

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-171072

(P2018-171072A)

(43) 公開日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z N A Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 132 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-132510 (P2018-132510)	(71) 出願人	505369158
(22) 出願日	平成30年7月12日 (2018. 7. 12)		
(62) 分割の表示	特願2017-132506 (P2017-132506) の分割		
原出願日	平成21年10月20日 (2009. 10. 20)		
(31) 優先権主張番号	61/242, 783		
(32) 優先日	平成21年9月15日 (2009. 9. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/156, 670	(74) 代理人	100145403
(32) 優先日	平成21年3月2日 (2009. 3. 2)		弁理士 山尾 憲人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	61/185, 545		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成21年6月9日 (2009. 6. 9)	(74) 代理人	100157956
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスチレチンの発現を阻害するための組成物および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 トランスチレチン (TTR) 遺伝子を標的とする二本鎖リボ核酸 (dsRNA)、および TTR の発現を阻害するための dsRNA を使用する方法の提供。

【解決手段】 トランスチレチン (TTR) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) であって、前記 dsRNA は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、トランスチレチン (TTR) をコードする mRNA の一部に相補的である領域を含み、前記相補性の領域は、30ヌクレオチド長未満であり、前記アンチセンス鎖は、ある特定の塩基配列、別の特定の塩基配列、他の特定の塩基配列、またはこれらとは異なる特定の塩基配列の15個以上の連続するヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸 (dsRNA)。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスチレチン (TTR) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) であって、前記 dsRNA は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、トランスチレチン (TTR) をコードする mRNA の一部に相補的である領域を含み、前記相補性の領域は、30ヌクレオチド長未満であり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 170、配列番号 450、配列番号 730、または配列番号 1010 の 15 個以上の連続するヌクレオチドを含む、二本鎖リボ核酸 (dsRNA)。

【請求項 2】

前記センス鎖は、配列番号 169、配列番号 449、配列番号 729、または配列番号 1009 の 15 個以上の連続するヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の dsRNA。 10

【請求項 3】

前記センス鎖は、配列番号 449 からなり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 450 からなる、請求項 1 に記載の dsRNA。

【請求項 4】

前記センス鎖は、配列番号 729 からなり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 730 からなる、請求項 1 に記載の dsRNA。

【請求項 5】

前記センス鎖は、配列番号 1009 からなり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 1010 からなる、請求項 1 に記載の dsRNA。 20

【請求項 6】

前記 dsRNA は、表 3A、3B、4、6A、6B、7、および 16 から選択されるセンス鎖と、表 3A、3B、4、6A、6B、7、および 16 から選択されるアンチセンス鎖と、を含む、請求項 1 に記載の dsRNA。

【請求項 7】

前記相補性の領域は、19ヌクレオチド長である、請求項 1 または 2 または 6 に記載の dsRNA。

【請求項 8】

前記相補性の領域は、配列番号 169 からなる、請求項 1 または 2 または 6 に記載の dsRNA。 30

【請求項 9】

前記 dsRNA のそれぞれの鎖は、19、20、21、22、23、または 24ヌクレオチド長である、請求項 1 または 2 または 6 に記載の dsRNA。

【請求項 10】

それぞれの鎖は、21ヌクレオチド長である、請求項 1 または 2 または 6 に記載の dsRNA。

【請求項 11】

前記 dsRNA は、配列番号 1331 の 637 位のアデニンヌクレオチドと配列番号 1331 の 638 位のグアニンヌクレオチドとの間で、TTR の mRNA を切断しない、請求項 1、2、3、4、5、または 6 に記載の dsRNA。 40

【請求項 12】

前記 dsRNA は、配列番号 1331 の 636 位のグアニンヌクレオチドと配列番号 1331 の 637 位のアデニンヌクレオチドとの間で、TTR の mRNA を切断する、請求項 1、2、3、4、5、または 6 に記載の dsRNA。

【請求項 13】

前記 dsRNA は、配列番号 1331 の 628 位のグアニンヌクレオチドと配列番号 1331 の 646 位のウラシルヌクレオチドとの間で、TTR の mRNA にアニール化される、請求項 1、2、3、4、5、または 6 に記載の dsRNA。

【請求項 14】

前記 dsRNA は、少なくとも 1 個の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1、2、3、4 50

、 5、または 6 に記載の dsRNA。

【請求項 15】

前記修飾ヌクレオチドのうち少なくとも 1 個は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、およびコレステリル誘導体基またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される末端ヌクレオチドの群から選択される、請求項 14 に記載の dsRNA。

【請求項 16】

前記修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-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、ロックされたヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、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、ホスホルアミデート、およびヌクレオチドを含む非天然塩基の群から選択される、請求項 14 に記載の dsRNA。

10

【請求項 17】

少なくとも 1 個の 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 14 に記載の dsRNA。

【請求項 18】

前記 dsRNA は、リガンドに共役される、請求項 1、2、3、4、5、または 6 に記載の dsRNA。

【請求項 19】

前記 dsRNA は、脂質製剤に製剤化される、請求項 1、2、3、4、5、または 6 に記載の dsRNA。

20

【請求項 20】

前記 dsRNA は、LNP 製剤、LNP 01 製剤、XTC-SNALP 製剤、または SNALP 製剤に製剤化される、請求項 19 に記載の dsRNA。

【請求項 21】

前記 dsRNA は、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)を、57.1/7.1/34.4/1.4 の比の XTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA と、約 7:1 の比の脂質:siRNA で使用することで、XTC-SNALP 製剤に製剤化される、請求項 19 に記載の dsRNA。

【請求項 22】

前記センス鎖は、配列番号 1009 からなり、前記アンチセンス鎖は、配列番号 1010 からなり、前記 dsRNA は、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)を、57.1/7.1/34.4/1.4 の比の XTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA と、約 7:1 の比の脂質:siRNA で使用することで、XTC-SNALP 製剤に製剤化される、請求項 19 に記載の dsRNA。

30

【請求項 23】

前記 dsRNA は、50/10/38.5/1.5 モル% の比の XTC/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14 および約 11:1 の比の脂質:siRNA を使用することで、LNP 09 製剤に製剤化される、請求項 19 に記載の dsRNA。

40

【請求項 24】

前記 dsRNA は、50/10/38.5/1.5 モル% の比の MC3/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14 および約 11:1 の比の脂質:siRNA を使用することで、LNP 11 製剤に製剤化される、請求項 19 に記載の dsRNA。

【請求項 25】

前記 dsRNA は、LNP 09 製剤または LNP 11 製剤に製剤化され、PBS 対照群と比較して、0.3 mg/kg の用量で、TTR の mRNA レベルを約 85~90% 低下させる、請求項 19 に記載の dsRNA。

【請求項 26】

前記 dsRNA は、LNP 09 製剤または LNP 11 製剤に製剤化され、PBS 対照群

50

と比較して、0.1 mg/kgの用量で、TTRのmRNAレベルを約50%低下させる、請求項19に記載のdsRNA。

【請求項27】

前記dsRNAは、LNP09製剤またはLNP11製剤に製剤化され、ウエスタンブロットによって測定して、PBS対照群と比較して、用量依存的な様式で、TTRのタンパク質レベルを低下させる、請求項19に記載のdsRNA。

【請求項28】

前記dsRNAは、DLiNDMAを、57.1/7.1/34.4/1.4の比のDLiNDMA/DPPC/コレステロール/PEG2000-cDMAと、約7:1の比の脂質:sRNAで使用することで、SNALP製剤に製剤化される、請求項19に記載のdsRNA。

10

【請求項29】

細胞への前記dsRNAの投与は、リアルタイムPCRアッセイによって測定して、TTRのmRNA発現の約95%の阻害をもたらす、前記細胞は、HepG2細胞またはHep3B細胞であり、前記dsRNAの濃度は、10 nMである、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

【請求項30】

細胞への前記dsRNAの投与は、分岐DNAアッセイによって測定して、TTRのmRNA発現の約74%の阻害をもたらす、前記細胞は、HepG2細胞またはHep3B細胞であり、前記dsRNAの濃度は、10 nMである、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

20

【請求項31】

前記dsRNAは、HepG2細胞内で、10 pM未満のIC50を有し、前記dsRNAの濃度は、10 nMである、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

【請求項32】

前記dsRNAは、約1 mg/kgのED50を有する、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

【請求項33】

前記dsRNAの投与は、カニクイザルの肝臓中でTTRのmRNAを約80%低下させ、前記dsRNAの濃度は、3 mg/kgである、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

30

【請求項34】

前記dsRNAの投与は、IFN- およびTNF- ELISAアッセイによって測定して、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)内の免疫刺激活性をもたらさない、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

【請求項35】

前記dsRNAの投与は、肝臓TTRのmRNAレベルを約97%、または血清TTRのタンパク質レベルを約90%低下させ、前記dsRNAの濃度は、6 mg/kgである、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

40

【請求項36】

前記dsRNAの投与は、肝臓TTRのmRNAレベルおよび/または血清TTRのタンパク質レベルを最長22日間低下させ、前記dsRNAの濃度は、6 mg/kgまたは3 mg/kgである、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

【請求項37】

前記dsRNAは、それを必要とする対象に、1 mg/kgまたは3 mg/kgで投与する時に、血清TTRのタンパク質レベルを、処置後14日目まで抑制する、請求項1、2、3、4、5、または6に記載のdsRNA。

【請求項38】

前記dsRNAは、リアルタイムPCRによって測定して、0.1 nMの濃度で、He

50

p 3 B 細胞中の T T R の発現を 9 8 . 9 % 低下させる、請求項 1、2、3、4、5、または 6 に記載の d s R N A。

【請求項 3 9】

前記 d s R N A は、リアルタイム P C R によって測定して、1 0 n M の濃度で、H e p 3 B 細胞中の T T R の発現を 9 9 . 4 % 低下させる、請求項 1、2、3、4、5、または 6 に記載の d s R N A。

【請求項 4 0】

トランスチレチン (T T R) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) であって、前記 d s R N A は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、トランスチレチン (T T R) をコードする m R N A の一部に相補的である領域を含み、前記相補性の領域は、3 0 ヌクレオチド長未満であり、前記 d s R N A は、表 3 A、3 B、4、6 A、6 B、7、および 1 6 から選択されるセンス鎖と、表 3 A、3 B、4、6 A、6 B、7、および 1 6 から選択されるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸 (d s R N A)。

10

【請求項 4 1】

トランスチレチン (T T R) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) であって、前記 d s R N A は、配列番号 1 3 3 1 のヌクレオチド 6 1 8 ~ 6 4 8 のうちの 1 5 ~ 3 0 ヌクレオチドに相補的な領域を含む、アンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 1 3 3 1 の 6 2 8 位でグアニンと塩基対形成する、二本鎖リボ核酸 (d s R N A)。

20

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 4 1 に記載の d s R N A を含有する、細胞。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 4 1 に記載の d s R N A の少なくとも 1 本の鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、ベクター。

【請求項 4 4】

請求項 4 3 のベクターを含む、細胞。

【請求項 4 5】

請求項 1 ~ 4 1 に記載の d s R N A および薬剤として許容される担体を含む、T T R 遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物。

30

【請求項 4 6】

d s R N A および S N A L P 製剤を含む T T R 遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物であって、前記 d s R N A は、3 0 ヌクレオチド長未満のアンチセンス鎖を含み、配列番号 1 7 0、配列番号 4 5 0、配列番号 7 3 0、または配列番号 1 0 1 0 の 1 5 個以上の連続するヌクレオチドを含み、前記 S N A L P 製剤は、5 7 . 1 / 7 . 1 / 3 4 . 4 / 1 . 4 の比で、それぞれ、D l i n D M A、D P P C、コレステロール、および P E G 2 0 0 0 - c D M A を含む、医薬組成物。

【請求項 4 7】

細胞内の T T R の発現を阻害する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 4 1 に記載の d s R N A と前記細胞を接触させることと、
(b) T T R 遺伝子の m R N A 転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ (a) において産生された前記細胞を維持し、それによって、前記細胞内の前記 T T R 遺伝子の発現を阻害することと、を含む、方法。

40

【請求項 4 8】

T T R の発現によって媒介された障害を治療する方法であって、かかる治療を必要とするヒトに、請求項 1 ~ 4 1 に記載の治療上有効な量の d s R N A を投与することを含む、方法。

【請求項 4 9】

前記 d s R N A は、約 0 . 0 1、0 . 1、0 . 5、1 . 0、2 . 5、または 5 . 0 m g / k g で、前記ヒトに投与される、請求項 4 8 に記載の方法。

50

- 【請求項 50】
前記 dsRNA は、約 1.0 mg / kg で、前記ヒトに投与される、請求項 48 ~ 49 に記載の方法。
- 【請求項 51】
前記ヒトは、トランスチレチンアミロイドーシスに罹患する、請求項 48 ~ 50 に記載の方法。
- 【請求項 52】
前記ヒトは、肝臓疾患に罹患する、請求項 48 ~ 51 に記載の方法。
- 【請求項 53】
前記ヒトは、肝臓移植をさらに提供される、請求項 48 ~ 52 に記載の方法。 10
- 【請求項 54】
前記 dsRNA の投与は、ヒト肝臓中で TTR の mRNA を約 80% 低下させ、前記 dsRNA の濃度は、3 mg / kg である、請求項 48 ~ 53 に記載の方法。
- 【請求項 55】
前記 dsRNA の投与は、IFN - および TNF - ELISA アッセイによって測定して、前記ヒトにおいて、免疫刺激活性をもたらさない、請求項 48 ~ 54 に記載の方法。
- 【請求項 56】
前記 dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベルを約 97%、または血清 TTR のタンパク質レベルを約 90% 低下させ、前記 dsRNA の濃度は、6 mg / kg である、請求項 48 ~ 55 に記載の方法。 20
- 【請求項 57】
前記 dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベルおよび / または血清 TTR のタンパク質レベルを最長 22 日間低下させ、前記 dsRNA の濃度は、6 mg / kg または 3 mg / kg である、請求項 48 ~ 56 に記載の方法。
- 【請求項 58】
前記 dsRNA は、50 / 10 / 38.5 / 1.5 モル% の比の XTC / DSPC / Chol / PEG₂₀₀₀ - C14 および約 11 : 1 の比の脂質 : siRNA を使用することで、LNP09 製剤に製剤化される、請求項 48 ~ 57 に記載の方法。
- 【請求項 59】
前記 dsRNA は、50 / 10 / 38.5 / 1.5 モル% の比の MC3 / DSPC / Chol / PEG₂₀₀₀ - C14 および約 11 : 1 の比の脂質 : siRNA を使用することで、LNP11 製剤に製剤化される、請求項 48 ~ 58 に記載の方法。 30
- 【請求項 60】
前記 dsRNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、PBS 対照群と比較して、0.3 mg / kg の用量で、TTR の mRNA レベルを約 85 ~ 90% 低下させる、請求項 48 ~ 59 に記載の方法。
- 【請求項 61】
前記 dsRNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、PBS 対照群と比較して、0.1 mg / kg の用量で、TTR の mRNA レベルを約 50% 低下させる、請求項 48 ~ 60 に記載の方法。 40
- 【請求項 62】
前記 dsRNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、ウエスタンブロットによって測定して、PBC 対照基と比較して、用量依存的な様式で、TTR のタンパク質レベルを低下させる、請求項 48 ~ 61 に記載の方法。
- 【請求項 63】
前記 dsRNA は、1 mg / kg または 3 mg / kg でヒトに投与する時に、血清 TTR のタンパク質レベルを、処置後 14 日目まで抑制する、請求項 48 ~ 62 に記載の方法。
- 【請求項 64】 50

前記 dsRNA 製剤は、D l i n D M A を、57.1 / 7.1 / 34.4 / 1.4 の比の D L i n D M A / D P P C / コレステロール / P E G 2 0 0 0 - c D M A と、約 7 : 1 の比の脂質 : s i R N A で使用することで、S N A L P 製剤に製剤化される、請求項 48 ~ 63 に記載の方法。

【請求項 65】

T T R の発現によって媒介される障害を治療するための dsRNA の使用であって、かかる治療を必要とするヒトに、請求項 1 ~ 41 に記載の治療上有効な量の前記 dsRNA を投与することを含む、使用。

【請求項 66】

前記 dsRNA は、約 0.01、0.1、0.5、1.0、2.5、または 5.0 mg / k g で、前記ヒトに投与される、請求項 65 に記載の使用。

10

【請求項 67】

前記 dsRNA は、約 1.0 mg / k g で、前記ヒトに投与される、請求項 65 ~ 66 に記載の使用。

【請求項 68】

前記ヒトは、トランスチレチンアミロイドーシスに罹患する、請求項 65 ~ 67 に記載の使用。

【請求項 69】

前記ヒトは、肝臓疾患に罹患する、請求項 65 ~ 68 に記載の使用。

【請求項 70】

20

前記ヒトは、肝臓移植をさらに提供される、請求項 65 ~ 69 に記載の使用。

【請求項 71】

細胞内の T T R の発現を阻害するための dsRNA の使用であって、
 (a) 請求項 1 ~ 41 に記載の dsRNA と前記細胞を接触させることと、
 (b) T T R 遺伝子の mRNA 転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ (a) において産生された前記細胞を維持し、それによって、前記細胞内の前記 T T R 遺伝子の発現を阻害することと、を含む、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、トランスチレチン (T T R) 遺伝子を標的とする二本鎖リボ核酸 (dsRNA)、および T T R の発現を阻害するための dsRNA を使用する方法に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本願は、2008年10月20日出願の米国仮出願第 61 / 106, 956 号、および 2008年11月18日出願の米国仮出願第 61 / 115, 738 号、および 2009年3月2日出願の米国仮出願第 61 / 156, 670 号、および 2009年6月9日出願の米国仮出願第 61 / 185, 545 号、および 2009年9月15日出願の米国仮出願第 61 / 242, 783 号、および 2009年9月22日出願の米国仮出願第 61 / 244, 794 号の利益を主張し、それらの全ては、全ての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0003】

配列表への言及

本願は、2009年 _____ に作成された、 _____ バイトの大きさで、 _____ . t x t と名づけられたテキストファイルとして、電子的に提出された配列表を含む。該配列表は、参照により組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

トランスチレチン (T T R) は、分泌された甲状腺ホルモン結合タンパク質である。T T R は、血漿および脳脊髄液中のレチノール結合タンパク質 (R B P) / ビタミン A、お

50

よび血清チロキシン (T 4) に結合し、輸送する。

【 0 0 0 5 】

通常配列の T T R および変異配列 T T R は共に、アミロイドーシスを引き起こす。通常配列の T T R は、高齢者における心アミロイドーシスを引き起こし、これは老年性全身アミロイドーシス (S S A) (老年性心アミロイドーシス (S C A) と呼ばれる) と称される。S S A は、しばしば、多くの他の器官において、微細な沈着物を伴う。T T R の変異は、T T R のアミロイド形成の過程を加速し、臨床的意義のある T T R アミロイドーシス (A T T R (アミロイドーシス - トランスチレチン型) と呼ばれる) の発症に対する最も重要な危険因子である。85 個以上のアミロイド生成性 T T R 変異体が、全身家族性アミロイドーシスを引き起こすことが知られる。肝臓は、T T R の発現の主要部位である。発現の他の重要な部位には、脈絡叢、網膜、および膵臓が含まれる。

10

【 0 0 0 6 】

T T R アミロイドーシスは、種々の形態で現れる。末梢神経系が、さらに著しく影響を受ける場合、該疾患は、家族性アミロイド神経障害 (F A P) と称される。心臓が主に関与するが、神経系は関与しない場合、該疾患は、家族性アミロイド心筋症 (F A C) と称される。T T R アミロイドーシスの第 3 の主要型は、髄膜 / C N S (中枢神経系) アミロイドーシスと称される。

【 0 0 0 7 】

二本鎖 RNA 分子 (d s R N A) が、RNA 干渉 (R N A i) として知られる、高度に保存された調節機序で遺伝子発現を遮断することが示されている。国際公開 WO 第 99 / 32619 号 (F i r e ら) は、線虫における遺伝子の発現を阻害するための、少なくとも 25 ヌクレオチド長の d s R N A の使用を開示している。また、d s R N A は、植物 (例えば、国際公開 WO 第 99 / 53050 号、W a t e r h o u s e ら、および国際公開 WO 第 99 / 61631 号、H e i f e t z らを参照)、ショウジョウバエ (例えば、Y a n g , D . , e t a l . , C u r r . B i o l . (2 0 0 0) 1 0 : 1 1 9 1 - 1 2 0 0 を参照)、ならびに哺乳動物 (国際公開 WO 第 00 / 44895 号、L i m m e r、および独国特許 DE 第 101 00 586.5 号、K r e u t z e r らを参照) を含む、他の生物において標的 RNA を分解することが示されている。

20

【 0 0 0 8 】

米国特許第 20070207974 号は、機能性および過機能性 s i R N A を開示する。米国特許第 20090082300 号は、T T R を対象とするアンチセンス分子を開示する。米国特許第 7,250,496 号は、T T R を対象とするマイクロ RNA を開示する。

30

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

一実施形態において、本発明は、トランスチレチン (T T R) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (d s R N A) を提供し、前記 d s R N A は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、トランスチレチン (T T R) をコードする m R N A の一部に相補的である領域を含み、該相補性の領域は、30 ヌクレオチド長未満であり、該アンチセンス鎖は、配列番号 170、配列番号 450、配列番号 730、または配列番号 1010 の 15 個以上の連続するヌクレオチドを含む。関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号 169、配列番号 449、配列番号 729、または配列番号 1009 の 15 個以上の連続するヌクレオチドを含む。なお別の関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号 449 からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号 450 からなる。なお別の関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号 729 からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号 730 からなる。さらに別の関連実施形態において、該センス鎖は、配列番号 1009 からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号 1010 からなる。なお別の関連実施形態において、該 d s R N A は、表 3 A、3 B、4、6 A、6 B、7、および 16 から選択されるセンス鎖と、表 3 A、3 B、4、6 A、6 B、7、および 16 から選択されるアンチセンス鎖と、を含む。

40

50

【0010】

ある実施形態において、該 dsRNA の該アンチセンス鎖とトランスチレチンをコードする該 mRNA との間の該相補性の領域は、19ヌクレオチド長である。別の実施形態において、該相補性の領域は、配列番号169からなる。他の実施形態において、該 dsRNA のそれぞれの鎖は、19、20、21、22、23、または24ヌクレオチド長である。さらに別の実施形態において、それぞれの鎖は、21ヌクレオチド長である。

【0011】

ある実施形態において、トランスチレチンの発現を阻害するための該 dsRNA は、配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドと配列番号1331の638位のグアニンヌクレオチドとの間で、TTRのmRNAを切断しない。他の実施形態において、該 dsRNA は、配列番号1331の636位のグアニンヌクレオチドと配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドとの間で、TTRのmRNAを切断する。ある実施形態において、該 dsRNA は、配列番号1331の628位のグアニンヌクレオチドと配列番号1331の646位のウラシルヌクレオチドとの間で、TTRのmRNAにアニール化する。

【0012】

さらに他の関連実施形態において、本発明は、トランスチレチンの発現を阻害するための上記の dsRNA を提供し、該 dsRNA は、1個以上の修飾ヌクレオチドを含む。関連実施形態において、少なくとも1個の修飾ヌクレオチド（またはヌクレオチド）は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、およびコレステリル誘導体基またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される末端ヌクレオチドからなる群から選択される。別の関連実施形態において、該修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-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、ロックされたヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、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、ホスホルアミデート、およびヌクレオチドを含む非天然塩基の群から選択される。ある実施形態において、該 dsRNA は、少なくとも1個の2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。

【0013】

他の実施形態において、トランスチレチンの発現を阻害するための上記の dsRNA は、リガンドに共役されるか、または脂質製剤に製剤化される。ある実施形態において、該脂質製剤は、LNP製剤、LNP01製剤、XTC-SNALP製剤、またはSNALP製剤に製剤化される。関連実施形態において、該XTC-SNALP製剤は、以下のとおりである：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(XTC)を、57.1/7.1/34.4/1.4の比のXTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMAと、約7:1の比の脂質:siRNAで使用する。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA の該センス鎖は、配列番号1009からなり、該アンチセンス鎖は、配列番号1010からなり、該 dsRNA は、以下のようにXTC-SNALP製剤に製剤化される：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(XTC)を、57.1/7.1/34.4/1.4の比のXTC/DPPC/コレステロール/PEG-cDMA、および約7:1の比の脂質:siRNAで使用する。代替として、上記のもの等の dsRNA は、以下のようにLNP09製剤に製剤化され得る：50/10/38.5/1.5モル%の比で、XTC/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14および約11:1の比の脂質:siRNAを使用する。別の変形において、該 dsRNA は、以下のようにLNP11製剤に製剤化される：50/10/38.5/1.5モル%の比で、MC3/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14および約11:1の比の脂質:siRNA比を使用する。さらに別の実施形態において、該 dsRNA は、LNP09製剤またはLNP11製剤に製剤化され、PBS対照群と比較して、0.3mg/kgの用量で、TTRのmRNAレベルを約85~90%低下させる。なお別の実施形態において、該 dsRNA は、LNP09製剤またはLNP11製剤に製剤化され、PBS対照群と比較して、0.1mg/kgの用量で、TTR

10

20

30

40

50

の mRNA レベルを約 50% 低下させる。なお別の実施形態において、該 dsRNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、ウエスタンブロットによって測定して、PBS 対照群と比較して、用量依存的な様式で、TTR のタンパク質レベルを低下させる。なお別の実施形態において、該 dsRNA は、以下のように SNALP 製剤に製剤化される：DLi nDMA を、57.1 / 7.1 / 34.4 / 1.4 の比の DLi nDMA / DPPC / コレステロール / PEG2000 - cDMA と、約 7 : 1 の比の脂質 : siRNA で使用する。

【0014】

ある実施形態において、本発明は、トランスチレチンの発現を阻害するための、上記のもの等の dsRNA を提供し、細胞への該 dsRNA の投与は、リアルタイム PCR アッセイによって測定して、TTR の mRNA 発現の約 95% の阻害をもたらす、該細胞は、HepG2 細胞または Hep3B 細胞であり、該 dsRNA の濃度は、10 nM である。関連実施形態において、細胞への該 dsRNA の投与は、分岐 DNA アッセイによって測定して、TTR の mRNA 発現の約 74% の阻害をもたらす、該細胞は、HepG2 細胞または Hep3B 細胞であり、該 dsRNA の濃度は、10 nM である。他の関連実施形態において、該 dsRNA は、HepG2 細胞内で、10 pM 未満の IC50 を有し、該 dsRNA の濃度は、10 nM である。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA は、約 1 mg / kg の ED50 を有する。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、カニクイザルの肝臓中の TTR の mRNA を約 80% 低下させ、該 dsRNA の濃度は、3 mg / kg である。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、IFN - および TNF - ELISA アッセイによって測定して、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) 内の免疫刺激活性をもたらさない。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベルを約 97%、または血清 TTR のタンパク質レベルを約 90% 低下させ、該 dsRNA の濃度は、6 mg / kg である。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベルおよび / または血清 TTR のタンパク質レベルを最長 22 日間低下させ、該 dsRNA の濃度は、6 mg / kg または 3 mg / kg である。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA は、それを必要とする対象に、1 mg / kg または 3 mg / kg で投与する時に、血清 TTR のタンパク質レベルを、処置後 14 日目まで抑制する。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA は、リアルタイム PCR によって測定して、0.1 nM の濃度で、Hep3B 細胞内の TTR の発現を 98.9% 低下させる。さらに他の関連実施形態において、該 dsRNA は、リアルタイム PCR によって測定して、10 nM の濃度で、Hep3B 細胞内の TTR の発現を 99.4% 低下させる。

【0015】

他の実施形態において、本発明は、トランスチレチン (TTR) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) を提供し、前記 dsRNA は、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は、トランスチレチン (TTR) をコードする mRNA の一部に相補的である領域を含み、前記相補性の領域は、30 ヌクレオチド長未満であり、該 dsRNA は、表 3A、3B、4、6A、6B、7、および 16 から選択されるセンス鎖と、表 3A、3B、4、6A、6B、7、および 16 から選択されるアンチセンス鎖と、を含む。

【0016】

別の実施形態において、本発明は、トランスチレチン (TTR) の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) を提供し、前記 dsRNA は、配列番号 1331 のヌクレオチド 618 ~ 648 のうちの 15 ~ 30 ヌクレオチドに相補的な領域を含む、アンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖は、配列番号 1331 の 628 位でグアニンと塩基対形成する。

【0017】

ある実施形態において、本発明は、上記の発明の概要に記載の dsRNA のうちのいずれかを含有する細胞を提供する。ある他の実施形態において、本発明は、上記の発明の概

10

20

30

40

50

要に記載の dsRNA のうちのいずれかの少なくとも 1 本の鎖をコードするヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。ある実施形態において、該ベクターは、細胞内にある。

【0018】

他の実施形態において、本発明は、上記の発明の概要に記載の dsRNA のうちのいずれか、および薬剤として許容される担体を含む TTR 遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物を提供する。関連実施形態において、本発明は、dsRNA および SNALP 製剤を含む TTR 遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物を提供し、該 dsRNA は、30ヌクレオチド長未満のアンチセンス鎖を含み、配列番号 170、配列番号 450、配列番号 730、または配列番号 1010 の 15 個以上の連続するヌクレオチドを含み、該 SNALP 製剤は、57.1/7.1/34.4/1.4 の比で、それぞれ、DlinDMA、DPPC、コレステロール、および PEG2000-cDMA を含む。

10

【0019】

なお別の実施形態において、本発明は、細胞内の TTR の発現を阻害する方法を提供し、該方法は、(a) 上記の発明の概要に記載の dsRNA のいずれかと該細胞を接触させることと、(b) TTR 遺伝子の mRNA 転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ (a) において産生された該細胞を維持し、それによって、該細胞内の該 TTR 遺伝子の発現を阻害することと、を含む。

【0020】

なお別の実施形態において、本発明は、TTR の発現によって媒介された障害を治療する方法であって、かかる治療を必要とするヒトに治療上有効な量の、上記の発明の概要に記載される dsRNA のいずれかを投与することを含む、方法を提供する。関連実施形態において、該 dsRNA は、約 0.01、0.1、0.5、1.0、2.5、または 5.0 mg/kg で、該ヒトに投与される。なお別の関連実施形態において、該 dsRNA は、約 1.0 mg/kg で、該ヒトに投与される。なお別の関連実施形態において、処置される該ヒトは、トランスチレチンアミロイドーシス、および/または肝臓疾患に罹患する。関連実施形態において、該ヒトは、肝臓移植をさらに提供される。なお別の実施形態において、該 dsRNA の投与は、ヒト肝臓中の TTR の mRNA を約 80% 低下させ、該 dsRNA の濃度は、3 mg/kg である。なお別の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、IFN- および TNF- ELISA アッセイによって測定して、該ヒトにおいて、免疫刺激活性をもたらさない。なお別の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベルを約 97%、または血清 TTR のタンパク質レベルを約 90% 低下させ、該 dsRNA の濃度は、6 mg/kg である。なお別の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベルおよび/または血清 TTR のタンパク質レベルを、最長 22 日間低下させ、該 dsRNA の濃度は、6 mg/kg または 3 mg/kg である。なお別の関連実施形態において、該 dsRNA は、以下のように LNP09 製剤に製剤化される：50/10/38.5/1.5 モル% の比で、XTC/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14 および約 11:1 の比の脂質：siRNA を使用する。なお別の関連実施形態において、該 dsRNA は、以下のように LNP11 製剤に製剤化される：50/10/38.5/1.5 モル% の比で、MC3/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14 および約 11:1 の比の脂質：siRNA を使用する。さらに別の関連実施形態において、該 dsRNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、PBS 対照群と比較して、0.3 mg/kg の用量で、TTR の mRNA レベルを約 85~90% 低下させる。なお別の関連実施形態において、該 dsRNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、PBS 対照群と比較して、0.1 mg/kg の用量で、TTR の mRNA レベルを約 50% 低下させる。さらに別の関連実施形態において、該 dsRNA は、LNP09 製剤または LNP11 製剤に製剤化され、ウエスタンブロットによって測定して、PBS 対照群と比較して、用量依存的な様式で、TTR のタンパク質レベルを低下させる。さらに別の関連実施形態において、該 dsRNA の投与は、ヒトに、1 mg/kg または 3 mg/kg で投与する時に、血清 TTR のタンパク質レベルを、処置後 14 日目まで抑制する。さらに別の関連実施形態に

20

30

40

50

において、該 dsRNA は、以下のように SNALP 製剤に製剤化される：DLi nDMA を、57.1 / 7.1 / 34.4 / 1.4 の比の DLi nDMA / DPPC / コレステロール / PEG2000 - cDMA で、および約 7 : 1 の比の脂質 : siRNA 比で使用する。

【0021】

別の実施形態において、本発明は、TTR の発現によって媒介された障害を治療するための dsRNA の使用であって、かかる治療を必要とするヒトに、治療上有効な量の、上記の発明の概要に記載される dsRNA のいずれかを投与することを含む、使用を提供する。関連実施形態において、該 dsRNA は、約 0.01、0.1、0.5、1.0、2.5、または 5.0 mg / kg で、該ヒトに投与される。特定の関連実施形態において、該 dsRNA は、約 1.0 mg / kg で、該ヒトに投与される。別の関連実施形態において、該ヒトは、トランスチレチンアミロイドーシス、および / または肝臓疾患に罹患する。本発明によって提供される使用のなお別の実施形態において、該処置されたヒトは、肝臓移植をさらに提供される。

10

【0022】

なお別の実施形態において、本発明は、細胞内の TTR の発現を阻害するための方法において、dsRNA の使用を提供し、該方法は、(a) 上記の発明の概要に記載の dsRNA と該細胞を接触させることと、(b) TTR 遺伝子の mRNA 転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ (a) において産生された該細胞を維持し、それによって、該細胞内の該 TTR 遺伝子の発現を阻害することと、が含まれる。

20

【0023】

本発明の 1 つ以上の実施形態の詳細は、以下の説明に説明される。本発明の他の特長、目的、利点は、説明および図面から、および特許請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図 1】TTR の siRNA での形質移入後、培養したヒト PBMC における、TNF および IFN レベルのグラフである。

【図 2】図 2A および 2B は HepG2 細胞内の AD - 18324 および AD - 18328 のそれぞれにおける用量反応曲線である。

【図 3】HepG2 細胞内の AD - 18246 における用量反応曲線である。

30

【図 4A】LNP01 に製剤化された TTR - dsRNA (AD - 18324、AD - 18328、および AD - 18246) の静脈内ボラス投与による、遺伝子導入 H129 - mTTR - KO / iNOS - KO / hTTR マウスにおける、肝臓 mRNA および血漿タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。

【図 4B】LNP01 に製剤化された TTR - dsRNA (AD - 18324、AD - 18328、および AD - 18246) の静脈内ボラス投与による、遺伝子導入 H129 - mTTR - KO / iNOS - KO / hTTR マウスにおける、肝臓 mRNA および血漿タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。

【図 5】SNALP に製剤化された TTR - dsRNA (AD - 18324 および AD - 18328) の 15 分間の静脈内注入後の非ヒト霊長類の肝臓中の TTR の mRNA レベルの測定の概要を示すグラフである。

40

【図 6A】SNALP - 18328 の静脈内ボラス投与による遺伝子導入マウスにおける、ヒト V30M TTR 肝臓 mRNA および血清タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。群平均が決定され、PBS 対照群に対して正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。PBS と比較した、群平均の低下の割合 (%) が、SNALP - 1955 および SNALP - 18328 群に対して示される。(* * * p < 0.001、一元配置 ANOVA および Dunn の事後検定)

【図 6B】SNALP - 18328 の静脈内ボラス投与による遺伝子導入マウスにおける、ヒト V30M TTR 肝臓 mRNA および血清タンパク質レベルのそれぞれの阻害を示す。群平均が決定され、PBS 対照群に対して正規化され、次いで、プロットされた。

50

エラーバーは標準偏差を示す。PBSと比較した、群平均の低下の割合(%)が、SNALP-1955およびSNALP-18328群に対して示される。(*** $p < 0.001$ 、一元配置ANOVAおよびDunnの事後検定)

【図7A】SNALP-18328の単回静脈内ボラス投与から22日にわたる、遺伝子導入マウスにおける、ヒトV30M TTR肝臓mRNAおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの低下の持続性を示す。群平均を決定した。TTR/GAPDHのmRNAレベルは、0日目のレベルに正規化され、プロットされた。各時点におけるSNALP-1955と比較して、正規化されたTTRのmRNAレベルの割合の低下が、算出され、SNALP-18328群に対して示される。(*** $p < 0.001$ 、一元配置ANOVAおよびDunnの事後検定)

10

【図7B】SNALP-18328の単回静脈内ボラス投与から22日にわたる、遺伝子導入マウスにおける、ヒトV30M TTR肝臓mRNAおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの低下の持続性を示す。群平均を決定した。TTR/GAPDHのmRNAレベルは、0日目のレベルに正規化され、プロットされた。各時点におけるSNALP-1955と比較して、正規化されたTTRのmRNAレベルの割合の低下が、算出され、SNALP-18328群に対して示される。(*** $p < 0.001$ 、一元配置ANOVAおよびDunnの事後検定)

【図8】SNALP-18328の15分間の単回静脈内注入から14日にわたる、非ヒト霊長類における、TTRの血清タンパク質レベルの時間経過を示す。

【図9】SNALP-18328の静脈内ボラス投与後の、ヒトV30M TTR/H SF-1ノックアウトマウスの種々の組織中のTTR-免疫反応性の低下を示す。E:食道; S:胃; I1:腸/十二指腸; I4:腸/結腸; N:神経; D:後根神経節。

20

【図10】XTC-SNALP-18328の15分間の単回静脈内注入後の、非ヒト霊長類の肝臓中のTTRのmRNAレベルの測定値を示す。

【図11A】LNP09-18328またはLNP11-18328の15分間の静脈内注入後の、非ヒト霊長類の肝臓中のTTRのmRNAおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの測定値を示す。

【図11B】LNP09-18328またはLNP11-18328の15分間の静脈内注入後の、非ヒト霊長類の肝臓中のTTRのmRNAおよび血清タンパク質レベルのそれぞれの測定値を示す。

30

【図11C】PBS対照群と比較した時の、0.3mg/kgのLNP09-18328の15分間の静脈内注入から28日間にわたる、TTRの血清タンパク質レベルの時間経過を示す。

【図12】ヒトTTRのmRNAの配列(参照配列NM_000371.3、配列番号1331)を示す。

【図13】ヒトおよびラットTTRのmRNAのそれぞれの配列である。図13Aは、ヒトTTRのmRNAの配列(参照配列NM_000371.2、配列番号1329)である。図13Bは、ラットTTRのmRNAの配列(参照配列NM_012681.1、配列番号1330)である。

【図14】NM_000371.3、NM_000371.2、およびAD-18328のヌクレオチドアライメントを示す。

40

【図15】家族性アミロイド神経障害、家族性アミロイド心筋症、およびCNSアミロイドーシスと関連するTTRにおける、症状および変異を図示する。

【図16】異なるTTRの注入継続時間での、SNALP-18534を用いた肝臓における、mRNAレベルの低下を示す。動物群($n = 4$ /群)は、15分間、または1、2、または3時間の注入を介して1mg/kgのSNALP-18534を投与した。48時間後、ラットは、安楽死させ、肝臓が採集された。TTRおよびGAPDHのmRNAレベルが、Quantigene bDNAアッセイを使用して、肝臓溶解物から測定された。TTRのmRNAレベルとGAPDHのmRNAレベルとの比が、各動物について算出された。群平均が決定され、PBS対照群に正規化され、次いで、プロットされた。

50

エラーバーは標準偏差を示す。(*** $p < 0.001$ 、PBSと比較した、一元配置ANOVAおよびBonferroniの事後検定)

【図17】LNP07-18534またはLNP08-18534の15分にわたる静脈内注入後の、ラットの肝臓中のTTRのmRNAレベルの測定値を示す。

【図18】LNP09-18534またはLNP11-18534の15分にわたる静脈内注入後の、Sprague-Dawleyラットの肝臓中の内因性TTRのmRNAレベルのインビボ阻害を示す。動物群($n = 4$ /群)は、15分間の注入を介して、0.01、0.03、0.1、または0.3 mg/kgのLNP09-18534、LNP-11-18534、またはPBSを静脈内に投与した。48時間後、動物は、安楽死させ、肝臓を採集した。TTRおよびGAPDHのmRNAレベルを、Quantigene bDNAアッセイを使用して、肝臓生検の溶解物から測定した。TTRのmRNAレベルとGAPDHのmRNAレベルとの比が、各動物について算出された。群平均が決定され、PBS対照群に対して正規化され、次いで、プロットされた。エラーバーは標準偏差を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0025】

本発明は、dsRNA、およびdsRNAがTTR遺伝子を標的とする、細胞または哺乳動物における、TTR遺伝子の発現を阻害するためのdsRNAを使用する方法を提供する。本発明はまた、TTR遺伝子の発現によって引き起こされる、哺乳動物における、TTRアミロイドーシス等の病態および疾患を治療するための、組成物および方法も提供する。dsRNAは、RNA干渉(RNAi)として知られる過程を通じてmRNAの配列に特異的な分解を導く。

20

【0026】

本明細書で取り上げられる組成物のdsRNAは、30ヌクレオチド長未満、一般に、19~24ヌクレオチド長である、領域を有するRNA鎖(アンチセンス鎖)を含み、TTR遺伝子のmRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である。これらのdsRNAの使用は、哺乳動物における、TTRの発現に関連する病理学に関係している遺伝子のmRNAの標的化分解を可能にする。特に、TTRのdsRNAの非常に低い投薬量は、特異的かつ効率的にRNAiを媒介することができ、TTR遺伝子の発現の著しい阻害をもたらす。細胞に基づくアッセイを用いて、本発明者は、TTRを標的とするdsRNAが、RNAiを特異的かつ効率的に媒介することができ、TTR遺伝子の発現の著しい阻害をもたらす事を実証した。したがって、これらのdsRNAを含む方法および組成物は、肝臓疾患またはTTRアミロイドーシス、例えば、FAPの治療において等、TTRを下方調節することによって媒介され得る病理過程を治療するのに有用である。

30

【0027】

TTRのdsRNAを含有する方法および組成物は、TTRアミロイドーシス等のTTRの発現によって媒介される病理過程を治療するのに有用である。1つの実施形態において、TTRの発現によって媒介される障害を治療する方法には、TTRを標的とした、治療上有効な量のdsRNAを、かかる処置を必要とするヒトに投与することが含まれる。1つの実施形態において、dsRNAは、約0.01、0.1、0.5、1.0、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25 mg/kgで、ヒトに投与される。

40

【0028】

以下の詳細な説明は、TTR遺伝子の発現を阻害するための、dsRNAを含有する組成物の作製方法および使用方法、ならびにこの遺伝子の発現によって引き起こされる疾患および障害を治療するための、組成物および方法を開示する。本発明で取り上げられる医薬組成物は、薬剤として許容される担体と共に、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24ヌクレオチド長であり、TTR遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を含むアンチセンス鎖を有するdsRNAを含む。また、本発

50

明で取り上げられる医薬組成物は、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24ヌクレオチド長であり、TTR遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に実質的に相補的である、相補性の領域を有するアンチセンス鎖を有するdsRNAも含む。

【0029】

dsRNAのセンス鎖は、配列番号169、配列番号449、配列番号729、または配列番号1009の15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含むことができる。dsRNAのアンチセンス鎖は、配列番号170、配列番号450、配列番号730、または配列番号1010の15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含むことができる。1つの実施形態において、dsRNAのセンス鎖は、配列番号449またはそのフラグメントからなり得、該アンチセンス鎖は、配列番号450またはそのフラグメントからなり得る。1つの実施形態において、dsRNAのセンス鎖は、配列番号729またはそのフラグメントからなり得、該アンチセンス鎖は、配列番号730またはそのフラグメントからなり得る。1つの実施形態において、dsRNAのセンス鎖は、配列番号1009またはそのフラグメントからなり得、該アンチセンス鎖は、配列番号1010またはそのフラグメントからなり得る。

10

【0030】

1つの実施形態において、dsRNAは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の修飾ヌクレオチドを含むことができる。1つの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、および/またはコレステリル誘導体基またはドデカン酸ビスデシルアミド基に結合される末端ヌクレオチドを含むことができる。1つの実施形態において、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-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、ロックされたヌクレオチド、脱塩基ヌクレオチド、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、ホスホルアミデート、および/またはヌクレオチドを有する非天然塩基を含むことができる。

20

【0031】

1つの実施形態において、dsRNAの該相補性の領域は、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上のヌクレオチド長である。1つの実施形態において、該相補性の領域は、配列番号169の10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドを含む。

30

【0032】

1つの実施形態において、dsRNAのそれぞれの鎖は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、またはそれ以上のヌクレオチド長である。1つの実施形態において、該dsRNAは、表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択される、センス鎖、または10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは21個のそのヌクレオチドフラグメント、ならびに表3A、3B、4、6A、6B、7、および16から選択される、アンチセンス鎖、または10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくは21個のそのヌクレオチドフラグメントを含む。

40

【0033】

1つの実施形態において、細胞へのdsRNAの投与は、リアルタイムPCRアッセイによって測定して、TTRのmRNA発現の約40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞へのdsRNAの投与は、リアルタイムPCRアッセイによって測定して、TTRのmRNA発現の約40%~45%、45%~50%、50%~55%、55%~60%、60%~65%、65%~70%、70%~75%、75%~80%、80%~85%、85%~90%、90%~95%、もしくはそれ以上の阻害

50

をもたらす。1つの実施形態において、細胞への dsRNA の投与は、分岐 DNA アッセイによって測定して、TTR の mRNA 発現の約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。1つの実施形態において、細胞への dsRNA の投与は、分岐 DNA アッセイによって測定して、TTR の mRNA 発現の約 40% ~ 45%、45% ~ 50%、50% ~ 55%、55% ~ 60%、60% ~ 65%、65% ~ 70%、70% ~ 75%、75% ~ 80%、80% ~ 85%、85% ~ 90%、90% ~ 95%、もしくはそれ以上の阻害をもたらす。

【0034】

1つの実施形態において、dsRNA は、0.01 pM、0.1 pM、1 pM、5 pM、10 pM、100 pM、または 1000 pM 未満の IC50 を有する。1つの実施形態において、dsRNA は、約 0.01、0.1、1、5、または 10 mg/kg の ED50 を有する。

10

【0035】

1つの実施形態において、dsRNA の投与は、カニクイザルにおける、TTR の mRNA を約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、またはそれ以上低下させることができる。1つの実施形態において、dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベルを、約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上、または血清 TTR のタンパク質レベルを、約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNA の投与は、肝臓 TTR の mRNA レベル、および/または血清 TTR のタンパク質レベルを最長 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 日、もしくはそれ以上の日数、低下させる。

20

【0036】

1つの実施形態において、dsRNA は、LNP 製剤に製剤化され、PBC 対照群と比較して、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、もしくは 1 mg/kg の用量で、TTR の mRNA レベルを、約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNA は、LNP 製剤に製剤化され、ウエスタンブロットによって測定して、PBC 対照群と比較して、TTR のタンパク質レベルを、約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、もしくはそれ以上低下させる。1つの実施形態において、dsRNA は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 mg/kg で、それを必要とする対象に投与する時、処置してから最長 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、もしくは 25 日目まで、血清 TTR のタンパク質レベルを抑制する。

30

【0037】

したがって、幾つかの態様において、TTR の dsRNA および薬剤として許容される担体を含む医薬組成物、TTR 遺伝子の発現を阻害するために組成物を使用する方法、および TTR 遺伝子の発現によって引き起こされる疾患を治療するために医薬組成物を使用する方法が、本発明で取り上げられる。

40

【0038】

I. 定義

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される、特定の用語および語句の意味を以下に提供する。本明細書の他の部分の用語の用法と、本項で提供されるその定義との間に明らかな相違がある場合、本項の定義が優先される。

【0039】

50

「G」、「C」、「A」、および「U」のそれぞれは、一般に、塩基としてそれぞれグアニン、シトシン、アデニン、およびウラシルを含有するヌクレオチドを表す。「T」および「dT」は、本明細書で交換可能に使用され、核酸塩基がチミン、例えば、デオキシリボチミン (deoxyribothymine) 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」または「ヌクレオチド」または「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、以下でさらに詳述する修飾ヌクレオチド、または代替の置換部分も指すことができ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、およびウラシルが、かかる置換部分を担持するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対形成性を実質的に変化させることなく、他の部分によって置換可能であることを十分認識している。例えば、限定されないが、その塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン、またはウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対を形成することができる。したがって、ウラシル、グアニン、またはアデニンを含有するヌクレオチドは、本発明のヌクレオチド配列において、例えば、イノシンを含有するヌクレオチドと置換され得る。かかる置換部分を含む配列は、本発明の実施形態である。

10

20

30

40

50

【0040】

本明細書で使用される、「トランスチレチン」(「TTR」)とは、細胞内の遺伝子を指す。TTRはまた、ATTR、HsT2651、PALB、プレアルブミン、TBPA、およびトランスチレチン(プレアルブミン、アミロイドーシスI型)としても知られている。ヒトTTRのmRNA転写物の配列は、NM_000371で見出され得る。マウスTTRのmRNAの配列は、NM_013697.2で見出され得る。ラットTTRのmRNAの配列は、NM_012681.1で見出され得る。

【0041】

本明細書で使用される、「標的配列」は、一次転写産物のRNAプロセシングの産物であるmRNAを含む、TTR遺伝子の転写の間に形成される、mRNA分子のヌクレオチド配列の連続する部分を指す。

【0042】

本明細書で使用される、「配列を含む鎖」という用語は、標準的なヌクレオチド命名法を使用して言及される配列によって説明される、ヌクレオチド鎖を含む、オリゴヌクレオチドを指す。

【0043】

本明細書で使用される場合、別途記載のない限り、第2のヌクレオチド配列に関連して第1のヌクレオチド配列を説明するために使用される時の「相補的」という用語は、当業者には理解されるように、特定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドとハイブリダイズして二本鎖構造を形成する、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの能力を指す。かかる条件は、例えば、ストリンジェントな条件であり得、ストリンジェントな条件は、40 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、12~16時間50もしくは70、その後の洗浄を含み得る。生物内で遭遇され得る、生理的に適切な条件等の他の条件を適用することができる。当業者は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの最終的な用途に応じて、2つの配列の相補性の試験に最も適切な、一連の条件を決定することができよう。

【0044】

これには、第1および第2のヌクレオチド配列の全長にわたる、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドに対する、第1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドの塩基対形成が含まれる。かかる配列は、本明細書において、互いに対して「完全に相補的」と呼ぶことができる。しかし、本明細書において、第1の配列が第2の配列に対して「実質的に相補的」とであると言われる場合、2つの配列は完全に相補的であり得るか、あるいはそれらの最終的な用途に最も適した条件下でハイブリダイズする能力を保持しながら、ハイブリダイズ時に、1個以上であるが、一般に4、3、または2個を超えないミスマッチ塩基対を形成してもよい。

しかし、2つのオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイズ時に1つ以上の単鎖のオーバーハングを形成するように設計される場合、かかるオーバーハングは、相補性の決定に関してミスマッチとは見なされないものとする。例えば、21ヌクレオチド長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を含むdsRNAであって、より長いオリゴヌクレオチドが、より短いオリゴヌクレオチドに完全に相補的である21ヌクレオチドの配列を含むdsRNAは、本明細書に記載の目的上、やはり「完全に相補的」として言及され得る。

【0045】

また、本明細書で使用される、「相補的」な配列は、それらのハイブリダイズ能に関する上記の要件が満たされる限り、非ワトソクリック塩基対、および/または非天然および修飾ヌクレオチドから形成される塩基対を含み得るか、または完全にそれらから形成され得る。かかる非ワトソクリック塩基対には、G-Uゆらぎまたはフーグスティーン型塩基対が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0046】

本明細書における「相補的」、「完全に相補的」、および「実質的に相補的」という用語は、これらが使用される文脈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、またはdsRNAのアンチセンス鎖と標的配列との間の塩基一致に対して使用され得る。

【0047】

本明細書で使用される、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」である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)、または3'UTRを含む、対象となるmRNA(例えば、TTRをコードするmRNA)の連続する部分に実質的に相補的である、ポリヌクレオチドを指す。例えば、ポリヌクレオチドは、配列が、TTRをコードするmRNAの中断されていない部分に実質的に相補的である場合、TTRのmRNAの少なくとも一部に相補的である。

20

【0048】

本明細書で使用される、「二本鎖RNA」または「dsRNA」という用語は、逆平行で、上で定義されるように実質的に相補的である、2本の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。一般に、各鎖のヌクレオチドの大半はリボヌクレオチドであるが、本明細書で詳細に説明されるように、それぞれもしくは両方の鎖は、少なくとも1個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および/または修飾ヌクレオチドも含み得る。加えて、本明細書で使用される「dsRNA」は、複数のヌクレオチドでの大幅な修飾を含み、本明細書で開示されるか、または当該技術分野において既知であるあらゆる種類の修飾を含む、リボヌクレオチドへの化学修飾を含み得る。siRNA型分子内で使用される、このようないずれの修飾も、本明細書および特許請求の範囲の目的上、「dsRNA」によって包含される。

30

【0049】

二本鎖構造を形成する2本の鎖は、より長い1つのRNA分子の異なる部分であってもよく、あるいはそれらは別個のRNA分子であってもよい。2本の鎖がより長い1つの分子の一部であり、したがって二本鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の中断されていないヌクレオチド鎖によって接続される場合、接続するRNA鎖は、「ヘアピンループ」と称される。2本の鎖が、二本鎖構造を形成する1本の鎖の3'末端とそれぞれのもう一方の鎖の5'末端との間の、中断されていないヌクレオチド鎖以外の手段によって共有結合的に接続される場合、該接続構造は、「リンカー」と称される。該RNA鎖は、同一また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、二本鎖内に存在するいずれかのオーバーハングを差し引いた、dsRNAの最も短い鎖内のヌクレオチド数である。二本鎖構造に加えて、dsRNAは、1つ以上のヌクレオチドオーバーハングを含み得る。また、「siRNA」という用語は、上に記載の通り、dsRNAを指すように本明細書に使用される。

40

【0050】

50

本明細書で使用される、「ヌクレオチドオーバーハング」とは、不對ヌクレオチド、または dsRNA の 1 本の鎖の 3' 末端がもう一方の鎖の 5' 末端を越えて延びるか、またはその逆である時に、dsRNA の二本鎖構造から突出するヌクレオチドを指す。「平滑」または「平滑末端」は、dsRNA のその末端に不對ヌクレオチドがない、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングがないことを意味する。「平滑末端の」dsRNA は、その長さ全体にわたって二本鎖である dsRNA であり、すなわち、該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ない。

【0051】

「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である領域を含む、dsRNA の鎖を指す。本明細書で使用される、「相補性の領域」という用語は、配列、例えば本明細書において定義される標的配列に実質的に相補的である、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相補的ではない場合、該ミスマッチは、該末端領域内に最も許容され、存在する場合、一般に、終端領域内、例えば、5' および / または 3' 終端の 6、5、4、3、もしくは 2 ヌクレオチド内にある。

10

【0052】

本明細書で使用される、「センス鎖」という用語は、アンチセンス鎖の領域に実質的に相補的である領域を含む、dsRNA の鎖を指す。

【0053】

本明細書で使用される、「SNALP」という用語は、安定な核酸脂質粒子を指す。SNALP は、dsRNA、または dsRNA が転写されるプラスミド等の核酸を含む、少量の水性内部をコーティングする、脂質の小胞を表す。SNALP は、例えば、米国特許出願公開第 20060240093 号、第 20070135372 号、および 2008 年 4 月 15 日に出願の第 US 2008/0104522 号に説明されている。これらの出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0054】

dsRNA について言及する際、「細胞への導入」とは、当業者には理解されるように、細胞への取り込みまたは吸収を促進することを意味する。dsRNA の吸収または取り込みは、支援を伴わない拡散過程もしくは細胞の能動的過程を通じて、または補助的な薬剤もしくは装置によって発生し得る。この用語の意味は、インビトロでの細胞に限定されず、dsRNA は、生命体の一部である「細胞に導入」することもできる。そのような場合、細胞への導入は、該生物への送達を含む。例えば、インビボ送達については、dsRNA を組織部位に注射するか、または全身投与することができる。細胞へのインビトロでの導入には、電気穿孔法およびリポフェクション法等の当該技術分野において既知の方法が含まれる。さらなるアプローチは、本明細書に説明されているか、または当該技術分野において既知である。

30

【0055】

「発現停止させる」、「~の発現を阻害する」、「~の発現を下方制御する」、および「~の発現を抑制する」等の用語は、それらが TTR 遺伝子について言及する限り、本明細書において、第 1 の細胞もしくは細胞群と実質的に同一であるが、そのように処置されていない第 2 の細胞もしくは細胞群（対照細胞）と比較して、TTR 遺伝子が転写され、TTR 遺伝子の発現が阻害されるように処置された第 1 の細胞もしくは細胞群から単離され得る、および / または検出され得る、mRNA の量の低下によって現れる、TTR 遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制を指す。阻害の程度は、通常、以下で表される。

40

【数 1】

$$\frac{(\text{対照細胞中の mRNA}) - (\text{処理細胞中の mRNA})}{(\text{対照細胞中の mRNA})} \cdot 100\%$$

【0056】

代替として、阻害の程度は、TTR 遺伝子の発現に機能的に結び付けられるパラメータ

50

、例えば細胞によって分泌される T T R 遺伝子によってコードされるタンパク質の量、または特定の表現型、例えばアポトーシスを提示する細胞の数の低下に関して出されてもよい。原則的に、T T R 遺伝子の発現停止は、構成的に、またはゲノム工学によってのいずれか、ならびに任意の適切なアッセイによって、該標的を発現する任意の細胞において決定することができる。しかし、ある d s R N A が特定の程度、T T R 遺伝子の発現を阻害し、したがって本発明に包含されるかどうかを決定するために参照が必要とされる場合、以下の実施例で提供されるアッセイが、かかる参照の役割を果たす。

【0057】

例えば、特定の場合において、T T R 遺伝子の発現は、本発明で取り上げられる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 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、または 50 % 抑制される。幾つかの実施形態において、T T R 遺伝子は、本発明で取り上げられる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 60 %、70 %、または 80 % 抑制される。幾つかの実施形態において、T T R 遺伝子は、本発明で取り上げられる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 %、または 95 % 抑制される。

10

【0058】

T T R の発現の文脈において本明細書で使用される、「治療する」、「治療」等の用語は、T T R の発現によって媒介される病理過程の軽減または緩和を指す。本発明の文脈において、本明細書で以下に列挙される他の病態のうちのいずれかに関連する限り (T T R の発現によって媒介される病理過程以外)、「治療する」、「治療」等の用語は、かかる病態に関連する少なくとも 1 つの症状の軽減もしくは緩和、または F A P 等の T T R アミロイドーシスの進行の遅延等の、かかる病態の進行の遅延もしくは逆行を意味する。T T R アミロイドーシスの症状には、神経障害 (例えば、知覚障害、遠位部の感覚鈍麻)、自律性神経障害 (例えば、胃潰瘍または起立性低血圧症等の胃腸障害)、運動神経障害、発作、認知症、ミエロパシー、多発性神経障害、手根管症候群、自律神経不全症、心筋症、硝子体混濁、腎不全、腎症、実質的に減少した m B M I (修正ボディー・マス・インデックス)、脳神経障害、および角膜格子状変性が含まれる。

20

【0059】

本明細書で使用される、「治療上有効な量」および「予防上有効な量」という句は、T T R の発現によって媒介される病理過程の処置、阻止、もしくは管理、または T T R の発現によって媒介される病理過程の明らかな症状において、治療的有用性を提供する量を指す。治療上有効である具体的な量は、普通の開業医が容易に決定することができ、例えば、T T R の発現によって媒介される病理過程の種類、患者の病歴および年齢、T T R の発現によって媒介される病理過程のステージ、ならびに他の T T R の発現によって媒介される病理過程に抗する薬剤の投与等の、当該技術分野において既知の因子に依存して異なり得る。

30

【0060】

本明細書で使用される、「医薬組成物」は、薬理学上有効な量の d s R N A と、薬剤として許容される担体とを含む。本明細書で使用される、「薬理学上有効な量」、「治療上有効な量」、または単に「有効量」は、目的とする薬理学的、治療的、または阻止的結果を産生するのに効果的な R N A の量を指す。例えば、ある臨床的治療が、疾患または障害に関連する測定可能なパラメータにおいて、少なくとも 25 % の低下がある時に有効であると見なされる場合、該疾患または障害を治療するための薬物の治療上有効な量は、該パラメータにおける少なくとも 25 % の低下をもたらすために必要な量である。例えば、T T R を標的とする d s R N A の治療上有効な量は、T T R の血清レベルを少なくとも 25 % 低下させることができる。別の例において、T T R を標的とする d s R N A の治療上有効な量は、肝機能または腎機能を少なくとも 25 % 向上させることができる。

40

【0061】

「薬剤として許容される担体」という用語は、治療薬を投与するための担体を指す。かかる担体には、食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、水、グリセロール、エタノール、および

50

これらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。該用語は、明確に、細胞培養基を除く。経口投与される薬物について、薬剤として許容される担体には、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、甘味剤、香味剤、着色剤、および防腐剤等の薬剤として許容される賦形剤が含まれるが、これらに限定されない。好適な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムおよびカルシウム、リン酸ナトリウムおよびカルシウム、ならびにラクトースが含まれ、コーンスターチおよびアルギン酸が好適な崩壊剤である。結合剤にはデンプンおよびゼラチンを含むことができ、一方滑沢剤が存在する場合は、概してステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクであろう。所望の場合、錠剤をモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の材料でコーティングして、消化管内での吸収を遅らせることができる。

10

【0062】

本明細書で使用される、「形質転換細胞」は、ベクターが導入されて、そこから dsRNA 分子を発現することができる細胞である。

【0063】

II. 二本鎖リボ核酸 (dsRNA)

本明細書でより詳細に記載されるように、本発明は、細胞または哺乳動物内、例えば、アミロイドーシスに罹患しているヒトの TTR 遺伝子の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸 (dsRNA) 分子を提供し、該 dsRNA は、TTR 遺伝子の発現において形成される mRNA の少なくとも一部に相補的である相補性の領域を有する、アンチセンス鎖を含み、該相補性の領域は、30ヌクレオチド長未満、一般に19~24ヌクレオチド長であり、該 dsRNA は、該 TTR 遺伝子を発現する細胞と接触すると、例えば、PCR または分枝 DNA (bDNA) ベースの方法によって、またはウエスタンブロット等によるタンパク質ベースの方法によってアッセイして、該 TTR 遺伝子の発現を少なくとも30%阻害する。TTR 遺伝子の発現は、以下の実施例で説明されるようにアッセイによって測定して、少なくとも30%軽減され得る。例えば、Hep3B細胞等の細胞培養内の TTR 遺伝子の発現は、bDNA または TaqMan アッセイ等による TTR の mRNA レベルを測定することによって、または ELISA アッセイ等によるタンパク質レベルを測定することによってアッセイされる等により、アッセイされ得る。本発明の dsRNA は、1本以上の単鎖のヌクレオチドのオーバーハングをさらに含み得る。

20

【0064】

該 dsRNA は、以下でさらに説明されるように、当該技術分野において既知の標準的な方法、例えば、Biosearch, Applied Biosystems, Inc. から市販されるもの等の自動 DNA 合成装置の使用によって、合成することができる。該 dsRNA は、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成するのに十分相補的である、2本の RNA 鎖を含む。該 dsRNA の1本の鎖 (アンチセンス鎖) は、TTR 遺伝子の発現の間に形成された mRNA の配列から派生した標的配列に実質的に相補的であり、一般に完全に相補的である、相補性の領域を含み、もう一方の鎖 (センス鎖) は、アンチセンス鎖に相補的である領域を含み、その結果、2本の鎖は、好適な条件下で組み合わせられると、ハイブリダイズして二本鎖構造を形成する。一般に、二本鎖構造は、15~30、または25~30、または18~25、または19~24、または19~21、または19、20もしくは21塩基対長である。一実施形態において、二本鎖は19塩基対長である。別の実施形態において、二本鎖は21塩基対長である。2本の異なる siRNA を組み合わせて使用する場合、二本鎖の長さは同一であってもよく、または異なってもよい。

30

40

【0065】

本発明の dsRNA のそれぞれの鎖は、一般に15~30、または18~25、または18、19、20、21、22、23、24、もしくは25ヌクレオチド長である。他の実施形態において、それぞれの鎖は25~30ヌクレオチド長である。二本鎖のそれぞれの鎖は、同一長さであってもよく、または異なる長さであってもよい。2本の異なる siRNA を組み合わせて使用する場合、各 siRNA のそれぞれの鎖の長さは、同一であってもよく、または異なってもよい。

50

【0066】

本発明の dsRNA は、1 個以上のヌクレオチドの 1 つ以上の単鎖のオーバーハングを含むことができる。一実施形態において、該 dsRNA の少なくとも一端は、1 ~ 4、一般には 1 または 2 個のヌクレオチドの、単鎖のヌクレオチドオーバーハングを有する。別の実施形態において、該 dsRNA のアンチセンス鎖は、センス鎖の 3' 末端および 5' 末端のそれぞれに、1 ~ 10 個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。さらなる実施形態において、該 dsRNA のセンス鎖は、アンチセンス鎖の 3' 末端および 5' 末端のそれぞれに、1 ~ 10 個のヌクレオチドのオーバーハングを有する。

【0067】

少なくとも 1 つのヌクレオチドオーバーハングを有する dsRNA は、平滑末端の対応物より予想外に優れた阻害特性を有し得る。幾つかの実施形態において、1 つのみのヌクレオチドオーバーハングの存在により、その全体的な安定性に影響を及ぼすことなく、dsRNA の干渉活性が強化される。1 つのみのオーバーハングを有する dsRNA は、インビボ、ならびに種々の細胞、細胞培養基、血液、および血清内で特に安定および効果的であることが判明している。一般に、単鎖のオーバーハングは、アンチセンス鎖の 3' 終端、または代替として、センス鎖の 3' 終端に位置する。該 dsRNA は、一般にアンチセンス鎖の 5' 末端に位置する、平滑末端も有し得る。かかる dsRNA は改善された安定性および阻害活性を有し得、したがって、低投薬量、すなわち、1 日当たり受容者の体重 1 kg につき 5 mg 未満の投与を可能にする。一般に、該 dsRNA 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。別の実施形態において、オーバーハング内のヌクレオチドのうち 1 つ以上が、ヌクレオシドチオリン酸と置換される。

【0068】

一実施形態において、TTR 遺伝子はヒト TTR 遺伝子である。特定の実施形態において、該 dsRNA のセンス鎖は、表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 からのセンス配列のうち 1 つであり、該アンチセンス鎖は、表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 からのセンス配列のうち 1 つである。表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 に提供される標的配列のいずれかの箇所を標的とする代替のアンチセンス剤を、標的配列および隣接する TTR 配列を使用して、容易に決定することができる。

【0069】

当業者は、20 ~ 23 だが、特に 21 個の塩基対の二本鎖構造を有する dsRNA が、RNA 干渉の誘発に特に効果的であるとして称賛を得ていることをよく認識している (Elbashir et al., EMBO 2001, 20: 6877 - 6888)。しかし、他の者は、より短いもしくはより長い dsRNA が、同様に効果的であり得ることを見出している。上記の実施形態において、表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 に提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質のために、本発明で取り上げられる dsRNA は、本明細書に記載の長さの少なくとも 1 本の鎖を含むことができる。一端または両端のわずかな数のヌクレオチドを差し引いた、表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 の配列のうち 1 つを有するより短い dsRNA が、上記の dsRNA と比較して、同様に効果的であり得ることは、妥当に予想され得る。したがって、表 3、4、6、または 7 の配列のうち 1 つからの、少なくとも 15、16、17、18、19、20 個、またはそれ以上の連続するヌクレオチドの部分的配列を有する dsRNA は、本明細書で以下に記載されるアッセイにおいて、TTR 遺伝子の発現を阻害するそれらの能力が、完全な配列を含む dsRNA と阻害の 5、10、15、20、25、もしくは 30% 以下の異なる dsRNA が、本発明によって企図される。さらに、所望の TTR 標的配列内で切断する dsRNA を、対応する TTR アンチセンス配列および相補的なセンス配列を用いて容易に作製することができる。

【0070】

加えて、表 3A、3B、4、6A、6B、または 7 に提供される dsRNA は、RNAi に基づく切断の影響を受けやすい、TTR 内の部位を特定する。したがって、本発明は

10

20

30

40

50

、本発明の薬剤のうちの1つによって標的とされる配列内を標的とする、dsRNAをさらに特徴とする。本明細書で使用される、第2のdsRNAは、第2のdsRNAが、第1のdsRNAのアンチセンス鎖に相補的であるmRNA内のいずれかの箇所でメッセージを切断する場合、第1のdsRNAの配列内を標的と言われる。かかる第2のdsRNAは、一般に、TTR遺伝子内の選択した配列に隣接する領域から取られたさらなるヌクレオチド配列に連結される、表3A、3B、4、6A、6B、または7に提供される配列のうちの1つからの少なくとも15個の連続するヌクレオチドからなる。

【0071】

本発明で取り上げられるdsRNAは、標的配列との1つ以上のミスマッチを含有してもよい。一実施形態において、本発明で取り上げられるdsRNAは、3つ以下のミスマッチを含有する。dsRNAのアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチの範囲が、相補性の領域の中心に位置しないことが好ましい。該dsRNAのアンチセンス鎖が標的配列とのミスマッチを含有する場合、ミスマッチは、いずれかの末端から5ヌクレオチド、例えば、相補性の領域の5'もしくは3'末端のいずれかから5、4、3、2、もしくは1ヌクレオチドに制限されることが好ましい。例えば、TTR遺伝子の領域に相補的である23ヌクレオチドのdsRNA鎖について、該dsRNAは、一般には、中央の13個のヌクレオチド内にはいかなるミスマッチも含有しない。本発明内で記載される方法を使用して、標的配列とのミスマッチを含有するdsRNAが、TTR遺伝子の発現の阻害に効果的であるかどうかを判定することができる。TTR遺伝子の発現の阻害における、ミスマッチを有するdsRNAの有効性を考慮することは、特にTTR遺伝子内の特定の相補性の領域が、集団内に多型の配列多様性を有することが既知である場合、重要である。

10

20

【0072】

修飾

また別の実施形態において、該dsRNAは、安定性を亢進させるために化学修飾される。本発明で取り上げられる核酸は、「Current protocols in nucleic acid chemistry」、Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USAに記載されるもの等の、当該技術分野において十分確立された方法によって、合成および/または修飾することができ、該文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明において有用であるdsRNA化合物の具体例には、修飾された骨格を含むか、または天然のヌクレオシド間結合を含まないdsRNAが含まれる。本明細書で定義されるように、修飾された骨格を有するdsRNAには、該骨格にリン原子を保持するもの、および該骨格にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書の目的上、また当該技術分野において時折言及されるように、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を有しない修飾されたdsRNAも、オリゴヌクレオシドであると見なすことができる。

30

40

【0073】

修飾されたdsRNA骨格には、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、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、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、ならびに正常な3'-5'結合を有するボラノホスフェート、2'-5'結合したこれらの類似体、そしてヌクレオシド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'へ、または2'-5'から5'-2'へ結合する、逆向きの極性を有するものが含まれる。また、種々の塩、混合塩、および遊離酸形態も含まれる。

【0074】

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には、米国特許第3,687,808号、第4,469,863号、第4,476,301号、第5,023,243号

50

、第5, 177, 195号、第5, 188, 897号、第5, 264, 423号、第5, 276, 019号、第5, 278, 302号、第5, 286, 717号、第5, 321, 131号、第5, 399, 676号、第5, 405, 939号、第5, 453, 496号、第5, 455, 233号、第5, 466, 677号、第5, 476, 925号、第5, 519, 126号、第5, 536, 821号、第5, 541, 316号、第5, 550, 111号、第5, 563, 253号、第5, 571, 799号、第5, 587, 361号、および第5, 625, 050号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0075】

その中にリン原子を含まない、修飾された dsRNA 骨格は、単鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合されたヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1個以上の単鎖ヘテロ原子も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。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成された）、シロキサン骨格、硫化物、スルホキシド、およびスルホン骨格、ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファミン酸骨格、メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格、スルホネートおよびスルホンアミド骨格、アミド骨格、ならびにN、O、S、およびCH₂を混合した構成成分を有する他のもの、を有するものが含まれる。

【0076】

上記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には、米国特許第5, 034, 506号、第5, 166, 315号、第5, 185, 444号、第5, 214, 134号、第5, 216, 141号、第5, 235, 033号、第5, 64, 562号、第5, 264, 564号、第5, 405, 938号、第5, 434, 257号、第5, 466, 677号、第5, 470, 967号、第5, 489, 677号、第5, 541, 307号、第5, 561, 225号、第5, 596, 086号、第5, 602, 240号、第5, 608, 046号、第5, 610, 289号、第5, 618, 704号、第5, 623, 070号、第5, 663, 312号、第5, 633, 360号、第5, 677, 437号、および第5, 677, 439号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0077】

他の好適な dsRNA 模倣体において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合の両方、すなわち、骨格が、新規の基で置換される。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とハイブリダイズするために維持される。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そのようなオリゴマー化合物の1つである dsRNA 模倣体は、ペプチド核酸 (PNA) と称される。PNA 化合物では、dsRNA 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、該骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接また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には、米国特許第5, 539, 082号、第5, 714, 331号、および第5, 719, 262号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。PNA 化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

【0078】

本発明の他の実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有する dsRNA、およびヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシドであり、特に上述の米国特許第5, 489, 677号の - - CH₂ - - NH - - CH₂ - - 、 - - CH₂ - - N(CH₃) - - O - - CH₂ - - [メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として知られる]、 - - CH₂ - - O - - N(CH₃) - - CH₂ - - 、 - - CH₂ - - N(CH₃) - - N(CH₃) - - CH₂ - - 、および - - N(CH₃) - - CH₂ - - CH₂ - - [式中、天然のホスホジエ

10

20

30

40

50

ステル骨格は、 $-O-P-O-CH_2-$ として表される]、および上述の米国特許第5,602,240号のアミド骨格である。

【0079】

また、修飾された dsRNA は、1つ以上の置換糖部分も含有することができる。好ましい dsRNA は、2' 位に、OH; F; O-, S-, もしくは N-アルキル; O-, S-, もしくは N-アルケニル; O-, S-, もしくは N-アルキニル; または O-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含み、ここで、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換もしくは非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキルまたは $C_2 \sim C_{10}$ アルケニルおよびアルキニルであり得る。O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、および O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂ が特に好ましく、式中、n および m は 1 ~ 約 10 である。他の好ましい dsRNA は、2' 位に、 $C_1 \sim C_{10}$ 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、もしくは 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、介入物、dsRNA の薬物動態特性を改善するための基、または dsRNA の薬力学的特性を改善するための基、ならびに類似した特性を有する他の置換基のうちの1つを含む。好ましい修飾には、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃ であって、2'-O-(2-メトキシエチル)または 2'-MOE としても知られる)(Martinet al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) すなわち、アルコキシ-アルコキシ基が含まれる。好ましいさらなる修飾には、本明細書において以下の実施例に記載される、2'-DMAOE としても知られる、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、O(CH₂)₂ON(CH₃)₂ 基、ならびに、同様に、本明細書において以下の実施例に記載される、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野で 2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルもしくは 2'-DMAEOE としても知られる)、すなわち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂ が含まれる。

10

20

【0080】

他の好ましい修飾には、2'-メトキシ(2'-OCH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、および 2'-フルオロ(2'-F)が含まれる。同様の修飾を、dsRNA の他の位置、特に 3' 末端ヌクレオチドもしくは 2'-5' 結合 dsRNA 内の糖の 3' 位、および 5' 末端ヌクレオチドの 5' 位で作製することもできる。また、dsRNA は、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分等の糖模倣体を有してもよい。かかる修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第4,981,957号、第5,118,800号、第5,319,080号、第5,359,044号、第5,393,878号、第5,446,137号、第5,466,786号、第5,514,785号、第5,519,134号、第5,567,811号、第5,576,427号、第5,591,722号、第5,597,909号、第5,610,300号、第5,627,053号、第5,639,873号、第5,646,265号、第5,658,873号、第5,670,633号、および第5,700,920号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許のうちのあるものは本出願によって共同所有され、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0081】

dsRNA は、核酸塩基(当該技術分野ではしばしば単に「塩基」と称される)修飾または置換をも含み得る。本明細書で使用される、「非修飾」もしくは「天然」の核酸塩基には、プリン塩基、アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基、チミン(T)、シトシン(C)、およびウラシル(U)が含まれる。修飾された核酸塩基には、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、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他

50

のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2 - プロピルおよび他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミンおよび2 - チオシトシン、5 - ハロウラシルおよびシトシン、5 - プロピニルウラシルおよびシトシン、6 - アゾのウラシル、シトシンおよびチミン、5 - ウラシル(シュドウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシルおよび他の8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ、特に5 - プロモ、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン、8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニン、ならびに3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニン等の、他の合成および天然の核酸塩基が含まれる。さらなる核酸塩基には、米国特許第3,687,808号で開示されるもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858 - 859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990で開示されるもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613で開示されるもの、およびSanghvi, Y. S., Chapter 15, DsRNA Research and Applications, pages 289 - 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993で開示されるものが含まれる。これらの核酸塩基のうち特定のものは、本発明で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ために、特に有用である。これらには、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル、および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、ならびにN - 2、N - 6、およびO - 6置換プリンが含まれる。5 - メチルシトシン置換は、核酸二本鎖の安定性を0.6 ~ 1.2 増加させることが示されていて(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、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせられると、さらに特に好ましい。

【0082】

上記の修飾された核酸塩基の特定のもの、ならびに他の修飾された核酸塩基の調製を教示する代表的な米国特許には、上記の米国特許第3,687,808号、ならびに米国特許第4,845,205号、第5,130,30号、第5,134,066号、第5,175,273号、第5,367,066号、第5,432,272号、第5,457,187号、第5,459,255号、第5,484,908号、第5,502,177号、第5,525,711号、第5,552,540号、第5,587,469号、第5,594,121号、第5,596,091号、第5,614,617号、および第5,681,941号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれ、米国特許第5,750,692号も、参照により本明細書に組み込まれる。

【0083】

共役体

本発明のdsRNAの別の修飾は、該dsRNAの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させる、1つ以上の部分または共役体の該dsRNAへの化学的結合を伴う。かかる部分には、コレステロール部分(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553 - 6556)、コール酸(Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053 - 1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシル - S - トリチルチオール(Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306 - 309、Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765 - 2770)、チオコレステロール(O

berhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10, 1111-1118、Kabanov et al., *FEB S Lett.*, 1990, 259, 327-330、Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-Hホスホネート (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654、Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミンもしくは
 10 はポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分 (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937)等の脂質部分が含まれるが、これらに限定されない。

【0084】

かかる dsRNA 共役体の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第 4,828,979号、第 4,948,882号、第 5,218,105号、第 5,525,465号、第 5,541,313号、第 5,545,730号、第 5,552,538号、第 5,578,717号、第 5,580,731号、第 5,591,584号、第 5,109,124号、第 5,118,802号、第 5,138,045号、第 5,414,077号、第 5,486,603号、第 5,512,439号、第 5,578,718号、第 5,608,046号、第 4,587,044号、第 4,605,735号、第 4,667,025号、第 4,762,779号、第 4,789,737号、第 4,824,941号、第 4,835,263号、第 4,876,335号、第 4,904,582号、第 4,958,013号、第 5,082,830号、第 5,112,963号、第 5,214,136号、第 5,082,830号、第 5,112,963号、第 5,214,136号、第 5,245,022号、第 5,254,469号、第 5,258,506号、第 5,262,536号、第 5,272,250号、第 5,292,873号、第 5,317,098号、第 5,371,241号、第 5,391,723号、第 5,416,203号、第 5,451,463号、第 5,510,475号、第 5,512,667号、第 5,514,785号、第 5,565,552号、第 5,567,810号、第 5,574,142号、第 5,585,481号、第 5,587,371号、第 5,595,726号、第 5,597,696号、第 5,599,923号、第 5,599,928号、および第 5,688,941号が含まれるが、これらに限定されず、当該特許はそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0085】

ある化合物の全ての位置が均一に修飾されている必要はなく、実際、前述の修飾のうちの1つ以上を単一化合物に、あるいはさらには dsRNA 内の単一ヌクレオチドに組み込むことができる。また、本発明は、キメラ化合物である dsRNA 化合物も含む。本発明の文脈において、「キメラ (chimeric)」dsRNA 化合物または「キメラ (chimera)」は、dsRNA 化合物であり、特に2つ以上の化学的にはっきりと異なる領域を含有し、それぞれ、少なくとも1つのモノマー単位、すなわち、dsRNA 化合物の場合のヌクレオチドからなる、dsRNA である。これらの dsRNA は、典型的には、該 dsRNA は、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取り込みの増加、および/または標的核酸に対する結合親和性の増加を該 dsRNA に付与するように、修飾される、少なくとも1つの領域を含有する。dsRNA のさらなる領域は、RNA : DNA

またはRNA:RNAハイブリッドを切断することができる酵素に対する基質としての役割を果たすことができる。一例として、RNAアーゼHは、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。RNAアーゼHの活性化は、したがって、RNA標的の切断をもたらし、それにより遺伝子発現のdsRNA阻害の効率を大きく亢進させる。それ故、キメラdsRNAが使用される場合、同一標的領域にハイブリダイズするホスホチオエートデオキシdsRNAと比較して、しばしばより短いdsRNAによって匹敵する結果を得ることができる。

【0086】

RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要であれば、当該技術分野において既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技法によって、日常的に検出することができる。dsRNAの標的mRNAにおける切断部位は、一般に、当業者に既知の方法、例えば、Soutschek et al., Nature; 2004, Vol. 432, pp. 173-178に記載の5'-RACE法(全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる)を用いて決定することができる。1つの実施形態において、Soutschekらによって記載の5'-RACE法を用いて、ALN-18328が、配列番号1331(NM_000371.3)の636位のグアニンヌクレオチドと配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドとの間で、TTRのmRNAを切断することが確認された。1つの実施形態において、ALN-18328が、配列番号1331の637位のアデニンヌクレオチドと配列番号1331の638位のグアニンヌクレオチドとの間で、TTRのmRNAを切断しないことが確認された。

【0087】

特定の場合において、該dsRNAは、非リガンド基によって修飾されてもよい。多くの非リガンド分子が、dsRNAの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進させるためにdsRNAに共役されており、かかる共役を行うための手順は、科学文献で入手可能である。かかる非リガンド部分には、コレステロール(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553)、コール酸(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール(Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306、Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765)、チオコレステロール(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:111、Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327、Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651、Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777)、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651)、パルミチル部分(Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Croke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923)等の脂質部分が含まれている。かかるdsRNA共役体の調製を教示する代表的な米国特許は、上に列記されている。典型的な共役プロトコルは、配列の1つ以上の位置にアミノリンカーを有するdsRNAの合成を伴う。次いで、アミノ基を、適切な力

ップリングもしくは活性化試薬を使用して、共役される分子と反応させる。共役反応は、依然として固体支持体に結合された dsRNA を用いて、または溶液相中での dsRNA の切断後のいずれかに実行することができる。典型的には、HPLC によって dsRNA 共役体を精製して、純粋な共役体が得られる。

【0088】

ベクターによりコードされる dsRNA

別の態様では、TTR の dsRNA 分子が、DNA もしくは RNA ベクターに挿入された転写単位から発現される (例えば Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10、Skillern, A らの国際 PCT 公開 WO 第 00/22113 号、Conrad の国際 PCT 公開 WO 第 00/22114 号、および Conrad の米国特許第 6,054,299 号を参照されたい)。これらの導入遺伝子は、線状構築物、環状プラスミド、またはウイルスベクターとして導入することができ、宿主ゲノムに統合される導入遺伝子として導入されて、受け継がれ得る。また、導入遺伝子は、染色体外プラスミドとして受け継が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)。

10

【0089】

dsRNA の個々の鎖を、2つの個別の発現ベクター上のプロモーターを用いて転写し、標的細胞に同時形質移入することができる。あるいは、dsRNA のそれぞれ個々の鎖を、いずれも同一発現プラスミド上に位置するプロモーターを用いて転写してもよい。一実施形態において、dsRNA は、dsRNA がステムアンド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として発現される。

20

【0090】

組換え dsRNA 発現ベクターは、一般に、DNA プラスミドまたはウイルスベクターである。dsRNA を発現するウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (概説として、Muzyczka, et al., Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129 を参照)、アデノウイルス (例えば、Berkner, et al., BioTechniques (1998) 6:616)、Rose nfeld et al. (1991, Science 252:431-434)、および Rosenfeld et al. (1992)、Cell 68:143-155 を参照)、またはアルファウイルス、ならびに当該技術分野において既知の他のものに基づいて構築することができるが、これらに限定されない。種々の遺伝子を、上皮細胞を含む多くの異なる細胞型にインビトロおよび/またはインビボで導入するために、レトロウイルスが使用されている (例えば、Eglitis, et al., Science (1985) 230:1395-1398、Danos and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464、Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018、Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:61416145、Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043、Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381、Chowdhury et al., 1991, Science 254:1802-1805、van Beusechem, et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-19、Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647、Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895、Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150:4104-4115、米国特許第 4,868,116 号、米国特許第 4,980,286 号、PCT 出願 WO 第 89/07136 号、PCT 出願 WO 第 89/02468 号、PCT 出願 WO 第 89/05345 号、および PCT 出願 WO 第 9

30

40

50

2 / 0 7 5 7 3 号を参照)。細胞のゲノムに挿入された遺伝子を形質導入して発現することができる組換えレトロウイルスベクターは、組換えレトロウイルスゲノムを、P A 3 1 7 および P s i - C R I P 等の好適なパッケージング細胞系に形質移入することによって、産生することができる (C o m e t t e e t a l . , 1 9 9 1 , ヒト Gene Therapy 2 : 5 - 1 0、C o n e e t a l . , 1 9 8 4 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8 1 : 6 3 4 9)。感受性宿主 (例えば、ラット、ハムスター、イヌ、およびチンパンジー) 内の多岐にわたる細胞および組織を感染させるために、組換えアデノウイルスベクターを使用することができ (H s u e t a l . , 1 9 9 2 , J . Infectious Disease , 1 6 6 : 7 6 9)、これは、感染に有糸分裂的に活性な細胞を必要としない利点も有する。

10

【 0 0 9 1 】

発現される d s R N A 分子のコード配列を受け入れることができる任意のウイルスベクターを使用することができ、例としては、アデノウイルス (A V)、アデノ随伴ウイルス (A A V)、レトロウイルス (例えば、レンチウイルス (L V)、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス)、ヘルペスウイルス等に由来するベクターである。ウイルスベクターの指向性は、エンベロープタンパク質もしくは他のウイルスからの他の表面抗原を用いて該ベクターをシュードタイピングすることにより、または異なるウイルスのキャプシドタンパク質を適宜置換することによって、修正することができる。

【 0 0 9 2 】

例えば、本発明で取り上げられるレンチウイルスベクターは、水疱性口内炎ウイルス (V S V)、狂犬病、エボラ、モコラ等からの表面タンパク質でシュードタイピングすることができる。本発明で取り上げられる A A V ベクターは、ベクターが異なるキャプシドタンパク質の血清型を発現するように操作することにより、異なる細胞を標的とすることができる。例えば、血清型 2 のゲノム上に血清型 2 のキャプシドを発現する A A V ベクターは、A A V 2 / 2 と称される。A A V 2 / 2 ベクター内のこの血清型 2 のキャプシド遺伝子を、血清型 5 のキャプシド遺伝子と置換して、A A V 2 / 5 ベクターを産生することができる。異なるキャプシドタンパク質血清型を発現する A A V ベクターを構築するための技法は、当該技術分野の技能内であり、例えば、R a b i n o w i t z J E e t a l . (2 0 0 2) , J V i r o l 7 6 : 7 9 1 - 8 0 1 を参照されたく、その開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【 0 0 9 3 】

本発明における使用に好適な組換えウイルスベクターの選択、d s R N A の発現のために核酸配列を該ベクターに挿入するための方法、および該ウイルスベクターを対象となる細胞に送達する方法は、当該技術分野の技能内である。例えば、D o r n b u r g R (1 9 9 5) , Gene Therap. 2 : 3 0 1 - 3 1 0、E g l i t i s M A (1 9 8 8) , Biotechniques 6 : 6 0 8 - 6 1 4、M i l l e r A D (1 9 9 0) , Hum Gene Therap. 1 : 5 - 1 4、A n d e r s o n W F (1 9 9 8) , Nature 3 9 2 : 2 5 - 3 0、および R u b i n s o n D A e t a l . , Nat. Genet. 3 3 : 4 0 1 - 4 0 6 を参照されたく、それらの開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

40

【 0 0 9 4 】

ウイルスベクターは、A V および A A V に由来し得る。一実施形態において、本発明で取り上げられる d s R N A は、例えば、U 6 もしくは H 1 R N A プロモーター、またはサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターのいずれかを有する組換え A A V ベクターから、2 つの別個の相補的な単鎖 R N A 分子として発現される。

【 0 0 9 5 】

本発明の d s R N A を発現するために好適な A V ベクター、組換え A V ベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、X i a H e t a l . (2 0 0 2) , Nat. Biotech. 2 0 : 1 0 0 6 - 1 0 1 0 に記載されている。

50

【0096】

本発明で取り上げられる dsRNA を発現するために好適な AAV ベクター、組換え AAV ベクターを構築するための方法、該ベクターを標的細胞に送達するための方法は、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、米国特許第 5,139,941 号、国際特許出願 WO 第 94/13788 号、および国際特許出願 WO 第 93/24641 号に記載され、それらの開示全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0097】

本発明で取り上げられる DNA プラスミドもしくはウイルスベクターのいずれか内で dsRNA の発現を駆動するプロモーターは、真核生物 RNA ポリメラーゼ I (例えばリボソーム RNA プロモーター)、RNA ポリメラーゼ II (例えば CMV 初期プロモーター、もしくはアクチンプロモーター、もしくは U1 snRNA プロモーター)、または一般に RNA ポリメラーゼ III プロモーター (例えば U6 snRNA もしくは 7SK RNA プロモーター)、あるいは原核生物プロモーター、例えば、発現プラスミドも T7 プロモーターからの転写に必要な T7 RNA ポリメラーゼをコードするという条件で、T7 プロモーターであり得る。該プロモーターは、臍臓への導入遺伝子の発現を導くこともできる (例えば、the insulin regulatory sequence for pancreas (Bucchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2511-2515) を参照)。

【0098】

さらに、導入遺伝子の発現は、例えば、特定の生理的調節因子、例えば、循環ブドウ糖レベル、またはホルモンに感受性である調節配列等の、誘発可能な調節配列および発現系を使用することによって、正確に調節することができる (Doeherty et al., 1994, FASEB J. 8: 20-24)。細胞または哺乳動物内の導入遺伝子の発現を制御するために好適である、かかる誘発可能な発現系には、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、二量化の化学誘発物質、およびイソプロピル-ベータ-D1-チオガラクトピラノシド (EPTG) による調節が含まれる。当業者は、dsRNA 導入遺伝子の目的とする用途に基づいて、適切な調節/プロモーター配列を選択することができよう。当業者は、dsRNA 導入遺伝子の目的とする用途に基づいて、適切な調節/プロモーター配列を選択することができよう。

【0099】

一般に、dsRNA 分子を発現することができる組換えベクターは、以下に記載するように送達され、標的細胞内に生き残る。代替として、dsRNA 分子の一過性発現を提供するウイルスベクターを使用することができる。かかるベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。発現すると、dsRNA は標的 RNA に結合し、その機能または発現を調節する。dsRNA を発現するベクターの送達は、静脈内もしくは筋肉内投与等によって全身的、患者から外植された標的細胞に投与後、該患者へ再導入することによって、また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等によって、であり得る。

【0100】

dsRNA 発現 DNA プラスミドは、典型的には、カチオン性脂質担体 (例えばオリゴフェクタミン (Oligofectamine))、または非カチオン性脂質に基づく担体 (例えば Transit-TKO (商標)) との複合体として、標的細胞に形質移入される。1 週間以上の期間にわたって、単一の TTR 遺伝子の異なる領域または複数の TTR 遺伝子を標的とする、dsRNA によって媒介されるノックダウンのための複数回の脂質の形質移入もまた、本発明によって企図される。ベクターの宿主細胞への導入の成功は、種々の既知の方法を使用して監視することができる。例えば、一過性形質移入は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 等の蛍光マーカー等のレポーターを用いて示すことができる。

10

20

30

40

50

エクスピボ細胞の安定な形質移入は、形質移入細胞に、ハイグロマイシンB耐性等の、特定の環境因子（例えば、抗生物質および薬物）に対する耐性を提供するマーカーを使用して、保証することができる。

【0101】

また、TTRに特異的なdsRNA分子は、ベクターに挿入して、ヒト患者に対する遺伝子療法ベクターとして使用することもできる。遺伝子療法ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照）、または定位固定注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057を参照）によって、対象に送達することができる。遺伝子療法ベクターの医薬調製物は、許容される希釈剤中の遺伝子療法ベクターを含んでもよく、または遺伝子送達媒体が中に埋め込まれる徐放性マトリックスを含んでもよい。代替として、組換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターから、完全な遺伝子送達ベクターを無傷で産生することができる場合、医薬調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含んでもよい。

10

【0102】

III. dsRNAを含有する医薬組成物

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるdsRNAと、薬剤として許容される担体とを含有する医薬組成物を提供する。該dsRNAを含有する医薬組成物は、TTRの発現によって媒介される病理過程等の、TTR遺伝子の発現もしくは活性に関連する疾患もしくは障害の治療に有用である。かかる医薬組成物は、送達様式に基づいて製剤化される。一例は、非経口投与を介して、例えば、静脈（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、持続ポンプ注入等による脳への注入によって、脳実質への直接送達用に製剤化される組成物である。

20

【0103】

本明細書で取り上げられる医薬組成物は、TTR遺伝子の発現を阻害するために十分な投薬量で投与される。

【0104】

一般に、dsRNAの好適な用量は、1日当たり受容者の体重1キログラムにつき0.01~200.0ミリグラムの範囲、一般には、1日当たり体重1キログラムにつき1~50mgの範囲であろう。例えば、該dsRNAは、単回用量当たり0.0059mg/kg、0.01mg/kg、0.0295mg/kg、0.05mg/kg、0.0590mg/kg、0.163mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.543mg/kg、0.5900mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.628mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5.0mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、または50mg/kgで投与することができる。

30

【0105】

一実施形態において、該投薬量は、0.01~0.2mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.3mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.10mg/kg、0.11mg/kg、0.12mg/kg、0.13mg/kg、0.14mg/kg、0.15mg/kg、0.16mg/kg、0.17mg/kg、0.18mg/kg、0.19mg/kg、または0.20mg/kgの用量で投与することができる。

40

【0106】

一実施形態において、該投薬量は、0.005mg/kg~1.628mg/kgである。例えば、該dsRNAは、0.0059mg/kg、0.0295mg/kg、0.0590mg/kg、0.163mg/kg、0.543mg/kg、0.5900mg

50

/ kg、または 1.628 mg / kg の用量で投与することができる。

【0107】

一実施形態において、該投薬量は、0.2 mg / kg ~ 1.5 mg / kg である。例えば、該 dsRNA は、0.2 mg / kg、0.3 mg / kg、0.4 mg / kg、0.5 mg / kg、0.6 mg / kg、0.7 mg / kg、0.8 mg / kg、0.9 mg / kg、1 mg / kg、1.1 mg / kg、1.2 mg / kg、1.3 mg / kg、1.4 mg / kg、または 1.5 mg / kg の用量で投与することができる。

【0108】

該医薬組成物は、1日1回投与することができ、あるいは、該 dsRNA は、1日にわたって適切な間隔で、2、3、またはそれ以上の分割用量 (sub-dose) として、さらに、持続注入または放出制御製剤による送達を用いて投与されてもよい。その場合、各分割用量に含有される dsRNA は、1日当たりの総投薬量を達成するように、対応してより小さくしなければならない。投薬量単位は、例えば、数日間にわたって該 dsRNA の持続放出を提供する、従来の持続放出製剤を使用して、数日間にわたる送達用に配合することができる。持続放出製剤は当該技術分野において周知であり、本発明の薬剤を用いて使用され得る部位等の特定の部位での薬剤の送達に特に有用である。本実施形態では、投薬量単位は、対応する複数の1日量を含む。

10

【0109】

TTTR レベルに対する単回用量の効果は長く続き、その結果、その後の用量は、3、4、もしくは5日の間隔より多くなく、または1、2、3、もしくは4週間の間隔より多くなく、または5、6、7、8、9、もしくは10週間の間隔より多くない量で投与される。

20

【0110】

当業者には、限定されないが、疾患もしくは障害の重症度、以前の処置、総体的な健康、および/または対象の年齢、ならびに存在する他の疾患を含む特定の因子が、対象を効果的に処置するために必要とされる投薬量およびタイミングに影響を及ぼし得ることが理解されよう。さらに、治療上有効な量の組成物を用いた対象の治療には、単回処置または一連の治療が含まれ得る。本発明により包含される個々の dsRNA に対する効果的な投薬量およびインビボ半減期の推定は、従来の方法を使用して、または本明細書のいずれかの箇所で記載される適切な動物モデルを使用したインビボ試験に基づいて、行うことができる。

30

【0111】

マウス遺伝学における進歩によって、TTTR の発現によって媒介される病理過程等の種々のヒト疾患の研究用に、多くのマウスモデルが生成されている。かかるモデルは、dsRNA のインビボ試験、ならびに治療上有効な用量を決定するために使用される。好適なマウスモデルは、例えば、ヒト TTTR を発現するプラスミドを含有するマウスである。別の好適なマウスモデルは、ヒト TTTR を発現する導入遺伝子を保有する遺伝子導入マウスである。

【0112】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための一連の投薬量の処方決定に使用することができる。本発明で取り上げられる組成物の投薬量は、一般に、ほとんどまたは全く毒性のない ED50 を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なってもよい。本発明で取り上げられる方法において使用されるいずれの化合物についても、治療上有効な用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、IC50 (すなわち、症状の半値阻害を達成する試験化合物の濃度) を含む、化合物、または適切な場合は、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲 (例えば、該ポリペプチドの濃度の低下を達成する) を達成するように、処方決定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィー

40

50

によって測定することができる。

【0113】

本発明で取り上げられる dsRNA は、標的遺伝子の発現によって媒介される病理過程の処置に効果的な他の既知の薬剤と組み合わせる投与することができる。いずれの場合においても、投与する医師は、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載される、標準的な有効性の測定値を使用して得られた結果に基づいて、dsRNA 投与の量およびタイミングを調整することができる。

【0114】

投与

本発明はまた、本発明で取り上げられる dsRNA 化合物を含む医薬組成物および製剤も含む。本発明の医薬組成物は、局所的または全身的な処置が所望されるか、および処置される範囲に依存して、多くの方法で投与することができる。投与は、局所的、噴霧器によってを含む、例えば、粉末もしくは噴霧剤の吸入もしくは吹送による経肺、気管内、鼻腔内、表皮および経皮、経口もしくは非経口であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腔内、もしくは筋肉内注射もしくは注入、または頭蓋内、例えば、実質内、くも膜下腔内、もしくは脳室内投与が含まれる。

【0115】

該 dsRNA は、肝臓（例えば、肝臓の肝細胞）等の特定の組織を標的とする様態で送達することができる。

【0116】

本発明は、脳に直接注射することによって送達することができる医薬組成物が含まれる。該注射は、脳の特定領域（例えば、黒質、皮質、海馬、線条体、もしくは淡蒼球）への定位固定注射によるものであり得、該 dsRNA は、中枢神経系への複数領域（例えば、脳、および/または脊髄への複数領域）に送達され得る。該 dsRNA は、脳の拡散領域に送達（例えば、脳の皮質への拡散送達）され得る。

【0117】

一実施形態において、TTR を標的とする dsRNA は、カニューレ、または例えば、脳等の組織（例えば、脳の黒質、皮質、海馬、線条体、もしくは淡蒼球）内に埋め込まれた一端を有する他の送達デバイスを経由して送達され得る。該カニューレは、該 dsRNA 組成物の貯蔵容器に接続することができる。流入または送達は、ポンプ、例えば、Alzet ポンプ等の浸透圧ポンプもしくはミニポンプによって媒介され得る（Direct, Cupertino, CA）。一実施形態において、ポンプおよび貯蔵容器は、組織から離れたエリア、例えば腹部内に埋め込まれ、送達は、ポンプまたは貯蔵所から放出部位に誘導する導管によって達成される。該 dsRNA 組成物の脳への注入は、数時間にわたって、または数日間、例えば、1、2、3、5、もしくは7日間、もしくはそれ以上であり得る。脳への送達用のデバイスは、例えば、米国特許第 6,093,180 号、および第 5,814,014 号に記載されている。

【0118】

局所投与用の医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ剤、坐薬、スプレー、液体、および粉末が含まれ得る。従来の医薬用担体、水性、粉末、もしくは油性基剤、増粘剤等が必要であるか、または望ましくあり得る。被覆したコンドーム、手袋等も有用であり得る。好適な局所製剤には、本発明で取り上げられる dsRNA が、脂質、リボソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤、および界面活性剤等の局所送達剤と混合されるものが含まれる。好適な脂質およびリボソームには、中性（例えば、ジオレオ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（DMPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（DMPG））、ならびにカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル（DOTAP）、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOTMA））が含まれる。本発明で取り上げられる dsRNA は、リボソーム内にカプセル化されてもよく、あるいは

10

20

30

40

50

はそれ、特にカチオン性リポソームと複合体を形成してもよい。代替として、dsRNAは、脂質、特にカチオン性脂質と複合されてもよい。好適な脂肪酸およびエステルには、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、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプリン酸、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、またはC₁₋₁₀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、あるいはその薬剤として許容される塩が含まれるが、これらに限定されない。局所製剤は、米国特許第6,747,014号に詳細に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0119】

リポソーム製剤

薬物の製剤化用に研究されて、使用されているマイクロエマルジョンの他に、組織立った多くの界面活性剤の構造がある。これらには、単層、ミセル、二重層、および小胞が含まれる。リポソーム等の小胞は、薬物送達の観点からの、それらが提示する特異性および作用の持続時間から、大きな関心を集めている。本発明において使用される、「リポソーム」という用語は、球状の1つまたは複数の二重層に配置された両親媒性脂質の小胞を意味する。

【0120】

リポソームは、親油性材料および水性の内部から形成される膜を有する、単層状または多層状の小胞である。水性部分が、送達される組成物を含む。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合することができる利点を有する。非カチオン性のリポソームは、細胞壁とさほど効率的に融合することはできないが、マクロファージによってインビボで取り込まれる。

20

【0121】

哺乳動物の無傷の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、それぞれ50nm未満の直径を有する、一連の微細孔を通過しなければならない。したがって、高度に変形可能で、そのような微細孔を通過することができるリポソームを使用することが望ましい。

【0122】

リポソームのさらなる利点には、天然のリン脂質から得られたリポソームは、生体適合性および生分解性であること、リポソームは、広範な水溶性および脂溶性の薬物を組み込むことができること、リポソームは、それらの内部区画でカプセル化された薬物を、代謝および分解から保護できること、が含まれる（Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製において考慮すべき重要な事項は、脂質の表面電荷、小胞の大きさ、およびリポソームの水性容積である。

30

【0123】

リポソームは、作用部位への活性成分の移送および送達に有用である。リポソーム膜は、構造的に生体膜と同様であるため、リポソームが組織に適用されると、リポソームは細胞膜との融合を開始し、リポソームと細胞との融合が進行するに従って、リポソームの内容物が細胞内へ出て、そこで活性薬剤が作用し得る。

40

【0124】

リポソーム製剤は、多くの薬物のための送達様式として、広範な調査の焦点となっている。局所投与について、リポソームが他の製剤に勝る幾つかの利点を提示するという証拠が増えつつある。かかる利点には、投与された薬物の高度な体内吸収に関連する副作用の減少、投与された薬物の所望の標的での蓄積の増加、ならびに親水性および疎水性の両方の多岐にわたる薬物を皮膚へ投与する能力が含まれる。

50

【0125】

幾つかの報告は、高分子量のDNAを含む薬剤を皮膚へ送達するリポソームの能力について詳述している。鎮痛剤、抗体、ホルモン、および高分子量のDNAを含む化合物が、皮膚に投与されている。大半の適用が、表皮上層の標的化をもたらした。

【0126】

リポソームは、広義の2つのクラスに分類される。カチオン性リポソームは、負に荷電したDNA分子と相互に作用し、安定な複合体を形成する、正に荷電したリポソームである。正に荷電したDNA/リポソーム複合体は、負に荷電した細胞表面に結合し、エンドソーム内に取り入れられる。エンドソーム内の酸性pHにより、リポソームが破裂し、その内容物を細胞の細胞質内に放出する(Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985)。

10

【0127】

pH感受性であるか、または負に荷電したリポソームは、DNAと複合するのではなく、それを捕捉する。DNAおよび脂質は共に同様に荷電されているため、複合体形成ではなく反発が生じる。それでもなお、DNAの一部は、これらのリポソームの水性内部内に捕捉される。チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養下の細胞単層へ送達するために、pH感受性リポソームが使用されている。外因性遺伝子の発現が、標的細胞中で検出された(Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274)。

【0128】

リポソーム組成物の1つの主要な種類には、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質が含まれる。例えば、中性のリポソーム組成物は、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)、またはジパルミチルホスファチジルコリン(DPPC)から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、一般にジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成され、一方アニオン性の膜融合性リポソームは、主にジオレイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から形成される。リポソーム組成物の別の種類は、例えば、大豆ホスファチジルコリン、および卵ホスファチジルコリン等のホスファチジルコリン(PC)から形成される。別の種類は、リン脂質、および/またはホスファチジルコリン、および/またはコレステロールの混合物から形成される。

20

【0129】

幾つかの研究が、リポソーム製剤の皮膚への局所送達を評価している。インターフェロンを含有するリポソームのモルモット皮膚への適用は、皮膚ヘルペス炎の軽減をもたらし、一方他の手段(例えば、溶液またはエマルジョンとして)を介したインターフェロンの送達は効果がなかった(Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410)。さらに、さらなる研究は、リポソーム製剤の一部として投与されたインターフェロンの、水性系を使用するインターフェロンの投与に対する有効性を試験し、リポソーム製剤は水溶性投与より優れていると結論付けた(du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265)。

30

【0130】

また、非イオン性リポソーム系は、特に非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む系における、薬物の皮膚への送達の実用性を決定するために調べられている。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)および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が、シクロスポリンAをマウス皮膚の真皮に送達するために使用された。結果は、かかる非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層へのシクロスポリンAの沈着の促進に効果的であることを示した(Hu et al., S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

40

【0131】

50

また、リポソームには、「立体的に安定化された」リポソームが含まれ、該用語は、本明細書で使用される場合、1つ以上の特定化された脂質を含むリポソームを指し、リポソームに組み込まれると、かかる特定化された脂質を欠くリポソームと比較して、循環寿命の向上をもたらす。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞を形成する脂質部分の一部が、(A)モノシアロガングリオシド G_{M1} 等の1つ以上の糖脂質を含むか、または(B)ポリエチレングリコール(PEG)部分等の1つ以上の親水性ポリマーで誘導体化されるものである。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはPEG誘導体化脂質を含有する立体的に安定化されたリポソームについて、これらの立体的に安定化されたリポソームの循環半減期の増加は、細網内皮系(RES)の細胞内への取り込みの減少に由来すると、当該技術分野では考えられている(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

10

【0132】

1つ以上の糖脂質を含む種々のリポソームが当該技術分野において既知である。Papahadjopoulosら(Ann. N. Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)は、モノシアロガングリオシド G_{M1} 、ガラクトセレブロシド硫酸、およびホスファチジルイノシトールの、リポソームの血中半減期を改善する能力について報告した。これらの所見は、Gabizonら(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988, 85, 6949)によって詳しく説明されている。共にAllenらによる、米国特許第4,837,028号および国際公開WO第88/04924号は、(1)スフィンゴミエリン、および(2)ガングリオシド G_{M1} もしくはガラクトセレブロシド硫酸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(Webbら)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-ジミリストールホスファチジルコリンを含むリポソームは、国際公開WO第97/13499号(Limら)に開示されている。

20

【0133】

1つ以上の親水性ポリマーによって誘導体化された脂質を含む多くのリポソーム、およびその調製方法は、当該技術分野において既知である。Sunamotoら(Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778)は、PEG部分を含有する非イオン性界面活性剤、2C1215Gを含むリポソームについて記載している。Illumら(FEBS Lett., 1984, 167, 79)は、ポリスチレン粒子のポリマーグリコールによる親水性コーティングが、血中半減期の著しい増加をもたらすことを指摘している。ポリアルキレングリコール(例えば、PEG)のカルボン酸基の結合によって修飾された合成リン脂質が、Sears(米国特許第4,426,330号、および第4,534,899号)によって記載されている。Klibanovら(FEBS Lett., 1990, 268, 235)は、PEGまたはステアリン酸PEGによって誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン(PE)を含むリポソームが、血中循環半減期の著しい増加を有することを示す実験について記載している。Blumeら(Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91)は、このような観察を、他のPEG誘導体化リン脂質、例えば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)とPEGとの組み合わせから形成されるDSPE-PEGに広げた。外部表面に共有結合されたPEG部分を有するリポソームが、欧州特許EP第0445131B1号および国際公開WO第90/04384号(Fisher)に記載されている。PEGによって誘導体化された1~20モルパーセントのPEを含有するリポソーム組成物、およびその使用方法が、Woodleら(米国特許第5,013,556号、および第5,356,633号)、ならびにMartinら(米国特許第5,213,804号および欧州特許EP第0496813B1号)によって記載されている。他の多くの脂質-ポリマー共役体を含むリポソームが、国際公開WO第91/05545号および米国特許第5,225,212号(共にMartinらによる

30

40

50

)、ならびに国際公開WO第94/20073号(Zalipskyら)に開示されている。PEG修飾セラミド脂質を含むリポソームが、国際公開WO第96/10391号(Choiら)に記載されている。米国特許第5,540,935号(Miyazakiら)および米国特許第5,556,948号(Tagawara)は、表面に官能基部分をさらに誘導体化することができるPEG含有リポソームについて記載している。

【0134】

核酸を含む多くのリポソームが当該技術分野において既知である。Thierryらによる国際公開WO第96/40062号は、高分子量の核酸をリポソーム中にカプセル化するための方法を開示している。Tagawaraによる米国特許第5,264,221号は、タンパク質結合リポソームを開示し、かかるリポソームの内容物にはdsRNAが含まれ得ると主張している。Rahmanらによる米国特許第5,665,710号は、オリゴデオキシヌクレオチドをリポソーム中にカプセル化する特定の方法について記載している。Loveらによる国際公開WO第97/04787号は、raf遺伝子を標的とするdsRNAを含むリポソームを開示している。

10

【0135】

トランスファーソームはさらに別の種類のリポソームであり、薬物送達媒体の興味を引く候補者である、高度に変形可能な脂質凝集物である。トランスファーソームは脂質小滴として記載されてもよく、これは、高度に変形可能であるため、この小滴より小さな孔に容易に浸透することができる。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(皮膚の孔の形状に適合する)、自己修復性であり、しばしば断片化されることなく標的に到達し、しばしば自己負荷性(self-loading)である。トランスファーソームを作製するために、標準的なリポソーム組成物に対して、表面エッジアクチベータ(surface edge-activator)、通常界面活性剤を添加することができる。トランスファーソームは、血清アルブミンを皮膚へ送達するために使用されている。血清アルブミンのトランスファーソームによって媒介される送達は、血清アルブミンを含有する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。

20

【0136】

界面活性剤は、エマルジョン(マイクロエマルジョンを含む)およびリポソーム等の製剤中に幅広い用途を見出す。天然および合成の両方の、多くの異なる種類の界面活性剤の性質を分類および順位付け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(「頭部基」としても知られる)の性質が、製剤に使用される異なる界面活性剤を分類するための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)。

30

【0137】

界面活性剤分子がイオン化されていない場合、これは、非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、医薬品および化粧品に幅広い用途を見出し、広範なpH値にわたって使用可能である。一般に、それらのHLB値は、その構造に依存して、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、スクロースエステル、およびエトキシ化エステル等の非イオン性エステルが含まれる。脂肪アルコールエトキシ化物(ethoxylate)、プロポキシ化(propoxylated)アルコール、およびエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマー等の非イオン性アルコールアミドおよびエーテルも、このクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤が、非イオン性界面活性剤のクラスのうちで最も一般的な構成物質である。

40

【0138】

界面活性剤分子が水中に溶解または分散された時に負の電荷を保有する場合、その界面活性剤は、アニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤には、石鹼等のカルボン

50

酸塩、アシルラクチレート (lactylate)、アミノ酸のアシルアミド、アルキル硫酸塩およびエトキシ化アルキル硫酸塩等の硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホネート、アシルイセチオネート (isethionate)、アシルタウレート (taurate)、およびスルホコハク酸塩等のスルホネート、ならびにリン酸塩が含まれる。アニオン性界面活性剤のクラスのうちで最も重要な構成物質は、アルキル硫酸塩および石鹸である。

【0139】

界面活性剤分子が正の荷電を保有する場合、それが水中に溶解または分散されると、その界面活性剤はカチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤には、第四アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが含まれる。第四アンモニウム塩がこのクラスで最も使用される構成物質である。

10

【0140】

界面活性剤分子が正または負の電荷のいずれをも保有する能力を有する場合、その界面活性剤は、両性として分類される。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、およびフォスファチドが含まれる。

【0141】

薬品、製剤、およびエマルジョン中の界面活性剤の使用が概説されている (Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

【0142】

20

核酸脂質粒子

一実施形態において、本発明で取り上げられる TTR の dsRNA は、脂質製剤中に完全にカプセル化されて、SPLP、pSPLP、SNALP、または他の核酸脂質粒子を形成する。本明細書で使用される、「SNALP」という用語は、SPLP を含む安定な核酸脂質粒子を指す。本明細書で使用される、「SPLP」という用語は、脂質小胞内にカプセル化されたプラスミド DNA を含む核酸脂質粒子を指す。SNALP および SPLP は、典型的には、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、および粒子の凝集を阻止する脂質 (例えば、PEG 脂質共役体) を含有する。SNALP および SPLP は、静脈内 (i.v.) 注射後に長時間の循環寿命を呈し、遠位の部位 (例えば、投与部位から物理的に離れた部位) に蓄積するため、全身適用に非常に有用である。SPLP には、「pSPLP」が含まれ、これには、PCT 公開 WO 第 00/03683 号に記載されるカプセル化された縮合剤と核酸との複合体が含まれる。本発明の粒子は、典型的には約 50 nm ~ 約 150 nm、より典型的には約 60 nm ~ 約 130 nm、より典型的には約 70 nm ~ 約 110 nm、最も典型的には約 70 ~ 約 90 nm の平均直径を有し、実質的に無毒である。さらに、該核酸は、本発明の核酸脂質粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に抵抗性である。核酸脂質粒子およびその調製方法は、例えば、米国特許第 5,976,567 号、第 5,981,501 号、第 6,534,484 号、第 6,586,410 号、第 6,815,432 号、および PCT 公開 WO 第 96/40964 号に開示されている。

30

【0143】

40

一実施形態において、脂質の薬物に対する比率 (質量/質量比率) (例えば、脂質の dsRNA に対する比率) 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、または約 6:1 ~ 約 9:1 の範囲内であろう。

【0144】

カチオン性脂質は、例えば、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルクロライド (DDAC)、N,N-ジステアシル-N,N-ジメチルアンモニウムプロミド (DDAB)、N-(I-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N,N,N-トリメチルクロライド (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ライド (DOTMA)、N,N-ジメチル-2,3-ジ

50

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(Dilinoylexy)-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(Dilinoleyenxy)-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(Dilinoyleycarbamoxy)-3-ジメチルアミノプロパン(DLin-C-DAP)、1,2-ジリノレイオキシ(Dilinoyleoxy)-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(Dilinoyleylthio)-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(linoylexy)-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ライド塩(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ライド塩(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)、または3-(N,N-ジリノレイルアミノ(Dioleylamino)-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(propanedio)(DOAP)、1,2-ジリノレイルオキシ(Dilinoyleloxo)-3-(2-N,N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン(DLin-EG-DMA)、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)、2,2-ジリノレイル(Dilinoyleyl)-4-ジメチルアミノメチル-[1,3]-ジオキソラン(DLin-K-DMA)、またはそれらの類似体、(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)、(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(MC3)、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)エチルアザネジイル)ジドデカン-2-オール(Tech G1)、あるいはそれらの混合物であり得る。カチオン性脂質は、粒子中に存在する総脂質の約20モル%~約50モル%、または約40モル%からなり得る。

【0145】

別の実施形態では、脂質siRNAナノ粒子を調製するために、化合物、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソランを使用することができる。2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソランの合成については、2008年10月23日出願の米国仮特許出願第61/107,998号に記載され、当該特許は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0146】

一実施形態において、脂質siRNA粒子には、40%の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、10%のDSPC、40%のコレストロール、10%のPEG-C-DOMG(モルパーセント)が含まれ、粒径 63.0 ± 2.0 nmおよび 0.027 のsiRNA/脂質比である。

【0147】

非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン(POPE)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン 4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレー

ト (D O P E - m a l)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (D M P E)、ジステアロイル - ホスファチジル - エタノールアミン (D S P E)、16 - O - モノメチル P E、16 - O - ジメチル P E、18 - 1 - トランス P E、1 - ステアロイル - 2 - オレオイル - ホスファチジエタノールアミン (S O P E)、コレステロール、またはそれらの混合物を含むが、これらに限定されない、アニオン性脂質または中性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、コレステロールが含まれる場合、粒子中に存在する総脂質の約 5 モル% ~ 約 90 モル%、約 10 モル%、または約 58 モル%であり得る。

【 0 1 4 8 】

粒子の凝集を阻害する共役された脂質は、例えば、制限されないが、PEG - ジアシルグリセロール (D A G)、PEG - ジアルキルオキシプロピル (D A A)、PEG - リン脂質、PEG - セラミド (C e r)、またはそれらの混合物を含む、ポリエチレングリコール (P E G) - 脂質であり得る。PEG - D A A 共役体は、例えば、PEG - ジラウリルオキシプロピル (C i ₂)、PEG - ジミリスチルオキシプロピル (C i ₄)、PEG - ジパルミチルオキシプロピル (C i ₆)、または PEG - ジステアリルオキシプロピル (C] ₈) であり得る。粒子の凝集を阻止する共役された脂質は、粒子中に存在する総脂質の 0 モル% ~ 約 20 モル%、または約 2 モル%であり得る。

10

【 0 1 4 9 】

幾つかの実施形態において、該核酸脂質粒子には、例えば、粒子中に存在する総脂質の約 10 モル% ~ 約 60 モル%、または約 48 モル%のコレステロールがさらに含まれる。

20

【 0 1 5 0 】

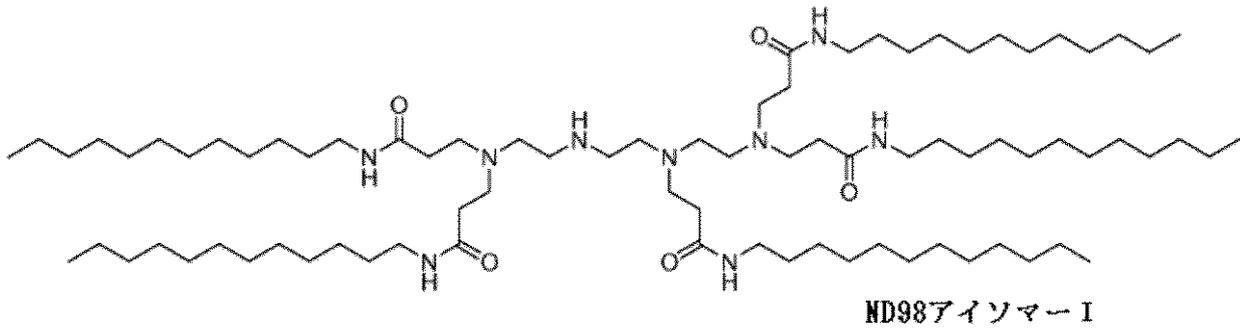
L N P 0 1

一実施形態において、脂質様 (l i p i d o i d) N D 9 8 - 4 H C l (M W 1 4 8 7) (式 1)、コレステロール (S i g m a - A l d r i c h)、および P E G - C e r a m i d e C 1 6 (A v a n t i P o l a r L i p i d s) を使用して、脂質 s i R N A ナノ粒子 (すなわち、LNP01 粒子) を調製することができる。それぞれエタノール中の原液を、ND98、133 mg / mL ; コレステロール、25 mg / mL ; PEG - C e r a m i d e C 1 6、100 mg / mL のように調製することができる。次いで、ND98、コレステロール、および PEG - C e r a m i d e C 1 6 の原液を、例えば、42 : 48 : 10 のモル比に混合することができる。混合された脂質溶液は、最終エタノール濃度が約 35 ~ 45 %、および最終酢酸ナトリウム濃度が約 100 ~ 300 mM になるように、(例えば、酢酸ナトリウム (p H 5) 中の) s i R N A 水溶液と混合することができる。脂質 s i R N A ナノ粒子は、典型的には、混合時に自然発生的に形成される。所望の粒径分布に依存して、得られたナノ粒子混合物は、例えば、L i p e x E x t r u d e r (N o r t h e r n L i p i d s , I n c) 等のサーモバレル押出機 (t h e r m o b a r r e l e x t r u d e r) を使用して、ポリカーボネート膜 (例えば、100 nm カットオフ) を通して押し出すことができる。場合によっては、押出ステップは割愛されてもよい。エタノール除去および同時の緩衝液交換は、例えば、透析または接線流濾過によって達成することができる。緩衝液は、例えば、約 p H 7、例えば、約 p H 6 . 9、約 p H 7 . 0、約 p H 7 . 1、約 p H 7 . 2、約 p H 7 . 3、または約 p H 7 . 4 のリン酸緩衝食塩水 (P B S) と交換することができる。

30

40

【化1】



式 1

LNP01 製剤については、例えば、国際出願公開WO第2008/042973号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0151】

さらなる例示的な脂質 siRNA 製剤は、以下の通りである。

【表 1 - 1】

	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脂質共役体 脂質:siRNA比	過程
SNALP	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)	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	
SNALP-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(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]-ジオキサラン(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	押出
LNP06	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキサラン(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	押出
LNP07	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキサラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5 脂質:siRNA 約6:1	インライン混合
LNP08	2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキサラン(XTC)	XTC/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5 脂質:siRNA 約11:1	インライン混合

10

20

30

40

【表 1 - 2】

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	インライン混合	
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	インライン混合	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)ブタノエート(MC3)	MC-3/DSPC/コレステロール/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 脂質:siRNA 10:1	インライン混合	
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)エチルアザネジイル)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	インライン混合	20

【 0 1 5 2 】

LNP09 製剤および XTC を含む製剤は、例えば、2009 年 9 月 3 日出願の米国仮出願第 61 / 239 , 686 号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。LNP11 製剤および MC3 を含む製剤は、例えば、2009 年 9 月 22 日出願の米国仮出願第 61 / 244 , 834 号に記載されており、当該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 1 5 3 】

標準的な方法、または押出を伴わない方法のうちのいずれかによって調製された製剤を同様の様態で特徴付けることができる。例えば製剤は、典型的には、目視検査によって特徴付けられる。それらは、凝集物または沈降物のない、白っぽい半透明の溶液であるべきである。脂質ナノ粒子の粒径および粒径分布は、例えば、Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern (USA)) を使用して、光散乱によって測定することができる。粒子は、40 ~ 100 nm 等の約 20 ~ 300 nm の粒径であるべきである。粒径分布は、単峰型であるべきである。製剤中、ならびに捕捉された画分中の総 siRNA 濃度は、色素排除アッセイを使用して推定される。製剤化された siRNA の試料を、製剤を分裂させる界面活性剤、例えば、0.5% の Triton-X100 の存在または不在下、Ribogreen (Molecular Probes) 等の RNA に結合する色素を用いてインキュベートすることができる。製剤中の総 siRNA は、標準曲線に対する、該界面活性剤を含有する試料からのシグナルによって決定することができる。捕捉された画分を、総 siRNA 含有量から siRNA を「含まない」含有量 (界面活性剤の不在下のシグナルによって測定される) を差し引くことによって決定する。捕捉された siRNA のパーセントは、典型的には 85% 超である。SNALP 製剤については、粒径は、少なくとも 30 nm、少なくとも 40 nm、少なくとも 50 nm、少なくとも 60 nm、少なくとも 70 nm、少なくとも 80 nm、少なくとも 90 nm、少なくと

40

50

も100nm、少なくとも110nm、および少なくとも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、または少なくとも約80nm～少なくとも約90nmである。

【0154】

経口投与用の組成物および製剤には、粉末もしくは顆粒、微粒子、ナノ粒子、水もしくは疎水性媒体中の懸濁液もしくは溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシエット、錠剤、またはミニタブレットが含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましくあり得る。幾つかの実施形態において、経口製剤とは、本発明で取り上げられるdsRNAが、1つ以上の浸透促進剤、界面活性剤、およびキレート化剤と併用して投与されるものである。好適な界面活性剤には、脂肪酸および/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および/またはその塩が含まれる。好適な胆汁酸/塩には、ケノデオキシコール酸(CDCA)およ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(glucolic acid)、グリコール酸(glycolic acid)、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、ならびにグリコジヒドロフシジン酸ナトリウムが含まれる。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、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプリン酸、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、またはモノグリセリド、ジグリセリド、もしくはその薬剤として許容される塩(例えば、ナトリウム)が含まれる。幾つかの実施形態において、浸透促進剤の組み合わせが使用され、例えば、胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩が挙げられる。例示的な1つの組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、およびUDCAのナトリウム塩である。さら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-セチルエーテルが含まれる。本発明で取り上げられるdsRNAは、噴霧乾燥粒子を含む顆粒形態で経口的に送達されるか、または微小もしくはナノ粒子を形成するように複合されてもよい。dsRNA複合剤には、ポリ-アミノ酸類；ポリイミン類；ポリアクリレート類；ポリアルキルアクリレート類、ポリオキセタン類、ポリアルキルシアノアクリレート類；カチオン化ゼラチン類、アルブミン類、デンプン類、アクリレート類、ポリエチレングリコール類(PEG)、およびデンプン類；ポリアルキルシアノアクリレート類；DEAE誘導体化ポリイミン類、ポルラン(pollulan)類、セルロース類、およびデンプン類が含まれる。好適な複合剤には、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リジン、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-アルブミンおよび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-co-グリコール酸(PLGA))、アルギン酸塩、ならびにポリエチレングリコール(PEG)が含まれる。dsRNA用の経口製剤およびそれらの調製は、米国特許第6,887,906号、米国特許公開第20030027780号、および米国特許第6,747,014号に詳細に記載され、これらはそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0155】

非経口、実質内(脳内への)、くも膜下腔内、脳室内、または肝内投与用の組成物および製剤には、滅菌水溶液が含まれてもよく、これも、限定されないが、浸透促進剤、担体化合物、および他の薬剤として許容される担体もしくは賦形剤等の緩衝液、希釈剤、およ

10

20

30

40

50

び他の好適な添加剤を含有し得る。

【0156】

本発明の医薬組成物には、溶液、エマルジョン、およびリボソームを含有する製剤が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物は、予め形成された液体、自己乳化型固体および、自己乳化型半固体を含む種々の構成成分から生成することができるが、これらに限定されない。肝臓癌等の肝障害を処置する際に肝臓を標的とする製剤が特に好ましい。

【0157】

本発明の医薬製剤は、簡便に単位剤形で提示することができ、医薬産業において周知である従来技法によって、調製することができる。かかる技法には、活性成分を1つもしくは複数の医薬用担体または1つもしくは複数の賦形剤と合わせるステップが含まれる。一般に、該製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体、あるいはその両方と均一かつ密接に関連させ、次いで必要であれば該産物を成形することによって調製される。

10

【0158】

本発明の組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐薬、および浣腸等の考えられる多くの剤形のうちのいずれかに製剤化することができる。また、本発明の組成物は、水性、疎水性、または混合媒体中の懸濁液として製剤化することもできる。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、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質をさらに含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

20

【0159】

エマルジョン

本発明の組成物は、エマルジョンとして調製および製剤化することができる。エマルジョンは、典型的には、1つの液体が、通常直径0.1 μm を超える液滴の形態の別の液体中に分散された多相系である (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)。エマルジョンは、しばしば、互いに密接に混合および分散される、2つの非混合性の液相を含む二相系である。一般に、エマルジョンは、油中水(w/o)型または水中油(o/w)型のいずれかの種類であり得る。水相が、大部分を占める油相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、油中水(w/o)型エマルジョンと称される。あるいは、油相が、大部分を占める水相中に微細に分割されて、微小液滴として分散される場合、得られる組成物は、水中油(o/w)型エマルジョンと称される。エマルジョンは、分散相に加えてさらなる構成成分と、水相または油相のいずれか中の溶液として、またはそれ自体別個の相として存在し得る、活性薬物とを含有することができる。また、乳化剤、安定剤、染料、および抗酸化剤等の医薬用賦形剤が、必要に応じてエマルジョン中に存在してもよい。また、医薬用エマルジョンは、例えば、油中水中油(o/w/o)型および水中油中水(w/o/w)型エマルジョンの場合等の、2つを超える相を含む、多重エマルジョンであってもよい。このような複合製剤は、しばしば、単純な二元エマルジョンは提供しない、特定の利点を提供する。o/w型エマルジョン

30

40

50

の個々の油滴が小さな水滴を囲む多重エマルジョンは、w/o/w型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内に囲まれた油滴の系は、o/w/o型エマルジョンを提供する。

【0160】

エマルジョンは、熱力学的安定性によってほとんどまたは全く特徴付けられない。しばしば、エマルジョンの分散相または不連続相が、外相または連続相中に良好に分散され、乳化剤の手段または製剤の粘度によってこの形態が維持される。エマルジョンの相のいずれも、エマルジョン型軟膏基剤およびクリームの場合のように、半固体または固体であり得る。エマルジョンを安定化する他の手段は、エマルジョンのいずれかの相に組み込むことができる乳化剤の使用を必要とする。乳化剤は、大きく、合成界面活性剤、天然に存在する乳化剤、吸収基剤、および微細に分散された固体の4つのカテゴリーに分類することができる (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

10

【0161】

合成界面活性剤は、界面活性剤としても知られ、エマルジョン製剤における広範な適用性が見出されており、文献で概説されている (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)。界面活性剤は、典型的には両親媒性であり、親水性および疎水性の部分を含む。界面活性剤の、親水性の疎水性に対する比率は、親水性/親油性バランス (HLB) と称されており、製剤の調製時の界面活性剤の分類および選択における、貴重なツールである。界面活性剤は、親水性基の性質に基づいて、非イオン性、アニオン性、カチオン性、および両性の異なるクラスに分類することができる (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。

20

30

【0162】

エマルジョン製剤に使用される天然に存在する乳化剤には、ラノリン、蜜蝋、フォスファチド類、レシチン、およびアカシアが含まれる。吸収基剤は、水を吸収してw/o型エマルジョンを形成するが、依然として無水ラノリンおよび親水性ペトロラタム等のそれらの半固体の稠度を保持することができる、親水性を有する。微細に分割された固体も、特に界面活性剤と組み合わせて、また粘性の調製物中で、良好な乳化剤として使用されている。これらには、極性の無機固体、例えば、重金属水酸化物、非膨張性粘土、例えば、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、コロイド性ケイ酸アルミニウムおよびコロイド性ケイ酸アルミニウムマグネシウム、顔料、ならびに非極性固体、例えば、炭素もしくはトリステアリン酸グリセリルが含まれる。

40

【0163】

また、多岐にわたる非乳化材料もエマルジョン製剤に含まれ、エマルジョンの性質に寄与する。これらには、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、防腐剤、および抗酸化剤が含まれる (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, R

50

ieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

【0164】

親水性コロイドまたは親水コロイドには、多糖類（例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲニン、グアーガム、カラヤガム、およびトラガカント）、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース）、および合成ポリマー（例えば、カルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー）等の、天然に存在するガムおよび合成ポリマーが含まれる。これらは、水中で分散または膨張して、分散相の液滴の周りに強い界面薄膜を形成し、外相の粘度を増加させることによってエマルジョンを安定化させる、コロイド溶液を形成する。

10

【0165】

エマルジョンは、しばしば、微生物の成長を容易に支持することができる炭水化物、タンパク質、ステロール、およびフォスファチド等の多くの成分を含有するため、これらの製剤には、しばしば防腐剤が組み込まれる。エマルジョン製剤に含まれる一般的に使用される防腐剤には、メチルパラベン、プロピルパラベン、第四アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸が含まれる。また、製剤の劣化を阻止するために、抗酸化剤も一般的にエマルジョン製剤に添加される。使用される抗酸化剤は、フリーラジカルスカベンジャー、例えば、トコフェロール、アルキルガレート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、または還元剤、例えば、アスコルビン酸およびメタ亜硫酸ナトリウム、ならびに抗酸化剤シナージスト、例えば、クエン酸、酒石酸、およびレシチンであり得る。

20

【0166】

皮膚、経口、および非経口経路を介するエマルジョン製剤の適用、ならびにそれらを製造するための方法は、文献で概説されている (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。経口送達用のエマルジョン製剤は、製剤化の容易さ、ならびに吸収および生物学的利用能の見地からの有効性から、非常に広範に使用されている (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)。鉱油基材の緩下剤、油性ビタミン、および高脂肪栄養調製物が、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。

30

【0167】

本発明の一実施形態において、dsRNAおよび核酸の組成物が、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、水、油、および単一の、光学的に等方性かつ熱力学的に安定な液体溶液である両親媒性物質の系として定義することができる (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。典型的には、マイクロエマルジョンは、まず油を界面活性剤水溶液中に分散し、次に十分な量の第4の構成成分、一般には中間鎖長のアルコールを添加して透明な系を形成することによって調製される、系である。したがって、マイクロエマルジョンは、表面活性分子の界面薄膜によって安定化される、2つの非混和液の熱力学的に安定で等方的な、透明の分散物質としても記載されている (Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and

40

50

Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185 - 215)。マイクロエマルジョンは、一般的に、油、水、界面活性剤、共界面活性剤、および電解質を含む、3～5つの構成成分の組み合わせを通じて調製される。マイクロエマルジョンが油中水(w/o)型、または水中油(o/w)型であるかは、使用される油および界面活性剤の性質、ならびに界面活性剤分子の極性頭部および炭化水素尾部の構造および幾何学的な畳み込みに依存する(Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

【0168】

相図を利用す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包括的な知識を当業者にもたらしめている(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)。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、自然発生的に形成される熱力学的に安定な液滴の製剤において、不水溶性薬物を可溶化する利点を提示する。

【0169】

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、または共界面活性剤と組み合わせた、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、テトラグリセロールモノラウレート(ML310)、テトラグリセロールモノオレエート(MO310)、ヘキサグリセロールモノオレエート(PO310)、ヘキサグリセロールペンタオレエート(PO500)、デカグリセロールモノカプレート(MCA750)、デカグリセロールモノオレエート(MO750)、デカグリセロールセクイオレエート(sequiolate)(SO750)、デカグリセロールデカオレエート(DAO750)が含まれるが、これらに限定されない。共界面活性剤は、通常、エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノール等の短鎖アルコールであるが、界面活性剤の薄膜中に浸透し、その結果、界面活性剤分子の間に生成される空隙のために不規則な薄膜を形成することによって、界面流動性を増加させる役目を果たす。しかしながら、マイクロエマルジョンは、共界面活性剤の使用を伴わずに調製することができ、アルコールを含まない自己乳化型のマイクロエマルジョン系が、当該技術分野において既知である。水相は、典型的には、水、該薬物の水溶液、グリセロール、PEG300、PEG400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコールの誘導体であり得るが、これらに限定されない。油相には、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中鎖(C8～C12)のモノ、ジ、およびトリ-グリセリド、ポリオキシエチル化グリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリ糖化(polyglycolized)グリセリド、飽和ポリ糖化C8～C10グリセリド、植物油、ならびにシリコンオイル等の材料が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0170】

マイクロエマルジョンは、薬物の可溶化および薬物吸収の亢進の見地から、特に興味深い。ペプチドを含む薬物の経口での生物学的利用能を亢進させるために、脂質基剤のマイクロエマルジョン(o/w型およびw/o型の両方)が提案されている(Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385 - 1390、Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205)。マイクロエマルジョンは、改善された薬物の可溶化、酵素的加水分解からの薬物の保護、界面活性剤が誘発する膜

10

20

30

40

50

流動性および透過性における変化による薬物吸収の潜在的な亢進、調製の容易さ、固形剤形を超える経口投与の容易さ、改善された臨床的効力、および低減した毒性の利点を提供する (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385、Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143)。しばしば、マイクロエマルジョンは、その構成成分が周囲温度で引き合わされると、自然発生的に形成され得る。これは、熱不安定性の薬物、ペプチド、または dsRNA を製剤化する際に特に有利であり得る。また、マイクロエマルジョンは、化粧用途および医薬用途の双方における活性構成成分の経皮送達に効果的である。本発明のマイクロエマルジョン組成物および製剤は、消化管からの dsRNA および核酸の向上された体内吸収を促進し、dsRNA および核酸の局所的な細胞取り込みを改善することが期待される。

10

【0171】

また、本発明のマイクロエマルジョンは、製剤の特性を改善し、本発明の dsRNA および核酸の吸収を亢進させるための、モノステアリン酸ソルビタン (Grill 3)、Labrasol、および浸透促進剤等のさらなる構成成分および添加剤を含有することができる。本発明のマイクロエマルジョンに使用される浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するものとして分類することができる (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。これらのクラスのそれぞれが、上述されている。

20

【0172】

浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、核酸、特に dsRNA の、動物の皮膚への効率的な送達を達成させるために、種々の浸透促進剤を用いる。ほとんどの薬物は、イオン化およ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、通常脂溶性または親油性の薬物のみが、容易に細胞膜を横断する。横断される膜が浸透促進剤で処理されている場合、非親油性薬物でさえも、細胞膜を横断し得ることが発見されている。非親油性薬物の細胞膜を横断する拡散の補助に加えて、浸透促進剤は、親油性薬物の透過性も亢進する。

【0173】

浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、および非キレート非界面活性剤の、5つの大きなカテゴリーのうちの1つに属するものとして分類することができる (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)。浸透促進剤の前述のクラスのそれぞれについて、以下により詳細に記載する。

30

【0174】

界面活性剤：本発明に関連して、界面活性剤 (または「表面活性剤」とは、水溶液中に溶解されると、溶液の表面張力または該水溶液と別の液体との間の界面張力を減少させ、粘膜を通る dsRNA の吸収が亢進されるという結果をもたらす、化学物質である。胆汁塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤には、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、およびポリオキシエチレン-20-セチルエーテル) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92)、ならびに FC-43 等のペルフルオロ化合物エマルジョンが含まれる (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252)。

40

【0175】

脂肪酸：浸透促進剤として作用する種々の脂肪酸およびそれらの誘導体には、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、ジカプリン酸、トリカプリン酸、モノオレイン

50

(1-モノオレオイル-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-モノカプリン酸、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C₁₋₁₀アルキルエステル(例えば、メチル、イソプロピル、およびt-ブチル)、ならびにそれらのモノおよびジ-グリセリド(すなわち、オレイン酸塩、ラウリン酸塩、カプリン酸塩、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、リノール酸塩等)が含まれる(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92、Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33、El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。

【0176】

胆汁塩：胆汁の生理学的役割には、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進が含まれる(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)。種々の天然胆汁塩、およびそれらの合成誘導体は、浸透促進剤として作用する。したがって、「胆汁塩」という用語には、胆汁の天然に存在する構成成分のうちのいずれも、ならびにそれらの合成誘導体のうちのいずれもが含まれる。好適な胆汁塩には、例えば、コール酸(もしくはその薬剤として許容されるナトリウム塩、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(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)、タウロ-24, 25-ジヒドロ-フシジン酸ナトリウム(STDHF)、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウム、およびポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル(POE)が含まれる(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)。

【0177】

キレート剤：本発明に関連して使用されるキレート剤は、金属イオンとの複合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dsRNAの吸収の亢進という結果をもたらす化合物として、定義することができる。本発明における浸透促進剤としての使用に関して、ほとんどの特徴付けられたDNAヌクレアーゼは触媒作用に二価金属イオンを必要とすることから、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機能するさらなる利点を有する(Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339)。好適なキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、クエン酸、サリチル酸塩(例えば、サリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチル酸塩、およびホモバニレート(homovanilate))、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9、およびベータ-ジケトンの

N - アミノアシル誘導体 (エナミン) が含まれるが、これらに限定されない (Lee et al., *Critical 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)。

【0178】

非キレート非界面活性剤：本明細書で使用される、非キレート非界面活性剤の浸透促進化合物は、キレート剤または界面活性剤としてわずかな活性しか示さないが、それにもかかわらず消化器粘膜を通じての dsRNA の吸収を亢進する化合物として、定義することができる (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1 - 33)。このクラスの浸透促進剤には、例えば、不飽和環状尿素、1 - アルキル - および 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、およびフェニルブタゾン等の非ステロイド性抗炎症薬 (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621 - 626) が含まれる。

10

【0179】

20

担体

また、本発明の特定の組成物には、製剤中に担体化合物が組み込まれる。本明細書で使用される、「担体化合物」または「担体」は、不活性 (すなわち、それ自体生物活性を有さない) であるが、例えば、生物活性のある核酸の分解、または循環からのその除去の促進によって、生物活性を有する核酸の生物学的利用能を減少させるインビボ過程によって、核酸として認識される、核酸、またはその類似体を指すことができる。核酸と担体化合物との同時投与は、典型的には後者の物質を過剰に伴い、おそらく共通の受容体に対する担体化合物と核酸との間の競合により、肝臓、腎臓、または他の循環外の貯蔵所で回収される核酸の量の著しい減少をもたらし得る。例えば、肝組織中の部分的ホスホロチオエート dsRNA の回収は、それがポリノシン酸、硫酸デキストラン、ポリシチジン酸 (polycytidic acid)、または 4' - アセトアミド - 4 イソチオシアノ - スチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸と同時投与される場合、減少され得る (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115 - 121、Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177 - 183)。

30

【0180】

賦形剤

担体化合物とは対照的に、「医薬用担体」または「賦形剤」は、1つ以上の核酸を動物に送達するための、薬剤として許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性な媒体である。賦形剤は液体または固体であり得、核酸および所定の医薬組成物の他の構成成分と組み合わせられた時に、所望の用量、軟度等を提供するように、計画された投与の様態を念頭において選択される。典型的な医薬用担体には、結合剤 (例えば、アルファ化トウモロコシデンブ、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース等)、充填剤 (例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶性セルロース、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、またはリン酸水素カルシウム等)、滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等)、崩壊剤 (例えば、デンブ、デンブグリコール酸ナトリウム等)、ならびに湿潤剤 (例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等) が含まれるが、これらに限定されない。

40

50

【0181】

また、核酸と有害に反応しない、経口（non-parenteral）投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を、本発明の組成物を製剤化するために使用することができる。好適な薬剤として許容される担体には、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、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等が含まれるが、これらに限定されない。

【0182】

核酸の局所投与用の製剤には、滅菌および非滅菌水溶液、アルコール等の一般的な溶媒中の非水溶液、または液体もしくは固形の油基剤中の核酸の溶液が含まれ得る。該溶液は、緩衝液、希釈剤、および他の好適な添加剤も含有し得る。核酸と有害に反応しない、経口（non-parenteral）投与に好適な薬剤として許容される有機または無機賦形剤を使用することができる。

10

【0183】

好適な薬剤として許容される賦形剤には、水、塩類溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、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等が含まれるが、これらに限定されない。

【0184】

他の構成成分

本発明の組成物は、医薬組成物中に従来認められる他の補助的な構成成分を、それらの当該技術分野において確立された使用量レベルで、さらに含有することができる。したがって、例えば、本組成物は、さらに、例えば、鎮痒薬、収斂薬、局所麻酔薬、または抗炎症薬等の、適合性の、薬剤として活性な材料を含有してもよく、あるいは、染料、香味剤、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤等の、本発明の組成物の種々の剤形に物理的に製剤化するために有用な、さらなる材料を含有してもよい。しかし、かかる材料は、添加された時に、本発明の組成物の構成成分の生物活性を過度に妨げてはならない。該製剤を滅菌し、所望される場合、補助的な薬剤、例えば、該製剤の1つまたは複数の核酸と有害に相互作用しない滑沢剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝液、着色物質、香味物質、および/または芳香物質等と混合してもよい。

20

30

【0185】

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、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することができる。また、懸濁液は、安定剤も含有することができる。

【0186】

幾つかの実施形態において、本発明で取り上げられる医薬組成物には、(a) 1つ以上のdsRNA化合物および(b)非RNAi機序によって機能する1つ以上の抗サイトカイン生物剤が含まれる。かかる生物学の例には、IL1（例えばアンキンラ）、IL6（トシリズマブ）、またはTNF（エタネルセプト、インフリキシマブ、アドリムマブ、もしくはセルトリズマブ）を標的とする生物学が含まれる。

40

【0187】

かかる化合物の毒性および治療効果は、例えば、LD50（集団の50%に致死的な用量）、およびED50（集団の50%に治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的な医薬的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、LD50/ED50比として表すことができる。高い治療指数を呈する化合物が好ましい。

【0188】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータを、ヒトにおける使用のための一連の投薬量の処方決定に使用することができる。本発明で取り上げられる組成物の投薬量

50

は、一般に、ほとんどまたは全く毒性のないED50を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なり得る。本発明で取り上げられる方法において使用されるいずれの化合物についても、治療上有効な用量は、まず細胞培養アッセイから推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、IC50（すなわち、症状の半値阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む、化合物、または適切な場合は、標的配列のポリペプチド産物の循環血漿濃度範囲（例えば、該ポリペプチドの濃度の低下を達成する）を達成するように、処方決定することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

10

【0189】

それらの投与に加えて、上述のように、本発明で取り上げられるdsRNAは、TTRの発現によって媒介される病理過程の処置に効果的な他の既知の薬剤と組み合わせて投与することができる。いずれの場合においても、投与する医師は、当該技術分野において既知であるか、または本明細書に記載される、標準的な有効性の測定値を使用して得られた結果に基づいて、dsRNA投与の量およびタイミングを調整することができる。

【0190】

TTR遺伝子の発現によって引き起こされる疾患を治療するための方法

本発明は、特に、TTRを標的とするdsRNA、およびTTR媒介性障害もしくは疾患の治療のための少なくとも1つのかかるdsRNAを含有する組成物の使用に関する。例えば、TTR遺伝子を標的とするdsRNAは、家族性アミロイド神経障害（FAP）、家族性アミロイド心筋症（FAC）、髄膜/CNSアミロイドーシス、アミロイドーシスV1I型（髄膜もしくは脳血管性アミロイドーシスとしても知られている）、高サイロキシン血症、および心アミロイドーシス（老年性全身アミロイドーシス（SSA）および老年性心アミロイドーシス（SCA）とも称される）等のTTRアミロイドーシスの治療のために有用であり得る。

20

【0191】

図15は、家族性アミロイド神経障害、家族性アミロイド心筋症、およびCNSアミロイドーシスと関連するTTRにおける、症状および変異を図示する。本発明には、これらの疾患および症状の治療のための組成物および方法が含まれ、TTRのこれらの変異型を対象とする。

30

【0192】

TTR遺伝子を標的とするdsRNAはまた、TTRアミロイドーシス等の症状および障害の治療にも使用される。かかるアミロイドーシスと関連する症状には、例えば、発作、認知症、ミエロパシー、多発性神経障害、手根管症候群、自律神経不全症、心筋症、胃腸障害（例えば、胃潰瘍、下痢、便秘、または吸収不良）、体重の減少、肝腫大、リンパ節腫脹症、甲状腺腫、硝子体混濁、腎不全（タンパク尿および腎機能障害を含む）、腎症、脳神経障害、角膜格子状変性、および全身衰弱を伴ううつ血性心不全、ならびに体液の停滞による呼吸困難が含まれる。

【0193】

TTRの発現に対する阻害効果により、本発明に従う組成物またはそこから調製される医薬組成物は、生活の質を向上させることができる。

40

【0194】

本発明は、さらに、例えば、これらの障害を治療するために現在用いられているもの等の、他の医薬品および/または他の治療方法、例えば、既知の医薬品および/または既知の治療方法と併用して、例えば、TTRアミロイドーシスを治療するための、dsRNAまたはその医薬組成物の使用に関する。一例では、TTRを標的とするdsRNAは、肝臓移植との併用で投与することができる。他の例では、TTRを標的とするdsRNAは、例えば、腎機能の管理のために、利尿薬、ACE（アンジオテンシン変換酵素）阻害剤、アンジオテンシン受容体遮断薬（ARB）、または透析療法等の、TTR疾患の症状を

50

治療するための医薬的または治療方法と併用して、投与することができる。

【0195】

dsRNAおよびさらなる治療薬は、同様の併用で、例えば、非経口で投与することができるか、またはさらなる治療薬は、別個の組成物の一部として、または本明細書に記載の別の方法によって投与することができる。

【0196】

本発明は、TTRアミロイドーシス、例えば、FAP等のTTRの発現によって媒介される疾患または障害を有する患者に、TTRを標的とするdsRNAを投与する方法を取り上げる。該dsRNAの投与は、例えば、FAPに罹患している患者において、末梢神経系の機能を安定させ、向上させることができる。患者は、治療量のdsRNA、例えば、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、または2.5mg/kgのdsRNAを投与することができる。該dsRNAは、一定期間、例えば、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、60分間、120分間、または180分間にわたって投与することができる。例えば、定期的に、例えば、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、またはそれ以上の期間、隔週で（すなわち、2週間ごとに）、反復投与される。初期治療レジメン後、該治療は、より低い頻度で、投与することができる。例えば、隔週で3ヶ月間、投与した後、6ヶ月間、またはそれ以上の期間、1ヶ月に1回、反復投与することができる。該dsRNAの投与は、患者における血液中または尿のTTRレベルを、少なくとも20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%もしくはそれ以上軽減することができる。

10

20

【0197】

総量の該dsRNAを投与する前に、患者は、総量の5%用量等の少量の用量を投与し、アレルギー反応または肝機能の変化等の副作用を監視することができる。例えば、肝機能の変化に対して監視される患者において、LFT（肝機能検査）の変化の低い発生率（例えば、LFTの10~20%発生率）は、許容される（例えば、可逆的な、ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ）および/またはAST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ）レベルの3倍の増加）。

【0198】

多くのTTR関連の疾病および障害は、遺伝性である。したがって、TTRのdsRNAを必要とする患者は、家族歴を得ることによって特定することができる。医者、看護師、または家族等のヘルスケア提供者は、TTRのdsRNAを処方する、または投与する前に家族歴を得ることができる。DNAテストもはまた、TTRのdsRNAを患者に投与する前に、TTR遺伝子の変異を同定するために、該患者に実施され得る。

30

【0199】

該患者は、TTRのdsRNAを受ける前に実施される生検を有し得る。該生検は、例えば、胃粘膜、末梢神経、皮膚、腹部脂肪、肝臓、もしくは腎臓等の組織上にあり得、該生検は、TTRによって媒介される障害を示す、アミロイド斑を示し得る。アミロイド斑を確認すると、患者は、TTRのdsRNAが投与される。

【0200】

TTR遺伝子の発現を阻害するための方法

さらに別の態様において、本発明は、哺乳動物における、TTR遺伝子の発現を阻害するための方法を提供する。該方法は、標的TTR遺伝子の発現が停止されるように、本発明で取り上げられる組成物を該哺乳動物に投与することを含む。

40

【0201】

処置される生物がヒト等の哺乳動物である場合、本組成物は、頭蓋内（例えば脳室内、脳実質内、およびくも膜下腔）、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（噴霧剤）、経鼻、直腸、ならびに局所（口腔および舌下を含む）投与を含む、経口または非経口の経路を含むが、これらに限定されない、当該技術分野において既知の任意の手段によって投与することができる。ある実施形態において、本組成物は、静脈内注入もしくは注射によって投

50

与される。

【0202】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および化学用語は、本発明が属する分野における当業者によって一般的に理解されるもの同一の意味を有する。本発明で取り上げられる dsRNA および方法の実践または試験に際して、本明細書に記載されるものと同様または等価の方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合は、定義を含み、本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および例は例示に過ぎず、限定するものではない。

【実施例】

【0203】

実施例

実施例 1 . dsRNA 合成

試薬の供給源

試薬の供給源が本明細書に具体的に与えられていない場合、かかる試薬は、分子生物学の用途に標準的な質/純度で、分子生物学用の試薬の任意の供給業者から得ることができる。

【0204】

siRNA 合成

Expedite 8909 合成機 (Applied Biosystems, Appliedera Deutschland GmbH, Darmstadt, Germany)、および固体支持体として制御細孔ガラス (CPG、500、Proligo Biochemie GmbH (Hamburg, Germany)) を使用して、1 μモルの規模で固相合成によって単鎖 RNA を生成した。RNA および 2'-O-メチルヌクレオチドを含有する RNA を、対応するホスホラミダイトおよび 2'-O-メチルホスホラミダイト (Proligo Biochemie GmbH (Hamburg, Germany)) をそれぞれ用いて、固相合成によって生成した。これらの構成要素を、Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA に記載されるような、標準的なヌクレオシドホスホラミダイト化学反応を用いて、オリゴリボヌクレオチド鎖の配列内の選択された部位に組み込んだ。ヨウ素酸化剤溶液を、アセトニトリル (1%) 中の Beaucage 試薬 (Chruachem Ltd (Glasgow, UK)) の溶液と置き換えて、ホスホロチオエート結合を導入した。さらなる補助試薬を Mallinckrodt Baker (Griesheim, Germany) から入手した。

【0205】

確立された手順に従い、陰イオン交換 HPLC によって、粗オリゴリボヌクレオチドの脱保護および精製を行った。収量および濃度を、分光光度計 (DU 640B、Beckman Coulter GmbH, (Unterschleissheim, Germany)) を使用した、260 nm の波長でのそれぞれの RNA の溶液の UV 吸収によって判定した。アニーリング緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8)、100 mM 塩化ナトリウム) 中で相補鎖の等モル溶液を混合し、3 分間 85 ~ 90 の湯浴中で加温し、3 ~ 4 時間かけて室温に冷却することによって、二本鎖 RNA を生成した。アニールされた RNA 溶液は、使用するまで -20 で保管した。

【0206】

3'-コレステロールで共役した siRNA (本明細書で -Chol-3' と称される) の合成には、RNA 合成のために適切に改質された固体支持体を使用された。改質された固体支持体は、以下のように調製した。

【0207】

10

20

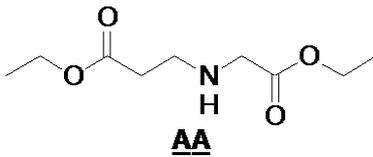
30

40

50

ジエチル - 2 - アザブタン - 1 , 4 - ジカルボキシレート AA

【化 2】



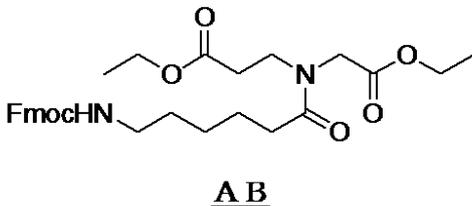
水酸化ナトリウムの 4 . 7 M の水溶液 (5 0 m L) を、水 (5 0 m L) 中のグリシンエチル塩酸塩 (3 2 . 1 9 g 、 0 . 2 3 モル) の、攪拌して氷冷した溶液に添加した。次いで、エチルアクリレート (2 3 . 1 g 、 0 . 2 3 モル) を添加し、混合物を、反応の完了が T L C によって確認されるまで、室温で攪拌した。1 9 時間後、該溶液をジクロロメタン (3 × 1 0 0 m L) で分配した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。残渣を蒸留して、AA (2 8 . 8 g 、 6 1 %) を得た。

10

【 0 2 0 8 】

3 - { エトキシカルボニルメチル - [6 - (9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニル - アミノ) - ヘキサノイル] - アミノ } - プロピオン酸エチルエステル AB

【化 3】



20

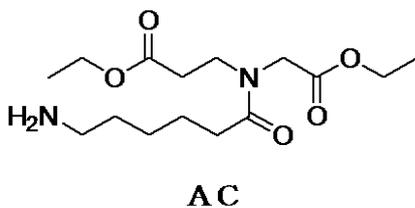
Fmoc - 6 - アミノ - ヘキサン酸 (9 . 1 2 g 、 2 5 . 8 3 ミリモル) をジクロロメタン (5 0 m L) に溶解し、氷冷した。ジイソプロピルカルボジイミド (3 . 2 5 g 、 3 . 9 9 m L 、 2 5 . 8 3 ミリモル) を該溶液に 0 で添加した。その後、ジエチル - アザブタン - 1 , 4 - ジカルボキシレート (5 g 、 2 4 . 6 ミリモル) 、およびジメチルアミノピリジン (0 . 3 0 5 g 、 2 . 5 ミリモル) を添加した。該溶液が室温になるようにし、さらに 6 時間攪拌した。反応の完了を T L C で確認した。反応混合物を真空下で濃縮し、酢酸エチルを添加して、ジイソプロピル尿素を沈殿させた。この懸濁液を濾過した。濾液を 5 % 塩酸水溶液、5 % 飽和重炭酸ナトリウム、および水で洗浄した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させて濃縮し、粗生成物を得て、カラムクロマトグラフィー (5 0 % EtOAc / ヘキサン) で精製し、1 1 . 8 7 g (8 8 %) の AB を得た。

30

【 0 2 0 9 】

3 - [(6 - アミノ - ヘキサノイル) - エトキシカルボニルメチル - アミノ] - プロピオン酸エチルエステル AC

【化 4】



40

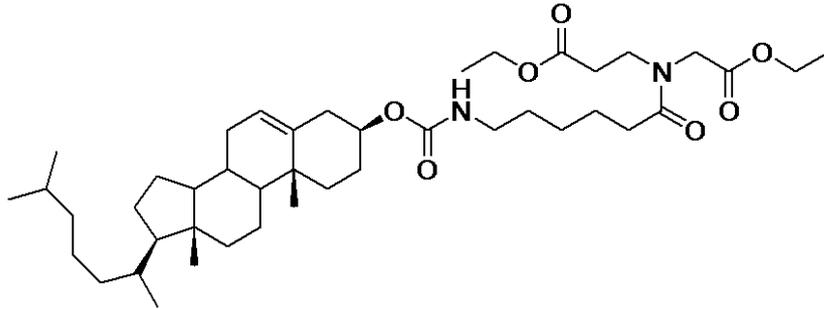
3 - { エトキシカルボニルメチル - [6 - (9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニルアミノ) - ヘキサノイル] - アミノ } - プロピオン酸エチルエステル AB (1 1 . 5 g 、 2 1 . 3 ミリモル) を、0 のジメチルホルムアミド中の 2 0 % ピペリジンに溶解した。この溶液を 1 時間攪拌し続けた。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣に水を添加し、酢酸エチルで生成物を抽出した。この粗生成物をその塩酸塩に変換することによって精

50

製した。

【0210】

3 - ({ 6 - [17 - (1 , 5 - ジメチル - ヘキシル) - 10 , 13 - ジメチル - 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 , 17 - テトラデカヒドロ - 1H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ] - ヘキサノイル } エトキシカルボニルメチル - アミノ) - プロピオン酸エチルエステル A D
【化5】



10

AD

3 - [(6 - アミノ - ヘキサノイル) - エトキシカルボニルメチル - アミノ] - プロピオン酸エチルエステル A C (4 . 7 g 、 14 . 8 ミリモル) の塩酸塩をジクロロメタンに取り込んだ。この懸濁液を氷上で 0 に冷却した。この懸濁液にジイソプロピルエチルアミン (3 . 87 g 、 5 . 2 mL 、 30 ミリモル) を添加した。得られた溶液に、コレステリルクロロホルメート (6 . 675 g 、 14 . 8 ミリモル) を添加した。反応混合物を終夜攪拌した。反応混合物をジクロロメタンで希釈し、10%塩酸で洗浄した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した (10 . 3 g 、 92%) 。

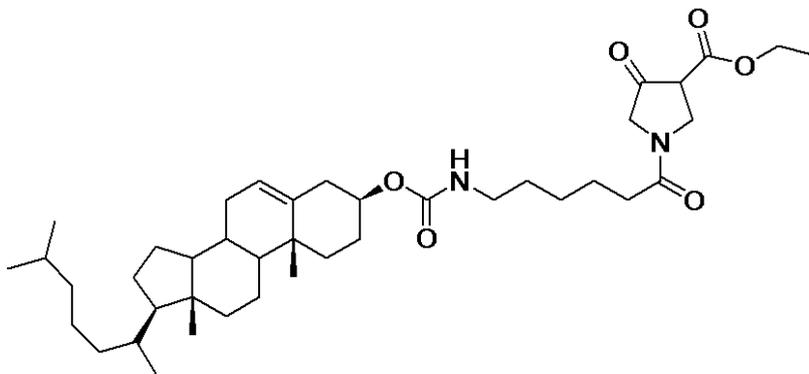
20

【0211】

1 - { 6 - [17 - (1 , 5 - ジメチル - ヘキシル) - 10 , 13 - ジメチル - 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 , 12 , 13 , 14 , 15 , 16 , 17 - テトラデカヒドロ - 1H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ] - ヘキサノイル } - 4 - オキソ - ピロリジン - 3 - カルボン酸エチルエステル A E

30

【化6】



40

AE

カリウム t - ブトキシド (1 . 1 g 、 9 . 8 ミリモル) を 30 mL の乾燥トルエンでスラリーにした。この混合物を氷上で 0 に冷却し、5 g (6 . 6 ミリモル) のジエステル A D を 20 分以内のうちに、攪拌しながらゆっくりと添加した。添加の間、温度は 5 未満に維持した。攪拌を 0 で 30 分間継続し、1 mL の氷酢酸、その直後に 40 mL の水中の 4 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を添加した。得られた混合物を 2 回、それぞれ 100 mL

50

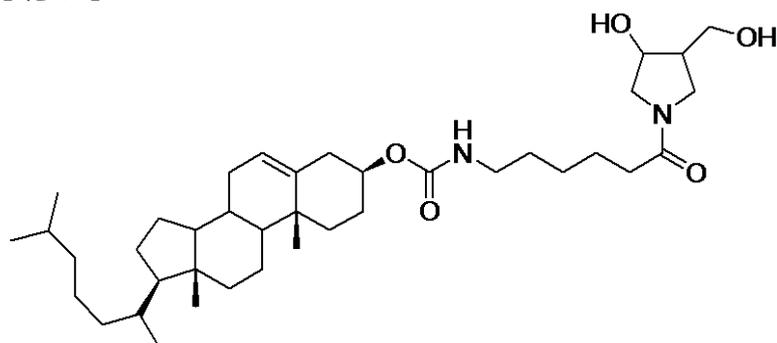
Lのジクロロメタンで抽出し、合わせた有機抽出物を2回、それぞれ10 mLのリン酸緩衝液で洗浄し、乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を60 mLのトルエンに溶解し、0 に冷却し、それぞれ50 mLの、

pH 9.5の冷炭酸塩緩衝液で3回抽出した。水性抽出液をリン酸でpH 3に調整し、それぞれ40 mLのクロロホルムで5回抽出し、合わせて乾燥させ、蒸発乾固させた。残渣を25%酢酸エチル/ヘキサンを使用して、カラムクロマトグラフィーで精製し、1.9 gのb-ケトエステルを得た(39%)。

【0212】

[6-(3-ヒドロキシ-4-ヒドロキシメチル-ピロリジン-1-イル)-6-オキソ-ヘキシル]-カルバミン酸17-(1,5-ジメチル-ヘキシル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イルエステルAF

【化7】



AF

メタノール(2 mL)を、b-ケトエステルAE(1.5 g、2.2ミリモル)と、テトラヒドロフラン(10 mL)中の水素化ホウ素ナトリウム(0.226 g、6ミリモル)との還流混合物に、1時間かけて滴下した。攪拌を還流温度で1時間継続した。室温に冷却後、1NのHCl(12.5 mL)を添加し、混合物を酢酸エチルで抽出した(3×40 mL)。合わせた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、真空下で濃縮して生成物を得て、カラムクロマトグラフィー(10% MeOH/CHCl₃)で精製した(89%)。

【0213】

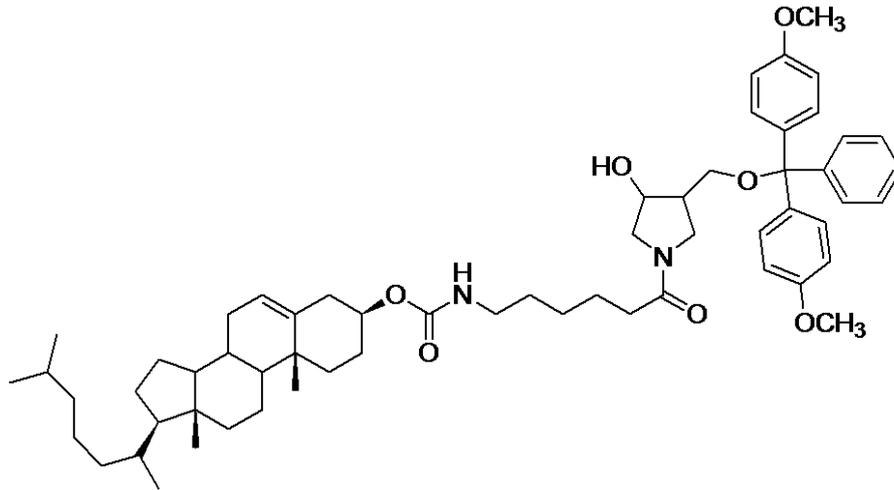
(6-{3-[ビス-(4-メトキシ-フェニル)-フェニル-メトキシメチル]-4-ヒドロキシ-ピロリジン-1-イル}-6-オキソ-ヘキシル)-カルバミン酸17-(1,5-ジメチル-ヘキシル)-10,13-ジメチル-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロペンタ[a]フェナントレン-3-イルエステルAG

10

20

30

【化 8】



10

AG

ジオール A F (1 . 2 5 g 、 1 . 9 9 4 ミリモル) を、真空内でピリジン (2 × 5 m L) を用いて蒸発乾固した。無水ピリジン (1 0 m L) および 4 , 4 ' - ジメトキシトリチルクロリド (0 . 7 2 4 g 、 2 . 1 3 ミリモル) を攪拌しながら添加した。反応は、終夜室温で行われた。メタノールを添加して反応を停止させた。反応混合物を真空下で濃縮し、残渣にジクロロメタン (5 0 m L) を添加した。この有機層を 1 M の飽和重炭酸ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。トルエンを蒸発させて残渣のピリジンを除去した。この粗生成物をカラムクロマトグラフィー (2 % MeOH / クロロホルム、5 % MeOH / CHCl₃ 中 R_f = 0 . 5) で精製した (1 . 7 5 g 、 9 5 %) 。

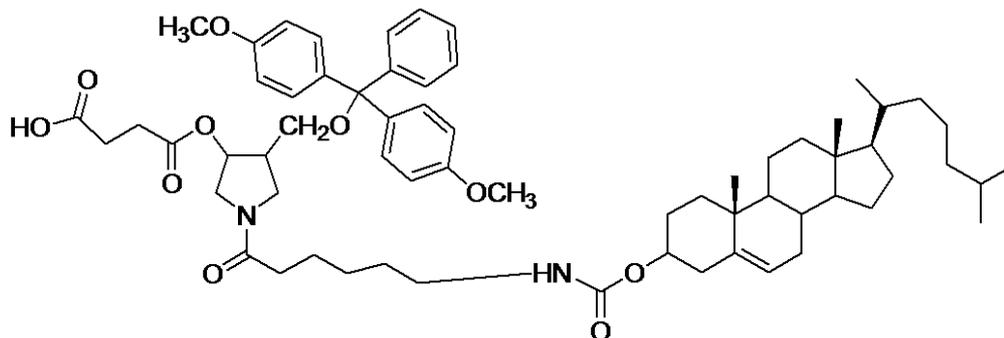
20

【 0 2 1 4 】

コハク酸モノ - (4 - [ビス - (4 - メトキシ - フェニル) - フェニル - メトキシメチル] - 1 - { 6 - [1 7 - (1 , 5 - ジメチル - ヘキシル) - 1 0 , 1 3 - ジメチル 2 , 3 , 4 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 , 1 7 - テトラデカヒドロ - 1 H シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルオキシカルボニルアミノ] - ヘキサノイル } - ピロリジン - 3 - イル) エステル A H

30

【化 9】



40

AH

化合物 A G (1 . 0 g 、 1 . 0 5 ミリモル) を無水コハク酸 (0 . 1 5 0 g 、 1 . 5 ミリモル) および D M A P (0 . 0 7 3 g 、 0 . 6 ミリモル) と混合し、終夜 4 0 の真空内で乾燥させた。該混合物を無水ジクロロエタン (3 m L) に溶解し、トリエチルアミン (0 . 3 1 8 g 、 0 . 4 4 0 m L 、 3 . 1 5 ミリモル) を添加し、この溶液をアルゴン雰

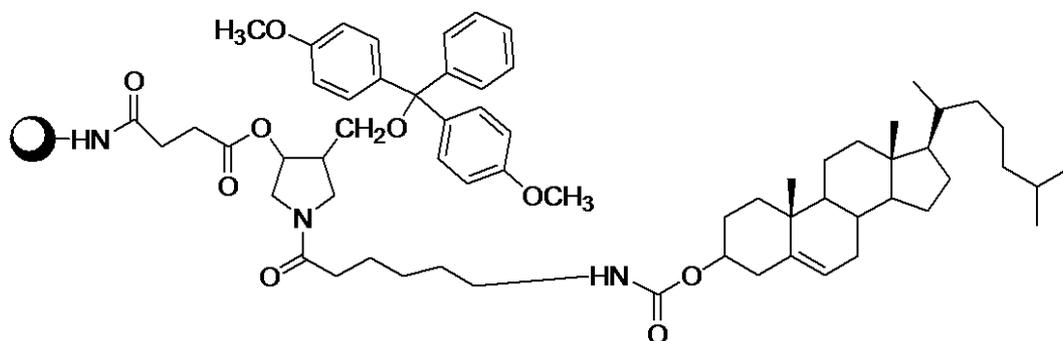
50

雰囲気下で16時間、室温で撹拌した。次いで、これをジクロロメタン(40 mL)で希釈し、氷冷クエン酸水溶液(5重量%、30 mL)および水(2×20 mL)で洗浄した。該有機相を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮乾固した。残渣をそのまま次のステップに使用した。

【0215】

コレステロール誘導体化CPG AI

【化10】



10

AI

コハク酸AH(0.254 g、0.242ミリモル)を、ジクロロメタン/アセトニトリル(3:2、3 mL)の混合物に溶解した。その溶液に、アセトニトリル(1.25 mL)中のDMA P(0.0296 g、0.242ミリモル)、アセトニトリル/ジクロロエタン(3:1、1.25 mL)中の2,2'-ジチオ-ビス(5-ニトロピリジン)(0.075 g、0.242ミリモル)を順次添加した。得られた溶液に、アセトニトリル(0.6 mL)中のトリフェニルホスフィン(0.064 g、0.242ミリモル)を添加した。反応混合物の色が鮮やかな橙色に変わった。この溶液を、手首動作式振盪機(wrist-action shaker)を使用して短く撹拌した(5分)。長鎖アルキルアミン-CPG(LCAA-CPG)(1.5 g、61 mM)を添加した。懸濁液を2時間撹拌した。焼結漏斗を通してCPGを濾過し、アセトニトリル、ジクロロメタン、およびエーテルで順次洗浄した。無水酢酸/ピリジンを使用して未反応のアミノ基を遮蔽した。達成されたCPGの装填を、UV測定値を取ることによって測定した(37 mM/g)。

20

30

【0216】

5'-12-ドデカン酸ビスデシルアミド(bisdecylamide)基(本明細書で「5'-C32-」と称される)または5'-コレステリル誘導体基(本明細書で「5'-Chol-」と称される)を担持するsiRNAの合成は、コレステリル誘導体について、酸化ステップが、核酸オリゴマーの5'末端にホスホロチオエート結合を導入するために、Beaucage試薬を使用して行われたことを除いて、国際公開WO第2004/065601号に記載されるように行った。

【0217】

核酸配列を、標準的なヌクレオチド命名法、具体的には、表1の略語を使用して、以下に示す。

40

【表 2】

表 1:核酸配列に使用されるヌクレオチドモノマーの略語の説明 これらのモノマーは、オリゴヌクレオチドが存在する場合、5' - 3' -ホスホジエステル結合によって相互に結合することが理解されよう。

略語	ヌクレオチド
A	アデノシン-3' -リン酸
C	シチジン-3' -リン酸
G	グアノシン-3' -リン酸
T	5-メチルウリジン-3' -リン酸
U	ウリジン-3' -リン酸
N	任意のヌクレオチド(G、A、C、またはT)
a	2' -O-メチルアデノシン-3' -リン酸
c	2' -O-メチルシチジン-3' -リン酸
g	2' -O-メチルグアノシン-3' -リン酸
u	2' -O-メチルウリジン-3' -リン酸
dT	2' -デオキシチミジン-3' -リン酸
sT、sdT	2' -デオキシチミジン-5' リン酸-ホスホロチオエート

10

20

【 0 2 1 8 】

実施例 2 A . T T R の s i R N A 設計

転写物

s i R N A 設計は、ヒト (記号 T T R) およびラット (記号 T t r) からの遺伝子トランスクリプトを標的とする s i R N A を同定するに行われた。該設計は、N C B I R e f s e q 収集からの T T R の転写物 N M _ 0 0 0 3 7 1 . 2 (配列番号 1 3 2 9) (ヒト) および N M _ 0 1 2 6 8 1 . 1 (配列番号 1 3 3 0) (ラット) を使用した。それらのそれぞれの T T R 遺伝子に 1 0 0 % 同一性がある、s i R N A 二本鎖を設計した。

【 0 2 1 9 】

s i R N A 設計および特異性の予測

全ての可能な 1 9 量体の予測された特異性を、それぞれの配列に対して決定した。T T R の s i R N A を、F A S T A アルゴリズムを用いて、ヒトおよびラットのトランスクリプトーム (N C B I R e f s e q セット内の N M _ および X M _ の記録のセットとして定義される) に対する包括的検索において使用した。次いで、P y t h o n スクリプト「オフターゲット F a s t a . p y」を使用して、整列を解析し、s i R N A と任意の潜在的「オフターゲット」転写物との間のミスマッチの位置および数に基づいてスコアを得た。該オフターゲットスコアは、分子の 5' 末端から 2 ~ 9 位での、s i R N A の「播種」領域の差異を強調するように重み付けする。該オフターゲットスコアは、以下のとおり算出される。オリゴと転写物との間のミスマッチに、ペナルティーを課す。オリゴの 2 ~ 9 位での、播種領域のミスマッチには、2 . 8 のペナルティーを課し、推定切断部位 1 0 および 1 1 のミスマッチには、1 . 2 のペナルティーを課し、1 2 ~ 1 9 位でのミスマッチには、1 のペナルティーを課す。1 位でのミスマッチは、考慮されない。次いで、それぞれのオリゴ転写物対のオフターゲットスコアが、ミスマッチのペナルティーを合計することによって計算される。次いで、全てのオリゴ転写物対からの最小オフターゲットスコアを決定し、オリゴのその後の分類に使用する。両方の s i R N A 鎖を、算出したスコアに従って、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見なす。どのオリゴが合成されるべきか選択するとき、アンチセンス鎖のオフターゲットスコアを、降順に並べ、ヒトからの最良の 1 4 4 個 (最小オフターゲットスコア) オリゴ対、およびラットからの最良の 2 6 個の対を選択した。

30

40

50

【 0 2 2 0 】

s i R N A の 配 列 選 択

ヒトTTRに由来する合計140個のセンスおよび140個のアンチセンスのs i R N A オリゴを合成し、二本鎖に形成した。ラットTTRに由来する合計26個のセンスおよび26個のアンチセンスのs i R N A オリゴを合成し、二本鎖に形成した。該オリゴに含まれた二本鎖を、表2～4（ヒトTTR）および表5～7（ラットTTR）に示す。

【 0 2 2 1 】

【表 3 - 1】

表 2. ヒト TTR の dsRNA 用の認識番号
オリゴの配列および修飾については、表 4 を参照されたい。

二本鎖#	センス オリゴ#	アンチセンス オリゴ#
AD-18243	A-32153	A-32154
AD-18244	A-32155	A-32156
AD-18245	A-32157	A-32158
AD-18246	A-32159	A-32160
AD-18247	A-32163	A-32164
AD-18248	A-32165	A-32166
AD-18249	A-32167	A-32168
AD-18250	A-32169	A-32170
AD-18251	A-32171	A-32172
AD-18252	A-32175	A-32176
AD-18253	A-32177	A-32178
AD-18254	A-32179	A-32180
AD-18255	A-32181	A-32182
AD-18256	A-32183	A-32184
AD-18257	A-32187	A-32188
AD-18258	A-32189	A-32190
AD-18259	A-32191	A-32192
AD-18260	A-32193	A-32194
AD-18261	A-32195	A-32196
AD-18262	A-32199	A-32200
AD-18263	A-32201	A-32202
AD-18264	A-32203	A-32204
AD-18265	A-32205	A-32206
AD-18266	A-32207	A-32208
AD-18267	A-32211	A-32212
AD-18268	A-32213	A-32214
AD-18269	A-32215	A-32216
AD-18270	A-32217	A-32218
AD-18271	A-32219	A-32220
AD-18272	A-32221	A-32222
AD-18273	A-32223	A-32224
AD-18274	A-32225	A-32226
AD-18275	A-32227	A-32228
AD-18276	A-32229	A-32230
AD-18277	A-32231	A-32232
AD-18278	A-32233	A-32234
AD-18279	A-32235	A-32236
AD-18280	A-32237	A-32238
AD-18281	A-32239	A-32240
AD-18282	A-32241	A-32242
AD-18283	A-32243	A-32244

10

20

30

40

【表 3 - 2】

二本鎖#	センス オリゴ#	アンチセンス オリゴ#
AD-18284	A-32247	A-32248
AD-18285	A-32249	A-32250
AD-18286	A-32251	A-32252
AD-18287	A-32253	A-32254
AD-18288	A-32255	A-32256
AD-18289	A-32259	A-32260
AD-18290	A-32261	A-32262
AD-18291	A-32263	A-32264
AD-18292	A-32265	A-32266
AD-18293	A-32267	A-32268
AD-18294	A-32269	A-32270
AD-18295	A-32271	A-32272
AD-18296	A-32273	A-32274
AD-18297	A-32275	A-32276
AD-18298	A-32277	A-32278
AD-18299	A-32279	A-32280
AD-18300	A-32281	A-32282
AD-18301	A-32283	A-32284
AD-18302	A-32285	A-32286
AD-18303	A-32287	A-32288
AD-18304	A-32289	A-32290
AD-18305	A-32291	A-32292
AD-18306	A-32295	A-32296
AD-18307	A-32297	A-32298
AD-18308	A-32299	A-32300
AD-18309	A-32301	A-32302
AD-18310	A-32303	A-32304
AD-18311	A-32307	A-32308
AD-18312	A-32309	A-32310
AD-18313	A-32311	A-32312
AD-18314	A-32313	A-32314
AD-18315	A-32315	A-32316
AD-18316	A-32319	A-32320
AD-18317	A-32321	A-32322
AD-18318	A-32323	A-32324
AD-18319	A-32325	A-32326
AD-18320	A-32327	A-32328
AD-18321	A-32331	A-32332
AD-18322	A-32333	A-32334
AD-18323	A-32335	A-32336
AD-18324	A-32337	A-32338
AD-18325	A-32339	A-32340
AD-18326	A-32341	A-32342
AD-18327	A-32343	A-32344

10

20

30

40

【表 3 - 3】

二本鎖#	センス オリゴ#	アンチセンス オリゴ#
AD-18328	A-32345	A-32346
AD-18329	A-32347	A-32348
AD-18330	A-32349	A-32350
AD-18331	A-32351	A-32352
AD-18332	A-32353	A-32354
AD-18333	A-32355	A-32356
AD-18334	A-32357	A-32358
AD-18335	A-32359	A-32360
AD-18336	A-32363	A-32364
AD-18337	A-32367	A-32368
AD-18338	A-32369	A-32370
AD-18339	A-32371	A-32372
AD-18340	A-32373	A-32374
AD-18341	A-32375	A-32376
AD-18342	A-32379	A-32380
AD-18343	A-32381	A-32382
AD-18344	A-32383	A-32384
AD-18345	A-32385	A-32386
AD-18346	A-32387	A-32388
AD-18347	A-32391	A-32392
AD-18348	A-32393	A-32394
AD-18349	A-32395	A-32396
AD-18350	A-32397	A-32398
AD-18351	A-32399	A-32400
AD-18352	A-32401	A-32402
AD-18353	A-32403	A-32404
AD-18354	A-32405	A-32406
AD-18355	A-32407	A-32408
AD-18356	A-32409	A-32410
AD-18357	A-32411	A-32412
AD-18358	A-32415	A-32416
AD-18359	A-32417	A-32418
AD-18360	A-32419	A-32420
AD-18361	A-32421	A-32422
AD-18362	A-32423	A-32424
AD-18363	A-32427	A-32428
AD-18364	A-32429	A-32430
AD-18446	A-32161	A-32162
AD-18447	A-32173	A-32174
AD-18448	A-32185	A-32186
AD-18449	A-32197	A-32198
AD-18450	A-32209	A-32210
AD-18451	A-32245	A-32246
AD-18452	A-32257	A-32258

10

20

30

40

【表 3 - 4】

二本鎖#	センス オリゴ#	アンチセンス オリゴ#
AD-18453	A-32293	A-32294
AD-18454	A-32305	A-32306
AD-18455	A-32317	A-32318
AD-18456	A-32329	A-32330
AD-18457	A-32361	A-32362
AD-18458	A-32365	A-32366
AD-18459	A-32377	A-32378
AD-18460	A-32389	A-32390
AD-18461	A-32401	A-32402
AD-18462	A-32413	A-32414
AD-18463	A-32425	A-32426

【 0 2 2 2 】

【表 4 - 1】

表 3 A. ヒト TTR の dsRNA のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖: s = センス, as = アンチセンス

位置: 転写物 (NM_000371.2, 配列番号 1329) における 5' 位の塩基

鎖	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列 番号	3' のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5' から 3' の方向)	配列 番号
S	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCC	1	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCNN	281
as	118	GGACACUUGGAUUCACCGG	2	GGACACUUGGAUUCACCGGNN	282
S	11	ACUCAUUCUUGGCAGGAUG	3	ACUCAUUCUUGGCAGGAUGNN	283
as	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGU	4	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUNN	284
S	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCA	5	AAGUGUCCUCUGAUGGUCA NN	285
as	129	UGACCAUCAGAGGACACUU	6	UGACCAUCAGAGGACACUUNN	286
S	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGC	7	UCAUUCUUGGCAGGAUGGCNN	287
as	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGA	8	GCCAUCCUGCCAAGAAUGANN	288
s	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCG	9	AAGUUCUAGAUGCUGUCCGNN	289
as	148	CGGACAGCAUCUAGAACUU	10	CGGACAGCAUCUAGAACUUNN	290
s	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAG	11	GUUCUAGAUGCUGUCCGAGNN	291
as	150	CUCGGACAGCAUCUAGAAC	12	CUCGGACAGCAUCUAGAACNN	292
s	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCA	13	CUAGAUGCUGUCCGAGGCANN	293
as	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAG	14	UGCCUCGGACAGCAUCUAGNN	294
s	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUC	15	GAUGCUGUCCGAGGCAGUCNN	295
as	156	GACUGCCUCGGACAGCAUC	16	GACUGCCUCGGACAGCAUCNN	296
s	14	CAUUCUUGGCAGGAUGGCU	17	CAUUCUUGGCAGGAUGGCUNN	297
as	32	AGCCAUCCUGCCAAGAAUG	18	AGCCAUCCUGCCAAGAAUGNN	298
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGUCCU	19	UGCUGUCCGAGGCAGUCCUNN	299
as	158	AGGACUGCCUCGGACAGCA	20	AGGACUGCCUCGGACAGCANN	300
s	146	CCGAGGCAGUCCUGCCAUC	21	CCGAGGCAGUCCUGCCAUCNN	301
as	164	GAUGGCAGGACUGCCUCGG	22	GAUGGCAGGACUGCCUCGGNN	302
s	152	CAGUCCUGCCAUCA AUGUG	23	CAGUCCUGCCAUCA AUGUGNN	303
as	170	CACAUUGAUGGCAGGACUG	24	CACAUUGAUGGCAGGACUGNN	304
s	164	CAAUGUGGCCGUGCAUGDG	25	CAAUGUGGCCGUGCAUGDGNN	305
as	182	CACAUGCACGGCCACA UUG	26	CACAUGCACGGCCACA UUGNN	306
s	178	AUGUGUUCAGAAAGGCUGC	27	AUGUGUUCAGAAAGGCUGCNN	307
as	196	GCAGCCUUUCUGAACACA U	28	GCAGCCUUUCUGAACACA UNN	308
s	2	CAGAAGUCCACUCAUUCUU	29	CAGAAGUCCACUCAUUCUUNN	309

10

20

30

【表 4 - 2】

鎖	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列 番号	3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向)	配列 番号
as	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUG	30	AAGAAUGAGUGGACUUCUGNN	310
s	21	GGCAGGAUGGCCUUCUCAUC	31	GGCAGGAUGGCCUUCUCAUCNN	311
as	39	GAUGAGAAGCCAUCCUGCC	32	GAUGAGAAGCCAUCCUGCCNN	312
s	210	GAGCCAUUUGCCUCUGGGA	33	GAGCCAUUUGCCUCUGGANN	313
as	228	UCCCAGAGGCCAAAUGGCUC	34	UCCCAGAGGCCAAAUGGCUCNN	314
s	23	CAGGAUGGCCUUCUCAUCGU	35	CAGGAUGGCCUUCUCAUCGUNN	315
as	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUG	36	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGNN	316
s	24	AGGAUGGCCUUCUCAUCGUC	37	AGGAUGGCCUUCUCAUCGUCNN	317
as	42	GACGAUGAGAAGCCAUCCU	38	GACGAUGAGAAGCCAUCCUNN	318
s	245	AGAGCUGCAUGGGCUCACA	39	AGAGCUGCAUGGGCUCACANN	319
as	263	UGUGAGCCCAUGCAGCUCU	40	UGUGAGCCCAUGCAGCUCUNN	320
s	248	GCUGCAUGGGCUCACAACU	41	GCUGCAUGGGCUCACAACUNN	321
as	266	AGUUGUGAGCCCAUGCAGC	42	AGUUGUGAGCCCAUGCAGCNN	322
s	25	GGAUGGCCUUCUCAUCGUCU	43	GGAUGGCCUUCUCAUCGUCUNN	323
as	43	AGACGAUGAGAAGCCAUCC	44	AGACGAUGAGAAGCCAUCCNN	324
s	251	GCAUGGGCUCACAACUGAG	45	GCAUGGGCUCACAACUGAGNN	325
as	269	CUCAGUUGUGAGCCCAUGC	46	CUCAGUUGUGAGCCCAUGCNN	326
s	253	AUGGGCUCACAACUGAGGA	47	AUGGGCUCACAACUGAGGANN	327
as	271	UCCUCAGUUGUGAGCCCAU	48	UCCUCAGUUGUGAGCCCAUNN	328
s	254	UGGGCUCACAACUGAGGAG	49	UGGGCUCACAACUGAGGAGNN	329
as	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCCA	50	CUCCUCAGUUGUGAGCCCANN	330
s	270	GAGGAAUUUGUAGAAGGGA	51	GAGGAAUUUGUAGAAGGANN	331
as	288	UCCUUCUACAAAUCCUC	52	UCCUUCUACAAAUCCUCNN	332
s	276	UUUGUAGAAGGGAUUAACA	53	UUUGUAGAAGGGAUUAACANN	333
as	294	UGUAUAUCCUUCUACAAA	54	UGUAUAUCCUUCUACAAANN	334
s	277	UUGUAGAAGGGAUUAACAA	55	UUGUAGAAGGGAUUAACAANN	335
as	295	UUGUAUAUCCUUCUACAA	56	UUGUAUAUCCUUCUACAANN	336
s	278	UGUAGAAGGGAUUAACAAA	57	UGUAGAAGGGAUUAACAANN	337
as	296	UUUGUAUAUCCUUCUACA	58	UUUGUAUAUCCUUCUACANN	338
s	281	AGAAGGGAUUAACAAAGUG	59	AGAAGGGAUUAACAAAGUNN	339
as	299	CACUUUGUAUAUCCUUCU	60	CACUUUGUAUAUCCUUCUNN	340
s	295	AAGUGGAAAUAGACACCAA	61	AAGUGGAAAUAGACACCAANN	341
as	313	UUGGUGUCUAUUUCCACUU	62	UUGGUGUCUAUUUCCACUUNN	342
s	299	GGAAAUAGACACCAAUCU	63	GGAAAUAGACACCAAUCUNN	343
as	317	AGAUUUGGUGUCUAUUUCC	64	AGAUUUGGUGUCUAUUUCCNN	344
s	300	GAAAUAGACACCAAUCUU	65	GAAAUAGACACCAAUCUUNN	345
as	318	AAGAUUUGGUGUCUAUUUC	66	AAGAUUUGGUGUCUAUUUCNN	346
s	303	AUAGACACCAAUCUUACU	67	AUAGACACCAAUCUUACUNN	347
as	321	AGUAAGAUAUUGGUGUCUAU	68	AGUAAGAUAUUGGUGUCUAUNN	348
s	304	UAGACACCAAUCUUACUG	69	UAGACACCAAUCUUACUGNN	349
as	322	CAGUAAGAUAUUGGUGUCUA	70	CAGUAAGAUAUUGGUGUCUANN	350
s	305	AGACACCAAUCUUACUGG	71	AGACACCAAUCUUACUGGNN	351
as	323	CCAGUAAGAUAUUGGUGUCU	72	CCAGUAAGAUAUUGGUGUCUNN	352
s	317	UUACUGGAAGGCACUUGGC	73	UUACUGGAAGGCACUUGGCNN	353
as	335	GCCAAGUGCCUCCAGUAA	74	GCCAAGUGCCUCCAGUAANN	354
s	32	UUCUCAUCGUCUGCUCUC	75	UUCUCAUCGUCUGCUCUCNN	355
as	50	GAGGAGCAGACGAUGAGAA	76	GAGGAGCAGACGAUGAGAANN	356
s	322	GGAAGGCACUUGGCAUCUC	77	GGAAGGCACUUGGCAUCUCNN	357
as	340	GAGAUGCCAAGUGCCUUC	78	GAGAUGCCAAGUGCCUUCNN	358

10

20

30

40

【表 4 - 3】

鎖	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列 番号	3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向)	配列 番号
s	326	GGCACUUGGCAUCUCCCCA	79	GGCACUUGGCAUCUCCCCANN	359
as	344	UGGGGAGAUGCCAAGUGCC	80	UGGGGAGAUGCCAAGUGCCNN	360
s	333	GGCAUCUCCCCAUUCCAUG	81	GGCAUCUCCCCAUUCCAUGNN	361
as	351	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTT	82	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTTNN	362
s	334	GCAUCUCCCCAUUCCAUGA	83	GCAUCUCCCCAUUCCAUGANN	363
as	352	UCAUGGAAUGGGGAGAUGC	84	UCAUGGAAUGGGGAGAUGCNN	364
s	335	CAUCUCCCCAUUCCAUGAG	85	CAUCUCCCCAUUCCAUGAGNN	365
as	353	CUCAUGGAAUGGGGAGAUG	86	CUCAUGGAAUGGGGAGAUGNN	366
s	336	AUCUCCCCAUUCCAUGAGC	87	AUCUCCCCAUUCCAUGAGCNN	367
as	354	GCUCAUGGAAUGGGGAGAU	88	GCUCAUGGAAUGGGGAGAUINN	368
s	338	CUCCCCAUUCCAUGAGCAU	89	CUCCCCAUUCCAUGAGCAUINN	369
as	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAG	90	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGNN	370
s	341	CCCAUCCAUGAGCAUGCA	91	CCCAUCCAUGAGCAUGCANN	371
as	359	UGCAUGCUC AUGGAAUGGG	92	UGCAUGCUC AUGGAAUGGGNN	372
s	347	CCAUGAGCAUGCAGAGGGUG	93	CCAUGAGCAUGCAGAGGGUGNN	373
as	365	CACCUCUGCAUGCUC AUGG	94	CACCUCUGCAUGCUC AUGGNN	374
s	352	AGCAUGCAGAGGUGGUAU	95	AGCAUGCAGAGGUGGUAUINN	375
as	370	AAUACCACCUCUGCAUGCU	96	AAUACCACCUCUGCAUGCUINN	376
s	354	CAUGCAGAGGUGGUAUUCA	97	CAUGCAGAGGUGGUAUUCANN	377
as	372	UGAAUACCACCUCUGCAUG	98	UGAAUACCACCUCUGCAUGNN	378
s	355	AUGCAGAGGUGGUAUUCAC	99	AUGCAGAGGUGGUAUUCACNN	379
as	373	GUGAAUACCACCUCUGCAU	100	GUGAAUACCACCUCUGCAUINN	380
s	362	GGUGGUAUUCACAGCCAAC	101	GGUGGUAUUCACAGCCAACNN	381
as	380	GUUGGCUGUGAAUACCACC	102	GUUGGCUGUGAAUACCACCNN	382
s	363	GUGGUAUUCACAGCCAACG	103	GUGGUAUUCACAGCCAACGNN	383
as	381	CGUUGGCUGUGAAUACCAC	104	CGUUGGCUGUGAAUACCACNN	384
s	364	UGGUAUUCACAGCCAACGA	105	UGGUAUUCACAGCCAACGANNN	385
as	382	UCGUUGGCUGUGAAUACCA	106	UCGUUGGCUGUGAAUACCANNN	386
s	365	GGUAUUCACAGCCAACGAC	107	GGUAUUCACAGCCAACGACNN	387
as	383	GUCGUUGGCUGUGAAUACC	108	GUCGUUGGCUGUGAAUACCNN	388
s	366	GUAUUCACAGCCAACGACU	109	GUAUUCACAGCCAACGACUINN	389
as	384	AGUCGUUGGCUGUGAAUAC	110	AGUCGUUGGCUGUGAAUACNN	390
s	367	UAUUCACAGCCAACGACUC	111	UAUUCACAGCCAACGACUCNN	391
as	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAUA	112	GAGUCGUUGGCUGUGAAUANNN	392
s	370	UCACAGCCAACGACUCCGG	113	UCACAGCCAACGACUCCGGNN	393
as	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGA	114	CCGGAGUCGUUGGCUGUGANN	394
s	390	CCCCGCCGCUACACCAUUG	115	CCCCGCCGCUACACCAUUGNN	395
as	408	CAAUGGUGUAGCGGCGGGG	116	CAAUGGUGUAGCGGCGGGGNN	396
s	4	GAAGUCCACUCAUUCUUGG	117	GAAGUCCACUCAUUCUUGGNN	397
as	22	CCAAGAAUGAGUGGACUUC	118	CCAAGAAUGAGUGGACUUCNN	398
s	412	CCUGCUGAGCCCUACUC	119	CCUGCUGAGCCCUACUCNN	399
as	430	GAGUAGGGGUCAGCAGGG	120	GAGUAGGGGUCAGCAGGGNN	400
s	417	CUGAGCCCUACUCCUAU	121	CUGAGCCCUACUCCUAUINN	401
as	435	AAUAGGAGUAGGGGUCAG	122	AAUAGGAGUAGGGGUCAGNN	402
s	418	UGAGCCCUACUCCUAUUC	123	UGAGCCCUACUCCUAUUCNN	403
as	436	GAAUAGGAGUAGGGGUCUA	124	GAAUAGGAGUAGGGGUCANN	404
s	422	CCCUACUCCUAUUCACCC	125	CCCUACUCCUAUUCACCCNN	405
as	440	GGUGGAAUAGGAGUAGGGG	126	GGUGGAAUAGGAGUAGGGGNN	406
s	425	CUACUCCUAUUCACCCAG	127	CUACUCCUAUUCACCCAGNN	407

10

20

30

40

【表 4 - 4】

鎖	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列 番号	3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向)	配列 番号
as	443	CGUGGUGGAAUAGGAGUAG	128	CGUGGUGGAAUAGGAGUAGNN	408
s	426	UACUCCUAUUCACCACCGG	129	UACUCCUAUUCACCACCGNN	409
as	444	CCGUGGUGGAAUAGGAGUA	130	CCGUGGUGGAAUAGGAGUANN	410
s	427	ACUCCUAUUCACCACCGGC	131	ACUCCUAUUCACCACCGCNN	411
as	445	GCCGUGGUGGAAUAGGAGU	132	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUHN	412
s	429	UCCUAUUCACCACGGCUG	133	UCCUAUUCACCACGGCUGNN	413
as	447	CAGCCGUGGUGGAAUAGGA	134	CAGCCGUGGUGGAAUAGGAN	414
s	432	UAUUCACCACGGCUGUCG	135	UAUUCACCACGGCUGUCGNN	415
as	450	CGACAGCCGUGGUGGAAUA	136	CGACAGCCGUGGUGGAAUAN	416
s	433	AUUCACCACGGCUGUCGU	137	AUUCACCACGGCUGUCGUN	417
as	451	ACGACAGCCGUGGUGGAAU	138	ACGACAGCCGUGGUGGAAUN	418
s	437	CACCACGGCUGUCGUCACC	139	CACCACGGCUGUCGUCACCNN	419
as	455	GGUGACGACAGCCGUGGUG	140	GGUGACGACAGCCGUGGUGNN	420
s	438	ACCACGGCUGUCGUCACCA	141	ACCACGGCUGUCGUCACCANN	421
as	456	UGGUGACGACAGCCGUGGU	142	UGGUGACGACAGCCGUGGUN	422
s	439	CCACGGCUGUCGUCACCAA	143	CCACGGCUGUCGUCACCAANN	423
as	457	UUGGUGACGACAGCCGUGG	144	UUGGUGACGACAGCCGUGGNN	424
s	441	ACGGCUGUCGUCACCAAUC	145	ACGGCUGUCGUCACCAAUCNN	425
as	459	GAUUGGUGACGACAGCCGU	146	GAUUGGUGACGACAGCCGUN	426
s	442	CGGCUGUCGUCACCAAUCC	147	CGGCUGUCGUCACCAAUCCNN	427
as	460	GGAUUGGUGACGACAGCCG	148	GGAUUGGUGACGACAGCCGNN	428
s	449	CGUCACCAAUCCCAAGGAA	149	CGUCACCAAUCCCAAGGAANN	429
as	467	UUCUUGGGAUUGGUGACG	150	UUCUUGGGAUUGGUGACGNN	430
s	455	CAAUCCCAAGGAAUGAGGG	151	CAAUCCCAAGGAAUGAGGNN	431
as	473	CCUCAUUCUUGGGAUUG	152	CCUCAUUCUUGGGAUUGNN	432
s	491	CCUGAAGGACGAGGGAUGG	153	CCUGAAGGACGAGGGAUGGNN	433
as	509	CCAUCCUCGUCUUCAGG	154	CCAUCCUCGUCUUCAGGNN	434
s	497	GGACGAGGGAUGGGAUUUC	155	GGACGAGGGAUGGGAUUUCNN	435
as	515	GAAAUCCAUCCUCGUCUCC	156	GAAAUCCAUCCUCGUCUCCNN	436
s	5	AAGUCCACUCAUUCUUGGC	157	AAGUCCACUCAUUCUUGGCNN	437
as	23	GCCAAGAAUGAGUGGACUU	158	GCCAAGAAUGAGUGGACUUN	438
s	508	GGGAUUUCAUGUAACCAAG	159	GGGAUUUCAUGUAACCAAGNN	439
as	526	CUUGGUUACAUGAAUCCC	160	CUUGGUUACAUGAAUCCCNN	440
s	509	GGAUUUCAUGUAACCAAGA	161	GGAUUUCAUGUAACCAAGANN	441
as	527	UCUUGGUUACAUGAAUCCC	162	UCUUGGUUACAUGAAUCCCNN	442
s	514	UCAUGUAACCAAGAGUAUU	163	UCAUGUAACCAAGAGUAUUN	443
as	532	AAUACUCUUGGUUACAUGA	164	AAUACUCUUGGUUACAUGANN	444
s	516	AUGUAACCAAGAGUAUUC	165	AUGUAACCAAGAGUAUUCNN	445
as	534	GGAAUACUCUUGGUUACAU	166	GGAAUACUCUUGGUUACAUN	446
s	517	UGUAACCAAGAGUAUUC	167	UGUAACCAAGAGUAUUCANN	447
as	535	UGGAAUACUCUUGGUUACA	168	UGGAAUACUCUUGGUUACANN	448
s	518	GUAACCAAGAGUAUUC	169	GUAACCAAGAGUAUUCANN	449
as	536	AUGGAAUACUCUUGGUUAC	170	AUGGAAUACUCUUGGUUACNN	450
s	54	UGCCUUGCUGGACUGGUUU	171	UGCCUUGCUGGACUGGUUUN	451
as	72	AUACCAGUCCAGCAAGGCA	172	AUACCAGUCCAGCAAGGCANN	452
s	543	UAAAGCAGUGUUUACCCU	173	UAAAGCAGUGUUUACCCUN	453
as	561	AGGUGAAAACACUGCUUUA	174	AGGUGAAAACACUGCUUUAN	454
s	55	GCCUUGCUGGACUGGUUU	175	GCCUUGCUGGACUGGUUUN	455
as	73	AAUACCAGUCCAGCAAGGC	176	AAUACCAGUCCAGCAAGGCNN	456

10

20

30

40

【表 4 - 5】

鎖	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列 番号	3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向)	配列 番号
s	551	UGUUUUCACCUCUAUUGC	177	UGUUUUCACCUCUAUUGCUNN	457
as	569	AGCAUAUGAGGUGAAAACA	178	AGCAUAUGAGGUGAAAACANN	458
s	552	GUUUUCACCUCUAUUGC	179	GUUUUCACCUCUAUUGCUNN	459
as	570	UAGCAUAUGAGGUGAAAAC	180	UAGCAUAUGAGGUGAAAACHN	460
s	553	UUUUCACCUCUAUUGC	181	UUUUCACCUCUAUUGCUNN	461
as	571	AUAGCAUAUGAGGUGAAAA	182	AUAGCAUAUGAGGUGAAAAANN	462
s	555	UUCACCUCUAUUGC	183	UUCACCUCUAUUGCUNN	463
as	573	ACAUAAGCAUAUGAGGUGAA	184	ACAUAAGCAUAUGAGGUGAANN	464
s	557	CACCUCUAUUGC	185	CACCUCUAUUGCUNN	465
as	575	UAACAUAAGCAUAUGAGGUG	186	UAACAUAAGCAUAUGAGGUGNN	466
s	56	CCUUGCUGGACUGGUAUUU	187	CCUUGCUGGACUGGUAUUUNN	467
as	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGG	188	AAAUACCAGUCCAGCAAGHNN	468
s	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUC	189	AUAUGCUAUGUUAGAAGUCNN	469
as	581	GACUUCUAACAUAAGCAUAU	190	GACUUCUAACAUAAGCAUAUNN	470
s	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCC	191	UAUGCUAUGUUAGAAGUCNN	471
as	582	GGACUUCUAACAUAAGCAUA	192	GGACUUCUAACAUAAGCAUANN	472
s	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAG	193	UGCUAUGUUAGAAGUCCAGNN	473
as	584	CUGGACUUCUAACAUAAGCA	194	CUGGACUUCUAACAUAAGCANN	474
s	57	CUUGCUGGACUGGUAUUUG	195	CUUGCUGGACUGGUAUUUGNN	475
as	75	CAAAUACCAGUCCAGCAAG	196	CAAAUACCAGUCCAGCAAGNN	476
s	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUA	197	AGUCCAGGCAGAGACAAUANN	477
as	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTT	198	AUUGUCUCUGCCUGGACUTTN	478
s	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAA	199	UCCAGGCAGAGACAAUAAANN	479
as	598	UUUAUUGUCUCUGCCUGGA	200	UUUAUUGUCUCUGCCUGGANN	480
s	607	GUGAAAGGCACUUUUCAUU	201	GUGAAAGGCACUUUUCAUUNN	481
as	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCAC	202	AAUGAAAAGUGCCUUUCANN	482
s	62	UGGACUGGUAUUUGUGUCU	203	UGGACUGGUAUUUGUGUCUNN	483
as	80	AGACACAAAUACCAGUCCA	204	AGACACAAAUACCAGUCCANN	484
s	77	GUCUGAGGCUGGCCUACG	205	GUCUGAGGCUGGCCUACGNN	485
as	95	CGUAGGGCCAGCCUCAGAC	206	CGUAGGGCCAGCCUCAGANN	486
s	79	CUGAGGCUGGCCUACGGG	207	CUGAGGCUGGCCUACGGGNN	487
as	97	CCCGUAGGGCCAGCCUCAG	208	CCCGUAGGGCCAGCCUCAGNN	488
s	81	GAGGCUGGCCUACGGGCA	209	GAGGCUGGCCUACGGGCANN	489
as	99	UGCCCGUAGGGCCAGCCUC	210	UGCCCGUAGGGCCAGCCUCNN	490
s	82	AGGCUGGCCUACGGGCAC	211	AGGCUGGCCUACGGGCANN	491
as	100	GUGCCCGUAGGGCCAGCCU	212	GUGCCCGUAGGGCCAGCCUNN	492
s	84	GCUGGCCUACGGGCACCG	213	GCUGGCCUACGGGCACCGNN	493
as	102	CGGUGCCCGUAGGGCCAGC	214	CGGUGCCCGUAGGGCCAGCANN	494
s	85	CUGGCCUACGGGCACCGG	215	CUGGCCUACGGGCACCGGNN	495
as	103	CCGGUGCCCGUAGGGCCAG	216	CCGGUGCCCGUAGGGCCAGNN	496
s	87	GGCCUACGGGCACCGGUG	217	GGCCUACGGGCACCGGUGNN	497
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCC	218	CACCGGUGCCCGUAGGGCCNN	498
s	9	CCACUCAUUCUUGGCAGGA	219	CCACUCAUUCUUGGCAGGANN	499
as	27	UCCUGCCAAGAAUGAGUGG	220	UCCUGCCAAGAAUGAGUGGNN	500
s	90	CCUACGGGCACCGGUGAAU	221	CCUACGGGCACCGGUGAAUNN	501
as	108	AUUCACCGGUGCCCGUAGG	222	AUUCACCGGUGCCCGUAGGNN	502
s	91	CUACGGGCACCGGUGAAUC	223	CUACGGGCACCGGUGAAUCNN	503
as	109	GAUUCACCGGUGCCCGUAG	224	GAUUCACCGGUGCCCGUAGNN	504
s	92	UACGGGCACCGGUGAAUCC	225	UACGGGCACCGGUGAAUCCNN	505

10

20

30

40

【表 4 - 6】

鎖	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列 番号	3'のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5'から3'の方向)	配列 番号
as	110	GGAUUCACCGGUGCCCGUA	226	GGAUUCACCGGUGCCCGUANN	506
s	93	ACGGGCACCGGUGAAUCCA	227	ACGGGCACCGGUGAAUCCANN	507
as	111	UGGAUUCACCGGUGCCCGU	228	UGGAUUCACCGGUGCCCGUUN	508
s	97	GCACCGGUGAAUCCAAGUG	229	GCACCGGUGAAUCCAAGUGNN	509
as	115	CACUUGGAUUCACCGGUGC	230	CACUUGGAUUCACCGGUGCNN	510
s	98	CACCGGUGAAUCCAAGUGU	231	CACCGGUGAAUCCAAGUGUNN	511
as	116	ACACUUGGAUUCACCGGUG	232	ACACUUGGAUUCACCGGUGNN	512
s	167	UGUGGCCAUGCAUGUGUUC	233	UGUGGCCAUGCAUGUGUUCNN	513
as	185	GAACACAUGCAUGGCCACA	234	GAACACAUGCAUGGCCACANN	514
s	168	GUGGCCAUGCAUGUGUUCA	235	GUGGCCAUGCAUGUGUUCANN	515
as	186	UGAACACAUGCAUGGCCAC	236	UGAACACAUGCAUGGCCACNN	516
s	171	GCCAUGCAUGUGUUCAGAA	237	GCCAUGCAUGUGUUCAGAANN	517
as	189	UUCUGAACACAUGCAUGGC	238	UUCUGAACACAUGCAUGGCNN	518
s	432	UAUCCACCACGGCUGUCA	239	UAUCCACCACGGCUGUCANN	519
as	449	UGACAGCCGUGGUGGAAUA	240	UGACAGCCGUGGUGGAAUANN	520
s	447	GUCAUCACCAAUCCAAGG	241	GUCAUCACCAAUCCAAGGNN	521
as	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGAC	242	CCUUGGGAUUGGUGAUGACNN	522
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGU	243	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN	523
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGAC	244	ACUUUGACCAUCAGAGGACNN	524
s	122	GAUGGUCAAAGUUCUAGAU	245	GAUGGUCAAAGUUCUAGAUNN	525
as	140	AUCUAGAACUUUGACCAUC	246	AUCUAGAACUUUGACCAUCNN	526
s	139	AUGCUGCCGAGGCAGUCC	247	AUGCUGCCGAGGCAGUCCNN	527
as	157	GGACUGCCUCGGACAGCAU	248	GGACUGCCUCGGACAGCAUNN	528
s	172	CCGUGCAUGUGUUCAGAAA	249	CCGUGCAUGUGUUCAGAAANN	529
as	190	UUUCUGAACACAUGCACGG	250	UUUCUGAACACAUGCACGGNN	530
s	238	AGUCUGGAGAGCUGCAUGG	251	AGUCUGGAGAGCUGCAUGGNN	531
as	256	CCAUGCAGCUCUCCAGACU	252	CCAUGCAGCUCUCCAGACUNN	532
s	252	CAUGGGUCACAACUGAGG	253	CAUGGGUCACAACUGAGGNN	533
as	270	CCUCAGUUGUGAGCCCAUG	254	CCUCAGUUGUGAGCCCAUGNN	534
s	33	UCUCAUCGUCUGCUCCUCC	255	UCUCAUCGUCUGCUCCUCCNN	535
as	51	GGAGGAGCAGACGAUGAGA	256	GGAGGAGCAGACGAUGAGANN	536
s	340	CCCCAUUCCAUGAGCAUGC	257	CCCCAUUCCAUGAGCAUGCNN	537
as	358	GCAUGCUC AUGGAAUGGGG	258	GCAUGCUC AUGGAAUGGGGNN	538
s	421	GCCCCUACUCCUAUUCCAC	259	GCCCCUACUCCUAUUCCACNN	539
as	439	GUGGAAUAGGAGUAGGGGC	260	GUGGAAUAGGAGUAGGGGCNN	540
s	431	CUAUUCCACCACGGCUGUC	261	CUAUUCCACCACGGCUGUCNN	541
as	449	GACAGCCGUGGUGGAAUAG	262	GACAGCCGUGGUGGAAUAGNN	542
s	440	CACGGCUGUCGUCACCAAU	263	CACGGCUGUCGUCACCAAUNN	543
as	458	AUUGGUGACGACAGCCGUG	264	AUUGGUGACGACAGCCGUGNN	544
s	496	AGGACGAGGGAUGGGAUUU	265	AGGACGAGGGAUGGGAUUUNN	545
as	514	AAAUCCAUCCUCGUCCU	266	AAAUCCAUCCUCGUCCUNN	546
s	556	UCACCUCAUAUGCUAUGUU	267	UCACCUCAUAUGCUAUGUUNN	547
as	574	AACAUAGCAUAUGAGGUGA	268	AACAUAGCAUAUGAGGUGANN	548
s	559	CCUCAUAUGCUAUGUUAGA	269	CCUCAUAUGCUAUGUUAGANN	549
as	577	UCUAACAUAGCAUAUGAGG	270	UCUAACAUAGCAUAUGAGGNN	550
s	570	AUGUUAGAAGUCCAGGCAG	271	AUGUUAGAAGUCCAGGCAGNN	551
as	588	CUGCCUGGACUUCUAACAU	272	CUGCCUGGACUUCUAACAUNN	552
s	78	UCUGAGGCUGGCCUACGG	273	UCUGAGGCUGGCCUACGGNN	553
as	96	CCGUAGGGCCAGCCUCAGA	274	CCGUAGGGCCAGCCUCAGANN	554

10

20

30

40

【表 4 - 7】

鎖	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列 番号	3' のジヌクレオチド オーバーハングを有する配列 (5' から3' の方向)	配列 番号
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUG	275	GGCCCUACGGGCACCGGUGNN	555
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCC	276	CACCGGUGCCCGUAGGGCCNN	556
s	95	GGGCACCGGUGAAUCCAAG	277	GGGCACCGGUGAAUCCAAGNN	557
as	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCC	278	CUUGGAUUCACCGGUGCCCNN	558
s	167	CCAUGCAUGUGUUCAGAAA	279	CCAUGCAUGUGUUCAGAAANN	559
as	185	UUUCUGAACACAUGCAUGG	280	UUUCUGAACACAUGCAUGGNN	560

【 0 2 2 3 】

【表 5 - 1】

表 3 B. ヒト ITR の dsRNA のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖: s = センス、as = アンチセンス

位置: 転写物 (NM_000371.2, 配列番号 1329) における 5' 位の塩基

鎖	位置	3' のテロメータシグナルを有する配列 (5' から 3' の方向)	配列番号
s	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCdTdT	561
as	118	GGACACUUGGAUUCACCGGdTdT	562
s	11	ACUCAUUCUUGGCAGGAUGdTdT	563
as	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUdTdT	564
s	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCAdTdT	565
as	129	UGACCAUCAGAGGACACUUDdTdT	566
s	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGCTdTdT	567
as	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGAdTdT	568
s	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCGdTdT	569
as	148	CGGACAGCAUCUAGAACUUDdTdT	570
s	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAGdTdT	571
as	150	CUCGGACAGCAUCUAGAACdTdT	572
s	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCAdTdT	573
as	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAGdTdT	574
s	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUCdTdT	575
as	156	GACUGCCUCGGACAGCAUCdTdT	576
s	14	CAUUCUUGGCAGGAUGGCUdTdT	577
as	32	AGCCAUCCUGCCAAGAAUGdTdT	578
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGUCCUdTdT	579
as	158	AGGACUGCCUCGGACAGCAdTdT	580
s	146	CCGAGGCAGUCCUGCCAUCdTdT	581
as	164	GAUGGCAGGACUGCCUCGGdTdT	582
s	152	CAGUCCUGCCAUCA AUGUdTdT	583
as	170	CACAUUGAUGGCAGGACUGdTdT	584
s	164	CAAUGUGGCCUGUCAUGUGdTdT	585
as	182	CACAUGCACGGCCACAUGdTdT	586
s	178	AUGUGUUCAGAAAGGCUGCTdTdT	587
as	196	GCAGCCUUUCUGAACACAUDdTdT	588
s	2	CAGAAGUCCACUCAUUCUUDdTdT	589
as	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	590
s	21	GGCAGGAUGGCUUCUCAUCdTdT	591
as	39	GAUGAGAAGCCAUCCUGCCdTdT	592
s	210	GAGCCAUUUGCCUCUGGGAdTdT	593
as	228	UCCAGAGGCCAAAUGGCUCdTdT	594
s	23	CAGGAUGGCUUCUCAUCGUdTdT	595
as	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGdTdT	596
s	24	AGGAUGGCUUCUCAUCGUCdTdT	597
as	42	GACGAUGAGAAGCCAUCCUdTdT	598
s	245	AGAGCUGCAUGGGCUCACAdTdT	599
as	263	UGUGAGCCCAUGCAGCUCUdTdT	600
s	248	GCUGCAUGGGCUCACAACUdTdT	601

10

20

30

40

【表 5 - 2】

鎖	位置	3' のテラキチミチソノンクを有する配列 (5' から3' の方向)	配列番号
as	266	AGUUGUGAGCCCAUGCAGCdTdT	602
s	25	GGAUGGCUUCUCAUCGUCdTdT	603
as	43	AGACGAUGAGAAGCCAUCCdTdT	604
s	251	GCAUGGGCUACACACUGAGdTdT	605
as	269	CUCAGUUGUGAGCCCAUGCdTdT	606
s	253	AUGGGCUCACAACUGAGGdTdT	607
as	271	UCCUCAGUUGUGAGCCCAUdTdT	608
s	254	UGGGCUACAACUGAGGdTdT	609
as	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCAdTdT	610
s	270	GAGGAAUUUGUAGAAGGGdTdT	611
as	288	UCCCUUCUACAAAUCCUCdTdT	612
s	276	UUUGUAGAAGGGAAUACdTdT	613
as	294	UGUAUAUCCCUUCUACAAAdTdT	614
s	277	UUGUAGAAGGGAAUACAdTdT	615
as	295	UUGUAUAUCCCUUCUACAdTdT	616
s	278	UGUAGAAGGGAAUACAAAdTdT	617
as	296	UUUGUAUAUCCCUUCUACAdTdT	618
s	281	AGAAGGGAAUACAAAGUGdTdT	619
as	299	CACUUUGUAUAUCCCUUCdTdT	620
s	295	AAGUGGAAAUAAGACACCAAdTdT	621
as	313	UUGGUGUCUAUUUCCACUdTdT	622
s	299	GGAAAUAGACACCAAAUUCdTdT	623
as	317	AGAUUUGGUGUCUAUUUCCdTdT	624
s	300	GAAAUAAGACACCAAAUUCdTdT	625
as	318	AAGAUUUGGUGUCUAUUUCCdTdT	626
s	303	AUAGACACCAAAUUCUUCdTdT	627
as	321	AGUAAGAUUUGGUGUCUAUdTdT	628
s	304	UAGACACCAAAUUCUUCdTdT	629
as	322	CAGUAAGAUUUGGUGUCUAdTdT	630
s	305	AGACACCAAAUUCUUCdTdT	631
as	323	CCAGUAAGAUUUGGUGUCdTdT	632
s	317	UUACUGGAAGGCACUUGCdTdT	633
as	335	GCCAAGUGCCUUCAGUAAdTdT	634
s	32	UUCUCAUCGUCUCUCCdTdT	635
as	50	GAGGAGCAGACGAUGAGAdTdT	636
s	322	GGAAGGCACUUGGCAUCUCdTdT	637
as	340	GAGAUGCCAAGUGCCUUCdTdT	638
s	326	GGCACUUGGCAUCUCCAdTdT	639
as	344	UGGGAGAUGCCAAGUGCCdTdT	640
s	333	GGCAUCUCCCAUUCCAUGdTdT	641
as	351	AUGGAAUGGGGAGAUCCCTdTdT	642
s	334	GCAUCUCCCAUUCCAUGdTdT	643
as	352	UCAUGGAAUGGGGAGAUCCdTdT	644
s	335	CAUCUCCCAUUCCAUGdTdT	645
as	353	CUCAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	646
s	336	AUCUCCCAUUCCAUGAdTdT	647
as	354	GCUCAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	648
s	338	CUCCCAUUCCAUGAGCAUdTdT	649
as	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGdTdT	650
s	341	CCCAUUCCAUGAGCAUGCdTdT	651
as	359	UGCAUGCUC AUGGAAUGGGdTdT	652
s	347	CCAUGAGCAUGCAGAGGUGdTdT	653
as	365	CACCUCUGCAUGCUC AUGdTdT	654
s	352	AGCAUGCAGAGGUGGUAUUdTdT	655
as	370	AAUACCACCUCUGCAUGCdTdT	656
s	354	CAUGCAGAGGUGGUAUUAdTdT	657
as	372	UGAAUACCACCUCUGCAUGdTdT	658

10

20

30

40

【表 5 - 4】

鎖	位置	3' のデオキシリボシクシオン-ホ-リン酸を有する配列 (5' から3' の方向)	配列番号
as	515	GAAAUCCCAUCCCUCGUCdTdT	716
s	5	AAGUCCACUCAUUCUUGGCdTdT	717
as	23	GCCAAGAAUGAGUGGACUdTdT	718
s	508	GGGAUUUCAUGUAACCAAGdTdT	719
as	526	CUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	720
s	509	GGAUUUC AUGUAACCAAGAdTdT	721
as	527	UCUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	722
s	514	UCAUGUAACCAAGAGUAUdTdT	723
as	532	AAUACUCUUGGUUACAUGAdTdT	724
s	516	AUGUAACCAAGAGUAUCCdTdT	725
as	534	GGAAUACUCUUGGUUACAuTdTdT	726
s	517	UGUAACCAAGAGUAUCCAdTdT	727
as	535	UGGAUACUCUUGGUUACAdTdT	728
s	518	GUAACCAAGAGUAUCCAUdTdT	729
as	536	AUGGAUACUCUUGGUUACdTdT	730
s	54	UGCCUUGCUGGACUGGUAdTdT	731
as	72	AUACCAGUCCAGCAAGGCAdTdT	732
s	543	UAAAGCAGUUVUUCACCUdTdT	733
as	561	AGGUGAAAACACUGCUUAdTdT	734
s	55	GCCUUGCUGGACUGGUAdTdT	735
as	73	AAUACCAGUCCAGCAAGGCdTdT	736
s	551	UGUUUUCACCUCAUAUGCUdTdT	737
as	569	AGCAUAUGAGGUGAAAACAdTdT	738
s	552	GUUUUCACCUCAUAUGCUAdTdT	739
as	570	UAGCAUAUGAGGUGAAAACdTdT	740
s	553	UUUUCACCUCAUAUGCUAdTdT	741
as	571	AUAGCAUAUGAGGUGAAAAdTdT	742
s	555	UUCACCUCAUAUGCUAdTdT	743
as	573	ACAUAAGCAUAUGAGGUGAAAdTdT	744
s	557	CACCUCAUAUGCUAUGUAdTdT	745
as	575	UAACAUAAGCAUAUGAGGUGdTdT	746
s	56	CCUUGCUGGACUGGUUUUdTdT	747
as	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGGdTdT	748
s	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUCdTdT	749
as	581	GACUUCUAACAUAAGCAUAUdTdT	750
s	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCCdTdT	751
as	582	GGACUUCUAACAUAAGCAUAdTdT	752
s	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAGdTdT	753
as	584	CUGGACUUCUAACAUAAGCAdTdT	754
s	57	CUUGCUGGACUGGUUUUGdTdT	755
as	75	CRAAUACCAGUCCAGCAAGdTdT	756
s	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUAdTdT	757
as	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTTdTdT	758
s	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAAdTdT	759
as	598	UUUAUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	760
s	607	GUGAAAGGCACUUUUCAUdTdT	761
as	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCAdTdT	762
s	62	UGGACUGGUUUUUGUCUdTdT	763
as	80	AGACACAAAUACCAGUCCAdTdT	764
s	77	GUCUGAGGCUGGCCUACGdTdT	765
as	95	CGUAGGGCCAGCCUCAGAdTdT	766
s	79	CUGAGGCUGGCCUACGGdTdT	767
as	97	CCCGUAGGGCCAGCCUCAGdTdT	768
s	81	GAGGCUGGCCUACGGCAdTdT	769
as	99	UGCCCGUAGGGCCAGCCUdTdT	770
s	82	AGGCUGGCCUACGGGCAdTdT	771
as	100	GUGCCCGUAGGGCCAGCCUdTdT	772

10

20

30

40

【表 5 - 5】

鎖	位置	3' のテリミネーション-ホークを有する配列 (5' から3' の方向)	配列番号
s	84	GCUGGCCUACGGGCACCGdTdT	773
as	102	CGGUGCCCGUAGGGCCAGCdTdT	774
s	85	CUGGCCUACGGGCACCGdTdT	775
as	103	CCGGUGCCCGUAGGGCCAGdTdT	776
s	87	GGCCUACGGGCACCGGUGdTdT	777
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	778
s	9	CCACUCAUUCUUGGCAGGdTdT	779
as	27	UCCUGCCAAGAAUGAGUGGdTdT	780
s	90	CCUACGGGCACCGGUGAAUGdTdT	781
as	108	AUUCACCGGUGCCCGUAGGdTdT	782
s	91	CUACGGGCACCGGUGAAUCdTdT	783
as	109	GAUUCACCGGUGCCCGUAGdTdT	784
s	92	UACGGGCACCGGUGAAUCCdTdT	785
as	110	GGAUUCACCGGUGCCCGUAdTdT	786
s	93	ACGGGCACCGGUGAAUCCdTdT	787
as	111	UGGAUUCACCGGUGCCCGUdTdT	788
s	97	GCACCGGUGAAUCCAAGUGdTdT	789
as	115	CACUUGGAUUCACCGGUGCdTdT	790
s	98	CACCGGUGAAUCCAAGUGdTdT	791
as	116	ACACUUGGAUUCACCGGUGdTdT	792
s	167	UGUGGCCAUGCAUGUGUUCdTdT	793
as	185	GAACACAUGCAUGGCCACdTdT	794
s	168	GUGGCCAUGCAUGUGUUCdTdT	795
as	186	UGAACACAUGCAUGGCCACdTdT	796
s	171	GCCAUGCAUGUGUUCAGAAdTdT	797
as	189	UUCUGAACACAUGCAUGGCCdTdT	798
s	432	UAUCCACCACGGCUGUCdTdT	799
as	449	UGACAGCCGUGGUGGAUAdTdT	800
s	447	GUCAUCACCAAUCCCAAGGdTdT	801
as	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	802
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT	803
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	804
s	122	GAUGGUCAAAGUUCUAGAAdTdT	805
as	140	AUCUAGAACUUUGACCAUCdTdT	806
s	139	AUGCUGUCCGAGGCAGUCCdTdT	807
as	157	GGACUGCCUCGGACAGCAUdTdT	808
s	172	CCGUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	809
as	190	UUUCUGAACACAUGCACGGdTdT	810
s	238	AGUCUGGAGAGCUGCAUGGdTdT	811
as	256	CCAUGCAGCUCUCCAGACUdTdT	812
s	252	CAUGGCUCACAAACUGAGGdTdT	813
as	270	CCUCAGUUGUGAGCCCAUGdTdT	814
s	33	UCUCAUCGUCUCUCCUCCdTdT	815
as	51	GGAGGAGCAGACGAUGAGAdTdT	816
s	340	CCCAUCCAUGAGCAUGCdTdT	817
as	358	GCAUGCUC AUGGAAUGGGdTdT	818
s	421	GCCCUACUCCUAUCCACdTdT	819
as	439	GUGGAAUAGGAGUAGGGCdTdT	820
s	431	CUAUCCACCACGGCUGUCdTdT	821
as	449	GACAGCCGUGGUGGAUUGdTdT	822
s	440	CACGGCUGUCGUCACCAAUdTdT	823
as	458	AUUGGUGACGACAGCCGUGdTdT	824
s	496	AGGACGAGGGAUGGGAUUUdTdT	825
as	514	AAAUCCCAUCCUCGUCUdTdT	826
s	556	UCACCUCAUAUGCUAUGUUdTdT	827
as	574	AACAUAGCAUAUGAGGUGAdTdT	828
s	559	CCUCAUAUGCUAUGUUAGAdTdT	829

10

20

30

40

【表 5 - 6】

鎖	位置	3' のテロキチミシオン-ホ-ンクを有する配列 (5' から3' の方向)	配列番号
as	577	UCUAACAUAGCAUAUGAGGdTdT	830
s	570	AUGUUAGAAGUCCAGGCAGdTdT	831
as	588	CUGCCUGGACUUCUAACAUAdTdT	832
s	78	UCUGAGGCUGGCCCUACGGdTdT	833
as	96	CCGUAGGGCCAGCCUCAGAdTdT	834
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUGdTdT	835
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	836
s	95	GGGCACCGGUGAAUCCAAGdTdT	837
as	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCCdTdT	838
s	167	CCAUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	839
as	185	UUUCUGAACACAUGCAUGGdTdT	840

10

【 0 2 2 4 】

【表 6 - 1】

表 4. ヒト TTR の dsRNA の化学修飾したセンスおよびアンチセンス鎖配列
二本鎖番号については、表 2 を参照されたい。

鎖：s = センス、as = アンチセンス

位置：転写物 (NM_000371.2, 配列番号 1329) における 5' 位の塩基

鎖	オリゴ#	位置	配列 (5' から 3' の方向)	配列番号
s	A-32153	100	ccGGuGAAuccAAGuGuccdTdT	841
as	A-32154	118	GGAcACUUGGAUUCACCGGdTdT	842
s	A-32155	11	AcucAuucuuGGcAGGAuGdTdT	843
as	A-32156	29	cAUCCUGCcAAGAAUGAGUdTdT	844
s	A-32157	111	AAGuGuccucuGAuGGucAdTdT	845
as	A-32158	129	UGACcAUcAGAGGAcACUdTdT	846
s	A-32163	13	ucAuucuuGGcAGGAuGGcdTdT	847
as	A-32164	31	GCcAUCCUGCcAAGAAUGAdTdT	848
s	A-32165	130	AAGuucuAGAuGcuGuccGdTdT	849
as	A-32166	148	CGGAcAGcAUCuAGAACUdTdT	850
s	A-32167	132	GuucuAGAuGcuGuccGAGdTdT	851
as	A-32168	150	CUCGGAcAGcAUCuAGAACdTdT	852
s	A-32169	135	cuAGAuGcuGuccGAGGcAdTdT	853
as	A-32170	153	UGCCUCGGAcAGcAUCuAGdTdT	854
s	A-32171	138	GAuGcuGuccGAGGcAGucdTdT	855
as	A-32172	156	GACUGCCUCGGAcAGcAUCdTdT	856
s	A-32175	14	cAuucuuGGcAGGAuGGcudTdT	857
as	A-32176	32	AGCcAUCCUGCcAAGAAUGdTdT	858
s	A-32177	140	uGcuGuccGAGGcAGuccudTdT	859
as	A-32178	158	AGGACUGCCUCGGAcAGcAdTdT	860
s	A-32179	146	ccGAGGcAGuccuGccAucdTdT	861
as	A-32180	164	GAUGGcAGGACUGCCUCGGdTdT	862
s	A-32181	152	cAGuccuGccAucAAuGuGdTdT	863
as	A-32182	170	cAcAUUGAUGGcAGGACUGdTdT	864
s	A-32183	164	cAAuGuGGccGuGcAuGuGdTdT	865
as	A-32184	182	cAcAUGcACGGCcAcAUUGdTdT	866
s	A-32187	178	AuGuGuucAGAAAGGcuGcdTdT	867
as	A-32188	196	GcAGCCUUCUGAAcAcAUdTdT	868
s	A-32189	2	cAGAAGuccAcucAuucudTdT	869
as	A-32190	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	870
s	A-32191	21	GGcAGGAuGGcuucucAucdTdT	871
as	A-32192	39	GAUGAGAAGCcAUCCUGCCdTdT	872
s	A-32193	210	GAGccAuuuGccucuGGGAdTdT	873
as	A-32194	228	UCCcAGAGGcAAAUGGCUCdTdT	874
s	A-32195	23	cAGGAuGGcuucucAucGudTdT	875
as	A-32196	41	ACGAUGAGAAGCcAUCCUGdTdT	876

10

20

30

40

【表 6 - 2】

鎖	オリゴ#	位置	配列(5'から3'の方向)	配列番号
s	A-32199	24	AGGAuGGcuucucAucGucdTdT	877
as	A-32200	42	GACGAUGAGAAGCCaUCCUdTdT	878
s	A-32201	245	AGAGcuGcAuGGGcucAcAdTdT	879
as	A-32202	263	UGUGAGCCcAUGcAGCUCdTdT	880
s	A-32203	248	GcuGcAuGGGcucAcAAcudTdT	881
as	A-32204	266	AGUUGUGAGCCcAUGcAGCdTdT	882
s	A-32205	25	GGAuGGcuucucAucGucdTdT	883
as	A-32206	43	AGACGAUGAGAAGCCaUCCdTdT	884
s	A-32207	251	GcAuGGGcucAcAAcuGAGdTdT	885
as	A-32208	269	CUCAGUUGUGAGCCcAUGCdTdT	886
s	A-32211	253	AuGGGcucAcAAcuGAGAdTdT	887
as	A-32212	271	UCCUCAGUUGUGAGCCcAUdTdT	888
s	A-32213	254	uGGGcucAcAAcuGAGGAdTdT	889
as	A-32214	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCcAdTdT	890
s	A-32215	270	GAGGAuuuGuAGAAGGGAdTdT	891
as	A-32216	288	UCCCUUCuAcAAAUCCUCdTdT	892
s	A-32217	276	uuuGuAGAAGGGAuAuAcAdTdT	893
as	A-32218	294	UGuAuAUCCCUUCuAcAAAdTdT	894
s	A-32219	277	uuGuAGAAGGGAuAuAcAdTdT	895
as	A-32220	295	UUGuAuAUCCCUUCuAcAdTdT	896
s	A-32221	278	uGuAGAAGGGAuAuAcAAAdTdT	897
as	A-32222	296	UUUGuAuAUCCCUUCuAcAdTdT	898
s	A-32223	281	AGAAGGGAuAuAcAAAGuGdTdT	899
as	A-32224	299	cACUUUGuAuAUCCCUUCdTdT	900
s	A-32225	295	AAGUGGAAuAGAcAccAAAdTdT	901
as	A-32226	313	UUGGUGUCuAUUUCcACUdTdT	902
s	A-32227	299	GGAAuAGAcAccAAAUcudTdT	903
as	A-32228	317	AGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT	904
s	A-32229	300	GAAuAGAcAccAAAUcudTdT	905
as	A-32230	318	AAGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT	906
s	A-32231	303	AuAGAcAccAAAUcudTdT	907
as	A-32232	321	AGuAAGAUUUGGUGUCuAUdTdT	908
s	A-32233	304	uAGAcAccAAAUcudTdT	909
as	A-32234	322	cAGuAAGAUUUGGUGUCuAdTdT	910
s	A-32235	305	AGAcAccAAAUcudTdT	911
as	A-32236	323	CcAGuAAGAUUUGGUGUCuAdTdT	912
s	A-32237	317	uuAcuGGAAGGcAcuuGGdTdT	913
as	A-32238	335	GCcAAGUGCCUUCcAGuAdTdT	914
s	A-32239	32	uucucAucGucGucucdTdT	915
as	A-32240	50	GAGGAGcAGACGAUGAGAdTdT	916
s	A-32241	322	GGAAAGcAcuuGGcAucudTdT	917
as	A-32242	340	GAGAUGCcAAGUGCCUUCdTdT	918
s	A-32243	326	GGcAuuGGcAucucdTdT	919
as	A-32244	344	UGGGGAGAUGCcAAGUGCCdTdT	920
s	A-32247	333	GGcAucucdTdT	921
as	A-32248	351	cAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	922
s	A-32249	334	GcAucucdTdT	923
as	A-32250	352	UcAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	924
s	A-32251	335	cAucucdTdT	925
as	A-32252	353	CUC AUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	926
s	A-32253	336	AucucdTdT	927
as	A-32254	354	GUC AUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	928
s	A-32255	338	cucdTdT	929
as	A-32256	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGdTdT	930
s	A-32259	341	cccAuuccAuGAGcAuGcAdTdT	931
as	A-32260	359	UGcAUGCUC AUGGAAUGGGdTdT	932
s	A-32261	347	ccAuGAGcAuGcAGAGGuGdTdT	933
as	A-32262	365	cACCUCUGC AUGCUC AUGGdTdT	934

10

20

30

40

【表 6 - 3】

鎖	オリゴ#	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列番号
s	A-32263	352	AGcAuGcAGAGGuGGuAuudTdT	935
as	A-32264	370	AAuACcACCUCUGcAUGCudTdT	936
s	A-32265	354	cAuGcAGAGGuGGuAuucAdTdT	937
as	A-32266	372	UGAAuACcACCUCUGcAUGdTdT	938
s	A-32267	355	AuGcAGAGGuGGuAuucAcdTdT	939
as	A-32268	373	GUGAAuACcACCUCUGcAUdTdT	940
s	A-32269	362	GGuGGuAuucAcAGccAAcdTdT	941
as	A-32270	380	GUUGGCUGUGAAuACcACCdTdT	942
s	A-32271	363	GuGGuAuucAcAGccAAcGdTdT	943
as	A-32272	381	CGUUGGCUGUGAAuACcACdTdT	944
s	A-32273	364	uGGuAuucAcAGccAAcGAdTdT	945
as	A-32274	382	UCGUUGGCUGUGAAuACcAdTdT	946
s	A-32275	365	GGuAuucAcAGccAAcGAcTdT	947
as	A-32276	383	GUCGUUGGCUGUGAAuACCdTdT	948
s	A-32277	366	GuAuucAcAGccAAcGAcudTdT	949
as	A-32278	384	AGUCGUUGGCUGUGAAuACdTdT	950
s	A-32279	367	uAuucAcAGccAAcGAcudTdT	951
as	A-32280	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAuAdTdT	952
s	A-32281	370	ucAcAGccAAcGAcuccGGdTdT	953
as	A-32282	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT	954
s	A-32283	390	ccccGccGcuAcAccAuuGdTdT	955
as	A-32284	408	cAAUGGUGuAGCGGGGGGdTdT	956
s	A-32285	4	GAAGuccAcucAuucuuGGdTdT	957
as	A-32286	22	CcAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT	958
s	A-32287	412	cccuGcuGAGccccuAcucdTdT	959
as	A-32288	430	GAGuAGGGGCUCAGcAGGGdTdT	960
s	A-32289	417	cuGAGccccuAcuccuAuudTdT	961
as	A-32290	435	AAuAGGAGuAGGGGCUCAGdTdT	962
s	A-32291	418	uGAGccccuAcuccuAuucdTdT	963
as	A-32292	436	GAAuAGGAGuAGGGGCUCAdTdT	964
s	A-32295	422	cccuAcuccuAuuccAccdTdT	965
as	A-32296	440	GGUGGAAuAGGAGuAGGGGdTdT	966
s	A-32297	425	cuAcuccuAuuccAccAcGdTdT	967
as	A-32298	443	CGUGGUGAAuAGGAGuAGdTdT	968
s	A-32299	426	uAcuccuAuuccAccAcGGdTdT	969
as	A-32300	444	CCGUGGUGGAAuAGGAGuAdTdT	970
s	A-32301	427	AcuccuAuuccAccAcGGcdTdT	971
as	A-32302	445	GCCGUGGUGGAAuAGGAGUdTdT	972
s	A-32303	429	uccuAuuccAccAcGGcuGdTdT	973
as	A-32304	447	cAGCCGUGGUGGAAuAGGAdTdT	974
s	A-32307	432	uAuuccAccAcGGcuGucGdTdT	975
as	A-32308	450	CGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT	976
s	A-32309	433	AuuccAccAcGGcuGucGudTdT	977
as	A-32310	451	ACGAcAGCCGUGGUGGAAUdTdT	978
s	A-32311	437	cAccAcGGcuGucGucAccdTdT	979
as	A-32312	455	GGUGACGAcAGCCGUGGUGdTdT	980
s	A-32313	438	AccAcGGcuGucGucAccAdTdT	981
as	A-32314	456	UGGUGACGAcAGCCGUGGUdTdT	982
s	A-32315	439	ccAcGGcuGucGucAccAAAdTdT	983
as	A-32316	457	UUGGUGACGAcAGCCGUGGdTdT	984
s	A-32319	441	AcGGcuGucGucAccAAucdTdT	985
as	A-32320	459	GAUUGGUGACGAcAGCCGUdTdT	986
s	A-32321	442	cGGcuGucGucAccAAuccdTdT	987
as	A-32322	460	GGAUUGGUGACGAcAGCCGdTdT	988
s	A-32323	449	cGucAccAAuccAAAGGAAdTdT	989
as	A-32324	467	UUCCUUGGGAUUGGUGACGdTdT	990
s	A-32325	455	cAAuccAAAGGAAuGAGGGdTdT	991
as	A-32326	473	CCCUcAUUCCUUGGGAUUGdTdT	992

10

20

30

40

【表 6 - 4】

鎖	オリゴ#	位置	配列 (5' から 3' の方向)	配列番号
s	A-32327	491	ccuGAAGGAcGAGGGAuGGdTdT	993
as	A-32328	509	CcAUCCCUCGUCCUUCAGGdTdT	994
s	A-32331	497	GGAcGAGGGAuGGGAuuucdTdT	995
as	A-32332	515	GAAAUCCcAUCCCUCGUCCdTdT	996
s	A-32333	5	AAGuccAcucAuucuuGGcdTdT	997
as	A-32334	23	GCCAAAGAAUGAGUGGACUudTdT	998
s	A-32335	508	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	999
as	A-32336	526	CUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1000
s	A-32337	509	GGAuuuucAuGuAAccAAGdTdT	1001
as	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1002
s	A-32339	514	ucAuGuAAccAAGAGuAuudTdT	1003
as	A-32340	532	AAuACUCUUGGUuAcAUGdTdT	1004
s	A-32341	516	AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT	1005
as	A-32342	534	GGAAuACUCUUGGUuAcAUdTdT	1006
s	A-32343	517	uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT	1007
as	A-32344	535	UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT	1008
s	A-32345	518	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1009
as	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1010
s	A-32347	54	uGccuuGcuGGAcuGGuAudTdT	1011
as	A-32348	72	AuACcAGUCcAGcAAGGcAdTdT	1012
s	A-32349	543	uAAAGcAGuGuuuucAccudTdT	1013
as	A-32350	561	AGGUGAAAACUCUGCUUuAdTdT	1014
s	A-32351	55	GccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT	1015
as	A-32352	73	AAuACcAGUCcAGcAAGGcAdTdT	1016
s	A-32353	551	uGuuuucAccucAuAuGcuAdTdT	1017
as	A-32354	569	AGcAuAUGAGGUGAAAACAdTdT	1018
s	A-32355	552	GuuuucAccucAuAuGcuAdTdT	1019
as	A-32356	570	uAGcAuAUGAGGUGAAAACdTdT	1020
s	A-32357	553	uuuucAccucAuAuGcuAudTdT	1021
as	A-32358	571	AuAGcAuAUGAGGUGAAAAdTdT	1022
s	A-32359	555	uucAccucAuAuGcuAuGudTdT	1023
as	A-32360	573	AcAuAGcAuAUGAGGUGAAdTdT	1024
s	A-32363	557	cAccucAuAuGcuAuGuuAdTdT	1025
as	A-32364	575	uAAcAuAGcAuAUGAGGUGdTdT	1026
s	A-32367	56	ccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT	1027
as	A-32368	74	AAAuACcAGUCcAGcAAGGdTdT	1028
s	A-32369	563	AuAuGcuAuGuuAGAAGucdTdT	1029
as	A-32370	581	GACUUCuAAcAuAGcAuAUdTdT	1030
s	A-32371	564	uAuGcuAuGuuAGAAGucdTdT	1031
as	A-32372	582	GGACUUCuAAcAuAGcAuAdTdT	1032
s	A-32373	566	uGcuAuGuuAGAAGuccAGdTdT	1033
as	A-32374	584	CUGGACUUCuAAcAuAGcAdTdT	1034
s	A-32375	57	cuuGcuGGAcuGGuAuuuGdTdT	1035
as	A-32376	75	cAAAuACcAGUCcAGcAAGdTdT	1036
s	A-32379	578	AGuccAGGcAGAGAcAAuAdTdT	1037
as	A-32380	596	uAUUGUCUCUGCCUGGACUdTdT	1038
s	A-32381	580	uccAGGcAGAGAcAAuAAAdTdT	1039
as	A-32382	598	UUuAUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	1040
s	A-32383	607	GuGAAAGGcAcuuuuucAuudTdT	1041
as	A-32384	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCAdTdT	1042
s	A-32385	62	uGGAcuGGuAuuuGuGucudTdT	1043
as	A-32386	80	AGAcAcAAAuACcAGUCcAdTdT	1044
s	A-32387	77	GucuGAGGcuGGcccuAcGdTdT	1045
as	A-32388	95	CGuAGGGCcAGCCUCAGAcdTdT	1046
s	A-32391	79	cuGAGGcuGGcccuAcGGdTdT	1047
as	A-32392	97	CCCGuAGGGCcAGCCUCAGdTdT	1048
s	A-32393	81	GAGGcuGGcccuAcGGGcAdTdT	1049
as	A-32394	99	UGCCCGuAGGGCcAGCCUCdTdT	1050

10

20

30

40

【表 6 - 5】

鎖	オリゴ#	位置	配列 (5'から3'の方向)	配列番号
s	A-32395	82	AGGcuGGcccuAcGGGcAcdTdT	1051
as	A-32396	100	GUGCCCGuAGGGcAGCCUdTdT	1052
s	A-32397	84	GcuGGcccuAcGGGcAccGdTdT	1053
as	A-32398	102	CGGUGCCCGuAGGGcAGCdTdT	1054
s	A-32399	85	cuGGcccuAcGGGcAccGGdTdT	1055
as	A-32400	103	CCGGUGCCCGuAGGGcAGdTdT	1056
s	A-32401	87	GGcccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1057
as	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGcCdTdT	1058
s	A-32403	9	ccAcucAuucuuGcAGGAdTdT	1059
as	A-32404	27	UCCUGCcAAGAAUGAGUGdTdT	1060
s	A-32405	90	ccuAcGGGcAccGGuGAAudTdT	1061
as	A-32406	108	AUUcACCGGUGCCCGuAGGdTdT	1062
s	A-32407	91	cuAcGGGcAccGGuGAAudTdT	1063
as	A-32408	109	GAUUcACCGGUGCCCGuAGdTdT	1064
s	A-32409	92	uAcGGGcAccGGuGAAuccdTdT	1065
as	A-32410	110	GGAUUcACCGGUGCCCGuAdTdT	1066
s	A-32411	93	AcGGGcAccGGuGAAuccAdTdT	1067
as	A-32412	111	UGGAUUcACCGGUGCCCGUdTdT	1068
s	A-32415	97	GcAccGGuGAAuccAAGuGdTdT	1069
as	A-32416	115	cACUUGGAUUcACCGGUGCdTdT	1070
s	A-32417	98	cAccGGuGAAuccAAGuGudTdT	1071
as	A-32418	116	AcACUUGGAUUcACCGGUGdTdT	1072
s	A-32419	167	uGuGGcAuGcAuGuGuucdTdT	1073
as	A-32420	185	GAAcAcAUGcAUGGCcAcAdTdT	1074
s	A-32421	168	GuGGcAuGcAuGuGuucAdTdT	1075
as	A-32422	186	UGAAcAcAUGcAUGGCcAcdTdT	1076
s	A-32423	171	GccAuGcAuGuGuucAGAAdTdT	1077
as	A-32424	189	UUCUGAAcAcAUGcAUGGCdTdT	1078
s	A-32427	432	uAuuccAccAcGGcuGucAdTdT	1079
as	A-32428	449	UGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT	1080
s	A-32429	447	GucAucAccAAuccAAGGdTdT	1081
as	A-32430	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	1082
s	A-32159	115	GuccucuGAuGGucAAAGudTdT	1083
as	A-32160	133	ACUUUGACcAUCAGAGGACdTdT	1084
s	A-32161	122	GAuGGucAAAGuucuAGAudTdT	1085
as	A-32162	140	AUCuAGAACUUUGACcAUCdTdT	1086
s	A-32173	139	AuGcuGuccGAGGcAGuccdTdT	1087
as	A-32174	157	GGACUGCCUGGAcAGcAUdTdT	1088
s	A-32185	172	ccGuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1089
as	A-32186	190	UUUCUGAAcAcAUGcACGGdTdT	1090
s	A-32197	238	AGucuGGAGAGcuGcAuGGdTdT	1091
as	A-32198	256	CcAUGcAGCUCUcAGACUdTdT	1092
s	A-32209	252	cAuGGGcucAcAAcuGAGGdTdT	1093
as	A-32210	270	CCUcAGUUGUGAGCCcAUGdTdT	1094
s	A-32245	33	ucucAucGucuGcuuccdTdT	1095
as	A-32246	51	GGAGGAcAGACGAUGAGAdTdT	1096
s	A-32257	340	ccccAuuccAuGAGcAuGcdTdT	1097
as	A-32258	358	GcAUGCUC AUGGA AUGGGdTdT	1098
s	A-32293	421	GcccuAcuccuAuuccAcdTdT	1099
as	A-32294	439	GUGGAuAGGAGuAGGGCdTdT	1100
s	A-32305	431	cuAuuccAccAcGGcuGuedTdT	1101
as	A-32306	449	GAcAGCCGUGGUGGAAuAGdTdT	1102
s	A-32317	440	cAcGGcuGucGucAccAAudTdT	1103
as	A-32318	458	AUUGGUGACGAcAGCCGUGdTdT	1104
s	A-32329	496	AGGAcGAGGGAuGGAAuudTdT	1105
as	A-32330	514	AAAUCCcAUCCUCGUCCUdTdT	1106
s	A-32361	556	ucAccucAuAuGcuAuGuudTdT	1107
as	A-32362	574	AAcAuAGcAuAUGAGGUGAdTdT	1108

10

20

30

40

【表 6 - 6】

鎖	オリゴ#	位置	配列(5'から3'の方向)	配列番号
s	A-32365	559	ccucAuAuGcuAuGuuAGAdTdT	1109
as	A-32366	577	UCuAAcAuAGcAuAUGAGGdTdT	1110
s	A-32377	570	AuGuuAGAAGuccAGGcAGdTdT	1111
as	A-32378	588	CUGCCUGGACUUCuAAcAUdTdT	1112
s	A-32389	78	ucuGAGGcuGGcccuAcGGdTdT	1113
as	A-32390	96	CCGuAGGGCCAGCCUcAGAdTdT	1114
s	A-32401	87	GGcccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1115
as	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGCCdTdT	1116
s	A-32413	95	GGGcAccGGuGAAuccAAGdTdT	1117
as	A-32414	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCdTdT	1118
s	A-32425	167	ccAuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1119
as	A-32426	185	UUUCUGAAcAcAUGcAUGGdTdT	1120

【 0 2 2 5 】

【表 7 - 1】

表 5 : ラット TTR の dsRNA の認識番号
配列については、表 7 を参照されたい。

二本鎖#	センスオリゴ#	アンチセンスオリゴ#
AD-18529	A-32745	A-32746
AD-18530	A-32747	A-32748
AD-18531	A-32749	A-32750
AD-18532	A-32751	A-32752
AD-18533	A-32753	A-32754
AD-18534	A-32755	A-32756
AD-18535	A-32757	A-32758
AD-18536	A-32759	A-32760
AD-18537	A-32761	A-32762
AD-18538	A-32763	A-32764
AD-18539	A-32159	A-32160
AD-18540	A-32765	A-32766
AD-18541	A-32767	A-32768
AD-18542	A-32769	A-32770
AD-18543	A-32771	A-32772
AD-18544	A-32773	A-32774
AD-18545	A-32775	A-32776
AD-18546	A-32777	A-32778
AD-18547	A-32779	A-32780
AD-18548	A-32781	A-32782
AD-18549	A-32783	A-32784
AD-18550	A-32785	A-32786
AD-18551	A-32787	A-32788
AD-18552	A-32791	A-32792
AD-18553	A-32793	A-32794
AD-18554	A-32795	A-32796

10

20

30

40

【 0 2 2 6 】

【表 8 - 1】

表 6 A. ラット TTR の dsRNA のセンスおよびアンチセンス鎖配列

鎖: s = センス、as = アンチセンス

位置: 転写物(NM_012881.1、配列番号1330)における 5' 位の塩基

鎖	位置	配列 (5' から 3' の方向)	配列番号	3' のシリアルリボホー ルックを有する配列 (5' から 3' の方向)	配列番号
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGU	1121	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN	1173
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGAC	1122	ACUUUGACCAUCAGAGGACNN	1174
s	537	UUCUUGCUCUAUAAAACCGU	1123	UUCUUGCUCUAUAAAACCGUNN	1175
as	555	ACGGUUUAUAGAGCAAGAA	1124	ACGGUUUAUAGAGCAAGAANN	1176
s	543	CUCUAUAAAACCGUGUAGC	1125	CUCUAUAAAACCGUGUAGCNR	1177
as	561	GCUAACACGGUUUAUAGAG	1126	GCUAACACGGUUUAUAGAGNN	1178
s	392	UCGCCACUACACCAUCGCA	1127	UCGCCACUACACCAUCGCANN	1179
as	410	UGCGAUGGUGUAGUGGCGA	1128	UGCGAUGGUGUAGUGGCGANN	1180
s	538	UCUUGCUCUAUAAAACCGUG	1129	UCUUGCUCUAUAAAACCGUGNN	1181
as	556	CACGGUUUAUAGAGCAAGA	1130	CACGGUUUAUAGAGCAAGANN	1182
s	541	UGCUCUAUAAAACCGUGUUA	1131	UGCUCUAUAAAACCGUGUUNN	1183
as	559	UAACACGGUUUAUAGAGCA	1132	UAACACGGUUUAUAGAGCANN	1184
s	532	CAGUGUUCUUGCUCUAUAA	1133	CAGUGUUCUUGCUCUAUANN	1185
as	550	UUAUAGAGCAAGAACACUG	1134	UUAUAGAGCAAGAACACUGNN	1186
s	542	GCUCUAUAAAACCGUGUAG	1135	GCUCUAUAAAACCGUGUAGNN	1187
as	560	CUAACACGGUUUAUAGAGC	1136	CUAACACGGUUUAUAGAGCNR	1188
s	134	CCUGGAUGCUGUCCGAGGC	1137	CCUGGAUGCUGUCCGAGGCNN	1189
as	152	GCCUCGGACAGCAUCCAGG	1138	GCCUCGGACAGCAUCCAGGNN	1190
s	119	UCUGAUGGUCAAAGUCCUG	1139	UCUGAUGGUCAAAGUCCUGNR	1191
as	137	CAGGACUUUGACCAUCAGA	1140	CAGGACUUUGACCAUCAGANN	1192
s	241	CUGGAGAGCUGCACGGGCU	1141	CUGGAGAGCUGCACGGGCUNR	1193
as	259	AGCCCUGGCAGCUCUCCAG	1142	AGCCCUGGCAGCUCUCCAGNN	1194
s	544	UCUAUAAAACCGUGUAGCA	1143	UCUAUAAAACCGUGUAGCANN	1195
as	562	UGCUAACACGGUUUAUAGA	1144	UGCUAACACGGUUUAUAGANN	1196
s	530	AACAGUGUUCUUGCUCUAU	1145	AACAGUGUUCUUGCUCUAUNN	1197
as	548	AUAGAGCAAGAACACUGUU	1146	AUAGAGCAAGAACACUGUUNN	1198
s	118	CUCUGAUGGUCAAAGUCCU	1147	CUCUGAUGGUCAAAGUCCUNN	1199
as	136	AGGACUUUGACCAUCAGAG	1148	AGGACUUUGACCAUCAGAGNN	1200
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGCCCU	1149	UGCUGUCCGAGGCAGCCUNN	1201
as	158	AGGGCUGCCUCGGACAGCA	1150	AGGGCUGCCUCGGACAGCANN	1202
s	239	GUCUGGAGAGCUGCACGGG	1151	GUCUGGAGAGCUGCACGGGNN	1203
as	257	CCCUGGCAGCUCUCCAGAC	1152	CCCUGGCAGCUCUCCAGACNN	1204
s	531	ACAGUGUUCUUGCUCUAUA	1153	ACAGUGUUCUUGCUCUAUNN	1205
as	549	UAUAGAGCAAGAACACUGU	1154	UAUAGAGCAAGAACACUGUNN	1206
s	117	CCUCUGAUGGUCAAAGUCC	1155	CCUCUGAUGGUCAAAGUCCNR	1207
as	135	GGACUUUGACCAUCAGAGG	1156	GGACUUUGACCAUCAGAGGNN	1208
s	131	AGUCCUGGAUGCUGUCCGA	1157	AGUCCUGGAUGCUGUCCGANN	1209
as	149	UCGGACAGCAUCCAGGACU	1158	UCGGACAGCAUCCAGGACUNN	1210
s	217	UUGCCUCUGGGAAGACCGC	1159	UUGCCUCUGGGAAGACCGCNR	1211
as	235	GCGGUCUCCCAGAGGCAA	1160	GCGGUCUCCCAGAGGCAANN	1212
s	242	UGGAGAGCUGCACGGGCUC	1161	UGGAGAGCUGCACGGGCUCNR	1213
as	260	GAGCCCGUGCAGCUCUCCA	1162	GAGCCCGUGCAGCUCUCCANN	1214
s	244	GAGAGCUGCACGGGCUCAC	1163	GAGAGCUGCACGGGCUCACNR	1215
as	262	GUGAGCCCGUGCAGCUCUC	1164	GUGAGCCCGUGCAGCUCUCNR	1216
s	246	GAGCUGCACGGGCUCACCA	1165	GAGCUGCACGGGCUCACCANN	1217
as	264	UGGUGAGCCCGUGCAGCUC	1166	UGGUGAGCCCGUGCAGCUCNR	1218
s	399	UACACCAUCGCAGCCUGC	1167	UACACCAUCGCAGCCUGCNR	1219
as	417	GCAGGGCUGCGAUGGUGUA	1168	GCAGGGCUGCGAUGGUGUANN	1220
s	132	GUCCUGGAUGCUGUCCGAG	1169	GUCCUGGAUGCUGUCCGAGNN	1221
as	150	CUCGGACAGCAUCCAGGAC	1170	CUCGGACAGCAUCCAGGACNR	1222

10

20

30

40

【表 8 - 2】

鎖	位置	配列 (5' から 3' の方向)	配列 番号	3' のシヌクレチド'- ホ- ンク' を有する配列 (5' から 3' の方向)	配列 番号
s	245	AGAGCUGCACGGGCUCACC	1171	AGAGCUGCACGGGCUCACCNN	1223
as	263	GGUGAGCCCGUGCAGCUCU	1172	GGUGAGCCCGUGCAGCUCUIN	1224

【 0 2 2 7 】

【表 9 - 1】

表 6 B. ラット TTR の dsRNA のセンスおよびアンチセンス鎖配列
 鎖: s = センス、as = アンチセンス
 位置: 転写物 (NM_012681.1、配列番号 1330) における 5' 位の塩基

鎖	位置	3' のテロメーション-ホックを有する配列 (5' から 3' の方向)	配列番号
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAAGUdTdT	1225
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	1226
s	537	UUCUUGCUCUAUAAAACCGUdTdT	1227
as	555	ACGGUUUAUAGAGCAAGAAdTdT	1228
s	543	CUCUAUAAAACCGUGUAGCdTdT	1229
as	561	GCUAACACGGUUUAUAGAGdTdT	1230
s	392	UCGCCACUACACCAUCGCAdTdT	1231
as	410	UGCGAUGGUGUAGUGGCGAdTdT	1232
s	538	UCUUGCUCUAUAAAACCGUGdTdT	1233
as	556	CACGGUUUAUAGAGCAAGAAdTdT	1234
s	541	UGCUCUAUAAAACCGUGUAdTdT	1235
as	559	UAACACGGUUUAUAGAGCAdTdT	1236
s	532	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAAdTdT	1237
as	550	UUAUAGAGCAAGAACACUGdTdT	1238
s	542	GCUCUAUAAAACCGUGUAGdTdT	1239
as	560	CUAACACGGUUUAUAGAGCdTdT	1240
s	134	CCUGGAUGCUGUCCGAGGCdTdT	1241
as	152	GCCUCGGACAGCAUCCAGGdTdT	1242
s	119	UCUGAUGGUCAAAAGUCCUGdTdT	1243
as	137	CAGGACUUUGACCAUCAGAAdTdT	1244
s	241	CUGGAGAGCUGCACGGGCUdTdT	1245
as	259	AGCCCUGGCAGCUCUCCAGdTdT	1246
s	544	UCUAUAAAACCGUGUAGCAdTdT	1247
as	562	UGCUAACACGGUUUAUAGAdTdT	1248
s	530	AACAGUGUUCUUGCUCUAUdTdT	1249
as	548	AUAGAGCAAGAACACUGUdTdT	1250
s	118	CUCUGAUGGUCAAAAGUCCUdTdT	1251
as	136	AGGACUUUGACCAUCAGAGdTdT	1252
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGCCCUdTdT	1253
as	158	AGGGCUGCCUCGGACAGCAdTdT	1254
s	239	GUCUGGAGAGCUGCACGGGdTdT	1255
as	257	CCCUGGCAGCUCUCCAGACdTdT	1256
s	531	ACAGUGUUCUUGCUCUAUAdTdT	1257
as	549	UAUAGAGCAAGAACACUGUdTdT	1258
s	117	CCUCUGAUGGUCAAAAGUCCdTdT	1259
as	135	GGACUUUGACCAUCAGAGGdTdT	1260
s	131	AGUCCUGGAUGCUGUCCGAdTdT	1261
as	149	UCGGACAGCAUCCAGGACUdTdT	1262
s	217	UUGCCUCUGGGAAGACCGCdTdT	1263
as	235	GCGGUCUCCCAGAGGCAAdTdT	1264
s	242	UGGAGAGCUGCACGGGCUCdTdT	1265
as	260	GAGCCCGUGCAGCUCUCCAdTdT	1266
s	244	GAGAGCUGCACGGGCUCACdTdT	1267
as	262	GUGAGCCCGUGCAGCUCUCdTdT	1268
s	246	GAGCUGCACGGGCUCACCAAdTdT	1269

10

20

30

40

【表 9 - 2】

鎖	位置	3' のテロシグナル-ホーンクを有する配列 (5' から3' の方向)	配列番号
as	264	UGGUGAGCCCGUGCAGCUCdTdT	1270
s	399	UACACCAUCCGAGCCUGCdTdT	1271
as	417	GCAGGGCUGCGAUGGUGUAdTdT	1272
s	132	GUCCUGGAUGCUGCCGAGdTdT	1273
as	150	CUCGGACAGCAUCCAGGACdTdT	1274
s	245	AGAGCUGCACGGGCUCACCCdTdT	1275
as	263	GGUGAGCCCGUGCAGCUCdTdT	1276

【 0 2 2 8 】

【表10-1】

表7. ラットTTRのdsRNAの化学修飾したセンスおよびアンチセンス鎖配列二本鎖# (dsRNA名) については、表5を参照されたい。

鎖: s=センス, as=アンチセンス

位置: 転写物(NM_012681.1, 配列番号1330)における5'位の塩基

鎖	オリゴ#	位置	配列(5'から3'の方向)	配列番号
s	A-32159	115	GuccucuGAuGGucAAAGudTdT	1277
as	A-32160	133	ACUUUGACcAUcAGAGGACdTdT	1278
s	A-32745	537	uucuuGcucuAuAAAaccGudTdT	1279
as	A-32746	555	ACGGUUuAuAGAGcAAGAAdTdT	1280
s	A-32747	543	cucuAuAAAaccGuGuuAGcdTdT	1281
as	A-32748	561	GCuAAcACGGUUuAuAGAGdTdT	1282
s	A-32749	392	ucGccAcuAcAccAucGcAdTdT	1283
as	A-32750	410	UGCGAUGGUGuAGUGGCGAdTdT	1284
s	A-32751	538	ucuuGcucuAuAAAaccGuGdTdT	1285
as	A-32752	556	cACGGUUuAuAGAGcAAGAdTdT	1286
s	A-32753	541	uGcucuAuAAAaccGuGuuAdTdT	1287
as	A-32754	559	uAAcACGGUUuAuAGAGcAdTdT	1288
s	A-32755	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1289
as	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAacACUGdTdT	1290
s	A-32757	542	GcucuAuAAAaccGuGuuAGdTdT	1291
as	A-32758	560	CuAAcACGGUUuAuAGAGCdTdT	1292
s	A-32759	134	ccuGGAuGcuGuccGAGGcdTdT	1293
as	A-32760	152	GCCUCGGAcAGcAUCcAGGdTdT	1294
s	A-32761	119	ucuGAuGGucAAAGuccuGdTdT	1295
as	A-32762	137	cAGGACUUUGACcAUcAGAdTdT	1296
s	A-32763	241	cuGGAGAGcuGcAcGGGcudTdT	1297
as	A-32764	259	AGCCCGUGcAGCUCUCcAGdTdT	1298
s	A-32765	544	ucuAuAAAaccGuGuuAGcAdTdT	1299
as	A-32766	562	UGCuAAcACGGUUuAuAGAdTdT	1300
s	A-32767	530	AAcAGuGuucuuGcucuAudTdT	1301
as	A-32768	548	AuAGAGcAAGAacACUGUudTdT	1302
s	A-32769	118	cucuGAuGGucAAAGuccudTdT	1303
as	A-32770	136	AGGACUUUGACcAUcAGAGdTdT	1304
s	A-32771	140	uGcuGuccGAGGcAGccudTdT	1305
as	A-32772	158	AGGGCUGCCUCGGAcAGcAdTdT	1306
s	A-32773	239	GucuGGAGAGcuGcAcGGGdTdT	1307
as	A-32774	257	CCCGUGcAGCUCUCcAGACdTdT	1308
s	A-32775	531	AcAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	1309
as	A-32776	549	uAuAGAGcAAGAacACUGUdTdT	1310
s	A-32777	117	ccucuGAuGGucAAAGuccdTdT	1311
as	A-32778	135	GGACUUUGACcAUcAGAGGdTdT	1312
s	A-32779	131	AGuccuGGAuGcuGuccGAdTdT	1313
as	A-32780	149	UCGGAcAGcAUCcAGGACUdTdT	1314
s	A-32781	217	uuGccucuGGAAAGaccGcdTdT	1315
as	A-32782	235	GCGGUCUCCcAGAGGcAAdTdT	1316
s	A-32783	242	uGGAGAGcuGcAcGGGcudTdT	1317
as	A-32784	260	GAGCCCUGcAGCUCUCcAdTdT	1318

10

20

30

40

【表 10 - 2】

鎖	オリゴ#	位置	配列(5'から3'の方向)	配列番号
s	A-32785	244	GAGAGGcuGcAcGGGcucAcdTdT	1319
as	A-32786	262	GUGAGCCCCGUGcAGCUCUCdTdT	1320
s	A-32787	246	GAGcuGcAcGGGcucAccAdTdT	1321
as	A-32788	264	UGGUGAGCCCCGUGcAGCUCdTdT	1322
s	A-32791	399	uAcAccAucGcAGcccuGcdTdT	1323
as	A-32792	417	GcAGGGCUGCGAUGGUGuAdTdT	1324
s	A-32793	132	GuccuGGAuGcuGuccGAGdTdT	1325
as	A-32794	150	CUCGGAcAGcAUCcAGGACdTdT	1326
s	A-32795	245	AGAGcuGcAcGGGcucAcdTdT	1327
as	A-32796	263	GGUGAGCCCCGUGcAGCUCUdTdT	1328

10

【0229】

T T R 配列の合成

1 μモルの規模で、Mer Made 192 合成機において、T T R 配列を合成した。配列表の全ての配列については、「エンドライト」化学反応を以下の詳細のように適用した。

- ・センス鎖内の全てのピリミジン（シトシンおよびウリジン）は、対応する 2' - O - メチル塩基（2' - O - メチルCおよび2' - O - メチルU）と置換された。

- ・アンチセンス鎖では、リボAヌクレオシドに隣接する（5'位に向かって）ピリミジンは、それらの対応する2' - O - メチルヌクレオシドと置換された。

- ・センスおよびアンチセンス配列の両方の3'末端で、2つの塩基dTdTの拡張を導入した。

- ・配列ファイルテキストファイルに変換し、Mer Made 192 合成ソフトウェアにおける負荷に対して互換性を保つようにした。

【0230】

T T R 配列の合成は、ホスホラミダイト化学反応を用いて、固定支持されたオリゴヌクレオチド合成を使用した。96ウェルプレート中の1 μmの規模で、上記の配列の合成を行った。アミダイト溶液を、0.1 M 濃度で調製し、エチルチオテトラゾール（アセトニトリル中0.6 M）を活性剤として使用した。

【0231】

合成した配列を切断し、第1のステップにおいてメチルアミン、および第2のステップにおいて、トリエチルアミン3HFを用いて、96ウェルプレート中に脱保護した。このようにして得られた粗配列を、アセトンとエタノールの混合液を用いて、沈殿させ、ペレットを、0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁させた。それぞれの配列からのサンプルを、LC - MSによって分析し、得られる大量データにより配列の同一性を確認した。サンプルの選択されたセットはまた、IEXクロマトグラフィーによっても分析した。

【0232】

過程における次のステップは、精製であった。全ての配列は、Source 15Qカラムを用いて、AKTA explorer 精製システムにおいて精製した。完全長配列に対応する単一ピークを、溶離液中に収集し、続いて、イオン交換クロマトグラフィーによって純度について分析した。

【0233】

AKTA 精製器を用いて、Sephadex G25カラム上に精製された配列を、脱塩した。脱塩したT T R 配列を、濃度および純度について分析した。次いで、T T R - dsRNAを形成するために、単鎖をアニールした。

【0234】

実施例 2 B : mRNA抑制に対するT T RのsiRNAのインビトロスクリーニング

50

d s R N Aを標的とするヒトT T R (表2)について、T T Rのm R N Aを定量化するために、q P C R (リアルタイムP C R)およびb D N A (分岐D N A)アッセイを用いて、H e p G 2およびH e p 3 B細胞内の内因性T T Rの発現の阻害のアッセイを行った。d s R N Aを標的とする齧歯類T T R (表5)を合成し、b D N Aアッセイを用いて、H . 4 . I I . E細胞内の内因性T T Rの発現の阻害のアッセイを行った。単回用量アッセイからの結果は、I C 5 0を計算するための用量反応実験用のT T Rのd s R N A二本鎖のサブセットを選択するために使用した。I C 5 0の結果は、さらなる試験用のT T Rのd s R N Aを選択するために使用した。

【0235】

細胞培養および形質移入：

肝細胞株のH e p G 2、H e p 3 B、およびH . 4 . I I . E細胞 (A T C C、M a n a s s a s , V A)を、トリプシン処理によりプレートから放出される前に、10% F B S、ストレプトマイシン、およびグルタミン (A T C C)で補完されるダルベッコ改変イーグル培地 (A T C C)中の5% C O₂の雰囲気下で、37 °Cでほぼコンフルエントまで増殖した。また、H . 4 . I I . E細胞も、イーグル最小必須培地中で増殖した。逆転写は、10 μLのO p t i - M E Mに加えて、ウェル当たり0.2 μLのL i p o f e c t a m i n e R N A i M a x (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d C A , c a t # 1 3 7 7 8 - 1 5 0)と一緒に、96ウェルプレート中に5 μLのO p t i - M E Mをウェル当たり5 μLのs i R N A二本鎖に添加することによって行われ、室温で15分間インキュベートした。次いで、4 × 10⁴ (H e p G 2)、2 × 10⁴ (H e p 3 B)、または2 × 10⁴ (H . 4 . I I . E)細胞を含有する、抗生物質を含有しない、80 μLの完全成長培地を添加した。R N A精製前に、細胞を、24時間インキュベートした。10 nMの最終2倍濃度で単回用量実験を行い、10、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005、0.00001 nMで用量反応実験を行った。

【0236】

Mag M A X - 9 6 総 R N A 単離キット (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y C A , 部品番号# : A M 1 8 3 0)を用いた総 R N A 単離：

細胞は、採集され、140 μLの溶解/結合溶液中で溶解され、次いで、E p p e n d o r f T h e r m o m i x e rを用いて850 rpmで1分間混合した (混合速度は、過程を通して同一であった)。20マイクロリットルの磁気ビーズを、細胞溶解物に添加し、5分間混合した。磁気ビーズは、磁気スタンドを用いて捕捉し、ビーズを妨害することなく、浮遊物を除去した。浮遊物を除去した後、磁気ビーズを洗浄液1 (イソプロパノールを添加)で洗浄し、1分間混合した。ビーズを再度捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、ビーズを150 μLの洗浄液2 (エタノールを添加)で洗浄し、捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、50 μLのD N アーゼ混合物 (M a g M a x t u r b o D N a s e B u f f e rおよびT u r b o D N a s e)をビーズに添加し、それらを10~15分間混合した。混合後、100 μLのR N A再生溶液を添加し、3分間混合した。浮遊物を除去し、磁気ビーズを150 μLの洗浄液2で再度洗浄し、1分間混合し、浮遊物を完全に除去した。磁気ビーズを2分間混合し、R N Aを50 μLの水で溶離する前に乾燥させた。

【0237】

A B I 高性能 c D N A 逆転写キット (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A , C a t # 4 3 6 8 8 1 3)を用いた c D N A 合成：

2 μLの10 × 緩衝液、0.8 μLの25 × d N T P、2 μLのランダムプライマー、1 μLの逆転写酵素、1 μLのR N a s e 阻害剤、および反応当たり3.2 μLのH₂Oのマスターミックスを、10 μLの総R N Aに添加した。以下のステップを通して、B i o - R a d C - 1 0 0 0またはS - 1 0 0 0のサーマルサイクラー (H e r c u l e s , C A)を用いて、c D N Aを生成した。25 °Cで10分間、37 °Cで120分間、85 °Cで5秒間、4 °Cで保持。

10

20

30

40

50

【0238】

リアルタイムPCR:

2 μ LのcDNAを、MicroAmp Optical 96ウェルプレート (Applied Biosystems cat# 4326659) 中のウェル当たり1 μ Lの18S TaqManプローブ (Applied Biosystems Cat# 4319413E)、1 μ LのTTR TaqManプローブ (Applied Biosystems cat# HS00174914 M1)、および10 μ LのTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Cat# 4324018) のマスターミックスを添加した。Ct (RQ) アッセイを用いて、ABI 7000 PrismまたはABI 7900 HTリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) において、リアルタイムPCRを行った。全ての反応を、3重に行った。

10

【0239】

Ct法を用いて、リアルタイムデータを分析し、倍率変化を計算するために、10 nM BlockIT 蛍光オリゴ (Invitrogen Cat# 2013) または10 nM AD-1955 (非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照二本鎖) で形質移入した細胞から行われたアッセイにたいして正規化した。

【0240】

分岐DNAアッセイ - QuantiGene 1.0 (Panomics, Fremont, CA. cat#: QG0004) - 齧歯類特異的な二本鎖をスクリーニングするために使用

20

H.4.II.E細胞 (ATCC) を、10 nM siRNAで形質移入した。培地を除去した後、H.4.II.Eを、100 μ Lの希釈した溶解混合物 (1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20 mg/mLの最終濃度に対して1 mL当たり10 μ LのプロテイナーゼKの混合物) で溶解し、次いで、65 °Cで35分間インキュベートした。次いで、80 μ Lの作業プローブセット (TTRまたはGAPDHプローブの混合物) および20 μ Lの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを、53 \pm 1 °Cで終夜 (約16 ~ 20時間) インキュベートした。捕捉プレートは、1 \times 洗浄緩衝液 (ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2の混合物) で3回洗浄し、次いで、1000 rpmで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100 μ Lの増幅作業用試薬を捕捉プレートに添加し、次いで、これを密閉し、46 \pm 1 °Cで1時間インキュベートした。洗浄および乾燥ステップを、1時間インキュベートした後に繰り返し、100 μ Lの標識溶液試薬を添加した。次いで該プレートを洗浄し、乾燥させ、100 μ Lの基質 (ラウリル硫酸リチウムと基質溶液の混合物) を添加した。捕捉プレートを46 \pm 1 °Cで30分間インキュベーター中に入れた。次いで、捕捉プレートをインキュベーターから取り出し、室温で30分間インキュベートした。最終的に、Victor Luminometer (Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて、捕捉プレートを読み取った。

30

【0241】

分岐DNAアッセイ - QuantiGene 2.0 (Panomics cat#: QS0011) : 全ての他の二本鎖をスクリーニングするために使用

40

提示された用量で、24時間インキュベートした後、培地を取り出し、細胞を、100 μ Lの溶解混合物 (1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20 mg/mLの最終濃度に対して10 μ LのプロテイナーゼK/mLの混合物) 中で溶解し、次いで、65 °Cで35分間インキュベートした。次いで、20 μ Lの作業プローブセット (遺伝子標的用のTTRプローブおよび内因性対照用のGAPDH) および80 μ Lの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを55 \pm 1 °Cで (約16 ~ 20時間) インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1 \times 洗浄緩衝液 (ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2) で3回洗浄し、次いで、240 gで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100 μ Lの事前増

50

幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、 55 ± 1 で1時間インキュベートした。1時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、 $100 \mu\text{L}$ の増幅作業試薬を添加した。1時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、 $100 \mu\text{L}$ の標識プローブを添加した。捕捉プレートを、 50 ± 1 で1時間インキュベートした。次いで、該プレートを1×洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、次いで、 $100 \mu\text{L}$ の基質を捕捉プレートに添加した。5～15分間インキュベートした後、SpectraMax Luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて、捕捉プレートを読み取った。

【0242】

bDNAデータ分析：

bDNAデータは、(i)それぞれの3重の試料から平均バックグラウンドを減算し、(ii)得られる3重のGAPDH(対照プローブ)およびTTR(実験プローブ)値を平均し、次いで、(iii)比：(実験プローブ-バックグラウンド)/(対照プローブ-バックグラウンド)を得ることによって分析された。

【0243】

結果

TTR-dsRNA(TTRのsiRNA)における単回用量およびIC50の結果の概要を、下表8に示す。単回用量の結果は、HepG2細胞においてアッセイした、対照に対するTTRのmRNAの割合(%)として表す。IC50は、表示されるように、HepG2および/またはHep3B細胞において決定した。

【0244】

10

20

【表 11 - 1】

表8. TIRの*siRNA*のインビトロスクリーニングの単回用量およびIC50の結果
 ND: データなし; *は、2つの実験の平均を表す結果を示す。

二本鎖#	対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%)		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bdNA	qPCR	bdNA	qPCR	bdNA
AD-18243	50.35	141.53	ND	ND	ND	ND
AD-18244	64.26	158.55	ND	ND	ND	ND
AD-18245	56.89	107.22	ND	ND	ND	ND
AD-18246	10.53	32.51*	0.265	0.086	ND	ND
AD-18247	125.56	69.57	ND	ND	ND	ND
AD-18248	127.78	66.97	ND	ND	ND	ND
AD-18249	48.77	48.76	ND	ND	ND	ND
AD-18250	96.94	86.42	ND	ND	ND	ND
AD-18251	170.41	129.15	ND	ND	ND	ND
AD-18252	73.52	81.90	ND	ND	ND	ND
AD-18253	25.25	61.25	ND	ND	ND	ND
AD-18254	95.13	103.96	ND	ND	ND	ND
AD-18255	119.46	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18256	42.64	95.67	ND	ND	ND	ND
AD-18257	146.25	141.75	ND	ND	ND	ND
AD-18258	10.20	13.41*	0.007	0.005	0.004	0.005
AD-18259	9.30	20.91*	0.102	0.005	ND	ND
AD-18260	125.37	81.36	ND	ND	ND	ND
AD-18261	14.27	19.40*	0.210	ND	ND	ND
AD-18262	84.95	104.05	ND	ND	ND	ND
AD-18263	16.32	23.25*	0.110	ND	ND	ND
AD-18264	104.18	83.69	ND	ND	ND	ND
AD-18265	41.62	64.87	ND	ND	ND	ND
AD-18266	39.98	110.53	ND	ND	ND	ND
AD-18267	149.64	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18268	152.93	174.04	ND	ND	ND	ND
AD-18269	37.27	92.28	ND	ND	ND	ND
AD-18270	99.44	164.75	ND	ND	ND	ND
AD-18271	18.89	28.33*	0.503	0.004	ND	ND
AD-18272	128.32	132.58	ND	ND	ND	ND
AD-18273	115.78	201.95	ND	ND	ND	ND
AD-18274	8.97	20.04*	0.009	0.176	0.036	0.012
AD-18275	4.09	22.25*	0.026	0.118	ND	ND
AD-18276	19.73	45.22*	0.198	0.677	ND	ND
AD-18277	10.55	26.31*	0.121	0.426	ND	ND
AD-18278	108.86	116.26	ND	ND	ND	ND
AD-18279	66.59	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18280	103.26	170.52	ND	ND	ND	ND
AD-18281	87.98	123.88	ND	ND	ND	ND

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

二本鎖#	対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%)		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18282	82.47	140.32	ND	ND	ND	ND
AD-18283	106.54	182.78	ND	ND	ND	ND
AD-18284	106.93	151.78	ND	ND	ND	ND
AD-18285	26.58	60.05*	ND	0.089	ND	ND
AD-18286	109.95	173.66	ND	ND	ND	ND
AD-18287	54.23	155.45	ND	ND	ND	ND
AD-18288	73.52	174.09	ND	ND	ND	ND
AD-18289	103.36	174.76	ND	ND	ND	ND
AD-18290	17.06	52.04*	1.253	0.181	ND	ND
AD-18291	7.71	169.29*	1.304	0.019	ND	ND
AD-18292	7.51	210.03*	0.604	0.005	ND	ND
AD-18293	3.61	62.53*	0.078	0.003	ND	ND
AD-18294	111.53	107.56	ND	ND	ND	ND
AD-18295	115.88	105.37	ND	ND	ND	ND
AD-18296	57.03	38.03	ND	ND	ND	ND
AD-18297	87.69	73.87	ND	ND	ND	ND
AD-18298	10.39	7.25*	0.455	0.008	ND	ND
AD-18299	18.79	18.06*	0.895	0.014	ND	ND
AD-18300	108.70	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18301	114.22	70.50	ND	ND	ND	ND
AD-18302	116.19	122.40	ND	ND	ND	ND
AD-18303	124.89	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18304	132.99	89.54	ND	ND	ND	ND
AD-18305	153.10	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18306	159.22	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18307	116.83	84.57	ND	ND	ND	ND
AD-18308	156.72	87.80	ND	ND	ND	ND
AD-18309	113.22	101.97	ND	ND	ND	ND
AD-18310	132.33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18311	161.68	92.92	ND	ND	ND	ND
AD-18312	103.01	71.17	ND	ND	ND	ND
AD-18313	120.65	53.26	ND	ND	ND	ND
AD-18314	116.33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18315	115.13	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18316	118.73	122.34	ND	ND	ND	ND
AD-18317	114.03	121.10	ND	ND	ND	ND
AD-18318	80.85	122.57	ND	ND	ND	ND
AD-18319	119.14	148.87	ND	ND	ND	ND
AD-18320	22.86	55.43*	ND	0.023	0.403	ND
AD-18321	6.44	31.56*	0.001	0.033	ND	ND
AD-18322	54.21	100.46	ND	ND	ND	ND
AD-18323	6.37	28.71*	0.005	0.023	ND	ND

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

二本鎖#	対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%)		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18324	2.53	15.98*	0.002	0.006	0.005	0.014
AD-18325	2.52	11.96*	0.001	0.016	ND	ND
AD-18326	18.34	43.16*	0.025	0.186	ND	ND
AD-18327	18.28	13.90*	0.044	0.215	ND	ND
AD-18328	4.53	26.04*	0.003	0.004	0.006	0.006
AD-18329	96.93	131.54	ND	ND	ND	ND
AD-18330	11.80	45.18*	0.0004	0.010	0.020	ND
AD-18331	117.77	163.07	ND	ND	ND	ND
AD-18332	11.53	35.09*	0.001	0.076	0.065	ND
AD-18333	12.24	46.94*	0.001	0.115	0.075	ND
AD-18334	16.27	55.28*	0.0004	0.181	1.071	ND
AD-18335	53.52	112.80	ND	ND	ND	ND
AD-18336	6.39	33.00*	0.001	0.112	0.081	ND
AD-18337	51.77	105.33	ND	ND	ND	ND
AD-18338	48.21	102.86	ND	ND	ND	ND
AD-18339	6.48	26.56*	0.004	0.002	0.018	0.029
AD-18340	4.53	30.76*	0.002	0.002	ND	ND
AD-18341	31.27	100.41	ND	ND	ND	ND
AD-18342	7.60	42.89*	ND	0.016	0.076	ND
AD-18343	3.42	17.45*	ND	0.001	ND	ND
AD-18344	75.08	134.31	ND	ND	ND	ND
AD-18345	13.62	42.75*	0.002	0.013	ND	ND
AD-18346	59.25	121.10	ND	ND	ND	ND
AD-18347	91.23	139.54	ND	ND	ND	ND
AD-18348	89.95	159.29	ND	ND	ND	ND
AD-18349	108.01	144.96	ND	ND	ND	ND
AD-18350	123.65	125.87	ND	ND	ND	ND
AD-18351	108.36	104.02	ND	ND	ND	ND
AD-18352	87.82	128.72	ND	ND	ND	ND
AD-18353	14.40	65.77	0.012	0.027	ND	ND
AD-18354	99.27	123.53	ND	ND	ND	ND
AD-18355	135.04	150.88	ND	ND	ND	ND
AD-18356	100.76	178.96	ND	ND	ND	ND
AD-18357	125.30	162.85	ND	ND	ND	ND
AD-18358	103.15	136.01	ND	ND	ND	ND
AD-18359	34.74	140.48	ND	ND	ND	ND
AD-18360	103.86	146.86	ND	ND	ND	ND
AD-18361	105.74	152.74	ND	ND	ND	ND
AD-18362	106.96	188.22	ND	ND	ND	ND
AD-18363	124.22	58.46	ND	ND	ND	ND
AD-18364	113.75	66.87	ND	ND	ND	ND
AD-18446	29.73	13.30	ND	ND	ND	ND

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

二本鎖#	対照に対する、10nMでの 単回用量の割合 (%)		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18447	109.74	53.63	ND	ND	ND	ND
AD-18448	22.96	8.81	ND	ND	ND	ND
AD-18449	112.59	50.11	ND	ND	ND	ND
AD-18450	89.41	34.89	ND	ND	ND	ND
AD-18451	74.35	23.88	ND	ND	ND	ND
AD-18452	125.25	54.86	ND	ND	ND	ND
AD-18453	126.98	56.31	ND	ND	ND	ND
AD-18454	113.88	52.48	ND	ND	ND	ND
AD-18455	163.00	48.89	ND	ND	ND	ND
AD-18456	15.70	10.52	ND	ND	ND	ND
AD-18457	12.86	8.22	ND	ND	ND	ND
AD-18458	13.00	7.00	ND	ND	ND	ND
AD-18459	14.41	10.72	ND	ND	ND	ND
AD-18460	121.16	74.87	ND	ND	ND	ND
AD-18461	100.53	71.87	ND	ND	ND	ND
AD-18462	47.75	29.35	ND	ND	ND	ND
AD-18463	58.98	44.79	ND	ND	ND	ND

10

20

【0245】

30

5つのTTR-dsRNA(AD-18258、AD-18274、AD-18324、AD-18328、およびAD-18339)に対するIC50を特定するために使用された用量反応データを、下表9に詳細に示す。全て5つのsiRNAが、pM単位のIC50を有することが確認された。表8中のdsRNAに対するIC50データは、下表9に表したデータの要約である。

【0246】

【表 1 2】

表 9. 5つの TTR - の dsRNA に対する用量反応データ

		対照 AD-1955 と比較した、阻害率 (%)												
二本鎖 AD-18258		二本鎖の用量 (nM)												
細胞型	検出方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	14.4	14.1	16.2	23.9	27.26	40.19	68.46	78.1	74.48	104.37	98.28	113.68	0.007
HepG2	bDNA	14.3	14.5	11.1	12.8	18.82	19.77	51.21	56.03	63.63	58.35	43.64	51.05	0.005
Hep3B	qPCR	11.9	8.62	12.4	16.4	28.35	30.49	58.36	54.57	81.26	89.43	81.85	101.87	0.004
Hep3B	bDNA	7.65	7.5	11.3	12.6	28.85	27.89	64.57	73.48	72.03	91.44	86.71	89.31	0.005

		対照 AD-1955 と比較した、阻害率 (%)												
二本鎖 AD-18274		二本鎖の用量 (nM)												
細胞型	検出方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	6.68	8.45	11.7	24.2	42.08	49.89	56.95	62.99	64.47	54.92	67.39	72.67	0.009
HepG2	bDNA	27.5	69	25.2	34.2	73.03	103.4	121.57	97.31	154.93	156.7	Nd	152.25	0.176
Hep3B	qPCR	7.58	17	15.6	43.9	42.22	60.55	78.8	77.81	79.97	85.84	86.13	83.99	0.036
Hep3B	bDNA	3.77	4.92	7.51	15	35.21	51.66	72.45	70.12	78.31	77.52	90.72	83.01	0.012

		対照 AD-1955 と比較した、阻害率 (%)												
二本鎖 AD-18324		Dose of duplex (nM)												
細胞型	検出方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	2.07	2.27	2.74	6.36	8.18	15.23	28.82	52.79	90.86	94.72	116.07	98.97	0.002
HepG2	bDNA	14.5	7.88	11.8	15.9	17.2	46.44	40.4	91.86	0	95.57	0	52.15	0.006
Hep3B	qPCR	2.07	3.48	5.76	16.2	18.73	44.54	49.77	68.88	63.48	76.61	74.7	77.83	0.005
Hep3B	bDNA	3.48	3.8	5.15	15.2	30.84	55.36	74.75	99.39	88.89	110.83	96.55	110.26	0.014

		対照 AD-1955 と比較した、阻害率 (%)												
二本鎖 AD-18328		二本鎖の用量 (nM)												
細胞型	検出方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	5.85	3.97	3.32	5.62	8	16.75	55.01	39.76	122.41	102.37	114.02	124.09	0.003
HepG2	bDNA	12.3	10.7	10.7	11.9	20.06	25	69.52	57.29	112.28	98.14	142.26	148.92	0.004
Hep3B	qPCR	3.17	5.52	11.7	13.8	27.68	39.58	61.21	61.87	90.51	87.56	106.03	108.72	0.006
Hep3B	bDNA	3.08	3.66	4.19	7.25	21.05	22.1	73.74	63.19	105.55	96.27	105.97	96.46	0.006

		対照 AD-1955 と比較した、阻害率 (%)												
二本鎖 AD-18339		二本鎖の用量 (nM)												
細胞型	検出方法	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.0001	0.00005	0.00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	6.27	7.28	Nd	11	15.25	38.69	38.78	71.7	84.09	62.2	75.61	85.46	0.004
HepG2	bDNA	15.1	8.14	5.13	6.89	12.17	32.14	42.98	64.01	60.76	79.95	81.97	95.43	0.002
Hep3B	qPCR	8.3	9.47	13.2	34.5	44.54	77.38	81.04	81.41	93.95	81.04	75.61	78.28	0.018
Hep3B	bDNA	10.5	9.43	11.7	27.1	44.88	72.32	79.88	79.6	87.46	96.53	95.13	89.88	0.029

10

20

30

齧歯類特異的な TTR - dsRNA (TTR の siRNA) に対する単回用量の結果の概要を、下表 10 に表す。単回用量の結果は、対照に対する TTR の mRNA の割合 (%) として表し、10 nM で齧歯類特異的な TTR の siRNA を形質移入した後、ラット H . 4 . I I . E 細胞においてアッセイした。これらの結果は、幾つかの齧歯類特異的な TTR の siRNA が、インビトロで内因性ラット TTR の mRNA を抑制するのに効果的であることを示す。

40

【 0 2 4 7 】

【表 1 3】

表 1 0. 齧歯類に特異的な T T R - d s R N A (T T R の s i R N A) のインビトロスクリーニングの単回用量の結果

二本鎖#	10nMにおける対照に対する割合(%)	二本鎖#	10nMにおける対照に対する割合(%)
AD-18529	19.83	AD-18542	6.3
AD-18530	44.49	AD-18543	16.46
AD-18531	6.01	AD-18544	17.55
AD-18532	24.06	AD-18545	3.53
AD-18533	37.78	AD-18546	2.75
AD-18534	8.19	AD-18547	7.01
AD-18535	10.18	AD-18548	5.02
AD-18536	16.13	AD-18549	1.61
AD-18537	15.88	AD-18550	9.58
AD-18538	19.93	AD-18551	7.74
AD-18539	49.24	AD-18552	3.74
AD-18540	2.99	AD-18553	50.39
AD-18541	1.32	AD-18554	111.06

10

20

【 0 2 4 8】

実施例 3 . T N F - および I F N - の分泌の誘発に対する T T R の s i R N A のインビトロアッセイ

免疫刺激に対する潜在性を評価するために、T N F - および I F N - の分泌の誘発に対する T T R の s i R N A を、インビトロでアッセイした。

【 0 2 4 9】

ヒト P B M C は、標準フィコールハイパック (F i c o l l 1 - H y p a q u e) 密度遠心分離によって、健全なドナーから得た新たに回収したパフィーコート (R e s e a r c h B l o o d C o m p o n e n t s , I n c . , B o s t o n , M A) から単離された。新たに単離された細胞 (1×10^5 / ウェル / $100 \mu\text{L}$) を、96 ウェルプレートに播種し、10% 加熱不活性化したウシ胎仔血清および 1% 抗生物質 / 抗真菌 (I n v i t r o g e n) で補完される R P M I 1 6 4 0 G l u t a M a x 培地 (I n v i t r o g e n) で培養した。

30

【 0 2 5 0】

D O T A P 形質移入試薬 (R o c h e A p p l i e d S c i e n c e) を用いて、s i R N A を P B M C に形質移入した。D O T A P は、まず、s i R N A を含有する等容量の O p t i - M E M と混合する前に、5 分間 O p t i - M E M (I n v i t r o g e n) 中で希釈した。製造業者の取扱説明書によって規定されるように、s i R N A / D O T A P 複合体をインキュベートし、続いて、P B M C ($50 \mu\text{L}$ / ウェル) に添加し、次いで、これを 24 時間培養した。陽性および陰性対照 s i R N A を、全てのアッセイに含んだ。A D - 5 0 4 8 を、陽性対照 s i R N A として使用した。A D - 5 0 4 8 は、ヒトアポリタンパク質 B (S o u t s c h e k e t a l . , 2 0 0 4) を標的とする配列に対応し、このアッセイにおいて、I F N - および T N F - の両方の分泌を引き起こす。このアッセイにおいて、I F N - および T N F - の分泌を引き起こさない、A D - 1 9 5 5 を、陰性対照 s i R N A として使用した。全ての s i R N A を、133 nM の最終濃度で使用した。R N A の形質移入試薬に対する比は、D O T A P の $1 \mu\text{g}$ 当たり 16.5 pモルであった。

40

【 0 2 5 1】

両方とも B e n d e r M e d S y s t e m s (V i e n n a , A u s t r i a) から I F N - (B M S 2 1 6 I N S T) および T N F - (B M S 2 2 3 I N S T) 用の

50

市販のELISAキットを用いて、培養浮遊物中のサイトカインを、検出し、定量化した。TTRのsiRNAのサイトカイン誘発は、陽性対照siRNA AD-5048に対する、産生したIFN- またはTNF- の割合として表される。

【0252】

多くのTTRのsiRNAに対するIFN- およびTNF- の刺激結果を、図1（4重のウェル±標準偏差の平均）および下表11（AD-5048と比較した割合）に表す。TTRのsiRNAは、培養したヒトPBMCによる誘発した有意なTNF- またはIFN- の分泌は、評価されなかった。

【表 1 4】

表 1 1. TTR の s i R N A に対する I F N - α および T N F - α の刺激結果

二本鎖#	IFN- α (AD-5048に対する割合(%))	TNF- α (AD-5048に対する割合 (%))
AD-18246	0	4
AD-18258	0	0
AD-18259	0	0
AD-18261	0	0
AD-18263	0	0
AD-18271	0	0
AD-18274	2	1
AD-18275	0	0
AD-18276	0	0
AD-18277	0	0
AD-18285	0	0
AD-18290	0	0
AD-18291	0	0
AD-18292	0	0
AD-18293	0	0
AD-18298	0	0
AD-18299	0	0
AD-18320	0	0
AD-18321	0	0
AD-18323	0	0
AD-18324	0	0
AD-18325	0	0
AD-18326	0	0
AD-18327	0	0
AD-18328	0	0
AD-18330	0	0
AD-18332	1	0
AD-18333	0	1
AD-18334	0	1
AD-18336	1	0
AD-18339	0	0
AD-18340	0	0
AD-18342	0	0
AD-18343	0	0
AD-18345	0	0
AD-18353	0	0
AD-18448	0	0
AD-18456	0	0
AD-18457	0	0
AD-18458	0	0
AD-18459	0	0

10

20

30

40

【 0 2 5 3】

5つのTTRを標的とするリードdsRNA(TTRのsiRNA)を、ヒト肝細胞株HepG2およびHep3Bにおいて、および免疫刺激活性の不在下で、pM範囲のIC50に基づいて選択した。いずれのミスマッチもない二本鎖は、オリゴとmRNAとの間

50

でミスマッチがある二本鎖よりも標的転写物の有意なノックダウンを達成する可能性が高い。交差種毒物学的データのより良好な翻訳を可能にし、ヒト患者に対して広範な適用性を有するために、ラット、カニクイザル、およびヒトからのオーソログ遺伝子において100%同一性を有し、既知の多型を有する領域を標的としない、二本鎖が、一般に好ましい。5つのリード化合物は、pM範囲の肝細胞株におけるIC50に基づいて、免疫刺激活性の不在下で、ヒトTTR転写物への特異性、および二本鎖によって標的とされるmRNAの領域内で、既知の多型(突然変異)の不在下で選択された。TTRの場合は、ヒト、ラット、およびカニクイザルにおいて、完全な同一性がある、19塩基オリゴは見出されなかった。これらのデータの概要を、表12に表し、これにはまた、二本鎖および交差種反応性によって標的とされる領域内の既知のTTR突然変異の情報も含まれる。

10

【0254】

【表15】

表12. 5つの最も有力なTTRのdsRNAに対するデータの概要

二本鎖#	IC50 (qPCR): nM HepG2	IC50 (bDNA): nM HepG2	IFNa/ TNFa	網羅されてい ない変異	交差種 反応性
AD-18258	0.007	0.005	陰性	なし (非コーディ ング領域)	サル:A~Gの1 4位で1つの ミスマッチ ラット:いずれ の位置でも相 同性なし
AD-18274	0.009	0.176	陰性	Lys70Asn; Val71Ala; Ile73Val; Asp74His	サル:ミスマッ チなし ラット:いずれ の位置でも相 同性なし
AD-18324	0.002	0.006	陰性	なし (非コーディ ング領域)	サル:ミスマッ チなし ラット:いずれ の位置でも相 同性なし
AD-18328	0.003	0.004	陰性	なし (非コーディ ング領域)	サル:ミスマッ チなし ラット:7つの ミスマッチ
AD-18339	0.004	0.002	陰性	なし (非コーディ ング領域)	なし

20

30

40

【0255】

実施例4. 遺伝子導入マウスにおける、LNP01-18324、LNP01-18328、およびLNP01-18246による肝臓TTRのmRNAおよび血漿TTRタンパク質のインピボの低下

2つのTTRのsiRNAであるAD-18324およびAD-18328を、インピボ評価のために選択した。これらの二本鎖は、肝細胞株(例えば、HepG2)における、インピボで有力な用量依存的な発現停止を示した。図2Aおよび図2Bは、AD-18

50

324 (図2A) またはAD-18328 (図2B) で形質移入した後の、HepG2細胞内の用量反応を示し、ここで、該用量は、x軸上にnMで表し、反応は、y軸上に、対照と比較した、画分TTRのmRNAの残存として表す。HepG2細胞では、AD-18324およびAD-18328のIC50は、それぞれ、2pMおよび3pMであると確認された。両方のリードdsRNA候補に対するTTR標的部位は、TTRのmRNAの3'非翻訳領域、文献で報告された突然変異がない領域内にある。

【0256】

表からの2つのリード候補のそれぞれの鎖の配列を、以下に再現する。

鎖：s = センス、as = アンチセンス

位置：NM_000371.2の転写物における5'位の塩基

【表16A】

二本鎖#	鎖	オリゴ#	位置*	5'から3'への方向の配列	配列番号
AD-18324	s	A-32337	509	GGAuuuuAuGuAAccAAGAdTdT	1001
AD-18324	as	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1002
AD-18328	s	A-32345	518	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1009
AD-18328	as	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1010

加えて、齧歯類交差反応性TTRのdsRNA、AD-18246をインビボでさらなる評価のために選択した。AD-18246は、オープンリーディングフレームの88位で開始する配列を標的とし、ここに、文献中に報告された3つの変異がある。HepG2細胞内のAD-18246に対する用量反応曲線を図3に示す。AD-18246は、実質的には、AD-18324およびAD-18328よりも有力ではなく、AD-18246のIC50は、265pMであると決定した。

【0257】

AD-18324、AD-18328、およびAD-18246を、LNP01に製剤化した後、遺伝子導入マウスに投与した。3~5月齢のH129-mTTR-KO/iNOS-KO/hTTRの遺伝子導入マウス(マウストランスチレチンのノックアウト/誘導一酸化窒素シンターゼノックアウト/ヒトのトランスチレチン遺伝子導入)に、siRNAのAD-18324およびAD-18328に対して、1.0mg/kg、3.0mg/kg、または6.0mg/kgで、siRNAのAD-18246に対して、3.0mg/kgで、およびsiRNAのAD-1955に対して、6.0mg/kgの濃度で、尾静脈を介して、200μLのLNP01に製剤化したトランスチレチンに特異的なsiRNA(AD-18324、AD-18328、またはAD-18246)、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とするLNP01に製剤化した対照siRNA(AD-1955)、またはPBSを静脈内(IV)投与した。LNP01は、ND98、コレステロール、およびPEG-Ceramide C16からなる脂質様製剤である。

【0258】

約40時間後、マウスに、200μLのケタミンで麻酔をかけ、次いで、右側の尾動脈を切断することによって採血した。全血は単離され、血漿は単離され、アッセイするまで-80で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

【0259】

処置の有効性は、(i)投薬から48時間後、肝臓におけるTTRのmRNAの測定、ならびに(ii)前採血および投薬から48時間後、血漿中のTTRタンパク質の測定によって評価された。TTR肝臓のmRNAレベルは、分岐DNAアッセイ-Quantigene2.0(Panomics cat#:QS0011)を利用してアッセイされた。簡潔に言えば、マウス肝臓の試料を粉碎し、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物(1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20mg/mLの

10

20

30

40

50

最終濃度に対して10 μ LのプロテイナーゼK/mLの混合物)を、65 $^{\circ}$ Cで35分間インキュベートした。次いで、20 μ Lの作業プローブセット(遺伝子標的用のTTRプローブおよび内因性対照用のGAPDH)および80 μ Lの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを55 \pm 1 $^{\circ}$ Cで(約16~20時間)インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1 \times 洗浄緩衝液(ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2)で3回洗浄し、次いで、240 gで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100 μ Lの事前増幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、55 \pm 1 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。1時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、100 μ Lの増幅作業試薬を添加した。1時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、100 μ Lの標識プローブを添加した。捕捉プレートを、50 \pm 1 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。次いで、該プレートを1 \times 洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、100 μ Lの基質を捕捉プレートに添加した。5~15分間インキュベートした後、SpectraMax Luminometerを用いて、捕捉プレートを読み取った。bDNAデータは、それぞれの3重の試料から平均バックグラウンドを減算し、得られる3重のGAPDH(対照プローブ)およびTTR(実験プローブ)値を平均し、次いで、比:(実験プローブ-バックグラウンド)/(対照プローブ-バックグラウンド)をコンピュータで計算することによって分析された。

10

【0260】

TTR血漿中レベルは、製造業者のガイドラインに従って、市販のキットの「Assay Max ヒトプレアルブミンELISAキット」(Assay Pro, St. Charles, MO, Catalog # EP3010-1)を利用して、アッセイした。簡潔に言えば、マウス血漿は、1 \times 混合希釈液中で1:10,000に希釈し、標準キットと共に前被覆されたプレートに添加し、室温で2時間インキュベートし、続いて、キットの洗浄緩衝液で5回洗浄した。50マイクロリットルのビオチン化プレアルブミン抗体を、それぞれのウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、続いて、洗浄緩衝液で5回洗浄した。50マイクロリットルのストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ共役体を、それぞれのウェルに添加し、室温で30分間インキュベートし、続いて、前述のように洗浄した。50 μ L/ウェルの停止溶液を添加することによって反応の停止を伴い、50 μ L/ウェルの発色基質を添加し、室温で10分間インキュベートすることによって、反応を生じさせた。450 nmでの吸光度を、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上で読み取り、データを、Softmax 4.6ソフトウェアパッケージ(Molecular Devices)を利用して分析した。

20

30

【0261】

LNP01-18324およびLNP01-18328は、IVボラス投与を伴う用量依存的な様式で、肝臓TTRのmRNA(図4A)および血漿TTRタンパク質(図4B)レベルを低下することが見出された。LNP01-18328のmRNA ED50は、約1 mg/kgであると決定され、一方、LNP01-18324のED50は、約2 mg/kgであることが確認された。6 mg/kgでの対照のLNP01-1955が、PBS群と比較して、肝臓TTRのmRNAレベルに有意に影響を及ぼさなかったため、LNP01-18324およびLNP01-18328の効果は特異的であった。LNP01-18324およびLNP01-18328は、PBS群と比較して、TTRのmRNAレベルにおけるものと同様の効力を有する、血漿TTRタンパク質レベルを低下させた。3 mg/kgで、LNP01-18246は、3 mg/kgのLNP01-18324またはLNP01-18328よりも少ない程度で肝臓TTRのmRNAレベルを低下させた。

40

【0262】

これらの結果は、IVボラスにより投与された、LNP01-18324およびLNP01-18328が、実質的には、遺伝子導入マウス肝臓によって発現されたヒトTTRのmRNAを低下させ、血中循環中のヒトTTRタンパク質の低下をもたらすことを実

50

証する。

【0263】

実施例5 . SNA LP - 18324およびSNA LP - 18328による非ヒト霊長類の肝臓中の野生型TTRのmRNAのインピボの低下

非ヒト霊長類における、肝臓TTRのmRNAレベルのTTR siRNAのAD - 18324およびAD - 18328の有効性を評価するために、該siRNAは、SNA LPに製剤化され、15分間のIV注入によって投与された。カニクイザル(Macaca fascicularis)(2~5kg、1群当たり3匹の動物)に、SNA LP - 18324(0.3、1.0、もしくは3.0mg/kg)、SNA LP - 18328(0.3、1、もしくは3mg/kg)、またはSNA LP - 1955(3mg/kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照siRNA AD - 1955を有する)を15分間のIV注入で投与した。投薬から48時間後、サルに、ペントバルビタールナトリウムで麻酔をかけ、失血させた。TTRのmRNA決定に対する肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

10

【0264】

特注の分岐DNAアッセイを利用して、およびQuant i Gene 1.0技術を利用して、肝臓中のTTRのmRNAレベルを、アッセイした。簡潔に言えば、サル肝臓の試料を粉碎し、組織溶解物を調製した。肝臓溶解混合物(1容量の溶解混合物、2容量のヌクレアーゼを含有しない水、および20mg/mLの最終濃度に対して10 μ LのプロテイナーゼK/mLの混合物)を、65で35分間インキュベートした。次いで、20 μ Lの作業プローブセット(遺伝子標的用のTTRプローブおよび内因性対照用のGAPDH)および80 μ Lの細胞溶解物を捕捉プレートに添加した。捕捉プレートを55 \pm 1で(約16~20時間)インキュベートした。翌日、該捕捉プレートを、1 \times 洗浄緩衝液(ヌクレアーゼを含有しない水、緩衝液の構成成分1、および洗浄緩衝液の構成成分2)で3回洗浄し、次いで、240gで1分間遠心分離を行うことによって乾燥させた。100 μ Lの事前増幅作業試薬を捕捉プレートに添加し、これをアルミホイルで密閉し、55 \pm 1で1時間インキュベートした。1時間インキュベートした後、洗浄ステップを繰り返し、次いで、100 μ Lの増幅作業試薬を添加した。1時間後、洗浄および乾燥ステップを繰り返し、100 μ Lの標識プローブを添加した。捕捉プレートを、50 \pm 1で1時間インキュベートした。次いで、該プレートを1 \times 洗浄緩衝液で洗浄し、乾燥させ、次いで、100 μ Lの基質を捕捉プレートに添加した。5~15分間インキュベートした後、Spectra Max Luminometerを用いて、捕捉プレートを読み取った。bDNAデータは、(i)それぞれの3重の試料から平均バックグラウンドを減算し、(ii)得られるGAPDH(対照プローブ)およびTTR(実験プローブ)値を平均し、次いで、(iii)比:(実験プローブ-バックグラウンド)/(対照プローブ-バックグラウンド)を得ることによって分析された。

20

30

【0265】

結果を図5に示す。SNA LP - 18324およびSNA LP - 18328は、陰性対照SNA LP - 1955と比較して、用量依存的な様式で、肝臓中のTTRのmRNAレベルを低下させた。SNA LP - 18328およびSNA LP - 18324のmRNA ED50は、それぞれ、約0.3および約1mg/kgであると決定した。

40

【0266】

これらの結果は、SNA LP - 18324およびSNA LP - 18328が、IV注入による投与時に、非ヒト霊長類肝臓中の野生型TTRのmRNAを抑制するのに効果的であることを実証する。

【0267】

実施例6 . 遺伝子導入マウスにおける、SNA LP - 18328による変異(V30M)TTRのmRNAおよびタンパク質のインピボの低下

肝臓中の変異(V30M)TTRのmRNAおよび血清中の変異(V30M)TTRタンパク質における、TTRのsiRNA AD - 18328の有効性を評価するために、

50

AD - 18328 を、SNALP に製剤化し、V30M hTTR 遺伝子導入マウスに、IV ポーラスにより投与した。8 ~ 12 週齢の V30M hTTR 遺伝子導入マウス (5 匹の動物 / 群) に、200 μ L の SNALP - 18328 (0.03、0.3、もしくは 3 mg / kg)、SNALP - 1955 (3 mg / kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照 siRNA AD - 1955 を有する)、または PBS を静脈内 (IV) 投与した。使用したマウスは、Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, Portugal からの Mus musculus 株 H129 - hTTR KO であった。簡潔に言えば、hTTR H129 遺伝子導入マウスを、H129 内因性 TTR KO マウス (ヌルマウス TTR のバックグラウンドにおいて、H129 - hTTR 遺伝子導入マウスを生成するためのヌルマウス (Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17 - 20.)) と交配した。

10

【0268】

注射してから 48 時間後、全て 5 つの処置群の動物に、致死量の ケタミン / キシラジン を与えた。血清試料は、収集され、分析するまで - 80 で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで - 80 で保存された。

【0269】

TTR の mRNA 定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉砕し、溶解物を調製した。分岐 DNA アッセイ (Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA) を用いることによって、GAPDH の mRNA レベルと比較した TTR の mRNA レベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中の mRNA レベルを定量化するために、Quantigene アッセイ (Genospectra) を使用した。TTR の mRNA の平均レベルを、それぞれの試料に対する GAPDH の mRNA の平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、PBS 処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、TTR の mRNA 発現の相対レベルを得た。

20

【0270】

TTR タンパク質の定量化については、製造業者のプロトコルに従って、AssayPro (St. Charles, MO) の Assaymax Prealbumin ELISA キットを用いて、血清をアッセイした。

30

【0271】

肝臓 mRNA および血清タンパク質における結果を、それぞれ、図 6 A および図 6 B に示す。SNALP - 18328 で処置した V30M hTTR 遺伝子導入マウスは、PBS 対照群と比較して、肝臓 TTR の mRNA レベルにおいて、用量依存的、かつ有意な低下があり、SNALP - 18328 の 3 mg / kg で、97% ($p < 0.001$) の最大低下率、および SNALP - 18328 の約 0.15 mg / kg で、50% 低下 (ED50) に達した。血清 TTR タンパク質はまた、SNALP - 18328 の 3 mg / kg で、(投薬前のレベルと比較して) 血清 TTR タンパク質の 99% ($p < 0.01$) の最大低下率を有する、用量依存的な様式で抑制され、これは、TTR の mRNA レベルの低下と一致した。3 mg / kg での SNALP - 1955 は、PBS と比較して、TTR の mRNA あるいはタンパク質レベルのいずれかにおいて統計的に有意な効果がなかった。

40

【0272】

これらの結果は、IV 投与した時、SNALP - 18328 が、遺伝子導入マウス肝臓中の変異 V30M TTR の mRNA を抑制するのに活性があり、血中循環中の変異 V30M TTR タンパク質の低下をもたらすことを実証する。

【0273】

実施例 7 . 遺伝子導入マウスにおける、SNALP - 18328 による TTR の mRNA およびタンパク質抑制の持続性

50

SNALP-18328によるTTRのmRNAおよびタンパク質抑制の持続性を評価するために、AD-18328をSNALPに製剤化し、V30M hTTR遺伝子導入マウスにIVボラス投与した。投薬後の種々の時点で、肝臓TTRのmRNAレベルおよび血清TTRのタンパク質レベルを定量化した。8~12週齢のV30M hTTR遺伝子導入マウス(4匹の動物/群)に、200 μ LのSNALP-18328(1mg/kg)、またはSNALP-1955(1mg/kg、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照siRNA AD-1955を有する)を静脈内(IV)投与した。使用したマウスは、Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, PortugalからのMus musculus株H129-hTTR KOであった。簡潔に言えば、hTTR H129遺伝子導入マウスを、H129内因性TTR KOマウス(ヌルマウスTTRのバックグラウンドにおいて、H129-hTTR遺伝子導入マウスを生成するためのヌルマウス(Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. Amyloid Suppl. 1, 17-20)と交配した。投薬から3日目、8日目、15日目、または22日目に、両方の処置群の動物は、致死量のケタミン/キシラジンを与えられた。血清試料は、収集し、分析するまで-80で保存された。肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80で保存された。

10

20

【0274】

TTRのmRNA定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、PBS処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、TTRのmRNA発現の相対レベルを得た。

30

【0275】

TTRタンパク質の定量化については、製造業者のプロトコルに従って、AssayPro(St. Charles, MO)のAssaymax PreAlbumin ELISAキットを用いて、血清をアッセイした。

【0276】

肝臓mRNAおよび血清タンパク質における結果を、それぞれ、図7Aおよび図7Bに示す。hTTR V30M遺伝子導入マウスにおいて、SNALP-18328の単回IVボラス投与は、肝臓中のTTRのmRNAレベルおよび血清中のTTRタンパク質レベルの持続的な阻害をもたらした。対照群(1mg/mL SNALP-1955)と比較して、1mg/kgでのSNALP-18328の単回IV投与は、投薬から3日目、8日目、15日目、および22日目の相対的TTRのmRNAレベルを、それぞれ、96% ($p < 0.001$)、90% ($p < 0.001$)、82% ($p < 0.001$)、および73% ($p < 0.001$)で有意に低下させ、研究の終了時(投薬から22日目)に、基線レベルに戻らなかった。タンパク質レベルはまた、投薬から3日目で、(SNALP-1955と比較して)97% ($p < 0.001$)の血清TTRの最大の低下を伴い減少した。投薬から8日目、15日目、および22日目で、TTRタンパク質レベルは、SNALP-1955と比較して、それぞれ、72% ($p < 0.05$)、32% ($p < 0.05$)、および40% ($p < 0.001$)で抑制された。これらの結果は、SNALP-18328の単回IV投与は、V30M hTTR遺伝子導入マウスにおいて、標的肝臓mRNAおよび血清タンパク質レベルの持続的な抑制を生じ、投薬から22日目で、肝臓TTRのmRNAおよび血清TTRタンパク質の有意な低下を得ることを実証する。

40

50

【0277】

実施例8：非ヒト霊長類における、SNALP-18328による血清TTRタンパク質抑制の持続性

SNALP-18328による血清TTRタンパク質抑制の持続性を評価するために、AD-18328をSNALPに製剤化し、非ヒト霊長類にIV注入により投与した。投薬後の種々の時点で、血清TTRのタンパク質レベルを定量化した。

【0278】

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) (SNALP-18328群用の $n = 5$ 匹の動物/群およびSNALP-1955群およびPBS群用の $n = 3$ 匹の動物/群) に、SNALP-18328 (0.3、1、もしくは 3 mg/kg)、SNALP-1955 (3 mg/kg 、非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする、陰性対照 siRNA AD-1955 を有する)、またはPBSを15分間のIV注入で投与した。投与期の0日目、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、7日目、10日目、および14日目で、血清試料は、収集され、分析まで -80 で保存された。

10

【0279】

ウエスタンブロット分析を使用して、血清試料中のTTRタンパク質レベルを評価した。それぞれの群からの血清試料は、プールされ、Laemmli試料緩衝液を用いて1:1に希釈した (-メルカプトエタノールを1:20の希釈で添加した)。該試料を95で10分間加熱した。12.5 μL のそれぞれの試料を、10~20% Criterion (Biorad, Hercules, CA) 調製用ゲルのそれぞれのレーンに装填し、120Vで1.5時間、SDS-PAGEにより分離し、次いで、15Vで1時間、セミドライシステムを用いて、ニトロセルロース膜に移動した。1xPBSを用いて1:1に希釈したLiCOR (Lincoln, NE) ブロッキング緩衝液中で、該膜を、終夜4でブロックした。まず、ロッカー (rocker) 上で室温で1時間、LiCORブロッキング緩衝液/PBS中で1:1000に希釈した希釈液で、該プロットを、一次抗体 (Santa Cruz (Santa Cruz, CA) からのヤギ抗TTR) でプローブした。プロットは、PBS+0.2% Tween 20を用いて4回洗浄した (洗浄当たり10分間)。蛍光標識二次抗体 (Invitrogen (Carlsbad, CA) からの抗ヤギ680nm) を、LiCORブロッキング緩衝液/PBS中で1:10,000の希釈液で添加し、該プロットを室温で1時間インキュベートした。インキュベートした後、プロットを、PBS+0.2% Tween 20で4回洗浄し、続いて、1xPBSで1回洗浄した。Li-COR社のOdyssey Infrared Imaging Systemを使用して、タンパク質バンドを検出した。TTRモノマーは、15kDaで移動する。

20

30

【0280】

結果を図8に示す。血清TTRのタンパク質レベルは、投薬前(0日目)のレベルと比較した場合、1または 3 mg/kg のSNALP-18328で用量依存的な低下を示した。SNALP-18328の単回IV投与後の、抑制の持続性は、1または 3 mg/kg のSNALP-18328での処置から少なくとも14日間である。

【0281】

これらの結果は、SNALP-18328の単回IV投与は、非ヒト霊長類 (カニクイザル (*Macaca fascicularis*)) において、血中循環中のTTRタンパク質の持続的な抑制を生じ、投薬から14日目で、TTRタンパク質の有意な低下を得ることを実証する。

40

【0282】

実施例9：遺伝子導入マウスにおける、SNALP-18328による末梢組織中の突然変異 (V30M) TTRのインビボの低下

末梢組織中のTTRを低下させる際のSNALP-18328の有効性を評価するために、hTTR V30M/HSF-1ノックアウトマウスを、TTRに対する免疫組織化学染色で評価した。2月齢のhTTR V30M/HSF-1ノックアウトマウス (Ma

50

eda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. *Amyloid Suppl.* 1, 17-20) に、0日目、14日目、28日目、および42日目での合計4回の投薬のために、2週間に1回の3mg/kgのSNALP-18328(12匹の動物)、3mg/kgのSNALP-1955(非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照siRNA AD-1955を有する、4匹の動物)、またはPBS(4匹の動物)をIVボラス投与した。複数の末梢組織中のTTR肝臓mRNAレベルおよびTTR免疫活性は、56日目の、第1の投薬から8週間で評価された。

【0283】

マウスに、1mg/kgのメドトミジンで麻酔をかけ、致死量のケタミンを与えた。対象となる組織および臓器を収集した。免疫組織化学のために、食道(E)、胃(S)、腸(十二指腸(I1)および結腸(I4))、神経(N)、ならびに後根神経節(D)を、中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィンで包埋した。TTR検出のために、ウサギ抗ヒトTTR一次抗体(1:1000、DAKO, Denmark)、および抗ウサギビオチン共役二次抗体(1:20 Sigma, USA)を、TTRタンパク質に染色するために、extravidin標識体(1:20, Sigma, USA)が続いた。反応は、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、AEC(Sigma, USA)を用いて生じさせた。基質の反応色によって占められる領域を測定し、総画像領域に対してのこの値を正規化する、Scion image quantプログラムを用いて、免疫組織化学スライドの半定量分析を行った。占領領域の割合(%)の平均値は、対応する標準偏差と共に表示する。それぞれの動物組織を、4つの異なる領域において評価した。胃および腸の副交感神経節中のヒトTTRの存在は、一次抗体としてウサギ抗ヒトTTR(1:1000, DAKO, Denmark)およびマウス抗PGP9.5(1:40, Serotec, USA)で染色する二重免疫蛍光によって検査され、二次抗体は、それぞれ、抗ウサギAlexa Fluor 488(Molecular probes, UK)およびヤギ抗マウスAlexa Fluor 568(Molecular probes, UK)であった。スライドは、vectashield(Vector)と共に実装され、FITCおよびローダミン用のフィルターを装備するZeiss Cell Observer System顕微鏡(Carl Zeiss, Germany)中で可視化された。

【0284】

結果を図9に図示する。PBSおよびSNALP-1955で処置した動物と比較して、SNALP-18328で処置した動物は、検査した全ての組織(食道(E)、胃(S)、腸(十二指腸(I1)および結腸(I4))、神経(N)、ならびに後根神経節(D))において、TTRの免疫活性の有意な低下を得た。

【0285】

これらの結果は、hTTR V30M/HSF-1ノックアウトマウスへのSNALP-18328投与は、食道、胃、腸(十二指腸および結腸)、神経、および後根神経節を含む、末梢組織および臓器において、TTRタンパク質の有意な低下を生じることを実証する。

【0286】

実施例10. XTC-SNALP-18328による非ヒト霊長類の肝臓中の野生型TTRのmRNAのインピボの低下

非ヒト霊長類において、siRNAの送達についての新規の脂質ナノ粒子製剤XTC-SNALPの有効性を評価するために、TTRのsiRNA AD-18328を、XTC-SNALP(XTC-SNALP-18328)に製剤化し、15分間のIV注入により投与し、肝臓TTRのmRNAを定量化した。カニクイザル(Macaca fascicularis)に、XTC-SNALP-18328(0.03、0.1、0.3、または1mg/kg)またはXTC-SNALP-1955(1mg/kg、非哺乳動

10

20

30

40

50

物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする対照 *siRNA* AD-1955 を有する) を 15 分間の IV 注入で投与した。投薬から 48 時間後、サルに、ペントバルビタールナトリウムで麻酔をかけ、失血させた。TTR の mRNA 決定に対する肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで -80 で保存された。肝組織中の TTR の mRNA の定量化のために使用される方法は、上記の実施例 5 に記載されるものと同様であった。

【0287】

結果を図 10 に示す。XTC-SNALP-18328 は、陰性対照 XTC-SNALP-1955 と比較して、用量依存的様式で、肝臓中の TTR の mRNA レベルを低下させた。mRNA ED50 は、約 0.1 mg/kg XTC-SNALP-18328 であると決定した。

10

【0288】

これらの結果は、XTC-SNALP-18328 が、IV 注入による投与時に、非ヒト霊長類肝臓中の野生型 TTR の mRNA を抑制するのに効果的であることを実証する。

【0289】

実施例 11: LNP09-18328 および LNP11-18328 による非ヒト霊長類肝臓中の野生型 TTR の mRNA のインピボの低下

非ヒト霊長類において、*siRNA* の送達のために、2 つの新規の脂質ナノ粒子製剤の LNP09 および LNP11 の有効性を評価するために、TTR の *siRNA* AD-18328 を、LNP09 (LNP09-18328) または LNP11 (LNP11-18328) に製剤化し、15 分間の IV 注入により投与し、肝臓 TTR の mRNA および血清 TTR のタンパク質レベルをアッセイした。カニクイザル (*Macaca fascicularis*) に、LNP09-18328 (0.03、0.1、もしくは 0.3 mg/kg)、LNP11-18328 (0.03、0.1、もしくは 0.3 mg/kg)、または PBS を、15 分間の IV 注入により投与した。肝臓生検試料は、投薬から 48 時間後に収集され、急速冷凍され、処理するまで -80 で保存された。血清は、投薬する前 (採血前)、および投薬から 1 日目、2 日目、4 日目、7 日目、14 日目、21 日目、および 28 日目に、収集され、処理するまで -80 で保存された。肝臓および血清 TTR タンパク質の評価における TTR の mRNA の定量化に使用された方法は、上記の実施例 5 および 8 に記載のものと同様であった。

20

【0290】

結果は、mRNA については、図 11A、およびタンパク質については、図 11B および図 11C に示す。LNP09-18328 および LNP11-18328 で処置した動物は、肝臓中の TTR の mRNA レベルの用量依存的な低下を示し、PBS 対照と比較して、0.3 mg/kg で、約 85% (LNP09-18328) および約 90% (LNP11-18328) の mRNA の最大低下率に達した。mRNA ED50 は、LNP09-18328 および LNP11-18328 の両方において、約 0.02 mg/kg であると決定した。投薬から 7 日目で、血清試料もまた、PBS 対照レベルと比較して、0.1 および 0.3 mg/kg の LNP09-18328 および LNP11-18328 に対して、TTR タンパク質の用量依存的な低下を示した。図 11C は、LNP09-18328 の 0.3 mg/kg の用量を有する TTR タンパク質レベルの減少が、PBS 対照群と比較して、および採血前の試料と比較して、投薬から少なくとも 28 日間にわたって存続することを示す。

30

40

【0291】

これらの結果は、LNP09-18328 および LNP11-18328 が、IV 注入による投与時に、非ヒト霊長類肝臓中の野生型 TTR の mRNA および血中循環中の野生型 TTR タンパク質を抑制するのに効果的であることを実証する。さらになお、LNP09-18328 による抑制は、持続し、IV 注入から少なくとも 28 日間存続する。

【0292】

実施例 12. TTR が並べられた配列の合成

AD-18328 の標的領域付近で TTR 遺伝子を標的とされる、TTR 二本鎖 (「並

50

べられた二本鎖」)のセットを設計し、これは、NM__000371.3のヌクレオチド628で開始するヒトTTR遺伝子を標的とする。

【0293】

下の実施例では、転写物上の*siRNA*の5'位の塩基を示す番号付けは、NM__000371.3(図12、配列番号1331)に基づく。上記の実施例では、ヒト*siRNA*を標的とする*siRNA*の番号付けは、NM__000371.2(図13A)に基づく。NM__000371.3は、図14に示すように、NM__000371.2と比較して、110塩基まで5'UTRの配列を延在する。したがって、一例として、AD-18328の開始位置は、NM__000371.3上の628およびNM__000371.2上の518である(図14)。

10

【0294】

1μモルの規模で、MerMade 192合成機において、TTRが並べられた配列を合成した。配列表の全ての配列については、「エンドライト」化学反応を以下の詳細のように適用した。

- ・センス鎖内の全てのピリミジン(シトシンおよびウリジン)は、2'-O-メチル塩基(2'-O-メチルCおよび2'-O-メチルU)を含有した。

- ・アンチセンス鎖では、リボAヌクレオシドに隣接する(5'位に向かって)ピリミジンは、それらの対応する2'-O-メチルヌクレオシドと置換された。

- ・センスおよびアンチセンス配列の両方の3'末端で、2つの塩基dTdTの拡張を導入した。

20

- ・配列ファイルテキストファイルに変換し、MerMade 192合成ソフトウェアにおける負荷に対して互換性を保つようにした。

【0295】

合成、切断、および脱保護:

TTR配列の合成は、ホスホラミダイト化学反応を用いて、固定支持されたオリゴヌクレオチド合成を使用した。96ウェルプレート中の1μmの規模で、配列の合成を行った。アミダイト溶液を、0.1M濃度で調製し、エチルチオテトラゾール(アセトニトリル中0.6M)を活性剤として使用した。合成した配列を切断し、第1のステップにおいてメチルアミン、および第2のステップにおいて、フッ化物試薬を用いて、96ウェルプレート中に脱保護した。粗配列は、アセトン:エタノール(80:20)の混合液を用いて、沈殿させ、ペレットを、0.2M酢酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁させた。それぞれの配列からの試料を、定量化のための紫外線の同一性を確認するために、LC-MSによって、および純度を決定するために、IEXクロマトグラフィーによって選択された試料のセットを分析した。

30

【0296】

精製および脱塩:

TTRが並べられた配列は、Source 15Qカラムを用いて、AKTA explorer精製システムにおいて精製した。65のカラム温度を精製中維持した。試料の注射および収集を、96ウェル(1.8mLの深いウェル)プレート中で行った。完全長配列に対応する単一ピークを、溶離液中に収集した。AKTA精製器を用いて、Sephadex G25カラム上に精製された配列を、脱塩した。濃度(A260での紫外線測定によって)および純度(イオン交換HPLCによって)のために、脱塩したTTR配列を、分析した。次いで、アニーリングのために単鎖を提出した。

40

【0297】

TTRの単鎖および二本鎖:

TTRが並べられた二本鎖および対応する単鎖(センスおよびアンチセンス)の詳細な表を、下表(表13)に示す。

【表 17 - 1】

表 13 : TTRが並べられた二本鎖および対応する単鎖

鎖 : s = センス、as = アンチセンス

位置 : 転写物(NM_000371.3, 配列番号1331)における 5' 位の塩基

二本鎖#	位置	オリゴ#	鎖	配列(5' から3' への方向)	配列番号
AD-18323	618	A-32335	S	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	1332
		A-32336	AS	CUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1333
AD-18324	619	A-32337	S	GAuuucAuGuAAccAAGAdTdT	1334
		A-32338	AS	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1335
AD-23000	620	A-42927	S	GAuuucAuGuAAccAAGAGdTdT	1336
		A-42928	AS	CUCUUGGUuAcAUGAAAUCdTdT	1337
AD-23001	621	A-42929	S	AuuucAuGuAAccAAGAGudTdT	1338
		A-42930	AS	ACUCUUGGUuAcAUGAAAuTdT	1339
AD-23002	622	A-42931	S	uuucAuGuAAccAAGAGuAdTdT	1340
		A-42932	AS	uACUCUUGGUuAcAUGAAAdTdT	1341
AD-23003	623	A-42933	S	uucAuGuAAccAAGAGuAudTdT	1342
		A-42934	AS	AuACUCUUGGUuAcAUGAAAdTdT	1343
AD-18325	624	A-32339	S	ucAuGuAAccAAGAGuAuudTdT	1344
		A-32340	AS	AAuACUCUUGGUuAcAUGAdTdT	1345
AD-23004	625	A-42935	S	cAuGuAAccAAGAGuAuucdTdT	1346
		A-42936	AS	GAAuACUCUUGGUuAcAUGdTdT	1347
AD-18326	626	A-32341	S	AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT	1348
		A-32342	AS	GGAAuACUCUUGGUuAcAuTdT	1349
AD-18327	627	A-32343	S	uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT	1350
		A-32344	AS	UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT	1351
AD-23005	628	A-42937	S	uAAccAAGAGuAuuccAuudTdT	1352
		A-42938	AS	AAUGGAAuACUCUUGGUuAdTdT	1353
AD-23006	629	A-42939	S	AAccAAGAGuAuuccAuuudTdT	1354
		A-42940	AS	AAAUGGAAuACUCUUGGUuTdT	1355
AD-23007	631	A-42941	S	AccAAGAGuAuuccAuuuudTdT	1356
		A-42942	AS	AAAUGGAAuACUCUUGGUdTdT	1357
AD-23008	632	A-42943	S	ccAAGAGuAuuccAuuuuudTdT	1358

10

20

30

【表 17 - 2】

二本鎖#	位置	オリゴ#	鎖	配列(5' から3' への方向)	配列番号
		A-42944	AS	AAAAAUGGAAuACUCUUGdTdT	1359
AD-23009	633	A-42945	S	cAAGAGuAuuccAuuuuuAdTdT	1360
		A-42946	AS	uAAAAAUGGAAuACUCUUGdTdT	1361
AD-23010	634	A-42947	S	AAGAGuAuuccAuuuuuAcdTdT	1362
		A-42948	AS	GuAAAAAUGGAAuACUCUudTdT	1363
AD-23011	635	A-42949	S	AGAGuAuuccAuuuuuAcdTdT	1364
		A-42950	AS	AGuAAAAAUGGAAuACUCUdTdT	1365
AD-23012	636	A-42951	S	GAGuAuuccAuuuuuAcuAdTdT	1366
		A-42952	AS	uAGuAAAAAUGGAAuACUCdTdT	1367
AD-23013	637	A-42953	S	AGuAuuccAuuuuuAcuAAdTdT	1368
		A-42954	AS	UuAGuAAAAAUGGAAuACUdTdT	1369
AD-23014	638	A-42955	S	GuAuuccAuuuuuAcuAAAAdTdT	1370
		A-42956	AS	UUuAGuAAAAAUGGAAuACdTdT	1371
AD-23015	639	A-42957	S	uAuuccAuuuuuAcuAAAGdTdT	1372
		A-42958	AS	CUUuAGuAAAAAUGGAAuAdTdT	1373
AD-23016	640	A-42959	S	AuuccAuuuuuAcuAAAGcdTdT	1374
		A-42960	AS	GCUUuAGuAAAAAUGGAAUdTdT	1375
AD-23017	641	A-42961	S	uuccAuuuuuAcuAAAGcAdTdT	1376
		A-42962	AS	UGC UUuAGuAAAAAUGGAAAdTdT	1377
AD-23018	642	A-42963	S	uccAuuuuuAcuAAAGcAGdTdT	1378
		A-42964	AS	CUGCUUuAGuAAAAAUGGAdTdT	1379
AD-23019	643	A-42965	S	ccAuuuuuAcuAAAGcAGudTdT	1380
		A-42966	AS	ACUGCUUuAGuAAAAAUGGdTdT	1381
AD-23020	644	A-42967	S	cAuuuuuAcuAAAGcAGuGdTdT	1382
		A-42968	AS	cACUGCUUuAGuAAAAAUGdTdT	1383
AD-23021	645	A-42969	S	AuuuuuAcuAAAGcAGuGudTdT	1384
		A-42970	AS	AcACUGCUUuAGuAAAAAUdTdT	1385
AD-23022	646	A-42971	S	uuuuuAcuAAAGcAGuGuudTdT	1386
		A-42972	AS	AAcACUGCUUuAGuAAAAAdTdT	1387
AD-23023	647	A-42973	S	uuuuAcuAAAGcAGuGuuudTdT	1388
		A-42974	AS	AAAcACUGCUUuAGuAAAAAdTdT	1389
AD-23024	648	A-42975	S	uuuAcuAAAGcAGuGuuuudTdT	1390
		A-42976	AS	AAAACACUGCUUuAGuAAAdTdT	1391
AD-23025	649	A-42977	S	uuAcuAAAGcAGuGuuuucdTdT	1392
		A-42978	AS	GAAAAcACUGCUUuAGuAAdTdT	1393
AD-23026	650	A-42979	S	uAcuAAAGcAGuGuuuucAdTdT	1394
		A-42980	AS	UGAAAACACUGCUUuAGuAdTdT	1395
AD-23027	651	A-42981	S	AcuAAAGcAGuGuuuucAcdTdT	1396
		A-42982	AS	GUGAAAACACUGCUUuAGUdTdT	1397
AD-23028	652	A-42983	S	cuAAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1398
		A-42984	AS	GGUGAAAACACUGCUUuAGdTdT	1399
AD-18330	653	A-32349	S	uAAAGcAGuGuuuucAccudTdT	1400
		A-32350	AS	AGGUGAAAACACUGCUUuAdTdT	1401
AD-23029	654	A-42985	S	AAAGcAGuGuuuucAccucdTdT	1402
		A-42986	AS	GAGGUGAAAACACUGCUUdTdT	1403
AD-23030	655	A-42987	S	AAGcAGuGuuuucAccucAdTdT	1404
		A-42988	AS	UGAGGUGAAAACACUGCUUdTdT	1405
AD-23031	656	A-42989	S	AGcAGuGuuuucAccucAudTdT	1406
		A-42990	AS	AUGAGGUGAAAACACUGCUdTdT	1407

10

20

30

40

【表 17 - 3】

二本鎖#	位置	オリゴ#	鎖	配列(5' から3' への方向)	配列番号
AD-18328	628	A-32345	S	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1408
		A-32346	AS	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1409

【0298】

実施例 13 . TTR が並べられた s i R N A のインビトロスクリーニング

TTR が並べられた二本鎖を、リアルタイム PCR アッセイを用いて、内因性 TTR の発現の阻害のために、Hep 3 B 細胞内でアッセイした。

10

【0299】

細胞培養および形質移入：Hep 3 B 細胞 (ATCC, Manassas, VA) を、トリプシン処理によりプレートから放出される前に、10% FBS、ストレプトマイシン、およびグルタミン (ATCC) で補完されるイーグル最小必須培地 (EMEM、ATCC) 中の 5% CO₂ の雰囲気下で、37 °C でほぼコンフルエントまで増殖した。96 ウェルプレートの個々のウェル中に、5 μL の Opti-MEM を 5 μL のそれぞれの s i R N A に添加することによって、逆転写を実行した。これに、10 μL の Opti-MEM に加えて、0.2 μL の Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad CA, cat # 13778-150) を、ウェル当たり添加し、混合物を室温で 15 分間インキュベートした。次いで、上記のものであるが、2.0 × 10⁴ Hep 3 B 細胞を含有する抗生物質を含有しない、80 μL の完全成長培地を添加した。RNA 精製前に、細胞を、24 時間インキュベートした。0.1 または 10 nM の最終 2 重濃度で実験を行った。

20

【0300】

MagMAX-96 総 RNA 単離キット (Applied Biosystems, Foster City CA, 部品番号 # : AM1830) を用いた総 RNA 単離：細胞は、採集され、140 μL の溶解 / 結合溶液中で溶解され、次いで、Eppendorf Thermomixer を用いて 850 rpm で 1 分間混合した (混合速度は、過程を通して同一であった)。20 マイクロリットルの電磁ビーズおよび溶解 / 結合エンハンサーの混合物を、細胞溶解物に添加し、5 分間混合した。磁気ビーズは、磁気スタンドを用いて捕捉し、ビーズを妨害することなく、浮遊物を除去した。浮遊物を除去した後、磁気ビーズを洗浄液 1 (イソプロパノールを添加) で洗浄し、1 分間混合した。ビーズを再度捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、ビーズを 150 μL の洗浄液 2 (エタノールを添加) で洗浄し、捕捉し、浮遊物を除去した。次いで、50 μL の DNase 混合物 (MagMax turbo DNase Buffer および Turbo DNase) をビーズに添加し、それらを 10 ~ 15 分間混合した。混合後、100 μL の RNA 再生溶液を添加し、3 分間混合した。浮遊物を除去し、磁気ビーズを 150 μL の洗浄液 2 で再度洗浄し、1 分間混合し、浮遊物を完全に除去した。磁気ビーズを 2 分間混合し、RNA を 50 μL の水で溶離する前に乾燥させた。

30

【0301】

ABI 高性能 cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat # 4368813) を用いた cDNA 合成：2 μL の 10 × 緩衝液、0.8 μL の 25 × dNTP、2 μL のランダムプライマー、1 μL の逆転写酵素、1 μL の RNase 阻害剤、および反応当たり 3.2 μL の H₂O のマスターミックスを、10 μL の総 RNA に添加した。以下のステップを通して、Bio-Rad C-1000 または S-1000 のサーマルサイクラー (Hercules, CA) を用いて、cDNA を生成した。25 °C で 10 分間、37 °C で 120 分間、85 °C で 5 秒間、4 °C で保持。

40

【0302】

リアルタイム PCR：2 μL の cDNA を、LightCycler 480 384

50

ウェルプレート (Roche cat# 0472974001) 中のウェル当たり、0.5 μ L の GAPDH TaqMan プローブ (Applied Biosystems Cat# 4326317E)、0.5 μ L の TTR TaqMan プローブ (Applied Biosystems cat# HS00174914 M1)、および 10 μ L の Roche Probes Master Mix (Roche Cat# 04887301001) を含有するマスターミックスに添加した。LightCycler 480 リアルタイム PCR 機械 (Roche) において、リアルタイム PCR を行った。それぞれの二本鎖を、2つの独立した形質移入において試験し、それぞれの形質移入を二重でアッセイした。

【0303】

Ct法を用いて、リアルタイムデータを分析した。それぞれの試料を、GAPDHの発現に対して正規化し、非標的二本鎖 AD-1955 で形質移入した細胞と比較してノックダウンを評価した。表14は、siRNAを用いた、TTRのノックダウンを示す。データは、AD-1955で標的とされた細胞に対して、メッセージの残存する割合(%)として表される。

【0304】

AD-18328のほぼ標的であるTTRを標的とする、多数ではあるが、全てではない並べられたTTR-dsRNAは、0.1 nMで、Hep3B細胞に形質移入される場合、TTRのmRNA少なくとも70%低下した。

【表18-1】

表14: AD-18328のほぼ標的であるTTRを標的とする並べられたdsRNAによるTTRの阻害

二本鎖#	0.1nMにてメッセージを 残存する割合(%)	0.1nMにて標準 偏差の割合(%)	10nMにてメッセージを 残存する割合(%)	10nMにて標準 偏差の割合(%)
AD-18323	6.7	1.90	1.7	0.02
AD-18324	1.8	0.58	0.9	0.10
AD-23000	5.5	0.93	2.1	0.87
AD-23001	15.2	4.89	4.9	1.74
AD-23002	3.1	1.12	1.4	0.55
AD-23003	17.3	3.13	1.7	0.06
AD-18325	1.5	0.27	1.4	0.66
AD-23004	9.0	0.15	10.5	0.96
AD-18326	22.0	1.85	7.6	0.78
AD-18327	11.6	2.64	9.6	1.67
AD-18328	1.1	0.70	0.6	0.16
AD-23005	0.8	0.31	0.6	0.21
AD-23006	1.5	0.46	1.2	0.43
AD-23007	2.4	0.91	1.9	0.46
AD-23008	0.6	0.10	0.8	0.26
AD-23009	1.0	0.13	0.9	0.22
AD-23010	60.1	15.66	66.2	22.71
AD-23011	56.5	16.99	53.6	4.70
AD-23012	7.7	2.36	7.7	3.25

【表 18 - 2】

二本鎖#	0.1nMにてメッセージを 残存する割合(%)	0.1nMにて標準 偏差の割合(%)	10nMにてメッセージを 残存する割合(%)	10nMにて標準 偏差の割合(%)
AD-23013	7.0	0.64	8.0	1.06
AD-23014	0.7	0.01	0.6	0.10
AD-23015	15.4	0.25	16.5	7.07
AD-23016	27.1	0.37	6.7	1.80
AD-23017	4.5	1.26	1.4	0.40
AD-23018	44.6	9.45	7.5	1.09
AD-23019	2.2	0.68	0.8	0.10
AD-23020	52.7	6.45	29.7	1.17
AD-23021	95.4	16.16	45.0	3.00
AD-23022	70.1	3.01	60.8	12.11
AD-23023	2.7	1.12	1.8	0.07
AD-23024	1.7	0.30	1.8	0.33
AD-23025	64.2	13.21	10.5	1.34
AD-23026	1.9	0.15	1.9	0.78
AD-23027	2.5	0.21	1.6	0.49
AD-23028	6.7	4.41	1.2	0.50
AD-18330	6.0	0.56	5.7	1.15
AD-23029	4.5	0.47	1.6	0.10
AD-23030	3.9	0.25	3.3	0.84
AD-23031	3.4	0.78	1.7	0.02

10

20

30

【0305】

実施例14. Sprague-Dawleyラットにおいて、SNALP-18534の
単回静脈内投与の有効性における注入期間の評価

目的

Sprague-Dawleyラットにおいて、肝臓TTRのmRNAレベルにおける
SNALP-18534の単回IV注入の有効性における注入期間の効果を決定すること

【表19】

表15：使用した略語および定義

SNALP-18534	SNALPに製剤化された齧歯類トランスチ レチンに特異的なsiRNA
SNALP-1955	SNALPに製剤化された非哺乳動物のルシ フェラーゼに特異的なsiRNA

40

上表からのAD-18534のセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を、以下に再現する

。

【表 20A】

鎖	オリゴ#	位置	5' から3' への方向の配列	配列番号
s	A-32755	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1289
as	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTd T	1290

研究材料

試験物質

SNALP-18534は、標的組織に送達するために、安定な核酸脂質粒子(SNALP)に製剤化される、齧歯類TTRのmRNA(AD-18534)を標的とするsiRNAからなる。SNALP製剤(脂質粒子)は、新規のアミノ脂質(DLinDMA)、PEG化脂質(mPEG2000-C-DMA)、中性脂質(DPPC)、およびコレステロールからなる。SNALP製剤中の脂質：核酸の比は、約5.8：1(w:w)である。SNALP-1955は、SNALP-18534として同一の脂質粒子で製剤化される、非哺乳動物のルシフェラーゼmRNAを標的とするsiRNAを含有し、非薬理的に活性な対照としての役割を果たす。用量レベルは、siRNA含有量の重量に基づいて、mg/kgとして表す。

【0306】

研究設計&手順

動物および試験物質の投与：

研究は、Sprague-Dawleyラットの9つの群(4匹の雄/群)からなつた。動物は、研究前の少なくとも2日間の順応期間が与えられ、全ての動物は、投薬開始時、7週齢であった。投与された用量は、1日目の投薬前に収集された体重データに基づいて計算された。試験および対照物質は、Baxter AS40A注射器ポンプに27Gテルモ翼状針を介して接続されたBaxter注射部位の隔膜で密閉された24G 3/4"のカニューレを用いて、尾静脈を介して、単回15分間、1時間、2時間、または3時間のIV注入として投与された。投与容量は、3mL/kgであり、注入速度は、12mL/kg/時であり、動物は、投薬中、ケージ中で自由に行動していた。ラットは、9つの処置群に分割され、表16に示されるように、SNALP-18534、SNALP-1955、またはPBSの単回IV注入で投与した。

【表 21】

表16：試験動物の用量群

群	N	試験物質	注入の持続時間	用量
A	4	PBS	15分間	---
B	4	PBS	3時間	---
C	4	SNALP-1955	1時間	1 mg/kg
D	4	SNALP-1955	2時間	1 mg/kg
E	4	SNALP-1955	3時間	1 mg/kg
F	4	SNALP-18534	15 分間	1 mg/kg
G	4	SNALP-18534	1時間	1 mg/kg
H	4	SNALP-18534	2時間	1 mg/kg
I	4	SNALP-18534	3時間	1 mg/kg

【0307】

組織収集およびRNA単離：

0日目に、イソフルレン吸入で動物に麻酔をかけ、投薬前の血液試料を、retro-

10

20

30

40

50

orbital bleedにより血清分離管に収集した。4 で遠心分離を行う前に、室温で約30分間、血液試料を凝固させた。次いで、血清試料は、分析が行われるまで、-80 で保存された。3日目に、全ての9つの処置群の動物に、致死量のケタミン/キシラジンを与えた。後大静脈を介して血清分離管に血液を収集し、次いで、4 で遠心分離を行う前に、室温で約30分間、凝固させた。血清試料は、分析が行われるまで、-80 で保存された。肝組織は、収穫され、ドライアイス上で瞬間凍結された。凍結された肝組織は、粉碎され、組織溶解物は、肝臓mRNAの定量化のために調製された。

【0308】

TTRのmRNAの定量化：

分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。

10

【0309】

TTRのmRNAの発現の相対レベルを得るために、15分間、1時間、および2時間の注入時間でのSNALP-1955およびSNALP-18534処置群に対する群平均値は、次いで、15分間の注入時間でのPBS処置群に対する平均値に対して正規化され、一方、3時間の注入時間でのSNALP-1955およびSNALP-18534処置群に対する群平均値は、次いで、3時間の注入時間でのPBS処置群に対する平均値に対して正規化された。

20

【0310】

結果

図16に示されるように、15分間~3時間の異なる注入時間での1mg/kg SNALP-18534の単回IV注入は、投薬から2日後に測定された肝臓TTRのmRNAレベルに匹敵する阻害をもたらす。1mg/kg SNALP-18534の単回IV注入はまた、SNALP-1955対照と比較した場合、15分間の単回IV注入から29日間にわたって持続的なTTRの下方調節を示した(データは示さず)。PBS処置群と比較して、1mg/kgにて、SNALP-18534の単回15分間、1時間、2時間、または3時間のIV注入は、相対TTRのmRNA発現レベルを、それぞれ、94%($p < 0.001$)、94%($p < 0.001$)、92%($p < 0.001$)、および93%($p < 0.001$)有意に低下させた。SNALP-18534活性の特異性は、同一の用量レベルで、1時間、2時間、または3時間のIV注入でのSNALP-1955投与による有意な標的阻害の欠如により実証される。

30

【0311】

結論

本研究は、15分間から最長3時間の異なる注入時間が、肝臓中のTTRのmRNAレベルの低下により評価されるように、ラットにおいて、1mg/kg SNALP-18534の単回IV投与の有効性に影響を及ぼさないことを実証する。

40

【0312】

実施例15. LNP07-18534およびLNP08-18534によるラット肝臓中の野生型TTRのmRNAのインビボの低下

ラットにおいて、siRNAの送達のための2つの新規の脂質ナノ粒子製剤のLNP07およびLNP08の有効性を評価するために、齧歯類特異的なTTRのsiRNA、AD-18534が、LNP07(LNP07-18534)またはLNP08(LNP08-18534)に製剤化され、15分間のIV注入により投与され、肝臓TTRのmRNAが定量化された。Sprague-Dawleyラット(群当たり4匹の動物)に、LNP07-18534(0.03、0.1、0.3、もしくは1mg/kg)、LNP

50

08-18534 (0.01、0.03、もしくは0.1 mg/kg)、または非哺乳動物のルシフェラーゼ遺伝子を標的とする陰性対照 siRNA AD-1955 を含有する LNP07-1955 (1 mg/kg) もしくは LNP08-1955 (0.1 mg/kg) の15分間のIV注入により投与された。48時間後、動物に麻酔をかけ、肝組織は、収集され、急速冷凍され、処理するまで-80 で保存された。

【0313】

TTRのmRNA定量化のために、冷凍の肝組織を粉末に粉碎し、溶解物を調製した。分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、正規化した値の群平均を、PBS処置群に対する平均値に対してさらに正規化し、TTRのmRNA発現の相対レベルを得た。

10

【0314】

結果を図17に示す。LNP07-18534は、用量依存的な様式で、肝臓中のTTRのmRNAレベルを低下させ、1 mg/kgでTTRのmRNAの94%抑制を得た。1 mg/kgで陰性対照LNP07-1955が、PBS対照と比較して、TTRのmRNAレベルに大きな影響を及ぼさなかったため、効果は、特異的であった。mRNA ED50は、約0.05 mg/kgのLNP07-18534であることが確認された。LNP08-18534は、用量依存的な様式で、肝臓中のTTRのmRNAレベルを低下させ、0.1 mg/kgでTTRのmRNAの86%抑制を得た。0.1 mg/kgで陰性対照LNP08-1955が、PBS対照と比較して、TTRのmRNAレベルに大きな影響を及ぼさなかったため、効果は、特異的であった。mRNA ED50は、約0.02 mg/kgのLNP08-18534であることが確認された。

20

【0315】

これらの結果は、LNP07-18534およびLNP08-18534が、IV注入により投与された場合、ラット肝臓中の野生型TTRのmRNAを抑制するのに効果的であり、LNP07およびLNP08が、肝臓にsiRNAを送達するために効果的な製剤であることを実証する。

30

【0316】

実施例16: Sprague-Dawleyラットにおいて、LNP09-18534またはLNP11-18534の単回静脈内投与によるTTR肝臓のmRNAの低下

目的:

内因性(野生型)肝臓TTRのmRNAレベルを低下させることに対する、Sprague-Dawleyラットにおける、齧歯類TTR特異的なsiRNAのAD-18534の送達のための2つの新規の脂質ナノ粒子(LNP)製剤の有効性を評価すること。ラットに、0.01、0.03、0.1、もしくは0.3 mg/kgのLNP09-18534、LNP11-18534、またはリン酸緩衝食塩水(PBS)のいずれかで15分間の注入を介して静脈内に投与し、TTR肝臓のmRNAレベルを、処置から48時間後にアッセイした。

40

【0317】

材料および方法:

LNP09製剤: (XTC/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14) = 50/10/38.5/1.5モル%、脂質: siRNA 約11:1。LNP11製剤: (MC3/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14) = 50/10/38.5/1.5モル%、脂質: siRNA 約11:1

組織収集およびRNA単離: 3日目に、全ての処置群の動物に、致死量のケタミン/キシラジンを与えた。後大静脈を介して血清分離管に血液を収集し、次いで、4 で遠心分

50

離を行う前に、室温で約30分間、凝固させた。血清試料は、分析が行われるまで、-80で保存された。肝組織は、収穫され、ドライアイス上で瞬間凍結された。凍結された肝組織は、粉碎され、組織溶解物は、肝臓mRNAの定量化のために調製された。

【0318】

TTRのmRNAの定量化：分岐DNAアッセイ(Quantigene Reagent System, Panomics, Fremont, CA)を用いることによって、GAPDHのmRNAレベルと比較したTTRのmRNAレベルを、溶解物中で決定した。簡潔に言えば、製造業者の取扱説明書に従って、組織試料の溶解物中のmRNAレベルを定量化するために、Quantigeneアッセイ(Genospectra)を使用した。TTRのmRNAの平均レベルを、それぞれの試料に対するGAPDHのmRNAの平均レベルに対して正規化した。次いで、群平均値は、PBS処置群に対して正規化され、TTRのmRNA発現の相対レベルを得た。

10

【0319】

結果：

図18に示されるように、PBS処置動物と比較して、LNP09-18534およびLNP11-18534で処置した動物は、肝臓中のTTRのmRNAレベルの有意な用量依存的な低下を有し、PBC対照群と比較して、0.3mg/kgで、LNP09およびLNP11製剤化群の両方に対して、約90%のmRNAの最大低下率に達し、用量は、LNP11-18534の0.03mg/kg未満で、LNP09-18534の0.1mg/kg未満で、50%低下(ED₅₀)に達した。

20

【0320】

結論

本研究は、Sprague-Dawleyラットにおいて、LNP09-18534またはLNP11-18534の単回15分間のIV注入が、肝臓TTRのmRNAの用量依存的な低下をもたらすことを実証する。これらのデータは、LNP09-18328およびLNP11-18328の内因性発現した(野生型)TTRのmRNAを低下させることにおける有効性を、それぞれ、LNP11-18534およびLNP09-18534で、0.03mg/kg未満および0.1mg/kg未満のED₅₀レベルで実証する。

【0321】

実施例17：ヒトにおけるTTRの阻害

ヒト対象は、病態を治療するために、TTR遺伝子の発現を阻害するためのTTR遺伝子を標的とするdsRNAにより処置される。

30

【0322】

治療を必要とする対象を選択または特定する。該対象は、肝臓疾患、トランスチレチンアミロイドーシス、および/または移植肝臓を有し得る。

【0323】

該対象の特定は、臨床的状況において、または他の場所、例えば、対象自身が自己試験キットの使用を通して対象の自宅で、行い得る。

【0324】

ゼロ時点で、好適な第1の用量の抗TTRのsiRNAを対象に投与する。該dsRNAは、本明細書に記載の通り製剤化する。第1の投与後、一定期間、例えば、7日、14日、および21日後、例えば、肝機能を測定することによって、対象の病態を評価する。この測定には、前記対象におけるTTRの発現、および/またはTTRのmRNAの成功したsiRNA標的の産物の測定を伴ってもよい。また、他の関連する基準を測定してもよい。用量の回数および強度は、対象の必要性に従って調整する。

40

【0325】

処置後、対象の腫瘍増殖率は、処置前に既存の比率、または同様に罹患するが、無処置である対象において測定された比率と比較して低下する。

【 図 1 】

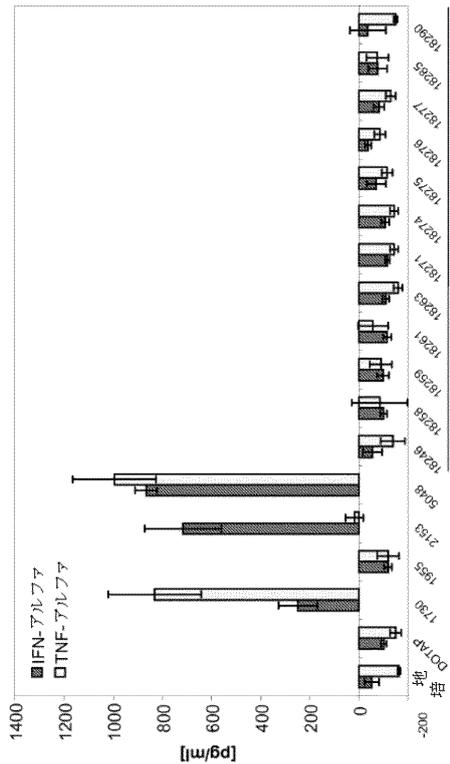


FIG. 1

【 図 2 】

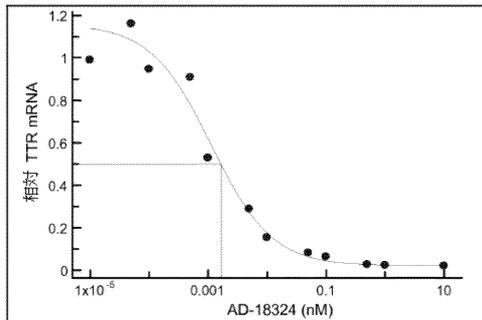


FIG. 2A

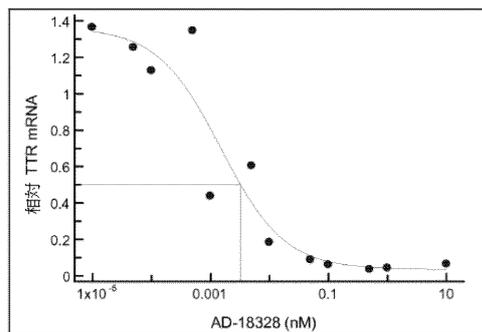


FIG. 2B

【 図 3 】

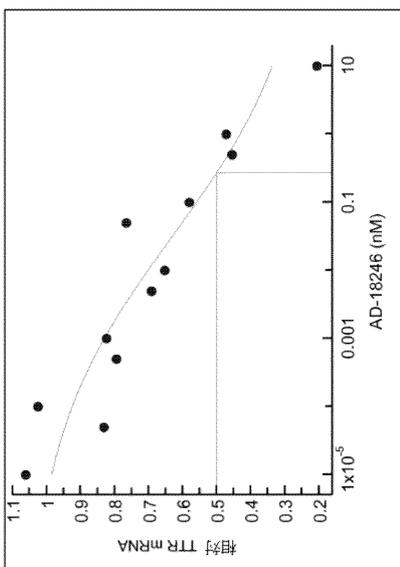


FIG. 3

【 図 4 A 】

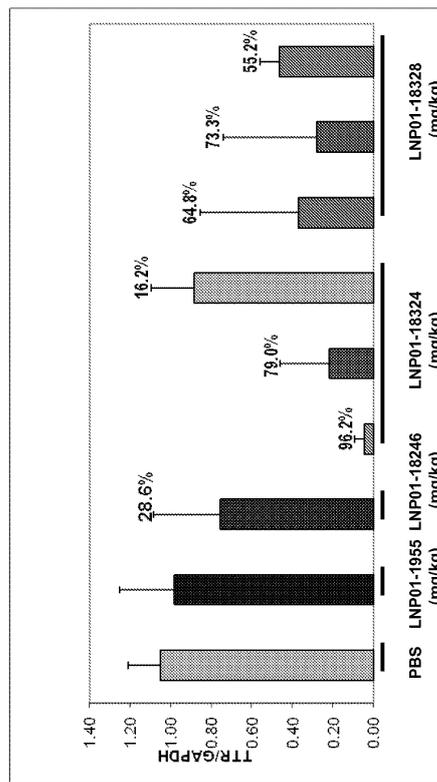


FIG. 4A

【 図 4 B 】

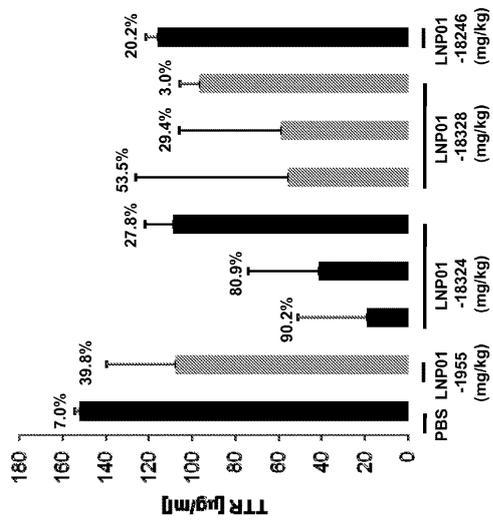


FIG. 4B

【 図 5 】

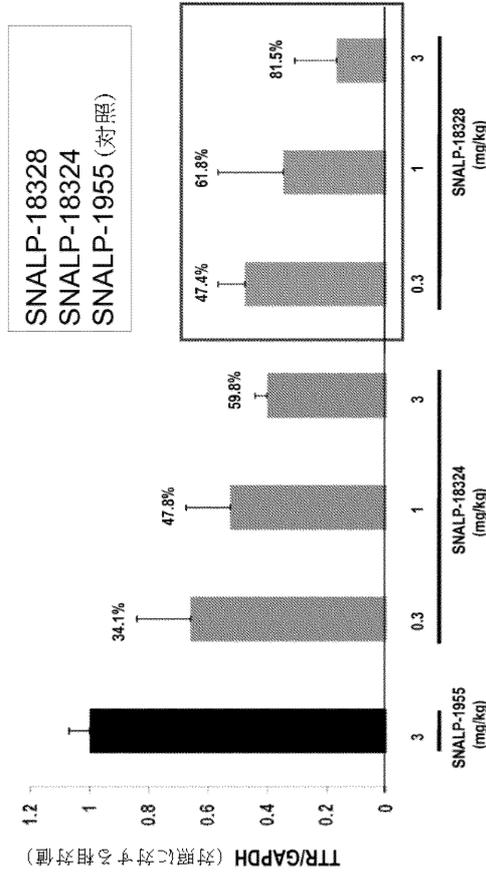


FIG. 5

【 図 6 A 】

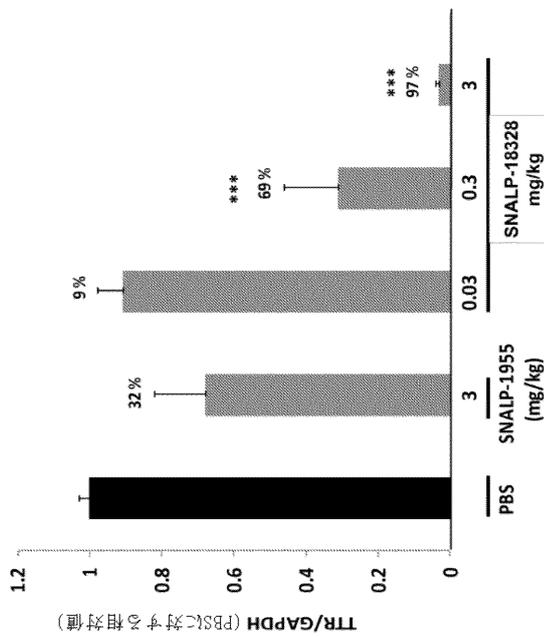


FIG. 6A

【 図 6 B 】

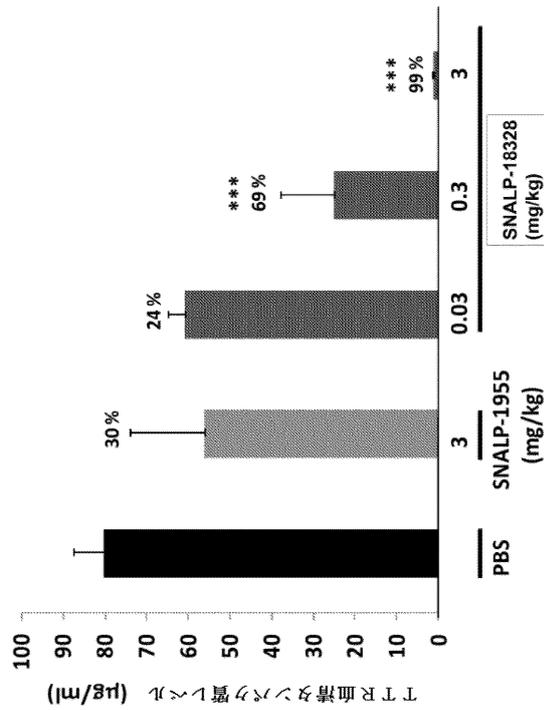


FIG. 6B

【 図 7 A 】

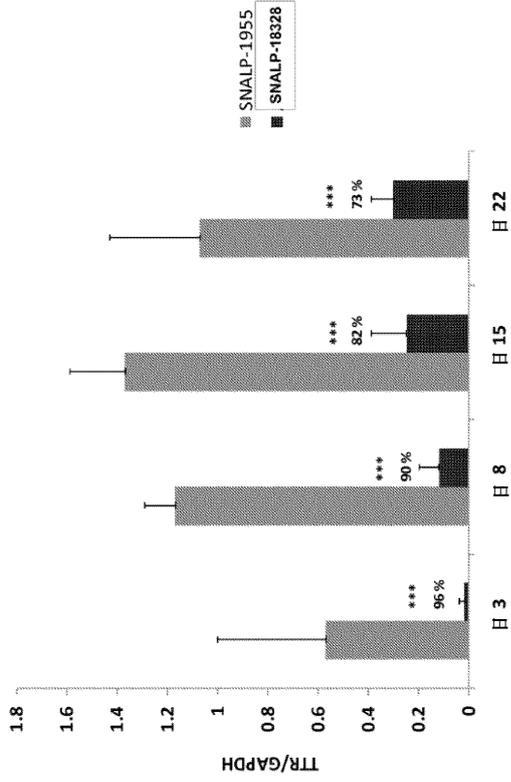


FIG. 7A

【 図 7 B 】

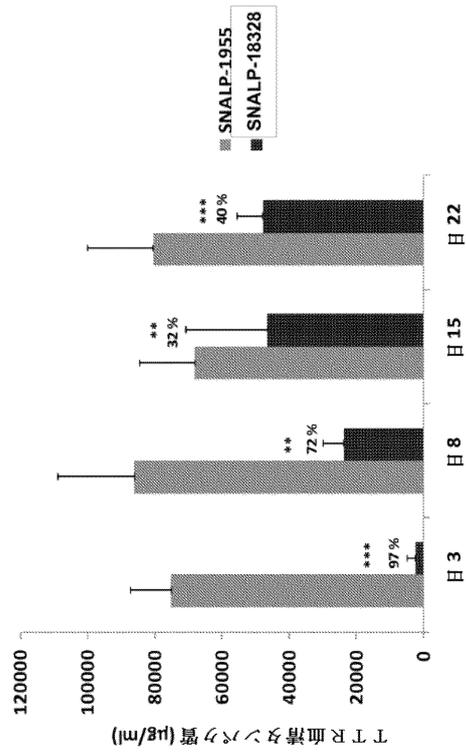


FIG. 7B

【 図 8 】

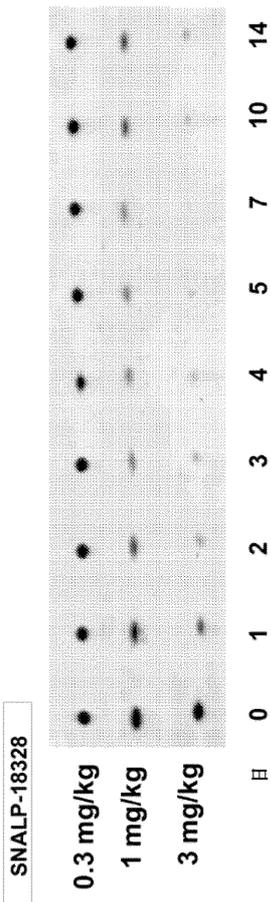


FIG. 9

【 図 9 】

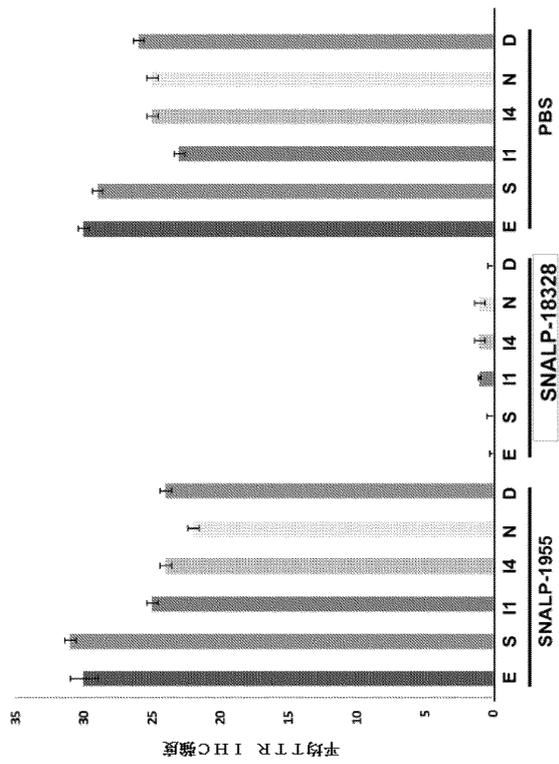


FIG. 9

【 図 1 0 】

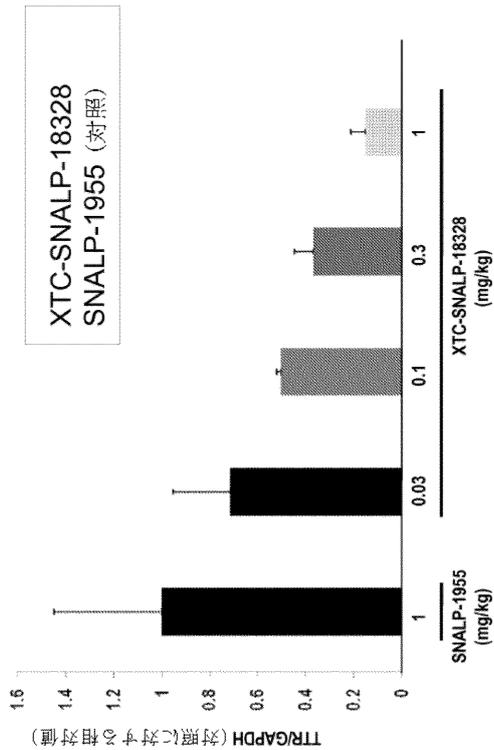


FIG. 10

【 図 1 1 A 】

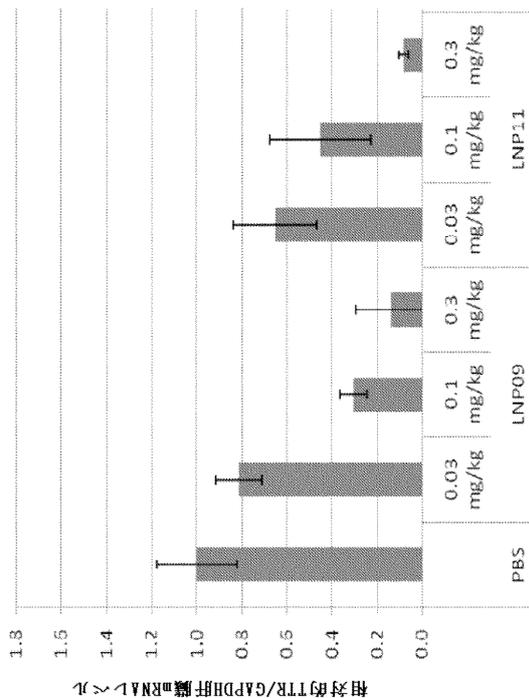


FIG. 11A

【 図 1 1 B 】

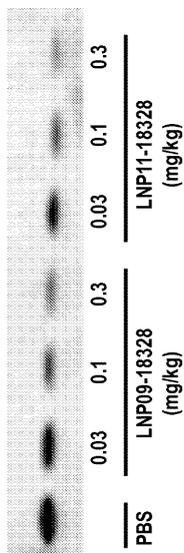


FIG. 11B

【 図 1 1 C 】

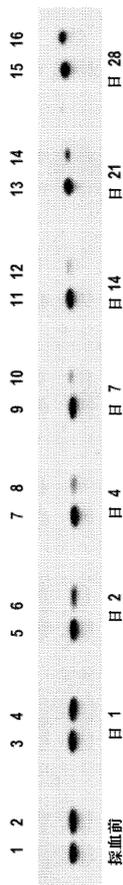


FIG. 11C

レーン 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 及び 15: PBS 動物
レーン 2, 4, 6, 8, 10, 14, 及び 16: 0.3 mg/kg LNP09-18328

【 図 1 2 】

```

gttgactaag tcaataatca gaatcagcag
gtttgcagtc agattggcag ggataagcag
cctagctcag gagaagtgcag tataaaagcc
ccaggctggg gagaagccatc acagaagtcc
actcattctt ggcaggatgg cttctcatcg
tctgtccctc ctctgccttg ctggactggt
atgtgtgtct gaggctggcc ctacgggcac
cggtgaatcc aagtgtccctc tgatggcaca
agttctagat gctgtccgag gcagtcctgc
catcaatgtg gccgtgcagc tgttcagaaa
ggctgctgat gacacctggg agccatttgc
ctctgggaaa accagtggat ctggagagct
gcatgggctc acaactgagg aggaatttgt
agaagggata tcaaaagtgg aatagacac
caaatcttac tgggaagcag ttggcatctc
cccattccat gagcatgcag aggtggtatt
cacagccaac gactccggcc cccgccccta
caccattgcc gccctgctga gcccctactc
ctattccacc acggctgtcg tcaccaatcc
caaggaatga gggacttctc ctccagtggg
cctgaaggac gaggatgggg attctatgta
accaagagta ttcccatttt actaaagcag
tgttttcacc tcatatgcta tgttagaagt
ccaggcagag acaataaaac attcctgtga
aaggcacttt tcattccact ttaactgtat
tttttaaatc cccttccaaa cccttccaaa
aaaaagagaa tcaaaathtt acaaagaatc
aaaggaattc tagaaagtat ctgggcagaa
cgtagggaga gatccaaatt tccattgtct
tgcaagcaaa gcacgtatta aatatgatct
gcagccatta aaaagacaca ttctgtaaaa
aaaaaaaa (配列番号 1331)

```

FIG. 12

【 図 1 3 】

FIG. 13A

```

ACAGAAGTCCACTCATTCTTGGCAGGATGGCTTCTCATCGTCTGCTCCTCCT
CTGCCTTGCTGGACTGGTATTGTGTCTGAGGCTGGCCCTACGGGCACCGGT
GAATCCAAGTGTCTCTGTGATGGTCAAAGTTCTAGATGCTGCCGAGGCAGTC
CTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTCAGAAAGGCTGTGTGATGACACCTG
GGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCCAGTGTGTCTGGAGAGCTGCATGGGCTC
ACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATAGACACCA
AATCTTACTGGAAGGCCTTGGCATCTCCCATTTCCATGAGCATGCAGAGGT
GGTATTCACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTTGCCGCCCTG
CTGAGCCCCCTACTCTATTCCACCACGGCTGTGCTCACCATCCCAAGGAAT
GAGGGACTTCTCCTCCAGTGGACCTGAAGGACGAGGGATGGGATTTTCATGTA
ACCAAGAGTATTCATTTTACTAAAGCAGTGTTTTACCTCATATGCTATG
TTAGAAGTCCAGGCAGAGACAATAAAACATTTCTGTGAAAGGCCTTTTCAT
TCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (配列番号 1329)

```

FIG. 13B

```

CCTGACAGGATGGCTTCCCTTCGCTGTCTCCTCTGCTCGCTGGACTGA
TATTTGCGCTCGAAGCTGGCCCTGGGGGTGCTGGAGAATCCAAGTGTCTCT
GATGGTCAAAGTCTGTGATGCTGCCGAGGCAGCCCTGCTGTCGATGTGGCC
GTGAAAGTGTCAAAGGACTGCAGACGGAAGCTGGGAGCCGTTTGCTCTGTG
GGAAGACCCGCGAGTCTGGAGAGCTGCACGGGCTCACACAGATGAGAAGTT
CAGGAAAGGGGTACAGGGTAGAAGTGGACACCAAATCATACTGGAAAGGCT
CTTGGCATTTCCTCATCCATGAATACGCAGAGGTGGTTTTTCACAGCCAAATG
ACTCTGGTCATCGCCACTACACCATCGCAGCCCTGCTCAGCCCGTACTCCTA
CAGCACCACCTGCTGCTGCTAGTACCCCAAGAACTGAGGGACCCAGCCACAG
AGGACCAAGATCTTGCCAAAGCAGTAGCTCCCATTTGTACTGAAACAGTGT
CTTGTCTCTATAAACCGTGTAGCAACTCGGGAAGATGCCGTGAAACGTTCTT
ATTAACACCTTTTATTTTCATTC
(配列番号 1330)

```

【 図 1 4 】

```

NM_009371.3 37 50 63 76 89 102 115 128 141 154 167 180 193 206 219 232 245 258 271 284 297 310 323 336 349 362 375 388 401 414 427 440 453 466 479 492 505 518 531 544 557 570 583 596 609 622 635 648 661 674 687 699 712 725 738 751 764 777 790 803 816 829 842 855 868 881 894 907 920 933 946 959 972 985 998 1011 1024 1037 1050 1063 1076 1089 1102 1115 1128 1141 1154 1167 1180 1193 1206 1219 1232 1245 1258 1271 1284 1297 1310 1323 1336 1349 1362 1375 1388 1401 1414 1427 1440 1453 1466 1479 1492 1505 1518 1531 1544 1557 1570 1583 1596 1609 1622 1635 1648 1661 1674 1687 1699 1712 1725 1738 1751 1764 1777 1790 1803 1816 1829 1842 1855 1868 1881 1894 1907 1920 1933 1946 1959 1972 1985 1998 2011 2024 2037 2050 2063 2076 2089 2102 2115 2128 2141 2154 2167 2180 2193 2206 2219 2232 2245 2258 2271 2284 2297 2310 2323 2336 2349 2362 2375 2388 2401 2414 2427 2440 2453 2466 2479 2492 2505 2518 2531 2544 2557 2570 2583 2596 2609 2622 2635 2648 2661 2674 2687 2700 2713 2726 2739 2752 2765 2778 2791 2804 2817 2830 2843 2856 2869 2882 2895 2908 2921 2934 2947 2960 2973 2986 3000 3013 3026 3039 3052 3065 3078 3091 3104 3117 3130 3143 3156 3169 3182 3195 3208 3221 3234 3247 3260 3273 3286 3299 3312 3325 3338 3351 3364 3377 3390 3403 3416 3429 3442 3455 3468 3481 3494 3507 3520 3533 3546 3559 3572 3585 3598 3611 3624 3637 3650 3663 3676 3689 3702 3715 3728 3741 3754 3767 3780 3793 3806 3819 3832 3845 3858 3871 3884 3897 3910 3923 3936 3949 3962 3975 3988 4001 4014 4027 4040 4053 4066 4079 4092 4105 4118 4131 4144 4157 4170 4183 4196 4209 4222 4235 4248 4261 4274 4287 4300 4313 4326 4339 4352 4365 4378 4391 4404 4417 4430 4443 4456 4469 4482 4495 4508 4521 4534 4547 4560 4573 4586 4599 4612 4625 4638 4651 4664 4677 4690 4703 4716 4729 4742 4755 4768 4781 4794 4807 4820 4833 4846 4859 4872 4885 4898 4911 4924 4937 4950 4963 4976 4989 5002 5015 5028 5041 5054 5067 5080 5093 5106 5119 5132 5145 5158 5171 5184 5197 5210 5223 5236 5249 5262 5275 5288 5301 5314 5327 5340 5353 5366 5379 5392 5405 5418 5431 5444 5457 5470 5483 5496 5509 5522 5535 5548 5561 5574 5587 5600 5613 5626 5639 5652 5665 5678 5691 5704 5717 5730 5743 5756 5769 5782 5795 5808 5821 5834 5847 5860 5873 5886 5899 5912 5925 5938 5951 5964 5977 5990 6003 6016 6029 6042 6055 6068 6081 6094 6107 6120 6133 6146 6159 6172 6185 6198 6211 6224 6237 6250 6263 6276 6289 6302 6315 6328 6341 6354 6367 6380 6393 6406 6419 6432 6445 6458 6471 6484 6497 6510 6523 6536 6549 6562 6575 6588 6601 6614 6627 6640 6653 6666 6679 6692 6705 6718 6731 6744 6757 6770 6783 6796 6809 6822 6835 6848 6861 6874 6887 6899 6912 6925 6938 6951 6964 6977 6990 7003 7016 7029 7042 7055 7068 7081 7094 7107 7120 7133 7146 7159 7172 7185 7198 7211 7224 7237 7250 7263 7276 7289 7302 7315 7328 7341 7354 7367 7380 7393 7406 7419 7432 7445 7458 7471 7484 7497 7510 7523 7536 7549 7562 7575 7588 7601 7614 7627 7640 7653 7666 7679 7692 7705 7718 7731 7744 7757 7770 7783 7796 7809 7822 7835 7848 7861 7874 7887 7899 7912 7925 7938 7951 7964 7977 7990 8003 8016 8029 8042 8055 8068 8081 8094 8107 8120 8133 8146 8159 8172 8185 8198 8211 8224 8237 8250 8263 8276 8289 8302 8315 8328 8341 8354 8367 8380 8393 8406 8419 8432 8445 8458 8471 8484 8497 8510 8523 8536 8549 8562 8575 8588 8601 8614 8627 8640 8653 8666 8679 8692 8705 8718 8731 8744 8757 8770 8783 8796 8809 8822 8835 8848 8861 8874 8887 8899 8912 8925 8938 8951 8964 8977 8990 9003 9016 9029 9042 9055 9068 9081 9094 9107 9120 9133 9146 9159 9172 9185 9198 9211 9224 9237 9250 9263 9276 9289 9302 9315 9328 9341 9354 9367 9380 9393 9406 9419 9432 9445 9458 9471 9484 9497 9510 9523 9536 9549 9562 9575 9588 9601 9614 9627 9640 9653 9666 9679 9692 9705 9718 9731 9744 9757 9770 9783 9796 9809 9822 9835 9848 9861 9874 9887 9899 9912 9925 9938 9951 9964 9977 9990 10003 10016 10029 10042 10055 10068 10081 10094 10107 10120 10133 10146 10159 10172 10185 10198 10211 10224 10237 10250 10263 10276 10289 10302 10315 10328 10341 10354 10367 10380 10393 10406 10419 10432 10445 10458 10471 10484 10497 10510 10523 10536 10549 10562 10575 10588 10601 10614 10627 10640 10653 10666 10679 10692 10705 10718 10731 10744 10757 10770 10783 10796 10809 10822 10835 10848 10861 10874 10887 10899 10912 10925 10938 10951 10964 10977 10990 11003 11016 11029 11042 11055 11068 11081 11094 11107 11120 11133 11146 11159 11172 11185 11198 11211 11224 11237 11250 11263 11276 11289 11302 11315 11328 11341 11354 11367 11380 11393 11406 11419 11432 11445 11458 11471 11484 11497 11510 11523 11536 11549 11562 11575 11588 11601 11614 11627 11640 11653 11666 11679 11692 11705 11718 11731 11744 11757 11770 11783 11796 11809 11822 11835 11848 11861 11874 11887 11899 11912 11925 11938 11951 11964 11977 11990 12003 12016 12029 12042 12055 12068 12081 12094 12107 12120 12133 12146 12159 12172 12185 12198 12211 12224 12237 12250 12263 12276 12289 12302 12315 12328 12341 12354 12367 12380 12393 12406 12419 12432 12445 12458 12471 12484 12497 12510 12523 12536 12549 12562 12575 12588 12601 12614 12627 12640 12653 12666 12679 12692 12705 12718 12731 12744 12757 12770 12783 12796 12809 12822 12835 12848 12861 12874 12887 12899 12912 12925 12938 12951 12964 12977 12990 13003 13016 13029 13042 13055 13068 13081 13094 13107 13120 13133 13146 13159 13172 13185 13198 13211 13224 13237 13250 13263 13276 13289 13302 13315 13328 13341 13354 13367 13380 13393 13406 13419 13432 13445 13458 13471 13484 13497 13510 13523 13536 13549 13562 13575 13588 13601 13614 13627 13640 13653 13666 13679 13692 13705 13718 13731 13744 13757 13770 13783 13796 13809 13822 13835 13848 13861 13874 13887 13899 13912 13925 13938 13951 13964 13977 13990 14003 14016 14029 14042 14055 14068 14081 14094 14107 14120 14133 14146 14159 14172 14185 14198 14211 14224 14237 14250 14263 14276 14289 14302 14315 14328 14341 14354 14367 14380 14393 14406 14419 14432 14445 14458 14471 14484 14497 14510 14523 14536 14549 14562 14575 14588 14601 14614 14627 14640 14653 14666 14679 14692 14705 14718 14731 14744 14757 14770 14783 14796 14809 14822 14835 14848 14861 14874 14887 14899 14912 14925 14938 14951 14964 14977 14990 15003 15016 15029 15042 15055 15068 15081 15094 15107 15120 15133 15146 15159 15172 15185 15198 15211 15224 15237 15250 15263 15276 15289 15302 15315 15328 15341 15354 15367 15380 15393 15406 15419 15432 15445 15458 15471 15484 15497 15510 15523 15536 15549 15562 15575 15588 15601 15614 15627 15640 15653 15666 15679 15692 15705 15718 15731 15744 15757 15770 15783 15796 15809 15822 15835 15848 15861 15874 15887 15899 15912 15925 15938 15951 15964 15977 15990 16003 16016 16029 16042 16055 16068 16081 16094 16107 16120 16133 16146 16159 16172 16185 16198 16211 16224 16237 16250 16263 16276 16289 16302 16315 16328 16341 16354 16367 16380 16393 16406 16419 16432 16445 16458 16471 16484 16497 16510 16523 16536 16549 16562 16575 16588 16601 16614 16627 16640 16653 16666 16679 16692 16705 16718 16731 16744 16757 16770 16783 16796 16809 16822 16835 16848 16861 16874 16887 16899 16912 16925 16938 16951 16964 16977 16990 17003 17016 17029 17042 17055 17068 17081 17094 17107 17120 17133 17146 17159 17172 17185 17198 17211 17224 17237 17250 17263 17276 17289 17302 17315 17328 17341 17354 17367 17380 17393 17406 17419 17432 17445 17458 17471 17484 17497 17510 17523 17536 17549 17562 17575 17588 17601 17614 17627 17640 17653 17666 17679 17692 17705 17718 17731 17744 17757 17770 17783 17796 17809 17822 17835 17848 17861 17874 17887 17899 17912 17925 17938 17951 17964 17977 17990 18003 18016 18029 18042 18055 18068 18081 18094 18107 18120 18133 18146 18159 18172 18185 18198 18211 18224 18237 18250 18263 18276 18289 18302 18315 18328 18341 18354 18367 18380 18393 18406 18419 18432 18445 18458 18471 18484 18497 18510 18523 18536 18549 18562 18575 18588 18601 18614 18627 18640 18653 18666 18679 18692 18705 18718 18731 18744 18757 18770 18783 18796 18809 18822 18835 18848 18861 18874 18887 18899 18912 18925 18938 18951 18964 18977 18990 19003 19016 19029 19042 19055 19068 19081 19094 19107 19120 19133 19146 19159 19172 19185 19198 19211 19224 19237 19250 19263 19276 19289 19302 19315 19328 19341 19354 19367 19380 19393 19406 19419 19432 19445 19458 19471 19484 19497 19510 19523 19536 19549 19562 19575 19588 19601 19614 19627 19640 19653 19666 19679 19692 19705 19718 19731 19744 19757 19770 19783 19796 19809 19822 19835 19848 19861 19874 19887 19899 19912 19925 19938 19951 19964 19977 19990 20003 20016 20029 20042 20055 20068 20081 20094 20107 20120 20133 20146 20159 20172 20185 20198 20211 20224 20237 20250 20263 20276 20289 20302 20315 20328 20341 20354 20367 20380 20393 20406 20419 20432 20445 20458 20471 20484 20497 20510 20523 20536 20549 20562 20575 20588 20601 20614 20627 20640 20653 20666 20679 20692 20705 20718 20731 20744 20757 20770 20783 20796 20809 20822 20835 20848 20861 20874 20887 20899 20912 20925 20938 20951 20964 20977 20990 21003 21016 21029 21042 21055 21068 21081 21094 21107 21120 21133 21146 21159 21172 21185 21198 21211 21224 21237 21250 21263 21276 21289 21302 21315 21328 21341 21354 21367 21380 21393 21406 21419 21432 21445 21458 21471 21484 21497 21510 21523 21536 21549 21562 21575 21588 21601 21614 21627 21640 21653 21666 21679 21692 21705 21718 21731 21744 21757 21770 21783 21796 21809 21822 21835 21848 21861 21874 21887 21899 21912 21925 21938 21951 21964 21977 21990 22003 22016 22029 22042 22055 22068 22081 22094 22107 22120 22133 22146 22159 22172 22185 22198 22211 22224 22237 22250 22263 22276 22289 22302 22315 22328 22341 22354 22367 22380 22393 22406 22419 22432 22445 22458 22471 22484 22497 22510 22523 22536 22549 22562 22575 22588 22601 22614 22627 22640 22653 22666 22679 22692 22705 22718 22731 22744 22757 22770 22783 22796 22809 22822 22835 22848 22861 22874 22887 22899 22912 22925 22938 22951 22964 22977 22990 23003 23016 23029 23042 23055 23068 23081 23094 23107 23120 23133 23146 23159 23172 23185 23198 23211 23224 23237 23250 23263 23276 23289 23302 23315 23328 23341 23354 23367 23380 23393 23406 23419 23432 23445 23458 23471 23484 23497 23510 23523 23536 23549 23562 23575 23588 23601 23614 23627 23640 23653 23666 23679 23692 23705 23718 23731 23744 23757 23770 23783 23796 23809 23822 23835 23848 23861 23874 23887 23899 23912 23925 23938 23951 23964 23977 23990 24003 24016 24029 24042 24055 24068 24081 24094 24107 24120 24133 24146 24159 24172 24185 24198 24211 24224 24237 24250 24263 24276 24289 24302 24315 24328 24341 24354 24367 24380 24393 24406 24419 24432 24445 24458 24471 24484 24497 24510 24523 24536 24549 24562 24575 24588 24601 24614 24627 24640 24653 24666 24679 24692 24705 24718 24731 24744 24757 24770 24783 24796 24809 24822 24835 24848 24861 24874 24887 24899 24912 24925 24938 24951 24964 24977 24990 25003 25016 250
```

【 図 1 6 】

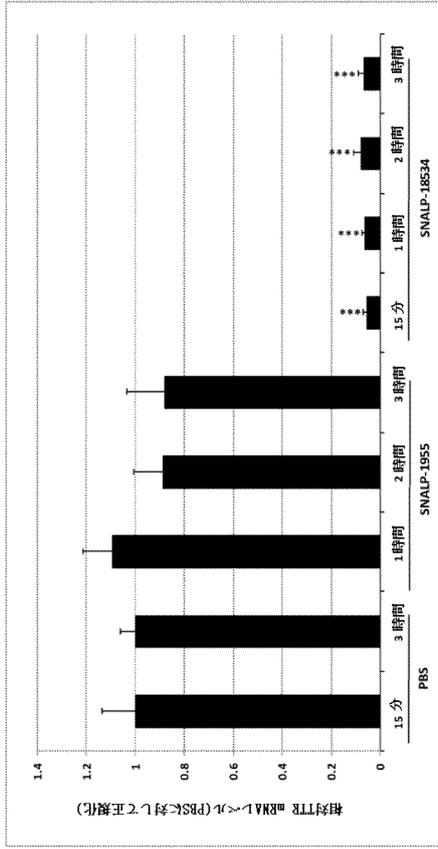


FIG. 16

【 図 1 7 】

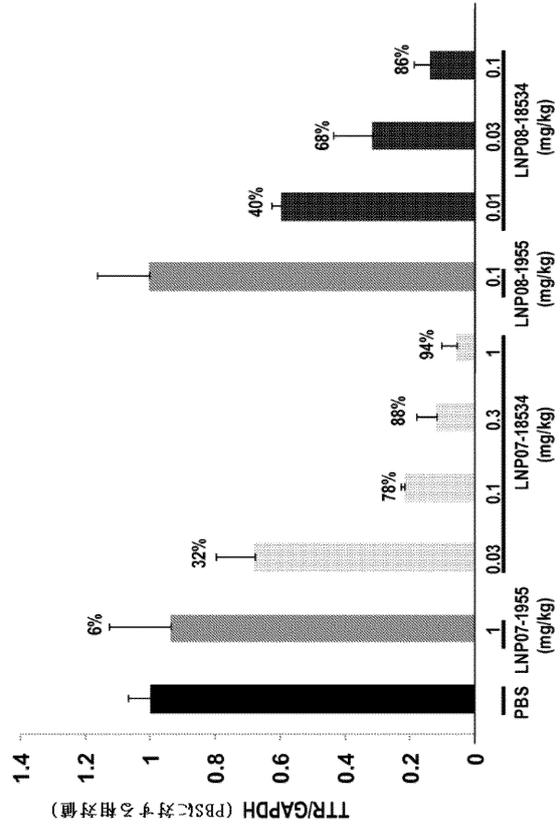


FIG. 17

【 図 1 8 】

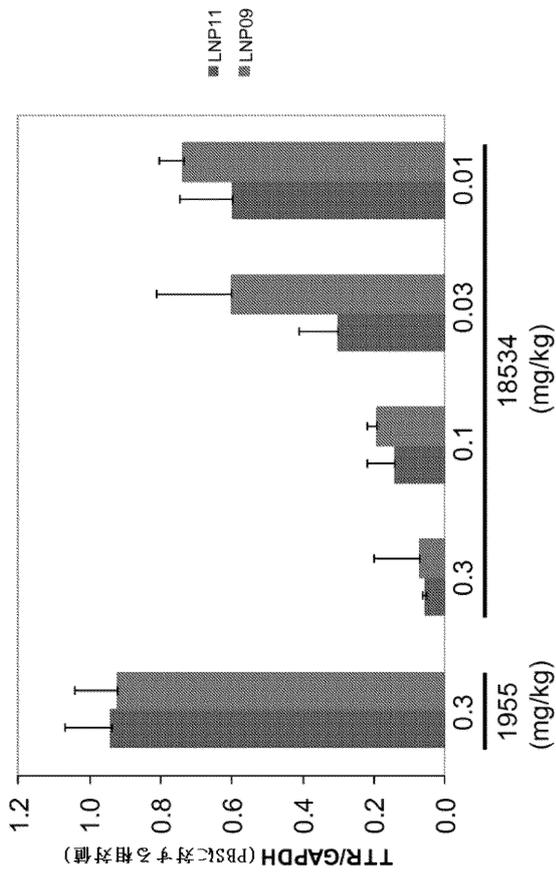


FIG. 18

【配列表】

2018171072000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年8月10日(2018.8.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

トランススチレチン(TTR)の発現を阻害するための二本鎖リボ核酸(dsRNA)であって、前記dsRNAは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、

a. 前記アンチセンス鎖はu A U U G U C U C U G C C U G G A C U d T d Tのヌクレオチド配列を含み、前記センス鎖はA G u c c A G G c A G A G A c A A u A d T d Tのヌクレオチド配列を含み；または

b. 前記アンチセンス鎖はU U u A U U G U C U C U G C C U G G A d T d Tのヌクレオチド配列を含み、前記センス鎖はu c c A G G c A G A G A c A A u A A A d T d Tのヌクレオチド配列を含み；

cは2'-O-メチルシチジン-3'-リン酸であり、uは2'-O-メチルウリジン-3'-リン酸であり、dTは2'-デオキシチミジン-3'-リン酸である、二本鎖リボ核酸(dsRNA)。

【請求項2】

前記dsRNAは、リガンドに共役される、請求項1に記載のdsRNA。

【請求項3】

前記dsRNAは、脂質製剤に製剤化される、請求項1または2に記載のdsRNA。

【請求項4】

前記dsRNAは、脂質ナノ粒子(LNP)製剤に製剤化される、請求項3に記載のdsRNA。

【請求項5】

前記LNP製剤は、(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(MC3)を含む、請求項4に記載のdsRNA。

【請求項6】

前記LNP製剤は、(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(MC3)、DSPC、コレステロールおよびPEG-DMGを含む、請求項5に記載のdsRNA。

【請求項7】

前記LNP製剤は、50/10/38.5/1.5モル%の比の(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(MC3)/DSPC/コレステロール/PEG-DMGを含む、請求項6に記載のdsRNA。

【請求項8】

請求項1~7のいずれか1項に記載のdsRNAを含有する細胞であって、ヒト内で形質転換された宿主細胞ではない、細胞。

【請求項9】

請求項1~7のいずれか1項に記載のdsRNAおよび薬剤として許容される担体を含む、TTR遺伝子の発現を阻害するための医薬組成物。

【請求項10】

細胞内のTTRの発現をインビトロで阻害する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の dsRNA と前記細胞をインビトロで接触させることと、

(b) TTR 遺伝子の mRNA 転写物の分解を得るために十分な時間、ステップ (a) において産生された前記細胞を維持し、それによって、前記細胞内の前記 TTR 遺伝子の発現を阻害することと、を含むが、但し、ヒトまたは動物体の治療によるいかなる方法も除かれる、方法。

【請求項 1 1】

ヒトにおける TTR 発現によって媒介された障害の治療のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の dsRNA を含む医薬組成物。

【請求項 1 2】

障害がトランスチレチンアミロイドーシスである、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

障害が、家族性アミロイド神経障害 (FAP)、家族性アミロイド心筋症 (FAC)、髄膜 / CNS アミロイドーシス、老年性全身アミロイドーシス (SSA) および老年性心アミロイドーシス (SCA) からなる群より選択される、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

障害が家族性アミロイド神経障害 (FAP) である、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記 dsRNA が、0.01、0.1、0.3、0.5、1.0、2.5、または 5.0 mg / kg で前記ヒトに投与される、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記 dsRNA が、0.1 ~ 1 mg / kg で前記ヒトに投与される、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記 dsRNA が、0.2 ~ 1.5 mg / kg で前記ヒトに投与される、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

前記 dsRNA が、0.3 ~ 0.5 mg / kg で前記ヒトに投与される、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記 dsRNA が、0.3 mg / kg で前記ヒトに投与される、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

前記ヒトが、TTR アミロイドーシスを治療するための別の治療方法をさらに受けている、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

前記さらなる治療方法が、利尿薬、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、アンジオテンシン受容体遮断薬、透析療法および肝臓移植からなる群より選択される、請求項 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

前記 dsRNA が、1、2、3 もしくは 4 週間を超えない間隔で前記ヒトに投与される、請求項 1 4 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

前記 dsRNA が、静脈内に、または静脈内注入によって投与される、請求項 1 4 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	

- (31)優先権主張番号 61/115,738
(32)優先日 平成20年11月18日(2008.11.18)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/106,956
(32)優先日 平成20年10月20日(2008.10.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/244,794
(32)優先日 平成21年9月22日(2009.9.22)
(33)優先権主張国 米国(US)

(特許庁注:以下のものは登録商標)

- 1 . T W E E N
- 2 . T r i t o n
- 3 . L a b r a s o l

- (74)代理人 100170520
弁理士 笹倉 真奈美
(72)発明者 ダイナ・ウェン・イー・サー
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・フロアー、サード・ストリート300番、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内
(72)発明者 グレゴリー・ヒンクル
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・フロアー、サード・ストリート300番、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内
(72)発明者 レネ・アルバレズ
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・フロアー、サード・ストリート300番、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内
(72)発明者 スチュアート・ミルスタイン
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・フロアー、サード・ストリート300番、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内
(72)発明者 チェン・キンミン
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・フロアー、サード・ストリート300番、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内

Fターム(参考) 4B065 AA91Y AA93Y AB01 AC12 AC20 BA04 BB18 BC12
4C076 AA65 CC09 CC16 DD09 DD09M DD49 DD49M DD63 DD63M DD70
DD70M EE23 EE23M FF21
4C084 AA13 MA38 NA14 ZA751 ZC411 ZC511

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA03 MA05 MA38 NA14 ZA75 ZC41
ZC51