

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-511042
(P2021-511042A)

(43) 公表日 令和3年5月6日(2021.5.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-539274 (P2020-539274)
 (86) (22) 出願日 平成31年1月15日 (2019.1.15)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年8月25日 (2020.8.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/013672
 (87) 国際公開番号 WO2019/143621
 (87) 国際公開日 令和1年7月25日 (2019.7.25)
 (31) 優先権主張番号 62/617,692
 (32) 優先日 平成30年1月16日 (2018.1.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

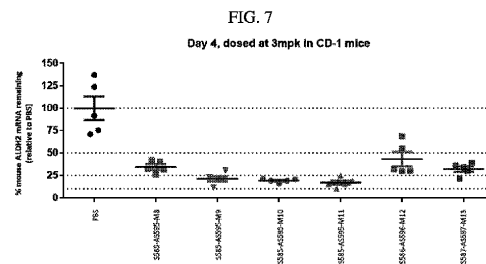
(71) 出願人 520130649
 ディセルナ ファーマシューティカルズ
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 4 2 1 レキシントン ヘイデン アベ
 ニュー 3 3
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ALDH2 発現を阻害するための組成物及び方法

(57) 【要約】

本開示は、特に肝実質細胞での ALDH2 発現を低減させるために有用なオリゴヌクレオチド、組成物、及び方法に関する。ALDH2 発現を低減させるための本開示のオリゴヌクレオチドは、二本鎖であってもよく又は一本鎖であってもよく、ヌクレアーゼに対するより強力な耐性及びより低い免疫原性等の特徴の向上のために修飾されていてもよい。また、ALDH2 発現を低減させるための本開示のオリゴヌクレオチドは、肝臓の肝実質細胞等の特定の細胞又は臓器を標的とするための標的指向性リガンドを含んでいてもよく、アルコール中毒及び関連状態を治療するために使用することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

A L D H 2 の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、配列番号 5 9 1 ~ 6 0 0 のいずれか 1 つに示される配列を含むアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 5 8 1 ~ 5 9 0 のいずれか 1 つに示される配列を含むセンス鎖を更に含む、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

前記アンチセンス鎖は、配列番号 5 9 1 ~ 6 0 0 のいずれか 1 つに示される配列からなる、請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記センス鎖は、配列番号 5 8 1 ~ 5 9 0 のいずれか 1 つに示される配列からなる、請求項 2 又は 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

A L D H 2 の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドは、長さが 1 5 ~ 3 0 ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 6 0 1 ~ 6 0 7 のいずれか 1 つに示される A L D H 2 の標的配列との相補性領域を有し、前記相補性領域は、長さが少なくとも 1 5 連続ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記相補性領域は、前記 A L D H 2 の標的配列と完全に相補的である、請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

前記アンチセンス鎖は、長さが 1 9 ~ 2 7 ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

前記アンチセンス鎖は、長さが 2 1 ~ 2 7 ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

長さが 1 5 ~ 4 0 ヌクレオチドのセンス鎖を更に含み、前記センス鎖は、前記アンチセンス鎖と二重鎖領域を形成する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 0】

前記センス鎖は、長さが 1 9 ~ 4 0 ヌクレオチドである、請求項 9 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 1】

前記二重鎖領域は、長さが少なくとも 1 9 ヌクレオチドである、請求項 9 又は 1 0 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 2】

前記二重鎖領域は、長さが少なくとも 2 1 ヌクレオチドである、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 3】

A L D H 2 との相補性領域は、長さが少なくとも 1 9 連続ヌクレオチドである、請求項 5 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 4】

A L D H 2 との相補性領域は、長さが少なくとも 2 1 連続ヌクレオチドである、請求項 5 ~ 1 3 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 5】

前記センス鎖は、配列番号 5 8 1 ~ 5 9 0 のいずれか 1 つに示される配列を含む、請求項 9 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記アンチセンス鎖は、配列番号 591 ~ 600 のいずれか 1 つに示される配列を含む、請求項 5 ~ 15 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

前記センス鎖は、配列番号 581 ~ 590 のいずれか 1 つに示される配列からなる、請求項 9 ~ 16 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

前記アンチセンス鎖は、配列番号 591 ~ 600 のいずれか 1 つに示される配列からなる、請求項 5 ~ 17 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

前記センス鎖は、その 3' - 末端に、 $S_1 - L - S_2$ として示されるステム - ループを含み、式中 S_1 は、 S_2 と相補的であり、 L は、 S_1 と S_2 との間に長さが 3 ~ 5 ヌクレオチドのループを形成する、請求項 9 ~ 18 のいずれか 1 つに記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 20】

ALDH2 の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドは、アンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、

前記アンチセンス鎖は、長さが 21 ~ 27 ヌクレオチドであり、ALDH2 との相補性領域を有し、

前記センス鎖は、その 3' 末端に、 $S_1 - L - S_2$ として示されるステム - ループを含み、式中 S_1 は S_2 と相補的であり、 L は、 S_1 と S_2 との間に長さが 3 ~ 5 ヌクレオチドのループを形成し、

前記アンチセンス鎖及び前記センス鎖は、長さが少なくとも 19 ヌクレオチドの二重鎖構造を形成するが、共有結合で連結されていない、オリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

前記相補性領域は、ALDH2 mRNA の少なくとも 19 連続ヌクレオチドと完全に相補的である、請求項 20 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 22】

L は、テトラループである、請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 23】

L は、長さが 4 ヌクレオチドである、請求項 19 ~ 22 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 24】

L は、GAAA として示される配列を含む、請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 25】

前記アンチセンス鎖は、長さが 27 ヌクレオチドであり、前記センス鎖は、長さが 25 ヌクレオチドである、請求項 9 ~ 18 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 26】

前記アンチセンス鎖及び前記センス鎖は、長さが 25 ヌクレオチドの二重鎖領域を形成する、請求項 25 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 27】

前記アンチセンス鎖に長さが 2 ヌクレオチドの 3' - 突出配列を更に含む、請求項 20 ~ 24 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 28】

各々長さが 21 ~ 23 ヌクレオチドの範囲であるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含む、請求項 9 ~ 18 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 29】

長さが 19 ~ 21 ヌクレオチドの範囲の二重鎖構造を含む、請求項 28 に記載のオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

長さが1個又は複数個ヌクレオチドの3'突出配列を含み、前記3'突出配列は、前記アンチセンス鎖、前記センス鎖、又は前記アンチセンス鎖及び前記センス鎖に存在する、請求項28又は29に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 31】

長さが2ヌクレオチドの3'突出配列を含み、前記3'突出配列は前記アンチセンス鎖に存在し、前記センス鎖は、長さが21ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖は長さが23ヌクレオチドであり、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖は、長さが21ヌクレオチドの二重鎖を形成する、請求項28又は29に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 32】

少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項1～31のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 33】

前記修飾ヌクレオチドは、2'-修飾を含む、請求項32に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 34】

前記2'-修飾は、2'-アミノエチル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル、及び2'-デオキシ-2'-フルオロ-d-アラビノ核酸から選択される修飾である、請求項33に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 35】

前記オリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、全て修飾されている、請求項32～34のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 36】

少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間連結を含む、請求項1～35のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 37】

少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート連結である、請求項36に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 38】

前記アンチセンス鎖の5'-ヌクレオチドの糖の4'-炭素は、ホスフェート類似体を含む、請求項1～37のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 39】

前記ホスフェート類似体は、オキシメチルホスホネート、ビニルホスホネート、又はマロニルホスホネートである、請求項38に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 40】

前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドは、1つ又は複数の標的指向性リガンドにコンジュゲートされている、請求項1～39のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 41】

各標的指向性リガンドは、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ポリペプチド、又は脂質を含む、請求項40に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 42】

各標的指向性リガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分を含む、請求項41に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 43】

前記GalNAc部分は、一価GalNAc部分、二価GalNAc部分、三価GalNAc部分、又は四価GalNAc部分である、請求項42に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 44】

前記ステム-ループのLの最大で4個のヌクレオチドは、各々一価GalNAc部分に

50

コンジュゲートされている、請求項 19 ~ 24 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 45】

前記標的指向性リガンドは、アプタマーを含む、請求項 40 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 46】

請求項 1 ~ 45 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド及び賦形剤を含む組成物。

【請求項 47】

対象にオリゴヌクレオチドを送達するための方法であって、請求項 46 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 48】

対象のエタノール耐容性を減少させるための方法であって、請求項 46 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 49】

対象のエタノール摂取を阻害するための方法であって、請求項 46 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 50】

対象のエタノール消費欲求を減少させるための方法であって、請求項 46 に記載の組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 51】

前記対象は、アルコール中毒に罹患している、請求項 47 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

ALDH2 の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドは、長さが 15 ~ 50 ヌクレオチドのセンス鎖及び長さが 15 ~ 30 ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖は、前記アンチセンス鎖と二重鎖領域を形成し、前記センス鎖は、配列番号 581 ~ 590 のいずれか 1 つに示されている配列を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 591 ~ 600 から選択される相補的配列を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 53】

ALDH2 の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、表 4 に示される表の行から選択される 1 対のセンス及びアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年1月16日に出願された「COMPOSITIONS AND METHODS FOR INHIBITING ALDH2 EXPRESSION」と題する米国特許仮出願第62/617692号に対する米国特許法第119条(e)に基づく利益を主張するものである。この文献の内容は全て、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、オリゴヌクレオチド、及びそれらの使用、特にアルコール中毒及び関連状態の治療に関する使用に関する。

【0003】

配列表の参照

本出願は、電子フォーマットの配列表と共に提出されている。配列表は、2019年1月15日に作成された、サイズが128キロバイトでファイル名がD0800_70010W000-SEQ.txtのファイルとして提供されている。配列表の電子フォーマットの情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0004】

アセトアルデヒドは、身体によるアルコール酸化の中間物質である。アセトアルデヒド代謝が阻害されると、アセトアルデヒドが蓄積して、中毒症状及び大きな不快感の発生がもたらされる。ミトコンドリアアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) は、体内でのアセトアルデヒド解毒に主要な役割を有する酵素である。ヒトALDH2の遺伝子多型は、広範囲の民族集団で良好に調査されている。異常遺伝子がヘテロ接合又はホモ接合である個体は、より低いALDH2酵素活性を有し、この欠損は、アルコール消費後の顔面潮紅、悪心、及び心悸亢進により明らかになる。研究により、こうした個体ではアルコール中毒の有病率が低減され、それはこうした不快効果に起因することが明らかになっている。従って、ALDH2活性の妨害は、ヒトのアルコール耐容性及びアルコール消費の欲求を減少させることができる。ALDH2を標的とする薬学的化合物が、ヒトのアルコール嫌悪を誘導するために使用されている。

10

【0005】

例えば、ジスルフィラムは、ALDH2酵素を阻害することによりアセトアルデヒドの代謝を *in vivo* で妨害する化合物である。ジスルフィラム投与の12時間以内のアルコール消費は、他の症状の中でも、顔面潮紅、頭頸部の拍動、悪心、嘔吐、発汗、及びめまいをもたらす場合がある。しかしながら、ジスルフィラムには、眠気、頭痛、及び頻度はより低い神経毒性等の一連の副作用のため、臨床的な制限がある。更に、ジスルフィラム及び類似治療薬が有効であるには、典型的には毎日投与が必要とされるため、こうした薬物には、患者服薬遵守が非常に低いという問題がある。

20

【発明の概要】

【0006】

本開示の態様は、対象のアルコール中毒を治療するためのオリゴヌクレオチド及び関連方法に関する。一部の実施形態では、対象のALDH2発現を選択的に阻害するための強力なRNAiオリゴヌクレオチドを開発した。一部の実施形態では、RNAiオリゴヌクレオチドは、ALDH2活性を低減させ、それによりアルコール耐容性及び/又はアルコール消費の欲求を減少させるために有用である。一部の実施形態では、本明細書において、そのようなオリゴヌクレオチドに基づく手法を使用して特に標的とし易いALDH2 mRNAの重要な領域(ホットスポットと呼ばれる)を特定した(実施例1を参照)。一部の実施形態では、本明細書で提供されるRNAiオリゴヌクレオチドには、修飾ホスフェート、ニック付きテトラループ構造、並びに/又は活性、生物学的利用能を向上させ、及び/若しくは *in vivo* 投与後の酵素分解の程度を最小限に抑える他の修飾が組み込まれている。一部の実施形態では、本明細書で提供されるRNAiオリゴヌクレオチドは、ALDH2活性の持続的低減をもたらすことができるため、ALDH2の既存の低分子阻害剤の毎日投与に関連する服薬遵守問題を克服する。

30

【0007】

本開示の1つの態様は、ALDH2の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号591~600のいずれか1つに示されている配列を含むアンチセンス鎖を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号581~590のいずれか1つに示されている配列を含むセンス鎖を更に含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号591~600のいずれか1つに示されている配列からなる。一部の実施形態では、センス鎖は、配列番号581~590のいずれか1つに示されている配列からなる。

40

【0008】

本開示の1つの態様は、ALDH2の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、長さが15~30ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号601~607のいずれか1つに示されているALDH2の標的配列との相補性領域を有する。一部の実施形態では、相補性領域は、長さが少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、

50

少なくとも19、少なくとも20、又は少なくとも21連続ヌクレオチドである。一部の実施形態では、相補性領域は、ALDH2の標的配列と完全に相補的である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、長さが19~27ヌクレオチドである。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、長さが21~27ヌクレオチドである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが15~40ヌクレオチドのセンス鎖であって、アンチセンス鎖と二重鎖領域を形成するセンス鎖を更に含む。一部の実施形態では、センス鎖は、長さが19~40ヌクレオチドである。一部の実施形態では、二重鎖領域は、長さが少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、又は少なくとも21ヌクレオチドである。一部の実施形態では、ALDH2との相補性領域は、長さが少なくとも19連続ヌクレオチドである。一部の実施形態では、センス鎖は、配列番号581~590のいずれか1つに示されている配列を含む。一部の実施形態では、センス鎖は、配列番号581~590のいずれか1つに示されている配列からなる。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号591~600のいずれか1つに示されている配列を含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号591~600のいずれか1つに示されている配列からなる。一部の実施形態では、センス鎖は、その3'末端に、S1-L-S2として示されるステム-ループを含み、式中S1はS2と相補的であり、Lは、S1とS2との間に長さが3~5ヌクレオチドのループを形成する。

10

【0009】

本開示の別の態様は、ALDH2の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドは、アンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、長さが21~27ヌクレオチドであり、ALDH2との相補性領域を有し、センス鎖は、その3'末端に、S1-L-S2として示されるステム-ループを含み、式中S1はS2と相補的であり、Lは、S1とS2との間に長さが3~5ヌクレオチドのループを形成し、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、長さが少なくとも19ヌクレオチドの二重鎖構造を形成するが、共有結合で連結されていない、オリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、相補性領域は、ALDH2 mRNAの少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、又は少なくとも21連続ヌクレオチドと完全に相補的である。一部の実施形態では、Lはテトラループである。一部の実施形態では、Lは、長さが4ヌクレオチドである。一部の実施形態では、Lは、GAAAとして示される配列を含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、長さが27ヌクレオチドであり、センス鎖は、長さが25ヌクレオチドである。一部の実施形態では、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、長さが25ヌクレオチドの二重鎖領域を形成する。

20

30

【0010】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンス鎖に長さが2ヌクレオチドの3'突出配列を更に含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、各々が21~23ヌクレオチドの長さの範囲であるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが19~21ヌクレオチドの範囲である二重鎖構造を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが1又は複数ヌクレオチドの3'突出配列を含み、3'突出配列は、アンチセンス鎖、センス鎖、又はアンチセンス鎖及びセンス鎖に存在する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが2ヌクレオチドの3'突出配列を含み、3'突出配列はアンチセンス鎖に存在し、センス鎖は、長さが21ヌクレオチドであり、アンチセンス鎖は長さが23ヌクレオチドであり、センス鎖及びアンチセンス鎖は、長さが21ヌクレオチドの二重鎖を形成する。

40

【0011】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは2'修飾を含む。一部の実施形態では、2'修飾は、2'-アミノエチル、2'-フルオロ、2'-オメチル、2'-O-メトキシエチル、及び2'デオキシ-2'-フルオロ-d-アラビノ核酸から選択される修飾である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの全てが修飾されて

50

いる。

【0012】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホリチオエート連結である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の5'ヌクレオチドの糖の4'炭素は、ホスフェート類似体を含む。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、オキシメチルホスホネート、ビニルホスホネート、又はマロニルホスホネートである。

【0013】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドは、1つ又は複数の標的指向性リガンドにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、各標的指向性リガンドは、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ポリペプチド、又は脂質を含む。一部の実施形態では、各標的指向性リガンドは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分を含む。一部の実施形態では、GalNAc部分は、一価GalNAc部分、二価GalNAc部分、三価GalNAc部分、又は四価GalNAc部分である。一部の実施形態では、ステム-ループのLの最大で4ヌクレオチドが各々、一価GalNAc部分にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、標的指向性リガンドはアダマーを含む。

10

【0014】

本開示の別の態様は、本開示のオリゴヌクレオチド及び賦形剤を含む組成物を提供する。本開示の別の態様は、本開示の組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、対象のエタノール耐容性の減少をもたらす。一部の実施形態では、本方法は、対象によるエタノール摂取の阻害をもたらす。一部の実施形態では、本方法は、対象のエタノール消費欲求の減少をもたらす。一部の実施形態では、治療しようとする対象は、アルコール中毒を罹患している。

20

【0015】

本開示の別の態様は、ALDH2の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、長さが15~40ヌクレオチドのセンス鎖及び長さが15~30ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、センス鎖はアンチセンス鎖と二重鎖領域を形成し、センス鎖は、配列番号581~590のいずれか1つに示されている配列を含み、アンチセンス鎖は、配列番号591~600から選択される相補的配列を含むオリゴヌクレオチドを提供する。

30

【0016】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、表4に示されている表の行から選択される1対のセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む。

【0017】

本明細書に組み込まれており、本明細書の一部を構成する添付の図面は、ある実施形態を図示するものであり、記載されている説明と共に、本明細書で開示されている組成物及び方法のある態様の非限定的な例を提供する役目を果たす。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】細胞モデル及び動物モデルで試験するための化合物を選択するために、及びALDH2の発現を低減するための二本鎖オリゴヌクレオチドを開発するために使用される実験設計を示すフローチャートである。

40

【図2】HepG2細胞で288個のALDH2オリゴヌクレオチドをスクリーニングした後に残存したALDH2 mRNAのパーセントを示すグラフである。各siRNAのセンス鎖の3'末端に対応するNM_000690.3のヌクレオチド位置が、X軸に示されている。

【図3A】HepG2細胞で3つの異なる濃度(1nM、0.1nM、及び0.01nM)にて96個のALDH2オリゴヌクレオチドをALDH2オリゴヌクレオチドスクリーニングした後に残存したmRNAのパーセンテージを示す1セットのグラフである。

【図3B】HepG2細胞で3つの異なる濃度(1nM、0.1nM、及び0.01nM

50

）にて96個のALDH2オリゴヌクレオチドをALDH2オリゴヌクレオチドスクリーニングした後に残存したmRNAのパーセンテージを示す1セットのグラフである。

【図3C】HepG2細胞で3つの異なる濃度（1nM、0.1nM、及び0.01nM）にて96個のALDH2オリゴヌクレオチドをALDH2オリゴヌクレオチドスクリーニングした後に残存したmRNAのパーセンテージを示す1セットのグラフである。

【図3D】HepG2細胞で3つの異なる濃度（1nM、0.1nM、及び0.01nM）にて96個のALDH2オリゴヌクレオチドをALDH2オリゴヌクレオチドスクリーニングした後に残存したmRNAのパーセンテージを示す1セットのグラフである。

【図4】4つのGalNAc部分（菱形）にコンジュゲートされているニック付きテトラループ構造を有する二本鎖オリゴヌクレオチドの非限定的な例を示す模式図である。

【図5A】様々な修飾パターンを有するように構成された、3つの異なる濃度（1nM、0.1nM、及び0.01nM）の、ニック付きテトラループ構造の異なる塩基配列のALDH2オリゴヌクレオチドを使用して、HepG2細胞でスクリーニングした結果を示す1セットのグラフである。

【図5B】様々な修飾パターンを有するように構成された、3つの異なる濃度（1nM、0.1nM、及び0.01nM）の、ニック付きテトラループ構造の異なる塩基配列のALDH2オリゴヌクレオチドを使用して、HepG2細胞でスクリーニングした結果を示す1セットのグラフである。

【図6】様々な修飾パターンを有するように構成された、3つの異なる濃度（1nM、0.1nM、及び0.01nM）の、ニック付きテトラループ構造の異なる塩基配列のALDH2オリゴヌクレオチドを使用して、Hepa1-6細胞でスクリーニングした結果を示すグラフである。

【図7】ニック付きテトラループ構造のGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの*in vivo*活性評価を示すグラフである。3つの異なるオリゴヌクレオチド配列を試験した。オリゴヌクレオチドを、3mg/kgにてマウスに皮下投与した。データは、PBS対照に対して正規化された、投与後4日目に残存したALDH2 mRNAの量を示す。

【図8】非ヒト霊長類（NHP）における、様々な修飾パターンを有するGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの持続期間研究の結果を示すグラフである。単一用量（3mg/kg）のオリゴヌクレオチドを、非ヒト霊長類に皮下投与した。データは、投与前のALDH2 mRNAの量と比べて、投与4、12、及び16週間後に残存するALDH2 mRNAの量を示す。「*」は、1頭の非ヒト霊長類を安楽死させ、16週間の分析には含めなかったことを意味する。

【図9】マウスにおいてALDH2 mRNAレベルを低減するオリゴヌクレオチドの活性を増強する修飾パターンを特定するための、様々な修飾パターンを有するGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの*in vivo*アッセイスクリーニングの結果を示すグラフである。

【図10】マウスでのALDH2 mRNAレベルの低減における、様々な修飾パターンを有するGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの活性の比較を示すグラフである。オリゴヌクレオチドを、0.5mg/kgでマウスに皮下投与した。データは、PBS対照に対して正規化された、投与後4日目に残存したALDH2 mRNAの量を示した。

【図11】CD-1マウスにおける、表示されているGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの用量漸増研究の結果を示すグラフである。オリゴヌクレオチドを、0.1、0.3、0.5mg/kgにてマウスに皮下投与した。データは、PBS対照に対して正規化され、オリゴヌクレオチド投与の72時間後に残存したALDH2 mRNAの量を示した。

【図12】様々な修飾パターンを有するGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドのALDH2 mRNA抑制活性の比較を示すグラフである。オリゴヌクレオチドを、0.5mg/kgにてマウスに皮下投与した。データは、PBS対照に対して正

10

20

30

40

50

規化され、投与後4日目に残存したALDH2 mRNAの量を示した。

【図13】マウスにおける、表示されているGalNacコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの持続期間研究の結果を示すグラフである。オリゴヌクレオチドを、3mg/kgにてマウスに皮下投与した。データは、PBS対照に対して正規化され、投与後35日目まで残存したALDH2 mRNAの量を示した。

【発明を実施するための形態】

【0019】

一部の態様によると、本開示は、アルコール中毒を治療するための、細胞、特に肝臓細胞（例えば、肝実質細胞）におけるALDH2発現の低減に効果的な、ALDH2 mRNAを標的とするオリゴヌクレオチドを提供する。従って、関連態様では、本開示は、アルコール中毒を治療するための方法であって、肝臓におけるALDH2遺伝子発現を選択的に低減させることを含む方法を提供する。ある実施形態では、本明細書で提供されるALDH2標的指向性オリゴヌクレオチドは、標的組織の選択された細胞（例えば、肝臓肝実質細胞）に送達して、対象のアルコール中毒を治療するために設計されている。

10

【0020】

用語の定義の説明を含む本開示の更なる態様が下記に提供されている。

【0021】

I. 定義

アルコール中毒：本明細書で使用される場合、用語「アルコール中毒」は、有害な結果が再発するにも関わらず個体により繰り返されるエタノール使用を指し、耐容性、使用中止、及び/又はアルコール消費に対する制御しがたい衝動が伴っていてもよく又はいなくともよい。アルコール中毒は、アルコール乱用、アルコール使用障害、又はアルコール依存症として分類される場合がある。様々な手法を使用して、アルコール中毒を罹患している個体を特定することができる。例えば、世界保健機構は、依存症を含むアルコール誤用の可能性を特定するためのツールとしてアルコール使用障害特定試験（AUDIT、Alcohol Use Disorders Identification Test）を確立させており、ミシガンアルコールスクリーニング試験（MAST、Michigan Alcohol Screening Test）を含む他の類似試験が開発されている。ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、平均赤血球容積（赤血球細胞サイズ）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、炭水化物欠損トランスフェリン（CDT）、エチルグルクロニド（EtG）、硫酸エチル（EtS）、及び/又はホスファチジルエタノール（Peth）のレベルを検出するための検査を含む臨床検査を使用して、飲酒の長期使用及び/又は再発を検出するための血液マーカーを評価してもよい。アルコール中毒の動物モデル（例えば、マウスモデル）が確立されている（例えば、Rijk H、Crabbe JC、Rigter H、A mouse model of alcoholism. *Physiol Behav.* 1982年11月；29巻（5号）：833～9頁；Elizabeth Brandon-Warnerら、Rodent Models of Alcoholic Liver Disease: Of Mice and Men、*Alcohol.* 2012年12月；46巻（8号）：715～725頁；及びAdeline Bertolaら、Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)、*Nature Protocols* 8巻、627～637頁（2013年）を参照）。

20

30

40

【0022】

ALDH2：本明細書で使用される場合、用語「ALDH2」は、アルデヒド脱水素酵素2ファミリー（ミトコンドリア）遺伝子を指す。ALDH2は、アルデヒド脱水素酵素のタンパク質ファミリーに属し、エタノールからアセテート（酢酸）を合成するアルコール代謝の酸化経路の2番目の酵素として機能するタンパク質をコードする。ALDH2の相同体は、ヒト、マウス、ラット、及び非ヒト霊長類種等を含む一連の種にわたって保存されている（例えば、NCBI Homologene：55480を参照）。また、A

50

LDH2は、例えばALDH1A1を含む、他のアルデヒド脱水素酵素コード遺伝子と相同性を有する。ヒトでは、ALDH2は、各々がそれぞれ異なるアイソフォームNP_000681.2(アイソフォーム1)及びNP_001191818.1(アイソフォーム2)をコードする、少なくとも2つの転写物、すなわちNM_000690.3(バリエーション1)及びNM_001204889.1(バリエーション2)をコードする。転写物バリエーション2は、転写物バリエーション1と比較して、5'コード領域のインフレームエクソンを欠如し、アイソフォーム1と比較して、より短いアイソフォーム(2)をコードする。ALDH2の遺伝子多型が特定されている(例えば、Chang JS、Hsiao JR、Chen CH.、ALDH2 polymorphism and alcohol-related cancers in Asians: a public health perspective.、J Biomed Sci.、2017年3月3日; 24巻(1号): 19頁、総説を参照)。

10

【0023】

およそ:本明細書で使用される場合、1つ又は複数の目的の値に適用される用語「およそ」又は「約」は、表記されている参照値と同様である値を指す。ある実施形態では、用語「およそ」又は「約」は、別様の記述がない限り又は別様に状況から明白でない限り(そのような数値が、可能な値の100%を超えてしまう場合を除く)、表記されている参照値のいずれかの方向に(よりも大きな又は未満の)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、又はそれよりも小さな値内に入る値の範囲を指す。

20

【0024】

投与:本明細書で使用される場合、用語「投与する」又は「投与」は、物質(例えば、オリゴヌクレオチド)を、薬理的に有用な様式で(例えば、対象の状態を治療するために)対象に提供することを意味する。

【0025】

アジア口糖タンパク質受容体(ASGPR):本明細書で使用される場合、用語「アジア口糖タンパク質受容体」又は「ASGPR」は、大きな48kDaサブユニット(ASGPR-1)及び小さな40kDaサブユニット(ASGPR-2)により形成される二分C型レクチンを指す。ASGPRは、主に肝実質細胞の洞様表面に発現され、末端ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン残基を含む循環性糖タンパク質(アジア口糖タンパク質)の結合、内部移行、及びその後のクリアランスに主要な役割を有する。

30

【0026】

相補的:本明細書で使用される場合、用語「相補的」は、ヌクレオチドが互いに塩基対を形成することを可能にするヌクレオチド(例えば、一本鎖核酸鎖の向かい合う核酸又は向かい合う領域の2つのヌクレオチド)間の構造的関係性を指す。例えば、向かい合う核酸のピリミジンヌクレオチドと相補的な一方の核酸のプリンヌクレオチドは、互いに水素結合を形成することにより共に塩基対を形成することができる。一部の実施形態では、相補的ヌクレオチドは、ワトソン-クリック様式の、又は安定的二重鎖の形成を可能にする任意の他の様式の塩基対を形成することができる。一部の実施形態では、2つの核酸は、本明細書に記載のような、相補性領域を形成するように互いに相補的なヌクレオチド配列を有していてもよい。

40

【0027】

デオキシリボヌクレオチド:本明細書で使用される場合、用語「デオキシリボヌクレオチド」は、リボヌクレオチドと比較して、そのペントース糖の2'位に水素を有するヌクレオチドを指す。修飾デオキシリボヌクレオチドは、糖、ホスフェート基、若しくは塩基に修飾を含むか又は糖、ホスフェート基、若しくは塩基の置換を含む、2'位以外の原子の1つ又は複数の修飾又は置換を有するデオキシリボヌクレオチドである。

【0028】

二本鎖オリゴヌクレオチド:本明細書で使用される場合、用語「二本鎖オリゴヌクレオ

50

チド」は、実質的に二重鎖形態であるオリゴヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域の相補的塩基対合は、共有結合的に別々の核酸鎖のヌクレオチドの逆平行配列間に形成される。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域の相補的塩基対合は、共有結合的に連結されている核酸鎖のヌクレオチドの逆平行配列間に形成される。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域の相補的塩基対合は、フォールディングして（例えば、ヘアピンにより）互いに塩基対を形成するヌクレオチドの相補的逆平行配列を提供する一本鎖核酸鎖で形成される。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、互いに完全に二重鎖である2つの共有結合的に別々の核酸鎖を含む。しかしながら、一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、部分的に二重鎖であり、例えば一方の又は両方の末端に突出を有する2つの共有結合的に別々の核酸鎖を含む。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、部分的に相補的であり、従って、内部ミスマッチ又は末端ミスマッチを含んでいてもよい1つ又は複数のミスマッチを有していてもよいヌクレオチドの逆平行配列を含む。

10

【0029】

二重鎖：本明細書で使用される場合、核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）に関する用語「二重鎖」は、ヌクレオチドの2つの逆平行配列の相補的塩基対合により形成される構造を指す。

【0030】

賦形剤：本明細書で使用される場合、用語「賦形剤」は、例えば、所望の稠度又は安定化効果を提供又は寄与するように組成物に含まれていてもよい非治療剤を指す。

20

【0031】

肝実質細胞：本明細書で使用される場合、用語「肝実質細胞」又は「肝実質細胞（複数）」は、肝臓の実質組織の細胞を指す。こうした細胞は、肝臓質量のおよそ70～85%を占め、血清アルブミン、フィブリノーゲン、及び凝固因子のプロトロンビングループ（第3因子及び第4因子を除く）を製造する。肝実質細胞系統細胞のマーカーとしては、これらに限定されないが、トランスサイレチン（Ttr）、グルタミンシンターゼ（Glu）、肝実質細胞核内因子1a（Hnf1a）、及び肝実質細胞核内因子4a（Hnf4a）を挙げることができる。成熟肝実質細胞のマーカーとしては、これらに限定されないが、シトクロムP450（Cyp3a11）、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ（Fah）、グルコース6-ホスフェート（G6p）、アルブミン（Alb）、及びOC2-2F8を挙げることができる。例えば、Huchら（2013年）、Nature、494巻（7436号）：247～250頁を参照されたい。この文献の肝実質細胞マーカーに関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0032】

ループ：本明細書で使用される場合、用語「ループ」は、互いに十分に相補的な核酸の2つの逆平行領域により隣接される核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）の非対合領域を指し、非対合領域を隣接する2つの逆平行領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下で（例えば、リン酸緩衝液中で、細胞中で）ハイブリダイズして二重鎖（「ステム」と呼ばれる）を形成する。

【0033】

修飾ヌクレオチド間連結：本明細書で使用される場合、用語「修飾ヌクレオチド間連結」は、リン酸ジエステル結合を含む参照ヌクレオチド間連結と比較して、1つ又は複数の化学的修飾を有するヌクレオチド間連結を指す。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは非天然連結である。典型的には、修飾ヌクレオチド間連結は、修飾ヌクレオチド間連結が存在する核酸に1つ又は複数の望ましい特性を付与する。例えば、修飾ヌクレオチドは、熱安定性、分解に対する耐性、ヌクレアーゼ耐性、溶解度、生物学的利用能、生物活性、低免疫原性等を向上させることができる。

40

【0034】

修飾ヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「修飾ヌクレオチド」は、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシル

50

リボヌクレオチド、アデニンデオキシリボヌクレオチド、グアニンデオキシリボヌクレオチド、シトシンデオキシリボヌクレオチド、及びチミジンデオキシリボヌクレオチドから選択される対応する参照ヌクレオチドと比較して、1つ又は複数の化学的修飾を有するヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは非天然ヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、その糖、核酸塩基、及び/又はホスフェート基に1つ又は複数の化学的修飾を有する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、対応する参照ヌクレオチドにコンジュゲートされた1つ又は複数の化学部分を有する。典型的には、修飾ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドが存在する核酸に1つ又は複数の望ましい特性を付与する。例えば、修飾ヌクレオチドは、熱安定性、分解に対する耐性、ヌクレアーゼ耐性、溶解度、生物学的利用能、生物活性、低免疫原性等を向上させることができる。ある実施形態では、修飾ヌクレオチドは、リボース環の2'位に2'-Oメチル置換又は2'-F置換を含む。

10

20

30

40

50

【0035】

ニック付きテトラループ構造：「ニック付きテトラループ構造」は、別々のセンス鎖（パッセンジャー鎖）及びアンチセンス鎖（ガイド鎖）が存在することにより特徴付けられるRNA iオリゴヌクレオチドの構造であって、センス鎖は、2つの鎖が二重鎖を形成するようにアンチセンス鎖との相補性領域を有し、鎖の少なくとも一方、一般にはセンス鎖は、二重鎖から伸長し、伸長は、テトラループ及びテトラループに隣接するステム領域を形成する2つの自己相補的配列を含み、テトラループは、少なくとも一方の鎖の自己相補的配列により形成される隣接ステム領域を安定させるように構成されている構造である。

【0036】

オリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、例えば、長さが100ヌクレオチド未満の短い核酸を指す。オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、及び/又は修飾リボヌクレオチドを含む修飾ヌクレオチドを含むことができる。オリゴヌクレオチドは、一本鎖であってもよく又は二本鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは、二重鎖領域を有していてもよく又は有していません。1セットの非限定的な例として、オリゴヌクレオチドは、これらに限定されないが、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロRNA (miRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、ダイサー基質干渉RNA (dsRNA、dicer substrate interfering RNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、短鎖siRNA、又は一本鎖siRNAであってもよい。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、RNA iオリゴヌクレオチドである。

【0037】

突出：本明細書で使用される場合、用語「突出」は、1つの鎖又は領域がそれと二重鎖を形成する相補的鎖の末端を越えて伸長する1つの鎖又は領域から生じる末端非塩基対合ヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、突出は、二本鎖オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端の二重鎖領域から伸長する1つ又は複数の非対合ヌクレオチドを含む。ある実施形態では、突出は、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖又はセンス鎖にある3'突出又は5'突出である。

【0038】

ホスフェート類似体：本明細書で使用される場合、用語「ホスフェート類似体」は、ホスフェート基の静電気特性及び/又は立体特性を模倣する化学部分を指す。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、酵素的に除去され易いことが多い5'-ホスフェートの代わりに、オリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドに配置されている。一部の実施形態では、5'ホスフェート類似体は、ホスファターゼ耐性連結を含む。ホスフェート類似体の例としては、5'メチレンホスホネート(5'-MP)及び5'-(E)-ビニルホスホネート(5'-VP)等の5'ホスホネートが挙げられる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'-末端ヌクレオチドの糖の4'-炭素位置にホスフェート類似体を有する(「4'-ホスフェート類似体」と呼ばれる)。4'-ホスフェート類似体の

例は、オキシメチル基の酸素原子が糖部分（例えば、その4'-炭素に）又はその類似体に結合されているオキシメチルホスホネートである。例えば、2017年9月1日出願された国際特許出願第PCT/US2017/049909号パンフレット、2016年9月2日出願された米国特許仮出願第62/383,207号明細書、及び2016年9月12日出願された第62/393,401号明細書を参照されたい。これらの文献の各々のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる。オリゴヌクレオチドの5'末端には、他の修飾が開発されている（例えば、国際公開第2011/133871号パンフレット；米国特許第8,927,513号明細書；及びPrakashら（2015年）、Nucleic Acids Res.、43巻（6号）：2993～3011頁を参照、これらの文献の各々のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。 10

【0039】

発現の低減：本明細書で使用される場合、遺伝子の「発現の低減」という用語は、遺伝子によりコードされるRNA転写物若しくはタンパク質の量の減少、及び/又は適切な参照細胞若しくは参照対象と比較した細胞若しくは対象の遺伝子の活性の量の減少を指す。例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、ALDH2 mRNA配列と相補的なアンチセンス鎖を有するもの）で細胞を処理する行為は、二本鎖オリゴヌクレオチドで処理されていない細胞と比較して、RNA転写物、タンパク質、及び/又は酵素活性（例えば、ALDH2遺伝子によりコードされる）の量の減少をもたらすことができる。同様に、「発現を低減する」は、本明細書で使用される場合、遺伝子（例えば、ALDH2）の発現の低減をもたらす行為を指す。 20

【0040】

相補性領域：本明細書で使用される場合、用語「相補性領域」は、適切なハイブリダイゼーション条件下で、例えばリン酸緩衝液中、細胞中等で、ヌクレオチドの2つの配列間のハイブリダイゼーションを可能にするために、ヌクレオチドの逆平行配列（例えば、mRNA内の標的ヌクレオチド配列）と十分に相補的である核酸（例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド）のヌクレオチドの配列を指す。相補性領域は、ヌクレオチド配列（例えば、mRNA又はその部分内に存在する標的ヌクレオチド配列）と完全に相補的であってもよい。例えば、mRNAに存在するヌクレオチド配列と完全に相補的である相補性領域は、mRNAの対応する配列とミスマッチ又はギャップ無しで相補的であるヌクレオチドの連続配列を有する。或いは、相補性領域は、ヌクレオチド配列（例えば、mRNA又はその部分内に存在するヌクレオチド配列）と部分的に相補的であってもよい。例えば、mRNAに存在するヌクレオチド配列と部分的に相補的である相補性領域は、相補性領域が適切なハイブリダイゼーション条件下でmRNAと依然としてハイブリダイズ可能である限り、mRNAの対応する配列と相補的であるが、mRNAの対応する配列と比較して、1つ又は複数のミスマッチ又はギャップ（例えば、1つ、2つ、3つ、又はそれよりも多くのミスマッチ又はギャップ）を含むヌクレオチドの連続配列を有する。 30

【0041】

リボヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「リボヌクレオチド」は、その2'位にヒドロキシル基を含むリボースをそのペントース糖として有するヌクレオチドを指す。修飾リボヌクレオチドは、リボース、ホスフェート基、若しくは塩基に修飾を含むか又はリボース、ホスフェート基、若しくは塩基の置換を含む、2'位以外の原子の1つ又は複数の修飾又は置換を有するリボヌクレオチドである。 40

【0042】

RNAiオリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「RNAiオリゴヌクレオチド」は、(a)センス鎖（パッセンジャー）及びアンチセンス鎖（ガイド）を有する二本鎖オリゴヌクレオチドであって、アンチセンス鎖又はアンチセンス鎖の一部は、標的mRNAの切断に際してアルゴノート2（Ago2）エンドヌクレアーゼにより使用される、二本鎖オリゴヌクレオチド、又は(b)単一のアンチセンス鎖を有する一本鎖オリゴヌクレオチドであって、そのアンチセンス鎖（又はそのアンチセンス鎖の一部）は 50

、標的 mRNA の切断に際して Ago 2 エンドヌクレアーゼにより使用される、一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを指す。

【 0 0 4 3 】

鎖：本明細書で使用される場合、用語「鎖」は、ヌクレオチド間連結（例えば、ホスホジエステル連結、ホスホロチオエート連結）を介して共に連結されているヌクレオチドの単一の連続配列を指す。一部の実施形態では、鎖は、2つの遊離末端、例えば、5' - 末端及び3' - 末端を有する。

【 0 0 4 4 】

対象：本明細書で使用される場合、用語「対象」は、マウス、ウサギ、及びヒトを含む任意の哺乳動物を意味する。一実施形態では、対象は、ヒト又は非ヒト霊長類である。用語「個体」又は「患者」は、「対象」と同義的に使用される場合がある。

10

【 0 0 4 5 】

合成：用語「合成」は、人為的に合成されたか（例えば、機械（例えば、固相核酸合成機）を使用して）、又はそうでなければ通常その分子を産生する天然供給源（例えば、細胞又は生物）に由来しない核酸又は他の分子を指す。

【 0 0 4 6 】

標的指向性リガンド：本明細書で使用される場合、用語「標的指向性リガンド」は、目的の組織又は細胞の同種分子（例えば、受容体）と選択的に結合し、他方の物質を目的の組織又は細胞へと標的化するために別の物質にコンジュゲート可能である分子（例えば、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ポリペプチド、又は脂質）を指す。例えば、一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、オリゴヌクレオチドを目的の特定の組織又は細胞へと標的化するためにオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、細胞表面受容体と選択的に結合する。従って、一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされると、細胞の表面に発現された受容体との選択的結合により、並びにオリゴヌクレオチド、標的指向性リガンド、及び受容体を含む複合体の細胞によるエンドソーム内部移行により、特定の細胞内へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にする。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、オリゴヌクレオチドが細胞中で標的指向性リガンドから放出されるように、細胞内部移行後に又は細胞内部移行中に切断されるリンカーを介してオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされている。

20

30

【 0 0 4 7 】

テトラループ：本明細書で使用される場合、用語「テトラループ」は、ヌクレオチドのフランキグ配列のハイブリダイゼーションにより形成される隣接二重鎖の安定性を増加させるループを指す。安定性の増加は、無作為に選択されたヌクレオチドの配列からなる同等の長さの1セットのループから平均して予想される隣接ステム二重鎖の T_m よりも高い隣接ステム二重鎖の融解温度 (T_m) の上昇として検出可能である。例えば、テトラループは、10 mM NaHPO_4 中で、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも56、少なくとも58、少なくとも60、少なくとも65、又は少なくとも75の融解温度を、長さが少なくとも2塩基対の二重鎖を含むヘアピンに付与することができる。一部の実施形態では、テトラループは、スタッキング相互作用により隣接ステム二重鎖中の塩基対を安定させることができる。加えて、テトラループのヌクレオチド間の相互作用としては、これらに限定されないが、非ワトソン-クリック型塩基対合、スタッキング相互作用、水素結合、及び接触相互作用が挙げられる（Cheong ら、Nature、1990年8月16日；346巻（6285号）：680～2頁；Heus及びPardi、Science、1991年7月12日；253巻（5016号）：191～4頁）。一部の実施形態では、テトラループは、3～6個のヌクレオチドを含むか又ははからなり、典型的には4～5個のヌクレオチドである。ある実施形態では、テトラループは、修飾されていてもよく又はされていなくともよい（例えば、標的指向性部分にコンジュゲートされていてもよく又はされていなくともよい）3、4、5、又は6個のヌクレオチドを含むか又ははからなる。一実施形態では、テトラループは、4個のヌクレオチドからな

40

50

る。任意のヌクレオチドをテトラループに使用することができ、Cornish-Bowden (1985年) *Nucl. Acids Res.*、13巻: 3021~3030頁に記載の、そのようなヌクレオチドの標準IUPAC-IUB記号を使用することができる。例えば、文字「N」は、その位置には任意の塩基が存在してもよいことを意味するために使用することができ、文字「R」は、その位置にはA(アデニン)又はG(グアニン)が存在してもよいことを意味するために使用することができ、「B」は、その位置にはC(シトシン)、G(グアニン)、又はT(チミン)が存在してもよいことを意味するために使用することができる。テトラループの例としては、UNCGファミリーのテトラループ(例えば、UUCG)、GNRAファミリーのテトラループ(例えば、GAAA)、及びCUUGテトラループが挙げられる(Woeseら、*Proc Natl Acad Sci USA*、1990年11月; 87巻(21号): 8467~71頁; Antaoら、*Nucleic Acids Res.*、1991年11月11日; 19巻(21号): 5901~5頁)。DNAテトラループの例としては、d(GNNA)ファミリーのテトラループ(例えば、d(GTTA))、d(GNRA)ファミリーのテトラループ、d(GNAB)ファミリーのテトラループ、d(CNNG)ファミリーのテトラループ、及びd(TNCG)ファミリーのテトラループ(例えば、d(TTCG))が挙げられる。例えば、Nakanoraら、*Biochemistry*、41巻(48号)、14281~14292頁、2002年。SHINJIら、*Nippon Kagakkaï Koen Yokoshu* 第78巻; 2号; 731頁(2000年)を参照されたい。これらの文献は、それらの関連開示について参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、テトラループは、ニック付きテトラループ構造内に含まれている。

【0048】

治療する: 本明細書で使用される場合、用語「治療する」は、既存の状態(例えば、疾患、障害)と比べて対象の健康及び/又は安寧を向上させるために、又は状態の発生の可能性を予防若しくは減少させるために、例えば、治療剤(例えば、オリゴヌクレオチド)を対象に投与することにより、それを必要とする対象に療治を提供する行為を指す。一部の実施形態では、治療は、対象が経験している状態(例えば、疾患、障害)の少なくとも1つの徴候、症状、又は寄与要因の頻度又は重症度を低減させることを含む。

【0049】

II. オリゴヌクレオチドに基づく阻害剤

i. ALDH2 標的指向性オリゴヌクレオチド

本明細書では、複数の異なる種(ヒト、カニクイザル、及びマウス(例えば、実施例1を参照))のmRNAを含むALDH2 mRNAの調査並びに*in vitro*試験及び*in vivo*試験により、強力なオリゴヌクレオチドが特定された。そのようなオリゴヌクレオチドを使用すると、ALDH2活性を低減することにより、並びに結果的にアルコール耐容性及び/又はアルコール消費の欲求を減少させることにより、アルコール中毒対象のための治療利益を達成することができる。例えば、本明細書では、表4に提供されている表にも配置されている(例えば、配列番号581に示されている配列を含むセンス鎖、及び配列番号591に示されている配列を含むアンチセンス鎖)ような、配列番号581~590のいずれか1つに示されている配列を含むか又はからなるセンス鎖、及び配列番号591~600から選択される相補的配列を含むか又はからなるアンチセンス鎖を有する強力なRNAiオリゴヌクレオチドが提供される。

【0050】

配列は、複数の異なるオリゴヌクレオチド構造(又は形式)に入れることができる。例えば、一部の実施形態では、配列は、両方とも長さが17~36ヌクレオチドの範囲であるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチドに組み込むことができる。一部の実施形態では、それらのセンス鎖の3'伸長内にテトラループ構造、及びそのアンチセンス鎖の3'末端に2個の末端突出ヌクレオチドを有するそのような配列が組み込まれているオリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、2個の末端突出ヌクレオチドは、GGである。典型的には、アンチセンス鎖の2個の末端GGヌクレオチドの一方又

は両方は、標的と相補的ではない。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、両方とも長さが 2 1 ~ 2 3 ヌクレオチドの範囲であるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含むそのような配列が組み込まれているオリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、長さが 1 又は 2 ヌクレオチドである 3' 突出が、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方に提供される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2 3 ヌクレオチドのガイド鎖及び 2 1 ヌクレオチドのパスセンジャー鎖を有し、パスセンジャー鎖の 3' - 末端及びガイド鎖の 5' - 末端は平滑末端を形成し、ガイド鎖は 2 ヌクレオチドの 3' 突出を有する。

【 0 0 5 2 】

一部の実施形態では、ALDH2 mRNA のある領域は、他の領域よりもオリゴヌクレオチドに基づく阻害を起こし易いため、標的化のホットスポットであることが発見された。一部の実施形態では、ALDH2 のホットスポット領域は、配列番号 6 0 1 ~ 6 0 7 のいずれか 1 つに示されている配列を含むか又はからなる。ALDH2 mRNA のこうした領域は、ALDH2 mRNA 発現を阻害するための本明細書で考察されているオリゴヌクレオチドを使用して標的とすることができる。

【 0 0 5 3 】

従って、一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、細胞中の mRNA を標的としその発現を阻害するための、ALDH2 mRNA (例えば、ALDH2 mRNA のホットスポット内の) に対する相補性領域を有するように設計されている。相補性領域は、一般に、オリゴヌクレオチド (又はその鎖) が ALDH2 mRNA にアニーリングしてその発現を阻害することを可能にするのに好適な長さ及び塩基内容である。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、ALDH2 mRNA のホットスポット領域内にマッピングされる配列を含む、配列番号 1 ~ 1 4 及び 1 7 ~ 2 9 0 に示されている配列と少なくとも部分的に相補的である相補性領域を (例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖に) 含む。一部の実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 1 4 及び 1 7 ~ 2 9 0 に示されている配列と完全に相補的である相補性領域を (例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖に) 含む。一部の実施形態では、配列番号 1 ~ 1 4 及び 1 7 ~ 2 9 0 に示されている配列の連続ヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチドの相補性領域は、アンチセンス鎖の長さ全体にわたる。一部の実施形態では、配列番号 1 ~ 1 4 及び 1 7 ~ 2 9 0 のいずれか 1 つに示されている配列の連続ヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチドの相補性領域は、アンチセンス鎖の長さ全体の部分にわたる (例えば、アンチセンス鎖の 3' 末端の 2 個のヌクレオチドを除いて)。一部の実施形態では、本明細書に開示されているオリゴヌクレオチドは、配列番号 5 8 1 ~ 5 9 0 に示されている配列のヌクレオチド 1 ~ 1 9 にわたる連続したひと続きのヌクレオチドと少なくとも部分的に (例えば、完全に) 相補的である相補性領域を (例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖に) 含む。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、相補性領域は、長さが少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、少なくとも 2 0、少なくとも 2 1、少なくとも 2 2、少なくとも 2 3、少なくとも 2 4、少なくとも 2 5 ヌクレオチドである。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、長さが 1 2 ~ 3 0 (例えば、1 2 ~ 3 0、1 2 ~ 2 2、1 5 ~ 2 5、1 7 ~ 2 1、1 8 ~ 2 7、1 9 ~ 2 7、又は 1 5 ~ 3 0) ヌクレオチドの範囲である、ALDH2 との相補性領域を有する。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、長さが 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、又は 3 0 ヌクレオチドであ

10

20

30

40

50

る、ALDH2との相補性領域を有する。

【0056】

一部の実施形態では、ALDH2との相補性領域は、ALDH2 mRNAの対応する配列と比較して、1つ又は複数のミスマッチを有してもよい。オリゴヌクレオチドにある相補性領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下でALDH2 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持する限り、最大1つ、最大2つ、最大3つ、最大4つ、最大5つ等のミスマッチを有してもよい。或いは、オリゴヌクレオチドの相補性領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下でALDH2 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持する限り、1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、又は5つ以下のミスマッチを有してもよい。一部の実施形態では、相補性領域に1つよりも多くのミスマッチが存在する場合、それらは、オリゴヌクレオチドが適切なハイブリダイゼーション条件下でALDH2 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持する限り、連続的に（例えば、2つ、3つ、4つ、又はそれよりも多くが連続して）配置されていてもよく、又は相補性領域の全体にわたって点在していてもよい。

10

【0057】

更に、一部の実施形態では、本明細書に提供されている二本鎖オリゴヌクレオチドは、表4に提供されている表に配置されているような（例えば、配列番号1に示されている配列を含むセンス鎖、及び配列番号291に示されている配列を含むアンチセンス鎖）、配列番号1～14及び17～290のいずれか1つに示されている配列を有するセンス鎖、並びに配列番号291～304及び307～580から選択される相補的配列を含むアンチセンス鎖を含むか又はからなる。

20

【0058】

ii. オリゴヌクレオチド構造

本開示の方法でALDH2を標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドには、RNAi、miRNA等を含む様々な構造が存在する。本明細書又は他所に記載されている構造のいずれかをフレームワークとして使用して、本明細書に記載の配列（例えば、配列番号601～607に示されているもの等の、ALDH2のホットスポット配列）を組み込むか又は標的とすることができる。ALDH2発現を標的とするための二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、RNAi経路により）は、一般に、互いに二重鎖を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を有する。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、共有結合で連結されていない。しかしながら、一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、共有結合で連結されている。

30

【0059】

一部の実施形態では、ALDH2の発現を低減するための二本鎖オリゴヌクレオチドは、RNA干渉（RNAi）を引き起こす。例えば、各鎖が、1～5ヌクレオチドの少なくとも1つの3'突出を有する19～25ヌクレオチドのサイズを有するRNAiオリゴヌクレオチドが開発されている（例えば、米国特許第8,372,968号明細書を参照）。ダイサーにより処理されて活性RNAi産物を生成するより長いオリゴヌクレオチドも開発されている（例えば、米国特許第8,883,996号明細書を参照）。更なる研究により、鎖の一方が熱力学的に安定なテトラループ構造を含む構造を含む、少なくとも一方の鎖の少なくとも一方の末端が二重鎖標的指向性領域を越えて伸長している伸長二本鎖オリゴヌクレオチドがもたらされた（例えば、米国特許第8,513,207号明細書及び第8,927,705号明細書並びに国際公開第2010033225号パンフレットを参照。これらの文献は、それらのオリゴヌクレオチドの開示について参照により本明細書に組み込まれる）。そのような構造としては、一本鎖伸長（分子の一方又は両方の側での）並びに二本鎖伸長を挙げることができる。

40

【0060】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが21～23ヌクレオチドの範囲であってもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の3'末端に突出（例えば、長さが1、2、又は3ヌクレオチドの）を有しても

50

よい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド（例えば、*siRNAs*）は、標的RNAに対してアンチセンスである21ヌクレオチドのガイド鎖、及び相補的パッセンジャー鎖を含み、両鎖はアニーリングして、19bp二重鎖、及びいずれかの又は両方の3'末端に2ヌクレオチドの突出を形成する。例えば、米国特許第9012138号明細書、米国特許第9012621号明細書、及び米国特許第9193753号明細書を参照されたい。これらの文献の各々の内容は、それらの関連開示について本明細書に組み込まれる。

【0061】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、アンチセンス-センス二重鎖を越えて伸長する領域を含む36ヌクレオチドのセンス鎖を有し、伸長領域は、ステムが6塩基対の二重鎖であり、テトラループが4個のヌクレオチドを有するステム-テトラループ構造を有する。こうした実施形態にあるものでは、テトラループヌクレオチドの3個又は4個は各々、一価GalNacリガンドにコンジュゲートされている。

10

【0062】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、25ヌクレオチドのセンス鎖、及びダイサー酵素による作用を受けると成熟RISCに組み込まれているアンチセンス鎖がもたらされる27ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含む。

【0063】

本明細書で開示されている組成物及び方法で使用するための他のオリゴヌクレオチド設計としては、以下のものが挙げられる：16量体*siRNA* (*Nucleic Acids in Chemistry and Biology*、Blackburn (編)、Royal Society of Chemistry、2006年を参照)、*shRNA* (例えば、19bp又はそれよりも短いステムを有する；例えば、Mooreら、*Methods Mol. Biol.* 2010年；629巻：141~158頁を参照)、平滑末端*siRNA* (例えば、長さが19bpsの；例えば、Kraynack及びBaker、*RNA* 12巻、163~176頁(2006年)を参照)、非対称*siRNA* (*aiRNA*；例えば、Sunら、*Nat. Biotechnol.* 26巻、1379~1382頁(2008年)を参照)、非対称短鎖二重鎖*siRNA* (*asymmetric shorter-duplex siRNA*) (例えば、Changら、*Mol Ther.* 2009年4月；17巻(4号)：725~32頁を参照)、フォーク型*siRNA* (例えば、Hohjoh、*FEBS Letters*、557巻、1~3号；2004年1月、193~198頁を参照)、一本鎖*siRNA* (Elsner；*Nature Biotechnology* 30巻、1063頁(2012年))、ダンベル型環状*siRNA* (例えば、Abeら、*J Am Chem Soc* 129巻：15108~15109頁(2007年)を参照)、及び低分子内部セグメント化干渉RNA (*small internally segmented interfering RNA*) (*sisRNA*；例えば、Bramsenら、*Nucleic Acids Res.* 2007年9月；35巻(17号)：5886~5897頁を参照)。上述の参考文献の各々は、その中の関連開示についてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ALDH2の発現を低減又は阻害するために一部の実施形態で使用することができるオリゴヌクレオチド構造の更なる非限定的な例は、マイクロRNA (*miRNA*)、短鎖ヘアピンRNA (*shRNA*)、及び短鎖*siRNA*である(例えば、Hamiltonら、*Embo J.*、2002年、21巻(17号)：4671~4679頁を参照；また米国特許出願公開第20090099115号明細書を参照)。

20

30

40

【0064】

a. アンチセンス鎖

一部の実施形態では、ALDH2を標的とするための本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、配列番号291~304、307~580、及び591~600のいずれか1つに示されている配列を含むか又はからなるアンチセンス鎖を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号291~304、307~580、及び591~600のいずれか1つに示されている配列の少なくとも12(例えば、少なくとも12

50

、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、又は少なくとも23)連続ヌクレオチドを含むか又はからなるアンチセンス鎖を含む。

【0065】

一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、長さが最大で40ヌクレオチド(例えば、長さが最大で40、最大で35、最大で30、最大で27、最大で25、最大で21、最大で19、最大で17、又は最大で12ヌクレオチド)のアンチセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド(例えば、長さが少なくとも12、少なくとも15、少なくとも19、少なくとも21、少なくとも25、少なくとも27、少なくとも30、少なくとも35、又は少なくとも38ヌクレオチド)のアンチセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが12~40(例えば、12~40、12~36、12~32、12~28、15~40、15~36、15~32、15~28、17~21、17~25、19~27、19~30、20~40、22~40、25~40、又は32~40)ヌクレオチドの範囲のアンチセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが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、又は40ヌクレオチドのアンチセンス鎖を有してもよい。

10

【0066】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖は、「ガイド鎖」と呼ばれる場合がある。例えば、アンチセンス鎖が、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と係合し、アルゴノートタンパク質に結合するか、又は1つ若しくは複数の類似因子と係合若しくは結合し、標的遺伝子のサイレンシングを指図する場合、それをガイド鎖と呼ぶことができる。一部の実施形態では、ガイド鎖と相補的なセンス鎖は、「パッセンジャー鎖」と呼ばれる場合がある。

20

【0067】

b. センス鎖

一部の実施形態では、ALDH2を標的とするための本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、配列番号1~14、17~290、及び581~590のいずれか1つに示されているセンス鎖配列を含むか又はからなる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1~14、17~290、及び581~590のいずれか1つに示されている配列の少なくとも12(例えば、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、又は少なくとも23)連続ヌクレオチドを含むか又はからなるセンス鎖を有する。

30

【0068】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが最大で40ヌクレオチド(例えば、長さが最大で40、最大で35、最大で30、最大で27、最大で25、最大で21、最大で19、最大で17、又は最大で12ヌクレオチド)のセンス鎖(又はパッセンジャー鎖)を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが少なくとも12ヌクレオチド(例えば、長さが少なくとも12、少なくとも15、少なくとも19、少なくとも21、少なくとも25、少なくとも27、少なくとも30、少なくとも35、又は少なくとも38ヌクレオチド)のセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが12~40(例えば、12~40、12~36、12~32、12~28、15~40、15~36、15~32、15~28、17~21、17~25、19~27、19~30、20~40、22~40、25~40、又は32~40)ヌクレオチドの範囲のセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、長さが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、又は40ヌクレオチドのセンス鎖を有してもよい。

40

50

【0069】

一部の実施形態では、センス鎖は、その3' - 末端にステム - ループ構造を含む。一部の実施形態では、センス鎖は、その5' - 末端にステム - ループ構造を含む。一部の実施形態では、ステムは、長さが2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14ヌクレオチドの二重鎖である。一部の実施形態では、ステム - ループは、分解（例えば、酵素的分解）に対するより良好な保護を分子に提供し、標的細胞へと送達するための標的指向性特徴を容易にする。例えば、一部の実施形態では、ループは、オリゴヌクレオチドの遺伝子発現阻害活性に実質的に影響を及ぼさず修飾を行うことができる、追加のヌクレオチドを提供する。ある実施形態では、センス鎖が（例えば、その3' - 末端に） $S_1 - L - S_2$ として示されるステム - ループを含み、式中 S_1 は、 S_2 と相補的であり、 L は、 S_1 と S_2 との間に長さが最大で10ヌクレオチド（例えば、長さが3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチド）のループを形成するオリゴヌクレオチドが本明細書で提供される。

10

【0070】

一部の実施形態では、ステム - ループのループ（ L ）は、テトラループである（例えば、ニック付きテトラループ構造内の）。テトラループは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、及びそれらの組合せを含んでいてもよい。典型的には、テトラループは、4～5ヌクレオチドを有する。

【0071】

c. 二重鎖の長さ

一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、長さが少なくとも12（例えば、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、又は少なくとも21）ヌクレオチドである。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、長さが12～30ヌクレオチド（例えば、長さが12～30、12～27、12～22、15～25、18～30、18～22、18～25、18～27、18～30、19～30、又は21～30ヌクレオチド）の範囲である。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、長さが12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチドである。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の長さ全体にはわたっていない。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間の二重鎖は、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの長さ全体にわたる。ある実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間の二重鎖は、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方の長さ全体にわたる。

20

30

【0072】

d. オリゴヌクレオチド末端

一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のいずれかに、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方に、3' - 突出が存在する。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、一方の5'末端が、他方の5'末端と比較して熱力学的により不安定である。一部の実施形態では、センス鎖の3'末端に平滑末端、及びアンチセンス鎖の3'末端に突出を含む非対称オリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'突出は、長さが1～8ヌクレオチド（例えば、長さが1、2、3、4、5、6、7、又は8ヌクレオチド）である。

40

【0073】

典型的には、RNAiのオリゴヌクレオチドは、アンチセンス（ガイド）鎖の3'末端に2ヌクレオチドの突出を有する。しかしながら、他の突出が可能である。一部の実施形態では、突出は、1～6ヌクレオチド、任意選択で1～5、1～4、1～3、1～2、2～6、2～5、2～4、2～3、3～6、3～5、3～4、4～6、4～5、5～6ヌクレオチド、又は1、2、3、4、5、若しくは6ヌクレオチドの長さを含む3'突出であ

50

る。しかしながら、一部の実施形態では、突出は、1～6ヌクレオチド、任意選択で1～5、1～4、1～3、1～2、2～6、2～5、2～4、2～3、3～6、3～5、3～4、4～6、4～5、5～6ヌクレオチド、又は1、2、3、4、5、若しくは6ヌクレオチドの長さを含む5'突出である。

【0074】

一部の実施形態では、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の3'末端又は5'末端の1つ又は複数の(例えば、2、3、4個の)末端ヌクレオチドは修飾されている。例えば、一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の1個又は2個の末端ヌクレオチドは修飾されている。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の最後のヌクレオチドは修飾されており、例えば2'-修飾、例えば2'-O-メトキシエチルを含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の最後の1個又は2個の末端ヌクレオチドは、標的と相補的である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の最後の1個又は2個のヌクレオチドは、標的と相補的でない。一部の実施形態では、センス鎖又はアンチセンス鎖の5'末端及び/又は3'末端は、逆向きキャップヌクレオチドを有する。

10

【0075】

e. ミスマッチ

一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間には1つ又は複数の(例えば、1、2、3、4、5つの)ミスマッチが存在する。センス鎖とアンチセンス鎖との間に1つよりも多くのミスマッチが存在する場合、それらは、連続的に配置されていてもよく(例えば、2つ、3つ、又はそれよりの多くが連続して)、又は相補性領域の全体にわたって点在していてもよい。一部の実施形態では、センス鎖の3'-末端は、1つ又は複数のミスマッチを含む。一実施形態では、2つのミスマッチが、センス鎖の3'末端に組み込まれている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖の3'-末端のセグメントの塩基ミスマッチ又は不安定化は、恐らくはダイサーによるプロセッシングを促進することにより、RNAiにおける合成二重鎖の効力を向上させた。

20

【0076】

iii. 一本鎖オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、本明細書に記載のような、ALDH2発現を低減するためのオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。そのような構造としては、これらに限定されないが、一本鎖RNAiオリゴヌクレオチドを挙げることができる。最近の努力により、一本鎖RNAiオリゴヌクレオチドの活性が実証されている(例えば、Matsuiら(2016年5月)、Molecular Therapy、24巻(5号)、946～955頁を参照)。しかしながら、一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'から3'方向に記載して、特定の核酸の標的とされているセグメントの逆相補体を含み、(例えば、ギャップマー(gapmer)として)細胞での標的RNAのRNAaseH誘導性切断を誘導するように、又は(例えば、ミックスマー(mixer)として)細胞での標的mRNAの翻訳を阻害するように好適に修飾されている核酸塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。本開示で使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの修飾に関するその開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,567,587号明細書に示されているものを含む、当該技術で公知の任意の好適な様式で修飾することができる(例えば、長さ、核酸塩基(ピリミジン、プリン)の糖部分、及び核酸塩基のヘテロ環部分の変更を含む)。更に、アンチセンス分子は、特定の標的遺伝子の発現を低減させるために、数十年にわたって使用されている(例えば、Bennettら、Pharmacology of Antisense Drugs, Annual Review of Pharmacology and Toxicology、57巻:81～105頁を参照)。

30

40

【0077】

iv. オリゴヌクレオチド修飾

オリゴヌクレオチドは、種々の方法で修飾して、特異性、安定性、送達、生物学的利用

50

能、ヌクレアーゼ分解からの耐性、免疫原性、塩基対合特性、RNA分布、及び細胞取り込み、及び治療使用又は研究使用に関連する他の特徴を向上又は制御することができる。例えば、Bramsenら、*Nucleic Acids Res.*、2009年、37巻、2867～2881頁；Bramsen及びKjems (*Frontiers in Genetics*、3巻(2012年)：1～22頁を参照されたい。従って、一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の好適な修飾を含んでもよい。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、その塩基(又は核酸塩基)、糖(例えば、リボース、デオキシリボース)、又はホスフェート基に修飾を有する。

【0078】

オリゴヌクレオチドの修飾の数及びそうしたヌクレオチド修飾の位置は、オリゴヌクレオチドの特性に影響を及ぼす場合がある。例えば、オリゴヌクレオチドは、それらを脂質ナノ粒子(LNP)又は類似の担体にコンジュゲートすることにより又は包含させることにより、*in vivo*送達することができる。しかしながら、オリゴヌクレオチドがLNP又は類似の担体により保護されていない場合(例えば、「ネイキッド送達」)、そのヌクレオチドの少なくとも一部を修飾することが有利であり得る。従って、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドのいずれかのある実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの全て又は実質的に全てが修飾されている。ある実施形態では、ヌクレオチドの半分よりも多くが修飾されている。ある実施形態では、ヌクレオチドの半分未満が修飾されている。典型的には、ネイキッド送達の場合、全ての糖の2'位が修飾されている。こうした修飾は、可逆的であってもよく又は不可逆的であってもよい。一部の実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、所望の特徴(例えば、酵素的分解からの保護、*in vivo*投与後に所望の細胞を標的とする能力、及び/又は熱力学的安定性)をもたらすのに十分な数及びタイプの修飾ヌクレオチドを有する。

【0079】

a. 糖修飾

一部の実施形態では、修飾糖(本明細書では糖類似体とも呼ばれる)としては、例えば、糖の2'、3'、4'、及び/又は5'炭素位置に1つ又は複数の修飾が生じる修飾デオキシリボース又はリボース部分が挙げられる。また、一部の実施形態では、修飾糖は、ロックド核酸(「LNA」)(例えば、Koshkinら(1998年)、*Tetrahedron* 54巻、3607～3630頁を参照)、アンロックド核酸(「UNA」)(例えば、Sneadら(2013年)、*Molecular Therapy - Nucleic Acids*、2巻、e103頁を参照)、及び架橋核酸(「BNA」)(例えば、Imanishi及びObika(2002年)、*The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun.*、1653～1659頁を参照)に存在するもの等の、非天然代替炭素構造を含んでもよい。Koshkinら、Sneadら、並びにImanishi及びObikaは、糖修飾に関するそれらの開示が参照により本明細書に組み込まれる。

【0080】

一部の実施形態では、糖のヌクレオチド修飾は、2'-修飾を含む。ある実施形態では、2'-修飾は、2'-アミノエチル、2'-フルオロ、2'-Oメチル、2'-O-メトキシエチル、又は2'-デオキシ-2'-フルオロ-d-アラビノ核酸であってもよい。典型的には、修飾は、2'-フルオロ、2'-O-メチル、又は2'-O-メトキシエチルである。しかしながら、オリゴヌクレオチドに使用するために開発された種々様々な2'位修飾を、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドに使用することができる。例えば、Bramsenら、*Nucleic Acids Res.*、2009年、37巻、2867～2881頁を参照されたい。一部の実施形態では、糖の修飾は、糖環の1つ又は複数の炭素の修飾を含んでもよい、糖環の修飾を含む。例えば、ヌクレオチドの糖の修飾は、糖の2'-炭素と1'-炭素又は4'-炭素との間の連結を含んでもよい。例えば、連結は、エチレン架橋又はメチレン架橋を含んでもよい。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2'-炭素と3'-炭素との結合を欠如する非環式

糖を有する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、例えば糖の4'位にチオール基を有する。

【0081】

一部の実施形態では、末端3'-末端基(例えば、3'-ヒドロキシル)は、ホスフェート基、或いは例えば、リンカー、アダプター、若しくは標識を付着させるために、又はオリゴヌクレオチドを別の核酸と直接ライゲーションさせるために使用することができる他の基である。

【0082】

b. 5'末端ホスフェート

オリゴヌクレオチドの5'-末端ホスフェート基は、アルゴノート2との相互作用を増強してもよく又は一部の場合では増強する。しかしながら、5'-ホスフェート基を含むオリゴヌクレオチドは、ホスファターゼ又は他の酵素による分解に感受性であってもよく、それにより *in vivo* でのそれらの生物学的利用能を制限することができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、そのような分解に耐性である5'ホスフェートの類似体を含む。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、オキシメチルホスホネート、ビニルホスホネート、又はマロニルホスホネートである。ある実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖の5'末端は、天然5'-ホスフェート基の静電的及び立体的特性を模倣する化学部分(「ホスフェート模倣体」)に付着されている(例えば、Prakashら(2015年)、*Nucleic Acids Res.*、*Nucleic Acids Res.* 2015年3月31日; 43巻(6号): 2993~3011頁を参照。この文献のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。5'末端に付着させることができるホスフェート模倣体が数多く開発されている(例えば、米国特許第8,927,513号明細書を参照。この文献のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。オリゴヌクレオチドの5'末端のための他の修飾が開発されている(例えば、国際公開第2011/133871号パンフレットを参照。この文献の各々のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。ある実施形態では、ヒドロキシル基が、オリゴヌクレオチドの5'末端に付着されている。

【0083】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、糖の4'-炭素位置にホスフェート類似体を有する(「4'-ホスフェート類似体」と呼ばれる)。例えば、2017年9月1日に出願された国際特許出願第PCT/US2017/049909号パンフレット、2016年9月2日に出願された、4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Sameと題する米国特許仮出願第62/383,207号明細書、及び2016年9月12日に出願された、4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Sameと題する第62/393,401号明細書を参照されたい。これらの文献の各々のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、5'-末端ヌクレオチドに4'-ホスフェート類似体を含む。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、オキシメチル基の酸素原子が糖部分(例えば、その4'-炭素に)又はその類似体に結合されているオキシメチルホスホネートである。他の実施形態では、4'-ホスフェート類似体は、チオメチル基の硫黄原子又はアミノメチル基の窒素原子が糖部分又はその類似体の4'-炭素に結合されているチオメチルホスホネート又はアミノメチルホスホネートである。ある実施形態では、4'-ホスフェート類似体は、オキシメチルホスホネートである。一部の実施形態では、オキシメチルホスホネートは、式-O-CH₂-PO(OH)₂又は-O-CH₂-PO(OR)₂により表され、式中Rは、独立してH、CH₃、アルキル基、CH₂CH₂CN、CH₂OCOC(CH₃)₃、CH₂OCH₂CH₂Si(CH₃)₃、又は保護基から選択される。ある実施形態では、アルキル基はCH₂CH₃である。より典型的には、Rは、独立してH、CH₃、又はCH₂CH₃から

10

20

30

40

50

選択される。

【0084】

c. 修飾ヌクレオシド間連結

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド間連結を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ホスフェート修飾又は置換は、少なくとも1つの（例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも5つの）修飾ヌクレオチド間連結を含むオリゴヌクレオチドをもたらすことができる。一部の実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドのいずれか1つは、1～10個の（例えば、1～10、2～8、4～6、3～10、5～10、1～5、1～3、又は1～2個の）修飾ヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドのいずれか1つは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の修飾ヌクレオチド間連結を含む。

10

【0085】

修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロジチオエート連結、ホスホロチオエート連結、ホスホトリエステル連結、チオノアルキルホスホネート連結、チオノアルキルホスホトリエステル連結、ホスホラミダイト連結、ホスホネート連結、又はボラノホスフェート連結であってもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示されているオリゴヌクレオチドのいずれか1つの少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート連結である。

20

【0086】

d. 塩基修飾

一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の修飾核酸塩基を有する。一部の実施形態では、修飾核酸塩基（本明細書では塩基類似体とも呼ばれる）は、ヌクレオチド糖部分の1'位に連結されている。ある実施形態では、修飾核酸塩基は、窒素含有塩基である。ある実施形態では、修飾核酸塩基は、窒素原子を含んでいない。例えば、米国特許出願公開第20080274462号明細書を参照されたい。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、ユニバーサル塩基を含む。しかしながら、ある実施形態では、修飾ヌクレオチドは、核酸塩基を含んでいない（脱塩基）。

【0087】

一部の実施形態では、ユニバーサル塩基は、修飾ヌクレオチドのヌクレオチド糖部分の1'位に、又は二重鎖に存在する場合、二重鎖の構造を実質的に変更することなく1つよりも多くのタイプの塩基の反対側に配置することができるヌクレオチド糖部分置換の等価位置に位置するヘテロ環式部分である。一部の実施形態では、標的核酸と完全に相補的な参照一本鎖核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、相補的核酸で形成される二重鎖よりも低い T_m を有する、標的核酸との二重鎖を形成する。しかしながら、一部の実施形態では、ユニバーサル塩基が、単一のミスマッチを生成するように塩基と置き換えられている参照一本鎖核酸と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、ミスマッチ塩基を含む核酸と形成される二重鎖よりも高い T_m を有する、標的核酸との二重鎖を形成する。

30

【0088】

ユニバーサル結合ヌクレオチドの非限定的な例としては、イノシン、1 - D - リボフラノシル - 5 - ニトロインドール、及び/又は1 - D - リボフラノシル - 3 - ニトロピロールが挙げられる（Quayらの米国特許出願公開第20070254362号明細書；Van Aerschotら、An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside、Nucleic Acids Res. 1995年11月11日；23巻（21号）：4363～70頁；Loakesら、3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR、Nucleic Acids Res. 1995年7月11日；23巻（13号）：2361～6

40

50

頁；Loakes及びBrown、5-Nitroindole as an universal base analogue.、Nucleic Acids Res. 1994年10月11日；22巻(20号)：4039～43頁。上述の文献の各々はそれらの塩基修飾に関する開示について参照により本明細書に組み込まれている。

【0089】

e. 可逆的修飾

ある修飾をなして、標的細胞に到達する前の *in vivo* 環境からオリゴヌクレオチドを保護することができるが、それらは、標的細胞のサイトゾルに到達するとオリゴヌクレオチドの効力又は活性を低減させる場合がある。分子が細胞の外部で望ましい特性を維持するように可逆的修飾をなすことができ、その後可逆的修飾は、細胞のサイトゾル環境に進入すると除去される。可逆的修飾は、例えば、細胞内酵素の作用により、又は細胞内部の化学条件により(例えば、細胞内グルタチオンによる還元により)除去することができる。

10

【0090】

一部の実施形態では、可逆的に修飾されたヌクレオチドは、グルタチオン感受性部分を含む。典型的には、核酸分子は、ヌクレオチド間ジホスフェート連結により創出される負電荷を遮蔽し、細胞取り込み及びヌクレアーゼ耐性を向上させるように、環式ジスルフィド部分で化学的に修飾されている。元々は Traversa Therapeutics, Inc. 社に帰属する米国特許出願公開第2011/0294869号明細書(「Traversa」)、Solstice Biologics, Ltd. 社の国際公開第2015/188197号パンフレット(「Solstice」)、Meadeら、Nature Biotechnology、2014年、32巻：1256～1263頁(「Meade」)、Merck Sharp & Dohme Corp 社の国際公開第2014/088920号パンフレットを参照されたい。これらの文献の各々は、そのような修飾の開示について参照により組み込まれる。ヌクレオチド間ジホスフェート連結のこの可逆的修飾は、サイトゾルの還元環境(例えば、グルタチオン)により細胞内で切断されるように設計されている。初期の例としては、細胞内部で切断可能であることが報告された中和ホスホトリエステル修飾が挙げられる(Dellingerら、J. Am. Chem. Soc. 2003年、125巻：940～950頁)。

20

【0091】

一部の実施形態では、そのような可逆的修飾は、オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼ及び他の過酷な環境条件(例えば、pH)に曝されることになる *in vivo* 投与中(例えば、血液及び/又は細胞のリソソーム/エンドソームコンパートメントを通過中)の保護を可能にする。修飾は、グルタチオンのレベルが細胞外空間と比較してより高い細胞のサイトゾルへと放出されると、元に戻り、その結果としてオリゴヌクレオチドが切断される。可逆的なグルタチオン感受性部分を使用すると、不可逆的修飾を使用する場合に利用可能な選択肢と比較して、立体的により大きな化学基を目的のオリゴヌクレオチドに導入することが可能である。これは、そうしたより大きな化学基は、サイトゾルで除去されるため、細胞のサイトゾル内部のオリゴヌクレオチドの生物学的活性を妨害するはずがないからである。結果として、そうしたより大きな化学基を組み込んで、ヌクレアーゼ耐性、親油性、電荷、熱安定性、特異性、及び低免疫原性等の種々の利点をヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに付与することができる。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分の構造を組み込んで、その放出の動力学を修飾することができる。

30

40

【0092】

一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、ヌクレオチドの糖に付着されている。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、修飾ヌクレオチドの糖の2'炭素に付着されている。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、特に修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの5'-末端ヌクレオチドである場合、糖の5'-炭素に位置する。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、特に修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの3'-末端ヌクレオチドである場合、糖の3'-炭素に位置する。一部の実

50

施形態では、グルタチオン感受性部分は、スルホニル基を含む。例えば、国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 7 / 0 4 8 2 3 9 号パンフレット、及び2016年8月23日に出版された、Compositions Comprising Reversibly Modified Oligonucleotides and Uses Thereofと題する米国特許仮出願第62/378,635号明細書を参照されたい。これらの文献の内容は、その関連開示について参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

v. 標的指向性リガンド

一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドを、1つ若しくは複数の細胞又は1つ若しくは複数の臓器に標的化することが望ましい場合がある。そのような戦略は、他の臓器における望ましくない効果の回避を支援することができるか、又はオリゴヌクレオチドが利益とならない細胞、組織、若しくは臓器へのオリゴヌクレオチドの過度の喪失を回避することができる。従って、一部の実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、特定の組織、細胞、又は臓器の標的化を容易にするように、例えば、肝臓へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にするように修飾されていてもよい。ある実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、肝臓の肝実質細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にするように修飾されていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の標的指向性リガンドにコンジュゲートされているヌクレオチドを含む。

10

【0094】

標的指向性リガンドは、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質若しくはタンパク質の一部（例えば、抗体若しくは抗体断片）、又は脂質を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的指向性リガンドはアプタマーである。例えば、標的指向性リガンドは、腫瘍血管系又は神経膠腫細胞を標的とするために使用される R G D ペプチド、腫瘍血管系若しくはストーマ、トランスフェリン、ラクトフェリンを標的とするための C R E K A ペプチド、又は C N S 血管系で発現されるトランスフェリン受容体を標的とするためのアプタマー、又は神経膠腫細胞上の E G F R を標的とするための抗 E G F R 抗体であってもよい。ある実施形態では、標的指向性リガンドは、1つ又は複数の G a l N A c 部分である。

20

【0095】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの1個又は複数の（例えば、1、2、3、4、5、又は6個の）ヌクレオチドは各々、別々の標的指向性リガンドにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの2～4個のヌクレオチドは各々、別々の標的指向性リガンドにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、標的指向性リガンドが歯ブラシの毛部分に相似し、オリゴヌクレオチドが歯ブラシに相似するように、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの末端の2～4個のヌクレオチドにコンジュゲートされている（例えば、リガンドは、センス鎖又はアンチセンス鎖の5'末端又は3'末端の2～4個ヌクレオチドの突出又は伸長部分にコンジュゲートされている）。例えば、オリゴヌクレオチドは、センス鎖の5'末端又は3'末端のいずれかにステム-ループを含んでいてもよく、ステムのループの1、2、3、又は4個のヌクレオチドは、例えば2016年6月23日に公開された国際公開第2016/100401号パンフレットに記載のような標的指向性リガンドに個々にコンジュゲートされていてもよい。この文献の関連内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0096】

一部の実施形態では、A L D H 2 の発現を低減させるオリゴヌクレオチドを、対象の肝臓の肝実質細胞へと標的化することが望ましい。任意の好適な肝実質細胞指向性部分をこの目的に使用することができる。

【0097】

G a l N A c は、主に肝実質細胞の洞様表面に発現され、末端ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン残基を含む循環性糖タンパク質（アシアロ糖タンパク質）の結合、

50

内部移行、及びその後のクリアランスに主要な役割を有するアジアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) のための高親和性リガンドである。GalNAc 部分を本開示のオリゴヌクレオチドにコンジュゲーションすることにより (間接的又は直接的のいずれかで)、そうしたオリゴヌクレオチドを、そうした肝実質細胞上で発現される ASGPR へと標的化することができる。

【0098】

一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、一価 GalNAc に直接的に又は間接的にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1 つよりも多くの一価 GalNAc に直接的に又は間接的にコンジュゲートされている (つまり、2 つ、3 つ、又は 4 つの一価 GalNAc 部分にコンジュゲートされており、典型的には 3 つ又は 4 つの一価 GalNAc 部分にコンジュゲートされている)。一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1 つ又は複数の二価 GalNAc、三価 GalNAc、又は四価 GalNAc 部分にコンジュゲートされている。

10

【0099】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの 1 個又は複数の (例えば、1、2、3、4、5、又は 6 個の) ヌクレオチドは各々、GalNAc 部分にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、ステム - ループのループ (L) の 2 ~ 4 個のヌクレオチドは各々、別々の GalNAc にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、GalNAc 部分が歯ブラシの毛部分に相似し、オリゴヌクレオチドが歯ブラシに相似するように、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの末端の 2 ~ 4 個のヌクレオチドにコンジュゲートされている (例えば、リガンドは、センス鎖又はアンチセンス鎖の 5' 末端又は 3' 末端の 2 ~ 4 個ヌクレオチドの突出又は伸長部分にコンジュゲートされている)。例えば、オリゴヌクレオチドは、センス鎖の 5' 末端又は 3' 末端のいずれかにステム - ループを含んでいてもよく、ステムのループの 1、2、3、又は 4 個のヌクレオチドは、個々に GalNAc 部分にコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、GalNAc 部分は、センス鎖のヌクレオチドにコンジュゲートされている。例えば、各 GalNAc 部分が 1 個のヌクレオチドにコンジュゲートされる場合、4 つの GalNAc 部分が、センス鎖のテトラループのヌクレオチドにコンジュゲートされていてもよい。

20

【0100】

適切な方法又は化学 (例えば、クリック化学) を使用して、標的指向性リガンドをヌクレオチドに連結することができる。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、クリックリンカーを使用してヌクレオチドにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、アセタールに基づくリンカーを使用して、標的指向性リガンドを、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか 1 個のヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。アセタールに基づくリンカーは、例えば、2016年6月23日に公開された国際公開第2016100401号A1パンフレットに開示されている。そのようなリンカーに関するこの文献の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、リンカーは不安定リンカーである。しかしながら、他の実施形態では、リンカーは、かなり安定である。一部の実施形態では、二重鎖伸長部分 (長さが最大で 3、4、5、又は 6 塩基対) が、標的指向性リガンド (例えば、GalNAc 部分) と二本鎖オリゴヌクレオチドとの間に提供されている。

30

40

【0101】

III. 製剤

オリゴヌクレオチド使用を容易にするための種々の製剤が開発されている。例えば、オリゴヌクレオチドは、分解を最小限に抑えるか、送達及び/若しくは取り込みを容易にするか、又は製剤中のオリゴヌクレオチドに別の有益な特性を提供する製剤を使用して、対象又は細胞環境に送達することができる。一部の実施形態では、本明細書には、ALDH2 の発現を低減させるオリゴヌクレオチド (例えば、一本鎖又は二本鎖オリゴヌクレオチド) を含む組成物が提供される。そのような組成物は、標的細胞の直近環境に又は全身性

50

のいずれかで対象に投与されると、十分な割合のオリゴヌクレオチドが細胞に進入して、ALDH2発現を低減するように好適に製剤化することができる。様々な好適なオリゴヌクレオチド製剤のいずれかを使用して、本明細書で開示されているALDH2を低減するためのオリゴヌクレオチドを送達することができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リン酸緩衝生理食塩溶液等の緩衝液、リボソーム、ミセル構造、及びカプシドで製剤化される。一部の実施形態では、ネイキッドオリゴヌクレオチド又はそれらのコンジュゲートを、水又は水溶液（例えば、pH調整剤を有する水）で製剤化される。一部の実施形態では、ネイキッドオリゴヌクレオチド又はそれらのコンジュゲートを、塩基性緩衝水溶液（例えば、PBS）で製剤化される。

【0102】

カチオン性脂質を有するオリゴヌクレオチドの製剤を使用して、細胞へのオリゴヌクレオチドのトランスフェクションを容易にすることができる。例えば、リポフェクチン、カチオン性グリセロール誘導體、及びポリカチオン性分子（例えば、ポリリシン）等のカチオン性脂質を使用することができる。好適な脂質としては、オリゴフェクタミン、リポフェクタミン（Life Technologies社）、NC388（Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.社、ポルダール、コロラド州）、又はFUGENE6（Roche社）が挙げられ、これらは全て製造業者の使用説明書に従って使用することができる。

【0103】

従って、一部の実施形態では、製剤は、脂質ナノ粒子を含む。一部の実施形態では、賦形剤は、リボソーム、脂質、脂質複合体、マイクロスフェア、マイクロ粒子、ナノスフェア、若しくはナノ粒子を含むか、又はそうでなければそれを必要とする対象の細胞、組織、臓器、若しくは体内に投与するために製剤化することができる（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Pharmaceutical Press、2013年を参照）。

【0104】

一部の実施形態では、本明細書で開示されている製剤は、賦形剤を含む。一部の実施形態では、賦形剤は、組成物に、安定性の向上、吸収の向上、溶解度の向上、及び/又は活性成分の治療増強を付与する。一部の実施形態では、賦形剤は、緩衝剤（例えば、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、トリス塩基、又は水酸化ナトリウム）又はビヒクル（例えば、緩衝溶液、ペトロラタム、ジメチルスルホキシド、又は鉱物油）である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、その保管寿命を延長するために凍結乾燥され、その後使用（例えば対象への投与）前に溶液にされる。従って、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1つを含む組成物中の賦形剤は、凍結乾燥保護剤（例えば、マンニトール、ラクトース、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドン）、又は崩壊温度調節剤（例えば、デキストラン、フィコール、又はゼラチン）であってもよい。

【0105】

一部の実施形態では、医薬組成物は、その意図されている投与経路と適合するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口投与、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、径粘膜、及び直腸内投与が挙げられる。典型的には、投与経路は、静脈内又は皮下である。

【0106】

注射使用に好適な医薬組成物としては、無菌水溶液（水溶性の場合）又は分散物、及び無菌注射溶液又は分散物の即時調製用の無菌粉末が挙げられる。静脈内投与又は皮下投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF社、パーシッパニー、ニュージャージー州）、又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びそれらの好適な混合物を含む溶媒又は分散媒であってもよい。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール等の多価アルコール、及び塩化ナトリウムを組成物中に含むこと

10

20

30

40

50

が望ましいだろう。無菌注射溶液は、必要とされる量のオリゴヌクレオチドを、上記に列挙されている成分の1つ又は組合せを有する選択された溶媒に組み込み、必要に応じて、続いて濾過滅菌することにより調製することができる。

【0107】

一部の実施形態では、組成物は、少なくとも約0.1%又はそれよりも多くの治療剤（例えば、ALDH2発現を低減するためのオリゴヌクレオチド）を含んでいてもよいが、活性成分のパーセンテージは、全組成物の質量又は容積の約1%～約80%又はそれよりも大きくてもよい。溶解度、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、製品保管寿命等の要因、並びに他の薬学的考慮要因が、そのような医薬製剤を調製する当業者により企図されることになり、従って様々な投薬量及び治療レジメンが望ましくてもよい。

10

【0108】

幾つかの実施形態は、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドのいずれかの肝臓標的送達に関するが、他の組織標的化も企図される。

【0109】

IV. 使用方法

i. 細胞でのALDH2発現低減

一部の実施形態では、細胞でのALDH2の発現を低減させるための本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドのいずれか1つの有効量を細胞に送達するための方法が提供される。本明細書で提供される方法は、任意の適切な細胞タイプに有用である。一部の実施形態では、細胞は、ALDH2を発現するあらゆる細胞（例えば、肝実質細胞、マクロファージ、単球由来細胞、前立腺がん細胞、脳、内分泌組織、骨髄、リンパ節、肺、胆嚢、肝臓、十二指腸、小腸、膵臓、腎臓、胃腸管、膀胱、脂肪及び柔組織、並びに皮膚の細胞）である。一部の実施形態では、細胞は、対象から得られたものであり、細胞が実質的にその天然表現型特性を維持するように、継代の回数が限定的であってもよい初代細胞である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドが送達される細胞は、*ex vivo*であってもよく又は*in vitro*であってもよい（つまり、培養中の細胞に、又は細胞が存在する生物に送達することができる）。具体的な実施形態では、肝実質細胞のみにおいてALDH2の発現を低減させるための本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドのいずれか1つの有効量を細胞に送達するための方法が提供される。

20

【0110】

一部の実施形態では、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを含む溶液を注射すること、オリゴヌクレオチドで覆われている粒子で衝撃すること、オリゴヌクレオチドを含む溶液を細胞又は生物と接触させること、又はオリゴヌクレオチドの存在下で細胞膜をエレクトロポレーションすることを含む、適切な核酸送達方法を使用して導入することができる。脂質媒介性担体輸送、化学媒介性輸送、及びリン酸カルシウム等のカチオン性リポソームトランスフェクション等の、オリゴヌクレオチドを細胞に送達するための他の適切な方法を使用することができる。

30

【0111】

阻害の結果は、細胞又は対象の1つ又は複数の特性を評価するための適切なアッセイにより、又はALDH2発現（例えば、RNA、タンパク質）を示す分子を評価する生化学的技法により確認することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドが、ALDH2の発現レベルを低減する程度は、発現レベル（例えば、ALDH2のmRNAレベル又はタンパク質レベル）を適切な対照（例えば、オリゴヌクレオチドが送達されていないか又は陰性対照が送達されている細胞又は細胞集団でのALDH2発現のレベル）と比較することにより評価される。一部の実施形態では、ALDH2発現の適切な対照レベルは、対照レベルを毎回測定する必要がないように、所定のレベル又は値であってもよい。所定のレベル又は値は、様々な形態をとることができる。一部の実施形態では、所定のレベル又は値は、中央値又は平均値等の、単一のカットオフ値であってもよい。

40

【0112】

50

一部の実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの投与は、細胞でのALDH2発現レベルの低減をもたらす。一部の実施形態では、ALDH2発現レベルの低減は、ALDH2の適切な対照レベルと比較して、1%若しくはそれよりも低い、5%若しくはそれよりも低い、10%若しくはそれよりも低い、15%若しくはそれよりも低い、20%若しくはそれよりも低い、25%若しくはそれよりも低い、30%若しくはそれよりも低い、35%若しくはそれよりも低い、40%若しくはそれよりも低い、45%若しくはそれよりも低い、50%若しくはそれよりも低い、55%若しくはそれよりも低い、60%若しくはそれよりも低い、70%若しくはそれよりも低い、80%若しくはそれよりも低い、又は90%若しくはそれよりも低い低減であってもよい。適切な対照レベルは、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドと接触していない細胞又は細胞集団でのALDH2発現レベルであってもよい。一部の実施形態では、本明細書で開示されている方法による、細胞へのオリゴヌクレオチド送達の効果は、有限期間後に評価される。例えば、ALDH2のレベルは、オリゴヌクレオチドを細胞に導入した少なくとも8時間後、12時間後、18時間後、24時間後に；又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、若しくは14日後に、細胞にて分析してもよい。

10

20

30

40

50

【0113】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞でオリゴヌクレオチド（例えば、そのセンス鎖及びアンチセンス鎖）を発現するように遺伝子操作されている導入遺伝子の形態で送達される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書で開示されている任意のオリゴヌクレオチドを発現するように遺伝子操作されている導入遺伝子を使用して送達される。導入遺伝子は、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、又は単純ヘルペスウイルス）又は非ウイルスベクター（例えば、プラスミド又は合成mRNA）を使用して送達してもよい。一部の実施形態では、導入遺伝子は、対象に直接注射してもよい。

【0114】

ii. 治療方法

本開示の態様は、対象のアルコール中毒を治療するためにALDH2発現を低減するための方法に関する。一部の実施形態では、本方法は、それを必要とする対象に本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドのいずれか1つの有効量を投与することを含んでもよい。そのような治療は、例えば、対象のエタノール耐容性を減少させ、それにより対象によるエタノール摂取を阻害する（例えば、対象のエタノール消費欲求を減少させることにより）ために使用することができる。本開示は、アルコール中毒及び/又はアルコール中毒に関連する疾患若しくは障害のリスクがある（影響を受けやすい）対象を処置するための予防法及び治療法の両方を提供する。

【0115】

ある態様では、本開示は、対象に治療剤（例えば、オリゴヌクレオチド又はそれをコードするベクター若しくは導入遺伝子）を投与することにより、本明細書に記載のような疾患又は障害を対象において予防するための方法を提供する。一部の実施形態では、治療しようとする対象は、ALDH2タンパク質の量を、例えば肝臓において低減させることから治療的に利益を得ることになる対象である。

【0116】

本明細書に記載の方法は、典型的には、有効量の、すなわち望ましい治療結果をもたらすことができる量のオリゴヌクレオチドを対象に投与することを含む。治療的に許容される量は、疾患又は障害を治療することが可能な量であってもよい。任意の1つの対象にとって適切な投薬量は、対象のサイズ、体表面積、年齢、投与しようとする特定の組成物、組成物中の活性成分、投与の時間及び経路、全体的な健康、並びに同時に投与されている他の薬物を含むある要因に依存することになる。

【0117】

一部の実施形態では、対象には、本明細書で開示されている組成物のいずれか1つが、経腸的に（例えば、経口的に、経胃栄養チューブにより、十二指腸栄養チューブにより、

胃瘻により、又は直腸的に)、非経口的に(例えば、皮下注射、静脈内注射又は注入、動脈内注射又は注入、筋肉内注射)、局所的に(例えば、上皮に、吸入により、目薬により、又は粘膜を介して)、又は標的臓器(例えば、対象の肝臓)への直接注射により投与される。典型的には、本明細書で開示されているオリゴヌクレオチドは、静脈内に又は皮下に投与される。

【0118】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、 $0.1\text{ mg/kg} \sim 25\text{ mg/kg}$ (例えば、 $1\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$)の範囲の用量で投与される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、 $0.1\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ の範囲の、又は $0.5\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ の範囲の用量で投与される。

10

【0119】

非限定的なセットの例として、本開示のオリゴヌクレオチドは、典型的には、1年に1回、1年に2回、四半期毎に(3か月毎に1回)、2か月に1回(2か月毎に1回)、毎月、又は毎週投与されるだろう。

【0120】

一部の実施形態では、治療しようとする対象は、ヒト又は非ヒト霊長類又は他の哺乳動物対象である。他の例示的な対象としては、イヌ及びネコ等の飼育動物；ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、及びニワトリ等の家畜；並びにマウス、ラット、モルモット、及びハムスター等の動物が挙げられる。

20

【実施例】

【0121】

実施例1：ヒト及びマウス細胞に基づくアッセイを使用したALDH2オリゴヌクレオチド阻害剤の開発

図1は、ヒト及びマウスに基づくアッセイを使用して、ALDH2発現を阻害するための候補オリゴヌクレオチドを開発するためのワークフローを示す。まず、コンピューターに基づくアルゴリズムを使用して、ALDH2を阻害するための候補オリゴヌクレオチド配列(25~27量体)を生成した。その後、細胞に基づくアッセイ及びPCRアッセイを使用して、候補オリゴヌクレオチドを、ALDH2発現を低減させるそれらの能力について評価した。

30

【0122】

コンピューターに基づくアルゴリズムにより、ヒトALDH2 mRNA(配列番号608、表1)に相補的だったオリゴヌクレオチドがもたらされた。それらのある配列は、カニクイザルALDH2 mRNA(配列番号609、表1)及び/又はマウスALDH2 mRNA(配列番号610、表1)にも相補的だった。

【表1】

表1. ヒト、カニクイザル、及びマウスALDH2 mRNAの配列

種	GenBank RefSeq #	配列番号
ヒト	NM_000690.3	608
カニクイザル	XM_005572278.2	609
マウス	NM_009656.4	610

40

【0123】

アルゴリズムにより提供されたオリゴヌクレオチドのうち、288個のオリゴヌクレオチドを、HepG2細胞に基づくアッセイでの実験評価の候補として選択した。このアッセイでは、ALDH2を発現するヒト肝癌細胞であるHepG2を、オリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。トランスフェクション後ある期間にわたって細胞を維持し、その後残存ALDH2 mRNAのレベルを、TAQMAN(登録商標)に基づくqPCRアッセイを使用して調査した。2つのqPCRアッセイ、3'アッセイ及び5'アッセイを使用して、それぞれHEXプローブ及びFAMプローブにより測定されるmRNAレベ

50

ルを決定した。288個のオリゴヌクレオチドを用いたHe p G 2細胞に基づくアッセイの結果は、図2に示されている。残存mRNAパーセントは、3'アッセイ(円形)及び5'アッセイ(菱形)の各々について示されている。陰性対照と比較して25%以下の残存mRNAをもたらすオリゴヌクレオチドをヒットとみなした。ヒトゲノムとの相補性が低いオリゴヌクレオチドを陰性対照として使用した。

【0124】

これらのオリゴヌクレオチドの活性及び位置に基づき、ヒトALDH2 mRNAのホットスポットを画定した。ホットスポットは、いずれかのアッセイにおいて対照と比較して25%以下のmRNAレベルをもたらす少なくとも1つのオリゴヌクレオチドに付随するひと続きのヒトALDH2 mRNA配列として特定した。従って、以下のホットスポットが、ヒトALDH2 mRNA配列内で特定された：181~273；445~539；646~696；691~749；1165~1235；1770~1821；及び1824~1916。

10

【0125】

ホットスポットの配列は、表2に概説されている。

【表2】

表2. ホットスポットの配列

ヒトALDH2 mRNAにおけるホットスポット位置	配列	配列番号
181~273	AACCAGCAGCCCGAGGCTCTTCTGCAACCAGATTTTCATAAA CAATGAATGGCACGATGCCGTCAGCAGGAAAACATTCCCCA CCGTCAATCCG	601
445~539	ACCTACCTGGCGGCCTTGGAGACCCTGGACAATGGCAAGCC CTATGTCATCTCCTACCTGGTGGATTTGGACATGGTCCTCA AATGTCTCCGGTATTATGC	602
646~696	CCGTGGAATTTCCCCTCCTGATGCAAGCATGGAAGCTGGG CCCAGCCTTG	603
691~749	GCCTTGGCAACTGGAACGTGGTTGTGATGAAGGTAGCTGA GCAGACACCCCTCACCGC	604
1165~1235	GAGCAGGGGCCGAGGTGGATGAACTCAGTTTAAGAAGAT CCTCGGCTACATCAACACGGGGAAGCAAGA	605
1770~1821	TCTCTTGGGTCAAGAAAGTTCTAGAATTTGAATTGATAAACA TGGTGGGTTG	606
1824~1916	TGAGGGTAAGAGTATATGAGGAACCTTTTAAACGACAACAA TACTGCTAGCTTTCAGGATGATTTTAAAAAATAGATTCAAA TGTGTTATCC	607

20

30

40

【0126】

用量応答分析

初期のHe p G 2細胞に基づくアッセイで評価した288個のオリゴヌクレオチドのうち、96個の特に活性だったオリゴヌクレオチドを、ALDH2レベルをノックダウンするそれらの能力に基づいてヒットとして選択し、二次スクリーニングに供した。

【0127】

この二次スクリーニングでは、候補オリゴヌクレオチドを、一次スクリーンと同じだが、3つの異なる濃度(1nM、0.1nM、及び0.01nM)でのアッセイを使用して

50

試験した(図3A~3D)。標的mRNAレベルを、試料にわたって安定的発現参照を提供するハウスキーピング遺伝子であるスプライシング因子アルギニン/セリンリッチ9(SFRS9)に対して正規化して、図3A~3Dに示されているmRNAパーセントを生成した。図3A~3Dの各々における試験したオリゴヌクレオチドは、陰性対照配列(NC1、NC5、NC7、BCAT NC)及び擬似トランスフェクションと比較して示されている。96個のオリゴヌクレオチドは全て、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、及び2'-O-メチル修飾ヌクレオチドの組合せを含む、M1と表記されている同じ修飾パターンを有していた。試験した96個のオリゴヌクレオチドの配列は、表3に提供されている(配列番号15~16及び305~306のデータは、図3A~3Dには示されていない)。

10

【表3】

表3. HepG2細胞に基づくアッセイの候補オリゴヌクレオチド配列

Hs	Cm	Mm	センス配列番号	対応するアンチセンス配列番号
X	X	X	20, 27~30, 36, 37, 39~40, 78~86, 88~89, 93~94, 96, 98~100, 102	310, 317~320, 326, 327, 329~330, 368~376, 378~379, 383~384, 386, 388~390, 392
X	X		45~46, 50~51, 115, 117, 119, 122~124, 161, 178, 181, 187, 189, 204~205, 208~209, 237, 239~240, 290	335~336, 340~341, 405, 407, 409, 412~414, 451, 468, 471, 477, 479, 494~495, 498~499, 527, 529~530, 580
X		X	1~2, 22~23	291~292, 312~313
X			3~4, 8, 10~14, 129, 140, 144, 162, 192, 194, 218~219, 222, 225, 227, 229~230, 233~234, 243, 245~246, 249~251, 253~254, 256~257, 259, 267~269, 274~275, 278~279, 281	293~294, 298, 300~304, 419, 430, 434, 452, 482, 484, 508~509, 512, 515, 517, 519~520, 523~524, 533, 535~536, 539~541, 543~544, 546~547, 549, 557~559, 564~565, 568~569, 571

20

30

Hs: ヒト、Cm: カニクイザル、及びMm: マウス。センス配列番号及びアンチセンス配列番号の欄は、ハイブリダイズして各オリゴヌクレオチドになるセンス鎖及び対応するアンチセンス鎖をそれぞれの順番で提供する。例えば、配列番号1のセンス鎖は、配列番号291のアンチセンス鎖とハイブリダイズし、配列番号2のセンス鎖は、配列番号293のアンチセンス鎖とハイブリダイズする。試験したオリゴヌクレオチドの各々は、同じ修飾パターンを有していた。

【0128】

この段階で、試験で性能が最良だった8つのオリゴヌクレオチドを更なる試験のために選択した。選択したオリゴヌクレオチドを、ニック付きテトラループ構造形式(22量体ガイド鎖を有する36量体パッセンジャー鎖)に変換した。基本テトラループ構造は、図4を参照されたい。その後、こうしたオリゴヌクレオチドを以前と同様に試験し、HepG2細胞においてALDH2 mRNA発現を低減するその能力について3つの濃度にて各オリゴヌクレオチドを評価した。図5A~5Bは、ニック付きテトラループ構造を有する異なる塩基配列で制作されており、各々が6つの異なる修飾パターンを有するように構成されているオリゴヌクレオチドのデータを示す。標的mRNAレベルを、上記に記載のように正規化して、図5A~5Bに示されているmRNAパーセントを生成し、図5A~5Bの各々における試験したオリゴヌクレオチドは、陰性対照配列(BCAT、C121、NC1、NC7)及び擬似トランスフェクションと比較して示されている。配列番号581~582及び配列番号591~592のデータは、図5A~5Bには示されていない

40

50

。

【0129】

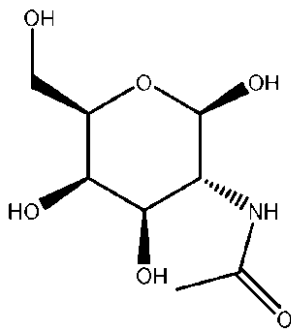
あるテトラループ修飾オリゴヌクレオチドを、各化合物について同じ修飾パターンを使用してHepa1-6細胞において更に試験した(図6)。標的mRNAレベルを、試料にわたって安定的発現参照を提供するハウスキーピング遺伝子であるヒポキサンチンリボシルトランスフェラーゼ(Hprt)に基づいて正規化した。図6における試験したオリゴヌクレオチドは、陰性対照配列(BCAT NC、NC1、NC5、NC7)及び擬似トランスフェクションと比較して示されている。

【0130】

*in vivo*マウス実験作業

上記の*in vitro*実験のデータを評価して、マウス肝実質細胞でのALDH2発現低減活性を維持しつつ、送達特性を向上させることになるテトラループ及び修飾パターンを特定した。その後、この分析に基づいて、選択したオリゴヌクレオチドをGalNAc部分にコンジュゲートした。4つのGalNAc部分を、センス鎖のテトラループのヌクレオチドにコンジュゲートした。コンジュゲーションは、クリックリンカーを使用して実施した。使用したGalNAcは、下記に示されている通りだった。

【化1】



N - アセチル - β - D - ガラクトサミン (CAS # : 14131 - 60 - 3)

【0131】

ニック付きテトラループ構造を有する様々な修飾パターンを有する3つの異なる塩基配列の合計6つの非常に強力なGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドを、3mg/kgにてCD-1マウスに皮下投与した。マウスを、投与後4日目に安楽死させた。肝臓試料を得、RNAを抽出して、RT-qPCRによりALDH2 mRNAレベルを評価した。こうした測定に基づいて、PBS対照mRNAと比較したALDH2 mRNAパーセントを決定した。それらは図7に示されている。

【0132】

実施例2：非ヒト霊長類(NHP)におけるGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの持続期間研究

この研究は、様々な修飾パターン(例えば、異なる数の2'フルオロ修飾及び/又は異なる数のホスホロチオエート連結をアンチセンス鎖に有する修飾パターン)を有する単一用量のGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの薬力学を評価するために設計した。この研究で試験したGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドは、S585-AS595-M14、S585-AS595-M15、S585-AS595-M16、S585-AS595-M17、S587-AS597-M23、及びS587-AS597-M24だった。単一用量のGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドを、非ヒト霊長類(各群n=4)に3mg/kgにて皮下投与した。動物を一晩断食させ、翌朝給餌する前に、血清試料及び肝生検を収集した。各動物について順化中に1つの投薬前生検を収集し、投与の4、8、又は12、又は16週間後に、3つの生検を収集した。生検を2つの画分に分割し、一方を瞬間凍結して-80で保管し、他方をRNAlater(ThermoFisher Scientific社)で処理し、mRNAレベル分析のために4で保管した。

10

20

30

40

50

【0133】

投与前のALDH2 mRNAの量と比べた、投与の4、8、12、又は16週間後に残存したALDH2 mRNAの量を、定量PCR (qPCR) で分析した。結果は、6つのGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドのうち4つが、約50%のALDH2 mRNA抑制を達成し、効果は、単一3mg/kg用量後の3か月にわたって維持されたことを示した(図8)。こうした結果により、提案された投薬頻度がヒトでは1四半期当たり1回以下であることが支持される。

【0134】

血清試料を、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP) 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、ガンマグルトミルトランスフェラーゼ (GGT) を含む、肝機能パネル試験のために保管した。

10

【0135】

実施例3：様々な修飾パターンを使用したGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの向上

この研究は、ALDH2 mRNAレベルを低減させるGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの活性に対する様々な修飾パターンの効果を評価するために設計した。図9に示されているように、数々の異なる修飾パターン(M14~M40)の2つのGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチド(S585-AS595及びS587-AS597)を、ALDH2 mRNAレベル低減におけるそれらの活性について、マウスにおけるin vivoアッセイでスクリーニングした。5つのGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドが、ALDH2 mRNAレベル低減のより高い活性を示した(S585-AS595-M23、S585-AS595-M24、S585-AS595-M16、S585-AS595-M17、及びS587-AS597-M23)。

20

【0136】

図9で試験したGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドの幾つかを、マウスにおけるALDH2 mRNAレベル低減のin vivo活性についても試験した。単一用量のGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドを、0.5mg/kgにてマウスに皮下投与し、マウス肝臓でのALDH2 mRNAレベルを、投与4日後にqPCRで評価した。結果は、修飾パターンM22、M15、M24、M17、M26、M30、及びM32が、修飾パターンM21、M14、M23、M16、M25、M29、及びM31と比較して、試験したオリゴヌクレオチドの効力を押し上げたことを示した(図10)。

30

【0137】

次に、図9及び10のALDH2 mRNAレベル低減により高い活性を示したGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチド(S585-AS595-M15、S585-AS595-M16、S585-AS595-M17、S585-AS595-M24、S585-AS595-M26、S585-AS595-M31、S585-AS595-M32)を、マウスにおける用量漸増研究で試験した。GalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチドを、0.1mg/kg、0.3mg/kg、又は0.5mg/kgにてマウスに皮下投与し、マウス肝臓でのALDH2 mRNAレベルを、投与72時間後にqPCRで評価した。試験したオリゴヌクレオチドの全てで、用量依存的応答が観察された(図11)。

40

【0138】

2つのGalNAcコンジュゲートALDH2オリゴヌクレオチド(S585-AS595-M33及びS585-AS595-M34)の活性に対するホスホロチオエート連結の数の効果を評価した。オリゴヌクレオチドを、アンチセンス鎖の5'末端に0、1、2、3、4、5、又は6つのホスホロチオエート連結を含むように更に修飾し、0.5mg/kgにてマウスに皮下投与した。マウス肝臓での残存ALDH2 mRNAレベルを、投与4日後にqPCRで評価した。結果は、異なる数のホスホロチオエート連結が、G

50

a l N A c コンジュゲート A L D H 2 オリゴヌクレオチドの効力に異なる影響を及ぼしたことを示した (図 1 2) 。

【 0 1 3 9 】

最後に、様々な修飾パターン (M 1 5 、 M 1 6 、 M 1 7 、 M 2 4 、 及び M 2 6) を有する G a l N A c コンジュゲート A L D H 2 オリゴヌクレオチド (S 5 8 5 - A S 5 9 5) を持続期間研究で試験した。G a l N A c コンジュゲート A L D H 2 オリゴヌクレオチドを、3 m g / k g にてマウスに皮下投与し、マウス肝臓での A L D H 2 m R N A レベルを、投与 7 2 時間後に q P C R で評価した。結果は、試験した G a l N A c コンジュゲート A L D H 2 オリゴヌクレオチドの A L D H N 2 m R N A 抑制活性が、少なくとも 3 5 日間継続したことを示した (図 1 3) 。

10

【 0 1 4 0 】

物質及び方法

トランスフェクション

最初のスクリーニングのため、リポフェクタミン R N A i M A X (商標) を使用して、効率的なトランスフェクションのためにオリゴヌクレオチドを複合体化した。オリゴヌクレオチド、R N A i M A X 、 及び O p t i - M E M を、室温で 2 0 分間一緒にインキュベートし、その後このミックスの 5 0 μ L を、トランスフェクション前にプレートのウェルに添加した。活性継代細胞のフラスコから培地を吸引し、トリプシンの存在下で 3 ~ 5 分間 3 7 $^{\circ}$ C で細胞をインキュベートした。細胞がフラスコにもはや接着しなくなった後、細胞増殖培地 (ペニシリン及びストレプトマイシンを欠如する) を添加してトリプシンを中和し、細胞を懸濁した。1 0 の μ L アリコートを取り出し、血球計算器で計数して、1 ミリリットル当たりを基準にして細胞を定量化した。H e L a 細胞の場合、2 5 , 0 0 0 個の細胞を、1 ウェル当たり 1 0 0 μ L の培地に接種した。希釈した細胞懸濁物を、O p t i - M E M 中にオリゴヌクレオチドを既に含んでいた 9 6 ウェルトランスフェクションプレートに添加した。その後、トランスフェクションプレートを 3 7 $^{\circ}$ C で 2 4 時間インキュベートした。2 4 時間のインキュベーション後、各ウェルから培地を吸引した。細胞を、P r o m e g a R N A 単離キットの溶解緩衝液を使用して溶解した。溶解緩衝液を、各ウェルに添加した。その後、溶解した細胞を、R N A 単離のために C o r b e t t X t r a c t o r G E N E (Q I A x t r a c t o r 社) に移したか、又は - 8 0 $^{\circ}$ C で保管した。

20

30

【 0 1 4 1 】

後のスクリーニング及び実験、例えば二次スクリーニングのために、リポフェクタミン R N A i M A X を使用してリバーストランスフェクションのためにオリゴヌクレオチドを複合体化した。複合体は、O p t i M E M 培地中で R N A i M A X 及び s i R N A を 1 5 分間混合することにより製作した。トランスフェクション混合物を、多ウェルプレートに移し、細胞懸濁物をウェルに添加した。2 4 時間のインキュベーション後、細胞を、P B S で 1 回洗浄し、その後 P r o m e g a S V 9 6 キットの溶解緩衝液を使用して溶解した。真空マニホールドにて S V 9 6 プレートを 사용하여 R N A を精製した。その後、4 マイクロリットルの精製 R N A を、6 5 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、4 $^{\circ}$ C に冷却した。その後、H i g h C a p a c i t y 逆転写キット (L i f e T e c h n o l o g i e s 社) を 1 0 40

40

【 0 1 4 2 】

c D N A 合成

C o r b e t t X - t r a c t o r G e n e (商標) (Q I A x t r a c t o r 社) を使用して、組織培養中の哺乳動物細胞から R N A を単離した。改変型 S u p e r S c r i p t I I プロトコールを使用して、単離した R N A から c D N A を合成した。単離した R N A (およそ 5 n g / μ L) を 6 5 $^{\circ}$ C に 5 分間加熱し、d N P 、 ランダム六量体、オ

50

リゴ d T、及び水と共にインキュベートした。混合物を 15 秒間冷却した。水、5 × 第一鎖緩衝液、D T T、S U P E R a s e ・ I n (商 標) (R N A 阻 害 剤)、及び S u p e r S c r i p t I I R T a s e からなる「酵素ミックス」を混合物に添加した。内容物を、サーモサイクラーを使用して 42 に 1 時間、その後 70 に 15 分間加熱し、その後 4 に冷却した。その後、得られた c D N A を、S Y B R (登 録 商 標) に 基 づ く q P C R に 供 した。1 反 応 当 たり 2 つ の 5 ' エ ン ド ヌ ク レ ア ー ゼ ア ッ セ イ を 含 む よ う に、q P C R 反 応 を 多 重 化 した。

【 0 1 4 3 】

q P C R ア ッ セ イ

S Y B R (登 録 商 標) に 基 づ く q P C R を 使 用 し て、プ ラ イ マ ー セ ッ ト を ま ず ス ク リ ー ニ ン グ し た。融 解 曲 線 並 び に「マ イ ナ ス R T」対 照 を 評 価 す る こ と に よ り、ア ッ セ イ 特 異 性 を 検 証 し た。H e L a 細 胞 及 び H e p a 1 - 6 細 胞 に 由 来 す る c D N A 鋳 型 の 希 釈 物 (1 反 応 当 たり 2 0 n g か ら 0 . 0 2 n g ま で の 1 0 倍 系 列 希 釈) を 使 用 し て、そ れ ぞ れ ヒ ト (H s) ア ッ セ イ 及 び マ ウ ス (M m) ア ッ セ イ を 試 験 し た。q P C R ア ッ セ イ を 3 8 4 ウ ェ ル プ レ ー ト に セ ッ ト ア ッ プ し、M i c r o A m p フ ィ ル ム で 覆 い、A p p l i e d B i o s y s t e m s 社 の 7 9 0 0 H T で 実 験 し た。試 薬 濃 度 及 び サ イ ク リ ン グ 条 件 は、以 下 の も の を 含 ん で い た：2 × S Y B R ミ ッ ク ス、1 0 μ M フ ォ ワ ー ド プ ラ イ マ ー、1 0 μ M リ バ ー ス プ ラ イ マ ー、D D H₂O、及 び c D N A 鋳 型。こ れ ら で 1 0 μ L の 総 容 積 に し た。

10

【 0 1 4 4 】

ク ロ ー ニ ン グ

単 一 融 解 曲 線 を 示 し た P C R ア ン プ リ コ ン を、P r o m e g a 社 の p G E M (登 録 商 標) - T E a s y ベ ク タ ー キ ッ ト に、製 造 業 者 の 使 用 説 明 書 に 従 っ て ラ イ ゲ ー シ ョ ン し た。製 造 業 者 の プ ロ ト コ ー ル に 従 っ て、J M 1 0 9 高 効 率 細 胞 を、新 た に ラ イ ゲ ー シ ョ ン し た ベ ク タ ー で 形 質 転 換 し た。そ の 後、ア ン ピ シ リ ン を 含 む L B プ レ ー ト に 細 胞 を プ レ ー テ ィ ン グ し、コ ロ ニ ー 増 殖 の た め に 3 7 で 一 晩 イ ン キ ュ ベ ー ト し た。

20

【 0 1 4 5 】

P C R ス ク リ ー ニ ン グ 及 び プ ラ ス ミ ド ミ ニ プ レ ッ プ

P C R を 使 用 し て、ラ イ ゲ ー シ ョ ン さ れ た 目 的 の ア ン プ リ コ ン を 含 む ベ ク タ ー で 形 質 転 換 さ れ た 大 腸 菌 (E . c o l i) の コ ロ ニ ー を 特 定 し た。イ ン サ ー ト を 隣 接 す る ベ ク タ ー 特 異 的 プ ラ イ マ ー を P C R 反 応 に 使 用 し た。そ の 後、P C R 産 物 を 全 て 1 % ア ガ ロ ー ス ゲ ル に 流 し、染 色 後 に ト ラ ン ス イ ル ミ ネ ー タ ー で 画 像 化 し た。ゲ ル を 質 的 に 評 価 し て、ど の プ ラ ス ミ ド が、予 想 サ イ ズ の ラ イ ゲ ー シ ョ ン さ れ た ア ン プ リ コ ン を 含 む と 考 え ら れ る か を 決 定 し た (お よ そ 3 0 0 b p。ア ン プ リ コ ン、及 び 使 用 さ れ た プ ラ イ マ ー に 特 異 的 な 隣 接 ベ ク タ ー 配 列 を 含 む)。

30

【 0 1 4 6 】

そ の 後、P C R ス ク リ ー ニ ン グ に よ り 形 質 転 換 体 で あ る こ と が 確 認 さ れ た コ ロ ニ ー を、ア ン ピ シ リ ン を 有 す る 2 m L の L B 培 地 か ら な る 培 養 中 で 一 晩 3 7 に て 振 と う し な が ら イ ン キ ュ ベ ー ト し た。そ の 後、大 腸 菌 細 胞 を 溶 解 し、P r o m e g a 社 の ミ ニ プ レ ッ プ キ ッ ト を 使 用 し て 目 的 の プ ラ ス ミ ド を 単 離 し た。2 6 0 n m で の U V 吸 光 度 に よ り プ ラ ス ミ ド 濃 度 を 決 定 し た。

40

【 0 1 4 7 】

プ ラ ス ミ ド 配 列 決 定 及 び 定 量 化

精 製 し た プ ラ ス ミ ド を、B i g D y e (登 録 商 標) タ ー ミ ネ ー タ ー 配 列 決 定 キ ッ ト を 使 用 し て 配 列 決 定 し た。ベ ク タ ー 特 異 的 プ ラ イ マ ー で あ る T 7 を 使 用 し て、イ ン サ ー ト 全 体 に わ た る リ ー ド 長 を 得 た。以 下 の 試 薬 を 配 列 決 定 反 応 に 使 用 し た：水、5 × 配 列 決 定 緩 衝 液、B i g D y e タ ー ミ ネ ー タ ー ミ ッ ク ス、T 7 プ ラ イ マ ー、及 び プ ラ ス ミ ド (1 0 0 n g / μ L)。こ れ ら で 1 0 μ L の 容 積 に し た。混 合 物 を 9 6 で 1 分 間 保 持 し、そ の 後 9 6 で 1 0 秒 間、5 0 で 5 秒 間、6 0 で 1 分 1 5 秒 間 の 1 5 サ イ ク ル；9 6 で 1 0 秒 間、5 0 で 5 秒 間、6 0 で 1 分 3 0 秒 間 の 5 サ イ ク ル；及 び 9 6 で 1 0 秒 間、5

50

0 で5秒間、60 で2分間の5サイクルに供した。その後、Applied Biosystems社のキャピラリー電気泳動シーケンサーを使用して、ダイターミネーション反応物を配列決定した。

【0148】

その後、配列が検証されたプラスミドを定量化した。プラスミドを、単一の切断制限エンドヌクレアーゼを使用して線形化した。線形性は、アガロースゲル電気泳動法を使用して確認した。プラスミド希釈物は全て、ポリプロピレンバイアルに対するプラスミドの非特異的結合を低減させるために、1 mL緩衝液当たり100 µgのtRNAを有するTE緩衝液(pH 7.5)で製作した。

【0149】

その後、線形化されたプラスミドを、1 µL当たり1,000,000から0.1コピーまで系列希釈し、qPCRに供した。アッセイ効率を算出し、効率が90~110%の範囲だった場合、アッセイを許容可能とみなした。

【0150】

多重化アッセイ

各標的について、mRNAレベルを、2つの5'ヌクレアーゼアッセイで定量化した。一般に、幾つかのアッセイを各標的についてスクリーニングする。選択された2つのアッセイは、良好な効率、低検出限界、及び目的の遺伝子(GOI)の幅広い5'→3'網羅範囲の組合せを示した。異なるフルオロフォアをそれぞれのプローブに使用した場合は、1つのGOIに対する両アッセイを1つの反応に組み合わせることができた。従って、それらが同じqPCR中に混合されていたか又は「多重化」されていた場合、アッセイ検証の最終工程は、選択されたアッセイの効率を決定することだった。

【0151】

10倍希釈物での両アッセイのための線形化プラスミドを一緒にして、qPCRを実施した。各アッセイの効率を、上記に記載のように決定した。許容される効率割合は、90~110%だった。

【0152】

線形化プラスミド標準物質を使用して多重化反応を検証しつつ、cDNAを鋳型として使用して目的の標的のC_q値も評価した。ヒト標的又はマウス標的には、それぞれHela cDNA及びHepa1-6 cDNAを使用した。この場合、cDNAは、未トランスフェクト細胞からCorbett(水中にて約5 ng/µl)で単離したRNAに由来した。このように、この試料cDNAの観察されたC_q値は、96ウェルプレートトランスフェクションの予想C_q値の代表だった。C_q値が30よりも大きかった場合、目的の遺伝子がより高い発現レベルを示す他の細胞株を探した。各ヒト株及びマウス株からCorbettでのハイスループット法により単離された全RNAのライブラリーを生成し、それを使用して、標的発現の許容可能なレベルについてスクリーニングした。

【0153】

オリゴヌクレオチド命名法の説明

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは全て、S N₁ - A S N₂ - M N₃のいずれかとして表記される。以下の表記法が適用される：

- ・ N₁：センス鎖配列の配列識別子番号
- ・ N₂：アンチセンス鎖配列の配列識別子番号
- ・ N₃：修飾パターンの参照番号であり、各番号は、オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオチドのパターンを表わす。

例えば、S 27 - A S 317 - M 1は、配列番号27により示されるセンス配列、配列番号317により示されるアンチセンス配列を有し、M 1として特定されている修飾パターンを有するように構成されているオリゴヌクレオチドを表す。

10

20

30

40

【表 4】

表 4. ALDH2 RNAi オリゴヌクレオチド配列

A p p 名称	センス配列 / m R N A 配列	S 配列番号	アンチセンス配列	A S 配列番号
S1-AS291-M1	GAGGUCUUCUGCAACCAGAUUUUCA	1	UGAAAAUCUGGUUGCAGAAGACCCUGG	291
S2-AS292-M1	AGGUCUUCUGCAACCAGAUUUUCAT	2	AUGAAAAUCUGGUUGCAGAAGACCUCG	292
S3-AS293-M1	GUCUUCUGCAACCAGAUUUUCAUAA	3	UUAUGAAAAUCUGGUUGCAGAAGACC	293
S4-AS294-M1	CUUCUGCAACCAGAUUUUCAUAAAC	4	GUUUUUGAAAAUCUGGUUGCAGAAGA	294
S5-AS295-M1	UUCUGCAACCAGAUUUUCAUAAACA	5	UGUUUUGAAAAUCUGGUUGCAGAAG	295
S6-AS296-M1	UCUGCAACCAGAUUUUCAUAAACAA	6	UUGUUUUGAAAAUCUGGUUGCAGAA	296
S7-AS297-M1	CUGCAACCAGAUUUUCAUAAACAAT	7	AUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGCAGA	297
S8-AS298-M1	UGCAACCAGAUUUUCAUAAACAATG	8	CAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGCAG	298
S9-AS299-M1	GCAACCAGAUUUUCAUAAACAAUGA	9	UCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGCAG	299
S10-AS300-M1	CAACCAGAUUUUCAUAAACAAUGAA	10	UUCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGC	300
S11-AS301-M1	AACCAGAUUUUCAUAAACAAUGAAT	11	AUUCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGC	301
S12-AS302-M1	ACCAGAUUUUCAUAAACAAUGAATG	12	CAUUCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGC	302
S13-AS303-M1	CCAGAUUUUCAUAAACAAUGAAUGG	13	CCAUUCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGC	303
S14-AS304-M1	CAGAUUUUCAUAAACAAUGAAUGGC	14	GCCAUUCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGC	304
S17-AS307-M1	AGAUUUUCAUAAACAAUGAAUGGCA	17	UGCCAUUCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGC	307
S18-AS308-M1	GAUUUCAUAAACAAUGAAUGGCAC	18	GUGCCAUUCAUUGUUUUGAAAAUCUGGUUGC	308
S19-AS309-M1	GCCGUCAGCAGGAAAACAUCUCCCA	19	UGGGGAAUGUUUCCUGCUGACGGCA	309
S20-AS310-M1	CCGUCAGCAGGAAAACAUCUCCCAC	20	GUGGGGAAUGUUUCCUGCUGACGGCA	310
S21-AS311-M1	GGCCUUGGAGACCCUGGACAAUGGC	21	GCCAUUGUCCAGGGUCUCCAAGGCCG	311
S22-AS312-M1	GCCUUGGAGACCCUGGACAAUGGCA	22	UGCCAUUGUCCAGGGUCUCCAAGGCCG	312
S23-AS313-M1	CCUUGGAGACCCUGGACAAUGGCAA	23	UUGCCAUUGUCCAGGGUCUCCAAGGCCG	313
S24-AS314-M1	UACCGUGGGAUUUGGACAUGGUCC	24	GGACCAUGUCCAAAUCACCAGGUAG	314
S25-AS315-M1	ACCUGGUGGAUUUGGACAUGGUCCT	25	AGGACCAUGUCCAAAUCACCAGGUAG	315
S26-AS316-M1	CCUGGUGGAUUUGGACAUGGUCCTC	26	GAGGACCAUGUCCAAAUCACCAGGUAG	316
S27-AS317-M1	CUGGUGGAUUUGGACAUGGUCCUCA	27	UGAGGACCAUGUCCAAAUCACCAGGUAG	317
S28-AS318-M1	UGGUGGAUUUGGACAUGGUCCUCA	28	UUGAGGACCAUGUCCAAAUCACCAGGUAG	318

10

20

30

40

50

S29-AS319 -M1	GGUGGAUUUGGACAUGGUCCUCAA	29	UUUGAGGACCAUGUCCAAAUCCACCA G	319
S30-AS320 -M1	GUGGAUUUGGACAUGGUCCUCAAAT	30	AUUUGAGGACCAUGUCCAAAUCCACC A	320
S31-AS321 -M1	UGGAUUUGGACAUGGUCCUCAAATG	31	CAUUUGAGGACCAUGUCCAAAUCCAC C	321
S32-AS322 -M1	GAUUUGGACAUGGUCCUCAAUUTC	32	GACAUUUGAGGACCAUGUCCAAAUCC A	322
S33-AS323 -M1	UCCCCGUCCUGAUGCAAGCAUGGA	33	UCCAUGCUUGCAUCAGGAGCGGAAA U	323
S34-AS324 -M1	UCCCCGUCCUGAUGCAAGCAUGGAA	34	UUCCAUGCUUGCAUCAGGAGCGGAA A	324
S35-AS325 -M1	CCCGCUCCUGAUGCAAGCAUGGAAG	35	CUCCAUGCUUGCAUCAGGAGCGGGA A	325
S36-AS326 -M1	CCGCUCCUGAUGCAAGCAUGGAAGC	36	GCUCCAUGCUUGCAUCAGGAGCGGG A	326
S37-AS327 -M1	CGCUCCUGAUGCAAGCAUGGAAGCT	37	AGCUCCAUGCUUGCAUCAGGAGCGG G	327
S38-AS328 -M1	GCUCCUGAUGCAAGCAUGGAAGCTG	38	CAGCUCCAUGCUUGCAUCAGGAGCG G	328
S39-AS329 -M1	CUCCUGAUGCAAGCAUGGAAGCUGG	39	CCAGCUCCAUGCUUGCAUCAGGAGC G	329
S40-AS330 -M1	UCCUGAUGCAAGCAUGGAAGCUGGG	40	CCCAGCUCCAUGCUUGCAUCAGGAG C	330
S41-AS331 -M1	AACUGGAAACGUGGUUGUGAUGAAG	41	CUUCAUCACAACCACGUUCCAGUUG C	331
S42-AS332 -M1	ACUGGAAACGUGGUUGUGAUGAAGG	42	CCUUCAUCACAACCACGUUCCAGUU G	332
S43-AS333 -M1	CUGGAAACGUGGUUGUGAUGAAGGT	43	ACCUUCAUCACAACCACGUUCCAGU U	333
S44-AS334 -M1	UGGAAACGUGGUUGUGAUGAAGGTA	44	UACCUUCAUCACAACCACGUUCCAG U	334
S45-AS335 -M1	GGAAACGUGGUUGUGAUGAAGGUAG	45	CUACCUUCAUCACAACCACGUUCCA G	335
S46-AS336 -M1	GAAACGUGGUUGUGAUGAAGGUAGC	46	GCUACCUUCAUCACAACCACGUUCC A	336
S47-AS337 -M1	AACGUGGUUGUGAUGAAGGUAGCTG	47	CAGCUACCUUCAUCACAACCACGUUU C	337
S48-AS338 -M1	ACGUGGUUGUGAUGAAGGUAGCUGA	48	UCAGCUACCUUCAUCACAACCACGUU U	338
S49-AS339 -M1	CGUGGUUGUGAUGAAGGUAGCUGAG	49	CUCAGCUACCUUCAUCACAACCACGU U	339
S50-AS340 -M1	GUUGUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGA	50	UCUGCUCAGCUACCUUCAUCACAACC A	340
S51-AS341 -M1	GUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGACAC	51	GUGUCUGCUCAGCUACCUUCAUCACA A	341
S52-AS342 -M1	AGGAUGUGGACAAAGUGGCAUUCAC	52	GUGAAUGCCACUUUGUCCACAUCCUC A	342
S53-AS343 -M1	GGGAGCAGCAACCUCAAGAGAGUGA	53	UCACUCUCUUGAGGUUGCUGCUCCCA G	343
S54-AS344 -M1	GGAGCAGCAACCUCAAGAGAGUGAC	54	GUCACUCUCUUGAGGUUGCUGCUCCC A	344
S55-AS345 -M1	GAGCAGCAACCUCAAGAGAGUGACC	55	GGUCACUCUCUUGAGGUUGCUGCUCC C	345

10

20

30

40

50

S56-AS346 -M1	AGCAGCAACCUCAAGAGAGUGACCT	56	AGGUCACUCUCUUGAGGUUGCUGCUC C	346
S57-AS347 -M1	GCAGCAACCUCAAGAGAGUGACCTT	57	AAGGUCACUCUCUUGAGGUUGCUGCU C	347
S58-AS348 -M1	GCCUGUUCUUAACCAGGGCCAGT	58	ACUGGCCCUUGUUGAAGAACAGGGCG A	348
S59-AS349 -M1	CCCUGUUCUUAACCAGGGCCAGTG	59	CACUGGCCCUUGUUGAAGAACAGGGC G	349
S60-AS350 -M1	CCUGUUCUUAACCAGGGCCAGUGC	60	GCACUGGCCCUUGUUGAAGAACAGGG C	350
S61-AS351 -M1	CUGUUCUUAACCAGGGCCAGUGCT	61	AGCACUGGCCCUUGUUGAAGAACAGG G	351
S62-AS352 -M1	UGUUCUUAACCAGGGCCAGUGCTG	62	CAGCACUGGCCCUUGUUGAAGAACAG G	352
S63-AS353 -M1	GUUCUUAACCAGGGCCAGUGCUGC	63	GCAGCACUGGCCCUUGUUGAAGAACA G	353
S64-AS354 -M1	UUCUUAACCAGGGCCAGUGCUGCT	64	AGCAGCACUGGCCCUUGUUGAAGAAC A	354
S65-AS355 -M1	CUUAACCAGGGCCAGUGCUGCT	65	ACAGCAGCACUGGCCCUUGUUGAAGA A	355
S66-AS356 -M1	UUAACCAGGGCCAGUGCUGCTG	66	CACAGCAGCACUGGCCCUUGUUGAAG A	356
S67-AS357 -M1	CAACCAGGGCCAGUGCUGCUGGCC	67	GGCACAGCAGCACUGGCCCUUGUUGA A	357
S68-AS358 -M1	GGCUCGGACCUUCGUGCAGGAGG	68	CCUCCUGCACGAAGGUCCGGGAGCCG G	358
S69-AS359 -M1	GCUCGGACCUUCGUGCAGGAGGA	69	UCCUCCUGCACGAAGGUCCGGGAGCC G	359
S70-AS360 -M1	CUCCGGACCUUCGUGCAGGAGGAC	70	GUCCUCCUGCACGAAGGUCCGGGAGC C	360
S71-AS361 -M1	UCCCGACCUUCGUGCAGGAGGACA	71	UGUCCUCCUGCACGAAGGUCCGGGAG C	361
S72-AS362 -M1	CCCGGACCUUCGUGCAGGAGGACAT	72	AUGUCCUCCUGCACGAAGGUCCGGGA G	362
S73-AS363 -M1	CCGGACCUUCGUGCAGGAGGACATC	73	GAUGUCCUCCUGCACGAAGGUCCGGG A	363
S74-AS364 -M1	GGAGGACAUCUAUGAUGAUUUGTG	74	CACAAACUCAUCAUAGAUGUCCUCCU G	364
S75-AS365 -M1	CGGGCCAAGUCUGGGUGGUCGGGA	75	UCCCGACCACCCGAGACUUGGCCCGG G	365
S76-AS366 -M1	GGGCCAAGUCUGGGUGGUCGGGAA	76	UCCCGACCACCCGAGACUUGGCCCGG G	366
S77-AS367 -M1	GCAGGUGGAUGAAACUCAGUUUAAG	77	CUUAAACUGAGUUUCAUCCACCUGCG G	367
S78-AS368 -M1	CAGGUGGAUGAAACUCAGUUUAAGA	78	UCUAAACUGAGUUUCAUCCACCUGC G	368
S79-AS369 -M1	AGGUGGAUGAAACUCAGUUUAAGAA	79	UUCUAAACUGAGUUUCAUCCACCUG C	369
S80-AS370 -M1	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAAGAAG	80	CUUCUAAACUGAGUUUCAUCCACCU G	370
S81-AS371 -M1	GUGGAUGAAACUCAGUUUAAGAAGA	81	UCUUCUAAACUGAGUUUCAUCCACC U	371
S82-AS372 -M1	UGGAUGAAACUCAGUUUAAGAAGAT	82	AUCUUCUAAACUGAGUUUCAUCCAC C	372

10

20

30

40

50

S83-AS373 -M1	GGAUGAAACUCAGUUUAAGAAGATC	83	GAUCUUCUAAAACUGAGUUUCAUCCA C	373
S84-AS374 -M1	GAUGAAACUCAGUUUAAGAAGAUC	84	GGAUCUUCUAAAACUGAGUUUCAUCC A	374
S85-AS375 -M1	AUGAAACUCAGUUUAAGAAGAUCC	85	AGGAUCUUCUAAAACUGAGUUUCAUC C	375
S86-AS376 -M1	UGAAACUCAGUUUAAGAAGAUCCTC	86	GAGGAUCUUCUAAAACUGAGUUUCAU C	376
S87-AS377 -M1	GAAACUCAGUUUAAGAAGAUCCUCG	87	CGAGGAUCUUCUAAAACUGAGUUUCA U	377
S88-AS378 -M1	AAACUCAGUUUAAGAAGAUCCUCGG	88	CCGAGGAUCUUCUAAAACUGAGUUUC A	378
S89-AS379 -M1	AACUCAGUUUAAGAAGAUCCUCGGC	89	GCCGAGGAUCUUCUAAAACUGAGUUU C	379
S90-AS380 -M1	ACUCAGUUUAAGAAGAUCCUCGGCT	90	AGCCGAGGAUCUUCUAAAACUGAGUU U	380
S91-AS381 -M1	CUCAGUUUAAGAAGAUCCUCGGCTA	91	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAACUGAGU U	381
S92-AS382 -M1	UCAGUUUAAGAAGAUCCUCGGCUAC	92	GUAGCCGAGGAUCUUCUAAAACUGAG U	382
S93-AS383 -M1	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGCUACA	93	UGUAGCCGAGGAUCUUCUAAAACUGA G	383
S94-AS384 -M1	AGUUUAAGAAGAUCCUCGGCUACAT	94	AUGUAGCCGAGGAUCUUCUAAAACUG A	384
S95-AS385 -M1	GUUUUAAGAAGAUCCUCGGCUACATC	95	GAUGUAGCCGAGGAUCUUCUAAAACU G	385
S96-AS386 -M1	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUACAUCA	96	UGAUGUAGCCGAGGAUCUUCUAAAAC U	386
S97-AS387 -M1	UUAAGAAGAUCCUCGGCUACAUCAA	97	UUGAUGUAGCCGAGGAUCUUCUAAA C	387
S98-AS388 -M1	UAAGAAGAUCCUCGGCUACAUCAAC	98	GUUGAUGUAGCCGAGGAUCUUCUAAA A	388
S99-AS389 -M1	AAGAAGAUCCUCGGCUACAUCAACA	99	UGUUGAUGUAGCCGAGGAUCUUCUUA A	389
S100-AS39 0-M1	AGAAGAUCCUCGGCUACAUCAACAC	100	GUGUUGAUGUAGCCGAGGAUCUUCU A	390
S101-AS39 1-M1	GAAGAUCCUCGGCUACAUCAACACG	101	CGUGUUGAUGUAGCCGAGGAUCUUCU U	391
S102-AS39 2-M1	AAGAUCCUCGGCUACAUCAACACGG	102	CCGUGUUGAUGUAGCCGAGGAUCUUC U	392
S103-AS39 3-M1	AGAUCUCGGCUACAUCAACACGGG	103	CCCUGUUGAUGUAGCCGAGGAUCUU C	393
S104-AS39 4-M1	UGCUGCUGACCGUGGUUACUUCATC	104	GAUGAAGUAACCACGGUCAGCAGCAA U	394
S105-AS39 5-M1	GCUGCUGACCGUGGUUACUUCAUCC	105	GGAUGAAGUAACCACGGUCAGCAGCA A	395
S106-AS39 6-M1	CUGCUGACCGUGGUUACUUCAUCCA	106	UGGAUGAAGUAACCACGGUCAGCAGC A	396
S107-AS39 7-M1	GCUGACCGUGGUUACUUCAUCCAGC	107	GCUGGAUGAAGUAACCACGGUCAGCA G	397
S108-AS39 8-M1	CCAGUGAUGCAGAUCUGAAGUUCA	108	UGAACUUCAGGAUCUGCAUCACUGGC C	398
S109-AS39 9-M1	AGUGAUGCAGAUCUGAAGUUCAAG	109	CUUGAACUUCAGGAUCUGCAUCACUG G	399

10

20

30

40

50

S110-AS40 0-M1	GUGAUGCAGAUCUGAAGUUCAAGA	110	UCUUGAACUUCAGGAUCUGCAUCACU G	400
S111-AS40 1-M1	UGAUGCAGAUCUGAAGUUCAAGAC	111	GUCUUGAACUUCAGGAUCUGCAUCAC U	401
S112-AS40 2-M1	GAUGCAGAUCUGAAGUUCAAGACC	112	GGUCUUGAACUUCAGGAUCUGCAUCA C	402
S113-AS40 3-M1	AUGCAGAUCUGAAGUUCAAGACCA	113	UGGUCUUGAACUUCAGGAUCUGCAUC A	403
S114-AS40 4-M1	GCAGAUCUGAAGUUCAAGACCATA	114	UAUGGUCUUGAACUUCAGGAUCUGCA U	404
S115-AS40 5-M1	CAGAUCUGAAGUUCAAGACCAUAG	115	CUAUGGUCUUGAACUUCAGGAUCUGC A	405
S116-AS40 6-M1	AGAUCUGAAGUUCAAGACCAUAGA	116	UCUAUGGUCUUGAACUUCAGGAUCUG C	406
S117-AS40 7-M1	GAUCUGAAGUUCAAGACCAUAGAG	117	CUCUAUGGUCUUGAACUUCAGGAUCU G	407
S118-AS40 8-M1	UCCUGAAGUUCAAGACCAUAGAGGA	118	UCCUCUAUGGUCUUGAACUUCAGGAU C	408
S119-AS40 9-M1	AAGUUCAAGACCAUAGAGGAGGUTG	119	CAACCUCUUGAACUUCAGGAUCUGC A	409
S120-AS41 0-M1	GCUGUCUUCACAAAGGAUUUGGACA	120	UGUCCAAAUCUUGUGAAGACAGCU G	410
S121-AS41 1-M1	GUCUUCACAAAGGAUUUGGACAAGG	121	CCUUGUCCAAAUCUUGUGAAGACAG G	411
S122-AS41 2-M1	GCAGGCAUACACUGAAGUGAAAACCT	122	AGUUUUCACUUCAGUGUAUGCCUGCA G	412
S123-AS41 3-M1	CAGGCAUACACUGAAGUGAAAACCTG	123	CAGUUUUCACUUCAGUGUAUGCCUGC A	413
S124-AS41 4-M1	AGGCAUACACUGAAGUGAAAACUGT	124	ACAGUUUUCACUUCAGUGUAUGCCUG C	414
S125-AS41 5-M1	GGCAUACACUGAAGUGAAAACUGTC	125	GACAGUUUUCACUUCAGUGUAUGCCU G	415
S126-AS41 6-M1	GCAUACACUGAAGUGAAAACUGUCA	126	UGACAGUUUUCACUUCAGUGUAUGCC U	416
S127-AS41 7-M1	AUACACUGAAGUGAAAACUGUCACA	127	UGUGACAGUUUUCACUUCAGUGUAUG C	417
S128-AS41 8-M1	UACACUGAAGUGAAAACUGUCACAG	128	CUGUGACAGUUUUCACUUCAGUGUAU G	418
S129-AS41 9-M1	CUGAAGUGAAAACUGUCACAGUCA	129	UUGACUGUGACAGUUUUCACUUCAGU G	419
S130-AS42 0-M1	GUCAAAAGUGCCUCAGAAGAACUCAT	130	AUGAGUUCUUCUGAGGCACUUUGACU G	420
S131-AS42 1-M1	CAAAGUGCCUCAGAAGAACUCAUAA	131	UUAUGAGUUCUUCUGAGGCACUUUGA C	421
S132-AS42 2-M1	AAGUGCCUCAGAAGAACUCAUAGA	132	UCUUAUGAGUUCUUCUGAGGCACUUU G	422
S133-AS42 3-M1	AGUGCCUCAGAAGAACUCAUAGAA	133	UUCUUAUGAGUUCUUCUGAGGCACUU U	423
S134-AS42 4-M1	GUGCCUCAGAAGAACUCAUAGAAT	134	AUUCUUAUGAGUUCUUCUGAGGCACU U	424
S135-AS42 5-M1	UGCCUCAGAAGAACUCAUAGAATC	135	GAUUCUUAUGAGUUCUUCUGAGGCAC U	425
S136-AS42 6-M1	CCUCAGAAGAACUCAUAGAATCAT	136	AUGAUUCUUAUGAGUUCUUCUGAGGC A	426

10

20

30

40

S137-AS42 7-M1	CUCAGAAGAACUCAUAAGAAUCATG	137	CAUGAUUCUUAUGAGUUCUUCUGAGG C	427
S138-AS42 8-M1	UCAGAAGAACUCAUAAGAAUCAUGC	138	GCAUGAUUCUUAUGAGUUCUUCUGAG G	428
S139-AS42 9-M1	CAGAAGAACUCAUAAGAAUCAUGCA	139	UGCAUGAUUCUUAUGAGUUCUUCUGA G	429
S140-AS43 0-M1	AGAAGAACUCAUAAGAAUCAUGCAA	140	UUGCAUGAUUCUUAUGAGUUCUUCUG A	430
S141-AS43 1-M1	GAAGAACUCAUAAGAAUCAUGCAAG	141	CUUGCAUGAUUCUUAUGAGUUCUUCU G	431
S142-AS43 2-M1	AAGAACUCAUAAGAAUCAUGCAAGC	142	GCUUGCAUGAUUCUUAUGAGUUCUUC U	432
S143-AS43 3-M1	GAACUCAUAAGAAUCAUGCAAGCTT	143	AAGCUUGCAUGAUUCUUAUGAGUUCU U	433
S144-AS43 4-M1	AACUCAUAAGAAUCAUGCAAGCUTC	144	GAAGCUUGCAUGAUUCUUAUGAGUUC U	434
S145-AS43 5-M1	CCCUCAGCCAUUGAUGGAAAGUUCA	145	UGAACUUCCAUCAAUGGCUGAGGGA G	435
S146-AS43 6-M1	CCUCAGCCAUUGAUGGAAAGUUCAG	146	CUGAACUUCCAUCAAUGGCUGAGGG A	436
S147-AS43 7-M1	UCAGCCAUUGAUGGAAAGUUCAGCA	147	UGCUGAACUUCCAUCAAUGGCUGAG G	437
S148-AS43 8-M1	CAGCCAUUGAUGGAAAGUUCAGCAA	148	UUGCUGAACUUCCAUCAAUGGCUGA G	438
S149-AS43 9-M1	AGCCAUUGAUGGAAAGUUCAGCAAG	149	CUUGCUGAACUUCCAUCAAUGGCUG A	439
S150-AS44 0-M1	GCCAUUGAUGGAAAGUUCAGCAAGA	150	UCUUGCUGAACUUCCAUCAAUGGCU G	440
S151-AS44 1-M1	CCAUUGAUGGAAAGUUCAGCAAGAT	151	AUCUUGCUGAACUUCCAUCAAUGGC U	441
S152-AS44 2-M1	CAUUGAUGGAAAGUUCAGCAAGATC	152	GAUCUUGCUGAACUUCCAUCAAUGG C	442
S153-AS44 3-M1	AUUGAUGGAAAGUUCAGCAAGAUCA	153	UGAUCUUGCUGAACUUCCAUCAAUG G	443
S154-AS44 4-M1	UUGAUGGAAAGUUCAGCAAGAUUCAG	154	CUGAUCUUGCUGAACUUCCAUCAAU G	444
S155-AS44 5-M1	UGAUGGAAAGUUCAGCAAGAUUCAGC	155	GCUGAUCUUGCUGAACUUCCAUCA U	445
S156-AS44 6-M1	GAUGGAAAGUUCAGCAAGAUUCAGCA	156	UGCUGAUCUUGCUGAACUUCCAUCA A	446
S157-AS44 7-M1	AUGGAAAGUUCAGCAAGAUUCAGCAA	157	UUGCUGAUCUUGCUGAACUUCCAUC A	447
S158-AS44 8-M1	UGGAAAGUUCAGCAAGAUUCAGCAAC	158	GUUGCUGAUCUUGCUGAACUUCCA C	448
S159-AS44 9-M1	GGAAAGUUCAGCAAGAUUCAGCAACA	159	UGUUGCUGAUCUUGCUGAACUUCCA U	449
S160-AS45 0-M1	GAAAGUUCAGCAAGAUUCAGCAACAA	160	UUGUUGCUGAUCUUGCUGAACUUCC A	450
S161-AS45 1-M1	AAAGUUCAGCAAGAUUCAGCAACAAA	161	UUUGUUGCUGAUCUUGCUGAACUUUC C	451
S162-AS45 2-M1	AAGUUCAGCAAGAUUCAGCAACAAAA	162	UUUUGUUGCUGAUCUUGCUGAACUUU C	452
S163-AS45 3-M1	AUCAGCAACAAAAACCAAGAAAAATG	163	CAUUUUUCUUGGUUUUGUUGCUGAUC U	453

10

20

30

40

50

S164-AS45 4-M1	CAGCAACAAAACCAAGAAAAAUGAT	164	AUCAUUUUUCUUGGUUUUGUUGCUGA U	454
S165-AS45 5-M1	AGCAACAAAACCAAGAAAAAUGATC	165	GAUCAUUUUUCUUGGUUUUGUUGCUG A	455
S166-AS45 6-M1	ACAAAACCAAGAAAAAUGAUCCUTG	166	CAAGGAUCAUUUUUCUUGGUUUUGUU G	456
S167-AS45 7-M1	CAAAACCAAGAAAAAUGAUCCUUGC	167	GCAAGGAUCAUUUUUCUUGGUUUUGU U	457
S168-AS45 8-M1	AGAAAAAUGAUCCUUGCGUGCUGAA	168	UUCAGCACGCAAGGAUCAUUUUUCU G	458
S169-AS45 9-M1	AAAAAUGAUCCUUGCGUGCUGAATA	169	UAUUCAGCACGCAAGGAUCAUUUUUC U	459
S170-AS46 0-M1	AAAAUGAUCCUUGCGUGCUGAAUAT	170	AUAUUCAGCACGCAAGGAUCAUUUU C	460
S171-AS46 1-M1	AAUGAUCCUUGCGUGCUGAAUATC	171	GAUAUUCAGCACGCAAGGAUCAUUUU U	461
S172-AS46 2-M1	AAUGAUCCUUGCGUGCUGAAUAUCT	172	AGAUUUCAGCACGCAAGGAUCAUUU U	462
S173-AS46 3-M1	AUGAUCCUUGCGUGCUGAAUAUCTG	173	CAGAUUUCAGCACGCAAGGAUCAUU U	463
S174-AS46 4-M1	UGAUCCUUGCGUGCUGAAUAUCUGA	174	UCAGAUUUCAGCACGCAAGGAUCAU U	464
S175-AS46 5-M1	GAUCCUUGCGUGCUGAAUAUCUGAA	175	UUCAGAUUUCAGCACGCAAGGAUCA U	465
S176-AS46 6-M1	UCCUUGCGUGCUGAAUAUCUGAAAA	176	UUUUCAGAUUUCAGCACGCAAGGAU C	466
S177-AS46 7-M1	CCUUGCGUGCUGAAUAUCUGAAAAG	177	CUUUUCAGAUUUCAGCACGCAAGGA U	467
S178-AS46 8-M1	CUUGCGUGCUGAAUAUCUGAAAAGA	178	UCUUUUCAGAUUUCAGCACGCAAGG A	468
S179-AS46 9-M1	UUGCGUGCUGAAUAUCUGAAAAGAG	179	CUCUUUUCAGAUUUCAGCACGCAAG G	469
S180-AS47 0-M1	UGCUGCUGAAUAUCUGAAAAGAGA	180	UCUCUUUUCAGAUUUCAGCACGCAA G	470
S181-AS47 1-M1	GCGUGCUGAAUAUCUGAAAAGAGAA	181	UUCUCUUUUCAGAUUUCAGCACGCA A	471
S182-AS47 2-M1	CGUGCUGAAUAUCUGAAAAGAGAAA	182	UUUCUUUUCAGAUUUCAGCACGCA A	472
S183-AS47 3-M1	GUGCUGAAUAUCUGAAAAGAGAAAT	183	AUUUCUUUUCAGAUUUCAGCACG C	473
S184-AS47 4-M1	UGCUGAAUAUCUGAAAAGAGAAATT	184	AAUUUCUUUUCAGAUUUCAGCAC G	474
S185-AS47 5-M1	GCUGAAUAUCUGAAAAGAGAAUUTT	185	AAUUUCUUUUCAGAUUUCAGCA C	475
S186-AS47 6-M1	CUGAAUAUCUGAAAAGAGAAUUTT	186	AAAAUUUCUUUUCAGAUUUCAGC A	476
S187-AS47 7-M1	UGAAUAUCUGAAAAGAGAAUUTT	187	AAAAUUUCUUUUCAGAUUUCAG C	477
S188-AS47 8-M1	GAAUAUCUGAAAAGAGAAUUUUTC	188	GAAAAUUUCUUUUCAGAUUUCA G	478
S189-AS47 9-M1	AAUAUCUGAAAAGAGAAUUUUUCC	189	GGAAAAUUUCUUUUCAGAUUUC A	479
S190-AS48 0-M1	AUAUCUGAAAAGAGAAUUUUUCCT	190	AGGAAAAUUUCUUUUCAGAUUU C	480

10

20

30

40

S191-AS48 1-M1	AUCUGAAAAGAGAAAUUUUUCCUAC	191	GUAGGAAAAUUUCUCUUUUCAGAU U	481
S192-AS48 2-M1	GAAAAGAGAAAUUUUUCCUACAAA	192	UUUUGUAGGAAAAUUUCUCUUUCA G	482
S193-AS48 3-M1	AAAAGAGAAAUUUUUCCUACAAAAT	193	AUUUUGUAGGAAAAUUUCUCUUUC A	483
S194-AS48 4-M1	AGAGAAAUUUUUCCUACAAAUCTC	194	GAGAUUUUGUAGGAAAAUUUCUCU U	484
S195-AS48 5-M1	GAGAAUUUUUCCUACAAAUCUCT	195	AGAGAUUUUGUAGGAAAAUUUCUCU U	485
S196-AS48 6-M1	AGAAUUUUUCCUACAAAUCUCTT	196	AAGAGAUUUUGUAGGAAAAUUUCUC U	486
S197-AS48 7-M1	CUUGGGUCAAGAAAGUUCUAGAATT	197	AAUUCUAGAACUUUCUUGACCCAAG G	487
S198-AS48 8-M1	GGGUCAAGAAAGUUCUAGAAUUUGA	198	UCAAAUUCUAGAACUUUCUUGACCCA A	488
S199-AS48 9-M1	GGUCAAGAAAGUUCUAGAAUUUGAA	199	UUCAAAUUCUAGAACUUUCUUGACCC A	489
S200-AS49 0-M1	GUCAAGAAAGUUCUAGAAUUUGAAT	200	AUUCAAAUUCUAGAACUUUCUUGACC C	490
S201-AS49 1-M1	UCAAGAAAGUUCUAGAAUUUGAATT	201	AAUUCAAAUUCUAGAACUUUCUUGAC C	491
S202-AS49 2-M1	CAAGAAAGUUCUAGAAUUUGAAUTG	202	CAAUUCAAAUUCUAGAACUUUCUUGA C	492
S203-AS49 3-M1	AAGAAAGUUCUAGAAUUUGAAUUGA	203	UCAAUUCAAAUUCUAGAACUUUCUUG A	493
S204-AS49 4-M1	AGAAAGUUCUAGAAUUUGAAUUGAT	204	AUCAAUUCAAAUUCUAGAACUUUCUU G	494
S205-AS49 5-M1	GAAAGUUCUAGAAUUUGAAUUGATA	205	UAUCAAUUCAAAUUCUAGAACUUUCU U	495
S206-AS49 6-M1	AAAGUUCUAGAAUUUGAAUUGAUAA	206	UUAUCAAUUCAAAUUCUAGAACUUUC U	496
S207-AS49 7-M1	AAGUUCUAGAAUUUGAAUUGAUAAA	207	UUUAUCAAUUCAAAUUCUAGAACUUU C	497
S208-AS49 8-M1	AGUUCUAGAAUUUGAAUUGAUAAAC	208	GUUUUCAAUUCAAAUUCUAGAACUU U	498
S209-AS49 9-M1	GUUCUAGAAUUUGAAUUGAUAAACA	209	UGUUUAUCAAUUCAAAUUCUAGAACU U	499
S210-AS50 0-M1	UUCUAGAAUUUGAAUUGAUAAACAT	210	AUGUUUAUCAAUUCAAAUUCUAGAAC U	500
S211-AS50 1-M1	UCUAGAAUUUGAAUUGAUAAACATG	211	CAUGUUUAUCAAUUCAAAUUCUAGAA C	501
S212-AS50 2-M1	CUAGAAUUUGAAUUGAUAAACAUGG	212	CCAUGUUUAUCAAUUCAAAUUCUAGA A	502
S213-AS50 3-M1	UAGAAUUUGAAUUGAUAAACAUGGT	213	ACCAUGUUUAUCAAUUCAAAUUCUAG A	503
S214-AS50 4-M1	AGAAUUUGAAUUGAUAAACAUGGTG	214	CACCAUGUUUAUCAAUUCAAAUUCUA G	504
S215-AS50 5-M1	GAAUUUGAAUUGAUAAACAUGGUGG	215	CCACCAUGUUUAUCAAUUCAAAUUCU A	505
S216-AS50 6-M1	UAAGAGUAUAUGAGGAACUUUUAAA	216	UUAAAAGGUUCCUCAUAUACUCUUAC C	506
S217-AS50 7-M1	AAGAGUAUAUGAGGAACUUUUAAA	217	UUAAAAGGUUCCUCAUAUACUCUUA C	507

10

20

30

40

50

S218-AS50 8-M1	AGAGUAUAUGAGGAACCUUUUAAAC	218	GUUUAAAAGGUUCCUCAUAUACUCUU A	508
S219-AS50 9-M1	GAGUAUAUGAGGAACCUUUUAAACG	219	CGUUUUAAAAGGUUCCUCAUAUACUCU U	509
S220-AS51 0-M1	AGUAUAUGAGGAACCUUUUAAACGA	220	UCGUUUAAAAGGUUCCUCAUAUACUC U	510
S221-AS51 1-M1	GUUAUAUGAGGAACCUUUUAAACGAC	221	GUCGUUUAAAAGGUUCCUCAUAUACU C	511
S222-AS51 2-M1	UAUAUGAGGAACCUUUUAAACGACA	222	UGUCGUUUAAAAGGUUCCUCAUAUAC U	512
S223-AS51 3-M1	AUGAGGAACCUUUUAAACGACAACA	223	UGUUGUCGUUUAAAAGGUUCCUCAUA U	513
S224-AS51 4-M1	GAGGAACCUUUUAAACGACAACAAT	224	AUUGUUGUCGUUUAAAAGGUUCCUCA U	514
S225-AS51 5-M1	AGGAACCUUUUAAACGACAACAATA	225	UAUUGUUGUCGUUUAAAAGGUUCCUC A	515
S226-AS51 6-M1	GAACCUUUUAAACGACAACAUAUACT	226	AGUAUUGUUGUCGUUUAAAAGGUUCC U	516
S227-AS51 7-M1	AACCUUUUAAACGACAACAUAUACTG	227	CAGUAUUGUUGUCGUUUAAAAGGUUC C	517
S228-AS51 8-M1	ACCUUUUAAACGACAACAUAUACUGC	228	GCAGUAUUGUUGUCGUUUAAAAGGUU C	518
S229-AS51 9-M1	CCUUUUAAACGACAACAUAUACUGCT	229	AGCAGUAUUGUUGUCGUUUAAAAGGU U	519
S230-AS52 0-M1	CUUUUUAAACGACAACAUAUACUGCTA	230	UAGCAGUAUUGUUGUCGUUUAAAAGG U	520
S231-AS52 1-M1	UAAACGACAACAUAUACUGCUAGCTT	231	AAGCUAGCAGUAUUGUUGUCGUUUAA A	521
S232-AS52 2-M1	AAACGACAACAUAUACUGCUAGCUTT	232	AAAGCUAGCAGUAUUGUUGUCGUUUAA A	522
S233-AS52 3-M1	AACGACAACAUAUACUGCUAGCUUTC	233	GAAAGCUAGCAGUAUUGUUGUCGUUU A	523
S234-AS52 4-M1	CGACAACAUAUACUGCUAGCUUUCAG	234	CUGAAAGCUAGCAGUAUUGUUGUCGU U	524
S235-AS52 5-M1	GACAACAUAUACUGCUAGCUUUCAGG	235	CCUGAAAGCUAGCAGUAUUGUUGUCG U	525
S236-AS52 6-M1	ACAACAUAUACUGCUAGCUUUCAGGA	236	UCCUGAAAGCUAGCAGUAUUGUUGUC G	526
S237-AS52 7-M1	CAACAUAUACUGCUAGCUUUCAGGAT	237	AUCCUGAAAGCUAGCAGUAUUGUUGU C	527
S238-AS52 8-M1	AACAUAUACUGCUAGCUUUCAGGATG	238	CAUCCUGAAAGCUAGCAGUAUUGUUG U	528
S239-AS52 9-M1	ACAUAUACUGCUAGCUUUCAGGAUGA	239	UCAUCCUGAAAGCUAGCAGUAUUGUU G	529
S240-AS53 0-M1	CAUAUACUGCUAGCUUUCAGGAUGAT	240	AUCAUCCUGAAAGCUAGCAGUAUUGU U	530
S241-AS53 1-M1	AAUAUACUGCUAGCUUUCAGGAUGATT	241	AAUCAUCCUGAAAGCUAGCAGUAUUG U	531
S242-AS53 2-M1	AUAUACUGCUAGCUUUCAGGAUGAUTT	242	AAAUCAUCCUGAAAGCUAGCAGUAUU G	532
S243-AS53 3-M1	UACUGCUAGCUUUCAGGAUGAUUTT	243	AAAAUCAUCCUGAAAGCUAGCAGUAU U	533
S244-AS53 4-M1	ACUGCUAGCUUUCAGGAUGAUUTT	244	AAAAUCAUCCUGAAAGCUAGCAGUA U	534

10

20

30

40

50

S245-AS53 5-M1	CUGCUAGCUUUCAGGAUGAUUUUTA	245	UAAAAAUCUCCUGAAAGCUAGCAGU A	535
S246-AS53 6-M1	UGCUAGCUUUCAGGAUGAUUUUUA	246	UUAAAAAUCUCCUGAAAGCUAGCAG U	536
S247-AS53 7-M1	GCUAGCUUUCAGGAUGAUUUUUAAA	247	UUUAAAAAUCUCCUGAAAGCUAGCA G	537
S248-AS53 8-M1	CUAGCUUUCAGGAUGAUUUUUAAAA	248	UUUUAAAAAUCUCCUGAAAGCUAGC A	538
S249-AS53 9-M1	AGCUUUCAGGAUGAUUUUAAAAAA	249	LUUUUUAAAAAUCUCCUGAAAGCUA G	539
S250-AS54 0-M1	GCUUUCAGGAUGAUUUUAAAAAAT	250	AUUUUUUAAAAAUCUCCUGAAAGCU A	540
S251-AS54 1-M1	CUUUCAGGAUGAUUUUUAAAAAATA	251	UAUUUUUUAAAAAUCUCCUGAAAGC U	541
S252-AS54 2-M1	UUUCAGGAUGAUUUUUAAAAAUAG	252	CUUUUUUUAAAAAUCUCCUGAAAG C	542
S253-AS54 3-M1	UUCAGGAUGAUUUUUAAAAAUAGA	253	UCUUUUUUAAAAAUCUCCUGAAA G	543
S254-AS54 4-M1	UCAGGAUGAUUUUUAAAAAUAGAT	254	AUCUUUUUUUAAAAAUCUCCUGAA A	544
S255-AS54 5-M1	CAGGAUGAUUUUUAAAAAUAGATT	255	AAUCUUUUUUUAAAAAUCUCCUGA A	545
S256-AS54 6-M1	AGGAUGAUUUUUAAAAAUAGAUTC	256	GAAUCUUUUUUUAAAAAUCUCCUG A	546
S257-AS54 7-M1	GGAUGAUUUUUAAAAAUAGAUUCA	257	UGAAUCUUUUUUUAAAAAUCUCCU G	547
S258-AS54 8-M1	GAUGAUUUUUAAAAAUAGAUUCA	258	UUGAAUCUUUUUUUAAAAAUCUCC U	548
S259-AS54 9-M1	AUGAUUUUUAAAAAUAGAUUCAAA	259	UUUGAAUCUUUUUUUAAAAAUCUCC C	549
S260-AS55 0-M1	UGAUUUUUAAAAAUAGAUUCAAAAT	260	AUUUGAAUCUUUUUUUAAAAAUCAU C	550
S261-AS55 1-M1	GAUUUUUUAAAAAUAGAUUCAAAATG	261	CAUUUGAAUCUUUUUUUAAAAAUCA U	551
S262-AS55 2-M1	AUUUUUUAAAAAUAGAUUCAAAUGT	262	ACAUUUUGAAUCUUUUUUUAAAAAUC A	552
S263-AS55 3-M1	UUUUUUAAAAAUAGAUUCAAAUGTG	263	CACAUUUUGAAUCUUUUUUUAAAAAU C	553
S264-AS55 4-M1	AAACGCUUCCUAUAAUCGAGUUTA	264	UAAACUCGAGUUUAGGAAGCGUUUC A	554
S265-AS55 5-M1	UAUAGGGGAAGAAAAGCUAUUGTT	265	AACAAUAGCUUUUUCUCCCUAUA A	555
S266-AS55 6-M1	AUAGGGGAAGAAAAGCUAUUGUTT	266	AAACAAUAGCUUUUUCUCCCUAUA A	556
S267-AS55 7-M1	GGGAAGAAAAGCUAUUGUUUACA	267	UGUAAACAAUAGCUUUUUCUCCCU A	557
S268-AS55 8-M1	GGGAAGAAAAGCUAUUGUUUACAA	268	UUGUAAACAAUAGCUUUUUCUCCCU U	558
S269-AS55 9-M1	GGAAGAAAAGCUAUUGUUUACAAT	269	AUUGUAAACAAUAGCUUUUUCUCCCU C	559
S270-AS56 0-M1	GAAGAAAAGCUAUUGUUUACAATT	270	AAUUGUAAACAAUAGCUUUUUCUCC C	560
S271-AS56 1-M1	AAGAAAAGCUAUUGUUUACAUTA	271	UAAUUGUAAACAAUAGCUUUUUCUCC C	561

10

20

30

40

50

S272-AS56 2-M1	AGAAAAAGCUAUUGUUUACAAUUAT	272	AUAAUUGUAAACAAUAGCUUUUUUCU C	562
S273-AS56 3-M1	GAAAAAGCUAUUGUUUACAAUUATA	273	UAUAAUUGUAAACAAUAGCUUUUUUCU U	563
S274-AS56 4-M1	AAAAAGCUAUUGUUUACAAUUUAT	274	AUAUAAUUGUAAACAAUAGCUUUUUUC U	564
S275-AS56 5-M1	AAAAGCUAUUGUUUACAAUUUATC	275	GAUAUAAUUGUAAACAAUAGCUUUUU C	565
S276-AS56 6-M1	AAAGCUAUUGUUUACAAUUUAUCA	276	UGAUUAAUUGUAAACAAUAGCUUUUU U	566
S277-AS56 7-M1	AAGCUAUUGUUUACAAUUUAUCAC	277	GUGAUUAAUUGUAAACAAUAGCUUUU U	567
S278-AS56 8-M1	AGCUAUUGUUUACAAUUUAUCACC	278	GGUGAUUAAUUGUAAACAAUAGCUU U	568
S279-AS56 9-M1	GCUAUUGUUUACAAUUUAUCACCA	279	UGGUGAUUAAUUGUAAACAAUAGCU U	569
S280-AS57 0-M1	CUAUUGUUUACAAUUUAUCACCAT	280	AUGGUGAUUAAUUGUAAACAAUAGC U	570
S281-AS57 1-M1	UAUUGUUUACAAUUUAUCACCATT	281	AAUGGUGAUUAAUUGUAAACAAUAG C	571
S282-AS57 2-M1	AUUGUUUACAAUUUAUCACCAUTA	282	UAAUGGUGAUUAAUUGUAAACAAUA G	572
S283-AS57 3-M1	UUGUUUACAAUUUAUCACCAUUA	283	UUAUGGUGAUUAAUUGUAAACAAU A	573
S284-AS57 4-M1	UGUUUACAAUUUAUCACCAUUAAG	284	CUUAAUGGUGAUUAAUUGUAAACAA U	574
S285-AS57 5-M1	GUUUACAAUUUAUCACCAUUAAGG	285	CCUAAUGGUGAUUAAUUGUAAACA A	575
S286-AS57 6-M1	UACAAUUUAUCACCAUUAAGGCAA	286	UUGCCUAAUGGUGAUUAAUUGUAA A	576
S287-AS57 7-M1	AUUUAUCACCAUUAAGGCAACUGC	287	GCAGUUGCCUAAUGGUGAUUAAUU G	577
S288-AS57 8-M1	ACUGCUACACCCUGCUUUGUAUUCT	288	AGAAUACAAAGCAGGGUGUAGCAGUU G	578
S289-AS57 9-M1	CUGCUACACCCUGCUUUGUAUUCTG	289	CAGAAUACAAAGCAGGGUGUAGCAGU U	579
S290-AS58 0-M1	UGCUCACACCCUGCUUUGUAUUCUGG	290	CCAGAAUACAAAGCAGGGUGUAGCAG U	580
S581-AS59 1-	UUCAAAAACAUGAAUGGCAGCAGC CGAAAGGCUGC	581	UGCCAUCAUUGUUUAUGAAGG	591
S582-AS59 2-	UCAUAAACAUGAAUGGCAGCAGC CGAAAGGCUGC	582	UUGCCAUCAUUGUUUAUGAGG	592
S583-AS59 3-M2	GAAACGUGGUUGUGAUGAAGGCAGC CGAAAGGCUGC	583	CUUCAUCACAACCACGUUUCGG	593
S583-AS59 3-M3	GAAACGUGGUUGUGAUGAAGGCAGC CGAAAGGCUGC	583	CUUCAUCACAACCACGUUUCGG	593
S583-AS59 3-M4	GAAACGUGGUUGUGAUGAAGGCAGC CGAAAGGCUGC	583	CUUCAUCACAACCACGUUUCGG	593
S583-AS59 3-M5	GAAACGUGGUUGUGAUGAAGGCAGC CGAAAGGCUGC	583	CUUCAUCACAACCACGUUUCGG	593
S583-AS59 3-M6	GAAACGUGGUUGUGAUGAAGGCAGC CGAAAGGCUGC	583	CUUCAUCACAACCACGUUUCGG	593
S583-AS59 3-M7	GAAACGUGGUUGUGAUGAAGGCAGC CGAAAGGCUGC	583	CUUCAUCACAACCACGUUUCGG	593

10

20

30

40

50

S584-AS59 4-M2	GUUGUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGC CGAAAGGCUGC	584	UCAGCUACCUUCAUCAACCGG	594	
S584-AS59 4-M3	GUUGUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGC CGAAAGGCUGC	584	UCAGCUACCUUCAUCAACCGG	594	
S584-AS59 4-M4	GUUGUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGC CGAAAGGCUGC	584	UCAGCUACCUUCAUCAACCGG	594	
S584-AS59 4-M5	GUUGUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGC CGAAAGGCUGC	584	UCAGCUACCUUCAUCAACCGG	594	
S584-AS59 4-M6	GUUGUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGC CGAAAGGCUGC	584	UCAGCUACCUUCAUCAACCGG	594	10
S584-AS59 4-M7	GUUGUGAUGAAGGUAGCUGAGCAGC CGAAAGGCUGC	584	UCAGCUACCUUCAUCAACCGG	594	
S585-AS59 5-M2	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M3	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M4	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M5	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M6	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	20
S585-AS59 5-M7	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M8	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M9	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M10	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S585-AS59 5-M11	GGUGGAUGAAACUCAGUUUAGCAGC CGAAAGGCUGC	585	UAAACUGAGUUUCAUCCACCGG	595	
S586-AS59 6-M2	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGGCAGC CGAAAGGCUGC	586	CCGAGGAUCUUCUAAACUGGG	596	30
S586-AS59 6-M3	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGGCAGC CGAAAGGCUGC	586	CCGAGGAUCUUCUAAACUGGG	596	
S586-AS59 6-M4	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGGCAGC CGAAAGGCUGC	586	CCGAGGAUCUUCUAAACUGGG	596	
S586-AS59 6-M5	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGGCAGC CGAAAGGCUGC	586	CCGAGGAUCUUCUAAACUGGG	596	
S586-AS59 6-M6	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGGCAGC CGAAAGGCUGC	586	CCGAGGAUCUUCUAAACUGGG	596	
S586-AS59 6-M7	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGGCAGC CGAAAGGCUGC	586	CCGAGGAUCUUCUAAACUGGG	596	
S586-AS59 6-M12	CAGUUUAAGAAGAUCCUCGGGCAGC CGAAAGGCUGC	586	CCGAGGAUCUUCUAAACUGGG	596	40
S587-AS59 7-M2	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUAGCAGC CGAAAGGCUGC	587	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAGG	597	
S587-AS59 7-M3	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUAGCAGC CGAAAGGCUGC	587	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAGG	597	
S587-AS59 7-M4	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUAGCAGC CGAAAGGCUGC	587	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAGG	597	
S587-AS59 7-M5	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUAGCAGC CGAAAGGCUGC	587	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAGG	597	

S587-AS59 7-M6	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUAGCAGC CGAAAGGCUGC	587	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAAGG	597
S587-AS59 7-M7	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUAGCAGC CGAAAGGCUGC	587	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAAGG	597
S587-AS59 7-M13	UUUAAGAAGAUCCUCGGCUAGCAGC CGAAAGGCUGC	587	UAGCCGAGGAUCUUCUAAAAGG	597
S588-AS59 8-M2	GUUCUAGAAUUUGAAUUGAUGCAGC CGAAAGGCUGC	588	AUCAAUUCAAUUCUAGAACGG	598
S588-AS59 8-M3	GUUCUAGAAUUUGAAUUGAUGCAGC CGAAAGGCUGC	588	AUCAAUUCAAUUCUAGAACGG	598
S588-AS59 8-M4	GUUCUAGAAUUUGAAUUGAUGCAGC CGAAAGGCUGC	588	AUCAAUUCAAUUCUAGAACGG	598
S588-AS59 8-M5	GUUCUAGAAUUUGAAUUGAUGCAGC CGAAAGGCUGC	588	AUCAAUUCAAUUCUAGAACGG	598
S588-AS59 8-M6	GUUCUAGAAUUUGAAUUGAUGCAGC CGAAAGGCUGC	588	AUCAAUUCAAUUCUAGAACGG	598
S588-AS59 8-M7	GUUCUAGAAUUUGAAUUGAUGCAGC CGAAAGGCUGC	588	AUCAAUUCAAUUCUAGAACGG	598
S589-AS59 9-M2	CCUUUUAAACGACAACAAUAGCAGC CGAAAGGCUGC	589	UAUUGUUGUCGUUUAAAAGGGG	599
S589-AS59 9-M3	CCUUUUAAACGACAACAAUAGCAGC CGAAAGGCUGC	589	UAUUGUUGUCGUUUAAAAGGGG	599
S589-AS59 9-M4	CCUUUUAAACGACAACAAUAGCAGC CGAAAGGCUGC	589	UAUUGUUGUCGUUUAAAAGGGG	599
S589-AS59 9-M5	CCUUUUAAACGACAACAAUAGCAGC CGAAAGGCUGC	589	UAUUGUUGUCGUUUAAAAGGGG	599
S589-AS59 9-M6	CCUUUUAAACGACAACAAUAGCAGC CGAAAGGCUGC	589	UAUUGUUGUCGUUUAAAAGGGG	599
S589-AS59 9-M7	CCUUUUAAACGACAACAAUAGCAGC CGAAAGGCUGC	589	UAUUGUUGUCGUUUAAAAGGGG	599
S590-AS60 0-M2	AUGAUUUUUUUUUUUUAGAUUGCAGC CGAAAGGCUGC	590	AUCUAUUUUUUUUUUUUUCAUGG	600
S590-AS60 0-M3	AUGAUUUUUUUUUUUUAGAUUGCAGC CGAAAGGCUGC	590	AUCUAUUUUUUUUUUUUUCAUGG	600
S590-AS60 0-M4	AUGAUUUUUUUUUUUUAGAUUGCAGC CGAAAGGCUGC	590	AUCUAUUUUUUUUUUUUUCAUGG	600
S590-AS60 0-M5	AUGAUUUUUUUUUUUUAGAUUGCAGC CGAAAGGCUGC	590	AUCUAUUUUUUUUUUUUUCAUGG	600
S590-AS60 0-M6	AUGAUUUUUUUUUUUUAGAUUGCAGC CGAAAGGCUGC	590	AUCUAUUUUUUUUUUUUUCAUGG	600
S590-AS60 0-M7	AUGAUUUUUUUUUUUUAGAUUGCAGC CGAAAGGCUGC	590	AUCUAUUUUUUUUUUUUUCAUGG	600

10

20

30

40

50

【 0 1 5 4 】

本明細書にて適切に例示的に記載されている本開示は、本明細書で具体的に開示されていない任意の1つ若しくは複数の構成要素又は1つ若しくは複数の制限の非存在下で実施することができる。従って、例えば、本明細書中の各出現において、「含む (c o m p r i s i n g)」、「から本質的になる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f)」、及び「からなる (c o n s i s t i n g o f)」という用語はいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えることができる。使用されている用語及び表現は、説明のために使用されており、限定のためではない。そのような用語及び表現の使用において、図示及び説明されている特徴又はそれらの部分のいかなる均等物も除外する意図はなく、特許請求されている本発明の範囲内で様々な変更が可能であることが認識される。従って、本発明は好ましい実施形態により具体的に開示されているが、当業者であれば、本明細書に開示されている概念の任意選択の特徴、改変、及び変異を実施することができ

、そのような改変及び変異は、本明細書及び添付の特許請求の範囲により画定されている本発明の範囲内にあるとみなされることが理解されるべきである。

【0155】

加えて、本発明の特徴又は態様が、マーカッシュ群又は選択肢の他のグループ化として記載されている場合、当業者であれば、本発明はそれにより、マーカッシュ群又は他の群の任意の個々のメンバー又はメンバーの部分群としても記載されていることを認識するだろう。

【0156】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は他の核酸の構造を説明する際に、配列表に示されている配列を参照することができることが認識されるべきである。そのような実施形態では、実際のオリゴヌクレオチド又は他の核酸は、指定の配列と比較して、1つ若しくは複数の代替ヌクレオチド（例えば、DNAヌクレオチドのRNA相当物又はRNAヌクレオチドのDNA相当物）、及び/又は1つ若しくは複数の修飾ヌクレオチド、及び/又は1つ若しくは複数の修飾ヌクレオチド間連結、及び/又は1つ若しくは複数の他の修飾を有していてもよいが、指定の配列と本質的に同じ又は同様の相補性特性を維持する。

10

【0157】

本発明の説明の状況における（特に以下の特許請求の範囲の状況における）用語「a」及び「an」及び「the」及び類似の指示物は、本明細書に別様の指定がない限り又は状況により明らかに矛盾しない限り、単数及び複数の両方を包含すると解釈されるものとする。用語が「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」、「含有する（containing）」は、本明細書に別様の指定がない限り、非限定的用語として解釈されるものとする（つまり、「含む」が「それに限定されない」ことを意味する）。本明細書中の値の範囲の記載は、本明細書に別様の指定がない限り、その範囲内に入る各個別の値を個々に参照するための簡略的方法としての役割を果たすことが意図されているに過ぎず、各個別の値は、それが個々に本明細書に記載されているかの如く、本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されている方法は全て、本明細書に別様の指定がない限り又は状況により明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる例又は例示的文言（例えば、「等」）の使用は、本発明をより良好に説明することが意図されているに過ぎず、別様に特許請求されていない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。明細書中の文言が、任意の特許請求されていない構成要素を、本発明の実施に不可欠であるものとして示すと解釈されるべきでない。

20

30

【0158】

本発明の実施形態が本明細書に記載されている。そうした実施形態の変異は、当業者であれば、上述の説明を読むと明白になる場合がある。

【0159】

本発明者らは、当業者がそのような変異を必要に応じて使用することを予想しており、本発明者らは、本発明が、本明細書に具体的に記載されているものとは別様に実施されることになることを意図している。従って、本発明は、準拠法により許容される、本明細書に添付されている特許請求の範囲に記載されている主題の改変及び均等物を全て含む。更に、それらの全ての考え得る変異における上記に記載の構成要素の任意の組合せは、本明細書に別様の指定がない限り又は状況により明らかに矛盾しない限り、本発明により包含される。当業者であれば、日常的なものを超える実験作業を使用することなく、本明細書に記載されている本発明の具体的な実施形態の多数の均等物を認識することになるか又は確認することができるだろう。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲により包含されることが意図されている。

40

【 図 1 】

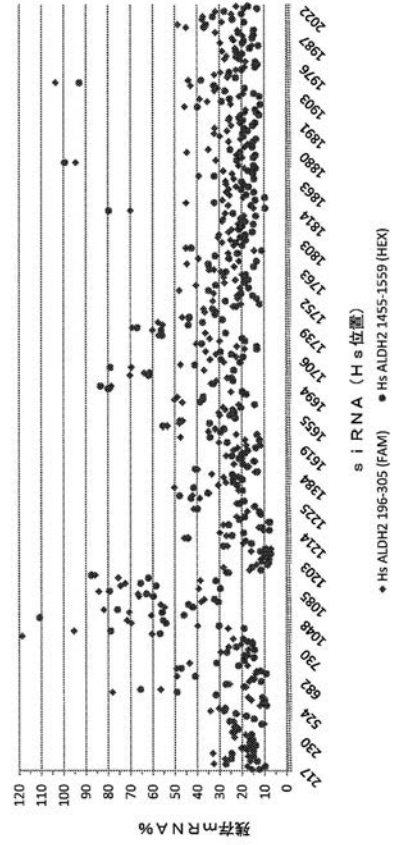
FIG. 1



【 図 2 】

FIG. 2

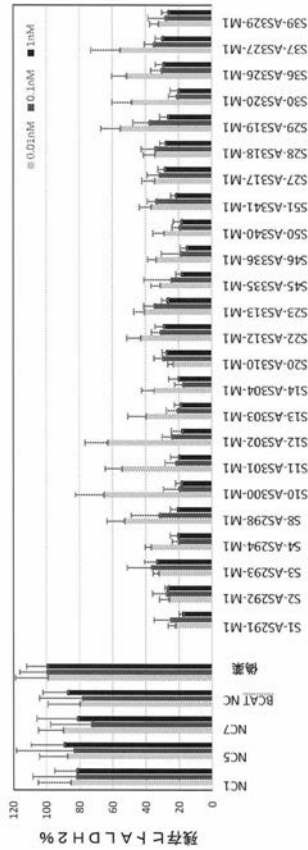
ヒトHPRT 517-591 (FAM) 及びヒトSFRS9 594-690 (HEX) に対して正規化されたHepG2細胞でのヒトALDH2ノックダウン対M107-M48 | NC1対照、M107-M48 | NC5対照、M107-M48 | NC7対照



【 図 3 A 】

FIG. 3A

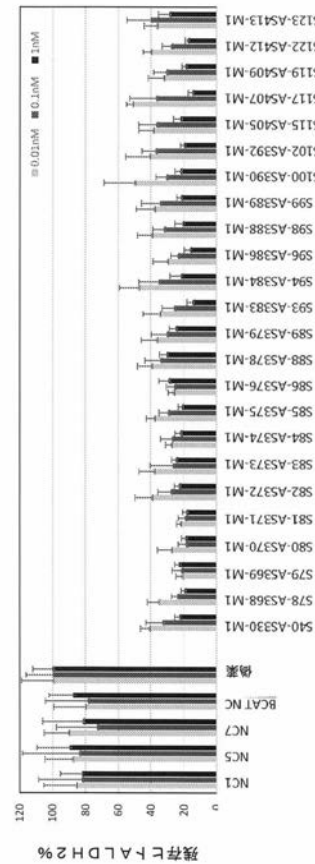
ヒトSFRS9 (F569) に対して正規化されたHepG2細胞における1 nM、0.1 nM、及び0.01 nMでのヒトALDH2第2段階スクリーニング対照薬



【 図 3 B 】

FIG. 3B

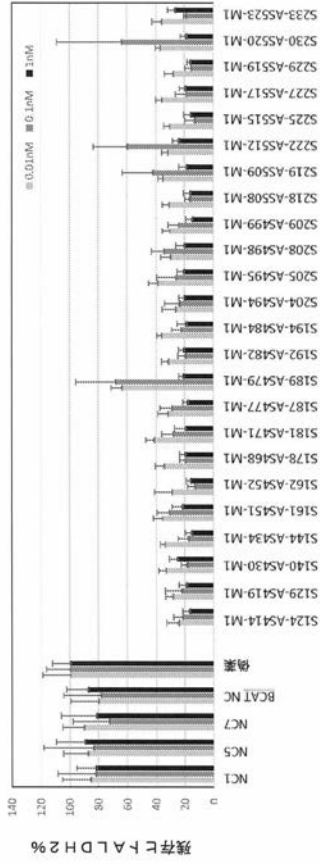
ヒトSFRS9 (F569) に対して正規化されたHepG2細胞における1 nM、0.1 nM、及び0.01 nMでのヒトALDH2第2段階スクリーニング対照薬



【 図 3 C 】

FIG. 3C

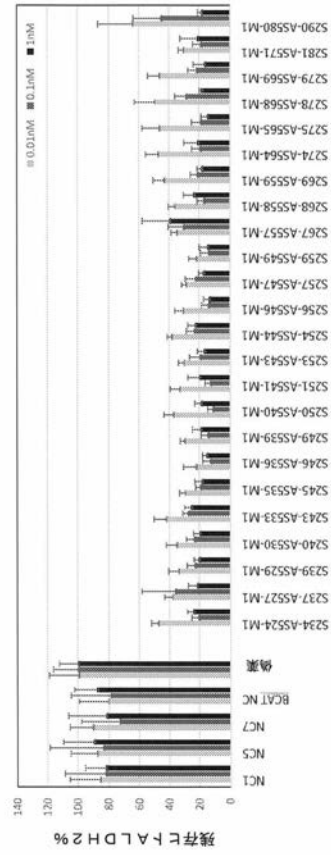
ヒトSFRS9 (F569) に対して正規化されたHepG2細胞における1 nM, 0, 1 nM, 及び0.01 nMでのヒトALDH2第2段階スクリーニング対偽薬



【 図 3 D 】

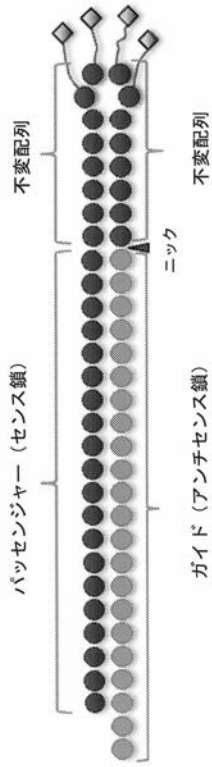
FIG. 3D

ヒトSFRS9 (F569) に対して正規化されたHepG2細胞における1 nM, 0, 1 nM, 及び0.01 nMでのヒトALDH2第2段階スクリーニング対偽薬



【 図 4 】

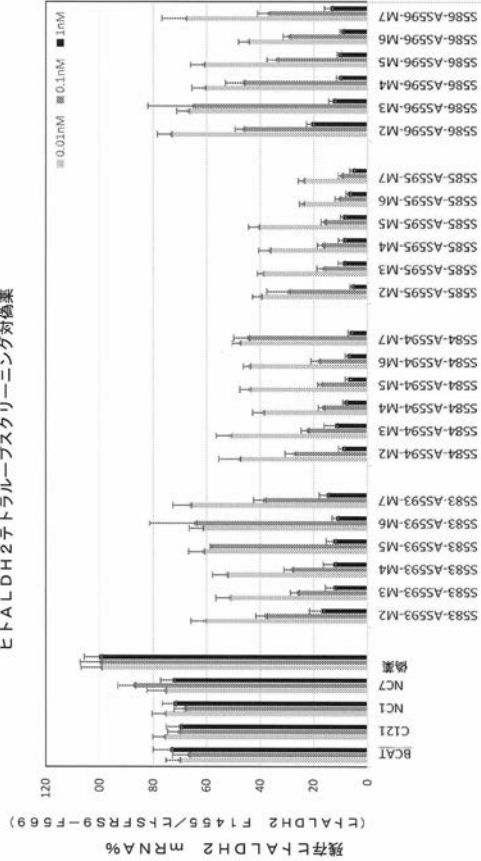
FIG. 4



【 図 5 A 】

FIG. 5A

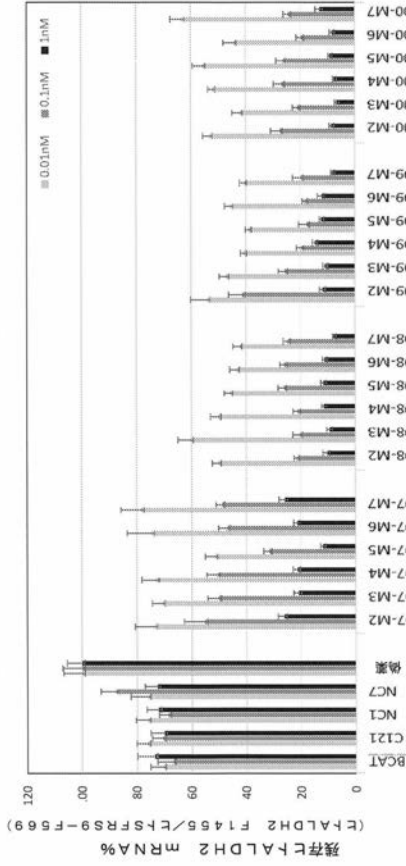
ヒトSFRS9に対して正規化されたHepG2細胞でのヒトALDH2チトアループスクリーニング対偽薬



【 図 5 B 】

FIG. 5B

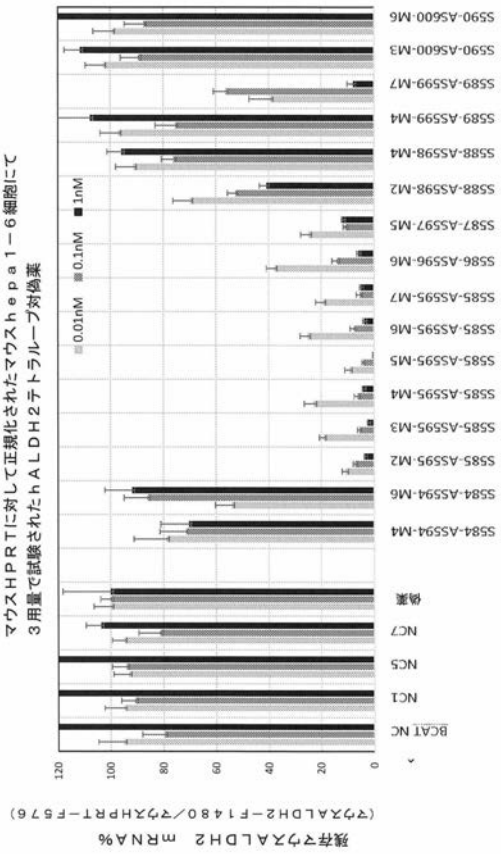
ヒトSFRRS9に対して正規化されたHepG2細胞での
ヒトALDH2テトララップスクリーニング対偽薬



【 図 6 】

FIG. 6

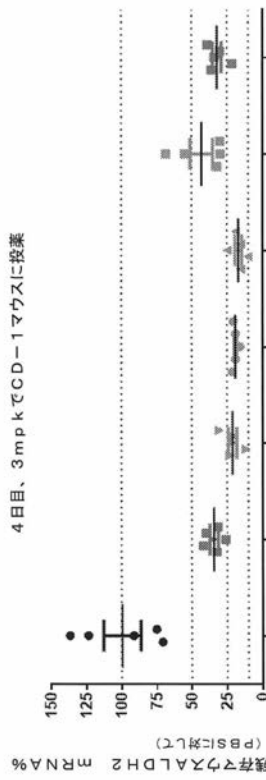
マウスHPR1に対して正規化されたマウスhepa1-6細胞にて
3用量で試験されたhALDH2テトララップ対偽薬



【 図 7 】

FIG. 7

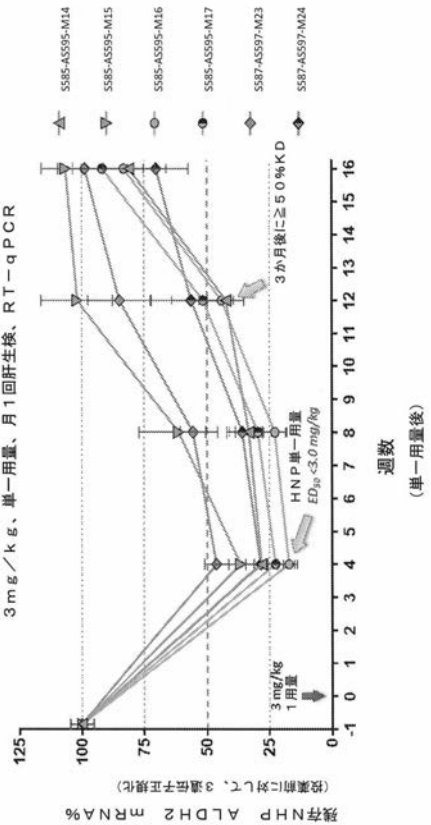
4日目、3mpkでCD-1マウスに投薬



【 図 8 】

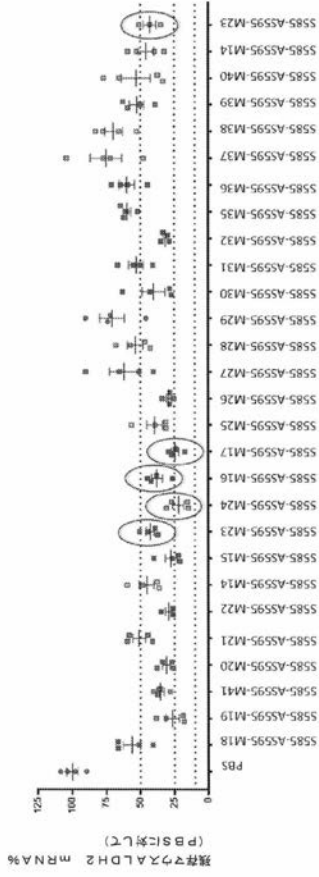
FIG. 8

サルでのGallXC-ALDH2ヒットスクリーニング、PD、及び作用持続時間
3mg/kg、単一用量、月1回肝生検、RT-qPCR



【 図 9 】

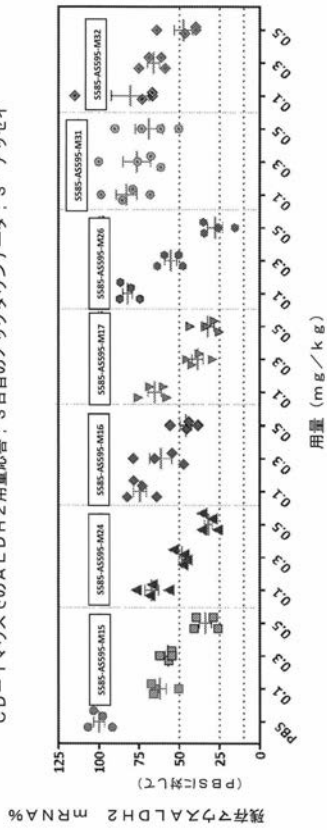
FIG. 9



【 図 1 1 】

FIG. 11

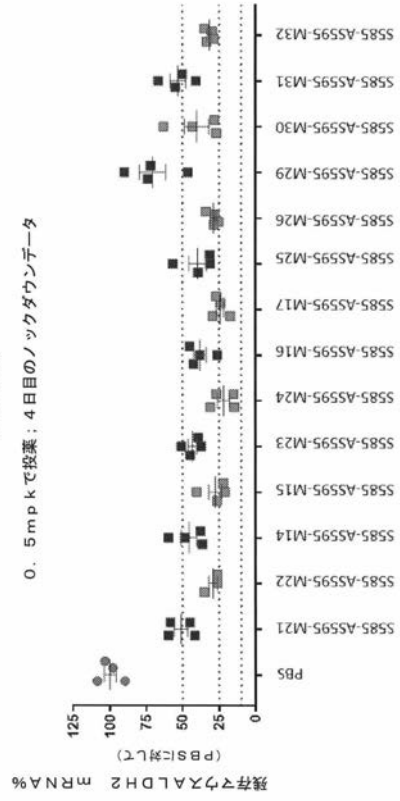
CD-1 マウスでのALDH2用量応答: 3日目のノックダウンデータ: 3' アッセイ



【 図 1 0 】

FIG. 10

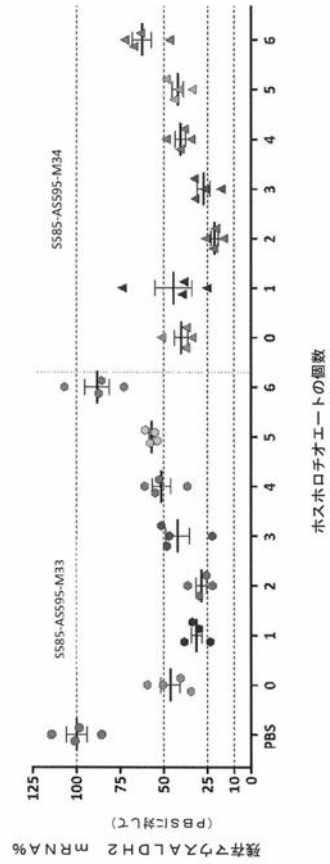
0. 5mpkで投薬: 4日目のノックダウンデータ



【 図 1 2 】

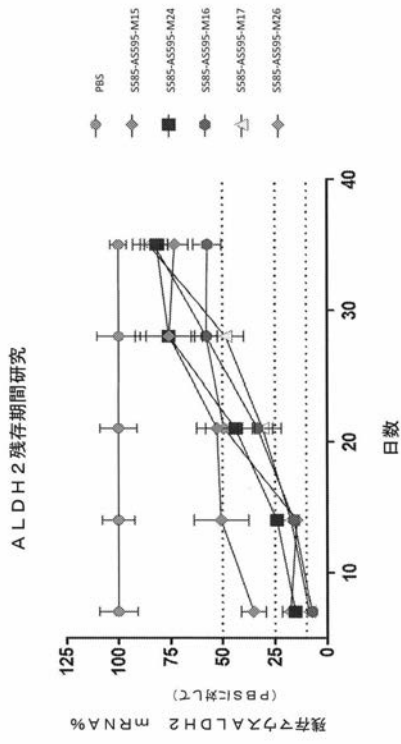
FIG. 12

0. 5mpkで投薬: 4日目のノックダウンデータ



【 図 1 3 】

FIG. 13



【 配 列 表 】

2021511042000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US19/13672
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12N 15/113; A61K 31/713, 31/712, 31/7115 (2019.01) CPC - C12N 15/113, 15/1137; A61K 31/713, 31/712, 31/7115, 31/7125; C07H 21/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2014/0248338 A1 (PROTIVA BIOTHERAPEUTICS, INC.) 04 September 2014; paragraphs [0009], [0012], [0035], [0118], [0120], [0133], [0171], [0173], [0177], [0179], [0186]; claims 1, 11	20, 21 ----- 5, 6
Y	WO 01/16346 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 08 March 2001; page 9, lines 91-5; SEQ ID NO: 3	5, 6
A	US 2003/0032788 A1 (GARVER E, et al.) 13 February 2003; paragraphs [0036], [0037], [0297]	1, 2, 3/1-2, 52, 53
A	WO 2015/169973 A2 (PROTAGEN AG) 12 November 2015; SEQ ID NO: 39	1, 2, 3/1-2, 52, 53
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 May, 2019 (06.05.2019)		Date of mailing of the international search report 23 MAY 2019
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US19/13672

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4, 7-19, 22-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***Continued Within the Next Supplemental Box-***

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 20, 21, 52, 53; SEQ ID NOs: 591, 581, 601

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US19/13672

-Continued from Box III: Lack of Unity of Invention-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-3, 5, 6, 20-22, 52, 53 and SEQ ID NOs: 591, 581 and 601 are directed toward sense and antisense oligonucleotides for reducing expression of ALDH2, wherein the antisense strands are complementary to sense strands to form a duplex in a stem-loop structure.

The oligonucleotides will be searched to the extent that they encompass a pair of RNAi oligonucleotides encompassing SEQ ID NOs: 591 (first exemplary antisense oligonucleotide), 581 (first exemplary sense oligonucleotide) and a target encompassing SEQ ID NO: 601 (first exemplary ALDH2 target sequence). Applicant is invited to elect additional oligonucleotide(s), and/or target(s) thereof with specified SEQ ID NO: for each, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional oligonucleotide sequence(s) and/or associated target sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-3 (each in-part), 5 (in-part), 6 (in-part), 20-22 and 52-53 (each in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 591 (antisense oligonucleotide), SEQ ID NO: 581 (sense oligonucleotide) and SEQ ID NO: 601 (ALDH2 target sequence). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a pair of oligonucleotides encompassing SEQ ID NO: 592 (antisense oligonucleotide), SEQ ID NO: 582 (sense oligonucleotide), and SEQ ID NO: 602 (ALDH2 target sequence).

No technical features are shared between the oligonucleotide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of: an oligonucleotide for reducing expression of ALDH2, the oligonucleotide comprising an antisense strand comprising a defined sequence; an oligonucleotide for reducing expression of ALDH2, the oligonucleotide comprising an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length, wherein the antisense strand has a region of complementarity to a defined target sequence of ALDH2, wherein the region of complementarity is at least 15 contiguous nucleotides in length; an oligonucleotide for reducing expression of ALDH2, the oligonucleotide comprising an antisense strand and a sense strand, wherein the antisense strand is 21 to 27 nucleotides in length and has a region of complementarity to ALDH2, wherein the sense strand comprises at its 3'-end a stem-loop set forth as: S1-L-S2, wherein S1 is complementary to S2, and wherein L forms a loop between S1 and S2 of 3 to 5 nucleotides in length, and wherein the antisense strand and the sense strand form a duplex structure of at least 19 nucleotides in length but are not covalently linked; and an oligonucleotide for reducing expression of ALDH2, the oligonucleotide comprising a sense strand of 15 to 50 nucleotides in length and an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length, wherein the sense strand forms a duplex region with the antisense strand, wherein the sense strand comprises a defined sequence and wherein the antisense strand comprises a defined complementary sequence; however, these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0248338 A1 to Protiva Biotherapeutics, Inc. (hereinafter 'Protiva').

Protiva discloses an oligonucleotide (antisense, siRNA oligonucleotides, etc.; paragraphs [0118], [0120]) for reducing expression of ALDH2 (inhibiting ALDH2 expression; paragraph [0009]; claim 11), the oligonucleotide comprising an antisense strand (paragraphs [0012], [0014]) comprising a defined sequence (paragraph [0017]); an oligonucleotide (antisense, siRNA oligonucleotides, etc.; paragraphs [0118], [0120]) for reducing expression of ALDH2 (inhibiting ALDH2 expression; paragraph [0009]; claim 11), the oligonucleotide comprising an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length (15 to 60 nucleotides in length; paragraph [0012]), wherein the antisense strand has a region of complementarity (paragraph [0034]) to a defined target sequence of ALDH2 (paragraphs [0084], [0120]), wherein the region of complementarity is at least 15 contiguous nucleotides in length (up to 16-contiguous homologous base pairs; paragraph [0130]); an oligonucleotide (antisense, siRNA oligonucleotides, etc.; paragraphs [0118], [0120]) for reducing expression of ALDH2 (inhibiting ALDH2 expression; paragraph [0009]; claim 11), the oligonucleotide comprising an antisense strand and a sense strand (paragraph [0012]; claim 1), wherein the antisense strand is 21 to 27 nucleotides in length (15 to 60 nucleotides in length; paragraph [0012]) and has a region of complementarity (paragraph [0034]) to ALDH2 (paragraphs [0084], [0120]), wherein the sense strand comprises at its 3'-end a stem-loop set forth as: S1-L-S2 (stem-loop structure; paragraph [0133]), wherein S1 is complementary to S2, and wherein L forms a loop between S1 and S2 regions in the loop (self-complementary stem-loop structure; paragraphs [0035], [0133]) of 3 to 5 nucleotides in length (loop of 1-25 nucleotides; paragraph [0186]), and wherein the antisense strand and the sense strand form a duplex structure of at least 19 nucleotides in length (duplex of 15-60 nucleotides; paragraph [0035]) but are not covalently linked (base-paired linkages; paragraph [0133]); and an oligonucleotide (antisense, siRNA oligonucleotides, etc.; paragraphs [0118], [0120]) for reducing expression of ALDH2 (inhibiting ALDH2 expression; paragraph [0009]; claim 11), the oligonucleotide comprising a sense strand of 15 to 50 nucleotides in length (15 to 60 nucleotides in length; paragraph [0012]) and an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length (15 to 60 nucleotides in length; paragraph [0012]), wherein the sense strand forms a duplex region with the antisense strand (duplex of 15-60 nucleotides; paragraph [0035]), wherein the sense strand comprises a defined sequence (paragraph [0017]) and wherein the antisense strand comprises a defined complementary sequence (paragraph [0017]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Protiva reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/32 (2006.01)	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/66 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
	A 6 1 K 47/66	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74) 代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74) 代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(72) 発明者 サクセナ ユトサフ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0 ケンブリッジ ケンブリッジパーク ドライブ 8 7

F ターム(参考) 4C076 CC01 DD51 DD67 DD70 EE41 EE59 FF34

4C084 AA13 NA14 ZB211 ZC391 ZC411

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZC39 ZC41