

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7167059号  
(P7167059)

(45)発行日 令和4年11月8日(2022.11.8)

(24)登録日 令和4年10月28日(2022.10.28)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	9/06 (2006.01)	A 6 1 K	9/06
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/18 (2006.01)	A 6 1 K	47/18

F I

Z N A

請求項の数 17 (全133頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-557353(P2019-557353)  
 (86)(22)出願日 平成30年4月19日(2018.4.19)  
 (65)公表番号 特表2020-517653(P2020-517653  
 A)  
 (43)公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/028436  
 (87)国際公開番号 WO2018/195355  
 (87)国際公開日 平成30年10月25日(2018.10.25)  
 審査請求日 令和3年4月12日(2021.4.12)  
 (31)優先権主張番号 62/487,454  
 (32)優先日 平成29年4月19日(2017.4.19)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73)特許権者 311001370  
 フィオ ファーマシューティカルズ コーポレーション  
 P h i o P h a r m a c e u t i c a l s C o r p .  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0  
 1 7 5 2 、 マールボロ、シマラーノ ド  
 ライブ 2 5 7 、 スイート 1 0 1  
 100102842  
 弁理士 葛和 清司  
 ロビー , リチャード , ジェイ .  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0  
 1 8 6 7 、 リーディング、 ウィリアム  
 ロード 3 2  
 マックスウェル , メリッサ  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸化合物の局所送達

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a) 1 以上の治療用オリゴヌクレオチド、  
(b) 約 5 % と約 4 0 % w / w の間の量において存在する尿素、  
(c) 乳酸、 および  
(d) 増粘剤

を含む、 ゲルにおいて製剤化された医薬組成物。

## 【請求項2】

増粘剤が、 メチルセルロース ( M C ) またはヒドロキシプロピルセルロース ( H P C )  
 である、 請求項1に記載の医薬組成物。

## 【請求項3】

乳酸が、 約 2 % と約 1 0 % w / w の間の量において存在する、 請求項1 または 2 に記載  
 の医薬組成物。

## 【請求項4】

増粘剤が、 約 0 % と約 4 0 % w / w の間の量において存在する、 請求項1 ~ 3 のいずれ  
 か一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項5】

増粘剤が、 約 0 % と約 2 % の間の量において存在し、 任意にここで、 前記増粘剤が、 メ  
 チルセルロース ( M C ) であり、 さらに、 任意にここで、 M C が、 約 1 % w / w において  
 存在する、 請求項1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

約 3 . 0 と 4 . 7 の間の pH を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

防腐剤（例として、安息香酸ナトリウム）、塩（例として、NaCl）、pH調整剤（例として、NaOH）、水、または先述のもののいずれかの組み合わせの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

治療用オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つが、CTGF、VEGF、MAP4K4、PDGF-B、SPP1、TGF B1、TGF B2、HIF-1 mTOR、PTGS 2 (COX-2)、PPIB、IL-1アルファ、IL-1ベータ、ICam-1、Tie1、Tie2、ANG2、Ang1、MYC、TNF、MMP1、TYR またはそれらのいずれかの組み合わせを標的とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

**【請求項 9】**

治療用オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つが、長い非コード領域の RNA (lncRNA) を標的とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

**【請求項 10】**

治療用オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つが、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む单離された二本鎖核酸分子であり、ここで二本鎖である分子の領域は 8 ~ 15 ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は 4 ~ 12 ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖の一本鎖領域は 3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、单離された二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも 40 % は修飾されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

**【請求項 11】**

单離された二本鎖核酸分子が、

(a) CTGF を標的とし、および表 1 に掲げられる配列の少なくとも 12 の連続したヌクレオチドを含む；

(b) MMP1 を標的とし、および表 2、3、4、および 5 に掲げられる配列の少なくとも 12 の連続したヌクレオチドを含む；

(c) TYR を標的とし、および表 6、7、8、および 9 に掲げられる配列の少なくとも 12 の連続したヌクレオチドを含む；または

(d) MAP4K4 を標的とする、

請求項 10 に記載の医薬組成物。

30

**【請求項 12】**

单離された二本鎖核酸分子が、

(a) 配列番号 359 に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号 360 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖；

(b) 配列番号 540 に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号 569 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖；

(c) 配列番号 696 に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号 735 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖；

(d) 配列番号 739 に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号 740 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖；または

(e) 配列番号 741 に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号 742 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖

を含む、請求項 11 に記載の医薬組成物。

40

**【請求項 13】**

0 . 1 % w / w から 10 % w / w までの治療用オリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

50

**【請求項 14】**

請求項 1 ~ 1\_3 のいずれか一項に記載の医薬組成物であって、前記医薬組成物は、治療用オリゴヌクレオチドを対象の真皮へ送達するための方法における使用のためのものであり、前記方法は、前記医薬組成物を対象へ局所的に投与することを含む、前記医薬組成物。

**【請求項 15】**

請求項 1 ~ 1\_3 のいずれか一項に記載の医薬組成物であって、前記医薬組成物は、対象において皮膚障害を処置するための方法における使用のためのものであり、前記方法は、前記医薬組成物の有効量を対象へ局所的に投与することを含む、前記医薬組成物。

**【請求項 16】**

請求項 1 ~ 1\_3 のいずれか一項に記載の医薬組成物を含む、キット。

10

**【請求項 17】**

請求項 1 ~ 1\_3 のいずれか一項に記載の医薬組成物であって、前記医薬組成物は、対象において審美的外観を改善するための方法における使用のためのものであり、前記方法は、前記医薬組成物の有効量を対象へ局所的に投与することを含む、前記医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、「核酸化合物の局所送達」と題される 2017 年 4 月 19 に提出された 35U.S.C. § 119(e) 米国仮出願シリアル番号 62/487,454, に基づく利益を主張し、これらの全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

**分野**

本開示は、いくつかの側面において、例えば局所投与によって、核酸分子を対象の皮膚へ送達するための組成物および方法に関する。

**【背景技術】****【0002】****発明の背景**

相補的なオリゴヌクレオチド配列は有望な治療剤であり、遺伝子の機能を解明する上での有用な研究用ツール (research tool) である。しかしながら、先行技術のオリゴヌクレオチド分子は、それらの臨床的開発を妨げる可能性があるいくつかの問題に悩まされており、これは、かかる組成物を *in vivo* で使用する遺伝子発現 (タンパク質合成を含む) の意図した効率的な阻害の達成をしばしば困難にする。

30

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0003】**

主要な問題は、これらの化合物の、細胞および組織への送達であった。従来の二本鎖 RNAi 化合物は、19 ~ 29 塩基長であって、およそ  $1.5 \times (10 \sim 15) \text{ nm}$  のサイズの高度に負に荷電した強固ならせんを形成する。このロッド型の分子は細胞膜を透過することができず、その結果として、*in vitro* および *in vivo* での両方において極めて限定的な効力しか有さない。その結果として、従来の全ての RNAi 化合物は、それらの組織分配および細胞取り込みを促進するために、何らかの種類の送達ビヒクルを必要とする。これは、RNAi 技術の主要な限定要因であると考えられる。

40

**【課題を解決するための手段】****【0004】**

本発明の側面は、例えば局所投与によって、核酸分子を対象へ送達するのに有用である組成物および方法に関する。いくつかの側面において、本開示は、局所的に適用された場合、尿素および乳酸を含む、治療用オリゴヌクレオチドゲル製剤が、角質層を通しておよび対象の真皮の中へ効率的に浸透するという驚くべき発見に基づく。いくつかの態様において、ゲル製剤は、これを必要とする対象の皮膚、頭皮、爪、口腔の粘膜または生殖器の粘膜に影響を与える障害を処置することのために有用である

**【0005】**

50

したがって、いくつかの側面において、本開示は、1以上の治療用オリゴヌクレオチド、尿素、および乳液を含む医薬組成物を提供する。

いくつかの態様において、医薬組成物は、さらに増粘剤を含む。いくつかの態様において、増粘剤は、メチルセルロース(MC)またはヒドロキシプロピルセルロース(HPC)である。いくつかの態様において、医薬組成物は、ゲルにおいて製剤化される。

#### 【0006】

いくつかの態様において、尿素は、約5%と約40%w/wの間の量において存在する。いくつかの態様において、尿素は、約5%と約15%w/wの間の量、例えば、約10%w/wにおいて存在する。

いくつかの態様において、尿素は、約5%と約40%の間の量において存在する。いくつかの態様において、尿素は、約5%と約15%w/wの間の量において、例えば10%w/wで存在する。

いくつかの態様において、乳酸は、約2%と約10%w/wの量において存在する。いくつかの態様において、乳酸は、約2%と約8%w/wの間の量、例えば、約5%w/wにおいて存在する。

いくつかの態様において、増粘剤は、約0%と約40%w/wの間の量において存在する。いくつかの態様において、増粘剤は、約0%と約2%の間の量、例えば、約1%w/wにおいて存在する。

#### 【0007】

いくつかの態様において、医薬組成物は、約3.0と4.7の間のpHを有する。いくつかの態様において、医薬組成物は、約3.5のpHを有する。

いくつかの態様において、医薬組成物は、防腐剤(例として、安息香酸ナトリウム)、塩(例として、NaCl)、pH調整剤(例として、NaOH)、水、または先述のもののいずれかの組み合わせの少なくとも1つをさらに含む。

#### 【0008】

いくつかの態様において、医薬組成物は、CTGF、VEGF、MAP4K4、PDGF-B、SPP1、TGF-B1、TGF-B2、HIF-1α、mTOR、PTGS2(COX-2)、PP1B、IL-1アルファ、IL-1ベータ、ICam-1、Tie1、Tie2、ANG2、Ang1、MYC、TNF、MMP1、TYRまたはその任意の組み合わせを標的とする少なくとも1つの治療用オリゴヌクレオチド含む。いくつかの態様において、医薬組成物は、長い非コード領域のRNA(1ncRNA)を標的とする、少なくとも1つの治療用オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、医薬組成物は、0.1%w/wから10%w/wまでの治療用オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、治療用オリゴヌクレオチドは、sd-rxRNAである。

#### 【0009】

いくつかの態様において、sd-rxRNAは、CTGFを標的とし、および表1に掲げられる配列の少なくとも12の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、配列番号359に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号360に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

いくつかの態様において、sd-rxRNAは、MMP1を標的とし、および表2、3、4、および5に掲げられる配列の少なくとも12の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、配列番号540に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号569に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

#### 【0010】

いくつかの態様において、sd-rxRNAはTYRを標的とし、および表6、7、8、および9に掲げられる、少なくとも12の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、配列番号696に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号735に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

いくつかの態様において、sd-rxRNAは、MAP4K4を標的とする。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、配列番号739に掲げられる配列を有するセンス

10

20

30

40

50

鎖、および配列番号 740 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、配列番号 741 に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号 742 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

**【 0011 】**

いくつかの態様において、医薬組成物は、約 1 % w / w から約 2 % w / w までの s d - r x R N A を含む。

いくつかの態様において、本開示は、本開示によって記載される医薬組成物を含むキット、例えば医薬組成物を収納する容器を含むキット、を提供する。

**【 0012 】**

いくつかの側面において、本開示は、治療用オリゴヌクレオチドを対象の真皮へ送達するための方法を提供し、ここで方法は、本開示によって記載される医薬組成物を対象へ局所的に投与することを含む。いくつかの態様において、対象は、皮膚、頭皮、爪、口腔粘膜、または生殖器粘膜の疾患または障害を有する。

10

**【 0013 】**

いくつかの態様において、本開示は、対象における皮膚障害を処置するための方法を提供し、ここで方法は、本開示によって記載されるとおりの医薬組成物の有効量を対象へ局所的に投与することを含む。

いくつかの態様において、皮膚障害は、皮膚がん、皮膚の瘢痕、乾癬、斑状強皮症、炎症後色素沈着、黒子、不均一な皮膚のトーン、色素沈着過剰、または光老化 (photo aging) である。

20

**【 0014 】**

いくつかの態様において、医薬組成物は、例えば、C T G F 、 V E G F 、 M A P 4 K 4 、 P D G F - B 、 S P P 1 、 T G F B 1 、 T G F B 2 、 H I F - 1 m T O R 、 P T G S 2 ( C O X - 2 ) 、 P P I B 、 I L - 1 アルファ、 I L - 1 ベータ、 I c a m - 1 、 T i e 1 、 T i e 2 、 A N G 2 、 A n g 1 、 M Y C 、 T N F 、 M M P 1 、 T Y R またはそれらのいずれかの組み合わせなどの、1 以上の標的遺伝子の発現および / または活性を低減させることに有効な量で投与される。いくつかの態様において、対象への医薬組成物の投与は、対象の真皮における 1 以上の標的遺伝子の発現および / または活性の低減をもたらす。

いくつかの態様において、本明細書に記載の方法は、皮膚の審美的外観を改善するためである。

30

**【 0015 】**

本開示のさらなる側面は、1 以上の治療用オリゴヌクレオチド、尿素、および乳酸を含む対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物に関する。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物は、増粘剤をさらに含む。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、増粘剤は、メチルセルロース ( M C ) またはヒドロキシプロピルセルロース ( H P C ) である。

**【 0016 】**

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物は、ゲルにおいて製剤化される。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、尿素は、約 5 % と約 40 % w / w の間の量において存在する。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、尿素は、約 5 % と 15 % w / w の間ににおいて存在し、任意にここで、尿素は、約 10 % w / w において存在する。

40

**【 0017 】**

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、乳酸は、約 2 % と約 10 % の間において存在する。いくつかの態様において、乳酸は、約 2 % と約 8 % w / w の間の量において存在し、任意にここで、乳酸は、約 5 % w / w において存在する。

50

## 【0018】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、増粘剤は、約0%と約40%w/wの間の量において存在する。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、増粘剤は、約0%と約2%の間の量において存在し、任意にここで、増粘剤は、メチルセルロース(MC)であり、さらに任意にここで、MCは約1%w/wにおいて存在する。

## 【0019】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物は、約3.0と4.7の間のpHを有する。いくつかの態様において、pHは、約3.5である。

10

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物が、防腐剤(例として、安息香酸ナトリウム)、塩(例として、NaCl)、pH調整剤(例として、NaOH)、水、または上の任意の組み合わせ、の少なくとも1つをさらに含む。

## 【0020】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、治療用オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、CTGF、VEGF、MAP4K4、PDGF-B、SPP1、TGF B1、TGF B2、HIF-1m TOR、PTGS2(COX-2)、PPIB、IL-1アルファ、IL-1ベータ、ICAM-1、Tie1、Tie2、ANG2、Ang1、MYC、TNF、MMP1、TYRまたはその任意の組み合わせを標的とする。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、治療用オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、長い非コード領域のRNA(lncRNA)を標的とする。

20

## 【0021】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、治療用オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、sd-rxRNAである。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、sd-rxRNAは、CTGFを標的とし、および表1に掲げられる配列の少なくとも12の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、sd-rxRNAは、配列番号359に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号360に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

30

## 【0022】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、sd-rxRNAは、MMP1を標的とし、および表2、3、4、および5に掲げられる、少なくとも12の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、配列番号540に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号569に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

40

## 【0023】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、sd-rxRNAは、TYRを標的とするおよび表6、7、8、および9に掲げられる、少なくとも12の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、配列番号696に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号735に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

## 【0024】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物において、sd-rxRNAは、MAP4K4を標的とする。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、配列番号739に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号740に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。いくつかの態様にお

50

いて、*s d - r x R N A* は、配列番号 741 に掲げられる配列を有するセンス鎖、および配列番号 742 に掲げられる配列を有するアンチセンス鎖を含む。

【0025】

いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物は、0.1% w / w から 10% w / w までの治療用オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、対象における審美的外観を改善することにおける使用のための組成物は、約 1% w / w から 約 2% w / w までの *s d - r x R N A* を含む。

【0026】

本発明の限定の各々は、本発明の多様な態様を包含し得る。したがって、いずれか 1 の要素または要素の組み合わせを伴う本発明の限定の各々は、本発明の各側面に含まれ得ると考えられる。本発明はその適用において、以下の説明に記載されるまたは図面に例示される、構築要素の詳細に限定されず、および構成要素の配置に限定されない。本発明は他の態様も可能であり、多様なやり方において実践または実行されることが可能である。

10

【0027】

図面の簡単な記載

添付の図面は、原寸で描画することを意図していない。図面において、多様な図において例示される各々同一またはほぼ同一の構成要素は、類似する数字で表わされる。明確化を目的として、全ての構成要素が全ての図面においてラベルされているわけではない。図面においては以下のとおりである：

【図面の簡単な説明】

20

【0028】

【図1】図1は、尿素（例として、10%尿素）および乳酸（例として、5%乳酸）を含む製剤中の *s d - r x R N A* の一態様による皮膚浸透の代表的な画像を示す。

【図2】図2は、局所投与に続いて、メチルセルロース（MC）を含有する製剤中の *s d - r x R N A* が表皮層の中へ浸透し、およびヒドロキシプロリルセルロース（HPC）を含有する製剤が角質層へ浸透することを示す、代表的な画像を示す。

【0029】

【図3-1】図3は、MCを含有するおよびpH 3.5に調整されている製剤の局所適用に続く、表皮および真皮の中への *s d - r x R N A* の増強された浸透を示唆する代表的な画像を示す。

30

【図3-2】図3は、MCを含有するおよびpH 3.5に調整されている製剤の局所適用に続く、表皮および真皮の中への *s d - r x R N A* の増強された浸透を示唆する代表的な画像を示す。

【図4】図4は、尿素（例として、10%尿素）および乳酸（例として、5%乳酸）を含む製剤の局所投与に続く、*s d - r x R N A* の一態様のヒト皮膚の中への浸透を示唆する代表的な画像を示す。

【図5】図5は、RXI-231について、各時点における基準線からのメラニン指標（MI）変化と、ビヒクルについての基準線からの同時間のMI変化を比較する、代表的なデータを示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0030】

詳細な記載

本発明の側面は、局所投与を使用して、皮膚および他の組織へ送達するための尿素および乳酸を含有する、治療用核酸分子の製剤に関する。驚くべきことに、いくつかの態様において、本明細書に記載のとおりに製剤化された核酸分子は、角質層から表皮へ、および皮膚の真皮へ浸透することができたことが見出された。本明細書に記載の製剤は、いくつかの態様において、皮膚、頭皮、爪、口腔の粘膜、および／または生殖器の粘膜に関連する適応症を処置するためまたは予防するために使用されることができる。

【0031】

本明細書に使用される「核酸分子」は、これらに限定されないが：*s d - r x R N A*、

50

r x RNA or i、オリゴヌクレオチド、ASO、siRNA、shRNA、miRNA、hisRNA、ncRNA、cp-lasirNA、airNA、BMT-101、RXI-109、RXI-231、EXC-001、一本鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、RNAおよびDNAを含む。いくつかの態様において、核酸分子は、化学修飾されたオリゴヌクレオチドなどの、化学修飾されたオリゴヌクレオチドである。

【0032】

用語「治療用オリゴヌクレオチド」は、疾患または障害に関連する標的遺伝子の発現または活性を低減させる核酸分子（例として、阻害性核酸分子）を指す。治療用オリゴヌクレオチドの例は、sd-rxRNA、rxRNA or i、オリゴヌクレオチド s、ASO、siRNA、shRNA、miRNA、hsRNA、ncRNA、cp-lasirNA、airNA、BMT-101、RXI-109、RXI-231、EXC-001、一本鎖核酸分子、二本鎖核酸分子、RNAおよびDNAを含む。  
10

【0033】

治療用オリゴヌクレオチドは、CTGF、VEGF、MAP4K4、PDGF-B、SPP1、TGF B1、TGF B2、HIF-1 mTOR、PTGS2(COX-2)、PP1B、IL-1アルファ、IL-1ベータ、ICam-1、Tie1、Tie2、ANG2、Ang1、MYC、TNF、MMP1、TYRまたはそれらのいずれかの組み合わせなどの疾患関連遺伝子を標的にすることができる。標的遺伝子の選抜および追加の治療用オリゴヌクレオチドの產生は、当業者によって、過度の実験なしに達成されてもよい。  
20

【0034】

sd-rxRNA分子

本発明の側面は、sd-rxRNA分子に関する。本明細書に使用されるとき、「sd-rxRNA」または「sd-rxRNA分子」とは、2014年8月5日に付与された、米国特許第8,796,443号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、および2009年9月22日に出願されたPCT公開番号WO2010/033247（出願番号PCT/US2009/005247）、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」において記載され、これらから本明細書に参考として組み込まれるもののような、自己送達型RNA分子を指す。

【0035】

簡単に述べると、sd-rxRNA（sd-rxRNAナノと称される）は、最小長が16ヌクレオチドのガイド鎖および8～18ヌクレオチド長のパッセンジャー鎖を含む、単離された非対称二本鎖核酸分子であって、ここで二本鎖核酸分子は二本鎖領域および一本鎖領域を有し、一本鎖領域は4～12ヌクレオチド長を有し、かつ、少なくとも3つのヌクレオチド主鎖修飾を有する。好ましい態様において、二本鎖核酸分子は、平滑である1末端を有するか、または、1つもしくは2つのヌクレオチド突出を含む。sd-rxRNA分子は、化学修飾を通じて、いくつかの例において疎水性抱合体の付着を通じて、最適化され得る。  
30

【0036】

いくつかの態様において、sd-rxRNAは、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を含む単離された二本鎖核酸分子を含み、ここで二本鎖である分子の領域は8～15ヌクレオチド長であり、ここでガイド鎖は4～12ヌクレオチド長の一本鎖領域を含有し、ここでガイド鎖の一本鎖領域は3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のホスホロチオアート修飾を含有し、およびここで、二本鎖核酸のヌクレオチドの少なくとも40%は修飾されている。  
40

【0037】

いくつかの態様において、本開示に記載のポリヌクレオチドは、本明細書において、単離された二本鎖またはデュプレックス核酸、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、ナノ分子、ナノRNA、sd-rxRNAナノ、sd-rxRNAまたはRNA分子を指す。  
50

一般に、s d - r x R N A は、従来の s i R N A と比較して、はるかに効果的に細胞によって取り込まれる。これらの分子は、標的遺伝子のサイレンシングにおいて高度に効率的である、血清の存在下における高活性、効率的な自己送達、多様なリンカーとの適合性、および、毒性に関連する化学修飾の存在の減少または完全な欠如を含む、以前に記載された R N A i 分子を凌駕する大きな利点を与える。

【 0 0 3 8 】

一本鎖ポリヌクレオチドとは対照的に、デュプレックスポリヌクレオチドは伝統的に細胞への送達が困難であったが、それは、これらが強固な構造および多数の負の電荷を有するために、その膜輸送が困難になっているからである。しかしながら、s d - r x R N A は、部分的に二本鎖であるにもかかわらず、in vivoで一本鎖として認識され、したがって、細胞膜を超えて効率的に送達されることが可能である。その結果、本開示に記載のポリヌクレオチドは、多くの例において自己送達が可能である。

10

【 0 0 3 9 】

よって、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、従来の R N A i 剤と同様の様式において製剤化されても、あるいは、細胞または対象へ単独で（または非送達型キャリアとともに）送達されてもよく、自己送達を可能にする。いくつかの態様において、分子の一部分が従来の R N A デュプレックスに類似し、分子の第 2 の部分が一本鎖である、自己送達型非対称二本鎖 R N A 分子が提供される。

【 0 0 4 0 】

本開示によって記載されるオリゴヌクレオチドは、いくつかの側面において、二本鎖領域と 5 ヌクレオチドまたはそれより長い一本鎖領域とを含む非対称構造と、具体的な化学修飾パターンとの組み合わせを有し、親油性または疎水性の分子に抱合される。このクラスの R N A i 様化合物は、in vitro および in vivo で優れた効力を有する。強固なデュプレックス領域のサイズの低減が、一本鎖領域へ適用されるホスホロチオアート修飾と組み合わせられると、観察される優れた効力を寄与すると考えられる。

20

【 0 0 4 1 】

s d - r x R N A を皮膚へ効果的に投与し、遺伝子発現をサイレンシングする方法は、2014年3月4日に特許付与された米国特許第8,664,189号、表題「皮膚への適応における R N A 干渉」、2013年4月4日に出願された米国特許第9,340,786号、表題「皮膚および線維症への適応における R N A 干渉」、2009年9月22日に出願されたPCT公開第WO2010/033246号、表題「皮膚への適応における R N A 干渉」、ならびに、2011年3月24日に出願されたPCT公開第WO2011/119887号、表題「皮膚および線維症への適応における R N A 干渉」において実証されている。上で参考とされた特許および刊行物の各々は、それらの全体が参考として本明細書に組み込まれる。

30

【 0 0 4 2 】

例えば、米国特許第9,340,786号中の図42は、in vivoでの R X i - 109 の皮内注射（ラット皮膚）の前の、R X I - 109 ( C T G F を標的化する s d - r x R N A ) の2回の皮内注射に続く、C T G F サイレンシングを実証する。提示されたデータは、ラット真皮における切除による創傷モデルを使用する研究からのものである。R X I - 109 の2回の皮内注射に続き、C T G F ・対・非標的化対照のサイレンシングは少なくとも5日間持続した。C T G F の m R N A の低減は、用量依存的：同用量の非標的化対照と比較して、300および600 μ g に対し、夫々 51 および 67 % であった。

40

【 0 0 4 3 】

図42に示されるデータを生成することに使用された方法は以下を包含した：R X I - 109 または非標的化対照 ( N T C ) が、第1および3日に、ラット背上の4部位の各々への皮内注射 ( 200 μ L 注射につき 300 または 600 μ g ) によって投与された。4 mm の切除による創傷が、第2用量（第3日）の30分後に、各注射部位にてなされた。創傷部位を包含し、組織を取り囲む末端生検サンプルが第8日に収集された。R N A が単離され、q P C R による遺伝子発現分析へ供された。データは、T A T A ボックス結合タンパク質 ( T B P ) ハウスキーピング遺伝子のレベルに対し正規化され、1.0に設定さ

50

れた P B S ビヒクリ対照に対してグラフ化される。エラーバーは、個々の生検サンプル間の標準偏差を表す。R X I - 1 0 9 で処置された群・対・同用量の非標的化対照群の P 値は、600 μg では \*\* p < 0.001 であり、300 μg では \* p < 0.01 であった。

【 0 0 4 4 】

本明細書に開示される s d - r x R N A 分子が、米国特許第9,340,786号（その全体が参考として組み込まれる）に開示される s d - r x R N A 分子と同じ様式で皮膚へ投与され得ることが理解されるべきである。

【 0 0 4 5 】

医薬組成物

いくつかの側面において、本開示は、対象へ、尿素、乳酸、およびある増粘剤（例として、メチルセルロース、「M C」）を含む治療用オリゴヌクレオチド（例として、s d - r x R N A s）の対象へのある製剤の局所投与という、驚くべき発見に関する。いくつかの態様において、治療用オリゴヌクレオチドの投与（例として、s d - r x R N A s）は、角質層を通して、および対象の皮膚の真皮の中への治療用オリゴヌクレオチドの送達をもたらす。

10

【 0 0 4 6 】

いくつかの態様において、本開示によって記載されるとおりの医薬組成物は、尿素を含む。いくつかの態様において、尿素は、5 % と約 40 % w / w の間の量において存在する（例として、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 %、または 40 %（境界を含む））。いくつかの態様において、尿素は、約 5 % と約 15 % w / w の間の量において存在する（例として、約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、または 15 %（境界を含む））。いくつかの態様において、尿素は、医薬組成物において約 10 % w / w で存在する。いくつかの態様において、尿素は、医薬組成物において、40 % w / w を超えて存在する。

20

【 0 0 4 7 】

いくつかの態様において、本開示によって記載される医薬組成物は、乳酸を含む。いくつかの態様において、乳酸は、約 2 % および約 10 % w / w の間の量において存在する（例として、約 2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、または 10 %（境界を含む））。いくつかの態様において、乳酸は、約 2 % および約 8 % w / w の間の量において存在する（例として、約 2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、または 8 %（境界を含む））。いくつかの態様において、乳酸は、約 5 % w / w において存在する。いくつかの態様において、乳酸は、10 % w / w を超えて存在する。

30

【 0 0 4 8 】

いくつかの態様において、本開示は、ゲルにおいて製剤化される医薬組成物に関する。一般に、「ゲル」は、濃縮して半固体塊または固体塊（m a s s）を形成し、液体相の中に分散されている固体層を有す、2層のコロイド組成物を指す。したがって、いくつかの態様において、本開示によって記載される医薬組成物は、増粘剤を含む（例として、実質的に液体の他の特性を変えずに液体の粘度を増加する剤）。典型的には、増粘剤は、多糖類またはペプチド（例として、タンパク質）である。

40

【 0 0 4 9 】

多糖類増粘剤の例は、これらに限定されないが、糖（例として、寒天、カラギーナン、等々）を含む。セルロース（例として、セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、等々）およびそれらの誘導体、デンプン（例として、コーンスター、ジャガイモデンプン、タピオカ、等々）およびその誘導体、ベジタブルガム（例として、アルギニン、グアーガム、キサンタンガム、等々）およびその誘導体、ペクチン等々、である。タンパ

50

ク質増粘剤の例は、これらに限定されないが、コラーゲン、アルブミン（例として、卵白）、ゼラチン、等々を含む。

【0050】

いくつかの態様において、増粘剤は、約0%と約40%w/wにおいて存在する（例として、存在しないか、または、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、または40%w/wにおいて存在する（境界を含む））。いくつかの態様において、増粘剤は、約0%と約2%の間の量において存在する（例として、存在しないか、または、約1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、または約2%w/wにおいて存在する（境界を含む））。いくつかの態様において、増粘剤は、医薬組成物において、約1%w/wにおいて存在する。いくつかの態様において、増粘剤は、医薬組成物において、40%w/wを超えて存在する。

10

【0051】

医薬組成成分における活性成分の量（例として、治療用オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド）は、一般に活性成分の有効性に依存し、および種、サイズ（例として、質量）、対象の標的組織等々などの他の因子に依存する。いくつかの態様において、本開示によって記載される医薬組成物における治療用オリゴヌクレオチドの量は、約0.1%w/wから10%w/wまでの範囲である（例として、約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、または10%w/w（境界を含む））。

20

【0052】

いくつかの態様において、本開示によって記載される医薬組成物における治療用オリゴヌクレオチドの量は、約1%から2%w/wまでの範囲である（例として、約1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、または2.0%w/w（境界を含む））。いくつかの態様において、医薬組成物における治療用オリゴヌクレオチドの量は、10%よりも多い。

【0053】

いくつかの側面において、本開示は、本開示によって記載される医薬組成物のpHを変化させることが、治療オリゴヌクレオチドの対象の皮膚（例として、真皮）の中への改善された送達をもたらすという発見に関する。一般に、組成物のpHは、pH調整剤、例えば酸（例として、塩酸、HCl）または塩基（例として、水酸化カリウム、NaOH）を、組成物に所望されるpHに達するまで加えることによって調整される。いくつかの態様において、医薬組成物は、約3.0と5.0の間のpHを有する（例として、約3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9または5.0（境界を含む））。いくつかの態様において、医薬組成物は、約3.5のpHを有する。

30

【0054】

いくつかの態様において、医薬組成物は、少なくとも1の追加の構成要素（例として、薬学的に許容し得る賦形剤）、例えば防腐剤、塩、pH調整剤、水、または先述のもののいずれかの組み合わせを含む。防腐剤の例は、これらに限定されないが、安息香酸ナトリウム、安息香酸、ホウ酸、メチルパラベン、エチルパラベン、ナトリウムプロピオナート、ソルビン酸カリウム、クロロブタノール(chlorobutanol)、ベンジルアルコール、フェノール（例として、フェノール、クロロクレゾール(chlorocresol)）、水銀化合物（例として、チオメルサール、ニトロメルサール）、および四元アンモニウム化合物（例として、ベンザルコニウム塩化物、セチルピリジニウム塩化物）を包含する。塩の例は、これらに限定されないが、ナトリウム塩化物、亜硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、等々を包含する。薬学的に許容し得る賦形剤の追加の例は、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、18th Ed(1990)において開示されている。

40

50

## 【0055】

## C T G F

いくつかの側面において、本開示は、結合組織成長因子（C T G F）を標的とする、s d - r x R N Aなどの核酸の使用に関する。C T G Fを標的とする核酸の例（例として、s d - r x R N A）は、下の表1に示され、および本明細書において米国特許第9,340,786号から参照により組み込まれる。

## 【0056】

## 【表1-1】

表1：C T C F s d - r x R N A配列（受託番号：NM\_001901.2）

10

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
13980	1222	1	A.mC. A. G. G. A. A. G. A.mU. G.mU. A.Chl	2	P.mU. A.fC. A.fU.fC.fU.fU.fC.fC.m U. G.mU* A* G*mU* A*mC* A.	98%
13981	813	3	G. A. G.mU. G. G. A. G.mC. G.mC.mC.mU.Chl	4	P.mA. G. G.fC. G.fC.fU.fC.fC. A.mC.mU.mC*mU* G*mU* G* G* U.	82%
13982	747	5	mC. G. A.mC.mU. G. G. A. A. G. A.mC. A.Chl	6	P.mU. G.fU.fC.fU.fU.fC.fC. A. G.mU.mC. G* G*mU* A* A* G* C.	116%
13983	817	7	G. G. A. G.mC. G.mC.mC.mU. G.mU.mU.mC.Chl	8	P.mG. A. A.fC. A. G. G.fC. G.fC.mU.mC.mC* A*mC*mU*mC*mU* G.	97%

20

30

40

50

【表 1 - 2】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
13984	1174	9	G.mC.mC. A.mU.mU. A.mC. A. A.mC.mU. G.Chl	10	P.mC. A. G.fU.fU. G.fU. A. A.fU. G. G.mC* A* G* G*mC* A* C.	102%
13985	1005	11	G. A. G.mC.mU.mU.mU .mC.mU. G. G.mC.mU.Chl	12	P.mA. G.fC.fC. A. G. A. A. A. G.mC.mU.mC* A* A* A*mC*mU* U.	114%
13986	814	13	A. G.mU. G. G. A. G.mC. G.mC.mC.mU. G.Chl	14	P.mC. A. G. G.fC. G.fC.fU.fC.fC. A.mC.mU*mC*mU* G*mU* G.	111%
13987	816	15	mU. G. G. A. G.mC. G.mC.mC.mU. G.mU.mU.Chl	16	P.mA. A.fC. A. G. G.fC. G.fC.fU.mC.mC. A*mC*mU*mC*mU* G* U.	102%
13988	1001	17	G.mU.mU.mU. G. A. G.mC.mU.mU.mU .mC.mU.Chl	18	P.mA. G. A. A. A. G.fC.fU.fC. A. A. A.mC*mU*mU* G* A*mU* A.	99%
13989	1173	19	mU. G.mC.mC. A.mU.mU. A.mC. A. A.mC.mU.Chl	20	P.mA. G.fU.fU. G.fU. A. A.fU. G. G.mC. A* G* G*mC* A*mC* A.	107%
13990	749	21	A.mC.mU. G. G. A. A. G. A.mC. A.mC. G.Chl	22	P.mC. G.fU. G.fU.fC.fU.fC.fC. A. G.mU*mC* G* G*mU* A* A.	91%
13991	792	23	A. A.mC.mU. G.mC.mC.mU. G. G.mU.mC.mC.Chl	24	P.mG. G. A.fC.fC. A. G. G.fC. A. G.mU.mU* G* G*mC*mU*mC* U.	97%
13992	1162	25	A. G. A.mC.mC.mU. G.mU. G.mC.mC.mU. G.Chl	26	P.mC. A. G. G.fC. A.fC. A. G. G.mU.mC.mU*mU* G* A*mU* G* A.	107%
13993	811	27	mC. A. G. A. G.mU. G. G. A. G.mC. G.mC.Chl	28	P.mG. fC. G.fC.fU.fC.fC. A.fC.fU.mC.mU. G*mU* G* G*mU*mC* U.	113%
13994	797	29	mC.mC.mU. G. G.mU.mC.mC. A. G. A.mC.mC.Chl	30	P.mG. G.fU.fC.fU. G. G. A.fC.fC. A. G. G*mC* A* G*mU*mU* G.	n/a
13995	1175	31	mC.mC. A.mU.mU. A.mC. A. A.mC.mU. G.mU.Chl	32	P.mA.fC. A. G.fU.fU. G.fU. A. A.mU. G. G*mC* A* G* G*mC* A.	113%
13996	1172	33	mC.mU. G.mC.mC. A.mU.mU. A.mC. A. A.mC.Chl	34	P.mG.fU.fU. G.fU. A. A.fU. G. G.mC. A. G* G*mC* A*mC* A* G.	110%

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
13997	1177	35	A.mU.mU. A.mC. A. A.mC.mU. G.mU.mC.mC.Chl	36	P.mG. G. A.fC. A. G.fU.fU. G.fU. A. A.mU* G* G*mC* A* G* G.	105%
13998	1176	37	mC. A.mU.mU. A.mC. A. A.mC.mU. G.mU.mC.Chl	38	P.mG. A.fC. A. G.fU.fU. G.fU. A. A.mU. G* G*mC* A* G* G* C.	89%
13999	812	39	A. G. A. G.mU. G. G. A. G.mC. G.mC.mC.Chl	40	P.mG. G.fC. G.fC.fU.fC.fC. A.fC.mU.mC.mU* G*mU* G* G*mU* C.	99%
14000	745	41	A.mC.mC. G. A.mC.mU. G. G. A. A. G. A.Chl	42	P.mU.fC.fU.fU.fC.fC. A. G.fU.fC. G. G.mU* A* A* G*mC*mC* G.	n/a
14001	1230	43	A.mU. G.mU. A.mC. G. G. A. G. A.mC. A.Chl	44	P.mU. G.fU.fC.fU.fC.fC. G.fU. A.mC. A.mU*mC*mU*mU*m C*mC* U.	106%
14002	920	45	G.mC.mC.mU.mU. G.mC. G. A. A. G.mC.mU.Chl	46	P.mA. G.fC.fU.fU.fC. G.fC. A. A. G. G.mC*mC*mU* G* A*mC* C.	93%
14003	679	47	G.mC.mU. G.mC. G. A. G. G. A. G.mU. G.Chl	48	P.mC. A.fC.fU.fC.fC.fU.fC. G.fC. A. G.mC* A*mU*mU*mU*mC* C.	102%
14004	992	49	G.mC.mC.mU. A.mU.mC. A. A. G.mU.mU.mU.Chl	50	P.mA. A. A.fC.fU.fU. G. A.fU. A. G. G.mC*mU*mU* G* G* A* G.	100%
14005	1045	51	A. A.mU.mU.mC.mU . G.mU. G. G. A. G.mU.Chl	52	P.mA.fC.fU.fC.fC. A.fC. A. G. A. A.mU.mU*mU* A* G*mC*mU* C.	104%
14006	1231	53	mU. G.mU. A.mC. G. G. A. G. A.mC. A.mU.Chl	54	P.mA.fU. G.fU.fC.fU.fC.fC. G.fU. A.mC. A*mU*mC*mU*mU* mC* C.	87%
14007	991	55	A. G.mC.mC.mU. A.mU.mC. A. A. G.mU.mU.Chl	56	P.mA. A.fC.fU.fU. G. A.fU. A. G. G.mC.mU*mU* G* G* A* G* A.	101%
14008	998	57	mC. A. A. G.mU.mU.mU. G. A. G.mC.mU.mU.Chl	58	P.mA. A. G.fC.fU.fC. A. A. A.fC.mU.mU. G* A*mU* A* G* G* C.	98%
14009	1049	59	mC.mU. G.mU. G. G. A. G.mU. A.mU. G.mU.Chl	60	P.mA.fC. A.fU. A.fC.fU.fC.fC. A.mC. A. G* A* A*mU*mU*mU* A.	98%

10

20

30

40

【0057】

【表 1 - 4】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
14010	1044	61	A. A. A.mU.mU.mC.mU . G.mU. G. G. A. G.Chl	62	P.mC.fU.fC.fC. A.fC. A. G. A. A.mU.mU.mU* A* G*mC*mU*mC* G.	93%
14011	1327	63	mU.mU.mU.mC. A. G.mU. A. G.mC. A.mC. A.Chl	64	P.mU. G.fU. G.fC.fU. A.fC.fU. G. A. A. A*mU*mC* A*mU*mU* U.	95%
14012	1196	65	mC. A. A.mU. G. A.mC. A.mU.mC.mU.mU . mU.Chl	66	P.mA. A. A. G. A.fU. G.fU.fC. A.mU.mU. G*mU*mC*mU*mC* mC* G.	101%
14013	562	67	A. G.mU. A.mC.mC. A. G.mU. G.mC. A.mC.Chl	68	P.mG.fU. G.fC. A.fC.fU. G. G.fU. A.mC.mU*mU* G*mC* A* G* C.	66%
14014	752	69	G. G. A. A. G. A.mC. A.mC. G.mU.mU.mU.Chl	70	P.mA. A. A.fC. G.fU. G.fU.fC.fU.mU.mC.m C* A* G*mU*mC* G* G.	95%
14015	994	71	mC.mU. A.mU.mC. A. A. G.mU.mU.mU. G. A.Chl	72	P.mU.fC. A. A. A.fC.fU.fU. G. A.mU. A. G* G*mC*mU*mU* G* G.	85%
14016	1040	73	A. G.mC.mU. A. A. A.mU.mU.mC.mU . G.mU.Chl	74	P.mA.fC. A. G. A. A.fU.fU.fU. A. G.mC.mU*mC* G* G*mU* A* U.	61%
14017	1984	75	A. G. G.mU. A. G. A. A.mU. G.mU. A. A.Chl	76	P.mU.fU. A.fC. A.fU.fU.fC.fU. A.mC.mC.mU* A*mU* G* G*mU* G.	32%
14018	2195	77	A. G.mC.mU. G. A.mU.mC. A. G.mU.mU.mU.Chl	78	P.mA. A. A.fC.fU. G. A.fU.fC. A. G.mC.mU* A*mU* A*mU* A* G.	86%
14019	2043	79	mU.mU.mC.mU. G.mC.mU.mC. A. G. A.mU. A.Chl	80	P.mU. A.fU.fC.fU. G. A. G.fC. A. G. A. A*mU*mU*mU*mC* mC* A.	81%
14020	1892	81	mU.mU. A.mU.mC.mU. A. A. G.mU.mU. A. A.Chl	82	P.mU.fU. A. A.fC.fU.fU. A. G. A.mU. A. A*mC*mU* G*mU* A* C.	84%
14021	1567	83	mU. A.mU. A.mC. G. A. G.mU. A. A.mU. A.Chl	84	P.mU. A.fU.fU. A.fC.fU.fC. G.fU. A.mU. A* A* G* A*mU* G* C.	72%
14022	1780	85	G. A.mC.mU. G. G. A.mC. A. G.mC.mU.mU.Chl	86	P.mA. A. G.fC.fU. G.fU.fC.fC. A. G.mU.mC*mU* A* A*mU*mC* G.	65%

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
14023	2162	87	A.mU. G. G.mC.mC.mU.mU. mU. A.mU.mU. A.Chl	88	P.mU. A. fU. A. A. A. G. G.fC.mC. A.mU*mU*mU* G*mU*mU* C.	80%
14024	1034	89	A.mU. A.mC.mC. G. A. G.mC.mU. A. A. A.Chl	90	P.mU.fU.fU. A. G.fC.fU.fC. G. G.mU. A.mU* G*mU*mC*mU*mU* C.	91%
14025	2264	91	mU.mU. G.mU.mU. G. A. G. A. G.mU. G.mU.Chl	92	P.mA.fC. A.fC.fU.fC.fU.fC. A. A.mC. A. A* A*mU* A* A* A* C.	58%
14026	1032	93	A.mC. A.mU. A.mC.mC. G. A. G.mC.mU. A.Chl	94	P.mU. A. G.fC.fU.fC. G. G.fU. A.mU. G.mU*mC*mU*mU*m C* A* U.	106%
14027	1535	95	A. G.mC. A. G. A. A. A. G. G.mU.mU. A.Chl	96	P.mU. A. A.fC.fC.fU.fU.fU.fC. . G.mC.mU* G* G*mU* A*mC* C.	67%
14028	1694	97	A. G.mU.mU. G.mU.mU.mC.mC. mU.mU. A. A.Chl	98	P.mU.fU. A. A. G. G. A. A.fC. A. A.mC.mU*mU* G* A*mC*mU* C.	94%
14029	1588	99	A.mU.mU.mU. G. A. A. G.mU. G.mU. A. A.Chl	100	P.mU.fU. A.fC. A.fC.fU.fU.fC. A. A. A.mU* A* G*mC* A* G* G.	97%
14030	928	101	A. A. G.mC.mU. G. A.mC.mC.mU. G. G. A.Chl	102	P.mU.fC.fC. A. G. G.fU.fC. A. G.mC.mU.mU*mC* G*mC* A* A* G.	100%
14031	1133	103	G. G.mU.mC. A.mU. G. A. A. G. A. A. G.Chl	104	P.mC.fU.fU.fC.fU.fU.f C. A.fU. G. A.mC.mC*mU*mC* G*mC*mC* G.	82%
14032	912	105	A.mU. G. G.mU.mC. A. G. G.mC.mC.mU.mU. Chl	106	P.mA. A. G. G.fC.fC.fU. G. A.fC.mC. A.mU* G*mC* A*mC* A* G.	84%
14033	753	107	G. A. A. G. A.mC. A.mC. G.mU.mU.mU. G.Chl	108	P.mC. A. A. A.fC. G.fU. G.fU.fC.mU.mU.mC* mC* A* G*mU*mC* G.	86%
14034	918	109	A. G. G.mC.mC.mU.mU. G.mC. G. A. A. G.Chl	110	P.mC.fU.fU.fC. G.fC. A. A. G. G.mC.mC.mU* G* A*mC*mC* A* U.	88%
14035	744	111	mU. A.mC.mC. G. A.mC.mU. G. G. A. A. G.Chl	112	P.mC.fU.fU.fC.fC. A. G.fU.fC. G. G.mU. A* A* G*mC*mC* G* C.	95%

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
14036	466	113	A.mC.mC. G.mC. A. A. G. A.mU.mC. G. G.Chl	114	P.mC.fC. G. A.fU.fC.fU.fU. G.fC. G. G.mU*mU* G* G*mC*mC* G.	73%
14037	917	115	mC. A. G. G.mC.mC.mU.mU. G.mC. G. A. A.Chl	116	P.mU.fU.fC. G.fC. A. A. G. G.fC.mC.mU. G* A*mC*mC* A*mU* G.	86%
14038	1038	117	mC. G. A. G.mC.mU. A. A. A.mU.mU.mC.mU .Chl	118	P.mA. G. A. A.fU.fU.fU. A. G.fC.mU.mC. G* G*mU* A*mU* G* U.	84%
14039	1048	119	mU.mC.mU. G.mU. G. G. A. G.mU. A.mU. G.Chl	120	P.mC. A.fU. A.fC.fU.fC.fC. A.fC. A. G. A* A*mU*mU*mU* A* G.	87%
14040	1235	121	mC. G. G. A. G. A.mC. A.mU. G. G.mC. A.Chl	122	P.mU. G.fC.fC. A.fU. G.fU.fC.fU.mC.mC. G*mU* A*mC* A*mU* C.	100%
14041	868	123	A.mU. G. A.mC. A. A.mC. G.mC.mC.mU.mC. Chl	124	P.mG. A. G. G.fC. G.fU.fU. G.fU.mC. A.mU*mU* G* G*mU* A* A.	104%
14042	1131	125	G. A. G. G.mU.mC. A.mU. G. A. A. G. A.Chl	126	P.mU.fC.fU.fU.fC. A.fU. G. A.fC.mC.mU.mC* G*mC*mC* G*mU* C.	85%
14043	1043	127	mU. A. A. A.mU.mU.mC.mU .G.mU. G. G. A.Chl	128	P.mU.fC.fC. A.fC. A. G. A. A.fU.mU.mU. A* G*mC*mU*mC* G* G.	74%
14044	751	129	mU. G. G. A. A. G. A.mC. A.mC. G.mU.mU.Chl	130	P.mA. A.fC. G.fU. G.fU.fC.fU.fU.mC.mC. A* G*mU*mC* G* G* U.	84%
14045	1227	131	A. A. G. A.mU. G.mU. A.mC. G. G. A. G.Chl	132	P.mC.fU.fC.fC. G.fU. A.fC. A.fU.mC.mU.mU*mC* mC*mU* G*mU* A.	99%
14046	867	133	A. A.mU. G. A.mC. A. A.mC. G.mC.mC.mU.Chl	134	P.mA. G. G.fC. G.fU.fU. G.fU.fC. A.mU.mU* G* G*mU* A* A* C.	94%
14047	1128	135	G. G.mC. G. A. G. G.mU.mC. A.mU. G. A.Chl	136	P.mU.fC. A.fU. G. A.fC.fC.fU.fC. G.mC.mC* G*mU*mC* A* G* G.	89%
14048	756	137	G. A.mC. A.mC. G.mU.mU.mU. G. G.mC.mC.Chl	138	P.mG. G.fC.fC. A. A. A.fC. G.fU. G.mU.mC*mU*mU*m C*mC* A* G.	93%

10

20

30

40

【0058】

【表 1 - 7】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
14049	1234	139	A.mC. G. G. A. G. A.mC. A.mU. G. G.mC.Chl	140	P.mG.fC.fC. A.fU. G.fU.fC.fU.fC.mC. G.mU* A*mC* A*mU*mC* U.	100%
14050	916	141	mU.mC. A. G. G.mC.mC.mU.mU. G.mC. G. A.Chl	142	P.mU.fC. G.fC. A. A. G. G.fC.fC.mU. G. A*mC*mC* A*mU* G* C.	96%
14051	925	143	G.mC. G. A. A. G.mC.mU. G. A.mC.mC.mU.Chl	144	P.mA. G. G.fU.fC. A. G.fC.fU.fU.mC. G.mC* A*A* G* G*mC* C.	80%
14052	1225	145	G. G. A. A. G. A.mU. G.mU. A.mC. G. G.Chl	146	P.mC.fC. G.fU. A.fC. A.fU.fC.fU.mU.mC.m C*mU* G*mU* A* G* U.	96%
14053	445	147	G.mU. G. A.mC.mU.mU.mC. G. G.mC.mU.mC.Chl	148	P.mG. A. G.fC.fC. G. A. A. G.fU.mC. A.mC* A* G* A* A* G* A.	101%
14054	446	149	mU. G. A.mC.mU.mU.mC. G. G.mC.mU.mC.mC. Chl	150	P.mG. G. A. G.fC.fC. G. A. A. G.mU.mC. A*mC* A* G* A* A* G.	93%
14055	913	151	mU. G. G.mU.mC. A. G. G.mC.mC.mU.mU. G.Chl	152	P.mC. A. A. G. G.fC.fC.fU. G. A.mC.mC. A*mU* G*mC* A*mC* A.	67%
14056	997	153	mU.mC. A. A. G.mU.mU.mU. G. A. G.mC.mU.Chl	154	P.mA. G.fC.fU.fC. A. A. A.fC.fU.mU. G. A*mU* A* G* G*mC* U.	92%
14057	277	155	G.mC.mC. A. G. A. A.mC.mU. G.mC. A. G.Chl	156	P.mC.fU. G.fC. A. G.fU.fU.fC.fU. G. G.mC*mC* G* A*mC* G* G.	84%
14058	1052	157	mU. G. G. A. G.mU. A.mU. G.mU. A.mC.mC.Chl	158	P.mG. G.fU. A.fC. A.fU. A.fC.fU.mC.mC. A*mC* A* G* A* A* U.	n/a
14059	887	159	G.mC.mU. A. G. A. G. A. A. G.mC. A. G.Chl	160	P.mC.fU. G.fC.fU.fU.fC.fU.fC.fU A. G.mC*mC*mU* G*mC* A* G.	80%
14060	914	161	G. G.mU.mC. A. G. G.mC.mC.mU.mU. G.mC.Chl	162	P.mG.fC. A. A. G. G.fC.fC.fU. G. A.mC.mC* A*mU* G*mC* A* C.	112%
14061	1039	163	G. A. G.mC.mU. A. A. A.mU.mU.mC.mU . G.Chl	164	P.mC. A. G. A. A.fU.fU.fU. A. G.mC.mU.mC* G* G*mU* A*mU* G.	104%

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)	
14062	754	165	A. A. G. A.mC. A.mC. G.mU.mU.mU. G. G.Chl	166	P.mC.fC. A. A. A.fC. G.fU. G.fU.mC.mU.mU*mC* mC* A* G*mU* C.	109%	10
14063	1130	167	mC. G. A. G. G.mU.mC. A.mU. G. A. A. G.Chl	168	P.mC.fU.fU.fC. A.fU. G. A.fC.fC.mU.mC. G*mC*mC* G*mU*mC* A.	103%	
14064	919	169	G. G.mC.mC.mU.mU. G.mC. G. A. A. G.mC.Chl	170	P.mG.fC.fU.fU.fC. G.fC. A. A. G. G.mC.mC*mU* G* A*mC*mC* A.	109%	
14065	922	171	mC.mU.mU. G.mC. G. A. A. G.mC.mU. G. A.Chl	172	P.mU.fC. A. G.fC.fU.fU.fC. G.fC. A. A. G* G*mC*mC*mU* G* A.	106%	
14066	746	173	mC.mC. G. A.mC.mU. G. G. A. A. G. A.mC.Chl	174	P.mG.fU.fC.fU.fU.fC.f C. A. G.fU.mC. G. G*mU* A* A* G*mC* C.	106%	20
14067	993	175	mC.mC.mU. A.mU.mC. A. A. G.mU.mU.mU. G.Chl	176	P.mC. A. A. A.fC.fU.fU. G. A.fU. A. G. G*mC*mU*mU* G* G* A.	67%	
14068	825	177	mU. G.mU.mU.mC.mC. A. A. G. A.mC.mC.mU.Chl	178	P.mA. G. G.fU.fC.fU.fU. G. G. A. A.mC. A* G* G*mC* G*mC* U.	93%	
14069	926	179	mC. G. A. A. G.mC.mU. G. A.mC.mC.mU. G.Chl	180	P.mC. A. G. G.fU.fC. A. G.fC.fU.mU.mC. G*mC* A* A* G* G* C.	95%	30
14070	923	181	mU.mU. G.mC. G. A. A. G.mC.mU. G. A.mC.Chl	182	P.mG.fU.fC. A. G.fC.fU.fU.fC. G.mC. A. A* G* G*mC*mC*mU* G.	95%	
14071	866	183	mC. A. A.mU. G. A.mC. A. A.mC. G.mC.mC.Chl	184	P.mG. G.fC. G.fU.fU. G.fU.fC. A.mU.mU. G* G*mU* A* A*mC* C.	132%	
14072	563	185	G.mU. A.mC.mC. A. G.mU. G.mC. A.mC. G.Chl	186	P.mC. G.fU. G.fC. A.fC.fU. G. G.mU. A.mC*mU*mU* G*mC* A* G.	n/a	
14073	823	187	mC.mC.mU. G.mU.mU.mC.mC. A. A. G. A.mC.Chl	188	P.mG.fU.fC.fU.fU. G. G. A. A.fC. A. G. G*mC* G*mC*mU*mC* C.	98%	
14074	1233	189	mU. A.mC. G. G. A. G. A.mC. A.mU. G. G.Chl	190	P.mC.fC. A.fU. G.fU.fC.fU.fC.fC. G.mU. A*mC* A*mU*mC*mU* U.	109%	40

【表 1 - 9】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
14075	924	191	mU. G.mC. G. A. A. G.mC.mU. G. A.mC.mC.Chl	192	P.mG. G.fU.fC. A. G.fC.fU.fU.fC. G.mC. A* A* G* G*mC*mC* U.	95%
14076	921	193	mC.mC.mU.mU. G.mC. G. A. A. G.mC.mU. G.Chl	194	P.mC. A. G.fC.fU.fU.fC. G.fC. A. A. G. G*mC*mC*mU* G* A* C.	116%
14077	443	195	mC.mU. G.mU. G. A.mC.mU.mU.mC. G. G.mC.Chl	196	P.mG.fC.fC. G. A. A. G.fU.fC. A.mC. A. G* A* A* G* A* G* G.	110%
14078	1041	197	G.mC.mU. A. A. A.mU.mU.mC.mU G.mU. G.Chl	198	P.mC. A.fC. A. G. A. A.fU.fU.fU. A. G.mC*mU*mC* G* G*mU* A.	99%
14079	1042	199	mC.mU. A. A. A.mU.mU.mC.mU G.mU. G. G.Chl	200	P.mC.fC. A.fC. A. G. A. A.fU.fU.mU. A. G*mC*mU*mC* G* G* U.	109%
14080	755	201	A. G. A.mC. A.mC. G.mU.mU.mU. G. G.mC.Chl	202	P.mG.fC.fC. A. A. A.fC. G.fU. G.mU.mC.mU*mU*m C*mC* A* G* U.	121%
14081	467	203	mC.mC. G.mC. A. A. G. A.mU.mC. G. G.mC.Chl	204	P.mG.fC. C.fG. A. U.fC.fU.fU.fG. C.mG. G*mU*mU* G* G*mC* C.	132%
14082	995	205	mU. A.mU.mC. A. A. G.mU.mU.mU. G. A.Chl	206	P.mC.fU.fC. A. A. A.fC.fU.fU. G. A.mU. A* G* G*mC*mU*mU* G.	105%
14083	927	207	G. A. A. G.mC.mU. G. A.mC.mC.mU. G. G.Chl	208	P.mC.fC. A. G. G.fU.fC. A. G.fC.mU.mU.mC* G*mC* A* A* G* G.	114%
17356	1267	209	A.mC. A.mU.mU. A. A.mC.mU.mC. A.mU. A.Chl	210	P.mU. A.fU. G. A. G.mU.fU. A. A.fU. G.fU*fC*fU*fC*fU*fC * A.	120%
17357	1267	211	G. A.mC. A.mU.mU. A. A.mC.mU.mC. A.mU. A.Chl	212	P.mU. A.fU. G. A. G.mU.fU. A. A.fU. G.fU*fC*fU*fC*fU*fC * A.	56%
17358	1442	213	mU. G. A. A. G. A. A.mU. G.mU.mU. A. A.Chl	214	P.mU.fU. A. A.fC. A.fU.fU.fC.fU.fC. A* A* A*fC*fC* A* G.	34%
17359	1442	215	mU.mU. G. A. A. G. A. A.mU. G.mU.mU. A. A.Chl	216	P.mU.fU. A. A.fC. A.fU.fU.fC.fU.fC. A* A* A*fC*fC* A* G.	31%

【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 10】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
17360	1557	217	G. A.mU. A. G.mC. A.mU.mC.mU.mU . A.Chl	218	P.mU.fU. A. A. G. A.fU. G.fC.fU. A.fU.fC*fU* G* A*fU* G* A.	59%
17361	1557	219	A. G. A.mU. A. G.mC. A.mU.mC.mU.mU . A. A.Chl	220	P.mU.fU. A. A. G. A.fU. G.fC.fU. A.fU.fC*fU* G* A*fU* G* A.	47%
17362	1591	221	mU. G. A. A. G.mU. G.mU. A. A.mU.mU. A.Chl	222	P.mU. A. A.fU.fU. A.fC. A.fC.fU.fU.fC. A* A* A*fU* A* G* C.	120%
17363	1599	223	A. A.mU.mU. G. A. G. A. A. G. G. A. A.Chl	224	P.mU.fU.fC.fC.fU.f C.fU.fC. A. A.fU.fU* A*fC* A*fC*fU* U.	71%
17364	1601	225	mU.mU. G. A. G. A. A. G. G. A. A. A. A.Chl	226	P.mU.fU.fU.fU.fC.f U.fU.fC.fU.fC. A. A*fU*fU* A*fC* A* C.	62%
17365	1732	227	mC. A.mU.mU.mC.mU . G. A.mU.mU.mC. G. A.Chl	228	P.mU.fC. G. A. A.fU.fC. A. G. A. A.fU. G*fU*fC* A* G* A* G.	99%
17366	1734	229	mU.mU.mC.mU. G. A.mU.mU.mC. G. A. A. A.Chl	230	P.mU.fU.fU.fC. G. A. A.fU.fC. A. G. A. A*fU* G*fU*fC* A* G.	97%
17367	1770	231	mC.mU. G.mU.mC. G. A.mU.mU. A. G. A. A.Chl	232	P.mU.fU.fC.fU. A. A.fU.fC. G. A.fC. A. G* G* A*fU*fU*fC* C.	45%
17368	1805	233	mU.mU.mU. G.mC.mC.mU. G.mU. A. A.mC. A.Chl	234	P.mU. G.fU.fU. A.fC. A. G. G.fC. A. A. A*fU*fU*fC* A*fC* U.	71%
17369	1805	235	A.mU.mU.mU. G.mC.mC.mU. G.mU. A. A.mC. A.Chl	236	P.mU. G.fU.fU. A.fC. A. G. G.fC. A. A. A*fU*fU*fC* A*fC* U.	67%
17370	1815	237	A.mC. A. A. G.mC.mC. A. G. A.mU.mU. A.Chl	238	P.mU. A. A.fU.fC.fU. G. G.fC.fU.fU. G.fU*fU* A*fC* A* G* G.	65%
17371	1815	239	A. A.mC. A. A. G.mC.mC. A. G. A.mU.mU. A.Chl	240	P.mU. A. A.fU.fC.fU. G. G.fC.fU.fU. G.fU*fU* A*fC* A* G* G.	35%
17372	2256	241	mC. A. G.mU.mU.mU. A.mU.mU.mU. G.mU. A.Chl	242	P.mU. A.fC. A. A. A.fU. A. A. A.fC.fU. G*fU*fC*fC* G* A* A.	113%

10

20

30

40

50

【表 1 - 11】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
17373	2265	243	mU. G.mU.mU. G. A. G. A. G.mU. G.mU. A.Chl	244	P.mU. A.fC. A.fC.fU.fC.fU.fC. A. A.fC. A* A* A*fU* A* A* A.	35%
17374	2265	245	mU.mU. G.mU.mU. G. A. G. A. G.mU. G.mU. A.Chl	246	P.mU. A.fC. A.fC.fU.fC.fU.fC. A. A.fC. A* A* A*fU* A* A* A.	31%
17375	2295	247	mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.Chl	248	P.mU.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC. A* A* A*fC* A*fU* G.	34%
17376	2295	249	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.Chl	250	P.mU.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC. A* A* A*fC* A*fU* G.	28%
17377	1003	251	mU. mU. G. A. G.mC.mU.mU.mU .mC.mU. G. A.Chl	252	P.mU.fC. A. G. A. A. A. G.fC.fU.fC. A. A* A*fC*fU*fU* G* A.	67%
17378	2268	253	mU. G. A. G. A. G.mU. G.mU. G. A.mC. A.Chl	254	P.mU. G.fU.fC. A.fC. A.fC.fU.fC.fU.fC. A* A* fC* A* A* A* U.	42%
17379	2272	255	A. G.mU. G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A.Chl	256	P.mU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC. A.fC.fU*fC*fU*fC* A* A* C.	35%
17380	2272	257	G. A. G.mU. G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A.Chl	258	P.mU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC. A.fC.fU*fC*fU*fC* A* A* C.	29%
17381	2273	259	G.mU. G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. A.Chl	260	P.mU.fC.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC. A*fC*fU*fC*fU*fC* A* A.	42%
17382	2274	261	mU. G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G. A.Chl	262	P.mU.fC.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC. A*fC*fU*fC*fU*fC* A.	42%
17383	2274	263	G.mU. G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G. A.Chl	264	P.mU.fC.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC. A*fC*fU*fC*fU*fC* A.	37%
17384	2275	265	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G.mU. A.Chl	266	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC* A*fC*fU*fC*fU* C.	24%
17385	2277	267	G. A.mC.mC. A. A. A. A. G.mU.mU. A. A.Chl	268	P.mU.fU. A. A.fC.fU.fU.fU. G. G.fU.fC* A*fC* A*fC*fU*fC.	27%
17386	2296	269	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.Chl	270	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC* A* A* A*fC* A* U.	23%

10

20

30

40

【0060】

【表 1 - 1 2】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
17387	2299	271	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.Chl	272	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G*fU* G*fC* A* A* A.	46%
21138	2296	273	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	274	P.mU.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	42%
21139	2296	275	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	276	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	32%
21140	2296	277	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	278	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.mC* A*mA* A*mC* A* U.	41%
21141	2296	279	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	280	P.mU.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.mC* A*mA* A*mC* A* U.	51%
21142	2296	281	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	282	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A*mA* A*mC* A* U.	25%
21143	2296	283	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	284	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC*mA*mA*mA*fC *mA* U.	61%
21144	2296	285	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	286	P.mU.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC*mA*mA*mA*fC *mA* U.	49%
21145	2296	287	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	288	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.fC*mA*mA*mA*fC *mA* U.	46%
21146	2296	289	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG- Chl	290	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC* A* A* A*fC* A* U.	37%
21147	2296	291	mG*mC* A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG- Chl	292	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC* A* A* A*fC* A* U.	43%
21148	2296	293	mG*mC*mA.mC. mC.mU.mU.mU.m C.mU.mA*mG*m A.TEG-Chl	294	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC* A* A* A*fC* A* U.	29%

10

20

30

40

50

【表 1 - 13】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
21149	2275	295	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G*mU*mA.TEG-Chl	296	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC* A*fC*fU*fC*fU* C.	138%
21150	2275	297	mG*mU* G. A.mC.mC. A. A.mA. A. G*mU*mA.TEG-Chl	298	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC* A*fC*fU*fC*fU* C.	116%
21151	2275	299	mG*mU*mG.mA. mC.mC.mA.mA.m A.mA.mG*mU*m A.TEG-Chl	300	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC* A*fC*fU*fC*fU* C.	105%
21152	2295	301	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	302	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.fC. A. A*fC* A*fA* G* G.	46%
21153	2295	303	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	304	P.mU.fU. A. G. mA. A.mA. G. G.fU. G.fC. A. A*fC* A*fA* G* G.	28%
21154	2295	305	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	306	P.mU.fU.mA. G.mA. A.mA. G.mG.fU. G.fC. A. A*fC* A*fA* G* G.	28%
21155	2295	307	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	308	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.mC. A. A*fC* A*mA* G* G.	60%
21156	2295	309	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	310	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.fC. A.mA*mA*fC*mA*fA* *mG* G.	54%
21157	2295	311	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	312	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.fC.mA.mA*mA*fC* mA*fA*mG* G.	40%
21158	2295	313	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	314	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.fC. A.mA*mA*fC*mA*m A*mG* G.	n/a
21159	2295	315	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	316	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.fC. A.mA*mA*mC*mA*m A*mG* G.	41%
21160	2295	317	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.Chl-TEG	318	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.fC.mA. A*mA*mC*mA*mA* mG*mG.	65%
21161	2295	319	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	320	P.mU.fU. A. G. A.mA. A.G. G.fU. G.fC. A. A*fC* A*mA*mG* G.	43%

10

20

30

40

50

【表 1 - 14】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
21162	2295	321	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. A.TEG-Chl	322	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC.mA. A*mA*fC* A*mA*mG* G.	41%
21163	2295	323	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A* A*TEG-Chl	324	P.mU.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC. A. A* A*fC* A* A* G* G.	32%
21164	2295	325	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU.mA* mA*TEG-Chl	326	P.mU.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC. A. A* A*fC* A* A* G* G.	39%
21165	2295	327	mU*mU* G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU.mA* mA*TEG-Chl	328	P.mU.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC. A. A* A*fC* A* A* G* G.	28%
21166	2295	329	mU.mU.mG.mC.m A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU.mA* mA*TEG-Chl	330	P.mU.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC. A. A* A*fC* A* A* G* G.	27%
21167	2299	331	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	332	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*fU* G*fC* A* A* A.	49%
21168	2299	333	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	334	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*mU* G*mC* A* A* A.	53%
21169	2299	335	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	336	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. mA. A. A.mG. G*fU* G*fC* A* A* A.	47%
21170	2299	337	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	338	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. mA. A. A.mG. G*mU* G*mC* A* A* A.	70%
21171	2299	339	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	340	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*mU* G*mC* A*mA* A.	65%
21172	2299	341	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	342	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*mU* G*mC*mA*mA* A.	43%
21173	2299	343	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	344	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. A. G.mG*mU*mG*mC*m A*mA* A.	52%
21174	2299	345	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	346	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*mU*mG*mC*mA* mA* A.	47%

10

20

30

40

【0061】

【表 1 - 15】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
21175	2299	347	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	348	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*fU*mG*fC*mA*m A* A.	35%
21176	2299	349	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU. G. A.TEG-Chl	350	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G.mA. A. A.mG. G*fU*mG*fC*mA*m A* A.	50%
21177	2299	351	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU*mG*m A.TEG-Chl	352	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G*fU*G*fC* A* A* A.	37%
21178	2299	353	mC*mC*mU.mU. mU.mC.mU. A. G.mU.mU*mG*m A.TEG-Chl	354	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G*fU*G*fC* A* A* A.	36%
21179	2299	355	mC*mC*mU.mU. mU.mC.mU.mA.m G.mU.mU*mG*m A.TEG-Chl	356	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G*fU*G*fC* A* A* A.	35%
21203	2296	357	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG-Chl	358	P.mU.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	40%
21204	2296	359	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG-Chl	360	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	28%
21205	2296	361	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG-Chl	362	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A*mA* A*mC* A* U.	51%
21206	2296	363	mG*mC* A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG-Chl	364	P.mU.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	46%
21207	2296	365	mG*mC* A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG-Chl	366	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	29%
21208	2296	367	mG*mC* A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG-Chl	368	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A*mA* A*mC* A* U.	72%
21209	2296	369	mG*mC*mA.mC. mC.mU.mU.mU.m C.mU.mA*mG*m A.TEG-Chl	370	P.mU.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	89%

10

20

30

40

50

【表 1 - 16】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
21210	2296	371	mG*mC*mA.mC. mC.mU.mU.mU.m C.mU.mA*mG*m A.TEG-Chl	372	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	65%
21211	2296	373	mG*mC*mA.mC. mC.mU.mU.mU.m C.mU.mA*mG*m A.TEG-Chl	374	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC* A*mA* A*mC* A* U.	90%
21212	2295	375	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	376	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC. G.fC.mA.mA*mA*fC* mA*mA*mG* G.	60%
21213	2295	377	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	378	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC. A.mA*mA*mC*mA*m A*mG* G.	63%
21214	2295	379	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	380	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC. A. A* A*fC* A*mA*mG* G.	52%
21215	2295	381	mU.mU. G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	382	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC.mA. A*mA*fC* A*mA*mG* G.	45%
21216	2295	383	mU*mU* G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	384	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC.mA.mA*mA*fC* mA*mA*mG* G.	65%
21217	2295	385	mU*mU* G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	386	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC. A.mA*mA*mC*mA*m A*mG* G.	69%
21218	2295	387	mU*mU* G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	388	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC. A. A* A*fC* A*mA*mG* G.	62%
21219	2295	389	mU*mU* G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	390	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC.mA. A*mA*fC* A*mA*mG* G.	54%
21220	2295	391	mU.mU.mG.mC.m A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	392	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC.mA.mA*mA*fC* mA*mA*mG* G.	52%
21221	2295	393	mU.mU.mG.mC.m A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	394	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC. A.mA*mA*mC*mA*m A*mG* G.	53%
21222	2295	395	mU.mU.mG.mC.m A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	396	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC. A. A* A*fC* A*mA*mG* G.	43%

10

20

30

40

50

【表 1 - 17】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
21223	2295	397	mU.mU.mG.mC.m A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU*mA* mA.TEG-Chl	398	P.mU.fU. A. G. A.mA. A. G. G.fU. G.fC.mA. A*mA*fC* A*mA*mG* G.	43%
21224	2299	399	mC.mC.mU.mU.m U.mC.mU. A. G.mU.mU*mG*m A.TEG-Chl	400	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*fU*mG*fC*mA*m A* A.	60%
21225	2299	401	mC*mC*mU.mU. mU.mC.mU. A. G.mU.mU*mG*m A.TEG-Chl	402	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*fU*mG*fC*mA*m A* A.	67%
21226	2299	403	mC*mC*mU.mU. mU.mC.mU.mA.m G.mU.mU*mG*m A.TEG-Chl	404	P.mU.fC. A. A.fC.fU. A. G. A.mA. A. G. G*fU*mG*fC*mA*m A* A.	66%
21227	2296	405	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A*mG*mA.TEG-Chl	406	P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.fC*mA*mA*mA*fC *mA* U.	49%
20584	2296	407	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.Chl-TEG	408	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.mU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	70%
20585	2296	409	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.Chl-TEG	410	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	15%
20586	2296	411	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.Chl-TEG	412	P.mU. C. U. A. G. A. A. A. G. G.mU. G.mC* A* A* A*mC* A* U.	30%
20587	2296	413	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.Chl-TEG	414	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC*mA*mA*mA*fC *mA* U.	32%
20616	2275	415	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G.mU. A.Chl-TEG	416	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.mC* A*mC*mU*mC*mU* C.	22%
20617	2275	417	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G.mU. A.Chl-TEG	418	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.mC* A*fC*mU*fC*mU* C.	18%
20618	2275	419	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G.mU. A.Chl-TEG	420	P.mU. A. C. U. U. U. U. G. G. U.mC. A.mC* A*mC*mU*mC*mU* C.	36%

【0062】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 8】

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	配列番号	アンチセンス配列	%残存mRNA発現 (1uM sd-rxRNA, A549)
20619	2275	421	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G.mU. A.Chl-TEG	422	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.mC*mA*mC*mU*m C*mU*C.	28%
21381	2275	423	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G*mU*mA.TEG- Chl	424	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.mC. A.mC* A*mC*mU*mC*mU* C.	28%
21382	2275	425	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G*mU*mA.TEG- Chl	426	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.mC* A*fC*mU*fC*mU* C.	28%
21383	2275	427	mG*mU*mG.mA. mC.mC.mA.mA.m A.mA.mG*mU*m A.TEG-Chl	428	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.mC. A.mC* A*mC*mU*mC*mU* C.	43%
21384	2275	429	mG*mU*mG.mA. mC.mC.mA.mA.m A.mA.mG*mU*m A.TEG-Chl	430	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.mC* A*fC*mU*fC*mU* C.	50%
20392	2275	431	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G.mU. A.TEG-Chl	432	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.fC* A*fC*fU*fC*fU* C.	28%
20393	2296	433	G.mC. A.mC.mC.mU.mU. mU.mC.mU. A. G. A.TEG-Chl	434	P.mU.fC.fU. A. G. A. A. A. G. G.fU. G.fC* A*A*fC*A*fC* A* U.	35%
21429	2275	435	G.mU. G. A.mC.mC. A. A. A. A. G*mU*mA.Teg- Chl	436	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.fC. A.mC* A*fC*mU*fC*mU* C.	36%
21430	2275	437	G.mU. G. A.mC.mC. A. A.mA. A. G*mU*mA.Teg- Chl	438	P.mU. A.fC.fU.fU.fU.fU. G. G.fU.mC. A.mC* A*mC*mU*mC*mU* C.	31%

【表 1 - 1 9】

キー	
Chl	=コレステロール
TEG-chl	=TEG リンカーを伴うコレステロール
M	=2'Oメチル
F	=2'フルオロ
*	=ホスホロチオアート結合
.	=ホスホジエステル結合

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 3 】

いくつかの態様において、核酸分子は、R X I - 1 0 9 であり、

## 【化 1】

G.mC. A.mC.mC.mU.mU.mU.mC.mU. A\*mG\*mA.TEG-Chl ( 例えば、配列番号 359 )

のセンス鎖配列および

## 【化 2】

P.mU.fC.fU. A. G.mA. A.mA. G. G.fU. G.mC\* A\* A\* A\*mC\* A\* U ( 例えば、配列番号 360 )

10

のアンチセンス鎖配列を含む。

## 【 0 0 6 4 】

マトリックスメタロプロテアーゼ

いくつかの側面において、本開示は、マトリックスメタロプロテアーゼ ( M M P s ) を標的とする、s d - r x R N A などの核酸の使用に関する。本明細書に使用されるとき、「マトリックスメタロプロテアーゼ」は、細胞外マトリックスのタンパク質を分解する能力のある、亜鉛依存性のエンドペプチダーゼを指し、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、コレステロール硫酸、アグリカン、フィブリノーゲンおよびフィブリンを包含するが、しかしこれらに限定されない。M M P は、幾つかの細胞拳動、例えば細胞増殖、細胞郵送、細胞分化、血管新生、アポトーシスおよび免疫機能と結び付けられてきた。幾つかの遺伝子は、これらに限定されないが、M M P 1、M M P 2、M M P 3、M M P 7、M M P 8、M M P 9、M M P 10、M M P 11、M M P 12、M M P 13、M M P 14、M M P 15、M M P 16、M M P 17、M M P 19、M M P 20、M M P 21、M M P 23 A / B、M M P 24、M M P 25、M M P 26、M M P 27 および M M P 28 を包含するM M P をコードする。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、間質性コラーゲンを分解するまたは壊すM M P を標的とする。いくつかの態様において、間質性コラーゲンは、コラーゲン I、コラーゲン I I および / またはコラーゲン I I I である。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。M M P 1 を標的とする核酸の例 ( 例として s d - r x R N A ) は、下の表 2 ~ 5 において示され、P C T 公開番号 WO 2016/037071 から参照により組み込まれる。

20

## 【 0 0 6 5 】

## 【表 2 - 1】

表 2 : M M P 1 センス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	センス化学	センス骨格
MMP1-1	481	439	CCUACAGGAUUGA	mmm0m00m0mmmm-Chl	ooooooooooooosso
MMP1-2	483	440	UACAGGAUUGAAA	mmm00m0mm00mm-Chl	ooooooooooooosso
MMP1-3	486	441	AGGAUUGAAAAUA	mm00mm00m00mm-Chl	ooooooooooooosso
MMP1-4	491	442	UGAAAAUUACACCA	m00m00mm0m0mm-Chl	ooooooooooooosso
MMP1-5	738	443	GAAAGGUGGACCA	mm0m00m000mmm-Chl	ooooooooooooosso
MMP1-6	739	444	AAAGGUGGACCAA	mm000m000mmmm-Chl	ooooooooooooosso
MMP1-7	869	445	UGAUGUUUCAGCUA	mm0m0mmm00mmm-Chl	ooooooooooooosso
MMP1-8	984	446	ACCUUUGAUGCWA	mmmmmm00m0mmm-	ooooooooooooosso

40

50

【表 2 - 2】

			Chl	
MMP1-9	987	447	UUUGAUGCUALAA	mmm0m0mm0mmm-Chl
MMP1-10	988	448	UUGAUGCUALAAA	mm00m0mm0m0mm-Chl
MMP1-11	989	449	UGAUGCUALAACAA	mm0m0mm0m0mm-Chl
MMP1-12	1042	450	ACAUGCGCACAA	mm0m0m0m0mm-Chl
MMP1-13	1044	451	AUGCGCACAAUA	mm0m0m0m00mm-Chl
MMP1-14	1150	452	AUGAAGUCCGGUA	mm0m0mmm0mm-Chl
MMP1-15	1151	453	UGAAGUCCGGUUA	mm000mmm0mm-Chl
MMP1-19	1155	454	GUCCGGUUUUUCA	mmmm0mmmmmmmm-Chl
MMP1-20	1156	455	UCCGGUUUUUCAA	mm0mmmmmmmm-Chl
MMP1-16	1157	456	CCGGUUUUUCAA	mm0mmmmmm0mm-Chl
MMP1-17	1158	457	CGGUUUUUCAAAA	mm0mmmmmm0mm-Chl
MMP1-18	1159	458	GGUUUUUCAAAGA	mmmmmmmm000mm-Chl
MMP1-21	1330	459	GGAGGUAUGAUGA	mm000m0m00mmm-Chl
MMP1-22	1331	460	GAGGUAUGAUGAA	mm00m0m00m0mm-Chl
MMP1-23	1332	461	AGGUUAUGAUGAAA	mm0m0m00m0mm-Chl
MMP1-24	1334	462	GUUAUGAUGAAUAA	mm0m00m000mmm-Chl
MMP1-25	1336	463	AUGAUGAAUUAUA	mm0m000m0mmm-Chl
MMP1-26	1339	464	AUGAAUUAUAAACA	mm000m0m000mm-Chl
MMP1-27	1359	465	GAUCCAGGUUAUA	mmmm000mm0mm-Chl
MMP1-28	1360	466	AUCCAGGUUAUCA	mmmm000mm0mmm-Chl
MMP1-40	1372	467	CCAAAUGAUAGA	mm0m0m00m0mm-Chl
MMP1-29	1373	468	CAAAUAGAUAGCA	mm000m00m00mm-Chl
MMP1-30	1374	469	AAAUAUGAUAGCAA	mm0m00m00mmm-Chl
MMP1-31	1393	470	UUCCUGGAAUUGA	mmmm00m0mmmm-Chl
MMP1-32	1517	471	UAAUAGCUGGUUA	mm0m00mm00mmm-Chl
MMP1-33	1518	472	AAUAGCUGGUUCA	mm0mm00mmmm-Chl
MMP1-34	1519	473	AUAGCUGGUUCAA	mm0mm00mmmm-Chl
MMP1-35	1520	474	UAGCUGGUUCAA	mm0mm00mm0mm-Chl

10

20

30

40

50

## 【表 2 - 3】

MMP1-36	1521	475	AGCUGGUUCAACA	mmmm00mmm00mm-Chl	oooooooooooooso
MMP1-37	1522	476	GCUGGUUCAACUA	mmm00mmm00mmm-Chl	oooooooooooooso
MMP1-38	1523	477	CUGGUUCAACUGA	mm00mmm00mmmm-Chl	oooooooooooooso
MMP1-39	1524	478	UGGUUCAACUGCA	mm0mmm00mm0mm-Chl	oooooooooooooso
MMP1-41	1525	479	GGUUCAACUGCAA	mmmm00mm0mmm-Chl	oooooooooooooso

O: ホスホジエステル；S: ホスホロチオアート；P: 5'リン酸化；0: 2'-OH；f: 2'-フルオロ；m: 2'-O-メチル；Chl: コレステロール。

10

## 【0 0 6 6】

## 【表 3 - 1】

表 3 : MMP1 アンチセンス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴ番号	配列番号	アンチセンス配列	アンチセンス化学	アンチセンス骨格
MMP1-1	480	UCAAUCCUGUAGGUCAGAU	Pmf00ffff0f000ff00m0	oooooooooooooso
MMP1-2	481	UUUCAAUCCUGUAGGUCAG	Pmfff00ffff0f000ff00	oooooooooooooso
MMP1-3	482	UAUUUCAAUCCUGUAGGU	Pm0ffff00ffff0f00m0	oooooooooooooso
MMP1-4	483	UGUGUAAUUUCAUCCUG	Pm0f0f00ffff0ffff0	oooooooooooooso
MMP1-5	484	UGGUCCACCUUCAUCUUC	Pm00fff0fffff0ffff0	oooooooooooooso
MMP1-6	485	UUGGUCCACCUUCAUCUU	Pmf00fff0fffff0fff0	oooooooooooooso
MMP1-7	486	UAGCUGAACAUCAACCACUG	Pm00ff000f0ff0ff0ff0	oooooooooooooso
MMP1-8	487	UAGCAUCAAAGGUUAGCUU	Pm00f0ff00m00ff0ff0	oooooooooooooso
MMP1-9	488	UUAUAGCAUCAAAGGUAG	Pmf0f0ff0ff00m00ff0	oooooooooooooso
MMP1-10	489	UUUAUAGCAUCAAAGGUUA	Pmff0f0ff0ff00m0ff0	oooooooooooooso
MMP1-11	490	UGUUAUAGCAUCAAAGGUU	Pm0ff0f0ff0ff00m0ff0	oooooooooooooso
MMP1-12	491	UUUGUGCGCAUGUAGAAC	Pmff0f0ff0ff0ff00m0f0	oooooooooooooso
MMP1-13	492	UAUUUGUGCGCAUGUAGAA	Pm0fff0f0ff0ff0ff00m0	oooooooooooooso
MMP1-14	493	UACCGGACUUCAUCUCUGU	Pm0ff000ffff0ffff00	oooooooooooooso
MMP1-15	494	UAACCGGACUUCAUCUCUG	Pm00ff000ffff0ffff0	oooooooooooooso
MMP1-19	495	UGAAAAACCGGACUUCAUC	Pm000m00ff000ffff0f0	oooooooooooooso
MMP1-20	496	UUGAAAAACCGGACUUCAU	Pmf000m00ff000ffff00	oooooooooooooso
MMP1-16	497	UUUGAAAAACCGGACUUCA	Pmff000m00ff000ffff0	oooooooooooooso
MMP1-17	498	UUUUGAAAAACCGGACUUC	Pmffff000m00ff000fff0	oooooooooooooso
MMP1-18	499	UCUUUGAAAAACCGGACUU	Pmffff000m00ff000ff0	oooooooooooooso
MMP1-21	500	UCAUCAUACCUCCAGUAU	Pmf0ff0f0ffff00f0f0	oooooooooooooso
MMP1-22	501	UUCAUCAUACCUCCAGUAU	Pmff0ff0f0ffff00f00	oooooooooooooso

20

30

40

50

## 【表3-2】

MMP1-23	502	UUUCAUCAUACCUCUCCAGUA	Pmffff0ff0f0fffff00f0	oooooooooooooosssssso
MMP1-24	503	UUUUCAUCAUACCUCUCCAG	Pmf0fff0ff0f0fffff00	oooooooooooooosssssso
MMP1-25	504	UUUAUUCAUCAUACCUCUCC	Pmf0f0ff0ff0f0ffff0	oooooooooooooosssssso
MMP1-26	505	UGUUUAUUCAUCAUCAUACC	Pm0fff0f0ff0ff0f0f0	oooooooooooooosssssso
MMP1-27	506	UAUAACCUGGAUCCAUAGA	Pm0f0fff000fff0f000	oooooooooooooosssssso
MMP1-28	507	UGAUAAACCUGGAUCCAUAG	Pm00f0fff000fff0f00	oooooooooooooosssssso
MMP1-40	508	UCUAUCAUUUUGGGAUAAAC	Pmff0ff0ffff0000f000	oooooooooooooosssssso
MMP1-29	509	UGCUAUCAUUUUGGGAUAA	Pm0ff0ff0ffff00m0f00	oooooooooooooosssssso
MMP1-30	510	UUGCUAUCAUUUUGGGAUAA	Pmf0ff0ff0ffff00m0f0	oooooooooooooosssssso
MMP1-31	511	UCAAUUCCAGGAAAGUCAU	Pmf0fffff000m000ff00	oooooooooooooosssssso
MMP1-32	512	UAACCAGCUAUUAGCUUUC	Pm00ff00ff0ff0ffff0	oooooooooooooosssssso
MMP1-33	513	UGAACCAAGCUAUUAGCUUU	Pm000ff00ff0ff0ffff0	oooooooooooooosssssso
MMP1-34	514	UGAACCAAGCUAUUAGCUU	Pmf000ff00ff0ff0ffff0	oooooooooooooosssssso
MMP1-35	515	UUUGAACCAAGCUAUUAGCU	Pmff000ff0ff0ff00f0	oooooooooooooosssssso
MMP1-36	516	UGUUGAACCAAGCUAUUAGC	Pm0ff000ff0ff0ff0000	oooooooooooooosssssso
MMP1-37	517	UAGUUGAACCAAGCUAUUAG	Pm0ff000ff0ff0ff000	oooooooooooooosssssso
MMP1-38	518	UCAGUUGAACCAAGCUAUUA	Pmf0ff000ff0ff0ff0f0	oooooooooooooosssssso
MMP1-39	519	UGCAGUUGAACCAAGCUAUU	Pm0f0ff000ff0ff0f0	oooooooooooooosssssso
MMP1-41	520	UUGCAGUUGAACCAAGCUAU	Pmf0f0ff000ff0ff00	oooooooooooooosssssso

O: ホスホジエステル；S: ホスホロチオアート；P: 5'リン酸化；0: 2'-OH；f: 2'-フルオロ；m: 2'

O-メチル。

## 【0067】

10

## 【表4-1】

20

表4：最適化されたMMP1センス鎖オリゴヌクレオチド

30

オリゴ番号	デュプレックスID	オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	センス化学	センス骨格
MMP1-42	26166	25856	869	521	UGAUGUU CAGCUA	mm0m0mmm0mmm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-43	26167	25856		522	UGAUGUU CAGCUA	mm0m0mmm0mmm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-44	26168	25856		523	UGAUGUU CAGCUA	mm0m0mmm0mmm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-45	26169	25856		524	UGAUGUU CAGCUA	mm0m0mmm0mmm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-46	26170	26102		525	YGAYGYY XAGXYA	mm0m0mmm0mmm- Chl	Ooooooooooooooso

40

50

【表 4 - 2】

MMP1-47	26171	26103		526	UGAUGUU CAGCUA	mmmmmmmmmmmmmmmm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-48	26172	25858	984	527	ACCUUUG AUGCUA	mmmmmm00m0mmmm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-49	26173	25858		528	ACCUUUG AUGCUA	mmmmmm00m0mmmm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-50	26174	25858		529	ACCUUUG AUGCUA	mmmmmm00m0mmmm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-51	26175	25858		530	ACCUUUG AUGCUA	mmmmmm00m0mmmm-Chl	oooooooooooooso
MMP1-52	26176	25858		531	ACCUUUG AUGCUA	mmmmmm00m0mmmm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-53	26177	25858		532	ACCUUUG AUGCUA	mmmmmm00m0mmmm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-54	26178	26110		533	AXXYYYG AYGXYA	mmmmmm00m0mmmm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-55	26179	25888		534	AGGUUAUG AUGAAA	mm0m0m00m00mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-56	26180	25888		535	AGGUUAUG AUGAAA	mm0m0m00m00mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-57	26181	25888		536	AGGUUAUG AUGAAA	mm0m0m00m00mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-58	26182	25888		537	AGGUUAUG AUGAAA	mm0m0m00m00mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-59	26183	26115		538	AGGYAYG AYGAAA	mm0m0m00m00mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-60	26184	26116		539	AGGYAYG AYGAAA	mm0m0mm0mm0mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-61	26185	25914	1520	540	UAGCUGG UUCAAA	mm0mm0mmmm0mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-62	26186	25914		541	UAGCUGG UUCAAA	mm0mm0mmmm0mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-63	26187	25914		542	UAGCUGG UUCAAA	mm0mm0mmmm0mm-Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-64	26188	25914		543	UAGCUGG UUCAAA	mm0mm0mmmm0mm-Chl	Ooooooooooooooso

10

20

30

40

50

【表4-3】

MMP1-65	26189	26121		544	YAGXYGG YYXAAA	mm0mm00mmm0mm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-66	26190	25916	1521	545	AGCUGGU UCAACA	mmmm00mmm00mm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-67	26191	25916	1521	546	AGCUGGU UCAACA	mmmm00mmm00mm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-68	26192	25916	1521	547	AGCUGGU UCAACA	mmmm00mmm00mm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-69	26193	25916	1521	548	AGCUGGU UCAACA	mmmm00mmm00mm- Chl	Ooooooooooooooso
MMP1-70	26194	26126	1521	549	AGXYGGY YXAAXA	mmmm00mmm00mm- Chl	Ooooooooooooooso

o: ホスホジエステル；s: ホスホロチオアート；P: 5'リン酸化；0: 2'-OH；f: 2'-フルオロ；m: 2'-O-メチル。X = 5メチルCおよびY = 5メチルU

【0068】

【表5-1】

表5：最適化されたMMP-1アンチセンス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴ番号	デュプレックスID	開始部位	オリゴ番号	配列番号	アンチセンス配列	アンチセンス化学	アンチセンス骨格
MMP1-42	26166	869	26098	550	UAGCUGAACAU ACCACUG	Pm00ff000f0ff0f m0fm0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-43	26167		26099	551	YAGXYGAAXAYX AXXAXYG	Pm00ff000f0ff0ff 0ff0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-44	26168		26100	552	YAGXYGAAXAYX AXXAXYG	Pm00ff000f0ff0f m0mm0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-45	26169		26101	553	UAGCUGAACAU ACCACUG	Pm00ff000f0ff0f m0mm0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-46	26170		25855	554	UAGCUGAACAU ACCACUG	Pm00ff000f0ff0ff 0ff0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-47	26171		25855	555	UAGCUGAACAU ACCACUG	Pm00ff000f0ff0ff 0ff0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-48	26172	984	26104	556	UAGCAUCAAAGG UUAGCUU	Pm00f0ff00m00 mf00mm0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-49	26173		26105	557	UAGCAUCAAAGG UUAGCUU	Pm00f0ff00m00 mffffmm0	oooooooooooooo osssssso

【表 5 - 2】

MMP1-50	26174		26106	558	UAGCAUCAAAGG UUAGCUU	Pm00f0ff00m00f fffff0	oooooooooooo osssssso
MMP1-51	26175		26107	559	YAGXAYXAAAGG YYAGXYU	Pm00f0ff00m00 mf00mm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-52	26176		26108	560	YAGXAYXAAAGG YUAGXYU	Pm00f0ff00m00 mffffmm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-53	26177		26109	561	UAGXAYXAAAGG YYAGXYU	Pm00f0ff00m00f fffff0	oooooooooooo osssssso
MMP1-54	26178		25857	562	UAGCAUCAAAGG UUAGCUU	Pm00f0ff00m00f f00ff0	oooooooooooo osssssso
MMP1-55	26179	1332	26111	563	UUUCAUCAUACC UCCAGUA	Pmffff0ff0f0ffmf mfffm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-56	26180		26112	564	UUUCAUCAUACC UCCAGUA	Pmffff0ff0f0ffmf m0mm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-57	26181		26113	565	YYYYXAYXAYAXX YXXAGYA	Pmffff0ff0f0ffmf mfffm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-58	26182		26114	566	YYYYXAYXAYAXX YXXAGYA	Pmffff0ff0f0ffmf m0fm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-59	26183		25887	567	UUUCAUCAUACC UCCAGUA	Pmffff0ff0f0fffff0 0f0	oooooooooooo osssssso
MMP1-60	26184		25887	568	UUUCAUCAUACC UCCAGUA	Pmffff0ff0f0fffff0 0f0	oooooooooooo osssssso
MMP1-61	26185		26117	569	UUUGAACCAGCU AUUAGCU	Pmff0f0ff00ff0f m0fm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-62	26186	1520	26118	570	UUUGAACCAGCU AUUAGCU	Pmff0m0ff00ff0f m0mm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-63	26187		26119	571	YYYGAAXXAGXY AYYAGXU	Pmff0f0ff00ff0f m0fm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-64	26188		26120	572	YYYGAAXXAGXY AYYAGXU	Pmff0m0ff00ff0f m0mm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-65	26189		25913	573	UUUGAACCAGCU AUUAGCU	Pmff000ff00ff0ff 00f0	oooooooooooo osssssso
MMP1-66	26190		26122	574	UGUUGAACCAGC UAUUAGC	Pm0ff0f0ff00ff0f fmm0	oooooooooooo osssssso
MMP1-67	26191	1521	26123	575	UGUUGAACCAGC UAUUAGC	Pm0ff0f0ff00ff0 mmmm0	oooooooooooo osssssso

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

MMP1-68	26192	1521	26124	576	YGYYGAAXXAGX YAYYAGC	Pm0ff0f0ff0ff0f fmm0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-69	26193	1521	26125	577	YGYYGAAXXAGX YAYYAGC	Pm0ff0f0ff0ff0 mmmm0	oooooooooooooo osssssso
MMP1-70	26194	1521	25915	578	UGUUGAACCAAGC UAUUAGC	Pm0ff000ff0ff0f f000	oooooooooooooo osssssso

O: ホスホジエステル；S: ホスホロチオアート；P: 5'リン酸化；0: 2'-OH；f: 2'-フルオロ；m: 2'

10

O-メチル。X = 5メチル C および Y = 5メチル U

## 【0069】

## チロシナーゼ

いくつかの側面において、本開示は、チロシナーゼを標的とする s d - r x R N A などの核酸の使用に関する。本明細書に使用されるとき「チロシナーゼ」は、メラニン産性についての速度制限ステップ、チロシンの水酸化およびドーパのドーパキノンへの酸化を制御するオキシダーゼを指す。チロシナーゼは、T Y R 遺伝子によって、コードされる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、T Y R を標的とする。T Y R を標的とする核酸の例（例として、s d - r x R N A）は、下の表 6 ~ 9 において示され、P C T 公開番号 WO2016/037071 から参照によって組み込まれる。

20

## 【0070】

## 【表 6 - 1】

表 6 : T Y R センス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴ番号	開始部位	配列番号	センス配列	センス化学	センス骨格
TYR-1	329	579	UAUAAUAGGACC A	mmmm00m00m0mmmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-2	330	580	AUAAUAGGACCU A	mm00m00m0mmmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-3	331	581	UAAAAGGACCUG A	mm0m00m0mmmmmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-4	489	582	UCACUUUAGCAA A	mm0mmmm00m0mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-5	490	583	CACUUUAGCAAA A	mmmmmm00m00mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-6	544	584	UGGCCAAAUGAA A	mm0mm000m00mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-7	662	585	AGAGACAUUGAU A	mm000m0mm00mm-Chl	ooooooooooooosso

30

40

50

【表 6 - 2】

TYR-8	663	586	GAGACAUUGAUU A	mm00m0mm00mmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-9	698	587	CUGCCUUGGCAU A	mm0mmmm00m0mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-10	809	588	GACAUUUGCACA A	mmm0mmm0m0mmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-11	811	589	CAUUUGCACAGA A	mmmmmm0m0m00mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-12	812	590	AUUUGCACAGAU A	mmmmmm0m0m000mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-13	813	591	UUUGCACAGAUG A	mmmm0m0m000mmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-14	815	592	UGCACAGAUGAG A	mmmm0m000m00mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-15	816	593	GCACAGAUGAGU A	mm0m000m000mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-16	817	594	CACAGAUGAGUA A	mmmm000m000mmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-37	818	595	ACAGAUGAGUAC A	mm000m000m0mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-17	853	596	UCCUAACUUACU A	mmmmmm0mmm0mmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-18	854	597	CCUAACUUACUC A	mmmm00mmm0mmmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-38	855	598	CUAACUUACUCA A	mm0mmm0mmmmmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-20	881	599	UUCUCCUCUUGG A	mmmmmmmmmm0mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-21	978	600	CUGGAAACCAUG A	mm000m0mm0mmm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-22	979	601	UGGAAACCAUGA A	mm0m0mm0m0mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-23	980	602	GGAAACCAUGAC A	mm000mm0m00mm-Chl	ooooooooooooosso
TYR-24	981	603	GAAACCAUGACA A	mm00mm0m00mmm-Chl	ooooooooooooosso

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

TYR-25	982	604	AAACCAUGACAA A	mm0mm0m00m0mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-26	983	605	AACCAUGACAAA A	mmmm0m00m00mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-27	1083	606	CCAAUUUCAGCU A	mm00mmmm00mmm-Chl	oooooooooooooso
TYR-28	1094	607	UUUAGAAAUA CA	mmm00m00m0mmm-Chl	oooooooooooooso
TYR-29	1101	608	AUACACUGGAAG A	mm0m0mm00m0mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-30	1103	609	ACACUGGAAGGA A	mm0mm000m00mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-31	1108	610	GGAAGGAAUUUGC A	mm00m00mmm0mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-32	1111	611	AGGAUUUGC A	mm00mmmm0mm0mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-39	1113	612	GAUUUGC A	mmmm0mm00mmm-Chl	oooooooooooooso
TYR-33	1186	613	GAAUGGAACAAU A	mm0m00m0m00mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-34	1189	614	UGGAACAAUGUC A	mm000m00m0mmm-Chl	oooooooooooooso
TYR-35	1310	615	CCAGAACCAA U	mm0m000mm00mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-36	1311	616	CAGAACCAA U	mm0m00mm00mmm-Chl	oooooooooooooso
TYR-19	1312	617	AGAACCAA U	mm000mm00m0mm-Chl	oooooooooooooso
TYR-40	1652	618	CAGAGCCAU U	mm000mm0mmmm-Chl	oooooooooooooso
TYR-41	1653	619	AGAGCCA U	mm00mm0mmmm0mm-Chl	oooooooooooooso

O: ホスホジエステル ; S: ホスホロチオアート ; P: 5'リン酸化 ; 0: 2'-OH; f: 2'-フルオロ ; m: 2'

O-メチル ; Chl: コステロール。

10

20

30

40

【 0 0 7 1 】

50

## 【表 7 - 1】

表 7 : TYR アンチセンス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴ番号	配列番号	アンチセンス配列	アンチセンス化学	アンチセンス骨格
TYR-1	620	UGGUCCUAUUUAUAAAAG AC	Pm00ffff0ff0f000m000	OoooooooooooooSSSSSSO
TYR-2	621	UAGGUCCUAUUUAUAAA GA	Pm000ffff0ff0f00m0m0	OoooooooooooooSSSSSSO
TYR-3	622	UCAGGUCCUAUUUAUAAA AG	Pmf000ffff0ff0f00m00	OoooooooooooooSSSSSSO
TYR-4	623	UUUGCUAAAGUGAGGU GG	Pmff0ff0m00f00m0f000	OoooooooooooooSSSSSSO
TYR-5	624	UUUUGCUAAAGUGAGGU AG	Pmfff0ff0m00f00m0f00	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-6	625	UUUCAUUUGGCCAUAGG UC	Pmfff0fff0ff0f000f0	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-7	626	UAUCAAUGUCUCUCCAG AU	Pm0ff00f0fffff00m0	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-8	627	UAAUCAAUGUCUCUCCA GA	Pm00ff00f0fffff000	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-9	628	UAUGCCAAGGCAGAAAA GC	Pm0f0ff0m00f00m00m0 0	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-10	629	UUGUGCAAAUGUCACAC UU	Pmf0f0f000f0ff0f0ff0	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-11	630	UUCUGUGCAAAUGUCAC AC	Pmfff0f0f000f0ff0f0	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-12	631	UAUCUGUGCAAAUGUCA CA	Pm0fff0f0f000f0ff0f0	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-13	632	UCAUCUGUGCAAAUGUC AC	Pmf0fff0f0f000f0ff00	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-14	633	UCUCAUCUGUGCAAAUG UC	Pmfff0fff0f0f000f0f0	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-15	634	UACUCAUCUGUGCAAAU GU	Pm0fff0fff0f0f000f00	oooooooooooooSSSSSSO
TYR-16	635	UUACUCAUCUGUGCAAA UG	Pmf0fff0fff0f0f000f0	oooooooooooooSSSSSSO

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

TYR-37	636	UGUACUCAUCUGUGCAA AU	Pm0f0fff0fff0f0f00m0	oooooooooooooosssssso
TYR-17	637	UAGUAAGUUAGGAUUUG UG	Pm00f000ff000mfff0f0	Oooooooooooooosssssso
TYR-18	638	UGAGUAAGUUAGGAUUU GU	Pm000f000ff00m0fff00	Oooooooooooooosssssso
TYR-38	639	UUGAGUAAGUUAGGAUU UG	Pmf000f000ff00m0fff0	Oooooooooooooosssssso
TYR-20	640	UCCAAGAGGAGAAGAAU GA	Pmff00m00m000m000f 00	Oooooooooooooosssssso
TYR-21	641	UCAUGGUUUCAGGAUU AC	Pmf0f0fffff00m0ff00	Oooooooooooooosssssso
TYR-22	642	UUCAUGGUUUCAGGAU UA	Pmff0f0fffff0m00ff0	Oooooooooooooosssssso
TYR-23	643	UGUCAUGGUUUCAGGA UU	Pm0ff0f0fffff00m0f0	Oooooooooooooosssssso
TYR-24	644	UUGUCAUGGUUUCAGG AU	Pmf0ff0f0fffff000m0	Oooooooooooooosssssso
TYR-25	645	UUUGUCAUGGUUUCAG GA	Pmff0ff0f0fffff00m0	Oooooooooooooosssssso
TYR-26	646	UUUUGUCAUGGUUUCCA GG	Pmfff0ff0f0fffff000	Oooooooooooooosssssso
TYR-27	647	UAGCUGAAUUGGCAGC UU	Pm0ff0m00ff00f0ff0	Oooooooooooooosssssso
TYR-28	648	UUGUAUUUCUAAAGCUG AA	Pmf0f0fffff00m0ff000	Oooooooooooooosssssso
TYR-29	649	UCUCCAGUGUAUUUCU AA	Pmfffff00f0f0fffff00	Oooooooooooooosssssso
TYR-30	650	UUCUCCAGUGUAUUU CU	Pmfffff00f0f0fffff0	Oooooooooooooosssssso
TYR-31	651	UGCAAAUCCUUCAGUG UA	Pm0f000fffff00f0f0	Oooooooooooooosssssso
TYR-32	652	UCUAGCAAUCCUCCA GU	Pmff00f000fffff000	Oooooooooooooosssssso
TYR-39	653	UGACUAGCAAUCCUUC CA	Pm0ff00f000fffff0	Oooooooooooooosssssso

10

20

30

40

50

## 【表 7 - 3】

TYR-33	654	UAUUGUUCCAUUCAUUA AG	Pm0ff0ffff0fff0f0f00	Oooooooooooooosssssso
TYR-34	655	UGACAUUGUUCCAUUCA UA	Pm00f0ff0ffff0fff0f0	Oooooooooooooosssssso
TYR-35	656	UAUUGGCUUCUGGAUAA AC	Pm0ff00ffff000f00m0	Oooooooooooooosssssso
TYR-36	657	UCAUUGGCUUCUGGAUA AA	Pmf0ff00ffff000f000	Oooooooooooooosssssso
TYR-19	658	UGCAUUGGCUUCUGGAU AA	Pm0ff00ffff000f00	Oooooooooooooosssssso
TYR-40	659	UUAAAUGGCUCUGAUAC AA	Pmf000f00ffff00f0f00	Oooooooooooooosssssso
TYR-41	660	UAUAAAUGGCUCUGAU CA	Pm0f000f00ffff00f0f0	Oooooooooooooosssssso

O: ホスホジエステル ; S: ホスホロチオアート ; P: 5'リン酸化 ; 0: 2'-OH; f: 2'-フルオロ ; m: 2'

O-メチル。

10

20

## 【0 0 7 2】

## 【表 8 - 1】

表 8 : 最適化された TYR センス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴ番号	RXi デュプレ ックス ID	オリゴ番号	開始部位	配列 番号	センス配列	センス化学	センス骨格
TYR-42	26195	25934	490	661	CACUUUAGC AAAA	mmmmmm00m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-43	26196	25934	490	662	CACUUUAGC AAAA	mmmmmm00m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-44	26197	25934	490	663	CACUUUAGC AAAA	mmmmmm00m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-45	26198	25934	490	664	CACUUUAGC AAAA	mmmmmm00m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-46	26199	26131	490	665	XAXYYYAGX AAAA	mmmmmm00m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-47	26200	26132	490	666	XAXYYYAGX AAAA	mmmmmm0mmm0 mm-Chl	oooooooooooo osso
TYR-48	26201	25940	663	667	GAGACAUUG AUUA	mm00m0mm00mm m-Chl	oooooooooooo osso

30

40

50

【表 8 - 2】

TYR-49	26202	25940	663	668	GAGACAUUG AUUA	mm00m0mm00mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-50	26203	25940	663	669	GAGACAUUG AUUA	mm00m0mm00mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-51	26204	25940	663	670	GAGACAUUG AUUA	mm00m0mm00mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-52	26205	26137	663	671	GAGAXAYYG AYYA	mm00m0mm00mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-53	26206	25950	813	672	UUUGCACAG AUGA	mmm0m0m000mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-54	26207	25950	813	673	UUUGCACAG AUGA	mmm0m0m000mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-55	26208	25950	813	674	UUUGCACAG AUGA	mmm0m0m000mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-56	26209	25950	813	675	UUUGCACAG AUGA	mmm0m0m000mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-57	26210	26142	813	676	YYYGXAXAG AYGA	mmm0m0m000mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-58	26211	26143	813	677	YYYGXAXAG AYGA	mmm0m0m000mm m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-59	26212	25954	816	678	GCACAGAUG AGUA	mm0m000m000mm -Chl	oooooooooooo osso
TYR-60	26213	25954	816	679	GCACAGAUG AGUA	mm0m000m000mm -Chl	oooooooooooo osso
TYR-61	26214	25954	816	680	GCACAGAUG AGUA	mm0m000m000mm -Chl	oooooooooooo osso
TYR-62	26215	25954	816	681	GCACAGAUG AGUA	mm0m000m000mm -Chl	oooooooooooo osso
TYR-63	26216	26148	816	682	GCACAGAUG AGUA	mm0m0m0m0m0m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-64	26217	26149	816	683	GXAXAGAYG AGYA	mm0m0m0m0m0m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-65	26218	25966	881	684	UUCUCCUCU UGGA	mmmmmmmmmm0 mm-Chl	oooooooooooo osso
TYR-66	26219	25966	881	685	UUCUCCUCU UGGA	mmmmmmmmmm0 mm-Chl	oooooooooooo osso

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

TYR-67	26220	25966	881	686	UUCUCCUCU UGGA	mmmmmmmmmmmm0 mm-Chl	oooooooooooo osso
TYR-68	26221	25966	881	687	UUCUCCUCU UGGA	mmmmmmmmmmmm0 mm-Chl	oooooooooooo osso
TYR-69	26222	26154	881	688	YYXYXXYXY YGGA	mmmmmmmmmmmm0 mm-Chl	oooooooooooo osso
TYR-70	26223	25990	1111	689	AGGAUUUGC UAGA	mm00mmm0mm0m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-71	26224	25990	1111	690	AGGAUUUGC UAGA	mm00mmm0mm0m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-72	26226	25990	1111	691	AGGAUUUGC UAGA	mm00mmm0mm0m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-73	26227	25990	1111	692	AGGAUUUGC UAGA	mm00mmm0mm0m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-74	26228	26159	1111	693	AGGAYYYGX YAGA	mm00mmm0mm0m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-75	26229	25994	1186	694	GAAUGGAAC AAUA	mm0m00m0m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-76	26230	25994	1186	695	GAAUGGAAC AAUA	mm0m00m0m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-77	26231	25994	1186	696	GAAUGGAAC AAUA	mm0m00m0m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-78	26232	25994	1186	697	GAAUGGAAC AAUA	mm0m00m0m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-79	26233	26164	1186	698	GAAYGGAAAX AAYA	mm0m00m0m00m m-Chl	oooooooooooo osso
TYR-80	26234	26165	1186	699	GAAYGGAAAX AAYA	mm0m0mm0mm0m m-Chl	oooooooooooo osso

O: ホスホジエステル ; S: ホスホロチオアート ; P: 5'リン酸化 ; 0: 2'-OH; f: 2'-フルオロ ; m: 2'

O-メチル。X = 5メチル C および Y = 5メチル U

【0 0 7 3】

40

いくつかの態様において、核酸分子は、R X I - 2 3 1 であり、

【化 3】

mG.mA. A.mU. G. G.mA. A.mC. A. A\*mU\*mA.TEG-Chl ( 例えは、配列番号 696)

のセンス鎖配列、および

【化 4】

P.5mU. A.5fU.5fU. G.5mU.5fU.5fC.5mC. A.5fU.5fU.5fC\* A\*5mU\* A\*5fU\*mA\* G  
( 例えは、配列番号 735)

50

のアンチセンス鎖配列を含む。

【 0 0 7 4 】

【表 9 - 1】

表 9 : 最適化された T Y R センス鎖オリゴヌクレオチド

オリゴ番号	RXi デュプレックスID	開始 部位	オリゴ 番号	配列 番号	アンチセンス配列	アンチセンス化学	アンチセンス 骨格
TYR-42	26195	490	26127	700	UUUUGCUAAAGU GAGGUAG	Pmfff0ff0f00f00 m0mm0	oooooooooooo osssssso
TYR-43	26196	490	26128	701	UUUUGCUAAAGU GAGGUAG	Pmfff0ff0f00f00 m0mf0	oooooooooooo osssssso
TYR-44	26197	490	26129	702	YYYYGXYAAAGY GAGGYAG	Pmfff0ff0f00f00 m0mm0	oooooooooooo osssssso
TYR-45	26198	490	26130	703	YYYYGXYAAAGY GAGGYAG	Pmfff0ff0f00f00 m0mf0	oooooooooooo osssssso
TYR-46	26199	490	25933	704	UUUUGCUAAAGU GAGGUAG	Pmfff0ff0m00f00 m0f00	oooooooooooo osssssso
TYR-47	26200	490	25933	705	UUUUGCUAAAGU GAGGUAG	Pmfff0ff0m00f00 m0f00	oooooooooooo osssssso
TYR-48	26201	663	26133	706	UAAUCAAUGUCU CUCCAGA	Pmf0ff00f0ffmff mmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-49	26202	663	26134	707	UAAUCAAUGUCU CUCCAGA	Pmf0ff00f0ffmm ffmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-50	26203	663	26135	708	YAAYXAAYGYXY XYXXAGA	Pmf0ff00f0ffmff mmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-51	26204	663	26136	709	YAAYXAAYGYXY XYXXAGA	Pmf0ff00f0ffmm ffmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-52	26205	663	25939	710	UAAUCAAUGUCU CUCCAGA	Pm0ff00f0ffffff 000	oooooooooooo osssssso
TYR-53	26206	813	26138	711	UCAUCUGUGCAA AUGUCAC	Pmf0fff0f0f0f0f mfmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-54	26207	813	26139	712	UCAUCUGUGCAA AUGUCAC	Pmf0fff0f0f0f0m 0fmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-55	26208	813	26140	713	YXAYXYGYGXAA AYGYXAC	Pmf0fff0f0f0f0f mfmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-56	26209	813	26141	714	YXAYXYGYGXAA AYGYXAC	Pmf0fff0f0f0f0m 0fmm0	oooooooooooo osssssso
TYR-57	26210	813	25949	715	UCAUCUGUGCAA	Pmf0fff0f0f00f0	oooooooooooo

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

					AUGUCAC	ff00	oooooooooooo
TYR-58	26211	813	25949	716	UCAUCUGUGCAA AUGUCAC	Pmf0fff0f0f000f0 ff00	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-59	26212	816	26144	717	UACUCAUCUGUG CAAAUGU	Pm0fff0fff0f0m0 m0mm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-60	26213	816	26145	718	UACUCAUCUGUG CAAAUGU	Pm0fff0fff0f0f0 m0fm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-61	26214	816	26146	719	YAXYXAYXYGYG XAAAYGU	Pm0fff0fff0f0m0 m0mm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-62	26215	816	26147	720	YAXYXAYXYGYG XAAAYGU	Pm0fff0fff0f0f0 m0fm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-63	26216	816	25953	721	UACUCAUCUGUG CAAAUGU	Pm0fff0fff0f0f00 0f00	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-64	26217	816	25953	722	UACUCAUCUGUG CAAAUGU	Pm0fff0fff0f0f00 0f00	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-65	26218	881	26150	723	UCCAAGAGGAGA AGAAUGA	Pmff00m00m00f m0m0fm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-66	26219	881	26151	724	UCCAAGAGGAGA AGAAUGA	Pmff00f00f00fm 0m0fm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-67	26220	881	26152	725	YXXAAGAGGAGA AGAAYGA	Pmff00m00m00f m0m0fm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-68	26221	881	26153	726	YXXAAGAGGAGA AGAAYGA	Pmff00f00f00fm 0m0fm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-69	26222	881	25965	727	UCCAAGAGGAGA AGAAUGA	Pmff00m00m000 m000f00	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-70	26223	1111	26155	728	UCUAGCAAAUCC UUCCAGU	Pmff00f000ffffmf mfmm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-71	26224	1111	26156	729	UCUAGCAAAUCC UUCCAGU	Pmff00f0f0ffffmf mf0m0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-72	26226	1111	26157	730	YXYAGXAAAYXX YYXXAGU	Pmff00f000ffffmf mfmm0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-73	26227	1111	26158	731	YXYAGXAAAYXX YYXXAGU	Pmff00f0f0ffffmf mf0m0	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-74	26228	1111	25989	732	UCUAGCAAAUCC UUCCAGU	Pmff00f000fffffff 000	oooooooooooo oooooooooooo
TYR-75	26229	1186	26160	733	UAUUGUUCCAUU	Pm0ff0mffm0ffff	oooooooooooooooo

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

					CAUAUAG	0m0fm0	osssssso
TYR-76	26230	1186	26161	734	UAUUGUUCCAUU	Pm0ff0ffff0fff0m	oooooooooooo
					CAUAUAG	0mm0	osssssso
TYR-77	26231	1186	26162	735	YAYYGYYXXAYY	Pm0ff0mffm0fff	oooooooooooo
					XAYAYAG	0m0fm0	osssssso
TYR-78	26232	1186	26163	736	YAYYGYYXXAYY	Pm0ff0ffff0fff0m	oooooooooooo
					XAYAYAG	0mm0	osssssso
TYR-79	26233	1186	25993	737	UAUUGUUCCAUU	Pm0ff0ffff0fff0f0	oooooooooooo
					CAUAUAG	f00	osssssso
TYR-80	26234	1186	25993	738	UAUUGUUCCAUU	Pm0ff0ffff0fff0f0	oooooooooooo
					CAUAUAG	f00	osssssso

O: ホスホジエステル；S: ホスホロチオアート；P: 5'リン酸化；0: 2'-OH；f: 2'-フルオロ；m: 2'

O-メチル。X = 5メチルCおよびY = 5メチルU

## 【0 0 7 5】

Map 4 k 4

いくつかの側面において、本開示は、MAP 4 k 4 を標的とする s d - r x R N A などの核酸の使用に関する。MAP 4 K 4 は、*Saccharomyces cerevisiae* Sterile 20 (STE 20)に関するタンパク質キナーゼの群に属する哺乳動物のセリン/トレオニンタンパク質キナーゼである。MAP 4 K 4 (Nck 相互作用キナーゼ (Nck interacting kinase) を表すNIKとしてもまた知られる)は、Nck の SH3 ドメインと相互作用するタンパク質についてのマウススクリーンにおいてはじめて同定された (Su et al. (1997))。その発見以来、MAP 4 K 4 は、広い範囲の生理学的な機能と結び付けられてきており、結び付けられ続けている。Map 4 k 4 を標的とする核酸(例として s d - r x R N A )の例は、下に示される。

## 【0 0 7 6】

デュプレックス：

パッセンジャー鎖：

## 【化 5】

DY547.mC.mU. G.mU. G. G.mA. A. G.mU.mC\*mU\* A.TEG-Chl (例えば、配列番号 739)

ガイド鎖：

## 【化 6】

P.fU. A. G. A.fC.fU.fU.fC.fC. A.mC\* A\*mG\* A\*mA\*mC\*mU\*mC\* U (例えば、配列番号 740)

デュプレックス：

パッセンジャー鎖：

## 【化 7】

mC.mU. G.mU. G. G.mA. A. G.mU.mC\*mU\* A.TEG-Chl (例えば、配列番号 741)

ガイド鎖：

## 【化 8】

P.fU. A. G. A.fC.fU.fU.fC.fC. A.mC\* A\*mG\* A\*mA\*mC\*mU\*mC\* U (例えば、配列番号 742)

10

20

30

40

50

## 【0077】

## 追加の標的遺伝子

いくつかの側面において、本開示は、以下の標的遺伝子：V E G F、P D G F - B、S P P 1、T G F B 1、T G F B 2、H I F - 1 m T O R、P T G S 2 ( C O X - 2 )、P P I B、I L - 1 アルファ、I L - 1 ベータ、I c a m - 1、T i e 1、T i e 2、A N G 2、A n g 1、M Y C、またはT N F の1つを標的とするs d - r x R N Aなどの核酸の使用に関する。

## 【0078】

いくつかの態様において、本開示により記載されるR N A i 化合物は、デュプレックス領域（8～15 塩基長が効率的なR I S C 侵入）および4～12 ヌクレオチド長の一本鎖領域を含む非対称化合物を含み；13 または14 ヌクレオチドのデュプレックスを持つ。いくつかの態様において、デュプレックス領域は13 または14 ヌクレオチド長である。6 または7 ヌクレオチドの一本鎖領域が、いくつかの態様において好ましい。本開示により記載されるR N A i 化合物の一本鎖領域はまた、2～12 のホスホロチオアートのヌクレオチド間連結部（ホスホロチオアート修飾として言及される）をも含む。いくつかの態様において、本開示により記載されるR N A i 化合物単一領域は、6～8 のホスホロチオアートヌクレオチド間連結部を包含する。本開示により記載されるのR N A i 化合物はまた、ユニークな化学修飾パターンをも含み、これは安定性を提供し、R I S C 侵入に適合する。いくつかの態様において、これらの要因の組み合わせが、in vitro およびin vivo でのR N A i 試薬の送達に高度に有用である、予想外の特性をもたらした。

10

20

## 【0079】

いくつかの態様において、安定性を提供し、かつ、R I S C 侵入に適合する、化学修飾されたパターンは、センス鎖またはパッセンジャー鎖ならびにアンチセンス鎖またはガイド鎖への修飾を含む。例えば、パッセンジャー鎖は、安定性を確実にし、かつ、活性に干渉しない、いずれの化学的実体によっても、修飾され得る。かかる修飾は、2' リボ修飾（O - メチル、2' F、2 デオキシ等）およびホスホロチオアート修飾のような主鎖修飾を含む。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖における化学修飾パターンは、パッセンジャー鎖内のC およびU ヌクレオチドのO - メチル修飾を含む。代わりに、パッセンジャー鎖は完全にO - メチル修飾されてもよい。

## 【0080】

30

ガイド鎖はまた、例えば、R I S C 侵入に干渉せずに、安定性を確実にするいずれの化学修飾によっても修飾されてもよい。ガイド鎖における好ましい化学修飾パターンは、C およびU ヌクレオチドの大多数が2' F 修飾され、かつ、5' 末端がリン酸化されているものを含む。ガイド鎖におけるいくつかの態様における化学修飾パターンは、1位と11～18位のC / U との2' O - メチル修飾および5' 末端の化学的リン酸化を含む。ガイド鎖におけるさらに別の好ましい化学修飾パターンは、1位と11～18位のC / U との2' O - メチル修飾および5' 末端の化学的リン酸化ならびに2～10位におけるC / U の2' F 修飾を含む。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および/またはガイド鎖は、少なくとも1つの5 - メチルC またはU 修飾を含有する。

## 【0081】

40

いくつかの態様において、s d - r x R N A 中のヌクレオチドのうち少なくとも30 % が修飾されている。例えば、s d - r x R N A 中のヌクレオチドのうち少なくとも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 % または99 % が修飾されている。いくつかの態様において、s d - r x R N A 中のヌクレオチドの100 %

50

が修飾されている。

【0082】

本開示により記載されるオリゴヌクレオチドの上の化学修飾パターンは、良好な耐性を示し、および、いくつかの態様において、非対称RNAi化合物の効力を改善することが観察されている。いくつかの態様において、記載された構成要素（ガイド鎖の安定化、ホスホロチオアートの伸長、センス鎖の安定化および/または疎水性抱合体）のいずれかの排除、またはいくつかの例において、分子のサイズの増加は、最適以下の効力をもたらし、いくつかの例において、効力の完全な喪失をもたらす。いくつかの態様において、要素の組み合わせは、HeLa細胞などの細胞への受動的送達の後であっても十分に活性がある化合物の開発をもたらす。

10

【0083】

s d - r x RNAは、いくつかの例において、新規の型の化学的性質（chemistries）を使用して化合物の疎水性を改善することにより、さらに改善され得る。例えば、1つの化学的性質は、疎水性塩基修飾の使用に関する。あらゆる位置におけるあらゆる塩基が、修飾が塩基の分配係数の増大をもたらす限りにおいて、修飾されてもよい。いくつかの態様において、修飾の化学的性質のための位置は、ピリミジンの4位および5位である。これらの位置の主要な利点は、(a)合成の容易性、および、(b)RISC複合体のローディングおよび標的認識のために必須である、塩基対形成およびA型らせん(A form helix)形成への干渉がないこと、である。いくつかの態様において、複数のデオキシリジンが全体的な化合物の効力に干渉せずに存在するs d - r x RNA化合物のバージョンが使用される。加えて、組織分布および細胞取り込みにおける主要な改善は、疎水性抱合体の構造を最適化することにより得られ得る。いくつかの態様において、ステロールの構造は、C17に付着された鎖(C17 attached chain)を変える(増大する/減少する)ように修飾される。この型の修飾は、いくつかの態様において、in vivoでの細胞取り込みの大きな増大を、および、組織取り込み成功率(prosperities)の改善をもたらす。

20

【0084】

本開示により処方されるdsRNAはまた、rxRNA or iを含む。rxRNA or iとは、2009年2月11日に出願されたPCT公開番号WO2009/102427(出願番号PCT/US2009/000852)、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、および2010年11月1日に出願された米国特許公開番号2011/0039914、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」において記載され、これらから参考として組み込まれる、RNA分子のクラスを指す。

30

いくつかの態様において、rxRNA or i分子は、標的遺伝子の発現を阻害するための長さ12~35ヌクレオチドの二本鎖RNA(dsRNA)コンストラクトを含み、これは、5'末端および3'末端を有するセンス鎖、ここで、センス鎖は、2'修飾リボース糖で高度に修飾され、およびここで、センス鎖の中央部における3~6ヌクレオチドは、2'修飾リボース糖で修飾されない、ならびに、5'末端および3'末端を有するアンチセンス鎖、これはセンス鎖および標的遺伝子のmRNAとハイブリダイズする、を含み、ここで、dsRNAは、配列依存的な様式において、標的遺伝子の発現を阻害する。

40

【0085】

rxRNA or iは、本明細書において記載される修飾のいずれのものを含んでもよい。いくつかの態様において、rxRNA or i中のヌクレオチドの少なくとも30%が修飾される。例えば、rxRNA or i中のヌクレオチドのうちの少なくとも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%または99%が修飾され

50

る。いくつかの態様において、s d - r x R N A 中のヌクレオチドの 100 % が修飾される。いくつかの態様において、r x R N A o r i のパッセンジャー鎖のみが修飾を含む。

【 0 0 8 6 】

本開示は、その適用に関して、以下の説明において記載されるかまたは図面において例示される構成および構成要素の配置の詳細に限定されない。本発明は、他の態様および多様な方法において実施されるかまたは行われることが可能である。また、本明細書に使用される用語および専門用語は、説明を目的とするものであり、限定するものとしてみなされるべきではない。本明細書における「含む (including)」、「含む (comprising)」または「有する (having)」、「含有する (containing)」、「伴う (involving)」およびそれらの変形の使用は、その後に列挙される項目およびその均等物ならびに追加の項目を包含することを意味する。

【 0 0 8 7 】

よって、本開示の側面は、ガイド (アンチセンス) 鎖およびパッセンジャー (センス) 鎖を含む、単離された二本鎖核酸分子に関する。本明細書に使用される用語「二本鎖」は、ヌクレオモノマーの少なくとも一部が相補的であり、二本鎖領域を形成するように水素結合されている、1または2以上の核酸分子を指す。いくつかの態様において、ガイド鎖の長さは、16 ~ 29ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、ガイド鎖は、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28または29ヌクレオチド長である。ガイド鎖は標的遺伝子に対して相補性を有する。ガイド鎖と標的遺伝子との間の相補性は、ガイド鎖のいずれの部分にわたっても存在することができる。本明細書に使用される相補性は、ガイド鎖が標的に対して R N A i を媒介できるように十分に相補的である限りにおいて、完全な相補性であっても、より不完全な相補性であってもよい。いくつかの態様において、相補性とは、ガイド鎖と標的との間の、25 %、20 %、15 %、10 %、5 %、4 %、3 %、2 %または1 %未満のミスマッチを指す。完全な相補性とは、100 %の相補性を指す。よって、本開示により記載されるオリゴヌクレオチドは、遺伝子変異、系統多型、または、進化による分岐に起因して予測可能な配列の変化に耐性を示すことができるという利点を有する。例えば、標的配列と比較して挿入、欠失および单一の点変異を有する s i R N A もまた、阻害について有効であることが見出されている。さらに、s i R N A の全ての部位が標的の認識について同等に寄与するわけではない。s i R N A の中心におけるミスマッチは最も重要であり、本質的に (essentially) 標的 R N A の切断を無効化する。アンチセンス鎖に関して、中心の上流または切断部位の上流におけるミスマッチは、耐性を示すが、標的 R N A の切断を著しく低減する。アンチセンス鎖に関して、中心または切断部位の下流におけるミスマッチ、好ましくは3'末端の付近、例えばアンチセンス鎖の3'末端から1、2、3、4、5または6ヌクレオチドに位置するものは、耐性を示し、標的 R N A の切断をごく僅かしか低減しない。

【 0 0 8 8 】

いかなる特定の理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの態様において、ガイド鎖は、少なくとも16ヌクレオチドの長さであり、R I S C 中でアルゴノートタンパク質をアンカーする。いくつかの態様において、ガイド鎖が R I S C 中ヘロードするとき、これは明確なシード領域を有し、標的 m R N A の切断は、ガイド鎖の10 ~ 11位にわたって行われる。いくつかの態様において、ガイド鎖の5'末端は、リン酸化されているかまたはリン酸化ができる。本明細書に記載される核酸分子は、最短トリガーリー R N A (minimum trigger RNA) として言及される場合もある。

【 0 0 8 9 】

いくつかの態様において、パッセンジャー鎖の長さは、8 ~ 15ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、パッセンジャー鎖は、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。パッセンジャー鎖は、ガイド鎖に対して相補性を有する。パッセンジャー鎖とガイド鎖との間の相補性は、パッセンジャーまたはガイド鎖のいずれの部位にわたっても存在してもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間には、分子の二本鎖領域内に100 %の相補性が存在する。

10

20

30

40

50

## 【0090】

本開示の側面は、最小二本鎖領域を有する二本鎖核酸分子に関する。いくつかの態様において、分子の二本鎖である領域は、8～15ヌクレオチド長の範囲である。ある態様において、分子の二本鎖である領域は、8、9、10、11、12、13、14または15ヌクレオチド長である。ある態様において、二本鎖領域は、13または14ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に100%の相補性が存在してもよく、または、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に1または2以上のミスマッチが存在してもよい。いくつかの態様において、二本鎖分子の一方の末端において、分子は、平滑末端であるかまたは1ヌクレオチドの突出を有する。分子の一本鎖領域は、いくつかの態様において、4～12ヌクレオチド長である。例えば、一本鎖領域は、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヌクレオチド長であってよい。しかしながら、ある態様において、一本鎖領域はまた、4ヌクレオチド長未満であっても、または、12ヌクレオチド長より長くてもよい。ある態様において、一本鎖領域は少なくとも6または少なくとも7ヌクレオチド長である。

## 【0091】

本開示に関するRNAiコンストラクトは、-13kcal/mol未満の熱力学的安定性( $\Delta G$ )を有することができる。いくつかの態様において、熱力学的安定性( $\Delta G$ )は、-20kcal/mol未満である。いくつかの態様において、( $\Delta G$ )が-21kcal/mol未満となったとき、効力の喪失が存在する。いくつかの態様において、-13kcal/molより高い( $\Delta G$ )値は、本発明の側面に適合性である。いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、いくつかの態様において、相対的に高い( $\Delta G$ )値を有する分子は、相対的に高い濃度において活性になる場合があり、一方、相対的に低い( $\Delta G$ )値を有する分子は、相対的に低い濃度において活性になる場合がある。いくつかの態様において、( $\Delta G$ )値は、-9kcal/molよりも高くてよい。最小二本鎖領域を有する本開示に関するRNAiコンストラクトにより媒介される遺伝子サイレンシング効果は予測できないが、それは、ほぼ同一の設計であるが熱力学的安定性がより低い分子は、不活性であることが示されているからである(Rana et al. 2004)。

## 【0092】

いかなる理論によっても拘束されることを望まないが、本明細書に記載される結果は、dsRNAまたはdsDNAの8～10bpの伸長が、RISCのタンパク質構成要素またはRISCのコファクターにより構造的に認識されるであろうことを示唆する。さらに、タンパク質構成要素により感受され得るか、および/または、かかる構成要素と相互作用するために十分に安定であり得、その結果アルゴノートタンパク質中へロードされ得る、トリガー化合物(triggering compound)のためのフリーエネルギー要求が存在する。最適な熱力学が存在して、好ましくは少なくとも8ヌクレオチドである二本鎖部分が存在する場合、デュプレックスは認識され、RNAi機構中にロードされるであろう。

## 【0093】

いくつかの態様において、熱力学的安定性は、LNA塩基の使用を通して増大する。いくつかの態様において、追加の化学修飾が導入される。化学修飾の幾つかの非限定例は、5'ホスファート、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-フルオロ、リボチミジン、C-5プロピニル-dC(pdc)およびC-5プロピニル-dU(pdU); C-5プロピニル-C(pC)およびC-5プロピニル-U(pU); 5'-メチルC、5'-メチルU、5'-メチルdC、5'-メチルdUメトキシ、(2',6'-ジアミノプリン)、5'-ジメトキシトリチル-N4-エチル-2'-デオキシシチジンおよびMGB(副溝結合剤)を含む。同一分子内で1つより多くの化学修飾を組み合わせられ得ることが、理解されるべきである。

## 【0094】

本発明に関する分子は、効力の増大および/または毒性の低減のために、最適化される。例えば、ガイドおよび/またはパッセンジャー鎖のヌクレオチドの長さ、および/ま

10

20

30

40

50

たは、ガイドおよび／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオアート修飾の数は、いくつかの側面においてRNA分子の効力に影響を及ぼし、一方、2'-フルオロ(2'F)修飾を2'-O-メチル(2'OMe)修飾により置き換えることは、いくつかの側面において分子の毒性に影響を及ぼす。具体的には、分子の2'F含有物の低減は、分子の毒性を低下させると予測される。さらに、RNA分子中のホスホロチオアート修飾の数は、細胞内への分子の取り込み、例えば細胞内への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。本明細書に記載される分子の好ましい態様は、2'F修飾を有さず、なお細胞取り込みおよび組織への浸透における同等の効力により特徴づけられる。かかる分子は、2'Fの大量使用により重度に修飾されたAccellおよびWolfrumにより記載される分子などの先行技術に対して、顕著な改善を表す。

10

#### 【0095】

いくつかの態様において、ガイド鎖は、およそ18～19ヌクレオチドの長さであり、およそ2～14のホスファート修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、ホスファート修飾された2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または14より多くのヌクレオチドを含有し得る。ガイド鎖は、RIC侵入に干渉せずに安定性を増大させる1以上の修飾を含有してもよい。ホスホロチオアート修飾ヌクレオチドなどのホスファート修飾ヌクレオチドは、3'末端にあっても、5'末端にあっても、または、ガイド鎖全体に広がっていてもよい。いくつかの態様において、ガイド鎖の3'末端の10ヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10のホスホロチオアート修飾ヌクレオチドを含有する。ガイド鎖はまた、2'Fおよび／または2'OMe修飾を含有し得るが、これは、分子全体を通して位置され得る。いくつかの態様において、ガイド鎖の1位のヌクレオチド(ガイド鎖の最も5'の位置におけるヌクレオチド)は、2'OMe修飾されているか、および／または、リン酸化されている。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドは、2'F修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の2～10位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'F修飾され得る。ガイド鎖中のCおよびUヌクレオチドもまた、2'OMe修飾され得る。例えば、19ntのガイド鎖の11～18位(または異なる長さの鎖における対応する位置)におけるCおよびUヌクレオチドは、2'OMe修飾され得る。いくつかの態様において、ガイド鎖の最も3'末端におけるヌクレオチドは、未修飾である。ある態様において、ガイド鎖中のCおよびUの大部分は、2'F修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11～18位におけるCまたはUは、2'OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の態様において、1位、および、11～18位におけるCまたはUは、2'OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されており、2～10位におけるCまたはUは2'F修飾されている。

20

#### 【0096】

いくつかの側面において、最適なパッセンジャー鎖は、およそ11～14ヌクレオチドの長さである。パッセンジャー鎖は、安定性を増大させる修飾を含有してもよい。パッセンジャー鎖における1以上のヌクレオチドは、2'OMe修飾され得る。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖における1以上のCおよび／またはUヌクレオチドが2'OMe修飾されているか、または、パッセンジャー鎖におけるCおよびUヌクレオチドの全てが2'OMe修飾されている。ある態様において、パッセンジャー鎖における全てのヌクレオチドが2'OMe修飾されている。パッセンジャー鎖上の1以上のヌクレオチドはまた、ホスホロチオアート修飾などのホスファート修飾もなされ得る。パッセンジャー鎖はまた、2'リボ、2'Fおよび2デオキシ修飾、または、上のいずれの組み合わせをも含有し得る。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との両方における化学修飾パターンは、良好に耐容され得、化学修飾の組み合わせは、RNA分子の効力および自己送達の増大をもたらし得る。

30

#### 【0097】

本開示の側面は、RNAiについて先に使用してきた分子と比較した場合、二本鎖領域に対して相対的に長い一本鎖領域を有するRNAiコンストラクトに関する。分子の一本鎖領域は、細胞取り込みまたは遺伝子サイレンシングを促進するために修飾されていて

40

50

もよい。いくつかの態様において、一本鎖領域のホスホロチオアート修飾は、細胞取り込みおよび／または遺伝子サイレンシングに影響を及ぼす。ガイド鎖のホスホロチオアート修飾されている領域は、分子の一本鎖および二本鎖の両領域内にヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、一本鎖領域は、2～12のホスホロチオアート修飾を含む。例えば、一本鎖領域は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12のホスホロチオアート修飾を含み得る。いくつかの例において、一本鎖領域は、6～8のホスホロチオアート修飾を含む。

#### 【0098】

いくつかの態様において、本開示に関連する分子はまた、細胞取り込みのためにも最適化される。本明細書に記載されるRNA分子において、ガイド鎖および／またはパッセンジャー鎖は、抱合体に付着され得る。ある態様において、抱合体は疎水性である。疎水性の抱合体は、10より高い分配係数を有する低分子であり得る。抱合体は、コレステロールなどのステロール型分子であっても、または、C17に付着した長さが増大したポリ炭素鎖を有する分子であってもよく、抱合体の存在は、脂質トランスフェクション試薬の有無に関らずRNA分子が細胞に取り込まれる能力に影響を及ぼし得る。抱合体は、疎水性リンカーを通して、パッセンジャー鎖またはガイド鎖に付着され得る。いくつかの態様において、疎水性リンカーは5～12Cの長さであり、および／または、ヒドロキシピロリジンをベースとする。いくつかの態様において、疎水性抱合体はパッセンジャー鎖に付着し、パッセンジャー鎖および／またはガイド鎖のいずれかのCU残基は、修飾されている。いくつかの態様において、パッセンジャー鎖および／またはガイド鎖のCU残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%は、修飾されている。いくつかの側面において、本発明に関連する分子は、自己送達性(s d)である。本明細書において用いられる場合、「自己送達(self-delivery)」とは、分子が、トランスフェクション試薬などの追加の送達ビヒクルを必要とせずに細胞へ送達される能力を指す。

#### 【0099】

本開示の側面は、RNAiにおける使用のために分子を選択することに関する。いくつかの態様において、8～15ヌクレオチドの二本鎖領域を有する分子は、RNAiにおける使用のために選択され得る。いくつかの態様において、分子は、その熱力学的安定性(G)に基づいて選択される。いくつかの態様において、-13kcal/mol未満の(-G)を有する分子が選択されるであろう。例えば、(-G)値は、-13、-14、-15、-16、-17、-18、-19、-21、-22または-22kcal/mol未満であってもよい。他の態様において、(-G)値は、-13kcal/molより高くてよい。例えば、(-G)値は、-12、-11、-10、-9、-8、-7または-7kcal/molより高くてよい。Gは、当該技術分野において知られているいずれの方法をも使用して計算され得ることが理解されるべきである。いくつかの態様において、Gは、Mfoldインターネットサイト([mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi](http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi))を通して利用可能なMfoldを使用して計算される。Gを計算するための方法は、以下の参考文献において記載され、それらから参考として組み込まれる: Zuker, M. (2003) Nucleic Acid Res., 31(13):3406-15; Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D. H. (1999) J. Mol. Biol. 288:911-940; Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., and Turner, D. H. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. 101:7287-7292; Duan, S., Mathews, D. H., and Turner, D. H. (2006) Biochemistry 45:9819-9832; Wuchty, S., Fontana, W., Hofacker, I. L., and Schuster, P. (1999) Biopolymers 49:145-165。

#### 【0100】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、5'および／または3'末端の突出を含有する。ポリヌクレオチドの一端におけるヌクレオチド突出の数および／または配列は、ポリヌクレオチドの他端と同じであっても異なっていてもよい。ある態様において、突出ヌクレオチドの1以上は、ホスホロチオアートまたは2' - OMe修飾などの化学修飾を含有して

10

20

30

40

50

もよい。

【0101】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、未修飾である。他の態様において、少なくとも1つのヌクレオチドが修飾されている。さらなる態様において、修飾は、ガイド配列の5'末端から2つ目のヌクレオチドにおいて、2' - Hまたは2' - 修飾されたリボース糖を含む。「2つ目のヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドの5'末端から2つ目のヌクレオチドとして定義される。

本明細書に使用される「2'修飾されたリボース糖」は、2' - OH基を有さないリボース糖を含む。「2'修飾されたリボース糖」は、(未修飾の基準のDNAヌクレオチドにおいて見出される)2' - デオキシリボースを含まない。例えば、2'修飾されているリボース糖は、2' - O - アルキルヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド、2' - デオキシヌクレオチドまたはこれらの組み合わせであってもよい。

【0102】

ある態様において、2'修飾されているヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチド(例としてC / U)である。2' - O - アルキルヌクレオチドの例は、2' - O - メチルヌクレオチドまたは2' - O - アリルヌクレオチドを含む。

ある態様において、上述の5'末端修飾を持つ本開示のsd - rxRNAポリヌクレオチドは、特定された5'末端修飾がない類似のコンストラクトと比較したとき、有意に(例として、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%またはそれを超えて)より低い「オフ・ターゲット(off-target)」遺伝子サイレンシングを呈し、よって、RNAi試薬または治療の全体的な特異性を大きく改善する。

本明細書に使用される「オフ・ターゲット」遺伝子サイレンシングは、例えばアンチセンス(ガイド)配列と、意図しない標的mRNA配列との間の偽の配列相同性に起因する、意図しない遺伝子サイレンシングを指す。

本開示のこの側面に従うと、あるガイド鎖修飾は、RNAi活性を著しく低下させずに(またはRNAi活性を全く低下させずに)、さらに、ヌクレアーゼ安定性を増大させ、および/または、インターフェロン誘導を低下させる。

【0103】

いくつかの態様において、5'ステム配列は、ポリヌクレオチドの5'末端上の2番目のヌクレオチドにて、2' - O - メチル修飾されたヌクレオチドなどの2'修飾されたリボース糖を含んでもよく、いくつかの態様においては、他の修飾ヌクレオチドを含まなくてもよい。かかる修飾を有するヘアピン構造は、該位置にて2' - O - メチル修飾がない類似のコンストラクトと比較して、標的特異性の増強またはオフ・ターゲットサイレンシングの低減を有してもよい。

特定の5'ステム配列の修飾と3'ステム配列の修飾とのある組み合わせは、標的遺伝子の発現を阻害する能力の増強、血清安定性の増強、および/または、標的特異性の増大などにより部分的に表わされる、さらなる予想外の利点をもたらしてもよい。

ある態様において、ガイド鎖は、ガイド鎖の5'末端における2番目のヌクレオチドにて、2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み、かつ、他の修飾ヌクレオチドを含まない。

【0104】

他の側面において、本開示のsd - rxRNA構造は、マイクロRNA機構によって、配列依存的な遺伝子サイレンシングを媒介する。本明細書に使用される用語「マイクロRNA」(「miRNA」)はまた、当該技術分野において、「小分子RNA(small temporal RNA)」(「stRNA」)としても言及され、遺伝子的に(例として、ウイルス、哺乳動物または植物ゲノムにより)コードされる小さい(10~50ヌクレオチドの)RNAであって、RNAサイレンシングを指向または媒介することができるものを指す。「miRNA障害」は、miRNAの異常な発現または活性により特徴づけられる疾患または障害を指すべきである。

【0105】

10

20

30

40

50

マイクロRNAは、マウス、線虫および哺乳動物において、発生またはがんなどの重要な経路において標的遺伝子を下方調節することに関与する。マイクロRNA機構を通した遺伝子サイレンシングは、miRNAとその標的メッセンジャーRNA(mRNA)との特異的であるがなお不完全な塩基対形成により、達成される。標的mRNA発現のマイクロRNA媒介性の下方調節において、多様な機構が使用されてもよい。

miRNAは、およそ22ヌクレオチドの非コードRNAであって、植物および動物の発生の間中、転写後または翻訳後のレベルにて、遺伝子発現を調節し得る。miRNAの1つの共通の特徴は、それらがpremiRNA(pre-miRNA)と称されるおよそ70ヌクレオチドの前駆体RNAステムループから、恐らくはRNase III型酵素であるダイサーまたはそのホモログによって、切り取られることである。天然に存在するmiRNAは、in vivoで内因性遺伝子により発現され、ヘアピンまたはステムループ前駆体(プレmiRNAまたはブリmiRNA(prim-miRNA))から、ダイサーまたは他のRNaseによりプロセッシングされる。miRNAは、in vivoで二本鎖デュプレックス(double-stranded duplex)として一過性に存在し得るが、一方の鎖のみが遺伝子サイレンシングを指揮するためにRISC複合体に取り込まれる。

#### 【0106】

いくつかの態様において、細胞取り込みおよびmiRNA活性の阻害において有効なsd-rxRNA化合物のバージョンが記載される。化合物は典型的に、RISC侵入性のバージョンに類似するが、大きな鎖の化学修飾パターンが、切断を遮断してRISC作用の効果的な阻害剤として作用するように、最適化されている。例えば、化合物は、先に記載のPS含有物で完全にまたは殆どメチル修飾されていてもよい。これらの型の化合物について、5'リン酸化は必要でない。二本鎖領域の存在は、細胞取り込みおよび効率的なRISCローディングを促進するので、好ましい。

#### 【0107】

低分子RNAを配列特異的調節剤として使用する別の経路は、RNA干渉(RNAi)経路であり、これは、細胞における二本鎖RNA(dsRNA)の存在に対する、進化的に保存された応答である。dsRNAは、ダイサーにより、~20塩基対(bp)デュプレックスの低分子干渉RNA(siRNA)へと切断される。これらの低分子RNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と称される多タンパク質エフェクター複合体へと集合させられる。siRNAは次いで、完璧な相補性を持つ標的mRNAの切断をガイドする。

#### 【0108】

バイオジェネシス、タンパク質複合体および機能のいくつかの側面は、siRNA経路とmiRNA経路との間で共有される。対象となる一本鎖ポリヌクレオチドは、siRNA機構においてdsRNAを模倣しても、または、miRNA機構においてマイクロRNAを模倣してもよい。

ある態様において、修飾RNAiコンストラクトは、同じ配列を有する未修飾RNAiコンストラクトと比較して、改善された血清および/または脳脊髄液中の安定性を有してもよい。

ある態様において、RNAiコンストラクトの構造は、ヒト、マウスおよび他のげっ歯類ならびに他の非ヒト哺乳動物からの初代細胞を含む哺乳動物の初代細胞などの初代細胞において、インターフェロン応答を誘導しない。ある態様において、RNAiコンストラクトはまた、無脊椎生物において標的遺伝子の発現を阻害するためにも使用されてもよい。

#### 【0109】

対象となるコンストラクトのin vivoでの安定性をさらに増大させるために、ヘアピン構造の3'末端は、保護基(単数または複数)により遮断されてもよい。例えば反転(inverted)ヌクレオチド、反転脱塩基部分またはアミノ末端修飾ヌクレオチドなどの保護基が使用されてもよい。反転ヌクレオチドは、反転デオキシヌクレオチドを含んでもよい。反転脱塩基部分は、3', 3'連結または5', 5'連結されたデオキシ脱塩基部分などの、反転デオキシ脱塩基部分を含んでもよい。

10

20

30

40

50

本発明のRNAiコンストラクトは、標的遺伝子（単数または複数）によりコードされるいずれの標的タンパク質の合成をも阻害することができる。本開示は、細胞において、in vitroまたはin vivoのいずれかで、標的遺伝子の発現を阻害する方法を含む。したがって、本開示のRNAiコンストラクトは、標的遺伝子の過剰発現により特徴づけられる疾患を持つ患者を処置するのに有用である。

#### 【0110】

標的遺伝子は、細胞にとって内因性であっても外因性（例として、ウイルスにより、または、組み換えDNA技術を使用して、細胞に導入されたもの）であってもよい。かかる方法は、標的遺伝子の発現を阻害するために十分な量でのRNAの細胞内への導入を含んでもよい。例として、かかるRNA分子は、組成物が標的遺伝子の発現を阻害するよう、標的遺伝子のヌクレオチド配列に対して相補的なガイド鎖を有してもよい。

10

本開示はまた、本発明の核酸を発現するベクター、および、かかるベクターまたは核酸を含む細胞にも関する。細胞は、in vivoのまたは培養中の、ヒト細胞などの哺乳動物細胞であり得る。

本開示はさらに、対象となるRNAiコンストラクトと薬学的に許容し得るキャリアまたは希釈剤とを含む、組成物に関する。

#### 【0111】

方法は、in vitroで、ex vivoで、または、in vivoで、例えば、培養中のヒト細胞などの培養中の哺乳動物細胞において行ってもよい。

標的細胞（例として哺乳動物細胞）は、脂質（例としてカチオン性脂質）またはリポソームなどの送達試薬の存在下において、接触させられてもよい。

20

本開示の別の側面は、哺乳動物細胞において標的遺伝子の発現を阻害するための方法を提供し、該方法は、哺乳動物細胞を、対象となるRNAiコンストラクトを発現するベクターと接触させることを含む。

#### 【0112】

本開示の一側面において、約16～約30ヌクレオチドの範囲のサイズである第1のポリヌクレオチドと、約26～約46ヌクレオチドの範囲のサイズである第2のポリヌクレオチドとを含む、より長いデュプレックスポリヌクレオチドが提供され、ここで、第1のポリヌクレオチド（アンチセンス鎖）は、第2のポリヌクレオチド（センス鎖）および標的遺伝子の両方に対して相補的であり、両方のポリヌクレオチドは、デュプレックスを形成し、ここで、第1のポリヌクレオチドは、長さが6塩基より長い一本鎖領域を含有し、別の化学修飾パターンにより修飾されており、および/または、細胞送達を容易にする抱合体部分を含む。この態様において、パッセンジャー鎖のヌクレオチドの約40～約90%、ガイド鎖のヌクレオチドの約40～約90%、第1のポリヌクレオチドの一本鎖領域のヌクレオチドの約40～約90%が、化学修飾ヌクレオチドである。

30

#### 【0113】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドデュプレックス中の化学修飾ヌクレオチドは、上で詳細に議論されたものなどの、当該技術分野において知られているいずれの化学修飾ヌクレオチドであってもよい。いくつかの態様において、化学修飾ヌクレオチドは、2'F修飾ヌクレオチド、2' - O - メチル修飾されたものおよび2'デオキシヌクレオチドからなる群より選択される。いくつかの態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド塩基の「疎水性修飾」から生じる。いくつかの態様において、化学修飾ヌクレオチドはホスホロチオアートである。さらなるいくつかの態様において、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオアート、2' - O - メチル、2'デオキシ、疎水性修飾およびホスホロチオアートの組み合わせである。これらの群の修飾が、リボース環、主鎖およびヌクレオチドの修飾を指すなら、いくつかの修飾ヌクレオチドが、3つの修飾の型全ての組み合わせを持つことも実行可能である。

いくつかの態様において、化学修飾は、デュプレックスの多様な領域にわたって同一ではない。特定の態様において、第1のポリヌクレオチド（パッセンジャー鎖）は、多数の多様な化学修飾を、多様な部位において有する。このポリヌクレオチドについて、ヌクレ

40

50

オチドの 90 %までが化学修飾されていてもよく、および／または、導入されたミスマッチを有していてもよい。

【 0 1 1 4 】

いくつかの態様において、第 1 のまたは第 2 のポリヌクレオチドの化学修飾は、これらに限定されないが、5' 位のウリジンおよびシトシンの修飾 (4-ピリジル、2-ピリジル、インドリル、フェニル (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH)；トリプトファニル (C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N)CH<sub>2</sub>CH (NH<sub>2</sub>)CO)、イソブチル、ブチル、アミノベンジル；フェニル；ナフチルなど) を含み、ここで、化学修飾は、ヌクレオチドの塩基対形成能力を変化させる場合がある。ガイド鎖について、本開示のこの側面の重要な特徴は、アンチセンスの 5' 末端に対する化学修飾の位置および配列である。例えば、ガイド鎖の 5' 末端の化学的リン酸化は通常、効力のために有益である。センス鎖のシード領域 (5' 末端に対して 2 ~ 7 位) における O-メチル修飾は、一般に良好な耐性を示さないが、一方、2' F およびデオキシは、良好な耐性を示す。ガイド鎖の中間部分およびガイド鎖の 3' 末端は、適用される化学修飾の型において、より許容的である。デオキシ修飾は、ガイド鎖の 3' 末端においては、耐性を示さない。

【 0 1 1 5 】

本開示のこの側面のユニークな特徴は、塩基に対する疎水性の修飾の使用を伴う。一態様において、疎水性修飾は好ましくは、ガイド鎖の 5' 末端付近に位置し、他の態様においては、それらはガイド鎖の中間に局在し、他の態様においては、それらはガイド鎖の 3' 末端に局在し、さらに別の態様において、それらは、ポリヌクレオチドの全長を通して分布する。同じ型のパターンが、デュプレックスのパッセンジャー鎖に適用可能である。

分子の他方の部分は、一本鎖領域である。一本鎖領域は、7 から 40 までのヌクレオチドの範囲であると予測される。

【 0 1 1 6 】

一態様において、第 1 のポリヌクレオチドの一本鎖領域は、40 % ~ 90 % の疎水性塩基修飾、40 % ~ 90 % のホスホロチオアート、40 % ~ 90 % のリボース部分の修飾、および、前述のもののあらゆる組み合わせからなる群より選択される修飾を含有する。

ガイド鎖 (第 1 のポリヌクレオチド) の RISC 複合体中へのローディングの効率は、重度に修飾されたポリヌクレオチドについて変わる場合があるので、一態様においては、効率的なガイド鎖のローディングを促進するために、デュプレックスポリヌクレオチドは、ガイド鎖 (第 1 のポリヌクレオチド) 上のヌクレオチド 9、11、12、13 または 14 と、センス鎖 (第 2 のポリヌクレオチド) 上の反対のヌクレオチドとの間のミスマッチを含む。

より詳細な本発明の側面は、以下のセクションにおいて記載される。

【 0 1 1 7 】

デュプレックスの特徴

本開示の二本鎖オリゴヌクレオチドは、2 つの別々の相補的な核酸鎖により形成されてもよい。デュプレックス形成は、標的遺伝子を含有する細胞の内側または外側のいずれかで生じ得る。

本明細書に使用される用語「デュプレックス (duplex)」は、相補的な配列に水素結合している二本鎖 (double-stranded) 核酸分子 (単数または複数) の領域を含む。本開示の二本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子に対してセンスであるヌクレオチド配列、および、標的遺伝子に対してアンチセンスである相補配列を含んでもよい。センスおよびアンチセンスヌクレオチド配列は、標的遺伝子配列に対応し、例として、標的遺伝子配列と同一であるかまたは標的遺伝子の阻害をもたらすために十分に同一 (例として、ほぼ少なくとも約 98 % 同一、96 % 同一、94 %、90 % 同一、85 % 同一または 80 % 同一) である。

【 0 1 1 8 】

ある態様において、本開示の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子のいずれの末端においても突出する一本鎖配列を有さない、すな

10

20

30

40

50

わち、平滑末端である。他の態様において、個々の核酸分子は、異なる長さであってもよい。言い換えると、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖でない。例えば、2つの別々の核酸分子が使用されるとき、分子の一方、例えばアンチセンス配列を含む第1の分子は、それにハイブリダイズする第2の分子より長くてもよい（分子の一部を一本鎖とする）。同様に、単一の核酸分子が使用されるとき、分子のいずれかの末端の部分が一本鎖のままであり得る。

#### 【0119】

いくつかの態様において、本開示によって記載される二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチおよび／またはループまたはバルジを含有するが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約70%にわたって二本鎖である。いくつかの態様において、本開示によって記載される二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約80%にわたって二本鎖である。いくつかの態様において、本開示によって記載される二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約90%～95%にわたって二本鎖である。いくつかの態様において、本開示によって記載される二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約96%～98%にわたって二本鎖である。ある態様において、本開示によって記載される二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個までのミスマッチを含有する。

10

#### 【0120】

##### 修飾

20

本開示のヌクレオチド（例として、治療用オリゴヌクレオチド）は、糖部分、ホスホジエステル連結部および／または塩基を含む、多様な位置において修飾されてもよい。

いくつかの態様において、ヌクレオチドの塩基部分は修飾されてもよい。例えば、ピリミジン塩基はピリミジン環の2、3、4、5、および／または6位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、シトシンの環外アミンが修飾されてもよい。プリン塩基もまた修飾されてもよい。例えば、プリン塩基は、1、2、3、6、7または8位において修飾されてもよい。いくつかの態様において、アデニンの環外アミンが修飾されてもよい。いくつかのケースにおいて、塩基部分の環の窒素原子は、例えば炭素などの別の原子で置換されてもよい。塩基部分への修飾は、いずれの好適な修飾でもあってもよい。修飾の例は当業者に知られている。いくつかの態様において、塩基の修飾は、アルキル化プリンまたはピリミジン、アシル化プリンまたはピリミジン、または、その他のヘテロ環を含む。

30

#### 【0121】

いくつかの態様において、ピリミジンは5位において修飾されてもよい。例えばピリミジンの5位は、アルキル基、アルキニル基、アルケニル基、アシル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。他の例において、ピリミジンの5位は、ヒドロキシリル基またはアルコキシリル基またはこれらの置換誘導体により修飾されてもよい。また、ピリミジンのN<sup>4</sup>位をアルキル化してもよい。さらに他の例において、ピリミジン5-6結合は飽和されていてもよく、ピリミジン環内の窒素原子は炭素原子により置換されてもよく、および／または、O<sup>2</sup>またはO<sup>4</sup>原子は、硫黄原子により置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

40

#### 【0122】

他の例において、プリンのN<sup>7</sup>位および／またはN<sup>2</sup>および／またはN<sup>3</sup>位は、アルキル基またはその置換誘導体により修飾されてもよい。さらなる例において、第3環はプリン二環系に縮合されてもよく、および／または、プリン環系内の窒素原子は炭素原子で置換されてもよい。他の修飾も可能であることが理解されるべきである。

5位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5591843号、米国特許第7,205,297号、米国特許第6,432,963号および米国特許第6,020,483号に開示されており；N<sup>4</sup>位で修飾されたピリミジンの非限定的例は、米国特許第5,580,731号に開示されており；8位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第6,355,787号および米国特許第

50

5,580,972号に開示されており；N<sup>6</sup>位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,853,386号、米国特許第5,789,416号および米国特許第7,041,824号に開示されており；2位で修飾されたプリンの非限定的例は、米国特許第4,201,860号および米国特許第5,587,469号に開示されており；これらの全ては、参考として本明細書に組み込まれる。

#### 【0123】

修飾塩基の非限定的例は、N<sup>4</sup> , N<sup>4</sup> - エタノシトシン、7 - デアザキサントシン、7 - デアザグアノシン、8 - オキソ - N<sup>6</sup> - メチルアデニン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N<sup>6</sup> - イソペンテニル - アデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルブソイドウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N<sup>6</sup> - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N<sup>6</sup> - イソペンテニルアデニン、ブソイドウラシル、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、2 - チオシトシンおよび2 , 6 - ジアミノプリンを含む。いくつかの態様において、塩基部分はプリンまたはピリミジン以外のヘテロ環式塩基であってもよい。ヘテロ環式塩基は任意に修飾および/または置換されてもよい。

#### 【0124】

糖部分は、天然の未修飾糖、例として単糖(ペントース、例としてリボース、デオキシリボース)、修飾糖および糖アナログを含む。一般に、可能なヌクレオモノマーの修飾、特に糖部分のものは、例えば、1以上のヒドロキシル基のハロゲン、ヘテロ原子、脂肪族基での置き換え、または、ヒドロキシル基の、エーテル、アミン、チオールなどとしての官能化を含む。

#### 【0125】

修飾ヌクレオモノマーの特に有用な一群は、2' - O - メチルヌクレオチドである。かかる2' - O - メチルヌクレオチドは、「メチル化されている」として言及されてもよく、対応するヌクレオチドは、非メチル化ヌクレオチドからアルキル化により、または直接的にメチル化ヌクレオチド試薬から、作られる。修飾ヌクレオモノマーは、未修飾ヌクレオモノマーと組み合わせて使用されてもよい。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、メチル化および非メチル化ヌクレオモノマーの両方を含有してもよい。

#### 【0126】

いくつかの例示的な修飾ヌクレオモノマーは、糖または骨格(backbone)が修飾されたリボヌクレオチドを含む。修飾リボヌクレオチドは、5'位で修飾されたウリジンまたはシチジン、例として5' - (2 - アミノ)プロピルウリジンおよび5' - ブロモウリジン；8位で修飾されたアデノシンおよびグアノシン、例として8 - ブロモグアノシン；デアザヌクレオチド、例として7 - デアザ - アデノシン；ならびにN - アルキル化ヌクレオチド、例としてN<sup>6</sup> - メチルアデノシンなどの、天然に存在しない塩基を(天然に存在する塩基の代わりに)含有してもよい。また、糖修飾リボヌクレオチドは、H、アルコキシ(もしくはOR)、Rもしくはアルキル、ハロゲン、SH、SR、アミノ(NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>など)またはCN基で置き換えられた2' - OH基をも有していてもよく、ここで、Rは、低級アルキル、アルケニルまたはアルキニルである。

#### 【0127】

修飾リボヌクレオチドはまた、修飾基、例としてホスホロチオアート基により置き換えられた、隣接するリボヌクレオチドに繋げられたホスホジエステル基をも有してもよい。より一般的には、多様なヌクレオチド修飾が組み合わされてもよい。

アンチセンス(ガイド)鎖は、標的遺伝子(单数または複数)の少なくとも一部に対して実質的に同一であってもよいが、少なくとも塩基対形成特性に関連して、配列は、有用であるため、例として標的遺伝子の表現型の発現を阻害するために、完全に同一である必

10

20

30

40

50

要はない。一般により高い相同性は、より短いアンチセンス遺伝子の使用を埋め合わせるために使用され得る。いくつかのケースにおいて、アンチセンス鎖は、一般に、標的遺伝子に対して（アンチセンス方向において）実質的に同一であろう。

【0128】

2' - O - メチル修飾RNAの使用はまた、細胞ストレス応答を最少化することが望ましい状況においても有益であり得る。2' - O - メチルヌクレオモノマーを有するRNAは、未修飾RNAを認識すると考えられる細胞機構によって認識され得ない。2' - O - メチル化されたかまたは部分的に2' - O - メチル化されたRNAは、標的RNA阻害を維持しつつ、二本鎖核酸に対するインターフェロン応答を回避し得る。これは、例えば、インターフェロンまたは他の細胞ストレス応答を回避するために、インターフェロン応答を誘導する短いRNAi（例としてsiRNA）配列、および、インターフェロン応答を誘導し得るより長いRNAi配列の両方において、有用であり得る。

【0129】

全体として、修飾糖は、D - リボース、2' - O - アルキル（2' - O - メチルおよび2' - O - エチルを含む）、すなわち、2' - アルコキシ、2' - アミノ、2' - S - アルキル、2' - ハロ（2' - フルオロを含む）、2' - メトキシエトキシ、2' - アリルオキシ（-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>）、2' - プロパルギル、2' - プロピル、エチニル、エテニル、プロペニルならびにシアノなどを含む。一態様において、糖部分は、記載されるように（Augustyns, K., et al., *Nucl. Acids. Res.* 18:4711 (1992)）、ヘキソースであってもよく、オリゴヌクレオチド中に組み込まれてもよい。例示的なヌクレオモノマーは、例として米国特許第5,849,902号において見出され得、これは本明細書に参考として組み込まれる。

【0130】

具体的な官能基の定義および化学用語は、以下にさらに詳細に記載される。本発明の目的のために、化学元素はCAS versionのHandbook of Chemistry and Physics, 75th Ed.の内表紙の元素周期表に従って同定され、具体的な官能基はこれに記載のようにして一般的に定義される。さらに、有機化学の一般原理ならびに具体的な官能部分および反応性は、Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999に記載され、この内容の全体は参考として本明細書に組み込まれる。

【0131】

本開示のある化合物は、特定の幾何学的形態または立体異性形態で存在してもよい。本開示は全てのかかる化合物を考慮し、これにはcis - およびtrans - 異性体、R - およびS - 鏡像異性体、ジアステレオマー、(D) - 異性体、(L) - 異性体、これらのラセミ混合物、および、これらのその他の混合物を、本発明の範囲内であるとして含む。追加の不斉炭素原子が、アルキル基などの置換基中に存在してよい。全てのかかる異性体およびこれらの混合物は、本開示に含むことが意図される。

【0132】

種々の異性体比のいずれかを含有する異性体混合物は、本開示に従って利用されてもよい。例えば、2種の異性体のみが組み合わせられるとき、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、96:4、97:3、98:2、99:1または100:0の異性体比を含有する混合物は全て、本開示に考慮される。当業者は容易に、さらに複雑な異性体混合物について類似の比率が考慮されることを理解するであろう。

例えば本開示の化合物の特定のエナンチオマーが所望される場合、これは不斉合成により、または、キラル補助基による誘導体化により調製されてもよく、ここで得られたジアステレオマー混合物は分離され、補助基が切断されて、純粋な所望のエナンチオマーが提供される。代わりに、分子がアミノなどの塩基性官能基を含有する場合またはカルボキシルなどの酸性官能基を含有する場合、ジアステレオマー塩が、適切な光学活性酸または塩基により形成され、次いでこうして形成されたジアステレオマーが、当該技術分野において周知の分別結晶化またはクロマトグラフィー手段により分割され、続いて純粋なエナンチオマーが回収される。

10

20

30

40

50

## 【0133】

ある態様において、本開示のオリゴヌクレオチドは、3' および 5' 終端(termini)を含む(環状オリゴヌクレオチドを除く)。一態様において、オリゴヌクレオチドの3' および 5' 終端は、例えば3' または5' 結合を修飾することにより、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る(例として米国特許第5,849,902号およびWO 98/13526)。例えば、オリゴヌクレオチドは「ブロック基(blocking group)」を含めることにより抵抗性になされ得る。本明細書に使用される用語「ブロック基」は、合成のための保護基または結合基のどちらかとしてオリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに付着され得る、置換基(例としてOH基以外のもの)を指す(例として、FITC、プロピル(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、グリコール(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-)ホスファート(PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)、ホスホン酸水素またはホスホロアミダイト)。「ブロック基」はまた、「末端ブロック基」または「エキソヌクレアーゼブロック基」をも含み、これらは、修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ抵抗性構造を含む、オリゴヌクレオチドの、3' および 5' 終端を保護する。

10

## 【0134】

例示の末端ブロック基は、キャップ構造(例として7-メチルグアノシンキャップ)、反転(inverted)ヌクレオモノマー、例として3' - 3' または5' - 5' 末端反転を有するもの(例としてOrtiagao et al. 1992. Antisense Res. Dev. 2:129を参照)、メチルホスホナート、ホスホロアミダイト、非ヌクレオチド基(例として、非ヌクレオチドリンカー、アミノリンカー、抱合体)などを含む。3' 末端ヌクレオモノマーは、修飾糖部分を含み得る。3' 末端ヌクレオモノマーは、オリゴヌクレオチドの3' - エキソヌクレアーゼ分解を防ぐブロック基により任意に置換され得る3' - Oを含む。例えば、3' - ヒドロキシルは、3' 3' ヌクレオチド間連結物を介してヌクレオチドにエステル化され得る。例えば、アルキルオキシラジカルは、メトキシ、エトキシまたはイソプロポキシであり得、好ましくはエトキシである。任意に、3' 末端における3' 3' 結合ヌクレオチドは、代替連結により連結され得る。ヌクレアーゼ分解を低減するために、最も5' の3' 5' 連結部は、修飾連結部、例としてホスホロチオアートまたはP-アルキルオキシホスホトリエステル連結部であることができる。好ましくは、2つの最も5' の3' 5' 連結部は、修飾連結部である。任意に、5' 末端ヒドロキシ部分は、リン含有部分、例として、ホスファート、ホスホロチオアートまたはP-エトキシホスファートで、エステル化され得る。

20

## 【0135】

合成方法が、本明細書に記載のとおり、種々の保護基を利用することを、当業者は理解するであろう。本明細書で使用される用語「保護基」は、特定の官能部分、例としてO、SまたはNを一時的に遮断して、多官能性化合物における別の反応部位にて反応が選択的に行われ得ることを意味する。ある態様において、保護基は良好な収率で選択的に反応して、計画された反応に対して安定である、保護された基質を与える;保護基は、容易に利用可能で好ましくは非毒性の、他の官能基を攻撃しない試薬により、良好な収率で選択的に除去可能であるべきである;保護基は、容易に分離可能な誘導体を(より好ましくは、新しい立体中心の生成なしに)形成する;および、保護基は、さらなる反応部位を回避するために最小数の付加的な官能性を有する。

30

## 【0136】

本明細書に詳述されるとおり、酸素、硫黄、窒素および炭素の保護基が利用されてもよい。ヒドロキシル保護基は以下を含む:メチル、メトキシルメチル(MOM)、メチルチオメチル(MTM)、t-ブチルチオメチル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチル(SMOM)、ベンジルオキシメチル(BOM)、p-メトキシベンジルオキシメチル(PMBM)、(4-メトキシフェノキシ)メチル(p-AOM)、グアイアコルメチル(GUM)、t-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル(POM)、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル(MEM)、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、ビス(2-クロロエトキシ)メチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル(SEMOR)、テトラヒドロピラニル(THP)、3-ブロモテトラヒドロピラニル、テトラ

40

50

ヒドロチオピラニル、1 - メトキシシクロヘキシル、4 - メトキシテトラヒドロピラニル (MTHP) 、4 - メトキシテトラヒドロチオピラニル、4 - メトキシテトラヒドロチオピラニルS、S - ジオキシド、1 - [ (2 - クロロ - 4 - メチル) フェニル] - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル (CTMP) 、1, 4 - ジオキサン - 2 - イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2, 3, 3a, 4, 5, 6, 7, 7a - オクタヒドロ - 7, 8, 8 - トリメチル - 4, 7 - メタノベンゾフラン - 2 - イル、1 - エトキシエチル、1 - (2 - クロロエトキシ) エチル、1 - メチル - 1 - メトキシエチル、1 - メチル - 1 - ベンジルオキシエチル、1 - メチル - 1 - ベンジルオキシ - 2 - フルオロエチル、2, 2, 2 - トリクロロエチル、2 - トリメチルシリルエチル、2 - (フェニルセレン) エチル、t - プチル、アリル、p - クロロフェニル、p - メトキシフェニル、2, 4 - ジニトロフェニル、ベンジル、p - メトキシベンジル、3, 4 - ジメトキシベンジル、o - ニトロベンジル、p - ニトロベンジル、p - ハロベンジル、2, 6 - ジクロロベンジル、p - シアノベンジル、p - フェニルベンジル、2 - ピコリル、4 - ピコリル、3 - メチル - 2 - ピコリルN - オキシド、ジフェニルメチル、p, p' - ジニトロベンズヒドリル、5 - ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、- ナフチルジフェニルメチル、p - メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ (p - メトキシフェニル) フェニルメチル、トリ (p - メトキシフェニル) メチル、4 - (4' - ブロモフェナシルオキシフェニル) ジフェニルメチル、4, 4', 4'' - トリス (4, 5 - ジクロロフタルイミドフェニル) メチル、4, 4', 4''' - トリス (ベンゾイルオキシフェニル) メチル、3 - (イミダゾール - 1 - イル) ビス (4', 4''' - 20  
ジメトキシフェニル) メチル、1, 1 - ビス (4 - メトキシフェニル) - 1' - ピレニルメチル、9 - アントリル、9 - (9 - フェニル) キサンテニル、9 - (9 - フェニル - 1  
0 - オキソ) アントリル、1, 3 - ベンゾジチオラン - 2 - イル、ベンズイソチアゾリルS、S - ジオキシド、トリメチルシリル (TMS) 、トリエチルシリル (TES) 、トリイソプロピルシリル (TIPS) 、ジメチルイソプロピルシリル (IPDMS) 、ジエチルイソプロピルシリル (DEIPS) 、ジメチルテキシルシリル (dimethylhexylsilyl) 、t - プチルジメチルシリル (TBDMS) 、t - プチルジフェニルシリル (TBDPS) 、トリベンジルシリル、トリ - p - キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル (DPMS) 、t - プチルメトキシフェニルシリル (TBMPs) 、ホルマート、ベンゾイルホルマート、アセタート、クロロアセタート、ジクロロアセタート、トリクロロアセタート、トリフルオロアセタート、メトキシアセタート、トリフェニルメトキシアセタート、フェノキシアセタート、p - クロロフェノキシアセタート、3 - フェニルプロピオナート、4 - オキソペンタノアート (レブリナート) 、4, 4 - (エチレンジチオ) ペンタノアート (レブリノイルジチオアセタール) 、ピバロアート、アダマントアート、クロトナート、4 - メトキシクロトナート、ベンゾアート、p - フェニルベンゾアート、2, 4, 6 - トリメチルベンゾアート (メシトアート) 、アルキルメチルカーボナート、9 - フルオレニルメチルカーボナート (Fmoc) 、アルキルエチルカーボナート、アルキル2, 2, 2 - トリクロロエチルカーボナート (Troc) 、2 - (トリメチルシリル) エチルカーボナート (TMSEC) 、2 - (フェニルスルホニル) エチルカーボナート (Psec) 、2 - (トリフェニルホスホニオ) エチルカーボナート (Peoc) 、アルキルイソブチルカーボナート、アルキルビニルカーボナートアルキルアリルカーボナート、アルキルp - ニトロフェニルカーボナート、アルキルベンジルカーボナート、アルキルp - メトキシベンジルカーボナート、アルキル3, 4 - ジメトキシベンジルカーボナート、アルキルo - ニトロベンジルカーボナート、アルキルp - ニトロベンジルカーボナート、アルキルS - ベンジルチオカーボナート、4 - エトキシ - 1 - ナフチルカーボナート、メチルジチオカーボナート、2 - ヨードベンゾアート、4 - アジドブチラート、4 - ニトロ - 4 - メチルペンタノアート、o - (ジブロモメチル) ベンゾアート、2 - フォルミルベンゼンスルホナート、2 - (メチルチオメトキシ) エチル、4 - (メチルチオメトキシ) ブチラート、2 - (メチルチオメトキシメチル) ベンゾアート、2, 6 - ジクロロ - 4 - (1, 1, 3, 3 - テ

トラメチルブチル)フェノキシアセタート、2,4-ビス(1,1-ジメチルプロピル)フェノキシアセタート、クロロジフェニルアセタート、イソブチラート、モノスクシノアート、(E)-2-メチル-2-ブテノアート、o-(メトキシカルボニル)ベンゾアート、-ナフトアート、ニトラート、アルキルN,N,N',N'-テトラメチルホスホロジアミダート、アルキルN-フェニルカルバマート、ボラート、ジメチルホスフィノチオイル、アルキル2,4-ジニトロフェニルスルフェナート(dinitrophenylsulfenate)、スルファート、メタンスルホナート(メシラート)、ベンジルスルホナートおよびトシラート(Ts)。

## 【0137】

1,2-または1,3-ジオールを保護するためには、保護基は以下を含む：メチレンアセタール、エチリデンアセタール、1-t-ブチルエチリデンケタール、1-フェニルエチリデンケタール、(4-メトキシフェニル)エチリデンアセタール、2,2,2-トリクロロエチリデンアセタール、アセトニド、シクロベンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、p-メトキシベンジリデンアセタール、2,4-ジメトキシベンジリデンケタール、3,4-ジメトキシベンジリデンアセタール、2-ニトロベンジリデンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、ジメトキシメチレンオルトエステル、1-メトキシエチリデンオルトエステル、1-エトキシエチリデンオルトエステル、1,2-ジメトキシエチリデンオルトエステル、-メトキシベンジリデンオルトエステル、1-(N,N-ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、-(N,N'-ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、2-オキサシクロベンチリデンオルトエステル、ジ-t-ブチルシリレン基(DTBS)、1,3-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサンリデン)誘導体(TIPDS)、テトラ-t-ブトキシジシロキサン-1,3-ジイリデン誘導体(TBDS)、環状カーボナート、環状ボロナート、エチルボロナートおよびフェニルボロナート。アミノ保護基は、以下を含む：メチルカルバマート、エチルカルバマート、9-フルオレニルメチルカルバマート(Fmoc)、9-(2-スルホ)フルオレニルメチル(fluoroenylmethyl)カルバマート、9-(2,7-ジブロモ)フルオレニルメチルカルバマート、2,7-ジ-t-ブチル-[9-(10,10-ジオキソ-10,10,10,10-テトラヒドロチオキサンチル)]メチルカルバマート(DBD-Tmoc)、4-メトキシフェナシルカルバマート(Phenoc)、2,2,2-トリクロロエチルカルバマート(Troc)、2-トリメチルシリルエチルカルバマート(Teoc)、2-フェニルエチルカルバマート(hz)、1-(1-アダマンチル)-1-メチルエチルカルバマート(Adroc)、1,1-ジメチル-2-ハロエチルカルバマート、1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチルカルバマート(TCBOC)、1-メチル-1-(4-ビフェニルイル)エチルカルバマート(Bpoc)、1-(3,5-ジ-t-ブチルフェニル)-1-メチルエチルカルバマート(t-Bumeoc)、2-(2'-および4'-ピリジル)エチルカルバマート(Pyoc)、2-(N,N-ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチルカルバマート、t-ブチルカルバマート(BOC)、1-アダマンチルカルバマート(Adoc)、ビニルカルバマート(Voc)、アリルカルバマート(Allo)、1-イソプロピルアリルカルバマート(Ipaoc)、シンナミルカルバマート(Coc)、4-ニトロシンナミルカルバマート(Noc)、8-キノリルカルバマート、N-ヒドロキシピペリジニルカルバマート、アルキルジチオカルバマート、ベンジルカルバマート(Cbz)、p-メトキシベンジルカルバマート(Moz)、p-ニトロベンジルカルバマート、p-ブロモベンジルカルバマート、p-クロロベンジルカルバマート、2,4-ジクロロベンジルカルバマート、4-メチルスルフィニルベンジルカルバマート(Msz)、9-アントリルメチルカルバマート、ジフェニルメチルカルバマート、2-メチルチオエチルカルバマート、2-メチルスルホニルエチルカルバマート、2-(p-トルエンスルホニル)エチルカルバマート、[2-(1,3-ジチアニル)]メチルカルバマート(Dmoc)、4-メチルチオフェニルカルバマート(Mtpc)、2,4-ジ

10

20

30

40

50

メチルチオフェニルカルバマート (B m p c ) 、 2 - ホスホニオエチルカルバマート (P e o c ) 、 2 - トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバマート (P p o c ) 、 1 , 1 - ジメチル - 2 - シアノエチルカルバマート、 m - クロロ - p - アシルオキシベンジルカルバマート、 p - (ジヒドロキシボリル) ベンジルカルバマート、 5 - ベンズイソキサゾリルメチルカルバマート、 2 - (トリフルオロメチル) - 6 - クロモニルメチルカルバマート (T c r o c ) 、 m - ニトロフェニルカルバマート、 3 , 5 - ジメトキシベンジルカルバマート、 o - ニトロベンジルカルバマート、 3 , 4 - ジメトキシ - 6 - ニトロベンジルカルバマート、 フェニル (o - ニトロフェニル) メチルカルバマート、 フェノチアジニル - (10) - カルボニル誘導体、 N' - p - トルエンスルホニルアミノカルボニル誘導体、 N' - フェニルアミノチオカルボニル誘導体、 t - アミルカルバマート、 S - ベンジルチオカルバマート、 p - シアノベンジルカルバマート、 シクロブチルカルバマート、 シクロヘキシルカルバマート、 シクロベンチルカルバマート、 シクロプロピルメチルカルバマート、 p - デシルオキシベンジルカルバマート、 2 , 2 - ジメトキシカルボニルビニルカルバマート、 o - (N , N - ジメチルカルボキサミド) ベンジルカルバマート、 1 , 1 - ジメチル - 3 - (N , N - ジメチルカルボキサミド) プロピルカルバマート、 1 , 1 - ジメチルプロピニルカルバマート、 ジ (2 - ピリジル) メチルカルバマート、 2 - フラニルメチルカルバマート、 2 - ヨードエチルカルバマート、 イソボルニルカルバマート、 イソブチルカルバマート、 イソニコチニルカルバマート、 p - (p' - メトキシフェニルアゾ) ベンジルカルバマート、 1 - メチルシクロブチルカルバマート、 1 - メチルシクロヘキシルカルバマート、 1 - メチル - 1 - シクロプロピルメチルカルバマート、 1 - メチル - 1 - (3 , 5 - ジメトキシフェニル) エチルカルバマート、 1 - メチル - 1 - (p - フェニルアゾフェニル) エチルカルバマート、 1 - メチル - 1 - フェニルエチルカルバマート、 1 - メチル - 1 - (4 - ピリジル) エチルカルバマート、 フェニルカルバマート、 p - (フェニルアゾ) ベンジルカルバマート、 2 , 4 , 6 - トリ - t - ブチルフェニルカルバマート、 4 - (トリメチルアンモニウム) ベンジルカルバマート、 2 , 4 , 6 - トリメチルベンジルカルバマート、 ホルムアミド、 アセトアミド、 クロロアセトアミド、 トリクロロアセトアミド、 トリフルオロアセトアミド、 フェニルアセトアミド、 3 - フェニルプロパンアミド、 ピコリンアミド、 3 - ピリジルカルボキサミド、 N - ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、 ベンズアミド、 p - フェニルベンズアミド、 o - ニトロフェニルアセトアミド、 o - ニトロフェノキシアセトアミド、 アセトアセトアミド、 (N' - ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ) アセトアミド、 3 - (p - ヒドロキシフェニル) プロパンアミド、 3 - (o - ニトロフェニル) プロパンアミド、 2 - メチル - 2 - (o - ニトロフェノキシ) プロパンアミド、 2 - メチル - 2 - (o - フェニルアゾフェノキシ) プロパンアミド、 4 - クロロブタンアミド、 3 - メチル - 3 - ニトロブタンアミド、 o - ニトロシンナミド、 N - アセチルメチオニン誘導体、 o - ニトロベンズアミド、 o - (ベンゾイルオキシメチル) ベンズアミド、 4 , 5 - ジフェニル - 3 - オキサゾリン - 2 - オン、 N - フタルイミド、 N - ジチアスクシンイミド (D t s ) 、 N - 2 , 3 - ジフェニルマレイイミド、 N - 2 , 5 - ジメチルピロール、 N - 1 , 1 , 4 , 4 - テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物 (S T A B A S E ) 、 5 - 置換 1 , 3 - ジメチル - 1 , 3 , 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、 5 - 置換 1 , 3 - ジベンジル - 1 , 3 , 5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、 1 - 置換 3 , 5 - ジニトロ - 4 - ピリドン、 N - メチルアミン、 N - アリルアミン、 N - [2 - (トリメチルシリル) エトキシ] メチルアミン (S E M ) 、 N - 3 - アセトキシプロピルアミン、 N - (1 - イソプロピル - 4 - ニトロ - 2 - オキソ - 3 - ピロリン - 3 - イル) アミン、 第四級アンモニウム塩、 N - ベンジルアミン、 N - ジ (4 - メトキシフェニル) メチルアミン、 N - 5 - ジベンゾスペリルアミン、 N - トリフェニルメチルアミン (T r ) 、 N - [(4 - メトキシフェニル) ジフェニルメチル] アミン (M M T r ) 、 N - 9 - フェニルフルオレニルアミン (P h F ) 、 N - 2 , 7 - ジクロロ - 9 - フルオレニルメチレンアミン、 N - フェロセニルメチルアミノ (F c m ) 、 N - 2 - ピコリルアミノ N' - オキシド、 N - 1 , 1 - ジメチルチオメチレンアミン、 N - ベンジリデンアミン、 N - p - メトキシベン

10

20

30

40

50

ジリデンアミン、N - ジフェニルメチレンアミン、N - [ ( 2 - ピリジル ) メシチル ] メチレンアミン、N - ( N' , N' - ジメチルアミノメチレン ) アミン、N , N' - イソプロピリデンジアミン、N - p - ニトロベンジリデンアミン、N - サリシリデンアミン、N - 5 - クロロサリシリデンアミン、N - ( 5 - クロロ - 2 - ヒドロキシフェニル ) フェニルメチレンアミン、N - シクロヘキシリデンアミン、N - ( 5 , 5 - ジメチル - 3 - オキソ - 1 - シクロヘキセニル ) アミン、N - ボラン誘導体、N - ジフェニルボリン酸誘導体、N - [ フェニル ( ペンタカルボニルクロム - またはタングステン ) カルボニル ] アミン、N - 銅キレート、N - 亜鉛キレート、N - ニトロアミン、N - ニトロソアミン、アミン N - オキシド、ジフェニルホスフィンアミド ( D p p ) 、ジメチルチオホスフィンアミド ( M p t ) 、ジフェニルチオホスフィンアミド ( P p t ) 、ジアルキルホスホルアミダート、ジベンジルホスホルアミダート、ジフェニルホスホルアミダート、ベンゼンスルフェニアミド、

## 【 0138 】

o - ニトロベンゼンスルフェニアミド ( N p s ) 、 2 , 4 - ジニトロベンゼンスルフェニアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェニアミド、2 - ニトロ - 4 - メトキシベンゼンスルフェニアミド、トリフェニルメチルスルフェニアミド、3 - ニトロピリジンスルフェニアミド ( N p y s ) 、 p - トルエンスルホンアミド ( T s ) 、ベンゼンスルホンアミド、2 , 3 , 6 - トリメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( M t r ) 、 2 , 4 , 6 - トリメトキシベンゼンスルホンアミド ( M t b ) 、 2 , 6 - ジメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( P m e ) 、 2 , 3 , 5 , 6 - テトラメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( M t e ) 、 4 - メトキシベンゼンスルホンアミド ( M b s ) 、 2 , 4 , 6 - トリメチルベンゼンスルホンアミド ( M t s ) 、 2 , 6 - ジメトキシ - 4 - メチルベンゼンスルホンアミド ( i M d s ) 、 2 , 2 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホンアミド ( P m c ) 、メタンスルホンアミド ( M s ) 、 - トリメチルシリルエタンスルホンアミド ( S E S ) 、 9 - アントラセンスルホンアミド、4 - ( 4' , 8' - ジメトキシナフチルメチル ) ベンゼンスルホンアミド ( D N M B S ) 、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミドおよびフェナシルスルホンアミド。例示の保護基は本明細書に詳述される。しかしながら本発明は、これらの保護基に限定されることを意図せず、むしろ、種々の追加の等価な保護基が上の基準を使用して容易に同定され、本発明の方法において利用され得る。加えて、種々の保護基については Protective Groups in Organic Synthesis, Third Ed. Greene, T.W. and Wuts, P.G., Eds., John Wiley & Sons, New York: 1999 に記載されており、この内容の全体は本明細書に参考として組み込まれる。

## 【 0139 】

本明細書に記載のとおり、化合物は、あらゆる数の置換基または官能部分により置換されてよいことが理解される。一般に、用語「任意に」が先行するかどうかに関わらず、用語「置換された」およびこの発明の式中に含まれる置換基は、所与の構造中の水素ラジカルの、特定置換基のラジカルによる置き換えを指す。任意の所与の構造中の 1 つより多くの位置が、特定群から選択された 1 より多くの置換基により置換されてもよい場合、置換基は各位置において同一であっても異なっていてもよい。本明細書に使用される用語「置換された」は、有機化合物の全ての許容し得る置換基を含むと考えられる。広い見地からは、許容し得る置換基は、有機化合物の、非環式および環式、分枝および非分枝、炭素環式およびヘテロ環式、芳香族および非芳香族置換基を含む。窒素などのヘテロ原子は、水素置換基および / またはヘテロ原子の原子価を満たす、本明細書に記載の有機化合物のいずれの許容し得る置換基を有してよい。その上、本発明は、いかなる様式においても、有機化合物の許容し得る置換基によって限定されることを意図しない。本発明により想定される置換基および変数の組み合わせは、好ましくは、例えば感染症または増殖性疾患などの処置に有用な安定な化合物の形成をもたらすものである。用語「安定な」とは、好ましくは、本明細書において、製造を可能とするのに十分な安定性を有し、検出されるのに十分な時間の間化合物の完全性を維持し、好ましくは本明細書に詳述される目的のために十

10

20

30

40

50

分な時間有用であるような、化合物を指す。

【0140】

本明細書に使用される用語「脂肪族」は、飽和および不飽和両方の、直鎖（すなわち非分枝）、分枝、非環式、環式または多環式の脂肪族炭化水素であって、任意に1以上の官能基により置換されているものを含む。当業者に理解されるとおり、本明細書において「脂肪族」は、これらに限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニルおよびシクロアルキニル部分を含むことを意図する。よって、本明細書に使用される用語「アルキル」は、直鎖、分枝および環式アルキル基を含む。類似の慣例がその他の一般的用語、例えば「アルケニル」、「アルキニル」などにも適用される。その上、本明細書に使用される用語「アルキル」、「アルケニル」、「アルキニル」などは、置換および非置換基の両方を包含する。ある態様において、本明細書で使用される場合「低級アルキル」は、1～6個の炭素原子を有するアルキル基（環式、非環式、置換、非置換、分枝または非分枝）を示すために使用される。

【0141】

ある態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～10個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～8個の脂肪族炭素原子を含有する。さらなる他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～6個の脂肪族炭素原子を含有する。さらに他の態様において、本発明で採用されるアルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、1～4個の脂肪族炭素原子を含有する。よって例示の脂肪族基は、これらに限定されないが、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、-CH<sub>2</sub>-シクロプロピル、ビニル、アリル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、シクロブチル、-CH<sub>2</sub>-シクロブチル、n-ペンチル、sec-ペンチル、イソペンチル、tert-ペンチル、シクロペンチル、-CH<sub>2</sub>-シクロペンチル、n-ヘキシル、sec-ヘキシル、シクロヘキシル、-CH<sub>2</sub>-シクロヘキシル部分等を含み、これは重ねて、1以上の置換基を有してもよい。アルケニル基は、これらに限定されないが、例えばエテニル、プロペニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-イルなどを含む。代表的なアルキニル基は、これらに限定されないが、エチニル、2-プロピニル（プロパルギル）、1-プロピニルなどを含む。

【0142】

本発明の化合物の、上の脂肪族（およびその他の）部分の置換基のいくつかの例は、これらに限定されないが以下を含む：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ；-F；-Cl；-Br；-I；-OH；-NO<sub>2</sub>；-CN；-CF<sub>3</sub>；-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>；-CHCl<sub>2</sub>；-CH<sub>2</sub>OH；-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH；-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>；-CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>；-C(O)R<sub>x</sub>；-CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>)；-CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>；-OC(O)R<sub>x</sub>；-OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>；-OC(=O)R<sub>x</sub>；-N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>；-S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>；-NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>；ここでR<sub>x</sub>の出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

【0143】

本明細書に使用される用語「ヘテロ脂肪族」は、例えば炭素原子の代わりに、1以上の酸素、硫黄、窒素、リンまたはケイ素原子を含む脂肪族部分を指す。ヘテロ脂肪族部分は

10

20

30

40

50

分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、モルホリノ、ピロリジニルなどの飽和および不飽和のヘテロ環を含んでもよい。ある態様において、ヘテロ脂肪族部分は、それ上にある 1 以上の水素原子の、下記を含むがこれらに限定はされない 1 以上の部分による独立した置き換えによって置換される：脂肪族；ヘテロ脂肪族；アリール；ヘテロアリール；アリールアルキル；ヘテロアリールアルキル；アルコキシ；アリールオキシ；ヘテロアルコキシ；ヘテロアリールオキシ；アルキルチオ；アリールチオ；ヘテロアルキルチオ；ヘテロアリールチオ；- F；- Cl；- Br；- I；- OH；- NO<sub>2</sub>；- CN；- CF<sub>3</sub>；- CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>；- CHCl<sub>2</sub>；- CH<sub>2</sub>OH；- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH；- CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>；- CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>；- C(O)R<sub>x</sub>；- CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>)；- CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>；- OC(O)R<sub>x</sub>；- OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>；- OC(=O)R<sub>x</sub>；ここで R<sub>x</sub> の出現の各々は独立して、これらに限定されないが、脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキルを含み、ここで、上記および本明細書に記載の脂肪族、ヘテロ脂肪族、アリールアルキルまたはヘテロアリールアルキル置換基のいずれもが、置換または非置換、分枝または非分枝、環式または非環式であってよく、およびここで、上記および本明細書に記載のアリールまたはヘテロアリール置換基のいずれもが、置換または非置換であってよい。一般に適用可能な置換基の追加の例は、本明細書に記載の具体的態様により説明される。

#### 【0144】

本明細書に使用される用語「ハロ」および「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選択される原子を指す。

用語「アルキル」は、飽和脂肪族基を含み、これは、直鎖アルキル基（例としてメチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなど）、分枝鎖アルキル基（イソプロピル、tert-ブチル、イソブチルなど）、シクロアルキル（脂環式）基（シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル）、アルキル置換シクロアルキル基およびシクロアルキル置換アルキル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキルは、6 個以下（例として直鎖については C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>、分枝鎖については C<sub>3</sub> ~ C<sub>6</sub>）、より好ましくは 4 個以下の炭素原子をその骨格中に有する。同様に、好ましいシクロアルキルは、3 ~ 8 個の炭素原子をその環構造中に有し、より好ましくは 5 または 6 個の炭素を環構造中に有する。用語 C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> は、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル基を含有する。

#### 【0145】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキルは、「非置換のアルキル」および「置換アルキル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の 1 以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルキル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、およびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレトイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホニアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。シクロアルキルは、例として上の置換基により、さらに置換されてもよい。「アルキルアリール」または「アリールアルキル」部分は、アリールで置換されたアルキル（例としてフェニルメチル（ベンジル））である。用語「アルキル」はまた、天然または非天然のアミノ酸の側鎖をも含む。用語「n-アルキル」は、

10

20

30

40

50

直鎖（すなわち、非分枝）の非置換のアルキル基を意味する。

【0146】

用語「アルケニル」は、上のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも1つの二重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルケニル」は、直鎖アルケニル基（例としてエチレン基、プロペニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキセニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニルなど）、分枝鎖アルケニル基、シクロアルケニル（脂環式）基（シクロプロペニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプチニル、シクロオクチニル）、アルキルまたはアルケニル置換シクロアルケニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルケニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルケニル基は、6個以下の炭素原子をその骨格中に有する（例として直鎖についてはC<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>、分枝鎖についてC<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>）。同様に、シクロアルケニル基は、その環構造中に3～8個の炭素原子、より好ましくは環構造中に5または6個の炭素を有してもよい。用語C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>は、2～6個の炭素原子を含むアルケニル基を含有する。

【0147】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルケニルは、「非置換のアルケニル」および「置換アルケニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の1以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有する、アルケニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレайдを含む）、アミジノ、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

用語「アルキニル」は、上のアルキルと長さが類似し、これと置換が可能な不飽和脂肪族基であるが、少なくとも1つの三重結合を含むものを含む。例えば、用語「アルキニル」は、直鎖アルキニル基（例としてエチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニルなど）、分枝鎖アルキニル基およびシクロアルキルまたはシクロアルケニル置換アルキニル基を含む。ある態様において、直鎖または分枝鎖アルキニル基は、6個以下の炭素原子をその骨格中に有する（例として直鎖についてはC<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>、分枝鎖についてC<sub>3</sub>～C<sub>6</sub>）。用語C<sub>2</sub>～C<sub>6</sub>は、2～6個の炭素原子を含むアルキニル基を含有する。

【0148】

その上、他に特定されない限りにおいて、用語アルキニルは、「非置換のアルキニル」および「置換アルキニル」の両方を含み、その後者は、炭化水素骨格の1以上の炭素上の水素を置き換える独立して選択される置換基を有するアルキニル部分を指す。かかる置換基は、例えば、アルキル基、アルキニル基、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレайдを含む）、アミジノ

10

20

30

40

50

、イミノ、スルフヒドリル、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフィニル、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分を含む。

炭素の数が他に特定されない限りにおいて、「低級アルキル」は、本明細書に使用されるとおり、上で定義されるが、1～5個の炭素原子をその骨格構造中に有するアルキル基を意味する。「低級アルケニル」および「低級アルキニル」は、例えば2～5個の炭素原子の鎖長を有する。

#### 【0149】

用語「アルコキシ」は、酸素原子に共有結合している置換および非置換のアルキル、アルケニルおよびアルキニル基を含む。アルコキシ基の例は、メトキシ、エトキシ、イソプロピルオキシ、プロポキシ、ブトキシおよびペントキシ基を含む。置換アルコキシ基の例は、ハロゲン化アルコキシ基を含む。アルコキシ基は、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、アルコキカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、カルボキシラート、アルキルカルボニル、アリールカルボニル、アルコキカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルチオカルボニル、アルコキシル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、シアノ、アミノ（アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノおよびアルキルアリールアミノを含む）、アシルアミノ（アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、カルバモイルおよびウレイドを含む）、アミジノ、イミノ、スルフフィドリル（sulffydryl）、アルキルチオ、アリールチオ、チオカルボキシラート、スルファート類、アルキルスルフミル（salkylsulfmyl）、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、ニトロ、トリフルオロメチル、シアノ、アジド、ヘテロシクリル、アルキルアリールまたは芳香族もしくはヘテロ芳香族部分などの、独立して選択される基により置換されていてもよい。ハロゲン置換アルコキシ基の例は、これらに限定されないが、フルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、クロロメトキシ、ジクロロメトキシ、トリクロロメトキシなどを含む。

#### 【0150】

用語「ヘテロ原子」は、炭素または水素以外のあらゆる元素の原子を含む。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、硫黄およびリンである。

用語「ヒドロキシ」または「ヒドロキシル」は、（適切なカウンターイオンとともに）-OHまたは-O-を持つ基を含む。

用語「ハロゲン」は、フッ素、臭素、塩素、ヨウ素などを含む。用語「過ハロゲン化」は一般に、全ての水素がハロゲン原子により置き換えられている部分を指す。

用語「置換される」は、当該部分に配置され得、当該分子がその意図する機能を行うことを可能にする、独立して選択される置換基を含む。置換基の例は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、(CR'R'0~3NR'R'')、(CR'R'0~3C)N、NO<sub>2</sub>、ハロゲン、(CR'R'0~3C(ハロゲン)<sub>3</sub>、(CR'R'0~3CH(ハロゲン)<sub>2</sub>、(CR'R'0~3CH<sub>2</sub>(ハロゲン)、(CR'R'0~3CONR'R'')、(CR'R'0~3S(O)1~2NR'R'')、(CR'R'0~3COH)O、(CR'R'0~3O(CR'R'0~3H、(CR'R'0~3S(O)0~2R'、(CR'R'0~3O(CR'R'0~3H、(CR'R'0~3COR'、(CR'R'0~3CO<sub>2</sub>R'、または(CR'R'0~3OR'基；ここで各R'およびR''は、各々独立して、水素、～C<sub>5</sub>アルキル、C<sub>2</sub>～C<sub>5</sub>アルケニル、C<sub>2</sub>～C<sub>5</sub>アルキニルもしくはアリール基であるか、または、R'およびR''は、一緒になって、ベンジリデン基もしくは-(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-基である、を含む。

#### 【0151】

用語「アミン」または「アミノ」は、窒素原子が少なくとも1個の炭素またはヘテロ原子に共有結合している化合物または部分を含む。用語「アルキルアミノ」は、窒素が少な

10

20

30

50

くとも 1 つのさらなるアルキル基に結合している基および化合物を含む。用語「ジアルキルアミノ」は、窒素原子が、少なくとも 2 つの追加のアルキル基に結合している基を含む。

用語「エーテル」は、2 個の異なる炭素原子またはヘテロ原子に結合した酸素を含有する化合物または部分を含む。例えば、この用語は、「アルコキシアルキル」を含み、これは、別のアルキル基に共有結合した酸素原子に共有結合しているアルキル、アルケニルまたはアルキニル基を指す。

#### 【 0 1 5 2 】

用語「ポリヌクレオチド」、「スクレオチド配列」、「核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」および「オリゴヌクレオチド」は、2 以上のスクレオチドのポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、DNA、RNA またはこれらの誘導体もしくは修飾バージョンであり得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドは、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において修飾され得、例えば分子の安定性、そのハイブリダイゼーションパラメータなどが改善される。ポリヌクレオチドは、限定することなく以下を含む群から選択される修飾塩基部分を含んでもよい：5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルクエオシン (galactosylqueosine)、イノシン、N<sup>6</sup> - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N<sup>6</sup> - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルクエオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N<sup>6</sup> - イソペンテニルアデニン、ワイブトキソシン (wybutoxosine)、シユードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシルおよび 2 , 6 - ジアミノプリン。ポリヌクレオチドは、修飾糖部分（例として 2' - フルオロリボース、リボース、2' - デオキシリボース、2' - O - メチルシチジン、アラビノースおよびヘキソース）および / または修飾リン酸部分（例としてホスホロチオアートおよび 5' - N - ホスホロアミダイト結合）を含んでもよい。スクレオチド配列は典型的には、タンパク質および酵素を作るために細胞機構によって使用される情報を含む、遺伝情報を持つ。これらの用語は、二本鎖または一本鎖のゲノムおよび cDNA、RNA、あらゆる合成のおよび遺伝子操作のポリヌクレオチド、および、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチドの両方を含む。これは、一本鎖および二本鎖分子、すなわち DNA - DNA、DNA - RNA、および RNA - RNA ハイブリッド、ならびに、アミノ酸骨格に塩基を抱合させることにより形成された「タンパク質核酸」(PNA) を含む。

#### 【 0 1 5 3 】

用語「塩基」は、知られているプリンおよびピリミジンヘテロ環式塩基、デアザプリンならびにそのアナログ（ヘテロ環置換アナログ、例としてアミノエトキシフェノキサジンを含む）、誘導体（例として 1 - アルキル - 、1 - アルケニル - 、ヘテロ芳香族 - および 1 - アルキニル誘導体）および互変異性体を含む。プリンの例は、アデニン、グアニン、イノシン、ジアミノプリンおよびキサンチンならびにそのアナログ（例として 8 - オキソ - N<sup>6</sup> - メチルアデニンまたは 7 - ジアザキサンチン）および誘導体を含む。ピリミジンは、例えばチミン、ウラシルおよびシトシンならびにそれらのアナログ（例として 5 - メチルシトシン、5 - メチルウラシル、5 - (1 - プロピニル)ウラシル、5 - (1 - プロピニル)シトシンおよび 4 , 4 - エタノシトシン）を含む。好適な塩基の他の例は、2 - アミノピリジンおよびトリアジン類などの非ブリニルおよび非ピリミジニル塩基を含む。

#### 【 0 1 5 4 】

10

20

30

40

50

好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、RNAヌクレオチドである。別の好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオモノマーは、修飾RNAヌクレオチドである。よって、オリゴヌクレオチドは、修飾RNAヌクレオチドを含有する。

用語「ヌクレオシド」は、糖部分、好ましくはリボースまたはデオキシリボースに共有結合した塩基を含む。好ましいヌクレオシドの例は、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシドを含む。ヌクレオシドはまた、遊離カルボキシル基、遊離アミノ基または保護基を含んでもよいアミノ酸またはアミノ酸アナログに連結した塩基をも含む。好適な保護基は当該技術分野において周知である (P. G. M. WutsおよびT. W. Greene、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第2版、Wiley-Interscience、New York、1999年を参照)。

用語「ヌクレオチド」は、ホスファート基またはホスファートアナログをさらに含むヌクレオシドを含む。

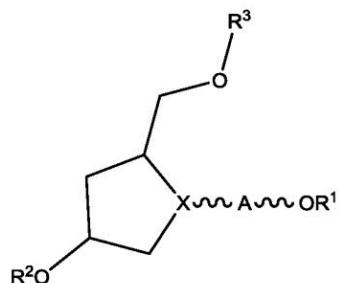
#### 【0155】

核酸分子は、分子の細胞への標的化および/または送達のために、疎水性部分と結びついてよい。ある態様において、疎水性部分はリンカーを介して核酸分子と結びつく。ある態様において、結びつきは非共有結合性相互作用を介する。他の態様において、結びつきは共有結合を介する。当該技術分野において知られているいずれのリンカーも、核酸を疎水性部分に結びつけるために使用されてもよい。当該技術分野において知られているリンカーは、公開された国際PCT出願：WO 92/03464、WO 95/23162、WO 2008/021157、WO 2009/021157、WO 2009/134487、WO 2009/126933、米国特許出願公開第2005/0107325号、米国特許第5,414,077号、米国特許第5,419,966号、米国特許第5,512,667号、米国特許第5,646,126号および米国特許第5,652,359号に記載されており、これらは本明細書に参考として組み込まれる。リンカーは、多原子リンカーに対する共有結合程度に単純であってもよい。リンカーは環式または非環式であってもよい。リンカーは、任意に置換されていてもよい。ある態様において、リンカーは核酸から切断されることができる。ある態様において、リンカーは、生理学的条件下で加水分解されることができる。ある態様において、リンカーは、酵素(例としてエステラーゼまたはホスホジエステラーゼ)により切断されることができる。ある態様において、リンカーは、核酸を疎水性部分から分離するスペーサー要素を含む。スペーサー要素は1~30個の炭素またはヘテロ原子を含んでもよい。ある態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素はプロトン化可能な官能基を含む。かかるプロトン化可能な官能基は、核酸分子のエンドゾーム脱出を促進してもよい。プロトン化可能な官能基はまた、核酸の細胞への送達を支援することもでき、例えば分子の全体の電荷を中性化する。他の態様において、リンカーおよび/またはスペーサー要素は、生物学的に不活性である(すなわち、もたらされる核酸分子に対して生物学的活性または機能を付与しない)。

#### 【0156】

ある態様において、リンカーおよび疎水性部分を持つ核酸分子は、本明細書に記載された式のものである。ある態様において、核酸分子は、式：

#### 【化9】



10

20

30

40

50

式中、

X は、N または C H であり；

A は、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R<sup>1</sup> は、疎水性部分であり；

R<sup>2</sup> は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

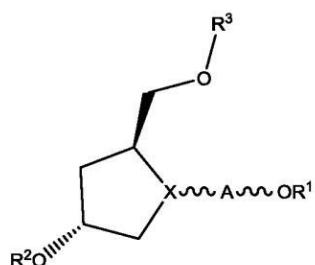
R<sup>3</sup> は、核酸である、

で表される。

【0157】

ある態様において、分子は、式：

【化10】



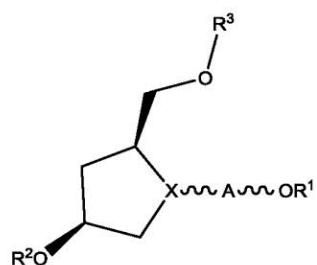
10

20

で表される。

ある態様において、分子は、式：

【化11】



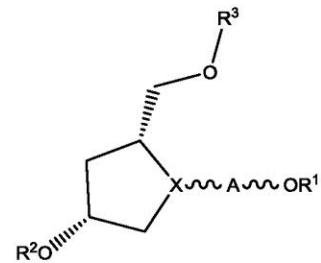
30

で表される。

【0158】

ある態様において、分子は、式：

【化12】

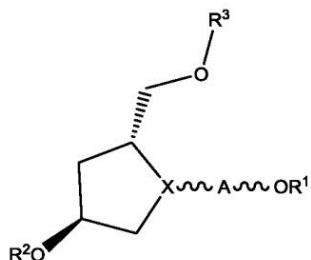


40

ある態様において、分子は、式：

50

## 【化13】



で表される。

10

## 【0159】

ある態様において、XはNである。ある態様において、XはCHである。

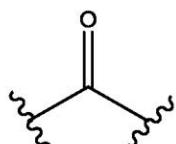
ある態様において、Aは結合である。ある態様において、Aは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、分枝または非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝の脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC<sub>1</sub>～<sub>20</sub>アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC<sub>1</sub>～<sub>12</sub>アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC<sub>1</sub>～<sub>10</sub>アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC<sub>1</sub>～<sub>8</sub>アルキルである。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のC<sub>1</sub>～<sub>6</sub>アルキルである。ある態様において、Aは、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である。ある態様において、Aは、非環式、置換、非分枝のヘテロ脂肪族である。

20

## 【0160】

ある態様において、Aは、式：

## 【化14】



30

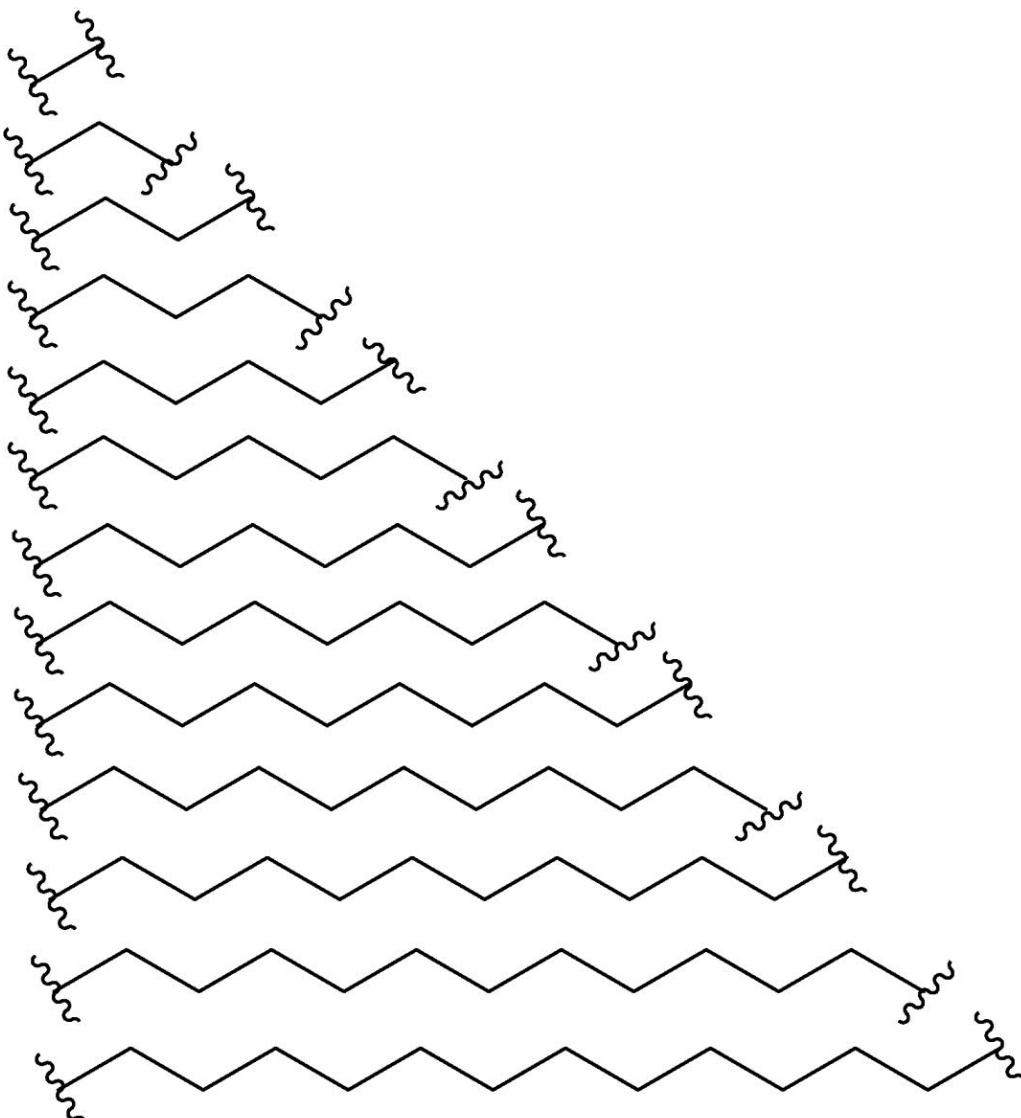
の1つで表される。

ある態様において、Aは、式：

40

50

【化 1 5】

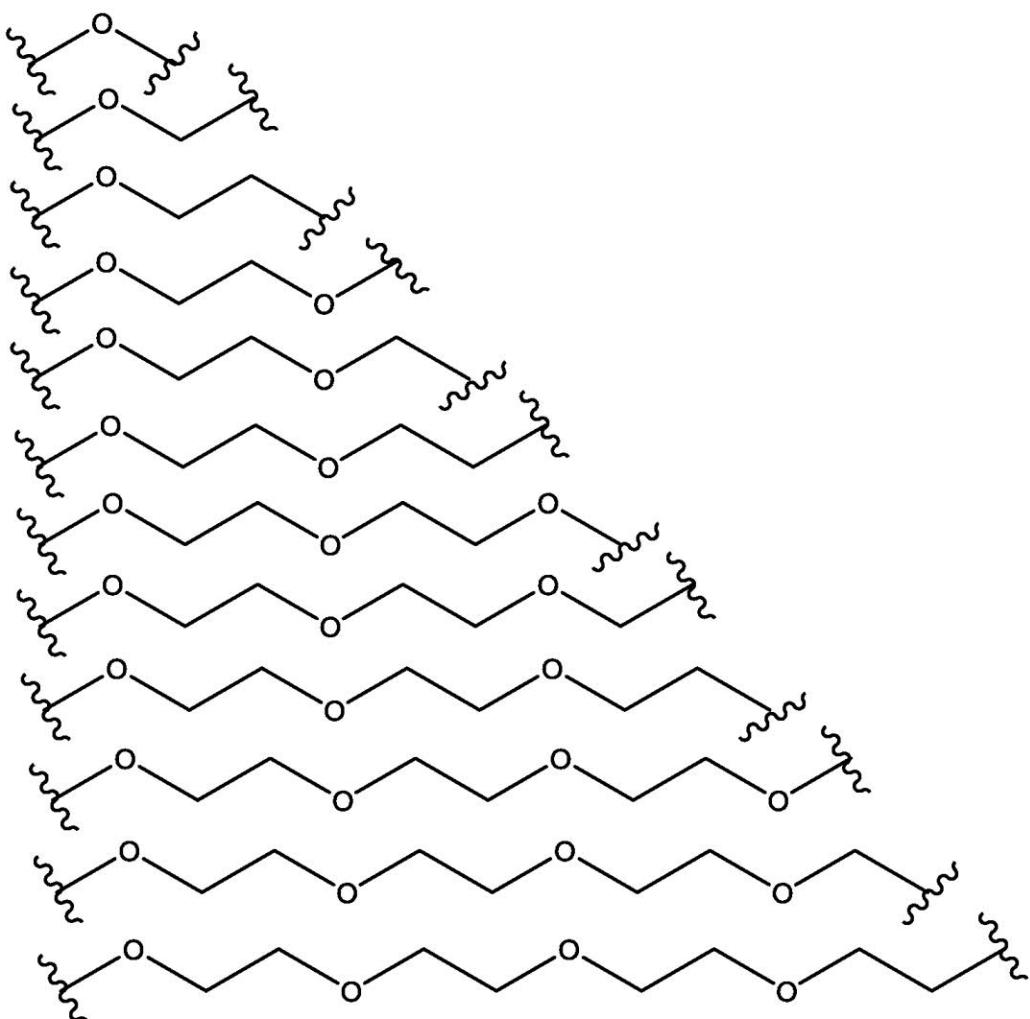


の 1 つで表される。

【0 1 6 1】

ある態様において、A は、式：

【化 1 6】



10

の 1 つで表される。

30

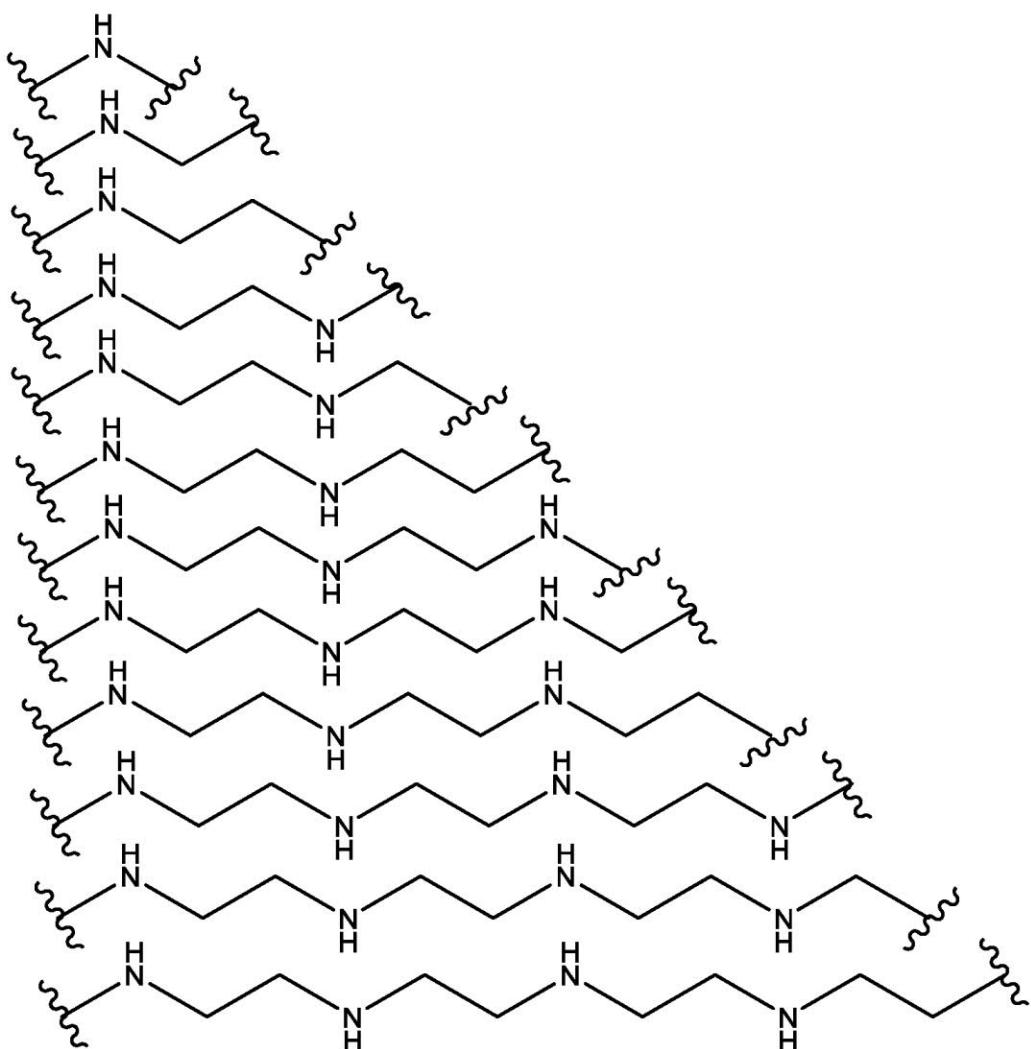
【 0 1 6 2 】

ある態様において、A は、式：

40

50

【化 1 7 】



10

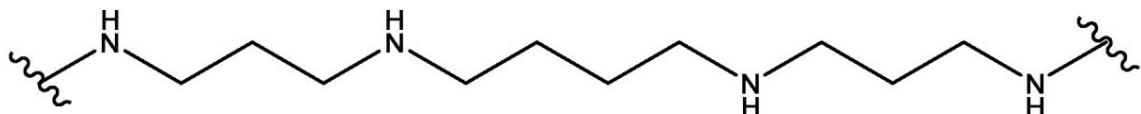
20

30

〔 0 1 6 3 〕

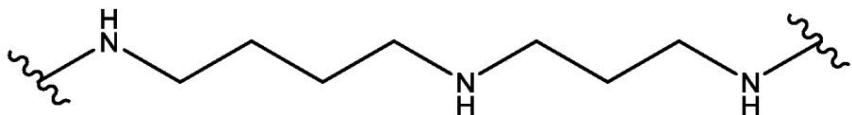
ある態様において、Aは、式：

【化 1 8】



ある態様において、Aは、式：

【化 1 9 】



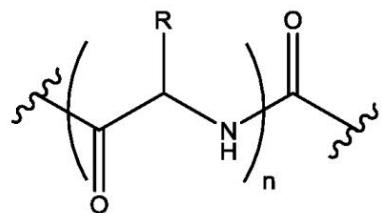
40

で表される。

【 0 1 6 4 】

ある態様において、A は、式：

## 【化 2 0】



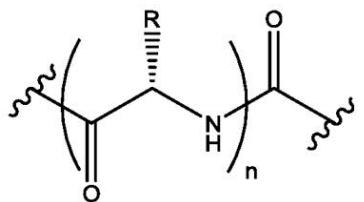
式中、

R の出現の各々は、独立して、天然または非天然のアミノ酸の側鎖であり；および

n は、1 から 20 までの整数である、

で表される。ある態様において、A は、式：

## 【化 2 1】



で表される。

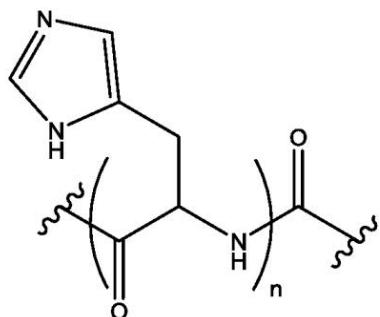
## 【0 1 6 5】

ある態様において、R の出現の各々は、独立して、天然のアミノ酸の側鎖である。ある態様において、n は、1 から 15 までの整数である（境界を含む）。ある態様において、n は、1 から 10 までの整数である（境界を含む）。ある態様において、n は、1 から 5 までの整数である（境界を含む）。

## 【0 1 6 6】

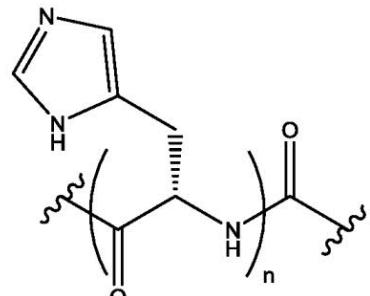
ある態様において、A は、式：

## 【化 2 2】



式中、n は、1 から 20 までの整数である（境界を含む）、  
で表される。ある態様において、A は、式：

## 【化 2 3】



10

20

30

40

50

で表される。

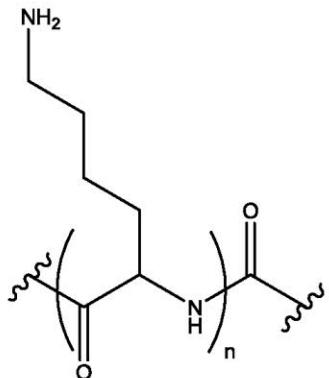
【0167】

ある態様において、 $n$ は、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 $n$ は、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 $n$ は、1から5までの整数である（境界を含む）。

【0168】

ある態様において、Aは、式：

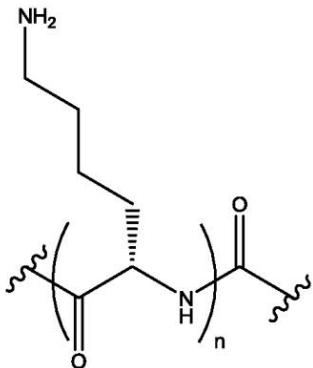
【化24】



10

式中、 $n$ は、1から20までの整数である（境界を含む）、  
で表される。ある態様において、Aは、式：

【化25】



30

で表される。

【0169】

ある態様において、 $n$ は、1から15までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 $n$ は、1から10までの整数である（境界を含む）。ある態様において、 $n$ は、1から5までの整数である（境界を含む）。

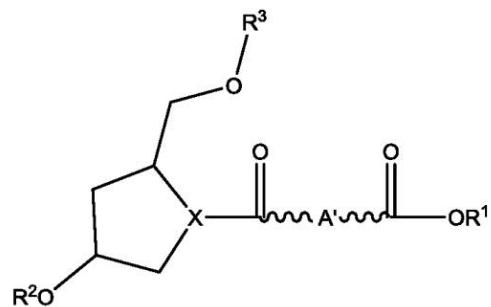
【0170】

ある態様において、分子は、式：

40

50

## 【化26】



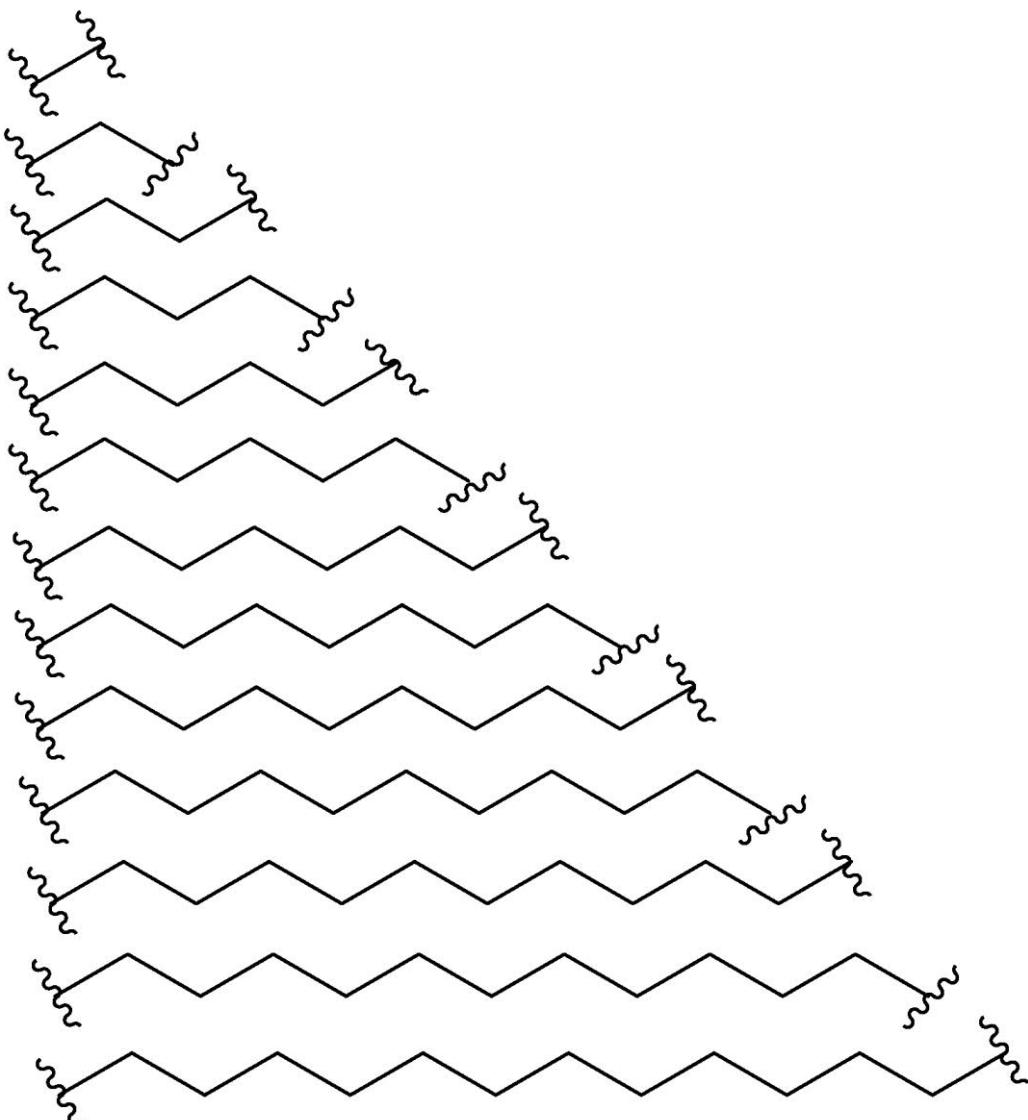
10

式中、X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、本明細書に定義されたとおりであり；およびA'は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、で表される。

## 【0171】

ある態様において、A'は、式：

## 【化27】



20

30

40

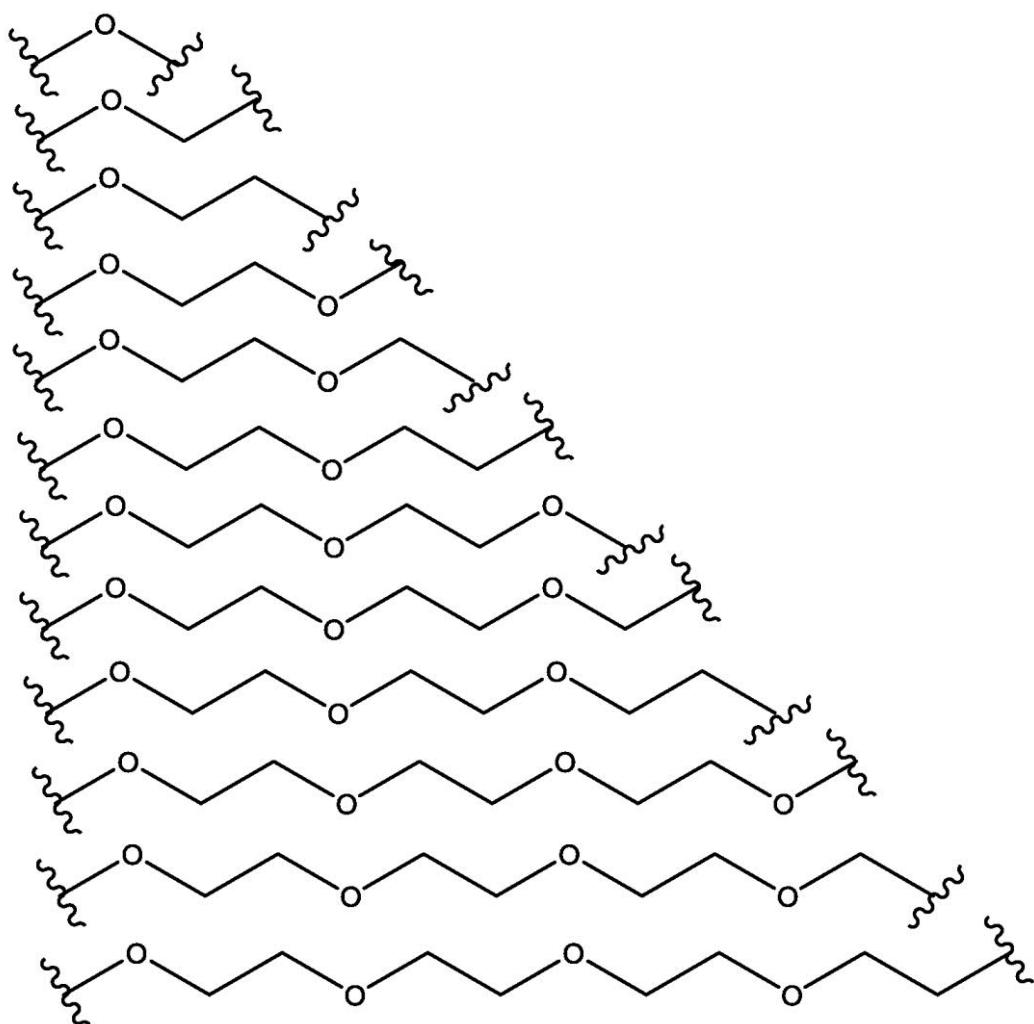
の1つで表される。

## 【0172】

ある態様において、Aは、式：

50

【化 2 8】



の 1 つで表される。

【 0 1 7 3 】

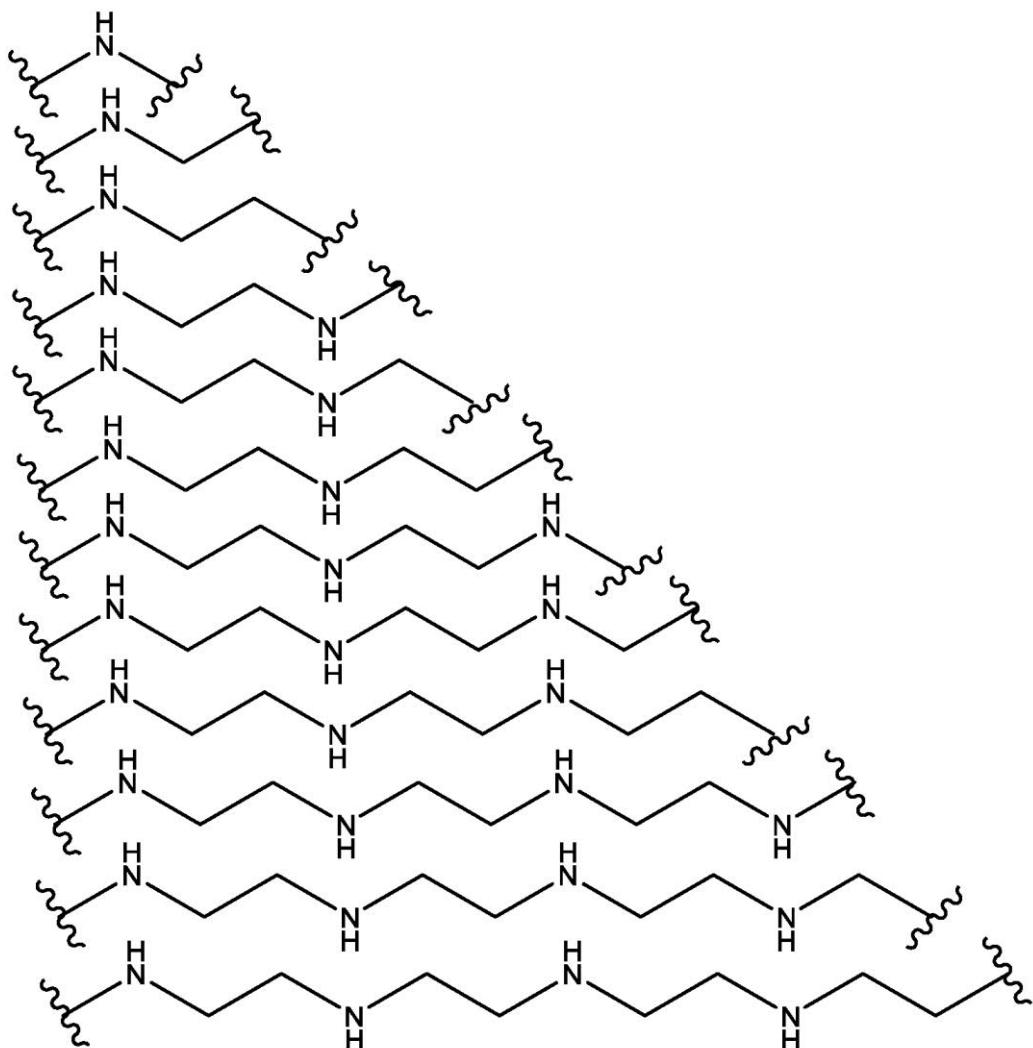
ある態様において、A は、式：

30

40

50

【化 2 9 】



10

20

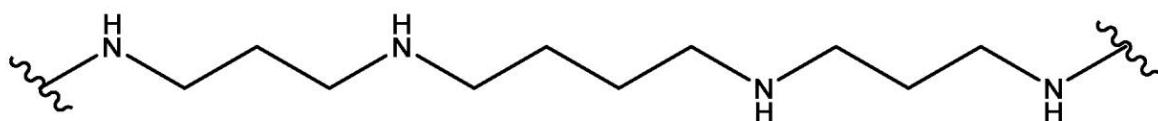
30

の 1 つで表される。

【 0 1 7 4 】

ある様態において、Aは、式：

【化 3 0 】

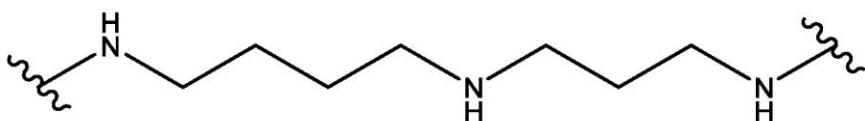


で表される。

40

ある様態において、Aは、式：

【化 3 1】



で表される。

【 0 1 7 5 】

ある態様において、 $R^1$ はステロイドである。ある態様において、 $R^1$ はコレステロ-

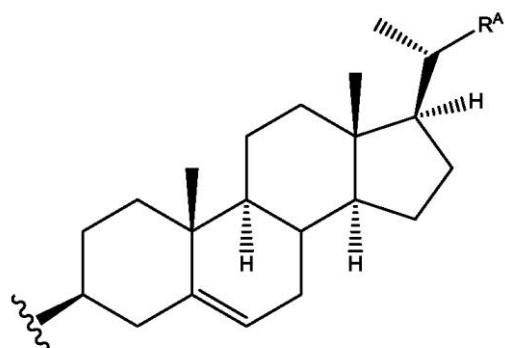
50

ルである。ある態様において、R<sup>1</sup>は親油性ビタミンである。ある態様において、R<sup>1</sup>はビタミンAである。ある態様において、R<sup>1</sup>はビタミンEである。

【0176】

ある態様において、R<sup>1</sup>は、式：

【化32】



10

式中、R<sup>A</sup>は、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族であるか；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族である、

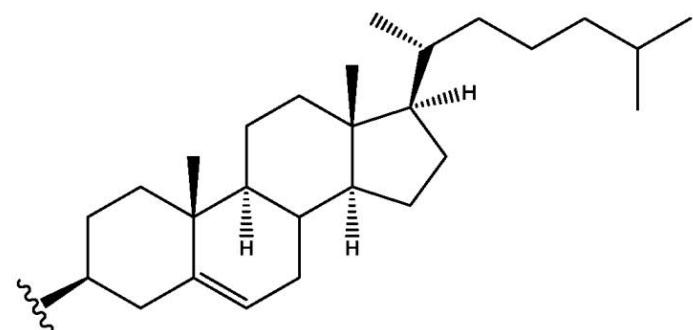
で表される。

20

【0177】

ある態様において、R<sup>1</sup>は、式：

【化33】



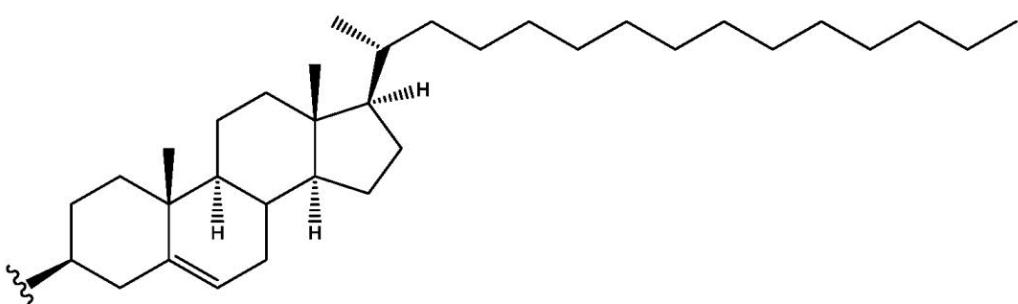
30

で表される。

【0178】

ある態様において、R<sup>1</sup>は、式：

【化34】



40

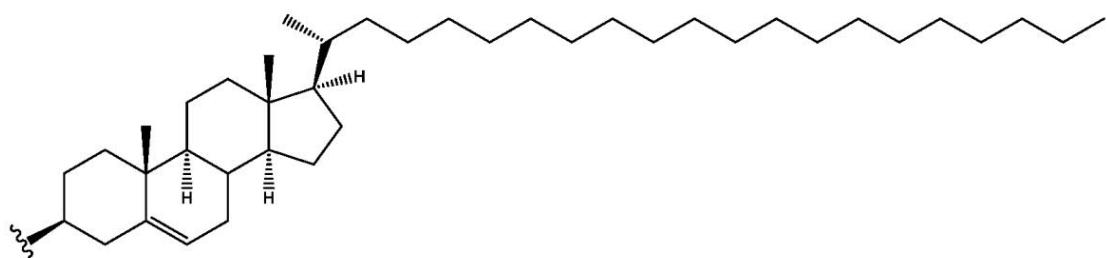
で表される。

【0179】

ある態様において、R<sup>1</sup>は、式：

50

【化 3 5】



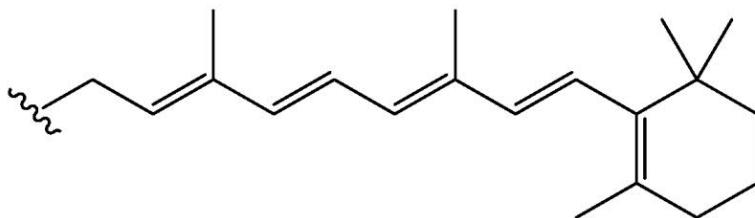
で表される。

10

【0180】

ある態様において、R<sup>1</sup>は、式：

【化 3 6】



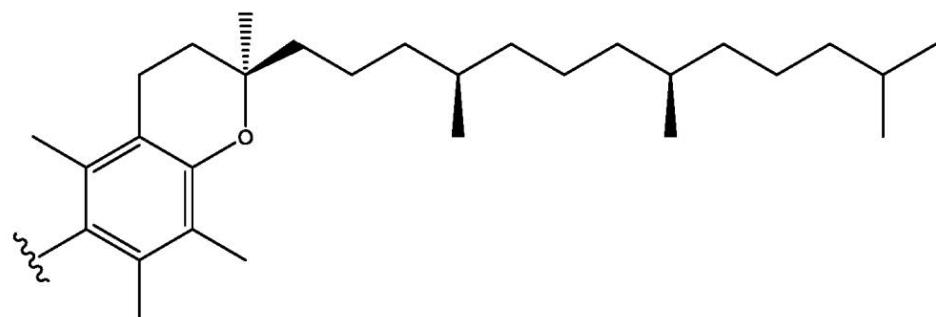
20

で表される。

【0181】

ある態様において、R<sup>1</sup>は、式：

【化 3 7】



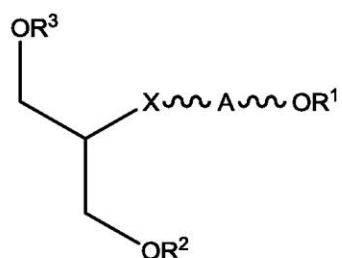
30

で表される。

【0182】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化 3 8】



40

式中

Xは、NまたはC Hであり；

Aは、結合；置換または非置換の、環式または非環式の、分枝または非分枝の脂肪族；  
または、置換または非置換の、環式または非環式の、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族で

50

あり；

R<sup>1</sup>は、疎水性部分であり；

R<sup>2</sup>は、水素；酸素保護基；環式または非環式の、置換または非置換の、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式の、置換または非置換の、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換の、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換の、分枝もしくは非分枝のアリール；置換または非置換の、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

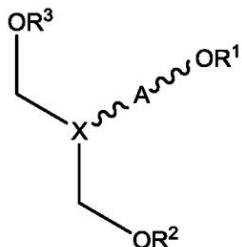
R<sup>3</sup>は、核酸である、

で表される。

【0183】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化39】



10

式中、

Xは、NまたはC Hであり；

Aは、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R<sup>1</sup>は、疎水性部分であり；

R<sup>2</sup>は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置換または非置換、分枝または非分枝のアシル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

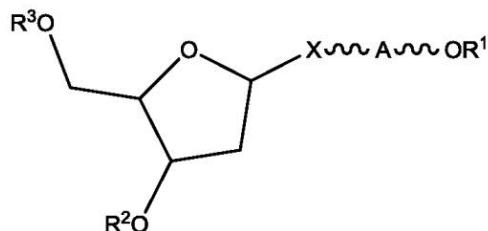
R<sup>3</sup>は、核酸である、

で表される。

【0184】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化40】



30

40

式中、

Xは、NまたはC Hであり；

Aは、結合；置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝の脂肪族；または、置換または非置換、環式または非環式、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族であり；

R<sup>1</sup>は、疎水性部分であり；

R<sup>2</sup>は、水素；酸素保護基；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝の脂肪族；環式または非環式、置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロ脂肪族；置

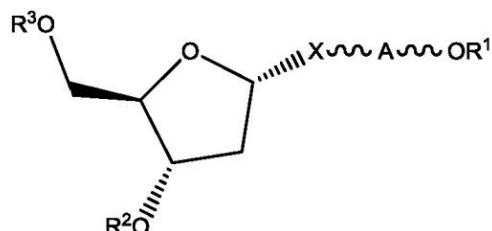
50

換または非置換、分枝または非分枝のアシリル；置換または非置換、分枝または非分枝のアリール；置換または非置換、分枝または非分枝のヘテロアリールであり；および

R<sup>3</sup>は、核酸である、

で表される。ある態様において、核酸分子は、式：

【化41】



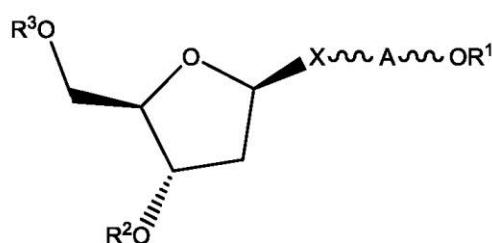
10

で表される。

【0185】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化42】



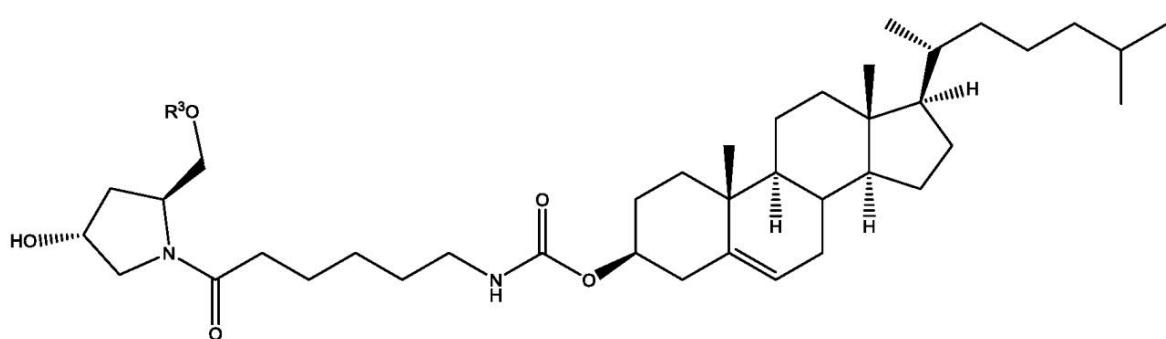
20

で表される。

【0186】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化43】



30

式中、R<sup>3</sup>は、核酸である、

40

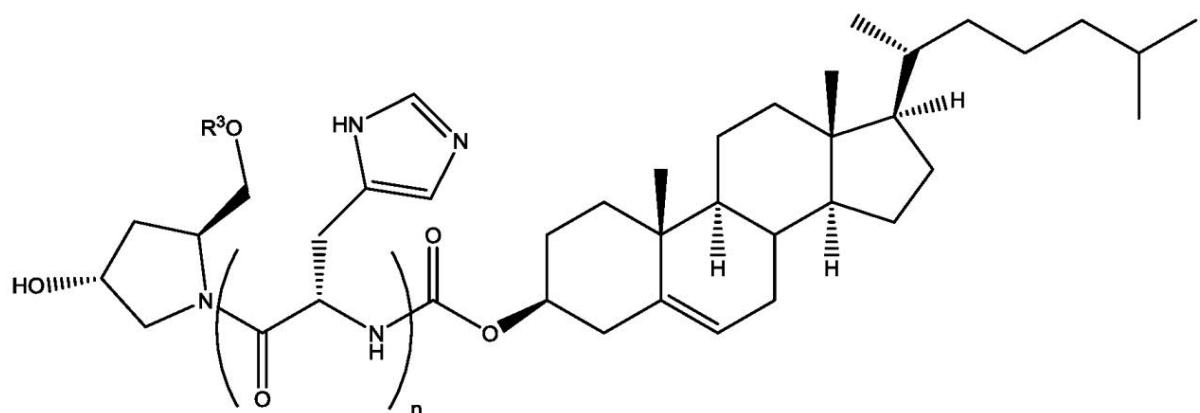
で表される。

【0187】

ある態様において、核酸分子は、式：

50

【化44】

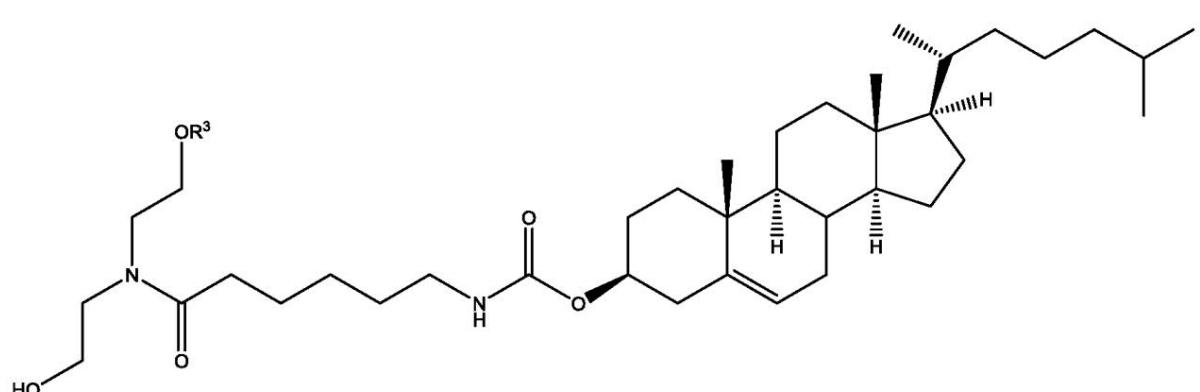


式中、R<sup>3</sup>は、核酸であり；および  
nは、1から20までの整数（境界を含む）である。  
で表される。

【0188】

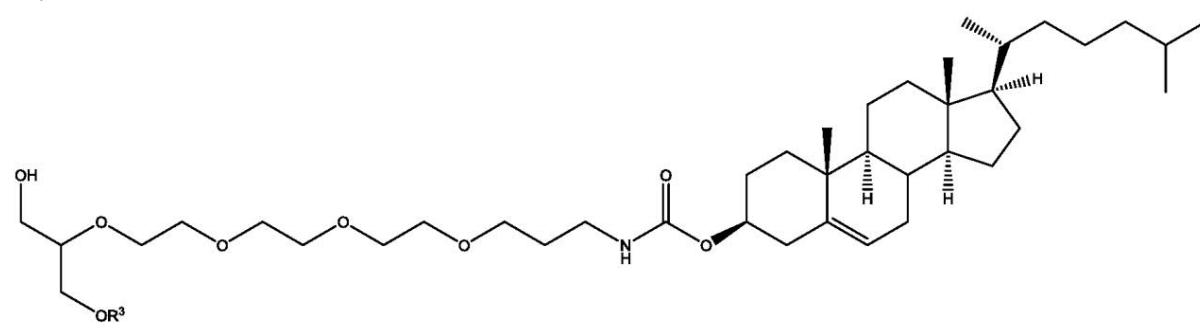
ある態様において、核酸分子は、式：

【化45】



で表される。  
ある態様において、核酸分子は、式：

【化46】



で表される。

【0189】

ある態様において、核酸分子は、式：

10

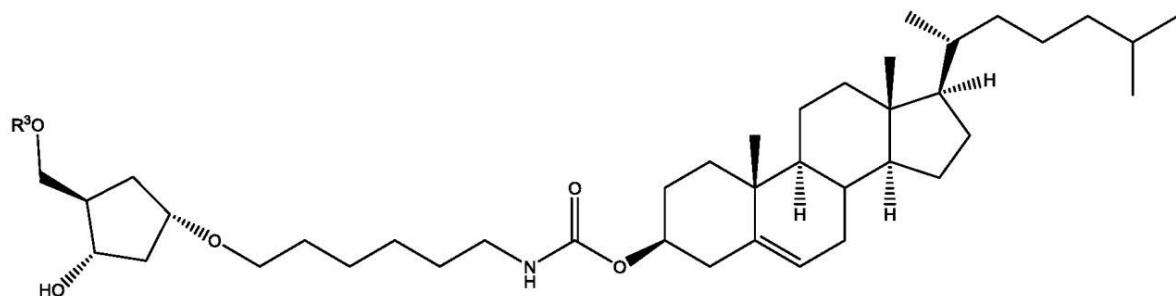
20

30

40

50

【化47】



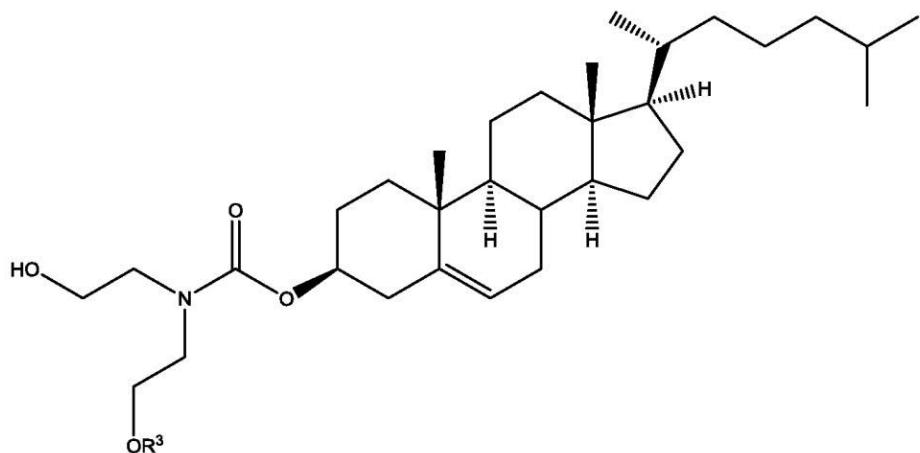
10

で表される。

【0190】

ある態様において、核酸分子は、式：

【化48】



20

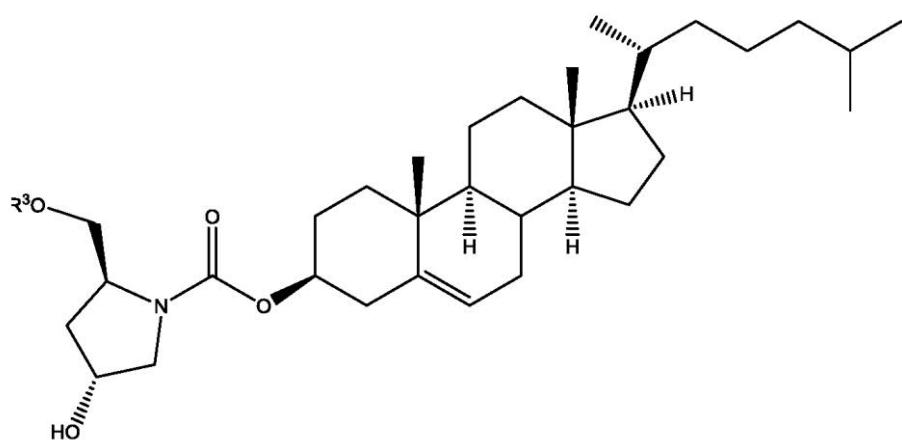
で表される。

【0191】

ある態様において、核酸分子は、式：

30

【化49】



40

で表される。

【0192】

本明細書に使用される用語「連結部 (linkage)」は、天然に存在する、隣接するヌクレオモノマーに共有結合する未修飾ホスホジエステル部分 (-O-(PO<sup>2-</sup>)-O-) を含む。本明細書に使用される用語「置換連結部 (substitute linkage)」は、ネイティブなホスホジエステル基の、隣接するヌクレオモノマーに共有結合するあらゆるアナログ

50

または誘導体を含む。置換連結部は、ホスホジエステルアナログ、例としてホスホロチオアート、ホスホロジチオアートおよびP-エチオキシホスホジエステル(P-ethyoxyphosphodiester)、P-エトキシホスホジエステル、P-アルキルオキシホスホジエステル、メチルホスホナートおよびリンを含有しない結合、例としてアセタールおよびアミドを含む。かかる置換連結部は、当該技術分野において知られている(例としてBjergarde et al. 1991. Nucleic Acids Res. 19:5843; Caruthers et al. 1991. Nucleosides Nucleotides. 10:47)。ある態様において、ホスホロチオアート連結部などの非加水分解性連結部が好ましい。

#### 【0193】

ある態様において、本開示のオリゴヌクレオチドは、疎水的に修飾されたヌクレオチドまたは「疎水性修飾」を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾」は、(1)塩基の全体的な疎水性が著しく増大し、および/または、(2)塩基がなお通常のワトソン-クリック相互作用に類似するものを形成することができるよう修飾された塩基を指す。いくつかの非限定的な塩基修飾の例は、5位のウリジンおよびシチジン修飾、例えばフェニル、4-ピリジル、2-ピリジル、インドリル、および、イソブチル、フェニル(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH)；トリプトファニル(C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N)CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CO)、イソブチル、ブチル、アミノベンジル；フェニル；およびナフチルを含む。

10

#### 【0194】

末端(3'または5'末端)、ループ領域またはsd-rxRNAの他のいずれ部分にも付着し得る別の型の抱合体は、ステロール、ステロール型分子、ペプチド、低分子、タンパク質などを含む。いくつかの態様において、sd-rxRNAは、1つより多い抱合体(同じまたは異なる化学的性質のもの)を含んでもよい。いくつかの態様において、抱合体は、コレステロールである。

20

#### 【0195】

標的遺伝子特異性を増大させるかまたはオフ・ターゲットサイレンシング作用を低減するための別な方法は、ガイド配列の5'末端の2番目のヌクレオチドに対応する位置にて、2'修飾(2'-O-メチル修飾など)を導入することである。これにより、ダイサー耐性ヘアピン構造におけるこの2'修飾の配置が可能になり、それにより、オフ・ターゲットサイレンシングがより少ないか、オフ・ターゲットサイレンシングを有さない、より良好なRNAiコンストラクトを設計することが可能となる。

30

一態様において、本開示のヘアピンポリヌクレオチドは、DNAである1つの核酸部分と、RNAである1つの核酸部分とを含み得る。本発明のアンチセンス(ガイド)配列は、RNA様およびDNA様の領域を含む「キメラオリゴヌクレオチド」であり得る。

#### 【0196】

語「RNase H活性化領域」は、オリゴヌクレオチド、例としてキメラオリゴヌクレオチドの、当該オリゴヌクレオチドが結合する標的RNA鎖を切断するRNase Hを動員することができる領域を含む。典型的には、RNase H活性化領域は、DNAまたはDNA様ヌクレオモノマーの(少なくとも約3~5、典型的には約3~12、より典型的には約5~12、より好ましくは約5~10の、連続したヌクレオモノマーの)最小コアを含む(例として米国特許第5,849,902号を参照)。いくつかの態様において、RNase H活性化領域は、約9個の連続したデオキシリボース含有ヌクレオモノマーを含む。

40

#### 【0197】

語「非活性化領域」は、アンチセンス配列、例としてキメラオリゴヌクレオチドの領域であって、RNase Hを動員または活性化しないものを含む。いくつかの態様において、非活性化領域は、ホスホロチオアートDNAを含まない。本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非活性化領域を含む。一態様において、非活性化領域は、ヌクレアーゼに対して安定であることができるか、または、標的に対して相補的であることおよびオリゴヌクレオチドにより結合される標的核酸分子と水素結合を形成することにより、標的に対する特異性を提供し得る。

50

## 【0198】

いくつかの態様において、連続したポリヌクレオチドの少なくとも一部は、置換連結部、例としてホスホロチオアート連結部により連結されている。

ある態様において、ガイド配列を超えるヌクレオチドの殆どまたは全ては(2'修飾されているようがいまいが)ホスホロチオアート連結部により連結されている。かかるコンストラクトは、その血清タンパク質に対するより高いアフィニティーに起因して、薬物動態が改善されている傾向がある。ポリヌクレオチドの非ガイド配列部分におけるホスホロチオアート連結部は一般に、一旦ガイド鎖がRISCにロードされた後は、ガイド鎖の活性に干渉しない。

## 【0199】

10

本開示のアンチセンス(ガイド)配列は、「モルホリノオリゴヌクレオチド」を含んでもよい。モルホリノオリゴヌクレオチドは非イオン性であり、RNase H非依存的機構により機能する。モルホリノオリゴヌクレオチドの4つの遺伝子塩基(アデニン、シトシン、グアニンおよびチミン/ウラシル)は、6員のモルホリン環に連結されている。モルホリノオリゴヌクレオチドは、例として非イオン性ホスホロジアミダート(phosphorodiamide)サブユニット間連結部によって、4つの異なるサブユニット型を結合することにより作られる。モルホリノオリゴヌクレオチドは、以下を含む多数の利点を有する:ヌクレアーゼに対する完全な耐性(Antisence & Nucl. Acid Drug Dev. 1996. 6:267);予測可能な標的化(Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141);細胞における確実な活性(Antisence & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:63);優れた配列特異性(Antisence & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:151);最小限の非アンチセンス活性(Biochemica Biophysica Acta. 1999. 1489:141);および簡便な浸透圧または搔爬による送達(Antisence & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:291)。モルホリノオリゴヌクレオチドはまた、高用量におけるその非毒性のために好ましい。モルホリノオリゴヌクレオチドの調製の議論は、Antisence & Nucl. Acid Drug Dev. 1997. 7:187において見出され得る。

20

## 【0200】

本明細書に記載の化学修飾は、本明細書に記載のデータに基づき、一本鎖ポリヌクレオチドのRISC中へのローディングを促進すると考えられる。一本鎖ポリヌクレオチドは、RISC中へのローディングおよび遺伝子サイレンシングの誘導において活性であることが示されている。しかしながら、一本鎖ポリヌクレオチドについての活性のレベルは、デュプレックスポリヌクレオチドと比較したとき、2~4桁の規模でより低いと考えられる。

30

本開示はいくつかの側面において、(a)一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(b)ポリヌクレオチドのRISC複合体への効率的なローディングを促進し、および(c)一本鎖ヌクレオチドの細胞による取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組み合わせを含んでもよい。加えて、態様のいくつかにおいて、単一のポリヌクレオチドの5'末端は、化学的にリン酸化されていてもよい。

## 【0201】

40

いくつかの態様において、本開示は、RISC阻害性ポリヌクレオチドの機能を改善する化学修飾パターンの説明を提供する。一本鎖ポリヌクレオチドは、基質競合機構を通して、予めロードされたRISC複合体の活性を阻害することが示されている。通常アンタゴマー(antagonist)と称されるこれらの型の分子について、活性には、通常、高濃度が必要であり、in vivoでの送達はあまり効果的ではない。本開示は、いくつかの側面において、(a)一本鎖ポリヌクレオチドの安定性を著しく増大し、(b)RISCによるポリヌクレオチドの基質としての効率的な認識を促進し、および/または、(c)細胞による一本鎖ヌクレオチドの取り込みを改善する、化学修飾パターンの説明を提供する。化学修飾パターンは、リボース修飾、骨格修飾、疎水性ヌクレオシド修飾と、抱合体型修飾との組合せを含んでもよい。

50

## 【0202】

本開示により提供される修飾は、全てのポリヌクレオチドに対して適用可能である。これは、一本鎖 R I S C 侵入性ポリヌクレオチド、一本鎖 R I S C 阻害性ポリヌクレオチド、多様な長さ（15～40bp）の従来のデュプレックス化ポリヌクレオチド、非対称性デュプレックス化ポリヌクレオチドなどを含む。ポリヌクレオチドは、5'末端修飾、リボース修飾、骨格修飾および疎水性ヌクレオシド修飾を含む、多様な化学修飾パターンにより修飾されていてよい。

## 【0203】

## 合成

本開示のオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られているいずれの方法によつても、例として酵素による合成および／または化学合成を使用して、合成され得る。オリゴヌクレオチドは、*in vitro*で（例として酵素による合成および化学合成を使用して）、または*in vivo*で（当該技術分野において周知の組み換えDNA技術を使用して）合成され得る。

10

## 【0204】

いくつかの態様において、化学合成は、修飾ポリヌクレオチドのために使用される。直鎖オリゴヌクレオチドの化学合成は、当該技術分野において周知であり、溶液または固相の技術により達成され得る。好ましくは、合成は、固相方法によるものである。オリゴヌクレオチドは、ホスホロアミダイト、亜リン酸トリエステル、H-ホスホナートおよびホスホトリエステル方法を含む、いくつかの異なる合成手順のいずれかにより、典型的には自動合成方法により、作られてもよい。

20

## 【0205】

オリゴヌクレオチドの合成プロトコルは当該技術分野において周知であり、例として米国特許第5,830,653号；WO 98/13526；Stec et al. 1984. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 6077；Stec et al. 1985. *J. Org. Chem.* 50:3908；Stec et al. *J. Chromatog.* 1985. 326:263；LaPlanche et al. 1986. *Nucl. Acid. Res.* 1986. 14:9081；Fasman G. D., 1989. *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology.* 1989. CRC Press, Boca Raton, Fla.；Lamone. 1993. *Biochem. Soc. Trans.* 21:1；米国特許第5,013,830号；米国特許第5,214,135号；米国特許第5,525,719号；Kawasaki et al. 1993. *J. Med. Chem.* 36:831；WO 92/03568；米国特許第5,276,019号；および米国特許第5,264,423号において見出され得る。

30

## 【0206】

選択される合成方法は、所望のオリゴヌクレオチドの長さに依存し得、かかる選択は、当業者の技術の範囲内である。例えば、ホスホロアミダイトおよび亜リン酸トリエステル法により、175またはそれより多いヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを生成し得、一方、H-ホスホナート法は、100ヌクレオチド未満のオリゴヌクレオチドのために良好に機能する。修飾塩基がオリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、および特に、修飾ホスホジエステル連結部が使用される場合、合成手順は、必要に応じて、公知の手順に従って変えられる。このことに関して、Uhlmannら（1990, *Chemical Reviews* 90:543-584）は、修飾塩基および修飾ホスホジエステル連結部を有するオリゴヌクレオチドを作製するための参考文献および概略手順を提供する。オリゴヌクレオチドを作製するための他の例示的な方法は、Sonveaux、1994年、「Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis」；Agrawal、*Methods in Molecular Biology* 26:1において教示される。例示的な合成方法はまた、「Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach」（Gait, M. J. IRL Press at Oxford University Press. 1984）においても教示される。その上、修飾ヌクレオチドを持ついくつかの配列を含む規定の配列の直鎖オリゴヌクレオチドは、幾つかの商業的供給源から容易に入手可能である。

40

## 【0207】

オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、または、ゲルクロマトグラフィーおよび高圧液体クロマトグラフィーを含む多数のクロマトグラフィー的方法

50

のいずれにより、精製されてもよい。ヌクレオチド配列、特に未修飾ヌクレオチド配列を確認するために、オリゴヌクレオチドは、マクサム・ギルバートシークエンシング、サンガーシークエンシング、キャピラリー電気泳動シークエンシング、ワンダーリングスポット (wandering spot) シークエンシングの手順を含む、知られている手順のいずれかにより、またはHybond紙に結合させたオリゴヌクレオチドの選択的化学分解を使用することにより、DNAシークエンシングに供されてもよい。短いオリゴヌクレオチドの配列はまた、レーザー脱離質量分析または高速原子衝撃によっても分析され得る (McNeal, et al., 1982, J. Am. Chem. Soc. 104:976 ; Viari, et al., 1987, Biomed. Environ. Mass Spectrom. 14:83 ; Grotjahn et al., 1982, Nuc. Acid Res. 10:4671)。シークエンシング方法はまた、RNAオリゴヌクレオチドについても利用可能である。

10

#### 【0208】

合成されたオリゴヌクレオチドの品質は、オリゴヌクレオチドを、例としてBergot and Egan. 1992. J. Chrom. 599:35の方法を使用して、キャピラリー電気泳動および分解性強アニオンHPLC(denaturing strong anion HPLC:SAX-HPLC)により試験することにより、確認され得る。

他の例示的な合成技術は、当該技術分野において周知である(例としてSambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Second Edition (1989) ; DNA Cloning, Volumes I and II (DN Glover Ed. 1985) ; Oligonucleotide Synthesis (M J Gait Ed, 1984 ; Nucleic Acid Hybridisation (B D Hames and S J Higgins eds. 1984) ; A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) ; またはシリーズであるMethods in Enzymology (Academic Press, Inc.)を参照)。

20

#### 【0209】

ある態様において、対象とするRNAiコンストラクトまたは少なくともその一部は、対象とするコンストラクトをコードする発現ベクターから転写される。この目的のために、当該技術分野において認識されるいずれのベクターも使用されてもよい。転写されたRNAiコンストラクトは、所望の修飾(未修飾センス鎖を修飾されたものにより置き換えることなど)が行われる前に、単離、精製されてもよい。

#### 【0210】

送達 / キャリア

細胞によるオリゴヌクレオチドの取り込み

30

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物は、1以上の細胞または細胞ライセートと接触させられて(すなわち、接触させられるか、または、本明細書においては投与または送達されるとして言及される)、これに取り込まれる。用語「細胞」は、原核および真核細胞、好ましくは脊椎動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞を含む。好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、ヒト細胞と接触させられる。

#### 【0211】

本発明のオリゴヌクレオチド組成物を、in vitroで、例として試験管または培養ディッシュ中で(対象中へ導入されても、されなくてもよく)、またはin vivoで、例として哺乳動物対象などの対象において、細胞と接触させてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、局所的に、またはエレクトロポレーションを通して投与される。オリゴヌクレオチドは、エンドサイトーシスによって遅い速度で細胞に取り込まれるが、エンドサイトーシスされたオリゴヌクレオチドは、一般に隔絶され、例として標的核酸分子へのハイブリダイゼーションのために利用可能ではない。一態様において、細胞による取り込みを、エレクトロポレーションまたはリン酸カルシウム沈殿により容易になされ得る。しかしながら、これらの手順はin vitroまたはex vivoの態様でのみ有用であり、便利ではなく、いくつかのケースにおいては細胞毒性と関連する。

40

#### 【0212】

他の態様において、細胞中へのオリゴヌクレオチドの送達は、リン酸カルシウム、DM SO、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な、当該技術分野において認識される方法により、または、トランスフェクションにより、例とし

50

てカチオン性、アニオン性または中性脂質組成物もしくはリポソームを使用して、当該技術分野において知られている方法を使用して（例としてWO 90/14074；WO 91/16024；WO 91/17424；米国特許第4,897,355号；Bergan et al. 1993. Nucleic Acid Research. 21:3567を参照）、増強され得る。増強されたオリゴヌクレオチドの送達はまた、ベクター（例としてShi, Y. 2003. Trends Genet 2003 Jan. 19:9；Reichhart J M et al. Genesis. 2002. 34(1-2):1604；Yu et al. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6047；Sui et al. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5515を参照）、ウイルス、ポリアミンまたはポリリジン、プロタミンもしくはN i、N 12-ビス（エチル）スペルミンなどの化合物を使用するポリカチオン抱合体（例としてBartzatt, R. et al. 1989. Biotechnol. Appl. Biochem. 11:133；Wagner E. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. 88:4255を参照）の使用によっても媒介され得る。

### 【0213】

ある態様において、本発明のsd-rxRNAは、多様なベータ-グルカン含有粒子を使用して送達されてもよく、該粒子はG e R P（グルカンカプセル化RNAロード粒子）として言及され、これは2010年3月4日出願の米国仮出願第61/310,611号、表題「食細胞への標的化送達のための製剤および方法」に記載されており、参考として組み込まれる。かかる粒子はまた、米国特許公開US 2005/0281781 A1およびUS 2010/0040656において、ならびにPCT公開WO 2006/007372およびWO 2007/050643においても記載されており、参考として組み込まれる。sd-rxRNA分子は、疎水的に修飾されていてもよく、および任意に、脂質および/または両親媒性ペプチドと結びついていてもよい。ある態様において、ベータ-グルカン粒子は酵母に由来する。ある態様において、ペイロードトラップ(payload trapping)分子は、少なくとも約1000Da、10,000Da、50,000Da、100kDa、500kDa等の分子量のポリマーである。好みのポリマーは、（限定せずに）カチオン性ポリマー、キトサンまたはPEI（ポリエチレンイミン）などを含む。

### 【0214】

グルカン粒子は、酵母細胞壁などの真菌細胞壁の不溶性構成要素に由来し得る。いくつかの態様において、酵母はパン酵母である。酵母由来グルカン分子は、1以上の- (1,3)-グルカン、- (1,6)-グルカン、マンナンおよびキチンを含み得る。いくつかの態様において、グルカン粒子は中空の酵母細胞壁を含み、これにより、粒子は細胞に似た3次元構造を維持し、この中でRNA分子などの分子と複合化するかまたはこれをカプセル化し得る。酵母細胞壁粒子の使用に関連するいくつかの利点は、構成要素の利用可能性、それらの生分解性の性質、および、それらの食作用細胞を標的化する能力である。

### 【0215】

いくつかの態様において、グルカン粒子は細胞壁からの不溶性構成要素を抽出することにより調製され得、例えばパン酵母（フライシュマンのもの）を1MのNaOH/pH4.0、H<sub>2</sub>Oで抽出し、続いて洗浄および乾燥することによる。酵母細胞壁粒子を調製するための方法は以下の文献に議論され、これらから参考として組み込まれる：米国特許第4,810,646号、同第4,992,540号、同第5,082,936号、同第5,028,703号、同第5,032,401号、同第5,322,841号、同第5,401,727号、同第5,504,079号、同第5,607,677号、同第5,968,811号、同第6,242,594号、同第6,444,448号、同第6,476,003号、米国特許公開第2003/0216346号、同第2004/0014715号および同第2010/0040656号ならびにPCT公開第WO2/12348号。

### 【0216】

グルカン粒子を調製するためのプロトコルもまた、以下の文献に記載されており、これらから参考として組み込まれる：Soto and Ostroff (2008), “Characterization of multilayered nanoparticles encapsulated in yeast cell wall particles for DNA delivery”；Bioconjug Chem 19(4):840-8；Soto and Ostroff (2007), “Oral Macrophage Mediated Gene Delivery System,” Nanotech, Volume 2, Chapter 5 (“Drug De

10

20

30

40

50

livery" ), pages 378-381 ; およびLi et al. (2007), "Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88-and Syk kinase dependent pathways." Clinical Immunology 124(2):170-181.

#### 【0217】

酵母細胞壁粒子などのグルカン含有粒子はまた、商業的にも得られ得る。いくつかの非限定的例は以下を含む：Biorigin (Sao Paolo, Brazil) からのNutricell MOS 55、SAF-Mannan (SAF Agri, Minneapolis, Minn.)、Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, Wis.)、アルカリ抽出粒子、例えばNutricepts (Nutricepts Inc., Burns ville, Minn.) およびASA Biotech製造のもの、Biopolymer Engineeringからの酸抽出 WGP 粒子および有機溶媒抽出粒子、例えばAlpha-beta Technology, Inc. (Worcester, Mass.) からのAdjuvax (商標) およびNovogen (Stamford, Conn.) からの微粒子グルカン。

10

#### 【0218】

酵母細胞壁粒子などのグルカン粒子は、製造および / または抽出方法に依存して種々のレベルの純度を有し得る。いくつかの例において、粒子はアルカリ抽出、酸抽出または有機溶媒抽出して、細胞内構成要素および / または細胞壁の外部マンノタングル質層を除去する。かかるプロトコルは、50 ~ 90 % の範囲のグルカン含量 (w / w) を有する粒子を製造し得る。いくつかの例において、低純度の粒子、すなわち低グルカン w / w 含量の粒子が好ましい場合もあり、一方他の態様においては、高純度すなわち高グルカン w / w 含量の粒子が好ましい場合もある。

20

#### 【0219】

酵母細胞壁粒子などのグルカン粒子は、天然の脂質含量を有し得る。例えば、粒子は 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 % または 20 % w / w を超える脂質を含有し得る。例のセクションにおいて、グルカン粒子 2 つのバッチ：YGP SAF および YGP SAF + L (天然脂質含有) の有効性を試験する。いくつかの態様において、天然脂質の存在は RNA 分子の複合体化または捕捉を支援し得る。

グルカン含有粒子は典型的には、および 2 ~ 4 ミクロンの直径を有するが、2 ミクロン未満または 4 ミクロンを超える直径の粒子もまた、本発明の側面に適合する。

30

#### 【0220】

送達する RNA 分子 (単数または複数) は、グルカン粒子に複合体化されるか、そのシェル内に「捕捉」される。粒子のシェルまたは RNA 構成要素は、Soto and Ostroff (2008) Bioconjug Chem 19:840 に記載され、参考として組み込まれているように、視覚化のために標識され得る。Gel RP をロードする方法は以下にさらに議論される。

オリゴヌクレオチドの取り込みのための最適なプロトコルは、多数の因子に依存するであろうが、最も重要なのは、使用される細胞の型である。取り込みにおいて重要な他の因子は、これらに限定されないが、オリゴヌクレオチドの性質および濃度、細胞のコンフルエンス、細胞を入れる培養の種類 (例として懸濁培養であるかまたはプレート培養であるか) および細胞を培養する培地の種類を含む。

40

#### 【0221】

##### カプセル化剤

カプセル化剤は、ビヒクル内にオリゴヌクレオチドを捕捉する。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、キャリアまたはビヒクル、例としてリポソームまたはミセルと結びついてもよいが、他のキャリアを使用され得ることは、当業者により理解される通りである。リポソームは、生体膜と類似する構造を有する脂質二重層からなるビヒクルである。かかるキャリアは、細胞による取り込みを促進するため、または、オリゴヌクレオチドを標的化するため、または、オリゴヌクレオチドの薬物動態または毒性学的特性を改善するために、使用される。

#### 【0222】

50

例えば、本開示により記載されるオリゴヌクレオチドはまた、その中に活性成分が分散してまたは脂質層に接着した水性濃縮層からなる小体中に多様に存在して含有される医薬組成物であるリポソーム中にカプセル化されても、投与されてもよい。オリゴヌクレオチドは、溶解性に依存して、水性層および脂質層の両方に存在しても、一般にリポソーム懸濁液 (liposomal suspension) と称されるものの中に存在してもよい。疎水性層は一般に、必ずではないが、レシチンおよびスフィンゴミエリンなどのリン脂質、コレステロールなどのステロイド、リン酸ジアセチルなどの多かれ少なかれイオン性の界面活性剤、ステアリルアミンまたはホスファチジル酸または疎水性の性質の他の材料を含む。リポソームの直径は一般に、約 15 nm から約 5 ミクロンまでの範囲である。

## 【0223】

10

薬物送達ビヒクルとしてのリポソームの使用は、幾つかの利点を与える。リポソームは、細胞内安定性を増大し、取り込み効率を増大し、生物学的活性を改善する。リポソームは、細胞膜を構成する脂質と類似の様式において配置された脂質からなる、中空の球体ビヒクルである。これらは、水溶性化合物を封入する内部の水性の空間を有し、直径 0.05 から数ミクロンまでの範囲のサイズである。幾つかの研究から、リポソームが核酸を細胞へ送達し得ること、および、核酸が生物学的に活性であり続けることが示される。例えば、リポフェクチンまたは LIPOFECTAMINE (商標) 2000 などの本来は研究用ツールとして設計された脂質送達ビヒクルは、無傷の (intact) 核酸分子を細胞へ送達し得る。

## 【0224】

リポソームを使用することの具体的な利点は以下を含む：それらは組成物において非毒性であり生分解性であること；それらは長期の循環半減期を呈すこと；および、認識分子が、組織へ標的化するために、それらの表面へ容易に付着され得ること。最後に、液体懸濁液または凍結乾燥製品のいずれにおいても、リポソームベースの医薬のコスト効率の良い製造は、受容可能な薬物送達システムとしてのこの技術のバイアビリティを実証している。

20

## 【0225】

いくつかの側面において、本発明に関連する製剤は、天然に存在するかまたは化学的に合成されたかまたは修飾された、飽和および不飽和の脂肪酸残基のクラスについて選択されてもよい。脂肪酸は、トリグリセリド類、ジグリセリド類または個々の脂肪酸の形態で存在してもよい。他の態様において、非経口栄養のために薬理学において現在使用されている脂肪酸および / または脂質の乳液の、よく検証された混合物の使用が利用されてもよい。

30

## 【0226】

リポソームベースの製剤は、オリゴヌクレオチドの送達のために広範に使用される。しかしながら、市販の脂質またはリポソーム製剤の殆どは、少なくとも 1 つの正に荷電した脂質 (カチオン性脂質) を含有する。この正に荷電した脂質の存在は、高レベルのオリゴヌクレオチドのローディングを得るために、および、リポソームの膜融合特性を増強するために、必須であると考えられている。最適な正に荷電した脂質の化合物を同定するための、幾つかの方法が実施され、公開されている。しかしながら、カチオン性脂質を含有する市販のリポソーム製剤は、高レベルの毒性によって特徴づけられる。in vivo での限定された治療インデックスにより、正に荷電した脂質を含有するリポソーム製剤が、RNA サイレンシングを達成するために必要とされる濃度よりもごく僅かに高い濃度において、毒性 (すなわち肝臓の酵素の増大) と関連することが明らかとなっている。

40

## 【0227】

本発明に関連する核酸は、疎水的に修飾され得、中性ナノトランスポーターに包含され得る。中性ナノトランスポーターのさらなる説明は、2009年9月22日に出願されたPCT出願PCT/US2009/005251、表題「中性ナノトランスポーター」から参考として組み込まれる。かかる粒子は、非荷電の脂質混合物中へのオリゴヌクレオチドの定量的な組み込みを可能にする。かかる中性ナノトランスポーター組成物においてカチオン性脂質が毒性レベルを欠いていることは、重要な特性である。

50

## 【0228】

PCT/US2009/005251に実証されているとおり、オリゴヌクレオチドは、カチオン性脂質を有さない脂質混合物中に効率的に組み込まれ得、かかる組成物は、治療用オリゴヌクレオチドを機能的な様式で細胞に効果的に送達し得る。例えば、脂質混合物が、ホスファチジルコリンベースの脂肪酸およびコレステロールなどのステロールから構成されたとき、高レベルの活性が観察された。例えば、中性脂質混合物の1つの好ましい製剤は、少なくとも20%のDOPCまたはDSPCおよび少なくとも20%のコレステロールなどのステロールから構成される。1:5の脂質対オリゴヌクレオチド比率という低さでも、オリゴヌクレオチドの非荷電製剤中での完全なカプセル化を得るのに充分であることが示された。

10

## 【0229】

中性ナノトランスポーター組成物は、オリゴヌクレオチドの中性脂質製剤中への効率的なローディングを可能にする。組成物は、分子の疎水性が増大するような様式において修飾されている（例えば、疎水性分子が、疎水性分子に、オリゴヌクレオチド末端または末端でないヌクレオチド、塩基、糖もしくは主鎖上で、（共有結合的にまたは非共有結合的に）付着されている）オリゴヌクレオチドを含み、修飾オリゴヌクレオチドは、中性脂質製剤と混合されている（例えば、少なくとも25%のコレステロールおよび25%のDOPCまたはそのアナログを含有する）。別の脂質などのカーゴ分子もまた、組成物中に含まれ得る。この組成物は、製剤の一部がオリゴヌクレオチド自体中に構築される場合、中性脂質粒子中におけるオリゴヌクレオチドの効率的なカプセル化を可能にする。

20

## 【0230】

いくつかの側面において、50から140nmまでの範囲のサイズの安定な粒子は、疎水性オリゴヌクレオチドを好ましい製剤と複合体化することにより形成され得る。製剤は、それ自体では典型的には小さい粒子を形成せず、むしろ集塊物を形成し、これは疎水性修飾オリゴヌクレオチドを付加することにより、安定な50～120nmの粒子へと転換されることに言及することは興味深い。

## 【0231】

本発明の中性ナノトランスポーター組成物は、疎水性修飾ポリヌクレオチド、中性脂質混合物および任意にカーゴ分子を含む。本明細書に使用される「疎水性修飾ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの修飾の前よりも疎水性にする少なくとも1つの修飾を有する、本開示のポリヌクレオチド（例として、sd-rxRNA）である。修飾は、疎水性分子をポリヌクレオチドに付着（共有結合的または非共有結合的に）することにより達成されてもよい。いくつかの例において、疎水性分子は、親油性基であるかまたは親油性基を含む。

30

## 【0232】

用語「親油性基」は、水に対するアフィニティーよりも高い、脂質に対するアフィニティーを有する基を意味する。親油性基の例は、これらに限定されないが、コレステロール、コレステリルまたは修飾コレステリル残基、アダマンチン、ジヒドロテステロン（dihydrotestosterone）、長鎖アルキル、長鎖アルケニル、長鎖アルキニル、オレイル、リトコール酸、コレノ酸、オレオイル-コレノ酸、パルミチル酸、ヘプタデシル酸、ミリスチル酸、胆汁酸、コール酸またはタウロコール酸、デオキシコール酸、オレイルリトコール酸、オレオイルコレノ酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド類、ビタミンEなどのビタミン類、飽和または不飽和のいずれかの脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル類、ピレン類、ポルフィリン類、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン類、ビオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、Texas-Red、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、シアニン色素（例としてCy3またはCy5）、Hoechst 33258色素、ソラレンまたはイブプロフェンを含む。コレステロール部分は還元されても（例としてコレスタン中のように）、または、置換されても（例としてハロゲンにより）よい。1分子における異なる親油性基の組み合わせもまた可能である。

40

50

## 【0233】

疎水性分子は、ポリヌクレオチドの多様な位置において付着されてもよい。上のとおり、疎水性分子は、ポリヌクレオチドの3'または5'末端などのポリヌクレオチドの末端の残基に連結されていてもよい。代わりに、これは、ポリヌクレオチドの内部のヌクレオチドまたは枝上のヌクレオチドに連結されていてもよい。疎水性分子が、例えばヌクレオチドの2'位に、付着されていてもよい。疎水性分子はまた、ポリヌクレオチドのヌクレオチドの複素環式塩基、糖または主鎖にも連結されていてもよい。

## 【0234】

疎水性分子は、リンカー部分によりポリヌクレオチドに繋げられていてもよい。任意に、リンカー部分は、非ヌクレオチド性のリンカー部分である。非ヌクレオチド性のリンカーは、例として、脱塩基残基( dスペーサー)、トリエチレン glycol (スペーサー9)もしくはヘキサエチレン glycol (スペーサー18)などのオリゴエチレン glycol、またはブタンジオールなどのアルカンジオールである。スペーサーユニットは、好ましくは、ホスホジエステルまたはホスホロチオアート結合により連結されている。リンカーユニットは、分子中に1回のみ現れても、または、例としてホスホジエステル、ホスホロチオアート、メチルホスホナートまたはアミン連結部などを介して、数回組み込まれてもよい。

10

## 【0235】

典型的な抱合プロトコルは、配列の1以上の位置においてアミノリンカーを保有するポリヌクレオチドの合成を含むが、しかしながらリンカーは必要ではない。アミノ基は、次いで、適切なカップリングまたは活性化試薬を使用して、抱合される分子と反応させられる。抱合反応は、まだ固体支持体に結合しているポリヌクレオチドを用いて、または、溶液相中のポリヌクレオチドの切断に続いて、実施されてもよい。HPLCによる修飾ポリヌクレオチドの精製は、典型的には、結果として純粋な材料を生じる。

20

## 【0236】

いくつかの態様において、疎水性分子は、ミセル中へ組み込まれるために充分な疎水性を提供する、ステロール型抱合体、フィトステロール抱合体、コレステロール抱合体、側鎖の長さが変えられたステロール型抱合体、脂肪酸抱合体、任意の他の疎水性基抱合体、および/または内部ヌクレオシドの疎水性修飾である。

## 【0237】

30

本開示の目的のために、用語「ステロール」またはステロイドアルコール類は、A環の3位においてヒドロキシル基を持つステロイドのサブグループを指す。これらは、アセチル-コエンザイムAからHMG-COAレダクターゼ経路を介して合成される両親媒性脂質である。全体的な分子は、極めて扁平である。A環上のヒドロキシル基は、極性である。脂肪族鎖の残りは、非極性である。通常、ステロールは、17位において8炭素鎖を有すると考えられる。

## 【0238】

本開示の目的のために、用語「ステロール型分子」は、ステロイドアルコール類を指し、これは、ステロールと構造が類似する。主要な差異は、環の構造および21位に結合する側鎖の炭素の数である。

40

本開示の目的のために、用語「フィトステロール」(また植物ステロールとも称される)は、植物において天然に存在する植物化学物質である、一群のステロイドアルコール類である。200種を超えるフィトステロールが知られている。

本開示の目的のために、用語「ステロールの側鎖」は、ステロール型分子の17位にて付着する側鎖の化学組成を指す。標準的な定義において、ステロールは、8炭素鎖を17位に保有する4環構造に限定される。本発明において、従来のものよりも長いおよび短い側鎖を持つステロール型分子が記載される。側鎖は、分枝であってもよいし、二重の骨格を含有していてもよい。

## 【0239】

よって、本開示に有用なステロールは、例えば、コレステロール、ならびに、17位に

50

2 ~ 7 個または 9 個の炭素より長い側鎖が結合しているユニークなステロールを含む。特定の態様において、ポリ炭素テイルの長さは、5 ~ 9 個の炭素の間で変動する。かかる抱合体は、特に肝臓への送達において、顕著により良好な *in vivo* 効力を有してもよい。これらの型の分子は、従来のコレステロールに抱合されたオリゴヌクレオチドよりも 5 ~ 9 倍低い濃度にて働くことが期待される。

代わりに、ポリヌクレオチドは、タンパク質、ペプチド、または、疎水性分子として機能する正に荷電した化学物質に結合していてもよい。タンパク質は、プロタミン、d s R N A 結合ドメインおよびアルギニンリッチペプチドからなる群から選択されてもよい。例示的な正に荷電した化学物質は、スペルミン、スペルミジン、カダベリンおよびプロトレシンを含む。

10

#### 【 0 2 4 0 】

他の態様において、疎水性分子抱合体は、疎水性修飾、ホスホロチオアート修飾および 2' リボ修飾を含むがこれらに限定されないポリヌクレオチドの最適な化学修飾パターンと組み合わされたとき（本明細書に詳細に記載されるとおり）、さらに高い効力を実証し得る。

他の態様において、ステロール型分子は、天然に存在するフィトステロールであってもよい。ポリ炭素鎖は、9 個より長くても、直鎖であっても、分枝鎖であっても、および / または、二重結合を含有していてもよい。ポリヌクレオチド抱合体を含有するいくつかのフィトステロールは、多様な組織へのポリヌクレオチドの送達において、顕著により強力かつ活性であり得る。いくつかのフィトステロールは組織選択性を実証し得ることから、R N A i を特異的に特定の組織へ送達するための手段として使用され得る。

20

#### 【 0 2 4 1 】

疎水性修飾ポリヌクレオチドは、中性脂肪酸混合物と混合されて、ミセルを形成する。中性脂肪酸混合物は、疎水性修飾ポリヌクレオチドとともにミセルを形成し得る生理学的 pH においてまたはその付近において、正味の中性または僅かに正味の負の電荷を有する、脂質の混合物である。本発明の目的のために、用語「ミセル」は、非荷電性脂肪酸とリン脂質との混合物により形成される、小さいナノ粒子を指す。中性脂肪酸混合物は、毒性を引き起こさない量において存在する限りにおいて、カチオン性脂質を含んでもよい。好みの態様において、中性脂肪酸混合物は、カチオン性脂質を含まない。カチオン性脂質を含まない混合物は、全脂質のうちの 1 % 未満、好みは 0 % が、カチオン性脂質であるものである。用語「カチオン性脂質」は、生理学的 pH においてまたはその付近において、正味の正の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。用語「アニオン性脂質」は、生理学的 pH においてまたはその付近において、正味の負の電荷を有する、脂質および合成脂質を含む。

30

#### 【 0 2 4 2 】

中性脂質は、強力であるが共有結合ではない引力（例として静電気、ファンデルワールス、パイ・スタッキング(pi-stacking)などの相互作用）により、本発明のオリゴヌクレオチドに結合する。

中性脂質混合物は、天然に存在するかまたは化学合成された、または、修飾された、飽和および不飽和脂肪酸残基のクラスから選択される製剤を含んでもよい。脂肪酸は、トリグリセリド、ジグリセリドまたは個別の脂肪酸の形態で存在し得る。他の態様において、薬理学において非経口栄養のために現在使用されている脂肪酸のよく確認された混合物および / または脂質乳液が利用されてもよい。

40

#### 【 0 2 4 3 】

中性脂肪酸混合物は、好みは、コリンをベースとする脂肪酸およびステロールの混合物である。コリンをベースとする脂肪酸は、例えば、D D P C、D L P C、D M P C、D P P C、D S P C、D O P C、P O P C および D E P C などの合成のホスホコリン誘導体を含む。D O P C（化合物登録番号 4235-95-4）は、ジオレオイルホスファチジルコリンである（ジエライドイルホスファチジルコリン、ジオレオイル - P C、ジオレオイルホスホコリン、ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン、ジオレイルホスファチ

50

ジルコリンとしても知られる)。D S P C (化合物登録番号816-94-4は、ジステアロイルホスファチジルコリンである(1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンとしても知られる)。

中性脂肪酸混合物中のステロールは、例えばコレステロールであってもよい。中性脂肪酸混合物は、完全にコリンベースの脂肪酸およびステロールからなっても、または、これは任意にカーゴ分子を含んでもよい。例えば、中性脂肪酸混合物は、少なくとも20%または25%の脂肪酸および20%または25%のステロールを有してもよい。

#### 【0244】

本発明の目的のために、用語「脂肪酸」は、脂肪酸の従来の説明に関する。これらは、個別の実体またはジグリセリドおよびトリグリセリドの形態において存在し得る。本発明の目的のために、用語「脂質乳液」は、食事から十分な脂質を得ることができない対象へ静脈内に与えられる安全な脂質製剤を指す。これは、大豆油(または他の天然に存在するオイル)と卵のリン脂質との乳液である。脂質乳液は、いくつかの不溶性麻酔剤の製剤のために使用されている。本開示において、脂質乳液は、イントラリピッド(Intralipid)、リポシン(Liposyn)、ニュートリピッド(Nutrilipid)などの市販の製剤の一部、特定の脂肪酸が濃縮されている改変された市販の製剤、または、完全にde novoで処方された脂肪酸とリン脂質との組合せであってもよい。

10

#### 【0245】

いくつかの態様において、本開示のオリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例として上の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約12時間～約24時間の間接触させられる。他の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、脂質、例として上の脂質または脂質組成物の1つを含む混合物と、約1～約5日間接触させられる。一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約3日間～約30日間接触させられる。他の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約5～約20日間、接触状態に置かれる。他の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7～約15日間、接触状態に置かれる。

20

#### 【0246】

製剤の50%～60%は、任意に、他のいずれの脂質または分子であってもよい。かかる脂質または分子は、本明細書において、カーゴ脂質またはカーゴ分子として言及される。カーゴ分子は、これらに限定されずに、イントラリピッド(intralipid)、低分子、膜融合ペプチドもしくは脂質を含むか、または、他の低分子が、細胞取り込み、エンドソームによる放出または組織分布特性を変えるために添加されてもよい。かかる特性が望ましい場合、カーゴ分子に耐性を示す能力は、これらの粒子の特性の改変のために重要である。例えば、いくつかの組織特異的代謝物の存在は、組織分布プロフィールを大幅に変える場合がある。例えば、多様な飽和レベルを有するより短いまたはより長い脂質鎖が濃縮されているイントラリピッド(intralipid)型製剤の使用は、これらの型の製剤の組織分布プロフィール(およびそれらのローディング)に影響を与える。

30

#### 【0247】

本開示に従い有用なカーゴ脂質の例は、膜融合脂質である。例えば、双性イオン脂質D O P E(化合物登録番号4004-5-1、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン)は、好ましいカーゴ脂質である。

40

イントラリピッド(Intralipid)は、以下の組成から構成され得る:1000mLが以下を含有する:精製大豆油90g、精製卵リン脂質12g、無水グリセロール22g、注射用水(1000mLへの十分量)。pHは、水酸化ナトリウムで、約pH8に調整される。エネルギー含量/L:4.6MJ(190kcal)。浸透圧(およそ):300mOsm/水1kg。他の態様において、脂質乳液は、5%のベニバナ油、5%の大豆油、乳化剤として添加される最大1.2%までの卵リン脂質および注射用水中の2.5%のグリセリンを含有する、リポシン(Liposyn)である。これはまた、pH調整のために水酸化ナトリウムを含有してもよい。pH8.0(6.0～9.0)。リポシンは、276m

50

0 s m o l / リットル ( 実測値 ) の浸透圧を有する。

【 0 2 4 8 】

カーゴ脂質のアイデンティティー、量および比率のバリエーションは、これらの化合物の細胞による取り込みおよび組織分布の特徴に影響を与える。例えば、脂質テイルの長さおよび飽和性のレベルは、肝臓、肺、脂肪および心筋細胞への異なる取り込みに影響を与える。ビタミン類または異なる形態のステロールなどの特別な疎水性分子の添加は、特定の化合物の代謝に関する特別な組織への分布に有利に働き得る。いくつかの態様において、ビタミン A または E が用いられる。複合体は、異なるオリゴヌクレオチド濃度にて形成され、より高い濃度は、より効率的な複合体形成に有利に働く。

【 0 2 4 9 】

他の態様において、脂質乳液は、脂質の混合物に基づく。かかる脂質は、天然の化合物、化学合成された化合物、精製脂肪酸または他のいずれの脂質をも含んでもよい。さらに他の態様において、脂質乳液の組成は、完全に人工的なものである。特定の態様において、脂質乳液は、70 % を超えて、リノール酸である。さらに別の特定の態様において、脂質乳液は、少なくとも 1 % のカルジオリピンである。リノール酸 ( L A ) は、不飽和オメガ - 6 脂肪酸である。これは、18 - 炭素鎖および 2 個のシス二重結合を有するカルボン酸からなる無色の液体である。

いくつかの態様において、疎水性修飾ポリヌクレオチドの組織分布を変えるための手段として、脂質乳液の組成の変更が使用される。この方法論は、特定の組織へのポリヌクレオチドの特異的送達をもたらす。

他の態様において、カーゴ分子の脂質乳液は、70 % を超えるリノール酸 ( C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> ) および / またはカルジオリピンを含む。

【 0 2 5 0 】

イントラリピッド ( intralipid ) などの脂質乳液は、いくつかの非水溶性薬物 ( プロポフォール ( Propofol ) ( Diprivan として再処方されている ) など ) のための送達用製剤として、前から使用されてきた。本発明のユニークな特徴は、( a ) 修飾ポリヌクレオチドを 1 以上の疎水性化合物と組み合わせ、それによりこれが脂質ミセル中に組み込まれ得るというコンセプト、および ( b ) 可逆性キャリアを提供するためにこれを脂質乳液と混合すること、を含む。血流中への注射の後で、ミセルは通常、アルブミン、HDL、LDL およびその他の血清タンパク質と結合する。この結合は可逆性であり、最終的に脂質は細胞により吸収される。ミセルの一部として組み込まれるポリヌクレオチドは、次いで、細胞の表面近くに送達されるであろう。その後、ステロール型送達を含むがこれらに限定されない多様な機構を通して、細胞による取り込みが起こり得る。

【 0 2 5 1 】

複合体化剤

複合体化剤は、強力であるが共有結合ではない引力 ( 例として静電気、ファンデルワールス、バイ・スタッキングなどの相互作用 ) により、本開示のオリゴヌクレオチドに結合する。いくつかの態様において、本開示のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの細胞による取り込みを増大するために、複合体化剤と複合体化され得る。複合体化剤の例は、カチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞へ送達するために使用され得る。しかしながら、上のとおり、カチオン性脂質を含まない製剤が、いくつかの態様において好ましい。

【 0 2 5 2 】

用語「カチオン性脂質」は、極性および非極性ドメインの両方を有する脂質および合成脂質であって、生理学的 pH またはその付近において正に荷電することができ、核酸などのポリアニオンに結合して核酸の細胞中への送達を促進するものを含む。一般に、カチオン性脂質は、飽和および不飽和アルキル、ならびに、脂環式のエーテル類およびアミンのエステル類、アミド類、または、これらの誘導体を含む。カチオン性脂質の直鎖および分枝アルキルおよびアルケニル基は、例として、1 から約 25 個の炭素原子を含有し得る。好ましい直鎖または分枝アルキルまたはアルケン基は、6 個以上の炭素原子を有する。脂

10

20

30

40

50

環式基は、コレステロールおよび他のステロイド基を含む。カチオン性脂質は、例として  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、アセタート、トリフルオロ酢酸、スルファート、亜硝酸化合物 (nitrite) およびニトロートを含む多様な対イオン (アニオン) とともに調製され得る。

### 【0253】

カチオン性脂質の例は、ポリエチレンイミン、ポリアミドアミン (PAMAM) スターバーストデンドリマー、リポフェクチン (DOTMA と DOPPEとの組合せ)、リポフェクターゼ (Lipofectase)、LIPOFECTAMINE (商標) (例えば、LIPOFECTAMINE (商標) 2000)、DOPPE、サイトフェクチン (Cytofectin) (Gilead Sciences、Foster City、Calif.)、およびユーフェクチン (Eufectins) (JBL、San Luis Obispo、Calif.) を含む。例示的なカチオン性リポソームは、 $\text{N} - [1 - (2, 3\text{-ジオレオロキシ}) - \text{プロピル}] - \text{N}, \text{N}, \text{N}$  - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、 $\text{N} - [1 - (2, 3\text{-ジオレオロキシ}) - \text{プロピル}] - \text{N}, \text{N}, \text{N}$  - トリメチルアンモニウムメチルスルファート (DOTAP)、 $3 - [\text{N} - (\text{N}', \text{N}') - \text{ジメチルアミノエタン}]$  カルバモイル]コレステロール (DC-Chol)、 $2, 3, -\text{ジオレイルオキシ}-\text{N} - [2$  (スペルミンカルボキサミド)エチル] -  $\text{N}, \text{N}$  -  $\text{ジメチル}-1-\text{プロパンアミニウムトリフルオロアセタート}$  (DOSPA)、 $1, 2-\text{ジミリスチルオキシプロピル}-3-\text{ジメチル}-\text{ヒドロキシエチルアンモニウムプロミド}$ ；およびジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド (DDAB) から製造され得る。カチオン性脂質、例えば  $\text{N} - (1 - (2, 3\text{-ジオレイルオキシ})\text{プロピル}) - \text{N}, \text{N}, \text{N}$  - トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) は、ホスホロチオアートオリゴヌクレオチドのアンチセンス効果を 1000 倍増大することが見出された (Vlassov et al., 1994, *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:95-108)。オリゴヌクレオチドはまた、例としてポリ (L-リジン) またはアビジンと複合体化されてもよく、脂質は、この混合物中、例としてステリル - ポリ (L-リジン) に含まれても含まれなくてもよい。

### 【0254】

カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドを細胞に送達するために当該技術分野において使用してきた (例として米国特許第5,855,910号；同第5,851,548号；同第5,830,430号；同第5,780,053号；同第5,767,099号；Lewis et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3176; Hope et al. 1998. *Molecular Membrane Biology* 15:1を参照)。今回のオリゴヌクレオチドの取り込みを容易にするために使用され得る他の脂質組成物は、クレームされる方法と組み合わせて使用され得る。上で列記されるものに加えて、例として米国特許第4,235,871号；米国特許第4,501,728号；同第4,837,028号；同第4,737,323号において教示されるものを含む他の脂質組成物もまた、当該技術分野において知られている。

### 【0255】

いくつかの態様において、脂質組成物は、剤、例としてウイルスタンパク質を、オリゴヌクレオチドの脂質媒介性トランスフェクションを増強するためにさらに含み得る (Kamata, et al., 1994. *Nucl. Acids. Res.* 22:536)。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、例として米国特許第5,736,392号に教示されるとおりのオリゴヌクレオチド、ペプチドおよび脂質を含む組成物の一部として、細胞と接触させられる。血清耐性である改善された脂質もまた記載されている (Lewis, et al., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:3176)。カチオン性脂質および他の複合体化剤は、エンドサイトーシスを通して細胞中へ運搬されるオリゴヌクレオチドの数を増大するために作用する。

### 【0256】

他の態様において、オリゴヌクレオチドの取り込みを最適化するために、 $\text{N}$  - 置換グリシンオリゴヌクレオチド (ペプトイド) が使用され得る。ペプトイドは、トランスフェクションのためのカチオン性脂質様化合物を作製するために使用してきた (Murphy, et al., 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1517)。ペプトイドは、標準的な方法 (例として Zuckermann, R. N., et al. 1992. *J. Am. Chem. Soc.* 114:10646; Zuckermann, R.

10

20

30

40

50

N., et al. 1992. Int. J. Peptide Protein Res. 40:497)を使用して合成され得る。カチオン性脂質とペプトイドとの組合せであるリプトイド(liptoid)もまた、目的のオリゴヌクレオチドの取り込みを最適化するために使用され得る(Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345)。リプトイドは、ペプトイドオリゴヌクレオチドを產生して、アミノ末端のサブモノマーをそのアミノ基を介して脂質にカップリングすることにより合成され得る(Hunag, et al., 1998. Chemistry and Biology. 5:345)。

#### 【0257】

正に荷電したアミノ酸を、高活性カチオン性脂質を作製するために使用され得ることは、当該技術分野において知られている(Lewis et al. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:3176)。いくつかの態様において、本開示のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、親油性部分に結合した多数のアルギニン、リジン、ヒスチジンまたはオルニチン残基を含む(例として米国特許第5,777,153号を参照)。

#### 【0258】

他の態様において、本開示のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、約1～約4個の塩基性残基を有するペプチドを含む。これらの塩基性残基は、例としてペプチドのアミノ末端、C末端または内部領域に位置され得る。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されてきた。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例としてリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例としてアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖(例としてグリシン(これはまた非極性であるとも考えられる)、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例としてアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ-分枝側鎖(例としてスレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例としてチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を持つアミノ酸を含む。塩基性アミノ酸の他にも、ペプチドの他の残基の大多数または全てが、非塩基性アミノ酸から、例としてリジン、アルギニンまたはヒスチジン以外のアミノ酸から選択され得る。好ましくは、長い中性の側鎖を有する中性アミノ酸が優勢であることが使用される。

#### 【0259】

いくつかの態様において、本開示のオリゴヌクレオチドを送達するための組成物は、1以上のガンマカルボキシグルタミン酸残基または-G1a残基を有する天然または合成のポリペプチドを含む。これらのガンマカルボキシグルタミン酸残基により、ポリペプチドが、互いにおよび膜表面に、結合することが可能になる。言い換えると、一連の-G1aを有するポリペプチドは、RNAiコンストラクトが、それが接触した膜が何であれそれに固着することを助けるための汎用送達モダリティーとして使用され得る。これは、少なくとも、RNAiコンストラクトが血流からクリアランスされることを遅延し、それらが標的にホーミングするチャンスを増強し得る。

#### 【0260】

ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、天然のタンパク質中に存在してもよい(例えばプロトロンビンは10個の-G1a残基を有する)。代わりに、これらは、精製された、組み換えるに作製された、または、化学合成されたポリペプチド中に、カルボキシル化により、例えばビタミンK依存性カルボキシラーゼを使用して、導入され得る。ガンマカルボキシグルタミン酸残基は、連続的であっても非連続的であってもよく、ポリペプチド中のかかるガンマカルボキシグルタミン酸残基の総数および位置は、オリゴヌクレオチドの異なるレベルの「固着性(stickiness)」を達成するために調節/微調整され得る。

#### 【0261】

いくつかの態様において、本開示のオリゴヌクレオチド組成物と接触させられる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例として上の脂質または脂質組成物の1つなどの脂質を含む混合物と、約12時間～約24時間接触させられる。他の態様において、オリゴヌクレオチド組成物と接触させる細胞は、オリゴヌクレオチドを含む混合物、および、例として上の脂質または脂質組成物の1つなどの脂質を含む混合物と、約1日～約

10

20

30

40

50

5日間接触させられる。一態様において、細胞は、脂質およびオリゴヌクレオチドを含む混合物と、約3日間～約30日間までの長さにわたり接触させられる。他の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約5～約20日間接触させたままに置かれる。他の態様において、脂質を含む混合物は、細胞と、少なくとも約7～約15日間接触させたままに置かれる。

例えば、一態様において、オリゴヌクレオチド組成物は、サイトフェクチンCSまたはGSV (Glen Research; Sterling, Va.から入手可能)、GS3815、GS2888などの脂質の存在下において、本明細書に記載されるとおり、長期のインキュベーション期間にわたって細胞と接触させられてもよい。

#### 【0262】

10

一態様において、細胞の、脂質およびオリゴヌクレオチド組成物を含む混合物とのインキュベーションは、細胞のバイアビリティを低下させない。好ましくは、トランスフェクションの後で、細胞は実質的に生存している。一態様において、トランスフェクションの後で、細胞は、少なくとも約70%～少なくとも約100%生存している。他の態様において、細胞は、少なくとも約80%～少なくとも約95%生存している。さらに他の例において、細胞は、少なくとも約85%～少なくとも約90%生存している。

#### 【0263】

一態様において、オリゴヌクレオチドは、本明細書において「輸送ペプチド」として言及される、オリゴヌクレオチドを細胞中へ輸送するペプチド配列を付着させることにより修飾される。一態様において、組成物は、タンパク質をコードする標的核酸分子に対して相補的であるオリゴヌクレオチドおよび共有結合で付着している輸送ペプチドを含む。

20

#### 【0264】

語「輸送ペプチド」は、オリゴヌクレオチドの細胞中への輸送を容易にさせるアミノ酸配列を含む。それが連結されている部分の細胞中への輸送を容易にさせる例示的なペプチドは、当該技術分野において知られており、例としてHIV-TAT転写因子、ラクトフェリン、ヘルペスVP22タンパク質および線維芽細胞増殖因子2を含む (Pooga et al. 1998. *Nature Biotechnology*. 16:857; およびDerossi et al. 1998. *Trends in Cell Biology*. 8:84; Elliott and O'Hare. 1997. *Cell* 88:223)。

#### 【0265】

オリゴヌクレオチドは、知られている技術 (例としてProchiantz, A. 1996. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:629; Derossi et al. 1998. *Trends Cell Biol.* 8:84; Troy et al. 1996. *J. Neurosci.* 16:253, Vives et al. 1997. *J. Biol. Chem.* 272:16010) を使用して輸送ペプチドに付着させ得る。例えば、一態様において、活性化チオール基を保有するオリゴヌクレオチドは、そのチオール基を介して、輸送ペプチド中に存在するシステインに (例としてDerossi et al. 1998. *Trends Cell Biol.* 8:84; Prochiantz. 1996. *Current Opinion in Neurobiol.* 6:629; Allinquant et al. 1995. *J Cell Biol.* 128: 919において教示されるとおり、例としてアンテナペディアホメオドメインの第2と第3とのヘリックスの間のターン中に存在するシステインに) 連結させる。他の態様において、Boc-Cys-(Npys)OH基は、最後の (N末端) アミノ酸およびSH基を保有するオリゴヌクレオチドがペプチドにカップリングされ得るように、輸送ペプチドにカップリングされ得る (Troy et al. 1996. *J. Neurosci.* 16:253)。

30

#### 【0266】

40

一態様において、連結基 (linking group) はヌクレオモノマーに付着され得、輸送ペプチドはリンカーへ共有結合で付着させられ得る。一態様において、リンカーは、輸送ペプチドについての結合部位として、および、ヌクレアーゼに対する安定性を提供し得るものの両方として、機能し得る。好適なリンカーの例は、置換または非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキル鎖、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルケニル鎖、C<sub>2</sub>～C<sub>20</sub>アルキニル鎖、ペプチドおよびヘテロ原子 (例としてS、O、NHなど) を含む。他の例示的なリンカーは、スルホスクシンイミジル-4-(マレイミドフェニル)-酪酸 (SMPB) (例としてSmith et al. *Biochem J* 1991. 276: 417-2を参照) などの二官能性架橋剤を含む。

50

いくつかの態様において、本開示のオリゴヌクレオチドは、受容体により媒介されるエンドサイトーシス機構を遺伝子の細胞中への送達のために利用する、分子抱合体として合成される（例としてBunnell et al. 1992. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 18:559およびこれにおいて引用される参考文献を参照）。

#### 【0267】

##### 標的化剤

オリゴヌクレオチドの送達はまた、オリゴヌクレオチドを細胞受容体へ標的化することによっても改善され得る。標的化部分は、オリゴヌクレオチドに抱合させても、オリゴヌクレオチドに結合したキャリア基（すなわち、ポリ（L-リジン）またはリポソーム）に付着させてもよい。この方法は、特異的受容体により媒介されるエンドサイトーシスを呈す細胞にとって良好に適する。

10

#### 【0268】

例えば、6-ホスホマンノシル化タンパク質に対するオリゴヌクレオチドの抱合体は、マンノース-6-リン酸特異的受容体を発現する細胞により、遊離オリゴヌクレオチドよりも20倍効率的に内部移行される。オリゴヌクレオチドはまた、細胞受容体に対するリガンドに、生分解性リンカーを使用してカップリングされてもよい。別の例において、送達コンストラクトは、ビオチン化オリゴヌクレオチドと強固な複合体を形成するマンノシル化ストレプトアビジンである。マンノシル化ストレプトアビジンは、ビオチン化オリゴヌクレオチドの内部移行を20倍増大することが見出された（Vlassov et al. 1994. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:95-108）。

20

#### 【0269】

加えて、特異的リガンドは、ポリリジンベースの送達システムのポリリジン成分に抱合させられ得る。例えば、トランスフェリン-ポリリジン、アデノウイルス-ポリリジンおよびインフルエンザウイルス赤血球凝集素HA-2のN末端膜融合ペプチド-ポリリジン抱合体は、真核細胞における受容体媒介性DNA送達を大いに増強する。肺胞マクロファージ中のポリ（L-リジン）に抱合したマンノシル化糖タンパク質は、オリゴヌクレオチドの細胞による取り込みを増強するために採用されている（Liang et al. 1999. *Pharmazie* 54:559-566）。

#### 【0270】

悪性細胞は、葉酸およびトランスフェリンなどの必須栄養素に対して高い必要性を有するので、これらの栄養素は、オリゴヌクレオチドをがん性細胞に標的化するために用いることができる。例えば、葉酸をポリ（L-リジン）に連結させると、前骨髓球性白血病（HL-60）細胞およびヒトメラノーマ（M-14）細胞において増強されたオリゴヌクレオチド取り込みが観察される（Ginobbi et al. 1997. *Anticancer Res.* 17:29）。別の例において、マレイル化されたウシ血清アルブミン、葉酸またはプロトポルフィリン三価鉄IXによりコートされたリポソームは、マウスマクロファージ、KB細胞および2.2.15ヒト肝細胞腫細胞において、オリゴヌクレオチドの増強された細胞による取り込みを示す（Liang et al. 1999. *Pharmazie* 54:559-566）。

30

#### 【0271】

リポソームは、肝臓、脾臓、網膜内皮系において自然に蓄積する（いわゆる受動的標的化）。リポソームを、抗体およびプロテインAなどの多様なリガンドにカップリングすることにより、これらは、特定の細胞集団に対して能動的に標的化され得る。例えば、プロテインA保有リポソームを、マウス主要組織適合複合体によりコードされるL細胞上に発現するH-2Kタンパク質に標的化されたH-2K特異的抗体により、予め処置されてもよい（Vlassov et al. 1994. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197:95-108）。

40

#### 【0272】

他のin vitroおよび/またはin vivoでのRNAi試薬の送達は、当該技術分野において知られており、目的のRNAiコンストラクトを送達するために使用され得る。例えば、数例を挙げると、米国特許出願公開第20080152661号、同第20080112916号、同第20080107694号、同第20080038296号、同第20070231392号、同第20060240093号、

50

同第20060178327号、同第20060008910号、同第20050265957号、同第20050064595号、同第20050042227号、同第20050037496号、同第20050026286号、同第20040162235号、同第20040072785号、同第20040063654号、同第20030157030号、WO 2008/036825、WO 04/065601およびAU2004206255B2を参照（全て参考として組み込まれる）。

#### 【0273】

##### 処置の指示

いくつかの側面において、本開示により記載される製剤（例として、ゲル製剤、軟膏等々）は、皮膚、頭皮、爪、口腔粘膜、または生殖器粘膜に影響を与える障害を処置することを必要とする対象において処置することに有用である。本明細書に使用されるとき、「これを必要とする対象」は、特定の障害または疾患（例として、皮膚疾患）の1以上の兆候または症状を呈する生物（例として、ヒト、非ヒト霊長目の動物、マウス、等々などの哺乳動物）である。本明細書に使用されるとき、用語、「処置する」、「処置すること」または「処置」は、皮膚疾患に関連する1以上の兆候または症状を低減または回復することを指す。

10

#### 【0274】

いくつかの側面において、本開示は、皮膚疾患に関連する遺伝子を標的とするための s d - r x R N A の使用に関する。いくつかの態様において、皮膚疾患に関連する遺伝子は、C T G F、V E G F、M A P 4 K 4、P D G F - B、S P P 1、T G F B 1、T G F B 2、H I F - 1 m T O R、P T G S 2 (C O X - 2)、P P I B、I L - 1 アルファ、I L - 1 ベータ、I c a m - 1、T i e 1、T i e 2、A N G 2、A n g 1、M Y C、T N F 、M M P 1、T Y R またはそれらのいずれの組み合わせをコードする。

20

#### 【0275】

皮膚障害に関連する遺伝子を標的とする s d - r x R N A により処置することができる疾患の非限定的な例は、皮膚障害、関節炎（変形性関節症および関節リウマチ）、挫瘍瘢痕、慢性潰瘍（静脈性潰瘍）、壞疽（ビブリオおよびクロストリジウム属）、角膜びらん、歯周炎、水疱形成性皮膚障害（例えば、スティーブンス・ジョンソン症候群など）、皮膚の光老化（光による損傷を含む）、子宮内膜癌、子宮内膜症、皮膚がん、皮膚損傷、乾癬、モルフェア（局部化した強皮症）、炎症後色素沈着過剰症、黒子、不均一な皮膚のトーン、および色素沈着過剰光老化を包含する。

30

肥大軟骨細胞特定タンパク質 2 4 としてもまた知られる、結合組織成長因子（C T G F）は、創傷治癒および強皮症に関与すると考えられている分泌されたヘパリン結合タンパク質である。結合組織成長因子は、線維芽細胞、筋線維芽細胞、内皮細胞および上皮細胞を含む多くの細胞のタイプで活性である。ヒト C T G F についての D N A およびタンパク質の配列情報を提供する代表的なGenbank受託番号は、NM\_001901.2およびM92934である。

#### 【0276】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子を標的とする s d - r x R N A を、挫瘍瘢痕を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。挫瘍は、青年の間で罹患率が高く、いくつかの場合においては、挫瘍病変は瘢痕形成をもたらし得る（委縮性または肥大性のいずれか）。病変の治癒は、3段階において起き、最終は、E C M のリモデリングである。M M P は、この段階において必要とされ、創傷治癒のこの段階におけるM M P の過剰発現が、瘢痕形成をもたらし得る（Fabbrocini, Annunziata, Monfrecola, Dermatology Research and Practice Volume 2010 (2010)、記事ID 893080、本明細書に参考として組み込まれる）。

40

#### 【0277】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子（例として、M M P ）を標的とする s d - r x R N A は、慢性潰瘍を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。静脈性潰瘍（うっ血性潰瘍、静

50

脈瘤性潰瘍または下腿潰瘍 (ulcus cruris) ) は、米国の人団の約 1 % が罹患し、下肢の潰瘍の最も一般的な形態である。静脈の機能不全および静脈の高血圧が、潰瘍の形成の主要な機構であると考えられる。ある態様において、s d - r x R N A は、慢性静脈性潰瘍を処置するために用いることができる (Collins L and Seraj S, Am Fam Physician. 2010 Apr 15;81(8):989-996、本明細書に参考として組み込まれる)。

#### 【 0 2 7 8 】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、M M P ) を標的とする s d - r x R N A は、壊疽を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。壊疽とは、相当量の組織の壊死であり、外傷、血管疾患または感染症 (Vibrio または Clostridium ) に起因する罹患組織への血流の減少により引き起こされる。コラゲナーゼは、ガス壊疽の拡散における公知の病原性因子である。

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、M M P ) を標的とする s d - r x R N A は、歯周炎を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。歯周炎 (膿漏) は、歯肉の感染に起因して引き起こされ、慢性炎症性疾患をもたらし、処置されないまま放置された場合、歯を支持する骨の喪失をもたらし得る。

#### 【 0 2 7 9 】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、M M P ) を標的とする s d - r x R N A は、水疱形成性皮膚障害を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。水疱形成性皮膚障害の非限定的な例は、スティーブンス・ジョンソン症候群および中毒性表皮壊死症を包含する。スティーブンス・ジョンソン症候群および中毒性表皮壊死症においては、薬物または細菌感染に対する反応に起因して、上皮 (皮膚の外層) が真皮から脱離する。

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、M M P ) を標的とする s d - r x R N A は、光老化を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。皮膚の光老化は、真皮のコラーゲン原線維に損傷を与える紫外線 A (U V A) 光線に対する繰り返しの暴露から生じる。この損傷は、罹患した皮膚の不正確な修復をもたらし、これが、しわおよび / または革のような皮膚をもたらす。

#### 【 0 2 8 0 】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、M M P ) を標的とする s d - r x R N A は、子宮内膜癌を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。子宮内膜癌は、子宮の内膜 (子宮の内側の表層) において起こる。M M P 1 は、子宮内膜癌において上方調節されることが見出され、癌の発生および / または病態形成において役割を果たすことが示唆された (Nishioka et al., Cancer Science, 2000年6月、第91巻、第6号、612-615頁、本明細書に参考とし組み込まれる)。いくつかの態様において、M M P を標的とする s d - r x R N A は、子宮内膜症を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。子宮内膜症は、子宮内膜 (子宮の内側の表層) が子宮の外側で増殖する状態である。M M P 1 は、子宮内膜の病変において上方調節されることが見出され、このことは、当該タンパク質が子宮内膜症の病態形成に関与することを示唆している (Lass et al., Hum. Reprod., 2005年6月、20(6): 1695-1701、本明細書に参考として組み込まれる)。

#### 【 0 2 8 1 】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、M M P ) を標的とする s d - r x R N A は、結核を処置するために用いることができる。いくつかの態様において、s d - r x R N A は、M M P 1 を標的とする。結核は、マイコバクテリア (最も一般的には結核菌) により引き起こされる感染性疾患であり、組織、最も一般的には肺 (肺結核) における組織の破壊を引き起こす。世界の人口の 3 分の 1 超が、結核の感染して

10

20

30

40

50

いると考えられている (Dye et al. *Science*, 2010;328(5980):856-861、本明細書に参考として組み込まれる)。コラゲナーゼは、結核を有する患者において上方調節されることが示されている (Elkingtonら、第121巻第5号 (2011年5月2日) *J Clin Invest*. 2011;121(5):1827-1833. doi:10.1172/JCI45666)。

#### 【0282】

いくつかの態様において、皮膚疾患に関連する遺伝子は、チロシナーゼ (TYR) をコードする。皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、TYR) を標的とする sd - rxRNA を用いて処置することができる疾患の非限定的な例は、皮膚の色素沈着障害 (例えば、メラニン増加症、炎症後色素沈着過剰、肝斑、日光性黒子) 、そばかす (freckle) および黒子 (lentigine) (多発性黒子症候群) 、網膜色素変性症、アジソン病、神経芽細胞腫、神経膠芽腫、パーキンソン病およびケロイドである。

#### 【0283】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、TYR) を標的とする sd - rxRNA は、皮膚の色素沈着過剰を処置するために用いることができる。色素沈着過剰は、皮膚の領域の暗色化であり、メラニンのレベルの増大、メラノサイト密度の変化、またはその両方から生じる。チロシナーゼは、メラニン生合成経路の律速段階を触媒する原因となる酵素である。ある態様において、sd - rxRNA は、皮膚の色素沈着過剰を処置するために用いられる。いくつかの態様において、sd - rxRNA は、TYR を標的とする。いくつかの態様において、TYR を標的とする sd - rxRNA は、メラニン増加症を処置するために用いることができる。メラニン増加症は、メラニンのレベルの増大に関連する皮膚の暗色化である。

#### 【0284】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、TYR) を標的とする sd - rxRNA は、炎症性色素沈着過剰を処置するために用いることができる。皮膚の炎症性色素沈着過剰は、炎症または皮膚の損傷の発生に続いて生じ得る。皮膚の炎症または損傷は、メラノサイトによるメラニンの産生の増大をもたらし得る。

#### 【0285】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、TYR) を標的とする sd - rxRNA は、肝斑を処置するために用いることができる。肝斑 (melasma) (妊娠中の女性においては肝斑 (chloasma) とも称される) は、色素沈着過剰の後天的な形態であり、全世界で何百万人もの人々が罹患し、その 90 % が女性である。肝斑の原因是、限定されないが、紫外線への暴露、妊娠、ホルモン置換治療および経口避妊薬を含むする。肝斑の病態形成は知られていないが、活性なメラノサイトの増加が存在することが仮説として挙げられる (Vashi, NA, *British Journal of Dermatology*, 2013, 169, 41-56、本明細書に参考として組み込まれる)。ある態様において、sd - rxRNA は、肝斑を処置するために用いられる。いくつかの態様において、sd - rxRNA は、チロシナーゼを標的とする。

#### 【0286】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、TYR) を標的とする sd - rxRNA は、日光性黒子を処置するために用いることができる。日光性黒子は、日光により誘導されるそばかすとしても知られ、日光および / または紫外光への繰り返しの暴露により引き起こされる色素沈着過剰病変である。繰り返しの暴露は、変異を誘発し、これが、患部領域におけるメラニン産生の増大をもたらす。

#### 【0287】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子 (例として、TYR) を標的とする sd - rxRNA は、網膜色素変性症を処置するために用いることができる。網膜色素変性症は、いくつかの既知の遺伝子における変異により引き起こされる遺伝性の網膜の変性疾患である。ある態様において、sd - rxRNA は、網膜色素変性症を処置するために用いられる (Hartong, *Lancet* 2006, 368, 1795、本明細書に参考として組み込まれる)。いくつかの態様において、sd - rxRNA は、TYR を標的とする。

10

20

30

40

50

## 【0288】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子（例として、T Y R）を標的とするsd-r x RNAは、アジソン病を処置するために用いることができる。アジソン病（慢性副腎不全、コルチゾル低下症（hypocortisolism）および副腎機能低下症としても知られる）は、慢性の内分泌障害であり、糖質コルチコイド、アンドロゲンおよびアルドステロンのレベルの低下をもたらす。ステロイドのレベルの低下は、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）およびメラノサイト刺激ホルモン（MSH）のレベルの増大をもたらし、メラノサイトの活性化およびメラニンの産生をもたらす。

## 【0289】

いくつかの態様において、皮膚障害に関連する遺伝子（例として、T Y R）を標的とするsd-r x RNAは、ケロイドを処置するために用いることができる。ケロイドは、元々の皮膚の損傷を超えて広がる瘢痕である。ケロイドは、退縮しない皮膚の瘢痕の特に攻撃的な形態である。ケロイド性瘢痕は、盛り上がり、不整形で、ピンク色から暗赤色であり、特徴的には元々の創傷の境界を超えて広がる。ケロイドは、一般的に圧痛性または有痛性であり、強い痒みを伴い得る。ケロイドは、皮膚の色が濃い個体においてより多く、しばしば家族性であり、ケロイドは、全ての皮膚型を有する人において生じ得る。

10

## 【0290】

いくつかの態様において、T Y Rに関連する疾患は、新生物（neoplasm）である。いくつかの例において、sd-r x RNAは、新生物または新生物組織を標的とし、新生物に関連する状態または障害の少なくとも1つの症状を寛解させるために用いられる。新生物（neoplasia）とは、しばしば異常な質量の組織（すなわち、新生物）をもたらす、細胞の異常な増殖を指す。新生物は、良性、前悪性（例えば上皮内癌）、または悪性（癌性）であり得る。良性新生物は、がんに変化しない子宮筋腫および色素性母斑（すなわち、皮膚の黒子）を含む。潜在的に悪性、または前癌性の新生物は、上皮内癌を含む、これは、周囲の組織に浸潤せず、むしろその正常な環境において増殖する、癌の初期の形態である。悪性新生物は、一般にがんと称され、それらは周囲の組織に浸潤してこれを破壊し、転移を形成する場合もあり、最終的に宿主にとって致死性となり得る。

20

## 【0291】

いくつかの例において、sd-r x RNAは、上皮起源の新生物または新生物細胞を標的とする。上皮細胞は、身体の表面全体を被覆し、内皮により内側を覆われている血管、リンパ管および心臓内部、ならびに中皮により内側を覆われている胸腔および腹腔を除き、身体の中空構造の殆どの内側を覆う、1または2以上の層に属する。

30

## 【0292】

上皮新生物は、限定されないが、良性および前悪性上皮腫瘍、例えば乳腺線維腺腫および大腸腺腫、ならびに悪性上皮腫瘍を包含する。悪性上皮腫瘍は、癌（carcinomas）とも称される原発腫瘍、および上皮起源の転移とも称される続発性腫瘍を包含する。癌は、限定されないが、以下を包含する：腺房癌（acinar carcinoma）、腺房癌（acinous carcinoma）、肺胞癌（別名腺様膿瘍癌、腺筋上皮腫、篩状癌（cribriform carcinoma）および円柱腫）、腺腫性癌（carcinoma adenomatous）、腺癌、副腎皮質の癌、肺胞癌、肺胞細胞癌（別名細気管支癌、肺胞細胞腫瘍および肺腺腫症）、基底細胞癌、基底細胞の癌（carcinoma basocellulare）（別名基底細胞腫（basaloma）、または基底細胞癌（basiloma）および、毛母細胞癌）、類基底細胞癌、基底扁平細胞癌、乳癌、細気管支肺胞上皮癌、細気管支癌、気管支原性肺癌、大脳様癌（cerebriform carcinoma）、胆管細胞癌（cholangiocellular carcinoma）（別名胆管腫（cholangioma）および胆管細胞癌（cholangiocarcinoma））、絨毛様癌（chorionic carcinoma）、コロイド様癌（colloid carcinoma）、面皰癌、体癌（corpus carcinoma）、篩状癌（cribriform carcinoma）、鎧状癌（carcinoma en cuirasse）、皮膚癌（carcinoma cutaneum）、円柱状癌、円柱状細胞癌、腺管癌（duct carcinoma）、緻密癌（carcinoma durum）、胎児性癌、脳癌（encephaloid carcinoma）、眼球上癌（epibulbar carcinoma）、類表皮癌、上皮性アデノイド癌（carcinoma epitheliale adenoides）、潰瘍形成性

40

50

癌 (carcinoma exulcere) 、線維性癌 (carcinoma fibrosum) 、ゼラチン様癌 (gelatiniform carcinoma) 、ゼラチン状癌、巨細胞癌、巨大細胞、腺の癌、顆粒膜細胞癌、毛母細胞癌、血液様癌 (hematoid carcinoma) 、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) (別名ヘパトーマ、悪性ヘパトーマおよび肝細胞 (hepatocarcinoma)) 、ハースル細胞癌、ガラス質癌 (hyaline carcinoma) 、腎明細胞癌 (hypernephroid carcinoma) 、乳児胎児性癌、上皮内癌 (carcinoma in situ) 、表皮内癌、上皮内癌 (intraepithelial carcinoma) 、クロムペッヘル (Krompecher) 癌、クルチツキー (Kulchitzky) 細胞癌、レンズ状癌 (lenticular carcinoma) 、レンズ状癌 (carcinoma lenticulare) 、脂肪腫性癌 (lipomatous carcinoma) 、リンパ上皮癌、乳様突起癌 (carcinoma mastitoides) 、髓様癌 (carcinoma medullare) 、髓様癌 (medullary carcinoma) 、黒色癌 (carcinoma melanodes) 、黒色癌 (melanotic carcinoma) 、粘液性癌 (mucinous carcinoma) 、粘液性癌 (carcinoma muciparum) 、粘液細胞癌 (carcina ma mucocellulare) 、粘表皮癌、粘膜癌 (carcinoma mucosum) 、粘膜癌 (mucous carcinoma) 、粘液腫状癌 (carcinoma myxomatodes) 、鼻咽頭癌、黒色癌 (carcinoma nigrum) 、燕麦細胞癌、骨化性癌 (carcinoma ossificans) 、類骨癌 (osteoid carcinoma) 、卵巣癌、乳頭癌、門脈周囲癌、前浸潤癌、前立腺癌、腎臓の腎細胞癌 (別名、腎臓の腺癌および腎明細胞癌 (hypernephroid carcinoma)) 、貯蔵細胞癌、肉腫様癌 (carcinoma sarcomatodes) 、シュナイダー癌 (scheinderian carcinoma) 、スキルス癌 (scirrhous carcinoma) 、陰囊癌、印環細胞癌、単純癌 (carcinoma simplex) 、小細胞癌、ソラノイド癌 (solanoid carcinoma) 、橢円状細胞癌 (spherical cell carcinoma) 、紡錘細胞癌、海面様癌、扁平上皮癌、有棘細胞癌、ひも状癌 (string carcinoma) 、毛細血管拡張性癌 (carcinoma telangiectaticum) 、毛細血管拡張性癌 (carcinoma telangiectodes) 、移行上皮癌、結節癌 (carcinoma tuberosum) 、結節癌 (tuberous carcinoma) 、疣状癌、絨毛癌 (carcinoma vilosum) 。

#### 【0293】

他の例において、sd - rx RNA は、中胚葉起源の新生物または新生物細胞、例えば肉腫を形成する新生物細胞を標的とする。肉腫は、骨および軟組織において生じる希少な中胚葉性新生物である。異なる型の肉腫が認識されており、これらは、脂肪肉腫 (粘液性脂肪肉腫および多形性脂肪肉腫 (pleiomorphic liposarcoma) を含む) 、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫 (別名悪性シュワン腫、神経線維肉腫、または神経原性肉腫) 、ユーイング腫瘍 (骨のユーイング肉腫、骨外 [骨ではない] ユーイング肉腫、および原始神経外胚葉性腫瘍 [PNET] を含む) 、滑膜肉腫、血管肉腫 (angiosarcoma) 、血管肉腫 (hemangiosarcoma) 、リンパ管肉腫、カポジ肉腫、血管内皮腫、線維肉腫、デスマイド腫瘍 (別名侵襲性線維腫症) 、隆起性皮膚線維肉腫 (DFSP) 、悪性線維性組織球腫 (MFH) 、血管周皮腫、悪性間葉腫、胞巣状軟部肉腫、類上皮肉腫、淡明細胞肉腫、線維形成性小細胞腫瘍、消化管間質腫瘍 (GIST) (別名GI間質肉腫) 、骨肉腫 (osteosarcoma) (別名骨肉腫 (osteogenic sarcoma)) - 骨格および骨格外、ならびに軟骨肉腫を包含する。

#### 【0294】

さらに他の例において、sd - rx RNA は、メラノサイト起源の新生物または新生物細胞を標的とする。メラノーマは、皮膚および他の器官のメラノサイト系から生じる腫瘍である。メラノーマの例は、悪性黒子由来メラノーマ、表在拡大型黒色腫、結節性メラノーマおよび末端黒子型メラノーマを包含する。

なお別の例において、sd - rx RNA は、限定されないが、以下において見出されるものを包含する新生物または新生物細胞を標的とする：胆道癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、ボーエン病およびパジェット病を包含する上皮内癌、肝臓癌、、有棘細胞癌を包含する口腔がん、線維肉腫および骨肉腫を包含する肉腫、メラノーマを包含する皮膚癌、、カポジ肉腫、胚の腫瘍 (精上皮腫、非精上皮腫 (奇形腫、絨毛癌)) を含む精巣癌、間質腫瘍および生殖細胞腫瘍、甲状腺の腺癌および髓様癌を包含する甲状腺癌、ならびに腺癌およびウィルムス腫瘍を包含する腎臓癌。

10

20

30

40

50

## 【0295】

他の例において、sd-r x RNAは、骨、筋肉および結合組織に起源を有する新生物および新生物細胞を標的とする。新生物細胞は、骨および結合組織の原発腫瘍（例として、肉腫）において見出すことができる。

## 【0296】

送達されるsd-r x RNAの合計の用量、濃度、容積、および送達の速度は、所与の新生物の型、サイズおよび構造について最適化することができる。RNA干渉の帯域は、これらのパラメーターを最適化することにより制御することができる。新生物中に送達されるsd-r x RNAの容積および濃度は、腫瘍全体にわたってRNA干渉を促進するために十分でなければならない。注射の回数、および新生物の構造に対するその配置に依存して、新生物の容積よりも小さい、新生物の容積よりも大きい、または新生物の容積とほぼ同等の合計sd-r x RNA容積を投与することが有用であり得る。

10

## 【0297】

いくつかの態様において、新生物を標的とするsd-r x RNAは、増殖性遺伝子または新生物組織において他の組織よりも高いレベルで発現される遺伝子を標的とする。「増殖性遺伝子」は、本明細書において言及される場合、細胞の増殖または複製の速度の増大を直接的または間接的に促進し、新生物または新生物細胞の形成をもたらす、任意の遺伝子であってよい。増殖性遺伝子の発現 / 機能から生じる増殖または複製の速度の増大は、類似の起源の非新生物組織の増殖または複製の速度と相対的である（例えば、皮膚の新生物、対、非新生物の皮膚）。増殖性遺伝子または新生物組織において他の組織よりも高いレベルで発現される遺伝子のいくつかの非限定的な例は、VEGF / VEGFR、HER2、PDGF / PDGFR、HDAC、MET、c-kit、CDK、FLT-1、IGF / IGF-R、FGF / FGF-R、Ras / Raf、Ab1、Bcl-2、Src、mTOR、PKC、MAPK、BIRC5、FAS、HIF1A、CDH16、MYC、HRASおよびCTNNB1を包含する。

20

## 【0298】

血管内皮増殖因子（VEGF）は、PDGF / VEGF増殖因子ファミリーのメンバーであり、ジスルフィド連結されたホモダイマーとしてしばしば見出されるタンパク質をコードする。このタンパク質は、内皮細胞に対して特異的に作用するグリコシル化されたマイトジエンであって、血管の透過性の増大を媒介すること、血管新生、脈管形成および内皮細胞の増殖を誘導すること、細胞遊走を促進すること、ならびにアポトーシスを阻害することを含む、多様な効果を有する。このタンパク質のレベルの上昇は、POEMS症候群、別名クロウ・深瀬症候群と関連付けられる。この遺伝子における変異は、増殖性および非増殖性の糖尿病性網膜症と関連付けられている。遊離で分泌されるアイソフォームまたは細胞に結合したアイソフォームのいずれかをコードする選択的スプライシングされた転写物のバリアントが特徴づけられており、これを、本発明のsd-r x RNAにより標的とすることができます。また、第1のAUGの上流で、これとインフレームにあり、さらなるアイソフォームをもたらす、非AUG（CUG）翻訳開始部位の使用についての証左が存在する。ヒトVEGFAの転写物バリアントの代表例は、Genbank受託番号NM\_001025366.2である。その対応するタンパク質は、Genbank受託番号NP\_001020537.2である。

30

## 【0299】

血小板由来増殖因子（PDGFA / PDGFB）は、血小板由来増殖因子ファミリーのメンバーである。このファミリーの4種のメンバーは、間葉系起源の細胞のための分裂促進因子であり、8個のシステインのモチーフにより特徴づけられる。PDGF遺伝子産物は、ホモダイマーとして、または血小板由来増殖因子ベータポリペプチドとのヘテロダイマーとして存在することができ、ここで、ダイマーはジスルフィド結合により接続される。ノックアウトマウスを用いた研究により、オリゴデンドロサイト、肺胞の平滑筋細胞、および精巣のライディッヒ細胞における細胞欠損が示されている；ノックアウトマウスは、胚として、または生後すぐに死亡する。PDGFについて2種のスプライスバリアント

40

50

が同定されており、これらを、本発明の s d - r x R N A により標的とすることができる。ヒト P D G F 転写物の代表例は、GenBank受託番号NM\_002607.5およびNM\_01105 7.3である。それらの対応するタンパク質は、それぞれ、GenBank受託番号NP\_002598.4およびNP\_03187.2である。P D G F は、その受容体である P D G F R に結合する。ヒト P D G F R 転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_006206.4であり、その対応するタンパク質は、NP\_006197.1である。

### 【 0 3 0 0 】

ヒト上皮増殖因子2 ( H E R 2 、別名、 H E R - 2 、 N E U 、 N G L 、 T K R 1 、 C D 3 4 0 、 M L N 1 9 および E R B B 2 ) は、受容体チロシンキナーゼの上皮増殖因子 ( E G F ) 受容体ファミリーのメンバーをコードする。このタンパク質は、それ自体のリガンド結合ドメインを有さず、したがって、増殖因子に結合することができない。しかし、それは、他のリガンドに結合した E G F 受容体ファミリーメンバーに緊密に結合してヘテロダイマーを形成し、リガンド結合を安定化し、キナーゼにより媒介される下流のシグナル伝達経路 ( マイトジエン活性化タンパク質キナーゼおよびホスファチジルイノシトール - 3 キナーゼを含むものなど ) の活性化を増強する。アイソフォームのアミノ酸位置 6 5 4 および 6 5 5 ( アイソフォーム b の位置 6 2 4 および 6 2 5 ) における対立遺伝子のバリエーションが報告されており、最も一般的な対立遺伝子は、 I l e 6 5 4 / I l e 6 5 5 である。この遺伝子の増幅および / または過剰発現は、乳腺腫瘍および卵巣腫瘍を含む多くのがんにおいて報告されている。選択的スプライシングは、いくつかのさらなる転写物バリアントを生じ、いくつかは異なるアイソフォームをコードする。各々の転写物バリアントは、本発明の s d - r x R N A の標的となり得る。 H E R 2 の転写物バリアントの代表例は、Genbank受託番号NM\_004448.2である。その対応するタンパク質は、Genbank受託番号NP\_004439.2である。

### 【 0 3 0 1 】

ヒストンデアセチラーゼ1 ( H D A C 1 ) は、ヒストンデアセチラーゼ / acuc / アルファファミリーに属し、ヒストンデアセチラーゼ複合体の成分である。それは、網膜芽細胞腫腫瘍抑制タンパク質と相互作用し、この複合体は、細胞の増殖および分化の制御における重要な要素である。転移関連タンパク質2と共に、それは、 p 5 3 をデアセチル化し、細胞の増殖およびアポトーシスに対するその効果を調節する。いくつかの例において、 s d - r x R N A は、 H D A C 1 、網膜芽細胞腫腫瘍抑制タンパク質、および / または転移関連タンパク質2を標的としてもよい。他の例において、 s d - r x R N A は、 p 5 3 を標的としてもよい。ヒト H D A C 1 転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_004964.2であり、その対応するタンパク質は、Genbank受託番号NP\_004955.2である。

### 【 0 3 0 2 】

M e t 癌原遺伝子 ( M E T ) は、肝細胞増殖因子受容体であり、チロシンキナーゼ活性をコードする。一次単鎖前駆体タンパク質は、転写後に切断されて、アルファおよびベータサブユニットを生じ、これらはジスルフィド連結されて成熟受容体を形成する。 M E T 遺伝子における多様な変異が、乳頭状腎臓癌と関連付けられている。この遺伝子について、異なるアイソフォームをコードする 2 種の転写物バリアントが見出されており、それらの各々を、 s d - r x R N A により標的とすることができる。ヒト M E T 転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_000245.2であり、その対応するタンパク質は、Genbank受託番号NP\_000236.2である。

### 【 0 3 0 3 】

V-kit Hardy-Zuckerman 4 ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子 ( K I T 、別名 P B T 、 S C F R 、 C - K i t または C D 1 1 7 ) は、癌原遺伝子c-kitのヒトホモログをコードする。c-kitは、初めに、ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子v-kitの細胞ホモログとして同定された。このタンパク質は、 M G F ( マスト細胞増殖因子、別名幹細胞因子 ) の 3 型膜貫通受容体である。この遺伝子における変異は、消化管腫瘍、マスト細胞疾患、急性骨髓性白血病、および限局性白皮病と関連する。この遺伝子について、異なるアイソフォームをコードする複数の転写物バリアントが見出されており、それらの各々を、 s d - r x R N A により標

10

20

30

40

50

的とすることができる。ヒトK I T転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_000222.2であり、その対応するタンパク質は、NP\_000213.1である。

#### 【0304】

サイクリン依存性キナーゼ(CDK)は、真核細胞の細胞周期制御において必須の役割を果たし、リン酸化され、それによりCDK活性化キナーゼ(CAK)により活性化される。CAKは、CDK7(MIM601955)、サイクリンH(CCNH;MIM601953)、およびMAT1を包含する、マルチサブユニットタンパク質である。MAT1(「menage a trois-1」を表す)は、CAK複合体のアセンブリに関与する。ヒトCDK転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_001177963.1であり、その対応するタンパク質は、NP\_001171434.1である。

10

#### 【0305】

Fms関連チロシンキナーゼ1(FLT-1、別名、FLT、VEGFR1、FLT1)は、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)ファミリーのメンバーをコードする。VEGFRファミリーメンバーは、受容体チロシンキナーゼ( RTK )であり、7個の免疫グロブリン(Ig)様ドメイン、膜貫通セグメント、および細胞質ドメイン内にチロシンキナーゼ(TK)ドメインを有する細胞外リガンド結合領域を含有する。このタンパク質は、VEGFR-A、VEGFR-Bおよび胎盤増殖因子に結合し、血管新生および脈管形成において重要な役割を果たす。この受容体の発現は、血管内皮細胞、胎盤栄養膜細胞および末梢血単球において見出される。この遺伝子について、異なるアイソフォームをコードする複数の転写物バリエントが見出されている。アイソフォームは、全長膜貫通受容体アイソフォーム、および短縮型の可溶性アイソフォームを包含する。可溶性アイソフォームは、妊娠子癥の発症と関連する。FLT-1の各々の転写物バリエントは、sd-r x RNAの標的となり得る。ヒトFLT-1転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_001159920.1であり、その対応するタンパク質は、NP\_00115392.1である。

20

#### 【0306】

インスリン様増殖因子(IGF)は、機能および構造においてインスリンと類似し、増殖および発達を媒介することに関与するタンパク質のファミリーのメンバーである。例えばIGF-Iタンパク質は、前駆体からプロセッシングされ、特異的受容体により結合されて、分泌される。この遺伝子における欠損は、インスリン様増殖因子I欠損の原因である。これらの遺伝子について、異なるアイソフォームをコードするいくつかの転写物バリエントが見出されており、それらの各々が、sd-r x RNAの標的となり得る。ヒトIGF転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_000618.3であり、その対応するタンパク質は、NP\_000609.1である。

30

#### 【0307】

線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーメンバーは、広範な分裂促進および細胞生存活性を有し、胚発生、細胞増殖、形態形成、組織修復、腫瘍の増殖および浸潤を含む、多様な生物学的プロセスに関与する。例えばFGF1は、内皮細胞の遊走および増殖の修飾因子、ならびに血管新生因子として機能する。それは、in vitroで多様な中胚葉および神経外胚葉由来の細胞のための分裂促進因子として作用し、それにより、器官形成に関与すると考えられる。いくつかのFGFの区別し得るアイソフォームをコードする選択的スプライシングされた転写物バリエントが報告されており、それらの各々が、sd-r x RNAの標的となり得る。ヒトFGF1転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_000800.3であり、その対応するタンパク質は、NP\_000791.1である。

40

#### 【0308】

線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)ファミリーメンバーは、メンバー間で、および進化を通して、高度に保存されたアミノ酸配列を有し、それらのリガンドアフィニティーおよび組織分布においては、互いに異なる。全長の代表的なタンパク質は、3個の免疫グロブリン様ドメインからなる細胞外領域、疎水性膜貫通セグメント、および細胞質チロシンキナーゼドメインからなる。タンパク質の細胞外部分は、線維芽細胞増殖因子と相互作用し、下流のシグナルのカスケードを発動し、最終的に、有糸分裂誘発および分化に影響

50

を及ぼす。例えば F G F R 1 は、酸性および塩基性線維芽細胞増殖因子の両方に結合し、四肢の誘導に関与する。この遺伝子における変異は、ファイファー症候群、ジャクソン・ワイズ症候群、アントレー・ビクスラー症候群、骨空洞性骨異形成症 (osteoglophonic dysplasia) 、および常染色体優性カルマン症候群 2 と関連付けられている。 F G F R 1 を含む染色体異常は、幹細胞骨髄増殖性障害および肝細胞白血病リンパ腫症候群に関連する。 F G F R 1 ファミリーメンバーの異なるタンパク質アイソフォームをコードする選択的スプライシングバリエントが記載されており、それらの各々が、 s d - r x R N A の標的となり得る。ヒト F G F R 1 の代表例は、Genbank受託番号 NM\_001174063.1 があり、その対応するタンパク質は、NP\_001167534.1 である。

## 【 0 3 0 9 】

R a s サブファミリー ( RAt Sarcoma の略語 ) は、細胞のシグナル伝達に関する低分子 G T P アーゼのタンパク質サブファミリーであり、また、これらのタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子サブファミリーを名付けるために用いられる。 R a s シグナル伝達の活性化は、細胞の増殖、分化および生存を引き起こす。 R a s は、構造において全て関連し多様な細胞挙動を制御するタンパク質の R a s スーパーファミリーの原型メンバーである。 R a s は、細胞の外から核へのシグナルを連絡するので、 r a s 遺伝子における変異は、細胞外シグナルの不在下においてすら、それを恒久的に活性化させ得、細胞内での不適切な伝達を引き起こし得る。これらのシグナルは、細胞の増殖および分裂をもたらすので、調節不全の R a s シグナル伝達は、最終的に、発がんおよびがんをもたらし得る。 R a s における活性化変異は、全てのヒト腫瘍の 20 ~ 25 % 、および特異的な腫瘍型の 90 % までにおいて、見出される。

## 【 0 3 1 0 】

哺乳動物 r a s 遺伝子ファミリーからのカーステン r a s 癌遺伝子ホモログである K R A S は、低分子 G T P アーゼスーパーファミリーのメンバーであるタンパク質をコードする。単アミノ酸置換が、変異を活性化する原因となる。生じるトランスフォーミングタンパク質は、肺の腺癌、粘液性腺腫、膵臓の腺管癌および結腸直腸癌を含む多様な悪性病変に関与すると考えられる。選択的スプライシングにより、 C 末端領域において異なる 2 種のアイソフォームをコードするバリエントがもたらされる。各々の K R A S 遺伝子バリエントが、 s d - r x R N A の標的となり得る。ヒト K R A S 転写物の代表例は、Genbank受託番号 NM\_004985.3 があり、その対応するタンパク質は、NP\_04976.2 である。

## 【 0 3 1 1 】

哺乳動物 r a s 遺伝子ファミリーからの v - H A - r a s ハーベイラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログである H R A S は、脱パルミトイル化および再パルミトイル化の連続周期を経験するタンパク質をコードし、これは、その細胞膜とゴルジ体との間の迅速交換を制御する。この遺伝子における変異は、出生前段階における成長の増大、生後の段階における成長の欠損、腫瘍形成の素因、精神遅滞、皮膚および筋骨格の異常、特有の顔貌、ならびに心血管異常により特徴づけられる、コステロ症候群を引き起こす。この遺伝子における欠損は、膀胱癌、濾胞性向上腺癌および口腔有棘細胞癌を含む多様ながんに関与する。この遺伝子について、異なるアイソフォームをコードする複数の転写物バリエントが、同定されている。各々の転写物バリエントが、 s d - r x R N A の標的となり得る。ヒト H R A S 転写物の代表例は、Genbank受託番号 NM\_001130442.1 があり、その対応するタンパク質は、NP\_001123914.1 である。

## 【 0 3 1 2 】

R A F 癌原遺伝子セリン / スレオニンタンパク質キナーゼは、癌原遺伝子 c - R A F として、または単純に c - R a f としても知られ、ヒトにおいては R A F 1 遺伝子によりコードされる酵素である。 c - R a f タンパク質は、 M A P K / E R K シグナル伝達経路において、タンパク質キナーゼカスケードの部分として機能する。 c - R a f は、セリン / スレオニン特異的タンパク質キナーゼの R a f キナーゼファミリーのメンバーであり、それが直接結合する膜結合型 G T P アーゼの R a s サブファミリーの下流で機能する、 M A P キナーゼ ( M A P 3 K ) である。活性化されると、 R a f - 1 は、リン酸化されて、二

10

20

30

40

50

特異性タンパク質キナーゼMEK1およびMEK2を活性化し、これらが、次いで、セリン／スレオニン特異的タンパク質キナーゼERK1およびERK2をリン酸化して活性化する。活性化されたERKは、細胞生理学の多面的エフェクターであり、細胞分裂周期、アポトーシス、細胞分化および細胞遊走に関与する遺伝子発現の制御において重要な役割を果たす。c-Raf (RAF1)、MEK1、MEK2、ERK1およびERK2のうちの任意の1または2以上が、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトRAF1転写物の代表例は、NM\_002880.3であり、その対応するタンパク質は、NP\_00287.1である。

### 【0313】

マイトジエン活性化タンパク質キナーゼ1 (MAPK1) (別名、ERK、p38、p40、p41、ERK2、ERT1、MAPK2、PRK M1、PRK M2、P42MAPKまたはp41mapk)は、MAPキナーゼファミリーのメンバーをコードする。MAPキナーゼは、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) としても知られ、複数の生化学的シグナルのための組み込み点として作用し、増殖、分化、転写制御および発達などの広範な細胞プロセスに関与する。このキナーゼの活性化は、上流のキナーゼによるそのリン酸化を必要とする。活性化されると、このキナーゼは、刺激された細胞の核に転座し、そこで、それは核標的をリン酸化する。この遺伝子について、同じタンパク質をコードするがUTRが異なる二種の選択的スプライシングされた転写物バリエントが報告されている。MAPK1の各々の転写物バリエントが、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトMAPK1転写物の代表例は、NM\_002745.4であり、その対応するタンパク質は、NP\_002736.3である。

### 【0314】

C-abl癌遺伝子1、非受容体チロシンキナーゼ (ABL1) は、細胞分化、細胞分裂、細胞接着およびストレス応答のプロセスに関連すると考えられている細胞質および核のタンパク質チロシンキナーゼをコードする。c-ABL1タンパク質の活性は、そのSH3ドメインにより負に制御され、SH3ドメインの欠失は、ABL1を癌遺伝子へと変える。t(9;22)転座は、慢性骨髓性白血病の多くの症例において存在する、BCR (MIM: 151410) とABL1遺伝子とのヘッドトゥテイル融合をもたらす。ユビキタスに発現するABL1チロシンキナーゼのDNA結合活性は、CDC2により媒介されるリン酸化により制御され、このことは、ABL1についての細胞周期機能を示唆している。ABL1遺伝子は、6kbまたは7kbのいずれかのmRNA転写物として発現され、共通のエクソン2~11に対してスプライシングされる、第1のエクソンが選択的スプライシングされる。ABL1の各々の転写物バリエントが、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトABL1転写物の代表例は、Genbank受託番号NM\_005057.4であり、その対応するタンパク質は、NP\_005148.2である。

### 【0315】

B細胞CLL/リンパ腫2 (Bc1-2) は、リンパ球などのいくつかの細胞のアポトーシス死を遮断するミトコンドリア外膜内在タンパク質をコードする。BCL2のIg重鎖遺伝子座への転移の場合におけるもののようなBCL2の構成的発現は、濾胞性リンパ腫の原因であると考えられる。選択的スプライシングにより產生される2種の転写物バリエントは、それらのC末端において異なり、それらの各々は、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトBc1-2転写物の代表例は、NM\_000633.2であり、その対応するタンパク質は、NP\_00624.2である。

### 【0316】

V-sirc肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ (SRC) は、ラウス肉腫ウイルスのv-sirc遺伝子と高度に類似する。この癌原遺伝子は、胚発生および細胞増殖の制御において役割を果たす。この遺伝子によりコードされるタンパク質は、その活性がc-SRCキナーゼによるリン酸化により阻害され得るチロシンタンパク質キナーゼである。この遺伝子における変異は、結腸癌の悪性進行に関与し得る。この遺伝子について、同じタンパク質をコードする2種の転写物バリエントが見出されており、それらの各々が、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトSRC転写物の代表例は、NM\_005417.3であり、その対応

10

20

30

40

50

するタンパク質は、NP\_005408.1である。

【0317】

mTOR (mechanistic target of rapamycin) (セリン／スレオニンキナーゼ)は、ホスファチジルイノシトールキナーゼ関連キナーゼのファミリーに属するタンパク質をコードする。これらのキナーゼは、DNA損傷および栄養枯渇などのストレスによる細胞対応を媒介する。このタンパク質は、FKBP12-ラパマイシン複合体の細胞周期停止および免疫抑制効果のための標的として作用する。ヒトmTOR転写物の代表例は、NM\_004958.3であり、その対応するタンパク質は、NP\_004949.1である。

【0318】

タンパク質キナーゼC (PKC) は、タンパク質上のセリンおよびスレオニンアミノ酸残基のヒドロキシル基のリン酸化を通して他のタンパク質の機能を制御することに関与する酵素のファミリーをコードする。PKC酵素は、次いで、ジアシルグリセロールまたはCa<sup>2+</sup>の濃度の増大などのシグナルにより活性化される。このように、PKC酵素は、いくつかのシグナル伝達経路において重要な役割を果たす。PKCファミリーは、約10種のアイソザイムからなる。それらは、それらのセカンドメッセンジャーの要件に基づいて、慣用的(古典的)、新規および非定型の3つのサブファミリーに分けられる。慣用的(c)PKCは、アイソフォーム、I、IIおよびを含む。これらは、活性化のためにCa<sup>2+</sup>、ジアシルグリセロール(DAG)およびホスファチジルセリンなどのリン脂質を必要とする。新規(n)PKCは、およびアイソフォームを含み、活性化のためにDAGを必要とするが、Ca<sup>2+</sup>は必要としない。したがって、慣用的および新規PKCは、ホスホリパーゼCと同じシグナル伝達経路を通して活性化される。一方、非定型(a)PKC(タンパク質キナーゼMおよび/アイソフォームを含む)は、活性化のためにCa<sup>2+</sup>もジアシルグリセロールも必要としない。用語「タンパク質キナーゼC」とは、アイソフォームのファミリー全体を指す。慣用的、新規および非定型PKC遺伝子のうちの任意の1または2以上のものが、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトPKC転写物の代表例は、NM\_005400.2であり、その対応するタンパク質は、NP\_005391.1である。

【0319】

BIRC5 (Baculoviral IAP repeat containing 5) (別名API4またはEPR-1)は、IAP (inhibitor of apoptosis) 遺伝子ファミリーのメンバーであり、アポトーシス細胞死を防止する負の調節タンパク質をコードする。IAPファミリーメンバーは、通常複数のバキュロウイルスIAPリピート(BIR)ドメインを含むが、この遺伝子は、単一のBIRドメインのみを有するタンパク質をコードする。コードされるタンパク質はまた、C末端RINGフィンガードメインを欠失する。遺伝子発現は、胎生期の発生の間におよび多くの腫瘍において高く、成体組織においてはまだ低い。アンチセンス転写物が、この遺伝子の発現の調節に関与する。この遺伝子について、区別し得るアイソフォームをコードする少なくとも4種の転写物バリエントが見出されており、それらの各々が、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトBIRC5転写物の代表例は、NM\_001012270.1であり、その対応するタンパク質は、NP\_001012270.1である。

【0320】

Fas (TNF受容体スーパーファミリー、メンバー6) (FAS、別名、APT1、CD95、FAS1、APO-1、FASTM、ALPS1AまたはTNFRSF6)は、TNF受容体スーパーファミリーのメンバーをコードする。この受容体は、デスドメインを含む。それは、プログラム細胞死の生理学的制御において中心的役割を果たすことが示されており、多様な悪性病変および免疫系の疾患の病態に関連付けられている。この受容体とそのリガンドとの相互作用は、Fas関連デスドメインタンパク質(FADD)、カスパーゼ8およびカスパーゼ10を含む、死を誘導するシグナル伝達複合体の形成を可能にする。複合体中のカスパーゼの自己タンパク質分解プロセッシングは、下流のカスパーゼカスケードを発動し、アポトーシスをもたらす。この受容体は、NF-カッパB、MAPK3/ERK1およびMAPK8/JNKを活性化することもまた示されており、正

10

20

30

40

50

常な二倍体線維芽細胞およびT細胞における増殖シグナルを伝達することに関与することが見出される。いくつかの選択的スプライシングされた転写物バリエントが記載されており、そのうちのいくつかは、ナンセンス変異依存mRNA分解（NMD：nonsense-mediated mRNA decay）のための候補である。膜貫通ドメインを欠失するアイソフォームは、全長アイソフォームにより媒介されるアポトーシスを負に制御し得る。各々の転写物バリエントが、sd-rxRNAの標的となり得る。いくつかの例において、sd-rxRNAの標的は、FADD、カスパーゼ8および/またはカスパーゼ10である。他の例において、sd-rxRNAの標的は、NF-カッパB、MAPK3/ERK1および/またはMAPK8/JNKである。ヒトBIRC5転写物の代表例は、NM\_001012270.1であり、その対応するタンパク質は、NP\_001012270.1である。

10

#### 【0321】

低酸素誘導因子1、アルファサブユニット（HIF1A）は、低下させた酸素分圧下において培養した哺乳動物細胞において見出される転写因子であり、低酸素に対する細胞および全身の恒常性応答において必須の役割を果たす。HIF1は、アルファサブユニットおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマーである。ベータサブユニットは、アリール炭化水素受容体核内輸送体（ARNT：aryl hydrocarbon nuclear translocator）として同定されている。この遺伝子は、HIF-1のベータサブユニットをコードする。この遺伝子の天然のアンチセンス転写物（aHIF）の過剰発現は、非乳頭状腎癌に関連することが示されている。異なるアイソフォームをコードする2種の選択的転写物が同定されている。各々の転写物バリエントおよび/または天然のアンチセンス転写物が、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトHIF1A転写物の代表例は、NM\_001530.3であり、その対応するタンパク質は、NP\_001521.1である。

20

#### 【0322】

カドヘリン16、KSP-カドヘリン（CDH16）は、カルシウム依存性の膜関連糖タンパク質をコードする遺伝子であるカドヘリンスーパーファミリーのメンバーである。以前に同定されている染色体16q22.1上のカドヘリン遺伝子のクラスターにマッピングされて、当該遺伝子は、スーパーファミリーメンバーCDH1、CDH3、CDH5、CDH8およびCDH11と共に局在する。タンパク質は、6個のカドヘリンドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通領域および切断型細胞質ドメインからなるが、多くの古典的カドヘリンに典型的なプロ配列およびトリペプチドHAV接着認識配列を欠失する。発現は、もっぱら腎臓において行われ、ここで、タンパク質は、ホモタイプ細胞認識の主要な調節因子として機能し、組織の発達の形態形成の方向において役割を果たす。区別し得るアイソフォームをコードする選択的スプライシングされた転写物バリエントが同定されており、それらの各々が、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトCDH16転写物の代表例は、NM\_004062.3であり、その対応するタンパク質は、NP\_004053.1である。

30

#### 【0323】

カテニン（カドヘリン関連タンパク質）、ベータ1（CTNNB1）は、接着結合（AJ）を構成するタンパク質の複合体の部分であるタンパク質をコードする。AJは、細胞増殖および細胞間の接着を制御することによる上皮細胞層の作製および維持のために必要である。コードされるタンパク質はまた、アクチン細胞骨格をアンカーし、上皮シートが完成した際に細胞に分裂を停止させる接触阻害シグナルを伝達する原因となり得る。このタンパク質は、APC遺伝子の産物に結合し、これは、結腸の腺腫性ポリポーシスにおいて変異している。この遺伝子における変異は、結腸直腸癌（CRC）、石灰化上皮腫（PTT）、髓芽腫（MDB）および卵巣癌の原因である。この遺伝子について、同じタンパク質をコードする3種の転写物バリエントが見出されており、それらの各々は、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトCTNNB1転写物の代表例は、NM\_001098209.1であり、その対応するタンパク質は、NP\_001091679.1である。

40

#### 【0324】

V-myc骨髄細胞腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ（MYC）は、細胞周期の進行、アポトーシスおよび細胞形質転換において役割を果たす多機能な核リンタンパク質をコード

50

する。それは、特異的な標的遺伝子の転写を制御する転写因子として機能する。この遺伝子の変異、過剰発現、再配列および転座は、多様な造血腫瘍、白血病およびバーキットリンパ腫を含むリンパ腫と関連付けられている。上流の、インフレームな非AUG (CUG) および下流のAUG開始部位からの代替的な翻訳開始は、区別し得るN末端を有する2種のアイソフォームの産生をもたらすことを示す証左が存在する。非AUG開始タンパク質の合成は、バーキットリンパ腫においては抑制され、このことは、この遺伝子の正常な機能におけるその重要性を示唆している。変異体バリエントを含む各々の転写物バリエントが、sd-rxRNAの標的となり得る。ヒトMYC転写物の代表例は、NM\_002467.4であり、その対応するタンパク質は、NP\_002458.2である。

## 【0325】

10

## 投与

本開示の側面は、本開示によって記載される製剤（例として、ゲル製剤、軟膏製剤、等々）の製剤の局所投与という驚くべき発見に関する。いくつかの態様において、本開示によって記載される製剤の投与は、治療用オリゴヌクレオチド（例として、sd-rxRNA）の対象の真皮への効果的な送達を媒介する。本明細書に使用される「投与」は、細胞をオリゴヌクレオチドに接触させることを指し、in vitroで、またはin vivoで実施され得る。標的核酸分子から翻訳されるタンパク質の発現を最適に減少させるために、オリゴヌクレオチドの投薬量は、例としてRNA安定性の読み出しによりまたは治療応答により測定されるものとして、過度の実験なしに調整されてもよい。

## 【0326】

20

例えば、核酸標的によりコードされるタンパク質の発現が測定され得、投薬レジメンがそれに従って調整される必要があるか否かを決定し得る。加えて、細胞におけるまたは細胞により産生されるRNAまたはタンパク質のレベルの増大または減少は、当該技術分野において認識されるいずれの技術をも使用して測定され得る。転写が減少したか否かを決定することにより、標的RNAの切断を誘導するまでのオリゴヌクレオチドの有効性が決定され得る。

## 【0327】

上記オリゴヌクレオチド組成物のいずれも、単独でまたは薬学的に許容し得るキャリアと組み合わせて、使用され得る。本明細書に使用される「薬学的に許容し得るキャリア」は、好適な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤などを含む。医薬活性物質のためのかかる媒体および剤は、当該技術分野において周知である。従来のいずれの媒体または剤が活性成分と適合しない場合を除いて、これは治療用組成物において使用され得る。補足の活性成分もまた、組成物中に組み込まれ得る。

30

## 【0328】

オリゴヌクレオチドは、非経口投与のために、リポソームもしくはポリエチレングリコールで修飾されたリポソーム中へ組み込んでも、または、カチオン性脂質と混和されてもよい。追加の物質、例えば特定の標的細胞上に見出される膜タンパク質に対して反応性の抗体の、リポソーム中への組み込みは、特異的な細胞型に対するオリゴヌクレオチドの標的化に役立ち得る。

## 【0329】

40

in vivoでの適用に関して、本開示の製剤は、患者へ、選択された投与の経路、例として非経口で、経口で、または腹腔内でのものに適応した多様な形態で投与され得る。非経口投与が好ましく、これは、以下の経路による投与を含む：静脈内；筋肉内；間質内（interstitially）；動脈内；皮下；眼内；滑膜内（intrasyновial）；経皮を含む経上皮；吸入を介した肺；眼（ophthalmic）；舌下および口腔内；眼（ophthalmic）を含む局所；経皮；眼（ocular）；直腸；ならびに送気を介した経鼻吸入。好ましい態様において、sd-rxRNA分子は、局所適用によって投与される。

## 【0330】

局所投与用の医薬製剤は、経皮貼付剤、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴下剤、スプレー、坐剤、液体または粉末を含む。加えて、従来の医薬用キャリア、水性、粉末ま

50

たは油性の基剤、または、増粘剤も、局所投与用の医薬製剤に使用されてもよい。

経粘膜または経皮投与用に、浸透すべき障壁に適切な浸透剤(penetrant)が、製剤中に使用される。かかる浸透剤は当該技術分野において知られており、例えば、経粘膜投与用に、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体ならびに界面活性剤を包含する。経粘膜投与は、鼻用スプレーを通して、または、坐剤を使用するものであってもよい。経口投与用に、オリゴヌクレオチドが、カプセル、錠剤およびトニックなどの従来の経口投与形態中へ製剤化される。局所投与用に、本発明のオリゴヌクレオチドが、当該技術分野において知られている軟膏(ointment)、軟膏(salve)、ゲルまたはクリームへと製剤化される。

#### 【0331】

選ばれた送達方法は、いくつかの態様において、細胞中へのオリゴヌクレオチドの侵入をもたらす。いくつかの態様において、好ましい送達方法は、リポソーム(10~400nm)、ハイドロゲル、制御放出ポリマーおよび他の薬学的に適用可能なビヒクルならびにマイクロインジェクションまたはエレクトロポレーション(ex vivoでの処置のため)を包含する。

10

#### 【0332】

本発明の医薬製剤は、乳液として調製され製剤化されてもよい。乳液は通常、1つの液体が別の液体中に通常は直径0.1μmを超える液滴の形態で分散した、均質な系である。本発明の乳液は、乳化剤、安定化剤、色素、脂質、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存剤などの賦形剤を含有してもよく、抗酸化剤もまた、必要に応じて乳液中に存在してもよい。賦形剤は、水相、油相またはそれ自体が別の相として、溶液として存在してもよい。

20

#### 【0333】

本発明の乳液製剤に使用されてもよい天然に存在する乳化剤の例は、ラノリン、ミツロウ、リン脂質、レシチンおよびアカシアを包含する。微細に分割された固体もまた、特に界面活性剤と組み合わせて、粘性の製剤において、良好な乳化剤として使用されてきた。乳化剤として使用されてもよい微細に分割された固体は、重金属水酸化物などの極性無機固体、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウムおよびコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウムなどの非膨潤性粘土、顔料ならびに炭素またはステアリン酸グリセリルなどの非極性固体を包含する。

30

#### 【0334】

乳液製剤に包含されてもよい保存剤の例は、メチルパラベン、プロピルパラベン、4級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルおよびホウ酸を包含する。乳液製剤に包含されてもよい抗酸化剤の例は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンなどのフリーラジカルスカベンジャーまたはアスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤ならびにクエン酸、酒石酸およびレシチンなどの抗酸化剤補助剤(antioxidant synergist)を包含する。

#### 【0335】

一態様において、オリゴヌクレオチドの組成物は、マイクロエマルジョン(microemulsion)として製剤化される。マイクロエマルジョンは、水、油および両親媒性物質の系であって、単一の光学的等方性および熱力学的安定性の溶液である。典型的には、マイクロエマルジョンは、第1に油を水性界面活性剤溶液中に分散させ、次いで、透明な系を形成するために、充分な量の第4の成分、一般的には中程度の鎖長のアルコールを加えることにより調製される。

40

マイクロエマルジョンの調製において使用されてもよい界面活性剤は、これらに限定されないが、単独でまたは共界面活性剤(cosurfactant)と組み合せでの、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル類、テトラグリセロールモノラウラート(ML310)、テトラグリセロールモノオレアート(MO310)、ヘキサグリセロールモノオレアート(P

50

0310)、ヘキサグリセロールペントオレアート(PO500)、デカグリセロールモノカブラーート(MCA750)、デカグリセロールモノオレアート(MO750)、デカグリセロールセキオレアート(S0750)、デカグリセロールデカオレアート(DA0750)を包含する。共界面活性剤、通常はエタノール、1-プロパノールおよび1-ブタノールなどの短鎖アルコールは、界面活性剤のフィルム中に浸透して、その後、界面活性剤分子の間で生み出される空隙のために不規則なフィルムを作り出すことにより、界面の流動性を増大させるのに役立つ。

#### 【0336】

しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用なしで調製されてもよく、アルコールを含まない自己乳化マイクロエマルジョン系が、当該技術分野において知られている。水相は、典型的には、これらに限定されないが、水、薬物の水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコールおよびエチレングリコールの誘導体であってもよい。油相は、これらに限定されないが、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル類、中鎖(C<sub>8</sub>~C<sub>12</sub>)モノ、ジおよびトリ-グリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル類、脂肪アルコール類、ポリグリコール化(polyglycolized)グリセリド、飽和ポリグリコール化C<sub>8</sub>~C<sub>10</sub>グリセリド、植物油およびシリコーン油などの材料を包含してもよい。

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化および増強された薬物の吸収の観点から特に関心がある。脂質ベースのマイクロエマルジョン(油/水および水/油の両方)が、薬物の経口でのバイオアベイラビリティーを増強するために提案されている。

#### 【0337】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化の改善、酵素による加水分解からの薬物の保護、界面活性剤により誘導される膜の流動性および透過性の変化に起因する薬物吸収の増強の可能性、調製の容易性、固体投与形態と比べた経口投与の容易性、臨床的効力の改善ならびに毒性の低減を与える(Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11:1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85:138-143)。マイクロエマルジョンはまた、化粧品および医薬適用の両方における、活性成分の経皮送達においても有効であった。本発明のマイクロエマルジョンの組成物および製剤は、胃腸管からのオリゴヌクレオチドの全身吸収の増大を促進し、ならびに、胃腸管、腎、口腔および他の投与の領域内における、オリゴヌクレオチドの局所的な細胞による取り込みを改善することが予測される。

#### 【0338】

一態様において、本開示は、核酸、特にオリゴヌクレオチドの、動物の皮膚への効率的な送達に影響を与える多様な(例として、1以上の)浸透増強剤を含む製剤に関する。越えるべき膜を浸透増強剤で処置した場合、非親油性薬物すら、細胞膜を越えることができる。細胞膜を越える非親油性薬物の拡散を増大することに加えて、浸透増強剤はまた、親油性薬物の浸透性を増強するようにも作用する。

#### 【0339】

本開示によって記載される製剤において、使用されてもよい5種のカテゴリーの浸透増強剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤および非キレート性非界面活性剤を包含する。投与されるオリゴヌクレオチドの浸透を増強するために利用されてもよい他の剤は、エチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのグリコール類、2-15ピロールなどのピロール類、アゾン類、リモネンなどのテルペン類ならびにメントンを包含する。

#### 【0340】

オリゴヌクレオチド、特に脂質製剤中のものはまた、医療用デバイス、例えば血管形成バルーンカテーテルなどのカテーテルを、カチオン性脂質製剤によりコーティングすることによっても投与され得る。コーティングは、例えば脂質製剤または脂質製剤と、好適な溶媒、例えば水をベースとする緩衝液、水性溶媒、エタノール、塩化メチレン、クロロフオルムなど、との混合物中に、医療用デバイスを浸漬することにより、達成されてもよい

10

20

30

40

50

。一定量の製剤がデバイスの表面に自然に接着し、デバイスがその後適宜患者へ投与される。代わりに、脂質製剤の凍結乾燥混合物は、デバイスの表面に特異的に結合されてもよい。かかる結合技術は、例えばK. Ishihara et al., *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 27, pp. 1309-1314 (1993)に記載され、その開示は、本明細書においてその全体を参考として組み込まれる。

#### 【0341】

投与されるべき有用な投薬量および特定の投与の形態は、細胞型、*in vivo*での使用については年齢、体重および特定の動物および処置されるべきその領域、使用される特定のオリゴヌクレオチドおよび送達方法、企図される治療および診断用途ならびに製剤の形態、例えば懸濁液、乳液、ミセルまたはリポソームなどの要因に依存して変動し、このことは当業者に容易に明らかであろう。典型的には、投薬量は、より低い量で投与され、所望の結果が達成されるまで増加させられる。オリゴヌクレオチドを送達するために脂質が使用されるとき、投与される脂質化合物の量は変化し得、一般に、投与されているオリゴヌクレオチド剤の量に依存する。例えば、脂質化合物のオリゴヌクレオチド剤に対する重量比は、好ましくは約1:1から約15:1までであり、約5:1～約10:1の重量比がより好ましい。一般に、投与されるカチオン性脂質化合物の量は、約0.1ミリグラム(mg)～約1グラム(g)まで変化する。一般的なガイダンスのために、典型的には、患者の体重の各1kg毎に約0.1mg～約10mgの特定のオリゴヌクレオチド剤および約1mg～約100mgの脂質組成物が投与されるが、より高いおよびより低い量も使用され得る。

10

#### 【0342】

本開示の剤は、医薬の投与に好適な生物学的に適合性の形態で、対象へ投与されるか、または、細胞と接触させられる。「投与に好適な生物学的に適合性の形態」は、オリゴヌクレオチドの治療効果があらゆる毒性効果を凌ぐ形態で、オリゴヌクレオチドが投与されることを意味する。一態様において、オリゴヌクレオチドは、対象へ投与される。対象の例は、哺乳動物、例としてヒトおよび他の靈長類；ウシ、ブタ、ウマおよび農耕(farming) (農業(agricultural))用動物；イヌ、ネコおよび他の家庭のペット；マウス、ラットおよびトランスジェニック非ヒト動物を包含する。

20

#### 【0343】

本開示のオリゴヌクレオチドの活性量の投与は、所望の結果を達成するために必要な投与量および時間において、有効量として定義される。例えば、オリゴヌクレオチドの活性量は、細胞の型、使用されるオリゴヌクレオチド、ならびに、*in vivo*での使用については疾患の状態、個体の年齢、性別および体重、ならびに、個体において所望の応答を惹起するオリゴヌクレオチドの能力などの因子に従って変動してもよい。細胞中のオリゴヌクレオチドの治療的レベルの確立は、取り込みの速度と流出または分解の速度に依存する。分解の度合いを低下させることは、オリゴヌクレオチドの細胞内半減期を延長する。よって、化学修飾されたオリゴヌクレオチド、例としてリン酸骨格の修飾を持つものは、異なる用量を必要とする場合がある。

30

#### 【0344】

正確なオリゴヌクレオチドの投薬量および投与される用量の回数は、実験的および臨床試験において生み出されるデータに依存するであろう。所望の効果、送達ビヒクル、疾患の兆候および投与の経路などの幾つかの因子が、投薬量に影響を与えるであろう。投薬量は当業者により容易に決定され得、対象とする医薬組成物中へ製剤化される。好ましくは、処置の期間は、少なくとも疾患の症状の経過全体に及ぶであろう。

40

#### 【0345】

投薬レジメンは、最適な治療応答を提供するために調整されてもよい。例えば、オリゴヌクレオチドは、繰り返して投与されてもよく、例として数回の用量が毎日投与してもよく、または、その用量が、治療状況の要件に従って比例的に低減させてもよい。オリゴヌクレオチドが細胞へ投与されるかまたは対象へ投与されるかに関わらず、当業者は、対象とするオリゴヌクレオチドの適切な用量および投与のスケジュールを容易に決定すること

50

ができるであろう。

【0346】

s d - r x R N A の、局所適用を通じた投与は、投薬レジメンの試験を通して最適化され得る。いくつかの態様において、単回投与で充分である。投与された s d - r x R N A の効果をさらに延長するために、 s d - r x R N A は、当業者が精通しているとおり、遅延放出製剤またはデバイスにおいて投与され得る。 s d - r x R N A 化合物の疎水性の性質により、広範で多様なポリマーの使用が可能となり、これらのいくつかは、従来のオリゴヌクレオチド送達に適合しない。

【0347】

他の態様において、 s d - r x R N A は複数回投与される。いくつかの態様において、これは、毎日、週2回、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、2カ月毎、3カ月毎、4カ月毎、5カ月毎、6カ月毎または6カ月に1回未満、投与される。いくつかの例において、これは、1日、1週間、1カ月および/または1年に複数回投与される。例えば、これは、およそ1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、12時間または12時間を超えてから1回、投与される。これは、毎日1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または10回を超えた回数、投与され得る。

10

【0348】

本開示の側面は、 s d - r x R N A 分子を対象へ投与することに関する。いくつかの例において、対象は患者であり、 s d - r x R N A 分子の投与には、 s d - r x R N A 分子を医院で投与することが関与する。

20

【0349】

いくつかの態様において、1種より多くの s d - r x R N A 分子が同時に投与される。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種または10種より多くの異なる s d - r x R N A 分子を含む組成物が投与されてもよい。ある態様において、組成物は2または3種の異なる s d - r x R N A 分子を含む。組成物が1種より多くの s d - r x R N A 分子を含むとき、組成物中の s d - r x R N A 分子は、同一の遺伝子または異なる遺伝子に指向し得る。

【0350】

いくつかの例において、局所投与により送達される s d - r x R N A の有効量は、少なくともおよそ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、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、100 mg / kg または100 mg / kg より多く、全ての中間の値を含む。

30

いくつかの例において、局所適用により送達される s d - r x R N A の有効量は、少なくとも約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950  $\mu$  g または950  $\mu$  g より多く、全ての中間の値を含む。

40

本明細書に記載の方法により投与される s d - r x R N A 分子は、皮膚の全ての細胞型に対して効率的に標的化される。好みの態様において、本明細書に記載の方法を通して投与される s d - r x R N A 分子は、対象の皮膚の皮膚層（例として、真皮の）へ、効果的に標的化され得る。

【0351】

細胞または非ヒト生物、特にヒト細胞または非ヒト哺乳動物の遺伝子特異的ノックアウト

50

トまたはノックダウン表現型は、処理の分析 (analytic to procedures) において、例として遺伝子発現プロフィールおよび / またはプロテオームの分析などの複雑な生理学的プロセスの機能的および / または表現型的分析において、使用されてもよい。好ましくは、分析は、オリゴヌクレオチドベースのチップを使用するハイスループット法により行われる。

#### 【 0 3 5 2 】

##### 治療的使用

いくつかの態様において、本開示のオリゴヌクレオチド組成物は、遺伝子の発現を阻害することにより、タンパク質の発現が関与する任意の疾患を処置するために使用することができる。オリゴヌクレオチド組成物により処置することができる疾患の例として、単に説明するために、がん、網膜症、自己免疫疾患、炎症性疾患（すなわち、I C A M - 1 関連障害、乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病）、ウイルス疾患（すなわち、H I V、C型肝炎）、m i R N A 障害および心血管性疾患が挙げられる。

10

#### 【 0 3 5 3 】

一態様において、オリゴヌクレオチドによる*in vitro*での細胞の処置を、対象から取り除かれた細胞の*ex vivo*での治療のため（例として白血病またはウイルス感染の処置のため）、または、対象に由来しないが対象へ投与される予定の細胞の処置のため（例として対象へ移植される予定の細胞における移植抗原の発現の除去）に使用することができる。加えて、*in vitro*での細胞の処置を、非治療的セッティングにおいて、例として遺伝子の機能を評価するため、遺伝子の調節およびタンパク質合成を研究するため、または、遺伝子発現またはタンパク質合成を調節するように設計されたオリゴヌクレオチドに対して行われた改善を評価するために、使用することができる。*in vivo*での細胞の処置は、タンパク質の発現を阻害することが望ましい特定の臨床的セッティングにおいて有用であり得る。アンチセンス治療が好適であることが報告されている多数の医療条件（例として米国特許第5,830,653号を参照）ならびに呼吸器多核体ウイルス感染症（WO 95/22,553）、インフルエンザウイルス（WO 94/23,028）および悪性腫瘍（WO 94/08,003）が存在する。アンチセンス配列の臨床的使用の他の例は、例としてGlaser. 1996. Genetic Engineering News 16:1において概説される。オリゴヌクレオチドによる切断のための例示的な標的は、例としてタンパクキナーゼC a、I C A M - 1、c - r a f キナーゼ、p 5 3、c - m y b および慢性骨髓性白血病において見出されるb c r / a b 1 融合遺伝子を包含する。

20

#### 【 0 3 5 4 】

対象とする核酸は、ヒト、非ヒト霊長類、非ヒト哺乳動物、非ヒト脊椎動物、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、ウサギなど）、家畜動物、ペット（ネコ、イヌなど）、ツメガエル、魚類、昆虫（ショウジョウバエなど）および線虫（*C. elegans*）などのR N A i 経路を有する任意の動物において、R N A i に基づく治療に使用することができる。

いくつかの側面において、本開示は、対象へ治療剤（例としてR N A i 剤またはこれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）を投与することにより、対象において、異常なまたは望ましくない標的遺伝子の発現または活性に関連する疾患または状態を予防するための方法を提供する。適切である場合、対象をはじめに、続くR N A i 治療に対してより応答性となるように、プライミング剤により処置する。異常な、または望ましくない標的遺伝子の発現または活性により引き起こされるかこれが寄与する疾患についてのリスクを有する対象は、例えば本明細書に記載の診断または予後診断アッセイのいずれかまたは任意の組み合わせにより同定することができる。予防剤の投与は、疾患または障害が予防されるように、標的遺伝子の異常の特徴である症状の顕在化に先だって行われても、あるいは、その進行において遅れて行われてもよい。標的遺伝子の異常の型に依存して、例えば標的遺伝子、標的遺伝子アゴニストまたは標的遺伝子アンタゴニスト剤を、対象を処置するために使用することができる。

30

#### 【 0 3 5 5 】

別の側面において、本開示は、治療を目的として、標的遺伝子発現、タンパク質の発現

40

50

または活性を調節するための方法に関する。したがって、例示的な態様において、本開示に記載される調節方法は、標的遺伝子を発現することができる細胞を、標的遺伝子またはタンパク質に対して特異的な（例として前記遺伝子によりコードされるmRNAに対して特異的な、たは前記タンパク質のアミノ酸配列を特定する）本開示の治療剤と、標的タンパク質の発現または1以上の活性が調節されるように、接触させることを含む。これらの調節方法は、in vitroで（例として細胞を剤とともに培養することにより）、in vivoで（例として剤を対象へ投与することにより）、または、ex vivoで行うことができる。典型的には、対象をはじめに、続くRNAi治療に対してより応答性になるように、プライミング剤で処置する。したがって、本開示は、標的遺伝子のポリペプチドまたは核酸分子の異常なまたは望ましくない発現または活性により特徴づけられる疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。標的遺伝子の活性の阻害は、標的遺伝子が異常に制御されていないか、および／または、低下した標的遺伝子の活性が有益な効果を有する可能性がある状況において望ましい。

#### 【0356】

本開示の治療剤は、異常なまたは望ましくない標的遺伝子の活性に関連する障害を処置（予防的または治療的に）するために、個体に投与することができる。かかる処置と組み合わせて、薬理ゲノミクス（すなわち、個体のジェノタイプと外来化合物または薬物に対する個体の応答との間の関係の研究）を考慮する。治療剤の代謝における差異は、薬理学的に活性な薬物の用量と血中濃度の間の関係を変化させることにより、重篤な毒性または治療の失敗をもたらす可能性がある。したがって、医師または臨床医は、治療剤を投与するか否かを決定する上で、ならびに、投薬量および／または治療剤による処置の治療レジメンを調整する上で、関連する薬理ゲノミクス研究において得られる知識を適用することを考慮してもよい。薬理ゲノミクスは、罹患個体における薬物の体内処理(disposition)および異常作用の変化に起因する、薬物に対する応答における臨床的に重要な遺伝的バリエーションに対処する。例えば、Eichelbaum, M. et al. (1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10-11): 983-985およびLinder, M. W. et al. (1997) Clin. Chem. 43(2):254-266を参照。

#### 【0357】

皮膚への適応におけるRNAi

本明細書において記載される核酸分子または核酸分子を含む組成物は、いくつかの態様において、機能低下した皮膚を、予め処置するか、処置するか、または、予防するために投与される。本明細書に使用される「機能低下した皮膚」は、正常な皮膚から区別される特徴を示す皮膚を指す。機能低下した皮膚は、皮膚科学的状態と関連して生じ得る。皮膚科学的状態の幾つかの非限定的な例として、酒さ(rosacea)、一般的な挫瘍、脂漏性皮膚炎、口囲皮膚炎、挫瘍様発疹、一過性棘融解性皮膚症(transient acantholytic dermatosis)および粟粒状壞死性挫瘍(acne necrotica miliaris)が挙げられる。いくつかの例において、機能低下した皮膚は、創傷および／または瘢痕組織を含み得る。いくつかの例において、本開示に関連する方法および組成物は、創傷の治癒、瘢痕形成の予防、低減もしくは阻害、および／または、創傷の再上皮形成の促進のために使用することができる。

#### 【0358】

対象を、対象の皮膚が機能低下を起こす前に、本開示に関連する分子により予め処置するかまたは予防的に処置してもよい。本明細書に使用される「予めの処置」または「予防的処置」は、皮膚が機能低下を起こす前に核酸を皮膚へ投与することを指す。例えば、対象を、皮膚が機能低下を起こすより15分間、30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、24時間、48時間、3日、4日、5日、6日、7日、8日もしくは8日以上前に、予め処置してもよい。他の態様において、対象を、本開示に関連する分子で、皮膚が機能低下を起こす直前に、および／または、皮膚が機能低下を起こすと同時に、および／または、皮膚が機能低下を起こした後に、処置してもよい。いくつかの態様において、皮膚は、待機的手術を含む外科手術などの医療処置によって、機能低下を起こす。ある態様において、方法

10

20

30

40

50

および組成物を、機能低下を起こすリスクがあると考えられる皮膚の領域に適用することができる。当業者は、慣用的な実験のみを用いて、投与のタイミングを最適化することができる事が理解されるべきである。

【0359】

いくつかの側面において、本開示に関連する方法を、機能低下した皮膚の治癒を促進させるために適用することができる。投与は、機能低下した皮膚機能低下した皮膚が部分的に既に治癒していたとしても、機能低下した皮膚が治癒するまでの任意の時間に、行うことができる。投与のタイミングは、機能低下した皮膚の性質、機能低下した皮膚内の損傷の程度および機能低下した領域のサイズを含む、幾つかの因子に依存し得る。いくつかの態様において、投与は、皮膚が機能低下を起こした直後、または、30分間、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、48時間もしくは48時間より後（例として、3日、4日、5日、6日、7日、10日、14日、等々）に、行ってもよい。本発明の方法および組成物を、必要に応じて、1以上の回数で投与してもよい。例えば、いくつかの態様において、組成物を、1日1回または1日2回投与してもよい。いくつかの例において、組成物を、機能低下した皮膚の形成の前および後の両方において投与してもよい。

【0360】

本開示に関連する組成物は、任意の好適な経路により投与することができる。いくつかの態様において、投与は、機能低下した皮膚の領域において局所的に行われる。いくつかの態様において、組成物は、局所用形態において、例えばクリームまたは軟膏などにおいて、投与してもよい。いくつかの態様において、本明細書に記載の組成物の投与は、機能低下した皮膚の最初の処置または予めの処置の一部を含むが、一方、他の態様においては、かかる組成物の投与は、機能低下した皮膚の領域に対するフォローアップ治療を含む。

【0361】

適用されるべき組成物または医薬の適切な量は、当業者により慣用的な実験を通して決定することができる多数の異なる因子に依存し得る。考慮され得る幾つかの非限定的な因子として、剤の生物学的活性およびバイオアベイラビリティー、剤の性質、投与の形態、半減期および処置される対象の特徴が挙げられる。

いくつかの側面において、本開示に関連する核酸分子はまた、肺線維症（pulmonary fibrosis）、肝硬変、強皮症および糸球体腎炎、肺線維症（lung fibrosis）、肝線維症、皮膚線維症、筋線維症、放射線線維症、腎線維症、増殖性硝子体網膜症および子宮線維症を含む、線維性障害の処置および/または予防において使用されてもよい。

【0362】

本明細書に記載の核酸分子の治療有効量は、いくつかの態様において、機能低下した皮膚の形成を予防する、および/または、機能低下した皮膚の状態を改善するのに充分な量である。いくつかの態様において、機能低下した皮膚の状態の改善は、創傷の治癒の促進および/または瘢痕形成の阻害および/または上皮の再生の促進に対応する。機能低下した皮膚の形成の予防および/または機能低下した皮膚の状態に対する改善の程度は、いくつかの例において、例えば医師または臨床医により決定される。

本開示に関連する核酸分子が機能低下した皮膚の形成を予防するおよび/または機能低下した皮膚の状態を改善する能力は、いくつかの例において、皮膚により示される特性を参照して測定することができる。いくつかの例において、これらの特性として、対照の皮膚と比較した、比較可能な時点における、上皮化の速度および/または機能低下した皮膚の領域のサイズの減少が挙げられる。

【0363】

本明細書に使用される、例えば外科術式の前の機能低下した皮膚の形成の予防、および/または、例えば外科術式の後の機能低下した皮膚の状態の改善は、対照試料において生じる治癒の速度と比較しての、機能低下皮膚における治癒の速度のあらゆる増大を包含し得る。いくつかの例において、機能低下した皮膚の状態は、処置された皮膚と対照の皮膚とにおいて達成された再上皮形成の速度の比較、または、処置された機能低下した皮膚

10

20

30

40

50

の領域と対照の機能低下した皮膚の領域との相対的面積の比較可能な時点における比較の、いずれかに関して評価することができる。いくつかの側面において、機能低下した皮膚の形成を予防するかまたは機能低下した皮膚の治癒を促進する分子は、投与の後で、機能低下した皮膚の領域に、比較可能な時点において対照と比較して、再上皮形成の速度の増大および／または機能低下した皮膚のサイズの減少を示させる分子であり得る。いくつかの態様において、機能低下した皮膚の治癒は、対照において生じる速度よりも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % または 100 % 高い治癒の速度を生じる。

#### 【0364】

いくつかの側面において、本開示に関連する方法および組成物により処置される対象は、外科手術などの医療処置を経験することになっているか、経験しているか、または、既に経験した対象である。いくつかの態様において、対象は、高齢者における皮膚の創傷など、再上皮形成に欠陥があるか、遅延しているか、または、他に障害を有する傾向を有し得る。創傷の治癒が、遅延した再上皮形成または他に障害を有する再上皮形成に関連する、状態または障害の他の非限定的な例として、糖尿病を罹患する患者、多剤併用中の患者、閉経後の女性、圧力傷害 (pressure injury) に対して感受性の患者、血管性疾患有する患者、臨床的に肥満の患者、化学療法を受けている患者、放射線治療を受けている患者、ステロイド処置を受けている患者、および、免疫無防備状態の患者が挙げられる。いくつかの例において、欠陥のある再上皮形成応答は、創傷部位における感染および潰瘍などの慢性創傷の形成の原因となり得る。

10

#### 【0365】

いくつかの態様において、本開示に関連する方法は、潰瘍などの慢性創傷において機能低下した皮膚の再上皮形成を促進し得、また、創傷の治癒に関連する瘢痕形成を阻害し得る。他の態様において、本開示に関連する方法は、慢性創傷に発達する、創傷の治癒に障害を有する素因を有する患者における急性創傷において、機能低下した皮膚の予防または処置のために適用される。他の側面において、本開示に関連する方法は、一般的な臨床の意味における使用のために、瘢痕形成を予防、低減または阻害しつつ、機能低下した皮膚の治癒の加速を促進するために、適用される。いくつかの側面において、これは、外科手術の切開の処置を含み得、かかる方法の適用は、さもなくばかかる治癒に際して生じ得る瘢痕形成の予防、低減または阻害をもたらし得る。かかる処置は、瘢痕を、より目立たなく、より正常な皮膚構造の再生を示すようにし得る。他の態様において、処置される機能低下した皮膚は、外科手術による切開により引き起こされる機能低下した皮膚ではない。機能低下した皮膚は、再上皮形成および治癒を促進するために、継続的治療および医薬の継続的適用に供される。

20

30

#### 【0366】

いくつかの側面において、本開示に関連する方法を、移植術に関連する機能低下した皮膚の処置において用いてもよい。これは、移植ドナー部位および／または移植レシピエント部位の処置を含み得る。移植は、いくつかの態様において、皮膚、人工皮膚または皮膚の代わりを含み得る。本発明に関連する方法はまた、上皮の再生を促進するために用いてもよい。本明細書において用いられる場合、上皮の再生の促進とは、対照処置されたまたは無処置の上皮において起こる再生と比較した場合の、上皮の再生の速度のあらゆる増加を包含する。得られた上皮の再生の速度は、いくつかの例において、当該技術分野において知られている任意の好適な上皮の再生のモデルを用いて、対照処置されたまたは無処置の上皮において起こるものと比較することができる。上皮の再生の促進は、再上皮形成応答が損なわれているか、阻害されているか、遅延しているか、または、他に欠陥がある場合において、有効な再上皮化を誘導するために役立ち得る。上皮の再生の促進はまた、上皮損傷を罹患する患者において、欠陥があるかまたは正常な上皮の再生応答の速度を加速するために達成してもよい。

40

#### 【0367】

再上皮形成応答が欠陥を有し得るいくつかの例は、天疱瘡、ヘイリー・ヘイリー病（家

50

族性良性天疱瘡)、中毒性表皮壊死症(TEN) / ライエル症候群、表皮水疱症、皮膚リューシュマニア症および日光角化症などの状態を含む。肺の再上皮化の欠陥は、特発性肺線維症(IPF)または間質性肺疾患に関連し得る。眼の再上皮化の欠陥は、部分角膜縁幹細胞欠乏症(partial limbal stem cell deficiency)または角膜糜爛などの状態に関連し得る。胃腸管または結腸の再上皮形成の欠陥は、慢性肛門裂傷(肛裂)、潰瘍性大腸炎またはクローン病および他の炎症性大腸障害などの状態に関連し得る。

#### 【0368】

いくつかの側面において、本開示に関連する方法は、瘢痕形成に関連する機能低下した皮膚を予防、低減あるいは阻害するために用いられる。これは、皮膚、眼、神経、腱、靭帯、筋肉および口腔(唇および口蓋を含む)ならびに内臓(肝臓、心臓、脳、腹腔、骨盤腔、胸腔、腸および生殖組織など)を含む、体内の任意の部位および任意の組織または器官に適用することができる。皮膚において、処置は、コラーゲン線維の形態および組織化を変化し得、結果として、瘢痕をより目立たなく、周囲の皮膚と混ざった状態にし得る。本明細書において用いられる場合、瘢痕形成の予防、低減または阻害は、対照処置されたまたは無処置の創傷において生じ得る瘢痕形成のレベルと比較した場合の、あらゆる程度の瘢痕形成における予防、低減または阻害を包含する。

皮膚の瘢痕形成と関連する機能低下した皮膚などの、機能低下した皮膚の予防、低減または阻害は、顕微鏡的および/または肉眼での特徴を参照して評価および/または測定することができる。肉眼での特徴として、皮膚の色、高さ、表面のテクスチャおよび固さが挙げられ得る。いくつかの例において、機能低下した皮膚の予防、低減または阻害は、皮膚の色、高さ、表面のテクスチャおよび固さが、処置の後で、無処置の対照よりも緊密に正常な皮膚のものと類似する場合に、実証することができる。機能低下した皮膚の顕微鏡的評価は、細胞外マトリックス(ECM)線維の厚みおよび/または方向および/または組成、ならびに、機能低下した皮膚の細胞充実性(cellularity)を試験することを含み得る。いくつかの例において、機能低下した皮膚の予防、低減または阻害は、細胞外マトリックス(ECM)線維の厚みおよび/または方向および/または組成、ならびに、機能低下した皮膚の細胞充実性が、処置の後で、無処置の対照よりも緊密に、正常な皮膚のものと類似する場合に、実証することができる。

#### 【0369】

いくつかの側面において、本開示に関連する方法は、少なくとも部分的に機能低下した皮膚の美容的外観を改善することに寄与するために、美容目的のために用いられる。いくつかの態様において、本開示に関連する方法は、身体の関節を覆う創傷の瘢痕形成などの機能低下した皮膚を予防、低減または阻害するために用いてもよい。他の態様において、本開示に関連する方法は、収縮性の瘢痕を形成するかまたは皮膚の張力が高い部位に創傷が位置するリスクが増大している場合に、創傷の治癒の加速を促進する、および/または、創傷の瘢痕形成を予防、低減または阻害するために、用いてもよい。

いくつかの態様において、本開示に関連する方法は、正常な瘢痕形成よりも顕著な有害効果を有し得る肥厚性瘢痕およびケロイドなどの異常な瘢痕形成のリスクが高い例において、機能低下した皮膚の治癒を促進するために適用することができる。いくつかの態様において、機能低下皮膚の治癒の加速を促進するおよび/または瘢痕形成を予防、低減または阻害するための本明細書に記載の方法は、異常な瘢痕の修正手術によりもたらされる機能低下した皮膚に適用される。

#### 【0370】

本開示の側面は、熱傷により引き起こされる機能低下した皮膚に関する。熱傷に対する応答における治癒は、肥厚性瘢痕の形成を含む有害な瘢痕形成をもたらし得る。本開示に関連する方法は、表皮が損傷を受ける皮膚への傷害などの、上皮層に対する損傷を含む全ての傷害の処置のために適用することができる。他の非限定的な上皮組織への傷害の例として、呼吸上皮、消化器系上皮(digestive epithelia)または内部組織もしくは器官の周囲の上皮に関する傷害が挙げられる。

#### 【0371】

10

20

30

40

50

本開示は、以下の例によってさらに例示されるが、これらは決して、さらに限定するものとして解釈されるべきではない。本出願を通して引用された全ての参考資料（参考文献、交付済み特許、公開された特許出願および同時係属の特許出願を含む）の全体の内容は、参考としてここに明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0372】

例1：局所ゲル製剤におけるsd-rxRNAの製剤

Map4k4を標的とするsd-rxRNA(1.2%w/w)は、10%尿素、5%乳酸およびそれらが100%となるまでの水の中で製剤化された。製剤を調製するためには、適切な体積のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)へ追加し、および尿素が完全に溶解するまで反転することによって、混合した。乳酸を追加しおよび溶液をボルテックスし、混合した。pHを所望されるレベルまで、10N NaOHを使用して調整した。メチルセルロース(MC)を追加し、および溶液を85℃へ加熱し、メチルセルロースを溶解し、ボルテックスし混合した。溶液を室温へ冷却しておいた。sd-rxRNA溶液を標的とするMap4k4を追加しおよび最終溶液をボルテックスし、および使用まで4℃において保存した。Map4k4を標的とする製剤の1つの例を、下の表10において記載した。

【表10】

表10：製剤の例

成分	%, w/w
PBS (1X)	82.8
尿素	10.00
乳酸	5.00
メチルセルロース	1.00
Map4k4を標的とするsd-rxRNA	1.20
残存する水/pHの調整 (10N NaOH)	100%までの十分量

10

20

【0373】

例2：ex-vivoブタ皮膚移植片モデルにおけるsd-rxRNAの取り込み

尿素および乳酸（例として、1.2%Map4k4 sd-rxRNA、10%尿素、5%乳酸；w/w）に含むゲルにおいて蛍光ラベル付けされたsd-rxRNAを含む製剤を、ブタの耳外植片皮膚（Yorkshire pigs）へトランズウェルインサート（transwell insert）の中に48時間局所的に適用し、sd-rxRNAの表皮および真皮の中への吸収について試験した。簡単に述べると、ブタ移植片皮膚を、Cetaphil Gentle Skin Cleanserおよび温水で洗浄し、次いで、プロットし乾燥した。生検のパンチ（各8mm）を、皮膚から採り、およびトランズウェルインサートの中へ配置した。エッジを、真空グリースによって封着した。インサートを、ガーゼおよび～4mLの完全なイーグル最小必須培地（EMEM）を含有する6ウェルデッショのウェルの中へ配置した。製剤の15μLを、各皮膚試料の上部へ追加した。培地を、1日当たり2回変えた。局所適用に続いて48時間、皮膚を、製剤を取り除くためにPBSですすぎ、および次いで4%パラホルムアルデヒドへ移動した。固定化の後、皮膚を処理し、ブロックしおよび切片を切った。蛍光造影を、蛍光ラベル付けされたsd-rxRNAの細胞による取り込みおよび局所化を検出することに使用した。核もまた染色された。角質層の染色を、PBS中で製剤化されたsd-rxRNAについて観察し（図1）、一方、皮膚の表皮層の染色を、尿素および乳酸を含むゲルにおいて製剤化されたsd-rxRNAについて観察した（図1）。

30

40

【0374】

例3：増粘剤およびex vivoブタ皮膚外植片モデルにおけるゲル組成物のpHを変動することのsd-rxRNAの取り込みへの効果

50

メチルセルロース (M C ; 1 % w / w ) およびヒドロキシプロピルセルロース (H P C ; 1 % w / w ) などの異なる製剤の増粘剤の効果、および製剤の pH レベルの効果を、尿素および乳酸 (例として、1 . 2 % M a p 4 k 4 s d - r x R N A 、 1 0 % 尿素、 5 % 乳酸 ; w / w ) を含む s d - r x R N A ゲル組成物の皮膚取り込みにおいて試験した。製剤を、ブタの耳外植片皮膚 (Yorkshire pigs) ヘトランズウェルインサートにおいて 4 8 時間局所的に適用し、蛍光ラベル付けされた s d - r x R N A の表皮および真皮の中への吸収について試験した。

#### 【 0 3 7 5 】

簡単に述べると、ブタの外植片皮膚を、Cetaphil Gentle Skin Cleanser および温水で洗浄し、次いでプロットし乾燥した。生検パンチ (各 8 mm) を皮膚から採り、およびトランズウェルのインサートの中へ配置した。エッジを真空グリースによって封着した。インサートを、ガーゼおよび~ 4 mL の完全な E M E M を含有する 6 ウェルディッシュの中へ配置した。製剤の 1 5  $\mu$  L を、各試料のウェブへ追加した。培地を、1 日当たり 2 回変えた。局所適用に続いて 4 8 時間、皮膚を、P B S で製剤をすすぎ、および次いで 4 % のパラホルムアルデヒドへ輸送された。固定化の後、皮膚を処理し、ロックしおよび切片を切った。蛍光造影を、細胞による s d - r x R N A の取り込みおよび局在化を検出することに使用した。核もまた染色した。図 2 は、組織の表皮および真皮への、1 % メチルセルロースを含有する尿素 / 乳酸ゲル製剤において製剤化された蛍光ラベル付けされた s d - r x R N A の増強された送達を示す。図 3 は、いくつかの態様において、p H 3 . 5 への製剤の調製は、p H 3 . 0 を有する製剤と比べて、組織の表皮および真皮の中への s d - r R N A の浸透を大いに高めることを示す。

10

#### 【 0 3 7 6 】

例 4 : ヒト皮膚における s d - r x R N A の取り込み

尿素 / 乳酸 (例として、1 0 % 尿素、5 % 乳酸、1 % M C 、p H 3 . 5 ; w / w ; 下の表 1 1 を参照) ゲル製剤において製剤化された s d - r x R N A を、ヒト外移植片皮膚へ局所適用し、蛍光ラベル付けされた s d - r x R N A の表皮および真皮の中への吸収について試験した。P B S の s d - r x R N A 製剤を、対象として使用した (下の表 1 2)。

20

#### 【 0 3 7 7 】

簡単に述べると、ヒト外植片皮膚をCetaphil Gentle Skin Cleanser および温水で洗浄し、ついでプロットし乾燥した。生検パンチ (各 8 mm) を皮膚から採り、およびトランズウェルインサートの中へ配置した。エッジを、真空グリースによって封着した。インサートを、ガーゼおよび~ 4 mL の完全な E M E M を含有する 6 ウェルディッシュのウェル中へ配置した。1 5  $\mu$  L の製剤を、各皮膚試料の上部へ追加した。培地を、1 日当たり 2 回変えた。局所適用に続いて 4 8 時間、皮膚を、P B S ですすぎ、製剤を取り除き、および 4 % パラホルムアルデヒドへ輸送した。固定化の後、皮膚をプロセスし、ロックしおよび切片を切った。蛍光造影を、細胞による蛍光ラベル付けされた s d - r x R N A の取り込みおよび局在化を検出するのに使用した。核もまた染色した。蛍光ラベル付けされた s d - r x R N A の表皮および真皮への送達を、尿素および乳酸 (例として、1 0 % 尿素、5 % 乳酸、1 % M C ; w / w ) を含む s d - r x R N A ゲル製剤において観察したが、しかし s d - r x R N A P B S 製剤を含む s d - r x R N A ゲル製剤 (図 4) では観察しなかった。

30

#### 【 0 3 7 8 】

40

## 【表 1 1】

表 1 1 : s d - r x R N A を含有するゲル製剤の組成物の一態様

成分	%, w/w
安息香酸ナトリウム、N F	0.20
NaCl, USP	0.90
Benecel A4M PHARM	1.00
尿素、USP	10.00
乳酸、USP	5.00
1N NaOH	16.40 <sup>1</sup>
Map4k4を標的とするsd-rxRNA	1.20
残存する水/pH の調整	100%までの十分量

10

## 【表 1 2】

表 1 2 : ビヒクルゲル製剤の組成物の一態様

成分	%, w/w
安息香酸ナトリウム、N F	0.20
NaCl, USP	0.90
Benecel A4M PHARM	1.00
尿素、USP	10.00
乳酸、USP	5.00
1N NaOH	16.40 <sup>1</sup>
残存する水/pH の調整	q.s. to 100%

20

<sup>1</sup> 推定量。パッチごとに 1.0 N NaOH および／または 1N HCl による最終 pH 3.5 への調製を要し得る。

## 【0 3 7 9】

例 5 : T Y R を標的とする s d - r x R N A を含有する局所ゲル製剤は、低減されたヒトにおける U V 曝露によって誘導された皮膚色素沈着をもたらす。

30

この例は、オープンラベル、单アーム（細胞）、非ランダム化された、評価者盲検パイロット研究(evaluator-blinded pilot study)を記載する。1時間、最小限の紅斑症の用量 (M E D) 査定（5つの部位への5曝露を使用する）を、腰背部（1～2日目）において実施した。これは、7日目におけるM E D レベルの3倍でのU V B 照射 (U V R) の対側性腰背部上の6つの部位への単一曝露に続いた。対象を、試験産物およびビヒクル（例として、表 1 3 において示されるように）を含む組成物によって、U V R の前に最大3日間毎日処置し（適用スケジュール 1）、および U V R の後 10 日まで（適用スケジュール 2）毎日処置した。少なくとも 1 つの U V R 部位（適用スケジュール当たり）は、試験産物およびビヒクル適用（照射された対照）なしで残存した。すべての試験部位を、適用の後綿ガーゼ（パッチ）によって閉鎖した。皮膚の紅斑症および色素沈着の臨床類別、ならびにDSM II Color Meterを使用する皮膚の色の査定を、U V R（研究7日目）の前に、および U V R の後の 1、4、7、9、11 および 18 日目において実施した。

40

## 【0 3 8 0】

50

## 【表 1 3】

表 1 3 : TYR 77 局所ゲル製剤の一態様

成分	%, w/w
安息香酸ナトリウム、NF	0.20
NaCl、USP	0.90
Benecel A4M PHARM	1.00
尿素、USP	10.00
乳酸、USP	5.00
1N NaOH	16.401
TYRを標的とするsd-rxRNA (TYR 77)	1.20
残存する水/pH の調整	100%までの十分量

各々の試験位置について使用された「生」メラニン指標の値は、各試験位置において Colorimeter によって実施されたトリブリケイト測定の平均であった。基準線を訂正されたメラニン指標の値を、各試験場所について、7日目のメラニン指標 (MI) を各「生」の値から引くことによって得た。18日目が産物 (RXI-231 またはビヒクル) の適用の最後の日であり、および適切な長さの「フォローアップ」時間は未知であると考え、25日目を含めておよび含めずに分析を行った。

## 【0381】

## 混合モデルアプローチ

MIへのRXI-231の効果を推定するため、分析をRXI-231についての各時点での基準線からの変化と、ビヒクルについての基準線からの時間にマッチするMIの変化を比較すること(図5)によって行った。推定値および対応する95%CIを、各時点におけるRXI-231とビヒクル処置(場所)の間の、ベースラインを調整し時間を一致させたMIについて、繰り返し測定のANCOVAモデルを使用し、対象を、ランダム効果として、位置、訪問、位置別の訪問を、を固定効果としてフィットさせて構築した。各位置についての基準線MIを、共変数として含めた。ANCOVAモデルの繰り返し測定分析を、SAS PROC MIXED手順を使用してフィットさせた。使用する推定方法は、制限付き最尤推定法(Restricted Maximum Likelihood)であった(Little, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., and Wolfinger, R.D. "SAS systems for Mixed Models", SAS Institute (1996))。

## 【0382】

## 【表 1 4】

表 1 4

固定効果のタイプ III 試験				
効果	Num DF	Den DF	F 値	P 値
0日目	1	107	48.75	<.0001
訪問	4	107	44.78	<.0001
位置	1	107	4.38	0.0388

混合モデルアプローチを使用し、UV曝露の前および後に適用したとき、RXI-231(部位1)とビヒクル(部位2)の間のメラニン指標の時間にわたる変化の違いは、統計的有意性( $p = 0.0388$ )に達した(表14)。

## 【0383】

10

20

30

40

50

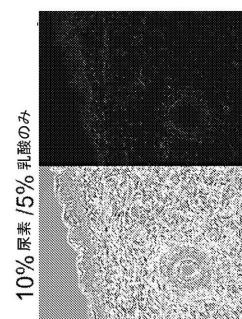
## 均等物

当業者は、慣用的な実験のみを使用して、本明細書に記載される本発明の具体的な態様についての多数の均等物を理解するかまたはそれに気付くことができるであろう。かかる均等物は、以下のクレームによって包含されることが意図される。

特許文書を含め、本明細書に開示される全ての参考文献は、それらの全体が参照されることによって組み込まれる。本出願は、2009年9月22日に出願されたPCT公開番号WO2010/033247（出願番号PCT/US2009/005247）、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2014年8月5日に発行され、2012年2月16日にUS 2012/0040459として公開された、米国特許第8,796,443号、表題「REDUCED SIZE SELF-DELIVERING RNAI COMPOUNDS」、2009年2月11日に出願されたPCT公開番号WO2009/102427（出願番号PCT/US2009/000852）、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、および2011年2月17日に公開された米国特許公開番号2011/0039914、表題「MODIFIED RNAI POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF」、2011年3月24日に出願されたPCT公開番号WO 2011/119887（出願番号PCT/US2011/029867）、表題「RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS」、および2011年9月29日にUS 2011/0237648として公開された米国特許第8,664,189号、表題「RNA INTERFERENCE IN DERMAL AND FIBROTIC INDICATIONS」の、全ての図面および明細書の全ての部分を含む全内容（配列表またはアミノ酸／ポリヌクレオチド配列を含む）を、参照によって組み込む。

## 【図面】

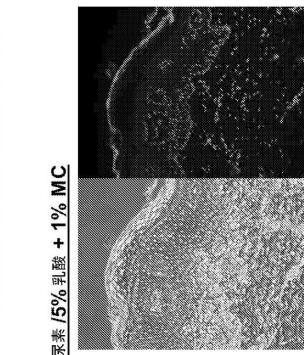
## 【図1】



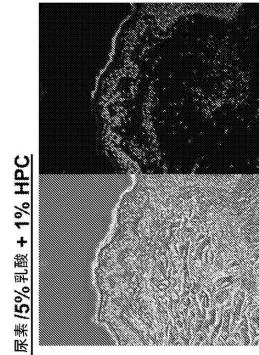
10% 尿素 / 5% 乳酸のみ

1.2% w/w sd-rxRNA  
10% 尿素 / 5% 乳酸

## 【図2】



局所 1.2% sd-rxRNA 10% 尿素 / 5% 乳酸 + 1% MC



局所 1.2% sd-rxRNA 10% 尿素 / 5% 乳酸 + 1% HPC

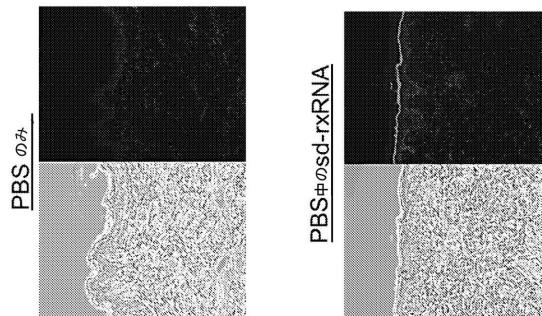
PBSのみ  
PBS + sd-rxRNA

図1

図2

10

20

30

40

50

【図 3 - 1】

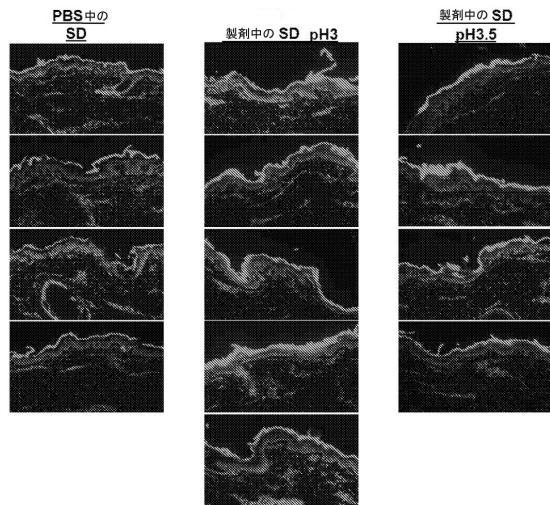
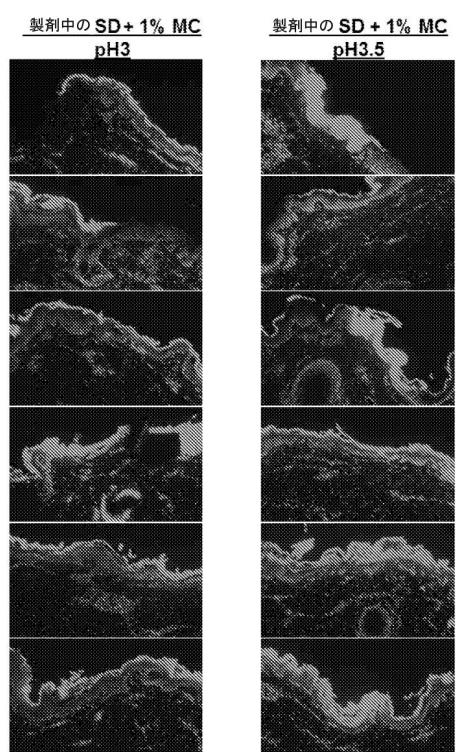


図 3

【図 3 - 2】



10

20

図 3 続き

【図 4】

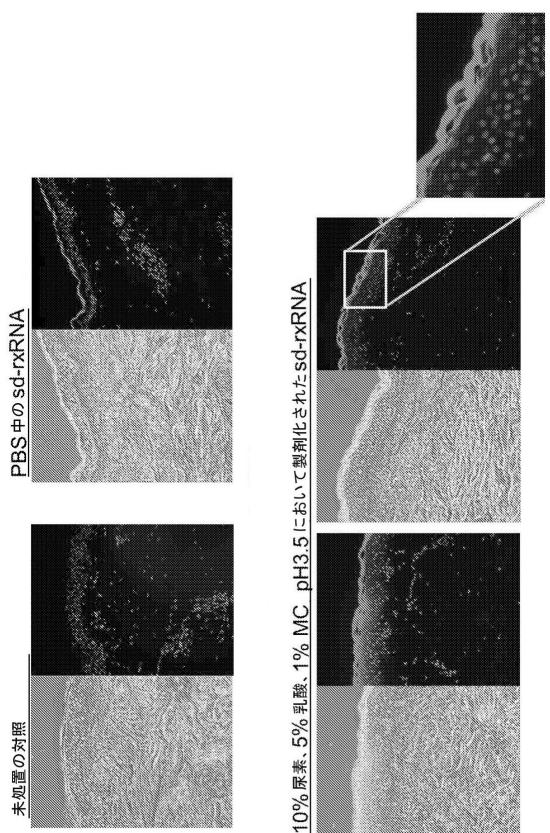


図 4

【図 5】

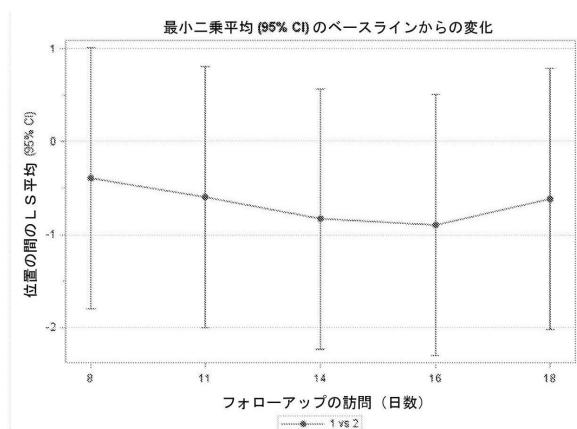


図 5

30

40

50

【配列表】

0007167059000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F	I			
A 6 1 K	47/38	(2006.01)	A 6 1 K	47/38	
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
C 1 2 N	15/11	(2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z
C 1 2 N	15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z
C 1 2 N	15/87	(2006.01)	C 1 2 N	15/113	1 1 0 Z
A 6 1 K	8/60	(2006.01)	C 1 2 N	15/113	1 2 0 Z
A 6 1 K	8/365	(2006.01)	C 1 2 N	15/113	1 3 0 Z
A 6 1 K	8/42	(2006.01)	C 1 2 N	15/113	1 4 0 Z
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/87	Z
			A 6 1 K	8/60	
			A 6 1 K	8/365	
			A 6 1 K	8/42	
			A 6 1 Q	19/00	

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01510、クリントン、プリザント ストリート 83

審査官 榎本 佳予子

## (56)参考文献

米国特許出願公開第2016/0243259(US, A1)

欧州特許出願公開第02364693(EP, A2)

米国特許出願公開第2006/0025363(US, A1)

米国特許出願公開第2009/0181908(US, A1)

特開2006-089475(JP, A)

特表2010-516816(JP, A)

国際公開第2016/037071(WO, A2)

特表2013-523650(JP, A)

特開2014-058557(JP, A)

Drug Delivery System, 2016年, Vol.31, No.3, p.201-209

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31/00 - 33/44

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 9/00 - 9/72

A 6 1 K 47/00 - 47/69

A 6 1 P 1/00 - 43/00

A 6 1 K 8/00 - 8/99

A 6 1 Q 1/00 - 90/00

C 1 2 N 15/00 - 15/90

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