

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-531728

(P2024-531728A)

(43)公表日 令和6年8月29日(2024.8.29)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 K	31/713(2006.01)	A 6 1 K	31/713		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/711(2006.01)	A 6 1 K	31/711		4 H 0 4 5
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全63頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-516476(P2024-516476)	(71)出願人	521548168
(86)(22)出願日	令和4年9月13日(2022.9.13)		アルゴノート アールエヌエー リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年5月8日(2024.5.8)		イギリス国, プリストル エーボン ビー
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/075355		エス8 1 エーエス, フレデリック プレ
(87)国際公開番号	WO2023/041508		イス 1 5
(87)国際公開日	令和5年3月23日(2023.3.23)	(74)代理人	100114188
(31)優先権主張番号	2113104.0		弁理士 小野 誠
(32)優先日	令和3年9月14日(2021.9.14)	(74)代理人	100119253
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		弁理士 金山 賢教
(31)優先権主張番号	2207239.1	(74)代理人	100124855
(32)優先日	令和4年5月18日(2022.5.18)		弁理士 坪倉 道明
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(74)代理人	100129713
			弁理士 重森 一輝
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)	(74)代理人	100137213
	最終頁に続く		弁理士 安藤 健司
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 心血管疾患の処置

(57)【要約】

本開示は、核酸であって、センス鎖とアンチセンス鎖とを含む二本鎖RNA分子を含み、前記分子のセンスRNA部分又はアンチセンスRNA部分のいずれかの少なくとも5'末端に共有結合された一本鎖DNA分子をさらに含み、前記二本鎖阻害的RNAは、高コレステロール血症及び心血管疾患などの、高コレステロール血症に関連する疾患の処置において心血管疾患に関連する遺伝子を標的とする、核酸に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸分子であって、

センス鎖とアンチセンス鎖とを含む二本鎖阻害的リボ核酸 (RNA) 分子を含む第 1 の部分と；

一本鎖デオキシリボ核酸 (DNA) 分子を含む第 2 の部分であって、前記一本鎖 DNA 分子の 3' 末端は、前記二本鎖阻害的 RNA 分子の前記センス鎖の 5' 末端に共有結合されているか、又は前記一本鎖 DNA 分子の 3' 末端は、前記二本鎖阻害的 RNA 分子の前記アンチセンス鎖の 5' に共有結合されており、前記二本鎖阻害的 RNA は、心血管疾患に関連する心血管遺伝子標的の一部をコードするセンスヌクレオチド配列又はその多型配列変異体を含むことを特徴とし、前記一本鎖 DNA 分子は、相補的塩基対形成によって前記一本鎖 DNA の一部にアニールしてステム及びループドメインを含む二本鎖 DNA 構造を形成するように適合されたヌクレオチド配列を、その長さの少なくとも一部にわたって含み、前記核酸分子は N - アセチルガラクトサミンを含み及び前記二本鎖阻害的 RNA は天然のヌクレオチドからなることを特徴とする、第 2 の部分と

を含む、核酸分子。

【請求項 2】

前記一本鎖 DNA 分子の 3' 末端が、前記二本鎖阻害的 RNA 分子の前記センス鎖の 5' 末端に共有結合されている、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記一本鎖 DNA 分子の 3' 末端が、前記二本鎖阻害的 RNA 分子の前記アンチセンス鎖の 5' 末端に共有結合されている、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記ループドメインがヌクレオチド配列 G C G A A G C を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記一本鎖 DNA 分子が、

5' T C A C C T C A T C C C G C G A A G C 3' (SEQ ID NO 387 及び 251)；

5' C G A A G C G C C C T A C T C C A C T 3' (SEQ ID NO 130)；及び

5' G C G A A G C C C C T A C T C C A C T 3' (SEQ ID NO 400)

の群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記阻害的 RNA 分子が、少なくとも 1 つのデオキシチミジンジヌクレオチド (dTdT) を含むか又は少なくとも 1 つのデオキシチミジンジヌクレオチド (dTdT) からなる 2 ヌクレオチドのオーバーハングを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記センス鎖及び / 又は前記アンチセンス鎖が、少なくとも 1 つのヌクレオチド間ホスホロチオアート結合を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記核酸分子がビニルホスホナート修飾を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記二本鎖阻害的 RNA 分子が 17 ~ 29 ヌクレオチド又は 19 ~ 21 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記心血管遺伝子標的がヒトリポタンパク質 (a) である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 11】

10

20

40

50

前記二本鎖阻害的RNA分子が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33及び34からなる群から選択されるアンチセンスヌクレオチド配列を含む、請求項10に記載の核酸分子。

【請求項12】

前記二本鎖阻害的RNA分子が、SEQ ID NO: 41を含むアンチセンスヌクレオチド配列とSEQ ID NO: 49を含むセンスヌクレオチド配列とを含み、前記一本鎖DNA分子が、前記二本鎖阻害的RNA分子の前記センス鎖の5'末端に共有結合されている、請求項10に記載の核酸分子。

【請求項13】

前記二本鎖阻害的RNA分子が、SEQ ID NO: 4を含むアンチセンスヌクレオチド配列とSEQ ID NO: 44を含むセンスヌクレオチド配列とを含み、前記一本鎖DNA分子が、前記二本鎖阻害的RNA分子の前記アンチセンス鎖の5'末端に共有結合されている、請求項10に記載の核酸分子。

【請求項14】

前記二本鎖阻害的RNA分子が、SEQ ID NO: 5を含むアンチセンスヌクレオチド配列とSEQ ID NO: 46を含むセンスヌクレオチド配列とを含み、前記一本鎖DNA分子が、前記二本鎖阻害的RNA分子の前記アンチセンス鎖の5'末端に共有結合されている、請求項10に記載の核酸分子。

【請求項15】

前記心血管遺伝子標的がヒトアポリポタンパク質C III (Apo C III)である、請求項1～9のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項16】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78及び79からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項15に記載の核酸分子。

【請求項17】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249及び250からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項15に記載の核酸分子。

【請求項18】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 50、51、52、53、54、55、56、57、58、80、81、82、83、84、85、86、87、88及び89からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項15に記載の核酸分子。

【請求項19】

前記心血管遺伝子標的がヒトジグリセリドアシルトランスフェラーゼ2 (DGAT2)である、請求項1～9のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項20】

前記核酸が、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118及び119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項19に記載の核酸分子。

【請求項21】

前記核酸が、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、1

10

20

30

40

50

49、150、151、152、153、154、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169及び170からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項19に記載の核酸分子。

【請求項22】

前記核酸が、SEQ ID NO: 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、120、121、122、123、124、125、126、127、128及び129からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項19に記載の核酸分子。

【請求項23】

前記心血管遺伝子標的がヒトPCSK9である、請求項1～9のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項24】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、189、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209及び210からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項23に記載の核酸分子。

【請求項25】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209及び210からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項23に記載の核酸分子。

【請求項26】

前記心血管遺伝子標的がヒトアポリポタンパク質Bである、請求項1～9のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項27】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 499、500、453、502、503、457、505、506、462、508、509、467、511、512、472、514、515、477、517、518、482、520、521、487、523、524及び492からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項26に記載の核酸分子。

【請求項28】

前記核酸分子が、450、501、455、504、460、507、465、510、470、513、475、516、480、519、485、522、490及び525からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む、請求項26に記載の核酸分子。

【請求項29】

前記核酸分子がN-アセチルガラクトサミンに共有結合されている、請求項1から28のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項30】

請求項1～29のいずれか一項に記載の少なくとも1つの核酸分子を含む薬学的組成物。

【請求項31】

前記組成物が少なくとも1つのさらなる治療薬を含む、請求項30に記載の薬学的組成物。

【請求項32】

高コレステロール血症若しくは高コレステロール血症に関連する疾患を有するか、又は高コレステロール血症若しくは高コレステロール血症に関連する疾患にかかりやすい対象の処置又は予防において使用するための、請求項1～31のいずれか一項に記載の核酸分

10

20

30

40

50

子又は薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

開示の分野

本開示は、核酸であって、センス鎖とアンチセンス鎖とを含む二本鎖RNA分子を含み、前記分子のセンスRNA部分又はアンチセンスRNA部分のいずれかの少なくとも5'末端に共有結合された一本鎖DNA分子をさらに含み、前記二本鎖阻害的RNA (double stranded inhibitory RNA) は、心血管疾患遺伝子を標的とする、核酸；前記核酸分子を含む薬学的組成物、及び心血管疾患遺伝子の発現の増加したレベルに関連する疾患、例えば高コレステロール血症の処置のための方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

開示の背景

高コレステロール血症に関連する心血管疾患、例えば虚血性心血管疾患は一般的な症状であり、心疾患並びに高い死亡率及び罹患率をもたらす。質の悪い食事、肥満又は遺伝性機能不全遺伝子の結果であり得る。例えば、高レベルのリポタンパク質 (a) 及び他のリポタンパク質は、アテローム性動脈硬化症に関連する。コレステロールは、動物細胞における膜合成のために不可欠である。水溶性の欠如は、コレステロールがリポタンパク質に付随して体内を輸送されることを意味する。アポリポタンパク質は、リン脂質、コレステロール及び血流を介した身体の様々な部分へのコレステロールなどの脂質の輸送を促進する脂質とともに形成される。リポタンパク質は、サイズによって分類され、HDL (高密度リポタンパク質)、LDL (低密度リポタンパク質)、IDL (中間密度リポタンパク質)、VLDL (超低密度リポタンパク質) 及びULDL (ウルトラ低密度リポタンパク質) リポタンパク質を形成することができる。

20

【0003】

リポタンパク質は、それらの循環全体を通して組成を変化させ、様々な比率のアポリポタンパク質A (ApoA)、B (ApoB)、C (ApoC)、D (ApoD) 又はE (ApoE)、トリグリセリド、コレステロール及びリン脂質を含む。例えば、ApoBは、ULDL及びLDLの主要なアポリポタンパク質であり、2つのアイソフォーム apoB-48 及び apoB-100 を有する。両 ApoB アイソフォームは、単一の遺伝子によってコードされ、終止コドンの生成をもたらす残基 2180 での ApoB-100 転写物のRNA編集後に、より短い ApoB-48 遺伝子が産生される。ApoB-100 は、LDLの主要な構造タンパク質であり、例えば細胞内へのコレステロールの輸送を可能にする細胞受容体に対するリガンドとしての役割を果たす。

30

【0004】

家族性高コレステロール血症は難病であり、血中LDLコレステロール (LDL-C) レベルの上昇に起因する。この疾患は、常染色体顕性障害であり、ヘテロ接合 (350 ~ 550 mg/dL の LDL-C) 状態及びホモ接合 (650 ~ 1000 mg/dL の LDL-C) 状態のいずれもが上昇した LDL-C をもたらす。家族性高コレステロール血症のヘテロ接合型は、集団の約 1 : 500 である。ホモ接合状態ははるかに稀であり、約 1 : 100 万である。LDL-C の正常レベルは 130 mg/dL の領域にある。

40

【0005】

高コレステロール血症は小児患者において特に急性であり、早期に診断されなければ、冠動脈心疾患の加速及び早期の死亡をもたらす。早期に診断され治療されれば、子供は通常平均余命を有することができる。成人では、変異又は他の要因のいずれかによる高LDL-Cは、冠動脈疾患、脳卒中又は腎臓疾患をもたらすアテローム性動脈硬化症のリスク増加と直接関連している。LDL-Cのレベルを低下させることは、アテローム性動脈硬化症及び関連する症状のリスクを低下させることが知られている。HMG-CoA レダクターゼを阻害することによってコレステロールのデノボ合成を遮断するスタチ

50

ンの投与によって、当初、LDL-Cレベルを低下させることができる。一部の対象は、スタチンをエゼチミブ、コレステロール又はニコチン酸などの他の治療薬と組み合わせる併用療法から恩恵を受けることができる。しかしながら、HMG-CoAレダクターゼの発現及び合成は、スタチン阻害に応答して適応し、時間が経過するにつれて増加するため、スタチン抵抗性が確立された後では、有益な効果は、一時的又は限定的であるに過ぎない。

【0006】

したがって、単独で、又は上昇したLDL-Cによる心血管疾患を制御するための既存の治療アプローチと組み合わせることができる代替療法を特定することが望まれている。

10

【0007】

遺伝子機能を特異的に消失させるための技術は、低分子阻害又は干渉RNA (siRNA) とも呼ばれる、siRNA分子中に含まれる配列に相補的なmRNAの破壊をもたらす二本鎖阻害的RNAを細胞内に導入することによる。siRNA分子は、互いにアニールして二本鎖RNA分子を形成するRNAの2つの相補鎖 (センス鎖及びアンチセンス鎖) を含む。siRNA分子は、典型的には、消失されるべき遺伝子のエクソンに由来するが、必ず由来するわけではない。多くの生物は、siRNAの形成をもたらすカスケードを活性化することによって二本鎖RNAの存在に応答する。二本鎖RNAの存在は、二本鎖RNAをリボ核タンパク質複合体の一部になるより小さな断片 (siRNA、約21~29ヌクレオチド長) にプロセシングするRNase IIIを含むタンパク質複合体を活性化する。siRNAは、RNase複合体がsiRNAのアンチセンス鎖に相補的なmRNAを切断し、それによってmRNAの破壊をもたらすためのガイドとして作用する。

20

【0008】

リボタンパク質 (a) の発現の阻害は公知であり、リボタンパク質 (a) の発現を停止させるための阻害的RNAの使用も公知である。例えば、国際公開第2019/092283号は、リボタンパク質 (a) をコードするmRNAのノックダウンを標的とする特異的siRNA配列の同定、及び冠動脈心疾患、大動脈弁狭窄症又は脳卒中などの上昇したリボタンパク質 (a) 発現に関連する心血管疾患の処置におけるそれらの使用を開示している。同様に、米国特許第9,932,586号は、リボタンパク質 (a) 発現を標的とする特異的siRNA配列、並びにパージャー病、冠動脈心疾患、腎動脈狭窄症、高アポベータリポ蛋白血症、脳血管アテローム性動脈硬化症、脳血管疾患及び静脈血栓症などの上昇したリボタンパク質 (a) 発現に関連する心血管疾患の処置におけるそれらの使用を開示している。

30

【0009】

APOC IIIの過剰発現は、アテローム性動脈硬化症及び2型糖尿病に関連する。例えば、国際公開第2003/020765号は、ApoC IIIポリペプチドに由来する免疫原を使用するアテローム性動脈硬化症の制御のためのワクチン接種アプローチ、並びに冠動脈及び脳血管疾患における動脈硬化性プラークを制御する上でのその使用を開示している。同様のワクチン接種アプローチは、国際公開第2004/080375号及び国際公開第2001/064008号に開示されている5。国際公開第2014/205449号及び国際公開第2014/179626号には、APOC III発現を標的とすることによってインスリン感受性を改善し、II型糖尿病を処置するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用が開示されている。

40

【0010】

さらに、国際公開第2007/136989号及び国際公開第2005/019418号はそれぞれ、高コレステロール血症、心血管疾患、II型糖尿病及びメタボリックシンドロームなどの血清トリグリセリドレベルの低下から利益を得る症状との関連で、DGA T2の発現を調節し、DGA T2発現の低下から利益を得る症状を処置するための、DGA Tに向けられたアンチセンス化合物の使用を開示している。国際公開第2018/09

50

3966号は、高コレステロール血症、心血管疾患、II型糖尿病及びメタボリックシンドロームなどの肥満及び肥満関連疾患を処置するための、DGAT2及びジグリセリドアシルトランスフェラーゼ1(DGAT1)に向けられたRNAサイレンシング10の使用を開示している。同様に、国際公開第2005/044981号は、多くの他の遺伝子標的の中でも特にDGAT2を標的化するためのsiRNAの使用、及びトリグリセリド調節から利益を得る疾患の処置におけるそれらの使用を開示している。

【0011】

本開示は、センス又はアンチセンス阻害的RNAのいずれかの少なくとも5'末端に連結された短いDNA部分の包含によって修飾されており、ヘアピン構造を形成する二本鎖阻害的RNAを含む核酸分子に関する。二本鎖阻害的RNAは、専ら又は主として天然のヌクレオチドを使用し、先行技術の二本鎖RNA分子が薬学及び薬物動態を改善するために典型的に利用する修飾されたヌクレオチド又は糖を必要としない。開示される二本鎖阻害的RNAは、潜在的により少ない副作用で心血管遺伝子標的を発現停止させる活性を有する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第2019/092283号

【特許文献2】米国特許第9,932,586号

【特許文献3】国際公開第2003/020765号

【特許文献4】国際公開第2004/080375号

【特許文献5】国際公開第2001/064008号

【特許文献6】国際公開第2014/205449号

【特許文献7】国際公開第2014/179626号

【特許文献8】国際公開第2007/136989号

【特許文献9】国際公開第2005/019418号

【特許文献10】国際公開第2018/093966号

【特許文献11】国際公開第2005/044981号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

発明の記述

本発明の一局面によれば、核酸分子であって、

センス鎖とアンチセンス鎖とを含む二本鎖阻害的リボ核酸(RNA)分子を含む第1の部分と；

一本鎖デオキシリボ核酸(DNA)分子を含む第2の部分であって、前記一本鎖DNA分子の3'末端は、前記二本鎖阻害的RNA分子の前記センス鎖の5'末端に共有結合されているか、又は前記一本鎖DNA分子の3'末端は、前記二本鎖阻害的RNA分子の前記アンチセンス鎖の5'に共有結合されており、前記二本鎖阻害的RNAは、心血管疾患に関連する心血管遺伝子標的の一部をコードするセンスヌクレオチド配列を含むことを特徴とし、前記一本鎖DNA分子は、相補的塩基対形成によって前記一本鎖DNAの一部にアニールして二本鎖DNA構造を形成するように適合されたヌクレオチド配列を、その長さの少なくとも一部にわたって含み、前記二本鎖阻害的RNAは天然のヌクレオチドからなる、第2の部分と

を含む、核酸分子が提供される。

【0014】

本発明の一局面によれば、核酸分子であって、

センス鎖とアンチセンス鎖とを含む二本鎖阻害的リボ核酸(RNA)分子を含む第1の部分と；

一本鎖デオキシリボ核酸(DNA)分子を含む第2の部分であって、前記一本鎖DNA

10

20

30

40

50

分子の3'末端は、前記二本鎖阻害的RNA分子の前記センス鎖の5'末端に共有結合されているか、又は前記一本鎖DNA分子の3'末端は、前記二本鎖阻害的RNA分子の前記アンチセンス鎖の5'に共有結合されており、前記二本鎖阻害的RNAは、心血管疾患に関連する心血管遺伝子標的の一部をコードするセンスヌクレオチド配列又はその多型配列変異体を含むことを特徴とし、前記一本鎖DNA分子は、相補的塩基対形成によって前記一本鎖DNAの一部にアニールしてステム及びループドメインを含む二本鎖DNA構造を形成するように適合されたヌクレオチド配列を、その長さの少なくとも一部にわたって含み、前記核酸分子はN-アセチルガラクトサミンを含み及び前記二本鎖阻害的RNAは天然のヌクレオチドからなることを特徴とする、第2の部分と

を含む、核酸分子が提供される。

10

【0015】

「多型配列変異体」は、1、2、3又はそれより多くのヌクレオチドが変化する遺伝子配列である。

【0016】

本発明の好ましい態様において、前記一本鎖DNA分子の3'末端は、二本鎖阻害的RNA分子のセンス鎖の5'末端に共有結合されている。

【0017】

本発明の好ましい態様において、前記一本鎖DNA分子の3'末端は、二本鎖阻害的RNA分子のアンチセンス鎖の5'末端に共有結合されている。

【0018】

本発明の好ましい態様において、一本鎖DNA分子は、前記センス鎖の5'末端及び前記アンチセンス鎖の5'末端に共有結合されている。

20

【0019】

本発明の代替の態様において、前記一本鎖DNA分子は、前記センス鎖の5'末端、前記センス鎖の3'末端に共有結合されている。

【0020】

本発明の好ましい態様において、前記ループ部分は、ヌクレオチド配列GNA又はGNNAを含む領域を含み、各Nは、独立して、グアニン(G)、チミジン(T)、アデニン(A)又はシトシン(C)を表す。

【0021】

本発明の好ましい態様において、前記ループドメインは、G及びCヌクレオチド塩基を含む。

30

【0022】

本発明の代替の態様において、前記ループドメインは、ヌクレオチド配列GCGAAGCを含む。

【0023】

本発明の好ましい態様において、前記一本鎖DNA分子は、ヌクレオチド配列5' TCACTCATCCCGCGAAGC 3' (SEQ ID NO 387及び251)を含む。

本発明の好ましい態様において、前記一本鎖DNA分子は、ヌクレオチド配列5' CGAAGCGCCCTACTCCACT 3' (SEQ ID NO 130)を含む。

40

【0024】

本発明の好ましい態様において、前記一本鎖DNA分子は、ヌクレオチド配列5' GCGAAGCGCCCTACTCCACT 3' (SEQ ID NO 400)を含む。

【0025】

阻害的RNA分子は、化学的修飾を必要としない天然のヌクレオチド塩基を含むか又は化学的修飾を必要としない天然のヌクレオチド塩基からなる。さらに、本発明のいくつかの態様においては、湾曲(crook)DNA分子が前記二本鎖阻害的RNAのセンス鎖の3'末端に連結されており、アンチセンス鎖には、少なくとも2ヌクレオチド塩基オーバーハング配列が提供されていてもよい。2ヌクレオチドオーバーハング配列は、標的に

50

よってコードされるヌクレオチドに対応することができ、又は非コードである。2ヌクレオチドオーバーハングは、任意の配列及び任意の順序の2つのヌクレオチド、例えば、UU、AA、UA、AU、GG、CC、GC、CG、UG、GU、UC、CU及びTTであり得る。

【0026】

本発明の好ましい態様において、前記阻害的RNA分子は、デオキシチミジンヌクレオチド(dTdT)を含むか又はデオキシチミジンヌクレオチド(dTdT)からなる2ヌクレオチドオーバーハングを含む。

【0027】

本発明の好ましい態様において、前記dTdTオーバーハングは、前記アンチセンス鎖の5'末端に位置する。 10

【0028】

本発明の代替の好ましい態様において、前記dTdTオーバーハングは、前記アンチセンス鎖の3'末端に位置する。

【0029】

本発明の好ましい態様において、前記dTdTオーバーハングは、前記センス鎖の5'末端に位置する。

【0030】

本発明の代替の好ましい態様において、前記dTdTオーバーハングは、前記センス鎖の3'末端に位置する。 20

【0031】

本発明の好ましい態様において、前記センス鎖及び/又は前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド間ホスホロチオアート結合を含む。

【0032】

本発明の好ましい態様において、前記センス鎖は、ヌクレオチド間ホスホロチオアート結合を含む。

【0033】

好ましくは、前記センス鎖の5'及び/又は3'末端の2つのヌクレオチドは、2つのヌクレオチド間ホスホロチオアート結合を含む。

【0034】

本発明の好ましい態様において、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド間ホスホロチオアート結合を含む。 30

【0035】

好ましくは、前記アンチセンス鎖の5'及び/又は3'末端の2つのヌクレオチドは、2つのヌクレオチド間ホスホロチオアート結合を含む。

【0036】

本発明の代替の好ましい態様において、前記一本鎖DNA分子は、1つ又は複数のヌクレオチド間ホスホロチオアート結合を含む。

【0037】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子はビニルホスホナート修飾を含む。 40

【0038】

本発明の好ましい態様において、前記ビニルホスホナート修飾は、前記センスRNA鎖の5'末端ホスファートへの修飾である。

【0039】

本発明の好ましい態様において、前記ビニルホスホナート修飾は、前記アンチセンスRNA鎖の5'末端ホスファートへの修飾である。

【0040】

本発明の好ましい態様において、前記二本鎖阻害的RNA分子は、10~40ヌクレオチド長である。

【0041】

本発明の好ましい態様において、前記二本鎖阻害的RNA分子は、17～29ヌクレオチド長である。

【0042】

本発明の好ましい態様において、前記二本鎖阻害的RNA分子は、19～21ヌクレオチド長である。好ましくは、19ヌクレオチド長である。

【0043】

本発明の好ましい態様において、前記心血管遺伝子標的は、ヒトリポタンパク質(a)である。

【0044】

本発明の代替の態様において、前記二本鎖阻害的RNA分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33又は34からなる群から選択されるアンチセンスヌクレオチド配列を含む。 10

【0045】

本発明の好ましい態様において、前記二本鎖阻害的RNA分子は、SEQ ID NO: 41を含むアンチセンスヌクレオチド配列とSEQ ID NO: 49を含むセンスヌクレオチド配列とを含み、前記一本鎖DNA分子は、二本鎖阻害的RNA分子のセンス鎖の5'末端に共有結合されている。

【0046】

本発明の好ましい態様において、前記二本鎖阻害的RNA分子は、SEQ ID NO: 4を含むアンチセンスヌクレオチド配列とSEQ ID NO: 44を含むセンスヌクレオチド配列とを含み、前記一本鎖DNA分子は、二本鎖阻害的RNA分子のアンチセンス鎖の5'末端に共有結合されている。 20

【0047】

本発明の好ましい態様において、前記二本鎖阻害的RNA分子は、SEQ ID NO: 5を含むアンチセンスヌクレオチド配列とSEQ ID NO: 46を含むセンスヌクレオチド配列とを含み、前記一本鎖DNA分子は、二本鎖阻害的RNA分子のアンチセンス鎖の5'末端に共有結合されている。

【0048】

本発明の代替の好ましい態様において、前記心血管遺伝子標的はヒトアポリポタンパク質C III (Apo C III)である。 30

【0049】

好ましくは、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78及び79からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

【0050】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249及び250からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。 40

【0051】

好ましくは、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 50、51、52、53、54、55、56、57、58、80、81、82、83、84、85、86、87、88及び89からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

【0052】

本発明の代替の好ましい態様において、前記心血管遺伝子標的はヒトジグリセリドアシルトランスフェラーゼ2 (DGAT2)である。

【0053】

好ましくは、前記核酸は、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118及び119からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

【0054】

好ましくは、前記核酸は、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169及び170からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

10

【0055】

好ましくは、前記核酸は、SEQ ID NO: 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、120、121、122、123、124、125、126、127、128及び129からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

【0056】

本発明の好ましい態様において、前記心血管遺伝子標的はヒトPCSK9である。

【0057】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、189及び190からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

20

【0058】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209及び210からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

【0059】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 255、256、257、258、259、260、261、262、263及び264からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

30

【0060】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 265、266、267、268、269、270、271、272、273及び274からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

【0061】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、292、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329及び330からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

40

【0062】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、37

50

2、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、285及び386からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

【0063】

本発明の好ましい態様において、前記心血管遺伝子標的はヒトアポリポタンパク質Bである。

【0064】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 499、500、453、502、503、457、505、506、462、508、509、467、511、512、472、514、515、477、517、518、482、520、521、487、523、524及び492からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

10

【0065】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、450、501、455、504、460、507、465、510、470、513、475、516、480、519、485、522、490及び525からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むRNA鎖を含む。

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表1に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表1に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

20

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表2に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表2に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

【0066】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表3に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表3に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

【0067】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表4に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表4に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

30

【0068】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表5に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表5に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

【0069】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表8に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表8に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

【0070】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表10に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表10に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

40

【0071】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表14に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表14に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

【0072】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、表15に記載されているヌクレオチド配列若しくは多型配列変異体を含むか又は表15に記載されているヌクレオチド配列若

50

しくは多型配列変異体からなるRNA鎖を含む。

【0073】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、SEQ ID NO: 388に記載されているヌクレオチド配列の19~21個の連続するヌクレオチドを含むか又はSEQ ID NO: 388に記載されているヌクレオチド配列の19~21個の連続するヌクレオチドからなる。

【0074】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、N-アセチルガラクトサミンに共有結合されている。

【0075】

本発明のさらなる態様において、N-アセチルガラクトサミンは、前記阻害的RNAのアンチセンス部分又は前記阻害的RNAのセンス部分のいずれかに結合されている。

【0076】

好ましくは、N-アセチルガラクトサミンは、前記センスRNAの5'末端に結合されている。

【0077】

本発明の代替の態様において、N-アセチルガラクトサミンは、前記センスRNAの3'末端に結合されている。

【0078】

本発明の代替の好ましい態様において、前記N-アセチルガラクトサミンは、前記アンチセンスRNAの3'末端に結合されている。

【0079】

本発明の好ましい態様において、N-アセチルガラクトサミンは一価である。

【0080】

本発明の好ましい態様において、N-アセチルガラクトサミンは二価である。

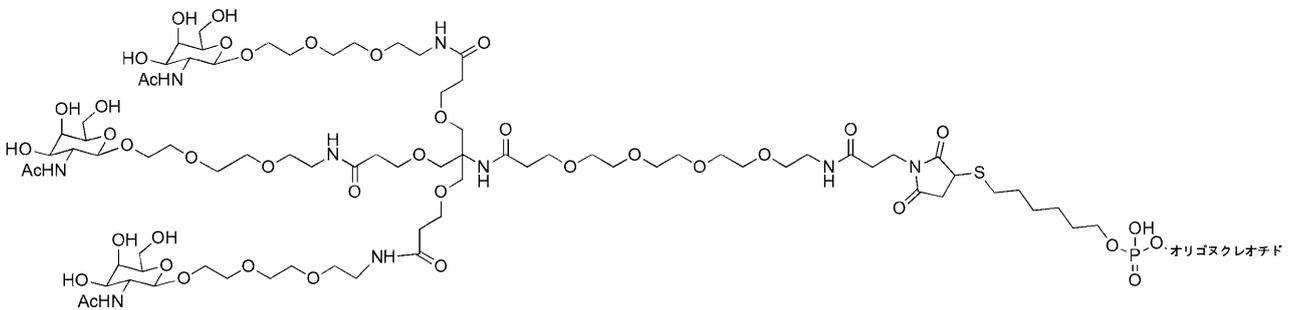
【0081】

本発明の代替の態様において、N-アセチルガラクトサミンは三価である。

【0082】

本発明の好ましい態様において、前記核酸分子は、以下の構造を含む分子に共有結合されている。

【化1】



【0083】

本発明の代替の態様において、前記核酸分子は、以下の構造を含む分子に共有結合されている。

10

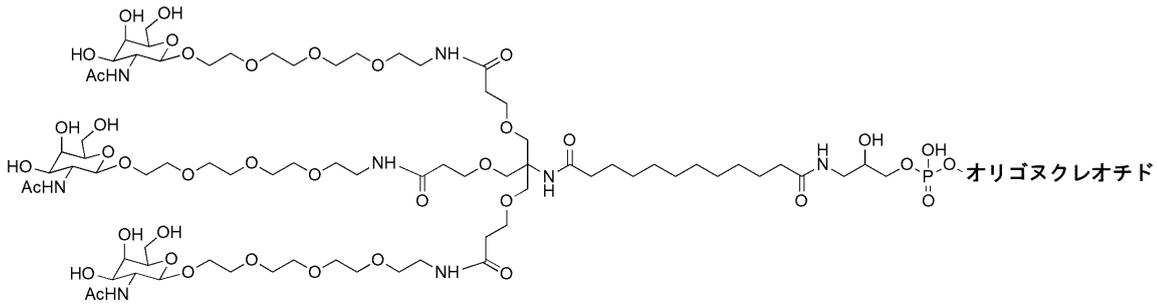
20

30

40

50

【化 2】

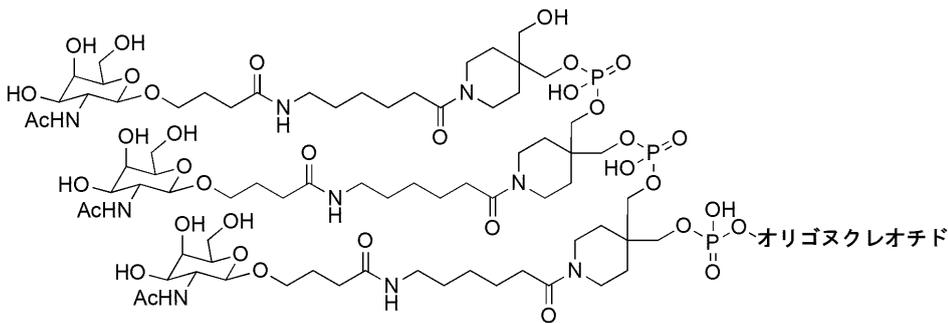


10

【0084】

本発明の代替の態様において、前記核酸分子は、以下の構造を含む分子に共有結合されている。

【化 3】

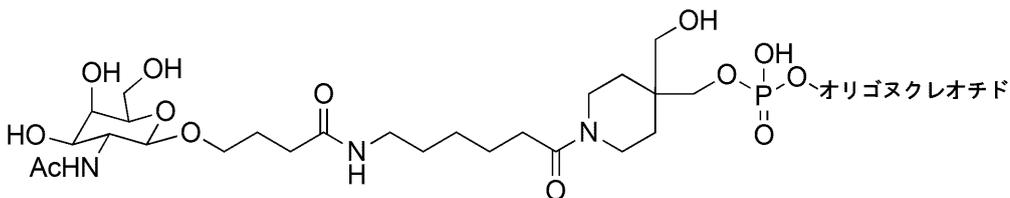


20

【0085】

本発明の代替の態様において、前記核酸分子は、以下の構造を含む分子に共有結合されている。

【化 4】



30

【0086】

本発明の代替の好ましい態様において、前記核酸分子は、N - アセチルガラクトサミン 4 - サルファートを含む分子に共有結合されている。

【0087】

本発明のさらなる局面によれば、本発明による少なくとも 1 つの核酸分子を含む薬学的組成物が提供される。

40

【0088】

本発明の好ましい態様において、前記組成物は、薬学的担体及び / 又は賦形剤をさらに含む。

【0089】

投与される場合、本発明の組成物は、薬学的に許容され得る調製物で投与される。このような調製物は、薬学的に許容され得る濃度の塩、緩衝剤、防腐剤、適合的な担体を通常含有し得、任意でコレステロール低下剤などの他の治療剤を含有してもよく、他の治療剤は本発明による核酸分子とは別個に、又は組み合わせが適合的である場合には組み合わせられた調製物で投与され得る。

【0090】

50

本発明による核酸と他の異なる治療剤との組み合わせは、同時、逐次又は時間的に別個の投与量として投与される。

【0091】

本発明の治療薬は、注射又は時間とともに徐々に注入することを含む任意の慣用の経路によって投与され得る。投与は、例えば、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下、経皮又は経上皮であり得る。

【0092】

本発明の組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独で、又はさらなる用量とともに、所望の応答を生じる組成物の量である。心血管疾患などの疾患を処置する場合、所望の応答は、疾患の進行を阻害すること又は反転させることである。これは、疾患の進行を一時的に遅らせるに過ぎないことを含み得るが、より好ましくは、疾患の進行を恒常的に停止させることを含む。これは、日常的な方法によって監視され得る。

10

【0093】

そのような量は、当然のことながら、処置されている具体的な症状、症状の重症度、年齢、身体状態、サイズ及び体重を含む個々の患者パラメータ、処置の期間、併用療法の性質（もし存在すれば）、具体的な投与経路、並びに医療従事者の知識及び専門知識に属する同様の要因に依存する。これらの要因は当業者に周知であり、日常的な実験のみで対処することができる。個々の成分又はそれらの組み合わせの最大用量、すなわち、健全な医学的判断による最も高い安全用量が使用されることが一般に好ましい。しかしながら、医学的理由、心理学的理由、又は実質的に任意の他の理由のために、患者は、より低い用量又は耐容され得る用量を求め得ることが当業者によって理解されよう。

20

【0094】

前述の方法で使用される薬学的組成物は、好ましくは無菌であり、患者/患畜への投与に適した重量又は体積の単位で、所望の応答を生成するための有効量の本発明による核酸分子を含有する。応答は、例えば、心血管疾患の退縮及び疾患症候の減少などを決定することによって測定することができる。

【0095】

対象に投与される本発明による核酸分子の用量は、種々のパラメータに従って、特に使用される投与様式及び対象の状態に従って選択され得る。他の要因には、所望の処置期間が含まれる。適用された初期用量において対象における応答が不十分であれば、より高い用量（又は異なる、より局所的な送達経路による効果的により高い用量）が、患者の耐容性が許容する程度まで使用され得る。本発明による核酸の検出方法は、処置を必要とする対象に対する適切な投与量の決定を容易にすることは明らかであろう。

30

【0096】

一般に、 $1\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の本明細書に開示される核酸分子の用量が、一般に、標準的な手順に従って製剤化され、投与される。好ましくは、用量は、 $1\text{ nM} \sim 500\text{ nM}$ 、 $5\text{ nM} \sim 200\text{ nM}$ 、 $10\text{ nM} \sim 100\text{ nM}$ の範囲であり得る。組成物の投与のための他のプロトコルは当業者に公知であり、用量、注射スケジュール、注射部位、投与様式などが前述のものとは異なる。（例えば、試験目的又は獣医学的治療目的のための）ヒト以外の哺乳動物への組成物の投与は、上記と実質的に同じ条件下で行われる。対象は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、好ましくはヒトであり、ヒトリポタンパク質（a）の発現に関して適合した非ヒト霊長類又はトランスジェニック哺乳動物を含む。

40

【0097】

投与される場合、本発明の薬学的調製物は、薬学的に許容され得る量及び薬学的に許容され得る組成物で適用される。「薬学的に許容され得る」という用語は、有効成分の生物学的活性の有効性を妨げない非毒性物質を意味する。そのような調製物は、塩、緩衝剤、防腐剤、適合的な担体を通常含有し得、任意に他の治療剤、例えばスタチンを含有してもよい。医薬に使用される場合、塩は薬学的に許容され得るべきであるが、薬学的に許容され得ない塩は、その薬学的に許容され得る塩を調製するために都合よく使用され得、本発明の範囲から除外されない。そのような薬理的及び薬学的に許容され得る塩には、以下

50

の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸などから調製されるものが含まれるが、これらに限定されない。また、薬学的に許容され得る塩は、ナトリウム塩、カリウム塩又はカルシウム塩などのアルカリ金属塩又はアルカリ土類塩として調製され得る。

【0098】

組成物は、所望であれば、薬学的に許容され得る担体と組み合わせられ得る。本明細書で使用される「薬学的に許容され得る担体」という用語は、ヒトへの投与に適した1つ又は複数の適合的な固体又は液体充填剤、希釈剤又は封入物質を意味する。この文脈における「薬学的に許容され得る担体」という用語は、例えば溶解性及び/又は安定性を促進するために活性成分と組み合わせられる、天然又は合成の有機又は無機成分を示す。薬学的組成物の成分はまた、所望の薬学的有効性を実質的に損なう相互作用が存在しないように、本発明の分子と、及び互いと混合することができる。

10

【0099】

薬学的組成物は、塩中の酢酸；塩中のクエン酸；塩中のホウ酸；及び塩中のリン酸を含む適切な緩衝剤を含有し得る。薬学的組成物はまた、適切な防腐剤を含有してもよい。

【0100】

薬学的組成物は、単位剤形で都合よく提供され得、薬学の分野で周知の方法のいずれによっても調製され得る。全ての方法は、活性剤を、1つ又は複数の補助成分を構成する担体と混ぜる工程を含む。一般に、組成物は、活性化化合物を液体担体又は細かく分割された固体担体又はその両方と均一かつ緊密に混ぜ、次いで、必要であれば生成物を成形することによって調製される。経口投与に適した組成物は、それぞれが所定量の活性化化合物を含有するカプセル、錠剤、ロゼンジなどの分離した単位として提供され得る。

20

【0101】

非経口投与に適した組成物は、好ましくはレシピエントの血液と等張である核酸の無菌水性又は非水性調製物を都合よく含む。この調製物は、適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を使用して公知の方法に従って製剤化され得る。無菌注射用調製物はまた、非毒性の非経口的に許容され得る希釈剤又は溶媒中の無菌注射用溶液又は懸濁液、例えば1,3-ブタンジオール中の溶液であり得る。使用され得る許容され得る溶媒としては、水、リンゲル液及び等張塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌固定油は、溶媒又は懸濁媒体として従来から使用されている。この目的のために、合成モノ又はジグリセリドを含む任意の無刺激性固定油が使用され得る。さらに、オレイン酸などの脂肪酸は、注射剤の調製において使用され得る。経口、皮下、静脈内、筋肉内などの投与に適した担体制剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAに見出すことができる。

30

【0102】

本発明のさらに好ましい態様において、前記薬学的組成物は、少なくとも1つのさらなる異なる治療剤を含む。

【0103】

本発明の好ましい態様において、前記さらなる治療薬はスタチンである。

【0104】

スタチンは、一般に、上昇したLDL-Cを有する対象においてコレステロールレベルを制御するために使用される。スタチンは、罹患しやすい対象及び心血管疾患を有する対象を予防及び治療する上で有効である。スタチンの典型的な投与量は5~80mgの領域内にあるが、これはスタチン及び高LDL-Cに苦しむ対象のために必要とされるLDL-Cの所望の低下レベルに依存する。しかしながら、スタチンの標的であるHMG-CoA還元酵素の発現及び合成は、スタチン投与に回答して適応するため、スタチン治療の有益な効果は、スタチン抵抗性が確立された後では、一時的又は限定的であるに過ぎない。

40

【0105】

好ましくは、前記スタチンは、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、ピトバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン及びシンバスタチンからなる群より選択

50

される。

【0106】

本発明の好ましい態様において、前記さらなる治療薬はエゼチミブである。エゼチミブは、少なくとも1つのスタチン、例えばシンバスタチンと組み合わせられてもよい。

【0107】

本発明の代替の好ましい態様において、前記さらなる治療薬は、フィブラート、ニコチン酸、コレスチラミンからなる群より選択される。

【0108】

本発明のさらなる代替の好ましい態様において、前記さらなる治療剤は、治療抗体、例えば、エボロクマブ、ボコシズマブ又はアリロクマブである。

10

【0109】

本発明のさらなる局面によれば、高コレステロール血症若しくは高コレステロール血症に関連する疾患を有するか、又は高コレステロール血症若しくは高コレステロール血症に関連する疾患にかかりやすい対象の処置又は予防において使用するための、本発明の核酸分子又は薬学的組成物が提供される。

【0110】

本発明の好ましい態様において、前記対象は小児対象である。

【0111】

小児対象には、新生児（0～28日齢）、乳児（1～24月齢）、幼児（2～6歳）及び思春期前〔7～14歳〕の小児が含まれる。

20

【0112】

本発明の代替の好ましい態様において、前記対象は成人/成体対象である。

【0113】

本発明の好ましい態様において、高コレステロール血症は家族性高コレステロール血症である。

【0114】

本発明の好ましい態様において、家族性高コレステロール血症は、上昇したレベルのリポタンパク質（a）発現に関連する。

【0115】

本発明の好ましい態様において、前記対象はスタチン治療に抵抗性である。

30

【0116】

本発明の好ましい態様において、高コレステロール血症に関連する前記疾患は、脳卒中予防、高脂血症、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、大動脈弁狭窄症、脳血管疾患、末梢動脈疾患、高血圧症、メタボリックシンドローム、II型糖尿病、非アルコール性脂肪酸肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、バージャー病、腎動脈狭窄症、高アポベータリポ蛋白血症、脳血管アテローム性動脈硬化症、脳血管疾患及び静脈血栓症からなる群より選択される。

【0117】

本発明のさらなる局面によれば、有効量の本発明による核酸又は薬学的組成物を投与し、それにより高コレステロール血症を処置又は予防する工程を含む、高コレステロール血症を有する又は高コレステロール血症にかかりやすい対象を処置するための方法が提供される。

40

【0118】

本発明の好ましい方法において、前記対象は小児対象である。

【0119】

本発明の別の好ましい方法において、前記対象は成人/成体対象である。

【0120】

本発明の好ましい方法において、高コレステロール血症は家族性高コレステロール血症である。

【0121】

50

本発明の好ましい方法において、家族性高コレステロール血症は、上昇したレベルのリポタンパク質 (a) 発現に関連する。

【 0 1 2 2 】

本発明の好ましい方法において、前記対象はスタチン治療に抵抗性である。

【 0 1 2 3 】

本発明の好ましい方法において、高コレステロール血症に関連する前記疾患は、脳卒中予防、高脂血症、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、冠動脈心疾患、大動脈弁狭窄症、脳血管疾患、末梢動脈疾患、高血圧症、メタボリックシンドローム、I I型糖尿病、非アルコール性脂肪酸肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、バージャー病、腎動脈狭窄症、高アポベータリポ蛋白血症、脳血管アテローム性動脈硬化症、脳血管疾患及び静脈血栓症からなる群より選択される。

10

【 0 1 2 4 】

本明細書の説明及び特許請求の範囲を通じて、「含む (c o m p r i s e) 」及び「含有する (c o n t a i n) 」という用語並びにこれらの用語の変形、例えば「含む (c o m p r i s i n g) 」及び「含む (c o m p r i s e s) 」は、「含むが、これらに限定されない (i n c l u d i n g b u t n o t l i m i t e d t o) 」を意味し、他の部分、添加剤、成分、整数又は工程を排除することは意図されない (排除しない) 。

【 0 1 2 5 】

本明細書の説明及び特許請求の範囲を通じて、文脈上別段の必要がない限り、単数形は複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、文脈上別段の必要がない限り、本明細書は単数だけでなく複数も想定していると理解されるべきである。

20

【 0 1 2 6 】

本発明の局面、態様又は実施例に関連して記載される特徴、整数、特性、化合物、化学部分又は基は、これらと整合しない場合を除き、本明細書に記載される任意の他の局面、態様又は実施例に適用可能であると理解されるべきである。

【 0 1 2 7 】

ここで、本発明の一態様を、単に例として、以下の図を参照しながら説明する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 2 8 】

【 図 1 】 s i R N A 化合物の形質移入後の H e p G 2 細胞における標的 P C S K 9 m R N A レベルを示す血清安定性アッセイ。水、10% F B S 又は10% ヒト血清中において37 で30分間又は2時間のインキュベーション後に、H e p G 2 細胞を以下の s i R N A で形質移入した：修飾されたインクリシラン [白いバー]、湾曲のない非修飾「インクリシラン」 [灰色のバー]、3' S S 湾曲ありの非修飾インクリシラン [格子模様のバー]、5' S S 「反転されたヘアピン」湾曲ありの非修飾インクリシラン [斑点のあるバー]、又は5' S S 湾曲ありの非修飾インクリシラン [格子模様のバー]。P C S K 9 m R N A レベルを R T - q P C R 分析によって定量した。対照は、「s i R N A なし」処置を含む [黒いバー] ；

30

【 図 2 】 s i R N A 化合物の形質移入後の H e p G 2 細胞における標的 P C S K 9 m R N A レベルを示す血清安定性アッセイ。水、10%、20% 又は50% F B S 中において37 で2時間のインキュベーション後に、H e p G 2 細胞を以下の s i R N A で形質移入した：修飾されたインクリシラン [白いバー]、湾曲のない非修飾「インクリシラン」 [灰色のバー]、5' S S 「反転されたヘアピン」湾曲ありの非修飾インクリシラン [斑点のあるバー]、又は5' S S 湾曲ありの非修飾インクリシラン [縞模様のバー]。P C S K 9 m R N A レベルを R T - q P C R 分析によって定量した。対照は、「s i R N A なし」前処置を含む [黒いバー] ；

40

【 図 3 】 s i R N A 化合物の形質移入後の H e p G 2 細胞における標的 P C S K 9 m R N A レベルを示す血清安定性アッセイ。水、10% F B S 又は10% ヒト血清中において37 で4時間のインキュベーション後に、H e p G 2 細胞を以下の s i R N A で形質移入した：修飾されたインクリシラン [白いバー]、湾曲のない非修飾「インクリシラン」

50

[灰色のバー]、5' SS「反転されたヘアピン」湾曲ありの非修飾インクリシラン[斑点のあるバー]、又は5' SS湾曲ありの非修飾インクリシラン[縞模様のバー]。PCSK9 mRNAレベルをRT-qPCR分析によって定量した。対照は、「siRNAなし」前処置を含む[黒いバー]；

【図4】siRNA(PC8-PC18と名付けられた)化合物の形質移入後のHepG2細胞における標的PCSK9 mRNAレベルを示す血清安定性アッセイ。水、10% FBS又は10%ヒト血清中において37℃で2時間のインキュベーション後に、HepG2細胞を以下の非修飾PC8-18 siRNAで形質移入した：湾曲なしのsiRNA A35[白いバー]、湾曲なしであるが、3' SS及び3' AS上にdTdTオーバーハングを含むsiRNA A36[灰色のバー]、3' SS上に湾曲を有するsiRNA A37[斑点のあるバー]、3' AS上に湾曲を有するsiRNA A38[縦の縞模様のバー]、3' SS上に湾曲及び3' AS上にdTdTオーバーハングを有するsiRNA A39[格子模様のバー]、5' SS「反転されたヘアピン」湾曲を有するsiRNA A41[横の縞模様のバー]、又は5' SS上に湾曲及び3' AS上にdTdTオーバーハングを有するsiRNA A42[黒地に斑点のあるバー]。PCSK9 mRNAレベルをRT-qPCR分析によって定量した。対照は、「siRNAなし」前処置を含む[黒いバー]；

【図5】図5A 非修飾siRNA化合物(PC2-PC12と名付けられた)の投与後の肝臓PCSK9 mRNAのインビボサイレンシング。各処置群について5匹のマウスの群に、ビヒクル[黒いバー]、化合物A(湾曲なし；白いバー)、化合物G(センス鎖(SS)の5'末端に湾曲；斑点のあるバー)又は化合物H(SSの3'末端の湾曲；灰色のバー)のいずれかを皮下(SC)に注射した。2mg/kg又は10mg/kgのいずれかで各化合物を与え、殺後、RT-qPCRによる肝臓PCSK9 mRNAレベルを2つの時点(2日目及び7日目)で測定した。図5B インビボ研究(図5A)においてマウスで使用されたsiRNA化合物A、G及びHの形質移入後のHepG2細胞における標的PCSK9 mRNAレベルを示す血清安定性アッセイ。水、10% FBS又は10%ヒト血清中において、37℃で30分間又は2時間のインキュベーション後に、siRNA化合物A、G又はHでHepG2細胞を形質移入した：化合物A(湾曲なし；白いバー)、化合物G(センス鎖(SS)の5'末端に湾曲；斑点のあるバー)又は化合物H(SSの3'末端に湾曲；灰色のバー)。PCSK9 mRNAレベルをRT-qPCR分析によって定量した。対照は、「siRNAなし」[黒いバー]及び「血清なし」前処置を含む。図5C インビボ研究(図5A)においてマウスで使用されたsiRNA化合物A、G及びHの形質移入後のHepG2細胞における標的PCSK9 mRNAレベルを示す血清安定性アッセイ。水、20%又は50%ヒト血清中において、37℃で2時間のインキュベーション後に、siRNA化合物A、G又はHでHepG2細胞を形質移入した：化合物A(湾曲なし；白いバー)、化合物G(センス鎖(SS)の5'末端に湾曲；斑点のあるバー)又は化合物H(SSの3'末端に湾曲；灰色のバー)。PCSK9 mRNAレベルをRT-qPCR分析によって定量した。対照は、「siRNAなし」[黒いバー]及び「血清なし」前処置を含む。

【発明を実施するための形態】

【0129】

材料及び方法

HepG2逆形質移入

Bio-Synthesis(Lewisville, TX)によって合成された二重鎖siRNA(表1)を、ヌクレアーゼを含まない水(Invitrogen(商標)AM9932)に再懸濁して、10µMのストック溶液を生成した。血清安定性アッセイのために、ビヒクル(ヌクレアーゼを含まない水)、10%ウシ胎児血清(FBS)又は種々の濃度(10%~80%)のヒト血清(HS)中で、2時間、37℃でストックsiRNAをインキュベートした。血清又はビヒクル中でのプレインキュベーション後、0.15µLのLipofectamine RNAiMAX(Invitrogen(商標)13778075)/ウェルを使用して、384ウェルプレート(Thermo Sci

10

20

30

40

50

entific (商標) 164688) 中の Hep G2 細胞中に、25 nM の濃度で siRNA を形質移入した。形質移入された細胞を 37 °C 及び 5% CO₂ でインキュベートした。siRNA 処理を受けていない細胞を対照として使用した。

初代マウス肝細胞における自由取り込み及び形質移入

【0130】

マウス肝細胞 (MSCP10、Lonza) を解凍し、Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements (Gibco (商標) CM3000) を補充した Williams E 培地 (Gibco (商標) A1217601) 中、384 ウェルプレート (Thermo Scientific (商標) 164688) に播種した。自由取り込みのために、ウェルあたり 0.15 µL の Lipofectamine を使用して 25 nM の siRNA で、又は 100 nM の GalNAc-siRNA で細胞を処理した。

二本鎖 RT-qPCR

【0131】

Cells-to-CT 1-step TaqMan Kit (Invitrogen (商標) A25603) を使用して、RT-qPCR 読み取りのために細胞を処理した。簡単に説明すると、細胞を 50 µL の氷冷 PBS で洗浄し、DNase I を含有する 20 µL の溶解溶液に溶解した。2 µL の STOP 溶液を 2 分間添加することにより、5 分後に溶解を停止した。RT-qPCR 分析のために、ウェルあたり 1 µL の溶解物を 20 µL の RT-qPCR 反応体積で 96 ウェル PCR プレートに分注した。GAPDH (VIC__PL、アッセイ Id Hs00266705__g1) 及び PCSK9 (FAM、アッセイ Id Hs00545399__m1) 又は ApoB (FAM、アッセイ Id Mm01545150__m1) に対する TaqMan プローブとともに、Cells-to-CT 1-step TaqMan Kit から TaqMan (登録商標) 1-Step qRT-PCR Mix を使用して、RT-qPCR を行った。QuantStudio 5 サーマサイクリング機器 (Applied Biosystems) を使用して、RT-qPCR を行った。GAPDH を内部対照として使用し、発現変化を参照試料 (siRNA 処理なし) に対して正規化した、CT 法を用いて相対定量を決定した。

インビボマウス研究動物

【0132】

University of Reading の Saretius 動物ユニット中で雄の C57BL/6J マウス (20 ~ 25 g) を群で飼育し、12 時間の明/暗サイクル下、23 °C で、Home Office の規制に従って湿度を制御して維持した。研究の期間中、マウスに標準的なげっ歯類飼料 SDS ラット拡張食餌 (RM3-E-FG) を与えた。

siRNA 化合物の製剤化

【0133】

5 mL/kg の投与体積で皮下 (SC) に与えられた場合に 2 及び 10 mg/kg の用量を提供するために、化合物 A、化合物 G 及び化合物 H をそれぞれ、RNAase を含まない PBS 中で 0.4 及び 2 mg/mL の濃度に製剤化した。対照群 (n = 5) には、5 mL/kg の投与体積で、ビヒクル (RNAase を含まない PBS) を皮下に与えた。

RT-qPCR のための肝臓処理

【0134】

siRNA 化合物又はビヒクル注射 (n = 5) 後 2 日目 (48 時間) 及び 7 日目 (168 時間) に、イソフルラン下での心臓穿刺によって、各処置群から試料を最終的に採取した。肝臓組織を切除し、液体 N₂ 中で急速凍結した。GeneLute (商標) Total RNA Purification Kit (RNB100-100RXN) を使用して、急速凍結された全肝臓のホモジネートから全 RNA を抽出した。

【0135】

GAPDH (VIC__PL)、PCSK9 (FAM) 及び mTTR (FAM) に対する

TaqManプローブとともにThermoFisher TaqMan Fast 1-Step Master Mixを使用して、Duplex RT-qPCRを行った。GAPDHを内部対照として使用し、標的遺伝子の発現変化をビヒクル対照に対して正規化したCT法を使用して、PCSK9の相対定量(RQ)を決定した。

[実施例1]

血清安定性アッセイにおける非修飾「インクリシラン」配列のセンス鎖(SS)上の湾曲の5'対3'配置を試験する

【0136】

10% FBS又は10%ヒト血清中での2時間のインキュベーション後、SSの5'又は3'末端のいずれかに位置する湾曲を有する非修飾「インクリシラン」は、「湾曲なし」siRNAと比較して増加した標的mRNA(PCSK9)ノックダウン(KD)を示す。しかしながら、ヒト血清中での前処理後には、湾曲が5'末端に存在する場合、SSの3'末端と比較してより優れたKDが観察される。

10

【0137】

これは図1で実証されており、ヘアピン配列GCGAAGCを含有する5' SS湾曲siRNA[縞模様のバー]は、10%ヒト血清での2時間の処理後のHepG2細胞において、修飾されたインクリシランで観察された標的KD(80%)[白いバー]に匹敵する高いレベルの標的KD(85%)を維持する。同様の結果は、「反転された」湾曲ヘアピン(CGAAGCG)がSSの5'末端に配置された場合に示され得る[斑点のあるバー]。対照的に、3' SSに配置された湾曲[格子模様のバー]は、ヒト血清中での前処理後のHepG2細胞において-18.75%(標的KDの低下);65%KD(血清インキュベーションなしでの80%KDと比較)を示す。予想されたように、湾曲が付着されていない非修飾「インクリシラン」[灰色のバー]は、FBS又はヒト血清のいずれかの中での前処理後に標的KDの低下したレベルを示す;それぞれ50%及び60%KDで、KDの-26.8%及び-39%の低下に等しい。

20

[実施例2]

漸増濃度のFBSを用いた血清安定性アッセイにおける非修飾「インクリシラン」配列のセンス鎖(SS)上の湾曲の5'配置を試験する

【0138】

漸増濃度のFBS中での、37℃で2時間のインキュベーション後、SSの5'末端に湾曲が配置された非修飾「インクリシラン」配列[縞模様のバー]は、試験されたFBSの全ての濃度(10%、20%及び50%)で持続的な標的mRNA(PCSK9)ノックダウン(70~80%KD)を示し、修飾されたインクリシランで観察されたレベル(70~80%KD)[白いバー]と同等である。同様に、SSの5'末端上の「反転された」湾曲ヘアピン(CGAAGCG)は、KDの低下なしに、65~75%のKDを提供する[斑点のあるバー]。これに対して、「湾曲なし」化合物[灰色のバー]は、わずか20~50%の標的KDが血清処理後に明らかであるように、KDの最大-85%の低下を示す。

30

[実施例3]

4時間のインキュベーション期間にわたる血清安定性アッセイにおける非修飾「インクリシラン」配列のセンス鎖(SS)上の湾曲の5'配置を試験する

【0139】

10% FBS又は10%ヒト血清のいずれかの中での4時間のインキュベーション後に、SSの5'末端に位置する湾曲を有する非修飾「インクリシラン」は、それぞれ約75%の標的mRNA(PCSK9)ノックダウン(KD)及び65%KDの持続したレベルを示す[縞模様のバー]。同様に、SSの5'末端における「反転した」湾曲ヘアピン(CGAAGCG)については明らかなKDの低下は存在せず[斑点のあるバー]、修飾された「インクリシラン」と同等であり、約70%のKDが観察される[白いバー]。対照的に、湾曲の非存在[灰色のバー]は、10% FBS(45%KD)又は10%ヒト血清(35%KD)中での4時間の前処理後に、それぞれKDの-36%及び-50%の低下

40

50

に等しい、大幅により低いレベルのKDをもたらす。

[実施例4]

血清安定性アッセイにおける、PCSK9を標的とする非修飾siRNA配列(PC8-18と名付けられた配列)上の湾曲の5'対3'配置を試験する

【0140】

10% FBS又は10%ヒト血清中での2時間のインキュベーション後、センス鎖(SS)の5'末端に位置する湾曲を有するPC8-18は、SS又はASのいずれかの3'に位置する湾曲と比較して、標的mRNA(PCSK9)の優れたレベルのノックダウン(KD)を示す。これは図4に示されており、3'SSに位置する湾曲で見られる60~70%KD(血清処理なしと比較して30%KDの低下に等しい)[白地に斑点のあるバー及び格子模様のバー]と比較して、5'SS湾曲を有するPC8-18 siRNAについては持続的な標的KD(約85%)が存在する:[横の縞模様のバー及び黒地に斑点のあるバー]。同様に、湾曲が3'AS上に配置されている場合、KDの低下は6~16%であり、65~75%の標的KDをもたらす[縦の縞模様のバー]。PC8-18 siRNA上に湾曲が存在しない場合、標的KDは、FBS中での2時間のインキュベーション後にわずか35%に低下し、KDの大幅な低下(血清処置なしと比較して-63%)に相当し、ヒト血清中ではわずか25%のKD(-77%)に低下する。同様に、3'dTdTオーバーハングを含有する湾曲なしの分子は、それぞれ、FBS及びヒト血清中での前処理後に(血清処理なしと比較して)-44%及び-72%のKDレベルの低下を示す。

10

20

[実施例5]

PCSK9を標的とする非修飾siRNA化合物(PC2配列)上の湾曲の5'配置対3'配置のインビボサイレンシング効果を試験する

【0141】

各処置群について5匹のマウスの群に、ビヒクル(PBS)、化合物A(湾曲なし)、化合物G(センス鎖(SS)の5'末端上の湾曲)又は化合物H(SSの3'末端上の湾曲)のいずれかを皮下(SC)注射した。各化合物を2mg/kg又は10mg/kgのいずれかで与え、殺後、2つの時点(2日目及び7日目)で肝臓PCSK9 mRNAのレベルを測定した。

【0142】

化合物G(5'SS湾曲)は、ビヒクル対照と比較して、2及び10mg/kgで48時間後に肝臓においてPCSK9 mRNAの40%KD及び7日後に10mg/kgで30%KDをもたらす(図5A)。化合物H(3'SS湾曲)については、48時間後に、同等の肝臓標的KD、2mg/kgで約50%KD(10mg/kgでは30%KD)が見られ、7日目には有意なKDは観察されなかった(図5A)。湾曲を含有しない化合物Aは、顕著により低い標的KDを示し、2日又は7日のいずれかでの2mg/kg用量のSC注射後にサイレンシングは存在しない。10mg/kgの用量では、化合物Aは、48時間後には20%未満のKDを示し、7日後には40%を示す(図5A)。

30

[実施例6]

血清安定性アッセイ(HepG2細胞)において化合物A、G及びHを試験する

40

【0143】

SS上の5'及び3'に位置する湾曲の両方について、同様の結果が示されている。化合物G(5'SS湾曲)及び化合物H(3'SS湾曲)は、10%FBS又はヒト血清中のいずれかでの2時間のインキュベーション後に、(血清処理なしと比較して)50%超のPCSK9 mRNA KDを維持する。対照的に、2時間の血清処置後に50%からわずかに20%KDへ、化合物A(湾曲なし)について見られる標的KDの低下が存在する;図5B。

【0144】

2時間にわたって、増加する血清濃度(20%及び50%)でこれらのsiRNA化合物をさらに検証すると、化合物G(5'SS湾曲)は、ヒト血清中において、3'SSに位

50

置する湾曲（H）よりも優れた性能を示した。これは図5Cに示されており、標的 mRNA KDの持続的なレベル（約50%）は、50%ヒト血清中での2時間のインキュベーション後の化合物G [斑点のあるバー]においてのみ明瞭である。これは、その「血清なし」処理KDレベルと比較すると、Gについては、KDの低下が存在しないことに相当する。対照的に、化合物H [灰色のバー]は、KDの完全な喪失（0%）を示し、50%ヒト血清中で2時間後に、「湾曲なし」化合物A [白いバー]と全く同じように機能する。

【表1】

表1 湾曲がコンジュゲートされている Lp(a)候補 siRNA 配列の選択

<i>siRNA ID</i>		センス配列(5'-3')	アンチセンス配列(5'-3')
センス (SEQ ID NO)	アンチ センス (SEQ ID NO)		
LP(a)			
LP1 (43)	LP9 (2)	GCCCCUUAUUGUUAUACG	CGUAUAACAAUAAGGGGC
LP2 (44)	LP10 (3)	GCCCCUUAUUGUUAUACGA	UCGUAUAACAAUAAGGGGC
LP3 (44)	LP11 (4)	GCCCCUUAUUGUUAUACGA	TCGUAUAACAAUAAGGGGC
LP4 (46)	LP12 (5)	CCCCUUAUUGUUAUACGA	UCGUAUAACAAUAAGGGG
LP5 (47)	LP13 (6)	CCCUUAUUGUUAUACGA	UCGUAUAACAAUAAGGG
LP6 (48)	LP14 (7)	CCCCUUAUUGUUAUACA	UGUAUAACAAUAAGGGG
LP7 (49)	LP15 (41)	CGGUAAUGGACAGAGUUAU	AUAACUCUGUCCAUAACCG
LP8 (42)	LP16 (35)	ACAGCCCCUUAUUGUUAUACGA	CGUAUAACAAUAAGGGGC

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 湾曲がコンジュゲートされている APOC III 及び DGAT2 siRNA 配列の選択

SEQ ID NO	名称	配列
50	APOC3_01	5'-ACGGGACAGUAUUCUCAGUNA
51	APOC3_02	5'-CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA
52	APOC3_03	5'-CUGUAGGUUGCUUAAAAGGGA
53	APOC3_04	5'-CUGGAGCACCGUUAAGGACAA
54	APOC3_05	5'-UCCCAAUAAAGCUGGACAAGA
55	APOC3_06	5'-GCCCCUGUAGGUUGCUUAAA
56	APOC3_07	5'-CCCUGAAAGACUACUGGAGCA
57	APOC3_08	5'-UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C
58	APOC3_09	5'-GACCUCAAUACCCCAAGUCCA
59	APOC3_10	5'-GAGCACCGUUAAGGACAAGUU
60	APOC3_01	5'-ACGGGACAGUAUUCUCAGUNA
61	APOC3_02	5'-CCCAAUAAAGCUGGACAAGAA
62	APOC3_03	5'-CUGUAGGUUGCUUAAAAGGGA
63	APOC3_04	5'-CUGGAGCACCGUUAAGGACAA
64	APOC3_05	5'-UCCCAAUAAAGCUGGACAAGA
65	APOC3_06	5'-GCCCCUGUAGGUUGCUUAAA
66	APOC3_07	5'-CCCUGAAAGACUACUGGAGCA
67	APOC3_08	5'-UGC U U A A A A G G G A C A G U A U U C
68	APOC3_09	5'-GACCUCAAUACCCCAAGUCCA
69	APOC3_10	5'-GAGCACCGUUAAGGACAAGUUt
70	APOC3_01	5'-UCACUGAGAAUACUGUCCCGU-3'
71	APOC3_02	5'-UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG-3'
72	APOC3_03	5'-UCCCUUUUAAGCAACCUACAG-3'
73	APOC3_04	5'-UUGUCCUUAACGGUGCUCAG-3'
74	APOC3_05	5'-UCUUGUCCAGCUUUAUUGGGA-3'
75	APOC3_06	5'-UUUUAAGCAACCUACAGGGGC-3'
76	APOC3_07	5'-UGCUCAGUAGUCUUUCAGGG-3'

10

20

30

40

50

77	APOC3_08	5'-GAAUACUGUCCCUUUUAAGCA-3'
78	APOC3_09	5'-UGGACUUGGGGUAUUGAGGUC-3'
79	APOC3_10	5'-AACUUGUCCUUAACGGUGCUC-3'
80	APOC3_01	5'-UCACUGAGAAUACUGUCCCGU
81	APOC3_02	5'-UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG
82	APOC3_03	5'-UCCCUUUUAAGCAACCUACAG
83	APOC3_04	5'-UUGUCCUUAACGGUGCUCCAG
84	APOC3_05	5'-UCUUGUCCAGCUUUAUUGGGA
85	APOC3_06	5'-UUUUAAGCAACCUACAGGGGC
86	APOC3_07	5'-UGCUCAGUAGUCUUUCAGGG
87	APOC3_08	5'-GAAUACUGUCCCUUUUAAGCA
88	APOC3_09	5'-UGGACUUGGGGUAUUGAGGUC
89	APOC3_10	5'-AACUUGUCCUUAACGGUGCUC
90	DGAT2_01	5'-CUCUGUAAAUUUGGAAGUGUC
91	DGAT2_02	5'-CACCAUGAGCUAGGUGGAGUA
92	DGAT2_03	5'-UUCCUGAAGUGACAAAGGAAA
93	DGAT2_04	5'-GACCACCAGGAACUAUAUCUU
94	DGAT2_05	5'-GUUCCAGAAAUACAUUGGUUU
95	DGAT2_06	5'-AACCGCAAGGGCUUUGUGAAA
96	DGAT2_07	5'-GAGCAAGAAGUUCCAGGCAU
97	DGAT2_08	5'-CAGUAGUAGGCAUCUGGAAUG
98	DGAT2_09	5'-GUCAUGGGUGUCUGUGGGUUA
99	DGAT2_10	5'-GCUCUGUAAAUUUGGAAGUGU
100	DGAT2_01	5'-CUCUGUAAAUUUGGAAGUGUC
101	DGAT2_02	5'-CACCAUGAGCUAGGUGGAGUA
102	DGAT2_03	5'-UUCCUGAAGUGACAAAGGAAA
103	DGAT2_04	5'-GACCACCAGGAACUAUAUCUU
104	DGAT2_05	5'-GUUCCAGAAAUACAUUGGUUU
105	DGAT2_06	5'-AACCGCAAGGGCUUUGUGAAA
106	DGAT2_07	5'-GAGCAAGAAGUUCCAGGCAU
107	DGAT2_08	5'-CAGUAGUAGGCAUCUGGAAUG
108	DGAT2_09	5'-GUCAUGGGUGUCUGUGGGUUA
109	DGAT2_10	5'-GCUCUGUAAAUUUGGAAGUGU
110	DGAT2_01	5'-GACACUCCAAAUUACAGAG-3'
111	DGAT2_02	5'-UACUCCACCUAGCUCAUGGUG-3'
112	DGAT2_03	5'-UUUCCUUUGUCACUUCAGGAA-3'
113	DGAT2_04	5'-AAGAUAGUUCUUGGUGGUC-3'
114	DGAT2_05	5'-AAACCAAUGUAUUUCUGGAAC-3'
115	DGAT2_06	5'-UUUCACAAAGCCCUUGCGGUU-3'
116	DGAT2_07	5'-AUGCCUGGGAACUUCUUGCUC-3'

10

20

30

40

50

117	DGAT2_08	5'-CAUUCCAGAUGCCUACUACUG-3'
118	DGAT2_09	5'-UAACCCACAGACACCCAUGAC-3'
119	DGAT2_10	5'-ACACUUCCAAUUUACAGAGC-3'
120	DGAT2_01	5'-GACACUUCCAAUUUACAGAG
122	DGAT2_02	5'-UACUCCACCUAGCUCAUGGUG
122	DGAT2_03	5'-UUUCCUUUGUCACUUCAGGAA
123	DGAT2_04	5'-AAGAUUAUAGUUCUGGUGGUC
124	DGAT2_05	5'-AAACCAAUGUAUUUCUGGAAC
125	DGAT2_06	5'-UUUCACAAAGCCCUUGCGGUU
126	DGAT2_07	5'-AUGCCUGGGAACUUCUUGCUC
127	DGAT2_08	5'-CAUUCCAGAUGCCUACUACUG
128	DGAT2_09	5'-UAACCCACAGACACCCAUGAC
129	DGAT2_10	5'-ACACUUCCAAUUUACAGAGC

10

【表 3】

表 3 DGAT2 siRNA 配列 (SEQ ID NO 131~170)、PCSK9 SEQ ID NO:171~210 及び ApoCIII (SEQ ID NO:211~250) の選択

20

SEQ ID NO	配列	
131	GACCACCAGGAACUAUAUCUU	センス配列
132	GUUCCAGAAUACAUUGGUUU	センス配列
133	AACCGCAAGGGCUUUGUGAAA	センス配列
134	GAGCAAGAAGUCCAGGCAU	センス配列
135	CUUUGGAGAGAAUGAAGUGUA	センス配列
136	CUUCGACAAGCACAAGACCAA	センス配列
137	GCCGAUGGGUCCAGAAGAAGU	センス配列
138	CUUCACUUGGCUGGUGUUUGA	センス配列
139	CUCCUUUGGAGAGAAUGAAGU	センス配列
140	UGCCAUCCUCAUGUACAUAUU	センス配列
141	CCGCAAGGGCUUUGUGAAACU	センス配列
142	AGCAAGAAGUCCCAGGCAUA	センス配列
143	AGUGUACAAGCAGGUGAUCUU	センス配列
144	UGCUGACCACCAGGAACUAUA	センス配列
145	CCGAUGGGUCCAGAAGAAGUU	センス配列
146	UUUGGAGAGAAUGAAGUGUAC	センス配列
147	UGGCGCUACUUUCGAGACUAC	センス配列
148	AAUGCCUGUGUUGAGGGAGUA	センス配列
149	AGUUCAGAAAUACAUUGGUU	センス配列
150	CAGAAGUGAGCAAGAAGUUC	センス配列

30

40

50

151	AAGAUUAAGUUCUGGUGGUC	アンチセンス配列
152	AAACCAAUGUAUUUCUGGAAC	アンチセンス配列
153	UUUCACAAAGCCCUUGCGGUU	アンチセンス配列
154	AUGCCUGGGAACUUCUUGCUC	アンチセンス配列
155	UACACUUCAUUCUCUCCAAAG	アンチセンス配列
156	UUGGUCUUGUGCUUGUCGAAG	アンチセンス配列
157	ACUUCUUCUGGACCCAUCGGC	アンチセンス配列
158	UCAAACACCAGCCAAGUGAAG	アンチセンス配列
159	ACUUCAUUCUCUCCAAAGGAG	アンチセンス配列
160	AAUAUGUACAUGAGGAUGGCA	アンチセンス配列
161	AGUUUCACAAAGCCCUUGCGG	アンチセンス配列
162	UAUGCCUGGGAACUUCUUGCUC	アンチセンス配列
163	AAGAUCACCUGCUUGUACACU	アンチセンス配列
164	UAUAGUUCUGGUGGUCAGCA	アンチセンス配列
165	AACUUCUUCUGGACCCAUCGG	アンチセンス配列
166	GUACACUUCAUUCUCUCCAAA	アンチセンス配列
167	GUAGUCUCGAAAGUAGCGCCA	アンチセンス配列
168	UACUCCUCAACACAGGCAUU	アンチセンス配列
169	AACCAAUGUAUUUCUGGAACU	アンチセンス配列
170	GGAACUUCUUGCUCACUUCUG	アンチセンス配列
171	CCUCAUAGGCCUGGAGUUUAU	センス配列
172	AGGCCUGGAGUUUAUUCGGAA	センス配列
173	CCUCAUAGGCCUGGAGUUUA	センス配列
174	AGGUCUGGAAUGCAAAGUCAA	センス配列
175	GGCCUGGAGUUUAUUCGGA	センス配列
176	CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA	センス配列
177	CCUCACCAAGAUCUGCAUGU	センス配列
178	ACCCUCAUAGGCCUGGAGUUU	センス配列
179	CACCAGCAUACAGAGUGACCA	センス配列
180	AUCUCCUAGACACCAGCAUAC	センス配列
181	UCCUAGACACCAGCAUACAGA	センス配列
182	CUGGAGUUUAUUCGGAAAAGC	センス配列
183	GCCUGGAGUUUAUUCGGAAAA	センス配列
184	GAGGCAGAGACUGAUCCACUU	センス配列
185	UAGGCCUGGAGUUUAUUCGGA	センス配列
186	CACUUCUCUGCCAAAGAUGUC	センス配列
187	AUGCAAAGUCAAGGAGCAUGG	センス配列
188	GGUCAUGGUCACCGACUUCGA	センス配列

10

20

30

40

50

189	GGCAGCUGUUUUGCAGGACUG	センス配列
190	GGGCAGGUUGGCAGCUGUUUU	センス配列
191	AUAAACUCCAGGCCUAUGAGG	アンチセンス配列
192	UUCCGAAUAAACUCCAGGCCU	アンチセンス配列
193	UAAACUCCAGGCCUAUGAGGG	アンチセンス配列
194	UUGACUUUGCAUUCAGACCU	アンチセンス配列
195	UUUCCGAAUAAACUCCAGGCC	アンチセンス配列
196	UGACUUUGCAUUCAGACCU	アンチセンス配列
197	ACAUGCAGGAUCUUGGUGAGG	アンチセンス配列
198	AAACUCCAGGCCUAUGAGGGU	アンチセンス配列
199	UGGUCACUCUGUAUGCUGGUG	アンチセンス配列
200	GUAUGCUGGUGUCUAGGAGAU	アンチセンス配列
201	UCUGUAUGCUGGUGUCUAGGA	アンチセンス配列
202	GCUUUUCCGAAUAAACUCCAG	アンチセンス配列
203	UUUCCGAAUAAACUCCAGGC	アンチセンス配列
204	AAGUGGAUCAGUCUCUGCCUC	アンチセンス配列
205	UCCGAAUAAACUCCAGGCCUA	アンチセンス配列
206	GACAUCUUUGGCAGAGAAGUG	アンチセンス配列
207	CCAUGCUCUUGACUUUGCAU	アンチセンス配列
208	UCGAAGUCGGUGACCAUGACC	アンチセンス配列
209	CAGUCCUGCAAAACAGCUGCC	アンチセンス配列
210	AAAACAGCUGCCAACCUGCCC	アンチセンス配列
211	CUGGAGCACCGUUAAGGACAA	センス配列
212	CCUGAAAGACUACUGGAGCA	センス配列
213	GAGCACCGUUAAGGACAAGUU	センス配列
214	ACUGGAGCACCGUUAAGGACA	センス配列
215	CCUGAAAGACUACUGGAGCAC	センス配列
216	AAGACUACUGGAGCACCGUUA	センス配列
217	CAGUUCUUGAAAGACUACUG	センス配列
218	GGUGACCGAUGGCUUCAGUUC	センス配列
219	GGGUGACCGAUGGCUUCAGUU	センス配列
220	ACUACUGGAGCACCGUUAAGG	センス配列
221	GACUACUGGAGCACCGUUAAG	センス配列
222	UUCAGUUCUUGAAAGACUAC	センス配列
223	GUUCCUGAAAGACUACUGGA	センス配列
224	UGGAGCACCGUUAAGGACAAG	センス配列
225	CGCCACCAAGACCGCCAAGGA	センス配列
226	GGGCUGGGUGACCGAUGGCUU	センス配列

10

20

30

40

50

227	GCCACCAAGACCGCCAAGGAU	センス配列
228	AGACUACUGGAGCACCGUUA	センス配列
229	CCACCAAGACCGCCAAGGAUG	センス配列
230	UCCUGAAAGACUACUGGAGC	センス配列
231	UUGUCCUUAACGGUGCUCAG	アンチセンス配列
232	UGCUCAGUAGUCUUUCAGGG	アンチセンス配列
233	AACUUGUCCUUAACGGUGCUC	アンチセンス配列
234	UGUCCUUAACGGUGCUCAGU	アンチセンス配列
235	GUGCUCAGUAGUCUUUCAGG	アンチセンス配列
236	UAACGGUGCUCAGUAGUCUU	アンチセンス配列
237	CAGUAGUCUUUCAGGGAACUG	アンチセンス配列
238	GAACUGAAGCCAUCGGUCACC	アンチセンス配列
239	AACUGAAGCCAUCGGUCACCC	アンチセンス配列
240	CCUUAACGGUGCUCAGUAGU	アンチセンス配列
241	CUUAACGGUGCUCAGUAGUC	アンチセンス配列
242	GUAGUCUUUCAGGGAACUGAA	アンチセンス配列
243	UCCAGUAGUCUUUCAGGGAAC	アンチセンス配列
244	CUUGUCCUUAACGGUGCUCCA	アンチセンス配列
245	UCCUUGGCGGUCUUGGUGGCG	アンチセンス配列
246	AAGCCAUCGGUCACCCAGCCC	アンチセンス配列
247	AUCCUUGGCGGUCUUGGUGGC	アンチセンス配列
248	UUAACGGUGCUCAGUAGUCU	アンチセンス配列
249	CAUCCUUGGCGGUCUUGGUGG	アンチセンス配列
250	GCUCCAGUAGUCUUUCAGGGA	アンチセンス配列

10

20

30

【表 4】

表 4 インビトロで HEPG2 細胞中での APOC3 及び DGAT2 遺伝子発現のサイレンシングにおいて使用される siRNA 対

名称	センス	アンチセンス
APOC3_01	5'-ACGGGACAGUAUUCUCAGUNAtcacctcatcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 401)	5'-UCACUGAGAAUACUGUCCCGU-3'(SEQ ID NO 70)
APOC3_02	5'-CCCAAUAAAGCUGGACAAGAAAtcacctcatcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 402)	5'-UUCUUGUCCAGCUUUAUUGGG-3'(SEQ ID NO 71)
APOC3_03	5'-CUGUAGGUUGCUUAAAAGGGAtcacctcatcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 403)	5'-UCCCUUUUAAGCAACCUACAG-3'(SEQ ID NO 72)
APOC3_04	5'-CUGGAGCACCGUUAAGGACAAAtcacct	5'-UUGUCCUUAACGGUGCUC

40

50

	catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 404)	AG-3'(SEQ ID NO 73)
APOC3_05	5'- UCCCAAUAAAGCUGGACAAGAtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 405)	5'- UCUUGUCCAGCUUUAUUGG GA-3'(SEQ ID NO 74)
APOC3_06	5'- GCCCCUGUAGGUUGC UAAAAAtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 406)	5'- UUUUAAGCAACCUACAGGG GC-3'(SEQ ID NO 75)
APOC3_07	5'- CCCUGAAAGACUACUGGAGCAtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 407)	5'- UGCUCAGUAGUCUUUCAG GG-3'(SEQ ID NO 76)
APOC3_08	5'- UGCUUAAAAGGGACAGUAUUCtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 408)	5'- GAAUACUGUCCCUUUUAAG CA-3'(SEQ ID NO 77)
APOC3_09	5'- GACCUCAAUACCCCAAGUCCAtcacct atcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 409)	5'- UGGACUUGGGGUUUUGAGG UC-3'(SEQ ID NO 78)
APOC3_10	5'- GAGCACCGUUAAGGACAAGUUtcaacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 410)	5'- AACUUGUCCUUAACGGUGC UC-3'(SEQ ID NO 79)
DGAT2_01	5'- CUCUGUAAAUUUGGAAGUGUCtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 411)	5'- GACACUCCAAAUUUACAG AG-3'(SEQ ID NO 110)
DGAT2_02	5'- CACCAUGAGCUAGGUGGAGUAtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 412)	5'- UACUCCACCUAGCUCAUGG UG-3'(SEQ ID NO 111)
DGAT2_03	5'- UUCCUGAAGUGACAAAGGAAAtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 413)	5'- UUUCCUUUGUCACUUCAGG AA-3'(SEQ ID NO 112)
DGAT2_04	5'- GACCACCAGGAACUAUAUCUUtcaacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 414)	5'- AAGAUUAUAGUUCUGGUGG UC-3'(SEQ ID NO 113)
DGAT2_05	5'- GUUCCAGAAAUAUAUUGGUUUtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 415)	5'- AAACCAAUGUAUUUCUGGA AC-3'(SEQ ID NO 114)
DGAT2_06	5'- AACCGCAAGGGCUUUGUGAAAtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 416)	5'- UUUCACAAAGCCCUUGCGG UU-3'(SEQ ID NO 115)
DGAT2_07	5'- GAGCAAGAAGUUC CAGGCAUtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 417)	5'- AUGCCUGGGAACUUCUUGC UC-3'(SEQ ID NO 116)
DGAT2_08	5'- CAGUAGUAGGCAUCUGGAAUGtcacct catcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 418)	5'- CAUCCAGAUGCCUACUAC UG-3'(SEQ ID NO 117)
DGAT2_09	5'- GUCAUGGGUGUCUGUGGGUUAtcacc tcatcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 419)	5'- UAACCCACAGACACCCAUG AC-3'(SEQ ID NO 118)
DGAT2_10	5'- GCUCUGUAAAUUUGGAAGUGUtcacc tcatcccgcgaagc-3'(SEQ ID NO 420)	5'- ACACUCCAAAUUUACAGA GC-3'(SEQ ID NO 119)

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5

5' 湾曲について血清安定性アッセイにおいて試験された湾曲構造

siRNA14b~siRNA15-5' CR は、非修飾「インクリシラン」配列からなる
(C=湾曲;CR=反転されたヘアピン湾曲)。

siRNA35~44 は、PC8 配列からなる

siRNA A、G 及び H は、PC2 配列からなる

オリゴ名	配列
siRNA14m 「インクリシラン」	センス:5' Cm*Um*Am Gm Am Cm Cf Um Gf Um t Um Um Gm Cm Um Um Um Um Gm Um 3' (SEQ ID NO 494) アンチセンス:5' Am*Cf*Am Af Af Af Gm Cf Am Af Am Af Cm Af Gm Gf Um Cf Um Am Gm* Am* Am 3' (SEQ ID NO 495)
siRNA14b	センス (5'-3'):CUAGACCUGUtUUGCUUUUGU (SEQ ID NO 389) アンチセンス (5'-3'):ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA (SEQ ID NO 390)
siRNA15b	センス (5'-3'):CUAGACCUGUtUUGCUUUUGUtcacctcatcccggaagc (SEQ ID NO 496) アンチセンス (5'-3'):ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA (SEQ ID NO 390)
siRNA15-5' C	センス (5'-3'):cgaagcgcctactccactCUAGACCUGUtUUGCUUUUGU (SEQ ID NO 497) アンチセンス (5'-3'):ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA (SEQ ID NO 390)
siRNA15-5' CR	センス (5'-3'):ccctactccactCUAGACCUGUtUUGCUUUUGU (SEQ ID NO 498) アンチセンス (5'-3'):ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA (SEQ ID NO 390)
siRNA35	センス (5'-3'):CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA (SEQ ID NO 278 及び 262 及び 176) アンチセンス (5'-3'):UGACUUUGCAUUC CAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)
siRNA36	センス (5'-3'):CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCAdTdT (SEQ ID NO 421) アンチセンス (5'-3'):UGACUUUGCAUUC CAGACCUGdTdT (SEQ ID NO 422)
siRNA37	センス (5'-3'):CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCAdTdCdAdCdTdCdAdTdCdCdCdGdCdGdAdAdGdC (SEQ ID NO 423) アンチセンス (5'-3'):UGACUUUGCAUUC CAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)
siRNA 38	センス (5'-3'):CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA (SEQ ID NO 278 及び 262 及び 176) アンチセンス (5'-3'):UGACUUUGCAUUC CAGACCUGdTdCdAdCdCdTdCdAdTdCdCd

10

20

30

40

50

注釈：

c、g、a、t 又は dT、dG、dA、dC：DNA塩基

A、G、C、U：RNA塩基

f：2'-デオキシ-2'-フルオロ

m：2'-O-メチル

*ヌクレオチド間結合ホスホロチオアート (PS)

GalNAc

[実施例7]

(インクリシラン、PCSK9配列)

【0145】

湾曲がセンス鎖の5'末端に付着された場合 (siRNA15-5'C)、siRNA配列は、10%FBS又はヒト血清中での2時間のインキュベーション後に、化学的に修飾されたバージョン (siRNA14m) に匹敵して、標的PCSK9に対する完全なKD活性を維持した。センス鎖の3'末端の湾曲 (siRNA15b) は、HS中で部分的な保護を示した。3'末端に短い湾曲 (ヘアピン部分のみ) を有するsiRNA (siRNA15s7) 及び5'末端に短い湾曲 (ヘアピン部分のみ) を有するsiRNA (INC_03) 並びに5'末端にのみステム12ヌクレオチド部分を有するsiRNA (INC_02) は全て、25nMでHepG2中に形質移入された場合、完全な19ヌクレオチドの湾曲と比較して、KDの著しい低下を示した (表6及び7)。

【表6】

表6.

配列名	血清なしでのKD	10%FBS後のKD	10%HS後のKD	FBSでの%KD低下	HSでの%KD低下
siRNA14m	78.7	79.6	79.9	0.0	0.0
siRNA14b	82.0	51.4	59.1	37.3	28.0
siRNA15b	80.1	80.6	65.9	0.0	17.6
siRNA15-5'C	86.5	87.6	84.7	0.0	2.0
siRNA15s7	80.9	44.8	51.4	44.6	36.5

【表7】

表7.

siRNA名	血清なしでのKD	10%HSでのKD	HSでの%KD低下
siRNA14m	50.4	62.2	0.0
siRNA14b	50.1	28.7	42.8
siRNA15-5'C	50.6	58.6	0.0
INC_02	34.2	0.0	100.0
INC_03	44.7	0.0	100.0

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8.siRNA の説明

siRNA 名	説明	配列
siRNA14m	完全に化学的に修飾されたバージョン	S (5'-3') Cm*Um*Am Gm Am Cm Cf Um Gf Um t Um Um Gm Cm Um Um Um Um Gm Um AS (5'-3') Am*Cf*Am Af Af Af Gm Cf Am Af Am Af Cm Af Gm Gf Um Cf Um Am Gm* Am* Am
siRNA14b	湾曲なし	S (5'-3'): CUAGACCUGU _t UUGCUUUUGU AS (5'-3'): ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA
siRNA15b	3' S 鎖上に湾曲	S (5'-3'): CUAGACCUGU _t UUGCUUUUGU _t acctcatcccgcgaagc AS (5'-3'): ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA
siRNA15-5' C	5' S 鎖上に湾曲	S (5'-3'): cgaagcgcctactccact CUAGACCUG U _t UUGCUUUUGU AS (5'-3'): ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA
siRNA15s7	3' S 鎖上にのみヘアピン (Harpin)部分	S (5'-3'): CUAGACCUGU _t UUGCUUUUGU _g gaagc (SEQ ID NO 430) AS (5'-3'): ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA (SEQ ID NO 390)
Inc_02	12ヌクレオチドのステムのみ、ヘアピンなし	S (5'-3'): ccctactccact CUAGACCUGU _t UUGC UUUUGU (SEQ ID NO 431) AS (5'-3'): ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA (SEQ ID NO 390)
Inc_03	5' S 鎖上にヘアピン	S (5'-3'): cgaagcg CUAGACCUGU _t UUGCUU UUGU (SEQ ID NO 432) AS (5'-3'): ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA (SEQ ID NO 390)

10

20

30

40

50

【実施例 8】

(PC8-18 PCSK9配列)

【0146】

湾曲がセンス鎖の5'末端に付着された場合(PC8_05)、siRNA配列は、80%HS中での2時間のインキュベーション後に標的PCSK9に対する完全なKD活性を維持し、これは血清プレインキュベーションなしで観察されたKDレベルに匹敵した。センス鎖の3'末端の湾曲(PC8_01)は、HS中で大幅に低下した保護を与え、血清プレインキュベーションなしと比較してKDの72%の低下を示した。3'末端に短い湾曲(ヘアピン部分のみ)を有するsiRNA(PC8_03)及び5'末端に短い湾曲(ヘアピン部分のみ)を有するsiRNA(PC8_11)並びに5'末端にのみステム12ヌクレオチド部分を有するsiRNA(PC8_10)は全て、25nMでHepG

2中に形質移入された場合、完全な19ヌクレオチドの湾曲と比較して、KDの著しい低下を示した(表9)。

【表9】

表9

siRNA名	血清なしでのKD	80%HSでのKD	80%HSでの%KD低下
PC8_00	72.9	0.0	100.0
PC8_01	51.6	14.5	72.0
PC8_03	50.0	1.4	97.3
PC8_05	63.3	60.4	4.6
PC8_10	54.0	25.8	52.2
PC8_11	72.6	17.3	76.2

10

【表10】

表10

siRNA名	説明	配列
PC8_00	湾曲なし	S (5'-3'): CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA (SEQ ID NO 262、278、176) AS (5'-3'): UGACUUUGCAUCCAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)
PC8_01	3'S鎖上に湾曲	S (5'-3'): CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA tcacctc atcccgcgaagc (SEQ ID NO 433) AS (5'-3'): UGACUUUGCAUCCAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)
PC8_03	3'S鎖上に湾曲ヘアピン	S (5'-3'): CAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA gcgaag c (SEQ ID NO 434) AS (5'-3'): UGACUUUGCAUCCAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)
PC8_05	5'S鎖上に湾曲	S (5'-3'): cgaagcgcctactccact CAGGUCUGGAAU GCAAAGUCA (SEQ ID NO 435) AS (5'-3'): UGACUUUGCAUCCAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)

20

30

40

50

siRNA名	説明	配列
siRNA_A	湾曲なし	S (5'--3') AGGCCUGGAGUUUAUUCGGAA GalNAc (SEQ ID NO 172、256) AS (3'-5') ttUCCGGACCUCAAAUAAGCCUU (SEQ ID NO 252、254)
siRNA_G	5' S 鎖上に湾曲	S (5'-3') cgaagcgccctactccactA*G*GCCUGGAGUUUAUUCG GAA GalNAc (SEQ ID NO 437) AS (3'-5') t*t*UCCGGACCUCAAAUAAGCC*U*U
siRNA_H	3' S 鎖上に湾曲	S (5'-3') A*G*GCCUGGAGUUUAUUCGGAAAtcacctcatcccgga agc (SEQ ID NO 438) AS (3'-5') GalNAc t*t*UCCGGACCUCAAAUAAGCC*U*U
PC8_10	12ヌクレオチドの ステムのみ、 ヘアピンなし	S (5'-3'): ccctactccactCAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA (SEQ ID NO 436) AS (5'-3'): UGACUUUGCAUUC CAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)
PC8_11	5' S 鎖上にヘアピ ン	S (5'-3'): cgaagcgCAGGUCUGGAAUGCAAAGUCA AS (5'-3'): UGACUUUGCAUUC CAGACCUG (SEQ ID NO 272、196、334)

10

20

[実施例 9]

(化合物 G - PCSK9 配列)

【 0 1 4 7 】

湾曲がセンス鎖の 5' 末端に付着された場合 (siRNA_G)、siRNA 配列は、80% HS 中での 8 時間のインキュベーション後に、血清ブレインキュベーションなしで観察された KD のレベルに匹敵して、PCSK9 に対する完全な KD 活性を維持した (表 11)。対照的に、siRNA_A (湾曲なし) 又は siRNA_H (センス鎖の 3' 末端の湾曲) は、25 nM で HepG2 中に形質移入された場合、80% HS 中で保護を示さず、それぞれ 70.8% 及び 100% の % KD の低下を示した。自由取り込みアッセイでは、siRNA_G は、10% FBS 中で培養され、100 nM の siRNA で 24、48 及び 72 時間処理された初代マウス肝細胞において、siRNA_H と比較してより良好な KD レベルを示した (表 12)。

30

【 表 11 】

表 11

40

siRNA 名	血清なしでの KD	80% HS での KD	HS での % KD 低下
siRNA_A	53.2	15.5	70.8
siRNA_G	59.5	58.5	1.7
siRNA_H	57.6	0.0	100.0

50

【表 1 2】

表 12.10%FBS 中で培養された初代マウス肝細胞における 100nM での siRNA_A、siRNA_H 及び siRNA_G の自由取り込み後の PCSK9 の KD レベル

処理からの時間	%KD siRNA_A	%KD siRNA_H	%KD siRNA_G
24 時間	0.0	0.0	15.0
48 時間	5.8	17.5	50.6
72 時間	0.0	0.0	36.5

10

[実施例 1 0]

(A p o B 配列)

【 0 1 4 8 】

マウス A p o B に対する配列を保有する合計 1 1 個の s i R N A を 2 0 % 及び 5 0 % ヒト血清に曝露し、その後、初代マウス肝細胞中に 2 5 n M で形質移入すると、センス鎖上に 5 ' 湾曲を保有する s i R N A 変異体は、総じて、3 ' 末端に湾曲を保有する s i R N A 変異体と比較して、血清への曝露後に A p o B の K D を誘導するより優れた能力を示した (表 1 3) 。

20

30

40

50

【表 1 3】

表 13.

siRNA 名	湾曲の位置	KD% 血清なし	KD 20%HS	KD 50%HS	20%HS での KD%低下	50%HS での KD%低下
TS3_1	5'SS	70.5	55.1	0.0	21.8	100.0
TS3_2	3'SS	75.4	0.0	0.0	100.0	100.0
TS3_3	3'AS	73.1	0.0	0.0	100.0	100.0
TS4_1	5'SS	64.4	9.3	8.8	85.6	86.3
TS4_2	3'SS	63.4	10.9	0.0	82.7	100.0
TS4_3	3'AS	67.9	0.0	0.0	100.0	100.0
ApoB_C10_1	5'SS	58.0	67.3	62.3	0.0	0.0
ApoB_C10_2	3'SS	52.4	0.0	38.2	100.0	27.0
ApoB_C10_3	3'AS	56.6	56.6	18.9	0.0	66.6
ApoB_C3_1	5'SS	48.1	50.9	37.6	0.0	21.7
ApoB_C3_2	3'SS	58.1	49.8	48.0	14.2	17.3
ApoB_C3_3	3'AS	54.9	41.2	0.0	25.0	100.0
ApoB_C2_1	5'SS	66.8	87.7	87.6	0.0	0.0
ApoB_C2_2	3'SS	70.9	87.1	86.8	0.0	0.0
ApoB_C2_3	3'AS	79.6	87.5	87.6	0.0	0.0
ApoB_DM2_1	5'SS	58.4	76.4	67.4	0.0	0.0
ApoB_DM2_2	3'SS	64.0	65.4	4.3	0.0	93.3
ApoB_DM2_3	3'AS	67.6	55.3	5.0	18.1	92.5
ApoB_DM3_1	5'SS	72.0	56.4	0.0	21.7	100.0
ApoB_DM3_2	3'SS	75.4	0.0	0.0	100.0	100.0
ApoB_DM3_3	3'AS	82.7	0.0	0.0	100.0	100.0
ApoB_DM5_1	5'SS	51.6	63.7	73.4	0.0	0.0
ApoB_DM5_2	3'SS	59.5	0.0	0.0	100.0	100.0
ApoB_DM5_3	3'AS	55.7	74.9	78.4	0.0	0.0
ApoB_DM13_1	5'SS	84.8	87.2	49.1	0.0	42.1
ApoB_DM13_2	3'SS	88.6	50.3	45.6	43.3	48.6
ApoB_DM13_3	3'AS	87.0	41.3	23.7	52.6	72.7
ApoB_DM18_1	5'SS	81.8	70.8	50.9	13.4	37.8
ApoB_DM18_2	3'SS	83.4	80.0	36.2	4.1	56.6
ApoB_DM18_3	3'AS	86.8	32.4	7.8	62.6	91.0
ApoB_DM19_1	5'SS	60.0	1.7	0.0	97.1	100.0
ApoB_DM19_2	3'SS	68.6	0.0	0.0	100.0	100.0
ApoB_DM19_3	3'AS	74.4	0.0	0.0	100.0	100.0

10

20

30

40

50

【表 1 4】

ApoB 配列表 14

siRNA 名	説明	配列
TS3_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactUAGACUUCUGAAUAAC*U *A (SEQ ID NO 439) AS (5'-3'):U*A*GUUAUUCAGGAAGUCUA*U*U (SEQ ID NO 440)
TS3_2	3'センス	S (5'-3'): U*A*GACUUCUGAAUAACUAtcacctcatcccgcgaa gc(SEQ ID NO 441) AS (5'-3'):U*A*GUUAUUCAGGAAGUCUA*U*U (SEQ ID NO 440)
TS3_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):U*A*GACUUCUGAAUAAC*U*A (SEQ ID NO 442) AS (5'-3'): U*A*GUUAUUCAGGAAGUCUA*U*Utcacctcatccc gcgaagc (SEQ ID NO 443)
TS4_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactUCAUCACACUGAAUACC*A* A (SEQ ID NO 444) AS (5'-3'):U*U*GGUAUUCAGUGUGAUGA*U*U (SEQ ID NO 445)
TS4_2	3'センス	S (5'-3'): U*C*AUCACACUGAAUACCAAtcacctcatcccgcgaa gc (SEQ ID NO 446) AS (5'-3'):U*U*GGUAUUCAGUGUGAUGA*U*U (SEQ ID NO 445)
TS4_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):U*C*AUCACACUGAAUACC*A*A (SEQ ID NO 447) AS (5'-3'): U*U*GGUAUUCAGUGUGAUGA*U*Utcacctcatccc gcgaagc(SEQ ID NO 448)
ApoB_C10_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactGUCAUCACACUGAAUACCA *A*U (SEQ ID NO 449) AS (5'-3'): A*U*UGGUAUUCAGUGUGAUGAC*U*U(SEQ ID NO 450)
ApoB_C10_2	3'センス	S (5'-3'): G*U*CAUCACACUGAAUACCAUtcacctcatcccgcg aagc (SEQ ID NO 451) AS (5'-3'): A*U*UGGUAUUCAGUGUGAUGAC*U*U(SEQ ID NO 452)

10

20

30

40

50

ApoB_C10_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):G*U*CAUCACACUGAAUACCA*A*U (SEQ ID NO 453) AS (5'-3'): A*U*UGGUAUUCAGUGUGAUGAC*U*Utcacctcat cccgcgaagc (SEQ ID NO 452)	
ApoB_C3_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactGGUGUAUGGCUUCAACCCU *G*A (SEQ ID NO 454) AS (5'- 3'):U*C*AGGGUUGAAGCCAUAACACC*U*U(SEQ ID NO 455)	
ApoB_C3_2	3'センス	S (5'-3'): G*G*UGUAUGGCUUCAACCCUGAtcacctcatcccgc gaagc (SEQ ID NO 456) AS (5'- 3'):U*C*AGGGUUGAAGCCAUAACACC*U*U(SEQ ID NO 455)	10
ApoB_C3_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):G*G*UGUAUGGCUUCAACCCU*G*A (SEQ ID NO 457) AS (5'-3'): U*C*AGGGUUGAAGCCAUAACACC*U*Utcacctcat cccgcgaagc(SEQ ID NO 458)	
ApoB_C2_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactCACCAACUUCUUCACGAG *U*C (SEQ ID NO 459) AS (5'-3'): G*A*CUCGUGGAAGAAGUUGGUG*U*U(SEQ ID NO 460)	20
ApoB_C2_2	3'センス	S (5'-3'): C*A*CCAACUUCUUCACGAGUctcacctcatcccgcg aagc (SEQ ID NO 461) AS (5'-3'): G*A*CUCGUGGAAGAAGUUGGUG*U*U(SEQ ID NO 460)	
ApoB_C2_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):C*A*CCAACUUCUUCACGAG*U*C (SEQ ID NO 462) AS (5'-3'): G*A*CUCGUGGAAGAAGUUGGUG*U*Utcacctcat cccgcgaagc(SEQ ID NO 463)	
ApoB_DM2_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactAGGCAGAGCUAGUGGCA*A* A(SEQ ID NO 464) AS (5'-3'): U*U*UGCCACUAGCUCUGCCU*U*U(SEQ ID NO 465)	30
ApoB_DM2_2	3'センス	S (5'-3'): A*G*GCAGAGCUAGUGGCAAAtcacctcatcccgcgaa gc(SEQ ID NO 466) AS (5'-3'): U*U*UGCCACUAGCUCUGCCU*U*U(SEQ ID NO 465)	
ApoB_DM2_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):A*G*GCAGAGCUAGUGGCA*A*A(SEQ ID NO 467) AS (5'-3'): U*U*UGCCACUAGCUCUGCCU*U*Utcacctcatccc gcgaagc(SEQ ID NO 468)	40

ApoB_DM3_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactGAGCAAUCUCUCAAU*A* A(SEQ ID NO 469) AS (5'-3'): U*U*AUUGAAGAGAUUUGCUC*U*U(SEQ ID NO 470)
ApoB_DM3_2	3'センス	S (5'-3'): G*A*GCAAUCUCUCAAUAAtcacctcatcccgcgaa gc(SEQ ID NO 471) AS (5'-3'): U*U*AUUGAAGAGAUUUGCUC*U*U(SEQ ID NO 470)
ApoB_DM3_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):G*A*GCAAUCUCUCAAU*A*A(SEQ ID NO 472) AS (5'-3'): U*U*AUUGAAGAGAUUUGCUC*U*Utcacctcatccc gcgaagc(SEQ ID NO 473)
ApoB_DM5_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactCCACAAAUGUCUACAGC*A* A(SEQ ID NO 474) AS (5'-3'): U*U*GUCUGUAGACAUUUGUGG*U*U(SEQ ID NO 475)
ApoB_DM5_2	3'センス	S (5'-3'): C*C*ACAAAUGUCUACAGCAAAtcacctcatcccgcgaa gc(SEQ ID NO 476) AS (5'-3'): U*U*GUCUGUAGACAUUUGUGG*U*U(SEQ ID NO 475)
ApoB_DM5_3	3'アンチセンス	S (5'-3'):C*C*ACAAAUGUCUACAGC*A*A(SEQ ID NO 477) AS (5'- 3'):U*U*GUCUGUAGACAUUUGUGG*U*Utcacctca tcccgcgaagc (SEQ ID NO 478)
ApoB_DM13_ 1	5'センス	S (5'-3'): cgaagcgcctactccactGAAACAGGCUUGAAAGA*A* U(SEQ ID NO 479) AS (5'-3'): A*U*UCUUUCAAGCCUGUUUC*U*U(SEQ ID NO 480)
ApoB_DM13_ 2	3'センス	S (5'- 3'):G*A*AACAGGCUUGAAAGAAUtcacctcatcccgc gaagc(SEQ ID NO 481) AS (5'-3'): A*U*UCUUUCAAGCCUGUUUC*U*U(SEQ ID NO 480)
ApoB_DM13_ 3	3'アンチセンス	S (5'-3'):G*A*AACAGGCUUGAAAGA*A*U(SEQ ID NO 482) AS (5'- 3'):A*U*UCUUUCAAGCCUGUUUC*U*Utcacctca

10

20

30

40

50

		tcccgcgaagc(SEQ ID NO 483)	
ApoB_DM18_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagegcctactccactGAGAGAAAUCGAAGAGG*A*A (SEQ ID NO 484) AS (5'-3'): U*U*CCUCUUCGAUUUCUCUC*U*U(SEQ ID NO 485)	
ApoB_DM18_2	3'センス	S (5'-3'): G*A*GAGAAAUCGAAGAGGAAtcacctcatcccgcgaagc (SEQ ID NO 486) AS (5'-3'): U*U*CCUCUUCGAUUUCUCUC*U*U(SEQ ID NO 485)	10
ApoB_DM18_3	3'アンチセンス	S (5'-3'): G*A*GAGAAAUCGAAGAGG*A*A(SEQ ID NO 487) AS (5'-3'): U*U*CCUCUUCGAUUUCUCUC*U*Utcacctcateccgcgaagc (SEQ ID NO 488)	20
ApoB_DM19_1	5'センス	S (5'-3'): cgaagegcctactccactAGUUAUAGUCCGUGAGC*U*A (SEQ ID NO 489) AS (5'-3'): U*A*GCUCACGGACUAUAACU*U*U(SEQ ID NO 490)	
ApoB_DM19_2	3'センス	S (5'-3'): A*G*UUAUAGUCCGUGAGCUAtcacctcatcccgcgaagc (SEQ ID NO 491) AS (5'-3'): U*A*GCUCACGGACUAUAACU*U*U(SEQ ID NO 490)	30
ApoB_DM19_3	3'アンチセンス	S (5'-3'): A*G*UUAUAGUCCGUGAGC*U*A(SEQ ID NO 492) AS (5'-3'): U*A*GCUCACGGACUAUAACU*U*Utcacctcatcccgcgaagc (SEQ ID NO 493)	

【表 15】

表 15

SEQ ID NO	
1	auaacucugu ccauuaccg
8	ucguauaaca auaggggc
9	gauaacucug uccauuacc
10	auaacucugu ccauuacca

40

50

11	uaacucuguc cauuaccgu
12	agaaugugcc ucgauaacu
13	auaacucugu ccaucacca
14	auaacucugu ccaucaccu
15	uaacucuguc cauuaccu
16	augugccuug auaacucug
17	aguuggugcu gcuucagaa
18	aaauaggggc ugccacagg
19	uaacucuguc caucaccu
20	augagccucg auaacucug
21	aaugagccuc gauaacucu
22	aaugcuucca ggacauuuc
23	acaguggugg agaauuguc
24	guaugugccu cgauaacuc
25	ucgauaacuc uguccauc
26	ugucacugga cauuguguc
27	cugggaucca ugguguaac
28	agaugaccaa gcuuggcag
29	uuaacucugu ccauuaccg
30	uuaacucugu ccauuacce
31	uuaacucugu ccauuaccu
32	auaacucugu ccauuacce
33	auaacucugu ccauuaccu
34	uuaacucugu ccauuacca
36	ucguauaaca auaaaggggc
37	tcguauaaca auaaaggggc
38	ucguauaaca auaaagggg
39	ucguauaaca auaaagg
40	uguauaaca uaagggg
45	gccccuauu guuauacga
251	tcacctcadc ccggaagc
255	ccucauaggc cuggaguuaa u
257	ccucauagg ccuggaguua a
258	accucauag gccuggaguua u
259	uagggcugga guuuauucgg a
260	aggucuggaa ugcaaguca a
261	ggccuggagu uuauucggaa a

10

20

30

40

50

263	ccucaccaag auccugcaug u
264	caccagcaua cagagugacc a
265	auaaacucca ggccuauagag g
266	uuccgaauaa acuccaggcc u
267	uaaacuccag gccuauagagg g
268	aaacuccagg ccuauagaggg u
269	uccgaauaaa cuccaggccu a
270	uugacuuugc auuccagacc u
271	uuuccgaaua aacuccaggc c
273	acaugcagga ucuuggugag g
274	uggucacucu guaucuggu g
275	agcaagcaga cauuuaucu u
276	aggucuggaa ugcaaaguca a
277	ggccuggagu uuauucggaa a
279	cccaagcaag cagacauuuu u
280	ccucaccaag auccugcaug u
281	uuuucuagac cuguuuugcu u
282	acccaagcaa gcagacauuu a
283	caccagcaua cagagugacc a
284	auucuggguu uuguagcau u
285	aucuccuaga caccagcau c
286	uccuagacac cagcauacag a
287	gacauuuauc uuugggucu g
288	uaucugggu uuuguagcau u
289	cuggaguuuu uucggaaaag c
290	gccuggagu uauucggaaa a
291	gaggcagaga cugauccacu u
292	aagcaagcag acauuuaucu u
293	uagaccuguu uugcuuuugu a
294	uuugcuuuug uaacuugaag a
295	cacuucucug ccaaagaugu c
296	uugcuuuugu aacuugaaga u
297	augcaaaguc aaggagcaug g
298	cccaccaag caagcagaca u
299	ggguaacagu gaggcuggga a
300	ggucaugguc accgacuucg a
301	ggcagcuguu uugcaggacu g

10

20

30

40

50

302	gggcagguug gcagcuguuu u
303	uugaagauau uuauucuggg u
304	uggcagcugu uuugcaggac u
305	ccggggauac cucaccaaga u
306	acugauccac uucucugcca a
307	auccacuucu cugccaaaga u
308	acuucucugc caaagauguc a
309	gucuggaaug caaagucaag g
310	cuucucugcc aaagauguca u
311	gaguugaggc agagacugau
312	gaccuguuuu gcuuuuguaa c
313	cggggauacc ucaccaagau c
314	uuucuagacc uguuuugcuu u
315	ggucuggaau gcaaagucaa g
316	uaucccuag acaccagcau a
317	agguuggcag cuguuuugca g
318	aacuuuucua gaccuguuuu g
319	cuuuucuaga ccuguuuuge u
320	uccacuucuc ugccaaagau g
321	uggaguuuau ucggaaaagc c
322	ggcagguugg cagcuguuuu g
323	uggaggugua ucuccuagac a
324	gucaucaaug aggccugguu c
325	uucuagaccu guuuugcuuu u
326	uucuggguuu uguagcauuu u
327	gagacugauc cacuucucug c
328	agucaaggag cauggaauc c
329	aucuuuuggg ucuguccucu c
330	caccaagca agcagacauu u
331	aaagauaaau gucugcuugc u
332	uugacuugc auuccagacc u
333	uuuccgaaua aacuccaggc c
335	auaaaugucu gcuugcuugg g
336	acaugcagga ucuuggugag g
337	aagcaaaaca ggucuagaaa a
338	uaaaugucug cuugcuuggg u
339	uggucacucu guauncuggu g
340	aaaugcuaca aaaccagaa u
341	guauncuggu gucuaggaga u

10

20

30

40

50

342	ucuguauugcu ggugucuagg a
343	cagacccaaa agauaaaugu c
344	aaugcuacaa aaccagaau a
345	gcuuuuccga auaaacucca g
346	uuuuccgaau aaacuccagg c
347	aaguggauca gucucugccu c
348	aagauaaaug ucugcuugcu u
349	uacaaaagca aaacaggucu a
350	ucuucaaguu acaaaaagcaa a
351	gacaucuug gcagagaagu g
352	aucuucaagu uacaaaagca a
353	ccaugcuccu ugacuuugca u
354	augucugcuu gcuugggugg g
355	uucccagccu cacuguuacc c
356	ucgaagucgg ugaccaugac c
357	caguccugca aaacagcugc c
358	aaaacagcug ccaaccugcc c
359	accagaaua aaauucuua a
360	aguccugcaa aacagcugcc a
361	aucuugguga gguaucuccg g
362	uuggcagaga aguggaucag u
363	aucuuuggca gagaagugga u
364	ugacaucuuu ggcagagaag u
365	ccuugacuuu gcauuccaga c
366	augacaucuu uggcagagaa g
367	gaucagucuc ugccucaacu c
368	guuacaaaag caaacaggu c
369	gaucuuggug agguaucccc g
370	aaagcaaac aggucuagaa a
371	cuugacuuug cauuccagac c
372	uauugcuggug ucuaggagau a
373	cugcaaaaca gcugccaacc u
374	caaacaggu cuagaaaagu u
375	agcaaacag gucuagaaaa g
376	caucuuggc agagaagugg a
377	ggcuuuuccg aauaaacucc a
378	caaacagcu gccaaccugc c
379	ugucuaggag auacaccucc a
380	gaaccaggcc ucauugauga c
381	aaaagcaaaa caggucuaga a

10

20

30

40

50

382	aaaaugcuac aaaaccaga a
383	gcagagaagu ggaucagucu c
384	gggauuccau gcuccuugac u
385	gagaggacag acccaaaaga u
386	aaaugucugc uugcuugggu g
387	tcacctcacc cgcgaage
388	agcgacgtcg aggcgtcat gttgcaggc gggcgccgcc gttcagttca gggtctgagc 60
	ctggaggagt gagccaggca gtgagactgg ctggggcggg cggggacgcg tcgttgacgc 120
	agcggctccc agctcccage caggattccg cgcgcccctt cacgcgccct gctcctgaac 180
	ttcagctcct gcacagtctt cccaccgca aggctcaagg cggcccgggc gtggaccgcg 240
	caaggcctct aggtctcttc gccaggacag caacctctcc cctggccctc atgggcaccg 300
	tcagctccag gcggctctgg tggccgctgc cactgctgct gctgctgctg ctgctcctgg 360
	gtccccgggg cgcctgtgag caggaggacg aggacggcga ctacgaggag ctggtgctag 420
	ccttgcttc cgaggaggac ggccctggccg aagcaccgca gcacggaacc acagccacct 480
	tccaccgctg cgccaaggat ccgtggaggt tgccctggcac ctacgtggtg gtgctgaagg 540
	aggagaccca cctctgcag tcagagcgca ctgcccgcg cctgcaggcc caggctgccc 600
	gccggggata cctaccaag atcctgcatg tcttccatgg cttttctctt ggcttctg 660
	tgaagatgag tggcgacctg ctggagctgg cttgaagtt gcccctgtc gactacatcg 720
	aggaggactc ctctgtcttt gccagagca tcccgtggaa cctggagcgg attaaccctc 780
	caaggatccg ggcgatgaa taccagcccc ccgacggagg cagcctggtg gaggtgtatc 840
	tcctagacac cagcatacag agtgaccacc gggaaatcga gggcagggtc atggtcaccg 900
	acttcgagaa tgtgcccag gaggacggga cccgcttcca cagacaggcc agcaagtgtg 960
	acagtcattg caccacactg gcaggggtgg tcagcgcccg ggatgccggc gtggccaagg 1020
	gtgccagcat gcgcagcctg cgcgtgctca actgccaagg gaagggcacg gttagcggca 1080
	ccctcatagg cctggagttt attcggaaaa gccagctggt ccagcctgtg gggccaactg 1140
	tgggtgctgct gccctggcg ggtgggtaca gccgctctt caacgcgcc tgccagcgcc 1200
	tggcgagggc tggggtcgtg ctggtcaccg ctgccggcaa cttccgggac gatgctgccc 1260
	tctactcccc agcctcagct cccgaggtea tcacagtgg ggcaccaat gccaagacc 1320
	agccggtgac cctggggact ttggggacca actttggccg ctgtgtggac ctcttgccc 1380

10

20

30

40

50

caggggagga	catcattggt	gcctccagcg	actgcagcac	ctgctttgtg
tcacagagtg	1440			
ggacatcaca	ggctgctgcc	cacgtggctg	gcattgcagc	catgatgctg
tctgccgagc	1500			
cggagctcac	cctggccgag	ttgaggcaga	gactgatcca	cttctctgcc
aaagatgtca	1560			
tcaatgaggc	ctggttcctt	gaggaccagc	gggtactgac	ccccaacctg
gtggccgccc	1620			
tgcccccaag	cacccatggg	gcaggttggc	agctgttttg	caggactgta
tggtcagcac	1680			
actcggggcc	tacacggatg	gccacagccg	tcgcccgtg	cgccccagat
gaggagctgc	1740			
tgagctgctc	cagtttctcc	aggagtggga	agcggcgggg	cgagcgcgat
gaggcccaag	1800			
ggggcaagct	ggtctgccgg	gcccacaacg	cttttggggg	tgagggtgtc
tacgccattg	1860			
ccaggtgctg	cctgctaccc	caggccaact	gcagcgtcca	cacagctcca
ccagctgagg	1920			
ccagcatggg	gaccctgttc	cactgccacc	aacagggcca	cgctctcaca
ggctgcagct	1980			
cccactggga	ggtggaggac	cttggcacc	acaagccggc	tgtgctgagg
ccacgaggtc	2040			
agcccaacca	gtcctgtggc	cacagggagg	ccagcatcca	cgcttctctc
tgccatgccc	2100			
caggtctgga	atgcaaagtc	aaggagcatg	gaatcccggc	ccctcaggag
caggtgaccg	2160			
tggcctgcga	ggagggctgg	accctgactg	gctgcagtgc	cctccctggg
acctcccacg	2220			
tcctgggggc	ctacgccgta	gacaacacgt	gtgtagtcag	gagccgggac
gtcagcacta	2280			
caggcagcac	cagcgaaggg	gccgtgacag	ccgttgccat	ctgctgccgg
agccggcacc	2340			
tggcgaggc	ctcccaggag	ctccagtgc	agccccatcc	caggatgggt
gtctggggag	2400			
ggtcaagggc	tggggctgag	ctttaaagt	gttccgactt	gtcctctct
cagcctcca	2460			
tggcctggca	cgaggggatg	gggatgcttc	cgctttccg	gggctgctgg
cctggccctt	2520			
gagtggggca	gcctccttgc	ctggaactca	ctcactctgg	gtgcctctc
cccaggtgga	2580			
ggtgccagga	agtcctctcc	ctcactgtgg	ggcatttac	cattcaaaaa
ggtcagactg	2640			
tgctcgggtg	ctgccagctg	ctccaatgt	gccgatgtcc	gtgggcagaa
tgacttttat	2700			
tgagctcttg	ttccgtgcca	ggcattcaat	cctcaggctt	ccaccaagga
ggcaggatc	2760			
ttccatgga	taggggaggg	ggcggtaggg	gctgcaggga	caaacatcgt
tgggggggtga	2820			
gtgtgaaagg	tgctgatggc	cctcatctcc	agctaactgt	ggagaagccc
ctgggggctc	2880			
cctgattaat	ggaggcttag	ctttctggat	ggcatctagc	cagaggctgg
agacaggtgc	2940			
gccccgggtg	gtcacaagct	gtgccttggg	ttcctgagcc	acctttactc
3000				tgetctatgc
caggctgtgc	tagcaaacacc	caaaggtggc	ctgccccggg	ccatcaccta

10

20

30

40

50

	ggactgactc 3060 ggcagtgtgc agtgggtgcat gcactgtctc agccaaccgc ctccactacc cggcagggtgta 3120 cacattcgca ccctacttc acagaggaag aaacctggaa ccagaggggg cgtgcctgcc 3180 aagctcacac agcaggaact gagccagaaa cgcagattgg gctggctctg aagccaagcc 3240 tcttctact tcacccggct gggctcctca tttttacggg taacagtgag gctgggaagg 3300 ggaacacaga ccaggaagct cggtgagtga tggcagaacg atgcctgcag gcatggaact 3360 ttttcgtta tcacccaggc ctgattcact ggctggcgg agatgcttct aagcatggt 3420 cgggggagag ggccaacaac tgtcctcct tgagcaccag cccacccaa gcaagcagac 3480 atttatcttt tgggtctgtc ctctctgttg ctttttaca gccaaacttt ctagacctgt 3540 tttgcttttg taacttgaag atatttattc tgggttttgt agcattttta ttaatatggt 3600 gactttttaa aataaaaaca acaaacgtt gtcttaa	
391	gucaucacac ugaauaccaa u	
392	auugguauuc agugugauga cac	
393	uugauguguu uagucgcua u	
394	uagcgacuaa acacaucaau u	
395	cuacacaaau cagegauuu	
396	aaaucgcuga uuuguguag	
397	uaaggcuaug aagagauact t	
398	aaguaucucu ucauagccuu a	
399	acaaaagcaa aacaggucua gaa	
400	gcgaagcccc tactccact	
427	cgaagcgecc tactccactu gacuuugcau uccagaccug	
473	uuauugaaga gauuugcucu utcacctcat cccgcgaage	
474	cgaagcgecc tactccacte cacaaauguc uacagcaa	
475	uugcuguaga cauuuguggu u	
499	GUCAUCACACUGAAUACCA*A*U	
500	G*U*CAUCACACUGAAUACCAAU	
501	A*U*UGGUAUUCAGUGUGAUGAC*U*U	
502	GGUGUAUGGCUUCAACCCU*G*A	
503	G*G*UGUAUGGCUUCAACCCUGA	
504	U*C*AGGGUUGAAGCCAUAACACC*U*U	
505	CACCAACUUCUCCACGAG*U*C	

10

20

30

40

50

506	C*A*CCAACUUCUCCACGAGUC
507	G*A*CUCGUGGAAGAAGUUGGUG*U*U
508	AGGCAGAGCUAGUGGCA*A*A
509	A*G*GCAGAGCUAGUGGCAAA
510	U*U*UGCCACUAGCUCUGCCU*U*U
511	GAGCAAAUCUCUCAAU*A*A
512	G*A*GCAAAUCUCUCAAUAA
513	U*U*AUUGAAGAGAUUUGCUC*U*U
514	CCACAAAUGUCUACAGC*A*A
515	C*C*ACAAAUGUCUACAGCAA(
516	U*U*GCUGUAGACAUUUGUGG*U*U
517	GAAACAGGCUUGAAAGA*A*U
518	G*A*AACAGGCUUGAAAGAAU
519	A*U*UCUUUCAAGCCUGUUUC*U*U
520	GAGAGAAAUCGAAGAGG*A*A
521	G*A*GAGAAAUCGAAGAGGAA
522	U*U*CCUCUUCGAUUUCUCUC*U*U
523	AGUUAUAGUCCGUGAGC*U*A
524	A*G*UUAUAGUCCGUGAGCUA
525	U*A*GCUCACGGACUAUAACU*U*U

10

20

参考文献

【0149】

Nair, J. K., Willoughby, J. L., Chan, A., Charisse, K., Alam, M. R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kel'in, A. V., Milstein, S. and Tanuja, N., 2014. Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *Journal of the American Chemical Society*, 136(49), pp. 16958 - 16961.

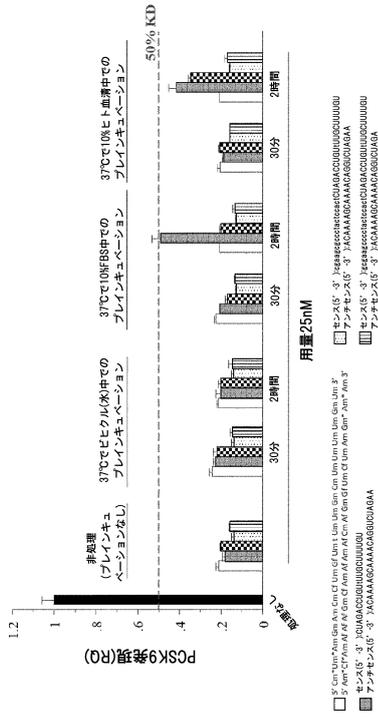
30

Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J. and John, M., 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), p. 173

40

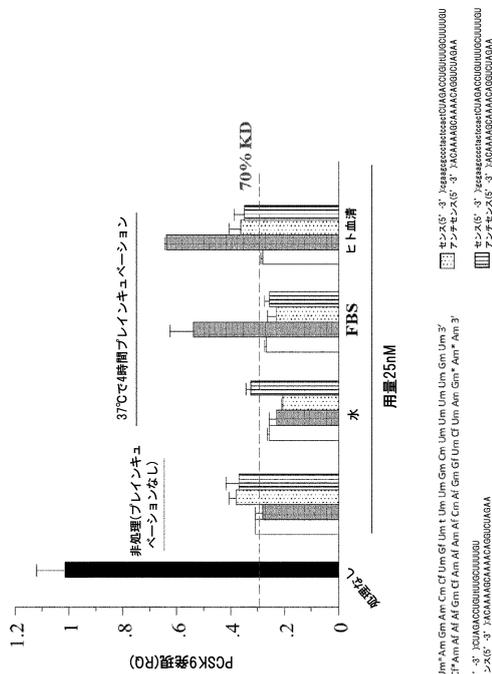
【 図 面 】
【 図 1 】

Figure 1



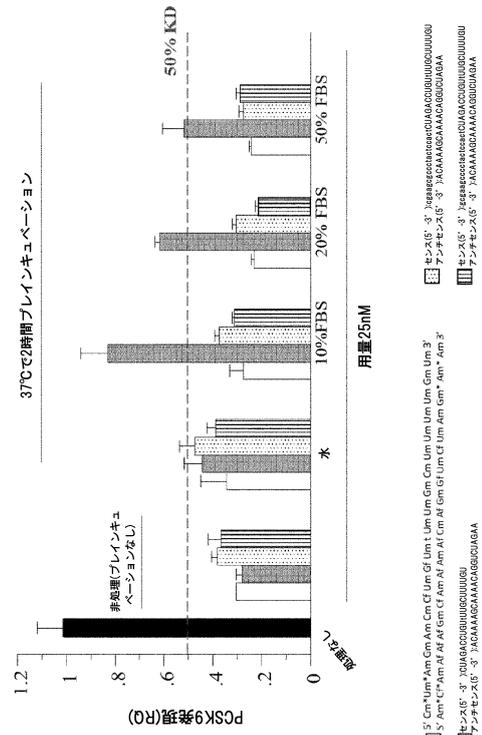
【 図 3 】

Figure 3



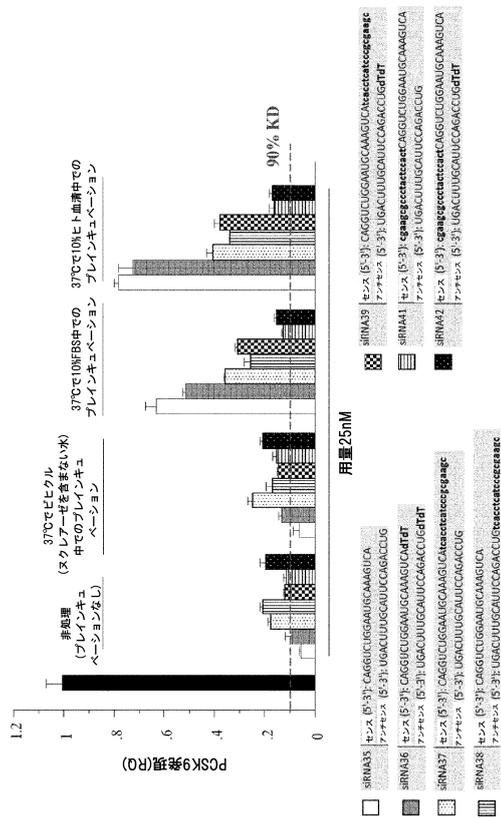
【 図 2 】

Figure 2



【 図 4 】

Figure 4



10

20

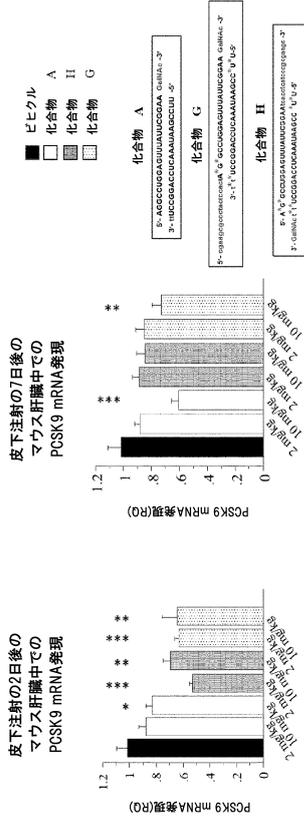
30

40

50

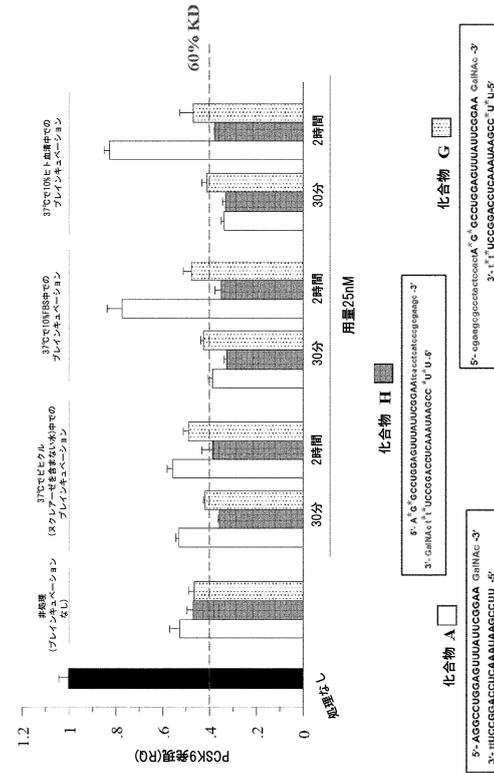
【 図 5 A 】

Figure 5A



【 図 5 B 】

Figure 5B

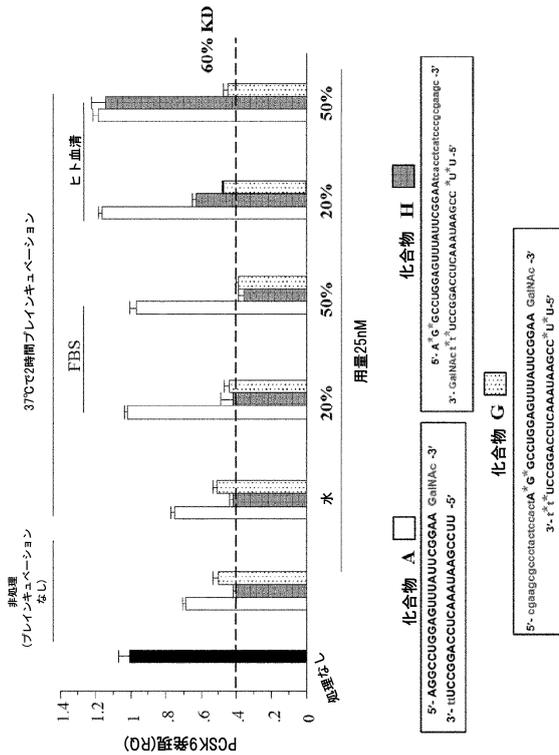


10

20

【 図 5 C 】

Figure 5C



30

40

50

【配列表】

2024531728000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/075355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 C12N15/11 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/001646 A2 (ARGONAUTE RNA LIMITED [GB]) 7 January 2021 (2021-01-07)	1-9, 26-32
Y	page 8 page 11 claims the whole document	10-14, 23-26, 28
Y	WO 2020/099476 A1 (SILENCE THERAPEUTICS GMBH [DE]) 22 May 2020 (2020-05-22)	10-14
Y	page 71 the whole document	
A	WO 2006/125977 A2 (THE UNIVERSITY OF YORK [GB]; MEDICAL RESEARCH COUNCIL [GB]) 30 November 2006 (2006-11-30)	1-9
	the whole document	
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 1 May 2023	Date of mailing of the international search report 15/05/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Macchia, Giovanni	

10

20

30

40

5

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/075355

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SIMON J. ALLISON ET AL.: "RNA interference by single- and double-stranded siRNA with a DNA extension containing a 3'-nuclease-resistant mini-hairpin structure", MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS, vol. 3, 1 January 2014 (2014-01-01), page e141, XP055583865, US ISSN: 2162-2531, DOI: 10.1038/mtna.2013.68 the whole document -s ALLISON S.J. et al.: "supplementary material", , 1 January 2014 (2014-01-01), XP093011835, Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2162253116302803?via%3Dihub#e141 [retrieved on 2023-01-05] the whole document</p>	1-9
A	<p>WO 2008/011431 A2 (SIRNA THERAPEUTICS INC. [US]) 24 January 2008 (2008-01-24) the whole document</p>	1
A	<p>WO 2012/058693 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. [US]) 3 May 2012 (2012-05-03) the whole document</p>	1
A	<p>REKA A. HARASZTI ET AL.: "5'-vinylphosphonate improves tissue accumulation and efficacy of conjugated siRNAs in vivo", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 45, no. 13, 7 June 2017 (2017-06-07), pages 7581-7592, XP055599779, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkx507 the whole document</p>	8
A	<p>WO 2021/119034 A1 (AMGEN INC. [US]) 17 June 2021 (2021-06-17) the whole document</p>	10-14
X,P	<p>WO 2021/185765 A1 (ARGONAUTE RNA LIMITED [GB]) 23 September 2021 (2021-09-23) the whole document</p>	1-5, 9, 23-25, 29-32
2	<p>Y WO 2014/089313 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS [US]) 12 June 2014 (2014-06-12) examples</p>	23-25
5	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/075355

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/141511 A2 (HALO BIO RNAI THERAPEUTICS, INC. [US]) 9 December 2010 (2010-12-09) page 60; sequence 115 -----	26, 28

10

20

30

40

5

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/075355

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
 - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- 2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/075355

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

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

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

10

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

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

20

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

30

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

10-14, 23-28 (completely); 1-9, 29-32 (partially)

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

40

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2022 /075355

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 10-14(completely); 1-9, 29-32(partially)

A nucleic acid molecule comprising:
 a first part that comprises a double stranded inhibitory ribonucleic acid (RNA) molecule comprising a sense strand and an antisense strand; and
 a second part that comprises a single stranded deoxyribonucleic acid (DNA) molecule,
 wherein the 3' end of said single stranded DNA molecule is covalently linked to the 5' end of the sense strand of the double stranded inhibitory RNA molecule
 or wherein the 3' end of the single stranded DNA molecule is covalently linked to the 5' of the antisense strand of the double stranded inhibitory RNA molecule,
 characterized in that the double stranded inhibitory RNA comprises a sense nucleotide sequence that encodes a part of a cardiovascular gene target associated with cardiovascular disease, or a polymorphic sequence variant thereof,
 and wherein said single stranded DNA molecule comprises a nucleotide sequence that is adapted over at least part of its length to anneal by complementary base pairing to a part of said single stranded DNA to form a double stranded DNA structure comprising a stem and a loop domain,
 characterized in that said nucleic acid molecule comprises N-acetylgalactosamine
 and said double stranded inhibitory RNA consists of natural nucleotides.
 The nucleic acid as above, wherein said cardiovascular gene target is human Lipoprotein A.

2. claims: 15-18(completely); 1-9, 29-32(partially)

As invention 1, but referring to human Apolipoprotein C III.

3. claims: 19-22(completely); 1-9, 29-32(partially)

As invention 1, but referring to human DGAT2.

4. claims: 23-25(completely); 1-9, 29-32(partially)

As invention 1, but referring to human PCSK9.

5. claims: 26-28(completely); 1-9, 29-32(partially)

As invention 1, but referring to human Apolipoprotein B.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/075355

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021001646 A2	07-01-2021	CA 3143404 A1	07-01-2021
		CN 114072503 A	18-02-2022
		EP 3965781 A2	16-03-2022
		GB 2585278 A	06-01-2021
		JP 2022537987 A	31-08-2022
		US 2023027604 A1	26-01-2023
		WO 2021001646 A2	07-01-2021
WO 2020099476 A1	22-05-2020	AU 2019380628 A1	20-05-2021
		BR 112021009213 A2	10-08-2021
		CA 3119239 A1	22-05-2020
		CL 2021001225 A1	24-12-2021
		CN 113227372 A	06-08-2021
		CO 2021007372 A2	09-07-2021
		CR 20210301 A	16-09-2021
		DK 3880818 T3	05-12-2022
		EA 202190895 A1	10-08-2021
		EP 3880818 A1	22-09-2021
		ES 2932295 T3	17-01-2023
		FI 3880818 T3	15-12-2022
		HR P20221358 T1	23-12-2022
		IL 283159 A	30-06-2021
		JP 7245328 B2	23-03-2023
		JP 2022507282 A	18-01-2022
		KR 20210095878 A	03-08-2021
		LT 3880818 T	27-12-2022
		MA 58208 B1	30-12-2022
		PE 20211282 A1	19-07-2021
		PH 12021550801 A1	04-10-2021
		PL 3880818 T3	23-01-2023
		PT 3880818 T	06-12-2022
		RS 63778 B1	30-12-2022
		SG 11202103882Q A	28-05-2021
		SI 3880818 T1	31-01-2023
		US 2022002722 A1	06-01-2022
		US 2022170016 A1	02-06-2022
		WO 2020099476 A1	22-05-2020
		WO 2006125977 A2	30-11-2006
EP 1891216 A2	27-02-2008		
US 2009012022 A1	08-01-2009		
US 2012136040 A1	31-05-2012		
WO 2006125977 A2	30-11-2006		
WO 2008011431 A2	24-01-2008	AU 2007275365 A1	24-01-2008
		CA 2658183 A1	24-01-2008
		CN 102124107 A	13-07-2011
		EP 2052079 A2	29-04-2009
		JP 2010503382 A	04-02-2010
		WO 2008011431 A2	24-01-2008
WO 2012058693 A2	03-05-2012	CA 2816321 A1	03-05-2012
		EP 2633046 A2	04-09-2013
		JP 2013545736 A	26-12-2013
		JP 2017012176 A	19-01-2017
		US 2013289094 A1	31-10-2013
		US 2016354404 A1	08-12-2016
		WO 2012058693 A2	03-05-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/075355

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021119034 A1	17-06-2021	AU 2020399636 A1	02-06-2022
		CA 3163322 A1	17-06-2021
		EP 4073252 A1	19-10-2022
		JP 2023504744 A	06-02-2023
		US 2023078200 A1	16-03-2023
		WO 2021119034 A1	17-06-2021
		WO 2021185765 A1	23-09-2021
CN 115066498 A	16-09-2022		
EP 4081642 A1	02-11-2022		
GB 2594788 A	10-11-2021		
WO 2021185765 A1	23-09-2021		
WO 2014089313 A1	12-06-2014	AR 093835 A1	24-06-2015
		AU 2013355237 A1	02-07-2015
		AU 2020201441 A1	19-03-2020
		AU 2022224712 A1	10-11-2022
		BR 112015013105 A2	12-09-2017
		CA 2892160 A1	12-06-2014
		CN 104854242 A	19-08-2015
		CN 108220295 A	29-06-2018
		CY 1120195 T1	12-12-2018
		DK 2929031 T3	29-01-2018
		EP 2929031 A1	14-10-2015
		EP 3336187 A1	20-06-2018
		EP 4083209 A1	02-11-2022
		ES 2657608 T3	06-03-2018
		HK 1213598 A1	08-07-2016
		HK 1256621 A1	27-09-2019
		HR P20180126 T1	23-02-2018
		HU E035887 T2	28-05-2018
		HU S2100021 I1	28-06-2021
		IL 292159 A	01-06-2022
		JP 6574383 B2	11-09-2019
		JP 7239335 B2	14-03-2023
		JP 2016506240 A	03-03-2016
		JP 2019103501 A	27-06-2019
		JP 2021097680 A	01-07-2021
		KR 20150091097 A	07-08-2015
		KR 20200035490 A	03-04-2020
		LT 2929031 T	12-02-2018
		LT PA2021510 I1	25-06-2021
		LU C00209 I2	07-10-2022
		MX 367076 B	05-08-2019
		NL 301107 I1	09-06-2021
		NO 2021024 I1	04-06-2021
		NZ 709013 A	31-01-2020
		NZ 749002 A	30-10-2020
		PL 2929031 T3	30-04-2018
		PT 2929031 T	19-01-2018
		SI 2929031 T1	28-02-2018
		US 2016017335 A1	21-01-2016
		US 2023002772 A1	05-01-2023
		WO 2014089313 A1	12-06-2014
		ZA 201503829 B	27-05-2020
WO 2010141511 A2	09-12-2010	CA 2764158 A1	09-12-2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/075355

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 102575252 A	11-07-2012
		EP 2438168 A2	11-04-2012
		ES 2804764 T3	09-02-2021
		JP 5875976 B2	02-03-2016
		JP 2012528572 A	15-11-2012
		JP 2015192674 A	05-11-2015
		US 2012184598 A1	19-07-2012
		US 2016160215 A1	09-06-2016
		US 2018346908 A1	06-12-2018
		WO 2010141511 A2	09-12-2010

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/712	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
C 0 7 K	14/435 (2006.01)	C 0 7 K	14/435	

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

- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川寄 洋祐
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100219265
弁理士 鈴木 崇大
- (74)代理人 100203208
弁理士 小笠原 洋平
- (74)代理人 100216839
弁理士 大石 敏幸
- (74)代理人 100228980
弁理士 副島 由加里
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 カーン, ステラ
イギリス国、ビーエス 8・1 エーエス・ブリストル、フレデリック・プレイス・1 5
- (72)発明者 ミッチェル, ダニエル
イギリス国、ビーエス 8・1 エーエス・ブリストル、フレデリック・プレイス・1 5
- (72)発明者 カーン, マイケル
イギリス国、ビーエス 8・1 エーエス・ブリストル、フレデリック・プレイス・1 5
- F ターム (参考) 4C076 AA11 AA22 AA36 AA53 AA95 BB01 BB11 BB15 BB16 BB17
BB31 CC11 CC21 CC41 DD66 EE59
4C084 AA13 AA19 MA02 MA17 MA23 MA35 MA37 MA52 MA63 MA66
NA13 NA14 ZA36 ZC33 ZC75
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA17 MA23 MA35
MA37 MA52 MA63 MA66 NA13 NA14 ZA36 ZC33 ZC75
4H045 AA10 AA30 CA40 EA20 FA74