

明 細 書

発明の名称：

トランスフェリン受容体2の発現を抑制する s i R N A

技術分野

[0001] 本発明は、トランスフェリン受容体2（T f R 2）をコードするm R N A に対するR N A干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有するs i R N A、該s i R N Aの使用、該s i R N Aを用いたT f R 2 遺伝子発現抑制方法、該s i R N Aを含有する医薬等に関する。

背景技術

[0002] T f R 2蛋白質をコードするm R N Aに対するs i R N Aは、T f R 2のm R N A発現を抑制し、鉄代謝において中心的な役割を担っているヘプシジン（h e p c i d i n）の産生を抑制することができる。その結果、生体内における鉄代謝を活性化させることで赤血球前駆細胞による鉄バイオアベイラビリティが促進され貧血を治療できることが期待される。そこで、h e p c i d i n産生の抑制を標的にして、T f R 2のm R N A発現を抑制するためのs i R N Aを用いる検討がなされている。

[0003] H e p c i d i nは、主に肝臓から産生されて血液中に分泌される、25個のアミノ酸から成るペプチドホルモンであり、生体内の鉄代謝において中心的な役割を担う。H e p c i d i nは、鉄輸送トランスポーターのF e r r o p o r t i n（S L C 4 0 A 1）に結合し、F e r r o p o r t i nの蛋白質分解を促進することによって、腸管からの鉄吸収とマクロファージからの鉄放出を抑制することで鉄代謝を負に制御することが知られている。血液中のH e p c i d i n濃度の上昇は、鉄代謝を抑制することによって、赤血球前駆細胞における鉄のバイオアベイラビリティを制限することで、様々な貧血疾患に寄与することが報告されている（非特許文献1）。

[0004] 血液中のH e p c i d i nの上昇が認められる貧血疾患としては、例えば、慢性腎臓病に伴う貧血、癌に伴う貧血、化学療法によって誘導される貧血

、鉄剤不応答性貧血 (iron refractory iron deficiency anemia、IRIDA)、関節リウマチやキャスルマン病などの慢性炎症に伴う貧血 (anemia of chronic disease、ACD)、ダイヤモンドブラックファン貧血、再生不良性貧血、 β サラセミア、鎌状赤血球症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、自己免疫性溶血性貧血、骨髓異形成症候群に伴う貧血、慢性骨髓単球性白血病、骨髓線維症に伴う貧血等が挙げられる。また、骨髓線維症患者では、赤血球輸血に伴う鉄の負荷や慢性的な炎症性サイトカインの上昇に相関して、血液中のHepcidin濃度の上昇を呈し得る（非特許文献2）。しかしながら、骨髓線維症のように骨髓における造血機能不全によって赤血球産生能力自体の不足に主に起因する貧血では、血液中のHepcidinの上昇に伴う鉄利用障害の病態への寄与は低いと考えられ、これまでにHepcidinの産生抑制による貧血治療効果は報告されていない。骨髓線維症等の骨髓機能不全に伴う貧血の治療薬としては、現在のところESA (erythropoiesis stimulating agent) 等の薬が使用される場合があるものの、その治療効果は限定的である。

[0005] 特許文献1は、TfR2 siRNAのAD-52590をサルに投与した結果、肝臓におけるTfR2のmRNA発現の減少、hepcidinのmRNA発現の減少、血液中のhepcidin濃度の減少、血液中の鉄濃度の上昇が認められたことを開示している。また、炎症性に伴う貧血病態を呈したラットにAD-47882を投与した結果、肝臓におけるTfR2 mRNA発現の減少、血液中のhepcidin濃度の減少、血液中の鉄濃度の上昇、ヘモグロビン値の上昇が認められたことを開示している。しかしながら、特許文献1は、siRNAをlipid nanoparticle (LNP) に封入したものを投与した結果を示したものであり、また投与経路は静脈内投与に限定されている。また、特許文献1が開示するTfR2 siRNAの治療効果は、炎症に伴う貧血に対する治療効果に限定されており、骨髓機能低下に伴う貧血などその他の貧血に対する治療効果は開示さ

れていない。

- [0006] 細胞、組織、あるいは個体内の標的遺伝子の発現を阻害する方法として、当該細胞、組織、あるいは個体内に2本鎖RNAを導入する手法がある。2本鎖RNAの導入によって、その配列に相同性を持つmRNAが分解され、標的遺伝子の発現が阻害される。この効果は「RNA干渉」または「RNAi」と呼ばれている。3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを有する、センス鎖、アンチセンス鎖それぞれ21ヌクレオチドからなる2本鎖RNA (small interfering RNA: siRNA) は、脊椎動物の培養細胞において、RNA干渉作用を有することが報告されている（例えば、非特許文献3参照。）。
- [0007] siRNAは遺伝子機能の同定、有用物質生産に適した細胞株のスクリーニング、疾患に関与する遺伝子の制御等に有用であるが、RNA分解酵素によって容易に分解されるため、体内での活性持続が難しい、合成コストが高額になるという欠点を有する。そのため、RNA分解酵素に対する安定性が高く、安価に製造できる、RNAi活性を保持したオリゴヌクレオチドの開発のために、様々な化学修飾が試みられてきた。
- [0008] オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合のリン酸基の非架橋酸素原子を硫黄原子に置き換えたホスホロチオエート (PS) 結合は、ヌクレアーゼに耐性になることが知られている。しかしながら、オリゴヌクレオチド中のPS結合の数を増やすと2本鎖RNAの熱力学的不安定化及び非特異的なタンパク質との結合が起きるので好ましくないと報告されている（例えば、非特許文献4参照。）。
- [0009] また、ヌクレオシドとして、DNA、2'-O-メチルヌクレオシド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオシド、2'-O, 4'-C架橋ヌクレオシドなどの糖修飾ヌクレオシドを採用したsiRNAは、例えば、特許文献2、特許文献3、特許文献4等の開示されている。
- [0010] 天然型のRNAを修飾RNAに置換することによって安定なsiRNAを取得する試みもなされている。例えば、RNAの2'-OH基をアルキル化

しRNAseの基質にならないようにした2'-O-アルキルヌクレオチドとした数多くの誘導体が報告されている。2'-O-メチルヌクレオチドはtRNAの中にも見られる天然に存在する修飾ヌクレオチドで、アンチセンス研究の初期の頃から研究されている（例えば、非特許文献5参照。）。

[0011] siRNAのセンス鎖またはアンチセンス鎖の一方、または両方のすべてのRNAを2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が減弱又は完全に失われるとの報告（例えば、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8、非特許文献9等参照。）また、2'-O-メチルヌクレオチドを3つ連続して導入するとセンス鎖への導入では活性低下が見られないが、アンチセンス鎖への導入では、活性低下が認められて、特にセンス鎖の5'末端に導入した場合に著しく活性が低下することが報告されている（例えば、非特許文献10参照。）。

[0012] 人工的に合成された修飾RNAである、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド（2'-F、または、2'-F RNA）を有するオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチドと同じN型配座を優先して形成し、RNAとの親和性も高くなるが、リン酸ジエステル結合からなるものはヌクレアーゼ抵抗性がないので、ホスホロチオエート結合とし、ヌクレアーゼ抵抗性を持たせる必要がある（例えば、非特許文献11参照。）。

[0013] ENA（2'-O, 4'-C-ethylene-bridged nucleic acids）は、ヌクレアーゼに対する安定性を有している修飾核酸であるが、siRNAのセンス鎖、アンチセンス鎖の一方または両方の3'末端のオーバーハング部位の2ヌクレオチドにENAを導入した場合、RNAi活性が低下することが報告されている（例えば、非特許文献12参照。）。

[0014] 複数の修飾核酸を組み合わせたsiRNAについて多くの報告がある。例えば、2'-O-メチルヌクレオチドと2'-Fを1つおきにsiRNAのセンス鎖、アンチセンス鎖に導入し、未修飾siRNAと比較して同程度以上のRNAi活性が得られ、血清中での比較的安定に保たれることが報告さ

れている（例えば、非特許文献13参照。）。

- [0015] DNA、2′-O-メチルRNA、及び、2′-Fを組み合わせた2本鎖オリゴヌクレオチドが報告されており、特にアンチセンス鎖の5′末端から14番目が2′-FであるsiRNAが報告されている（例えば、特許文献5、6参照。）。また、DNA、2′-O-メチルRNA、2′-F RNA、及び、LNA（2′-O, 4′-C-methylene-bridged nucleic acids）を組み合わせた2本鎖オリゴヌクレオチドが報告されており、特にアンチセンス鎖の5′末端から2、あるいは、14番目が2′-F、DNA、あるいは、LNAであるsiRNAの活性が報告されている（例えば、特許文献5、特許文献7参照。）。

先行技術文献

特許文献

- [0016] 特許文献1：国際公開第2012/177921号パンフレット
特許文献2：米国特許第US9, 399, 775号公報
特許文献3：米国特許第US9, 796, 974号公報
特許文献4：米国特許第US10, 612, 024号公報
特許文献5：国際公開第2012/058210号パンフレット
特許文献6：国際公開第2013/074974号パンフレット及び米国特許第US9, 399, 775号公報、米国特許第US9, 796, 974号公報
特許文献7：国際公開第2016/028649号パンフレット、米国特許第US10, 612, 024号公報

非特許文献

- [0017] 非特許文献1：Pharmaceuticals 2019, 12, 170
非特許文献2：Am. J. Hematol. 88:312-316, 2013.
非特許文献3：Nature、2001年、第411巻、p. 494-498

非特許文献4: Antisense Nucleic Acid Drug Development、2000年、第10巻、p. 117-121

非特許文献5: Nucleic Acids Research、1987年、第15巻、p. 6131-6148

非特許文献6: EMBO Journal、2001年、第20巻、p. 6877-6888

非特許文献7: RNA、第9巻、2003年、p. 1034-1048

非特許文献8: Biochemistry、2003年、第42巻、p. 7967-7975

非特許文献9: Nucleic Acids Research、2003年、第31巻、p. 2705-2716

非特許文献10: Journal of Medical Chemistry、2005年、第48巻、p. 4247-4253

非特許文献11: Journal of Medical Chemistry、1993年、第36巻、p. 831-841

非特許文献12: Antisense and Nucleic Acid Drug Development、2002年、第12巻、p. 301-309

非特許文献13: Journal of Medicinal Chemistry、2005年、第48巻、p. 901-904

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0018] 貧血を予防、改善、及び／又は治療し得る、高い薬理活性を持つ T f R 2 s i R N A が求められている。また、細胞に対する毒性が低く、血液中における安定性や薬物送達性に優れた T f R 2 s i R N A が求められている。

[0019] 慢性炎症に伴う貧血において H e p c i d i n の上昇が認められる場合、血液中の H e p c i d i n の産生を抑制することで治療効果が得られるが、

これは赤血球の産生異常というよりもHepcidinの上昇による鉄利用障害が生じていることに主に起因している。しかしながら、骨髄線維症等の骨髄機能不全に伴う貧血は、多くの場合赤血球の産生が低下していることに起因しているため、Hepcidinの上昇が認められる場合であってもHepcidinの産生を抑制することで治療効果が得られることは期待できず、そのような報告もない。そのため、骨髄線維症等の骨髄機能不全に伴う貧血に対する新規の有効な治療薬が特に求められている。また、本発明者らの研究において、特許文献1のTfR2 siRNAの標的配列については、配列特異的な細胞毒性が確認されたことから、先行技術のsiRNAには安全性の懸念がある。

- [0020] 本発明は、TfR2をコードするmRNAに対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用（これらの作用をノックダウン作用ということもある。）を有する新規なsiRNAを提供することを目的とする。また、本発明は、細胞毒性、安定性、及び／又は薬物送達性が改善された新規なTfR2 siRNAを提供することを目的とする。さらに、本発明は、TfR2 mRNAの発現を抑制することで治療又は予防可能な疾患の治療又は予防のための新規な医薬組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0021] 本発明者らは、鋭意研究を行ったところ、TfR2 mRNAにおける特定の位置の塩基配列を標的配列とするTfR2 siRNAが、RNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有し、かつ、特許文献1の標的配列で観察された細胞に対する毒性が本発明の標的配列では観察されなかったことを見出した。また、DNA、RNA、2'-O-メチルRNA、2'-F RNA、LNA、ENA、3'-O-メチルRNAを適宜組み合わせたオリゴヌクレオチドを有するsiRNAが、RNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有し、生体内において安定的であることを見出した。また、siRNAにGalNAc等の輸送用ユニットを付加することにより薬物送達性が改善されることを見出した。さらに本発明者らは、TfR2 siRN

Aを用いてTfR2 mRNAの発現を抑制することで、炎症に伴う貧血モデルマウスだけでなく、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおいて貧血症状の改善が認められること等を見出し、本発明を完成させた。

[0022] すなわち、本発明は、以下を提供する。

[1] トランスフェリン受容体2のmRNAに対するノックダウン作用を有する、以下の(A)のアンチセンス鎖領域及び(B)のセンス鎖領域を含むオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩；

(A) 配列番号1のヌクレオチド番号2845から2867、又は、ヌクレオチド番号1534から1556の間の領域において連続する18～21塩基からなる標的配列と実質的に相補的な標的対応配列からなり、該標的対応配列の5'末端のヌクレオシドは、該標的配列の3'末端のヌクレオシドと実質的に相補的なヌクレオシド、アデニンを有するヌクレオシド、又はウラシルを有するヌクレオシドであり、該標的対応配列の5'末端及び／又は3'末端に5塩基以下のオーバーハング構造が付加していてもよい、18～31塩基長からなるアンチセンス鎖領域、及び、

(B) 前記アンチセンス鎖領域の標的対応配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含有し、さらに該ヌクレオチド配列の5'末端及び／又は3'末端に5塩基以下のオーバーハング構造が付加していてもよい、18～31塩基長からなるセンス鎖領域。

[2] 前記標的配列が、配列番号1のヌクレオチド番号2847～2865、又はヌクレオチド番号1536～1554の19塩基からなるヌクレオチド配列である、[1]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[3] 前記アンチセンス鎖領域の標的対応配列における5'末端のヌクレオシドが、アデニン又はウラシルを有するヌクレオシドである、[1]又は[2]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[4] 前記アンチセンス鎖領域の標的対応配列が、配列番号1のヌクレオチド番号2847～2865、又はヌクレオチド番号1536～1554の

19塩基からなる標的配列と完全に相補的なヌクレオチド配列である、[1]～[3]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[5] オリゴヌクレオチドを構成する糖及び／又はリン酸ジエステル結合の少なくとも1個が修飾されている、[1]～[4]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[6] オリゴヌクレオチドを構成する糖がD-リボフラノースであり、糖の修飾がD-リボフラノースの2'位の水酸基の修飾である、[5]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[7] 糖の修飾が、D-リボフラノースの2'-デオキシ化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルコキシル化、2'-ハロゲン化、及び／又は2'-O、4'-C-アルキレン化である、[6]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[8] 前記2'-O-アルキル化が2'-O-メチル化、前記2'-O-アルコキシル化が2'-O-メトキシエチル化、前記2'-ハロゲン化が2'-フルオロ化、並びに、前記2'-O、4'-C-アルキレン化が2'-O、4'-C-メチレン化及び／又は2'-O、4'-C-エチレン化である、[7]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[9] リン酸ジエステル結合の修飾がホスホロチオエートである、[5]～[8]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[10] センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の3'末端のヌクレオチドにおけるD-リボフラノースが3'-O-アルキル化されていることを特徴とする、[5]～[9]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[11] 前記3'-O-アルキル化が3'-O-メチル化である、[10]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[12] センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の5'末端及び／又は3'末端に、3塩基以下のオーバーハング構造が付加している、[1]～[11]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[13] オーバーハング構造が2塩基である、[12]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[14] オーバーハング構造が、2個の連続したチミンを含むヌクレオシド、又は2個の連続したウラシルを含むヌクレオシドである、[13]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[15] オーバーハング構造が、アンチセンス鎖領域の3'末端に付加した2個の連続したU(M)である、[14]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[16] センス鎖領域が以下の式(I)に示すオリゴヌクレオチドからなり、アンチセンス鎖領域が以下の式(II)に示すオリゴヌクレオチドからなり、さらに以下の(a)乃至(g)に示される特徴を有する、[1]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩：

センス鎖領域：5' $S_{05}-S_a-S_{19}-S_{18}-S_{17}-S_{16}-S_{15}-S_{14}-S_{13}-S_{12}-S_{11}-S_{10}-S_9-S_8-S_7-S_6-S_5-S_4-S_3-S_2-S_1-S_{03}$ 3' (I)

アンチセンス鎖領域：5' $A_{05}-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-A_{10}-A_{11}-A_{12}-A_{13}-A_{14}-A_{15}-A_{16}-A_{17}-A_{18}-A_{19}-A_a-A_{03}$ 3' (II)

(a) S_1 は3'-修飾ヌクレオシドであり、 $S_2\sim S_{19}$ は1個のヌクレオシドを示し、それぞれ独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA又はDNAであり、 S_a は0～3個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA又はDNAを示し、 S_{03} 及び S_{05} はそれぞれ独立して、0～3個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2'-OMe RNA、2'-F RN

A、DNA又は2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドを示す。各ヌクレオシド間の結合は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合を示す；

(b) A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13} 、 A_{14} 及び A_{15} は1個のヌクレオシドを示し、そのうち少なくとも1つはDNA、RNA、2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシド又は2'-MOE RNAであり、それ以外は2'-OMe RNA又は2'-F RNAであり、 $A_1 \sim A_{10}$ 及び $A_{16} \sim A_{19}$ は1個のヌクレオシドを示し、それぞれ独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA又はDNAを示し、 A_a は0～3個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA又はDNAを示し、 A_{03} 及び A_{05} はそれぞれ独立して、0～3個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA、DNA又は2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドを示す。各ヌクレオシド間の結合は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合を示す；

(c) $A_2 \sim A_a$ の間のヌクレオチド配列は、標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列からなり、 A_1 は標的配列の対応するヌクレオシドと相補的な塩基を有するヌクレオシド、アデニンを有するヌクレオシド、チミンを有するヌクレオシド、又はウラシルを有するヌクレオシドであり、 A_{03} と A_{05} が存在する場合、そのヌクレオチド配列は、それぞれ独立して、標的配列の対応するヌクレオシドとは独立に選択されるヌクレオチド配列である；

(d) $S_1 \sim S_a$ の間のヌクレオチド配列と、 $A_1 \sim A_a$ の間のヌクレオチド配列とは、互いに実質的に相補的なヌクレオチド配列であり、かつ、2本鎖構造を形成している；

(e) S_{05} と A_{03} の両方が存在する場合、 S_{05} 及び A_{03} は、互いに相補的ではないヌクレオチド配列である；

(f) S_{03} と A_{05} の両方が存在する場合、 S_{03} 及び A_{05} は、互いに相補的ではないヌクレオチド配列である；並びに、

(g) センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の、5'末端のヌクレオシドの5'位及び／又は3'末端のヌクレオシドの3'位もしくは3'末端のヌクレオシドが3'-修飾ヌクレオシドである場合はその2'位、が化学修飾されていてもよい。

[17] 式(11)において、 S_1 が3'-OMe RNAである[16]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[18] 2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドが、LNA又はENAである、[16]又は[17]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[19] 式(11)において、 A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13} 、 A_{14} 及び A_{15} の2つ以上が同一又はそれぞれ異なってもよく、DNA、RNA、2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシド又は2'-MOE RNAである[16]～[18]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[20] 式(11)において、 A_{14} がRNA又は2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドである、[19]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[21] 式(11)において、 A_{13} が2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシド又は2'-OMe RNAであり、 A_{14} がRNAである、[20]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[22] 式(11)において、 $A_{11}-A_{12}-A_{13}-A_{14}-A_{15}$ が以下のいずれか；

$A_{11}(2'-OMe\text{ RNA})-A_{12}(2'-OMe\text{ RNA})-A_{13}(ENA)-A_{14}(RNA)-A_{15}(2'-OMe\text{ RNA})$ 、

$A_{11}(2'-F\text{ RNA})-A_{12}(2'-OMe\text{ RNA})-A_{13}(ENA)-A_{14}(RNA)-A_{15}(2'-OMe\text{ RNA})$ 、

$A_{11}(2'-OMe\text{ RNA})-A_{12}(2'-F\text{ RNA})-A_{13}(ENA)-A_{14}(RNA)-A_{15}(2'-OMe\text{ RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{13}(\text{LNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{13}(\text{LNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{F RNA}) - A_{13}(\text{LNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、又は、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{F RNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

である、[21]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[23] 式(11)において、 A_{12} がDNAであり、 A_{14} が $2'-\text{O}$ 、 $4'-\text{C}$ 架橋化修飾ヌクレオシドである、[20]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[24] 式(11)において、 $A_{11} - A_{12} - A_{13} - A_{14} - A_{15}$ が以下のいずれか；

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{ENA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{ENA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、 $A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{LNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、又は、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{LNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

である、[23]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[25] 式(11)において、 A_2 、 A_6 及び A_{16} が $2'-\text{F RNA}$ である、[16]～[24]のいずれ1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその

薬学上許容される塩。

[26] 式(11)において、更に、 A_8 、 A_9 及び A_{10} からなる群から選択される1又は2個のヌクレオシドが2'-F RNAであり、 A_1 、 $A_3 \sim A_5$ 、 A_7 、 $A_{17} \sim A_{19}$ 及び A_a のヌクレオシドが2'-OMe RNAである、[25]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[27] 式(11)において、 A_2 、 A_6 、 A_8 、 A_{10} 及び A_{16} が2'-F RNAであり、 A_1 、 $A_3 \sim A_5$ 、 A_7 、 A_9 、 $A_{17} \sim A_{19}$ 及び A_a のヌクレオシドが2'-OMe RNAである、[26]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[28] 式(1)において、 S_{11} 、 S_{12} 、 S_{13} 及び S_{15} が2'-F RNAである[16]～[27]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[29] 式(1)において、 $S_2 \sim S_{10}$ 、 S_{14} 、 $S_{16} \sim S_{19}$ 及び S_a が2'-OMe RNAである[28]のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[30] 式(11)においてRNAが採用される場合、当該RNAとその3'側に隣接するヌクレオシドとの間の結合がホスホロチオエート結合であることを特徴とする、[16]～[29]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[31] 前記オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端から2～5ヌクレオチドにおいて、各ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であることを特徴とする、[16]～[30]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[32] S_{03} 、 S_{05} 、 A_{05} 及び A_{03} のヌクレオシド数が0～2である、[16]～[31]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[33] S_{03} のヌクレオシド数が0である、[32]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

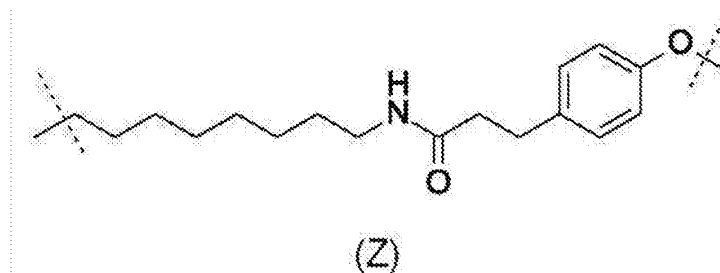
〔34〕 S_{03} 、 S_{05} 及び A_{05} のヌクレオシド数が0であり、 A_{03} のヌクレオシド数が2である、〔33〕に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

〔35〕 前記アンチセンス鎖領域及びセンス鎖領域が、それぞれ独立したオリゴヌクレオチドとして2本鎖オリゴヌクレオチドを形成していることを特徴とする、〔1〕～〔34〕のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

〔36〕 前記アンチセンス鎖領域の5'末端のヌクレオシドとセンス鎖領域の3'末端のヌクレオシドとがリンカー構造により連結されていることを特徴とする、〔1〕～〔34〕のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

〔37〕 前記リンカー構造が、下記式

[0023] [化1]



[0024] [式中、破線は結合手を示し、フェニル基に結合している酸素原子は、隣接するアンチセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'ーリン酸基とリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合することを表し、他方の末端のメチレン基は、隣接するセンス鎖領域の3'末端のヌクレオチドの3'ーリン酸基（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位のリン酸基）とリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合することを表す。]

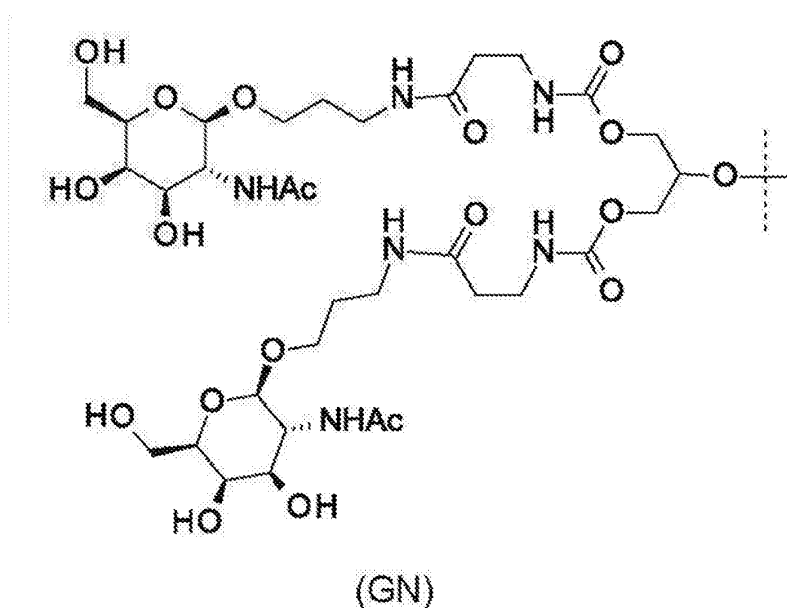
で表される構造である、〔36〕に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

〔38〕 オリゴヌクレオチドの5'末端のヌクレオシドの5'位及び／又

は3'末端のヌクレオシドの3'位もしくは3'末端のヌクレオシドが3'-修飾ヌクレオシドである場合はその2'位、がG a l N A cユニットで化学修飾されていることを特徴とする、[1]～[37]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[39] 前記G a l N A cユニットが、

[0025] [化2]



[0026] [式中、破線は隣接するヌクレオチドの5'末端のリン酸基及び／又は3'末端のリン酸基（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位のリン酸基）とリン酸ジエステル結合することを表す。]

で表されるユニットであることを特徴とする、[38]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[40] オーバーハング構造を除くセンス鎖領域が以下の式(1-1)であり、オーバーハング構造を除くアンチセンス鎖領域が以下の式(11-1)～(11-10)のいずれかであり、前記センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域がそれぞれ独立したオリゴヌクレオチドとして2本鎖オリゴヌクレオチドを形成しており、前記センス鎖領域及び前記アンチセンス鎖領域はそれぞれ独立してオーバーハング構造を含んでいてもよい、[1]に記載のオリ

ゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

(式)

5' C(M)G(M)U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)
C(M)A(M)A(3M) 3' (I - 1)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 1)

5' U(M)U(F)G(M)A(F)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 2)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 3)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)
A(M)C(F)G(M) 3' (I I - 4)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 5)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 6)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 7)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(R)[^]C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 8)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)[^]C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 9)

5' U(M)U(F)G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(R)[^]C(M)C(F)
A(M)C(M)G(M) 3' (I I - 10)

[核酸の塩基についてAはアデニン、Uはウラシル、Tはチミン、Gはグアニン、
Cはシトシン（ただし、CがENAのときは2' - O, 4' - C - エチレン架
橋 - 5 - メチルシチジンを示す）を示し、核酸について(R)はRNA、(D)はDNA
、(M)は2' - OMe RNA、(3M)は3' - OMe RNA、(F)は2' - F RNA、(E)はENAを示す。

また、式中、「 $\wedge$ 」はヌクレオシド間の結合がホスホロチオエート結合 ($-P(=S)(OH)-$) であることを示し、特に記載のない場合はヌクレオシド間の結合がリン酸ジエステル結合 ($-P(=O)(OH)-$) であることを示すが、特に記載のない場合であってもセンス鎖領域の5'末端及び3'末端から3個のヌクレオシドにおける2か所のヌクレオシド間結合、並びに、アンチセンス鎖領域の5'末端から3個のヌクレオシドにおける2か所のヌクレオシド間結合及び3'末端から4個のヌクレオシドにおける3か所のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。]

[41] センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の5'末端及び／又は3'末端に、3塩基以下のオーバーハング構造が付加している、[40]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[42] オーバーハング構造が2塩基である、[41]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

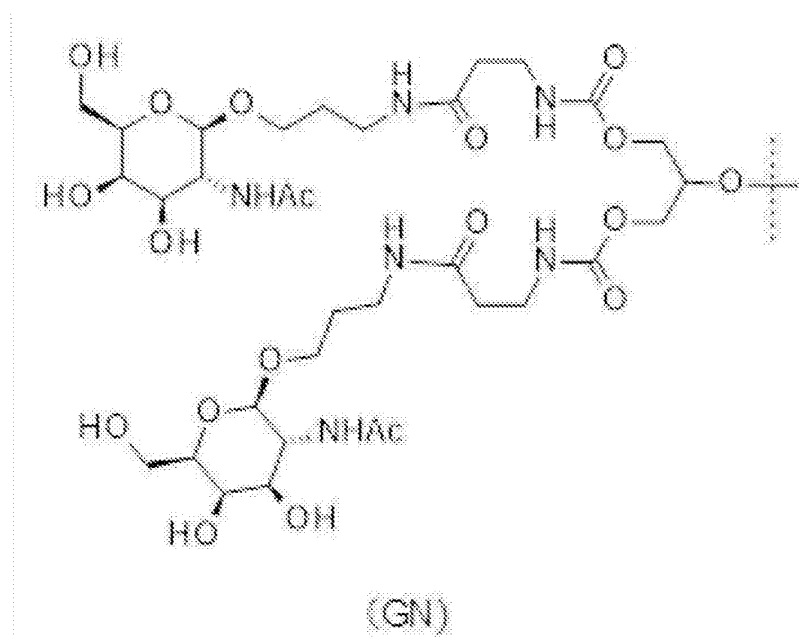
[43] オーバーハング構造が、2個の連続したチミンを含むヌクレオシド、又は2個の連続したウラシルを含むヌクレオシドである、[42]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[44] オーバーハング構造が、アンチセンス鎖領域の3'末端に付加した2個の連続したU (M) である、[43]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[45] センス鎖領域の5'末端が以下の式

[0027]

[化3]



[0028] [式中、破線は隣接するセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'ーリン酸基とリン酸ジエステル結合することを表す。]

で表される G a l N A c ユニットで化学修飾されていることを特徴とする、
[40]～[44]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[46] センス鎖領域が以下の式(1-2)であり、アンチセンス鎖領域が以下の式(11-11)～(11-20)のいずれかであり、前記センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域がそれぞれ独立したオリゴヌクレオチドとして2本鎖オリゴヌクレオチドを形成している、[1]に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

(式)

5' GNC(M)[^]G(M)[^]U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)
)U(M)C(M)[^]A(M)[^]A(3M) 3' (1-2)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C
(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (11-11)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(F)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C
(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 2)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C
(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 3)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C
(F)A(M)C(F)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 4)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(R)[~]C(M)
C(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 5)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(R)[~]C(M)
C(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 6)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R)[~]C(M)
C(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 7)

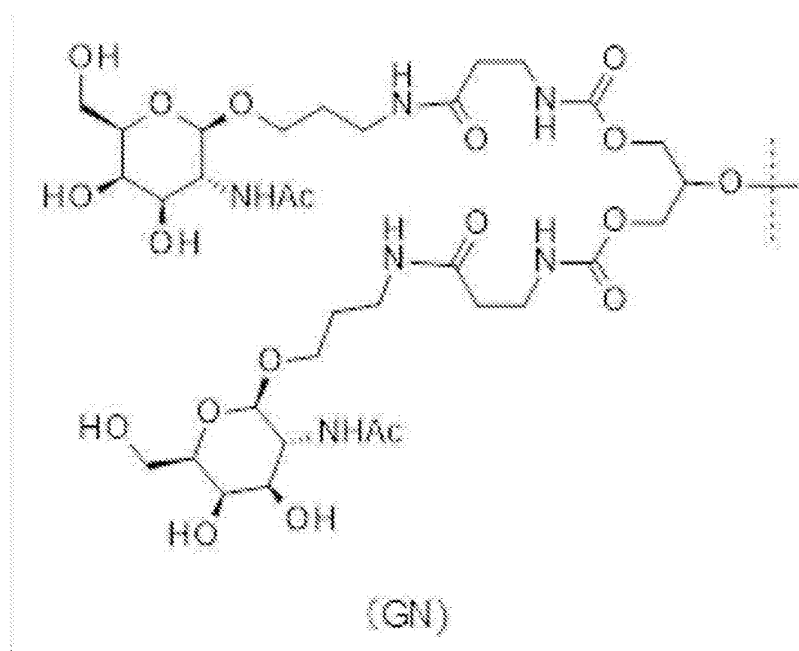
5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(R)[~]C(M)
C(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 8)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)[~]C(M)
C(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 1 9)

5' U(M)[~]U(F)[~]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(R)[~]C(M)
C(F)A(M)C(M)[~]G(M)[~]U(M)[~]U(M) 3' (I I - 2 0)

[式中、「GN」は下記式

[化4]



(式中、破線は隣接するセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'ーリン酸基とリン酸ジエステル結合していることを表す。)で表されるG a l N A c ユニットを示し、核酸の塩基についてAはアデニン、Uはウラシル、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシン(ただし、CがE N A のときは2'ーO, 4'ーCーエチレン架橋ー5ーメチルシチジンを示す)を示し、核酸について(R)はRNA、(D)はDNA、(M)は2'ーOMe RNA、(3M)は3'ーOMe RNA、(F)は2'ーF RNA、(E)はENAを示す。また、式中、「^」はヌクレオシド間の結合がホスホロチオエート結合(−P(=S)(OH)−)であることを示し、特に記載のない場合はヌクレオシド間の結合がリン酸ジエステル結合(−P(=O)(OH)−)であることを示す。センス鎖領域の3'末端のヌクレオチドの3'位、アンチセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'位、及びアンチセンス鎖領域の3'末端のヌクレオチドの3'位はそれぞれ水酸基である。]

[47] [1]～[46]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

[48] トランスフェリン受容体2の発現を抑制することにより治療又は

予防可能な疾患の治療又は予防のための、〔４７〕に記載の医薬組成物。

〔４９〕 貧血の予防又は治療のための、〔４８〕に記載の医薬組成物。

〔５０〕 貧血が、慢性炎症に伴う貧血又は骨髄機能不全に伴う貧血である、〔４９〕に記載の医薬組成物。

〔５１〕 前記慢性炎症に伴う貧血が、自己免疫疾患に伴う貧血、感染症に伴う貧血、炎症性腸疾患に伴う貧血、心不全に伴う貧血、慢性腎臓病に伴う貧血、癌性貧血、又はキャッスルマン病に伴う貧血である、〔５０〕に記載の医薬組成物。

〔５２〕 前記骨髄機能不全に伴う貧血が、骨髄線維症に伴う貧血、骨髄異形成症候群に伴う貧血、又は慢性骨髄単球性白血病に伴う貧血、化学療法による骨髄抑制に伴う貧血である、〔５０〕に記載の医薬組成物。

〔５３〕 他の薬剤による治療を受けている患者を対象とする、〔４７〕～〔５２〕に記載の医薬組成物。

〔５４〕 前記他の薬剤が、貧血治療薬、貧血の原因となる疾患の治療薬、又は鉄過剰症治療薬である、〔５３〕に記載の医薬組成物。

〔５５〕 前記貧血治療薬が、赤血球造血刺激因子製剤、HIFPHD (hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase) 阻害薬、経口鉄剤、静注鉄剤、ルスパテルセプト、又はダナゾールである、〔５４〕に記載の医薬組成物。

〔５６〕 前記赤血球造血刺激因子製剤が、エポエチンアルファ、エポエチンベータ、エポエチンベータペゴル、エポエチンカップ、又はダルベポエチンアルファである、〔５５〕に記載の医薬組成物。

〔５７〕 前記HIFPHD (hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase) 阻害薬が、ロキサデュスタット、バダデュスタット、ダプロデュスタット、エナロデュスタット、又はモリデュスタットである、〔５５〕に記載の医薬組成物。

〔５８〕 前記経口鉄剤が、クエン酸第一鉄、クエン酸第二鉄、フマル酸第一鉄、溶性ピロリン酸第二鉄、乾燥硫酸鉄である、〔５５〕に記載の医薬組成

物。

〔５９〕 前記が静注鉄剤、カルボキシマルトース第二鉄、含糖酸化鉄である、〔５５〕記載の医薬組成物。

〔６０〕 前記貧血の原因となる疾患の治療薬が、骨髓線維症治療薬、骨髓異形成症候群治療薬、慢性腎臓病治療薬又は抗がん剤である、〔５４〕記載の医薬組成物。

〔６１〕 前記骨髓線維症治療薬がＪＡＫ２阻害薬である、〔６０〕記載の医薬組成物。

〔６２〕 前記ＪＡＫ２阻害薬が、ルキシロチニブ、フェドラチニブ、パクリチニブ又はモメロチニブである、〔６１〕記載の医薬組成物。

〔６３〕 前記骨髓異形成症候群治療薬がアザシチジン又はレナリドミドである、〔６０〕記載の医薬組成物。

〔６４〕 前記慢性腎臓病治療薬が、ＳＧＬＴ２（*sodium glucose co-transporter 2*）阻害薬、レニン・アンジオテンシン系阻害薬、カルシウム拮抗薬、利尿薬、糖尿病治療薬、高脂血症治療薬、ステロイド、又は免疫抑制薬である、〔６０〕記載の医薬組成物。

〔６５〕 前記レニン・アンジオテンシン系阻害薬が、アンジオテンシンⅠ受容体拮抗薬又はアンジオテンシン変換酵素阻害薬である、〔６４〕記載の医薬組成物。

〔６６〕 前記抗がん剤が化学療法薬である、〔６０〕記載の医薬組成物。

〔６７〕 前記化学療法薬が、シスプラチン、カルボプラチン、ドキソルビシン、パクリタキセル、又はアムルピシンである、〔６６〕記載の医薬組成物。

〔６８〕 前記鉄過剰症治療薬が鉄キレート剤である、〔５４〕記載の医薬組成物。

〔６９〕 前記鉄キレート剤が、デフェラシロクス、デフェロキサミン、又はデフェリプロンである、〔６８〕記載の医薬組成物。

〔７０〕 対象に、〔１〕～〔４６〕のいずれか１つに記載のオリゴヌクレ

オチド又はその薬学上許容される塩の有効量を投与することを含む、貧血を治療又は予防する方法。

[71] 対象に、[47]～[69]のいずれか1つに記載の医薬組成物を投与することを含む、貧血を治療又は予防する方法。

[72] 貧血の治療または予防における使用のための[1]～[46]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[73] [47]～[69]のいずれか1つに記載の医薬組成物の有効成分としての使用のための[1]～[46]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[74] [47]～[69]のいずれか1つに記載の医薬組成物の製造における[1]～[46]のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩の使用。

[0029] また、ある一態様において、本発明は以下を提供する。

[75] トランスフェリン受容体2遺伝子をノックダウンする効果を有する化合物を有効成分とする、骨髓機能不全に伴う貧血の治療又は予防のための医薬組成物。

[76] 前記化合物が、RNAi-オリゴヌクレオチドである、[75]に記載の医薬組成物。

発明の効果

[0030] 本発明のsiRNAは、TfR2 mRNAの発現を抑制することができる。また、本発明のsiRNAは生体内において肝臓におけるTfR2 mRNAの発現を抑制することができ、貧血を予防、改善、及び／又は治療することができる。

図面の簡単な説明

[0031] [図1] 2本鎖siRNAの修飾パターンを示す図である。図中、黒丸は2'-O-メチルRNAを表し、白丸は2'-デオキシ-2'-フルオロRNAを表し、黒三角形はDNAを表し、白三角形は3'-O-メチルRNAを表し、白ひし形はENAを表し、黒ひし形はRNAを表し、縦の棒が入った白丸

はLNAを表し、横の棒が入った白丸は2'-O-メトキシエチルRNAを表し、マークとマークを繋ぐ線はリン酸ジエステル結合を表し、マークとマークを繋ぐ線に「s」が記載されている場合はホスホロチオエート結合を表す。図中、上部の鎖はセンス鎖（またはパッセンジャー鎖）を表し、センス鎖の左側の末端が5'末端、右側の末端が3'末端を表す。下部の鎖はアンチセンス鎖（またはガイド鎖）を表し、アンチセンス鎖の右側の末端が5'末端、左側の末端が3'末端を表す。各siRNAは、NNN-xxxで表し、NNN-xxxの後に記載されている数字とアルファベットは、図1乃至6に記載の修飾パターンの略号を示す。

[図2] 2本鎖siRNAにおけるアンチセンス鎖のA₁₄がDNA又はRNAの場合の修飾パターンを示す図である。各記号、配置、修飾などは、図1と同じ様式で表示される。

[図3] 2本鎖siRNAにおける、アンチセンス鎖のA₈及びA₉が2'-デオキシ-2'-フルオロRNAの場合の修飾パターンを示す図である。各記号、配置、修飾などは、図1と同じ様式で表示される。

[図4] 2本鎖siRNAにおける、アンチセンス鎖のA₁₄がENAの場合の修飾パターンを示す図である。各記号、配置、修飾などは、図1と同じ様式で表示される。

[図5] 2本鎖siRNAにおける、アンチセンス鎖のA₈及びA₉が2'-デオキシ-2'-フルオロRNA、かつ、アンチセンス鎖のA₁₃がENAの場合の修飾パターンを示す図である。各記号、配置、修飾などは、図1と同じ様式で表示される。

[図6] 2本鎖siRNAにおける、アンチセンス鎖のA₈が2'-O-メチルRNA、及びA₉が2'-デオキシ-2'-フルオロRNAの場合の修飾パターンを示す図である。各記号、配置、修飾などは、図1と同じ様式で表示される。

[図7] 図7Aは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるTfR2-siRNAを封入した核酸脂質粒子の処置による血漿中鉄濃度の推移を示す図

である。図7Bは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるLNP封入TfR2 siRNAの処置による血漿中hepcidin濃度の推移を示す図である。図7Cは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるLNP封入TfR2 siRNAの処置によるヘモグロビン値(hemoglobin, HGB)の推移を示す図である。図7Dは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるLNP封入TfR2 siRNAの処置によるmean corpuscular hemoglobin (MCH) 値を示す図である。図7Eは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるLNP封入TfR2 siRNAの処置による肝臓TfR2 (mTfR2) mRNA発現量を示す図である。図7Fは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるLNP封入TfR2 siRNAの処置による肝臓Hepcidin (mHepcidin) mRNA発現量を示す図である。

[図8-1]図8Aは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるHGB値の推移を示す図である。図8Bは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおける、薬剤処置して3日後のHGB値を示す図である。図8Cは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置による肝臓mTfR2 mRNA発現量を示す図である。図8Dは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるHGB値を示す図である。

[図8-2]図8Eは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるMCH値を示す図である。図8Fは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるhematocrit (HCT) 値を示す図である。図8Gは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるred blood cell (RBC) 数を示す図である。

[図9]図9Aは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュ

ゲートTfR2 siRNAの処置による血漿中鉄濃度を示す図である。図9Bは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置による血漿中hepcidin濃度を示す図である。図9Cは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるHGB値を示す図である。図9Dは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるMCH値を示す図である。図9Eは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるRBC数を示す図である。図9Fは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置による肝臓mTfR2 mRNA発現量を示す図である。

[図10]図10Aは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置による血漿中鉄濃度を示す図である。図10Bは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるHGB値を示す図である。図10Cは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるMCH値を示す図である。図10Dは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるRBC数を示す図である。図10Eは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置による肝臓mTfR2 mRNA発現量を示す図である。

[図11]HepG2細胞におけるsiRNAの細胞毒性評価結果を示す図である。

[図12]HepG2細胞におけるsiRNAのhTfR2ノックダウン活性を示す図である。

[図13]正常マウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置による血漿中鉄濃度の推移を示す図である。

[図14]図14Aは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalN

A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aの処置前におけるH G B値を示す図である。図1 4 Bは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるG a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aの処置前における血漿中鉄濃度を示す図である。図1 4 Cは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して8日後の血漿中鉄濃度を示す図である。図1 4 Dは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して9日後のH G B値を示す図である。図1 4 Eは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して9日後のM C H値を示す図である。図1 4 Fは、骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して9日後のR B C数を示す図である。

[図15]図1 5 Aは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるG a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aの処置による血漿中鉄濃度の推移を示す図である。図1 5 Bは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるG a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aの処置前におけるH G B値を示す図である。図1 5 Cは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して8日後におけるH G B値を示す図である。図1 5 Dは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して8日後におけるM C H値を示す図である。図1 5 Eは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して8日後におけるR B C数を示す図である。図1 5 Fは、炎症に伴う貧血モデルマウスにおける、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを処置して8日後における肝臓m T f R 2 m R N A発現量を示す図である。

[図16]図1 6 Aは、M D SモデルマウスにおけるG a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aの処置による血漿中鉄濃度の推移を示す図である。図1 6 Bは、M D SモデルマウスにおけるG a l N A cコンジュゲートT f

図16Cは、MDSモデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して8週間後におけるHGB値を示す図である。図16Dは、MDSモデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して8週間後におけるMCH値を示す図である。図16Eは、MDSモデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して8週間後におけるRBC数を示す図である。図16Fは、MDSモデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して8週間後における肝臓mTfR2 mRNA発現量を示す図である。

[図17-1]図17Aは、慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置前の血漿中鉄濃度を示す図である。図17Bは、慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置前におけるHGB値を示す図である。図17Cは、慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後における血漿中鉄濃度を示す図である。図17Dは、慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後におけるHGB値を示す図である。

[図17-2]図17Eは、慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後におけるMCH値を示す図である。図17Fは、慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後におけるRBC数を示す図である。図17Gは、慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後における肝臓mTfR2 mRNA発現量を示す図である。

[図18]図18Aは、Ruxolitinibによる貧血モデルマウスにおけ

る、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置前におけるHGB値を示す図である。図18Bは、Ruxolitinibによる貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して3週間後における血漿中鉄濃度を示す図である。図18Cは、Ruxolitinibによる貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後におけるHGB値を示す図である。図18Dは、Ruxolitinibによる貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後におけるMCH値を示す図である。図18Eは、Ruxolitinibによる貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後におけるRBC数を示す図である。図18Fは、Ruxolitinibによる貧血モデルマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置を開始して6週間後における肝臓mTfR2 mRNA発現量を示す図である。

[図19] hTfR2 Tgマウスにおける、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAを処置して7日後における肝臓hTfR2 mRNA発現量を示す図である。

[図20] ヒト初代肝臓細胞におけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によるhTfR2 mRNA発現量を示す図である。

[図21] 図21Aは、HepG2細胞におけるTfR2-019及びTfR2-039のHepcidin mRNA発現抑制活性を示す図である。図21Bは、HepG2細胞におけるTfR2-019、94DUG及びTfR2-039、23DUGのHepcidin mRNA発現抑制活性を示す図である。

[図22-1] ヒトトランスフェリン受容体2 (hTfR2) をコードする遺伝子のmRNAの塩基配列 (配列番号1) を示す図である。下線の配列 (2847 ~ 2865 番目の配列) はTfR2-019の標的配列を示し、二重下線の

配列（1536～1554番目の配列）はTfR2-039の標的配列を示す。

[図22-2]図22-1の続きを示す図である。

発明を実施するための形態

[0032] <1. 用語の説明>

本明細書において、「標的遺伝子」とは、トランスフェリン受容体2（transferrin receptor 2、TfR2）をコードする遺伝子に対するmRNAをいい、RNAプロセッシングを受ける前の未成熟なmRNA（mRNA前駆体、又はpre-mRNAともいう）であってもよく、RNAプロセッシングを受けて成熟したmRNAであってもよい。RNAプロセッシングには、例えば、RNAスプライシング、5'末端のキャップ構造形成、及び3'末端のポリA尾部形成等が含まれる。

[0033] TfR2は主に肝臓に発現している2型膜蛋白質であり、細胞内領域、膜貫通領域、細胞外領域から構成されることが知られている（The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35（2003）292-296）。TfR2は、鉄代謝において重要な役割をもつhepcidinの産生、及び鉄代謝の制御において中心的な役割を担っていることが知られている（Front. Pharmacol., 06 March 2014、Haematologica 2011; 96（4）: 500-506.、Blood. 2011; 117（10）: 2960-2966）。

[0034] 貧血とは、血液中の赤血球中に存在し、酸素運搬能を有するヘモグロビンの濃度が低下する病態を指す。貧血は、身体活動の低下や、死亡率の上昇に関与する（Ann N Y Acad Sci. 2019 August ; 1450（1）: 15-31.）。貧血は、その原因、臨床像、平均赤血球容積（mean corpuscular volume, MCV）などの赤血球指数等によって種々の分類がなされる（日本内科学会雑誌104巻7号: 1375-1382、臨床検査のガイドライン JSLM

2015 : 175-180)。貧血は、赤血球の産生不足や赤血球の過剰

な破壊、鉄欠乏等が主な原因の一つと考えられており、これらには例えば、慢性炎症などに伴う鉄利用障害や、骨髓機能不全など多様な病態が複雑に関与することが知られている (Ann N Y Acad Sci, 2019 August ; 1450 (1) : 15-31.)。

慢性炎症に伴う貧血においては、インターロイキン 6 (Interleukin 6、IL6) などの炎症性サイトカインの慢性的な上昇により、鉄代謝において主要な役割を担う hepcidin の血液中濃度が上昇することによって鉄利用障害が引き起こされることで造血機能が低下することが知られている (Med Clin North Am, 2017 March ; 101 (2) : 285-296.)。そのような慢性炎症の原因としては、例えば、自己免疫性疾患、感染症、炎症性腸疾患、心不全、慢性腎臓病、癌等の慢性疾患が挙げられる。慢性炎症に伴う貧血としては、例えば、関節リウマチもしくは全身性エリテマトーデスもしくは自己免疫性溶血性貧血等の自己免疫疾患に伴う貧血、感染症に伴う貧血、マクロファージ活性化症候群に伴う貧血、キャッスルマン病に伴う貧血、炎症性大腸炎等の炎症性腸疾患に伴う貧血、心不全に伴う貧血、慢性腎臓病に伴う貧血、及び癌性貧血等が挙げられる。癌性貧血には、例えば、多発性骨髄腫、急性白血病、慢性白血病、肺癌又は乳癌などの癌に伴う貧血が含まれる。

骨髓機能不全に伴う貧血は、何らかの要因により赤血球産生能が著しく障害を受けることで貧血に至る。骨髓機能不全に伴う貧血としては、例えば、骨髓異形成症候群に伴う貧血、骨髓線維症に伴う貧血、慢性骨髓単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia、CMML) に伴う貧血、化学療法による骨髓抑制に伴う貧血、再生不良性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、ファンコニ貧血等が挙げられる。骨髓線維症とは、造血幹細胞に後天的に JAK2 V617F などの遺伝子変異が生じることで、異常な造血幹細胞由来のクローンが増殖し、慢性的な炎症の亢進および骨髓線維化が進行することで骨髓機能が低下する疾患であり、重度な貧血や脾臓腫大などを呈することが知られている (Am J Hem

atol. 2021; 96: 145-162.)。

[0035] 本明細書において、核酸又は核酸分子とは、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドの総称である。

[0036] 「ヌクレオシド」とは、遺伝情報に重要な塩基部分と分子の物理化学的性質に重要な糖部分が結合した化学構造部分を意味する。

[0037] 「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドの糖部分の3'位(3'位が修飾されている場合は2'位)の水酸基がリン酸基とエステルを形成している化合物である。

[0038] 「オリゴヌクレオチド」とは、2以上のヌクレオチドがその中の1つのヌクレオチドのリン酸基部分と別のヌクレオチドの糖部分の5'位の水酸基が結合した構造(リン酸ジエステル結合)から構成されるオリゴマーのことをいう。但し、3'末端のヌクレオチドの3'位(3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位)、及び/又は、5'末端のヌクレオチドの5'位は、水酸基であってもリン酸基であってもよく、それらが化学修飾された構造であってもよい。また、ヌクレオシド間のリン酸ジエステル結合は化学修飾されていてもよい。本明細書においては、オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチドとは同一の意味で用いている。

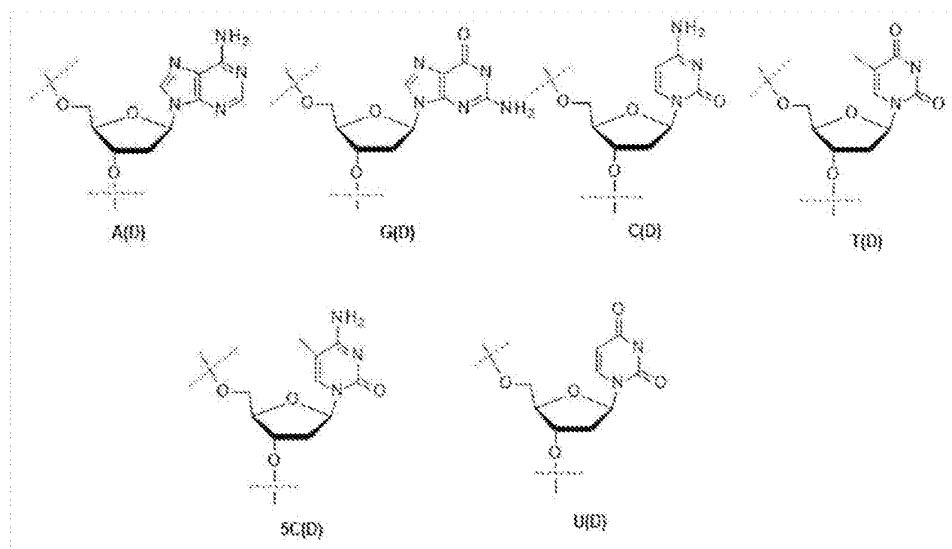
[0039] 核酸の塩基部分は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、ウラシル(U)、チミン(T)であり、AとU又はT、GとCは、それぞれ水素結合によりワトソン-クリック塩基対を形成し、塩基対を形成する関係にある塩基同士の間を「相補的」という。それぞれの塩基部分は化学修飾される場合があるが、修飾された塩基であっても、通常は元の塩基と同じ塩基対形成能を示す場合もある。代表的な修飾塩基としては、5-メチルシトシン(5C)、5-メチルウラシル(5U)等が知られており、5UはTと同一の構造である。本明細書に添付する配列表において、5CはCとして、5UはT又はUとして表示される。

[0040] 本明細書において、核酸の表記方法は、「塩基の記号(糖部分の記号)」として表示される場合がある。糖部分の記号については、以下の各種ヌクレ

オシドの記載箇所説明される。

- [0041] 本明細書において、オリゴヌクレオチドの「修飾パターン」とは、特に言及がない限り、塩基の配列とは無関係に、オリゴヌクレオチドを構成する各ヌクレオシドの糖部分の修飾様式の配置を意味する。また、特に言及された場合、更に各ヌクレオシド間の結合様式と組み合わせた修飾パターンを意味する。糖部分の構造やヌクレオシド間結合は、標的配列に依存せず、分子としての安定性や、その安定性に起因する結合性能に影響を与える要素であることから、ある標的配列に対して確認された修飾パターンによる作用効果が、別の標的配列に対して同じ修飾パターンを適用した場合にも同様の作用効果が示される蓋然性が高いとされている（例えば、Mol Ther. (2018) 26:708-717を参照）。
- [0042] 本明細書において、「天然型のヌクレオシド」とは、2'-デオキシヌクレオシド又はリボヌクレオシドである。各塩基に対応する2'-デオキシヌクレオシド（「DNA」ともいう。糖部分を表す記号は（D）であり、塩基部分の小文字標記で表す場合もある。）は以下の式で表される構造を有し、2'-デオキシアデノシンはA（D）またはa、2'-デオキシグアノシンはG（D）またはg、2'-デオキシシチジンはC（D）またはc、チミジンはT（D）またはt、2'-デオキシ-5-メチルシチジンは5C（D）または5c、2'-デオキシウリジンはU（D）またはu、と表記する場合もある。また、塩基を特定しない2'-デオキシヌクレオシドはN（D）と表記する場合がある。
- [0043]

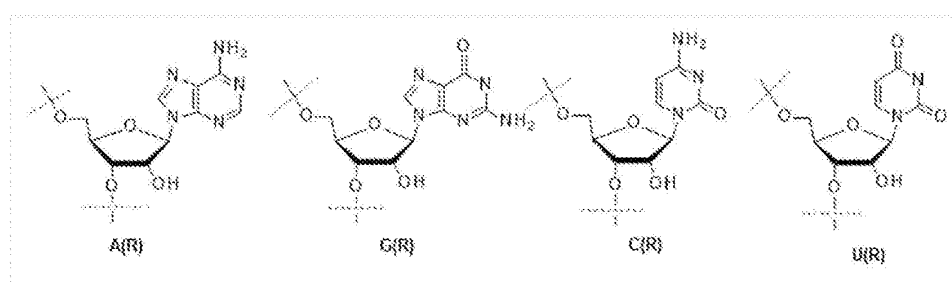
[化5]



(上記各式中、破線は結合手を示す。)

[0044] 各塩基に対応するリボヌクレオシド(「RNA」ともいう。糖部分を表す記号は(R)であり、塩基部分の大文字標記で表す場合もある。)は以下の式で表される構造を有し、アデノシンはA(R)またはA、グアノシンはG(R)またはG、シチジンはC(R)またはC、ウリジンはU(R)またはU、と表記する場合もある。また、塩基を特定しないリボヌクレオシドはN(R)と表記する場合がある。

[0045] [化6]



(上記各式中、破線は結合手を示す。)

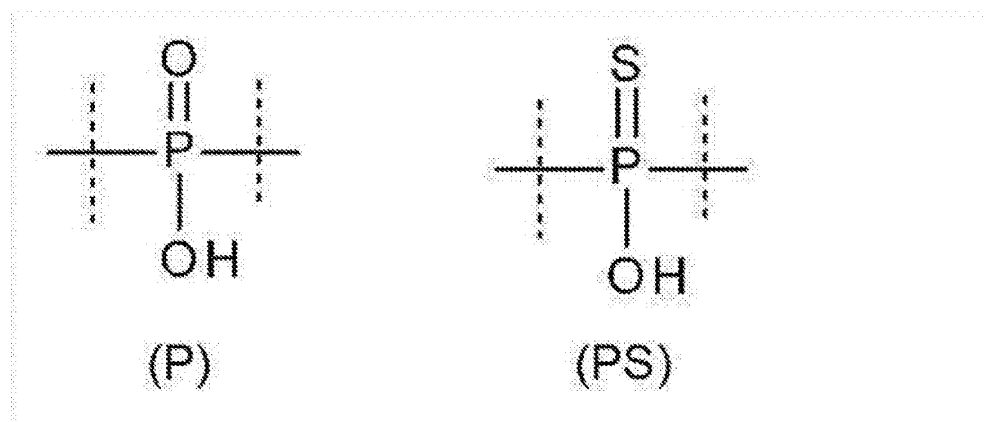
[0046] 本明細書において、「修飾ヌクレオシド」及び「修飾ヌクレオチド」とは、天然のヌクレオシドの塩基部分、糖部分又はリン酸ジエステル部分に少なくとも一つの化学修飾された構造を含むヌクレオシド又はヌクレオチドを意

味する。

[0047] 本明細書において、「化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合」とは、天然のヌクレオシド間結合に採用されるリン酸ジエステル結合、又は化学修飾されたリン酸ジエステル結合を意味する。天然のヌクレオシド間結合は、下記式 (P) で表されるリン酸ジエステル結合であり、本明細書における塩基配列の表示においては、ヌクレオシド間、あるいは、ヌクレオシドと、隣接する構造ユニット（例えば G a l N A c ユニット）、化学修飾構造（例えば、後述する「2」で表示される構造）、又は、化学リンカーもしくはオリゴヌクレオチドリンカー（例えば、後述する「Z」で表示される構造）との間に文字および記号を挟まずに表示される。また、本明細書において、「化学修飾されたリン酸ジエステル結合」とは、リン酸ジエステル結合に含まれるリン原子が化学修飾された結合様式を意味する。化学修飾されたリン酸ジエステル結合の例としては、下記式 (P S) で表されるホスホロチオエート結合、リン原子に窒素原子が付加した修飾結合であるホスホロアミデート結合、リン原子に置換可能なアルキル基が付加した修飾結合であるアルキルホスホネート結合（例えば、メチル基の場合は、メチルホスホネート結合となる）、リン酸基の非共有結合の酸素原子に置換可能なアルキル基が付加した修飾結合であるリン酸トリエステル結合が挙げられる。ホスホロチオエート結合が採用される場合、本明細書における塩基配列の表示においては、ヌクレオシド間、あるいは、ヌクレオシドと、その隣接する構造ユニット（例えば G a l N A c ユニット）、化学修飾構造（例えば、後述する「2」で表示される構造）、又は、化学リンカーもしくはオリゴヌクレオチドリンカー（例えば、後述する「Z」で表示される構造）との間に「^」が表示される。

[0048]

[化7]



[0049] (上記各式中、破線は結合手を示し、一方の結合手は5'側に隣接するヌクレオシドの3'-水酸基の酸素原子(3'位が修飾されたヌクレオシドでは2'位の酸素原子)、隣接する構造ユニット、又は、化学リンカーもしくはオリゴヌクレオチドリinkerとエステル結合することを表し、他方の結合手は3'側に隣接するヌクレオシドの5'-水酸基の酸素原子、構造ユニット、又は、化学リンカーもしくはオリゴヌクレオチドリinkerとエステル結合することを表す。)

[0050] 本明細書において、「糖修飾ヌクレオシド」とは、ヌクレオシドの糖部分が修飾されているヌクレオシドをいう。糖修飾ヌクレオシドには、本発明の属する技術分野で知られている糖修飾の全ての様式を含む。糖修飾ヌクレオシドの例としては、2'-修飾ヌクレオシド、3'-修飾ヌクレオシド、4'-チオ修飾ヌクレオシド、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシド及び2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドなどが挙げられる。好ましい糖修飾としては、2'-O-アルキル化(メチル化、エチル化、プロピル化、イソプロピル化、ブチル化など)、2'-O-アルコキシアルキル化(メトキシエチル化、メトキシプロピル化、メトキシブチル化など)、2'-ハロゲン化(クロロ化、フルオロ化など)、3'-O-アルキル化(メチル化、エチル化、プロピル化、イソプロピル化、ブチル化など)、3'-O-アルコキシアルキル化(メトキシエチル化、メトキシプロピル化、メトキシブチル

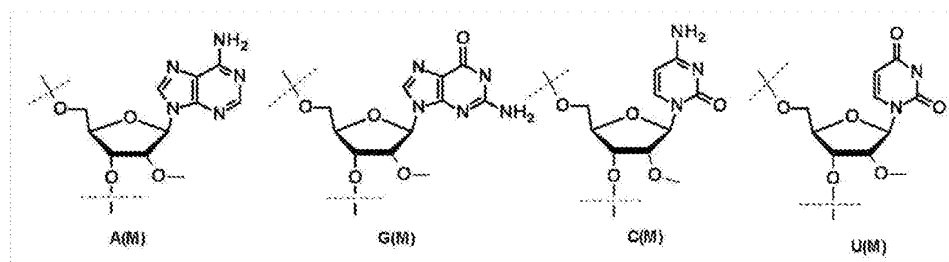
化など)、3'-ハロゲン化(クロロ化、フルオロ化など)、2'-O、4'-C-架橋化(アルキレン化架橋等)などが例示される。

[0051] 本明細書において、「2'-修飾ヌクレオシド」とは、ヌクレオシドに含まれるリボフラノースの2'位が化学修飾されたヌクレオシドをいう。そのような修飾の例としては、例えば、2'-O-アルキル化(メチル化、エチル化、プロピル化、イソプロピル化、ブチル化など)ヌクレオシド、2'-O-アルコキシアルキル化(メトキシエチル化、メトキシプロピル化、メトキシブチルなど)ヌクレオシド、2'-ハロゲン化(クロロ化、フルオロ化など)ヌクレオシド、2'-アリル化ヌクレオシド、2'-アミノ化ヌクレオシド、2'-アジド化ヌクレオシド、2'-O-アリル化ヌクレオシド、2'-OCF₃ヌクレオシド、2'-O(CH₂)₂SCH₃ヌクレオシド、2'-O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)ヌクレオシド、又は2'-O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)ヌクレオシド(各R_mとR_nは個別にH、アミノ保護基、又は置換あるいは非置換C₁-C₁₀アルキルである)等を例示することができる。好ましい2'-修飾ヌクレオシドは、2'-O-アルキル化ヌクレオシド、2'-O-アルコキシアルキル化ヌクレオシド、又は2'-ハロゲン化ヌクレオシドである。

[0052] 糖修飾ヌクレオシドのうち、2'-O-アルキル化修飾の例としては、例えば、2'-O-メチルヌクレオシド(「2'-OMe RNA」又は「2'-O-メチルRNA」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は(M)である。)が挙げられる。各塩基に対応した2'-O-メチルヌクレオシドは、以下の式で表される構造を有し、2'-O-メチルアデノシンをA(M)、2'-O-メチルグアノシンをG(M)、2'-O-メチルシチジンをC(M)、2'-O-メチル-5-メチルシチジンを5C(M)、2'-O-メチルウリジンをU(M)、2'-O-メチル-5-メチルウリジンをT(M)、と表記する場合もある。また、塩基を特定しない2'-O-メチルヌクレオシドは、N(M)と表記する場合がある。

[0053]

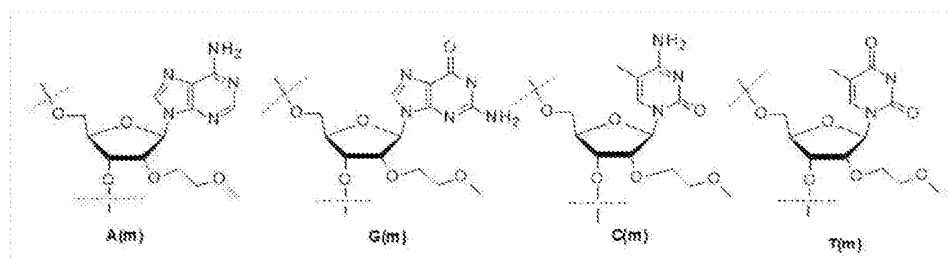
[化8]



(上記各式中、破線は結合手を示す。)

[0054] また、2'-O-アルコキシアルキル化修飾の例としては、例えば、2'-O-メトキシエチルヌクレオシド(「2'-MOE RNA」、「2'-O-メトキシエチルRNA」又は「2'-メトキシエトキシRNA」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は(m)である。)が挙げられる。各塩基に対応した2'-O-メトキシエチルヌクレオシドは、以下の式で表される構造を有し、2'-O-メトキシエチルアデノシンをA(m)、2'-O-メトキシエチルグアノシンをG(m)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジンをC(m)(塩基の構造は5Cだが、便宜上C(m)と表示する。2'-O-メトキシエチルシチジンに置き換えて用いることもできる。)、2'-O-メトキシエチルウリジンをU(m)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジンをT(m)、と表記する場合もある。また、塩基を特定しない2'-O-メトキシエチルヌクレオシドはN(m)と表記する場合がある。

[0055] [化9]

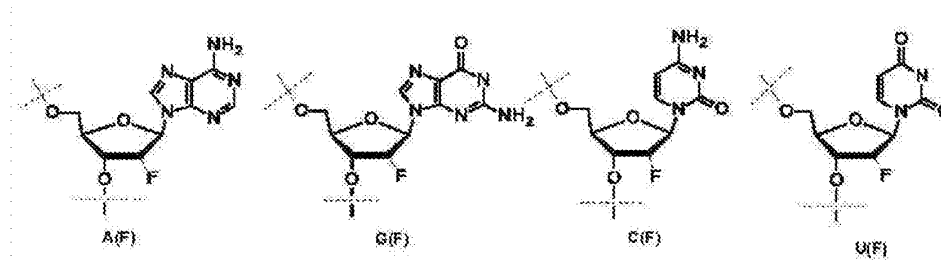


(上記各式中、破線は結合手を示す。)

[0056] また、2'-ハロゲン化修飾の例としては、例えば、2'-デオキシ-2

’-フルオロヌクレオシド（「2’-F RNA」又は「2’-デオキシ-2’-フルオロRNA」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は（F）である。）が挙げられる。各塩基に対応した2’-デオキシ-2’-フルオロヌクレオシドは、以下の式で表される構造を有し、2’-デオキシ-2’-フルオロアデノシンをA（F）、2’-デオキシ-2’-フルオログアノシンをG（F）、2’-デオキシ-2’-フルオロシチジンをC（F）、2’-デオキシ-2’-フルオロ-5-メチルシチジンを5mC（F）、2’-デオキシ-2’-フルオロウリジンをU（F）、2’-デオキシ-2’-フルオロ-5-メチルウリジンをT（F）、と表記する場合もある。また、塩基を特定しない2’-デオキシ-2’-フルオロヌクレオシドはN（F）と表記する場合がある。

[0057] [化10]



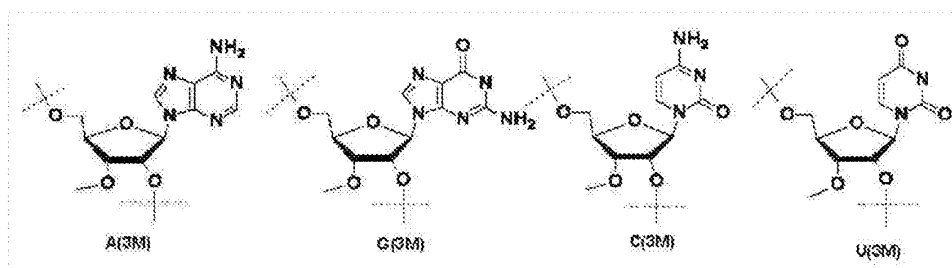
（上記各式中、破線は結合手を示す。）

[0058] 本明細書において、「3’-修飾ヌクレオシド」とは、ヌクレオシドに含まれるリボフラノースの3’位が化学修飾されたヌクレオシドをいう。3’-修飾ヌクレオシドにおける2’位の水酸基は修飾されていてもよい。そのような修飾の例としては、例えば、3’-O-アルキル化（メチル化、エチル化、プロピル化、イソプロピル化、ブチル化など）ヌクレオシド、3’-O-アルコキシアルキル化（メトキシエチル化、メトキシプロピル化、メトキシブチル化など）ヌクレオシド、3’-ハロゲン化（クロロ化、フルオロ化など）ヌクレオシド、3’-アリル化ヌクレオシド、3’-アミノ化ヌクレオシド、3’-アジド化ヌクレオシド、3’-O-アリル化ヌクレオシド、3’-OCF₃ヌクレオシド、3’-O(CH₂)₂SCH₃ヌクレオシド、

3' - O - (CH₂)₂ - O - N (R_m) (R_n) ヌクレオシド、又は 3' - O - CH₂ - C (=O) - N (R_m) (R_n) ヌクレオシド (各 R_m と R_n は個別に H、アミノ保護基、又は置換あるいは非置換 C1 - C10 アルキルである) 等を例示することができる。好ましい 3' - 修飾ヌクレオシドは、3' - O - アルキル化ヌクレオシド、3' - O - アルコキシアルキル化ヌクレオシド、又は 3' - ハロゲン化ヌクレオシドである。等を例示することができる。

[0059] 3' - 修飾ヌクレオシドのうち、3' - O - アルキル化修飾の例としては、例えば、3' - O - メチルヌクレオシド (「3' - OMe RNA」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は (3M) である。) が挙げられる。各塩基に対応した 3' - O - メチルヌクレオシドは、以下の式で表される構造を有し、3' - O - メチルアデノシンを A (3M)、3' - O - メチルグアノシンを G (3M)、3' - O - メチルシチジンを C (3M)、3' - O - メチル-5-メチルシチジンを 5mC (3M)、3' - O - メチルウリジンを U (3M)、3' - O - メチル-5-メチルウリジンを T (3M)、と表記する場合もある。また、塩基を特定しない 3' - O - メチルヌクレオシドは N (3M) と表記する場合がある。

[0060] [化11]



(上記各式中、破線は結合手を示す。)

[0061] また、3' - O - アルコキシアルキル化修飾の例としては、例えば、3' - O - メトキシエチルヌクレオシド (「3' - MOE RNA」、「3' - O - メトキシエチル RNA」又は「3' - メトキシエトキシ RNA」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は (3m) である。) が挙げられる。各塩基に対応した 3' - O - メトキシエチルヌクレオシドは、各塩基に対応し

た3'-O-メチルヌクレオシドの上記構造図において、3'位の酸素原子に結合したメチル基に代わってメトキシエチル基が結合した構造を有する。各塩基に対応した3'-O-メトキシエチルヌクレオシドは、3'-O-メトキシエチルアデノシンをA(3m)、3'-O-メトキシエチルグアノシンをG(3m)、3'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジンをC(3m)(塩基の構造は5Cだが、便宜上C(3m)と表示する。3'-O-メトキシエチルシチジンに置き換えて用いることもできる。)、3'-O-メトキシエチルウリジンをU(3m)、3'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジンをT(3m)、と表記する場合もある。また、塩基を特定しない3'-O-メトキシエチルヌクレオシドはN(3m)と表記する場合がある。

[0062] また、3'-ハロゲン化修飾の例としては、例えば、3'-デオキシ-3'-フルオロヌクレオシド(「3'-F RNA」又は「3'-デオキシ-3'-フルオロRNA」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は(3F)である。)が挙げられる。各塩基に対応した3'-デオキシ-3'-フルオロヌクレオシドは、各塩基に対応した3'-O-メチルヌクレオシドの上記構造図において、3'位の炭素原子に結合したメトキシ基に代わってフッ素原子が結合した構造を有する。各塩基に対応した3'-デオキシ-3'-フルオロヌクレオシドは、3'-デオキシ-3'-フルオロアデノシンをA(3F)、3'-デオキシ-3'-フルオログアノシンをG(3F)、3'-デオキシ-3'-フルオロシチジンをC(3F)、3'-デオキシ-3'-フルオロ-5-メチルシチジンを5mC(3F)、3'-デオキシ-3'-フルオロウリジンをU(3F)、3'-デオキシ-3'-フルオロ-5-メチルウリジンをT(3F)と表すこともある。また、塩基を特定しない3'-デオキシ-3'-フルオロヌクレオシドはN(3F)と表記する場合がある。

[0063] 本明細書において、「4'-チオ修飾ヌクレオシド」とは、ヌクレオシドに含まれるリボフラノースの4'位の酸素原子が硫黄原子で置換されたヌク

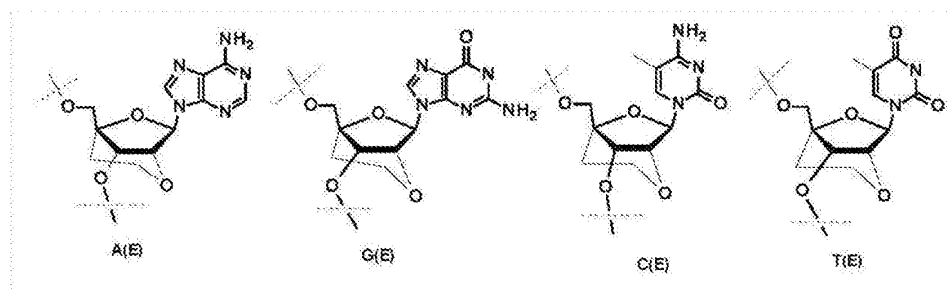
レオシドをいう。4' -チオ修飾ヌクレオシドの例としては、4' -酸素原子が硫黄原子で置換された β -D-リボヌクレオシドを挙げることができる (Hoshika, S. et al. FEBS Lett. 579, p. 3115-3118, (2005); Dande, P. et al. J. Med. Chem. 49, p. 1624-1634 (2006); Hoshika, S. et al. ChemBioChem. 8, p. 2133-2138, (2007))。

[0064] 本明細書において、「4' -チオ-2' -修飾ヌクレオシド」とは、ヌクレオシドに含まれるリボフラノースの2' 位が化学修飾され、かつ、リボフラノースの4' 位の酸素原子が硫黄原子で置換されたヌクレオシドをいう。4' -チオ-2' -修飾ヌクレオシドの例としては、2' -H、又は、2' -O-メチルを保持する4' -チオ-2' -修飾ヌクレオシドを挙げることができる (Matsugami, et al. Nucleic Acids Res. 36, 1805 (2008))。

[0065] 糖修飾ヌクレオシドのうち、2' -O, 4' -C-架橋化修飾の例としては、例えば、2' -O, 4' -C-エチレン架橋ヌクレオシド(「ENA」又は「ENAユニット」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は(E)である。)(Morita, K. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, p. 73 (2002).; Morita, K. et al. Bioorg. Med. Chem., 11, p. 2211 (2003).)が挙げられる。各塩基に対応した2' -O, 4' -C-エチレン架橋ヌクレオシドは、以下の式で表される構造を有し、2' -O, 4' -C-エチレン架橋アデノシンをA(E)、2' -O, 4' -C-エチレン架橋グアノシンをG(E)、2' -O, 4' -C-エチレン架橋-5-メチルシチジンをC(E)(塩基の構造は5Cだが、便宜上C(E)と表示する。2' -O, 4' -C-エチレン架橋シチジンに置き換えて用いることもできる。)、2' -O, 4' -C-エチレン架橋ウリジンをU(E)、2' -O, 4' -C-エチレン架橋-5-メチルウリ

ジンをT (E)、と表記する場合もある。また、塩基を特定しない2' - O, 4' - C - エチレン架橋ヌクレオシドはN (E) と表記する場合がある。

[0066] [化12]

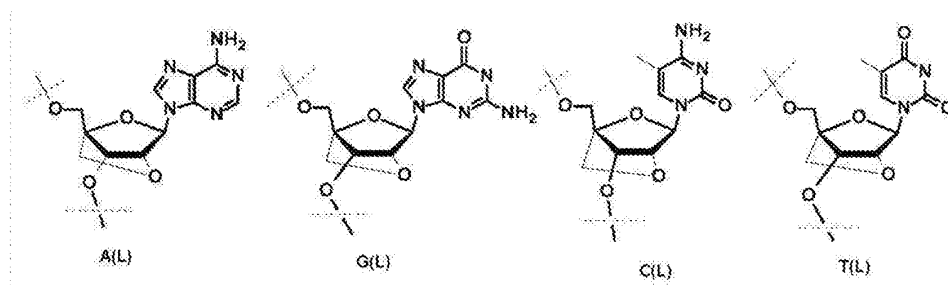


(上記各式中、破線は結合手を示す。)

[0067] また、2' - O, 4' - C - 架橋化修飾の別の例としては、例えば、2' - O, 4' - C - メチレン架橋ヌクレオシド (「LNA」又は「LNAユニット」と表示する場合もある。糖部分を表す記号は(L)である。)(Obika, S. et al. Tetrahedron Lett., 38, p. 8735 - (1997). ; Obika, S. et al., Tetrahedron Lett., 39, p. 5401 - (1998). ; A. A. Koshkin, A. A. et al. Tetrahedron, 54, p. 3607 (1998). ; Obika, S. Bioorg. Med. Chem., 9, p. 1001 (2001).) が挙げられる。各塩基に対応した2' - O, 4' - C - メチレン架橋ヌクレオシドは、以下の式で表される構造を有し、2' - O, 4' - C - メチレン架橋アデノシンをA (L)、2' - O, 4' - C - メチレン架橋グアノシンをG (L)、2' - O, 4' - C - メチレン架橋 - 5 - メチルシチジンをC (L) (塩基の構造は5Cだが、便宜上C (L) と表示する。2' - O, 4' - C - メチレン架橋シチジンに置き換えて用いることもできる。)、2' - O, 4' - C - メチレン架橋ウリジンをU (L)、2' - O, 4' - C - メチレン架橋 - 5 - メチルウリジンをT (L) と表示することもある。また、塩基を特定しない2' - O, 4' - C - メチレン架

橋ヌクレオシドはN (L) と表記する場合がある。

[0068] [化13]

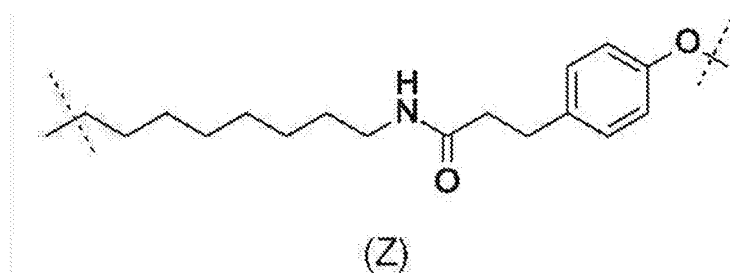


(上記各式中、破線は結合手を示す。)

[0069] 本発明のオリゴヌクレオチド又はその塩は、標的配列のヌクレオチド配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を有するアンチセンス鎖領域（単にアンチセンス鎖ということもある）、及び該アンチセンス鎖領域の相補領域におけるヌクレオチド配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を有するセンス鎖領域（単にセンス鎖ということもある）を有する。センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域は、相補領域のヌクレオチド配列において2本鎖構造を形成するが、それぞれが独立したオリゴヌクレオチドとして2本鎖オリゴヌクレオチドを形成していてもよく、一方の5'末端のヌクレオチドの5'位と他方の3'末端のヌクレオチドの3'位（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位）とが連結されて1本鎖オリゴヌクレオチドを形成していてもよい。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチドは2分子のオリゴヌクレオチドでもよく、1分子のオリゴヌクレオチドでもよい。本発明のオリゴヌクレオチドが1分子のオリゴヌクレオチドである場合、センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域の連結様式としては、本発明のオリゴヌクレオチドがRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限り特に限定されないが、例えば、一方の5'末端のヌクレオチドの5'位と他方の3'末端のヌクレオチドの3'位（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位）との、所望の化学リンカー又はオリゴヌクレオチドリリンカーによる連結が挙げられる。そのようなリンカーとしては、例えば、WO 2012/074038に記載のり

ンカーが挙げられ、好ましくは、下記式（Z）で示されるリンカーが挙げられる。下記式（Z）で示されるリンカーはWO 2012/074038にしたがって適宜調整できる。

[0070] [化14]

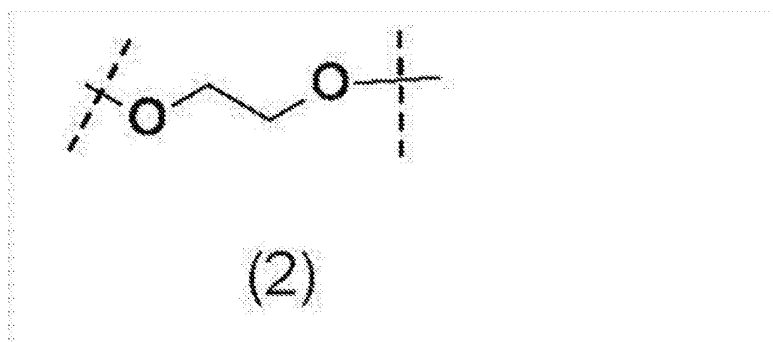


[0071] （上記式中、破線は結合手を示し、フェニル基に結合している酸素原子は、隣接するアンチセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'ーリン酸基とリン酸ジエステル結合することを表し、他方の末端のメチレン基は隣接するセンス鎖領域の3'末端のヌクレオチドの3'ーリン酸基（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位のリン酸基）とリン酸ジエステル結合することを表し、形成される各リン酸ジエステル結合は、ホスホロチオエート結合などの化学修飾されたリン酸ジエステル結合であってもよい。）

[0072] 本発明のオリゴヌクレオチドにおける、3'末端のヌクレオチドの3'位（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位）及び／又は5'末端のヌクレオチドの5'位は、水酸基又はリン酸基であってもよく、それらが化学修飾された構造であってもよい。化学修飾された構造としては、例えば、下記式（2）に示す構造が挙げられる。

[0073]

[化15]



[0074] (上記式中、破線は結合手を示し、一方の結合手は、隣接するヌクレオチドと結合することを表し、5'末端のヌクレオチドと結合する場合は5'-リン酸基と、3'末端のヌクレオチドと結合する場合は3'-リン酸基(3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位のリン酸基)と、リン酸ジエステル結合を形成することを表し、他方の結合手は水素原子と結合して水酸基となることを表し、形成されるリン酸ジエステル結合は、ホスホロチオエート結合などの化学修飾されたリン酸ジエステル結合であってもよい。)

[0075] 本明細書における、「実質的に同一のヌクレオチド配列」とは、対象となるヌクレオチド配列に対して、全て同一の塩基からなるヌクレオチド配列に加え、70%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列、1又は数個の同一ではない塩基を含むが、オリゴヌクレオチドとして所望の機能を発揮することができるヌクレオチド配列も含む。ここで、「同一の塩基」とは、元の塩基と完全に同一の塩基に加えて、元の塩基と同等以上の塩基対形成能を有する塩基が含まれる。そのような塩基としては、例えば、化学修飾塩基であって、元の塩基と同等以上の塩基対形成能を有する塩基(例えば、Cと5C、UとT(5U))は、それぞれ同一の塩基とみなす。配列の同一性について、対象となるヌクレオチド配列に対して、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらにより好ましくは91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性、或いは、3塩基、2塩基又は1塩基のミスマッチを有する配列のことをいう。ヌクレオチド配列の同一性はBLAST(登録商標)等の公知の遺伝子解析ソフトウェアを用い

て計算することが出来る。

[0076] 本明細書における、「実質的に相補的なヌクレオチド配列」とは、対象となるヌクレオチド配列に対して、全てが相補的なヌクレオチドからなるヌクレオチド配列に加え、1又は数個（例えば、5個、4個、3個、又は2個）のヌクレオチドが相補的なヌクレオチドではないが、オリゴヌクレオチド同士が塩基対を形成するヌクレオチド配列も含む。また、本明細書において、「相補的な塩基」とは、対象となる塩基に対してワトソン－クリック塩基対を形成できる塩基をいい、未修飾の塩基であってもよく、化学修飾された塩基であってもよい。例えば、5－メチルウラシルはアデニンと、5－メチルシトシンはグアニンと、それぞれ互いに相補的な塩基である。

[0077] 本明細書におけるオリゴヌクレオチドの「2本鎖構造」とは、互いに実質的に相補的なヌクレオチド配列同士がワトソン－クリック塩基対を形成して2本鎖の構造を有しているものをいう。2本鎖構造を形成するヌクレオチド配列は、2分子の異なるオリゴヌクレオチド間における実質的に相補的なヌクレオチド配列同士であってもよく、1本鎖オリゴヌクレオチドの内部における実質的に相補的な配列同士であってもよい。

[0078] 本明細書において、「構造ユニット」とは、オリゴヌクレオチドに所望の機能を付与する化学構造単位をいう。オリゴヌクレオチドに付与する所望の機能としては、例えば、オリゴヌクレオチドを標的組織もしくは標的細胞（標的組織等ともいう）に輸送する機能、オリゴヌクレオチドの体内動態を改善する機能、等が挙げられる。構造ユニットは、公知の方法でオリゴヌクレオチドに結合させることができるが、例えば、構造ユニット中にアミダイト構造を有することで、オリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドの3'位（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位）又は5'末端のヌクレオチドの5'位に結合させることができる。また、構造ユニット中に、リガンドなどの標的組織等への輸送を促進する構造を有することで、標的組織等に対する輸送能をオリゴヌクレオチドに付与することができるが、そのような構造としては、肝細胞に輸送するためのG a l N A cユニット、肝臓や筋組

織に輸送するための脂肪酸ユニット等が挙げられる。本明細書において、このような標的組織等に対する輸送能を付与するための構造ユニットを、特に「輸送用ユニット」ということがある。

[0079] <2. RNA i-オリゴヌクレオチド>

本明細書において、「RNA i-オリゴヌクレオチド」とは、センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域に含まれる実質的に相補的なヌクレオチド同士がワトソン-クリック塩基対を形成し、2本鎖構造を形成する相補領域を含み、標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有するオリゴヌクレオチドである。標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限り、RNA i-オリゴヌクレオチドに含まれる相補領域の全ての塩基がワトソン-クリック塩基対を形成していなくてもよい。本明細書において、RNA i-オリゴヌクレオチドは、「siRNA」と記載される場合もある。

[0080] 本明細書において、「標的配列と実質的に同一のヌクレオチド配列」とは、標的配列と同一のヌクレオチド配列をいうが、完全に同一の配列に加えて、RNA i-オリゴヌクレオチドが標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限りにおいて、実質的に同一のヌクレオチド配列も含む。

[0081] 本明細書において、「標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列」とは、標的配列と相補的なヌクレオチド配列をいうが、完全に相補的な配列に加え、RNA i-オリゴヌクレオチドが標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限りにおいて、実質的に相補的なヌクレオチド配列も含む。

[0082] 本明細書において、標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含み、標的遺伝子に対してRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有するオリゴヌクレオチドを標的遺伝子に対するRNA i-オリゴヌクレオチドという。

[0083] 標的遺伝子に対するRNA i-オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は

、標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限りにおいて特に制限されないが、例えば、コンピュータソフトウェア（例えば、GENETYX（登録商標）：GENETYX CORPORATION製等。）を用いて標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有すると予想された配列に基づいて決定することができる。さらに選択された配列に基づいて作製したRNA iーオリゴヌクレオチドのRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を確認することによって決定することもできる。

[0084] 本明細書中において遺伝子発現抑制作用とは、遺伝子の発現を完全に抑制する作用の他に、コントロールに比して遺伝子の発現を減少させる作用も含まれ、遺伝子抑制（gene silencing）も遺伝子発現抑制作用に含まれる。また、本明細書においては、遺伝子発現抑制作用と遺伝子発現抑制活性を同じ意味に用いている。

[0085] RNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用は、当業者が通常行う方法で確認することができるが、例えば、標的遺伝子が発現している細胞に標的遺伝子に対するRNA iーオリゴヌクレオチドを投与して一定時間経過後の標的遺伝子の翻訳産物であるタンパク質をウエスタンブロット解析によって定量しタンパク質の発現量をコントロールと比較することによって確認することが出来る。また、リアルタイムPCRの手法により標的遺伝子に対するRNA iーオリゴヌクレオチド投与後の標的遺伝子の発現量をリアルタイムで測定することによっても確認することができる。

[0086] 本明細書において、「標的配列」とは、標的遺伝子であるトランスフェリン受容体2をコードする遺伝子に対するmRNAのヌクレオチド配列のうち、いずれの部分でもよい18ヌクレオチド以上の配列であって、本発明のRNA iーオリゴヌクレオチドが標的とする配列を意味する。また、標的配列にSNPs等が知られている場合、それらの変異を有する配列も標的配列に含まれる。本発明のRNA iーオリゴヌクレオチドにおいては、アンチセンス鎖領域の少なくとも一部に標的配列と実質的に相補的な配列（以下、「標

的対応配列」)を含む。

- [0087] 本明細書において、「相補領域」とは、RNA iーオリゴヌクレオチドに含まれるセンス鎖領域とアンチセンス鎖領域のヌクレオチド配列が、互いに実質的に相補的である領域を意味する。センス鎖領域とアンチセンス鎖領域は、その相補領域において、必ずしも完全に相補的である必要はないが、少なくとも相補領域における末端の塩基同士は相補的である。本発明のRNA iーオリゴヌクレオチドにおいて、アンチセンス鎖領域の相補領域は、標的対応配列を包含するが、相補領域の5'末端及び／又は3'末端がさらに延長された領域においてセンス鎖領域との相補性を維持していてもよい。
- [0088] 本発明におけるRNA iーオリゴヌクレオチドを構成するアンチセンス鎖領域における標的対応配列の鎖長は、RNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限り特に限定されないが、18ヌクレオチドから、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の全長までのいかなる長さでもよい。例えば、標的対応配列の鎖長は18～29ヌクレオチドとすることができ、好ましくは18～24ヌクレオチド、18～23ヌクレオチド、又は18～22ヌクレオチドであり、より好ましくは18～21ヌクレオチドであり、さらに好ましくは18又は19ヌクレオチドである。
- [0089] 本発明におけるRNA iーオリゴヌクレオチドを構成するセンス鎖領域及びアンチセンス鎖領域における各相補領域の鎖長は、RNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限り特に限定されず、いかなる長さでもよい。例えば、相補領域の鎖長は19～29ヌクレオチドとすることができ、好ましくは19～24ヌクレオチド、19～23ヌクレオチド、又は19～22ヌクレオチドであり、より好ましくは19～21ヌクレオチドであり、さらに好ましくは19ヌクレオチドである。
- [0090] 本発明におけるRNA iーオリゴヌクレオチドを構成するセンス鎖領域及びアンチセンス鎖領域の鎖長は、RNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限り特に限定されず、いかなる長さでもよい。センス鎖領域の鎖長としては、例えば、19～39ヌクレオチドとすることができ、好まし

くは19～29ヌクレオチドであり、より好ましくは19～24ヌクレオチド、19～23ヌクレオチド、又は19～22ヌクレオチドであり、さらに好ましくは19～21ヌクレオチドであり、最も好ましくは19ヌクレオチドである。アンチセンス鎖領域の鎖長としては、例えば、19～39ヌクレオチドとすることができ、好ましくは19～29ヌクレオチドであり、より好ましくは19～24ヌクレオチド、19～23ヌクレオチド、又は19～22ヌクレオチドであり、さらに好ましくは21～23ヌクレオチドであり、最も好ましくは21ヌクレオチドである。

[0091] 本発明のRNA i-オリゴヌクレオチドにおいて、センス鎖領域とアンチセンス鎖領域が異なるオリゴヌクレオチド分子に存在する場合、その全体が2本鎖構造である必要はなく、5'及び／又は3'末端のヌクレオシドが一部突出した、又は、2本鎖構造を形成しないオーバーハング構造を有していてもよい。そのようなオーバーハング構造は、例えば、1～5個のヌクレオシド、好ましくは1～3個のヌクレオシド、さらに好ましくは2個のヌクレオシドからなる構造が挙げられる。また、オーバーハング構造は、2本鎖オリゴヌクレオチドの全ての末端に存在していてもよく、その一部のみであってもよい。本明細書において、オーバーハング構造の表示として、センス鎖領域の5'末端をS₀₅、3'末端をS₀₃、アンチセンス鎖領域の5'末端をA₀₅、3'末端をA₀₃、とそれぞれ表示する場合がある。オーバーハング構造の塩基配列は特に限定されないが、オリゴT又はオリゴUを採用することができる。

[0092] RNA i-オリゴヌクレオチドは、下記の(i)～(iv)から選択される少なくともいずれか一つの性質を有する。

(i) 標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する；

(ii) RNA分解酵素に安定で、標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する；

(iii) エキソヌクレアーゼに対して安定で、標的遺伝子に対するRNA干渉

作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する；

(iv) RNA分解酵素、エキソヌクレアーゼに対して安定で、標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する；

[0093] RNA i-オリゴヌクレオチドの一例としては、標的遺伝子に対するアンチセンス鎖領域、及び該アンチセンス鎖領域に実質的に相補的なヌクレオチド配列を有するセンス鎖領域を有する2本鎖オリゴヌクレオチドを由来とし、このアンチセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'位及びセンス鎖領域の3'末端のヌクレオチドの3'位(3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位)が、各々において化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル構造を形成したリンカーによって結合されていてもよい。このようなオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド3'-P(=O)(OH)-[リンカー]-P(=O)(OH)-5'-オリゴヌクレオチド、の構造を形成している[ここで、『オリゴヌクレオチド3'』は、オリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドの3'位(3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位)に水酸基上の水素原子を持たない構造を表し、『5'-オリゴヌクレオチド』は、オリゴヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドの5'位に水酸基上の水素原子を持たない構造を示す。]オリゴヌクレオチドを挙げることができる。このようなリンカーは、例えばWO2012/074038等に記載されており、これら文献の記載を参考にして合成することができる。

[0094] RNA i-オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシドは、天然型ヌクレオシドであってもよく、糖修飾ヌクレオシドを採用してもよい。また、ヌクレオシド間結合は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合であり、例えば、リン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合を適宜選択することができる。

[0095] 本発明のRNA i-オリゴヌクレオチドは、TfR2 mRNAの発現を抑制することができる。また、本発明のRNA i-オリゴヌクレオチドは、細胞に対する毒性が小さく、安全性が高い医薬品に適用し得る。また、本発明のRNA i-オリゴヌクレオチドは、TfR2 mRNAの発現を抑制す

ることで、鉄代謝において中心的な役割を担っている *hepcidin* の産生を抑制し得る。また、本発明の RNA i-オリゴヌクレオチドは、*TfR2* mRNA の発現を抑制することで、血漿中鉄濃度及び／又は HGB 値を上昇し得る。作用機序は特に限定されないが、本発明の RNA i-オリゴヌクレオチドは、*TfR2* mRNA の発現及び／又は *hepcidin* の産生を抑制することにより治療又は予防可能な疾患の治療又は予防に用いることができる。そのような疾患としては、例えば、貧血が挙げられる。作用機序は特に限定されないが、本発明の RNA i-オリゴヌクレオチドは、例えば、HGB 値を上昇させることで貧血を治療又は予防し得る。また、本発明の RNA i-オリゴヌクレオチドは、血液細胞輸血が必要な貧血患者に対して、血液細胞輸血の頻度及び／又は輸血量を軽減し得る。例えば、貧血患者に対して一定期間（例えば、1 日、1 週間、2 週間、4 週間、8 週間、12 週間、1 カ月、2 カ月、3 カ月、6 カ月又 1 年）における血液細胞輸血の頻度及び／又は輸血量を約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、又は約 100% 軽減し得る。

[0096] 本発明は、本発明の RNA i-オリゴヌクレオチドを有効成分として含有する貧血の治療又は予防に用いる医薬組成物、当該オリゴヌクレオチドの有効量を投与することを含む貧血を治療又は予防する方法、貧血の治療又は予防に使用するための当該オリゴヌクレオチド、貧血の治療又は予防用医薬組成物の製造における本発明の RNA i-オリゴヌクレオチドの使用、等の医薬用途発明を提供する。本発明の RNA i-オリゴヌクレオチドが治療又は予防し得る貧血には例えば、慢性炎症に伴う貧血 (*anemia of chronic disease*、ACD)、骨髓機能不全に伴う貧血、鉄欠乏性貧血、鉄剤不応答性貧血 (*iron refractory iron deficiency anemia*、IRIDA)、赤血球造血刺激因子製剤 (*erythropoietin stimulating agent*、ESA) 抵抗性の貧血、化学療法によって誘導される貧血、再生不良性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、及び、 β サラセミアもしくは鎌

状赤血球症等の遺伝性ヘモグロビン異常症等が含まれる。慢性炎症に伴う貧血には、例えば、関節リウマチもしくは全身性エリテマトーデスもしくは自己免疫性溶血性貧血等の自己免疫疾患に伴う貧血、感染症に伴う貧血、炎症性大腸炎等の炎症性腸疾患に伴う貧血、心不全に伴う貧血、慢性腎臓病に伴う貧血、癌性貧血、マクロファージ活性化症候群に伴う貧血及びキャスルマン病に伴う貧血等が含まれる。慢性腎臓病に伴う貧血には、例えば、糖尿病に伴う腎臓病、高血圧に伴う腎臓病、ネフローゼ症候群（例えば、フィンランド型先天性ネフローゼ症候群、びまん性メサンギウム硬化症、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、ギャロウェイ・モフト（Galloway-Mowat）症候群、などが挙げられる）、慢性糸球体腎炎に伴う腎臓病（例えば、IgA腎症、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、紫斑病性腎炎、抗糸球体基底膜腎炎（グッドパスチャー（Goodpasture）症候群）、アルポート症候群、エプスタイン（Epstein）症候群、ループス腎炎、顕微鏡的多発血管炎、非典型溶血性尿毒症症候群、ネイル・パテラ（Nail-Patella）症候群（爪膝蓋症候群）、フィブロネクチン腎症、リポタンパク糸球体症、などが挙げられる）、慢性尿細管間質性腎炎に伴う腎臓病、慢性腎盂腎炎に伴う腎臓病、アミロイド沈着に伴う腎臓病、常染色体優性尿細管間質性腎臓病、ネフロン癆に伴う腎臓病、腎奇形に伴う腎臓病（例えば、多発性嚢胞腎などが挙げられる）、等の慢性腎臓病に伴う貧血が含まれる。癌性貧血には、例えば、多発性骨髄腫、急性白血病、慢性白血病、肺癌又は乳癌などの癌に伴う貧血が含まれる。骨髄機能不全に伴う貧血には、例えば、骨髄線維症に伴う貧血、骨髄異形成症候群に伴う貧血、慢性骨髄単球性白血病（chronic myelomonocytic leukemia、CMML）に伴う貧血、化学療法による骨髄抑制に伴う貧血、再生不良性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、ファンコニ貧血等が含まれる。

[0097] 本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドは、好ましくは、慢性炎症に伴う貧血、骨髄機能不全に伴う貧血の治療又は予防に用いられ得、より好ましく

は、関節リウマチもしくは全身性エリテマトーデスもしくは自己免疫性溶血性貧血等の自己免疫疾患に伴う貧血、感染症に伴う貧血、炎症性大腸炎等の炎症性腸疾患に伴う貧血、心不全に伴う貧血、慢性腎臓病に伴う貧血、癌性貧血、キャスルマン病に伴う貧血、骨髄線維症に伴う貧血、骨髄異形成症候群に伴う貧血、慢性骨髄単球性白血病に伴う貧血、及び化学療法による骨髄抑制に伴う貧血の治療又は予防に用いられ得る。

[0098] 本明細書において、「併用」とは、2以上の異なる薬剤を、同時、別個又は順次に投与することをいう。本発明は、本発明のRNA i-オリゴヌクレオチドを他の1又は2以上の薬剤と併用することを含む、貧血の治療又は予防方法を提供する。本発明のRNA i-オリゴヌクレオチドは、本発明の効果を奏する限り他の1又は2以上の薬剤と併用してもよい。好ましくは、本発明のRNA i-オリゴヌクレオチドを、貧血症状に対する作用機序が異なる他の薬剤と併用することでより大きな治療効果を提供し得る。例えば、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome, MDS) に対しては、赤血球の増殖を促すことで貧血を治療する作用機序を持つESA (erythropoiesis stimulating agent)、赤血球の分化を促すことで貧血を治療する作用機序を持つルスパテルセプト (Luspatercept) などの薬剤、DNAメチル化を抑制し異常な細胞を殺傷する作用機序を持つアザシチジン (Azacitidine) などの薬剤が処方される場合があるが、これらの薬剤とTfR2 siRNAとは作用機序が異なる。従って、これらの薬剤とTfR2 siRNAとの併用は、MDSに対して、単剤よりも大きな治療効果を提供し得る。また、慢性腎臓病に伴う貧血に対しては、赤血球の増殖を促すことで貧血を治療する作用機序を持つESAやHIFPHD (hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase) 阻害薬などの薬剤が処方される場合があるが、これらの薬剤とTfR2 siRNAとは作用機序が異なる。従って、これらの薬剤とTfR2 siRNAとの併用は、慢性腎臓病に伴う貧血に対して、単剤よりも大きな治療

効果を提供し得る。また、Ruxolitinibは骨髄線維症に対して、主にsplenomegalyなどの症状に対して治療効果を示すことが知られている(N Engl J Med 2012; 366:799-807)。しかし、貧血症状に対する効果は限局的か無効、あるいは貧血を悪化させることが知られている(Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:79)。ルキシソリチニブ(Ruxolitinib)による貧血が悪化する機序としては、JAK2を阻害することによって赤血球細胞の増殖に必要とされるEPOシグナルが抑制されてしまうことにあると考えられている。しかしながら、Ruxolitinibは骨髄線維症において、貧血を除く症状に対して一定の治療効果を挙げていることから、RuxolitinibとTfR2 siRNAとの併用は、骨髄線維症における貧血に対して有用な治療効果を提供し得る。同様に、Ruxolitinib以外の他のJAK2阻害薬との併用によっても骨髄線維症における貧血に対して有用な治療効果を提供し得る。他のJAK2阻害薬としては、例えば、フェドラチニブ(Fedratinib)、パクリチニブ(Pacritinib)及びモメロチニブ(Momelotinib)などが挙げられる。

[0099] 本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドを他の薬剤と併用して用いる場合、本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドを投与する順序は本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、併用する他の薬剤と同時に投与されてもよく、併用する他の薬剤の投与の前又は後に投与されてもよい。本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドと併用し得る薬剤としては、例えば、他の貧血治療薬又は貧血の原因となる疾患の治療薬が挙げられる。他の貧血治療薬としては、例えば、ESA、HIFPHD(hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase)阻害薬、経口鉄剤、静注鉄剤、ダナゾール(Danazol)、Luspatercept、などが挙げられる。ESAとしては、例えば、エポエチンアルファ、エポエチンベータ、エポエチンベータペゴル、エポエチンカッパ、ダルベポエ

チンアルファ等が挙げられる。HIFPHD阻害薬としては、例えば、ロキサデュスタット、バダデュスタット、ダプロデュスタット、エナロデュスタット、モリデュスタット等が挙げられる。経口鉄剤としては、例えば、クエン酸第一鉄、クエン酸第二鉄、フマル酸第一鉄、溶性ピロリン酸第二鉄、乾燥硫酸鉄等が挙げられる。静注鉄剤としては、例えば、カルボキシマルトース第二鉄、含糖酸化鉄等が挙げられる。また、貧血の原因となる疾患の治療薬としては、例えば、骨髄線維症治療薬、骨髄異形成症候群治療薬、慢性腎臓病治療薬、抗がん剤等が挙げられる。骨髄線維症治療薬としては、例えば、JAK2阻害薬が挙げられる。JAK2阻害薬としては、例えば、Ruxolitinib、Fedratinib、Pacritinib、及びMomelotinib等が挙げられ、Ruxolitinibとの併用が好ましい。骨髄異形成症候群治療薬としては、例えば、Azacitidine、レナリドミド (Lenalidomide) 等が挙げられ、Azacitidine又はレナリドミドとの併用が好ましい。慢性腎臓病治療薬としては、例えば、SGLT2 (sodium glucose co-transporter 2) 阻害薬、レニン・アンジオテンシン系阻害薬 (例えば、アンジオテンシンII受容体拮抗薬 (ARB)、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬など)、カルシウム拮抗薬、利尿薬、糖尿病治療薬、高脂血症治療薬、ステロイド、免疫抑制薬等が挙げられる。抗がん剤には化学療法薬が含まれ、化学療法薬としては、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、ドキソルビシン、パクリタキセル、アムルピシン等が挙げられる。

[0100] また、本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドは鉄過剰症の治療薬と併用してもよい。貧血に対する治療として血液細胞輸血を行う場合、慢性的な血液細胞輸血に伴い鉄過剰症を発症し得る。鉄過剰症とは、肝臓や心臓などの組織において、輸血した血液細胞由来の鉄が蓄積することで生じる病態であり、肝不全、心不全、糖尿病、関節痛、甲状腺機能低下症、下垂体機能低下、又は性機能不全等を呈し得る。したがって、貧血に対する治療において鉄過剰症の治療又は予防のために鉄過剰症治療薬を用いる場合があり、本発明

のRNA i-オリゴヌクレオチドと好適に併用し得る。鉄過剰症の治療薬としては、例えば、鉄キレート剤等が挙げられ、鉄キレート剤としてはデフェラシロクス (Deferasirox)、デフェロキサミン (Deferoxamine)、デフェリプロン (Deferiprone) 等が挙げられる。

[0101] <3. S3M-オリゴヌクレオチド>

本発明は、センス鎖領域が以下の式 (I) に示すオリゴヌクレオチドからなり、アンチセンス鎖領域が以下の式 (II) に示すオリゴヌクレオチドからなり、さらに以下の (a) 乃至 (g) に示される特徴を有するRNA i-オリゴヌクレオチド (以下、「S3M-オリゴヌクレオチド」という) 又はその薬学上許容される塩を提供する：

センス鎖領域：5' $S_{O5}-S_a-S_{19}-S_{18}-S_{17}-S_{16}-S_{15}-S_{14}-S_{13}-S_{12}-S_{11}-S_{10}-S_9-S_8-S_7-S_6-S_5-S_4-S_3-S_2-S_1-S_{O3}$ 3' (I)

アンチセンス鎖領域：5' $A_{O5}-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-A_{10}-A_{11}-A_{12}-A_{13}-A_{14}-A_{15}-A_{16}-A_{17}-A_{18}-A_{19}-A_a-A_{O3}$ 3' (II)

(a) $S_1 \sim S_{19}$ は、それぞれ1個のヌクレオシドを示し、 S_1 は3'-修飾ヌクレオシドである。 S_a は0～10個のヌクレオシド、好ましくは0～5個又は0～4個、より好ましくは0～3個、0～2個、又は0～1個、のヌクレオシドである。 S_{O3} 及び S_{O5} は、それぞれ独立して、0～5個、好ましくは0～4個、より好ましくは、0～3個、0～2個、又は0～1個、のヌクレオシドである。各ヌクレオシド間の結合は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合を示す；

(b) $A_1 \sim A_{19}$ は、それぞれ1個のヌクレオシドを示し、 A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13} 、 A_{14} 及び A_{15} のうち少なくとも1つはDNA、RNA、2'-O,4'-C-架橋化ヌクレオシド又は2'-MOE RNAである。 A_a は0～10個のヌクレオシド、好ましくは0～5個又は0～4個、より好ましくは0～3個、0～2

個、又は0～1個、のヌクレオシドである。 A_{03} 及び A_{05} は、それぞれ独立して、0～5個、好ましくは0～4個、より好ましくは、0～3個、0～2個、又は0～1個、のヌクレオシドである。各ヌクレオシド間の結合は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合を示す；

(c) $A_2 \sim A_a$ の間のヌクレオチド配列は、標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列（標的対応配列）からなり、 A_1 は標的配列の対応するヌクレオシドと相補的な塩基を有するヌクレオシド、アデニンを有するヌクレオシド、チミンを有するヌクレオシド、又はウラシルを有するヌクレオシドであり、 A_{03} と A_{05} が存在する場合、そのヌクレオチド配列は、それぞれ独立して、標的配列の対応するヌクレオシドとは独立に選択されるヌクレオチド配列である；

(d) $S_1 \sim S_a$ の間のヌクレオチド配列と $A_1 \sim A_a$ の間のヌクレオチド配列とは、互いに実質的に相補的なヌクレオチド配列からなる相補領域であり、かつ、2本鎖構造を形成している；

(e) S_{05} と A_{03} の両方が存在する場合、 S_{05} 及び A_{03} は、互いに相補的ではないヌクレオシドである；

(f) S_{03} と A_{05} の両方が存在する場合、 S_{03} 及び A_{05} は、互いに相補的ではないヌクレオシドである；、並びに、

(g) センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の、5'末端のヌクレオシドの5'位及び／又は3'末端のヌクレオシドの3'位もしくは3'末端のヌクレオシドが3'-修飾ヌクレオシドである場合はその2'位、が化学修飾されていてもよい。

[0102] <3-1. センス鎖領域>

S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域は、上記式(1)で表される領域、すなわち、 $S_{05} \sim S_{03}$ をいう。S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域における相補領域は、3'末端のヌクレオシドから附番した $S_1 \sim S_{19}$ 、及び相補領域の5'側に位置する S_a として表示する。すなわち、S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖における相補領域は、上記式(1)における

$S_1 \sim S_a$ の領域である。 $S_1 \sim S_{19}$ は、それぞれ一つのヌクレオシドを表し、 S_a は0～5個、好ましくは0～4個、より好ましくは、0～3個、0～2個、又は0～1個、のヌクレオシドを表す。また、センス鎖領域のオーバーハング構造は、5'末端に付加するものを S_{o5} 、3'末端に付加するものを S_{o3} と表示し、それぞれ0～5個、好ましくは0～4個、より好ましくは、0～3個、0～2個、又は0～1個、のヌクレオシドを表す。

[0103] S3M-オリゴヌクレオチドは、センス鎖領域における相補領域の3'末端に位置するヌクレオシド（すなわち、上記式(1)における S_1 ）が、3'-修飾ヌクレオシドであることを特徴とする。そのような3'-修飾ヌクレオシドとしては、S3M-オリゴヌクレオチドがRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限り特に限定されないが、好ましくは、3'-デオキシ-3'-フルオロRNA (3'-F RNA)、3'-OMe RNA、又は3'-MOE RNAであり、より好ましくは3'-OMe RNAである。さらに、この3'-修飾ヌクレオシドの2'位は、水酸基、修飾されていてもよいアルコキシ基（好ましくは、メトキシ基、エトキシ基、メトキシエトキシ基）、又は修飾されていてもよいリン酸基（好ましくは、チオリン酸基、ジチオリン酸基、メチルリン酸基、エチルリン酸基）であってもよく、オーバーハング構造（すなわち、上記式(1)における S_{o3} ）のヌクレオシドの5'位と結合してもよく、又は、リンカー構造と結合していてもよい。好ましくは、2'位は水酸基である。

[0104] S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域における相補領域の S_1 以外のヌクレオシドは、特に限定されず、様々な天然ヌクレオシド又は糖修飾ヌクレオシドを採用することができるが、好ましくは、それぞれ独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA又はDNAである。

[0105] S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域における相補領域の一つの態様は、3'末端から11、12、13及び15番目のヌクレオシド（すなわち、上記式(1)における S_{11} 、 S_{12} 、 S_{13} 及び S_{15} ）のうち、少なくとも一つが、2'-F RNAであり、それ以外のヌクレオシドは、2'-OM

e RNA、2'-F RNA、DNA又はそれらの組み合わせである。好ましくは、 S_{11} 、 S_{12} 、 S_{13} 及び S_{15} はすべて2'-F RNAである。

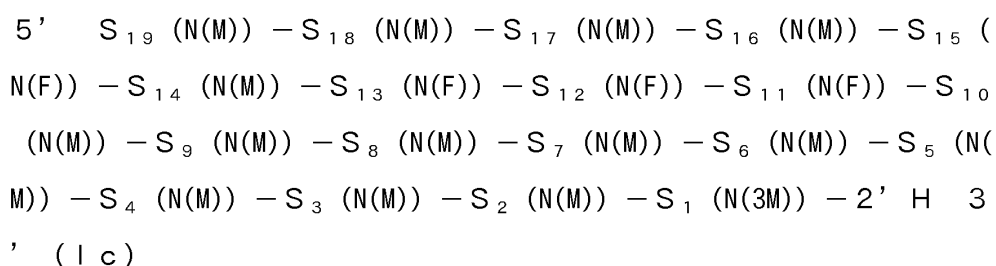
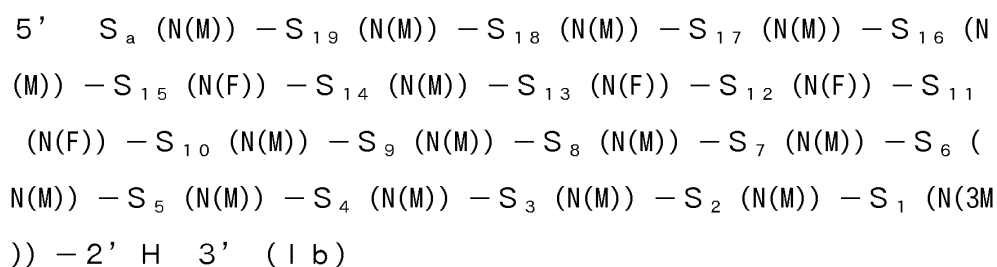
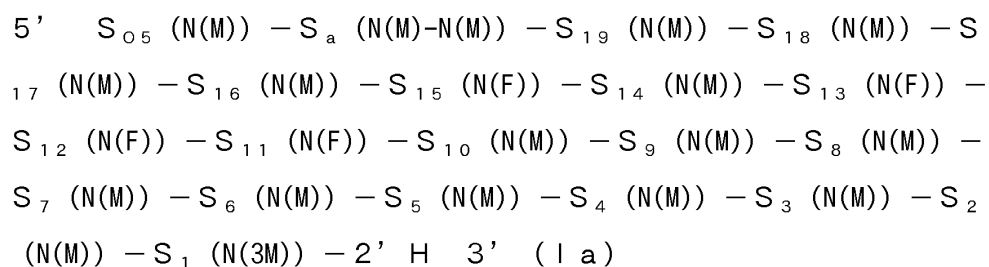
[0106] S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域における相補領域の一つの好ましい態様は、センス鎖領域における相補領域の $S_2 \sim S_{10}$ 、 S_{14} 、 $S_{16} \sim S_{19}$ 及び S_a のヌクレオシドが、それぞれ独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA又はDNA或いはそれらから選択される2種類が交互に配置された修飾パターンであり、より好ましくは、それぞれ独立して2'-OMe RNA又はDNA或いはそれらが交互に配置された修飾パターン、さらにより好ましくはそれらすべてが2'-OMe RNAである。 S_a のヌクレオシド数は0～10個の間で適宜選択することができ、必要に応じて、その3'側から、 S_{20} 、 S_{21} 、 S_{22} 、 S_{23} 、 S_{24} 、 S_{25} 、 S_{26} 、 S_{27} 、 S_{28} 、及び S_{29} として表示する場合がある。

[0107] S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域における相補領域のヌクレオチド配列（すなわち、上記式（I）における $S_1 \sim S_a$ ）は、アンチセンス領域における相補領域（すなわち、上記式（II）における $A_1 \sim A_a$ ）と実質的に相補的なヌクレオチド配列である。

[0108] S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域は、その相補領域の3'末端及び／又は5'末端にオーバーハング構造（すなわち、上記式（I）における S_{03} 及び S_{05} ）を有していてもよい。 S_{03} 及び S_{05} はそれぞれ独立して、0～5個（好ましくは、4、3、2、1又は0個）のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA、DNA又は2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドである。好ましくは、 S_{03} 、及び、 S_{05} は存在せず、である。

[0109] S_{03} 及び S_{05} が存在する場合、その塩基は、オーバーハングとしての機能を発揮する限り特に限定されないが、好ましくは、オリゴU、又は、オリゴTである。

[0110] S3M-オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域の修飾パターンを以下式（Ia）～（Ic）に例示する。



[上記式において、(N(M))は2'-OMe RNAを表し、(N(F))は2'-F RNAを表し、(N(3M))は3'-OMe RNAを表す。S₀₅(N(M))及びS_a(N(M))は0～3個の2'-OMe RNAからなるヌクレオシドを表す。各オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端から3個のヌクレオシドの2か所のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、それ以外のヌクレオシド間結合はリン酸ジエステル結合である。すなわち、各オリゴヌクレオチドは、3'末端と5'末端に、それぞれ2か所ずつ、合計4か所のホスホロチオエート結合を有している。]

[0111] <3-2. アンチセンス鎖領域>

S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域は、上記式(I I)で表される領域、すなわち、A₀₅～A₀₃をいう。S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域は、5'末端のヌクレオシドから附番したA₁～A₁₉、及び相補領域の3'側に位置するA_aとして表示する。す

なわち、アンチセンス鎖の相補領域は、上記式 (11) における $A_1 \sim A_a$ の領域である。S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域のヌクレオチド配列は、標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列であればよく、例えば、標的配列と5、4、3、2又は1塩基のミスマッチが含まれていてもよく、好ましくは完全に相補的である。 $A_1 \sim A_{19}$ は、それぞれ一つのヌクレオチドを表し、 A_a は0～5個のヌクレオチドを表す。また、アンチセンス鎖領域のオーバーハング構造は、5'末端に付加するものを A_{05} 、3'末端に付加するものを A_{03} と表示する。

[0112] A_1 は、標的配列の対応する塩基と実質的に相補的な塩基であってもよく、標的配列とは独立してアデニン、ウラシル又はチミンであってもよい。*sirRNA*のセンス鎖の相補領域における3'末端の塩基が、標的配列とは無関係にアデニン又はウラシルである場合に、良好なRNA干渉活性を示すことは、特許US10093923等に記載されている。また、文献 (Nature 465, 818-822 (2010)) には、アンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドはRNA干渉活性に関与するAGO2タンパク質に結合し、標的mRNAに結合しないことが示されている。アンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドがアデニン又はウラシルヌクレオチドである場合の方が、グアニン又はシトシンである場合よりも、AGO2タンパク質に強く結合することも示されていることから、アンチセンス鎖の5'末端はアデニン又はウラシルヌクレオチドであることが好ましい。

[0113] S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域の A_1 、 A_{12} 、 A_{13} 、 A_{14} 及び A_{15} のうち、少なくとも一つ（好ましくは、2つ以上）が、DNA、RNA、2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオチド及び2'-MOE RNAからなる群から選択されるいずれかである。ここで用いられる2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオチドとしては、特に限定されないが、好ましくは、LNA又はENAである。アンチセンス鎖相補領域において、前記で同定されるヌクレオチド以外のヌクレオチドは、特に限定されず、様々な天然ヌクレオチド又は糖修飾ヌクレオチドを採用することができるが、好ま

しくは、それぞれ独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA又はDNAである。

[0114] 本発明の一例として、S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域のA₁₄が、RNAであるオリゴヌクレオチドが提供される。このようなオリゴヌクレオチドの修飾パターンとしては、例えば、図2の56型、57型、図3の61型、62型、66型及び67型、図5の75型～83型、図6の91型～95型に示されるものが例示されるが、これらに限定されない。

[0115] A₁₄がRNAであるオリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域の好ましい態様としては、A₁₃が2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシド、2'-OMe RNA又は2'-F RNAであり、より好ましくは2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドであり、更に好ましくはENA又はLNAである（図5の76型～83型、及び、図6の91型～93型）。このようなS3M-オリゴヌクレオチドにおいて、A₁₁—A₁₂—A₁₃—A₁₄—A₁₅の修飾パターンとして好ましくは、以下式（I I I a）～（I I I h）のいずれかである。

A₁₁(2'-OMe RNA)—A₁₂(2'-OMe RNA)—A₁₃(ENA)—A₁₄(RNA)—A₁₅(2'-OMe RNA) (I I I a)

A₁₁(2'-F RNA)—A₁₂(2'-OMe RNA)—A₁₃(ENA)—A₁₄(RNA)—A₁₅(2'-OMe RNA) (I I I b)

A₁₁(2'-OMe RNA)—A₁₂(2'-F RNA)—A₁₃(ENA)—A₁₄(RNA)—A₁₅(2'-OMe RNA) (I I I c)

A₁₁(2'-OMe RNA)—A₁₂(2'-OMe RNA)—A₁₃(LNA)—A₁₄(RNA)—A₁₅(2'-OMe RNA) (I I I d)

A₁₁(2'-F RNA)—A₁₂(2'-OMe RNA)—A₁₃(LNA)—A₁₄(RNA)—A₁₅(2'-OMe RNA) (I I I e)

A₁₁(2'-OMe RNA)—A₁₂(2'-F RNA)—A₁₃(LNA)—A₁₄(RNA)—A₁₅(2'-OMe RNA) (I I I f)

A₁₁(2'-F RNA)—A₁₂(2'-OMe RNA)—A₁₃(2'-OMe RNA)—A₁₄(RNA)—A₁₅(

2'-OMe RNA) (l l l g)

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{F RNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ (l l l h)

[0116] 本発明の一例として、S 3 M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域の A_{14} が2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドであるオリゴヌクレオチドが提供される。ここで、2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドとして、好ましくはENA又はLNAである。このようなオリゴヌクレオチドの修飾パターンとしては、例えば、図4の70型～74型、及び図6の88型～90型に示されるものが例示されるが、これらに限定されない。

[0117] A_{14} が2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドであるオリゴヌクレオチドの好ましい態様としては、 A_{12} がDNAである。このようなS 3 M-オリゴヌクレオチドにおいて、アンチセンス鎖相補領域の $A_{11} - A_{12} - A_{13} - A_{14} - A_{15}$ の修飾パターンとして好ましくは、以下式 (l l l i) ～ (l l l l) のいずれかである。

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{ENA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ (l l l i)

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{ENA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ (l l l j)

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{LNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ (l l l k)

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{LNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ (l l l l)

[0118] 本発明の一例として、S 3 M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域の A_{14} がDNAであるオリゴヌクレオチドが提供される。このようなオリゴヌクレオチドの修飾パターンとしては、例えば、図2の58型及び59型、図3の63型、64型、68型及び69型に示されるものが例示されるが、これらに限定されない。

[0119] 本発明の一例として、S 3 M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域

の式(11)の A_{15} が2'-MOE RNAであるオリゴヌクレオチドが提供される。このようなオリゴヌクレオチドの修飾パターンとしては、例えば、図5の79型及び83型に示されるものが例示されるが、これらに限定されない。

[0120] 本発明の一例として、S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域の5'末端から11~13番目のヌクレオシド(式(11)の A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13})のいずれかが2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドであるオリゴヌクレオチドが提供される。このようなオリゴヌクレオチドの修飾パターンとしては、例えば、ENAは図1の43型、45型、図4の75型~84型、図6の85型、86型、及び、91型~93型、LNAは図1の44型、46型、及び図3の67型、69型に示されるものが例示されるが、これらに限定されない。

[0121] 本発明の一例として、S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域の5'末端から11~13番目のヌクレオシド(式(11)の A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13})のいずれかがDNAであるオリゴヌクレオチドが提供される。このようなオリゴヌクレオチドの修飾パターンとしては、例えば、図1の41型、42型、図4の71型、及び図6の87型~90型に示されるものが例示されるが、これらに限定されない。

[0122] 本発明の一例として、S3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域の5'末端から11~13番目のヌクレオシド(式(11)の A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13})のいずれかが2'-MOE RNAであるオリゴヌクレオチドが提供される。このようなオリゴヌクレオチドの修飾パターンとしては、例えば、図1の47型、48型、及び図4の74型に示されるものが例示されるが、これらに限定されない。

[0123] 本発明のS3M-オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域において、上記で特定されたヌクレオシド以外のヌクレオシドは様々な種類を適宜選択することができるが、好ましくは、 A_2 、 A_6 及び A_{16} の少なくとも一つ(好ましくは全て)のヌクレオシドが、2'-F RNAである

。さらに好ましいアンチセンス鎖領域は、 A_2 、 A_6 及び A_{16} に加えて更に、 A_8 、 A_9 及び A_{10} からなる群から選択される1又は2個のヌクレオシドが2'－F RNAであり、前記で特定された以外のヌクレオシド（たとえば、 A_1 、 $A_3\sim A_5$ 、 A_7 、 $A_{17}\sim A_{19}$ 及び A_a ）は、2'－OMe RNA又はDNAである。

[0124] 本発明のS3M－オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域における相補領域において、 $A_{11}\sim A_{15}$ 以外の領域の好ましい修飾パターンは、例えば以下の表A-1および表A-2に例示される。

[0125] [表A-1]

	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_8	A_9	A_{10}
パターン 1	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 2	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)
パターン 3	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)
パターン 4	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(M)
パターン 5	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)
パターン 6	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)
パターン 7	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(F)	(M)	(F)	(M)
パターン 8	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 9	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)
パターン 10	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)
パターン 11	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(F)	(M)
パターン 12	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(F)	(F)
パターン 13	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(F)	(F)	(M)
パターン 14	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(M)
パターン 15	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(M)
パターン 16	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)	(F)	(M)	(M)	(F)	(F)

[0126]

[表A-2]

	A ₁₆	A ₁₇	A ₁₈	A ₁₉	A _a	A ₀₃
パターン 1	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 2	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 3	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 4	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 5	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 6	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 7	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 8	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 9	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 10	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 11	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 12	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 13	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 14	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)
パターン 15	(F)	(M)	(F)	(M)	(M)	(M)
パターン 16	(F)	(M)	(M)	(M)	(M)	(M)

[0127] [上記表において、(M)は2'-OMe RNAであり、(F)は2'-F RNAである。A_aは、0～5個のヌクレオシドであり、0以外の場合全て同一のヌクレオシドである。A₀₃は、0～5個のヌクレオシドであり、0以外の場合全て同一のヌクレオシドである。ヌクレオシド間結合は、リン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合が適宜選択される。]

[0128] S3M-オリゴヌクレオチドに含まれるアンチセンス鎖領域は、その相補領域の3'末端及び／又は5'末端にオーバーハング構造（すなわち、上記式(11)におけるA₀₃及A₀₅）を有していてもよい。A₀₃及びA₀₅はそれぞれ独立して、0～5個（好ましくは、3、2、1又は0個）のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2'-OMe RNA、2'-F RNA、DNA又は2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドである。

。好ましくは、 A_{03} は、2又は3個の2'-OMe RNAからなるオーバーハングであるか、あるいは、1又は2個の2'-OMe RNAと1又は2個の2'-0,4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドとからなるオーバーハングであり、 A_{05} は存在しない。

[0129] A_{03} 及び A_{05} が存在する場合、その塩基は、オーバーハングとしての機能を発揮する限り特に限定されないが、好ましくは、オリゴU、又は、オリゴTである。

[0130] <3-3. ヌクレオシド間結合>

本発明のS3M-オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間の結合様式は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合を適宜選択することができ、好ましくは、リン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合であり、それらをそれぞれ単独で、又は、組み合わせて採用することができる。好ましくは、リン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合の組み合わせであり、センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域それぞれに含まれるヌクレオシド間結合において、ホスホロチオエート結合の含有率が、50%以下、40%以下、30%以下、29%以下、28%以下、27%以下、26%以下または25%以下である。

[0131] RNA及び／又は2'-F RNAが採用される場合、当該ヌクレオシドとその3'側に隣接するヌクレオシドとの間の結合がホスホロチオエート結合であってもよい。好ましくは、RNAが採用される場合、当該ヌクレオシドとその3'側に隣接するヌクレオシドとの間の結合はホスホロチオエート結合である。

[0132] 本発明のS3M-オリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの5'末端及び／又は3'末端から1、2、3、4又は5番目のヌクレオシド間結合（ヌクレオシド間の結合数として、1、2、3、又は4か所）は、ホスホロチオエート結合を採用することが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチドにおいて、センス鎖領域とアンチセンス鎖領域が異なるオリゴヌクレオチドに含まれる場合、センス鎖領域の5'末端及び3'末端から1、2、3、

4又は5番目のそれぞれのヌクレオシド間、並びに アンチセンス鎖領域の5'末端及び3'末端から1、2、3、4又は5番目のそれぞれのヌクレオチド間結合がホスホロチオエート結合であってもよく、好ましくは、センス鎖領域の5'末端及び3'末端から1、2、3番目のそれぞれのヌクレオシド間結合（ヌクレオシド間の結合数として、2か所）、並びに アンチセンス鎖領域の5'末端から1、2、3番目のそれぞれのヌクレオシド間結合（ヌクレオシド間の結合数として、2か所）、及び3'末端から1、2、3又は4番目のそれぞれのヌクレオシド間結合（ヌクレオシド間の結合数として、3か所）、がホスホロチオエート結合である。

[0133] <4. オリゴヌクレオチドの合成方法>

本発明のオリゴヌクレオチドの調製方法としては所望のオリゴヌクレオチドが合成できる限り特に制限はないが、既知の化学合成法（リン酸トリエステル法、ホスホロアミダイト法、又は、H-ホスホネート法等）を用いることができる。例えば、市販の核酸合成機を用いて、市販のDNA/RNA合成に使われる試薬を用いて合成することができる。

[0134] 通常のホスホロアミダイト法により、所望のヌクレオチド配列を持つオリゴヌクレオチドは、DNA合成機、例えばパーキンエルマー社のホスホロアミダイト法によるモデル392などを用いて文献（Nucleic Acids Research, 12, 4539（1984））記載の方法に準じて合成することができる。

[0135] 各種ヌクレオシドに対応したアミダイト試薬は市販されているものを購入して使用してもよく、公知の方法に従って合成することもできる。

[0136] 本発明のオリゴヌクレオチドは、市販の合成機（例えば、パーキンエルマー社のホスホロアミダイト法によるモデル392）などを用いて、文献（Nucleic Acids Research, 12, 4539（1984））に記載の方法に準じて合成することができる。その際に用いられるホスホロアミダイト試薬は、天然型のヌクレオシド及び2'-O-メチルヌクレオシド（すなわち、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルシチジン、2'-O-メチルウリジン）につ

いては、市販のホスホロアミダイト試薬を用いることができる。2'-0-アルキル基の炭素数が2～6個の2'-0-アルキルグアノシン、2'-0-アルキルアデノシン、2'-0-アルキルシチジンおよび2'-0-アルキルウリジンについては、以下の通りである。

- [0137] 2'-0-アミノエチルグアノシン、2'-0-アミノエチルアデノシン、2'-0-アミノエチルシチジン、2'-0-アミノエチルウリジンは、文献 (Blommers et al. Biochemistry (1998), 37, 17714-17725.) に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。
- [0138] 2'-0-プロピルグアノシン、2'-0-プロピルアデノシン、2'-0-プロピルシチジン、2'-0-プロピルウリジンは、文献 (Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.) に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。
- [0139] 2'-0-アリルグアノシン、2'-0-アリルアデノシン、2'-0-アリルシチジン、2'-0-アリルウリジンは、市販のホスホロアミダイト試薬を用いることができる。
- [0140] 2'-MOE RNAについて、2'-0-メトキシエチルグアノシン、2'-0-メトキシエチルアデノシン、2'-0-メトキシエチル-5-メチルシチジン、2'-0-メトキシエチル-5-メチルウリジンは、特許 (US6261840) または、文献 (Martin, P. Helv. Chim. Acta. (1995) 78, 486-504.) に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成でき、市販のホスホロアミダイト試薬を用いることもできる。
- [0141] 2'-0-ブチルグアノシン、2'-0-ブチルアデノシン、2'-0-ブチルシチジン、2'-0-ブチルウリジンは、文献 (Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.) に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。
- [0142] 2'-0-ペンチルグアノシン、2'-0-ペンチルアデノシン、2'-0-ペンチルシチジン、2'-0-ペンチルウリジンは、文献 (Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.) に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合

成できる。

- [0143] 2'-0-プロパルギルグアノシン、2'-0-プロパルギルアデノシン2'-0-プロパルギルシチジン、2'-0-プロパルギルウリジンは、市販のホスホロアミダイト試薬を用いることができる。
- [0144] 2'-F RNAについて、2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン、2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシン、2'-デオキシ-2'-フルオロシチジン、2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンは、文献(J. Med. Chem. 36, 831 (1993))に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成でき、市販のホスホロアミダイト試薬を用いることもできる。
- [0145] 3'-修飾ヌクレオシドである3'-F RNAについて、3'-デオキシ-3'-フルオログアノシンはW02017027645に従って、3'-デオキシ-3'-フルオロアデノシンはW02018198076に従って、3'-デオキシ-3'-フルオロウリジンはUS2011/0196141に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。また、3'-デオキシ-3'-フルオロシチジンは前記文献など、公知の方法を参考にして合成することができる。
- [0146] 3'-修飾ヌクレオシドである3'-OMe RNAについて、3'-0-メチルグアノシン、3'-0-メチルアデノシン、3'-0-メチルシチジン、3'-0-メチルウリジンは、市販のホスホロアミダイト試薬を用いて合成することができる。
- [0147] 3'-修飾ヌクレオシドである3'-MOE RNAについて、3'-0-メトキシエチルグアノシン、3'-0-メトキシエチルアデノシン、3'-0-メトキシエチル-5-メチルシチジン、3'-0-メトキシエチル-5-メチルウリジンは、US2003/0096979に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。
- [0148] LNAについて、2'-0,4'-C-メチレングアノシン、2'-0,4'-C-メチレンアデノシン、2'-0,4'-C-メチレンシチジン、2'-0,4'-C-メチレン-5-メチルシチジンおよび2'-0,4'-C-メチレン-5-メチルウリジンについては、W099/14226に記載の方法に従って対応するホスホロアミダイト試薬を製造することができる。
- [0149] 2'-0,4'-C-架橋部分のアルキレン基の炭素数が2～5個の2'-0,4'-C-アル

キレングアノシン、2'-0,4'-C-アルキレンアデノシン、2'-0,4'-C-アルキレンシチジン、2'-0,4'-C-アルキレン-5-メチルシチジンおよび2'-0,4'-C-アルキレン-5-メチルウリジンについては、W000/47599に記載の方法に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を製造することができる。

[0150] D-リボフラノースの2'-デオキシ-2'-C,4'-C-メチレンオキシメチレン化されたヌクレオシドは、文献 (Wang, G. et al. Tetrahedron (1999), 55, 7707-7724) に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。

[0151] S-cEt (constrained ethyl) は、文献 (Seth, P.P. et al. J. Org. Chem (2010), 75, 1569-1581.) に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。

[0152] AmNAは、文献 (Yahara, A. et al. ChemBioChem (2012), 13, 2513-2516.) または、W02014/109384に従って、対応するホスホロアミダイト試薬を合成できる。

[0153] ホスホロアミダイト試薬をカップリング後、硫黄、テトラエチルチウラムジスルフィド (TETD、アプライドバイオシステム社)、Beaucage試薬 (Glen Research社)、または、キサントヒドリドなどの試薬を反応させることにより、ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成することができる (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991), J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990), PCT/W098/54198)。

[0154] 合成機で用いるコントロールド ポア グラス (CPG)、及び、ポリスチレンを固相担体として、2'-0-メチルヌクレオシド及び3'-0-メチルヌクレオシドが結合した固相担体は、市販のものを利用することができる。また、2'-0,4'-C-メチレングアノシン、2'-0,4'-C-メチレンアデノシン、2'-0,4'-C-メチレン-5-メチルシチジンおよび2'-0,4'-C-メチレン-5-メチルウリジンについては、W099/14226に記載の方法に従って、アルキレン基の炭素数が2～5個の2'-0,4'-C-アルキレングアノシン、2'-0,4'-C-アルキレンアデノシン、2'-0,4'-C-アルキレン-5-メチルシチジンおよび2'-0,4'-C-アルキレン-5-メチルウリジンについては、W000/47599に記載の方法に従って製造したヌクレオシ

ドを文献 (Oligonucleotide Synthesis, Edited by M.J.Gait, Oxford University Press, 1984) に従って、CPGに結合することができる。また、ユニバーサルレジンを用いて、上述のホスホロアミダイト試薬を結合させることにより合成できる。また、修飾されたCPG (特開平 7-87982 の実施例 12 b に記載) を用いることにより、3' 末端に 2-ヒドロキシエチルリン酸基が結合したオリゴヌクレオチドを合成できる。また、3'-amino-Modifier C3 CPG, 3'-amino-Modifier C7 CPG, Glyceryl CPG, (Glen Research), 3'-specer C3 SynBase CPG 1000, 3'-specer C9 SynBase CPG 1000 (link technologies) を使えば、3' 末端にヒドロキシアルキルリン酸基、または、アミノアルキルリン酸基が結合したオリゴヌクレオチドを合成できる。

[0155] また、オリゴヌクレオチド類縁体をチオエート化する場合は、硫黄のほかテトラエチルチウラムジスルフィド (TETD、アプライドバイオシステムズ社)、Beaucage 試薬、フェニルアセチルジスルフィド/ピリジン-アセトニトリル (1:1 v/v) 溶液 (Ravikumar, V. T. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. (2006) 16, p. 2513-2517) 等の試薬を用い、文献 (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991)、J. Am. Chem. Soc., 112, 1253 (1990)) 記載の方法に準じてチオエート誘導体を得ることができる。

[0156] RNA の 2' -水酸基の保護基として、t-ブチルジメチルシリル (TBS) 基などのシリル系の保護基を用いている場合、フッ化 テトラブチルアンモニウム (TBAF)、HF-ピリジン、又は、HF-トリエチルアミンなどを用いて脱保護することができる。

[0157] 濃アンモニア水、メタノール性アンモニア、エタノール性アンモニア、濃アンモニア水-エタノール (3:1 V/V) 混液、濃アンモニア水-40% メチルアミン水溶液 (1:1 V/V) 混液、メチルアミン、0.5 M LiOH 水溶液、3.5 M トリエチルアミン/メタノール溶液の (1:10 V/V) 混液、0.05M 炭酸カリウム含メタノールなどを用いて、塩基部のアシル

基、及び、リン酸基部のシアノエチル基を脱保護することができ、好適には濃アンモニア水、濃アンモニア水－エタノール混液（3：1 V/V）である。

[0158] 逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー（高速液体クロマトグラフィーを含む。）等の各種クロマトグラフィーなど、通常の核酸の精製に用いられる精製操作で精製することにより、本発明のオリゴヌクレオチドを得ることができる。

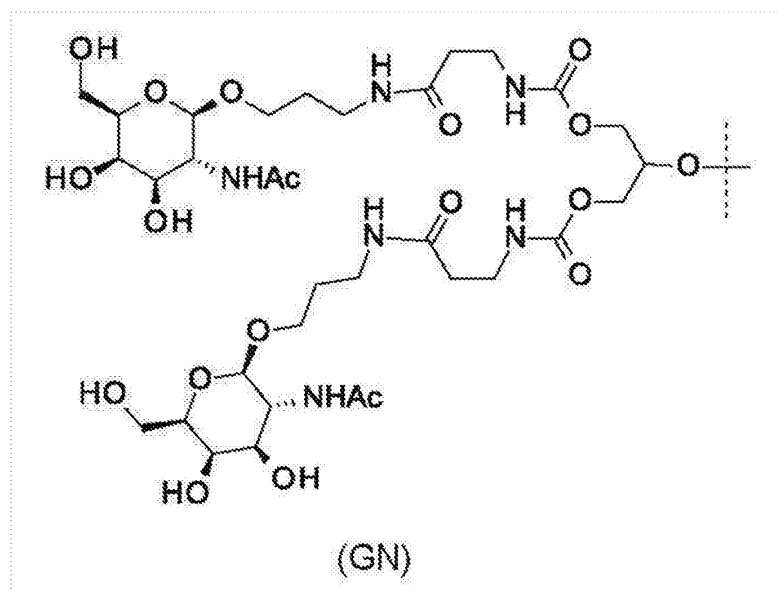
[0159] 本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドを標的組織又は標的細胞に輸送するための輸送用ユニットが結合したオリゴヌクレオチドが含まれる。そのような輸送用ユニットが結合したオリゴヌクレオチドとしては、例えば、所望の化学構造にアミノアルキルリン酸基（例えば、アルキルとしては、3乃至9の炭素数を持つ。）を導入したユニットを、オリゴヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドの5'位及び／又は3'末端のヌクレオチドの3'位（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位）に結合させたオリゴヌクレオチドを挙げることができる。そのような輸送用ユニットとしては、例えば肝臓実質細胞のアシアロ糖受容体（ASGRP）に結合するGalNAcユニット、肝臓や筋組織へ輸送するための脂肪酸（例えば、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸など）ユニット（例えば、Nucleic Acids Res. (2020) 47, 6029-6044、W02017/19267号公報など参照）等を、適宜採用することができる。

[0160] GalNAcユニットとは、ASGRPに結合可能なN-アセチル-D-ガラクトサミン（GalNAc）を含む構造単位で、本発明のオリゴヌクレオチドを肝臓に送達するために用いることができる。GalNAcユニットは、直鎖または分岐したリンカー構造を有していてもよく、例えば、直鎖、2分岐以上、3分岐以上、又は4分岐以上、あるいは、4分岐以下、3分岐以下、又は2分岐以下の分岐したリンカー構造を有し得る。また、GalNAcユニットは、オリゴヌクレオチドとの結合のためのリン酸基またはチオリン酸基を含んでいてもよい。ASGRPへの結合能が維持される限り、一

つのG a I N A cユニットに含まれるG a I N A cの数に制限は無く、またG a I N A cの構造が修飾されていてもよい。本発明のオリゴヌクレオチドに用いることができるG a I N A cユニットとしては、例えば、WO2021/049504号公報、WO2009/073809号公報、WO2014/076196号公報、WO2014/179620号公報、WO2015/006740号公報、WO2015/105083号公報、WO2016/0556012017/023817号公報、WO2017/084987号公報、WO2017/131236号公報、Methods in Enzymology、1999年、313巻、297～321頁、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 3690-3693、等の公知のG a I N A cユニットを適宜採用することができる。

[0161] 例えば、採用できるG a I N A cユニットとしては、下記式のものが挙げられ、WO2021/049504に記載の方法にしたがって適宜調整できる。

[0162] [化16]



[0163] (上記式中、破線は結合手を示し、結合手の酸素原子は、隣接するヌクレオチドと結合することを表し、5'末端のヌクレオチドと結合する場合は5'

ーリン酸基と、3'末端のヌクレオチドと結合する場合は3'ーリン酸基（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位のリン酸基）と、リン酸ジエステル結合を形成することを表し、形成されるリン酸ジエステル結合は、ホスホロチオエート結合などの化学修飾されたリン酸ジエステル結合であってもよい。）

[0164] 本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドにコレステロールユニット、脂質ユニット又は、ビタミンEユニットを導入したもの（例えば、Lorenz, C. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, p. 4975-4977 (2004); Soutschek, J., et al. *Nature*, 432, p. 173-178, (2004); Wolfrum, C. et al. *Nature Biotech.* 25, p. 1149-1157, (2007); Kubo, T. et al. *Oligonucleotides*, 17, p. 1-20, (2007); Kubo, T., et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365, p. 54-61, (2008); Nishina, K., et al., *Mol. Ther.* 16, p. 734-740, (2008) 参照。)、及びオリゴヌクレオチドの末端に、タンパク質に結合する核酸分子であるアプタマー (aptamer) を結合したものも含む。

[0165] 本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドとモノクローナル抗体（又はその適切な結合部分）や、タンパク質（又はその適切なオリゴペプチドフラグメント）が結合したものも含む（例えば、Song, et al. *Nature Biotech.* 23, p. 709-717 (2005); Xia et al. *Pharm. Res.* 24, p. 2309-2316 (2007); Kumar, et al. *Nature*, 448, p. 39-43 (2007) 参照。）。

また、本発明のオリゴヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドにカチオンックポリマーを加えることで、正電荷を帯びた複合体としたものも含む（臓

器及び細胞への分布を達成することができた例として、Leng et al. J. Gen. Med. 7, p. 977-986 (2005), Baigude et al. 2, p. 237-241, ACS Chem. Biol. (2007), Yadava et al. Oligonucleotide 17, p. 213-222 (2007) 参照)。

[0166] 本発明のオリゴヌクレオチドには、上記のオリゴヌクレオチドのあらゆる薬学的に許容可能な塩類、エステル、又はそのようなエステルの塩類を含む。本発明のオリゴヌクレオチドの薬学的に許容可能な塩類としては、好適にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩等の金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N,N'*-ジベンジリエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；及び、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩を挙げることができる。

[0167] 本発明のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩は、TfR2

mRNAの発現を抑制することができる。また、本発明のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩は、TfR2 mRNAの発現を抑制することで、鉄代謝において中心的な役割を担っているhepcidinの産生を抑制し得る。作用機序は特に限定されないが、本発明のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩は、TfR2 mRNAの発現及び／又はhepcidinの産生を抑制することにより治療又は予防可能な疾患の治療又は予防に用いることができる。好ましい一つの態様として、貧血患者に投与された場合に、TfR2 mRNAの発現を抑制することができ、貧血症状の改善効果が期待できる。また、本発明のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩は、該オリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物として用いることもできる。

[0168] 本発明のオリゴヌクレオチドを含有する医薬組成物は、例えばリポソーム、受容体標的分子、経口、直腸、局所的又は取り込み、分配及び／又は吸収を補助するための他の処方として、他の分子、分子構造又は化合物の混合物と混合される、封入される、共役される。本発明のオリゴヌクレオチドを、疾患の予防薬又は治療薬として使用する場合には、前記オリゴヌクレオチド、又は、その薬学上許容される塩を、それ自体あるいは適宜の薬学的に許容される、賦形剤、希釈剤等と混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等により経口的に、又は、注射剤、坐剤、貼付剤、若しくは、外用剤等により非経口的に投与することができる。

[0169] これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤を挙げることができる。）、滑沢剤（例えば、ステア

リン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；D L ロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体を挙げることができる。）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤を挙げることができる。）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸を挙げることができる。）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

[0170] 上記のように調製されたオリゴヌクレオチドを導入する被導入体としては、標的遺伝子とその細胞内でRNAに転写され得るものであれば、特に制限

されない。被導入体としては細胞、組織、あるいは個体を意味する。

[0171] 本発明のオリゴヌクレオチドが導入される細胞としては、生殖系列細胞、体性細胞、分化全能性細胞、多分化能細胞、分割細胞、非分割細胞、実質組織細胞、上皮細胞、不滅化細胞、形質転換細胞、神経細胞又は免疫細胞のいずれのものであってもよい。

[0172] 組織としては単一細胞胚又は構成性細胞、又は多重細胞胚、胎児組織等を含む。また、上記分化細胞としては、例えば、脂肪細胞、線維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、神経細胞、グリア、血液細胞、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、白血球、顆粒球、ケラチン生成細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞及び内分泌線又は外分泌腺の細胞等が挙げられる。このような細胞の例としては、CHO-K1細胞(RIKEN Cell bank)、ショウジョウバエS2細胞(Schneider, I. et al., J. Embryol. Exp. Morph., 27, p. 353-365 (1972)、ヒトHeLa細胞(ATCC:CCL-2)、あるいは、ヒトHEK293細胞(ATCC:CRL-1573)等が好ましく用いられる。

[0173] さらに本発明のオリゴヌクレオチドの被導入体として用いられる個体として、具体的には、植物、動物、原生動物、ウイルス、バクテリア、又は真菌類に属するもの等が挙げられる。植物は単子葉植物、双子葉植物又は裸子植物であってよく、動物は、脊椎動物又は無脊椎動物であってよい。脊椎動物としてはマウス、ラット、サル、イヌ及びヒトを含む哺乳類が好ましい。

[0174] 被導入体への本発明のオリゴヌクレオチドの導入方法としては、被導入体が細胞、あるいは組織の場合は、カルシウムフوسفレート法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、ウイルス感染、3L5-オリゴヌクレオチド溶液への浸漬、あるいは形質転換法等が用いられる。また、胚に導入する方法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション法、あるいはウイルス感染等が挙げられる。被導入体が植物の場合には植物体の体腔又は間質細胞等への注入又は灌流、あるいは噴霧による方法がよい。

られる。また、動物個体の場合には、経口、局所、皮下、筋肉内及び静脈内投与、非経口、経膣、経直腸、経鼻、経眼、経膜内投与等によって全身的に導入する方法、あるいはエレクトロポレーション法やウイルス感染等が用いられる。経口導入の方法としては、本発明のオリゴヌクレオチドを生物の食物と直接混合する方法を使うこともできる。

[0175] 本発明のオリゴヌクレオチドを患者へ導入する方法については、上記に加えてコロイド分散系を用いることができる。コロイド分散系は化合物の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果が期待される。コロイド分散系は、通常用いられるものであれば限定しないが、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを包含する脂質をベースとする分散系を挙げる事ができ、好ましくは、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果のある、複数のリポソーム、人工膜の小胞である (Mannino et al., *Biotechnique*, 1988, 6, p. 682-; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, p. 91-; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, p. 119-; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, p. 698-)。サイズ範囲が0.2-0.4 μm である単膜リポソームは、巨大分子を含有する水性緩衝液のかなりの割合を被包化し得、化合物はこの水性内膜に被胞化され、生物学的に活性な形態で脳細胞へ輸送される (Fraley et al., *Trends Biochem. Sci.*, 1981, 6, p. 77-)。

[0176] リポソームの組成は、通常、脂質、特にリン脂質、とりわけ相転移温度の高いリン脂質を1種又はそれ以上のステロイド、特にコレステロールと通常複合したものである。リポソーム生産に有用な脂質の例は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴ

脂質、ホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド及びガングリオシドのようなホスファチジル化合物を包含する。

[0177] 特に有用なのはジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここでは脂質部分が14-18の炭素原子、特に16-18の炭素原子を含有し、飽和している（14-18の炭素原子鎖の内部に二重結合を欠いている）。

[0178] 代表的なリン脂質は、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファチジルコリンを包含する。

[0179] リポソームを包含するコロイド分散系の標的化は、受動的又は能動的のいずれかであってもよい。

[0180] 受動的な標的化は、洞様毛細血管を含有する臓器の網内系細胞へ分布しようとするリポソーム本来の傾向を利用することによって達成される。

[0181] 一方、能動的な標的化は、例えば、ウイルスのタンパク質コート（Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 1993, 90, p. 8474-）、モノクローナル抗体（又はその適切な結合部分）、糖、糖脂質又はタンパク質（又はその適切なオリゴペプチドフラグメント）のような特定のリガンドをリポソームへ結合させること、又は天然に存在する局在部位以外の臓器及び細胞型への分布を達成するためにリポソームの組成を変えることによってリポソームを修飾する手法等を挙げることができる。

[0182] 標的化されたコロイド分散系の表面は様々なやり方で修飾され得る。リポソームで標的したデリバリーシステムでは、脂質二重層との緊密な会合において標的リガンドを維持するために、リポソームの脂質二重層へ脂質基が取込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドと結びつけるために様々な連結基が使用され得る。

[0183] 本発明のオリゴヌクレオチドのデリバリーが所望される細胞の上に支配的に見出される特定の細胞表面分子に結合する標的リガンドは、例えば、（1）デリバリーが所望される細胞によって支配的に発現される特定の細胞受容体と結合している、ホルモン、成長因子又はその適切なオリゴペプチドフラ

グメント、又は（２）標的細胞上で支配的に見出される抗原性エピトープと特異的に結合する、ポリクローナル又はモノクローナル抗体、又はその適切なフラグメント（例えば、 Fab ； $F(ab')_2$ ）、であり得る。２種又はそれ以上の生物活性剤は、単一のリポソーム内部で複合し、投与することもできる。

- [0184] 内容物の細胞内安定性及び／又は標的化を高める薬剤をコロイド分散系へ追加することも可能である。
- [0185] 本発明のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩の使用量は症状、年齢等により異なるが、経口投与の場合には、１回当たり下限１ｍｇ（好適には、３０ｍｇ）、上限２０００ｍｇ（好適には、１５００ｍｇ）を、静脈内投与または皮下投与の場合には、１回当たり下限０．５ｍｇ（好適には、５ｍｇ）、上限１０００ｍｇ（好適には、２５０ｍｇ）を、気管内投与の場合には、１回当たり下限０．５ｍｇ（好適には、５ｍｇ）、上限５００ｍｇ（好適には、２５０ｍｇ）を、眼球内投与の場合には、１回当たり下限０．０５ｍｇ（好適には、０．５ｍｇ）、上限１０ｍｇ（好適には、５ｍｇ）を、成人に対して、１日当たり１乃至３回症状に応じて投与することが望ましい。また、安定性が高められた薬剤の場合は、１週間に１乃至３回、さらに安定性が高められた薬剤の場合は、１ヶ月、３ヶ月、６か月、１２か月、１８か月又は２４か月に１乃至３回、症状に応じて投与することが望ましい。
- [0186] 局所的投与に対する医薬組成物及び処方は、経皮的パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、飴、坐薬、スプレー、液体及び粉末を含む。
- [0187] 本発明のオリゴヌクレオチドは、 $TfR2$ mRNAの発現を抑制することができる。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、細胞に対する毒性が小さく、安全性が高い医薬品に適用し得る。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、 $TfR2$ mRNAの発現を抑制することで、鉄代謝において中心的な役割を担っている *hepcidin* の産生を抑制し得る。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、 $TfR2$ mRNAの発現を抑制することで、血漿中鉄濃度及び／又はHGB値を上昇し得る。作用機序は特に限定されないが

、本発明のオリゴヌクレオチドは、TfR2 mRNAの発現及び／又はhepcidinの産生を抑制することにより治療又は予防可能な疾患の治療又は予防に用いることができる。そのような疾患としては、例えば、貧血が挙げられる。作用機序は特に限定されないが、本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドは、例えば、HGB値を上昇させることで貧血を治療又は予防し得る。また、本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドは、血液細胞輸血が必要な貧血患者に対して、血液細胞輸血の頻度及び／又は輸血量を軽減し得る。例えば、貧血患者に対して一定期間（例えば、1日、1週間、2週間、4週間、8週間、12週間、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月又1年）における血液細胞輸血の頻度及び／又は輸血量を約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、又は約100%軽減し得る。

[0188] 本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する貧血の治療又は予防に用いる医薬組成物、当該オリゴヌクレオチドの有効量を投与することを含む貧血を治療又は予防する方法、貧血の治療又は予防に使用するための当該オリゴヌクレオチド、貧血の治療又は予防用医薬組成物の製造における本発明のオリゴヌクレオチドの使用、等の医薬用途発明を提供する。本発明のオリゴヌクレオチドが治療又は予防し得る貧血には例えば、慢性炎症に伴う貧血（anemia of chronic disease、ACD）、骨髓機能不全に伴う貧血、鉄欠乏性貧血、鉄剤不応答性貧血（iron refractory iron deficiency anemia、IRIDA）、赤血球造血刺激因子製剤（erythropoietin stimulating agent、ESA）抵抗性の貧血、化学療法によって誘導される貧血、再生不良性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、及び、 β サラセミアもしくは鎌状赤血球症等の遺伝性ヘモグロビン異常症等が含まれる。慢性炎症に伴う貧血には、例えば、関節リウマチもしくは全身性エリテマトーデスもしくは自己免疫性溶血性貧血等の自己免疫疾患に伴う貧血、感染症に伴う貧血、炎症性大腸炎等の炎症性腸疾患に伴う貧血、心不全に伴う貧血、慢性腎臓病に伴う貧血、癌性貧血、マクロファ-

ジ活性化症候群に伴う貧血及びキャッスルマン病に伴う貧血等が含まれる。慢性腎臓病に伴う貧血には、例えば、糖尿病を伴う腎臓病、高血圧を伴う腎臓病、ネフローゼ症候群（例えば、フィンランド型先天性ネフローゼ症候群、びまん性メサンギウム硬化症、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状分節性糸球体硬化症、膜性腎症、ギャロウェイ・モワト（Galloway-Mowat）症候群、などが挙げられる）、慢性糸球体腎炎を伴う腎臓病（例えば、IgA腎症、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、紫斑病性腎炎、抗糸球体基底膜腎炎（グッドパスチャー（Goodpasture）症候群）、アルポート症候群、エプスタイン（Epstein）症候群、ループス腎炎、顕微鏡的多発血管炎、非典型溶血性尿毒症症候群、ネイル・パテラ（Nail-Patella）症候群（爪膝蓋症候群）、フィブロネクチン腎症、リボタンパク糸球体症、などが挙げられる）、慢性尿管間質性腎炎を伴う腎臓病、慢性腎盂腎炎を伴う腎臓病、アミロイド沈着を伴う腎臓病、常染色体優性尿細管間質性腎臓病、ネフロン癆を伴う腎臓病、腎奇形を伴う腎臓病（例えば、多発性嚢胞腎などが挙げられる）、等の慢性腎臓病に伴う貧血が含まれる。癌性貧血には、例えば、多発性骨髄腫、急性白血病、慢性白血病、肺癌又は乳癌などの癌に伴う貧血が含まれる。骨髄機能不全に伴う貧血には、例えば、骨髄線維症に伴う貧血、骨髄異形成症候群に伴う貧血、慢性骨髄単球性白血病（chronic myelomonocytic leukemia、CMML）に伴う貧血、化学療法による骨髄抑制に伴う貧血、再生不良性貧血、ダイヤモンドブラックファン貧血、ファンconi貧血等が含まれる。

[0189] 本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、慢性炎症に伴う貧血、骨髄機能不全に伴う貧血の治療又は予防に用いられ得、より好ましくは、関節リウマチもしくは全身性エリテマトーデスもしくは自己免疫性溶血性貧血等の自己免疫疾患に伴う貧血、感染症に伴う貧血、炎症性大腸炎等の炎症性腸疾患に伴う貧血、心不全に伴う貧血、慢性腎臓病に伴う貧血、癌性貧血、キャッスルマン病に伴う貧血、骨髄線維症に伴う貧血、骨髄異形成症候群に伴う

貧血、慢性骨髄単球性白血病に伴う貧血、及び化学療法による骨髄抑制に伴う貧血の治療又は予防に用いられ得る。

[0190] 本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドを他の1又は2以上の薬剤と併用することを含む、貧血の治療又は予防方法を提供する。本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明の効果を奏する限り他の1又は2以上の薬剤と併用してもよい。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドを、貧血症状に対する作用機序が異なる他の薬剤と併用することでより大きな治療効果を提供し得る。例えば、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome, MDS) に対しては、赤血球の増殖を促すことで貧血を治療する作用機序を持つESA (erythropoiesis stimulating agent)、赤血球の分化を促すことで貧血を治療する作用機序を持つルスパテルセプト (Luspatercept) などの薬剤、DNAメチル化を抑制し異常な細胞を殺傷する作用機序を持つアザシチジン (Azacitidine) などの薬剤が処方される場合があるが、これらの薬剤とTfR2 siRNAとは作用機序が異なる。従って、これらの薬剤とTfR2 siRNAとの併用は、MDSに対して、単剤よりも大きな治療効果を提供し得る。また、慢性腎臓病に伴う貧血に対しては、赤血球の増殖を促すことで貧血を治療する作用機序を持つESAやHIFPHD (hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase) 阻害薬などの薬剤が処方される場合があるが、これらの薬剤とTfR2 siRNAとは作用機序が異なる。従って、これらの薬剤とTfR2 siRNAとの併用は、慢性腎臓病に伴う貧血に対して、単剤よりも大きな治療効果を提供し得る。また、Ruxolitinibは骨髄線維症に対して、主にsplenomegalyなどの症状に対して治療効果を示すことが知られている (N Engl J Med 2012; 366: 799-807)。しかし、貧血症状に対する効果は限局的か無効、あるいは貧血を悪化させることが知られている (Journal of Hematology & Oncology 2013, 6: 79)。ルキシ

リチニブ (Ruxolitinib) による貧血が悪化する機序としては、JAK2を阻害することによって赤血球細胞の増殖に必要とされるEPOシグナルが抑制されてしまうことにあると考えられている。しかしながら、Ruxolitinibは骨髄線維症において、貧血を除く症状に対して一定の治療効果を挙げていることから、RuxolitinibとTfR2 siRNAとの併用は、骨髄線維症における貧血に対して有用な治療効果を提供し得る。同様に、Ruxolitinib以外の他のJAK2阻害薬との併用によっても骨髄線維症における貧血に対して有用な治療効果を提供し得る。他のJAK2阻害薬としては、例えば、フェドラチニブ (Fedratinib)、パクリチニブ (Pacritinib) 及びモメロチニブ (Mometinib) などが挙げられる。

- [0191] 本発明のオリゴヌクレオチドを他の薬剤と併用して用いる場合、本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドを投与する順序は本発明の効果を奏する限り特に限定されないが、併用する他の薬剤と同時に投与されてもよく、併用する他の薬剤の投与の前又は後に投与されてもよい。本発明のRNAi-オリゴヌクレオチドと併用し得る薬剤としては、例えば、他の貧血治療薬又は貧血の原因となる疾患の治療薬が挙げられる。他の貧血治療薬としては、例えば、ESA、HIFPHD (hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase) 阻害薬、経口鉄剤、静注鉄剤、ダナゾール (Danazol)、Luspatercept、などが挙げられる。ESAとしては、例えば、エポエチンアルファ、エポエチンベータ、エポエチンベータベゴル、エポエチンカップ、ダルベポエチンアルファ等が挙げられる。HIFPHD阻害薬としては、例えば、ロキサデュスタット、バダデュスタット、ダプロデュスタット、エナロデュスタット、モリデュスタット等が挙げられる。経口鉄剤としては、例えば、クエン酸第一鉄、クエン酸第二鉄、フマル酸第一鉄、溶性ピロリン酸第二鉄、乾燥硫酸鉄等が挙げられる。静注鉄剤としては、例えば、カルボキシマルトース第二鉄、含糖酸化鉄等が挙げられる。また、貧血の原因となる疾患の治療薬としては、

例えば、骨髄線維症治療薬、骨髄異形成症候群治療薬、慢性腎臓病治療薬、抗がん剤等が挙げられる。骨髄線維症治療薬としては、例えば、JAK2阻害薬が挙げられる。JAK2阻害薬としては、例えば、Ruxolitinib、Fedratinib、Pacritinib、及びMomelotinib等が挙げられ、Ruxolitinibとの併用が好ましい。骨髄異形成症候群治療薬としては、例えば、Azacitidine、レナリドミド（Lenalidomide）等が挙げられ、Azacitidine又はレナリドミドとの併用が好ましい。慢性腎臓病治療薬としては、例えば、SGLT2（sodium glucose co-transporter 2）阻害薬、レニン・アンジオテンシン系阻害薬（例えば、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（ARB）、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬など）、カルシウム拮抗薬、利尿薬、糖尿病治療薬、高脂血症治療薬、ステロイド、免疫抑制薬等が挙げられる。抗がん剤には化学療法薬が含まれ、化学療法薬としては、例えば、シスプラチン、カルボプラチン、ドキソルビシン、パクリタキセル、アムルピシン等が挙げられる。

- [0192] また、本発明のオリゴヌクレオチドは鉄過剰症の治療薬と併用してもよい。貧血に対する治療として血液細胞輸血を行う場合、慢性的な血液細胞輸血に伴い鉄過剰症を発症し得る。鉄過剰症とは、肝臓や心臓などの組織において、輸血した血液細胞由来の鉄が蓄積することで生じる病態であり、肝不全、心不全、糖尿病、関節痛、甲状腺機能低下症、下垂体機能低下、又は性機能不全等を呈し得る。したがって、貧血に対する治療において鉄過剰症の治療又は予防のために鉄過剰症治療薬を用いる場合があり、本発明のオリゴヌクレオチドと好適に併用し得る。鉄過剰症の治療薬としては、例えば、鉄キレート剤等が挙げられ、鉄キレート剤としてはデフェラシロクス（Deferasirox）、デフェロキサミン（Deferoxamine）、デフェリプロン（Deferiprone）等が挙げられる。

実施例

- [0193] （実施例1～82）

表 1 に示す実施例 1 ～ 8 2 の化合物は、それぞれ独立したオリゴヌクレオチドであるセンス鎖領域及びアンチセンス鎖領域から構成される 2 本鎖オリゴヌクレオチドであり、該センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域の相補領域はすべてが天然型の RNA（すなわち、A（R）、G（R）、C（R）、及び U（R））で構成されている。また、各ヌクレオシド間結合は化学修飾されていないリン酸ジエステル結合である。各実施例の化合物におけるアンチセンス鎖領域は、表 1 に記載された各標的配列（開始位置及び終了位置に挟まれた領域の塩基配列）と完全に相補的な配列からなる相補領域を有し、該相補領域の 3' 末端にオーバーハング構造として 2 個の連続した T（D）が結合したオリゴヌクレオチドである。また、各実施例の化合物におけるセンス鎖領域は、対応するアンチセンス鎖領域の相補領域におけるヌクレオチド配列と完全に相補的な配列からなる相補領域を有し、該相補領域の 3' 末端にオーバーハング構造として 2 個の連続した T（D）が結合したオリゴヌクレオチドである。なお、実施例 6 1 の化合物は、WO 2 0 1 2 / 1 7 7 9 2 1 に記載されているヒト TfR 2（h TfR 2）に対する siRNA である AD-4 7 8 2 6 における 1 9 塩基対が全て天然型の RNA であって、センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域の各 3' 末端にオーバーハング構造として 2 個の連続した T（D）が結合しているものである。

[0194] 表 1 の各化合物は、ホスホロアミダイト法（Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)、Nature Communications 6, Article number: 6317 (2015)) を用いて合成を行った。各実施例の化合物は、負イオン ESI 質量分析により同定し、その結果を表 1 に記載した。また、各実施例の化合物は、それぞれ個別に合成したセンス鎖領域及びアンチセンス鎖領域を等モルずつ 1 つのチューブに入れてアニーリング処理後、未変性ゲルで 2 本鎖オリゴヌクレオチドを形成していることを確認した。

[0195]

[表1-1]

実施例	化合物名称	標的配列の 開始位置	標的配列の 終了位置	センス鎖領域の 分子量	アンチセンス鎖領域の 分子量
1	TfR2-001	2657	2675	6646.37	6649.27
2	TfR2-002	1114	1132	6624.72	6685.04
3	TfR2-003	399	417	6734.91	6548.29
4	TfR2-004	2157	2175	6652.11	6629.77
5	TfR2-005	2497	2515	6583.01	6715.25
6	TfR2-006	1669	1687	6667.45	6628.97
7	TfR2-007	2543	2561	6551.67	6733.92
8	TfR2-008	918	936	6653.14	6628.17
9	TfR2-009	2658	2676	6644.50	6633.72
10	TfR2-010	2180	2198	6559.74	6722.03
11	TfR2-011	1446	1464	6563.57	6729.86
12	TfR2-012	1843	1861	6752.25	6540.43
13	TfR2-013	1236	1254	6692.84	6605.73
14	TfR2-014	1824	1842	6552.53	6748.08
15	TfR2-015	2667	2685	6734.68	6550.24
16	TfR2-016	1042	1060	6480.05	6820.56
17	TfR2-017	2659	2677	6607.34	6678.06
18	TfR2-018	2680	2698	6611.58	6669.11
19	TfR2-019	2847	2865	6655.76	6613.08
20	TfR2-020	2544	2562	6529.26	6757.86
21	TfR2-021	2181	2199	6520.08	6760.85
22	TfR2-022	1671	1689	6649.91	6645.88
23	TfR2-023	1788	1806	6518.94	6777.18
24	TfR2-024	1233	1251	6706.11	6605.52
25	TfR2-025	2499	2517	6564.16	6716.94
26	TfR2-026	2422	2440	6654.04	6611.86
27	TfR2-027	1141	1159	6695.40	6621.10
28	TfR2-028	2175	2193	6682.89	6631.59
29	TfR2-029	1837	1855	6696.91	6583.11
30	TfR2-030	2534	2552	6523.62	6771.59
31	TfR2-031	1787	1805	6559.13	6752.32
32	TfR2-032	917	935	6666.78	6630.22
33	TfR2-033	2636	2654	6643.05	6656.46
34	TfR2-034	894	912	6626.34	6667.53
35	TfR2-035	2145	2163	6671.56	6621.64

[0196]

[表1-2]

実施例	化合物名称	標的配列の 開始位置	標的配列の 終了位置	センス鎖領域の 分子量	アンチセンス鎖領域の 分子量
36	TfR2-036	1308	1326	6625.92	6667.59
37	TfR2-037	2645	2663	6628.83	6668.09
38	TfR2-038	2824	2842	6764.86	6546.52
39	TfR2-039	1536	1554	6652.30	6646.75
40	TfR2-040	1841	1859	6778.08	6502.47
41	TfR2-041	2545	2563	6523.60	6740.06
42	TfR2-042	504	522	6695.27	6620.27
43	TfR2-043	93	111	6565.85	6746.68
44	TfR2-044	414	432	6643.58	6649.31
45	TfR2-045	415	433	6620.18	6691.65
46	TfR2-046	2143	2161	6670.24	6661.91
47	TfR2-047	1743	1761	6645.61	6666.08
48	TfR2-048	1998	2016	6689.93	6641.90
49	TfR2-049	1845	1863	6677.87	6606.31
50	TfR2-050	1842	1860	6780.09	6501.11
51	TfR2-051	1069	1087	6543.54	6773.30
52	TfR2-052	1742	1760	6672.60	6628.87
53	TfR2-053	2646	2664	6627.88	6673.84
54	TfR2-054	1623	1641	6623.58	6676.32
55	TfR2-055	2425	2443	6660.18	6610.74
56	TfR2-056	2423	2441	6675.54	6590.43
57	TfR2-057	2634	2652	6630.83	6670.68
58	TfR2-058	64	82	6701.99	6600.48
59	TfR2-059	1585	1603	6652.70	6631.57
60	TfR2-060	1668	1686	6687.20	6631.76
61	TfR2-061	241	259	6610.06	6701.54
62	TfR2-062	1746	1764	6567.92	6732.37
63	TfR2-063	2004	2022	6671.13	6645.01
64	TfR2-064	396	414	6696.31	6588.21
65	TfR2-065	1748	1766	6565.91	6732.86
66	TfR2-066	2800	2818	6605.37	6707.92
67	TfR2-067	397	415	6696.17	6593.60
68	TfR2-068	306	324	6557.51	6786.94
69	TfR2-069	1234	1252	6708.31	6607.12
70	TfR2-070	2427	2445	6660.36	6593.84

[0197]

[表1-3]

実施例	化合物名称	標的配列の 開始位置	標的配列の 終了位置	センス鎖領域の 分子量	アンチセンス鎖領域の 分子量
71	TfR2-071	2681	2699	6589.66	6709.78
72	TfR2-072	2799	2817	6605.45	6709.89
73	TfR2-073	465	483	6624.81	6692.06
74	TfR2-074	1312	1330	6591.52	6696.28
75	TfR2-075	1687	1705	6671.36	6632.90
76	TfR2-076	2553	2571	6551.07	6701.44
77	TfR2-077	2684	2702	6535.41	6751.70
78	TfR2-078	994	1012	6764.41	6547.17
79	TfR2-079	1789	1807	6559.74	6737.30
80	TfR2-080	66	84	6676.65	6641.69
81	TfR2-081	1468	1486	6719.88	6610.66
82	TfR2-082	2647	2665	6631.34	6671.27

[0198] 表中の「標的配列の開始位置」および「標的配列の終了位置」は、それぞれ配列番号1に示すヒトTfR2 mRNAの塩基配列における塩基の位置を示す。各実施例の化合物は、これらに挟まれた塩基配列を標的配列とする2本鎖オリゴヌクレオチドである。すなわち各実施例のアンチセンス鎖領域は、当該標的配列の開始位置および終了位置に挟まれた塩基配列と相補的な配列を有し、センス鎖領域は当該アンチセンス鎖領域と相補的な配列を有する。例えば、実施例19の化合物（TfR2-019）におけるセンス鎖領域の相補領域の配列は、5' CGUGAGUUUCAAUAUCAA 3'（配列番号43）であり、アンチセンス鎖領域の相補領域の配列は、5' UUGAUUUGAAACUCCACG 3'（配列番号44）である。また、実施例39の化合物（TfR2-039）におけるセンス鎖領域の相補領域の配列は、5' ACCUCAAGCCGUAGUGUA 3'（配列番号45）であり、アンチセンス鎖領域の相補領域の配列は、5' UACACUACGGCUUUGAGGU 3'（配列番号46）である。また、表1の各実施例の化合物のセンス鎖領域及びアンチセンス鎖領域における各相補領域の3'末端には、オーバーハング構造として2個の連続したT（D）が結合している。各オリゴヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドの5'位及び3'末端のヌクレオチドの3'位は、水素原子が、上述した各ヌクレオシドの構造図中の酸素原子と

結合した水酸基となっている。また、表中の「分子量」は、負イオンESI質量分析による実測値を示す。

[0199] (実施例 83～184)

表 2 に示す実施例 83～133 の化合物は、それぞれセンス鎖領域の 3' 末端のヌクレオチドの 3' 位 (3' 位が修飾されたヌクレオチドでは 2' 位) 及びアンチセンス鎖領域の 5' 末端のヌクレオチドの 5' 位が上述した式 (Z) で示されるリンカーで連結した 1 本鎖オリゴヌクレオチドであり、センス鎖領域の相補領域と、アンチセンス鎖領域の相補領域とで 2 本鎖構造を形成している。また、表 3 に示す実施例 134～184 の化合物は、それぞれ独立したオリゴヌクレオチドであるセンス鎖領域及びアンチセンス鎖領域を有する 2 本鎖オリゴヌクレオチドである。

[0200] 実施例 180 (T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G . s 1) 及び実施例 181 (T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G . s 2) の化合物は、実施例 169 の化合物 (T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G) におけるアンチセンス鎖領域の 3' 末端のオーバーハング構造がそれぞれ 1 ヌクレオチドであるか、又は存在しない、s i R N A である。実施例 182 (T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G . e 1) 及び実施例 183 (T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G . e 2) の化合物は、実施例 19 の化合物 (T f R 2 - 0 1 9) における標的配列 (すなわち、配列番号 1 の 2847～2865 番目の配列) を 5' 末端側にそれぞれ 1 又は 2 個のヌクレオチド鎖長延ばした配列 (すなわち、それぞれ配列番号 1 の 2846～2865 番目の配列及び 2845～2865 番目の配列) を標的配列とし、相補領域の鎖長がそれぞれ 20 b p、21 b p である s i R N A である。実施例 184 (T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G . e 3) の化合物は、実施例 169 の化合物 (T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G) におけるアンチセンス鎖領域の 3' 末端のオーバーハング構造を G (M) U (M) とした s i R N A である。

[0201] 表 2 及び表 3 に示す実施例 83～184 の化合物も実施例 1～82 と同様に合成した。配列中、「2」の部分合成時には、DMT-ethane-Diol pho

sphoramidite (ChemGene、カタログ番号：CLP-2250) を用い、「Z」の部分を作成するには、W02012/074038の実施例12に記載された方法を用いた。「2'-O-メチルヌクレオシド」の部分は、Nucleic Acids Research 17, 3373 (1989)に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。「DNA」の部分は、Nucleic Acids Research 11, 4539 (1984)に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。「3'-O-メチルヌクレオシド」の部分は、3'-O-Methyl Adenosine (n-bz) CED phosphoramidite (ChemGene、カタログ番号：ANP-2901)、3'-O-Methyl Cytidine (n-bz) CED phosphoramidite (ChemGene、カタログ番号：ANP-2902)、3'-O-Methyl Guanosine (n-ibu) CED phosphoramidite (ChemGene、カタログ番号：ANP-2903)、または、3'-O-Methyl Uridine CED phosphoramidite (ChemGene、カタログ番号：ANP-2904) を用いて合成した。「2'-O,4'-C-メチレンヌクレオシド」の部分は、W099/14226に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。「2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオシド」の部分は、J. Med. Chem. 36, 831 (1993)に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。「2'-O-メトキシエチルヌクレオシド」の部分は、Helv. Chim. Acta 78, 486-504 (1995)に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。「GN」の部分は、W02019/172286参考例41に記載されたホスホロアミダイト体を用いて合成した。なお、実施例134～179の化合物については、センス鎖領域の塩基配列を表3-1～表3-5、アンチセンス鎖領域の塩基配列を表3-6～表3-10にそれぞれ示した。また、実施例180～184の化合物については、センス鎖領域の塩基配列を表3-11、アンチセンス鎖領域の塩基配列を表3-12にそれぞれ示した。

[0202] 実施例134～184の化合物は、センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域を等モルずつ1つのチューブに入れてアニーリング処理後、未変性ゲル、または、HPLCを使って2本鎖オリゴヌクレオチドを形成していることを確認した。

[0203]

[表2-1]

实施例	化合物 名称	碱基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
83	TFR2-003. 5	G(M)~U(M)~G(M)A(M)G(F)G(M)A(F)U(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)~C(F)~A(M)U(M)A(M)G(F)U(M)U(F)G(F)A(M)C(M)A(M)U(M)C(F)C(M)U(F)C(M)A(M)C(M)~U(M)~U(M)	13637.49	13635.29	2
84	TFR2-005. 5	G(M)~C(M)~U(M)C(M)C(F)U(M)C(F)G(F)C(F)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)U(M)G(M)A(M)U(M)Z A(M)~A(F)~U(M)C(M)A(M)U(F)U(M)C(F)A(F)A(M)G(M)C(M)G(M)A(F)G(M)G(F)A(M)G(M)C(M)~U(M)~U(M)	13651.48	13650.29	3
85	TFR2-006. 5	U(M)~G(M)~G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~C(M)A(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M)U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)~U(M)~U(M)	13647.17	13650.29	4
86	TFR2-022. 5	G(M)~G(M)~C(M)A(M)G(F)A(M)C(F)U(F)C(F)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(F)~U(M)U(M)C(M)A(F)U(M)A(F)G(F)A(M)G(M)A(M)G(M)U(F)C(M)U(F)G(M)C(M)C(M)~U(M)~U(M)	13648.50	13650.29	5
87	TFR2-039. 5	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13652.26	13650.29	6
88	TFR2-046. 5	G(M)~C(M)~G(M)A(M)C(F)U(M)G(F)A(F)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M)A(M)U(M)G(M)U(M)A(M)C(M)Z G(M)~U(F)~A(M)C(M)A(M)U(F)G(M)C(F)G(F)U(M)G(M)U(M)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)G(M)C(M)~U(M)~U(M)	13676.17	13680.29	7
89	TFR2-065. 5	A(M)~G(M)~C(M)A(M)G(F)U(M)G(F)C(F)C(F)U(M)A(M)U(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(F)~A(M)A(M)G(M)G(F)A(M)A(F)U(F)A(M)G(M)G(M)C(M)A(F)C(M)U(F)G(M)C(M)U(M)~U(M)~U(M)	13647.20	13650.29	8
90	TFR2-007. 5	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(F)C(F)A(M)A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13632.75	13635.29	9
91	TFR2-013. 5	G(M)~G(M)~C(M)U(M)A(F)G(M)U(F)G(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(F)~A(M)U(M)U(M)G(F)U(M)U(F)G(F)A(M)C(M)A(M)C(F)U(M)A(F)G(M)C(M)C(M)~U(M)~U(M)	13648.57	13650.29	10
92	TFR2-019. 5	C(M)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	13617.57	13620.29	11

[0204]

[表2-2]

実施例	化合物 名称	塩基配列(5' -3')	分子量	理論値	配列 番号
93	TfR2-037. 5	A(M)~C(M)~C(M)U(F)A(M)A(F)U(F)G(F)U(M)G(M)A(M)C(M)G(M)G(M)U(M)C(M)A(M)U(M)Z A(M)~U(F)~G(M)A(M)C(M)C(F)G(M)U(F)C(F)A(M)C(M)A(M)U(M)U(F)A(M)G(F)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13652.76	13650.29	12
94	TfR2-076. 5	G(M)~C(M)~U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(F)U(M)U(M)C(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)~A(F)~A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)A(M)U(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(M)G(M)C(M)~U(M)~U(M)	13602.76	13605.29	13
95	TfR2-077. 5	U(M)~A(M)~G(M)C(M)A(F)U(M)C(F)C(F)U(M)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(F)~U(M)G(M)A(M)U(F)U(M)G(F)A(M)G(M)G(M)G(M)A(F)U(M)G(F)C(M)U(M)A(M)~U(M)~U(M)	13632.45	13635.29	14
96	TfR2-081. 5	C(M)~U(M)~G(M)G(M)G(F)A(M)C(F)G(F)U(M)G(M)G(M)U(M)G(M)A(M)C(M)U(M)U(M)U(M)Z A(M)~A(F)~A(M)G(M)U(M)C(F)A(M)C(F)C(F)A(M)C(M)G(M)U(F)C(M)C(F)C(M)A(M)G(M)~U(M)~U(M)	13682.43	13680.29	15
97	TfR2-061. 5	C(M)~A(M)~G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)C(F)A(M)A(M)A(M)C(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)Z A(M)~A(F)~U(M)G(M)A(M)G(F)G(M)U(F)U(F)U(M)G(M)G(M)C(M)U(F)G(M)C(F)C(M)U(M)G(M)~U(M)~U(M)	13666.44	13665.29	16
98	TfR2-006. 3	U(M)~G(M)~G(M)G(M)C(D)A(M)G(D)A(D)C(D)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)~T(D)~C(M)A(M)U(M)A(D)G(M)A(D)G(D)A(M)G(M)U(M)C(M)T(D)G(M)C(D)C(M)C(M)A(M)~U(M)~U(M)	13496.61	13498.37	17
99	TfR2-007. 3	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(D)U(M)C(D)A(D)T(D)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~T(D)~G(M)A(M)U(M)C(D)A(M)G(D)C(D)A(M)A(M)U(M)G(M)A(D)G(M)A(D)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13481.10	13483.36	18
100	TfR2-013. 3	G(M)~G(M)~C(M)U(M)A(D)G(M)T(D)G(D)G(D)U(M)C(M)A(M)A(M)A(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(D)~A(M)U(M)U(M)G(D)U(M)T(D)G(D)A(M)C(M)A(M)C(M)A(M)C(D)U(M)A(D)G(M)C(M)C(M)~U(M)~U(M)	13496.24	13498.40	19
101	TfR2-019. 3	C(M)~G(M)~U(M)G(M)G(D)A(M)G(D)T(D)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~T(D)~G(M)A(M)U(M)A(D)U(M)T(D)G(D)A(M)A(M)A(M)C(M)T(D)C(M)C(D)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	13507.44	13510.47	20
102	TfR2-039. 3	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(D)A(M)A(D)A(D)G(D)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)A(M)Z U(M)~A(D)~C(M)A(M)C(M)T(D)A(M)C(D)G(D)G(M)C(M)U(M)U(M)T(D)G(M)A(D)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13496.54	13498.37	21

[0205] [表2-3]

実施例	化合物 名称	塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
103	TFR2-076, 3	G(M)^(C(M)^(U(M)G(M)A(D)U(M)C(D)A(D)U(M)U(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^(A(D)^(A(M)U(M)G(M)A(D)G(M)A(D)A(D)A(M)U(M)U(M)G(M)A(D)U(M)C(D)A(M)G(M)C(M)^(U(M)^(U(M)			
104	TFR2-006, 6	U(M)^(G(M)^(G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)^(U(F)^(C(M)A(M)U(M)A(M)A(F)G(M)A(M)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M)U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)^(U(M)^(U(M)			
105	TFR2-007, 6	A(M)^(C(M)^(C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^(U(F)^(G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(M)C(F)A(M)A(M)U(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)^(U(M)^(U(M)			
106	TFR2-013, 6	G(M)^(G(M)^(C(M)U(M)A(F)G(M)U(F)G(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)^(G(F)^(A(M)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)G(F)A(M)C(M)C(M)A(M)C(M)A(M)A(F)G(M)C(M)C(M)^(U(M)^(U(M)			
107	TFR2-019, 6	C(M)^(G(M)^(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)^(U(F)^(G(M)A(M)U(M)A(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)^(U(M)^(U(M)			
108	TFR2-039, 6	A(M)^(C(M)^(C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)A(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^(A(F)^(C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^(U(M)^(U(M)			
109	TFR2-076, 6	G(M)^(C(M)^(M)G(M)A(F)U(M)C(F)A(F)A(F)U(M)U(M)C(M)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)^(A(F)^(A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(M)A(F)A(M)U(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(M)C(M)^(U(M)^(U(M)			
110	TFR2-039, 8	A(D)^(C(M)^(C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)A(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^(A(F)^(C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^(U(M)^(U(M)			
111	TFR2-039, 9	A(D)^(C(M)^(C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)A(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)^(A(F)^(C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^(U(M)^(U(M)			
112	TFR2-039, 10	A(M)^(C(M)^(C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)A(M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^(A(F)^(C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^(U(M)^(U(M)			
113	TFR2-039, 11	A(M)^(C(M)^(C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)A(M)G(M)U(M)A(M)Z T(D)^(A(F)^(C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)^(U(M)^(U(M)			

[0206] [表2-4]

実施例	化合物 名称	塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
114	TfR2-039, 12	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)A(M)Z T(D)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13650.20	13646.32	22
115	TfR2-019, 8	C(D)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	13605.92	13602.29	11
116	TfR2-019, 9	C(D)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(M)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	13599.79	13602.29	11
117	TfR2-019, 15	C(M)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)~A(M)~A(D)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	13633.59	13630.46	23
118	TfR2-019, 17	C(M)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)~A(M)~A(D)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	13634.22	13630.46	23
119	TfR2-039, 19	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13675.42	13674.35	6
120	TfR2-039, 20	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)A(M)Z T(D)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13662.17	13658.35	22
121	TfR2-039, 21	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13650.03	13650.29	6
122	TfR2-039, 22	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13663.25	13662.32	6
123	TfR2-039, 23	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13664.40	13662.32	6
124	TfR2-039, 24	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	13669.00	13674.35	6

[0207]

[表2-5]

実施例	化合物 名称	塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
125	THR2-039. 25	A(N) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)	13690.27	13686.38	6
126	THR2-039. 26	A(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)	13687.73	13686.38	6
127	THR2-039. 5G	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)	14554.80	14547.45	6
128	THR2-019. 6G	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)A(M)Z U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)U(M)U(M)U(M)	14536.80	14529.45	11
129	THR2-019. 22	C(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)A(M)Z U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)U(M)U(M)U(M)	13632.67	13632.32	11
130	THR2-019. 22s	C(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)A(M)Z U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)U(M)U(M)U(M)	13679.53	13680.53	11
131	AD47882. 5G	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)Z A(M) ⁺ G(F) ⁻ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)U(M)U(M)U(M)	14555.13	14554.85	24
132	AD47882. 23G	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)Z A(M) ⁺ G(F) ⁻ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)U(M)U(M)U(M)	14560.47	14559.47	24
133	AD47882. 23sG	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)U(M)Z A(M) ⁺ G(F) ⁻ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)U(M)U(M)U(M)	14615.25	14615.08	24

[0208]

[表2-6]

化合物 名称	塩基配列(5'-3')	配列 番号
TFR2-003. 5	G(M)~U(M)~G(M)A(M)G(F)G(M)A(F)U(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)Z U(M)~C(F)~A(M)U(M)A(M)G(F)U(M)U(F)G(F)A(M)C(M)A(M)U(M)C(F)C(M)U(F)C(M)A(M)C(M)~U(M)~U(M)	2
TFR2-005. 5	G(M)~C(M)~U(M)C(M)C(F)U(M)C(F)G(F)C(F)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)U(M)G(M)A(M)U(M)U(M)Z A(M)~A(F)~U(M)C(M)A(M)U(F)U(M)C(F)A(F)A(M)G(M)C(M)G(M)A(F)G(M)G(F)A(M)G(M)C(M)~U(M)~U(M)	3
TFR2-006. 5	U(M)~G(M)~G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~C(M)A(M)U(M)A(F)G(M)A(F)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M)U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)~U(M)~U(M)	4
TFR2-022. 5	G(M)~C(M)~C(M)A(M)G(F)A(M)C(F)U(F)C(F)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(F)~U(M)U(M)C(M)A(F)U(M)A(F)G(F)A(M)G(M)A(M)G(M)U(F)C(M)U(F)G(M)C(M)C(M)~U(M)~U(M)	5
TFR2-039. 5	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	6
TFR2-046. 5	G(M)~C(M)~G(M)A(M)C(F)U(M)G(F)A(F)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M)A(M)U(M)G(M)U(M)A(M)C(M)Z G(M)~U(F)~A(M)C(M)A(M)U(F)G(M)C(F)G(F)U(M)G(M)U(M)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)G(M)C(M)~U(M)~U(M)	7
TFR2-065. 5	A(M)~G(M)~C(M)A(M)G(F)U(M)G(F)C(F)U(M)A(M)U(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(F)~A(M)A(M)G(M)G(F)A(M)A(F)U(F)A(M)G(M)G(M)C(M)A(F)C(M)U(F)G(M)C(M)U(M)~U(M)~U(M)	8
TFR2-007. 5	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(F)C(F)A(M)A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	9

[0209]

[表2-7]

化合物 名称	塩基配列 (5' - 3')	配列 番号
TFR2-013.5	G(M) ^ G(M) ^ C(M) U(M) A(F) G(M) U(F) G(F) G(F) U(M) C(M) A(M) A(M) C(M) A(M) A(M) U(M) C(M) A(M) Z U(M) ^ G(F) ^ A(M) U(M) U(M) G(F) U(M) U(F) G(F) A(M) C(M) C(M) A(M) C(F) U(M) A(F) G(M) C(M) C(M) ^ U(M) ^ U(M)	10
TFR2-019.5	C(M) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) U(M) C(M) A(M) A(M) Z U(M) ^ U(F) ^ G(M) A(M) U(M) A(F) U(M) U(F) G(F) A(M) A(M) C(M) U(F) C(M) C(F) A(M) C(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	11
TFR2-037.5	A(M) ^ C(M) ^ C(M) C(M) U(F) A(M) A(F) U(F) G(F) U(M) G(M) A(M) C(M) G(M) G(M) U(M) C(M) A(M) U(M) Z A(M) ^ U(F) ^ G(M) A(M) C(M) C(F) G(M) U(F) C(F) A(M) C(M) A(M) U(M) U(F) A(M) G(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M) ^ U(M)	12
TFR2-076.5	G(M) ^ C(M) ^ U(M) G(M) A(F) U(M) C(F) A(F) A(F) U(M) U(M) U(M) C(M) U(M) C(M) A(M) U(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ A(M) U(M) G(M) A(F) G(M) A(F) A(F) A(M) U(M) U(M) G(M) A(F) U(M) C(F) A(M) G(M) C(M) ^ U(M) ^ U(M)	13
TFR2-077.5	U(M) ^ A(M) ^ G(M) C(M) A(F) U(M) C(F) C(F) C(F) U(M) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) C(M) A(M) C(M) A(M) Z U(M) ^ G(F) ^ U(M) G(M) A(M) U(F) U(M) G(F) A(F) A(M) G(M) G(M) G(M) A(F) U(M) G(F) C(M) U(M) A(M) ^ U(M) ^ U(M)	14
TFR2-081.5	C(M) ^ U(M) ^ G(M) G(M) G(F) A(M) C(F) G(F) G(F) U(M) G(M) G(M) U(M) G(M) A(M) C(M) U(M) U(M) Z A(M) ^ A(F) ^ A(M) G(M) U(M) C(F) A(M) C(F) C(F) A(M) C(M) C(M) G(M) U(F) C(M) C(F) C(M) A(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	15
TFR2-061.5	C(M) ^ A(M) ^ G(M) G(M) C(F) A(M) G(F) C(F) C(F) A(M) A(M) A(M) C(M) C(M) U(M) C(M) A(M) U(M) U(M) Z A(M) ^ A(F) ^ U(M) G(M) A(M) G(F) G(M) U(F) U(F) U(M) G(M) G(M) C(M) U(F) G(M) C(F) C(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	16
TFR2-006.3	U(M) ^ G(M) ^ G(M) G(M) C(D) A(M) G(D) A(D) C(D) U(M) C(M) U(M) C(M) A(M) U(M) G(M) A(M) A(M) Z U(M) ^ T(D) ^ C(M) A(M) U(M) A(D) G(M) A(D) G(D) A(M) G(M) U(M) C(M) T(D) G(M) C(D) C(M) C(M) A(M) ^ U(M) ^ U(M)	17

[0210]

[表2-8]

化合物 名称	塩基配列(5'-3')	配列 番号
TFR2-007. 3	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(D)U(M)C(D)A(D)T(D)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~T(D)~G(M)A(M)U(M)C(D)A(M)G(D)C(D)A(M)A(M)U(M)G(M)A(D)G(M)A(D)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	18
TFR2-013. 3	G(M)~G(M)~C(M)U(M)A(D)G(M)T(D)G(D)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(D)~A(M)U(M)U(M)G(D)U(M)T(D)G(D)A(M)C(M)C(M)A(M)C(D)U(M)A(D)G(M)C(M)C(M)~U(M)~U(M)	19
TFR2-019. 3	C(M)~G(M)~U(M)G(M)G(D)A(M)G(D)T(D)T(D)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~T(D)~G(M)A(M)U(M)A(D)U(M)T(D)G(D)A(M)A(M)A(M)C(M)T(D)C(M)C(D)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	20
TFR2-039. 3	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(D)A(M)A(D)A(D)G(D)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)~A(D)~C(M)A(M)C(M)T(D)A(M)C(D)G(D)G(M)C(M)U(M)U(M)T(D)G(M)A(D)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	21
TFR2-076. 3	G(M)~C(M)~U(M)G(M)A(D)U(M)C(D)A(D)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)C(M)A(M)U(M)U(M)A(M)Z U(M)~A(D)~A(M)U(M)G(M)A(D)G(M)A(D)A(D)A(M)U(M)U(M)G(M)A(D)U(M)C(D)A(M)G(M)C(M)~U(M)~U(M)	13
TFR2-006. 6	U(M)~G(M)~G(M)G(M)C(F)A(M)G(F)A(F)C(F)U(M)C(M)U(M)C(M)U(M)A(M)U(M)G(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~C(M)A(M)U(M)A(F)G(M)A(M)G(F)A(M)G(M)U(M)C(M)U(F)G(M)C(F)C(M)C(M)A(M)~U(M)~U(M)	4
TFR2-007. 6	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)U(M)C(F)A(F)U(F)U(M)G(M)C(M)U(M)G(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)C(F)A(M)G(M)C(F)A(M)A(M)U(M)G(M)A(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)~U(M)	9
TFR2-013. 6	G(M)~G(M)~C(M)U(M)A(F)G(M)U(F)G(F)G(F)U(M)C(M)A(M)A(M)C(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(M)Z U(M)~G(F)~A(M)U(M)U(M)G(F)U(M)U(M)G(F)A(M)C(M)C(M)A(M)C(F)U(M)A(F)G(M)C(M)C(M)~U(M)~U(M)	10

[0211]

[表2-9]

化合物 名称	塩基配列 (5' - 3')	配列 番号
TfR2-019, 6	C(M) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) U(M) C(M) A(M) A(M) Z U(M) ^ U(F) ^ G(M) A(M) U(M) A(F) U(M) U(M) G(F) A(M) A(M) A(M) C(M) U(F) C(M) C(F) A(M) C(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	11
TfR2-039, 6	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) U(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(M) G(F) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	6
TfR2-076, 6	G(M) ^ C(M) ^ U(M) G(M) A(F) U(M) C(F) A(F) A(F) U(M) U(M) U(M) C(M) U(M) C(M) A(M) U(M) U(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ A(M) U(M) G(M) A(F) G(M) A(M) A(F) A(M) U(M) U(M) G(M) A(F) U(M) C(F) A(M) G(M) C(M) ^ U(M) ^ U(M)	13
TfR2-039, 8	A(D) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) U(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(M) G(F) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	6
TfR2-039, 9	A(D) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) U(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(F) G(M) C(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	6
TfR2-039, 10	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) U(M) A(M) Z T(D) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(F) G(F) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	22
TfR2-039, 11	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) U(M) A(M) Z T(D) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(M) G(F) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	22
TfR2-039, 12	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) U(M) A(M) Z T(D) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(F) G(M) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	22

[0212]

[表2-10]

化合物 名称	塩基配列 (5' - 3')	配列 番号
THR2-019. 8	C(D) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(F) U(M) A(M) A(M) C(M) A(M) A(M) U(M) C(M) A(M) A(M) Z U(M) ^ U(F) ^ G(M) A(M) U(M) A(F) U(M) U(M) G(F) A(M) A(M) A(M) C(M) U(F) C(M) C(F) A(M) C(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	11
THR2-019. 9	C(D) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) C(M) A(M) A(M) Z U(M) ^ U(F) ^ G(M) A(M) U(M) A(F) U(M) U(F) G(M) A(M) A(M) A(M) C(M) U(F) C(M) C(F) A(M) C(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	11
THR2-019. 15	C(M) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) T(D) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) U(M) C(M) ^ A(M) ^ A(D) Z U(M) ^ U(F) ^ G(M) A(M) U(M) A(F) U(M) U(M) G(F) A(M) A(M) A(M) C(M) U(F) C(M) C(F) A(M) C(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	23
THR2-019. 17	C(M) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) T(D) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) U(M) C(M) ^ A(M) ^ A(D) Z U(M) ^ U(F) ^ G(M) A(M) U(M) A(F) U(M) U(F) G(M) A(M) A(M) A(M) C(M) U(F) C(M) C(F) A(M) C(M) G(M) ^ U(M) ^ U(M)	23
THR2-039. 19	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(M) G(M) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	6
THR2-039. 20	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) A(M) Z T(D) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(M) G(M) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	22
THR2-039. 21	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) A(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(F) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	6
THR2-039. 22	A(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) A(M) A(M) Z U(M) ^ A(F) ^ C(M) A(M) C(M) U(F) A(M) C(M) G(F) G(M) C(M) U(M) U(M) U(F) G(M) A(F) G(M) G(M) U(M) ^ U(M)	6

[0213]

[表2-11]

化合物 名称	塩基配列(5'→3')	配列 番号
TFR2-039, 23	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)	6
TFR2-039, 24	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)	6
TFR2-039, 25	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(M)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)	6
TFR2-039, 26	A(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(3M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(M)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(M)G(M)G(M)U(M)~U(M)	6
TFR2-039, 5G	GNA(M)~C(M)~C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M)U(M)A(M)Z U(M)~A(F)~C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(F)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M)~U(M)	6
TFR2-019, 6G	GNC(M)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)A(M)A(M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)	11
TFR2-019, 22	C(M)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)C(M)A(M)A(3M)Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)	11
TFR2-019, 22s	C(M)~G(M)~U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)~A(M)~A(3M)~Z U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)	11

[0214]

[表2-12]

化合物 名称	塩基配列(5'-3')	配列 番号
AD47882. 5G	GNC(M)~C(M)~A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)C(M)U(M)Z A(M)~G(F)~A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)~U(M)~U(M)	24
AD47882. 23G	GNC(M)~C(M)~A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)C(M)U(3M)Z A(M)~G(F)~A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(F)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)~U(M)~U(M)	24
AD47882. 23sG	GNC(M)~C(M)~A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M)~C(M)~Z A(M)~G(F)~A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)~U(M)~U(M)	24

[0215] [表3-1]

実施例	化合物 名称	センス鎖 名称	センス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
134	TFR2-039, 28DU	TFR2-039, 28S	A(D) ⁻ C(E) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)U(M) ⁻ A(M)	6325.17	6323.42	25
135	TFR2-039, 29DU	TFR2-039, 29S	A(D) ⁻ C(M) ⁻ C(E)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)U(M) ⁻ A(M)	6323.22	6323.42	25
136	TFR2-039, 30DU	TFR2-039, 30S	A(D) ⁻ C(M) ⁻ C(M)T(E)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)U(M) ⁻ A(M)	6321.96	6323.41	47
137	TFR2-039, 31DU	TFR2-039, 31S	A(D) ⁻ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(E)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)U(M) ⁻ A(M)	6336.64	6335.45	25
138	TFR2-039, 32DU	TFR2-039, 32S	A(D) ⁻ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(E)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)U(M) ⁻ A(M)	6309.91	6309.39	25
139	TFR2-039, 90U	TFR2-039, 9S	A(D) ⁻ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)U(M) ⁻ A(M)	6296.13	6297.38	25
140	TFR2-019, 29DU	TFR2-019, 29S	C(D) ⁻ G(M) ⁻ T(E)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M)	6322.20	6325.39	26
141	TFR2-019, 34DU	TFR2-019, 34S	C(D) ⁻ G(M) ⁻ T(E)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M)	6321.49	6325.39	26
142	TFR2-019, 22DU	TFR2-019, 22S	C(M) ⁻ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁻ A(3M)	6330.00	6329.39	27
143	TFR2-019, 22sDU	TFR2-019, 22sS	C(M) ⁻ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁻ A(3M) ⁻ 2	6470.00	6469.49	27

[0216] [表3-2]

実施例	化合物 名称	センス鎖 名称	センス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
144	THR2-039, 23DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
145	THR2-039, 35DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
146	THR2-039, 36DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
147	THR2-039, 37DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
148	THR2-039, 38DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
149	THR2-039, 39DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
150	THR2-039, 40DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
151	THR2-039, 41DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
152	THR2-039, 42DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
153	THR2-039, 43DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25
154	THR2-039, 45DUG	THR2-039, 23SG	GNA(M) ⁺ C(M) ⁻ C(M)U(M)C(F)A(M)A(F)A(F)G(F)C(M)C(M)G(M)U(M)A(M)G(M)U(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ A(3M)	7228, 28	7228, 32	25

[0217] [表3-3]

実施例	化合物 名称	センズ鐵 名称	センズ鐵領域の塩基配列 (5' - 3')	分子量	理論値	配列 番号
155	TFR2-019, 22DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
156	TFR2-019, 36DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
157	TFR2-019, 38DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
158	TFR2-019, 85DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
159	TFR2-019, 86DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
160	TFR2-019, 87DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
161	TFR2-019, 71DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
162	TFR2-019, 88DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
163	TFR2-019, 89DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
164	TFR2-019, 90DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27
165	TFR2-019, 80DUG	TFR2-019, 22SG	GNC (M) ⁺ G (M) ⁻ U (M) G (M) G (F) A (M) G (F) U (F) U (M) C (M) A (M) A (M) U (M) A (M) U (M) C (M) ⁻ A (M) ⁻ A (3M)	7230.30	7230.28	27

[0218]

[表3-4]

実施例	化合物 名称	センス鐵 名称	センス鐵領域の塩基配列(5' -3')	分子量	理論値	配列 番号
166	TFR2-019, 91DUG	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27
167	TFR2-019, 92DUG	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27
168	TFR2-019, 93DUG	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27
169	TFR2-019, 94DUG	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27
170	TFR2-019, 95DUG	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27
171	AD47882, 23DUG	AD47882, 23SG	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁺ U(3M)	7056.15	7056.20	28
172	AD47882, 23sDUG	AD47882, 23sSG	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁺ U(3M) ²	7200.00	7199.99	28
173	AD47882, 41DUG	AD47882, 23SG	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁺ U(3M)	7056.15	7056.20	28
174	AD47882, 89DUG	AD47882, 23SG	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁺ U(3M)	7056.15	7056.20	28
175	AD47882, 89DUG	AD47882, 23SG	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁺ U(3M)	7056.15	7056.20	28
176	AD47882, 91DUG	AD47882, 23SG	GNC(M) ⁺ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁺ U(3M)	7056.15	7056.20	28

[表3-5]

実験例	化合物 名称	センス鎖 名称	センス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
177	AD47882. 920UG	AD47882. 235G	GNC(M) ⁻ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁻ U(3M)	7056.15	7056.20	28
178	AD47882. 930UG	AD47882. 235G	GNC(M) ⁻ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁻ U(3M)	7056.15	7056.20	28
179	AD47882. 940UG	AD47882. 235G	GNC(M) ⁻ C(M) ⁻ A(M)C(M)G(F)U(M)G(F)A(F)U(F)U(M)C(M)U(M)C(M)C(M)U(M)U(M)U(M) ⁻ C(M) ⁻ U(3M)	7056.15	7056.20	28

[0220]

[表3-6]

実施例	化合物 名称	アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列 (5' -3')	分子量	理論値	配列 番号
134	TFR2-039, 280U	TFR2-039, 9AS	U(M) ⁻ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6949.20	6949.72	29
135	TFR2-039, 290U	TFR2-039, 9AS	U(M) ⁻ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6949.20	6949.72	29
136	TFR2-039, 300U	TFR2-039, 9AS	U(M) ⁻ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6949.20	6949.72	29
137	TFR2-039, 310U	TFR2-039, 9AS	U(M) ⁻ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6949.20	6949.72	29
138	TFR2-039, 320U	TFR2-039, 9AS	U(M) ⁻ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6949.20	6949.72	29
139	TFR2-039, 90U	TFR2-039, 9AS	U(M) ⁻ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6949.20	6949.72	29
140	TFR2-019, 290U	TFR2-019, 29AS	U(M) ⁻ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6917.88	6917.74	30
141	TFR2-019, 340U	TFR2-019, 34AS	U(M) ⁻ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6914.60	6917.74	30
142	TFR2-019, 220U	TFR2-019, 22AS	U(M) ⁻ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6918.0	6917.74	30
143	TFR2-019, 2230U	TFR2-019, 22AS	U(M) ⁻ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	6918.0	6917.74	30

[表3-7]

実施例	化合物 名称	アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
144	TFR2-039. 23DUG	TFR2-039. 23AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6950.0	6949.72	29
145	TFR2-039. 35DUG	TFR2-039. 35AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6963.03	6965.79	29
146	TFR2-039. 36DUG	TFR2-039. 36AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6964.35	6965.79	29
147	TFR2-039. 37DUG	TFR2-039. 37AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6977.99	6981.86	29
148	TFR2-039. 38DUG	TFR2-039. 38AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6942.14	6941.73	29
149	TFR2-039. 39DUG	TFR2-039. 39AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6957.52	6957.80	29
150	TFR2-039. 40DUG	TFR2-039. 40AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6987.83	6989.94	29
151	TFR2-039. 41DUG	TFR2-039. 41AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6949.06	6949.79	31
152	TFR2-039. 42DUG	TFR2-039. 42AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(F)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6964.35	6965.86	31
153	TFR2-039. 43DUG	TFR2-039. 43AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6994.48	6991.83	29
154	TFR2-039. 45DUG	TFR2-039. 45AS	U(M) ⁺ A(F) ⁻ C(M)A(M)C(M)U(F)A(M)C(F)G(M)G(M)C(M)U(M)U(M)U(F)G(M)A(F)G(M)G(M)U(M) ⁺ U(M) ⁻ U(M)	6994.74	6991.82	32

[表3-8]

実施例	化合物 名称	アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
155	TFR2-019, 22DUG	TFR2-019, 22AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~U(M)~U(M)	6918.0	6917.74	30
156	TFR2-019, 36DUG	TFR2-019, 36AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6929.97	6929.99	30
157	TFR2-019, 38DUG	TFR2-019, 38AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6905.91	6905.95	30
158	TFR2-019, 85DUG	TFR2-019, 85AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6955.94	6956.00	30
159	TFR2-019, 86DUG	TFR2-019, 86AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)U(M)G(F)A(M)A(E)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6941.94	6941.99	30
160	TFR2-019, 87DUG	TFR2-019, 87AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6899.95	6899.98	30
161	TFR2-019, 71DUG	TFR2-019, 71AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6926.06	6925.99	33
162	TFR2-019, 88DUG	TFR2-019, 88AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6926.05	6925.99	33
163	TFR2-019, 89DUG	TFR2-019, 89AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6926.11	6925.99	33
164	TFR2-019, 90DUG	TFR2-019, 90AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(F)~G(M)~U(M)~U(M)	6926.00	6925.99	33
165	TFR2-019, 80DUG	TFR2-019, 80AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(M)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	6953.09	6957.96	30

[表3-9]

実施例	化合物 名称	アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
166	TFR2-019, 91DUG	TFR2-019, 91AS	U(M) ⁺ U(F) ⁺ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)C(E)U(R) ⁺ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	6957.96	6957.96	30
167	TFR2-019, 92DUG	TFR2-019, 92AS	U(M) ⁺ U(F) ⁺ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R) ⁺ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	6958.07	6957.96	30
168	TFR2-019, 93DUG	TFR2-019, 93AS	U(M) ⁺ U(F) ⁺ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(R) ⁺ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	6958.06	6957.96	30
169	TFR2-019, 94DUG	TFR2-019, 94AS	U(M) ⁺ U(F) ⁺ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R) ⁺ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	6935.66	6935.69	30
170	TFR2-019, 95DUG	TFR2-019, 95AS	U(M) ⁺ U(F) ⁺ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(R) ⁺ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	6935.68	6935.69	30
171	AD47882, 23DUG	AD47882, 9AS	A(M) ⁺ G(F) ⁺ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	7118.03	7118.12	34
172	AD47882, 23sDUG	AD47882, 9AS	A(M) ⁺ G(F) ⁺ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	7118.03	7118.12	34
173	AD47882, 41DUG	AD47882, 41AS	A(M) ⁺ G(F) ⁺ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)T(D)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	7119.06	7118.1	35
174	AD47882, 88DUG	AD47882, 88AS	A(M) ⁺ G(F) ⁺ A(M)A(F)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)T(D)C(M)A(E)C(M)G(F)U(M)G(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	7130.10	7130.10	35
175	AD47882, 89DUG	AD47882, 89AS	A(M) ⁺ G(F) ⁺ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)T(D)C(M)A(E)C(M)G(F)U(M)G(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	7130.11	7130.10	35
176	AD47882, 91DUG	AD47882, 91AS	A(M) ⁺ G(F) ⁺ A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)U(M)C(E)A(F) ⁺ C(M)G(F)U(M)G(M) ⁺ G(M) ⁺ U(M) ⁺ U(M)	7162.09	7162.07	34

[表3-10]

実施例	化合物 名称	アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
177	AD47882, 92DUG	AD47882, 92AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(E)A(R)ˆC(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	7163.08	7162.07	34
178	AD47882, 93DUG	AD47882, 93AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)U(F)C(E)A(R)ˆC(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	7162.05	7162.07	34
179	AD47882, 94DUG	AD47882, 94AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(M)A(R)ˆC(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	7136.04	7136.06	34

[0225]

[表3-11]

実施例	化合物 名称	センス鎖 名称	センス鎖領域の塩基配列(5'-3')	分子量	理論値	配列 番号
180	TFR2-019, 94DUG. s1	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27
181	TFR2-019, 94DUG. s2	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27
182	TFR2-019, 94DUG. s1	TFR2-019, 22SG. s1	GNG(M) ⁺ C(M) ⁻ G(M)U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7589.35	7589.35	36
183	TFR2-019, 94DUG. s2	TFR2-019, 22SG. s2	GNG(M) ⁺ G(M) ⁻ C(M)G(M)U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7948.42	7948.41	37
184	TFR2-019, 94DUG. s3	TFR2-019, 22SG	GNC(M) ⁺ G(M) ⁻ U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M) ⁻ A(M) ⁺ A(3M)	7230.30	7230.28	27

[0226]

[表3-12]

実施例	化合物 名称	アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5'→3')	分子量	理論値	配列 番号
180	TER2-019, 94DUG, s1	TER2-019, 94AS, s1	U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R) ⁻ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁻ G(M) ⁻ U(M)	6599	6599.58	38
181	TER2-019, 94DUG, s2	TER2-019, 94AS, s2	U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R) ⁻ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁻ G(M)	6263	6263.31	39
182	TER2-019, 94DUG, e1	TER2-019, 94AS, e1	U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R) ⁻ C(M)C(F)A(M)C(M)G(M) ⁻ C(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	7254	7255.06	40
183	TER2-019, 94DUG, e2	TER2-019, 94AS, e2	U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R) ⁻ C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M) ⁻ C(M) ⁻ U(M) ⁻ U(M)	7574	7574.27	41
184	TER2-019, 94DUG, e3	TER2-019, 94AS, e3	U(M) ⁺ U(F) ⁻ G(M)A(M)U(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R) ⁻ C(M)C(F)A(M)C(M) ⁻ G(M) ⁻ G(M) ⁻ U(M)	6974	6974.88	42

[0227] [表3-13]

センス鎖 名称	センス鎖領域の塩基配列(5'→3')		配列 番号
TFR2-039, 28S	A(D) ^ C(E) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) G(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ A(M)		25
TFR2-039, 29S	A(D) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) G(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ A(M)		25
TFR2-039, 30S	A(D) ^ C(M) ^ C(M) T(E) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) G(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ A(M)		47
TFR2-039, 31S	A(D) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(E) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) G(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ A(M)		25
TFR2-039, 32S	A(D) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(E) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) G(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ A(M)		25
TFR2-039, 9S	A(D) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) G(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ A(M)		25
TFR2-019, 29S	C(D) ^ G(M) ^ T(E) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(F) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) U(M) C(M) ^ A(M) ^ A(M)		26
TFR2-019, 34S	C(D) ^ G(M) ^ T(E) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(F) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) U(M) C(M) ^ A(M) ^ A(M)		26

[0228]

[表3-14]

センス鎖 名称	センス鎖領域の塩基配列 (5' - 3')	配列 番号
THR2-019, 22S	C(M) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) C(M) ^ A(M) ^ A(3M)	27
THR2-019, 22sS	C(M) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) C(M) ^ A(M) ^ A(3M) ^ 2	27
THR2-039, 23SG	GNA(M) ^ C(M) ^ C(M) U(M) C(F) A(M) A(F) A(F) G(F) C(M) C(M) G(M) U(M) A(M) G(M) U(M) G(M) ^ U(M) ^ A(3M)	25
THR2-019, 22SG	GNC(M) ^ G(M) ^ U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) C(M) ^ A(M) ^ A(3M)	27
AD47882, 23SG	GNC(M) ^ C(M) ^ A(M) C(M) G(F) U(M) G(F) A(F) U(F) U(M) C(M) C(M) C(M) U(M) U(M) C(M) ^ C(M) ^ U(3M)	28
AD47882, 23sSG	GNC(M) ^ C(M) ^ A(M) C(M) G(F) U(M) G(F) A(F) U(F) U(M) C(M) C(M) C(M) U(M) U(M) C(M) ^ C(M) ^ U(3M) ^ 2	28
THR2-019, 22SG, e1	GNG(M) ^ C(M) ^ G(M) U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) C(M) ^ A(M) ^ A(3M)	36
THR2-019, 22SG, e2	GNG(M) ^ G(M) ^ C(M) G(M) U(M) G(M) G(F) A(M) G(F) U(F) U(M) C(M) A(M) A(M) U(M) A(M) C(M) ^ A(M) ^ A(3M)	37

[0229]

[表3-15]

アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列 (5' -3')	配列 番号
TfR2-039. 9AS	U(M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (M) G (M) C (M) U (M) U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) U (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TfR2-019. 29AS	U(M) ^ U (F) ^ G (M) A (M) U (M) A (F) U (M) U (F) G (M) A (M) A (M) C (M) U (F) C (M) C (F) A (M) C (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	30
TfR2-019. 34AS	U(M) ^ U (F) ^ G (M) A (M) U (M) A (F) U (M) U (M) G (F) A (M) A (M) C (M) U (F) C (M) C (F) A (M) C (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	30
TfR2-019. 22AS	U(M) ^ U (F) ^ G (M) A (M) U (M) A (F) U (M) U (M) G (F) A (M) A (M) C (M) U (F) C (M) C (F) A (M) C (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	30
TfR2-039. 23AS	U(M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (M) G (M) C (M) U (M) U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) U (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TfR2-039. 35AS	U(M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (M) G (M) C (M) U (M) U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TfR2-039. 36AS	U(M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (M) G (M) G (M) C (M) U (F) U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TfR2-039. 37AS	U(M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (M) G (M) G (M) C (M) U (F) ^ U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	29

[表3-16]

アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列 (5'-3')	配列 番号
TFR2-039. 38AS	U (M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (F) G (M) C (M) U (F) U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TFR2-039. 39AS	U (M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (F) G (M) C (M) U (F) ^ U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TFR2-039. 40AS	U (M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) ^ G (F) ^ G (M) C (M) U (F) ^ U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TFR2-039. 41AS	U (M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (M) G (M) C (M) T (D) U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	31
TFR2-039. 42AS	U (M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (M) G (M) C (M) T (D) ^ U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	31
TFR2-039. 43AS	U (M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (M) G (M) C (E) U (M) U (M) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	29
TFR2-039. 45AS	U (M) ^ A (F) ^ C (M) A (M) C (M) U (F) A (M) C (F) G (M) G (M) C (M) U (M) T (E) U (F) G (M) A (F) G (M) G (M) ^ U (M) ^ U (M)	32
TFR2-019. 36AS	U (M) ^ U (F) ^ G (M) A (M) U (M) A (F) U (M) U (M) G (M) A (M) A (M) A (F) C (M) U (F) C (M) C (F) A (M) C (M) ^ G (M) ^ U (M) ^ U (M)	30

[0231]

[表3-17]

アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5' - 3')	配列 番号
TFR2-019. 38AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TFR2-019. 85AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TFR2-019. 86AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(E)A(M)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TFR2-019. 87AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)U(F)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TFR2-019. 71AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	33
TFR2-019. 88AS	U(M)~U(F)~G(M)A(F)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	33
TFR2-019. 89AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	33
TFR2-019. 90AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(F)~G(M)~U(M)~U(M)	33

[表3-18]

アンチ センス鎖 名称	アンチセンス領域の塩基配列(5'-3')	配列 番号
TfR2-019. 80AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TfR2-019. 91AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TfR2-019. 92AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TfR2-019. 93AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TfR2-019. 94AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TfR2-019. 95AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
TfR2-019. 95AS	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~U(M)~U(M)	30
AD47882. 9AS	A(M)~G(F)~A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)U(M)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)G(M)~U(M)~U(M)	34
AD47882. 41AS	A(M)~G(F)~A(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(F)G(M)A(M)A(M)T(D)C(M)A(F)C(M)G(F)U(M)G(M)~G(M)~U(M)~U(M)	35

[表3-19]

アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5'→3')	配列 番号
AD47882. 88AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(F)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)T(D)C(M)A(E)C(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	35
AD47882. 89AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)T(D)C(M)A(E)C(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	35
AD47882. 91AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(F)A(M)U(M)C(E)A(R)ˆC(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	34
AD47882. 92AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(E)A(R)ˆC(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	34
AD47882. 93AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(M)U(F)C(E)A(R)ˆC(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	34
AD47882. 94AS	A(M)ˆG(F)ˆA(M)A(M)A(M)G(F)G(M)A(M)G(F)A(M)A(F)U(M)C(M)A(R)ˆC(M)G(F)U(M)G(M)ˆG(M)ˆU(M)ˆU(M)	34
TR2-019. 94AS.s1	U(M)ˆU(F)ˆG(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)ˆC(M)C(F)A(M)C(M)ˆG(M)ˆU(M)	38
TR2-019. 94AS.s2	U(M)ˆU(F)ˆG(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)ˆC(M)C(F)A(M)C(M)ˆG(M)	39

[表3-20]

アンチ センス鎖 名称	アンチセンス鎖領域の塩基配列(5'-3')	配列 番号
THR2-019. 944S. e1	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)~C(M)~U(M)~U(M)	40
THR2-019. 944S. e2	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)G(M)C(M)~C(M)~U(M)~U(M)	41
THR2-019. 944S. e3	U(M)~U(F)~G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(R)~C(M)C(F)A(M)C(M)~G(M)~G(M)~U(M)	42

[0235] 表中の「分子量」は、負イオンESI質量分析による実測値を示す。表中の「塩基配列」においてN(R)はRNA、N(D)はDNA、N(M)は2'-OMe RNA、N(m)は2'-MOE RNA、N(3M)は3'-OMe RNA、N(F)は2'-F RNA、N(L)はLNA、N(E)はENA、を示

す。それぞれのヌクレオシドの構造は、上述した各構造式で表される。

[0236] 表中の「GN」は、上述した式（GN）で表されるG a I N A cユニットを示す。表中の「2」は $-O(CH_2)_2O-$ （上述した式（2）で示す）、「Z」は $-O(CH_2)_8NHC(=O)(CH_2)_2PhO-$ （上述した式（Z）で示す）、をそれぞれ示す。ヌクレオシド間の結合、または、ヌクレオシドとG a I N A cユニット、「2」、もしくは「Z」との結合について、表中の「^」は、ホスホロチオエート結合（ $-P(=S)(OH)-$ 、上述したヌクレオシド間結合の構造図（PS）で示す）を示す。特に記載のない場合は、リン酸ジエステル結合（ $-P(=O)(OH)-$ 、上述したヌクレオシド間結合の構造図（P）で示す）で結合したものを示す。

[0237] 各オリゴヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドの5'位及び3'末端のヌクレオチドの3'位（3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位）は、水素原子が、上述した各ヌクレオシドの構造図中の酸素原子と結合した水酸基となっている。「2」が末端になっている場合、上述した「2」の構造図において、水素原子が、オリゴヌクレオチドと結合していない結合手側の酸素原子と結合した水酸基となっている。「^」が末端になっている場合、上述した「PS」の構造図において、水酸基がリン原子と結合している。但し、「GN」が末端になっている場合は、水素原子の結合を必要としない。

[0238] 試験例1：HepG2細胞に対するTfR2 siRNAのフォワードトランスフェクション法によるスクリーニング

TfR2 siRNAとして実施例1～82の化合物を用いて、以下の実験を行った。トランスフェクションの前日に、10% FBS（Gibco社製）を添加したDMEM培地（Gibco社製）100 μ L中に、96ウェルプレート（Corning社製品）に1ウェルあたり 2.5×10^4 個のHepG2細胞を播種した。トランスフェクション当日、siRNA検体を1種類あたり2ウェル分、siRNAの代わりに蒸留水としたネガティブコントロール（NT）を2ウェル分、ポジティブコントロールとしてTfR2-061（実施例61）を2ウェル分作製した。siRNA 1検体のトランスフェクションを実施するための試薬調製としては、50 μ LのOp

ti-MEM (Life Technology社製) と $3\mu\text{L}$ の RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific社製) を混合したものに、 $50\mu\text{L}$ の Opti-MEM と $1\mu\text{L}$ の siRNA (濃度は $10\mu\text{M}$) を添加し、室温で15分間インキュベートした。その後、予め調製し、 37°C で温めた10% FBSを含んだDMEMを1mL加えた。このうちの $110\mu\text{L}$ を、HepG2細胞を播種した96ウェルプレートに培地を除去した後に添加した。

siRNAの最終濃度は全ての検体において 10nM とした。ネガティブコントロール用の試薬調製としては、 $50\mu\text{L}$ の Opti-MEM (Life Technology社製) と $3\mu\text{L}$ の RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific社製) を混合したものに、 $50\mu\text{L}$ の Opti-MEM と $1\mu\text{L}$ の蒸留水を添加し、室温で15分間インキュベートした。

[0239] トランスフェクションして2日後に、PBS (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて細胞を1回洗浄し、RNAの抽出を行った。RNAの抽出は、RNeasy Mini Kit (QUAGEN社製) を用いてキットのプロトコルに従って実施した。得られた 300ng のRNAを、High Capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems社製) を用いて逆転写反応しcDNAを合成した。得られたcDNAを用いて、定量的PCRによって内因性のhTfR2のmRNA量を測定した。ハウスキーピング遺伝子としては、ヒト18S ribosomal RNA (h18S) のmRNA量を測定した。

[0240] 定量的PCRは、IDT PrimeTime Gene Expression Master Mix (Integrated DNA Technologies社製) を用いて、以下のように行った。得られたcDNAは、蒸留水を用いて10倍に希釈した (cDNA $15\mu\text{L}$ および蒸留水 $135\mu\text{L}$ を混合した)。384ウェルのPCRプレート (Applie

d Biosystems社製)の1ウェルあたり、5 μ LのIDT PrimeTime Gene Expression Master Mix、0.5 μ LのhTfR2プライマー(Hs. PT. 58. 20599434、Integrated DNA Technologies社製)、0.5 μ Lのh18Sプライマー(Hs. PT. 39a. 22214856、Integrated DNA Technologies社製)、2 μ Lの蒸留水、2 μ LのcDNAの割合で混合(計10 μ L)し、各cDNAに対して2ウェル分調製し、定量的PCRを行った。hTfR2とh18SのmRNA発現量を2ウェル間の平均値として測定した。hTfR2のmRNA発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるh18SのmRNA発現量で正規化した。ネガティブコントロールにおけるhTfR2 mRNA発現量を1.0としたときの相対値として、各siRNAを処置した検体の相対hTfR2 mRNA発現量を算出して表記した。結果は以下の表4に示した。

[0241]

[表4-1]

化合名称	相对值
TfR2-001	0.35
TfR2-002	0.41
TfR2-003	0.41
TfR2-004	0.43
TfR2-005	0.42
TfR2-006	0.43
TfR2-007	0.35
TfR2-008	0.53
TfR2-009	0.40
TfR2-010	0.42
TfR2-011	0.53
TfR2-012	0.49
TfR2-013	0.31
TfR2-014	0.49
TfR2-015	0.33
TfR2-016	0.50
TfR2-017	0.48
TfR2-018	0.39
TfR2-019	0.30
TfR2-020	0.49
TfR2-021	1.01
TfR2-022	0.43
TfR2-023	1.18
TfR2-024	0.41
TfR2-025	0.81
TfR2-026	1.16
TfR2-027	0.61
TfR2-028	0.45
NT	1.00
TfR2-061	0.19

[0242] [表4-2]

化合物名称	相对值
TfR2-029	0.55
TfR2-030	0.98
TfR2-031	1.22
TfR2-032	0.55
TfR2-033	0.53
TfR2-034	0.48
TfR2-035	0.40
TfR2-036	0.48
TfR2-037	0.35
TfR2-038	0.48
TfR2-039	0.36
TfR2-040	0.65
TfR2-041	0.39
TfR2-042	1.02
TfR2-043	0.44
TfR2-044	0.58
TfR2-045	0.90
TfR2-046	0.38
TfR2-047	0.76
TfR2-048	0.77
TfR2-049	0.87
TfR2-050	0.50
TfR2-051	0.45
TfR2-052	0.40
TfR2-053	0.32
TfR2-054	0.45
TfR2-055	0.54
TfR2-056	0.43
NT	1.00
TfR2-061	0.22

[0243] [表4-3]

化合物名称	相対値
TfR2-057	0.46
TfR2-058	0.50
TfR2-059	0.63
TfR2-060	0.63
TfR2-062	0.61
TfR2-063	0.73
TfR2-064	0.47
TfR2-065	0.43
TfR2-066	0.63
TfR2-067	0.49
TfR2-068	0.69
TfR2-069	0.50
TfR2-070	0.54
TfR2-071	0.52
TfR2-072	0.53
TfR2-073	0.55
TfR2-074	0.58
TfR2-075	0.57
TfR2-076	0.39
TfR2-077	0.40
TfR2-078	0.52
TfR2-079	0.90
TfR2-080	0.50
TfR2-081	0.38
TfR2-082	0.35
NT	1.00
TfR2-061	0.35

[0244] 試験例 1 - 1 : H e p G 2 細胞を用いた細胞毒性の評価

試験例 2 と同様の方法で、リバーストランスフェクション法を用いて s i

RNAをHepG2細胞に導入して4日後における、細胞毒性の評価を行った。siRNAとして、TfR2-061（実施例61）、TfR2-019（実施例19）、及びTfR2-039（実施例39）を用いた。

[0245] 肝臓細胞に対するsiRNAの細胞毒性について、cell counting kit-8（CCK8、同仁化学研究所）を用いて試験した。培養上清を除去した後に、10%FBSを含有するDMEM 100 μ Lあたり10 μ LのCCK8試薬を調製した溶液を110 μ L/wellで添加した。その後30分間、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーター内で細胞をインキュベートした。その後、マイクロプレートリーダーを用いてOD450nm吸光度を測定した。ネガティブコントロール（NT）におけるOD450nm値を1.0としたときの相対値として、各siRNAを処置したwellにおけるOD450nm値を相対値として算出して表記した。結果は、図11に示した。

[0246] この結果は、特にTfR2-019及びTfR2-039において、肝臓細胞に対する毒性が小さいことを示すものである。

[0247] 試験例2：HepG2細胞に対するTfR2 siRNAのリバーストランスフェクション法によるスクリーニング

TfR2 siRNAとして各実施例の化合物を用いて、以下の実験を行った。リバーストランスフェクション法によって以下のようにsiRNAのスクリーニングを行った。トランスフェクション当日、siRNA検体を1種類あたり2ウェル分、siRNAの代わりに蒸留水としたネガティブコントロール（NT）を2ウェル分、ポジティブコントロールとしてTfR2-061（実施例61）又はWO2012/177921に記載されているhTfR2に対するsiRNA（AD-52590）を2ウェル分作製した。

[0248] 1ウェルあたり14.8 μ LのOpti-MEMと0.2 μ LのRNAiMAXの混合液に5 μ LのsiRNAを添加し、室温で20分間インキュベートした。ネガティブコントロール用の試薬調製としては、Opti-MEMとRNAiMAXの混合液に対して、siRNAの代わりに5 μ Lの蒸留

水を添加した。ポジティブコントロール用の試薬調製としては、Opti-MEMとRNAiMAXの混合液に対して、5 μ LのTfR2-061（実施例61）またはAD-52590を添加した。次に、siRNAまたはネガティブコントロールまたはポジティブコントロールを含む混合液を20 μ Lずつ96ウェルの細胞培養用プレート（SUMIRON社製）に添加した。混合液を添加した96ウェルプレートに、予め37℃に温めておいた10% FBSを含んだDMEMを用いて調製した 2×10^4 cells/mLのHepG2細胞を、1ウェルあたり80 μ Lずつ播種した。siRNAの最終濃度としては、10 nMから10倍または50倍公比になるように調製した。

[0249] トランスフェクションして1日後または2日後に、PBSを用いて細胞を1回洗浄した。Superprep Cell Lysis RT Kit for qPCR（タカラバイオ社製）を用いて、キットのプロトコルに従ってRNA抽出および逆転写反応を実施しcDNAを合成した。得られたcDNAを用いて、定量的PCRによって内因性のhTfR2のmRNA発現量を測定した。ハウスキーピング遺伝子としては、h18SのmRNA発現量を測定した。

[0250] 定量的PCRは、IDT PrimeTime Gene Expression Master Mix（Integrated DNA Technologies社製）を用いて、以下のように行った。得られたcDNAは原液として使用した。384ウェルのPCRプレート（Applied Biosystems社製）の1ウェルあたり、5 μ LのIDT PrimeTime Gene Expression Master Mix、0.25 μ LのhTfR2プライマー（Hs. PT. 58. 20599434、Integrated DNA Technologies社製）または、0.25 μ Lのh18Sプライマー（Hs. PT. 39a. 22214856. g、Integrated DNA Technologies社製）、2.75 μ Lの蒸留水、2 μ LのcDNAの割合で混合（計10 μ

L) し、各 cDNA に対して 2 ウェル分調製し、定量的 PCR を行った。hTfR2 と h18S の mRNA 発現量を 2 ウェル間の平均値として測定した。hTfR2 の mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である h18S の mRNA 発現量で正規化した。ネガティブコントロールにおける hTfR2 mRNA 発現量を 1.0 としたときの相対値として、各 siRNA を処置した検体の相対 hTfR2 mRNA 発現量を算出して表記した。結果は、以下の表 5 ～表 20 に示した。

[0251]

[表5-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-061	10	0.07
	1	0.07
	0.1	0.11
TfR2-007	10	0.19
	1	0.20
	0.1	0.21
TfR2-013	10	0.11
	1	0.17
	0.1	0.14
TfR2-015	10	0.38
	1	0.47
	0.1	0.37
TfR2-019	10	0.19
	1	0.19
	0.1	0.66
TfR2-037	10	0.37
	1	0.32
	0.1	0.28
TfR2-076	10	0.39
	1	0.74
	0.1	0.28
TfR2-077	10	0.26
	1	0.19
	0.1	0.30
TfR2-081	10	0.13
	1	0.15
	0.1	0.27

[0252]

[表5-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-061	10	0.10
	1	0.10
	0.1	0.13
TfR2-003	10	0.56
	1	0.43
	0.1	0.83
TfR2-005	10	0.36
	1	0.26
	0.1	0.27
TfR2-006	10	0.31
	1	0.37
	0.1	0.75
TfR2-022	10	0.25
	1	0.22
	0.1	0.20
TfR2-039	10	0.21
	1	0.25
	0.1	0.23
TfR2-046	10	0.30
	1	0.27
	0.1	0.24
TfR2-065	10	0.14
	1	0.15
	0.1	0.15

[0253]

[表6-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
AD-52590	1	0.05
	0.02	0.44
	0.0004	0.81
TfR2-003.5	1	0.10
	0.02	0.46
	0.0004	0.87
TfR2-005.5	1	0.07
	0.02	0.20
	0.0004	0.56
TfR2-006.5	1	0.08
	0.02	0.34
	0.0004	0.76
TfR2-007.5	1	0.12
	0.02	0.24
	0.0004	1.03
TfR2-013.5	1	0.12
	0.02	0.44
	0.0004	0.75
TfR2-019.5	1	0.05
	0.02	0.31
	0.0004	0.82
TfR2-022.5	1	0.36
	0.02	0.37
	0.0004	0.78
TfR2-037.5	1	0.16
	0.02	0.31
	0.0004	0.58

[0254]

[表6-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
AD-52590	1	0.03
	0.02	0.24
	0.0004	0.60
TfR2-039.5	1	0.09
	0.02	0.38
	0.0004	0.54
TfR2-061.5	1	0.02
	0.02	0.11
	0.0004	0.38
TfR2-065.5	1	0.22
	0.02	0.16
	0.0004	0.36
TfR2-076.5	1	0.04
	0.02	0.10
	0.0004	0.50
TfR2-077.5	1	0.06
	0.02	0.12
	0.0004	0.43
TfR2-081.5	1	0.02
	0.02	0.26
	0.0004	0.43

[0255]

[表7-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	–	1.00
AD-52590	0.001	0.92
	0.01	0.72
	0.1	0.44
	1	0.14
	10	0.09
TfR2-006.5	0.001	0.86
	0.01	0.69
	0.1	0.36
	1	0.20
	10	0.15
TfR2-013.5	0.001	0.84
	0.01	0.67
	0.1	0.46
	1	0.23
	10	0.16
TfR2-039.5	0.001	0.70
	0.01	0.72
	0.1	0.51
	1	0.27
	10	0.23

[0256]

[表7-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	－	1.00
AD-52590	0.001	0.80
	0.01	0.57
	0.1	0.26
	1	0.08
	10	0.08
TfR2-007.5	0.001	0.68
	0.01	0.53
	0.1	0.25
	1	0.19
	10	0.16
TfR2-019.5	0.001	0.58
	0.01	0.31
	0.1	0.14
	1	0.08
	10	0.07
TfR2-076.5	0.001	0.64
	0.01	0.27
	0.1	0.28
	1	0.17
	10	0.15

[0257]

[表8-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
AD-52590	0.001	1.02
	0.01	0.77
	0.1	0.45
	1	0.14
	10	0.15
TfR2-006.3	0.001	1.06
	0.01	1.02
	0.1	0.67
	1	0.34
	10	0.39
TfR2-013.3	0.001	1.04
	0.01	1.16
	0.1	0.81
	1	0.45
	10	0.37
TfR2-039.3	0.001	0.95
	0.01	1.05
	0.1	0.92
	1	0.79
	10	0.81

[0258]

[表8-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	–	1.00
AD-52590	0.001	0.90
	0.01	0.62
	0.1	0.31
	1	0.13
	10	0.12
TfR2-007.3	0.001	0.95
	0.01	0.94
	0.1	0.86
	1	0.76
	10	0.67
TfR2-019.3	0.001	0.77
	0.01	0.55
	0.1	0.36
	1	0.25
	10	0.25
TfR2-076.3	0.001	0.80
	0.01	0.57
	0.1	0.39
	1	0.27
	10	0.28

[0259]

[表8-3]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
AD-52590	0.001	0.72
	0.01	0.71
	0.1	0.45
	1	0.24
	10	0.04
TfR2-006.6	0.001	0.93
	0.01	0.91
	0.1	0.39
	1	0.17
	10	0.10
TfR2-013.6	0.001	0.77
	0.01	1.16
	0.1	0.44
	1	0.15
	10	0.14
TfR2-039.6	0.001	0.91
	0.01	0.88
	0.1	0.50
	1	0.17
	10	0.22

[0260]

[表8-4]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
AD-52590	0.001	0.78
	0.01	0.44
	0.1	0.24
	1	0.04
	10	0.04
TfR2-007.6	0.001	0.91
	0.01	0.58
	0.1	0.34
	1	0.16
	10	0.07
TfR2-019.6	0.001	0.54
	0.01	0.31
	0.1	0.18
	1	0.09
	10	0.11
TfR2-076.6	0.001	0.79
	0.01	0.45
	0.1	0.27
	1	0.16
	10	0.18

[0261]

[表9]

化合物名称	濃度 (nM)	相対値
NT	–	1.00
AD-52590	0.001	0.73
	0.01	0.47
	0.1	0.22
	1	0.06
	10	0.06
TfR2-039.5	0.001	0.82
	0.01	0.69
	0.1	0.36
	1	0.20
	10	0.21
TfR2-019.6	0.001	0.56
	0.01	0.32
	0.1	0.17
	1	0.09
	10	0.06
TfR2-039.5G	0.001	0.73
	0.01	0.64
	0.1	0.39
	1	0.19
	10	0.19
TfR2-019.6G	0.001	0.53
	0.01	0.33
	0.1	0.17
	1	0.08
	10	0.06

[0262]

[表10]

化合物名称	濃度 (nM)	相対値
NT	–	1.00
AD-52590	0.001	0.97
	0.01	0.81
	0.1	0.34
	1	0.14
	10	0.12
TfR2-039.5	0.001	0.98
	0.01	0.83
	0.1	0.50
	1	0.28
	10	0.29
TfR2-039.10	0.001	0.87
	0.01	0.81
	0.1	0.55
	1	0.29
	10	0.26
TfR2-039.11	0.001	0.95
	0.01	0.65
	0.1	0.47
	1	0.32
	10	0.28
TfR2-039.12	0.001	0.81
	0.01	0.73
	0.1	0.53
	1	0.32
	10	0.35

[0263]

[表11-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相対値
NT	–	1.00
AD-52590	0.001	0.92
	0.01	0.74
	0.1	0.39
	1	0.14
	10	0.10
TfR2-039.5	0.001	1.09
	0.01	0.99
	0.1	0.63
	1	0.31
	10	0.40
TfR2-039.19	0.001	1.12
	0.01	0.91
	0.1	0.53
	1	0.36
	10	0.29
TfR2-039.20	0.001	1.08
	0.01	0.96
	0.1	0.63
	1	0.32
	10	0.29
TfR2-039.8	0.001	0.81
	0.01	0.75
	0.1	0.46
	1	0.31
	10	0.22

[0264]

[表11-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-019.6	0.001	0.72
	0.01	0.51
	0.1	0.28
	1	0.22
	10	0.12
TfR2-019.8	0.001	0.84
	0.01	0.41
	0.1	0.25
	1	0.19
	10	0.11
TfR2-019.9	0.001	0.73
	0.01	0.38
	0.1	0.29
	1	0.14
	10	0.09
TfR2-019.15	0.001	0.78
	0.01	0.55
	0.1	0.28
	1	0.17
	10	0.12
TfR2-019.17	0.001	0.75
	0.01	0.42
	0.1	0.27
	1	0.15
	10	0.11

[0265]

[表12-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	–	1.00
AD-52590	0.001	0.91
	0.01	0.72
	0.1	0.35
	1	0.14
	10	0.10
TfR2-039.5	0.001	1.09
	0.01	0.79
	0.1	0.51
	1	0.30
	10	0.31
TfR2-039.21	0.001	1.03
	0.01	0.83
	0.1	0.60
	1	0.30
	10	0.30
TfR2-039.22	0.001	0.93
	0.01	0.96
	0.1	0.60
	1	0.33
	10	0.26
TfR2-039.23	0.001	1.05
	0.01	0.83
	0.1	0.54
	1	0.32
	10	0.36

[0266]

[表12-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	—	1.00
TfR2-039.5	0.001	0.81
	0.01	0.77
	0.1	0.57
	1	0.29
	10	0.36
TfR2-039.24	0.001	1.11
	0.01	1.03
	0.1	0.60
	1	0.34
	10	0.34
TfR2-039.25	0.001	1.40
	0.01	0.91
	0.1	0.73
	1	0.44
	10	0.39
TfR2-039.26	0.001	1.22
	0.01	1.10
	0.1	0.87
	1	0.42
	10	0.53

[0267]

[表13-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	–	1.00
AD-52590	0.01	0.46
	0.1	0.19
	1	0.03
	10	0.05
TfR2-039.5	0.01	0.60
	0.1	0.34
	1	0.22
	10	0.21
TfR2-039.9	0.01	0.64
	0.1	0.33
	1	0.17
	10	0.19
TfR2-039.9DU	0.01	0.92
	0.1	0.57
	1	0.20
	10	0.13
TfR2-039.28DU	0.01	1.44
	0.1	0.94
	1	0.29
	10	0.19

[0268]

[表13-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	–	1.00
AD-52590	0.01	0.52
	0.1	0.21
	1	0.07
	10	0.06
TfR2-039.9	0.01	0.81
	0.1	0.45
	1	0.31
	10	0.32
TfR2-039.29DU	0.01	1.14
	0.1	0.80
	1	0.35
	10	0.27
TfR2-039.30DU	0.01	1.08
	0.1	0.95
	1	0.32
	10	0.30
TfR2-039.31DU	0.01	1.19
	0.1	0.74
	1	0.32
	10	0.30

[0269]

[表13-3]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
AD-52590	0.01	0.48
	0.1	0.18
	1	0.07
	10	0.07
TfR2-039.5	0.01	0.63
	0.1	0.28
	1	0.22
	10	0.23
TfR2-039.9	0.01	0.85
	0.1	0.35
	1	0.25
	10	0.28
TfR2-039.32DU	0.01	1.05
	0.1	0.93
	1	0.43
	10	0.38

[0270]

[表14]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	－	1.00
AD-52590	0.001	0.84
	0.01	0.66
	0.1	0.31
	1	0.07
	10	0.07
TfR2-019.6	0.001	0.57
	0.01	0.37
	0.1	0.22
	1	0.12
	10	0.08
TfR2-019.29DU	0.001	0.69
	0.01	0.43
	0.1	0.22
	1	0.12
	10	0.06
TfR2-019.34DU	0.001	0.71
	0.01	0.42
	0.1	0.21
	1	0.11
	10	0.06

[0271]

[表15]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-019.6	0.001	0.65
	0.01	0.36
	0.1	0.23
	1	0.14
	10	0.11
TfR2-019.22	0.001	0.66
	0.01	0.34
	0.1	0.22
	1	0.14
	10	0.08
TfR2-019.22s	0.001	0.68
	0.01	0.36
	0.1	0.21
	1	0.13
	10	0.07
TfR2-019.22DU	0.001	0.79
	0.01	0.48
	0.1	0.28
	1	0.15
	10	0.11
TfR2-019.22sDU	0.001	0.80
	0.01	0.47
	0.1	0.28
	1	0.15
	10	0.08

[0272]

[表16-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-019.6G	0.001	0.66
	0.01	0.33
	0.1	0.18
	1	0.13
	10	0.13
TfR2-039.5G	0.001	0.93
	0.01	0.71
	0.1	0.40
	1	0.32
	10	0.29
TfR2-039.23DUG	0.001	1.02
	0.01	0.94
	0.1	0.75
	1	0.43
	10	0.39
TfR2-039.38DUG	0.001	0.93
	0.01	0.95
	0.1	0.59
	1	0.30
	10	0.24
TfR2-039.41DUG	0.001	0.96
	0.01	0.84
	0.1	0.50
	1	0.28
	10	0.26

[0273]

[表16-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	–	1.00
TfR2-039. 23DUG	0.001	1.00
	0.01	0.95
	0.1	0.89
	1	0.49
	10	0.42
TfR2-039. 35DUG	0.001	1.03
	0.01	0.93
	0.1	0.76
	1	0.42
	10	0.29
TfR2-039. 36DUG	0.001	0.93
	0.01	0.93
	0.1	0.65
	1	0.32
	10	0.30
TfR2-039. 37DUG	0.001	0.96
	0.01	0.89
	0.1	0.62
	1	0.31
	10	0.25
TfR2-039. 38DUG	0.001	1.03
	0.01	0.92
	0.1	0.62
	1	0.30
	10	0.24

[0274]

[表17-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-039.23DUG	0.001	0.91
	0.01	0.72
	0.1	0.60
	1	0.35
	10	0.27
TfR2-039.39DUG	0.001	0.79
	0.01	0.81
	0.1	0.42
	1	0.18
	10	0.13
TfR2-039.40DUG	0.001	0.83
	0.01	0.81
	0.1	0.47
	1	0.15
	10	0.14
TfR2-039.41DUG	0.001	0.81
	0.01	0.63
	0.1	0.31
	1	0.13
	10	0.14
TfR2-039.42DUG	0.001	0.66
	0.01	0.73
	0.1	0.37
	1	0.16
	10	0.12

[0275]

[表17-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	—	1.00
TfR2-039. 23DUG	0.001	0.75
	0.01	0.76
	0.1	0.59
	1	0.25
	10	0.21
TfR2-039. 36DUG	0.001	0.58
	0.01	0.59
	0.1	0.39
	1	0.12
	10	0.09
TfR2-039. 41DUG	0.001	0.66
	0.01	0.63
	0.1	0.26
	1	0.08
	10	0.07
TfR2-039. 43DUG	0.001	0.72
	0.01	0.52
	0.1	0.59
	1	0.42
	10	0.35
TfR2-039. 45DUG	0.001	0.48
	0.01	0.47
	0.1	0.44
	1	0.23
	10	0.21

[0276]

[表18-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	－	1.00
TfR2-019.6G	0.001	0.88
	0.01	0.37
	0.1	0.20
	1	0.13
	10	0.14
TfR2-019.22DUG	0.001	0.87
	0.01	0.46
	0.1	0.23
	1	0.12
	10	0.15
TfR2-019.38DUG	0.001	0.89
	0.01	0.54
	0.1	0.30
	1	0.16
	10	0.12
TfR2-019.36DUG	0.001	0.88
	0.01	0.49
	0.1	0.25
	1	0.14
	10	0.13
TfR2-019.87DUG	0.001	0.95
	0.01	0.43
	0.1	0.25
	1	0.15
	10	0.13

[0277]

[表18-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-019.6G	0.001	0.84
	0.01	0.44
	0.1	0.25
	1	0.12
	10	0.11
TfR2-019.22DUG	0.001	0.89
	0.01	0.51
	0.1	0.22
	1	0.13
	10	0.10
TfR2-019.85DUG	0.001	0.64
	0.01	0.36
	0.1	0.17
	1	0.15
	10	0.09
TfR2-019.86DUG	0.001	0.72
	0.01	0.34
	0.1	0.19
	1	0.15
	10	0.10
TfR2-039.41DUG	0.001	0.93
	0.01	0.89
	0.1	0.57
	1	0.33
	10	0.28

[0278]

[表19-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对値
NT	—	1.00
TfR2-061.5	0.001	0.75
	0.01	0.50
	0.1	0.33
	1	0.15
	10	0.15
TfR2-019.22DUG	0.001	1.07
	0.01	0.61
	0.1	0.33
	1	0.25
	10	0.22
TfR2-019.71DUG	0.001	0.97
	0.01	0.88
	0.1	0.57
	1	0.32
	10	0.31
TfR2-019.88DUG	0.001	0.86
	0.01	0.76
	0.1	0.46
	1	0.28
	10	0.24
TfR2-019.89DUG	0.001	0.81
	0.01	0.71
	0.1	0.40
	1	0.30
	10	0.19

[0279]

[表19-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-019.6G	0.001	0.84
	0.01	0.62
	0.1	0.30
	1	0.21
	10	0.16
TfR2-019.22DUG	0.001	1.09
	0.01	0.73
	0.1	0.30
	1	0.20
	10	0.15
TfR2-019.90DUG	0.001	1.02
	0.01	0.93
	0.1	0.45
	1	0.29
	10	0.22
TfR2-019.80DUG	0.001	1.06
	0.01	0.76
	0.1	0.35
	1	0.26
	10	0.21
TfR2-019.91DUG	0.001	1.02
	0.01	0.66
	0.1	0.33
	1	0.25
	10	0.17

[0280]

[表19-3]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
TfR2-019.6G	0.001	0.79
	0.01	0.53
	0.1	0.35
	1	0.29
	10	0.19
TfR2-019.92DUG	0.001	0.88
	0.01	0.67
	0.1	0.33
	1	0.24
	10	0.24
TfR2-019.22DUG	0.001	0.83
	0.01	0.55
	0.1	0.34
	1	0.23
	10	0.24
TfR2-019.93DUG	0.001	0.85
	0.01	0.67
	0.1	0.40
	1	0.26
	10	0.24
TfR2-046.5	0.001	0.84
	0.01	0.78
	0.1	0.55
	1	0.35
	10	0.37

[0281]

[表20]

化合物名称	濃度 (nM)	相対値
NT	—	1.00
TfR2-019.92DUG	0.001	0.85
	0.01	0.52
	0.1	0.35
	1	0.16
	10	0.13
TfR2-019.93DUG	0.001	0.68
	0.01	0.42
	0.1	0.22
	1	0.11
	10	0.08
TfR2-019.94DUG	0.001	0.65
	0.01	0.48
	0.1	0.28
	1	0.15
	10	0.16
TfR2-019.95DUG	0.001	0.91
	0.01	0.53
	0.1	0.25
	1	0.18
	10	0.09

[0282] 試験例2-1: HepG2細胞を用いたhTfR2ノックダウン活性

試験例2と同様の方法で、リバーストランスフェクション法を用いてsiRNAをHepG2細胞に導入して2日後における、hTfR2のmRNA発現量の評価を行った。siRNAとして、TfR2-019（実施例19）、及びTfR2-019.94DUG（実施例169）を用いた。

[0283] hTfR2 mRNA発現量の評価について、ネガティブコントロール（NT）におけるhTfR2 mRNA発現量を1.0としたときの相対値と

して、各 s i R N A を処置した検体の相対 h T f R 2 m R N A 発現量を算出して表記した。結果は、図 1 2 に示した。

[0284] この結果は、特に T f R 2 - 0 1 9 . 9 4 D U G が、h T f R 2 m R N A に対する高いノックダウン活性を有することを示すものである。

[0285] 試験例 3 : 雄性カニクイザルに対する T f R 2 s i R N A の単回投与試験
T f R 2 - 0 3 9 . 5 G (実施例 1 2 7) または T f R 2 - 0 3 9 . 2 3 D U G (実施例 1 4 4) を、3 0 m g / k g の用量で皮下投与した後の血漿中鉄濃度および血漿中 h e p c i d i n 濃度を測定した。血漿中鉄濃度は、メタロアッセイ鉄測定キット(メタロジェニクス社製)を用いて測定した。血漿中 h e p c i d i n 濃度は、L C / M S を用いて測定した。T f R 2 - 0 3 9 . 5 G (実施例 1 2 7) を投与した結果は表 2 1、T f R 2 - 0 3 9 . 2 3 D U G (実施例 1 4 4) を投与した結果は表 2 2 にそれぞれ示した。

[0286] [表21]

days after administration	Monkey 1	
	plasma Fe ug/dL	Hepcidin (nM)
0	146.5	15.5
3	209.0	11.3
7	214.0	11.6
14	271.0	11.2
21	300.0	13.1
29	285.5	13.9
35	204.0	20.0
42	219.5	17.6
49	203.5	15.6
56	187.5	18.8

[0287]

[表22]

days after administration	Monkey 2		Monkey 3	
	plasma Fe ug/dL	Hepcidin (nM)	plasma Fe ug/dL	Hepcidin (nM)
-14	108.5	16.4	121.5	13.0
0	142.5	16.4	140.5	11.7
7	183.0	11.9	121.0	12.4
14	215.0	9.45	140.5	9.83
21	198.5	9.77	180.0	8.88
28	197.5	10.4	168.0	9.60
37	169.5	10.8	196.0	10.4
42	183.5	11.5	131.0	4.95
49	156.5	not determined	124.0	not determined

[0288] 試験例4： TfR2 siRNAを用いたsiRNA封入核酸脂質粒子の調製

(1) siRNA封入核酸脂質粒子の調製

ジステアロイルホスファチジルコリン (1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine: 以下DSPCと表記, NOF CORPORATION)、コレステロール (Cholesterol: 以下Cholと表記, Sigma-Aldrich, Inc.)、酢酸 (7R, 9Z)-18-([3-(ジメチルアミノ)プロピルオキシ]カルボニル)オキシ)オクタコサ-9-エン-7-イル (WO2015/005253の実施例28に記載の化合物) (以下LPと表記)、及びポリエチレングリコール分子量が約2000の1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロール メトキシポリエチレングリコール (1, 2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Methoxypolyethylene Glycol、以下PEG-DMGと表記, NOF CORPORATION) を、10:48:40:2のモル比にて、総脂質濃度10 mMになるようにエタノールに溶解した。

[0289] 一方、マウスTfR2 siRNAとしてAD-47882 (WO2012/177921に記載されているマウスTfR2に対するsiRNA) を、クエン酸緩衝液 (20mM Citrate Buffer, pH4.0) にて希釈調製した。

[0290] 上記の脂質溶液と s i R N A 溶液を、s i R N A に対する総脂質重量比が 1 1 となり、且つその体積比が 1 : 3 となるように N a n o A s s e m b l e r B e n c h T o p (P r e c i s i o n N a n o s y s t e m s I n c .) を用いてマイクロ流路内で混合し、核酸脂質粒子の粗分散液を得た。核酸脂質粒子の分散液を約 2 5 ~ 5 0 倍量のリン酸緩衝液にて 1 2 ~ 1 8 時間透析 (F l o a t - A - L y z e r G 2 , M W C O : 1 , 0 0 0 k D , S p e c t r a / P o r) することにより、エタノール除去を行い、精製された s i R N A 封入核酸脂質粒子の分散液を得た。尚、L P は W O 2 0 1 5 / 0 0 5 2 5 3 の実施例 2 8 に記載の方法に従い合成した。

[0291] (2) s i R N A 封入核酸脂質粒子の特性評価

(1) で調製した核酸脂質粒子を含む分散液について以下の特性評価を行った。

(2 - 1) s i R N A の封入率

s i R N A の封入率は、Q u a n t - i T R i b o G r e e n R N A A s s a y k i t (I n v i t r o g e n) を用い、添付文書に準じて測定した。すなわち、0 . 0 1 5 % T r i t o n X - 1 0 0 界面活性剤存在下及び非存在下において、核酸脂質粒子の分散液中の s i R N A を定量し、次式により封入率を算出した。

封入率 (%) = { ([界面活性剤存在下における s i R N A 量] - [界面活性剤非存在下における s i R N A 量]) / [界面活性剤存在下における s i R N A 量] } x 1 0 0 (%)

[0292] (2 - 2) s i R N A と脂質の比率

核酸脂質粒子分散液を 1 . 0 % T r i t o n X - 1 0 0 にて希釈調製し、核酸脂質粒子の分散液中の s i R N A 量をイオン交換クロマトグラフィーにて測定した (S y s t e m : A g i l e n t 1 2 6 0 s e r i e s , C o l u m n : D i o n e x B i o L C D N A P a c P A 2 0 0 (8 μ m , 4 . 0 m m x 2 5 0 m m) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) , B u f f e r A : 1 0 m M トリス塩酸緩衝液,

25 mM 過塩素酸ナトリウム, 20%エタノール (pH 7.0), Buffer B: 10 mM トリス塩酸緩衝液, 250 mM 過塩素酸ナトリウム, 20%エタノール (pH 7.0), (B%): 20–70% (15 min), Flow Rate: 0.5 mL/min, Temperature: 40°C, Detection: 260 nm)。

[0293] 核酸脂質粒子分散液を、エタノールにて希釈調製し、核酸脂質粒子の分散液中の各脂質量を逆相クロマトグラフィーにて測定した (System: Dionex Ultimate 3000, Column: XSelect CSH C18 (130 Å, 3.5 μm, 3.0 mm × 150 mm) (Waters catalog # 186005263), Buffer A: 0.2%ギ酸, Buffer B: 0.2%ギ酸, メタノール, (B%): 75–95% (15 min), 95% (2 min), Flow Rate: 0.45 mL/min, Temperature: 50°C, Detection: Corona CAD (Charged Aerosol Detector))。siRNAに対する総脂質量の比率は次式により算出した。

$$\text{siRNAに対する総脂質量 (wt/wt)} = [\text{総脂質濃度}] / [\text{siRNA濃度}] \quad (\text{wt/wt})$$

[0294] (2–3) 平均粒子径

核酸脂質粒子の粒子径は、Zeta Potential/Particle Sizer NICOMPTM 380ZLS (PARTICLE SIZING SYSTEMS) にて測定した。表中の平均粒子径は体積平均粒子径を表し、±以下は、偏差を表す。各特性評価の結果は表23に示した。

[0295] [表23]

	封入率 (%)	粒子径 (nm)	総脂質/siRNA (wt/wt)
AD-47882	95	91 ± 26	11

[0296] 以上の結果より、これらの核酸脂質粒子は、s i R N Aの約95%が脂質粒子内に封入されており、約90nmの平均粒子径を有していることが明らかとなった。

[0297] 試験例5：骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるT f R 2 s i R N Aを封入した核酸脂質粒子の薬効評価試験

マウスT f R 2 s i R N Aを封入した核酸脂質粒子としてAD-47882 (WO2012/177921に記載されているマウスT f R 2に対するs i R N A)を封入した核酸脂質粒子を用いて以下の実験を行った。核酸脂質粒子は試験例4と同様の方法で調整した。骨髓機能の低下を誘発するために、100 mg/kgのcarboplatin (東京化成工業社製)を雄性のC57BL/6N J c lマウス (日本クレア社製)に腹腔内投与 (i. p.)した。骨髓機能の低下を誘導しない対象群 (control)としては、carboplatinの代わりにPBSをi. p.投与した (n=5)。Carboplatinを投与して4日後に、血漿中鉄濃度とHGB値を基に群化した後に、薬剤処置を行った (n=5/群)。薬剤は、0.5 mg/kg (0.5 mpk) および0.25 mg/kg (0.25 mpk) のAD-47882について、それぞれ核酸脂質粒子として静脈内投与 (i. v.)を一回行った。vehicle対象群としては、薬剤の代わりにPBSをi. v.投与した。AD-47882の投与前 (Day 0)、および、AD-47882を投与してから3日後 (Day 3)、7日後 (Day 7)、10日後 (Day 10)、11日後 (Day 11)に尾静脈採血を行い、QuantiChrom Whole Blood HB kit (Bioassay Systems社製)を用いて、HGB値を測定した。HGB値の結果は、図7Cに示した。AD-47882の投与前 (Day 0)、投与してから3日後 (Day 3)、7日後 (Day 7)においては、血漿中鉄濃度および血漿中hepcidin濃度の測定を行った。血漿中鉄濃度は、血漿中鉄濃度は、メタロアッセイ鉄測定キット (メタロジェニクス社製)を用いて測定した。血漿中hepcidin濃度は、LC/MSを用

いて測定した。血漿中鉄濃度と血漿中hepcidin濃度の結果は、それぞれ、図7Aと図7Bに示した。また、AD-47882を処置して11日後（Day11）において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行い、多項目自動血球分析装置XT2000（シスメックス株式会社製）を用いて、mean corpuscular hemoglobin（MCH）値を測定した。MCH値の結果は、図7Dに示した。

[0298] また、マウスを放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、マウスTfR2（mTfR2）およびマウスHepcidin（mHepcidin）のmRNA発現量を測定した。RNAの抽出は、RNeasy Mini Kit（QUAGEN社製）を用いてキットのプロトコルに従って実施した。得られた5000 ngのRNAを、High Capacity RNA to cDNA kit（Applied Biosystems社製）を用いて逆転写反応することによって得られたcDNAを用いて、定量的PCRによって内因性のマウスTfR2とHepcidinのmRNA量を測定した。

[0299] 定量的PCRは、IDT PrimeTime Gene Expression Master Mix（Integrated DNA Technologies社製）を用いて、以下のように行った。得られたcDNAは、蒸留水を用いて10倍に希釈した（cDNA 15 μ Lおよび蒸留水135 μ Lを混合した）。384ウェルのPCRプレート（Applied Biosystems社製）の1ウェルあたり、5 μ LのIDT PrimeTime Gene Expression Master Mix、0.25 μ LのマウスTfR2（mTfR2）プライマー（Mm. PT. 58.7860185、Integrated DNA Technologies社製）、または、0.25 μ LのマウスHepcidin（mHepcidin）プライマー（Mm. PT. 58.43563393、Integrated DNA Technologies社製）、2.75 μ Lの蒸留水、2 μ LのcDNAの割合で混合（計10 μ L）し、各cDN

Aに対して2ウェル分調製し、定量的PCRを行った。ハウスキーピング遺伝子としては、マウス β -actin (mActb) プライマー (Mm, P T, 39a, 22214843, g, Integrated DNA Technologies社製) を使用し、上記に記したような割合で混合し、各cDNAに対して2ウェル分調製し、定量的PCRを行った。mTfR2、mHepcidin、およびmActbのmRNA量を2ウェル間の平均値として測定した。mTfR2およびmHepcidinのmRNA発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるmActbのmRNA発現量で正規化した。骨髓機能の低下を誘導していないcontrol群におけるmRNA量を1.0としたときの相対値として、vehicle群およびAD-47882処置群における相対mRNA量を算出して表記(平均値±標準誤差)した。肝臓におけるmTfR2およびmHepcidinのmRNA発現量の結果は、それぞれ図7E及び図7Fに示した。

[0300] これらの結果は、TfR2 siRNAの処置によってTfR2のmRNA発現量を抑制することでHGB値を上昇させ、骨髓機能不全に伴う貧血、例えば、骨髓線維症に伴う貧血などの貧血疾患に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0301] 試験例6：骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの薬効評価試験

GalNAcをコンジュゲートしたTfR2 siRNAとして、AD47882, 23DUG(実施例171)を用いて以下の実験を行った。骨髓機能の低下を誘発するために、100 mg/kgのCarboplatinを腹腔内投与(i.p.)した。骨髓機能の低下を誘導しない対象群(control)としては、Carboplatinの代わりにPBSをi.p.投与した(n=5)。Carboplatinを投与して4日後における、HGB値を基に群化した後に、薬剤処置を行った(n=9又は10/群)。GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNA処置群は、3 mg/kg(3mpk)の用量で1回皮下投与した。陽性対象群としては、ac

t i v i n r e c e p t o r t y p e I I B (A c t R I I B) のリガンドをトラップする薬剤として、FcをコンジュゲートしたA c t R I I B (A c t R I I B - F c) を 1 0 m g / k g の用量で3または4日おきに計3回皮下投与した。A c t R I I B - F c は、L u s p a t e r c e p t (A C E - 5 3 6) の細胞外ドメインをマウス I g G 2 a の F c ドメインに結合させた蛋白製剤であり (W O 2 0 1 6 0 9 0 1 8 8 , B l o o d , 2 0 1 4 ; 1 2 3 (2 5) : 3 8 6 4 - 3 8 7 2) 、 S m a d 2 / 3 シグナルを抑制することで赤血球分化を促進し、 β サラセミアモデルマウスや骨髓異形成症候群モデルマウスに対して治療効果を示すことが知られている (B l o o d , 2 0 1 4 ; 1 2 3 (2 5) : 3 8 6 4 - 3 8 7 2 , N a t u r e M e d i c i n e v o l u m e 2 0 , p a g e s 4 0 8 - 4 1 4 (2 0 1 4)) 。 v e h i c l e 群としては、PBSを3から4日おきに計3回皮下投与した。G a l N A c コンジュゲート T f R 2 s i R N A と A c t R I I B - F c の併用処置群としては、上記のように s i R N A を 1 回、A c t R I I B - F c を計3回皮下投与した。

- [0302] 薬剤処置を行う前 (D a y 0) 、処置して3日後 (D a y 3) 、8日後 (D a y 8) に尾静脈採血を行い、Q u a n t i C h r o m W h o l e B l o o d H B k i t (B i o a s s a y S y s t e m s 社製) を用いて、HGB値を測定した。HGB値の結果は、図8Aに示している (平均値 $\pm$ 標準誤差) 。図8Bは、薬剤処置をして3日後におけるHGB値を示した結果であり、G a l N A c コンジュゲート T f R 2 s i R N A と A c t R I I B - F c との併用効果を示すものである。薬剤処置をして9日後 (D a y 9) において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行い、多項目自動血球分析装置 X T 2 0 0 0 (シスメックス株式会社製) を用いて、HGB値、MCH値、h e m a t o c r i t (H C T) 値、および r e d b l o o d c e l l (R B C) 数を測定した。それぞれの結果は、図8Dから図8Gに示した (平均値 $\pm$ 標準誤差) 。また、マウスを放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、m T f R 2 の m R N A 発現量を測定した。RNAの抽出

および定量的PCRは、試験例5に記載の通りに実施した。mTfR2のmRNA発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるmActbのmRNA発現量で正規化した。mTfR2のmRNA発現量の結果は、図8Cに示した。骨髓機能の低下を誘導していないcontrol群におけるmRNA量を1.0としたときの相対値として、その他の群における相対mRNA量を算出して表記（平均値±標準誤差）した。

[0303] これらの結果は、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によってTfR2のmRNA発現量を抑制することでHGB値を上昇させ、骨髓機能不全に伴う貧血、例えば、骨髓線維症に伴う貧血などの貧血疾患に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。また、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAとLuspaterceptとの併用投与によって、例えば、骨髓線維症に伴う貧血などの貧血疾患に対して、単剤よりも大きな治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0304] 試験例7：炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの薬効評価試験

GalNAcをコンジュゲートしたTfR2 siRNAとして、AD47882.5G（実施例131）、AD47882.23G（実施例132）、AD47882.23sG（実施例133）、AD47882.23DUG（実施例171）、およびAD47882.23sDUG（実施例172）の化合物を用いて以下の実験を行った。各GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAを1 mg/kg（1 mpk）の用量で雄性のC57BL/6NJc1マウス（日本クレア社製）に1回投与した（Day0）。vehicle群としては、PBSを皮下投与した。siRNAまたはPBSを処置して、5日後（Day5）にturpentineを150 μL/マウスで皮下投与して炎症を誘導した。炎症を誘導しない対象群（control）としては、turpentineの代わりにPBSをs.c.投与した。本試験ではn=5/群とした。1回目のturpentineを投与して2日後（Day7）に血漿中鉄濃度と血漿中hepcidin濃度を測

定した。血漿中鉄濃度は、メタロアッセイ鉄測定キット（メタロジェニクス社製）を用いて測定した。血漿中h e p c i d i n濃度は、LC／MSを用いて測定した。結果は、それぞれ図9 Aと図9 Bに示した。

[0305] 1回目のt u r p e n t i n eを投与して6日後（D a y 1 1）に再度t u r p e n t i n eを150 μL／マウスで皮下投与した。2回目のt u r p e n t i n eを投与して2日後（D a y 1 3）において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行い、多項目自動血球分析装置X T 2 0 0 0（シスメックス株式会社製）を用いて、H G B値、M C H値、R B C数を測定した。結果はそれぞれ、図9 Cから図9 Eに示した。また、マウスを放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、m T f R 2のm R N A発現量を測定した。R N Aの抽出および定量的P C Rは、試験例5に記載の通りに実施した。m T f R 2のm R N A発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるm A c t bのm R N A発現量で正規化した。m T f R 2のm R N A発現量の結果は、図9 Fに示した。炎症を誘導していないc o n t r o l群におけるm R N A量を1.0としたときの相対値として、その他の群における相対m R N A量を算出して表記（平均値±標準誤差）した。

[0306] これらの結果は、G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aの処置によってT f R 2のm R N A発現量を抑制することでH G B値を上昇させ、炎症に伴う貧血、例えば、慢性腎臓病に伴う貧血や癌性貧血などの貧血疾患に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0307] 試験例8：炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるG a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aの薬効評価試験

G a l N A cをコンジュゲートしたT f R 2 s i R N Aとして、AD47882.41DUG（実施例173）、AD47882.88DUG（実施例174）、AD47882.89DUG（実施例175）、AD47882.91DUG（実施例176）、AD47882.92DUG（実施例177）、およびAD47882.93DUG（実施例178）を用いて以下の実験を行った。各G a l N A cコンジュゲートT f R 2 s i R N Aを

1 mg/kg (1 mpk) の用量で雄性の C57BL/6N Jcl マウス (日本クレア社製) に 1 回投与した (Day 0)。vehicle 群としては、PBS を皮下投与した。siRNA または PBS を処置して、4 日後 (Day 4) に turpentine を 150 μ L/マウスで皮下投与して炎症を誘導した。炎症を誘導しない対象群 (control) としては、turpentine の代わりに PBS を s. c. 投与した。本試験では n = 5/群とした。1 回目の turpentine を投与して 2 日後 (Day 6) に血漿中鉄濃度を測定した。血漿中鉄濃度は、メタロアッセイ鉄測定キット (メタロジェニクス社製) を用いて測定した。結果は、それぞれ図 10A に示した。

[0308] 1 回目の turpentine を投与して 7 日後 (Day 11) に再度 turpentine を 150 μ L/マウスで皮下投与した。2 回目の turpentine を投与して 3 日後 (Day 14) において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行い、多項目自動血球分析装置 XT2000 (シスメックス株式会社製) を用いて、HGB 値、MCH 値、RBC 数を測定した。結果はそれぞれ、図 10B から 10D に示した。また、マウスを放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、mTfR2 の mRNA 発現量を測定した。RNA の抽出および定量的 PCR は、試験例 5 に記載の通りに実施した。mTfR2 の mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である mActb の mRNA 発現量で正規化した。mTfR2 の mRNA 発現量の結果は、図 10E に示した。炎症を誘導していない control 群における mRNA 量を 1.0 としたときの相対値として、その他の群における相対 mRNA 量を算出して表記 (平均値 $\pm$ 標準誤差) した。

[0309] これらの結果は、GalNAc コンジュゲート TfR2 siRNA の処置によって TfR2 の mRNA 発現量を抑制することで HGB 値を上昇させ、炎症に伴う貧血、例えば、慢性腎臓病に伴う貧血や癌性貧血などの貧血疾患に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0310] 試験例 9 : HepG2 細胞に対する TfR2 siRNA のリバーストラ

ンスフェクション法によるスクリーニング

試験例2と同様の方法で、s i R N AとしてT f R 2-019.94DUG（実施例169）、T f R 2-019.94DUG. s 1（実施例180）、T f R 2-019.94DUG. s 2（実施例181）、T f R 2-019.94DUG. e 1（実施例182）、T f R 2-019.94DUG. e 2（実施例183）、及びT f R 2-019.94DUG. e 3（実施例184）を用いて、h T f R 2のm R N A発現量について試験した。ネガティブコントロール（N T）におけるh T f R 2 m R N A発現量を1.0としたときの相対値として、各s i R N Aを処置した検体の相対h T f R 2 m R N A発現量を算出して表記した。結果は、以下の表24に示した。

[0311]

[表24-1]

化合物名称	濃度 (nM)	相对值
NT	—	1.00
19.94DUG	0.001	0.97
	0.01	0.58
	0.1	0.26
	1	0.05
	10	0.03
19.94DUG. s1	0.001	1.13
	0.01	0.48
	0.1	0.17
	1	0.07
	10	0.02
19.94DUG. s2	0.001	1.02
	0.01	0.53
	0.1	0.26
	1	0.08
	10	0.04
19.94DUG. e1	0.001	0.92
	0.01	0.40
	0.1	0.20
	1	0.06
	10	0.02
19.94DUG. e2	0.001	0.89
	0.01	0.51
	0.1	0.21
	1	0.08
	10	0.04

[0312]

[表24-2]

化合物名称	濃度 (nM)	相対値
NT	—	1.00
19.94DUG	0.001	0.86
	0.01	0.63
	0.1	0.30
	1	0.10
	10	0.06
19.94DUG e3	0.001	0.99
	0.01	0.60
	0.1	0.27
	1	0.09
	10	0.03

[0313] 試験例10：正常マウスにおけるGalNAcコンジュゲートsiRNAの薬効評価試験

GalNAcをコンジュゲートしたsiRNAとしてAD47882.5G（実施例131）及びAD47882.94DUG（実施例179）を用いて、以下の実験を行った。GalNAcをコンジュゲートしたsiRNAとして、AD47882.5Gを10 mg/kg（10mpk）または3 mg/kg（3mpk）または1 mg/kg（1mpk）の用量で雄性のC57BL/6NJc1マウス（日本クレア社製）に皮下投与（s.c.）した（n=5/群）。vehicle群としては、PBSを皮下投与した（n=5/群）。siRNAまたはPBSの処置前（Day0）、処置して7日後（Day7）、21日後（Day21）、28日後（Day28）に尾静脈採血を行い、メタロアッセイ鉄測定キット（メタロジェニクス社製）を用いて、血漿中铁濃度を測定した。血漿中铁濃度の結果を図13Aに示した（平均値±標準誤差）。

[0314] GalNAcをコンジュゲートしたsiRNAとして、AD47882.94DUGを3 mg/kg（3mpk）または1 mg/kg（1mpk

）または0.3 mg/kg (0.3 mpk) の用量で雄性のC57BL/6NJc1マウス（日本クレア社製）に皮下投与（s.c.）した（n=5/群）。vehicle群としては、PBSを皮下投与した（n=5/群）。siRNAまたはPBSの処置前（Day 0）、処置して7日後（Day 7）、21日後（Day 21）、28日後（Day 28）に尾静脈採血を行い、メタロアッセイ鉄測定キット（メタロジェニクス社製）を用いて、血漿中鉄濃度を測定した。血漿中鉄濃度の結果を図13Bに示した（平均値±標準誤差）。

[0315] この結果は、特にAD47882.94DUGが、*in vivo*において安定的にTfR2のmRNA発現量を抑制し、血漿中鉄濃度を上昇させることを示すものである。また同様に、AD47882.88DUG（実施例174の化合物）、AD47882.89DUG（実施例175の化合物）、AD47882.91DUG（実施例176の化合物）、AD47882.92DUG（実施例177の化合物）、AD47882.93DUG（実施例178の化合物）、AD47882.71DUG（AD47882.88DUGの化合物に対して、71型の修飾パターンを施した化合物）、AD47882.80DUG（AD47882.88DUGの化合物に対して、80型の修飾パターンを施した化合物）、又はAD47882.90DUG（AD47882.88DUGの化合物に対して、90型の修飾パターンを施した化合物）をそれぞれ正常マウスに処置した他の試験において、処置して28日後における血漿中鉄濃度が上昇していることが確認された。これらの結果から、標的配列が異なるTfR2 siRNAに対してこれらの化合物と同様の修飾パターンを施すことで、安定的にTfR2のmRNA発現量を抑制し、血漿中鉄濃度を上昇させることができるsiRNAが得られることが示唆される。

[0316] 試験例11：骨髓機能低下に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの薬効評価試験

GalNAcをコンジュゲートしたTfR2 siRNAとして、AD4

7882, 23DUG (実施例171) 及びAD47882, 94DUG (実施例179) を用いて以下の実験を行った。骨髓機能の低下を誘発するために、100 mg/kgのcarboplatinを雄性のC57BL/6NJc1マウス (日本クレア社製) に腹腔内投与 (i. p.) した。Carboplatinを投与して4日後における、HGB値及び血漿中鉄濃度を基に群化した後に、薬剤処置を行った (n=6/群)。GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNA処置群は、3 mg/kg (3mpk) の用量で1回皮下投与 (s. c.) した。vehicle群としては、PBSを1回皮下投与した。

[0317] 薬剤処置を行う前 (Day 0) に尾静脈採血を行い、QuantiChrom Whole Blood HB kit (Bioassay Systems社製) を用いて、HGB値を測定した。薬剤処置前のHGB値の結果は、図14Aに示した (平均値±標準誤差)。また、血漿中鉄濃度は、メタロアッセイ鉄測定キット (メタロジェニクス社製) を用いて測定した。薬剤処置前の血漿中鉄濃度の結果は、図14Bに示した (平均値±標準誤差)。図14Cは、薬剤処置をして8日後 (Day 8) における血漿中鉄濃度を示した結果である。薬剤処置をして9日後 (Day 9) において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行い、多項目自動血球分析装置XT2000 (シスメックス株式会社製) を用いて、HGB値、MCH値、RBC数を測定した。それぞれの結果は、図14Dから図14Fに示した (平均値±標準誤差)。

[0318] これらの結果は、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によって血漿中鉄濃度を上昇させることでHGB値を上昇させ、骨髓機能不全に伴う貧血、例えば、骨髓線維症に伴う貧血などの貧血疾患に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0319] 試験例12：炎症に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの薬効評価試験

GalNAcをコンジュゲートしたTfR2 siRNAとして、AD4

7882.92 DUG（実施例177）及びAD47882.94 DUG（実施例179）を用いて以下の実験を行った。炎症を誘発するために、turpentineを150 μ L／マウスで週3回、雄性のC57BL／6NJ c lマウス（日本クレア社製）に皮下投与（s. c.）した。炎症を誘導しない対照群（control）としては、turpentineの代わりにPBSを皮下投与した。1回目のturpentineを投与して7日後（Day 0）において、尾静脈採血を行い、血漿中鉄濃度及びHGB値を測定した。血漿中鉄濃度は、メタロアッセイ鉄測定キット（メタロジェニクス社製）を用いて測定した。また、HGB値はQuantiChrom Whole Blood HB kit（Bioassay Systems社製）を用いて測定した。結果はそれぞれ図15A及び図15Bに示した（平均値±標準誤差）。薬剤は雄性のC57BL／6NJ c lマウス（日本クレア社製）に投与した（n=5／群）。GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNA処置群は、3 mg／kg（3 mpk）の用量で1回皮下投与した。vehicle群としては、PBSを1回皮下投与した。

[0320] 薬剤処置をして4日後（Day 4）、処置して8日後（Day 8）に尾静脈採血を行い、メタロアッセイ鉄測定キット（メタロジェニクス社製）を用いて血漿中鉄濃度を測定した。結果は図15Aに示した（平均値±標準誤差）。また、薬剤処置をして8日後において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行い、多項目自動血球分析装置XT2000（シスメックス株式会社製）を用いて、HGB値、MCH値、RBC数を測定した。それぞれの結果は、図15Cから図15Eに示した（平均値±標準誤差）。また、マウスをイソフルラン麻酔下で放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、mTfR2のmRNA発現量を測定した。RNAの抽出および定量的PCRは、試験例5に記載の通りに実施した。mTfR2のmRNA発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるmActbのmRNA発現量で正規化した。mTfR2のmRNA発現量の結果は、図15Fに示した。炎症を誘導していないcontrol群におけるmRNA量を1.0としたときの相対値として、その

他の群における相対mRNA量を算出して表記（平均値±標準誤差）した。

[0321] これらの結果は、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によってTfR2のmRNA発現量を抑制することでHGB値を上昇させ、炎症に伴う貧血、例えば、慢性腎臓病に伴う貧血や癌性貧血などの貧血疾患に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0322] 試験例13：NUP98-HOXD13マウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの薬効評価試験

無効造血および不十分な赤血球分化成熟という特徴を有する骨髓異形成症候群（Myelodysplastic syndrome, MDS）のモデルマウスとして、NUP98-HOXD13マウス（C57BL/6-Tg（Vav1-NUP98/HOXD13）G2Apla/J）が知られている（Nature Medicine volume 20, pages 408-414（2014））。MDSに対するTfR2 siRNAの治療効果を検証するために、NUP98-HOXD13マウスに対する、GalNAcをコンジュゲートしたTfR2 siRNAの投与試験を行った。化合物は、AD47882、23DUG（実施例171）を用いた。

[0323] NUP98-HOXD13マウスは、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社から購入し実験に使用した。4か月齢のNUP98-HOXD13マウスにおける血漿中鉄濃度とHGB値と体重値を基に群化した後、薬剤処置を行った（n=8/群）。GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNA処置群は、5 mg/kg（5 mpk）の用量で1週間に1回皮下投与（s.c.）した。vehicle群としては、PBSを1週間に1回皮下投与した。

[0324] 薬剤処置を開始して2週間後、4週間後、及び8週間後に尾静脈採血を行い、メタロアッセイ鉄測定キット（メタロジェニクス社製）を用いて血漿中鉄濃度を測定した。結果は図16Aに示した（平均値±標準誤差）。また、薬剤処置を開始して2週間後、4週間後、6週間後、及び8週間後に尾静脈採血を行い、QuantiChrom Whole Blood HB k

it (Bioassay Systems 社製) を用いて HGB 値を測定した。結果は図 16B に示した (平均値 ± 標準誤差)。また、薬剤処置を開始して 8 週間後において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行い、多項目自動血球分析装置 XT2000 (シスメックス株式会社製) を用いて、HGB 値、MCH 値、RBC 数を測定した。それぞれの結果は、図 16C から図 16E に示した (平均値 ± 標準誤差)。また、マウスをイソフルラン麻酔下で放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、mTfR2 の mRNA 発現量を測定した。RNA の抽出および定量的 PCR は、試験例 5 に記載の通りに実施した。mTfR2 の mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である mActb の mRNA 発現量で正規化した。mTfR2 の mRNA 発現量の結果は、図 16F に示した。vehicle 群における mRNA 量を 1.0 としたときの相対値として、その他の群における相対 mRNA 量を算出して表記 (平均値 ± 標準誤差) した。

[0325] これらの結果は、GaINAc コンジュゲート TfR2 siRNA の処置によって TfR2 の mRNA 発現量を抑制することで血漿中鉄濃度を上昇させ、その結果、HGB 値を上昇させることで、骨髓機能低下に伴う貧血疾患の 1 つである MDS に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0326] 試験例 14 : 慢性腎臓病に伴う貧血モデルマウスにおける GaINAc コンジュゲート TfR2 siRNA の薬効評価試験

GaINAc をコンジュゲートした TfR2 siRNA として、AD47882.94DUG (実施例 179) の化合物を用いて以下の実験を行った。慢性腎臓病とそれに伴う貧血を誘発するために、adenine (WAKO 社製品、010-11513) が 0.2% 含有量となるように調製した餌を雄性の C57BL/6N Jcl マウス (日本クレア社製) に与えた。0.2% adenine 食を介入して 2 週間後に尾静脈採血を行い、血漿中鉄濃度及び HGB 値を測定した。血漿中鉄濃度は、メタロアッセイ鉄測定キット (メタロジェニクス社製) を用いて測定した。また、HGB 値は、Qu

antiChrom Whole Blood HB kit (Bioassay Systems社製)を用いて測定した。結果はそれぞれ図17A及び図17Bに示した(平均値±標準誤差)。これらの血漿中鉄濃度、HGB値及び体重値を基に群化した後、薬剤処置を行った($n=6$ /群)。GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNA処置群は、 3 mg/kg (3 mpk) または 1 mg/kg (1 mpk) または 0.3 mg/kg (0.3 mpk) の用量で1週間に1回皮下投与した。vehicle群としては、PBSを1週間に1回皮下投与した。慢性腎臓病に伴う貧血を誘導しない対照群(control)としては、 0.2% adenineを含有しない餌を与えた。

[0327] 薬剤処置を開始して6週間後に尾静脈採血を行い、メタロアッセイ鉄測定キット(メタロジェニクス社製)を用いて血漿中鉄濃度を測定した。結果は図17Cに示した(平均値±標準誤差)。また、薬剤処置を開始して6週間後において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行って採取した血液を用いて、多項目自動血球分析装置XT2000(シスメックス株式会社製)を用いて、HGB値、MCH値、RBC数を測定した。それぞれの結果は、図17Dから図17Fに示した(平均値±標準誤差)。また、マウスをイソフルラン麻酔下で放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、mTfR2のmRNA発現量を測定した。RNAの抽出および定量的PCRは、試験例5に記載の通りに実施した。mTfR2のmRNA発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるmActbのmRNA発現量で正規化した。mTfR2のmRNA発現量の結果は、図17Gに示した。vehicle群におけるmRNA量を1.0としたときの相対値として、その他の群における相対mRNA量を算出して表記(平均値±標準誤差)した。

[0328] これらの結果は、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によってTfR2のmRNA発現量を抑制することで血漿中鉄濃度及びHGB値を上昇させることで、慢性腎臓病に伴う貧血に対して治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0329] 試験例15: Ruxolitinib (JAK1/JAK2阻害剤) 投与に伴う貧血モデルマウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの薬効評価試験

Ruxolitinib投与による貧血に対するTfR2 siRNAの効果を検証するために、GalNAcをコンジュゲートしたTfR2 siRNAとして、AD47882.23DUG (実施例171) の化合物を用いて以下の実験を行った。

[0330] Ruxolitinib投与による貧血を誘発するために、0.1% Ruxolitinib (LC Laboratories社製品 R-6688) 含有量となるように調製した餌を雄性的C57BL/6N Jclマウス (日本クレア社製) に与えた。0.1% Ruxolitinib含有食を介して6週間後に尾静脈採血を行い、多項目自動血球分析装置XT2000 (シスメックス株式会社製) を用いて、HGB値を測定した。結果は図18Aに示した (平均値±標準誤差)。これらのHGB値及び体重値を基に群化した後、薬剤処置を行った (n=5/群)。GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNA処置群は、3 mg/kg (3mpk) の用量で1週間に1回皮下投与 (s.c.) した。vehicle群としては、PBSを1週間に1回皮下投与した。Ruxolitinibによる貧血を誘導しない対照群 (control) としては、0.1% Ruxolitinibを含有しない餌を与えた。

[0331] 薬剤処置を開始して3週間後に尾静脈採血を行い、メタロアッセイ鉄測定キット (メタロジェニクス社製) を用いて血漿中鉄濃度を測定した。結果は図18Bに示した (平均値±標準誤差)。また、薬剤処置を開始して6週間後において、イソフルラン麻酔下で腹大静脈内採血を行って採取した血液を用いて、多項目自動血球分析装置XT2000 (シスメックス株式会社製) によって、HGB値、MCH値、RBC数を測定した。それぞれの結果は、図18Cから図18Eに示した (平均値±標準誤差)。また、マウスをイソフルラン麻酔下で放血処置により安楽殺後、肝臓を採材し、mTfR2のm

RNA発現量を測定した。RNAの抽出および定量的PCRは、試験例5に記載の通りに実施した。mTfR2のmRNA発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるmActbのmRNA発現量で正規化した。mTfR2のmRNA発現量の結果は、図18Fに示した。0.1% Ruxolitinib含有餌を与えていないcontrol群におけるmRNA量を1.0としたときの相対値として、その他の群における相対mRNA量を算出して表記（平均値±標準誤差）した。

[0332] これらの結果は、骨髄線維症の治療におけるRuxolitinib等のJAK2阻害剤とTfR2 siRNAとの併用効果を提供できる可能性を示すものである。

[0333] 試験例16：ヒトTfR2発現マウスにおけるGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの薬効評価試験

株式会社特殊免疫研究所において作出した、ヒトTfR2遺伝子座を有する雄性または雌性のTfR2ヒト化マウスを用いて、ヒトTfR2 mRNAに対するGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの効果を検証するために、以下の実験を行った。TfR2ヒト化マウスは、ヒトTfR2遺伝子座を内包するBAC (bacterial artificial chromosome) クローン (RP11-264N5) を用いて作出した。GalNAcをコンジュゲートしたTfR2 siRNAとして、TfR2-019.88DUG (実施例162の化合物)、TfR2-019.92DUG (実施例167の化合物)、TfR2-019.93DUG (実施例168の化合物)、TfR2-019.94DUG (実施例169の化合物) を用いた。

[0334] GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNA処置群は、3 mg/kg (3 mpk) または0.3 mg/kg (0.3 mpk) の用量で1回皮下投与 (s. c.) した (n=3/群)。vehicle群としては、PBSを1回皮下投与した (n=4/群)。

[0335] 薬剤処置を開始して7日後において、イソフルラン麻酔下でマウスを放血

処置により安楽殺後、肝臓を採材し、h T f R 2 の m R N A 発現量を測定した。R N A の抽出および定量的 P C R は、試験例 5 に記載の通りに実施した。h T f R 2 の m R N A 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である m A c t b の m R N A 発現量で正規化した。h T f R 2 に対するプライマーは、試験例 1 及び試験例 2 に記載のものを使用した。h T f R 2 の m R N A 発現量の結果は、図 19 に示した。v e h i c l e 群における m R N A 量を 1.0 としたときの相対値として、その他の群における相対 m R N A 量を算出して表記（平均値±標準誤差）した。

[0336] これらの結果は、G a l N A c コンジュゲート T f R 2 s i R N A の処置によって、ヒト T f R 2 m R N A の発現量を抑制できることを示している。また、ヒト T f R 2 m R N A の発現量を抑制することで H G B 値を上昇させ、骨髓機能不全に伴う貧血、例えば、骨髓線維症に伴う貧血などの貧血疾患や、炎症に伴う貧血、例えば、慢性腎臓病に伴う貧血などの貧血疾患に対して、治療効果を提供できる可能性を示すものである。また、ヒト T f R 2 発現マウスからさらに内在性のマウス T f R 2 をノックアウトしたマウスに T f R 2 - O 19, 94 D U G（実施例 169 の化合物）を処置した他の試験において、42 日後においてもヒト T f R 2 遺伝子の発現が抑制され、T f R 2 - O 19, 94 D U G の安定的なヒト T f R 2 遺伝子発現抑制効果が確認された。

[0337] 試験例 17：ヒト初代肝臓細胞を用いた G a l N A c コンジュゲート T f R 2 s i R N A の薬効評価試験

G a l N A c をコンジュゲートした s i R N A は、肝臓へパトサイトに発現している A S G P R (a s i a l o g l y c o p r o t e i n r e c e p t o r 1) を介して肝臓に取り込まれることが知られている。そこで、トランスフェクション試薬を用いない条件における、G a l N A c コンジュゲート T f R 2 s i R N A の効果を検証するために、ヒト初代肝臓細胞を用いて G a l N A c コンジュゲート T f R 2 s i R N A の薬効評価試験を行った。G a l N A c をコンジュゲートした T f R 2 s i R N A として、

TfR2-019.88DUG (実施例162)、TfR2-019.89DUG (実施例163)、TfR2-019.90DUG (実施例164)、TfR2-019.91DUG (実施例166)、TfR2-019.92DUG (実施例167)、TfR2-019.93DUG (実施例168)、TfR2-019.94DUG (実施例169)、TfR2-019.95DUG (実施例170)、の化合物を用いた。

[0338] (ヒト初代肝臓細胞の培養)

液体窒素タンクで保管されたヒト初代肝臓細胞 (L I F E T E C H N O L O G I E S 社製品、H M C P I S) を、37℃の温浴を用いて融解し、予め37℃で温めておいた10 mLのCryopreserved Hepatocytes Recovery Medium (CHRM) (L I F E T E C H N O L O G I E S 社製品、CM7000) に注ぎ入れ転倒混和した。その後、遠心 (100g、10分間) を行い、上清を除去した後、予め37℃に温めておいた5 mLの細胞播種用培地を用いて細胞懸濁液を調製した。細胞播種用培地は、William's Medium E (L I F E T E C H N O L O G I E S 社製品、A1217601) にHepatocyte Plating Supplement Pack (L I F E T E C H N O L O G I E S 社製品、CM3000) を添加することで調製した。その後、生細胞数をカウントし、 5×10^5 cells/mLとなるように、細胞播種用培地を用いて調製し、コラーゲンコートの96 wellプレートに1wellあたりに細胞を 5×10^4 cellsとなるように播種し、CO₂インキュベーターで4～6時間培養し、顕微鏡を用いて細胞がプレートに接着していることを確認した。その後、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの添加実験を行った。

[0339] (GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの添加)

予め37℃で温めておいた細胞培養用培地を用いてGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAを含む培地を調製した。siRNA検体を1種類あたり2ウェル分、siRNAの代わりに蒸留水としたネガティブコント

ロール (NT) を2ウェル分調製した。siRNAの最終濃度としては、10000nMから4.8nMまでの範囲で、5倍公比になるように調製した。細胞培養用培地は、William's Medium E (LIFE TECHNOLOGIES社製品、A1217601) にHepatocyte Maintenance Supplement Pack (LIFE TECHNOLOGIES社製品、CM4000) を添加することで調製した。96wellプレートに播種されたヒト初代肝臓細胞の各々のウェルにおける細胞播種用培地を吸引除去した後に、調製したGalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAを含有した培地を100μLずつ添加した。化合物を添加して3日後にPBSを用いて細胞を1回洗浄し、RNAの抽出を行った。

[0340] (RNA抽出、qPCR)

RNAの抽出および定量的PCRは、試験例1に記載の通りに実施した。hTfR2とh18SのmRNA発現量を2ウェル間の平均値として測定した。hTfR2のmRNA発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるh18SのmRNA発現量で正規化した。ネガティブコントロール(NT)におけるhTfR2 mRNA発現量を1.0としたときの相対値として、各siRNAを処置した検体の相対hTfR2 mRNA発現量を算出して表記(平均値±標準誤差)した。結果は、それぞれ図20A～図20Cに示した。

[0341] これらの結果は、GalNAcコンジュゲートTfR2 siRNAの処置によって、ヒト肝臓ヘパトサイトに取り込まれることで、ヒトTfR2 mRNAの発現量を抑制できることを示している。また、ヒトTfR2 mRNA発現量を抑制することでHGB値を上昇させ、骨髓機能不全に伴う貧血、例えば、骨髓線維症に伴う貧血などの貧血疾患や、炎症に伴う貧血、例えば、慢性腎臓病に伴う貧血などの貧血疾患に対して、治療効果を提供できる可能性を示すものである。

[0342] 試験例18: HepG2細胞を用いたTfR2 siRNAのHepcidin遺伝子発現に対する効果

試験例2と同様の方法で、リバーストランスフェクション法を用いて siRNA を Hep G2 細胞に導入して2日後における、Hepcidin の mRNA 発現量の評価を行った。Hepcidin に対するプライマーは、Hs00221783__m1 (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた。siRNA として、TfR2-019 (実施例19)、TfR2-039 (実施例39)、TfR2-019.94DUG (実施例169)、TfR2-039.23DUG (実施例144) を用いた。

[0343] Hepcidin mRNA 発現量の評価について、ネガティブコントロール (NT) における Hepcidin mRNA 発現量を 1.0 としたときの相対値として、各 siRNA を処置した検体の相対 Hepcidin mRNA 発現量を算出して表記した。結果は、図21に示した。

産業上の利用可能性

[0344] 本発明の siRNA は、TfR2 mRNA の発現を抑制することができ、さらに鉄代謝において中心的な役割を担っている hepcidin の産生を抑制し得る。本発明の siRNA は、TfR2 mRNA の発現及び／又は hepcidin の産生を抑制することにより治療又は予防可能な疾患の治療又は予防に有用である。

配列表フリーテキスト

[0345] 配列番号1：hTfR2 mRNA のヌクレオチド配列

配列番号2～24：1本鎖オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列

配列番号25～28：2本鎖オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域のヌクレオチド配列

配列番号29～35：2本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域のヌクレオチド配列

配列番号36、37：2本鎖オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域のヌクレオチド配列

配列番号38～42：2本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖領域のヌクレオチド配列

配列番号 43 : T f R 2 - 0 1 9 におけるセンス鎖領域の相補領域のヌクレオチド配列

配列番号 44 : T f R 2 - 0 1 9 におけるアンチセンス鎖領域の相補領域のヌクレオチド配列

配列番号 45 : T f R 2 - 0 3 9 におけるセンス鎖領域の相補領域のヌクレオチド配列

配列番号 46 : T f R 2 - 0 3 9 におけるアンチセンス鎖領域の相補領域のヌクレオチド配列

配列番号 47 : 2 本鎖オリゴヌクレオチドのセンス鎖領域のヌクレオチド配列

請求の範囲

- [請求項1] トランスフェリン受容体2のmRNAに対するノックダウン作用を有する、以下の（A）のアンチセンス鎖領域及び（B）のセンス鎖領域を含むオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩；
- （A）配列番号1のヌクレオチド番号2845から2867、又は、ヌクレオチド番号1534から1556の間の領域において連続する18～21塩基からなる標的配列と実質的に相補的な標的対応配列からなり、該標的対応配列の5'末端のヌクレオシドは、該標的配列の3'末端のヌクレオシドと実質的に相補的なヌクレオシド、アデニンを有するヌクレオシド、又はウラシルを有するヌクレオシドであり、該標的対応配列の5'末端及び／又は3'末端に5塩基以下のオーバーハング構造が付加していてもよい、18～31塩基長からなるアンチセンス鎖領域、及び、
- （B）前記アンチセンス鎖領域の標的対応配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列を含有し、さらに該ヌクレオチド配列の5'末端及び／又は3'末端に5塩基以下のオーバーハング構造が付加していてもよい、18～31塩基長からなるセンス鎖領域。
- [請求項2] 前記標的配列が、配列番号1のヌクレオチド番号2847～2865、又はヌクレオチド番号1536～1554の19塩基からなるヌクレオチド配列である、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項3] 前記アンチセンス鎖領域の標的対応配列における5'末端のヌクレオシドが、アデニン又はウラシルを有するヌクレオシドである、請求項1又は2に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項4] 前記アンチセンス鎖領域の標的対応配列が、配列番号1のヌクレオチド番号2847～2865、又はヌクレオチド番号1536～1554の19塩基からなる標的配列と完全に相補的なヌクレオチド配列

である、請求項1～3のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項5] オリゴヌクレオチドを構成する糖及び／又はリン酸ジエステル結合の少なくとも1個が修飾されている、請求項1～4のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項6] オリゴヌクレオチドを構成する糖がD-リボフラノースであり、糖の修飾がD-リボフラノースの2'位の水酸基の修飾である、請求項5に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項7] 糖の修飾が、D-リボフラノースの2'-デオキシ化、2'-O-アルキル化、2'-O-アルコシアルキル化、2'-ハロゲン化、及び／又は2'-O、4'-C-アルキレン化である、請求項6に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項8] 前記2'-O-アルキル化が2'-O-メチル化、前記2'-O-アルコシアルキル化が2'-O-メトキシエチル化、前記2'-ハロゲン化が2'-フルオロ化、並びに、前記2'-O、4'-C-アルキレン化が2'-O、4'-C-メチレン化及び／又は2'-O、4'-C-エチレン化である、請求項7に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項9] リン酸ジエステル結合の修飾がホスホロチオエートである、請求項5～8のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項10] センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の3'末端のヌクレオシドにおけるD-リボフラノースが3'-O-アルキル化されていることを特徴とする、請求項5～9のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項11] 前記3'-O-アルキル化が3'-O-メチル化である、請求項10に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項12] センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の5'末端及び／又は

3' 末端に、3 塩基以下のオーバーハング構造が付加している、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項13] オーバーハング構造が2 塩基である、請求項 12 に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項14] オーバーハング構造が、2 個の連続したチミンを含むヌクレオシド、又は2 個の連続したウラシルを含むヌクレオシドである、請求項 13 に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項15] オーバーハング構造が、アンチセンス鎖領域の3' 末端に付加した2 個の連続したU (M) である、請求項 14 に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項16] センス鎖領域が以下の式 (I) に示すオリゴヌクレオチドからなり、アンチセンス鎖領域が以下の式 (II) に示すオリゴヌクレオチドからなり、さらに以下の (a) 乃至 (g) に示される特徴を有する、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩：

センス鎖領域：5' $S_{O5} - S_a - S_{19} - S_{18} - S_{17} - S_{16} - S_{15} - S_{14} - S_{13} - S_{12} - S_{11} - S_{10} - S_9 - S_8 - S_7 - S_6 - S_5 - S_4 - S_3 - S_2 - S_1 - S_{O3}$ 3' (I)

アンチセンス鎖領域：5' $A_{O5} - A_1 - A_2 - A_3 - A_4 - A_5 - A_6 - A_7 - A_8 - A_9 - A_{10} - A_{11} - A_{12} - A_{13} - A_{14} - A_{15} - A_{16} - A_{17} - A_{18} - A_{19} - A_a - A_{O3}$ 3' (II)

(a) S_1 は 3' - 修飾ヌクレオシドであり、 $S_2 \sim S_{19}$ は 1 個のヌクレオシドを示し、それぞれ独立して、2' - OMe RNA、2' - F RNA 又は DNA であり、 S_a は 0 ～ 3 個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2' - OMe RNA、2' - F RNA 又は DNA を示し、 S_{O3} 及び S_{O5} はそれぞれ独立して、0 ～ 3 個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2' - OMe RNA、2' - F RNA、DNA 又は 2' -

O, 4' - C - 架橋化修飾ヌクレオシドを示す。各ヌクレオシド間の結合は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合を示す；

(b) A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13} 、 A_{14} 及び A_{15} は 1 個のヌクレオシドを示し、そのうち少なくとも 1 つは DNA、RNA、2' - O, 4' - C - 架橋化修飾ヌクレオシド又は 2' - MOE RNA であり、それ以外は 2' - OMe RNA 又は 2' - F RNA であり、 $A_1 \sim A_{10}$ 及び $A_{16} \sim A_{19}$ は 1 個のヌクレオシドを示し、それぞれ独立して、2' - OMe RNA、2' - F RNA 又は DNA を示し、 A_a は 0 ～ 3 個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2' - OMe RNA、2' - F RNA 又は DNA を示し、 A_{o3} 及び A_{o5} はそれぞれ独立して、0 ～ 3 個のヌクレオシドを示し、それぞれのヌクレオシドは独立して、2' - OMe RNA、2' - F RNA、DNA 又は 2' - O, 4' - C - 架橋化修飾ヌクレオシドを示す。各ヌクレオシド間の結合は、化学修飾されていてもよいリン酸ジエステル結合を示す；

(c) $A_2 \sim A_a$ の間のヌクレオチド配列は、標的配列と実質的に相補的なヌクレオチド配列からなり、 A_1 は標的配列の対応するヌクレオシドと相補的な塩基を有するヌクレオシド、アデニンを有するヌクレオシド、チミンを有するヌクレオシド、又はウラシルを有するヌクレオシドであり、 A_{o3} と A_{o5} が存在する場合、そのヌクレオチド配列は、それぞれ独立して、標的配列の対応するヌクレオシドとは独立に選択されるヌクレオチド配列である；

(d) $S_1 \sim S_a$ の間のヌクレオチド配列と、 $A_1 \sim A_a$ の間のヌクレオチド配列とは、互いに実質的に相補的なヌクレオチド配列であり、かつ、2 本鎖構造を形成している；

(e) S_{o5} と A_{o3} の両方が存在する場合、 S_{o5} 及び A_{o3} は、互いに相補的ではないヌクレオチド配列である；

(f) S_{o3} と A_{o5} の両方が存在する場合、 S_{o3} 及び A_{o5} は、互いに

相補的ではないヌクレオチド配列である；並びに、

(g) センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の、5'末端のヌクレオシドの5'位及び／又は3'末端のヌクレオシドの3'位もしくは3'末端のヌクレオシドが3'-修飾ヌクレオシドである場合はその2'位、が化学修飾されていてもよい。

- [請求項17] 式(11)において、 S_1 が3'-OMe RNAである請求項16に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項18] 2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドが、LNA又はENAである、請求項16又は17に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項19] 式(11)において、 A_{11} 、 A_{12} 、 A_{13} 、 A_{14} 及び A_{15} の2つ以上が同一又はそれぞれ異なってもよく、DNA、RNA、2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシド又は2'-MOE RNAである請求項16～18のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項20] 式(11)において、 A_{14} がRNA又は2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドである、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項21] 式(11)において、 A_{13} が2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシド又は2'-OMe RNAであり、 A_{14} がRNAである、請求項20に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項22] 式(11)において、 $A_{11}-A_{12}-A_{13}-A_{14}-A_{15}$ が以下のいずれか；
 $A_{11}(2'-OMe RNA)-A_{12}(2'-OMe RNA)-A_{13}(ENA)-A_{14}(RNA)-A_{15}(2'-OMe RNA)$ 、
 $A_{11}(2'-F RNA)-A_{12}(2'-OMe RNA)-A_{13}(ENA)-A_{14}(RNA)-A_{15}(2'-OMe RNA)$ 、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{F RNA}) - A_{13}(\text{ENA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{13}(\text{LNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{13}(\text{LNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{F RNA}) - A_{13}(\text{LNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、又は、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(2'-\text{F RNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{RNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

である、請求項21に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項23] 式(11)において、 A_{12} がDNAであり、 A_{14} が2'-O, 4'-C-架橋化修飾ヌクレオシドである、請求項20に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項24] 式(11)において、 $A_{11} - A_{12} - A_{13} - A_{14} - A_{15}$ が以下のいずれか；

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{ENA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{ENA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

$A_{11}(2'-\text{F RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{LNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、又は、

$A_{11}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{12}(\text{DNA}) - A_{13}(2'-\text{OMe RNA}) - A_{14}(\text{LNA}) - A_{15}(2'-\text{OMe RNA})$ 、

である、請求項23に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容

される塩。

- [請求項25] 式(11)において、 A_2 、 A_6 及び A_{16} が2'-F RNAである、請求項16～24のいずれ1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項26] 式(11)において、更に、 A_8 、 A_9 及び A_{10} からなる群から選択される1又は2個のヌクレオシドが2'-F RNAであり、 A_1 、 $A_3 \sim A_5$ 、 A_7 、 $A_{17} \sim A_{19}$ 及び A_a のヌクレオシドが2'-OMe RNAである、請求項25に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項27] 式(11)において、 A_2 、 A_6 、 A_8 、 A_{10} 及び A_{16} が2'-F RNAであり、 A_1 、 $A_3 \sim A_5$ 、 A_7 、 A_9 、 $A_{17} \sim A_{19}$ 及び A_a のヌクレオシドが2'-OMe RNAである、請求項26に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項28] 式(1)において、 S_{11} 、 S_{12} 、 S_{13} 及び S_{15} が2'-F RNAである請求項16～27のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項29] 式(1)において、 $S_2 \sim S_{10}$ 、 S_{14} 、 $S_{16} \sim S_{19}$ 及び S_a が2'-OMe RNAである請求項28のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項30] 式(11)においてRNAが採用される場合、当該RNAとその3'側に隣接するヌクレオシドとの間の結合がホスホロチオエート結合であることを特徴とする、請求項16～29のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項31] 前記オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端から2～5ヌクレオチドにおいて、各ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であることを特徴とする、請求項16～30のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項32] S_{03} 、 S_{05} 、 A_{05} 及び A_{03} のヌクレオシド数が0～2である、請

求項 1 6～3 1 のいずれか 1 つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項33] S_{03} のヌクレオシド数が 0 である、請求項 3 2 に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

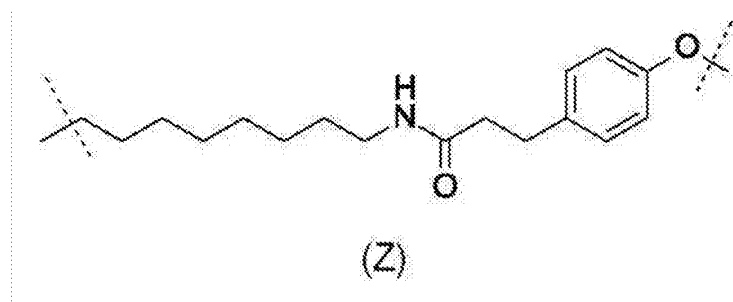
[請求項34] S_{03} 、 S_{05} 及び A_{05} のヌクレオシド数が 0 であり、 A_{03} のヌクレオシド数が 2 である、請求項 3 3 に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項35] 前記アンチセンス鎖領域及びセンス鎖領域が、それぞれ独立したオリゴヌクレオチドとして 2 本鎖オリゴヌクレオチドを形成していることを特徴とする、請求項 1～3 4 のいずれか 1 つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項36] 前記アンチセンス鎖領域の 5' 末端のヌクレオシドとセンス鎖領域の 3' 末端のヌクレオシドとがリンカー構造により連結されていることを特徴とする、請求項 1～3 4 のいずれか 1 つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項37] 前記リンカー構造が、下記式

[化1]



[式中、破線は結合手を示し、フェニル基に結合している酸素原子は、隣接するアンチセンス鎖領域の 5' 末端のヌクレオチドの 5' - リン酸基とリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合することを表し、他方の末端のメチレン基は、隣接するセンス鎖領域の 3' 末端のヌクレオチドの 3' - リン酸基（3' 位が修飾されたヌクレオチ

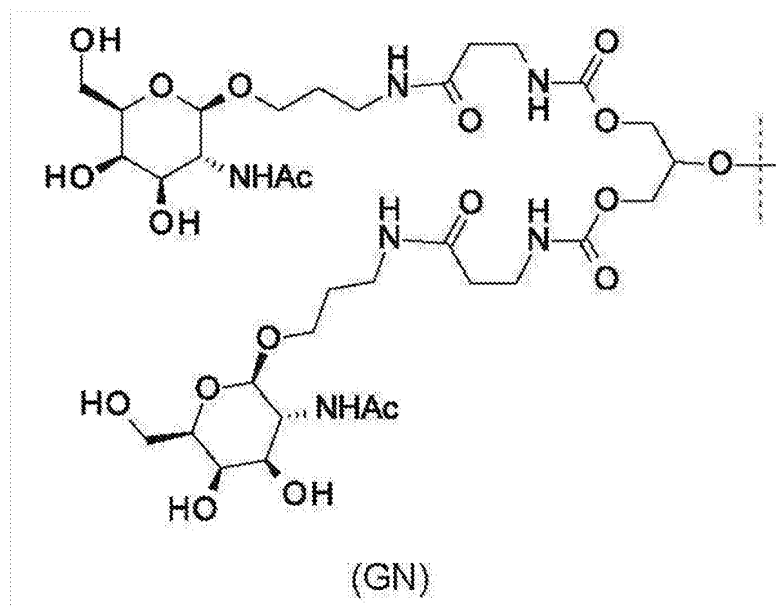
ドでは2'位のリン酸基)とリン酸ジエステル結合又はホスホロチオエート結合することを表す。]

で表される構造である、請求項36に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項38] オリゴヌクレオチドの5'末端のヌクレオシドの5'位及び／又は3'末端のヌクレオシドの3'位もしくは3'末端のヌクレオシドが3'-修飾ヌクレオシドである場合はその2'位、がG a I N A cユニットで化学修飾されていることを特徴とする、請求項1～37のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項39] 前記G a I N A cユニットが、

[化2]

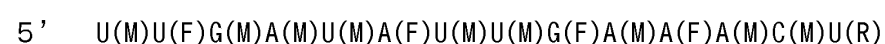
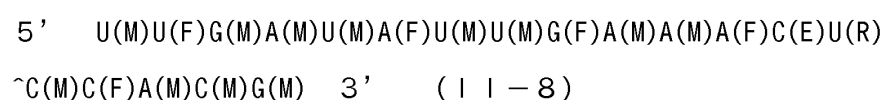
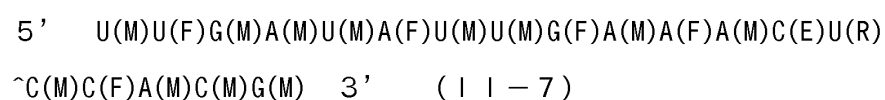
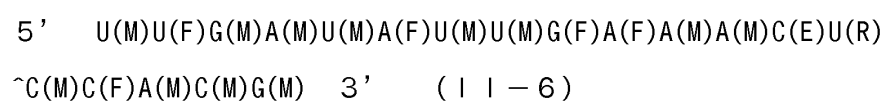
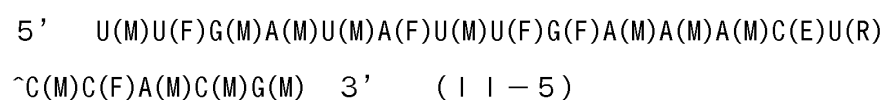
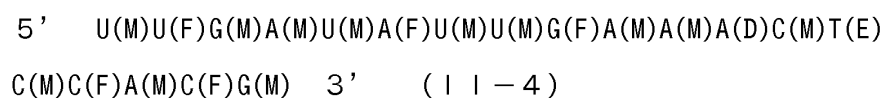
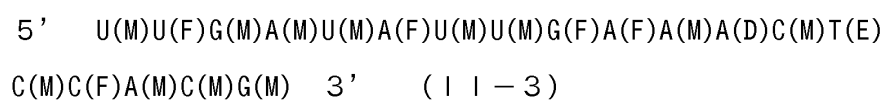
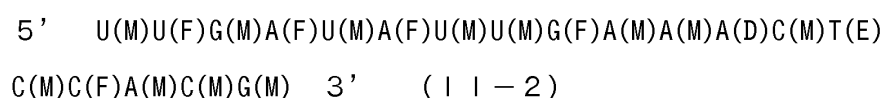
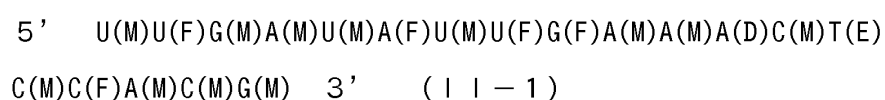
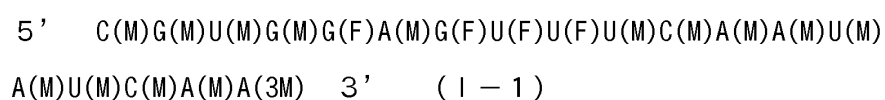


[式中、破線は隣接するヌクレオチドの5'末端のリン酸基及び／又は3'末端のリン酸基(3'位が修飾されたヌクレオチドでは2'位のリン酸基)とリン酸ジエステル結合することを表す。]

で表されるユニットであることを特徴とする、請求項38に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項40] オーバーハング構造を除くセンス鎖領域が以下の式（Ⅰ－１）であり、オーバーハング構造を除くアンチセンス鎖領域が以下の式（ⅠⅠ－１）～（ⅠⅠ－１０）のいずれかであり、前記センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域がそれぞれ独立したオリゴヌクレオチドとして２本鎖オリゴヌクレオチドを形成しており、前記センス鎖領域及び前記アンチセンス鎖領域はそれぞれ独立してオーバーハング構造を含んでもよい、請求項１に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

（式）



$$^{\wedge}\text{C}(\text{M})\text{C}(\text{F})\text{A}(\text{M})\text{C}(\text{M})\text{G}(\text{M}) \quad 3' \quad (11-9)$$

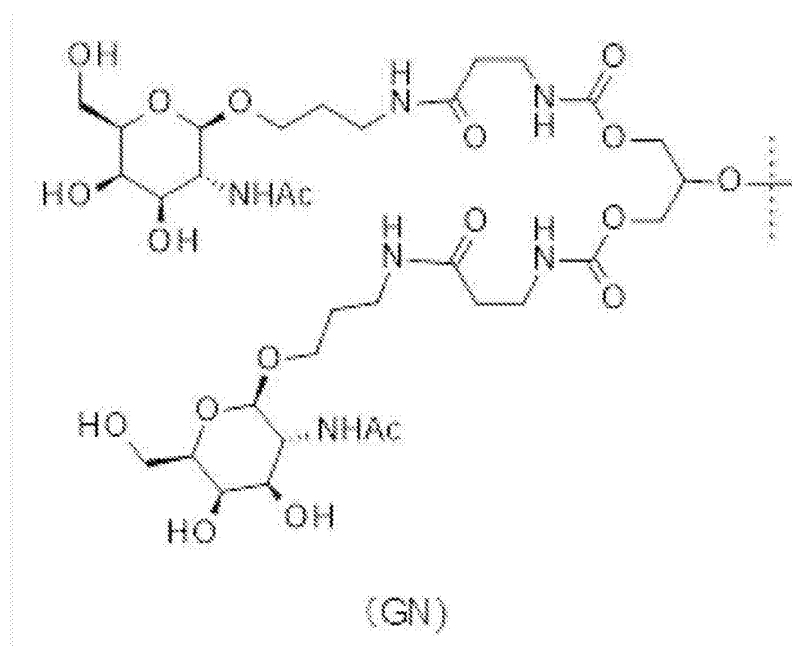
$$5' \quad \text{U}(\text{M})\text{U}(\text{F})\text{G}(\text{M})\text{A}(\text{M})\text{U}(\text{M})\text{A}(\text{F})\text{U}(\text{M})\text{U}(\text{M})\text{G}(\text{F})\text{A}(\text{M})\text{A}(\text{M})\text{A}(\text{F})\text{C}(\text{M})\text{U}(\text{R})$$

$$^{\wedge}\text{C}(\text{M})\text{C}(\text{F})\text{A}(\text{M})\text{C}(\text{M})\text{G}(\text{M}) \quad 3' \quad (11-10)$$

[式中、核酸の塩基についてAはアデニン、Uはウラシル、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシン（ただし、CがENAのときは2'-O, 4'-C-エチレン架橋-5-メチルシチジンを示す）を示し、核酸について(R)はRNA、(D)はDNA、(M)は2'-OMe RNA、(3M)は3'-OMe RNA、(F)は2'-F RNA、(E)はENAを示す。また、式中、「 $\wedge$ 」はヌクレオシド間の結合がホスホロチオエート結合 (-P(=S)(OH)-) であることを示し、特に記載のない場合はヌクレオシド間の結合がリン酸ジエステル結合 (-P(=O)(OH)-) であることを示すが、特に記載のない場合であってもセンス鎖領域の5'末端及び3'末端から3個のヌクレオシドにおける2か所のヌクレオシド間結合、並びに、アンチセンス鎖領域の5'末端から3個のヌクレオシドにおける2か所のヌクレオシド間結合及び3'末端から4個のヌクレオシドにおける3か所のヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。]

- [請求項41] センス鎖領域及び／又はアンチセンス鎖領域の5'末端及び／又は3'末端に、3塩基以下のオーバーハング構造が付加している、請求項40に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項42] オーバーハング構造が2塩基である、請求項41に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項43] オーバーハング構造が、2個の連続したチミンを含むヌクレオシド、又は2個の連続したウラシルを含むヌクレオシドである、請求項42に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項44] オーバーハング構造が、アンチセンス鎖領域の3'末端に付加した2個の連続したU(M)である、請求項43に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項45] センス鎖領域の5'末端が以下の式

[化3]



[式中、破線は隣接するセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'ーリン酸基とリン酸ジエステル結合することを表す。]

で表されるG a l N A cユニットで化学修飾されていることを特徴とする、請求項40～44のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

[請求項46]

センス鎖領域が以下の式(1-2)であり、アンチセンス鎖領域が以下の式(11-11)～(11-20)のいずれかであり、前記センス鎖領域及びアンチセンス鎖領域がそれぞれ独立したオリゴヌクレオチドとして2本鎖オリゴヌクレオチドを形成している、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。

(式)

5' GNC(M)[^]G(M)[^]U(M)G(M)G(F)A(M)G(F)U(F)U(F)U(M)C(M)A(M)A(M)U(M)A(M)U(M)C(M)[^]A(M)[^]A(3M) 3' (1-2)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(E)C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (11-11)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(F)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(
E)C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 2)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(D)C(M)T(
E)C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 3)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(D)C(M)T(
E)C(M)C(F)A(M)C(F)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 4)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)U(F)G(F)A(M)A(M)A(M)C(E)U(
R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 5)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(F)A(M)A(M)C(E)U(
R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 6)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(E)U(
R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 7)

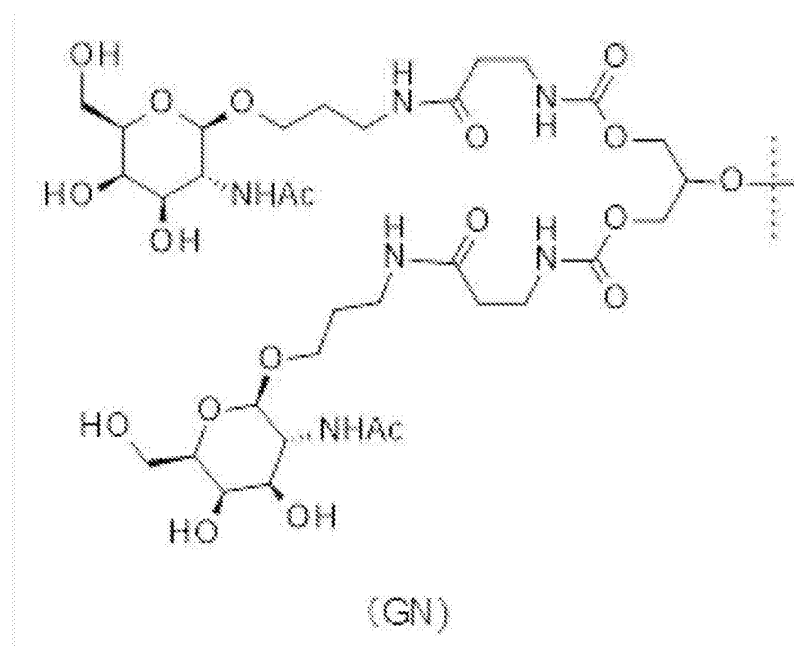
5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(E)U(
R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 8)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(F)A(M)C(M)U(
R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 1 9)

5' U(M)[^]U(F)[^]G(M)A(M)U(M)A(F)U(M)U(M)G(F)A(M)A(M)A(F)C(M)U(
R)[^]C(M)C(F)A(M)C(M)[^]G(M)[^]U(M)[^]U(M) 3' (I I - 2 0)

[式中、「GN」は下記式

[化4]



(式中、破線は隣接するセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'ーリン酸基とリン酸ジエステル結合していることを表す。)で表されるG a l N A cユニットを示し、核酸の塩基についてAはアデニン、Uはウラシル、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシン(ただし、CがE N Aのときは2'ーO, 4'ーCーエチレン架橋ー5ーメチルシチジンを示す)を示し、核酸について(R)はRNA、(D)はDNA、(M)は2'ーOMe RNA、(3M)は3'ーOMe RNA、(F)は2'ーF RNA、(E)はENAを示す。また、式中、「^」はヌクレオシド間の結合がホスホロチオエート結合(ーP(=S)(OH)ー)であることを示し、特に記載のない場合はヌクレオシド間の結合がリン酸ジエステル結合(ーP(=O)(OH)ー)であることを示す。センス鎖領域の3'末端のヌクレオチドの3'位、アンチセンス鎖領域の5'末端のヌクレオチドの5'位、及びアンチセンス鎖領域の3'末端のヌクレオチドの3'位はそれぞれ水酸基である。]

[請求項47]

請求項1～46のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

- [請求項48] トランスフェリン受容体2の発現を抑制することにより治療又は予防可能な疾患の治療又は予防のための、請求項47に記載の医薬組成物。
- [請求項49] 貧血の予防又は治療のための、請求項48に記載の医薬組成物。
- [請求項50] 貧血が、慢性炎症に伴う貧血又は骨髓機能不全に伴う貧血である、請求項49に記載の医薬組成物。
- [請求項51] 前記慢性炎症に伴う貧血が、自己免疫疾患に伴う貧血、感染症に伴う貧血、炎症性腸疾患に伴う貧血、心不全に伴う貧血、慢性腎臓病に伴う貧血、癌性貧血、又はキャッスルマン病に伴う貧血である、請求項50に記載の医薬組成物。
- [請求項52] 前記骨髓機能不全に伴う貧血が、骨髓線維症に伴う貧血、骨髓異形成症候群に伴う貧血、又は慢性骨髓単球性白血病に伴う貧血、化学療法による骨髓抑制に伴う貧血である、請求項50に記載の医薬組成物。
- [請求項53] 貧血治療薬、貧血の原因となる疾患の治療薬、又は鉄過剰症治療薬による治療を受けている患者を対象とする、請求項47～52記載の医薬組成物。
- [請求項54] 前記貧血治療薬、貧血の原因となる疾患の治療薬、又は鉄過剰症治療薬がルスパテルセプト又はルキシソリチニブである、請求項53記載の医薬組成物。
- [請求項55] 対象に、請求項1～46のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩の有効量を投与することを含む、貧血を治療又は予防する方法。
- [請求項56] 貧血の治療または予防における使用のための請求項1～46のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩。
- [請求項57] 請求項47～54のいずれか1つに記載の医薬組成物の製造における請求項1～46のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド又はその薬学上許容される塩の使用。