとして、2'-O-メチルビニルホスホン酸ウリジンを含まないポリヌクレオチドを含む。

【0217】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書で提示される通りである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖を含む部分について、第1の鎖および第2の鎖を含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、表1Aまたは1Bに例示された配列を

50

含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、表 1 A または 1 B に例示された配列を含むが、塩基修飾を伴わない。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書で提示される s i R N A 対を含む。一部の実施形態では、s i R N A 対は、F N 3 ドメインへとコンジュゲートされない。

【0218】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、当技術分野で公知の手順を使用する、化学合成反応および／または酵素的ライゲーション反応を使用して構築される。例えば、オリゴヌクレオチド分子は、分子の生物学的安定性を増大させるか、またはオリゴヌクレオチド分子と、標的核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるようにデザインされた、天然に存在するヌクレオチドまたは多様な修飾ヌクレオチドを使用して化学合成される。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子が、サブクロニングされた発現ベクターを使用して、アンチセンスの配向性で（すなわち、挿入されたオリゴヌクレオチド分子から転写される R N A が、目的のポリ核酸分子をターゲティングするように、アンチセンスの配向性を有する）生物学的に作製される。

10

【0219】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、両方の鎖が、単一の連続オリゴヌクレオチド断片、または切断型リンカーで隔てられた鎖として合成され、その後、ハイブリダイズし、二重鎖の精製を可能とする、個別の断片または鎖をもたらすように切断される、タンデム合成法を介して合成される。

20

【0220】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子はまた、1つの断片が、センス領域を含み、第2の断片が、分子のアンチセンス領域を含む、2つの顕著に異なる核酸鎖または核酸断片からもアセンブルされる。

【0221】

一部の場合に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートによる、オリゴヌクレオチド分子ヌクレオチド間連結の化学修飾がなされる場合、連結は、安定性を改善する。過剰な修飾は、場合によって、毒性または活性の低下を引き起こす。したがって、核酸分子をデザインする場合、場合によって、これらのヌクレオチド間連結の量は、最小化される。このような場合、これらの連結濃度の低減は、これらの分子の毒性を低下させ、有効性を増大させ、特異性を高める。

30

【0222】

本明細書で記載される通り、一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のセンス鎖の 5' 末端において、リンカーを含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のアンチセンス鎖の 5' 末端において、ビニルホスホン酸または修飾ビニルホスホン酸を含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のセンス鎖の 3' 末端において、リンカーを含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のアンチセンス鎖の 3' 末端において、ビニルホスホン酸を含むように修飾される。リンカーは、d s R N A を、F N 3 ドメインへと連結するのに使用される。リンカーは、例えば、天然で存在するか、または本明細書で記載され、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第 10, 196, 446 号において記載された通りに置換された、F N 3 ドメイン上のシステイン残基に、共有結合的に接合しうる。d s R N A のこのような修飾鎖の非限定例は、表 2 に例示される。

40

【0223】

50

【表 5 - 1】

表2: リンカーおよび/またはビニルホスホン酸を伴う対

siRNA 対	配列 番号	5'-3'におけるセンス鎖	配列 番号	5'-3'におけるアンチセンス 鎖	L = リンカー
III	70	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][mG][fC][mC][fU] [mU][fA][mA][fU][mG][fA]][mA]-L	71	[VP][*fU][*mU][fC][mA][f U][mU][fA][mA][fG][mG][f C][mC][fA][mC][fG][mA][f G][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
JJJ	72	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG]][mA]-L	73	[VP][*fU][*mC][mG][mA][mA][mU][mU][mC][mA][m U][mC][mC][fU][mC][mC][mC][mA][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
KKK	74	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU]][mA]-L	75	[VP][*fU][*mA][fG][mA][f U][fG][fC][mC][fA][mC][m C][mC][fA][mC][fC][mU][f U][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
LLL	76	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA]][fC][mA][mA][mU][mU][f U][mC][mA]-L	77	[VP][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][mU][m G][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
MMM	78	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU]][fG][mC][mA][mA][mC][f G][mC][mA]-L	79	[VP][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][m A][mG][mA][fU][mG][mG]][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
NNN	80	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG]][fC][mA][mA][mC][mG][f C][mA][mA]-L	81	[VP][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][m A][mA][mG][fA][mU][mG]][mG][mC][mU][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
OOO	82	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU]][fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mA]-L	83	[VP][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][m A][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
OPPP	84	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][mA][mC]][fC][mU][mC][mG][mA][f G][mG][mA]-L	85	[VP][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][m A][mA][mA][fU][mG][mU]][mG][mG][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
QQQ	86	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][mG][fC][mC][fU] [mU][fA][mA][fU][mG][m G][mA]-L	87	[VP][*fU][*mU][fC][mA][f U][mU][fA][mA][fG][mG][f C][mC][fA][mC][fG][mA][f G][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
RRR	658	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU]][mA][mA][idT]-L	659	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
SSS	660	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU]][mA][mG][idT]-L	661	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
TTT	662	[fC][*mA][*fA][mG][fG][	663	[VP][mU][*fU][*mA][fG][	Mal-C ₂ H ₄

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

		mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mG][mA][idT]-L		mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
UUU	664	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fG][mA][mA][idT]-L	665	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
VVV	666	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mA][fU][mA][mA][idT]-L	667	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
W W W	668	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mA][idT]-L	669	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
XXX	670	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mA][idT]-L	671	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
YYY	672	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	673	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
ZZZ	674	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	675	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
A A A A	676	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mA][mA][idT]-L	677	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
BBBB	678	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fA][mC][mA][idT]-L	679	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
CCCC	680	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mA][fG][mC][mA][idT]-L	681	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
D D D D	682	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	683	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
EEEE	684	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	685	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

FFFF	686	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mA][idT]-L	687	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
G G G G	688	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mG][idT]-L	689	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
H H H H	690	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mG][mA][idT]-L	691	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
IIII	692	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f G][mU][mA][idT]-L	693	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
JJJJ	694	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mG][f C][mU][mA][idT]-L	695	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
K K K K	696	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mG][f C][mU][mA][idT]-L	697	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
LLLL	698	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mG][mU][f C][mU][mA][idT]-L	699	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
MMM M	700	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mG][mU][f C][mU][mG][idT]-L	701	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
NNN N	702	[fC][*mA][*fA][mG][fG] [mU][fG][fG][fG][mU][fG] [mG][mC][mA][fU][mC][fU] [mA][mG][idT]-L	703	[VP][mU][*fU][*mA][fG] [mA][fU][fG][fC][mC][fA] [mC][mC][mC][fA][mC][fC] [mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
OOO O	706	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mA]-L	707	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
PPPP	711	[mU][*mG][*fG][mA][mC] [mU][fU][fC][fA][mA][mC] [fC][mU][mA][mG][mA][f	712	[VP][mU][*fU][*mG][mU] [mC][mU][mA][mG][mG][m	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

		C][mA][mA]-L		U][mU][mG][mA][fA][mG][mU][mC][mC][mA][*mU][*mU]	
Q Q Q Q	1053	[mG][*mG][*fG][mU][mG][mA][fC][fA][fA][mC][mU][fA][mC][mU][mA][mU][fC][mU][mA]	1054	[VP][mU][fA][*mG][*mA][mU][mA][mG][mU][mA][mG][mU][mU][mG][fU][mC][mA][mC][mC][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
RRRR	1055	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][mG][fA][mU][fG][mA][fA][mU][fU][mC][fG][mA][fA]	1056	[VP][mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][mU][fU][mC][fA][mU][fC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
SSSS	1057	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][mG][fG][mU][fG][mG][fC][mA][fU][mC][fU][mA][fA]	1058	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][mG][fC][mC][fA][mC][fC][mC][fC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
TTTT	1059	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG][mC][fC][mU][fG][mG][fA][mU][fG][mA][fU][mU][fA]	1060	[VP][mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][mU][fC][mC][fA][mG][fG][mC][fU][mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -

10

20

略号解:(n/N=任意のヌクレオチド)、mN=2'-O-メチル残基、fN=2'-F 残基、*=ホスホロチオエート、(idT)=idT(inverted dT)、(VP)2'-O-メチルビニルホスホン酸ウリジン、BMPS=プロピルマレイミドである

【0224】

一部の実施形態では、上記で提示された、A～PPPPのs i R N A対は、センス鎖の3'末端において、リンカーを含む。一部の実施形態では、上記で提示された、A～PPPPのs i R N A対は、センス鎖の5'末端において、ビニルホスホン酸を含む。

30

【0225】

リンカー(L)の構造は、以下の表3における通りの構造である。

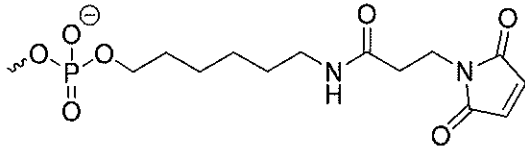
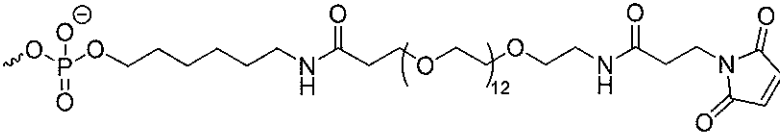
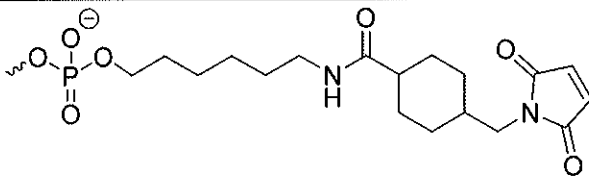
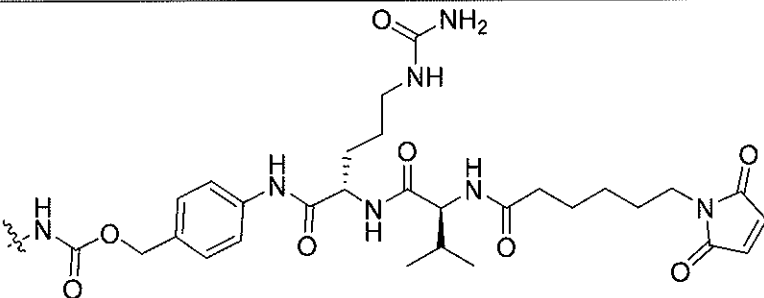
【0226】

40

50

【表 6】

表 3: リンカー(L)の代表例

リンカー構造	リンカー名
	Mal-C ₂ H ₄ C(O) (NH)-(CH ₂) ₆
	Mal-(PEG) ₁₂ (NH) (CH ₂) ₆
	Mal-NH-(CH ₂) ₆ または アミノヘキシル リンカー-(CH ₂) ₆ -
	Val-Cit-PABA

【 0 2 2 7 】

クリック化学反応、アミドカップリング、還元的アミン化、オキシムカップリング、トランスグルタミナーゼコンジュゲーションおよびソルターゼによるコンジュゲーションなどの酵素的カップリングにより形成されるリンカーなど、他のリンカーもまた、使用される。本明細書で提示されるリンカーは、例示的な性質のリンカーであり、他のこのような方法により作製される他のリンカーもまた使用される。

【 0 2 2 8 】

s i R N Aへと接続されると、構造であるL-（X 4）は、以下の式により表される：

10

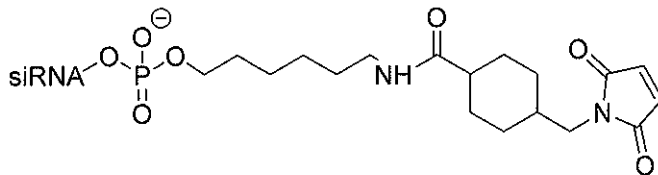
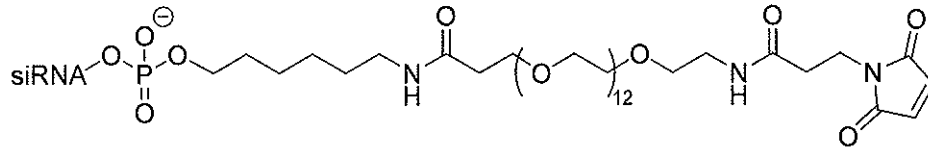
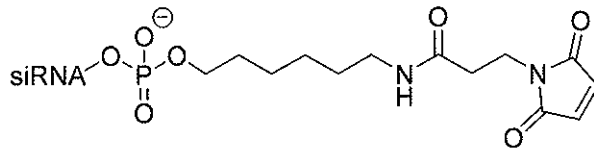
20

30

40

50

【化 1 4】



10

【0229】

20

本明細書では、ある特定の修飾ヌクレオ塩基を伴う、ある特定の siRNA 配列が例示されるが、本明細書では、このような修飾を伴わない配列もまた、提示される。すなわち、配列は、修飾を伴わない、本明細書で提示される表に例示された配列を含みうる。一部の実施形態では、非修飾 siRNA 配列は、dsRNA のセンス鎖の 5' 末端において、リンカーをなおも含みうる。一部の実施形態では、核酸分子は、dsRNA のアンチセンス鎖の 5' 末端において、ビニルホスホン酸を含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、dsRNA のセンス鎖の 3' 末端において、リンカーを含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、dsRNA のアンチセンス鎖の 3' 末端において、ビニルホスホン酸を含むように修飾される。リンカーは、本明細書で提示される通りでありうる。

30

【0230】

一部の実施形態では、CD71 に結合するポリペプチドを含む FN3 タンパク質が提供される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CD71 に結合する FN3 ドメインを含む。一部の実施形態では、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 の配列を含むポリペプチドが提供される。一部の実施形態では、CD71 に結合するポリペプチドは、配列番号 301～301、310、312～572、592～599、または 708～710 の配列を含む。ポリペプチドが結合しうる CD71 タンパク質の配列は、例えば、配列番号 2 または 3 でありうる。一部の実施形態では、CD71 に結合する FN3 ドメインは、CD71 に特異的に結合する。

40

【0231】

一部の実施形態では、CD71 に結合する FN3 ドメインは、場合により、残基位置 11、14、17、37、46、73、または 86（残基の番号付けは、配列番号 4 に対応する）において、置換を有する、配列番号 1 の Tenc on 配列、または配列番号 4 の Tenc on 27 配列（LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFD SFLIQYQESEKVG E AIVLTVP GS ERSYDLTG LKPGTEYTV SIYGVKGGHRSNPLSAIFTT）に基づく。

【0232】

一部の実施形態では、CD71 に結合する単離 FN3 ドメインは、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～71

50

0 のアミノ酸配列を含む。

【0233】

一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号273のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。配列番号273は、配列番号288、配列番号289、配列番号290、および配列番号291の配列に基づくコンセンサス配列である。配列番号273の配列は、
MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFX₁IX₂YX₃
EX₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSEERSYDLTG LKPGTEYX₁₀V
X₁₁IX₁₂X₁₃VKG GX₁₄X₁₅SX₁₆PLX₁₇AX₁₈FTT

〔式中、

X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、各々独立に、メチオニンまたはプロリン以外の
任意のアミノ酸であり、

10

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され；

X₂は、Y、G、A、またはVから選択され；

X₃は、I、T、L、A、またはHから選択され；

X₄は、S、Y、またはPから選択され；

X₅は、Y、G、Q、またはRから選択され；

X₆は、GまたはPから選択され；

X₇は、A、Y、P、D、またはSから選択され；

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され；

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され；

20

X₁₂は、D、Q、H、またはVから選択され；

X₁₃は、GまたはSから選択され；

X₁₄は、R、G、F、L、またはDから選択され；

X₁₅は、W、S、P、またはLから選択され；

X₁₆は、T、V、M、またはSから選択される]

である。

【0234】

一部の実施形態では：

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され；

X₂は、G、A、またはVから選択され；

30

X₃は、T、L、A、またはHから選択され；

X₄は、YまたはPから選択され；

X₅は、G、Q、またはRから選択され；

X₆は、GまたはPから選択され；

X₇は、Y、P、D、またはSから選択され；

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され；

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され；

X₁₂は、Q、H、またはVから選択され；

X₁₃は、GまたはSから選択され；

X₁₄は、G、F、L、またはDから選択され；

40

X₁₅は、S、P、またはLから選択され；

X₁₆は、V、M、またはSから選択される。

【0235】

一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号288の配列において示される通りである。一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号289の配列において示される通りである。一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号290の配列において示される通りである。一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅

50

、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号291の配列において示される通りである。

【0236】

一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンではない。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アラニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アルギニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アスパラギンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アスパラギン酸である。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、システインである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、グルタミンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、グルタミン酸である。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、グリシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、ヒスチジンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、イソロイシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、ロイシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、リシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、フェニルアラニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、セリンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、トレオニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、トリプトファンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、チロシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、バリンである。

【0237】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き、一部の実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除き、配列番号288の配列に示される通りに明示される。

【0238】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き、一部の実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除き、配列番号289の配列に示される通りに明示される。

【0239】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き、一部の実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除き、配列番号290の配列に示される通りに明示される。

【0240】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ヒトCD71タンパク質（配列番号2または5）に結合するか、またはこれに特異的に結合する、フィブロネクチンIII型（FN3）ドメインが提供される。本明細書で提示される通り、FN3ドメインは、CD71タンパク質に結合しうる。ドメインはまた、CD71タンパク質にも特異的に結合しうることも、明示的に言明されないとしても、提示される。したがって、例えば、CD71に結合するFN3ドメインはまた、CD71に特異的に結合するFN3ドメインタンパク質も包含するであろう。これらの分子は、例えば、治療適用および診断適用ならびにイメージングにおいて使用される。一部の実施形態では、本明細書で開示される、FN3ドメインをコードするポリヌクレオチド、またはその相補性核酸、ベクター、宿主細胞、およびこれらを作製および使用する方法が提供される。

一部の実施形態では、CD71に結合するか、またはこれに特異的に結合する、単離FN3ドメインが提供される。

一部の実施形態では、FN3ドメインは、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーでありうる。リンカーは、本明細書で記載される、短鎖ペプチド配列などの短鎖ペプチド配列でありうる。例えば、リンカーは、G/Sリンカーなどでありうる。

[illegible]

【0247】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、当業者により実施され、表面プラズモン共鳴法またはKinexa法により決定される通り、約 1×10^{-7} M未満、例えば、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 1×10^{-12} M未満、または約 1×10^{-13} M未満の解離定数 (K_D) で、CD71に結合しうる。測定された、特定のFN3ドメイン-抗原間相互作用のアフィニティーは、異なる条件（例えば、オスモル濃度、pH）下で測定された場合に変動しうる。したがって、アフィニティー、および他の抗原結合性パラメータ（例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off} ）の測定は、タンパク質足場および抗原の正規化溶液、ならびに本明細書で記載される緩衝液などの正規化緩衝液によりなされる。

10

【0248】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、CD71に、標準溶液ELISAアッセイにおいて、陰性対照について得られるシグナルを、少なくとも5倍上回る強さで結合しうる。

【0249】

一部の実施形態では、CD71に結合するか、またはこれに特異的に結合するFN3ドメインは、分子のN末端へと連結された、イニシエーターメチオニン (Met) を含む。一部の実施形態では、CD71に結合するか、またはこれに特異的に結合するFN3ドメインは、FN3ドメインのC末端へと連結された、システイン (Cys) を含む。N末端Metおよび／またはC末端Cysの付加は、発現、および／または分子の半減期を延長し、他の機能をもたらすコンジュゲーションを容易としうる。

20

【0250】

FN3ドメインはまた、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第10,196,446号において記載されたシステイン置換などのシステイン置換も含有しうる。略述すると、一部の実施形態では、本明細書で提示されるポリペプチドは、米国特許第10,196,446号の、配列番号6または配列番号1に基づくFN3ドメインの、残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、および93からなる群から選択される位置、ならびに類縁のFN3ドメイン内の、同等の位置において、少なくとも1つのシステイン置換を含みうる。一部の実施形態では、置換は、残基6にある。一部の実施形態では、置換は、残基8にある。一部の実施形態では、置換は、残基10にある。一部の実施形態では、置換は、残基11にある。一部の実施形態では、置換は、残基14にある。一部の実施形態では、置換は、残基15にある。一部の実施形態では、置換は、残基16にある。一部の実施形態では、置換は、残基20にある。一部の実施形態では、置換は、残基30にある。一部の実施形態では、置換は、残基34にある。一部の実施形態では、置換は、残基38にある。一部の実施形態では、置換は、残基40にある。一部の実施形態では、置換は、残基41にある。一部の実施形態では、置換は、残基45にある。一部の実施形態では、置換は、残基47にある。一部の実施形態では、置換は、残基48にある。一部の実施形態では、置換は、残基53にある。一部の実施形態では、置換は、残基54にある。一部の実施形態では、置換は、残基59にある。一部の実施形態では、置換は、残基60にある。一部の実施形態では、置換は、残基62にある。一部の実施形態では、置換は、残基64にある。一部の実施形態では、置換は、残基70にある。一部の実施形態では、置換は、残基88にある。一部の実施形態では、置換は、残基89にある。一部の実施形態では、置換は、残基90にある。一部の実施形態では、置換は、残基91にある。一部の実施形態では、置換は、残基93にある。

30

40

【0251】

ドメイン内またはタンパク質内の位置におけるシステイン置換は、既存のアミノ酸残基の、システイン残基による置きかえを含む。一部の実施形態では、システインは、置換されるのではなく、上記で列挙された位置に隣接して、配列へと挿入される。システイン修

50

飾の他の例は、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第20170362301号において見出される。配列のアライメントは、例えば、NCBIウェブサイトにおいて、デフォルトパラメータを使用するBlastPを使用して実施される。

【0252】

一部の実施形態では、システイン残基は、ドメイン内またはタンパク質内の任意の位置に挿入される。

【0253】

一部の実施形態では、CD71に結合するFN3ドメインは、細胞へと内部化される。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、検出用標識または治療剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。細胞傷害剤は、治療剤として作用しうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、本明細書で開示される、任意の検出用標識、治療的、および／または細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、オリゴヌクレオチドの、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、筋細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞である。一部の実施形態では、細胞は、樹状細胞である。一部の実施形態では、細胞は、中枢神経系細胞である。一部の実施形態では、細胞は、心臓細胞である。

10

【0254】

一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含む。

20

【0255】

一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号301のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号302のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号303のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号304のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号305のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号306のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号307のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号310のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号312のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号313のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号314のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号315のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号316のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号317のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号318のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号319のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号320のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号321のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号322のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号323のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号324のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配

30

40

50

[illegible]

[illegible]

50

50

50

50

ノ酸配列を含む。

【0256】

一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、分子のN末端へと連結された、イニシエーターメチオニン (Met) を含む。

【0257】

一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列のうちの1つと、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む。同一性パーセントは、NCBIウェブサイトを介して利用可能である、BlastPを使用して、2つ配列をアライメントするのに、デフォルトパラメータを使用して決定される。CD71に結合するFN3ドメインの配列は、例えば、表4に見出される。

【0258】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表4:CD71結合性FN3ドメイン配列

配列 番号	CD71に結合するFN3ドメインのアミノ酸配列
301	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPITYIEAVVLGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVGISGVKGGHNSMPLSAIFTT
302	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFMINYSELFWMGEAIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVRIKGVKGGKGSWPLHAHFTT
303	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIEYAETRWYGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPIDGVKGGIASKPLSAIFTT
304	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYYRDQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
305	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVYIWGVKGGKPSFPLRAGFTT
306	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPFIIMETFSRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYRVPIGGVKGGSSCPLSAIFTT
307	MLPAPKNLVVSDVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
310	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIAYIETATRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPPIGVKGGNTSSPLSAIFTT
312	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPFYAEPSPTEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
313	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIAYPEDGFRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIGVKGGGGSGPLSAIFTT
314	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYYVENVWGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYWEVIIGVKGGQCSRPLSAIFTT
315	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTECPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
316	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYREFRPSGEAIVLT VPGSERSYDLTVETGYRNEVVICGVKGGPWGSGPLSAIFTT
317	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPILYTECVYRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYHVPITGVKGGGGSWPLSAIFTT
318	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIMYHEIYVGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIEGVKGGGTSGPLSAIFTT
319	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAITYTEAALCGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPINGVKGGGTSGPLSAIFTT
320	MLPAPKNLVVARVTEDSARLSWTAPDAAIDSFIDYSEYWWGGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVLITGVKGGYRSGPLSAIFTT
321	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIRYNEFIVAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPIAGVKGGGASWPLSAIVTT
322	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWYLELQFAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPITGVKGGIISFPLSAIFTT
323	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIYHEWYGDGEAIV LTVPGSERSYDLTGPKPGTEYVRISGVKGGFESGPLSAIFTT
324	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFMIRYQEGTRWGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVMIAGVKGGQISLPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

325	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIWYLEKSYQGGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVPIIGVKGGGRDSCPLSAIFTT
326	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVPIIGVKGGSPSAPLSAEFTT
327	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRISYAETVRQGEAIVLT VPGSERSYDLTVETGYRNWVMILGVKGGPGSLPLSAIFTT
328	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVVRAFDSDLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVPIIGVKGGSPSAPLSAEFTT
329	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWIEYWEAVGFGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGYLSAPLSAIFTT
330	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIIHYVEQQLIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPITGVKGGACSWPLSAIFTT
331	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIEYSEHPIDGEAIVL PGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVRIHGVKGGWFSHPLWAFFTT
332	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVTIAGVKGGWRKPLNAESTT
333	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYVESYWYGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPIYGVKGGDGSGLPLSAIFTT
334	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYITYVELNLAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPILGVKGGSLSQPLSAIFTT
335	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPISYIESIADGEAIVLT PGSERSYDLTGLKPGTEYWVAIVGVKGGPFSWSLSAIVTT
336	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVPT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVPIAGVKGGGPSAPLSAIFTT
337	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTTTPDAAFDSFPIYYWEVTITGEAIYLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVDIPGVKGGASPPLSAIFTT
338	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPILYLEHTVRSEIVLT VPGSERSYDLTDLKPGTEYCVPIDGVKGGLSRPLSAIFTT
339	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIPYTEPPDPGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYLVTLGVKGGSMSVPLSAIFTT
340	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIDYWENRCPGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYCVWISGVKGGYSSWPLSAIFTT
341	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVPIIGVKGGHLSPLSAIVTT
342	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIPYAETSPSGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSEPLSAIFTT
343	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFMIVYYEYTRFGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVPIDGVKGGGRSSPLSAIFTT
344	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIPYAEPSPTEGEAIVLT PGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIVTT
345	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPVPIIGVKGGSPSAPLSAEFTT
346	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFIIPYAEPVDPGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGKLSLPLSAIFTT
347	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIVYLEMMVTGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPILGVKGGTRSVPLSAIFTT
348	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIYYEEGYLEYYSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVGIVGVKGGGLSGPLSAISTT
349	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIAYAEPDPGEAIVLT

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

	VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDWLPLSAIFTT
350	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTIHYREFQLSGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPIEGVKGGPGSRPLSAIFTT
351	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSECSYDLTGLKPGTEYVPVWQGVKGGSPSAPLSAESTT
352	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIDYDELAIFYGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
353	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVPVWQGVKGGSPSAPLSAESTT
354	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIAYGEHIVIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYMPVPIAGVKGGPISLPLSAIFTT
355	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIPIYAEPSPTGEIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSLPLSAIFTT
356	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIYVELVLLGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYDVLIPGVKGGSLSRPLSAIFTT
357	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIPIYAEISRNGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVLIHGVKGGCLSDPLSAIFTT
358	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIHYLELSRHGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVMIFGVKGGGPKPLSAIFTT
359	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIYNEVHWIGEIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGHWSKPLSAIFTT
360	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIDYDELAIFYGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
361	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIPIYSELWIKGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYQVPIPIGVKGGGRNSFPLSAIFTT
362	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIKIRYTETRSIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYCVPIGGVKGGDSSWPLSAISTT
363	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEICISYYERMGRGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYMPVYIFGVKGGGLNSLPLSAIFTT
364	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIYVYAEPIPNGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGRNSDPLSAIFTT
365	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIPIYAEPRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
366	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEITIDYDEPRSPGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYRVFIWGIKGGDTSFPLSAIFTT
367	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEITILYAEQAQFGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPITGVKGGTRSGPLSAISTT
368	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIPIYAEVRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSLPLSAISTT
369	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIHIAYEETATSGEAIYLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVEIEGVKGGARSRLYADFTT
370	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVPVWQGVKGGDLNPLSAIFTT
371	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEIPIYSELVLYGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVGIAGVKGGVVSRLSAIFTT
372	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSEITIGYREWYWGGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPISGVKGGLDLPLSAIFTT
373	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVPVWQGVKGGSPSAPLSAESTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

374	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFSITYLEWWNLGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYMTIPGVKGGMSSYPLSAIFTT
375	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTISYGEEALIGEAIYLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYYVHIEGVKGGWSQPLAAFTT
376	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTIEYYENIGIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVPIVGVKGGPYSHPLSAIFTT
377	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYAEPRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
378	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFGIGYYEHKRFGEAIQL SVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVDIEGVKGGVLSWPLFAEFTT
379	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPVIEYTERFWSGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVPIDGVKGGQCSTPLSAIFTT
380	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPWIDYEEEGVIGEAIYL HVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVKIHGVKGGHPSHPLVAVFTT
381	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYVELRHLGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
382	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFLIPYAETSPSGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSSPLSAIFTT
383	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYAEPRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
384	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFSILYLELTPKGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
385	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPHIEYFPIPIGEIVLTP GSERSYDLTGLKPGTEYAVNIYGVKGGYLSHPLSAIFTT
386	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSECSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
387	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFAIEYTEFLYSGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVPIGVKGGFVSPPLSAIVTT
388	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIKYREVLRCGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTPITGVKGGFGSSPLSAIFTT
389	MLPAPENLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPWIEYYEGVIQGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYFVAIWGVKGGKWSVPLSAIFTT
390	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAEFTT
391	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIHYWETQGFGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVLIPGVKGGPSSLPLSAIFTT
392	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIPIYAEPSPTEGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
393	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFAIEYYEPVPAGEAIYLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYDVITIYGVKGGYYSHPLFASFTT
394	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAIFTT
395	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
396	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYLEVFEYGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYQVPIEGVKGGAMSLPLSAIFTT
397	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIWYEEETTIGEAIYH VPGSERSYDLTGLKPGTEYEVHITGVKGGPYSRPLFANFTT
398	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYDEWPEFGEAIVLT

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

	VPGSERSYDLTGLKPDTEYIVEIYGVKGGWFSWPLSAIFTT
399	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIPYAEPSPTEGAIIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSVIFTT
400	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIWEYEEVMYLGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPIPGVKGGHSSPPLSAIFTT
401	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFHILYEELFLVGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYKVPISGVKGGPVSRPLSAIFTT
402	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
403	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFHIVYHEPRPSGEAIWL HVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVGIVSVKGGDLSPVLAFFTT
404	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAISLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAVFTT
405	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIFLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHANFTT
406	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAILLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYASFTT
407	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAISL YVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
408	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIQLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
409	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFHISYEEDYTFGEAIYLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYRVVIGGVKGGWFSEPLLAFTT
410	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIYLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLDASFTT
411	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIDL VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLDPLEAYFTT
412	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAILL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
413	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAINLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFFTT
414	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAISLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSSPLFAVFTT
415	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIELH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
416	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIQLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
417	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAITLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
418	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIWL VVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVASFTT
419	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAINLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
420	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIHLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
421	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIALW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
422	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAILV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

423	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLGAVFTT
424	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIQLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLASFTT
425	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIALH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFFTT
426	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLHANFTT
427	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIFLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
428	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIVLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIASFTT
429	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAINL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
430	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIEYFEWTLNGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVQIYGVKGGCLSRPLSAIFTT
431	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIHL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAHFTT
432	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIPYAEPSPDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT
433	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIYLY VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAFTT
434	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIGLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
435	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIQLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAFTT
436	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIWLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLIAIFTT
437	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIVLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
438	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIQLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHASFTT
439	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLNANFTT
440	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLSAIFTT
441	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIFLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAFTT
442	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLKAQFTT
443	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAILLF VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAHFTT
444	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIGLY VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGAFTT
445	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAIFTT
446	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAITLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
447	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIVLE

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

	VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAHFTT
448	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEIALH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLRAVFTT
449	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
450	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSRTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLV PGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
451	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPRPLQAHFTT
452	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAITLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAFTT
453	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEIALH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
454	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLIAHFTT
455	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHARFTT
456	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIFLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAAVFTT
457	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAISTT
458	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAVFTT
459	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIYK VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAHFTT
460	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLLAYFTT
461	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLEAKFTT
462	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIKLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAIFTT
463	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIYLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPFLKAAFTT
464	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAIFTT
465	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAAWFTT
466	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIFLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLNAFTT
467	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHAYSTT
468	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
469	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAVFTT
470	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLLAHFTT
471	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAYFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

472	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLASFTT
473	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIVYHEPRPSGEAIHLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLSAFTT
474	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
475	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRISYCETFYHGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAKFTT
476	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIWL KVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
477	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIWL KVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
478	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIQLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
479	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIAYAEPDPDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
480	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIALL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAQFTT
481	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIHLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAKFTT
482	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIDLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHALFTT
483	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAILLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGFPSMPLSAIFTT
484	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIDLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSFTT
485	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIYLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAKFTT
486	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
487	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAISLL VPDSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLKFTT
488	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIGLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
489	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIQLT VPGSERSYDLTGPKPGTEYWVLIQGVKGGGSSVPLVAYFTT
490	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAISLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEASFTT
491	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILAV PGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSLPLVASFTT
492	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIGYTEYGGYGEAIYL SVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGGSSVPLSAIFTT
493	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAISLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIANFTT
494	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIALL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
495	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAILD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSIFTT
496	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPDPDGEAIVL

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

	WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRASFTT
497	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIKLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFFTT
498	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIILE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
499	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHADFTT
500	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL EVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVADFTT
501	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAHFTT
502	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIGYTEYGGYGEAILH VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
503	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLAAFTT
504	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSQFTT
505	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLHPLVALFTT
506	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
507	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAAYFTT
508	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLVAFTT
509	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSCRSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAIFTT
510	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAINLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSFPLSAVFTT
511	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
512	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL AVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAQFTT
513	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
514	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLCAEFTT
515	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAEFTT
516	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPPKFTT
517	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIILE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAVFTT
518	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
519	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLK VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAIFTT
520	MLPAPKNPVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLKRLSPPVVTTITMA

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

	VCRKPVAENLSQTLS
521	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIFLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSPLTAFTT
522	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLAAFTT
523	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLQANFTT
524	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
525	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSASFTT
526	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTASFTT
527	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
528	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAASFTT
529	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAHFTT
530	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL LVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
531	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLY VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSDPLDAVFTT
532	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIYLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSTFTT
533	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLF VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLKAYFTT
534	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
535	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSLPLSADFTT
536	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAEFTT
537	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYASFTT
538	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIRLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGFTT
539	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAIFTT
540	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAKFTT
541	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT
542	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAAFTT
543	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLAAVFTT
544	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGAHFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

545	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIAL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVASFTT
546	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAFTT
547	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRASFTT
548	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL GVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHATFTT
549	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHANFTT
550	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAKFTT
551	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPDPLQAVFTT
552	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAFTT
553	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
554	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAKFTT
555	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLF VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSTPLSASFTT
556	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAYFTT
557	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAYFTT
558	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFSTT
559	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAVFTT
560	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPMPLSAFTT
561	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAKFTT
562	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQAFSTT
563	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAANFTT
564	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAINLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
565	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTASFTT
566	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIRLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGASFTT
567	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
568	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIYLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
569	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

	DVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
570	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIYCETKMCGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVPIPGVKGGTASLPLSAIFTT
571	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFFIYYIESYPAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
572	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFFIYYIESYPAGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
592	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTAPAPAPAP APLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
593	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTGGGGSGG GGSGGGGGSGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVY HEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLS AIFTT
594	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKEA AAKEAAAKEAAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIV YHEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPL SAIFTT
595	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
596	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTAPAPAPA PAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIEYFEYVGYGEAIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTT
597	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTGGGGSG GGGGSGGGGGSGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIE YFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRP LSAIFTT
598	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKE AAAKEAAAKEAAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIE YFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRP LSAIFTT
599	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKL PAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFKIEYFEYVGYGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTT
708	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
709	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
710	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSFFIGYLEPQPPGEAIHLG VPGSCRSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT

10

20

30

40

【0259】

本明細書で提示される通り、一部の実施形態では、CD71に結合するFN3ドメインは、各々の配列が、下記に提示される、配列番号2（ヒト成熟CD71）または配列番号5（ヒト成熟CD71細胞外ドメイン）に結合する：

【0260】

【表 8】

2	MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKGPPPPQPLLQRLCSGPRLLLLSLGLS LLLLVVVCVIGSQNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNVG RKMKSLESQLEKQQKDLSEDHSSLLLHVKQFVSDLRSLSCQMAALQGN GSERTCCPVNWVEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTS WEEQKFVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQ PDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQ EPPLL
5	QNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAQVKGLSTQGGNVGRKMKSLESQLE KQQKDLSEDHSSLLLHVKQFVSDLRSLSCQMAALQNGSERTCCPVNW VEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHI GPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDDWYGHGLG GGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

10

【0261】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーでありうる。リンカーは、本明細書で記載される、短鎖ペプチド配列などの短鎖ペプチド配列でありうる。例えば、リンカーは、G/SリンカーまたはG/Aリンカーなどでありうる。本明細書で提示される通り、リンカーは、例えば、(GS)₂、(配列番号720)、(GGGS)₂(配列番号721)、(GGGGS)₅(配列番号722)、(AP)₂₋₂₀、(AP)₂(配列番号723)、(AP)₅(配列番号724)、(AP)₁₀(配列番号725)、(AP)₂₀(配列番号726)、およびA(EAAAK)₅AAA(配列番号727)、または(EAAAK)₁₋₅(配列番号728)でありうる。これらは、非限定例であり、他のリンカーもまた、使用される。GGGGSリピートまたはGGGGAリピートの数もまた、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つでありうる。一部の実施形態では、リンカーは、1つまたはそれ以上のGGGGSリピートと、1つまたはそれ以上のGGGGAリピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK(配列番号729)；GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS(配列番号730)；APAPAPAPAP(配列番号731)；またはEAAAK(配列番号732)を含む。

20

30

【0262】

一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号593のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号594のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号595のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号596のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号597のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号598のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号599のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592～599のうちの1つのアミノ酸配列を有する。

40

【0263】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、該当する場合、当業者により実施され、表面プラズモン共鳴法またはKinexa法により決定される通り、約 1×10^{-7} M未満、

50

例えば、約 1×10^{-8} M 未満、約 1×10^{-9} M 未満、約 1×10^{-10} M 未満、約 1×10^{-11} M 未満、約 1×10^{-12} M 未満、または約 1×10^{-13} M 未満の解離定数 (K_D) で、CD71 に結合しうる。測定された、特定の FN3 ドメイン-抗原間相互作用のアフィニティーは、異なる条件 (例えば、オスモル濃度、pH) 下で測定された場合に変動しうる。したがって、アフィニティー、および他の抗原結合性パラメータ (例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off}) の測定は、タンパク質足場および抗原の正規化溶液、ならびに本明細書で記載される緩衝液などの正規化緩衝液によりなされる。

【0264】

一部の実施形態では、FN3 ドメインは、その標的タンパク質に、標準溶液 ELISA アッセイにおいて、陰性対照について得られるシグナルを、少なくとも 5 倍上回る強さで結合しうる。

【0265】

一部の実施形態では、その標的タンパク質に結合するか、またはこれに特異的に結合する FN3 ドメインは、分子の N 末端へと連結された、イニシエーターメチオニン (Met) を含む。一部の実施形態では、その標的タンパク質に結合するか、またはこれに特異的に結合する FN3 ドメインは、FN3 ドメインの C 末端へと連結された、システイン (Cys) を含む。N 末端 Met および／または C 末端 Cys の付加は、半減期延長分子の発現および／またはコンジュゲーションを容易としうる。

【0266】

FN3 ドメインはまた、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第 10, 196, 446 号において記載されたシステイン置換などのシステイン置換も含有しうる。略述すると、一部の実施形態では、FN3 ドメインを含むポリペプチドは、システイン操作フィブロネクチン III 型 (FN3) ドメインと称される、システインで置換された残基を有する FN3 ドメインを有しうる。一部の実施形態では、FN3 ドメインは、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第 10, 196, 446 号の配列番号 1 (LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESSEKVGAEINLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYTVS IYGVKGGHRSNPLSAEFTT) に基づく FN3 ドメインの、残基 6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、および 93 からなる群から選択される位置、ならびに類縁の FN3 ドメイン内の、同等の位置において、少なくとも 1 つのシステイン置換を含む。ドメイン内またはタンパク質内の位置におけるシステイン置換は、既存のアミノ酸残基の、システイン残基による置きかえを含む。システイン修飾の他の例は、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第 20170362301 号において見出される。配列のアライメントは、例えば、NCBI ウェブサイトにおいて、デフォルトパラメータを使用する BlastP を使用して実施される。

【0267】

一部の実施形態では、標的タンパク質に結合する FN3 ドメインは、細胞へと内部化される。一部の実施形態では、FN3 ドメインの内部化は、検出用標識または治療剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、FN3 ドメインの内部化は、細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。細胞傷害剤は、治療剤として作用しうる。一部の実施形態では、FN3 ドメインの内部化は、本明細書で開示される、任意の検出用標識、治療的、および／または細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞、肺細胞、筋細胞、免疫細胞、樹状細胞、CNS 細胞、または心臓細胞である。一部の実施形態では、治療剤は、本明細書で提示される siRNA 分子である。検出用標識へとコンジュゲートされた、CD71 に結合する FN3 ドメインは、in vivo または in vitro において、腫瘍組織などの試料上における、CD71 の発現について査定するのに使用される。検出用標識へとコンジュゲートされた、CD71 に結合する FN3 ドメインは、in vi

10

20

30

40

50

v o または i n v i t r o において、試料である、血液、免疫細胞、筋細胞、または樹状細胞上における、C D 7 1 の発現について査定するのに使用される。

【0268】

本明細書で提示される通り、s i R N A 分子へと連結された、異なる F N 3 ドメインはまた、異なる標的に結合する、別の F N 3 ドメインへもコンジュゲートされるか、または連結される。これは、分子が、第 1 の標的と、別の、例えば、標的とに結合するように、多特異的（例えば、二特異的、三特異的など）となることを可能とするであろう。一部の実施形態では、第 1 の F N 3 結合性ドメインは、腫瘍細胞により発現される抗原（腫瘍抗原）に結合する、別の F N 3 ドメインへと連結される。

【0269】

一部の実施形態では、F N 3 ドメインは、二価 F N 3 ドメインを形成するように、リンカーにより、一体に連結される。リンカーは、可撓性リンカーでありうる。一部の実施形態では、リンカーは、G / S リンカーである。一部の実施形態では、リンカーは、1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つの G / S リピートを有する。G / S リピート単位は、4 つのグリシンに続くセリン、例えば、G G G G S である。本明細書では、リンカーの他の例も提示され、これらもまた、使用される。

【0270】

一部の実施形態では、リンカーは、(G S)₂、(配列番号 720)、(G G G S)₂ (配列番号 721)、(G G G G S)₅ (配列番号 722)、(A P)₂₋₂₀、(A P)₂ (配列番号 723)、(A P)₅ (配列番号 724)、(A P)₁₀ (配列番号 725)、(A P)₂₀ (配列番号 726)、および A (E A A A K)₅ A A A (配列番号 727)、または (E A A A K)₁₋₅ (配列番号 728) のポリペプチドである。これらは、非限定例であり、他のリンカーもまた、使用される。G G G G S リピートまたは G G G G A リピートの数もまた、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つでありうる。一部の実施形態では、リンカーは、1 つまたはそれ以上の G G G G S リピートと、1 つまたはそれ以上の G G G G A リピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、1 つまたはそれ以上の G G G G S リピートと、1 つまたはそれ以上の E A A A K リピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、1 つまたはそれ以上の G G G G S リピートと、1 つまたはそれ以上の「A P」リピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K (配列番号 729)；G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 730)；A P A P A P A P A P (配列番号 731)；または E A A A K (配列番号 732) を含む。

【0271】

いかなる特定の理論にも束縛されずに述べると、一部の実施形態では、核酸分子へと連結された F N 3 ドメインは、1 つまたはそれ以上の F N 3 ドメインの結合パートナーを発現し（例えば、腫瘍細胞）、その中における、核酸分子の細胞内蓄積をもたらす細胞への、治療剤のターゲティング送達において使用される。これは、s i R N A 分子が、細胞機構と適正に相互作用して、標的遺伝子の発現を阻害し、有効性を改善し、また、一部の実施形態では、同じ s i R N A 分子の、ターゲティングされていない投与により生じる毒性も回避することを可能とする。

【0272】

それらの特異的標的タンパク質に結合する、本明細書で記載される F N 3 ドメインは、単量体、二量体、または多量体として、例えば、標的分子への結合価数を増大させ、これにより、標的分子への結合アビディティを増大させるか、または 2 つもしくはこれを超える、異なる標的分子に同時に結合する、二特異的足場もしくは多特異的足場を作出する手段として作出される。二量体および多量体は、単一特異的タンパク質足場、二特異的タンパク質足場、または多特異的タンパク質足場を連結することにより、例えば、アミノ酸リンカー、例えば、ポリグリシン、グリシンおよびセリン、またはアラニンおよびプロリンを含有するリンカーを組み入れることにより作出される。例示的リンカーは、(G S)₂、(配列番号 720)、(G G G S)₂ (配列番号 721)、(G G G G S)₅ (配列

10

20

30

40

50

【 0 2 7 3 】

【 0 2 7 4 】

【 0 2 7 5 】

一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメイン（タンパク質）は、単離アルブミン結合性ドメイン（タンパク質）である。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質が、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に対応する置換を有することを条件として、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、A10Vである。一部の実施形態では、置換は、A10G、A10L、A10I、A10T、またはA10Sである。一部の実施形態では、10位における置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。一部の実施形態では、単離アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、1

07、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と比較した場合に、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、または14の置換を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に対応する位置にある。一部の実施形態では、提供されるFN3ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、もしくは119の、残基位置6、11、22、25、26、52、53、61、88、もしくは6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、もしくは93位に対応する、少なくとも1つの残基位置、またはC末端において、システイン残基を含む。一連の位置が列挙されるが、各位置はまた、個別にも選出される。一部の実施形態では、システインは、6、53、または88位に対応する位置にある。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインのさらなる例は、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第10,925,932号において見出される。

10

【0276】

抗体様特性、とりわけ、C1qへの結合、補体依存性細胞傷害作用(CDC)、Fc受容体への結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)、食作用、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体;BCR)の下方調節など、Fcエフェクター機能など、Fc領域と関連する特性を付与するように、抗体定常領域の全部または一部が、FN3ドメインへと接合され、これらの活性の一因となる、Fc内の残基を修飾することにより、さらに修飾される場合がある(総説については、Strohl、Curr Opin Biotechnol、20、685~691、2009を参照されたい)。

20

【0277】

所望の特性のために、PEG5000またはPEG20,000などのポリエチレングリコール(PEG)分子、異なる鎖長の脂肪酸および脂肪酸エステル、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、オレイン酸、アラキドン酸、オクタデカンジオン酸、テトラデカンジオン酸、オクタデカンジオン酸、ドコサカンジオン酸など、ポリリシン、オクタン、炭水化物(デキストラン、セルロース、オリゴ糖、または多糖)など、さらなる部分も、FN3ドメインへと組み込まれる。これらの部分は、タンパク質足場のコード配列との、直接的な融合体であり、標準的なクローニング法および発現法により作出される場合がある。代替的に、周知の化学的カップリング法は、部分を、本明細書で開示される、組換え作製分子へと接合するのに使用される。

30

【0278】

PEG部分は、例えば、システイン残基を、分子のC末端へと組み込むことにより、FN3ドメインへと付加される場合もあり、システインを、分子の結合面から離れた残基位置へと操作し、周知の方法を使用して、PEG基を、システインへと接合することにより、FN3ドメインへと付加される場合もある。

40

【0279】

さらなる部分を組み込むFN3ドメインは、いくつかの周知のアッセイにより、機能性について比較される。例えば、Fcドメインおよび/またはFcドメイン変異体の組み込みにより変更される特性については、FcγRI受容体、FcγRII受容体、FcγRIII受容体、またはFcRn受容体などの受容体の可溶性形態を使用する、Fc受容体結合アッセイにおいてアッセイされる場合もあり、例えば、ADCCもしくはCDCを測定するか、またはin vivoモデルにおける、本明細書で開示される分子の薬物動態特性について査定する、周知の細胞ベースのアッセイを使用してアッセイされる場合もある。

【0280】

50

本明細書で提示される組成物は、F N 3 タンパク質および核酸分子を調製し、それらを、一体に連結することにより調製される。タンパク質を、核酸分子へと連結する技法は、公知であり、任意の方法が使用される。例えば、一部の実施形態では、核酸分子を、本明細書で提示されるリンカーなどのリンカーで修飾し、次いで、タンパク質を、リンカーを含む核酸分子と混合して、組成物を形成する。例えば、一部の実施形態では、F N 3 ドメインは、チオール-マレイミド化学反応を使用して、s i R N A システインへとコンジュゲートされる。一部の実施形態では、システイン含有 F N 3 ドメインを、例えば、還元剤（例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（T C E P））を伴う、リン酸緩衝生理食塩液（または他の任意の適切な緩衝液）中で還元して、遊離チオールをもたらすことができる。次いで、一部の実施形態では、F N 3 ドメインを含有する遊離チオールは、連結複合体を形成するように、マレイミド連結で修飾された s i R N A 二重鎖と混合され、条件下でインキュベートされた。一部の実施形態では、混合物は、室温で、0～5 時間、または約 1、2、3、4、または 5 時間にわたりインキュベートされる。反応は、例えば、N-エチルマレイミドでクエンチされる。一部の実施形態では、コンジュゲートは、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換を使用して精製される。他の方法もまた、使用されるが、これは、1つの非限定的実施形態であるに過ぎない。

10

【0281】

F N 3 タンパク質を作製する方法は、公知であり、任意の方法は、タンパク質を作製するのに使用される。例は、参照によって本明細書に組み入れる参考文献において提示される。

20

【0282】

一部の実施形態では、C D 7 1 に特異的に結合する F N 3 ドメインは、配列番号 3 0 1～3 0 1、3 1 0、3 1 2～5 1 9、5 2 1～5 7 2、5 9 2～5 9 9、または 7 0 8～7 1 0 のアミノ酸配列を含み、この場合、ヒスチジンタグが、精製を容易とするために、ポリペプチドの N 末端または C 末端へと付属させられている。一部の実施形態では、ヒスチジンタグ（H i s タグ）は、6つのヒスチジン残基を含む。さらなる実施形態では、H i s タグは、少なくとも 1つのグリシン残基、または約 2つ～約 4つのグリシン残基により、F N 3 ドメインへと接続される。したがって、F N 3 ドメインの精製、およびポリペプチドからの H i s タグの切断の後、1つまたはそれ以上のグリシンが、N 末端上または C 末端上に残される場合がある。一部の実施形態では、H i s タグが、N 末端から除去される場合、全てのグリシンが除去される。一部の実施形態では、H i s タグが、C 末端から除去される場合、グリシンのうちの 1つまたはそれ以上が保持される。

30

【0283】

一部の実施形態では、C D 7 1 に特異的に結合する F N 3 ドメインは、配列番号 3 0 1～3 0 1、3 1 0、3 1 2～5 1 9、5 2 1～5 7 2、5 9 2～5 9 9、または 7 0 8～7 1 0 のアミノ酸配列を含み、この場合、N 末端メチオニンは、F N 3 ドメインの精製の後で保持される。

【0284】

キット

一部の実施形態では、本明細書で記載される組成物を含むキットが提供される。

40

【0285】

キットは、治療的使用のために使用され、診断用キットとして使用される。

【0286】

一部の実施形態では、キットは、核酸分子へとコンジュゲートされた F N 3 ドメインを含む。

【0287】

コンジュゲート F N 3 ドメインの使用

本明細書で提示される組成物は、細胞、組織、臓器、体液、または、一般に、宿主における、ヒト疾患の症状、または特異的病態を診断するか、モニタリングするか、モジュレートするか、処置するか、緩和するか、これらの発生を防止するか、またはこれらを軽減

50

するのに使用される。

【0288】

一部の実施形態では、骨格筋内の、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質を選択的に低減する方法が提供される。ある特定の実施形態では、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質は、肝臓内および／または腎臓内で低減されない。

【0289】

一部の実施形態では、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質の低減は、本明細書で記載されるコンジュゲートの投与後、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、または5週間を超える期間にわたり維持される。

【0290】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、筋疾患の処置のために、CD71陽性組織（例えば、骨格筋、平滑筋）への送達を容易としうる。

【0291】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、免疫疾患の処置のために、活性化リンパ球、活性化樹状細胞、または他の活性化免疫細胞への送達を容易としうる。

【0292】

一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における自己免疫疾患を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、1型糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、および免疫性血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。

【0293】

一部の実施形態では、ポンベ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を有する対象を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。

【0294】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォブズ病（GSD3；グリコーゲン脱分枝酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5；筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、GSD12であるアルドラーゼA欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4；グリコーゲン脱分枝酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7；筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC／SLC37A4）欠損症（GSD1；フォンギールケ病）、ハース病（GSD6；肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2／PHKB

10

20

30

40

50

／PHKG2／PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症（GSD10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD11）、ファンコーニービッケル症候群（GSD11；グルコース輸送体（GLUT2）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（GSD12）、β-エノラーゼ（ENO3）欠損症（GSD13）、およびグリコゲニン-1（GYG1）欠損症（GSD15）からなる群から選択される。

【0295】

一部の実施形態では、がんを処置するための医薬組成物または医薬の調製における、本明細書で提示される組成物の使用が提供される。一部の実施形態では、がんは、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、胃がん、明細胞性腎細胞癌、明細胞性乳癌、明細胞性子宮内膜癌、明細胞性卵巣癌、明細胞性子宮癌、肝細胞癌、膵臓がん、前立腺がん、軟部組織がん、ユーイング肉腫、および非小細胞肺癌からなる群から選択される。

10

【0296】

一部の実施形態では、CD71細胞は、多発性硬化症（MS）および脳の感染性疾患など、CNS疾患、炎症性疾患／免疫疾患に関与する細胞である。一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、中枢神経系へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における神経学的状態および／または脳腫瘍を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、脳腫瘍は、非悪性脳腫瘍、良性脳腫瘍、および悪性脳腫瘍からなる群から選択される。一部の実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギラン-バレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、偏頭痛、脳炎、敗血症、および重症筋無力症からなる群から選択される。

20

【0297】

一部の実施形態では、がんを有する対象を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。

30

【0298】

一部の実施形態では、対象は、充実性腫瘍を有する。

40

【0299】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、黒色腫である。

【0300】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、肺がんである。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、非小細胞肺癌（NSCLC）である。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、扁平上皮非小細胞肺癌（NSCLC）である。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、非扁平上皮NSCLCである。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、肺腺癌である。

【0301】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、腎細胞癌（RCC）である。

【0302】

50

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、中皮腫である。

【0303】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、鼻咽頭癌（NPC）である。

【0304】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、結腸直腸がんである。

【0305】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、前立腺がんである。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、去勢抵抗性前立腺がんである。

【0306】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、胃がん（stomach cancer）である。 10

【0307】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、卵巣がんである。

【0308】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、胃がん（gastric cancer）である。

【0309】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、肝がんである。

【0310】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、膵がんである。

【0311】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、甲状腺がんである。 20

【0312】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、頭頸部扁平上皮がんである。

【0313】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、食道癌または消化器癌である。

【0314】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、乳がんである。

【0315】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、卵管がんである。

【0316】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、脳がんである。 30

【0317】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、尿道がんである。

【0318】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、泌尿生殖器がんである。

【0319】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、子宮内膜症である。

【0320】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、子宮頸がんである。

【0321】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、がんの転移性病変である。 40

【0322】

一部の実施形態では、対象は、血液悪性腫瘍を有する。

【0323】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、骨髄腫、または白血病である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、B細胞リンパ腫である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、パーキットリンパ腫である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、ホジキンリンパ腫である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、非ホジキンリンパ腫である。

【0324】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、骨髄異形成症候群である。

【0325】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄性白血病（CML）である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄単球性白血病（CMML）である。

【0326】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、多発性骨髄腫（MM）である。

【0327】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、形質細胞腫である。

【0328】

一部の実施形態では、がんは、軟部組織がんである。一部の実施形態では、軟部組織がんは、ユーイング肉腫である。

【0329】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される任意の組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物の、がんを処置するための医薬組成物または医薬の調製における使用が提供される。一部の実施形態では、組成物は、がんを処置するために使用される。

【0330】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるポンペ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される任意の組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物の、ポンペ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を処置するための医薬組成物または医薬の調製における使用が提供される。一部の実施形態では、組成物は、ポンペ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を処置するために使用される。

【0331】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される任意の組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物の、糖原病を処置するための医薬組成物または医薬の調製における使用が提供される。一部の実施形態では、組成物は、糖原病を処置するために使用される。

【0332】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォブズ病（GSD3；グリコーゲン脱分枝酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5；筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、GSD12であるアルドラーゼA欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4；グリコーゲン脱分枝酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7；筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC／SLC37A4）欠損症（GSD1；フォンギールケ病）、ハース病（GSD6；肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2／PHKB／PHKG2／PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症（GSD10）、筋乳酸デヒドロゲナーゼ（LDHA）欠損症（GSD11）、ファンコーニービッケル症候群（GSD11；グルコース輸送体（GLUT2）欠損症）、アルドラーゼA欠損症（GSD12）、 β -エノラーゼ（ENO3）欠損症（GSD13）、およびグリコゲニン-1（GYG1）欠損症（GSD15）からなる群から選択される。

【0333】

一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、中枢神経系へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における神経学的状態および／または脳腫瘍を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、脳腫瘍は、非悪性脳腫瘍、良性脳腫瘍、および悪性脳腫瘍からなる群から選択される。一部の実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギラン・バレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、偏頭痛、脳炎、敗血症、および重症筋無力症からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象における、神経学的状態および／または脳腫瘍を処置する方法であって、対象へと、CD71に結合するFN3ドメインを投与する工程を含み、FN3ドメインが、治療剤（例えば、細胞傷害剤、siRNAなどのオリゴヌクレオチド、ASO、別の標的に結合するFN3ドメインなど）へとコンジュゲートされる方法が提供される。

10

【0334】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるポンペ病を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、対象における、ポンペ病を処置する方法であって、対象へと、CD71に結合するFN3ドメインを投与する工程を含み、FN3ドメインが、治療剤（例えば、細胞傷害剤、siRNAなどのオリゴヌクレオチド、ASO、別の標的に結合するFN3ドメインなど）へとコンジュゲートされる方法が提供される。

20

30

【0335】

一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における自己免疫疾患を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、1型糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、および免疫性血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象における、自己免疫疾患を処置する方法であって、対象へと、CD71に結合するFN3ドメインを投与する工程を含み、FN3ドメインが、治療剤（例えば、細胞傷害剤、siRNAなどのオリゴヌクレオチド、ASO、別の標的に結合するFN3ドメインなど）へとコンジュゲートされる方法が提供される。

40

【0336】

一部の実施形態では、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞へと、本明細書で提示される組成物または医薬組成物を送達

50

する工程を含む。一部の実施形態では、細胞は、*ex vivo*における細胞である。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*における細胞である。一部の実施形態では、標的遺伝子は、*GY S 1*である。しかし、本明細書で提示される証拠が、*siRNA*分子が、*FN 3*ドメインへとコンジュゲートされた場合に、効率的に送達されることを裏付ける通り、標的遺伝子は、任意の標的遺伝子でありうる。一部の実施形態では、*GY S 1*をターゲティングする*siRNA*は、*FN 3*ドメインへと連結される。一部の実施形態では、*FN 3*ポリペプチド（ドメイン）は、*CD 7 1*に結合する*FN 3*ポリペプチド（ドメイン）である。一部の実施形態では、*FN 3*ポリペプチドは、本明細書で提示される通りであるか、または、それらの各々が、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、*PCT*出願第*PCT/US 20/55509*号、米国出願第*17/070,337*号、*PCT*出願第*PCT/US 20/55470*号、または米国出願第*17/070,020*号において提示される通りである。一部の実施形態では、*siRNA*は、*FN 3*ドメインへとコンジュゲートされない。

10

【0337】

一部の実施形態では、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞へと、本明細書で提示される組成物または医薬組成物を送達する工程を含む。一部の実施形態では、細胞は、*ex vivo*における細胞である。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*における細胞である。一部の実施形態では、標的遺伝子の発現を低減する方法は、標的遺伝子の発現の、約99%、90~99%、50~90%、または10~50%の低減を結果としてもたらす。

20

【0338】

一部の実施形態では、*GY S 1*の発現を低減する方法が提供される。一部の実施形態では、低減される発現は、*GY S 1 mRNA*の発現（量）である。一部の実施形態では、*GY S 1*の発現を低減する方法は、*GY S 1*の発現の、約99%、90~99%、50~90%、または10~50%の低減を結果としてもたらす。一部の実施形態では、低減される発現は、*GY S 1*タンパク質の発現（量）である。一部の実施形態では、低減されるタンパク質は、グリコーゲンである。一部の実施形態では、グリコーゲンの低減は、筋細胞内で生じる。一部の実施形態では、グリコーゲンの低減は、心臓細胞内で生じる。一部の実施形態では、方法は、*GY S 1*をターゲティングする、本明細書で提示される*siRNA*分子を含む。一部の実施形態では、*siRNA*は、*FN 3*ドメインへとコンジュゲートされる。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、*CD 7 1*に結合する*FN 3*ドメインである。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、本明細書で提示される通りである。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、*CD 7 1*に結合する2つの*FN 3*ドメインによる二量体である。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、同じ*FN 3*ドメインである。一部の実施形態では、2つの*FN 3*ドメインは、異なる、すなわち、*CD 7 1*の異なる領域またはアミノ酸残基、すなわち、異なるエピトープに結合する。一部の実施形態では、方法は、対象（患者）へと、本明細書で提示される*GY S 1 siRNA*分子などの*GY S 1 siRNA*分子を投与する工程を含む。一部の実施形態では、対象へと投与される*GY S 1 siRNA*は、*FN 3*ドメインへとコンジュゲートされるか、または連結される。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、*CD 7 1*に結合する*FN 3*ドメインである。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、本明細書で提示される通りである。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、*CD 7 1*に結合する2つの*FN 3*ドメインによる二量体である。一部の実施形態では、*FN 3*ドメインは、同じ*FN 3*ドメインである。一部の実施形態では、2つの*FN 3*ドメインは、異なる、すなわち、*CD 7 1*の異なる領域またはアミノ酸残基、すなわち、異なるエピトープに結合する。一部の実施形態では、*CD 7 1*結合性ドメインは、本明細書で提示されるポリペプチドである。

30

40

【0339】

一部の実施形態では、*siRNA*分子を、対象における細胞へと送達する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される組成物を含む医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、細胞は、*CD 7 1*陽性細胞である。

50

タンパク質に言及する、「陽性細胞」という用語は、タンパク質を発現する細胞を指す。一部の実施形態では、タンパク質は、細胞表面上で発現される。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、筋細胞、CNS細胞、または血液脳関門内部の細胞である。一部の実施形態では、siRNAは、細胞内の標的遺伝子の発現を下方調節する。一部の実施形態では、標的遺伝子は、GYS1である。

【0340】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物は、細胞、組織、臓器、体液、または、一般に、宿主における、ヒト疾患の症状、または特異的病態を診断するか、モニタリングするか、モジュレートするか、処置するか、緩和するか、これらの発生を防止するか、またはこれらを軽減するのに使用され、また、血液脳関門を越えることが可能な特性も呈する。血液脳関門(BBB)は、大半の高分子(例えば、DNA、RNA、およびポリペプチド)、および多くの低分子が、脳に侵入することを防止する。BBBは、主に、高度に制限的な密着結合を伴う、特化した内皮細胞から構成され、この結果、小型の物質および大型の物質の、血液から、中枢神経系への通過は、BBBにより制御される。多くの治療剤が、所望の効率で、BBBを越えて送達されないため、この構造は、神経疾患および神経障害(例えば、脳がん)を伴う患者の処置および管理を困難とする。BBBの破壊を伴う、さらなる状態は、脳卒中、糖尿病、発作、高血圧性脳症、後天性免疫不全症候群、外傷性脳傷害、多発性硬化症、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、パーキンソン病(PD)、およびアルツハイマー病を含む。この能力は、とりわけ、例えば、星状細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、上衣腫、胚細胞腫(松果体腫)、多形性神経膠芽腫、希突起神経膠腫、神経鞘腫、網膜芽細胞腫、および先天性腫瘍を含む脳がん;または脊髄がん、例えば、神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、および肉腫を処置するために有用である。この能力は、さらに、ポンペ病および/または糖原病の処置においても有用である。ある特定の実施形態では、本明細書で提示される組成物は、治療剤または細胞傷害剤を、例えば、血液脳関門を越えて送達するのに使用される。ある特定の実施形態では、本明細書で提示される組成物は、治療剤または細胞傷害剤を、例えば、筋肉へと送達するのに使用される。

【0341】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォーブズ病(GSD3;グリコーゲン脱分枝酵素(AGL)欠損症)、マッカードル病(GSD5;筋グリコーゲンホスホリラーゼ(PYGM)欠損症)、II型糖尿病/糖尿病性腎症、GSD12であるアルドラーゼA欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病(GSD4;グリコーゲン脱分枝酵素(GBE1)欠損症)、タルイ病(GSD7;筋ホスホフルクトキナーゼ(PFKM)欠損症)、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ(GYS2)欠損症(GSD0)、グルコース-6-ホスファターゼ(G6PC/SLC37A4)欠損症(GSD1;フォンギールケ病)、ハース病(GSD6;肝グリコーゲンホスホリラーゼ(PYGL)欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症)、ホスホリラーゼキナーゼ(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1)欠損症(GSD9)、ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症(GSD10)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ(LDHA)欠損症(GSD11)、ファンコーニービッケル症候群(GSD11;グルコース輸送体(GLUT2)欠損症)、アルドラーゼA欠損症(GSD12)、 β -エノラーゼ(ENO3)欠損症(GSD13)、およびグリコゲニン-1(GYG1)欠損症(GSD15)からなる群から選択される。

【0342】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物または医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)である筋ジストロフィーなどの筋疾患を処置するのに使用される。

10

20

30

40

50

【0343】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物または医薬組成物は、単独で、または他の治療剤と組み合わせて、すなわち、同時に、または逐次的に投与される。一部の実施形態では、他の治療剤、またはさらなる治療剤は、他の抗腫瘍剤、または治療剤である。異なる腫瘍の種類および腫瘍の病期は、がんの処置に有用な、多様な補助的化合物の使用を要求する。例えば、本明細書で提示される組成物は、とりわけ、タキソール、チロシンキナーゼ阻害剤、ロイコボリン、フルオロウラシル、イリノテカン、ホスファターゼ阻害剤、MEK阻害剤など、多様な化学療法剤と組み合わせて使用される。組成物はまた、とりわけ、抗PD-1または抗CTLA-4など、腫瘍に対する免疫応答をモジュレートする薬物と組み合わせても使用される。さらなる処置は、PD-1またはPD-L1をターゲティングする抗体など、免疫系をモジュレートする薬剤でありうる。

10

【0344】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物または医薬組成物は、GAA酵素補充療法(ERT)と組み合わせて投与される。

【0345】

「～を処置する」または「処置」とは、目的が、がんの発症または拡散など、所望されない生理学的変化または障害を防止するか、または緩徐化する(低下させる)ことである、治療的処置および予防的措置を指す。一部の実施形態では、有益な臨床的結果、または所望の臨床的結果は、検出可能であれ、検出不能であれ、症状の緩和、疾患の程度の減殺、疾患の状態の安定化(すなわち、非増悪)、疾患進行の遅延または緩徐化、疾患状態の改善または軽減、および寛解(部分的であれ、全面的であれ)を含むがこれらに限定されない。「処置」はまた、処置を施されない場合の平均余命と比較して、生存を延長することも意味する。処置を必要とする患者は、状態もしくは障害を既に伴う患者のほか、状態もしくは障害を有しやすい患者、または状態もしくは障害が防止されるべきである患者を含む。

20

【0346】

「治療有効量」とは、所望の治療的結果を達成するのに必要な投与量で、必要な期間にわたり有効な量を指す。本明細書で提示される組成物の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重などの因子に従い変動する。有効量についての例示的指標は、患者の福利の改善、腫瘍のサイズの減少もしくは退縮、腫瘍の増殖の停止もしくは緩徐化、および／またはがん細胞の、体内の他の位置への転移の非存在である。

30

【0347】

投与／医薬組成物

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物と、薬学的に許容される担体とによる医薬組成物が提供される。治療的使用のために、組成物は、薬学的に許容される担体中に、有効成分としてのドメインまたは分子の有効量を含む医薬組成物として調製される。「担体」とは、それと共に活性化合物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または媒体を指す。このような媒体は、水、および石油由来の油、動物由来の油、植物由来の油、またはラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ごま油など、合成由来の油を含む油などの液体でありうる。例えば、0.4%の生理食塩液および0.3%のグリシンが使用される。これらの溶液は、滅菌であり、一般に、粒子状物質を含まない。これらの溶液は、常套的な周知の滅菌法(例えば、濾過)により滅菌される。組成物は、pH調整剤および緩衝剤、安定化剤、増粘剤、滑沢剤、および着色剤など、生理学的条件を近似するのに要求される、薬学的に許容される補助物質を含む。本明細書で開示される分子の、このような医薬製剤中濃度は、広範に、すなわち、体重の約0.5%未満、通例、少なくとも約1%～最大15または20%で変動する場合があります、主に、選択される特定の投与方式に従い要求される用量、流体の体積、粘度などに基づき選択されるであろう。他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む、適切な媒体および製剤については、例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」、21版、Troy, D. B. 編、Lipincott Willi

40

50

ams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006、5部、「Pharmaceutical Manufacturing」、691～1092頁（とりわけ、958～989を参照されたい）において記載されている。

【0348】

本明細書で開示される組成物の治療的使用のための投与方式は、錠剤、カプセル、溶液、粉末、ゲル、粒子による製剤を使用する、非経口投与、例えば、皮内投与、筋内投与、腹腔内投与、静脈内投与または皮下投与、肺内投与；経粘膜（経口、鼻腔内、膣内、直腸内）投与など、薬剤を、宿主へと送達する、任意の適切な経路であることが可能であり、シリンジ、植込み式デバイス、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ；または当技術分野で周知の、当業者により理解される、他の手段の中に含有される。部位特異的投与は、例えば、関節内送達、気管支内送達、腹腔内送達、関節包内送達、軟骨内送達、体腔内送達、腔内送達、小脳内送達、脳室内送達、結腸内送達、子宮頸部内送達、胃内送達、肝内送達、心内送達、骨内送達、骨盤内送達、心膜内送達、腹腔内送達、胸膜内送達、前立腺内送達、肺内送達、直腸内（intrarectal）送達、腎内送達、網膜内送達、脊髄内送達、滑膜内送達、胸内送達、子宮内送達、血管内送達、膀胱内送達、病変内送達、膣内送達、直腸内（rectal）送達、口腔内送達、舌下送達、鼻腔内送達、または経皮送達により達成される。

10

【0349】

医薬組成物は、本明細書で記載される医薬組成物を含む容器を含むキットとして供給される。医薬組成物は、例えば、単回投与もしくは複数回投与のための注射用溶液の形態で提供される場合もあり、注射の前に復元される滅菌粉末として提供される場合もある。代替的に、このようなキットは、医薬組成物の投与のための、乾燥粉末分散器、液体エアゾール発生器、または噴霧器を含みうる。このようなキットは、医薬組成物の適応および用法についての、書面による情報をさらに含みうる。

20

【0350】

実施例

以下の実施例は、本明細書で開示される実施形態を例示する。これらの実施例は、例示だけを目的として提示され、実施形態は、いかなる形であれ、これらの実施例に限定されるものと見なされるべきではなく、本明細書で提示される教示の結果としての証拠となる、任意の変化形および全ての変化形を包含すると見なされるべきである。当業者は、本質的に同様の結果をもたらすように変化させられるか、または改変される、それほど重要でない、様々なパラメータをたやすく認識するであろう。

30

【実施例1】

【0351】

GY S 1 s i R N A 配列の I D および特徴付け

s i R N A のコンピュータによるスクリーニング：コンピュータによる s i R N A スクリーニングを実施して、ヒト s i R N A の、ヒト G Y S 1 m R N A との相補性を同定した（図1を参照されたい）。全ての可能な19マーのアンチセンス配列を、ヒト G Y S 1 s i R N A 配列（NM__001161587）から作出し、各19マーを、他のヒト G Y S 1 アイソフォームに対する活性のほか、マウス、ラット、および C y n o m o l g u s m a c a q u e の間の、潜在的交差反応性について評価した。d b S N P （b155 v2）を使用して、ヒト s i R N A 標的部位を、共通ヒト S N P （マイナー対立遺伝子頻度（MAF）>1%）について評価した。共通対立遺伝子をターゲティングする配列は、棄却した。次に、s i R N A のオフターゲット遺伝子は、全ての関連するモデル生物における、センス鎖およびアンチセンス鎖について評価した。この選択は、200の潜在的候補配列をもたらしたが、これは、i n v i t r o ノックダウンスクリーンにより、さらに規定された。上位の s i R N A 候補配列を、表1Aおよび1Bに示す。システイン操作センチリンとのコンジュゲーションのための G Y S 1 s i R N A リンカーは、表3に記載された通りに調製した。

40

【0352】

50

非処置対照細胞と共に、HEK293T細胞に、10 nMのABXO-HHH (siRNA対であるHHH)を、24時間にわたりリポフェクトした(処置群1つ当たり6連で)。mRNAを、細胞から選択されたポリA+ mRNAであり、平均深度を>3,000万リードとする、Illumina HiSeqプラットフォーム上の、非ストランド2×150bpペアドエンドシーケンシングにかけられた。

【0353】

図2：非処置細胞と対比された、ABXO-HHH処置細胞のDESeq2結果を示す、ボルカノプロットである。x軸は、全ての遺伝子についての、 $\log_2$ による遺伝子発現の倍数変化(非処置細胞による遺伝子発現で除された、ABXO-HHH処置細胞による遺伝子発現)を表す。y軸は、負の $\log_{10}$ により変換された補正P値を示す。有色ドットは、BLASTを介して検出された、ABXO-HHHとの有意な相補性を伴う遺伝子を表す。

【0354】

FastQCを使用して、RNA-seqライブラリー品質を精査した。Kallistoを使用して、ライブラリーを、GrCh38ヒトトランスクリプトームに照らして、シュードアライメントした。本発明者らは、トランスクリプトームに照らしたリードアライメントの平均が>90%である、例外的リードアライメントを達成した。次いで、ABXO-HHH処置細胞を、リポフェクタミンだけで処置された細胞と比較する、DESeq2を使用して、示差的発現を評価した。

【0355】

DESeq2結果は、GYS1標的の、実質的、かつ、有意なノックダウンを示した。ABXO-HHH処置試料中のGYS1発現は、非処置試料の31%へと下方調節された(図2)。GYS1は、ABXO-HHH処置下で、示差的に発現(DE)された全ての遺伝子について、最も大きく下方調節されたタンパク質コード遺伝子であった。GYS1はまた、p値を最小とする、示差的発現度が群を抜く遺伝子でもあり、 $1 \times 10^{87.7}$ の補正p値は、最近接の最小補正p値を、30桁を超えて下回った。

【0356】

BLASTを使用して、コンピュータによる潜在的オフターゲット効果の予測を実施した。ABXO-HHHのセンス配列およびアンチセンス配列は、GrCh38トランスクリプトームから構築された内部BLASTデータベースに対して、BLASTによりアライメントした。BLASTにより同定された、全ての潜在的オフターゲット効果のうち、ABXO-HHHの存在下で、RAP2Cだけが、有意に下方調節され(図2) $\log_2$ による倍数変化を<-1とするDE閾値を超えなかった。

【0357】

まとめると、これらのデータは、ABXO-HHHが、ヒトトランスクリプトーム中、比較的高濃度であってもなお、高度に特異的なsiRNAであることを裏付ける。

【0358】

オリゴヌクレオチドの合成、脱保護、およびアニーリングのためのプロトコール：

オリゴヌクレオチドの合成は、アセトニトリル中のホスホルアミダイト濃度を0.1Mとする、500 Å対照多孔性ガラス(CPG)上の、標準ホスホルアミダイト化学反応を使用する、Mermade 12合成器上で実施した。THF/ピリジン/水中のI2(0.02M)が、0.6MのETT(5-エチルチオテトラゾール)を活性化剤とする酸化剤であった。ピリジン中に0.09Mの、N,N-ジメチル-N'-(3-チオx-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-イル)メタンイミドアミド(DDTT)を、ホスホロチオエート(PS)結合を導入するための硫黄化試薬として使用した。ジクロロメタン中に3%(v/v)のジクロロ酢酸を、脱保護化液として使用した。緩衝液Aとしての、pH8.5における、20mMのリン酸、ならびに緩衝液Bとしての、20mMのリン酸pH8.5、および1M臭化ナトリウムを伴う、イオン交換クロマトグラフィー(IEX)により、マレイミドを伴わない、全ての一本鎖を精製した。精製の後、オリゴヌクレオチド画分をプールし、濃縮し、脱塩した。次いで、脱塩試料を、凍結乾燥させ、-20

10

20

30

40

50

℃で保管した。

【0359】

アンチセンス鎖の脱保護

合成の後、支持体を、アセトニトリル（ACN）で洗浄し、カラム内、真空下で乾燥させ、密閉可能な、1 mLのネジ栓付きバイアルへと移し、含水アンモニア中に5%のジエチルアミン溶液と共に、65℃で、5時間にわたり振盪した。粗オリゴの切断および脱保護は、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）で確認し、その後、IEX-HPLCで精製した。

【0360】

マレイミド含有オリゴヌクレオチドの合成および脱保護

3'アミノ修飾CPG固体支持体、または5'アミノ修飾ホスホルアミダイトを使用して、マレイミド含有オリゴを作製した。支持体を、密閉可能な、1 mLのバイアルへと移し、切断および脱保護のために、50/50 v/vの40%含水メチルアミン/含水アンモニア（AMA）と共に、室温で、2時間にわたり、または65℃で、10分間にわたりインキュベートした。一本鎖を、IEXクロマトグラフィーにより精製し、マレイミド付加の前におけるアンチセンスと同じ条件下で脱塩した。

【0361】

pH7.1の0.05 Mリン酸緩衝液中に、約20 mg/mLのアミン修飾センス鎖を作製し、これに、ACN中に溶解させた、10モル当量のマレイミドN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステルを付加した。NHSエステル溶液を、含水オリゴヌクレオチド溶液へと添加し、室温で、3時間にわたり振盪した。こうしてマレイミドをコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを、イオン交換緩衝液条件下における、マレイミドの加水分解を防止するように、逆相クロマトグラフィー（緩衝液B中に80%のアセトニトリルを伴う、20 mMの酢酸トリエチルアンモニウム）により精製した。

【0362】

精製の後、オリゴヌクレオチド画分をプールし、濃縮し、脱塩した。

【0363】

マレイミドの加水分解を回避するために、センス鎖およびアンチセンス鎖の二重鎖化は、等モル量の、各脱塩一本鎖を使用する凍結乾燥を介して実施した。

【0364】

センチリンの、siRNAへのコンジュゲーション、コンジュゲートの精製および解析：センチリンを、マレイミドを介する、システイン特異的化学反应を介して、siRNAへとコンジュゲートした。PBS中に50~200 μMの、システイン含有センチリンを、10 mMのトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）により、室温で（30分間）還元して、遊離チオールをもたらした。次いで、センチリンを含有する遊離チオールを、直ちに、水中のsiRNA二重鎖を含有するマレイミドと、センチリン：siRNAのモル比を、約1.5：1として混合した。室温または37℃で、2時間にわたるインキュベーションの後、反応を、N-エチルマレイミド（反応混合物の最終NEM濃度を1 mMとする）でクエンチした。コンジュゲートは、2つの工程で精製した。工程I：固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（タグ付けタンパク質のための）、または疎水性相互作用クロマトグラフィー（タグなしタンパク質のための）であり、反応しなかったsiRNAリンカーを除去した。工程II：Capto-DEAEであり、反応しなかったセンチリンを除去した。コンジュゲートを含有する画分をプールし、透析を使用して脱塩することにより、HEPES緩衝生理食塩液（HBS）へと交換し、必要な場合、濃縮した。

【0365】

センチリン-siRNAコンジュゲートの解析的特徴付け：センチリン-siRNAコンジュゲートを、解析法の組合せにより特徴づけた。SDS-PAGEを使用して、コンジュゲートの量を、遊離タンパク質の量と比較した。SDS-PAGEのために、4~20%のMini-PROTEAN（登録商標）TGX Stain-Free（商標）P

10

20

30

40

50

rotein Gels (BioRad) を、SDS 緩衝液中、100V で、1 時間にわたり泳動させた。ゲルは、UV 光下で視覚化した。解析用 SEC (Superdex-75 5/150 GL カラム; GE) を使用して、センチリン-siRNA コンjugate の純度および凝集状態を解析した。液体クロマトグラフィー/質量分析 (LCMS) を使用して、コンjugate の同一性および純度を確認した。試料は、Waters Acuity UPLC/Xevo G2-XS TOF 質量分析計システムを使用して解析した。測定器は、ネガティブエレクトロスプレーイオン化モードで作動させ、200~3000 の m/z にわたり走査した。コンjugate は、2 つの断片：アンチセンス-センチリンおよびセンス-センチリンとして見られた。

【0366】

センチリンの、siRNA へのコンjugation、コンjugate の精製および解析：センチリンを、マレイミドを介する、システイン特異的化学反应を介して、siRNA へとコンjugate した。PBS 中に 50~200 μM の、システイン含有センチリンを、10mM のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) により、室温で (30 分間) 還元して、遊離チオールをもたらした。次いで、センチリンを含有する遊離チオールを、直ちに、水中の siRNA 二重鎖を含有するマレイミドと、センチリン：siRNA のモル比を、約 1.5 : 1 として混合した。室温または 37 °C で、2 時間にわたるインキュベーションの後、反応を、N-エチルマレイミド (反応混合物の最終 NEM 濃度を 1mM とする) でクエンチした。コンjugate は、2 つの工程で精製した。工程 I：固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (タグ付けタンパク質のための)、または疎水性相互作用クロマトグラフィー (タグなしタンパク質のための) であり、反応しなかった siRNA リンカーを除去した。工程 II：Capto-DEAE であり、反応しなかったセンチリンを除去した。コンjugate を含有する画分をプールし、透析を使用して脱塩することにより、HBS へと交換し、必要な場合、濃縮した。

【0367】

図 6：タグ付きタンパク質のための、IMAC クロマトグラフィーである。IMAC のために、Cytiva 製の HisTrap HP カラム (1ml、5ml) を使用した。HisTrap 緩衝液 A (結合緩衝液) は、Type 1 H₂O 中に 50mM のトリス pH 7.4、500mM の NaCl、および 10mM のイミダゾールであり、HisTrap 緩衝液 B (溶出緩衝液)：Type 1 H₂O 中に 50mM のトリス pH 7.4、500mM の NaCl、および 250mM のイミダゾールであった。反応試料を、試料ループまたは試料ポンプを介して、カラムへと直接注入した。試料の適用後、カラムを、5~10 カラム容量の緩衝液 A で洗浄した。溶出は、典型的に、段階的勾配 (0~100%) で開始した。画分は、フラクションコレクターおよびピークフラグメンテーションを使用して、UV リーディングが、50mAU 以上である場合に回収した。

【0368】

図 7：タグなしタンパク質 (過剰量の siRNA の除去) のための HIC である。HIC のために、Cytiva 製の HiTrap Butyl HP カラム (1ml、5ml) を使用した。HIC 緩衝液 A (結合緩衝液) は、Type 1 H₂O 中に 2M の硫酸アンモニウム、25mM のリン酸ナトリウム pH 7.0 であったが、HIC 緩衝液 B (溶出緩衝液)：Type 1 H₂O 中に 25mM のリン酸ナトリウム pH 7.0 であった。コンjugation 反応試料を、緩衝液 A により、1 : 1 の比に希釈した。上記で調製された試料を、試料ループまたは試料ポンプを介して、カラムへと直接注入した。試料の適用後、カラムを、5 カラム容量の緩衝液 A で洗浄した。溶出は、典型的に、B 中の 0.0% で開始し、次いで、下記の表 10 の勾配で継続した。画分は、フラクションコレクターおよびピークフラグメンテーションを使用して、UV リーディングが、50mAU 以上である場合に回収した。

【0369】

10

20

30

40

50

【表 9】

表10

	種類	B の%	長さ(カラム容量)
1	線形	30～90	3.00
2	線形	35.0	10.00
3	線形	100.0	10.00
4	線形	100.0	5.00

10

【0370】

開環：レトロマイケル反応を介する、カーゴの喪失を回避するために、マレイミド環の加水分解を実施する。H i s t r a p（タグ付けタンパク質）またはH I C（タグなしタンパク質）からプールされた画分を、25 mMのトリスpH 8.9緩衝液へと透析した。この緩衝液中の反応物を、摂氏37度で、72時間にわたり、インキュベーターシェーカーに入れた。LC-MSにより、反応を、完了についてモニタリングした。

20

【0371】

図8：タグ付けタンパク質およびタグなしタンパク質（過剰量の非反応センチリンの除去）のためのイオン交換クロマトグラフィー（IEX）である。IEXクロマトグラフィーのために、Cytiva製のHiTrap Capto DEAEカラム（1 mL、5 mL）を使用した。Capto DEAE緩衝液A（結合緩衝液）は、Type 1 H₂O中に25 mMのトリスpH 8.8であったが、使用されたCapto DEAE緩衝液B（溶出緩衝液）は、Type 1 H₂O中に25 mMのトリスpH 8.8、1 MのNaClであった。

【0372】

開環後の試料を、試料ループまたは試料ポンプを介して、カラムへと直接注入した。試料の適用後、カラムを、5～10カラム容量の緩衝液Aで洗浄した。溶出は、典型的に、B中の0.0%で開始し、次いで、下記の表11の勾配で継続した。

30

【0373】

反応しなかったタンパク質が、典型的に、第1のピークであり、第2のピークは、典型的に、純粋コンジュゲートとなる、フロースルー中に、反応しなかったタンパク質を溶出させた。全ての画分を回収し、プールした。プールの濃度は、収量計算のためのNano dropを使用して、A260を測定することにより決定した。

【0374】

【表10】

40

表 11

1	線形	20	5
2	線形	100	15
3	線形	100	5

【0375】

50

図9：センチリン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートについての解析用SECの例である。センチリン-siRNAコンジュゲートを、解析法の組合せにより特徴づけた。解析用SECを使用して、センチリン-siRNAコンジュゲートの純度および凝集状態を解析した。Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column, 125 Å, 1.7 μm, 4.6×150mmを伴う、Waters H-class UPLCを、規定のSEC解析のために使用した。典型的に、オートサンプラーを使用して、2～5 μl試料を注入し、流量を、1分間当たり0.25 mlとし、使用される移動相は、1倍濃度のPBSまたは100 mM、pH 7.2のリン酸緩衝液とした。

【0376】

図10：コンジュゲートについての、SDS PAGEゲルの例である。SDS-PAGEを使用して、コンジュゲートの量を、遊離タンパク質の量と比較した。SDS PAGEゲルを実施するためにInvitrogen Mini Gel tank. PowerEase (商標) Touch 600W Power Supply and 115 V ACを使用した。Invitrogen - NuPAGE (商標) 4-12% Bis-Tris Protein Gel, 1.0mmを、20×NuPAGE (登録商標) MES SDS Running Buffer and SeeBlue (商標) Pre-stained Protein Standardと共に使用した。試料は、超純水により、約0.5 mg/mLへと正規化した。非還元型ゲルのために、10 μLの正規化試料を、10 μLの2倍濃度のLaemmli Sample Bufferと、1対1の比で混合した。還元型ゲルのために、2倍濃度のLaemmli Sample Bufferを、β-メルカプトエタノールと、95対1の比で混合し、次いで、10 μLの試料と、1対1の比で混合した。結果として得られる試料混合物を、95℃で、5分間にわたり煮沸し、次いで、熱サイクラー内で冷却した。15 μLの試料およびタンパク質ラダーを、適切なウェルへとロードし、電圧を、200 Vに設定し、泳動時間を、約30分間に設定した。ゲル泳動が終了したら、これを、クーマシーブルーまたはSYBR Greenまたはメチレンブルーにより視覚化した。左端のレーンは、タンパク質ラダーであり、隣のレーンは、センチリン自体であり、最後のレーンは、センチリン-siRNAコンジュゲートである。

【0377】

ヒト細胞(H358)に、候補siRNA配列を、ある範囲の濃度でトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、RNAを採取し、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を介して、GYS1レベルについて解析した。18SリボソームRNAを、RT-PCR内因性対照遺伝子として使用した。ノックダウンレベルを、非処置細胞と比較した。Graphpad Prismソフトウェアを使用して、EC50値を計算し、Emax値は、GYS1 mRNAについて観察された、最大ノックダウンパーセントを表す(表5)。

【0378】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 5

siRNA	参照番号	EC50 (pM)	E _{max} (%)
A	ABXO8	3.841	70
B	ABXO9	10.02	70.2
C	ABXO12	12.62	71.5
D	ABXO110	21.73	87.9
E	ABXO113	23.74	82.1
F	ABXO114	6.716	75.5
G	ABXO115	4.5	75.2
H	ABXO116	0.7542	69.4
I	ABXO117	20.87	93.8
J	ABXO122	8.93	65.6
K	ABXO123	4.049	75.5
L	ABXO124	2.642	70.5
M	ABXO125	0.8761	53.3
N	ABXO128	2.549	76.3
O	ABXO129	0.4961	64.3
P	ABXO139	0.6143	70.6
Q	ABXO142	23.19	80.3
R	ABXO150	58.88	96.1
S	ABXO151	1.502	75.6
T	ABXO152	24.76	91.1
U	ABXO155	5.893	60.2
V	ABXO156	0.6893	57.6
W	ABXO160	0.787	80.1
X	ABXO168	8.662	75.7
Y	ABXO171	38.82	69.2
Z	ABXO191	54.2	75.4
AA	ABXO197	19.8	77.1
BB	ABXO201	7.1	75.6
CC	ABXO203	5.7	74.9
DD	ABXO205	9.8	80.4

10

20

30

他の s i R N A についてもまた、上記で記載された通りに調べ、それらの E C 5 0 を、表 6 に提示する。

【 0 3 7 9 】

40

50

【表 1 2】

表 6

siRNA 対	EC50 (pM)
EE	1.8
FF	6
GG	5.9
HH	15.1
II	8.2
JJ	25.2
KK	
LL	1.35
MM	3.74
NN	5.66
OO	5.56
PP	6.34
QQ	11.76
RR	2.85
SS	3.35
TT	5.67
UU	0.4
VV	3.72
WW	3.15
XX	2.57
YY	1.64
ZZ	1.56
AAA	検出なし
BBB	4.87
CCC	2.65
DDD	2.66
EEE	1.21
FFF	1.31
GGG	該当なし

10

20

30

【0380】

候補 s i R N A 配列の選択性は、ヒト細胞（H E K - 2 9 3）への、ある範囲の濃度の s i R N A のトランスフェクションにより査定した。細胞生存率は、C e l l T i t e r G l o を使用して、トランスフェクションの72時間後評価した。E m a x 値は、最高被験 s i R N A 濃度（10 n M）における、細胞生存率の最大低減パーセントとして報告した（表7）。

【0381】

40

50

【表 13】

表 7

siRNA対	参照番号	Emax(10nMのときの%)
A	ABXO8	5.52
B	ABXO9	-0.3
C	ABXO12	31.67
D	ABXO110	25.68
E	ABXO113	22.83
F	ABXO114	-1.1
G	ABXO115	30.85
H	ABXO116	29.27
I	ABXO117	35.19
J	ABXO122	28.25
K	ABXO123	17.21
L	ABXO124	24.09
M	ABXO125	71.45
N	ABXO128	42.41
O	ABXO129	58.02
P	ABXO139	34.44
Q	ABXO142	8.94
R	ABXO150	16.06
S	ABXO151	60.95
T	ABXO152	42.84
U	ABXO155	54.4
V	ABXO156	34.1
W	ABXO160	-4.59
X	ABXO168	51.66
Y	ABXO171	4.79
Z	ABXO191	46.41
AA	ABXO197	25.01
BB	ABXO201	46.92
CC	ABXO203	15.18
DD	ABXO205	60.13

【実施例 2】

【0382】

CD71に結合する、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインの選択

トランスフェリンの、CD71への結合を阻害しない、CD71に結合するFN3ドメインを同定するためのパニング法および生化学スクリーニング法：トランスフェリンの、CD71への結合を阻害しない、CD71に特異的に結合するFN3ドメインについてスクリーニングするために、ストレプトアビジンコーティングMaxisorpプレート(Nunc; 型番: 436110)を、Starting Block T20(Pierce)中で、1時間にわたりブロッキングし、次いで、トランスフェリンの存在下で、またはCD71のトランスフェリン結合性部位に結合するFN3タンパク質と共に、1時間にわたり、ビオチニル化CD71(パニング法における抗原と同じ抗原を使用する)、または陰性対照(非類縁Fc融合組換えタンパク質およびヒト血清アルブミン)によりコーティングした。トランスフェリンの濃度は、最大で、35 μ Mである。いかなる特定の理論にも束縛されずに述べると、トランスフェリン、またはCD71のトランスフェリン結合性部位に結合するFN3タンパク質の組入れは、FN3ドメインの選択で、トランスフ

エリンの、CD71への結合と競合しないか、またはこれを阻害しないFN3ドメインが得られるように強い。プレートを、TBSですすぎ、希釈された溶解物を、プレートへと、1時間にわたり適用した。さらなるすすぎに続き、ウェルを、HRPコンジュゲート抗V5tag抗体(Abcam; ab1325)で、1時間にわたり処理し、次いで、ペルオキシダーゼ(POD)(Roche; 11582950001)でアッセイした。ストレプトアビジン対照についてのELISAシグナルの、少なくとも10倍のELISAシグナルを伴うFN3ドメイン溶解物に由来するDNAを、シーケンシングする結果として、スクリーニングから単離されるFN3ドメイン配列をもたらした。

【実施例3】

【0383】

CD71に結合するが、トランスフェリンと競合的ではない、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインの選択

トランスフェリンと競合的ではないか、または競合が最小限である、CD71結合性FN3ドメインを同定するために、バイアスCISディスプレイ戦略をデザインした。略述すると、ヒトCD71の細胞外ドメイン(ECD)についての、5ラウンドにわたるパニングの後で回収されたアウトプットを使用した(実施例3)。さらなるラウンドにわたるオフ速度選択も、実施例3に記載される通りに実施したが、1)最終的な溶出工程の前に、トランスフェリンと同じ部位に結合したセンチリンを溶出させる、ヒトホロトランスフェリンによる洗浄工程;または2)モノクローナル抗体であるOKT9による、FN3ドメイン結合剤の溶出を追加した。トランスフェリン洗浄戦略およびOKT9溶出戦略から回収されたFN3ドメインを、既に記載されている通りに、PCR増幅し、pETベクターへとクローニングした。huCD71に、特異的に結合した、228のFN3ドメインを、ELISAにより、huCD71 ECDへの結合について確認した。固有の結合剤のサブセットは、SECにより解析し、モノメチルアウリスチンF(MMAF)へとコンジュゲートし、ヒトホロトランスフェリンを伴う/伴わないSKBR-3細胞内における細胞生存率アッセイを介して、内部化について評価した。ポリペプチドは、受容体により内部化されることが見出された。

【0384】

Integral Molecular社が、メンブレンプロテオームアレイ(MPA)アッセイを実施して、ABX1198(配列番号509)およびABX1100(配列番号509+リンカー番号0000を伴うsiRNA対)の特異性を、ヒト膜タンパク質のライブラリーに対してプロファイリングした。MPAライブラリーは、全ての1回膜貫通型タンパク質、複数回膜貫通型タンパク質、およびGタンパク質共役受容体(GPCR)を含む、GPIアンカータンパク質、イオンチャネル、および輸送体のうちの94%を含み、各膜タンパク質が、ニワトリQT6細胞バックグラウンド内で固有に発現された、6000を超えるヒト膜タンパク質を含有した。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞内で、個別に発現された膜タンパク質に結合するリガンド(FN3ドメイン)を直接検出した。

【0385】

ABX1198(配列番号509)およびABX1100(配列番号509+リンカー番号0000を伴うsiRNA対)は、それぞれ、最適のシグナル/バックグラウンドノイズ比、1.25ug/ml、1.25ug/ml、および0.31ug/mlを伴う濃度で、MPAに対してスクリーニングした。スクリーニングで同定された膜タンパク質標的は、リガンドの系列希釈液、および同定された標的を個別にトランスフェクトされた細胞を使用する、検証手順において追跡した。

【実施例4】

【0386】

CD71 FN3ドメイン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用する、筋細胞内のmRNAのノックダウン

FN3ドメインへと固有に操作されたシステインを介する、マレイミド化学反応を使用

10

20

30

40

50

して、*muCD71* に結合する *FN3* ドメインを、*siRNA* オリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド (*ASO*) へとコンジュゲートする。システイン置換は、本明細書で提示され、また、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第 20150104808 号においても提示されているシステイン置換などのシステイン置換でありうる。*siRNA* または *ASO* は、*in vitro* において、標準的な化学修飾で修飾され、標的 *mRNA* のノックダウンを可能とすることを確認される。*FN3* ドメイン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを、マウスへと、オリゴヌクレオチドペイロードの最大用量を 10 mg/kg として、静脈内投与した。投与後の多様な時点において、マウスを殺し、骨格筋、心臓筋肉、および他の多様な組織を回収し、必要となるまで、*RNA later* (商標) (*Sigma Aldrich*) 中で保管した。標準的な *qPCR* $\Delta\Delta C_T$ 法、ならびに標的遺伝子および対照遺伝子に特異的なプライマーを使用して、標的遺伝子のノックダウンを評価した。標的遺伝子は、筋内でノックダウンされることが見出され、このようなノックダウンは、*siRNA* または *ASO* を、*FN3* の *CD71* 結合性ドメインとコンジュゲートすることにより増強された。

10

【0387】

被験 *FN3* - *siRNA* コンジュゲートは、表 8 に記載された通りである。

【0388】

【表 14】

表 8

コンジュゲート	CD71 FN3 ドメイン (センチリン)	GYS1 siRNA 対
ABXC-1	配列番号 572	RRRR
ABXC-2	配列番号 572	SSSS
ABXC-3	配列番号 572	TTTT
ABX1005	配列番号 572	GYS1 以外の標的/対照
ABXC-27	配列番号 572	A
ABXC-28	配列番号 572	QQQQ
ABXC-29	配列番号 572	PPPP

20

30

【0389】

図 4A は、3つの異なる *FN3* ドメイン-*siRNA* コンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、*GYS1* *mRNA* の、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける。有効性研究のために、雄 *GAA* - マウス (4~5 週齢である) は、*Jackson Laboratories* から得た。全ての動物を、*IACUC* プロトコルに従い処置した。5 例の動物に、 5.4 mg/kg の、3つの異なる *FN3* ドメイン-*siRNA* コンジュゲート (3 mg/kg の *Gys1* *siRNA*) または媒体の、単回尾静脈内ボラス注射を施した。単回投与の 4 週間後、マウスを安楽死させ、腓腹筋を、*RNA later* 中に回収し、 4°C で、一晩にわたり保管し、 -80°C で凍結させた。*Qiagen* 製の *RNeasy Fibrous Tissue* キットを使用して、腓腹から、全 *RNA* を単離した。標的 *Gys1* および内因性対照 (*Pgk1*、*Ubc*、*Hprt1*、および *Aha1*) の発現レベルは、リアルタイム定量的 *PCR* を使用して解析した。データは、媒体単独を投与された対照動物に対する、 $\Delta\Delta C_T$ 法による正規化を使用して解析した。*FN3* ドメイン-*siRNA* コンジュゲート処置群内の、*Gys1* *mRNA* のノックダウン百分率は、残りの *Gys1* *mRNA* レベルの百分率を、100 から減算することにより測定した。統計学的有意性は、*GraphPad Prism* ソフトウェアにおいて、ダネット多重比較検定による、一元 *ANOVA* を使用して計算した。統計学的有意性は、図上に、アステリスク: *** $p < 0.001$ により提示する。

40

50

【0390】

図4Bは、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、GYS1タンパク質の、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける。腓腹筋内の、Gys1タンパク質の定量は、RIPA緩衝液中で、腓腹筋をホモジネートすることにより実施した。腓腹筋内のタンパク質濃度は、ブラッドフォードアッセイを使用して測定した。Gys1レベルは、12-230kDa Jess separation modules (SM-W004) のための、製造元による標準法を使用して定量した。タンパク質は、Protein Simple社製の、特許権のある光活性化捕捉化学反応を使用して、キャピラリー上に固定化することにより分離した。抗Gys1一次抗体を、1:100の希釈率で使用した。化学発光は、ペルオキシド/Luminol-Sを使用して確立した。キャピラリーの化学発光についてのデジタル画像は、高さ(化学発光強度)、面積、およびシグナル/ノイズ比を、自動で測定する、Protein Simple社製のCompass for Simple Westernソフトウェアを使用して捕捉した。内部系を、各試行に組み入れた。FN3ドメイン-siRNAコンジュゲート処置群のピーク面積値は、媒体で処置された組織に対して正規化し、処置群内の、Gys1タンパク質のノックダウン百分率は、残りのGys1タンパク質レベルの百分率を、100から減算することにより測定した。統計学的有意性は、GraphPad Prismソフトウェアにおいて、ダネット多重比較検定による、一元ANOVAを使用して計算した。統計学的有意性は、図上に、アステリスク:*** $p < 0.001$ により提示する。

10

20

【0391】

図5は、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用し、異なる標的(AHA-1)に対するsiRNAと比較されたGYS1ノックダウンが、骨格筋に、高度に特異的であることを裏付ける。雄GAA-マウス(8~9週齢である)は、Jackson Laboratoriesから得た。全ての動物を、IACUCプロトコルに従い処置した。3例の動物に、17.9mg/kgの、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mg/kgのGys1 siRNA)、17.9mg/kgの、1つのFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mg/kgのAha1 siRNA)または媒体の、単回尾静脈内ボラス注射を施した。単回投与の2週間後、マウスを安楽死させた。腓腹筋、大腿四頭筋、横隔膜、心臓、肝臓、および腎臓の組織を、RNAlater中に回収し、4℃で、一晚にわたり保管し、-80℃で凍結させた。Qiagen製のRNeasy Fibrous Tissueキットを使用して、組織から、全RNAを単離した。標的Gys1/Aha1および内因性対照(Pgk1)の発現レベルは、リアルタイム定量的PCRを使用して解析した。データは、媒体単独を投与された対照動物に対する、 $\Delta\Delta Ct$ 法による正規化を使用して解析した。

30

【実施例5】

【0392】

ABX-HHH処置細胞と、非処置細胞とを比較する、RNA-seq実験

mRNAシーケンシングは、HEK293T細胞に、10nMのABXO-HHHを、24時間にわたりリポフェクトした後における、ポリA+選択mRNAに対して実施した。処置群1つ当たり6連のmRNAを、 $>3,000$ 万リードの平均深度までシーケンシングした。マッピング率を $>90\%$ とするKallistoを使用して、ライブラリーを、GRCh38トランスクリプトームに照らして、シュードアライメントした。このボロカノプロット中の値は、ABXO-HHH処置RNA-seqライブラリーを、非処置細胞と対比して比較するDESeq2を使用して生成した。図2におけるプロット内の各ドットは、遺伝子内で測定された発現の変化を表す。x軸は、全ての遺伝子についての、 $\log_2$ による遺伝子発現の倍数変化(非処置細胞による遺伝子発現で除された、ABXO-HHH処置細胞による遺伝子発現)を表す。y軸は、負の $\log_{10}$ により変換された補正P値を示す。黒矢印は、プロット上のGYS1を指し示す。

40

【実施例6】

50

【0393】

CD71 FN3ドメイン-siRNAコンジュゲートの結合特異性

Integral Molecular (www.integralmolecular.com) が、同社に特許権のあるメンブレンプロテオームアレイ (MPA) アッセイを実施して、CD71 FN3ドメインおよびCD71 FN3ドメイン-siRNAコンジュゲートの特異性を、ヒト膜タンパク質のライブラリーに対してプロファイリングした (図3)。MPAは、全ての1回膜貫通型タンパク質、複数回膜貫通型タンパク質、およびGタンパク質共役受容体 (GPCR) を含む、GPIアンカータンパク質、イオンチャネル、および輸送体のうちの94%に及び、各膜タンパク質が、ニワトリQT6細胞バックグラウンド内で固有に発現された、6000を超えるヒト膜タンパク質を含有した。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞内で、個別に発現された膜タンパク質に結合するFN3ドメインを直接検出した。

10

【0394】

FN3ドメイン、およびFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートは、それぞれ、最適のシグナル/バックグラウンドノイズ比を伴う、1.25 µg/mlまたは0.31 µg/mlの濃度で、MPAに対してスクリーニングした。スクリーニングで同定された膜タンパク質標的は、リガンドの系列希釈液を、同定された標的を固有に発現する細胞上で使用して検証した。

【0395】

一般的方法

20

分子生物学における標準的方法については記載されている (Sambrook、Fritsch、およびManiatis (1982および1989、2版; 2001、3版) 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY; SambrookおよびRussell (2001)、「Molecular Cloning」、3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY; Wu (1993)、「Recombinant DNA」、217巻、Academic Press、San Diego、CA)。標準的方法はまた、細菌細胞におけるクローニングおよびDNAの突然変異誘発 (1巻)、哺乳動物細胞および酵母におけるクローニング (2巻)、糖コンジュゲートおよびタンパク質の発現 (3巻)、ならびにバイオインフォマティクス (4巻) について記載する、Ausbelら (2001)、「Current Protocols in Molecular Biology」、1~4巻、John Wiley and Sons, Inc., New York, NY においても見られる。

30

【0396】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、および結晶化を含む、タンパク質精製のための方法について記載されている (Coliganら (2000)、「Current Protocols in Protein Science」、1巻、John Wiley and Sons, Inc., New York)。タンパク質の化学解析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の作製、グリコシル化について記載されている (例えば、Coliganら (2000)、「Current Protocols in Protein Science」、2巻、John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubelら (2001)、「Current Protocols in Molecular Biology」、3巻、John Wiley and Sons, Inc., NY、16.0.5~16.22.17頁; Sigma-Aldrich, Co. (2001)、「Products for Life Science Research」、St. Louis、MO、45~89頁; Amersham Pharmacia Biotech (2001)、「BioDirectory」、Piscataway、N.J., 384~391頁を参照された

40

50

い)。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製、精製、および断片化について記載されている (Coliganら (2001)、「Current Protocols in Immunology」、1巻、John Wiley and Sons, Inc.、New York; Harlowおよび Lane (1999)、「Using Antibodies」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY; Harlowおよび Lane、前出)。リガンド／受容体相互作用を特徴付けるための標準的技法は利用可能である (例えば、Coliganら (2001)、「Current Protocols in Immunology」、4巻、John Wiley, Inc.、New York を参照されたい)。

10

【0397】

本明細書で引用される、全ての参考文献を、各個別の刊行物、データベース登録番号 (例えば、Genbank 配列または Gene ID 登録番号)、特許出願、または特許を、参照によって組み入れることが、具体的に、かつ、個別に指し示された場合と同じ程度に、参照によって組み入れる。参照による組み入れについてのこの言明は、このような引用が、参照による組み入れについての専一的な言明に近接してなされていない場合であってもなお、37 C. F. R. § 1.57 (b) (1) に従い、本出願者らにより、それらの各々が、37 C. F. R. § 1.57 (b) (2) に準拠して、明らかに同定される、各個別の刊行物、データベース登録番号 (例えば、Genbank 配列または Gene ID 登録番号)、特許出願、または特許、およびあらゆる個別のこれらの引用物に関することが意図される。存在する場合、本明細書内における、参照による組み入れについての専一的な言明の組み入れは、いかなる形でも、参照による組み入れについてのこの一般的な言明を無化しない。本明細書における参考文献の引用は、参考文献が、関連する先行技術であることの容認として意図されず、これらの刊行物または文献の内容または刊行年月日についてのいかなる容認も構成しない。

20

【0398】

本実施形態は、本明細書で記載される、具体的実施形態による範囲内に限定されないものとする。実際、当業者には、前出の記載から、本明細書で記載される実施形態に加えた、実施形態の多様な改変が明らかとなろう。このような改変は、付属の特許請求の範囲内に収まることが意図される。

30

【0399】

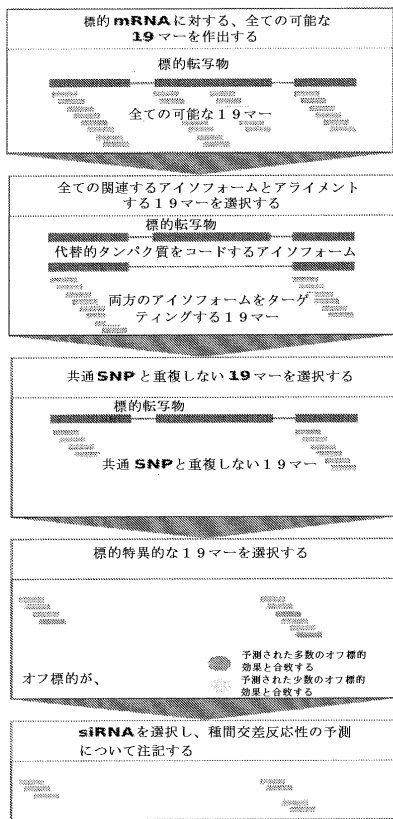
前出の明細書は、当業者が、実施形態を実施することを可能とするのに十分であると考えられる。当業者には、前出の記載から、本明細書で示され、記載される実施形態に加えた、実施形態の多様な改変が明らかとなり、付属の特許請求の範囲内に収まる。

40

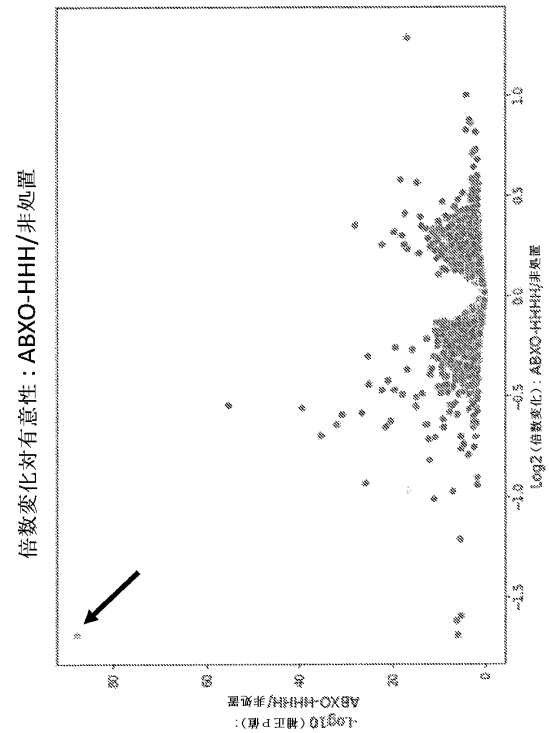
50

【図面】

【図 1】



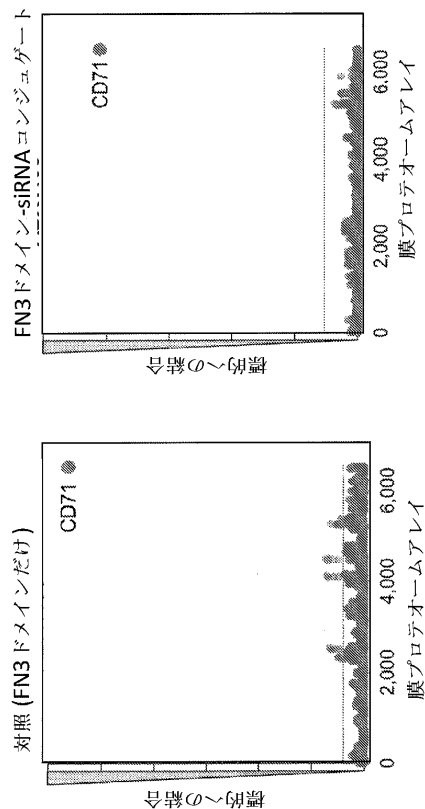
【図 2】



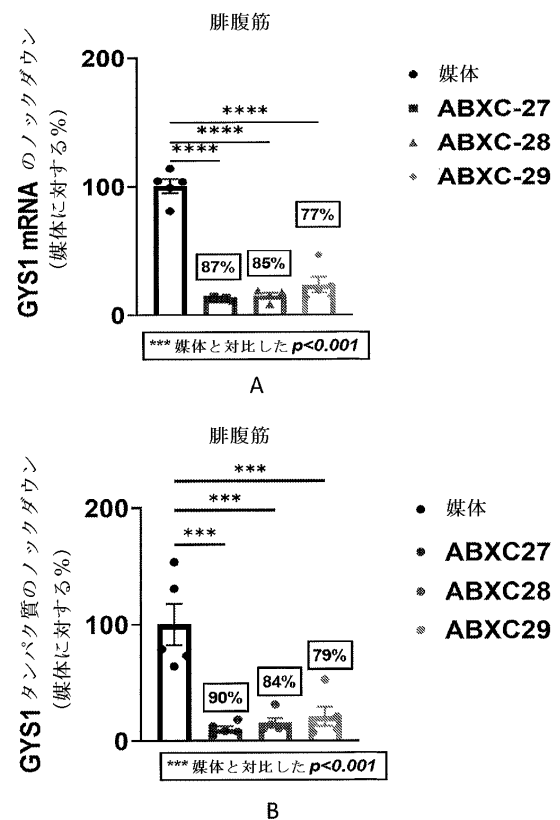
10

20

【図 3】



【図 4】

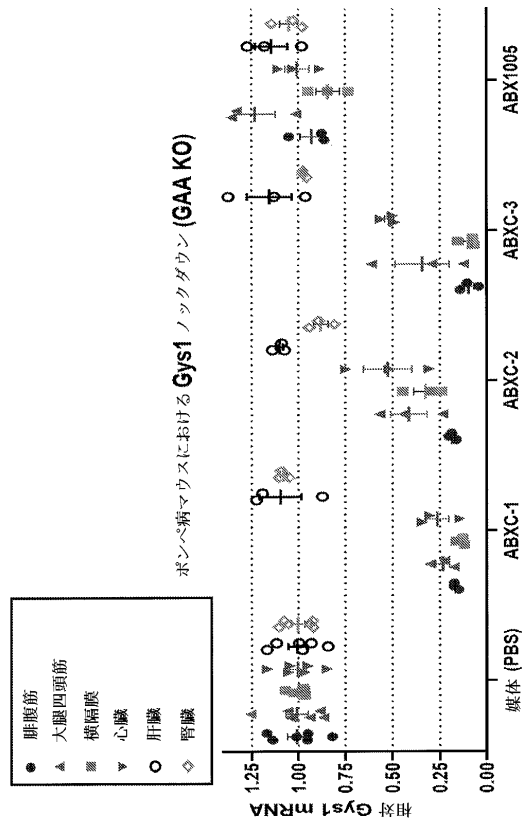


30

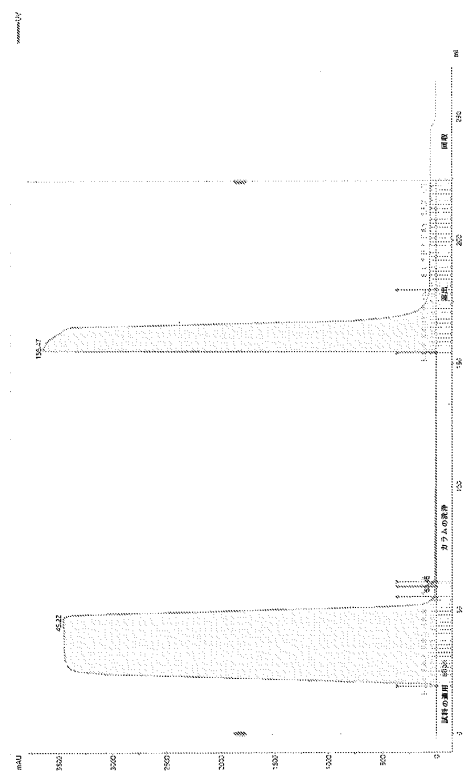
40

50

【図 5】



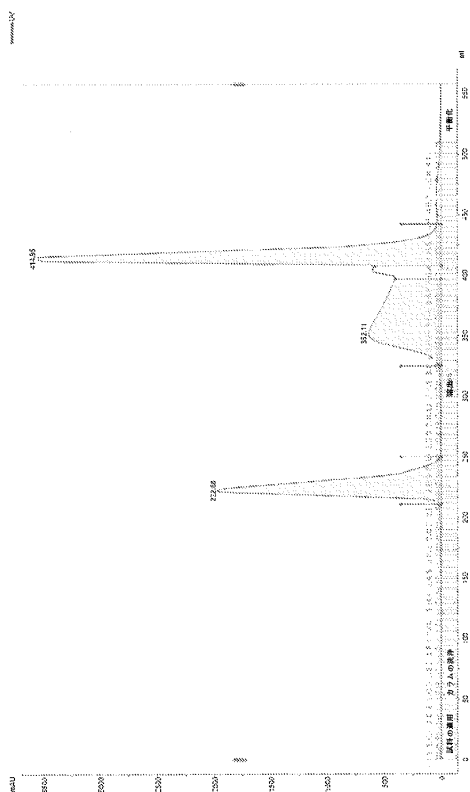
【図 6】



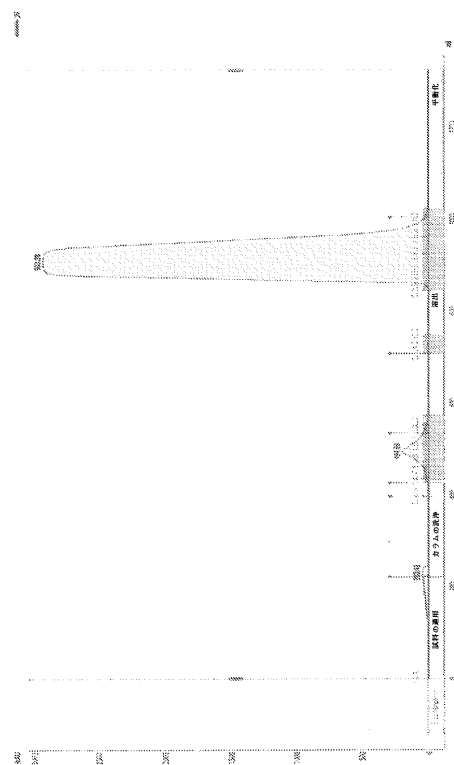
10

20

【図 7】



【図 8】

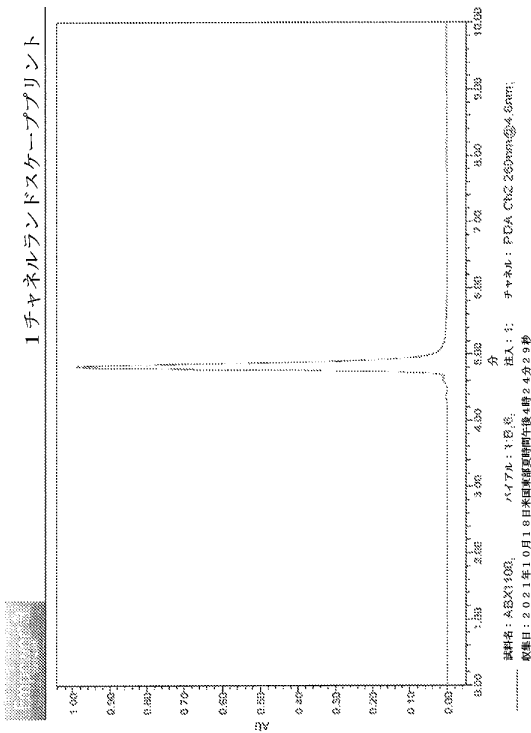


30

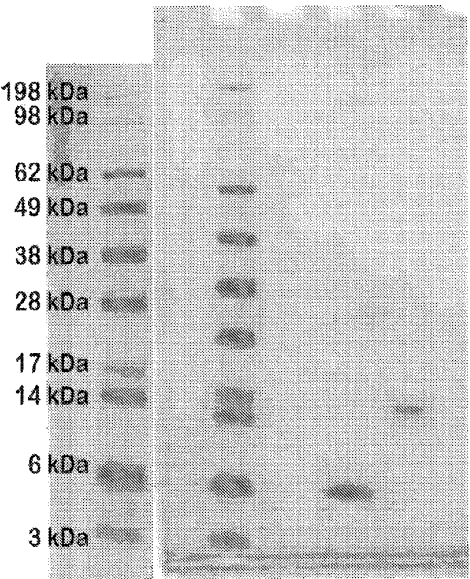
40

50

【図 9】



【図 10】



10

20

【配列表】

202451426600001.app

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年2月9日(2023.2.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

関連出願

本出願は、参照によってそれらの全体を本明細書に組み入れる、2021年4月14日に出願された、米国特許仮出願第63/174,776号、2021年7月30日に出願された、米国特許仮出願第63/203,776号、および2022年3月28日に出願された、米国特許仮出願第63/324,437号に対する優先権を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、参照によってその全体を本明細書に組み入れる配列表を含有する。2022年5月17日に作成された前記ASCIIコピーは、145965__002612__SL.txtと称され、427,548バイトのサイズである。

20

【0003】

分野

本実施形態は、フィブロネクチンIII型ドメイン(FN3)へとコンジュゲートされているsiRNA分子、ならびに分子を作製および使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

治療用核酸は、例えば、低分子干渉RNA(siRNA)、マイクロRNA(miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プラスミド、免疫刺激性核酸、アンチセンス、アンタゴミル、アンチミル、マイクロRNA模倣剤、スーパーミル、U1アダプター、およびアプタマーを含む。siRNAまたはmiRNAの場合、これらの核酸は、RNA干渉(RNAi)と称する過程を介して、特異的タンパク質の細胞内レベルを下方調節しうる。siRNA構築物およびmiRNA構築物は、標的タンパク質に対して方向付けられた、任意のヌクレオチド配列により合成されるので、RNAiの治療適用は、極めて広範である。現在のところ、siRNA構築物は、in vitroおよびin vivoモデルのいずれにおいても、標的タンパク質を特異的に下方調節する能力を示している。加えて、siRNA構築物は、現在のところ、臨床研究において査定されており、様々な疾患について承認されている。

30

【0005】

しかし、現在のところ、siRNA構築物が直面している2つの問題は、第1に、血漿中のヌクレアーゼによるそれらの消化に対する感受性であり、第2に、遊離siRNAまたはmiRNAとして全身投与された場合にそれらがRISC(RNA-induced silencing complex)に結合しうる細胞内コンパートメントへのアクセスを得るそれらの能力の限定である。コレステロールおよびPEG脂質など、他の脂質成分を伴うカチオン性脂質から形成される脂質ナノ粒子、炭水化物(GalNAc三量体など)など、ある特定の送達系が、細胞内への、オリゴヌクレオチドの取込みを容易とするのに使用されている。しかし、これらは、siRNAの、肝臓以外の組織内の、その意図された標的への、効率的、かつ、有効な送達に成功することが示されていない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0006】

s i R N Aを、その意図される細胞標的へと送達するための組成物および方法が、依然として必要とされている。さらに、必要とされるものは、C D 7 1に特異的に結合し、臨床使用のために特性が最適化されたF N 3ドメイン、および受容体媒介性のC D 7 1の内部化を介して、細胞内へのアクセスを可能とする、新規の治療剤のために、このような分子を使用する方法である。本実施形態は、これらの必要ならびに他の必要を満たす。

【課題を解決するための手段】

【0007】

一部の実施形態では、C D 7 1に結合するF N 3ドメインタンパク質へとコンジュゲートされたs i R N Aが提供される。

【0008】

一部の実施形態では、本明細書で提示される、任意のF N 3ドメインのアミノ酸配列を含むF N 3ドメインが提供される。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に結合する。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に特異的に結合する。

【0009】

一部の実施形態では、組成物は、可撓性リンカーなどのリンカーにより接続された、2つのF N 3ドメインを含む。一部の実施形態では、2つのF N 3ドメインは、異なる標的に結合する。一部の実施形態では、第1のF N 3ドメインは、C D 7 1に結合する。一部の実施形態では、第2のF N 3ドメインは、C D 7 1でない、異なる標的に結合する。

【0010】

本明細書の一部の実施形態では、d s R N A分子またはs i R N A分子などのオリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書で提示される修飾を伴うか、またはこれを伴わない、本明細書で提示される配列を有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、医薬組成物などの組成物により提供される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ポリペプチドへとコンジュゲートされる。

【0011】

一部の実施形態では、s i R N A分子へとコンジュゲートされた、1つまたはそれ以上のF N 3ドメインを含む組成物が提供される。

【0012】

一部の実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、X 1は、第1のF N 3ドメインであり；X 2は、第2のF N 3ドメインであり；X 3は、第3のF N 3ドメインまたは半減期延長分子であり；Lは、リンカーであり；X 4は、オリゴヌクレオチド分子であり；n、q、およびyは、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0013】

一部の実施形態では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、Cは、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン（A B D）であり；X 1は、第1のF N 3ドメインであり；X 2は、第2のF N 3ドメインであり；X 3は、第3のF N 3ドメインまたは半減期延長分子であり；Lは、リンカーであり；X 4は、オリゴヌクレオチド分子であり；n、q、およびyは、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0014】

一部の実施形態では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4 - C$ の式〔式中、X 1は、第1のF N 3ドメインであり；X 2は、第2のF N 3ドメインであり；X 3は、第3のF N 3ドメインまたは半減期延長分子であり；Lは、リンカーであり；X 4は、オリゴヌクレオチド分子であり；Cは、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン（A B D）であり；n、q、およびyは、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0015】

一部の実施形態では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、X

10

20

30

40

50

1 は、第 1 の FN3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の FN3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

【0016】

一部の実施形態では、 $C-X_4-L-(X_1)_n-(X_2)_q-(X_3)_y$ の式 [式中、C は、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン (ABD) であり；X 1 は、第 1 の FN3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の FN3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

10

【0017】

一部の実施形態では、 $X_4-L-(X_1)_n-(X_2)_q-(X_3)_y-C$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の FN3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の FN3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン (ABD) であり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

【0018】

一部の実施形態では、 $C-(X_1)_n-(X_2)_q[L-X_4]-(X_3)_y$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の FN3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の FN3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン (ABD) であり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

20

【0019】

一部の実施形態では、 $(X_1)_n-(X_2)_q[L-X_4]-(X_3)_y-C$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の FN3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の FN3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の FN3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーまたはアルブミン結合性ドメイン (ABD) であり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

30

【0020】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物のうちの 1 つまたはそれ以上を含む医薬組成物が提供される。

【0021】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるポンペ病 (GSD 2；酸性アルファグルコシダーゼ (GAA) 欠損症) を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。

【0022】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォーブズ病 (GSD 3；グリコーゲン脱分枝酵素 (AGL) 欠損症)、マッカードル病 (GSD 5；筋グリコーゲンホスホリラーゼ (PYGM) 欠損症)、II 型糖尿病／糖尿病性腎症、GSD 12 であるアルドラーゼ A 欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病 (GSD 4；グリコーゲン脱分枝酵素 (GBE1) 欠損症)、タルイ病 (GSD 7；筋ホスホフルクトキナーゼ (PFKM) 欠損症)、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ (GYS2) 欠損症 (GSD 0)、グルコース-6-ホスファターゼ (G6PC／SLC37A4) 欠損症 (GSD 1；フォンギールケ病)、ハース病

40

50

(GSD6；肝グリコーゲンホスホリラーゼ(PYGL)欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症)、ホスホリラーゼキナーゼ(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1)欠損症(GSD9)、ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症(GSD10)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ(LDHA)欠損症(GSD11)、ファンコーニービッケル症候群(GSD11；グルコース輸送体(GLUT2)欠損症)、アルドラーゼA欠損症(GSD12)、 β -エノラーゼ(ENO3)欠損症(GSD13)、およびグリコゲニン-1(GYG1)欠損症(GSD15)からなる群から選択される。

【0023】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。

10

【0024】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における神経学的状態および／または脳腫瘍を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギラン・バレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、偏頭痛、脳炎、敗血症、および重症筋無力症からなる群から選択される。

【0025】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における自己免疫疾患を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、1型糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、および免疫性血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。

20

【0026】

一部の実施形態では、がんを処置するための医薬組成物または医薬の調製における、本明細書で提示される組成物の使用が提供される。一部の実施形態では、がんは、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、胃がん、明細胞性腎細胞癌、明細胞性乳癌、明細胞性子宮内膜癌、明細胞性卵巣癌、明細胞性子宮癌、肝細胞癌、膵臓がん、前立腺がん、軟部組織がん、ユーイング肉腫、および非小細胞肺癌からなる群から選択される。

30

【0027】

一部の実施形態では、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する方法であって、細胞を、本明細書で提示される組成物と接触させる工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝細胞、筋細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、またはCNS細胞である。

【0028】

一部の実施形態では、骨格筋内の、GY S 1 mRNAおよびGY S 1タンパク質を選択的に低減する方法が提供される。ある特定の実施形態では、GY S 1 mRNAおよびGY S 1タンパク質は、肝臓内および／または腎臓内で低減されない。

40

【0029】

一部の実施形態では、本明細書で記載される、FN3ドメインをコードする単離ポリヌクレオチドが提供される。

【0030】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

【0031】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0032】

一部の実施形態では、FN3ドメインを作製する方法が提供される。一部の実施形態で

50

は、方法は、F N 3ドメインをコードするか、またはこれを発現させるベクターを含む宿主細胞を培養する工程を含む。一部の実施形態では、方法は、F N 3ドメインを精製する工程をさらに含む。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に結合する。

【0033】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子へと連結された、C D 7 1に結合するF N 3ドメインと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子を伴うか、またはこれを伴わない、F N 3ドメインのうちの1つまたはそれ以上を含むキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】s i R N Aスクリーニングのために評価および検討された特性を表すフローチャートを示す図である。

【図2】細胞が、s i R N A対であるH H Hをトランスフェクトされた後における、トランスクリプトームの変化を同定する、R N Aシーケンシング実験についてのグラフであり、この場合、矢印は、G Y S 1転写物の、有意な減少を同定する。

【図3】プロテオームアレイにおいて、6,000を超える受容体を使用する、標的結合アッセイの結果を提示する図であり、この場合、データは、C D 7 1が、F N 3ドメインの排他的結合標的であることを裏付ける。

【図4】図4Aは、3つの異なるF N 3ドメイン-s i R N Aコンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、G Y S 1 m R N Aの、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける図である。図4Bは、3つの異なるF N 3ドメイン-s i R N Aコンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、G Y S 1タンパク質の、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける図である。

【図5】3つの異なるF N 3ドメイン-s i R N Aコンジュゲートを使用し、異なる標的(A H A - 1)に対するs i R N Aと比較されたG Y S 1ノックダウンが、骨格筋に、高度に特異的であることを裏付ける図である。

【図6】コンジュゲート(タグ付きタンパク質)の精製のための、H i s t r a p クロマトグラムの例を示す図である。

【図7】コンジュゲート(タグなしタンパク質)の精製のための、H I C クロマトグラムの例を示す図である。

【図8】コンジュゲート(タグ付き/タグなしタンパク質)の精製のための、イオン交換クロマトグラムの例を示す図である。

【図9】センチリン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートについての、解析用S E Cの例を示す図である。

【図10】コンジュゲートについての、S D S P A G E ゲルの例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0035】

内容が、そうでないことを、明らかに指示しない限りにおいて、本明細書および附属の特許請求の範囲で使用される、単数形の「ある(a)」 「ある(an)」、および「その」は、複数形の指示対象を含む。したがって、例えば、「ある細胞」への言及は、2つまたはこれを超える細胞の組合せなどを含む。

【0036】

「フィブロネクチンI I I型(F N 3)ドメイン」(F N 3ドメイン)とは、フィブロネクチン、テネイン、細胞内細胞骨格タンパク質、サイトカイン受容体、および原核生物酵素を含むタンパク質内において、高頻度で生じるドメインを指す(B o r kおよびD o o l i t t l e、P r o c N a t A c a d S c i U S A、89:8990~8994、1992;M e i n k eら、J B a c t e r i o l、175:1910~1918、1993;W a t a n a b eら、J B i o l C h e m、265:15659~15665、1990)。例示的F N 3ドメインは、ヒトテネインC内に存在する、15の異なるF N 3ドメイン、ヒトフィブロネクチン(F N)内に存在する、15の異なる

10

20

30

40

50

FN3ドメイン、および、例えば、米国特許第8,278,419号において記載されている、非天然の合成FN3ドメインである。個々のFN3ドメインは、ドメイン番号およびタンパク質名、例えば、テネシンの第3のFN3ドメイン(TN3)、またはフィブロネクチンの第10のFN3ドメイン(FN10)により言及される。本明細書を通して使用される通り、「センチリン」もまた、FN3ドメインを指す。さらに、本明細書で記載されるFN3ドメインは、可変重(V_H)鎖および／または可変軽(V_L)鎖の構造を有さないもので、抗体ではない。

【0037】

本明細書で使用された、「自己免疫疾患」とは、疾患状態(condition)、および個体の免疫応答が、個体自身の構成要素に対して方向付けられる結果として、非所望であり、かつ、しばしば消耗性である状態(condition)をもたらす状態(state)を指す。本明細書で使用された、「自己免疫疾患」は、自己免疫状態、自己免疫症候群などをさらに含むことが意図される。自己免疫疾患は、アジソン病、アレルギー、アレルギー性鼻炎、強直性脊椎炎、喘息、アテローム性動脈硬化、自己免疫性耳疾患、自己免疫性眼疾患、自己免疫萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性耳下腺炎、自己免疫性ブドウ膜炎、セリアック病、原発性胆汁性肝硬変、良性リンパ球性血管炎、COPD、大腸炎、冠動脈性心疾患、クローン病、糖尿病(I型)、うつ病、1型糖尿病および／または2型糖尿病を含む糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギラン＝バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患(IBD)、組換え医薬品に対する免疫応答、例えば、血友病における第VII因子、若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、男性不妊症、混合性結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、腫瘍科疾患、骨関節炎、疼痛、原発性粘液水腫、天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、乾癬、乾癬性関節炎、反応性関節炎、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、交感性眼炎、T細胞リンパ腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、精巣血管中心性T細胞リンパ腫、甲状腺炎、移植拒絶、潰瘍性大腸炎、自己免疫性ブドウ膜炎、および血管炎を含むがこれらに限定されない。自己免疫疾患は、罹患組織が、一次標的であり、場合によって、二次標的である状態を含むがこれらに限定されない。このような状態は、AIDS、アトピー性アレルギー、気管支喘息、湿疹、ハンセン病、統合失調症、遺伝性うつ病、組織／臓器移植、慢性疲労症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳卒中、自閉症、てんかん、アルツス現象、アナフィラキシー、およびアルコール／薬物中毒を含むがこれらに限定されない。

【0038】

「捕捉剤」という用語は、特定の種類の細胞に結合し、他の細胞からの、この細胞の分離を可能とする物質を指す。例示的捕捉剤は、磁気ビーズ、強磁性流体、封入試薬、特定の細胞型に結合する分子などである。

【0039】

「試料」とは、対象から分離された、同様の体液、細胞、または組織のほか、対象内に存在する、体液、細胞、または組織の回収物を指す。例示的試料は、組織生検、細針吸引、手術切除組織、臓器培養物、細胞培養物、ならびに血液、血清および漿液、血漿、リンパ、尿、唾液、囊胞液、涙液、糞便、痰、分泌性組織／臓器の粘液性分泌物、腔分泌物、腹水、胸水、心膜腔液、腹膜腔液、腹腔液、および他の体腔液、気管支洗浄により回収された体液、滑液、対象または生物学的供給源と接触した液体、例えば、細胞馴致培地または臓器馴致培地を含む細胞／臓器培養培地、および洗浄液などの体液である。

【0040】

「～を置換すること」または「置換された」または「～を突然変異させること」または「突然変異させられた」とは、ポリペプチド配列内またはポリヌクレオチド配列内の1つまたはそれ以上のアミノ酸またはヌクレオチドを、この配列の変異体を作成するように変更するか、欠失させるか、または挿入することを指す。

【0041】

10

20

30

40

50

「変異体」とは、1つまたはそれ以上の修飾、例えば、置換、挿入、または欠失により、参照ポリペプチドまたは参照ポリヌクレオチドと異なるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指す。

【0042】

「～に特異的に結合する」または「～に特異的結合すること」とは、FN3ドメインが、約 1×10^{-6} Mもしくはこれ未満、例えば、約 1×10^{-7} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-8} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-9} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-10} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-11} Mもしくはこれ未満、約 1×10^{-12} Mもしくはこれ未満、または約 1×10^{-13} Mもしくはこれ未満の解離定数 (K_D) で、CD71など、その標的に結合する能力を指す。代替的に、「～に特異的結合すること」とは、標準溶液ELISAアッセイにおいて、FN3ドメインが、その標的（例えば、CD71）に、陰性対照の、少なくとも5倍の強さで結合する能力を指す。特異的結合はまた、本明細書で記載され、図3に示された、プロテオームアレイを使用しても裏付けられる。一部の実施形態では、陰性対照は、CD71に結合しないFN3ドメインである。一部の実施形態では、CD71に特異的に結合するFN3ドメインは、他の類縁の抗原、例えば、Macaca Fascicularis（カニクイザル、cyno）またはPan troglodytes（チンパンジー）など、他の種（相同体）に由来する、同じ所定の抗原に対する交差反応性を有しうる。

10

【0043】

「ライブラリー」とは、変異体のコレクションを指す。ライブラリーは、ポリペプチド変異体またはポリヌクレオチド変異体から構成される。

20

【0044】

「安定性」とは、それが、その通常の機能活性のうちの少なくとも1つ、例えば、CD71など、所定の抗原への結合を保持するように、分子が、生理学的条件下で、フォールディング状態を維持する能力を指す。

【0045】

「CD71」とは、配列番号2または5のアミノ酸配列を有する、ヒトCD71タンパク質を指す。一部の実施形態では、配列番号2は、全長ヒトCD71タンパク質である。一部の実施形態では、配列番号5は、ヒトCD71の細胞外ドメインである。

【0046】

「Tencn」とは、配列番号1

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESSE
KVGAEAINLTVPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSIIYGVKGGHR
SNPLSAEFTT

に示され、米国特許公開第2010/0216708号において記載されているコンセンサス配列を有する、合成フィブロネクチンIII型（FN3）ドメインを指す。

30

【0047】

「がん細胞」または「腫瘍細胞」とは、新たな遺伝物質の取込みを必ずしも伴わない、自発性または誘導性の表現型変化を有する、in vivo、ex vivoにおける、がん性細胞、前がん性細胞、または形質転換細胞、および組織培養物中のこれらの細胞を指す。形質転換は、形質転換ウイルスによる感染、および新たなゲノム核酸の組込み、または外因性核酸の取込みから生じうるが、形質転換はまた、自発的に、または発がん物質への曝露後に生じる場合もあり、これにより、内因性遺伝子を突然変異させる場合もある。形質転換／がんは、例えば、in vitro、in vivo、およびex vivoなど、ヌードマウスなどの適切な動物宿主における、形状変化、細胞の不死化、増殖制御の異常、病巣形成、増殖、悪性腫瘍、腫瘍特異的マーカーレベル、浸潤性、腫瘍の増殖または抑制により例示される（Freshney、「Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique」（3版、1994））。

40

【0048】

50

「樹状細胞」とは、適応免疫系において、重要な役割を果たす抗原提示細胞（APC）の種類を指す。樹状細胞の主要な機能は、抗原を、Ｔリンパ球へと提示し、免疫応答を、直接的にまたは間接的に、さらにモジュレートするサイトカインを分泌することである。樹状細胞は、不活性Ｔリンパ球内、または休眠ナイーブＴリンパ球内において、一次免疫応答を誘導する能力を有する。

【００４９】

「免疫細胞」とは、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、およびＮＫ細胞）、好中球、または単球／マクロファージとして類別される、免疫系の細胞を指す。これらは、全ての種類の白血球である。

【００５０】

「ベクター」とは、生体系内の複製が可能であるか、またはこのような系の間で移動されるポリヌクレオチドを指す。ベクターのポリヌクレオチドは、典型的に、生体系内のこれらのポリヌクレオチドの複製または維持を容易とするように機能する、複製起点、ポリアダニル化シグナル、または選択マーカーなどのエレメントを含有する。このような生体系の例は、細胞、ウイルス、動物、植物、およびベクターを複製することが可能な、生物学的構成要素を利用する、再構成された生体系を含みうる。ベクターを含むポリヌクレオチドは、DNAの場合もあり、RNA分子の場合もあり、これらのハイブリッド体の場合もある。

【００５１】

「発現ベクター」とは、生体系内、または発現ベクター内に存在するポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの翻訳を方向付けるように再構成された生体系内において利用されるベクターを指す。

【００５２】

「ポリヌクレオチド」とは、糖リン酸骨格または他の同等の共有結合的化学反应により、共有結合的に連結されたヌクレオチド鎖を含む合成分子を指す。cDNAは、ポリヌクレオチドの典型例である。

【００５３】

「ポリペプチド」または「タンパク質」とは、ポリペプチドを形成するように、ペプチド結合により連結された、少なくとも２つのアミノ酸残基を含む分子を指す。約５０アミノ酸未満の小型のポリペプチドは、「ペプチド」と称される。

【００５４】

「～価」とは、分子内の抗原に特異的な、一定数の結合性部位の存在を指す。このように、「一価」、「二価」、「四価」、および「六価」とは、それぞれ、分子内の抗原に特異的な、１つ、２つ、４つ、および６つの結合性部位の存在を指す。

【００５５】

「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」は、非ヒト霊長動物、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両性類、爬虫類など、全ての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物を含む。注記される場合を除き、「患者」または「対象」という用語は、互換的に使用される。

【００５６】

「単離された」とは、組換え細胞など、分子がその中で産生される系の他の構成要素から、実質的に分離および／または精製された分子（FN3ドメインなどの合成ポリヌクレオチドまたはポリペプチドなど）のほか、少なくとも１つの精製工程または単離工程にかけられたタンパク質の均質集団を指す。「単離FN3ドメイン」とは、他の細胞素材および／または化学物質を実質的に含まないFN3ドメインを指し、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の純度までなどの高純度まで単離されたFN3ドメインを包含する。

【００５７】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子へと連結されたFN3ドメインを含むポ

10

20

30

40

50

リペプチドなどのポリペプチドを含む組成物が提供される。オリゴヌクレオチド分子は、例えば、s i R N A 分子でありうる。

【0058】

したがって、一部の実施形態では、s i R N A は、標的遺伝子の発現を阻害することが可能な二本鎖RNA i (d s R N A) 剤である。d s R N A 剤は、センス鎖（パッセンジャー鎖）およびアンチセンス鎖（ガイド鎖）を含む。一部の実施形態では、d s R N A 剤の各鎖は、12～40ヌクレオチドの長さの範囲でありうる。例えば、各鎖は、14～40ヌクレオチドの長さ、17～37ヌクレオチドの長さ、25～37ヌクレオチドの長さ、27～30ヌクレオチドの長さ、17～23ヌクレオチドの長さ、17～21ヌクレオチドの長さ、17～19ヌクレオチドの長さ、19～25ヌクレオチドの長さ、19～23ヌクレオチドの長さ、19～21ヌクレオチドの長さ、21～25ヌクレオチドの長さ、または21～23ヌクレオチドの長さでありうる。

10

【0059】

一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖は、典型的に、二重鎖d s R N A を形成する。d s R N A 剤の二重鎖領域は、12～40ヌクレオチド対の長さでありうる。例えば、二重鎖領域は、14～40ヌクレオチド対の長さ、17～30ヌクレオチド対の長さ、25～35ヌクレオチドの長さ、27～35ヌクレオチド対の長さ、17～23ヌクレオチド対の長さ、17～21ヌクレオチド対の長さ、17～19ヌクレオチド対の長さ、19～25ヌクレオチド対の長さ、19～23ヌクレオチド対の長さ、19～21ヌクレオチド対の長さ、21～25ヌクレオチド対の長さ、または21～23ヌクレオチド対の長さでありうる。別の例では、二重鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、および27ヌクレオチド対の長さから選択される。

20

【0060】

一部の実施形態では、d s R N A は、鎖の3'末端もしくは5'末端またはこれらの両末端において、d s R N A 剤の、1つまたはそれ以上の突出領域および／またはキャッピング基を含む。突出は、1～10ヌクレオチドの長さ、1～6ヌクレオチドの長さ、例えば、2～6ヌクレオチドの長さ、1～5ヌクレオチドの長さ、2～5ヌクレオチドの長さ、1～4ヌクレオチドの長さ、2～4ヌクレオチドの長さ、1～3ヌクレオチドの長さ、2～3ヌクレオチドの長さ、または1～2ヌクレオチドの長さでありうる。突出は、一方の鎖が、他方の鎖より長いことの結果である場合もあり、同じ長さの2つの鎖が、ずらされていることの結果である場合もある。突出は、標的m R N A とミスマッチを形成する場合もあり、ターゲティングされる遺伝子配列と相補性である場合もあり、他の配列である場合もある。第1の鎖と、第2の鎖とはまた、例えば、ヘアピンを形成するように、さらなる塩基により接合される場合もあり、他の非塩基リンカーにより接合される場合もある。

30

【0061】

一部の実施形態では、d s R N A 剤の突出領域内のヌクレオチドは、各々、独立に、2'-F、2'-O-メチル、2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-O-(2-メトキシエチル)、2'-O-(2-メトキシエチル)、およびこれらの任意の組合せなどの2'-糖修飾ヌクレオチドを含むがこれらに限定されない、修飾ヌクレオチドの場合もあり、非修飾ヌクレオチドの場合もある。例えば、T T (U U) は、いずれかの鎖上のいずれかの末端について、突出配列でありうる。突出は、標的m R N A とミスマッチを形成する場合もあり、ターゲティングされる遺伝子配列と相補性である場合もあり、他の配列である場合もある。

40

【0062】

d s R N A 剤のセンス鎖、アンチセンス鎖、またはこれらの両方の鎖における、5'突出または3'突出は、リン酸化される場合がある。一部の実施形態では、突出領域は、2つのヌクレオチドの間に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートを有する、2つのヌクレオチドを含有し、この場合、2つのヌクレオチドは、同じ場合もあり、異なる場合もある。一実施形

50

態では、突出は、センス鎖、アンチセンス鎖、またはこれらの両方の鎖の3'末端に存在する。一実施形態では、この3'突出は、アンチセンス鎖内に存在する。一実施形態では、この3'突出は、センス鎖内に存在する。

【0063】

dsRNA剤は、その全体的安定性に影響を及ぼさずに、dsRNAの干渉活性を強化しうる、単一の突出だけを含む。例えば、一本鎖突出は、センス鎖の3'末端に、または、代替的に、アンチセンス鎖の3'末端に配置される。dsRNAはまた、アンチセンス鎖の5'末端（またはセンス鎖の3'末端）に配置された平滑末端を有する場合もあり、この逆の場合もある。一般に、dsRNAのアンチセンス鎖は、3'末端において、ヌクレオチド突出を有し、5'末端は、平滑末端である。理論に束縛されずに述べると、アンチセンス鎖の5'末端における非対称平滑末端およびアンチセンス鎖の3'末端突出は、RISCへの、ガイド鎖のローディングに好適である。例えば、単一突出は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチド長を含む。

10

【0064】

一部の実施形態では、dsRNA剤はまた、dsRNA二重鎖の両末端において、2つの平滑末端を有する場合もある。

【0065】

一部の実施形態では、dsRNA剤のセンス鎖内およびアンチセンス鎖内のあらゆるヌクレオチドは、修飾される場合がある。各ヌクレオチドは、非連結型リン酸酸素の一方もしくは両方、および／または連結型リン酸酸素のうちの1つもしくはそれ以上の、1つまたはそれ以上の変更を含む。同じであるか、または異なる修飾；リボース糖の構成要素、例えば、リボース糖上の2つのヒドロキシルの変更；リン酸部分の、「脱リン酸化」リンカーによる全面的置き換え；天然に存在する塩基の修飾または置き換え；ならびにリボース-リン酸骨格の置き換えまたは修飾により修飾される。

20

【0066】

一部の実施形態では、3'突出内または5'突出内の塩基の全部または一部は、例えば、本明細書で記載される修飾により修飾される。修飾は、例えば、リボース糖の2'位における、当技術分野で公知の修飾による修飾の使用、例えば、ヌクレオ塩基のリボ糖に代えた、2'-デオキシ-2'-フルオロ（2'-F）修飾デオキシリボヌクレオチド、または2'-O-メチル修飾デオキシリボヌクレオチドの使用、およびリン酸基内の修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾、ホスホロジチオエート修飾、ホスホン酸修飾、ホスホルアミデート修飾、またはメシルホスホルアミデート修飾を含む。突出は、標的配列と相同である必要はない。

30

【0067】

一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-デオキシ、または2'-フルオロにより、独立に修飾される。鎖は、1つを超える修飾を含有しうる。一実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖の各残基は、2'-O-メチルまたは2'-フルオロにより、独立に修飾される。

【0068】

一部の実施形態では、少なくとも2つの異なる修飾は、典型的に、センス鎖上およびアンチセンス鎖上に存在する。これらの2つの修飾は、2'-デオキシ修飾、2'-O-メチル修飾、もしくは2'-フルオロ修飾、非環状ヌクレオチド、または他の修飾でありうる。

40

【0069】

一実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖は、各々、2'-フルオロ、2'-O-メチル、または2'-デオキシから選択される、異なる形で修飾された、2つのヌクレオチドを含む。

【0070】

dsRNA剤は、少なくとも1つのホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によ

50

るヌクレオチド間連結をさらに含む。ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結修飾は、鎖の任意の位置における、センス鎖もしくはアンチセンス鎖、またはこれらの両方の、任意のヌクレオチド上で生じうる。例えば、ヌクレオチド間連結の修飾は、センス鎖上および／またはアンチセンス鎖上の、あらゆるヌクレオチド上で生じる場合もあり；各ヌクレオチド間連結修飾は、センス鎖上またはアンチセンス鎖上において、交互パターンで生じる場合もあり；センス鎖またはアンチセンス鎖は、いずれもが、ヌクレオチド間連結の修飾を、交互パターンで含む。センス鎖上のヌクレオチド間連結の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じ場合もあり、異なる場合もあり、センス鎖上のヌクレオチド間連結の修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオチド間連結の修飾の交互パターンと比べて、シフトを有する場合もある。

10

【0071】

一部の実施形態では、dsRNA剤は、突出領域内に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結修飾を含む。例えば、突出領域は、2つのヌクレオチドの間に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結を有する、2つのヌクレオチドを含む。ヌクレオチド間連結修飾はまた、二重鎖領域内の末端対合ヌクレオチドで、突出ヌクレオチドを連結するようにも施される。例えば、少なくとも2つ、3つ、4つ、または全ての突出ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結を介して連結されるが、場合により、突出ヌクレオチドを、突出ヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドと連結する、さらなるホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、メシルホスホルアミデート、またはメチルホスホン酸によるヌクレオチド間連結も存在しうる。例えば、3つの末端ヌクレオチドの間に、少なくとも2つのホスホロチオエートによるヌクレオチド間連結が存在する場合があります、この場合、3つのヌクレオチドのうちの2つは、突出ヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、突出ヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドである。一部の実施形態では、これらの3つの末端ヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端にある場合がある。

20

30

【0072】

一部の実施形態では、dsRNA組成物は、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第7,427,672号に記載された、修飾塩基またはヌクレオシド類似体により連結される。一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、本明細書で記載される式で、リンカーまたはLと称される。

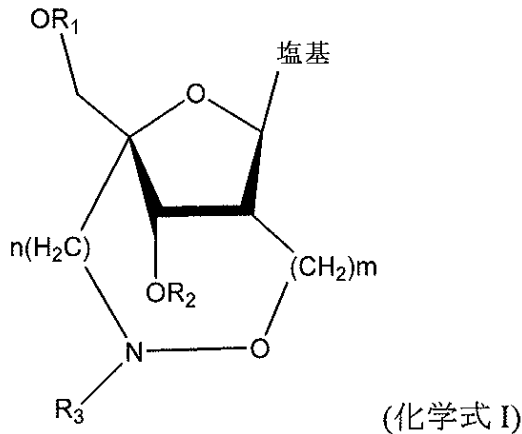
【0073】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Iに示される構造およびその塩：

40

50

【化 1】



〔式中、塩基は、場合により、置換基を有する、芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、 R_1 および R_2 は、同一であるか、または異なり、各々は、水素原子、核酸合成のためのヒドロキシル基に対する保護基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、リン酸基、核酸合成のための保護基により保護されたリン酸基、または $-P(R_4)R_5$ 〔式中、 R_4 および R_5 は、同一であるか、または異なり、各々は、ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基により保護されたヒドロキシル基、メルカプト基、核酸合成のための保護基により保護されたメルカプト基、アミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルコキシ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキルチオ基、1つ～6つの炭素原子を有するシアノアルコキシ基、または1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基により置換されたアミノ基を表し、 R_3 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、または機能的分子単位置換基を表し、 m は、0～2の整数を表示し、 n は、0～3の整数を表示する〕を有する。一部の実施形態では、 m および n は、0である。

【0074】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I 〔式中、 R_1 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、またはシアノ基、またはシリル基により置換されたアリール環を有する、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基である〕において示される構造およびその塩を有する。

【0075】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I 〔式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、*p*-トルエンスルホニル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または *tert*-ブチルジフェニルシリル基である〕において示される構造およびその塩を有する。

【0076】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I 〔式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基により保護されたリン酸基により置換されたアリール環を有する、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基である〕において示される構造およびその塩を有する。

【0077】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Ⅰ〔式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、-P(OC₂H₄CN)(N(i-Pr)₂)、-P(OCH₃)(N(i-Pr)₂)、ホスホニル基、または2-クロロフェニル基もしくは4-クロロフェニルリン酸基である〕において示される構造およびその塩を有する。

【0078】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Ⅰ〔式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルケニル基、6つ～14の炭素原子を有するアリール基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、メタンスルホニル基もしくはp-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族スルホニル基もしくは芳香族スルホニル基、アセチル基など、1つ～5つの炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である〕において示される構造およびその塩を有する。

【0079】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Ⅰ〔式中、 R_3 としての機能的分子単位置換基は、蛍光標識化分子もしくは化学発光標識化分子、核酸切断活性官能基、または細胞内シグナルペプチドもしくは核移行シグナルペプチドである〕において示される構造およびその塩を有する。

【0080】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Ⅰ〔式中、塩基は、以下の α 基：ヒドロキシ基、核酸合成のための保護基により保護されたヒドロキシ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基により保護されたメルカプト基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基により置換されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、およびハロゲン原子から選択される置換基を有する、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、もしくはプリン-9-イル基、または2-オキソピリミジン-1-イル基である〕において示される構造およびその塩を有する。

【0081】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式Ⅰ〔式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル（すなわち、アデニル）、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する6-アミノプリン-9-イル、2,6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル（すなわち、グアニル）、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2,6-ジメトキシプリン-9-イル、2,6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、シトシル）、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1,2-ジヒドロピリミジン-

1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、ウラシニル）、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、チミニル）、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、5-メチルシトシニル）、または核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである]において示される構造およびその塩を有する。

【0082】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、化学式 I [式中、mは、0であり、nは、1である]において示される構造およびその塩を有する。

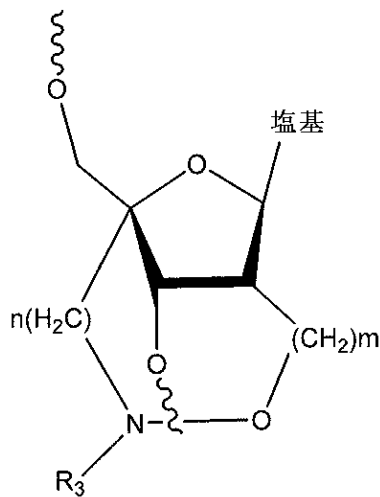
10

【0083】

一部の実施形態では、修飾塩基またはヌクレオシド類似体は、オリゴヌクレオチド類似体内の、それぞれのヌクレオシドの間の連結の形態が、天然核酸内のホスホジエステル結合と同一のホスホジエステル結合 $[-OP(O_2^-)O-]$ 以外に、1つもしくは2つまたはこれを超えるホスホロチオエート結合 $[-OP(O)(S^-)O-]$ 、ホスホロジチオエート結合 $[-O_2PS_2-]$ 、ホスホン酸結合 $[-PO(OH)_2-]$ 、ホスホルアミデート結合 $[-O=P(OH)_2-]$ 、またはメシルホスホルアミデート結合 $[-OP(O)(N)(SO_2)(CH_3)O-]$ を含有する場合があります、1つまたはそれ以上の種類の、これらの構造のうちの、2つまたはこれを超える構造が含有される場合、塩基は、これらの構造：

20

【化2】



30

[式中、塩基は、場合により、置換基を有する、芳香族複素環基または芳香族炭化水素環基を表し、R₃は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、アシル基、スルホニル基、シリル基、または機能的分子単位置換基を表し、mは、0～2の整数を表示し、nは、0～3の整数を表示する]の間で、同一の場合もあり、異なる場合もあることを条件として、化学式 I I において示される構造、または薬学的に許容可能なその塩を有する、ヌクレオシド類似体の、1つまたはそれ以上の種類の単位構造のうちの、1つもしくは2つまたはこれを超える構造を含有する、DNAオリゴヌクレオチド類似体またはRNAオリゴヌクレオチド類似体である。一部の実施形態では、mおよびnは、0である。

40

【0084】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式 I I [式中、R₁は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基

50

、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、またはシアノ基、またはシリル基により置換されたアリール環を有する、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基である]において示される構造を有する。

【0085】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、 R_1 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、*p*-トルエンスルホニル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、トリチル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、または*tert*-ブチルジフェニルシリル基である〕において示される構造を有する。

【0086】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、 R_2 は、水素原子、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、脂肪族スルホニル基、または芳香族スルホニル基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、もしくはシアノ基、シリル基、ホスホロアミダイト基、ホスホニル基、リン酸基、または核酸合成のための保護基により保護されたリン酸基により置換されたアリール環を有する、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基である〕において示される構造を有する。

【0087】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、 R_2 は、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、*p*-メトキシベンジル基、メタンスルホニル基、*p*-トルエンスルホニル基、*tert*-ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、 $-P(OC_2H_4CN)(N(i-Pr)_2)$ 、ホスホニル基、または2-クロロフェニル基もしくは4-クロロフェニルリン酸基である〕において示される構造を有する。

【0088】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、 R_3 は、水素原子、フェノキシアセチル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルケニル基、6つ～14の炭素原子を有するアリール基、1つ～3つのアリール基により置換されたメチル基、メタンスルホニル基もしくは*p*-トルエンスルホニル基などの低級脂肪族スルホニル基もしくは芳香族スルホニル基、アセチル基など、1つ～5つの炭素原子を有する脂肪族アシル基、またはベンゾイル基などの芳香族アシル基である〕において示される構造を有する。

【0089】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、 R_3 としての機能的分子単位置換基は、蛍光標識化分子もしくは化学発光標識化分子、核酸切断活性官能基、または細胞内シグナルペプチドもしくは核移行シグナルペプチドである〕において示される構造を有する。

【0090】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、塩基は、以下の α 基：ヒドロキシル基、核酸合成のための保護基により保護されたヒドロキシル基、1つ～5つの炭素原子を有するアルコキシ基、メルカプト基、核酸合成のための保護基により保護されたメルカプト基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキルチオ基、アミノ基、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基により置換されたアミノ基、1つ～5つの炭素原子を有するアルキル基、およびハロゲン原子から選択される置換基を有する、プリン-9-イル基、2-オキソピリミジン-1-イル基、もしくはプリン-9-イル基、または2-オキソピリミジン-1-イル基である〕において示される構造を有する。

【0091】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式ⅠⅠ〔式中、塩基は、6-アミノプリン-9-イル（すなわち、アデニル）、核

10

20

30

40

50

酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル（すなわち、グアニル）、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、シトシル）、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 2-オキソ-4-アミノ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、ウラシル）、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、チミル）、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル（すなわち、5-メチルシトシル）、または核酸合成のための保護基により保護されたアミノ基を有する 4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イルである」において示される構造を有する。

10

20

30

40

【0092】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド類似体または薬学的に許容可能なその塩は、化学式 I E [式中、m は、0 であり、n は、1 である] において示される構造を有する。

【0093】

一部の実施形態では、本明細書で記載される組成物は、ポリマー（ポリマー部分 C）をさらに含む。一部の場合に、ポリマーは、分枝状単量体もしくは非分枝状単量体の長鎖、および／または二次元もしくは三次元における、単量体の架橋ネットワークからなる、天然ポリマーまたは合成ポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、多糖、リグニン、ゴム、またはポリアルキレンオキシド（例えば、ポリエチレングリコール）を含む。一部の場合に、少なくとも 1 つのポリマーは、アルファージヒドロキシルポリエチレングリコール、オメガージヒドロキシルポリエチレングリコール、生体分解性ラクトンベースのポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート（PET、PETG）、ポリエチレンテレフタレート（PETE）、ポリテトラメチレングリコール（PTG）、またはポリウレタンのほか、これらの混合物を含むがこれらに限定されない。本明細書で使用される混合物は、同じ化合物中における、異なるポリマーの使用を指すほか、ブロックコポリマーを指す。場合によって、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも 1 つの区画が、別のポリマーの単量体から構築されるポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。一部の場合に、ポリマーは、PEG を含む。一部の場合に、ポリマーは、ポリエチレンイミド（PEI）またはヒドロキシエチルデンプン（HES）を含む。

【0094】

一部の場合に、C は、PEG 部分である。一部の場合に、PEG 部分が、オリゴヌクレオチド分子の 5' 末端においてコンジュゲートされるのに対して、結合性部分は、オリゴ

50

ヌクレオチド分子の3'末端においてコンジュゲートされる。一部の場合に、PEG部分が、オリゴヌクレオチド分子の3'末端においてコンジュゲートされるのに対して、結合性部分は、オリゴヌクレオチド分子の5'末端においてコンジュゲートされる。一部の場合に、PEG部分は、オリゴヌクレオチド分子の内部部位へとコンジュゲートされる。一部の場合に、PEG部分、結合性部分、またはこれらの組合せは、オリゴヌクレオチド分子の内部部位へとコンジュゲートされる。一部の場合に、コンジュゲーションは、直接的コンジュゲーションである。一部の場合に、コンジュゲーションは、天然のライゲーションを介するコンジュゲーションである。

【0095】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、多分散化合物または単分散化合物である。一部の場合に、多分散材料は、平均値重量（重量平均）によるサイズ、および二分散性により特徴づけられる、分子量が異なる材料の二分散分布を含む。一部の場合に、単分散PEGは、1つのサイズの分子を含む。一部の実施形態では、Cは、多分散化ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）、または単分散化ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、表示の分子量は、ポリアルキレンオキシド分子、例えば、PEG分子の分子量の平均を表す。

【0096】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）の分子量は、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daである。

【0097】

一部の実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の場合に、Cの分子量は、約200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1100 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1200 Daである。一部の場合に、Cの

分子量は、約 1 3 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 4 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 4 5 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 5 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 6 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 7 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 8 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 9 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 1 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 2 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 3 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 4 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 5 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 6 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 7 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 8 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 9 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 3 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 3 2 5 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 3 3 5 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 3 5 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 3 7 5 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 4 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 4 2 5 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 4 5 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 4 6 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 4 7 5 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 5 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 5 5 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 6 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 6 5 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 7 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 7 5 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 8 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 0 , 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 2 , 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 2 0 , 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 3 5 , 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 4 0 , 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 5 0 , 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 6 0 , 0 0 0 D a である。一部の場合に、C の分子量は、約 1 0 0 , 0 0 0 D a である。

10

20

30

40

50

【0098】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、P E G）は、1つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマー P E G である、ディスクリート P E G である。一部の場合に、ディスクリート P E G（d P E G）は、2つ～60、2つ～50、または2つ～48の反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50、またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約2つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約3つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約4つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約5つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約6つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約7つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約8つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約9つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約10またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約11またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約12またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約13またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約14またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E G は、約15またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。

。一部の場合に、d P E Gは、約 1 6 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 1 7 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 1 8 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 1 9 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 2 0 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 2 2 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 2 4 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 2 6 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 2 8 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 3 0 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 3 5 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 4 0 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 4 2 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 4 8 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、d P E Gは、約 5 0 またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。場合によって、d P E Gは、純粋（例えば、約 9 5 %、9 8 %、9 9 %、または 9 9 . 5 %）出発材料から、段階的に、単一分子量化合物として合成される。場合によって、d P E Gは、平均分子量ではなく、特異的分子量を有する。場合によって、本明細書で記載される d P E Gは、Q u a n t a B i o d e s i g n , L M D 製の d P E G である。

10

20

【0099】

一部の実施形態では、C は、アルブミン結合性ドメインである。ある特定の態様では、アルブミン結合性ドメインは、アルブミン結合性ドメインが、会合しているか、または連結されたドメインまたは別の治療剤の半減期を延長するように、血清アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（H S A）に特異的に結合する。一部の実施形態では、ヒト血清アルブミン結合性ドメインは、分子の N 末端へと連結された、イニシエーターメチオニン（M e t）を含む。一部の実施形態では、ヒト血清アルブミン結合性ドメインは、ドメインの C 末端または N 末端へと連結されたシステイン（C y s）を含む。N 末端 M e t および／または C 末端 C y s の付加は、発現、および／または P E G、F c 領域など、別の半減期延長分子でありうる別の分子とのコンジュゲーションを容易としうる。

30

【0100】

一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、表 8 に提示された、配列番号 1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、または 1 1 9 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメイン（タンパク質）は、単離アルブミン結合性ドメイン（タンパク質）である。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、配列番号 1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、または 1 1 9 のアミノ酸配列と、少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質が、配列番号 1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、または 1 1 9 の 1 0 位に対応する置換を有することを条件として、アルブミン結合性ドメインは、配列番号 1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、または 1 1 9 のアミノ酸配列と、少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、A 1 0 V である。一部の実施形態では、

40

50

置換は、A 1 0 G、A 1 0 L、A 1 0 I、A 1 0 T、またはA 1 0 Sである。一部の実施形態では、1 0 位における置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。一部の実施形態では、単離アルブミン結合性ドメインは、配列番号1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、または1 1 9のアミノ酸配列と比較した場合に、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0、1 1、1 2、1 3、または1 4の置換を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、配列番号1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、または1 1 9の1 0 位に対応する位置にある。一部の実施形態では、提供されるF N 3ドメインは、配列番号1 0 1、1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6、1 0 7、1 0 8、1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、もしくは1 1 9の、残基位置6、1 1、2 2、2 5、2 6、5 2、5 3、6 1、8 8、もしくは6、8、1 0、1 1、1 4、1 5、1 6、2 0、3 0、3 4、3 8、4 0、4 1、4 5、4 7、4 8、5 3、5 4、5 9、6 0、6 2、6 4、7 0、8 8、8 9、9 0、9 1、もしくは9 3位に対応する、少なくとも1つの残基位置、またはC末端において、システイン残基を含む。一連の位置が列挙されるが、各位置はまた、個別にも選出される。一部の実施形態では、システインは、6、5 3、または8 8位に対応する位置にある。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインのさらなる例は、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第1 0, 9 2 5, 9 3 2号において見出される。

10

20

30

40

50

【0 1 0 1】

【表 1】

表 8

配列 番号	配列
101	MLPAPKNLVASRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
102	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
103	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
104	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNISYWEPGIGGEAIWL RVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
105	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIYAEPGIGGEAIWL RVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
106	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEAGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
107	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPAIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
108	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGAGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
109	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGAGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
110	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIAL RVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
111	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LAVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIARFTT
112	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVAWIHGVKGGASSPPLIARFTT
113	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVAIHGVKGGASSPPLIARFTT
114	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIAGVKGGASSPPLIARFTT
115	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGSSPPLIARFTT
116	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGAAASPPLIARFTT
117	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSAPPLIARFTT
118	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLAARFTT
119	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIAIWYWEPIGIGGEAIW LRVPGSERSYDLTGLKPGTEYKVWIHGVKGGASSPPLIAAFTT

10

20

30

40

【0102】

一部の実施形態では、dsRNA剤は、二重鎖内の標的とのミスマッチ、またはその組合せを含む。ミスマッチは、突出領域内で生じる場合もあり、二重鎖領域内で生じる場合もある。塩基対は、解離または溶解を促進するそれらの傾向に基づきランク付けされる（例えば、特定の対合についての、会合または解離の自由エネルギーに基づきランク付けされ、最近隣解析または同様の解析もまた、使用されるが、最も簡単な手法は、個別対ベースで、対を検討する手法である）。解離の促進に関して述べると：A：Uが、G：Cに対して優先され；G：Uが、G：Cに対して優先され；I：Cが、G：C（I＝イノシン）に対して優先される。ミスマッチ、例えば、非カノニカルな対合、またはカノニカルな対

50

合以外の対合（本明細書の他の箇所で記載される）が、カノニカルの（A：T、A：U、G：C）対合に対して優先され；ユニバーサル塩基を含む対合が、カノニカルの対合に対して優先される。

【0103】

一部の実施形態では、dsRNA剤は、センス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端におけるリン含有基を含みうる。5'末端リン含有基は、5'末端リン酸（5'-P）、5'末端ホスホロチオエート（5'-PS）、5'末端ホスホロジチオエート（5'-PTS）、5'末端ビニルホスホン酸（5'-VP）、5'末端メチルホスホン酸（MePhos）、5'末端メシルホスホルアミデート（5'-MsPA）、または5'-デオキシ-5'-C-マロニルでありうる。5'末端リン含有基が、5'末端ビニルホスホン酸（5'-VP）である場合、5'-VPは、trans-ビニルリン酸もしくはcis-ビニルリン酸などの5'-E-VP異性体、またはこれらの混合物でありうる。これらの修飾の代表的構造は、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第10,233,448号において見出される。

【0104】

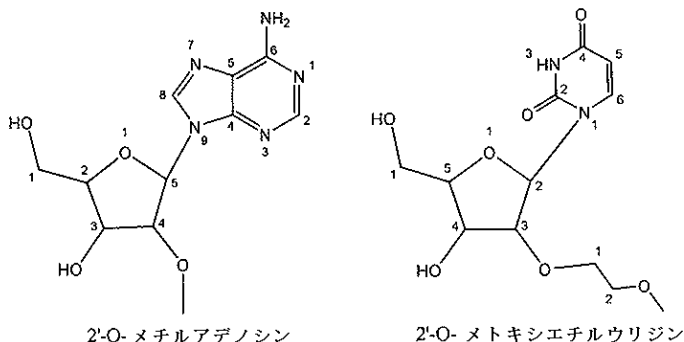
一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体または合成ヌクレオチド塩基は、リボース部分の2'ヒドロキシル基における修飾を伴う核酸を含む。一部の場合に、修飾は、H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、もしくはCN〔式中、Rは、アルキル部分である〕を含む。例示的アルキル部分は、鎖長C₁~C₁₀であり、直鎖状および分枝状のいずれでもある、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、tert-ブチルを含むがこれらに限定されない。一部の場合に、アルキル部分は、修飾をさらに含む。一部の場合に、修飾は、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシル基、ニトロ基、ニトロソ基、ニトリル基、複素環（例えば、イミダゾール、ヒドラジン、またはヒドロキシルアミノ）基、イソシアン酸もしくはシアン酸基、または硫黄含有基（例えば、スルホキシド、スルホン、スルフィド、およびジスルフィド）を含む。一部の場合に、アルキル部分は、O、S、N、Seなどのさらなるヘテロ原子をさらに含み、これらのヘテロ原子の各々は、上記で記載されたアルキル基により、さらに置換される。一部の場合に、複素環基の炭素は、窒素、酸素、または硫黄により置換される。一部の場合に、複素環置換は、モルホリノ、イミダゾール、およびピロリジノを含むがこれらに限定されない。

【0105】

一部の場合に、2'ヒドロキシル基における修飾は、2'-O-メチル修飾、または2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）修飾である。アデノシン分子の2'-O-メチル修飾、およびウリジンの2'-O-メトキシエチル修飾の例示的化学構造が、下記に例示される。

【0106】

【化3】



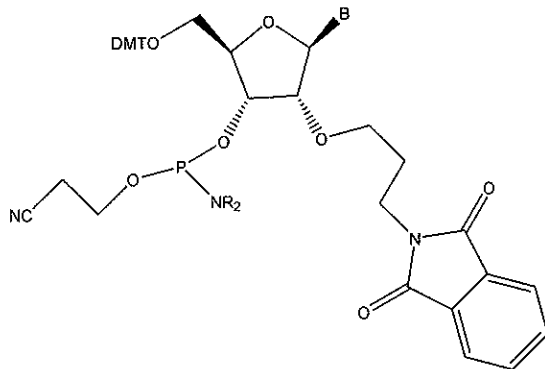
【0107】

一部の場合に、2'ヒドロキシル基における修飾は、プロピルリンカーを含む拡張アミ

ン基が、アミン基を、2' 酸素へと結合させる、2' -O-アミノプロピル修飾である。一部の場合に、この修飾は、アミン基に由来する、糖1つ当たり1つの陽性電荷を導入することにより、オリゴヌクレオチド分子の、リン酸に由来する全体的陰性電荷を中和し、これにより、その両性イオン特性に起因する細胞取込み特性を改善する。2' -O-アミノプロピルヌクレオシドホスホルアミダイトの例示的化学構造が、下記に例示される。

【0108】

【化4】



2'-O-アミノプロピルヌクレオシドホスホルアミダイト

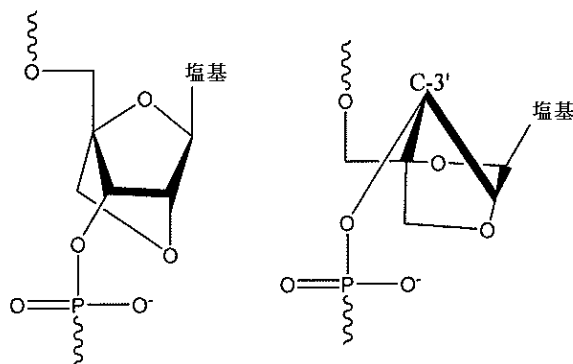
10

【0109】

一部の場合に、2' ヒドロキシル基における修飾は、2' 炭素において結合された酸素分子が、メチレン基により、4' 炭素へと連結され、これにより、2' -C, 4' -C-オキシメチレン結合型二環式リボヌクレオチド単量体を形成する、ロックトリボース修飾または架橋リボース修飾（例えば、ロック核酸またはLNA）である。LNAの例示的化学構造が、下記に例示される。左側に示された表示は、LNA単量体の化学結合度を強調する。右側に示された表示は、LNA単量体のフラノース環の、ロックト3'-endo (3E) コンフォメーションを強調する。

【0110】

【化5】



LNA (ロックト核酸)

30

40

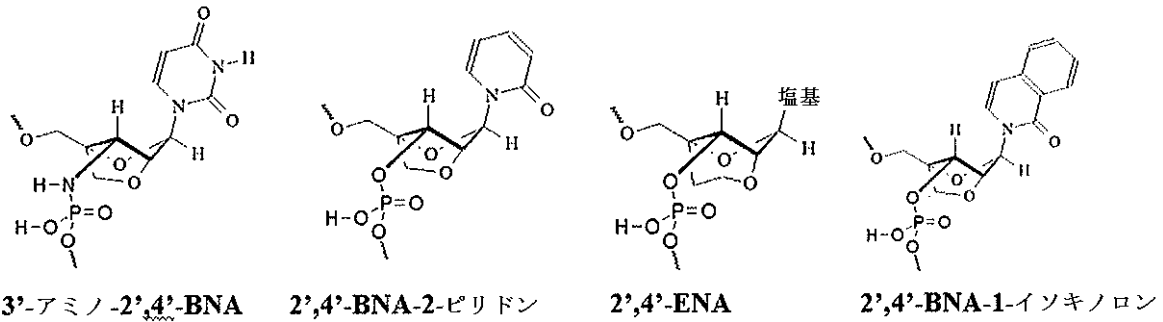
【0111】

一部の場合に、2' ヒドロキシル基における修飾は、例えば、糖コンフォメーションを、C3'-endo糖パッキングコンフォメーションへとロックする、2'-4'-エチレン架橋核酸などのエチレン核酸（ENA）を含む。ENAは、LNAもまた含む、修飾核酸の、架橋核酸クラスの一部である。ENAおよび架橋核酸の例示的化学構造が、下記に例示される。

【0112】

50

【化 6】



10

【0113】

一部の実施形態では、2'ヒドロキシル基における、さらなる修飾は、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)を含む。

【0114】

一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体は、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N,N-ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、1-メチルイノシン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジン、および5位において修飾を有する他のヌクレオチドである、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2,2-ジメチルグアノシン、5-メチルアミノエチルウリジン、5-メチルオキシウリジン、7-デアザアデノシンなどのデアザヌクレオチド、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、6-アゾチミジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジンおよび4-チオウリジンおよび2-チオシチジンなど、他のチオ塩基、ジヒドロウリジン、シュドウリジン、ケウオシン、アルケオシン、ナフチル基および置換ナフチル基、N6-メチルアデノシンなど、任意のO-アルキル化プリンおよびO-アルキル化ピリミジン、ならびにN-アルキル化プリンおよびN-アルキル化ピリミジン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、アミノフェノールまたは2,4,6-トリメトキシベンゼンなど、フェニル基および修飾フェニル基、G-クランプヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8-置換アデニンおよび8-置換グアニン、5-置換ウラシルおよび5-置換チミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシルアルキルヌクレオチド、カルボキシルアルキルアミノアルキルヌクレオチド、およびアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドなどであるがこれらに限定されない、修飾塩基を含む。修飾ヌクレオチドはまた、糖部分に関する修飾ヌクレオチドのほか、糖またはリボシルではないその類似体を有するヌクレオチドも含む。例えば、場合によって、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、および他の糖、複素環、または炭素環であるか、またはこれらに基づく。ヌクレオチドという用語はまた、当技術分野で、ユニバーサル塩基として公知のヌクレオチドも含む。例として述べると、ユニバーサル塩基は、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネブラリンを含むがこれらに限定されない。

20

30

40

【0115】

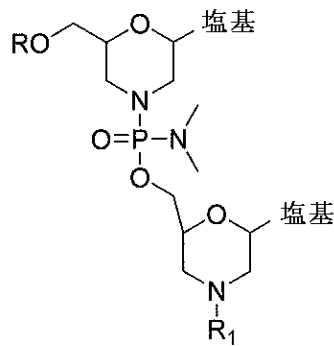
一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体は、モルホリノ、ペプチド核酸(PNA)、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、1',5'-アンヒドロヘキシトール核酸(HNA)、またはこれらの組合せをさらに含む。モルホリノ、またはホスホロジアミデートモルホリ

50

ノオリゴ（PMO）は、その構造が、通常、糖構造およびリン酸構造からの逸脱により、天然核酸構造を模倣する合成分子を含む。一部の場合に、5環員リボース環は、4つの炭素、1つの窒素、および1つの酸素を含有する、6環員モルホリノ環で置換される。場合によって、リボース単量体は、リン酸基ではなく、ホスホロジアミデート基により連結される。このような場合、骨格変更は、帯電オリゴヌクレオチドにより使用される細胞内送達剤などの細胞内送達剤の補助を伴わずに、細胞膜を通過することが可能な中性分子であるモルホリノをもたらす、全ての正電荷および負電荷を除去する。

【0116】

【化7】



モルホリノ

10

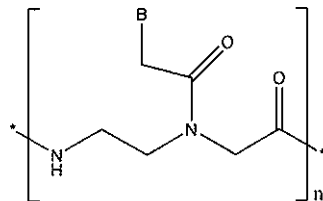
20

【0117】

一部の実施形態では、ペプチド核酸（PNA）は、糖環またはリン酸連結を含有せず、塩基は、接合され、オリゴグリシン様分子により、適切に隔てられるので、骨格電荷を消失させる。

【0118】

【化8】



PNA

30

【0119】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の修飾は、場合により、ヌクレオチド間連結において生じる。一部の場合に、修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート、メシルホスホルアミデート、ホスホロジチオエート、メチルホスホン酸、5'-アルキレンホスホン酸、5'-メチルホスホン酸、3'-アルキレンホスホン酸、ボロントリフルオリド 40
エート、3'-5'連結または2'-5'連結のボラノリン酸エステルおよびセレノリン酸エステル、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、水素ホスホン酸連結、アルキルホスホン酸、アルキルホスホノチオエート、アリールホスホノチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3'-アルキルホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、カーボネート、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチリミノ、チオアミデート、リボアセチル基を伴う連結、アミノエチルグリシン、シリル連結またはシロキサン連結、飽和もしくは不飽和であり、か 50

つ／または置換され、かつ／またはヘテロ原子を含有する、例えば、1つ～10の炭素の、ヘテロ原子を伴うか、またはこれを伴わない、アルキル連結またはシクロアルキル連結、モルホリノ構造、アミド、ポリアミドを伴う連結であって、塩基が、直接的に、または間接的に、アザ窒素骨格へと接合される連結、ならびにこれらの組合せを含むがこれらに限定されない。ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド (P S A S O) は、ホスホロチオエート連結を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。メシルホスホルアミデートアンチセンスオリゴヌクレオチド (M s P A A S O) は、メシルホスホルアミデート連結を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0120】

一部の場合に、修飾は、メチルホスホン酸修飾、メシルホスホルアミデート修飾、またはチオールホスホン酸修飾などのメチル修飾またはチオール修飾である。一部の場合に、修飾ヌクレオチドは、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイトを含むがこれらに限定されない。

【0121】

一部の場合に、修飾ヌクレオチドは、ヘキシトール核酸（または1', 5'-アンヒドロヘキシトール核酸 (HNA)）を含むがこれらに限定されない。

【0122】

一部の実施形態では、1つまたはそれ以上の修飾は、場合により、リボース部分、リン酸骨格、およびヌクレオシドの修飾、または3'末端または5'末端における、ヌクレオチド類似体による修飾をさらに含む。例えば、3'末端は、場合により、3'カチオン基、または3'-3'連結を介する3'末端におけるヌクレオシドの反転を含む。別の代替法では、3'末端は、場合により、アミノアルキル基、例えば、3'-C5-アミノアルキルdTとコンジュゲートされる。さらなる代替法では、3'末端は、場合により、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位または脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。一部の場合に、5'末端は、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アルキルアミノ置換基とコンジュゲートされる。場合によって、5'末端は、脱塩基部位、例えば、脱プリン部位または脱ピリミジン部位とコンジュゲートされる。

【0123】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体のうちの1つまたはそれ以上を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体のうちの、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) により修飾された、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、またはこれらの組合せを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) により修飾された、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、またはこれらの組合せから選択される、合成ヌクレオチド類似体のうちの、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6

つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25、またはこれを超える、チオールホスホン酸ヌクレオチドを含む。

10

【0124】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、約5%~約100%の修飾、約10%~約100%の修飾、約20%~約100%の修飾、約30%~約100%の修飾、約40%~約100%の修飾、約50%~約100%の修飾、約60%~約100%の修飾、約70%~約100%の修飾、約80%~約100%の修飾、および約90%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、100%の修飾を含む。

【0125】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約90%の修飾、約20%~約90%の修飾、約30%~約90%の修飾、約40%~約90%の修飾、約50%~約90%の修飾、約60%~約90%の修飾、約70%~約90%の修飾、および約80%~約100%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

20

【0126】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約80%の修飾、約20%~約80%の修飾、約30%~約80%の修飾、約40%~約80%の修飾、約50%~約80%の修飾、約60%~約80%の修飾、および約70%~約80%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0127】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約70%の修飾、約20%~約70%の修飾、約30%~約70%の修飾、約40%~約70%の修飾、約50%~約70%の修飾、および約60%~約70%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

30

【0128】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約60%の修飾、約20%~約60%の修飾、約30%~約60%の修飾、約40%~約60%の修飾、および約50%~約60%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0129】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約50%の修飾、約20%~約50%の修飾、約30%~約50%の修飾、および約40%~約50%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

40

【0130】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約40%の修飾、約20%~約40%の修飾、および約30%~約40%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0131】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約30%の修飾、および約20%~約30%の修飾のうちの少なくとも1つを含む。

【0132】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約10%~約20%の修飾を含む。

【0133】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、約15%~約90%、約20%~約80%

50

、約 30 %～約 70 %、または約 40 %～約 60 %の修飾を含む。

【0134】

さらなる場合に、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約 15 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、または 99 %の修飾を含む。

【0135】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約 1 つ、約 2 つ、約 3 つ、約 4 つ、約 5 つ、約 6 つ、約 7 つ、約 8 つ、約 9 つ、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、または約 40 の修飾を含む。

10

【0136】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、少なくとも約 1 つ、約 2 つ、約 3 つ、約 4 つ、約 5 つ、約 6 つ、約 7 つ、約 8 つ、約 9 つ、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、約 37、約 38、約 39、または約 40 の修飾ヌクレオチドを含む。

【0137】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 5～約 100 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 100 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 5 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 10 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 15 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 20 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 25 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 30 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 35 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 40 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 45 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 50 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 55 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 60 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 65 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 70 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 75 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 80 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 85 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 90 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 95 %は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部

20

30

40

50

の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 96% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 97% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 98% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 99% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子のうちの、約 100% は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む。一部の実施形態では、合成ヌクレオチド類似体は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル (2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル (2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル (2'-O-DMAEOE)、または 2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) により修飾された、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、2'-フルオロ-N3-P5'-ホスホルアミダイト、またはこれらの組合せを含む。

【0138】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 1 つ～約 25 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 1 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 2 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 3 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 4 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 5 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 6 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 7 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 8 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 9 つの修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 10 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 11 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 12 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 13 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 14 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 15 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 16 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 17 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 18 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 19 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 20 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 21 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオ

チド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 22 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 23 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 24 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 25 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 26 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 27 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 28 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 29 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 30 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 31 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 32 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 33 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 34 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 35 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 36 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 37 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 38 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 39 の修飾を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体を含む、約 40 の修飾を含む。

10

20

30

40

50

【0139】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、1つのポリヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖を含み、第2のポリヌクレオチドが、アンチセンス鎖を含み、2つの個別のポリヌクレオチドからアセンブルされる。他の実施形態では、センス鎖は、場合によって、ポリヌクレオチドリンカーまたは非ヌクレオチドリンカーである、リンカー分子を介して、アンチセンス鎖へと接続される。

【0140】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、センス鎖内のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖内のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、センス鎖内に存在するピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含み、この場合、センス鎖内に存在するプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

【0141】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。

【0142】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のピリミジンヌクレオチドは、2'

ーデオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、この場合、前記アンチセンス鎖内に存在する場合のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

【0143】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、複数の（例えば、2つまたはこれを超える、3つまたはこれを超える、4つまたはこれを超える、5つまたはこれを超える、6つまたはこれを超える、7つまたはこれを超える、8つまたはこれを超えるなど）、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、複数の2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドのうちの、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つは、連続ヌクレオチドである。一部の実施形態では、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置される。一部の実施形態では、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチド、または2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端に配置される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、その5'末端および／もしくは3'末端、またはこれらの両方において、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドを含む。場合により、このような実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖は、ポリヌクレオチドの5'末端における、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドの3'末端、またはポリヌクレオチドの3'末端における、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つの、2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドの5'末端において、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。これもまた場合により、このような少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドは、連続ヌクレオチドである。

【0144】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの少なくとも1つは、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、プリンヌクレオチドである。一部の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端に配置された、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドである。

【0145】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの1つが、5'末端に配置された、少なくとも2つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドを有するのに対し、別の鎖は、5'末端に配置された、少なくとも2つの2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドを有する。鎖が、5'末端に配置された、少なくとも2つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドを有する、一部の実施形態では、鎖はまた、少なくとも2つの2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾連続ヌクレオチドの3'末端において、少なくとも2つ、少なくとも3つの2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドも含む。一部の実施形態では、センス鎖およびアンチセンス鎖のうちの1つは、その5'末端および／または3'末端において、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドへと連結された、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つの2'-O-メチル修飾連続ヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、センス鎖お

よびアンチセンス鎖のうちの1つは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドと、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドとを交互に有する、少なくとも4つ、少なくとも5つのヌクレオチドを有する。

【0146】

一部の実施形態では、siRNAなどのオリゴヌクレオチド分子は、式I：

$N_1 N_2 N_3 N_4 N_5 N_6 N_7 N_8 N_9 N_{10} N_{11} N_{12} N_{13} N_{14} N_{15} N_{16} N_{17} N_{18} N_{19}$ ：センス鎖 (SS)

$N_{21} N_{20} N_{19} N_{18} N_{17} N_{16} N_{15} N_{14} N_{13} N_{12} N_{11} N_{10} N_9 N_8 N_7 N_6 N_5 N_4 N_3 N_2 N_1$ ：アンチセンス鎖 (AS)

【式中、Nにより表される、各ヌクレオチドは、独立に、A、U、C、またはG、または本明細書で提示される修飾ヌクレオチド塩基などの修飾ヌクレオチド塩基である】 10

に例示される式を有する。センス鎖およびアンチセンス鎖のヌクレオチドである N_1 は、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確さのために述べると、式Iは、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれにおいても、 N_1 、 N_2 、 N_3 などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同じである必要はなく、同じであることが意図されない。式Iに例示されたsiRNAであれば、標的配列と相補性であろう。

【0147】

例えば、一部の実施形態では、センス鎖は、 N_1 および N_2 における、ホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_6 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{12} 、および N_{17} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{13} 、 N_{14} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{18} 、および N_{19} における2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。 20

【0148】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、 N_1 へと接合されたビニルホスホン酸部分、 N_2 における、ホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を伴う2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{12} 、 N_{13} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{17} 、 N_{18} 、および N_{19} における、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_{14} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_{20} および N_{21} における、ホスホロチオエート (PS) 修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0149】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、センス鎖は、センス鎖の、5'末端、3'末端、または5'末端および3'末端の両方において、末端キャップ部分を含む。他の実施形態では、末端キャップ部分は、逆位デオキシ脱塩基部分である。 30

【0150】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、この場合、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端において、グリセリル修飾を含む。

【0151】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖が、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または約1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含み；アンチセンス鎖 40 50

が、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約10であるか、もしくは、より具体的に述べると、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上である、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上である、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または末端キャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

10

20

【0152】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖が、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含み；アンチセンス鎖が、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25またはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25もしくはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはこれを超えるホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または末端キ

30

40

50

ャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

【0153】

一部の実施形態では、センス鎖は、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または約1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）、2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約10であるか、もしくは、より具体的に述べると、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、1つもしくはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、もしくはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または末端キャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

【0154】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖が、センス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25またはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含み；アンチセンス鎖が、アンチセンス鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、約1つ～約25またはこれを超える、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホ

ン酸、ホスホルアミデート、もしくはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロによる修飾ヌクレオチド、および／または1つもしくはそれ以上の（例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超える）ユニバーサル塩基による修飾ヌクレオチド、ならびに、場合により、末端キャップ分子を含む、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖および／またはアンチセンス鎖の、1つまたはそれ以上の、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはこれを超えるピリミジンヌクレオチドは、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方において、10約1つ〜約5、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結および／または末端キャップ分子を伴うか、またはこれらを伴わない、2'-デオキシ、2'-O-メチル、および／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾され、同じ鎖内または異なる鎖内に存在する。

【0155】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子の各鎖内に、約1つ〜約25、例えば、約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはこれを超える、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートによるヌクレオチド間連結を有する、化学修飾された短鎖干渉核酸分子である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'末端において、リン酸骨格修飾を含む。代替的におよび／または加えて、オリゴヌクレオチド分子は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'末端において、リン酸骨格修飾を含む。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホロチオエートである。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホロジチオエートである。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホン酸である。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、ホスホルアミデートである。一部の場合に、リン酸骨格修飾は、メシルホスホルアミデートである。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホロチオエート骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホロジチオエート骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホン酸骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。一部の実施形態では、センス鎖またはアンチセンス鎖は、2つのホスホルアミデート骨格を介してカップリングされた、3つの連続ヌクレオシドを有する。

【0156】

別の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、2'-5'ヌクレオチド間連結を含む。一部の場合に、2'-5'ヌクレオチド間連結は、一方または両方の配列鎖の、3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方にある。さらなる場合に、2'-5'ヌクレオチド間連結は、一方または両方の配列鎖内の、他の多様な位置に存在する、例えば、オリゴヌクレオチド分子の一方もしくは両方の鎖内のピリミジンヌクレオチドのあらゆるヌクレオチド間連結を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはこれを超えるヌクレオチド間連結は、2'-5'ヌクレオチド間連結を含むか、またはオリゴヌクレオチド分子の一方もしくは両方の鎖内のプリンヌクレオチドのあらゆるヌクレオチド間連結を含む、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくはこれを超えるヌクレオチド間連結は、2'-5'ヌクレオチド間連結を含む。

10

20

...

50

、 $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の
の場合に、 $2'$ – O –ジメチルアミノエチル($2'$ – O –DMAOE)修飾オリゴヌクレオ
チド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$
エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、 $2'$ – O –ジメチルアミノプロピル($2'$ – O –DMAP)修飾オリゴヌクレオチド分
子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキ
ソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、 $2'$ – O –ジメチルアミノエチルオキシエチル($2'$ – O –DMAEOE)修飾オリゴヌクレ
オチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ –
 $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の 10
の場合に、 $2'$ – O – N –メチルアセトアミド($2'$ – O –NMA)修飾オリゴヌクレオチド
分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキ
ソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、
DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ
耐性)である。一部の場
合に、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性
(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、また
は $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、HNA修飾オリゴヌクレオ
チド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$
エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場 20
合に、モルホリノは、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$
– $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部
の場合に、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼに対して耐性(例えば、
RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$
エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、メチルホスホン酸ヌクレオチド修飾オ
リゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐
性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である
。一部の場
合に、チオールホスホン酸ヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、ヌク
レアーゼ耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアー
ゼ耐性、または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、 $2'$ –フルオ 30
ロ– $N3-P5'$ –ホスホルアミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、ヌクレアーゼ
耐性(例えば、RNアーゼH耐性、DNアーゼ耐性、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ耐性、
または $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ耐性)である。一部の場
合に、本明細書で記載される
、 $5'$ 側コンジュゲートは、 $5'$ – $3'$ エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。一部の場
合に、
本明細書で記載される、 $3'$ 側コンジュゲートは、 $3'$ – $5'$ エキソヌクレアーゼ切断を
阻害する。

【0159】

一部の実施形態では、本明細書で記載される、合成ヌクレオチド類似体のうちの1つま
たはそれ以上は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、
結合アフィニティーを増大させている。 $2'$ – O –メチル、 $2'$ – O –メトキシエチル($2'$ 40
– O –MOE)、 $2'$ – O –アミノプロピル、 $2'$ –デオキシ、 $2'$ –デオキシ– $2'$ –フル
オロ、 $2'$ – O –アミノプロピル($2'$ – O –AP)、 $2'$ – O –ジメチルアミノエチル($2'$
– O –DMAOE)、 $2'$ – O –ジメチルアミノプロピル($2'$ – O –DMAP)、 $2'$
– O –ジメチルアミノエチルオキシエチル($2'$ – O –DMAEOE)、または $2'$ – O –
 N –メチルアセトアミド($2'$ – O –NMA)により修飾された、LNA、ENA、PNA
、HNA、モルホリノ、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオ
チド、または $2'$ –フルオロ– $N3-P5'$ –ホスホルアミダイトを含む、合成ヌクレオチド
類似体のうちの1つまたはそれ以上は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポ
リ核酸分子と比べて、結合アフィニティーを増大させている。一部の場
合に、 $2'$ – O –
メチル修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポ 50

リ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-O-アミノプロピル修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-デオキシ修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、LNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、ENA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、PNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、HNA修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、モルホリノ修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、メチルホスホン酸ヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、チオールホスホン酸ヌクレオチド修飾オリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、2'-フルオロ-N³-P^{5'}-ホスホルアミダイトを含むオリゴヌクレオチド分子は、それらのmRNA標的に対する、同等の天然のポリ核酸分子と比べて、結合アフィニティを増大させている。一部の場合に、アフィニティの増大は、K_dの低下、融点(T_m)の上昇、またはこれらの組合せにより例示される。

【0160】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、キラル的に純粋な(または立体的に純粋な)ポリ核酸分子、または単一のエナンチオマーを含むポリ核酸分子である。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、L-ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、D-ヌクレオチドを含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子組成物は、30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、もしくはこれ未満の、その鏡像エナンチオマーを含む。場合によって、オリゴヌクレオチド分子組成物は、30%未満、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、もしくはこれ未満のラセミ混合物を含む。

【0161】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、アプタマーコンジュゲート部分を含むように、さらに修飾される。一部の場合に、アプタマーコンジュゲート部分は、DNAアプタマーコンジュゲート部分である。一部の場合に、アプタマーコンジュゲート部分は、循環抗体への接合のための特異的エピトープを提示する、特異的細胞表面標的および特異的細胞表面部分を認識するアプタマー部分を含む、Alphamerである。

【0162】

さらなる実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増大させるように修飾される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、RNA（例えば、siRNA）である。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増大させるように、上記で記載された修飾のうちの1つまたはそれ以上により修飾される。場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチル修飾、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）修飾、2'-O-アミノプロピル修飾、2'-デオキシ修飾、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）修飾、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）修飾、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）修飾、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）修飾、または2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）修飾などにより、2'ヒドロキシル位置において修飾されるか、またはロックトリボースコンフォメーションもしくは架橋リボースコンフォメーション（例えば、LNAまたはENA）により、2'ヒドロキシル位置において修飾される。場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、2'-O-メチルリボースおよび／または2'-O-メトキシエチルリボースにより修飾される。場合によって、オリゴヌクレオチド分子はまた、その安定性を増大させるように、モルホリノ、PNA、HNA、メチルホスホン酸ヌクレオチド、チオールホスホン酸ヌクレオチド、および／または2'-フルオロ-N³-P⁵-ホスホルアミダイトも含む。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、キラル的に純粋な（または立体的に純粋な）オリゴヌクレオチド分子である。一部の場合に、キラル的に純粋な（または立体的に純粋な）オリゴヌクレオチド分子は、その安定性を増大させるように修飾される。当業者には、送達のための安定性を増大させるのに適する、RNAへの修飾が明らかであろう。

【0163】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、2'修飾を含む。一部の実施形態では、センス鎖の5'末端から、3、7、8、9、12、および17位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾により修飾されない。一部の実施形態では、センス鎖の5'末端から、3、7、8、9、12、および17位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾により修飾される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から、2および14位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾により修飾されない。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から、2および14位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾により修飾される。一部の実施形態では、ヌクレオチドのうちのいずれかは、5'-ホスホロチオエート基による修飾をさらに含む。一部の実施形態では、センス鎖の5'末端から、1および2位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基による修飾により修飾される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から、1、2、20、および21位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、5'-ホスホロチオエート基による修飾により修飾される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子のセンス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端は、ビニルホスホン酸修飾をさらに含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端から1位における、オリゴヌクレオチド分子のヌクレオチドは、ビニルホスホン酸修飾により修飾される。

【0164】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性のセンス領域およびアンチセン

ス領域を含む、二本鎖ポリヌクレオチド分子であり、この場合、アンチセンス領域は、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を有する。一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、2つの個別のポリヌクレオチドからアセンブルされ、この場合、一方の鎖は、センス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖と、センス鎖とは、自己相補性であり（例えば、アンチセンス鎖と、センス鎖とが、二重鎖構造または二本鎖構造を形成する、例えば、二本鎖領域が、約19、20、21、22、23、またはこれを超える塩基対である場合など、各鎖は、他の鎖内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み）；アンチセンス鎖は、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス鎖は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を含む。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、単一のオリゴヌクレオチドからアセンブルされ、この場合、オリゴヌクレオチド分子の、自己相補性のセンス領域と、アンチセンス領域とは、核酸ベースのリンカー、または非核酸ベースのリンカーにより連結される。

10

20

30

40

50

【0165】

場合によって、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域を有し、二重鎖、非対称二重鎖、ヘアピン、または非対称ヘアピンによる二次構造を伴うポリヌクレオチドであり、この場合、アンチセンス領域は、個別の標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を有する。他の場合に、オリゴヌクレオチド分子は、自己相補性のセンス領域およびアンチセンス領域を含む、2つまたはこれを超えるループ構造およびステムを有する、環状一本鎖ポリヌクレオチドであり、この場合、アンチセンス領域は、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、RNAiを媒介することが可能である、活性のオリゴヌクレオチド分子を作出するように、*in vivo*または*in vitro*においてプロセッシングされる。さらなる場合に、オリゴヌクレオチド分子はまた、標的核酸分子内またはその部分内のヌクレオチド配列と相補性であるヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド（例えば、ここで、このようなオリゴヌクレオチド分子は、標的核酸配列またはその部分に対応するヌクレオチド配列の、オリゴヌクレオチド分子内における存在を要求しない）も含み、この場合、一本鎖ポリヌクレオチドは、5'リン酸、または5'ニリン酸、3'ニリン酸などの末端リン酸基をさらに含む。

【0166】

一部の場合に、非対称ヘアピンは、アンチセンス領域と、ヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むループ部分と、センス領域が、アンチセンス領域と塩基対合し、ループとの二重鎖を形成するのに十分である、相補性ヌクレオチドを有する限りにおいて、アンチセンス領域より少数のヌクレオチドを含むセンス領域とを含む、直鎖状オリゴヌクレオチド分子である。例えば、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子は、細胞または*in vivo*系において、RNAiを媒介するのに十分な長さ（例えば、約19～約22のヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、約4つ～約8つのヌクレオチドを含むループ領域と、アンチセンス領域と相補性である、約3つ～約18のヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。場合によって、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子はまた、化学的に修飾された5'末端リン酸基も含む。さらなる場合に、非対称ヘアピンオリゴヌクレオチド分子のループ部分は、ヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカー分子、またはコンジュゲート分子を含む。

【0167】

一部の実施形態では、非対称二重鎖は、センス領域と、アンチセンス領域とを含む、2つの個別の鎖を有するオリゴヌクレオチド分子であり、この場合、センス領域は、センス領域が、アンチセンス領域と塩基対合し、二重鎖を形成するのに十分である、相補性ヌクレオチドを有する限りにおいて、アンチセンス領域より少数のヌクレオチドを含む。例え

ば、非対称二重鎖オリゴヌクレオチド分子は、細胞または *in vitro* 系において、RNAi を媒介するのに十分な長さ（例えば、約 19 ～ 約 22 のヌクレオチド）を有するアンチセンス領域と、アンチセンス領域と相補性である、約 3 つ ～ 約 19 のヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。

【0168】

場合によって、ユニバーサル塩基は、それらの間でほとんど識別されることなく、天然の DNA/RNA 塩基の各々と、塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を指す。ユニバーサル塩基の非限定例は、C-フェニル、C-ナフチル、および他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、ならびに当技術分野で公知の 3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および 6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体を含む。

【0169】

一部の実施形態では、dsRNA 剤は、5'リン酸化されるか、または 5'プライム末端において、ホスホリル類似体を含む。5'リン酸修飾は、RISC 媒介遺伝子サイレンシングと適合性である修飾を含む。適切な修飾は、5'-リン酸 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$) ; 5'-ニリン酸 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-三リン酸 ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-グアノシンキャップ (7-メチル化または非メチル化) ($7\text{m}-\text{G}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-アデノシンキャップ (Appp)、および任意の修飾ヌクレオチドキャップ構造または非修飾ヌクレオチドキャップ構造 ($\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$) ; 5'-モノチオリン酸 (ホスホロチオエート ; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$) ; 5'-モノジチオリン酸 (ホスホロジチオエート ; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-ホスホロチオレート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$) ; ホスホロジチオエート [$-\text{O}_2\text{PS}_2-$] ; ホスホン酸 [$-\text{PO}(\text{OH})_2-$] ; ホスホルアミデート [$-\text{O}=\text{P}(\text{OH})_2-$] ; メシルホスホルアミデート (CH_3)(SO_2)($\text{N})\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-5'$) ; 酸素/硫黄で置きかえられた、一リン酸、ニリン酸、および三リン酸の、任意のさらなる組合せ（例えば、5'-アルファーチオ三リン酸、5'-ガンマチオ三リン酸など）、5'-ホスホルアミデート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-アルキルホスホン酸 ($\text{R}=\text{アルキル}=\text{メチル}$ 、エチル、イソプロピル、プロピルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$ 、5'-アルケニルホスホン酸（すなわち、ビニル、置換ビニル）、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$ ）、5'-アルキルエーテルホスホン酸 ($\text{R}=\text{アルキルエーテル}=\text{メトキシメチル}(\text{MeOCH}_2-)$ 、エトキシメチルなど、例えば、 $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-$) を含む。一部の実施形態では、修飾は、dsRNA のアンチセンス鎖中に施される。

【0170】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子の配列は、GYS1 の標的配列に対して、少なくとも 40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または 99.5% 相補性である。一部の実施形態では、GYS1 の標的配列は、標的配列の最初のヌクレオチドが、コード領域内の GYS1 mRNA 転写物内、または 5'非翻訳領域 (UTR) 内もしくは 3'UTR 内の、任意のヌクレオチドで始まる、GYS1 内の、約 10 ～ 50 塩基対の長さ、約 15 ～ 50 塩基対の長さ、15 ～ 40 塩基対の長さ、15 ～ 30 塩基対の長さ、または 15 ～ 25 塩基対の長さの配列の核酸配列である。例えば、標的配列の最初のヌクレオチドは、GYS1 mRNA のコード領域内または非コード領域 (5'側非翻訳領域または 3'側非翻訳領域) 内の核酸位置 (nal ; 全長 GYS1 mRNA の 5'末端から始まる数であり、例えば、5'末端最初のヌクレオチドは、nal 1 である) 1、nal 2、nal 3、nal 4、nal 5、nal 6、nal 7、nal 8、nal 9、nal 10、nal 11、nal 12、nal 13、nal 14、nal 15、nal 1

10

20

30

40

50

5、nal 16、nal 17、または他の任意の核酸位置で始まるように選択される。一部の実施形態では、標的配列の最初のヌクレオチドは、nal 10~nal 15、nal 10~nal 20、nal 50~nal 60、nal 55~nal 65、nal 75~nal 85、nal 95~nal 105、nal 135~nal 145、nal 155~nal 165、nal 225~nal 235、nal 265~nal 275、nal 275~nal 245、nal 245~nal 255、nal 285~nal 335、nal 335~nal 345、nal 385~nal 395、nal 515~nal 525、nal 665~nal 675、nal 675~nal 685、nal 695~nal 705、nal 705~nal 715、nal 875~nal 885、nal 885~nal 895、nal 895~nal 905、nal 1035~nal 1045、nal 1045~nal 1055、nal 1125~nal 1135、nal 1135~nal 1145、nal 1145~nal 1155、nal 1155~nal 1165、nal 1125~nal 1135、nal 1155~nal 1165、nal 1225~nal 1235、nal 1235~nal 1245、nal 1275~nal 1245、nal 1245~nal 1255、nal 1265~nal 1275、nal 1125~nal 1135、nal 1155~nal 1165、nal 1225~nal 1235、nal 1235~nal 1245、nal 1275~nal 1245、nal 1245~nal 1255、nal 1265~nal 1275、nal 1275~nal 1285、nal 1335~nal 1345、nal 1345~nal 1355、nal 1525~nal 1535、nal 1535~nal 1545、nal 1605~nal 1615、nal 1615~c. 1625、nal 1625~nal 1635、nal 1635~1735、nal 1735~1835、nal 1835~1935、nal 1836~1856、nal 1935~2000、nal 2000~2100、nal 2100~2200、nal 2200~2260、nal 2260~2400、nal 2400~2500、nal 2500~2600、nal 2600~2700、nal 2700~2800、nal 2800~2500、nal 2500~2600、nal 2600~2700、nal 2700~2800、nal 2800~2860などの中の位置、またはこれらの間の位置で始まるように選択される。一部の実施形態では、GYS1 mRNAの配列は、NCBI参照配列：NM_002103として提示される。

10

20

30

40

【0171】

一部の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖剤は、それとハイブリダイズし、RNA干渉を介して、その発現を阻害するように、標的RNAと、100%相補性である。標的RNAは、細胞内で発現される、任意のRNAでありうる。別の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝細胞、筋細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、または中枢神経系細胞である。別の実施形態では、dsRNAのアンチセンス鎖剤は、標的RNAと、少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、または少なくとも50%相補性である。一部の実施形態では、標的RNAは、GYS1 RNAである。一部の実施形態では、siRNA分子は、GYS1の発現を低減するsiRNAである。一部の実施形態では、siRNA分子は、本明細書で記載されるアッセイにおいて、本明細書で記載される通り、200nM以下の濃度で、GYSの発現を低減し、他のRNAの発現を、50%を超えて低減しないsiRNAである。

【0172】

siRNAは、任意の遺伝子、または目的のRNA（例えば、mRNA）転写物に対してターゲティングされる。

【0173】

50

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第10,233,448号において見出される。

【0174】

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、Andersonら、Nucleic Acids Research、2021、49(16)、9026～9041において見出される。

【0175】

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、PCT公開第WO2021/030778号において見出される。

【0176】

他の修飾および修飾パターンは、例えば、参照によって本明細書に組み入れる、PCT公開第WO2021/030763号において見出される。

【0177】

一部の実施形態では、siRNAは、FN3ドメインなどのタンパク質へと連結される。siRNAは、同じ標的タンパク質、または異なる標的タンパク質に結合する、複数のFN3ドメインへと連結される。一部の実施形態では、リンカーは、センス鎖の、FN3ドメインへの連結を容易とするのに使用されるセンス鎖へと接合される。

【0178】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、siRNA分子などであるがこれらに限定されない核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。一部の実施形態では、 X_1 と、 X_2 と、 X_3 とは、異なる標的タンパク質に結合する。一部の実施形態では、 y は、0である。一部の実施形態では、 n は、1であり、 q は、0であり、 y は、0である。一部の実施形態では、 n は、1であり、 q は、1であり、 y は、0である。一部の実施形態では、 n は、1であり、 q は、1であり、 y は、1である。一部の実施形態では、第3のFN3ドメインは、 X_3 を伴わない分子と比較して、分子全体としての半減期を延長する。一部の実施形態では、半減期延長部分は、アルブミンに結合するFN3ドメインである。このようなFN3ドメインの例は、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第20170348397号、および米国特許第9,156,887号において記載されたFN3ドメインを含むがこれらに限定されない。FN3ドメインは、例えば、共有結合的相互作用を介して、他のサブユニットを組み込みうる。一部の実施形態では、FN3ドメインは、半減期延長部分をさらに含む。例示的半減期延長部分は、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合性タンパク質および／またはアルブミン結合性ドメイン、トランスフェリンならびにその断片および類似体、ならびにFc領域である。ヒトFc領域のアミノ酸配列は、周知であり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgEのFc領域を含む。一部の実施形態では、FN3ドメインは、本明細書で記載される半減期延長部分のうちのいずれかなどであるがこれらに限定されない、分子全体の半減期を延長する分子に結合する、第2のFN3ドメインを組み込みうる。一部の実施形態では、第2のFN3ドメインは、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合性タンパク質および／またはアルブミン結合性ドメイン、ならびにこれらの断片および類似体に結合する。

【0179】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X_1) - (X_2) - L - (X_4)$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； L は、リンカーであり； X_4 は、核酸分子である〕を有する組成物が提供される。一部の実施形態では、 X_4 は、siRNA分子である。一部の実施形態では、 X_1 は、CD71のうちの1つに結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、 X_2 は、CD71のうちの1つに結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、 X_1 および X_2 は、同じ標

10

20

30

40

50

的タンパク質に結合しない。一部の実施形態では、X 1 および X 2 は、同じ標的タンパク質に結合するが、タンパク質上の、異なる結合性部位において結合する。一部の実施形態では、X 1 および X 2 は、同じ標的タンパク質に結合する。一部の実施形態では、X 1 および X 2 は、C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインである。一部の実施形態では、組成物は、A S G P R に結合する化合物またはタンパク質を含まない（例えば、これらが非含有である）。

【0180】

一部の実施形態では、本明細書では、 $C - (X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] - (X 3)_y$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

10

【0181】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] - (X 3)_y - C$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

【0182】

一部の実施形態では、本明細書では、 $C - (X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] L - (X 3)_y$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

20

【0183】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X 1)_n - (X 2)_q [L - X 4] L - (X 3)_y - C$ の式 [式中、X 1 は、第 1 の F N 3 ドメインであり；X 2 は、第 2 の F N 3 ドメインであり；X 3 は、第 3 の F N 3 ドメインまたは半減期延長分子であり；L は、リンカーであり；X 4 は、オリゴヌクレオチド分子であり；C は、ポリマーであり；n、q、および y は、各々独立に、0 または 1 である] を有する組成物が提供される。

30

【0184】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式 [式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{As} - L_2 - F_1$ の式を有し、
C は、PEG などのポリマーであり；
 L_1 および L_2 は、各々独立に、リンカーであり；
 X_s は、二本鎖 siRNA 分子のセンス鎖である 5' - 3' オリゴヌクレオチドであり；
 X_{As} は、二本鎖 siRNA 分子のアンチセンス鎖である 3' - 5' オリゴヌクレオチドであり；
 F_1 は、少なくとも 1 つの F N 3 ドメインを含むポリペプチドであり；
 X_s および X_{As} は、組成物／複合体を形成するように、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成する]
を有する組成物または複合体が提供される。

40

【0185】

一部の実施形態では、C は、分子の半減期を延長する分子でありうる。本明細書では、このような部分について記載される。一部の実施形態では、C はまた、Endopporter、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリシン、または両親媒性ペプチドでもありうる。これらの部分は、本明細書で提示される、他の半減期延長部分に代えて、またはこれらに加えて使用される。一部の実施形態では、C は、複合体を、細胞、エンドソーム、または ER へと送達する分子の場合があり、前記分子は、表 9 に列挙されたペプチドから選択される：

50

【0186】

【表2】

配列 番号	名称	配列
750	TAT	RKKRRQRRR
751	ペネトラチン	RQIKIWFQNRRMKWKK
752	トランスポルタン	GWTLSAGYLLGKINKALAAALAKKIL
753	MAP	KLALKLALKALKAAALKLA
754	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
755	KDEL	KDEL
756	GALA	WEAALAEALAEHLAEALAEALEALAA
757	HA2	GDIMGEWGNEIFGAIAGFLGC
758	アウリン1.2	GLFDIHKIAESF
759	MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKSKRKV
760	TP-10	AGYLLGKINLKALAAALAKKIL
761	EB-1	LIRLWSHLIHIWFQNRRRLKWKKK
762	HA2-ペネトラチン	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRR MKWKK
763	エンドソーム溶解剤	FFKKLAHALHLLALLALHLAHALKKA
764	エンドソーム溶解剤	LFEAIEGFIENGWGMIDGWYG
765	エンドソーム溶解剤	LFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGRKKRRQRRR
766	エンドソーム溶解剤	IGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
767	ERターゲットティング剤	MKLAVTLTLVTLALSSSSASA
1061	ERターゲットティング剤	RLIEDICLPRWGCLWEDDKDEL
1062	ERターゲットティング剤	MIRTLTLLSTLVAGALSK
1063	ERターゲットティング剤	ILSSLTVTQLLRRLHQWIK
1064	ERターゲットティング剤	MIRTLTLLSTLVAGALSKDEL

【0187】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式〔式中、 A_1 は、 X_s の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - F_1$ の式を有する〕を有する組成物または複合体が提供される。

【0188】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式〔式中、 A_1 は、 $C - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する〕を有する組成物または複合体が提供される。

【0189】

一部の実施形態では、センス鎖は、本明細書で提示されるセンス鎖である。

【0190】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、本明細書で提示されるアンチセンス鎖である。

【0191】

一部の実施形態では、センス鎖と、アンチセンス鎖とは、 $GY S_1$ をターゲットティングする、二本鎖 $s i R N A$ 分子を形成する。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、約21～23のヌクレオチド塩基対の長さである。ある特定の実施形態では、 C は、場合により用いられる。

【0192】

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式〔式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_s$ の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有し、

10

20

30

40

50

F_1 は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり；

L_1 および L_2 は、各々独立に、リンカーであり；

C は、PEGなどのポリマーであり；

X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5' - 3' オリゴヌクレオチドであり；

X_{AS} は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3' - 5' オリゴヌクレオチドであり；

X_S および X_{AS} は、組成物／複合体を形成するように、二本鎖オリゴヌクレオチド分子を形成する]

を有する組成物または複合体が提供される。ある特定の実施形態では、 C は、場合により用いられる。

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式 [式中、 A_1 は、 X_S の式を有し、 B_1 は、 $X_{AS} - L_2 - C$ の式を有する] を有する組成物または複合体が提供される。

一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ の式 [式中、 A_1 は、 $F_1 - L_1 - X_S$ の式を有し、 B_1 は、 X_{AS} の式を有する] を有する組成物または複合体が提供される。

【0193】

一部の実施形態では、 C は、分枝状単量体もしくは非分枝状単量体の長鎖、および／または二次元もしくは三次元における、単量体の架橋ネットワークからなる、天然ポリマーまたは合成ポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、多糖、リグニン、ゴム、または例えば、ポリエチレングリコールでありうるポリアルキレンオキシドを含む。一部の場合に、少なくとも1つのポリマーは、アルファージヒドロキシルポリエチレングリコール、オメガージヒドロキシルポリエチレングリコール、生体分解性ラクトンベースのポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリ乳酸 (PLA)、ポリ (グリコール酸) (PGA)、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート (PET、PETG)、ポリエチレンテレフタレート (PETE)、ポリテトラメチレングリコール (PTG)、またはポリウレタンのほか、これらの混合物を含むがこれらに限定されない。本明細書で使用される混合物は、同じ化合物中における、異なるポリマーの使用を指すほか、ブロックコポリマーを指す。場合によって、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも1つの区画が、別のポリマーの単量体から構築されるポリマーである。一部の場合に、ポリマーは、ポリアルキレンオキシドを含む。一部の場合に、ポリマーは、PEGを含む。一部の場合に、ポリマーは、ポリエチレンイミド (PEI) またはヒドロキシエチルデンプン (HES) を含む。

【0194】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド (例えば、PEG) は、多分散化合物または単分散化合物である。一部の場合に、多分散材料は、平均値重量 (重量平均) によるサイズ、および二分散性により特徴づけられる、分子量が異なる材料の二分散分布を含む。一部の場合に、単分散PEGは、1つのサイズの分子を含む。一部の実施形態では、 C は、多分散化ポリアルキレンオキシド (例えば、PEG)、または単分散化ポリアルキレンオキシド (例えば、PEG) であり、表示の分子量は、ポリアルキレンオキシド分子、例えば、PEG分子の分子量の平均を表す。

【0195】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド (例えば、PEG) の分子量は、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daである。

【0196】

一部の実施形態では、Cは、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の実施形態では、Cは、PEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。一部の場合に、Cの分子量は、約200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1100 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1450 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約1900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2100 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2200 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2300 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2400 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2700 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2800 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約2900 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3250 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3350 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約3750 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4250 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4600 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約4750 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約5000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約5500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約6000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約6500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約7000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約7500 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約8000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約10,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約12,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約20,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約35,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約40,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約50,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約60,000 Daである。一部の場合に、Cの分子量は、約100,000 Daである。

10

20

30

40

50

ある。

【0197】

一部の実施形態では、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、1つを超える反復エチレンオキシド単位を含むポリマーPEGである、ディスクリートPEGである。一部の場合に、ディスクリートPEG（dPEG）は、2つ～60、2つ～50、または2つ～48の反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50、またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約2つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約3つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約4つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約5つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約6つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約7つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約8つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約9つまたはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約10またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約11またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約12またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約13またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約14またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約15またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約16またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約17またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約18またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約19またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約20またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約22またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約24またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約26またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約28またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約30またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約35またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約40またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約42またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。一部の場合に、dPEGは、約48またはこれを超える反復エチレンオキシド単位を含む。場合によって、dPEGは、純粋（例えば、約95%、98%、99%、または99.5%）出発材料から、段階的に、単一分子量化合物として合成される。場合によって、dPEGは、平均分子量ではなく、特異的分子量を有する。場合によって、本明細書で記載されるdPEGは、Quantabio Biodesign, LMD製のdPEGである。

【0198】

一部の実施形態では、L₁は、ポリマーであるCを、センス鎖であるX_Sへと連結するか、またはF₁のポリペプチドを、センス鎖であるX_Sへと連結するのに使用される、任意のリンカーである。一部の実施形態では、L₁は、

10

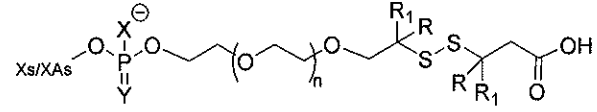
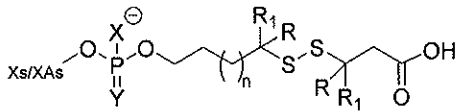
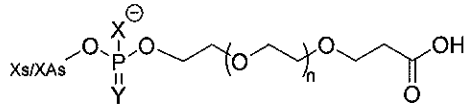
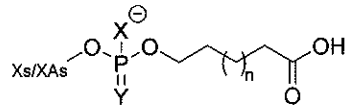
20

30

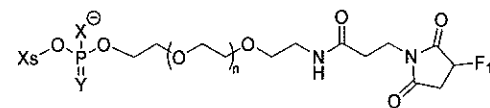
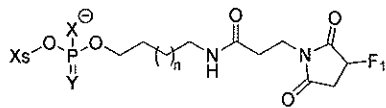
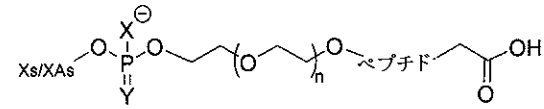
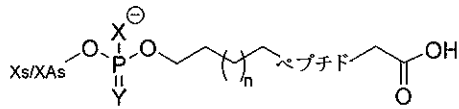
40

50

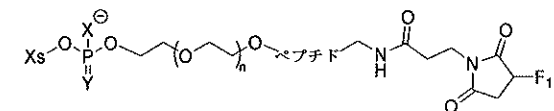
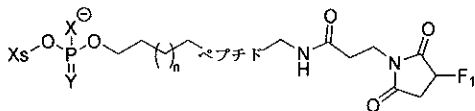
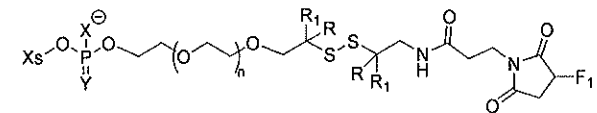
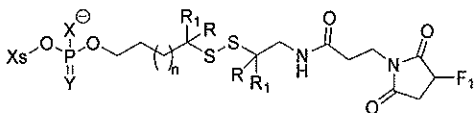
【化 9】



10



20



30

の式〔式中、 X_S 、 X_{AS} 、および F_1 は、上記で規定された通りである〕を有する。

【0199】

一部の実施形態では、 $n = 0 \sim 20$ である。一部の実施形態では、 R および R_1 は、独立に、メチルである。一部の実施形態では、 R および R_1 は、独立に、存在するか、またはいずれも存在しない。一部の実施形態では、 X および Y は、独立に、 S である。一部の実施形態では、 X および Y は、独立に、存在するか、または存在しない。一部の実施形態では、ペプチドは、*Val-Cit*、*Val-Ala* などであるがこれらに限定されない、酵素切断型ペプチドである。

【0200】

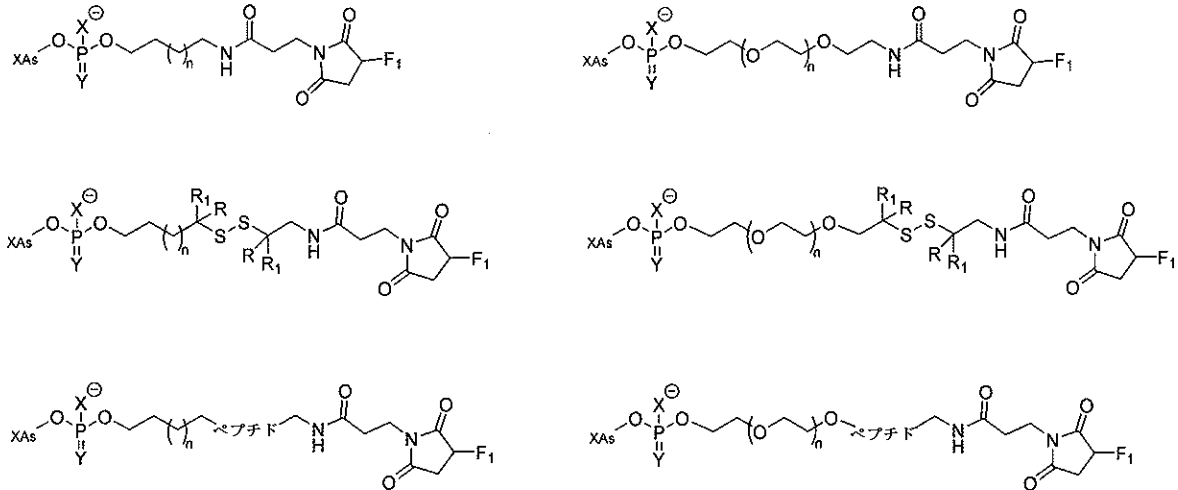
一部の実施形態では、 L_2 は、 F_1 のポリペプチドを、アンチセンス鎖である X_{AS} へと連結するか、またはポリマーである C を、アンチセンス鎖である X_{AS} へと連結するのに使用される、任意のリンカーである。

【0201】

一部の実施形態では、 L_2 は、

40

【化 1 0】



10

の式〔式中、 X_{As} および F_1 は、上記で規定された通りである〕を有する。

【0202】

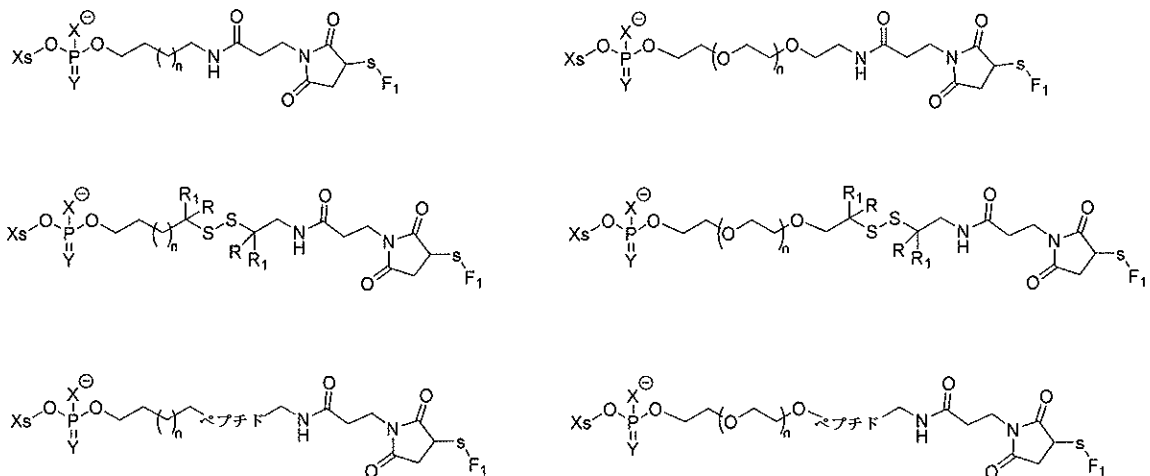
一部の実施形態では、 $n = 0 \sim 20$ である。一部の実施形態では、 R および R_1 は、独立に、メチルである。一部の実施形態では、 R および R_1 は、独立に、存在するか、またはいずれも存在しない。一部の実施形態では、 X および Y は、独立に、 S である。一部の実施形態では、 X および Y は、独立に、存在するか、または存在しない。一部の実施形態では、ペプチドは、*Val-Cit*、*Val-Ala*などであるがこれらに限定されない、酵素切断型ペプチドである。

20

【0203】

一部の実施形態では、リンカーは、以下：

【化 1 1】

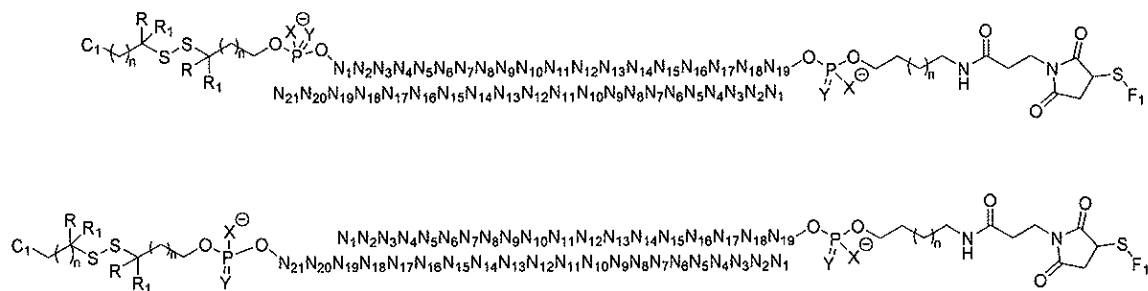


30

40

の通りに例示される F_1 上に存在するシステイン残基を介して、 F_1 へと共有結合的に接合される。一部の実施形態では、 $A_1 - B_1$ は、

【化 1 2】



10

の式〔式中、Cは、PEGなどのポリマー、Endopporter、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリシン、両親媒性ペプチド、または本明細書で提示される、表9に列挙されたペプチドであり； X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5'-3'オリゴヌクレオチドであり； X_A は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3'-5'オリゴヌクレオチドであり； $1F$ は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり； X_S および X_A は、二本鎖siRNA分子を形成する〕を有する。センス鎖およびアンチセンス鎖は、「N」表記により表され、この場合、Nにより表される、各ヌクレオチドは、独立に、A、U、C、もしくはG、または本明細書で提示される修飾ヌクレオチド塩基などの修飾ヌクレオチド塩基である。センス鎖およびアンチセンス鎖のヌクレオチドである N_1 は、それぞれの鎖の5'末端を表す。明確さのために述べると、式Iは、センス鎖およびアンチセンス鎖のいずれにおいても、 N_1 、 N_2 、 N_3 などを利用するが、ヌクレオチド塩基は、同じである必要はなく、同じであることが意図されない。式Iに例示されたsiRNAであれば、標的配列と相補性であろう。

20

【0204】

例えば、一部の実施形態では、センス鎖は、 N_1 および N_2 における、ホスホロチオエート(PS)修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_8 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{12} 、および N_{17} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{13} 、 N_{14} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{18} 、および N_{19} における2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

30

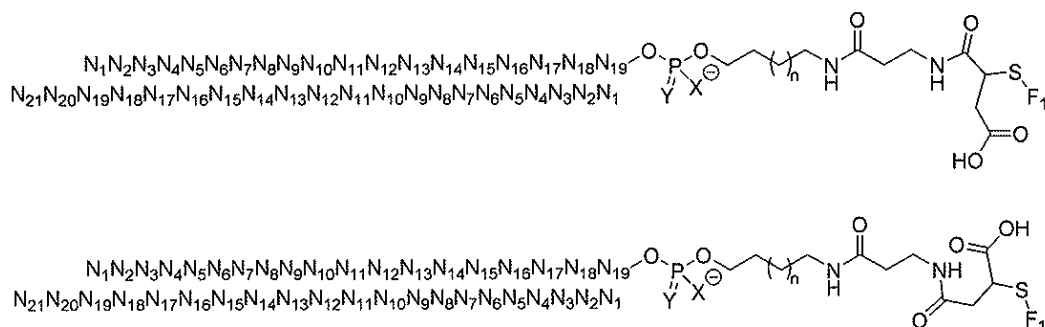
【0205】

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、 N_1 へと接合されたビニルホスホン酸部分、 N_2 における、ホスホロチオエート(PS)修飾骨格を伴う2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、 N_3 、 N_4 、 N_5 、 N_6 、 N_7 、 N_8 、 N_9 、 N_{10} 、 N_{11} 、 N_{12} 、 N_{13} 、 N_{15} 、 N_{16} 、 N_{17} 、 N_{18} 、および N_{19} における、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、 N_{14} における、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、ならびに N_{20} および N_{21} における、ホスホロチオエート(PS)修飾骨格を伴う2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0206】

本明細書の一部の実施形態では、

【化 1 3】



40

50

の式〔式中、 F_1 は、少なくとも1つのFN3ドメインを含むポリペプチドであり、リンカーへとコンジュゲートされ、 L_1 、 L_1 は、 X_S へと連結され、 X_S は、二本鎖siRNA分子のセンス鎖である5' - 3'オリゴヌクレオチドであり、 $\bar{X}_S$ は、二本鎖siRNA分子のアンチセンス鎖である3' - 5'オリゴヌクレオチドであり； $\bar{X}$ および X_{AS} は、二本鎖siRNA分子を形成する〕

を有する化合物が提供される。上記で例示されたリンカーは、非限定例であり、他の種類のリンカーも使用される。

【0207】

一部の実施形態では、 F_1 は、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； n 、 q 、および y は、 n 、 q 、および y のうちの少なくとも1つが、1であることを条件として、各々独立に、0または1である〕を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、 n 、 q 、および y は、各々、1である。一部の実施形態では、 n および q は、1であり、 y は、0である。一部の実施形態では、 n および y は、1であり、 q は、0である。

【0208】

一部の実施形態では、 X_1 は、本明細書で提示される、FN3のCD71結合性ドメインなどのFN3のCD71結合性ドメインである。一部の実施形態では、 X_2 は、FN3のCD71結合性ドメインである。一部の実施形態では、 X_1 と、 X_2 とは、FN3の異なるCD71結合性ドメインである。一部の実施形態では、結合性ドメインは、同じ結合性ドメインである。一部の実施形態では、 X_3 は、ヒト血清アルブミンに結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、 X_3 は、タンパク質の半減期を延長するエフェクター機能を伴わないFcドメインである。一部の実施形態では、 X_1 は、第1のCD71結合性ドメインであり、 X_2 は、第2のCD71結合性ドメインであり、 X_3 は、FN3のアルブミン結合性ドメインである。このようなポリペプチドの例は、本明細書および下記で提示される。一部の実施形態では、本明細書では、 $C - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4$ の式〔式中、 C は、PEGなどのポリマー、Endopporter、INF-7、TAT、ポリアルギニン、ポリリシン、両親媒性ペプチド、または表9に提示されたペプチドであり； X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり；および X_4 は、核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0209】

一部の実施形態では、本明細書では、 $(X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y - L - X_4 - C$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、核酸分子であり；および C は、ポリマーであり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0210】

一部の実施形態では、本明細書では、 $X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり；および X_4 は、核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0211】

一部の実施形態では、本明細書では、 $C - X_4 - L - (X_1)_n - (X_2)_q - (X_3)_y$ の式〔式中、 C は、ポリマーであり； X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり；および X_4 は、核酸分子であり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0212】

一部の実施形態では、本明細書では、 $X_4-L-(X_1)_n-(X_2)_q-(X_3)_y-C$ の式〔式中、 X_1 は、第1のFN3ドメインであり； X_2 は、第2のFN3ドメインであり； X_3 は、第3のFN3ドメインまたは半減期延長分子であり； L は、リンカーであり； X_4 は、核酸分子であり；および C は、ポリマーであり； n 、 q 、および y は、各々独立に、0または1である〕を有する組成物が提供される。

【0213】

一部の実施形態では、GYS1 siRNA対は、以下の配列：センス鎖（5' - 3'）
n s n s n n n n N f N f N f n n n n n n n n s n s a、およびアンチセンス鎖（5' - 3'）
U f s N f s n n n n N f n n n n n n n n N f n N f n n n s u s u〔配列中、（
n）は、2'-O-Me（メチル）であり、（Nf）は、2'-F（フルオロ）であり、（
s）は、ホスホロチオエート骨格修飾である〕を有する。各ヌクレオチドは、センス鎖
およびアンチセンス鎖のいずれにおいても、リボ糖位置およびヌクレオ塩基位置において
、独立に修飾されるか、または組み合わせて修飾される。

【0214】

一部の実施形態では、siRNA分子は、表1Aまたは1Bに由来する配列対を含む。

【0215】

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1A:siRNA のセンス配列およびアンチセンス配列

siRNA 対	配列 番号	5'-3'におけるセンス鎖	配列 番号	5'-3'におけるアンチセンス鎖
A	10	[fC][*mU][*fG][mG][fG][m A][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]	11	[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU] [fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU] mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
B	12	[fC][*mA][*fA][mG][fG][m U][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][T]	13	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG] [fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA] mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
C	14	[fU][*mC][*fC][mG][fC][m A][fG][fC][fC][mU][fG][mG][mA][mU][fG][mA][fU][mU][mA][T]	15	[mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][fU] [fC][mC][fA][mG][mG][mC][fU] mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*mU]
D	16	[mG][*mC][*fG][mA][mC][mU][fG][fC][fC][mU][mG][f U][mA][mG][mC][mA][fA][mC][mA][idT]	17	[fU][*fG][*mU][mU][mG][mC][m U][mA][mC][mA][mG][mC][fA][mG][mU][mC][mG][mC][*mU][*mU]
E	18	[mU][*mU][*fU][mA][mU][mG][fG][fG][fC][mA][mU][f C][mU][mG][mG][mA][fC][mU][mA][idT]	19	[fU][*fA][*mG][mU][mC][mC][m A][mG][mA][mU][mG][mC][mC] fC][mA][mU][mA][mA][mA][*m U][*mU]
F	20	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA][f C][mA][mA][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	21	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][m U][mG][mU][mU][mG][mG][mU] fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]
G	22	[mG][*mG][*fA][mC][mC][mA][fA][fC][fA][mA][mU][f U][mU][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	23	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][m A][mA][mA][mU][mU][mG][mU] fU][mG][mG][mU][mC][mC][*mU][*mU]
H	24	[mA][*mC][*fC][mA][mA][mC][fA][fA][fU][mU][mU][f C][mA][mA][mC][mG][fU][mG][mA][idT]	25	[fU][*fC][*mA][mC][mG][mU][m U][mG][mA][mA][mA][mU][mU] fG][mU][mU][mG][mG][mU][*m U][*mU]
I	26	[mG][*mC][*fG][mC][mA][mA][fA][fC][fA][mG][mC][f U][mU][mU][mG][mG][fG][mA][mA][idT]	27	[fU][*fU][*mC][mC][mC][mA][m A][mA][mG][mC][mU][mG][mU] fU][mU][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]
J	28	[mA][*mG][*fA][mG][mC][mC][fA][fU][fC][mU][mU][f U][mG][mC][mA][mA][fC][mG][mA][idT]	29	[fU][*fC][*mG][mU][mU][mG][m C][mA][mA][mA][mG][mA][mU] fG][mG][mC][mU][mC][mU][*mU][*mU]
K	30	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][f G][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]	31	[fU][*fG][*mC][mG][mU][mU][m G][mC][mA][mA][mA][mG][mA] fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

L	32	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG][fC][mA][mA][mC][mG][fC][mA][mA][idT]	33	[fU][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mG][fA][mU][mG][mG][mC][mU][*mU][*mU]
M	34	[mC][*mC][*fA][mU][mC][mU][fU][fU][fG][mC][mA][fA][mC][mG][mC][mA][fG][mC][mA][idT]	35	[fU][*fG][*mC][mU][mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][fA][mG][mA][mU][mG][mG][*mU][*mU]
N	36	[mA][*mC][*fG][mC][mA][mG][fC][fG][fG][mC][mA][fG][mU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	37	[fU][*fG][*mA][mA][mG][mA][mC][mU][mG][mC][mC][mG][fC][mU][mG][mC][mG][mU][*mU][*mU]
O	38	[mU][*mG][*fA][mC][mC][mA][fC][fC][fA][mU][mC][fC][mG][mC][mC][mG][fA][mA][mA][idT]	39	[fU][*fU][*mU][mC][mG][mG][mC][mG][mG][mA][mU][mG][mG][fU][mG][mG][mU][mC][mA][*mU][*mU]
P	40	[mC][*mG][*fA][mA][mU][mC][fG][fG][fC][mC][mU][fC][mU][mU][mC][mA][fA][mU][mA][idT]	41	[fU][*fA][*mU][mU][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mC][mC][fG][mA][mU][mU][mC][mG][*mU][*mU]
Q	42	[mC][*mU][*fU][mC][mA][mA][fU][fA][fG][mC][mA][fG][mU][mG][mC][mC][fG][mA][mA][idT]	43	[fU][*fU][*mC][mG][mG][mC][mA][mC][mU][mG][mC][mU][mA][fU][mU][mG][mA][mA][mG][*mU][*mU]
R	44	[mC][*mA][*fG][mU][mA][mU][fC][fU][fC][mC][mA][fC][mC][mA][mA][mU][fC][mU][mA][idT]	45	[fU][*fA][*mG][mA][mU][mU][mG][mG][mU][mG][mG][mA][mG][fA][mU][mA][mC][mU][mG][*mU][*mU]
S	46	[mC][*mC][*fA][mC][mC][mA][fA][fU][fC][mU][mC][fU][mC][mC][mG][mG][fC][mU][mA][idT]	47	[fU][*fA][*mG][mC][mC][mG][mG][mA][mG][mA][mG][mA][mU][fU][mG][mG][mU][mG][mG][*mU][*mU]
T	48	[mC][*mA][*fC][mC][mA][mA][fU][fC][fU][mC][mU][fC][mC][mG][mG][mC][fU][mU][mA][idT]	49	[fU][*fA][*mA][mG][mC][mC][mG][mG][mA][mG][mA][mG][mA][fU][mU][mG][mG][mU][mG][*mU][*mU]
U	50	[mC][*mC][*fC][mC][mU][mC][fA][fG][fC][mU][mU][fA][mC][mG][mG][mU][fA][mU][mA][idT]	51	[fU][*fA][*mU][mA][mC][mC][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mU][fG][mA][mG][mG][mG][*mU][*mU]
V	52	[mC][*mC][*fC][mU][mC][mA][fG][fC][fU][mU][mA][fC][mG][mG][mU][mA][fU][mC][mA][idT]	53	[fU][*fG][*mA][mU][mA][mC][mC][mG][mU][mA][mA][mG][mC][fU][mG][mA][mG][mG][*mU][*mU]
W	54	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][idT]	55	[fU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
X	56	[mG][*mG][*fA][mA][mC][mC][fG][fC][fA][mC][mG][fG][mA][mG][mC][mG][fC][mC][mA][idT]	57	[fU][*fG][*mG][mC][mG][mC][mU][mC][mC][mG][mU][mG][mC][fG][mG][mU][mU][mC][mC][*mU][*mU]
Y	58	[mA][*mC][*fG][mG][mA][mG][fC][fG][fC][mC][mU][f	59	[fU][*fG][*mU][mC][mG][mG][mA][mG][mA][mG][mG][mC][mG][

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

		C][mU][mC][mC][mG][fA][mC][mA][idT]		fC][mU][mC][mC][mG][mU][*mU][*mU]
Z	60	[mA][*mG][*fC][mA][mA][mG][fC][fG][fC][mA][mA][fC][mU][mC][mU][mG][fU][mG][mA][idT]	61	[fU][*fC][*mA][mC][mA][mG][mA][mG][mU][mU][mG][mC][mG][fC][mU][mU][mG][mC][mU][*mU][*mU]
AA	62	[mC][*mA][*fG][mA][mU][mG][fG][fU][fC][mC][mU][fC][mC][mA][mU][mU][fU][mC][mA][idT]	63	[fU][*fG][*mA][mA][mA][mU][mG][mA][mG][mG][mA][mC][fC][mA][mU][mC][mU][mG][*mU][*mU]
BB	64	[mU][*mC][*fU][mA][mG][mA][fU][fC][fU][mG][mG][fA][mA][mC][mC][mU][fU][mA][mA][idT]	65	[fU][*fU][*mA][mA][mG][mG][mU][mU][mC][mC][mA][mG][mA][fU][mC][mU][mA][mG][mA][*mU][*mU]
CC	66	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][mA][mC][fC][mU][mC][mG][mA][fG][mG][mA][idT]	67	[fU][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][mA][mA][fU][mG][mU][mG][mG][mG][*mU][*mU]
DD	68	[mA][*mC][*fC][mG][mC][mU][fU][fG][fG][mU][mU][fU][mG][mC][mA][mG][fU][mU][mA][idT]	69	[fU][*fA][*mA][mC][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mC][mC][mA][fA][mG][mC][mG][mG][mU][*mU][*mU]
EE		[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mG][mA][T]		[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
FF		[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mA][fG][mG][mA][T]		[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
GG		[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fG][mA][fG][mG][mA][T]		[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]
HH		[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]		[fU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][fC][fA][fU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*fU]
II		[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG][mA][mA][T]		[mU][*fU][*fC][fG][fA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][fC][fC][fU][fC][fC][fC][fA][fG][*fU][*mU]
JJ		[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][*fU][idT]		[mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][fU][fU][mC][fA][mU][mC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][*mG][*fU][*mU]
KK		[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mA][idT]		[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
LL		[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]		[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

MM	616	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mG][mA][idT]	617	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
NN	618	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fG][mA][mA][idT]	619	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
OO	620	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mA][fU][mA][mA][idT]	621	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
PP	622	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mA][idT]	623	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
QQ	624	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mG][idT]	625	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]
RR	626	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]	627	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
SS	628	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mG][idT]	629	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
TT	630	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mA][mA][idT]	631	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
UU	632	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fA][mC][mA][idT]	633	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
VV	634	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mA][fG][mC][mA][idT]	635	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
WW	636	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mA][idT]	637	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
XX	638	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mG][mC][fG][mC][mG][idT]	639	[mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]
YY	640	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA][idT]	641	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]
ZZ	642	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mG][mU][mA][mG][mA][mU][m	643	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][m

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

		A][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mG][idT]		A][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
AAA	644	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mG][mA][idT]	645	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
BBB	646	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fG][mU][mA][idT]	647	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	10
CCC	648	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	649	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
DDD	650	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mG][fC][mU][mA][idT]	651	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
EEE	652	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mA][idT]	653	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	20
FFF	654	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mG][mU][fC][mU][mG][idT]	655	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	
GGG	656	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mA][mG][idT]	657	[mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	
HHH	704	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU][fA][mC][mA][mU][mU][fC][mU][mA]	705	[mU][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][mA][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	30

略号解:(n/N=任意のヌクレオチド)、mN=2'-O-メチル残基、fN=2'-F 残基、*=ホスホロチオエート、および(idT)=idT(inverted dT)、(VP)2'-O-メチルビニルホスホン酸ウリジンである。カッコは、個別の塩基を指し示す。

【 0 2 1 6 】

【表 4 - 1】

表 1B

配列番号	センス鎖(5'-3')	配列番号	アンチセンス鎖(5'-3')
801	caggggugcg gucuugcaa	861	uugcaagacc gcacccug u
802	ggugcggucu ugcaauagg	862	ccuauugcaa gaccgcaccu u
803	gugcggucuu gcaauagga	863	uccuauugca agaccgcacu u
804	agccaugccu uuaaacgc	864	gcgguuuaaa ggcauggcuu u
805	augccuuuaa accgcacuu	865	aagugcgguu uaaaggcau u
806	ugggaggau g aaucgacc	866	ggucgaauuc auccuccau u
807	aacgcagugc ucuucgaag	867	cuucgaagag cacugcguu u
808	ggacgaau g ggcgacaac	868	guugucgccc cauucguccu u
809	ggcgacugcc uguagcaac	869	guugcuacag gcagucgccu u
810	cacgcugcug gggcgcuac	870	guagcgcccc agcagcgugu u
811	ugcgucacg ucuucacua	871	uagugaagac gugagcgcau u
812	ccuauuacuu cuuuau cgc	872	gcgauaaaga aguauaaggu u
813	cuuuau cgc ggcgcua u	873	auagcggcgc gcgauaaagu u
814	ucgccggccg cuauagagu u	874	aacucauagc ggccggcgau u
815	gccgcuauga guucuccaa	875	uuggagaacu cauagcggu u
816	ccgcuaugag uucuccaac	876	guuggagaac ucauagcggu u
817	ggcucggcuc aacuaucug	877	cagauaguug agccgagccu u
818	gcucggcuca acuaucugc	878	gcagauagu gaggcgagcu u
819	ucggcucaac uaucugcuc	879	gagcagauag uugagccgau u
820	ccagcgcgga ccaacaauu	880	aauguuggu ccgcguggu u
821	agcgcgacc aacaauuc	881	gaauguug guccgcgcu u
822	ucgggaggaa gcuuuuga	882	ucauaaagcu uccuccgau u
823	acgcagcggc agucuuucc	883	ggaaagacug ccgcugcggu u
824	gaccaccauc cgccgauc	884	gauucggcgg augguggu u
825	ccgaucggc cucuucuu	885	auugaagagg ccgauucgu u
826	aaucggcuc uucauagc	886	gcuauugaag aggcggauu u
827	caauagcagu gccgacagg	887	ccugucggca cugcuauugu u
828	aggaguugu ccgugcgug	888	cagccacgga caaacuccu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

829	cggcugagug cacgguuau	889	auaaccgugc acucagccgu u
830	ugggaauccc caguaucuc	890	gagauacugg ggauucccau u
831	cagaccccuc agcuuacgg	891	ccguaagcug aggggucugu u
832	ccccucagcu uacgguauc	892	gauaccguua gcugaggggu u
833	cucagcuuac gguaucuauc	893	guagauaccg uaagcugagu u
834	gcuuacggua ucuacauuc	894	gaaguagau accguaagcu u
835	ccggcggcag cguaucauc	895	gaugauacgc ugccgccggu u
836	agcguaucua ccagcggaa	896	uuccgcugga ugauacgcu u
837	gcguaucauc cagcggaa	897	guuccgcugg augauacgcu u
838	uaccuaggcc gguaucua	898	uauaguaccg gccuagguau u
839	cuaggccggu acuauaugu	899	acauauagua ccggccuagu u
840	aggccggua uauaugucu	900	agacauauag uaccggccu u
841	ggccgguauc auaugucug	901	cagacauua guaccggccu u
842	gccgguaucua uaugucugc	902	gcagacauau aguaccggcu u
843	cgguaucua uugucgcgc	903	gcgcagacau auaguaccgu u
844	gguaucua uugucgcgc	904	cgcgagaca uauaguaccu u
845	cuauaugucu gcgcgccac	905	guggcgcgca gacauauagu u
846	uauugucgc gcgccaug	906	cauguggcgc gcagacauu u
847	augucgcgc gccacaug	907	ccauguggcgc cgagacauu u
848	ucgccucgc ugucacgac	908	gucgugacag cgaggcgau u
849	cgccgagcgc uacgaugag	909	cuaucguag gcucgccgu u
850	caaggaccgg cgcaacauc	910	gauguugcgc cgguccuugu u
851	acauccgugc accagagug	911	cacucuggug cacggauguu u
852	cugggcgagg agcguaacu	912	aguuaagcuc cucgccagu u
853	ggcgaggag cguaacuaa	913	uuaguuaagc uccucgccu u
854	gcgaggagcg uaacuaagu	914	acuuaguua gcuccugcu u
855	gaggagcgua acuaagucc	915	ggacuuaugu acgcucccu u
856	aguccgcaa acacuccac	916	guggaguguu uggcggaucu u
857	ggcgaucaag uccagagcc	917	ggcucuggac uugaucgcu u
858	ccuaaccug gcuuaaucc	918	ggaauaagcc agguuagggu u
859	ugugaaacca cuagguucu	919	agaaccuagu gguuacau u
860	accacuaggu ucuaggucc	920	ggaccuagaa ccuaguggu u
921	caggggugcg gucuugcaa	981	uugcaagacc gcaccucgu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

922	ggugcggucu ugcaauaga	982	ucuauugcaa gaccgcaccu u
923	gugcggucuu gcaauagga	983	uccuauugca agaccgcacu u
924	agccaugccu uuaaaccga	984	ucgguuuaaa ggcauggcuu u
925	augccuuuaa accgcacua	985	uagugcgguu uaaaggcauu u
926	ugggaggau gaaucgaca	986	ugucgaauc auccuccau u
927	aacgcagugc ucuucgaaa	987	uuucgaagag cacugcguu u
928	ggacgaagg ggcgacaaa	988	uuugucgcc cauucguccu u
929	ggcgacugcc uguagcaaa	989	uuugcuacag gcagucgccu u
930	cacgcugcug gggcgcuaa	990	uuagcgcgcc agcagcgugu u
931	ugcgucacg ucuucacua	991	uagugaagac gugagcgau u
932	ccuuauacuu cuuuaucga	992	ucgauaaaga aguauaaggu u
933	cuuuauagcc ggccgcuaa	993	uuagcggccg gcgauaaagu u
934	ucgccggccg cuaugagua	994	uacucauagc ggccggcgau u
935	gccgcuauga guucuccaa	995	uuggagaacu cauagcggu u
936	ccgcuaugag uucuccaaa	996	uuuggagaac ucauagcggu u
937	ggcucggcuc aacuaucua	997	uagauaguug agccgagccu u
938	gucgggcua acuaucuga	998	ucagauagu gagccgagcu u
939	ucggcucaac uaucugcua	999	uagcagauag uugagccgau u
940	ccagcgcgga ccaacaaua	1000	uauuguuggu ccgcgcuggu u
941	agcgcggaac aacaauua	1001	uaauuguug guccgcgcuu u
942	ucgggaggaa gcuuuauga	1002	ucauaaagcu uccuccgau u
943	acgcagcggc agucuuuca	1003	ugaaagacug ccgcgcguu u
944	gaccaccauc cgccgaaua	1004	uauucggcgg auggugguu u
945	ccgaauagc cucuucaaa	1005	uuugaagagg ccgaaucggu u
946	aaucggccuc uucaauaga	1006	ucuauugaag aggccgauu u
947	caauagcagu gccgacaga	1007	ucugucggca cugcuauugu u
948	aggaguuugu ccguggcua	1008	uagccacgga caaacuccu u
949	cggcugagug cacgguuaa	1009	uuuaccgugc acucagccgu u
950	ugggaauccc caguaucua	1010	uagauacugg ggauuccau u
951	cagacccuc agcuuacga	1011	ucguaagcug aggggucugu u
952	cccucagcu uacgguaa	1012	uauaccguaa gcugagggu u
953	cucagcuuac gguaucuaa	1013	uuagauaccg uaagcugagu u
954	gcuuacggua ucuacaua	1014	uaauguagau accguaagcu u

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

955	ccggcggcag cguaucua	1015	uauauacgc ugccgccgu u
956	agcguaucuu ccagcgga	1016	uuccgcugga ugauacguu u
957	gcguaucauc cagcgga	1017	uuuccgcugg augauacgu u
958	uaccuaggcc gguacuua	1018	uauaguaccg gccuagguau u
959	cuaggccggu acuaauaga	1019	ucauauagua ccggccuagu u
960	aggccgguac uauauguca	1020	ugacauauag uaccggccuu u
961	ggccgguacu auaugucua	1021	uagacauua guaccggccu u
962	gccgguacua uaugucuga	1022	ucagacauau aguaccggcu u
963	cgguaucua ugucugcga	1023	ucgcagacau auaguaccgu u
964	gguacuauau gucugcgca	1024	ugcgagaca uauaguaccu u
965	cuauaugucu gcgcgcaa	1025	uugcgcgca gacauauagu u
966	uauugucugc cgccacua	1026	uauugggcg gcagacauu u
967	augucugcg gccacuga	1027	ucauugggcg cgagacauu u
968	ucgccucgc ugucacga	1028	uucgugacag cgaggcgau u
969	cggcgagcg uacgauga	1029	uucaucguag cgcucggcu u
970	caaggaccgg cgcaacua	1030	uauugcgcg cgguccuugu u
971	acaucgugc accagagua	1031	uacucggug cacggaugu u
972	cuggcgagg agcguaaca	1032	uguuacguc cucgccagu u
973	ggcgaggag cguaacua	1033	uuaguacgc uccugcccu u
974	gcgaggagcg uaacuaaga	1034	ucuuaguac gcuccugcu u
975	gaggagcgu acuaaguc	1035	ugacuuagu acgcucccu u
976	aguccgcaa acacucca	1036	uuggagugu uggcgacuu u
977	ggcgaucaag uccagagca	1037	ugcucggac ugaucgcu u
978	ccuaaccug gcuauuca	1038	ugaauagcc agguagggu u
979	ugugaaacca cuagguuca	1039	ugaaccuagu gguuacau u
980	accacuaggu ucuagguca	1040	ugaccuagaa ccuaguggu u
1041	uggacuuaaccuagacaa	1042	uugcuagguagaaguccau
1043	cugggaggauaauucgaa	1044	uucgaaucuccuccaguu
1045	gggugacaacuauucua	1046	uagauaguauugucccuu
1047	cugggaggauaauucgaa	1048	uucgaaucuccuccaguu
1049	caaggugggugcaucua	1050	uuagaugccaccaccuuguu
1051	uccgcagccuggaugaua	1052	uaaucauccagcgcggaau

10

20

30

40

【0217】

一部の実施形態では、上記で例示されたポリヌクレオチドは、s i R N A のアンチセンス鎖上における 5' ヌクレオチドとして、2'-O-メチルビニルホスホン酸ウリジンを含まないポリヌクレオチドを含む。

【0218】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書で提示される通りである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、二重鎖を含む部分について、第1の鎖および第2の鎖を含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、表1Aまたは1Bに例示された配列を

50

含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、表 1 A または 1 B に例示された配列を含むが、塩基修飾を伴わない。一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書で提示される s i R N A 対を含む。一部の実施形態では、s i R N A 対は、F N 3 ドメインへとコンジュゲートされない。

【0219】

一部の実施形態では、本明細書で記載されるオリゴヌクレオチド分子は、当技術分野で公知の手順を使用する、化学合成反応および／または酵素的ライゲーション反応を使用して構築される。例えば、オリゴヌクレオチド分子は、分子の生物学的安定性を増大させるか、またはオリゴヌクレオチド分子と、標的核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるようにデザインされた、天然に存在するヌクレオチドまたは多様な修飾ヌクレオチドを使用して化学合成される。代替的に、オリゴヌクレオチド分子は、オリゴヌクレオチド分子が、サブクロニングされた発現ベクターを使用して、アンチセンスの配向性で（すなわち、挿入されたオリゴヌクレオチド分子から転写される R N A が、目的のポリ核酸分子をターゲティングするように、アンチセンスの配向性を有する）生物学的に作製される。

10

【0220】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、両方の鎖が、単一の連続オリゴヌクレオチド断片、または切断型リンカーで隔てられた鎖として合成され、その後、ハイブリダイズし、二重鎖の精製を可能とする、個別の断片または鎖をもたらすように切断される、タンデム合成法を介して合成される。

20

【0221】

一部の場合に、オリゴヌクレオチド分子はまた、1つの断片が、センス領域を含み、第2の断片が、分子のアンチセンス領域を含む、2つの顕著に異なる核酸鎖または核酸断片からもアセンブルされる。

【0222】

一部の場合に、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホン酸、ホスホルアミデート、またはメシルホスホルアミデートによる、オリゴヌクレオチド分子ヌクレオチド間連結の化学修飾がなされる場合、連結は、安定性を改善する。過剰な修飾は、場合によって、毒性または活性の低下を引き起こす。したがって、核酸分子をデザインする場合、場合によって、これらのヌクレオチド間連結の量は、最小化される。このような場合、これらの連結濃度の低減は、これらの分子の毒性を低下させ、有効性を増大させ、特異性を高める。

30

【0223】

本明細書で記載される通り、一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のセンス鎖の 5' 末端において、リンカーを含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のアンチセンス鎖の 5' 末端において、ビニルホスホン酸または修飾ビニルホスホン酸を含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のセンス鎖の 3' 末端において、リンカーを含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、d s R N A のアンチセンス鎖の 3' 末端において、ビニルホスホン酸を含むように修飾される。リンカーは、d s R N A を、F N 3 ドメインへと連結するのに使用される。リンカーは、例えば、天然で存在するか、または本明細書で記載され、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第 10, 196, 446 号において記載された通りに置換された、F N 3 ドメイン上のシステイン残基に、共有結合的に接合しうる。d s R N A のこのような修飾鎖の非限定例は、表 2 に例示される。

40

【0224】

50

【表 5 - 1】

表2: リンカーおよび/またはビニルホスホン酸を伴う対

siRNA 対	配列 番号	5'-3'におけるセンス鎖	配列 番号	5'-3'におけるアンチセンス 鎖	L = リンカー
III	70	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][mG][fC][mC][fU] [mU][fA][mA][fU][mG][fA]][mA]-L	71	[VP][*fU][*mU][fC][mA][f U][mU][fA][mA][fG][mG][f C][mC][fA][mC][fG][mA][f G][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
JJJ	72	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][fG][fA][mU][fG][mA][mA][mU][fU][mC][fG]][mA]-L	73	[VP][*fU][*mC][mG][mA][mA][mU][mU][mC][mA][m U][mC][mC][fU][mC][mC][mC][mA][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
KKK	74	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU]][mA]-L	75	[VP][*fU][*mA][fG][mA][f U][fG][fC][mC][fA][mC][m C][mC][fA][mC][fC][mU][f U][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
LLL	76	[mG][*mC][*fG][mC][mG][mG][fA][fC][fC][mA][mA]][fC][mA][mA][mU][mU][f U][mC][mA]-L	77	[VP][*fG][*mA][mA][mA][mU][mU][mG][mU][mU][m G][mG][mU][fC][mC][mG][mC][mG][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
MMM	78	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU]][fG][mC][mA][mA][mC][f G][mC][mA]-L	79	[VP][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][m A][mG][mA][fU][mG][mG]][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
NNN	80	[mA][*mG][*fC][mC][mA][mU][fC][fU][fU][mU][mG]][fC][mA][mA][mC][mG][f C][mA][mA]-L	81	[VP][*fU][*mG][mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][m A][mA][mG][fA][mU][mG]][mG][mC][mU][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
OOO	82	[mU][*mU][*fA][mC][mG][mG][fU][fA][fU][mC][mU]][fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mA]-L	83	[VP][*fA][*mG][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mG][m A][mU][mA][fC][mC][mG][mU][mA][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
OPPP	84	[mC][*mC][*fC][mA][mC][mA][fU][fU][fU][mA][mC]][fC][mU][mC][mG][mA][f G][mG][mA]-L	85	[VP][*fC][*mC][mU][mC][mG][mA][mG][mG][mU][m A][mA][mA][fU][mG][mU]][mG][mG][mG][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
QQQ	86	[mU][*mC][*fU][mC][fG][mU][fG][mG][fC][mC][fU] [mU][fA][mA][fU][mG][m G][mA]-L	87	[VP][*fU][*mU][fC][mA][f U][mU][fA][mA][fG][mG][f C][mC][fA][mC][fG][mA][f G][mA][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
RRR	658	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU]][mA][mA][idT]-L	659	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
SSS	660	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU]][mA][mG][idT]-L	661	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC]][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
TTT	662	[fC][*mA][*fA][mG][fG][	663	[VP][mU][*fU][*mA][fG][	Mal-C ₂ H ₄

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

		mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fU][mG][mA][idT]-L		mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
UUU	664	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mC][fG][mA][mA][idT]-L	665	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
VVV	666	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fU][mA][fU][mA][mA][idT]-L	667	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
W W W	668	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mA][idT]-L	669	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
XXX	670	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][fG][fG][mU][fG][mG][mC][mA][fG][mC][fU][mA][mA][idT]-L	671	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][fG][fC][mC][fA][mC][mC][mC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
YYY	672	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	673	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
ZZZ	674	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	675	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
A A A A	676	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mA][mA][idT]-L	677	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
BBBB	678	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fA][mC][mA][idT]-L	679	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
CCCC	680	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mA][fG][mC][mA][idT]-L	681	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
D D D D	682	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	683	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
EEEE	684	[mG][*mA][*fG][mC][mC][mA][fU][fC][fU][mU][mU][fG][mC][mA][mA][mC][fG][mC][mA][idT]-L	685	[VP][mU][*fG][*mC][mG][mU][mU][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mA][fU][mG][mG][mC][mU][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

FFFF	686	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mA][idT]-L	687	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
G G G G	688	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mG][idT]-L	689	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
H H H H	690	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mG][mA][idT]-L	691	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
IIII	692	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f G][mU][mA][idT]-L	693	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
JJJJ	694	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mG][f C][mU][mA][idT]-L	695	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
K K K K	696	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mG][f C][mU][mA][idT]-L	697	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
LLLL	698	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mG][mU][f C][mU][mA][idT]-L	699	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
MMM M	700	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mG][mU][f C][mU][mG][idT]-L	701	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
NNN N	702	[fC][*mA][*fA][mG][fG] [mU][fG][fG][fG][mU][fG] [mG][mC][mA][fU][mC][fU] [mA][mG][idT]-L	703	[VP][mU][*fU][*mA][fG] [mA][fU][fG][fC][mC][fA] [mC][mC][mC][fA][mC][fC] [mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
OOO O	706	[mU][*mU][*fA][mC][mG] [mG][fU][fA][fU][mC][mU] [fA][mC][mA][mU][mU][f C][mU][mA]-L	707	[VP][mU][*fA][*mG][mA] [mA][mU][mG][mU][mA][m G][mA][mU][mA][fC][mC] [mG][mU][mA][mA][*mU] *mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
PPPP	711	[mU][*mG][*fG][mA][mC] [mU][fU][fC][fA][mA][mC] [fC][mU][mA][mG][mA][f	712	[VP][mU][*fU][*mG][mU] [mC][mU][mA][mG][mG][m	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

		C][mA][mA]-L		U][mU][mG][mA][fA][mG][mU][mC][mC][mA][*mU][*mU]	
Q Q Q Q	1053	[mG][*mG][*fG][mU][mG][mA][fC][fA][fA][mC][mU][fA][mC][mU][mA][mU][fC][mU][mA]	1054	[VP][mU][fA][*mG][*mA][mU][mA][mG][mU][mA][mG][mU][mU][mG][fU][mC][mA][mC][mC][mC][*mU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
RRRR	1055	[fC][*mU][*fG][mG][fG][mA][fG][mG][fA][mU][fG][mA][fA][mU][fU][mC][fG][mA][fA]	1056	[VP][mU][*fU][*mC][fG][mA][fA][mU][fU][mC][fA][mU][fC][mC][fU][mC][fC][mC][fA][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
SSSS	1057	[fC][*mA][*fA][mG][fG][mU][fG][mG][fG][mU][fG][mG][fC][mA][fU][mC][fU][mA][fA]	1058	[VP][mU][*fU][*mA][fG][mA][fU][mG][fC][mC][fA][mC][fC][mC][fC][fA][mC][fC][mU][fU][mG][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -
TTTT	1059	[fU][*mC][*fC][mG][fC][mA][fG][mC][fC][mU][fG][mG][fA][mU][fG][mA][fU][mU][fA]	1060	[VP][mU][*fA][*mA][fU][mC][fA][mU][fC][mC][fA][mG][fG][mC][fU][mG][fC][mG][fG][mA][*fU][*mU]	Mal-C ₂ H ₄ C(O)(NH) -(CH ₂) ₆ -

10

20

略号解:(n/N=任意のヌクレオチド)、mN=2'-O-メチル残基、fN=2'-F 残基、*=ホスホロチオエート、(idT)=idT(inverted dT)、(VP)2'-O-メチルビニルホスホン酸ウリジン、BMPS=プロピルマレイミドである

【0225】

一部の実施形態では、上記で提示された、A～PPPPのs i R N A対は、センス鎖の3'末端において、リンカーを含む。一部の実施形態では、上記で提示された、A～PPPPのs i R N A対は、センス鎖の5'末端において、ビニルホスホン酸を含む。

30

【0226】

リンカー(L)の構造は、以下の表3における通りの構造である。

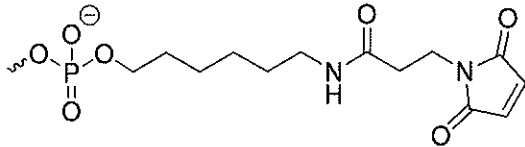
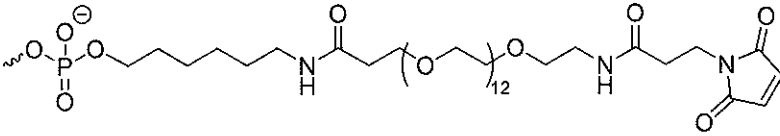
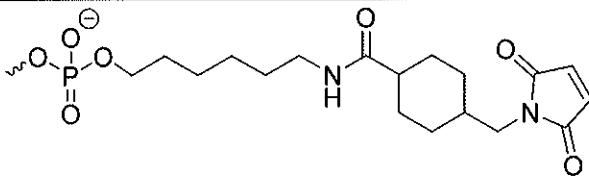
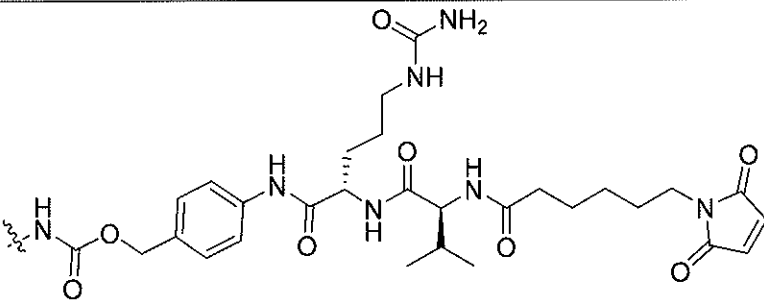
【0227】

40

50

【表 6】

表 3: リンカー(L)の代表例

リンカー構造	リンカー名
	Mal-C ₂ H ₄ C(O) (NH)-(CH ₂) ₆
	Mal-(PEG) ₁₂ (NH) (CH ₂) ₆
	Mal-NH-(CH ₂) ₆ または アミノヘキシル リンカー-(CH ₂) ₆ -
	Val-Cit-PABA

10

20

【0228】

クリック化学反応、アミドカップリング、還元的アミン化、オキシムカップリング、トランスグルタミナーゼコンジュゲーションおよびソルターゼによるコンジュゲーションなどの酵素的カップリングにより形成されるリンカーなど、他のリンカーもまた、使用される。本明細書で提示されるリンカーは、例示的な性質のリンカーであり、他のこのような方法により作製される他のリンカーもまた使用される。

30

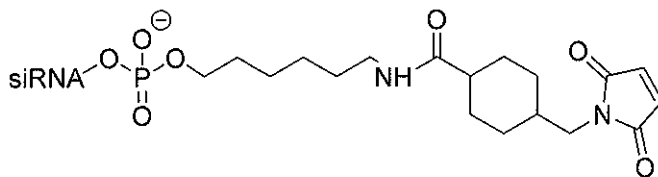
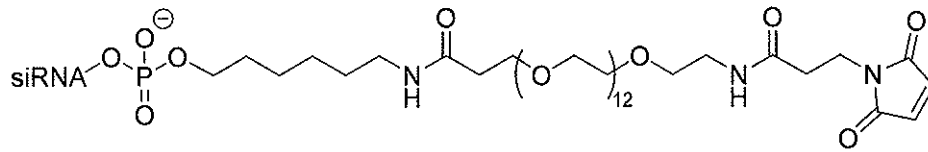
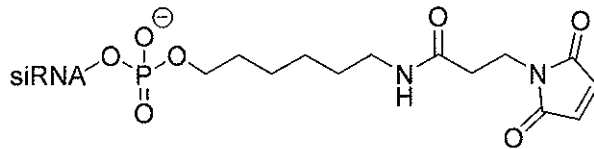
【0229】

s i R N A へと接続されると、構造である L - (X 4) は、以下の式により表される：

40

50

【化 1 4】



【0230】

本明細書では、ある特定の修飾ヌクレオ塩基を伴う、ある特定の siRNA 配列が例示されるが、本明細書では、このような修飾を伴わない配列もまた、提示される。すなわち、配列は、修飾を伴わない、本明細書で提示される表に例示された配列を含みうる。一部の実施形態では、非修飾 siRNA 配列は、dsRNA のセンス鎖の 5' 末端において、リンカーをなおも含みうる。一部の実施形態では、核酸分子は、dsRNA のアンチセンス鎖の 5' 末端において、ビニルホスホン酸を含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、dsRNA のセンス鎖の 3' 末端において、リンカーを含むように修飾される。一部の実施形態では、核酸分子は、dsRNA のアンチセンス鎖の 3' 末端において、ビニルホスホン酸を含むように修飾される。リンカーは、本明細書で提示される通りでありうる。

【0231】

一部の実施形態では、CD71 に結合するポリペプチドを含む FN3 タンパク質が提供される。一部の実施形態では、ポリペプチドは、CD71 に結合する FN3 ドメインを含む。一部の実施形態では、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～710 の配列を含むポリペプチドが提供される。一部の実施形態では、CD71 に結合するポリペプチドは、配列番号 301～301、310、312～572、592～599、または 708～710 の配列を含む。ポリペプチドが結合しうる CD71 タンパク質の配列は、例えば、配列番号 2 または 3 でありうる。一部の実施形態では、CD71 に結合する FN3 ドメインは、CD71 に特異的に結合する。

【0232】

一部の実施形態では、CD71 に結合する FN3 ドメインは、場合により、残基位置 1、14、17、37、46、73、または 86（残基の番号付けは、配列番号 4 に対応する）において、置換を有する、配列番号 1 の Tencon 配列、または配列番号 4 の Tencon 27 配列（LPAPK N L V V S R V T E D S A R L S W T A P D A A F D S F L I Q Y Q E S E K V G E A I V L T V P G S E R S Y D L T G L K P G T E Y T V S I Y G V K G G H R S N P L S A I F T T）に基づく。

【0233】

一部の実施形態では、CD71 に結合する単離 FN3 ドメインは、配列番号 273、288～291、301～310、312～572、592～599、または 708～71

0 のアミノ酸配列を含む。

【0234】

一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号273のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。配列番号273は、配列番号288、配列番号289、配列番号290、および配列番号291の配列に基づくコンセンサス配列である。配列番号273の配列は、
MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSSF₁IX₂YX₃
EX₄X₅X₆X₇GEAIX₈LX₉VPGSEERSYDLTG LKPGTEYX₁₀V
X₁₁IX₁₂X₁₃VKG GX₁₄X₁₅SX₁₆PLX₁₇AX₁₈FTT

[式中、

X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、各々独立に、メチオニンまたはプロリン以外の
任意のアミノ酸であり、

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され；

X₂は、Y、G、A、またはVから選択され；

X₃は、I、T、L、A、またはHから選択され；

X₄は、S、Y、またはPから選択され；

X₅は、Y、G、Q、またはRから選択され；

X₆は、GまたはPから選択され；

X₇は、A、Y、P、D、またはSから選択され；

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され；

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され；

X₁₂は、D、Q、H、またはVから選択され；

X₁₃は、GまたはSから選択され；

X₁₄は、R、G、F、L、またはDから選択され；

X₁₅は、W、S、P、またはLから選択され；

X₁₆は、T、V、M、またはSから選択される]

である。

【0235】

一部の実施形態では：

X₁は、D、F、Y、またはHから選択され；

X₂は、G、A、またはVから選択され；

X₃は、T、L、A、またはHから選択され；

X₄は、YまたはPから選択され；

X₅は、G、Q、またはRから選択され；

X₆は、GまたはPから選択され；

X₇は、Y、P、D、またはSから選択され；

X₁₀は、W、N、S、またはEから選択され；

X₁₁は、L、Y、またはGから選択され；

X₁₂は、Q、H、またはVから選択され；

X₁₃は、GまたはSから選択され；

X₁₄は、G、F、L、またはDから選択され；

X₁₅は、S、P、またはLから選択され；

X₁₆は、V、M、またはSから選択される。

【0236】

一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号288の配列において示される通りである。一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号289の配列において示される通りである。一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号290の配列において示される通りである。一部の実施形態では、X₁、X₂、X₃、X₄、X₅

、X₆、X₇、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、およびX₁₆は、配列番号291の配列において示される通りである。

【0237】

一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンではない。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アラニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アルギニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アスパラギンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、アスパラギン酸である。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、システインである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、グルタミンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、グルタミン酸である。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、グリシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、ヒスチジンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、イソロイシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、ロイシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、リシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、フェニルアラニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、セリンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、トレオニンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、トリプトファンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、チロシンである。一部の実施形態では、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈は、独立に、バリンである。

【0238】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き、一部の実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除き、配列番号288の配列に示される通りに明示される。

【0239】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き、一部の実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除き、配列番号289の配列に示される通りに明示される。

【0240】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き、一部の実施形態では、X₈が、Vではなく、X₉が、Tではなく、X₁₇が、Sではなく、X₁₈が、Iではないことを除き、配列番号290の配列に示される通りに明示される。

【0241】

一部の実施形態では、配列は、X₈、X₉、X₁₇、およびX₁₈の位置に対応する位置が、上記に明示されたアミノ酸残基以外の、任意のアミノ酸残基でありうることを除き

、一部の実施形態では、 X_8 が、 V ではなく、 X_9 が、 T ではなく、 X_{17} が、 S ではなく、 X_{18} が、 I ではないことを除き、配列番号291の配列に示される通りに明示される。

【0242】

一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号273の配列と、少なくとも62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号273の配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号273の配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号273の配列と、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一である。

10

【0243】

同一性パーセントは、NCBIウェブサイトを通じて利用可能である、BLASTPを使用して、2つ配列をアライメントするのに、デフォルトパラメータを使用して決定される。

20

【0244】

一部の実施形態では、ヒトCD71タンパク質（配列番号2または5）に結合するか、またはこれに特異的に結合する、フィブロネクチンIII型（FN3）ドメインが提供される。本明細書で提示される通り、FN3ドメインは、CD71タンパク質に結合しうる。ドメインはまた、CD71タンパク質にも特異的に結合しうることも、明示的に言明されないとしても、提示される。したがって、例えば、CD71に結合するFN3ドメインはまた、CD71に特異的に結合するFN3ドメインタンパク質も包含するであろう。これらの分子は、例えば、治療適用および診断適用ならびにイメージングにおいて使用される。一部の実施形態では、本明細書で開示される、FN3ドメインをコードするポリヌクレオチド、またはその相補性核酸、ベクター、宿主細胞、およびこれらを作製および使用する方法が提供される。

30

【0245】

一部の実施形態では、CD71に結合するか、またはこれに特異的に結合する、単離FN3ドメインが提供される。

【0246】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーでありうる。リンカーは、本明細書で記載される、短鎖ペプチド配列などの短鎖ペプチド配列でありうる。例えば、リンカーは、G/Sリンカーなどでありうる。

【0247】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、本明細書で提示されるリンカーなどのリンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含む。例示的リンカーは、(GS)₂、(配列番号720)、(GGGS)₂（配列番号721）、(GGGG)₁₋₅（配列番号1065）、(AP)₁₋₂₀（配列番号1066）；(AP)₂（配列番号723）、(AP)₅（配列番号724）、(AP)₁₀（配列番号725）、(AP)₂₀（配列番号726）、A(EAAAK)₅AAA（配列番号727）、または(EAAAK)₁₋₅（配列番号728）を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK（配列番号729）；GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG（配列番号730）；APAPAPAPAP（配列番号731）；またはEAAAK（配列番号732）のアミノ酸配列を含むか、またはこれらのア

40

50

ミノ酸配列である。

【0248】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、当業者により実施され、表面プラズモン共鳴法またはKinexa法により決定される通り、約 1×10^{-7} M未満、例えば、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 1×10^{-12} M未満、または約 1×10^{-13} M未満の解離定数(K_D)で、CD71に結合しうる。測定された、特定のFN3ドメイン-抗原間相互作用のアフィニティーは、異なる条件(例えば、オスモル濃度、pH)下で測定された場合に変動しうる。したがって、アフィニティー、および他の抗原結合性パラメータ(例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、タンパク質足場および抗原の正規化溶液、ならびに本明細書で記載される緩衝液などの正規化緩衝液によりなされる。

10

【0249】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、CD71に、標準溶液ELISAアッセイにおいて、陰性対照について得られるシグナルを、少なくとも5倍上回る強さで結合しうる。

【0250】

一部の実施形態では、CD71に結合するか、またはこれに特異的に結合するFN3ドメインは、分子のN末端へと連結された、イニシエーターメチオニン(Met)を含む。一部の実施形態では、CD71に結合するか、またはこれに特異的に結合するFN3ドメインは、FN3ドメインのC末端へと連結された、システイン(Cys)を含む。N末端Metおよび/またはC末端Cysの付加は、発現、および/または分子の半減期を延長し、他の機能をもたらすコンジュゲーションを容易としうる。

20

【0251】

FN3ドメインはまた、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第10,196,446号において記載されたシステイン置換などのシステイン置換も含有しうる。略述すると、一部の実施形態では、本明細書で提示されるポリペプチドは、米国特許第10,196,446号の、配列番号6または配列番号1に基づくFN3ドメインの、残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、および93からなる群から選択される位置、ならびに類縁のFN3ドメイン内の、同等の位置において、少なくとも1つのシステイン置換を含みうる。一部の実施形態では、置換は、残基6にある。一部の実施形態では、置換は、残基8にある。一部の実施形態では、置換は、残基10にある。一部の実施形態では、置換は、残基11にある。一部の実施形態では、置換は、残基14にある。一部の実施形態では、置換は、残基15にある。一部の実施形態では、置換は、残基16にある。一部の実施形態では、置換は、残基20にある。一部の実施形態では、置換は、残基30にある。一部の実施形態では、置換は、残基34にある。一部の実施形態では、置換は、残基38にある。一部の実施形態では、置換は、残基40にある。一部の実施形態では、置換は、残基41にある。一部の実施形態では、置換は、残基45にある。一部の実施形態では、置換は、残基47にある。一部の実施形態では、置換は、残基48にある。一部の実施形態では、置換は、残基53にある。一部の実施形態では、置換は、残基54にある。一部の実施形態では、置換は、残基59にある。一部の実施形態では、置換は、残基60にある。一部の実施形態では、置換は、残基62にある。一部の実施形態では、置換は、残基64にある。一部の実施形態では、置換は、残基70にある。一部の実施形態では、置換は、残基88にある。一部の実施形態では、置換は、残基89にある。一部の実施形態では、置換は、残基90にある。一部の実施形態では、置換は、残基91にある。一部の実施形態では、置換は、残基93にある。

30

40

【0252】

ドメイン内またはタンパク質内の位置におけるシステイン置換は、既存のアミノ酸残基の、システイン残基による置きかえを含む。一部の実施形態では、システインは、置換さ

50

れるのではなく、上記で列挙された位置に隣接して、配列へと挿入される。システイン修飾の他の例は、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第20170362301号において見出される。配列のアライメントは、例えば、NCBIウェブサイトにおいて、デフォルトパラメータを使用するBLASTPを使用して実施される。

【0253】

一部の実施形態では、システイン残基は、ドメイン内またはタンパク質内の任意の位置に挿入される。

【0254】

一部の実施形態では、CD71に結合するFN3ドメインは、細胞へと内部化される。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、検出用標識または治療剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。細胞傷害剤は、治療剤として作用しうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、本明細書で開示される、任意の検出用標識、治療的、および／または細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、オリゴヌクレオチドの、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞である。一部の実施形態では、細胞は、筋細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞である。一部の実施形態では、細胞は、樹状細胞である。一部の実施形態では、細胞は、中枢神経系細胞である。一部の実施形態では、細胞は、心臓細胞である。

【0255】

一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号273、288～291、301～310、312～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含む。

【0256】

一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号301のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号302のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号303のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号304のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号305のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号306のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号307のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号310のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号312のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号313のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号314のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号315のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号316のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号317のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号318のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号319のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号320のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号321のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号322のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号323のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、CD71に結合する単離FN3ドメインは、配列番号324のア

50

50

50

50

50

50

一部の実施形態では、C D 7 1 に結合する単離 F N 3 ドメインは、配列番号 7 1 0 のアミノ酸配列を含む。

【 0 2 5 7 】

一部の実施形態では、C D 7 1 に結合する単離 F N 3 ドメインは、分子の N 末端へと連結された、イニシエーターメチオニン (M e t) を含む。

【 0 2 5 8 】

一部の実施形態では、C D 7 1 に結合する単離 F N 3 ドメインは、配列番号 2 7 3、2 8 8 ~ 2 9 1、3 0 1 ~ 3 1 0、3 1 2 ~ 5 7 2、5 9 2 ~ 5 9 9、または 7 0 8 ~ 7 1 0 のアミノ酸配列のうちの 1 つと、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む。同一性パーセントは、N C B I ウェブサイトを介して利用可能である、B l a s t P を使用して、2 つ配列をアライメントするのに、デフォルトパラメータを使用して決定される。C D 7 1 に結合する F N 3 ドメインの配列は、例えば、表 4 に見出される。

【 0 2 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表4:CD71結合性FN3ドメイン配列

配列 番号	CD71に結合するFN3ドメインのアミノ酸配列
301	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPITYIEAVVLGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVGISGVKGGHNSMPLSAIFTT
302	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFMINYSELFWMGEAIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVRIKGVKGGKGSWPLHAHFTT
303	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIEYAETRWYGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPIDGVKGGIASKPLSAIFTT
304	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYRDQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
305	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVYIWGVKGGKPSFPLRAGFTT
306	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIIYMETFSRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYRVPIGGVKGGSSCPLSAIFTT
307	MLPAPKNLVVSDVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
310	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIAYIETATRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPPIGVKGGNTSSPLSAIFTT
312	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIPYAEPSPTEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAISTT
313	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIAYPEDGFRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIGVKGGGGSGPLSAIFTT
314	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIYYVENVWGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYWEVIIGVKGGQCSRPLSAIFTT
315	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTECPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
316	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFGIAYREFRPSGEAIVLT VPGSERSYDLTVETGYRNEVVICGVKGGPWGSGPLSAIFTT
317	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPILYTECVYRGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYHVPITGVKGGGGSWPLSAIFTT
318	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFNIMYHEIYVGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPIEGVKGGGTSGPLSAIFTT
319	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAITYTEAALCGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVPINGVKGGGTSGPLSAIFTT
320	MLPAPKNLVVARVTEDSARLSWTAPDAAIDSFIDYSEYWWGGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVLITGVKGGYRSGPLSAIFTT
321	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIRYNEFIVAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPIAGVKGGGASWPLSAIVTT
322	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFWYLELQFAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPITGVKGGIISFPLSAIFTT
323	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIYHEWYGDGEAIV LTVPGSERSYDLTGPKPGTEYRVIRISGVKGGFESGPLSAIFTT
324	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFMIRYQEGTRWGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYIVMIAGVKGGQISLPLSAIFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

325	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIWYLEKSYQGGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPPIIGVKGGRDSCPLSAIFTT
326	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
327	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFRISYAETVRQGEAIVLT VPGSERSYDLTVETGYRNWVMILGVKGGPGSLPLSAIFTT
328	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVVRAFDSDFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
329	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIEWEAVGFGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGYLSAPLSAIFTT
330	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIHYVEQQLIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPITGVKGGACSWPLSAIFTT
331	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFTIEYSEHPIDGEAIVL PGSERSYDLTGLKPGTEYVVPRIHGVKGGWFSHPLWAFFTT
332	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVTIAGVKGGWRKPLNAESTT
333	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFGIAYVESYWYGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPIYGVKGGDGSGLPLSAIFTT
334	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYITYVELNLAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPILGVKGGSLSQPLSAIFTT
335	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFISYIESIADGEAIVLT PGSERSYDLTGLKPGTEYWVAIVGVKGGPFSWSLSAIVTT
336	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVPT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPPIAGVKGGGPSAPLSAIFTT
337	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTTTPDAAFDSPFIYYWEVTITGEAIVLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPDIPGVKGGASPPLSAIFTT
338	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIPYLEHTVRSEIVLT VPGSERSYDLTDLKPGTEYCVPIDGVKGGLSRPLSAIFTT
339	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIPYTEPPDPGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYLVTLGVKGGSMSVPLSAIFTT
340	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFTIDYWENRCPGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYCVWISGVKGGYSSWPLSAIFTT
341	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPWIQGVKGGHLSPLSAIVTT
342	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFLIPYAETSPSGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSEPLSAIFTT
343	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFMIVYYEYTRFGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVPIDGVKGGGRSSPLSAIFTT
344	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIPYAEPSPTEAIVLT PGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIVTT
345	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVVPWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
346	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIIPYAEPDPGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGKLSLPLSAIFTT
347	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPGIVYLEMMVTGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPILGVKGGTRSVPLSAIFTT
348	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFLIYYEEGYLEYYSGE AIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVGIVGVKGGGLSGPLSAISTT
349	MLPAPKNLVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYAEPDPGEAIVLT

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

	VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDWLPLSAIFTT
350	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIHYREFQLSGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYDVPIEGVKGGPGSRPLSAIFTT
351	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSECSYDLTGLKPGTEYVPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
352	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIDYDELAIFYGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
353	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT
354	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIAYGEHIVIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYMPVPIAGVKGGPISLPLSAIFTT
355	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIPYAEPSPTGEIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSLPLSAIFTT
356	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFSIGYVELVLLGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYDVLIPGVKGGSLSRPLSAIFTT
357	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFAIPYAEISRNGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTVLIHGVKGGCLSDPLSAIFTT
358	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIEYLELSRHGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVMIFGVKGGGPKPLSAIFTT
359	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVYNEVHWIGEIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYFVGIYGVKGGHWSKPLSAIFTT
360	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFEIDYDELAIFYGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVRIPIGVKGGMPSLPLSAIVTT
361	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFQIVYSELWIKGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYQVPIPIGVKGGGRNSFPLSAIFTT
362	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFKIRYTETRISIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYCVPIGGVKGGDSSWPLSAISTT
363	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFCISYYERMGRGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYMPVYIFGVKGGGLNSLPLSAIFTT
364	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIVYAEPIPNGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGGRNSDPLSAIFTT
365	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIAYAEPRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
366	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIDYDEPRSPGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYRVFIWGIKGGDTSFPLSAIFTT
367	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTILYAEQAQFGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPITGVKGGTRSGPLSAISTT
368	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIPIYAEVRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSLPLSAISTT
369	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIAYEETATSGEIYLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVEIEGVKGGARSRLYADFTT
370	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVPVWIQGVKGGDLNPLSAIFTT
371	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPISYLELSLYGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVGIAGVKGGVVSRLPLSAIFTT
372	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFTIGYREWYWGGEIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPISGVKGGLDLPLSAIFTT
373	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYVPVWIQGVKGGSPSAPLSAESTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

374	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFSITYLEWWNLGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYMTIPGVKGGMSSYPLSAIFTT
375	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTISYGEEALIGEAIYLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYYVHIEGVKGGWSQPLAAFTT
376	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSTIEYYENIGIGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVPVIGVKGGPYSHPLSAIFTT
377	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYAEPRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
378	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPGIGYYEHKRFGEAIQL SVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVDIEGVKGGVLSWPLFAEFTT
379	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPVIEYTERFWSGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVPIDGVKGGQCSTPLSAIFTT
380	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPWIDYEEEGVIGEAIYL HVPGSERSYDLTGLKPGTEYVVKIHGVKGGHPSHPLVAVFTT
381	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYVELRHLGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
382	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFLIPYAETSPSGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGDYSSPLSAIFTT
383	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYAEPRPDGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
384	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFSILYLELTPKGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
385	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPHIEYFEPPIGEIVLTP GSERSYDLTGLKPGTEYAVNIYGVKGGYLSHPLSAIFTT
386	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSECSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
387	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFAIEYTEFLYSGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYGVPIGVKGGFVSPPLSAIVTT
388	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIKYREVLRCGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYTPITGVKGGFGSSPLSAIFTT
389	MLPAPENLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPWIEYYEGVIQGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYFVAIWGVKGGKWSVPLSAIFTT
390	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAEFTT
391	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIHYWETQGFGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYPVLIPGVKGGPSSLPLSAIFTT
392	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIPYAEPSPTEGEIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSAIFTT
393	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFAIEYYEPVPAGEAIYLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYDVTIYGVKGGYYSHPLFASFTT
394	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAIFTT
395	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
396	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIAYLEVFEYGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYQVPIEGVKGGAMSLPLSAIFTT
397	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIWYEEETTIGEAIYH VPGSERSYDLTGLKPGTEYEVHITGVKGGPYSRPLFANFTT
398	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPGIAYDEWPEFGEIVLT

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

	VPGSERSYDLTGLKPDTEYIVEIYGVKGGWFSWPLSAIFTT
399	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFIPYAEPSTGEAIVLTV PGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGHLSPLSVIFTT
400	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIWEYEEVMYLGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYNVPIPGVKGGHSSPPLSAIFTT
401	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFHILYEELFLVGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYKVPISGVKGGPVSRPLSAIFTT
402	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWQGVARAFDSFLITYREQIFAGEVIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYPVWIIQGVKGGSPSAPLSAEFTT
403	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFHIVYHEPRPSGEAIWL HVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVGIVSVKGGDLSVPLVAFTT
404	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAISLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAVFTT
405	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIFLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHANFTT
406	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAILLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYASFTT
407	MSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAISL YVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAISTT
408	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIQLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
409	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFHISYEEDYTFGEAIYLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYRVVIGGVKGGWFSEPLLAFTT
410	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIYLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLDASFTT
411	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIDL VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLDPLEAYFTT
412	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAILLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
413	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAINLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
414	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAISLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSSPLFAVFTT
415	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIELH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
416	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIQLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
417	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAITLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
418	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIWL VVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVASFTT
419	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAINLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
420	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAIHLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
421	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFFIGYLEPQPPGEAIALW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
422	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSPFYIAYAEPRPDGEAILLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

423	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLGAVFTT
424	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLASFTT
425	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFFTT
426	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLHANFTT
427	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIFLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
428	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIASFTT
429	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAINL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
430	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFVIEYFEWTLNGEIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVQIYGVKGGCLSRPLSAIFTT
431	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAHFTT
432	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIPYAEPSPGTGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAHFTT
433	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIYLY VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAFTT
434	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
435	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAFTT
436	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIWLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLIAIFTT
437	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
438	MLPTPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHASFTT
439	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLNANFTT
440	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPMPLSAIFTT
441	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIFLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAFTT
442	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPHPLKAQFTT
443	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLF VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAHFTT
444	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLY VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGAFTT
445	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAIFTT
446	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAITLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
447	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLE

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

	VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAHFTT
448	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLRAVFTT
449	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
450	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSRTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLV PGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
451	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPRPLQAHFTT
452	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAITLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLYAFFTT
453	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
454	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLIAHFTT
455	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHARFTT
456	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIFLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAAVFTT
457	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAISTT
458	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAVFTT
459	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIYK VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAHFTT
460	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLLAYFTT
461	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLEAKFTT
462	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIKLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAIFTT
463	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIYLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPFLKAAFTT
464	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLVAIFTT
465	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLAAWFTT
466	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIFLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLNAFTT
467	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLHAYSTT
468	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAIFTT
469	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLSAVFTT
470	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLLAHFTT
471	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLSSPLDAYFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

472	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLASFTT
473	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFHIVYHEPRPSGEAIHLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLSAFTT
474	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLSAIFTT
475	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFRISYCETFYHGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAKFTT
476	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL KVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
477	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL KVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQANFTT
478	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
479	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFPIAYAEPRPDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAFTT
480	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAQFTT
481	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAKFTT
482	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIDLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHALFTT
483	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGFPSMPLSAIFTT
484	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIDLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSFTT
485	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIYLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAKFTT
486	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
487	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAISLL VPDSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLKFTT
488	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDASFTT
489	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLT VPGSERSYDLTGPKPGTEYWVLIQGVKGGGSSVPLVAYFTT
490	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEASFTT
491	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILAV PGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSLPLVASFTT
492	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIGYTEYGGYGEAIYL SVPGSERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGGSSVPLSAIFTT
493	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIANFTT
494	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIVTT
495	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSIFTT
496	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVL

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

	WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRASFTT
497	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIKLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFFTT
498	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIILE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
499	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHADFTT
500	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL EVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVADFTT
501	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAHFTT
502	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFDIGYTEYGGYGEAILH VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVLIQGVKGGSSVPLSAIFTT
503	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPVPLAAFTT
504	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSQFTT
505	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSMPLHPLVALFTT
506	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
507	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAAYFTT
508	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSYPLVAAFTT
509	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSCRSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTAIFTT
510	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAINLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSFPLSAVFTT
511	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAIFTT
512	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL AVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAQFTT
513	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
514	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLCAEFTT
515	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAEFTT
516	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPPKFTT
517	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIILE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAVFTT
518	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
519	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLK VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLEAIFTT
520	MLPAPKNPVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLKRLSPPVVTTITMA

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 0】

	VCRKPVAENLSQTLS
521	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIFLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSPLTAFTT
522	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIVLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSHPLAAFTT
523	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLQANFTT
524	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAEFTT
525	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSASFTT
526	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTASFTT
527	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
528	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAASFTT
529	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAHFTT
530	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL LVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
531	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLY VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSDPLDAVFTT
532	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIYLD VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSTFTT
533	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLF VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLKAYFTT
534	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAIFTT
535	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIQLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSLPLSADFTT
536	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAEFTT
537	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYASFTT
538	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTTPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIRLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGFTT
539	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAIFTT
540	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAKFTT
541	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT
542	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLL VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAAFTT
543	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIHLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSVPLAAVFTT
544	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAISLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGAHFTT

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

545	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIAL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVASFTT
546	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAFTT
547	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRASFTT
548	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL GVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHATFTT
549	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHANFTT
550	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLYAKFTT
551	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAIGLW VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFSPDPLQAVFTT
552	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAFTT
553	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
554	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLA VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLSAKFTT
555	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFFIGYLEPQPPGEAILLF VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSTPLSASFTT
556	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLHAYFTT
557	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLRAYFTT
558	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAFTT
559	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIQLG VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLLAVFTT
560	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIHLR VPGSERSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPMPLSAFTT
561	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAILLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLIAKFTT
562	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLH VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLQAIFTT
563	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIALV VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLAANFTT
564	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAINLS VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
565	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIVLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLTASFTT
566	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIRLQ VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLGASFTT
567	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIGL WVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLVAYFTT
568	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIYLE VPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLFTT
569	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFYIAYAEPRPDGEAIWL

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

	DVPGSERSYDLTGLKPGTEYSVLIHGVKGGLLSSPLDAYFTT
570	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIYECETKMCGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYRVPIPGVKGGTASLPLSAIFTT
571	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFFIYYIESYPAGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
572	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFFIYYIESYPAGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYWVGIDGVKGGRWSTPLSAIFTT
592	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTAPAPAPAP APLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVL TVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
593	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTGGGGSGG GGSGGGGGSGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVY HEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLS AIFTT
594	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKEA AAKEAAAKEAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIV YHEPRPDGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPL SAIFTT
595	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTTEAAAKLPA PKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVLTVPGS ERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
596	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTAPAPAPA PAPLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIEYFEYVGYGEAIV LTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTT
597	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTGGGGSG GGGGSGGGGGSGGGGSLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIE YFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRP LSAIFTT
598	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKE AAAKEAAAKEAAKLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIE YFEYVGYGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRP LSAIFTT
599	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIEYFEYVGYGEAIVL TVPGSCRSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTTEAAAKL PAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFKIEYFEYVGYGEAIVLTVP GSERSYDLTGLKPGTEYYVAIYGKGGWYSRPLSAIFTT
708	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSCRSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
709	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFAIVYHEPRPDGEAIVLT VPGSERSYDLTGLKPGTEYEVVILGVKGGVHSYPLSAIFTT
710	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSDFFIGYLEPQPPGEAIHLG VPGSCRSYDLTGLKPGTEYNVTIQGVKGGFPSIPLFASFTT

10

20

30

40

【0260】

本明細書で提示される通り、一部の実施形態では、CD71に結合するFN3ドメインは、各々の配列が、下記に提示される、配列番号2（ヒト成熟CD71）または配列番号5（ヒト成熟CD71細胞外ドメイン）に結合する：

【0261】

50

【表 8】

2	MTKEYQDLQHLDNEESDHHQLRKGPPPPQPLLQRLCSGPRLLLLSLGLS LLLLVVVCVIGSQNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAVKGLSTQGGNVG RKMKSLESQLEKQQKDLSEDHSSLLLVHKQFVSDLRSLSCQMAALQGN GSERTCCPVNWVEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTS WEEQKFVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQ PDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQ EPPLL
5	QNSQLQEELRGLRETFSNFTASTEAVKGLSTQGGNVGRKMKSLESQLE KQQKDLSEDHSSLLLVHKQFVSDLRSLSCQMAALQGNNGSERTCCPVNW VEHERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHI GPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYETGFKNWRPEQPDDWYGHGLG GGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDKASQEPPLL

10

【0262】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含む。リンカーは、可撓性リンカーでありうる。リンカーは、本明細書で記載される、短鎖ペプチド配列などの短鎖ペプチド配列でありうる。例えば、リンカーは、G/SリンカーまたはG/Aリンカーなどでありうる。本明細書で提示される通り、リンカーは、例えば、(GS)₂、(配列番号720)、(GGGS)₂ (配列番号721)、(GGGGS)₅ (配列番号722)、(AP)₂₋₂₀ (配列番号1067)、(AP)₂ (配列番号723)、(AP)₅ (配列番号724)、(AP)₁₀ (配列番号725)、(AP)₂₀ (配列番号726)、およびA(EAAAK)₅AAA (配列番号727)、または(EAAAK)₁₋₅ (配列番号728)でありうる。これらは、非限定例であり、他のリンカーもまた、使用される。GGGGS (配列番号1068) リピートまたはGGGGA (配列番号1069) リピートの数もまた、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つでありうる。一部の実施形態では、リンカーは、1つまたはそれ以上のGGGGS (配列番号1068) リピートと、1つまたはそれ以上のGGGGA (配列番号1069) リピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK (配列番号729)；GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列番号730)；APAPAPAPAP (配列番号731)；またはEAAAK (配列番号732)を含む。

20

30

【0263】

一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号593のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号594のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号595のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号596のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号597のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号598のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号599のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、リンカーにより接続された、2つのFN3ドメインを含むFN3ドメインは、配列番号592～599のうちの1つのアミノ酸配列を有する。

40

【0264】

50

一部の実施形態では、FN3ドメインは、該当する場合、当業者により実施され、表面プラズモン共鳴法またはKinexa法により決定される通り、約 1×10^{-7} M未満、例えば、約 1×10^{-8} M未満、約 1×10^{-9} M未満、約 1×10^{-10} M未満、約 1×10^{-11} M未満、約 1×10^{-12} M未満、または約 1×10^{-13} M未満の解離定数(K_D)で、CD71に結合しうる。測定された、特定のFN3ドメイン-抗原間相互作用のアフィニティーは、異なる条件(例えば、オスモル濃度、pH)下で測定された場合に変動しうる。したがって、アフィニティー、および他の抗原結合性パラメータ(例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、タンパク質足場および抗原の正規化溶液、ならびに本明細書で記載される緩衝液などの正規化緩衝液によりなされる。

【0265】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、その標的タンパク質に、標準溶液ELISAアッセイにおいて、陰性対照について得られるシグナルを、少なくとも5倍上回る強さで結合しうる。

【0266】

一部の実施形態では、その標的タンパク質に結合するか、またはこれに特異的に結合するFN3ドメインは、分子のN末端へと連結された、イニシエーターメチオニン(Met)を含む。一部の実施形態では、その標的タンパク質に結合するか、またはこれに特異的に結合するFN3ドメインは、FN3ドメインのC末端へと連結された、システイン(Cys)を含む。N末端Metおよび/またはC末端Cysの付加は、半減期延長分子の発現および/またはコンジュゲーションを容易としうる。

【0267】

FN3ドメインはまた、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第10,196,446号において記載されたシステイン置換などのシステイン置換も含有しうる。略述すると、一部の実施形態では、FN3ドメインを含むポリペプチドは、システイン操作フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインと称される、システインで置換された残基を有するFN3ドメインを有しうる。一部の実施形態では、FN3ドメインは、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許第10,196,446号の配列番号1(LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAEINLTVPGSERSYDLTG LKPGTEYT VSYGVKGGHRSNPLSAEFTT)に基づくFN3ドメインの、残基6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、および93からなる群から選択される位置、ならびに類縁のFN3ドメイン内の、同等の位置において、少なくとも1つのシステイン置換を含む。ドメイン内またはタンパク質内の位置におけるシステイン置換は、既存のアミノ酸残基の、システイン残基による置きかえを含む。システイン修飾の他の例は、例えば、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第20170362301号において見出される。配列のアライメントは、例えば、NCBIウェブサイトにおいて、デフォルトパラメータを使用するBLASTPを使用して実施される。

【0268】

一部の実施形態では、標的タンパク質に結合するFN3ドメインは、細胞へと内部化される。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、検出用標識または治療剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。細胞傷害剤は、治療剤として作用しうる。一部の実施形態では、FN3ドメインの内部化は、本明細書で開示される、任意の検出用標識、治療的、および/または細胞傷害剤の、細胞への送達を容易としうる。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞、肺細胞、筋細胞、免疫細胞、樹状細胞、CNS細胞、または心臓細胞である。一部の実施形態では、治療剤は、本明細書で提示されるsiRNA分子である。検出用標識へとコンジュゲートされた、CD71に結合するFN3ドメインは、in vivoまたはin vitroにおいて

10

20

30

40

50

、腫瘍組織などの試料上における、CD71の発現について査定するのに使用される。検出用標識へとコンジュゲートされた、CD71に結合するFN3ドメインは、*in vivo*または*in vitro*において、試料である、血液、免疫細胞、筋細胞、または樹状細胞上における、CD71の発現について査定するのに使用される。

【0269】

本明細書で提示される通り、siRNA分子へと連結された、異なるFN3ドメインはまた、異なる標的に結合する、別のFN3ドメインへもコンジュゲートされるか、または連結される。これは、分子が、第1の標的と、別の、例えば、標的とに結合するように、多特異的（例えば、二特異的、三特異的など）となることを可能とするであろう。一部の実施形態では、第1のFN3結合性ドメインは、腫瘍細胞により発現される抗原（腫瘍抗原）に結合する、別のFN3ドメインへと連結される。

10

【0270】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、二価FN3ドメインを形成するように、リンカーにより、一体に連結される。リンカーは、可撓性リンカーでありうる。一部の実施形態では、リンカーは、G/Sリンカーである。一部の実施形態では、リンカーは、1つ、2つ、3つ、または4つのG/Sリピートを有する。G/Sリピート単位は、4つのグリシンに続くセリン、例えば、GGGGS（配列番号1068）である。本明細書では、リンカーの他の例も提示され、これらもまた、使用される。

【0271】

一部の実施形態では、リンカーは、(GS)₂、（配列番号720）、(GGGS)₂（配列番号721）、(GGGGS)₅（配列番号722）、(AP)₂₋₂₀（配列番号1067）、(AP)₂（配列番号723）、(AP)₅（配列番号724）、(AP)₁₀（配列番号725）、(AP)₂₀（配列番号726）、およびA(EAAAK)₅AAA（配列番号727）、または(EAAAK)₁₋₅（配列番号728）のポリペプチドである。これらは、非限定例であり、他のリンカーもまた、使用される。GGGGS（配列番号1068）リピートまたはGGGGA（配列番号1069）リピートの数もまた、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つでありうる。一部の実施形態では、リンカーは、1つまたはそれ以上のGGGGS（配列番号1068）リピートと、1つまたはそれ以上のGGGGA（配列番号1069）リピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、1つまたはそれ以上のGGGGS（配列番号1068）リピートと、1つまたはそれ以上のEAAAK（配列番号732）リピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、1つまたはそれ以上のGGGGS（配列番号1068）リピートと、1つまたはそれ以上の「AP」リピートとを含む。一部の実施形態では、リンカーは、EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKE（配列番号729）；GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG（配列番号730）；APAPAPAPAP（配列番号731）；またはEAAAK（配列番号732）を含む。

20

30

【0272】

いかなる特定の理論にも束縛されずに述べると、一部の実施形態では、核酸分子へと連結されたFN3ドメインは、1つまたはそれ以上のFN3ドメインの結合パートナーを発現し（例えば、腫瘍細胞）、その中における、核酸分子の細胞内蓄積をもたらす細胞への、治療剤のターゲティング送達において使用される。これは、siRNA分子が、細胞機構と適正に相互作用して、標的遺伝子の発現を阻害し、有効性を改善し、また、一部の実施形態では、同じsiRNA分子の、ターゲティングされていない投与により生じる毒性も回避することを可能とする。

40

【0273】

それらの特異的標的タンパク質に結合する、本明細書で記載されるFN3ドメインは、単量体、二量体、または多量体として、例えば、標的分子への結合価数を増大させ、これにより、標的分子への結合アビディティを増大させるか、または2つもしくはこれを超える、異なる標的分子に同時に結合する、二特異的足場もしくは多特異的足場を作出する手段として作出される。二量体および多量体は、単一特異的タンパク質足場、二特異的タ

50

ンパク質足場、または多特異的タンパク質足場を連結することにより、例えば、アミノ酸リンカー、例えば、ポリグリシン、グリシンおよびセリン、またはアラニンおよびプロリンを含有するリンカーを組み入れることにより作出される。例示的リンカーは、(GS)₂、(配列番号720)、(GGGS)₂ (配列番号721)、(GGGGS)₅ (配列番号722)、(AP)₂₋₂₀ (配列番号1067)、(AP)₂ (配列番号723)、(AP)₅ (配列番号724)、(AP)₁₀ (配列番号725)、(AP)₂₀ (配列番号726)、およびA(EAAAK)₅AAA (配列番号727)、または(EAAAK)₁₋₅ (配列番号728)を含む。一部の実施形態では、リンカーは、EAAAK EAAAKEAAAKEAAAK (配列番号729)；GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号730)；APAPAPAPAP (配列番号731)；またはEAAAK (配列番号732)のアミノ酸配列を含むか、またはこれらのアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【0274】

二量体および多量体は、N-C方向において、互いと連結される。ポリペプチドを、新規に連結された融合ポリペプチドと接続する、天然に存在するペプチドリンカーならびに合成ペプチドリンカーの使用は、文献(Hall et al., J Biol Chem, 264, 5260~5268, 1989; Alft et al., Protein Eng., 8, 725~731, 1995; Robinson et al., Biochemistry, 35, 109~116, 1996; 米国特許第5,856,456号)において周知である。本段落で記載されたリンカーはまた、本明細書で提示される式および上記で提示されたドメインを連結するのにも使用される。

【0275】

半減期延長部分

一部の実施形態では、FN3ドメインはまた、例えば、共有結合的相互作用を介して、他のサブユニットも組み込む場合がある。一部の実施形態では、FN3ドメインは、半減期延長部分をさらに含む。例示的半減期延長部分は、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合性タンパク質および／または結合性タンパク質ドメイン、トランスフェリンならびにその断片および類似体、ならびにFc領域である。ヒトFc領域のアミノ酸配列は、周知であり、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgEのFc領域を含む。一部の実施形態では、FN3ドメインは、アルブミン、アルブミン変異体、アルブミン結合性タンパク質および／またはアルブミン結合性ドメイン、ならびにこれらの断片および類似体に結合し、分子全体の半減期を延長する。

【0276】

一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメイン(タンパク質)は、単離アルブミン結合性ドメイン(タンパク質)である。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質が、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に対応する置換を有することを条件として、アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、ま

たは99%同一であるか、またはこれらのパーセント同一であるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、A10Vである。一部の実施形態では、置換は、A10G、A10L、A10I、A10T、またはA10Sである。一部の実施形態では、10位における置換は、任意の天然に存在するアミノ酸である。一部の実施形態では、単離アルブミン結合性ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119のアミノ酸配列と比較した場合に、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、または14の置換を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、置換は、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、または119の10位に対応する位置にある。一部の実施形態では、提供されるFN3ドメインは、配列番号101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、もしくは119の、残基位置6、11、22、25、26、52、53、61、88、もしくは6、8、10、11、14、15、16、20、30、34、38、40、41、45、47、48、53、54、59、60、62、64、70、88、89、90、91、もしくは93位に対応する、少なくとも1つの残基位置、またはC末端において、システイン残基を含む。一連の位置が列挙されるが、各位置はまた、個別にも選出される。一部の実施形態では、システインは、6、53、または88位に対応する位置にある。一部の実施形態では、アルブミン結合性ドメインのさらなる例は、参照によって本明細書に組み入れる、米国特許第10,925,932号において見出される。

10

20

【0277】

抗体様特性、とりわけ、C1qへの結合、補体依存性細胞傷害作用(CDC)、Fc受容体への結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)、食作用、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体;BCR)の下方調節など、Fcエフェクター機能など、Fc領域と関連する特性を付与するように、抗体定常領域の全部または一部が、FN3ドメインへと接合され、これらの活性の一因となる、Fc内の残基を修飾することにより、さらに修飾される場合がある(総説については、Strohl、Curr Opin Biotechnol、20、685~691、2009を参照されたい)。

30

【0278】

所望の特性のために、PEG5000またはPEG20,000などのポリエチレングリコール(PEG)分子、異なる鎖長の脂肪酸および脂肪酸エステル、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、オレイン酸、アラキドン酸、オクタジエン酸、テトラデカンジエン酸、オクタデカンジエン酸、ドコサジエン酸など、ポリリシン、オクタン、炭水化物(デキストラン、セルロース、オリゴ糖、または多糖)など、さらなる部分も、FN3ドメインへと組み込まれる。これらの部分は、タンパク質足場のコード配列との、直接的な融合体であり、標準的なクローニング法および発現法により作出される場合がある。代替的に、周知の化学的カップリング法は、部分を、本明細書で開示される、組換え作製分子へと接合するのに使用される。

40

【0279】

PEG部分は、例えば、システイン残基を、分子のC末端へと組み込むことにより、FN3ドメインへと付加される場合もあり、システインを、分子の結合面から離れた残基位置へと操作し、周知の方法を使用して、PEG基を、システインへと接合することにより、FN3ドメインへと付加される場合もある。

【0280】

さらなる部分を組み込むFN3ドメインは、いくつかの周知のアッセイにより、機能性について比較される。例えば、Fcドメインおよび/またはFcドメイン変異体の組み込みにより変更される特性については、FcγRI受容体、FcγRII受容体、FcγRIII受容体、またはFcRn受容体などの受容体の可溶性形態を使用する、Fc受容体結

50

合アッセイにおいてアッセイされる場合もあり、例えば、A D C CもしくはC D Cを測定するか、または*in vivo*モデルにおける、本明細書で開示される分子の薬物動態特性について査定する、周知の細胞ベースのアッセイを使用してアッセイされる場合もある。

【0281】

本明細書で提示される組成物は、F N 3タンパク質および核酸分子を調製し、それらを、一体に連結することにより調製される。タンパク質を、核酸分子へと連結する技法は、公知であり、任意の方法が使用される。例えば、一部の実施形態では、核酸分子を、本明細書で提示されるリンカーなどのリンカーで修飾し、次いで、タンパク質を、リンカーを含む核酸分子と混合して、組成物を形成する。例えば、一部の実施形態では、F N 3ドメインは、チオール-マレイミド化学反応を使用して、s i R N Aシステインへとコンジュゲートされる。一部の実施形態では、システイン含有F N 3ドメインを、例えば、還元剤（例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（T C E P））を伴う、リン酸緩衝生理食塩液（または他の任意の適切な緩衝液）中で還元して、遊離チオールをもたらすことができる。次いで、一部の実施形態では、F N 3ドメインを含有する遊離チオールは、連結複合体を形成するように、マレイミド連結で修飾されたs i R N A二重鎖と混合され、条件下でインキュベートされた。一部の実施形態では、混合物は、室温で、0～5時間、または約1、2、3、4、または5時間にわたりインキュベートされる。反応は、例えば、N-エチルマレイミドでクエンチされる。一部の実施形態では、コンジュゲートは、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換を使用して精製される。他の方法もまた、使用されるが、これは、1つの非限定的実施形態であるに過ぎない。

【0282】

F N 3タンパク質を作製する方法は、公知であり、任意の方法は、タンパク質を作製するのに使用される。例は、参照によって本明細書に組み入れる参考文献において提示される。

【0283】

一部の実施形態では、C D 7 1に特異的に結合するF N 3ドメインは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含み、この場合、ヒスチジンタグが、精製を容易とするために、ポリペプチドのN末端またはC末端へと付属させられている。一部の実施形態では、ヒスチジンタグ（H i s タグ）は、6つのヒスチジン残基（配列番号1070）を含む。さらなる実施形態では、H i s タグは、少なくとも1つのグリシン残基、または約2つ～約4つのグリシン残基により、F N 3ドメインへと接続される。したがって、F N 3ドメインの精製、およびポリペプチドからのH i s タグの切断の後、1つまたはそれ以上のグリシンが、N末端上またはC末端上に残される場合がある。一部の実施形態では、H i s タグが、N末端から除去される場合、全てのグリシンが除去される。一部の実施形態では、H i s タグが、C末端から除去される場合、グリシンのうちの1つまたはそれ以上が保持される。

【0284】

一部の実施形態では、C D 7 1に特異的に結合するF N 3ドメインは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、または708～710のアミノ酸配列を含み、この場合、N末端メチオニンは、F N 3ドメインの精製の後で保持される。

【0285】

キット

一部の実施形態では、本明細書で記載される組成物を含むキットが提供される。

【0286】

キットは、治療的使用のために使用され、診断用キットとして使用される。

【0287】

一部の実施形態では、キットは、核酸分子へとコンジュゲートされたF N 3ドメインを

含む。

【0288】

コンジュゲートFN3ドメインの使用

本明細書で提示される組成物は、細胞、組織、臓器、体液、または、一般に、宿主における、ヒト疾患の症状、または特異的病態を診断するか、モニタリングするか、モジュレートするか、処置するか、緩和するか、これらの発生を防止するか、またはこれらを軽減するのに使用される。

【0289】

一部の実施形態では、骨格筋内の、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質を選択的に低減する方法が提供される。ある特定の実施形態では、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質は、肝臓内および／または腎臓内で低減されない。

10

【0290】

一部の実施形態では、GYS1 mRNAおよびGYS1タンパク質の低減は、本明細書で記載されるコンジュゲートの投与後、約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、または5週間を超える期間にわたり維持される。

【0291】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、筋疾患の処置のために、CD71陽性組織（例えば、骨格筋、平滑筋）への送達を容易としうる。

【0292】

一部の実施形態では、FN3ドメインは、免疫疾患の処置のために、活性化リンパ球、活性化樹状細胞、または他の活性化免疫細胞への送達を容易としうる。

20

【0293】

一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における自己免疫疾患を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、1型糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、および免疫性血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。

30

【0294】

一部の実施形態では、ポンペ病（GSD2；酸性アルファーグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を有する対象を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。

40

【0295】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォブズ病（GSD3；グリコーゲン脱分枝酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5；筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、GSD12であるアルドラーゼA欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4；グリコーゲン脱分枝酵素（GBE1）

50

欠損症)、タルイ病(GSD7;筋ホスホフルクトキナーゼ(PFKM)欠損症)、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ(GYS2)欠損症(GSD0)、グルコース-6-ホスファターゼ(G6PC/SLC37A4)欠損症(GSD1;フォンギールケ病)、ハース病(GSD6;肝グリコーゲンホスホリラーゼ(PYGL)欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症)、ホスホリラーゼキナーゼ(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1)欠損症(GSD9)、ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症(GSD10)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ(LDHA)欠損症(GSD11)、ファンコーニービッケル症候群(GSD11;グルコース輸送体(GLUT2)欠損症)、アルドラーゼA欠損症(GSD12)、 β -エノラーゼ(ENO3)欠損症(GSD13)、およびグリコゲニン-1(GYG1)欠損症(GSD15)からなる群から選択される。

10

【0296】

一部の実施形態では、がんを処置するための医薬組成物または医薬の調製における、本明細書で提示される組成物の使用が提供される。一部の実施形態では、がんは、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、胃がん、明細胞性腎細胞癌、明細胞性乳癌、明細胞性子宮内膜癌、明細胞性卵巣癌、明細胞性子宮癌、肝細胞癌、膵臓がん、前立腺がん、軟部組織がん、ユーイング肉腫、および非小細胞肺癌からなる群から選択される。

【0297】

一部の実施形態では、CD71細胞は、多発性硬化症(MS)および脳の感染性疾患など、CNS疾患、炎症性疾患/免疫疾患に関与する細胞である。一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、中枢神経系へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における神経学的状態および/または脳腫瘍を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301~301、310、312~519、521~572、592~599、もしくは708~710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、脳腫瘍は、非悪性脳腫瘍、良性脳腫瘍、および悪性脳腫瘍からなる群から選択される。一部の実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンペ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギラン-バレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、偏頭痛、脳炎、敗血症、および重症筋無力症からなる群から選択される。

20

30

【0298】

一部の実施形態では、がんを有する対象を処置する方法であって、対象へと、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301~301、310、312~519、521~572、592~599、もしくは708~710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。

40

【0299】

一部の実施形態では、対象は、充実性腫瘍を有する。

【0300】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、黒色腫である。

【0301】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、肺がんである。一部の実施形態では、充実性腫瘍

50

は、非小細胞肺癌（NSCLC）である。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、扁平上皮非小細胞肺癌（NSCLC）である。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、非扁平上皮NSCLCである。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、肺腺癌である。

【0302】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、腎細胞癌（RCC）である。

【0303】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、中皮腫である。

【0304】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、鼻咽頭癌（NPC）である。

【0305】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、結腸直腸がんである。

【0306】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、前立腺がんである。一部の実施形態では、充実性腫瘍は、去勢抵抗性前立腺がんである。

【0307】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、胃がん（stomach cancer）である。

【0308】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、卵巣がんである。

【0309】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、胃がん（gastric cancer）である。

【0310】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、肝がんである。

【0311】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、膵がんである。

【0312】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、甲状腺がんである。

【0313】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、頭頸部扁平上皮がんである。

【0314】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、食道癌または消化器癌である。

【0315】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、乳がんである。

【0316】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、卵管がんである。

【0317】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、脳がんである。

【0318】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、尿道がんである。

【0319】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、泌尿生殖器がんである。

【0320】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、子宮内膜症である。

【0321】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、子宮頸がんである。

【0322】

一部の実施形態では、充実性腫瘍は、がんの転移性病変である。

【0323】

一部の実施形態では、対象は、血液悪性腫瘍を有する。

【0324】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、リンパ腫、骨髄腫、または白血病である。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、血液悪性腫瘍は、B細胞リンパ腫である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、バーキットリンパ腫である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、ホジキンリンパ腫である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、非ホジキンリンパ腫である。

【0325】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、骨髄異形成症候群である。

【0326】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄性白血病（CML）である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、慢性骨髄単球性白血病（CMML）である。

【0327】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、多発性骨髄腫（MM）である。

【0328】

一部の実施形態では、血液悪性腫瘍は、形質細胞腫である。

【0329】

一部の実施形態では、がんは、軟部組織がんである。一部の実施形態では、軟部組織がんは、ユーイング肉腫である。

【0330】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される任意の組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物の、がんを処置するための医薬組成物または医薬の調製における使用が提供される。一部の実施形態では、組成物は、がんを処置するために使用される。

【0331】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるポンペ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される任意の組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物の、ポンペ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を処置するための医薬組成物または医薬の調製における使用が提供される。一部の実施形態では、組成物は、ポンペ病（GSD2；酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）欠損症）を処置するために使用される。

【0332】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される任意の組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物の、糖原病を処置するための医薬組成物または医薬の調製における使用が提供される。一部の実施形態では、組成物は、糖原病を処置するために使用される。

【0333】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォーブズ病（GSD3；グリコーゲン脱分枝酵素（AGL）欠損症）、マッカードル病（GSD5；筋グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGM）欠損症）、II型糖尿病／糖尿病性腎症、GSD12であるアルドラーゼA欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病（GSD4；グリコーゲン脱分枝酵素（GBE1）欠損症）、タルイ病（GSD7；筋ホスホフルクトキナーゼ（PFKM）欠損症）、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ（GYS2）欠損症（GSD0）、グルコース-6-ホスファターゼ（G6PC／SLC37A4）欠損症（GSD1；フォンギールケ病）、ハース病（GSD6；肝グリコーゲンホスホリラーゼ（PYGL）欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGAM2）欠損症）、ホスホリラーゼキナーゼ（PHKA2／PHKB／PHKG2／PHKA1）欠損症（GSD9）、ホスホグリセリン酸ムターゼ（PGA

10

20

30

40

50

M2) 欠損症 (GSD10)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ (LDHA) 欠損症 (GSD11)、ファンコーニービッケル症候群 (GSD11; グルコース輸送体 (GLUT2) 欠損症)、アルドラーゼ A 欠損症 (GSD12)、 β -エノラーゼ (ENO3) 欠損症 (GSD13)、およびグリコゲニン-1 (GYG1) 欠損症 (GSD15) からなる群から選択される。

【0334】

一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、中枢神経系へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における神経学的状態および／または脳腫瘍を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、脳腫瘍は、非悪性脳腫瘍、良性脳腫瘍、および悪性脳腫瘍からなる群から選択される。一部の実施形態では、神経学的状態は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ラフォラ病、ポンベ病、成人ポリグルコサン小体病、脳卒中、脊髄損傷、運動失調、ベル麻痺、脳動脈瘤、てんかん、発作、ギラン-バレー症候群、多発性硬化症、筋ジストロフィー、神経皮膚症候群、偏頭痛、脳炎、敗血症、および重症筋無力症からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象における、神経学的状態および／または脳腫瘍を処置する方法であって、対象へと、CD71に結合するFN3ドメインを投与する工程を含み、FN3ドメインが、治療剤（例えば、細胞傷害剤、siRNAなどのオリゴヌクレオチド、ASO、別の標的に結合するFN3ドメインなど）へとコンジュゲートされる方法が提供される。

10

20

【0335】

一部の実施形態では、それを必要とする対象におけるポンベ病を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、対象における、ポンベ病を処置する方法であって、対象へと、CD71に結合するFN3ドメインを投与する工程を含み、FN3ドメインが、治療剤（例えば、細胞傷害剤、siRNAなどのオリゴヌクレオチド、ASO、別の標的に結合するFN3ドメインなど）へとコンジュゲートされる方法が提供される。

30

【0336】

一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、免疫細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、CD71に結合するポリペプチドは、樹状細胞へと方向付けられる。一部の実施形態では、それを必要とする対象における自己免疫疾患を処置する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、CD71に結合するポリペプチドまたは医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、このポリペプチドは、CD71に結合するFN3ドメインである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号301～301、310、312～519、521～572、592～599、もしくは708～710などの配列、または治療剤へと連結されるか、もしくはこれとコンジュゲートされた、本明細書で提示されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、自己免疫疾患は、関節リウマチ、橋本自己免疫性甲状腺炎、セリアック病、1型糖尿病、白斑、リウマチ熱、悪性貧血／萎縮性胃炎、円形脱毛症、および免疫性血小板減少性紫斑病からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象における、自己免疫疾患を処置する方法であって、対象へと、CD71に結合するFN3ドメインを投与する工程を含み、F

40

50

N3ドメインが、治療剤（例えば、細胞傷害剤、s i R N Aなどのオリゴヌクレオチド、A S O、別の標的に結合するF N 3ドメインなど）へとコンジュゲートされる方法が提供される。

【0337】

一部の実施形態では、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞へと、本明細書で提示される組成物または医薬組成物を送達する工程を含む。一部の実施形態では、細胞は、e x v i v oにおける細胞である。一部の実施形態では、細胞は、i n v i v oにおける細胞である。一部の実施形態では、標的遺伝子は、G Y S 1である。しかし、本明細書で提示される証拠が、s i R N A分子が、F N 3ドメインへとコンジュゲートされた場合に、効率的に送達されることを裏付ける通り、標的遺伝子は、任意の標的遺伝子でありうる。一部の実施形態では、G Y S 1をターゲティングするs i R N Aは、F N 3ドメインへと連結される。一部の実施形態では、F N 3ポリペプチド（ドメイン）は、C D 7 1に結合するF N 3ポリペプチド（ドメイン）である。一部の実施形態では、F N 3ポリペプチドは、本明細書で提示される通りであるか、または、それらの各々が、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、P C T出願第P C T / U S 2 0 / 5 5 5 0 9号、米国出願第17 / 0 7 0 , 3 3 7号、P C T出願第P C T / U S 2 0 / 5 5 4 7 0号、または米国出願第17 / 0 7 0 , 0 2 0号において提示される通りである。一部の実施形態では、s i R N Aは、F N 3ドメインへとコンジュゲートされない。

10

20

【0338】

一部の実施形態では、細胞内の標的遺伝子の発現を低減する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、細胞へと、本明細書で提示される組成物または医薬組成物を送達する工程を含む。一部の実施形態では、細胞は、e x v i v oにおける細胞である。一部の実施形態では、細胞は、i n v i v oにおける細胞である。一部の実施形態では、標的遺伝子の発現を低減する方法は、標的遺伝子の発現の、約99%、90~99%、50~90%、または10~50%の低減を結果としてもたらす。

【0339】

一部の実施形態では、G Y S 1の発現を低減する方法が提供される。一部の実施形態では、低減される発現は、G Y S 1 m R N Aの発現（量）である。一部の実施形態では、G Y S 1の発現を低減する方法は、G Y S 1の発現の、約99%、90~99%、50~90%、または10~50%の低減を結果としてもたらす。一部の実施形態では、低減される発現は、G Y S 1タンパク質の発現（量）である。一部の実施形態では、低減されるタンパク質は、グリコーゲンである。一部の実施形態では、グリコーゲンの低減は、筋細胞内で生じる。一部の実施形態では、グリコーゲンの低減は、心臓細胞内で生じる。一部の実施形態では、方法は、G Y S 1をターゲティングする、本明細書で提示されるs i R N A分子を含む。一部の実施形態では、s i R N Aは、F N 3ドメインへとコンジュゲートされる。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に結合するF N 3ドメインである。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、本明細書で提示される通りである。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に結合する2つのF N 3ドメインによる二量体である。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、同じF N 3ドメインである。一部の実施形態では、2つのF N 3ドメインは、異なる、すなわち、C D 7 1の異なる領域またはアミノ酸残基、すなわち、異なるエピトープに結合する。一部の実施形態では、方法は、対象（患者）へと、本明細書で提示されるG Y S 1 s i R N A分子などのG Y S 1 s i R N A分子を投与する工程を含む。一部の実施形態では、対象へと投与されるG Y S 1 s i R N Aは、F N 3ドメインへとコンジュゲートされるか、または連結される。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に結合するF N 3ドメインである。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、本明細書で提示される通りである。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、C D 7 1に結合する2つのF N 3ドメインによる二量体である。一部の実施形態では、F N 3ドメインは、同じF N 3ドメインである。一部の実施形態では、2つのF N 3ドメインは、異なる、すなわち、C D 7 1の異なる領域またはア

30

40

50

ミノ酸残基、すなわち、異なるエピトープに結合する。一部の実施形態では、CD71結合性ドメインは、本明細書で提示されるポリペプチドである。

【0340】

一部の実施形態では、siRNA分子を、対象における細胞へと送達する方法が提供される。一部の実施形態では、方法は、対象へと、本明細書で提示される組成物を含む医薬組成物を投与する工程を含む。一部の実施形態では、細胞は、CD71陽性細胞である。タンパク質に言及する、「陽性細胞」という用語は、タンパク質を発現する細胞を指す。一部の実施形態では、タンパク質は、細胞表面上で発現される。一部の実施形態では、細胞は、腫瘍細胞、肝細胞、免疫細胞、樹状細胞、心臓細胞、筋細胞、CNS細胞、または血液脳関門内部の細胞である。一部の実施形態では、siRNAは、細胞内の標的遺伝子の発現を下方調節する。一部の実施形態では、標的遺伝子は、GYS1である。

10

【0341】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物は、細胞、組織、臓器、体液、または、一般に、宿主における、ヒト疾患の症状、または特異的病態を診断するか、モニタリングするか、モジュレートするか、処置するか、緩和するか、これらの発生を防止するか、またはこれらを軽減するのに使用され、また、血液脳関門を越えることが可能な特性も呈する。血液脳関門(BBB)は、大半の高分子(例えば、DNA、RNA、およびポリペプチド)、および多くの低分子が、脳に侵入することを防止する。BBBは、主に、高度に制限的な密着結合を伴う、特化した内皮細胞から構成され、この結果、小型の物質および大型の物質の、血液から、中枢神経系への通過は、BBBにより制御される。多くの治療剤が、所望の効率で、BBBを越えて送達されないため、この構造は、神経疾患および神経障害(例えば、脳がん)を伴う患者の処置および管理を困難とする。BBBの破壊を伴う、さらなる状態は、脳卒中、糖尿病、発作、高血圧性脳症、後天性免疫不全症候群、外傷性脳傷害、多発性硬化症、ラフォラ病、ポンベ病、成人ポリグルコサン小体病、パーキンソン病(PD)、およびアルツハイマー病を含む。この能力は、とりわけ、例えば、星状細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、上衣腫、胚細胞腫(松果体腫)、多形性神経膠芽腫、希突起神経膠腫、神経鞘腫、網膜芽細胞腫、および先天性腫瘍を含む脳がん;または脊髄がん、例えば、神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、および肉腫を処置するために有用である。この能力は、さらに、ポンベ病および/または糖原病の処置においても有用である。ある特定の実施形態では、本明細書で提示される組成物は、治療剤または細胞傷害剤を、例えば、血液脳関門を越えて送達するのに使用される。ある特定の実施形態では、本明細書で提示される組成物は、治療剤または細胞傷害剤を、例えば、筋内へと送達するのに使用される。

20

30

【0342】

一部の実施形態では、それを必要とする対象における糖原病を処置する方法であって、本明細書で提示される組成物を投与する工程を含む方法が提供される。一部の実施形態では、糖原病は、コーリー病またはフォブズ病(GSD3;グリコーゲン脱分枝酵素(AGL)欠損症)、マッカードル病(GSD5;筋グリコーゲンホスホリラーゼ(PYGM)欠損症)、II型糖尿病/糖尿病性腎症、GSD12であるアルドラーゼA欠損症、ラフォラ病、低酸素症、アンデルセン病(GSD4;グリコーゲン脱分枝酵素(GBE1)欠損症)、タルイ病(GSD7;筋ホスホフルクトキナーゼ(PFKM)欠損症)、および成人ポリグルコサン小体病からなる群から選択される。一部の実施形態では、糖原病は、グリコーゲンシンターゼ(GYS2)欠損症(GSD0)、グルコース-6-ホスファターゼ(G6PC/SLC37A4)欠損症(GSD1;フォンギールケ病)、ハース病(GSD6;肝グリコーゲンホスホリラーゼ(PYGL)欠損症または筋ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症)、ホスホリラーゼキナーゼ(PHKA2/PHKB/PHKG2/PHKA1)欠損症(GSD9)、ホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM2)欠損症(GSD10)、筋乳酸デヒドロゲナーゼ(LDHA)欠損症(GSD11)、ファンコーニービッケル症候群(GSD11;グルコース輸送体(GLUT2)欠損症)、アルドラーゼA欠損症(GSD12)、β-エノラーゼ(ENO3)欠損症(GS

40

50

D 1 3)、およびグリコゲニン-1 (G Y G 1) 欠損症 (G S D 1 5) からなる群から選択される。

【0 3 4 3】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物または医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) である筋ジストロフィーなどの筋疾患を処置するのに使用される。

【0 3 4 4】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物または医薬組成物は、単独で、または他の治療剤と組み合わせて、すなわち、同時に、または逐次的に投与される。一部の実施形態では、他の治療剤、またはさらなる治療剤は、他の抗腫瘍剤、または治療剤である。異なる腫瘍の種類および腫瘍の病期は、がんの処置に有用な、多様な補助的化合物の使用を要求する。例えば、本明細書で提示される組成物は、とりわけ、タキソール、チロシンキナーゼ阻害剤、ロイコボリン、フルオロウラシル、イリノテカン、ホスファターゼ阻害剤、M E K 阻害剤など、多様な化学療法剤と組み合わせて使用される。組成物はまた、とりわけ、抗 P D - 1 または抗 C T L A - 4 など、腫瘍に対する免疫応答をモジュレートする薬物と組み合わせても使用される。さらなる処置は、P D - 1 または P D - L 1 をターゲティングする抗体など、免疫系をモジュレートする薬剤でありうる。

【0 3 4 5】

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物または医薬組成物は、G A A 酵素補充療法 (E R T) と組み合わせて投与される。

【0 3 4 6】

「～を処置する」または「処置」とは、目的が、がんの発症または拡散など、所望されない生理学的変化または障害を防止するか、または緩徐化する（低下させる）ことである、治療的処置および予防的措置を指す。一部の実施形態では、有益な臨床的結果、または所望の臨床的結果は、検出可能であれ、検出不能であれ、症状の緩和、疾患の程度の減殺、疾患の状態の安定化（すなわち、非増悪）、疾患進行の遅延または緩徐化、疾患状態の改善または軽減、および寛解（部分的であれ、全面的であれ）を含むがこれらに限定されない。「処置」はまた、処置を施されない場合の平均余命と比較して、生存を延長することも意味する。処置を必要とする患者は、状態もしくは障害を既に伴う患者のほか、状態もしくは障害を有しやすい患者、または状態もしくは障害が防止されるべきである患者を含む。

【0 3 4 7】

「治療有効量」とは、所望の治療的結果を達成するのに必要な投与量で、必要な期間にわたり有効な量を指す。本明細書で提示される組成物の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重などの因子に従い変動する。有効量についての例示的指標は、患者の福利の改善、腫瘍のサイズの減少もしくは退縮、腫瘍の増殖の停止もしくは緩徐化、および／またはがん細胞の、体内の他の位置への転移の非存在である。

【0 3 4 8】

投与／医薬組成物

一部の実施形態では、本明細書で提示される組成物と、薬学的に許容される担体とによる医薬組成物が提供される。治療的使用のために、組成物は、薬学的に許容される担体中に、有効成分としてのドメインまたは分子の有効量を含む医薬組成物として調製される。「担体」とは、それと共に活性化合物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または媒体を指す。このような媒体は、水、および石油由来の油、動物由来の油、植物由来の油、またはラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ごま油など、合成由来の油を含む油などの液体でありうる。例えば、0.4%の生理食塩液および0.3%のグリシンが使用される。これらの溶液は、滅菌であり、一般に、粒子状物質を含まない。これらの溶液は、常套的な周知の滅菌法（例えば、濾過）により滅菌される。組成物は、p H 調整剤および緩衝剤、安定化剤、増粘剤、滑沢剤、および着色剤など、生理学的条件を近似するのに要求される、薬学的に許容される補助物質を含む。本明細書で開示される分子の、この

10

20

30

40

50

ような医薬製剤中濃度は、広範に、すなわち、体重の約 0.5% 未満、通例、少なくとも約 1% ~ 最大 15 または 20% で変動する場合があります、主に、選択される特定の投与方式に従い要求される用量、流体の体積、粘度などに基づき選択されるであろう。他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む、適切な媒体および製剤については、例えば、「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」、21 版、Troy, D. B. 編、Lipincott Williams and Wilkins、Philadelphia、PA 2006、5 部、「Pharmaceutical Manufacturing」、691~1092 頁（とりわけ、958~989 を参照されたい）において記載されている。

【0349】

本明細書で開示される組成物の治療的使用のための投与方式は、錠剤、カプセル、溶液、粉末、ゲル、粒子による製剤を使用する、非経口投与、例えば、皮内投与、筋内投与、腹腔内投与、静脈内投与または皮下投与、肺内投与；経粘膜（経口、鼻腔内、膣内、直腸内）投与など、薬剤を、宿主へと送達する、任意の適切な経路であることが可能であり、シリンジ、植込み式デバイス、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ；または当技術分野で周知の、当業者により理解される、他の手段の中に含有される。部位特異的投与は、例えば、関節内送達、気管支内送達、腹腔内送達、関節包内送達、軟骨内送達、体腔内送達、腔内送達、小脳内送達、脳室内送達、結腸内送達、子宮頸部内送達、胃内送達、肝内送達、心内送達、骨内送達、骨盤内送達、心膜内送達、腹腔内送達、胸膜内送達、前立腺内送達、肺内送達、直腸内（intrarectal）送達、腎内送達、網膜内送達、脊髄内送達、滑膜内送達、胸内送達、子宮内送達、血管内送達、膀胱内送達、病変内送達、膣内送達、直腸内（rectal）送達、口腔内送達、舌下送達、鼻腔内送達、または経皮送達により達成される。

【0350】

医薬組成物は、本明細書で記載される医薬組成物を含む容器を含むキットとして供給される。医薬組成物は、例えば、単回投与もしくは複数回投与のための注射用溶液の形態で提供される場合もあり、注射の前に復元される滅菌粉末として提供される場合もある。代替的に、このようなキットは、医薬組成物の投与のための、乾燥粉末分散器、液体エアゾール発生器、または噴霧器を含みうる。このようなキットは、医薬組成物の適応および用法についての、書面による情報をさらに含みうる。

【0351】

実施例

以下の実施例は、本明細書で開示される実施形態を例示する。これらの実施例は、例示だけを目的として提示され、実施形態は、いかなる形であれ、これらの実施例に限定されるものと見なされるべきではなく、本明細書で提示される教示の結果としての証拠となる、任意の変化形および全ての変化形を包含すると見なされるべきである。当業者は、本質的に同様の結果をもたらすように変化させられるか、または改変される、それほど重要でない、様々なパラメータをたやすく認識するであろう。

【実施例 1】

【0352】

GY S1 siRNA 配列の ID および特徴付け

siRNA のコンピュータによるスクリーニング：コンピュータによる siRNA スクリーニングを実施して、ヒト siRNA の、ヒト GY S1 mRNA との相補性を同定した（図 1 を参照されたい）。全ての可能な 19 マーのアンチセンス配列を、ヒト GY S1 siRNA 配列（NM_001161587）から作出し、各 19 マーを、他のヒト GY S1 アイソフォームに対する活性のほか、マウス、ラット、および *Cynomolgus macaque* の間の、潜在的交差反応性について評価した。dbSNP（b155 v2）を使用して、ヒト siRNA 標的部位を、共通ヒト SNP（マイナー対立遺伝子頻度（MAF）> 1%）について評価した。共通対立遺伝子をターゲティングする配列は、棄却した。次に、siRNA のオフターゲット遺伝子は、全ての関連するモデル生物におけ

る、センス鎖およびアンチセンス鎖について評価した。この選択は、200の潜在的候補配列をもたらしたが、これは、*in vitro*ノックダウンスクリーンにより、さらに規定された。上位の*siRNA*候補配列を、表1Aおよび1Bに示す。システイン操作センチリンとのコンジュゲーションのためのGYS1 *siRNA*リンカーは、表3に記載された通りに調製した。

【0353】

非処置対照細胞と共に、HEK293T細胞に、10nMのABXO-HHH (*siRNA*対であるHHH)を、24時間にわたりリポフェクトした(処置群1つ当たり6連で)。mRNAを、細胞から選択されたポリA+ mRNAであり、平均深度を>3,000万リードとする、Illumina HiSeqプラットフォーム上の、非ストランド2×150bpペアドエンドシーケンシングにかけられた。

【0354】

図2：非処置細胞と対比された、ABXO-HHH処置細胞のDESeq2結果を示す、ボルカノプロットである。x軸は、全ての遺伝子についての、 $\log_2$ による遺伝子発現の倍数変化(非処置細胞による遺伝子発現で除された、ABXO-HHH処置細胞による遺伝子発現)を表す。y軸は、負の $\log_{10}$ により変換された補正P値を示す。有色ドットは、BLASTを介して検出された、ABXO-HHHとの有意な相補性を伴う遺伝子を表す。

【0355】

FastQCを使用して、RNA-seqライブラリー品質を精査した。Kallistoを使用して、ライブラリーを、GrCh38ヒトトランスクリプトームに照らして、シュードアライメントした。本発明者らは、トランスクリプトームに照らしたリードアライメントの平均が>90%である、例外的リードアライメントを達成した。次いで、ABXO-HHH処置細胞を、リポフェクタミンだけで処置された細胞と比較する、DESeq2を使用して、示差的発現を評価した。

【0356】

DESeq2結果は、GYS1標的の、実質的、かつ、有意なノックダウンを示した。ABXO-HHH処置試料中のGYS1発現は、非処置試料の31%へと下方調節された(図2)。GYS1は、ABXO-HHH処置下で、示差的に発現(DE)された全ての遺伝子について、最も大きく下方調節されたタンパク質コード遺伝子であった。GYS1はまた、p値を最小とする、示差的発現度が群を抜く遺伝子でもあり、 $1 \times 10^{87.7}$ の補正p値は、最近接の最小補正p値を、30桁を超えて下回った。

【0357】

BLASTを使用して、コンピュータによる潜在的オフターゲット効果の予測を実施した。ABXO-HHHのセンス配列およびアンチセンス配列は、GrCh38トランスクリプトームから構築された内部BLASTデータベースに対して、BLASTによりアライメントした。BLASTにより同定された、全ての潜在的オフターゲット効果のうち、ABXO-HHHの存在下で、RAP2Cだけが、有意に下方調節され(図2) $\log_2$ による倍数変化を<-1とするDE閾値を超えなかった。

【0358】

まとめると、これらのデータは、ABXO-HHHが、ヒトトランスクリプトーム中、比較的高濃度であってもなお、高度に特異的な*siRNA*であることを裏付ける。

【0359】

オリゴヌクレオチドの合成、脱保護、およびアニーリングのためのプロトコール：

オリゴヌクレオチドの合成は、アセトニトリル中のホスホルアミダイト濃度を0.1Mとする、500Å対照多孔性ガラス(CPG)上の、標準ホスホルアミダイト化学反応を使用する、Mermade 12合成器上で実施した。THF/ピリジン/水中のI2(0.02M)が、0.6MのETT(5-エチルチオテトラゾール)を活性化剤とする酸化剤であった。ピリジン中に0.09Mの、N,N-ジメチル-N'-(3-チオx-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-イル)メタンイミドアミド(DDTT)を、ホス

10

20

30

40

50

ホロチオエート（PS）結合を導入するための硫黄化試薬として使用した。ジクロロメタン中に3%（v/v）のジクロロ酢酸を、脱保護化液として使用した。緩衝液Aとしての、pH 8.5における、20 mMのリン酸、ならびに緩衝液Bとしての、20 mMのリン酸pH 8.5、および1 M臭化ナトリウムを伴う、イオン交換クロマトグラフィー（IEX）により、マレイミドを伴わない、全ての一本鎖を精製した。精製の後、オリゴヌクレオチド画分をプールし、濃縮し、脱塩した。次いで、脱塩試料を、凍結乾燥させ、-20℃で保管した。

【0360】

アンチセンス鎖の脱保護

合成の後、支持体を、アセトニトリル（ACN）で洗浄し、カラム内、真空下で乾燥させ、密閉可能な、1 mLのネジ栓付きバイアルへと移し、含水アンモニア中に5%のジエチルアミン溶液と共に、65℃で、5時間にわたり振盪した。粗オリゴの切断および脱保護は、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）で確認し、その後、IEX-HPLCで精製した。

【0361】

マレイミド含有オリゴヌクレオチドの合成および脱保護

3'アミノ修飾CPG固体支持体、または5'アミノ修飾ホスホルアミダイトを使用して、マレイミド含有オリゴを作製した。支持体を、密閉可能な、1 mLのバイアルへと移し、切断および脱保護のために、50/50 v/vの40%含水メチルアミン/含水アンモニア（AMA）と共に、室温で、2時間にわたり、または65℃で、10分間にわたりインキュベートした。一本鎖を、IEXクロマトグラフィーにより精製し、マレイミド付加の前におけるアンチセンスと同じ条件下で脱塩した。

【0362】

pH 7.1の0.05 Mリン酸緩衝液中に、約20 mg/mLのアミン修飾センス鎖を作製し、これに、ACN中に溶解させた、10モル当量のマレイミドN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステルを付加した。NHSエステル溶液を、含水オリゴヌクレオチド溶液へと添加し、室温で、3時間にわたり振盪した。こうしてマレイミドをコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを、イオン交換緩衝液条件下における、マレイミドの加水分解を防止するように、逆相クロマトグラフィー（緩衝液B中に80%のアセトニトリルを伴う、20 mMの酢酸トリエチルアンモニウム）により精製した。

【0363】

精製の後、オリゴヌクレオチド画分をプールし、濃縮し、脱塩した。

【0364】

マレイミドの加水分解を回避するために、センス鎖およびアンチセンス鎖の二重鎖化は、等モル量の、各脱塩一本鎖を使用する凍結乾燥を介して実施した。

【0365】

センチリンの、siRNAへのコンジュゲーション、コンジュゲートの精製および解析：センチリンを、マレイミドを介する、システイン特異的化学反应を介して、siRNAへとコンジュゲートした。PBS中に50~200 μMの、システイン含有センチリンを、10 mMのトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）により、室温で（30分間）還元して、遊離チオールをもたらした。次いで、センチリンを含有する遊離チオールを、直ちに、水中のsiRNA二重鎖を含有するマレイミドと、センチリン：siRNAのモル比を、約1.5：1として混合した。室温または37℃で、2時間にわたるインキュベーションの後、反応を、N-エチルマレイミド（反応混合物の最終NEM濃度を1 mMとする）でクエンチした。コンジュゲートは、2つの工程で精製した。工程I：固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（タグ付けタンパク質のための）、または疎水性相互作用クロマトグラフィー（タグなしタンパク質のための）であり、反応しなかったsiRNAリンカーを除去した。工程II：Capto-DEAEであり、反応しなかったセンチリンを除去した。コンジュゲートを含有する画分をプールし、透析を使用して脱塩することにより、HEPES緩衝生理食塩液（HBS）へと交換し、必要な場合、

10

20

30

40

50

濃縮した。

【0366】

センチリン-siRNAコンジュゲートの解析的特徴付け：センチリン-siRNAコンジュゲートを、解析法の組合せにより特徴づけた。SDS-PAGEを使用して、コンジュゲートの量を、遊離タンパク質の量と比較した。SDS-PAGEのために、4~20%のMini-PROTEAN（登録商標）TGX Stain-Free（商標）Protein Gels（BioRad）を、SDS緩衝液中、100Vで、1時間にわたり泳動させた。ゲルは、UV光下で視覚化した。解析用SEC（Superdex-75 5/150 GLカラム；GE）を使用して、センチリン-siRNAコンジュゲートの純度および凝集状態を解析した。液体クロマトグラフィー/質量分析（LCMS）を使用して、コンジュゲートの同一性および純度を確認した。試料は、Waters Acuity UPLC/Xevo G2-XS TOF質量分析計システムを使用して解析した。測定器は、ネガティブエレクトロスプレーイオン化モードで作動させ、200~3000のm/zにわたり走査した。コンジュゲートは、2つの断片：アンチセンス-センチリンおよびセンス-センチリンとして見られた。

10

【0367】

センチリンの、siRNAへのコンジュゲーション、コンジュゲートの精製および解析：センチリンを、マレイミドを介する、システイン特異的化学反应を介して、siRNAへとコンジュゲートした。PBS中に50~200μMの、システイン含有センチリンを、10mMのトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）により、室温で（30分間）還元して、遊離チオールをもたらした。次いで、センチリンを含有する遊離チオールを、直ちに、水中のsiRNA二重鎖を含有するマレイミドと、センチリン：siRNAのモル比を、約1.5：1として混合した。室温または37℃で、2時間にわたるインキュベーションの後、反応を、N-エチルマレイミド（反応混合物の最終NEM濃度を1mMとする）でクエンチした。コンジュゲートは、2つの工程で精製した。工程I：固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（タグ付けタンパク質のための）、または疎水性相互作用クロマトグラフィー（タグなしタンパク質のための）であり、反応しなかったsiRNAリンカーを除去した。工程II：Capto-DEAEであり、反応しなかったセンチリンを除去した。コンジュゲートを含有する画分をプールし、透析を使用して脱塩することにより、HBSへと交換し、必要な場合、濃縮した。

20

30

【0368】

図6：タグ付きタンパク質のための、IMACクロマトグラフィーである。IMACのために、Cytiva製のHiTrap HPカラム（1ml、5ml）を使用した。HiTrap緩衝液A（結合緩衝液）は、Type 1 H₂O中に50mMのトリスpH7.4、500mMのNaCl、および10mMのイミダゾールであり、HiTrap緩衝液B（溶出緩衝液）：Type 1 H₂O中に50mMのトリスpH7.4、500mMのNaCl、および250mMのイミダゾールであった。反応試料を、試料ループまたは試料ポンプを介して、カラムへと直接注入した。試料の適用後、カラムを、5~10カラム容量の緩衝液Aで洗浄した。溶出は、典型的に、段階的勾配（0~100%）で開始した。画分は、フラクションコレクターおよびピークフラグメンテーションを使用して、UVリーディングが、50mAU以上である場合に回収した。

40

【0369】

図7：タグなしタンパク質（過剰量のsiRNAの除去）のためのHICである。HICのために、Cytiva製のHiTrap Butyl HPカラム（1ml、5ml）を使用した。HIC緩衝液A（結合緩衝液）は、Type 1 H₂O中に2Mの硫酸アンモニウム、25mMのリン酸ナトリウムpH7.0であったが、HIC緩衝液B（溶出緩衝液）：Type 1 H₂O中に25mMのリン酸ナトリウムpH7.0であった。コンジュゲーション反応試料を、緩衝液Aにより、1：1の比に希釈した。上記で調製された試料を、試料ループまたは試料ポンプを介して、カラムへと直接注入した。試料の適用後、カラムを、5カラム容量の緩衝液Aで洗浄した。溶出は、典型的に、B中の0.

50

0 %で開始し、次いで、下記の表 10 の勾配で継続した。画分は、フラクションコレクターおよびピークフラグメンテーションを使用して、UVリーディングが、50 mAU以上である場合に回収した。

【0370】

【表 9】

表10

	種類	B の%	長さ(カラム容量)
1	線形	30～90	3.00
2	線形	35.0	10.00
3	線形	100.0	10.00
4	線形	100.0	5.00

10

【0371】

開環：レトロマイケル反応を介する、カーゴの喪失を回避するために、マレイミド環の加水分解を実施する。HiStrap（タグ付けタンパク質）またはHIC（タグなしタンパク質）からプールされた画分を、25 mMのトリス pH 8.9 緩衝液へと透析した。この緩衝液中の反応物を、摂氏 37 度で、72 時間にわたり、インキュベーターシェーカーに入れた。LC-MSにより、反応を、完了についてモニタリングした。

20

【0372】

図 8：タグ付けタンパク質およびタグなしタンパク質（過剰量の非反応センチリンの除去）のためのイオン交換クロマトグラフィー（IEX）である。IEXクロマトグラフィーのために、Cytiva製のHiTrap Capto DEAEカラム（1 ml、5 ml）を使用した。Capto DEAE緩衝液 A（結合緩衝液）は、Type 1 H₂O中に25 mMのトリス pH 8.8であったが、使用されたCapto DEAE緩衝液 B（溶出緩衝液）は、Type 1 H₂O中に25 mMのトリス pH 8.8、1 MのNaClであった。

30

【0373】

開環後の試料を、試料ループまたは試料ポンプを介して、カラムへと直接注入した。試料の適用後、カラムを、5～10カラム容量の緩衝液 A で洗浄した。溶出は、典型的に、B中の0.0 %で開始し、次いで、下記の表 11 の勾配で継続した。

【0374】

反応しなかったタンパク質が、典型的に、第 1 のピークであり、第 2 のピークは、典型的に、純粋コンジュゲートとなる、フロースルー中に、反応しなかったタンパク質を溶出させた。全ての画分を回収し、プールした。プールの濃度は、収量計算のためのNanodropを使用して、A260を測定することにより決定した。

40

【0375】

50

【表 10】

表 11

1	線形	20	5
2	線形	100	15
3	線形	100	5

【0376】

図9：センチリン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートについての解析用SECの例である。センチリン-siRNAコンジュゲートを、解析法の組合せにより特徴づけた。解析用SECを使用して、センチリン-siRNAコンジュゲートの純度および凝集状態を解析した。Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column, 125 Å, 1.7 μm, 4.6×150mmを伴う、Waters H-class UPLCを、規定のSEC解析のために使用した。典型的に、オートサンプラーを使用して、2～5 μl 試料を注入し、流量を、1分間当たり0.25 mlとし、使用される移動相は、1倍濃度のPBSまたは100 mM、pH 7.2のリン酸緩衝液とした。

【0377】

図10：コンジュゲートについての、SDS PAGEゲルの例である。SDS-PAGEを使用して、コンジュゲートの量を、遊離タンパク質の量と比較した。SDS PAGEゲルを実施するためにInvitrogen Mini Gel tank. PowerEase (商標) Touch 600W Power Supply and 115 V ACを使用した。Invitrogen - NuPAGE (商標) 4-12% Bis-Tris Protein Gel, 1.0mmを、20×NuPAGE (登録商標) MES SDS Running Buffer and SeeBlue (商標) Pre-stained Protein Standardと共に使用した。試料は、超純水により、約0.5 mg/mLへと正規化した。非還元型ゲルのために、10 μLの正規化試料を、10 μLの2倍濃度のLaemmli Sample Bufferと、1対1の比で混合した。還元型ゲルのために、2倍濃度のLaemmli Sample Bufferを、β-メルカプトエタノールと、95対1の比で混合し、次いで、10 μLの試料と、1対1の比で混合した。結果として得られる試料混合物を、95℃で、5分間にわたり煮沸し、次いで、熱サイクラー内で冷却した。15 μLの試料およびタンパク質ラダーを、適切なウェルへとロードし、電圧を、200 Vに設定し、泳動時間を、約30分間に設定した。ゲル泳動が終了したら、これを、クーマシーブルーまたはSYBR Greenまたはメチレンブルーにより視覚化した。左端のレーンは、タンパク質ラダーであり、隣のレーンは、センチリン自体であり、最後のレーンは、センチリン-siRNAコンジュゲートである。

【0378】

ヒト細胞(H358)に、候補siRNA配列を、ある範囲の濃度でトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、RNAを採取し、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を介して、GYS1レベルについて解析した。18SリボソームRNAを、RT-PCR内因性対照遺伝子として使用した。ノックダウンレベルを、非処置細胞と比較した。Graphpad Prismソフトウェアを使用して、EC50値を計算し、Emax値は、GYS1 mRNAについて観察された、最大ノックダウンパーセントを表す(表5)。

【0379】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 5

siRNA	参照番号	EC50 (pM)	E _{max} (%)
A	ABXO8	3.841	70
B	ABXO9	10.02	70.2
C	ABXO12	12.62	71.5
D	ABXO110	21.73	87.9
E	ABXO113	23.74	82.1
F	ABXO114	6.716	75.5
G	ABXO115	4.5	75.2
H	ABXO116	0.7542	69.4
I	ABXO117	20.87	93.8
J	ABXO122	8.93	65.6
K	ABXO123	4.049	75.5
L	ABXO124	2.642	70.5
M	ABXO125	0.8761	53.3
N	ABXO128	2.549	76.3
O	ABXO129	0.4961	64.3
P	ABXO139	0.6143	70.6
Q	ABXO142	23.19	80.3
R	ABXO150	58.88	96.1
S	ABXO151	1.502	75.6
T	ABXO152	24.76	91.1
U	ABXO155	5.893	60.2
V	ABXO156	0.6893	57.6
W	ABXO160	0.787	80.1
X	ABXO168	8.662	75.7
Y	ABXO171	38.82	69.2
Z	ABXO191	54.2	75.4
AA	ABXO197	19.8	77.1
BB	ABXO201	7.1	75.6
CC	ABXO203	5.7	74.9
DD	ABXO205	9.8	80.4

10

20

30

他の s i R N A についてもまた、上記で記載された通りに調べ、それらの E C 5 0 を、表 6 に提示する。

【 0 3 8 0 】

40

50

【表 1 2】

表 6

siRNA 対	EC50 (pM)
EE	1.8
FF	6
GG	5.9
HH	15.1
II	8.2
JJ	25.2
KK	
LL	1.35
MM	3.74
NN	5.66
OO	5.56
PP	6.34
QQ	11.76
RR	2.85
SS	3.35
TT	5.67
UU	0.4
VV	3.72
WW	3.15
XX	2.57
YY	1.64
ZZ	1.56
AAA	検出なし
BBB	4.87
CCC	2.65
DDD	2.66
EEE	1.21
FFF	1.31
GGG	該当なし

10

20

30

【0381】

候補 s i R N A 配列の選択性は、ヒト細胞（H E K - 2 9 3）への、ある範囲の濃度の s i R N A のトランスフェクションにより査定した。細胞生存率は、C e l l T i t e r G l o を使用して、トランスフェクションの72時間後評価した。E m a x 値は、最高被験 s i R N A 濃度（10 n M）における、細胞生存率の最大低減パーセントとして報告した（表7）。

【0382】

40

50

【表 13】

表 7

siRNA対	参照番号	Emax(10nMのときの%)
A	ABXO8	5.52
B	ABXO9	-0.3
C	ABXO12	31.67
D	ABXO110	25.68
E	ABXO113	22.83
F	ABXO114	-1.1
G	ABXO115	30.85
H	ABXO116	29.27
I	ABXO117	35.19
J	ABXO122	28.25
K	ABXO123	17.21
L	ABXO124	24.09
M	ABXO125	71.45
N	ABXO128	42.41
O	ABXO129	58.02
P	ABXO139	34.44
Q	ABXO142	8.94
R	ABXO150	16.06
S	ABXO151	60.95
T	ABXO152	42.84
U	ABXO155	54.4
V	ABXO156	34.1
W	ABXO160	-4.59
X	ABXO168	51.66
Y	ABXO171	4.79
Z	ABXO191	46.41
AA	ABXO197	25.01
BB	ABXO201	46.92
CC	ABXO203	15.18
DD	ABXO205	60.13

【実施例 2】

【0383】

CD71に結合する、フィブロネクチンIII型(FN3)ドメインの選択

トランスフェリンの、CD71への結合を阻害しない、CD71に結合するFN3ドメインを同定するためのパニング法および生化学スクリーニング法：トランスフェリンの、CD71への結合を阻害しない、CD71に特異的に結合するFN3ドメインについてスクリーニングするために、ストレプトアビジンコーティングMaxisorpプレート(Nunc; 型番: 436110)を、Starting Block T20(Pierce)中で、1時間にわたりブロッキングし、次いで、トランスフェリンの存在下で、またはCD71のトランスフェリン結合性部位に結合するFN3タンパク質と共に、1時間にわたり、ビオチニル化CD71(パニング法における抗原と同じ抗原を使用する)、または陰性対照(非類縁Fc融合組換えタンパク質およびヒト血清アルブミン)によりコーティングした。トランスフェリンの濃度は、最大で、35 μMである。いかなる特定の理論にも束縛されずに述べると、トランスフェリン、またはCD71のトランスフェリン結合性部位に結合するFN3タンパク質の組入れは、FN3ドメインの選択で、トランスフ

エリンの、CD71への結合と競合しないか、またはこれを阻害しないFN3ドメインが得られるように強いる。プレートを、TBSですすぎ、希釈された溶解物を、プレートへと、1時間にわたり適用した。さらなるすすぎに続き、ウェルを、HRPコンジュゲート抗V5 tag抗体 (Abcam; ab1325) で、1時間にわたり処理し、次いで、ペルオキシダーゼ (POD) (Roche; 11582950001) でアッセイした。ストレプトアビジン対照についてのELISAシグナルの、少なくとも10倍のELISAシグナルを伴うFN3ドメイン溶解物に由来するDNAを、シーケンシングする結果として、スクリーニングから単離されるFN3ドメイン配列をもたらした。

【実施例3】

【0384】

CD71に結合するが、トランスフェリンと競合的ではない、フィブロネクチンIII型 (FN3) ドメインの選択

トランスフェリンと競合的ではないか、または競合が最小限である、CD71結合性FN3ドメインを同定するために、バイアスCISディスプレイ戦略をデザインした。略述すると、ヒトCD71の細胞外ドメイン (ECD) についての、5ラウンドにわたるパニングの後で回収されたアウトプットを使用した (実施例3)。さらなるラウンドにわたるオフ速度選択も、実施例3に記載される通りに実施したが、1) 最終的な溶出工程の前に、トランスフェリンと同じ部位に結合したセンチリンを溶出させる、ヒトホロトランスフェリンによる洗浄工程; または2) モノクローナル抗体であるOKT9による、FN3ドメイン結合剤の溶出を追加した。トランスフェリン洗浄戦略およびOKT9溶出戦略から回収されたFN3ドメインを、既に記載されている通りに、PCR増幅し、pETベクターへとクローニングした。huCD71に、特異的に結合した、228のFN3ドメインを、ELISAにより、huCD71 ECDへの結合について確認した。固有の結合剤のサブセットは、SECにより解析し、モノメチルアウリスチンF (MMAF) へとコンジュゲートし、ヒトホロトランスフェリンを伴う/伴わないSKBR-3細胞内における細胞生存率アッセイを介して、内部化について評価した。ポリペプチドは、受容体により内部化されることが見出された。

【0385】

Integral Molecular社が、メンブレンプロテオームアレイ (MPA) アッセイを実施して、ABX1198 (配列番号509) およびABX1100 (配列番号509+リンカー番号0000を伴うsiRNA対) の特異性を、ヒト膜タンパク質のライブラリーに対してプロファイリングした。MPAライブラリーは、全ての1回膜貫通型タンパク質、複数回膜貫通型タンパク質、およびGタンパク質共役受容体 (GPCR) を含む、GPIアンカータンパク質、イオンチャネル、および輸送体のうちの94%を含み、各膜タンパク質が、ニワトリQT6細胞バックグラウンド内で固有に発現された、6000を超えるヒト膜タンパク質を含有した。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞内で、個別に発現された膜タンパク質に結合するリガンド (FN3ドメイン) を直接検出した。

【0386】

ABX1198 (配列番号509) およびABX1100 (配列番号509+リンカー番号0000を伴うsiRNA対) は、それぞれ、最適のシグナル/バックグラウンドノイズ比、1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、および0.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を伴う濃度で、MPAに対してスクリーニングした。スクリーニングで同定された膜タンパク質標的は、リガンドの系列希釈液、および同定された標的を個別にトランスフェクトされた細胞を使用する、検証手順において追跡した。

【実施例4】

【0387】

CD71 FN3ドメイン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用する、筋細胞内のmRNAのノックダウン

FN3ドメインへと固有に操作されたシステインを介する、マレイミド化学反応を使用

10

20

30

40

50

して、*muCD71* に結合する *FN3* ドメインを、*siRNA* オリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド (*ASO*) へとコンジュゲートする。システイン置換は、本明細書で提示され、また、参照によってその全体を本明細書に組み入れる、米国特許出願公開第 20150104808 号においても提示されているシステイン置換などのシステイン置換でありうる。*siRNA* または *ASO* は、*in vitro* において、標準的な化学修飾で修飾され、標的 *mRNA* のノックダウンを可能とすることを確認される。*FN3* ドメイン-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを、マウスへと、オリゴヌクレオチドペイロードの最大用量を 10 mg/kg として、静脈内投与した。投与後の多様な時点において、マウスを殺し、骨格筋、心臓筋肉、および他の多様な組織を回収し、必要となるまで、*RNA later* (商標) (*Sigma Aldrich*) 中で保管した。標準的な *qPCR* $\Delta\Delta C_T$ 法、ならびに標的遺伝子および対照遺伝子に特異的なプライマーを使用して、標的遺伝子のノックダウンを評価した。標的遺伝子は、筋内でノックダウンされることが見出され、このようなノックダウンは、*siRNA* または *ASO* を、*FN3* の *CD71* 結合性ドメインとコンジュゲートすることにより増強された。

10

【0388】

被験 *FN3* - *siRNA* コンジュゲートは、表 8 に記載された通りである。

【0389】

【表 14】

表 8

コンジュゲート	CD71 FN3 ドメイン (センチリン)	GYS1 siRNA 対
ABXC-1	配列番号 572	RRRR
ABXC-2	配列番号 572	SSSS
ABXC-3	配列番号 572	TTTT
ABX1005	配列番号 572	GYS1 以外の標的/対照
ABXC-27	配列番号 572	A
ABXC-28	配列番号 572	QQQQ
ABXC-29	配列番号 572	PPPP

20

30

【0390】

図 4A は、3つの異なる *FN3* ドメイン-*siRNA* コンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、*GYS1 mRNA* の、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける。有効性研究のために、雄 *GAA* - マウス (4~5 週齢である) は、*Jackson Laboratories* から得た。全ての動物を、*IACUC* プロトコルに従い処置した。5 例の動物に、 5.4 mg/kg の、3つの異なる *FN3* ドメイン-*siRNA* コンジュゲート (3 mg/kg の *Gys1 siRNA*) または媒体の、単回尾静脈内ボラス注射を施した。単回投与の 4 週間後、マウスを安楽死させ、腓腹筋を、*RNA later* 中に回収し、 4°C で、一晚にわたり保管し、 -80°C で凍結させた。*Qiagen* 製の *RNeasy Fibrous Tissue* キットを使用して、腓腹から、全 *RNA* を単離した。標的 *Gys1* および内因性対照 (*Pgk1*、*Ubc*、*Hprt1*、および *Aha1*) の発現レベルは、リアルタイム定量的 *PCR* を使用して解析した。データは、媒体単独を投与された対照動物に対する、 $\Delta\Delta C_T$ 法による正規化を使用して解析した。*FN3* ドメイン-*siRNA* コンジュゲート処置群内の、*Gys1 mRNA* のノックダウン百分率は、残りの *Gys1 mRNA* レベルの百分率を、100 から減算することにより測定した。統計学的有意性は、*GraphPad Prism* ソフトウェアにおいて、ダネット多重比較検定による、一元 *ANOVA* を使用して計算した。統計学的有意性は、図上に、アステリスク: *** $p < 0.001$ により提示する。

40

50

【0391】

図4Bは、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用する、マウス腓腹筋内の、GYS1タンパク質の、媒体単独と比較されたノックダウンを裏付ける。腓腹筋内の、Gys1タンパク質の定量は、RIPA緩衝液中で、腓腹筋をホモジネートすることにより実施した。腓腹筋内のタンパク質濃度は、ブラッドフォードアッセイを使用して測定した。Gys1レベルは、12-230kDa Jess separation modules (SM-W004) のための、製造元による標準法を使用して定量した。タンパク質は、Protein Simple社製の、特許権のある光活性化捕捉化学反応を使用して、キャピラリー上に固定化することにより分離した。抗Gys1一次抗体を、1:100の希釈率で使用した。化学発光は、ペルオキシド/Luminol-Sを使用して確立した。キャピラリーの化学発光についてのデジタル画像は、高さ(化学発光強度)、面積、およびシグナル/ノイズ比を、自動で測定する、Protein Simple社製のCompass for Simple Westernソフトウェアを使用して捕捉した。内部系を、各試行に組み入れた。FN3ドメイン-siRNAコンジュゲート処置群のピーク面積値は、媒体で処置された組織に対して正規化し、処置群内の、Gys1タンパク質のノックダウン百分率は、残りのGys1タンパク質レベルの百分率を、100から減算することにより測定した。統計学的有意性は、GraphPad Prismソフトウェアにおいて、ダネット多重比較検定による、一元ANOVAを使用して計算した。統計学的有意性は、図上に、アステリスク:*** $p < 0.001$ により提示する。

10

20

【0392】

図5は、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートを使用し、異なる標的(AHA-1)に対するsiRNAと比較されたGYS1ノックダウンが、骨格筋に、高度に特異的であることを裏付ける。雄GAA-マウス(8~9週齢である)は、Jackson Laboratoriesから得た。全ての動物を、IACUCプロトコルに従い処置した。3例の動物に、17.9mg/kgの、3つの異なるFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mg/kgのGys1 siRNA)、17.9mg/kgの、1つのFN3ドメイン-siRNAコンジュゲート(10mg/kgのAha1 siRNA)または媒体の、単回尾静脈内ボラス注射を施した。単回投与の2週間後、マウスを安楽死させた。腓腹筋、大腿四頭筋、横隔膜、心臓、肝臓、および腎臓の組織を、RNAlater中に回収し、4℃で、一晚にわたり保管し、-80℃で凍結させた。Qiagen製のRNeasy Fibrous Tissueキットを使用して、組織から、全RNAを単離した。標的Gys1/Aha1および内因性対照(Pgk1)の発現レベルは、リアルタイム定量的PCRを使用して解析した。データは、媒体単独を投与された対照動物に対する、 $\Delta\Delta Ct$ 法による正規化を使用して解析した。

30

【実施例5】

【0393】

ABX-HHH処置細胞と、非処置細胞とを比較する、RNA-seq実験

mRNAシーケンシングは、HEK293T細胞に、10nMのABXO-HHHを、24時間にわたりリポフェクトした後における、ポリA+選択mRNAに対して実施した。処置群1つ当たり6連のmRNAを、 $>3,000$ 万リードの平均深度までシーケンシングした。マッピング率を $>90\%$ とするKallistoを使用して、ライブラリーを、GRCh38トランスクリプトームに照らして、シュードアライメントした。このボロカノプロット中の値は、ABXO-HHH処置RNA-seqライブラリーを、非処置細胞と対比して比較するDESeq2を使用して生成した。図2におけるプロット内の各ドットは、遺伝子内で測定された発現の変化を表す。x軸は、全ての遺伝子についての、 $\log_2$ による遺伝子発現の倍数変化(非処置細胞による遺伝子発現で除された、ABXO-HHH処置細胞による遺伝子発現)を表す。y軸は、負の $\log_{10}$ により変換された補正P値を示す。黒矢印は、プロット上のGYS1を指し示す。

40

【実施例6】

50

【0394】

CD71 FN3ドメイン-siRNAコンジュゲートの結合特異性

Integral Molecular (www.integralmolecular.com) が、同社に特許権のあるメンブレンプロテオームアレイ (MPA) アッセイを実施して、CD71 FN3ドメインおよびCD71 FN3ドメイン-siRNAコンジュゲートの特異性を、ヒト膜タンパク質のライブラリーに対してプロファイリングした (図3)。MPAは、全ての1回膜貫通型タンパク質、複数回膜貫通型タンパク質、およびGタンパク質共役受容体 (GPCR) を含む、GPIアンカータンパク質、イオンチャネル、および輸送体のうちの94%に及び、各膜タンパク質が、ニワトリQT6細胞バックグラウンド内で固有に発現された、6000を超えるヒト膜タンパク質を含有した。フローサイトメトリーを使用して、非固定細胞内で、個別に発現された膜タンパク質に結合するFN3ドメインを直接検出した。

10

【0395】

FN3ドメイン、およびFN3ドメイン-siRNAコンジュゲートは、それぞれ、最適のシグナル/バックグラウンドノイズ比を伴う、1.25 µg/mlまたは0.31 µg/mlの濃度で、MPAに対してスクリーニングした。スクリーニングで同定された膜タンパク質標的は、リガンドの系列希釈液を、同定された標的を固有に発現する細胞上で使用して検証した。

【0396】

一般的方法

20

分子生物学における標準的方法については記載されている (Sambrook、Fritsch、およびManiatis (1982および1989、2版; 2001、3版) 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY; SambrookおよびRussell (2001)、「Molecular Cloning」、3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY; Wu (1993)、「Recombinant DNA」、217巻、Academic Press、San Diego、CA)。標準的方法はまた、細菌細胞におけるクローニングおよびDNAの突然変異誘発 (1巻)、哺乳動物細胞および酵母におけるクローニング (2巻)、糖コンジュゲートおよびタンパク質の発現 (3巻)、ならびにバイオインフォマティクス (4巻) について記載する、Ausbelら (2001)、「Current Protocols in Molecular Biology」、1~4巻、John Wiley and Sons, Inc.、New York、NYにおいても見られる。

30

【0397】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、および結晶化を含む、タンパク質精製のための方法について記載されている (Coliganら (2000)、「Current Protocols in Protein Science」、1巻、John Wiley and Sons, Inc.、New York)。タンパク質の化学解析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の作製、グリコシル化について記載されている (例えば、Coliganら (2000)、「Current Protocols in Protein Science」、2巻、John Wiley and Sons, Inc.、New York; Ausubelら (2001)、「Current Protocols in Molecular Biology」、3巻、John Wiley and Sons, Inc.、NY、16.0.5~16.22.17頁; Sigma-Aldrich, Co. (2001)、「Products for Life Science Research」、St. Louis、MO、45~89頁; Amersham Pharmacia Biotech (2001)、「BioDirectory」、Piscataway、N.J.、384~391頁を参照された

40

50

い)。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製、精製、および断片化について記載されている (Coliganら (2001)、「Current Protocols in Immunology」、1巻、John Wiley and Sons, Inc.、New York; Harlowおよび Lane (1999)、「Using Antibodies」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY; Harlowおよび Lane、前出)。リガンド／受容体相互作用を特徴付けるための標準的技法は利用可能である (例えば、Coliganら (2001)、「Current Protocols in Immunology」、4巻、John Wiley, Inc.、New Yorkを参照されたい)。

10

【0398】

本明細書で引用される、全ての参考文献を、各個別の刊行物、データベース登録番号 (例えば、Genbank 配列または Gene ID 登録番号)、特許出願、または特許を、参照によって組み入れることが、具体的に、かつ、個別に指し示された場合と同じ程度に、参照によって組み入れる。参照による組み入れについてのこの言明は、このような引用が、参照による組み入れについての専一的な言明に近接してなされていない場合であってもなお、37 C. F. R. § 1.57 (b) (1) に従い、本出願者らにより、それらの各々が、37 C. F. R. § 1.57 (b) (2) に準拠して、明らかに同定される、各個別の刊行物、データベース登録番号 (例えば、Genbank 配列または Gene ID 登録番号)、特許出願、または特許、およびあらゆる個別のこれらの引用物に関することが意図される。存在する場合、本明細書内における、参照による組み入れについての専一的な言明の組み入れは、いかなる形でも、参照による組み入れについてのこの一般的な言明を無化しない。本明細書における参考文献の引用は、参考文献が、関連する先行技術であることの容認として意図されず、これらの刊行物または文献の内容または刊行年月日についてのいかなる容認も構成しない。

20

【0399】

本実施形態は、本明細書で記載される、具体的実施形態による範囲内に限定されないものとする。実際、当業者には、前出の記載から、本明細書で記載される実施形態に加えた、実施形態の多様な改変が明らかとなろう。このような改変は、付属の特許請求の範囲内に収まることが意図される。

30

【0400】

前出の明細書は、当業者が、実施形態を実施することを可能とするのに十分であると考えられる。当業者には、前出の記載から、本明細書で示され、記載される実施形態に加えた、実施形態の多様な改変が明らかとなり、付属の特許請求の範囲内に収まる。

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/024846

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C07H 21/02; C12N 15/113 (2022.01)

CPC - C07H 21/02; C12N 15/113; C12N 2310/14 (2022.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

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

see Search History document

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

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013/0130377 A1 (LEE et al) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document	1, 2, 19, 20
A	WO 2018/148501 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 16 August 2018 (16.08.2018) entire document	1, 2, 19, 20
A	US 2019/0184028 A1 (JANSSEN BIOTECH INC.) 20 June 2019 (20.06.2019) entire document	1, 2, 19, 20

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2022

Date of mailing of the international search report

SEP 12 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Taina Matos

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/024846

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 10 and 11 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/024846

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-18, 23-47, 54, 56-72, 84-108
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 19, 20

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/024846

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-4, 19-22, 48-53, 55, and 73-83 are drawn to siRNAs comprising a sense strand and antisense strand, and compositions thereof.

The first invention of Group I+ is restricted to an siRNA comprising a sense strand and antisense strand, wherein the sense strand is selected to be SEQ ID NO:10 and the antisense strand is selected to be SEQ ID NO:11. It is believed that claims 1, 2, 19, and 20 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOS: 10 and 11.

Applicant is invited to elect additional siRNA, and their respective, corresponding, SEQ ID NOS to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an siRNA comprising a sense strand and antisense strand, wherein the sense strand is selected to be SEQ ID NO:12 and the antisense strand is selected to be SEQ ID NO:13. Additional antibody siRNA, and their respective, corresponding, SEQ ID NOS will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element, requiring the selection of alternative siRNA where "siRNA comprising a sense strand and antisense strand" and "the sense strand comprises a sequence of SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620, 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662, 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704, 706, 801-860, 821-880, or as set forth in Table 1A, Table 1B, or Table 2" and "the anti-sense strand comprises a sequence of SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 601, 603, 605, 607, 609, 611, 613, 615, 617, 619, 621, 623, 625, 627, 629, 631, 633, 635, 637, 639, 641, 643, 645, 647, 649, 651, 653, 655, 657, 659, 661, 663, 665, 667, 669, 671, 673, 675, 677, 679, 681, 683, 685, 687, 689, 691, 693, 695, 697, 699, 701, 703, 705, 707, 861-920, 981-1042, or as set forth in Table 1A, Table 1B, or Table 2."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a composition comprising an siRNA comprising a sense strand and antisense strand; a composition comprising one or more FN3 domains conjugated to a siRNA comprising a sense strand and an anti-sense strand; a composition having a formula comprising the core structures as shown in instant claims 48, 73, and/or 74, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2013/0130377 A1 to Lee et al. (hereinafter, "Lee") teaches an siRNA comprising a sense strand and antisense strand (Abstract, a novel siRNA structure and the use thereof, and more particularly to a double-stranded siRNA molecule comprising an antisense strand and a sense strand).

Further, US 2019/0184028 A1 to Janssen Biotech, Inc. (hereinafter, "Janssen") teaches a composition comprising one or more FN3 domains conjugated to a siRNA comprising a sense strand and an anti-sense strand (Para. [0024], compositions comprising FN3 domain molecules to cell associated target ligands, that can be used, for example, for delivery of nucleic acid therapeutic payloads or other payloads and methods of producing such FN3 domain molecules. In some embodiments, the active moiety is a nanoparticle containing a nucleic acid molecule and the FN3 domain molecule is attached to the nanoparticle, either directly or indirectly, such as through a covalent bond; Para. [0008], chemically modified single or double stranded oligonucleotide molecules with demonstrated stability in biological fluids may be used for preparing direct conjugates with a targeting domain. Delivery of such conjugates, including siRNA; and a composition having a formula comprising the core structures as shown in instant claims 48, 73, and/or 74 (Para. [0024], compositions comprising FN3 domain molecules to cell associated target ligands, that can be used, for example, for delivery of nucleic acid therapeutic payloads or other payloads and methods of producing such FN3 domain molecules. In some embodiments, the active moiety is a nanoparticle containing a nucleic acid molecule and the FN3 domain molecule is attached to the nanoparticle, either directly or indirectly, such as through a covalent bond; Para. [0008], chemically modified single or double stranded oligonucleotide molecules with demonstrated stability in biological fluids may be used for preparing direct conjugates with a targeting domain. Delivery of such conjugates, including siRNA).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/08 (2006.01)	A 6 1 P 3/08	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
(32)優先日 令和4年3月28日(2022.3.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW O. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
(72)発明者 ラッセル・シー・アディス アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4. フィラデルフィア. スイート 2 0 0. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
(72)発明者 スティーブン・ジー・ナドラー アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4. フィラデルフィア. スイート 2 0 0. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
(72)発明者 ヤオ・シン アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4. フィラデルフィア. スイート 2 0 0. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
(72)発明者 ジャンナ・ドルジナ アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4. フィラデルフィア. スイート 2 0 0. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
(72)発明者 カリン・ティー・オニール アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4. フィラデルフィア. スイート 2 0 0. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
(72)発明者 ロバート・ヴィ・コラコウスキー アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4. フィラデルフィア. スイート 2 0 0. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
(72)発明者 スティーブン・ジェイ・アンダーソン アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 1 0 4. フィラデルフィア. スイート 2 0 0. マーケット・ストリート 3 6 7 5		
F ターム (参考) 4C076 DD63 EE41 EE59 FF31 4C084 AA13 NA14 ZA94 ZB07 ZB26 ZC54 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA94 ZB07 ZB26 ZC54 4H045 AA10 AA30 BA09 BA21 BA62 EA20		