

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-517965
(P2025-517965A)

(43)公表日 令和7年6月12日(2025.6.12)

(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 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 4
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16		4 C 0 8 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全78頁)					
(21)出願番号	特願2024-569102(P2024-569102)	(71)出願人	500203709		
(86)(22)出願日	令和5年5月24日(2023.5.24)		アムジェン インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和6年12月9日(2024.12.9)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/067384		2 0 , サウザンド オークス, ワン ア		
(87)国際公開番号	WO2023/230495		ムジェン センター ドライブ		
(87)国際公開日	令和5年11月30日(2023.11.30)	(74)代理人	100078282		
(31)優先権主張番号	63/345,513		弁理士 山本 秀策		
(32)優先日	令和4年5月25日(2022.5.25)	(74)代理人	100113413		
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 森下 夏樹		
	米国(US)	(74)代理人	100181674		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		弁理士 飯田 貴敏		
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),	(74)代理人	100181641		
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(		弁理士 石川 大輔		
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,	(74)代理人	230113332		
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		弁護士 山本 健策		
	最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 S C A P発現を阻害するためのRNA iコンストラクト及びその使用方法

(57)【要約】
本開示は、S C A P遺伝子の発現を低減するためのs i RNAなどのRNA iコンストラクトに関する。非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）などの肝疾患を治療するか又は予防するためにこのようなRNA iコンストラクトを使用する方法も記載される。ある特定の実施形態では、RNA iコンストラクトは、表1に列挙されるアンチセンス配列と3ヌクレオチド以下だけ異なる少なくとも15個の連続的なヌクレオチドを有する領域を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む RNA i コンストラクトであって、前記アンチセンス鎖が、表 1 に列挙されるアンチセンス配列とは 3 ヌクレオチド以下が異なる少なくとも 15 個の連続したヌクレオチドを有する領域を含み、前記 RNA i コンストラクトが、SREBP 切断活性化タンパク質 (SCAP) mRNA の発現を阻害する、RNA i コンストラクト。

【請求項 2】

前記センス鎖が、約 15 ～約 30 塩基対長の二重鎖領域を形成するために、前記アンチセンス鎖の配列と十分に相補的な配列を含む、請求項 1 に記載の RNA i コンストラクト

10

【請求項 3】

前記二重鎖領域が、約 17 ～約 24 塩基対長である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 4】

前記二重鎖領域が、約 19 ～約 21 塩基対長である、請求項 1 ～3 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 5】

前記二重鎖領域が、19 塩基対長である、請求項 4 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 6】

前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖が、各々約 15 ～約 30 ヌクレオチド長である、請求項 1 ～5 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

20

【請求項 7】

前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖が、各々約 19 ～約 27 ヌクレオチド長である、請求項 6 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 8】

前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖が、各々約 21 ～約 25 ヌクレオチド長である、請求項 7 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 9】

前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖が、各々約 21 ～約 23 ヌクレオチド長である、請求項 8 に記載の RNA i コンストラクト。

30

【請求項 10】

少なくとも 1 つの平滑末端を含む、請求項 1 ～9 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 11】

1 ～4 個の不對ヌクレオチドの少なくとも 1 つのヌクレオチドオーバーハングを含む、請求項 1 ～10 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 12】

前記ヌクレオチドオーバーハングが、2 つの不對ヌクレオチドを有する、請求項 11 に記載の RNA i コンストラクト。

40

【請求項 13】

前記 RNA i コンストラクトが、前記センス鎖の 3' 末端、前記アンチセンス鎖の 3' 末端、又は前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖の両方の 3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを含む、請求項 11 又は 12 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 14】

前記ヌクレオチドオーバーハングが、5' -UU-3' ジヌクレオチド又は 5' -dTdT-3' ジヌクレオチドを含む、請求項 11 ～13 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 15】

前記 RNA i コンストラクトが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1

50

～ 14 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 16】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-修飾ヌクレオチドである、請求項 15 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 17】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、2'-O-アリル修飾ヌクレオチド、二環式核酸 (BNA)、グリコール核酸、逆位ヌクレオチド、又はこれらの組合せである、請求項 15 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 18】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、又はこれらの組合せである、請求項 17 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 19】

前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖内の前記ヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである、請求項 15～18 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 20】

前記修飾ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、又はそれらの組合せである、請求項 19 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 21】

少なくとも 1 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 22】

前記 RNA i コンストラクトが、前記アンチセンス鎖の 3' 末端に 2 つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 21 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 23】

前記 RNA i コンストラクトが、前記アンチセンス鎖の 3' 末端及び 5' 末端の両方に 2 つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、且つ前記センス鎖の 5' 末端に 2 つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項 21 に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 24】

前記アンチセンス鎖が、表 1 に列挙されるアンチセンス配列から選択される配列を含む、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 25】

前記センス鎖が、表 1 に列挙されるセンス配列から選択される配列を含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 26】

前記 RNA i コンストラクトが、表 1 に列挙される二重鎖化合物のいずれか 1 つである、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 27】

低分子干渉 RNA (siRNA) である、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 28】

前記 RNA i コンストラクトが、対照 RNA i コンストラクトとインキュベートされた肝臓細胞における SCAP 発現レベルと比較して、前記 RNA i コンストラクトとのインキュベーション後の肝臓細胞における前記 SCAP の発現レベルを低減する、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 29】

前記肝臓細胞が、Hep3B 細胞又は HepG2 細胞である、請求項 28 に記載の RNA i

10

20

30

40

50

A i コンストラクト。

【請求項 30】

前記 RNA i コンストラクトが、インビトロの Hep 3 B 細胞において、5 nM で SCAP 発現の少なくとも 40 % を阻害する、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 31】

前記 RNA i コンストラクトが、インビトロの Hep G 2 細胞において、5 nM で SCAP 発現の少なくとも 40 % を阻害する、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 32】

前記 RNA i コンストラクトが、Hep 3 B 細胞における SCAP 発現を約 5 nM 未満の IC50 で阻害する、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 33】

前記 RNA i コンストラクトが、Hep G 2 細胞における SCAP 発現を約 5 nM 未満の IC50 で阻害する、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 34】

肝臓細胞の表面上に発現される 1 つ以上のタンパク質に結合するリガンドを更に含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト及び薬学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤を含む、組成物。

【請求項 36】

SCAP の発現の低減を必要とする患者において、SCAP の発現を低減するための方法であって、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクトを前記患者に投与することを含む、方法。

【請求項 37】

SCAP の発現の低減を必要とする患者において、SCAP の発現を低減するための方法であって、請求項 35 に記載の組成物を前記患者に投与することを含む、方法。

【請求項 38】

肝細胞における SCAP の発現レベルが、前記 RNA i コンストラクトを受容していない患者の SCAP 発現レベルと比較して、前記 RNA i コンストラクトの投与後に前記患者において低減される、請求項 36 又は請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記患者が、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）に罹患している、請求項 36 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記患者が、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に罹患している、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

NAFLD の治療における使用のための、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト又は請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 42】

NAFLD を治療するための医薬品の調製のための、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の RNA i コンストラクト又は請求項 35 に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、SREBP 切断活性化タンパク質（SCAP）の肝臓の発現を調整するため

10

20

30

40

50

の組成物及び方法に関する。特に、本開示は、RNA干渉を介してSCAP発現を低減するための核酸に基づく治療薬及びそのような核酸に基づく治療薬を使用して、肝疾患、例えば、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）を治療するか又は予防する方法に関する。

【0002】

電子的に提出された資料の参照による組み込み

本明細書には、本明細書と同時に提出された、以下のとおり識別されるヌクレオチド／アミノ酸配列表が全体として参照により組み込まれる：2023年5月19日に作成された「A-2911-W001-SEC.xml」という名称の550キロバイトの1つのXML文書。

10

【0003】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2022年5月25日出願の米国仮特許出願第63／345,513号明細書の利益を主張する。

【背景技術】

【0004】

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、様々な肝臓病理を含む世界で最も一般的な慢性肝疾患であり、その有病率は過去20年間で倍増し、現在では世界人口のおよそ20%が罹患していると推定される（Sattar et al. (2014) BMJ 349: g4596; Loomba and Sanyal (2013) Nature Reviews Gastroenterology & hepatology 10 (11): 686-690; Kim and Kim (2017) Clin Gastroenterol Hepatol 15 (4): 474-485; Petta et al. (2016) Dig Liver Dis 48 (3): 333-342）。NAFLDは、肝臓中におけるトリグリセリドの蓄積から始まり、1) 著しい飲酒歴がなく、且つ2) 他の種類の肝疾患の診断が除外されている個体において、5%超の肝細胞に細胞質脂質小滴が存在することによって定義される（Zhu et al (2016) World J Gastroenterol 22 (36): 8226-33; Rinella (2015) JAMA 313 (22): 2263-73; Yki-Jarvinen (2016) Diabetologia 59 (6): 1104-11）。一部の個体では、脂肪症と呼ばれる肝臓への異所性脂肪の蓄積により、炎症及び肝細胞損傷が誘発され、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）と呼ばれるより進行した段階の疾患が引き起こされる（Rinella、前掲）。2015年の時点で、7500万～1億人のアメリカ人がNAFLDを患っていると予測されており、NASHは、NAFLD診断のおよそ10～30%を占める（Rinella、前掲; Younossi et al (2016) Hepatology 64 (5): 1577-1586）。

20

30

【0005】

NAFLDの発病のための重要なトリガーのうちの1つは、TG及び脂肪酸の蓄積の増加をもたらす肝臓におけるトリグリセリド（TG）恒常性の喪失である。時間が経つにつれて、脂肪毒性は、肝細胞の適応的及び再生的応答を使い果たし、炎症、自然免疫系の活性化、及び脂肪肝炎を付与する。進行性のNASHは、肝臓内のコラーゲン蓄積及び線維症を引き起こす。線維症のグレードが悪化するにつれて、NASH患者の10%～29%の肝臓が肝硬変になり、最終的には肝細胞癌に至る。

40

【0006】

ステロール応答要素結合タンパク質（SREBP）ファミリーは、肝臓内での新規の脂質生成及びTG蓄積の調節において、重要な役割を果たす。SREBPは、小胞体（ER）内で不活性前駆体として合成される。SREBP切断活性化タンパク質（SCAP）は、SREBPファミリーの転写因子の唯一知られている調節因子である。合成後直ちに、SCAPは、SREBPとの複合体を形成して、ゴルジ小胞へのSREBPをエスコートする。ここで、SREBPは更にプロセッシングされて、転写因子の活性アミノ末端を放出

50

する。活性SREBPが核に転座して、SREBP応答要素に結合して、標的遺伝子の転写活性化を駆動する。したがって、SCAP機能の阻害が活性SREBPのプロセッシングを防止し、肝臓における脂質生成及びTG蓄積を低減することができる。

現在、NAFLD症状は薬理的治療が承認されていないので、減量及び任意の二次的
症状の治療によって管理されている。したがって、罹患した個体においてNAFLDを治
療する組成物及び方法が必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Sattar et al. (2014) BMJ 349:g4596

10

【非特許文献2】Loomba and Sanyal (2013) Nature Reviews Gastroenterology & hepatology 10(11):686-690

【非特許文献3】Kim and Kim (2017) Clin Gastroenterol Hepatol 15(4):474-485

【非特許文献4】Petta et al. (2016) Dig Liver Dis 48(3):333-342

【非特許文献5】Zhu et al (2016) World J Gastroenterol 22(36):8226-33

【非特許文献6】Rinella (2015) JAMA 313(22):2263-73

20

【非特許文献7】Yki-Jarvinen (2016) Diabetologia 59(6):1104-11

【非特許文献8】Younossi et al (2016) Hepatology 64(5):1577-1586

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含むRNAiコンストラクトを提供し、このRNAiコンストラクトは、SREBP切断活性化タンパク質(SCAP)のmRNAの発現を阻害する。ある特定の実施形態では、RNAiコンストラクトは、表1に列挙されるアンチセンス配列と3ヌクレオチド以下だけ異なる少なくとも15個の連続的なヌクレオチドを有する領域を含む。

30

【0009】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるRNAiコンストラクトのセンス鎖は、アンチセンス鎖の配列に十分に相補的な配列を含み、約15～約30塩基対長の二重鎖領域を形成する。これら及び他の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖はそれぞれ、約15～30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、RNAiコンストラクトは、少なくとも1つの平滑末端を含む。他の実施形態では、RNAiコンストラクトは、少なくとも1つのヌクレオチドオーバーハングを含む。そのようなヌクレオチドオーバーハングは、少なくとも1～6個の不對ヌクレオチドを含んでもよく、且つセンス鎖の3'末端、アンチセンス鎖の3'末端、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方の3'末端に位置し得る。ある特定の実施形態では、RNAiコンストラクトは、センス鎖の3'末端及びアンチセンス鎖の3'末端に2個の不對ヌクレオチドのオーバーハングを含む。他の実施形態では、RNAiコンストラクトは、アンチセンス鎖の3'末端に2個の不對ヌクレオチドのオーバーハングを含み、且つセンス鎖の3'末端／アンチセンス鎖の5'末端に平滑末端を含む。

40

【0010】

本開示のRNAiコンストラクトは、リボース環、核酸塩基、又はホスホジエステル骨格に対する修飾を有するヌクレオチドを含む、1つ以上の修飾ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、RNAiコンストラクトのリボース環に対する修飾は、1つ以

50

上の 2' - 修飾を含む。そのような 2' - 修飾は、2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、2' - オーメチル修飾ヌクレオチド、2' - オーメトキシエチル修飾ヌクレオチド、2' - オーアリル修飾ヌクレオチド、又は二環性核酸 (BNA) を含むことができる。リボース環に対する修飾は、グリコール核酸 (GNA) の組み込みを含んでもよく、ここではリボース環がプロピレングリコールで置き換えられている。特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、1つ以上の 2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、2' - オーメチル修飾ヌクレオチド、又はこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトのセンス鎖及びアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。本開示の RNA i コンストラクトには、例えばセンス鎖の 3' 末端、5' 末端、又は 3' 末端及び 5' 末端の両方において、末端ヌクレオチドとして脱塩基ヌクレオチドを組み込み得る。10
そのような実施形態では、脱塩基ヌクレオチドは逆位であり得、例えば 3' - 3' ヌクレオチド間結合又は 5' - 5' ヌクレオチド間結合を介して、隣接するヌクレオチドに結合され得る。

【0011】

いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトは、修飾ヌクレオチド間結合又はヌクレオチド間結合などの少なくとも1つの骨格修飾を含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の RNA i コンストラクトは、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。特定の実施形態では、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、10
センス鎖及び／又はアンチセンス鎖の 3' 末端又は 5' 末端に配置されてもよい。

【0012】

本開示はまた、前述の RNA i コンストラクト及び薬学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤を含む組成物、並びにそれを必要とする患者において SCAP の発現を低減する方法であって、前述の RNA i コンストラクト又は組成物を患者に投与することを含む方法を提供する。20

【0013】

本開示はまた、NAFLD 又は NASH の治療のためなどの SCAP の発現の低減において使用するための RNA i コンストラクトも含む。また、NAFLD を治療するための医薬品の調製のための、SCAP 発現を阻害する RNA i コンストラクトの使用も提供される。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本開示は、SREBP 切断活性化タンパク質 (SCAP) 遺伝子を標的化し、且つ肝臓細胞における SCAP の発現を低減する RNA i コンストラクトの設計及び生成に部分的に基づく。SCAP 発現の阻害は、例えば、単純性脂肪肝 (脂肪症)、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬変 (肝臓の不可逆的な進行した瘢痕)、又は SCAP 媒介性高脂血症若しくは高トリグリセリド血症を含む SCAP 発現に関連する状態を治療又は予防するために有用である。30

【0015】

本開示は、SCAP をコードする遺伝子の発現を調節するための組成物及び方法を提供する。いくつかの実施形態では、この遺伝子は、細胞又は哺乳動物 (例えば、ヒト) などの対象内に存在し得る。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、SCAP mRNA を標的化し、且つ細胞又は哺乳動物における SCAP 発現を低減する RNA i コンストラクトを含む。そのような RNA i コンストラクトは、例えば、単純性脂肪肝 (脂肪症)、40
、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬変 (肝臓の不可逆的な進行した瘢痕)、又は SCAP 媒介性高脂血症若しくは高トリグリセリド血症などの様々な形態の肝臓関連疾患を治療又は予防するために有用である (例えば、Lee et al., Experimental & Molecular Medicine, 52: 724-729 (2020) を参照されたい)。

【0016】

上述したように、SCAP (SREBP 切断活性化タンパク質) は、SREBP を小胞 50

体内のそれらの合成部位からゴルジ体内の切断部位まで輸送するステロール調節エスコートタンパク質であり、ゴルジ体内で、それらは細胞質NH₂末端転写因子ドメインを放出する2つのプロテアーゼによって順次切断される。細胞培養実験は、SCAPを欠如する変異体細胞が、低レベルのSREBP前駆体を有することを実証しており、これは明らかに、SCAPの非存在下で、これらのタンパク質が不安定であるためである。加えて、SCAP欠損CHO細胞は、コレステロールを合成することができず、それらは増殖のために、コレステロールの外部供給源を必要とする(Rawson et al., J Biol Chem., 274:28549-28556 (1999))。SCAPは、コレステロールセンサーとしても機能し、これはSCAPの複数回膜貫通ドメインによって媒介される。このステロール感知モチーフにおける点突然変異は、SREBP切断のステロール抑制を防止し、コレステロールの制御不能な過剰産生をもたらす。

10

【0017】

脂質合成の制御は肝臓において特に重要であり、肝臓はそれ自体で使用するのではなく、リポタンパク質として血漿中に転送するためにも脂質を合成する。血漿リポタンパク質コレステロールのレベルは、スタチンの処置によって低下される。加えて、血漿インスリンが上昇すると、肥満症及び非インスリン依存性真性糖尿病において生じる可能性があるなど、肝脂肪酸合成が上昇する。肝臓では、トランスジェニックマウスにおけるSREBP-1aの可溶性転写活性化ドメインの過剰発現は、巨大な脂肪肝をもたらす。ステロール抵抗性変異体SCAPを過剰発現するトランスジェニックマウスは、コレステロールを過剰産生し、コレステロールを摂取すると、正常なフィードバック阻害を示さない肝臓を生じさせ、SCAPが肝臓で調節的な役割を果たしていることを示唆している。肝臓の条件付きSCAP欠損を有するマウスは、肝臓におけるコレステロール及び脂肪酸合成の基礎比率の低減を示し、これは主に、複数の生合成酵素をコードするmRNAの減少のためである(Matsuda et al., Genes & Development 15:1206-121 (2001))。加えて、NASH/NAFLD患者は、SREBP1c及びその標的遺伝子の発現及び転写活性の増大を示す。まとめると、これらのデータは、SCAP及びSREBPが肝脂質合成にとって必要であるという証拠をインビボで提供する。

20

【0018】

RNA干渉(RNAi)は、細胞内に外来のRNAを導入して、標的とするタンパク質をコードするmRNAの特異的な分解をもたらし、その結果としてタンパク質の発現を低減するプロセスである。RNAi技術及び肝臓への送達の両方の進歩、並びに他のRNAiに基づく療法により増大する良好なアウトカムは、SCAPなどの肝臓における脂質合成を調節する遺伝子を直接的に標的化することにより、NAFLDを治療的に処置するための説得力のある手段であることを示唆している。

30

【0019】

本明細書で使用する場合、「RNAiコンストラクト」という用語は、細胞中に導入された際にRNA干渉機構を介して標的遺伝子(例えば、SCAP)の発現を下方制御することができるRNA分子を含む薬剤を指す。RNA干渉は、核酸分子が、例えば、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)経路を介して、配列特異的に標的RNA分子(例えば、メッセンジャーRNA又はmRNA分子)の切断及び分解を誘導するプロセスである。いくつかの実施形態では、RNAiコンストラクトは、ハイブリダイズして二重鎖領域を形成するのに十分に互いに相補的な、連続したヌクレオチドの2本の逆平行鎖を含む二本鎖RNA(dsRNA)分子を含む。二本鎖RNAiコンストラクトは、RNAi「トリガー」と呼ばれることもある。「ハイブリダイズする」又は「ハイブリダイゼーション」という用語は、典型的には2つのポリヌクレオチドにおける相補的な塩基間の水素結合(例えば、ワトソン-クリック、フーグスティーン又は逆フーグスティーン水素結合)を介した、相補的なポリヌクレオチドの対形成を指す。標的配列(例えば、標的mRNA)と実質的に相補的な配列を有する領域を含む鎖は、「アンチセンス鎖」と称されている。「センス鎖」は、アンチセンス鎖のある領域に対して実質的に相補的な領域を含む鎖を

40

50

指す。いくつかの実施形態では、センス鎖は、標的配列と実質的に同一の配列を有する領域を含み得る。

【0020】

ある特定の実施形態では、二本鎖RNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖は、ハイブリダイズして二重鎖領域を形成するが、そうでなければ分離している別々の2つの分子であり得る。2つの別々の鎖から形成されるそのような二本鎖RNA分子は、「低分子干渉RNA」又は「短干渉RNA」(siRNA)と称される。siRNAは、典型的には約20〜27個の塩基対であり、RNAiの中心である非コード二本鎖RNA分子のクラスである。したがって、いくつかの実施形態では、本開示のRNAiコンストラクトは、siRNAを含む。他の実施形態では、RNAiコンストラクトは、マイクロRNA(「miRNA」又は「成熟miRNA」としても知られる)であり得る。miRNAは、植物、動物及びいくつかのウイルスに存在する小さい(およそ18〜24個のヌクレオチドの長さ)非コードRNA分子である。miRNAはsiRNAに似ているが、miRNAは内因性前駆体ヘアピンRNA構造に由来する。miRNAは、標的mRNAの相補的領域への塩基対形成及びRISC経路を介した標的RNAの切断を導くことによって遺伝子発現を調節する。

10

【0021】

いくつかの実施形態では、本開示は、SCAPに向けられるRNAiコンストラクトを提供する。いくつかの実施形態では、RNAiコンストラクトは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含むsiRNAであり、アンチセンス鎖は、SCAPのmRNA配列に相補的である領域を含む。RNAiアンチセンス鎖の領域は、SCAPのmRNA配列の任意の好適な領域と相補的であり得る。例えば、アンチセンス鎖は、SCAPのmRNA配列のコード領域又は3'非翻訳領域(UTR)と相補的である領域を含み得る。

20

【0022】

二本鎖RNAi分子は、リボヌクレオチドのリボース糖、塩基、又は本明細書に記載されるもの若しくは当該技術分野で知られているものなどの骨格構成要素への修飾を含む、リボヌクレオチドへの化学修飾を含み得る。二本鎖RNA分子(例えば、siRNA、shRNAなど)で使用されるような任意のそのような修飾は、本開示の目的のための用語「二本鎖RNA」によって包含される。

【0023】

本明細書で使用する場合、生理的条件などのある特定の条件下において、第1の配列を含むポリヌクレオチドが、第2の配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズして二重鎖領域を形成することができる場合、第1の配列は第2の配列に「相補的」である。他のそのような条件として、当業者に知られている中程度の、又はストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が挙げられ得る。第1の配列は、第1の配列を含むポリヌクレオチドが、第2の配列を含むポリヌクレオチドと、一方又は双方のヌクレオチド配列の全長にわたって、いかなるミスマッチもなく塩基対形成するならば、第2の配列に対して完全に相補的(100%相補的)であるとみなされる。配列は、標的配列に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%相補的であるならば、標的配列と「実質的に相補的」である。相補性パーセントは、第2の配列又は標的配列内の対応する位置の塩基に対して相補的な、第1の配列内の塩基の数を、第1の配列の全長で割ることによって算出することができる。また、2つの配列がハイブリダイズする場合に、30塩基対の二重鎖領域の全体にわたって5、4、3、2、又は1つ以下のミスマッチが存在するならば、一方の配列が、もう一方の配列に対して実質的に相補的であると言われてもよい。一般に、本明細書で定義されるとおりの任意のヌクレオチドオーバーハングが存在する場合、このようなオーバーハングの配列は、2つの配列間の相補性の程度の決定において考慮されない。例として、ハイブリダイズして各鎖の3'末端に2ヌクレオチドオーバーハングを有する19塩基対二重鎖領域を形成する、21ヌクレオチド長のセンス鎖及び21ヌクレオチド長のアンチセンス鎖は、この用語が本明細書に使用される場合、完全に相補的であるとみなされることになる。

30

40

50

【0024】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の領域は、標的RNA配列（例えば、SCAP mRNA）の領域と完全に相補的な配列を含む。そのような実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の配列と完全に相補的な配列を含み得る。他のそのような実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖の配列に対して実質的に相補的な配列、例えばセンス鎖及びアンチセンス鎖によって形成される二重鎖領域内に1、2、3、4、又は5つのミスマッチを有する配列を含み得る。ある特定の実施形態では、任意のミスマッチが、末端領域内（例えば、鎖の5'及び／又は3'末端の6、5、4、3、2又は1つのヌクレオチド以内）に生じることが好ましい。一実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖から形成される二重鎖領域内の任意のミスマッチが、望ましくはアンチセンス鎖の5'末端の6、5、4、3、2、又は1つのヌクレオチド以内に生じる。

10

【0025】

dsRNAの2本の実質的に相補的な鎖が別個のRNA分子によって構成される場合、それらの分子は、共有結合される必要はないが、共有結合することは可能である。2本の鎖が、二重鎖構造を形成する一方の鎖の3'末端と他方の鎖の5'末端との間で、ヌクレオチドの中断されていない鎖以外の手段によって共有結合されている場合、その結合構造は「リンカー」と称される。RNA鎖は、同じ又は異なる数のヌクレオチドを有してもよい。二重鎖内の塩基対の最大数は、dsRNAの最短の鎖のヌクレオチドから、二重鎖内に存在するあらゆるオーバーハングを差し引いた数である。二重鎖構造に加えて、RNAiは、1つ以上のヌクレオチドオーバーハングを含んでもよい。

20

【0026】

他の実施形態では、ハイブリダイズして二重鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖は、単一RNA分子の一部であってもよく、すなわち、センス鎖及びアンチセンス鎖は、単一RNA分子の自己相補的領域の一部である。そのような場合、単一RNA分子は、二重鎖領域（ステム領域とも称される）及びループ領域を含む。センス鎖の3'末端は、不對ヌクレオチドの隣接配列によってアンチセンス鎖の5'末端に連結されて、ループ領域を形成することになる。ループ領域は、典型的には、アンチセンス鎖がセンス鎖と塩基対を形成して二重鎖又はステム領域を形成し得るように、RNA分子それ自体が再度折り畳まれることが可能なほど十分に長い。ループ領域は、約3～約25個、約5～約15個、又は約8～約12個の不對ヌクレオチドを含み得る。本明細書で述べるように、少なくとも部分的に自己相補的な領域を有するそのようなRNA分子は、「短ヘアピンRNA」（shRNA）と称される。いくつかの実施形態では、ループ領域は、少なくとも1、2、3、4、5、10、20、又は25個の不對ヌクレオチドを含み得る。他の実施形態では、ループ領域は、10、9、8、7、6、5、4、3、2個、又はそれ以下の不對ヌクレオチドを含み得る。ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるRANiコンストラクトは、shRNAを含む。単一の少なくとも部分的に自己相補的なRNA分子の長さは、約35ヌクレオチド～約100ヌクレオチド、約45ヌクレオチド～約85ヌクレオチド、又は約50～約60ヌクレオチドであってもよく、本明細書に列挙される長さをそれぞれ有する二重鎖領域及びループ領域を含んでもよい。

30

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるRANiコンストラクトは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、SCAPメッセンジャーRNA（mRNA）配列と実質的に、又は完全に相補的な配列を有する領域を含む。本明細書で使用する場合、「SCAP mRNA配列」は、あらゆる種（例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、ヒト）に由来するSCAPタンパク質のバリエーション又はアイソフォームが挙げられるSCAPタンパク質をコードする、スプライスバリエーションを含むあらゆるメッセンジャーRNA配列を指す。SCAPは、当該技術分野においてSREBFシャペロンとしても知られている。

40

【0028】

また、SCAP mRNA配列は、その相補的DNA（cDNA）配列として発現され

50

る転写物配列を含む。cDNA配列は、RNA塩基（例えば、グアニン、アデニン、ウラシル及びシトシン）ではなく、DNA塩基（例えば、グアニン、アデニン、チミン及びシトシン）として表されるmRNA転写産物の配列を指す。ゆえに、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトのアンチセンス鎖は、標的のSCAP mRNA配列又はSCAP cDNA配列と実質的に、又は完全に相補的な配列を有する領域を含み得る。SCAP mRNA又はcDNA配列は、NCBI参照配列NM_001320044.2又はNM_012235.4に由来し得るものなどの任意のSCAP mRNA又はcDNA配列を含み得るが、これらに限定されない。

【0029】

アンチセンス鎖の領域は、SCAP mRNA配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドと実質的に、又は完全に相補的であり得る。いくつかの実施形態では、相補性の領域をアンチセンス鎖が含むSCAP mRNA配列の標的領域は、約15～約30個の連続したヌクレオチド、約16～約28個の連続したヌクレオチド、約18～約26個の連続したヌクレオチド、約17～約24個の連続したヌクレオチド、約19～約25個の連続したヌクレオチド、約19～約23個（例えば、19、20、21、22、又は23個）の連続したヌクレオチド、又は約19～約21個の連続したヌクレオチドに及んでよい。ある特定の実施形態では、SCAP mRNA配列と実質的に又は完全に相補的な配列を含むアンチセンス鎖の領域は、いくつかの実施形態において、表1に列挙されるアンチセンス配列からの少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態では、センス配列及び／又はアンチセンス配列は、表1に列挙される配列からの、1、2又は3つ以下のヌクレオチドミスマッチを有する少なくとも15個の連続したヌクレオチド（例えば、少なくとも16、17、又は18個の連続したヌクレオチド）を含む。

【0030】

RNAiコンストラクトのセンス鎖は、通常、2本の鎖が生理的条件下でハイブリダイズして二重鎖領域を形成するようにアンチセンス鎖の配列と十分に相補的な配列を含む。「二重鎖領域」は、ワトソン-クリック塩基対形成又は他の水素結合相互作用のいずれかによって互いに塩基対を形成して、2つのポリヌクレオチド間で二重鎖を作出する2つの相補的又は実質的に相補的なポリヌクレオチド内の領域を指す。RNAiコンストラクトの二重鎖領域は、例えば、ダイサー酵素及び／又はRISC複合体が結合することにより（後述）、RNAiコンストラクトがRNA干渉経路に入ることを可能にする十分な長さのものであるべきである。例えば、いくつかの実施形態では、二重鎖領域は、約15～約30塩基対長である。この範囲内における二重鎖領域の他の長さ、例えば約15～約28塩基対、約15～約26塩基対、約15～約24塩基対、約15～約22塩基対、約17～約28塩基対、約17～約26塩基対、約17～約24塩基対、約17～約23塩基対、約17～約21塩基対、約19～約25塩基対、約19～約23塩基対、又は約19～約21塩基対も好適である。一実施形態では、二重鎖領域は、約17～約24塩基対長である。別の実施形態では、二重鎖領域は、約19～約21塩基対長である。例えば、二重鎖領域は、約19塩基対長であってもよい。

【0031】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトは、標的RNA配列、例えば、SCAP標的mRNA配列と相互作用して、標的RNAの切断を導く約17～約24個のヌクレオチドの二重鎖領域を含有する。理論に束縛されるものではないが、細胞に導入された長い二本鎖RNAは、ダイサーとして知られるIII型エンドヌクレアーゼによってsiRNAに分解され得る（Sharp et al., (2001) Genes Dev. 15:485）。ダイサーであるリボヌクレアーゼIII様酵素は、dsRNAを、特徴的な2塩基の3'オーバーハングを有する19～23塩基対の短い干渉RNAにプロセッシングする（Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363）。次いで、siRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）に組み込まれるが、1つ以上のヘリカーゼがsiRNA二重鎖を巻き戻して、

相補的なアンチセンス鎖が標的認識を誘導することを可能にする (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。適切な標的 mRNA に結合すると直ぐに、RISC 内の 1 つ以上のエンドヌクレアーゼが標的を切断してサイレンシングを誘導する (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。

【0032】

センス鎖及びアンチセンス鎖が 2 つの別々の分子である (例えば、siRNA RNA i コンストラクト) 実施形態について、センス鎖及びアンチセンス鎖は、二重鎖領域の長さと同じ長さである必要はない。例えば、一方又は両方の鎖は、二重鎖領域より長くてもよく、二重鎖領域に隣接している 1 個以上の不對ヌクレオチド又はミスマッチを有してもよい。したがって、いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトは、少なくとも 1 つのヌクレオチドオーバーハングを含む。本明細書で使用する場合、「ヌクレオチドオーバーハング」は、鎖の末端における不對ヌクレオチド又は二重鎖領域を越えて延在するヌクレオチドを指す。ヌクレオチドオーバーハングは、典型的には、一方の鎖の 3' 末端が他方の鎖の 5' 末端を越えて延在するか、又は一方の鎖の 5' 末端が他方の鎖の 3' 末端を越えて延在する場合に生成される。ヌクレオチドオーバーハングの長さは、一般に、1～6 個のヌクレオチド、1～5 個のヌクレオチド、1～4 個のヌクレオチド、1～3 個のヌクレオチド、2～6 個のヌクレオチド、2～5 個のヌクレオチド、又は 2～4 個のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドオーバーハングは、1、2、3、4、5、又は 6 個のヌクレオチドを含む。特定の一実施形態では、ヌクレオチドオーバーハングは、1～4 個のヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオチドオーバーハングは、2 個のヌクレオチドを含む。オーバーハングにおけるヌクレオチドは、本明細書に記載されるとおりのリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又は修飾ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、5'-ウリジン-ウリジン-3' (5'-UU-3') ジヌクレオチドを含む。そのような実施形態では、UU ジヌクレオチドは、リボヌクレオチド又は修飾ヌクレオチド、例えば 2'-修飾ヌクレオチドを含んでもよい。他の実施形態では、オーバーハングは、5'-デオキシチミジン-デオキシチミジン-3' (5'-dTdT-3') ジヌクレオチドを含む。

【0033】

ヌクレオチドオーバーハングは、一方又は両方の鎖の 5' 末端又は 3' 末端に存在してもよい。例えば、一実施形態では、RNA i コンストラクトは、アンチセンス鎖の 5' 末端及び 3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを含む。別の実施形態では、RNA i コンストラクトは、センス鎖の 5' 末端及び 3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトは、センス鎖の 5' 末端及びアンチセンス鎖の 5' 末端にヌクレオチドオーバーハングを含む。他の実施形態では、RNA i コンストラクトは、センス鎖の 3' 末端及びアンチセンス鎖の 3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを含む。

【0034】

RNA i コンストラクトは、二本鎖 RNA 分子の一方の末端に単一のヌクレオチドオーバーハングを含み、且つ他の末端に平滑末端を含み得る。「平滑末端」は、センス鎖及びアンチセンス鎖が分子の末端で完全に塩基対を形成しており、二重鎖領域を越えて延在する不對ヌクレオチドがないことを意味する。いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトは、センス鎖の 3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを含み、且つセンス鎖の 5' 末端及びアンチセンス鎖の 3' 末端に平滑末端を含む。他の実施形態では、RNA i コンストラクトは、アンチセンス鎖の 3' 末端にヌクレオチドオーバーハングを含み、且つアンチセンス鎖の 5' 末端及びセンス鎖の 3' 末端に平滑末端を含む。ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、二本鎖 RNA 分子の両末端で平滑末端を含む。そのような実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は同じ長さを有し、二重鎖領域は、センス鎖及びアンチセンス鎖と同じ長さである (すなわち、分子は、その全長にわたって二本鎖である)。

10

20

30

40

50

【0035】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ独立して、任意の好適な長さ、例えば約15～約30ヌクレオチド長、約18～約28ヌクレオチド長、約19～約27ヌクレオチド長、約19～約25ヌクレオチド長、約19～約23ヌクレオチド長、約21～約25ヌクレオチド長、又は約21～約23ヌクレオチド長であり得る。ある特定の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖はそれぞれ、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、又は約25ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、RNAiコンストラクトが2つのヌクレオチドオーバーハングを有するように、センス鎖及びアンチセンス鎖は、同じ長さであるが、これらの鎖よりも短い二重鎖領域を形成する。例えば、一実施形態では、RNAiコンストラクトは、(i)それぞれ21個ヌクレオチド長であるセンス鎖及びアンチセンス鎖、(ii)19塩基対長である二重鎖領域、並びに(iii)センス鎖の3'末端及びアンチセンス鎖の3'末端の両方にある2個の不對ヌクレオチドのヌクレオチドオーバーハングを含む。別の実施形態では、RNAiコンストラクトは、(i)それぞれ23ヌクレオチド長であるセンス鎖及びアンチセンス鎖、(ii)21塩基対長である二重鎖領域、並びに(iii)センス鎖の3'末端及びアンチセンス鎖の3'末端の両方にある2個の不對ヌクレオチドのヌクレオチドオーバーハングを含む。他の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、同じ長さを有し、それらの全長にわたって、二本鎖分子のいずれの末端にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないように二重鎖領域を形成する。このような一実施形態では、RNAiコンストラクトは平滑末端であり、(i)それぞれ21ヌクレオチド長のセンス鎖及びアンチセンス鎖、並びに(ii)21塩基対長の二重鎖領域を含む。別の実施形態では、RNAiコンストラクトは、平滑末端であり、(i)それぞれ23ヌクレオチド長であるセンス鎖及びアンチセンス鎖、並びに(ii)23塩基対長である二重鎖領域を含む。

【0036】

他の実施形態では、RNAiコンストラクトが少なくとも1つのヌクレオチドオーバーハングを含むように、センス鎖又はアンチセンス鎖がもう一方の鎖よりも長く、この2本の鎖は、短い方の鎖の長さに等しい長さを有する二重鎖領域を形成する。例えば、一実施形態では、RNAiコンストラクトは、(i)19ヌクレオチド長であるセンス鎖、(ii)21ヌクレオチド長であるアンチセンス鎖、(iii)19塩基対長の二重鎖領域、及び(iv)アンチセンス鎖の3'末端にある2個の不對ヌクレオチドの単一ヌクレオチドオーバーハングを含む。別の実施形態では、RNAiコンストラクトは、(i)21ヌクレオチド長であるセンス鎖、(ii)23ヌクレオチド長であるアンチセンス鎖、(iii)21塩基対長の二重鎖領域、及び(iv)アンチセンス鎖の3'末端にある2個の不對ヌクレオチドの単一ヌクレオチドオーバーハングを含む。

【0037】

本明細書に開示されるRNAiコンストラクトのアンチセンス鎖は、表1に列挙されるアンチセンス配列のいずれか1つの配列又はこれらのアンチセンス配列のいずれかのヌクレオチド1～18、2～18、1～19、2～19、1～21、若しくは2～21の配列を含み得る。表1に列挙されるアンチセンス配列の各々は、2ヌクレオチドオーバーハング配列に加えて、SCAP mRNA配列と相補的な16～19個の連続したヌクレオチドの配列を含む。したがって、いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号148～294又は配列番号442～588のいずれか1つのヌクレオチド1～18、2～18、1～19、2～19、1～21、若しくは2～21の配列を含む。同様に、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトのセンス鎖は、表1に列挙されるセンス配列のいずれか1つの配列又はこれらのセンス配列のいずれかのヌクレオチド1～18、2～18、1～19、2～19、1～21、若しくは2～21の配列を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号1～147又は配列番号295～441のいずれか1つのヌクレオチド1～18、2～18、1～19、2～19、1～21、若しくは2～21の配列を含む。

【0038】

修飾ヌクレオチド

表 1 に列挙するものなどの本明細書に開示される RNA i コンストラクトは、1 つ以上の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。「修飾ヌクレオチド」は、ヌクレオシド、核酸塩基、ペントース環、又はホスフェート基への 1 つ以上の化学修飾を有するヌクレオチドを指す。本明細書で使用する場合、修飾ヌクレオチドは、アデノシンーリン酸、グアノシンーリン酸、ウリジンーリン酸、及びシチジンーリン酸を含有するリボヌクレオチド、並びにデオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシチミジンーリン酸、及びデオキシシチジンーリン酸を含有するデオキシリボヌクレオチドを包含しない。しかしながら、RNA i コンストラクトは、修飾ヌクレオチド、リボヌクレオチド、及びデオキシリボヌクレオチドの組合せを含み得る。二本鎖 RNA 分子の一方又は両方の鎖への修飾ヌクレオチドの組み込みは、例えば、ヌクレアーゼ及び他の分解プロセスに対する分子の感受性を低下させることにより、RNA 分子のインビボ安定性を改善させることができる。修飾ヌクレオチドの組み込みにより、標的遺伝子の発現を低下させるための RNA i コンストラクトの効力を増強させることもできる。

10

【0039】

ある特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、リボース糖の修飾を有する。これらの糖の修飾には、ペントース環の 2' 及び／又は 5' 位での修飾並びに二環式糖修飾が含まれ得る。2' - 修飾ヌクレオチドは、H 又は OH 以外の置換基を 2' 位に有するペントース環を有するヌクレオチドを指す。そのような 2' 修飾としては、2' - O - アルキル（例えば、O - C₁ ~ C₁₀ 又は O - C₁ ~ C₁₀ 置換アルキル）、2' - O - アリル（O - C₆H₅ 又は O - C₆H₄ - CH₃）、2' - C - アリル、2' - フルオロ、2' - O - メチル（O - CH₃）、2' - O - メトキシエチル（O - (CH₂)₂ - OCH₃）、2' - OCF₃、2' - O(CH₂)₂SCH₃、2' - O - アミノアルキル、2' - アミノ（例えば、NH₂）、2' - O - エチルアミン、及び 2' - アジドが挙げられるが、これらに限定されない。ペントース環の 5' 位での修飾としては、5' - メチル（R 又は S）、5' - ビニル、及び 5' - メトキシが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0040】

「二環式糖修飾」は、環の 2 個の原子を架橋により連結して第 2 の環を形成して二環式糖構造を生じさせる、ペントース環の修飾を指す。いくつかの実施形態では、二環式糖修飾は、ペントース環の 4' 炭素と 2' 炭素との間の架橋を含む。二環式糖修飾を有する糖部分を含むヌクレオチドは、本明細書中で「二環式核酸」、「架橋核酸」、又は「BNA」と称される。「ロックド核酸」(LNA) は、リボース環が 2' - 炭素及び 4' - 炭素を連結するメチレン架橋によってロックされている 2' , 4' - 二環式核酸 (2' , 4' - BNA) である。例示的な二環式糖修飾としては、α-L-メチレンオキシ (4' - CH₂ - O - 2') 二環式核酸 (BNA) ; β-D-メチレンオキシ (4' - CH₂ - O - 2') BNA (LNA) ; エチレンオキシ (4' - (CH₂)₂ - O - 2') BNA ; アミノオキシ (4' - CH₂ - O - N(R) - 2') BNA ; オキシアミノ (4' - CH₂ - N(R) - O - 2') BNA ; メチル (メチレンオキシ) (4' - CH(CH₃) - O - 2') BNA (拘束エチル又は cEt と称される) ; メチレン-チオ (4' - CH₂ - S - 2') BNA ; メチレン-アミノ (4' - CH₂ - N(R) - 2') BNA ; メチル炭素環式 (4' - CH(CH₃) - 2') BNA ; プロピレン炭素環式 (4' - (CH₂)₃ - 2') BNA ; 及びメトキシ (エチレンオキシ) (4' - CH(CH₂OMe) - O - 2') BNA (拘束 MOE 又は cMOE と称される) が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示される RNA i コンストラクトに組み込むことができるこれら及び他の糖修飾ヌクレオチドは、例えば、米国特許第 9, 181, 551 号明細書、米国特許出願公開第 2016/0122761 号明細書、及び Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, 19:937-954 (2012) に記載されている。

30

40

【0041】

いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトは、1 つ以上の 2' - フルオロ修飾

50

ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、2'-O-アリル修飾ヌクレオチド、二環式核酸（BNA）、又はこれらの組合せを含む。ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、1つ以上の2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、又はこれらの組合せを含む。特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、1つ以上の2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、又はこれらの組合せを含む。

【0042】

RNA i コンストラクトのセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方は、1つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の修飾ヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、センス鎖内の全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の修飾ヌクレオチドを含む。他の実施形態では、アンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。ある特定の他の実施形態では、センス鎖の全てのヌクレオチド及びアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。これら及び他の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、又はこれらの組合せであり得る。

【0043】

ある特定の実施形態では、本発明のRNA i コンストラクトの鎖の一方又は両方に組み込まれる修飾ヌクレオチドは、核酸塩基（本明細書では「塩基」とも称される）の修飾を有する。「修飾核酸塩基」又は「修飾塩基」は、天然に存在するプリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）以外の塩基を指す。修飾核酸塩基は、合成であっても天然に存在する修飾であってよく、ユニバーサル塩基、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン（X）、ヒポキサントシン（I）、2-アミノアデニン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、並びにアデニン及びグアニンの他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、並びに2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシン、6-アゾウラシル、シトシン、及びチミン、5-ウラシル（シュドウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、並びに他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル、並びに他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、並びに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

いくつかの実施形態では、修飾塩基はユニバーサル塩基である。「ユニバーサル塩基」は、結果として生じる二重鎖領域の二重らせん構造を変えないことなく、RNA及びDNA内の天然の塩基の全てと無差別に塩基対を形成する塩基類似体を指す。ユニバーサル塩基は、当業者に知られており、これとして、イノシン、C-フェニル、C-ナフチル、及び他の芳香族誘導体、アゾールカルボキサミド、並びに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、及び6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

本発明のRNA i コンストラクトに組み込むことができる他の好適な修飾塩基としては、Herdewijn, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., Vol. 10: 297-310, 2000、及びPeacock et al., J. Org. Chem., Vol. 76: 7295-7300, 2011に記載されているものが挙げられ、これらの両方は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

グアニン、シトシン、アデニン、チミン、及びウラシルを、そのような置換核酸塩基を有するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドの塩基対形成特性を実質的に変えることなく、上記で説明されている修飾核酸塩基などの他の核酸塩基に置き換え得ることを、当業者は十分に認識している。

【0046】

いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトのセンス鎖及びアンチセンス鎖は、1つ以上の脱塩基ヌクレオチドを含み得る。「脱塩基ヌクレオチド」又は「脱塩基ヌクレオシド」は、リボース糖の1'位に核酸塩基を欠くヌクレオチド又はヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、脱塩基ヌクレオチドは、RNA i コンストラクトのセンス鎖及び／又はアンチセンス鎖の末端に組み込まれている。一実施形態では、センス鎖は、その3'末端、その5'末端、又はその3'末端及び5'末端の両方にて、末端ヌクレオチドとして脱塩基ヌクレオチドを含む。別の実施形態では、アンチセンス鎖は、その3'末端、その5'末端、又はその3'末端及び5'末端の両方にて、末端ヌクレオチドとして脱塩基ヌクレオチドを含む。脱塩基ヌクレオチドが末端ヌクレオチドであるそのような実施形態では、ヌクレオチドは、逆位ヌクレオチドであってよく、すなわち、天然の3'-5'ヌクレオチド間結合ではなく、3'-3'ヌクレオチド間結合を介して（鎖の3'末端上にある場合）、又は5'-5'ヌクレオチド間結合を介して（鎖の5'末端上にある場合）、隣接するヌクレオチドと結合され得る。また、脱塩基ヌクレオチドは、糖修飾、例えば上記に記載された糖修飾のいずれかを含み得る。ある特定の実施形態では、脱塩基ヌクレオチドは、2'-フルオロ修飾、2'-O-メチル修飾、又は2'-H（デオキシ）修飾などの2'-修飾を含む。一実施形態では、脱塩基ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾を含む。別の実施形態では、脱塩基ヌクレオチドは、2'-H修飾を含む（すなわち、デオキシ脱塩基ヌクレオチド）。

【0047】

いくつかの実施形態では、センス鎖及び／又はアンチセンス鎖において、アデノシンヌクレオチドの前にある全てのピリミジンヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。例えば、いずれかの鎖で配列5'-CA-3'又は5'-UA-3'が現れる場合、シチジン及びウリジンヌクレオチドは修飾ヌクレオチドであり、好ましくは2'-O-メチル修飾ヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、センス鎖内の全てのピリミジンヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド（例えば、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド）であり、アンチセンス鎖内に存在する全ての配列5'-CA-3'又は5'-UA-3'の5'ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド（例えば、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド）である。他の実施形態では、二重鎖領域内の全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである。そのような実施形態では、修飾ヌクレオチドは、好ましくは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド又はこれらの組合せである。

【0048】

RNA i コンストラクトがヌクレオチドオーバーハングを含む実施形態では、オーバーハング内のヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又は修飾ヌクレオチドであり得る。一実施形態では、オーバーハング内のヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、例えば、デオキシチミジンである。別の実施形態では、オーバーハング内のヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドである。例えば、いくつかの実施形態では、オーバーハング内のヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-メトキシエチル修飾ヌクレオチド、又はこれらの組合せである。

【0049】

本開示のRNA i コンストラクトはまた、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合を含み得る。本明細書で使用する場合、「修飾ヌクレオチド間結合」という用語は、天然の3'-5'ホスホジエステル結合以外のヌクレオチド間の結合を指す。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、アルキルホスホネート（例えば、メチルホスホネート、3'-アルキレンホスホネート）、ホスフィネート、ホスホロアミデート（例えば、3'-アミノホスホロアミデート及

10

20

30

40

50

びアミノアルキルホスホロアミデート)、ホスホロチオエート ($P=S$)、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル及びボラノホスフェートなどのリン含有ヌクレオチド間結合である。一実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、2' - 5' ホスホジエステル結合である。他の実施形態では、修飾ヌクレオチド間結合は、リン非含有ヌクレオチド間結合であるため、修飾ヌクレオシド間結合と称され得る。そのようなリン非含有結合として、モルホリノ結合 (一部はヌクレオシドの糖部分から形成される) ; シロキサン結合 ($-O-Si(H)_2-O-$) ; スルフィド、スルホキシド、及びスルホン結合 ; ホルムアセチル及びチオホルムアセチル結合 ; アルケン含有骨格 ; スルファメート骨格 ; メチレンメチルイミノ ($-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$) 及びメチレンヒドラジノ結合 ; スルホネート及びスルホンアミド結合 ; アミド結合 ; 並びに N、O、S、及び CH_2 構成要素部分が混合された他のものが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、修飾ヌクレオシド間結合は、米国特許第 5, 539, 082 号明細書 ; 同第 5, 714, 331 号明細書 ; 及び同第 5, 719, 262 号明細書に記載されているものなどのペプチド核酸又は PNA を作り出すためのペプチドに基づく結合 (例えば、アミノエチルグリシン) である。開示される RNA i コンストラクトに使用され得る他の好適な修飾されたヌクレオチド間及びヌクレオシド間結合は、米国特許第 6, 693, 187 号明細書及び同第 9, 181, 551 号明細書、米国特許出願公開第 2016/0122761 号明細書、並びに Deleavey and Damha、前掲に記載されている。

10

20

ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、1つ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、RNA i コンストラクトのセンス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖に存在し得る。例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8 個以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。他の実施形態では、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8 個以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。更に他の実施形態では、両方の鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8 個以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。RNA i コンストラクトは、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の 3' 末端、5' 末端又は 3' 末端及び 5' 末端の両方に 1つ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み得る。例えば、ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の 3' 末端に、約 1 ~ 約 6 個以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6 個以上) の連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。他の実施形態では、RNA i コンストラクトは、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の 5' 末端に約 1 ~ 約 6 個以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6 個以上) の連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。一実施形態では、RNA i コンストラクトは、センス鎖の 3' 末端に単一のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、且つアンチセンス鎖の 3' 末端に単一のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。別の実施形態では、RNA i コンストラクトは、アンチセンス鎖の 3' 末端に 2つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合 (すなわち、アンチセンス鎖の 3' 末端における第 1 及び第 2 のヌクレオチド間結合でのホスホロチオエートヌクレオチド間結合) を含む。別の実施形態では、RNA i コンストラクトは、アンチセンス鎖の 3' 末端及び 5' 末端の両方に 2つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。更に別の実施形態では、RNA i コンストラクトは、アンチセンス鎖の 3' 末端及び 5' 末端の両方に 2つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、且つセンス鎖の 5' 末端に 2つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。更に別の実施形態では、RNA i コンストラクトは、アンチセンス鎖の 3' 末端及び 5' 末端の両方に 2つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、且つセンス鎖の 3' 末端及び 5' 末端の両方に 2つの連続したホスホロチオエートヌクレオチド間結合を (すなわちアンチセンス鎖の 5' 末端及び 3' 末端の両方において、第 1 及び第 2 のヌクレオチド間結合でのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、且つセンス鎖の 5' 末端及び 3' 末端

30

40

50

の両方において、第1及び第2のヌクレオチド間結合でのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。一方又は両方の鎖が1つ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む実施形態のいずれかでは、鎖内の残りのヌクレオチド間結合は、天然の3'-5', ホスホジエステル結合であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチド間結合は、ホスホジエステル及びホスホロチオエートから選択され、少なくとも1つのヌクレオチド間結合はホスホロチオエートである。

【0051】

RNA i コンストラクトがヌクレオチドオーバーハングを含む実施形態では、オーバーハング内の不對ヌクレオチドの2つ以上が、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合によって連結され得る。ある特定の実施形態では、アンチセンス鎖及び／又はセンス鎖の3'末端のヌクレオチドオーバーハングにおける全ての不對ヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合によって連結されている。他の実施形態では、アンチセンス鎖及び／又はセンス鎖の5'末端のヌクレオチドオーバーハングにおける全ての不對ヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合によって連結されている。更に他の実施形態では、あらゆるヌクレオチドオーバーハング内の全ての不對ヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合によって連結されている。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、開示されるRNA i コンストラクトのセンス鎖、アンチセンス鎖、又はアンチセンス鎖及びセンス鎖の両方の5'末端は、ホスフェート部分を含む。本明細書で使用する場合、「ホスフェート部分」という用語は、未修飾ホスフェート（ O-P=O ）（OH）OH）並びに修飾ホスフェートを含む末端ホスフェート基を指す。修飾ホスフェートは、O及びOH基の1つ以上がH、O、S、N（R）又はアルキルで置換されており、RがH、アミノ保護基又は非置換若しくは置換アルキルであるホスフェートを含む。例示的なホスフェート部分としては、5'-リン酸；5'-ニリン酸；5'-三リン酸；5'-グアノシンキャップ（7-メチル化若しくは非メチル化）；5'-アデノシンキャップ又は任意の他の修飾若しくは未修飾ヌクレオチドキャップ構造；5'-モノチオホスフェート（ホスホロチオエート）；5'-モノジチオホスフェート（ホスホロジチオエート）；5'- α -チオ三リン酸；5'- γ -チオ三リン酸；5'-ホスホロアミデート；5'-ビニルホスフェート；5'-アルキルホスホネート（ここで、「アルキル」はメチル、エチル、イソプロピル、プロピルなどであり得る）；及び5'-アルキルエーテルホスホネート（ここで、「アルキルエーテル」はメトキシメチル、エトキシメチルなどであり得る）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0053】

本明細書に開示されるRNA i コンストラクトに組み込むことができる修飾ヌクレオチドは、本明細書に記載される2つ以上の化学修飾を有し得る。例えば、修飾ヌクレオチドは、リボース糖の修飾並びに核酸塩基の修飾を有し得る。例として、修飾ヌクレオチドは、2'糖修飾（例えば、2'-フルオロ又は2'-O-メチル）を含んでもよく、修飾塩基（例えば、5-メチルシトシン又はシュドウラシル）を含んでもよい。他の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、5'ホスフェートへの修飾と組み合わせられた糖修飾を含んでもよく、これにより、修飾ヌクレオチドがポリヌクレオチドに組み込まれたときに、修飾されたヌクレオチド間又はヌクレオシド間結合を生成することになる。例えば、いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、糖修飾、例えば2'-フルオロ修飾、2'-O-メチル修飾又は二環式糖修飾、並びに5'ホスホロチオエート基を含み得る。したがって、いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトの一方又は両方の鎖は、2'修飾ヌクレオチド又はBNA及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合の組合せを含む。ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトのセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方は、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合の組合せを含む。修飾ヌクレオチド及びヌクレオチド間結合を含む例示的なRNA i コンストラクトを表1及び2に示す。

40

【0054】

50

RNA i コンストラクトの機能

本明細書に開示されるRNA i コンストラクトは、望ましくは、細胞、特に肝臓細胞におけるSCAPの発現を低減又は阻害する。したがって、一実施形態では、本開示は、細胞を本明細書に記載の任意のRNA i コンストラクトと接触させることにより、細胞内でのSCAP発現を低減する方法を提供する。細胞は、インビトロ又はインビボであってよい。SCAP発現は、SCAP mRNA、SCAPタンパク質、又はSCAP発現と関連する別のバイオマーカーの量又はレベルを測定することによって評価することができる。本明細書に開示されるRNA i コンストラクトで処置された細胞又は動物におけるSCAP発現の低減は、RNA i コンストラクトで処置されていないか又は対照RNA i コンストラクトで処置された細胞又は動物におけるSCAP発現と比較して判定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、SCAP発現の低減は、(a) 本明細書に開示されるRNA i コンストラクトで処置された肝臓細胞におけるSCAP mRNAの量又はレベルを測定することと、(b) 対照RNA i コンストラクト（例えば、肝臓細胞において発現されないRNA分子に向けられるRNA i コンストラクト、又はナンセンス配列若しくはスクランブル配列を有するRNA i コンストラクト）で、又はコンストラクトなしで処置された肝臓細胞におけるSCAP mRNAの量又はレベルを測定することと、(c) (a) において処置された細胞由来の測定されたSCAP mRNAレベルを、(b) における対照細胞由来の測定されたSCAP mRNAレベルと比較することによって評価される。処置された細胞及び対照細胞におけるSCAP mRNAレベルは、比較前に、対照遺伝子（例えば、18SリボソームRNA）について、RNAレベルに関して正規化されてもよい。SCAP mRNAレベルは、ノーザンブロット分析、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）、逆転写酵素（RT）-PCR、リアルタイムRT-PCR、及び定量PCRなどが挙げられる種々の方法によって測定することができる。

【0055】

他の実施形態では、SCAP発現の低減は、(a) 本明細書に開示されるRNA i コンストラクトで処置された肝臓細胞におけるSCAPタンパク質の量又はレベルを測定することと、(b) 対照RNA i コンストラクト（例えば、肝臓細胞において発現されないRNA分子に向けられるRNA i コンストラクト、又はナンセンス配列若しくはスクランブル配列を有するRNA i コンストラクト）で、又はコンストラクトなしで処置された肝臓細胞におけるSCAPタンパク質の量又はレベルを測定することと、(c) (a) において処置された細胞由来の測定されたSCAPのタンパク質レベルを、(b) における対照細胞由来の測定されたSCAPタンパク質レベルと比較することによって評価される。SCAPタンパク質レベルは、ウェスタンブロット、イムノアッセイ（例えば、ELISA）及びフローサイトメトリーが挙げられるが、これらに限定されない当業者に知られる任意の好適な方法を使用して測定することができる。SCAPのmRNA又はタンパク質を測定する任意の好適な方法を使用して、本明細書に開示されるRNA i コンストラクトの有効性を評価することができる。

【0056】

いくつかの実施形態では、SCAP発現レベルを評価するための方法は、SCAPを自然に発現する細胞（例えば、肝臓細胞）又はSCAPを発現するように操作された細胞においてインビトロで実施される。ある特定の実施形態では、方法は、肝臓細胞においてインビトロで実施される。好適な肝臓細胞としては、初代肝細胞（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、又は齧歯類の肝細胞）、HepAD38細胞、HuH-6細胞、HuH-7細胞、HuH-5-2細胞、BNLCL2細胞、Hep3B細胞、又はHepG2細胞が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、肝臓細胞は、Hep3B細胞である。別の実施形態では、肝臓細胞は、HepG2細胞である。

【0057】

他の実施形態では、SCAP発現レベルを評価する方法は、インビボで実施される。例えば、RNA i コンストラクト及び任意の対照RNA i コンストラクトを動物（例えば、

齧歯類又は非ヒト霊長類)に投与することができ、処置後の動物から採取した肝臓組織でSCAPのmRNA又はタンパク質レベルが評価され得る。代わりに、又は加えて、SCAP発現と関連するバイオマーカー又は機能表現型を、処理した動物において評価することができる。

【0058】

ある特定の実施形態では、SCAPの発現は、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトによって、肝臓細胞において少なくとも40%、少なくとも45%、又は少なくとも50%だけ低減される。いくつかの実施形態では、SCAPの発現は、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトにより、肝臓細胞において少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、又は少なくとも85%だけ低減される。他の実施形態では、SCAPの発現は、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトにより、肝臓細胞において約90%以上、例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上だけ低減される。SCAPの発現のパーセントの低減は、本明細書中に記載される方法のいずれか又は当該技術分野で知られている他の方法によって測定することができる。例えば、ある特定の実施形態では、RNAiコンストラクトは、インビトロでHep3B細胞(野生型SCAPを含有する)において5nMでSCAP発現の少なくとも40%を阻害する。関連する実施形態では、RNAiコンストラクトは、インビトロでHep3B細胞において、5nMでSCAP発現の少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、又は少なくとも75%を阻害する。他の実施形態では、RNAiコンストラクトは、インビトロでHep3B細胞において、5nMでSCAP発現の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、又は少なくとも98%を阻害する。ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトは、インビトロでHepG2細胞において、5nMでSCAP発現の少なくとも40%を阻害する。関連する実施形態では、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトは、インビトロでHepG2細胞において、5nMでSCAP発現の少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、又は少なくとも75%を阻害する。他の実施形態では、RNAiコンストラクトは、インビトロでHepG2細胞において、5nMでSCAP発現の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、又は少なくとも98%を阻害する。ある特定の実施形態では、RNAiコンストラクトは、インビトロでヒトSCAPを発現するCHOトランスフェクトされた細胞中で、5nMにてSCAP発現の少なくとも40%を阻害する。関連する実施形態では、RNAiコンストラクトは、インビトロでヒトSCAPを発現するCHOトランスフェクトされた細胞中で、5nMにてSCAP発現の少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、又は少なくとも75%を阻害する。他の実施形態では、RNAiコンストラクトは、インビトロでヒトSCAPを発現するCHOトランスフェクトされた細胞中で、5nMにてSCAP発現の少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、又は少なくとも98%を阻害する。SCAPの低減は、例えば、RNA FISH又はドロップレットデジタルPCRを含む様々な技術を使用して測定することができる(例えば、Kamitaki et al., Digital PCR. Methods in Molecular Biology, 1768: 401-422 (2018). doi: 10.1007/978-1-4939-7778-9_23を参照されたい)。

【0059】

いくつかの実施形態では、IC₅₀値を計算して、肝臓細胞におけるSCAP発現の阻害に対する本明細書に開示されるRNAiコンストラクトの効力を評価する。「IC₅₀値」は、生物学的又は生化学的機能の50%阻害を達成するのに要求される用量/濃度で

10

20

30

40

50

ある。他の実施形態では、RNA i コンストラクトの効力は、生物学的又は生化学的機能の50%活性化を達成するのに要求される用量／濃度である「AC₅₀」値を計算することによって評価され得る。任意の物質又はアンタゴニストのIC₅₀値又はAC₅₀値は、任意のアッセイにおいて用量反応曲線を構築し、発現レベル又は機能活性に及ぼす種々の濃度の物質又はアンタゴニストの効果を試験することによって決定することができる。最大の生物学的応答又は本来の発現レベルの半分を阻害するのに必要な濃度を決定することにより、所与のアンタゴニスト又は物質のIC₅₀値を計算することができる。したがって、イムノアッセイ、RNA FISHアッセイ、又はドロップレットデジタルPCRアッセイなどの任意のアッセイにおいて、肝臓細胞における本来のSCAPの発現レベル（例えば、対照肝臓細胞におけるSCAPの発現レベル）の半分を阻害するのに必要とされるRNA i コンストラクトの濃度を決定することにより、任意のRNA i コンストラクトについてIC₅₀値を計算することができる。同様に、最大の生物学的応答又は本来の発現レベルの半分を活性化するのに必要な濃度を決定することにより、所与の物質のAC₅₀値を計算することができる。本明細書に開示されるRNA i コンストラクトは、約20 nM未満（例えば、約15 nM、10 nM、5 nM、又は1 nM未満）のIC₅₀で肝臓細胞（例えばHep 3 B細胞）におけるSCAP発現を阻害し得る。例えば、開示されるRNA i コンストラクトは、約0.001 nM～約20 nM、約0.001 nM～約10 nM、約0.001 nM～約5 nM、約0.001 nM～約1 nM、約0.1 nM～約10 nM、約0.1 nM～約5 nM、又は約0.1 nM～約1 nMのIC₅₀で肝臓細胞におけるSCAP発現を阻害し得る。ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、約1 nM～約10 nM（例えば、約5 nM）のIC₅₀で肝臓細胞（例えば、Hep 3 B細胞）におけるSCAP発現を阻害する。本明細書に開示されるRNA i コンストラクトは、約20 nM未満のIC₅₀で肝臓細胞（例えば、Hep G 2細胞）におけるSCAP発現を阻害し得る。例えば、RNA i コンストラクトは、約0.001 nM～約20 nM、約0.001 nM～約10 nM、約0.001 nM～約5 nM、約0.001 nM～約1 nM、約0.1 nM～約10 nM、約0.1 nM～約5 nM、又は約0.1 nM～約1 nMのIC₅₀で肝臓細胞におけるSCAP発現を阻害し得る。ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、約1 nM～約10 nM（例えば、約5 nM）のIC₅₀で肝臓細胞（例えば、Hep G 2細胞）におけるSCAP発現を阻害する。本明細書に開示されるRNA i コンストラクトは、約20 nM未満のIC₅₀で、ヒトSCAPを発現する細胞（例えば、CHOでトランスフェクトされた細胞）におけるSCAP発現を阻害し得る。例えば、RNA i コンストラクトは、約0.001 nM～約20 nM、約0.001 nM～約10 nM、約0.001 nM～約5 nM、約0.001 nM～約1 nM、約0.1 nM～約10 nM、約0.1 nM～約5 nM、又は約0.1 nM～約1 nMのIC₅₀でSCAP発現細胞におけるSCAP発現を阻害する。ある特定の実施形態では、RNA i コンストラクトは、約1 nM～約10 nM（例えば、約5 nM）のIC₅₀で、SCAP発現細胞におけるSCAP発現を阻害する。

10

20

30

40

50

【0060】

本明細書に開示されるRNA i コンストラクトは、例えば、従来の核酸固相合成などの当該技術分野で知られる技術を使用して、容易に作製することができる。RNA i コンストラクトのポリヌクレオチドは、標準的なヌクレオチド又はヌクレオシド前駆体（例えば、ホスホロアミダイト）を利用して、好適な核酸合成装置で構築することができる。自動核酸合成装置が、いくつかのベンダーによって市販されており、Applied Biosystems（Foster City, CA）のDNA／RNA合成装置、BioAutomation（Irving, TX）のMerMade合成装置、及びGE Healthcare Life Sciences（Pittsburgh, PA）のOligoPilot合成装置が挙げられる。

【0061】

リボヌクレオシドの5'位で酸解離性ジメトキシトリチル（DMT）と共に2'シリル保護基を使用して、ホスホロアミダイト化学を介してオリゴヌクレオチドを合成することが

できる。最終脱保護条件は、RNA産物を著しく分解しないことが知られている。全ての合成は、任意の自動又は手動合成装置により、大規模、中規模、又は小規模で行うことができる。また、合成は、複数のウェルプレート、カラム、又はスライドガラスにおいて実行され得る。

【0062】

2'-O-シリル基は、フッ化物イオンに曝露することによって除去することができ、フッ化物イオンは、フッ化物イオンの任意の供給源、例えば無機対イオンと対になるフッ化物イオンを含有する塩、例えばフッ化セシウム及びフッ化カリウム又は有機対イオンと対になるフッ化物イオンを含有する塩、例えばフッ化テトラアルキルアンモニウムを含むことができる。クラウンエーテル触媒が、脱保護反応において無機フッ化物と組み合わせて利用され得る。例示的なフッ化物イオン供給源としては、フッ化テトラブチルアンモニウム又はアミノヒドロフルオライド（例えば、双極性非プロトン溶媒、例えばジメチルホルムアミド中でトリエチルアミンと水性HFとを組み合わせる）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0063】

亜リン酸トリエステル及びホスホトリエステルに用いられる保護基の選択により、フッ化物に対するトリエステルの安定性を改変することができる。ホスホトリエステル又は亜リン酸トリエステルのメチル保護は、フッ化物イオンに対する結合を安定化し、プロセス収率を向上させることができる。

【0064】

リボヌクレオシドは、反応性の2'-ヒドロキシル置換基を有するため、RNAにおける反応性の2'位を、5'-O-ジメトキシトリチル保護基に対して直交性である保護基、例えば酸処理に対して安定であるもので保護することが望ましい場合がある。シリル保護基が、この条件を満たしており、最終的なフッ化物脱保護工程において容易に除去され得、これにより、RNA分解を最小減に抑えることが可能となる。

20

【0065】

標準的なホスホロアミダイトカップリング反応では、テトラゾール触媒を使用し得る。例示的な触媒は、例えば、テトラゾール、S-エチル-テトラゾール、ベンジルチオテトラゾール、及びp-ニトロフェニルテトラゾールを含む。

【0066】

本明細書に記載されるRNA iコンストラクトを合成する更なる方法は、当業者に明らかであろう。加えて、様々な合成工程を代替の順番又は順序で実施して、所望の化合物を得てもよい。本明細書に記載のRNA iコンストラクトの合成において有用な他の合成化学転換、保護基（例えば、塩基に存在するヒドロキシル、アミノなどのための）及び保護基の手法（保護及び脱保護）は、当該技術分野で知られており、例えばR. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1994); 及びL. Paquette, ed., Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons (1995)、並びにそれらの後続版に記載されるものが挙げられる。RNA iコンストラクトのカスタム合成も、Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO)、Axo Labs GmbH (Kulmbach, Germany) 及びAmbion, Inc. (Foster City, CA) を含むいくつかの商業的ベンダーから入手可能である。

30

40

【0067】

本明細書に開示されるRNA iコンストラクトは、リガンドを含み得る。本明細書で使

50

用する場合、「リガンド」は、別の化合物又は分子と直接的又は間接的に相互作用することができる任意の化合物又は分子を指す。別の化合物又は分子とリガンドとの相互作用は、生物学的応答を誘発し得るか（例えば、シグナル伝達カスケードを惹起する、受容体媒介性のエンドサイトーシスを誘導する）、又はまさに物理的会合であり得る。リガンドは、結合する二本鎖RNA分子の1つ以上の特性、例えばRNA分子の薬力学、薬物動態、結合、吸収、細胞分布、細胞内取り込み、電荷及び／又はクリアランス特性を修飾することができる。

【0068】

リガンドは、血清タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、低密度リポタンパク質、グロブリン）、コレステロール部分、ビタミン（例えば、ビオチン、ビタミンE、ビタミンB12）、葉酸部分、ステロイド、胆汁酸（例えば、コール酸）、脂肪酸（例えば、パルミチン酸、ミリスチン酸）、炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン若しくはヒアルロン酸）、グリコシド、リン脂質又は抗体若しくはその結合断片（例えば、肝臓細胞などの特定の細胞型に対するRNAiコンストラクトを標的化する全抗体若しくは結合断片）を含み得る。リガンドの他の例としては、染料、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、プソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（例えば、TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、多環芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性分子（例えば、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビスO（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル又はフェノキサジン）、ペプチド（例えば、アンテナペディアペプチド、Tatペプチド、RGDペプチド）、アルキル化剤、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、例えば、PEG-40K）、ポリアミノ酸、及びポリアミン（例えば、スペルミン、スペルミジン）が挙げられる。

【0069】

ある特定の実施形態では、リガンドは、エンドソーム不安定化特性を有する。エンドソーム不安定化リガンドは、エンドソームの溶解及び／又はRNAiコンストラクト若しくはその構成要素のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する。エンドソーム不安定化リガンドは、pH依存性膜活性及び膜融合性を示すポリカチオンペプチド又はペプチド模倣体であり得る。一実施形態では、エンドソーム不安定化リガンドは、エンドソームのpHでその活性型立体構造をとる。「活性型」立体構造は、エンドソーム不安定化リガンドが、エンドソームの溶解及び／又はRNAiコンストラクト若しくはその構成要素のエンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する立体構造である。例示的なエンドソーム不安定化リガンドとしては、GALAペプチド（Subbarao et al., Biochemistry, Vol. 26: 2964-2972, 1987）、EALAペプチド（Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., Vol. 118: 1581-1586, 1996）及びそれらの誘導體（Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, Vol. 1559: 56-68, 2002）が挙げられる。一実施形態では、エンドソーム不安定化構成要素は、pHの変化に応答して電荷又はプロトン化に変化を起こすことになる化学基（例えば、アミノ酸）を含有し得る。エンドソーム不安定化構成要素は、直鎖状又は分枝状であり得る。

【0070】

いくつかの実施形態では、リガンドは、脂質又は他の疎水性分子を含む。一実施形態では、リガンドは、コレステロール部分又は他のステロイドを含む。コレステロールコンジュゲート型オリゴヌクレオチドは、その非コンジュゲート型対応物よりも活性であると報告されている（Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Development, Vol. 12: 103-228, 2002）。核酸分子へのコンジュゲーションのためのコレステロール部分及び他の脂質を含むリガンドは

、米国特許第 7, 851, 615 号明細書；同第 7, 745, 608 号明細書；及び同第 7, 833, 992 号明細書にも記載されている。別の実施形態では、リガンドは、葉酸部分を含み得る。葉酸部分にコンジュゲートしているポリヌクレオチドは、受容体依存性エンドサイトーシス経路を介して細胞に取り込まれ得る。そのような葉酸-ポリヌクレオチドコンジュゲートは、例えば、米国特許第 8, 188, 247 号明細書に記載されている。

【0071】

SCAP が肝臓細胞（例えば、肝細胞）において発現されることを考慮すると、ある特定の実施形態では、肝臓細胞に RNAi コンストラクトを特異的に送達することが望ましい。いくつかの実施形態では、RNAi コンストラクトは、肝臓細胞の表面に発現されるタンパク質と結合又は相互作用するリガンドを採用することにより、肝臓に特異的に標的化され得る。例えば、ある特定の実施形態では、リガンドは、肝細胞上で発現される受容体に特異的に結合する 1 つ以上の抗原結合タンパク質（例えば、抗体又はその結合断片（例えば、Fab、scFv））を含んでもよい。

10

【0072】

ある特定の実施形態では、リガンドは、炭水化物を含む。「炭水化物」は、酸素、窒素、又は硫黄原子が各炭素原子に結合されている少なくとも 6 つの炭素原子を有する 1 つ以上の単糖単位（直鎖状、分枝状、又は環状であり得る）で構成される化合物を指す。炭水化物として、糖（例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、及び約 4、5、6、7、8、又は 9 つの単糖単位を含有するオリゴ糖）、並びに多糖、例えば、デンプン、グリコーゲン、セルロース、及び多糖ガムが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リガンドに組み込まれる炭水化物は、ペントース、ヘキソース又はヘプトースから選択される単糖並びにそのような単糖単位を含む二糖及び三糖である。他の実施形態では、リガンドに組み込まれている炭水化物は、アミノ糖であり、例えば、ガラクトサミン、グルコサミン、N-アセチルガラクトサミン及び N-アセチルグルコサミンである。

20

【0073】

いくつかの実施形態では、リガンドは、ヘキソース又はヘキソサミンを含む。ヘキソースは、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、又はフルクトースから選択され得る。ヘキソサミンは、フルクトサミン、ガラクトサミン、グルコサミン、又はマンノサミンから選択され得る。ある特定の実施形態では、リガンドは、グルコース、ガラクトース、ガラクトサミン、又はグルコサミンを含む。一実施形態では、リガンドは、グルコース、グルコサミン、又は N-アセチルグルコサミンを含む。別の実施形態では、リガンドは、ガラクトース、ガラクトサミン、又は N-アセチル-ガラクトサミンを含む。特定の実施形態では、リガンドは、N-アセチル-ガラクトサミンを含む。グルコース、ガラクトース及び N-アセチル-ガラクトサミン (GalNAc) を含むリガンドは、化合物を肝臓細胞に標的化するのに特に有効である（例えば、D' Souza and Dev arajan, J. Control Release, Vol. 203: 126-139, 2015 を参照されたい）。本明細書に開示される RNAi コンストラクトに組み込むことができる GalNAc 又はガラクトース含有リガンドの例は、米国特許第 7, 491, 805 号明細書；同第 8, 106, 022 号明細書；及び同第 8, 877, 917 号明細書；米国特許出願公開第 2003/0130186 号明細書；並びに国際公開第 2013/166155 号パンフレットに記載されている。

30

40

【0074】

ある特定の実施形態では、リガンドは、多価炭水化物部分を含む。本明細書で使用する場合、「多価炭水化物部分」は、独立して他の分子と結合又は相互作用することができる 2 つ以上の炭水化物単位を含む部分を指す。例えば、多価炭水化物部分は、2 つ以上の異なる分子、又は同じ分子上の 2 つ以上の異なる部位に結合することができる、炭水化物で構成される 2 つ以上の結合ドメインを含む。炭水化物部分の価数は、炭水化物部分内の個々の結合ドメインの数を示す。例えば、炭水化物部分に関する「一価」、「二価」、「三価」、及び「四価」という用語は、それぞれ、1、2、3 及び 4 つの結合ドメインを有す

50

る炭水化物部分を指す。多価炭水化物部分は、多価ラクトース部分、多価ガラクトース部分、多価グルコース部分、多価N-アセチル-ガラクトサミン部分、多価N-アセチル-グルコサミン部分、多価マンノース部分、又は多価フコース部分を含み得る。いくつかの実施形態では、リガンドは、多価ガラクトース部分を含む。他の実施形態では、リガンドは、多価N-アセチル-ガラクトサミン部分を含む。これら及び他の実施形態では、多価炭水化物部分は、二価、三価、又は四価である。そのような実施形態では、多価炭水化物部分は、二分岐又は三分岐であり得る。特定の実施形態では、多価N-アセチル-ガラクトサミン部分は、三価又は四価である。別の特定の実施形態では、多価ガラクトース部分は、三価又は四価である。本明細書に開示されるRNAiコンストラクトへの組み込みのための例示的なGalNAc含有リガンドは、三分岐GalNAc含有リガンド（「GalNAc3」とも称される）を含む。

10

【0075】

リガンドは、RNAiコンストラクトのRNA分子に直接的又は間接的に結合又はコンジュゲートされ得る。例えば、いくつかの実施形態では、リガンドは、RNAiコンストラクトのセンス鎖又はアンチセンス鎖に共有結合的に直接結合される。他の実施形態では、リガンドは、RNAiコンストラクトのセンス鎖又はアンチセンス鎖にリンカーを介して共有結合的に結合される。リガンドは、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトのポリヌクレオチド（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖）の核酸塩基、糖部分又はヌクレオチド間結合に結合され得る。プリン核酸塩基又はその誘導体へのコンジュゲーション又は結合は、環内原子及び環外原子を含むあらゆる位置で生じ得る。ある特定の実施形態では、プリン核酸塩基の2位、6位、7位又は8位がリガンドに結合される。ピリミジン核酸塩基又はその誘導体へのコンジュゲーション又は結合もまた、あらゆる位置で生じ得る。いくつかの実施形態では、ピリミジン核酸塩基の2位、5位及び6位がリガンドに結合され得る。ヌクレオチドの糖部分へのコンジュゲーション又は結合は、あらゆる炭素原子で生じ得る。リガンドに結合され得る糖部分の例示的な炭素原子としては、2'、3'、及び5'の炭素原子が挙げられる。例えば、脱塩基ヌクレオチドでは、1'位もリガンドに結合することができる。ヌクレオチド間結合も、リガンドの結合を支持することができる。リン含有結合（例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデートなど）の場合、リガンドは、リン原子に直接結合され得るか、又はリン原子に結合されたO、N若しくはS原子に結合され得る。アミン又はアミド含有ヌクレオシド間結合（例えば、PNA）の場合、リガンドは、アミン若しくはアミドの窒素原子か、又は隣接する炭素原子に結合され得る。

20

30

【0076】

ある特定の実施形態では、リガンドは、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの3'又は5'末端に結合され得る。ある特定の実施形態では、リガンドは、センス鎖の5'末端に共有結合的に結合される。例えば、いくつかの実施形態では、リガンドは、センス鎖の5'末端ヌクレオチドに結合される。そのようなある特定の実施形態では、リガンドは、センス鎖の5'末端ヌクレオチドの5'位で結合される。他の実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端に共有結合的に結合される。例えば、いくつかの実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端ヌクレオチドに結合される。そのようなある特定の実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端ヌクレオチドの3'位で結合される。代替的な実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端近傍であるが、1つ以上の末端ヌクレオチドの前（すなわち1、2、3又は4つの末端ヌクレオチドの前）に結合される。いくつかの実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端ヌクレオチドの糖の2'位で結合される。

40

【0077】

ある特定の実施形態では、リガンドは、リンカーを介してセンス鎖又はアンチセンス鎖に結合される。「リンカー」は、リガンドをRNAiコンストラクトのポリヌクレオチド構成要素に共有結合的に結合する原子又は原子の基である。リンカーは、約1〜約30原子長、約2〜約28原子長、約3〜約26原子長、約4〜約24原子長、約6〜約20原子長、約7〜約20原子長、約8〜約20原子長、約8〜約18原子長、約10〜約18

50

原子長、及び約 12 ～ 約 18 原子長であってよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、2つの官能基を有するアルキル部分を一般に含む、二官能性結合部分を含み得る。官能基の一方は、目的の化合物（例えば、RNA i コンストラクトのセンス鎖又はアンチセンス鎖）に結合するように選択され、他方は、本明細書に記載されるようなリガンドなどの任意の選択された基に実質的に結合するように選択される。ある特定の実施形態では、リンカーは、エチレングリコール単位又はアミノ酸単位などの反復単位からなる鎖構造又はオリゴマーを含む。二官能性結合部分に典型的に使用される官能基の例として、求核性基と反応させるための求電子剤、及び求電子性基と反応させるための求核剤が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、二官能性結合部分として、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、不飽和（例えば、二重結合又は三重結合）などが挙げられる。

10

【0078】

リガンドを RNA i コンストラクトのセンス鎖又はアンチセンス鎖に結合するために使用され得るリンカーとしては、ピロリジン、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、6-アミノヘキサン酸、置換 C₁～C₁₀アルキル、置換若しくは非置換 C₂～C₁₀アルケニル又は置換若しくは非置換 C₂～C₁₀アルキニルが挙げられるが、これらに限定されない。そのようなリンカーにとって好ましい置換基として、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル、及びアルキニルが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0079】

ある特定の実施形態では、リンカーは、切断可能である。切断可能なリンカーは、細胞外部では十分に安定であるが、標的細胞に進入すると切断され、リンカーが一体に保持している2つの部分を放出する。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、標的細胞中又は第1の参照条件（例えば、細胞内条件を模倣するか、又はそれに相当するように選択され得る）下において、対象の血液中又は第2の参照条件（例えば、血液若しくは血清に見出される条件を模倣するか、又はそれに相当するように選択され得る）下よりも少なくとも10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍以上、又は少なくとも100倍速く切断される。

30

【0080】

切断可能なリンカーは、切断剤、例えば pH、酸化還元電位又は分解性分子の存在に対して感受性である。一般に、切断剤は、血清又は血液中よりも細胞内部で優勢であるか、又は高いレベル若しくは活性で見出される。そのような分解性薬剤の例としては、特定の基質のために選択されるか、又は基質特異性のない酸化還元剤、例えば、酸化酵素若しくは還元酵素、又は細胞内に存在し、還元によって酸化還元切断可能なリンカーを分解することができるメルカプタンなどの還元剤を含む酸化還元剤；エステラーゼ；エンドソーム又は酸性環境を生成することができる薬剤、例えば、5以下の pH をもたらすもの；一般酸として作用することによって酸切断可能なリンカーを加水分解又は分解することができる酵素、ペプチダーゼ（基質特異的であり得る）、及びホスファターゼが挙げられる。

40

【0081】

切断可能なリンカーは、pH に感受性のある部分を含み得る。ヒト血清の pH は 7.4 であるが、平均的な細胞内の pH はそれよりわずかに低く、約 7.1 ～ 7.3 の範囲である。エンドソームは、5.5 ～ 6.0 の範囲のより酸性の pH を有し、リソソームは、更により酸性であるおよそ 5.0 の pH を有する。一部のリンカーは、好ましい pH にて切断される切断可能な基を有することによって、リガンドから細胞内部に、又は細胞の所望の区画中に RNA 分子を放出することになる。

【0082】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能となる切断可能な基を含み得る。リンカーに組み込まれる切断可能な基の種類は、標的化される細胞に依存し得る。例えば、肝臓標的

50

化リガンドは、エステル基を含むリンカーを介してRNA分子に結合され得る。肝臓細胞はエステラーゼに富んでおり、したがって、リンカーは、エステラーゼに富んでいない細胞型よりも肝臓細胞において効率的に切断されることになる。エステラーゼに富む他の種類の細胞としては、肺、腎皮質及び精巣の細胞が挙げられる。肝臓細胞及び滑膜細胞などのペプチダーゼに富む細胞を標的化する場合、ペプチド結合を含有するリンカーを使用することができる。

【0083】

一般に、切断可能なリンカー候補の適合性は、リンカー候補を切断する分解性薬剤の能力（又は条件）を試験することによって評価することができる。また、血液中又は他の非標的組織と接触するときの切断に抵抗する能力について、切断可能なリンカー候補を試験することが望ましい。したがって、標的細胞内で切断を示すように選択される第1の条件と、他の組織又は体液、例えば血液又は血清内で切断を示すように選択される第2の条件との間で、切断に対する相対的感受性を判断することができる。評価は、無細胞系、細胞、細胞培養物、臓器若しくは組織培養物中において又は動物全体で実行することができる。無細胞又は培養条件において初期評価を行い、動物全体における更なる評価によって確認することが有用であり得る。いくつかの実施形態では、有用なリンカー候補は、細胞において（又は細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下で）、血液又は血清（又は細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して少なくとも2倍、4倍、10倍、20倍、50倍、70倍又は100倍速く切断される。

【0084】

他の実施形態では、酸化還元切断可能なリンカーが利用される。酸化還元切断可能なリンカーは、還元又は酸化されると切断される。還元的に切断可能な基の一例として、ジスルフィド結合基（ $-S-S-$ ）がある。切断可能なリンカー候補が、好適な「還元的に切断可能なリンカー」であるかどうか、又は例えば特定のRNA iコンストラクト及び特定のリガンドと共に使用するのに好適であるかどうかを判定するために、本明細書に記載の1つ以上の方法を使用することができる。例えば、ジチオスレイトール（DTT）又は例えば標的細胞などの細胞中で観察されることになる切断速度を模倣する当該技術分野で知られる他の還元剤と共にインキュベーションすることにより、リンカー候補を評価することができる。リンカー候補は、血液条件又は血清条件を模倣するように選択された条件下で評価することもできる。特定の実施形態では、リンカー候補は、血液中最大10%だけ切断される。他の実施形態では、有用なリンカー候補は、細胞（又は細胞内条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）において、血液（又は細胞外条件を模倣するように選択されたインビトロ条件下）と比較して少なくとも2倍、4倍、10倍、20倍、50倍、70倍、又は100倍速く分解される。

【0085】

更に他の実施形態では、ホスフェート系の切断可能リンカーは、ホスフェート基を分解又は加水分解する薬剤によって切断される。細胞内でホスフェート基を加水分解する薬剤の例としては、細胞内のホスファターゼなどの酵素がある。ホスフェート系切断可能な基の例は、 $-O-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(SR_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(O)(OR_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(OR_k)-S-$ 、 $-S-P(S)(OR_k)-O-$ 、 $-O-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(S)(R_k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R_k)-S-$ 、 $-O-P(S)(R_k)-S-$ であり、ここで、 R_k は、水素又は $C_1 \sim C_{10}$ アルキルであり得る。具体的な実施形態としては、 $-O-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(S)(SH)-O-$ 、 $-S-P(O)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(OH)-S-$ 、 $-S-P(O)(OH)-S-$ 、 $-O-P(S)(OH)-S-$ 、 $-SP(S)(OH)-O-$ 、 $-O-P(O)(H)-O-$ 、 $-O-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-O-$ 、 $-S-P(S)(H)-O-$ 、 $-S-P(O)(H)-S-$ 、 $-O-P(S)(H)-S-$ が挙げられる。別の具体的

な実施形態は、 $-O-P(O)(OH)-O-$ である。これらのリンカー候補は、上に記載されるものに類似する方法を用いて評価することができる。

【0086】

他の実施形態では、リンカーは、酸性条件下で切断される基である、酸切断可能な基を含み得る。いくつかの実施形態では、酸切断可能な基は、約6.5以下のpH（例えば、約6.0、5.5、5.0以下）の酸性環境において、又は一般酸として作用し得る酵素などの薬剤によって切断される。細胞内では、エンドソーム及びリソソームなどの特定の低pHオルガネラが、酸切断可能な基に切断環境を提供することができる。酸切断可能な結合基の例としては、ヒドラゾン、エステル、及びアミノ酸のエステルが挙げられるが、これらに限定されない。酸切断可能な基は、一般式 $-C=NN-$ 、 $C(O)O$ 、又は $-OC(O)$ を有し得る。具体的な実施形態は、エステルの酸素（アルコキシ基）に結合した炭素が、アリール基、置換アルキル基、又はジメチル、ペンチル若しくはセブチルなどの三級アルキル基である場合である。これらの候補は、上に記載される方法に類似した方法を使用して評価することができる。

10

【0087】

他の実施形態では、リンカーは、細胞中のエステラーゼ及びアミダーゼなどの酵素によって切断される、エステル系の切断可能な基を含み得る。エステル系の切断可能な基の例としては、アルキレン、アルケニレン及びアルキニレン基のエステルが挙げられるが、これらに限定されない。エステル切断可能な基は、一般式 $-C(O)O-$ 、又は $-OC(O)-$ を有する。これらのリンカー候補は、上に記載されるものに類似する方法を用いて評価することができる。

20

【0088】

更なる実施形態では、リンカーは、細胞中のペプチダーゼ及びプロテアーゼなどの酵素によって切断されるペプチド系の切断可能な基を含み得る。ペプチド系の切断可能な基は、オリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）及びポリペプチドを生じるような、アミノ酸間で形成されたペプチド結合である。ペプチド系の切断可能な基は、アミド基（ $-C(O)NH-$ ）を含まない。アミド基は、あらゆるアルキレン、アルケニレン又はアルキニレン間で形成され得る。ペプチド結合は、ペプチド及びタンパク質を生じるような、アミノ酸間で形成される特殊なタイプのアミド結合である。ペプチド系の切断可能な基は、一般に、アミノ酸間で形成されてペプチド及びタンパク質を生じるペプチド結合（すなわち、アミド結合）に限定され、アミド官能基全体を含むわけではない。ペプチド系の切断可能な連結基は、一般式 $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$ を有し、式中、 R^A 及び R^B は、2つの隣接するアミノ酸の側鎖である。これらの候補は、上に記載される方法に類似した方法を使用して評価することができる。

30

【0089】

本明細書に記載のRNA iコンストラクト中のセンス鎖又はアンチセンス鎖にリガンドを結合させるのに好適な他の種類のリンカーは当該技術分野で知られており、例えば米国特許第7,723,509号明細書；同第8,017,762号明細書；同第8,828,956号明細書；同第8,877,917号明細書；及び同第9,181,551号明細書に記載のリンカーを含むことができる。

40

【0090】

ある特定の実施形態では、RNA iコンストラクトのセンス鎖又はアンチセンス鎖に共有結合的に結合されるリガンドは、GalNAc部分、例えば、多価のGalNAc部分を含む。いくつかの実施形態では、多価のGalNAc部分は、三価のGalNAc部分であり、且つセンス鎖の3'末端に結合される。他の実施形態では、多価のGalNAc部分は、三価のGalNAc部分であり、且つセンス鎖の5'末端に結合される。更に他の実施形態では、多価のGalNAc部分は、四価のGalNAc部分であり、且つセンス鎖の3'末端に結合される。更に他の実施形態では、多価のGalNAc部分は、四価のGalNAc部分であり、且つセンス鎖の5'末端に結合される。

【0091】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトは、RNAiコンストラクトの細胞内発現をコードし、且つ制御するベクターを投与することにより、目的の細胞又は組織に送達され得る。「ベクター」（本明細書では「発現ベクター」とも称される）は、目的の核酸を細胞の内部に送達するために使用することができる物質の組成物である。多数のベクターが当該技術分野で知られており、線状ポリヌクレオチド、イオン性又は両親媒性化合物と結合したポリヌクレオチド、プラスミド及びウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミド又はウイルスを含む。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、生細胞内で複製されてもよいし、合成的に作製されてもよい。

10

【0092】

一般に、RNAiコンストラクトを発現するためのベクターは、RNAiコンストラクトをコードする配列に作動可能に連結された1つ以上のプロモーターを含むことになる。「作動可能に連結された」、「作動的に連結された」又は「転写制御下で」という語句は、RNAポリメラーゼによる転写の開始及びポリヌクレオチド配列の発現を制御するために、プロモーターがポリヌクレオチド配列に対して正しい位置及び向きにある場合を示すために、本明細書では互換的に使用され得る。「プロモーター」は、細胞の合成装置によって認識されるか又は合成装置に導入され、特定の遺伝子配列の転写を開始するのに必要とされる配列を指す。好適なプロモーターとしては、RNA pol I、pol II、HI、又はU6 RNA pol III、及びウイルスプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）最初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、及びラウス肉腫ウイルスの長い末端反復）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、HI又はU6 RNA pol IIIプロモーターが利用される。プロモーターは、組織特異的プロモーター又は誘導性プロモーターであり得る。特に注目するのは、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン遺伝子、アルブミン遺伝子、ヘモペキシン遺伝子、及び肝性リパーゼ遺伝子由来のプロモーター配列などの肝臓特異的プロモーターである。誘導性プロモーターとしては、例えばエクジソン、エストロゲン、プロゲステロン、テトラサイクリン、及びイソプロピル-PD1-チオガラクトピラノシド（IPTG）によって調節されるプロモーターが挙げられる。

20

30

【0093】

RNAiコンストラクトがsiRNAを含む場合、別々の2つの鎖（センス鎖及びアンチセンス鎖）が、単一のベクター又は別々の2つのベクターから発現され得る。例えば、いくつかの実施形態では、センス鎖をコードする配列は、第1のベクターのプロモーターに作動可能に連結され、アンチセンス鎖をコードする配列は、第2のベクターのプロモーターに作動可能に連結される。そのような実施形態では、第1及び第2のベクターは、例えば、感染又はトランスフェクションによって標的細胞に同時に導入され、その結果、センス鎖及びアンチセンス鎖が転写されると、細胞内でハイブリダイズしてsiRNA分子を形成することになる。別の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、単一のベクター内に位置する2つの別個のプロモーターから転写される。そのような実施形態では、センス鎖をコードする配列は、第1のプロモーターに作動可能に連結され、アンチセンス鎖をコードする配列は、第2のプロモーターに作動可能に連結されてもよく、第1及び第2のプロモーターは、単一のベクター内に配置される。一実施形態では、ベクターは、siRNA分子をコードする配列に作動可能に連結される第1のプロモーター、及び同じ配列に逆方向で作動可能に連結される第2のプロモーターを含み、その結果、第1のプロモーターからの配列の転写がsiRNA分子のセンス鎖の合成をもたらす、第2のプロモーターからの配列の転写がsiRNA分子のアンチセンス鎖の合成をもたらす。

40

【0094】

RNAiコンストラクトがshRNAを含む場合、単一の少なくとも部分的に自己相補的RNA分子をコードする配列が、単一の転写物を生成するプロモーターに作動可能に連

50

結される。いくつかの実施形態では、shRNAをコードする配列は、リンカーポリヌクレオチド配列によって結合される逆位反復を含み、転写後にshRNAのステム及びループ構造を生成する。

【0095】

いくつかの実施形態では、RNAiコンストラクトをコードするベクターは、ウイルスベクターである。本明細書に記載されるRNAiコンストラクトを発現するのに好適な様々なウイルスベクター系としては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター、マロニー（maloney）マウス白血病ウイルス）、アデノ随伴ウイルスベクター；単純ヘルペスウイルスベクター；SV40ベクター；ポリオマウイルスベクター；パピロマウイルスベクター；ピコルナウイルスベクター；及びボックスウイルスベクター（例えば、ワクシニアウイルス）が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）である。

10

【0096】

本開示での使用に好適な様々なベクター、siRNA又はshRNA分子をコードする核酸配列をベクターに挿入する方法、及びベクターを目的の細胞に送達する方法は、当該技術分野で公知である（例えば、Dornburg, Gene Therap., Vol. 2: 301-310, 1995; Egli, Biotechniques, Vol. 6: 608-614, 1988; Miller, HumGene Therap., Vol. 1: 5-14, 1990; Anderson, Nature, Vol. 392: 25-30, 1998; Robinson D A et al., Nat. Genet., Vol. 33: 401-406, 2003; Brummelkamp et al., Science, Vol. 296: 550-553, 2002; Brummelkamp et al., Cancer Cell, Vol. 2: 243-247, 2002; Lee et al., Nat Biotechnol, Vol. 20: 500-505, 2002; Miyagishi et al., Nat Biotechnol, Vol. 20: 497-500, 2002; Paddison et al., Genes Dev, Vol. 16: 948-958, 2002; Paul et al., Nat Biotechnol, Vol. 20: 505-508, 2002; Sui et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 99: 5515-5520, 2002及びYu et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 99: 6047-6052, 2002を参照されたい）。

20

30

【0097】

組成物

本開示はまた、本明細書に記載されるRNAiコンストラクト及び薬学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤を含む組成物及び製剤を提供する。そのような組成物及び製剤は、SCAPの発現の低減を必要とする対象において、SCAPの発現を低減するのに有用である。临床上の用途を考える場合、医薬組成物及び製剤は、目的の用途に適切な形態で調製されることとなる。一般に、このことは、パイロジェン、並びにヒト又は動物に有害となる可能性のある他の不純物も実質的に含まない組成物の調製を伴うことになる。

40

【0098】

「薬学的に許容される」又は「薬理学的に許容される」という語句は、動物又はヒトに投与される場合の有害な、アレルギー性の、又は他の不都合な反応をもたらさない分子実体及び組成物を指す。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体、賦形剤、又は希釈剤」としては、ヒトへの投与に好適な医薬品などの医薬品の製剤化における使用に許容される溶媒、緩衝液、溶液、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張化剤、並びに吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質に対するこのような媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野でよく知られている。従来のある媒体又は薬剤が、本開示のRNAiコンストラクトと適合しない場合を除いて、治療組成物に使用されることが意図される。補助的な活性成分もまた、それらが組成物のベクター又はRNAiコンス

50

トラクトを不活化しないことを条件として、組成物中に組み込まれ得る。

【0099】

医薬組成物の製剤化のための組成物及び方法は、投与経路、治療されることになる疾患若しくは障害の種類及び程度、並びに投与されることになる用量が挙げられるが、これらに限定されない、いくつかの基準に依存する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、意図される送達経路に基づいて製剤化される。例えば、ある特定の実施形態では、医薬組成物は、非経口送達用に製剤化される。非経口の送達形態として、静脈内、動脈内、皮下、髄腔内、腹腔内、及び筋肉内の注射又は注入が挙げられる。一実施形態では、医薬組成物は、静脈内送達用に製剤化される。このような実施形態では、医薬組成物は、脂質に基づく送達ビヒクルを含み得る。別の実施形態では、医薬組成物は、皮下送達のために製剤化される。そのような実施形態では、医薬組成物は、標的化リガンド（例えば、本明細書に記載の GalNAc 含有リガンド）を含み得る。

10

【0100】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、有効量の RNAi コンストラクトを含む。「有効量」は、有利な又は所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、対象の肝細胞内で SCAP 発現を引き下げるのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、SCAP 発現を、例えばヒトヘテロ接合体における野生型 SCAP 対立遺伝子の発現に匹敵するレベルにまで部分的にのみ引き下げるのに十分な量であり得る。

【0101】

本明細書に開示される RNAi コンストラクトの有効量は、約 0.01 mg/kg 体重～約 100 mg/kg 体重、約 0.05 mg/kg 体重～約 75 mg/kg 体重、約 0.1 mg/kg 体重～約 50 mg/kg 体重、約 1 mg/kg～約 30 mg/kg 体重、約 2.5 mg/kg 体重～約 20 mg/kg 体重、又は約 5 mg/kg 体重～約 15 mg/kg 体重であり得る。有効量の RNAi コンストラクトを含む医薬組成物は、毎週、隔週、毎月、四半期毎又は半年毎に投与され得る。有効であると考えられる投与量及び投与頻度を正確に決定することは、患者の大きさ、年齢、性別、治療されることになる障害の種類（例えば、脂肪症、NAFLD、NASH、又は肝硬変）、使用される特定の RNAi コンストラクト、並びに投与経路を含むいくつかの要因に基づき得る。本明細書に開示される特定のあらゆる RNAi コンストラクトの有効投与量及びインビボ半減期の推定値は、従来の方法及び／又は適切な動物モデルにおける試験を使用して確認することができる。

20

30

【0102】

水中油型エマルション、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、及び脂質に基づく系などのコロイド分散系を、本明細書に開示される RNAi コンストラクト又はそのようなコンストラクトをコードするベクターの送達ビヒクルとして使用してもよい。核酸の送達に好適な市販の脂肪エマルションとしては、INTRALIPID（登録商標）、LIPOSYN（登録商標）、LIPOSYN（登録商標）II、LIPOSYN（登録商標）III、NUTRILIPID、及び他の類似の脂肪エマルションが挙げられる。インビボにおける送達ビヒクルとして使用するための好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち、人工膜小胞）である。RNAi コンストラクトは、カチオン性リポソームなどのリポソーム内に封入され得る。或いは、本明細書に開示される RNAi コンストラクトは、脂質、例えばカチオン性脂質に対して複合体形成され得る。好適な脂質及びリポソームとしては、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、及びジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG））、並びにカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル（DOTAP）及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOTMA））が挙げられる。そのようなコロイド分散系の調製及び使用は、当該技術分野でよく知

40

50

られている。例示的な製剤はまた、例えば、米国特許第 5, 783, 565 号明細書；同第 5, 837, 533 号明細書；同第 5, 981, 505 号明細書；同第 6, 127, 170 号明細書；同第 6, 217, 900 号明細書；同第 6, 379, 965 号明細書；同第 6, 383, 512 号明細書；同第 6, 747, 014 号明細書；同第 7, 202, 227 号明細書；及び国際公開第 03 / 093449 号パンフレットに開示されている。

【0103】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される RNA i コンストラクトは、脂質製剤に完全に封入されて、例えば SPLP、pSPLP、SNALP、又は他の核酸-脂質粒子を形成する。本明細書で使用する場合、「SNALP」という用語は、SPLP を含む安定な核酸-脂質粒子を指す。本明細書で使用する場合、「SPLP」という用語は、脂質小胞に封入されたプラスミド DNA を含む核酸-脂質粒子を指す。SNALP 及び SPLP は典型的に、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び粒子の凝集を妨げる脂質（例えば PEG-脂質コンジュゲート）を含有する。SNALP 及び SPLP は、静脈内注射後に長期間の循環寿命を示し、且つ遠位部位（例えば、投与部位から物理的に離れた部位）にて蓄積するため、全身投与に非常に有用である。SPLP は、国際公開第 00 / 03683 号パンフレットに記載の封入された縮合剤-核酸複合体を含む「pSPLP」を含む。核酸-脂質粒子は、典型的に、平均直径が約 50 nm ~ 約 150 nm、約 60 nm ~ 約 130 nm、約 70 nm ~ 約 110 nm、又は約 70 nm ~ 約 90 nm であり、実質的に非毒性である。加えて、核酸-脂質粒子内に存在する核酸は、水溶液中で、ヌクレアーゼによる分解に対して耐性があるのが望ましい。核酸-脂質粒子及びその調製方法は、例えば、米国特許第 5, 976, 567 号明細書；同第 5, 981, 501 号明細書；同第 6, 534, 484 号明細書；同第 6, 586, 410 号明細書；同第 6, 815, 432 号明細書、及び国際公開第 96 / 40964 号パンフレットに開示されている。

【0104】

注射に好適な医薬組成物は、例えば、滅菌水溶液又は分散体及び注射用滅菌溶液又は分散体の即時調製のための滅菌粉末を含む。一般に、これらの調製物は、滅菌済みであり、容易に注射可能である程度の流体である。調製物は、製造及び保存条件下で安定でなければならない。適切な溶媒又は分散媒体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合液、及び植物油を含有し得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（レシチンなど）を使用することによって、必要な粒径を維持することによって（分散液の場合）、及び／又は界面活性剤を使用することによって維持することができる。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖又は塩化ナトリウム）が組成物に含まれ得る。注射可能な組成物の持続的な吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによってもたらされ得る。

【0105】

滅菌注射用溶液は、適切な量の RNA i コンストラクト（単独又はリガンドと複合体化）を、必要に応じて任意の他の成分（上記など）と共に溶媒に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散系は、塩基性分散媒体及び所望の他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に、滅菌された種々の活性成分を組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製用の滅菌粉末の場合、適切な調製方法として、その予め滅菌濾過した溶液から活性成分に加えて任意の追加の所望の成分の粉末が得られる、真空乾燥技術及び凍結乾燥技術が挙げられる。

【0106】

本明細書で提供される組成物は、中性形態又は塩形態で製剤化され得る。薬学的に許容される塩として、例えば、無機酸（例えば、塩酸又はリン酸）又は有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）から誘導される酸付加塩（遊離アミノ基と共に形

成される)が挙げられる。また、遊離カルボキシル基と共に形成される塩は、無機塩基(例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化第二鉄)から、又は有機塩基(例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなど)から誘導され得る。

【0107】

水溶液中での非経口投与のために、例えば、溶液は一般に適切に緩衝され、液体希釈剤は最初に、例えば、十分な生理食塩水又はグルコースを用いて等張にされる。そのような水溶液は、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、及び腹腔内投与に用いられ得る。当該技術分野の当業者に知られているように、滅菌水性媒体を使用することが望ましい。実例として、単回用量を等張NaCl溶液1ml中に溶解し、皮下注射液1000mlに添加し得るか、又は提示された注入部位に注射し得る(例えば、“Remington’s Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580を参照されたい)。ヒト投与について、調製物は、FDA基準によって要求される無菌性、発熱性、一般的安全性、及び純度の基準を満たさなければならない。本開示のある特定の実施形態では、医薬組成物は、滅菌生理食塩水及び本明細書に記載されるRNAiコンストラクトを含むか又はそれらからなる。他の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるRNAiコンストラクト及び滅菌水(例えば、注射用水、WFI)を含むか又はそれらからなる。更に他の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるRNAiコンストラクト及びリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含むか又はそれらからなる。

10

20

【0108】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、投与用デバイスでパッケージ化されるか又はその中に保存される。注射製剤用のデバイスとしては、注射ポート、プレフィルドシリンジ、自動注入装置、注射ポンプ、装着型注射器、及び注射ペンが挙げられるが、これらに限定されない。エアロゾル化製剤又は粉末製剤用のデバイスとしては、インヘラー、通気器、吸引器などが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、本開示は、本明細書に記載される障害の1つ以上を治療するか又は予防するための医薬組成物を含む投与デバイスを含む。

【0109】

SCAP発現を阻害するための方法

本開示はまた、細胞におけるSCAP遺伝子の発現を阻害する方法を提供する。本方法は、細胞を、RNAiコンストラクト、例えば、二本鎖RNAiコンストラクトと、細胞内でのSCAPの発現を阻害するのに有効な量で接触させることを含む。細胞をRNAiコンストラクト、例えば二本鎖RNAiコンストラクトと接触させることは、インビトロ又はインビボで行われ得る。細胞をインビボでRNAiコンストラクトと接触させることは、対象、例えばヒト対象内の細胞又は細胞群をRNAiコンストラクトと接触させることを含む。細胞を接触させるインビトロ及びインビボ方法の組合せも本開示の範囲内である。

30

【0110】

本開示は、SCAPの発現の低減又は阻害を必要とする対象において、SCAPの発現を低減させるか、又は阻害する方法、及びSCAP発現又は活性と関連する症状、疾患、又は障害を処置又は予防する方法を提供する。「SCAP発現と関連する症状、疾患、又は障害」は、SCAPの発現レベルが変わるか、又はSCAPの発現レベルの上昇が、症状、疾患、若しくは障害の発症リスクの増大と関連する症状、疾患、又は障害を指す。

40

【0111】

細胞を接触させることは、上で論じられるとおり、直接的であってもよいし、間接的であってもよい。更に、細胞を接触させることは、本明細書に記載されるか、又は当技術分野で知られるあらゆるリガンドを含む標的化リガンドを介して達成してもよい。好ましい実施形態では、標的化リガンドは、炭水化物部分、例えば、三分岐GalNAcリガンド(GalNAc3)、又は目的の部位にRNAiコンストラクトを向ける任意の他のリガ

50

ンドである。

【0112】

一実施形態では、細胞とRNAiの接触は、細胞への取り込み又は細胞への吸収を促進するか又は引き起こすことによって、「導入すること」又は「細胞にRNAiを送達すること」を含む。RNAiの吸収又は取り込みは、補助なしの拡散性若しくは活性細胞性プロセスによって、又は補助剤若しくはデバイスによって起こすことができる。例えば、インビボでの導入のために、RNAiを組織部位に注射してもよいし、全身投与してもよい。細胞へのインビトロ導入は、エレクトロポレーション及びリポフェクションなどの当技術分野で知られる方法を使用して達成され得る。さらなる方法は、本明細書において以下に記載されており、且つ／又は当技術分野において知られている。

10

【0113】

本明細書で使用する場合、「阻害する」という用語は、「低減する」、「サイレンシングする」、「下方制御する」、「抑制する」、及び他の類似用語と互換的に使用され、あらゆるレベルの阻害を含む。

【0114】

「SCAPの発現を阻害すること」という語句は、あらゆるSCAP遺伝子（例えば、マウスSCAP遺伝子、ラットSCAP遺伝子、サルSCAP遺伝子、又はヒトSCAP遺伝子）並びにSCAP遺伝子のバリエーション又は変異体の発現の阻害を指すことが意図される。したがって、SCAP遺伝子は、遺伝子操作細胞、細胞群、若しくは生物の文脈における野生型SCAP遺伝子、変異体SCAP遺伝子、又はトランスジェニックSCAP遺伝子であり得る。

20

【0115】

「SCAP遺伝子の発現を阻害する」は、SCAP遺伝子のあらゆるレベルの阻害、例えば、SCAP遺伝子の発現の少なくとも一部の抑制を含む。SCAP遺伝子の発現は、例えば、SCAP mRNAレベル又はSCAPタンパク質レベルといったSCAP遺伝子発現と関連するあらゆる変数のレベル、又はレベルの変化に基づいて評価され得る。このレベルは、例えば、対象に由来する試料を含む個々の細胞又は細胞群において評価され得る。

【0116】

阻害は、対照レベルと比較して、SCAP発現と関連する1つ以上の変数の絶対レベル又は相対レベルの低下によって評価され得る。対照レベルは、例えば、投与前のベースラインレベル、又は処置されていないか若しくは対照（例えば、バッファのみの対照又は不活剤対照）で処置された類似対象、細胞、若しくは試料から判定されるレベルといった、当該技術において利用されるあらゆるタイプの対照レベルであり得る。いくつかの実施形態では、SCAP遺伝子の発現は、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%だけ阻害される。

30

40

【0117】

SCAP遺伝子の発現の阻害は、第1の細胞又は細胞群と実質的に同一であるが、同様に処理されていない第2の細胞又は細胞群（対照細胞）と比較した場合の、SCAP遺伝子の発現が阻害されるように、SCAP遺伝子が転写され、且つ処理された（例えば、細胞を本明細書に開示されるRNAiコンストラクトと接触させることにより、又はこの細胞が存在する、若しくは存在した対象に本明細書に開示されるRNAiコンストラクトを投与することにより）第1の細胞又は細胞群（このような細胞は、例えば、対象に由来する試料中に存在し得る）により発現されるmRNAの量の減少によって明らかにされ得る

50

。阻害は、以下の式を使用して、処理された細胞中の mRNA レベルを対照細胞中の mRNA レベルの割合として表すことによって評価され得る。

【数 1】

$$\frac{(\text{対照細胞中の mRNA}) - (\text{処置された細胞中の mRNA})}{\text{対照細胞中の mRNA}} \times 100\%$$

【0118】

これ以外にも、SCAP 遺伝子の発現の阻害は、SCAP 遺伝子発現、例えば、SCAP タンパク質発現又は SREBP タンパク質ファミリー活性に機能的に関連するパラメーターの低減に関して評価され得る。SCAP 遺伝子サイレンシングは、当技術分野で知られる任意のアッセイによって、内因的又は組換え的に SCAP を発現する任意の細胞において決定され得る。

【0119】

SCAP タンパク質の発現の阻害は、細胞又は細胞群によって発現される SCAP タンパク質のレベル（例えば、対象から得られる試料内で発現されるタンパク質のレベル）の低減によって明らかにされ得る。上で説明されるとおり、mRNA の抑制を評価するために、処理された細胞又は細胞群におけるタンパク質発現レベルの阻害は、対照細胞又は細胞群におけるタンパク質のレベルのパーセンテージとして同様に表され得る。

【0120】

SCAP 遺伝子の発現の阻害を評価するために使用され得る対照細胞又は細胞群としては、本明細書に開示される RNAi コンストラクトとまだ接触していない細胞又は細胞群が挙げられる。例えば、対照細胞又は対照細胞群は、RNAi コンストラクトによる対象の治療の前に、個々の対象（例えば、ヒト対象又は動物対象）から得てもよい。

【0121】

細胞又は細胞群によって発現される SCAP の mRNA のレベル、又は循環 SCAP の mRNA のレベルは、mRNA 発現を評価するための当該技術分野で知られる任意の方法、例えば上記の方法を使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、試料内での SCAP の発現のレベルは、例えば SCAP 遺伝子の mRNA といった、転写ポリヌクレオチド又はその一部を検出することによって判定される。この点について、例えば RNA は、例えば、酸性フェノール／グアニジンイソチオシアネート抽出（RNAzol B；Biogenesis）、RNeasy RNA 調製キット（Qiagen）又は PAXgene（PreAnalytix、Switzerland）の使用を含む RNA 抽出技術を用いて、細胞から抽出され得る。リボ核酸ハイブリダイゼーションを利用する典型的なアッセイ形式としては、核ランオンアッセイ、RT-PCR、RNAアーゼ保護アッセイ（Melton et al., Nuc. Acids Res., 12:7035）、ノーザンブロッティング、インサイチュハイブリダイゼーション、及びマイクロアレイ分析が挙げられる。循環 SCAP の mRNA は、国際公開第 2012/177906 号パンフレットに記載される方法を使用して検出され得る。

【0122】

一実施形態では、SCAP の発現のレベルは、核酸プローブを用いて判定される。「プローブ」という用語は、本明細書で使用する場合、特定の SCAP 配列に選択的に結合することができる任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成することができるか、又は適切な生物学的調製物から誘導することができる。プローブは、標識されるように特別に設計してもよい。プローブとして利用され得る分子の例としては、RNA、DNA、タンパク質、抗体及び有機分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0123】

単離された mRNA は、サザン又はノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析及びプローブアレイを含むが、これらに限定されないハイブリダイゼーション又は増幅アッセイに使用することができる。mRNA レベルの決定のための 1 つの方法は、単離さ

れた mRNA を、SCAP の mRNA とハイブリダイズすることができる核酸分子（プローブ）と接触させることを含む。一実施形態では、例えば、アガロースゲル上で単離された mRNA を泳動させ、mRNA をゲルからニトロセルロースなどの膜に移すことによって、mRNA を固体表面上に固定化し、プローブと接触させる。代替的な実施形態では、プローブは、例えば、Affymetrix 遺伝子チップアレイにおいて、固体表面上に固定化し、mRNA をプローブと接触させる。当業者であれば、既知の mRNA 検出法を、SCAP mRNA のレベルの判定での使用に容易に適合させることができる。

【0124】

試料中の SCAP の発現レベルを決定するための代替的な方法は、例えば、RT-PCR 10
例えば、米国特許第 4,683,202 号明細書を参照されたい）、リガーゼ連鎖反応（Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193）、自家持続配列複製法（Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写増幅系（Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、Q-ベータレプリカーゼ（Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197）、ローリングサークル複製（Lizardi et al.、前掲；及び米国特許第 5,854,033 号明細書）又は任意の他の核酸増幅方法による、例えば、試料中の mRNA の核酸増幅及び／又は 20
逆転写酵素のプロセスを含み、これに続いて、当業者によく知られる技術を使用して増幅された分子を検出する。これらの検出スキームは、特に、核酸分子が非常に少ない数で存在するときに、核酸分子を検出するのに有用である。本開示のいくつかの態様では、SCAP の発現レベルは、定量的蛍光発生 RT-PCR（すなわち、TaqMan（商標）システム）によって決定され得る。SCAP の mRNA の発現レベルは、メンブレンプロット（ノーザン、サザン、ドットなどのハイブリダイゼーション分析に使用されているものなど）又はマイクロウェル、サンプルチューブ、ゲル、ビーズ若しくはファイバー（又は結合核酸を含む任意の固体支持体）を使用してモニターされ得る（例えば、米国特許第 5,445,934 号明細書；同第 5,677,195 号明細書；同第 5,770,722 号明細書；同第 5,744,305 号明細書；及び同第 5,874,219 号明細書を参照されたい）。SCAP 発現レベルの判定は、溶液中の核酸プローブの使用を含んでもよい。ある特定の実施形態では、mRNA 発現のレベルは、分枝状 DNA（bDNA）アッセイ又はリアルタイム PCR（qPCR）を使用して評価される。 30

【0125】

SCAP タンパク質発現のレベルは、タンパク質レベルの測定のための、当該技術において知られているあらゆる方法を用いて判定され得る。そのような方法としては、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高拡散クロマトグラフィー、液体又はゲル沈降素反応、吸収分光法、比色アッセイ、分光光度アッセイ、フローサイトメトリー、免疫拡散法（一元又は二元）、免疫電気泳動、ウエスタンブロッティング、放射性免疫アッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、電気化学発光アッセイなどが挙げられる。 40

【0126】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法の有効性は、胃腸痛、呼吸困難、高血圧、又は四肢、顔、喉頭、上気道、腹部、導体、及び生殖器の腫脹などの SCAP 関連疾患の症状における低減を検出又は監視することによって監視され得る。これらの症状は、当該技術分野で知られる任意の方法を使用してインビトロ又はインビボで評価され得る。

【0127】

いくつかの態様では、RNA i コンストラクト又は RNA i コンストラクトを含む組成物は、RNA i コンストラクトが対象内の特定の部位に送達されるように対象に投与される。SCAP の発現の阻害は、対象内の特定の部位由来の体液又は組織に由来する試料内 50

での S C A P mRNA 又は S C A P タンパク質のレベル又はレベルの変化の測定を用いて評価され得る。いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトは、肝臓、脈絡叢、網膜、及び脾臓などの部位に送達され得る。その部位は、前述の部位のいずれか 1 つに由来する細胞の小単位又は部分群であってもよい。また、当該部位は、特定の型の受容体を発現する細胞を含んでもよい。

【0128】

S C A P 関連疾患を処置又は予防する方法

本開示は、S C A P 関連の疾患、障害及び／若しくは状態を有するか、又は S C A P 関連の疾患、障害及び／若しくは状態を発症する傾向がある対象、RNA i コンストラクト、RNA i コンストラクトを含む組成物（例えば、医薬組成物）、又は本明細書に記載される RNA i コンストラクトを含むベクターに投与することを含む治療的及び予防的方法を提供する。S C A P 関連疾患の非限定的な例として、例えば、脂肪肝（脂肪症）、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）、肝硬変、肝臓内での脂肪の蓄積、肝臓の炎症、肝細胞壊死、肝線維症、肥満、及び非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）、高トリグリセリド血症、及び高脂血症が挙げられる。一実施形態では、S C A P 関連疾患は、N A F L D である。別の実施形態では、S C A P 関連疾患は、N A S H である。別の実施形態では、S C A P 関連疾患は、脂肪肝（脂肪症）である。別の実施形態では、S C A P 関連疾患は、インスリン抵抗性である。

10

【0129】

ある特定の実施形態では、本開示は、必要とする患者において S C A P の発現を低減するための方法であって、本明細書に記載される RNA i コンストラクトのいずれかを患者に投与することを含む方法を提供する。本明細書で使用する場合、「患者」という用語は、ヒトを含む哺乳動物を指し、「対象」という用語と互換的に使用することができる。患者の肝細胞内での S C A P の発現レベルは、RNA i コンストラクトを受けていない患者の S C A P 発現レベルと比較して、RNA i コンストラクトの投与後に低減されるのが望ましい。

20

【0130】

本明細書に開示される方法は、S C A P 関連疾患を患っている対象、例えば、S C A P 遺伝子発現及び／又は S C A P タンパク質産生の低減から利益を受けることとなる対象を処置するのに有用である。一態様では、本開示は、非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）を患っている対象において、S C A P 遺伝子発現のレベルを低減する方法を提供する。別の態様では、本開示は、N A F L D を有する対象において S C A P タンパク質のレベルを低減する方法を提供する。

30

【0131】

本明細書に開示される治療方法（及び使用）は、対象、例えば、ヒトに、治療有効量の S C A P 遺伝子を標的化する開示された RNA i コンストラクト、RNA i コンストラクトを含む医薬組成物、又は RNA i コンストラクトを含むベクターを投与することを含む。

【0132】

一態様では、本開示は、例えば、高められたヘッジホッグシグナル伝達経路の存在、疲労、衰弱、減量、食欲不振、吐き気、腹痛、クモ状血管、皮膚及び眼の黄色化（黄疸）、かゆみ、水分蓄積及び脚の腫脹（浮腫）、腹部膨満（腹水）、及び精神錯乱などの、N A F L D を有する対象の少なくとも 1 つの症状を予防する方法を提供する。方法は、予防有効量の RNA i コンストラクト、例えば s i R N A、RNA i コンストラクトを含む医薬組成物、又は RNA i コンストラクトをコードするベクターを対象に投与し、それによって S C A P 遺伝子発現の低減から利益を受ける障害を有する対象における少なくとも 1 つの症状を予防することを含む。「予防有効量」は、所望の予防結果（例えば、疾患発症の予防）を達成するために、必要な投与量及び期間で有効な量を指す。

40

【0133】

別の態様では、本開示は、対象、例えば、S C A P 遺伝子発現の低減及び／又は阻害か

50

ら利益を受けることになる対象を治療するための、治療有効量の本明細書に開示される RNA i コンストラクトの使用を提供する。更なる態様では、本開示は、SCAP 遺伝子発現の低減から利益を受けることとなる、障害、例えば、SCAP 関連疾患を患っている対象などの対象、例えば、SCAP 遺伝子発現及び／又は SCAP タンパク質産生の低減及び／又は阻害から利益を受けることとなる対象を処置するための医薬品の製造における、SCAP 遺伝子を標的化する RNA i コンストラクト、例えば、siRNA、又は SCAP 遺伝子を標的化する RNA i コンストラクトを含む医薬組成物の使用を提供する。

【0134】

本開示は、SCAP 遺伝子発現及び／又は SCAP タンパク質産生の低減及び／又は阻害から利益を受けることになる障害に罹患している対象において、少なくとも 1 つの症状を予防するための RNA i コンストラクト、例えば、本明細書に開示される siRNA の使用を提供する。例えば、本開示は、NAFLD の治療における、本明細書に記載される RNA i コンストラクト、それを含む組成物、及びそれを含むベクターの使用を提供する。

10

【0135】

更なる態様では、本開示は、SCAP 関連疾患などの SCAP 遺伝子発現及び／又は SCAP タンパク質産生の低減及び／又は阻害から利益を受けることとなる障害に罹患している対象において、少なくとも 1 つの症状を予防するための医薬品の製造における、開示される RNA i コンストラクト、それを含む組成物、又はそれを含むベクターの使用を提供する。

20

【0136】

一実施形態では、SCAP を標的化する RNA i コンストラクトは、RNA i コンストラクトが対象に投与されるとき、例えば、対象の細胞、組織、血液又は他の組織若しくは体液において SCAP 遺伝子の発現が、少なくとも約 10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、62 %、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 %、又は少なくとも約 99 % 以上だけ低減されるように、SCAP 関連疾患、例えば、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を有する対象に投与される。

30

【0137】

本明細書で開示される方法及び使用は、標的 SCAP 遺伝子の発現が、任意の好適な時間、例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、18、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、又は約 80 時間低減されるように、本明細書に記載される組成物を投与することを含む。一実施形態では、標的 SCAP 遺伝子の発現は、長期間、例えば、少なくとも約 2、3、4、5、6、7 日以上、例えば、約 1 週、2 週、3 週、又は約 4 週以上減少される。

40

【0138】

本明細書に開示される方法及び使用による RNA i コンストラクトの投与は、SCAP 関連疾患、例えば、NAFLD を有する患者におけるそのような疾患又は障害の重症度、徴候、症状、及び／又はマーカーの低減をもたらし得る。この文脈における「低減」は、そのようなレベルの統計的に有意な減少を意味する。低減は、例えば、少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、又は約 100 % であり得る。疾患の治療又は予防の有効性は、例えば、疾患進行、疾患寛解、病状の重症

50

度、疼痛の低減、生活の質、治療効果を維持するのに必要な医薬品の用量、疾患マーカーのレベル又は治療されているか若しくは予防の標的となる所与の疾患に適した他の任意の測定可能なパラメーターを測定することによって評価され得る。そのようなパラメーターのいずれか1つ又はパラメーターの任意の組合せを測定することにより、治療又は予防の有効性を観察することは、十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、NAFLDの治療の有効性は、例えば、NAFLD症状、肝臓脂肪レベル、又は下流遺伝子の発現の定期的なモニタリングによって評価され得る。最初の読取りと後の読取りとの比較は、治療が有効であるかどうかの指標を医師に提供する。SCAPを標的化するRNAi又はその医薬組成物の投与と関連して、SCAP関連疾患「に対して有効」とは、臨床的に適切な様式での投与が、少なくとも統計的に有意な割合の患者にとって、病状の改善、治癒、疾患の低減、延命、生活の質の改善、又はNAFLD及び／若しくはSCAP関連疾患並びに関連原因の処置に精通している医者によって好ましいと一般に認められている他の効果などの有益な効果をもたらすことを示す。

10

【0139】

治療又は予防効果は、病状の1つ以上のパラメーターにおいて統計的に有意な改善がある場合、又はそうでない場合に予期される症状が悪化又は発症しないことによって明らかとなる。一例として、疾患の測定可能なパラメーターの少なくとも10%の、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%以上の好ましい変化が、有効な治療を意味し得る。所与のRNAiコンストラクト又はそのコンストラクトの製剤の有効性は、当該技術分野で知られている所与の疾患のための実験動物モデルを用いて判断することもできる。実験動物モデルを使用する場合、治療の有効性は、マーカー又は症状の統計的に有意な低減が観察される場合に証明される。

20

【0140】

対象には、任意の治療有効量のRNAiコンストラクトが投与され得る。RNAiコンストラクトの治療有効量の例示的な範囲としては、約0.01mg/kg体重～約100mg/kg体重、約0.05mg/kg体重～約75mg/kg体重、約0.1mg/kg体重～約50mg/kg体重、約1mg/kg～約30mg/kg体重、又は約2.5mg/kgの体重～約20mg/kg体重が挙げられるが、これらに限定されない。列挙された範囲の中間の値及び範囲も本開示に含まれる。

【0141】

RNAiコンストラクト、又はそれを含む組成物の投与は、例えば、患者の細胞、組織、血液、尿、又は他のコンパートメント内のSCAPタンパク質レベルの存在を、少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、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%、又は少なくとも約99%以上だけ低減し得る。

30

40

【0142】

RNAiの総用量の投与前に、5%の注入液などのより少ない用量を患者に投与し、アレルギー反応などの有害作用についてモニターしてもよい。別の例では、サイトカイン（例えば、TNF-α又はINF-α）レベルの増大などの望ましくない免疫賦活作用について、患者を観察してもよい。

【0143】

SCAP発現に対する阻害効果によって、本開示による組成物又はそれから調製される医薬組成物は、SCAP関連疾患（例えば、NAFLD）に罹患している患者の生活の質

50

を高めることができる。

【0144】

本明細書に開示されるRNAiは、「裸の」形態で投与されてもよく、この場合、修飾又は未修飾RNAiコンストラクトは、「遊離RNAi」として、水性又は好適な緩衝溶液中に直接的に懸濁される。遊離RNAiは、医薬組成物の非存在下で投与される。遊離RNAiは、好適な緩衝溶液中にあってもよい。緩衝溶液は、アセテート、シトレート、プロタミン、カルボネート、若しくはホスフェート、又はその任意の組合せを含んでもよい。一実施形態では、緩衝溶液は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。RNAiを含有する緩衝溶液のpH及び重量オスモル濃度は、対象への投与に好適であるように調整され得る。

10

【0145】

或いは、本明細書に開示されるRNAiコンストラクトは、リポソーム製剤などの医薬組成物として投与され得る。

【0146】

SCAP遺伝子発現の低減及び／又は阻害から利益を受けることとなる対象は、本明細書に記載されるか、又は当該技術分野で別途知られている非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)及び／又は別のSCAP関連疾患若しくは障害を有している対象である。

【0147】

本開示は更に、例えば、これらの障害を治療するために現在利用されているものなどの、例えば既知の医薬品及び／又は既知の治療法など他の医薬品及び／又は他の治療法を組み合わせ、SCAP遺伝子発現の低減及び／又は阻害から利益を受けることになる対象、例えば、SCAP関連疾患を有する対象を治療するための方法、並びにRNAiコンストラクト又はその医薬組成物の使用を提供する。

20

【0148】

例えば、ある特定の実施形態では、SCAP遺伝子を標的化するRNAiコンストラクトは、例えば、SCAP関連疾患を治療するのに有用な薬剤と組み合わせ投与される。例えば、SCAP発現の低減から利益を受けることとなる対象、例えば、SCAP関連疾患を患っている対象を処置するのに好適な追加の治療薬及び治療法としては、SCAP遺伝子の異なる部分を標的化するRNAiコンストラクト、SCAP関連疾患を処置するための治療剤及び／若しくは手順、又は前述のいずれかの組合せが挙げられる。

30

【0149】

ある特定の実施形態では、SCAP遺伝子の一部を標的化する第1のRNAiコンストラクトは、SCAP遺伝子の異なる部分を標的化する第2のRNAiコンストラクトと組み合わせ投与される。例えば、第1のRNAiコンストラクトは、二重鎖領域を形成する第1のセンス鎖及び第1のアンチセンス鎖を含んでもよく、当該第1のセンス鎖のヌクレオチドの実質的に全て及び第1のアンチセンス鎖のヌクレオチドの実質的に全てが修飾ヌクレオチドであり、当該第1のセンス鎖は、3'末端に結合したリガンドにコンジュゲートされており、そのリガンドは、二価又は三価の分枝状リンカーを介して結合された1つ以上のGalNAc誘導体であり；且つ第2のRNAiコンストラクトは、二重鎖領域を形成する第2のセンス鎖及び第2のアンチセンス鎖を含むことができ、第2のセンス鎖のヌクレオチドの実質的に全て及び第2のアンチセンス鎖のヌクレオチドの実質的に全てが修飾ヌクレオチドであり、第2のセンス鎖は、3'末端に結合したリガンドにコンジュゲートされており、そのリガンドは、二価又は三価の分枝状リンカーを介して結合された1つ以上のGalNAc誘導体である。一実施形態では、第1及び第2のセンス鎖のヌクレオチドの全て、並びに／又は第1及び第2のアンチセンス鎖のヌクレオチドの全ては、修飾を含む。修飾ヌクレオチドは、本明細書に記載される修飾ヌクレオチドのいずれか1つ又は組合せであり得る。

40

【0150】

他の実施形態では、SCAP遺伝子を標的化する第1のRNAiコンストラクトは、SCAP遺伝子とは異なる遺伝子を標的化する第2のRNAiコンストラクトと組み合わせ

50

て投与される。例えば、SCAP遺伝子を標的化するRNAiコンストラクトは、3 (PNPLA3) 遺伝子を含むパタチン様ホスホリパーゼドメインを標的化するRNAiコンストラクトと組み合わせて投与されてもよい。I148M変異体PNPLA3タンパク質は、非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD) の治療のための強力なヒト遺伝子検証を伴う治療標的である。PNPLA3 I148Mの発現は、過剰な肝臓脂肪の蓄積をもたらす、発生率、進行、及び重症度の増加を伴う非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 関連表現型を引き起こす。SCAP遺伝子を標的化する第1のRNAiコンストラクト及び異なる遺伝子、例えば、PNPLA3遺伝子を標的化する第2のRNAiコンストラクトは、同じ医薬組成物の一部として投与されてもよい。或いは、SCAP遺伝子を標的化する第1のRNAiコンストラクト及び異なる遺伝子、例えば、PNPLA3遺伝子を標的化する第2のRNAiコンストラクトは、異なる医薬組成物の一部として投与されてもよい。

10

【0151】

RNAiコンストラクト及び追加の治療剤並びに／又は治療は、同時に且つ／又は同じ組合せで、例えば、非経口的に投与されてもよく、或いは、追加の治療剤が別個の組成物の一部として、若しくは別々に、且つ／又は当該技術分野で知られているか若しくは本明細書に記載される別の方法によって投与されてもよい。

【0152】

本開示はまた、細胞内のSCAP発現 (遺伝子又はタンパク質発現) を低減し、且つ／又は阻害するため本明細書に開示されるRNAiコンストラクト及び／又はRNAiコンストラクトを含む組成物を使用する方法も提供する。更に他の態様では、細胞内のSCAP遺伝子発現を低減し、且つ／又は阻害するための医薬品の製造のための本明細書に開示されるRNAi及び／又はRNAiを含む組成物の使用が提供される。更なる他の態様では、本開示は、細胞内のSCAPタンパク質産生を低減し、且つ／又は阻害する際の使用のための本明細書に記載されるRNAi及び／又はRNAiコンストラクトを含む組成物を提供する。更に他の態様では、細胞内のSCAPタンパク質産生を低減し、且つ／又は阻害するための医薬品の製造のための本明細書に記載されるRNAiコンストラクト及び／又はRNAiコンストラクトを含む組成物の使用が提供される。本方法及び使用は、細胞を本明細書に開示されるRNAiコンストラクト、例えばsiRNAと接触させて、細胞を、SCAP遺伝子のmRNA転写物の分解を得るのに十分な時間維持することによって、細胞内のSCAP遺伝子の発現を阻害するか、又はSCAPタンパク質産生を阻害することを含む。遺伝子発現の低減は、mRNA又はタンパク質レベルを決定するための当該技術分野で知られるか又は本明細書に記載される任意の方法によって評価することができる。

20

30

【0153】

本明細書に開示される方法及び使用において、細胞は、インビトロで接触されてもインビボで接触されてもよい、すなわち、細胞は、対象の外側 (例えば、細胞培養中) にあっても又は対象内にあってもよい。本明細書に開示される方法を使用する処置に好適な細胞は、SCAP遺伝子を発現するあらゆる細胞、例えば、NAFLDを患っている対象由来の細胞、又はSCAP遺伝子若しくはSCAP遺伝子の一部を含む発現ベクターを含む細胞であり得る。本開示の方法に用いるのに好適な細胞としては、例えば哺乳動物細胞、例えば霊長類細胞 (ヒト細胞又は非ヒト霊長類細胞、例えばサル細胞若しくはチンパンジー細胞など)、非霊長類細胞 (ウシ細胞、ブタ細胞、ラクダ細胞、ラマ細胞、ウマ細胞、ヤギ細胞、ウサギ細胞、ヒツジ細胞、ハムスター、モルモット細胞、ネコ細胞、イヌ細胞、ラット細胞、マウス細胞、ライオン細胞、トラ細胞、クマ細胞又はバッファロー細胞など)、鳥類細胞 (例えば、アヒル細胞又はガチョウ細胞)、又はクジラ細胞が挙げられる。一実施形態では、細胞は、ヒト細胞である。

40

【0154】

SCAP遺伝子発現は、細胞内で、少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20

50

%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、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%、99%、又は約100%だけ阻害され得る。

【0155】

10

SCAPタンパク質産生は、細胞内で、少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、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%、99%、又は約100%だけ阻害され得る。

20

【0156】

本明細書に開示されるインビボでの方法及び使用は、RNAiコンストラクトを含有する組成物を対象に投与することを含んでもよく、RNAiコンストラクトは、対象のSCAP遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部と相補的なヌクレオチド配列を含む。治療対象の生物がヒトである場合、組成物は、当該技術分野で知られる任意の手段によって投与されてもよく、このような手段としては、皮下、静脈内、経口、腹腔内又は頭蓋内（例えば、脳室内、実質内及び髄腔内）、筋肉内、経皮、気道（噴霧剤）、経鼻、直腸を含む非経口経路並びに局所（頬側及び舌下を含む）投与が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、組成物は、皮下又は静脈内の注入又は注射によって投与される。一実施形態では、組成物は、皮下注射によって投与される。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、投与は、デポ注射による。デポ注射は、長期間にわたってRNAiコンストラクトを一貫して放出し得る。ゆえに、デポ注射は、所望の効果、例えば、所望のSCAPの阻害、又は治療効果若しくは予防効果を得るのに必要な投与頻度を減少させ得る。また、デポ注射は、より一貫した血清濃度を実現し得る。デポ注射としては、皮下注射又は筋肉内注射が挙げられ得る。いくつかの実施形態では、デポ注射は、皮下注射である。

【0158】

いくつかの実施形態では、投与は、ポンプを介する。ポンプは、外部ポンプ又は外科的に埋め込まれるポンプであり得る。ある特定の実施形態では、ポンプは、皮下に埋め込まれる浸透圧ポンプである。他の実施形態では、ポンプは、注入ポンプである。注入ポンプは、静脈内、皮下、動脈又は硬膜外注入に用いられ得る。好ましい実施形態では、注入ポンプは、皮下注入ポンプである。他の実施形態では、ポンプは、RNAiコンストラクトを対象に送達する、外科的に埋め込まれるポンプである。

40

【0159】

投与様式は、局所性又は全身性の処置が所望されるかに基づいて、また処置されることとなる領域に基づいて選択されてもよい。投与経路及び投与部位は、標的化を高めるように選択され得る。

【0160】

50

方法及び使用は、RNA i コンストラクト、例えば、哺乳動物の細胞内で SCAP 遺伝子を標的化する siRNA を含む組成物を、哺乳動物、例えば、ヒトに投与すること、及び SCAP 遺伝子の mRNA 転写物の分解を得るのに十分な時間にわたり哺乳動物を維持し、それにより哺乳動物内の SCAP 遺伝子の発現を阻害することを含む。遺伝子発現及び／又はタンパク質発現の低減は、当該技術分野で知られるか又は本明細書に記載される任意の方法によって、RNA i コンストラクト投与対象から得られた試料で評価することができる。一実施形態では、組織試料は、SCAP 遺伝子及び／又はタンパク質発現の低減を監視するための組織材料として機能する。別の実施形態では、血液試料は、SCAP 遺伝子及び／又はタンパク質発現の低減を監視するための組織材料として機能する。

【0161】

いくつかの実施形態では、RNA i コンストラクトの投与後のインビボにおける標的 mRNA（例えば、SCAP の mRNA）の RISC 媒介性切断の検証は、5' - RACE 又は当該技術分野で知られるプロトコルの改変（Lasham A et al., (2010) Nucleic Acid Res., 38 (3) p-e19; 及び Zimmermann et al., (2006) Nature 441:111-4）を実施することによって評価され得る。

【0162】

本明細書に開示される全てのリボ核酸配列は、配列中のウラシル塩基をチミン塩基で置換することにより、デオキシリボ核酸配列に変換することができることが理解される。同様に、本明細書に開示される全てのデオキシリボ核酸配列は、配列中のチミン塩基をウラシル塩基と置換することにより、リボ核酸配列に変換することができる。本明細書で開示される全ての配列のデオキシリボ核酸配列、リボ核酸配列、並びにデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの混合物を含有する配列が本開示によって包含される。

【0163】

加えて、本明細書で開示されるあらゆる核酸配列は、化学修飾の任意の組合せによって修飾され得る。当該技術分野の当業者は、特定の場合、修飾ポリヌクレオチドを記載するための「RNA」又は「DNA」のこのような指定が任意であることを容易に理解するであろう。例えば、リボース糖に 2' - OH 置換基及びチミン塩基を有するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドは、修飾糖を有する DNA 分子（DNA の天然の 2' - H に対して 2' - OH）又は修飾塩基（RNA の天然のウラシルに対してチミン（メチル化ウラシル））を有する RNA 分子と記載され得る。

【0164】

したがって、配列表に記載のものを含むがこれらに限定されない本明細書で提供される核酸配列は、修飾核酸塩基を有するそのような核酸を含むが、これらに限定されない天然若しくは修飾 RNA 及び／又は DNA の任意の組合せを含有する核酸を包含するように意図される。更なる例として、限定するものではないが、配列「ATCGATCG」を有するポリヌクレオチドは、修飾又は非修飾にかかわらない RNA 塩基、例えば配列「AUCGAUCG」を有するもの、並びに「AUCGATCG」などのいくつかの DNA 塩基及び RNA 塩基を有するもの、並びに「ATmeCGAUCG」などの他の修飾塩基を有するポリヌクレオチドを含むそのような化合物を含むが、これらに限定されないそのような配列を有する任意のポリヌクレオチドを包含し、配列中、meC は、5 位にメチル基を含むシトシン塩基を示す。

【0165】

実行された実験及び達成された結果を含む以下の実施例は、例示目的のためにのみ提供されるものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0166】

本明細書に記載される全ての動物実験は、Amgen の動物実験委員会（IACUC）により承認され、Guide for the Care and Use of Lab

10

20

30

40

50

oratory Animals, 8th Edition (National Research Council (U. S.)) に従って実施した。Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsの更新のための委員会、Institute for Laboratory Animal Research (U. S.) 及びNational Academies Press (U. S.) (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Ed., National Academies Press, Washington, D. C. に従って管理された。マウスは、空調された空間において $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で12時間明期；12時間暗期のサイクル（0600～1800時間）で単独飼育した。動物には、別段の指示がない限り、通常の固形飼料食餌（Envigo、2920X、又は別途明記された食餌）及び自動給水システムによる水（逆浸透精製）を自由に与えた。終了時に、深麻酔下で心臓穿刺によって血液を回収し、その後Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) ガイドラインに従って、二次的な物理的方法によって安楽死させた。

10

【0167】

実施例1：修飾SCAP siRNA分子の選択、設計、及び合成

SREBP切断活性化タンパク質（SCAP）遺伝子を標的化する治療用siRNA分子のための最適な配列の同定及び選択は、ヒトSCAP転写物のバイオインフォマティクス分析を使用して確認された。siRNAトリガーを、センス（パッセンジャー）及びアンチセンス（ガイド）鎖からなる化学的に修飾されたsiRNA二重鎖として調製した。両方の鎖は、2つの塩基対3'オーバーハングを有する18～23ヌクレオチド長であった。各ヌクレオチドのリボース内の天然の2'-OHが、2'-OMe又は2'-F基のいずれかで置換され、且つ両方の鎖の各末端での2つのホスホジエステルヌクレオチド間結合がホスホロチオエートで置き換えられ、エンドヌクレアーゼによる分解を低減させるようにsiRNAを修飾した。生成された未修飾及び修飾アンチセンス並びにセンスsiRNA配列を表1に示す。

20

【0168】

表1及び本出願の他の部分のヌクレオチド配列は、以下の表記法に従って列挙されている。A、U、G、及びC＝対応するリボヌクレオチド；dT＝デオキシチミジン；dA＝デオキシアデノシン；dC＝デオキシシチジン；dG＝デオキシグアノシン；invAb＝逆位脱塩基；invDT＝逆位デオキシチミジン；invDA＝逆位デオキシアデノシン；invDC＝逆位デオキシシチジン；invDG＝逆位デオキシグアノシン；a、u、g、及びc＝対応する2'-O-メチルリボヌクレオチド；Af、Uf、Gf、及びCf＝対応する2'-デオキシ-2'-フルオロ（「2'-フルオロ」）リボヌクレオチド；Ab＝脱塩基；MeO-I＝2'-メトキシイノシン；GNA＝グリコール核酸；sGNA＝3'ホスホロチオエートを有するグリコール核酸；LNA＝ロックド核酸。配列中の「s」の挿入は、2つの隣接するヌクレオチドがホスホロチオジエステル基（例えば、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合）によって連結されることを示す。特に示されない限り、他の全てのヌクレオチドは、3'-5'ホスホジエステル基によって連結されている。

30

40

【0169】

【表 1 - 1】

表I.SCAPに向けられる未修飾及び修飾されたsiRNA配列

二本鎖番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 未修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
1	ggaccuGfuGfGfAfauiuc acscs[invAb]	1	ggaccuguggaau cacc	295	usGfsgugaAfuuccAfcA fgguccsusu	148	uguguaauucc acaggucuu	442
2	ggaccuGfuGfGfAfauiuc acscs[invAb]	2	ggaccuguggaau cacc	296	usGfsgUfgAfAfuuccAf cAfguccsusu	149	uguguaauucc acaggucuu	443
3	ggacCfuGfuGfGfAfauiuc acscs[invAb]	3	ggaccuguggaau cacc	297	usGfsgugaAfuuccacAf gGfuccsusu	150	uguguaauucc acaggucuu	444
4	ggacCfuGfuGfGfAfauiuc cs[invAb]	4	ggaccuguggaau cacc	298	usGfsgugaauuccAfcAf gGfuccsusu	151	uguguaauucc acaggucuu	445
5	ggaccuGfuGfGfAfauiuc accacs[invAb]	5	ggaccuguggaau cacc	299	usGfsgugaAfuuccAfcA fgguccsusu	152	uguguaauucc acaggucuu	446
6	ggaccuGfuGfGfAfauiuc acscs[invAb]	6	ggaccuguggaau cacc	300	usGfsgugaAfuuccAfcA fgguccsc	153	uguguaauucc acagguc	447
7	gcgagaUfuUfUfCfcu acscs[invAb]	7	gcgagaauuuuccc uacc	301	asGfsguagGfsgaaAfaU fcuuccsusu	154	agguaggggaa aaucucgcu	448
8	gcgagaUfuUfUfCfcu acscs[invAb]	8	gcgagaauuuuccc uacc	302	asGfsgUfaGfGfsgaaAf aUfcuuccsusu	155	agguaggggaa aaucucgcu	449
9	gcgaGfaUfuUfUfCfcu acscs[invAb]	9	gcgagaauuuuccc uacc	303	asGfsguagGfsgaaaUf cUfcuuccsusu	156	agguaggggaa aaucucgcu	450
10	gcgaGfaUfuUfUfCfcu s[invAb]	10	gcgagaauuuuccc uacc	304	asGfsguaggggaaAfaUf cUfcuuccsusu	157	agguaggggaa aaucucgcu	451
11	gcgagaUfuUfUfCfcu acscs[invAb]	11	gcgagaauuuuccc uacc	305	asGfsguagGfsgaaAfaU fcuuccsusu	158	agguaggggaa aaucucg	452
12	gcgagaUfuUfUfCfcu accuacs[invAb]	12	gcgagaauuuuccc uaccu	306	asGfsguagGfsgaaAfaU fcuuccsusu	159	agguaggggaa aaucucgcu	453

【表 1 - 2】

二本鎖番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
13	ccugucCfaUfUGfAfcau ucsgs[invAb]	13	ccuguccaungaca uucg	307	asCfsgaaUGfucaaUfgG facaggsusu	160	acgaauucaaa uugacagguu	454
14	ccugucCfaUfUGfAfcau ucsgs[invAb]	14	ccuguccaungaca uucg	308	asCfsgAfauUfGfucaaUf gGfacaggsusu	161	acgaauucaaa uugacagguu	455
15	ccugUfcCfAfUfUGfcau ucsgs[invAb]	15	ccuguccaungaca uucg	309	asCfsgaaUGfucaaUfgG Cfaggsusu	162	acgaauucaaa uugacagguu	456
16	ccugUfcCfAfUfUGfcau ucsgs[invAb]	16	ccuguccaungaca uucg	310	asCfsgaaUGfucaaUfgG Cfaggsusu	163	acgaauucaaa uugacagguu	457
17	ccugucCfaUfUGfAfcau ucguus[invAb]	17	ccuguccaungaca uucguu	311	asCfsgaaUGfucaaUfgG facaggsusu	164	acgaauucaaa uugacagguu	458
18	ccugucCfaUfUGfAfcau ucsgs[invAb]	18	ccuguccaungaca uucg	312	asCfsgaaUGfucaaUfgG facaggsusu	165	acgaauucaaa uugacagguu	459
19	guccauUfgAfCfAfUfucg ccsgs[invAb]	19	guccaungacauc gccc	313	asCfsgcgAfauGfCfA fugagcsusu	166	acggcgaaugu caauugacuu	460
20	cuguccauUfgAfCfAfUfu cgccgs[invAb]	20	cuguccaungaca uugccc	314	asCfsgcgAfauGfCfA fugagcsusu	167	acggcgaaugu caauugacuu	461
21	cuguccAfUfUGfAfCfauu cgccgs[invAb]	21	cuguccaungaca uugccc	315	asCfsgcgAfauGfCfA uGfagcsusu	168	acggcgaaugu caauugacuu	462
22	cuguccauUfgAfCfAfUfu cgccgs[invAb]	22	cuguccaungaca uugccc	316	asCfsgcgAfauGfCfA fugagcsusu	169	acggcgaaugu caauugacuu	463
23	cuguccAfUfUGfAfCfauu cgcs[invAb]	23	cuguccaungaca uugccc	317	asCfsgcgAfauGfCfA uGfagcsusu	170	acggcgaaugu caauugacuu	464
24	guccauUfgAfCfAfUfucg cguus[invAb]	24	guccaungacauc gcccguu	318	asCfsgcgAfauGfCfA fugagcsusu	171	acggcgaaugu caauugacuu	465
25	ggaagAfCfCfGfAfua ucsu[invAb]	25	ggaagagccagu auu	319	asAfsgaaUfucgCfuC fuucsu	172	agaauacucg cuuucuu	466

【0171】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
26	ggaaagAfgCfcGfAfgua ucsu[invAb]	26	ggaaagagccgagu aucu	320	asAfsGfAfuAfcfueggCf uCfuucccsusu	173	aagauacuagg cucuuuccuu	467
27	ggaaAfgAfgCfcgaguau us[invAb]	27	ggaaagagccgagu aucu	321	asAfsGfauacuaggCfuCf uUfuuccsu	174	aagauacuagg cucuuuccuu	468
28	ggaaagAfgCfcGfAfgua ucuuus[invAb]	28	ggaaagagccgagu aucuuu	322	asAfsGfauaCfueggCfuC fuucccsusu	175	aagauacuagg cucuuuccuu	469
29	ggaaagAfgCfcGfAfgua ucuu[invAb]	29	ggaaagagccgagu aucu	323	asAfsGfauaCfueggCfuC fuuccsc	176	aagauacuagg cucuuucc	470
30	ggaaAfgAfgCfcgagu ucuu[invAb]	30	ggaaagagccgagu aucu	324	asAfsGfauaCfueggCfu uUfuuccsu	177	aagauacuagg cucuuuccuu	471
31	aaagagCfcGfAfgfUfauc uuucs[invAb]	31	aaagagccgaguau cuuc	325	asGfsaagaUfaucGfgC fuuuususu	178	agaagauacu ggcucuuuuu	472
32	ggaaagagCfcGfAfgfUfa ucuuus[invAb]	32	ggaaagagccgagu aucuuc	326	asGfsaagaUfaucGfgC fuuuuccsu	179	agaagauacu ggcucuuuccu u	473
33	ggaaagAfgCfcGfAfgua ucuuus[invAb]	33	ggaaagagccgagu aucuuc	327	asGfsaagaUfaucggCfu Cfuucccsusu	180	agaagauacu ggcucuuuccu u	474
34	ggaaagagCfcGfAfgfUfa ucuuus[invAb]	34	ggaaagagccgagu aucuuc	328	asGfsaagaUfaucGfgC fuuuuccsc	181	agaagauacu ggcucuuucc	475
35	ggaaagAfgCfcGfaguau ucuu[invAb]	35	ggaaagagccgagu aucuuc	329	asGfsaagaauacuGfgCfu Cfuucccsusu	182	agaagauacu ggcucuuuccu u	476
36	aaagagCfcGfAfgfUfauc ucuuus[invAb]	36	aaagagccgaguau cucuuu	330	asGfsaagaUfaucGfgC fuuuuccsc	183	agaagauacu ggcucuuucc	477
37	ggggagAfgAfuUfuUfucc ccsu[invAb]	37	ggggagagauuuc cccu	331	usAfsGgggAfaaauCfuC fgccgcsusu	184	uaggggaaaau cucggccuuu	478
38	ggcgagAfuUfuUfCfccc uases[invAb]	38	ggcgagauuuccc cuac	332	asGfsuaggGfgaaaAfuC fucggcsusu	185	aguaaggggaaa aucucggccuu	479

【0172】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

二本類 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
39	aagauaUfcUfCfGfGfgcc uucsg[invAb]	39	aagaauaucueggc cuc	333	asGfsaaggCfcoagaGfaU faucuuusu	186	agaagccoga gaauauuu	480
40	cgggccUfuCfUfAfCfaac casus[invAb]	40	cggccuucuaaca ccau	334	asAfsuggUfguaGfAfaG fgcccsusu	187	aaugguuguag aaagcccggu	481
41	cugcagUfuUfAfGfAfggg acscs[invAb]	41	cugcaguuaagagg gacc	335	asGfsguccCfucuaAfaC fugcagsusu	188	agguccucua aacuigcaguu	482
42	acggggAfcCfUfGfUfuac agsas[invAb]	42	acggggaccugua caga	336	asUfscuguAfacagGfuC fccogusu	189	aucuguacag guccccgguu	483
43	cggcucAfaCfGfGfUfucc cusus[invAb]	43	cggcucacgguc ccuu	337	asAfsaggAfacegUfuG fagccgsusu	190	aaagggacccg uuagagccgu	484
44	uguacuGfaCfUfGfGfag ccsgs[invAb]	44	uguacugacugcca gccc	338	asCfsggcuGfccagUfuA fguacasu	191	acggcugccag ucaguacuu	485
45	cccugCfaGfUfUfUfaga ggsgs[invAb]	45	cccugcaguuuag aggg	339	usCfscuccUfaaacUfgCf aggggsusu	192	uccucuaaacu gcaggggguu	486
46	uguccaUfuGfAfCfAfuuc gcscs[invAb]	46	uguccauagacuu cgcc	340	asGfsgogaAfugucAfaU fggacasu	193	agggcgauguc aaugggacuu	487
47	ggcuggCfaCfCfGfUfugu cusgs[invAb]	47	ggcuggcacccgug ucug	341	asCfsagacAfacegUfgC fcagccusu	194	acagacaacggu gccagccuu	488
48	ggcucaAfcGfGfUfUfcc uusgs[invAb]	48	ggcucaacgguucc cuug	342	usCfsaaggGfaaccGfuU fgagccusu	195	ucaaggggaacc guugagccuu	489
49	gcucaaCfGfUfUfCfcu ugsas[invAb]	49	gcucaaagguuucc uuga	343	asUfscagGfgaacCfU fugagcsusu	196	aucaagggacc guugagcuu	490
50	caacggUfuCfCfUfUfuga uusgs[invAb]	50	caacgguucccug auuu	344	asAfsaauCfagggAfaC fccuugsusu	197	aaaaucaaggga accguuguu	491
51	acgguuCfcCfUfUfGfaau ucsus[invAb]	51	acgguucccungau uuuu	345	asAfsaaaaUfcaagGfgA facegsusu	198	aaagaaaucaagg gaaccgguu	492
52	gugggaUfgUfAfCfUfag ugsgs[invAb]	52	gugggauguacuga cugg	346	asCfscaguCfaguaCfaUf cccacusu	199	accagucaguac auccacuu	493

【0173】

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

二本領 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 未修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
53	ougaaaCfuCfCfCfCfug ccsas[invAb]	53	ougaaacuccuccu gcca	347	asUfsggcaAfgggAfgU fuucagsusu	200	auggcaagggg aguuucaguu	494
54	gauccuGfaCfAfUfCfauu gsgs[invAb]	54	gauccugacaucau uagg	348	usCfscaaUfgaugUfcA fggaucsuu	201	ucccaaugaug ucaggauuu	495
55	ugguceAfcGfUfGfCfau ucsas[invAb]	55	ugguceagugcac uuca	349	usUfsgaagUfgcacGfuG fgaccasu	202	uugaagugcac gugggacauu	496
56	guggacUfcUfGfAfCfcgc aasas[invAb]	56	guggacucugacgg caaa	350	asUfsguugCfGfuaGfaG fuaccasu	203	auuugcgguca gguccacuu	497
57	ggaggaGfaUfUfGfGfugu cgscs[invAb]	57	ggagagagauugu guogc	351	asGfscgacAfccaaUfcUf cuuccsu	204	agcgacaccau cuuccuu	498
58	aguguuUfcCfCfUfGfgea casas[invAb]	58	aguguuuccuccg acaa	352	asUfsguugCfagggGfaA facacusu	205	auugugcagg gaaacacuuu	499
59	ggagauUfgGfUfGfUfCfc ugsas[invAb]	59	ggagauuguguc gcuca	353	asUfscagcGfacacCfaAf uuccesu	206	aucagcgacacc aauccuu	500
60	uugcugAfcCfUfCfAfucc ccscs[invAb]	60	uugcugagucuauc cccc	354	asGfsgggAfgagCfuC fagcgasu	207	agggggauag cucagcgauu	501
61	uguccGfgGfCfAfUfucc aascs[invAb]	61	ugucccgggcauuc caac	355	asGfsguugAfaugcCfcG fggacasu	208	aguuugaauug cggggacauu	502
62	ggaguuCfuGfUfCfUfauu ugsas[invAb]	62	ggaguuucugucuu uugc	356	asGfscaaaGfagacAfgA facuccsu	209	agcaagagagaca gaaucuu	503
63	gagguaAfcCfUfGfGfggg ccsus[invAb]	63	gagguaaccuuggg gcuu	357	asAfgggCfccagGfuU facuccsu	210	aaagccccaggg uuaccuu	504
64	acaccaUfcAfCfGfUfugc agscs[invAb]	64	acaccauacguug cagc	358	asGfscugcAfagcuGfaU fggugusu	211	agcugcaacgu gaugguuuu	505
65	cggcuacfuUfCfAfCfcu agsus[invAb]	65	cggcuacuuacccc uagu	359	asAfcuagGfgugaAfgU fagcgusu	212	aaauaggguga aguagcgguu	506
66	cauugaCfcAfGfAfCfcau ggsus[invAb]	66	cauugaccagacca uugu	360	asAfcscuuGfgucGfgU fcaaugusu	213	aaacauugucu ggucaauugu	507

10

20

30

40

【0174】

50

【表 1 - 6】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 未修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
67	aggagaUfuGfGfUfGfucg cusgs[invAb]	67	aggagaunuguguc gucg	361	usCfsagcgAfcaccAfaU fucucusu	214	ucagcgacacca aauccuuu	508
68	cggccuUfcCfCfUfCfuc gsgs[invAb]	68	cggccuuccucuu cggg	362	asCfscggaAfgaggGfaA fggcggsusu	215	acccgaagagg gaagcgguu	509
69	aunгааGfgGfGfUfGfucg ugscs[invAb]	69	aunгааggguguc gucg	363	asGfscacaGfaccCfcUf ucaaususu	216	agcacagcaccc cuucauuu	510
70	ccuguccAfcGfUfGfCfa cuucas[invAb]	70	ccuguccacguc acuua	364	usUfsgaagUfgcacGfuG fgaccaggusu	217	uugaagugcac guggaaccaggu u	511
71	ccugguCfcAfcGfUfGfca cuucas[invAb]	71	ccugguccacguc acuua	365	usUfsgaagUfgcacguGf gAfcagggsusu	218	uugaagugcac guggaaccaggu u	512
72	ugguccAfcGfUfGfCfacu ucaaus[invAb]	72	ugguccacgucac uicaau	366	usUfsgaagUfgcacGfuG fgaccagg	219	uugaagugcac guggaaccagg	513
73	ccugguccAfcGfUfGfCfa cuucas[invAb]	73	ccugguccacguc acuua	367	usUfsgaagUfgcacGfuG fgaccagg	220	uugaagugcac guggaaccagg	514
74	ccugguCfcAfcGfugcau ucas[invAb]	74	ccugguccacguc acuua	368	usUfsgaagugcacGfuGf gAfcagggsusu	221	uugaagugcac guggaaccaggu u	515
75	ggagauUfgGfUfGfUfGfc ugsas[invAb]	75	ggagauuguguc gucga	369	asUfscAfgCfGfacacCf aAfuuccesusu	222	aucagcgacacc aauccuuu	516
76	acaccaUfcAfcGfUfGfc agscs[invAb]	76	acaccaucacguug cagc	370	asGfscUfgCfAfaaguGf aUfgugususu	223	agcugcaacgu gaugguuuu	517
77	ggagAfuUfgGfUfGfucgc ugas[invAb]	77	ggagauuguguc gucga	371	asUfscagcGfacaccaAfu Cfuccesusu	224	aucagcgacacc aauccuuu	518
78	acacCfaUfcCfAfcfguugc agcs[invAb]	78	acaccaucacguug cagc	372	asGfscugcAfacugaUf gGfugususu	225	agcugcaacgu gaugguuuu	519
79	ggagAfuUfgGfugucgucg as[invAb]	79	ggagauuguguc gucga	373	asUfscagcgacacCfaAfu Cfuccesusu	226	aucagcgacacc aauccuuu	520

【 0 1 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 未修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
80	acacCfaUfcAfcgungcagc s invAb	80	acaccaucaagcung cagc	374	asGfscugcaacguGfaUf gFguususu	227	agcugcaacgu gaugguuuuu	521
81	ggagauUfgGfUfGfUfcgc ugas invAb	81	ggagauuguguc gcuiga	375	asUfscagcGfacacCfaAf ucusc	228	aucagcgacacc aaucucc	522
82	acaccaUfcAfcGfUfUfcg agcs invAb	82	acaccaucaagcung cagc	376	asGfscugcAfacuGfaU fguusgu	229	agcugcaacgu gaugguuu	523
83	ggagauUfgGfUfGfUfcgc ugaus invAb	83	ggagauuguguc gcuauu	377	asUfscagcGfacacCfaAf ucucusu	230	aucagcgacacc aaucuccu	524
84	acaccaUfcAfcGfUfUfcg agcuus invAb	84	acaccaucaagcung cagcuu	378	asGfscugcAfacuGfaU fegguusuu	231	agcugcaacgu gaugguuuuu	525
85	uegcugAfcGfUfCfAfucc cccs invAb	85	uegcugagcucauc cccc	379	asGfsgGfgGfAfugagCf uCfagcgasusu	232	aggggggaugag cucagcgauu	526
86	uegcUfgAfGfUfcaucc cccs invAb	86	uegcugagcucauc cccc	380	asGfsggggAfugagcuCf aGfcgasusu	233	aggggggaugag cucagcgauu	527
87	uegcUfgAfGfUfcaucc s invAb	87	uegcugagcucauc cccc	381	asGfsgggggaugagCfuCf aGfcgasusu	234	aggggggaugag cucagcgauu	528
88	uegcugAfcGfUfCfAfucc cccuus invAb	88	uegcugagcucauc cccuu	382	asGfsggggAfugagCfuC fagcgasusu	235	aggggggaugag cucagcgauu	529
89	uegcugAfcGfUfCfAfucc cccs invAb	89	uegcugagcucauc cccc	383	asGfsggggAfugagCfuC fagcggsa	236	aggggggaugag cucagcgauu	530
90	ggcucaAfcGfGfUfUfccc uusgs invAb	90	ggcucaacggnucc cuug	384	usCfcaAfgGfGfaaccGf uUfgagccusu	237	ucaaggggaacc guugagccuu	531
91	ggcuCfaAfcGfGfUfUfccc uugs invAb	91	ggcucaacggnucc cuug	385	usCfcaaggGfaaccguUf gAfccusu	238	ucaaggggaacc guugagccuu	532
92	ggcuCfaAfcGfUfUfUfccc gs invAb	92	ggcucaacggnucc cuug	386	usCfcaagggaaccGfuUf gAfccusu	239	ucaaggggaacc guugagccuu	533
93	ggcucaAfcGfGfUfUfccc uugaus invAb	93	ggcucaacggnucc cuugau	387	usCfcaaggGfaaccGfuU fagccusu	240	ucaaggggaacc guugagccuu	534

10

20

30

40

【 0 1 7 6 】

50

【 0 1 7 7 】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 未修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
94	ggcuaAfcGfGrFUfUfcc uuGs[invAb]	94	ggcuaacagggucc cuug	388	usCfsaaGGfGaaccGfuU fGagscse	241	ucaagggaacc gungagcc	535
95	gcggcgagAfUfUFUfUfCc ccuacs[invAb]	95	gcggcgagauuuuc ccuac	389	asGfsuagGfGaaaaAfUc fucgcgcsusu	242	aguaagggaaga aucucgcgcgu	536
96	cggcucaACfGfGUfUfCfc cuGgs[invAb]	96	cggcucaacggnucc ccuuga	390	asUfscagGfGaaccCfG U fugagccgsusu	243	aucagggggaacc gungagccggu	537
97	gcggcgAgfAfUfUFUfUccc ccuacs[invAb]	97	gcggcgagauuuuc ccuac	391	asGfsuagGfGaaaaAfU uCfGccgcsusu	244	aguaagggaaga aucucgcgcgu	538
98	cggcucaAfaCfGfGUfUfUccc cuGgs[invAb]	98	cggcucaacggnucc ccuuga	392	asUfscagGfGaaccGfUfu Gfagccgsusu	245	aucagggggaacc gungagccggu	539
99	gcggcgAgfAfUfUfUfUcccc uacs[invAb]	99	gcggcgagauuuuc ccuac	393	asGfsuaggggaaaaAfUcFf uCfGccgcsusu	246	aguaagggaaga aucucgcgcgu	540
100	cggcucaAfaCfGfGuuccu uGgs[invAb]	100	cggcucaacggnucc ccuuga	394	asUfscaggggaacCfGfUfu Gfagccgsusu	247	aucagggggaacc gungagccggu	541
101	ggcgagAfUfUfUfUfUfCfccc uacuu[invAb]	101	ggcgagauuuuccc cuacuu	395	asGfsuagGfGaaaaAfUc fucgcgsc	248	aguaagggaaga aucucgcgcg	542
102	gcuaaCfGfUfUfUfUfCfcu uGaus[invAb]	102	gcuaacggnuccc uuGauu	396	asUfscagGfGaaccCfG U fugagccsg	249	aucagggggaacc gungagccg	543
103	gcggcgagAfUfUfUfUfUfCfc ccuacs[invAb]	103	gcggcgagauuuuc ccuac	397	asGfsuagGfGaaaaAfUc fucgcgsc	250	aguaagggaaga aucucgcgcg	544
104	cggcucaACfGfGUfUfUfCfc cuGgs[invAb]	104	cggcucaacggnucc ccuuga	398	asUfscagGfGaaccCfG U fugagccsg	251	aucagggggaacc gungagccg	545
105	agaaganaUfcUfUfUfUfUfGfg ccuacs[invAb]	105	agaanaucucgg gccuac	399	asGfsaaGGfGcgaGfaU faucuscuu	252	agaaggcccgga rauaucucu	546

【表 1 - 9】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
106	agaagauUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv/Ab]	106	agaagauaucucgg gccuuc	400	asGfsaaggCfcogaGfaU faucuuususu	253	agaagggccoga gaauaucuuc u	547
107	agaagaUfaUfCfUfCfggg ccuucs[inv/Ab]	107	agaagauaucucgg gccuuc	401	asGfsaaggCfcogaUfa Ufcuuususu	254	agaagggccoga gaauaucuuc u	548
108	agaagaUfaUfcUfCfGfgcc uucs[inv/Ab]	108	agaagauaucucgg gccuuc	402	asGfsaaggccogaGfaUfa Ufcuuususu	255	agaagggccoga gaauaucuuc u	549
109	aagauaUfcUfCfGfGfgcc uucuu[inv/Ab]	109	aagauaucucgggc cuccu	403	asGfsaaggCfcogaGfaU faucuuuscu	256	agaagggccoga gaauaucuuc u	550
110	ccugguccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv/Ab]	110	ccugguccacgugc acuuc	404	usUfsgaagUfGcacguGf gAfcacggsusu	257	uuagaagugcac guggaaccaggu u	551
111	ggggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv/Ab]	111	ggggcgagaunuc ccuac	405	asGfsuaggGfgaaaanCf uCfGccgcsusu	258	aguaggggaaa aucucgcccgu u	552
112	cggcucacCfGfUfUfCfc cuugas[inv/Ab]	112	cggcucacgguc ccuuga	406	asUfscagGfgaacgUfu Gfagccggsusu	259	aucaggggaacc guuagagccguu u	553
113	agaagauaUfcUfCfGfGfg ccuucs[inv/Ab]	113	agaagauaucucgg gccuuc	407	asGfsaaggCfcogaUfa Ufcuuususu	260	agaagggccoga gaauaucuuc u	554
114	ccugguccAfcGfUfGfCfa cuucas[inv/Ab]	114	ccugguccacgugc acuuc	408	usUfsgaagUfGcacGfuG fgAfcacggsusu	261	uuagaagugcac guggaaccaggu u	555
115	ggggcgagAfuUfUfUfCfc ccuacs[inv/Ab]	115	ggggcgagaunuc ccuac	409	asGfsuaggGfgaaaAfuC fuCfGccgcsusu	262	aguaggggaaa aucucgcccgu u	556

【 0 1 7 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 10】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (3'-5')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
116	eggcucaaCfGfUfUfCfc cungas[invAb]	116	eggcucaacggguc ccmga	410	asUfscagGfGaacCfGfU fuGfagccgsusu	263	aucagggaacc gunagaccguu	557
117	agaagauaUfcUfCfGfGfG ccuacs[invAb]	117	agaagauauncggg gccuuc	411	asGfsaaggCfccaGfaU faUfouucusu	264	agaagggccga gaauaucuu	558
118	ccugguCfcAfcGfugcacu ucas[invAb]	118	ccugguccacgguc acuua	412	usUfsgaaGfUfGcacguG fgAfccaggsusu	265	uuagagugcac gugagaccagu	559
119	ggggcgAfgAfuUfuucccc uacs[invAb]	119	ggggcgagauuuc ccuac	413	asGfsuagGfGfGaaaauC fuCfGccgsusu	266	aguaggggaaa aucucggcu	560
120	eggcucafaCfGfGfuccu ugas[invAb]	120	eggcucaacggguc ccmga	414	asUfscaaGfGfGaacgU fuGfagccgsusu	267	aucagggaacc gunagaccguu	561
121	agaagaUfaUfcUfGggcc uucs[invAb]	121	agaagauncggg gccuuc	415	asGfsaagGfCfGcgagaU faUfouucusu	268	agaagggccga gaauaucuu	562
122	ggagauUfgGfUfGfUfGc ugas[invAb]	122	ggagauuggguc gcuga	416	asUfscagGfGaaccaAfu Cfuccusu	269	aucagggaacc aaucuccu	563
123	uegcugAfgCfUfCfAfucc cccs[invAb]	123	uegcugagcuauc cccc	417	asGfsggggAfugagcuCf aGfGgasusu	270	aggggggagag cucagcgauu	564
124	acaccaUfcAfCfGfUfugc agcs[invAb]	124	acaccaacggug cagc	418	asGfscugCfGfGgagaUf gGfugusu	271	agcugcaacgu gauggguguu	565
125	ggcucaAfcGfGfUfUfccc uugs[invAb]	125	ggcucaacgguucc cung	419	usCfsaaggGfGaacguUf gAfGccusu	272	ucaagggaacc gunagaccuu	566
126	ggagauUfgGfUfGfUfGc ugas[invAb]	126	ggagauuggguc gcuga	420	asUfscagGfGaacCfAf uCfuccusu	273	aucagggaacc aaucuccu	567
127	ggagAfuUfgGfugcgug as[invAb]	127	ggagauuggguc gcuga	421	asUfscagCfGfGaacAfa uCfuccusu	274	aucagggaacc aaucuccu	568

【0179】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
128	uegcugAfcGfUfCfAfucc cccs[invAb]	128	uegcugagucauc cccc	422	asGfsaggAfugagCfuC faGfaggasusu	275	aggggggagag cucagcgauu	569
129	uegcUfgAfgCfucauccccc s[invAb]	129	uegcugagucauc cccc	423	asGfsaggGfAfugagcuC faGfaggasusu	276	aggggggagag cucagcgauu	570
130	acaccaUfcAfCfGfUfugc agcs[invAb]	130	acaccaucagguug cagg	424	asGfscugcAfaeguGfaU fgGfugususu	277	agcugcaacgu gauggguguuu	571
131	acacCfaUfcAfcguugcagc s[invAb]	131	acaccaucagguug cagg	425	asGfscugCfAfaeguGfaU fgGfugususu	278	agcugcaacgu gauggguguuu	572
132	ggcucaAfcGfGfUfUfccc uugs[invAb]	132	ggcucaacgguuucc cuug	426	usCfsaaggGfaaccGfuU fgAfgccsusu	279	ucaaggggaacc guugagccuu	573
133	ggcuCfaAfcGfguuccuu gs[invAb]	133	ggcucaacgguuucc cuug	427	usCfsaagGfGfaaccguU fgAfgccsusu	280	ucaaggggaacc guugagccuu	574
134	uegcugAfgCfUfCfAfucc cccs[invAb]	134	uegcugagucauc cccc	428	asGfsgGfgGfAfugagCf uClagcgsa	281	aggggggagag cucagcgau	575
135	uegcugAfgCfUfCfAfucc cccs[invAb]	135	uegcugagucauc cccc	429	asGfsgGfgGfAfugagcu Clagfaggasusu	282	aggggggagag cucagcgauu	576
136	ugguCfcAfCfGfUfGcacu ucaaus[invAb]	136	ugguuccacugcac uuccau	430	usUfsgaagUfgcacguGf gAfccasgsg	283	uugaagugcac guggaccagg	577
137	ugguuccAfcGfUfGfCfacu ucaaus[invAb]	137	ugguuccacugcac uuccau	431	usUfsgaagUfgcacguGf gAfccasgsg	284	uugaagugcac guggaccagg	578
138	ugguuccAfcGfUfGfCfacu ucaaus[invAb]	138	ugguuccacugcac uuccau	432	usUfsgaagUfgcacGfuG fgAfccasgsg	285	uugaagugcac guggaccagg	579
139	ggagauUfgGfUfGfUfGfc ugaus[invAb]	139	ggagauuguguc gcuauu	433	asUfscagcGfacaccaAfu Cfuccsusu	286	aucagcgacacc aauccuuu	580
140	ggagauUfgGfUfGfUfGfc ugaus[invAb]	140	ggagauuguguc gcuauu	434	asUfscagcGfacacCfaAf uCluccsusu	287	aucagcgacacc aauccuuu	581
141	ggagAfuUfGfGfUfGfugc ugaus[invAb]	141	ggagauuguguc gcuauu	435	asUfscagcGfacaccaAfu Cfuccsusu	288	aucagcgacacc aauccuuu	582

10

20

30

40

【0180】

50

【表 1 - 1 2】

二本鎖 番号	修飾された センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	未修飾の センス(5'-3')	配列 番号 (センス- 修飾)	修飾された アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス- 修飾)	未修飾の アンチセンス (5'-3')	配列番号 (アンチセンス- 未修飾)
142	acaccaUfcAfCfGfUfuge agcuus[invAb]	142	acaccucaacgguug cagcuu	436	asGfsoagcAfaeguGfaU fgGfugususu	289	agcugcaacgu gaugguuuuu	583
143	acaccaUfcAfCfGfUfuge agcuus[invAb]	143	acaccucaacgguug cagcuu	437	asGfsoagcAfaeguGfaU fgGfugususu	290	agcugcaacgu gaugguuuuu	584
144	ggcuCfaAfCfGfGfuucc uugaus[invAb]	144	ggcucaacgguucc cuugau	438	usCfsoagcGfaacguUf gAfgecsusu	291	ucaaggggaacc guugagccuu	585
145	ggcuCfaAfCfGfGfuucc uugs[invAb]	145	ggcucaacgguucc cuug	439	usCfsoagcGfaacguUf gAfgecsu	292	ucaaggggaacc guugagcc	586
146	eggcuCfaCfGfGfUfuucc cuugas[invAb]	146	eggcucaacgguucc ccuuga	440	asUfsoagGfgaaccgUfu Gfagcsug	293	aucaggggaacc guugagccg	587
147	eggcuCfaCfGfGfUfuucc cuugas[invAb]	147	eggcucaacgguucc ccuuga	441	asUfsoagGfgaaccCfGfU fuGfagcsug	294	aucaggggaacc guugagccg	588

10

20

30

40

【0181】

実施例 2：RNA FISH アッセイにおける選択した SCAP siRNA 分子の有効性

実施例 1 で合成した siRNA 分子を、リボ核酸分子 (RNA FISH) を標的化する蛍光インサイチュハイブリダイゼーションアッセイにおいてスクリーニングし、IC₅₀ 及び最大活性値を決定した。

【0182】

RNA FISH アッセイを行って、試験 siRNA による SCAP mRNA のノックダウンを測定した。Hep3B (ATCC から購入した) を、10% ウシ胎仔血清 (FBS, Sigma) 及び 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (P-S, Corning

50

）を補充した最小必須培地（MEM，Corning）中で培養した。siRNAトランスフェクションを、以下のように実施した：1 μ Lの試験siRNA及び4 μ LのプレーンMEMを、BioMek FX（Beckman Coulter）によって、PDLでコーティングしたCellCarrier-384 Ultraアッセイプレート（PerkinElmer）に加えた。次に、プレーンMEM中に予め希釈した5 μ LのリポフェクタミンRNAiMAX（Thermo Fisher Scientific）（5 μ L MEM中0.035 μ LのRNAiMAX）を、Multidrop Combi Reagent Dispenser（Thermo Fisher Scientific）によってアッセイプレート中に分注した。室温（RT）でのsiRNA/RNAiMAX混合物の20分のインキュベーション後に、10% FBS及び1% P-Sを補充したMEM中30 μ LのHep3B細胞（ウェル当たり2000細胞）を、Multidrop Combi Reagent Dispenserを用いてトランスフェクション複合体に加えて、アッセイプレートを室温にて20分間保持してから、インキュベータの方へ動かした。細胞を、37℃及び5% CO₂で72時間インキュベートした。

10

【0183】

RNA FISHアッセイを、Affymetrix QuantiGene（登録商標）View RNA HCスクリーニングアッセイキット（QVP0011）、Affymetrix View HCシグナル増幅キット3-plex（QVP0213）、及びAffymetrix遺伝子特異的プローブ（SCAP Human 0.33mL View RNA Type 6（650ラベル）VA6-20279-01及びPPIB Human 0.44mL View RNA Type 1（488ラベル）VA1-10148-01）を使用して、製造業者のプロトコルに従って実施した。

20

【0184】

最初に、プレートを連続的な100%、70%、及び50%エタノール洗浄により再水和した。次に、細胞をPBSで洗浄し、次いでキットの指示書に従って透過処理し、プロテアーゼ消化した。目的のWorking Probe Setを、製造業者のプロトコルに従って調製し、ウェルに添加し、40℃で3時間インキュベートした。Working Probe Set、Working PreAmp、Working Amp、及びWorking LPによる連続的なハイブリダイゼーションに関して、製造業者のプロトコルに従った。最後に、核対比染色が適用された（Hoechst 33342及びCell Mask Blue；Molecular Probes）。プレートを室温で30分間インキュベートし、PBSで洗浄し、80 μ LのPBSで重層し、続いてプレートをイメージングのために密閉した。

30

【0185】

全てのプレートが、Hoechst 33342及びCell Mask Blueに関してはUVチャネル、Type1プローブに関しては488チャネル、並びにType6プローブに関しては647チャネルを使用して、Opera Phenixハイコンテンツスクリーニングシステム（PerkinElmer）上で画像化された。

【0186】

RNA FISHデータはColumbusソフトウェアを使用して分析され、画像はGenedata Screenerを使用して生成された。画像を分析して、細胞当たりの平均スポット数を得た。スポット数を、高い（リン酸緩衝生理食塩水を含む、Corning）及び低い（標的プローブ対を含まない）対照ウェルを用いて正規化した。総siRNA濃度に対して正規化された値をプロットし、データを、Genedata Screener（Genedata）で4パラメーターのシグモイドモデルに当てはめて、IC₅₀及び最大活性を得た。

40

【0187】

アッセイの結果を表2に示す。SCAP活性を、対照と比較したノックダウンのパーセンテージとして表す。負の値は、SCAPレベルの減少を示す。いくつかのsiRNAトリガーの追加の試験を実施し、それらの結果を表2の最後の欄に示す。

50

【 0 1 8 8 】
【 表 2 - 1 】

表2. 修飾されたSCAP siRNAを用いたRNA FISHアッセイ

二本鎖 番号	センス(5'-3')	配列 番号 (センス)	アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 最大 活性 (%)	RNA FISH 追加の 試験の 平均活性 (%)
1	ggaccuGfuGfGfAfAfucacscs[invAb]	1	usGfsgugaAfuuccAfcAfgguccsusu	148	3.24	-73.7	
2	ggaccuGfuGfGfAfAfucacscs[invAb]	2	usGfsgUfgAfAfuuccAfcAfgguccsusu	149	1.04	-82.7	
3	ggacCfuGfUfGfGfaauccacs[invAb]	3	usGfsgugaAfuuccacAfgGfuccsusu	150	1.23	-80.6	
4	ggacCfuGfuGfugaauccacs[invAb]	4	usGfsgugaAfuuccAfcAfgGfuccsusu	151	1.18	-78.5	
5	ggaccuGfuGfGfAfAfucaccaus[invAb]	5	usGfsgugaAfuuccAfcAfgguccsusu	152	--	-34.6	-64.0
6	ggaccuGfuGfGfAfAfucacscs[invAb]	6	usGfsgugaAfuuccAfcAfgguccsc	153	6.63	-65.7	-54.9
7	gcgagaUfuUfUfCfCfcuacscs[invAb]	7	asGfsguagGfsgaaAfaUfcuogcsusu	154	0.916	-68.8	-70.9
8	gcgagaUfuUfUfCfCfcuacscs[invAb]	8	asGfsgUfaGfGfsgaaAfaUfcuogcsusu	155	1.13	-81.7	
9	gcgaGfaUfuUfUfUfCfcuacacs[invAb]	9	asGfsguagGfsgaaaUfcUfcgcsusu	156	1.82	-85.0	
10	gcgaGfaUfuUfUfUfUfCfcuacacs[invAb]	10	asGfsguaggggaaAfaUfcUfcgcsusu	157	1.89	-73.0	
11	gcgagaUfuUfUfUfCfCfcuacacs[invAb]	11	asGfsguagGfsgaaAfaUfcuogsc	158	3.52	-63.9	-57.6
12	gcgagaUfuUfUfCfCfcuacuuus[invAb]	12	asGfsguagGfsgaaAfaUfcuogcsusu	159	7.67	-69.7	-64.8
13	ccugucCfaUfuUfGfAfcauucsgs[invAb]	13	asCfsgaaUGfucaaUfgGfacaggssusu	160	3.76	-69.2	-63.3
14	ccugucCfaUfuUfGfAfcauucsgs[invAb]	14	asCfsgAfaUfGfucaaUfgGfacaggssusu	161	1.44	-82.4	
15	ccugUfcCfAfUfUfgacaucgs[invAb]	15	asCfsgaaUGfucaaUGfCfaggssusu	162	0.62	-88.5	
16	ccugUfcCfAfUfUfgacaucgs[invAb]	16	asCfsgaaugucaaUfgGfCfaggssusu	163	6.04	-55.4	-40.3
17	ccugucCfaUfuUfGfAfcauucguus[invAb]	17	asCfsgaaUGfucaaUfgGfacaggssusu	164	1.65	-77.8	
18	ccugucCfaUfuUfGfAfcauucgs[invAb]	18	asCfsgaaUGfucaaUfgGfacaggsg	165	16.10	-68.3	-61.0
19	guccauUfgAfCfAfUfucgcs[invAb]	19	asCfsggcgAfauguCfaAfuggacssusu	166	1.61	-78.5	

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

50

【 0 1 9 0 】

[illegible]

40

【表 2 - 3】

二本鎖 番号	センス(5'-3')	配列 番号 (センス)	アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 最大 活性 (%)	RNA FISH 追加の 試験の 平均活性 (%)
42	acggggAfcCfUfGfUfuacagss[invAb]	42	asUfscuguAfacagGfuCfcccugusuu	189	1.45	-84.3	
43	cggcucAfaCfGfGfUfuccucss[invAb]	43	asAfsagggAfaccgUfuGfagccgssuu	190	14.90	-63.7	-32.2
44	uguacuGfaCfUfGfGfcagccss[invAb]	44	asCfsggcuGfccagUfcAfguacassuu	191	3.59	-53.2	-41.7
45	ccccugCfaGfUfUfagagsgs[invAb]	45	usCfscucUfaaacUfgCfagggssuu	192	12.20	-50.0	-49.1
46	uguccaUfuGfAfcAfuucgcs[invAb]	46	asGfsgcgaAfugucAfaUfggacassuu	193	0.55	-87.4	
47	ggcuggCfaCfCfGfUfugucss[invAb]	47	asCfsgagacAfacggUfgCfagccssuu	194	3.20	-48.1	-8.4
48	ggcucaAfcGfGfUfUfccuuss[invAb]	48	usCfsaaggGfaacGfuUfgagccssuu	195	3.10	-79.8	
49	gcucaaCfGfGfUfUfccuuss[invAb]	49	asUfscagGfgaacCfGfUfugagccssuu	196	2.20	-92.1	
50	caacggUfuCfCfUfUfugauuss[invAb]	50	asAfsaacUfagggAfaCfeguugssuu	197	0.97	-79.4	
51	acgguuCfcCfUfUfGfauuucss[invAb]	51	asAfsagaaUfcaagGfgAfacggssuu	198	0.67	-89.9	
52	gugggaUfgUfAfcUfUfgacugss[invAb]	52	asCfscaguCfaguaCfaUfccacssuu	199	5.38	-59.6	-39.1
53	cugaaaCfuCfCfCfUfugccss[invAb]	53	asUfsggcaAfggggAfgUfuucagssuu	200	--	-20.0	-7.6
54	gaucuuGfaCfAfcUfUfauugsgs[invAb]	54	usCfsccaaUfgaugUfcAfggaucssuu	201	2.77	-66.2	-32.8
55	ugguccAfcGfUfGfCfUfUfauucss[invAb]	55	usUfsgaagUfsgacGfuGfgaccassuu	202	1.70	-78.7	
56	guggacUfcUfGfAfcfcgcaasas[invAb]	56	asUfuuugcGfgucaGfaGfuuccassuu	203	5.67	-47.1	-23.4
57	ggaggaGfaUfUfGfGfugucss[invAb]	57	asGfscgacAfccaaUfcUfcccassuu	204	0.91	-80.6	
58	aguguuUfcCfCfUfUfGfgcacasas[invAb]	58	asUfuuugCfcaggGfaAfacacssuu	205	2.22	-57.4	-45.6
59	ggagauUfgGfUfGfUfegucss[invAb]	59	asUfscagcGfacacCfaAfucuccssuu	206	3.50	-84.1	
60	ucgcugAfcCfUfCfAfuucccs[invAb]	60	asGfsggggAfugagCfuCfagccgssuu	207	3.30	-75.0	
61	ugucccGfgGfCfAfuuccaacs[invAb]	61	asGfsuuggAfaugCfcGfggacassuu	208	5.09	-51.0	-32.3
62	ggaguuCfuGfUfCfUfUfauugcs[invAb]	62	asGfscaaaGfagacAfgAfacuccssuu	209	0.31	-91.4	
63	gagguaAfcCfUfGfGfgggccss[invAb]	63	asAfsggccCfccagGfuUfaccuccssuu	210	2.24	-62.1	-48.2

【 0 1 9 1 】

10

20

30

40

50

【 0 1 9 2 】

二本鎖番号	センス(5'-3')	配列番号(センス)	アンチセンス(5'-3')	配列番号(アンチセンス)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 最大活性 (%)	RNA FISH 追加の試験の平均活性 (%)
64	acaccaUfcAfCfGfUfUgcagcs[invAb]	64	asGfscugcAfacguGfaUfgugususu	211	3.50	-86.7	
65	egguaCfuUfCfAfCfcuagss[invAb]	65	asAfsuagGfuguaAfgUfagccgsusu	212	17.80	-55.9	-37.4
66	cauugaCfcAfGfAfCfcauggss[invAb]	66	asAfsccauGfugcuGfgUfcaaugssusu	213	3.28	-54.7	-42.2
67	aggagaUfuGfGfUfGfucugss[invAb]	67	usCfsagcGfAcaccAfaUfuccususu	214	0.79	-71.5	
68	ccggcuUfcCfCfUfCfucuggss[invAb]	68	asCfsccgaAfgaggGfaAfgggcgssusu	215	--	-40.5	-31.4
69	auugaaGfgGfGfUfGfougss[invAb]	69	asGfscacaGfAcaccCfcUfucaaususu	216	2.73	-71.0	
70	ccugguccAfcGfUfGfCfacuacs[invAb]	70	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccaggssusu	217	3.51	-77.78	
71	ccugguCfcAfCfGfUfgcacuacs[invAb]	71	usUfsgaagUfgcacguGfgAfccaggssusu	218	1.83	-76.44	
72	ugguccAfcGfUfGfCfacuacauss[invAb]	72	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccaggsg	219	7.48	-88.25	
73	ccugguccAfcGfUfGfCfacuacs[invAb]	73	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccaggsg	220	5.25	-80.05	
74	ccugguCfcAfcGfugcacuacs[invAb]	74	usUfsgaagugcacGfuGfgAfccaggssusu	221	5.77	-81.11	
75	ggagauUfgGfUfGfUfGfcugss[invAb]	75	asUfscAfGfCfGfacacCfaAfuccssusu	222	2.9	-81.52	
76	acaccaUfcAfCfGfUfUgcagcs[invAb]	76	asGfscUfgCfAfacguGfaUfgugususu	223	3.93	-90.02	
77	ggagAfuUfGfGfUfguecgas[invAb]	77	asUfscageGfAcaccaaAfuCfuccssusu	224	500	-8.18	-64.7
78	acacCfaUfCfAfCfugugcagcs[invAb]	78	asGfscugcAfacgugaUfgGfugususu	225	4.2	-86.99	
79	ggagAfuUfgGfugucgugas[invAb]	79	asUfscagegacacCfaAfuCfuccssusu	226	6.53	-88.09	
80	acacCfaUfcAfegungcagcs[invAb]	80	asGfscugcacaaguGfaUfgGfugususu	227	7	-87.92	
81	ggagauUfgGfUfGfUfgcugas[invAb]	81	asUfscageGfAcacCfaAfuccscsc	228	12.1	-71.94	
82	acaccaUfcAfCfGfUfugcagcs[invAb]	82	asGfscugcAfacguGfaUfgugususu	229	16.6	-76.00	
83	ggagauUfgGfUfGfUfegugaus[invAb]	83	asUfscageGfAcacCfaAfuccssusu	230	6.5	-85.33	
84	acaccaUfcAfCfGfUfugcagcuss[invAb]	84	asGfscugcAfacguGfaUfgugususu	231	7.52	-78.50	
85	uegcugAfcCfUfCfAfucccccs[invAb]	85	asGfsgGfgGfAfugagCfuCfagcgasusu	232	3.65	-76.02	

【表 2 - 5】

二本鎖 番号	センス(5'-3')	配列 番号 (センス)	アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス)	RNA FISH IC50 IP [nM]	RNA FISH 最大 活性 (%)	RNA FISH 追加の 試験の 平均活性 (%)
86	ucgcUfgAfGfCfUfcaucccccs[invAb]	86	asGfsggggAfugagcuCfaGfcgasusu	233	4.87	-78.97	
87	ucgcUfgAfGfCfucucccccs[invAb]	87	asGfsgggggaugagCfuCfaGfcgasusu	234	17.4	-64.39	-44.7
88	ucgcugAfGfCfUfCfAfuccccuus[invAb]	88	asGfsggggAfugagCfuCfagccgasusu	235	14.8	-63.94	-55.5
89	ucgcugAfGfCfUfCfAfucccccs[invAb]	89	asGfsggggAfugagCfuCfagccgsa	236	12.5	-66.64	-57.4
90	ggcucaAfcGfGfUfUfcccucugs[invAb]	90	usCfcaAfGfGfGfaccGfuUfagcccsusu	237	4.7	-85.50	
91	ggcuCfaAfCfGfGfuccccuugs[invAb]	91	usCfcaaggGfaccguUfGfAfcccsusu	238	7.08	-86.03	
92	ggcuCfaAfcGfGfuccccuugs[invAb]	92	usCfcaagggaaccGfuUfGfAfcccsusu	239	9.84	-79.22	
93	ggcucaAfcGfGfUfUfcccungaus[invAb]	93	usCfcaaggGfaccGfuUfagcccsusu	240	22.6	-80.97	
94	ggcucaAfcGfGfUfUfcccucugs[invAb]	94	usCfcaaggGfaccGfuUfagccsc	241	20.5	-63.66	-55.4
95	ggcgagAfUfUfUfUfCfcccuaacs[invAb]	95	asGfuaaggGfgaacAfUfUfUfGfagcccsusu	242	3.88	-82.42	
96	cggucaaaCfGfGfUfUfCfcccungas[invAb]	96	asUfscaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	243	4.55	-85.51	
97	ggcgagAfGfAfUfUfUfUfcccuaacs[invAb]	97	asGfuaaggGfgaacAfUfUfGfagcccsusu	244	3.09	-80.60	
98	cggucaAfaCfGfGfUfUfcccungas[invAb]	98	asUfscaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	245	3.29	-92.30	
99	ggcgagAfGfAfUfUfUfUfcccuaacs[invAb]	99	asGfuaaggGfgaacAfUfUfUfGfagcccsusu	246	9.43	-79.94	
100	cggucaAfaCfGfGfUfUfcccungas[invAb]	100	asUfscaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	247	4.23	-89.56	
101	ggcgagAfUfUfUfUfCfcccuaacs[invAb]	101	asGfuaaggGfgaacAfUfUfUfGfagcccsusu	248	17.9	-78.53	
102	gcucaaaCfGfGfUfUfCfcccungaus[invAb]	102	asUfscaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	249	5.36	-88.46	
103	ggcgagAfUfUfUfUfUfCfcccuaacs[invAb]	103	asGfuaaggGfgaacAfUfUfUfGfagcccsusu	250	6.13	-78.57	
104	cggucaaaCfGfGfUfUfCfcccungas[invAb]	104	asUfscaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	251	3.3	-90.52	
105	agaagauaUfcUfCfGfGfGfcccuaacs[invAb]	105	asGfuaaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	252	7.32	-71.83	
106	agaagauaUfcUfCfGfGfGfcccuaacs[invAb]	106	asGfuaaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	253	5.56	-70.77	
107	agaagaUfaUfCfUfCfGfGfGfcccuaacs[invAb]	107	asGfuaaggGfgaacCfGfUfUfGfagcccsusu	254	35.6	-45.72	-25.7

【 0 1 9 3 】

10

20

30

40

50

7～8週齢及び体重20グラムを超える雄Balb/cマウスを、Charles River Laboratories (Charles River Laboratories, Inc, MA) から入手した。マウスに、ロバストな肝臓発現のために、AAV8ウイルスベクターを投与した。各動物に、200 μ lの細胞培養グレードのPBS中で再構成した 1×10^{12} 個ウイルス粒子を投与した。AAVベクターは、ルシフェラーゼ遺伝子に基づくレポーターコンストラクトをコードした。Xenolight Redi

j e c t D-ルシフェリン基質 (P e r k i m E l m e r) の10分間の腹腔内投与後に、ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応から生成された光シグナルを測定することによって、ルシフェラーゼ活性を分析した。これらの光シグナルは、フラックスとして示された。P e r k i n E l m e rからのI V I S L u m i n a S 5 S p e c t r u m 前臨床インビロイメージング装置を使用して、生体発光イメージング (B L I) を実施した。肝臓上に小さな同一の対象領域 (R O I) を配置してB L I画像分析を実施し、L i v i n g I m a g eソフトウェア4.7.2を使用して分析した。

【0196】

S C A P s i R N A 活性を監視するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の3' U T R 領域は、s i R N A が結合して、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の分解を開始することができる特定のS C A P m R N A 配列を含んでいた。A A V 投与から2週間後、マウスをベースラインルシフェラーゼ活性について画像撮影した。次いで、動物をベースライン画像強度に従ってランダム化し、s i R N A 当たり5匹の動物にグループ分けした。翌日、マウスに、センス鎖の5'末端で三分岐G a l N A c (G a l N A c 3) にコンジュゲートされたS C A P s i R N A を体重1 k g 当たり3 m g (m p k) にて皮下投与した。s i R N A の投与後4週間で、B L I イメージングを実施し、ルシフェラーゼ活性を監視した。4週目でのs i R N A 効力は、各s i R N A 群についての4週目 (W k 4) フラックス：ベースラインフラックスの比を、P B S 群に対して標準化することによって計算されたサイレンシング%のデータとして表3に示した。合計で158のトリガーを試験し、それらのいくつかは異なる化学修飾を含んでいた。

【0197】

10

20

30

40

50

表3.SCAP siRNAのインビボ効力

二本鎖 番号	センス(5'-3')	配列 番号 (センス)	アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス)	BLI 用量	BLI wk4 サイレンシング %
1	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs[invAb]	1	usGfsgugaAfuuccAfcAfgguccsusu	148	3mpk	-80.34
2	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs[invAb]	2	usGfsgUfgAfAfuuccAfcAfgguccsusu	149	3mpk	-15.88
3	ggacCfuGfUfGfGfaauacacs[invAb]	3	usGfsgugaAfuuccAfcGfucacsusu	150	3mpk	-53.3
4	ggacCfuGfuGfGfaauacacs[invAb]	4	usGfsgugaauuccAfcAfgGfucacsusu	151	3mpk	-42.49
5	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacaus[invAb]	5	usGfsgugaAfuuccAfcAfgguccsusu	152	3mpk	-63.11
6	ggaccuGfuGfGfAfAfuacacscs[invAb]	6	usGfsgugaAfuuccAfcAfgguccsc	153	3mpk	-3.65
7	gcgagaUfuUfUfCfcfcuacscs[invAb]	7	asGfsguagGfggaaAfaUfcuegcusu	154	3mpk	-86.33
8	gcgagaUfuUfUfCfcfcuacscs[invAb]	8	asGfsgUfaGfGfggaaAfaUfcuegcusu	155	3mpk	-79.59
9	gcgaGfaUfuUfUfUfccccuacscs[invAb]	9	asGfsguagGfggaaaUfcUfcgcusu	156	3mpk	-72.82
10	gcgaGfaUfuUfUfUfccccuacscs[invAb]	10	asGfsguaggggaaAfaUfcUfcgcusu	157	3mpk	-84.66
11	gcgagaUfuUfUfUfCfcfcuacscs[invAb]	11	asGfsguagGfggaaAfaUfcuegcsc	158	3mpk	-47.38
12	gcgagaUfuUfUfCfcfcuacuuus[invAb]	12	asGfsguagGfggaaAfaUfcuegcusu	159	3mpk	-81.46
13	ccugucCfaUfuUfGfAfcuucscgs[invAb]	13	asCfsgaauGfucaaUfgGfacaggusu	160	3mpk	-65.41
14	ccugucCfaUfuUfGfAfcuucscgs[invAb]	14	asCfsgAfaUfGfucaaUfgGfacaggusu	161	3mpk	-77.07
15	ccugUfcCfaUfuUfGacauucgs[invAb]	15	asCfsgaauGfucaaUfgGfacaggusu	162	3mpk	-79.08
16	ccugUfcCfaUfugacauucgs[invAb]	16	asCfsgaauuguaaUfgGfaCfaggusu	163	3mpk	-73.33
17	ccugucCfaUfuUfGfAfcuucguus[invAb]	17	asCfsgaauGfucaaUfgGfacaggusu	164	3mpk	-83.3
18	ccugucCfaUfuUfGfAfcuucgs[invAb]	18	asCfsgaauGfucaaUfgGfacasgsg	165	3mpk	-27.8
19	guccauUfgAfCfAfUfuegcscgs[invAb]	19	asCfsggcgAfauguCfaAfuaggacusu	166	3mpk	-71.1
20	cuguccauUfgAfCfAfUfuegcscgs[invAb]	20	asCfsggcgAfauguCfaAfuaggacagusu	167	3mpk	-57.77
21	cuguccAfuUfGfAfCfaucgcscgs[invAb]	21	asCfsggcgAfauguAfaGfagacagusu	168	3mpk	-64.67

【 0 1 9 9 】

[illegible]

50

【表 3 - 3】

二本鎖 番号	センス(5'-3')	配列 番号 (センス)	アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス)	BLI 用量	BLI wk4 サイレンシング %
45	ccccugCfaGfuUfUfagaggsgs[inv/Ab]	45	usCfscucUfaaacUfgCfagggsusu	192	3mpk	0
46	uguccaUfuGfAfCfAfuccgcs[inv/Ab]	46	asGfsggaAfugacAfaUfggacasu	193	3mpk	-69.36
47	ggcuggCfaCfCfGfUfugucsgs[inv/Ab]	47	asCfsagacAfaccgUfgCfagccusu	194	--	--
48	ggcucaAfcGfGfUfUfccuugsgs[inv/Ab]	48	usCfsaaggGfaaceGfuUfgagccusu	195	3mpk	-87.62
49	gcuaaaCfGfUfUfCfcuugsgs[inv/Ab]	49	asUfscagGfgaacCfGfUfugagcsusu	196	3mpk	-86.43
50	caacggUfuCfCfCfUfugauus[inv/Ab]	50	asAfsaueAfagggAfaCfuguugsusu	197	3mpk	-60.78
51	acgguuCfcCfUfUfGfauuucsu[inv/Ab]	51	asAfsaaaaUfcaagGfGfAfacegusu	198	3mpk	-74.51
52	gugggaUfgUfAfCfUfgacugsgs[inv/Ab]	52	asCfscaguCfaguaCfaUfccacusu	199	3mpk	-20.77
53	cugaaaCfuCfCfCfUfugccsgs[inv/Ab]	53	asUfsggcaAfugggAfgUfuucagsusu	200	--	--
54	gauccuGfaCfAfUfCfauugsgs[inv/Ab]	54	usCfscaaUfgaugUfcAfggaucusu	201	--	--
55	ugguccAfcGfUfGfCfauucsgs[inv/Ab]	55	usUfsgaagUfgcacGfuGfgaccasu	202	3mpk	-73.63
56	guggacUfcUfGfAfCfGcaasas[inv/Ab]	56	asUfsuugCfGfugaGfaGfuuccasu	203	--	--
57	ggaggaGfaUfUfGfGfugcgcs[inv/Ab]	57	asGfsgacAfccaaUfcUfccuccusu	204	3mpk	-34.27
58	aguguuUfcCfCfUfGfGfGcaasas[inv/Ab]	58	asUfsgugCfGaggGfaAfacacusu	205	--	--
59	ggagauUfgGfUfGfUfGcgugsgs[inv/Ab]	59	asUfscagCfGacCfaAfucuccusu	206	3mpk	-76.45
60	ucgcugAfGfUfCfAfuccccsgs[inv/Ab]	60	asGfsgggAfugagCfuCfagcgasu	207	3mpk	-45.22
61	uguccGfGfGfAfUfuccaascs[inv/Ab]	61	asGfsuuggAfaugeCfcGfggacasu	208	--	--
62	ggaguuCfuGfUfCfUfGfGfGccsgs[inv/Ab]	62	asGfscaaaGfagacAfgAfacuccusu	209	3mpk	-48.69
63	gagguaAfcCfUfGfGfGfGccsgs[inv/Ab]	63	asAfsggccCfGagGfuUfaccucusu	210	--	--
64	acaccaUfcAfCfGfUfugcagcs[inv/Ab]	64	asGfscugCfGagGfuUfGfugugusu	211	--	--
65	egguaCfuUfCfAfCfGfGfGccsgs[inv/Ab]	65	asAfsuagGfGugaAfgUfagccgusu	212	--	--
66	cauugaCfcAfGfAfCfGfGfGccsgs[inv/Ab]	66	asAfsccauGfGucuGfgUfcaaugusu	213	--	--
67	aggagaUfuGfGfUfGfGfGccsgs[inv/Ab]	67	usCfsagCfGacAfaUfccuccusu	214	3mpk	-73.73

【 0 2 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

二本鎖 番号	センス(5'-3')	配列 番号 (センス)	アンチセンス(5'-3')	配列 番号 (アンチセンス)	BLI 用量	BLI wk4 サイレンシング %
114	ccugguccAfcGfUfGfCfGcfacuuac[invAb]	114	usUfsgaagUfgcacGfuGfGfAfcaggsus	261	--	--
115	ggggcgagAfuUfUfUfCfCccuac[invAb]	115	asGfsuagGfugaAfuCfuCfGccgsusu	262	--	--
116	cggcucaACfGfUfUfCfCccuac[invAb]	116	asUfscagGfugaACfGfUfGfagccgsusu	263	--	--
117	agaagauUfcUfCfGfGfGccuac[invAb]	117	asGfsaaggCfGcgaGfaUfaUfcuuususu	264	--	--
118	ccugguCfcAfcGfGfcacuuac[invAb]	118	usUfsgaaGfUfGfcagGfGfAfcaggsus	265	--	--
119	ggggcgAfgAfuUfuucccuac[invAb]	119	asGfsuagGfGfgaaaauCfuCfGccgsusu	266	--	--
120	cggcucAfaCfGfGfuucccuac[invAb]	120	asUfscagGfGfgaacGfUfGfagccgsusu	267	--	--
121	agaagaUfaUfcUfGfGfGccuac[invAb]	121	asGfsaagGfCfGcgaGfaUfaUfcuuususu	268	--	--
122	ggagauUfgGfUfGfUfGfcguc[invAb]	122	asUfscagGfGfcaccaAfuCfuuccusu	269	--	--
123	ucgcugAfgCfUfCfAfucccc[invAb]	123	asGfsggggAfugagcuCfaGfGcgasusu	270	--	--
124	acaccaUfcAfcGfUfGfcguc[invAb]	124	asGfscugCfAfcgugaUfgGfugususu	271	--	--
125	ggcucaAfcGfGfUfUfGfcuac[invAb]	125	usCfsaaggGfaaccGfUfgAfgccusu	272	--	--
126	ggagauUfgGfUfGfUfGfcguc[invAb]	126	asUfscagGfGfcaccaCfaAfuCfuuccusu	273	--	--
127	ggagAfuUfGfGfGfGfcguc[invAb]	127	asUfscagCfGfcaccaAfuCfuuccusu	274	--	--
128	ucgcugAfgCfUfCfAfucccc[invAb]	128	asGfsggggAfugagCfuCfaGfGcgasusu	275	--	--
129	ucgcUfgAfgCfGfcuucccc[invAb]	129	asGfsggggGfAfugagcuCfaGfGcgasusu	276	--	--
130	acaccaUfcAfcGfUfGfGfcguc[invAb]	130	asGfscugCfAfcgugaUfgGfugususu	277	--	--
131	acacCfaUfcAfcgugcagc[invAb]	131	asGfscugCfAfcgugaUfgGfugususu	278	--	--
132	ggcucaAfcGfGfUfUfGfcuac[invAb]	132	usCfsaaggGfaaccGfUfgAfgccusu	279	--	--
133	ggcuCfaAfcGfGfGfGfcguc[invAb]	133	usCfsaagGfGfGfGfGfcgususu	280	--	--
134	ucgcugAfgCfUfCfAfucccc[invAb]	134	asGfsgGfGfAfugagCfuCfagccgsa	281	--	--
135	ucgcugAfgCfUfCfAfucccc[invAb]	135	asGfsgGfGfAfugagcuCfaGfGcgasusu	282	--	--

【表 3 - 7】

二本類 番号	センズ(5'-3')	配列 番号 (センズ)	アンチセンズ(5'-3')	配列 番号 (アンチセンズ)	BLI 用量	BLI wk4 サイレンシング %
136	ugguCfcAfcGfUfgcaciuccaus[invAb]	136	usUfsgaagUfgcacguGfgAfccasgsg	283	--	--
137	ugguccAfcGfUfgGfCfacuuccaus[invAb]	137	usUfsgaagUfgcacguGfgAfccasgsg	284	--	--
138	ugguccAfcGfUfgGfCfacuuccaus[invAb]	138	usUfsgaagUfgcacGfuGfgAfccasgsg	285	--	--
139	ggagauUfgGfUfgUfgcugauus[invAb]	139	asUfscagcGfacaccaAfuCfuccsusu	286	--	--
140	ggagauUfgGfUfgUfgcugauus[invAb]	140	asUfscagcGfacacCfaAfuCfuccsusu	287	--	--
141	ggagAfuUfgGfUfgUfgcugauus[invAb]	141	asUfscagcGfacaccaAfuCfuccsusu	288	--	--
142	acaccaUfcAfcGfUfgcagcuus[invAb]	142	asGfscugcAfacguGfaUfgGfugususu	289	--	--
143	acaccaUfcAfcGfUfgcagcuus[invAb]	143	asGfscugcAfacgugaUfgGfugususu	290	--	--
144	ggcuCfaAfcGfGfuuccuugaus[invAb]	144	usCfsaaggGfaaccguUfgAfgccsusu	291	--	--
145	ggcuCfaAfcGfGfuuccuugaus[invAb]	145	usCfsaaggGfaaccguUfgAfgsccsc	292	--	--
146	cggcuCfaCfGfGfuuccuugaus[invAb]	146	asUfscagGfgaacCGUfuGfagcscsg	293	--	--
147	cggcuCfaCfGfGfuuccuugaus[invAb]	147	asUfscagGfgaacCfGfUfuGfagcscsg	294	--	--

10

20

30

40

【0204】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、各々の個々の刊行物、特許又は特許出願が具体的且つ個別に参照により組み込まれることが示された場合と同程度に参照により本明細書に組み込まれる。しかしながら、本明細書における参考文献の引用は、そのような参考文献が本発明の先行技術であることを認めるものと解釈されるべきではない。参照により組み込まれる参考文献において提供される定義又は用語のいずれかが、本明細書で提供される用語及び考察と異なる限りにおいて、本用語及び本定義が優先される。

【0205】

50

前述の本明細書は、当業者が本発明を実施するのに十分なものであると考えられる。前述の説明及び実施例は、本発明のある特定の好ましい実施形態を詳細に説明し、本発明者が企図する最良の形態を記載するものである。しかしながら、前述の内容がいかに詳細に記載されようとも、本発明を多くの方法で実施してもよく、添付の特許請求の範囲及びその均等物に従って本発明が解釈されるべきであることが理解されるであろう。

【配列表】

2025517965000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/67384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 31/713 (2023.01) ADD. C12N 15/85, A61P 1/16 (2023.01) CPC - INV. C12N 15/113, A61K 31/713 ADD. A61K 31/7105, C12N 2310/14 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.
X	WO 2020/243702 A2 (AMGEN INC.) 3 December 2020 (03.12.2020) Abstract; Claim 1; Claim 4; Claim 5; SEQ ID NO 326	1-3
A	US 2013/0012538 A1 (UESUGI et al.) 10 January 2013 (10.01.2013) Abstract	1-3
☐ 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 15 September 2023		Date of mailing of the international search report NOV 17 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/67384

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.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/67384

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.: 4-42
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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:

—Please see continuation in first extra sheet —

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.: 1-3, limited to SEQ ID NO:442

20

30

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.

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/67384

Continuation of 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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-3, directed to an RNAi construct comprising a sense strand and an antisense strand. The RNAi construct will be searched to the extent that the RNAi construct encompasses wherein the antisense strand comprises a region having at least 15 contiguous nucleotides differing by 0 nucleotides from an antisense sequence listed in Table 1 comprising SEQ ID NO:442 (note, this is the first claimed antisense sequence for the inventive RNAi construct). The first named invention was determined based on the first claimed antisense sequence from Table 1 (Claim 1) for the inventive RNAi construct embodiment. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-3 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the RNAi construct encompasses wherein the antisense strand comprises a region having at least 15 contiguous nucleotides differing by 0 nucleotides from an antisense sequence listed in Table 1 comprising SEQ ID NO:442. Additional RNAi construct(s) comprising additional sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected RNAi construct(s) comprising additional sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass 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. An exemplary election would be a RNAi construct comprising wherein the antisense strand comprises a region having at least 15 contiguous nucleotides differing by 0 nucleotides from an antisense sequence listed in Table 1 comprising SEQ ID NO:443 (claims 1-3).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Groups I+ each include the special technical feature of a unique nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence comprises a unique sequence complementary to a unique target, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

Group I+ inventions share the technical features of including:

an RNAi construct comprising a sense strand and an antisense strand, wherein the antisense strand comprises a region having at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from an antisense sequence, and wherein the RNAi construct inhibits the expression of a SREBP Cleavage Activating Protein (SCAP) mRNA.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2020/243702 A2 to Amgen Inc., (hereinafter 'Amgen').

Amgen teaches an RNAi construct comprising a sense strand and an antisense strand, wherein the antisense strand comprises a region having at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from an antisense sequence, and wherein the RNAi construct inhibits the expression of a SREBP Cleavage Activating Protein (SCAP) mRNA (Abstract - 'The present invention relates to RNAi constructs for reducing expression of the SCAP gene. Methods of using such RNAi constructs to treat or prevent liver disease, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) are also described.'; Claim 1 - 'An RNAi construct comprising a sense strand and an antisense strand, wherein the antisense strand comprises a region having at least 15 contiguous nucleotides differing by no more than 3 nucleotides from an antisense sequence listed in Table 1 or 2, and wherein the RNAi construct inhibits the expression of SREBP Cleavage Activating Protein (SCAP)').

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4 above: claims 4-42 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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

(72)発明者 ハーバリック, ブラッドリー ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320-1799, サウザンド オークス, ワン アムジエン センター ドライブ, ロー デパートメント-パテント オペレーションズ, メール ストップ 28-5-エー

(72)発明者 ダス, アムリタ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320-1799, サウザンド オークス, ワン アムジエン センター ドライブ, ロー デパートメント-パテント オペレーションズ エムエス 28-5-エー

(72)発明者 ホーマン, オリバー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320-1799, サウザンド オークス, ワン アムジエン センター ドライブ, ロー デパートメント-パテント オペレーションズ, メール ストップ 28-5-エー

(72)発明者 リン, ダニエル シー. エイチ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320-1799, サウザンド オークス, ワン アムジエン センター ドライブ, ロー デパートメント-パテント オペレーションズ, メール ストップ 28-5-エー

F ターム (参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 BC01 CA45

4C084 AA13 MA66 NA14 ZA751 ZA752 ZC411 ZC412

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA75