

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7437891号
(P7437891)

(45)発行日 令和6年2月26日(2024.2.26)

(24)登録日 令和6年2月15日(2024.2.15)

(51)国際特許分類

F I

| | | | | |
|---------|------------------|---------|---------|-------|
| A 6 1 K | 31/7115(2006.01) | A 6 1 K | 31/7115 | Z N A |
| 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 | |
| A 6 1 K | 47/54 (2017.01) | A 6 1 K | 47/54 | |
| A 6 1 K | 48/00 (2006.01) | A 6 1 K | 48/00 | |

請求項の数 13 (全176頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-136630(P2019-136630)
(22)出願日 令和1年7月25日(2019.7.25)
(62)分割の表示 特願2016-515086(P2016-515086)
)の分割
原出願日 平成26年5月22日(2014.5.22)
(65)公開番号 特開2019-214587(P2019-214587)
A)
(43)公開日 令和1年12月19日(2019.12.19)
審査請求日 令和1年8月23日(2019.8.23)
審判番号 不服2022-3901(P2022-3901/J1)
審判請求日 令和4年3月15日(2022.3.15)
(31)優先権主張番号 61/912,988
(32)優先日 平成25年12月6日(2013.12.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

最終頁に続く

(73)特許権者 505369158
アルナイラム ファーマシューティカルズ,
インコーポレイテッド
ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンドール・ストリート675、ヘンリ・エイ・ターミア・スクエア
(74)代理人 100145403
弁理士 山尾 憲人
(74)代理人 100122301
弁理士 富田 憲史
(74)代理人 100157956
弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T M P R S S 6 I R N A 組成物及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞内でのT M P R S S 6 (マトリプターゼ - 2) 遺伝子の発現を阻害するための二本鎖RNAi剤であって、前記二本鎖RNAi剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖が、

5' - C U U C U U C U G G U U C A U U C U C C A - 3' (配列番号223)

のヌクレオチド配列を含み、前記アンチセンス鎖が、

5' - U G G A G A A U G A A C C A G A A G A A G C A - 3' (配列番号292)

のヌクレオチド配列を含み、

前記センス鎖が21~30ヌクレオチド長であり、及びアンチセンス鎖が23~30ヌクレオチド長であり、

前記センス鎖の前記ヌクレオチドの全て及び前記アンチセンス鎖の前記ヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドであり、

前記センス鎖が、3'末端において価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された、1つ又は複数のG a l N A c 誘導体を含むリガンドにコンジュゲートされる、

二本鎖RNAi剤。

【請求項2】

前記修飾ヌクレオチドの少なくとも1つが、3'末端デオキシ - チミン (d T) ヌクレオチド、2' - O - メチル修飾ヌクレオチド、2' - フルオロ修飾ヌクレオチド、2' - デオキシ - 修飾ヌクレオチド、固定ヌクレオチド、非塩基性ヌクレオチド、2' - アミノ - 修飾ヌ

10

20

クレオチド、2'-アルキル-修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミデート、非天然塩基を含むヌクレオチド、5'-ホスホチオエート基を含むヌクレオチド、5'リン酸又は5'リン酸模倣体を含むヌクレオチド、及びコレステリル誘導体又はドデカン酸ビスデシルアミド基に結合された末端ヌクレオチドからなる群から選択される、請求項1に記載の二本鎖RNAi剤。

【請求項3】

少なくとも1つの鎖が、少なくとも1つまたは少なくとも2つのヌクレオチドの3'オーバーハングを含む、請求項1に記載の二本鎖RNAi剤。

【請求項4】

前記センス鎖が21~25または21~23のヌクレオチド長であり、及び前記アンチセンス鎖が23~25ヌクレオチド長である、請求項1に記載の二本鎖RNAi剤。

10

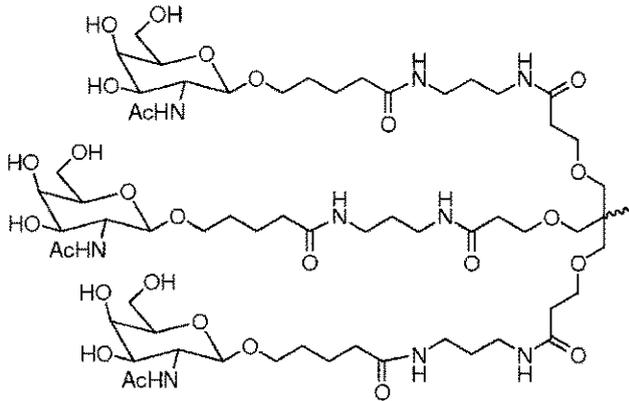
【請求項5】

前記センス鎖が21ヌクレオチド長であり、及び前記アンチセンス鎖が23ヌクレオチド長である、請求項4に記載の二本鎖RNAi剤。

【請求項6】

前記リガンドが、

【化1】



20

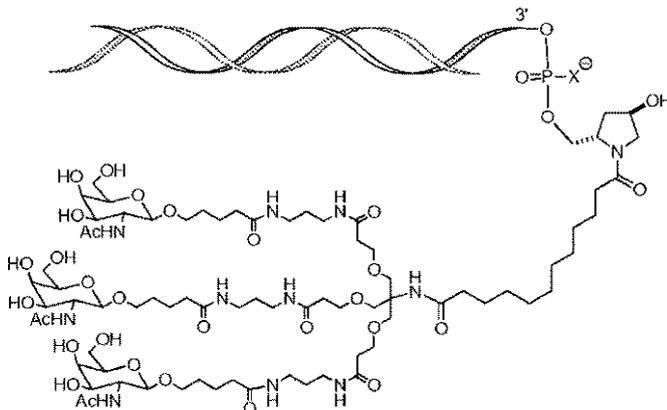
である、請求項1に記載の二本鎖RNAi剤。

30

【請求項7】

以下の概略図

【化2】



40

(式中、Xが、O又はSである)に示される前記リガンドにコンジュゲートされている、請求項6に記載の二本鎖RNAi剤。

【請求項8】

少なくとも1つのホスホチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合を更に含む、請求項1に記載の二本鎖RNAi剤。

50

【請求項 9】

前記RNAi剤が、6～8つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項8に記載の二本鎖RNAi剤。

【請求項 10】

請求項1に記載の二本鎖RNAi剤を含む医薬組成物。

【請求項 11】

TMPRSS6に関連する疾患に罹患しているヒト対象の処置方法への使用のための、請求項1に記載の二本鎖RNAi剤、又は請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記ヒトが、遺伝性ヘモクロマトーシス、サラセミア、赤芽球性ポルフィリン症、パーキンソン病、アルツハイマー病又はフリードライヒ運動失調症から選択される疾患に罹患している、請求項11に記載の二本鎖RNAi剤、又は医薬組成物。

10

【請求項 13】

前記二本鎖RNAi剤、又は医薬組成物が、皮下投与又は静脈内投与されるものである、請求項11又は12に記載の二本鎖RNAi剤、又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2013年5月22日に出願された米国仮特許出願第61/826,178号明細書及び2013年12月6日に出願された米国仮特許出願第61/912,988号明細書の優先権の利益を主張するものである。本出願は、2011年11月18日に出願された米国仮特許出願第61/561,710号明細書、及び2012年11月16日に出願されたPCT/US2012/065601号明細書に関する。上記の仮特許出願のそれぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。

20

【0002】

配列表

本出願は、全体が参照により本明細書に援用される、ASCII形式で電子的に提出されている配列表を含む。2014年5月21日に作成された前記ASCIIのコピーの名称は、121301-00720__SL.txtであり、サイズは449,620バイトである。

30

【背景技術】

【0003】

TMPRSS6（膜貫通プロテアーゼ、セリン6）遺伝子は、II型セリンプロテアーゼであるマトリプターゼ-2としても知られているTMPRSS6をコードする。TMPRSS6遺伝子は、主に肝臓で発現されるが、高いレベルのTMPRSS6 mRNAが、腎臓でも見られ、より低いレベルが子宮で見られ、はるかに少ない量が多く他の組織で検出される（非特許文献1）。TMPRSS6は、ヘプシジン活性化因子及びBMP共受容体HJV（ヘモジュベリン）を結合し、タンパク質を分解し、それにより、ヘプシジンレベルの下方制御を引き起こすことによって、鉄ホメオスタシスに役割を果たす。

40

【0004】

TMPRSS6は、短いN末端細胞質内尾部、II型膜貫通ドメイン、2つの細胞外CUB（補体因子C1s/C1r、ウニ胚成長因子及びBMP（骨形成タンパク質））ドメインから構成されるステム領域（stem region）、3つのLDLR（低比重リポタンパク質受容体クラスA）ドメイン、及びC末端トリプシン様セリンプロテアーゼドメインからなる。細胞外ドメインにおけるN-グリコシル化のためのコンセンサス部位、及び細胞質内尾部領域における潜在的なリン酸化部位もある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

50

【文献】Ramsay et al., Haematologica (2009), 94 (6), 840 - 849

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

多くの疾患が、増加したレベルの鉄によって特徴付けられる病態である鉄過剰に関連し得る。鉄過剰は、様々な組織における過剰な鉄沈着を引き起こすことがあり、組織及び臓器障害につながり得る。したがって、鉄過剰に関連する疾患の有効な処置のための方法が、現在必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、TMPRSS6を標的とするRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤を含む組成物を提供する。本発明は、TMPRSS6発現を阻害し、TMPRSS6に関連する疾患、例えば、サラセミア、例えば、サラセミア、又はヘモクロマトーシスなどの鉄過剰に関連する疾患を処置するための本発明の組成物の使用方法も提供する。

【0008】

したがって、一態様において、本発明は、細胞内でのTMPRSS6（マトリプターゼ-2）の発現を阻害することが可能なRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤であって、二本鎖RNAi剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖が、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3、配列番号4、又は配列番号5のヌクレオチド配列のいずれか1つと3つ以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖が、配列番号6、配列番号7、又は配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のヌクレオチド配列のいずれか1つと3つ以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、

センス鎖のヌクレオチドの実質的に全て及びアンチセンス鎖のヌクレオチドの実質的に全てが、修飾ヌクレオチドであり、

センス鎖が、3'末端において結合されたりガンドにコンジュゲートされる二本鎖RNAi剤を提供する。

【0009】

一実施形態において、前記センス鎖のヌクレオチドの全て及び前記アンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾ヌクレオチドである。

【0010】

一実施形態において、センス鎖及びアンチセンス鎖が、表1、2、4、5、8、10、及び12のいずれか1つに列挙されるアンチセンス配列のいずれか1つと3つ以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含む相補性の領域を含む。

【0011】

一実施形態において、修飾ヌクレオチドの少なくとも1つが、3'末端デオキシ-チミン（dT）ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ-修飾ヌクレオチド、固定ヌクレオチド、非塩基性ヌクレオチド、2'-アミノ-修飾ヌクレオチド、2'-アルキル-修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミデート、非天然塩基を含むヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、5'リン酸又は5'リン酸模倣体を含むヌクレオチド（例えば、PCT公開番号国際公開第2011/005860号パンフレットを参照）、及びコレステリル誘導体又はドデカン酸ビスデシルアミド基に結合された末端ヌクレオチドからなる群から選択される。

【0012】

一実施形態において、少なくとも1つの鎖が、少なくとも1つのヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。別の実施形態において、少なくとも1つの鎖が、少なくとも2つのヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。別の態様において、本発明は、細胞内でのTMPRSS6（マトリプターゼ-2）の発現を阻害することが可能なRNAi剤、例えば、二

10

20

30

40

50

本鎖RNAi剤であって、二本鎖RNAi剤が、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、TMPRSS6をコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖が、約14～約30ヌクレオチド長であり、二本鎖RNAi剤が、式(III)：

センス：5' ρ -N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q3'

アンチセンス：3' ρ' -N_b'-(X'X'X'_k)-N_b'-Y'Y'Y'_b-N(Z'Z'Z'_l)_l-N_a'-n_q'5'(III)

(式中：

i、j、k、及びlがそれぞれ、独立して、0又は1であり；

p、p'、q、及びq'がそれぞれ、独立して、0～6であり；

各N_a及びN_a'が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～25のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

各N_b及びN_b'が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～10のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

それぞれ存在していても又は存在していなくてもよい各n_p、n_p'、n_q、及びn_q'が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、及びZ'Z'Z'がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し；

N_b上の修飾が、Y上の修飾と異なり、N_b'上の修飾が、Y'上の修飾と異なり；

センス鎖が、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされている)

によって表される二本鎖RNAi剤を提供する。

【0013】

一実施形態において、iが0であり；jが0であり；iが1であり；jが1であり；i及びjの両方が0であり；又はi及びjの両方が1である。別の実施形態において、kが0であり；lが0であり；kが1であり；lが1であり；k及びlの両方が0であり；又はk及びlの両方が1である。

【0014】

一実施形態において、XXXが、X'X'X'に相補的であり、YYYが、Y'Y'Y'に相補的であり、ZZZが、Z'Z'Z'に相補的である。

【0015】

一実施形態において、YYYモチーフが、センス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。

【0016】

一実施形態において、Y'Y'Y'モチーフが、5'末端のアンチセンス鎖の11位、12位及び13位に存在する。

【0017】

一実施形態において、Y'が、2'-O-メチルである。

【0018】

一実施形態において、式(III)が、式(IIIa)：

センス：5' ρ -N_a-YYY-N_a-n_q3'

アンチセンス：3' ρ' -N_a'-Y'Y'Y'_a-N_a'-n_q'5'(IIIa)

によって表される。

【0019】

別の実施形態において、式(III)が、式(IIIb)：

センス：5' ρ -N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q3'

アンチセンス：3' ρ' -N_a'-Y'Y'Y'_b-N_b'-ZZZ'-N_a'-n_q'5'(IIIb)

)

(式中、各N_b及びN_b'が、独立して、1～5つの修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す)

によって表される。

10

20

30

40

50

【0020】

更に別の実施形態において、式(III)が、式(IIIc)：

センス：5' ρ - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3'

アンチセンス：3' ρ' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5' (IIIc)

(式中、各N_b及びN_b'が、独立して、1~5つの修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す)

によって表される。

【0021】

一実施形態において、式(III)が、式(III d)：

センス：5' ρ - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3'

アンチセンス：3' ρ' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5' (III d)

(式中、各N_b及びN_b'が、独立して、1~5つの修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各N_a及びN_a'が、独立して、2~10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す)

によって表される。

【0022】

一実施形態において、二本鎖領域は、15~30ヌクレオチド対長である。別の実施形態において、二本鎖領域は、17~23ヌクレオチド対長である。更に別の実施形態において、二本鎖領域は、17~25ヌクレオチド対長である。一実施形態において、二本鎖領域は、23~27ヌクレオチド対長である。別の実施形態において、二本鎖領域は、19~21ヌクレオチド対長である。別の実施形態において、二本鎖領域は、21~23ヌクレオチド対長である。一実施形態において、各鎖は、15~30のヌクレオチドを有する。別の実施形態において、各鎖は、19~30のヌクレオチドを有する。

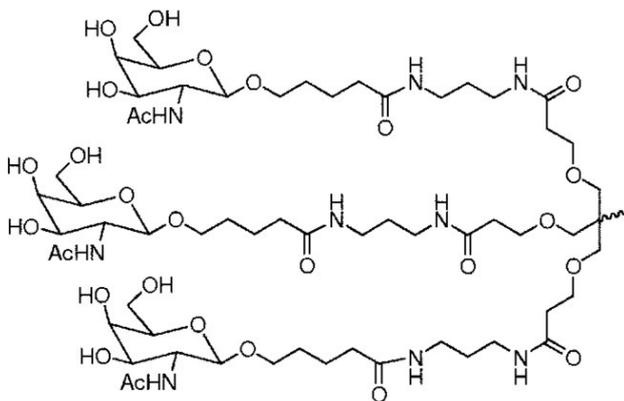
【0023】

一実施形態において、ヌクレオチド上の修飾は、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-アルキル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、及びそれらの組合せからなる群から選択される。別の実施形態において、ヌクレオチド上の修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾である。

【0024】

一実施形態において、リガンドは、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された1つ又は複数のGalNAc誘導体である。別の実施形態において、リガンドは、

【化1】



である。

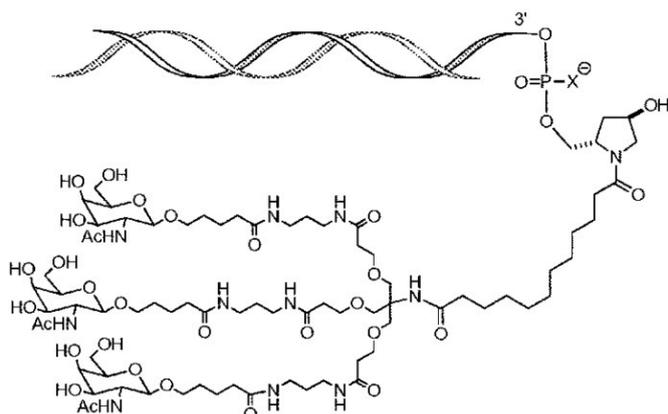
【0025】

一実施形態において、リガンドは、センス鎖の3'末端に結合される。

【 0 0 2 6 】

一実施形態において、RNAi剤は、以下の概略図

【化2】



10

(式中、XがO又はSである)に示されるリガンドにコンジュゲートされている。特定の実施形態において、XがOである。

【 0 0 2 7 】

一実施形態において、剤は、少なくとも1つのホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合を更に含む。

20

【 0 0 2 8 】

一実施形態において、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合は、1つの鎖の3'末端にある。一実施形態において、鎖は、アンチセンス鎖である。別の実施形態において、鎖は、センス鎖である。

【 0 0 2 9 】

一実施形態において、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合は、1つの鎖の5'末端にある。一実施形態において、鎖は、アンチセンス鎖である。別の実施形態において、鎖は、センス鎖である。

【 0 0 3 0 】

一実施形態において、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合は、1つの鎖の5'末端及び3'末端の両方にある。一実施形態において、鎖は、アンチセンス鎖である。

30

【 0 0 3 1 】

一実施形態において、RNAi剤は、6~8つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

【 0 0 3 2 】

一実施形態において、アンチセンス鎖は、5'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合及び3'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、センス鎖は、5'末端又は3'末端のいずれかにおける少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

40

【 0 0 3 3 】

一実施形態において、二本鎖のアンチセンス鎖の5'末端の1位における塩基対が、AU塩基対である。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、Yヌクレオチドが、2'-フルオロ修飾を含む。

【 0 0 3 5 】

一実施形態において、Y'ヌクレオチドが、2'-O-メチル修飾を含む。

【 0 0 3 6 】

一実施形態において、 $p' > 0$ である。別の実施形態において、 $p' = 2$ である。

【 0 0 3 7 】

50

一実施形態において、 $q' = 0$ であり、 $p = 0$ であり、 $q = 0$ であり、 p' オーバーハングヌクレオチドが、標的 mRNA に相補的である。別の実施形態において、 $q' = 0$ であり、 $p = 0$ であり、 $q = 0$ であり、 p' オーバーハングヌクレオチドが、標的 mRNA に非相補的である。

【0038】

一実施形態において、センス鎖が、合計で 21 のヌクレオチドを有し、アンチセンス鎖が、合計で 23 のヌクレオチドを有する。

【0039】

一実施形態において、少なくとも 1 つの n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合される。

【0040】

一実施形態において、全ての n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合される。

【0041】

一実施形態において、RNAi 剤は、表 1、2、4、5、8、10、及び 12 のいずれか 1 つに列挙される RNAi 剤の群から選択される。

【0042】

一実施形態において、RNAi 剤は、AD-59743 である。別の実施形態において、RNAi 剤は、AD-60940 である。

【0043】

一態様において、本発明は、細胞内での TMPRSS6 の発現を阻害するための二本鎖 RNAi 剤であって、

二本鎖 RNAi 剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖が、配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3、配列番号 4、又は配列番号 5 のヌクレオチド配列のいずれか 1 つと 3 つ以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 連続ヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖が、配列番号 6、配列番号 7、又は配列番号 8、配列番号 9、又は配列番号 10 のヌクレオチド配列のいずれか 1 つと 3 つ以下のヌクレオチドが異なる少なくとも 15 連続ヌクレオチドを含み、

センス鎖のヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾及び 2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、

センス鎖が、5' 末端における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

アンチセンス鎖のヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾及び 2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、

アンチセンス鎖が、5' 末端における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合及び 3' 末端における 2 つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

センス鎖が、3' 末端において分枝鎖状の二価又は三価リンカーを介して結合された 1 つ又は複数の GalNAc 誘導体にコンジュゲートされる二本鎖 RNAi 剤を提供する。

【0044】

一実施形態において、センス鎖のヌクレオチドの全て及びアンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾を含む。

【0045】

別の態様において、本発明は、細胞内での TMPRSS6 (マトリプターゼ-2) の発現を阻害することが可能な RNAi 剤、例えば、二本鎖 RNAi 剤であって、二本鎖 RNAi 剤が、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、TMPRSS6 をコードする mRNA の一部に相補的な領域を含み、各鎖が、約 14 ~ 約 30 ヌクレオチド長であり、二本鎖 RNAi 剤が、式 (III) :

センス: 5' n_p - N_a - (XXX) i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ) j - N_a - n_q 3'

アンチセンス: 3' n_p' - N_b' - (X'X'X') - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z') i - N_a' - n_q' 5' (III)

10

20

30

40

50

(式中：

i 、 j 、 k 、及び l がそれぞれ、独立して、0又は1であり；

p 、 p' 、 q 、及び q' がそれぞれ、独立して、0～6であり；

各 N_a 及び $N_{a'}$ が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～25のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

各 N_b 及び $N_{b'}$ が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～10のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

それぞれ存在していても又は存在していなくてもよい各 n_p 、 $n_{p'}$ 、 n_q 、及び $n_{q'}$ が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 、及び $Z'Z'Z'$ がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾が、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり；

N_b 上の修飾が、 Y 上の修飾と異なり、 $N_{b'}$ 上の修飾が、 Y' 上の修飾と異なり；

センス鎖が、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされている）

によって表される二本鎖RNA i 剤を提供する。

【0046】

更に別の態様において、本発明は、細胞内でのTMPRSS6（マトリプターゼ-2）の発現を阻害することが可能なRNA i 剤、例えば、二本鎖RNA i 剤であって、二本鎖RNA i 剤が、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、TMPRSS6をコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖が、約14～約30ヌクレオチド長であり、二本鎖RNA i 剤が、式（III）：

センス：5' n_p - N_a - (XXX) $_i$ - N_b - YYY - $N_{b'}$ - (ZZZ) $_j$ - N_a - n_q 3'

アンチセンス：3' $n_{p'}$ - $N_{b'}$ - ($X'X'X'$) $_i$ - N_b - $Y'Y'Y'$ - N_a - ($Z'Z'Z'$) $_j$ - $N_{a'}$ - $n_{q'}$ 5'（III）

(式中：

i 、 j 、 k 、及び l がそれぞれ、独立して、0又は1であり；

それぞれ存在していても又は存在していなくてもよい各 n_p 、 n_q 、及び $n_{q'}$ が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

p 、 q 、及び q' がそれぞれ、独立して、0～6であり；

$n_{p'} > 0$ であり、少なくとも1つの $n_{p'}$ が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合され；

各 N_a 及び $N_{a'}$ が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～25のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

各 N_b 及び $N_{b'}$ が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～10のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

XXX 、 YYY 、 ZZZ 、 $X'X'X'$ 、 $Y'Y'Y'$ 、及び $Z'Z'Z'$ がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾が、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり；

N_b 上の修飾が、 Y 上の修飾と異なり、 $N_{b'}$ 上の修飾が、 Y' 上の修飾と異なり；

センス鎖が、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされている）

によって表される二本鎖RNA i 剤を提供する。

【0047】

更なる態様において、本発明は、細胞内でのTMPRSS6（マトリプターゼ-2）の発現を阻害することが可能なRNA i 剤、例えば、二本鎖RNA i 剤であって、二本鎖RNA i 剤が、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、TMPRSS6をコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖が、約14～約30ヌクレオチド長であり、二本鎖RNA i 剤が、式（III）：

10

20

30

40

50

センス：5' η_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q
3'

アンチセンス：3' $\eta_{p'}$ - N_{b'} - (X'X'X'_{k'}) - N_{b'} - Y'Y'Y'_{b'} - N_{a'} - n_{q'}
)_l - N_{a'} - n_{q'} 5' (III)

(式中：

i、j、k、及びlがそれぞれ、独立して、0又は1であり；

それぞれ存在していても又は存在していなくてもよい各n_p、n_q、及びn_{q'}が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

p、q、及びq'がそれぞれ、独立して、0～6であり；

n_{p'} > 0であり、少なくとも1つの $\eta_{p'}$ が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合され； 10

各N_a及びN_{a'}が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～25のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

各N_b及びN_{b'}が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～10のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、及びZ'Z'Z'がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾が、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり；

N_b上の修飾が、Y上の修飾と異なり、N_{b'}上の修飾が、Y'上の修飾と異なり； 20

センス鎖が、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされ、リガンドが、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された1つ又は複数のGalNAc誘導体である)によって表される二本鎖RNAi剤を提供する。

【0048】

別の態様において、本発明は、細胞内でのTMPRSS6(マトリプターゼ-2)の発現を阻害することが可能なRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤であって、二本鎖RNAi剤が、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、TMPRSS6をコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖が、約14～約30ヌクレオチド長であり、二本鎖RNAi剤が、式(III)：

センス：5' η_p - N_a - (XXX)_i - N_b - YYY - N_b - (ZZZ)_j - N_a - n_q
3' 30

アンチセンス：3' $\eta_{p'}$ - N_{b'} - (X'X'X'_{k'}) - N_{b'} - Y'Y'Y'_{b'} - N_{a'} - n_{q'}
)_l - N_{a'} - n_{q'} 5' (III)

(式中：

i、j、k、及びlがそれぞれ、独立して、0又は1であり；

それぞれ存在していても又は存在していなくてもよい各n_p、n_q、及びn_{q'}が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

p、q、及びq'がそれぞれ、独立して、0～6であり；

n_{p'} > 0であり、少なくとも1つの $\eta_{p'}$ が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合され； 40

各N_a及びN_{a'}が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～25のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

各N_b及びN_{b'}が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0～10のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、及びZ'Z'Z'がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾が、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり；

N_b上の修飾が、Y上の修飾と異なり、N_{b'}上の修飾が、Y'上の修飾と異なり；

センス鎖が、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み； 50

センス鎖が、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされ、リガンドが、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された1つ又は複数のGalNAc誘導体である)によって表される二本鎖RNAi剤を提供する。

【0049】

更に別の態様において、本発明は、細胞内でのTMPRSS6(マトリプターゼ-2)の発現を阻害することが可能なRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤であって、二本鎖RNAi剤が、アンチセンス鎖に相補的なセンス鎖を含み、アンチセンス鎖が、TMPRSS6をコードするmRNAの一部に相補的な領域を含み、各鎖が、約14~約30ヌクレオチド長であり、二本鎖RNAi剤が、式(III)：

センス：5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3'

アンチセンス：3' n_p' - N_b - Y'Y'Y'a' - N_b 5' (IIIa)

(式中：

それぞれ存在していても又は存在していなくてもよい各 n_p 、 n_q 、及び n_q' が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

p 、 q 、及び q' がそれぞれ、独立して、0~6であり；

$n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合され；

各 N_a 及び N_a' が、独立して、修飾又は非修飾のいずれかの0~25のヌクレオチド又はそれらの組合せを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

YYY及びY'Y'Y'がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つのモチーフを表し、修飾が、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり；

センス鎖が、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み；

センス鎖が、少なくとも1つのリガンドにコンジュゲートされ、リガンドが、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された1つ又は複数のGalNAc誘導体である)によって表される二本鎖RNAi剤を提供する。

【0050】

一実施形態において、本発明は、表1、2、4、5、8、19、及び12のいずれか1つに列挙されるRNAi剤の群から選択されるRNAi剤を提供する。

【0051】

一態様において、本発明は、修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド剤を含む組成物であって、剤が、細胞内でのTMPRSS6の発現を阻害することが可能であり、表1、2、4、5、8、10、及び12のいずれか1つに列挙される配列の群から選択されるセンス配列に相補的な配列を含み、ポリヌクレオチドが、約14~約30ヌクレオチド長である組成物を提供する。

【0052】

本発明は、例えば、本発明の二本鎖RNAi剤を含む、細胞、ベクター、宿主細胞、及び医薬組成物も提供する。

【0053】

ある実施形態において、RNAi剤は、医薬組成物を用いて投与される。

【0054】

好ましい実施形態において、RNAi剤は、溶液中で投与される。あるこのような実施形態において、siRNAは、非緩衝液中で投与される。一実施形態において、siRNAは、水中で投与される。他の実施形態において、siRNAは、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、プロラミン緩衝液、炭酸緩衝液、若しくはリン酸緩衝液又はそれらの任意の組合せなどの緩衝液とともに投与される。ある実施形態において、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。

【0055】

一実施形態において、医薬組成物は、脂質製剤を更に含む。一実施形態において、脂質製剤は、LNP、又はXTCを含む。別の実施形態において、脂質製剤は、MC3を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

一態様において、本発明は、細胞内でのTMPRSS6発現の阻害方法を提供する。本方法は、細胞を、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤、又は本発明の修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド剤、又は本発明のベクター、又は本発明の医薬組成物と接触させる工程と；工程(a)で産生される細胞を、TMPRSS6遺伝子のmRNA転写物の分解を得るのに十分な時間にわたって維持し、それにより、細胞中のTMPRSS6遺伝子の発現を阻害する工程とを含む。

【 0 0 5 7 】

一実施形態において、細胞は、対象中にある。

【 0 0 5 8 】

一実施形態において、対象はヒトである。

【 0 0 5 9 】

一実施形態において、TMPRSS6発現は、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は100%だけ阻害される。

【 0 0 6 0 】

別の実施形態において、ヘプシジン遺伝子発現は、少なくとも約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、又は約5倍増加される。

【 0 0 6 1 】

更に別の実施形態において、血清ヘプシジン濃度は、少なくとも約10%、約25%、約50%、約100%、約150%、約200%、約250%、又は約300%だけ増加される。

【 0 0 6 2 】

一実施形態において、血清鉄濃度は、少なくとも約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%又は約100%だけ低下される。

【 0 0 6 3 】

別の実施形態において、トランスフェリン飽和度パーセントは、少なくとも約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%又は約100%だけ減少される。

【 0 0 6 4 】

別の態様において、本発明は、TMPRSS6発現によって媒介されるか、又はそれに関連する疾患に罹患している対象の処置方法を提供する。本方法は、治療有効量の本発明のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤、又は本発明の修飾されたアンチセンスポリヌクレオチド剤、又は本発明のベクター、又は本発明の医薬組成物を対象に投与し、それにより、対象を処置する工程を含む。

【 0 0 6 5 】

一態様において、本発明は、TMPRSS6に関連する疾患に罹患している対象の処置方法を提供する。本方法は、治療有効量の二本鎖RNAi剤を対象に皮下投与し、それにより、対象を処置する工程を含み、

二本鎖RNAi剤が、二本鎖領域を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み、
センス鎖が、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3、配列番号4、又は配列番号5のヌクレオチド配列のいずれか1つと3つ以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖が、配列番号6、配列番号7、又は配列番号8、配列番号9、又は配列番号10のヌクレオチド配列のいずれか1つと3つ以下のヌクレオチドが異なる少なくとも15連続ヌクレオチドを含み、

アンチセンス鎖のヌクレオチドの実質的に全てが、2'-O-メチル修飾及び2'-フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、

アンチセンス鎖が、5'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合及び3'末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

10

20

30

40

50

センス鎖のヌクレオチドの実質的に全てが、2' - O - メチル修飾及び2' - フルオロ修飾からなる群から選択される修飾を含み、

センス鎖が、5' 末端における2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、

センス鎖が、3' 末端において分枝鎖状の二価又は三価リンカーを介して結合された1つ又は複数の GalNAc 誘導体にコンジュゲートされる。

【0066】

一実施形態において、センス鎖のヌクレオチドの全て及びアンチセンス鎖のヌクレオチドの全てが、修飾を含む。

【0067】

一実施形態において、対象はヒトである。

10

【0068】

一実施形態において、対象は、鉄過剰に関連する疾患、例えば、遺伝性ヘモクロマトーシス、 β -サラセミア（例えば、重症型 β -サラセミア及び中間型 β -サラセミア）、赤芽球性ポルフィリン症、パーキンソン病、アルツハイマー病又はフリードライヒ運動失調症に罹患している。

【0069】

一実施形態において、RNAi 剤、例えば、二本鎖 RNAi 剤は、約 0.01 mg/kg ~ 約 10 mg/kg、約 1 mg/kg ~ 約 10 mg/kg、約 2 mg/kg ~ 約 10 mg/kg、約 3 mg/kg ~ 約 10 mg/kg、約 4 mg/kg ~ 約 10 mg/kg、約 5 mg/kg ~ 約 15 mg/kg、約 6 mg/kg ~ 約 15 mg/kg、約 7 mg/kg ~ 約 15 mg/kg、約 8 mg/kg ~ 約 15 mg/kg、約 9 mg/kg ~ 約 15 mg/kg、約 10 mg/kg ~ 約 20 mg/kg、約 12 mg/kg ~ 約 20 mg/kg、約 13 mg/kg ~ 約 20 mg/kg、約 14 mg/kg ~ 約 20 mg/kg、約 15 mg/kg ~ 約 20 mg/kg、約 16 mg/kg ~ 約 20 mg/kg 又は約 18 mg/kg ~ 約 20 mg/kg の用量で投与される。特定の実施形態において、二本鎖 RNAi 剤は、約 0.1 mg/kg、約 1.0 mg/kg、又は約 3.0 mg/kg の用量で投与される。

20

【0070】

一実施形態において、RNAi 剤、例えば、二本鎖 RNAi 剤は、皮下又は静脈内投与される。

30

【0071】

一実施形態において、RNAi 剤は、2つ以上の用量で投与される。特定の実施形態において、RNAi 剤は、約 12 時間に 1 回、約 24 時間に 1 回、約 48 時間に 1 回、約 72 時間に 1 回、約 96 時間に 1 回、約 7 日に 1 回、又は約 14 日に 1 回からなる群から選択される間隔で投与される。特定の実施形態において、RNAi 剤は、2 週間以下、3 週間以下、4 週間以下、5 週間以下、又はそれ以上にわたって週に 1 回投与される。

【0072】

更に別の態様において、本発明は、対象の鉄過剰に関連する疾患の処置方法を提供する。本方法は、治療有効量の RNAi 剤、例えば、二本鎖 RNAi 剤、又は本発明のベクターを対象に投与し、それにより、対象を処置する工程を含む。

40

【0073】

一実施形態において、鉄過剰に関連する疾患は、ヘモクロマトーシスである。別の実施形態において、鉄過剰に関連する疾患は、サラセミア、例えば、 β -サラセミア（例えば、重症型 β -サラセミア及び中間型 β -サラセミア）、又は赤芽球性ポルフィリン症である。更に別の実施形態において、鉄過剰に関連する疾患は、神経疾患、例えば、パーキンソン病、アルツハイマー病又はフリードライヒ運動失調症である。

【0074】

一実施形態において、対象は、霊長類又はげっ歯類である。別の実施形態において、対象はヒトである。

【0075】

50

一実施形態において、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤は、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.5mg/kg～約50mg/kg、約10mg/kg～約30mg/kg、約10mg/kg～約20mg/kg、約15mg/kg～約20mg/kg、約15mg/kg～約25mg/kg、約15mg/kg～約30mg/kg、又は約20mg/kg～約30mg/kgの用量で投与される。

【0076】

一実施形態において、RNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤は、皮下又は静脈内投与される。

【0077】

一実施形態において、RNAi剤は、2つ以上の用量で投与される。特定の実施形態において、RNAi剤は、約12時間に1回、約24時間に1回、約48時間に1回、約72時間に1回、約96時間に1回、約7日に1回、又は約14日に1回からなる群から選択される間隔で投与される。

10

【0078】

一実施形態において、投与により、対象における鉄レベル、フェリチンレベル及び/又はトランスフェリン飽和度レベルが低下される。

【0079】

一実施形態において、本方法は、対象における鉄レベルを決定する工程を更に含む。

【0080】

一実施形態において、本発明のiRNA剤（又は本発明の医薬組成物）を対象に投与する工程を含む本発明の方法は、更なる薬剤の投与及び/又は他の治療方法と組み合わせて実施される。一実施形態において、本発明の方法は、鉄キレート剤、例えば、デフェリプロン、デフェロキサミン、及びデフェラシロクスを対象に投与する工程を更に含む。

20

【0081】

本発明は、以下の詳細な説明及び図面によって更に例示される。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】1mg/kg、3mg/kg又は10mg/kgのiRNA剤AD-59743の単回用量の投与の後の、野生型マウスの肝臓におけるTMPRSS6 mRNAの相対的レベルを示すグラフである。

30

【図2】1mg/kg、3mg/kg又は10mg/kgのiRNA剤AD-59743の単回用量の投与の後の、野生型マウスの肝臓におけるヘプシジンmRNAの相対的レベルを示すグラフである。

【図3-1】0.3mg/kg、1.0mg/kg又は3.0mg/kgの用量でのAD-60940、又はPBSのみ（対照）の単回皮下注射の後の様々な時点におけるC57BL/6マウスにおける肝臓TMPRSS6 mRNA（図3A）、肝臓ヘプシジンmRNA（図3B）のレベルを示す。各データ点が、3匹のマウスの平均値を表す。平均の標準偏差が、エラーバーによって表される。

【図3-2】0.3mg/kg、1.0mg/kg又は3.0mg/kgの用量でのAD-60940、又はPBSのみ（対照）の単回皮下注射の後の様々な時点におけるC57BL/6マウスにおける血清ヘプシジン（図3C）、総血清鉄（図3D）のレベルを示す。各データ点が、3匹のマウスの平均値を表す。平均の標準偏差が、エラーバーによって表される。

40

【図3-3】0.3mg/kg、1.0mg/kg又は3.0mg/kgの用量でのAD-60940、又はPBSのみ（対照）の単回皮下注射の後の様々な時点におけるC57BL/6マウスにおけるトランスフェリン飽和度パーセント（図3E）のレベルを示す。各データ点が、3匹のマウスの平均値を表す。平均の標準偏差が、エラーバーによって表される。図3F：投与の11日後におけるAD-60940の用量に応じた相対的な肝臓TMPRSS6 mRNA濃度を示す。各データ点が、各用量レベルで観察されるTMPRSS6 mRNA濃度の最大の抑制を表す。データを、ヒルの式に当てはめた。

50

【図4】図4A：3週間にわたって週に1回の投与の投与計画と、その後の21日目におけるマウスの殺処分を示す概略図である。図4B：図4Aに示される計画にしたがった、0.3mg/kg、1.0mg/kgの用量でのAD-60940、又はPBS（対照）の皮下注射を投与されたC57BL/6マウスにおける肝臓TMPRSS6 mRNA、肝臓ヘプシジンmRNA、及びトランスフェリン飽和度パーセントのレベルを示すグラフである。各バーが、3匹のマウスの平均値を表す。平均の標準偏差が、エラーバーによって表される。図4C：AD-60940の用量に応じた相対的な肝臓TMPRSS6 mRNA濃度を示す。データを、ヒルの式に当てはめた。

【図5】血清ヘプシジン濃度及び相対的なTMPRSS6 mRNAレベルの関係（図5A）、トランスフェリン飽和度パーセント及び相対的なTMPRSS6 mRNAレベルの関係（図5B）、血清ヘプシジン濃度及び相対的なヘプシジンmRNAレベルの関係（図5C）及びトランスフェリン飽和度パーセント及び血清ヘプシジン濃度との関係（図5D）を示すグラフである。

10

【図6】3mg/kgの示されるiRNA剤又はPBS（対照）の単回の皮下投与の後の、C57BL/6マウスの肝臓におけるTMPRSS6 mRNAの相対的レベルを示すグラフである。バーが、3匹のマウスの平均を表し、エラーバーが、平均の標準偏差を表す。

【図7】3週間にわたって週に1回の、0.3mg/kg又は1.0mg/kgの示されるiRNA剤、又はPBS（対照）の皮下投与の後の、C57BL/6マウスの肝臓におけるTMPRSS6 mRNAの相対的レベルを示すグラフである。バーが、3匹のマウスの平均を表し、エラーバーが、平均の標準偏差を表す。

20

【図8】ヒト（*Homo sapiens*）TMPRSS6のヌクレオチド配列（配列番号1）を示す。

【図9】ハツカネズミ（*Mus musculus*）TMPRSS6のヌクレオチド配列（配列番号2）を示す。

【図10】ドブネズミ（*Rattus norvegicus*）TMPRSS6のヌクレオチド配列（配列番号3）を示す。

【図11】アカゲザル（*Macaca mulatta*）TMPRSS6のヌクレオチド配列（配列番号4）を示す。

【図12】アカゲザル（*Macaca mulatta*）TMPRSS6のヌクレオチド配列（配列番号5）を示す。

30

【図13】配列番号1の逆相補配列（配列番号6）を示す。

【図14】配列番号2の逆相補配列（配列番号7）を示す。

【図15】配列番号3の逆相補配列（配列番号8）を示す。

【図16】配列番号4の逆相補配列（配列番号9）を示す。

【図17】配列番号5の逆相補配列（配列番号10）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0083】

本発明は、TMPRSS6を標的とするRNAi剤、例えば、二本鎖iRNA剤を含む組成物を提供する。本発明は、TMPRSS6発現を阻害し、TMPRSS6に関連する疾患、例えば、サラセミア又はヘモクロマトーシスを処置するための本発明の組成物の使用方法も提供する。

40

【0084】

TMPRSS6は、HAMP遺伝子発現の阻害剤として鉄ホメオスタシスに重要な役割を果たす。HAMP遺伝子は、鉄ホメオスタシスの中心的調節因子である肝臓ホルモンヘプシジンをコードする。ヘプシジンは、吸収腸細胞、肝細胞及びマクロファージに主に局在する鉄排出タンパク質フェロポーチン（FPN1）に結合する。フェロポーチンの細胞外ドメインへのヘプシジン結合は、フェロポーチンの内在化及び分解をもたらす。したがって、食事に含まれる鉄の腸からの吸収、及びマクロファージ及び肝細胞からの鉄の放出を減少させる。HAMP遺伝子発現は、BMP共受容体ヘモジュベリン（HJV）によっ

50

て媒介される、骨形成タンパク質 (BMP) / サンズ・オブ・マザーズ・アゲインスト・デカペンタプレジック (Sons of Mothers Against Decapentaplegic) (SMAD) 依存性シグナル伝達カスケードを介して、鉄に应答して刺激され得る。HAMP 調節における TMPRSS6 の重要な役割は、BMP 媒介 HAMP 上方制御の阻害である。TMPRSS6 は、BMP 媒介 HAMP 上方制御に必須である BMP 共受容体 HJV を切断し；したがって、BMP シグナル伝達、核への SMAD 移行、及び HAMP 転写活性化を防ぐことによって、BMP 媒介 HAMP 上方制御を阻害する。

【0085】

いくつかのヒト及びマウスの研究により、HAMP 調節及び鉄ホメオスタシスにおける TMPRSS6 の役割が確認された (Duet al. Science 2008, Vol. 320, pp1088 - 1092; Folgueras et al. Blood 2008, Vol. 112, pp2539 - 45)。研究により、TMPRSS6 における機能喪失変異が、ヘプシジン発現の上方制御をもたらし、ヘプシジンレベルの上昇、低色素性小球性貧血、低い平均赤血球容積 (MCV)、低いトランスフェリン飽和度、経口による鉄の不十分な吸収、及び非経口による鉄に対する不完全な应答によって特徴付けられる、鉄剤不応性鉄欠乏性貧血 (IRIDA) と呼ばれる遺伝性鉄欠乏性貧血を引き起こし得ることが示された (Finberg. Seminars in Hematology 2009, Vol. 46, pp378 - 86)。しかしながら、HAMP の正の調節因子 (例えば、BMP1、BMP4、及び HFE) の機能喪失変異は、ヘプシジン発現を下方制御し、鉄過剰症を引き起こすことが示されている (Milet et al. Am J Hum Gen 2007, Vol. 81, pp799 - 807; Finberg et al. Blood 2011, Vol. 117, pp4590 - 9)。遺伝性ヘモクロマトーシス (HH) と総称される原発性鉄過剰症、大量の無効造血によって特徴付けられる貧血、及び中間型 - サラセミア (TI) などの鉄過剰 (続発性ヘモクロマトーシス) において、血清鉄濃度及び鉄貯蔵の上昇にもかかわらず、ヘプシジンレベルは低い。中間型 - サラセミアのマウスモデルは、TMPRSS6 発現の低下が、ヘプシジンのレベルの上昇をもたらすことを実証した (Finberg 2010 Oral Presentation: "TMPRSS6, an inhibitor of Hepatic BMP / Smad Signaling, is required for Hepcidin S 30
uppression and Iron Loading in a Mouse Model of -Thalassemia". American Society of Hematology Annual Meeting 2010, Abstract No. : 164)。

【0086】

本発明は、TMPRSS6 遺伝子の発現を調節するための、iRNA 剤、組成物及び方法を記載する。特定の実施形態において、TMPRSS6 の発現は、TMPRSS6 特異的 iRNA 剤を用いて低下又は阻害され、それにより、HAMP 発現の増大、及び血清鉄レベルの減少をもたらす。したがって、本発明において取り上げられる iRNA 組成物を用いた TMPRSS6 遺伝子の発現又は活性の阻害は、対象における鉄レベルの低下を目的とする治療のための有用な手法であり得る。このような阻害は、ヘモクロマトーシス又はサラセミア、例えば、 - サラセミア (例えば、重症型 - サラセミア及び中間型 - サラセミア) などの鉄過剰に関連する疾患を処置するのに有用であり得る。

【0087】

I. 定義

本発明がより容易に理解され得るように、いくつかの用語がまず定義される。更に、変数の値又は値の範囲が記載されるときは常に、記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図されることに留意されたい。

【0088】

冠詞「a」及び「an」は、その冠詞の文法的目的語の1つ又は2つ以上 (すなわち、

10

20

30

40

50

少なくとも1つ)を指すために本明細書において使用される。例として、「要素 (a n e l e m e n t) 」は、1つの要素又は2つ以上の要素、例えば、複数の要素を意味する。

【0089】

「～を含む (i n c l u d i n g) 」という用語は、「～を含むがこれらに限定されない (i n c l u d i n g b u t n o t l i m i t e d t o) 」という語句を意味するために本明細書において使用され、この語句と同義的に使用される。

【0090】

「又は」という用語は、文脈上明らかに他の意味を示さない限り、「及び/又は」という用語を意味するために本明細書において使用され、この用語と同義的に使用される。

【0091】

本明細書において使用される際、「T M P R S S 6」は、I I型細胞膜セリンプロテアーゼ (T T S P) 遺伝子又はタンパク質を指す。T M P R S S 6は、マトリプターゼ - 2、I R I D A (鉄剤不応性鉄欠乏性貧血)、膜貫通プロテアーゼセリン6、I I型膜貫通セリンプロテアーゼ6、及び膜結合モザイクセリンプロテイナーゼマトリプターゼ - 2としても知られている。T M P R S S 6は、約899アミノ酸長のセリンプロテアーゼI I型膜貫通タンパクである。T M P R S S 6は、複数のドメイン、例えば、短い内部領域、膜貫通ドメイン、ウニ精子タンパク質/エンテロペプチダーゼドメイン/アグリニン (S E A) ドメイン、2つの補体因子/ウニ胚成長因子/ B M P ドメイン (C U B)、3つのL D L - R クラスαドメイン (L D L α)、及び保存H i s - A s p - S e r 三つ組 (H D S) を備えたトリプシン様セリンプロテアーゼドメインを含有する。「T M P R S S 6」という用語は、ヒトT M P R S S 6 (そのアミノ酸及びヌクレオチド配列が、例えば、G e n B a n k 登録番号G I : 5 6 6 8 2 9 6 7に見られる) ; マウスT M P R S S 6 (そのアミノ酸及びヌクレオチド配列が、例えば、G e n B a n k 登録番号G I : 1 2 5 6 5 6 1 5 1に見られる) ; ラットT M P R S S 6 (そのアミノ酸及びヌクレオチド配列が、例えば、G e n B a n k 登録番号G I : 1 9 4 4 7 4 0 9 7に見られる) ; アカゲザルT M P R S S 6 (そのアミノ酸及びヌクレオチド配列が、例えば、G e n B a n k 登録番号X M _ 0 0 1 0 8 5 2 0 3 . 2 (G I : 2 9 7 2 6 0 9 8 9) 及びX M _ 0 0 1 0 8 5 3 1 9 . 1 (G I : 1 0 9 0 9 4 0 6 1) に見られる) を含む。A G T m R N A 配列の更なる例が、公開されているデータベース、例えば、G e n B a n k、U n i P r o t、O M I M、及びM a c a c a のゲノムプロジェクトのウェブサイトを用いて、容易に入手可能である。

【0092】

本明細書において使用される際の「T M P R S S 6」という用語は、T M P R S S 6 遺伝子における一塩基多型 (S N P) などの、T M P R S S 6 遺伝子の天然D N A 配列の変異も指す。例示的なS N P は、w w w . n c b i . n l m . n i h . g o v / p r o j e c t s / S N P において利用可能なd b S N P データベースに見られる。

【0093】

本明細書において使用される際、「標的配列」は、一次転写産物のR N A プロセシングの産物であるm R N A を含む、T M P R S S 6 遺伝子の転写の際に形成されるm R N A 分子のヌクレオチド配列の連続する部分を指す。

【0094】

本明細書において使用される際、「配列を含む鎖」という用語は、標準的なヌクレオチドの命名法を用いて示される配列によって表されるヌクレオチドの鎖を含むオリゴヌクレオチドを指す。

【0095】

「G」、「C」、「A」及び「U」はそれぞれ、一般に、それぞれ、塩基としてグアニン、シトシン、アデニン、及びウラシルを含むヌクレオチドを表す。「T」及び「d T」は、本明細書において同義的に使用され、核酸塩基が、チミン、例えば、デオキシリボチミン、2'-デオキシチミジン又はチミジンであるデオキシリボヌクレオチドを指す。しかしながら、「リボヌクレオチド」又は「ヌクレオチド」又は「デオキシリボヌクレオチド

10

20

30

40

50

」という用語は、以下に更に詳述されるように、修飾ヌクレオチド、又は代理置換部分 (surrogate replacement moiety) も指し得ることが理解されよう。当業者は、グアニン、シトシン、アデニン、及びウラシルが、このような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対合特性をそれほど変化させずに他の部分によって置換され得ることを十分に認識している。例えば、限定はされないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドが、アデニン、シトシン、又はウラシルを含むヌクレオチドと塩基対合し得る。したがって、ウラシル、グアニン、又はアデニンを含むヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド配列において、例えば、イノシンを含むヌクレオチドによって置換され得る。このような置換部分を含む配列は、本発明の実施形態である。

10

【0096】

本明細書において同義的に使用される「iRNA」、「RNAi剤」、「iRNA剤」、「RNA干渉剤」という用語は、その用語が本明細書において定義されるように、RNAを含有し、且つRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)経路を介してRNA転写物の標的化された切断を仲介する剤を指す。iRNAは、RNA干渉(RNAi)として公知のプロセスによってmRNAの配列に特異的な分解を導く。iRNAは、細胞、例えば、哺乳動物対象などの対象中の細胞内でのTMPRSS6の発現を調節する(例えば阻害する)。

【0097】

一実施形態において、本発明のRNAi剤は、標的RNA配列、例えば、TMPRSS6標的mRNA配列と相互作用して、標的RNAの切断を導く一本鎖RNAを含む。理論に制約されるのを望むものではないが、細胞中に導入される長い二本鎖RNAが、Dicerとして公知のIII型エンドヌクレアーゼによってsiRNAに分解されると考えられる(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485)。リボヌクレアーゼIII様酵素であるDicerは、dsRNAをプロセシングして、特徴的な2つの塩基3'オーバーハングを有する19~23塩基対の短干渉RNAにする(Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363)。次に、siRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれ、ここで、1つ又は複数のヘリカーゼが、siRNA二本鎖をほどいて、相補的なアンチセンス鎖が、標的認識を導くことを可能にする(Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309)。適切な標的mRNAに結合すると、RISC中の1つ又は複数のエンドヌクレアーゼが標的を切断して、サイレンシングを誘導する(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188)。ここで、一態様において、本発明は、細胞中で生成され、且つ標的遺伝子、すなわち、TMPRSS6遺伝子のサイレンシングをもたらすRISC複合体の形成を促進する一本鎖RNA(siRNA)に関する。したがって、「siRNA」という用語はまた、上記のRNAiを指すために本明細書において使用される。

20

30

【0098】

別の実施形態において、RNAi剤は、標的mRNAを阻害するために細胞又は生物に導入される一本鎖siRNAであり得る。一本鎖RNAi剤は、RISCエンドヌクレアーゼArgonaute 2に結合し、これが、次に、標的mRNAを切断する。一本鎖siRNAは、一般に、15~30のヌクレオチドであり、化学的に修飾される。一本鎖siRNAの設計及び試験が、米国特許第8,101,348号明細書及びLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載され、それぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。本明細書に記載されるアンチセンスヌクレオチド配列のいずれかが、本明細書に記載されるような又はLima et al., (2012) Cell 150:883-894に記載される方法によって化学的に修飾される一本鎖siRNAとして使用され得る。

40

【0099】

更に別の実施形態において、本発明は、TMPRSS6を標的とする一本鎖アンチセン

50

スオリゴヌクレオチド分子を提供する。「一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子」は、標的 mRNA (即ち、TMPRSS6) 中の配列に相補的である。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、mRNA に塩基対合し、翻訳機構を物理的に妨害することによって、化学量論的に翻訳を阻害し得る (Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1: 347 - 355 を参照)。あるいは、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、標的にハイブリダイズし、RNAseH 切断イベントによって標的を切断することによって、標的 mRNA を阻害する。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、約 10 ~ 約 30 ヌクレオチド長であり、標的配列に相補的な配列を有し得る。例えば、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、本明細書に記載されるアンチセンスヌクレオチド配列、例えば、表 1、2、4、5、8、10、及び 12 のいずれか 1 つに示される配列のいずれか 1 つからの少なくとも約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個、又はそれ以上の連続するヌクレオチドである配列を含み得、又は本明細書に記載される標的部位のいずれかに結合し得る。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、修飾 RNA、DNA、又はそれらの組合せを含み得る。

10

【0100】

別の実施形態において、本発明の組成物、使用及び方法に使用するための「iRNA」は、二本鎖 RNA であり、本明細書において「二本鎖 RNA i 剤」、「二本鎖 RNA (dsRNA) 分子」、「dsRNA 剤」、又は「dsRNA」と呼ばれる。「dsRNA」という用語は、標的 RNA、すなわち、TMPRSS6 遺伝子に対する「センス」及び「アンチセンス」配向を有することが示される、2 本の逆平行で且つ実質的に相補的な核酸鎖を含む二本鎖構造を有するリボ核酸分子の複合体を指す。本発明のある実施形態において、二本鎖 RNA (dsRNA) は、本明細書において RNA 干渉又は RNA i と呼ばれる、転写後遺伝子サイレンシング機構による、標的 RNA、例えば、mRNA の分解を引き起こす。

20

【0101】

一般に、dsRNA 分子のそれぞれの鎖のヌクレオチドの大部分は、リボヌクレオチドであるが、本明細書において詳細に記載されるように、それぞれの又は両方の鎖は、1 つ又は複数の非リボヌクレオチド、例えば、デオキシリボヌクレオチド及び/又は修飾ヌクレオチドも含み得る。更に、本明細書において使用される際、「RNA i 剤」は、化学的修飾を有するリボヌクレオチドを含んでいてもよく；RNA i 剤は、複数のヌクレオチドにおける実質的な修飾を含み得る。このような修飾は、本明細書に開示されるか又は当該技術分野において公知のあらゆるタイプの修飾を含み得る。siRNA タイプの分子に使用される際のいずれのこのような修飾も、本明細書及び特許請求の範囲の目的のために「RNA i 剤」によって包含される。

30

【0102】

二本鎖構造を形成する 2 本の鎖は、1 つのより大きい RNA 分子の異なる部分であってもよく、又はそれらは別個の RNA 分子であってもよい。2 本の鎖が、1 つのより大きい分子の一部であり、したがって、二本鎖構造を形成する 1 本の鎖の 3' 末端とその他方の鎖の 5' 末端との間のヌクレオチドの連続した鎖によって結合された場合、結合する RNA 鎖は、「ヘアピンループ」と呼ばれる。2 本の鎖が、二本鎖構造を形成する 1 本の鎖の 3' 末端とその他方の鎖の 5' 末端との間のヌクレオチドの連続した鎖以外の手段によって共有結合された場合、結合構造は、「リンカー」と呼ばれる。RNA 鎖は、同じか又は異なる数のヌクレオチドを有し得る。塩基対の最大数は、dsRNA の最も短い鎖のヌクレオチドの数から、二本鎖に存在するオーバーハングを引いた数である。二本鎖構造に加えて、RNA i 剤は、1 つ又は複数のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。

40

【0103】

一実施形態において、本発明の RNA i 剤は、標的 RNA 配列、例えば、TMPRSS6 標的 mRNA 配列と相互作用して、標的 RNA の切断を導く 24 ~ 30 のヌクレオチドの dsRNA である。理論に制約されるのを望むものではないが、細胞中に導入される長

50

い二本鎖RNAは、Dicerとして公知のIII型エンドヌクレアーゼによってsiRNAに分解される(Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15: 485)。リボヌクレアーゼIII様酵素であるDicerは、dsRNAをプロセッシングして、特徴的な2つの塩基3'オーバーハングを有する19~23塩基対短干渉RNAにする(Bernstein, et al., (2001) Nature 409: 363)。次に、siRNAは、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)に組み込まれ、ここで、1つ又は複数のヘリカーゼが、siRNA二本鎖をほどいて、相補的なアンチセンス鎖が、標的認識を導くことを可能にする(Nykanen, et al., (2001) Cell 107: 309)。適切な標的mRNAに結合すると、RISC中の1つ又は複数のエンドヌクレアーゼが標的を切断して、サイレンシングを誘導する(Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15: 188)。本明細書において使用される際、「ヌクレオチドオーバーハング」は、RNAi剤の1本の鎖の3'末端が、他方の鎖の5'末端を越えて延びるか、又はその逆である場合、RNAi剤の二本鎖構造から突出する1つ又は複数の不對ヌクレオチドを指す。「平滑な」又は「平滑末端」は、二本鎖RNAi剤の該当する末端に不對ヌクレオチドが存在しない、即ち、ヌクレオチドオーバーハングが存在しないことを意味する。「平滑末端」RNAi剤は、その全長にわたって二本鎖である、即ち、分子のいずれの末端にもヌクレオチドオーバーハングが存在しないdsRNAである。本発明のRNAi剤は、一方の末端にヌクレオチドオーバーハングを有するRNAi剤(即ち、1つのオーバーハング及び1つの平滑末端を有する剤)又は両方の末端にヌクレオチドオーバーハングを有するRNAi剤を含む。

10

20

【0104】

「アンチセンス鎖」という用語は、標的配列に実質的に相補的な領域を含む二本鎖RNAi剤(例えば、ヒトTMPRSS6 mRNA)の鎖を指す。本明細書において使用される際、「トランスサイレチンをコードするmRNAの一部に相補的な領域」という用語は、TMPRSS6 mRNA配列の一部に実質的に相補的なアンチセンス鎖の領域を指す。相補性の領域が、標的配列に完全には相補的でない場合、ミスマッチは、末端領域において最も許容され、存在する場合、一般に、1つ又は複数の末端領域、例えば、5'末端及び/又は3'末端の6、5、4、3、又は2つのヌクレオチド中に存在する。

【0105】

本明細書において使用される際の「センス鎖」という用語は、アンチセンス鎖の領域と実質的に相補的な領域を含むdsRNAの鎖を指す。

30

【0106】

本明細書において使用される際、「切断領域」という用語は、切断部位に直接隣接して位置する領域を指す。切断部位は、標的における、切断が生じる部位である。ある実施形態において、切断領域は、切断部位のいずれかの末端で、切断部位に直接隣接した3つの塩基を含む。ある実施形態において、切断領域は、切断部位のいずれかの末端で、切断部位に直接隣接した2つの塩基を含む。ある実施形態において、切断部位は、アンチセンス鎖のヌクレオチド10及び11によって結合される部位で特異的に生じ、切断領域は、ヌクレオチド11、12及び13を含む。

【0107】

本明細書において使用される際、特に示されない限り、「相補的な」という用語は、当業者により理解されるように、第1のヌクレオチド配列を第2のヌクレオチド配列と関連して記載するのに使用される場合、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、所定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとハイブリダイズし、二本鎖構造を形成する能力を指す。このような条件は、例えば、ストリンジентな条件であり得、ここで、ストリンジентな条件は、400mMのNaCl、40mMのPIPES(pH6.4)、1mMのEDTA、50又は70で12~16時間と、それに続く洗浄を含み得る。生物の内部で起こり得る生理学的に関連した条件などの他の条件を適用することができる。例えば、相補的な配列は、核酸の関連する機能、例えば、RNAiを進行させるのに十分である。当業

40

50

者は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的な用途に従って、2つの配列の相補性の試験に最も適切な条件の組を決定することができるであろう。

【0108】

配列は、第1及び第2のヌクレオチド配列の全長にわたる、第1のヌクレオチド配列を含むヌクレオチドと、第2のヌクレオチド配列を含むヌクレオチドとの塩基対合がある場合、互いに対して「完全に相補的」であり得る。しかしながら、第1の配列が、本明細書において第2の配列に対して「実質的に相補的」と称される場合、2つの配列は、完全に相補的であり得、又は、それらの最終的な適用に最も関連する条件下でハイブリダイズする能力を保持しながら、ハイブリダイゼーションを行うと、それらは、1つ又は複数であるが、一般に、4、3又は2以下のミスマッチ塩基対を形成し得る。しかしながら、2つのオリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションの際に1つ又は複数の一本鎖オーバーハングを形成するように設計されている場合、このようなオーバーハングは、相補性の決定に関してはミスマッチと見なされないものとする。例えば、本明細書に記載される目的のために、21ヌクレオチド長の一方のオリゴヌクレオチドと、23ヌクレオチド長の別のオリゴヌクレオチドとを含むdsRNAは、長い方のオリゴヌクレオチドが、短い方のオリゴヌクレオチドに対して完全に相補的な21ヌクレオチドの配列を含む場合、「完全に相補的」と称されてもよい。

10

【0109】

本明細書において使用される際の「相補的」という用語は、それらのハイブリダイズする能力に関連した上記の要求が満たされる限り、非ワトソン-クリック塩基対及び/又は非天然及び修飾ヌクレオチドから形成される塩基対も含むことができ、又はこのような塩基対から完全に形成され得る。このような非ワトソン-クリック塩基対としては、限定はされないが、G:Uゆらぎ又はフーグスティーン型塩基対が挙げられる。

20

【0110】

本明細書における「相補的」、「完全に相補的」と及び「実質的に相補的」という用語は、それらの使用の状況から理解されるように、dsRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖との間で、又はdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列との間で、一致する塩基に関連して使用され得る。

【0111】

本明細書において使用される際、メッセンジャーRNA(mRNA)「の少なくとも一部に実質的に相補的」ポリヌクレオチドは、5'UTR、オープン・リーディング・フレーム(ORF)、又は3'UTRを含む目的のmRNA(例えば、TMPRSS6をコードするmRNA)の連続する部分に実質的に相補的なポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、その配列がTMPRSS6をコードするmRNAの連続する部分と実質的に相補的である場合、TMPRSS6 mRNAの少なくとも一部に相補的である。

30

【0112】

本明細書において使用される際の「阻害する」という用語は、「低下させる」、「サイレンシングする」、「下方制御する」、「抑制する」と及び他の類似語と同義的に使用され、任意のレベルの阻害を含む。

【0113】

本明細書において使用される際の「TMPRSS6の発現を阻害する」という語句は、任意のTMPRSS6遺伝子(例えば、マウスTMPRSS6遺伝子、ラットTMPRSS6遺伝子、サルTMPRSS6遺伝子、又はヒトTMPRSS6遺伝子など)ならびに変異体、(例えば、自然発生変異体)、又はTMPRSS6遺伝子の突然変異体の発現の阻害を含む。したがって、TMPRSS6遺伝子は、野生型TMPRSS6遺伝子、突然変異体TMPRSS6遺伝子、又は遺伝子組み換えされた細胞、細胞群、又は生物の文脈におけるトランスジェニックTMPRSS6遺伝子であり得る。

40

【0114】

「TMPRSS6遺伝子の発現を阻害する」は、TMPRSS6遺伝子の任意のレベルの阻害、例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なく

50

とも約 20%、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%などの、TMPRSS6 遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を含む。

【0115】

TMPRSS6 遺伝子の発現は、TMPRSS6 遺伝子の発現に関連する任意の変数のレベル、例えば、組織または血清中の、TMPRSS6 mRNA レベル、TMPRSS6 タンパク質レベル、ヘプシジン mRNA レベル、ヘプシジンタンパク質レベル、又は血清脂質レベルに基づいて評価され得る。阻害は、対照のレベルと比較したこれらの変数の 1 つ又は複数の絶対的又は相対的レベルの低下によって評価され得る。対照のレベルは、当該技術分野において用いられる任意のタイプの対照のレベル、例えば、投与前ベースライン (pre-dose baseline) レベル、又は非処理又は対照 (例えば、緩衝液のみの対照又は不活性な剤の対照など) で処理された同様の対象、細胞、又は試料から測定されるレベルであり得る。

10

【0116】

本明細書において使用される際の「細胞を二本鎖 RNA i 剤と接触させる」という語句は、任意の可能な手段によって細胞を接触させることを含む。細胞を二本鎖 RNA i 剤と接触させる工程は、細胞を RNA i 剤とインビトロで接触させる工程又は細胞を RNA i 剤とインビボで接触させる工程を含む。接触は、直接又は間接的に行われ得る。したがって、例えば、RNA i 剤は、方法を個々に行うことによって細胞と物理的に接触されてもよく、あるいは、RNA i 剤は、それを後に細胞と接触させるのを可能にするか又はそれを後に細胞と接触させる状況に置かれてもよい。

20

【0117】

細胞をインビトロで接触させる工程は、例えば、RNA i 剤とともに細胞をインキュベートすることによって行われ得る。細胞をインビボで接触させる工程は、RNA i 剤が接触される細胞が位置する組織に後に到達するように、例えば、RNA i 剤を、細胞が位置する組織中又は組織の近傍に注入することによって、又は RNA i 剤を、別の領域、血流又は皮下腔中に注入することによって行われ得る。例えば、RNA i 剤は、目的の部位、例えば、肝臓に RNA i 剤を指向するリガンド、例えば、GalNAc3 リガンドを含んでいてもよく、及び/又はそれに結合され得る。インビトロ及びインビボでの接触方法の組合せも可能である。本発明の方法に関連して、細胞はまた、RNA i 剤とインビトロで接触され、その後、対象に移植されてもよい。

30

【0118】

本明細書において使用される際の「患者」又は「対象」は、ヒト又は非ヒト動物のいずれか、好ましくは、哺乳動物、例えば、ヒトまたはサルを含むことが意図される。最も好ましくは、対象又は患者はヒトである。

【0119】

本明細書において使用される際の「TMPRSS6 に関連する疾患」は、TMPRSS6 の発現を阻害することによって、処置又は予防され得る任意の疾患、又は軽減され得る症状を含むことが意図される。ある実施形態において、TMPRSS6 に関連する疾患は、鉄レベルの上昇によって特徴付けられる病態である鉄過剰、又は鉄調節異常にも関連する。鉄過剰は、例えば、遺伝性疾患、食事からの鉄摂取の増加、又は過剰な鉄の静脈注射を含む非経口投与される過剰な鉄、及び輸血鉄過剰症によって引き起こされ得る。

40

【0120】

TMPRSS6 に関連する疾患としては、限定はされないが、遺伝性ヘモクロマトーシス、特発性ヘモクロマトーシス、原発性ヘモクロマトーシス、続発性ヘモクロマトーシス、重度の若年性ヘモクロマトーシス、新生児ヘモクロマトーシス、鉄芽球性貧血、溶血性

50

貧血、赤血球異形成貧血、鎌型赤血球貧血、異常ヘモグロビン症、サラセミア（例えば、
 - サラセミア及び - サラセミア）、慢性肝疾患、晩発性皮膚ポルフィリン症、赤芽球
 性ポルフィリン症、無トランスフェリン血症、遺伝性チロシン血症、脳肝腎症候群、特発
 性肺ヘモジデリン沈着症、腎ヘモジデリン沈着症が挙げられる。

【0121】

TMPRSS6に関連する疾患は、過剰な鉄の経口投与、輸血鉄過剰症及び過剰な鉄の
 静脈注射に関連する疾患を含む。

【0122】

TMPRSS6に関連する疾患は、鉄過剰に関連するか又はそれによって引き起こされ
 得る症状を有する疾患も含む。このような症状としては、肝疾患（肝硬変、癌）、心臓発
 作又は心不全、糖尿病、変形性関節症、骨粗鬆症、メタボリック・シンドローム、甲状腺
 機能低下症、性腺機能低下症、及び場合によっては早死にのリスクの増加が挙げられる。
 一実施形態において、TMPRSS6に関連する疾患としては、アルツハイマー病、パー
 キンソン病、ハンチントン病、フリードライヒ運動失調症、てんかん及び多発性硬化症な
 どの、鉄過剰及び/又は鉄調節異常に関連する神経変性疾患が挙げられる。TMPRSS
 6を標的とするiRNA、例えば、表1、2、4、5、8、10、及び12のいずれか1
 つに記載されるiRNAの投与により、これらの症状の1つ又は複数を処置し、又は鉄レ
 ベルの増加によって悪化する疾病又は疾患の発症又は進行を防ぐことができる。

10

【0123】

一実施形態において、TMPRSS6に関連する疾患は、
 - サラセミアである。
 - サラセミアは、
 - グロブリン鎖の合成における遺伝的欠損によって特徴付けられる遺伝
 性疾患の群のいずれか1つである。同型接合状態では、
 サラセミア（「重症型サラセミア」）は、重度の、輸血依存性貧血を引き起こす。異型接合状態では、
 サラセミア形質
 （「軽症型サラセミア」）は、軽度ないし中等度の小球性貧血を引き起こす。

20

【0124】

「中間型サラセミア」は、疾病の臨床的重症度が、軽症型
 - サラセミアの軽度の症状
 と重症型
 - サラセミアとの間辺りである対象をもたらず
 - サラセミアである。診断は
 、定期的な輸血の必要なく診断の時点で少なくとも6~7g/dLの十分なヘモグロビン
 （Hb）値を維持している患者に基づいた臨床的診断である。

【0125】

一実施形態において、
 - サラセミアは、重症型サラセミアである。別の実施形態にお
 いて、
 - サラセミアは、中間型サラセミアである。

30

【0126】

本明細書において使用される際の「治療有効量」は、TMPRSS6に関連する疾病を
 処置するために患者に投与される場合、（例えば、既存の疾病又は疾病の1つ又は複数の
 症状を軽減し、改善し、又は維持することによって）この疾病の処置を行うのに十分な、
 RNAi剤の量を含むことが意図される。「治療有効量」は、RNAi剤、RNAi剤が
 投与される方法、疾病及びその重症度ならびに処置される患者の病歴、年齢、体重、家族
 歴、遺伝子構造、TMPRSS6発現によって媒介される病理学的過程の段階、もしあれ
 ば、以前の処置又は併用処置のタイプ、及び他の個体特性に応じて変化し得る。

40

【0127】

本明細書において使用される際の「予防的に有効な量」は、TMPRSS6に関連する
 疾病の症状をまだ生じても又は示してもいないが、この疾病に罹患しやすい可能性のある
 対象に投与される場合、この疾病又はこの疾病の1つ又は複数の症状を予防又は改善す
 るのに十分な、RNAi剤の量を含むことが意図される。疾病の改善は、この疾病の経過を
 遅らせること又は後から発症する疾病の重症度を軽減することを含む。「予防的に有効な
 量」は、RNAi剤、薬剤が投与される方法、疾病に罹患する危険度、ならびに処置され
 る患者の病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構造、もしあれば、以前の処置又は併用処置
 のタイプ、及び他の個体特性に応じて変化し得る。

【0128】

50

「治療有効量」又は「予防的に有効な量」はまた、任意の処置に適用される妥当なベネフィット・リスク比 ($benefit/risk\ ratio$) である所望の局所又は全身的作用を生じる、RNAi 剤の量を含む。本発明の方法に用いられる iRNA 剤 ($gent$) は、このような処置に適用される妥当なベネフィット・リスク比を得るのに十分な量で投与され得る。

【0129】

本明細書において使用される際の「試料」という用語は、対象から単離された類似の体液、細胞、又は組織、ならびに対象中に存在する体液、細胞、又は組織の集合体を含む。生体液の例としては、血液、血清及び漿膜液、血漿、脳脊髄液、眼液、リンパ液、尿、唾液などが挙げられる。組織試料は、組織、器官又は局所領域に由来する試料を含み得る。例えば、試料は、特定の器官、器官の部分、あるいはそれらの器官中の体液又は細胞に由来し得る。特定の実施形態において、試料は、肝臓 (例えば、全肝臓又は肝臓の特定の部分又は、例えば、肝細胞などの肝臓中の特定のタイプの細胞) に由来し得る。好ましい実施形態において、「対象に由来する試料」は、対象から得られる血液又は血漿を指す。更なる実施形態において、「対象に由来する試料」は、対象から得られる肝臓組織 (又はその小部分 ($subcomponent$)) を指す。

10

【0130】

II. 本発明の iRNA

対象、例えば、TMPRSS6 に関連する疾患、例えば、 - サラセミア (例えば、重症型 - サラセミア及び中間型 - サラセミア) 又はヘモクロマトーシスに罹患しているヒトなどの哺乳動物中の細胞などの細胞内での TMPRSS6 遺伝子の発現を阻害する改良された二本鎖 RNAi 剤、及びこのような二本鎖 RNAi 剤の使用が本明細書に記載される。

20

【0131】

したがって、本発明は、インピボでの標的遺伝子 (即ち、TMPRSS6 遺伝子) の発現を阻害することが可能な化学的修飾を有する二本鎖 RNAi 剤を提供する。本発明の特定の態様において、本発明の iRNA のヌクレオチドの実質的に全てが修飾される。本発明の他の実施形態において、本発明の iRNA のヌクレオチドの全てが修飾される。「ヌクレオチドの実質的に全てが修飾される」本発明の iRNA は、大部分は修飾されるが、完全に修飾されるわけではなく、5 つ以下、4 つ以下、3 つ以下、2 つ以下、又は 1 つ以下の非修飾ヌクレオチドを含み得る。

30

【0132】

RNAi 剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。RNAi 剤の各鎖は、12 ~ 30 ヌクレオチド長の範囲であり得る。例えば、各鎖は、14 ~ 30 ヌクレオチド長、17 ~ 30 ヌクレオチド長、19 ~ 30 ヌクレオチド長、25 ~ 30 ヌクレオチド長、27 ~ 30 ヌクレオチド長、17 ~ 23 ヌクレオチド長、17 ~ 21 ヌクレオチド長、17 ~ 19 ヌクレオチド長、19 ~ 25 ヌクレオチド長、19 ~ 23 ヌクレオチド長、19 ~ 21 ヌクレオチド長、21 ~ 25 ヌクレオチド長、又は 21 ~ 23 ヌクレオチド長であり得る。

【0133】

センス鎖及びアンチセンス鎖は、典型的に、本明細書において「RNAi 剤」とも呼ばれる二本鎖 RNA (「dsRNA」) を形成する。RNAi 剤の二本鎖領域は、12 ~ 30 ヌクレオチド対長であり得る。例えば、二本鎖領域は、14 ~ 30 ヌクレオチド対長、17 ~ 30 ヌクレオチド対長、27 ~ 30 ヌクレオチド対長、17 ~ 23 ヌクレオチド対長、17 ~ 21 ヌクレオチド対長、17 ~ 19 ヌクレオチド対長、19 ~ 25 ヌクレオチド対長、19 ~ 23 ヌクレオチド対長、19 ~ 21 ヌクレオチド対長、21 ~ 25 ヌクレオチド対長、又は 21 ~ 23 ヌクレオチド対長であり得る。別の例では、二本鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、及び 27 ヌクレオチド対長から選択される。

40

【0134】

一実施形態において、RNAi 剤は、1 つ又は両方の鎖の 3' 末端、5' 末端、又は両方

50

の末端において1つ又は複数のオーバーハング領域及び/又はキャッピング基を含み得る。オーバーハングは、1~6ヌクレオチド長、例えば、2~6ヌクレオチド長、1~5ヌクレオチド長、2~5ヌクレオチド長、1~4ヌクレオチド長、2~4ヌクレオチド長、1~3ヌクレオチド長、2~3ヌクレオチド長、又は1~2ヌクレオチド長であり得る。オーバーハングは、1つの鎖が他の鎖より長い結果であるか、又は同じ長さの2つの鎖が互い違いになっている結果であり得る。オーバーハングは、標的mRNAとのミスマッチを形成し得るか、又はオーバーハングは、標的とされる遺伝子配列に相補的であり得るか、又は別の配列であり得る。第1及び第2の鎖がまた、例えば、ヘアピンを形成するように更なる塩基によって、又は他の非塩基リンカーによって結合され得る。

【0135】

一実施形態において、RNAi剤のオーバーハング領域中のヌクレオチドはそれぞれ、独立して、限定はされないが、2'-F、2'-O-メチル、チミジン(T)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン(Teo)、2'-O-メトキシエチルアデノシン(Aeo)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン(m5Ceo)、及びそれらの任意の組合せなどの、2'-糖修飾を含む、修飾又は非修飾ヌクレオチドであり得る。例えば、TTは、いずれかの鎖上のいずれかの末端のためのオーバーハング配列であり得る。オーバーハングは、標的mRNAとのミスマッチを形成し得るか、又はオーバーハングは、標的とされる遺伝子配列に相補的であり得るか、又は別の配列であり得る。

【0136】

RNAi剤のセンス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖における5'-又は3'-オーバーハングは、リン酸化され得る。ある実施形態において、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエートを有する2つのヌクレオチドを含み、ここで、2つのヌクレオチドは、同じか又は異なり得る。一実施形態において、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の3'末端に存在する。一実施形態において、この3'-オーバーハングは、アンチセンス鎖中に存在する。一実施形態において、この3'-オーバーハングは、センス鎖中に存在する。

【0137】

RNAi剤は、その全体的安定性に影響を与えずに、RNAiの干渉活性を強化し得る1つのみのオーバーハングを含み得る。例えば、一本鎖オーバーハングは、センス鎖の3'末端、あるいは、アンチセンス鎖の3'末端に位置し得る。RNAiは、アンチセンス鎖の5'末端(又はセンス鎖の3'末端)又はその逆に位置する平滑末端も有し得る。一般に、RNAiのアンチセンス鎖は、3'末端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5'末端は平滑である。理論に制約されるのを望むものではないが、アンチセンス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の3'末端オーバーハングにおける非対称の平滑末端は、RISCプロセスへのガイド鎖導入に有利に働く。

【0138】

本発明に取り上げられる核酸のいずれも、参照により本明細書に援用される“Current protocols in nucleic acid chemistry,” Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されるものなどの当該技術分野において十分に確立された方法によって合成及び/又は修飾され得る。修飾としては、例えば、末端修飾、例えば、5'末端修飾(リン酸化、コンジュゲート、逆結合(inverted linkage))又は3'末端修飾(コンジュゲート、DNAヌクレオチド、逆結合など);塩基修飾、例えば、安定塩基、不安定塩基、又は広範なパートナーと塩基対合する塩基による置換、塩基の除去(非塩基性ヌクレオチド)、又はコンジュゲート塩基;糖修飾(例えば、2'位又は4'位で)又は糖の置換;及び/又はホスホジエステル結合の修飾又は置換を含む骨格修飾が挙げられる。本明細書に記載される実施形態に有用なiRNA化合物の具体例としては、限定はされないが、修飾された骨格を含むか又は天然のヌクレオチド間結合を含まないRNAが挙げられる。修飾された骨格を有するRNAとしては、特に、骨格中にリン原子を有さないものが挙げられる。本明細書の目的のために、及

10

20

30

40

50

び当該技術分野において時折言及されるように、ヌクレオシド間骨格中にリン原子を有さない、修飾RNAは、オリゴヌクレオシドであるともみなすこともできる。ある実施形態において、修飾iRNAは、そのヌクレオシド間骨格中にリン原子を有する。

【0139】

修飾RNA骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネート並びに3'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含む他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホロアミデート及びアミノアルキルホスホロアミデートを含むホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、及び通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似体、及び、ヌクレオシド単位の隣接する対が、3'-5'~5'-3'又は2'-5'~5'-2'に結合する、反転極性を有するものが挙げられる。様々な塩、混合塩及び遊離酸形態も含まれる。

【0140】

上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許としては、限定はされないが、米国特許第3,687,808号明細書；同第4,469,863号明細書；同第4,476,301号明細書；同第5,023,243号明細書；同第5,177,195号明細書；同第5,188,897号明細書；同第5,264,423号明細書；同第5,276,019号明細書；同第5,278,302号明細書；同第5,286,717号明細書；同第5,321,131号明細書；同第5,399,676号明細書；同第5,405,939号明細書；同第5,453,496号明細書；同第5,455,233号明細書；同第5,466,677号明細書；同第5,476,925号明細書；同第5,519,126号明細書；同第5,536,821号明細書；同第5,541,316号明細書；同第5,550,111号明細書；同第5,563,253号明細書；同第5,571,799号明細書；同第5,587,361号明細書；同第5,625,050号明細書；同第6,028,188号明細書；同第6,124,445号明細書；同第6,160,109号明細書；同第6,169,170号明細書；同第6,172,209号明細書；同第6,239,265号明細書；同第6,277,603号明細書；同第6,326,199号明細書；同第6,346,614号明細書；同第6,444,423号明細書；同第6,531,590号明細書；同第6,534,639号明細書；同第6,608,035号明細書；同第6,683,167号明細書；同第6,858,715号明細書；同第6,867,294号明細書；同第6,878,805号明細書；同第7,015,315号明細書；同第7,041,816号明細書；同第7,273,933号明細書；同第7,321,029号明細書；及び米国再発行特許第RE39464号明細書が挙げられ、これらのそれぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。

【0141】

内部にリン原子を含まない修飾RNA骨格は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、又は1つ又は複数の短鎖ヘテロ原子若しくは複素環式ヌクレオシド間結合によって形成される骨格を有する。これらとしては、モルホリノ結合（一部がヌクレオシドの糖部分から形成された）を有するもの；シロキサ骨格；スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格；並びに混合N、O、S及びCH₂構成要素部分を有する他のものが挙げられる。

【0142】

上記のオリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許としては、限定はされないが、米国特許第5,034,506号明細書；同第5,166,315号明細書；同第5,185,444号明細書；同第5,214,134号明細書；同第5,216,141号明細書；同第5,235,033号明細書；同第5,64,562号明細書；同第5

、 264、564号明細書；同第5、405、938号明細書；同第5、434、257号明細書；同第5、466、677号明細書；同第5、470、967号明細書；同第5、489、677号明細書；同第5、541、307号明細書；同第5、561、225号明細書；同第5、596、086号明細書；同第5、602、240号明細書；同第5、608、046号明細書；同第5、610、289号明細書；同第5、618、704号明細書；同第5、623、070号明細書；同第5、663、312号明細書；同第5、633、360号明細書；同第5、677、437号明細書；及び同第5、677、439号明細書が挙げられ、これらのそれぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。

【0143】

他の実施形態において、好適なRNA模倣体が、iRNAにおける使用のために考えられ、ここで、糖及びヌクレオシド間結合の両方、即ち、ヌクレオチド単位の骨格が、新規な基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されている、このようなオリゴマー化合物の1つであるRNA模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と呼ばれる。PNA化合物において、RNAの糖骨格が、アミド含有骨格、特に、アミノエチルグリシン骨格で置換される。核酸塩基は、保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許としては、限定はされないが、米国特許第5、539、082号明細書；同第5、714、331；及び同第5、719、262号明細書が挙げられ、これらのそれぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。本発明のiRNAに使用するのに好適な更なるPNA化合物が、例えば、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に記載されている。

【0144】

本発明に取り上げられるある実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するRNA及びヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシドを含み、特に、上述した米国特許第5、489、677号明細書の - - CH₂ - - NH - - CH₂ - -、 - - CH₂ - - N(CH₃) - - O - - CH₂ - - [メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られている]、 - - CH₂ - - O - - N(CH₃) - - CH₂ - -、 - - CH₂ - - N(CH₃) - - N(CH₃) - - CH₂ - - 及び - - N(CH₃) - - CH₂ - - CH₂ - - [式中、天然のホスホジエステル骨格は、 - - O - - P - - O - - CH₂ - - として表される]、及び上述した米国特許第5、602、240号明細書のアミド骨格を含む。ある実施形態において、本明細書に取り上げられるRNAは、上述した米国特許第5、034、506号明細書のモルホリノ骨格構造を有する。

【0145】

修飾RNAは、1つ又は複数の置換された糖部分も含有し得る。本明細書に取り上げられるiRNA、例えば、dsRNAは、2'位において、OH；F；O-、S-、又はN-アルキル；O-、S-、又はN-アルケニル；O-、S-又はN-アルキニル；又はO-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含むことができ、ここで、アルキル、アルケニル及びアルキニルは、置換又は非置換のC₁~C₁₀アルキル又はC₂~C₁₀アルケニル及びアルキニルであり得る。例示的な好適な修飾は、O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、及びO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂を含み、式中、n及びmが、1~約10である。他の実施形態において、dsRNAは、2'位において、G₁~C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル又はO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、挿入基(intercalator)、iRNAの薬力学的特性を向上させる基、又はiRNAの薬物動態特性を向上させる基、及び同様の特性を有する他の置換基のう

10

20

30

40

50

ちの1つを含む。ある実施形態において、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2'-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られている2'-O-C₂H₄OC₂H₅) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78: 486-504)、即ち、アルコキシ-アルコキシ基を含む。別の例示的な修飾は、本明細書において以下の実施例に記載される、2'-DMAOEとしても知られている2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野において、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られている)、即ち、2'-O-C₂H₄-O-CH₂-N(CH₂)₂である。

【0146】

他の修飾は、2'-メトキシ(2'-OC₃H₇)、2'-アミノプロポキシ(2'-OC₃H₇CH₂CH₂NH₂)及び2'-フルオロ(2'-F)を含む。同様の修飾を、iRNAのRNAにおける他の位置、特に、3'末端ヌクレオチド上又は2'-5'結合dsRNA中の糖の3'位及び5'末端ヌクレオチドの5'位で行うこともできる。iRNAはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有し得る。このような修飾された糖構造の調製を教示する代表的な米国特許としては、限定はされないが、米国特許第4,981,957号明細書；同第5,118,800号明細書；同第5,319,080号明細書；同第5,359,044号明細書；同第5,393,878号明細書；同第5,446,137号明細書；同第5,466,786号明細書；同第5,514,785号明細書；同第5,519,134号明細書；同第5,567,811号明細書；同第5,576,427号明細書；同第5,591,722号明細書；同第5,597,909号明細書；同第5,610,300号明細書；同第5,627,053号明細書；同第5,639,873号明細書；同第5,646,265号明細書；同第5,658,873号明細書；同第5,670,633号明細書；及び同第5,700,920号明細書が挙げられ、これらのうちのいくつかは、本出願と所有者が同一である。上記のそれぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。

【0147】

iRNAは、核酸塩基(当該技術分野において多くの場合、単に「塩基」と呼ばれる)修飾又は置換も含み得る。本明細書において使用される際、「非修飾」又は「天然」核酸塩基は、プリン塩基アデニン(A)及びグアニン(G)、並びにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を含む。修飾核酸塩基は、デオキシ-チミン(dT)、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシン、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に、5-プロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルアデニン及び7-メチルアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-ダアザアデニン(daazaadenine)及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンなどの他の合成及び天然核酸塩基を含む。更なる核酸塩基としては、米国特許第3,687,808号明細書に開示されるもの、Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008に開示されるもの；The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されるもの、Englisches et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613

10

20

30

40

50

によって開示されるもの、及び *Sanghvi, Y. S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289 - 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993* によって開示されるものが挙げられる。これらの核酸塩基のいくつかは、本発明に取り上げられるオリゴマー化合物の結合親和性を高めるのに特に有用である。これらとしては、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル及び5 - プロピニルシトシンを含む、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン及びN - 2、N - 6及び0 - 6置換プリンが挙げられる。5 - メチルシトシン置換基が、核酸二本鎖安定性を0.6 ~ 1.2 だけ増加させることが示されており (*Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276 - 278*)、例示的な塩基置換であり、特に2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられる場合は尚更である。

10

【0148】

上記の修飾核酸塩基並びに他の修飾核酸塩基のいくつかの調製を教示する代表的な米国特許としては、限定はされないが、上記の米国特許第3,687,808号明細書、同第4,845,205号明細書；同第5,130,30号明細書；同第5,134,066号明細書；同第5,175,273号明細書；同第5,367,066号明細書；同第5,432,272号明細書；同第5,457,187号明細書；同第5,459,255号明細書；同第5,484,908号明細書；同第5,502,177号明細書；同第5,525,711号明細書；同第5,552,540号明細書；同第5,587,469号明細書；同第5,594,121号明細書、同第5,596,091号明細書；同第5,614,617号明細書；同第5,681,941号明細書；同第5,750,692号明細書；同第6,015,886号明細書；同第6,147,200号明細書；同第6,166,197号明細書；同第6,222,025号明細書；同第6,235,887号明細書；同第6,380,368号明細書；同第6,528,640号明細書；同第6,639,062号明細書；同第6,617,438号明細書；同第7,045,610号明細書；同第7,427,672号明細書；及び同第7,495,088号明細書が挙げられ、これらのそれぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。

20

【0149】

iRNAのRNAはまた、1つ又は複数のロケット核酸(LNA)を含むように修飾され得る。ロケット核酸は、修飾されたりボース部分を有するヌクレオチドであり、リボース部分は、2'及び4'炭素を結合する追加の架橋を含む。この構造は、3' - endo構造的立体配置におけるリボースを有効に「ロックする」。siRNAにロケット核酸を加えると、血清中のsiRNA安定性が増加し、オフターゲット効果が低下されることが示されている (*Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1): 439 - 447; Mook, O.R. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3): 833 - 843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12): 3185 - 3193*)。

30

40

【0150】

ロケット核酸ヌクレオチドの調製を教示する代表的な米国特許としては、限定はされないが、米国特許第6,268,490号明細書；同第6,670,461号明細書；同第6,794,499号明細書；同第6,998,484号明細書；同第7,053,207号明細書；同第7,084,125号明細書；及び同第7,399,845号明細書が挙げられ、これらのそれぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。

【0151】

RNA分子の末端に対する潜在的に安定した修飾は、N - (アセチルアミノカプロイル) - 4 - ヒドロキシプロリノール (Hyp - C6 - NHAc)、N - (カプロイル - 4 - ヒドロキシプロリノール (Hyp - C6)、N - (アセチル - 4 - ヒドロキシプロリノール

50

ル (Hyp - N H A c)、チミジン - 2' - 0 - デオキシチミジン (エーテル)、N - (アミノカプロイル) - 4 - ヒドロキシプロリノール (Hyp - C 6 - アミノ)、2 - ドコサノイル - ウリジン - 3' - ホスフェート、逆方向塩基 (i n v e r t e d b a s e) d T (i d T) などを含み得る。この修飾の開示は、P C T 公開番号国際公開第 2 0 1 1 / 0 0 5 8 6 1 号パンフレットに見られる。

【 0 1 5 2 】

A . 本発明のモチーフを含む修飾 i R N A

本発明の特定の態様において、本発明の二本鎖 R N A i 剤としては、例えば、それぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される、2 0 1 1 年 1 1 月 1 8 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 5 6 1 , 7 1 0 号明細書、又は 2 0 1 2 年 1 1 月 1 6 日に出願された P C T / U S 2 0 1 2 / 0 6 5 6 9 1 号明細書に開示される化学的修飾を有する剤が挙げられる。

10

【 0 1 5 3 】

本明細書及び米国仮特許出願第 6 1 / 5 6 1 , 7 1 0 号明細書に示されるように、より優れた結果が、3 連続ヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つ又は複数のモチーフを、R N A i 剤のセンス鎖及び / 又はアンチセンス鎖中、特に、切断部位又はその近傍に導入することによって得られる。ある実施形態において、R N A i 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖は、あるいは完全に修飾され得る。これらのモチーフの導入により、存在する場合、センス鎖及び / 又はアンチセンス鎖の修飾パターンが中断される。R N A i 剤は、例えば、センス鎖上で、G a l N A c 誘導体リガンドと任意選択的にコンジュゲートされ得る。得られた R N A i 剤は、より優れた遺伝子サイレンシング活性を示す。

20

【 0 1 5 4 】

より詳細には、二本鎖 R N A i 剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖が、R N A i 剤の少なくとも 1 つの鎖の切断部位又はその近傍に 3 連続ヌクレオチド上の 3 つの同一の修飾の 1 つ又は複数のモチーフを有するように修飾される場合、R N A i 剤の遺伝子サイレンシング活性が優位に向上されたことが意外にも発見された。

【 0 1 5 5 】

一実施形態において、R N A i 剤は、1 9 連続ヌクレオチド長の平滑末端二本鎖 (d o u b l e e n d e d b l u n t m e r) であり、センス鎖は、5' 末端から 7 位、8 位、9 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5' 末端から 1 1 位、1 2 位、1 3 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - O - メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。

30

【 0 1 5 6 】

別の実施形態において、R N A i 剤は、2 0 連続ヌクレオチド長の平滑末端二本鎖であり、センス鎖は、5' 末端から 8 位、9 位、1 0 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5' 末端から 1 1 位、1 2 位、1 3 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - O - メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。

【 0 1 5 7 】

更に別の実施形態において、R N A i 剤は、2 1 連続ヌクレオチド長の平滑末端二本鎖であり、センス鎖は、5' 末端から 9 位、1 0 位、1 1 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。アンチセンス鎖は、5' 末端から 1 1 位、1 2 位、1 3 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - O - メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含む。

40

【 0 1 5 8 】

一実施形態において、R N A i 剤は、2 1 連続ヌクレオチドセンス鎖及び 2 3 連続ヌクレオチドアンチセンス鎖を含み、センス鎖は、5' 末端から 9 位、1 0 位、1 1 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - F 修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含み；アンチセンス鎖は、5' 末端から 1 1 位、1 2 位、1 3 位の 3 連続ヌクレオチドにおける 3 つの 2' - O - メチル修飾の少なくとも 1 つのモチーフを含み、R N A i 剤の一方の末端が平滑である一方、

50

他方の末端は、2つのヌクレオチドオーバーハングを含む。好ましくは、2つのヌクレオチドオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にある。2つのヌクレオチドオーバーハングが、アンチセンス鎖の3'末端にある場合、末端の3つのヌクレオチドの間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合があり得、3つのうちの2つのヌクレオチドが、オーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドである。一実施形態において、RNAi剤は、センス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の5'末端の両方における末端の3つのヌクレオチドの間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を更に有する。一実施形態において、モチーフの一部であるヌクレオチドを含む、RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖中の全てのヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドである。一実施形態において、各残基が、独立して、例えば、交互のモチーフ中で、2'-O-メチル又は3'-フルオロで修飾される。任意選択で、RNAi剤は、リガンド(好ましくは、GalNAc₃)を更に含む。

10

【0159】

一実施形態において、RNAi剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、RNAi剤は、少なくとも25且つ29以下のヌクレオチド長を有する第1の鎖と、5'末端から11位、12位、13位の3連続ヌクレオチドにおける3つの2'-O-メチル修飾の少なくとも1つのモチーフを含む、30ヌクレオチド長以下を有する第2の鎖とを含み；第1の鎖の3'末端及び第2の鎖の5'末端が、平滑末端を形成し、第2の鎖は、その3'末端で第1の鎖より1~4ヌクレオチド長く、二本鎖領域は、少なくとも25ヌクレオチド長であり、第2の鎖は、RNAi剤が哺乳動物細胞中に導入されたときに標的遺伝子の発現を低下させるように、第2の鎖長の少なくとも19のヌクレオチドに沿って標的mRNAに十分に相補的であり、RNAi剤のダイサー切断(dicer cleavage)が、第2の鎖の3'末端を含むsiRNAを優先的にもたらし、それにより、哺乳動物における標的遺伝子の発現を低下させる。任意選択で、RNAi剤は、リガンドを更に含む。

20

【0160】

一実施形態において、RNAi剤のセンス鎖は、3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含み、モチーフの1つは、センス鎖の切断部位に存在する。

【0161】

一実施形態において、RNAi剤のアンチセンス鎖も、3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含むことができ、モチーフの1つは、アンチセンス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。

30

【0162】

17~23ヌクレオチド長の二本鎖領域を有するRNAi剤では、アンチセンス鎖の切断部位は、典型的に、5'末端から10位、11位及び12位の付近である。したがって、3つの同一の修飾のモチーフは、アンチセンス鎖の5'末端から1つ目のヌクレオチドから数え始めて、又は、アンチセンス鎖の5'末端から、二本鎖領域内の1つ目の対合ヌクレオチドから数え始めて、アンチセンス鎖の9位、10位、11位；10位、11位、12位；11位、12位、13位；12位、13位、14位；又は13位、14位、15位に存在し得る。アンチセンス鎖中の切断部位はまた、5'末端からのRNAiの二本鎖領域の長さに応じて変化し得る。

40

【0163】

RNAi剤のセンス鎖は、鎖の切断部位に3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを含んでいてもよく；アンチセンス鎖は、鎖の切断部位又はその近傍に3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の少なくとも1つのモチーフを有し得る。センス鎖及びアンチセンス鎖がdsRNA二本鎖を形成する場合、センス鎖及びアンチセンス鎖は、センス鎖における3つのヌクレオチドの1つのモチーフ及びアンチセンス鎖における3つのヌクレオチドの1つのモチーフが、少なくとも1つのヌクレオチドの重複を有し、即ち、センス鎖中のモチーフの3つのヌクレオチドのうち少なくとも1つが、アンチセンス鎖中のモチーフの3つのヌクレオチドのうち少なくとも1つと

50

塩基対を形成するように整列され得る。あるいは、少なくとも2つのヌクレオチドが重複してもよく、又は全ての3つのヌクレオチドが重複してもよい。

【0164】

一実施形態において、RNAi剤のセンス鎖は、3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の2つ以上のモチーフを含み得る。第1のモチーフは、鎖の切断部位又はその近傍に存在してもよく、他のモチーフは、ウイング修飾(wing modification)であり得る。本明細書における「ウイング修飾」という用語は、同じ鎖の切断部位又はその近傍のモチーフから離れた鎖の別の部分に存在するモチーフを指す。ウイング修飾は、第1のモチーフに隣接するか、又は少なくとも1つ又は複数のヌクレオチドによって隔てられている。モチーフが、互いに直接隣接している場合、モチーフの化学構造は、互いに異なり、モチーフが、1つ又は複数のヌクレオチドによって隔てられている場合、化学構造は、同じか又は異なり得る。2つ以上のウイング修飾が存在し得る。例えば、2つのウイング修飾が存在する場合、各ウイング修飾は、切断部位又はその近傍の第1のモチーフに対して1つの端部に又はリードモチーフ(lead motif)のいずれかの側に存在し得る。

10

【0165】

センス鎖と同様に、RNAi剤のアンチセンス鎖は、3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の2つ以上のモチーフを含んでいてもよく、モチーフの少なくとも1つが、鎖の切断部位又はその近傍に存在する。このアンチセンス鎖はまた、センス鎖に存在し得るウイング修飾と同様の配列で1つ又は複数のウイング修飾を含み得る。

20

【0166】

一実施形態において、RNAi剤のセンス鎖又はアンチセンス鎖におけるウイング修飾は、典型的に、鎖の3'末端、5'末端又は両方の末端に第1の1つ又は2つの末端ヌクレオチドを含まない。

【0167】

別の実施形態において、RNAi剤のセンス鎖又はアンチセンス鎖におけるウイング修飾は、典型的に、鎖の3'末端、5'末端又は両方の末端の二本鎖領域内に第1の1つ又は2つの対合ヌクレオチドを含まない。

【0168】

RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも1つのウイング修飾を含む場合、ウイング修飾は、二本鎖領域の同じ末端に位置してもよく、1つ、2つ又は3つのヌクレオチドの重複を有し得る。

30

【0169】

RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖がそれぞれ、少なくとも2つのウイング修飾を含む場合、センス鎖及びアンチセンス鎖は、1つの鎖からの2つの修飾がそれぞれ、二本鎖領域の1つの末端に位置して、1つ、2つ又は3つのヌクレオチドの重複を有し；1つの鎖からの2つの修飾がそれぞれ、二本鎖領域の他方の末端に位置して、1つ、2つ又は3つのヌクレオチドの重複を有し；1つの鎖からの2つの修飾がリードモチーフの各側に位置して、二本鎖領域中に1つ、2つ又は3つのヌクレオチドの重複を有するように整列され得る。

40

【0170】

一実施形態において、モチーフの一部であるヌクレオチドを含む、RNAi剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖中の全てのヌクレオチドが修飾され得る。各ヌクレオチドは、同じ又は異なる修飾で修飾されてもよく、この修飾は、非結合リン酸酸素及び/又は結合リン酸酸素の1つ又は複数の一方又は両方の1つ又は複数の変更；リボース糖の成分、例えば、リボース糖の2'ヒドロキシルの変更；「脱リン(dephospho)」リンカーによるリン酸部分の大規模な置換；天然の塩基の修飾又は置換；及びリボース-リン酸骨格の置換又は修飾を含み得る。

【0171】

核酸が、サブユニットのポリマーであるため、例えば、塩基、又はリン酸部分、又はリ

50

ン酸部分の非結合Oの修飾といった修飾の多くは、核酸内の繰り返される位置に存在する。場合によっては、修飾は、核酸中の目的の位置の全てに存在し得るが、多くの場合、そうではない。例として、修飾は、3'又は5'末端位置のみに存在してもよく、末端領域、例えば、末端ヌクレオチド上の位置又は鎖の最後の2、3、4、5、又は10のヌクレオチドのみに存在してもよい。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、又はその両方に存在してもよい。修飾は、RNAの二本鎖領域のみに存在してもよく、又はRNAの一本鎖領域のみに存在してもよい。例えば、非結合O位置におけるホスホロチオエート修飾は、一方又は両方の末端のみに存在してもよく、末端領域、例えば、末端ヌクレオチド上の位置又は鎖の最後の2、3、4、5、又は10のヌクレオチドのみに存在してもよく、又は二本鎖及び一本鎖領域、特に、末端に存在してもよい。5'末端又は両方の末端が、リン酸化され

10

【0172】

例えば、安定性を高めること、オーバーハング中に特定の塩基を含むこと、又は一本鎖オーバーハング、例えば、5'又は3'オーバーハング、又はその両方に修飾ヌクレオチド又はヌクレオチド代用物(surrogate)を含むことが可能であり得る。例えば、オーバーハング中にプリンヌクレオチドを含むことが望ましいことがある。ある実施形態において、3'又は5'オーバーハング中の塩基の全て又は一部が、例えば、本明細書に記載される修飾で修飾されてもよい。修飾は、例えば、当該技術分野において公知の修飾によるリボース糖の2'位における修飾の使用、例えば、核酸塩基のリボ糖の代わりにデオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ(2'-F)又は2'-O-メチル修飾 20の使用、及びリン酸基の修飾、例えば、ホスホロチオエート修飾を含み得る。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

【0173】

一実施形態において、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アシル、2'-C-アシル、2'-デオキシ、2'-ヒドロキシル、又は2'-フルオロで修飾される。鎖は、2つ以上の修飾を含み得る。一実施形態において、センス鎖及びアンチセンス鎖の各残基は、独立して、2'-O-メチル又は2'-フルオロで修飾される。

【0174】

少なくとも2つの異なる修飾が、典型的に、センス鎖及びアンチセンス鎖に存在する。それらの2つの修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾、又は他のものであり得る。

30

【0175】

一実施形態において、N_a及び/又はN_bは、交互のパターンの修飾を含む。本明細書において使用される際の「交互のモチーフ」という用語は、1つ又は複数の修飾を有するモチーフを指し、各修飾が、1つの鎖の交互のヌクレオチドに存在する。交互のヌクレオチドは、1つおきのヌクレオチドに1つ又は3つおきのヌクレオチドに1つ、又は同様のパターンを指し得る。例えば、A、B及びCがそれぞれ、ヌクレオチドに対する1つのタイプの修飾を表す場合、交互のモチーフは、「A B A B A B A B A B A B . . .」、「A A B B A A B B A A B B . . .」、「A A B A A B A A B A A B . . .」、「A A A B A A A B A A A B . . .」、「A A A B B B A A A B B B . . .」、又は「A B C A B C A B C A B C . . .」などであり得る。

40

【0176】

交互のモチーフに含まれる修飾のタイプは、同じか又は異なり得る。例えば、A、B、C、Dがそれぞれ、ヌクレオチド上の1つのタイプの修飾を表す場合、交互のパターン、即ち、1つおきのヌクレオチドにおける修飾は、同じであってもよいが、センス鎖又はアンチセンス鎖のそれぞれが、「A B A B A B . . .」、「A C A C A C . . .」、「B D B D B D . . .」又は「C D C D C D . . .」などの交互のモチーフ内の修飾のいくつかの可能性から選択され得る。

【0177】

50

一実施形態において、本発明のRNAi剤は、アンチセンス鎖における交互のモチーフの修飾パターンに対してシフトされた、センス鎖における交互のモチーフの修飾パターンを含む。このシフトは、センス鎖のヌクレオチドの修飾基が、アンチセンス鎖のヌクレオチドの異なる修飾の基に対応するか、その逆であるようなシフトであり得る。例えば、センス鎖は、dsRNA二本鎖におけるアンチセンス鎖と対合される場合、センス鎖における交互のモチーフは、鎖の5'から3'へと「A B A B A B」から開始してもよく、アンチセンス鎖における交互のモチーフは、二本鎖領域内の鎖の5'から3'へと「B A B A B A」から開始され得る。別の例として、センス鎖における交互のモチーフは、鎖の5'から3'へと「A A B B A A B B」から開始してもよく、アンチセンス鎖における交互のモチーフは、二本鎖領域内の鎖の5'から3'へと「B B A A B B A A」から開始してもよく、それにより、センス鎖とアンチセンス鎖との間の修飾パターンの完全な又は部分的なシフトが存在する。

【0178】

一実施形態において、RNAi剤は、センス鎖における2'-O-メチル修飾及び2'-F修飾の交互のモチーフのパターンを含み、このパターンは、最初に、アンチセンス鎖における2'-O-メチル修飾及び2'-F修飾の交互のモチーフのパターンに対するシフトを有し、即ち、センス鎖における2'-O-メチル修飾ヌクレオチドが、アンチセンス鎖における2'-F修飾ヌクレオチドと塩基対を形成し、その逆も同様である。センス鎖の1位は、2'-F修飾から開始してもよく、アンチセンス鎖の1位は、2'-O-メチル修飾から開始してもよい。

【0179】

センス鎖及び/又はアンチセンス鎖への、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つ又は複数のモチーフの導入は、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖中に存在する最初の修飾パターンを中断する。センス鎖及び/又はアンチセンス鎖に3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つ又は複数のモチーフを導入することによる、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の修飾パターンのこの中断は、標的遺伝子の対する遺伝子サイレンシング活性を意外にも高める。

【0180】

一実施形態において、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾のモチーフが、鎖のいずれかに導入される場合、モチーフに隣接するヌクレオチドの修飾は、モチーフの修飾と異なる修飾である。例えば、モチーフを含む配列の一部は、「 $\cdots N_a Y Y Y N_b \cdots$ 」であり、ここで、「Y」は、3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾のモチーフの修飾を表し、「 N_a 」及び「 N_b 」は、Yの修飾と異なる、モチーフ「YYY」に隣接するヌクレオチドの修飾を表し、 N_a 及び N_b は、同じか又は異なる修飾であり得る。あるいは、 N_a 及び/又は N_b は、ウイング修飾が存在する場合、存在していても又は存在していなくてもよい。

【0181】

RNAi剤は、少なくとも1つのホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合を更に含み得る。ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合の修飾は、鎖のいずれかの位置の、センス鎖又はアンチセンス鎖又は両方の鎖の任意のヌクレオチドに存在し得る。例えば、ヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖における全てのヌクレオチドに存在してもよく；各ヌクレオチド間結合の修飾は、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖において交互のパターンで存在してもよく；又はセンス鎖又はアンチセンス鎖は、交互のパターンで両方のヌクレオチド間結合の修飾を含み得る。センス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互のパターンは、アンチセンス鎖と同じか又は異なってもよく、センス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互のパターンは、アンチセンス鎖におけるヌクレオチド間結合の修飾の交互のパターンに対するシフトを有し得る。

【0182】

一実施形態において、RNAiは、オーバーハング領域にホスホロチオエート又はメチ

10

20

30

40

50

ルホスホネートヌクレオチド間結合の修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合を有する2つのヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチド間結合の修飾はまた、オーバーハングヌクレオチドを、二本鎖領域内の末端の対合ヌクレオチドと結合するために形成され得る。例えば、少なくとも2、3、4、又は全てのオーバーハングヌクレオチドが、ホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合によって結合されてもよく、任意選択で、オーバーハングヌクレオチドを、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドと結合する更なるホスホロチオエート又はメチルホスホネートヌクレオチド間結合が存在し得る。例えば、末端の3つのヌクレオチド間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在してもよく、3つのヌクレオチドのうちの2つが、オーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドが、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドである。これらの末端の3つのヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'末端、センス鎖の3'末端、アンチセンス鎖の5'末端、及び/又はアンチセンス鎖の5'末端に存在し得る。

【0183】

一実施形態において、2つのヌクレオチドオーバーハングは、アンチセンス鎖の3'末端にあり、末端の3つのヌクレオチド間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合が存在し、3つのヌクレオチドのうちの2つが、オーバーハングヌクレオチドであり、第3のヌクレオチドが、オーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドである。任意選択で、RNAi剤は、センス鎖の5'末端及びアンチセンス鎖の5'末端の両方において、末端の3つのヌクレオチド間に2つのホスホロチオエートヌクレオチド間結合を更に有し得る。

【0184】

一実施形態において、RNAi剤は、標的とのミスマッチ、二本鎖内のミスマッチ、又はそれらの組合せを含む。ミスマッチは、オーバーハング領域又は二本鎖領域で生じ得る。塩基対は、解離又は融解（例えば、特定の対合の結合又は解離の自由エネルギーに対してであり、最も簡単な手法は、個々の対ごとに対を調べることであるが、類似の又は同様の分析も使用され得る）を促進する傾向に基づいて評価され得る。解離の促進に関して：A：Uが、G：Cより好ましく；G：Uが、G：Cより好ましく；I：Cが、G：Cより好ましい（I = イノシン）。ミスマッチ、例えば、非正準又は正準以外の対合（本明細書の他の箇所に記載される）が、正準な（A：T、A：U、G：C）対合より好ましく；ユニバーサル塩基を含む対合が、正準な対合より好ましい。

【0185】

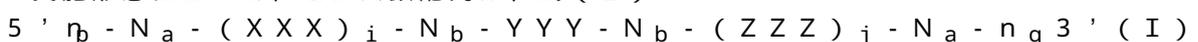
一実施形態において、RNAi剤は、A：U、G：U、I：Cの群から独立して選択されるアンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の最初の1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つの塩基対のうちの少なくとも1つ、及び二本鎖の5'末端におけるアンチセンス鎖の解離を促進するためのミスマッチ対、例えば、非正準又は正準以外の対合又はユニバーサル塩基を含む対合を含む。

【0186】

一実施形態において、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の1位におけるヌクレオチドは、A、dA、dU、U、及びdTからなる群から選択される。あるいは、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の最初の1、2又は3塩基対のうちの少なくとも1つは、AU塩基対である。例えば、アンチセンス鎖の5'末端からの二本鎖領域内の第1の塩基対は、AU塩基対である。

【0187】

一実施形態において、センス鎖配列は、式(I)：



(式中：

i及びjがそれぞれ、独立して、0又は1であり；

p及びqがそれぞれ、独立して、0～6であり；

10

20

30

40

50

各 N_a が、独立して、0 ~ 25 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

各 N_b が、独立して、0 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

各 n_p 及び n_q が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

ここで、 N_b 及び Y が、同じ修飾を有さず；

XXX 、 YYY 及び ZZZ がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す)

によって表され得る。好ましくは、 YYY が、全て 2' - F 修飾ヌクレオチドである。

【0188】

一実施形態において、 N_a 及び Y 又は N_b は、交互のパターンの修飾を含む。

【0189】

一実施形態において、 YYY モチーフは、センス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。例えば、RNA i 剤が、17 ~ 23ヌクレオチド長の二本鎖領域を有する場合、 YYY モチーフは、5'末端から1つ目のヌクレオチドから数え始めて；又は任意選択で、5'末端から、二本鎖領域内の1つ目の対合ヌクレオチドから数え始めて、センス鎖の切断部位又はその近傍に存在し得る（例えば：6位、7位、8位、7位、8位、9位、8位、9位、10位、9位、10位、11位、10位、11位、12位又は11位、12位、13位に存在し得る）。

【0190】

一実施形態において、 i が1であり、 j が0であり、又は i が0であり、 j が1であり、又は i 及び j の両方が1である。したがって、センス鎖は、以下の式によって表され得る：

5' n_p - N_a - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3' (I b)；

5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_a - n_q 3' (I c)；又は

5' n_p - N_a - XXX - N_b - YYY - N_b - ZZZ - N_a - n_q 3' (I d)。

【0191】

センス鎖が、式 (I b) によって表される場合、 N_b は、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2 又は 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は、独立して、2 ~ 20、2 ~ 15、又は 2 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し得る。

【0192】

センス鎖が、式 (I c) として表される場合、 N_b は、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2 又は 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a は、独立して、2 ~ 20、2 ~ 15、又は 2 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し得る。

【0193】

センス鎖が、式 (I d) として表される場合、各 N_b は、独立して、0 ~ 10、0 ~ 7、0 ~ 5、0 ~ 4、0 ~ 2 又は 0 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5 又は 6 である。各 N_a は、独立して、2 ~ 20、2 ~ 15、又は 2 ~ 10 の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し得る。

【0194】

X 、 Y 及び Z のそれぞれが、互いに同じか又は異なり得る。

【0195】

他の実施形態において、 i が0であり、 j が0であり、センス鎖は、以下の式によって表され得る：

5' n_p - N_a - YYY - N_a - n_q 3' (I a)。

【0196】

センス鎖が、式 (I a) によって表される場合、各 N_a は、独立して、2 ~ 20、2 ~

10

20

30

40

50

15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し得る。

【0197】

一実施形態において、RNA_iのアンチセンス鎖配列は、式(II)：

5' η_q ' - N_a' - (Z' Z' Z' N_b' - Y' Y' Y' N' (X' X' X' N' a - n_p'
3' (II)

(式中：

k及びlがそれぞれ、独立して、0又は1であり；

p'及びq'がそれぞれ、独立して、0～6であり；

各N_a'が、独立して、0～25の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；

10

各N_b'が、独立して、0～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

各n_p'及び η_q 'が、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；

ここで、N_b'及びY'が、同じ修飾を有さず；

X' X' X'、Y' Y' Y'及びZ' Z' Z'がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチドにおける3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す)

によって表され得る。

【0198】

一実施形態において、N_a'及び/又はN_b'は、交互のパターンの修飾を含む。

【0199】

20

Y' Y' Y'モチーフは、アンチセンス鎖の切断部位又はその近傍に存在する。例えば、RNA_i剤が、17～23ヌクレオチド長の二本鎖領域を有する場合、Y' Y' Y'モチーフは、5'末端から1つ目のヌクレオチドから数え始めて；又は任意選択で、5'末端から、二本鎖領域内の1つ目の対合ヌクレオチドから数え始めて、アンチセンス鎖の9位、10位、11位；10位、11位、12位；11位、12位、13位；12位、13位、14位；又は13位、14位、15位に存在し得る。好ましくは、Y' Y' Y'モチーフは、11位、12位、13位に存在する。

【0200】

一実施形態において、Y' Y' Y'モチーフは、全て2'-OMe修飾ヌクレオチドである。

【0201】

30

一実施形態において、kが1であり、lが0であり、又はkが0であり、lが1であり、又はk及びlの両方が1である。

【0202】

したがって、アンチセンス鎖は、以下の式によって表され得る：

5' η_q ' - N_a' - Z' Z' Z' N_b' - Y' Y' Y' N' (X' X' X' N' a - n_p' 3' (II b)；

5' η_q ' - N_a' - Y' Y' Y' N' X' X' X' N' (X' X' X' N' a - n_p' 3' (II c)；又は

5' η_q ' - N_a' - Z' Z' Z' N_b' - Y' Y' Y' N' X' X' X' N' (X' X' X' N' a - n_p' 3' (II d)。

【0203】

アンチセンス鎖が、式(II b)によって表される場合、N_b'は、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各N_a'は、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

40

【0204】

アンチセンス鎖が、式(II c)として表される場合、N_b'は、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各N_a'は、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0205】

アンチセンス鎖が、式(II d)として表される場合、各N_b'は、独立して、0～10

50

、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各 N_a' は、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。好ましくは、 N_b は、0、1、2、3、4、5又は6である。

【0206】

他の実施形態において、 k が0であり、 l が0であり、アンチセンス鎖は、以下の式によって表され得る：



【0207】

アンチセンス鎖が、式(IIa)として表される場合、各 N_a' は、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。 10

【0208】

X' 、 Y' 及び Z' のそれぞれが、互いに同じか又は異なり得る。

【0209】

センス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、独立して、LNA、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-ヒドロキシル、又は2'-フルオロで修飾され得る。例えば、センス鎖及びアンチセンス鎖の各ヌクレオチドは、独立して、2'-O-メチル又は2'-フルオロで修飾される。各 X 、 Y 、 Z 、 X' 、 Y' 及び Z' は、特に、2'-O-メチル修飾又は2'-フルオロ修飾を表し得る。 20

【0210】

一実施形態において、RNAi剤のセンス鎖は、二本鎖領域が21のヌクレオチドである場合、5'末端から1つ目のヌクレオチドから数え始めて；又は任意選択で、5'末端から、二本鎖領域内の1つ目の対合ヌクレオチドから数え始めて、鎖の9位、10位及び11位に存在する $Y Y Y$ モチーフを含んでいてもよく； Y は、2'-F修飾を表す。センス鎖は、二本鎖領域の反対側の末端にウイング修飾として $X X X$ モチーフ又は $Z Z Z$ モチーフを更に含んでいてもよく； $X X X$ 及び $Z Z Z$ はそれぞれ、独立して、2'-OMe修飾又は2'-F修飾を表す。

【0211】

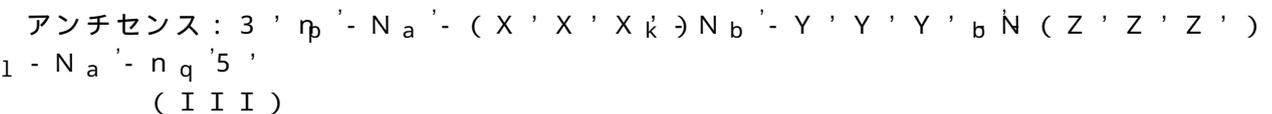
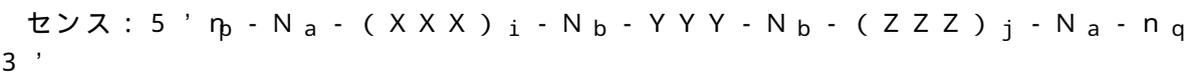
一実施形態において、アンチセンス鎖は、5'末端から1つ目のヌクレオチドから数え始めて；又は任意選択で、5'末端から、二本鎖領域内の1つ目の対合ヌクレオチドから数え始めて、鎖の11位、12位、13位に存在する $Y' Y' Y'$ モチーフを含んでいてもよく； Y' は、2'-O-メチル修飾を表す。アンチセンス鎖は、二本鎖領域の反対側の末端にウイング修飾として $X' X' X'$ モチーフ又は $Z' Z' Z'$ モチーフを更に含んでいてもよく； $X' X' X'$ 及び $Z' Z' Z'$ はそれぞれ、独立して、2'-OMe修飾又は2'-F修飾を表す。 30

【0212】

上の式(Ia)、(Ib)、(Ic)、及び(Id)のいずれか1つによって表されるセンス鎖はそれぞれ、式(IIa)、(IIb)、(IIc)、及び(IId)のいずれか1つによって表されるアンチセンス鎖と二本鎖を形成する。

【0213】

したがって、本発明の方法に使用するためのRNAi剤は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含んでいてもよく、各鎖は、14～30のヌクレオチドを有し、RNAi二本鎖は、式(III)：



(式中：

i 、 j 、 k 、及び l がそれぞれ、独立して、0又は1であり；

p、p'、q、及びq'がそれぞれ、独立して、0～6であり；
 各N_a及びN_a'が、独立して、0～25の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し、各配列が、少なくとも2つの異なる修飾のヌクレオチドを含み；
 各N_b及びN_b'が、独立して、0～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表し；

ここで、
 それぞれ存在していても又は存在していなくてもよい各n_p'、n_p、n_q'、及びn_qが、独立して、オーバーハングヌクレオチドを表し；
 XXX、YYY、ZZZ、X'X'X'、Y'Y'Y'、及びZ'Z'Z'がそれぞれ、独立して、3連続ヌクレオチド上に3つの同一の修飾の1つのモチーフを表す）
 10
 によって表される。

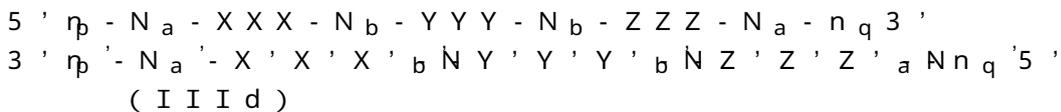
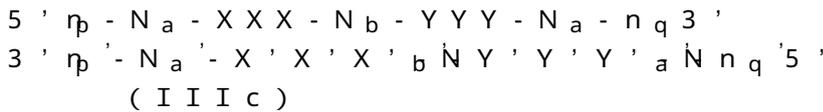
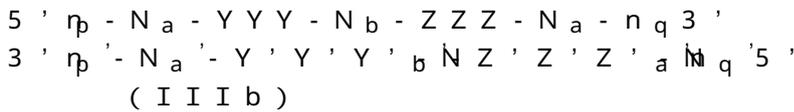
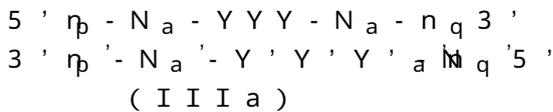
【0214】

一実施形態において、iが0であり、jが0であり；又はiが1であり、jが0であり；又はiが0であり、jが1であり；又はi及びjの両方が0であり；又はi及びjの両方が1である。別の実施形態において、kが0であり、lが0であり；又はkが1であり、lが0であり；kが0であり、lが1であり；又はk及びlの両方が0であり；又はk及びlの両方が1である。

【0215】

RNAi二本鎖を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖の例示的な組合せは、以下の式を含む：

20



30

【0216】

RNAi剤が、式(III a)によって表される場合、各N_aは、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0217】

RNAi剤が、式(III b)によって表される場合、各N_bは、独立して、1～10、1～7、1～5又は1～4の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各N_aは、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

40

【0218】

RNAi剤が、式(III c)として表される場合、各N_b、N_b'は、独立して、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各N_aは、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。

【0219】

RNAi剤が、式(III d)として表される場合、各N_b、N_b'は、独立して、0～10、0～7、0～10、0～7、0～5、0～4、0～2又は0の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。各N_a、N_a'は、独立して、2～20、2～15、又は2～10の修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列を表す。N_a、N_a'、N

50

b 及び N_b のそれぞれは、独立して、交互のパターンの修飾を含む。

【0220】

式 (III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、及び (IIId) 中の X、Y 及び Z のそれぞれは、互いに同じか又は異なり得る。

【0221】

RNAi 剤が、式 (III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、及び (IIId) によって表される場合、Yヌクレオチドの少なくとも1つが、Y'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Yヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成し；又はYヌクレオチドの全ての3つが全て、対応するY'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

10

【0222】

RNAi 剤が、式 (IIIb) 又は (IIId) によって表される場合、Zヌクレオチドの少なくとも1つが、Z'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Zヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成し；又はZヌクレオチドの全ての3つが全て、対応するZ'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

【0223】

RNAi 剤が、式 (IIIc) 又は (IIId) として表される場合、Xヌクレオチドの少なくとも1つが、X'ヌクレオチドの1つと塩基対を形成し得る。あるいは、Xヌクレオチドの少なくとも2つが、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成し；又はXヌクレオチドの全ての3つが全て、対応するX'ヌクレオチドと塩基対を形成する。

20

【0224】

一実施形態において、Yヌクレオチド上の修飾は、Y'ヌクレオチド上の修飾と異なり、Zヌクレオチド上の修飾は、Z'ヌクレオチド上の修飾と異なり、及び/又はXヌクレオチド上の修飾は、X'ヌクレオチド上の修飾と異なる。

【0225】

一実施形態において、RNAi 剤が、式 (IIId) によって表される場合、 N_a 修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾である。別の実施形態において、RNAi 剤が、式 (IIId) によって表される場合、 N_a 修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合される。更に別の実施形態において、RNAi 剤が、式 (IIId) によって表される場合、 N_a 修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合され、センス鎖は、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された1つ又は複数の GalNAc 誘導体にコンジュゲートされる。別の実施形態において、RNAi 剤が、式 (IIId) によって表される場合、 N_a 修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合され、センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、センス鎖は、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された1つ又は複数の GalNAc 誘導体にコンジュゲートされる。

30

【0226】

一実施形態において、RNAi 剤が、式 (IIIa) によって表される場合、 N_a 修飾は、2'-O-メチル又は2'-フルオロ修飾であり、 $n_p' > 0$ であり、少なくとも1つの n_p' が、ホスホロチオエート結合を介して隣接するヌクレオチドに結合され、センス鎖は、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含み、センス鎖は、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合された1つ又は複数の GalNAc 誘導体にコンジュゲートされる。

40

【0227】

一実施形態において、RNAi 剤は、式 (III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、及び (IIId) によって表される少なくとも2つの二本鎖を含む多量体であり、この二本鎖は、リンカーによって結合される。リンカーは、切断可能又は切断不可能であり得る。任意選択で、多量体は、リガンドを更に含む。二本鎖のそれぞれは、同じ

50

遺伝子又は2つの異なる遺伝子を標的とすることができ；又は二本鎖のそれぞれは、2つの異なる標的部位において同じ遺伝子を標的とすることができる。

【0228】

一実施形態において、RNAi剤は、式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、及び(IIId)によって表される3つ、4つ、5つ、6つ又はそれ以上の二本鎖を含む多量体であり、この二本鎖は、リンカーによって結合される。リンカーは、切断可能又は切断不可能であり得る。任意選択で、多量体は、リガンドを更に含む。二本鎖のそれぞれは、同じ遺伝子又は2つの異なる遺伝子を標的とすることができ；又は二本鎖のそれぞれは、2つの異なる標的部位において同じ遺伝子を標的とすることができる。

【0229】

一実施形態において、式(III)、(IIIa)、(IIIb)、(IIIc)、及び(IIId)によって表される2つのRNAi剤は、5'末端、及び3'末端の一方又は両方で互いに結合され、任意選択で、リガンドにコンジュゲートされる。RNAi剤のそれぞれは、同じ遺伝子又は2つの異なる遺伝子を標的とすることができ；又はRNAi剤のそれぞれは、2つの異なる標的部位において同じ遺伝子を標的とすることができる。

【0230】

様々な刊行物に、本発明の方法に使用され得る多量体RNAi剤が記載されている。このような刊行物としては、国際公開第2007/091269号パンフレット、米国特許第7858769号明細書、国際公開第2010/141511号パンフレット、国際公開第2007/117686号パンフレット、国際公開第2009/014887号パンフレット及び国際公開第2011/031520号パンフレットが挙げられ、それぞれの全内容が、参照により本明細書に援用される。

【0231】

RNAi剤に対する1つ又は複数の炭水化物部分のコンジュゲーションを含むRNAi剤は、RNAi剤の1つ又は複数の特性を最適化することができる。多くの場合、炭水化物部分は、RNAi剤の修飾サブユニットに結合される。例えば、dsRNA剤の1つ又は複数のリボヌクレオチドサブユニットのリボース糖は、別の部分、例えば、炭水化物リガンドが結合される非炭水化物(好ましくは環状の)担体で置換され得る。サブユニットのリボース糖がこのように置換されたリボヌクレオチドサブユニットは、本明細書において、リボース置換修飾サブユニット(RRMS)と呼ばれる。環状担体は、炭素環系であつてもよく、即ち、全ての環原子が、炭素原子であり、又は複素環系、即ち、1つ又は複数の環原子が、ヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、硫黄であり得る。環状担体は、単環系であつてもよく、又は2つ以上の環、例えば縮合環を含み得る。環状担体は、完全に飽和した環系であつてもよく、又は1つ又は複数の二重結合を含み得る。

【0232】

リガンドは、担体を介してポリヌクレオチドに結合され得る。担体は、(i)少なくとも1つの「骨格結合点」、好ましくは、2つの「骨格結合点」及び(ii)少なくとも1つの「テザー結合点(tethering attachment point)」を含む。本明細書において使用される際の「骨格結合点」は、官能基、例えば、ヒドロキシル基、又は一般に、骨格、例えば、リン酸塩、又は修飾リン酸塩、例えば、硫黄を含有する、リボ核酸の骨格中への担体の組み込みに利用可能であり且つそれに適した結合を指す。「テザー結合点」(TAP)は、ある実施形態において、選択された部分を接続する環状担体の構成環原子、例えば、炭素原子又はヘテロ原子(骨格結合点を提供する原子と異なる)を指す。この部分は、例えば、炭水化物、例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖及び多糖であり得る。任意選択で、選択された部分は、介在するテザー(intervening tether)によって環状担体に接続される。したがって、環状担体は、多くの場合、官能基、例えば、アミノ基を含み、又は一般に、構成環への別の化学成分、例えば、リガンドの組み込み又は連結(tethering)に適した結合を提供する。

【0233】

RNAi剤は、担体を介してリガンドにコンジュゲートされてもよく、この担体は、環

10

20

30

40

50

式基又は環式基であり得；好ましくは、環式基は、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、[1 , 3] ジオキソラン、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジニル (p y r i d a z i n o n y l)、テトラヒドロフリル及びデカリンから選択され；好ましくは、環式基は、セリノール骨格又はジエタノールアミン骨格から選択される。

【 0 2 3 4 】

ある特定の実施形態において、本発明の方法に使用するための RNA i 剤は、表 1、2、4、5、8、10、及び 12 のいずれか 1 つに列挙される剤の群から選択される剤である。一実施形態において、剤が表 12 に列挙される剤である場合、剤には、末端 d T が欠如し得る。

10

【 0 2 3 5 】

本発明は、アンチセンス鎖上に 5' リン酸又は 5' リン酸模倣体を含む、表 1、2、4、5、8、10、及び 12 のいずれか 1 つに列挙される配列のいずれか 1 つを含む二本鎖 RNA i 剤を更に含む（例えば、PCT 公開番号国際公開第 2011005860 号パンフレットを参照）。更に、本発明は、センス鎖の 5' 末端に 2'-OMe 基の代わりに 2'フルオロ基を含む、表 1、2、4、5、8、10、及び 12 のいずれか 1 つに列挙される配列のいずれか 1 つを含む二本鎖 RNA i 剤を含む。

【 0 2 3 6 】

これらの薬剤は、リガンドを更に含み得る。

20

【 0 2 3 7 】

一実施形態において、剤は、AD-60940（センス鎖：C f s u s G f g U f a U f u U f C f C f u A f g G f g U f a C f a A f L 9 6；アンチセンス鎖：u s U f s g U f a C f c C f u A f g g a A f a U f a C f c A f g s a s g）である。

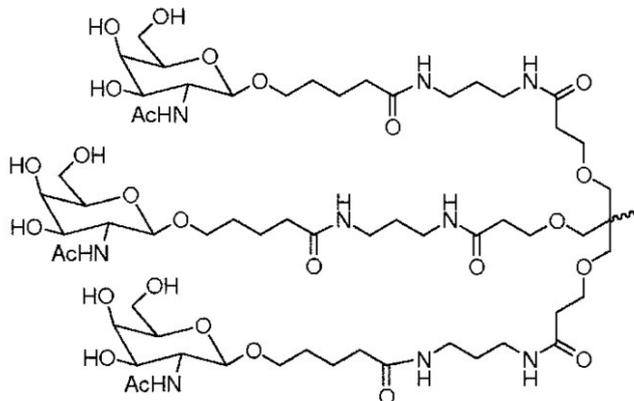
【 0 2 3 8 】

A. リガンド

本発明の二本鎖 RNA (d s RNA) 剤は、任意選択で、1 つ又は複数のリガンドにコンジュゲートされ得る。リガンドは、3' 末端、5' 末端又は両方の末端において、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖に結合され得る。例えば、リガンドは、センス鎖にコンジュゲートされ得る。好ましい実施形態において、リガンドは、センス鎖の 3' 末端にコンジュゲートされる。好ましい一実施形態において、リガンドは、GalNAc リガンドである。特に好ましい実施形態において、リガンドは、GalNAc₃ である：

30

【 化 3 】



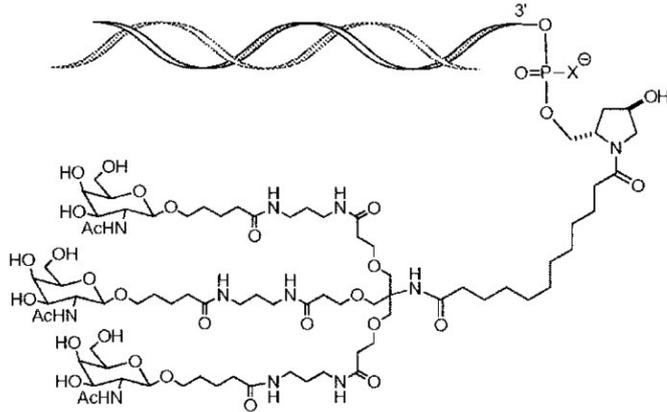
40

【 0 2 3 9 】

ある実施形態において、リガンド、例えば、GalNAc リガンドは、RNA i 剤の 3' 末端に結合される。一実施形態において、RNA i 剤は、以下の概略図

50

【化4】



10

(式中、Xが、O又はSである)に示されるように、リガンド、例えば、GalNAcリガンドにコンジュゲートされる。一実施形態において、XがOである。

【0240】

様々な構成要素が、本発明のRNAi剤に結合され得る。好ましい部分は、介在するテザーを介して直接又は間接的に、好ましくは共有結合で結合されるリガンドである。

【0241】

好ましい実施形態において、リガンドは、リガンドが組み込まれる分子の分布、標的化又は寿命を変化させる。好ましい実施形態において、リガンドは、例えば、このようなリガンドが存在しない種と比較して、選択された標的、例えば、分子、細胞又は細胞型、区画、受容体、例えば、細胞若しくは器官の区画、組織、器官又は身体の領域に対する向上した親和性を提供する。選択された標的に対する向上した親和性を提供するリガンドは、標的化リガンドとも呼ばれる。

20

【0242】

一部のリガンドは、エンドソーム溶解特性を有し得る。エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームの溶解及び/又は本発明の組成物、又はその成分の、エンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する。エンドソーム溶解リガンドは、pH依存性の膜活性及び融合性(fusogenicity)を示すポリアニオン性ペプチド又はペプチド模倣体であり得る。一実施形態において、エンドソーム溶解リガンドは、エンドソームのpHでその活性立体配座を取る。「活性」立体配座は、エンドソーム溶解リガンドが、エンドソームの溶解及び/又は本発明の組成物、又はその成分の、エンドソームから細胞の細胞質への輸送を促進する立体配座である。例示的なエンドソーム溶解リガンドとしては、GALAペプチド(Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964 - 2972)、EALAペプチド(Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581 - 1586)、及びそれらの誘導体(Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56 - 68)が挙げられる。一実施形態において、エンドソーム溶解成分は、pHの変化に応じて電荷の変化又はプロトン化を起こす化学基(例えば、アミノ酸)を含み得る。エンドソーム溶解成分は、直鎖状又は分枝鎖状であり得る。

30

40

【0243】

リガンドは、輸送、ハイブリダイゼーション、及び特異性の特性を向上させることができ、得られる天然若しくは修飾オリゴリボヌクレオチド、又は本明細書に記載されるモノマーの任意の組合せを含むポリマー分子及び/又は天然若しくは修飾リボヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性も向上させ得る。

【0244】

リガンドは、一般に、例えば、取り込みを向上させるための、治療用の修飾因子;例えば、分布を監視するための診断化合物又はレポーター基;架橋剤;及びヌクレアーゼ耐性を与える部分を含み得る。一般的な例としては、脂質、ステロイド、ビタミン、糖、タン

50

パク質、ペプチド、ポリアミン、及びペプチド模倣体が挙げられる。

【0245】

リガンドは、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低比重リボタンパク（LDL）、高比重リボタンパク（HDL）、又はグロブリン）；炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン又はヒアルロン酸）；又は脂質などの天然の物質を含み得る。リガンドはまた、合成ポリマー、例えば、合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）などの、組み換え又は合成分子であり得る。ポリアミノ酸の例としては、ポリアミノ酸は、ポリリジン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コ-グリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、又はポリホスファジンである。ポリアミンの例としては、ポリエチレンイミン、ポリリジン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、擬似ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、又は -ヘリックスペプチドが挙げられる。

10

【0246】

リガンドはまた、標的基、例えば、細胞又は組織標的剤、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質又はタンパク質、例えば、腎細胞などの特定の細胞型に結合する抗体を含み得る。標的基は、サイトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、フォレート、ビタミンB12、ビオチン、RGDペプチド、RGDペプチド模倣体又はアプタマーであり得る。

20

【0247】

リガンドの他の例としては、色素、挿入剤（例えばアクリジン）、架橋剤（例えばソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ又はキレート剤（例えばEDTA）、親油性分子、例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸（*cholenic acid*）、ジメトキシトリチル、又はフェノキサジン）及びペプチド複合体（例えば、アンテナペディア（*antennapedia*）ペプチド、Tatペプチド）、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカ、酵素、ハプテン（例えばビオチン）、輸送/吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター（*cluster*）、アクリジン-イミダゾール複合体、Eu³⁺+テトラアザ大員環複合体）、ジニトロフェニル、HRP、又はAPが挙げられる。

30

40

【0248】

リガンドは、タンパク質、例えば、糖タンパク質、又はペプチド、例えば、コリガンド（*co-ligand*）、又は抗体、例えば、癌細胞、内皮細胞、又は骨細胞などの特定の細胞型に結合する抗体に対する特異親和性を有する分子であり得る。リガンドはまた、

50

ホルモン及びホルモン受容体を含んでもよい。リガンドはまた、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N - アセチル - ガラクトサミン、N - アセチル - グルコサミン、多価マンノース、多価フコース又はアブタマーなどの非ペプチド種を含み得る。リガンドは、例えば、リポ多糖、38MAPキナーゼの活性化因子、又はNF - Bの活性化因子であり得る。

【0249】

リガンドは、例えば、細胞の微小管、マイクロフィラメント、及び/又は中間径フィラメントを破壊することによって、例えば、細胞骨格を破壊することによって、細胞中へのiRNA剤の取り込みを向上させ得る物質、例えば、薬剤であり得る。薬剤は、例えば、タクソン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャスプラキノリド、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、又はミオセルピンであり得る。

10

【0250】

リガンドは、例えば、炎症反応を活性化することによって、細胞中へのオリゴヌクレオチドの取り込みを増加させ得る。このような効果を与え得る例示的なりガンドとしては、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン - 1、又はインターフェロンが挙げられる。

【0251】

一態様において、リガンドは、脂質又は脂質ベースの分子である。このような脂質又は脂質ベースの分子は、好ましくは、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン (HSA) に結合する。HSA結合リガンドは、身体の標的組織、例えば、非腎臓標的組織へのコンジュゲートの分配を可能にする。例えば、標的組織は、肝臓の実質細胞を含む肝臓であり得る。HSAに結合し得る他の分子も、リガンドとして使用され得る。例えば、ナプロキセン又はアスピリンが使用され得る。脂質又は脂質ベースのリガンドは、(a)コンジュゲートの分解に対する耐性を増大し、(b)標的細胞又は細胞膜への標的化又は輸送を増大し、及び/又は(c)血清タンパク質、例えば、HSAへの結合を調整するのに使用され得る。

20

【0252】

脂質ベースのリガンドを用いて、標的組織へのコンジュゲートの結合を調節すること、例えば、制御することができる。例えば、より強くHSAに結合する脂質又は脂質ベースのリガンドは、腎臓に対して標的化される可能性が低く、したがって、身体から除去される可能性が低い。より弱くHSAに結合する脂質又は脂質ベースのリガンドを用いて、コンジュゲートを腎臓に対して標的化することができる。

30

【0253】

好ましい実施形態において、脂質ベースのリガンドは、HSAに結合する。好ましくは、脂質ベースのリガンドは、コンジュゲートが好ましくは非腎臓組織に分配されるような十分な親和性でHSAに結合する。しかしながら、親和性は、HSA - リガンド結合が反転され得ないほど強力でないのが好ましい。

【0254】

別の好ましい実施形態において、コンジュゲートが好ましくは腎臓に分配されるように、脂質ベースのリガンドは、HSAに弱く結合するか又は全く結合しない。腎細胞を標的とする他の部分も、脂質ベースのリガンドの代わりに又はそれに加えて使用され得る。

40

【0255】

別の態様において、リガンドは、標的細胞、例えば、増殖細胞によって取り込まれる部分、例えば、ビタミンである。これらは、例えば、悪性又は非悪性の望ましくない細胞増殖、例えば、癌細胞を特徴とする障害を処置するのに特に有用である。例示的なビタミンは、ビタミンA、E、及びKを含む。他の例示的なビタミンは、ビタミンB、例えば、葉酸、B12、リボフラビン、ピオチン、ピリドキサル又は他のビタミンあるいは癌細胞によって取り込まれる栄養素を含む。HAS、低比重リポタンパク (LDL) 及び高比重リポタンパク (HDL) も含まれる。

50

【 0 2 5 6 】

別の態様において、リガンドは、細胞透過剤 (cell - permeation agent)、好ましくは、らせん状細胞透過剤である。好ましくは、この剤は両親媒性である。例示的な剤は、tat又はアンテナペディア (antennopedia) などのペプチドである。この剤がペプチドである場合、それは、ペプチジル模倣体、逆転異性体、非ペプチド又は擬ペプチド結合、及びD - アミノ酸の使用を含めて修飾され得る。らせん状剤は、好ましくは α - ヘリックス剤であり、これは、好ましくは、親油性及び疎油性相を有する。

【 0 2 5 7 】

リガンドは、ペプチド又はペプチド模倣体であり得る。ペプチド模倣体 (本明細書においてオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる) は、天然ペプチドと類似した明確な三次元構造に折り畳まれることが可能な分子である。ペプチド又はペプチド模倣体部分は、約5 ~ 50個のアミノ酸の長さ、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は50個のアミノ酸の長さであり得る。ペプチド又はペプチド模倣体は、例えば、細胞透過性ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、又は疎水性ペプチド (例えば、主にTy r、Tr p又はPheからなる) であり得る。ペプチド部分は、 dendri merペプチド、構造規制 (constrained) ペプチド又は架橋ペプチドであり得る。別の代替例において、ペプチド部分は、疎水性膜輸送配列 (MTS) を含み得る。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列AAVAALLPAVLLALLAP (配列番号11) を有するRF GFである。疎水性MTSを含有するRF GF類似体 (例

10

20

えば、アミノ酸配列AALLPVLLAAP (配列番号12)) も、標的部分であり得る。ペプチド部分は、細胞膜を介してペプチド、オリゴヌクレオチド、及びタンパク質を含む大型極性分子を運搬することができる「送達」ペプチドであり得る。例えば、HIV Tatタンパク質に由来する配列 (GRKKRRQRRRPPQ) (配列番号13) 及びショウジョウバエアンテナペディア (Drosophila Antennapedia) タンパク質 (RQIKIWFQNRRMKWKK) (配列番号14) は、送達ペプチドとして機能することが可能であることが分かっている。ペプチド又はペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリー、又は1ビーズ1化合物 (one - bead - one - compound) (OBOC) コンビナトリアルライブラリーから特定されたペプチドなどの、DNAのランダム配列によってコードされ得る (Lam et al., Nature, 354 : 82 - 84, 1991)。

30

好ましくは、組み込まれたモノマー単位を介してiRNA剤に結合されたペプチド又はペプチド模倣体は、アルギニン - グリシン - アスパラギン酸 (RGD) - ペプチド、又はRGD模倣体などのペプチドである。ペプチド部分は、約5つのアミノ酸から約40個のアミノ酸の長さの範囲であり得る。ペプチド部分は、安定性又は直接配座特性を高めるためなどの構造修飾を有し得る。後述される構造修飾のいずれも用いられ得る。RGDペプチド部分は、内皮腫瘍細胞又は乳癌腫瘍細胞などの腫瘍細胞を標的とするのに使用され得る (Zitzmann et al., Cancer Res., 62 : 5139 - 43, 2002)。RGDペプチドは、肺、腎臓、脾臓、又は肝臓を含む様々な他の組織の腫瘍に対するiRNA剤の標的化を促進することができる (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8 : 783 - 787, 2001)。好ましくは、RGDペプチドは、腎臓に対するiRNA剤の標的化を促進する。RGDペプチドは、直鎖状又は環状であり得、特定の組織に対する標的化を促進するために、修飾、例えば、グリコシル化又はメチル化され得る。例えば、グリコシル化RGDペプチドは、iRNA剤を、 α ₃ を発現する腫瘍細胞に送達することができる (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42 : 326 - 336, 2001)。増殖細胞に豊富なマーカーを標的とするペプチドが使用され得る。例えば、RGD含有ペプチド及びペプチド模倣体は、癌細胞、特に、インテグリンを示す細胞を標的とすることができる。したがって、RGDペプチド、RGDを含有する環状ペプチド、D - アミノ酸を含むRGDペプチド、ならびに合成RGD模倣体を使用し得る。RGDに加えて、インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使

40

50

用することができる。一般に、このようなりガンドは、増殖細胞及び血管新生を制御するのに使用され得る。このタイプのリガンドの好ましいコンジュゲートは、P E C A M - 1、V E G F、又は他の癌遺伝子、例えば、本明細書に記載される癌遺伝子を標的とする。

【0258】

「細胞透過性ペプチド」は、細胞、例えば、細菌又は真菌細胞などの微生物細胞、あるいはヒト細胞などの哺乳動物細胞を透過することが可能である。微生物細胞を透過するペプチドは、例えば、 α -ヘリックス直鎖状ペプチド（例えば、L L - 37又はC e r o p i n P 1）、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば、 α -デフェンシン、 β -デフェンシン又はバクテネシン（b a c t e n e c i n））、又は1つ若しくは2つの支配的アミノ酸のみを含有するペプチド（例えば、P R - 39又はインドリシジン）であり得る。細胞透過性ペプチドはまた、核局在化シグナル（N L S）を含み得る。例えば、細胞透過性ペプチドは、H I V - 1 g p 4 1の融合ペプチドドメイン及びS V 40大型T抗原のN L Sに由来する、M P Gなどの二分両親媒性ペプチドであり得る（S i m e o n i e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . 3 1 : 2 7 1 7 - 2 7 2 4 , 2 0 0 3）。

【0259】

一実施形態において、標的化ペプチドは、両親媒性 α -ヘリックスペプチドであり得る。例示的な両親媒性 α -ヘリックスペプチドとしては、限定はされないが、セクロピン、リコトキシン（l y c o t o x i n）、パラダキシン（p a r a d a x i n）、プフォリン、C P F、ボンピニン様ペプチド（B L P）、カテリシジン、セラトトキシン（c e r a t o t o x i n）、エボヤ（S . c l a v a）ペプチド、メクラウナギの腸由来の抗菌性ペプチド（H F I A P）、マガイニン、プレビニン-2、デルマセプチン、メリチン、プレウロシジン、H₂Aペプチド、アフリカツメガエル（X e n o p u s）ペプチド、エスクレンチニス-1（e s c u l e n t i n i s - 1）、及びカエリン（c a e r i n）が挙げられる。いくつかの因子が、好ましくは、ヘリックス安定性の完全性を維持するものと考えられる。例えば、最大数のヘリックス安定化残基（例えば、l e u、a l a、又はl y s）が用いられ、最小数のヘリックス不安定化残基（例えば、プロリン、又は環状モノマー単位が用いられる。キャッピング残基が考えられる（例えば、G l yが、例示的なN-キャッピング残基であり、及びN又はC末端アミド化が、ヘリックスを安定させるために追加のH結合を提供するのに使用され得る。i ± 3位、又はi ± 4位だけ離間された、反対の電荷を有する残基間の塩架橋の形成により、安定性が提供され得る。例えば、リジン、アルギニン、ホモ-アルギニン、オルニチン又はヒスチジンなどのカチオン性残基が、アニオン性残基であるグルタミン酸又はアスパラギン酸と塩架橋を形成し得る。

【0260】

ペプチド及びペプチド模倣体リガンドとしては、天然又は修飾ペプチド、例えば、D又はLペプチド； α 、 β 、又は γ ペプチド；N-メチルペプチド；アザペプチド；1つ又は複数の尿素結合、チオ尿素結合、カルバメート結合、又はスルホニル尿素結合で置換された1つ又は複数のアミド結合、即ち、ペプチド結合を有するペプチド；又は環状ペプチドを有するリガンドが挙げられる。

【0261】

標的化リガンドは、特定の受容体を標的とすることが可能な任意のリガンドであり得る。例は、葉酸塩、G a l N A c、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、G a l N A cクラスター、マンノースクラスター、ガラクトースクラスターなどの糖のクラスター、又はアプタマーである。クラスターは、2つ以上の糖単位の組合せである。標的化リガンドは、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、P S M A、エンドセリン、G C P I I、ソマトスタチン、L D L及びH D Lリガンドも含む。リガンドはまた、核酸、例えば、アプタマーに基づき得る。アプタマーは、非修飾であり得、又は本明細書に開示される修飾の任意の組合せを有し得る。

【0262】

エンドソーム放出剤としては、イミダゾール、ポリ又はオリゴイミダゾール、P E I、

10

20

30

40

50

ペプチド、融合性ペプチド、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、マスクオリゴ又はポリカチオン又はアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール/ポリケタール、オルトエステル、マスク又は非マスクカチオン又はアニオン電荷を有するポリマー、マスク又は非マスクカチオン又はアニオン電荷を有する dendrimer が挙げられる。

【0263】

PK調節剤は、薬物動態学的調節剤 (pharmacokinetic modulator) を表す。PK調節剤としては、親油性物質 (lipophile)、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミンなどが挙げられる。例示的なPK調節剤としては、限定はされないが、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられる。いくつかのホスホロチオエート結合を含むオリゴヌクレオチドも、血清タンパク質に結合することが知られており、したがって、骨格に複数のホスホロチオエート結合を含む短鎖オリゴヌクレオチド、例えば、約5塩基、10塩基、15塩基又は20塩基のオリゴヌクレオチドも、リガンドとして (例えば、PK調節リガンドとして) 本発明に適している。

10

【0264】

更に、血清成分 (例えば、血清タンパク質) に結合するアプタマーも、PK調節リガンドとして本発明に適している。

【0265】

本発明に適した他のリガンドコンジュゲートが、2004年8月10日に出願された米国特許出願第10/916,185号明細書; 2004年9月21日に出願された米国特許出願第10/946,873号明細書; 2007年8月3日に出願された米国特許出願第10/833,934号明細書; 2005年4月27日に出願された米国特許出願第11/115,989号明細書、及び2007年11月21日に出願された米国特許出願第11/944,227号明細書に記載されており、これらの文献は、あらゆる目的のために、全体が参照により援用される。

20

【0266】

2つ以上のリガンドが存在する場合、リガンドは、全て同じ特性を有してもよく、全て異なる特性を有してもよく、又は一部のリガンドが同じ特性を有する一方、他のリガンドが異なる特性を有する。例えば、リガンドは、標的化特性を有してもよく、エンドソーム溶解活性を有してもよく、又はPK調節特性を有してもよい。好ましい実施形態において、全てのリガンドが、異なる特性を有する。

30

【0267】

リガンドは、様々な位置、例えば、3'末端、5'末端、及び/又は内部位置で、オリゴヌクレオチドに結合され得る。好ましい実施形態において、リガンドは、介在するテザー、例えば、本明細書に記載される担体を介してオリゴヌクレオチドに結合される。リガンド又は連結配位子は、モノマーが、成長している鎖に組み込まれるとき、モノマーに存在し得る。ある実施形態において、リガンドは、「前駆体」モノマーが、成長している鎖に組み込まれた後、「前駆体」モノマーへの結合によって組み込まれ得る。例えば、アミノ末端のテザーを例えば有するモノマー (即ち、リガンドが結合されていない)、例えば $\text{TA P - (CH}_2\text{)}_n\text{NH}_2$ が、成長しているオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれ得る。その後の作業において、即ち、前駆体モノマーを鎖に組み込んだ後、求電子基を有する、例えば、ペンタフルオロフェニルエステル基又はアルデヒド基を有するリガンドが、その後、リガンドの求電子基を前駆体モノマーのテザーの末端求電子基と結合することによって、前駆体モノマーに結合され得る。

40

【0268】

別の例では、クリック化学反応に関与するのに適した化学基を有するモノマーが、例えば、アジド又はアルキン末端のテザー/リンカーに組み込まれ得る。その後の作業において、即ち、前駆体モノマーを鎖に組み込んだ後、相補的な化学基、例えば、アルキン又はアジドを有するリガンドが、アルキン及びアジドと一緒に結合することによって、前駆体

50

モノマーに結合され得る。

【0269】

二本鎖オリゴヌクレオチドの場合、リガンドが、一方又は両方の鎖に結合され得る。ある実施形態において、二本鎖 iRNA 剤は、センス鎖にコンジュゲートされるリガンドを含む。他の実施形態において、二本鎖 iRNA 剤は、アンチセンス鎖にコンジュゲートされるリガンドを含む。

【0270】

ある実施形態において、リガンドは、核酸分子の核酸塩基、糖部分、又はヌクレオシド間結合にコンジュゲートされ得る。プリン核酸塩基又はその誘導体に対するコンジュゲーションは、環内及び環外原子を含む任意の位置に生じ得る。ある実施形態において、プリン核酸塩基の 2 位、6 位、7 位、又は 8 位が、コンジュゲート部分に結合される。ピリミジン核酸塩基又はその誘導体に対するコンジュゲーションも、任意の位置に生じ得る。ある実施形態において、ピリミジン核酸塩基の 2 位、5 位、及び 6 位が、コンジュゲート部分で置換され得る。ヌクレオシドの糖部分に対するコンジュゲーションは、任意の炭素原子に生じ得る。コンジュゲート部分に結合され得る糖部分の炭素原子の例としては、2'、3'、及び 5' 炭素原子が挙げられる。1' 位も、脱塩基残基中など、コンジュゲート部分に結合され得る。ヌクレオシド間結合も、コンジュゲート部分を有し得る。リン含有結合（例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデートなど）の場合、コンジュゲート部分は、リン原子に直接結合されるか、又はリン原子に結合された O、N、若しくは S 原子に結合され得る。アミン含有又はアミド含有ヌクレオシド間結合（例えば、PNA）の場合、コンジュゲート部分は、アミン若しくはアミドの窒素原子又は隣接する炭素原子に結合され得る。

10

20

【0271】

RNA 干渉の分野における任意の好適なリガンドが使用され得るが、リガンドは、典型的に、炭水化物、例えば、単糖（GalNAc など）、二糖、三糖、四糖、多糖である。

【0272】

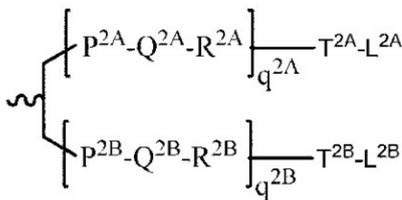
リガンドを核酸にコンジュゲートするリンカーは、上述されるリンカーを含む。例えば、リガンドは、二価又は三価の分枝鎖状リンカーを介して結合される 1 つ又は複数の GalNAc（N-アセチルグルコサミン）誘導体であり得る。

【0273】

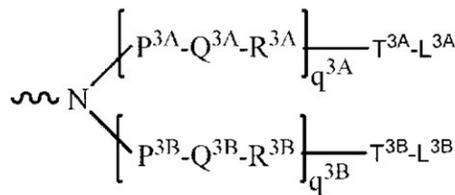
一実施形態において、本発明の dsRNA は、式 (IV) ~ (VII) のいずれかに示される構造を含む二価及び三価の分枝鎖状リンカーにコンジュゲートされる：

30

【化 5】

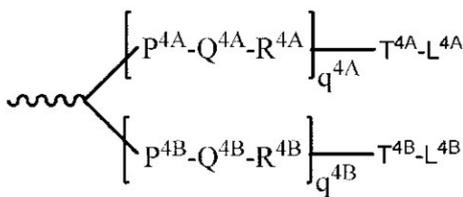


式(IV)

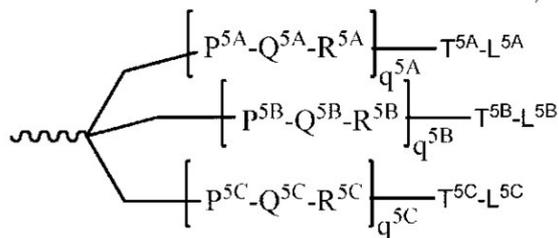


式(V)

40



式(VI)



式(VII)

、又は

50

式中：

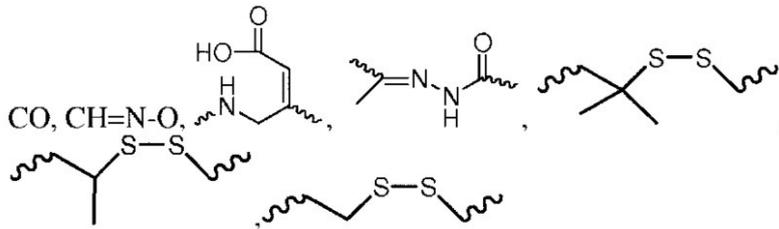
q^{2A} 、 q^{2B} 、 q^{3A} 、 q^{3B} 、 q^{4A} 、 q^{4B} 、 q^{5A} 、 q^{5B} 及び q^{5C} は、各存在に関して独立して0～20を表し、反復単位は、同一又は異なっていてもよく；

p^{2A} 、 p^{2B} 、 p^{3A} 、 p^{3B} 、 p^{4A} 、 p^{4B} 、 p^{5A} 、 p^{5B} 、 p^{5C} 、 T^{2A} 、 T^{2B} 、 T^{3A} 、 T^{3B} 、 T^{4A} 、 T^{4B} 、 T^{4A} 、 T^{5B} 、 T^{5C} は、各々、各存在に関して独立して不在、CO、NH、O、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NH又はCH₂Oであり；

Q^{2A} 、 Q^{2B} 、 Q^{3A} 、 Q^{3B} 、 Q^{4A} 、 Q^{4B} 、 Q^{5A} 、 Q^{5B} 、 Q^{5C} は、各存在に関して独立して不在、アルキレン、置換されたアルキレンであり、ここで、1つ又は複数のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C-C又はC(O)のうちの1つ又は複数により中断又は終結されてもよく；

R^{2A} 、 R^{2B} 、 R^{3A} 、 R^{3B} 、 R^{4A} 、 R^{4B} 、 R^{5A} 、 R^{5B} 、 R^{5C} は、各々、各存在に関して独立して不在、NH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、

【化6】



20

又はヘテロシクリルであり；

L^{2A} 、 L^{2B} 、 L^{3A} 、 L^{3B} 、 L^{4A} 、 L^{4B} 、 L^{5A} 、 L^{5B} 及び L^{5C} は、リガンドを表し；即ち、それぞれ、各存在に関して独立して、単糖(GalNAcなど)、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、又は多糖であり；

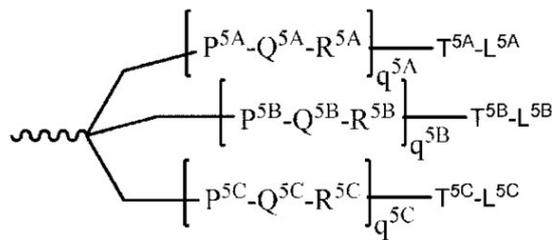
R^a が、H又はアミノ酸側鎖である。

【0274】

式(VII)のものなどの、三価コンジュゲートGalNAc誘導体は、RNAi剤とともに使用されて、標的遺伝子の発現を阻害するのに特に有用である；

30

【化7】



式(VII)

40

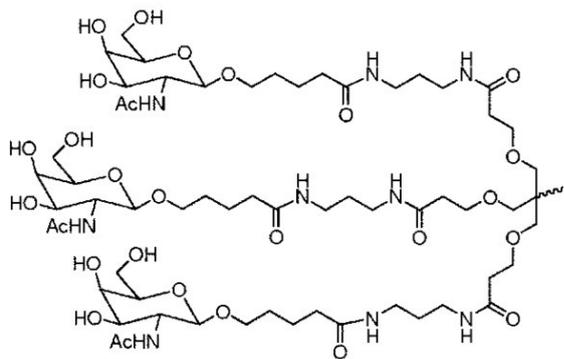
式中、 L^{5A} 、 L^{5B} 及び L^{5C} は、GalNAc誘導体などの単糖を表す。

【0275】

GalNAc誘導体にコンジュゲートする好適な二価及び三価の分枝鎖状結合基の例としては、限定はされないが、以下の化合物が挙げられる：

50

【化 8】



10

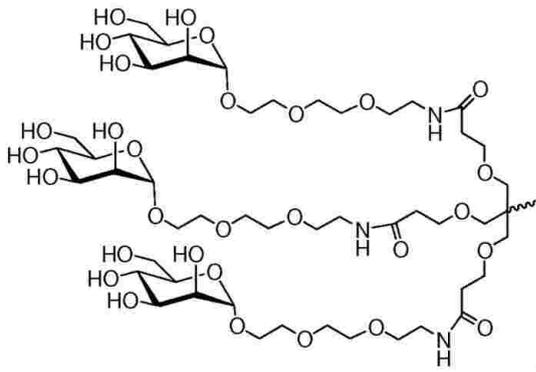
20

30

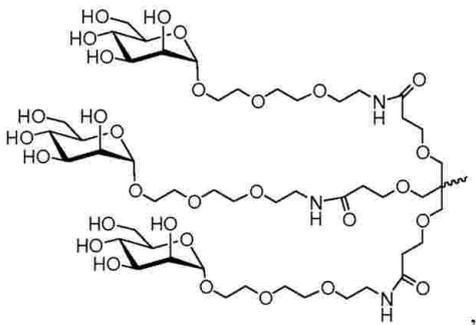
40

50

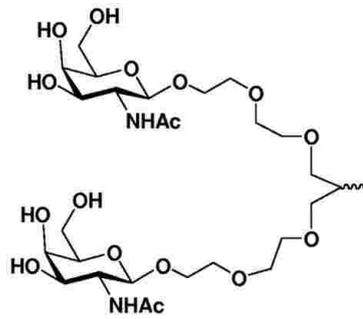
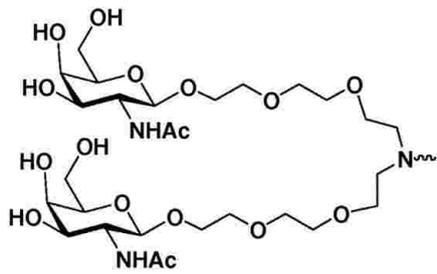
【化9】



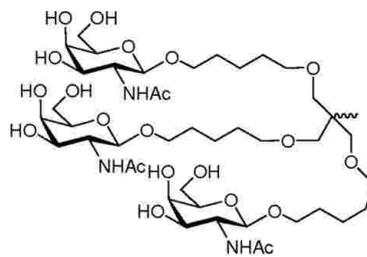
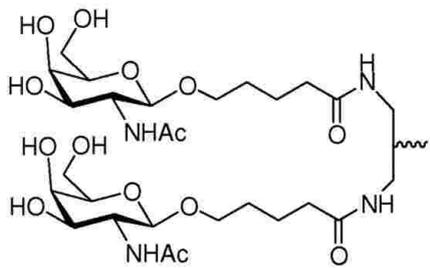
10



20



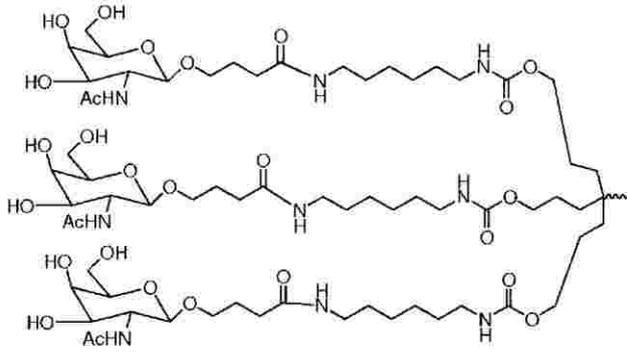
30



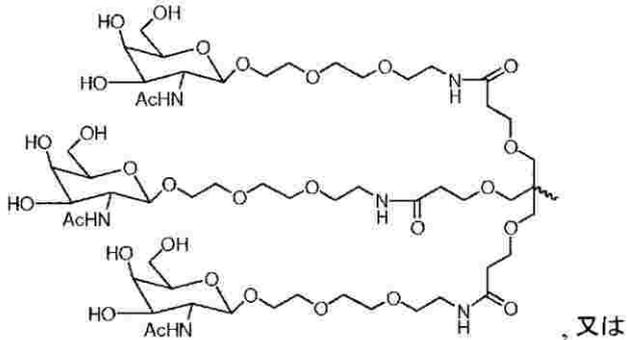
40

50

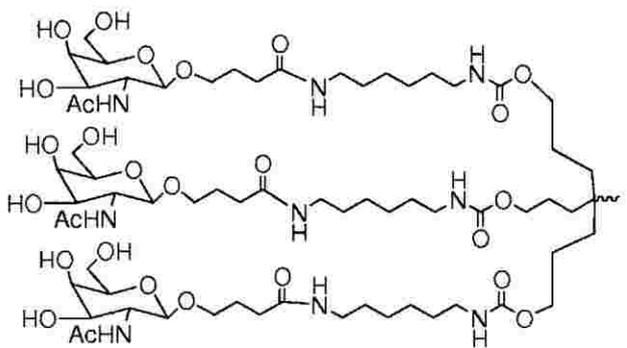
【化 1 0】



10



20



30

【 0 2 7 6】

他の実施形態において、本発明の方法に使用するためのRNAi剤は、AD-59743である。

【 0 2 7 7】

III. 本発明のiRNAの送達

細胞、例えば、ヒト対象（例えば、ヘモクロマトーシスなどのTMPRSS6に関連する障害に罹患している対象などの、iRNA剤を必要とする対象）などの対象中の細胞への本発明のiRNA剤の送達は、いくつかの様々な方法で行うことができる。例えば、送達は、細胞を、本発明のiRNAとインビトロ又はインビボのいずれかで接触させることによって行われ得る。インビボ送達はまた、iRNA、例えば、dsRNAを含む組成物を対象に投与することによって直接行われ得る。あるいは、インビボ送達は、iRNAの発現をコードし、それを導く1つ又は複数のベクターを投与することによって、間接的に行われ得る。これらの代替例は、以下に更に説明される。

40

【 0 2 7 8】

一般に、核酸分子を（インビトロ又はインビボで）送達する任意の方法は、本発明のiRNAとともに使用するために適合され得る（例えば、全体が参照により本明細書に援用される、Akhtar S. and Julian R L., (1992) Trends Cell Biol. 2 (5) : 139 - 144 及び国際公開第94/02595号パン

50

フレットを参照)。インビボ送達の場合、iRNA分子を送達するために考慮される因子としては、例えば、送達される分子の生物学的安定性、非特異的効果の防止、及び標的組織における送達される分子の蓄積が挙げられる。iRNAの非特異的効果は、局所投与によって、例えば、組織への直接注入又は移植によって、あるいは製剤を局所的に投与することによって、最小限に抑えられ得る。処置部位への局所投与は、剤の局所濃度を最大にし、剤によって悪影響を受け得るか又は剤を分解し得る、全身組織への剤の曝露を制限し、投与されるiRNA分子の総投与量を少なくすることができる。いくつかの研究が、iRNAが局所投与される場合の遺伝子産物のノックダウンの成功を示している。例えば、カニクイザルの硝子体内注射によるVEGF dsRNAの眼内送達(Tolentino, M.J. et al., (2004) *Retina* 24:132-138)及びマウスの網膜下注射(Reich, S.J. et al. (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216)は両方とも、加齢性黄斑変性症の実験モデルにおける新血管形成を防ぐことを示した。更に、マウスにおけるdsRNAの直接腫瘍内投与が腫瘍容積を減少させ(Pille, J. et al. (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274)、担癌マウスの生存を延長することができる(Kim, W.J. et al., (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S. et al., (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523)。RNA干渉は、直接注入による中枢神経系への局所送達(Dorn, G. et al., (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, P.H. et al. (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H. et al. (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, G.T., et al. (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, E.R., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneva, Y., et al. (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602)及び鼻腔内投与による肺への局所送達(Howard, K.A. et al., (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X. et al., (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V. et al., (2005) *Nat. Med.* 11:50-55)による成功も示している。疾病の処置のためにiRNAを全身投与するために、RNAは、修飾され得るか、あるいは薬剤送達システムを用いて送達され得る；両方の方法は、インビボでのエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによるdsRNAの急速な分解を防ぐ働きをする。RNA又は医薬担体の修飾は、標的組織へのiRNA組成物の標的化を可能にし、望ましくないオフターゲット効果を回避することもできる。iRNA分子は、細胞取り込みを向上させ、分解を防ぐコレステロールなどの親油基への化学的結合によって修飾され得る。例えば、親油性コレステロール部分にコンジュゲートされるApoBに対するiRNAを、マウスに全身投与し、肝臓及び空腸の両方においてapoB mRNAのノックダウンを得た(Soutschek, J. et al., (2004) *Nature* 432:173-178)。アプタマーへのiRNAのコンジュゲートは、前立腺癌のマウスモデルにおける腫瘍増殖を阻害し、腫瘍退縮を仲介することが示されている(McNamarra, J.O. et al., (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015)。代替的な実施形態において、iRNAは、ナノ粒子、 dendリマー、ポリマー、リポソーム、又はカチオン性送達システムなどの薬剤送達システムを用いて送達され得る。正に帯電したカチオン性送達システムは、iRNA分子(負に帯電した)の結合を促進し、また、負に帯電した細胞膜における相互作用を向上させて、細胞によるiRNAの効率的な取り込みを可能にする。カチオン性脂質、 dendリマー、又はポリマーは、iRNAに結合され得るか、又はiRNAを包む小胞又はミセル(例えば、Kim S.H. et al., (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116を参照)を形成するように誘導され得る。小胞又はミセルの形成は、全身投与される場合のiRNAの分解を更に防ぐ。カチオン性iRNA複合体を作製し、投与するための方法は、十分当業者の能力の範囲内である(例えば、全

10

20

30

40

50

体が参照により本明細書に援用される、Sorensen, DR., et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 327: 761 - 766; Verma, UN. et al., (2003) *Clin. Cancer Res.* 9: 1291 - 1300; Arnold, AS et al., (2007) *J. Hypertens.* 25: 197 - 205を参照)。iRNAの全身送達に有用な薬剤送達システムのいくつかの非限定的な例としては、DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003)、上記参照; Verma, UN. et al., (2003)、上記を参照)、Oligofectamine、「固体核酸脂質粒子」(Zimmermann, TS. et al., (2006) *Nature* 441: 111 - 114)、カルジオリピン (Chien, PY. et al., (2005) *Cancer Gene Ther.* 12: 321 - 328; Pal, A. et al., (2005) *Int J. Oncol.* 26: 1087 - 1091)、ポリエチレンイミン (Bonnet ME. et al., (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3: 472 - 487)、及びポリアミドアミン (Tomalia, DA. et al., (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35: 61 - 67; Yoo, H. et al., (1999) *Pharm. Res.* 16: 1799 - 1804) が挙げられる。ある実施形態において、iRNAは、全身投与のためにシクロデキストリンとともに複合体を形成する。投与のための方法及びiRNAs及びシクロデキストリンの医薬組成物が、全体が参照により本明細書に援用される米国特許第7,427,605号明細書に見出され得る。

【0279】

A. ベクターでコードされた本発明のiRNA

TMPRSS6 遺伝子を標的とするiRNAは、DNA又はRNAベクターに挿入された転写単位から発現され得る (例えば、Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12: 5 - 10; Skilleren, A.らの国際PCT公開番号国際公開第00/22113号パンフレット、Conradの国際PCT公開番号国際公開第00/22114号パンフレット、及びConradの米国特許第6,054,299号明細書を参照)。発現は、使用される特定の構築物及び標的組織又は細胞型に応じて、一時的 (およそ数時間から数週間) であるか又は持続され得る (数週間から数カ月又はそれ以上)。これらの導入遺伝子は、線状構築物、環状プラスミド、又はウイルスベクターとして導入することができ、これらは、組み込み又は非組み込みベクターであり得る。導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして継承されるのを可能にするように構築することもできる (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 1292)。

【0280】

iRNAの個々の1つ又は複数の鎖は、発現ベクターにおけるプロモーターから転写され得る。2本の別個の鎖が発現されて、例えば、dsRNAを生成する場合、2つの別個の発現ベクターが、(例えば、トランスフェクション又は感染によって) 標的細胞中に共導入され得る。あるいは、dsRNAの各個々の鎖が、同じ発現プラスミド上に位置するプロモーターによって転写され得る。一実施形態において、dsRNAは、ステム・ループ構造を有するように、リンカーポリヌクレオチド配列によって接合される逆方向反復ポリヌクレオチドとして発現される。

【0281】

iRNA発現ベクターは、一般に、DNAプラスミド又はウイルスベクターである。真核細胞と適合する発現ベクター、好ましくは、脊椎動物細胞と適合する発現ベクターを用いて、本明細書に記載されるiRNAの発現のための組み換え構築物を産生することができる。真核細胞の発現ベクターは、当該技術分野において周知であり、多くの商業的供給源から入手可能である。通常、所望の核酸セグメントを挿入するのに好都合な制限部位を含むこのようなベクターが提供される。iRNA発現ベクターの送達は、例えば、静脈内

又は筋肉内投与によるか、患者から移植された標的細胞に投与した後に患者に再導入することによるか、又は所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段などによる全身送達であり得る。

【0282】

iRNA発現プラスミドは、カチオン性脂質担体（例えば、Oligofectamine）又は非カチオン性の脂質ベースの担体（例えば、Transit-TKO（商標））との複合体として標的細胞中にトランスフェクトされ得る。1週間以上の期間にわたる標的RNAの異なる領域を標的とするiRNAを介したノックダウンのための複数回の脂質のトランスフェクションも、本発明によって想定される。宿主細胞中へのベクターの導入の成功は、様々な公知の方法を用いて監視され得る。例えば、一過性のトランスフェクションは、緑色蛍光タンパク質（GFP）などの蛍光マーカーなどのレポーターを用いて示され得る。エクスピボでの細胞の安定したトランスフェクションは、トランスフェクト細胞に、ハイグロマイシンB耐性などの、特定の環境因子（例えば、抗生物質及び薬剤）に対する耐性を与えるマーカーを用いて確実にすることができる。

10

【0283】

本明細書に記載される方法及び組成物とともに用いられ得るウイルスベクター系としては、限定はされないが、(a) アデノウイルスベクター；(b) レンチウイルスベクター、モロニー Maus 白血病ウイルスなどを含むがこれらに限定されないレトロウイルスベクター；(c) アデノ随伴ウイルスベクター；(d) 単純ヘルペスウイルスベクター；(e) SV40ベクター；(f) ポリオーマウイルスベクター；(g) パピローマウイルスベクター；(h) ピコルナウイルスベクター；(i) オルソポックス(orthopox)、例えば、ワクシニアウイルスベクター又は鳥ボックス、例えばカナリア痘又は鶏痘などのボックスウイルスベクター；及び(j) ヘルパー依存性又は弱毒アデノウイルスが挙げられる。複製欠損ウイルスも有利であり得る。異なるベクターが、細胞のゲノムに組み込まれるか又は組み込まれないであろう。構築物は、必要に応じて、トランスフェクションのためのウイルス配列を含み得る。あるいは、構築物は、エピソーム複製が可能なベクター、例えばEPV及びEBVベクターに組み込まれ得る。iRNAの組み換え発現のための構築物は、一般に、標的細胞内でのiRNAの発現を確実にするために、調節要素、例えば、プロモーター、エンハンサーなどを必要とする。ベクター及び構築物について考慮される他の態様が、更に後述される。

20

30

【0284】

iRNAの送達に有用なベクターは、所望の標的細胞又は組織におけるiRNAの発現に十分な調節要素（プロモーター、エンハンサーなど）を含むであろう。調節要素は、構成的発現又は調節性/誘導性発現のいずれかを提供するように選択され得る。

【0285】

iRNAの発現は、例えば、特定の生理的調節因子、例えば、血中グルコースレベル、又はホルモンに対して感受性がある誘導性調節配列を使用することによって、正確に調節され得る(Docherty et al., 1994, FASEB J. 8: 20-24)。細胞又は哺乳動物におけるdsRNAの発現の制御に好適なこのような誘導性発現系は、例えば、エクジソン、エストロゲン、プロゲステロン、テトラサイクリン、二量化の化学誘導物質、及びイソプロピル-D1-チオガラクトピラノシド(IPTG)による調節を含む。当業者は、iRNA導入遺伝子の目的とする使用に基づいて、適切な調節/プロモーター配列を選択することができるであろう。

40

【0286】

iRNAをコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用され得る。例えば、レトロウイルスベクターが使用され得る(Miller et al., Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)を参照)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの適切なパッケージング及び宿主細胞DNAへの組み込みに必要な構成要素を含有する。iRNAをコードする核酸配列は、患者への核酸の送達を促進する、1つ又は複数のベクターにクローニングされる。レトロウイルスベクターについての更な

50

る詳細は、例えば、Boesen et al., *Biotherapy* 6:291-302 (1994)に見出すことができ、これには、造血幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、造血幹細胞にmdr1遺伝子を送達するレトロウイルスベクターの使用が記載されている。遺伝子療法におけるレトロウイルスベクターの使用を示す他の参考文献は、Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); 及び Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993)である。使用のために考えられるレンチウイルスベクターとしては、例えば、参照により本明細書に援用される、米国特許第6,143,520号明細書; 同第5,665,557号明細書; 及び同第5,981,276号明細書に記載されるHIVに基づいたベクターが挙げられる。

10

【0287】

アデノウイルスも、本発明のiRNAの送達における使用のために考えられる。アデノウイルスは、例えば、呼吸上皮に遺伝子を送達するための特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、本来、呼吸上皮に感染し、軽度の疾病を引き起こす。アデノウイルスに基づいた送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、及び筋肉である。アデノウイルスには、非分裂細胞に感染することが可能であるという利点がある。Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993)には、アデノウイルスに基づいた遺伝子療法の概説が示されている。Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994)は、アカゲザルの呼吸上皮に遺伝子を移送するアデノウイルスベクターの使用を示した。遺伝子療法におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155; Mastrangeli et al. (1992), *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); PCT公報の国際公開第94/12649号パンフレット; 及びWang et al., *Gene Therapy* 2:775-783 (1995)に見出すことができる。本発明に取り上げられるiRNAを発現するのに好適なAVベクター、組み換えAVベクターを構築するための方法、及びベクターを標的細胞中に送達するための方法が、Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20:1006-1010に記載されている。

20

30

【0288】

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターも、本発明のiRNAを送達するのに使用され得る(Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号明細書)。一実施形態において、iRNAは、例えば、U6若しくはH1 RNAプロモーター、又はサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターのいずれかを有する組み換えAAVベクターから、2つの別個の相補的な一本鎖RNA分子として発現され得る。本発明に取り上げられるdsRNAを発現するのに好適なAAVベクター、組み換えAVベクターを構築するための方法、及びベクターを標的細胞中に送達するための方法が、全開示内容が参照により本明細書に援用される、Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61:3096-3101; Fisher K J et al. (1996), *J. Virol.* 70:520-532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63:3822-3826; 米国特許第5,252,479号明細書; 米国特許第5,139,941号明細書; 国際特許出願番号国際公開第94/13788号パンフレット; 及び国際特許出願番号国際公開第93/24641号パンフレットに記載されている。

40

【0289】

50

本発明の*iRNA*の送達に好適な別のウイルスベクターは、ワクシニアウイルス、例えば、改変ウイルスアンカラ(Modified Virus Ankara)(MVA)又はNYVACなどの弱毒化ワクシニア、鶏痘又はカナリア痘などの鳥ポックスなどのポックスウイルスである。

【0290】

ウイルスベクターの指向性は、エンペロータンパク質又は他のウイルスからの他の表面抗原を用いてベクターをシュードタイピングする(pseudotype)ことによって、又は異なるウイルスカプシドタンパク質を必要に応じて置換することによって、改変され得る。例えば、レンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、狂犬病、エボラ、モコラなどからの表面タンパク質を用いてシュードタイピングされ得る。AAVベクターは、異なるカプシドタンパク質血清型を発現するようにこのベクターを操作することによって、異なる細胞を標的とするように作製され得る。例えば、全開示内容が参照により本明細書に援用されるRabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801を参照。

【0291】

ベクターの医薬製剤は、許容できる希釈剤中のベクターを含むことができ、又は遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる徐放性マトリックスを含むことができる。あるいは、組み換え細胞から、完全な遺伝子送達ベクター、例えば、レトロウイルスベクターが無傷で産生され得る場合、医薬製剤は、遺伝子送達システムを産生する1つ又は複数の細胞を含むことができる。

【0292】

IV. 本発明の医薬組成物

本発明は、本発明の*iRNA*を含む医薬組成物及び製剤も含む。一実施形態において、本明細書に記載される*iRNA*と、薬学的に許容され得る担体とを含有する医薬組成物も本明細書に提供される。*iRNA*を含有する医薬組成物は、TMPRSS6に関連する疾病又は障害、例えば、ヘモクロマトーシスを処置するのに有用である。このような医薬組成物は、送達様式に基づいて製剤化される。一例は、非経口投与を介した、例えば、静脈内(IV)送達による全身投与用に製剤化される組成物である。別の例は、例えば、持続性ポンプ注入などによる脳への注入による、脳実質への直接送達用に製剤化される組成物である。

【0293】

本発明のRNAi剤を含む医薬組成物は、例えば、緩衝液を含むか又は含まない溶液、又は薬学的に許容され得る担体を含有する組成物であり得る。このような組成物としては、例えば、水性又は結晶性組成物、リポソーム製剤、ミセル製剤、エマルジョン、及び遺伝子治療ベクターが挙げられる。

【0294】

本発明の方法において、RNAi剤は、溶液中で投与され得る。遊離RNAi剤は、非緩衝液、例えば、生理食塩水又は水中で投与され得る。あるいは、遊離*siRNA*はまた、好適な緩衝液中で投与され得る。緩衝液は、酢酸塩、クエン酸塩、プロタミン、炭酸塩、又はリン酸塩、又はそれらの任意の組合せを含み得る。好ましい実施形態において、緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。RNAi剤を含有する緩衝液のpH及び浸透圧は、対象に投与するのに好適なように調整され得る。

【0295】

ある実施形態において、浸透圧が、所望の値、例えば、ヒト血漿の生理学的値(physiologic value)に保持されるように、緩衝液は、溶液の浸透圧を制御するための剤に更に含む。浸透圧を制御するために緩衝液に加えられ得る溶質としては、限定はされないが、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、非代謝ポリマー、ビタミン、イオン、糖、代謝産物、有機酸、脂質、又は塩が挙げられる。ある実施形態において、溶液の浸透圧を制御するための剤は、塩である。特定の実施形態において、溶液の浸透圧を制御するための剤は、塩化ナトリウム又は塩化カリウムである。

【 0 2 9 6 】

本発明の医薬組成物は、T M P R S S 6 遺伝子の発現を阻害するのに十分な投与量で投与され得る。

【 0 2 9 7 】

一般に、本発明の i R N A の好適な用量は、1日当たりレシピエントの体重1キログラムにつき約0.001~約200.0ミリグラムの範囲、一般に、1日当たり体重1キログラムにつき約1~50mgの範囲である。例えば、d s R N A は、単回投与当たり約0.01mg/kg、約0.05mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約1.5mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約20mg/kg、約30mg/kg、約40mg/kg、又は約50mg/kgで投与され得る。

10

【 0 2 9 8 】

例えば、R N A i 剤、例えばd s R N A は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、又は約10mg/kgの用量で投与され得る。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

20

【 0 2 9 9 】

別の実施形態において、R N A i 剤、例えばd s R N A は、約0.1~約50mg/kg、約0.25~約50mg/kg、約0.5~約50mg/kg、約0.75~約50mg/kg、約1~約50mg/kg、約1.5~約50mg/kg、約2~約50mg/kg、約2.5~約50mg/kg、約3~約50mg/kg、約3.5~約50mg/kg、約4~約50mg/kg、約4.5~約50mg/kg、約5~約50mg/kg、約7.5~約50mg/kg、約10~約50mg/kg、約15~約50mg/kg、約20~約50mg/kg、約20~約50mg/kg、約25~約50mg/kg、約25~約50mg/kg、約30~約50mg/kg、約35~約50mg/kg、約40~約50mg/kg、約45~約50mg/kg、約0.1~約45mg/kg、約0.25~約45mg/kg、約0.5~約45mg/kg、約0.75~約45mg/kg、約1~約45mg/kg、約1.5~約45mg/kg、約2~約45mg/kg、約2.5~約45mg/kg、約3~約45mg/kg、約3.5~約45mg/kg、約4~約45mg/kg、約4.5~約45mg/kg、約5~約45mg/kg、約7.5~約45mg/kg、約10~約45mg/kg、約15~約45mg/kg、約20~約45mg/kg、約20~約45mg/kg、約25~約45mg/kg、約25~約45mg/kg、約30~約45mg/kg、約35~約45mg/kg、約40~約45mg/kg、約0.1~約40mg/kg、約0.25~約40mg/kg、約0.5~約40mg/kg、約0.75~約40mg/kg、約1~約40mg/kg、約1.5~約40mg/kg、約2~約40mg/kg、約2.5~約40mg/kg、約3~約40mg/kg、約3.5~約40mg/kg、約4~約40mg/kg、約4.5~約40mg/kg、約5~約40mg/kg、約7.5~約40mg/kg、約10~約40mg/kg、約15~約40mg/kg、約20~約40mg/kg、約20~約40mg/kg、約25~約40mg/kg、約25~約40mg/kg、約30~約40mg/kg、約35~約40mg/kg、約0.1~約30mg/kg、約0.

30

40

50

2.5 ~ 約30 mg / kg、約0.5 ~ 約30 mg / kg、約0.75 ~ 約30 mg / kg、約1 ~ 約30 mg / mg、約1.5 ~ 約30 mg / kb、約2 ~ 約30 mg / kg、約2.5 ~ 約30 mg / kg、約3 ~ 約30 mg / kg、約3.5 ~ 約30 mg / kg、約4 ~ 約30 mg / kg、約4.5 ~ 約30 mg / kg、約5 ~ 約30 mg / kg、約7.5 ~ 約30 mg / kg、約10 ~ 約30 mg / kg、約15 ~ 約30 mg / kg、約20 ~ 約30 mg / kg、約20 ~ 約30 mg / kg、約25 ~ 約30 mg / kg、約0.1 ~ 約20 mg / kg、約0.25 ~ 約20 mg / kg、約0.5 ~ 約20 mg / kg、約0.75 ~ 約20 mg / kg、約1 ~ 約20 mg / mg、約1.5 ~ 約20 mg / kb、約2 ~ 約20 mg / kg、約2.5 ~ 約20 mg / kg、約3 ~ 約20 mg / kg、約3.5 ~ 約20 mg / kg、約4 ~ 約20 mg / kg、約4.5 ~ 約20 mg / kg、約5 ~ 約20 mg / kg、約7.5 ~ 約20 mg / kg、約10 ~ 約20 mg / kg、又は約15 ~ 約20 mg / kgの用量で投与される。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

10

【0300】

例えば、RNAi剤、例えばdsRNAは、約0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、又は約10 mg / kgの用量で投与され得る。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

20

【0301】

別の実施形態において、RNAi剤、例えばdsRNAは、約0.5 ~ 約50 mg / kg、約0.75 ~ 約50 mg / kg、約1 ~ 約50 mg / mg、約1.5 ~ 約50 mg / kg、約2 ~ 約50 mg / kg、約2.5 ~ 約50 mg / kg、約3 ~ 約50 mg / kg、約3.5 ~ 約50 mg / kg、約4 ~ 約50 mg / kg、約4.5 ~ 約50 mg / kg、約5 ~ 約50 mg / kg、約7.5 ~ 約50 mg / kg、約10 ~ 約50 mg / kg、約15 ~ 約50 mg / kg、約20 ~ 約50 mg / kg、約20 ~ 約50 mg / kg、約25 ~ 約50 mg / kg、約25 ~ 約50 mg / kg、約30 ~ 約50 mg / kg、約35 ~ 約50 mg / kg、約40 ~ 約50 mg / kg、約45 ~ 約50 mg / kg、約0.5 ~ 約45 mg / kg、約0.75 ~ 約45 mg / kg、約1 ~ 約45 mg / mg、約1.5 ~ 約45 mg / kb、約2 ~ 約45 mg / kg、約2.5 ~ 約45 mg / kg、約3 ~ 約45 mg / kg、約3.5 ~ 約45 mg / kg、約4 ~ 約45 mg / kg、約4.5 ~ 約45 mg / kg、約5 ~ 約45 mg / kg、約7.5 ~ 約45 mg / kg、約10 ~ 約45 mg / kg、約15 ~ 約45 mg / kg、約20 ~ 約45 mg / kg、約20 ~ 約45 mg / kg、約25 ~ 約45 mg / kg、約25 ~ 約45 mg / kg、約30 ~ 約45 mg / kg、約35 ~ 約45 mg / kg、約40 ~ 約45 mg / kg、約0.5 ~ 約40 mg / kg、約0.75 ~ 約40 mg / kg、約1 ~ 約40 mg / mg、約1.5 ~ 約40 mg / kb、約2 ~ 約40 mg / kg、約2.5 ~ 約40 mg / kg、約3 ~ 約40 mg / kg、約3.5 ~ 約40 mg / kg、約4 ~ 約40 mg / kg、約4.5 ~ 約40 mg / kg、約5 ~ 約40 mg / kg、約7.5 ~ 約40 mg / kg、約10 ~ 約40 mg / kg、約15 ~ 約40 mg / kg、約20 ~ 約40 mg / kg、約20 ~ 約40 mg / kg、約25 ~ 約40 mg / kg、約25 ~ 約40 mg / kg、約30 ~ 約40 mg / kg、約35 ~ 約40 mg / kg、約0.5 ~ 約30 mg / kg、約0.75 ~ 約30 m

30

40

50

g / k g、約 1 ~ 約 3 0 m g / m g、約 1 . 5 ~ 約 3 0 m g / k b、約 2 ~ 約 3 0 m g / k g、約 2 . 5 ~ 約 3 0 m g / k g、約 3 ~ 約 3 0 m g / k g、約 3 . 5 ~ 約 3 0 m g / k g、約 4 ~ 約 3 0 m g / k g、約 4 . 5 ~ 約 3 0 m g / k g、約 5 ~ 約 3 0 m g / k g、約 7 . 5 ~ 約 3 0 m g / k g、約 1 0 ~ 約 3 0 m g / k g、約 1 5 ~ 約 3 0 m g / k g、約 2 0 ~ 約 3 0 m g / k g、約 2 0 ~ 約 3 0 m g / k g、約 2 5 ~ 約 3 0 m g / k g、約 0 . 5 ~ 約 2 0 m g / k g、約 0 . 7 5 ~ 約 2 0 m g / k g、約 1 ~ 約 2 0 m g / m g、約 1 . 5 ~ 約 2 0 m g / k b、約 2 ~ 約 2 0 m g / k g、約 2 . 5 ~ 約 2 0 m g / k g、約 3 ~ 約 2 0 m g / k g、約 3 . 5 ~ 約 2 0 m g / k g、約 4 ~ 約 2 0 m g / k g、約 4 . 5 ~ 約 2 0 m g / k g、約 5 ~ 約 2 0 m g / k g、約 7 . 5 ~ 約 2 0 m g / k g、約 1 0 ~ 約 2 0 m g / k g、又は約 1 5 ~ 約 2 0 m g / k g の用量で投与される。一実施形態において、d s R N A は、約 1 0 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g の用量で投与される。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

10

【 0 3 0 2 】

例えば、対象に、約 0 . 5、0 . 6、0 . 7、0 . 8、0 . 9、1、1 . 1、1 . 2、1 . 3、1 . 4、1 . 5、1 . 6、1 . 7、1 . 8、1 . 9、2、2 . 1、2 . 2、2 . 3、2 . 4、2 . 5、2 . 6、2 . 7、2 . 8、2 . 9、3、3 . 1、3 . 2、3 . 3、3 . 4、3 . 5、3 . 6、3 . 7、3 . 8、3 . 9、4、4 . 1、4 . 2、4 . 3、4 . 4、4 . 5、4 . 6、4 . 7、4 . 8、4 . 9、5、5 . 1、5 . 2、5 . 3、5 . 4、5 . 5、5 . 6、5 . 7、5 . 8、5 . 9、6、6 . 1、6 . 2、6 . 3、6 . 4、6 . 5、6 . 6、6 . 7、6 . 8、6 . 9、7、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4、7 . 5、7 . 6、7 . 7、7 . 8、7 . 9、8、8 . 1、8 . 2、8 . 3、8 . 4、8 . 5、8 . 6、8 . 7、8 . 8、8 . 9、9、9 . 1、9 . 2、9 . 3、9 . 4、9 . 5、9 . 6、9 . 7、9 . 8、9 . 9、1 0、1 0 . 5、1 1、1 1 . 5、1 2、1 2 . 5、1 3、1 3 . 5、1 4、1 4 . 5、1 5、1 5 . 5、1 6、1 6 . 5、1 7、1 7 . 5、1 8、1 8 . 5、1 9、1 9 . 5、2 0、2 0 . 5、2 1、2 1 . 5、2 2、2 2 . 5、2 3、2 3 . 5、2 4、2 4 . 5、2 5、2 5 . 5、2 6、2 6 . 5、2 7、2 7 . 5、2 8、2 8 . 5、2 9、2 9 . 5、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、又は約 5 0 m g / k g などの治療量の i R N A を投与してもよい。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

20

30

【 0 3 0 3 】

特定の実施形態において、例えば、本発明の組成物が、本明細書に記載される d s R N A 及び脂質を含む場合、対象には、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 0 . 0 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0 . 0 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 0 . 2 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0 . 2 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 0 . 3 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0 . 3 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 0 . 4 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0 . 4 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 0 . 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 1 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 1 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 1 . 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 1 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 2 m g / k g ~ 約 約 2 . 5 m g / k g、約 2 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 3 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 3 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 3 . 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4 . 5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 4 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 5 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 6 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 6 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 7 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 7 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 8 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 8 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、約 9 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g、又は約 9 . 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g などの、治療量の i R N A が投与され得る。記載される値の中間の値及び

40

50

範囲も、本発明の一部であることが意図される。

【0304】

例えば、dsRNAは、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、又は約10mg/kgの用量で投与され得る。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

10

【0305】

本発明の特定の実施形態において、例えば、二本鎖RNAi剤が、修飾（例えば、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾の1つ又は複数のモチーフ（剤の切断部位又はその近傍に1つのこのようなモチーフを含む））、6つのホスホロチオエート結合、及びリガンドを含む場合、このような剤は、約0.01~約0.5mg/kg、約0.01~約0.4mg/kg、約0.01~約0.3mg/kg、約0.01~約0.2mg/kg、約0.01~約0.1mg/kg、約0.01mg/kg~約0.09mg/kg、約0.01mg/kg~約0.08mg/kg、約0.01mg/kg~約0.07mg/kg、約0.01mg/kg~約0.06mg/kg、約0.01mg/kg~約0.05mg/kg、約0.02~約0.5mg/kg、約0.02~約0.4mg/kg、約0.02~約0.3mg/kg、約0.02~約0.2mg/kg、約0.02~約0.1mg/kg、約0.02mg/kg~約0.09mg/kg、約0.02mg/kg~約0.08mg/kg、約0.02mg/kg~約0.07mg/kg、約0.02mg/kg~約0.06mg/kg、約0.02mg/kg~約0.05mg/kg、約0.03~約0.5mg/kg、約0.03~約0.4mg/kg、約0.03~約0.3mg/kg、約0.03~約0.2mg/kg、約0.03~約0.1mg/kg、約0.03mg/kg~約0.09mg/kg、約0.03mg/kg~約0.08mg/kg、約0.03mg/kg~約0.07mg/kg、約0.03mg/kg~約0.06mg/kg、約0.03mg/kg~約0.05mg/kg、約0.04~約0.5mg/kg、約0.04~約0.4mg/kg、約0.04~約0.3mg/kg、約0.04~約0.2mg/kg、約0.04~約0.1mg/kg、約0.04mg/kg~約0.09mg/kg、約0.04mg/kg~約0.08mg/kg、約0.04mg/kg~約0.07mg/kg、約0.04mg/kg~約0.06mg/kg、約0.05~約0.5mg/kg、約0.05~約0.4mg/kg、約0.05~約0.3mg/kg、約0.05~約0.2mg/kg、約0.05~約0.1mg/kg、約0.05mg/kg~約0.09mg/kg、約0.05mg/kg~約0.08mg/kg、又は約0.05mg/kg~約0.07mg/kgの用量で投与される。上記の記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図され、例えば、RNAi剤は、約0.015mg/kg~約0.45mg/kgの用量で対象に投与され得る。

20

30

40

【0306】

例えば、RNAi剤、例えば、医薬組成物中のRNAi剤は、約0.01mg/kg、0.0125mg/kg、0.015mg/kg、0.0175mg/kg、0.02mg/kg、0.0225mg/kg、0.025mg/kg、0.0275mg/kg、0.03mg/kg、0.0325mg/kg、0.035mg/kg、0.0375mg/kg、0.04mg/kg、0.0425mg/kg、0.045mg/kg、0.0475mg/kg、0.05mg/kg、0.0525mg/kg、0.055mg/kg

50

kg、0.0575 mg/kg、0.06 mg/kg、0.0625 mg/kg、0.065 mg/kg、0.0675 mg/kg、0.07 mg/kg、0.0725 mg/kg、0.075 mg/kg、0.0775 mg/kg、0.08 mg/kg、0.0825 mg/kg、0.085 mg/kg、0.0875 mg/kg、0.09 mg/kg、0.0925 mg/kg、0.095 mg/kg、0.0975 mg/kg、0.1 mg/kg、0.125 mg/kg、0.15 mg/kg、0.175 mg/kg、0.2 mg/kg、0.225 mg/kg、0.25 mg/kg、0.275 mg/kg、0.3 mg/kg、0.325 mg/kg、0.35 mg/kg、0.375 mg/kg、0.4 mg/kg、0.425 mg/kg、0.45 mg/kg、0.475 mg/kg、又は約0.5 mg/kgの用量で投与され得る。上記の記載される値の中間の値も、本発明の一部であることが意図される。

10

【0307】

医薬組成物は、一日1回投与することができ、又はiRNAは、1日を通して適切な間隔で、2、3以上のサブ用量として投与され、又は更には、連続注入若しくは徐放製剤を介した送達を用いて投与されてもよい。その場合、各サブ用量に含まれるiRNAは、総一日投与量を達成するように、対応してより少量である必要がある。投与単位はまた、例えば数日間の期間に亘るiRNAの持続放出を提供する従来の持続放出製剤を使用して、数日間に亘る送達用に配合されてもよい。持続放出製剤は当技術分野にて周知であり、薬剤を特定の部位に送達するのに特に有用であるため、本発明の薬剤と共に使用することができる。この実施形態において、投与単位は、一日用量の対応する倍数を含む。

20

【0308】

他の実施形態において、医薬組成物の単回投与は、長続きすることができるため、その後の用量は、3、4、又は5日以下の間隔、あるいは1、2、3、又は4週間以下の間隔で投与される。本発明のある実施形態において、本発明の医薬組成物の単回投与は、週に1回投与される。本発明の他の実施形態において、本発明の医薬組成物の単回投与は、2ヶ月に1回(bi-monthly)投与される。

【0309】

当業者は、非限定的に疾病又は疾患の重篤さ、以前の処置、対象の全体的な健康及び/又は年齢、並びに存在する他の疾病を含む所定の因子が対象を効果的に処置するのに必要な投与量及び時間に影響し得ることを認識するであろう。更に、治療的有効量の組成物による対象の処置は、単一の処置又は一連の処置を含み得る。本発明により包含される個々のiRNAに関する有効な投与量、及びインビボでの半減期は、従来の方法論を用いて、又は、本明細書の他の箇所に記載されるような適切な動物モデルを使用したインビボでの試験に基づいて概算することができる。

30

【0310】

マウス遺伝学の進歩により、TMPRSS6の発現の低下から利益を得られ得る鉄過剰に関連する疾患などの、様々なヒトの疾病の研究用の多くのマウスモデルが生成された。このようなモデルは、iRNAのインビボ試験のために、並びに治療に有効な用量を決定するために使用され得る。好適なマウスモデルは、当該技術分野において公知であり、これらとしては、例えば、サラセミアのモデルとしてのサラセミアTh3/+マウス(Douet et al., Am. J. Pathol. (2011), 178(2): 774-83)、遺伝性ヘモクロマトーシスのモデルとしてのHFEノックアウトマウス(Zhou et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2492-2497); 先天性赤芽球性ポルフィリン症のモデルとしてのUros(mut248)マウス(Ged et al. (2006) Genomics, 87(1): 84-92)が挙げられる。

40

【0311】

本発明の医薬組成物は、局所的又は全身的処置が必要かどうか及び処置される部位に応じて、いくつかの方法で投与され得る。投与は、局所投与(例えば、経皮パッチによる)、例えば、噴霧器などによる、粉末又はエアロゾルの吸入又は吹送による経肺投与; 気管

50

内、鼻腔内、表皮及び経皮、経口又は非経口投与であり得る。非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内又は筋肉内注射又は注入；例えば、埋め込みデバイスによる皮下投与；又は例えば、実質内、髄腔内若しくは脳室内投与による頭蓋内投与が挙げられる。

【0312】

iRNAは、肝臓（例えば、肝臓の肝細胞）などの特定の組織を標的とするように送達され得る。

【0313】

局所投与用の医薬組成物及び製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、坐薬、噴霧剤、液剤及び散剤が挙げられる。従来の医薬担体、水性、粉末又は油性基剤、増粘剤などが必要であり、又は所望され得る。被覆コンドーム、手袋なども有用であり得る。好適な局所製剤は、本発明を特徴付けるiRNAが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化剤及び界面活性剤などの局所送達薬剤との混合物であるものを含む。好適な脂質及びリポソームは、中性（例えば、ジオレイルホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリンDMP C、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰イオン性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロールDMP G）及び陽イオン性（例えば、ジオレイルテトラメチルアミノプロピルDOTAP及びジオレイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA）を含む。本発明を特徴付けるiRNAは、リポソーム中に封入されることができ、又はリポソームに対して、特に陽イオン性リポソームに対して錯体を形成することができる。代替的に、iRNAは、脂質に対して、特に陽イオン性脂質に対して錯体化されてもよい。好適な脂肪酸及びエステルには、非限定的にアラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、又はC₁~20アルキルエステル（例えば、ミリスチン酸イソプロピルIPM）、モノグリセリド、ジグリセリド又はこれらの薬学的に許容され得る塩が挙げられる。局所製剤は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,747,014号明細書に詳細に記載されている。

【0314】

A. 膜分子集合体を含むiRNA製剤

本発明の組成物及び方法に使用するためのiRNAは、膜分子集合体、例えば、リポソーム又はミセル中の送達用に製剤化され得る。本明細書において使用される際、「リポソーム」という用語は、少なくとも1つの二重層、例えば、1つの二重層又は複数の二重層に配置された両親媒性の脂質から構成される小胞を指す。リポソームは、親油性材料及び水性内部から形成される膜を有する単層及び多層小胞を含む。水性部分は、iRNA組成物を含有する。親油性材料は、水性外部から水性内部を分離し、通常、iRNA組成物を含まないが、場合によっては、含むことがある。リポソームは、作用部位への活性成分の移送及び送達に有用である。リポソーム膜は生体膜と構造が類似しているため、リポソームが組織に付着されると、リポソームの二重層が、細胞膜の二重層と融合する。リポソーム及び細胞の融合が進むにつれて、iRNAを含む内部の水性内容物が、細胞に送達され、ここで、iRNAは、標的RNAに特異的に結合することができ、RNAiを仲介することができる。場合によっては、リポソームはまた、例えば、iRNAを特定の細胞型に指向するように、特異的に標的化される。

【0315】

RNAi剤を含有するリポソームは、様々な方法によって調製され得る。一例において、リポソームの脂質成分は、ミセルが脂質成分で形成されるように、洗剤に溶解される。例えば、脂質成分は、両親媒性のカチオン性脂質又は脂質コンジュゲートであり得る。洗剤は、高い臨界ミセル濃度を有することができ、非イオン性であり得る。例示的な洗剤としては、コール酸塩、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸塩、及びラウロイルサルコシンが挙げられる。次に、RNAi剤の調製物は、脂質成分を含むミセルに

10

20

30

40

50

加えられる。脂質におけるカチオン性基は、RNAi剤と相互作用し、RNAi剤の周りで縮合して、リポソームを形成する。縮合の後、洗剤は、例えば透析によって除去されて、RNAi剤のリポソーム製剤が得られる。

【0316】

必要に応じて、縮合を補助する担体化合物が、例えば、制御添加によって、縮合反応中に加えられる。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えば、スペルミン又はスペルミジン）であり得る。縮合を補助するためにpHも調整され得る。

【0317】

送達ビヒクルの構成成分としてポリヌクレオチド/カチオン性脂質複合体を組み込む安定したポリヌクレオチド送達ビヒクルを生成するための方法が、例えば、全内容が参照により本明細書に援用される国際公開第96/37194号パンフレットに更に記載されている。リポソーム形成は、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8: 7413 - 7417, 1987; 米国特許第4,897,355号明細書; 米国特許第5,171,678号明細書; Bangham et al., M. Mol. Biol. 23: 238, 1965; Olson et al., Biochim. Biophys. Acta 557: 9, 1979; Szoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew et al., Biochim. Biophys. Acta 775: 169, 1984; Kim et al., Biochim. Biophys. Acta 728: 339, 1983; 及び Fukunaga et al., Endocrinol. 115: 757, 1984に記載される例示的な方法の1つ又は複数の態様も含み得る。送達ビヒクルとして使用するのに適切なサイズの脂質集合体を調製するための一般的に使用される技術としては、超音波処理ならびに凍結融解及び押し出しが挙げられる（例えば、Mayer et al., Biochim. Biophys. Acta 858: 161, 1986を参照）。一貫して小さく（50~200nm）且つ比較的均一な集合体が所望される場合、顕微溶液化（microfluidization）が使用され得る（Mayhew et al., Biochim. Biophys. Acta 775: 169, 1984）。これらの方法は、RNAi剤の調製物をリポソームにパッケージングするのに容易に適合される。

【0318】

リポソームは、2つの大きなクラスに分かれる。陽イオン性リポソームは、負に帯電された核酸分子と相互作用して安定な複合体を形成する正に帯電されたりポソームである。正に帯電された核酸/リポソーム複合体は負に帯電された細胞表面に結合し、エンドソーム内に移行される。エンドソーム内の酸性pHによって、リポソームが破裂され、それらの内容物を細胞質内に放出する（Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980 - 985）。

【0319】

pH感受性かつ負に帯電されたりポソームは、核酸と複合するのではなく、核酸を捕捉する。核酸及び脂質の両方は同様に帯電されるため、複合体形成ではなく反発が起こる。にも係わらず、いくつかの核酸はこれらのリポソームの水性内部内に捕捉される。pH感受性リポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードする核酸を培養物中の細胞単層に送達するよう使用されている。標的細胞内で外来遺伝子の発現が検出された（Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269~274）。

【0320】

リポソーム組成物の主要なタイプは、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。例えば中性リポソーム組成物は、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）又はジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）から形成され得る。陰イオン性リポソーム組成物は一般に、ジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成される一方、陰イオン性膜融合リポソームは、主としてジオレイルホスファチジルエタノー

10

20

30

40

50

ルアミン (DOPE) から形成される。他のタイプのリポソーム組成物は、例えば、大豆 PC、及び卵 PC などのホスファチジルコリン (PC) から形成される。他のタイプは、リン脂質及び / 又はホスファチジルコリン及び / 又はコレステロールの混合物から形成される。

【0321】

リポソームを細胞中にインビトロ及びインビボで導入するための他の方法の例としては、米国特許第 5, 283, 185 号明細書；米国特許第 5, 171, 678 号明細書；国際公開第 94/00569 号パンフレット；国際公開第 93/24640 号パンフレット；国際公開第 91/16024 号パンフレット；Felgner, J. Biol. Chem. 269: 2550, 1994；Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 11307, 1993；Nabel, Human Gene Ther. 3: 649, 1992；Gershon, Biochem. 32: 7143, 1993；及び Strauss, EMBO J. 11: 417, 1992 が挙げられる。

10

【0322】

非イオン性リポソーム系、特に非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系も試験されて、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性が決定されている。Novasome (商標) I (ジラウリン酸グリセリル / コレステロール / ポリオキシエチレン - 10 - ステアリルエーテル) 及び Novasome (商標) II (ジステアリン酸グリセリル / コレステロール / ポリオキシエチレン - 10 - ステアリルエーテル) を含む非イオン性リポソーム製剤を使用して、シクロスポリン - A をマウス皮膚の真皮に送達した。結果はそのような非イオン性リポソーム系が皮膚の異なる層中へのシクロスポリン - A の堆積を促進するのに有効であることを示した (Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6)466)。

20

【0323】

リポソームは、「立体的に安定化された」リポソームも含み、本明細書で使用されるこの用語は、1つ又は複数の特定化脂質を含むリポソームを指し、該特定化脂質は、リポソームに組み込まれた際、そのような特定化脂質を欠いたリポソームと比較して増強された循環寿命をもたらす。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームのベシクル形成脂質部分の一部が、(A) モノシアロガングリオシド GM₁ などの1つ又は複数の糖脂質を含むもの、又は (B) ポリエチレングリコール (PEG) 部分などの1つ又は複数の親水性ポリマーにより誘導体化されているものである。任意の特定の理論に束縛されるものではないが、当技術分野では、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、又は PEG - 誘導体化脂質を含む立体的に安定化されたリポソームに関しては、これらの立体的に安定化されたリポソームの増強された循環半減期は、細網内皮系 (RES) の細胞内への取り込みの低下に由来すると考えられている (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42；Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

30

【0324】

1つ又は複数の糖脂質を含む様々なリポソームが、当技術分野にて既知である。Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) は、リポソームの血中半減期を改善するモノシアロガングリオシド GM₁、硫酸ガラクトセレブロシド及びホスファチジリンイノシトールの能力を報告している。これらの発見は、Gabizon et al. により詳説されている (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949)。両方とも Allen et al. に付与された米国特許第 4, 837, 028 号明細書及び国際公開第 88/04924 号パンフレットは、(1) スフィンゴミエリン及び (2) ガングリオシド GM₁ 又は硫酸ガラクトセレブロシドエステルを含むリポソームを開示している。米国特許第 5, 543, 152 号明細書 (Webb et al.) は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。1, 2 - sn - ジミリストイルホスファチジルコリンを含むリポソームは、国際公開第 97/13499 号パンフレット (Lim et al.) に

40

50

開示されている。

【0325】

一実施形態において、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームには、細胞膜に融合することができるという利点がある。非カチオン性リポソームは、それほど効率的に細胞膜と融合することができないが、インピボでマクロファージによって取り込まれ、RNAi剤をマクロファージに送達するのに使用され得る。

【0326】

リポソームの更なる利点としては以下が挙げられる：天然のリン脂質から得られるリポソームは、生体適合性があり且つ生分解性可能であり；リポソームは、広範囲の水溶性及び脂溶性薬剤を組み込むことができ；リポソームは、その内部の区画中に封入されたRNAi剤を代謝及び分解から保護することができる（Rosoff, in "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製における重要な考慮事項は、脂質表面電荷、小胞サイズ及びリポソームの水溶性容積である。

10

【0327】

正に帯電した合成カチオン性脂質である、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)を用いて、核酸と自発的に相互作用して、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合し、RNAi剤の送達をもたらすことが可能な脂質-核酸複合体を形成する、小さいリポソームを形成することができる(例えば、Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:7413-7417, 1987、及びDOTMA及びDNAとのその使用の説明については米国特許第4,897,355号明細書を参照)。

20

【0328】

DOTMA類似体である、1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(DOTAP)は、リン脂質と組み合わせて使用して、DNA複合小胞を形成することができる。Lipofectin(商標) Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.)は、負に帯電したポリヌクレオチドと自発的に相互作用して、複合体を形成する正に帯電したDOTMAリポソームを含む生体組織培養細胞中に高度にアニオン性の核酸を送達するための効果的な薬剤である。十分に正に帯電したリポソームが使用される場合、得られる複合体の正味電荷も正である。このように調製される正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自発的に付着し、細胞膜と融合し、機能性核酸を、例えば、組織培養細胞中に効率的に送達する。別の市販のカチオン性脂質である、1,2-ビス(オレイルオキシ)-3,3-(トリメチルアンモニウム)プロパン(「DOTAP」)(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana)は、オレオイル部分がエーテル結合ではなく、エステルによって結合された点でDOTMAとは異なる。

30

【0329】

他の報告されているカチオン性脂質化合物としては、2つのタイプの脂質のうちの1つにコンジュゲートされ、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタオレオイルアミド(「DOGS」)(Transfectam(商標), Promega, Madison, Wisconsin)及びジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスベルミル-アミド(「DPPEs」)などの化合物を含む、例えば、カルボキシスベルミンを含む様々な部分にコンジュゲートされたものが挙げられる(例えば、米国特許第5,171,678号明細書を参照)。

40

【0330】

別のカチオン性脂質コンジュゲートは、DOPEと組み合わせてリポソームに製剤化されたコレステロール(「DC-Chol」)による脂質の誘導体化を含む(Gao, X. 及びHuang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991を参照)。ポリリジンとDOPEにコンジュゲートすることによつ

50

て作製されるリポポリリジン、血清の存在下におけるトランスフェクションに有効であると報告されている (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065: 8, 1991)。特定の細胞株では、コンジュゲートされたカチオン性脂質を含有するこれらのリポソームは、DOTMA含有組成物より低い毒性を示し、より効率的なトランスフェクションを提供するとされている。他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIE及びDMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) 及びLipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland) が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に好適な他のカチオン性脂質が、国際公開第98/39359号パンフレット及び国際公開第96/37194号パンフレットに記載されている。

10

【0331】

リポソーム製剤は、局所投与に特に適しており、リポソームは、他の製剤に優るいくつかの利点を示す。このような利点としては、投与される薬剤の高い全身性吸収率に関連する副作用の減少、所望の標的における投与される薬剤の蓄積の増加、及びRNAi剤を皮膚に投与する能力が挙げられる。ある実施において、RNAi剤を表皮細胞に送達するために、また、真皮組織、例えば、皮膚へのRNAi剤の浸透を促進するために、リポソームが使用される。例えば、リポソームは、局所的に適用され得る。リポソームとして製剤化される薬剤の皮膚への局所送達報告されている (例えば、Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 及び du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992: 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6: 682-690, 1988; Itani, T. et al., *Gene* 56: 267-276, 1987; Nicolaou, C. et al. (1987) *Meth. Enz.* 149: 157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101: 512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7851-7855, 1987を参照)。

20

【0332】

また、非イオン性リポソーム系、特に、非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系は、皮膚への薬剤の送達におけるそれらの有用性を決定するために調べられた。Novasome I (ジラウリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) 及びNovasome II (ジステアリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) を含む非イオン性リポソーム製剤が、マウス皮膚の真皮に薬剤を送達するのに使用された。RNAi剤を含むこのような製剤は、皮膚疾患を処置するのに有用である。

30

【0333】

iRNAを含むリポソームは、高度に変形可能に作製され得る。このような変形性は、リポソームが、リポソームの平均半径より小さい孔を透過するのを可能にし得る。例えば、トランスフェルソーム (transfersome) は、変形可能なりポソームの一種である。トランスフェルソームは、表面縁活性化因子、通常、界面活性剤を、標準的なりポソーム組成物に加えることによって作製され得る。RNAi剤を含むトランスフェルソームは、皮膚のケラチノサイトにRNAi剤を送達するために、例えば、皮下感染によって送達され得る。無傷の哺乳動物皮膚を横断するために、脂質小胞は、好適な経皮勾配の影響下で、50nm未満の直径をそれぞれ有する一連の微細孔を透過しなければならない。更に、脂質特性のため、これらのトランスフェルソームは、自己最適化 (例えば、毛穴の形状に適応可能)、自己修復性であり得、多くの場合、破碎せずにそれらの標的に到達し、多くの場合、自己充填性 (self-loading) であり得る。

40

【0334】

本発明に適した他の製剤が、2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61 /

50

018, 616号明細書; 2008年1月2日に出願された同第61/018, 611号明細書; 2008年3月26日に出願された同第61/039, 748号明細書; 2008年4月22日に出願された同第61/047, 087号明細書及び2008年5月8日に出願された同第61/051, 528号明細書に記載されている。2007年10月3日に出願されたPCT出願第PCT/US2007/080331号明細書にも、本発明に適した製剤が記載されている。

【0335】

トランスファーソームは、リポソームの更なる別のタイプであり、薬物送達ビヒクルの候補として魅力的な、高く変形可能な脂質凝集体である。トランスファーソームは、脂質小滴として記載することもでき、この脂質小滴は、高く変形可能であるため、小滴よりも小さい孔内を容易に透過することができる。トランスファーソームは、それらが使用される環境に適合可能であり、例えば自己最適性(皮膚内の孔の形状に適應する)であり、自己修復性であり、しばしば細分化することなくそれらの標的に到達し、また多くの場合、自己負荷性である。トランスファーソームを作製するためには、通常は界面活性剤である表面縁部活性化因子を標準的なリポソーム組成物に加えることが可能である。トランスファーソームは、皮膚に血清アルブミンを送達するのに使用されている。トランスファーソーム仲介による血清アルブミンの送達は、血清アルブミンを含む溶液の皮下注射と同様に効果的であることが示されている。

10

【0336】

界面活性剤は、エマルション(マイクロエマルションを含む)及びリポソームなどの製剤に広い用途を見出している。天然及び合成の両方の多数の異なるタイプの界面活性剤を分類及び順位付けする最も一般的な方法は、親水性/親油性バランス(HLB)の使用によるものである。親水性基(「頭部」としても既知)の性質は、製剤中に使用される異なる界面活性剤を類別する最も有用な手段を提供する(Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

20

【0337】

界面活性剤分子がイオン化されていない場合、この界面活性剤は非イオン性界面活性剤に分類される。非イオン性界面活性剤は、医薬及び美容製品に広い用途を見出し、広い範囲のpH値に亘って使用可能である。一般に、それらのHLB値は、それらの構造に応じて2~約18の範囲である。非イオン性界面活性剤には、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、ショ糖エステル、及びエトキシ化エステルなどの非イオン性エステルが挙げられる。非イオン性アルカノールアミド、及び、脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、及びエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーなどのエーテルも、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤クラスの最も人気のあるメンバーである。

30

【0338】

界面活性剤分子が水中に溶解又は分散した際に負電荷を保有する場合、この界面活性剤は陰イオン性に分類される。陰イオン性界面活性剤には、せっけんなどのカルボキシレート、アシルラクチレート、アミノ酸のアシルアミド、アルキルスルフェート及びエトキシ化アルキルスルフェートなどの硫酸エステル、アルキルベンゼンスルホネートなどのスルホネート、アシルイセチオネート、アシルタウレート及びスルホスクシネート、並びにホスフェートが挙げられる。陰イオン性界面活性剤クラスの最も重要なメンバーは、アルキルスルフェート及びせっけんである。

40

【0339】

界面活性剤分子が水中に溶解又は分散した際に正電荷を保有する場合、この界面活性剤は陽イオン性に分類される。陽イオン性界面活性剤には、第四級アンモニウム塩及びエトキシ化アミンが挙げられる。第四級アンモニウム塩は、最も使用されているこのクラスのメンバーである。

50

【0340】

界面活性剤分子が正又は負電荷のいずれかを保有する能力を有する場合、この界面活性剤は両性に分類される。両性界面活性剤には、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタイン及びホスファチドが挙げられる。

【0341】

薬物製品、製剤及びエマルジョン中での界面活性剤の使用は、概説されている (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

【0342】

本発明の方法に使用するための iRNA はまた、ミセル製剤として提供され得る。「ミセル」は、分子の全ての疎水性部分が内側を向いて、親水性部分を周囲の水相と接触したままにするように、両親媒性分子が球体構造で配置される、特定のタイプの分子集合体として本明細書において定義される。環境が疎水性である場合、逆の配置が存在する。

10

【0343】

経皮膜を介した送達に好適な混合ミセル製剤は、siRNA 組成物の水溶液、アルカリ金属 C₈ ~ C₂₂ アルキル硫酸塩、及びミセル形成化合物を混合することによって調製され得る。例示的なミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容され得る塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレエート、モノラウレート、ルリヂサ油、月見草油、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシン及びその薬学的に許容され得る塩、グリセリン、ポリグリセリン、リジン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテル及びその類似体、ポリドカノールアルキルエーテル及びその類似体、ケノデオキシコール酸塩、デオキシコール酸塩、及びそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物は、アルカリ金属アルキル硫酸塩の添加と同時に又はその後に加えられてもよい。混合ミセルは、成分の実質的に任意の種類で形成されるが、より小さいサイズのミセルを提供するためには激しい混合で形成される。

20

【0344】

一方法において、siRNA 組成物及び少なくともアルカリ金属アルキル硫酸塩を含有する第1のミセル組成物が調製される。次に、第1のミセル組成物は、少なくとも3つのミセル形成化合物と混合されて、混合ミセル組成物が形成される。別の方法において、ミセル組成物は、siRNA 組成物、アルカリ金属アルキル硫酸塩及びミセル形成化合物の少なくとも1つを混合し、続いて、激しく混合しながら残りのミセル形成化合物を加えることによって調製される。

30

【0345】

フェノール及びノ又は m-クレゾールが、混合ミセル組成物に加えられて、製剤を安定化し、細菌増殖から保護してもよい。あるいは、フェノール及びノ又は m-クレゾールは、ミセル形成成分とともに加えられてもよい。グリセリンなどの等張剤も、混合ミセル組成物の形成後に加えられてもよい。

【0346】

スプレーとしてのミセル製剤の送達では、製剤は、エアロゾルディスペンサーに入れることができ、ディスペンサーに噴射剤が充填される。圧力下にある噴射剤は、ディスペンサー中で液体形態である。成分の比率は、水相及び噴射剤相が1つになるように、すなわち、1つの相が存在するように調整される。2つの相が存在する場合、例えば、定量弁によって、内容物の一部を投薬する前にディスペンサーを振とうする必要がある。医薬品の投薬用量は、微細なスプレー状で定量弁から噴射される。

40

【0347】

噴射剤は、水素含有クロロフルオロカーボン、水素含有フルオロカーボン、ジメチルエーテル及びジエチルエーテルを含み得る。特定の実施形態において、HFA 134a (1, 1, 1, 2テトラフルオロエタン) が使用されてもよい。

【0348】

50

必須成分の特定の濃度は、比較的単純な実験によって決定され得る。口腔を介した吸収では、注射又は胃腸管を介した投与のための投与量の、例えば、少なくとも2倍又は3倍に増加させることが望ましいことが多い。

【0349】

B. 脂質粒子

本発明のiRNAすなわちdsRNAは、脂質製剤中、例えばLNP中に完全に封入されてもよく、又は他の核酸-脂質粒子を形成してもよい。

【0350】

本明細書で使用される用語「LNP」は、安定な核酸-脂質粒子を指す。LNPは、典型的には、陽イオン性脂質、非陽イオン性脂質、及び粒子の凝集を防止する脂質（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）を含む。LNPは、静脈内（i.v.）注射後に延長された循環寿命を有し、かつ遠位部位（例えば、投与部位から物理的に分離された部位）に蓄積するため、全身適用に極めて有用である。LNPは「pSPLP」を含み、pSPLPは、PCT公開第国際公開第00/03683号パンフレットに示されているように、封入された縮合剤-核酸複合体を含む。本発明の粒子は、典型的には、約50nm～約150nm、より典型的には約60nm～約130nm、より典型的には約70nm～約110nm、最も典型的には約70nm～約90nmの平均粒径を有し、かつ実質的に無毒である。加えて、核酸は、本発明の核酸-脂質粒子中に存在する場合、水性溶液中で、ヌクレアーゼによる分解に耐性である。核酸-脂質粒子、及びそれらの調製方法は、例えば米国特許第5,976,567号明細書；米国特許第5,981,501号明細書；米国特許第6,534,484号明細書；米国特許第6,586,410号明細書；米国特許第6,815,432号明細書；米国特許出願公開第2010/0324120号明細書及びPCT公開国際公開第96/40964号パンフレットに開示されている。

【0351】

一実施形態において、脂質対薬物の比（質量/質量比）（例えば、脂質対dsRNAの比）は、約1:1～約50:1、約1:1～約25:1、約3:1～約15:1、約4:1～約10:1、約5:1～約9:1、又は約6:1～約9:1の範囲内であろう。上記の範囲の中間の範囲も、本発明の一部であるものと考えられる。

【0352】

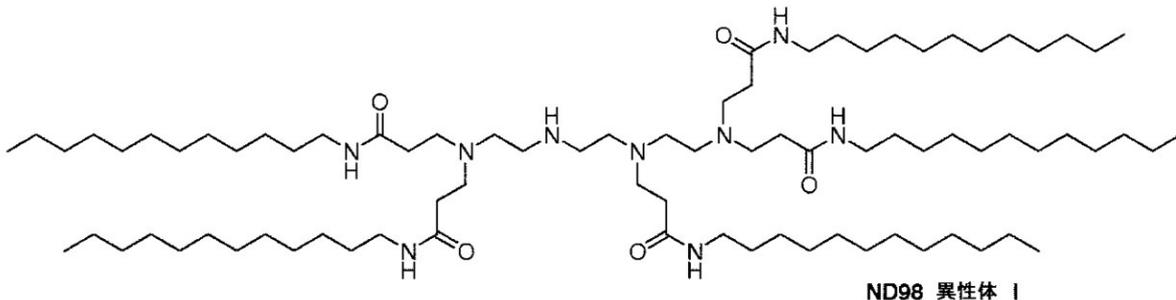
陽イオン性脂質は、例えば、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）、N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド（DDAB）、N-(I-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTAP）、N-(I-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ)プロピルアミン（DODMA）、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLenDMA）、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-C-DAP）、1,2-ジリノレイ（Dilinoley）オキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン（DLin-DAC）、1,2-ジリノレイ（Dilinoley）オキシ-3-モルホリノプロパン（DLin-MA）、1,2-ジリノレオイル-3-ジメチルアミノプロパン（DLinDAP）、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-S-DMA）、1-リノレオイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-2-DMAP）、1,2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩（DLin-TMA.Cl）、1,2-ジリノレオイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩（DLin-TAP.Cl）、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルピペラジノ)プロパン（DLin-MPZ）、又は3-(N,N-ジリノレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール（DLinAP）、3-(N,N-ジオレイルアミノ)-1,2-プロパンジオール（DOAP）、1,2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン（DLin-EG-DMA）、1

ば約10mol%～約60mol%又は約48mol%のコレステロールを含む。

【0358】

一実施形態において、リポイド(lipidoid)ND98・4HCl(MW 1487)(参照により本明細書に援用される、2008年3月26日に出願された米国特許出願第12/056,230号明細書を参照)、コレステロール(Sigma-Aldrich)、及びPEG-Ceramide C16(Avanti Polar Lipids)が、脂質-dsRNAナノ粒子(すなわち、LNP01粒子)を調製するのに使用され得る。エタノール中のそれぞれの原液が、以下のとおりに調製され得る:ND98、133mg/ml;コレステロール、25mg/ml、PEG-Ceramide C16、100mg/ml。次に、ND98、コレステロール、及びPEG-Ceramide C16原液は、例えば、42:48:10のモル比で組み合わせられ得る。組み合わせられた脂質溶液は、最終的なエタノール濃度が約35～45%であり、最終的な酢酸ナトリウム濃度が約100～300mMであるようにdsRNA水溶液(例えば酢酸ナトリウム(pH5)中)と混合され得る。脂質-dsRNAナノ粒子は、通常、混合時に自然に形成される。所望の粒度分布に応じて、得られるナノ粒子混合物が、例えば、Lipex Extruder(Northern Lipids, Inc)などのサーモバレル押出機(thermobarrel extruder)を用いて、ポリカーボネート膜(例えば、100nmのカットオフ)を通して押し出され得る。場合によっては、押し出し工程は省略され得る。エタノール除去及び同時の緩衝液交換は、例えば、透析又は接線流る過によって達成され得る。緩衝液は、例えば、約pH7、例えば、約pH6.9、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、又は約pH7.4のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)と交換され得る。

【化11】



式1

【0359】

LNP01製剤が、例えば、参照により本明細書に援用される国際出願公開番号国際公開第2008/042973号パンフレットに記載されている。

【0360】

更なる例示的な脂質-dsRNA製剤が、表Aに記載される。

【0361】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 A.

| | イオン性/カチオン性脂質 | カチオン性脂質/非カチオン性脂質/ コレステロール/PEG-脂質コンジュゲート 脂質:siRNA 比 |
|-------|--|--|
| LNP-1 | 1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA) | DLinDMA/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) 脂質:siRNA 約 7:1 |
| 2-XTC | 2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC) | XTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 脂質:siRNA 約 7:1 |
| LNP05 | 2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC) | XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約 6:1 |
| LNP06 | 2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC) | XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 脂質:siRNA 約 11:1 |
| LNP07 | 2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC) | XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約 6:1 |

10

20

【 0 3 6 2 】

30

40

50

【表 2】

| | | | |
|-------|--|--|----|
| LNP08 | 2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC) | XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, 脂質:siRNA 約 11:1 | |
| LNP09 | 2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン (XTC) | XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1 | |
| LNP10 | (3aR,5s,6aS)-N,N-ジメチル-2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)テトラヒドロ-3aH-シクロペンタ[d][1,3]ジオキソール-5-アミン (ALN100) | ALN100/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1 | 10 |
| LNP11 | (6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)プタノエート (MC3) | MC-3/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1 | |
| LNP12 | 1,1'-(2-(4-(2-((2-(ビス(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)(2-ヒドロキシドデシル)アミノ)エチル)ピペラジン-1-イル)エチル)アザンジイル)ジドデカン-2-オール (Tech G1) | Tech G1/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1 | 20 |
| LNP13 | XTC | XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 33:1 | |
| LNP14 | MC3 | MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 脂質:siRNA: 11:1 | 30 |
| LNP15 | MC3 | MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 脂質:siRNA: 11:1 | |
| LNP16 | MC3 | MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1 | |
| LNP17 | MC3 | MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1 | 40 |

【 0 3 6 3 】

【表 3】

| | | |
|-------|---------|--|
| LNP18 | MC3 | MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 12:1 |
| LNP19 | MC3 | MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 脂質:siRNA: 8:1 |
| LNP20 | MC3 | MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1 |
| LNP21 | C12-200 | C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 7:1 |
| LNP22 | XTC | XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA: 10:1 |

10

20

【0364】

DSPC：ジステアロイルホスファチジルコリン

DPPC：ジパルミトイルホスファチジルコリン

PEG-DMG：PEG-ジジミリストイル (didymyristoyl) グリセロール (C14-PEG、又はPEG-C14) (2000の平均分子量を有するPEG)

PEG-DSG：PEG-ジスチリルグリセロール (C18-PEG、又はPEG-C18) (2000の平均分子量を有するPEG)

PEG-cDMA：PEG-カルバモイル-1, 2-ジミリスチルオキシプロピルアミン (2000の平均分子量を有するPEG)

【0365】

LNP(1, 2-ジリノレニルオキシ-N, N-ジメチルアミンプロパン (DLinDMA)) を含む製剤が、参照により本明細書に援用される、2009年4月15日に出願された国際公開第2009/127060号パンフレットに記載されている。

30

【0366】

XTCを含む製剤は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、2009年1月29日出願の米国特許仮出願第61/148,366号明細書；2009年3月2日出願の米国特許仮出願第61/156,851号明細書；2009年6月10日出願の米国特許仮出願第 号明細書；2009年7月24日出願の米国特許仮出願第61/228,373号明細書2009年9月3日出願米国特許仮出願第61/239,686号明細書、及び2010年1月29日出願の国際出願第PCT/US2010/022614号明細書に記載されている。

40

【0367】

MC3を含む製剤が、例えば、全内容が参照により本明細書に援用される、2010年6月10日に出願された米国特許出願公開第2010/0324120号明細書に記載されている。

【0368】

ALNY-100を含む製剤は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、2009年11月10日出願の国際特許出願第PCT/US09/63933号明細書に記載されている。

【0369】

50

C 1 2 - 2 0 0 を含む製剤は、参照により本明細書に組み込まれる、2009年5月5日出願の米国特許仮出願第61/175,770号明細書及び2010年5月5日出願の国際出願第PCT/US10/33777号明細書に記載されている。

【0370】

イオン性/カチオン性脂質の合成

本発明の核酸-脂質粒子に使用される、例えば、カチオン性脂質などの化合物のいずれも、実施例により詳細に記載される方法を含む公知の有機合成技術によって調製され得る。全ての置換基は、特に示されない限り、以下に定義されるとおりである。

【0371】

「アルキル」は、1~24個の炭素原子を含有する、直鎖状又は分枝鎖状、非環状又は環状の、飽和脂肪族炭化水素を意味する。代表的な飽和直鎖状アルキルは、メチル、エチル、n-プロピル、n-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシルなどを含む一方；飽和分枝鎖状アルキルは、イソプロピル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、イソペンチルなどを含む。代表的な飽和環状アルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどを含む一方；不飽和環状アルキルは、シクロペンテニル及びシクロヘキセニルなどを含む。

10

【0372】

「アルケニル」は、隣接する炭素原子間に少なくとも1つの二重結合を含有する、上で定義されるアルキルを意味する。アルケニルは、シス及びトランス異性体の両方を含む。代表的な直鎖状及び分枝鎖状アルケニルは、エチレニル、プロピレニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブチレニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-メチル-1-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニルなどを含む。

20

【0373】

「アルキニル」は、隣接する炭素間に少なくとも1つの三重結合を更に含有する、上で定義される任意のアルキル又はアルケニルを意味する。代表的な直鎖状及び分枝鎖状アルキニルは、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-メチル-1-ブチニルなどを含む。

【0374】

「アシル」は、結合点における炭素が以下に規定されるオキシ基で置換される、任意のアルキル、アルケニル、又はアルキニルを意味する。例えば、-C(=O)アルキル、-C(=O)アルケニル、及び-C(=O)アルキニルが、アシル基である。

30

【0375】

「複素環」は、飽和、不飽和、又は芳香族のいずれかであり、且つ窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される1又は2つのヘテロ原子(ここで、窒素及び硫黄ヘテロ原子は、任意選択で酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は、任意選択で四級化されていてもよい)を含有する5員~7員の単環式、又は7員~10員の二環式の複素環を意味し、この複素環には、上記の複素環のいずれかがベンゼン環に縮合された二環式の環が含まれる。複素環は、任意のヘテロ原子又は炭素原子を介して結合され得る。複素環は、以下に規定されるヘテロアリアルを含む。複素環は、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル(piperidinyl)、ピペリジニル(piperizynyl)、ヒダントイニル、パレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフランニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニルなどを含む。

40

【0376】

「任意選択で置換されるアルキル」、「任意選択で置換されるアルケニル」、「任意選択で置換されるアルキニル」、「任意選択で置換されるアシル」、及び「任意選択で置換される複素環」という用語は、置換されるとき、少なくとも1つの水素原子が置換基で置換されることを意味する。オキシ置換基(=O)の場合、2つの水素原子が置換される。これに関して、置換基は、オキシ、ハロゲン、複素環、-CN、-OR_x、-NR_xR_y

50

、 $-NR_xC(=O)R_y$ 、 $-NR_xSO_2R_y$ 、 $-C(=O)R_x$ 、 $-C(=O)OR_x$ 、 $-C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SONR_x$ 及び $-SONNR_xR_y$ を含み、式中、 n が、0、1又は2であり、 R_x 及び R_y が、同じか又は異なっており、独立して、水素、アルキル又は複素環であり、前記アルキル及び複素環置換基のそれぞれが、オキソ、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-CN$ 、アルキル、 $-OR_x$ 、複素環、 $-NR_xR_y$ 、 $-NR_xC(=O)R_y$ 、 $-NR_xSO_2R_y$ 、 $-C(=O)R_x$ 、 $-C(=O)OR_x$ 、 $-C(=O)NR_xR_y$ 、 $-SONR_x$ 及び $-SONNR_xR_y$ のうちの1つ又は複数で更に置換され得る。

【0377】

「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、プロモ及びヨードを意味する。

【0378】

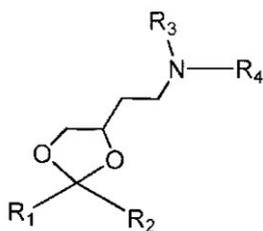
ある実施形態において、本発明の方法は、保護基の使用を必要とし得る。保護基の方法は、当業者に周知である（例えば、*Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T. W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999*を参照）。簡潔には、本発明の文脈における保護基は、官能基の望ましくない反応性を低下させるか又はなくす任意の基である。保護基は、官能基に加えられて、特定の反応中のその反応性を遮蔽し、その後、除去されることで、元の官能基が現れ得る。ある実施形態において、「アルコール保護基」が使用される。「アルコール保護基」は、アルコール官能基の望ましくない反応性を低下させるか又はなくす任意の基である。保護基は、当該技術分野において周知の技術を用いて、加えられ、除去され得る。

【0379】

式Aの合成

ある実施形態において、本発明の核酸-脂質粒子は、式A：

【化12】



のカチオン性脂質を用いて製剤化され、式中、 R_1 及び R_2 が、独立して、アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、それぞれが任意選択で置換されていてもよく、 R_3 及び R_4 が、独立して、低級アルキルであり、又は R_3 及び R_4 が、一緒になって、任意選択で置換される複素環を形成することができる。ある実施形態において、カチオン性脂質は、XTC(2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキサラン)である。一般に、上の式Aの脂質は、以下の反応スキーム1又は2によって作製され得、ここで、全ての置換基は、特に示されない限り、上で定義されるとおりである。

【0380】

10

20

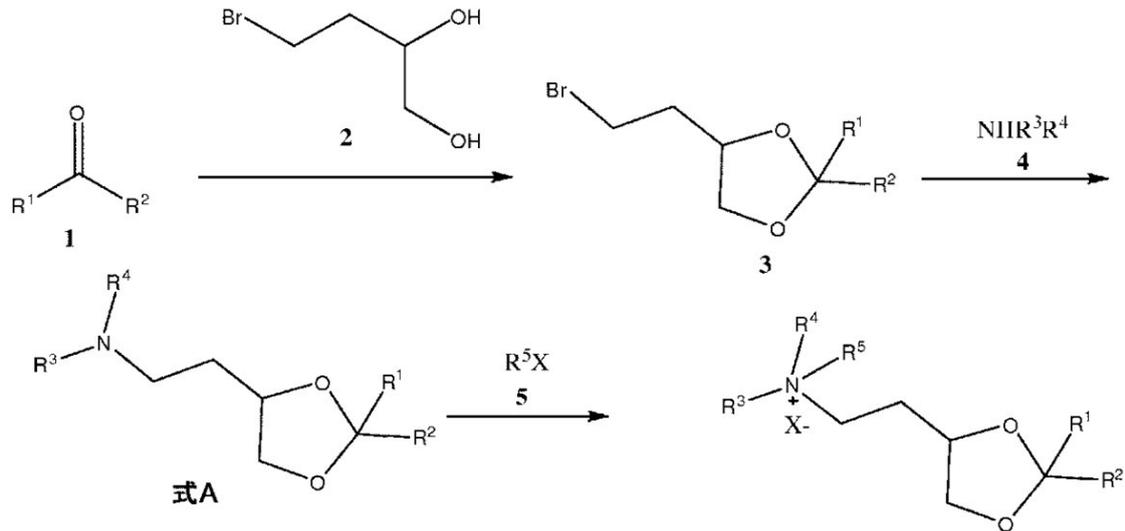
30

40

50

【化 1 3】

スキーム1



10

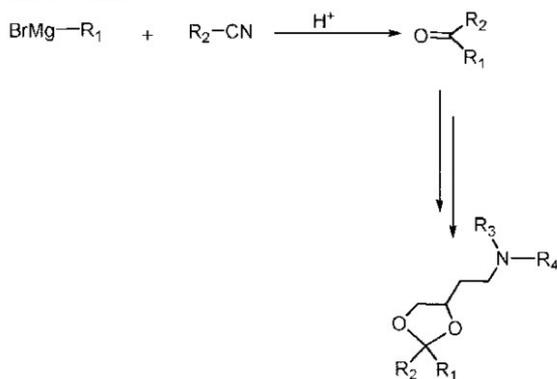
脂質A (式中、R¹及びR²が、独立して、アルキル、アルケニル又はアルキニルであり、それぞれが任意選択で置換されていてもよく、R³及びR⁴が、独立して、低級アルキルであり、又はR³及びR⁴が、一緒になって、任意選択で置換される複素環を形成することができる) は、スキーム1にしたがって調製され得る。ケトン1及び臭化物2は、購入されるか又は当業者に公知の方法にしたがって調製され得る。1及び2の反応により、ケタール3が得られる。アミン4によるケタール3の処理により、式Aの脂質が得られる。式Aの脂質は、式5 (式中、Xが、ハロゲン、水酸化物、ホスフェート、サルフェートなどから選択されるアニオン対イオンである) の有機塩を用いて、対応するアンモニウム塩に転化され得る。

20

【0381】

【化 1 4】

スキーム2



30

あるいは、ケトン1の出発材料は、スキーム2にしたがって調製され得る。グリニヤール試薬6及びシアン化物7は、購入されるか又は当業者に公知の方法にしたがって調製され得る。6及び7の反応により、ケトン1が得られる。式Aの対応する脂質へのケトン1の転化は、スキーム1に表される。

【0382】

MC3の合成

DLin-M-C3-DMA (すなわち、(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル4-(ジメチルアミノ)ブタノエート) の調製は以下のとおりであった。ジクロロメタン(5 mL)中の(6Z, 9Z

40

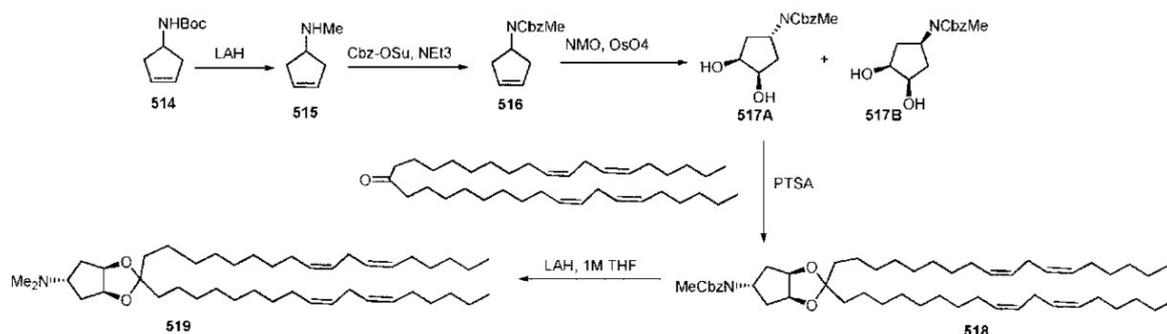
50

, 28 Z, 31 Z) - ヘプタトリアコンタ - 6, 9, 28, 31 - テトラエン - 19 - オール (0.53 g)、4 - N, N - ジメチルアミノ酪酸塩酸塩 (0.51 g)、4 - N, N - ジメチルアミノピリジン (0.61 g) 及び 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (0.53 g) の溶液を、室温で一晩攪拌した。溶液を、希塩酸で洗浄し、続いて、希炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機画分を、無水硫酸マグネシウム上で乾燥させ、ろ過し、溶媒を回転蒸発器において除去した。残渣を、1 ~ 5 % のメタノール / ジクロロメタン溶出勾配を用いてシリカゲルカラム (20 g) に通した。精製された生成物を含有する画分を組み合わせて、溶媒を除去し、無色油 (0.54 g) を得た。ALNY - 100 の合成

【0383】

ケタール 519 [ALNY - 100] の合成を、スキーム 3 にしたがって行った：

【化15】



【0384】

515 の合成

二口丸底フラスコ (1 L) 中で、200 ml の無水 THF 中の LiAlH_4 (3.74 g、0.09852 mol) の攪拌懸濁液に、70 ml の THF 中の 514 (10 g、0.04926 mol) の溶液を、窒素雰囲気下で、0°C でゆっくりと加えた。完全に加えた後、反応混合物を室温まで温め、次に、4 時間加熱還流させた。反応の進行を TLC によって監視した。(TLC による) 反応の完了後、混合物を 0°C に冷却し、飽和 Na_2SO_4 溶液の慎重な添加によってクエンチした。反応混合物を室温で 4 時間攪拌し、ろ過して取り除いた。残渣を THF で十分に洗浄した。ろ液及び洗浄液を混合し、400 ml のジオキサン及び 26 ml の濃 HCl で希釈し、室温で 20 分間攪拌した。揮発性物質を、減圧下で取り除いて、白色の固体として 515 の塩酸塩を得た。収量：7.12 g¹
 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz) : δ = 9.34 (broad, 2H)、5.68 (s, 2H)、3.74 (m, 1H)、2.66 ~ 2.60 (m, 2H)、2.50 ~ 2.45 (m, 5H)。

【0385】

516 の合成

250 mL の二口丸底フラスコ中で、100 mL の乾燥 DCM 中の化合物 515 の攪拌溶液に、 NEt_3 を加え (37.2 mL、0.2669 mol)、窒素雰囲気下で 0°C に冷却した。50 mL の乾燥 DCM 中の N - (ベンジルオキシ - カルボニルオキシ) - スクシンイミド (20 g、0.08007 mol) をゆっくりと加えた後、反応混合物を、室温まで温めた。反応 (TLC によって 2 ~ 3 時間) の完了後、混合物を、1 N の HCl 溶液 (1 x 100 mL) 及び飽和 NaHCO_3 溶液 (1 x 50 mL) で連続して洗浄した。次に、有機層を、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、粗材料を得て、それを、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、粘着性の塊として 516 を得た。収量：11 g (89%)。¹H - NMR (CDCl₃, 400 MHz) : δ = 7.36 ~ 7.27 (m, 5H)、5.69 (s, 2H)、5.12 (s, 2H)、4.96 (br., 1H) 2.74 (s, 3H)、2.60 (m, 2H)、2.30 ~ 2.25 (m, 2H)。LC - MS [M + H]⁺ - 232.3 (96.94%)。

10

20

30

40

50

【0386】

517A及び517Bの合成

シクロペンテン516(5g、0.02164mol)を、500mLの一口丸底フラスコ中で、220mLのアセトン及び水(10:1)の溶液に溶解させ、それに、N-メチルモルホリン-N-オキsid(7.6g、0.06492mol)、続いて、4.2mLの、tert-ブタノール中のOsO₄(0.275g、0.00108mol)の7.6%溶液を室温で加えた。反応(約3時間)の完了の後、混合物を、固体Na₂SO₃の添加によってクエンチし、得られた混合物を、室温で1.5時間攪拌した。反応混合物を、DCM(300mL)で希釈し、水(2×100mL)、続いて、飽和NaHCO₃(1×50mL)溶液、水(1×30mL)及び最後に塩水(1×50mL)で洗浄した。有機相を、無水Na₂SO₄上で乾燥させ、溶媒を減圧下で除去した。粗材料のシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製により、ジアステレオマーの混合物を得て、それを、分取HPLCによって分離した。収量：-6gの粗517A-ピーク-1(白色の固体)、5.13g(96%)。1H-NMR(DMSO、400MHz)：=7.39~7.31(m, 5H)、5.04(s, 2H)、4.78~4.73(m, 1H)、4.48~4.47(d, 2H)、3.94~3.93(m, 2H)、2.71(s, 3H)、1.72~1.67(m, 4H)。LC-MS-[M+H]-266.3、[M+NH₄+]-283.5存在、HPLC-97.86%。X線により確認された立体化学。

10

【0387】

518の合成

化合物505の合成について記載されるのと同様の手順を用いて、化合物518(1.2g、41%)を無色油として得た。1H-NMR(CDCl₃、400MHz)：=7.35~7.33(m, 4H)、7.30~7.27(m, 1H)、5.37~5.27(m, 8H)、5.12(s, 2H)、4.75(m, 1H)、4.58~4.57(m, 2H)、2.78~2.74(m, 7H)、2.06~2.00(m, 8H)、1.96~1.91(m, 2H)、1.62(m, 4H)、1.48(m, 2H)、1.37~1.25(br m, 36H)、0.87(m, 6H)。HPLC-98.65%。

20

【0388】

化合物519の合成のための一般的な手順

ヘキサン(15mL)中の化合物518(1当量)の溶液を、THF(1M、2当量)中のLAHの氷冷した溶液に滴下して加えた。完全に加えた後、混合物を、0.5時間にわたって40で加熱し、次に、氷浴上で再度冷却した。混合物を、飽和Na₂SO₄水溶液を用いて慎重に加水分解し、次に、セライトを通してろ過し、還元して油にした。カラムクロマトグラフィーにより、純粋な519(1.3g、68%)が得られ、これは、無色油として得られた。¹³C NMR =130.2、130.1(x2)、127.9(x3)、112.3、79.3、64.4、44.7、38.3、35.4、31.5、29.9(x2)、29.7、29.6(x2)、29.5(x3)、29.3(x2)、27.2(x3)、25.6、24.5、23.3、226、14.1;エレクトロスプレーMS(+ve)：C₄₄H₈₀NO₂についての分子量(M+H)+計算値654.6、実測値654.6。

30

40

【0389】

標準的な又は押し出しフリー(extrusion-free)方法のいずれかにより調製された製剤は、同様の方法で特徴付けることができる。例えば、製剤は典型的には視認検査により特徴付けられる。製剤は凝集体又は沈殿物を含まない白みがあった半透明溶液である筈である。脂質-ナノ粒子の粒子サイズ及び粒子サイズ分布は、例えば、Malvern Zetasizer Nano ZS(Malvern, USA)を使用した光散乱により測定することができる。粒子は、そのサイズが約20~300nm、例えば40~100nmである必要がある。粒子サイズ分布は、単峰形である必要がある。製剤中の総dsRNA濃度、及び捕捉された割合は、色素排除アッセイを用いて概算される。処方されたdsRNAのサンプルは、製剤崩壊界面活性剤、例えば0.5%トリトン-X1

50

00の存在又は不在下、Ribogreen (Molecular Probes)などのRNA結合染料と共にインキュベートされてもよい。製剤中の総dsRNAは、標準的な曲線に対する界面活性剤を含むサンプルからの信号により決定され得る。捕捉された割合は、総dsRNA含有量から「遊離」dsRNA含有量(界面活性剤の不在下で信号により測定した)を減算することにより決定される。捕捉されたdsRNAのパーセントは、典型的には>85%である。LNP製剤の場合、粒子サイズは、少なくとも30nm、少なくとも40nm、少なくとも50nm、少なくとも60nm、少なくとも70nm、少なくとも80nm、少なくとも90nm、少なくとも100nm、少なくとも110nm、及び少なくとも120nmである。好適な範囲は、典型的には少なくとも約50nm~少なくとも約110nm、少なくとも約60nm~少なくとも約100nm、又は少なくとも約80nm~少なくとも約90nmである。

10

【0390】

経口投与用の組成物及び製剤には、散剤又は顆粒、微粒子、ナノ粒子、懸濁剤、又は水若しくは非水性媒体中の液剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、薬袋、錠剤又は小型錠剤が挙げられる。増粘剤、風味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤又は結合剤は、所望され得る。いくつかの実施形態では、経口製剤は、本発明を特徴付けるdsRNAが、1種又は複数種の透過促進剤界面活性剤及びキレート剤と共に投与されるものである。好適な界面活性剤には、脂肪酸及び/若しくはエステル又はその塩、胆汁酸及び/又はその塩が挙げられる。好適な胆汁酸/塩には、ケノデオキシコール酸(CDCA)及びウルソデオキシケノデオキシコール酸(UDCA)、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グル
 コール酸、グリコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコ
 ール酸、タウロ-24,25-ジヒドロ-フシジン酸ナトリウム及びグリコジヒドロフシ
 ジン酸ナトリウムが挙げられる。好適な脂肪酸には、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレ
 イン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン
 酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン、ジラウ
 リン、グリセリル1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、ア
 シルカルニチン、アシルコリン、若しくはモノグリセリド、ジグリセリド、又はこれらの
 薬学的に許容され得る塩(例えば、ナトリウム)が挙げられる。いくつかの実施形態にお
 いて、浸透促進剤の組み合わせ、例えば胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩が使用され
 る。例示的な1つの組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸及びUDCAのナトリウム塩
 である。更なる浸透促進剤には、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキ
 シエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる。本発明を特徴付けるDsRNAは、噴
 霧乾燥粒子、又はマイクロ若しくはナノ粒子を形成するために錯体化されたものを含む顆
 粒形態で経口的に送達され得る。dsRNA錯体化剤には、ポリ-アミノ酸;ポリイミン
 ;ポリアクリレート;ポリアルキルアクリレート、ポリオキセタン、ポリアルキルシアノ
 アクリレート;陽イオン化ゼラチン、アルブミン、澱粉、アクリレート、ポリエチレング
 リコール(PEG)及び澱粉;ポリアルキルシアノアクリレート;DEAE-誘導体化ポリ
 イミン、プルラン、セルロース及び澱粉が挙げられる。好適な錯体化剤には、キトサン
 、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リシン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリ
 スペルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチルエチレン
 P(TDAE)、ポリアミノスチレン(例えば、p-アミノ)、ポリ(メチルシアノアクリ
 レート)、ポリ(エチルシアノアクリレート)、ポリ(ブチルシアノアクリレート)、
 ポリ(イソブチルシアノアクリレート)、ポリ(イソヘキシルシアノ(cyna)アクリ
 レート)、DEAE-メタクリレート、DEAE-ヘキシルアクリレート、DEAE-
 アクリルアミド、DEAE-アルブミン及びDEAE-デキストラン、ポリメチルアクリ
 レート、ポリヘキシルアクリレート、ポリ(D,L-乳酸)、ポリ(DL-乳酸-コ-グ
 リコール酸(PLGA)、アルギン酸塩、及びポリエチレングリコール(PEG)が挙げ
 られる。dsRNA用の経口製剤、及びそれらの製剤は、その各々が参照により本明細書
 に組み込まれる米国特許第6,887,906号明細書、米国特許出願公開第20030
 027780号明細書及び米国特許第6,747,014号明細書に記載されている。

20

30

40

50

【0391】

非経口、実質内（脳内へ）、くも膜下腔内、脳室内又は肝内投与用の組成物及び製剤には、無菌水性溶液を挙げることができ、該無菌水性溶液は、緩衝液、希釈剤、並びに、非限定的に浸透促進剤、担体化合物、及び他の薬学的に許容され得る担体又は賦形剤などの他の好適な添加剤も含み得る。

【0392】

本発明の医薬組成物は、非限定的に、液剤、乳剤、及びリポソーム含有製剤を含む。これらの組成物は、非限定的に予め形成された液剤、自己乳化型固体及び自己乳化型半固体を含む多様な構成成分から生成され得る。肝癌腫などの肝疾患を処置する際、肝臓を標的とする製剤が特に好ましい。

10

【0393】

単位剤形にて都合よく存在し得る本発明の医薬製剤は、医薬産業にて周知の従来技術に従って調製することができる。そのような技術は、活性成分を医薬担体又は賦形剤と関連させるステップを含む。一般に、製剤は、活性成分を液体担体又は微粉化固体担体又は両方と均一かつ親密に関連させた後、必要であれば、製品を成形することにより調製される。

【0394】

本発明の組成物は、非限定的に錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、ソフトゲル剤、坐薬、及び浣腸などの多数の可能な剤形のいずれかに処方され得る。本発明の組成物はまた、水性、非水性又は混合媒体中の懸濁液として処方され得る。水性懸濁液は、更に、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール及び/又はデキストランを含む、懸濁液の粘度を増大させる物質を含んでもよい。懸濁液はまた、安定剤を含み得る。

20

【0395】

C. 更なる製剤

i. エマルション

本発明の組成物は、エマルションとして、調製され、製剤化され得る。エマルションは、典型的に、1つの液体が、通常、直径が0.1 µmを超える液滴の形態の別の液体中に分散された不均一系である（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301を参照）。エマルションは、多くの場合、互いに親密に混合され及び分散された2つの非混和性液体相を含む二層系である。一般に、エマルションは、油中水(w/o)又は水中油(o/w)の種類のものであり得る。水性相が微小液滴として塊の油相中に微細に分割され及び分散された場合、得られた組成物は、油中水(w/o)エマルションと呼ばれる。代替的に、油相が微小液滴として塊の水性相中に微細に分割され及び分散された場合、得られた組成物は、水中油(o/w)エマルションと呼ばれる。エマルションは、分散相及び活性薬物に加えて追加の構成

30

40

50

成分を含むことができ、該構成成分は、水性相、油相中の溶液として、又はそれ自体が別個の相として存在し得る。必要に応じてエマルジョン中に乳化剤、安定剤、染料、及び抗酸化剤などの医薬賦形剤も存在し得る。医薬エマルジョンは、例えば、油中水中油（ $o/w/o$ ）及び水中油中水（ $w/o/w$ ）エマルジョンの場合など、3つ以上の相からなる多エマルジョンであり得る。そのような複合製剤は、多くの場合、単純な二成分エマルジョンが提供しない所定の利点を提供する。 o/w エマルジョンの個々の油小滴が小さい水小滴を囲い込む多エマルジョンは、 $w/o/w$ エマルジョンを構成する。同様に、油の連続相中で安定化された水の小球中に囲い込まれた油小滴の系は、 $o/w/o$ エマルジョンを提供する。

【0396】

エマルジョンは、熱力学的安定性を殆ど又は全く有さないことにより特徴付けられる。多くの場合、エマルジョンの分散又は不連続相は、外部又は連続相中に良好に分散され、乳化剤の手段、又は製剤の粘度を介してこの形態に維持される。エマルジョンの相のいずれかは、エマルジョン型軟膏ベース及びクリームの場合のように半固体又は固体であり得る。エマルジョンを安定化させる他の手段には、エマルジョンのいずれかの相に組み込まれ得る乳化剤の使用が含まれる。乳化剤は、合成界面活性剤、天然乳化剤、吸収基剤、及び微細に分散した固体の4つのカテゴリーに大きく分類され得る（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照)。

【0397】

表面活性剤としても知られている合成界面活性剤は、エマルジョンの製剤化に広範な適用性が見出されており、文献に概説されている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199を参照)。界面活性剤は、通常、両親媒性であり、親水性部分及び疎水性部分を含む。界面活性剤の疎水性に対する親水性の比率は、親水性/親油性バランス（HLB）と称されており、製剤の調製の際の界面活性剤の分類及び選択の際の貴重な手段である。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて、異なる種類、すなわち、非イオン性、アニオン性、カチオン性及び両性に分類され得る（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285を参照)。

【0398】

エマルジョン製剤中に使用される、天然に存在する乳化剤には、ラノリン、蜜蝋、ホス

10

20

30

40

50

ファチド、レシチン及びアカシアが挙げられる。吸収ベースは、無水ラノリン及び親水性ワセリンのように、水を取り入れてw/oエマルションを形成するが、尚それらの半固体稠度を維持する親水性特性を所有する。微粉化固体は、特に界面活性剤の組み合わせ中、及び粘稠な製剤中で、良好な乳化剤として使用されている。これらには、重金属水酸化物などの極性無機固体、ベントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド状ケイ酸アルミニウム及びコロイド状ケイ酸アルミニウムマグネシウムなどの非膨潤粘土、顔料、及び炭素などの非極性固体又はトリストエアリン酸グリセリルが挙げられる。

【0399】

非常に多様な非乳化材料もエマルション製剤中に含まれ、エマルションの特性に寄与する。それらには、脂肪、油、蠟、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存剤及び抗酸化剤が挙げられる (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0400】

親水性コロイド又は親水コロイドには、多糖（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲナン、グァーガム、カラヤガム、及びトラガカント）などの天然に存在するゴム及び合成ポリマー、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロース及びカルボキシプロピルセルロース）、及び合成ポリマー（例えば、カルボマー、セルロースエーテル、及びカルボキシビニルポリマー）が挙げられる。これらは水中に分散し又は水中で膨潤して、分散相の小滴の周囲に強力な界面フィルムを形成することにより、また、外部相の粘度を増大させることにより、エマルションを安定化するコロイド溶液を形成する。

【0401】

エマルションは、多くの場合、微生物の増殖を容易に支持し得る炭水化物、タンパク質、ステロール及びホスファチドなどの多数の成分を含むため、これらの製剤は、多くの場合、保存剤を組み込んでいる。製剤に含まれる、通常使用される保存剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四級アンモニウム塩、塩化ベンズアルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、及びホウ酸が挙げられる。抗酸化剤も、通常、エマルション製剤に加えられて、製剤の変質を防止する。使用される抗酸化剤は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシルエンなどの遊離基スカベンジャー、又はアスコルビン酸及びメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤、並びにクエン酸、酒石酸及びレシチンなどの抗酸化剤共力剤であり得る。

【0402】

皮膚、経口及び非経口経路を介したエマルション製剤の適用ならびにそれらの製造方法は、文献に概説されている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照）。経口送達用のエマルション製剤は、製剤化の容易さ、ならびに吸収及び生物学的利用能の観点からの有効性のため、非常に広範に使用されている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott William

10

20

30

40

50

s & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199を参照)。鉱油基剤の緩下剤、油溶性ビタミン及び高脂肪栄養製剤が、o/w型エマルジョンとして一般的に経口投与されている材料に含まれる。

【0403】

ii. マイクロエマルジョン

本発明の一実施形態において、iRNA及び核酸の組成物は、マイクロエマルジョンとして製剤化される。マイクロエマルジョンは、単一の光学的に等方性で且つ熱力学的に安定した液体溶液である、水、油及び両親媒性物質の系として定義され得る（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245を参照）。典型的には、マイクロエマルジョンは、最初に油を水性界面活性剤溶液中に分散した後、十分な量の第四の構成成分、一般に中間の鎖長のアルコールを加えて透明系を形成することにより調製される。従って、マイクロエマルジョンは、表面活性分子の界面フィルムにより安定化されている2つの非混和性液体からなる熱力学的に安定な、等方的に透明な分散物として記載されている（Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pp. 185 - 215）。マイクロエマルジョンは通常、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤及び電解質を含む3～5つの構成成分の組み合わせを用いて調製される。マイクロエマルジョンが油中水(w/o)タイプ又は水中油(o/w)タイプのいずれのものであるかは、使用される油及び界面活性剤の特性と、界面活性剤分子の極性頭部及び炭化水素尾部の構造及び幾何学的充填(geometric packing)とに依存する（Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271）。

【0404】

状態図を用いる現象論的手法が広範に研究されており、マイクロエマルジョンを製剤化する方法についての広範な知識を当業者に与えている（例えば、Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335を参照）。従来のエマルジョンと比較して、マイクロエマルジョンは、自発的に形成する熱力学的に安定な小滴の製剤中で水不溶性

10

20

30

40

50

薬物を可溶化する利点を提供する。

【0405】

マイクロエマルジョンの調製に使用される界面活性剤には、単独で又は補助界面活性剤との組み合わせで、非限定的に、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、モノラウリン酸テトラグリセロール (ML310)、モノオレイン酸テトラグリセロール (MO310)、モノオレイン酸ヘキサグリセロール (PO310)、ペンタオレイン酸ヘキサグリセロール (PO500)、モノカプリン酸デカグリセロール (MCA750)、モノオレイン酸デカグリセロール (MO750)、セスキオレイン酸 (sequioleate) デカグリセロール (SO750)、デカオレイン酸デカグリセロール (DAO750) が挙げられる。通常、エタノール、1-プロパノール、及び1-ブタノールなどの短鎖アルコールである補助界面活性剤は、界面活性剤フィルム中に浸透し、その結果、界面活性剤分子間に生成された空隙空間によって不規則フィルムを形成することにより、界面流動性を増大させる役割を果たす。しかしながら、マイクロエマルジョンは、補助界面活性剤を使用することなく調製されることができ、アルコールフリー自己乳化型マイクロエマルジョン系は、当技術分野にて既知である。水性相は、典型的には、非限定的に水、薬物の水性溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、及びエチレングリコールの誘導体とすることができる。油相は、非限定的に Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖 (C8~C12) モノ、ジ、及びトリ-グリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコール化グリセリド、飽和ポリグリコール化 C8~C10 グリセリド、植物油及びシリコン油などの材料を含むことができる。

【0406】

マイクロエマルジョンは、薬物可溶化及び薬物吸収向上の観点から特に興味深い。脂質ベースのマイクロエマルジョン (o/w 及び w/o の両方) は、ペプチドを含む薬物の経口バイオアベイラビリティの向上に提案されている (例えば米国特許第 6,191,105 号明細書、米国特許第 7,063,860 号明細書、米国特許第 7,070,802 号明細書、米国特許第 7,157,099 号明細書、Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205 を参照されたい)。マイクロエマルジョンは、薬物可溶化の改善、酵素加水分解からの薬物の保護、界面活性剤誘導による膜流動性及び透過性の変更に起因する薬物吸収の可能な向上、調製の容易さ、固体剤形を超える経口投与の容易さ、臨床的効能の改善、及び毒性の低下の利点を提供する (例えば米国特許第 6,191,105 号明細書、米国特許第 7,063,860 号明細書、米国特許第 7,070,802 号明細書、米国特許第 7,157,099 号明細書、Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143 を参照されたい)。多くの場合、マイクロエマルジョンは、マイクロエマルジョンの構成成分が周囲温度で一緒にされた際に自発的に形成され得る。このことは、易熱性薬物、ペプチド又は iRNA を処方する際に特に有利であり得る。マイクロエマルジョンはまた美容及び医薬用途の両方において活性構成成分の経費送達に有効である。本発明のマイクロエマルジョン組成物及び製剤が胃腸管からの iRNA 及び核酸の全身吸収の増大、並びに iRNA 及び核酸の局部細胞取り込みの改善を促進することが期待される。

【0407】

本発明のマイクロエマルジョンはまた、モノステアリン酸ソルピタン (Grill 3)、ラブラソール (Labrasol)、及び透過促進剤などの追加の構成成分及び添加剤を含んで、製剤の特性を改善し、かつ本発明の iRNA 及び核酸の吸収を向上させ得る。本発明のマイクロエマルジョン中で使用される浸透促進剤は、5つの広いカテゴリーの1つに属するものとして分類され得る - 界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤

、及び非キレート化非界面活性剤 (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92)。これらのクラスの各々は、上記に論じられている。

【0408】

iii. 微粒子

本発明のRNAi剤は、粒子、例えば、微粒子に組み込まれてもよい。微粒子は、噴霧乾燥によって生成され得るが、凍結乾燥、蒸発、流体床乾燥、真空乾燥、又はこれらの技術の組合せを含む他の方法によって生成されてもよい。

【0409】

iv. 浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、動物の皮膚への、核酸、特にiRNAの効率的な送達を行うために様々な浸透促進剤を用いる。ほとんどの薬剤が、イオン化及び非イオン化の両方の形態で溶液中に存在する。しかしながら、通常、脂溶性又は親油性の薬剤のみが、細胞膜を容易に横断する。横断される膜が浸透促進剤で処理されている場合、非親油性薬剤でも細胞膜を横断することができることが発見されている。細胞膜をわたる非親油性薬剤の拡散の補助に加えて、浸透促進剤は、親油性薬剤の浸透性も向上させる。

【0410】

浸透促進剤は、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、及び非キレート非界面活性剤の5つの大きいカテゴリーのうちの一つに属するものとして分類され得る (例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92を参照)。浸透促進剤の上記の種類それぞれが、以下により詳細に記載される。

【0411】

界面活性剤 (又は「表面活性剤」) は、水溶液に溶解されると、溶液の表面張力又は水溶液と別の液体との間の界面張力を低下させ、粘膜を通るiRNAの吸収が向上されるという結果を生じる化学物質である。胆汁塩及び脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル及びポリオキシエチレン-20-セチルエーテル (例えば、Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92を参照); 及びFC-43などのペルフルオロ化合物エマルジョン (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252) が挙げられる。

【0412】

浸透促進剤として作用する様々な脂肪酸及びそれらの誘導体としては、例えば、オレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸 (n-デカン酸)、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン (1-モノオレイル-rac-グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール1-モノカプレート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらのC₁~20アルキルエステル (例えば、メチル、イソプロピル及びt-ブチル)、ならびにそれらのモノグリセリド及びジグリセリド (すなわち、オレエート、ラウレート、カプレート、ミリステート、パルミテート、ステアレート、リノレエートなど) が挙げられる (例えば、Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeut*

10

20

30

40

50

ic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 - 33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651 - 654を参照)。

【0413】

胆汁の生理学的役割には、脂質及び脂溶性ビタミンの分散及び吸収の促進が含まれる(例えば、Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934 - 935を参照)。様々な天然の胆汁塩、及びそれらの合成誘導体が、浸透促進剤として作用する。したがって、「胆汁塩」という用語は、胆汁の天然成分のいずれかならびにそれらの合成誘導体のいずれかを含む。好適な胆汁塩としては、例えば、コール酸(又はその薬学的に許容され得るナトリウム塩、コール酸ナトリウム)、デヒドロコール酸(デヒドロコール酸ナトリウム)、デオキシコール酸(デオキシコール酸ナトリウム)、グルコール酸(glucolic acid)(グルコール酸ナトリウム(sodium glucolate))、グリコール酸(グリココール酸ナトリウム)、グリコデオキシコール酸(グリコデオキシコール酸ナトリウム)、タウロコール酸(タウロコール酸ナトリウム)、タウロデオキシコール酸(タウロデオキシコール酸ナトリウム)、ケノデオキシコール酸(ケノデオキシコール酸ナトリウム)、ウルソデオキシコール酸(UDCA)、ナトリウムタウロ-24, 25-ジヒドロ-フシデート(STDHF)、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム及びポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル(POE)が挙げられる(例えば、Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782 - 783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 - 33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579 - 583を参照)。

【0414】

本発明に関連して使用されるキレート剤は、金属イオンとの錯体を形成することによって溶液から金属イオンを除去し、粘膜を通るiRNAの吸収が向上されるという結果を生じる化合物として定義され得る。本発明における浸透促進剤としてのキレート剤の使用に関して、ほとんどの特徴付けられたDNAヌクレアーゼが触媒作用のために二価金属イオンを必要とし、したがって、キレート剤によって阻害されるため、キレート剤は、DNAヌクレアーゼ阻害剤としても作用するという更なる利点を有する(Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315 - 339)。好適なキレート剤としては、限定はされないが、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、クエン酸、サリチレート(例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチレート及びホモバニレート(homovanilate))、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9及び-ジケトンのN-アミノアシル誘導体(エナミン)が挙げられる(例えば、Katdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Cr

10

20

30

40

50

ritical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51を参照)。

【0415】

本明細書において使用される際、非キレート非界面活性剤の浸透促進化合物は、キレート剤又は界面活性剤としてのわずかな活性を示すが、それにもかかわらず、消化器粘膜を通るiRNAの吸収を促進する化合物として定義され得る(例えば、Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33を参照)。この種類の浸透促進剤としては、例えば、不飽和環状尿素、1-アルキル-及び1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体(Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); ならびにジクロフェナクナトリウム、インドメタシン及びフェニルブタゾンなどの非ステロイド性炎症剤(Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626)が挙げられる。

【0416】

細胞レベルにおけるiRNAの取り込みを促進する剤も、本発明の医薬組成物及び他の組成物に加えられ得る。例えば、リポフェクチン(lipofectin)などのカチオン性脂質(Junichiらの米国特許第5,705,188号明細書)、カチオン性グリセロール誘導体、及びポリリジンなどのポリカチオン性分子(LolloらのPCT出願の国際公開第97/30731号パンフレット)も、dsRNAの細胞取り込みを促進することが知られている。市販のトランスフェクション試薬の例としては、特に、例えば、Lipofectamine(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine 2000(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、293fectin(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Cellfectin(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、DMRIE-C(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、FreeStyle(商標)MAX(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine(商標)2000 CD(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Lipofectamine(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、RNAiMAX(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Oligofectamine(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、Optifect(商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)、X-tremeGENE Q2 Transfection Reagent(Roche; Grenzachstrasse, Switzerland)、DOTAP Liposomal Transfection Reagent(Grenzachstrasse, Switzerland)、DOSPER Liposomal Transfection Reagent(Grenzachstrasse, Switzerland)、又はFugene(Grenzachstrasse, Switzerland)、Transfectam(登録商標)Reagent(Promega; Madison, WI)、TransFast(商標)Transfection Reagent(Promega; Madison, WI)、Tfx(商標)-20 Reagent(Promega; Madison, WI)、Tfx(商標)-50 Reagent(Promega; Madison, WI)、DreamFect(商標)(OZ Biosciences; Marseille, France)、EcoTransfect(OZ Biosciences; Marseille, France)、TransPass^a D1 Transfection Reagent(New England Biolabs; Ipswich, MA, USA)、LyoVec(

10

20

30

40

50

商標) / LipoGen (商標) (Invitrogen; San Diego, CA, USA)、PerFectin Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、NeuroPORTER Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER Transfection reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、GenePORTER 2 Transfection reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、Cytfectin Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、BaculoPORTER Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、TrojanPORTER (商標) transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, USA)、RiboFect (Bioline; Taunton, MA, USA)、PlasFect (Bioline; Taunton, MA, USA)、UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA)、又はHiFect (商標) (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA) が挙げられる。

10

【0417】

エチレングリコール及びプロピレングリコールなどのグリコール、2-ピロールなどのピロール、アゾン、ならびにリモネン及びメントンなどのテルペンを含む、他の剤を用いて、投与される核酸の浸透を促進することができる。

20

【0418】

v. 担体

本発明の所定の組成物は、製剤中に担体化合物も組み込んでいる。本明細書で使用される「担体化合物」又は「担体」は、不活性（即ち、生物学的活性 *per se* を所有しない）であり得るが、例えば、生物学的に活性な核酸を分解し、又は循環からの核酸の除去を促進することによる、生物学的活性を有する核酸のバイオアベイラビリティを低下させるインビボでのプロセスによって、核酸であると認識される核酸又はその類似体を指すことができる。核酸及び担体化合物の共投与、典型的には過剰な後者の物質による共投与により、おそらくは共通の受容体に対する担体化合物と核酸との競合に起因して、肝臓、腎臓又は他の循環外リザーバ (*extracirculatory reservoir*) 中で回収される核酸の量が実質的に低下し得る。例えば、肝臓内での部分的ホスホロチオエートの回収は、それがポリイノシン酸、デキストラン硫酸塩、ポリシチジル酸 (*polycytidic acid*) 又は4-アセトアミド-4'イソチオシアノ-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸と共投与された際、低下され得る (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183)。

30

【0419】

vi. 賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬担体」又は「賦形剤」は、動物に1つ又は複数の核酸を送達するための薬学的に許容され得る溶媒、懸濁剤、又は任意の他の薬理的に不活性なビヒクルである。賦形剤は、液体又は固体とすることができ、計画された投与方法を考慮に入れて、核酸及び医薬組成物の他の所定の構成成分と組み合わせられた際に、所望の高、稠度などを提供するように選択される。典型的な医薬担体には、非限定的に、結合剤（例えば、化トウモロコシ澱粉、ポリビニルピロリドン又はヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；充填剤（例えば、乳糖及び他の糖、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート又はリン酸水素カルシウムなど）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸

40

50

化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、水素化植物油、トウモロコシ澱粉、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；錠剤崩壊剤（例えば、澱粉、澱粉グリコール酸ナトリウムなど）；及び湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が挙げられる。

【0420】

核酸と有害に反応しない、非 - 非経口投与に薬学的に許容され得る好適な有機又は無機賦形剤も本発明の組成物の処方中使用され得る。薬学的に許容され得る好適な担体には、非限定的に、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

10

【0421】

核酸の局所投与用の製剤には、アルコールなどの通常の溶媒中の無菌及び非無菌水性溶液、非水性溶液、又は液体若しくは固体油ベース中の核酸溶液を挙げることができる。溶液は、緩衝剤、希釈剤及び他の好適な添加剤も含み得る。核酸と有害に反応しない、非 - 非経口投与に薬学的に許容され得る好適な有機又は無機賦形剤を使用し得る。

【0422】

薬学的に許容され得る好適な賦形剤には、非限定的に、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、乳糖、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

20

【0423】

v i i . 他の構成成分

本発明の組成物は更に、医薬組成物中に従来見出される他の補助構成成分も、当技術分野にて確立されたそれらの使用レベルで含有し得る。それ故、例えば、組成物は、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬若しくは抗炎症薬剤などの更なる、適合可能な、医薬的に活性な材料を含有することができ、又は、染料、風味剤、保存剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤及び安定剤などの、本発明の組成物の様々な剤形を物理的に処方するのに有用な更なる材料を含有することができる。しかしながら、それらの材料は、加えられた際、本発明の組成物の構成成分の生物学的活性を過度に妨害しない必要がある。製剤は滅菌されてもよく、また所望の場合、製剤の核酸と有害に相互作用しない補助剤、例えば滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩、緩衝液、着色料、調味料及び/又は芳香性物質などと混合される。

30

【0424】

水性懸濁液は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール及び/又はデキストランを含む、懸濁液の粘度を増大させる物質を含み得る。懸濁液は、安定剤も含み得る。

【0425】

ある実施形態において、本発明に取り上げられる医薬組成物は、(a) 1つ又は複数の i RNA 化合物と、(b) 非 RNA i 機構によって機能し、出血性疾患を処置するのに有用な 1つ又は複数の剤とを含む。このような剤の例としては、限定はされないが、抗炎症剤、抗脂肪症剤、抗ウイルス剤、及び/又は抗線維症剤が挙げられる。更に、シリマリンなどの、肝臓を保護するのに一般的に使用される他の物質も、本明細書に記載される i RNA とともに使用され得る。肝疾患を処置するのに有用な他の剤としては、テルピブジン、エンテカビル、及びテラプレビルなどのプロテアーゼ阻害剤ならびに、例えば、Tungらの米国特許出願公開第 2005/0148548 号明細書、同第 2004/0167116 号明細書、及び同第 2003/0144217 号明細書；及び Haleらの米国特許出願公開第 2004/0127488 号明細書に開示されている他の剤が挙げられる。

40

【0426】

このような化合物の毒性及び処置効果は、例えば、LD₅₀（個体群の 50% の致死量）及び ED₅₀（個体群の 50% に治療に有効な用量）を決定するための、細胞培養物又

50

は実験動物における標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性作用と処置効果との間の用量比は、処置指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表され得る。高い処置指数を示す化合物が好ましい。

【0427】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータは、ヒトに使用するためのある範囲の投与量を製剤化するのに使用され得る。本発明における本明細書に取り上げられる組成物の投与量は、一般に、ほとんど又は全く毒性を伴わずにED₅₀を含む血中濃度の範囲内である。投与量は、用いられる剤形及び用いられる投与経路に応じて、この範囲内で変化し得る。本発明に取り上げられる方法に使用される任意の化合物では、治療に有効な用量は、細胞培養アッセイから最初に推測され得る。用量は、細胞培養物中で測定して、IC₅₀（即ち、症状の最大障害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む、化合物の、又は、適切な場合、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲を動物モデル内で達成する（例えば、ポリペプチドの濃度の低下を達成する）ように処方され得る。そのような情報を使用して、ヒトでの有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。

10

【0428】

上記に述べたそれらの投与に加えて、本発明を特徴付けるiRNAは、鉄過剰により仲介され、かつTMPRSS6発現を阻害することにより処置され得る病理過程の処置に有効な他の既知の薬剤と組み合わせて投与されてもよい。いずれの場合でも、投与する医師は、観察された結果に基づいて、当技術分野にて既知の又は本明細書に記載される標準的な有効性の尺度を使用して、iRNAの量及び投与時間を調整することができる。

20

【0429】

V. TMPRSS6発現の阻害方法

本発明は、細胞内でのTMPRSS6（マトリプターゼ-2）の発現の阻害方法を提供する。本方法は、細胞を、細胞内でのTMPRSS6の発現を阻害するのに有効な量のRNAi剤、例えば、二本鎖RNAi剤と接触させ、それにより、細胞内でのTMPRSS6の発現を阻害する工程を含む。

【0430】

細胞を二本鎖RNAi剤と接触させる工程は、インビトロ又はインビボで行われ得る。細胞をRNAi剤とインビボで接触させる工程は、対象、例えば、ヒト対象内の細胞又は細胞群を、RNAi剤と接触させる工程を含む。インビトロ及びインビボでの接触方法の組合せも可能である。接触は、上述されるように、直接又は間接的に行われ得る。更に、細胞を接触させる工程は、本明細書に記載されるか又は当該技術分野において公知の任意のリガンドを含む標的化リガンドによって行われ得る。好ましい実施形態において、標的化リガンドは、炭水化物部分、例えば、GalNAc₃リガンド、又はRNAi剤を目的の部位、例えば、対象の肝臓に指向する任意の他のリガンドである。

30

【0431】

本明細書において使用される際の「阻害する」という用語は、「低下させる」、「サイレンシングする」、「下方制御する」及び他の類似語と同義的に使用され、任意のレベルの阻害を含む。

40

【0432】

本明細書において使用される際の「TMPRSS6の発現を阻害する」という語句は、任意のTMPRSS6遺伝子（例えば、マウスTMPRSS6遺伝子、ラットTMPRSS6遺伝子、サルTMPRSS6遺伝子、又はヒトTMPRSS6遺伝子など）ならびにTMPRSS6遺伝子の変異体又は突然変異体の発現の阻害を指すことが意図される。したがって、TMPRSS6遺伝子は、野生型TMPRSS6遺伝子、突然変異体TMPRSS6遺伝子、又は遺伝子組み換えされた細胞、細胞群、又は生物の文脈におけるトランスジェニックTMPRSS6遺伝子であり得る。

【0433】

「TMPRSS6遺伝子の発現を阻害する」は、TMPRSS6遺伝子の任意のレベル

50

の阻害、例えば、TMPRSS6 遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を含む。TMPRSS6 遺伝子の発現は、TMPRSS6 遺伝子の発現に関連する任意の変数のレベル、例えば、TMPRSS6 mRNA レベル、TMPRSS6 タンパク質レベル、又は脂質レベル、又はレベルの変化に基づいて評価され得る。このレベルは、例えば、対象に由来する試料を含む、個々の細胞又は細胞群中で評価され得る。

【0434】

阻害は、対照のレベルと比較したTMPRSS6 発現に関連する1つ又は複数の変数の絶対的又は相対的レベルの低下によって評価され得る。対照のレベルは、当該技術分野において用いられる任意のタイプの対照のレベル、例えば、投与前ベースライン (pre-dose baseline) レベル、又は非処理又は対照 (例えば、緩衝液のみの対照又は不活性な剤の対照など) で処理された同様の対象、細胞、又は試料から測定されるレベルであり得る。

10

【0435】

本発明の方法のある実施形態において、TMPRSS6 遺伝子の発現は、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%だけ阻害される。

20

【0436】

TMPRSS6 遺伝子の発現の阻害は、TMPRSS6 遺伝子が転写され、TMPRSS6 遺伝子の発現が阻害されるように (例えば、1つ又は複数の細胞を、本発明のRNAi 剤と接触させることによって、又は本発明のRNAi 剤を、細胞が存在する又は存在していた対象に投与することによって) 処理されている第1の細胞又は細胞群 (このような細胞は、例えば、対象に由来する試料中に存在し得る) によって発現されるmRNAの量の、そのように処理されていない以外は第1の細胞又は細胞群と実質的に同一の第2の細胞又は細胞群 (対照細胞) と比較した際の低下に現れる。好ましい実施形態において、阻害は、以下の式を用いて、対照細胞中のmRNAのレベルにおけるパーセンテージとして、処理された細胞中のmRNAのレベルを表すことによって評価される：

30

【数1】

$$\frac{(\text{対照細胞中のmRNA}) - (\text{処理された細胞中のmRNA})}{(\text{対照細胞中のmRNA})} \cdot 100\%$$

【0437】

あるいは、TMPRSS6 遺伝子の発現の阻害は、例えば、TMPRSS6 タンパク質発現、ヘプジン遺伝子またはタンパク質発現などのTMPRSS6 遺伝子の発現、または組織または血清中の鉄レベルに機能的に関連するパラメータの低下に関して評価され得る。TMPRSS6 遺伝子サイレンシングは、構造的に又はゲノム工学によって、及び当該技術分野において公知の任意のアッセイによって、TMPRSS6 を発現する任意の細胞中で測定され得る。肝臓は、TMPRSS6 発現の主要部位である。発現の他の実質的な部位は、腎臓及び子宮を含む。

40

【0438】

TMPRSS6 タンパク質の発現の阻害は、細胞又は細胞群によって発現されるTMPRSS6 タンパク質のレベル (例えば、対象に由来する試料中で発現されるタンパク質のレベル) の低下に現れる。mRNAの抑制の評価について上で説明されるように、処理された細胞又は細胞群中のタンパク質の発現レベルの阻害は、対照細胞又は細胞群中のタン

50

パク質のレベルにおけるパーセンテージとして同様に表され得る。

【0439】

TMPRSS6 遺伝子の発現の阻害を評価するのに使用され得る対照細胞又は細胞群は、本発明のRNAi剤とまだ接触されていない細胞又は細胞群を含む。例えば、対照細胞又は細胞群は、RNAi剤による対象の処理の前に、個々の対象（例えば、ヒト又は動物対象）から得られる。

【0440】

細胞又は細胞群によって発現されるTMPRSS6 mRNAのレベルは、mRNAの発現を評価するために当該技術分野において公知の任意の方法を用いて測定され得る。一実施形態において、試料中のTMPRSS6の発現のレベルは、転写されたポリヌクレオチド、又はその一部、例えば、TMPRSS6 遺伝子のmRNAを検出することによって測定される。RNAは、例えば、酸フェノール/グアニジンイソチオシアネート抽出(RNAzol B; Biogenesis)、RNeasy RNA調製キット(Qiagen)又はPAX遺伝子(PreAnalytix, Switzerland)の使用を含む、RNA抽出技術を用いて、細胞から抽出され得る。リボ核酸のハイブリダイゼーションを用いる典型的なアッセイ形式としては、核ランオンアッセイ(nuclear run-on assay)、RT-PCR、RNase保護アッセイ(Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035)、ノーザンブロット法、インサイチュハイブリダイゼーション、及びマイクロアレイ分析が挙げられる。

【0441】

一実施形態において、TMPRSS6の発現のレベルは、核酸プローブを用いて測定される。本明細書において使用される際の「プローブ」という用語は、特定のTMPRSS6に選択的に結合することが可能な任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成可能であり、又は適切な生物学的調製から得られる。プローブは、標識されるように特に設計され得る。プローブとして用いられ得る分子の例としては、限定はされないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、及び有機分子が挙げられる。

【0442】

単離されたmRNAは、サザン又はノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析及びプローブアッセイを含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーション又は増幅アッセイに使用され得る。mRNAレベルを測定するための一方法は、単離されたmRNAを、TMPRSS6 mRNAにハイブリダイズし得る核酸分子(プローブ)と接触させる工程を含む。一実施形態において、mRNAは、固体表面に固定され、例えば、アガロースゲル上に単離されたmRNAを流し、ゲルからニトロセルロースなどの膜へとmRNAを転写することによって、プローブと接触される。代替的な実施形態において、プローブは、固体表面に固定され、mRNAは、例えば、Affymetrix遺伝子チップアレイ中で、プローブと接触される。当業者は、TMPRSS6 mRNAのレベルを測定するのに使用するための公知のmRNA検出方法を容易に適合させることができる。

【0443】

試料中のTMPRSS6の発現のレベルを測定するための代替的な方法は、例えば、RT-PCR(Mullis, 1987、米国特許第4,683,202号明細書に記載される実験実施形態)、リガーゼ連鎖反応(Barany(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193)、自家持続配列複製法(Guattelli et al.(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム(Kwoh et al.(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ(Q-Beta Replicase)(Lizardi et al.(1988)Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製(Lizardiらの米国特許第5,854,033号明細書)又は任意の他の核酸増幅方法による、例えば、試料中のmRNAの(cDNAを調製するための)核酸増幅及び/又は逆転写酵素のプロセス、続いて、当業者に周知の技術を用いた増幅分子の検出を含む。これら

10

20

30

40

50

の検出スキームは、核酸分子がごく少数で存在する場合、核酸分子の検出に特に有用である。本発明の特定の態様において、TMPRSS6の発現のレベルは、定量的な蛍光性RT-PCR（即ち、TaqMan（商標）System）によって測定される。

【0444】

TMPRSS6 mRNAの発現レベルは、膜プロット（ノーザン、サザン、ドットなどのハイブリダイゼーション分析に使用されるものなど）、又はマイクロウェル、試料チューブ、ゲル、ビーズ又は繊維（又は結合された核酸を含む任意の固体担体）を用いて監視され得る。参照により本明細書に援用される、米国特許第5,770,722号明細書、同第5,874,219号明細書、同第5,744,305号明細書、同第5,677,195号明細書及び同第5,445,934号明細書を参照されたい。TMPRSS6発現レベルの測定は、溶液中での核酸プローブの使用も含み得る。

10

【0445】

好ましい実施形態において、mRNAの発現のレベルは、分岐DNA（bDNA）アッセイ又はリアルタイムPCR（qPCR）を用いて評価される。これらの方法の使用は、本明細書に提供される実施例に記載され、例示される。

【0446】

TMPRSS6タンパク質の発現のレベルは、タンパク質レベルの測定のための当該技術分野において公知の任意の方法を用いて測定され得る。このような方法としては、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、超拡散（hyperdiffusion）クロマトグラフィー、流体又はゲル内沈降素反応、吸光分光法、比色分析法、分光光度アッセイ、フローサイトメトリー、（単純又は二重）免疫拡散法、免疫電気泳動、ウエスタンブロット法、放射免疫定量法（RIA）、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、電気化学発光アッセイなどが挙げられる。

20

【0447】

本明細書において使用される際の「試料」という用語は、対象から単離された類似の体液、細胞、又は組織、ならびに対象中に存在する体液、細胞、又は組織の集合体を含む。生体液の例としては、血液、血清及び漿膜液、血漿、リンパ液、尿、脳脊髄液、唾液、眼液などが挙げられる。組織試料は、組織、器官又は局所領域に由来する試料を含み得る。例えば、試料は、特定の器官、器官の部分、あるいはそれらの器官中の体液又は細胞に由来し得る。特定の実施形態において、試料は、肝臓（例えば、全肝臓又は肝臓の特定の部分又は、例えば、肝細胞などの肝臓中の特定のタイプの細胞）に由来し得る。好ましい実施形態において、「対象に由来する試料」は、対象から得られる血液又は血漿を指す。更なる実施形態において、「対象に由来する試料」は、対象から得られる肝臓組織を指す。

30

【0448】

本発明の方法のある実施形態において、RNAi剤は、RNAi剤が対象内の特定の部位に送達されるように、対象に投与される。TMPRSS6の発現の阻害は、対象内の特定の部位からの体液又は組織に由来する試料中のTMPRSS6 mRNA又はTMPRSS6タンパク質のレベル又はレベルの変化の測定を用いて評価され得る。好ましい実施形態において、部位は肝臓である。部位はまた、上記の部位のいずれか1つからの細胞の小区分（subsection）又は部分群（subgroup）であり得る。部位は、特定のタイプの受容体を発現する細胞も含み得る。

40

【0449】

VI. TMPRSS6に関連する疾患の処置又は予防方法

本発明は、TMPRSS6遺伝子発現によって調節され得る疾病及び病態の処置又は予防方法も提供する。例えば、本明細書に記載される組成物は、鉄過剰に関連する疾患、例えば、サラセミア（例えば、 β -サラセミア又は δ -サラセミア）、原発性ヘモクロマトーシス、続発性ヘモクロマトーシス、重度の若年性ヘモクロマトーシス、赤芽球性ポルフィリン症、鉄芽球性貧血、溶血性貧血、赤血球異形成貧血、又は鎌型赤血球貧血を処置するのに使用され得る。一実施形態において、TMPRSS6 iRNAは、異常ヘモグロ

50

ピン症を処置するのに使用され得る。本発明のTMPRSS6 iRNAは、慢性アルコール依存症などの、他の病態に起因する鉄のレベルの上昇を処置するのに使用され得る。

【0450】

サラセミアでは、骨髄が、不十分な量のヘモグロビン鎖を合成し；これが、ひいては、赤血球の産生を減少させ、貧血を引き起こす。又は鎖のいずれかが罹患し得るが、サラセミアがより一般的である。新生児は、身体が、鎖を有さないHbFをまだ産生するため、正常であり；生後数ヶ月の間、骨髄がHbAを産生するように切り替わり、症状が現れ始める。

【0451】

- サラセミアは、HBB遺伝子の非発現(°)又は低発現(+)対立遺伝子のいずれかの突然変異に起因し、- サラセミアは、遺伝子型に応じて重症度が変化し、軽症型/ - サラセミア形質(/ °又は / +)、中間型 - サラセミア(° / +)、及び重症型 - サラセミア(° / °又は " 7 +)を含む。

10

【0452】

中間型サラセミア(TI)が、典型的に、溶血をほとんど示さない一方、重症型 - サラセミア(TM)には、典型的に、例えば、貧血及び脾腫を引き起こす十分な溶血；及び骨髄の活動亢進(bone marrow drive)(骨格変化、骨減少症)を引き起こす著しい無効造血、エリスロポエチン合成の増加、肝脾腫、造血剤の摂取(巨赤芽球性貧血)、及び血液中の高尿酸が伴う。本発明のiRNA、例えば、TMPRSS6 iRNAは、典型的に、よりTIのようなサラセミアを伴う鉄過剰を処置するのに(例えば、° / +、 / °又は / + 遺伝子型を有する固体を処置するのに)より適している。

20

【0453】

- サラセミアの症状は、例えば、治療による合併症、例えば、内分泌障害、肝線維症及び心筋繊維化を引き起こす鉄過剰も含む。TMPRSS6を標的とするiRNA剤の投与は、これらの症状のうちの1つ又は複数を処置するのに有効であり得る。

【0454】

- サラセミアは、HBA1又はHBA2遺伝子の非発現(a°)又は低発現(a+)対立遺伝子のいずれかの突然変異に起因し、又はサラセミアは、遺伝子型に応じて重症度が変化し、サラセミア形質(- /)、Hb Bart型及び胎児水腫(a° / a°)、軽症型a - サラセミア(- - /)、(- / -)、及びHbH病(- / - a)を含む。より少ないa - グロビン鎖が産生されると、成人において過剰な鎖及び新生児において過剰な鎖がもたらされる。過剰な鎖は、異常な酸素解離曲線を有する、不安定な四量体(4鎖のヘモグロビンH又はHbHと呼ばれる)を形成する。TMPRSS6を標的とするiRNA剤の投与は、a - サラセミアに罹患している対象における鉄過剰を処置するのに有効であり得る。

30

【0455】

ヘモクロマトーシスの症状としては、例えば、腹痛、関節痛、疲労、活力不足、脱力感、皮膚の黒ずみ(「ブロンジング(bronzing)」と呼ばれることが多い)、及び体毛の喪失が挙げられる。TMPRSS6を標的とするiRNA剤の投与は、これらの症状のうちの1つ又は複数を処置するのに有効であり得る。

40

【0456】

鉄過剰に関連する他の症状としては、肝疾患(肝硬変、癌)、心臓発作又は心不全、糖尿病、変形性関節症、骨粗鬆症、メタボリック・シンドローム、甲状腺機能低下症、性腺機能低下症、及び場合によっては早死にのリスクの増加が挙げられる。過剰負荷につながる鉄の不適切な使用(mismanagement)は、アルツハイマー病、若年性パーキンソン病、ハンチントン病、てんかん及び多発性硬化症などの神経変性疾患も促進し得る。TMPRSS6を標的とするiRNA剤、例えば、表1又は2に記載されるiRNAの投与により、これらの症状のうちの1つ又は複数を処置し、又は鉄レベルの増加によって悪化する疾病又は疾患の発症又は進行を防ぐことができる。

50

【0457】

本発明の方法は、他の薬剤及び/又は他の治療方法、例えば、これらの疾患を処置するのに現在用いられているものなどの、例えば、公知の薬剤及び/又は公知の治療方法と組み合わせ、例えば、鉄過剰に関連する疾患を処置するための、iRNA剤又はその医薬組成物の使用に更に関する。例えば、特定の実施形態において、TMPRSS6を標的とするiRNA剤は、例えば、鉄キレート剤(例えば、デフェロキサミン)、葉酸、輸血、静脈切開術、潰瘍に対処するための薬剤、胎児のヘモグロビン値を上昇させるための薬剤(例えば、ヒドロキシウレア)、感染症を制御するための薬剤(例えば、抗生物質及び抗ウイルス薬)、血栓状態を処置するための薬剤、又は幹細胞若しくは骨髄移植と組み合わせ投与される。幹細胞移植は、血縁者、例えば、兄弟姉妹などの臍帯に由来する幹細胞を用いることができる。例示的な鉄キレート剤としては、デフェロキサミン、デフェラシロクス(Exjade)、デフェリプロン、ビタミンE、小麦胚芽抽、トコフェルソラン、及びインジカキサンチンが挙げられる。

10

【0458】

iRNA剤及び更なる治療剤は、同じ組成物中で、例えば、非経口投与され得、又は更なる治療剤は、別個の組成物の一部として又は本明細書に記載される別の方法によって投与され得る。iRNA剤及び更なる治療剤の投与は、同時に、又は異なる時点で任意の順序であり得る。

【0459】

本発明のiRNA剤の投与は、鉄レベルを低下させ、フェリチンレベルを低下させ、及び/又はトランスフェリン飽和度レベルを低下させ得る。例えば、dsRNAの投与は、血清鉄レベルを低下させ、及び/又は血清フェリチンレベルを低下させ得る。トランスフェリン飽和度レベルは、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又はそれ以上だけ低下され得る。別の実施形態において、トランスフェリン飽和度レベルは、投与後7日間、10日間、20日間、30日間、又はそれ以上にわたってより低いままである。

20

【0460】

トランスフェリン飽和度レベルは、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、又はそれ以下に低下され得る。別の実施形態において、より低いトランスフェリン飽和度レベルは、投与後7日間、10日間、20日間、30日間、又はそれ以上にわたって維持される。トランスフェリン飽和度は、血清トランスフェリンに結合された鉄の量の尺度であり、血清鉄及び総鉄結合能の比率に相当する。

30

【0461】

血清鉄レベルは、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上だけ低下され得る。別の実施形態において、血清鉄レベルは、投与後7日間、10日間、20日間、30日間、又はそれ以上にわたってより低いままである。

【0462】

本発明のiRNA剤の投与は、好ましくは、哺乳動物の血液中、より特定的には血清中、又は1つ又は複数の組織中の鉄レベルの低下をもたらす。ある実施形態において、鉄レベルは、処置前のレベルと比較して、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上だけ低下される。

40

【0463】

この文脈における「低下させる」とは、このようなレベルの統計的に有意な低下を意味する。低下は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又はそれ以上であり得、このような障害を有さない個体の正常範囲内であると認められるレベルまで低下されるのが好ましい。

【0464】

本発明のiRNA剤の投与は、血清ヘプシジンレベルを増加させ、及び/又はヘプシジ

50

ン遺伝子発現を増加させ得る。例えば、dsRNAの投与は、少なくとも約10%、25%、50%、100%、150%、200%、250%、300%、又はそれ以上だけ血清ヘプシジンを増加させ得る。更なる例において、dsRNAの投与は、少なくとも約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、又はそれ以上だけヘプシジンmRNAレベルを増加させ得る。

【0465】

疾病の処置又は予防の有効性は、例えば、疾病の進行、疾病の寛解、症状の重症度、痛みの減少、クオリティ・オブ・ライフ、処置効果を持続させるのに必要な薬剤の用量、疾病マーカーのレベル、又は処置されている若しくは予防の対象とされる所定の疾病に適切な、測定可能な任意の他のパラメータを測定することによって評価され得る。このようなパラメータのいずれか1つ、又はパラメータの任意の組合せを測定することによって処置又は予防の有効性を監視することは、十分当業者の能力の範囲内である。例えば、トランスフェリン飽和度又は血清フェリチンのレベルは、所与の処置計画の有効性について監視され得る。

10

【0466】

鉄レベル試験は、典型的に、患者の血液の試料において行われる。鉄レベル試験は、タンパク質トランスフェリンによって運ばれる血清中の鉄の量を測定する。TIBC（総鉄結合能）試験は、トランスフェリンが完全に飽和していた場合に血液が運び得る鉄の量を測定する。トランスフェリンが、肝臓によって産生されるため、TIBCは、肝機能及び栄養を監視するのに使用され得る。トランスフェリン試験は、血液中のトランスフェリン（シデロフィリンとも呼ばれる）レベルの直接的尺度である。トランスフェリンの飽和レベルは、血清鉄レベルをTIBCで除算することによって計算され得る。フェリチン試験は、身体が後に使用するために鉄を貯蔵する血液中のタンパク質のレベルを測定する。

20

【0467】

本明細書に記載されるiRNA処置は、TMPRSS6に関連する疾患（例えば、血清中の鉄レベル、例えば、350µg/dL超、500µg/dL超、1000µg/dL超、又はそれ以上の鉄レベルによって示され得るような上昇した鉄レベル）に罹患している個体を処置するのに使用され得る。一実施形態において、血清中の鉄の上昇したレベルは、例えば、乾燥重量で15、20、25、又は30mg/gを超える。

【0468】

本明細書に記載されるiRNA処置は、血清中の上昇したフェリチンレベル、例えば、300µg/L超、500µg/L超、1000µg/L超、1500µg/L超、2000µg/L超、2500µg/L超、又は3000µg/L、又はそれ以上のフェリチンレベルによって示され得るような上昇した鉄レベルを有する個体を処置するのにも使用され得る。

30

【0469】

本明細書に記載されるiRNA処置は、血清中の上昇したトランスフェリンレベル、例えば、400mg/dL超、500mg/L超、1000mg/dL超、又はそれ以上のトランスフェリンレベルによって示され得るような上昇した鉄レベルを有する個体を処置するのに更に使用され得る。

40

【0470】

本明細書に記載されるiRNA処置は、緩やかに上昇したトランスフェリン飽和度レベル、例えば、40%、45%、又は50%又はそれ以上の飽和レベルによって示され得るような緩やかに上昇した鉄レベルを有する個体を処置するのにも使用され得る。更に、本明細書に記載される処置は、トランスフェリン飽和度のわずかな上昇を有する個体における鉄レベルの上昇を防ぐのにも使用され得る。当業者は、本明細書に記載されるiRNAによる処置を受けている対象におけるトランスフェリン飽和度レベルを容易に監視し、少なくとも5%又は10%のトランスフェリン飽和度レベルの低下を測定することができる。

【0471】

本明細書に記載されるiRNA処置は、400µg/dL超、500µg/dL超、又

50

は1000 µg/dL超、又はそれ以上のTIBC値によって示され得るような上昇した鉄レベルを有する個体を処置するのに使用され得る。

【0472】

ある実施形態において、本発明のiRNA剤による処置を必要とする個体は、減少したヘマトクリット値、減少したヘモグロビン値、増加した赤血球分布幅、増加した数の網状赤血球、減少した数の成熟赤血球、増加した不飽和鉄結合能、減少した無効造血、減少した髄外造血、及び/又は減少したHAM P 1発現レベルを有する。

【0473】

患者は、血糖(グルコース)値又はフェトプロテインレベルのアッセイによって、心エコー図(例えば、心機能を調べるため)、心電図(ECG)(例えば、心臓の電気的活動を調べるため)、画像検査(CTスキャン、MRI及び超音波など)、及び肝機能試験によって更に監視され得る。過剰な鉄染色又は鉄濃度が、肝生検試料において、又は肝臓障害の程度、例えば、肝疾患の病期を確認するために、測定され得る。

10

【0474】

処置又は予防の効果は、疾病状態の1つ又は複数のパラメータの統計的に有意な改善がある場合、又は悪化若しくは本来予想されていた症状が発生しないことにより明らかである。一例として、疾病の測定可能なパラメータの少なくとも10%、好ましくは、少なくとも20%、30%、40%、50%又はそれ以上の好ましい変化は、有効な処置を示し得る。所定のiRNA薬剤又はその薬剤の製剤の有効性も、当該技術分野において公知であるように、所定の疾病に関して実験動物モデルを用いて判断することができる。実験動物モデルを用いる場合、処置の有効性は、マーカー又は症状の統計的に有意な低下が観察された場合に証明される。

20

【0475】

あるいは、有効性は、臨床的に許容される疾病の重症度の評価尺度に基づいて診断の当業者により決定された疾病の重症度の低減により測定することができる。

【0476】

本明細書において使用される際、「対象」は、ヒト又は非ヒト動物、好ましくは、脊椎動物、より好ましくは、哺乳動物を含む。対象は、トランスジェニック生物を含み得る。最も好ましくは、対象は、TMPRSS6に関連する疾患に罹患しているか、又はTMPRSS6に関連する疾患を発症しやすいヒトなどのヒトである。

30

【0477】

本発明の方法のある実施形態において、TMPRSS6発現は、例えば、少なくとも1週間、2週間、3週間、又は4週間又はそれ以上の長期間にわたって低下される。例えば、場合によっては、TMPRSS6遺伝子の発現は、本明細書に記載されるiRNA剤の投与によって、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は100%だけ抑制される。ある実施形態において、TMPRSS6遺伝子は、iRNA剤の投与によって、少なくとも約60%、70%、又は80%だけ抑制される。ある実施形態において、TMPRSS6遺伝子は、二本鎖オリゴヌクレオチドの投与によって、少なくとも約85%、90%、又は95%だけ抑制される。別の実施形態において、TMPRSS6遺伝子は、投与後7日間、10日間、20日間、30日間、又はそれ以上にわたって抑制されたままである。

40

【0478】

本発明のRNAi剤は、皮下、静脈内、筋肉内、眼内、気管支内、胸膜内、腹腔内、動脈内、リンパ管、脳脊髄、及びそれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない、当該技術分野において公知の任意の投与方法を用いて、対象に投与され得る。好ましい実施形態において、RNAi剤は、皮下投与される。

【0479】

ある実施形態において、投与は、蓄積注射による。蓄積注射は、長期間にわたって持続的にRNAi剤を放出し得る。したがって、蓄積注射は、所望の効果、例えば、TMPRSS6

50

SS6の所望の阻害、又は治療又は予防効果を得るのに必要な投与頻度を減少させ得る。蓄積注射は、より一貫した血清濃度も提供し得る。蓄積注射は、皮下注射又は筋肉内注射を含み得る。好ましい実施形態において、蓄積注射は、皮下注射である。

【0480】

ある実施形態において、投与は、ポンプによる。ポンプは、外部ポンプ又は手術により埋め込まれたポンプであってもよい。特定の実施形態において、ポンプは、皮下に埋め込まれた浸透圧ポンプである。他の実施形態において、ポンプは、注入ポンプである。注入ポンプは、静脈内、皮下、動脈内、又は硬膜外注入に使用され得る。好ましい実施形態において、注入ポンプは、皮下注入ポンプである。他の実施形態において、ポンプは、RNAi剤を肝臓に送達する手術により埋め込まれたポンプである。

10

【0481】

他の投与方法としては、硬膜外、脳内、脳室内、経鼻投与、動脈内、心臓内、骨内注入、くも膜下腔内、及び硝子体内、及び経肺が挙げられる。投与方法は、局所又は全身的処置が所望されるかどうかに基づいて、及び処置される部位に基づいて選択され得る。投与の経路及び部位は、標的化を促進するように選択され得る。

【0482】

本方法は、例えば、少なくとも5、より好ましくは7、10、14、21、25、30又は40日間にわたってTMPRSS6 mRNAのレベルを低下させるのに十分な用量でiRNA剤を投与する工程と；任意選択で、第2の単回用量のdsRNAを投与する工程とを含み、ここで、第2の単回用量は、第1の単回用量が投与された少なくとも5、より好ましくは、7、10、14、21、25、30又は40日後に投与され、それにより、対象内でのTMPRSS6遺伝子の発現を阻害する。

20

【0483】

一実施形態において、本発明のiRNA剤の用量は、4週間に1回以下、3週間に1回以下、2週間に1回以下、又は週に1回以下投与される。別の実施形態において、投与は、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、又は6ヶ月間、又は1年間又はそれ以上にわたって維持され得る。別の実施形態において、本発明のiRNA剤の用量は、3週間にわたって週に1回投与される。

【0484】

一般に、iRNA剤は、免疫系を活性化せず、例えば、TNF-又はIFN-レベルなどのサイトカインレベルを増加させない。例えば、本明細書に記載されるものなどのインビトロPBMCアッセイなどのアッセイによって測定される場合、TNF-又はIFN-のレベルの増加は、TMPRSS6を標的とししないdsRNAなどの対照dsRNAで処理された対照細胞の30%、20%、又は10%未満である。

30

【0485】

例えば、対象には、0.3mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、又は3mg/kgのdsRNAなどの、治療量のiRNA剤が投与され得る。iRNA剤は、5分間、10分間、15分間、20分間、又は25分間などの期間にわたって、静脈内注射によって投与され得る。投与は、例えば、隔週（即ち、2週間ごと）で1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間又はそれ以上など、定期的に繰り返される。最初の処置計画の後、処置剤は、より少ない頻度で投与され得る。例えば、隔週で3ヶ月間の投与後、投与は、月に1回で6ヶ月間又は1年間又はそれ以上にわたって繰り返され得る。iRNA剤の投与は、例えば、細胞、組織、血液、尿又は患者の他の区画内のTMPRSS6レベルを、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%又は少なくとも90%又はそれ以上だけ低下させ得る。

40

【0486】

iRNA剤の総用量を投与する前に、患者により少ない用量を投与し（5%未満となる用量の注入反応など）、アレルギー反応などの副作用、又は脂質レベル又は血圧の上昇を

50

監視し得る。別の例では、サイトカイン（例えば、TNF - 又はINF - ）レベルの増加などの望ましくない免疫賦活作用に関して患者を監視し得る。

【0487】

鉄レベルの上昇に関連する多くの疾病は、遺伝性である。したがって、TMPRSS6 iRNAを必要とする患者が、家族歴を聴取することによって特定され得る。医者、看護師、又は家族の一員などの医療介護提供者が、TMPRSS6 dsRNAを処方又は投与する前に、家族歴を聴取することができる。TMPRSS6 dsRNAが患者に投与される前に、TMPRSS6 遺伝子における突然変異を特定するために、DNA試験も患者に対して行われ得る。例えば、遺伝性ヘモクロマトーシスの診断は、GenBank登録番号CAB07442.1 (GI: 1890180、2008年10月23日付の記録) にしたがって、2つのHFE (ヘモクロマトーシス) 遺伝子突然変異C282Y及びH63Dを特定することによって確認され得る。

10

【0488】

処置又は予防の効果は、疾病状態の1つ又は複数のパラメータの統計的に有意な改善が存在した場合、又は悪化若しくはさもなくば予想されていた症状が発生しないことにより明らかである。一例として、疾病の測定可能なパラメータの少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%、又はそれを上回る好ましい変化は、有効な処置を示し得る。本発明の特定のiRNA剤、又はそのiRNA剤の所定の製剤に関する有効性も、当技術分野にて既知のように、所定の疾病に関して実験動物モデルを使用して判断することができる。実験動物モデルを使用する際、処置の有効性は、マーカー又は症状において統計的に有意な低下が観察された場合に証明される。

20

【0489】

一実施形態において、RNAi剤は、約0.25mg/kg~約50mg/kg、例えば、約0.25mg/kg~約0.5mg/kg、約0.25mg/kg~約1mg/kg、約0.25mg/kg~約5mg/kg、約0.25mg/kg~約10mg/kg、約1mg/kg~約10mg/kg、約5mg/kg~約15mg/kg、約10mg/kg~約20mg/kg、約15mg/kg~約25mg/kg、約20mg/kg~約30mg/kg、約25mg/kg~約35mg/kg、又は約40mg/kg~約50mg/kgの用量で投与される。

【0490】

ある実施形態において、RNAi剤は、約0.25mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約11mg/kg、約12mg/kg、約13mg/kg、約14mg/kg、約15mg/kg、約16mg/kg、約17mg/kg、約18mg/kg、約19mg/kg、約20mg/kg、約21mg/kg、約22mg/kg、約23mg/kg、約24mg/kg、約25mg/kg、約26mg/kg、約27mg/kg、約28mg/kg、約29mg/kg、30mg/kg、約31mg/kg、約32mg/kg、約33mg/kg、約34mg/kg、約35mg/kg、約36mg/kg、約37mg/kg、約38mg/kg、約39mg/kg、約40mg/kg、約41mg/kg、約42mg/kg、約43mg/kg、約44mg/kg、約45mg/kg、約46mg/kg、約47mg/kg、約48mg/kg、約49mg/kg又は約50mg/kgの用量で投与される。

30

40

【0491】

特定の実施形態において、例えば、本発明の組成物が、本明細書に記載されるdsRNA及び脂質を含む場合、対象には、約0.01mg/kg~約5mg/kg、約0.01mg/kg~約10mg/kg、約0.05mg/kg~約5mg/kg、約0.05mg/kg~約10mg/kg、約0.1mg/kg~約5mg/kg、約0.1mg/kg~約10mg/kg、約0.2mg/kg~約5mg/kg、約0.2mg/kg~約10mg/kg、約0.3mg/kg~約5mg/kg、約0.3mg/kg~約10m

50

g / k g、約 0.4 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0.4 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 0.5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 0.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 1 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 1 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 1.5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 1.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 2 m g / k g ~ 約 2.5 m g / k g、約 2 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 3 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 3 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 3.5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4.5 m g / k g ~ 約 5 m g / k g、約 4 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 4.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 5.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 6 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 6.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 7 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 7.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 8 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 8.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、約 9 m g / k g ~ 約 10 m g / k g、又は約 9.5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g などの、治療量の iRNA が投与され得る。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

10

【0492】

例えば、dsRNA は、約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、又は約 10 m g / k g の用量で投与され得る。記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図される。

20

【0493】

本発明の特定の実施形態において、例えば、二本鎖 RNA i 剤が、1つ又は複数の修飾（例えば、3連続ヌクレオチド上の3つの同一の修飾のモチーフ（剤の切断部位又はその近傍に1つのこのようなモチーフを含む））、6つのホスホロチオエート結合、及びリガンドを含む場合、このような剤は、約 0.01 ~ 約 0.5 m g / k g、約 0.01 ~ 約 0.4 m g / k g、約 0.01 ~ 約 0.3 m g / k g、約 0.01 ~ 約 0.2 m g / k g、約 0.01 ~ 約 0.1 m g / k g、約 0.01 m g / k g ~ 約 0.09 m g / k g、約 0.01 m g / k g ~ 約 0.08 m g / k g、約 0.01 m g / k g ~ 約 0.07 m g / k g、約 0.01 m g / k g ~ 約 0.06 m g / k g、約 0.01 m g / k g ~ 約 0.05 m g / k g、約 0.02 ~ 約 0.5 m g / k g、約 0.02 ~ 約 0.4 m g / k g、約 0.02 ~ 約 0.3 m g / k g、約 0.02 ~ 約 0.2 m g / k g、約 0.02 ~ 約 0.1 m g / k g、約 0.02 m g / k g ~ 約 0.09 m g / k g、約 0.02 m g / k g ~ 約 0.08 m g / k g、約 0.02 m g / k g ~ 約 0.07 m g / k g、約 0.02 m g / k g ~ 約 0.06 m g / k g、約 0.02 m g / k g ~ 約 0.05 m g / k g、約 0.03 ~ 約 0.5 m g / k g、約 0.03 ~ 約 0.4 m g / k g、約 0.03 ~ 約 0.3 m g / k g、約 0.03 ~ 約 0.2 m g / k g、約 0.03 ~ 約 0.1 m g / k g、約 0.03 m g / k g ~ 約 0.09 m g / k g、約 0.03 m g / k g ~ 約 0.08 m g / k g、約 0.03 m g / k g ~ 約 0.07 m g / k g、約 0.03 m g / k g ~ 約 0.06 m g / k g、約 0.03 m g / k g ~ 約 0.05 m g / k g、約 0.04 ~ 約 0.5 m g / k g、約 0.04 ~ 約 0.4 m g / k g、約 0.04 ~ 約 0.3 m g / k g、約 0.04 ~ 約 0.2 m g / k g、約 0.04 ~ 約 0.1 m g / k g、約 0.04 m g / k g ~ 約 0.09 m g / k g、約 0.04 m g / k g ~ 約 0.08 m g / k g、約 0.04 m g / k g ~ 約 0.07 m g / k g、約 0.04 m g / k g ~ 約 0.06 m g / k g、約 0.05 ~

30

40

50

約 0.5 mg/kg、約 0.05 ~ 約 0.4 mg/kg、約 0.05 ~ 約 0.3 mg/kg、約 0.05 ~ 約 0.2 mg/kg、約 0.05 ~ 約 0.1 mg/kg、約 0.05 mg/kg ~ 約 0.09 mg/kg、約 0.05 mg/kg ~ 約 0.08 mg/kg、又は約 0.05 mg/kg ~ 約 0.07 mg/kg の用量で投与される。上記の記載される値の中間の値及び範囲も、本発明の一部であることが意図され、例えば、RNAi 剤は、約 0.015 mg/kg ~ 約 0.45 mg/mg の用量で対象に投与され得る。

【0494】

例えば、RNAi 剤、例えば、医薬組成物中の RNAi 剤は、約 0.01 mg/kg、0.0125 mg/kg、0.015 mg/kg、0.0175 mg/kg、0.02 mg/kg、0.0225 mg/kg、0.025 mg/kg、0.0275 mg/kg、0.03 mg/kg、0.0325 mg/kg、0.035 mg/kg、0.0375 mg/kg、0.04 mg/kg、0.0425 mg/kg、0.045 mg/kg、0.0475 mg/kg、0.05 mg/kg、0.0525 mg/kg、0.055 mg/kg、0.0575 mg/kg、0.06 mg/kg、0.0625 mg/kg、0.065 mg/kg、0.0675 mg/kg、0.07 mg/kg、0.0725 mg/kg、0.075 mg/kg、0.0775 mg/kg、0.08 mg/kg、0.0825 mg/kg、0.085 mg/kg、0.0875 mg/kg、0.09 mg/kg、0.0925 mg/kg、0.095 mg/kg、0.0975 mg/kg、0.1 mg/kg、0.125 mg/kg、0.15 mg/kg、0.175 mg/kg、0.2 mg/kg、0.225 mg/kg、0.25 mg/kg、0.275 mg/kg、0.3 mg/kg、0.325 mg/kg、0.35 mg/kg、0.375 mg/kg、0.4 mg/kg、0.425 mg/kg、0.45 mg/kg、0.475 mg/kg、又は約 0.5 mg/kg の用量で投与され得る。上記の記載される値の中間の値も、本発明の一部であることが意図される。

【0495】

対象に投与され得る RNAi 剤の用量は、望ましくない副作用を避けると同時に、例えば、所望のレベルの TMPRSS6 遺伝子の抑制（例えば、TMPRSS6 mRNA の抑制、TMPRSS6 タンパク質の発現、又は脂質レベルの低下に基づいて評価した際の）又は所望の治療又は予防効果を得るために、特定の用量のリスク及びベネフィットを釣り合わせるように調整され得る。

【0496】

ある実施形態において、RNAi 剤は、2 つ以上の用量で投与される。反復される又は高頻度の注入を促進することが必要とされる場合、送達デバイス、例えば、ポンプ、半永久的なステント（例えば、静脈内、腹腔内、嚢内又は関節包内）、又はリザーバの埋め込みが望ましいことがある。ある実施形態において、その後の投与の回数又は量は、所望の効果の達成、例えば、TMPRSS6 遺伝子の抑制、又は治療又は予防効果の達成、例えば、鉄過剰の減少に応じて決まる。ある実施形態において、RNAi 剤は、計画にしたがって投与される。例えば、RNAi 剤は、週に 1 回、週に 2 回、週に 3 回、週に 4 回、又は週に 5 回投与され得る。ある実施形態において、計画は、例えば、1 時間ごと、4 時間ごと、6 時間ごと、8 時間ごと、12 時間ごと、毎日、2 日ごと、3 日ごと、4 日ごと、5 日ごと、毎週、隔週、又は毎月での、規則的間隔の投与を含む。他の実施形態において、計画は、狭い間隔の投与、続いて、RNAi 剤が投与されないより長い期間を含む。例えば、計画は、比較的短い期間（例えば、約 6 時間ごと、約 12 時間ごと、約 24 時間、約 48 時間ごと、又は約 72 時間ごと）で投与される最初の組の投与、続いて、RNAi 剤が投与されないより長い期間（例えば、約 1 週間、約 2 週間、約 3 週間、約 4 週間、約 5 週間、約 6 週間、約 7 週間、又は約 8 週間）を含む。一実施形態において、RNAi 剤は、最初に 1 時間ごとに投与され、その後、より長い間隔（例えば、毎日、毎週、隔週、又は毎月）で投与される。別の実施形態において、RNAi 剤は、最初に毎日投与され、その後、より長い間隔（例えば、毎週、隔週、又は毎月）で投与される。特定の実施形態において、より長い間隔は、時間とともに増加し、又は所望の効果の達成に基づいて決定

10

20

30

40

50

される。特定の実施形態において、RNAi剤は、第1週の間は1日1回投与され、その後、投与の8日目に週1回投与が開始する。別の特定の実施形態において、RNAi剤は、第1週の間は1日おきに投与され、その後、投与の8日目に週1回投与が開始する。

【0497】

ある実施形態において、RNAi剤は、狭い間隔の投与の「初期投与段階」と、後に続き得る、RNAi剤がより長い間隔で投与される「維持段階」を含む投与計画で投与される。一実施形態において、初期投与段階は、第1週の間、RNAi剤の1日1回の投与を5回含む。別の実施形態において、維持段階は、RNAi剤の週に1回又は2回の投与を含む。更なる実施形態において、維持段階は、5週間継続する。

【0498】

これらの計画のいずれも、任意選択的に、1回又は複数回の反復で繰り返され得る。反復回数は、所望の効果の達成、例えば、TMPRSS6遺伝子の抑制、及び/又は治療又は予防効果の達成、例えば鉄レベルの低下又はサラセミア、例えば、サラセミア、又はヘモクロマトーシスの症状の減少に応じて決まる。

【0499】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載されるiRNA剤をどのように投与するかについて、最終使用者、例えば、介護者又は対象に指示する方法を取り上げる。本方法は、任意選択で、1回又は複数回の用量のiRNA剤を最終使用者に提供する工程と、本明細書に記載される投与計画でiRNA剤を投与するように最終使用者に指示し、それにより、最終使用者に指示する工程とを含む。

【0500】

VII. キット

本発明は、iRNA剤のいずれかを使用し、及び/又は本発明の方法のいずれかを行うためのキットも提供する。このようなキットは、1つ又は複数のRNAi剤と、使用説明書、例えば、細胞を、TMPRSS6の発現を阻害するのに有効な量のRNAi剤と接触させることによって、細胞内でのTMPRSS6の発現を阻害するための説明書とを含む。キットは、任意選択で、細胞をRNAi剤と接触させるための手段（例えば、注射器具）、又はTMPRSS6の阻害を測定するための手段（例えば、TMPRSS6 mRNA又はTTRタンパク質の阻害を測定するための手段）を更に含み得る。TMPRSS6の阻害を測定するためのこのような手段は、例えば、血漿試料などの、対象に由来する試料を得るための手段を含み得る。本発明のキットは、任意選択で、RNAi剤を対象に投与するための手段又は治療有効量又は予防的に有効な量を決定するための手段を更に含み得る。

【0501】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者により通常に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書に記載したものと同様の又は等価な方法及び材料を、本発明を特徴付けるiRNA及び方法の実践又は試験に使用できるが、好適な方法及び材料は下記に記載されている。本明細書に言及した全ての刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配する。加えて、材料、方法及び実施例は、単なる例示であり、限定を意図するものではない。

【実施例】

【0502】

材料及び方法

以下の材料及び方法を実施例に使用した。

ABI高容量cDNA逆転写キット(Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813)を用いたcDNA合成

【0503】

反応当たり2µlの10倍緩衝液、0.8µlの25倍dNTPs、2µlのランダムプライマー、1µlの逆転写酵素、1µlのRNase阻害剤及び3.2µlのH₂Oの

10

20

30

40

50

マスターミックスを、 $10\ \mu\text{l}$ の総RNAに加えた。以下の工程を介して、Bio-Rad C-1000又はS-1000サーモサイクラー(Hercules, CA)を用いて、 25°C で10分間、 37°C で120分間、 85°C で5秒間、 4°C で保持。

【0504】

細胞培養及びトランスフェクション

Hep3B細胞(ATCC, Manassas, VA)を、10%のFBS、ストレプトマイシン、及びグルタミン(ATCC)が補充されたEMEM(ATCC)中、5%のCO₂の雰囲気下、 37°C でほぼコンフルエンスまで増殖させた後、トリプシン処理によりプレートから解放した。ウェル当たり $14.8\ \mu\text{l}$ のOpti-MEM及び $0.2\ \mu\text{l}$ のLipofectamine RNAiMax(Invitrogen, Carlsbad CA, cat # 13778-150)を、96ウェルプレート内のウェルごとに $5\ \mu\text{l}$ の各siRNA二本鎖に加えることによりトランスフェクションを行い、室温で15分間インキュベートした。次に、約 2×10^4 個のHep3B細胞を含む、抗生物質を有さない $80\ \mu\text{l}$ の完全増殖培地を、siRNA混合物に加えた。RNA精製の前に、細胞を、24時間インキュベートした。 $10\ \text{nM}$ 及び $0.1\ \text{nM}$ の最終二本鎖濃度で単回投与実験を行った。

10

【0505】

DYNABEADS mRNA単離キット(Invitrogen, part #: 610-12)を用いた総RNA単離

20

細胞を採取し、 $150\ \mu\text{l}$ の溶解/結合緩衝液中に溶解させた後、プラットフォームシェーカーを用いて $850\ \text{rpm}$ で5分間混合した(混合速度は、プロセス全体を通して同一であった)。 $10\ \text{ml}$ の磁気ビーズ及び $80\ \mu\text{l}$ の溶解/結合緩衝液混合物を丸底プレートに加え、1分間混合した。磁気スタンドを用いて磁気ビーズを捕捉し、ビーズを乱すことなく上清を除去した。上清を除去した後、溶解した細胞を残りのビーズに加え、5分間混合した。上清を除去した後、磁気ビーズを $150\ \mu\text{l}$ の洗浄緩衝液Aで2回洗浄し、1分間混合した。ビーズを再度捕捉し、上清を除去した。次に、ビーズを $150\ \mu\text{l}$ の洗浄緩衝液Bで洗浄し、捕捉し、上清を除去した。次に、ビーズを $150\ \mu\text{l}$ の溶出緩衝液で洗浄し、捕捉し、上清を除去した。ビーズを2分間乾燥させた。乾燥後、 $50\ \mu\text{l}$ の溶出緩衝液を加え、 75°C で5分間混合した。ビーズを磁石上で5分間捕捉し、精製されたRNAを含有する $50\ \mu\text{l}$ の上清を除去し、新たな96ウェルプレートに加えた。

30

【0506】

リアルタイムPCR

$2\ \mu\text{l}$ のcDNAを、384ウェルプレート(Roche cat # 04887301001)中で、ウェル当たり、 $0.5\ \mu\text{l}$ のヒトGAPDH TaqMan Probe(Applied Biosystems Cat # 4326317E)、 $0.5\ \mu\text{l}$ のヒトTMPRSS6 TaqMan probe(Applied Biosystems cat # Hs00542184_m1)及び $5\ \mu\text{l}$ のLightcycler 480プローブマスターミックス(Roche Cat # 04887301001)を含むマスターミックスに加えた。Ct(RQ)アッセイを用いて、Roche LC480 Real Time PCRシステム(Roche)中で、リアルタイムPCRを行った。特に断りのない限り、各二本鎖を2つの独立したトランスフェクションにおいて試験し、各トランスフェクションを2回アッセイした。

40

【0507】

相対的な倍加変化を計算するために、Ct方法を用いて、リアルタイムデータを分析し、 $10\ \text{nM}$ のAD-1955でトランスフェクトした細胞、又は疑似トランスフェクト細胞を用いて行ったアッセイに対して正規化した。

【0508】

AD-1955のセンス配列及びアンチセンス配列は、センス： $5' - \text{cuuAcGcu}$

50

G A G u A c u u c G A d T s d T - 3 ' (配列番号 1 5) ; 及びアンチセンス : 5 ' - U C G A A G u A C U c A G C G u A A G d T s d T - 3 ' (配列番号 1 6) である。

【 0 5 0 9 】

【 表 4 】

表 B: 核酸配列の説明に使用されるヌクレオチドモノマーの略語。

| 略語 | ヌクレオチド |
|-----|--------------------------------|
| A | アデノシン-3'-リン酸 |
| Ab | β-L-アデノシン-3'-リン酸 |
| Af | 2'-フルオロアデノシン-3'-リン酸 |
| Afs | 2'-フルオロアデノシン-3'-ホスホロチオエート |
| As | アデノシン-3'-ホスホロチオエート |
| C | シチジン-3'-リン酸 |
| Cb | β-L-シチジン-3'-リン酸 |
| Cf | 2'-フルオロシチジン-3'-リン酸 |
| Cfs | 2'-フルオロシチジン-3'-ホスホロチオエート |
| Cs | シチジン-3'-ホスホロチオエート |
| G | グアノシン-3'-リン酸 |
| Gb | β-L-グアノシン-3'-リン酸 |
| Gbs | β-L-グアノシン-3'-ホスホロチオエート |
| Gf | 2'-フルオログアノシン-3'-リン酸 |
| Gfs | 2'-フルオログアノシン-3'-ホスホロチオエート |
| Gs | グアノシン-3'-ホスホロチオエート |
| T | 5'-メチルウリジン-3'-リン酸 |
| Tf | 2'-フルオロ-5-メチルウリジン-3'-リン酸 |
| Tfs | 2'-フルオロ-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート |
| Ts | 5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート |

【 0 5 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 5】

| 略語 | ヌクレオチド |
|----------|--|
| U | ウリジン-3'-リン酸 |
| Uf | 2'-フルオロウリジン-3'-リン酸 |
| Ufs | 2'-フルオロウリジン -3'-ホスホロチオエート |
| Us | ウリジン -3'-ホスホロチオエート |
| N | 任意のヌクレオチド (G, A, C, T 又は U) |
| a | 2'-O-メチルアデノシン-3'-リン酸 |
| as | 2'-O-メチルアデノシン-3'- ホスホロチオエート |
| c | 2'-O-メチルシチジン-3'-リン酸 |
| cs | 2'-O-メチルシチジン-3'- ホスホロチオエート |
| g | 2'-O-メチルグアノシン-3'-リン酸 |
| gs | 2'-O-メチルグアノシン-3'- ホスホロチオエート |
| t | 2'-O-メチル-5-メチルウリジン-3'-リン酸 |
| ts | 2'-O-メチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート |
| u | 2'-O-メチルウリジン-3'-リン酸 |
| us | 2'-O-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート |
| dT | 2'-デオキシチミジン |
| dTs | 2'-デオキシチミジン-3'-ホスホロチオエート |
| dU | 2'-デオキシウリジン |
| s | ホスホロチオエート結合 |
| L96 | N-[トリス(GalNAc-アルキル)-アミドデカノイル]-4-ヒドロキシプロリノール Hyp-(GalNAc-アルキル)3 |
| (Aeo) | 2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-リン酸 |
| (Aeos) | 2'-O-メトキシエチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート |
| (Geo) | 2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'-リン酸 |
| (Geos) | 2'-O-メトキシエチルグアノシン-3'- ホスホロチオエート |
| (Teo) | 2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'-リン酸 |
| (Teos) | 2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン-3'- ホスホロチオエート |
| (m5Ceo) | 2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'-リン酸 |
| (m5Ceos) | 2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン-3'- ホスホロチオエート |
| (A3m) | 3'-O-メチルアデノシン-2'-リン酸 |
| (A3mx) | 3'-O-メチル-キシロフラノシルアデノシン-2'-リン酸 |
| (G3m) | 3'-O-メチルグアノシン-2'-リン酸 |
| (G3mx) | 3'-O-メチル-キシロフラノシルグアノシン-2'-リン酸 |
| (C3m) | 3'-O-メチルシチジン-2'-リン酸 |
| (C3mx) | 3'-O-メチル-キシロフラノシルシチジン-2'-リン酸 |
| (U3m) | 3'-O-メチルウリジン-2'-リン酸 |

【 0 5 1 1 】

10

20

30

40

50

【表 6】

| 略語 | ヌクレオチド |
|----------|---|
| (U3mx) | 3'-O-メチルキシロウリジン-2'-リン酸 |
| (Chd) | 2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸 |
| (pshe) | ヒドロキシエチルホスホロチオエート |
| (Uhd) | 2'-O-ヘキサデシル-ウリジン-3'-リン酸 |
| (Tgn) | チミジン-グリコール核酸 (GNA) S-異性体 |
| (Cgn) | シチジン-グリコール核酸 (GNA) |
| (Chd) | 2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸 |
| (Ggn) | 2'-O-ヘキサデシル-シチジン-3'-リン酸 |
| (Agn) | アデノシン-グリコール核酸 (GNA) |
| P | 5'-リン酸 |
| (m5Cam) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-リン酸 |
| (m5Cams) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)-5-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート |
| (Tam) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-リン酸 |
| (Tams) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)チミジン-3'-ホスホロチオエート |
| (Aam) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3'-リン酸 |
| (Aams) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)アデノシン-3'-ホスホロチオエート |
| (Gam) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3'-リン酸 |
| (Gams) | 2'-O-(N-メチルアセトアミド)グアノシン-3'-ホスホロチオエート |
| Y44 | 2-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-5-リン酸 |

10

20

【0512】

実施例 1 . オリゴヌクレオチドの設計、特異性及び有効性の予測
転写物

30

NCBI Gene database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) において注釈付けされたヒト、アカゲザル (アカゲザル (Macaca mulatta))、マウス、及びラット TMPRSS6 転写物を標的とする siRNA を特定するために、siRNA 設計を行った。設計には、NCBI RefSeq collection からの以下の転写物を使用した: ヒト - NM_153609.2; アカゲザル - XM_001085203.2 及び XM_001085319.1; マウス - NM_027902.2; ラット - NM_001130556.1。高い霊長類/げっ歯類配列分散のため、限定はされないが、ヒト及びアカゲザル転写物のみ; ヒト、アカゲザル、及びマウス転写物のみ; ヒト、アカゲザル、マウス、及びラット転写物のみ; 及びマウス及びラット転写物のみと一致する二本鎖を含むバッチを含むいくつかの別個のバッチで、siRNA 二本鎖を設計した。各設計バッチ (上記) において考慮される、列挙されるヒト転写物及び他の種の転写物と 100% の同一性を共有する全ての siRNA 二本鎖を設計した。

40

【0513】

全ての可能な 19 量体 (19mer) の特異性を、各配列から予測した。次に、7ヌクレオチドより長い反復がない候補 19 量体を選択した。これらの 1259 の候補ヒト/アカゲザル、91 のヒト/アカゲザル/マウス、37 のヒト/アカゲザル/マウス/ラット、及び 810 のマウス/ラット siRNA を、パイソンスクリプト (python script) 「BruteForce.py」で実施される包括的な「力まかせ (brut

50

e - f o r c e) 」アルゴリズムを用いて、適切なトランスクリプトーム (ヒト、アカゲザル、マウス、又はラット N C B I R e f s e q セット内の N M _ 及び X M _ レコードのセットとして定義される) に対する包括的検索に使用した。次に、スクリプトが、転写物 - オリゴのアライメントを解析して、s i R N A と、あらゆる可能性のある「オフターゲット」転写物との mismatches の位置及び数に基づいてスコアを生成した。オフターゲットスコアを重み付けして、分子の 5 ' 末端から 2 ~ 9 位にある、s i R N A の「シード」領域の差異を強調する。力まかせ探索 (b r u t e - f o r c e s e a r c h) による各オリゴ - 転写物対に、個々の mismatches スコアを合計することによって mismatches スコアを与え； 2 ~ 9 位にある mismatches を、2 . 8 とみなし、切断部位 1 0 ~ 1 1 位にある mismatches を、1 . 2 とみなし、領域 1 2 ~ 1 9 の mismatches を、1 . 0 とみなした。更なるオフターゲット予測を、各オリゴの 3 つの異なる、シード指向性の 6 量体から誘導される 7 量体及び 8 量体の頻度を比較することによって行った。5 ' 開始点に対して 2 ~ 7 位からの 6 量体を用いて、2 つの 7 量体及び 1 つの 8 量体を生成した。3 ' A を 6 量体に加えることによって 7 量体 1 を生成し； 5 ' A を 6 量体に加えることによって 7 量体 2 を生成し； A を 6 量体の 5 ' 及び 3 ' 末端の両方に加えることによって、8 量体を生成した。ヒト、アカゲザル、マウス、又はラット 3 ' U T R o m e (コード領域「C D S」の末端が明確に定義された N C B I の R e f s e q データベースからのトランスクリプトームの部分列として定義される) における 8 量体及び 7 量体の頻度を予め計算した。8 量体の頻度の範囲からの中央値を用いて、8 量体の頻度を 7 量体の頻度に対して標準化した。次に、「m i r S e e d S c o r e」を、((3 × 標準化された 8 量体の数値) + (2 × 7 量体 2 の数値) + (1 × 7 量体 1 の数値)) の和を計算することによって計算した。

【 0 5 1 4 】

両方の s i R N A 鎖を、計算されたスコアにしたがって、特異性のカテゴリーに割り当てた： 3 を超えるスコアは、高度の特異性があり、3 に等しいスコアは、特異性があり、2 . 2 ~ 2 . 8 のスコアは中程度の特異性があるとみなした。s i R N A を、アンチセンス鎖の特異性によって並べ替えた。次に、アンチセンスオリゴが、1 番目の位置で G C を欠き、1 3 及び 1 4 番目の位置の両方で G を欠き、シード領域における 3 以上の U s 又は A s を有する (高い予測される有効性を有する二本鎖の特性)、ヒト / アカゲザル及びマウス / ラットセットからの二本鎖を選択した。同様に、シード領域における 3 以上の U s 又は A s を有していたヒト / アカゲザル / マウス及びヒト / アカゲザル / マウス / ラットセットからの二本鎖を選択した。

【 0 5 1 5 】

センス鎖及びアンチセンス鎖のそれぞれにおいて 2 1 及び 2 3 ヌクレオチド長の候補 G a l N A c コンジュゲート二本鎖を、(標的転写物との完全な相補性を保ちながら) アンチセンス 1 9 量体の 4 つの更なるヌクレオチドを 3 ' 方向に伸長することによって設計した。センス鎖を、アンチセンス 2 3 量体 (2 3 m e r) の最初の 2 1 ヌクレオチドの逆補体として特定した。全ての 2 3 ヌクレオチドにわたって全ての選択される種の転写物との完全な一致を維持する二本鎖を選択した。

【 0 5 1 6 】

s i R N A 配列の選択

合計で 3 9 のセンス及び 3 9 のアンチセンスに由来するヒト / アカゲザル、6 のセンス及び 6 のアンチセンスに由来するヒト / アカゲザル / マウス、3 のセンス及び 3 のアンチセンスに由来するヒト / アカゲザル / マウス / ラット、及び 1 6 のセンス及び 1 6 のアンチセンスに由来するマウス / ラット s i R N A 2 1 / 2 3 量体オリゴを合成し、G a l N A c コンジュゲート二本鎖に形成した。

【 0 5 1 7 】

修飾二本鎖のセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列が、表 1 に示され、非修飾二本鎖のセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列が、表 2 に示される。

【 0 5 1 8 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表1. TmprSS6の修飾配列

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | アンチセンス配列 | アンチセンス配列番号 |
|------------|------------|--|------|--|------------|
| AD-58686.1 | A-119159.1 | UfsgsGfcCfuGfgAfgAfgGfuGfuCfcUfuCfl96 | 17 | usUfsgAfaCfaCfaAfcAfcuCfuCfcAfgGfcsCfisa | 65 |
| AD-58687.1 | A-119175.1 | GfsgsGfgUfgCfuAfcUfcUfgGfuAfuUfuCfl96 | 18 | asGfsgAfaAfuAfuCfagaCfuAfgCfacsCfisc | 66 |
| AD-58688.1 | A-119191.1 | CfsasAfcGfgCfcUfgGfaUfgAfgAfaAfl96 | 19 | asGfsuUfuCfuCfuCfaucCfaGfgCfcGfcsUfsg | 67 |
| AD-58689.1 | A-119207.1 | AfsusCfGfcAfcUfUfcUfcCfcCfaGfgAfuCfl96 | 20 | asAfgsAfuCfcUfgGfgagAfaGfuGfgCfsgAfsu | 68 |
| AD-58690.1 | A-119223.1 | GfsgsUfgGfcAfgGfaGfgUfgGfcAfuCfuUfl96 | 21 | asCfsaAfgAfuGfcCfaccUfcCfuGfcCfacsCfisc | 69 |
| AD-58692.1 | A-119161.1 | GfsasCfcGfaCfuGfGfcAfuGfuAfuGfaCfl96 | 22 | asCfsgUfcAfuAfcAfuGfgCfcAfgUfcGfcsUfsc | 70 |
| AD-58693.1 | A-119177.1 | GfsgsUfgUfgCfGfgUfgCfaCfuAfuGfgCfl96 | 23 | asAfgCfcAfuAfgUfgcaCfcCfagCfacsCfisc | 71 |
| AD-58694.1 | A-119193.1 | GfsgsCfcUfgGfaUfgAfgAfgAfaAfcUfgCfl96 | 24 | asCfsgCfaGfuUfuCfucuCfaUfcCfaGfcsCfisc | 72 |
| AD-58695.1 | A-119209.1 | CfsusCfuGfgUfaUfUfUfcCfuAfgGfgUfaCfl96 | 25 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsAfg | 73 |
| AD-58696.1 | A-119225.1 | GfscsCfcCfuGfgUfcUfaAfcUfuGfgGfaUfl96 | 26 | asGfsaUfcCfcAfaGfuuaGfaCfcAfgGfcsGfsc | 74 |

10

20

30

40

【 0 5 1 9 】

50

【表 8】

| 二本鎖ID | センス 配列ID | センス配列 | 配列 番号 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 |
|----------------|-------------|---|----------|--------------|---|----------|
| AD- 58698.1 | A-119163.1 | GfsasGfgCfaGfaAfgUfaUfgAfuUfuGfcCfL96 | 27 | A-119164.1 | asCfsgGfcAfaAfuCfauaCfuUfcUfgGfcsUfsc | 75 |
| AD- 58699.1 | A-119179.1 | AfsasGfcCfaGfuGfUfGfaAfaGfaCfaUfaGfL96 | 28 | A-119180.1 | asGfscUfaUfgUfcUfuucAfcAfcUfgGfcsUfsu | 76 |
| AD- 58700.1 | A-119195.1 | GfscsCfsgGfgAfcCfGfAfcUfgGfcCfaUfgUfL96 | 29 | A-119196.1 | asUfsaCfaUfgGfcCfaguCfsgGfuCfcCfsgGfsc | 77 |
| AD- 58701.1 | A-119211.1 | CfsusCfcAfgGfuUfCfGfgGfgUfcGfaCfaCfL96 | 30 | A-119212.1 | asUfsgUfgUfcGfaCfccGfaAfcCfuGfsgAfsfg | 78 |
| AD- 58702.1 | A-119227.1 | AfsgsCfcCfcUfgGfuAfaCfuUfgGfgAfL96 | 31 | A-119228.1 | gsAfsuCfcCfaAfgUfuuaAfcCfaGfgGfsgCfsu | 79 |
| AD- 58704.1 | A-119165.1 | UfscsGfcCfaCfuUfCfUfcCfcAfgGfaUfcUfL96 | 32 | A-119166.1 | usAfsaGfaUfcCfuGfsgaGfaAfgUfgGfcsGfsa | 80 |
| AD- 58705.1 | A-119181.1 | AfscsUfcUfgGfuAfuUfuCfcUfaGfgGfuAfL96 | 33 | A-119182.1 | usGfsuAfcCfcUfaGfgaaAfuAfcCfaGfasGfsu | 81 |
| AD- 58706.1 | A-119197.1 | UfscsGfcUfgAfcCfGfcUfgGfuGfaUfaAfL96 | 34 | A-119198.1 | usGfsuUfaUfaUfcAfcCfcagCfsgGfuCfaGfcsGfsa | 82 |
| AD- 58707.1 | A-119213.1 | GfscsCfcCfaAfcGfGfcUfgGfaUfgAfgAfL96 | 35 | A-119214.1 | usCfsuCfuCfaUfcCfaggCfcGfuUfgGfsgGfsc | 83 |
| AD- 58708.1 | A-119229.1 | GfscsCfaAfgCfaGfGfcGfaCfaAfgUfaUfL96 | 36 | A-119230.1 | gsAfsaUfaCfuUfgUfccccCfcUfgCfuUfsgGfsc | 84 |
| AD- | A-119167.1 | UfscsCfcCfuAfcAfgGfcGfcGfaGfuAfcGfL96 | 37 | A-119168.1 | usUfscGfuAfcUfcGfpgccCfuGhuAfgGfsgGfsa | 85 |

【 0 5 2 0 】

10

20

30

40

50

【表 9】

| 二本線ID | センス 配列ID | センス配列 | 配列 番号 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 |
|----------------|-------------|---------------------------------------|----------|--------------|---------------------------------------|----------|
| 58710.1 | | | | | | |
| AD- 58711.1 | A-119183.1 | CfsusGfgGfuUfgUfAfcCfigCfuAfcAfgCfL96 | 38 | A-119184.1 | usAfgCfuGfuAfgCfiguAfaCfaAfcCfcsAfg | 86 |
| AD- 58712.1 | A-119199.1 | CfsusGfgCfcUfgGfAfgfaGfgUfgCfuUfL96 | 39 | A-119200.1 | usGfsaAfgCfaCfaCfcUfcCfaGfgCfcsAfg | 87 |
| AD- 58713.1 | A-119215.1 | GfsusGfcGfgGfuGfAfcUfaUfgGfcUfuGfL96 | 40 | A-119216.1 | usAfcAfaGfcCfaUfagnGfcAfcCfcGfcsAfc | 88 |
| AD- 58714.1 | A-119231.1 | UfsgsGfcAfgGfaGfgUfgGfcAfuCfuUfgUfL96 | 41 | A-119232.1 | asGfsaCfaAfgAfuGfccaCfcCfuGfcsCfca | 89 |
| AD- 58716.1 | A-119169.1 | CfscsCfuAfcAfgGfcCfcGfaGfuAfcGfaAfl96 | 42 | A-119170.1 | asCfsuUfcGfuAfcUfcggCfcCfuGfuAfgsGfsg | 90 |
| AD- 58717.1 | A-119185.1 | AfscsCfuGfcUfuCfuUfcUfgGfuUfcAfuUfL96 | 43 | A-119186.1 | asGfsaAfuGfaAfcCfagaAfgAfaGfcAfgsGfsu | 91 |
| AD- 58718.1 | A-119201.1 | UfsgsCfcUfgUfgAfuGfgGfgUfcAfaGfgAfl96 | 44 | A-119202.1 | asGfsuCfcUfuGfaCfcccAfuCfaCfaGfgsCfca | 92 |
| AD- 58719.1 | A-119217.1 | CfscsGfcUfuCfigGfAfgCfcCfcUfgGfuCfL96 | 45 | A-119218.1 | usAfgAfcCfaGfgGfgcuUfcCfgAfaGfcsUfg | 93 |
| AD- 58720.1 | A-119233.1 | CfscsCfcUfgGfuCfuAfaCfuUfgGfgAfuCfL96 | 46 | A-119234.1 | csAfgAfuCfcCfaAfguuAfgAfcCfaGfgsGfsg | 94 |
| AD- 58721.1 | A-119171.1 | UfsgsCfuUfcUfuCfuUfgUfuCfaUfuCfuCfL96 | 47 | A-119172.1 | usGfgAfgAfaUfgAfaaccAfgAfaAfgsCfca | 95 |

【 0 5 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 10】

| 二本線ID | センス 配列ID | センス配列 | 配列 番号 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 |
|----------------|-------------|--|----------|--------------|--|----------|
| AD- 58722.1 | A-119187.1 | CfscsCfaAfcGfgCfcUfgGfaUfgAfgAfl96 | 48 | A-119188.1 | usUfsuCfuCfuCfaUfccaGfgCfcGfuUfgsGfsg | 96 |
| AD- 58723.1 | A-119203.1 | AfsasGfgGfcCfuGfcFAfcAfgCfuAfcUfaCfl96 | 49 | A-119204.1 | usCfsgUfaGfuAfgCfugUcfcAfgGfcCfcsUfsu | 97 |
| AD- 58724.1 | A-119219.1 | GfsusCfuAfaCfuUfgGfgAfuCfuGfgGfaAfl96 | 50 | A-119220.1 | csAfsuUfcCfcAfgAfuCccCfaAfgUfuAfgsAfcsc | 98 |
| AD- 58725.1 | A-119235.1 | AfsgsCfuUfcGfgAFAFGfcCfcCfuGfgUfcUfl96 | 51 | A-119236.1 | usUfsaGfaCfcAfgGfggcUfuCfcGfaAfgsCfsu | 99 |
| AD- 58726.1 | A-119173.1 | CfscsAfgUfgAfaFAfgAfcAfuAfgCfuGfl96 | 52 | A-119174.1 | usGfscAfgCfuAfuGfuccUfuCfaCfaCfusGfsg | 100 |
| AD- 58727.1 | A-119189.1 | CfscsAfgGfuUfcGfgGfgUfcGfaCfaUfl96 | 53 | A-119190.1 | asGfsaUfgUfgUfcGfaccCfcGfaAfcCfusGfsg | 101 |
| AD- 58728.1 | A-119205.1 | UfscsCfaCfcGfuGfgGfuUfgUfuAfcCfsgCfl96 | 54 | A-119206.1 | usAfgCfsgGfuAfaCfaaccCfcAfgCfsgUfgsCfisa | 102 |
| AD- 58729.1 | A-119221.1 | UfsgsCfcAfaGfcAfgGfgGfgAfcAfaGfuAfl96 | 55 | A-119222.1 | asAfsuAfcUfuGfuCfcccCfuGfcUfuGfgsCfisa | 103 |
| AD- 58697.1 | A-119241.1 | AfsusCfcAfgAfaCfaGfgAfgGfcUfgUfgUfl96 | 56 | A-119242.1 | csCfisaCfaCfaGfcCfuccUfgUfuCfuGfgsAfsu | 104 |
| AD- 58703.1 | A-119243.1 | UfsusCfaCfcUfcCfcaGfgAfuCfuCfcCfuCfl96 | 57 | A-119244.1 | gsUfsgAfgGfgAfgAfuCfuCfcaGfgUfgsAfsa | 105 |
| AD- 58704.1 | A-119245.1 | CfscsUfcCfcaGfgGfgUfgAfgGfcCfaUfl96 | 58 | A-119246.1 | csCfisaUfgGfcCfaCfucaCfcCfuCfsgGfisaGfsg | 106 |

【0522】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

| 二本線ID | センス 配列ID | センス配列 | 配列 番号 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 |
|----------------|-------------|--|----------|--------------|--|----------|
| 58709.1 | | | | | | |
| AD- 58715.1 | A-119247.1 | UfscsCfaGfaAfcAfcGfGfaGfgCfuGfuGfL96 | 59 | A-119248.1 | gsCfscAfcAfcAfgCfcucCfuGfuUfcUfjgsGfisa | 107 |
| AD- 58730.1 | A-119237.1 | GfsusGfuCfcUfcCfGfAfgGfgUfgAfgUfgGfL96 | 60 | A-119238.1 | gsGfscCfaCfuCfaCfcucCfgGfaGfgAfcAfcsc | 108 |
| AD- 58731.1 | A-119249.1 | UfscsCfGfgGfuCfGfAfcAfcAfuCfuGfuGfL96 | 61 | A-119250.1 | csCfscAfcAfcAfuGfuguCfgAfcCfcCfjgsAfcisa | 109 |
| AD- 58734.1 | A-119251.1 | UfscsGfgGfgUfcGfAfcCfaUfcUfgUfgGfL96 | 62 | A-119252.1 | csCfscCfaCfaGfaUfgugUfcGfaCfcCfcsGfisa | 110 |
| AD- 58737.1 | A-119253.1 | UfjgsCfuUfcCfaCfGfAfgGfaCfaGfcAfuGfL96 | 63 | A-119254.1 | gsCfscAfuGfcUfgUfcuUfcUfgGfaAfgsCfisa | 111 |
| AD- 59743.1 | A-120243.1 | UfscsUfgGfuAfuUfUfcCfcUfaGfgGfuAfcAfcL96 | 64 | A-120244.1 | uisGfsuAfcCfcUfaGfgaaAfuAfcCfaGfasgsu | 112 |

【 0 5 2 3 】

10

20

30

40

50

【 表 1 2 】

表2. TMPRSS6の非修飾配列

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 | NM_153609.2に おける位置 |
|----------------|----------------|-----------------------|------|-----------------------|----------------|------------------------|----------|-----------------------|
| AD- 58686.1 | A- 119159.1 | UGGCCUGGAGAGGUGUCCUUC | 113 | 2041-2063 | A- 119160.1 | UUGAAGGACACCCUCCAGGCCA | 161 | 2041-2063 |

【 0 5 2 4 】

10

20

30

40

50

【表 13】

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 | NM_153609.2に おける位置 |
|------------|------------|---|------|-----------------------|--------------|---|----------|-----------------------|
| AD-58687.1 | A-119175.1 | G G G G U G C U A C U C U G G U A U U U C | 114 | 319-341 | A-119176.1 | A G G A A A U A C C A G A G U A G C A C C C C | 162 | 319-341 |
| AD-58688.1 | A-119191.1 | C A A C G G C C U G G A U G A G A G A A A | 115 | 1557-1579 | A-119192.1 | A G U U U C U C U A U C C A G G C C G U U G | 163 | 1557-1579 |
| AD-58689.1 | A-119207.1 | A U C C C C A C U U C U C C C A G G A U C | 116 | 401-423 | A-119208.1 | A A G A U C C U G G G A G A A G U G G C G A U | 164 | 401-423 |
| AD-58690.1 | A-119223.1 | G G U G G C A G G A G G U G G C A U C U U | 117 | 2665-2688 | A-119224.1 | A C A A G A U G C C A C C U C C U G C C A C C | 165 | 2665-2688 |
| AD-58692.1 | A-119161.1 | G A C C G A C U G G C C A U G U A U G A C | 118 | 922-944 | A-119162.1 | A C G U C A U A C A U G G C C A G U C G G U C | 166 | 922-944 |
| AD-58693.1 | A-119177.1 | G G U G U G C G G G U G C A C U A U G G C | 119 | 1444-1466 | A-119178.1 | A A G C C A U A G U G C A C C C C C A C A C C | 167 | 1444-1466 |
| AD-58694.1 | A-119193.1 | G G C C U G G A U G A G A G A A A C U G C | 120 | 1561-1583 | A-119194.1 | A C G C A G U U U C U C U C A U C C A G G C C | 168 | 1561-1583 |
| AD-58695.1 | A-119209.1 | C U C U G G U A U U C C U A G G G U A C | 121 | 328-350 | A-119210.1 | U U G U A C C C U A G G A A U A C C A G A G | 169 | 328-350 |
| AD-58696.1 | A-119225.1 | G C C C C U G G U C U A A C U U G G G A U | 122 | 2966-2989 | A-119226.1 | A G A U C C A A G U U A G A C C A G G G C C | 170 | 2966-2989 |
| AD-58698.1 | A-119163.1 | G A G G C A G A A G U A U G A U U U G C C | 123 | 1281-1303 | A-119164.1 | A C G G C A A A U C A U A C U U C U G C C U C | 171 | 1281-1303 |
| AD- | A- | A A G C C A G U G A A A A G A C A U A G | 124 | 731-753 | A- | A G C U A U G U C U U U C A C A C U G G C U U | 172 | 731-753 |

【 0 5 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 |
|----------------|----------------|-----------------------|------|-----------------------|----------------|---------------------------|------|-----------------------|
| 58699.1 | 119179.1 | | | | 119180.1 | | | |
| AD- 58700.1 | A- 119195.1 | GCCGGGACCGACUGGCCAUGU | 125 | 917-939 | A- 119196.1 | AUACAUGGCCAGUCGGUCCCGGC | 173 | 917-939 |
| AD- 58701.1 | A- 119211.1 | CUCCAGGUUCCGGGUCGACAC | 126 | 1894-1916 | A- 119212.1 | AUGUGUCGACCCCGAACCCUGGAG | 174 | 1894-1916 |
| AD- 58702.1 | A- 119227.1 | AGCCCCUGGUCUAACUUGGGA | 127 | 2965-2988 | A- 119228.1 | GAUCCCAAGUUAGACCAGGGGCU | 175 | 2965-2988 |
| AD- 58704.1 | A- 119165.1 | UCGCCACUUCUCCCGGAUCU | 128 | 402-424 | A- 119166.1 | UAAGAUCUCCUGGGAGAAGUGGCCA | 176 | 402-424 |
| AD- 58705.1 | A- 119181.1 | ACUCUGUAUUUCCUAGGGUA | 129 | 327-349 | A- 119182.1 | UGUACCCUAGGAAAUACCACAGU | 177 | 327-349 |
| AD- 58706.1 | A- 119197.1 | UCCCGACCCUGGGUGAUAA | 130 | 1934-1956 | A- 119198.1 | UGUUUACACCCAGCGGUCAGCGA | 178 | 1934-1956 |
| AD- 58707.1 | A- 119213.1 | GCCCCAACGGCCUGGAUGAGA | 131 | 1553-1575 | A- 119214.1 | UCUCUGAUCCAGCGCGUUGGGC | 179 | 1553-1575 |
| AD- 58708.1 | A- 119229.1 | GCCAAGCAGGGGACAAGUAU | 132 | 2610-2633 | A- 119230.1 | GAUAUCUUUCCCGCCUUGGCGC | 180 | 2610-2633 |
| AD- 58710.1 | A- 119167.1 | UCCCCUACAGGGCCGAGUACG | 133 | 680-702 | A- 119168.1 | UUUGUACUCGGCCCUUAGGGGA | 181 | 680-702 |
| AD- 58711.1 | A- 119183.1 | CUGGGUUGUUACCGCUACAGC | 134 | 769-791 | A- 119184.1 | UAGCUGUAGCGGUAAACACCAG | 182 | 769-791 |

【 0 5 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 5】

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 | NM_153609.2に おける位置 |
|------------|------------|-----------------------|------|-----------------------|--------------|--------------------------|----------|-----------------------|
| AD-58712.1 | A-119199.1 | CUGGCCUGGAGAGGUGUCCUU | 135 | 2040-2062 | A-119200.1 | UGAAGGACACCCUCUCCAGGCCAG | 183 | 2040-2062 |
| AD-58713.1 | A-119215.1 | GUGCGGUGCACUAUGGCCUUG | 136 | 1447-1469 | A-119216.1 | UACAAGCCAUAGUGCACC GCCAC | 184 | 1447-1469 |
| AD-58714.1 | A-119231.1 | UGGCAGGAGGUGGCAUCUUGU | 137 | 2667-2690 | A-119232.1 | AGACAAGAUGCACCUCUCCGCCA | 185 | 2667-2690 |
| AD-58716.1 | A-119169.1 | CCCUACAGGCCGAGUACGAA | 138 | 682-704 | A-119170.1 | ACUUCGUACUGGCCUUGUAGGG | 186 | 682-704 |
| AD-58717.1 | A-119185.1 | ACCUGCUUCUUGGUUCAUU | 139 | 559-581 | A-119186.1 | AGAAUGAACCCAGAGACCAGGU | 187 | 559-581 |
| AD-58718.1 | A-119201.1 | UGCCUGUGAUGGGUCAAGGA | 140 | 1530-1552 | A-119202.1 | AGUCCUUGACCCCAUCACAGGCA | 188 | 1530-1552 |
| AD-58719.1 | A-119217.1 | CAGCUUGGGAAGCCUUGGUUC | 141 | 2955-2978 | A-119218.1 | UAGACCAGGGGUUCCGGAAGCUG | 189 | 2955-2978 |
| AD-58720.1 | A-119233.1 | CCCCUGGUUAACUUGGGAUC | 142 | 2967-2990 | A-119234.1 | CAGAUCCCAAGUUAAGACCAGGGG | 190 | 2967-2990 |
| AD-58721.1 | A-119171.1 | UGCUUCUUGGUUCAUUCUC | 143 | 562-584 | A-119172.1 | UGGAGAAUGAACCCAGAGAACCA | 191 | 562-584 |
| AD-58722.1 | A-119187.1 | CCCAACGGCCUGGAGAGAGA | 144 | 1555-1577 | A-119188.1 | UUUCUCUAUCCAGGCCUUGGG | 192 | 1555-1577 |
| AD- | A- | AAGGCCUGCACAGGUACUAC | 145 | 1054-1076 | A- | UCGUAGUAGGUGUGCAGGCCUU | 193 | 1054-1076 |

【 0 5 2 7】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 | NM_153609.2に おける位置 |
|----------------|----------------|------------------------|------|-----------------------|----------------|--------------------------|----------|-----------------------|
| 58723.1 | 119203.1 | | | | 119204.1 | | | |
| AD- 58724.1 | A- 119219.1 | GUCUAACUUGGGAUCUGGGAA | 146 | 2973-2996 | A- 119220.1 | CAUUCGCCAGAUCCCAAGUUAGAC | 194 | 2973-2996 |
| AD- 58725.1 | A- 119235.1 | AGCUUGCGAAGCCCCUGGUCU | 147 | 2956-2979 | A- 119236.1 | UUAGACCAGGGGUUCCGAAGCU | 195 | 2956-2979 |
| AD- 58726.1 | A- 119173.1 | CCAGUGUGAAAAGACAUAGCUG | 148 | 734-756 | A- 119174.1 | UGCAGCUAUGUCUUUCACACUGG | 196 | 734-756 |
| AD- 58727.1 | A- 119189.1 | CCAGGUUGGGGUCGACACAU | 149 | 1896-1918 | A- 119190.1 | AGAUGUGCCGCCGGAACCCUGG | 197 | 1896-1918 |
| AD- 58728.1 | A- 119205.1 | UCCAGCUGGGUUGUACCGC | 150 | 763-785 | A- 119206.1 | UAGCGGUAACAACCCAGCGUGGA | 198 | 763-785 |
| AD- 58729.1 | A- 119221.1 | UGCCAAGCAGGGGACAAGUA | 151 | 2609-2632 | A- 119222.1 | AAUACUUGUCCCCCUCUUGGCA | 199 | 2609-2632 |
| AD- 58697.1 | A- 119241.1 | AUCCAGAACAGGAGGUCUGU | 152 | 1324-1346 | A- 119242.1 | CCACACAGCCUCCUGUUCUGGAU | 200 | 1324-1346 |
| AD- 58703.1 | A- 119243.1 | UUCACCUCCAGAUUCCCCUC | 153 | 1414-1436 | A- 119244.1 | GUGAGGGAGAUUCUGGGAGGUGAA | 201 | 1414-1436 |
| AD- 58709.1 | A- 119245.1 | CCUCCAGGGUCAGUGGCCAU | 154 | 1862-1884 | A- 119246.1 | CCAUGGCCACACACCCUCCGGAGG | 202 | 1862-1884 |
| AD- 58715.1 | A- 119247.1 | UCCAGAACAGGAGGUCUGUG | 155 | 1325-1347 | A- 119248.1 | GCCACACAGCCUCCUUCUUGGA | 203 | 1325-1347 |

【 0 5 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 17】

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 | アンチセンス 配列 | アンチセンス配列 | 配列 番号 | NM_153609.2に おける位置 |
|----------------|----------------|----------------------|------|-----------------------|----------------|------------------------|----------|-----------------------|
| AD- 58730.1 | A- 119237.1 | GUGUCCUCCGAGGUGAGUGG | 156 | 1858-1880 | A- 119238.1 | GCCACACACCCUCCGAGGACAC | 204 | 1858-1880 |
| AD- 58731.1 | A- 119249.1 | UUCGGGUCGACACAUCUGUG | 157 | 1901-1923 | A- 119250.1 | CCCACAGAUUGUGGACCCCGAA | 205 | 1901-1923 |
| AD- 58734.1 | A- 119251.1 | UCGGGUCGACACAUCUGUGG | 158 | 1902-1924 | A- 119252.1 | CCCCACAGAUUGUGGACCCCGA | 206 | 1902-1924 |
| AD- 58737.1 | A- 119253.1 | UGCUCCAGGAGGACAGCAUG | 159 | 1966-1988 | A- 119254.1 | GCCAUCCUCCUCCUGGAAGCA | 207 | 1966-1988 |
| AD- 59743.1 | A- 120243.1 | UCUGGUAUUCCUAGGGUACA | 160 | | A- 120244.1 | UGUACCCUAGGAAAUACCAAGU | 208 | |

【0529】

実施例 2 . インピトロでの単回用量スクリーン

修飾され、コンジュゲートされたTMPRSS6 siRNA二本鎖も、ヒト細胞株 Hep3B 内でのトランスフェクションアッセイによって有効性について評価した。TMPRSS6 siRNA を、2つの用量、10 nM 及び 0.1 nM でトランスフェクトした。これらのアッセイの結果が、表 3 に示され、データが、陰性対照 siRNA、AD-1955 でトランスフェクトした細胞に対して、TMPRSS6 を標的とする siRNA でトランスフェクトした細胞中に残るメッセージの割合 ± 標準偏差 (SD) として表される。

【0530】

10

20

30

40

50

【表 1 8】

表3. TMRSS6単回用量スクリーン

| 二本鎖ID | 10nM 平均 | 10nM 標準偏差 | 0.1nM 平均 | 0.1nM 標準偏差 |
|------------|---------|-----------|----------|------------|
| AD-58686.1 | 71.58 | 18.94 | 103.29 | 32.00 |
| AD-58687.1 | 89.33 | 13.14 | 104.94 | 20.06 |
| AD-58688.1 | 34.16 | 11.36 | 87.18 | 8.43 |
| AD-58689.1 | 79.82 | 7.28 | 110.37 | 6.08 |
| AD-58690.1 | 69.10 | 9.83 | 99.92 | 24.84 |
| AD-58692.1 | 79.21 | 5.67 | 136.49 | 0.84 |
| AD-58693.1 | 77.29 | 12.12 | 106.01 | 17.97 |
| AD-58694.1 | 50.51 | 10.36 | 89.47 | 3.84 |
| AD-58695.1 | 54.37 | 5.75 | 87.66 | 13.59 |
| AD-58696.1 | 93.26 | 0.06 | 84.79 | 3.84 |
| AD-58697.1 | 72.95 | 23.41 | 98.98 | 10.29 |
| AD-58698.1 | 42.61 | 7.81 | 109.98 | 16.78 |
| AD-58699.1 | 24.93 | 8.58 | 79.71 | 12.55 |
| AD-58700.1 | 74.10 | 15.37 | 89.75 | 7.80 |
| AD-58701.1 | 79.18 | 8.18 | 89.70 | 9.98 |
| AD-58702.1 | 96.43 | 18.38 | 113.05 | 10.65 |
| AD-58703.1 | 79.15 | 28.50 | 97.30 | 6.79 |
| AD-58704.1 | 67.92 | 0.87 | 92.26 | 1.24 |
| AD-58705.1 | 59.50 | 20.47 | 99.25 | 3.28 |
| AD-58706.1 | 71.67 | 0.75 | 102.38 | 14.88 |
| AD-58707.1 | 77.89 | 22.26 | 97.52 | 1.31 |
| AD-58708.1 | 73.87 | 9.61 | 98.38 | 1.81 |
| AD-58709.1 | 94.62 | 4.69 | 100.73 | 16.10 |
| AD-58710.1 | 59.19 | 10.57 | 95.23 | 11.99 |
| AD-58711.1 | 63.62 | 16.83 | 103.11 | 3.66 |
| AD-58712.1 | 65.79 | 6.96 | 81.58 | 1.50 |
| AD-58713.1 | 84.14 | 26.41 | 101.56 | 5.60 |

10

20

30

【 0 5 3 1】

40

50

【表 19】

| 二本鎖ID | 10nM 平均 | 10nM 標準偏差 | 0.1nM 平均 | 0.1nM 標準偏差 |
|------------|---------|-----------|----------|------------|
| AD-58714.1 | 64.73 | 6.06 | 102.37 | 1.63 |
| AD-58715.1 | 91.05 | 18.67 | 101.08 | 11.00 |
| AD-58716.1 | 70.07 | 13.02 | 97.20 | 2.98 |
| AD-58717.1 | 11.27 | 6.91 | 66.56 | 4.32 |
| AD-58718.1 | 62.10 | 18.62 | 89.01 | 15.30 |
| AD-58719.1 | 72.94 | 18.26 | 91.58 | 9.97 |
| AD-58720.1 | 60.51 | 14.43 | 90.92 | 5.68 |
| AD-58721.1 | 17.72 | 7.70 | 56.72 | 2.57 |
| AD-58722.1 | 51.65 | 11.33 | 81.44 | 0.50 |
| AD-58723.1 | 53.27 | 21.60 | 94.25 | 16.20 |
| AD-58724.1 | 58.03 | 49.89 | 77.11 | 4.63 |
| AD-58725.1 | 54.58 | 40.10 | 76.12 | 1.59 |
| AD-58726.1 | 10.33 | 9.88 | 42.75 | 7.97 |
| AD-58727.1 | 62.80 | 26.45 | 83.23 | 13.10 |
| AD-58728.1 | 49.36 | 36.27 | 83.30 | 1.74 |
| AD-58729.1 | 43.83 | 61.99 | 73.54 | 19.33 |
| AD-58730.1 | 59.60 | 41.85 | 76.12 | 1.03 |
| AD-58731.1 | 85.29 | 24.78 | 128.06 | 32.14 |
| AD-58734.1 | 85.71 | 10.74 | 101.75 | 6.11 |
| AD-58737.1 | 79.87 | 10.59 | 114.89 | 7.46 |

10

20

【0532】

実施例3．AD-59743を用いたインビボでの単回用量スクリーン

30

AD-59743がTMPRSS6タンパク質の発現を抑制する能力を、AD-59743の投与後の野生型C57BL/6マウスの肝臓中のTMPRSS6及びヘプシジンmRNAのレベルを測定することによって評価した。1、3又は10mg/kgの単回用量のAD-59743を、皮下投与し、マウスを3日目又は7日目に殺処分した。肝臓中のTMPRSS6及びヘプシジンmRNAのレベルを、上述される方法を用いて、qPCRによって測定した。対照群にPBSによる注射を与えた。

【0533】

AD-59743の投与後のTMPRSS6 mRNAのレベルが、図1に示され、AD-59743の投与後のヘプシジンmRNAのレベルが、図2に示される。結果は、7日目まで持続されるTMPRSS6転写物のレベルの用量依存的な低下を示す。

40

【0534】

実施例4．鉄キレート剤と組み合わされたTMPRSS6 siRNA剤のインビボでの影響

この試験の目的は、鉄レベルに対する同時投与されるTMPRSS6特異的siRNA及び鉄キレート剤の影響を試験することであった。この試験では、6週齢の野生型C57BL/6及びサラセミアTh3/+マウス(Dou et al., Am. J. Pathol. (2011), 178(2):774-83)に、3~5ppmの鉄を含有する低鉄食を与えた。マウスに、デフェリプロンを含有する製剤AF-011-46273、250mg/kg/日の用量の鉄キレート剤及び以下の構造：オリゴSeq-センス-UGGuAuuuccuAGGGuAcAdTs dT(配列番号209)；オリゴSeq-アンチセンス-UGuACCCuAGGA AuACcAdTs dT(配列番号210)

50

を有する iRNA 剤を静脈内投与した。製剤は、MC - 3 / DSPC / コレステロール / PEG - DMG 50 / 10 / 38 . 5 / 1 . 5 も含有していた。肝臓及び脾臓組織を採取し、組織の非ヘム鉄濃度を、既に記載されるように測定した（例えば、Schmidt et al. (2013) Blood 121 (7) : 1200 - 8 ; Cook, J D, et al. . Tissue iron stores. In: Cook J D, editor. Methods in Hematology. Vol 1. New York, NY : Churchill Livingstone Press ; 1980 . p. 104 - 109 を参照）。

【0535】

これらの実験の結果は、陰性対照と比べて低下した鉄レベルで、Th3 / + マウス中の AD - 46273 及びデフェリプロンの相加効果を示す。

10

【0536】

実施例 5 . オリゴヌクレオチドの設計、特異性及び有効性の予測

転写物

NCBI Gene database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) において注釈付けされたヒト、カニクイザル (カニクイザル (*Macaca fascicularis*)) ; これ以降、「カニクイザル (cyno)」、マウス、及びラット TMPRSS6 転写物を標的とする siRNA を特定するために、siRNA 設計を行った。設計には、NCBI RefSeq collection からの以下の転写物を使用した：ヒト - NM__153609.2 ; マウス - NM__027902.2 ; ラット - NM__001130556.1。カニクイザルの場合、転写物の配列は、カニクイザル (*M. fascicularis*) ゲノムプロジェクト及び NCBI ヌクレオチドデータベース (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/download.jsp> 及び <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) からそれぞれ入手可能な 2 つの登録番号：“ENSP00000384964 [mRNA] 遺伝子座 = chr10 : 82446450 : 82485403 : -” 及び FR874253.1 から構築される配列の、ヒト TMPRSS6 とのアラインメントによって得られた。高い霊長類 / げっ歯類配列分散のため、限定はされないが、ヒト及びカニクイザル転写物のみ ; ヒト、カニクイザル、及びマウス転写物のみ ; 及びヒト、カニクイザル、マウス、及びラット転写物のみと一致する二本鎖を含むパッチを含むいくつかの別個のパッチで、SiRNA 二本鎖を設計した。規定の領域において、各設計パッチ (上記) において考慮される、列挙されるヒト転写物及び他の種の転写物と 100% の同一性を共有するほとんどの siRNA 二本鎖を設計した。場合によっては、アンチセンス鎖 : 標的 mRNA 相補的塩基対が、GC 又は CG 対であった場合、二本鎖と mRNA 標的との間のミスマッチが、最初のアンチセンス (最後のセンス) 位置において許容された。これらの場合、最初のアンチセンス : 最後のセンス対において UA 又は AU 対を有する二本鎖を設計した。したがって、二本鎖は、相補性を維持したが、標的に対して不一致であった (U : C、U : G、A : C、又は A : G)。

20

30

【0537】

全ての可能な 19 量体の特異性を、各配列から予測した。次に、7 ヌクレオチドより長い反復がない候補 19 量体を選択した。これらの 1128 の候補ヒト / カニクイザル、69 のヒト / カニクイザル / マウス、及び 23 のヒト / カニクイザル / マウス / ラット siRNA を、パイソンスクリプト「BruteForce.py」で実施される包括的な「力まかせ」アルゴリズムを用いて、適切なトランスクリプトーム (ヒト、マウス、又はラット NCBI RefSeq セット内の NM__ 及び XM__ レコードのセット、及び NCBI ヌクレオチド中のカニクイザルトランスクリプトームセットとして定義される) に対する包括的検索に使用した。次に、スクリプトが、転写物 - オリゴのアラインメントを解析して、siRNA と、あらゆる可能性のある「オフターゲット」転写物とのミスマッチの位置及び数に基づいてスコアを生成した。オフターゲットスコアを重み付けして、分子の 5

40

50

末端から 2 ~ 9 位にある、s i R N A の「シード」領域の差異を強調する。力まかせ探索による各オリゴ - 転写物対に、個々のミスマッチスコアを合計することによってミスマッチスコアを与え； 2 ~ 9 位にあるミスマッチを、2 . 8 とみなし、切断部位 1 0 ~ 1 1 位にあるミスマッチを、1 . 2 とみなし、領域 1 2 ~ 1 9 のミスマッチを、1 . 0 とみなした。更なるオフターゲット予測を、各オリゴの 3 つの異なる、シード指向性の 6 量体から誘導される 7 量体及び 8 量体の頻度を比較することによって行った。5 ' 開始点に対して 2 ~ 7 位からの 6 量体を用いて、2 つの 7 量体及び 1 つの 8 量体を生成した。3 ' A を 6 量体に加えることによって 7 量体 1 を生成し； 5 ' A を 6 量体に加えることによって 7 量体 2 を生成し； A を 6 量体の 5 ' 及び 3 ' 末端の両方に加えることによって、8 量体を生成した。ヒト、カニクイザル、マウス、又はラット 3 ' U T R o m e (コード領域「C D S」の末端が明確に定義された N C B I の R e f s e q データベースからのトランスクリプトームの部分列として定義される)における 8 量体及び 7 量体の頻度を予め計算した。8 量体の頻度の範囲からの中央値を用いて、8 量体の頻度を 7 量体の頻度に対して標準化した。次に、「m i r S e e d S c o r e」を、 $(3 \times \text{標準化された 8 量体の数値}) + (2 \times \text{7 量体 2 の数値}) + (1 \times \text{7 量体 1 の数値})$ の和を計算することによって計算した。

【 0 5 3 8 】

両方の s i R N A 鎖を、計算されたスコアにしたがって、特異性のカテゴリーに割り当てた：3 を超えるスコアは、高度の特異性があり、3 に等しいスコアは、特異性があり、2 ~ 2 . 8 のスコアは中程度の特異性があるとみなす。アンチセンス鎖の特異性によって並べ替えた。次に、アンチセンスオリゴが、シード領域における最大 U A 含量及び低い全 G C 含量を含む、高い予測される有効性を有する二本鎖の特性を有する中程度に (又は高度に) 特異的な二本鎖を選択した。

【 0 5 3 9 】

G a l N a C コンジュゲート二本鎖について、アンチセンス 1 9 量体 (上記) を、標的と相補的な配列 (t a r g e t - c o m p l e m e n t a r y s e q u e n c e) の 2 3 ヌクレオチドへと伸長することによって、センス 2 1 量体 (2 1 m e r) 及びアンチセンス 2 3 量体オリゴを設計した。設計バッチに含まれる全ての種の転写物の相補性を調べた。各二本鎖について、センス 2 1 量体を、アンチセンス鎖の最初の 2 1 ヌクレオチドの逆補体として特定した。

【 0 5 4 0 】

s i R N A 配列の選択

合計で 5 のセンス及び 5 のアンチセンスヒト、3 2 のセンス及び 3 2 のアンチセンスに由来するヒト / カニクイザル、4 のセンス及び 4 のアンチセンスに由来するヒト / カニクイザル / マウス、8 のセンス及び 8 のアンチセンスに由来するヒト / カニクイザル / マウス / ラット、1 9 のセンス及び 1 9 のアンチセンスに由来するヒト / カニクイザル / ラット、2 のセンス及び 2 のアンチセンスに由来するヒト / マウス、及び 1 のセンス及び 1 のアンチセンスに由来するヒト / マウス / ラット s i R N A 2 1 / 2 3 量体オリゴを合成し、G a l N A c コンジュゲート二本鎖に形成した。

【 0 5 4 1 】

非修飾二本鎖のセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列が、表 4 に示され、修飾二本鎖のセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列が、表 5 に示される。

【 0 5 4 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表4. TMPRSS6-非修飾配列

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | アンチセンス配列ID | アンチセンス配列 | 配列番号 | NM_153609.2に おける位置 |
|------------|------------|------------------------|------|------------|---------------------------|------|-----------------------|
| AD-60944.1 | A-122732.1 | GGUGCUACUCUGGUUUUCCU | 211 | A-122733.1 | AGAAAUAACCAGAGUAGCACCCC | 280 | 318 |
| AD-59743.1 | A-120243.1 | UCUGGUUUUCCUAGGGUACA | 212 | A-120244.1 | UGUACCCUAGGAAAUAACCAGAGU | 281 | 326 |
| AD-60940.1 | A-122745.1 | CUGGUUUUCCUAGGGUACAA | 213 | A-122746.1 | UUGUACCCUAGGAAAUAACCAGAG | 282 | 327 |
| AD-61002.2 | A-122838.1 | UGGUUUUCCUAGGGUACAAA | 214 | A-122839.1 | UUUUGUACCCUAGGAAAUAACCAGA | 283 | 328 |
| AD-61000.1 | A-122852.1 | GGUUUUCCUAGGGUACAAGA | 215 | A-122853.1 | UCUUUACCCUAGGAAAUAACCAG | 284 | 329 |
| AD-46273.1 | A-96908.1 | UGGUUUUCCUAGGGUACA | 216 | A-96909.1 | UGUACCCUAGGAAAUAACCACA | 285 | 330 |
| AD-61003.1 | A-122854.1 | GUUUUCCUAGGGUACAAGGA | 217 | A-122855.1 | UCCUUUACCCUAGGAAAUAACCACA | 286 | 330 |
| AD-60994.1 | A-122848.1 | AUUUCCUAGGGUACAAGCGGA | 218 | A-122849.1 | UCGCCUUUACCCUAGGAAAUAACC | 287 | 332 |
| AD-60990.1 | A-122830.1 | UUUCCUAGGGUACAAGGGCGGA | 219 | A-122831.1 | UCCGCCUUUACCCUAGGAAAUAACC | 288 | 333 |
| AD-60956.1 | A-122736.1 | CGCCACUUCUCCAGGAUCUU | 220 | A-122737.1 | AAGAUCUUGGGAGAGUUGCGGAU | 289 | 400 |
| AD-60981.1 | A-122757.1 | GCCACUUCUCCAGGAUCUUA | 221 | A-122758.1 | UAAGAUCCUUGGGAGAGUUGCGGA | 290 | 401 |
| AD-60953.1 | A-122775.1 | CUGCUUUUCUGGUUCAUUCU | 222 | A-122776.1 | AGAAUGAACCCAGAAAGCAGGU | 291 | 558 |
| AD-60977.1 | A-122783.1 | CUUCUUCUGGUUCAUUCUCA | 223 | A-122784.1 | UGGAGAAUGAACCCAGAAAGCA | 292 | 561 |
| AD-60964.1 | A-119169.2 | CCCUACAGGGCCGAGUACGAA | 224 | A-122764.1 | UUCGUACUCGGCCCUAGGAGGGA | 293 | 679 |
| AD-60947.1 | A-122773.1 | CUACAGGGCCGAGUACGAA | 225 | A-122774.1 | ACUUUGUACUCGGCCCUAGGAGG | 294 | 681 |
| AD-60957.1 | A-122751.1 | GCCAGUGUAAAAGACAUAGCU | 226 | A-122752.1 | AGCUUUGUCUUUCACACUGGCUU | 295 | 730 |
| AD-60960.1 | A-122792.1 | AGUGUAAAAGACAUAGCUGCA | 227 | A-122793.1 | UGCAGCUUUGUCUUUCACACUGG | 296 | 733 |
| AD-60972.1 | A-122796.1 | CACGCUUGGUUUUACCGCUA | 228 | A-122797.1 | UAGCGGUAACAACCCAGCGUGGA | 297 | 762 |
| AD-60970.1 | A-122765.1 | GGGUUUGUUACCGCUACAGCUA | 229 | A-122766.1 | UAGCUUAGCGGUAACAACCCAG | 298 | 768 |
| AD-60963.1 | A-122753.1 | CGGGACCGACUGGCCAUUGAU | 230 | A-122754.1 | AUACAUGGCCAGUCGGUCCCGGC | 299 | 916 |
| AD-60968.1 | A-122739.1 | CCGACUGGCCAUUGAUAGCGU | 231 | A-122740.1 | ACGUCAUACAUGGCCAGUCGGUC | 300 | 921 |
| AD-60942.1 | A-122786.1 | GGGCCUGCACAGCUACUACGA | 232 | A-122787.1 | UCGUAGUAGCUGGCGGCCCCUU | 301 | 1053 |
| AD-60951.1 | A-122749.1 | GGCAGAAUGAUUGAUUUGCCGU | 233 | A-122750.1 | ACGGCAAUAUUAUUCUGGCCUC | 302 | 1280 |
| AD-60984.1 | A-122800.1 | CCAGAACAGGGGCGUGUGG | 234 | A-122801.1 | CCACACAGCCUCCUUGUUCUGGAU | 303 | 1323 |

【 0 5 4 3】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

| | | | | | | | |
|------------|------------|------------------------|-----|------------|--------------------------|-----|------|
| AD-60955.1 | A-122806.1 | CAGAACAGGAGGUGUGGGC | 235 | A-122807.1 | GCCACACAGCCUCCUUCUUGGA | 304 | 1324 |
| AD-60943.1 | A-122802.1 | CACCUCCAGAUCCUCCAC | 236 | A-122803.1 | GUGAGGGAGAUCCGGAGGUGAA | 305 | 1413 |
| AD-61001.1 | A-122823.1 | CACCUCCAGAUCCUCCAA | 237 | A-122824.1 | UUGAGGGAGAUCCGGAGGUGAA | 306 | 1413 |
| AD-60974.1 | A-122741.1 | UGUGGGGUGCACAUUGGCUU | 238 | A-122742.1 | AAGCCAUAGUGCACCCGCACCC | 307 | 1443 |
| AD-60982.1 | A-122769.1 | GCGGGUGCACAUUGGCUUGUA | 239 | A-122770.1 | UACAAGCCAUAGUGCACCCGCAC | 308 | 1446 |
| AD-60996.1 | A-122834.1 | CCCUCCUGGAGAGUCCU | 240 | A-122835.1 | AGGAACUCUCCAGGCGAGGGGUC | 309 | 1479 |
| AD-60997.1 | A-122850.1 | CCCUCCUGGAGAGUCCUA | 241 | A-122851.1 | UAGGAACUCUCCAGGCGAGGGGU | 310 | 1480 |
| AD-61006.1 | A-122856.1 | CCUGCCUGGAGAGUCCUCU | 242 | A-122857.1 | AGAGAAUCUCUCCAGGCGAGGGG | 311 | 1481 |
| AD-60988.1 | A-122844.1 | CUGCCUGGAGAGUCCUCUA | 243 | A-122845.1 | UAGAGAAUCUCUCCAGGCGAGGG | 312 | 1482 |
| AD-60959.1 | A-122777.1 | CCUGUGAUGGGGUCAAGGACU | 244 | A-122778.1 | AGUCCUUGACCCCAUCACAGGCA | 313 | 1529 |
| AD-60999.1 | A-122836.1 | GGACUGCCCAACGGCCUGGA | 245 | A-122837.1 | UCCAGGCGUUGGGCGAGUCCUU | 314 | 1545 |
| AD-60991.1 | A-122846.1 | ACUGCCCAACGGCCUGGAUA | 246 | A-122847.1 | UAUCCAGGCCGUUGGGCGAGUCC | 315 | 1547 |
| AD-60993.1 | A-122832.1 | CUGCCCAACGGCCUGGAUGA | 247 | A-122833.1 | UCAUCCAGGCCGUUGGGCGAGUC | 316 | 1548 |
| AD-61005.1 | A-122840.1 | UGCCCAACGGCCUGGAUGAA | 248 | A-122841.1 | UUCAUCCAGGCCGUUGGGCGAGU | 317 | 1549 |
| AD-60987.1 | A-119213.2 | GCCCCAACGGCCUGGAUGAGA | 249 | A-122829.1 | UCUCAUCCAGGCCGUUGGGCGAG | 318 | 1550 |
| AD-60986.1 | A-122842.1 | CCCCAACGGCCUGGAUGAGAA | 250 | A-122843.1 | UUCUCAUCCAGGCCGUUGGGGCA | 319 | 1551 |
| AD-60952.1 | A-119187.2 | CCCAACGGCCUGGAUGAGAGA | 251 | A-122761.1 | UCUCUCAUCCAGGCCGUUGGGGC | 320 | 1552 |
| AD-60983.1 | A-119191.2 | CAACGGCCUGGAUGAGAGAAA | 252 | A-122785.1 | UUUCUCUCAUCCAGGCCGUUGGG | 321 | 1554 |
| AD-60950.1 | A-122734.1 | ACGGCCUGGAUGAGAGAAACU | 253 | A-122735.1 | AGUUUCUCAUCCAGGCCGUUG | 322 | 1556 |
| AD-60980.1 | A-122743.1 | CCUGGAUGAGAGAAACUGCGU | 254 | A-122744.1 | ACGCAGUUUCUCUCAUCCAGGCC | 323 | 1560 |
| AD-60998.1 | A-122821.1 | CACUGGACUGUGGCCUCCAA | 255 | A-122822.1 | UUGGAGGCCACAGUCACAGUUCU | 324 | 1804 |
| AD-60961.1 | A-122808.1 | GUCUCCGAGGGUGAGUGGCC | 256 | A-122809.1 | GGCCACUCACCCUCCGGAGGACAC | 325 | 1857 |
| AD-61004.1 | A-122825.1 | CUCCGAGGGUGAGUGGCCAUA | 257 | A-122826.1 | UAUGGCCACUCACCCUCCGGAGGA | 326 | 1860 |
| AD-60949.1 | A-122804.1 | UCCGAGGGUGAGUGGCCAUGG | 258 | A-122805.1 | CCAUGGCCACUCACCCUCCGGAGG | 327 | 1861 |
| AD-60969.1 | A-119189.2 | CCAGGUUCGGGGUCGACACAU | 259 | A-122755.1 | AUGUGCGACCCCGAACCUCCGAG | 328 | 1893 |
| AD-60966.1 | A-122794.1 | AGGUUCGGGGUCGACACAUUCU | 260 | A-122795.1 | AGAUGUGCGACCCCGAACCUCCG | 329 | 1895 |
| AD-60967.1 | A-122810.1 | CGGGGUCGACACAUUCUGGGG | 261 | A-122811.1 | CCACAGAUUGUGUCGACCCCGAA | 330 | 1900 |
| AD-60989.1 | A-122816.1 | CGGGGUCGACACAUUCUGUGGA | 262 | A-122817.1 | UCCACAGAUUGUGUCGACCCCGAA | 331 | 1900 |

【 0 5 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

| | | | | | | | |
|------------|------------|------------------------|-----|------------|---------------------------|-----|------|
| AD-60973.1 | A-122812.1 | GGGUCGACACAUCUUGUGGGG | 263 | A-122813.1 | CCCCACAGAUUGUGACCCCGA | 332 | 1901 |
| AD-60992.1 | A-122818.1 | GGGUCGACACAUCUUGUGGA | 264 | A-122819.1 | UCCACAGAUUGUGACCCCGA | 333 | 1901 |
| AD-60985.1 | A-122827.1 | GGGUCGACACAUCUUGUGGA | 265 | A-122828.1 | UCCACAGAUUGUGACCCCG | 334 | 1902 |
| AD-60946.1 | A-122759.1 | GCUGACCGUGGGUGAACA | 266 | A-122760.1 | UGUUUACCCAGCGGUCAGCGA | 335 | 1933 |
| AD-60979.1 | A-122814.1 | CUCCAGGAGGACAGGCG | 267 | A-122815.1 | GCCAUUCUGUCCUCCUGGAAGCA | 336 | 1965 |
| AD-60976.1 | A-122767.1 | GGCCUGGAGGUGUCCUUA | 268 | A-122768.1 | UGAAGGACACCUCUCCAGGCCAG | 337 | 2039 |
| AD-60939.1 | A-122730.1 | GCCUGGAGGUGUCCUCAA | 269 | A-122731.1 | UUUAAGGACACCUCUCCAGGCCA | 338 | 2040 |
| AD-60978.1 | A-122798.1 | CCAAGCAGGGGACAAUAUU | 270 | A-122799.1 | AAUACUUUGUCCCCUUGUUGGCA | 339 | 2608 |
| AD-60958.1 | A-122762.1 | CAAGCAGGGGACAAUAUUC | 271 | A-122763.1 | GAUUAUUUGUCCCCUUGUUGGC | 340 | 2609 |
| AD-60962.1 | A-119231.2 | UGGCAGGAGGUGGCAUUGU | 272 | A-122738.1 | ACAAGAUGCCACCUCUCCAGGCC | 341 | 2664 |
| AD-60941.1 | A-122771.1 | GCAGGAGGUGGCAUUGUCU | 273 | A-122772.1 | AGACAAGUCCACCUCUCCAGGCCA | 342 | 2666 |
| AD-60965.1 | A-122779.1 | GCUUCGGAAGCCCCUGGUCUA | 274 | A-122780.1 | UAGACCAGGGGCUUCCGGAAGCUG | 343 | 2954 |
| AD-60954.1 | A-122790.1 | CUUCGGAAGCCCCUGGUCUA | 275 | A-122791.1 | UUAGACCAGGGGCUUCCGGAAGCUG | 344 | 2955 |
| AD-60975.1 | A-119233.2 | CCCUGGUCUAAAUUGGGAUC | 276 | A-122756.1 | GAUCCAAAGUUAGACCAGGGGCU | 345 | 2964 |
| AD-60945.1 | A-122747.1 | CCCUGGUCUAAAUUGGGAUCU | 277 | A-122748.1 | AGAUCACCAAGUUAGACCAGGGGC | 346 | 2965 |
| AD-60971.1 | A-122781.1 | CCUGGUCUAAAUUGGGAUCUG | 278 | A-122782.1 | CAGAUCCCAAGUUAGACCAGGGG | 347 | 2966 |
| AD-60948.1 | A-122788.1 | CUAAAUUGGGAUCUUGGGAUUG | 279 | A-122789.1 | CAUUCACCAAGUUAGACCAGGGG | 348 | 2972 |

【 0 5 4 5 】

10

20

30

40

50

【 表 2 3 】

表5. TMPRSS6の修飾配列

| 二本鎖ID | センス配列ID | センス配列 | 配列番号 | アンチセンス配列ID | アンチセンス配列 | 配列番号 |
|------------|------------|--|------|------------|--------------------------------------|------|
| AD-46273.1 | A-96908.1 | uGGuAuuuccuAGGGuAcAdTsdT | 349 | A-96909.1 | UGUACCCuAGGAAuAcAdTsdT | 418 |
| AD-59743.1 | A-120243.1 | UfscsUfgGfuAfuUfCfUfaGfgGfuAfcAfL96 | 350 | A-120244.1 | usGfsuAfcCfcUfaGfgaaAfuAfcCfaGfagsu | 419 |
| AD-60939.1 | A-122730.1 | GfscsCfuGfgAfgAfcGfuCfcUfuCfaAfL96 | 351 | A-122731.1 | usUfsgAfaGfgAfcAfccuCfuCfcAfgGfscsa | 420 |
| AD-60940.1 | A-122745.1 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfL96 | 352 | A-122746.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsaag | 421 |
| AD-60941.1 | A-122771.1 | GfscsAfgGfaGfgUfgGfcAfuCfuUfgUfcUfL96 | 353 | A-122772.1 | asGfsaCfaAfgAfuGfccaCfcUfcCfuGfscsa | 422 |
| AD-60942.1 | A-122786.1 | GfsgsGfcCfuGfcafcAfcAfgCfuAfcUfaCfcAfL96 | 354 | A-122787.1 | usCfsgUfaGfuAfgCfuguGfcAfgGfcCfcsusu | 423 |

【 0 5 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 5】

| | | | | | | |
|------------|------------|--|-----|------------|---|-----|
| AD-60971.1 | A-122781.1 | CfscsUfgGfuCfuAfaCfuUfgGfAfuCfuGfl96 | 383 | A-122782.1 | csAfsGfUcCfcCfaAfguuAfaCfcCfaGfGfsg | 452 |
| AD-60972.1 | A-122796.1 | CfsasCfGfCfuGfGfUfUfgUfUfaAfcCfGfUfL96 | 384 | A-122797.1 | usAfsGfGfUfAfaCfaaccCfaAfgCfGfUfGfsgsa | 453 |
| AD-60973.1 | A-122812.1 | GfsgGfUfcGfAfcAfcUfUfgUfgGfGfL96 | 385 | A-122813.1 | csCfscCfaCfaGfaUfgUfGfAfcCfcCfcsGsa | 454 |
| AD-60974.1 | A-122741.1 | UfsgUfgCfGfGfUfgGfAfcUfUfgGfUfL96 | 386 | A-122742.1 | asAfsGfCfaAfaUfgUfgcaCfcCfGfCfaCfascsc | 455 |
| AD-60975.1 | A-119233.2 | CfscscCfcUfgGfUfcUfAfcUfUfgGfAfuCfL96 | 387 | A-122756.1 | gsAfsuCfcCfaAfgUfgUfaGfAfcCfaGfGfGfsgsu | 456 |
| AD-60976.1 | A-122767.1 | GfsgCfcUfgGfAfcAfcUfgUfgUfUfUfUfL96 | 388 | A-122768.1 | usGfsaAfgGfAfcCfaCfcUfcCfaGfGfCfcsasg | 457 |
| AD-60977.1 | A-122783.1 | CfsusUfcUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 389 | A-122784.1 | usGfsgAfgAfaUfgAfaaccAfgAfaGfaAfgsca | 458 |
| AD-60978.1 | A-122798.1 | CfscsAfaGfcAfgGfGfAfcAfaGfaUfUfL96 | 390 | A-122799.1 | asAfsuAfcUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 459 |
| AD-60979.1 | A-122814.1 | CfsusUfcCfaGfGfAfcGfAfcUfUfgGfL96 | 391 | A-122815.1 | gsCfscAfuGfcUfgUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 460 |
| AD-60980.1 | A-122743.1 | CfscsUfgGfaUfgAfgAfcAfcUfUfgCfUfL96 | 392 | A-122744.1 | asCfsgCfaGfuUfUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 461 |
| AD-60981.1 | A-122757.1 | GfscsCfaCfuUfcUfCfCAfgGfAfcUfUfUfL96 | 393 | A-122758.1 | usAfsaGfaUfcCfuGfGfgaGfaAfgUfGfCfcsGsa | 462 |
| AD-60982.1 | A-122769.1 | GfscsGfGfUfGfAfcUfUfUfUfUfUfUfL96 | 394 | A-122770.1 | usAfsaAfaGfcCfaUfAfgUfGfAfcCfcCfcsasac | 463 |
| AD-60983.1 | A-119191.2 | CfsasAfcGfGfCfcUfGfUfUfUfUfUfUfL96 | 395 | A-122785.1 | usUfscUfcUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 464 |
| AD-60984.1 | A-122800.1 | CfscsAfgAfaCfaGfAfcUfUfgUfUfUfL96 | 396 | A-122801.1 | csCfsaCfaCfaGfcCfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 465 |
| AD-60985.1 | A-122827.1 | GfsgsGfuCfGfAfcAfcUfUfUfUfUfUfL96 | 397 | A-122828.1 | usCfscCfcAfcAfgAfuGfuCfGfAfcCfcsG | 466 |
| AD-60986.1 | A-122842.1 | CfscsCfaAfcGfGfCfcUfUfUfUfUfUfL96 | 398 | A-122843.1 | usUfscUfcAfcUfUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 467 |
| AD-60987.1 | A-119213.2 | GfscsCfcCfaAfcGfGfCfcUfUfUfUfUfL96 | 399 | A-122829.1 | usCfsuCfaUfcCfaGfGfCfcUfUfUfUfUfL96 | 468 |
| AD-60988.1 | A-122844.1 | CfsusGfcCfcUfgGfAfgAfcUfUfUfUfL96 | 400 | A-122845.1 | usAfsGfAfgAfcUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 469 |
| AD-60989.1 | A-122816.1 | CfsgsGfGfUfCfGfAfcAfcUfUfUfUfL96 | 401 | A-122817.1 | usCfscAfcAfgAfuGfUfUfUfUfUfUfL96 | 470 |
| AD-60990.1 | A-122830.1 | UfscsUfcCfuAfgGfUfAfcAfcUfUfUfL96 | 402 | A-122831.1 | usCfscGfcCfuUfgUfUfUfUfUfUfUfL96 | 471 |
| AD-60991.1 | A-122846.1 | AfscsUfgCfcCfaAfcGfGfCfcUfUfUfL96 | 403 | A-122847.1 | usAfsuCfcAfcGfGfCfcUfUfUfUfUfL96 | 472 |
| AD-60992.1 | A-122818.1 | GfsgsGfUfGfAfcAfcUfUfUfUfUfUfL96 | 404 | A-122819.1 | usCfscCfaCfaGfaUfgUfUfUfUfUfL96 | 473 |
| AD-60993.1 | A-122832.1 | CfsusGfcCfcAfcGfGfCfcUfUfUfUfL96 | 405 | A-122833.1 | usCfsaUfcCfaGfGfCfcUfUfUfUfUfL96 | 474 |
| AD-60994.1 | A-122848.1 | AfscsUfUfCfuAfgGfUfAfcAfcUfUfL96 | 406 | A-122849.1 | usCfsgCfcUfUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 475 |
| AD-60996.1 | A-122834.1 | CfscsCfcUfgCfcUfUfUfUfUfUfUfL96 | 407 | A-122835.1 | asGfsgAfaCfuCfuCfcagGfGfCfaGfGfGfsgusc | 476 |
| AD-60997.1 | A-122850.1 | CfscsCfuGfcCfcUfUfGfAfcGfUfUfL96 | 408 | A-122851.1 | usAfsGfAfaUfcUfUfUfUfUfUfUfL96 | 477 |
| AD-60998.1 | A-122821.1 | CfsasCfuGfUfGfAfcUfUfUfUfUfUfL96 | 409 | A-122822.1 | usUfsgGfaGfGfCfcAfcagUfAfcUfUfUfL96 | 478 |
| AD-60999.1 | A-122836.1 | GfsgsAfcUfgCfcCfcAfcUfUfUfUfUfL96 | 410 | A-122837.1 | uscfsaCfcCfcUfUfUfUfUfUfUfUfL96 | 479 |

【 0 5 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

| | | | | | | |
|------------|------------|--|-----|------------|--------------------------------------|-----|
| AD-61000.1 | A-122852.1 | GfsgsUfaUfuUfcCfUfAfgGfgUfaCfaAfgAfl96 | 411 | A-122853.1 | usCfsuUfgUfaCfcCfuagGfaAfaUfaCfcsasg | 480 |
| AD-61001.1 | A-122823.1 | CfsasCfcUfcCfcAfgAfuCfcCfuCfaAfl96 | 412 | A-122824.1 | usUfsgAfgGfgAfgAfuCfcUfgGfgUfgsasa | 481 |
| AD-61002.1 | A-122838.1 | UfsgsGfuAfuUfuCfcUfaGfgGfuAfcAfaAfl96 | 413 | A-122839.1 | usUfsuGfuAfcCfcUfaggAfaAfuAfcCfasgsa | 482 |
| AD-61003.1 | A-122854.1 | GfisuAfuUfuCfcUfAfgGfgGfuAfaGfgAfl96 | 414 | A-122855.1 | usCfscUfuGfuAfcCfcuaGfgAfaAfuAfcscsa | 483 |
| AD-61004.1 | A-122825.1 | CfsusCfcGfaGfgGfuGfaGfuGfgCfcAfuAfl96 | 415 | A-122826.1 | usAfsuGfgCfcAfcUfcacCfcUfcGfgAfgsgsa | 484 |
| AD-61005.1 | A-122840.1 | UfsgsCfcCfcAfaCfcGfcCfuGfgAfuGfaAfl96 | 416 | A-122841.1 | usUfscAfuCfcAfgGfcgUfuGfgGfgCfasgsu | 485 |
| AD-61006.1 | A-122856.1 | CfscsUfgCfcCfuGfgAfgAfuCfcUfuAfl96 | 417 | A-122857.1 | asGfsaGfgAfaCfuCuccAfgGfgCfaGfgsgsg | 486 |

10

20

30

40

【 0 5 4 9 】

実施例 6 . インピトロでの単回用量スクリーン

単回用量及び用量応答試験のための細胞培養及びトランスフェクション

Hep3B細胞(ATCC, Manassas, VA)を、10%のFBS、ストレプトマイシン、及びグルタミン(ATCC)を補充したDMEM(ATCC)中で、5%のCO₂の雰囲気中で、37℃でほぼコンフルエンスまで増殖させた後、トリプシン処理によりプレートから解放した。ウェル当たり14.8µlのOpti-MEM及び0.2µlのLipofectamine RNAiMax(Invitrogen, Carlsbad CA, cat # 13778-150)を、96ウェルプレート内のウェルごと

50

に5 μ lのsiRNA二本鎖に加えることによりトランスフェクションを行い、室温で15分間インキュベートした。次に、約 2×10^4 個のHep3B細胞を含む、抗生物質を有さない80 μ lの完全増殖培地を、siRNA混合物に加えた。RNA精製の前に、細胞を、24時間インキュベートした。10 nM及び0.1 nMの最終二本鎖濃度で実験を行った。

【0550】

DYNABEADS mRNA単離キット(Invitrogen, part #: 610-12)を用いた総RNA単離

細胞を採取し、150 μ lの溶解/結合緩衝液中に溶解させた後、エッペンドルフサーモミキサー(Eppendorf Thermomixer)を用いて、850 rpmで5分間混合した(混合速度は、プロセス全体を通して同一であった)。10マイクロリットルの磁気ビーズ及び80 μ lの溶解/結合緩衝液混合物を丸底プレートに加え、1分間混合した。磁気スタンドを用いて磁気ビーズを捕捉し、ビーズを乱すことなく上清を除去した。上清を除去した後、溶解した細胞を残りのビーズに加え、5分間混合した。上清を除去した後、磁気ビーズを150 μ lの洗浄緩衝液Aで2回洗浄し、1分間混合した。ビーズを再度捕捉し、上清を除去した。次に、ビーズを150 μ lの洗浄緩衝液Bで洗浄し、捕捉し、上清を除去した。次に、ビーズを150 μ lの溶出緩衝液で洗浄し、捕捉し、上清を除去した。ビーズを2分間乾燥させた。乾燥後、50 μ lの溶出緩衝液を加え、70 で5分間混合した。ビーズを磁石上で5分間捕捉した。40 μ lの上清を除去し、別の96ウェルプレートに加えた。

【0551】

ABI高容量cDNA逆転写キット(Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat # 4368813)を用いたcDNA合成

反応当たり、2 μ lの10倍緩衝液、0.8 μ lの25倍dNTP、2 μ lのランダムプライマー、1 μ lの逆転写酵素、1 μ lのRNase阻害剤及び3.2 μ lのH₂Oのマスターミックスを、10 μ lの総RNAに加えた。以下の工程を介して、Bio-Rad C-1000又はS-1000サーモサイクラー(Hercules, CA)を用いて、cDNAを生成した: 25 で10分間、37 で120分間、85 で5秒間、4 で保持。

【0552】

リアルタイムPCR

2 μ lのcDNAを、384ウェル50プレート(Roche cat # 04887301001)中で、ウェル当たり、0.5 μ lのGAPDH TaqMan Probe (Applied Biosystems Cat # 4326317E)、0.5 μ lのTMPRSS6 TaqMan probe (Applied Biosystems cat # Hs00542184_m1)及び5 μ lのLightcycler 480プローブマスターミックス(Roche Cat # 04887301001)を含むマスターミックスに加えた。Ct(RQ)アッセイを用いて、Roche Lightcycler Real Time PCRシステム(Roche)中でリアルタイムPCRを行った。要約した表中に特に断りのない限り、各二本鎖を2つの独立したトランスフェクションにおいて試験し、各トランスフェクションを2回アッセイした。

【0553】

相対的な倍加変化を計算するために、Ct方法を用いて、リアルタイムデータを分析し、10 nMのAD-1955でトランスフェクトした細胞、又は疑似トランスフェクト細胞を用いて行ったアッセイに対して正規化した。

【0554】

データは、非処理の細胞に対して、TMPRSS6を標的とするsiRNAでトランスフェクトした細胞中に残るTMPRSS6メッセージの割合として表される。全てのsiRNAを、少なくとも2回トランスフェクトし、qPCR反応を2回行った。データが、表6に示される。

10

20

30

40

50

【 0 5 5 5 】

【 表 2 7 】

表6. Tmprss6単回用量スクリーン

| 二本鎖ID | 10nM 平均 | 0.1nM 平均 | 10nM 標準偏差 | 0.1nM 標準偏差 |
|----------|---------|----------|-----------|------------|
| AD-46273 | 76.5 | 112.1 | 14.3 | 18.6 |
| AD-59743 | 61.4 | 108.2 | 8.7 | 4.4 |
| AD-60939 | 38.0 | 85.7 | 19.3 | 25.2 |
| AD-60940 | 24.2 | 22.6 | 10.1 | 9.7 |
| AD-60941 | 48.5 | 84.7 | 11.7 | 29.7 |
| AD-60942 | 102.9 | 111.2 | 4.3 | 44.8 |
| AD-60943 | 86.2 | 96.5 | 2.3 | 28.8 |
| AD-60944 | 24.6 | 78.5 | 1.1 | 36.5 |
| AD-60945 | 65.8 | 140.9 | 0.5 | 59.2 |
| AD-60946 | 50.3 | 105.9 | 4.1 | 31.2 |
| AD-60947 | 79.1 | 147.2 | 12.3 | 51.2 |
| AD-60948 | 81.0 | 113.9 | 0.6 | 32.7 |
| AD-60949 | 111.3 | 96.2 | 8.2 | 28.1 |
| AD-60950 | 53.8 | 93.2 | 7.6 | 42.3 |
| AD-60951 | 74.1 | 121.6 | 6.4 | 56.2 |
| AD-60952 | 47.6 | 118.3 | 8.1 | 52.4 |
| AD-60953 | 22.0 | 56.7 | 8.3 | 18.0 |
| AD-60954 | 23.3 | 55.8 | 5.3 | 31.7 |
| AD-60955 | 110.8 | 117.5 | 1.6 | 38.7 |
| AD-60956 | 15.8 | 29.6 | 1.7 | 10.2 |
| AD-60957 | 22.3 | 58.3 | 1.5 | 6.1 |
| AD-60958 | 106.4 | 136.0 | 24.1 | 61.7 |
| AD-60959 | 79.6 | 123.3 | 0.6 | 49.9 |
| AD-60960 | 17.4 | 49.4 | 8.6 | 10.2 |
| AD-60961 | 107.7 | 129.0 | 6.6 | 50.5 |
| AD-60962 | 90.2 | 113.3 | 8.0 | 67.2 |

10

20

30

【 0 5 5 6 】

40

50

【表 2 8】

| | | | | |
|----------|-------|-------|------|------|
| AD-60963 | 117.4 | 138.1 | 2.6 | 16.8 |
| AD-60964 | 80.7 | 123.2 | 24.2 | 18.9 |
| AD-60965 | 30.1 | 80.2 | 9.0 | 20.8 |
| AD-60966 | 54.1 | 133.6 | 4.6 | 44.0 |
| AD-60967 | 122.2 | 147.4 | 11.7 | 42.0 |
| AD-60968 | 86.9 | 142.0 | 39.9 | 49.7 |
| AD-60969 | 106.2 | 116.3 | 16.6 | 39.1 |
| AD-60970 | 54.6 | 112.6 | 7.3 | 11.8 |
| AD-60971 | 50.5 | 118.8 | 6.9 | 47.0 |
| AD-60972 | 55.6 | 94.2 | 6.5 | 3.4 |
| AD-60973 | 126.1 | 133.6 | 8.0 | 36.8 |
| AD-60974 | 82.6 | 115.0 | 8.7 | 43.7 |
| AD-60975 | 88.2 | 114.3 | 13.6 | 43.9 |
| AD-60976 | 46.3 | 71.0 | 11.6 | 30.2 |
| AD-60977 | 13.5 | 26.4 | 3.4 | 9.2 |
| AD-60978 | 72.7 | 92.9 | 6.4 | 31.7 |
| AD-60979 | 103.8 | 97.0 | 13.7 | 29.2 |
| AD-60980 | 28.4 | 58.0 | 12.3 | 21.1 |
| AD-60981 | 56.0 | 80.6 | 18.3 | 4.5 |
| AD-60982 | 102.4 | 137.4 | 15.2 | 16.4 |
| AD-60983 | 60.8 | 87.1 | 10.1 | 20.3 |
| AD-60984 | 53.6 | 116.7 | 1.2 | 47.8 |
| AD-60985 | 72.6 | 99.2 | 0.7 | 21.7 |
| AD-60986 | 90.1 | 96.4 | 6.6 | 29.5 |
| AD-60987 | 83.1 | 90.7 | 1.6 | 13.7 |
| AD-60988 | 69.4 | 102.3 | 2.4 | 55.4 |
| AD-60989 | 112.4 | 105.7 | 0.6 | 14.7 |
| AD-60990 | 90.4 | 93.4 | 6.2 | 4.1 |
| AD-60991 | 97.6 | 95.6 | 15.5 | 23.4 |
| AD-60992 | 104.0 | 131.4 | 6.9 | 33.7 |
| AD-60993 | 118.6 | 129.2 | 10.5 | 30.1 |
| AD-60994 | 25.9 | 57.2 | 6.8 | 0.3 |
| AD-60996 | 77.3 | 94.2 | 7.8 | 12.6 |
| AD-60997 | 60.1 | 80.9 | 18.8 | 7.5 |
| AD-60998 | 32.6 | 61.4 | 5.7 | 24.6 |
| AD-60999 | 133.6 | 110.9 | 39.7 | 15.4 |
| AD-61000 | 55.8 | 117.6 | 14.2 | 24.9 |
| AD-61001 | 57.9 | 85.2 | 8.1 | 42.0 |
| AD-61002 | 15.4 | 31.4 | 1.5 | 10.1 |
| AD-61003 | 82.3 | 98.1 | 4.0 | 11.8 |
| AD-61004 | 106.4 | 97.7 | 38.5 | 18.8 |
| AD-61005 | 138.0 | 141.2 | 65.7 | 20.0 |
| AD-61006 | 31.7 | 70.9 | 7.8 | 6.6 |

10

20

30

40

【 0 5 5 7】

実施例 7 . T M P R S S 6 i R N A 剤の単回用量投与のインビボでの影響

雌の C 5 7 B L / 6 マウスに、0 . 3 m g / k g 、 1 . 0 m g / k g 又は 3 . 0 m g / k g の用量の A D - 6 0 9 4 0 、 又は対照として P B S のみを単回皮下注射で投与した。3 匹のマウスを、様々な時点で、肝臓 T M P R S S 6 m R N A 、 肝臓ヘプシジン m R N A 、 血清ヘプシジン、総血清鉄、及びトランスフェリン飽和度パーセントについて、用量ごとに評価した。1 . 0 m g / k g 又は 3 . 0 m g / k g の A D - 6 0 9 4 0 又は P B S を与えられたマウスを、0 日目（処置前）並びに処置の 7 、 1 1 、 1 4 及び 2 1 日後に評価した。0 . 3 m g / k g の A D - 6 0 9 4 0 を与えられたマウスを、0 日目（処置前）

50

並びに処置の7及び11日後に評価した。肝臓TMPRSS6 mRNA及び肝臓ヘプシジンmRNAレベルを、qPCRによって測定し、GAPDH mRNAレベルに対して正規化し、PBSのみを投与されたマウスにおけるmRNAレベルに対して表した。血清ヘプシジンを、ELISA (Intrinsic Life Sciences) によって測定した。総血清鉄及びトランスフェリン飽和度パーセント (% Tf Sat) を、Olympus AU400 Serum Chemistry Analyzerを用いて測定した。各データ点が、3匹のマウスの平均値を表す。平均の標準偏差が、エラーバーによって表される。

【0558】

AD-60940の単回用量投与により、対照と比べて肝臓TMPRSS6 mRNAの堅固でかつ持続的な抑制が得られた。TMPRSS6 mRNA濃度が、3.0 mg/kgの用量の投与後、最大で3週間にわたって90%超だけ抑制された(図3A)。肝臓TMPRSS6 mRNA濃度の抑制の結果として、ヘプシジンmRNAレベルが、対照と比べて2倍増加し(図3B)、血清ヘプシジン濃度が、対照と比べて2倍超増加した(図3C)。更に、総血清鉄(図3D)が低下し、トランスフェリン飽和度パーセントが、対照と比べて50%超だけ低下した(図3E)。総血清鉄及びトランスフェリン飽和度パーセントの低下は、AD-60940の投与後、最大で3週間にわたって持続した。図3Fは、投与の11日後におけるAD-60940の用量に応じた相対的な肝臓TMPRSS6 mRNA濃度を示す。各データ点が、各用量レベルで観察されるTMPRSS6 mRNA濃度の最大の抑制を表す。データを、ヒルの式に当てはめた。

【0559】

AD-60940がヘプシジン及び血清鉄動員を調節する程度は、以前のHbb^{th3/+}マウス試験において観察されたものとほぼ同一であり(Schmidt et al., Blood (2013), 121(7), 1200-1208)、AD-60940が、
- サラセミアにおいて疾患修飾効果をもたらすための強力なRNAi治療剤であることを示す。

【0560】

実施例8. TMPRSS6 iRNA剤の複数回用量投与のインビボでの影響

雌のC57BL/6マウスに、0.3 mg/kg、1.0 mg/kgの用量のAD-60940、又はPBSのみ(対照として)を、3週間にわたって週に1回、皮下注射で投与し、次に、最後の投与の7日後に殺処分した(図4A)。用量ごとに3匹のマウスを、肝臓TMPRSS6 mRNA、肝臓ヘプシジンmRNA、及びトランスフェリン飽和度パーセントについて評価した。肝臓TMPRSS6 mRNA及び肝臓ヘプシジンmRNAレベルを、qPCRによって測定し、GAPDH mRNAレベルに対して正規化し、PBSのみを投与されたマウスにおけるmRNAレベルに対して表した。トランスフェリン飽和度パーセント(% Tf Sat)を、Olympus AU400 Serum Chemistry Analyzerを用いて測定した。各データ点が、3匹のマウスの平均値を表す。平均の標準偏差が、エラーバーによって表される。

【0561】

1.0 mg/kgのAD-60940の複数回用量投与により、TMPRSS6 mRNA濃度の90%超の抑制が得られた(図4B)。対照と比べて、ヘプシジンmRNA濃度が、2倍増加し、トランスフェリン飽和度パーセントが、50%超だけ低下した(図4B)。図4Cは、AD-60940の用量に応じた相対的な肝臓TMPRSS6 mRNA濃度を示す。データを、ヒルの式に当てはめた。これらのデータは、複数回用量のED80が、1.0 mg/kg未満であることを示す。

【0562】

この試験は、AD-60940が、TMPRSS6の堅固でかつ持続的な抑制を示し、ヘプシジン誘導及び全身的な鉄制限をもたらすことを実証し、AD-60940が、
- サラセミアにおいて疾患修飾効果をもたらすための強力なRNAi治療剤であることを示す。

10

20

30

40

50

【0563】

実施例9．肝臓TMPRSS6 mRNAレベル及び血清ヘプシジン濃度及びトランスフェリン飽和度パーセントの間の関係

AD-59743、AD-61002、AD-60940、及び他のTMPRSS6 siRNA剤を用いて生成されたデータを、肝臓TMPRSS6 mRNAレベル及び血清ヘプシジンレベル及びトランスフェリン飽和度パーセントの間の関係を評価するために更に分析した。血清ヘプシジン濃度は、ヒルの式を用いて、TMPRSS6 mRNAレベルに対する非線形関係を示した(図5A)。トランスフェリン飽和度パーセントは、線形単回帰式に当てはめたとき、TMPRSS6 mRNAレベルに対する線形関係を示した(図5B)。TMPRSS6 mRNAレベル及びトランスフェリン飽和度パーセントの間の線形関係は、鉄制限が、AD-60940によって正確にかつ予想どおりに調節され得ることを示す。血清ヘプシジン濃度及び相対的なヘプシジンmRNAレベルも、線形単回帰式に当てはめたとき、線形関係を示した(図5C)。対照的に、トランスフェリン飽和度パーセント及び血清ヘプシジン濃度の間の関係は、非線形であり、ヒルの式に当てはめた(図5D)。

10

【0564】

実施例10．インビボでの単回用量スクリーン

図6に示されるTMPRSS6 siRNA二本鎖を、siRNA二本鎖の投与後に、雌のC57BL/6マウスの肝臓中のTMPRSS6 mRNAのレベルを抑制する能力によって、有効性について評価した。3mg/kgのTMPRSS6 siRNA二本鎖を単回の皮下投与で投与し、マウスを7日後に殺処分した。肝臓中のTMPRSS6 mRNAのレベルを、上述される方法を用いてqPCRによって測定した。対照群のマウスには、PBSの注射を与えた。

20

【0565】

TMPRSS6 siRNA二本鎖の投与後のTMPRSS6 mRNAのレベルが、図6に示される。結果は、AD-60940、AD-59743及びAD-61002の投与により、最大のサイレンシングをもたらすAD-60940による肝臓TMPRSS6 mRNAのかなりの抑制が得られたことを示す。具体的には、TMPRSS6 siRNA二本鎖AD-60940は、対照と比べて80%超だけTMPRSS6 mRNAを減少させた。データは、AD-59743、AD-60940、AD-61002、AD-60994、AD-60998及びAD-61001による処置が、7日目まで維持されるTMPRSS6転写物のレベルの低下をもたらすことも示す。

30

【0566】

実施例11．インビボでの複数回用量スクリーン

図7に示されるTMPRSS6 siRNA二本鎖を、siRNA二本鎖の投与後に、野生型C57BL/6マウスの肝臓中のTMPRSS6 mRNAのレベルを抑制する能力によって、有効性について評価した。0.3mg/kg又は1.0mg/kgのいずれかのTMPRSS6 siRNA二本鎖の皮下投与を、3週間にわたって週に1回投与した。マウスを、最後の投与の7日後に殺処分した。肝臓中のTMPRSS6 mRNAのレベルを、上述される方法を用いて、qPCRによって測定した。対照群のマウスに、PBSの注射を与えた。

40

【0567】

TMPRSS6 siRNA二本鎖の投与後のTMPRSS6 mRNAのレベルが、図7に示される。結果は、TMPRSS6 siRNA二本鎖AD-60940の1.0mg/kgの投与計画により、対照と比べて80%超だけTMPRSS6 mRNAが減少されることを示す。

【0568】

実施例12．AD-60940の最適化

AD-60940の投与が、対照と比べて80%超だけTMPRSS6 mRNAを持続的に減少させたという観察に基づいて、様々な化学的修飾を有するAD-60940の

50

親配列に基づいた更なる *siRNA* を、Hep3B細胞におけるトランスフェクションによって、10 nM及び0.1 nMでの単回用量スクリーンにおいて有効性について評価した。これらの剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列が、表8に示され、このスクリーンの結果が、表9に示される。表9中のデータは、対照に対して残るメッセージの平均割合として表される。

【0569】

更に、上記の表4及び5に記載される *siRNA* の一部を、センス鎖の5'末端に2' OMe修飾を有する2' Fを置換し、アンチセンス鎖に5'-リン酸を加えるように修飾した。これらの *siRNA* 剤も、Hep3B細胞におけるトランスフェクションによって、10 nM及び0.1 nMでの単回用量スクリーンにおいてインビトロ有効性について評価した。これらの剤のセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列が、表10に示され、このスクリーンの結果が、表11に示される。表11中のデータは、対照に対して残るメッセージの平均割合として表される。

【0570】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表8. TmprSS6の修飾配列

| 二本鎖ID | センスID | センス配列 | 配列番号 | アンチセンスID | アンチセンス配列 | 配列番号 |
|----------|-------------|--|------|-------------|---------------------------------------|------|
| AD-63214 | A-126586.2 | Y44CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 487 | A-126587.2 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 544 |
| AD-63240 | A-122745.11 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 488 | A-126607.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 545 |
| AD-63209 | A-126594.1 | csusgguuUfuUfcCfuaggGfdTacaal96 | 489 | A-122746.13 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 546 |
| AD-63208 | A-122745.6 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 490 | A-126587.1 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 547 |
| AD-63202 | A-126586.1 | Y44CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 491 | A-122746.6 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 548 |
| AD-63216 | A-122745.7 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 492 | A-126603.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 549 |
| AD-63219 | A-126617.1 | gsgsUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 493 | A-126618.1 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 550 |
| AD-63228 | A-122745.9 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 494 | A-126605.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 551 |
| AD-63205 | A-122745.13 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 495 | A-126609.1 | usUfsgUfaccCfuagggaAfaUfaccAfgsasg | 552 |
| AD-63241 | A-126589.2 | csusgguaUfuUfcCfuaggGfuacaal96 | 496 | A-126611.3 | usUfsguaCfccUfagggaAfaUfaccagsasg | 553 |
| AD-63243 | A-126621.3 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfguaAcaal96 | 497 | A-126624.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 554 |
| AD-63203 | A-126593.1 | csusgguaUfuUfcCfuaggGfuadCaal96 | 498 | A-122746.12 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 555 |
| AD-63223 | A-122745.16 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 499 | A-126612.1 | usUfsguaCfccuagggaAfaUfaccagsasg | 556 |
| AD-63231 | A-126621.1 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfguaAcaal96 | 500 | A-126622.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 557 |
| AD-63199 | A-122745.12 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 501 | A-126608.1 | usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 558 |
| AD-63217 | A-122745.15 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 502 | A-126611.1 | usUfsguaCfccUfagggaAfaUfaccagsasg | 559 |
| AD-63229 | A-122745.17 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 503 | A-126613.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 560 |
| AD-63255 | A-126621.5 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfguaAcaal96 | 504 | A-126626.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 561 |
| AD-63226 | A-126589.1 | csusgguaUfuUfcCfuaggGfuacaal96 | 505 | A-122746.8 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 562 |
| AD-63211 | A-122745.14 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 506 | A-126610.1 | usUfsgUfaccuuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 563 |
| AD-63273 | A-126621.8 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfguaAcaal96 | 507 | A-126629.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 564 |
| AD-60940 | A-122745.1 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 508 | A-122746.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 565 |
| AD-63249 | A-126621.4 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfguaAcaal96 | 509 | A-126625.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 566 |
| AD-63256 | A-122745.19 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 510 | A-126634.1 | usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 567 |

【表 3 0】

| | | | | | | |
|----------|-------------|---------------------------------------|-----|-------------|---------------------------------------|-----|
| AD-63280 | A-126639.1 | csusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 511 | A-126587.3 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 568 |
| AD-63237 | A-126621.2 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 512 | A-126623.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 569 |
| AD-63285 | A-126621.10 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 513 | A-126631.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 570 |
| AD-63215 | A-126595.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 514 | A-122746.14 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 571 |
| AD-63222 | A-122745.8 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 515 | A-126604.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 572 |
| AD-63232 | A-126590.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 516 | A-122746.9 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 573 |
| AD-63218 | A-126594.2 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 517 | A-126611.7 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 574 |
| AD-63261 | A-126621.6 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 518 | A-126627.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 575 |
| AD-63267 | A-126621.7 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 519 | A-126628.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 576 |
| AD-63234 | A-122745.10 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 520 | A-126606.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 577 |
| AD-63250 | A-122745.18 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 521 | A-126633.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 578 |
| AD-63212 | A-126593.2 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 522 | A-126611.6 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 579 |
| AD-63210 | A-126602.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 523 | A-122746.21 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 580 |
| AD-63244 | A-126621.11 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 524 | A-126632.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 581 |
| AD-63235 | A-126588.2 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 525 | A-126611.2 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 582 |
| AD-63279 | A-126621.9 | csusGfguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 526 | A-126630.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 583 |
| AD-63227 | A-126597.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 527 | A-122746.16 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 584 |
| AD-63220 | A-126588.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 528 | A-122746.7 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 585 |
| AD-63238 | A-126591.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 529 | A-122746.10 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 586 |
| AD-63242 | A-126598.2 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 530 | A-126611.11 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 587 |
| AD-63239 | A-126599.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 531 | A-122746.18 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 588 |
| AD-63233 | A-126598.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 532 | A-122746.17 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 589 |
| AD-63268 | A-126636.1 | CfsusGfgUfaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 533 | A-122746.22 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 590 |
| AD-63221 | A-126596.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 534 | A-122746.15 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 591 |
| AD-63236 | A-126597.2 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 535 | A-126611.10 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 592 |
| AD-63197 | A-126592.1 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 536 | A-122746.11 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 593 |
| AD-63224 | A-126595.2 | csusgguaUfuUfcCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 537 | A-126611.8 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 594 |

【 0 5 7 2】

10

20

30

40

50

【表 3 1】

| | | | | | | |
|----------|-------------|---------------------------------------|-----|-------------|--------------------------------------|-----|
| AD-63200 | A-126590.2 | csusgguaFuuuUfcCfUfagGfGfuacaaL96 | 538 | A-126611.4 | usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg | 595 |
| AD-63262 | A-122745.20 | CfsusGfgUfaUfuUfCfUfAgfGfgUfaCfaAfl96 | 539 | A-126635.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaaUfaCfcAfgsasg | 596 |
| AD-63204 | A-126601.1 | csusgguauuucdCuaggguaCaal96 | 540 | A-122746.20 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 597 |
| AD-63230 | A-126596.2 | csusgguaFuuuucCfuaggguaadCaal96 | 541 | A-126611.9 | usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg | 598 |
| AD-63198 | A-126600.1 | csusgguauuucdCdTaggguaCaal96 | 542 | A-122746.19 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 599 |
| AD-63206 | A-126591.2 | csusgguaFuuuucCfuaggguaCaal96 | 543 | A-126611.5 | usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg | 600 |

【 0 5 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表9. Tmprss6単回用量スクリーン

| | 10nM | 0.1nM |
|----------|-------|-------|
| 二本鎖ID | 平均 | 平均 |
| AD-63214 | 12.40 | 19.46 |
| AD-63240 | 12.29 | 27.03 |
| AD-63209 | 17.11 | 23.38 |
| AD-63208 | 14.77 | 23.31 |
| AD-63202 | 14.87 | 27.08 |
| AD-63216 | 15.97 | 34.05 |
| AD-63219 | 18.47 | 27.82 |
| AD-63228 | 19.44 | 34.52 |
| AD-63205 | 15.44 | 38.23 |
| AD-63241 | 18.81 | 41.42 |
| AD-63243 | 19.15 | 30.87 |
| AD-63203 | 17.06 | 42.12 |
| AD-63223 | 21.98 | 27.52 |
| AD-63231 | 22.42 | 30.68 |
| AD-63199 | 17.74 | 39.50 |
| AD-63217 | 18.81 | 38.99 |
| AD-63229 | 22.33 | 33.42 |
| AD-63255 | 21.06 | 34.31 |
| AD-63226 | 18.36 | 41.65 |
| AD-63211 | 26.00 | 32.07 |
| AD-63273 | 23.11 | 34.96 |
| AD-60940 | 22.99 | 34.34 |
| AD-63249 | 30.83 | 28.35 |
| AD-63256 | 23.18 | 35.19 |
| AD-63280 | 25.10 | 32.42 |
| AD-63237 | 23.95 | 35.43 |
| AD-63285 | 21.53 | 39.60 |
| AD-63215 | 29.27 | 42.54 |
| AD-63222 | 23.88 | 38.24 |
| AD-63232 | 30.29 | 35.04 |
| AD-63218 | 27.02 | 37.31 |
| AD-63261 | 24.22 | 46.61 |
| AD-63267 | 28.32 | 38.90 |
| AD-63234 | 24.42 | 55.83 |
| AD-63250 | 26.77 | 47.92 |
| AD-63212 | 28.43 | 46.01 |
| AD-63210 | 27.91 | 44.35 |
| AD-63244 | 30.66 | 45.65 |
| AD-63235 | 32.75 | 51.82 |
| AD-63279 | 38.00 | 48.80 |

10

20

30

40

【 0 5 7 4 】

50

【表 3 3】

| | | |
|----------|-------|-------|
| AD-63227 | 33.15 | 58.12 |
| AD-63220 | 38.31 | 54.08 |
| AD-63238 | 45.56 | 51.50 |
| AD-63242 | 47.96 | 54.26 |
| AD-63239 | 51.98 | 49.22 |
| AD-63233 | 51.37 | 65.83 |
| AD-63268 | 41.22 | 82.16 |
| AD-63221 | 57.02 | 65.11 |
| AD-63236 | 49.86 | 71.66 |
| AD-63197 | 47.67 | 78.29 |
| AD-63224 | 67.73 | 60.88 |
| AD-63200 | 62.89 | 67.68 |
| AD-63262 | 64.25 | 79.72 |
| AD-63204 | 68.01 | 80.99 |
| AD-63230 | 66.88 | 81.04 |
| AD-63198 | 65.67 | 78.28 |
| AD-63206 | 65.10 | 82.71 |

10

20

【 0 5 7 5 】

30

40

50

【表 3 4】

表10. TMRSS6の修飾配列

| 二本鎖ID | センスID | センス配列 | 配列番号 | アンチセンスID | アンチセンス配列 | 配列番号 |
|----------|-------------|---|------|-------------|---------------------------------------|------|
| AD-63214 | A-126586.2 | Y44CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 601 | A-126587.2 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 658 |
| AD-63240 | A-122745.11 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 602 | A-126607.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 659 |
| AD-63209 | A-126594.1 | csusgguaUfuUfCfCfuaggCfUtaaal96 | 603 | A-122746.13 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 660 |
| AD-63208 | A-122745.6 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 604 | A-126587.1 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 661 |
| AD-63202 | A-126586.1 | Y44CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 605 | A-122746.6 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 662 |
| AD-63216 | A-122745.7 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 606 | A-126603.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 663 |
| AD-63219 | A-126617.1 | gsgsUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 607 | A-126618.1 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 664 |
| AD-63228 | A-122745.9 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 608 | A-126605.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 665 |
| AD-63205 | A-122745.13 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 609 | A-126609.1 | usUfsgUfaccCfuaggAfaUfaccagsasg | 666 |
| AD-63241 | A-126589.2 | csusgguaUfuUfCfCfuaggCfuaaal96 | 610 | A-126611.3 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 667 |
| AD-63243 | A-126621.3 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 611 | A-126624.1 | usUfscfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 668 |
| AD-63203 | A-126593.1 | csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuadCaal96 | 612 | A-122746.12 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 669 |
| AD-63223 | A-122745.16 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 613 | A-126612.1 | usUfsguaCfcCfuaggAfaUfaccagsasg | 670 |
| AD-63231 | A-126621.1 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 614 | A-126622.1 | usUfscfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 671 |
| AD-63199 | A-122745.12 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 615 | A-126608.1 | usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 672 |
| AD-63217 | A-122745.15 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 616 | A-126611.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 673 |
| AD-63229 | A-122745.17 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 617 | A-126613.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 674 |
| AD-63255 | A-126621.5 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 618 | A-126626.1 | usUfscfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 675 |
| AD-63226 | A-126589.1 | csusgguaUfuUfCfCfuaggGfuaaal96 | 619 | A-122746.8 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 676 |
| AD-63211 | A-122745.14 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 620 | A-126610.1 | usUfsgUfaccuAfggaAfaUfaccagsasg | 677 |
| AD-63273 | A-126621.8 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 621 | A-126629.1 | usUfscfuaCfcCfuAfggaAfaUfaccagsasg | 678 |
| AD-60940 | A-122745.1 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 622 | A-122746.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 679 |
| AD-63249 | A-126621.4 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 623 | A-126625.1 | usUfscfuaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 680 |
| AD-63256 | A-122745.19 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfl96 | 624 | A-126634.1 | usUfsgUfaccCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 681 |
| AD-63280 | A-126639.1 | csusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgCfuaAfl96 | 625 | A-126587.3 | PusUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 682 |

【 0 5 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

| | | | | | | |
|----------|-------------|--|-----|-------------|---|-----|
| AD-63237 | A-126621.2 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 626 | A-126623.1 | usUfsgUfaAfcCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 683 |
| AD-63285 | A-126621.10 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 627 | A-126631.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 684 |
| AD-63215 | A-126595.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 628 | A-122746.14 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 685 |
| AD-63222 | A-122745.8 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAFL96 | 629 | A-126604.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 686 |
| AD-63232 | A-126590.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 630 | A-122746.9 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 687 |
| AD-63218 | A-126594.2 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 631 | A-126611.7 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 688 |
| AD-63261 | A-126621.6 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 632 | A-126627.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 689 |
| AD-63267 | A-126621.7 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 633 | A-126628.1 | usUfsgUfaAfcCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 690 |
| AD-63234 | A-122745.10 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAFL96 | 634 | A-126606.1 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 691 |
| AD-63250 | A-122745.18 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAFL96 | 635 | A-126633.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 692 |
| AD-63212 | A-126593.2 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 636 | A-126611.6 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 693 |
| AD-63210 | A-126602.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 637 | A-122746.21 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 694 |
| AD-63244 | A-126621.11 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 638 | A-126632.1 | usUfsgUfaAfcCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 695 |
| AD-63235 | A-126588.2 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 639 | A-126611.2 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 696 |
| AD-63279 | A-126621.9 | csusGfguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 640 | A-126630.1 | usUfsgUfaAfcCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 697 |
| AD-63227 | A-126597.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 641 | A-122746.16 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 698 |
| AD-63220 | A-126588.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 642 | A-122746.7 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 699 |
| AD-63238 | A-126591.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 643 | A-122746.10 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 700 |
| AD-63242 | A-126598.2 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 644 | A-126611.11 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 701 |
| AD-63239 | A-126599.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 645 | A-122746.18 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 702 |
| AD-63233 | A-126598.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 646 | A-122746.17 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 703 |
| AD-63268 | A-126636.1 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAFL96 | 647 | A-122746.22 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 704 |
| AD-63221 | A-126596.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 648 | A-122746.15 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 705 |
| AD-63236 | A-126597.2 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 649 | A-126611.10 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 706 |
| AD-63197 | A-126592.1 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 650 | A-122746.11 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 707 |
| AD-63224 | A-126595.2 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 651 | A-126611.8 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 708 |
| AD-63200 | A-126590.2 | csusgguaUfuUfCfCfuAfgGfguAfcfaaL96 | 652 | A-126611.4 | usUfsguaCfcCfuAfggaAfaUfaccAfgsasg | 709 |
| AD-63262 | A-122745.20 | CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAFL96 | 653 | A-126635.1 | usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg | 710 |

【 0 5 7 7】

10

20

30

40

50

【表 36】

| | | | | | | |
|----------|------------|---------------------------------|-----|-------------|--|-----|
| AD-63204 | A-126601.1 | csusgguaauuucdCuaggguaacaal96 | 654 | A-122746.20 | usUfsgUfaCfcCfuAfiggaAfaUfaCfcAfigsasg | 711 |
| AD-63230 | A-126596.2 | csusgguaAfuuucCfuaggguaadCaal96 | 655 | A-126611.9 | usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg | 712 |
| AD-63198 | A-126600.1 | csusgguaauuucdCdTaggguaacaal96 | 656 | A-122746.19 | usUfsgUfaCfcCfuAfiggaAfaUfaCfcAfigsasg | 713 |
| AD-63206 | A-126591.2 | csusgguaAfuuucCfuaggguaacaal96 | 657 | A-126611.5 | usUfsguaCfccUfaggaAfaUfaccagsasg | 714 |

【0578】

10

20

30

40

50

【表 3 7】

表11. TMPRSS6単回用量スクリーン

| 二本鎖ID | 10nM | | 0.1nM | |
|----------|-------|------|-------|------|
| | 平均 | 標準偏差 | 平均 | 標準偏差 |
| AD-60998 | 26.1 | 3.1 | 42.9 | 13.3 |
| AD-60970 | 24.3 | 9.3 | 39.0 | 24.2 |
| AD-61002 | 27.5 | 8.5 | 32.1 | 9.8 |
| AD-60994 | 19.9 | 5.8 | 28.2 | 9.3 |
| AD-60992 | 57.9 | 15.4 | 67.5 | 13.6 |
| AD-61006 | 25.8 | 2.5 | 33.4 | 8.7 |
| AD-59743 | 21.1 | 3.2 | 31.7 | 8.1 |
| AD-60966 | 64.6 | 15.6 | 76.0 | 18.2 |
| AD-60952 | 44.1 | 10.7 | 76.9 | 16.5 |
| AD-61000 | 37.2 | 5.8 | 43.3 | 12.7 |
| AD-60949 | 94.9 | 22.3 | 91.3 | 13.2 |
| AD-60969 | 100.7 | 18.5 | 124.5 | 43.0 |
| AD-60967 | 93.7 | 6.4 | 112.1 | 31.5 |
| AD-60984 | 44.7 | 21.4 | 58.2 | 9.6 |
| AD-60943 | 65.6 | 11.0 | 61.7 | 9.8 |
| AD-61001 | 69.2 | 8.3 | 100.8 | 8.4 |
| AD-60986 | 38.9 | 13.9 | 58.9 | 4.8 |
| AD-60988 | 61.7 | 12.0 | 68.6 | 15.2 |
| AD-60993 | 92.1 | 13.1 | 86.5 | 10.0 |
| AD-60987 | 113.9 | 15.3 | 97.9 | 21.0 |
| AD-60997 | 54.8 | 7.2 | 75.8 | 16.4 |
| AD-60973 | 61.5 | 15.7 | 80.8 | 9.3 |
| AD-61005 | 116.8 | 23.4 | 128.1 | 10.8 |
| AD-60985 | 71.2 | 15.1 | 78.7 | 14.6 |
| AD-61003 | 101.0 | 15.2 | 97.5 | 15.8 |
| AD-60989 | 75.8 | 9.8 | 97.2 | 20.8 |
| AD-60955 | 108.6 | 23.4 | 102.0 | 16.6 |
| AD-60991 | 96.6 | 19.4 | 95.6 | 12.4 |
| AD-61004 | 111.1 | 6.4 | 110.9 | 18.3 |
| AD-60961 | 96.9 | 36.0 | 84.1 | 28.2 |
| AD-60999 | 106.7 | 12.7 | 92.3 | 24.6 |
| AD-60990 | 92.9 | 38.4 | 97.6 | 16.8 |
| AD-60996 | 71.2 | 7.5 | 101.5 | 8.9 |

10

20

30

40

【0579】

実施例13. AD-60940の最適化

TMPRSS6を標的とする更なる二本鎖を産生し、以下の材料及び方法を用いて有効性についてインビトロでスクリーニングした。

【0580】

更なるsiRNAの設計、合成、及びインビトロスクリーニング

siRNA設計

センス鎖及びアンチセンス鎖の両方について、19ヌクレオチド長のTMPRSS6二本鎖を、GenBank登録番号NM_153609.3に記載されるヒトTMPRSS

50

6 mRNA配列を用いて設計した。実質的に3209ヌクレオチド転写物全体にわたる、7ヌクレオチドより長い反復を含まない3180の二本鎖を最初に同定した。次に、全ての3180の二本鎖を、各二本鎖位置におけるヌクレオチド対、並びにスクリーニングに使用される用量及び細胞株を評価する線形モデルにしたがって、予測される有効性について採点した。また、二本鎖を、特注の力まかせアルゴリズムを用いて、ヒトRefSeq collectionにおける全ての転写物に対してマッチングさせ、TMPRSS6以外の転写物に対する(鎖当たりの)ミスマッチの最低数を採点した。次に、合成され、スクリーニングされる二本鎖を、以下のスキームにしたがって、3180から選択した：転写物の5'末端から開始して、最も高い予測される有効性を有し、TMPRSS6以外の全ての転写物に対する両方の鎖における少なくとも1つのミスマッチを有し、他の二本鎖組の一部として既に合成及びスクリーニングされていない全ての 10 ± 2 ヌクレオチドの「ウインドウ」内で二本鎖を選択した。全ての基準を満たす二本鎖が、所与のウインドウ内で同定されない場合、そのウインドウを飛ばした。303の二本鎖を、上記の基準にしたがって選択した。更なる31の二本鎖も選択した。

【0581】

334 TMPRSS6センス鎖及びアンチセンス鎖配列の詳細なリストが、表12に示される。

【0582】

細胞培養及びトランスフェクション

Hep3B2.1-7細胞を、米国培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)(Rockville, Md., cat. No. HB-8064)から入手し、加湿器の付いた培養器(humidified incubator)(Heraeus HERAcCell, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Germany)において、5%のCO₂の雰囲気下、37℃で、10%のウシ胎仔血清(FCS)(Biochrom AG, Berlin, Germany, cat. No. S0115)及びペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100mg/ml(Biochrom AG, Berlin, Germany, cat. No. A2213)を含有するように補充されたEMEM(ATCC #30-2003)中で培養した。

【0583】

dsRNAのトランスフェクションを、96ウェルプレート上にウェル当たり15,000個の細胞を播種した直後に行い、製造業者によって説明されるように、Lipofectamine 2000(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany, cat. No. 11668-019)を用いて行った。トランスフェクションを4回行い、dsRNAを、10nMの濃度でトランスフェクトした。

【0584】

分岐DNAアッセイ - QunatiGene 2.0(Panomics cat #: QS0011)

TMPRSS6 mRNAの測定のために、TMPRSS6についてはQuantigene II Kit及びbDNAについてはQuantigene I Explore Kit(それぞれ、Panomics, Fremont, Calif., USA, cat. No. 15735又はQG0004)の製造業者によって推奨される手順にしたがって、細胞を、トランスフェクションの24時間後に採取し、53℃で溶解させた。その後、50µlの溶解物を、ヒトTMPRSS6に特異的なプローブセットを用いてインキュベートし、10µlの溶解物を、ヒトGAPDHに特異的なプローブセットを用いてインキュベートし、Quantigeneのための製造業者のプロトコルにしたがって処理した。化学発光を、RLU(相対発光量)としてVictor 2-Light(Perkin Elmer, Wiesbaden, Germany)において測定し、ヒトTMPRSS6プローブセットを用いて得られた値を、各ウェルについてそれぞれのヒトGAPDH値に対して正規化し、次に、3つの関連のない対照dsRNAの平均に関連付けた。

10

20

30

40

50

【 0 5 8 5 】

本化合物のインビトロでの有効性が、表 1 3 に示される。

【 0 5 8 6 】

【 表 3 8 】

表12. 更なる修飾TMPRSS6 siRNA

| 二本鎖ID | センス配列 | 配列番号 | センスID | NM_153609.3に おける位置 | アンチセンス配列 | 配列 番号 | アンチセンスID |
|------------|--------------------------|------|------------|-----------------------|---------------------------|----------|------------|
| AD-63290.1 | UGAGCCAGACCCAGUCCAGdTdT | 715 | A-126858.1 | 3-21 | CUGACUGGGUCUGGGUCAdTdT | 1049 | A-126859.1 |
| AD-63296.1 | GACCCAGUCCAGUCUCUGGdTdT | 716 | A-126860.1 | 10-28 | ACCAGAGCUGGACUCUGGGUCdTdT | 1050 | A-126861.1 |
| AD-63302.1 | CUCUGGUCUCUGCCUCUCUGdTdT | 717 | A-126862.1 | 22-40 | CAGAGGGCAGGGCACCAGAGdTdT | 1051 | A-126863.1 |
| AD-63308.1 | GCCUCUGGUGCGAGCUGAdTdT | 718 | A-126864.1 | 33-51 | UCAGCUCGCACCAGAGGGCdTdT | 1052 | A-126865.1 |
| AD-63314.1 | GGUGCGAGCUGACCCUGAGAdTdT | 719 | A-126866.1 | 40-58 | UCUCAGGUCAGCUCGCACCdTdT | 1053 | A-126867.1 |
| AD-63320.1 | UGACCCAGAGUCCAGUCUCCdTdT | 720 | A-126868.1 | 49-67 | GGAAGUGCAUCUCAGGUCAdTdT | 1054 | A-126869.1 |
| AD-63326.1 | UGCACUCCUCUCUCUGdTdT | 721 | A-126870.1 | 59-77 | CACAGAGGGGAAAGUGCAdTdT | 1055 | A-126871.1 |
| AD-63332.1 | CUGUGAGCUCUCUGGCACdTdT | 722 | A-126872.1 | 73-91 | GUGCCGAGACAGCUCACAGdTdT | 1056 | A-126873.1 |
| AD-63291.1 | GUCUCGGCACCCACUUGCAdTdT | 723 | A-126874.1 | 82-100 | UGCAAUGUGGUGCCGAGACdTdT | 1057 | A-126875.1 |
| AD-63297.1 | CCACUUGCAGUCACUGCCGdTdT | 724 | A-126876.1 | 92-110 | CGGCAGUGACUCGCAAGUGGdTdT | 1058 | A-126877.1 |
| AD-63303.1 | GUCACUGCCGCGUGAUGUdTdT | 725 | A-126878.1 | 101-119 | AACAUCAGCGGCGCAGUGACdTdT | 1059 | A-126879.1 |
| AD-63309.1 | GCCUGAUGUUGUUAUCUCUdTdT | 726 | A-126880.1 | 110-128 | AAGAGUAACAACAUCAAGGdTdT | 1060 | A-126881.1 |
| AD-63315.1 | UUACUUCUCCACUCCAAAAdTdT | 727 | A-126882.1 | 121-139 | UUUUUGGAGUGGAAAGAGUAAdTdT | 1061 | A-126883.1 |
| AD-63321.1 | ACUCCAAAAGGAUGCCCGUdTdT | 728 | A-126884.1 | 131-149 | ACGGGCAUCCUUUUGGAGUdTdT | 1062 | A-126885.1 |
| AD-63327.1 | UGCCCGUGCCGAGGCCCCdTdT | 729 | A-126886.1 | 143-161 | GGGGCCUCGCGCCACCGGCAdTdT | 1063 | A-126887.1 |
| AD-63333.1 | UGCCCGAGGCCCCCAGGdTdT | 730 | A-126888.1 | 149-167 | ACCUUGGGGGCCUCGCGCCAdTdT | 1064 | A-126889.1 |
| AD-63292.1 | CCAGGUGCUGGCGGCGAGdTdT | 731 | A-126890.1 | 162-180 | CUGCCCGCCAGCCACCUUGdTdT | 1065 | A-126891.1 |
| AD-63298.1 | GCGGGCAGGGGACGAGGdTdT | 732 | A-126892.1 | 173-191 | CCUCCGUCGCCCUGCCCGdTdT | 1066 | A-126893.1 |
| AD-63304.1 | GGACGGAGGUGAUGCGGAdTdT | 733 | A-126894.1 | 183-201 | CUCGCCAUCACCUCCGUCdTdT | 1067 | A-126895.1 |
| AD-63310.1 | GUGAUGCGGAGGAGCGGAdTdT | 734 | A-126896.1 | 191-209 | UCCGCUUCUCCGCCCAUCAdTdT | 1068 | A-126897.1 |
| AD-63316.1 | GAAAGCGGAGCCGAGGGGAdTdT | 735 | A-126898.1 | 202-220 | UCCCCUCCGGCUCUCCUdTdT | 1069 | A-126899.1 |
| AD-63322.1 | GCCGGAGGGGAUGUUCAGAdTdT | 736 | A-126900.1 | 210-228 | CUUGAAACAUCUCCUCCGCGdTdT | 1070 | A-126901.1 |

【 0 5 8 7 】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

| | | | | | | | |
|------------|-------------------------|-----|------------|---------|--------------------------|------|------------|
| AD-63328.1 | UGUUCAAGGCCUGUGAGGAdTdT | 737 | A-126902.1 | 221-239 | UCCUCACAGGCCUUUAACAAdTdT | 1071 | A-126903.1 |
| AD-63334.1 | CUGAGAGACUCCAAGAGAdTdT | 738 | A-126904.1 | 231-249 | UCUCUUUGGAGUCCUCACAGdTdT | 1072 | A-126905.1 |
| AD-63293.1 | ACUCCAAGAGAAAAGCCCGdTdT | 739 | A-126906.1 | 239-257 | CGGGUUUUUCUCUUUGGAGUdTdT | 1073 | A-126907.1 |
| AD-63299.1 | GCCCGGGCUACCUCCGCCdTdT | 740 | A-126908.1 | 253-271 | GGCGGAGGUAGCCCCGGGCdTdT | 1074 | A-126909.1 |
| AD-63305.1 | ACCUCCGUGUGUCCCUdTdT | 741 | A-126910.1 | 263-281 | AGGGCCACAGGGGGAGGUdTdT | 1075 | A-126911.1 |
| AD-63311.1 | GCCUGGCCCCUJUUGUdTdT | 742 | A-126912.1 | 269-287 | ACAAACAGGGGCCACAGGCdTdT | 1076 | A-126913.1 |
| AD-63317.1 | UGUUUGUCUGUGGCCCUdTdT | 743 | A-126914.1 | 281-299 | AGGGCCAGCAGCAACAAdTdT | 1077 | A-126915.1 |
| AD-63323.1 | UGUGGCCUGUCUGUGUdTdT | 744 | A-126916.1 | 290-308 | AGCACGAGCAGGGCCAGCAAdTdT | 1078 | A-126917.1 |
| AD-63329.1 | GCUCUGUGGCCUUCGGCGdTdT | 745 | A-126918.1 | 300-318 | CGCCGAAAGCCAGCACAGGCdTdT | 1079 | A-126919.1 |
| AD-63335.1 | UCGGGGGGUUCUACUCUdTdT | 746 | A-126920.1 | 313-331 | AGAGUAGCACCCCGCCGAdTdT | 1080 | A-126921.1 |
| AD-63294.1 | CGGGGGGUGUACUCUGdTdT | 747 | A-126922.1 | 314-332 | CAGAGUAGCACCCCGCCGdTdT | 1081 | A-126923.1 |
| AD-63300.1 | GGCGGGGUGUACUCUGGdTdT | 748 | A-126924.1 | 315-333 | CCAGAGUAGCACCCCGCCdTdT | 1082 | A-126925.1 |
| AD-63306.1 | GCGGGGUGUACUCUGGUdTdT | 749 | A-126926.1 | 316-334 | ACCAGAGUAGCACCCCGCCdTdT | 1083 | A-126927.1 |
| AD-63312.1 | CGGGGGUGUACUCUGGUAdTdT | 750 | A-126928.1 | 317-335 | UACCAGAGUAGCACCCCGGdTdT | 1084 | A-126929.1 |
| AD-63318.1 | GGGGGUGUACUCUGGUAdTdT | 751 | A-126930.1 | 318-336 | AUACCAGAGUAGCACCCCGdTdT | 1085 | A-126931.1 |
| AD-63324.1 | GGGUGUACUCUGGUUUUdTdT | 752 | A-126932.1 | 320-338 | AAAUACCAGAGUAGCACCCdTdT | 1086 | A-126933.1 |
| AD-63330.1 | GGUGUACUCUGGUUUUCdTdT | 753 | A-126934.1 | 321-339 | GAAAUACCAGAGUAGCACCCdTdT | 1087 | A-126935.1 |
| AD-63336.1 | GUGUACUCUGGUUUUCCdTdT | 754 | A-126936.1 | 322-340 | GGAAUACCAGAGUAGCACdTdT | 1088 | A-126937.1 |
| AD-63295.1 | GUACUCUGGUUUUCCUAdTdT | 755 | A-126938.1 | 324-342 | UAGGAAUACCAGAGUAGCAdTdT | 1089 | A-126939.1 |
| AD-63301.1 | CUACUCUGGUUUUCCUAGdTdT | 756 | A-126940.1 | 325-343 | CUAGGAAUACCAGAGUAGdTdT | 1090 | A-126941.1 |
| AD-63307.1 | UACUCUGGUUUUCCUAGGdTdT | 757 | A-126942.1 | 326-344 | CCUAGGAAUACCAGAGUAdTdT | 1091 | A-126943.1 |
| AD-63313.1 | ACUCUGGUUUUCCUAGGGdTdT | 758 | A-126944.1 | 327-345 | CCCUAGGAAUACCAGAGUdTdT | 1092 | A-126945.1 |
| AD-63319.1 | CUCUGGUUUUCCUAGGGUdTdT | 759 | A-126946.1 | 328-346 | ACCUAGGAAUACCAGAGdTdT | 1093 | A-126947.1 |
| AD-63325.1 | CUGGUUUUCCUAGGGUACdTdT | 760 | A-126948.1 | 330-348 | GUACCUAGGAAUACCAGdTdT | 1094 | A-126949.1 |
| AD-63331.1 | GUUUUCCUAGGGUACAAGdTdT | 761 | A-126950.1 | 333-351 | CUUGUACCUAGGAAUACAdTdT | 1095 | A-126951.1 |
| AD-63337.1 | UAUUUCCUAGGGUACAAGGdTdT | 762 | A-126952.1 | 334-352 | CCUUGUACCUAGGAAUAdTdT | 1096 | A-126953.1 |
| AD-63343.1 | AUUUCCUAGGGUACAAGGCdTdT | 763 | A-126954.1 | 335-353 | GCCUUGUACCUAGGAAUdTdT | 1097 | A-126955.1 |
| AD-63349.1 | UUUCCUAGGGUACAAGGCdTdT | 764 | A-126956.1 | 336-354 | CGCCUUGUACCUAGGAAAdTdT | 1098 | A-126957.1 |

【 0 5 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 4 0】

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------|-----|------------|---------|--------------------------|------|------------|
| AD-63355.1 | UUCUAGGGUACAAGCGGGdTdT | 765 | A-126958.1 | 337-355 | CCGCCUUGUACCCUAGGAAdTdT | 1099 | A-126959.1 |
| AD-63361.1 | CCUAGGGUACAAGCGGGdTdT | 766 | A-126960.1 | 339-357 | CUCCGCCUUGUACCCUAGGGdTdT | 1100 | A-126961.1 |
| AD-63367.1 | CUAGGGUACAAGCGGGdTdT | 767 | A-126962.1 | 340-358 | CCUCCGCCUUGUACCCUAGdTdT | 1101 | A-126963.1 |
| AD-63373.1 | UAGGGUACAAGCGGGdTdT | 768 | A-126964.1 | 341-359 | ACCUCGCCUUGUACCCUAdTdT | 1102 | A-126965.1 |
| AD-63379.1 | AGGSUACAAGCGGGdTdT | 769 | A-126966.1 | 342-360 | CACCUCCGCCUUGUACCCUdTdT | 1103 | A-126967.1 |
| AD-63381.1 | GGUACAAGCGGGdTdT | 770 | A-126968.1 | 343-361 | UCACCUCCGCCUUGUACCCdTdT | 1104 | A-126969.1 |
| AD-63344.1 | GGUACAAGCGGGdTdT | 771 | A-126970.1 | 344-362 | AUCACCCGCCUUGUACCCdTdT | 1105 | A-126971.1 |
| AD-63350.1 | GUACAAGCGGGdTdT | 772 | A-126972.1 | 345-363 | CAUCACCCGCCUUGUACdTdT | 1106 | A-126973.1 |
| AD-63356.1 | UACAAGCGGGdTdT | 773 | A-126974.1 | 346-364 | CCAUCACCCGCCUUGUAdTdT | 1107 | A-126975.1 |
| AD-63362.1 | ACAAGCGGGdTdT | 774 | A-126976.1 | 347-365 | ACCAUACCCGCCUUGUdTdT | 1108 | A-126977.1 |
| AD-63368.1 | CAAGCGGGdTdT | 775 | A-126978.1 | 348-366 | GACCAUACCCGCCUUGdTdT | 1109 | A-126979.1 |
| AD-63374.1 | AAGCGGGdTdT | 776 | A-126980.1 | 349-367 | UGACCAUACCCGCCUdTdT | 1110 | A-126981.1 |
| AD-63380.1 | AGCGGGdTdT | 777 | A-126982.1 | 350-368 | CUGACCAUACCCGCCUdTdT | 1111 | A-126983.1 |
| AD-63339.1 | UGAUGGUCAGCCAGGUGdTdT | 778 | A-126984.1 | 359-377 | UACACCUGGCUGACCAUCAdTdT | 1112 | A-126985.1 |
| AD-63345.1 | CCAGGUGUACUACAGGCAGUdTdT | 779 | A-126986.1 | 369-387 | ACUGCCUAGUACACCCUUGdTdT | 1113 | A-126987.1 |
| AD-63351.1 | GCAGUCUGCGUACUCAAAdTdT | 780 | A-126988.1 | 383-401 | UUAGUACACGCAGACUUGdTdT | 1114 | A-126989.1 |
| AD-63357.1 | GCGUUAUCAAUCCGACdTdT | 781 | A-126990.1 | 390-408 | GUGGCGAUUGAGUACACGCdTdT | 1115 | A-126991.1 |
| AD-63363.1 | UCGCCAUUCCAGGAGUdTdT | 782 | A-126992.1 | 402-420 | AUCCUGGAGAGUUGCGAdTdT | 1116 | A-126993.1 |
| AD-63369.1 | CUCCAGGAUUAACCCGdTdT | 783 | A-126994.1 | 411-429 | GCGGUAAGAUCUGGAGdTdT | 1117 | A-126995.1 |
| AD-63375.1 | UACCCGGGAAUCUAGUdTdT | 784 | A-126996.1 | 423-441 | ACUAGAUUCCGGCGGUAdTdT | 1118 | A-126997.1 |
| AD-63381.1 | CCGGAAUCUAGUCCUUCdTdT | 785 | A-126998.1 | 429-447 | GAAGGCACUAGAUUCCGGdTdT | 1119 | A-126999.1 |
| AD-63340.1 | AGUCCUCCGAGUAAAdTdT | 786 | A-127000.1 | 439-457 | UUUCACUGCGGAAGGCACUdTdT | 1120 | A-127001.1 |
| AD-63346.1 | GUGAAACCCCAAAGCCAdTdT | 787 | A-127002.1 | 452-470 | UGGGCUUUGCGGUUUCACAdTdT | 1121 | A-127003.1 |
| AD-63352.1 | CGCCAAAGCCAGAAAGUdTdT | 788 | A-127004.1 | 459-477 | CAUCUUGGGGUUUGGGdTdT | 1122 | A-127005.1 |
| AD-63358.1 | CAGAAAGUCCUCAAAGGCdTdT | 789 | A-127006.1 | 469-487 | GCUCUUGAGCAUCUUCUGdTdT | 1123 | A-127007.1 |
| AD-63364.1 | UCAAGGAGCUCAUACCCAGdTdT | 790 | A-127008.1 | 479-497 | CUGGUGAUGAGCCUUCUAdTdT | 1124 | A-127009.1 |
| AD-63370.1 | ACCAGACCCGCCUGGAAAdTdT | 791 | A-127010.1 | 493-511 | UUCCAGCGGGUGUGGUdTdT | 1125 | A-127011.1 |
| AD-63376.1 | GCCUGGAAACUUAUCAAdTdT | 792 | A-127012.1 | 503-521 | UUUGAUAAGUUCUCCAGGCdTdT | 1126 | A-127013.1 |

【 0 5 8 9】

10

20

30

40

50

【表 4 1】

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------|-----|------------|---------|--------------------------|------|------------|
| AD-63382.1 | GAACUUACUACAACUCCAGAdTdT | 793 | A-127014.1 | 509-527 | CUGAGUUGUAGUAAGUUCdTdT | 1127 | A-127015.1 |
| AD-63341.1 | AACUCCAGCUCGUCUAUdTdT | 794 | A-127016.1 | 520-538 | AAUAGACGGAGCUGGAGUdTdT | 1128 | A-127017.1 |
| AD-63347.1 | CCGUCUAUCCUUUGGGAdTdT | 795 | A-127018.1 | 530-548 | UCCCCAAAGAAUAGACGGdTdT | 1129 | A-127019.1 |
| AD-63353.1 | UUGGGAGGACCCUACAdTdT | 796 | A-127020.1 | 542-560 | GUGAGGGUCCUCCUCCCAAdTdT | 1130 | A-127021.1 |
| AD-63359.1 | CCCCUACCUUGUUCUdTdT | 797 | A-127022.1 | 553-571 | AGAAGAAGCAGGUGAGGGdTdT | 1131 | A-127023.1 |
| AD-63365.1 | CUGCUUCUUGGUUAUdTdT | 798 | A-127024.1 | 561-579 | AAUGAACAGAAAGCAGdTdT | 1132 | A-127025.1 |
| AD-63371.1 | CUGGUCAUUCUCAAUCdTdT | 799 | A-127026.1 | 570-588 | GAUUUGGAAUUGAACCAAdTdT | 1133 | A-127027.1 |
| AD-63377.1 | UCUCCAAAUCCCCAGCAdTdT | 800 | A-127028.1 | 579-597 | GUGUCUGGGGAUUUGGAGAdTdT | 1134 | A-127029.1 |
| AD-63383.1 | CCGAGCACCGCCGCGUAUdTdT | 801 | A-127030.1 | 590-608 | AUCAGCCGGGGUGCUGGGdTdT | 1135 | A-127031.1 |
| AD-63342.1 | GGCUGAUGCUGAGCCCCGAdTdT | 802 | A-127032.1 | 602-620 | UCGGGUCUACAGCAUCAGCCdTdT | 1136 | A-127033.1 |
| AD-63348.1 | UGAGCCCCAGGUGGUCAdTdT | 803 | A-127034.1 | 611-629 | UGCACCAUCCUGGGGCUAdTdT | 1137 | A-127035.1 |
| AD-63354.1 | UGGUCAGGCACUUGGUdTdT | 804 | A-127036.1 | 623-641 | ACCAGCAGUCCUGCACCAdTdT | 1138 | A-127037.1 |
| AD-63360.1 | AGGCACUGCUGGUGGAGAdTdT | 805 | A-127038.1 | 629-647 | UCCUCCAGCAGUCCUdTdT | 1139 | A-127039.1 |
| AD-63366.1 | GUGGAGGAGCUGCUGUCCAdTdT | 806 | A-127040.1 | 640-658 | UGGACAGCAGCUCUCCACdTdT | 1140 | A-127041.1 |
| AD-63372.1 | UGUCCACAGUCAACAGCUCdTdT | 807 | A-127042.1 | 653-671 | GAGCUGUUGACUGUGGACAdTdT | 1141 | A-127043.1 |
| AD-63378.1 | UCAACAGCUCGGCUGCCGUdTdT | 808 | A-127044.1 | 662-680 | ACGGCAGCCGAGCUGUUGAdTdT | 1142 | A-127045.1 |
| AD-63384.1 | UCGGCUGCCGUCCCUACAdTdT | 809 | A-127046.1 | 670-688 | UGUAGGGGAGCCGAGCCGAdTdT | 1143 | A-127047.1 |
| AD-63390.1 | AGUGACCCAGGGCCUAdTdT | 810 | A-127048.1 | 702-720 | UAGGCCUCCGGGUCACUAdTdT | 1144 | A-127049.1 |
| AD-63396.1 | AGGCCUAGUGAUCCUGGAdTdT | 811 | A-127050.1 | 713-731 | UCCAGGAUCACUAGGCCUdTdT | 1145 | A-127051.1 |
| AD-63402.1 | UAGUGAUCUGGAAAGCCAdTdT | 812 | A-127052.1 | 719-737 | CUGGCUUCCAGGGAUCACUAdTdT | 1146 | A-127053.1 |
| AD-63408.1 | AAGCCAGUGUGAAAGACAUdTdT | 813 | A-127054.1 | 731-749 | AUGCUUUCACACUUGGCUUdTdT | 1147 | A-127055.1 |
| AD-63414.1 | UGAAAGACAUAGCUGCAUdTdT | 814 | A-127056.1 | 740-758 | AAUGCAGCUAUGUCUUCAdTdT | 1148 | A-127057.1 |
| AD-63420.1 | UGCAUUGAAUCCACGCUgTdTdT | 815 | A-127058.1 | 753-771 | CAGCGUGAAUUCAAUGCAdTdT | 1149 | A-127059.1 |
| AD-63426.1 | CUACAGCUACGUGGCCAGdTdT | 816 | A-127060.1 | 783-801 | CUGGCCACGUAJGCUAGdTdT | 1150 | A-127061.1 |
| AD-63385.1 | CUACGUGGCCAGGCCAGdTdT | 817 | A-127062.1 | 789-807 | CUGGCCUUGGCCACGUAJGdTdT | 1151 | A-127063.1 |
| AD-63391.1 | AGGCCAGGUCUCCGGCUdTdT | 818 | A-127064.1 | 800-818 | AGCCGAGGACCUUGGCCUdTdT | 1152 | A-127065.1 |
| AD-63397.1 | CCGGCUGAAAGGGCCUGACdTdT | 819 | A-127066.1 | 813-831 | GUCAGGCCCUUCAGCCGGdTdT | 1153 | A-127067.1 |
| AD-63403.1 | GGCCUGACCAUCCUUGCCUdTdT | 820 | A-127068.1 | 823-841 | AGGCCAGGUGGUCAGGCCCCdTdT | 1154 | A-127069.1 |

【 0 5 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 4 2】

| | | | | | | | |
|------------|-------------------------|-----|------------|-----------|--------------------------|------|------------|
| AD-63409.1 | CCACCGCCUCCAGCUCGdTdT | 821 | A-127070.1 | 831-849 | GCAGCUGGAGCCAGGUGGdTdT | 1155 | A-127071.1 |
| AD-63415.1 | CCAGCUCGUCUGGCACCUdTdT | 822 | A-127072.1 | 842-860 | AGGUGCCACAGGCAGCUGGdTdT | 1156 | A-127073.1 |
| AD-63421.1 | CUGUGGCACCGCAGGCGCdTdT | 823 | A-127074.1 | 850-868 | GSCCCUGCAGGUGCCACAGdTdT | 1157 | A-127075.1 |
| AD-63427.1 | CUGCAGGGCCCAAGACCCdTdT | 824 | A-127076.1 | 859-877 | GGUCCUUGGGCCUUCGACAGdTdT | 1158 | A-127077.1 |
| AD-63386.1 | CCAAGACCUCAUGCUAAAdTdT | 825 | A-127078.1 | 869-887 | UUAGACUAGAGGUCUUGGdTdT | 1159 | A-127079.1 |
| AD-63392.1 | UGCUAAACUCCGGCUGGAdTdT | 826 | A-127080.1 | 881-899 | UCCAGCCGGAGUUUAGCAdTdT | 1160 | A-127081.1 |
| AD-63398.1 | CCGGCUGGAGUGGACCGdTdT | 827 | A-127082.1 | 891-909 | CAGCUCUACUCAGCCGGdTdT | 1161 | A-127083.1 |
| AD-63404.1 | GALCUGGCAGAGUGCCGdTdT | 828 | A-127084.1 | 903-921 | CCGGCACUCUGCCAGCGUCdTdT | 1162 | A-127085.1 |
| AD-63410.1 | GGCAGAGUGCCGGACCCAdTdT | 829 | A-127086.1 | 909-927 | UCGGUCCCGCACUCUGCCdTdT | 1163 | A-127087.1 |
| AD-63416.1 | ACCGACUGCCAUUAUAGAdTdT | 830 | A-127088.1 | 923-941 | UCAUACUUGCCAGUCGGUdTdT | 1164 | A-127089.1 |
| AD-63422.1 | CCAUUAUAGCUGGCCGGdTdT | 831 | A-127090.1 | 932-950 | CCGGCCACGUCAUACAUUGGdTdT | 1165 | A-127091.1 |
| AD-63428.1 | GUGCCGGCCCGGAGAGAdTdT | 832 | A-127092.1 | 943-961 | UCUCCAGGGCCCGCCACdTdT | 1166 | A-127093.1 |
| AD-63387.1 | CCUUGGAGAAAGGCUAUdTdT | 833 | A-127094.1 | 953-971 | AUGACCCUUCUUCACAGGGdTdT | 1167 | A-127095.1 |
| AD-63393.1 | AGAAGAGGCUCAUACCUdTdT | 834 | A-127096.1 | 959-977 | GAGGUGAUGAGCCUUCUdTdT | 1168 | A-127097.1 |
| AD-63399.1 | ACCUCGGUGACGGCUGCAdTdT | 835 | A-127098.1 | 973-991 | UGCAGCCGUACACCGAGGUdTdT | 1169 | A-127099.1 |
| AD-63405.1 | ACGGCUGCAGCCCGCAGGAdTdT | 836 | A-127100.1 | 983-1001 | UCCUGGGCUGCAGCCGUdTdT | 1170 | A-127101.1 |
| AD-63411.1 | GCCGCCAGGAGCCCGUGGdTdT | 837 | A-127102.1 | 992-1010 | ACCAGGGCUCUUGCGGGdTdT | 1171 | A-127103.1 |
| AD-63417.1 | AGCCCGUGGAGGAGUUCUdTdT | 838 | A-127104.1 | 1001-1019 | AGAACCUCACCCAGGGCUdTdT | 1172 | A-127105.1 |
| AD-63423.1 | GUGGAGGUUCUGCGUCGGdTdT | 839 | A-127106.1 | 1009-1027 | CCGACCCAGAACCCUCCdTdT | 1173 | A-127107.1 |
| AD-63429.1 | UGCGUCGGGGCCCAUCAUdTdT | 840 | A-127108.1 | 1019-1037 | AUGAUGGCCCGCCAGCCAdTdT | 1174 | A-127109.1 |
| AD-63388.1 | CCAUCAUGGCGGUCUCUGdTdT | 841 | A-127110.1 | 1031-1049 | CAGACGCGCCCAUGAUGGdTdT | 1175 | A-127111.1 |
| AD-63394.1 | GCGGUCGUCUGGAAGAGGdTdT | 842 | A-127112.1 | 1039-1057 | CCUUCUUCAGACGACCCGdTdT | 1176 | A-127113.1 |
| AD-63400.1 | GGAGAAGGGCCUGCACAGdTdT | 843 | A-127114.1 | 1049-1067 | CUGUGAGGCCUUCUUCdTdT | 1177 | A-127115.1 |
| AD-63406.1 | CCUGCACAGCUACUACGAdTdT | 844 | A-127116.1 | 1059-1077 | GUCGUAGUAGCUGUGCAGGdTdT | 1178 | A-127117.1 |
| AD-63412.1 | ACUACGACCCUUCGUGCUdTdT | 845 | A-127118.1 | 1070-1088 | AGCACAAAGGGUUCUAGUdTdT | 1179 | A-127119.1 |
| AD-63418.1 | CCUUCGUCUCUCCGUGCAdTdT | 846 | A-127120.1 | 1079-1097 | UGCAGGAGAGCACGAAGGdTdT | 1180 | A-127121.1 |
| AD-63424.1 | CCGUGCAGCCGGUGGUCUdTdT | 847 | A-127122.1 | 1091-1109 | AAGACCCGGCUGCACGGdTdT | 1181 | A-127123.1 |
| AD-63430.1 | CGGUGGUCUUCACAGCCUGdTdT | 848 | A-127124.1 | 1100-1118 | CAGGCCUGGAAGACCACCCGdTdT | 1182 | A-127125.1 |

【 0 5 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 4 3】

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------|-----|------------|-----------|--------------------------|------|------------|
| AD-63389.1 | AGGCCUGAAGUGAAGAACCUdTdT | 849 | A-127126.1 | 1112-1130 | AGGUUCACUUCACAGGCCUdTdT | 1183 | A-127127.1 |
| AD-63395.1 | AAGUGAACCUAGCGUGGAdTdT | 850 | A-127128.1 | 1121-1139 | UCCAGCGUCAGGUUCACUdTdT | 1184 | A-127129.1 |
| AD-63401.1 | GACGUGGACAAACAGCUCdTdT | 851 | A-127130.1 | 1131-1149 | GAGCCUGUUGCCAGCGUCdTdT | 1185 | A-127131.1 |
| AD-63407.1 | ACAACAGGCGACUCCAdTdT | 852 | A-127132.1 | 1139-1157 | UGGAGUCGAGCCUUGUdTdT | 1186 | A-127133.1 |
| AD-63413.1 | ACUCCAGGGGCUCCUAdTdT | 853 | A-127134.1 | 1151-1169 | CUGAGCAGCCUUGGAGUdTdT | 1187 | A-127135.1 |
| AD-63419.1 | CCCGUACUCCCGAGCUAdTdT | 854 | A-127136.1 | 1172-1190 | UAGCUGGGAAAGUACGGGdTdT | 1188 | A-127137.1 |
| AD-63425.1 | UUCCCCAGCUACUACUGCdTdT | 855 | A-127138.1 | 1180-1198 | GCGAGUAGUAGUGGGAAAdTdT | 1189 | A-127139.1 |
| AD-63431.1 | ACUACUCGCCCCAAACCCAdTdT | 856 | A-127140.1 | 1190-1208 | UGGGUUUGGGGCGAGUAGUdTdT | 1190 | A-127141.1 |
| AD-63437.1 | CCCAAACCCACUUCUUGdTdT | 857 | A-127142.1 | 1199-1217 | CAGGAGCAGUGGUGUUGGdTdT | 1191 | A-127143.1 |
| AD-63443.1 | GCUCUUGGCACCUACAGGUdTdT | 858 | A-127144.1 | 1211-1229 | ACCGUGAGGUGGCCAGGAGCdTdT | 1192 | A-127145.1 |
| AD-63449.1 | ACCUCAGGUGCCCUUCUdTdT | 859 | A-127146.1 | 1220-1238 | AGAGAGGCACCCUGAGGUdTdT | 1193 | A-127147.1 |
| AD-63455.1 | CUCUCUGGACUACGGUUGdTdT | 860 | A-127148.1 | 1233-1251 | CAAGCCUAGUCCAGAGAdTdT | 1194 | A-127149.1 |
| AD-63461.1 | GACUACGGCUUGGCCCUdTdT | 861 | A-127150.1 | 1240-1258 | AGAGGCCAAGCCGUGUUCdTdT | 1195 | A-127151.1 |
| AD-63467.1 | CCUCUCUGUUUGAUGCCUAdTdT | 862 | A-127152.1 | 1253-1271 | UAGGCAUCAAAACAGAGGdTdT | 1196 | A-127153.1 |
| AD-63473.1 | GUUUGAUGCCUUAUGCUCUdTdT | 863 | A-127154.1 | 1260-1278 | CAGUGCAUAGGCAUCAAAAdTdT | 1197 | A-127155.1 |
| AD-63482.1 | GCACUGAGGAGGCAGAGUdTdT | 864 | A-127156.1 | 1273-1291 | ACUUCUGCCUUCUCAGUCdTdT | 1198 | A-127157.1 |
| AD-63488.1 | GGAGGCAGAAUUAUUAUdTdT | 865 | A-127158.1 | 1280-1298 | AAAUCAUCUUCUUGCCUCCdTdT | 1199 | A-127159.1 |
| AD-63494.1 | AUGAUUUGCCGUGCACCAdTdT | 866 | A-127160.1 | 1292-1310 | UGGGUCAGCGGCAAAUCAUdTdT | 1200 | A-127161.1 |
| AD-63499.1 | UGCACCAGGCCAGUGGAdTdT | 867 | A-127162.1 | 1303-1321 | UCCACUGGCCUUGGGUGCdTdT | 1201 | A-127163.1 |
| AD-63456.1 | GCCAGUGGACGAUCCAGAAAdTdT | 868 | A-127164.1 | 1313-1331 | UUCUGGAUCGUCACUUGGCDdTdT | 1202 | A-127165.1 |
| AD-63462.1 | GGAGUCCAGAAACAGAGdTdT | 869 | A-127166.1 | 1319-1337 | CUCUUGUUCUGGAUCGUCdCdTdT | 1203 | A-127167.1 |
| AD-63468.1 | ACAGGAGGCUUGUGGCUUdTdT | 870 | A-127168.1 | 1331-1349 | AAGCCACACAGCCUCCUUGdTdT | 1204 | A-127169.1 |
| AD-63474.1 | CUGUGGCUUGCGCAUCCdTdT | 871 | A-127170.1 | 1339-1357 | GGAUGCGCAAGCCACACAGdTdT | 1205 | A-127171.1 |
| AD-63483.1 | UGCGAUCCUGCAGCCUAdTdT | 872 | A-127172.1 | 1349-1367 | UAGGCUUGCAGGAGCGCAdTdT | 1206 | A-127173.1 |
| AD-63489.1 | AGCCUACGCCGAGAGGUdTdT | 873 | A-127174.1 | 1361-1379 | AUCCUCGGCGUAGGCUdTdT | 1207 | A-127175.1 |
| AD-63495.1 | CCGAGAGGAUCCCGUGUdTdT | 874 | A-127176.1 | 1370-1388 | ACCAGGGGAUCCUCUGGdTdT | 1208 | A-127177.1 |
| AD-63451.1 | CCGUGGUGGCCACGGCCGdTdT | 875 | A-127178.1 | 1382-1400 | CCGGCCGUGGCCACACCGdTdT | 1209 | A-127179.1 |
| AD-63457.1 | CCACGGCCGGGAUCCCAUdTdT | 876 | A-127180.1 | 1391-1409 | AUGGUAUCCCGCCGUGGdTdT | 1210 | A-127181.1 |

【 0 5 9 2 】

10

20

30

40

50

【表 4 4】

| | | | | | | | |
|------------|---------------------------|-----|------------|-----------|---------------------------|------|------------|
| AD-63463.1 | GGAUCACCAUCAACUUCACdtdT | 877 | A-127182.1 | 1400-1418 | GUGAAGUUGAUGGUAUCCdtdT | 1211 | A-127183.1 |
| AD-63469.1 | UCAACUUCACUCCUCCAGAUdtdT | 878 | A-127184.1 | 1409-1427 | AUCUGGGAGGUGAAGUUGAdtdT | 1212 | A-127185.1 |
| AD-63475.1 | CCCAGAUUCUCCUCACACCGGdtdT | 879 | A-127186.1 | 1421-1439 | CCGGUUGAGGGAGAUUCUGGGdtdT | 1213 | A-127187.1 |
| AD-63434.1 | CCCUACCGGGCCCGGUGdtdT | 880 | A-127188.1 | 1430-1448 | ACACCGGGCCCGGUGAGGGdtdT | 1214 | A-127189.1 |
| AD-63440.1 | CCCGGUGUGCGGGUGCACUdtdT | 881 | A-127190.1 | 1441-1459 | AGUACACCCGCACACCGGGdtdT | 1215 | A-127191.1 |
| AD-63446.1 | GCUUUGUACAACAGUGGAdtdT | 882 | A-127192.1 | 1463-1481 | UCCGACUUGUUAACAAGCAdtdT | 1216 | A-127193.1 |
| AD-63452.1 | ACAACAGUCGGACCCUGdtdT | 883 | A-127194.1 | 1469-1487 | CAGGGUCCGACUUGGUUGdtdT | 1217 | A-127195.1 |
| AD-63458.1 | ACCCUCCUUGGAGAGUdtdT | 884 | A-127196.1 | 1481-1499 | AACUCCAGGGCAGGGGUdtdT | 1218 | A-127197.1 |
| AD-63464.1 | CCUGGAGAUUCCUCUGUdtdT | 885 | A-127198.1 | 1489-1507 | AACAGGAACUCUCCAGGGdtdT | 1219 | A-127199.1 |
| AD-63470.1 | UCUGUUCUGUGAAUUGGACUdtdT | 886 | A-127200.1 | 1502-1520 | AGUCCAUUCACACAGACAGAdtdT | 1220 | A-127201.1 |
| AD-63476.1 | GAUUGGACUCUGUGUCCUdtdT | 887 | A-127202.1 | 1512-1530 | AGGGACACAGAGUCCAUUCdtdT | 1221 | A-127203.1 |
| AD-63435.1 | CUGUGUCCUUGCCUGUGAUdtdT | 888 | A-127204.1 | 1521-1539 | AUCACAGCAGGGACACAGAdtdT | 1222 | A-127205.1 |
| AD-63441.1 | CUGCCUGUGAUGGGGUCAAdtdT | 889 | A-127206.1 | 1529-1547 | UUGACCCCAUCACAGGCAGAdtdT | 1223 | A-127207.1 |
| AD-63447.1 | GGUCAAGGACUGCCCCAAGdtdT | 890 | A-127208.1 | 1542-1560 | GUUGGGGACUCCUUGACCCdtdT | 1224 | A-127209.1 |
| AD-63453.1 | UGCCCCAACGGCCUGGAUGdtdT | 891 | A-127210.1 | 1552-1570 | CAUCCAGGCCGUUGGGCAdtdT | 1225 | A-127211.1 |
| AD-63459.1 | CGGCCUGGAUGAGAGAAAGdtdT | 892 | A-127212.1 | 1560-1578 | GUUUUCUCAUCUCCAGGCCGdtdT | 1226 | A-127213.1 |
| AD-63465.1 | GAGAAACUUGCGUUGGAdtdT | 893 | A-127214.1 | 1570-1588 | UGCAAACGGAGUUUCUCUCdtdT | 1227 | A-127215.1 |
| AD-63471.1 | UUUGCAGGCCACAUUCCAdtdT | 894 | A-127216.1 | 1583-1601 | UGGAUUGGCUUCUGCAAAAdtdT | 1228 | A-127217.1 |
| AD-63477.1 | GCCACUUCAGUGCAAAGdtdT | 895 | A-127218.1 | 1591-1609 | CUUUGCACUUGGAUUGGCCdtdT | 1229 | A-127219.1 |
| AD-63436.1 | GUGCAAAGAGGACACACAdtdT | 896 | A-127220.1 | 1602-1620 | UGUGUGUCCUUCUUGCACAdtdT | 1230 | A-127221.1 |
| AD-63442.1 | GAGCACACAUUGCAUCUdtdT | 897 | A-127222.1 | 1609-1627 | AGAUGCAUGUGCUCUCCUdtdT | 1231 | A-127223.1 |
| AD-63448.1 | GCAUCUCACUGCCCAAGGUdtdT | 898 | A-127224.1 | 1622-1640 | ACCUUGGGCAGUGAGAUCCdtdT | 1232 | A-127225.1 |
| AD-63454.1 | GCCCAAGGUCUGUGAUGGGdtdT | 899 | A-127226.1 | 1632-1650 | CCCAUCACAGACCUUGGGCAdtdT | 1233 | A-127227.1 |
| AD-63460.1 | UGUGAUGGGCAGCCUUGAUdtdT | 900 | A-127228.1 | 1642-1660 | AAUCAGGCUCCCAUCACAdtdT | 1234 | A-127229.1 |
| AD-63466.1 | GCAGCCUGAUUGUCUCAAAdtdT | 901 | A-127230.1 | 1650-1668 | GUUGAGACAAUCAGGCUCCdtdT | 1235 | A-127231.1 |
| AD-63472.1 | GUCUCAAGGCAGCGACAdtdT | 902 | A-127232.1 | 1661-1679 | UCUGCGUCUCCGUUGAGACAdtdT | 1236 | A-127233.1 |
| AD-63478.1 | GCGACGAAGAGCAGUCCAdtdT | 903 | A-127234.1 | 1673-1691 | UGGCACUUGCUUCUGGCGAdtdT | 1237 | A-127235.1 |
| AD-63484.1 | AGCAGUGCCAGGAAGGGUdtdT | 904 | A-127236.1 | 1682-1700 | ACCCCUUCCUGGCACUUGCUdtdT | 1238 | A-127237.1 |

【 0 5 9 3 】

10

20

30

40

50

【表 4 5】

| | | | | | | | |
|------------|-------------------------|-----|------------|-----------|--------------------------|------|------------|
| AD-63490.1 | GAAGGGGUGCCAUGUGGGAdTdT | 905 | A-127238.1 | 1693-1711 | UCCCAUGGCAUCCUUCAdTdT | 1239 | A-127239.1 |
| AD-63496.1 | CCAUGUGGGACAUUACCUAdTdT | 906 | A-127240.1 | 1702-1720 | AGGUGAAUUCUCCACAUUGGdTdT | 1240 | A-127241.1 |
| AD-63502.1 | CAUUCACCUUCCAGUGUGAdTdT | 907 | A-127242.1 | 1712-1730 | UCACACUGGAAUGUGAAUGdTdT | 1241 | A-127243.1 |
| AD-63508.1 | CAGUGUGAGGACCGGAGCUdTdT | 908 | A-127244.1 | 1723-1741 | AGCUCGGUCCUCCACACUGdTdT | 1242 | A-127245.1 |
| AD-63514.1 | GACCGAGCUGCGUGAAGAdTdT | 909 | A-127246.1 | 1732-1750 | UCUUCACGACGAGCUCGUCdTdT | 1243 | A-127247.1 |
| AD-63520.1 | CUGCUGAAGAAGCCCAAdTdT | 910 | A-127248.1 | 1740-1758 | GUUGGCUUCUUCACGACGAdTdT | 1244 | A-127249.1 |
| AD-63479.1 | AGCCCAACCCGACUGUGAdTdT | 911 | A-127250.1 | 1751-1769 | UCACACUGCGGUGUGGCUdTdT | 1245 | A-127251.1 |
| AD-63485.1 | CAGUGUGAUGGGCGCCCGdTdT | 912 | A-127252.1 | 1762-1780 | CGGGCCGCCCAUCACACUGdTdT | 1246 | A-127253.1 |
| AD-63491.1 | GCGGCCGACUGCAGGGAdTdT | 913 | A-127254.1 | 1773-1791 | GUCUUCGACAGUCGGGCCdTdT | 1247 | A-127255.1 |
| AD-63497.1 | CUGCAGGACGGCUCGGAUdTdT | 914 | A-127256.1 | 1782-1800 | AUCCGAGCCGUCCUUCGAGdTdT | 1248 | A-127257.1 |
| AD-63503.1 | ACGGCUCGGAUGAGGACAdTdT | 915 | A-127258.1 | 1790-1808 | UGCUCCUACUCCGAGCCGUGdTdT | 1249 | A-127259.1 |
| AD-63509.1 | UGAGGACACUGUGACUGdTdT | 916 | A-127260.1 | 1800-1818 | ACAGUCACAGUGUCCUCAdTdT | 1250 | A-127261.1 |
| AD-63515.1 | CUGGACUGUGGCCUCCAGdTdT | 917 | A-127262.1 | 1809-1827 | CUGGAGCCACAGUCACAGdTdT | 1251 | A-127263.1 |
| AD-63521.1 | GCCUCCAGGGCCCUCCAGdTdT | 918 | A-127264.1 | 1820-1838 | CUGGAGGGCCUUGGAGGdTdT | 1252 | A-127265.1 |
| AD-63480.1 | CCCCUCCAGCCGCAUUGUdTdT | 919 | A-127266.1 | 1830-1848 | AACAAUUGCGGCUUGGAGGdTdT | 1253 | A-127267.1 |
| AD-63486.1 | CCGCAUUGUUGGUGGAGCUdTdT | 920 | A-127268.1 | 1839-1857 | AGCUCCACCAACAUCGGdTdT | 1254 | A-127269.1 |
| AD-63492.1 | GUGGAGCUGUGUCCUCCGAdTdT | 921 | A-127270.1 | 1850-1868 | UCGGAGGACACAGCUCACAdTdT | 1255 | A-127271.1 |
| AD-63498.1 | CUCGGGGUGAGUGGCCAdTdT | 922 | A-127272.1 | 1863-1881 | UGGCCACUACCCUCCGAGdTdT | 1256 | A-127273.1 |
| AD-63504.1 | GGGUGAGUGGCCAUUGCAGdTdT | 923 | A-127274.1 | 1869-1887 | CUGCCAUUGGCCACUACCCdTdT | 1257 | A-127275.1 |
| AD-63510.1 | AUGGCAGGCCAGCCUCCAGdTdT | 924 | A-127276.1 | 1881-1899 | CUGGAGGCUUGGCCUCCAUdTdT | 1258 | A-127277.1 |
| AD-63516.1 | CCUCCAGGUUCGGGUCGAdTdT | 925 | A-127278.1 | 1893-1911 | UCGACCCCGAACCUUGGAGGdTdT | 1259 | A-127279.1 |
| AD-63522.1 | GGUUCGGGUCGACACAUdTdT | 926 | A-127280.1 | 1899-1917 | GAUGUGGACCCCGAACCCdTdT | 1260 | A-127281.1 |
| AD-63481.1 | ACAUCUGGGGGGCCUdTdT | 927 | A-127282.1 | 1913-1931 | AGGGCCCCCACCACAGAUdTdT | 1261 | A-127283.1 |
| AD-63487.1 | GUGGGGGGCCCUCAUCGAdTdT | 928 | A-127284.1 | 1919-1937 | GCGAUGAGGGCCCCCACCAdTdT | 1262 | A-127285.1 |
| AD-63493.1 | AUCGCUGACCGCUGGGUGAdTdT | 929 | A-127286.1 | 1933-1951 | UCACCCAGCGGUCAGCGAUdTdT | 1263 | A-127287.1 |
| AD-63499.1 | ACCGCUGGGUGAUAAACAGdTdT | 930 | A-127288.1 | 1940-1958 | GCUGUUAUACCCAGCGGUGdTdT | 1264 | A-127289.1 |
| AD-63505.1 | UGAAACAGCUGCCACUGdTdT | 931 | A-127290.1 | 1949-1967 | CAGUGGGCAGCUGUUAUCAdTdT | 1265 | A-127291.1 |
| AD-63511.1 | CCCACUUCUCCAGGAGGAdTdT | 932 | A-127292.1 | 1961-1979 | UCCUCCUGGAGGAGCUGGGdTdT | 1266 | A-127293.1 |

【 0 5 9 4】

10

20

30

40

50

【表 4 6】

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------|-----|------------|-----------|--------------------------|------|------------|
| AD-63517.1 | CCAGGAGACAGCAUGGCCdTdT | 933 | A-127294.1 | 1971-1989 | GGCCAUGCUGUCCUCCUGGGdTdT | 1267 | A-127295.1 |
| AD-63523.1 | ACAGCAUGGCCUCCACGGUdTdT | 934 | A-127296.1 | 1979-1997 | ACCGUGGAGGCCCAUGCUGdTdT | 1268 | A-127297.1 |
| AD-63482.1 | CCACGGUGCUGUGGACCGdTdT | 935 | A-127298.1 | 1991-2009 | ACGGUCCACAGCACCUGGGdTdT | 1269 | A-127299.1 |
| AD-63488.1 | GGACCGUGUCCUGGGCAAdTdT | 936 | A-127300.1 | 2003-2021 | UUGCCAGGAACACGGUCCdTdT | 1270 | A-127301.1 |
| AD-63494.1 | UCCUGGCAAGUGUGGCAdTdT | 937 | A-127302.1 | 2012-2030 | UGCCACACCUUGCCACAGAdTdT | 1271 | A-127303.1 |
| AD-63500.1 | GUGUGGCAAGUCCUGCCUdTdT | 938 | A-127304.1 | 2023-2041 | AGCGAGUUCUGCCACACdTdT | 1272 | A-127305.1 |
| AD-63506.1 | GAACUCCGUGGCCUGGAdTdT | 939 | A-127306.1 | 2031-2049 | UCAGGCCAGCGGAGUUCdTdT | 1273 | A-127307.1 |
| AD-63512.1 | GGCCUGGAGAGGUGUCCUdTdT | 940 | A-127308.1 | 2042-2060 | AAGGACACCUUCUCCAGGCCdTdT | 1274 | A-127309.1 |
| AD-63518.1 | AGGUGUCCUCCAAGGUGAdTdT | 941 | A-127310.1 | 2051-2069 | CUCACCUUGAAGGACACCUdTdT | 1275 | A-127311.1 |
| AD-63524.1 | CAAGGUGAGCCCGCUGCdTdT | 942 | A-127312.1 | 2061-2079 | GAGCAGCGGCUCCACCUdTdT | 1276 | A-127313.1 |
| AD-63483.1 | GCCUGCUCUGCACCCGUAdTdT | 943 | A-127314.1 | 2072-2090 | UACGGUGCAGGAGCAGCCdTdT | 1277 | A-127315.1 |
| AD-63489.1 | GCACCGUACCAAGAGAdTdT | 944 | A-127316.1 | 2082-2100 | CUCUUGGUGUACGGUGCdTdT | 1278 | A-127317.1 |
| AD-63495.1 | CCACGAAGAGGACAGCCAUdTdT | 945 | A-127318.1 | 2091-2109 | AUGGCUUGCCUUCUUGGGdTdT | 1279 | A-127319.1 |
| AD-63501.1 | AGGACAGCCAUAGACUACGAdTdT | 946 | A-127320.1 | 2099-2117 | UCGUAGUCAUGGCUUGCCUdTdT | 1280 | A-127321.1 |
| AD-63507.1 | ACUACGACGUGGCGUCUdTdT | 947 | A-127322.1 | 2111-2129 | AGCAGCCACCCUUCGUAGUdTdT | 1281 | A-127323.1 |
| AD-63513.1 | UGGCGUCUGCAGCUCGAdTdT | 948 | A-127324.1 | 2120-2138 | UCGAGCUGCAGCAGCGCCAdTdT | 1282 | A-127325.1 |
| AD-63519.1 | AGCUGACACCCCGUGUdTdT | 949 | A-127326.1 | 2132-2150 | ACCACCGGUGGUGCAGCUdTdT | 1283 | A-127327.1 |
| AD-63525.1 | CCGGUGGUGCGCUCGGCCGdTdT | 950 | A-127328.1 | 2143-2161 | CGGCCGAGGCACCCCGGdTdT | 1284 | A-127329.1 |
| AD-63531.1 | UGCGCUGGCGCCGUGCGdTdT | 951 | A-127330.1 | 2150-2168 | CGCACGGCGCCGAGCGCAdTdT | 1285 | A-127331.1 |
| AD-63537.1 | CCGUGCGCCCGUCUGCCUdTdT | 952 | A-127332.1 | 2162-2180 | AGGCAGACGGGCGCACGGdTdT | 1286 | A-127333.1 |
| AD-63543.1 | CCGUCUGCCUGCCCGCGdTdT | 953 | A-127334.1 | 2171-2189 | CGCGCGGCGAGGCGAGCGdTdT | 1287 | A-127335.1 |
| AD-63549.1 | CCGCGCGCUCACUUCUdTdT | 954 | A-127336.1 | 2183-2201 | AAGAAGUGGAGCGCGCGdTdT | 1288 | A-127337.1 |
| AD-63555.1 | CCCACUUCUGAGCCCGGdTdT | 955 | A-127338.1 | 2192-2210 | CCGGCUCGAAGAAGUGGGdTdT | 1289 | A-127339.1 |
| AD-63561.1 | GAGCCCGCCUGCACUUCUdTdT | 956 | A-127340.1 | 2203-2221 | AGCAGUACAGGCCGCGUCdTdT | 1290 | A-127341.1 |
| AD-63567.1 | GGCCUGCACUCUGGAUAdTdT | 957 | A-127342.1 | 2209-2227 | UAAUCCAGCAGUCCAGGCCdTdT | 1291 | A-127343.1 |
| AD-63526.1 | UGGAUUACGGGCGGCGdTdT | 958 | A-127344.1 | 2231-2239 | CGCCCCAGCCCGUUAUCCAdTdT | 1292 | A-127345.1 |
| AD-63532.1 | GCUGGGCGCCUUGCGCGAdTdT | 959 | A-127346.1 | 2231-2249 | UCGCGCAAGCGCCCGCAGdTdT | 1293 | A-127347.1 |
| AD-63538.1 | UGCGAGGCGGCGCCCAUdTdT | 960 | A-127348.1 | 2243-2261 | AUGGGCGCCCGCUCGCGAdTdT | 1294 | A-127349.1 |

【 0 5 9 5】

10

20

30

40

50

【表 4 7】

| | | | | | | | |
|------------|---------------------------|-----|------------|-----------|---------------------------|------|------------|
| AD-63544.1 | AGGCGGCCCAUCAGCAAdTdT | 961 | A-127350.1 | 2249-2267 | UUGUGAUGGGGCCCCCUdTdT | 1295 | A-127351.1 |
| AD-63550.1 | UCAGCAGCUCUGCAGAAAdTdT | 962 | A-127352.1 | 2261-2279 | UUCUGCAGAGCGUUGCUGAdTdT | 1296 | A-127353.1 |
| AD-63556.1 | UGCAGAAAAGUGGAGUGGCAAdTdT | 963 | A-127354.1 | 2273-2291 | UGCACAUCCACUUCUCGCAAdTdT | 1297 | A-127355.1 |
| AD-63562.1 | AAGUGGAGUGGCAGUUGAUAdTdT | 964 | A-127356.1 | 2279-2297 | AUCAACUGCACAUCACAUAdTdT | 1298 | A-127357.1 |
| AD-63568.1 | GCAGUUGAUCCACAGGACAdTdT | 965 | A-127358.1 | 2289-2307 | GUCCUGUGGGAUCAACUGCAdTdT | 1299 | A-127359.1 |
| AD-6357.1 | CACAGGCCUGGACAGGAdTdT | 966 | A-127360.1 | 2300-2318 | UCGUGCACAGGUCUUGAdTdT | 1300 | A-127361.1 |
| AD-63533.1 | GCAGCGAGGUCUAGCUCAdTdT | 967 | A-127362.1 | 2312-2330 | UAGCGAUGACCUUGCUCAdTdT | 1301 | A-127363.1 |
| AD-63539.1 | GUCUAUCGCUACCCAGGUGAdTdT | 968 | A-127364.1 | 2320-2338 | UCACCCUGUAGCGUAUAGAdTdT | 1302 | A-127365.1 |
| AD-63545.1 | CCAGGUGACGCCACGCAUGdTdT | 969 | A-127366.1 | 2331-2349 | CAUGCGUGGCGGUCACCCUGdTdT | 1303 | A-127367.1 |
| AD-63551.1 | CCAGGCAUGCUGUGGCCGdTdT | 970 | A-127368.1 | 2341-2359 | CGGCACACAGCAUGCGUGdTdT | 1304 | A-127369.1 |
| AD-63557.1 | CUGUGCGCGGCUACCGCAAdTdT | 971 | A-127370.1 | 2350-2368 | UGCGGUGAGCCGGCACACAGAdTdT | 1305 | A-127371.1 |
| AD-63563.1 | ACGCAGGGCAAGAGGAdTdT | 972 | A-127372.1 | 2363-2381 | UCCUUCUUGCCCUUGGGGAdTdT | 1306 | A-127373.1 |
| AD-63569.1 | GCAAGAAGGAGCCUGUCAAdTdT | 973 | A-127374.1 | 2372-2390 | UGACAGGCAUCCUUCUUGCAdTdT | 1307 | A-127375.1 |
| AD-63528.1 | GCCUGUCAGGGUGACUCAGdTdT | 974 | A-127376.1 | 2383-2401 | CUGAGUCACCCUGACAGGAdTdT | 1308 | A-127377.1 |
| AD-63534.1 | GUGACUCAGGUGGUCGCUdTdT | 975 | A-127378.1 | 2393-2411 | AGCGGACCAUCCUGACAdTdT | 1309 | A-127379.1 |
| AD-63540.1 | GUGGUCGCGUGUGUGCAAdTdT | 976 | A-127380.1 | 2402-2420 | UUGCACACCAAGCGGACCAAdTdT | 1310 | A-127381.1 |
| AD-63546.1 | UGGUGUGCAAGGCACUCAGAdTdT | 977 | A-127382.1 | 2411-2429 | CUGAGUGCCUUGCACACCAAdTdT | 1311 | A-127383.1 |
| AD-63552.1 | GCACUCAGUGCCCGUGGAdTdT | 978 | A-127384.1 | 2422-2440 | ACCAGGGCCACUAGUGGAdTdT | 1312 | A-127385.1 |
| AD-63558.1 | GCCGCUUGUCCUGCGGGAdTdT | 979 | A-127386.1 | 2432-2450 | CCCAGGAAACCAAGGAdTdT | 1313 | A-127387.1 |
| AD-63564.1 | UCCUGCGGGGCGUGGUCAdTdT | 980 | A-127388.1 | 2441-2459 | CUGACCAAGCCCGCAGGAdTdT | 1314 | A-127389.1 |
| AD-63570.1 | GCUGGUCAGCUGGGGCGUGdTdT | 981 | A-127390.1 | 2451-2469 | CAGGCCCAAGCUGACCAAGAdTdT | 1315 | A-127391.1 |
| AD-63529.1 | GGCCUGGGCUGUGGGCGGdTdT | 982 | A-127392.1 | 2463-2481 | CCGGCCACAGCCAGGCGGAdTdT | 1316 | A-127393.1 |
| AD-63535.1 | GGCUGUGCGCGGCUAACUAdTdT | 983 | A-127394.1 | 2470-2488 | AGUUAGCCCGCCACAGCCAdTdT | 1317 | A-127395.1 |
| AD-63541.1 | CUAACUACUUGGGGUCUAdTdT | 984 | A-127396.1 | 2483-2501 | UAGACGCGAAGUAGUAGAdTdT | 1318 | A-127397.1 |
| AD-63547.1 | CGGCGUCUACACCCGCAUCAdTdT | 985 | A-127398.1 | 2493-2511 | GAUGCGGUGUAGACGCGGAdTdT | 1319 | A-127399.1 |
| AD-63553.1 | ACACCCGCAUCACAGGUGAdTdT | 986 | A-127400.1 | 2501-2519 | ACACCCUGAUGCGGGUGAdTdT | 1320 | A-127401.1 |
| AD-63559.1 | ACAGGUGUGAUCAGCUGGAdTdT | 987 | A-127402.1 | 2512-2530 | UCCAGCUGAUCACACCCUGAdTdT | 1321 | A-127403.1 |
| AD-63565.1 | UCAGCUGGUAUCCAGCAAGUdTdT | 988 | A-127404.1 | 2522-2540 | ACUUGCGGAUCCAGCUGAdTdT | 1322 | A-127405.1 |

【 0 5 9 6 】

10

20

30

40

50

【表 4 8】

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------|------|------------|-----------|-------------------------|------|------------|
| AD-63571.1 | CAGCAAGUGGACCUUGAGGdTdT | 989 | A-127406.1 | 2533-2551 | CUCAGGUCACCACUUGCUGdTdT | 1323 | A-127407.1 |
| AD-63530.1 | UGACCUAGGAACUGCCCGdTdT | 990 | A-127408.1 | 2543-2561 | GGGGCAGUUCUCCAGGUCAdTdT | 1324 | A-127409.1 |
| AD-63536.1 | GGAAUCUGCCCCUUGCAAAdTdT | 991 | A-127410.1 | 2551-2569 | UUUGCAGGGGGGCAUUCCTdTdT | 1325 | A-127411.1 |
| AD-63542.1 | CUGCAAAGCAGGCCACCdTdT | 992 | A-127412.1 | 2563-2581 | GGUGGCCUUGUUUGCAGdTdT | 1326 | A-127413.1 |
| AD-63548.1 | GCAGGCCACCUCCUGGAdTdT | 993 | A-127414.1 | 2570-2588 | UCCAGAGGUGGGCCUUGCdTdT | 1327 | A-127415.1 |
| AD-63554.1 | CCUCCUGACUCAGAGGdTdT | 994 | A-127416.1 | 2580-2598 | GCUCUCUGACUCCAGGAdTdT | 1328 | A-127417.1 |
| AD-63560.1 | CUCAGAGCCAGGCAAdTdT | 995 | A-127418.1 | 2589-2607 | UUGCCUGGCUUCUGAGdTdT | 1329 | A-127419.1 |
| AD-63566.1 | CCAGGGCAACUGCCAAAGCAdTdT | 996 | A-127420.1 | 2599-2617 | UGUUUGGCAGUUGCCUGdTdT | 1330 | A-127421.1 |
| AD-63572.1 | GGCAAAGUUAUCUGGGGdTdT | 997 | A-127422.1 | 2621-2639 | CCCGCCAGAAUACUUGCCdTdT | 1331 | A-127423.1 |
| AD-63578.1 | CUGGGGGGUGGGGAdTdT | 998 | A-127424.1 | 2632-2650 | CUCCCCACCCCGCCAGdTdT | 1332 | A-127425.1 |
| AD-63584.1 | GGUGGGGAGAGCAGGdTdT | 999 | A-127426.1 | 2640-2658 | CCUGCUCUCUCCCCACCdTdT | 1333 | A-127427.1 |
| AD-63590.1 | AGAGAGCAGGCCUUGUGGdTdT | 1000 | A-127428.1 | 2649-2667 | ACCAGGGCCUUCUCUdTdT | 1334 | A-127429.1 |
| AD-63596.1 | CCUCUGGUGGCAGGAGGdTdT | 1001 | A-127430.1 | 2659-2677 | ACCUCUGCCACCACAGGGdTdT | 1335 | A-127431.1 |
| AD-63602.1 | GGAGGUGGCAUCUUGUCUdTdT | 1002 | A-127432.1 | 2672-2690 | GAGACAAGAUUGCCUCCdTdT | 1336 | A-127433.1 |
| AD-63608.1 | CAUCUUGUCUCUGUCCUUGAdTdT | 1003 | A-127434.1 | 2680-2698 | UCAGGGACGAGCAAGAUGdTdT | 1337 | A-127435.1 |
| AD-63614.1 | CCCUUGUCUCUGCCUCCAGUdTdT | 1004 | A-127436.1 | 2693-2711 | ACUGGAGCAGACAUCAGGGdTdT | 1338 | A-127437.1 |
| AD-63573.1 | CUGCUCCAGUUGAUGCAGGdTdT | 1005 | A-127438.1 | 2702-2720 | CCUGCCAUCACUGGAGCAGdTdT | 1339 | A-127439.1 |
| AD-63579.1 | AUGGCAGGAGGAGGAdTdT | 1006 | A-127440.1 | 2713-2731 | UUUCUCCUCCUUGCCAUdTdT | 1340 | A-127441.1 |
| AD-63585.1 | GGUUGGAAAGUCCAGCAdTdT | 1007 | A-127442.1 | 2722-2740 | UGCUGCACUUCUCCAUCCdTdT | 1341 | A-127443.1 |
| AD-63591.1 | UGCCAGCAGCUGGGGUCAdTdT | 1008 | A-127444.1 | 2733-2751 | UGACCCCGCAGCUGGCAdTdT | 1342 | A-127445.1 |
| AD-63597.1 | AGCUGGGGUAAGACGUCdTdT | 1009 | A-127446.1 | 2740-2758 | GACGUCUUGACCCCGCAGCdTdT | 1343 | A-127447.1 |
| AD-63603.1 | UCAAGACUCCCUUGAGGAdTdT | 1010 | A-127448.1 | 2749-2767 | UCCUCAGGGGACGUCUUGAdTdT | 1344 | A-127449.1 |
| AD-63609.1 | CCUUGAGGACCAGGCCAdTdT | 1011 | A-127450.1 | 2759-2777 | UGGGCCUUGGUCUCCAGGGdTdT | 1345 | A-127451.1 |
| AD-63615.1 | GCCCAACCCAGCCUUCUdTdT | 1012 | A-127452.1 | 2773-2791 | AGAAGGGCUGGGUUGGGCdTdT | 1346 | A-127453.1 |
| AD-63574.1 | AGCCUUCUGCCUCCAAUdTdT | 1013 | A-127454.1 | 2783-2801 | AUUUGGAGGAGGAGGCUdTdT | 1347 | A-127455.1 |
| AD-63580.1 | CCUCCAAUUCUCUCUCCUdTdT | 1014 | A-127456.1 | 2793-2811 | AGGAGAGAAUUGGGAGGdTdT | 1348 | A-127457.1 |
| AD-63586.1 | CUCUCUCCCGUCCCUUdTdT | 1015 | A-127458.1 | 2803-2821 | AAGGGACGAGGAGAGGdTdT | 1349 | A-127459.1 |
| AD-63592.1 | UCCGUCCCUUCCUCCUdTdT | 1016 | A-127460.1 | 2811-2829 | AGUGGAGAAAGGGGAGGdTdT | 1350 | A-127461.1 |

【 0 5 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 4 9】

| | | | | | | | |
|------------|--------------------------|------|------------|-----------|--------------------------|------|------------|
| AD-63598.1 | CUUCCUCCACUGCUGCCUAAdTdT | 1017 | A-127462.1 | 2819-2837 | UAGGCAGCAGUGAGGAGAdTdT | 1351 | A-127463.1 |
| AD-63604.1 | CUGCCUAUUGCAAGGCAGUdTdT | 1018 | A-127464.1 | 2831-2849 | ACUGCCUUCUAUAGGCAGdTdT | 1352 | A-127465.1 |
| AD-63610.1 | GCAAAGCAGUGGCUCAGCAdTdT | 1019 | A-127466.1 | 2840-2858 | UGCUGAGCCACUCGCCUUGCdTdT | 1353 | A-127467.1 |
| AD-63616.1 | UGGCUACGACGCAAGAAUgdTdT | 1020 | A-127468.1 | 2849-2867 | CAUUCUUGCUGCUGAGCCAdTdT | 1354 | A-127469.1 |
| AD-63575.1 | CAAGAAUGCUGGUUUAACAdTdT | 1021 | A-127470.1 | 2860-2878 | UGUAGAACACGCAUUCUUGdTdT | 1355 | A-127471.1 |
| AD-63581.1 | UGGUUCUAUACUCCAGGAdTdT | 1022 | A-127472.1 | 2869-2887 | UCCUCGGGAUGUAGAACAdTdT | 1356 | A-127473.1 |
| AD-63587.1 | CCCGAGGAGUCUCUGAGGUdTdT | 1023 | A-127474.1 | 2880-2898 | ACCUCAGACACUCCUGGGdTdT | 1357 | A-127475.1 |
| AD-63593.1 | GUCUGAGGUGCGCCCAAdTdT | 1024 | A-127476.1 | 2890-2908 | AGUGGGGCGCACCCUCAGAdTdT | 1358 | A-127477.1 |
| AD-63599.1 | GCCCCACUCUGUACAGAGGdTdT | 1025 | A-127478.1 | 2901-2919 | CCUCUGUACAGAGUGGGGdTdT | 1359 | A-127479.1 |
| AD-63605.1 | CUGUACAGAGGCUUUGGdTdT | 1026 | A-127480.1 | 2909-2927 | CCAAACAGCCUCUCUACAGdTdT | 1360 | A-127481.1 |
| AD-63611.1 | CUGUUUGGCAGCCUUGCCdTdT | 1027 | A-127482.1 | 2920-2938 | GGCAAAGCUGCCCAAACAGdTdT | 1361 | A-127483.1 |
| AD-63617.1 | CUUGCCUCCAGAGCAGAdTdT | 1028 | A-127484.1 | 2933-2951 | UCUGCUCUCUGGAGGCAAGdTdT | 1362 | A-127485.1 |
| AD-63576.1 | UCCAGAGCAGAUUCCAGdTdT | 1029 | A-127486.1 | 2939-2957 | CUGGAAUCUGCUCUCUGGAdTdT | 1363 | A-127487.1 |
| AD-63582.1 | GAUCCAGCUCUGGAAAGCCdTdT | 1030 | A-127488.1 | 2950-2968 | GGCUUCGGAAGCUGGAAUCdTdT | 1364 | A-127489.1 |
| AD-63588.1 | GAUUGGAAAGUGUCUCCAUdTdT | 1031 | A-127490.1 | 2991-3009 | AUUGGAGCACCUUCCAUUCdTdT | 1365 | A-127491.1 |
| AD-63594.1 | GUGCUCCCAUCGGAGGGAdTdT | 1032 | A-127492.1 | 3000-3018 | UCCCCUCCGAUGGGAGGCACdTdT | 1366 | A-127493.1 |
| AD-63600.1 | UCGGAGGACCCUCAGAGdTdT | 1033 | A-127494.1 | 3009-3027 | CUCUGAGGGUCCUCCUGAdTdT | 1367 | A-127495.1 |
| AD-63606.1 | CCUCAGAGCCUUGGAGAdTdT | 1034 | A-127496.1 | 3019-3037 | GUCUCCAGGCUUCUGAGGGdTdT | 1368 | A-127497.1 |
| AD-63612.1 | GAGACGCCAGGUGGCCUdTdT | 1035 | A-127498.1 | 3033-3051 | AGGCCACCUGGCAGUCUCdTdT | 1369 | A-127499.1 |
| AD-63618.1 | AGGUGGGCCUGUGCCACUdTdT | 1036 | A-127500.1 | 3042-3060 | AGUGGCAGCAGGCCACCUCdTdT | 1370 | A-127501.1 |
| AD-63577.1 | CUGCCACUGUAAAGCCAAAAdTdT | 1037 | A-127502.1 | 3053-3071 | UUUUGCCUUACAGUGGCAGdTdT | 1371 | A-127503.1 |
| AD-63583.1 | CUGUAGCCAAAAGGUGGGdTdT | 1038 | A-127504.1 | 3059-3077 | CCCACCUUUUGGCUUACAGdTdT | 1372 | A-127505.1 |
| AD-63589.1 | GUGGGAAGUCCUGACUCCdTdT | 1039 | A-127506.1 | 3073-3091 | GGAGUCAGGACUUCGCCACdTdT | 1373 | A-127507.1 |
| AD-63595.1 | CCUGACUCCAGGGUCCUUGdTdT | 1040 | A-127508.1 | 3083-3101 | CAAGACCUCUGGAGUCAGGGdTdT | 1374 | A-127509.1 |
| AD-63601.1 | GGGUCCUUGCCCCACCCCUdTdT | 1041 | A-127510.1 | 3093-3111 | AGGGUGGGGCAAGGCCdTdT | 1375 | A-127511.1 |
| AD-63607.1 | GCCCCACCCUGCCUGCCAdTdT | 1042 | A-127512.1 | 3101-3119 | UGGCAGGAGGGUGGGGdTdT | 1376 | A-127513.1 |
| AD-63613.1 | CCUGCCACUUGGGCCUUCAdTdT | 1043 | A-127514.1 | 3113-3131 | UGAGGGCCCGAGGUGGCAGdTdT | 1377 | A-127515.1 |
| AD-63619.1 | CUGGGCCUUCACAGCCCAAdTdT | 1044 | A-127516.1 | 3121-3139 | CUGGGCUGUGAGGGCCCAAdTdT | 1378 | A-127517.1 |

10

20

30

40

【 0 5 9 8】

50

【表 5 0】

| | | | | | | | |
|------------|---------------------------|------|------------|-----------|---------------------------|------|------------|
| AD-63620.1 | UCACAGCCAGAGACCCUCACAdTdT | 1045 | A-127518.1 | 3129-3147 | GUGAGGGUCUGGGGCUUGAGAdTdT | 1379 | A-127519.1 |
| AD-63621.1 | CUCACUGGGAGGUGAGCUCdTdT | 1046 | A-127520.1 | 3143-3161 | GAGCUCACCCUCCAGUGAGdTdT | 1380 | A-127521.1 |
| AD-63622.1 | GGUGAGCUCAGCUGGCCUUdTdT | 1047 | A-127522.1 | 3153-3171 | AAGGGCAGCUGAGCUCACCCdTdT | 1381 | A-127523.1 |
| AD-63623.1 | UGGAAUAAAGCUGGCCUGAUdTdT | 1048 | A-127524.1 | 3172-3190 | AUCAGGCAGCUUUAUUCCAAdTdT | 1382 | A-127525.1 |

10

20

30

40

【 0 5 9 9】

50

【表 5 1】

表13:

dT修飾siRNAによるHep3B細胞におけるTMPRSS6単回用量スクリーン(10nM)

| 二本鎖ID | 残るメッセージの 平均% | 標準偏差 |
|------------|-----------------|------|
| AD-63290.1 | 122.8 | 18.0 |
| AD-63296.1 | 87.4 | 6.0 |
| AD-63302.1 | 71.4 | 16.9 |
| AD-63308.1 | 82.1 | 10.3 |
| AD-63314.1 | 59.1 | 5.3 |
| AD-63320.1 | 90.7 | 4.5 |
| AD-63326.1 | 121.0 | 18.2 |
| AD-63332.1 | 114.4 | 11.6 |
| AD-63291.1 | 84.7 | 15.0 |
| AD-63297.1 | 82.8 | 3.9 |
| AD-63303.1 | 67.6 | 5.5 |
| AD-63309.1 | 55.8 | 6.5 |
| AD-63315.1 | 64.2 | 7.4 |
| AD-63321.1 | 85.8 | 6.4 |
| AD-63327.1 | 91.9 | 14.9 |
| AD-63333.1 | 76.4 | 5.2 |
| AD-63292.1 | 54.4 | 22.9 |
| AD-63298.1 | 54.6 | 5.0 |
| AD-63304.1 | 24.6 | 7.3 |
| AD-63310.1 | 23.3 | 0.6 |
| AD-63316.1 | 50.9 | 7.2 |
| AD-63322.1 | 53.7 | 10.5 |
| AD-63328.1 | 29.2 | 2.3 |
| AD-63334.1 | 28.5 | 1.2 |
| AD-63293.1 | 50.9 | 6.8 |
| AD-63299.1 | 85.5 | 2.3 |
| AD-63305.1 | 43.0 | 7.2 |
| AD-63311.1 | 28.9 | 2.6 |
| AD-63317.1 | 40.9 | 2.7 |
| AD-63323.1 | 40.2 | 7.3 |
| AD-63329.1 | 27.9 | 12.0 |
| AD-63335.1 | 82.0 | 4.2 |
| AD-63294.1 | 21.8 | 1.0 |
| AD-63300.1 | 32.3 | 8.0 |
| AD-63306.1 | 32.9 | 8.3 |
| AD-63312.1 | 26.5 | 4.6 |
| AD-63318.1 | 31.3 | 2.4 |
| AD-63324.1 | 25.7 | 1.9 |
| AD-63330.1 | 24.5 | 2.0 |

10

20

30

40

【 0 6 0 0 】

50

【表 5 2】

| | | |
|------------|------|------|
| AD-63336.1 | 36.1 | 8.6 |
| AD-63295.1 | 29.2 | 1.8 |
| AD-63301.1 | 28.9 | 5.2 |
| AD-63307.1 | 68.8 | 10.6 |
| AD-63313.1 | 90.2 | 8.2 |
| AD-63319.1 | 21.9 | 3.3 |
| AD-63325.1 | 26.1 | 4.8 |
| AD-63331.1 | 36.7 | 4.5 |
| AD-63337.1 | 67.7 | 9.3 |
| AD-63343.1 | 83.9 | 15.0 |
| AD-63349.1 | 71.6 | 3.5 |
| AD-63355.1 | 62.8 | 10.4 |
| AD-63361.1 | 56.0 | 3.3 |
| AD-63367.1 | 49.3 | 8.7 |
| AD-63373.1 | 54.1 | 8.2 |
| AD-63379.1 | 47.5 | 6.3 |
| AD-63338.1 | 28.0 | 2.8 |
| AD-63344.1 | 29.7 | 5.7 |
| AD-63350.1 | 23.0 | 2.3 |
| AD-63356.1 | 81.5 | 13.7 |
| AD-63362.1 | 19.7 | 2.9 |
| AD-63368.1 | 42.2 | 4.7 |
| AD-63374.1 | 24.5 | 2.0 |
| AD-63380.1 | 24.9 | 4.9 |
| AD-63339.1 | 28.9 | 10.1 |
| AD-63345.1 | 29.9 | 5.6 |
| AD-63351.1 | 20.4 | 3.7 |
| AD-63357.1 | 35.8 | 6.8 |
| AD-63363.1 | 30.4 | 2.5 |
| AD-63369.1 | 29.0 | 3.1 |
| AD-63375.1 | 36.6 | 2.4 |
| AD-63381.1 | 29.1 | 4.3 |
| AD-63340.1 | 40.4 | 18.8 |
| AD-63346.1 | 36.4 | 3.5 |
| AD-63352.1 | 25.8 | 3.9 |
| AD-63358.1 | 42.6 | 8.1 |
| AD-63364.1 | 48.1 | 6.6 |
| AD-63370.1 | 24.6 | 2.8 |
| AD-63376.1 | 22.1 | 4.2 |
| AD-63382.1 | 31.0 | 7.5 |
| AD-63341.1 | 37.6 | 13.7 |
| AD-63347.1 | 27.6 | 2.0 |
| AD-63353.1 | 76.4 | 14.5 |
| AD-63359.1 | 25.3 | 1.1 |

10

20

30

40

【 0 6 0 1 】

50

【表 5 3】

| | | |
|------------|------|------|
| AD-63365.1 | 27.3 | 3.4 |
| AD-63371.1 | 16.3 | 1.3 |
| AD-63377.1 | 65.4 | 7.1 |
| AD-63383.1 | 72.2 | 7.0 |
| AD-63342.1 | 30.8 | 7.3 |
| AD-63348.1 | 72.7 | 9.2 |
| AD-63354.1 | 38.7 | 5.0 |
| AD-63360.1 | 28.7 | 3.0 |
| AD-63366.1 | 30.9 | 6.8 |
| AD-63372.1 | 84.0 | 9.0 |
| AD-63378.1 | 64.1 | 8.6 |
| AD-63384.1 | 38.0 | 2.6 |
| AD-63390.1 | 48.3 | 10.6 |
| AD-63396.1 | 45.6 | 7.0 |
| AD-63402.1 | 42.0 | 9.9 |
| AD-63408.1 | 40.4 | 9.1 |
| AD-63414.1 | 23.8 | 6.2 |
| AD-63420.1 | 55.3 | 5.2 |
| AD-63426.1 | 61.6 | 8.5 |
| AD-63385.1 | 61.6 | 10.2 |
| AD-63391.1 | 38.0 | 3.1 |
| AD-63397.1 | 66.7 | 16.8 |
| AD-63403.1 | 77.2 | 15.4 |
| AD-63409.1 | 60.3 | 10.7 |
| AD-63415.1 | 35.0 | 5.4 |
| AD-63421.1 | 60.6 | 2.9 |
| AD-63427.1 | 40.5 | 7.2 |
| AD-63386.1 | 42.0 | 7.4 |
| AD-63392.1 | 34.2 | 3.1 |
| AD-63398.1 | 62.6 | 18.5 |
| AD-63404.1 | 65.9 | 8.1 |
| AD-63410.1 | 19.7 | 4.0 |
| AD-63416.1 | 51.3 | 9.0 |
| AD-63422.1 | 59.3 | 2.7 |
| AD-63428.1 | 58.2 | 9.7 |
| AD-63387.1 | 42.2 | 4.8 |
| AD-63393.1 | 27.9 | 4.4 |
| AD-63399.1 | 49.6 | 8.4 |
| AD-63405.1 | 72.5 | 9.3 |
| AD-63411.1 | 45.4 | 14.9 |
| AD-63417.1 | 36.7 | 9.4 |
| AD-63423.1 | 76.8 | 4.9 |
| AD-63429.1 | 77.8 | 14.4 |
| AD-63388.1 | 37.4 | 4.4 |

10

20

30

40

【 0 6 0 2 】

50

【表 5 4】

| | | |
|------------|------|------|
| AD-63394.1 | 31.5 | 4.6 |
| AD-63400.1 | 60.9 | 28.6 |
| AD-63406.1 | 40.7 | 14.3 |
| AD-63412.1 | 22.0 | 7.0 |
| AD-63418.1 | 22.8 | 4.3 |
| AD-63424.1 | 25.5 | 2.8 |
| AD-63430.1 | 21.5 | 3.2 |
| AD-63389.1 | 34.4 | 5.3 |
| AD-63395.1 | 31.1 | 0.7 |
| AD-63401.1 | 44.3 | 9.5 |
| AD-63407.1 | 41.5 | 4.9 |
| AD-63413.1 | 52.4 | 6.4 |
| AD-63419.1 | 26.3 | 5.6 |
| AD-63425.1 | 78.8 | 4.6 |
| AD-63431.1 | 32.8 | 6.6 |
| AD-63437.1 | 42.3 | 1.4 |
| AD-63443.1 | 56.4 | 8.9 |
| AD-63449.1 | 26.0 | 5.9 |
| AD-63455.1 | 28.0 | 9.7 |
| AD-63461.1 | 32.1 | 11.1 |
| AD-63467.1 | 33.8 | 19.8 |
| AD-63473.1 | 28.9 | 3.4 |
| AD-63432.1 | 36.5 | 7.4 |
| AD-63438.1 | 27.3 | 4.3 |
| AD-63444.1 | 54.6 | 36.0 |
| AD-63450.1 | 42.0 | 6.1 |
| AD-63456.1 | 36.6 | 10.2 |
| AD-63462.1 | 23.3 | 3.0 |
| AD-63468.1 | 48.8 | 27.3 |
| AD-63474.1 | 23.8 | 3.2 |
| AD-63433.1 | 51.8 | 13.8 |
| AD-63439.1 | 41.7 | 5.5 |
| AD-63445.1 | 74.6 | 6.1 |
| AD-63451.1 | 49.6 | 9.0 |
| AD-63457.1 | 26.7 | 4.9 |
| AD-63463.1 | 27.8 | 3.8 |
| AD-63469.1 | 48.4 | 14.0 |
| AD-63475.1 | 40.3 | 1.4 |
| AD-63434.1 | 93.3 | 9.9 |
| AD-63440.1 | 37.6 | 4.7 |
| AD-63446.1 | 38.1 | 15.4 |
| AD-63452.1 | 42.3 | 4.0 |
| AD-63458.1 | 29.7 | 7.9 |
| AD-63464.1 | 25.7 | 3.4 |

10

20

30

40

【 0 6 0 3 】

50

【表 5 5】

| | | |
|------------|-------|------|
| AD-63470.1 | 44.8 | 7.8 |
| AD-63476.1 | 33.9 | 4.7 |
| AD-63435.1 | 23.4 | 5.2 |
| AD-63441.1 | 37.1 | 4.5 |
| AD-63447.1 | 46.5 | 9.0 |
| AD-63453.1 | 73.1 | 16.8 |
| AD-63459.1 | 31.8 | 4.6 |
| AD-63465.1 | 27.3 | 6.6 |
| AD-63471.1 | 19.5 | 3.1 |
| AD-63477.1 | 35.2 | 4.7 |
| AD-63436.1 | 21.8 | 4.7 |
| AD-63442.1 | 44.1 | 11.2 |
| AD-63448.1 | 33.6 | 6.0 |
| AD-63454.1 | 58.2 | 16.8 |
| AD-63460.1 | 27.7 | 2.4 |
| AD-63466.1 | 27.1 | 4.4 |
| AD-63472.1 | 20.5 | 4.1 |
| AD-63478.1 | 36.3 | 7.3 |
| AD-63484.1 | 48.4 | 31.3 |
| AD-63490.1 | 44.0 | 6.1 |
| AD-63496.1 | 45.5 | 19.9 |
| AD-63502.1 | 49.0 | 18.3 |
| AD-63508.1 | 41.4 | 2.7 |
| AD-63514.1 | 36.0 | 5.1 |
| AD-63520.1 | 40.9 | 4.2 |
| AD-63479.1 | 35.1 | 6.5 |
| AD-63485.1 | 45.5 | 24.0 |
| AD-63491.1 | 69.0 | 14.5 |
| AD-63497.1 | 57.1 | 25.1 |
| AD-63503.1 | 36.0 | 15.3 |
| AD-63509.1 | 29.7 | 6.4 |
| AD-63515.1 | 33.9 | 5.7 |
| AD-63521.1 | 117.2 | 10.2 |
| AD-63480.1 | 38.6 | 0.7 |
| AD-63486.1 | 48.5 | 12.1 |
| AD-63492.1 | 38.7 | 3.7 |
| AD-63498.1 | 64.6 | 20.3 |
| AD-63504.1 | 41.7 | 1.9 |
| AD-63510.1 | 39.6 | 4.0 |
| AD-63516.1 | 30.9 | 4.8 |
| AD-63522.1 | 56.4 | 15.6 |
| AD-63481.1 | 72.0 | 7.3 |
| AD-63487.1 | 128.8 | 48.9 |
| AD-63493.1 | 31.7 | 6.7 |

10

20

30

40

【 0 6 0 4 】

50

【表 5 6】

| | | |
|------------|-------|------|
| AD-63499.1 | 44.2 | 17.7 |
| AD-63505.1 | 69.4 | 7.6 |
| AD-63511.1 | 43.8 | 5.3 |
| AD-63517.1 | 75.3 | 2.2 |
| AD-63523.1 | 82.1 | 10.6 |
| AD-63482.1 | 40.1 | 12.2 |
| AD-63488.1 | 42.3 | 12.7 |
| AD-63494.1 | 19.0 | 1.1 |
| AD-63500.1 | 30.2 | 11.2 |
| AD-63506.1 | 30.5 | 7.6 |
| AD-63512.1 | 38.1 | 15.2 |
| AD-63518.1 | 35.0 | 7.3 |
| AD-63524.1 | 60.5 | 3.7 |
| AD-63483.1 | 22.7 | 3.6 |
| AD-63489.1 | 47.6 | 13.7 |
| AD-63495.1 | 31.0 | 12.7 |
| AD-63501.1 | 24.3 | 2.1 |
| AD-63507.1 | 37.4 | 7.0 |
| AD-63513.1 | 32.3 | 5.1 |
| AD-63519.1 | 46.0 | 6.6 |
| AD-63525.1 | 66.5 | 14.5 |
| AD-63531.1 | 104.0 | 24.1 |
| AD-63537.1 | 32.1 | 3.4 |
| AD-63543.1 | 31.2 | 3.8 |
| AD-63549.1 | 35.2 | 5.2 |
| AD-63555.1 | 41.7 | 9.3 |
| AD-63561.1 | 44.2 | 7.0 |
| AD-63567.1 | 39.2 | 4.9 |
| AD-63526.1 | 66.9 | 15.7 |
| AD-63532.1 | 90.3 | 17.8 |
| AD-63538.1 | 50.8 | 11.5 |
| AD-63544.1 | 31.9 | 2.4 |
| AD-63550.1 | 35.0 | 8.8 |
| AD-63556.1 | 31.0 | 6.0 |
| AD-63562.1 | 20.2 | 2.4 |
| AD-63568.1 | 30.6 | 2.7 |
| AD-63527.1 | 28.8 | 2.4 |
| AD-63533.1 | 63.3 | 6.9 |
| AD-63539.1 | 28.4 | 3.5 |
| AD-63545.1 | 26.9 | 8.5 |
| AD-63551.1 | 52.5 | 4.7 |
| AD-63557.1 | 26.7 | 2.2 |
| AD-63563.1 | 28.1 | 2.7 |
| AD-63569.1 | 29.2 | 2.8 |

10

20

30

40

【 0 6 0 5 】

50

【表 5 7】

| | | |
|------------|-------|------|
| AD-63528.1 | 52.9 | 9.0 |
| AD-63534.1 | 42.5 | 6.8 |
| AD-63540.1 | 50.5 | 10.9 |
| AD-63546.1 | 53.6 | 10.5 |
| AD-63552.1 | 38.8 | 5.0 |
| AD-63558.1 | 49.3 | 3.0 |
| AD-63564.1 | 69.2 | 3.1 |
| AD-63570.1 | 50.6 | 6.0 |
| AD-63529.1 | 59.5 | 6.5 |
| AD-63535.1 | 21.0 | 1.7 |
| AD-63541.1 | 40.1 | 23.4 |
| AD-63547.1 | 26.0 | 9.6 |
| AD-63553.1 | 31.5 | 6.0 |
| AD-63559.1 | 34.9 | 2.7 |
| AD-63565.1 | 43.3 | 5.3 |
| AD-63571.1 | 41.6 | 4.4 |
| AD-63530.1 | 127.6 | 15.0 |
| AD-63536.1 | 38.0 | 16.0 |
| AD-63542.1 | 48.3 | 8.4 |
| AD-63548.1 | 41.9 | 7.9 |
| AD-63554.1 | 88.2 | 15.2 |
| AD-63560.1 | 48.8 | 17.7 |
| AD-63566.1 | 33.6 | 6.8 |
| AD-63572.1 | 82.4 | 67.9 |
| AD-63578.1 | 78.5 | 11.5 |
| AD-63584.1 | 55.7 | 7.2 |
| AD-63590.1 | 53.4 | 2.9 |
| AD-63596.1 | 63.5 | 8.6 |
| AD-63602.1 | 49.3 | 3.6 |
| AD-63608.1 | 29.2 | 4.4 |
| AD-63614.1 | 30.0 | 7.4 |
| AD-63573.1 | 96.1 | 14.7 |
| AD-63579.1 | 38.1 | 4.5 |
| AD-63585.1 | 40.0 | 2.1 |
| AD-63591.1 | 30.5 | 2.5 |
| AD-63597.1 | 55.1 | 5.8 |
| AD-63603.1 | 43.6 | 4.0 |
| AD-63609.1 | 37.7 | 2.7 |
| AD-63615.1 | 44.4 | 9.7 |
| AD-63574.1 | 44.3 | 10.3 |
| AD-63580.1 | 33.1 | 3.5 |
| AD-63586.1 | 39.3 | 2.9 |
| AD-63592.1 | 73.7 | 1.6 |
| AD-63598.1 | 32.4 | 6.6 |

10

20

30

40

【 0 6 0 6 】

50

【表 5 8】

| | | |
|------------|------|------|
| AD-63604.1 | 98.7 | 7.1 |
| AD-63610.1 | 42.1 | 7.1 |
| AD-63616.1 | 55.2 | 10.4 |
| AD-63575.1 | 27.8 | 3.0 |
| AD-63581.1 | 36.3 | 3.2 |
| AD-63587.1 | 36.1 | 3.3 |
| AD-63593.1 | 39.2 | 4.7 |
| AD-63599.1 | 37.0 | 5.6 |
| AD-63605.1 | 49.3 | 3.7 |
| AD-63611.1 | 88.8 | 7.7 |
| AD-63617.1 | 45.6 | 6.6 |
| AD-63576.1 | 59.9 | 2.9 |
| AD-63582.1 | 82.9 | 8.3 |
| AD-63588.1 | 33.5 | 6.7 |
| AD-63594.1 | 64.7 | 18.0 |
| AD-63600.1 | 99.5 | 11.9 |
| AD-63606.1 | 40.8 | 2.7 |
| AD-63612.1 | 44.5 | 5.3 |
| AD-63618.1 | 41.7 | 4.6 |
| AD-63577.1 | 31.1 | 0.3 |
| AD-63583.1 | 57.3 | 8.6 |
| AD-63589.1 | 61.9 | 5.9 |
| AD-63595.1 | 51.2 | 8.5 |
| AD-63601.1 | 70.7 | 15.4 |
| AD-63607.1 | 39.4 | 1.9 |
| AD-63613.1 | 36.8 | 2.7 |
| AD-63619.1 | 83.8 | 13.8 |
| AD-63620.1 | 69.4 | 7.3 |
| AD-63621.1 | 30.6 | 3.1 |
| AD-63622.1 | 51.8 | 8.4 |
| AD-63623.1 | 37.3 | 8.6 |

10

20

30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】

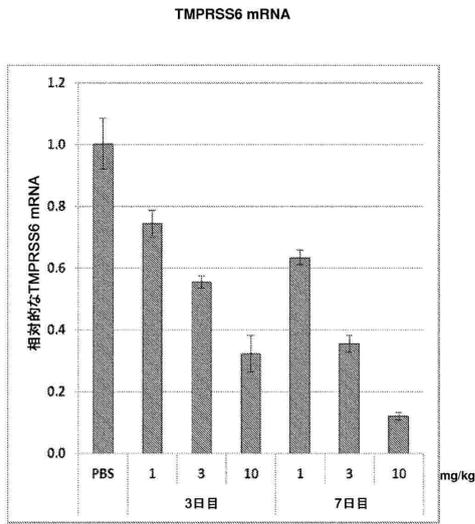


図 1

【 図 2 】

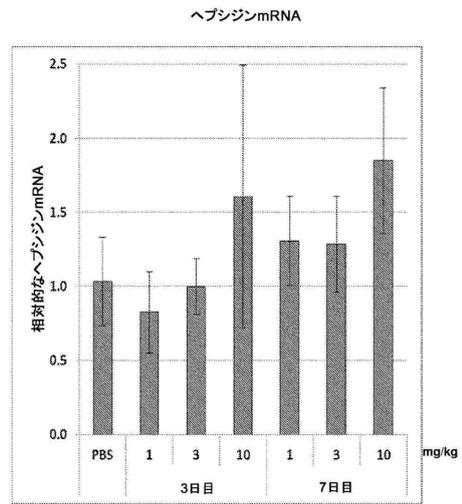


図 2

【 図 3 - 1 】

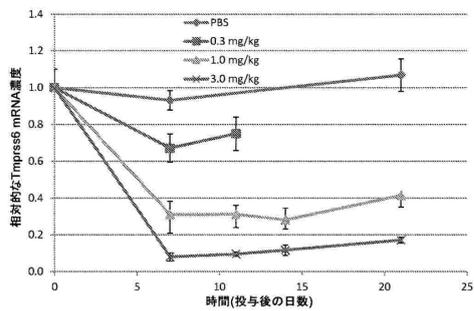


図 3A

【 図 3 - 2 】

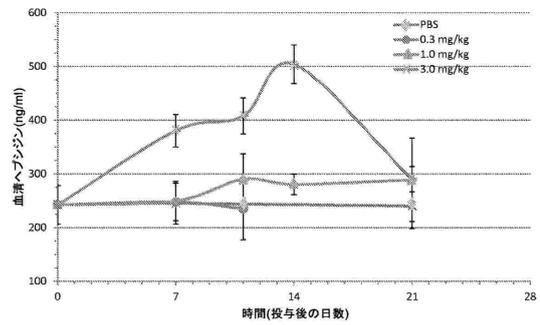


図 3C

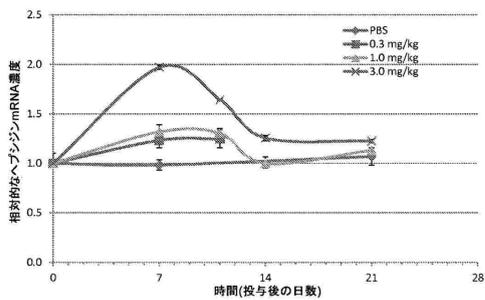


図 3B

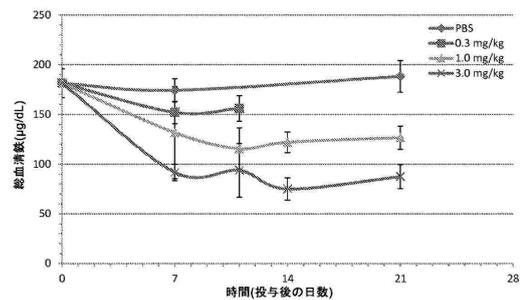


図 3D

10

20

30

40

50

【 図 3 - 3 】

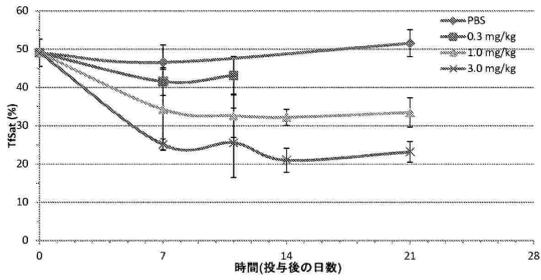


図 3E

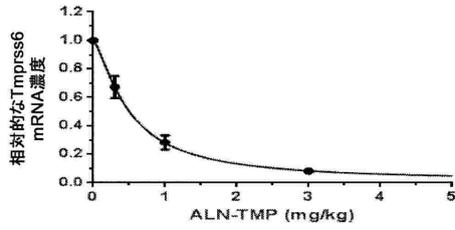


図 3F

【 図 4 】

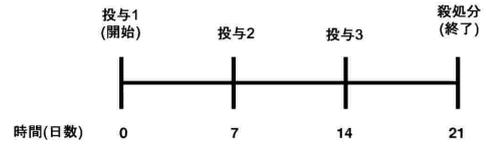


図 4A

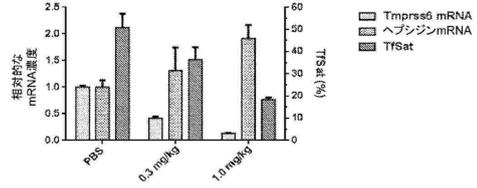


図 4B

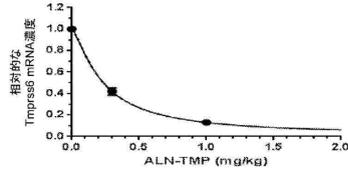


図 4C

【 図 5 】

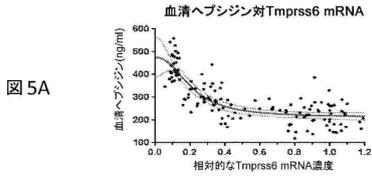


図 5A

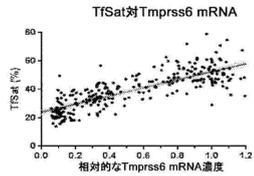


図 5B

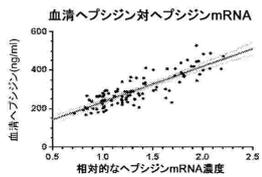


図 5C

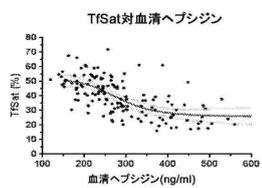


図 5D

【 図 6 】

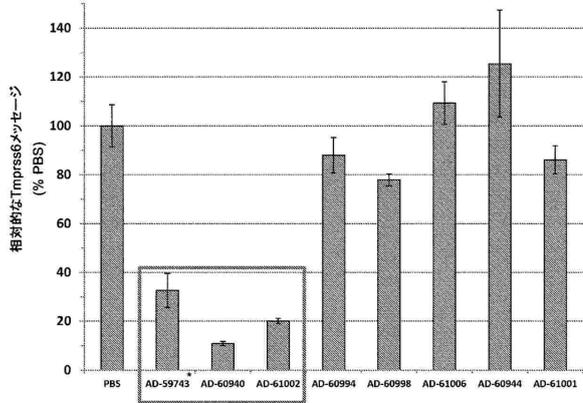


図 6

10

20

30

40

50

【配列表】

0007437891000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 7/00 (2006.01)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)

F I

A 6 1 P 7/00
C 1 2 N 15/113 1 3 0 Z

(31)優先権主張番号 61/826,178

(32)優先日 平成25年5月22日(2013.5.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ジェイムズ・バトラー

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 ブライアン・ベッテンコート

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 カラントッタティル・ジー・ラジーブ

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 マルティン・マイアー

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

(72)発明者 クラウス・カリセ

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、サード・ストリート300番、サード・フロア

合議体

審判長 光本 美奈子

審判官 富永 みどり

審判官 原口 美和

(56)参考文献 国際公開第2012/135246(WO, A2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K

C12N

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq/UniProt