

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5468978号

(P5468978)

(45) 発行日 平成26年4月9日 (2014.4.9)

(24) 登録日 平成26年2月7日 (2014.2.7)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713

請求項の数 10 (全 169 頁)

(21) 出願番号	特願2010-106021 (P2010-106021)	(73) 特許権者	505175825
(22) 出願日	平成22年4月30日 (2010.4.30)		サーモ フィッシャー サイエнтиフィ
(62) 分割の表示	特願2006-509678 (P2006-509678)		ック バイオサイエンシズ インク、
原出願日	平成16年4月1日 (2004.4.1)		アメリカ合衆国 コロラド 80026,
(65) 公開番号	特開2010-172344 (P2010-172344A)		ラファイエット, クレセント ドライ
(43) 公開日	平成22年8月12日 (2010.8.12)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成22年4月30日 (2010.4.30)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	10/406,908	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成15年4月2日 (2003.4.2)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	10/613,077		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成15年7月1日 (2003.7.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA干渉において使用するための修飾ポリヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

s i RNAであって、

(a) 複数のヌクレオチドから構成されるアンチセンス鎖であって、最も5'側のヌクレオチドが第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドであり、該第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位がリン酸化された、アンチセンス鎖と、

(b) 複数のヌクレオチドから構成されるセンス鎖であって、最も5'側のヌクレオチドが第1の5'末端センス・ヌクレオチドであり、該第1の5'末端センス・ヌクレオチドのすぐ下流は、第2の5'末端センス・ヌクレオチドであり、該第1の5'末端センス・ヌクレオチドは第1の2'炭素センス修飾を含み、第2の5'末端センス・ヌクレオチドは第2の2'炭素センス修飾を含む、センス鎖と、

を含み、該2'炭素修飾を有するヌクレオチド以外のヌクレオチドの各々が2'-OHを有し、

該s i RNAが18と30との間の塩基対から構成され、

該第1の2'炭素センス修飾および該第2の2'炭素センス修飾の各々は、2'-O-メチル修飾である、

s i RNA。

【請求項2】

前記s i RNAが19と25との間の塩基対から構成される、請求項1に記載のs i RNA。

【請求項 3】

前記アンチセンス鎖および前記センス鎖が 100% 相補的であり、オーバーハングを含まない二重鎖を形成する、請求項 1 に記載の s i R N A。

【請求項 4】

R N A i 中に誘導されたオフ・ターゲット効果を減少させる方法であって、請求項 1 に記載の前記 s i R N A を細胞に インビトロ で導入することを含む、オフ・ターゲット効果減少方法。

【請求項 5】

R N A i 中のオフ・ターゲット効果を減少させる方法であって、s i R N A を標的核酸に インビトロ でさらすことを含み、前記 s i R N A がアンチセンス鎖およびセンス鎖を含み

10

、
(a) 前記センス鎖が、複数のヌクレオチドから構成され、最も 5' 末端のヌクレオチドが第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドであり、該第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドのすぐ下流は第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドであり、該第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドは第 1 の 2' 炭素修飾を含み、該第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドは第 2 の 2' 炭素修飾を含み、ならびに

(b) 前記アンチセンス鎖が、複数のヌクレオチドから構成され、最も 5' 側のヌクレオチドが第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドであり、該第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドの 5' 炭素位がリン酸化されており、

該 2' 炭素修飾を有するヌクレオチド以外のヌクレオチドの各々が 2' -OH を有し、

20

該 s i R N A が 18 と 30 との間の塩基対から構成され、

該第 1 の 2' 炭素センス修飾および該第 2 の 2' 炭素センス修飾の各々は、2' -O -メチル修飾である、

オフ・ターゲット効果減少方法。

【請求項 6】

前記 s i R N A が 19 と 25 との間の塩基対から構成される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記アンチセンス鎖および前記センス鎖が 100% 相補的であり、オーバーハングを含まない二重鎖を形成する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

30

ヘアピンを形成することができる単分子の s i R N A であって、

(a) 複数のヌクレオチドから構成されるアンチセンス領域であって、最も 5' 側のヌクレオチドが第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドであり、該第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドの 5' 炭素位がリン酸化される、アンチセンス領域と、

(b) 複数のヌクレオチドから構成されるセンス領域であって、最も 5' 側のヌクレオチドが第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドであり、第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドのすぐ下流が第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドであり、第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 1 の 2' 炭素センス修飾を含み、第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 2 の 2' 炭素センス修飾を含む、センス領域と、

(c) 前記センス領域と前記アンチセンス領域との間に位置したループ領域と、

40

を含み、該 2' 炭素修飾を有するヌクレオチド以外のヌクレオチドの各々が 2' -OH を有し、

該 s i R N A が 18 と 30 との間の塩基対から構成され、

該第 1 の 2' 炭素センス修飾および該第 2 の 2' 炭素センス修飾の各々は、2' -O -メチル修飾である、 s i R N A。

【請求項 9】

前記 s i R N A が、19 と 25 との間の塩基対から構成される、請求項 8 に記載の s i R N A。

【請求項 10】

R N A i 中のオフ・ターゲット効果を減少させる方法であって、

50

標的核酸に対して、ヘアピンを形成することができる単分子の *siRNA* を インビトロ でさらすことを含み、前記単分子の *siRNA* は、アンチセンス領域とセンス領域とを含み、

(a) 前記センス領域は、複数のヌクレオチドから構成され、最も 5' 側のヌクレオチドが第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドであり、第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドのすぐ下流が第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドであり、第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 1 の 2' 炭素センス修飾を含み、第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 2 の 2' 炭素センス修飾を含み、

(b) 前記アンチセンス領域は、複数のヌクレオチドから構成され、最も 5' 側のヌクレオチドが第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドであり、該第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドの 5' 炭素位がリン酸化され、さらに、

(c) 前記センス領域と前記アンチセンス領域との間に位置したループ領域を含み、該 2' 炭素修飾を有するヌクレオチド以外のヌクレオチドの各々が 2' -OH を有し、該 *siRNA* が 18 と 30 との間の塩基対から構成され、

該第 1 の 2' 炭素センス修飾および該第 2 の 2' 炭素センス修飾の各々は、2' -O-メチル修飾である、オフ・ターゲット効果減少方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は修飾ポリヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

哺乳類細胞での RNA 誘導遺伝子サイレンシング (*RNA-induced gene silencing*) は、現在のところ、最低でも 3 通りの異なる制御レベルが関係していると考えられている。すなわち、(i) 転写不活性化 (*siRNA* 誘導 DNA およびヒストン・メチル化)、(ii) 小さな干渉 RNA (*siRNA*) によって誘導された mRNA の分解、ならびに (iii) mRNA 誘導転写減衰である。*siRNA* によって発生する RNA 干渉 (*RNAi*) は、長時間にわたって効果があり、細胞分裂が多数繰り返されても効果を示すことができる。したがって、*siRNA* 媒介方法を介して遺伝子機能にアクセスする能力は、過剰発現遺伝子に対する治療法を開発するのと同様に、遺伝子機能分析、薬物標的の確証 (バリデーション)、および広範囲にわたるゲノム研究を促す刺激のかつ有益なツールを意味する。さらに、*RNAi* は治療的なツールとして幅広い可能性がある。

【0003】

RNA 代謝に関する分野での比較的最近の発見によって、二本鎖 RNA (*dsRNA*) の取り込みが *RNAi* を誘導し得ることが明らかになった。

【0004】

これらの状況下では、ダイサー (*Dicer*) と呼ばれる III 型 RNアーゼは、長い *dsRNA* を処理して *siRNA* にするもので、該 *siRNA* はその後 RNA 誘導サイレンシング複合体 (*RISC*) と協力して配列特異的に標的転写産物の分解をもたらす。この現象は、多種多様な生物体で見られた。残念なことに、哺乳動物細胞では、長い *dsRNA* を用いた *RNAi* の誘導は、ある程度の成功が得られたに過ぎなかった。主に、このような無効性は、インターフェロン反応の誘導によるものであり、該反応は、標的化されたものとは対照的に、一般的なタンパク質合成の阻害をもたらす。

【0005】

最近では、培養液中で哺乳動物細胞に合成 *siRNA* を導入する場合、標的 mRNA の配列特異的阻害を、インターフェロン反応の誘導を伴うことなく、実現することができる。これらの短い二本鎖は、モル濃度以下 (*sub-molar concentration*)

ons)で触媒的に作用して、95%を越える細胞内標的mRNAを切断する。siRNA活性のメカニズム、ならびにその用途のいくつかについては、Provost et al., Ribonuclease Activity and RNA Binding of Recombinant Human Dicer, E. M. B. O. J., 2002 Nov., 1, 21 (21): 5864-5874; Tabara et al., The dsRNA Binding Protein RDE-4 Interacts with RDE-1, DCR-1 and a DexH-box Helicase to Direct RNAi in C. elegans, Cell. 2002, June 28, 109 (7): 861-71; Ketting et al., Dicer Functions in RNA Interference and in Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in C. elegans; および Martinez et al., Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi, Cell 2002, Sept. 6, 110 (5): 563に記載されている。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

siRNAを用いて作業をおこなう場合、解決しなければならない主要な問題が4つある。すなわち、(i)機能性、(ii)特異性、(iii)送達方法、および(iv)安定性である。機能性とは、特定のsiRNAが所望の標的をサイレンシングする能力のことをいう。機能性を改善するための方法は、例えば、例えば、米国特許出願第10/714,333号の主題である。特異性とは、特定のsiRNAが、所望の標的、しかもその標的のみをサイレンシングする能力のことをいう。したがって、特異性は、オフ・ターゲット効果(off-target effects)を最小限化することを意味する。送達方法は、ユーザが特定のsiRNAを細胞に導入する手段であり、例えばベクターまたはsiRNAそれ自体の修飾を用いることを含むものであってもよい。安定性とは、細胞内または細胞外環境に存在する酵素または他の有害な物質による分解を抑えるsiRNAの能力のことをいう。例えば、裸siRNA分子を血液、血清、または血清含有培地に導入する場合、裸siRNA分子は安定ではなく、ほとんどが素早く分解されて裸siRNA分子の効力が減少または除去される。

20

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、特異性を増加または減少させること、および／または安定性を増加させることができるsiRNAに対する修飾をおこなうことで、第2および第4の問題(すなわち、特異性および安定性)を解決する。

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、RNA干渉を実施するための組成物および方法に関する。一般に、本明細書に記載されたsiRNA化学修飾は、それが結合した分子の2つの重大な性質、すなわち安定性と特異性に影響を及ぼす。安定性に影響を及ぼすそのような修飾は、核酸を分解させる傾向があるヌクレアーゼまたは他の因子を含む血液、血清、血清含有培地、および他の生物物質への曝露を必要とする応用での使用にとって、特に有利である。特定の標的に向けられるsiRNAによって誘導されたオフ・ターゲット効果(off-target effects)の度合いを減少させる修飾は、研究および治療的な設定にとって特に有益である。実質的にRNAi適用を改善する修飾の多数の異なる組み合わせが開示されており、またこれらの組み合わせは最適サイレンシング試薬、形質移入制御、およびエクサエクオ(ex aequo)試薬の設計に適用可能である。

40

【0009】

第1の実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチ

50

ドから構成されるポリヌクレオチドを含むセンス鎖と、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド単位から構成されるポリヌクレオチドを含むアンチセンス鎖とを有する s i R N A を提供する。

【0010】

第2の実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチドを含むセンス鎖と、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド単位から構成されるポリヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、コンジュゲートとを有する s i R N A を提供する。

【0011】

第3の実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドを含むセンス鎖と、アンチセンス鎖と、コンジュゲートとを有する s i R N A を提供する。

10

【0012】

第4の実施形態によれば、本発明は、センス鎖と、アンチセンス鎖と、コンジュゲートとを有する s i R N A を提供し、センス鎖および／またはアンチセンス鎖が少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドを有する。

【0013】

第5の実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドを含むセンス鎖と、2'ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'アミン修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、および2'アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるコンジュゲートとを有し、ポリリボヌクレオチドが18個と30個との間のヌクレオチド塩基対を含む s i R N A を提供する。

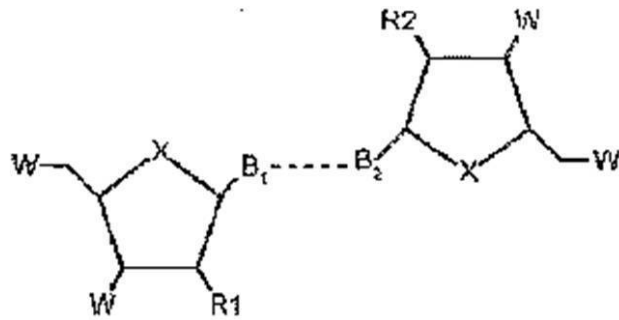
20

【0014】

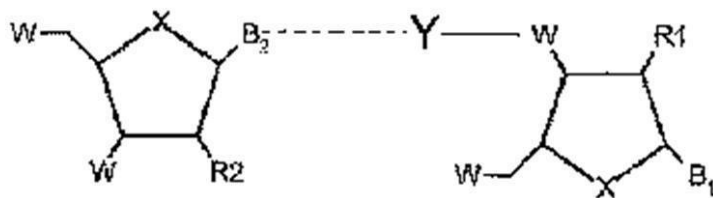
第6の実施形態によれば、本発明は以下の構造の一つを含む。

【0015】

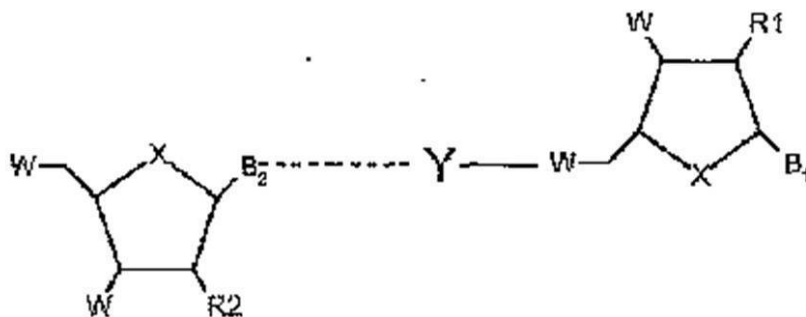
【化 2】



または



または



式中、 B_1 および B_2 の各々は、窒素塩基、複素環、または炭素環式化合物であり、 X は、 O 、 S 、 C 、および N からなる群から選択され、 W は、 OH 、リン酸塩、リン酸エステル、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、修飾ヌクレオチド間連結、コンジュゲート、ヌクレオチド、およびポリヌクレオチドからなる群から選択され、 R_1 は、オルトエステルであり、 R_2 は、 $2'$ - O -アルキル基、アルキル基、アミン、ハロゲンからなる群から選択され、ならびに Y はヌクレオチドまたはポリヌクレオチドである。 B_1 と B_2 とのあいだの破線は、窒素含有塩基間の水素結合による相互作用を示す。

【0016】

第7の実施形態によれば、本発明はRNA干渉を実施する方法を提供する。この方法は、 $siRNA$ を標的核酸にさらすことを含み、この $siRNA$ はセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成され、センス鎖およびアンチセンス鎖の少なくとも1つが、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドを含む。

【0017】

第8の実施形態によれば、本発明はRNA干渉を実施する別の方法を提供する。この方法は、 $siRNA$ を標的核酸にさらすことを含み、この $siRNA$ はセンス鎖、アンチセンス鎖、およびコンジュゲートから構成される。この実施形態によれば、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかが $2'$ 修飾ヌクレオチドから構成される。

【0018】

本発明の第1～第8の実施形態の組成物は、ヌクレアーゼ分解に対して耐性を示す $siRNA$ を与えることができ、その一方で生物学的機能性を保つ。例えば、少なくとも1つ

10

20

30

40

50

のオルトエステル修飾ヌクレオチドを持つ s i R N A（例えば、センス鎖上のもの）と少なくとも1つの他の修飾（例えば、アンチセンス鎖上の適当な位置にあるもの）とを用いることで、R N A干渉用途での機能性を保ちながら安定性を高めることができる。さらに、R N A干渉用途で、コンジュゲートと共に、1種類以上の2'修飾を持つ s i R N Aおよび／または修飾ヌクレオチド間連結を用いることによって、各々の鎖上にオルトエステル修飾が存在しない場合でも、機能性を保ちながら安定性を高めることができる。

【0019】

第9の実施形態によれば、本発明はR N A干渉を実施する方法を提供するもので、該方法は、s i R N Aを標的核酸にさらすことを含み、このs i R N Aがセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成され、さらにセンス鎖が実質的に非機能的である。

10

【0020】

第10の実施形態によれば、本発明はR N A干渉を実施する方法を提供するもので、該方法は、s i R N Aを標的核酸にさらすことを含み、このs i R N Aが、(a)コンジュゲートと、(b)少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾を含み、実質的に非機能的であるセンス鎖と、(c)少なくとも1つの2'-フッ素修飾を含むアンチセンス鎖とを含み、センス鎖とアンチセンス鎖とが18～30塩基対の二本鎖を形成する。

【0021】

第11の実施形態によれば、本発明は、

(a) (i) 第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドであって、第1の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第2の5'末端センス・ヌクレオチドである、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドと、

20

(i i) 少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドであって、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドまたは上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドとは異なるヌクレオチドである、少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドと、から構成されるセンス鎖と、

(b) (i) 少なくとも1つの2'ハロゲン修飾ピリミジン・ヌクレオチド、ならびに (i i) 第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドであって、5'炭素位がリン酸化された第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成されるアンチセンス鎖と、

30

から構成され、

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、18と30との間の塩基対の二本鎖を形成することができる、s i R N Aを提供する。

【0022】

第11の実施形態の分子を、標的のサイレンシングに用いること、および／あるいは対照として用いることも可能である。これらの分子は、蛍光標識等の標識、および／または第3の2'-O-アルキル／センス修飾を含む第3の5'末端センス・ヌクレオチドを、さらに含むものであってもよい。

【0023】

第12の実施形態によれば、本発明は、

40

(a) (i) 第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドであって、第1の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第2の5'末端センス・ヌクレオチドである、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドと、

(i i) 少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドであって、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドまたは上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドとは異なるヌクレオチドである、少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドと、

から構成されるセンス鎖と、

50

(b) (i) 第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドであって、第1の2'-O-アルキル・アンチセンス修飾を含む第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の2'-O-アルキル・アンチセンス修飾を含む第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドである、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと、

(ii) 少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾アンチセンス・ヌクレオチドであって、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび上記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとは異なるヌクレオチドである、少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾アンチセンス・ヌクレオチドと、

から構成されるアンチセンス鎖と、

から構成され、

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、16と28との間の塩基対の二本鎖を形成することができる、siRNAを提供する。

【0024】

好ましくは、第12の実施形態の分子もまた、例えば蛍光色素であってもよい標識を含み、ならびに／または第3の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第3の5'末端センス・ヌクレオチドおよび／もしくは第3の2'-O-アルキル・アンチセンス修飾を含む第3の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドを含む。第12の実施形態の分子は、例えば19～25塩基対、または例えば19～28塩基対の二本鎖を形成することができる。

【0025】

第13の実施形態によれば、本発明は、

(a) 第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成されるアンチセンス鎖であって、この第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドは、この第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されてる、アンチセンス鎖と、

(b) 第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成されるセンス鎖であって、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を有し、また上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を有する、センス鎖と、

を含む、siRNAを提供する。

【0026】

好ましくは、上記2'-修飾が2'-O-アルキル修飾である。この実施形態によれば、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、少なくとも実質的に相補的である18～30塩基対を、好ましくは含む。

【0027】

第14の実施形態によれば、本発明は、ヘアピンsiRNAを形成することができる単分子のsiRNAに関する。この単分子siRNAは、

(a) アンチセンス領域であって、該アンチセンス領域が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成されており、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがこの第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化される、アンチセンス領域と、

(b) センス領域であって、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を有し、第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を有する、センス領域と、

(c) 上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置したループ領域と、を含む。

【0028】

この第14の実施形態によれば、センス領域およびアンチセンス領域が少なくとも実質的に相補的であり、安定な二本鎖を形成することが可能である。第13の実施形態と同様に、この第14の実施形態によれば、上記センス領域および上記アンチセンス領域が、好

10

20

30

40

50

ましくは18～30塩基対を含む二本鎖を形成する。好ましくは、上記ループ領域がアンチセンス領域の下流である。

【0029】

第15の実施形態によれば、本発明はオフ・ターゲット効果を最小化させるための方法に関し、この方法は、標的核酸に対して、または標的核酸を発現している、もしくは発現することができる細胞に対して、siRNAをさらすことを含むもので、上記siRNAがアンチセンス鎖とセンス鎖とを含み、

(a) 上記センス鎖が、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を有し、第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を有し、ならびに

(b) 上記アンチセンス鎖が、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成されており、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがこの第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されている。

【0030】

第16の実施形態によれば、オフ・ターゲット効果を最小化させるための方法に関し、この方法は、標的核酸に対して、または標的核酸を発現している、もしくは発現することができる細胞に対して、ヘアピンを形成することができる修飾された単分子のsiRNAをさらすことを含む、上記単分子siRNAが、アンチセンス領域とセンス領域とから構成され、

(a) 上記センス鎖が、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を有し、第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を有し、

(b) 上記アンチセンス鎖が、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成されており、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがこの第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されおり、さらに、

(c) 上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置したループ領域を含む。

【0031】

好ましくは、上記ループ領域がアンチセンス領域の下流に位置している。

【0032】

第17の実施形態によれば、本発明はsiRNAに関するもので、該siRNAは、

(a) アンチセンス鎖であって、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第1の2'炭素アンチセンス修飾を有し、また上記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第2の2'炭素アンチセンス修飾を有し、さらに上記第1の5'末端のアンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位で上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがリン酸化されている、アンチセンス鎖と、

(b) センス鎖であって、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を有し、第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を有する、センス鎖と、

を含む。

【0033】

好ましくは、上記2'炭素修飾が2'-O-アルキル修飾である。この第17の実施形態によれば、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、好ましくは、少なくとも実質的に相補的である18～30塩基対を含む。

【0034】

第18の実施形態によれば、本発明はヘアピンsiRNAを形成することができる単分子siRNAに関するもので、該単分子siRNAは、

(a) アンチセンス領域であって、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成され、

第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第1の2'炭素アンチセンス修飾を含み、第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第2の2'炭素アンチセンス修飾を含み、さらに上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位で上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがリン酸化されている、アンチセンス領域と、

(b) センス領域であって、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を含む、センス領域と、

(c) 上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置するループ領域と、を含む。

【0035】

この第18の実施形態によれば、上記センス領域および上記アンチセンス領域が実質的に相補的であり、安定な二本鎖を形成することが可能である。第14の実施形態に類似して、この第18の実施形態によれば、上記センス領域および上記アンチセンス領域は、好ましくは、少なくとも実質的に相補的である18〜30塩基対を含む二本鎖を形成する。好ましくは、上記ループ領域がアンチセンス領域の下流に位置している。

【0036】

第19の実施形態によれば、本発明は、オフ・ターゲット効果を最小化させるための方法に関し、この方法は、標的核酸に対して、または該標的核酸を発現している、もしくは発現することができる細胞に対して、siRNAをさらすことを含み、該siRNAがアンチセンス鎖とセンス鎖とを含み、

(a) 上記センス鎖が、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を有し、第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を有し、

(b) 上記アンチセンス鎖が、第1の2'炭素アンチセンス修飾を有する第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の2'炭素アンチセンス修飾を有する第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成され、該第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位で第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがリン酸化されている。

【0037】

第20の実施形態によれば、本発明はオフ・ターゲット効果を最小化させるための方法に関し、この方法は標的核酸に対して、または該標的核酸を発現している、もしくは発現することができる細胞に対して、ヘアピンsiRNAを形成することができる単分子のsiRNAをさらすことを含み、上記単分子siRNAが、アンチセンス領域およびセンス領域を含み、

(a) 上記センス領域が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を有し、また上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を有し、

(b) 上記アンチセンス領域が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第1の2'炭素アンチセンス修飾を有し、また上記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第2の2'炭素アンチセンス修飾を有し、さらに上記第1の5'アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位で、上記第1の5'アンチセンス・ヌクレオチドがリン酸化されており、

(c) ループ領域が上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置している。

【0038】

好ましくは、上記ループ領域が上記アンチセンス領域の下流にある。

【0039】

本発明は、s i R N A適用のための制御、トラッキング剤、およびエクサエクオ (e x a e q u o) 剤も提供する。これらの薬剤は、リン酸化5'末端アンチセンス・ヌクレオチドを含まないという点を除いて、第17および第18の実施形態の分子を含む。したがって、これらの薬剤は、(i) 各々が2'炭素アンチセンス修飾、好ましくは2'-O-アルキル修飾、より好ましくは2'-O-メチル修飾を含む第1および第2 (または第1、第2、および第3) の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと、(i i) 各々が2'炭素センス修飾、好ましくは2'-O-アルキル修飾、より好ましくは2'-O-メチル修飾を含む第1および第2 (または第1、第2、および第3) の5'末端センス・ヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、例えば蛍光標識であり、また第1の5'末端センス・ヌクレオチド上に位置している標識以外の他のヌクレオチドが、いずれも修飾を受けていない。また、2'-O-アルキル基による1つ以上のセンス・ピリミジンの修飾、および/または2'-ハロゲン基による1つ以上のアンチセンス・ピリミジンの修飾の修飾、あるいは/またはセンスおよび/もしくはアンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドの5'炭素上にあるブロック基があってもよい。

10

【0040】

本発明はまた、以下の項目を提供する。

(項目1)

R N A干渉を実施する方法であって、s i R N Aを標的核酸にさらすことを含み、上記 s i R N Aはセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成され、さらに上記センス鎖は実質的に非機能的である、R N A干渉実施方法。

20

(項目2)

上記センス鎖が少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾を含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

上記センス鎖が少なくとも1つのシトシン含有ヌクレオチド塩基またはウラシル含有ヌクレオチド塩基を含み、上記少なくとも1つのシトシン含有ヌクレオチド塩基またはウラシル含有ヌクレオチド塩基が2'-O-メチル修飾を有する、項目2に記載の方法。

(項目4)

上記2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル修飾である、項目2に記載の方法。

30

(項目5)

上記少なくとも1つの2'-O-メチル修飾が、第1、第2、第18、および/または第19のヌクレオチド塩基上にある、項目4に記載の方法。

(項目6)

上記センス鎖が、さらに5'コンジュゲートを含む、項目1に記載の方法。

(項目7)

上記コンジュゲートがコレステロールである、項目6に記載の方法。

(項目8)

上記センス鎖が3'末端にキャップを有する、項目1に記載の方法。

(項目9)

上記キャップが、逆位のデオキシチミジンまたは2つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドである、項目8に記載の方法。

40

(項目10)

上記アンチセンス鎖が少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、項目1に記載の方法。

(項目11)

上記少なくとも1つの修飾ヌクレオチドが2'-ハロゲン修飾ヌクレオチドである、項目10に記載の方法。

(項目12)

上記2'-ハロゲン修飾ヌクレオチドが2'-フッ素修飾ヌクレオチドである、項目11に記載の方法。

50

(項目 1 3)

上記センス鎖が1つ以上のシトシン含有ヌクレオチド塩基および／またはウラシル含有ヌクレオチド塩基を含み、上記1つ以上のシトシン含有ヌクレオチド塩基および／またはウラシル含有ヌクレオチド塩基の各々が、2'-フッ素修飾されている、項目1に記載の方法。

(項目 1 4)

RNA干渉を実施する方法であって、siRNAを標的核酸にさらすことを含み、上記siRNAは、

(a) コンジュゲートと、

(b) 少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾を含み、実質的に非機能的であるセンス鎖と、

(c) 少なくとも1つの2'-フッ素修飾を含むアンチセンス鎖と、

を含み、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が18～30塩基対の二重鎖を形成する、RNA干渉実施方法。

(項目 1 5)

上記少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾が、第1、第2、第18、および／または第19のヌクレオチド塩基上にある、項目14に記載の方法。

(項目 1 6)

上記コンジュゲートが5'コンジュゲートである、項目14に記載の方法。

(項目 1 7)

上記コンジュゲートがコレステロールである、項目14に記載の方法。

(項目 1 8)

上記センス鎖が、さらに3'末端にキャップを有する、項目14に記載の方法。

(項目 1 9)

上記キャップが、逆位のデオキシチミジンまたは2つの連続した2'-O-メチル修飾ヌクレオチドである、項目18に記載の方法。

(項目 2 0)

RNA干渉を実施する方法であって、siRNAを標的核酸にさらすことを含み、上記siRNAはセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成され、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも1つが、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドを含む、RNA干渉実施方法。

(項目 2 1)

上記少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドが、上記センス鎖上に位置している、項目20に記載の方法。

(項目 2 2)

上記アンチセンス鎖が、2'ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'アミン修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、および2'アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも1つのヌクレオチドを含む、項目21に記載の方法。

(項目 2 3)

上記アンチセンス鎖が、少なくとも1つの2'ハロゲン修飾ヌクレオチドを含み、上記ハロゲンがフッ素である、項目22に記載の方法。

(項目 2 4)

上記siRNAが、さらにコンジュゲートを含む、項目21に記載の方法。

(項目 2 5)

上記コンジュゲートが、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭化水素、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目24に記載の方法。

(項目 2 6)

上記コンジュゲートがコレステロールである、項目24に記載の方法。

(項目 2 7)

10

20

30

40

50

上記コンジュゲートがポリエチレングリコールである、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 8)

上記 s i R N A が 1 8 ～ 3 0 ヌクレオチド塩基対を含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 9)

上記 s i R N A が 1 9 ヌクレオチド塩基対を含む、請求鋼 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

上記 s i R N A が、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なく 1 つ上に、少なくとも 1 つのヌクレオチド・ユニットのオーバーハングを有する、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 3 1)

s i R N A の少なくとも 1 本の鎖が、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結を含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

上記修飾ヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート結合とホスホロジチオエート結合とからなる群から選択される、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

上記 s i R N A の少なくとも一方の鎖が、ポリリボヌクレオチドである、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 3 4)

R N A 干渉を実施する方法であって、s i R N A を標的核酸にさらすことを含み、上記 s i R N A が、

(a) センス鎖と、

(b) アンチセンス鎖と、

(c) コンジュゲートと、

から構成され、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、2 ' 修飾ヌクレオチドを含む、R N A 干渉実施方法。

(項目 3 5)

s i R N A であって、

(a) 少なくとも 1 つのオルトエステル修飾ヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチドを含むセンス鎖と、

(b) 少なくとも 1 つの 2 ' 修飾ヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチドを含むアンチセンス鎖と、

を含む、s i R N A。

(項目 3 6)

上記アンチセンス鎖が、2 ' ハロゲン修飾ヌクレオチド、2 ' アミン修飾ヌクレオチド、2 ' -O-アルキル修飾ヌクレオチド、および 2 ' アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチドを含む、項目 3 5 に記載の s i R N A。

(項目 3 7)

上記 2 ' 修飾ヌクレオチドが 2 ' ハロゲン修飾ヌクレオチドであり、上記ハロゲンがフッ素である、項目 3 6 に記載の s i R N A。

(項目 3 8)

さらにコンジュゲートを含む、項目 3 5 に記載の s i R N A。

(項目 3 9)

上記コンジュゲートが、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 3 8 に記載の s i R N A。

(項目 4 0)

上記コンジュゲートがコレステロールである、項目 3 8 に記載の s i R N A。

(項目 4 1)

上記コンジュゲートがポリエチレングリコールである、項目 3 8 に記載の s i R N A。

(項目 4 2)

10

20

30

40

50

上記 s i R N A が 1 8 ～ 3 0 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 3 5 に記載の s i R N A。

(項目 4 3)

上記 s i R N A が 1 9 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 4 2 に記載の s i R N A
。

(項目 4 4)

さらに、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つの上に、少なくとも 1
つのヌクレオチド・ユニットのオーバーハングを有する、項目 3 5 に記載の s i R N A。

(項目 4 5)

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの修飾ヌク
レオチド間連結を含む、項目 3 5 に記載の s i R N A。

(項目 4 6)

上記修飾ヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート結合とホスホロジチオエート結合と
からなる群から選択される、項目 4 5 に記載の s i R N A。

(項目 4 7)

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、ポリリボヌクレオチドであ
る、項目 3 5 に記載の s i R N A。

(項目 4 8)

s i R N A であって、

(a) 少なくとも 1 つのオルトエステル修飾ヌクレオチドから構成されるポリヌクレオ
チドを含むセンス鎖と、

(b) 少なくとも 1 つの 2 ' 修飾ヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチドを含む
アンチセンス鎖と、

(c) コンジュゲートと、
を含む、s i R N A。

(項目 4 9)

上記コンジュゲートが上記センス鎖上に位置している、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 5 0)

上記コンジュゲートが上記アンチセンス鎖上に位置している、項目 4 8 に記載の s i R N
A。

(項目 5 1)

上記アンチセンス鎖が、2 ' ハロゲン修飾ヌクレオチド、2 ' アミン修飾ヌクレオチド、
2 ' -O-アルキル修飾ヌクレオチド、および 2 ' アルキル修飾ヌクレオチドからなる群
から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチドを含む、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 5 2)

上記センス鎖が 2 ' ハロゲン修飾ヌクレオチドから構成され、上記ハロゲンがフッ素であ
る、項目 5 1 に記載の s i R N A。

(項目 5 3)

上記コンジュゲートが、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物
、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからな
る群から選択される、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 5 4)

上記コンジュゲートがコレステロールである、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 5 5)

上記コンジュゲートがポリエチレングリコールである、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 5 6)

上記 s i R N A が 1 8 ～ 3 0 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 4 8 に記載の s i
R N A。

(項目 5 7)

上記 s i R N A が 1 9 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 5 6 に記載の s i R N A

10

20

30

40

50

。

(項目 5 8)

さらに、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つ上に、少なくとも 1 つのヌクレオチド・ユニットのオーバーハングを有する、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 5 9)

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結を含む、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 6 0)

上記修飾ヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート結合とホスホロジチオエート結合とからなる群から選択される、項目 5 9 に記載の s i R N A。

(項目 6 1)

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、ポリリボヌクレオチドである、項目 4 8 に記載の s i R N A。

(項目 6 2)

s i R N A であって、

(a) 少なくとも 1 つのオルトエステル修飾ヌクレオチドから構成されるセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖と、

(c) コンジュゲートと、

を含む、s i R N A。

(項目 6 3)

上記コンジュゲートが上記センス鎖上に位置している、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 6 4)

上記 が上記アンチセンス鎖上に位置している、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 6 5)

上記アンチセンス鎖が、2' ハロゲン修飾ヌクレオチド、2' アミン修飾ヌクレオチド、2' -O-アルキル修飾ヌクレオチド、および 2' アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも 1 つのヌクレオチドを含む、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 6 6)

上記アンチセンス鎖が、2' ハロゲン修飾ヌクレオチドから構成され、上記ハロゲンがフッ素である、項目 6 5 に記載の s i R N A。

(項目 6 7)

上記コンジュゲートが、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 6 8)

上記コンジュゲートがコレステロールである、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 6 9)

上記コンジュゲートがポリエチレングリコールである、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 7 0)

上記 s i R N A が 1 8 ~ 3 0 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 7 1)

上記 s i R N A が 1 9 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 7 0 に記載の s i R N A

。

(項目 7 2)

さらに、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なく 1 つ上に、少なくとも 1 つのヌクレオチド・ユニットのオーバーハングを有する、項目 6 2 に記載の s i R N A。

(項目 7 3)

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結を含む、項目 6 2 に記載の s i R N A。

10

20

30

40

50

- (項目 7 4)
上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、ポリリボヌクレオチドである、項目 6 2 に記載の s i R N A。
- (項目 7 5)
s i R N A であって、
 (a) センス鎖と、
 (b) アンチセンス鎖と、
 (c) コンジュゲートと、
を含み、上記センス鎖および／またはアンチセンス鎖が少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドを含む、s i R N A。
- (項目 7 6)
上記 2' 修飾ヌクレオチドが、2' ハロゲン修飾ヌクレオチド、2' アミン修飾ヌクレオチド、2' -O-アルキル修飾ヌクレオチド、および 2' アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 7 7)
上記 2' 修飾ヌクレオチドが 2' ハロゲン修飾ヌクレオチドであり、上記ハロゲンがフッ素である、項目 7 6 に記載の s i R N A。
- (項目 7 8)
上記コンジュゲートが、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 7 9)
上記コンジュゲートがコレステロールである、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 8 0)
上記コンジュゲートがポリエチレングリコールである、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 8 1)
上記 s i R N A が 1 8 ~ 3 0 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 8 2)
上記 s i R N A が 1 9 ヌクレオチド塩基対から構成される、項目 7 5 に記載の s i R N A
- (項目 8 3)
さらに、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なく 1 つ上に、少なくとも 1 つのヌクレオチド・ユニットのオーバーハングを有する、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 8 4)
上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結を含む、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 8 5)
上記修飾ヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート結合とホスホロジチオエート結合とからなる群から選択される、項目 8 4 に記載の s i R N A。
- (項目 8 6)
上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも 1 つが、ポリリボヌクレオチドである、項目 7 5 に記載の s i R N A。
- (項目 8 7)
s i R N A であって、
 (a) 少なくとも 1 つの 2' オルトエステル修飾ヌクレオチドから構成されるセンス鎖と、
 (b) 2' ハロゲン修飾ヌクレオチド、2' アミン修飾ヌクレオチド、2' -O-アルキル修飾ヌクレオチド、および 2' アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドから構成されるアンチセンス鎖と、

10

20

30

40

50

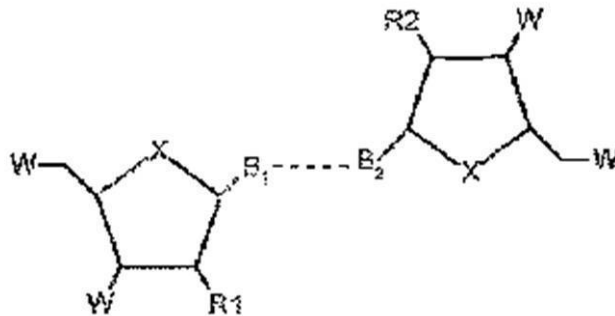
(c) アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるコンジュゲートと、

を含み、上記ポリヌクレオチドが18個と30個との間のヌクレオチド塩基対を含む、
siRNA。

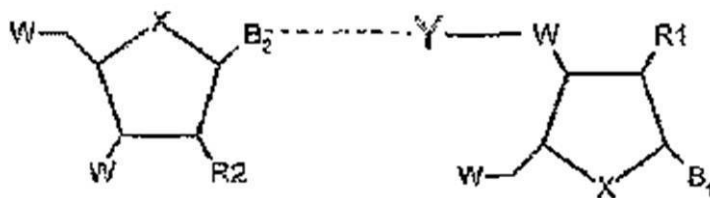
(項目88)

組成物であって、

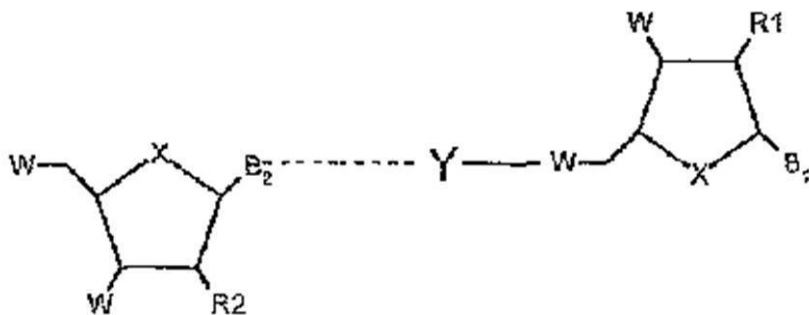
【化1】



または



または



を含み、

B_1 と B_2 の各々は、窒素含有塩基、複素環、または炭素環式化合物であり、

Xは、O、S、C、およびNからなる群から選択され、

Wは、OH、リン酸塩、リン酸エステル、リン酸ジエステル、リン酸トリエステル、修飾ヌクレオチド間連結、コンジュゲート、ヌクレオチド、およびポリヌクレオチドからなる群から選択され、

R1は、オルトエステルであり、

R2は、2'-O-アルキル基、アルキル基、およびアミン、さらにハロゲンからなる群から選択され、ならびに

Yは、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドである、組成物。

(項目89)

siRNAであって、

10

20

30

40

50

- (a) センス鎖であって、
 (i) 第1の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第2の5'末端センス・ヌクレオチド、ならびに
 (ii) 上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドとも上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドとも異なるヌクレオチドである少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチド、
 から構成されるセンス鎖と、
 (b) アンチセンス鎖であって、
 (i) 少なくとも1つの2'ハロゲン修飾ピリミジン・ヌクレオチド、ならびに
 (ii) 5'炭素位がリン酸化された第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド、
 から構成されるアンチセンス鎖と、
 から構成され、
 上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、18塩基対と30塩基対との間の二重鎖を形成することができる、s i R N A。
- (項目90)
 上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、19塩基対と25塩基対との間の二重鎖を形成することができる、項目89に記載のs i R N A。
- (項目91)
 さらに標識を含む、項目89に記載のs i R N A。
- (項目92)
 上記標識が、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドに付着している、項目91に記載のs i R N A。
- (項目93)
 上記標識が蛍光色素である、項目92に記載のs i R N A。
- (項目94)
 上記センス鎖上の全てのピリミジンが、2'-O-アルキル修飾を含む、項目89に記載のs i R N A。
- (項目95)
 上記アンチセンス鎖上の全てのピリミジンが、2'-フッ素修飾を含む、項目89に記載のs i R N A。
- (項目96)
 上記第1の2'-O-アルキル・センス修飾、上記第2の2'-O-アルキル・センス修飾、および上記少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドの各々が2'-O-メチルを含む、項目89に記載のs i R N A。
- (項目97)
 上記ハロゲンがフッ素である、項目89に記載のs i R N A。
- (項目98)
 上記第1の2'-O-アルキル・センス修飾が2'-O-メチルであり、上記第2の2'-O-アルキル・センス修飾が2'-O-メチルであり、上記少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドが2'-O-メチルを含み、上記ハロゲンがフッ素であり、ならびに上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドがさらに蛍光色素を含む、項目89に記載のs i R N A。
- (項目99)
 さらに、少なくとも1つのホスホロチオエートを含む、項目89に記載のs i R N A。
- (項目100)
 さらに、少なくとも1つのメチルホスホネートを含む、項目89に記載のs i R N A。
- (項目101)
 s i R N Aであって、
 (a) センス鎖であって、

10

20

30

40

50

(i) 第1の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の2'-O-アルキル・センス修飾を含む第2の5'末端センス・ヌクレオチド、ならびに

(ii) 上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドとも上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドとも異なるヌクレオチドである少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチド、

から構成されるセンス鎖と、

(b) アンチセンス鎖であって、

(i) 第1の2'-O-アルキル・アンチセンス修飾を含む第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の2'-O-アルキル・アンチセンス修飾を含む第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド、ならびに

(ii) 上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとも上記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとも異なるヌクレオチドである少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾アンチセンス・ヌクレオチド、

から構成されるアンチセンス鎖と、

から構成され、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、16塩基対と28塩基対との間の二重鎖を形成することができる、siRNA。

(項目102)

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、19~28塩基対の二重鎖を形成することができる、項目101に記載のsiRNA。

(項目103)

上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が、19~25塩基対の二重鎖を形成することができる、項目101に記載のsiRNA。

(項目104)

上記センス鎖上の全てのピリミジンが2'-O-アルキル修飾を含む、項目101に記載のsiRNA。

(項目105)

上記アンチセンス鎖上の全てのピリミジンが2'-O-アルキル修飾を含む、項目101に記載のsiRNA。

(項目106)

上記第1の2'-O-アルキル・センス修飾、上記第2の2'-O-アルキル・センス修飾、上記第1の2'-O-アルキル・アンチセンス修飾、上記第2の2'-O-アルキル・アンチセンス修飾、上記少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾センス・ヌクレオチド、および上記少なくとも1つの2'-O-アルキル・ピリミジン修飾アンチセンス・ヌクレオチドの各々が、2'-O-メチルを含む、項目101に記載のsiRNA。

(項目107)

さらに標識を含む、項目101に記載のsiRNA。

(項目108)

上記標識が、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドに付着している、項目107に記載のsiRNA。

(項目109)

上記標識が蛍光色素である、項目107に記載のsiRNA。

(項目110)

さらに、少なくとも1つのホスホロチオエートを含む、項目101に記載のsiRNA。

(項目111)

さらに、少なくとも1つのメチルホスホネートを含む、項目101に記載のsiRNA。

(項目112)

遺伝子サイレンシングの方法であって、標的遺伝子を発現している、または該標的遺伝子を発現することができる細胞内へ、項目89のsiRNAを導入することを含む、遺伝子

10

20

30

40

50

サイレンシング方法。

(項目 1 1 3)

コントロール試薬を用いることを含む遺伝子サイレンシングを実施する方法であって、

項目 1 0 1 の s i R N A であるコントロール試薬を用いるステップと、

標的遺伝子を発現している、または該標的遺伝子を発現することができる細胞内へ、上記コントロール試薬を導入するステップと、

を含む、遺伝子サイレンシング実施方法。

(項目 1 1 4)

s i R N A であって、

(a) 第 1 の 5 ' 末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、該第 1 の 5 ' 末端アンチセンス・ヌクレオチドの 5 ' 炭素位がリン酸化されたアンチセンス鎖と、

(b) 第 1 の 2 ' 炭素センス修飾を有する第 1 の 5 ' 末端センス・ヌクレオチドおよび第 2 の 2 ' 炭素センス修飾を有する第 2 の 5 ' 末端センス・ヌクレオチドから構成されるセンス鎖と、

を含む、s i R N A。

(項目 1 1 5)

上記第 1 の 2 ' 炭素センス修飾および上記第 2 の 2 ' 炭素センス修飾の各々が、2 ' -O-アルキル修飾である、項目 1 1 4 に記載の s i R N A。

(項目 1 1 6)

さらに、第 3 の 5 ' 末端センス・ヌクレオチドを含み、上記第 3 の 5 ' 末端センス・ヌクレオチドが 2 ' -O-アルキル修飾を含む、項目 1 1 5 に記載の s i R N A。

(項目 1 1 7)

上記 2 ' -O-アルキル修飾の少なくとも 1 つが、2 ' -O-メチル修飾である、項目 1 1 5 に記載の s i R N A。

(項目 1 1 8)

上記 2 ' -O-アルキル修飾の各々が、2 ' -O-メチル修飾である、項目 1 1 5 に記載の s i R N A。

(項目 1 1 9)

上記 s i R N A が 1 8 と 3 0 との間の塩基対から構成される、項目 1 1 5 に記載の s i R N A。

(項目 1 2 0)

上記 s i R N A が 1 9 と 2 5 との間の塩基対から構成される、項目 1 1 9 に記載の s i R N A。

(項目 1 2 1)

上記アンチセンス鎖および上記センス鎖が実質的に相補的であり、オーバーハングを含まない二重鎖を形成する、項目 1 1 9 に記載の s i R N A。

(項目 1 2 2)

R N A i 中のオフ・ターゲット効果を減少させる方法であって、s i R N A を標的核酸にさらすことを含み、上記 s i R N A がアンチセンス鎖およびセンス鎖を含み、

(a) 上記センス鎖が、第 1 の 2 ' 炭素修飾を有する第 1 の 5 ' 末端センス・ヌクレオチドと第 2 の 2 ' 炭素修飾を有する第 2 の 5 ' 末端センス・ヌクレオチドとから構成され、ならびに

(b) 上記アンチセンス鎖が、第 1 の 5 ' 末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、該第 1 の 5 ' 末端アンチセンス・ヌクレオチドの 5 ' 炭素位がリン酸化されている、オフ・ターゲット効果減少方法。

(項目 1 2 3)

上記第 1 の 2 ' 炭素センス修飾および上記第 2 の 2 ' 炭素センス修飾の各々が、2 ' -O-アルキル修飾である、項目 1 2 2 に記載の方法。

(項目 1 2 4)

さらに、2 ' -O-アルキル修飾を有する第 3 の 5 ' 末端センス・ヌクレオチドを含む、

10

20

30

40

50

項目 1 2 3 に記載の方法。

(項目 1 2 5)

上記 2' - オールキル修飾の少なくとも 1 つが、2' - オーメチル修飾である、項目 1 2 3 に記載の方法。

(項目 1 2 6)

上記 2' - オールキル修飾の各々が、2' - オーメチル修飾である、項目 1 2 3 に記載の方法。

(項目 1 2 7)

上記 s i R N A が 1 8 と 3 0 との間の塩基対から構成される、項目 1 2 2 に記載の方法。

(項目 1 2 8)

上記 s i R N A が 1 9 と 2 5 との間の塩基対から構成される、項目 1 2 7 に記載の s i R N A。

(項目 1 2 9)

上記アンチセンス鎖および上記センス鎖が実質的に相補的であり、オーバーハングを含まない二重鎖を形成する、項目 1 2 7 に記載の方法。

(項目 1 3 0)

ヘアピンを形成することができる単分子の s i R N A であって、

(a) 5' 炭素位でリン酸化された第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成されるアンチセンス領域と、

(b) 第 1 の 2' 炭素センス修飾を有する第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドおよび第 2 の 2' 炭素センス修飾を有する第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドから構成されるセンス領域と、

(c) 上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置したループ領域と、を含む、s i R N A。

(項目 1 3 1)

上記第 1 の 2' 炭素センス修飾および上記第 2 の 2' 炭素センス修飾の各々が、2' - オールキル修飾である、項目 1 3 0 の s i R N A。

(項目 1 3 2)

さらに、2' - オールキル修飾を含む第 3 の 5' 末端センス・ヌクレオチドを含む、項目 1 3 0 に記載の s i R N A。

(項目 1 3 3)

上記 2' - オールキル修飾の少なくとも 1 つが、2' - オーメチル修飾である、項目 1 3 1 に記載の s i R N A。

(項目 1 3 4)

上記 2' - オールキル修飾の各々が、2' - オーメチル修飾である、項目 1 3 1 に記載の s i R N A。

(項目 1 3 5)

上記 s i R N A が、1 8 と 3 0 との間の塩基対から構成される、項目 1 3 0 に記載の s i R N A。

(項目 1 3 6)

上記 s i R N A が、1 9 と 2 5 との間の塩基対から構成される、項目 1 3 5 に記載の s i R N A。

(項目 1 3 7)

R N A i 中のオフ・ターゲット効果を減少させる方法であって、

標的核酸に対して、ヘアピンを形成することができる単分子の s i R N A をさらすことを含み、上記単分子の s i R N A は、アンチセンス領域とセンス領域とを含み、

(a) 上記センス領域は、第 1 の 2' 炭素センス修飾を有する第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドと第 2 の 2' 炭素センス修飾を有する第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドとから構成され、

(b) 上記アンチセンス領域は、5' 炭素位がリン酸化された第 1 の 5' 末端アンチセ

10

20

30

40

50

ンス・ヌクレオチドから構成され、さらに、

(c) 上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置したループ領域を含む、オフ・ターゲット効果減少方法。

(項目 1 3 8)

上記第 1 の 2' 炭素センス修飾および上記第 2 の 2' 炭素センス修飾の各々が、2'-O-アルキル修飾である、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 3 9)

さらに、2'-O-アルキル修飾を有する第 3 の 5' 末端センス・ヌクレオチドを含む、項目 1 3 8 に記載の方法。

(項目 1 4 0)

上記 2'-O-アルキル修飾の少なくとも 1 つが 2'-O-メチル修飾である、項目 1 3 8 に記載の方法。

(項目 1 4 1)

上記 2'-O-アルキル修飾の各々が 2'-O-メチル修飾である、項目 1 3 8 に記載の方法。

(項目 1 4 2)

上記 siRNA が 1 8 と 3 0 との間の塩基対から構成される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 4 3)

さらに、第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドを含み、上記第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドがさらに第 1 の 2' 炭素末端アンチセンス修飾を含み、上記第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドは第 2 の 2' 炭素末端アンチセンス修飾を含む、項目 1 1 4 に記載の siRNA。

(項目 1 4 4)

さらに、第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドを含み、上記第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドがさらに第 1 の 2' 炭素末端アンチセンス修飾を含み、上記第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドは第 2 の 2' 炭素末端アンチセンス修飾を含む、項目 1 3 0 に記載の単分子の siRNA。

(項目 1 4 5)

RNA i 中に誘導されたオフ・ターゲット効果を減少させる方法であって、項目 1 1 4 または 1 4 3 のいずれか 1 項の上記 siRNA を細胞に導入することを含む、オフ・ターゲット効果減少方法。

(項目 1 4 6)

RNA i 中のオフ・ターゲット効果を減少させる方法であって、項目 1 4 4 の siRNA を細胞に導入することを含む、オフ・ターゲット効果減少方法。

(項目 1 4 7)

siRNA であって、

(a) 第 1 の 2' 炭素アンチセンス修飾を有する第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドと第 2 の 2' 炭素アンチセンス修飾を有する第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成されるアンチセンス鎖と、

(b) 第 1 の 2' 炭素センス修飾を有する第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドと第 2 の 2' 炭素センス修飾を有する第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドとから構成されるセンス鎖と、

を含む、siRNA。

(項目 1 4 8)

上記センス鎖と上記アンチセンス鎖とが 1 6 ~ 2 8 塩基対の二重鎖を形成する、項目 1 4 7 に記載の siRNA。

(項目 1 4 9)

上記センス鎖と上記アンチセンス鎖とが 1 8 ~ 2 5 塩基対の二重鎖を形成する、項目 1 4 8 に記載の siRNA。

(項目 1 5 0)

10

20

30

40

50

上記第1の2'炭素アンチセンス修飾、上記第2の2'炭素アンチセンス修飾、上記第1の2'炭素センス修飾、および上記第2の2'炭素センス修飾の各々が、2'-O-アルキル修飾を含む、項目148に記載のs i R N A。

(項目151)

上記2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチルである、項目150に記載のs i R N A。

(項目152)

さらに標識を含む、項目150に記載のs i R N A。

(項目153)

ヘアピンを形成することができる単分子のs i R N Aであって、

(a) 第1の2'炭素アンチセンス修飾を有する第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の2'炭素アンチセンス修飾を有する第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成されるアンチセンス領域と、

(b) 第1の2'炭素センス修飾を有する第1の5'末端センス・ヌクレオチドと第2の2'炭素センス修飾を有する第2の5'末端センス・ヌクレオチドとから構成されるセンス領域と、

(c) 上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置するループ領域と、を含む、s i R N A。

(項目154)

上記センス領域および上記アンチセンス領域が、16~28塩基対の二重鎖を形成する、項目153に記載のs i R N A。

(項目155)

上記センス領域および上記アンチセンス領域が、18~25塩基対の二重鎖を形成する、項目154に記載のs i R N A。

(項目156)

上記第1の2'炭素アンチセンス修飾、上記第2の2'炭素アンチセンス修飾、上記第1の2'炭素センス修飾、および上記第2の2'炭素センス修飾の各々が、2'-O-アルキル修飾を含む、項目154に記載のs i R N A。

(項目157)

上記2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチルである、項目156に記載のs i R N A。

(項目158)

さらに標識を含む、項目156に記載のs i R N A。

(項目159)

s i R N Aであって、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の各々が少なくとも1つのオルトエステル修飾を2'位に有する、s i R N A。

(項目160)

s i R N Aであって、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、上記アンチセンス鎖が少なくとも1つのオルトエステル修飾ならびに／または2'-ハロゲン修飾、2'-アルキル修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-アミン修飾、および2'-デオキシ修飾からなる群から選択される少なくとも1つの修飾を有する、s i R N A。

(項目161)

s i R N Aであって、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、上記センス鎖および／または上記アンチセンス鎖が少なくとも1つのオルトエステル修飾を含み、そして上記センス鎖および／または上記アンチセンス鎖が2'-ハロゲン修飾、2'-アルキル修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-アミン修飾、および2'-デオキシ修飾からなる群から選択される少なくとも1つの2'修飾を含む、s i R N A。

(項目162)

s i R N Aであって、

10

20

30

40

50

(a) 第1の2'炭素センス修飾を有する第1の5'末端センス・ヌクレオチドと第2の2'炭素センス修飾を有する第2の5'末端センス・ヌクレオチドとから構成されるセンス鎖と、

(b) 第1の2'炭素アンチセンス修飾を有する第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の2'炭素アンチセンス修飾を有する第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成されるアンチセンス鎖と、

を含む、s i R N A。

(項目163)

s i R N Aであって、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、上記アンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-オルトエステル修飾を有し、上記アンチセンス鎖がさらに、2'-オルトエステル修飾、2'-アルキル修飾、2'-ハロゲン修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-アミン修飾、および2'-デオキシ修飾からなる群から選択される1つ以上の修飾によって修飾され、上記2'-アルキル修飾、上記2'-O-メチル修飾、および上記2'-ハロゲン修飾が上記アンチセンス鎖の1つ以上のピリミジンにおいてであり、上記s i R N Aがさらに3'キャップを含む、s i R N A。

(項目164)

上記2'炭素修飾が2'-O-アルキル修飾である、項目162に記載のs i R N A。

(項目165)

上記2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル修飾である、項目164に記載のs i R N A。

(項目166)

上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび/または上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがさらに、5'ブロック基によって修飾されている、項目162に記載のs i R N A。

(項目167)

上記5'ブロック基が、5'-メチル修飾、5'-O-メチル修飾、および5'-アジド修飾からなる群から選択される、項目166に記載のs i R N A。

(項目168)

上記5'末端センス・ヌクレオチドならびに/または上記5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの上記第1および第2の2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル修飾であり、そして上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび/または第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがさらに5'ブロック基を含む、項目101~111のいずれか一項に記載のs i R N A。

(項目169)

上記5'ブロック基が、5'-メチル修飾、5'-O-メチル修飾、または5'-アジド修飾からなる群から選択される、項目168に記載のs i R N A。

(項目170)

さらに3'キャップを含む、項目35~111、114~121、130~136、143~144、および147~162のいずれか一項に記載のs i R N A。

(項目171)

上記3'キャップが逆位のデオキシチミジンである、項目170のs i R N A。

(項目172)

さらに、2'-デオキシ修飾および/またはメチルホスホネート・ヌクレオチド間連結の少なくとも1つを含む、項目35~111、114~121、130~136、143~144、および147~161のいずれか一項に記載のs i R N A。

(項目173)

さらに、2'-アルキル修飾、2'-O-アルキル修飾、および2'-ハロゲン修飾からなる群から選択される修飾を、1つ以上のピリミジンにおいて含む、項目35~111、114~121、130~136、143~144、および147~161のいずれか一項に記載のs i R N A。

10

20

30

40

50

(項目 1 7 4)	上記 2'-アルキル修飾が 2'-メチル修飾である、項目 1 7 5 に記載の s i R N A。	
(項目 1 7 5)	上記 2'-O-アルキル修飾が 2'-O-メチル修飾である、項目 1 7 5 に記載の s i R N A。	
(項目 1 7 6)	上記 2'-ハロゲン修飾が 2'-フッ素修飾である、項目 1 7 5 に記載の s i R N A。	
(項目 1 7 7)	さらに、コンジュゲートを含む、項目 8 7 ~ 1 1 1、1 1 4 ~ 1 2 1、1 3 0 ~ 1 3 6、1 4 3 ~ 1 4 4、および 1 4 7 ~ 1 7 8 のいずれか一項に記載の s i R N A。	10
(項目 1 7 8)	上記コンジュゲートが、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 1 7 9 に記載の s i R N A。	
(項目 1 7 9)	上記コンジュゲートがコレステロールまたは P E G を含む、項目 1 7 9 に記載の s i R N A。	
(項目 1 8 0)	上記コンジュゲートがさらに標識を含む、項目 1 7 9 に記載の s i R N A。	
(項目 1 8 1)	上記標識が蛍光標識である、項目 1 8 2 に記載の s i R N A。	20
(項目 1 8 2)	上記蛍光標識が、T A M R A、B O D I P Y、C y 3、C y 5、フルオロセイン、および D a b s y l からなる群から選択される、項目 1 8 3 に記載の s i R N A。	
(項目 1 8 3)	上記コンジュゲートがさらに標識を含む、項目 3 8 ~ 4 1 および 4 8 ~ 8 6 のいずれか一項に記載の s i R N A。	
(項目 1 8 4)	上記標識が蛍光標識である、項目 1 8 5 に記載の s i R N A。	
(項目 1 8 5)	上記蛍光標識が、T A M R A、B O D I P Y、C y 3、C y 5、フルオロセイン、および D a b s y l からなる群から選択される、項目 1 8 6 に記載の s i R N A。	30
(項目 1 8 6)	上記 2'-アルキル修飾ヌクレオチドが 2'-メチル修飾ヌクレオチドである、項目 3 6、5 1、6 5、7 6、8 7、および 8 8 のいずれか一項に記載の s i R N A。	
(項目 1 8 7)	上記 2'-O-アルキル修飾ヌクレオチドが 2'-O-メチル修飾ヌクレオチドである、項目 3 6、5 1、6 5、7 6、8 7、および 8 8 のいずれか一項に記載の s i R N A。	
(項目 1 8 8)	上記 2'-アミン修飾ヌクレオチドが 2'-NH ₂ 修飾ヌクレオチドである、項目 3 6、5 1、6 5、7 6、8 7、および 8 8 のいずれか一項に記載の s i R N A。	40
(項目 1 8 9)	上記 2'-ハロゲン修飾ヌクレオチドが 2'-フッ素修飾ヌクレオチドである、項目 8 7 および 8 8 のいずれか一項に記載の s i R N A。	
(項目 1 9 0)	上記修飾ヌクレオチド間連結がメチルホスホネートである、項目 4 5、5 9、7 3、8 4、および 8 8 のいずれか一項に記載の s i R N A。	
(項目 1 9 1)	さらに、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結を含む、項目 8 9 に記載の s i R N A。	
。		50

(項目 192)

上記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、メチルホスホネート結合、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 193 に記載の s i RNA。

(項目 193)

さらに、少なくとも 1 つの 2' - オルトエステル修飾を含む、88 ~ 111、114 ~ 121、130 ~ 136、147 ~ 158、および 162 のいずれか一項に記載の s i RNA。

(項目 194)

上記 2' - オルトエステル修飾が 2' - ビス (ヒドロキエチル) オルトエステル修飾である、項目 195 に記載の s i RNA。

10

(項目 195)

上記 2' オルトエステル修飾が 2' - ビス (ヒドロキシエチル) オルトエステルである、項目 35 ~ 74、87 ~ 88、159 ~ 161、および 163 のいずれか一項に記載の s i RNA。

(項目 196)

RNA 干渉を実施する方法であって、項目 35 ~ 74、87 ~ 88、159 ~ 161、および 163 ~ 194 のいずれか一項の s i RNA を細胞に投与することを含む、RNA 干渉実施方法。

(項目 197)

上記 オルトエステル修飾が 2' - ビス (ヒドロキシエチル) オルトエステルである、項目 198 に記載の方法。

20

(項目 198)

RNA 干渉を実施する方法であって、項目 195 ~ 199 のいずれか一項の s i RNA を細胞に投与することを含む、RNA 干渉実施方法。

(項目 199)

s i RNA であって、

(a) アンチセンス鎖と、

(b) センス鎖と、

を含み、

30

上記センス鎖が第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドおよび第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 1 の 2' 炭素センス修飾を有し、そして上記第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 2 の 2' 炭素センス修飾を有する、s i RNA。

(項目 200)

s i RNA であって、

(a) 第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドおよび第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 1 の 2' 炭素センス修飾を有し、そして上記第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドが第 2 の 2' 炭素センス修飾を有するセンス鎖と、

40

(b) 第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、上記第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドが 5' リン酸化修飾を有し、そして上記第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドが 2' 炭素アンチセンス修飾を有するアンチセンス鎖と、

を含む、s i RNA。

本発明の他の利点および実施形態ならびにさらなる利点および実施形態をより良く理解するために、実施例と関連した以下の説明について言及するもので、その範囲は添付した特許請求の範囲に記述されている。

【0041】

本発明の好ましい実施形態は、いかなる形であれ本発明の範囲を制限することを意図し

50

たものではなく、例証および記述を目的として選択されている。本発明のいくつかの態様の好ましい実施形態の利点は、添付の図面に示される。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1A】図1Aは、トランスフェクションの24時間後に測定されるセンスおよび／またはアンチセンス鎖に対するオルトエステル修飾の機能性を説明する。修飾二本鎖の説明については「好ましい実施形態」を参照せよ。s i R N A + S E A P 発現プラスミドによって同時にトランスフェクトされた細胞でのS E A P 発現レベルを、S E A P 発現プラスミド単独によってトランスフェクトされた細胞と比較することで、各s i R N Aによって誘導されたS E A Pサイレンシングの度合いを決定した。

10

【図1B】図1Bは、トランスフェクションの48時間後に測定されるオルトエステル修飾（センスおよび／またはアンチセンス鎖上）の機能性を示す。

【図2A】図2Aは、トランスフェクションの24時間後に測定される、他の修飾とともにオルトエステル修飾（センスおよび／またはアンチセンス鎖上）の機能性を示す。

【図2B】図2Bは、トランスフェクションの72時間後に測定される、他の修飾とともにセンスおよび／またはアンチセンス鎖上のオルトエステル修飾の機能性を示す。

【図2C】図2Cは、トランスフェクションの144時間後に測定される、他の修飾とともにセンスおよび／またはアンチセンス鎖上のオルトエステル修飾の機能性を示す。

【図3】図3は、s i R N A機能性に対するセンスおよびアンチセンス鎖修飾の効果を示す。

20

【図4】図4は、s i R N A機能性に対するセンスおよびアンチセンス鎖修飾の効果を説明する。

【図5】図5は、センス鎖上の種々の修飾と併用したアンチセンス鎖のチオ系修飾の効果を示す。

【図6】図6は、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方でのホスホロチオエート修飾の効果を示す。

【図7】図7は、他の多様な修飾と併用した2'-O-メチル修飾（センスおよびアンチセンス鎖の両方で）の効果を示す。

【図8】図8は、他の化学修飾と併用した2'-デオキシ-RNAハイブリッド（どちらか一方の鎖）であるs i R N Aの効果を示す。

30

【図9】図9は、他の化学修飾と併用したセンス鎖5'末端でのコレステロール・コンジュゲートの5'末端の機能性を示す。

【図10】図10は、他の化学修飾と併用したセンス鎖5'末端でのP E Gコンジュゲートの機能性を示す。

【図11】図11は、センス鎖5'末端でのコレステロール・コンジュゲートを持つ修飾s i R N Aの効力増加を示す。

【図12】図12は、ダルマコン（D h a r m a c o n）2'-A C E・RNA合成化学に用い得る保護RNAヌクレオチド・ホスホラミダイトを示す。

【図13】図13は、ダルマコン（D h a r m a c o n）RNA合成サイクルの概略を示す。

40

【図14】図14は、好ましい2'-A C E保護RNAの構造を示す。

【図15A】図15Aは、他の裸s i R N A上の単一2'-デオキシ修飾（センスまたはアンチセンス鎖）の機能的な影響（f u n c t i o n a l c o n s e q u e n c e s）を示す。

【図15B】図15Bは、他の裸s i R N A上の2つのタンDEM 2'-デオキシ修飾（センスまたはアンチセンス鎖）の機能的な影響を示す。

【図15C】図15Cは、他の裸s i R N A上の3つのタンDEM 2'-デオキシ修飾（センスまたはアンチセンス鎖）の機能的な影響を示す。

【図16A】図16Aは、他の裸s i R N A上の単一2'-O-メチル修飾（センスまたはアンチセンス鎖）の機能性影響（f u n c t i o n a l i t y c o n s e q u e n c e s）を示す。

50

e s) を示す。

【図16B】図16Bは、他の裸 s i R N A 上の2つのタンデム 2' - O - メチル修飾（センスまたはアンチセンス鎖）の機能性影響を示す。

【図16C】図16Cは、他の裸 s i R N A 上の3つのタンデム 2' - O - メチル修飾（センスまたはアンチセンス鎖）の機能性影響を示す。

【図17】図17は、二本鎖安定性に対するセンスおよびアンチセンス鎖での修飾の影響を示す。

【図18】図18は、裸および修飾 s i R N A の受動的な取り込みに対する5' コレステロール部分を含むコンジュゲートの効果を示す。

【図19】図19は、センス鎖内の種々の位置における2つのタンデム 2' - デオキシ修飾の機能的な影響を示す。 10

【図20】図20は、センス鎖内の種々の位置における3つのタンデム 2' - デオキシ修飾の機能的な影響を示す。

【図21】図21は、アンチセンス鎖内の種々の位置における単一 2' - デオキシ修飾の機能的な影響を示す。

【図22】図22は、アンチセンス鎖内の種々の位置における2つのタンデム 2' - デオキシ修飾の機能的な影響を示す。

【図23】図23は、アンチセンス鎖内の種々の位置における3つのタンデム 2' - デオキシ修飾の機能的な影響を示す。

【図24】図24は、センス鎖内での種々の位置における2つのタンデム 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。 20

【図25】図25は、センス鎖内での種々の位置における3つのタンデム 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。

【図26】図26は、アンチセンス鎖での種々の位置における単一 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。

【図27】図27は、アンチセンス鎖での種々の位置における2つのタンデム 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。

【図28】図28は、アンチセンス鎖での種々の位置における3つのタンデム 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。

【図29】図29は、ヒト・シクロフィリン遺伝子に対する s i R N A を用いた（1）5' センス、（2）5' アンチセンス、または（3）5' センスおよびアンチセンス鎖の位置1および2上での2つの 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。 30

【図30】図30は、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子に対する s i R N A を用いた（1）5' センス、（2）5' アンチセンス、または（3）5' センスおよびアンチセンス鎖の位置1および2上での2つの 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。注記：この図では、アンチセンス鎖の5' 末端のリン酸化を「P」で表す。

【図31】図31は、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子に対する s i R N A を用いた（1）5' センス、（2）5' アンチセンス、または（3）5' センスおよびアンチセンス鎖の位置1および2上での2つの 2' - O - メチル修飾の機能的な影響を示す。注記：この図では、アンチセンス鎖の5' 末端のリン酸化を「P」で表す。 40

【図32】図32は、ヒト血清での修飾 s i R N A の安定性を示す。修飾 " a " = センス鎖での全 C s および U s の 2' - O - メチル修飾（3' i d T キャッピングと組み合わさっている）。修飾 " b " = センス鎖での全 C s および U s の 2' F 修飾（3' i d T キャッピングと組み合わさっている）。

【図33】図33は、アルブミンおよび他の血清タンパク質に対する修飾 s i R N A - コレステロール・コンジュゲートの親和性を示す。

【図34】図34は、小分子コンジュゲートが s i R N A 効力について有する効果を示す。

【図35】図35は、ヒト血清での s i R N A コンジュゲートの安定性を示す。 s i R N A は、センス鎖上に、（1）全 C s および U s 上の 2' - O - メチル基と、（2）3' i 50

d T キャップとを運び、s i R N A a-コンジュゲートは、センス鎖上に、(1) 全 C s および U s 上の 2'-O-メチル基、(2) 3' i d T キャップ、および (3) 5' コレステロール・コンジュゲートを担持する。

【図 3 6】図 3 6 は、コレステロール・コンジュゲートが受動的な s i R N A 取り込みについて有する効果を示す。

【図 3 7】図 3 7 A は、血清にさらされた s i R N A を含むエチジウム・ブロミド染色ゲルを示す、典型的な血清安定性試験から得られた結果を表す（上側が未修飾、下側が「分子 1 修飾」による修飾）。この図の目的にとって、用語「分子 1 修飾 (m o l e c u l e 1 m o d i f i c a t i o n s)」とは、センス鎖の 1 および 2 位上の 2'-O-メチル修飾、センス鎖の全 C s および U s 上の 2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全 C s および U s 上の 2'-フルオロ (F l) 修飾、およびアンチセンス鎖の 5' 末端上にあるリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。図 3 7 B は、修飾および未修飾形態である 4 種類のヒト・シクロフィリン B・s i R N A の相対的安定性をプロットする一組の折れ線グラフである (U 1 = 5' G A A A G A G C A U C U A C G G U G A (配列番号 3 1 5)、U 2 = 5' G A A A G G A U U U G G C U A C A A A (配列番号 3 1 6)、U 3 = 5' A C A G C A A A U U C C A U C G U G U (配列番号 3 1 7)、および U 4 = 5' G G A A A G A C U G U U C C A A A A (配列番号 3 1 8)、センス鎖)。X 軸は、時間 (h r) を表す。Y 軸は元のままの状態を保つ二本鎖が占める割合を表す。黒四角は、未修飾配列を示す。白四角は、修飾配列を示す。

【図 3 8】図 3 8 は、種々の濃度で所定の標的をサイレンシングするために、裸、または修飾 (分子 1 修飾) されている s i R N A (U 1 および U 3) の能力を比較する。Y 軸は、対照群 (形質移入されていない細胞) と比較した発現の度合いを表す。X 軸は形質移入の手順を進めている最中の s i R N A の濃度を表す。黒棒は、未修飾配列を表す。白棒は修飾配列を表す。この図の目的にとって、用語「分子 1 修飾 (m o l e c u l e 1 m o d i f i c a t i o n s)」とは、センス鎖の 1 および 2 位上の 2'-O-メチル修飾、センス鎖の全 C s および U s 上の 2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全 C s および U s 上の 2'-フルオロ (F l) 修飾、およびアンチセンス鎖の 5' 末端上にあるリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。

【図 3 9】図 3 9 は、修飾 s i R N A (「分子 1 修飾」を持つ) および未修飾 s i R N A によって、7 日間にわたり誘導されたサイレンシングの度合いを評価する。Y 軸は、対照群 (形質移入されていない細胞) と比較した場合の遺伝子発現の度合いを表す。X 軸は、形質移入後の日数を表す。黒棒は、未修飾配列を表す。白棒は、修飾配列を表す。この図の目的にとって、用語「分子 1 修飾 (m o l e c u l e 1 m o d i f i c a t i o n s)」とは、センス鎖の 1 および 2 位上の 2'-O-メチル修飾、センス鎖の全 C s および U s 上の 2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全 C s および U s 上の 2'-フルオロ (F l) 修飾、およびアンチセンス鎖の 5' 末端上にあるリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。

【図 4 0】図 4 0 は、種々の濃度で細胞に形質移入された 4 通りの個々の修飾 s i R N A (分子 1 修飾にもとづく) および未修飾 s i R N A によって誘導された細胞死の度合いを比較する。Y 軸は、細胞の相対的生存度 (非形質移入細胞にもとづく) を表す。X 軸は、形質移入の手順を実施している際の s i R N A の濃度を表す。培養物を、アラマー・ブルー (A l a m a r B l u e) アッセイを用いた形質移入の 24~48 時間後に試験した。黒棒は未修飾配列を表す。白棒は、修飾配列を表す。この図の目的にとって、用語「分子 1 修飾 (m o l e c u l e 1 m o d i f i c a t i o n s)」とは、センス鎖の 1 および 2 位上の 2'-O-メチル修飾、センス鎖の全 C s および U s 上の 2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全 C s および U s 上の 2'-フルオロ (F l) 修飾、およびアンチセンス鎖の 5' 末端上にあるリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。

【図 4 1】図 4 1 は、修飾形態 (分子 1 修飾にもとづく) および未修飾形態である 4 通りの個々のヒト・シクロフィリン B・s i R N A によるオフ・ターゲット化の度合いを比較

する。データを6つの異なる群にわけた。すなわち、4倍(4x)を上回る発現減少が見られる標的の数、3~4倍(3~4x)の発現減少が見られる標的の数、2.5~3倍(2.5~3x)の発現減少が見られる標的の数、4倍(>4x)を上回る発現増加が見られる標的の数、3~4倍(3~4x)の発現増加が見られる標的の数、さらに2.5~3倍(2.5~3x)の発現増加が見られる標的の数である。黒棒は、未修飾配列を表す。白棒は、修飾配列を表す。この図の目的にとって、用語「分子1修飾(molecule 1 modifications)」とは、センス鎖の1および2位上の2'-O-メチル修飾、センス鎖の全CsおよびUs上の2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全CsおよびUs上の2'-フルオロ(Fl)修飾、およびアンチセンス鎖の5'末端上にあるリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。

10

【図42】図42は、(1)分子2修飾(molecule 2 modifications)、(2)Cy3による裸分子修飾、および(3)Cy3により修飾された裸NSC9分子を含むcyclo14 siRNAの遺伝子サイレンシング能力を比較するヒストグラムを示す。Y軸は、対照遺伝子(GAPDH)と比較したヒト・シクロフィリンB発現の度合いを示す。「脂質(lipid)」は、形質移入試薬であるLipofectamine 2000によって処置された対照細胞を表す。「対照(control)」は、未処理の細胞のことをいう。NS9は、非特異的配列#9である。この図の目的にとって、用語「分子2修飾(molecule 2 modifications)」とは、センス鎖の1および2位上の2'-O-メチル修飾、センス鎖の全CsおよびUs上の2'-O-メチル修飾、センス鎖の5'末端にあるCys3標識、アンチセンス鎖の全CおよびU上の2'-フルオロ(Fl)修飾、およびアンチセンス鎖の5'末端上にあるリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。

20

【図43】図43AおよびBは、2'-O-メチル化SEAP-2217 siRNAに関する機能と修飾との関係を示す。これらの図は、SEAP-2217のセンス鎖(図43A)およびアンチセンス鎖(図43B)の単鎖2'-O-メチル修飾(黒棒)および対形成2'-O-メチル修飾(灰)の遺伝子サイレンシングの効果を示す。X軸は、siRNA(5'→3')に沿った修飾の相対的位置を表す。Y軸は、対照群に対する発現比を表す。

【図44】図44Aおよび図44Bは、SEAP2217機能に対する2'-デオキシ基の付加の効果を示す。特に、2'-デオキシ基によって3つの連続的なヌクレオチド(例えば、位置1、2、および3)が修飾される。識別番号が各基に対応づけられている(例えば、S3D-16は以下のようにデコードされる。すなわち、「S」=センス鎖修飾、「3」=連続的に修飾されるヌクレオチドの数、「D」=2'-デオキシ修飾、「16」=修飾の第1の位置)。図44Aは、センス鎖修飾を示す。図44Bは、アンチセンス鎖修飾を示す。対照群として、siRNAなしおよび非特異的(ns)RNAを含む。

30

【図45】図45A~図45Fは、6種類のルシフェラーゼ特異的siRNA(luc8、18、56、58、63、および81)のアンチセンス鎖に対する、5'リン酸化を持つまたは持たない2'-O-メチル化の効果を示す。「S」=センス鎖。「AS」=アンチセンス鎖。「*」は、指定鎖の1および2位での2'-O-メチル化を示す。「p」は、指定された鎖の5'リン酸化を示す。Y軸は、対照(非形質移入)細胞の発現率(%)を示す。「対照」=偽形質移入細胞である。

40

【図46-1】図46A~Eは、本発明の一実施形態にもとづいて生産された5つのルシフェラーゼ特異的siRNA(luc8、56、58、63、81)の用量依存を表す。「S」=センス鎖。「AS」=アンチセンス鎖。「M」は、指定の鎖の1および2位にある2'-O-メチル化を示す。「p」は、指定の鎖の5'リン酸化を示す。Y軸は、対照(形質移入されていない)細胞の発現率を表す。X軸は、1=200mM、2=100nM、3=10nM、4=1nM、5=0.1nM、および6=0.01nMによる形質移入の過程でのsiRNAの濃度を表す。

【図46-2】図46A~Eは、本発明の一実施形態にもとづいて生産された5つのルシフェラーゼ特異的siRNA(luc8、56、58、63、81)の用量依存を表す。

50

「S」＝センス鎖。「AS」＝アンチセンス鎖。「M」は、指定の鎖の1および2位にある2'-O-メチル化を示す。「p」は、指定の鎖の5'リン酸化を示す。Y軸は、対照（形質移入されていない）細胞の発現率を表す。X軸は、1＝200mM、2＝100nM、3＝10nM、4＝1nM、5＝0.1nM、および6＝0.01nMによる形質移入の過程でのsiRNAの濃度を表す。

【図46-3】図46A～Eは、本発明の一実施形態にもとづいて生産された5つのルンフェラーゼ特異的siRNA（luc8、56、58、63、81）の用量依存を表す。

「S」＝センス鎖。「AS」＝アンチセンス鎖。「M」は、指定の鎖の1および2位にある2'-O-メチル化を示す。「p」は、指定の鎖の5'リン酸化を示す。Y軸は、対照（形質移入されていない）細胞の発現率を表す。X軸は、1＝200mM、2＝100nM、3＝10nM、4＝1nM、5＝0.1nM、および6＝0.01nMによる形質移入の過程でのsiRNAの濃度を表す。

10

【図47】図47は、センスおよびアンチセンス鎖-RISC相互作用の予想反応速度と、（1）2'-O-メチル化（*）および（2）該分子の相対的機能性に対するその相互作用の感受性を表す。高度に機能的な分子（例えば、>F90、90%を上回る機能性）では、RISCがアンチセンス鎖（K_{overall}＝100）に対して選択性が高い。ヌクレオチド1および2位での2'-O-メチル基によるセンス鎖の修飾は、さらに、AS鎖選択に傾くが、相対的な増減率は軽度である。乏しい機能性または適度な機能性の二本鎖に由来するセンスおよびアンチセンス鎖は、RISCとのより良く均整のとれた平衡（K_{overall} 約1）を示す。これらの場合、Sの修飾は、RISCに結合する能力を本質的に取り除き、RISC-AS相互作用への選択性を強く傾ける。

20

【図48A】図48Aおよび48Bは、cyclo4siRNAとNS4siRNAとのあいだの競合についての研究を示す。A-I：cyclo4siRNAを種々の濃度で細胞に形質移入した。A-II：cyclo4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、アンチセンス鎖のCsおよびUsにある2'F1基、ならびにセンス鎖の5'末端にあるCy3基により修飾された、Cy3コンジュゲート19bpNS4二本鎖。A-III：cyclo4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、ならびにアンチセンス鎖のCsおよびUsに結合された2'F1基によって修飾されたCy3コンジュゲート17bpNS4二本鎖。B-I：cyclo4（種々の濃度で）と、19bpNS4二本鎖。B-II：cyclo4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、ならびにアンチセンス鎖のCsおよびUsにある2'F1基により修飾された19bpNS4二本鎖。B-III：cyclo4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、ならびにアンチセンス鎖のCsおよびUsにある2'F1基により修飾された17bpNS4二本鎖。注：全ての形質移入を、リポフェクタミン（Lipofectamin）2000（製造元の指示）および100nMの核酸濃度を用いて実施した。データを内部GAPDHレベルを正規化した。

30

40

【図48B】図48Aおよび48Bは、cyclo4siRNAとNS4siRNAとのあいだの競合についての研究を示す。A-I：cyclo4siRNAを種々の濃度で細胞に形質移入した。A-II：cyclo4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、アンチセンス鎖のCsおよびUsにある2'F1基、ならびにセンス鎖の5'末端にあるCy3基により修飾された、Cy3コンジュゲート19bpNS4二本鎖。A-III：cyclo4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、ならびにアンチセンス鎖のCsおよびUsに結合された2'F1基によって修飾されたCy3コンジュゲート17bpNS4二本鎖。B-I：cyclo4（種々の濃度で

50

）と、19bpNS4二本鎖。B-I I : c y c l o 4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、ならびにアンチセンス鎖のCsおよびUsにある2' F1基により修飾された19bpNS4二本鎖。B-I I I : c y c l o 4（種々の濃度で）と、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'-O-メチル基、センス鎖のCsおよびUsにある2'-O-メチル基、ならびにアンチセンス鎖のCsおよびUsにある2' F1基により修飾された17bpNS4二本鎖。注：全ての形質移入を、リポフェクタミン（L i p h o f e c t a m i n）2000（製造元の指示）および100nMの核酸濃度を用いて実施した。データを内部GAPDHレベルを正規化した。

【図49】図49は、GAPDHと非特異的対照#2との競合実験を示す。（1）非競合s i R N Aであるc y c l o 1 4、（2）競合s i R N A（非特異的配列#2）、もしくは（3）センスおよびアンチセンス鎖の両方の1および2位で2'-O-メチル基によって標識された競合s i R N Aとともに、GAPDH・s i R N Aを、種々の濃度（0.781~100nM）でHeLa細胞に導入した。

【発明を実施するための形態】

【0043】

（詳細な説明）

ここで、本発明を好ましい実施形態と関連させて説明する。これらの実施形態は、本発明の理解を助けるために提示されており、いかなる形であれ、本発明を制限することを意図したものではなく、またそのように解釈されてはならない。この開示を読むことで当業者にとって容易に理解される全ての代替、修飾、および等価物は、本発明の精神および範囲のなかに包含される。

【0044】

この開示は、RNA干渉を実行するための組成物および方法についてのプライマーではない。当業者に知られている基礎概念については、詳しくは説明しなかった。

【0045】

本発明は、s i R N A誘導遺伝子サイレンシングを含むRNA干渉を実施するための組成物および方法に関する。本発明、修飾ポリヌクレオチド、およびその誘導体を用いることで、RNA干渉用途の効率を改善することが可能である。

【0046】

特に明記しない限り、以下の用語および表現は、以下で規定される意味を持つ。

【0047】

（アルキル）

用語「アルキル（a l k y l）」とは、飽和または不飽和、さらに置換または非置換型であるヒドロカルビル部分のことをいう。それは、直鎖状、分岐状、環状、および／または複素環状であり、かつエーテル、ケトン、アルデヒド、カルボン酸塩等の官能基を含む部分から構成されるものであってもよい。

【0048】

典型的なアルキル基として、限定されるものではないが、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、エイコシル、およびより大きい炭素数のアルキル基、同様に2-メチルプロピル、2-メチルー4-エチルブチル、2, 4-ジエチルプロイル、3-プロピルブチル、2, 8-ジブチルデシル、6, 6-ジメチロクチル、6-プロピルー6-ブチロクチル、2-メチルブチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、および2-エチルヘキシルが挙げられる。上記用語アルキルはまた、アルケニル基、例えばビニル、アリル、アラルキル、およびアルキニル基も包含する。

【0049】

アルキル基内での置換として、任意の原子または基を含むことができる。そのことはアルキル部分で許容され、限定されるものではないが、ハロゲン、硫黄、チオール、チオエ

10

20

30

40

50

ーテル、チオエステル、アミン（一級、二級、または三級）、アミド、エーテル、エステル、アルコール、ならびに酸素が挙げられる。一例として、アルキル基は、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシ基、ニトロ、ニトロソまたはニトリル基等の修飾と、イミダゾール、ヒドラジノまたはヒドロキシルアミノ基等のヘテロ環、イソシアネートまたはシアネート基、スルホキシド、スルホン、ジスルフィド等の硫黄含有基を、含むこともできる。

【0050】

さらに、アルキル基はまた、ヘテロ置換を含むものであってもよく、このような置換では、炭素原子が、例えば窒素、酸素、もしくは硫黄によって置換される。複素環置換は、1つ以上のヘテロ原子を持つアルキル環のことをいう。ヘテロ環部分の例として、限定されるものではないが、モルホリノ、イミダゾール、およびピロリドンが挙げられる。

10

【0051】

（2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド）

「2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド（2'-O-alkyl modified nucleotide）」という成句は、ヌクレオチド単位のことをいい、該ヌクレオチド単位は糖部分、例えば、該糖の2'位に位置した炭素原子とアルキル基との両方に酸素原子が結合するようにして2'位で修飾されるデオキシリボシル部分を持つ。

【0052】

（アミンおよび2'-アミン修飾ヌクレオチド）

用語「アミン（amine）」とは、例えば、1、2、または3つの水素原子を他の基（例えば、アルキル基）で置き換えることで、アンモニアから直接または間接的に誘導されることをいう。一級アミンは、一般構造 RNH_2 を有し、二級アミンは一般の構造 R_2NH を有する。成句「2'-アミン修飾ヌクレオチド」とは、糖の2'位に付着したアミンまたは窒素含有基によって修飾される糖部分を持つヌクレオチド単位のことをいう。

20

【0053】

アミンという用語として、限定されるものではないが、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、アニリン、シクロヘキシルアミン、ベンジルアミン、多環式アミン、ヘテロ原子置換アリールおよびアルキルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジイソプロピルアミン、ジブチルアミン、メチルプロピルアミン、メチルヘキシルアミン、メチルシクロプロピルアミン、エチルシクロヘキシルアミン、メチルベンジルアミン、メチルシクロヘキシルメチルアミン、ブチルシクロヘキシルアミン、モルフォリン、チオモルホリン、ピロリジン、ピペリジン、2,6-ジメチルピペリジン、ピペラジン、ならびにヘテロ原子置換アルキルもしくはアリール二級アミンが挙げられる。

30

【0054】

（アンチセンス鎖）

本明細書で用いられるフレーズ「アンチセンス鎖（antisense strand）」とは、目的とするところの標的核酸に対して、実質的または100%相補的であるポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一領域のことをいう。アンチセンス鎖は、ポリヌクレオチド領域（すなわちRNA、DNA、またはキメラRNA/DNA）から構成可能である。例えば、アンチセンス鎖は、一分子の伝令RNA、mRNAではないRNA（例えば、tRNA、rRNA、およびhnRNA）、あるいはコードまたは非コードのDNA配列に対して全体的または部分的に相補的であってもよい。フレーズ「アンチセンス鎖」として、2本の異なる鎖から形成される両方のポリヌクレオチドのアンチセンス領域と、ヘアピン構造を形成することができる単分子のsiRNAとが挙げられる。フレーズ「アンチセンス鎖」および「アンチセンス領域（antisense region）」は、等価であることを意図しており、同義的に使われる。アンチセンス鎖を、低分子および／またはコンジュゲートの多様な群によって修飾させることができる。

40

【0055】

（2'-炭素修飾）

フレーズ「2'-炭素修飾（2'-carbon modification）」とは、

50

糖部分（例えば2'位で修飾されるデオキシリボシル部分）を持つヌクレオチド単位のことをいう。この位置で、糖の2'位に位置した炭素原子と、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-プロピル、2'-O-イソプロピル、2'-O-ブチル、2'-O-イソブチル、2'-O-エチル-O-メチル（ $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ）、および2'-O-エチル-OH（ $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ）等のアルキル基との両方に、酸素原子が付着するようにして、「2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド」が修飾を受ける。「2'炭素センス修飾」とは、センス鎖上またはポリヌクレオチドのセンス領域内にあるヌクレオチドの2'炭素位における修飾のことをいう。「2'炭素アンチセンス修飾」とはアンチセンス鎖上またはポリヌクレオチドのアンチセンス領域内にあるヌクレオチドの2'炭素位における修飾のことをいう。

10

【0056】

(相補性)

用語「相補性 (complementary)」とは、互いに塩基対を形成するポリヌクレオチドの能力のことをいう。塩基対は、逆平行ポリヌクレオチド鎖または領域内のヌクレオチド単位間の水素結合によって、概ね形成される。相補性ポリヌクレオチド鎖または領域は、ワトソン・クリック (Watson-Crick) 方式（例えば、AとT、AとU、CとG）で塩基対を形成することができ、あるいは安定な二本鎖を形成することを可能とする他の任意の方法で塩基対を形成することができる。

【0057】

完全な相補性または100%相補性は、一方のポリヌクレオチド鎖または領域の各々のヌクレオチド単位が他方のポリヌクレオチド鎖または領域の各のヌクレオチドと水素結合を形成することができる状況のことをいう。完全な相補性に満たないことは、2本の鎖または2つの領域の、すべてではないがいくつかのヌクレオチド単位が互いに水素結合することができることをいう。例えば、2つの20量体に関して、もし各鎖上の2つの塩基対のみが互いに水素結合することができる場合、それらのポリヌクレオチド鎖または領域の相補性が10%であることを示している。同じ例で、各鎖または各領域上の18塩基対が互いに水素結合することができる場合、ポリヌクレオチド鎖は90%相補性を示す。実質的な相補性とは、90%以上の相補性を示すポリヌクレオチド鎖または領域のことをいう。

20

【0058】

(コンジュゲートおよび末端コンジュゲート)

用語「コンジュゲート (conjugate)」とは、安定性の増加および／またはそれ自体によるsiRNAの取り込みの促進をおこなう等、siRNAの物性を変える分子または部分 (moiety) のことをいう。「末端コンジュゲート (terminal conjugate)」は、siRNAの3'および／または5'末端に直接またはリンカーを介して付着することが可能である。内部コンジュゲートは、直接またはリンカーを介して間接的に、塩基、リボースの2'位、または他の適当な1つの位置または複数の位置、例えば5-アミノアリル・ウリジンに付着することが可能である。

30

【0059】

互いに付着しない異なる2本の鎖を持つsiRNA（すなわち、siRNAが単分子またはヘアピンsiRNAではない）では、該鎖の一方または両方の5'末端がコンジュゲートを持つことができ、さらに／またはsiRNAを含む該鎖の一方または両方の3'末端がコンジュゲートを持つことができる。

40

【0060】

コンジュゲートは、例えば、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗原、毒素、ホルモン、脂質、ヌクレオチド、ヌクレオシド、糖、炭水化物、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコール）、さらにまたこれらの物質類の全ての類似体または誘導体であってもよい。コンジュゲートのさらなる例として、ステロイド（例えば、コレステロール）、リン脂質、ジおよびトリアシルグリセロール、脂肪酸、不飽和または置換を含む、もしくは含まない炭水化物、酵素基質、ビオチン

50

、ジゴキシゲニン、および多糖類も挙げられる。さらに他の例として、ヘキシルーSートリチルチオール等のチオエーテル、チオコレステロール、ドデカンジオールまたはウンデシル基等のアシル鎖、ジヘキサデシルーracーグリセロール、トリエチルアンモニウム、1, 2ージエーOーヘキサデシルーracーグリセロー3ーHーホスホネート、ポリアミン、ポリエチレングリコール、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミン部分、ヘキシルアミノカルボニルーオキシコレステロール、ファルネシル、ゲラニル、およびゲラニルゲラニル部分が挙げられる。

【0061】

コンジュゲートもまた、検出可能な標識であってもよい。例えば、コンジュゲートをフルオロフォアとすることができる。コンジュゲートとして、TAMRA等のフルオロフォア、BODIPY、シアニン誘導体（例えば、Cy3またはCy5ダブルシル（Dabsyl））、フルオロセイン、または公知の他の適当なフルオロフォアが挙げられる。

10

【0062】

コンジュゲートを、都合がよく、かつそれを持つsiRNAの所望の活性と実質的に干渉しない末端ヌクレオチド上の任意の位置（例えば、リボシル糖の3'または5'位に付着させてもよい。コンジュゲートは、RNA干渉の媒介となるsiRNAの能力が、形質移入後24時間で機能性が測定される培養細胞を用いた生体外（in vitro）アッセイで80%を上回る減少となるような、その機能性への悪影響を及ぼす場合、実質的にsiRNAの所望の活性と干渉する。

【0063】

（デオキシヌクレオチド）

用語「デオキシヌクレオチド（deoxynucleotide）」とは、2'および/または3'炭素に結合した水素を持つ代わりに、適当な結合および/または2'、3'末端ジデオキシを持つ糖部分の2'または3'位で、OH基を欠いているヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのことをいう。

20

【0064】

（デオキシリボヌクレオチド）

用語「デオキシリボヌクレオチド（deoxyribonucleotide）および「DNA」は、リボシル部分の2'位にHを持つ少なくとも1つのリボシル部分を含むヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのことをいう。

30

【0065】

（下流）

ヌクレオチドからなる1本の鎖の1つの領域は、もし該第1の領域の5'側最末端部分（most portion）が第2の領域の3'末端に対してその領域の最も近接した部分である場合、第2の領域の下流であると見なされる。

【0066】

（エクサエクオ剤）

フレーズ「エクサエクオ剤（exaequo agent）」とは、RNAi経路への参加見込み、またはRNAi経路へ参加する能力について他の核酸と競合する能力という観点から、不活性または半不活性である核酸のことをいう。分子をエクサエクオ剤として用いることができ、エクサエクオ剤は溶液中の核酸の総量を均一または同等にするために使用される。

40

【0067】

（第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド）

フレーズ「第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド」とは、センス鎖または領域上に対応の相補的塩基を持つアンチセンス鎖または領域の塩基に関して、その鎖の5'側最末端位置（most position）に位置しているアンチセンス鎖または領域のヌクレオチドのことをいう。したがって、2本の異なる鎖から構成されるsiRNA（すなわち、単分子またはヘアピンsiRNAではない）において、アンチセンス鎖上の任意の5'オーバーハングの一部である塩基とは異なる5'側最末端塩基（most base

50

）と呼ぶ。第1の5'末端アンチセンスセンス・ヌクレオチドがヘアピン分子の一部である場合、用語「末端 (terminal)」はアンチセンス領域内にある相対的に5'側の最末端位置のことをいい、したがってアンチセンス領域の5'側最末端ヌクレオチドである。

【0068】

(第1の5'末端センス・ヌクレオチド)

フレーズ「第1の5'末端センス・ヌクレオチド」は、アンチセンス・ヌクレオチドに関して定義される。2本の異なる鎖から構成される分子（すなわち、単分子またはヘアピン siRNA ではない）では、アンチセンス鎖上の対応の相補的塩基を持つセンス鎖の塩基に関して、その鎖の5'最末端位置に位置しているセンス鎖のヌクレオチドのことをいう。したがって、2本の異なる鎖（すなわち、単分子またはヘアピン siRNA ではない）から構成される siRNA では、センス鎖または領域上の任意の5'オーバーハングの一部である塩基以外の5'最末端塩基である。第1の5'末端センス・ヌクレオチドが、ヘアピンを形成することができる単分子 siRNA 分子の一部分である場合、用語「末端」は、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドに対して相補性を持つ塩基からの距離で測定されるセンス鎖または領域内の相対的位置のことをいう。

【0069】

(機能性)

siRNA を、培養細胞系で誘導されるサイレンシングのレベルまたは度合いに基づいて、5つのグループ（非機能性、半機能性、機能性、高機能性、および超機能性）に分けることが可能である。本明細書に用いられるように、これらの違いは、一組の条件に基づいており、該条件とは、siRNA が100 nMの濃度で上記細胞系に形質移入されること、サイレンシングのレベルが形質移入後およそ24時間（しかし形質移入後72時間を超えてはならない）に調べられることである。この文脈のなかで、「非機能性 siRNA (non-functional siRNA)」は、誘導される標的サイレンシングが50%未満 (<50%) である siRNA として定義される。「半機能性 siRNA (semi-functional siRNA)」は、50~79% 標的サイレンシングを誘導する。「機能性 siRNA (functional siRNA)」は、80~95% 遺伝子サイレンシングを誘導する分子である。「高機能性 siRNA (high functional siRNA)」は、95%を上回る遺伝子サイレンシングを誘導する分子である。「超機能性 siRNA (hyperfunctional siRNA)」は、特別な分子種である。この文書の目的のために、超機能性 siRNA は、(1) サブナノモル未満の濃度（すなわち、1ナノモル未満）で形質移入した場合に特異的標的のサイレンシングを95%を上回る率で誘導し、さらに／または(2) 96時間を上回る時間にわたってサイレンシングの機能的（または良好な）レベルを誘導する分子として定義される。これらの相対的機能性（絶対的であることを意図していない）は、機能的ゲノム解析、標的同定、および薬物療法等の用途に対する特定の標的と siRNA とを比較するのに用いられる。

【0070】

(機能的用量)

「機能的用量 (functional dose)」とは、投与後24、48、72、および96時間で100 nM濃度のmRNAを95%以上減少させるという効果を示す siRNA の用量のことをいう。一方、siRNA の「僅かに機能的用量 (marginally functional dose)」は投与後24時間で100 nM濃度のmRNAを50%以上減少させる効果を示し、さらにRNAの「非機能的用量 (non-functional dose)」は投与後24時間で100 nM濃度のmRNAの減少を50%未満とする効果を示す。

【0071】

(ハロゲン)

用語「ハロゲン (halogen)」とは、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素、またはアス

10

20

30

40

50

タチンのいずれかの原子のことをいう。フレーズ「2'ハロゲン修飾ヌクレオチド(2' halogen modified nucleotide)」とは、2'炭素に直接付着した2'位にあるハロゲンにより修飾された糖部分を持つヌクレオチド単位のことをいう。

【0072】

(2'ハロゲン修飾ピリミジン)

フレーズ「2'ハロゲン修飾ピリミジン(2' halogen modified pyrimidine)」とは、ヌクレオチドの糖の2'炭素に対して付着したハロゲン基を含むピリミジン(例えば、シトシンまたはウラシル)のことをいう。

【0073】

(ヌクレオチド間連結)

フレーズ「ヌクレオチド間連結(internucleotide linkage)」とは、1つのsiRNA内での2つのヌクレオチド単位間に存在する結合または連結のタイプのことをいうもので、修飾されたもの、または未修飾のものであってもよい。フレーズ「修飾ヌクレオチド間連結」は、現在のところ公知、これから知られる、さらにまたはこの開示を読むことで当業者が推論する、全ての修飾ヌクレオチド間結合を包含する。ヌクレオチド間連結は、関連した対イオンを有するものであってもよく、この用語は、そのような対イオンと、ヌクレオチド間連結で形成され得る任意の配位化合物とを含むことが意図されている。

【0074】

ヌクレオチド間連結の修飾として、限定されるものではないが、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、5'-アルキレンホスホネテート、5'-メチルホスホネート、3'-アルキレンホスホネート、3'-5'連結または2'-5'連結の三フッ化ホウ素、ボラノホスフェートエステル、およびセレノホスフェート、リン酸トリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、水素ホスホン酸塩結合、アルキル・ホスホネート、アルキルホスホノチオエート、アリールホスホンチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスフィネート、ホスホルアミダート、3'-アルキルホスホルアミダート、アミノアルキルホスホルアミダート、チオノホスホルアミダート、ホスホロピペラジダート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリダート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、カルボネート、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、チオアミダート、リボアセチル基との連結、アミノエチルグリシン、シリルまたはシロキサン連結、ヘテロ原子を含む、ならびに／あるいは飽和もしくは未飽和および／または置換し得る1~10の炭素からなるヘテロ原子を有するか、もしくは持たないアルキルまたはシクロアルキル連結、モルホリノ構造との連結、直接または間接的に主鎖のアザ窒素に対して塩基が付着し得るポリアミド、さらにsiRNA内でのそれらの修飾ヌクレオチド間連結の組み合わせである。

【0075】

(リンカー)

「リンカー(linker)は、他の部分(例えばヌクレオチドおよびそのコンジュゲート)と互いに付着する部分である。細胞に取り込まれる分子の安定性および／または能力をコンジュゲートが高める一方で、リンカーは細胞に取り込まれる分子に対してコンジュゲートを単に付着させることから、リンカーとコンジュゲートとを区別することが可能である。

【0076】

一例として、リンカーは修飾または未修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド、ポリマー、糖および他の炭水化物、ポリエーテル、例えば、ポリエチレングリコール、ポリアルコール、ポリプロピレン、プロピレングリコール、エチレンとプロピレングリコールとの混合物、ポリアルキルアミン、スベルミジン等のポリアミン、ポリ(エチルアクリレート)等のポリエステル、ポリホスホジエステル、およびアルキレンを含むことができる。コンジュ

10

20

30

40

50

ゲートおよびそのリンカーの一例は、コレステロール-TEG-ホスホラミダイトであり、コレステロールはコンジュゲートであり、テトラエチレングリコールおよびホスフェートはリンカーとして用いられる。

【0077】

(ヌクレオチド)

用語「ヌクレオチド (nucleotide)」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、あるいはそれらの修飾された形態、さらにはそれらの類似体のことをいう。ヌクレオチドとして、プリン、例えばアダニン、ヒポキサンチン、グアニン、およびそれらの誘導体および類似体が挙げられ、さらにピリミジンとして、例えばシトシン、ウラシル、チミン、およびそれらの誘導体および類似体が挙げられる。

10

【0078】

ヌクレオチド類似体として、塩基、糖、および／またはリン酸塩の化学構造に修飾を持つヌクレオチドが挙げられ、限定されるものではないが、該ヌクレオチドとして、5位ピリミジン修飾、8位プリン修飾、シトシン環外アミン、および5プロモウラシルの置換；ならびに2'位糖修飾として、限定されるものではないが、糖修飾リボヌクレオチドが挙げられ、ここで該リボヌクレオチドの2'-OHがH、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、もしくはCN等によって置換されており、Rが本明細書に定義したようにアルキル部分である。ヌクレオチド類似体もまた、塩基（例えば、イノシン、キューオシン、キサンチン）、糖（例えば、2'-メチルリボース）、非天然ホスホジエステル連結（例えば、メチルホスホネート、ホスホロチオエート）、ならびにペプチドが含まれることを意図している。

20

修飾塩基とは、ヌクレオチド塩基のことをいい、該塩基として、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ならびに、1つ以上の原子もしくは基の置換または付加によって修飾されたウラシル、キサンチン、イノシン、およびキューオシンが挙げられる。塩基部分に関して修飾されたヌクレオチドから構成し得る修飾の種類のいくつかの例として、限定されるものではないが、アルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミン化、アミド化、またはアセチル化された種々の組み合わせの塩基が挙げられる。より特異的な修飾塩基として、例えば、5-プロピニルウリジン、5-プロピニルシチジン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、N, N-ジメチルアデニン、2-プロピルアデニン、2-プロピルグアニン、2-アミノアデニン、1-メチルイノシン、3-メチルウリジン、5-メチルシチジン、5-メチルウリジンおよび5位に修飾を持つ他のヌクレオチド、5-(2-アミノ)プロピルウリジン、5-ハロシチジン、5-ハロウリジン、4-アセチルシチジン、1-メチルアデノシン、2-メチルアデノシン、3-メチルシチジン、6-メチルウリジン、2-メチルグアノシン、7-メチルグアノシン、2, 2-ジメチルグアノシン、5-メチルオキシウリジン、デアザヌクレオチド、例えば7-デアザーアデノシン、6-アゾウリジン、6-アゾシチジン、6-アゾチミジン、5-メチル-2-チオウリジン、他のチオ塩基、例えば2-チオウリジンおよび4-チオウリジン、および2-チオシチジン、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、任意のO-およびN-アルキル化プリンおよびピリミジン、例えばN6-メチルアデノシン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニルおよび修飾フェニル基、例えばアミノフェノールもしくは2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、G-クランプ・ヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8-置換アデニン、およびグアニン、5-置換ウラシルおよびチアミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアリルヌクレオチド、カルボキシアリルヌクレオチド、およびアリルカルボニルアリル化ヌクレオチドが挙げられる。修飾ヌクレオチドもまた、糖部分に関して修飾されたヌクレオチドと、さらにリボシルではない糖または類似体を持つヌクレオチドとが挙げられる。例えば、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、ならびに他の糖、ヘテロ環、または炭素環が挙げられる。ヌクレオチドという用語もまた、広範な塩基として当業者に知られているものを含むことが意図されている。

30

40

50

実施例として、一例として、広範な塩基として、限定されるものではないが、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネブラリンが挙げられる。

【0079】

さらに、ヌクレオチドという用語はまた、ヌクレオチドに付着した検出可能な標識（例えば放射活性部分または蛍光部分）または質量標識を有する種を含む。

【0080】

（ヌクレオチド単位）

フレーズ「ヌクレオチド単位 (nucleotide unit)」とは、単一のヌクレオチド残基のことをいい、修飾または未修飾窒素塩基、修飾もしくは未修飾の糖、および2つのヌクレオチドまたはさらなる連結を除外するコンジュゲートの連結を可能にする修飾もしくは未修飾の部分とから構成される。

10

【0081】

（オフ・ターゲット）

用語「オフ・ターゲット (off-target)」およびフレーズ「オフ・ターゲット効果」とは、所定の標的に向けられた siRNA または shRNA が、別の mRNA 配列、DNA 配列、または細胞タンパク質もしくは他の部分と直接あるいは間接的に相互作用することによって、意図されていない効果を生ずる、任意の事象をいう。例えば、「オフ・ターゲット効果 (off-target effect)」は、siRNA または shRNA のセンスおよび／またはアンチセンス鎖と他の転写産物との間の部分的相同性または相補性によって、他の転写産物の同時に起こる分解が存在する時に、生ずる可能性がある。

20

【0082】

（オルトエステル）

用語「オルトエステル保護 (orthoester protected)」または「オルトエステル修飾 (orthoester modified)」とは、オルトエステルによるヌクレオチド単位内の糖部分の修飾のことをいう。好ましくは、この糖部分がリボシル部分である。一般に、 $RC(OR')_3$ 構造を持ち、式中 R' は同一または異なるもの、 R は H 、さらに下線が引かれた C はオルトエステルの中心炭素である。本発明のオルトエステルは、ヌクレオチド単位の糖部分の炭素が酸素に結合し、次にオルトエステルの中心炭素に結合しているオルトエステルから構成される。オルトエステルの中心炭素に対して次に結合するものは、2つの酸素原子であり、合計3つの酸素がそのオルトエステルの中心炭素に結合することになる。中心炭素に結合したこれら2つの酸素（いずれも糖部分の炭素には結合しない）は、次に同一または異なる2つの部分を構成する炭素に結合する。例えば、上記酸素の一方はエチル部分に結合することができ、また他方はイソプロピル部分に結合することができる。一例では、 R を H 、1つの R' をリボシル部分とすることができ、他の2つの R' を2つの2-エチルーヒドロキシル部分とすることができ、オルトエステルを糖部分の任意の位置に置くことができ、例えば、2'、3'、および／または5'位に置くことができる。好ましいオルトエステル、さらにオルトエステル保護ポリヌクレオチドの製造方法については、米国特許第5,889,136号および第6,008,400号に記載されている。

30

40

【0083】

（オーバーハング）

用語「オーバーハング (overhang)」とは、第1の鎖または領域が二本鎖を形成する相補性鎖の末端を越えて延びる1本の鎖または領域から生ずる、末端の塩基対を形成していない1つまたは複数のヌクレオチドのことをいう。塩基対の水素結合を介して二本鎖を形成することができる2つのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域の一方または両方が、2つのポリヌクレオチドまたは領域によって共有された相補性の5'および／または3'末端を越える3'および／または5'末端を有することが可能である。二本鎖の3'および／または5'末端を越えて延びる一本鎖領域を、オーバーハングという。

50

【0084】

(医薬的に許容される担体)

フレーズ「医薬的に許容される担体 (pharmaceutically acceptable carrier)」として、細胞への dsRNA、dsDNA、または dsRNA/DNA ハイブリッドの導入を促進させる組成物が挙げられ、また限定されるものではないが、溶媒または分散剤、コーティング剤、抗感染剤、等張剤、および本発明のポリヌクレオチドおよび siRNA の吸収時間もしくは放出の媒介となる薬剤が挙げられる。

【0085】

(ポリヌクレオチド)

用語「ポリヌクレオチド (polynucleotide)」とは、ヌクレオチドのポリマーのことをいい、限定されるものではないが、DNA、RNA、DNA/RNA ハイブリッドが挙げられ、規則的および不規則的に交互になったデオキシリボシル部分およびリボシル部分からなるポリヌクレオチド鎖（すなわち、交互ヌクレオチド単位が、糖部分の 2' 位で、-OH、次に -H、次に -OH、つぎに H、等を持つ）と、種々の構成要素または部分が任意の位置でヌクレオチド単位に付着しているそのような種類のポリヌクレオチドの修飾とが含まれる。特に明記しない限り、または文脈から明らかにならない限り、用語「ポリヌクレオチド」として、単分子 siRNA と 2 本のことなる鎖から構成される siRNA とが挙げられる。

10

【0086】

(ポリリボヌクレオチド)

用語「ポリリボヌクレオチド (polyribonucleotide)」とは、2 つ以上の修飾または未修飾リボヌクレオチドおよび／あるいはそれらの類似体を含むポリヌクレオチドのことをいう。

20

【0087】

(リボヌクレオチドおよびリボ核酸)

用語「リボヌクレオチド (ribonucleotide)」およびフレーズ「リボ核酸 (ribonucleic acid)」(RNA) は、少なくとも 1 つのリボヌクレオチド単位を含む修飾または未修飾のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのことをいう。リボヌクレオチド単位は、リボシル部分の 1' 位での N-グリコシド連結に付着した窒素塩基を持つリボシル部分の 1' 位、さらに別のヌクレオチドに対する連結を可能にするか、もしくは連結を妨げる部分の 2' 位に対して付着する酸素を含む。

30

【0088】

(RNA 干渉および RNAi)

フレーズ「RNA 干渉 (RNA interference)」および用語「RNAi」は同義であり、少なくとも 1 つのリボヌクレオチド単位を含むポリヌクレオチドまたは siRNA が生物学的プロセスに対する効果を奏するプロセスのことをいう。このプロセスは、限定されるものではないが、mRNA を分解し、翻訳を減衰させ、tRNA、rRNA、hnRNA、cDNA、およびゲノム DNA による相互作用を生ずることによって、同様に付加的なタンパク質によって DNA のメチル化をおこなうことによっておこなわれる遺伝子サイレンシングを含む。

40

【0089】

(第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチド)

フレーズ「第 2 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチド」とは、第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドに直接隣接し、かつ第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドの 3' 位に付着したヌクレオチドのことをいう。したがって、それは、対応のセンス・ヌクレオチドが存在する一組のヌクレオチド内のアンチセンス鎖または領域の最も 5' 末端側にある第 2 のヌクレオチドである。

【0090】

(第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチド)

フレーズ「第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチド」とは、第 1 の 5' 末端センス・ヌク

50

レオチドに直接隣接し、かつ第1の5'末端センス・ヌクレオチドの3'位に付着したヌクレオチドのことをいう。したがって、それは、対応のアンチセンス・ヌクレオチドが存在する一組のヌクレオチド内のセンス鎖または領域の最も5'末端側にある第2のヌクレオチドである。

【0091】

(センス鎖)

フレーズ「センス鎖 (sense strand)」とは、伝令RNAまたはDNA配列等の標的核酸として、部分的または全体的に、同一のヌクレオチド配列の持つポリヌクレオチドまたは領域のことをいう。フレーズ「センス鎖」として、2本の異なる鎖から形成されるポリヌクレオチドの両方のセンス領域と、ヘアピン構造を形成することができる単分子 siRNA のセンス領域とが挙げられる。配列が提供される場合、慣例によって、特に明記しない限り、それはセンス鎖 (または領域) であり、相補性アンチセンス鎖 (または領域) の存在が暗に含まれる。フレーズ「センス鎖 (sense strand)」および「センス領域 (sense region)」は、等価であることを意図しており、同義的に使われる。

10

【0092】

(siRNA、すなわち短い干渉RNA)

用語「siRNA」およびフレーズ「短い干渉RNA (short interfering RNA)」とは、単分子の核酸のことをいい、またRNAiを実行することが可能であり、かつ18と30との間の塩基対長である二本鎖を持つ2本の異なる鎖から構成される核酸のことをいう。また、用語「siRNA」およびフレーズ「短い干渉RNA」として、リボヌクレオチド部分以外の部分も含む核酸が挙げられ、該部分として、限定されるものでないが、修飾ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド連結、非ヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、および上記ヌクレオチドの類似体が挙げられる。

20

【0093】

siRNAを二本鎖とすることができ、また短いヘアピンRNA、4〜23以上のヌクレオチドほどの長さのループを持つRNA、ステムループ状の突出持つRNA、マイクロRNA、および短い一過性のRNAが挙げられる。ループまたはヘアピン・ループを持つRNAとして、該ループがフレキシブル・リンカー等のリンカーによって幹部分 (ステム) に結合している構造が挙げられる。フレキシブル・リンカーは、多種多様な化学構造から構成せられ、かつステム構成要素の効果的な分子間ハイブリダイゼーションを可能にする十分な長さで材料とからなる。概して、スパンの長さは、少なくとも約10〜24原子である。

30

【0094】

siRNAがヘアピンである場合、センス鎖およびアンチセンス鎖は、1つの長い分子の一部分である。

【0095】

(安定化)

用語「安定化 (stabilized)」とは、dsRNAが分解に抗する一方で機能性を保つ該dsRNAの能力のことをいい、その能力は、例えば血清等の生物学的材料の存在下で、半減期として測定される。siRNAの半減期とは、例えば血清中で、siRNAが50%分解するのにかかった時間のことをいう。

40

【0096】

(実質的な相補性)

実質的な相補性 (substantial complementarity) とは、90%以上の相補性を示すポリヌクレオチド鎖のことをいう。

【0097】

(トラックアビリティ)

用語「トラックアビリティ」とは、分子が細胞に導入される等の後に、該分子の移動または配置を追跡する能力のことをいう。「トラックアブル (trackable)」である

50

分子は、細胞形質移入手順等の成功および失敗を観察する上で有用である。

【0098】

(好ましい実施形態)

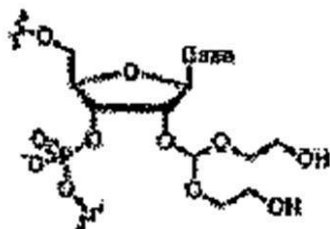
ここで、好ましい実施形態に関連して本発明を説明する。これらの実施形態は、本発明の理解を助けるために提供されており、いかなるかたちであれ、本発明を限定することを意図したものではなく、またそのような意図があると解釈すべきものではない。この開示を読むことによって当業者が理解しうる代替物、修飾、および等価物の全てが本発明の精神および範囲内である。

【0099】

第1の実施形態によれば、本発明は s i R N A を提供する。この s i R N A は、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドから構成されるポリヌクレオチドを含むセンス鎖と、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド単位を含むアンチセンス鎖とを含む。好ましくは、修飾ヌクレオチドは、リボヌクレオチドまたはその類似体である。オルトエステルを、糖部分の任意の位置、例えば2'、3'、および/または5'位に、置くことができる。好ましくは、オルトエステル部分は、糖部分の2'位にある。好ましくは、オルトエステル、およびポリヌクレオチドで保護されたオルトエステルの製造方法は、米国特許第5,889,136号および第6,008,400号に記載されている。また、好ましくは、オルトエステルは、リボシル部分の2'位に付着している。好ましくは、オルトエステルは、2つの2-エチルーヒドロキシル置換基を含む。最も好ましいオルトエステルを以下に示、また本明細書では、2'-ACEまたは2'-ビス(ヒドロキシエチル)オルトエステル部分と呼ぶ。すなわち、

【0100】

【化3】



2'-ACE 保護 RNA の構造

センス鎖上のオルトエステル基を含む利点は、図1A、1B、2A、および2Cを参照することによってわかる。

【0101】

図1に示すデータの生成は、いくつかの変異体でDharmacon Inc.の登録商標ACEケミストリーを用いることで合成したs i R N A二本鎖標的SEAP(ヒト分泌アルカリ・ホスファターゼ)を用いて、おこなった。これらの変異体として、裸、または未修飾のRNA、すなわち各の2'-OHがオルトエステルによる修飾を受けているACE保護RNAと、フッ素が各2'炭素および各CおよびUに結合している2'フルオロ修飾変異体とが挙げられる。

【0102】

s i R N Aの二本鎖を、センス鎖とアンチセンス鎖とから構成することができる。センスおよびアンチセンス鎖の全ての可能な組み合わせからなるアレイが生成された。図1を参照すると、以下の用語が用いられる。

【0103】

S — s i R N A二本鎖内の裸センス鎖。

【0104】

A S — s i R N A二本鎖内の裸アンチセンス鎖。

【0105】

pS — siRNA二本鎖内の2' ACE保護センス鎖。

【0106】

pAS — siRNA二本鎖内の2' ACE保護アンチセンス鎖。

【0107】

2FS — フッ素原子が各Cおよび／またはU保持ヌクレオチド単位の2'炭素に結合するようにして、全てのCおよびUを持つsiRNA内のセンス鎖。

【0108】

2FAS — フッ素原子が2'炭素、または各Cおよび／またはU保持ヌクレオチド単位の結合するようにして、全てのCおよびUを持つsiRNA内のアンチセンス鎖。

10

【0109】

S—ASとは、裸センス鎖および裸アンチセンス鎖から形成された二本鎖siRNAのことをいう。

【0110】

pS—ASとは、ACE修飾センス鎖および裸アンチセンス鎖から形成された二本鎖siRNAのことをいう。

【0111】

P2'F—2'修飾を有する、CsおよびUsを除く全てのヌクレオチドの2'—ACE修飾。

【0112】

20

pAAV6プラスミド（SEAP発現プラスミド）と目的のsiRNAとによって、二本鎖を同時形質移入し、あるいは安定にSEAPを発現するHEK293細胞中にsiRNAを形質移入した。両方の条件下で、標準的な形質移入用の手順を用いたが、結果はHela、MDA75、または3T3Li（マウス）細胞系のあいだで変化はなかった。

【0113】

siRNA誘導SEAPサイレンシングのレベルは、製造元のプロトコルに従ってClontechのSEAP検出キットを用いて、形質移入後の異なる時点（24、48、72、または144時間）で決定した。タンパク質減少レベルは、mRNA減少レベルと良好な一致が見られる（mRNAのレベルは、Quantigeneキット（Bayer）を用いて測定した）。siRNA誘導毒性は、AlmaBlue毒性アッセイあるいはハウスキーピング遺伝子（シクロリン）さもなければ両方の発現レベルを用いて測定した。特に明記しない限り、著しい毒性は何ら観察されなかった。

30

【0114】

1～100ナノモル濃度のあいだ（図1）、および10ピコモル濃度～1マイクロモル濃度（図2）のあいだで濃度を変えて、細胞に各の二本鎖を形質移入した（図1）。図1および図2では、裸および2'フルオロ修飾と組み合わせて、siRNA二本鎖のセンスおよびアンチセンス鎖に対するACE修飾の導入の効果が示されている。

【0115】

オリゴのアンチセンス鎖に対するACE修飾の存在がsiRNA二本鎖の機能性と著しく干渉する。ACE修飾センス・オリゴは、裸または2'F修飾ASオリゴと一緒に使用されているかどうかに関わらずSEAPサイレンシングで影響を及ぼした。

40

【0116】

サイレンシングの程度を24、48、または72時間で比較し、siRNAサイレンシングでの検出可能な減少を144時間後に観察した。

【0117】

図3および図4は、AS（図3）およびセンス（図4）鎖を一定に保ち、反対側の鎖に対する種々の修飾を組み合わせてスクリーニングしたsiRNA機能性スクリーニングをまとめたものである。特に、AS鎖を、（1）裸に、（2）全てのCおよびUで2'F基によって修飾、（3）2、4、6、14、および18位（5'側から数える）で2'デオキシ基により修飾、（4）67～10位（鎖の5'側から計算）に位置したものを除く、

50

UおよびCsの全てでの2'-O-メチル基による修飾、(5)全ての位置でのホスホロチオエートによる修飾、あるいは(6)1~6位および14~19位(鎖の5'側から計算)でのホスホロチオエートによる修飾のいずれかをおこなった。これらのAS鎖に対して、(1)裸、(2)全ての位置で2'-ACE修飾、(3)全てのCsおよびUsでの2'F修飾、(4)全てのUsで修飾された2'アミン(NH₂)、(5)全ての奇数のヌクレオチド(例えば、1、3、5、...)に対する2'-デオキシ修飾、(6)全てのCおよびUでの2'-O-メチル修飾、あるいは(7)全ての位置でホスホロチオエートを担持するセンス鎖との対形成をおこなった。これらの実験の結果は、アンチセンス鎖の記述された2'-O-メチル修飾が耐容性を示さない一方で、ホスホロチオエート、2'F、および2'デオキシ修飾を含む他の修飾が、種々のセンス鎖修飾と組み合わせさせて、この鎖上で可能であることを示している。同様に、図4では、アミン修飾が一般にセンス鎖に対して耐容性を示さない一方で、2'-ACE、2'F、2'デオキシ、2'-O-メチル、およびホスホロチオエート付加が、種々のAS鎖修飾と組み合わせさせて、重大な機能性の混乱を招くことなく、可能であることが示されている。

10

【0118】

図5、6、7、および8は、使用した修飾の種類に応じてグループ分けしたより詳細なデータを表す。図5では、裸、2'-O-ACE修飾、または2'F修飾センス鎖が、2'F-8T AS = 鎖の各端にある4つのホスホロチオエート、各端の第2のヌクレオチドから開始、それに加えてCおよびUにF基；8T AS = 鎖の各端にある4つのホスホロチオエート、各端の第2のヌクレオチドから開始；4T-AS = 各端の第2のヌクレオチドから開始して鎖の各端上に2つのホスホロチオエートのいずれかと、対を形成した。図6では、偶数位置、または12位(AS-Thio12、鎖のいずれかの端部上にある6つのホスホロチオエート)でのホスホロチオエート修飾を含むアンチセンス鎖を、裸にした、全ての位置で2'-ACE修飾した、または全ての位置でホスホロチオエート修飾した相補的センス鎖と対を形成した。あるいは、全ての位置でホスホロチオエートを持つセンス鎖を、裸にした、全てのCおよびUで2'F基を持つ、全ての位置でホスホロチオエートを持つ、あるいは12ホスホロチオエートを持つ(各末端での6つのヌクレオチドの修飾)アンチセンス鎖と対を形成した。図7について、2'-Ome = ヌクレオチド7~11位のあいだに生ずるものを除いた全てのUおよびC上の2'-O-メチル修飾と、S-Ome = センスのCおよびU上の2'-O-メチル修飾とを担持するアンチセンス鎖は、裸の、S-2'ACE = 全てのヌクレオチド上の2'ACE修飾；S-デオキシ・ハイブリッド = 上記鎖をまたがる全ての奇数ヌクレオチド(1、3、5...)上の2'デオキシ修飾；S-Ome = センス鎖の全てのCおよびUの2'-O-メチル修飾；AS-2'F = 上記鎖上の全てのCおよびUの2'F修飾；AS-デオキシ・ハイブリッド = ヌクレオチド2、4、6、14、16、18の2'デオキシ修飾；あるいはAs-Ome = ヌクレオチド7~11位のあいだに生ずるものを除く全てのUおよびCの2'-O-メチル修飾のいずれかと一致した。図8に関して、デオキシ修飾を担持するAS鎖(AS-デオキシハイブリッド=ヌクレオチド2、4、6、14、16、18の2'デオキシ修飾)をセンス鎖と組み合わせた。ここでセンス鎖は、裸の、S-2'ACE修飾 = 全てのヌクレオチド上の2'ACE修飾；S-Ome = 全てのUおよびCでの2'-O-メチル修飾；または2'デオキシ(1位、3位、5位、...その他)であった。同様に、センス-2'デオキシ・ハイブリッド(1位、3位、5位、...その他)を、裸の、2'F修飾(CおよびU)、2'-O-メチル(7位~11位のあいだにあるものを除いたUおよびC)、ならびに2'デオキシ(2位、3位、6位、14位、16位、18位)であるアンチセンス鎖と対を形成した。

20

30

40

【0119】

特に、図5は、裸の2'ACE修飾および2'F修飾センス鎖との組み合わせでアンチセンス鎖に置かれた場合、ホスホロチオエート修飾が十分に許容される。

【0120】

図6は、ホスホロチオエート主鎖修飾が非特異的に誘導された毒性について同様の制限

50

を持つセンスおよびアンチセンス鎖上の両方で許容されることを、さらに示す。

【0121】

図7は、2'-O-メチル修飾の存在が siRNA 二本鎖のセンス上で十分に許容されるが、siRNA 二本鎖のアンチセンス鎖では許容されないことを示している。機能的 siRNA 二本鎖が 2'-O-メチル修飾 AS 鎖とセンス鎖のデオキシハイブリッドとの組み合わせによって形成されることについて述べる価値がある。

【0122】

図8は、RNA 干渉でのデオキシハイブリッド型の修飾の適合性を示す。デオキシリボハイブリッドは、RNA/DNA ハイブリッド・オリゴであり、デオキシおよびリボ構成要素が共に、例えばデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとが交互になった配列中のオリゴに取り込まれる。これらの種類のオリゴの設計で、連続した DNA/RNA 二本鎖の広がり大きさを 5 ヌクレオチドよりも短く保つことで、RNアーゼH活性の導入を避けることが重要である。デオキシリボハイブリッドは、2'フルオロおよび 2'ACE 修飾オリゴと組み合わせてセンスおよびアンチセンス鎖の両方で機能的であった。また、デオキシハイブリッド・センス鎖は、アンチセンス鎖が 2'-O-メチルで修飾された場合に siRNA 活性を支持する唯一の修飾（それらの条件下）であった。

【0123】

図9は、ACE および 2'フルオロ修飾 siRNA の効力を改善するためのコレステロールを含むコンジュゲートの有用性を示す。上記センス鎖上でコレステロールを含むコンジュゲートを用いることで、センス鎖に対する修飾による不の効果を軽減するが、アンチセンス鎖に対する修飾による負の効果を改善することはない。

【0124】

図10は、センス鎖上のPEGコンジュゲートに関して等価なデータを示す。

【0125】

図11は、コレステロールを含むコンジュゲートの存在が修飾 siRNA オリゴの効力を改善することを示す。

【0126】

図12は、Dharmacon の 2'-ACE RNA 合成ケミストリーで使用される保護 RNA ヌクレオチドの構造を示す。

【0127】

図13は、RNA 合成サイクルを概説する。好ましくは、そのサイクルは、適当な合成装置上で自動化された様式でおこなわれる。ステップ(i)では、取り込まれるホスホラミダイト（ここでは、窒素塩基としてウリジンを持つ）は、示したメチル基のかわりに 3'位のホスホラミダイト部分上に任意の許容可能な基を持つことができる。例えば、アルキル基またはシアノエチル基をその位置で用いることができる。この RNA 合成サイクルを、修飾ヌクレオチド間連結を持つポリヌクレオチドを合成する場合、および／または他の修飾（例えば、2'位で）を持つポリヌクレオチドを合成する場合、ある種の変化によって、以下に説明するように、実施することができる。

【0128】

図14は、2'脱保護直前の 2'-ACE 保護 RNA 産物の構造を示す。2'位にオルトエステルを保持することが必要な場合、この 2'脱保護ステップが実施されない。

【0129】

3'末端にジードTオーバーハングを持つ 19 量体二本鎖、すなわちセンス鎖の第2、第5、第7、第9、第11、および第19位で 2'アミン修飾ヌクレオチド単位を持つ G 2'-N-UGA 2'-N-UG 2'-N-UA 2'-N-UG 2'-N-UCAGAG AG 2'-NUdTdT について、アンチセンス鎖が裸であるか、全ての C および U で 2'フルオロ修飾されているか、交互にリボヌクレオチド単位とデオキシリボ単位とを含むデオキシハイブリッドであるか、または 2'-O-メチル修飾を有するか否かに関わらず、機能性の著しい喪失が生じた。好ましくは、センス鎖は、第2、第5、第7、第9、第11、および第19位で 2'アミノ修飾を含まない。

【0130】

3' ジー d T オーバーハングを持つ s i R N A 1 9 量体（配列番号 1 7 1 ~ 3 1 4 を見よ）上で、デオキシリボヌクレオチド単位による任意のリボヌクレオチド単位の置換は、修飾がセンスまたはアンチセンス鎖のいずれにあっても、R N A i における 1 9 量体の機能性に対して著しい影響を及ぼすことはない（図 1 5 A 参照）。同一 s i R N A 1 9 量体上で、相前後した 2 つのデオキシリボヌクレオチド単位による 2 つの隣接リボヌクレオチド単位の置換は R N A i 内での 1 9 量体の機能性に著しい影響を及ぼすものではない。図 1 5 B は、1 および 2 位、3 および 4 位、5 および 6 位等が個々にデオキシリボヌクレオチドに修飾される場合、該修飾がセンス鎖に生じると機能性が著しく影響を受けることはなく、そのような修飾がアンチセンス鎖上に生ずると機能性に対して僅かに負の影響が現れることを、示している。同一の s i R N A 1 9 量体上では、相前後した 3 つのデオキシリボヌクレオチド単位による 3 つの隣接リボヌクレオチド単位の置換は、その修飾がアンチセンス上でのものであれば機能性に著しい影響を及ぼすものではないが、修飾された単位がセンス鎖の第 1 から第 3、または第 7 から第 9 スクレオチドである場合、機能的に著しい影響（場合によっては）を受ける。この実験では、ポリリボヌクレオチドの単位 1 ~ 3、4 ~ 6、7 ~ 9 等を、個々にデオキシリボヌクレオチド単位によって置換した（図 1 5 C 参照）。

10

【0131】

3' ジー d T オーバーハングを有する同一 s i R N A 1 9 量体ポリリボヌクレオチド上で、2'-O-メチル部分による任意の個々の単位の修飾は、修飾がセンスまたはアンチセンス鎖にあらうとなかろうと、R N A i での 1 9 量体の機能性に対して著しい影響を与えることはない（図 1 6 A 参照）。同一 s i R N A 1 9 量体を用いて、相前後する 2 つの 2'-O-メチル修飾による 2 つの隣接リボヌクレオチド単位の置換は、アンチセンス鎖の第 1 および第 2、または第 1 3 および第 1 4 の位置で、あるいはセンス鎖の第 1 7 および第 1 8 の位置で、修飾が起こらない限り、R N A i での 1 9 量体の機能性に著しい影響を与えない（図 1 6 B 参照）。以降の実験によって、アンチセンス鎖の第 1 3 位および第 1 4 位、さらにセンス鎖の第 7 位および第 8 位が決定的ではないことが確認された。最も顕著に、機能性の変化を補正する修飾が追加されない場合、機能性を維持するならばアンチセンス鎖の第 1 および第 2 位が 2'-O-メチル修飾を持ってはならない。同一の s i R N A 1 9 量体を用いて、相前後する 2'-O-メチル修飾を持つ 3 つの隣接リボヌクレオチド単位の置換は、第 1 位 ~ 第 3 位以外の位置でその修飾がアンチセンス鎖上にある場合、機能性に対して著しい影響を及ぼさない（図 1 6 C 参照）。この実験では、ポリリボヌクレオチドの 1 ~ 3 位、4 ~ 6 位、7 ~ 9 位等を 2'-O-メチル部分により個々に修飾した。

20

30

【0132】

単一の 2'-デオキシ部分または単一の 2'-O-メチル部分のいずれかによる同一ポリリボヌクレオチドの修飾は、機能性に対して著しい影響を及ぼすことはない。タンデムになった 2 つ以上の 2'-O-メチル部分によるアンチセンス鎖の 1 および 2 位、あるいは 1、2、および 3 位の修飾によって、機能性を著しく減少させることができる。センス鎖上の 7 ~ 9 位およびアンチセンス鎖上の 1 3 ~ 1 5 は、タンデムになった 2 つ以上の 2'-O-メチル修飾に対して感受性を持つ。したがって、好ましくはアンチセンス鎖は、二本鎖内の他の位置に競合する修飾が起こらない限り、第 1 および第 2、第 1、第 2、および第 3、第 1 3 および第 1 4、ならびに第 1 3、第 1 4 および第 1 5 位に 2'-O-メチル修飾を含まない。以降の実験は、アンチセンス鎖上の 1 および 2 位（または 1 および 2、ならびに 3 位）の 2'-O-メチル修飾は、二本鎖機能性の鍵である。センス鎖上の 7 ~ 9 位ならびにアンチセンス鎖上の 1 3 ~ 1 5 位はあまり重要ではない。

40

【0133】

ヌクレオチドの全てが、選択されたヌクレオチドのみが修飾されるセンス鎖よりも、オルトエステル基で全てのヌクレオチドが修飾されるセンス鎖を合成するほうが、実用上の問題として無駄がない。しかし、理論的には、ある種のヌクレオチドのみが修飾される実

50

用的手段がセンス鎖を合成するために開発されていることから、本発明ではこれらのポリヌクレオチドを用いることができた。

【0134】

好ましくは、2'修飾ヌクレオチドは、2'ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'アミン修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、および2'アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される。修飾がハロゲンである場合、そのハロゲンは好ましくはフッ素である。上記修飾がフッ素であると、好ましくは、シトシンまたはウラシル塩基部分を含む1つ以上のヌクレオチドにそれが付着する。2'修飾ヌクレオチドが2'アミノ修飾ヌクレオチドである場合、アミンは好ましくは-NH₂である。この2'修飾ヌクレオチドが2'-O-アルキル修飾である場合、好ましくは上記修飾が2'-O-メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはイソブチル部分であり、最も好ましくは、2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル部分である。2'修飾ヌクレオチドが2'-アルキル修飾である場合、好ましくは修飾は2'メチル修飾であり、該メチル部分の炭素が直接、糖部分の2'炭素に付着する。

10

【0135】

図2Cは、siRNA効果が形質移入後144時間で次第に消え始めていくことを示している。修飾されたオリゴの用量および効力は、裸siRNA二本鎖と同等であった。

【0136】

第2の実施形態によれば、本発明はセンス鎖を含むsiRNAを提供する。ここで、このセンス領域は、第1の実施形態に基づいて提供される少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドと、第1の実施形態に基づいて提供される少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドと、コンジュゲートとを含む。好ましくは、上記修飾が2'メチル修飾であり、そのメチル部分の炭素が糖部分の2'炭素に直接付着している。

20

【0137】

図2Cは、siRNA効果が形質移入後144時間で次第に消え始めていくことを示している。修飾されたオリゴの用量および効力は、裸siRNA二本鎖と同等であった。

【0138】

第2の実施形態によれば、本発明はセンス鎖を含むsiRNAを提供する。ここで、このセンス領域は、第1の実施形態に基づいて提供される少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドと、第1の実施形態にもとづいて提供される少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドと、コンジュゲートとを含む。

30

【0139】

この実施形態内のコンジュゲートは、好ましくは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。より好ましくは、コレステロール、ポリエチレングリコール、抗原、抗体、およびレセプター・リガンドからなる群から選択される。よりいっそう好ましくは、コンジュゲートはコレステロールまたはポリエチレングリコールを含む。もっとも好ましくは、コンジュゲートはコレステロールを含み、5'炭素位でセンス鎖の5'末端ヌクレオチド単位と連結する。

【0140】

センス鎖の5'末端におけるコレステロール修飾コンジュゲートの導入は、裸または未修飾二本鎖に匹敵する、あるいはそれよりも優れたオルトエステル修飾および2'アンチセンス修飾siRNAに対する効力の増加をもたらした。図9および11を見よ。センス鎖の5'末端でのコレステロール含有コンジュゲートの導入は、対応する裸二本鎖に匹敵する、あるいはそれよりも優れたオルトエステル修飾および2'フッ素修飾siRNAに対する機能的有効量の減少をもたらした。

40

【0141】

図9は、ACEおよび2'フッ素修飾siRNAの効力を改善するためのコレステロールの有用性を示す。正のコレステロール効果が、主にセンス塩化物上に導入された修飾によって観察された。例えば、配列番号1~16のセンス鎖の5'位にある5'末端に対し

50

てコレステロール部位が付着することで、形質移入作用因子の不在下でRNAiが生ずる（図18参照）。

【0142】

第3の実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチド、アンチセンス鎖、およびコンジュゲートから構成されるセンス鎖を持つsiRNAを提供する。この実施形態では、上記第1の実施形態のオルトエステル修飾を、上記第2の実施形態のコンジュゲートと組み合わせて、用いてもよい。

【0143】

第4の実施形態によれば、本発明は、センス鎖、アンチセンス鎖、およびコンジュゲートを有し、上記センス鎖および／またはアンチセンス鎖が少なくとも2'修飾ヌクレオチドを有するsiRNAを提供する。この実施形態の2'修飾ヌクレオチドは、上記第1の実施形態の2'修飾ヌクレオチドと同様のパラメーターに基づいて、好ましくは選択される。同様に、上記コンジュゲートは、上記第2の実施形態でコンジュゲートが選択された同一のパラメータにもとづいて選択される。

【0144】

第5の実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドと、2'ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'アミン修飾ヌクレオチド、2'ーOーアルキル修飾ヌクレオチド、および2'アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドから構成されるアンチセンス鎖と、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるコンジュゲートとを有し、上記ポリヌクレオチドが18～30のヌクレオチド塩基対を含むsiRNAを提供する。

【0145】

この実施形態のオルトエステルは、上記第1の実施形態のオルトエステルを選択するための基準に基づいて選択される。上記2'修飾がハロゲンである場合、好ましくはハロゲンがフッ素であり、アンチセンス鎖の少なくとも1つはCおよび／またはU含有ヌクレオチド単位に付着する。上記2'修飾ヌクレオチドが2'アミノ修飾ヌクレオチドである場合、アミンは好ましくはNH₂である。2'修飾ヌクレオチドが2'ーOーアルキル修飾である場合、好ましくは2'ーOーアルキル修飾が2'ーOーメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはイソブチル部分であり、最も好ましくは2'ーOーアルキル修飾が2'ーOーメチル部分である。2'修飾ヌクレオチドが2'アルキル修飾である場合、好ましくは、それは2'メチル修飾であり、そのメチル部分の炭素が直接、糖部分の2'炭素に付着している。

【0146】

第6の実施形態によれば、本発明は以下の構造を含む組成物を包含する。

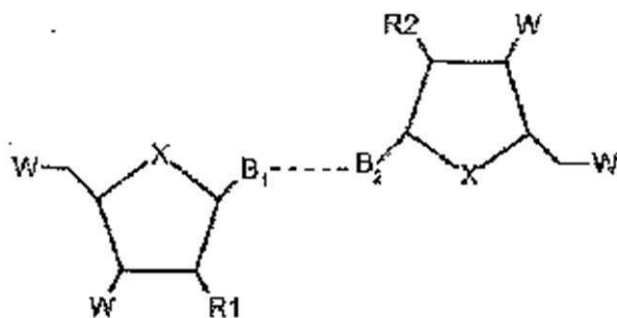
【0147】

10

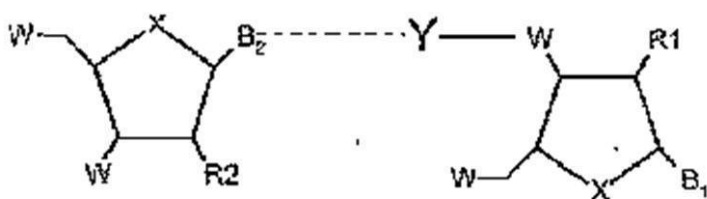
20

30

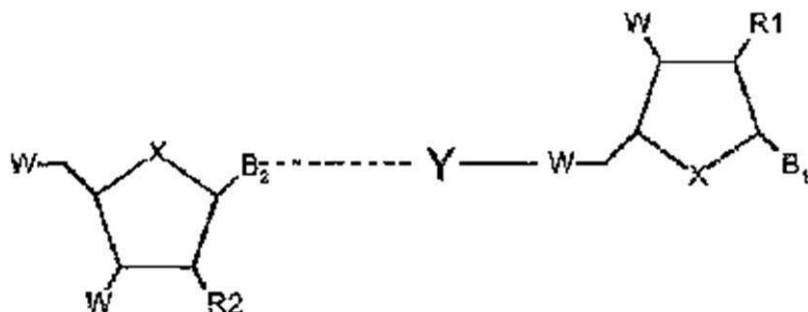
【化 4】



または



または



式中、 B_1 および B_2 の各々が窒素含有塩基、複素環、または炭素環式化合物であり、 X が O 、 S 、 C 、および N からなる群からなる群から選択され、 W が OH 、リン酸塩、リン酸エステル、リン酸ジエステル、ホスホトリエステル、修飾ヌクレオチド間連結、コンジュゲート、ヌクレオチド、およびポリヌクレオチドからなる群から選択され、 R_1 がオルトエステル、 R_2 が $2'$ - O -アルキル基、アルキル基、アミン、およびハロゲン、さらに Y がヌクレオチドまたはポリヌクレオチドである。 R_2 がハロゲンである場合、このハロゲンは好ましくはフッ素である。 R_2 がフッ素である場合、フッ素は好ましくは1つ以上の C および U 含有ヌクレオチド単位に付着している。 R_2 がアミンである場合、このアミンは好ましくは $-NH_2$ である。 R_2 が $2'$ - O -アルキル修飾である場合、好ましくは、それは $2'$ - O -メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、またはイソブチル部分であり、より好ましくは、 $2'$ - O -メチル部分である。 R_2 が $2'$ アルキル修飾である場合、好ましくは、それは $2'$ メチル修飾であり、該メチル修飾の炭素が直接、糖部分の $2'$ 炭素に付着している。

【0148】

この実施例の R_1 、オルトエステルは、上記第1の実施形態のオルトエステルを選択するためのパラメータに基づいて選択される。

【0149】

式中の破線は、窒素含有塩素間の水素結合による相互作用を示す。好ましくは、 B_1 および B_2 は、天然の窒素含有塩素、例えばアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、キサンチン、ヒポキサンチン、およびクエウオシン、あるいはそれらの類似体であ

る。好ましくは、XがOである。

【0150】

上記実施形態の各々に関して、s i R N Aは任意の長さのものであり、好ましくは18～30ヌクレオチド塩基対、より好ましくは18～19塩基対であり、任意のオーバーハングが除かれる。長さが約30塩基対未満のs i R N Aを用いることで、非特異的なプロセス（例えばs i R N A適用の機能性を減少させるインターフェロン関連の反応）を避けることができ、その一方でR N A干渉適用における機能的反応が保たれる。さらに、好ましくは、上記ヌクレオチドはリボヌクレオチドである。

【0151】

上記実施形態において、オーバーハングが鎖の一方または両方に存在し得る。好ましくは、s i R N Aがオーバーハングを有する場合、長さが1～6ヌクレオチド単位、より好ましくは2～3、さらに最も好ましくは2であり、s i R N Aの各々の鎖の3'末端に位置する。しかし、平滑末端を有するs i R N Aは機能的である。2つのヌクレオチドのオーバーハングが最も好ましい。

【0152】

上記実施形態での類似性は、s i R N Aのいずれか一方の鎖または両方の鎖が、1つ以上の修飾ヌクレオチド間連結を持ち得ることである。好ましくは、修飾ヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエートとホスホロジチオエートとからなる群から選択される。さらに、好ましくは、上記ポリヌクレオチドが4を上回る数の修飾ヌクレオチド間連結を持つことができる。より好ましくは、本発明のポリヌクレオチドが、8を上回る数の修飾ヌクレオチド間連結を含む。最も好ましくは、約10個の修飾ヌクレオチド間連結が用いられる。安定性を最も高くするために、完全な修飾が好ましいが、実際に用いることができる修飾連結の数に対して、数多くの因子が影響を及ぼす。このような因子として、連結によって与えられる安定性の度合い、連結が機能性に影響を及ぼす度合い、化学的に連結を導入する能力、さらに連結の毒性が挙げられる。好ましくは、修飾はエクソヌクレアーゼ活性に対する保護のために、3'および5'末端に配置される。

【0153】

本発明の上記実施形態のポリヌクレオチドは、安定化されている。これらの安定化したs i R N Aの半減期は、約20秒から100時間以上である。好ましくは、本発明の安定化s i R N Aの半減期は1時間を超える。より望ましくは、本発明の安定化s i R N Aは、10時間を超える半減期を示す。もっとも好ましくは、本発明の安定化s i R N Aは、100時間を上回る半減期を示す。その上、望ましくは、s i R N Aの効果は、少なくとも1世代以上にわたる細胞分裂を存続する。

【0154】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト血清存在下で高い安定性を示す。好ましくは、例えば、ヒト血清中での本発明の19量体二本鎖の半減期が数分から24時間である。より好ましくは、ヒト血清での19量体二本鎖の半減期が24時間から3日間である。最も好ましくは、血清中での19量体二本鎖の半減期は3～20日以上である。

【0155】

第2、第4、第6、第14、第16、および第18位でのデオキシリボ核酸修飾を持つアンチセンス鎖を有する19量体ポリリボヌクレオチド二本鎖にとって、37℃で1時間30分、胎仔牛血清にさらすことで、おそらくは血清ヌクレアーゼによって、第4および第6位が分解から守られた。同様に、第2～第6、第12、第14、第16および第17、さらに第19位にあるアンチセンス鎖上の2'-O-メチル修飾を含む19量体ポリリボヌクレオチド二本鎖に関して、血清ヌクレアーゼによる分解からこれらの位置が保護された。ヌクレオチド1～6および13～19間での19量体ポリリボヌクレオチド二本鎖に対するアンチセンス鎖内のホスホロチオエート修飾の導入によって、血清ヌクレアーゼ分解に抵抗する修飾ヌクレオチド間結合が与えられる。しかし、アンチセンス鎖の各2'位でACEオルトエステル部分により修飾された19量体によっては、ヒト血清に対する安定性が得られなかったが、おそらく血清リボヌクレアーゼのみならず血清ホスホジエス

テラーゼが原因と考えられる。

【0156】

ポリヌクレオチド二本鎖のアンチセンス鎖における2'位での修飾は、CおよびUヌクレオチド単位で、血清中でのポリリボヌクレオチド二本鎖の安定性を著しく高める。図17は、センスおよびアンチセンス鎖の両方の2'位での修飾の種類に関する関数として、2'-O-メチル（配列番号13）に関して、2'-F（5'-2'-G f U G A f U G f U A f U G f U f C A G A G A G f U d T d T-3'）（配列番号17）、ホスホロチオエート・ヌクレオチド間連結（配列番号10および11）、さらにACE保護（配列番号3および4）に関して、安定性を示す。縦軸は、非分解性ポリヌクレオチドと対照との割合を示す。したがって、対照と比較した安定性率が高くなれば、観察される分解も少なくなる。図17から、センス鎖を修飾することは、安定性を達成する上で十分である。

10

【0157】

2'-O-メチル部分または2'フルオロ部分のいずれかによる各Cおよび各Uの修飾は、センスおよびアンチセンス鎖の完全な安定化をもたらす。安定なセンス鎖、例えば2'フルオロまたは2'-O-メチル修飾を持つものを裸のアンチセンス鎖にアニーリングして、安定性が改善される。

【0158】

本発明の組成物は、新規の保護基スキームに準拠したD h a r m a c o nのRNA合成ケミストリーに基づいて作ることができる。2'-ヒドロキシル上の酸に不安定なオルトエステル保護基（2'-ACE）と併用して5'-ヒドロキシル（5'-S I L）の保護に、シリルエステル類を用いることができる。このような保護基の組が、続いて標準的なホスホラミダイト固相合成技術で使われる。いくつかの保護および機能化リボヌクレオチド・ホスホラミダイトの構造を図12に示す。とって代わるものとして、本発明の組成物を任意の他の適当なRNA合成ケミストリーを用いて作ることができる。

20

【0159】

第7の実施形態によれば、本発明はRNA干渉を実施するための方法を提供する。この方法は、RNAiを実施するために、siRNAを標的核酸にさらすことから構成される。この方法では、siRNAはセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成され、さらに上記センス鎖および上記アンチセンス鎖の少なくとも1つが、少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドを含む。

30

【0160】

好ましくは、目的とする標的核酸に対して、アンチセンス鎖のポリヌクレオチドが90%以上の相補性を表す。より好ましくは、本発明のアンチセンス鎖ポリヌクレオチドが、目的とする標的核酸に対して、99%以上の相補性を示す。最も好ましくは、本発明のポリヌクレオチドが、連続する少なくとも18~19塩基にわたって、目的とする標的核酸に対して完全な相補性を持つ。

【0161】

好ましくは、上記少なくとも1つのオルトエステル修飾ヌクレオチドがセンス鎖上に位置し、上記オルトエステルの組成物が第1の実施形態について前述されたパラメーターによって定義される。

40

【0162】

オルトエステル修飾に加えて、上記した他の修飾のいずれかもまた、この方法で使用する場合に提示可能である。例えば、アンチセンス鎖は、2'ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'アミン修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、および2'アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択される少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを、好ましくは含む。修飾ヌクレオチドが2'ハロゲン修飾ヌクレオチドである場合、上記ハロゲンは好ましくはフッ素である。このハロゲンは好ましくはフッ素である。ハロゲンがフッ素である場合、このフッ素は、好ましくは、CまたはU含有ヌクレオチド単位に付着している。上記2'修飾がアミンである場合、好ましくは、そのアミンは、-NH₂という部分を有する。上記2'修飾が2'-O-アルキル基である場合、好ましくは、その基は

50

、メソオキシ- OCH_3 という部分を有する。上記2'修飾がアルキル基である場合、好ましくはその修飾がメチル基($-\text{CH}_3$)である。さらに、好ましくは、これらの修飾のいずれもがヌクレオチド8~11で生じず、より好ましくはこれらの修飾のいずれもがアンチセンス鎖の7~12位で生じない。

【0163】

上記方法はまた、siRNAが5'コンジュゲートを含むかたちで、実施される。このコンジュゲートを、コンジュゲートの選択に関する前述の基準に基づいて、選択することができる。

【0164】

これらの方法を用いる際、上記siRNAは任意の数の塩基対ではあるが、好ましくは18~30塩基対、より好ましくは19塩基対である。さらに好ましくは、上記ポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドのアンチセンス鎖およびセンス鎖を含む。

【0165】

一方または両方の鎖上の3'および/または5'末端ヌクレオチド単位の1つ以上の塩基対のオーバーハングもまた、オーバーハングのための上記パラメータにもとづいて存在する。

【0166】

第8の実施形態によれば、本発明は、RNA干渉を実行するための方法を提供するもので、siRNAを標的核酸にさらすことを含む。このsiRNAは、センス鎖、アンチセンス鎖、およびコンジュゲートから構成される。センスまたはアンチセンス鎖のいずれも、2'修飾ヌクレオチドを含む。好ましくは、本発明のこの実施形態のsiRNAは、前述の実施形態と同程度の相補性を示す。

【0167】

この実施形態によれば、アンチセンス鎖は、好ましくは、2'ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'アミノ修飾ヌクレオチド、2'-O-アルキル修飾ヌクレオチド、および2'アルキル修飾ヌクレオチドから選択される少なくとも1つのヌクレオチドを含む。上記修飾は、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖に対しておこなうことができる。修飾ヌクレオチドが2'ハロゲン修飾ヌクレオチドである場合、ハロゲンが好ましくはフッ素である。ハロゲンがフッ素である場合、上記フッ素は好ましくは、少なくとも2つのCまたはU含有ヌクレオチドに結合する。好ましい2'アミノ修飾は $-\text{NH}_2$ である。好ましい2'-O-アルキル修飾は $-\text{OCH}_3$ である。好ましくは2'アルキル修飾は、 $-\text{CH}_3$ である。

【0168】

上記方法はまた、siRNAがコンジュゲートを含んで実行することができる。コンジュゲートは、既に述べられたコンジュゲートを選択するためのパラメータに基づいて選択される。siRNAは、任意の数の塩基対であってもいいが、前述の実施形態では、好ましくは18~30塩基対、最も好ましくは18~19塩基対である。同様に、いずれかの、または両方の鎖の3'および/または5'末端ヌクレオチド上の1つ以上の塩基対のオーバーハングを与えることができる。さらに、センスまたはアンチセンスのいずれかが、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間連結を含むことができ、好ましくはホスホロチオエート連結およびホスホロジエチエート連結から選択される。好ましくは、上記センスおよびアンチセンス鎖は、ポリリボヌクレオチドである。

【0169】

上述した実施形態の各々は、ポリヌクレオチドが裸ポリヌクレオチドよりもより安定していることから、効果的なRNA干渉を実施することが可能である。裸ポリヌクレオチドとは異なり、本発明のポリヌクレオチドは、血液、血清、および他の生物学的媒体に存在するヌクレアーゼおよび他に物質による分解に対して耐性を示す。

【0170】

本発明のさらなる驚くべき利点は、「オフ・ターゲット化(off-targeting)」とも呼ばれる非特異的RNA干渉を最小限にすることである。非特異的RNA干渉は

10

20

30

40

50

、標識にされていない遺伝子の機能をセンス鎖がサイレンシングまたは部分的にサイレンシングする場合に生ずる。本明細書に記載するオルトエステル修飾および他の修飾は、単独または互いに組み合わさって、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖で用いられ、そのような非特異的RNA干渉の削減または防止をおこなう。

【0171】

非特異的RNA干渉を減少させるために、好ましくはセンス鎖修飾を、5'末端ヌクレオチドを第1番目として、5'末端から第8、第9、第10、または第11番目のヌクレオチドで、おこなう。より好ましくは、第8、第9、第10、および第11番目のヌクレオチドの全てを2'位で修飾する。最も好ましくは、第8、第9、第10、および第11番目のヌクレオチドが全て2'位で修飾され、かつ該修飾がオルトエステルである。

10

【0172】

第9の実施形態によれば、本発明は、siRNAを標的核酸にさらすことを含み、上記siRNAがセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成され、さらに前記センス鎖は実質的に非機能的である、RNA干渉を実施する方法を提供する。「実質的に非機能的(substantially nonfunctional)」によって意味されることは、いっさいの非標的遺伝子の発現を、上記センス鎖が50%以上阻害することができないということである。したがって、「実質的に非機能的」センス鎖によって阻害される非特異的mRNAの発現は50%未満である。本発明の付加的な利点として、血清含有培地および血清中での安定性が高められる。

【0173】

20

この実施形態によれば、上記センス鎖は、少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾、少なくとも1つのシトシン含有ヌクレオチド塩基またはウラシル含有ヌクレオチド塩基を含むことができ、その少なくとも1つのシトシン含有ヌクレオチド塩基またはウラシル含有ヌクレオチド塩基は、2'-O-メチル修飾を有する。好ましくは、2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル修飾である。より好ましくは、上記2'-O-アルキル修飾が第1、第2、第18、および/または第19ヌクレオチド塩基上の、2'-O-メチル修飾である。

【0174】

上記センス鎖は、さらに、コンジュゲートを含み得る。好ましくは、コンジュゲートがコレステロールである。好ましくは、このコレステロールは、センス鎖の5'および/または3'末端に付着している。コレステロールによるsiRNA二本鎖の修飾は、アルブミンおよび他の血清タンパク質に対する二本鎖の親和性を著しく増加させ、顕著な毒性をいっさい生ずることなく二本鎖の体内分布を変える。

30

【0175】

上記センス鎖は、その3'末端にキャップを含み得る。好ましくは、このキャップは逆位のデオキシチミジンまたは末端位置(ヌクレオチド18および19)にある2つの連続的な2'-O-メチル修飾塩基である。

【0176】

上記アンチセンス鎖は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含み得る。好ましくは、この少なくとも1つの修飾ヌクレオチドは、2'-ハロゲン修飾ヌクレオチドである。最も好ましくは、その修飾ヌクレオチドは2'-フッ素修飾ヌクレオチドである。

40

【0177】

前記センス鎖が1つ以上のシトシン含有ヌクレオチド塩基および/またはウラシル含有ヌクレオチド塩基を含む場合、1つ以上のシトシン含有ヌクレオチド塩基および/またはウラシル含有ヌクレオチド塩基は、2'-フッ素修飾されたものである。

【0178】

第10の実施形態によれば、本発明は、RNA干渉を実施する方法を提供するもので、該方法はsiRNAを標的核酸にさらすことを含み、このsiRNAは、(a)コンジュゲートと、(b)少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾を含み、実質的に非機能的であるセンス鎖と、(c)少なくとも1つの2'-フッ素修飾を含むアンチセンス鎖とから

50

構成され、上記センス鎖および上記アンチセンス鎖が18～30塩基対の二本鎖を形成する。好ましくは、上記少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾が、第1、第2、第18、および/または第19のヌクレオチド塩基である。好ましくは、上記コンジュゲートがコレステロールである。好ましくは、上記コレステロールは、センス鎖の5'および/または3'末端に付着している。

上記センス鎖は、さらにその3'末端にキャップを含み得る。好ましくは、このキャップは逆位のデオキシチミジン(idT)または末端位置(ヌクレオチド18および19)にある2つの連続的な2'-O-メチル修飾塩基である。

【0179】

本発明の上記した実施形態の利点は、RISC複合体アセンブリーの方向性を促進するsiRNA二本鎖のセンス鎖の修飾を可能にし、センス鎖が遺伝子サイレンシングに関与するのを防ぐことである。本発明者は、siRNA媒介サイレンシングの効率に対する種々の修飾を持つsiRNAを用いる効果を系統的に研究した。本発明者は、2'-デオキシまたは2'-O-メチル修飾を持つ二本鎖を有するセンスおよびアンチセンス鎖の各々の位置での修飾が、siRNA機能と干渉しないことを発見した。2または3つのそのような修飾に対してタンデム(相前後した)阻害を用いる場合、十分に許容された(well-tolerated)修飾のパターンがセンス鎖とアンチセンス鎖とで異なる。2'-O-メチルで修飾されたセンス鎖の1位および2位を持つsiRNA二本鎖は、完全に機能的であった。しかし、アンチセンス鎖の同様な位置での修飾は、完全に非機能的なsiRNAをもたらした。図19～31を参照せよ。5'末端でのアンチセンス鎖のリン酸化は、部分的にアンチセンス鎖機能性を回復させた。

【0180】

本明細書に記載した修飾は安価であり、信頼性が高く、かつ非毒性であり、センス鎖がアンチセンス鎖としての機能を実質的におこなうことができないようにsiRNA二本鎖を修飾する方法ある。これの実質的な効果は、siRNA特異性および効力が増加することである。最近のマイクロアレイ分析によれば、11個のヌクレオチドの存在が非特異的サイレンシングを誘発するのに十分であることを示唆しており、さらにsiRNA二本鎖と他のmRNA転写産物のセンス鎖との間の相同性は、場合によっては、少なくとも非特異的な活性の半分を生み出すことが可能であることも示唆されている(Jackson, A. L., et al. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nature Biotechnology 21, 635-637)。したがって、センス鎖の非特異的な活性が阻害されるとすれば、二本鎖特異性が増加する。このこともまた、機能的RISC形成の方向へ平衡が移る効果を持つと思われる、同様に必要なsiRNA濃度を低下させる。

【0181】

本発明者は、十分に許容され、かつ血清(例えば、ヒト血清)存在下でsiRNA二本鎖の安定性を高める修飾を提供する。siRNA二本鎖のセンス鎖修飾を安定化させることのみで、非修飾または裸のアンチセンス鎖に対してある程度の安定性を与える。2'-O-アルキル修飾によるセンス鎖のCまたはU毎の修飾(例えば、2'-O-メチル部分)は、いくつかの配列の安定性にとってかなり効果的ではあるが、他の配列にとっては効果的ではない。さらに、本発明者は、センス鎖の5'末端ヌクレオチドの2'-O-メチル修飾が重要であることを発見した。このようなかたちでの修飾もまた、完全に修飾されたsiRNAと比較して、非特異的な効果の度合いが低いという結果になることが予想される。本明細書のデータが記述しているように、センス鎖の1、2、18、および19位での修飾が二本鎖性能と干渉しない。センス鎖修飾によって生ずる二本鎖安定性の一例を図32に示す。この図は、全てのUおよびCに対するO-メチル修飾を二本鎖のセンス鎖に施すことで、抗SEAPsiRNA2217の半減期が10分から4時間に増加したことを示している。アンチセンス鎖のidTバージョンは安定性が2倍低いことから、dTdTによる3'末端の修飾は重要である。アンチセンス鎖が裸のままであることから、この

ような修飾モードは任意の配列に適用することができる。

【0182】

血清中での数時間に及ぶ半減期は、s i R N A の効果的送達を高める上で十分なものでなければならない。なぜなら、細胞内 s i R N A は R I S C 複合体によって安定化されるからである。図 3 5 は、センス鎖の C および U が 2' - O - メチルで修飾され、i d T キャップが 3' 末端に置かれた場合の s i R N A 二本鎖の安定性を示す。この種の処方機能性は配列依存的ではあるが、センス鎖の 5' 末端上にコレステロールが存在することで、著しく改善される。さらなる修飾（例えば、センス鎖 C および U の 2' - O - メチル修飾、それに加えてセンス鎖の 1 位および 2 位の 2' - O - メチル修飾、アンチセンス鎖の C および U の 2' F 修飾、さらにアンチセンス鎖の 5' 末端上のリン酸基、図 3 7 参照）は、サイレンシング機能性を感知できるほどに変えることなしに、そのような分子の血清安定性を 5 日間、さらに増加させることができる。

10

【0183】

コレステロール・コンジュゲートによる s i R N A の修飾は、別の予想外の特徴を持つ。コレステロールによって修飾された s i R N A は、アルブミンおよび他の血清タンパク質に対して、かなり高い親和性を示す。図 3 3 を参照せよ。血清タンパク質親和性は、マウスにおけるアンチセンス生体内分解に関する以前の研究で有用であることが証明された。ホスホチオ修飾の存在は、非特異的アンチセンス結合活性の大部分に参与するが、血清タンパク質に対する高い親和性を持ち、それによって薬物動態学的挙動を変えることから、生体内 (i n v i v o) アンチセンス適用にとっては有益であることが証明された。コレステロール修飾 s i R N A は、ホスホチオ修飾の非特異性が高まるという欠点なしに血清タンパク質親和性の利点を示す。

20

【0184】

第 1 1 の実施形態によれば、本発明はセンス鎖とアンチセンス鎖とから構成される s i R N A を提供する。このセンス鎖は、第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチドおよび第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドを有し、それら両方とも 2' 炭素修飾、好ましくは 2' - O - アルキル修飾を持つ。いくつかの実施形態では、この s i R N A は標識も含む。この標識が存在する場合、好ましくはこの標識が第 1 の 5' 末端センス・ヌクレオチド上に位置する。さらに、センス鎖上の少なくとも 1 つのピリミジン（例えば、シトシンまたはウラシル）、好ましくは複数のピリミジンの各々が、2' 炭素修飾、好ましくは 2' - O - アルキル修飾を有する。これらの修飾は、ピリミジンであってもよい第 1 または第 2 の 5' 末端センス・ヌクレオチドの任意の修飾に加えて、s i R N A の配列に依存している。

30

【0185】

第 1 1 の実施形態のアンチセンス鎖は、少なくとも 1 つの 2' - ハロゲン修飾ピリミジン、好ましくはフッ素修飾ピリミジンと、リン酸化されている第 1 の 5' 末端アンチセンス・ヌクレオチドとを含む。好ましくは、アンチセンス鎖上の全てのピリミジンが 2' - フッ素修飾を持つ。

【0186】

好ましくは、s i R N A は、18 ~ 30 塩基対、より好ましくは 19 ~ 25 塩基対、さらに最も好ましくは 19 ~ 23 塩基対を持つ（ヘアピンを形成することができる単分子 s i R N A 中に存在する場合にオーバーハングまたはループもしくはステム構造を除く）。好ましくは、センス鎖およびアンチセンス鎖は、オーバーハング、ループ、またはステム構造を除いて、少なくとも 79 % 相補性、より好ましくは塩基対の範囲にわたって 90 % 相補性、さらに最も好ましくはこの範囲にわたって 100 % 相補性である。同様に、好ましくは、アンチセンス領域は、標的領域に対して、少なくとも 79 %、より好ましくは少なくとも 90 %、さらに最も好ましくは少なくとも 100 % 相補性である。好ましくは、上記ポリヌクレオチドは R N A である。

40

【0187】

s i R N A は、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかの 5' または 3' 末端のいずれかに、オーバーハングを含むものであってもよい。しかし、2 本の異なる鎖から構成さ

50

れるポリヌクレオチドの場合、任意のオーバーハングが存在するとすれば、該オーバーハングはセンス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端のみに存在する。また、好ましくは任意のオーバーハングは長さが6塩基長以下、好ましくは2塩基長以下である。最も好ましくは、オーバーハングが存在しないか、あるいはセンス鎖およびアンチセンス鎖の一方もしくは両方の3'末端上に2塩基からなるオーバーハングが存在する。第11の実施形態によれば、アンチセンス鎖の5'末端にオーバーハングを持たないことが好ましい。オーバーハング・ヌクレオチドは、非リン酸5'-ヌクレオチドを残す1種類以上の細胞内酵素プロセスまたはイベントによって頻繁に取り除かれる。したがって、アンチセンス鎖の5'末端にオーバーハングを持たないことが望ましい。

【0188】

10

第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドのリン酸化とは、そのヌクレオチドの糖部分の5'炭素に付着した1つ以上のリン酸基が存在することをいう。好ましくは、リン酸基が1つだけ存在する。

【0189】

2'-O-アルキル修飾は、どの塩基に該修飾が現れるかに関わらず、好ましくは、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-プロピル、2'-O-イソプロピル、2'-O-ブチル、2'-O-イソブチル、2'-O-エチル-O-メチル ($-CH_2CH_2OCH_3$)、および2'-O-エチル-OH ($-OCH_2CH_2OH$) からなる群から選択される。最も好ましくは、2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル部分である。さらに、修飾が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドの各々で同一である必要はない。しかし、本発明の分子を合成することに関して実用上の観点から、全体として同一の修飾を用いることが求められる場合もある。

20

【0190】

2'-O-アルキル・ピリミジン修飾に関して、第1の2つの5'末端センスヌクレオチドにあるピリミジン以外の少なくとも1つのピリミジンが、2'-O-アルキル基により修飾される。好ましくは、二本鎖形成領域内にある上記センス鎖上の全てのピリミジンが修飾される。さらに、好ましくは、2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル基である。2'-O-アルキル修飾と同様に、同じアルキル修飾が、2'-O-アルキル基を有する各々のヌクレオチドの上で、使われる必要はない。オーバーハング、ループまたはステムがある場合、それらの領域のピリミジンは、2'-O-アルキル基を含んでもよく、あるいは含まなくてもよい。しかし、2'-O-アルキル基のうちの少なくとも1つは、好ましくはセンス領域である。

30

【0191】

2'ハロゲン修飾ヌクレオチドに関して、修飾はアンチセンス鎖のピリミジンの少なくとも1つに生じ、より好ましくはアンチセンス鎖のピリミジンの全てに生ずる。さらに、好ましくは、上記ハロゲンがフッ素である。オーバーハング、ステム、またはループが存在する場合、それらの領域のピリミジンは、ハロゲン基を含んでもよく、あるいは含まなくてもよいが、好ましくはいずれのステムまたはループ構造はこの修飾を含まず、上記少なくとも1つのハロゲン基がセンス領域内にある。本明細書中に記載されるその他の修飾に影響されることなく siRNA の安定性を増加させるために、2'-ハロゲン修飾 (2'フルオロ修飾を含む) を用いることが可能であるという点に、留意する必要がある。したがって、それらの修飾を siRNA 用途での他の修飾と共に使用することと同様に、それらを別々に用いることも可能である。

40

【0192】

安定性および第11の実施形態に関連して機能性という本発明の利益を著しく否定するものでなければ、センスおよび／またはアンチセンス鎖のヌクレオチド修飾の他の種類を含めることが可能である。ピリミジン修飾ヌクレオチド (例えば、ハロゲン、好ましくはフッ素修飾) と追加の2'-O-アルキル修飾ピリミジンとを持ちいることで、一定レベルのヌクレアーゼ耐性が得られる。

【0193】

50

化学修飾に加えて、塩基対ミスマッチまたは隆起（バルジ）をセンスおよび／またはアンチセンス鎖に付加することができ、該付加によって100%未満の相同性を共有する標的とのRISC媒介付着に関与するそれらの鎖の能力を変える。そのようなミスマッチの例として（限定されるものではないが）プリン・ピリミジン・ミスマッチ（例えば、G-U、C-A）およびプリン・プリンもしくはピリミジン・ピリミジン・ミスマッチ（例えば、G-A、U-C）が挙げられる。これらの種類の修飾を導入することは、前述の修飾と組み合わせてもよく、それらが本発明の利点を損なうことなく機能性の他の属性（例えば、オフ・ターゲット効果）を変えるかどうかを決定するために、評価することができる。

【0194】

10

いくつかの用途では、蛍光標識等の標識を使用することが求められる場合もある。標識が蛍光である場合、蛍光標識はCy3（商標）、Cy5（商標）、またはAlexa色素（Molecular Probes, Eugene, OR）である。これらの標識は、好ましくは、センス鎖の5'末端に加えられ、より好ましくは5'末端センス・ヌクレオチドに加えられる。これらは、形質移入細胞等の中の標識siRNAの分布をユーザが視覚化することを可能とさせて、ある一定の形質移入の成功を評価することを可能とする。標識ヌクレオチドの使用は、当業者に周知であり、蛍光標識以外の標識として、例えば質量または放射活性標識を、そのような標識が有益であると考えられる用途で、用いることが可能である。

【0195】

20

蛍光修飾（fluorescent modification）は、非形質移入細胞から形質移入細胞を分離するために用いることができる。具体的には、第11の実施形態の分子を細胞集団に対して形質移入した後、FAGSによってソートすることで、形質移入された細胞を非形質移入細胞から分離する。このことによって、より純度の高い集団（混合したものよりも）を得ることができ、その後、遺伝子サイレンシングによって得られる表現型を明確に同定する能力が改善される。

【0196】

第11の実施形態の分子は、種々の用途を持ち、例えばその分子を形質移入コントロール試薬または安定的サイレンシング試薬として用いることが可能である。これらの分子が標識を含む場合、該分子を細胞へ形質移入することで、細胞のどの分画に成功裏に形質移入がなされたかをユーザが視覚化および判断することを可能とする。また、これらの修飾は、siRNA機能をこれといって変えないことから、第11の実施形態の分子は、同時に形質移入制御およびサイレンシング試薬となることができる。さらに、使用しうる配列に対して上記修飾が制限を加えるものではないことから、該修飾を多様なsiRNAおよびRNAi用途で 사용할ことができ、また標的配列依存的ではない。

30

【0197】

したがって、上記第11の実施形態の分子は、その独特な修飾セットを持つことから、機能性を変えることなく、安定性および「トラックアビリティ（trackability）」を提供する。それらの分子を、形質移入された細胞の純粋集団を単離することにも用いることができる。もし2'-O-アルキル基をアンチセンス鎖の最初の2つまたは最初の3つのヌクレオチドに加えると、オフ・ターゲット効果を減少させる付加的な利益を実現することができる。さらに、2'-O-アルキル基をセンス鎖の最初の2つまたは3つのヌクレオチドに加えると、それらがセンス鎖オフ・ターゲット効果を減少させる付加的な利益を持つことができる。

40

【0198】

第12の実施形態によれば、本発明はセンス鎖およびアンチセンス鎖から構成される別のsiRNAを提供する。このセンス鎖は、第11の実施形態のセンス鎖のパラメータと同様のパラメータに基づいて決定され、該パラメータとして第1および第2の5'末端センス・ヌクレオチドの2'炭素修飾、好ましくは2'-O-アルキル修飾と、ピリミジンの少なくとも1つの2'炭素修飾、好ましくは2'-O-アルキル修飾とが挙げられる。

50

しかし、アンチセンス鎖に対する上記修飾の代わりに、第12の実施形態のアンチセンスは、第1および第2、あるいは第1、第2、および第3の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、該ヌクレオチドの各々が2'-O-アルキル修飾を持つ。さらに、第1および第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド以外に、アンチセンス鎖上に、少なくとも1つの2'-O-アルキル修飾ピリミジンが存在する。さらにまた、好ましくは、2'-F1修飾が存在せず、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドのリン酸化が存在しない。リン酸化の欠如は、対応する機能的ポリヌクレオチドと比較して、限定された機能性の分子を与える。上記説明に対する別のバリエーションとして、第12の実施形態の分子は、上記の属性全てに加えて、センス鎖、アンチセンス鎖、またはセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方に5'ブロック基を含む。そのようなブロック基は、さらに、この分子がリン酸化されてRISCに入ることを除外するもので、5'-アルキル、5'-O-アルキル、アジド(N₃)、アミン類、および他の部分からなる。

10

【0199】

サイズ、オーバーハング、および他の修飾に関する他の好ましいパラメータは、第11の実施形態に対するものと同じである。しかし、これらの組成物が遺伝子のサイレンシングに用いられないことから、それらは長さが16~28塩基対とすることができ、好ましくは18~30塩基対長であると考えられる。

【0200】

第12の実施形態の分子は、形質移入制御に加えて、潜在的な「フィルター(filter)」またはエクサエクオ剤として作用することも可能であり、これは用量実験で、またはマイクロアッセイ研究の負の対照として、特に有用である。多くの実験が、異なる濃度(例えば、100 nM、50 nM、25 nM、および1 nM)での所定のsiRNAの効果を試験する。必要に応じて、形質移入実験を実施した場合、異なる核酸レベルでの形質移入の結果として生ずるいかなる例外も回避するために、一定濃度の「全siRNA(total siRNA)」を持つことが望まれる。残念なことに、任意の未修飾対照siRNA(例えば、非特異的対照)を加えることは、RISCとの相互作用に関する研究のもとで、siRNAと競争する潜在的な下落傾向を有する。第12の実施形態の分子は、この問題を軽減する。両方のセンスおよびアンチセンス鎖の1および2位(または1、2、および3位)上の2'-O-メチル修飾の追加は、リン酸化5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがない場合、それは、RISCとの相互作用に対するこの分子の能力を制限する。したがって、この分子は形質移入することができるが、RISCに関して他のsiRNAと競争することはできない。第11の実施形態の分子の場合と同様に、ピリミジン(CおよびU)に対する2'-O-メチル基の付加は、ヌクレアーゼ消化の可能性を最小限にする。

20

30

【0201】

第12の実施形態の分子は、他の「非特異的(non-specific)配列または対照群とは異なり、RISCと十分な相互作用をおこなうことはない。このように、これらの分子は限られたオフ・ターゲット化副作用のみを生ずるはずなので、RISC上の部位を争うことのないトラッカブルである能力を有する。

【0202】

上記した実施形態(第11および第12の両方)を、隣接したセンスおよびアンチセンス鎖(すなわち、2本の別々の鎖)を持たないsiRNA、さらにはヘアピンを形成することができる単分子siRNA(shRNA)に適用することが可能ある。用語「siRNA」として、両方のタイプのRNAが挙げられる。例えば、ヘアピンは、ループ構造(好ましくは4~10塩基対を含み得る)と、センス領域とを含み、センス領域とアンチセンス領域とが個々に19~23塩基対長であり、実質的に互いに相補的である。ループ構造の好ましい配列が、例えば、5'-UUCG(配列番号319)、5'-UUUGUGUAG(配列番号320)、および5'-CUUCUGUCA(配列番号321)である。

40

【0203】

50

ヘアピンは、アンチセンス領域の下流にあるループ流域とともに望ましくは構築される。この構成は、第11の実施形態にとっては特に望ましい。なぜならば、末端アンチセンス・ヌクレオチドをリン酸化するのがより容易であるからである。このように、単分子 siRNA を設計する際、オーバーハングが5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの上流にないことが好ましい。

【0204】

本発明にもとづいて、単分子 siRNA、特に左回りの (left-handed) 単分子構造 (例えば、5'-AS-Loop-S) を設計する場合、好ましくは、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドに対して相補的である塩基から数えて (すなわち、センス領域の3'末端から数えて)、センス領域の第18、第19、または第20の塩基であるヌクレオチドとして定義される。第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、このように定義される。なぜなら、ヘアピンを形成することができる単分子 siRNA が細胞に入る場合、ダイサー (Dicer) が、2本の異なる鎖 (siRNA) から構成されるヘアピン siRNA を約18~20塩基対から構成されるヘアピン siRNA 分子に処理し、これらの分子がこの処理された分子の末端にセンス鎖修飾を持つことが要求されるからである。最も好ましくは、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、センス領域の3'末端からセンス領域の19番目の塩基であるヌクレオチドとして定義される。さらに、好ましくは、ポリヌクレオチドは、左回りのヘアピンを形成することができる。

【0205】

shRNA は、さらに、ステム領域を含むことができ、該ステム領域は、ループ構造の第5'末端および第3'末端に直接隣接した1つ以上のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含み、さらに該ステム領域の1つ以上のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドが標的特異的もしくは非標的特異的である。好ましくは、その単分子 siRNA の全長は、100塩基対未満であり、より好ましくは85塩基対未満である。

【0206】

本発明の単分子 siRNA は、最終的には細胞の機能 (cellular machinery) によって2本の異なる鎖に変換されるように処理される。あるいは、この分子をRNAi経路の1つ以上のステップ (例えば、ダイサーによる処理) にかけて、RISCに単分子状ヘアピン分子として入れることも可能である。さらに、これらの単分子 siRNA を、全ての修飾よりも少ないもので細胞に導入してもよく、また導入された天然のプロセスまたはプロセッシング用分子を用いて、細胞自体の中で修飾することも可能である (例えば、第11の実施形態に関して、天然キナーゼによる細胞内でのリン酸化)。しかし、好ましくは、上記ポリヌクレオチドに対して、既に存在している全ての修飾が導入される (同様に、siRNA が2つの異なる鎖から構成される場合、好ましくは、それらの鎖が、細胞に導入された場合に全ての修飾を含む。アンチセンス鎖が、例えば、導入後にリン酸化の基によって修飾され得るにもかかわらず)。

【0207】

上記実施形態 (第11および第12) が安定性増加を目的としているにもかかわらず、それらのタイプまたは他のタイプの修飾が他のパラメータ、例えば特異性に対しても影響を及ぼすという点に注意することが重要である。

【0208】

さらに、これらの安定性および機能性修飾を組み合わせてもよい (例えば、少なくとも1つのセンス・ピリミジンを持つ追加の2'炭素修飾 (好ましくは、-O-メチル修飾) と、2'炭素修飾 (好ましくは、-O-メチル修飾) を持つ第1の2 (または3) 以外の好ましくは全てのセンス・ピリミジンと、2'炭素修飾 (好ましくは、-O-メチル修飾) を持つ第1の2 (または3) 以外の、少なくとも1つの、好ましくは全ての、アンチセンス・ピリミジンの2'F1修飾と、5'アンチセンス・ヌクレオチドのリン酸化とを併用した、第1および第2の (または第1、第2、および第3の) 5'末端センスおよびアンチセンス・ヌクレオチド2'炭素修飾 (好ましくは、-O-メチル修飾))。さらに、

本発明の上記修飾は、無作為に選択される、または、例えば、米国特許出願第10/714,333号に記載されているような論理的設計に基づいて、選択された配列を含む siRNA と組み合わせてもよい。

【0209】

リン酸主鎖に対する安定化修飾は、本発明のいくつかの用途のためにポリヌクレオチド内に含めることが可能である。例えば、少なくとも1つのホスホロチオエートおよび／またはメチルホスホネートを、オリゴヌクレオチド主鎖のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖にある、同様に存在しうる任意のオーバーハング、ループ構造、またはステム構造にある、任意の、または全てのピリミジンのいくつかの、または全ての3'位にあるリン酸基と置換してもよい。ホスホロチオエート（およびメチルホスホネート）類似体は、オリゴヌクレオチド主鎖のリン酸基の修飾から生ずる。ホスホロチオエート内では、リン酸塩Oが硫黄原子に置き換わる。メチルホスホネートでは、酸素がメチル基によって置き換わる。一実施形態では、ホスホロチオエート修飾またはメチルホスホネートは、2'フッ素（または他のハロゲン）修飾ヌクレオチドも含む全てのアンチセンス鎖ヌクレオチドの3'位に置かれている。さらに、ホスホロチオエート3'修飾を、2'フッ素置換の代わりに、および独立して用い、siRNA分子の安定性を高めることが可能である。これらの修飾は、siRNA用途において、本明細書に記載された他の修飾と併用して、あるいはそれらの修飾とは別個に、用いることが可能である。

10

【0210】

ヌクレアーゼは、一般に、リン酸塩部分およびリボース環の2'OH位にある酸素基の両方を用いてRNAに対する攻撃を媒介する。複数の酸素の1つに対する硫黄基の置換によって、この反応に参加するリン酸塩の能力が取り除かれ、ヌクレアーゼ消化に対するこの部位の感度が制限される。しかし、ホスホロチオエートが典型的に有毒な点に留意する必要があることから、いかなる毒作用も否定される場合に主に有益であり、例えば、他のヌクレオチド毎、第3のヌクレオチド毎、または第4のヌクレオチド毎にこの修飾を用いることを制限することによって、達成しうると考えることができる。

20

【0211】

第12の実施形態の分子は、限定された機能のものではあるが、上記したように、負の対照研究で使用可能であり、またエクサエクオ剤として用いることができる。複数の分子に関連する上記修飾セットは、該分子を、siRNAのアンチセンス鎖の5'末端に対して必須のリン酸基を付加する細胞内キナーゼにとって劣った基質とする。修飾がリン酸化を著しく阻害する一方で、これらの修飾を担持する分子のいくつかの小分画が、いまだに5'アンチセンス位置のC5でリン酸化を受けて少量のサイレンシングを生成することも考えられる。そのような場合、それらの分子のセンスおよび／またはアンチセンス鎖の5'末端の5'炭素位を、キナーゼリン酸化を防ぐブロック基によって、修飾することが求められる可能性がある。ブロック基は、例えば、末端ヌクレシドの5'炭素位のリン酸化を防ぐ任意の基であってもよく、限定されるものではないが、5'-アルキル、5'-オームethyl、および5'-アミン基が挙げられる。

30

【0212】

対照またはエクサエクオ剤の別の例は、以下の2'炭素修飾のみを含む。すなわち、(i) 各々が2'修飾、例えば上記した2'修飾（例として、2'-オームethyl修飾）を含む第1および第2、または第1、第2、および第3の5'末端センス・ヌクレオチドと、(ii) 各々が2'修飾、例えば上記した2'修飾（例として、2'-オームethyl修飾）を含む第1および第2、または第1、第2、および第3の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとを含み、ならびに5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがリン酸化されていない。

40

【0213】

本発明のポリヌクレオチドは、現在知られている、またはこれから知られるであろう方法、さらにこの開示を読むことによって本発明と関連して有用であると当業者が結論出すいかなる方法が、本発明の分子を合成する上で有用である。特定の修飾を含む siRNA

50

二本鎖は、Scaringe, S. A. (2000) "Advanced 5'-silyl-2'-orthoester approach to RNA oligonucleotide synthesis," *Methods Enzymol.* 317, 3-18; Scaringe, S. A. (2001) "RNA oligonucleotide synthesis via 5'-silyl-2'-orthoester chemistry," *Methods* 23, 206-217; Scaringe, S. and Caruthers, M. H. (1999) 米国特許第5, 889, 136号; Scaringe, S. and Caruthers, M. H. (1999) 米国特許第6, 008, 400号; Scaringe, S. (2000) 米国特許第6111086号; Scaringe, S. (2003) 米国特許第6, 590, 093号に記載されている事項および方法を用いて、化学的に合成することが可能である。上記合成方法は、ヌクレオシド塩基保護5'-O-シリル-2'-O-オルトエステル-3'-O-ホスホラミダイトを用いて、3'から5'方向に固体担体上に所望の未修飾siRNA配列をアセンブルする。手短かに言うと、必須のホスホラミダイトの合成は、標準塩基保護リボヌクレオシド（ウリジン、N⁴-アセルエチジン、N²-イソブチリルグアノシン、およびN⁶-イソブチリルアデノシン）から始まる。5'-O-シリルおよび2'-O-オルトエステル保護基の導入、ならびに反応性3'-O-ホスホラミダイト部分が次に4つのステップによって達成される。すなわち、

1. Markiewicz 試薬によるヌクレオシド糖の5'-および3'-ヒドロキシル基の同時かつ一時的なブロッキング（1, 3-ジクロロ-1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシロキサン [TIPS-Cl₂] 含有ピリジン溶液 {Markiewicz, W. T. (1979) (1979) "Tetra isopropylidisiloxane-1, 3-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'- and 5'-Hydroxy Functions of Nucleoside," *J. Chem. Research (S)*, 24-25} をおこなった後、クロマトグラフィーによる精製；

2. 触媒としてピリジニウムp-トルエンスルホネートを用いてトリス（アセトキシエチル）-オルトフォルメート含有ジクロロメタンを用い、TIPS-ヌクレオシド糖の2'-ヒドロキシルをビス（アセトキシエチル）オルトエステル [ACE誘導体] に位置特異的変換した後、クロマトグラフィーによる精製；

3. フッ化水素およびN, N, N'-N'-テトラメチルエチレンジアミン含有アセトニトリルを用いてTIP保護基の特異的除去によるヌクレオシド糖の5'-および3'-ヒドロキシル基の放出をおこなった後、クロマトグラフィーによる精製；

4. ベンズヒドロキシル-ビス（トリメチルシリロキシル）クロリド [BzH-Cl] 含有ジクロロメタンを用いて5'-O-シリルエタノールとして5'-ヒドロキシルの保護を行った後、クロマトグラフィーによる精製；ならびに

5. ビス（N, N-ジイソプロピルアミノ）メトキシホスフィンおよび5-メチルチオールH-テトラゾール含有ジクロロメタン/アセトニトリルを用いて3'-O-ホスホラミダイトへの変換を行った後、クロマトグラフィーによる精製。

【0214】

ホスホラミダイト誘導体は、一般に厚く、無色から薄黄色のシロップである。自動RNA合成装置に適合させるために、生成物の各々を予め定めた量の無水アセトニトリルに溶解し、この溶液を適当な数の血清バイアルに等分にして加え、各バイアル内のホスホラミダイトが1.0 mmole量とする。次に、これらのバイアルを適当な真空デシケーターに置いて、高真空に一晩置くことで溶媒の除去をおこなう。次に、雰囲気乾燥アルゴンに置き換えて、バイアルをゴム製のセプタムでキャップし、密閉されたホスホラミダイトを、必要とする時まで-20℃に保存する。合成装置に投入する前に、各ホスホラミダイトを十分な無水アセトニトリルで溶解して所望の濃度にする。

【0215】

所望のオリゴリボヌクレオチドの合成は、自動合成装置を使用して行われる。それは、

3'-ヒドロキシルを介して固体ビーズ状ポリスチレン担体に、切断可能な連結を介して、3'-末端ヌクレオシドの共有結合から始まる。所望の合成スケールにとって適当な量の担体を測定して反应用カートリッジに入れ、それを次に合成装置に固定する。結合したヌクレオシドを5'-O-ジメトキシトリチル部分で保護し、鎖アセンブリのための5'-ヒドロキシルを遊離させるために、その部分を無水酸（3% [v/v] ジクロロ酢酸含有ジクロロメタン）で除去する。

【0216】

アセンブルされる配列のそれ以降のヌクレオシドを、以下の一般的な反応からなる4ステップ・サイクルを用いて、固体担体上で成長する鎖に対して、順次加える。

1. カップリング：適当なホスホラミダイトを5'-エチルチオ-1H-テトラゾールで活性化させ、担体結合ヌクレオシドまたはオリゴヌクレオチドの遊離5'-ヒドロキシルと反応させる。これら2種類の試薬の濃度の最適化とモル過剰、さらにはその反応時間が、一般にサイクルあたり98%を上回るカップリング収率が得られる。

2. 酸化：カップリング・ステップで形成した分子間連結は、リン原子をそのP(III) [亜リン酸塩] 酸化状態に残す。生物学的に関連した酸化状態は、P(V) [リン酸塩] である。したがって、亜リン酸はtert-ブチルヒドロペルオキシド含有トルエン溶液を用いて、P(III) からP(V) に酸化する。

3. キャッピング：少量の残留未反応5'-ヒドロキシル基は、欠失を含む配列の形成を防ぐために、以降の結合サイクルへの参加かがブロックされなければならない。このことは、過剰の無水酢酸と1-メチルイミダゾールとを含むアセトニトリルで担体を処置することによって達成され、酢酸エステルとして効率的に残留5'-ヒドロキシル基がブロックされる。

4. 脱シリル化：シリル保護された5'-ヒドロキシルは、次の共役反応の前に脱保護されなければならない。このことは、トリエチルアミン・トリヒドロゲンフルオリド含有N,N-ジメチルホルムアミドによる処理を介して達成され、他の保護基（2'-O-ACE、N-アシル塩基保護基またはメチルホスホネート）が同時に取り除かれることなしに、素早く、かつ特異的に5'-ヒドロキシルを放出する。

【0217】

上記4つの反応ステップの間で、アセトニトリルによるいくつかの洗浄がある点に留意する必要がある。洗浄を用いることで、次の反応ステップに先立って過剰な試薬および溶媒が取り除かれる。上記サイクルは、オリゴリボヌクレオチドの未修飾部分がアセンブルされるまでの必要な回数が繰り返される。上記合成方法は、例示のみであり、分子が作られる手段を限定するものとして構成されるものではない。siRNAを合成するために現在知られている、またはこれから知られるであろう方法、さらにこの開示を読むことによって本発明と関連して有用であると当業者が結論出すいかなる方法も、用いることが可能である。

【0218】

第11および第12の実施形態のいくつかの実施形態のsiRNAは、2つの修飾ヌクレオシド（例えば、2'-O-メチル誘導体）を各々の鎖の5'末端に含む。これらの修飾ヌクレオシドで5'-O-シリル-2'-O-メチル-3'-O-ホスホラミダイト誘導体は、既に記載したものと同様の手順（上記ステップ4および5）を用いて調製され、塩基保護2'-O-メチルヌクレオシド（2'-O-メチル-ウリジン、2'-O-メチル-N⁴-アセチルシチジン、2'-O-メチル-N²-イソブチリルグアノシン、および2'-O-メチル-N⁶-イソブチリルアデノシン）から開始される。これらの修飾ヌクレオシドに2'-ヒドロキシルが存在しないことで、これらの化合物のACE保護の必要性がなくなる。このように、5'-O-シリルおよび反応性3'-O-ホスホラミダイト部分の誘導は、以下の2つのステップによって達成される。

【0219】

1. ベンズヒドロキシビス（トリメチルシリルオキシ）シリルクロリド（BzH-C1）含有N,N-ジメチルホルムアミドを用いて、5'-O-シリルエーテルとして5'

ーヒドロキシルの保護をおこなった後、クロマトグラフィーによる精製、および

2. ビス(N, N-ジイソプロピルアミノ)メトキシホスフィンおよび5-エチルチオ-1H-テトラゾール含有ジクロロメタン/アセトニトリルを用いて3'-O-ホスホラミダイトの変換をおこなった後、クロマトグラフィーによる精製。

【0220】

ホスホラミダイトの精製後パッケージングを、標準的なヌクレオシド・ホスホラミダイトについて既に記載された手順を用いて実施する。同様に、2つの5'-O-シリル-2'-O-メチルヌクレオシドのホスホラミダイト誘導体を介しておこなわれる該5'-O-シリル-2'-O-メチルヌクレオシドの取り込みは、標準的なヌクレオシド・ホスホラミダイトに介して既に記載された同一の4ステップ/サイクルを2回適用することによって、達成される。

10

【0221】

この発明の第11の実施形態のいくつかの実施形態のsiRNA二本鎖は、アンチセンス鎖の5'末端にリン酸塩部分を含む。このリン酸塩は、アンチセンス鎖に対する最終カップリングとして化学的に導入される。所望のホスホラミダイト誘導体(ビス(シアノエチル)-N, N-ジイソプロピルアミノホスホラミダイト)は、要するに以下のようにして合成される。すなわち、三塩化リンを1当量のN, N-ジイソプロピルアミンを含む無水テトラヒドロフランで、過剰のトリエチルアミンの存在下で反応させる。次に、2当量の3-ヒドロキシプロピオニトリルを添加して完全に反応させる。最後に、生成物をクロマトグラフィーによって精製する。ホスホラミダイトの精製後パッケージングは、標準的なヌクレオシド・ホスホラミダイトについて既に記載された手順を用いて実施される。同様に、アンチセンス鎖の5'末端でのホスホラミダイトの取り込みは、標準的なヌクレオシド・ホスホラミダイトについて既に記載された同一の4ステップ・サイクルを適用することによって、達成される。

20

【0222】

修飾かつ保護されたオリゴヌクレオチドは、鎖アセンブリの最後で固体担体に連結したままである。二段階の迅速な切断/脱保護手順を用いてメチルホスホネート保護基を取り除き、オリゴヌクレオチドを固体担体から切り離し、N-アシル塩基保護基を除去する。この手順がシアノエチル保護基をアンチセンス鎖上の5'-リン酸塩から取り除くという点に留意する必要がある。さらに、この手順はACEオルトエステルからアシル機能性を取り除き、2'-O-ACE保護基をビス(2-ヒドロキシエチル)オルトエステルに変換する。この新規のオルトエステルは弱酸に対して著しく不安定であり、同様に親ACE基よりも親水性が高い。二段階の手順を以下に手短に示す。

30

1. 担体結合オリゴリボヌクレオチドを、二ナトリウム-2-カルバモイル-2-シアノエチレン-1, 1-ジチオレートトリヒドレート含有N, N-ジメチルホルムアミドで処理する。この試薬は、素早くかつ能率的に、ヌクレオチド間リン酸連結からメチル保護基を取り除く。この際、固体担体からオリゴヌクレオチドを切り離すことはない。次に、担体を水で洗浄し、過剰のジチオレートを除去する。

2. オリゴリボヌクレオチドを、室温で、40% (w/v) 水溶性メチルアミンを用いて固体担体から切り離す。粗オリゴリボヌクレオチド含有メチルアミン溶液を次に55℃まで加熱して保護基をヌクレオシド塩基から取り除く。粗オルトエステル保護オリゴヌクレオチドを以下の溶媒から真空中で得る。

40

【0223】

2'-オルトエステルの除去は、合成プロセスの最終ステップである。このことは、粗オリゴヌクレオチドを、酢酸およびN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンの水溶液、pH 3.8、55℃で、35分間にわたって処理することで達成される。完全に脱保護されたオリゴヌクレオチドを、次に、エタノール沈殿によって脱塩し、さらに遠心によって単離する。

【0224】

また、ポリヌクレオチドの5'末端での蛍光標識の取り込みは、当業者にとって一般的

50

であり、かつ周知の操作である。一般に、この取り込みを達成するために用いられる方法が2つあり、必要な材料はいくつかの市販元（例えば、Glen Research Inc., Sterling, Virginia, USA; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA; TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, California, USA; およびその他）から入手可能である。第1の方法は、蛍光分子を利用するもので、該蛍光分子は、既に述べたヌクレオシドのホスホラミダイト誘導体に類似したホスホラミダイト部分で誘導体化された。そのような場合、この蛍光色素は、鎖アセンブリの最終サイクルで担体結合ポリヌクレオチドに追加される。フルオロフォア修飾ポリヌクレオチドを次に、固体担体から切り離し、前述の標準的手順を用いて脱保護した。この方法を「直接標識 (direct labeling)」と呼ぶ。あるいは、上記第2の方法は、ホスホラミダイト部分により誘導体化されるリンカー分子を利用する。その部分は、保護された反応性官能基（例えばアミノ、スルフヒドリル、カルボニル、カルボキシル、その他）を含む。このリンカー分子は、鎖アセンブリの最後のサイクルに、担体結合したポリヌクレオチドに追加される。リンカー修飾ポリヌクレオチドは、それから固体担体から切り離されて、上述の標準的な手順を使用して脱保護される。リンカーの官能基も、標準的な脱保護手順を実施している間、またはそれ以降の基特異的処置を利用することによって脱保護される。粗リンカー修飾ポリヌクレオチドが次にフルオロフォア誘導体で反応を起こす。誘導体は、フルオロフォアの部位とリンカーの官能基との間で共有結合の形成をもたらす。この方法は「間接的標識化 (indirect labeling)」と呼ばれている。

【0225】

一旦合成されるならば、本発明のポリヌクレオチドを直ちに使用してもよく、あるいは将来の使用のために保存してもよい。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドを適当な緩衝液中に二本鎖として保存する。多くの緩衝液が siRNA を保存するのに適していることが当技術分野で知られている。例えば、緩衝液は 100 mM KCl、30 mM HEPES-pH 7.5、および 1 mM MgCl₂ を含むものであってもよい。好ましくは、本発明の siRNA は、4℃で1年間そのような緩衝液中で保存された場合、その活性の30%~100%を保持する。より好ましくは、そのような緩衝液に4℃で1年間保存した場合に、本発明の siRNA が生物学的活性を80~100%保持する。あるいは、上記組成物は、そのような緩衝液に-20℃で少なくとも1年以上保存することができる。好ましくは、-20℃での1年以上の保存は、生物学的活性の50%未満の減少を生じる。好ましくは、-20℃での保存による生物学的活性の減少が1年以上後に20%未満である。最も好ましくは、-20℃での1年以上の保存による生物学的活性の減少が10%未満である。

【0226】

使用前に siRNA プールの安定性を確実にするために、それらが使用の準備が整うまで、-20℃で乾燥した状態に保つことが可能である。使用前に、再懸濁しなければならないが、一旦再懸濁すると、例えば上述した緩衝液で、使用するまで-20℃に保たなければならない。上述した緩衝液を、使用前に、ほぼ4℃または室温で保存してもよい。形質移入を実施する実効温度は、当業者によく知られており、例えば、室温が挙げられる。

【0227】

本発明を開発する際に、二種類以上の修飾を、安定性を増加させるために二本鎖に加えた。出願人は、安定性を改善する際の手助けになる他の修飾との組合せが、将来、発見可能であることを理解している。その上、本発明の修飾は、他の目的のために所望である修飾と結合されることができた。例えば、いくつかの例で、1つの修飾は、特定の1組の条件（例えば1種類のヌクレアーゼ）に対して、分子を安定化させることができ、その一方で第2の修飾が条件（例えばヌクレアーゼの異なるファミリー）の第2の組に対して分子を安定化させることができる。あるいは、2つの別々の修飾が、ある種の条件セットの方へ分子を安定させるために、相加的にまたは相乗的に作用することができた。さらに他の例において、1つの修飾は、分子を安定させることができた、しかし、それは他の所望の

性質（例えば s i R N A の効力または毒性）上、有害な結果を有する。これらのようなケースにおいて、分子の機能性のこれらの態様を修復する付加的な修飾を加えることができた。

【0228】

種々のアプローチを、安定性を強化するために必要とされる分子のタイプとキー・ポジションとを同定するのに用いることができる。1つの非限定的な実施例において、修飾機能ウォークが実行される。この手順では、一つの種類の修飾が、センスおよび／またはアンチセンス鎖をまたがって1つ以上のヌクレオチドに対して加えられる。実質的に、修飾および未修飾を、いくつかの方法の1つによって、（1）機能性および（2）安定性について試験した。したがって、例えば、センスおよび／またはアンチセンス鎖の1および2位、3および4位、5および6位、7および8位、9および10位、11および12位、13および14位、15および16位、17および18位、または18および19位に対して、2'-O-Me基を付加することができ、さらに機能性（例えば、特異的標的をサイレンシングするそれらの分子の能力）について試験し、作用（例えばヌクレアーゼによる）に対して分子を安定化させる。安定性を強化するキーポジションが同定されるが、二本鎖機能性の損失を招く場合、続いて修飾ウォークの第2のラウンドとなることで、二本鎖機能性を高めると思われるミスマッチまたは隆起が起こる付加的な化学基（例えば、アンチセンス鎖上の5'末端の5'リン酸塩）が、安定性を高める修飾を既に含む分子に付加される。

【0229】

本発明の第13の実施形態は、s i R N Aに関するもので、該s i R N Aは、

（a）アンチセンス鎖であって、該アンチセンス鎖は第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、その第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されている、アンチセンス鎖と、

（b）センス鎖であって、該センス鎖は第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の2'炭素センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドは第2の2'炭素センス修飾を含む、センス鎖と、を有する。

【0230】

好ましくは、s i R N Aは、オーバーハングを除いて、18～30塩基対、より好ましくは19～25塩基対、最も好ましくは19～23塩基対を含む。好ましくは、上記センス鎖およびアンチセンス鎖は、塩基対の範囲にわたって少なくとも実質的に相補的であり、より好ましくはこの範囲にわたって100%相補性を持つ。好ましくは、ポリヌクレオチドがRNAである。

【0231】

s i R N Aは、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかの5'または3'末端のいずれかにオーバーハングを有するものであってもよい。しかし、好ましくは、任意のオーバーハングが存在する場合、該オーバーハングはセンス鎖および／またはアンチセンス鎖の3'末端にある。さらに、好ましくは任意のオーバーハングが6以下の塩基長、より好ましくは2以下の塩基長である。最も好ましくは、オーバーハング無し、または3'末端でセンス鎖およびアンチセンス鎖の一方または両方にある2つの塩基のオーバーハングが存在する。オーバーハングしているヌクレオチドは、1種類以上の細胞内酵素プロセスまたはイベントによって頻繁に除去されることから、非リン酸化5'-ヌクレオチドが残り、アンチセンス鎖の5'末端上にオーバーハングを持たないことが好ましい。

【0232】

第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドのリン酸化は、ヌクレオチドの糖部分の5'炭素に付着した1つ以上のリン酸基の存在に言及するものである。好ましくは、1つのリン酸基のみが存在する。

【0233】

2'炭素修飾とは、ヌクレオチドの糖部分の2'炭素上にある修飾のことをいう。「第1の2'炭素センス修飾」とは、第1の5'末端センス・ヌクレオチド上にある修飾のことをいう。「第2の2'炭素センス修飾」とは、第2の5'末端センス・ヌクレオチド上にある修飾のことをいう。

【0234】

化学修飾のRNA-RNA、RNA-DNA、またはDNA-DNA二本鎖に沿ったキーポジションへの追加がこれらの分子の化学的かつ機能的な特性を有意に変えることができることが、知られている。出願人は、修飾をsiRNAのセンス鎖に付加することで、該鎖がRISCに入るのを防ぎ、センス鎖特異的オフ・ターゲット効果を誘導することができることを、理解する。そのような修飾として、任意の数の化学部分を付加することが含まれる。好ましくは、その部分はヌクレオチドのリボース環の2'位（すなわち、2'炭素）に付着される。本発明によれば、好ましくは、上記修飾が2'-O-アルキル基である。しかし、本発明の文脈のなかで使用された場合に、他の修飾がこの鎖によってオフ・ターゲット効果を最小限にする。そのような修飾がオフ・ターゲット効果を最小化する条件の下で含まれる場合、例えば、2'修飾ヌクレオチドを、2'ハロゲン修飾ヌクレオチド、2'アミン修飾ヌクレオチド、および2'アルキル修飾ヌクレオチドからなる群から選択してもよい。修飾がハロゲンの場合、このハロゲンは好ましくはフッ素である。2'修飾ヌクレオチドが2'アミン修飾ヌクレオチドである場合、アミンは好ましくは-NH₂である。この2'修飾ヌクレオチドが2'-アルキル修飾である場合、好ましくは、その修飾は2'メチル修飾であり、該メチル部分の炭素は糖部分の2'炭素に直接付着する。

【0235】

上記したように、好ましくは、修飾は2'-O-アルキル基である。より好ましくは、修飾は、2'-O-メチル、2'-O-エチル、2'-O-プロピル、2'-O-イソプロピル、2'-O-ブチル、2'-O-イソブチル、2'-O-メチル-O-メチル（-CH₂CH₂OCH₃）、および2'-O-エチル-OH（-OCH₂CH₂OH）からなる群から選択される。最も好ましくは、2'-O-アルキル修飾が2'-O-メチル部分である。さらに、修飾が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドの各々で同一である必要はない。しかし、本発明の分子を合成することに関して実用上の観点から、全体として同一の修飾を用いることが求められる場合もある。

【0236】

上記の修飾は、他のいかなる部分も修飾されないことを示唆していると解釈してはならない。オフ・ターゲット効果を増加させない限り、他の種類の修飾が許される。例えば、いくつかの実施形態で、付加的な修飾を、センス鎖の1、2、3、またはそれ以上の連続的なヌクレオチドまたは1つ置きヌクレオチドに加えることができる。あるいは、付加的な修飾を、RISC複合体へセンス鎖を入れるためのキーとして同定される特異的な位置に限定することができる。さらに、付加的な2'-O-メチル基（または他の2'修飾）は、センス鎖の一つ以上、好ましくは全てのピリミジン（例えば、Cおよび/またはUヌクレオチド）に加えられることができ、さらに/あるいは2'F1修飾（または他のハロゲン修飾）をアンチセンス鎖の一つ以上、好ましくは全てのピリミジン（例えば、Cおよび/またはUヌクレオチド）に加えることができる（もし、ハロゲン修飾を以下の第16および第17の実施形態と併用して用いるならば、好ましくは、最初の2つの5'末端アンチセンス・ヌクレオチドに入るもの以外の全てのピリミジンが、ハロゲン修飾であり、あるいは最初の3つが他の修飾を含むならば、最初の3つの5'末端アンチセンス・ヌクレオチド）。

【0237】

化学修飾に加えて、100%未満の相同性を共有する標的とのRISC媒介結合に関与するこれらの鎖の能力を変える塩基対のミスマッチまたは隆起（バルジ）をセンスおよび/またはアンチセンス鎖に加えることができると仮定される。そのようなミスマッチの例

として（限定されるものではないが）、プリンーピリミジン・ミスマッチ（例えばG-U、C-A）とプリンープリンまたはピリミジンーピリミジン・ミスマッチ（例えばG-A、U-C）が挙げられる。この種の修飾の導入は、上記の修飾と組み合わせることが可能であり、さらにオフ・ターゲット効果を減らすかどうか決定するために、それらを評価すること可能である。

【0238】

どんな修飾が許されるかについて決定するために、いくつかの非制限アッセイを、オフ・ターゲット効果を制限する修飾を同定するために実行することができる。1つの非限定的例において、センス鎖（試験されている修飾を担持する）を、多くの標識ヌクレオチドのうちの1つで標識させることができる。その後、結合アッセイを実施して、修飾センス鎖に対するRISCの親和性を未修飾形状のそれと比較することができる。

10

【0239】

第14の実施形態によれば、本発明は、ヘアピンをsiRNAを形成することができる単分子のsiRNAに関するもので、該単分子siRNAは、

（a）アンチセンス領域であって、該アンチセンス領域が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドは、この第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されている、アンチセンス領域と、

（b）センス領域であって、該センス鎖は第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の2'炭素センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドは第2の2'炭素センス修飾を含む、センス鎖と、

20

（c）ループ領域であって、該ループ領域が上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置している、ループ領域と、

を含む。

【0240】

この実施形態によれば、修飾の範囲は第13の実施形態のものと同一である。しかし、ポリヌクレオチドが単分子であり、かつヘアピンを形成することができるが、2本の異なる鎖ではないことから、センス領域とアンチセンス領域との両方を含む連続した1本の分子が存在する。好ましくは、上記センス領域およびアンチセンス領域が少なくとも実質的に相補的であり、より好ましくは100%の相補性を有する。第13の実施形態と同様に、好ましくは、上記センス領域およびアンチセンス領域は18~30の塩基対、より好ましくは19~25塩基対、さらに好ましくは19~25塩基対を含み、最も好ましくは19~23塩基対を含む。好ましくは、上記ヌクレオチドがRNAである。

30

【0241】

本発明にもとづいて、単分子siRNA、特に左回りの（left-handed）単分子構造（例えば、5'-AS-Loop-S）を設計する場合、好ましくは、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドに対して相補的である塩基から数えて（すなわち、センス領域の3'末端から数えて）、センス領域の第18、第19、または第20の塩基であるヌクレオチドとして定義される。第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、このように定義される。なぜなら、ヘアピンを形成することができる単分子siRNAが細胞に入る場合、典型的には、ダイサー（Dicer）が、約18~20塩基対の2本の異なる鎖（siRNA）から構成される分子に、長い二本鎖領域を含むヘアピンsiRNAのなかに処理し、この処理された分子の5'末端に結合したセンス鎖修飾をそれらの分子が保持することが求められるからである。最も好ましくは、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、センス領域の3'末端からセンス領域の19番目の塩基であるヌクレオチドとして定義される。さらに、好ましくは、ポリヌクレオチドは、左回りのヘアピンを形成することができる。

40

【0242】

上記ヘアピンは、4~10塩基から構成されるループ構造と、センス領域とを含み、セ

50

ンス領域およびアンチセンス領域は個々に19～23塩基対長であり、互いに実質的に相補的である。ループ構造の好ましい配列として、例えば、5'-UUCG（配列番号323）、5'-UUUGUGUAG（配列番号324）、および5'-CUUCCUGUCA（配列番号325）が挙げられる。

【0243】

ヘアピンは、好ましくは、アンチセンス領域の下流にあるループ領域によって構築される。この構成は、末端アンチセンス・ヌクレオチドをリン酸化することがより容易なので、この構造が望ましい。このように、単分子siRNAを設計する際、オーバーハングが5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの上流にないことが好ましい。いくつかの実施形態のセンス領域3'末端で、例えば、1、2、または3ヌクレオチドのオーバーハングを有することが望ましい場合もある。さらに、好ましくは、単分子siRNAは左回りのヘアピンを形成することができる。

10

【0244】

shRNAは、さらに、ステム領域を含むことができ、該ステム領域は、ループ構造の第5'末端および第3'末端に直接隣接した1つ以上のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含み、さらに該ステム領域の1つ以上のヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドが標的特異的（もしくは非標的特異的）である。好ましくは、その単分子siRNAの全長は、100塩基対未満であり、より好ましくは85塩基対未満である。

【0245】

本発明の単分子siRNAは、最終的には細胞の機能（cellular machinery）によって2本の異なる鎖に変換されるように処理される。さらに、これらの単分子siRNAを、全ての修飾よりも少ないもので細胞に導入してもよく、また導入された天然のプロセスまたはプロセッシング用分子を用いて、細胞自体の中で修飾することも可能である（例えば、細胞内でのリン酸化）。しかし、好ましくは、上記siRNAに対して、既に存在している全ての修飾が導入される（同様に、siRNAが2つの異なる鎖から構成される場合、第1の実施形態の鎖が好ましくは全ての修飾を持つ細胞に導入される。例えば、導入後にリン酸化の基によって修飾され得るにもかかわらず）。

20

【0246】

第15の実施形態によれば、本発明はオフ・ターゲット効果を最小化するための方法に関し、該方法は、修飾siRNAを標的核酸、または該標的核酸を発現するか、該標的核酸を発現することができる細胞もしくは組織に、さらすことを含み、上記siRNAは、アンチセンス鎖とセンス鎖とを有し、

30

（a）上記センス鎖が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の2'炭素センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドは第2の2'炭素センス修飾を含む、センス鎖と、

（b）上記アンチセンス鎖が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがこの第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'位でリン酸化されている、アンチセンス鎖と、を含む。

40

【0247】

第15の実施形態の修飾siRNAは、好ましくは第13の実施形態のsiRNAである。

【0248】

第16の実施形態によれば、本発明はオフ・ターゲット効果を最小化するための方法に関し、上記方法は、修飾siRNAを標的核酸、または該標的核酸を発現するか、該標的核酸を発現することができる細胞もしくは組織に、ヘアピンを形成することができる単一siRNAをさらすことを含み、上記siRNAは、アンチセンス鎖とセンス鎖とを有し、

（a）該センス領域は第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端セン

50

ス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の2'炭素センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドは第2の2'炭素センス修飾を含む、センス領域と、

(b) 上記アンチセンス領域が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがこの第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されている、アンチセンス領域と、

(c) ループ領域であって、該ループ領域が上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置している、ループ領域と、を含む。

【0249】

第16の実施形態の修飾 siRNA は、好ましくは第14の実施形態の siRNA である。

【0250】

他の実施形態では、修飾の組み合わせが以下のように記載されるように、なおも追加の修飾が存在し得る。すなわち、(1) 2'修飾基(リボース上の炭素2)によって修飾される鎖の5'から数えて、センス領域(またはshRNAのセンス領域)の1および2位(または1、2、および3位)、(2) 2'修飾基(リボース上の炭素2)によって修飾される鎖の5'末端から数えて、センス領域(またはshRNAのアンチセンス領域)の1および2位(または1、2、および3位)、および(3) アンチセンス鎖の5'末端がリン酸化されている(リボースの炭素5)。3種類の修飾全ての組み合わせは、実質的に、センスおよびアンチセンス鎖によって誘導されたオフ・ターゲット効果を減少させる点で有益であると思われる。

【0251】

第17の実施形態によれば、本発明は siRNA を提供するもので、該 siRNA は、

(a) アンチセンス鎖であって、上記アンチセンス鎖が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第1の2'炭素アンチセンス修飾を含み、上記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第2の2'炭素アンチセンス修飾を含み、該第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがこの第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されている、アンチセンス鎖と、

(b) センス鎖であって、上記センス鎖が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を含む、センス鎖と、を含む。

【0252】

この第17の実施形態によれば、上記修飾は、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドに2'炭素修飾の付加することで第13の実施形態のものと同様に定義される。あるいは、第2の末端アンチセンス・ヌクレオチド上の2'炭素修飾の付加によって、上記修飾は第13の実施形態のものと同様に定義される。これらの2'炭素修飾は、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドに対する修飾と同じように定義される。さらに、第3の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド上にさらなる2'炭素修飾が存在してもよい。

【0253】

第18の実施形態によれば、本発明はヘアピンを形成することができる単分子の siRNA 分子を提供する。この siRNA は、

(a) アンチセンス領域であって、該アンチセンス領域が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第1の2'炭素アンチセンス修飾を含み、上記

第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第2の2'炭素アンチセンス修飾を含み、さらに第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドがこの第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの5'炭素位でリン酸化されている、アンチセンス領域と、

(b) センス領域であって、該センス鎖は第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、前記第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を含み、前記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'炭素センス修飾を含む、センス領域と、

(c) ループ領域であって、該ループ領域が上記センス領域と上記アンチセンス領域との間に位置している、ループ領域と、

から構成される。

10

【0254】

この18の実施形態によれば、上記修飾は、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドに2'炭素修飾の付加することで第17の実施形態のものと同様に定義される。これらの2'炭素修飾は、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドに対する修飾と同じように定義される。さらに、第3の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド上にさらなる2'炭素修飾が存在してもよい。

【0255】

第19の実施形態によれば、本発明は、遺伝子サイレンシングの過程でオフ・ターゲット効果を減少させるための方法を提供する。この方法は、第17の実施形態の siRNA を、標的核酸、または該標的核酸を発現するか、該標的核酸を発現することができる細胞もしくは組織に、投与することを含む。

20

【0256】

第20の実施形態によれば、本発明は、遺伝子サイレンシングの過程でオフ・ターゲット効果を減少させるための方法を提供する。この方法は、第18の実施形態の siRNA を、標的核酸、または該標的核酸を発現するか、該標的核酸を発現することができる細胞もしくは組織に、投与することを含む。

【0257】

上記の実施形態が増加した特異性を目的とするにもかかわらず、他のパラメータ（例えば、安定性に影響を及ぼす上述のもの）に影響を及ぼすように設計可能である修飾の他の種類やそれらの組合せによって、siRNAが修正される点に注意することは重要である。

30

【0258】

しかし、いくつかの安定性指向の修飾は、機能性が制限された siRNA を与え、例えば対照またはエクサエクオ剤として使用する以外は使用されない（例えば、センス鎖であって、上記センス鎖が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'-O-アルキル（好ましくはメチル）センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'-O-アルキル（好ましくは、メチル）センス修飾を含む；少なくとも1つの（好ましくは、全ての）2'-O-アルキル（好ましくはメチル）ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドであって、上記少なくとも1つの、好ましくは全ての2'-O-アルキル（好ましくはメチル）ピリミジン修飾センス・ヌクレオチドが、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドまたは上記第2の5'末端センス・ヌクレオチド以外のヌクレオチドである；アンチセンス鎖であって、上記アンチセンス鎖が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第1の2'-O-アルキル（好ましくはメチル）アンチセンス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の2'-O-アルキル（好ましくはメチル）アンチセンス修飾を含む；上記アンチセンス鎖上の2'標識ピリミジン、好ましくは少なくとも1つの2'-O-アルキル（好ましくはメチル）ピリミジン修飾アンチセンス・ヌクレオチドであって、上記少なくとも1つの2'

40

50

ーOーアルキル（好ましくはメチル）ピリミジン修飾アンチセンス・ヌクレオチドが、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドまたは上記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチド以外のヌクレオチドであり、さらに必要に応じて、蛍光標識等の標識を上記5'末端センス・ヌクレオチドに有する）。

【0259】

さらに、修飾のいくつかの他の関連した組み合わせを用いて、対照群またはエクサエクオ剤として用いることができる s i R N A を開発することができる。例えば、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドをリン酸化することなく、s i R N A または s h R N A をこの開示で記載される第17および第18の実施形態と同様に開発することができる。したがって、一実施形態下で、(i) 各々が2'修飾、例えば上記した2'修飾（例として2'ーOーメチル修飾）を各々が含む第1および第2、または第1、第2、および第3の5'炭素末端センス・ヌクレオチドと、(ii) 各々が2'修飾、例えば上記した2'修飾（例として2'ーOーメチル修飾）を各々が含む第1および第2、または第1、第2、および第3の5'炭素末端アンチセンス・ヌクレオチドとに制限される2'修飾がある。

10

【0260】

エクサエクオ (exaequo) 剤または対照群を用いる場合、ブロック基によりセンス鎖および／またはアンチセンス鎖の5'末端の5'炭素位を修飾することが求められる場合もある。このブロック基は、例えば、アルキル基または他のいずれかの基であってもよく、ヌクレオチドの5'炭素位のリン酸化を防ぐ。リン酸化は、細胞内に存在するキナーゼの働きによって細胞内で生ずると思われる。典型的なブロック基として、限定されるものではないが、メチル、Oーメチル、およびアミン基が挙げられる。

20

【0261】

これらの分子は、機能的ではないが、負の対照研究で使用され、またエクサエクオ剤として使用することが可能である。さらに、もし上記した標識等の方式が用いられる場合、これらの薬剤はトラッキング剤として有用であり、形質移入の検出を助けられると思われ、さらに細胞内で分子がどこに存在するかの検出も助けるものと思われる。これらの薬剤は、サイレンシングのために用いられないことから、好ましくは18～30塩基対ではあるが、それらは16～28塩基対を含むことができる。

【0262】

さらに、リン酸主鎖に対する安定化修飾は、本発明のいくつかの用途のために s i R N A 内に含めることが可能である。例えば、少なくとも1つのホスホロチオエートおよび／またはメチルホスホネートを、オリゴヌクレオチド主鎖のセンス鎖および／またはアンチセンス鎖にある、同様に存在しうる任意のオーバーハング、ループ構造、またはステム構造にある、任意の、または全てのピリミジンのいくつかの、または全ての3'位にあるリン酸基と置換してもよい。ホスホロチオエート（およびメチルホスホネート）類似体は、オリゴヌクレオチド主鎖のリン酸基の修飾から生ずる。ホスホロチオエート内では、リン酸塩 O⁻ が硫黄原子に置き換わる。メチルホスホネートでは、酸素がメチル基によって置き換わる。一実施形態では、ホスホロチオエート修飾またはメチルホスホネートは、2'フッ素（または他のハロゲン）修飾ヌクレオチドも含む全てのアンチセンス鎖ヌクレオチドの3'位に置かれている。さらに、ホスホロチオエート3'修飾を、2'フッ素置換の代わりに、および独立して用い、s i R N A 分子の安定性を高めることが可能である。これらの修飾は、s i R N A 用途において、本明細書に記載された他の修飾と併用して、あるいはそれらの修飾とは別個に、用いることが可能である。

30

40

【0263】

ヌクレアーゼは、一般に、リン酸塩部分およびリボース環の2'OH位にある酸素基の両方を用いて R N A に対する攻撃を媒介する。複数の酸素の1つに対する硫黄基の置換によって、この反応に参加するリン酸塩の能力が取り除かれ、ヌクレアーゼ消化に対するこの部位の感度が制限される。しかし、ホスホロチオエートが典型的に有毒な点に留意する必要があることから、いかなる毒作用も否定される場合に主に有益であり、例えば、他の

50

ヌクレオチド毎、第3のヌクレオチド毎、または第4ののくレオチド毎にこの修飾を用いることを制限することによって、達成しうると考えることができる。

【0264】

さらに、いくつかの用途では、本発明のヌクレオチドに標識（例えば、蛍光標識、放射性標識、または質量標識）を取り込むことが望ましい場合もある。

【0265】

本発明の上記修飾は、s i R N Aと組み合わせてもよく、このs i R N Aは、無作為に選択、または、例えば、米国特許出願第10／714, 333号に記載されているような論理的設計に基づいて、選択された配列を含む。さらに、細胞の機能（c e l l u l a r m a c h i n e r y）による処理を促進し得る全体的または部分的な内部熱安定性に基づいて、配列を選択することが望ましい場合もある。

10

【0266】

本発明の第13～20の実施形態を開発する際に、2種類以上の修飾を二本鎖に加えてオフ・ターゲット効果を最小化させた。上記したように、出願人は、オフ・ターゲット効果を最小化する際の手助けになる他の修飾および組合せが、将来、発見可能であることを理解している。その上、本発明の修飾を、他の目的のために望まれる修飾と結合することができた。例えば、いくつかの例で、1つの修飾は、オフ・ターゲット・サイレンシング（例えば、R I S Cに結合したセンス鎖）の1つの特定のステップに影響を及ぼすことができ、その一方で第2の修飾は、例えば相同性が100%未満である標的と結合するセンス／アンチセンス鎖の能力を変えないことなく、異なるステップに完全に影響を及ぼすことができた。あるいは、2つの別々の修飾が同一のステップに影響を及ぼすことができた。いくつかの例では、2つ以上の修飾が、1つ以上のステップでの不要な相互作用またはプロセスを最小化することで、相加的または相乗的に作用して、オフ・ターゲット効果を制限した。さらに他の例において、1つの修飾は、オフターゲット効果を除去することができたが、それは他の所望の性質（例えばs i R N Aの効力または安定性）上、有害な結果を有する。これらのようなケースにおいて、分子の機能性のこれらの態様を修復する付加的な修飾を加えることができた。

20

【0267】

種々のアプローチを、センスおよび／またはアンチセンス鎖オフ・ターゲット化効果を除去するために必要とされる分子のタイプとキー・ポジションとを同定するのに用いることができる。1つの非限定的な実施例において、修飾－機能ウォークが実行される。この手順では、一つの種類の修飾が、センスおよび／またはアンチセンス鎖をまたがって1つ以上のヌクレオチドに対して加えられる。実質的に、修飾および未修飾を、いくつかの方法の1つによって、（1）機能性および（2）オフ・ターゲット効果について試験した。したがって、例えば、センスおよび／またはアンチセンス鎖の1および2位、3および4位、5および6位、7および8位、9および10位、11および12位、13および14位、15および16位、17および18位、または18および19位に対して、2'-O-Me基を付加することができ、さらに機能性（例えば、特異的標的をサイレンシングするそれらの分子の能力）とオフ／ターゲット効果（例えば、マイクロアレイ分析による）について試験する。いくつかの、または全てのオフ・ターゲット効果を取り除くキーポジションが同定されるが、二本鎖機能性の損失を招く場合、続いて修飾ウォークの第2のラウンドとなることで、二本鎖機能性を高めると思われるミスマッチまたは隆起が起こる付加的な化学基（例えば、アンチセンス鎖上の5'末端の5'リン酸塩）が、オフ・ターゲット効果を取り除く修飾を既に含む分子に付加される。

30

40

【0268】

本発明の第13～第20の実施形態の修飾が、用いるs i R N Aの機能性に依存して、異なる効果を有することが可能である点に留意する必要がある。このように、高機能的s i R N Aでは、本発明の修飾は、分子が一定の機能性を失う原因になり得るが、それにもかかわらずオフ・ターゲット効果が減少することから望ましい。対照的に、適度または不十分に機能的なs i R N Aが使用される場合、機能性の減少はわずかであり、いくつか

50

の例では、機能性を高めることができる。

【0269】

機能性を保持し、かつ分解に抵抗する本発明の dsRNA の安定性が塩基配列、細胞種、または導入される種に依存することがないことから、本発明は広範囲に及ぶ生物に適用可能であり、該生物として、限定されるものではないが、植物、動物、原生動物、細菌、ウイルス、および菌類が挙げられる。本発明は、牛、ウマ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、犬歯、齧歯動物（例えばハムスター）、マウス、およびラット、さらに霊長類（例えばゴリラ、チンパンジー、およびヒト）等の哺乳類での使用にとって特に有利である。

【0270】

本発明を、多様な細胞型（例えば、限定されるものではないが、一次細胞、生殖細胞系列、および体細胞）で、有利に使うことが可能である。細胞は、例えば、幹細胞または分化した細胞である。例えば、細胞型として、胚細胞、卵母細胞、精細胞、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（ケラチノサイト）、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞、さらに内分泌物または外分泌腺の細胞が挙げられる。

【0271】

本発明は、幅広い範囲の遺伝子に対する RNA 干渉を用いる（および／または対照として用いる）用途に適用可能であり、該遺伝子として、限定されるものではないが、糖尿病、アルツハイマーおよび癌等の疾患に関係するヒトゲノムの 45,000 遺伝子、さらにヒト、マウス、ハムスター、チンパンジー、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ラクダ、ブタ、イヌ、ネコ、線形動物（例えば線虫 *C. elegans*）、ハエ（例えばキイロショウジョウバエ *D. melanogaster*）、さらに他の脊椎動物および無脊椎動物のゲノムに含まれる全ての遺伝子が挙げられる。

【0272】

本発明の siRNA は、任意の方法によって細胞に投与することが可能であり、該方法は、現在知られている、またはこれから知られるであろう方法、さらにこの開示を読むことによって本発明と関連して有用であると当業者が結論出すいかなる方法である。例えば、siRNA を受動的に細胞へ送達することが可能である。

【0273】

修飾 siRNA の受動的な取り込みは、例えば、コンジュゲート、例えばセンス鎖の 5' 末端にあるポリエチレングリコール部分またはコレステロール部分、および／または、適当な状況下で、医薬的に許容される担体の存在によって、調整することができる。

【0274】

送達のための他の方法として、限定されるものではないが、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム、陽イオン性脂質／リポソーム、マイクロインジェクション、電気穿孔法、免疫沈降法、および siRNA と特定のコンジュゲートまたはリガンド（例えば抗体、抗原、もしくは受容体）とのカップリングが挙げられる。

【0275】

好ましくは、siRNA は、投与される際に二本鎖を含む。

【0276】

さらに、遺伝子サイレンシングのレベルを評価する方法は制限されない。したがって、任意の所定の siRNA のサイレンシング能力は、ノーザン分析、ウェスタン分析、RT-PCR、発現プロファイリング、その他を含むがこれらの限定されない任意の多数の当該分野で試験された手順のうちの 1 つによって、研究され得る。

【0277】

さらに、本発明の siRNA は、多様な用途の組み合わせに使用することが可能であり、限定されるものではないが、該用途として、基礎研究、創薬および開発、診断、ならびに薬物療法が挙げられる。例えば、本発明を、遺伝子産物が創薬または開発のための標的であるかどうかを確認するのに用いることができる。このような用途では、目的とすると

10

20

30

40

50

ころの標的核酸配列に対応するmRNAは、標的にされた分解に関して同定される。特定の遺伝子を標的することに特異的である本発明のsiRNAを細胞または器官、好ましくは二本鎖の形態に導入する。細胞または生体を、標的mRNAの分解を可能とする条件下に保つことで、遺伝子の活性または発現が減少する。遺伝子の発現または活性の減少の程度を測定し、そのような減少発現または活性の効果とともに、測定は、もし発現または活性が減少した場合、目的とする核酸配列が創薬または開発のための作用因子である。このように、表現型的に望ましい効果は、目的とするところの特定の標的核酸のRNA干渉を伴うことがありえ、適当な例では、毒性および薬物動態研究は行わうことができる、治療製剤が開発される。

【0278】

10

本発明は、例えば、目的とする疾患または障害の原因または因子と考えられる目的とする標的核酸の活性を減衰させることによって、生体での疾患または障害の一時的または永続的な状態を誘発するRNA干渉の用途にも用いることが可能である。目的とする標的核酸の活動亢進は、疾患または障害をより悪化させ、あるいは場合によっては、目的とするところの疾患または障害を改善するか、治療する傾向がある。同様に、目的とする標的核酸の活性減少によって、疾患または障害が生ずる場合もあり、それによってより悪化したり、場合によっては、改善または治癒する傾向がある。目的とする標的核酸は、ゲノムもしくは染色体核酸または染色体外核酸（例えばウィルス核酸）を含むことができる。

【0279】

20

さらに、本発明は、目的とする標的核酸または標的核酸配列の機能を判断するRNA干渉用途で 사용할ことが可能である。例えば、目的とする一定の標的核酸の活動を除外または減少させるロックダウン実験である。このことは、目的とする特定の標的核酸を標的化する1種類以上のsiRNAによるRNA干渉を実行することで、達成することができる。そのようなロックダウンの効果を観察することは、目的とする標的核酸の機能に関する推論を導くことができる。RNA干渉は、対立遺伝子のどちらか一方を有している目的とする標的核酸の活性を弱毒化させ、生体または系に対する効果を観察することで、多形性の効果（例えば双対立形質の多形性）を検討するのに用いられることもできる。治療的に、対立遺伝子の一方または他方、あるいは両方を、選択的な対立遺伝子サイレンシングが望ましいRNA干渉を使用して選択的に対立遺伝子サイレンシングことができる。

【0280】

30

さらに、本発明が、疾患の治療、または標的の過剰または過小発現における動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトの医薬製造での組成物の使用を含む、診断、予防、および治療等のRNA干渉用途で使用可能である。好ましくは、上記疾患または障害は、1種類以上のタンパク質の機能異常に起因するものであり、その疾患または障害は1種類以上のタンパク質からなる遺伝子産物の発現に関係している。例えば、特定のヒト胸部ガンが一般に「bcl-2」遺伝子として知られている遺伝子から発現されるタンパク質の機能障害に関連があると広く認められる。bcl-2遺伝子に対する1種類以上のsiRNAを使用し、また必要に応じて、薬物が乳癌の処置のために使われる医薬的に許容される担体、希釈剤および／またはアジュバント組み合わせで、薬物を、本発明の組成物および教示に従って製造することができる。出願人は、細胞モデルで方法および組成物の有用性を確立した。ヒトを含む動物の細胞に対するポリヌクレオチド（例えばsiRNA）の送達の方法は、周知である。当技術分野で現在知られている、または知られるであろういっさいの送達ビヒクルであって、siRNA等のポリヌクレオチドをヒト等の動物に導入するための有用性を有する送達ビヒクルは、本発明に従って製造された組成物中に存在する任意の修飾にこの送達ビヒクルが不適合でない限り、本発明に従う医薬の製造において有用であることが予測される。本発明によって作られる組成物に適合しない送達ビヒクルは、細胞培養での有効性に対して測定される場合に95%を超えて組成物の有効性を減らすものである。

40

【0281】

動物モデルは、例えば、癌、脈管系、先天異常または代謝の疾患を含む多くの、多くの

50

疾患に対して存在する。哺乳類（例えばマウス、ラットまたはヒト以外の霊長類）のような動物で、特定の疾患または障害のために最適投薬計画に到達するための投薬計画で、動物に核酸を投与することは、当業者に周知である。一旦有効性が当業者により、単調な実験によって哺乳類で確立されるならば、ヒト治験の開始の間の投薬計画はそのような研究で達されるデータに基づいて達成することができる。

【0282】

本発明にもとづいて製造される薬物の投薬量は、被検体のキログラムあたり数マイクログラムから数ミリグラムまで変化する。当技術分野で知られているように、投薬は投与を受けた哺乳類の質量、用量の投与を受けた哺乳類の性質、疾患または疾患の重症度、さらに、当業者に知られている他のファクターの中で、被験体の血清の薬物の安定性によって変化する。

10

【0283】

これらの用途に関して、疾患を有することが疑われる生体または特定の目的とする標的核酸の操作による変調に従う疾患は、s i R N Aを投与することによって処置される。s i R N A処置による結果として、寛解性、一時的な軽減、予防、および／または特定の疾患に対する診断が得られる。好ましくは、s i R N Aは医薬的に許容される担体または希釈剤で医薬的に許容可能な方法で投与される。

【0284】

本発明の治療上の適用は、種々の治療組成物および投薬方法によって、実行することができる。医薬的に許容される担体および希釈剤は、当業者に良く知られている。細胞および生体に対する投与の方法もまた、当業者に周知である。投与計画が、例えば、治療を受ける疾患または障害の反応の重症度および程度次第であることが、知られており、治療の過程は数日から数ヶ月にまで及ぶか、または障害または疾患状態に対して所望の効果が達成されるまでである。s i R N Aの慢性投与は、いくつかの疾患または障害で持続する所望効果のために必要であることができる。例えば、適当な投与計画は、医薬的に許容可能な送達ルート近傍で、医薬的に許容される担体または希釈剤で1種類以上のs i R N Aの変更量を投与することによって決定することができ、レシピエント生体の体内薬物累積値の量は投与の後で種々の時間で測定することができる。同様に、所期の効果（例えば、遺伝子産物または遺伝子活性の発現の抑制の程度）をs i R N Aの投与の後で種々の時間に測定することができる、また、このデータは他の薬物動態学的なデータ（例えば生体または器官での蓄積）と相関していることができる。当業者は、最適な投薬量、投与計画、その他を決定することができる。当業者は、ヒトに関する研究ガイド通りに生体内および生体外からE C₅₀を用いることが可能である。

20

30

【0285】

またさらに、本発明をR N A干渉用途（例えば診断法、予防薬、および薬物療法学）で用いることが可能である。これらの用途のために、特定の目的とする標的核酸の操作による変調に従う疾患または障害を有すると疑われる生体が、s i R N Aを投与することで処置される。s i R N A処置の結果は寛解性を示し、一時的軽減、予防的であり、さらに／または特定の疾患もしくは障害の診断となる。好ましくは、s i R N Aを医薬的に許容される担体または希釈剤で、医薬的に許容される方法で、s i R N Aが投与される。

40

【0286】

さらに、上記s i R N Aは、局所的にクリームまたは軟膏、経口製剤（例えばカプセルまたは錠剤または懸濁液または溶液など）として適用することができる。投与経路として、静脈内、筋肉内、経皮、真皮、皮膚、皮下、鼻腔内、経口、直腸、点眼、さらには有利な場所、例えば器官または組織に近い場所、標的となる目的の核酸を持つ細胞種にs i R N Aを放出するための装置を組織移植することによってもよい。

【0287】

別の実施形態によれば、本発明は、s i R N A、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖の各々が少なくとも1つのオルトエステル修飾を2'位に有する。

50

【0288】

本発明の別の態様にれば、本発明は、s i R N Aであって、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、該アンチセンス鎖が少なくとも1つのオルトエステル修飾および／または2'-ハロゲン修飾、2'-アルキル修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-アミン修飾、および2'-デオキシ修飾からなる群から選択される少なくとも1つの修飾を含む。

【0289】

別の実施形態によれば、本発明はs i R N Aを含み、該s i R N Aは、センス鎖およびアンチセンス鎖を含み、上記センス鎖および／またはアンチセンス鎖が、少なくとも1つのオルトエステル修飾を含み、さらに塩基センス鎖および／またはアンチセンス鎖が、2'-ハロゲン修飾、2'-アルキル修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-アミン修飾、および2'-デオキシ修飾からなる群から選択される少なくとも1つの2'修飾を含む。

10

【0290】

さらに別の実施形態では、本発明は、s i R N Aを含み、該s i R N Aは、(a)センス鎖であって、上記センス鎖が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の2'炭素センス修飾を含み、上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドは第2の2'炭素センス修飾を含む、センス鎖と、(b)アンチセンス鎖であって、該アンチセンス鎖が第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第1の2'炭素アンチセンス修飾および5'修飾を含み、さらに前記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドが第2の2'炭素アンチセンス修飾を含む、アンチセンス鎖と、を含む。

20

【0291】

さらに別の実施形態では、本発明はs i R N Aを含み、該s i R N Aはセンス鎖とアンチセンス鎖とを含み、上記アンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-オルトエステル修飾を含み、また上記アンチセンス鎖は、少なくとも1つの2'-オルトエステル修飾を含み、上記アンチセンス鎖は、さらに、2'-オルトエステル修飾、2'-アルキル修飾、2'-ハロゲン修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-アミン修飾、および2'-デオキシ修飾からなる群から選択される1つ以上の修飾によって修飾され、上記2'-アルキル修飾、2'-O-メチル修飾、および2'-ハロゲン修飾がアンチセンス鎖の1つ以上のピリミジン上にあり、さらにs i R N Aは、3'キャップを含む。この2'炭素修飾は、例えば、2'-O-メチル修飾等の2'-O-アルキル修飾である。上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび／または第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドは、5'ブロック基によってさらに修飾される。この5'ブロック基は、5'-メチル修飾、5'-O-メチル修飾、および5'-アジド修飾からなる群から選択することができる。

30

【0292】

別の実施形態では、上記5'末端センス・ヌクレオチドおよび／または5'末端アンチセンス・ヌクレオチドの第1および第2の2'-O-アルキル修飾は、2'-O-メチル修飾であり、さらに上記第1の5'末端センスおよび／またはアンチセンス・ヌクレオチドは、さらに、5'ブロック基を含むことができる。この5'ブロック基は、5'-メチル修飾、5'-O-メチル修飾、または5'アジド修飾からなる群から選択される。別の実施形態では、本発明は、アンチセンス鎖およびセンス鎖からなるs i R N Aを提供するもので、該センス鎖は、第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドは、第1の2'炭素センス修飾を含み、また第2の5'末端センス・ヌクレオチドは第2の2'炭素センス修飾を含む。

40

【0293】

他の実施形態では、本発明は、s i R N Aを提供するもので、該s i R N Aは、(a)センス鎖であって、該センス鎖が第1の5'末端センス・ヌクレオチドおよび第2の5'末端センス・ヌクレオチドから構成され、上記第1の5'末端センス・ヌクレオチドが第1の2'炭素センス修飾を含み、また上記第2の5'末端センス・ヌクレオチドが第2の

50

2'炭素センス修飾を含む、センス鎖と、(b)アンチセンス鎖であって、該アンチセンス鎖は、第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドと第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドとから構成され、上記第1の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドは5'リン酸塩修飾を含み、また上記第2の5'末端アンチセンス・ヌクレオチドは2'炭素アンチセンス修飾を含む、アンチセンス鎖と、を含む。

【0294】

他の実施形態では、本発明の組成物のいずれかが、さらに3'キャップを含む。この3'キャップは、例えば、逆位のデオキシチミジンである。

【0295】

他の実施形態では、本発明の組成物は、少なくとも1つの2'-デオキシ修飾および／またはメチルホスホネート・ヌクレオチド間連結を含むことができる。本発明の組成物はまた、1つ以上のピリミジン上に、2'-アルキル修飾、2'-O-アルキル修飾、および2'-ハロゲン修飾から選択される修飾を含む。上記2'-アルキル修飾を2'-メチル修飾、例えば2'-O-メチル修飾とすることができる。上記2'-ハロゲン修飾を、例えば2'-フッ素修飾とすることができる。

【0296】

他の実施形態では、本発明の上記組成物は、少なくとも1つの2'-アミン修飾および／または2'-ハロゲン修飾を含むことができる。この2'-アミン修飾は、例えば、2'-NH₂修飾である。2'-ハロゲン修飾は、例えば、2'-フッ素修飾である。本発明の組成物は、1つ以上の修飾ヌクレオチド間連結を含むことができ、例えば、1つ以上のホスホロチオエート連結、ホスホロジチオエート連結、メチルホスホネート連結、さらにそれらの組み合わせを含むことができる。

【0297】

本発明の他の実施形態では、上記組成物のいずれかも、コンジュゲートを含むことができる。このコンジュゲートは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、ポリマー、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびそれらの組み合わせからなる群から選択することができる。コンジュゲートは、コレステロールまたはPEGであってもよい。コンジュゲートは、さらに、蛍光標識等の標識を含む。この蛍光標識は、TAMRA、BODIPY、Cy3、Cy5、フルオロセイン、およびDabsylからなる群から選択される。あるいは、上記蛍光標識は、当技術分野で公知のいずれかの蛍光標識を用いてもよい。

【0298】

他の実施形態では、本発明の組成物は、少なくとも1つの2'-オルトエステル修飾を含み、この2'-オルトエステル修飾が、好ましくは2'-ビス(ヒドロキシエチル)オルトエステル修飾である。

【0299】

他の実施形態では、本発明の組成物のいずれかがRNA干渉を実施する方法で用いることができ、該方法は、本発明の1種類以上の組成物を細胞に投与することを含む。好ましくは、オルトエステル修飾がsiRNAに存在し、オルトエステル修飾が2'-ビス(ヒドロキシエチル)オルトエステルである。

【0300】

ある程度具体性をもって本発明を記載するために、ここで実施例が提供される。これらの実施例は、いかなる形であれ特許請求の範囲の範囲を制限することを意図したものでも制限を加えるものでもない。本発明は以下の実施例への言及を通して容易に理解されるにもかかわらず、それらは本発明を説明するための手段で、特に言及しない限り、本発明を制限することを意図したものではない。

【実施例】**【0301】**

(実施例1)

(siRNAの合成)

RNAオリゴ・ヌクレオチドは、図13に例示したヌクレオチド添加反応サイクルを使用する段階的な方式で合成した。合成は、好ましくは、適切な機械上での自動化プロセスとして行う。いくつかのこのような合成機械は、当業者に周知である。各ヌクレオチドは、固体担体に結合したオリゴ・ヌクレオチドに連続的に加える（3'方位から5'方位）。ポリスチレン担体が好ましいが、いかなる適切な担体を使用してもよい。鎖の3'位末端での第1のヌクレオシドは、固体担体に共有結合的に付着される（固体担体に対する付着）。ヌクレオチド前駆体、ホスホラミダイトやH-ホスホン酸塩などの活性化リボ・ヌクレオチド、およびテトラゾール、たとえば、Sエチル・テトラゾール（他のいかなる適切な活性化因子を使用してもよいが）などの活性化因子を加え（図13のステップi）で、第1のヌクレオシドの5'位末端上へ第2の塩基をカップリングさせる。担体を洗浄し、いかなる未反応の5'ヒドロキシル基も、それだけには限定されないが、例えば無水酢酸やフェノキシ無水酢酸などのアセチル化剤でキャップして未反応5'アセチル部位（moieties）を得る（ステップii）。次いで、たとえば、t-ブチルヒドロペルオキシドやヨウ素などの適切な酸化剤、および水を用いて、P（III）結合を、より安定で最終的に所望のP（V）結合に酸化する（ステップiii）。ヌクレオチド添加サイクルの終わりに、5'シリル基を、フッ化物イオン（たとえば、フッ化トリエチルアンモニウムまたはフッ化t-ブチルアンモニウム）を用いて切断する（ステップiv）。このサイクルを、後続のヌクレオチドそれぞれに対して繰り返す。図13にはメチル保護基を有するホスホラミダイトを例示するが、ホスホラミダイト部分（moiet y）の酸素を保護または置換するために他のいかなる適切な基を用いてもよいことを強調すべきである。たとえば、アルキル基、シアノエチル基、またはチオ誘導体をこの位置で使用してもよい。さらに、ステップ（i）に入る活性化ヌクレオシドは、異なる種類の活性化のヌクレオシド（例えばH-ホスホン酸塩、メチルホスホラミダイト、またはチオホスホラミダイト）であってもよい。担体に取り付けた初期または3'位のヌクレオシドは、シリル基よりむしろジメトキシトリチル基などの異なる5'位保護基を有することができることに留意すべきである。標準のDNA合成化学に使用されるとき、ジメトキシトリチル基の切断は酸水解を必要とする。すなわち、ジクロロ酢酸（DCA）やトリクロロ酢酸（TCA）などの酸は、このステップのために単独で使用される。DCA切断ステップとは別に、このサイクルを、所望のポリヌクレオチドを合成するのに必要な回数繰り返す。

【0302】

合成の後に、リン酸塩上の保護基（図13ではメチル基として示したが、必ずしもメチル基に限定されない）を、DMF（ジメチルホルムアミド）中1モル濃度の二ナトリウム-2-カルバモイル-2-シアノエチレン-1,1-ジチオレート三水和物（ジチオレート）を用いて30分で切断する。この脱保護溶液は、水を使用している固体担体に結合したオリゴ・ヌクレオチドで洗浄する。次いで、担体を、55℃で20分間40%のメチルアミンで処置する。これによって、RNAオリゴヌクレオチドを溶液中に放出し、環外アミンを脱保護（deprotect）し、かつ、2'ACE基上のアセチル保護を除去する。オリゴヌクレオチドは、この段階で陰イオン交換型HPLC（高速液体クロマトグラフィ）によって分析することができる。

【0303】

除去が所望される場合、2'オルトエステル基は、除去される最後の保護基である。2'脱保護の直前の2'ACEで保護されたRNAの構造は、図14に示すとおりである。

【0304】

自動化処理の場合、最初のヌクレオシドを有する固体担体を、合成装置に取り付ける。この装置は、合成のために必要とされる全ての必要な補助剤と単量体を含む。試薬は不活性ガス下に維持する。というのは、不活性ガス下に維持しない場合、いくつかの単量体は加水分解するおそれがあるからである。全てのラインを試薬で充填するように装置を準備する。合成サイクルに従って正しい順序の試薬の分配を規定する合成サイクルを設計して、図13で指定される順序で試薬を分配する。サイクルが一旦規定されると、加えるべき各試薬の量が規定され、ステップ間の時間が規定され、かつ洗浄ステップが規定され、ま

た、最初のヌクレオシドを有する固体担体が一旦加えられると合成が進行する準備ができる。

【0305】

本明細書に記載されたRNA類似体に関して、修飾は、3つの異なる一般的な方法で実施される。第1は、炭水化物および塩基修飾に関して実施されるもので、同様にある種のリンカーおよびコンジュゲートの導入に対しても実施され、修飾が既に存在する修飾ホスホラミダイトを用いる。このような修飾の例は、炭水化物2'位の修飾種(2'-F、2'-NH₂、2'-O-アルキル、等)であり、2'位のオルトエステルが、所望の修飾で置換されている。フルオロセイン誘導体、ダブシル(Dabsyl)、コレステロール、シアニン誘導体、またはポリエチレン・グリコールなどの3'位または5'位末端修飾もまた、導入することができる。特定のヌクレオチド間結合修飾もまた、入って来る反応性ヌクレオシド介在物を介して導入される。得られるヌクレオチド間結合修飾の例は、限定されるものではないがメチルホスホン酸塩、ホスホロアミダート、ホスホロチオエート、またはホスホロジチオエートを含む。

10

【0306】

同じまたは類似のサイクルを用いて、多くの修飾因子を、使用することができる。このクラスの例は、たとえば、2-アミノプリン、5-メチルシチジン、5-アミノアリルウリジン、ジアミノプリン、2-O-アルキル、マルチ原子スパーサー類、単一の単量体スパーサー、2'アミノヌクレオシド、2'フッ化ヌクレオシド、5-ヨードウリジン、4-チオウリジン、アクリジン、5-ブロモウリジン、5-フルオロシチジン、5-フルオロウリジン、5-ヨードウリジン、5-ヨードシチジン、5-ビオチンチミジン、5-フルオロセインチミジン、イノシン、プソイドウリジン、脱塩基単量体、ネブラリン(nebularine)、デアザヌクレオシド、ピレンヌクレオシド、アザヌクレオシド等を含む。しばしば、合成における残りのステップは、標準の脱保護条件になりやすい置換基を導入する修飾を除き同じままである。ここでは、修飾条件は、置換基に影響を及ぼさないものが使用される。第2の、特定のヌクレオチド間結合修飾は、それらの導入を可能にする酸化ステップの変更を要求する。このクラスの例は、元素硫黄または別の適切な硫黄移動剤による酸化剤が必要であるホスホロチオエート類とホスホロジチオエート類を含む。第3の、特定のコンジュゲートと修飾は、「後合成工程」により導入され、そこで、固相合成が完了した後、所望の分子が生体高分子に加えられる。これの例は、ポリエチレングリコールを、炭化水素リンカーに付着した一級アミンを含む予備合成されたオリゴヌクレオチドに添加することである。この場合の取付けは、溶液相反応でポリエチレングリコールのN-ヒドロキシサクシニミジル(succinimidyl)エステルを用いて、実現することができる。

20

30

【0307】

ここで、合成RNAとその類似体の合成のための最も好ましい方法を概説してきたが、これらの分子をアセンブルすることができるいかなる核酸合成法もそれらのアセンブリに使用することができるはずである。代替方法の例には、5' DMT-2' TBDMSおよび5' DMT-2' TOMの合成手法を含む。いくつかの2'-O-メチル、2'-F、および主鎖修飾は、たとえば、修飾型および野生型T7、ならびにSP6ポリメラーゼを用いる転写反応に導入することができる。

40

【0308】

(修飾RNAを合成すること)

以下のガイドラインは、修飾RNAの合成のために提供し、当技術分野で知られているいかなる自動合成器にも容易に適合することができる。

【0309】

(3'位末端修飾)

3'位修飾を組み込むためのいくつかの方法がある。3'位修飾は、当技術分野で周知の方法を用いて、選択された固体担体上へ固着または「搭載(load)」することができる。代替として、3'位修飾を、ホスホラミダイトとして使用することができる。この

50

ホスホラミダイトは、標準の合成方法を用いて一般的な担体にカップリングさせ、この一般的な担体は、所望の末端修飾の活性化ホスホラミダイトを導入することによって3'位末端修飾が生成されるヒドロキシルを提供する。代替として、ポリヌクレオチドが固体担体から除去された後、後合成的に3'位修飾を導入することもできる。遊離ポリヌクレオチドは、最初は、選択された修飾の適切に活性化された形態と反応する3'位末端のヒドロキシルアミノ、チオール、またはハロゲンを含む。例は、それだけには限定されないが、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、チオエーテル、ジスルフィド、マレイミド (malimido) またはハロアルキルの反応を含む。この修飾は、今や、ポリヌクレオチドの3'位末端になる。後合成的にコンジュゲート化することができる修飾の例は、それだけには限定されないが、フルオロセイン (fluoroscain) 類、アクリジン類、TAMRA、ダブシル (dabsyl)、コレステロール、ポリエチレングリコール類、マルチ原子スペーサー類 (multi-atom spacer)、シアニン類、脂質類、炭水化物類、脂肪酸類、ステロイド類、ペプチド類、またはポリペプチド類であってもよい。

10

【0310】

(5'位末端修飾)

5'位修飾をポリヌクレオチド内に導入するいくつかの方法がある。例えば、5'修飾を有するヌクレオチドは購入することができ、そしてその後ホスホラミダイトで活性化することができる。5'位修飾を有するこのホスホラミダイトも、商業的に入手可能である。次いで、5'位修飾を有する活性化ヌクレオチドを、他のいかなる活性化ヌクレオチドも使用できるのと同様にサイクルに使用する。しかし、全ての5'位修飾が、ホスホラミダイトとして使われる訳ではない。このような場合には、5'位修飾は、3'位修飾の場合に上記で記載した類似の方法で導入することができる。

20

【0311】

(チオエート)

ホスホロチエート結合などの1つまたは複数のチオエート部分を有するポリヌクレオチドを、上記で説明しかつ図13に例示した合成サイクルに従って作製した。しかし、トリチルヒドロペルオキシドの酸化ステップの代わりに、元素硫黄または別の硫化剤を使用した。

30

【0312】

(5'位チオ修飾)

5'位チオールを有する単量体は、グレン・リサーチ (Glen Research) などの商業的な供給元から、ホスホラミダイトとして購入することができる。これらの5'位チオール修飾単量体は、一般的に、トリチル保護基を担持する。合成の後に、このトリチル基は当技術分野で周知のいかなる方法によっても除去することができる。

【0313】

(他の修飾)

特定の修飾のために、この合成サイクルの諸ステップは、いくらか変わる。たとえば、3'の末端が逆位のチミジン (dT) を有する場合 (第1の塩基が5'水酸基によって固体担体に付着され、第1のカップリングが3'-3'結合である) では、脱トリチル化およびカップリングがより緩やかに生じるので、ジクロロ酢酸 (DCA) などの過剰な脱トリチル化剤を用いるべきであり、カップリング時間を300秒まで増加させるべきである。いくらかの5'修飾は、長いカップリング時間を必要とすることある。例は、コレステロールと、Cy3またはCy5ビオチンのようなフルオロフォア、ダブシル (dabsyl)、アミノリンカー類、チオリンカー類、スペーサー類、ポリエチレングリコール、リン酸化剤、BODIPYまたは光切断可能なリンカーなどを含む。

40

【0314】

ポリヌクレオチドが一つの修飾だけを有する場合、この修飾は、部分的に構築されたポリヌクレオチドをその上に有した担体を取り出し、修飾を有する単量体を手動でカップリングし、次いで自動合成器中に担体を再び配置し、そして自動合成を再開することによ

50

て、手動で最も効率的に実施することができることに留意すべきである。

【0315】

(実施例2)

(担体からの合成オリゴの脱保護および切断)

切断は、手動で、または機械上で自動化したプロセスで行った。ヌクレオチド間連結からの保護部分、例えばメチル基、の切断は、当技術分野で知られているいかなる適当な切断試薬、例えばジチオレートまたはチオフェノール、を使用することによって達成することができる。DMF中1モルのジチオレートを室温で10～20分間にわたって固体担体に加える。次いで担体を、例えばDMFで、それから水、そしてアセトニトリルで完全に洗浄する。別法として、水での洗浄、それに引く完全なアセトニトリルでの洗浄は、いかなる残留ジチオレートを除去するのにも十分である。

10

【0316】

担体からのポリヌクレオチドの切断および環外塩基保護の除去は、40%のN-メチルアミン(NMA)水溶液を用いて、引き続き20分間にわたって55℃まで加熱することによって行うことができる。一旦、ポリヌクレオチドが溶液中に存在したら、固体担体からNMAを慎重に除去する。次いで、ポリヌクレオチドを含有する溶液を、真空下でNMAを除去するまで乾燥させる。二本鎖化(duplexing)、脱塩、ゲル精製、品質制御などを含むさらなる加工処理は、当技術分野で知られているいかなる方法によっても実施することができる。

20

【0317】

いくつかの修飾のために、NMAステップを変更してもよい。例えば、3'アミノ修飾については、NMAでの処理は55℃で40分間にしなければならない。ピューロマイシン、5'末端アミノ結合修飾、および2'アミノヌクレオチド修飾は、40%のNMAを追加した後、1時間にわたって加熱する。Cy5で修飾したオリゴヌクレオチドは、遮光しながら、24時間にわたって水酸化アンモニウムで処理する。

【0318】

(切断試薬の調製)

HPLC等級の水および合成等級のアセトニトリルを使用する。ジチオレートは、結晶として予め調製されたものである。4.5グラムのジチオレート結晶を90mLのDMFに添加する。40パーセントのNMAは、Sigma Aldrich社などの供給元から、購入することができ、使用の準備ができている。

30

【0319】

(一本鎖ポリヌクレオチドのアニーリング)

一本鎖(Single stranded)ポリヌクレオチドは、当技術分野で知られているいかなる方法によって、いかなる適当な緩衝液を使用してもアニールすることができる。例えば、等しい量の各々の鎖を、適当な緩衝液、例えば、50mMのHEPES pH7.5、100mMの塩化カリウム、1mMの塩化マグネシウム、に混合することができる。混合物を1分間にわたって90℃で加熱し、室温まで冷却する。他の例では、それぞれ50マイクロモル濃度となるように、各ポリヌクレオチドを別々に調製する。次いで、30マイクロリットルの各々のポリヌクレオチド溶液を、15マイクロリットルのアニーリング緩衝液(×5)と一緒に管に加える。ここで、アニーリング緩衝液の最終濃度は、100mMの塩化カリウム、30mMのHEPES-KOH pH7.4、および2mMの塩化マグネシウムである。最終的な体積は75マイクロリットルである。次いで溶液を、90℃で1分間にわたってインキュベートし、15秒間にわたって遠心機で回転させ、1時間にわたって37℃でインキュベートした後に、室温に戻す。次いで溶液を、マイナス20℃で冷凍貯蔵し、5回まで凍結融解させることができる。二本鎖の最終濃度は、20マイクロモルである。ポリヌクレオチド貯蔵のための適当な緩衝液の例は、20mMのKCl、6mMのHEPES pH7.5、0.2mMのMgCl₂である。使用される全ての緩衝液は、RNaseを含まないものでなければならない。

40

【0320】

50

(オルトエステル部分の除去)

所望する場合、オルトエステル部分またはその複数部分は、当技術分野で知られているいかなる適当な方法によっても、ポリヌクレオチドから除去することができる。そのような方法は、揮発性の酢酸テトラメチレンジアミン (TEMED) pH 3.8 緩衝系を使用する。その緩衝系はオルトエステル部分またはその複数部分の除去後に凍結乾燥によって除去することができる。3.0 を超える pH での脱保護は、リン酸ジエステル主鎖の酸触媒による切断の可能性を最小にする助けとなる。例えば、脱保護は、オルトエステルで保護されているポリヌクレオチドを懸濁させ、60℃で30分間にわたってインキュベートすることによって、TEMEDでpHを3.8に調節した100mMの酢酸を使用して達成することができる。溶液を次いで、凍結乾燥させるか、使用前に乾燥させるために素早く真空下 (Speed Vac) におく。必要に応じて、脱保護後の脱塩は、当技術分野で知られているいかなる方法、例えば逆相カートリッジのエタノール沈殿または脱塩、によって実施することができる。

10

【0321】

(実施例3)

(RNA干渉での使用に向けて合成した siRNA)

以下は、Dharmacon社の登録商標のACE試薬を使用して合成され、設計され、ここに記載される本発明に従って使用される、ジdTオーバーハングを有する19量体の siRNA のリストである。「SEAP」は、人間の分泌されたアルカリホスファターゼを意味する。「ヒト・シクロ」は、ヒト・シクロフィリンを意味する。ヌクレオチド単位間の星印は、ホスホロチオエート結合である修飾ヌクレオチド間連結を意味する。構造 2'-F-C または 2'-F-U は、リボシル部分の 2' 炭素に付着したフッ素を有するヌクレオチド単位を意味する。構造 2'-N-C または 2'-N-U は、リボシル部分の 2' 炭素に付着した -NH₂ 基を有するヌクレオチド単位を意味する。構造 2'-OME-C または 2'-OME-U は、Cs または Us のいずれかのリボシル部分の 2' 炭素で、それぞれ 2'-O-メチル修飾がむき出しになった (baring) ヌクレオチド単位を意味する。dG、dU、dA、dC、およびdTは、2'位に関してデオキシであり、代わりにリボシル部分の 2' 炭素に付着した水素を有するヌクレオチド単位を意味する。特に記載されない限り、以下のリストにある全てのヌクレオチド単位は、2'炭素にOHを有するリボシルである。

20

【0322】

30

【表1】

表1: SEAPコンストラクト		
識別子	配列	配列番号
SP-2217-s	gugauguaugucagagagudtdt	1
SP-2217-as	acucucugacauacauacacdttdt	2
SP-2217-s-p	gugauguaugucagagagudtdt (ace on)	3
SP-2217-as-p	acucucugacauacauacacdttdt (ace on)	4
SP-2217-as4	ac*u*cucugacauacau*c*acdttdt	5
SP-2217-as8	ac*u*c*u*cugacauac*a*u*c*acdttdt	6
SP-2217-as8F	a2'-F-c*2'-F-u*2'-F-c*2'-F-u*2'-F-c2'-F-uga2'-F-ca2'-F-ua2'-F-c*a*2'-F-u*2'-F-c*a2'-F-cdttdt	7
SP-s-N	g2'-N-uga2'-N-ug2'-N-ua2'-N-ug2'-N-u2'-N-cagagag2'-N-udtdt	8
SP-as-N-12	a2'-N-c2'-N-u2'-N-c2'-N-u2'-N-cugaca2'-N-ua2'-N-ca2'-N-u2'-N-ca2'-N-cdttdt	9
SP-s-thio	g*u*g*a*u*g*u*a*u*g*u*c*a*g*a*g*a*g*udtdt	10
SP-as-thio	a*c*u*c*u*c*u*g*a*c*a*u*a*c*a*u*c*a*cdttdt	11
SP-as-thio12	a*c*u*c*u*c*ugacaua*c*a*u*c*a*cdttdt	12
SP-s-M	g2'-OMe-uga2'-OMe-ug2'-OMe-ua2'-OMe-ug2'-OMe-u2'-OMe-cagagag2'-OMe-udtdt	13
SP-as-M10	a 2'-OMe-c 2'-OMe-u 2'-OMe-c 2'-OMe-u 2'-OMe-c u g a c a 2'-OMe-u a 2'-OMe-c a 2'-OMe-u 2'-OMe-c a 2'-OMe-c dt dt	14
SP-2217-s	dgudgadugduadugducdagdagdagduddtdt	15

10

20

30

【0323】

【表 2】

SP-2217-as	adcudcudcugacauadcaducdacdttdt	16
SP-2217-sF	g2'-F-uga2'-F-ug2'-F-ua2'-F-ug2'-F-u2'-F-cagagag2'-F-udtdt	17

表 2 : ヒト・シクロフィリン・コンストラクト

識別子	配列	配列番号
H-cyclo-476-s	ugguguuuggcaaaguucudtdt	18
H-cyclo-476-as	agaacuuugccaaacaccadtdt	19
H-cyc-F-s	(2'-F-u)gg(2'-F-u)g(2'-F-u)(2'-F-u)(2'-F-u)gg(2'-F-c)aaag(2'-F-u)(2'-F-u)(2'-F-c)(2'-F-u)dttdt	20
H-cyc-F-as9	agaa(2'-F-c)(2'-F-u)(2'-F-u)(2'-F-u)g(2'-F-c)(2'-F-c)aaa(2'-F-c)a(2'-F-c)(2'-F-c)adtdt	21
H-cyc-F-as8	agaa(2'-F-c)(2'-F-u)(2'-F-u)ug(2'-F-c)(2'-F-c)aaa(2'-F-c)a(2'-F-c)(2'-F-c)adtdt	22
H-cyclo-476-as6	agaa(2'-F-c)(2'-F-u)(2'-F-u)ugccaaa(2'-F-c)a(2'-F-c)(2'-F-c)adtdt	23
H-cyclo-476-as1	agaacuu(2'-F-u)gccaaacaccadtdt	24

表 3 : ホタル・ルシフェラーゼ・コンストラクト

識別子	配列	配列番号
Luc -1188-2'-F-s	ga2'-F-u2'-F-ua2'-F-ug2'-F-u2'-F-c2'-F-cgg2'-F-u2'-F-ua2'-F-ug2'-F-uadtdt	25
Luc -1188-2'-F-as	2'-F-ua2'-F-ca2'-F-uaa2'-F-c2'-F-cgga2'-F-ca2'-F-uaa2'-F-u2'-F-cdttdt	26

(実施例 4)

(RNA 干渉の実施)

(形質移入)

siRNA二本鎖を、標準の緩衝液（50ミリモルのHEPES pH7.5、100ミリモルのKCl、1mMのMgCl₂）を使用してアニールした。形質移入は、後述する標準プロトコルに従って行う。

【0324】

(96穴プレートおよび6穴プレートのための標準形質移入プロトコル：siRNA)

- 293およびCalu6のためのプロトコル、HeLa、MDA 75は同一である。
- 細胞は、形質移入の日に95%の集密的であるように平板培養される。

3. SuperRNAsin (Ambion) が、RNAses に対する防御のために形質移入混合物に加えられる。

4. 全ての溶液と取扱いは、RNase を含まない条件下で実施しなければならない。
プレート 1 小さなフラスコにおいて 25 ml 媒体の 0.5 ~ 1 ml、または大きいフラスコにおいて 50 ml 媒体の 1 ml。

【0325】

(96穴プレート)

1. 3 ml の 0.05% トリプシン-EDTA を培養フラスコ (6 インチ大) に添加して 5 分間、37 °C でインキュベート。

2. 7 ml (14 ml 大) の通常培地の添加およびピペッティング 10 回繰り返して、細胞を再懸濁。 10

3. ステップ 2 から細胞懸濁液を 25 マイクロリットル採取し、75 マイクロリットルのトリパンブルー染色 (1:4) および細胞カウンターに 10 マイクロリットル入れる。

4. 標準血球計算板で細胞数を計数。

5. 細胞平均数 $\times 4 \times 10000$ は、1 ml あたりの細胞数。

6. 通常培地で希釈して 350000 / ml にする。

7. 100 マイクロリットル (HEK293 では 35,000 細胞) を 96 穴プレートにプレーティング。

【0326】

(2×96穴プレート (60穴フォーマット) に対する形質移入)

20

1. OPTI-MEM 2 ml + 80 マイクロリットルの Lipofectamine 2000 (1:25) + 15 マイクロリットルの SuperRNAsin (AMBIION)。

2. 等分量 (アリコート) の siRNA (スクリーニング用 100 マイクロモル、0.8 マイクロリットル (全希釈比は、1:750、0.8 マイクロリットルの 100 マイクロモル溶液で最終濃度 100 ナノモルを得る) を所望のオーダーで深皿に移す (通常、60 穴フォーマットに対して 3 カラム $\times$ 6、または 96 穴に対して 4 カラム $\times$ 8)。

3. 100 マイクロリットルの OPT1-MEM を移す。

4. Lipofectamine 2000 および SuperRNAsin とともに 100 マイクロリットルの OPT1-MEM を各ウェルに移す。 30

5. 室温 (RT) に 20 ~ 30 分放置。

6. 各ウェルに 0.55 ml の通常培地を添加。プレートをフィルムで覆って混合。

7. 100 $\times$ 3 $\times$ 2 を直接、細胞に対してアレイ・アウト (2 枚のプレートに十分)。

【0327】

(2×6穴プレートに対する形質移入)

8. 8 ml OPTI-MEM + 160 マイクロリットル Lipofectamine 2000 (1:25)、30 マイクロリットルの SuperRNAsin (AMBIION)。

9. 等分量の siRNA (全希釈比は、1:750、5 マイクロリットルの 100 マイクロモル溶液によって最終濃度 100 ナノモルを得る) をポリスチレン管に移す。 40

10. Lipofectamine 2000 および SuperRNAsin (AMBIION) とともに 1,300 マイクロリットルの OPT1-MEM を移す。

11. 室温 (RT) で 20 ~ 30 分間放置。

12. 各ウェルに 0.55 ml の通常培地を添加。プレートをフィルムで覆って混合。

13. 2 ml を各ウェルに移す (2 ウェルにとって十分)。

【0328】

mRNA またはタンパク質濃度を、標準キットまたは Custom B-DNA セット および Quantigene キット (Bayer) を用いて、形質移入後 24、48、72、および 96 時間で測定する。

【0329】

50

(実施例 5)

(活性の測定／検出)

s i R N A 誘導 R N A 干渉のレベル、または遺伝子サイレンシングを、標的 m R N A レベルまたは対応のタンパク質レベルによって評価した。m R N A レベルのアッセイは、B-DNA (商標) 技術 (Q u a n t a g e n e C o r p .) を用いて実施した。f L U C および r L U C に対するタンパク質レベルは、S T E A D Y G L O (商標) キット (P r o m e g a C o r p .) によってアッセイした。ヒトアルカリホスファターゼレベルは、G r e a t E s c A P e S E A P F l u o r e s c e n c e D e t e c t i o n K i t s (# K 2 0 4 3 - 1)、B D B i o s c i e n c e s, C l o n t e c h. を用いてアッセイした。

10

【0330】

(実施例 6)

(2'-デオキシ修飾／ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子)

センス鎖およびアンチセンス鎖にある 2 つのタンデム 2'-デオキシ修飾を持つ s i R N A の機能的効果を、19 量体領域の相補性とジ d T オーバーハングを二本鎖の 3' 末端に有する 21 量体 s i R N A に導入することで、系統的に試験した。s i R N A は、H E K 2 9 3 細胞に導入したホタル・ルシフェラーゼ遺伝子 (f L U C 5) に向けられた。s i R N A 機能性を上記したようにして測定した。毒性は、A L M A R ブルーで測定したところ、影響を受けていないように見えた。機能性は、3 通りの濃度で評価した。すなわち、1、10、および 100 n M 最終。使用した s i R N A の配列、および 2'-デオキシ修飾の置換を、表 1 に示す。これらの実験の結果を図 19-23 に示す。

20

【0331】

【表 4 - 1】

表 4 : 2'-デオキシ修飾/FLUCについてのコンストラクト		
識別子	配列	配列番号
FLUC5-AS 3D19	uuuauagggaucucucudgdadttdt	27
FLUC5-AS 3D16	uuuauagggaucucucudcdgdadttdt	28
FLUC5-AS 3D13	uuuauagggaucuducdudcugadttdt	29
FLUC5-AS 3D10	uuuauaggdadudcucucugadttdt	30
FLUC5-AS 3D7	uuuaugdadgdgaucucucugadttdt	31
FLUC5-AS 3D4	uuudadudgaggauucucucugadttdt	32
FLUC5-AS 3D1	dududuaagggaucucucugadttdt	33
FLUC5-AS 2D19	uuuauagggaucucucudgdadttdt	34
FLUC5-AS 2D17	uuuauagggaucucucudgdadttdt	35
FLUC5-AS 2D15	uuuauagggaucucuducugadttdt	36
FLUC5-AS 2D13	uuuauagggaucuducucugadttdt	37
FLUC5-AS 2D11	uuuauaggadudcucucugadttdt	38
FLUC5-AS 2D9	uuuauagdgdaucucucugadttdt	39
FLUC5-AS 2D7	uuuaugdadggaucucucugadttdt	40
FLUC5-AS 2D5	uuuadudgaggauucucucugadttdt	41
FLUC5-AS 2D3	uududaagggaucucucugadttdt	42
FLUC5-AS 2D1	duduuagggaucucucugadttdt	43
FLUC5-AS 1D19	uuuauagggaucucucugadttdt	44
FLUC5-AS 1D18	uuuauagggaucucucudgdadttdt	45
FLUC5-AS 1D17	uuuauagggaucucucudugadttdt	46
FLUC5-AS 1D16	uuuauagggaucucudcugadttdt	47
FLUC5-AS 1D15	uuuauagggaucucducugadttdt2	48

10

20

30

【 0 3 3 2 】

【表 4 - 2】

FLUC5-AS 1D14	uuuauaggaggaucucucugadttdt	49	
FLUC5-AS 1D13	uuuauaggaggaucucucugadttdt	50	
FLUC5-AS 1D12	uuuauaggaggaucucucugadttdt	51	
FLUC5-AS 1D11	uuuauaggaducucucugadttdt	52	
FLUC5-AS 1D10	uuuauaggdaucucucugadttdt	53	
FLUC5-AS 1D9	uuuauaggdgaucucucugadttdt	54	
FLUC5-AS 1D8	uuuauagdggaucucucugadttdt	55	10
FLUC5-AS 1D7	uuuauagdaggauucucucugadttdt	56	
FLUC5-AS 1D6	uuuauagaggauucucucugadttdt	57	
FLUC5-AS 1D5	uuuauadaggauucucucugadttdt	58	
FLUC5-AS 1D4	uuuauaugaggauucucucugadttdt	59	
FLUC5-AS 1D3	uuuauaugaggauucucucugadttdt	60	
FLUC5-AS 1D2	uuuauaugaggauucucucugadttdt	61	
FLUC5-AS 1D1	uuuauaugaggauucucucugadttdt	62	20
FLUC5-S 3D19	ucagagagauccucaudadadadttdt	63	
FLUC5-S 3D16	ucagagagauccucadudadaadttdt	64	
FLUC5-S 3D13	ucagagagauccududcauaaadttdt	65	
FLUC5-S 3D10	ucagagagadudcdcauaaadttdt	66	
FLUC5-S 3D7	ucagagdadgdaucucuaaadttdt	67	
FLUC5-S 3D4	ucadgdadgagaucucuaaadttdt	68	
FLUC5-S 3D1	dudcdagagagauccucauaaadttdt	69	
FLUC5-S 2D19	ucagagagauccucauadadadttdt	70	30
FLUC5-S 2D17	ucagagagauccucaudadaadttdt	71	
FLUC5-S 2D15	ucagagagauccucdaduaaadttdt	72	
FLUC5-S 2D13	ucagagagauccudcdcauaaadttdt	73	
FLUC5-S 2D11	ucagagagaudcdcauaaadttdt	74	
FLUC5-S 2D9	ucagagagdaduccucauaaadttdt	75	
FLUC5-S 2D7	ucagagdadgaucucuaaadttdt	76	
FLUC5-S 2D5	ucagdadgagaucucuaaadttdt	77	
FLUC5-S 2D3	ucdadgagagauccucauaaadttdt	78	40
FLUC5-S 2D1	dudcagagagauccucauaaadttdt	79	
FLUC5-S 1D19	ucagagagauccucauaadadttdt	80	
FLUC5-S 1D18	ucagagagauccucauadaadttdt	81	
FLUC5-S 1D17	ucagagagauccucaudaaadttdt	82	

【 0 3 3 3 】

【表 4 - 3】

fLUC5-S 1D16	ucagagagauccucaduaaadttdt	83
fLUC5-S 1D15	ucagagagauccucdaaadttdt	84
fLUC5-S 1D14	ucagagagauccucdaaadttdt	85
fLUC5-S 1D13	ucagagagauccucdaaadttdt	86
fLUC5-S 1D12	ucagagagauccucdaaadttdt	87
fLUC5-S 1D11	ucagagagauccucdaaadttdt	88
fLUC5-S 1D10	ucagagagauccucdaaadttdt	89
fLUC5-S 1D9	ucagagagauccucdaaadttdt	90
fLUC5-S 1D8	ucagagagauccucdaaadttdt	91
fLUC5-S 1D7	ucagagagauccucdaaadttdt	92
fLUC5-S 1D6	ucagagagauccucdaaadttdt	93
fLUC5-S 1D5	ucagagagauccucdaaadttdt	94
fLUC5-S 1D4	ucagagagauccucdaaadttdt	95
fLUC5-S 1D3	ucagagagauccucdaaadttdt	96
fLUC5-S 1D2	ucagagagauccucdaaadttdt	97
fLUC5-S 1D1	ucagagagauccucdaaadttdt	98
「d」は、「d」の後に続くヌクレオチドが2'位のデオキシであることを示す。		

10

20

(実施例 7)

(2'-O-メチル修飾/ホタルルシフェラーゼ遺伝子)

センス鎖およびアンチセンス鎖に単一2'-O-メチル修飾、2つのタンDEM 2'-O-メチル修飾、および3つのタンDEM 2'-O-メチル修飾を持つ siRNA の機能的効果を、19量体領域の相補性とジdTオーバーハングを二本鎖の3'末端に有する21量体 siRNA に導入することで、系統的に試験した。siRNA は、HEK293細胞に形質移入されたホタル・ルシフェラーゼ遺伝子 (fLUC5) に向けられた。siRNA 機能性は、以下のように測定した。機能性は、3通りの濃度で評価した。すなわち、1、10、および100 nM 最終。毒性は、ALMARブルーで測定したところ、影響を受けていないように見えた。使用した siRNA の配列および2'-O-メチル修飾の配置は、表5に示す。これらの実験の結果を図24~28に示す。

30

【0334】

【表 5 - 1】

表 5 : 2'-O-メチル修飾/FLUCについてのコンストラクト		
識別子	配列	配列番号
FLUC5-AS 3M19	uuuauagggaucucucumgmadttdt	99
FLUC5-AS 3M16	uuuauagggaucucumcmumgadttdt	100
FLUC5-AS 3M13	uuuauagggaucumcmucugadttdt	101
FLUC5-AS 3M10	uuuauaggmamumcucucugadttdt	102
FLUC5-AS 3M7	uuuaugmamgmgaucucucugadttdt	103
FLUC5-AS 3M4	uuumamumgaggauucucucugadttdt	104
FLUC5-AS 3M1	mumumuaugaggauucucucugadttdt	105
FLUC5-AS 2M19	uuuauagggaucucucumgmadttdt	106
FLUC5-AS 2M17	uuuauagggaucucucumgmadttdt	107
FLUC5-AS 2M15	uuuauagggaucucumcugadttdt	108
FLUC5-AS 2M13	uuuauagggaucumcucugadttdt	109
FLUC5-AS 2M11	uuuauagggamumcucucugadttdt	110
FLUC5-AS 2M9	uuuauaggmgaucucucugadttdt	111
FLUC5-AS 2M7	uuuaugmamggauucucucugadttdt	112
FLUC5-AS 2M5	uuuamumgaggauucucucugadttdt	113
FLUC5-AS 2M3	uumumaugaggauucucucugadttdt	114
FLUC5-AS 2M1	mumuaugaggauucucucugadttdt	115
FLUC5-AS 1M19	uuuauagggaucucucugmadttdt	116
FLUC5-AS 1M18	uuuauagggaucucucumgadttdt	117
FLUC5-AS 1M17	uuuauagggaucucucumugadttdt	118
FLUC5-AS 1M16	uuuauagggaucucumcugadttdt	119
FLUC5-AS 1M15	uuuauagggaucucumucugadttdt	120
FLUC5-AS 1M14	uuuauagggaucumcucugadttdt	121
FLUC5-AS 1M13	uuuauagggaucumcucugadttdt	122
FLUC5-AS 1M12	uuuauagggaumcucucugadttdt	123
FLUC5-AS 1M11	uuuauagggamucucucugadttdt	124
FLUC5-AS 1M10	uuuauaggmaucucucugadttdt	125
FLUC5-AS 1M9	uuuauaggmgaucucucugadttdt	126
FLUC5-AS 1M8	uuuauagmggaucucucugadttdt	127
FLUC5-AS 1M7	uuuauagmaggaucucucugadttdt	128
FLUC5-AS 1M6	uuuauumgaggauucucucugadttdt	129

10

20

30

40

【表 5 - 2】

FLUC5-AS 1M5	uuuamugagggaucucucugadtdt	130
FLUC5-AS 1M4	uumaugagggaucucucugadtdt	131
FLUC5-AS 1M3	uumaugagggaucucucugadtdt	132
FLUC5-AS 1M2	umuuaggagggaucucucugadtdt	133
FLUC5-AS 1M1	muuuaggagggaucucucugadtdt	134
FLUC5-S 3M19	ucagagagauccucaumamamadtdt	135
FLUC5-S 3M16	ucagagagauccucamumamaadtdt	136
FLUC5-S 3M13	ucagagagauccumcmuauaaadtdt	137
FLUC5-S 3M10	ucagagagamumcmucuaaaadtdt	138
FLUC5-S 3M7	ucagagmangmauccucauaaaadtdt	139
FLUC5-S 3M4	ucamgmaggagauccucauaaaadtdt	140
FLUC5-S 3M1	mumcmagagagauccucauaaaadtdt	141
FLUC5-S 2M19	ucagagagauccucauamamadtdt	142
FLUC5-S 2M17	ucagagagauccucamumaaadtdt	143
FLUC5-S 2M15	ucagagagauccumcmuauaaadtdt	144
FLUC5-S 2M13	ucagagagaucmcmucuaaaadtdt	145
FLUC5-S 2M11	ucagagagamumccucauaaaadtdt	146
FLUC5-S 2M9	ucagagangmauccucauaaaadtdt	147
FLUC5-S 2M7	ucagagmgagauccucauaaaadtdt	148
FLUC5-S 2M5	ucagmamaggagauccucauaaaadtdt	149
FLUC5-S 2M3	ucmamaggagauccucauaaaadtdt	150
FLUC5-S 2M1	mumcagagagauccucauaaaadtdt	151
FLUC5-S 1M19	ucagagagauccucauaamadtdt	152
FLUC5-S 1M18	ucagagagauccucauamaadtdt	153
FLUC5-S 1M17	ucagagagauccucaumaadtdt	154
FLUC5-S 1M16	ucagagagauccucamuuaadtdt	155
FLUC5-S 1M15	ucagagagauccucmauaaaadtdt	156
FLUC5-S 1M14	ucagagagauccumcauaaaadtdt	157
FLUC5-S 1M13	ucagagagauccmucuaaaadtdt	158
FLUC5-S 1M12	ucagagagaucmucuaaaadtdt	159
FLUC5-S 1M11	ucagagagaumccucauaaaadtdt	160
FLUC5-S 1M10	ucagagagamuccucauaaaadtdt	161
FLUC5-S 1M9	ucagagagmauccucauaaaadtdt	162
FLUC5-S 1M8	ucagagangmauccucauaaaadtdt	163

10

20

30

40

【表 5 - 3】

FLUC5-S 1M7	ucagagmagauccucauaaadttdt	164
FLUC5-S 1M6	ucagamgagauccucauaaadttdt	165
FLUC5-S 1M5	ucagmagagauccucauaaadttdt	166
FLUC5-S 1M4	ucamgagagauccucauaaadttdt	167
FLUC5-S 1M3	ucmagagagauccucauaaadttdt	168
FLUC5-S 1M2	umcagagagauccucauaaadttdt	169
FLUC5-S 1M1	mucagagagauccucauaaadttdt	170

「m」という文字は、「m」の後に続くヌクレオチドが2'-O-メチル部分で修飾されていることを示す。

10

(実施例 8)

(2'-デオキシおよび2'-O-メチル修飾/センス対アンチセンス鎖)

15の二本鎖（そのうち5つがヒト・シクロフィリン遺伝子に向けられ、10がホタル／ルシフェラーゼに向けられている）を種々の修飾により試験した（図29～31参照）。ヒトのシクロフィリンBについて、試験した二本鎖は、（1）未修飾、（2）センス鎖の第1および第2の位置に2'-O-メチル修飾、および（3）アンチセンス鎖の第1および第2の位置に2'-O-メチル修飾、さらに（4）センス鎖およびアンチセンス鎖上に2'-O-メチル修飾を含む。ルシフェラーゼに関して、ヒト／シクロフィリンBについて記載された修飾の全てに加えて、（1）AS鎖の5'リン酸化と併用したAS鎖上の2'-O-メチル修飾と、（2）アンチセンス鎖の5'リン酸化と併用したセンスおよびアンチセンス鎖の2'-O-メチル修飾を、試験した。全ての15の二本鎖について、2'-O-メチル部分を持つセンス鎖の位置1および2での修飾は、機能性と干渉しなかった。アンチセンス鎖の同一の修飾は、二本鎖の機能性を制限した。この機能性の減少は、アンチセンス鎖がその5'末端でリン酸化された場合に、部分的に少なくなった（図30および31）。上記のデータを考え合わせると、アンチセンス鎖の5'リン酸化と併用したセンス鎖の1位および2位の2'-O-メチル化は、二本鎖の機能性を変えことなくセンス鎖オフ・ターゲット化を制限するようにsiRNA二本鎖を修飾する、安価で信頼性があり、さらに非毒性である方法である。この情報は、商業的価値がある。なぜなら、それによってsiRNAの特異性と効力が高められるからである。最近のマイクロアレイ・データによれば、丁度11ヌクレオチドの存在で非特異的なサイレンシングの誘導が十分なされることを示している。siRNA二本鎖のセンス鎖内に存在する相同性は、概ね、少なくとも半分の非特異的機能性を構成する。固有の非特異性がブロックされる場合、センス鎖はオフ・ターゲット化に貢献することができず、siRNAの特異性は増加するはずである。機能的RISCアンチセンス鎖複合体への平衡の移動もまた、siRNAの有効濃度を下げる。

20

30

40

【0337】

(実施例 9)

(5'コンジュゲートによる修飾siRNA)

二本鎖安定性、機能性、および受動的取り込みに対する種々の修飾の効果をアッセイした。図33は、二本鎖安定性に対するコレステロール・コンジュゲーションおよび（センスおよびアンチセンス鎖の1位および2位上の2'-O-メチル修飾、プラス、センス鎖の全てのCおよびUの2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖の全てのCおよびUの2'F修飾、プラス、アンチセンス鎖の5'リン酸化）の効果を示す。裸のsiRNAまたは修飾siRNAは³²P標識（AS鎖、T4キナーゼ、プロメガ）し、血清（または血清アルブミン）とともにインキュベートし、さらにゲル・シフト・クロマトグラフィー（変

50

性、15%PAGE)で走らせた。これらの実験の結果は、未修飾二本鎖が素早く分解した一方で、コレステロールおよび既に説明した修飾を持つsiRNAは、血清または血清アルブミン存在下で安定であることを示す。同様に、3' idTキャッピングおよびCHO(5'センス)コンジュゲーションと併用したCおよびUの2'-O-メチル修飾を担持するsiRNAについてもまた、安定性の増大が示される(図35)。

【0338】

同様に修飾した分子に対する研究(例えば、センス鎖の2' F1修飾と併用してセンス鎖の5'末端のコレステロール修飾)は、そのような修飾が機能性(図34)および受動的取り込み(図36、修飾=コレステロールを有するセンスおよびアンチセンスの両方のCおよびUに対する2' F)が高めることを明らかにする。

10

【0339】

(実施例10)

(SEAP2217標的上での2'でのデオキシおよび2'-O-メチル修飾ウオーク)

SEAPコンストラクトを標的にしたsiRNAを用いた2'-デオキシおよび2'-O-メチル・ウオークに使用するコンストラクト(図31および図32参照)を表6に示す。

【0340】

【表 6 - 1】

表 6 : 2'-デオキシおよび2'-O-メチル・ウオークについての コンストラクト		
識別子	配列	配列番号
2217-S 2M1	mgmugauguaugucagagagudtdt	171
2217-AS 3D19	acucucugacauacaudcdadcdtdt	172
2217-AS 3D16	acucucugacauacadudcdacdttdt	173
2217-AS 3D13	acucucugacaudadcdaucaacdttdt	174
2217-AS 3D10	acucucugadcdaduacaucaacdttdt	175
2217-AS 3D7	acucucdudgdacauacaucaacdttdt	176
2217-AS 3D4	acudcdudcugacauacaucaacdttdt	177
2217-AS 3D1	dadcducucugacauacaucaacdttdt	178
2217-AS 2D19	acucucugacauacaucdadcdtdt	179
2217-AS 2D17	acucucugacauacaudcdacdttdt	180
2217-AS 2D15	acucucugacauacdaducacdttdt	181
2217-AS 2D13	acucucugacaudadcaucaacdttdt	182
2217-AS 2D11	acucucugacdaduacaucaacdttdt	183
2217-AS 2D9	acucucugdadcuaacaucaacdttdt	184
2217-AS 2D7	acucucdudgacauacaucaacdttdt	185
2217-AS 2D5	acududcugacauacaucaacdttdt	186
2217-AS 2D3	acdudcucugacauacaucaacdttdt	187
2217-AS 2D1	dadcucucugacauacaucaacdttdt	188
2217-AS 3M19	acucucugacauacaumcmamcdtdt	189
2217-AS 3M16	acucucugacauacamumcmacdttdt	190

【 0 3 4 1 】

【表 6 - 2】

2217-AS 3M13	acucucugacaumamcaucaacdttdt	191
2217-AS 3M10	acucucugamcmamuacaucaacdttdt	192
2217-AS 3M7	acucucumgmacaucacaucaacdttdt	193
2217-AS 3M4	acumcmumcugacauacaucaacdttdt	194
2217-AS 3M1	mamcmucucugacauacaucaacdttdt	195
2217-AS 2M19	acucucugacauacaucaumacdttdt	196
2217-AS 2M17	acucucugacauacaucaumcmacdttdt	197
2217-AS 2M15	acucucugacauacmamucaacdttdt	198
2217-AS 2M13	acucucugacaumamcaucaacdttdt	199
2217-AS 2M11	acucucugacmamuacaucaacdttdt	200
2217-AS 2M9	acucucugmamcauacaucaacdttdt	201
2217-AS 2M7	acucucummgacauacaucaacdttdt	202
2217-AS 2M5	acumcmumcugacauacaucaacdttdt	203
2217-AS 2M3	acumcmucugacauacaucaacdttdt	204
2217-AS 2M1	mamcucucugacauacaucaacdttdt	205
2217-S 3D19	gugauguaugucagagdadgdudtdt	206
2217-S 3D16	gugauguaugucagadgdadgdudtdt	207
2217-S 3D13	gugauguaugucdadgdagagudtdt	208
2217-S 3D10	gugauguaudgdudcagagagudtdt	209
2217-S 3D7	gugaugdudadugucagagagudtdt	210
2217-S 3D4	gugdududgnaugucagagagudtdt	211
2217-S 3D1	dgdudgauguaugucagagagudtdt	212
2217-S 2D19	gugauguaugucagagadgdudtdt	213

10

20

30

40

【表 6 - 3】

2217-S 2D17	gugauguaugucagagdadgudtdt	214
2217-S 2D15	gugauguaugucagdadgagudtdt	215
2217-S 2D13	gugauguaugucdadgagagudtdt	216
2217-S 2D11	gugauguaugdudcagagagudtdt	217
2217-S 2D9	gugauguaududgucagagagudtdt	218
2217-S 2D7	gugaugdudaugucagagagudtdt	219
2217-S 2D5	gugadudguaugucagagagudtdt	220
2217-S 2D3	gudgdauguaugucagagagudtdt	221
2217-S 2D1	dgdugauguaugucagagagudtdt	222
2217-S 3M19	gugauguaugucagagmamgmudtdt	223
2217-S 3M16	gugauguaugucagagmamgmudtdt	224
2217-S 3M13	gugauguaugucmamgmagagudtdt	225
2217-S 3M10	gugauguaumgmumcagagagudtdt	226
2217-S 3M7	gugaugmumamugucagagagudtdt	227
2217-S 3M4	gugmamumguaugucagagagudtdt	228
2217-S 3M1	mgmumgauguaugucagagagudtdt	229
2217-S 2M19	gugauguaugucagagmamgmudtdt	230
2217-S 2M17	gugauguaugucagagmamgmudtdt	231
2217-S 2M15	gugauguaugucagmamgmagudtdt	232
2217-S 2M13	gugauguaugucmamgmagagudtdt	233
2217-S 2M11	gugauguaugmumcagagagudtdt	234
2217-S 2M9	gugaugmamumgucagagagudtdt	235
2217-S 2M7	gugaugmumaugucagagagudtdt	236

10

20

30

40

【表 6 - 4】

2217-S 2M5	gugamunguaugucagagagudtdt	237
2217-S 2M3	gumgmauguaugucagagagudtdt	238
2217-S 1M19	gugauguaugucagagagmudtdt	239
2217-S 1M18	gugauguaugucagagagmudtdt	240
2217-S 1M17	gugauguaugucagagmagudtdt	241
2217-S 1M16	gugauguaugucagagmagudtdt	242
2217-S 1M15	gugauguaugucagmagagudtdt	243
2217-S 1M14	gugauguaugucamgagagudtdt	244
2217-S 1M13	gugauguaugucmagagagudtdt	245
2217-S 1M12	gugauguaugumcagagagudtdt	246
2217-S 1M11	gugauguaugmucagagagudtdt	247
2217-S 1M10	gugauguaumgucagagagudtdt	248
2217-S 1M9	gugauguaumugucagagagudtdt	249
2217-S 1M8	gugaugumaugucagagagudtdt	250
2217-S 1M7	gugaugmuaugucagagagudtdt	251
2217-S 1M6	gugaumguaugucagagagudtdt	252
2217-S 1M5	gugamuguaugucagagagudtdt	253
2217-S 1M4	gugmauguaugucagagagudtdt	254
2217-S 1M3	gumgauguaugucagagagudtdt	255
2217-S 1M2	gmugauguaugucagagagudtdt	256
2217-S 1M1	mgugauguaugucagagagudtdt	257
2217-AS 1M19	acucucugacauacaucacdttdt	258
2217-AS 1M18	acucucugacauacaucmacdttdt	259
2217-AS 1M17	acucucugacauacauacacdttdt	260
2217-AS 1M16	acucucugacauacamuacacdttdt	261
2217-AS 1M15	acucucugacauacmaucacdttdt	262
2217-AS 1M14	acucucugacauamcaucacdttdt	263
2217-AS 1M13	acucucugacaumacaucacdttdt	264
2217-AS 1M12	acucucugacamuaucacacdttdt	265
2217-AS 1M11	acucucugacmauacaucacdttdt	266

10

20

30

40

【表 6 - 5】

2217-AS 1M10	acucucugamcauacaucacdttdt	267
2217-AS 1M9	acucucugmacauacaucacdttdt	268
2217-AS 1M8	acucucumgacauacaucacdttdt	269
2217-AS 1M7	acucucmugacauacaucacdttdt	270
2217-AS 1M6	acucumcugacauacaucacdttdt	271
2217-AS 1M5	acucmucugacauacaucacdttdt	272
2217-AS 1M4	acumcucugacauacaucacdttdt	273
2217-AS 1M3	acmucucugacauacaucacdttdt	274
2217-AS 1M2	amcucucugacauacaucacdttdt	275
2217-AS 1M1	macucucugacauacaucacdttdt	276
2217-S 1D19	gugauguaugucagagagduddttdt	277
2217-S 1D18	gugauguaugucagagadguddttdt	278
2217-S 1D17	gugauguaugucagagdaguddttdt	279
2217-S 1D16	gugauguaugucagadgaguddttdt	280
2217-S 1D15	gugauguaugucagdagaguddttdt	281
2217-S 1D14	gugauguaugucadgagaguddttdt	282
2217-S 1D13	gugauguaugucdagagaguddttdt	283
2217-S 1D12	gugauguaugucdagagaguddttdt	284
2217-S 1D11	gugauguaugducagagaguddttdt	285
2217-S 1D10	gugauguaudgucagagaguddttdt	286
2217-S 1D9	gugauguaugucagagaguddttdt	287
2217-S 1D8	gugaugudaugucagagaguddttdt	288
2217-S 1D7	gugaugduaugucagagaguddttdt	289
2217-S 1D6	gugaugduaugucagagaguddttdt	290
2217-S 1D5	gugaugduaugucagagaguddttdt	291
2217-S 1D4	gugaugduaugucagagaguddttdt	292
2217-S 1D3	gugaugduaugucagagaguddttdt	293
2217-S 1D2	gugaugduaugucagagaguddttdt	294
2217-S 1D1	gugaugduaugucagagaguddttdt	295
2217-AS 1D19	acucucugacauacaucadcdtdt	296
2217-AS 1D18	acucucugacauacaucdadcdtdt	297

10

20

30

40

【表 6 - 6】

2217-AS 1D17	acucucugacauacaudcacdttdt	298
2217-AS 1D16	acucucugacauacaducacdttdt	299
2217-AS 1D15	acucucugacauacdaucacdttdt	300
2217-AS 1D14	acucucugacauadcaucacdttdt	301
2217-AS 1D13	acucucugacaudacaucacdttdt	302
2217-AS 1D12	acucucugacaduacaucacdttdt	303
2217-AS 1D11	acucucugacdauacaucacdttdt	304
2217-AS 1D10	acucucugadcauacaucacdttdt	305
2217-AS 1D9	acucucugdacauacaucacdttdt	306
2217-AS 1D8	acucucudgacauacaucacdttdt	307
2217-AS 1D7	acucucudugacauacaucacdttdt	308
2217-AS 1D6	acucudcugacauacaucacdttdt	309
2217-AS 1D5	acucducugacauacaucacdttdt	310
2217-AS 1D4	acudcucugacauacaucacdttdt	311
2217-AS 1D3	acducucugacauacaucacdttdt	312
2217-AS 1D2	adcucucugacauacaucacdttdt	313
2217-AS 1D1	dacucucugacauacaucacdttdt	314
文字「d」は、文字「d」の後に続くヌクレオチドが2'位のデオキシであることを示す。 文字「m」は、文字「m」の後に続くヌクレオチドが2'-O-メチル部分によって修飾されていることを示す。		

(実施例 11)

(分子 1 修飾および安定性)

実施例 11～18 の目的のために、用語「分子 1 修飾 (m o l e c u l e 1 m o d i f i c a t i o n s)」とは、センス鎖上の 1 および 2 位に 2'-O-メチル修飾、センス鎖上の全ての C および U 上に 2'-O-メチル修飾、アンチセンス鎖上の全ての C および U の 2'-フッ素 (F1) 修飾、およびアンチセンス鎖の 5' 末端上にあるリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。同様に、用語「分子 2 修飾 (m o l e c u l e 2 m o d i f i c a t i o n)」は、センス鎖の 1 および 2 位上の 2'-O-メチル修飾、センス鎖の全 Cs および Us 上の 2'-O-メチル修飾、センス鎖の 5' 末端上の Cy3 標識、アンチセンス鎖の全ての C および U 上の 2'-フッ素 (F1) 修飾、ならびにアンチセンス鎖の 5' 末端上のリン酸塩修飾を含む分子のことをいう。

【0346】

s i R N A 安定性に対する分子 1 修飾の効果を評価するために、4 種類のユニークな s i R N A を、修飾および未修飾形態で合成した。続いて、これらの分子を時間を変えて 37℃で 100% 血清中でインキュベートし、PAGE で分析することで二本鎖の未分解性 (i n t a c t n e s s) を評価した。配列の視覚化は、エチジウム・ブロマイド染色によっておこなった。

【0347】

図37に示されるこれらの実験結果は、分子1修飾を持つ二本鎖が、未修飾の等価物と比べて著しく安定性が高いことを示す。未修飾分子は、室温で血清にさらしたところ、2分以内に50%以上分解した。それに比べて、分子1修飾を持つ配列の半減期は、概ね125～135時間であった。したがって、分子1修飾は、安定性を約500倍、著しく高めた。

【0348】

(実施例12)

(分子1修飾およびsiRNAサイレンシング抗力)

siRNA抗力に対する分子1修飾の効果を評価するために、ヒト・シクロフィリンB (U1およびU2) に向けられた2種類のユニークなsiRNAを、2'-O-ACEケミストリーを用いて、修飾および未修飾形態で合成し、その機能性について、全細胞アッセイで調べた。手短に言えば、濃度0.01～200nMで、修飾および未修飾siRNAをHeLa細胞(10,000細胞/ウェル、96穴プレート)に形質移入(Lipofectamine 2000)し、24～48時間培養した。続いて、指定された標的の発現レベルを、分岐DNAアッセイを用いて評価した(Genospectra、Femont、CA)。

10

【0349】

これらの実験結果を図38に示す。また、これらの実験結果は分子1修飾を持つ二本鎖が、試験した全ての濃度で、未修飾siRNAと同等に機能することを示す。したがって、分子1修飾は、siRNAの抗力を変えるようには見えない。

20

【0350】

(実施例13)

(分子1修飾およびサイレンシング寿命)

siRNAのサイレンシング寿命(silencing longevity)に対する分子1修飾の効果を判断するために、ヒト・シクロフィリンB遺伝子を対象とするsiRNAを修飾および未修飾形態で合成し、前述のごとくHeLa細胞(100nM)に形質移入した。続いて、サイレンシングのレベルを分岐DNAアッセイを用いて、7日間にわたってモニターした。

【0351】

30

図39に示すこれらの実験の結果の一例は、未修飾分子によって誘導されるサイレンシングのレベルが7日間にわたって約70%から0%に低下することが示され、修飾二本鎖が実験の過程全体を通して>80%機能性を誘導することを実証する。したがって、分子1修飾によって修飾されたsiRNAは、これらの二本鎖によって誘導されたサイレンシングの寿命を高める。

【0352】

(実施例14)

(分子1修飾および毒性)

siRNA毒性に対する分子1修飾の効果を判断するために、ヒト・シクロフィリンBを対象とする4種類のsiRNA(U1～U4)を修飾および未修飾形態で合成し、0.01～200nMの濃度範囲で、HeLa細胞に形質移入した。形質移入後t=48時間の時点で、Alamer Blue生存度アッセイを実施して細胞個体群内での細胞死のレベルを評価した。修飾二本鎖と未修飾二本鎖との並列比較では、試験した濃度のいずれかで誘導される細胞死のレベルに違いは無かった(図40)。

40

【0353】

(実施例15)

(分子1修飾およびオフ・ターゲット効果)

オフ・ターゲット効果に対する分子1修飾の効果を評価するために、4種類のsiRNA標的ヒト・シクロフィリンB(U1～U4)を修飾および未修飾形態で合成し、100nMの濃度でHeLa細胞に形質移入した。続いて、(1)偽形質移入、(2)形質移入

50

(未修飾)、および(3)形質移入(修飾)細胞から得た全RNAを精製(Qiagen)し、cDNAに変換し、さらにAgilent's Low RNA Input Linear Amp Kitを用いて、Cy3(偽形質移入)またはCy5(形質移入-未修飾、形質移入-修飾)による標識をおこなった。偽形質移入および非形質移入細胞から得た標識cDNAを混合し、21,000を上回る数のプローブが含まれるAgilent Human1A(V2)Oligo Microarrayにハイブリダイズさせた。修飾および未修飾試料と結合したオフ・ターゲットの数を、ソフトウェア(Agililent's Feature Extraction, Sptfire, およびSptfire Functional Genomics)(それぞれバージョン7.2、7.2、および7.1)を用いて、評価した。

10

【0354】

これらのオフ・ターゲット研究のまとめを図41に示す。また、このまとめによれば、修飾および未修飾siRNAは、オフ・ターゲットされた遺伝子の数に関して、類似した機能を示した。具体的には、オフ・ターゲット遺伝子を誘導または抑制のレベル(野生型遺伝子発現と比較)に基づいて分離した場合、修飾siRNAは未修飾のものと類似して(またはそれよりも良好に)機能した。

【0355】

(実施例16)

(分子2修飾およびサイレンシング効力)

分子2修飾を含むsiRNAの機能性を試験するために、ヒト・シクロフィリンBを対象とするsiRNAであるシクロ14(5'GOCCTTAGCTACAGGAGAG、センス鎖 配列番号322)を、分子2修飾により合成し、さらに指定した標的をサイレンシングする能力について試験した。手短に言えば、cyclo14を、2'-O-ACEケミストリーを用いた適当な修飾により合成した。続いて、T482HeLa細胞(10,000細胞/ウェル、96穴プレート)をプレーティングして一晚培養し、さらに100nM濃度でcyclo14二本鎖による形質移入(Lipofectamine 2000)をおこなった。形質移入後3日、mRNAサイレンシングのレベルを分岐DNAアッセイ(Genospectra、Fremont、CA)を用いて評価した。

20

【0356】

これらの研究の結果を図42に示す。未修飾cyclo14二本鎖は概ね80~95%サイレンシングを誘導する。Cy3標識単独で修飾されたcyclo14二本鎖は、約70~80%サイレンシングを誘導、また分子2修飾を持つcyclo14siRNAは80%またはそれよりも良好なサイレンシングを誘導し、分子2修飾の付加は二本鎖の機能性に対してほとんど影響がない。

30

【0357】

(実施例17)

(トラックアビリティに対する分子2修飾の効果)

分子2修飾の有用性を試験するために、形質移入効率を評価する手段として、cyclo14siRNAを前述の修飾により調製し、蛍光顕微鏡で視覚化をおこなった。具体的には、cyclo14を、2'-O-ACEケミストリーを用いた適当な修飾により合成した。続いて、T482HeLa細胞(10,000細胞/ウェル、96穴プレート)をプレーティングして一晚培養し、さらに100nM濃度で適当な二本鎖による形質移入(Lipofectamine 2000)をおこなった。形質移入後48時間で、培地をHoechst33342(2μg/ml、20分、37℃)でインキュベートし、次にDapiおよびRhodamineフィルターを用いてLeica DMIL蛍光顕微鏡による視覚化をおこなった。

40

【0358】

分子2修飾を持つcyclo14siRNAによる形質移入がなされたHeLa細胞の蛍光顕微鏡写真(添付図面なし)は、強く染色された核およびその周囲を示している。未修飾cyclo14siRNAにより形質移入された細胞では、同等の染色が見られな

50

いことから（データ不図示）、分子2修飾が所定の s i R N A の細胞内位置および形質移入の成功を評価する優れた手段であることがわかる。

【0359】

（実施例18）

（安定性に対する分子2修飾の効果）

分子2修飾が二本鎖の細胞内安定を高めたかどうかを試験するために、分子2修飾を持つ c y c l o 1 4 s i R N A を H e L a 細胞に形質移入し、C y 3 標識 C y c l o 1 4 形質移入細胞と7日間にわたって比較した。前述の修飾の付加によって C y 3 単独による修飾を受けた二本鎖を上回る著しく強化された s i R N A 安定性を示す。両方の試料が第2日目（D a y 2）に強い染色パターンを示す一方で、C y 3 - C y c l o 1 4 形質移入細胞は、第7日目（D a y 7）までに失う。対照的に、分子2修飾を持つ c y c l o 1 4 s i R N A を含む細胞は、第7日（D a y 7）に強い染色パターンを保持している。さらに、C y 3 標識二本鎖とは異なり、分子2修飾を持つ s i R N A はまた、二本鎖への核アクセス（n u c l e a r a c c e s s）を促進する。

【0360】

（実施例19）

（サイレンシング活性を修飾する化学修飾の同定）

R N A 合成のためのプラットフォームとして 2'-O-A C E ケミストリーを用いて、センス（S）およびアンチセンス（A S）鎖に1、2、または3つの連続的（c o n s e c u t i v e l y）に修飾したヌクレオチドからなる修飾ウォークを S E A P - 2 2 1 7、ヒト分泌アルカリホスファターゼ（S E A P、S E A P - 2 2 1 7 - センス鎖 5'-G U G A U G U A U G U C A G A G A G U d T d T（配列番号326））上で実行した。続いて、これらの修飾 s i R N A のサイレンシング効率を、S E A P 発現ベクター（C l o n t e c h）を持つ各二本鎖を H E K 2 9 3 細胞（100 nM s i R N A、50 n g / ウェル S E P 発現ベクター、L i p o f e c t a m i n e 2000）に同時形質移入し、形質移入後24時間での標的タンパク質活性の減少をアッセイすることによって、評価した。図43Aおよび図43Bは、2'-O-メチル化 S E A P - 2 2 1 7 s i R N A に対する修飾と機能とのあいだの相互関係を示す。S E A P を標的とする未修飾二本鎖は、S E A P 遺伝子のサイレンシングを > 90% 誘導する。S および A S 鎖の単一塩基修飾は、s i R N A 活性に対する効果をほとんど誘導しなかった。このことは、R N A i で必須の役割を演ずるような単一の2'-ヒドロシル基がいずれの鎖にもないことを示唆している。それとは対照的に、二重の並列した修飾のウォークは、修飾塩基の導入がサイレンシング活性にとって著しく干渉したいくつかのキー・ポジジョンを同定した。

【0361】

機能との最も顕著な干渉は、A S 鎖の5'末端の2つの連続的な塩基（1および2位）または3つの連続的な塩基（1、2、および3位）を修飾した場合に観察されるので、隣接する修飾基間の連携効果が暗示される。S 鎖の同様な修飾は、二本鎖機能性を変えるのに失敗したことから、対を形成した2'-O-メチル修飾塩基はS鎖とA S 鎖との区別を可能にする。

【0362】

実験の同一セットを2'-デオキシ修飾を用いて実行した。図44Aおよび図44Bに示す研究は、二本鎖のいずれかの鎖上に異なる位置（例えば、1+2+3、4+5+6、その他...）で3つの連続的な2'-デオキシ基を付加することは、二本鎖サイレンシングに対してなんら効果がないことを示している。同様の結果は、2および1の連続的な2'-デオキシ基（データ不図示）の効果試験するウォークについて観察された。

【0363】

二本鎖機能性に対する2'-O-メチル修飾の効果をさらに試験するために、ルシフェラーゼ遺伝子（l u c 8、18、56、58、63、および81）を対象とする一連の s i R N A を、2'-O-A C E ケミストリーを用いて合成してリボース環の2'位にO

10

20

30

40

50

ーメチル基を含むように修飾する。

L u c 8 5' - G A A A A A U C A G A G A G A U C C U (配列番号 3 2 7)

L u c 1 8 5' - U A C C G G A A A A C U C G A C G C A (配列番号 3 2 8)

L u c 5 6 5' - A C G U C G C C A G U C A A G U A A C (配列番号 3 2 9)

L u c 5 8 5' - G A U U A C G U C G C C A G U C A A G (配列番号 3 3 0)

L u c 6 3 5' - A G A G A L T C G U G G A L I J A C G U C (配列番号 3 3 1)

L u c 8 1 5' - U G U U G U U U U G G A G C A C G G A (配列番号 3 3 2)

(上に列挙した配列はセンス鎖である)。

【0364】

具体的には、(1) センス鎖、(2) アンチセンス鎖、または(3) これら両方の鎖の2つの5'最端ヌクレオチド上に2'-O-メチル修飾を含むs i R N Aを、L u c-発現プラスミド(p C M V L u c, 5 0 n g/ウェル)を介して、H E K 2 8 3細胞に形質移入する。続いて、各二本鎖のサイレンシング能力の並列比較を実行して、標的転写分解に対するこの修飾の効果を判断した。

【0365】

これらの研究の結果は、A S鎖への2'-O-メチル基の付加のみが、標的m R N Aをサイレンシングするための二本鎖の能力を著しく削減することを示した(図4 5 A~F参照)。対照的に、センス鎖上にこの修飾を持つ二本鎖は、同等物である未修飾s i R N Aよりも十分に(l u c 5 8、6 3、8 1)、あるいは良好に(l u c 5 6、8、1 8)機能した。このことは、センス鎖の修飾がR I S Cによる鎖選択を偏らせ、(いくつかの例では)有効なアンチセンス鎖濃度を高めたことを示唆している。強化されたサイレンシングは、分子の5'センス末端に対するR I S Cの結合親和性の減少(そのため、対向端に結合するための遊離のR I S Cの可用性が増加)、センス鎖をリン酸化するための天然キナーゼの能力減少(したがって、R I S Cへのアクセスに対するセンス鎖とアンチセンス鎖の競合の減少)、あるいは5'センス末端からの二本鎖の解き放しをおこなうR I S Cの能力の減少の結果であり得る。両方の鎖に2'-O-メチル修飾を含むs i R N Aは、いずれかの単鎖上に修飾を含んだ分子に対して観察された値間にある減少したサイレンシング能力を示した。これらの結果に対する1つの解釈は、修飾鎖に関して2'-O-メチル修飾の結合親和性がR I S Cのものよりも低いということである。両方の鎖が修飾された場合では、どちらの鎖もその相補体を越える利益を得ることはなく、両方の修飾分子の機能性の平均を表す新しい平衡が確立される。

【0366】

2'-O-メチル化S/A S s i R N Aを含む細胞内で観察されたサイレンシングの減少レベルは、二本鎖をリン酸化するための細胞キナーゼの弱体化した能力の結果であるかどうかを試験するために、2'-O-メチル修飾を持つs i R N Aを、A S鎖の5'末端上にリン酸基を持つように修飾した。具体的には、(1) アンチセンス鎖の5'末端の位置1および2、または(2) アンチ鎖およびセンス鎖の両方の5'末端の位置1および2、のいずれかにおいて2'-O-メチル基を有するL u c s i R N Aを、合成の過程でA S鎖上で5'-リン酸化した。次に、これらの二本鎖を、既に記載した手順を用いて、H E K 2 9 3細胞に導入し、所望の標的をサイレンシングする能力について試験した。結果は、試験した例の83%(10/12)で、アンチセンス鎖の5'リン酸化が、等価物である非リン酸化分子を超えて二本鎖のサイレンシング効率を改善したことを示した(図4 5 A~F)。残りの2つの例では、サイレンシングが未変化のままであり、あるいは僅かに改善されただけである。

【0367】

用量応答曲線を用いたサイレンシングに対する化学修飾の効果についてのより詳しい実験は、以前のデータを支持している。ルシフェラーゼ遺伝子(l u c 8、5 6、5 8、6 3、および8 1)を対象とする5つの異なるs i R N Aを、2'-O-メチル修飾および未修飾形態で、2-O-A C Eケミストリーを用いて合成した。次に、これらの二本鎖を、濃度を0.01~200 nMのあいだで変えながら、H e L a細胞(ルシフェラーゼ

10

20

30

40

50

発現ベクターと共に)に形質移入し、ルシフェラーゼタンパク質のサイレンシングのレベルについて、アッセイした($t = 24 \sim 48$)。これらの実験結果を図46にまとめて以下のような結論を導いた。すなわち、(1)アンチセンス鎖の5'末端の1位および2位への2'-O-メチル基の付加によって、サイレンシング活性が一貫して崩壊する。(2) siRNAのセンス鎖の5'末端の1位および2位への2'-O-メチル基の付加によって、標的特異的サイレンシングの効果が改善されるか、または該サイレンシングに対してほとんど効果ないかのいずれかである。(3)両鎖(センスおよびアンチセンス)の5'末端の1および2位に対する2'-O-メチル基の付加によって、アンチセンス鎖の5'末端上にある未修飾二本鎖と、2'-O-メチル修飾を持つ二本鎖とにより観察されたもののあいだにある中間のサイレンシング効果が生ずる。(4)センスおよびアンチセンス鎖の両方の5'末端の1および2位に2'-O-メチル修飾を持つ分子のアンチセンス鎖の5'末端に対してリン酸基を付加することで、両方の鎖の5'末端上に2'-O-メチル修飾を有する二本鎖を超えて分子のサイレンシング機能が改善される。

【0368】

これらの結果は、アンチセンス鎖の第1の末端ヌクレオチドの5'リン酸化に加えて、siRNAのセンスおよびアンチセンス鎖の1位および2位置の2'-O-メチル修飾の付加が、種々の濃度での二本鎖の効力を高めることを示唆する。さらに、種々の修飾の効果は、以下の結論を導く。すなわち、(1)センスまたはアンチセンス鎖の5'末端への2'-O-メチル基の付加は、その鎖によるサイレンシングの著しい減少をもたらす。(2)5'リン酸基の付加は、2'-O-メチル基の存在下であっても、ほぼ完全に、サイレンシングを回復する。したがって、AS-2'-O-メチル化の阻害効果のいくつかのフラクションがおそらく二本鎖リン酸化の阻害の結果であると思われる一方で、効果のいくつかの部分が、RNAi経路の他のステップ(例えば、RISC結合、siRNA巻き戻し、RISC媒介siRNA標的結合、またはRISC媒介標的切断)についてのこの形態の修飾の効果によるものであるとかなりの蓋然性で思われる。重要なことに、これらの他のステップでの2'-O-メチル化の潜在的効果は、著者らに、上記修飾が、アンチセンス鎖との100%相同性を有する意図された標的と、相同性が劣るオフ・ターゲットとの間を区別するRISCの能力をも変えるかもしれない可能性があることを考えさせた。

【0369】

(実施例20)

(オフ・ターゲッティングに対する2'-O-メチル化および5'リン酸化の効果)

アンチセンス鎖の2'-O-メチル化がサイレンシングを中断させ、一方で等価なセンス鎖標識が標的特異的サイレンシングに対してなら効果を持たないという観察によって、センス鎖によって生ずるオフ・ターゲット・サイレンシングを排除するための戦略を示唆する。さらに、二本鎖リン酸化の下流にあるステップが2'-O-メチル化によって影響を及ぼされる可能性があるという観察は、この組み合わせ(センスおよびアンチセンス鎖の5'の位置1および2の2'-O-メチル化、プラス、AS鎖の5'末端のリン酸化)の修飾を含むsiRNAが、高効力および/または低センス/アンチセンス・オフ・ターゲッティング効果を有するものである可能性を導く。

【0370】

(1)センス鎖、(2)アンチセンス鎖、および(3)センスおよびアンチセンス鎖の2'-O-メチル化と組み合わさったアンチセンス鎖の5'-リン酸化の、オフ・ターゲット化に対する効果を試験するために、4種類の異なる遺伝子を対象とする2つのsiRNA(トータル8つのsiRNA; MAPK14-193 および -153、MPHOSPH1-202 および -203、IGF1R-73、ならびに-74、およびPTEN-213、さらに-214)を、2'-O-ACEケミストリーを用いて合成し、さらに適当な部位で修飾した。MAPK14-153がアンチセンス鎖の5'末端上にリン酸基のみを含む条件下で、実験を実施した場合、広範囲のオフ・ターゲット化が観察される。上記センス鎖がさらに1および2位で2'-O-メチル基により、さらに修飾される場合、その鎖によるオフターゲット化が取り除かれる。しかし、アンチセンス鎖オフセッ

ト・ターゲットの新規セットが生ずる。アンチセンス鎖オフ・ターゲット化の増大は、センス鎖による競合の非存在下での、A S 鎖-R I S C 相互作用の増加に起因すると思われる。上記アンチセンス鎖が5'末端上にリン酸基を有し、位置1および2で2'-O-メチル基により修飾されている場合、アンチセンス鎖によるオフ・ターゲットが喪失するが、センス鎖オフ・ターゲットが再び観察される。最後に、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方が、2'-O-メチル基（各々の鎖の1および2位上）によって修飾され、かつアンチセンス鎖の5'末端上にリン酸基が結合する場合、両方の鎖によるオフターゲット化の度合いが急激に減少する。

【0371】

上記したものと同様の結果が、I G F 1 R、P T E N、M A P K 1、およびM P H O S P H I に対応する残りの7種類のs i R N Aについて得られた。したがって、それらの実験から、以下を結論付けることが可能である（1）同一ターゲットを対象とする別のs i R N Aは、変化するレベルのオフ・ターゲット効果を誘導する。（2）アンチセンス鎖（アンチセンス鎖の5'-リン酸化と組み合わせて）の5'末端の1および2位の2'-O-メチル修飾は、その鎖によるオフ・ターゲット効果を取り除くが、しかし多くの場合、付加的なセンス鎖オフターゲットをもたらす。（3）センス鎖の5'末端の1および2位の2'-O-メチル修飾（アンチセンス鎖の5'-リン酸化と組み合わせて）が、その鎖に基づいてオフターゲット効果を取り除くが、しばしば付加的なアンチセンス鎖オフターゲットをもたらす。（4）センスおよびアンチセンス鎖の両方の1および2位の2'-O-メチル修飾（アンチセンス鎖の5'リン酸化との組み合わせ）は、両方の鎖から標的効果を劇的に取り除く。したがって、3通りの修飾の組み合わせ（アンチセンス鎖の5'-リン酸化、センス鎖の1および2位の2'-O-メチル化、およびアンチセンス鎖の1および2位の2'-O-メチル化）が、両方の鎖によって一般に生ずるオフ・ターゲット効果での急激な減少に到る。さらに、特異的サイレンシング活性が試験された3つのケース（M A P K 1 4、P T E N、およびM P H O S P H 1）では、最小オフ・ターゲット効果を有する完全に修飾された分子（例えば、アンチセンス鎖上に5'リン酸塩、センス鎖の1位および2位の2'-O-メチル化、ならびにアンチセンス鎖の1位および2位の2'-O-メチル化）が、アンチセンス鎖の5'末端上の5'リン酸基のみを含むs i R N Aと同等かそれ以上に所定の標的をサイレンシングした。

【0372】

（2'-O-メチル化の効果）

上記したデータは、A S 鎖の5'末端の1位および2位に対して2'-O-メチル基を付加することで、s i R N A 活性が中断することを明瞭に示している。この修飾が二本鎖機能を中断させる方法は、R N A i 経路で2つの異なるステップに分解することができる。第1のステップでは、2'-O-メチル化が、二本鎖をリン酸化する常在キナーゼの活性を明確に中断させる。5'リン酸基を添加することで、細胞酵素の必要性を総合的に軽減することで、この機能を満たし、さらに二本鎖機能性を改善する。したがって、この化学的修飾の効果の1つが十分に定義される。両方の鎖の1位および2位のヌクレオチドで2'-O-メチル基によって修飾されたs i R N Aのアンチセンス鎖の5'末端に、リン酸基を合成付加することで活性を増加させる一方で、完全な機能性は回復しない。この結果は、リン酸化イベントの下流にあるステップ（例えば、R I S C 結合、R I S C 媒介s i R N A 標的／オフ・ターゲット相互作用、ならびに／またはR I S C 媒介s i R N A 標的／オフ・ターゲット切断）もまた、2'-O-メチル化によって影響を受けることを示唆している。

【0373】

（2'-O-メチル化および強化された二本鎖機能性）

機能性に関する重要なパラメータとして、R I S C に対するs i R N A 結合と、それに続く二本鎖巻き戻し（アンワインディング）である。ここに提示される研究は、場合によっては、その分子の本来の機能性に対して反比例する様式で、センス鎖の2'-O-Me修飾が用量応答曲線を変える。これらの知見の1つの解釈は、センスおよびアンチセンス

鎖とRISCとの連携が平衡した状態で存在しており、該平衡は「オン (on)」および「オフ (off)」の係数 (例えば、 k_1 、 k_1' 、 k_2 、および k_2' 、図47) によって定義されるということである。高機能分子は、 $K_{overall} (k_1 k_2 / k_1' k_2')$ を示し、アンチセンス鎖 (例えば、 $K_{overall} = 100$) と結合する方向への傾きを反映している。対照的に、非機能性または半機能性分子 (< 70) は、よりいっそう偏りがなくバランスのとれた鎖相互作用を示す $K_{overall}$ を表す (例えば、 < 70 siRNA については、 $K_{overall}$ は約1である)。非機能性分子または半機能性分子のセンス鎖の化学修飾は、RISC-AS相互作用に対する平衡状態を駆動するので、RISC-AS:RISC-S ($K_{overall}$ は約5) および全体の二重機能性を大幅に変化させる。対照的に、高機能性分子の場合、RISC-AS相互作用は既に好ましく、そのため化学修飾は、RISC-AS関連と機能性とをさらに強化することがより少なくなる。

10

【0374】

(2'-O-メチル化およびオフ・ターゲット・サイレンシング)

両方の鎖の第1位および第2位にある2'-O-メチル修飾を含む二本鎖のアンチセンス鎖の5'末端に対するリン酸基の合成的付加によって、サイレンシング表現型の部分的レスキューに到る一方で、完全回復に欠けていることから、この修飾が二本鎖リン酸化の下流である付加的なステップ (例えば、RISC結合、RISC媒介siRNA標的/オフ・ターゲット相互作用、ならびに/またはRISC媒介siRNA標的/オフ・ターゲット切断) に影響を及ぼすことが示唆される。この事実は、これらの同一の修飾が、サイレンシングにとって必要なsiRNA-標的相補性の度合いに対してより大きな要求がなされるかもしれない可能性を拡げる。2'-O-メチルの位置がオフ・ターゲットと所定のsiRNA (センスまたはアンチセンス鎖) との相同性の部分と重なる場合には、化学修飾の付加は、siRNAオフ標的相互作用を脱安定化させることで、RNAi媒介ダウン・レギュレーションでの重要なステップを抑制する可能性がある。あるいは、2'-O-メチル基の位置がオフターゲットと所定のsiRNAとのあいだの相同性の部分と重なり合う場合、付加的な化学修飾がその領域で二本鎖の可撓性をかえ、それによって標的分子を分解するRISCの能力を阻害し得る。さらに別のシナリオでは、2'-O-メチル修飾の部位がオフ・ターゲットとの相同性の場所とは重なり得ない。この場合には、修飾の脱安定化効果がその分子の下流へ移され、それによってsiRNAに100%未満の相同性を有する標的と対を形成し、そして/または分解するRISCの能力を除去するという可能性がある。そのため、SまたはAS鎖の5'末端以外の位置にある2'-O-メチル修飾がオフ・ターゲット効果を取り除くために使用することが可能である。

20

30

【0375】

(実施例21)

(エクサエクオ剤としての修飾二本鎖)

siRNAによる継続的投薬またはマイクロアレイ実験の最中に、形質移入の間、全siRNA濃度を一定に保つことが所望される。残念なことに、第2のsiRNAの付加 (例え非特異的であっても) が、標的特異的siRNAによって誘導されたサイレンシングの度合いを少なくすることができ、このことは、おそらくRISCへのアクセスのための2本の配列のあいだの競合による。そのような理由から、遺伝子標的化を中断させることがないエクサエクオ (exaequo) 剤として作用し得る二本鎖の開発が重要である。

40

【0376】

例えば用量実験などにおける非競合的エクサエクオ (exaequo) 剤として作用する修飾二本鎖の能力を評価するために、修飾および非修飾の、非特異的siRNAの特異的siRNAサイレンシングに対する効果を調べた。このことを達成するために、ヒト・シクロフィリンB遺伝子 (例えば、cyclo4) を対象とするsiRNA二本鎖を最初に、種々の濃度 (例えば、用量応答) で細胞に形質移入した。cyclo4単独で誘導された標的特異的サイレンシングを次に、(a) 非修飾かつ非特異的配列#4 (NS4) または (b) 修飾NS4、の存在下で、この分子によって誘導したサイレンシングと比較した

50

。この場合、NS4の修飾バージョンは、19または17塩基対長のいずれかであり（それぞれ、配列番号333：UAGCGACUAAACACAUCAおよび配列番号334：UAGCGACUAAACACAUC）、センスおよびアンチセンス鎖上の1位および2位にある－O－メチル基を含み、またCおよびU上の2'－O－メチル基2'－O－メチル基、ならびにアンチセンス鎖のCおよびU上の2'Flを含んだ。センスおよびアンチセンス鎖の5'末端には、リン酸基は結合していない。

【0377】

具体的には、HeLa細胞を96穴プレートにプレーティングし、一晚置いて接着させた。続いて、Lipofectamine 2000を用いて、以下のものの1つを細胞に形質移入した。すなわち、

a) cyclo4 siRNA (1-100nM)、(配列番号318：GGA AAG ACU GUU CCA AAA A)

b) cyclo4 siRNA (1-100nM)、プラス、NS4 (19塩基対)、

c) cyclo4 siRNA (1-100nM)、プラス、修飾NS4 (17または19塩基対)、

d) センス鎖の5'末端上にCy3標識も含むcyclo4 siRNA (1-100nM) プラス、修飾NS4 (17または19塩基対)。第2のsiRNAの濃度は、形質移入の最中に全siRNA濃度が100nMに保たれるように、cyclo4の濃度に第2のsiRNA濃度を一致させた。次に、分岐DNAアッセイ (Genospectra、Fremont、CA) を用いて、標的特異的サイレンシングを測定した (t = 24時間)。

【0378】

これらの実験の結果を図43に示し、かつ以下に説明した。

1. cyclo4は、有力な二本鎖である。cyclo4の濃度を100nMから1nMに減少させても、この二本鎖のサイレンシング能は、かえられない (F95、図48A-I 参照)。

2. 19塩基対未修飾NS4 siRNAをcyclo4に加えることで、cyclo4誘導遺伝子サイレンシングに対して好適な濃度依存的減少をもたし、NS4が例えばRISC複合体へのアクセスについてcyclo4と競合していることを示唆している (図48B-I 参照)。

3. センスおよびアンチセンス鎖の1および2位上の2'－O－メチル基と、センス鎖のCおよびU上の2'－O－メチル基と、アンチセンス鎖のCおよびU上の2'Fl基とを含むNS4二本鎖 (17または19塩基対) は、cyclo4による標的特異的サイレンシングを減少させず、それらの二本鎖は例えばRISCに対してcyclo4と競合しないことが示唆される (図43B I IおよびB I I I参照)。

4. センスおよびアンチセンス鎖の1および2位上の2'－O－メチル基と、センス鎖のCおよびU上の2'－O－メチル基と、アンチセンス鎖のCおよびU上の2'Fl基と、センス鎖の5'末端上のCy3とを含むNS4二本鎖 (17または19塩基対) は、cyclo4による標的特異的サイレンシングを減少させず、それらの二本鎖は例えばRISCに対してcyclo4と競合しないことが示唆される (図48A I IおよびA I I I参照)。

【0379】

これらの結果は、上記の修飾を含むsiRNAが機能的siRNAと競合せず、マイクロアレイ研究等のsiRNA研究でエクサエクオ (ex aequo) 剤として使用することができることを、示している。

【0380】

上記修飾を持つsiRNAが、標的特異的siRNAと競合しない理由は、修飾二本鎖が細胞へ入ることができないからであると、考えられる。これを試験するために、センスおよびアンチセンス鎖の1および2位にある2'－O－メチル基と、センス鎖のCおよびU上の2'－O－メチル基と、アンチセンス鎖のCおよびU上の2'Fl基 (アンチセン

10

20

30

40

50

ス鎖上には5'リン酸基がない)とを担持するsiRNAを、センス鎖の5'末端上でCy3部分で標識し、HeLa細胞に形質移入した。形質移入後48時間、細胞を蛍光顕微鏡で分析した。これらの実験の結果は、Lipofectamine2000形質移入によって、細胞内に入るそれらの二本鎖の能力に上記修飾が変更を加えることはないことを示す。(A)センスおよびアンチセンス鎖の1および2位上の2'-O-メチル基、センス鎖のCおよびU上の2'-O-メチル基、アンチセンス鎖のCおよびUに付加された2'F1基、ならびにセンス鎖の5'末端上のCy3基、によって修飾されたcyclo14 siRNA 二本鎖によって染色されたHeLa細胞と、(B)(A)と同様に染色され、かつ核の位置を同定するためのHoechst33342による対比染色されたものとの顕微鏡写真(本明細書では複製せず)によって、これらの修飾を含むsiRNAの核および核周囲を示した。

10

【0381】

センスおよびアンチセンス鎖の1および2位上への2'-O-メチル基の付加が他の同時形質移入されたsiRNAと競合する二本鎖の能力を取り除くのに十分であるかどうかを試験するために、GAPDH(GAPDH4)を対象とするsiRNAを、(1)非特異的対照#2(NS2-配列番号334:UAGGCUAUGAAGAGAUAC)、(2)センスおよびアンチセンス鎖の両方の1位および2位に2'-O-メチル修飾を担持する非特異的対照#2、あるいは(3)cyclo14(配列番号335:GGCCUUAAGCUACAGGAGAG、GAPDH4と競合しないシクロフィリンsiRNA)とともに、様々な濃度(0.781~100nM)でHeLa細胞に形質移入した。第2のsiRNAの濃度を、形質移入中の全siRNA濃度が100nMとなるように、GAPDH4の濃度と一致させた。次に、GAPDH転写産物のレベルを評価するために分岐DNAアッセイを実施する前に、細胞をさらに24時間培養した。これらの実験の結果を図49で説明するとともに、以下に示す。

20

1. GAPDH4が、Cyclo14の存在下で(またはそれ自体で、データ不図示)、野生型転写産物の約90%サイレンシングを誘導する。
2. 未修飾NS2の付加によってGAPDHサイレンシングでの劇的な減少がもたらされた。
3. センスおよびアンチセンス鎖の両方の1および2位で2'-O-メチル基によるNS2の修飾が、未修飾分子によって観察された干渉効果を除去した。

30

【0382】

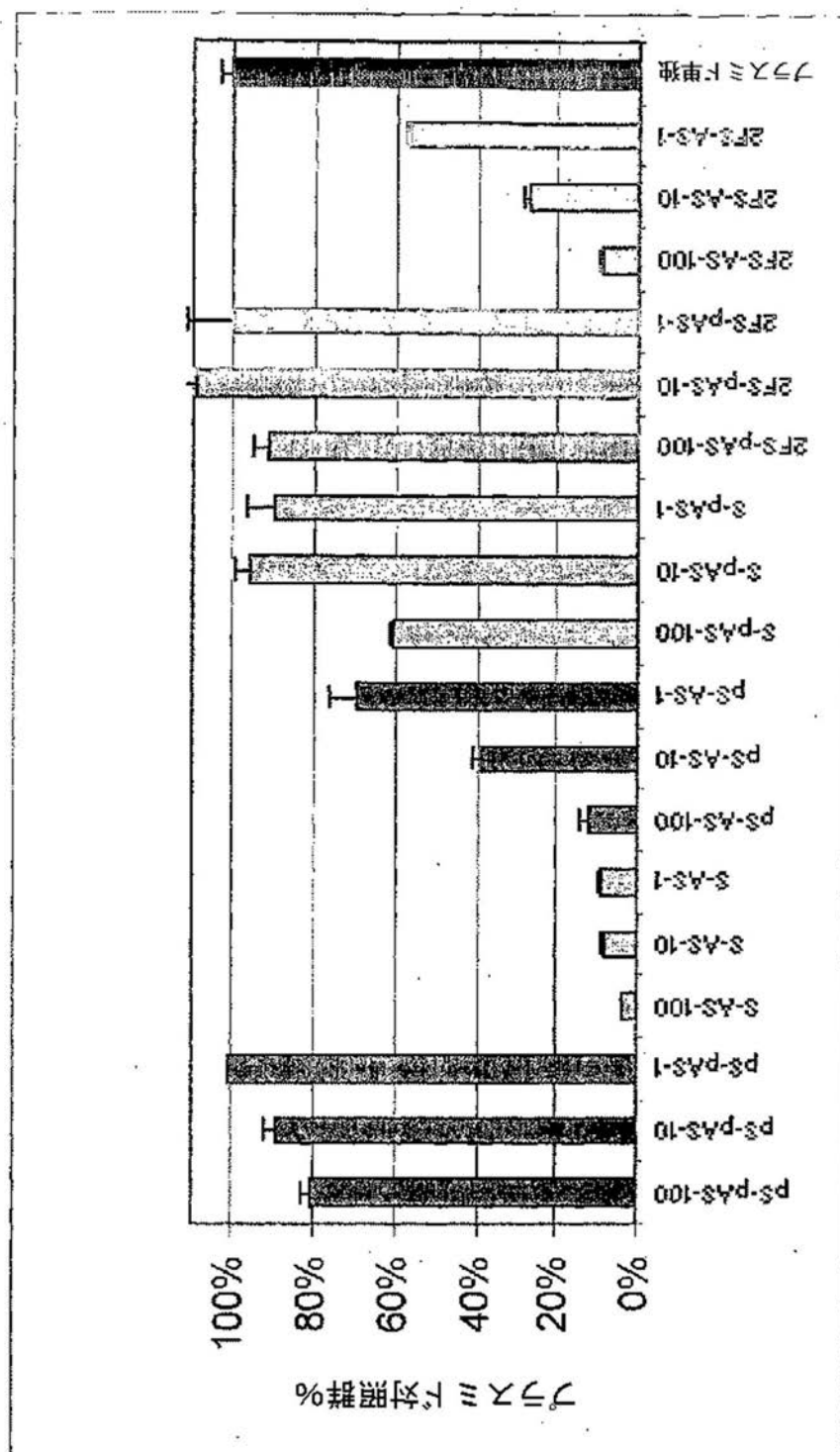
これらの結果は、既に述べた修飾を含むsiRNAは、機能的siRNAと競合することがなく、マイクロアレイ研究を含む種々のsiRNA適用で、エクサエクオ剤として用いられることを実証する。

【0383】

本発明を、いくつかの具体的または好ましい独創的な実施形態と組み合わせて説明および例証したが、本発明が多くの上なる修飾をおこなうことができることは、当業者に理解される。本願は、一般に本発明の原理に従うありとあらゆる変形例、使用、または適用に及ぶもので、添付した請求の範囲の適用および範囲に記載された必須の特徴に適用するものとして、当技術分野で既知または慣習にともなう開示からの逸脱を含む。

40

Figure 1A. siRNAのセンス鎖に対するオルトエステル修飾の導入して、24時間の時間点で得られる機能性構成要素



【図 1 B】

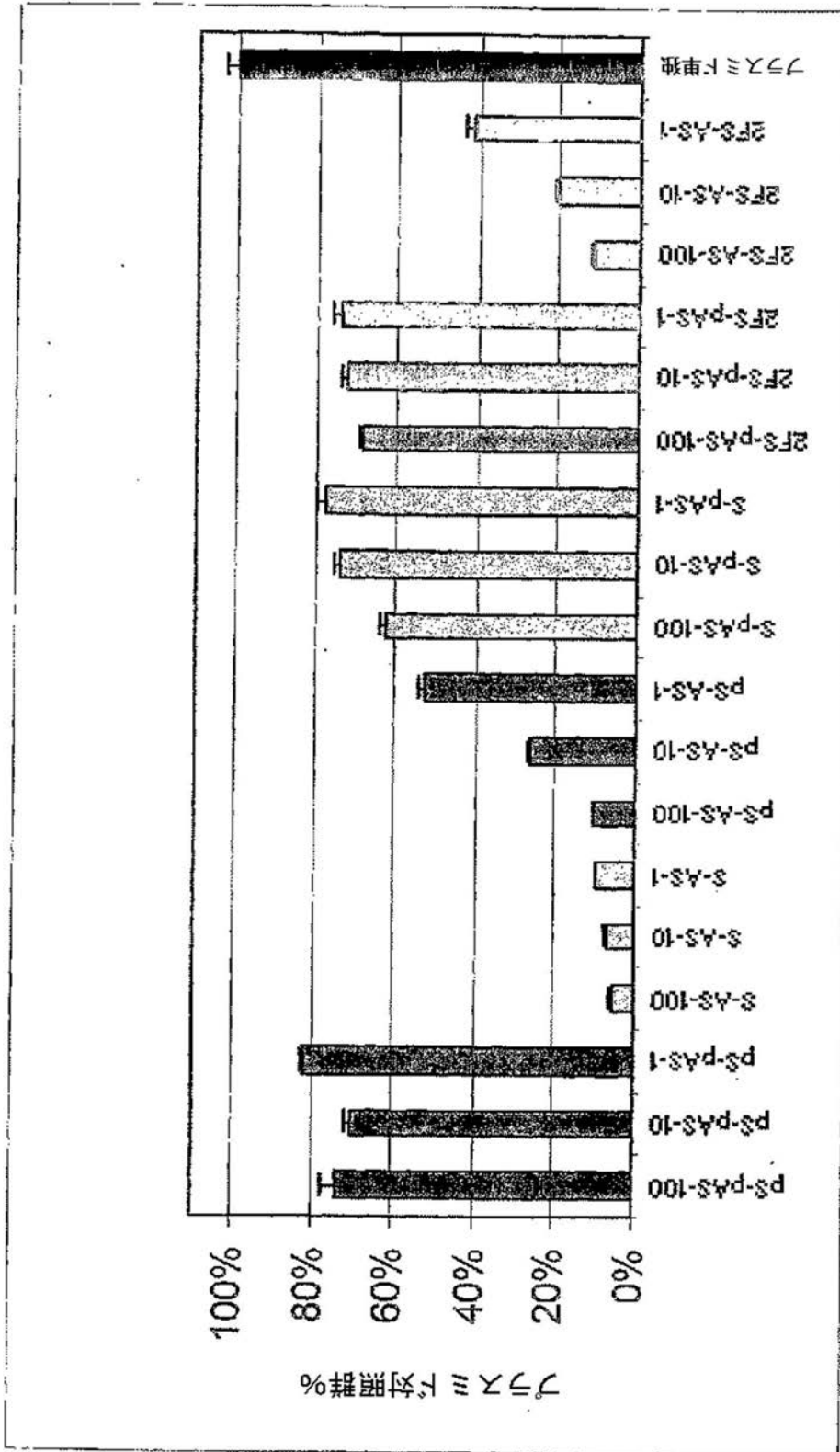


Figure 1B. siRNAのセンス鎖に対するオルトエステル修飾の導入して、
48時間時間点で得られる機能性構成要素

Figure 2A. 細胞培養、24時間の時点でのオルトエステルおよび2'F修飾RNAの時間的経過

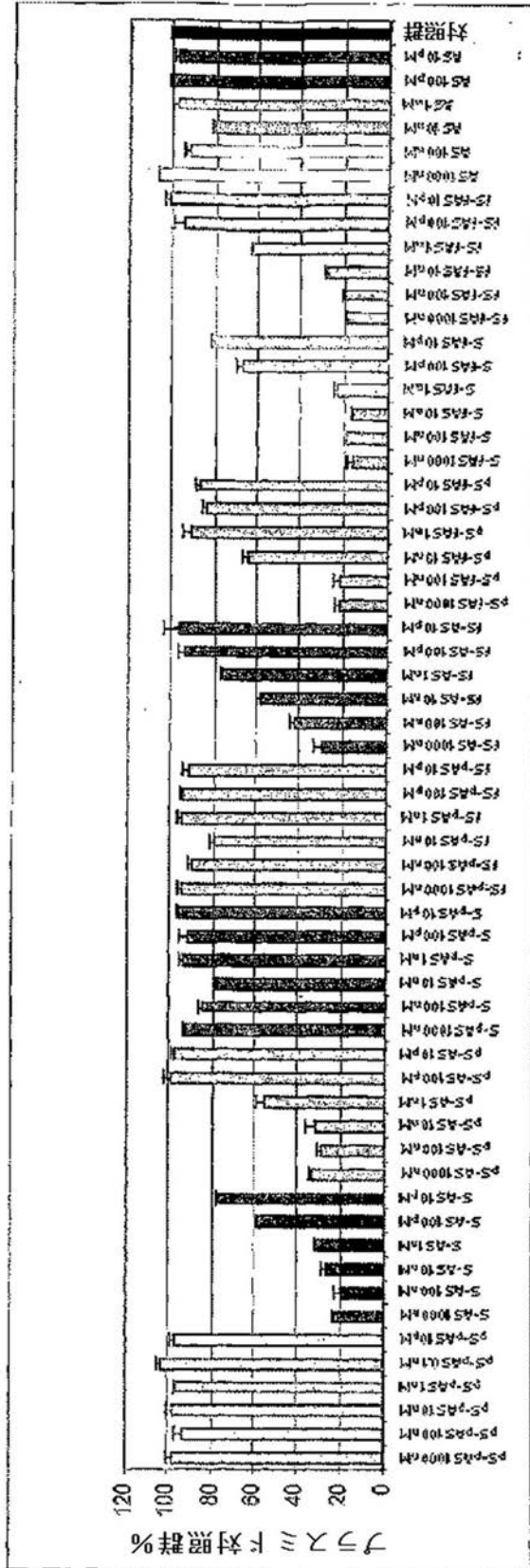
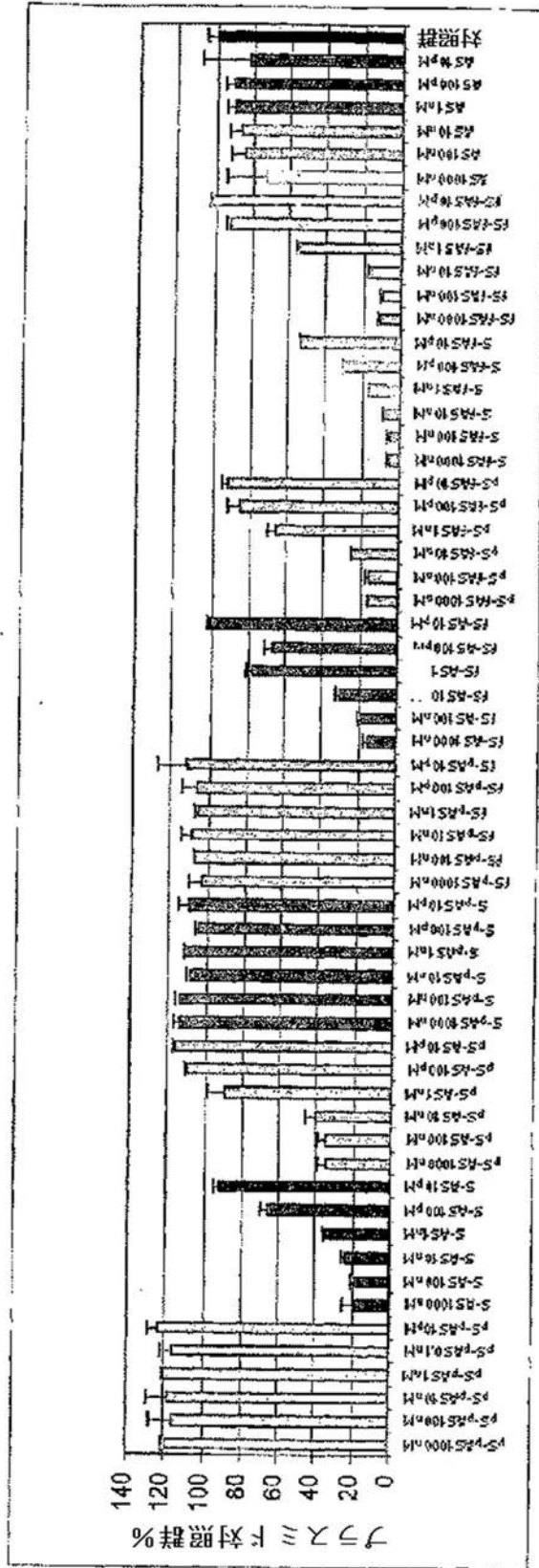


Figure 2B. 細胞培養、72時間の時点でのオルトエステルおよび2'F修飾RNAの時間的経過



【図 2 C】

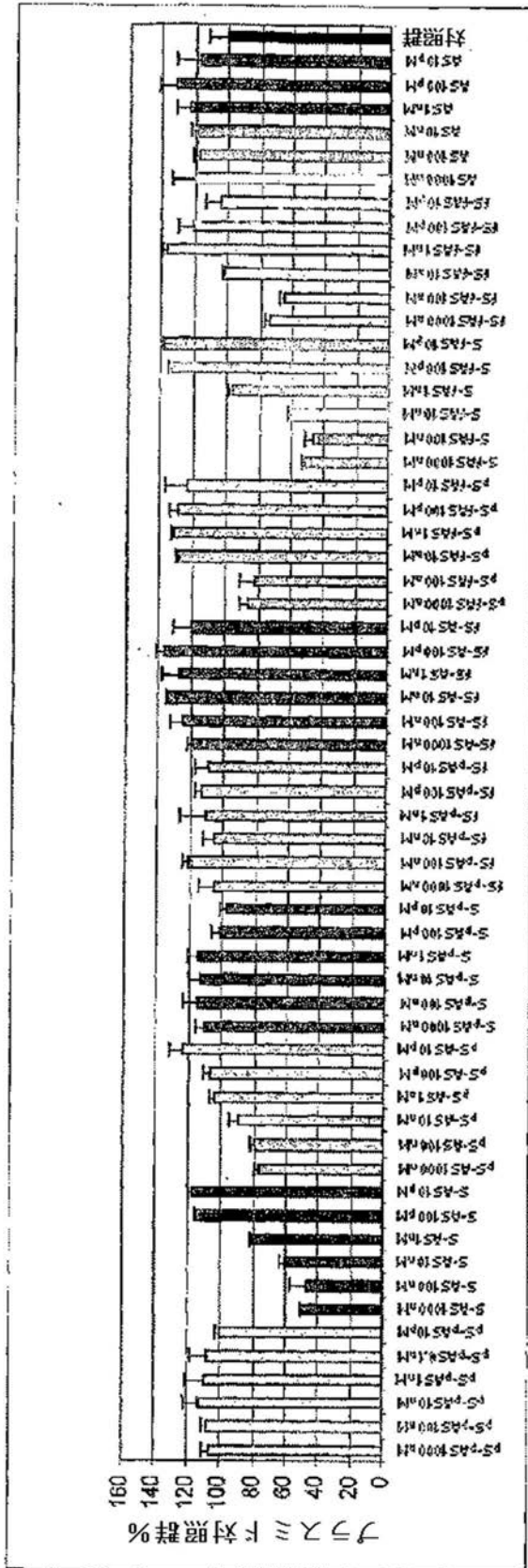


Figure 2C. 細胞培養、144時間の時点でのオルトエステルおよび2'F修飾RNAの時間的経過

【図 3】

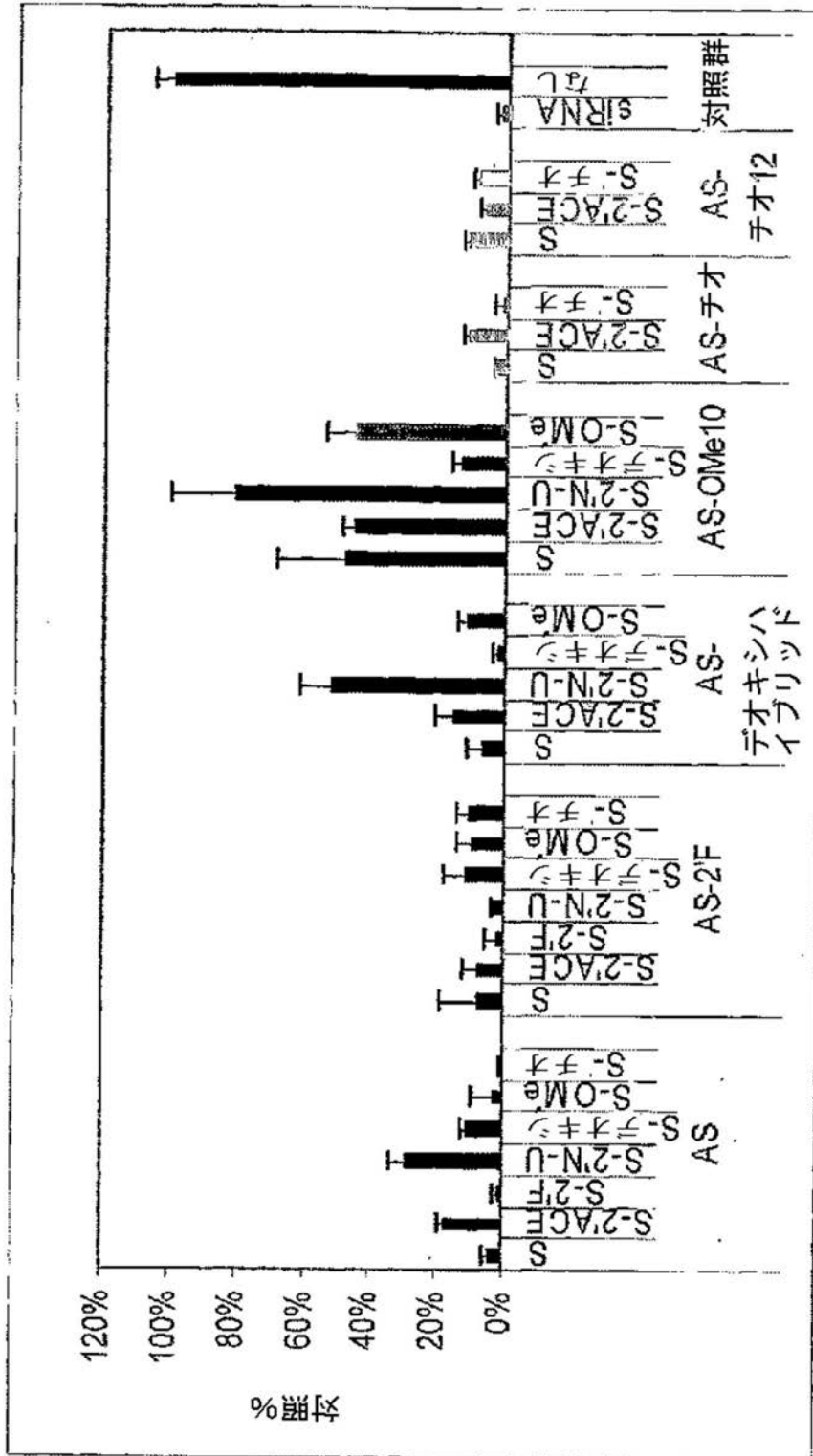


Figure 3. siRNAにおける修飾トレランス：センス・スクリーニング

【図 4】

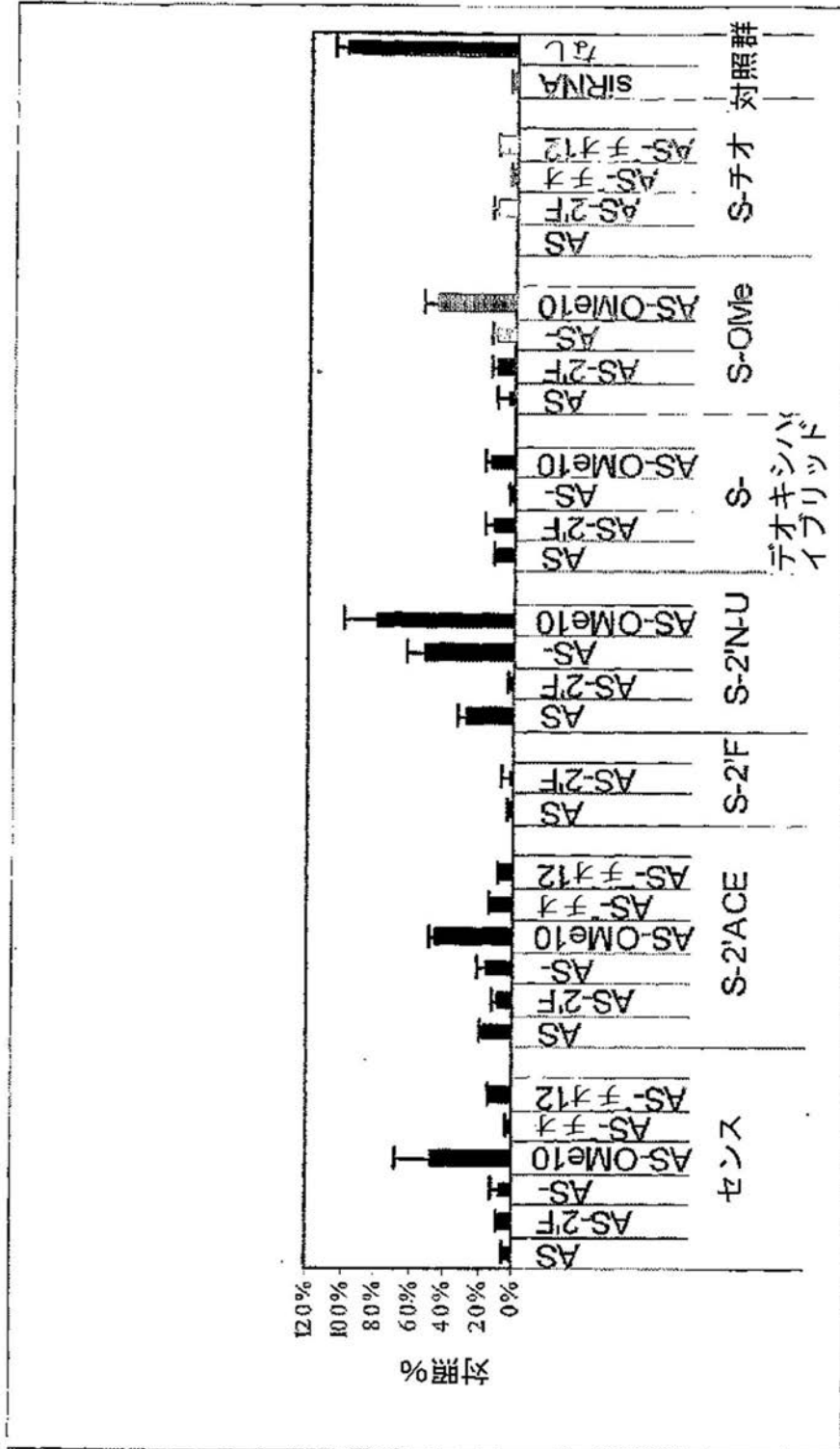


Figure 4. siRNAにおける修飾トレランス：アンチセンス・スクリーニング

【図 5】

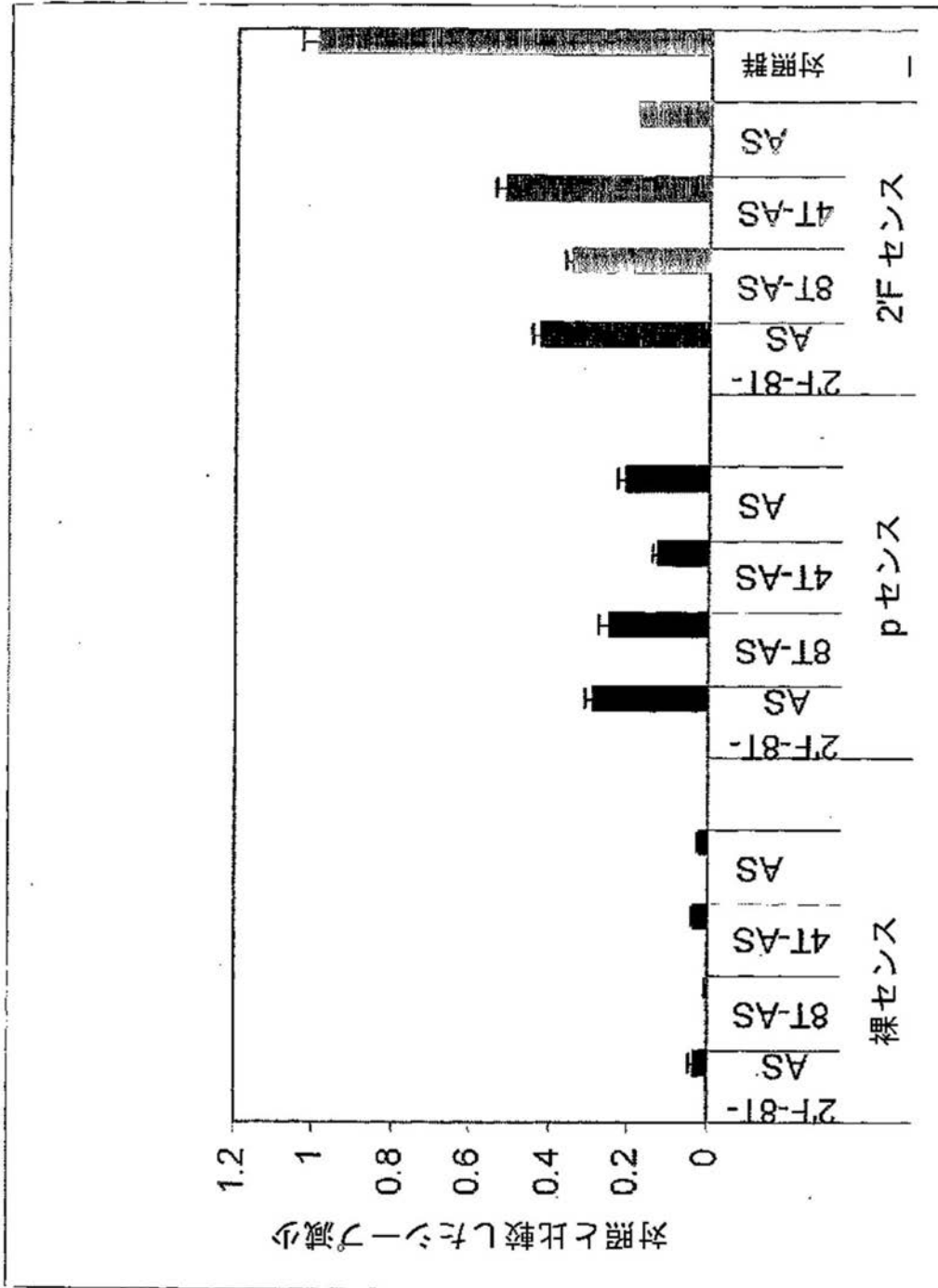


Figure 5. アンチセンス鎖に対するチオ系修飾

【図 6】

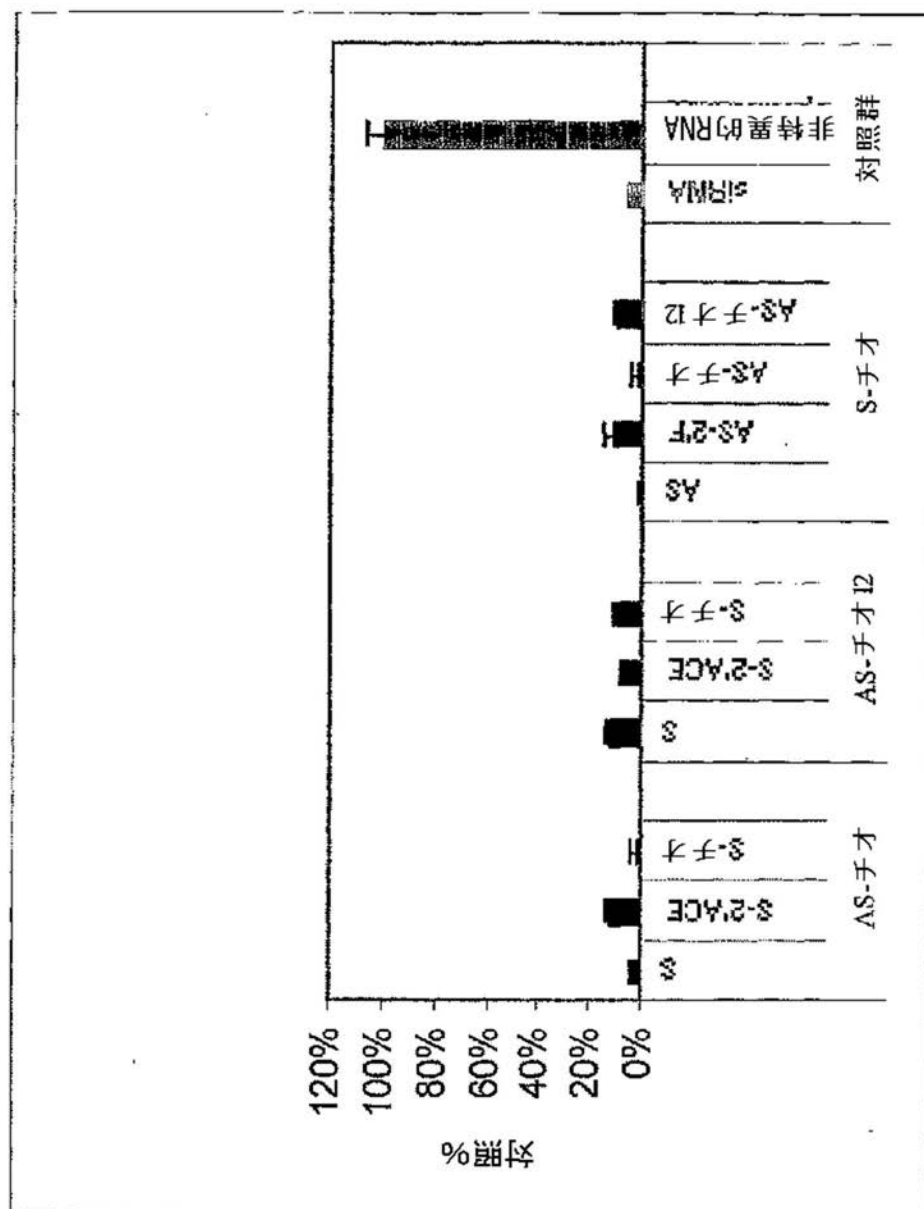


Figure 6. センスおよびアンチセンス鎖の両方で許容されるホスホロチオエート修飾

【図 7】

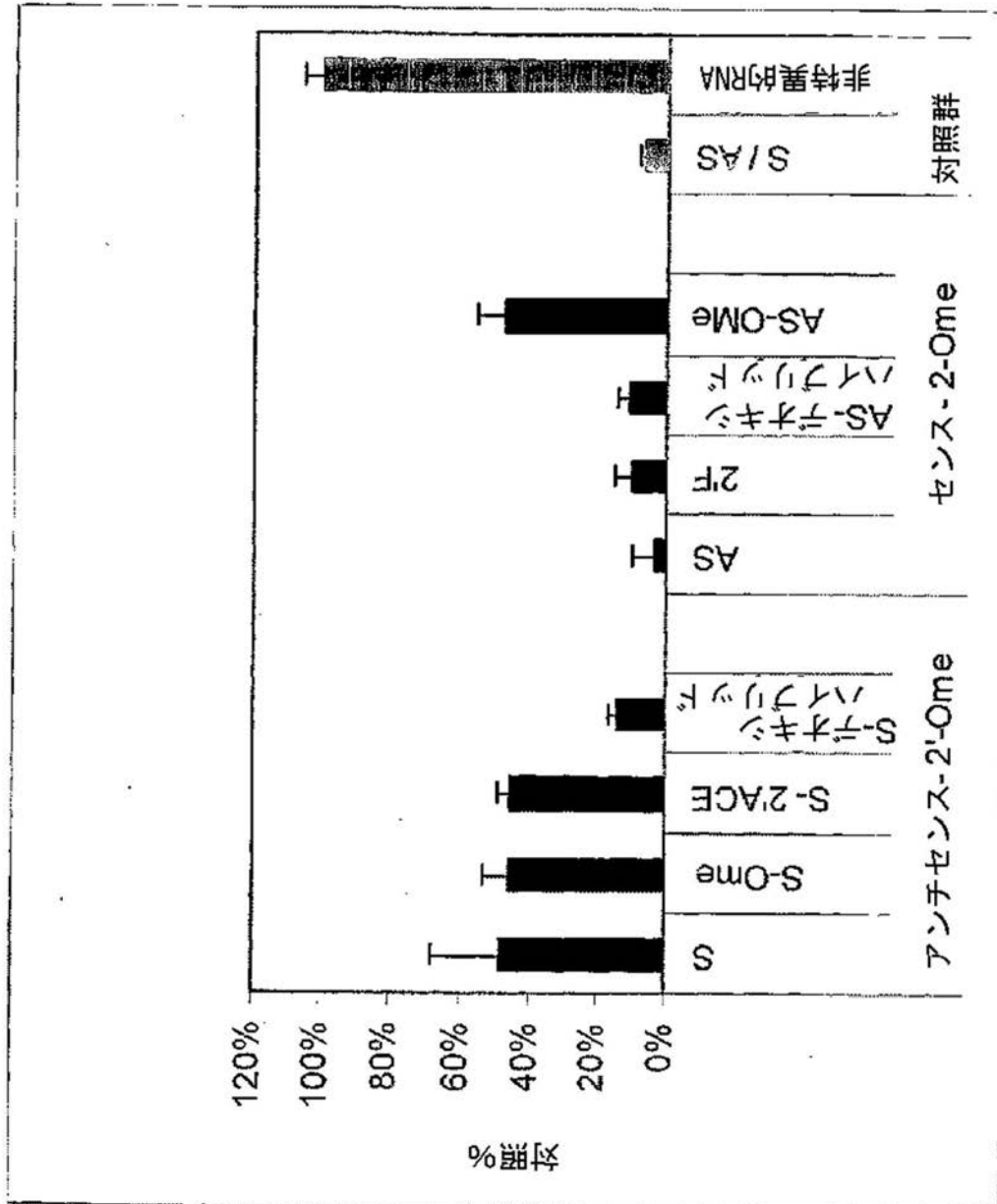


Figure 7. RNA干渉での2'-O-修飾

【図 8】

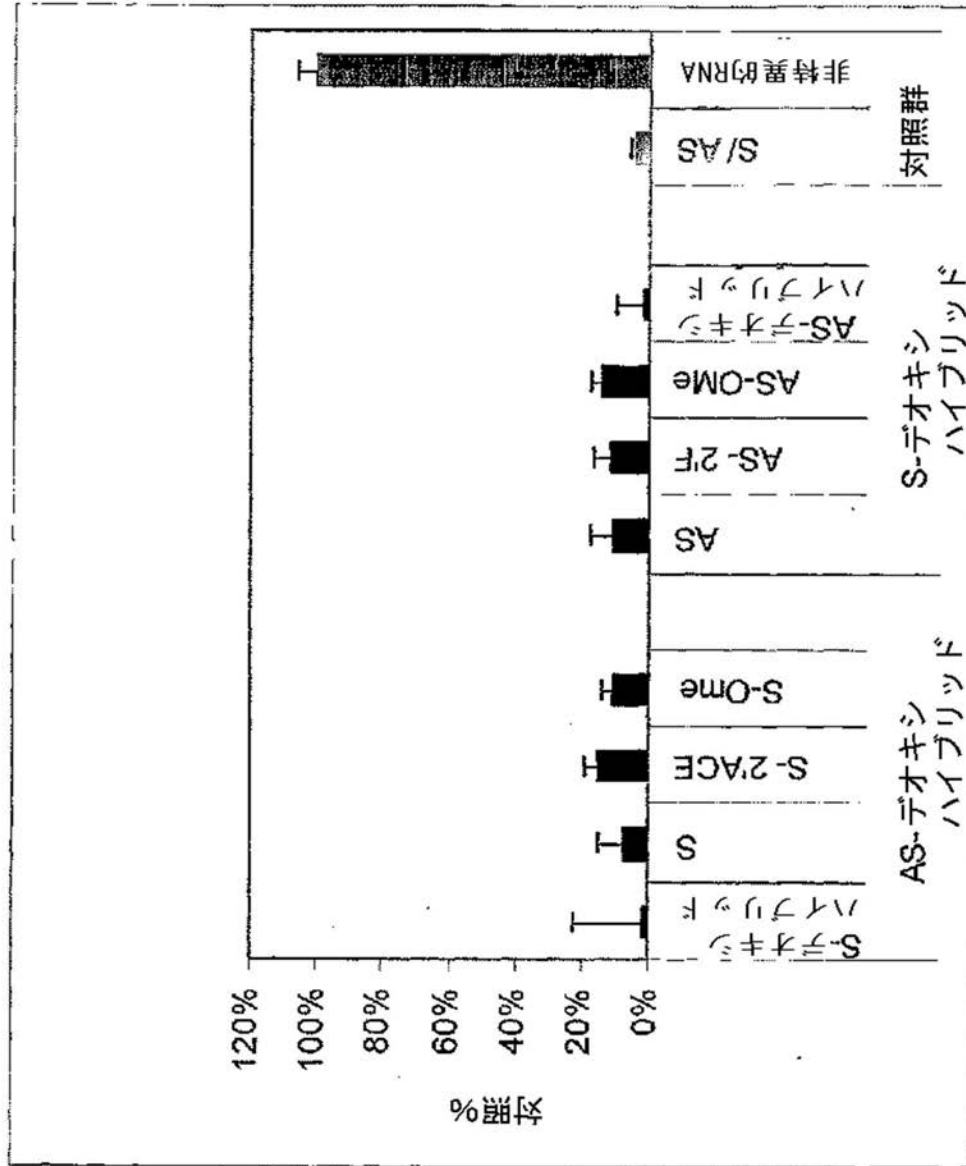


Figure 8. RNA干渉での2'デオキシリボ・ハイブリッド

【図 9】

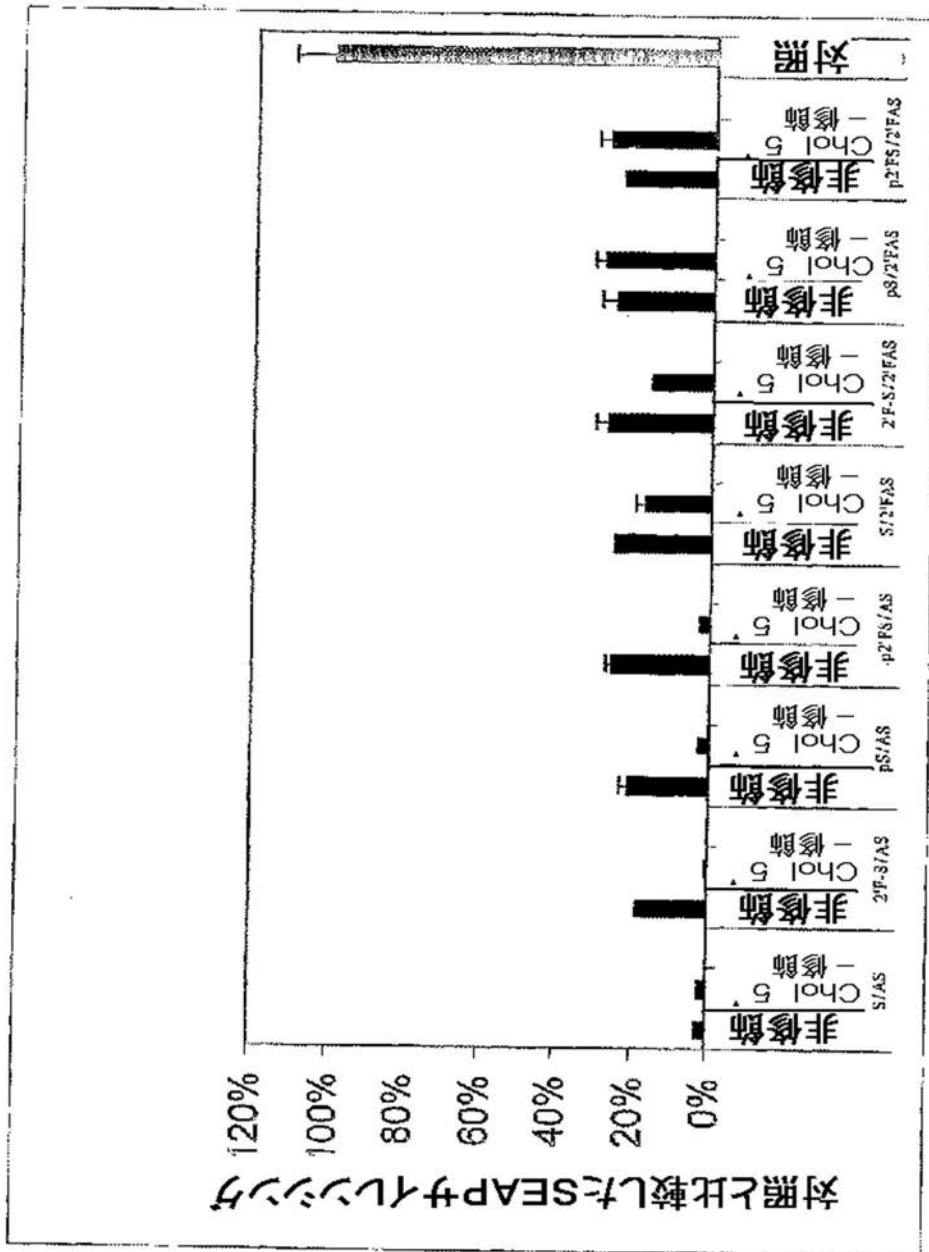


Figure 9. siRNA二重鎖のセンス鎖の5'末端上のコレステロール-コンジュゲートによって高められる修飾siRNAの効力

【図10】

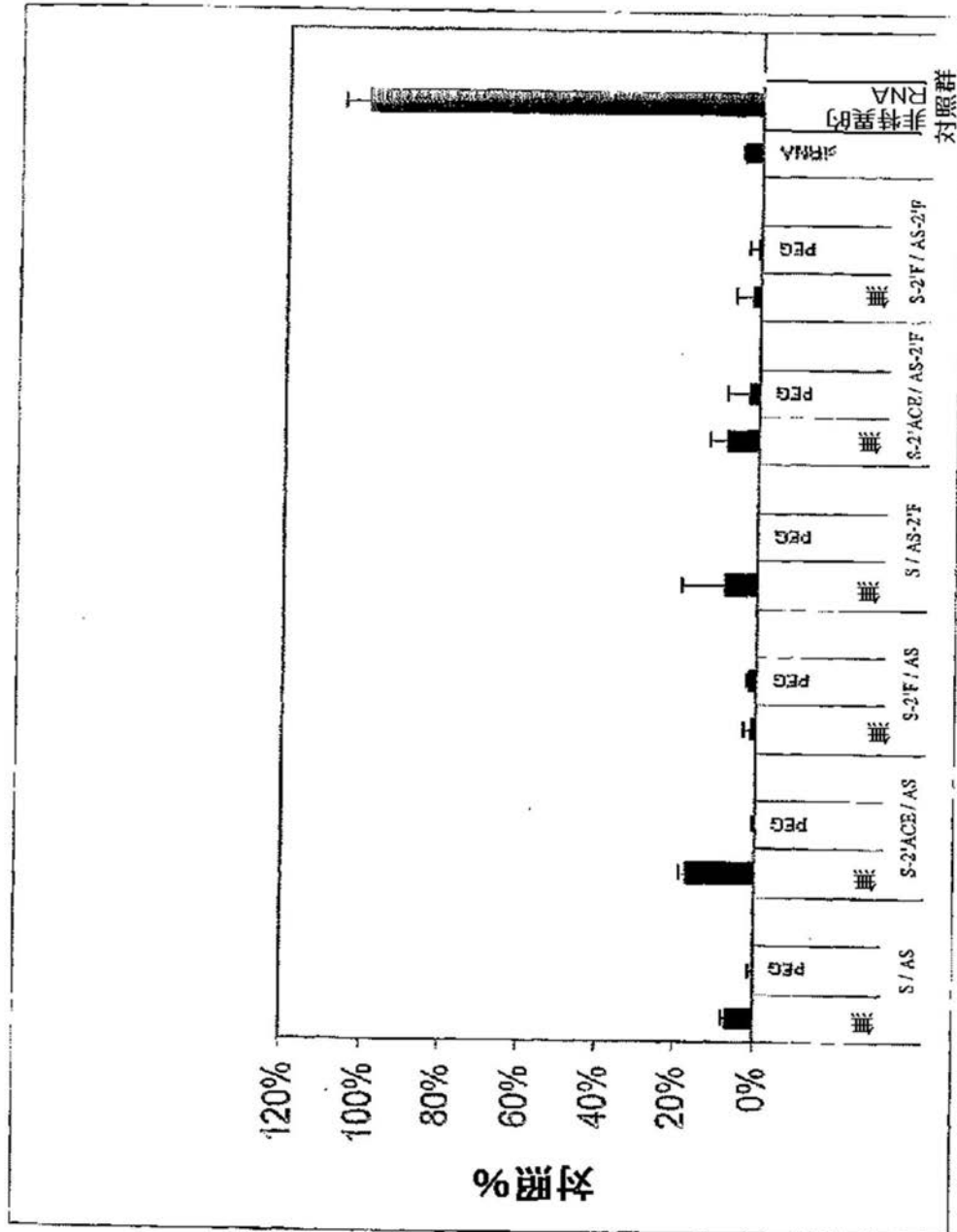


Figure 10. siRNA二本鎖のセンス鎖の5'末端上のPEGコンジュゲートによって高められる siRNA効力

【図 1 1】

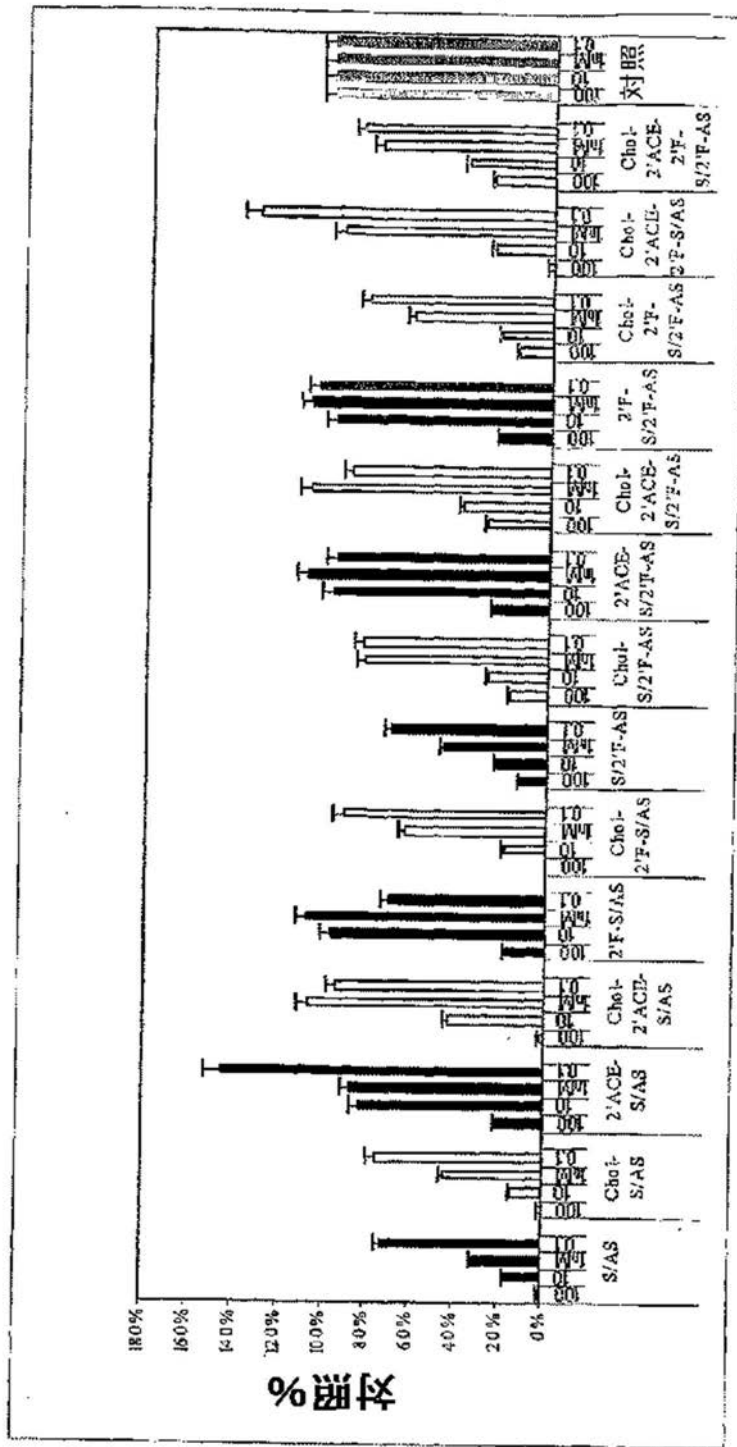


Figure 11. 5'コレステロール・コンジュゲートを持つセンス鎖によってもたらされる、
2'Fおよびオルトエステル修飾オリゴの効力の増加と用量の減少

【図 12】

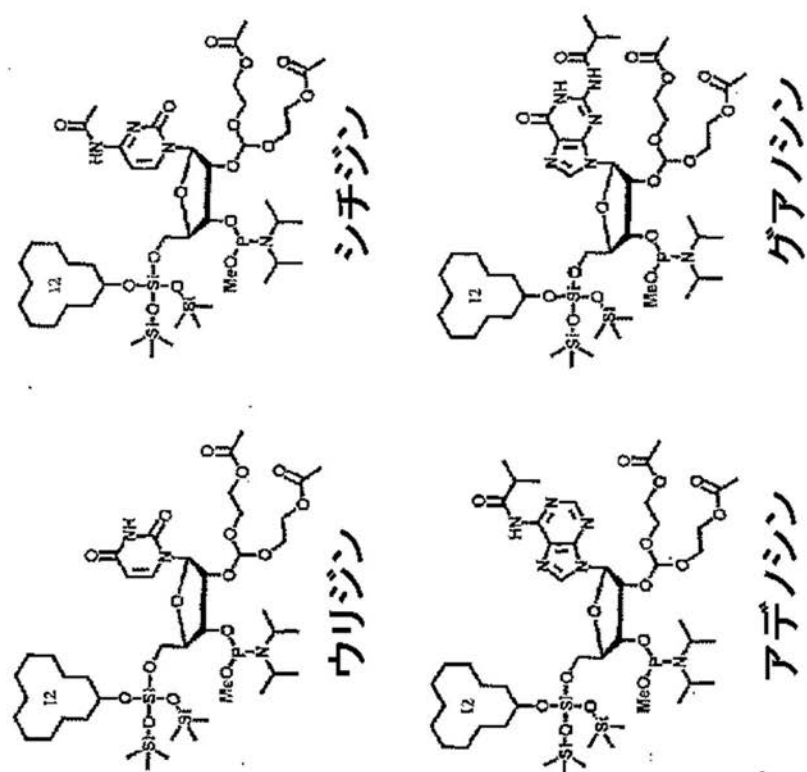


Figure 12: Dharmacon 2'-ACE RNA 合成ケミストリーに対する保護RNAヌクレオシド・ホスホラミダイト

【図 13】

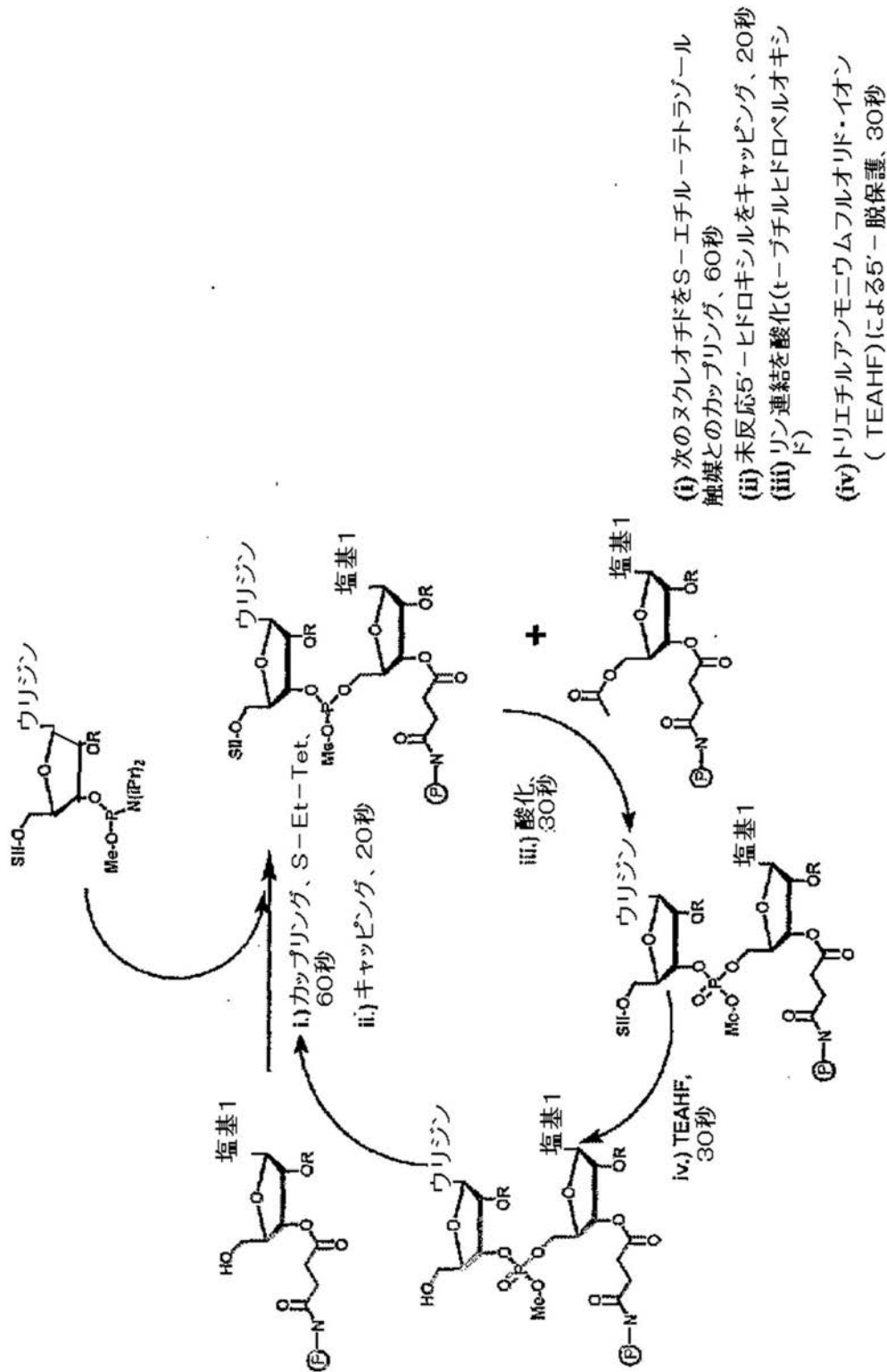


Figure 13: Dharmacon RNA合成サイクルの概要

【図 14】

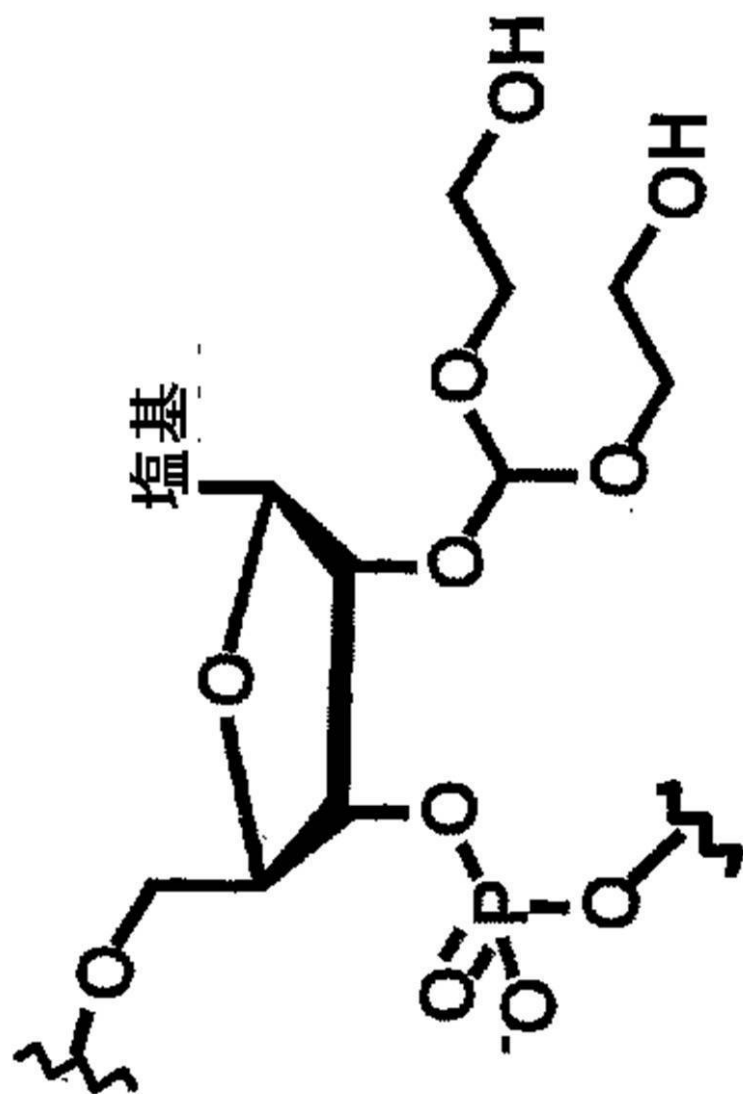


Figure 14: 2'-ACE保護RNA

【図 15 A】

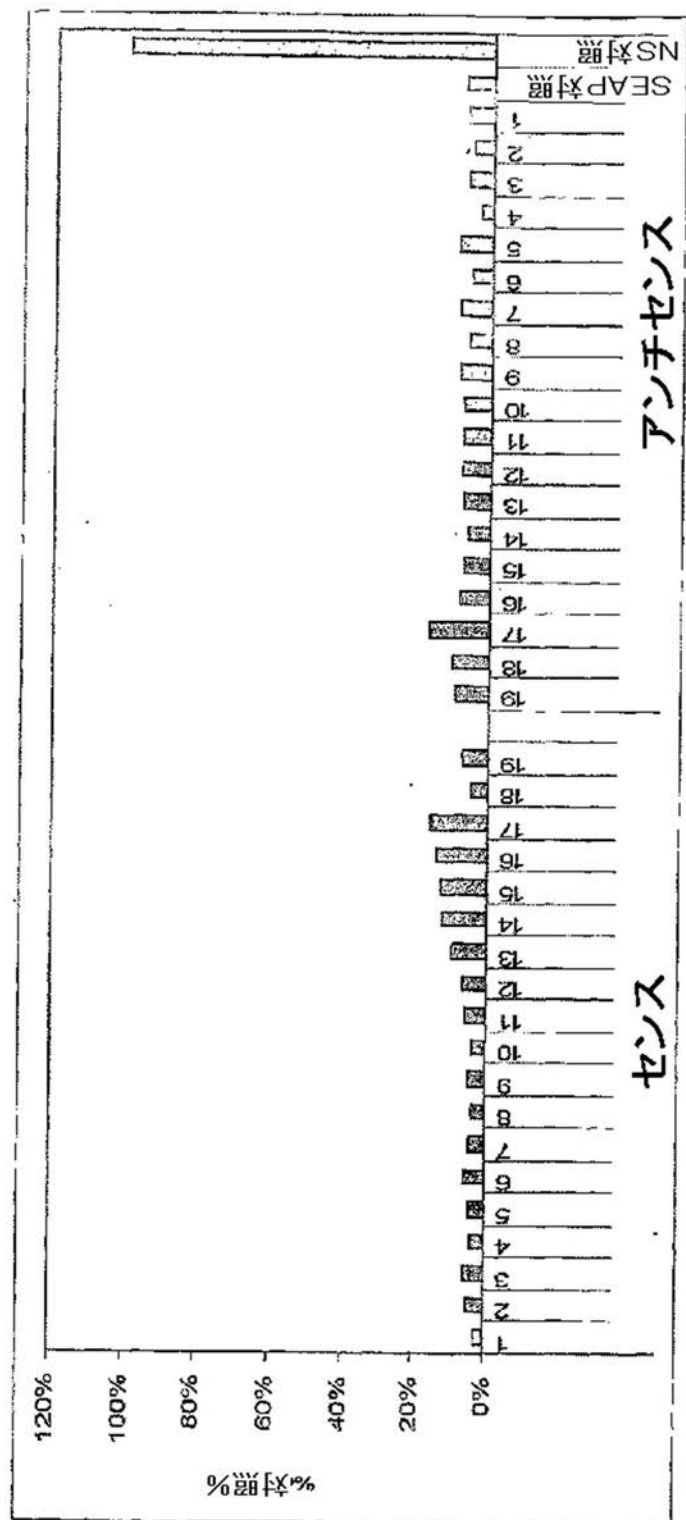


Figure 15A: 単一のデオキシヌクレオチド修飾

【図15B】

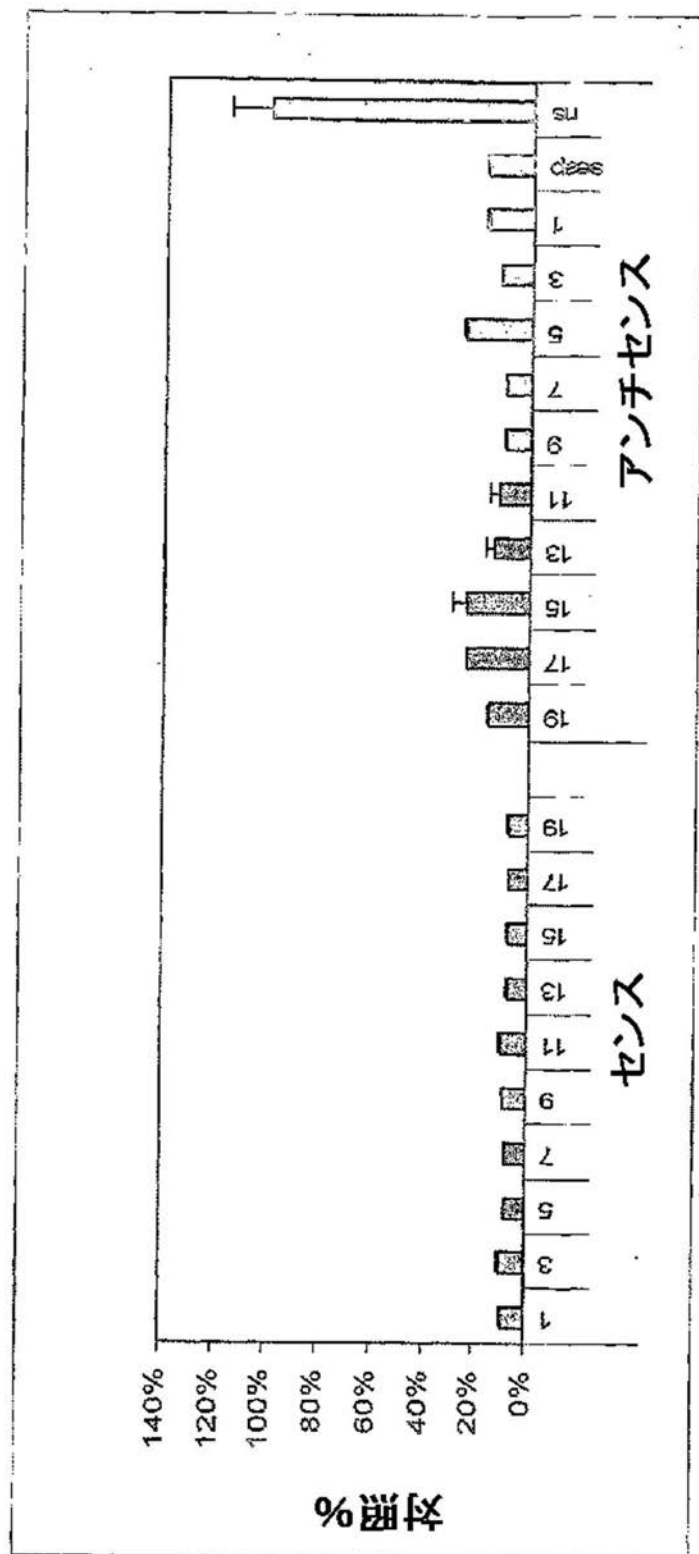


Figure 15B: 相前後した2つのデオキシヌクレオチド修飾

【図15C】

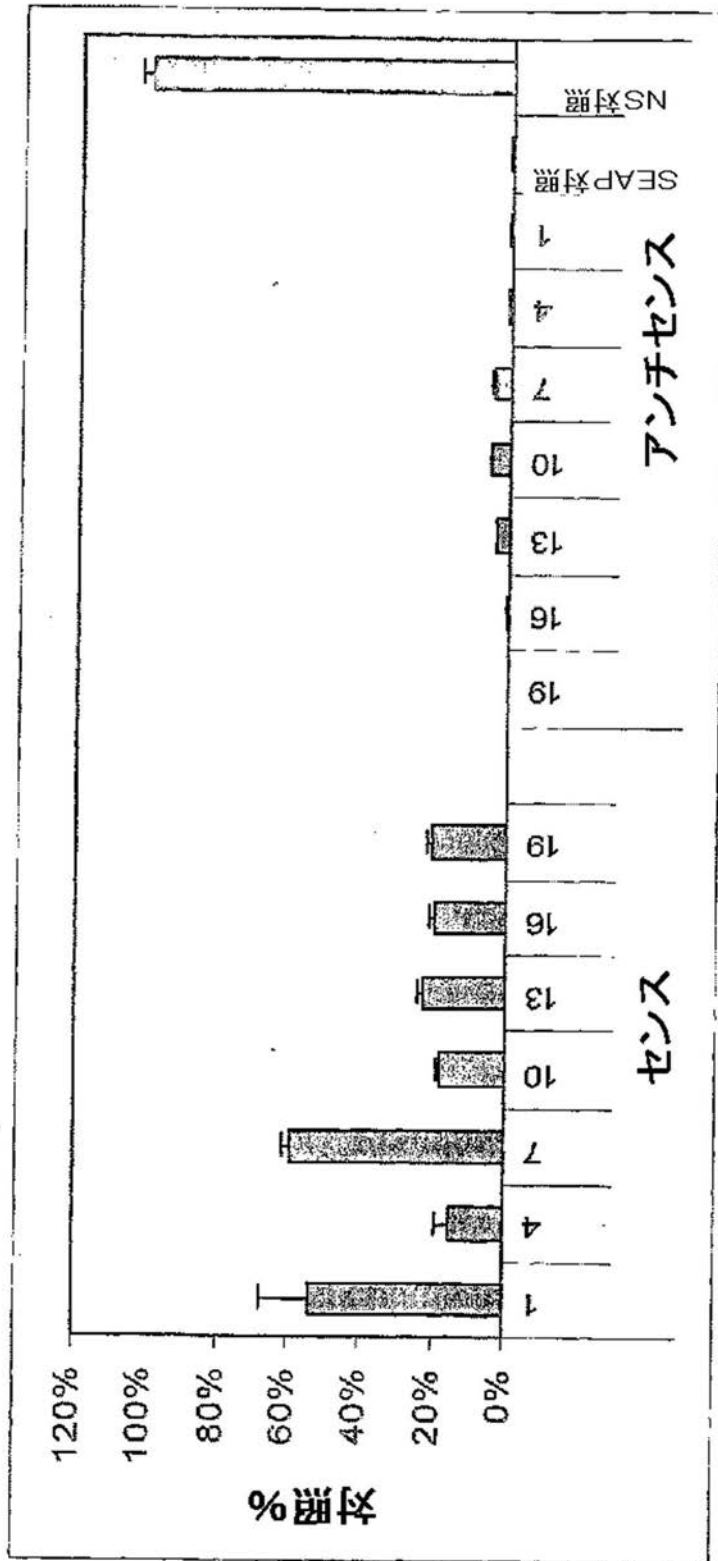


Figure 15C: 相前後した3つのデオキシリボヌクレオチド修飾

【図16A】

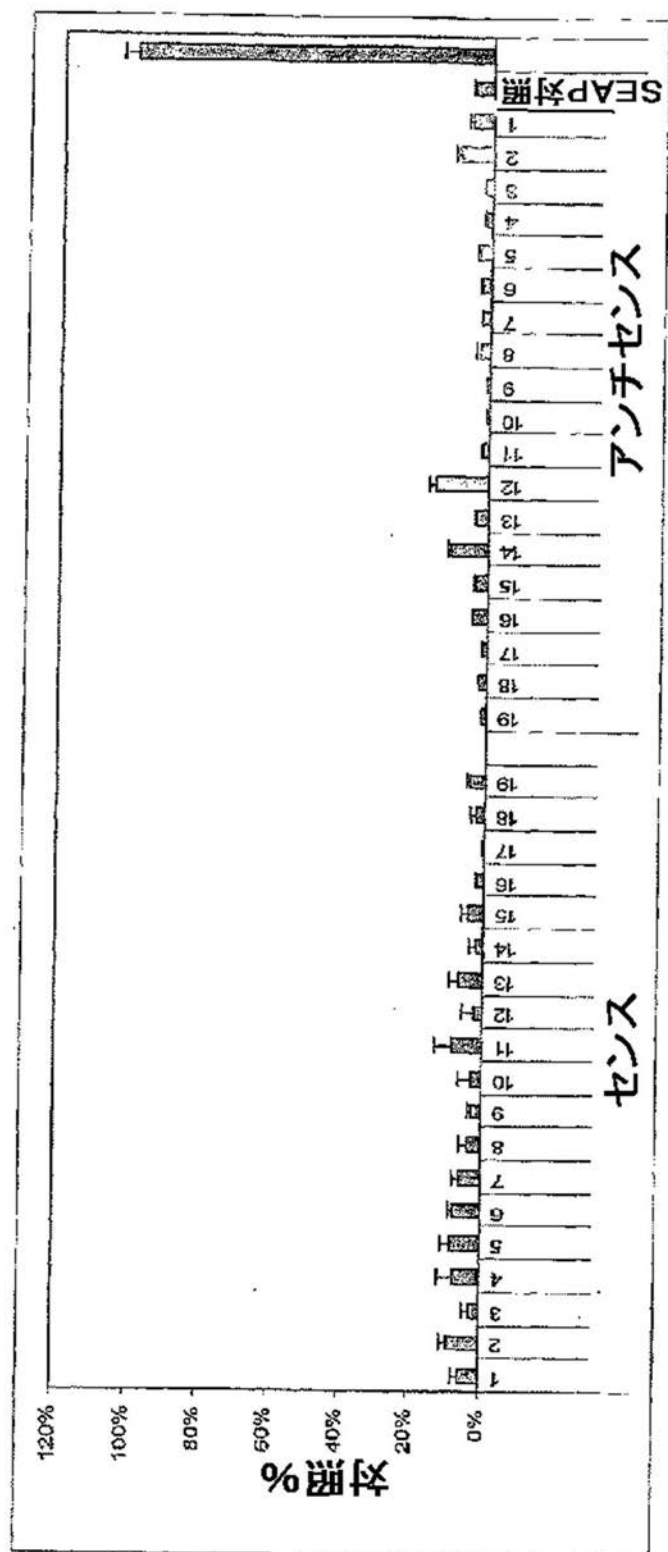


Figure 16A: 単一の2'-O-メチル修飾

【図 16 B】

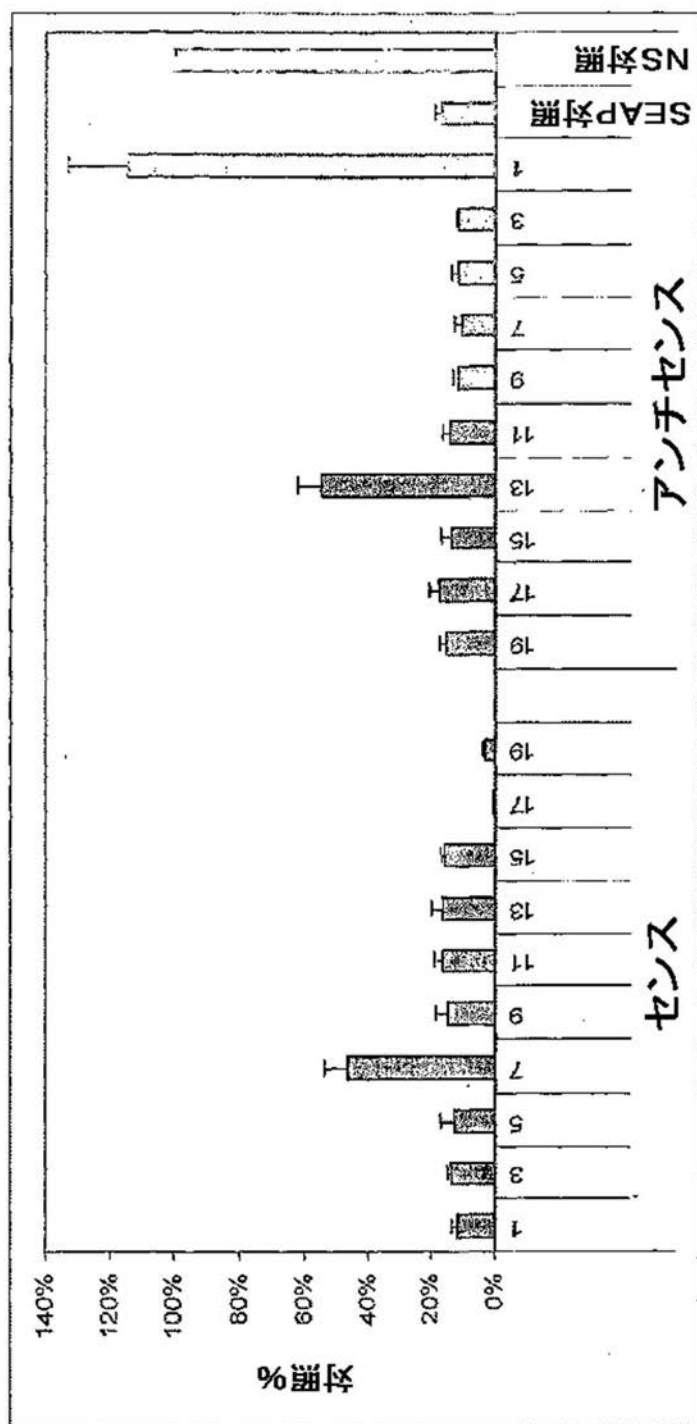


Figure 16B: 相前後した2つの2'-O-メチル修飾

【図16C】

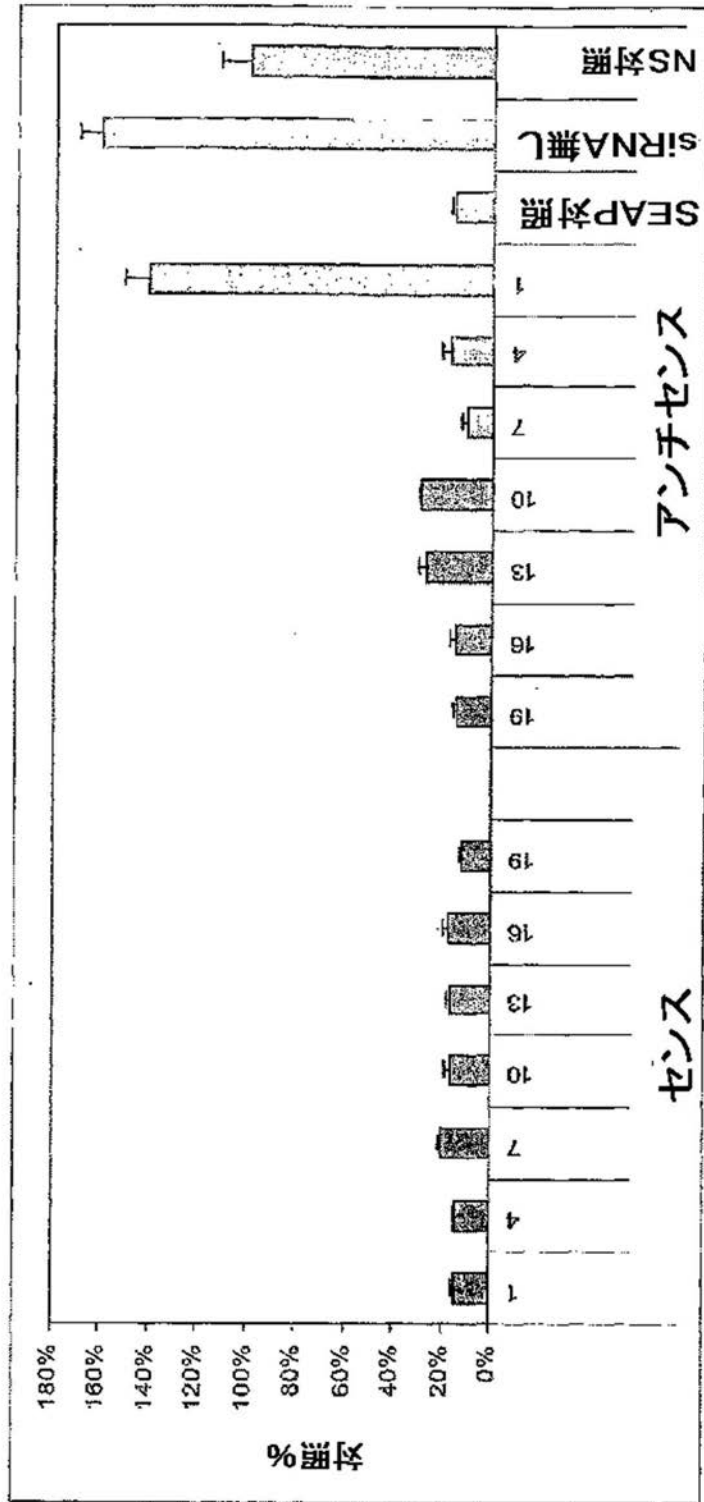


Figure 16C: 相前後した3つの2'-O-メチル修飾

【図 17】

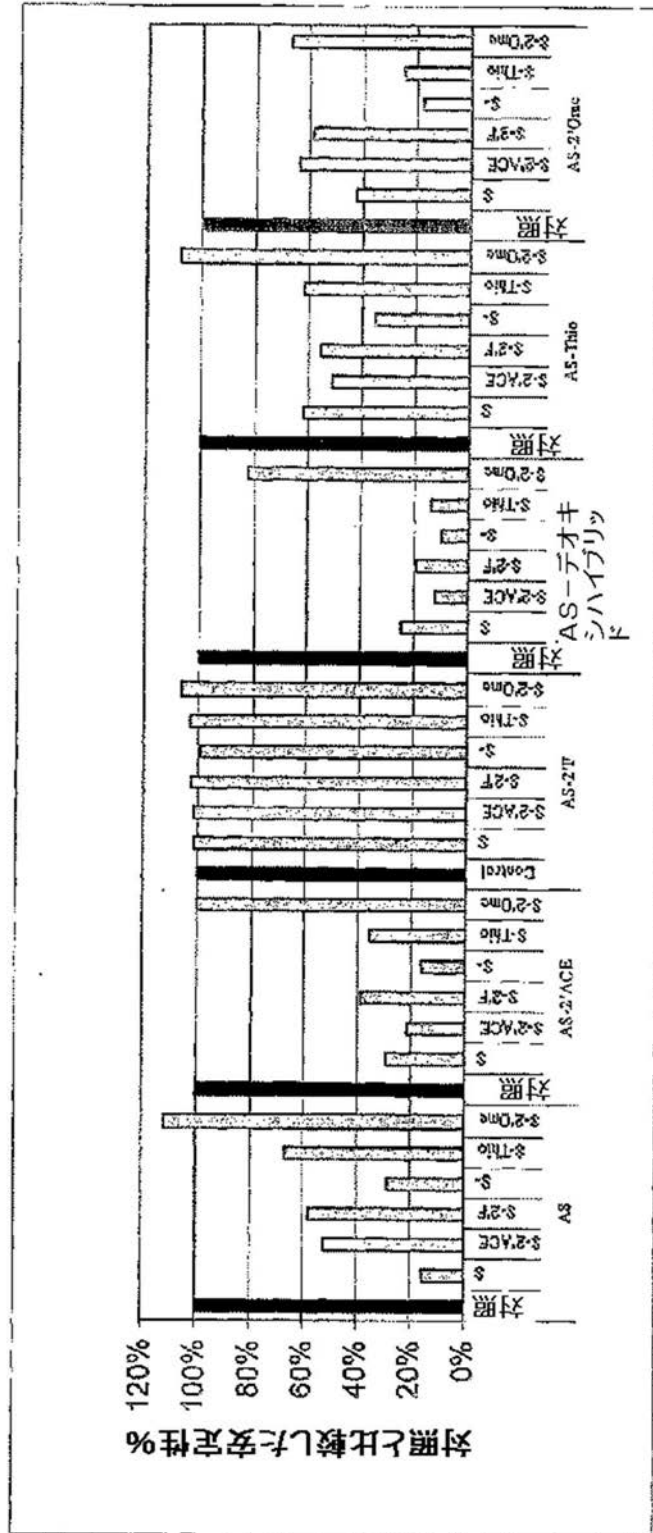


Figure 17: 培地中での1時間インキュベーションに対する安定性スクリーニング

【図18】

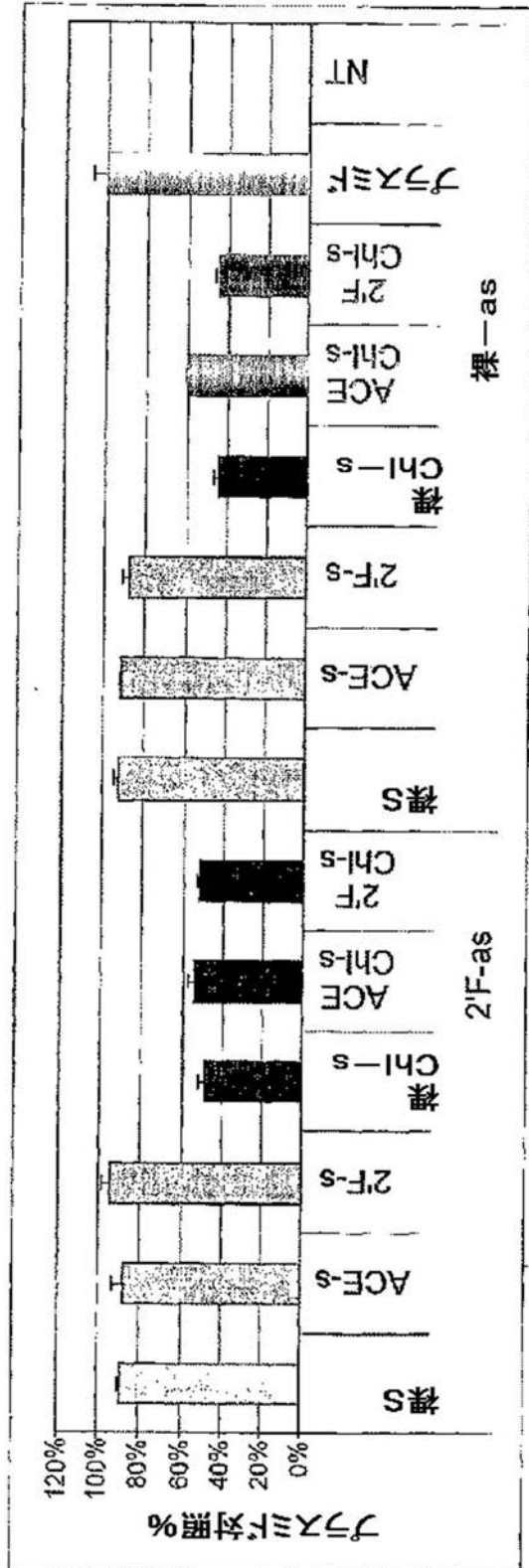


Figure 18: siRNAの受動送達に対するコレステロール修飾の効果

【図19】

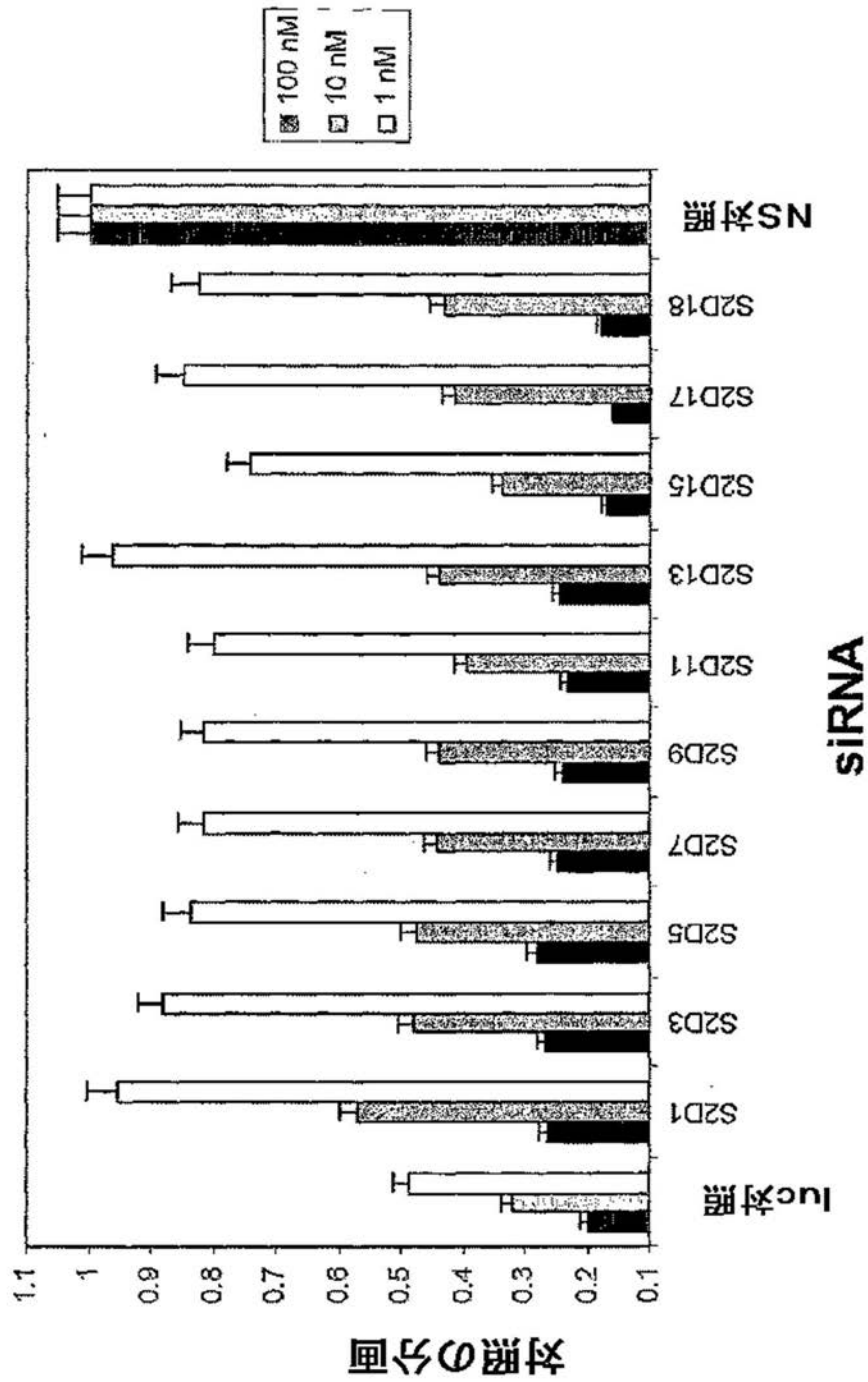


Figure 19: 修飾干渉スクリーニング: センズ鎖での2デオキシの阻害

【図 20】

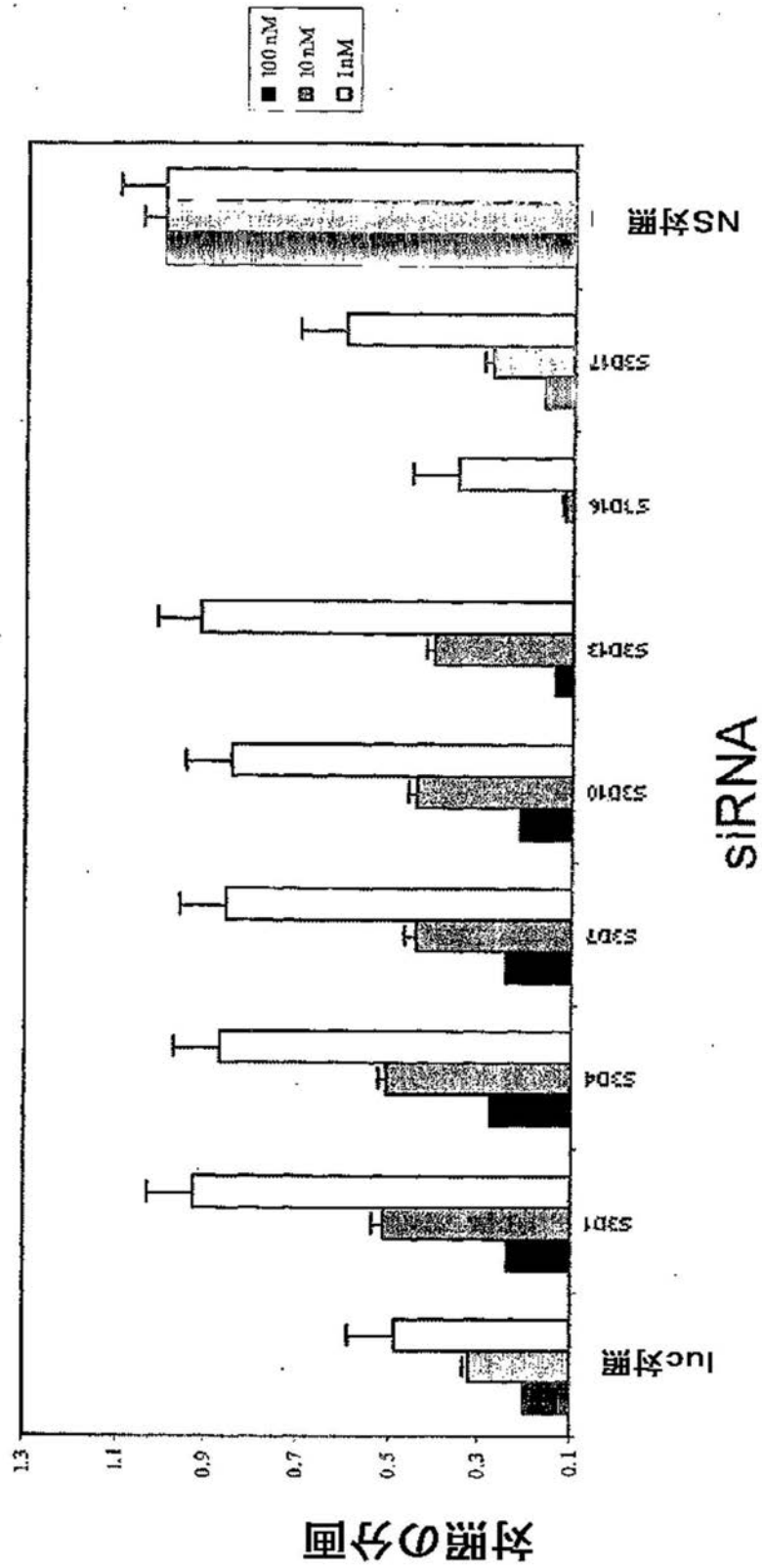


Figure 20: 修飾干渉スクリーニング: センズ鎖での3デオキシシの阻害

【図 21】

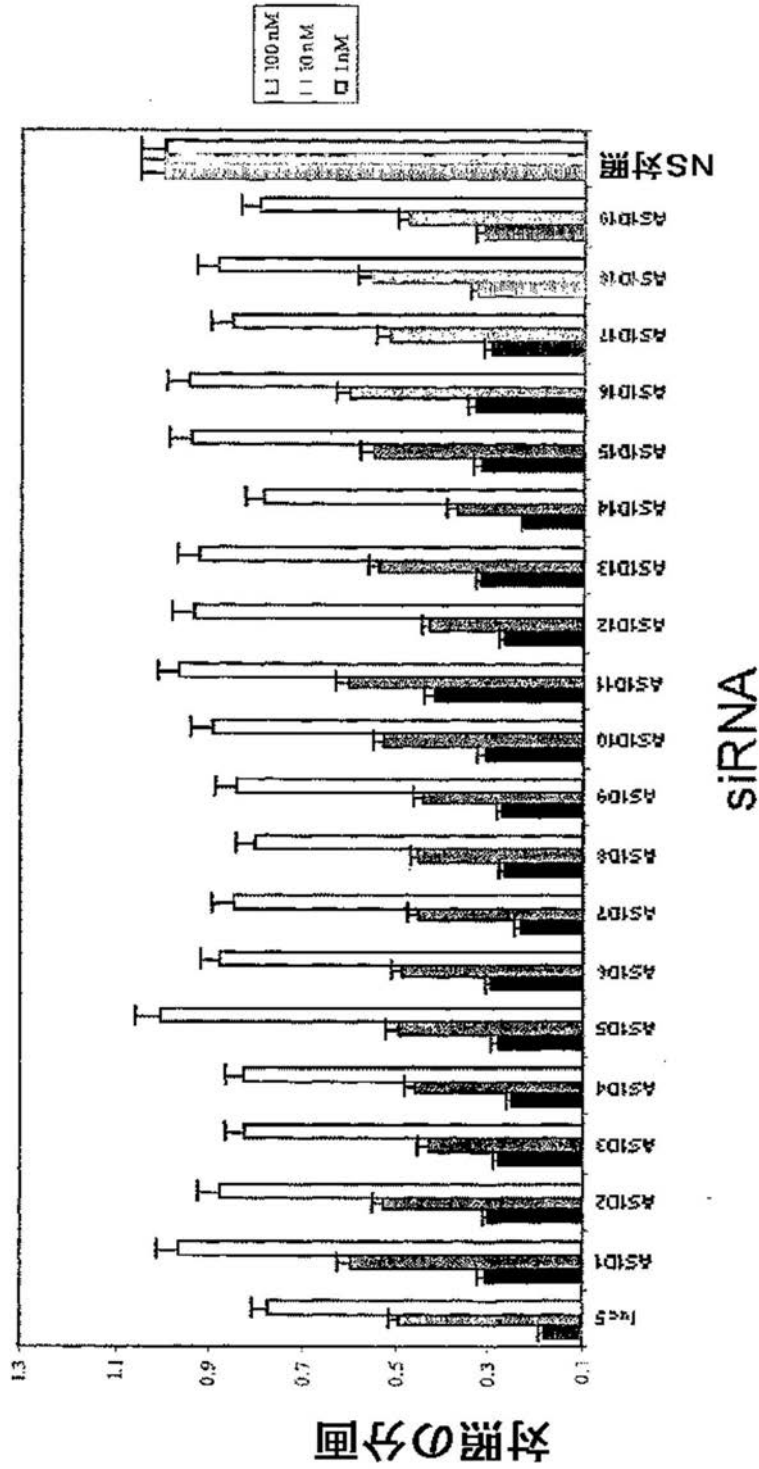


Figure 21: 修飾干渉スクリーニング: アンチセンス鎖でのデオキシ

【図 22】

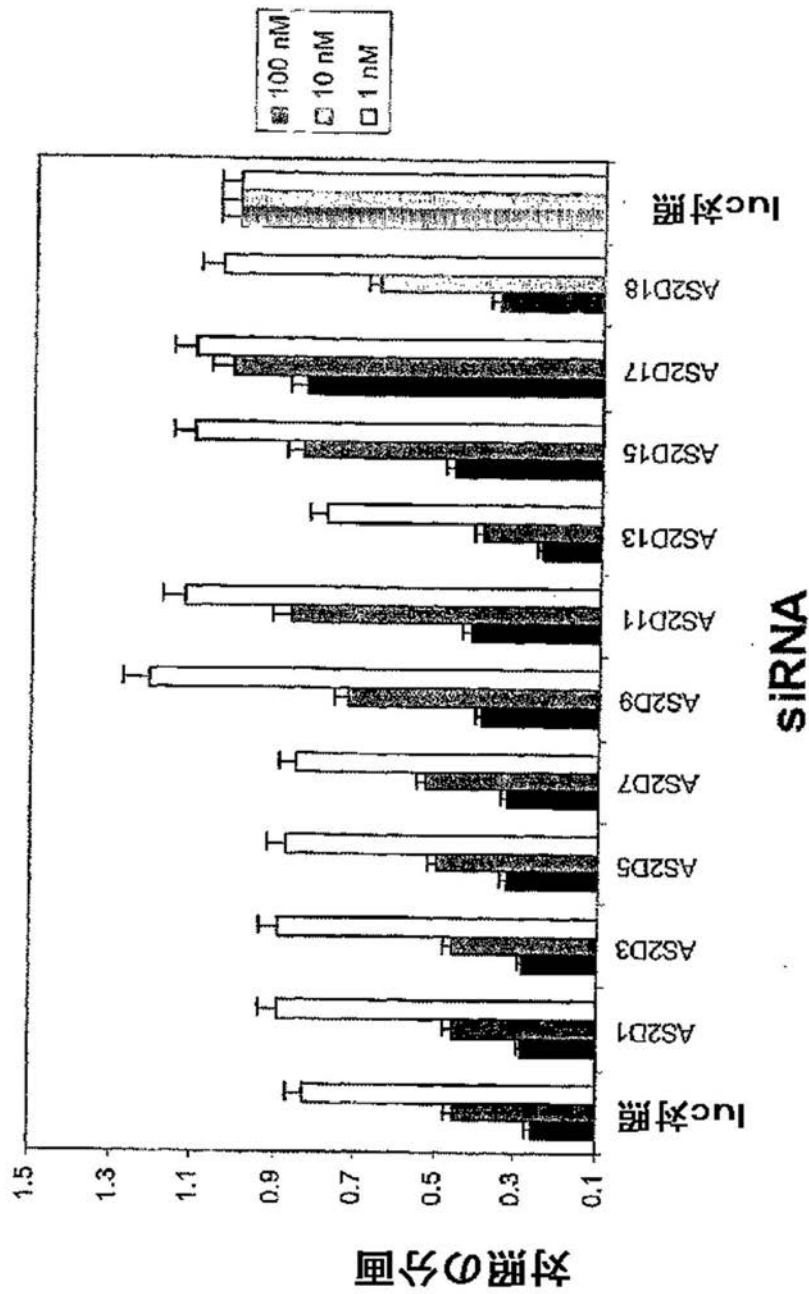


Figure 22: 修飾干渉スクリーニング: アンチセンス鎖での2デオキシの阻害

【図 23】

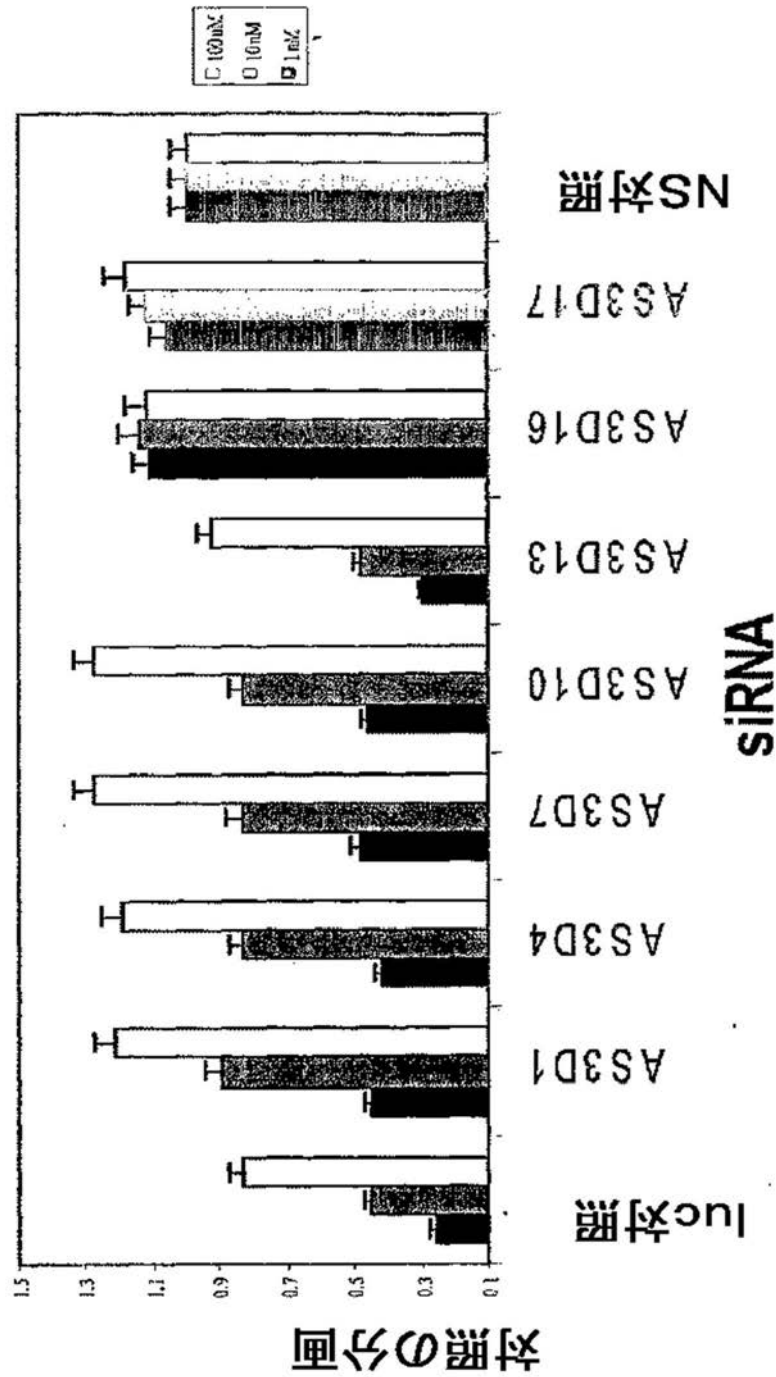


Figure 23: 修飾干渉スクリーニング: アンチセンス鎖での3デオキシの阻害

【図 24】

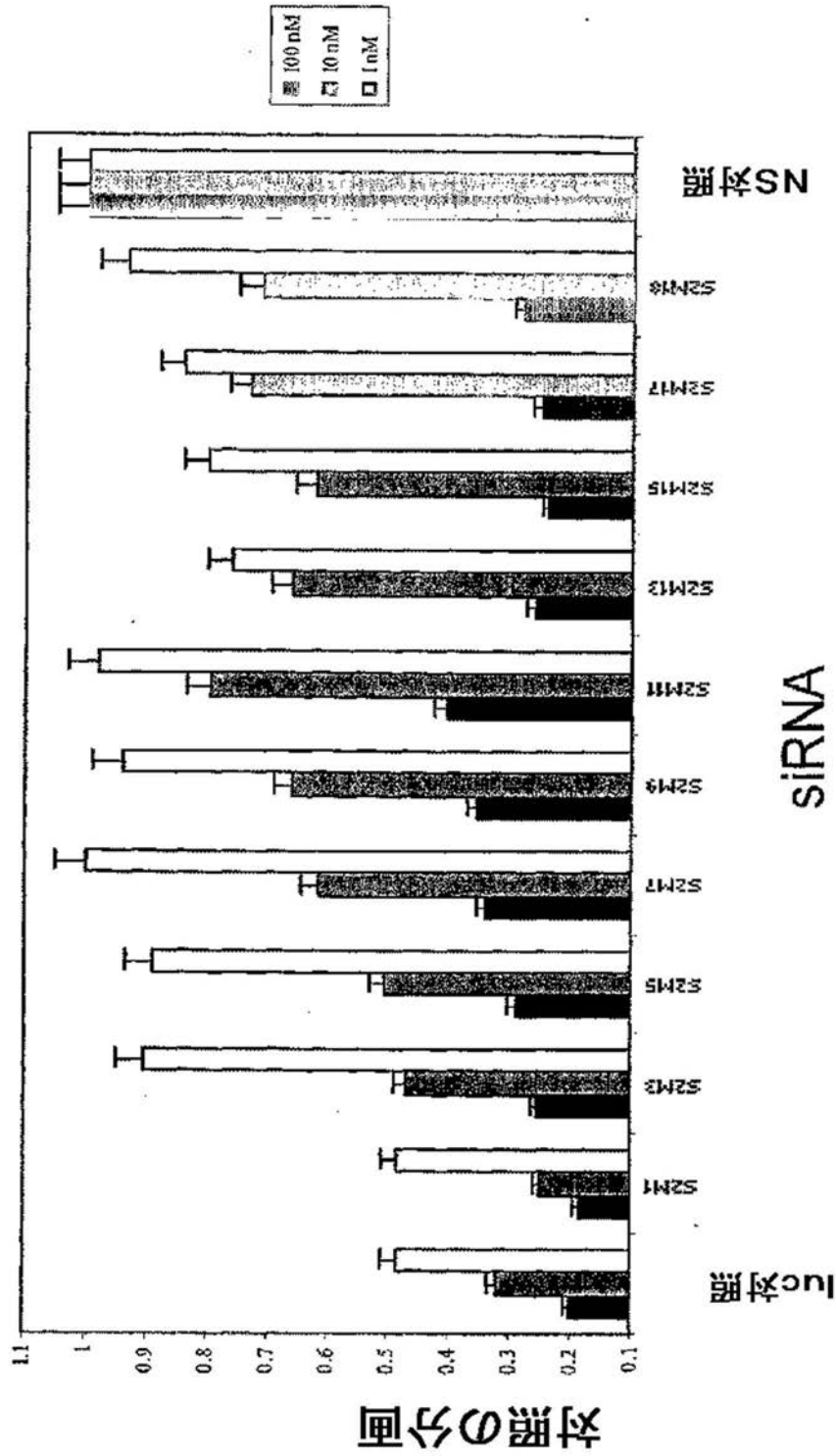


Figure 24: 修飾干渉スクリーニング: アンチセンス鎖での2メトキシの阻害

【図 25】

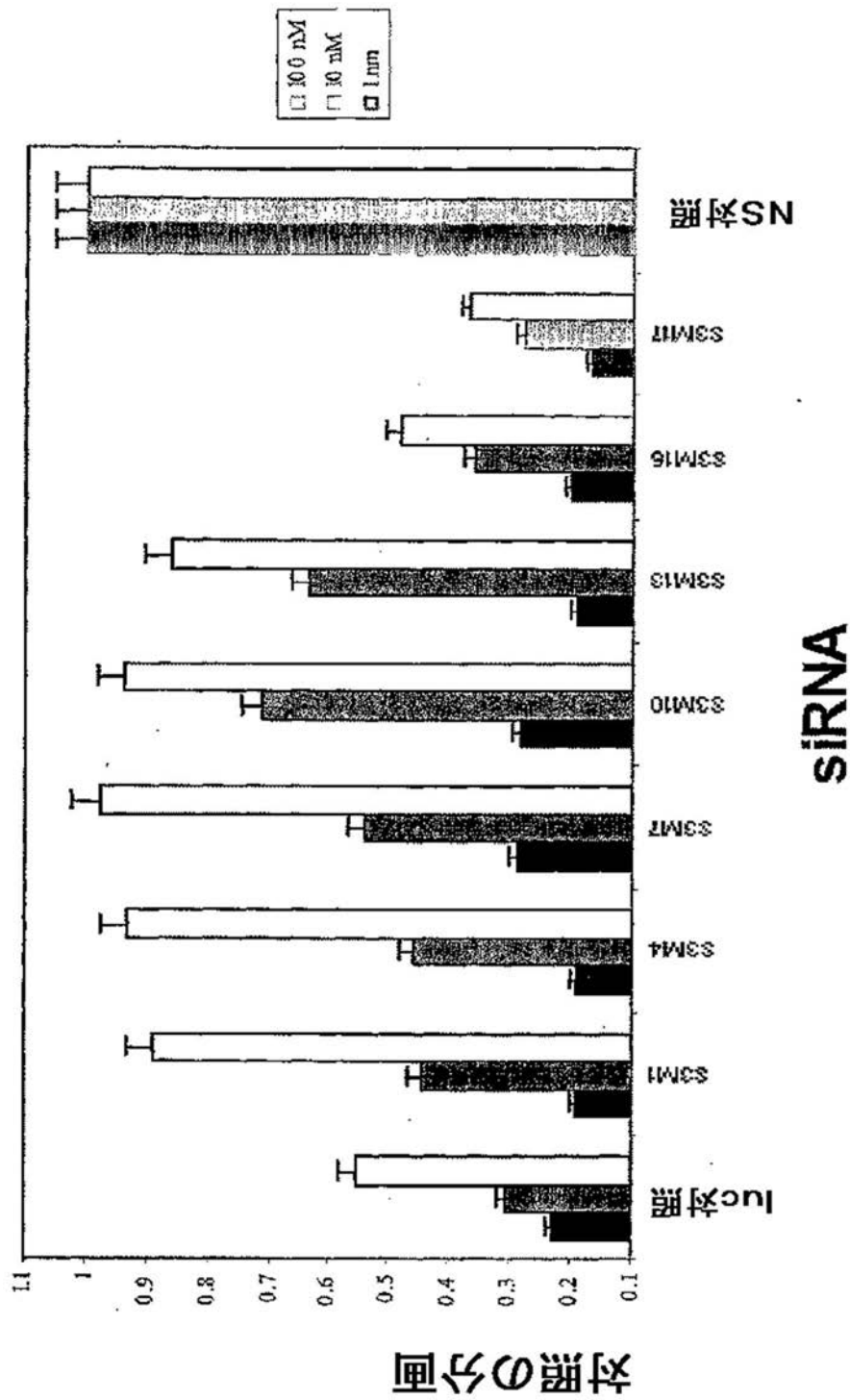


Figure 25: 修飾干渉スクリーニング: センス鎖での3メトキシの阻害

【図 26】

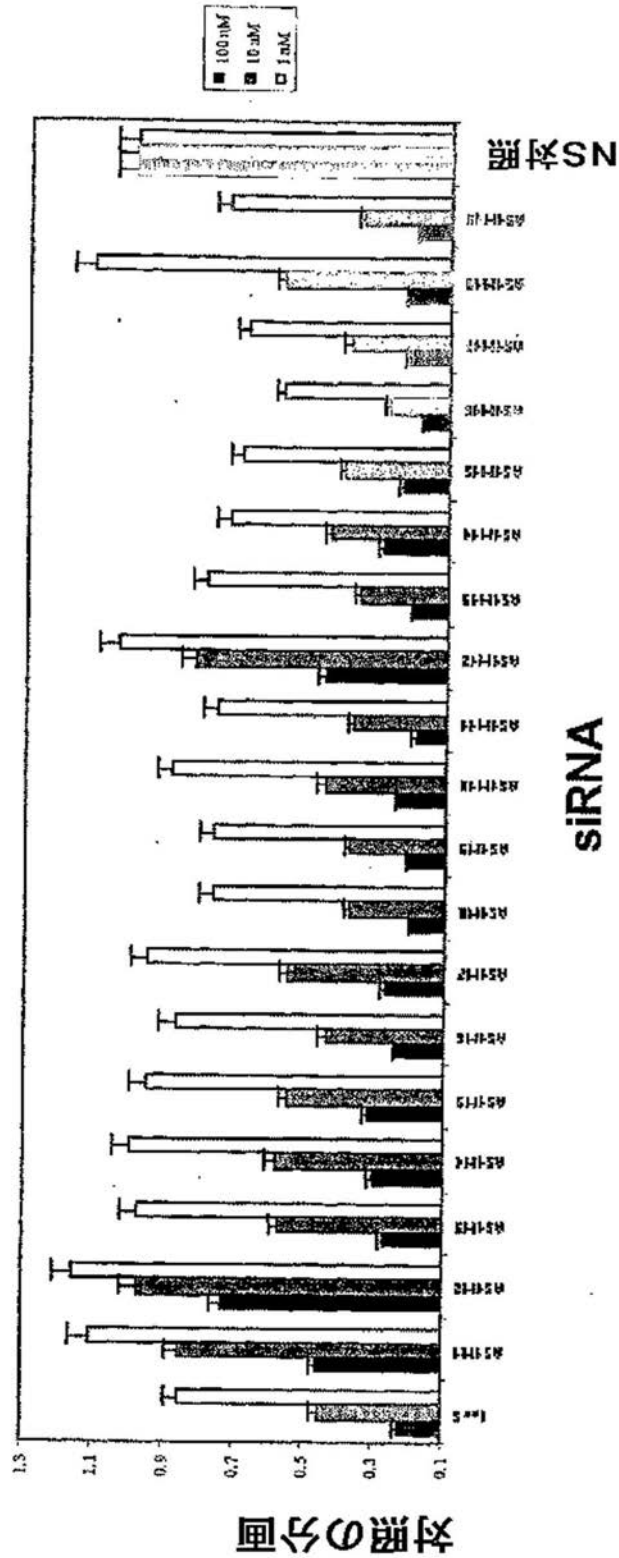


Figure 26: 修飾干渉スクリーニング: アンチセンス鎖での2'-O-メチル

【図 27】

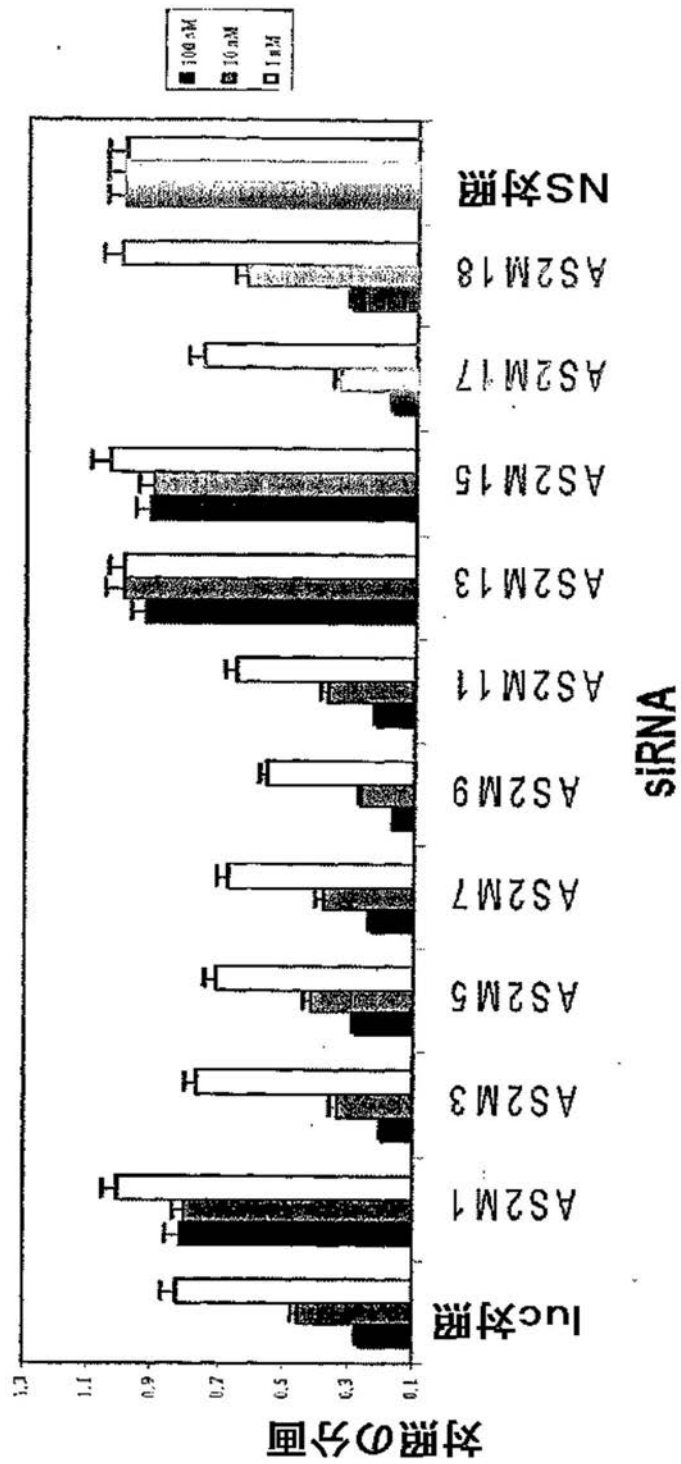


Figure 27: 修飾干渉スクリーニング: アンチセンス鎖での2つの2'-O-メチルの阻害

【図 28】

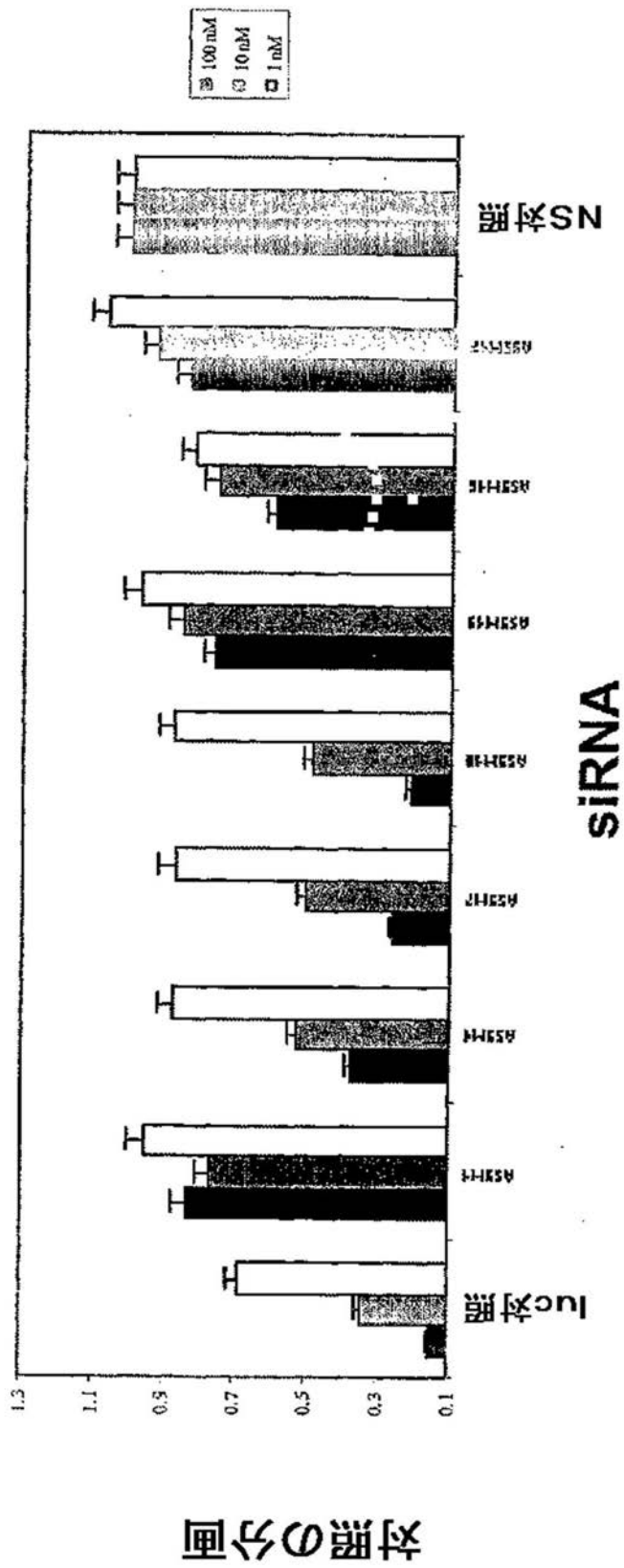


Figure 28: 修飾干渉スクリーニング: アンチセンス鎖での3つの2'-O-メチルの阻害

【図 29】

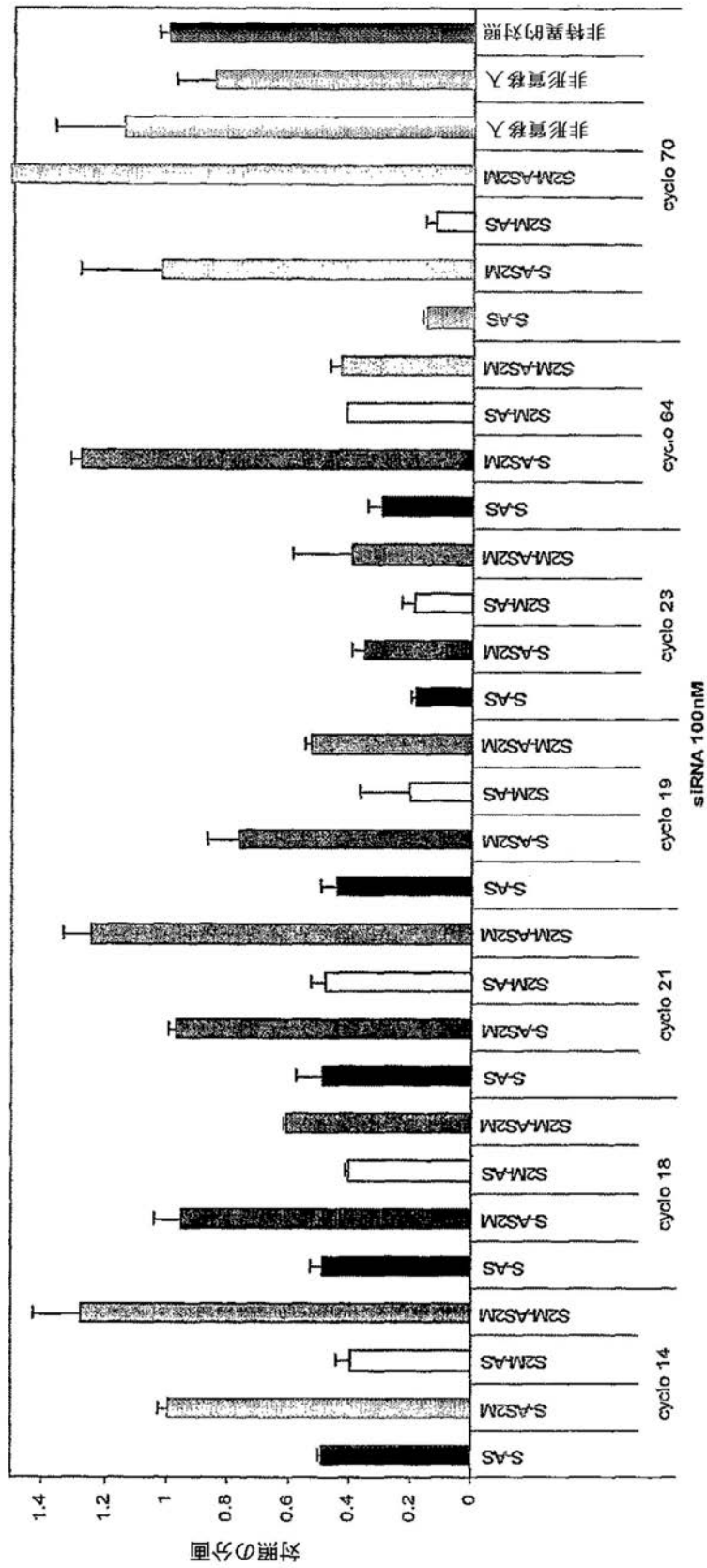


Figure 29: 2'-2' Ome修飾の存在によってもたらされる5' AS鎖による
ヒト・シクロフィリンでの機能性の干渉

【図 30】

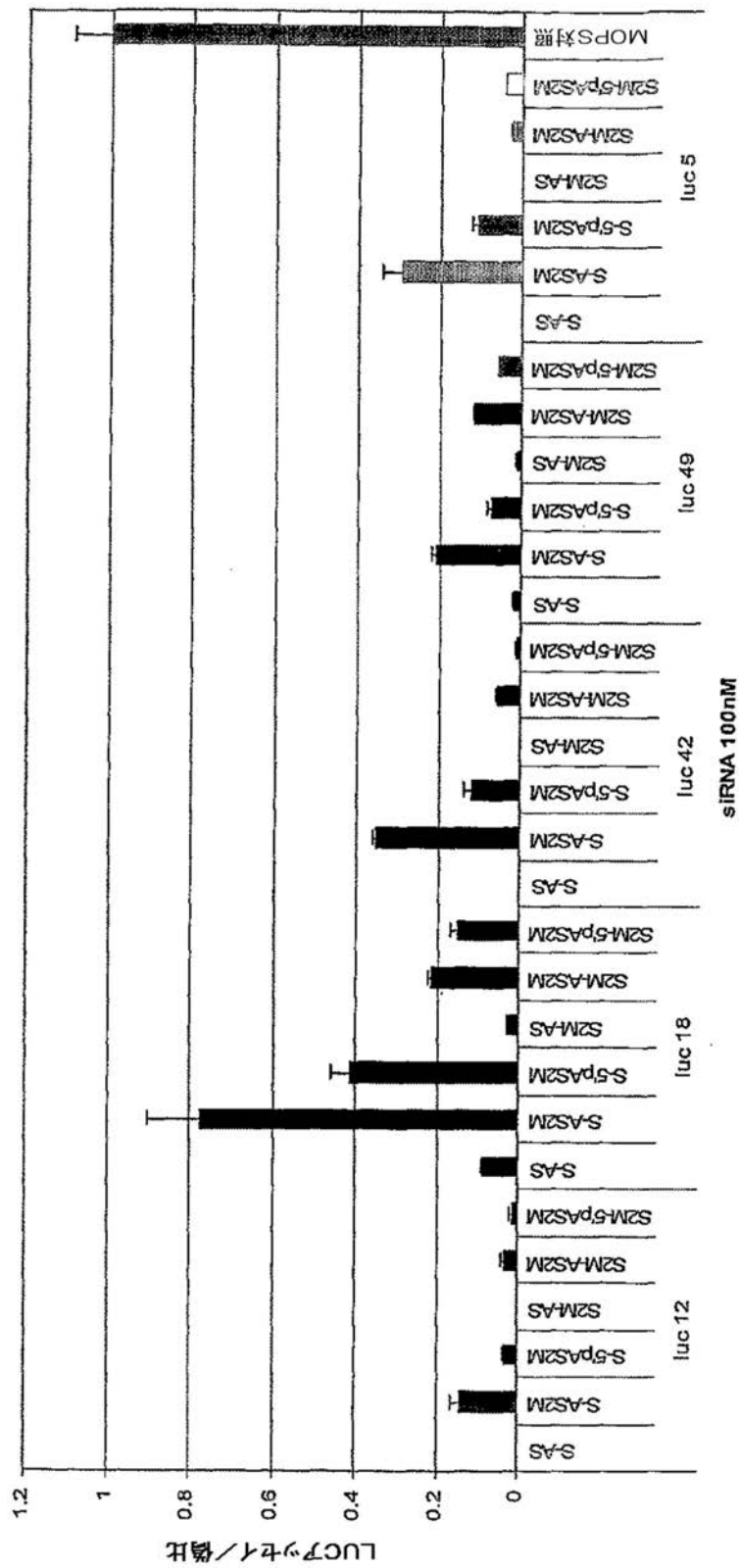


Figure 30:2-2' Ome修飾の存在によってもたらされる5' AS鎖による
293細胞内ホタル・ルシフェラーゼでの機能性の干渉

【図 3 1】

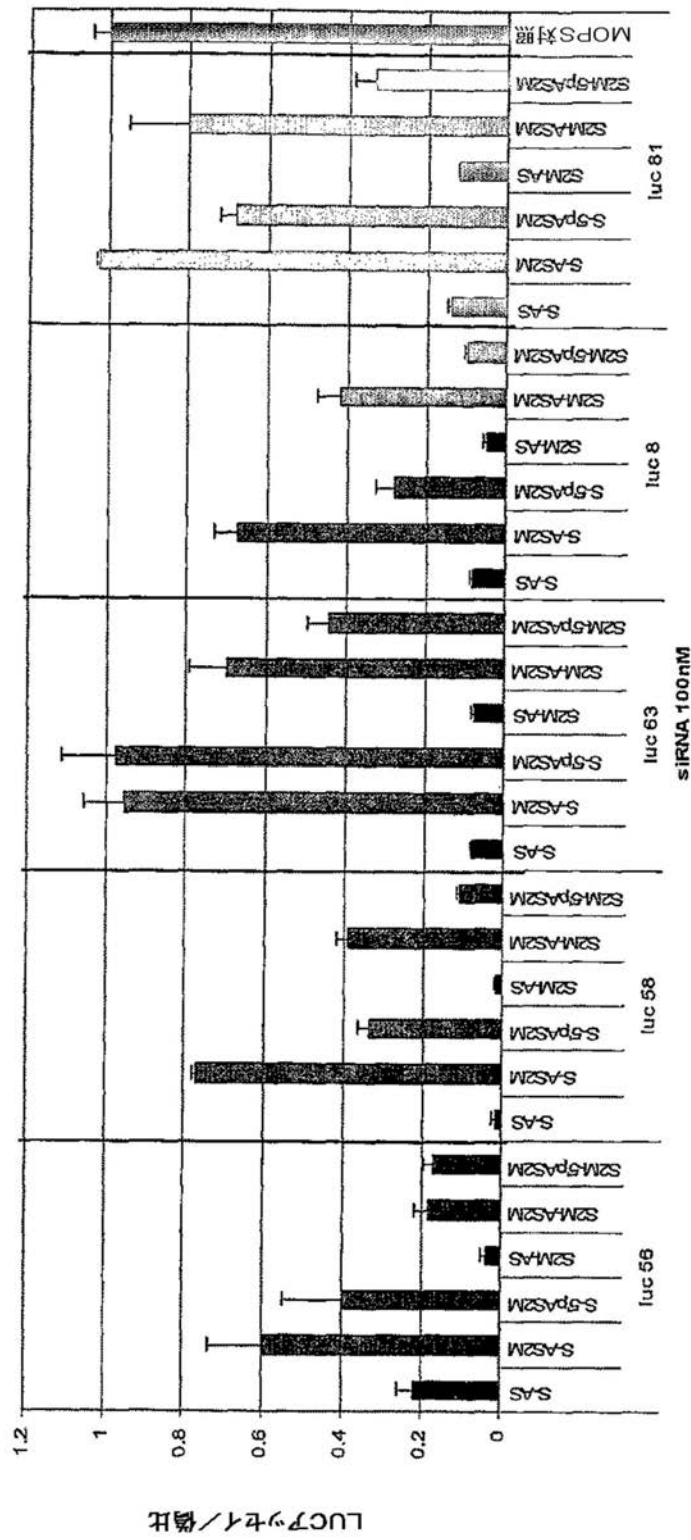


Figure 31: 2'-2' Ome 修飾の存在によってもたらされる 5' AS 鎖による
293 細胞での機能性の干渉

【図 3 2】

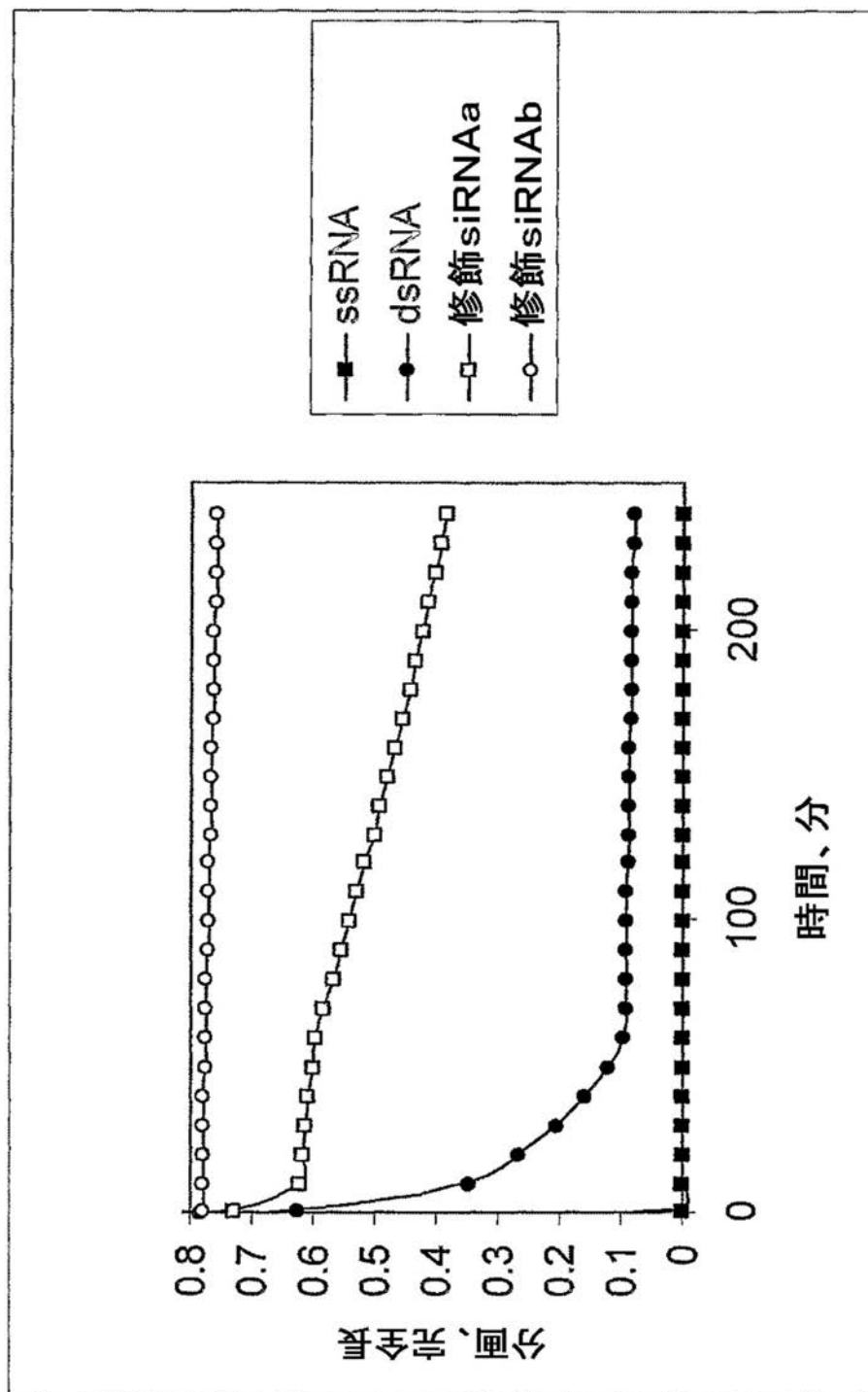


Figure 32: 100%ヒト血清でのsiRNA安定性

【図 33】

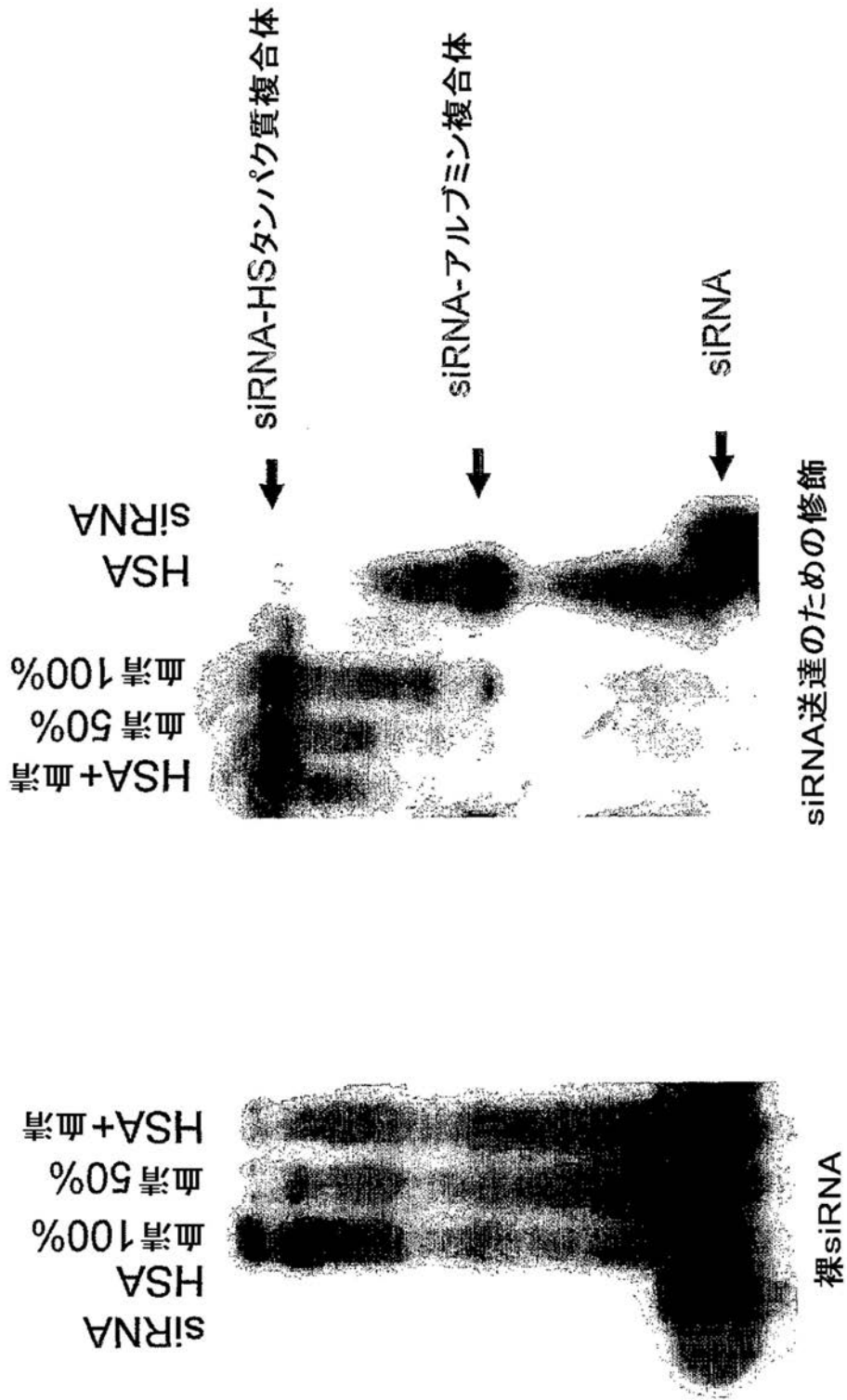


Figure 33: アルブミンおよび他の血清タンパク質に対する siRNA –
 コレステロール・コンジュゲートの親和性の増加

【図 3 4】

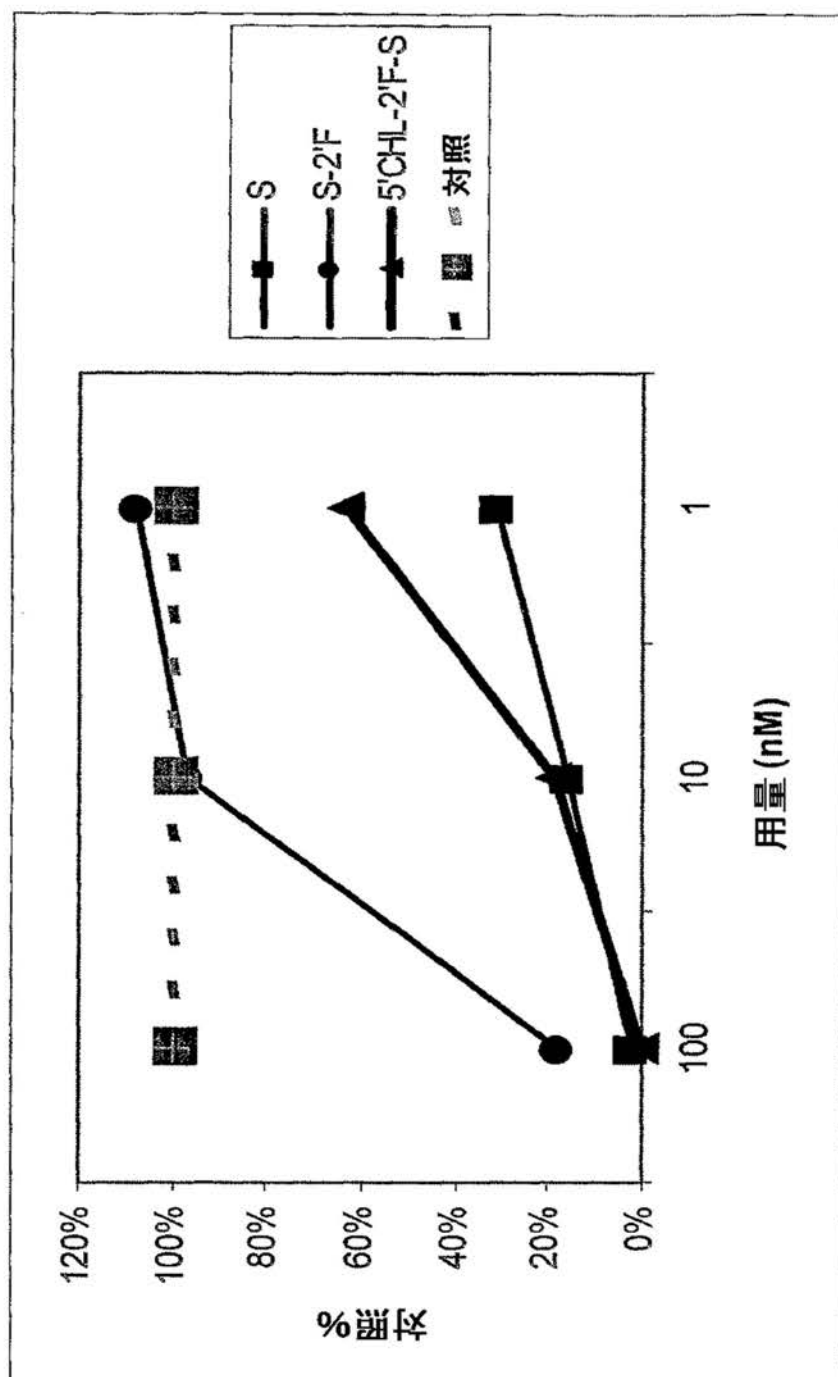


Figure 34: 小分子コンジュゲートによる修飾siRNAの効力を維持および強化

【図 35】

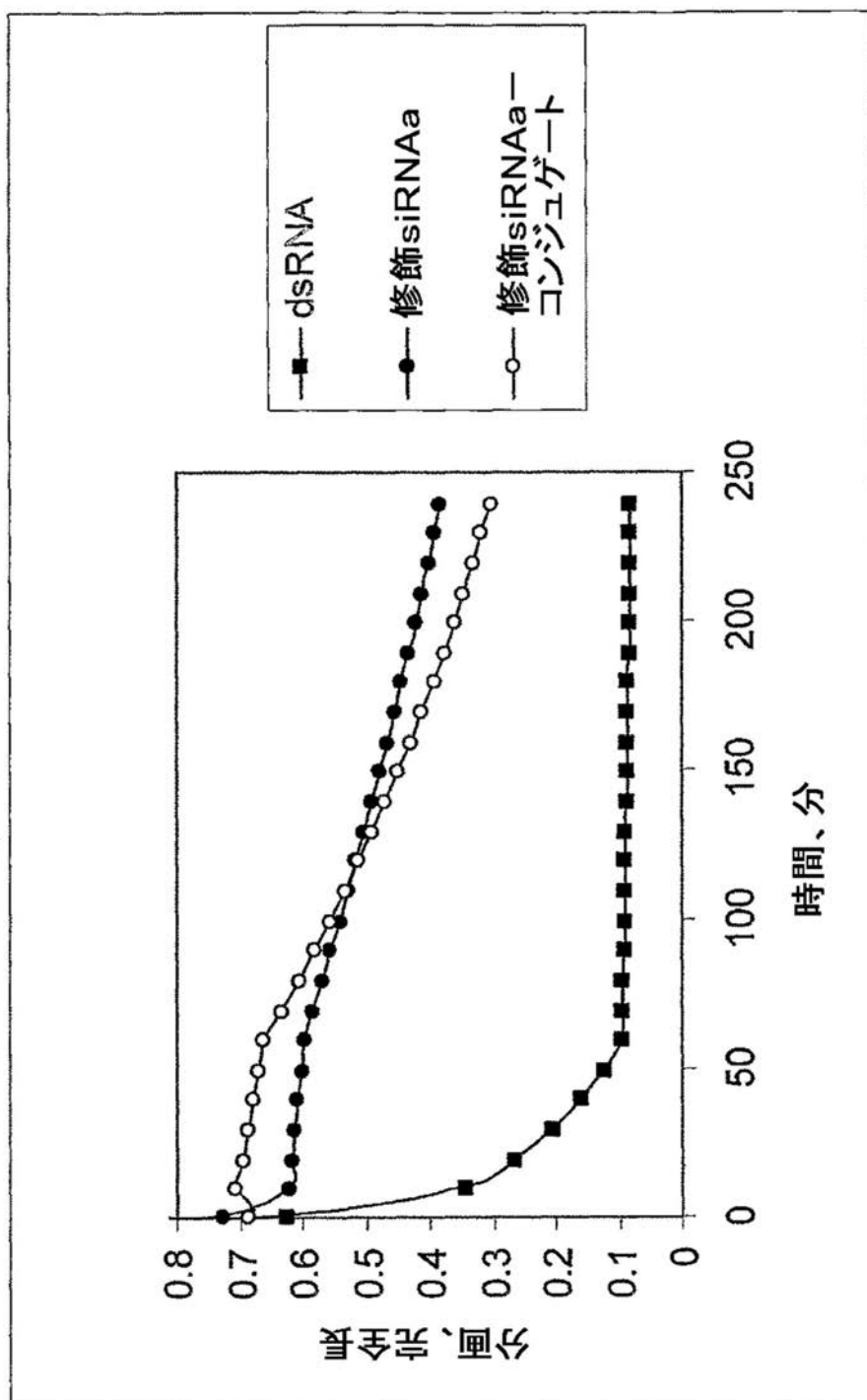


Figure 35: ヒト血清におけるsiRNAコンジュゲートの安定性

【図 3 6】

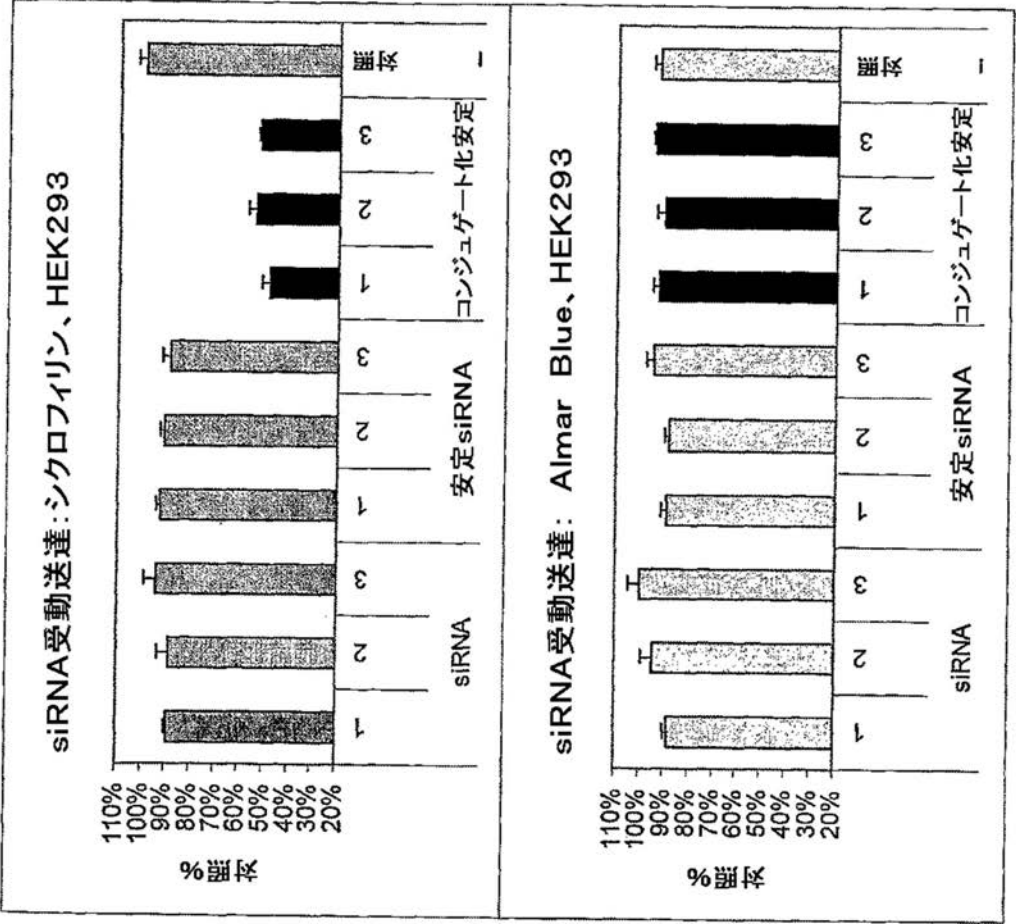


Figure 36: コレステロール・コンジュゲートによって誘導可能な siRNA の取り込み

【図 37】

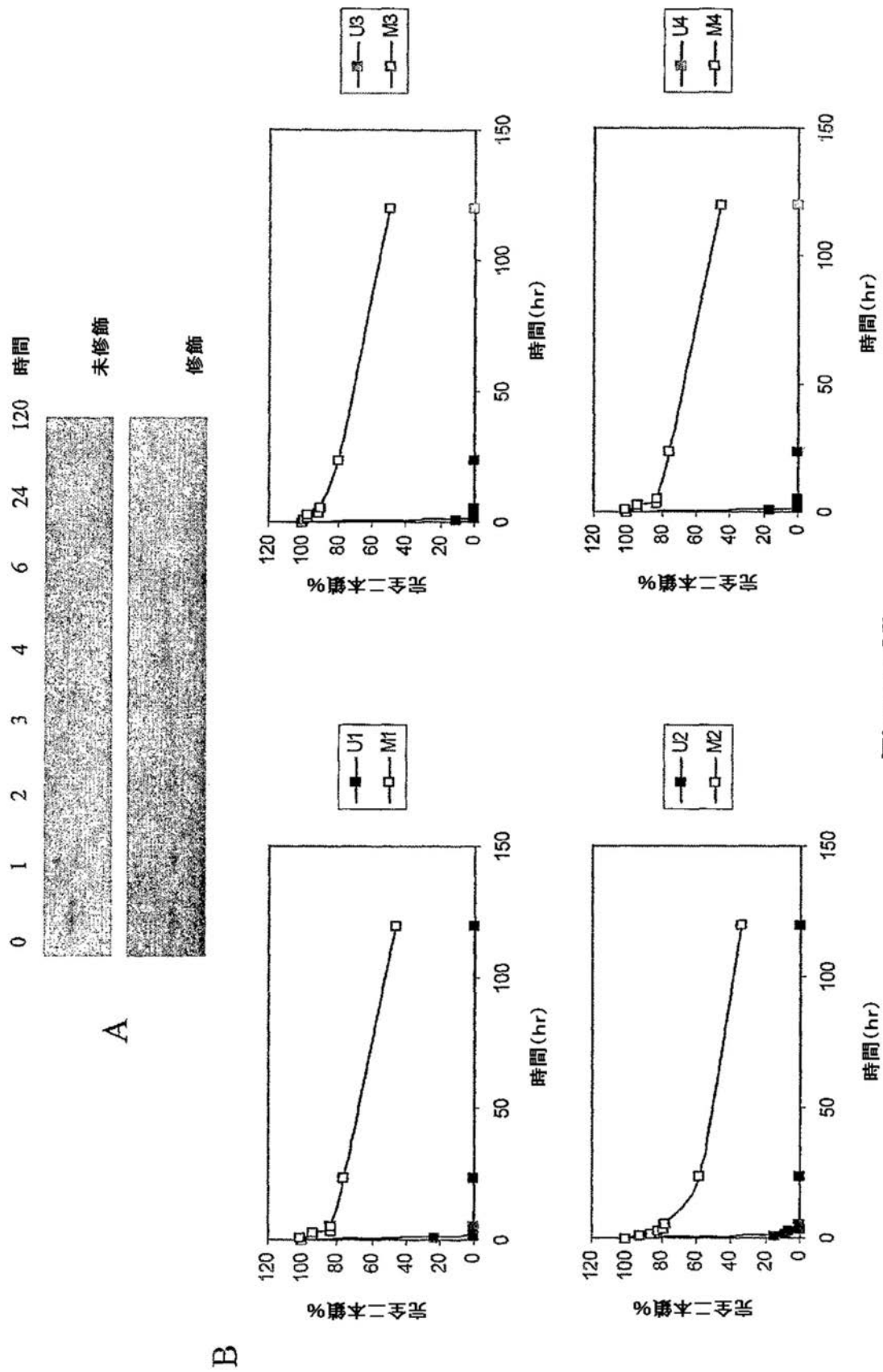


Figure 37

【図 38】

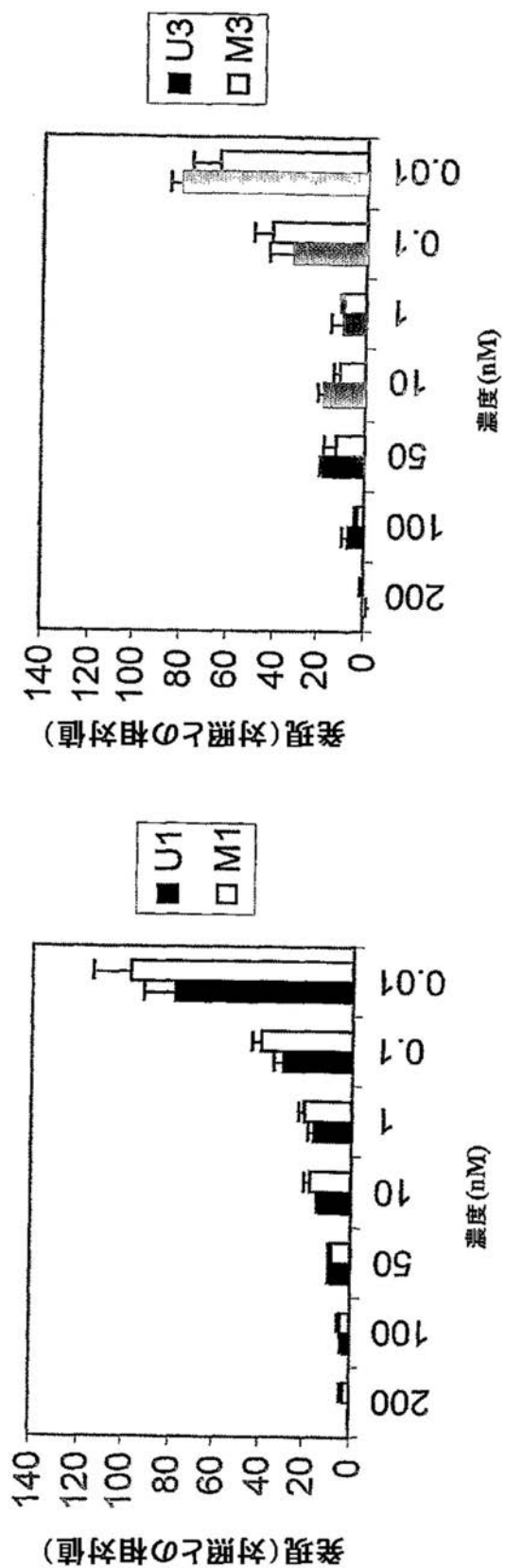


Figure 38

【図 39】

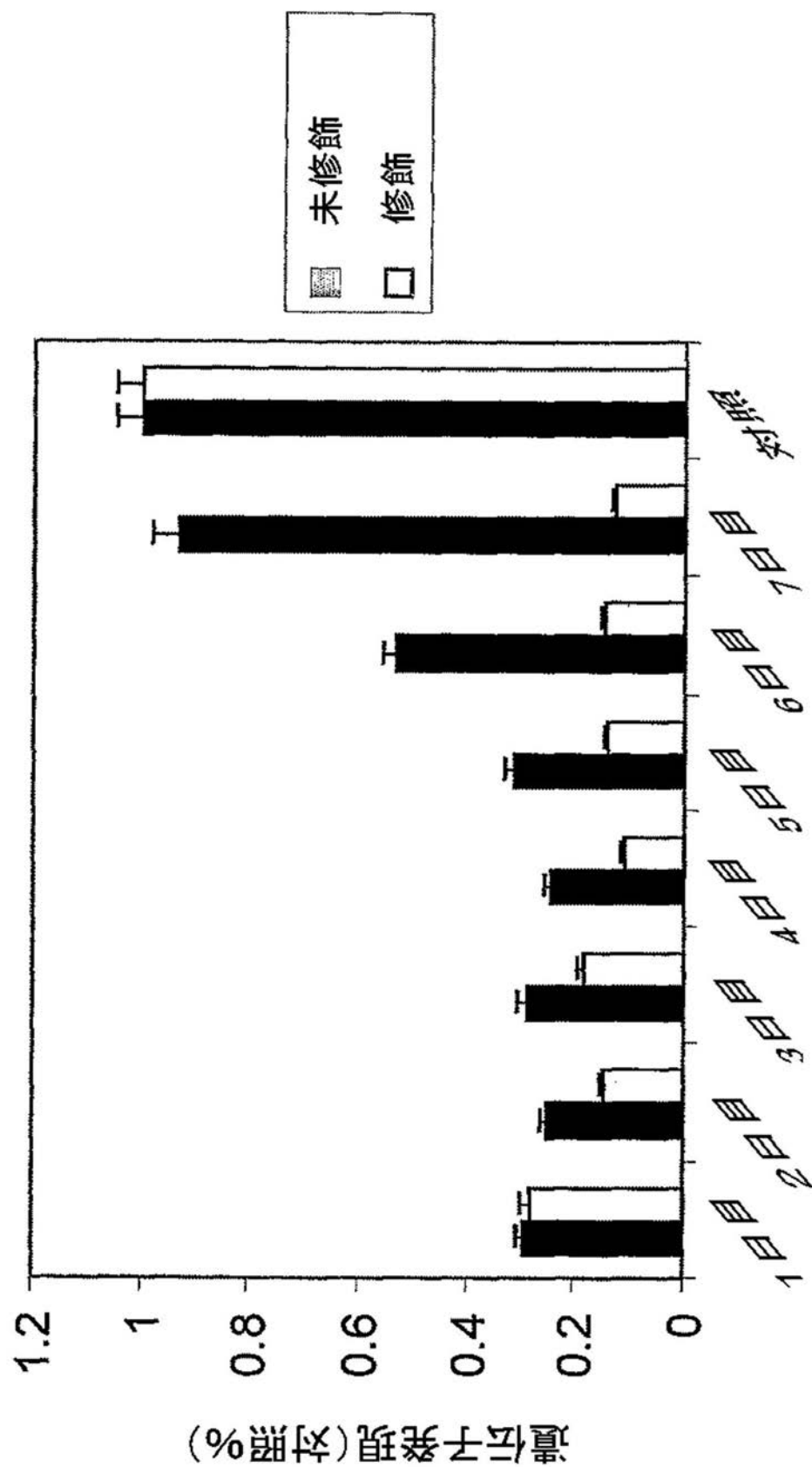


Figure 39

【図 40】

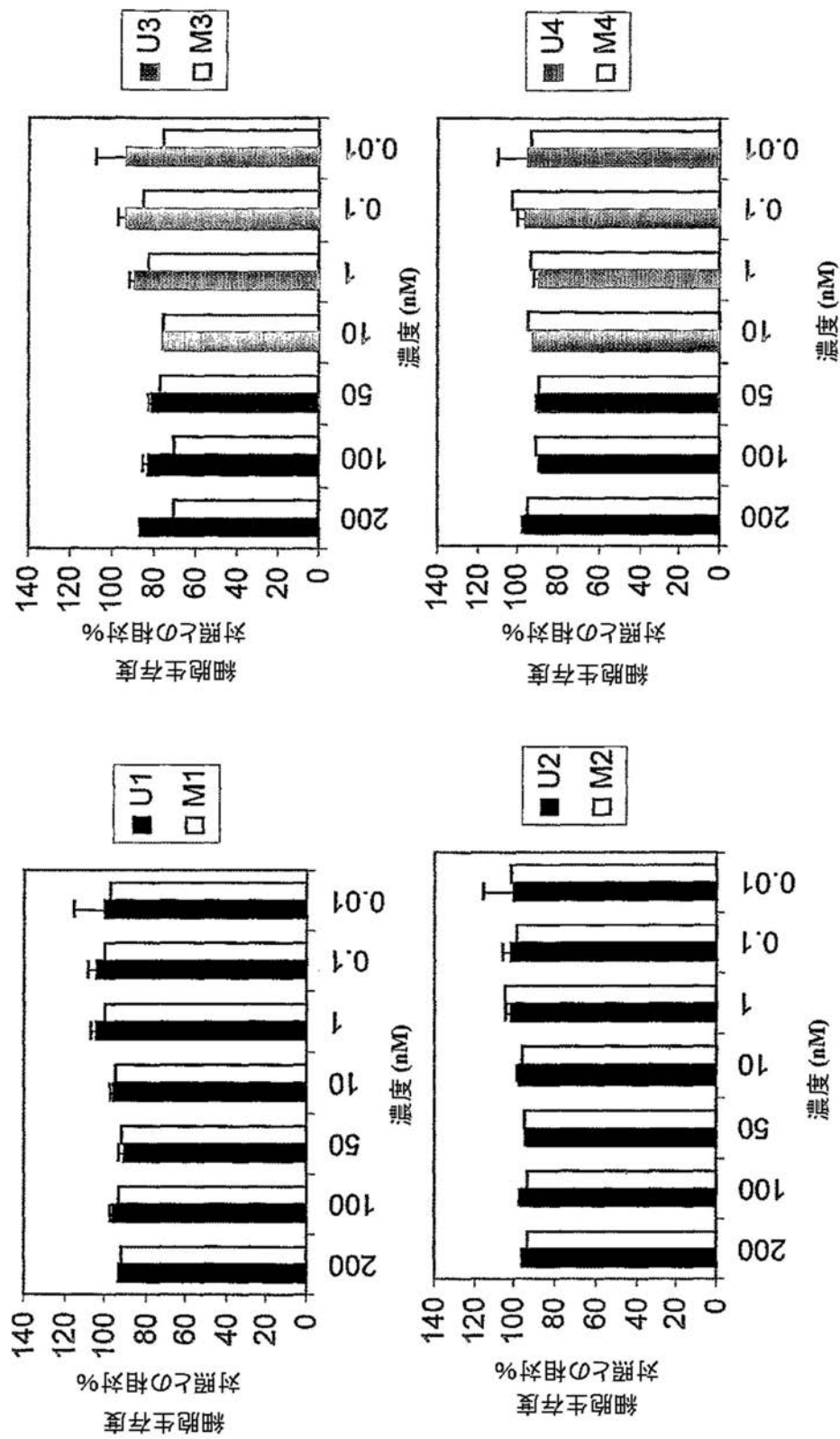


Figure 40

【図 41】

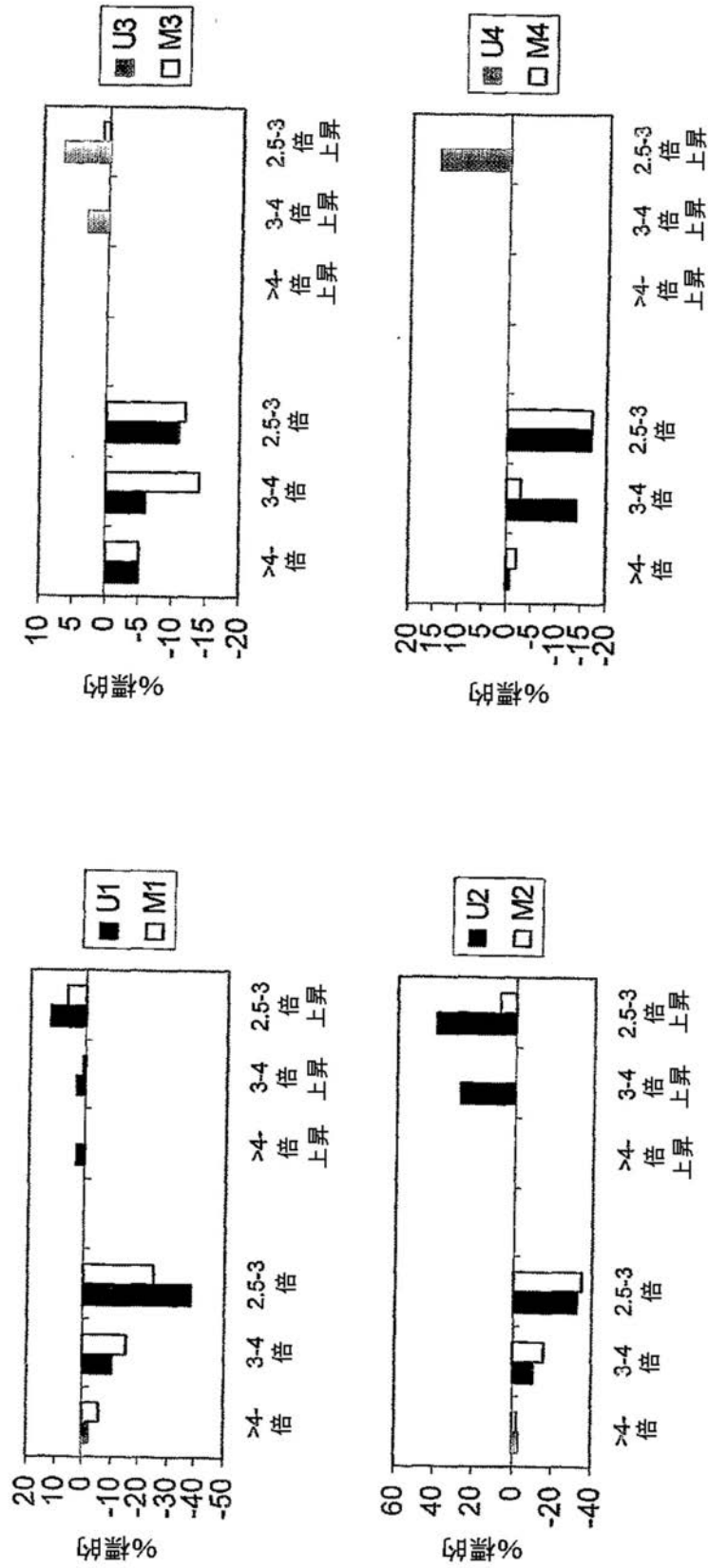


Figure 41

【図 4 2】

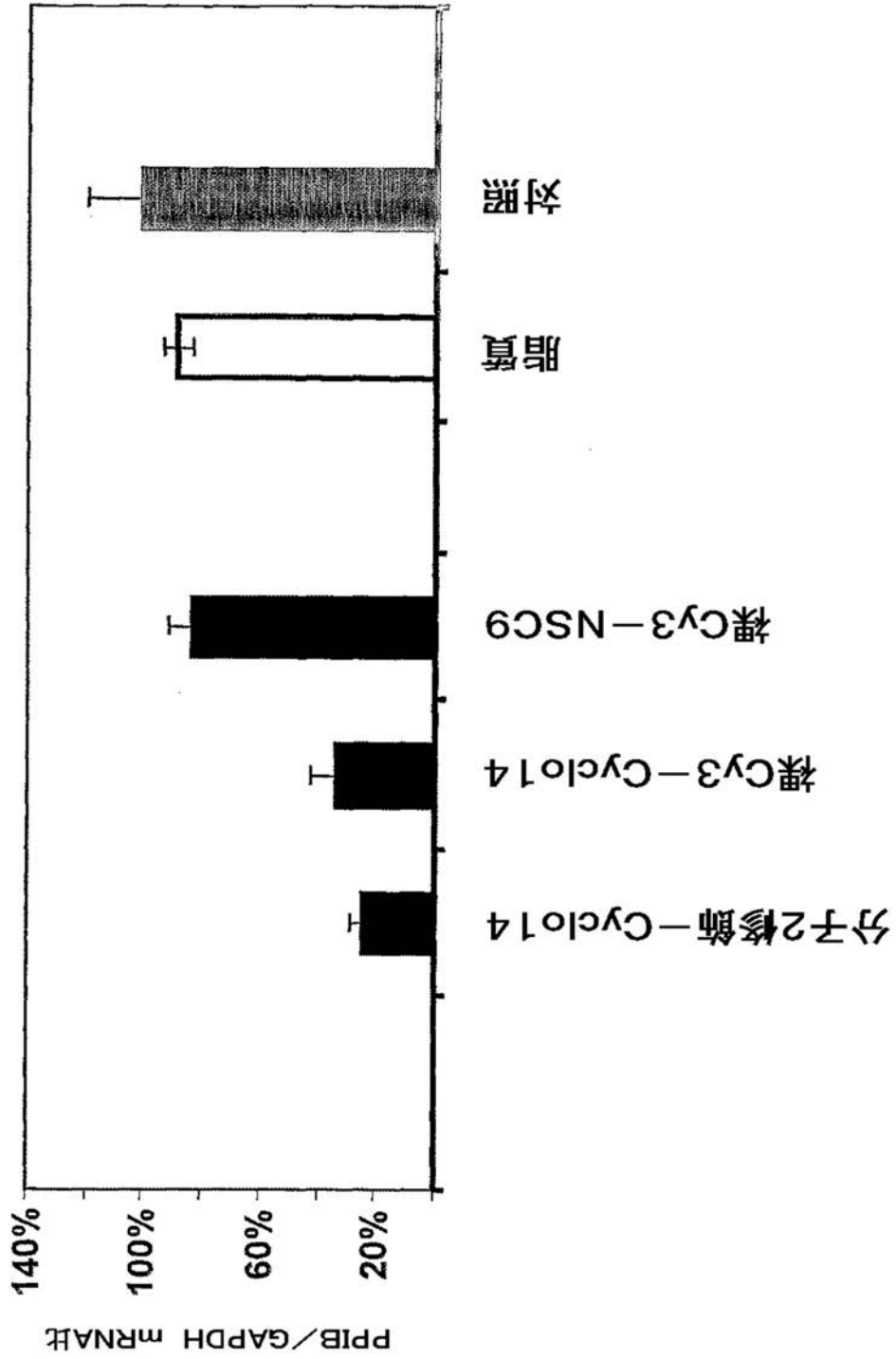


Figure 42

【図 43】

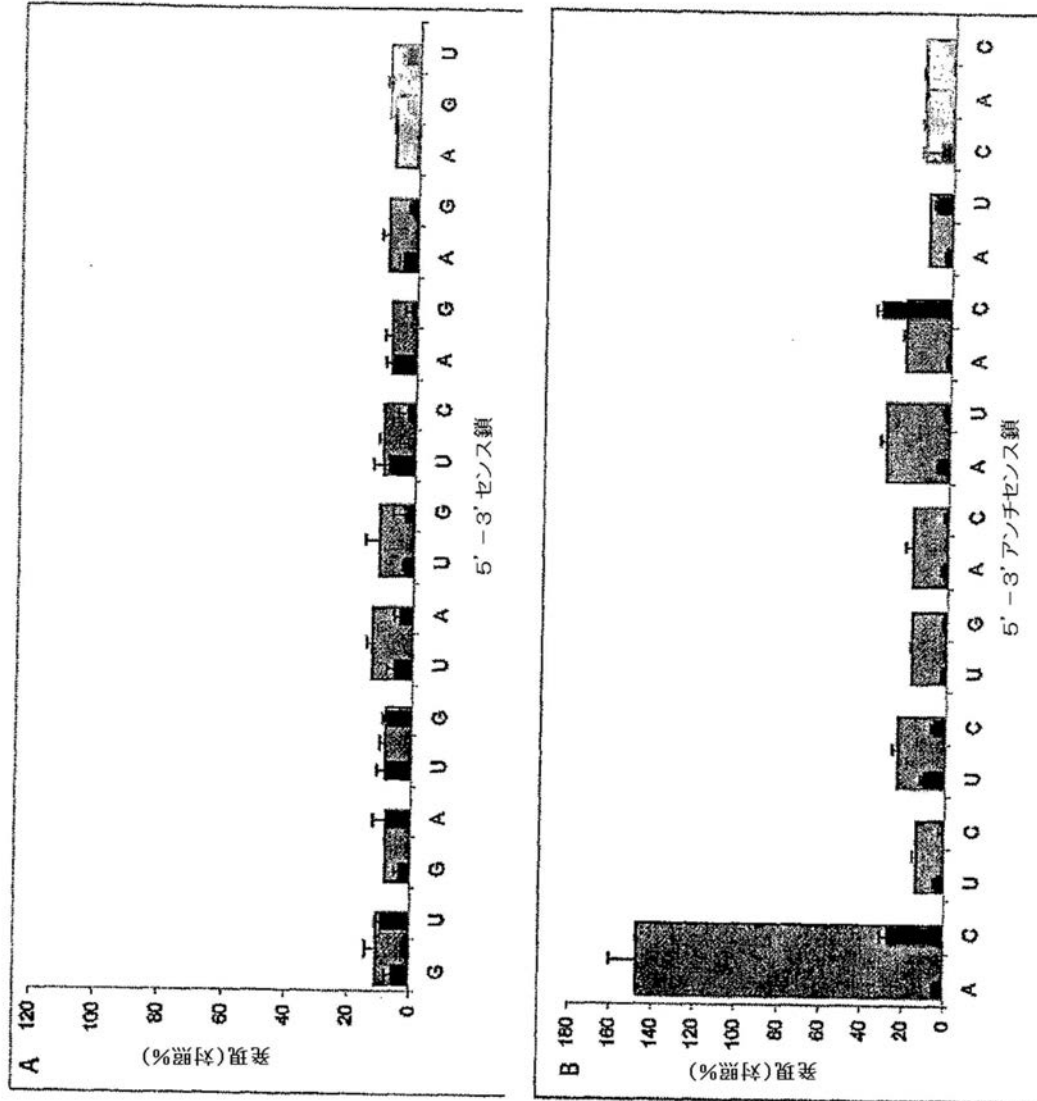


Figure 43

【図 4 4】

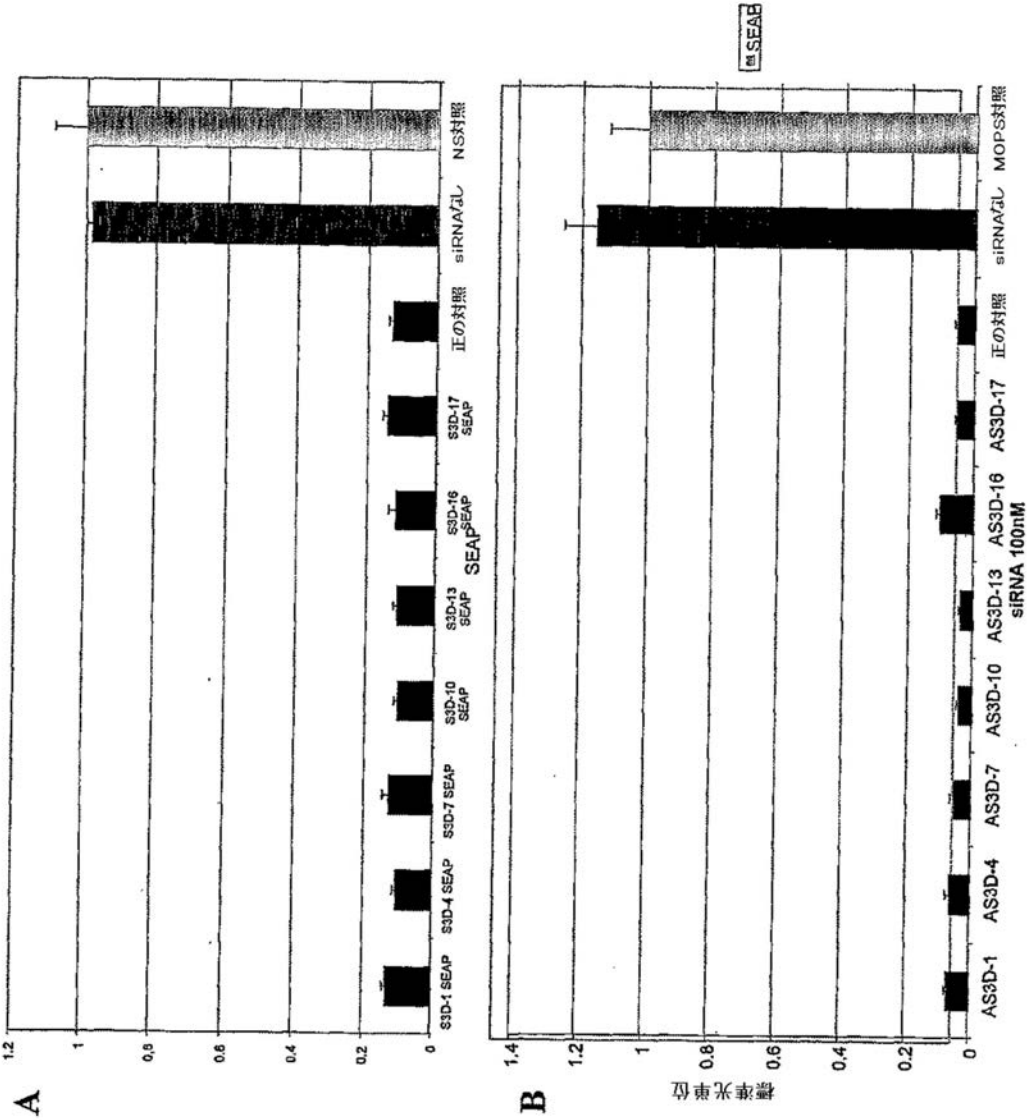


Figure 44

【図 45】

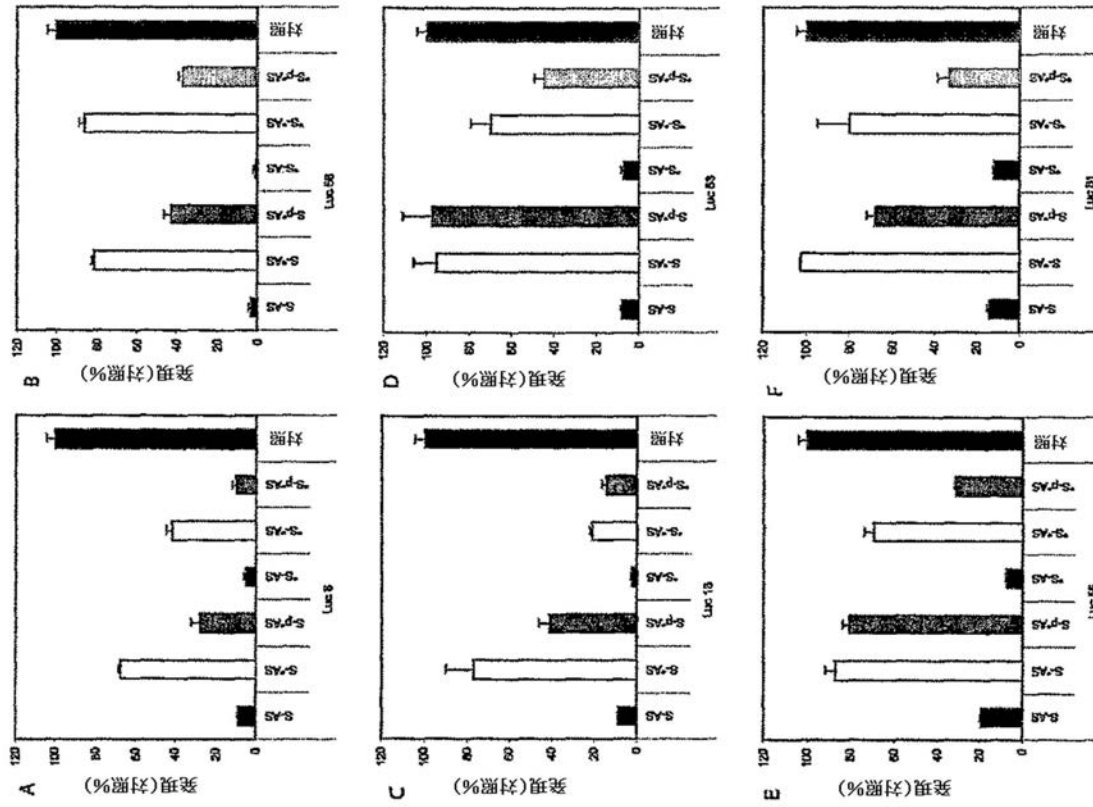


Figure 45

【図 46-1】

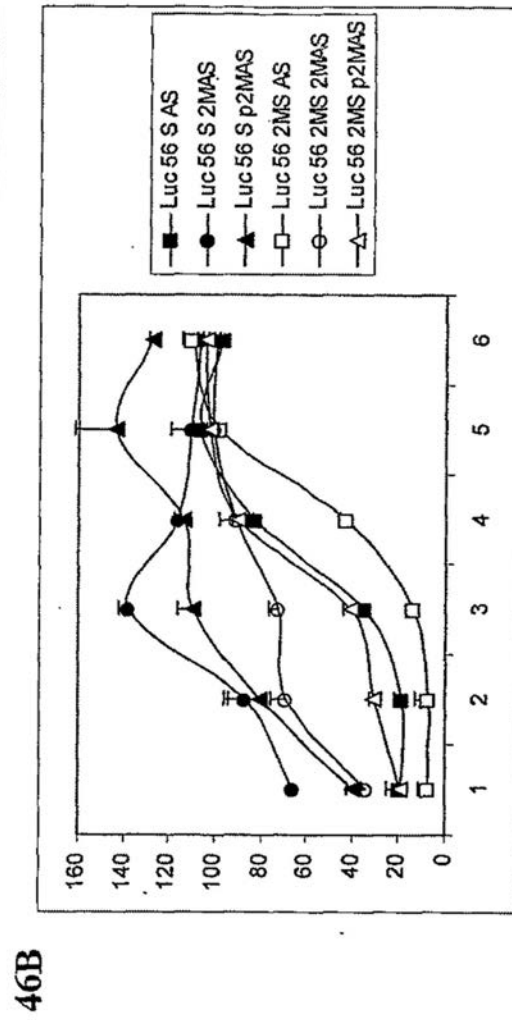
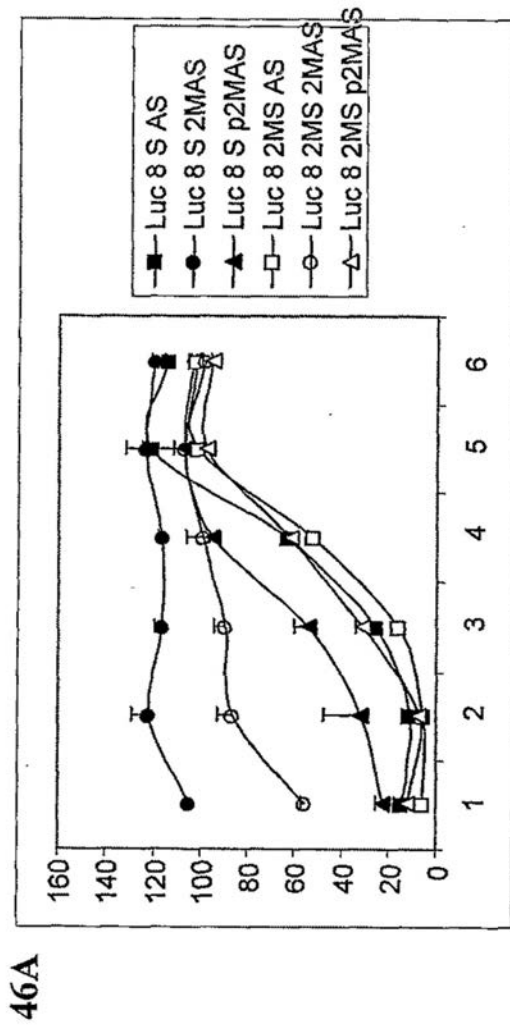


Figure 46A,B

【図 46-2】

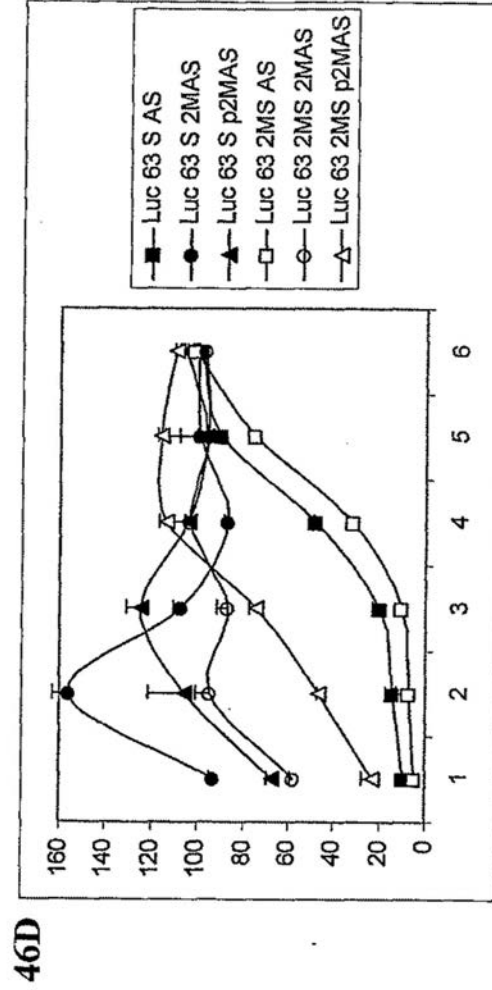
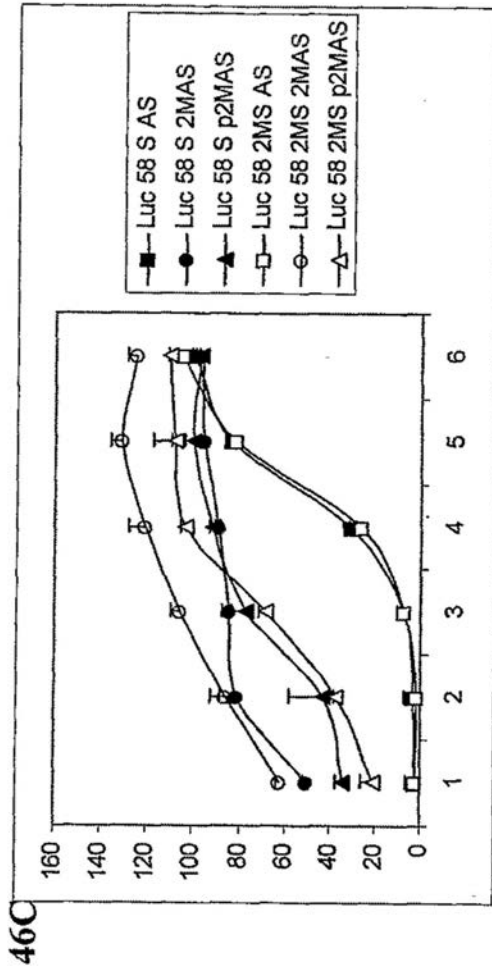


Figure 46C,D

【図 46-3】

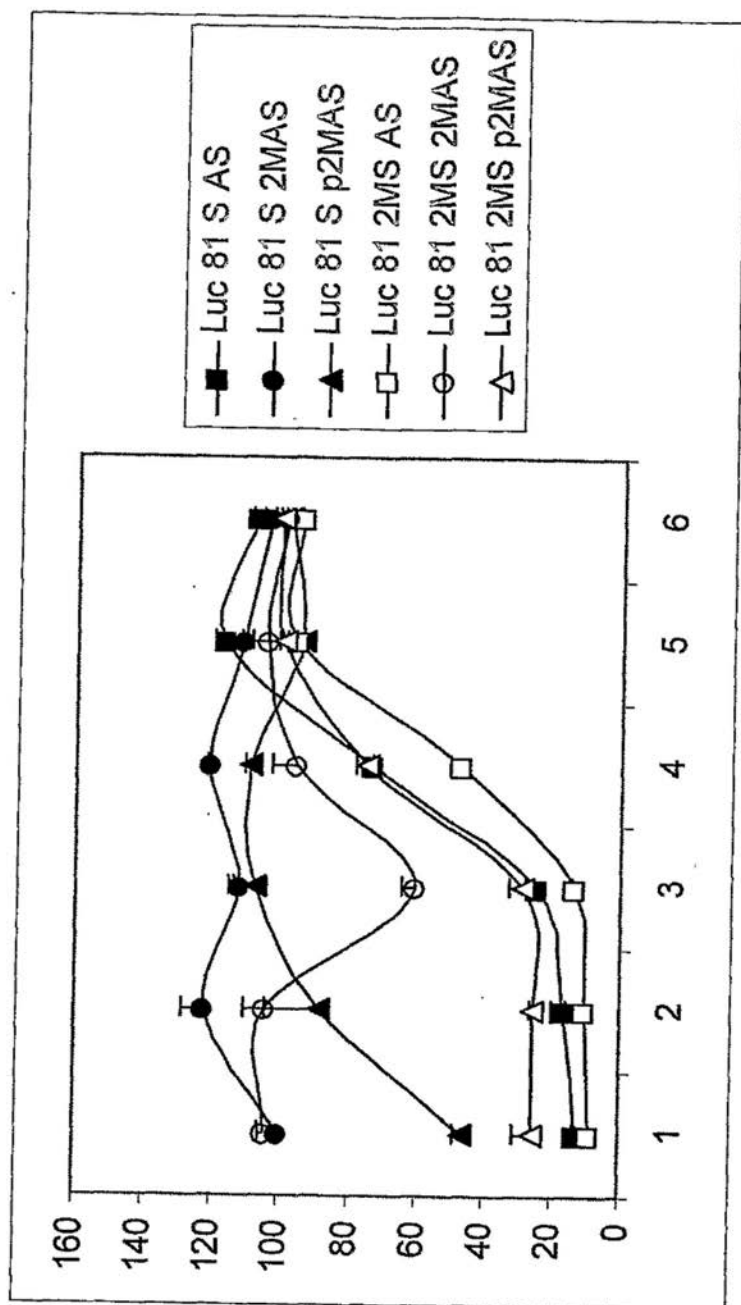


Figure 46E

【図 47】

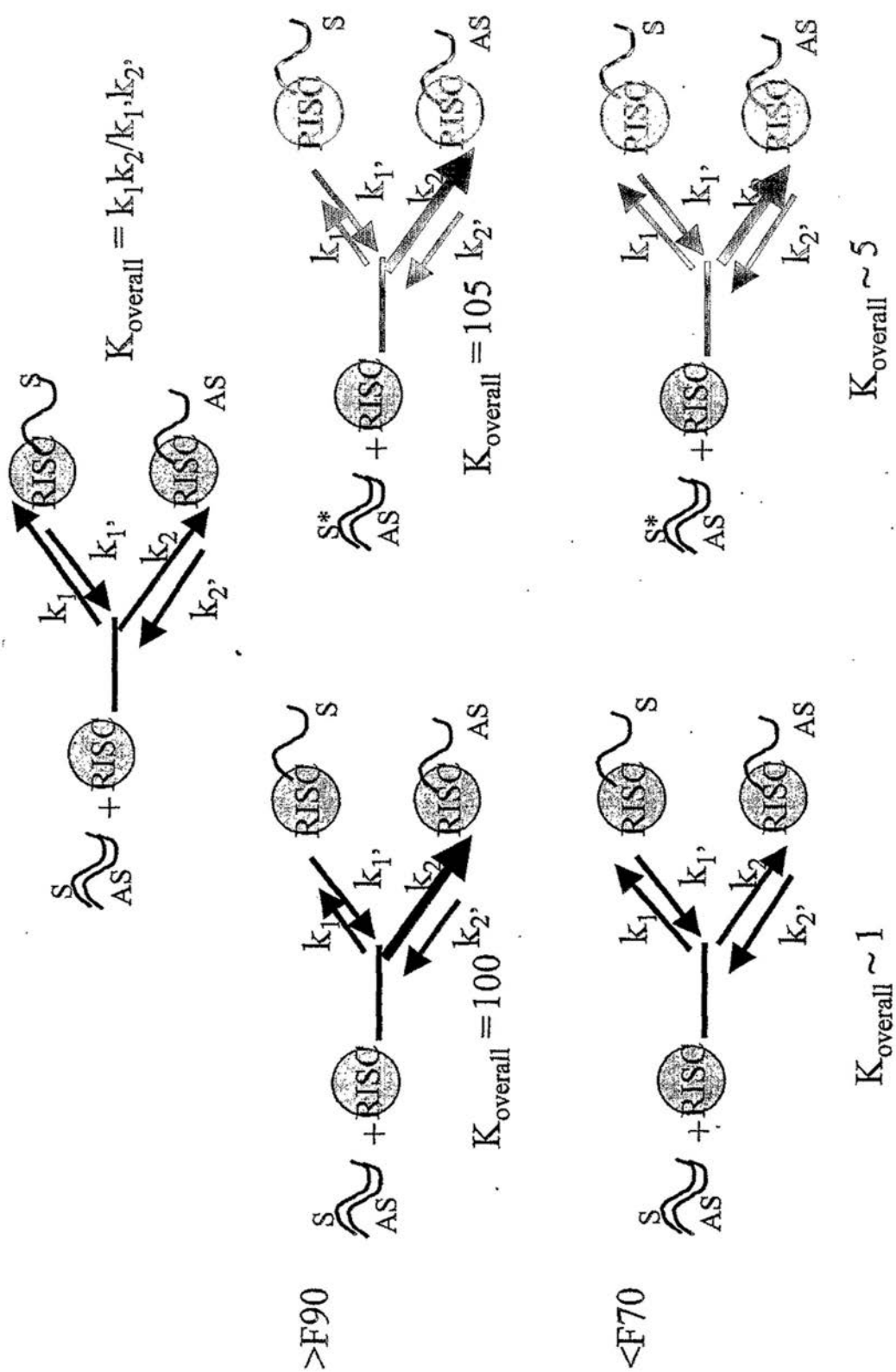


Figure 47

【図 48 A】

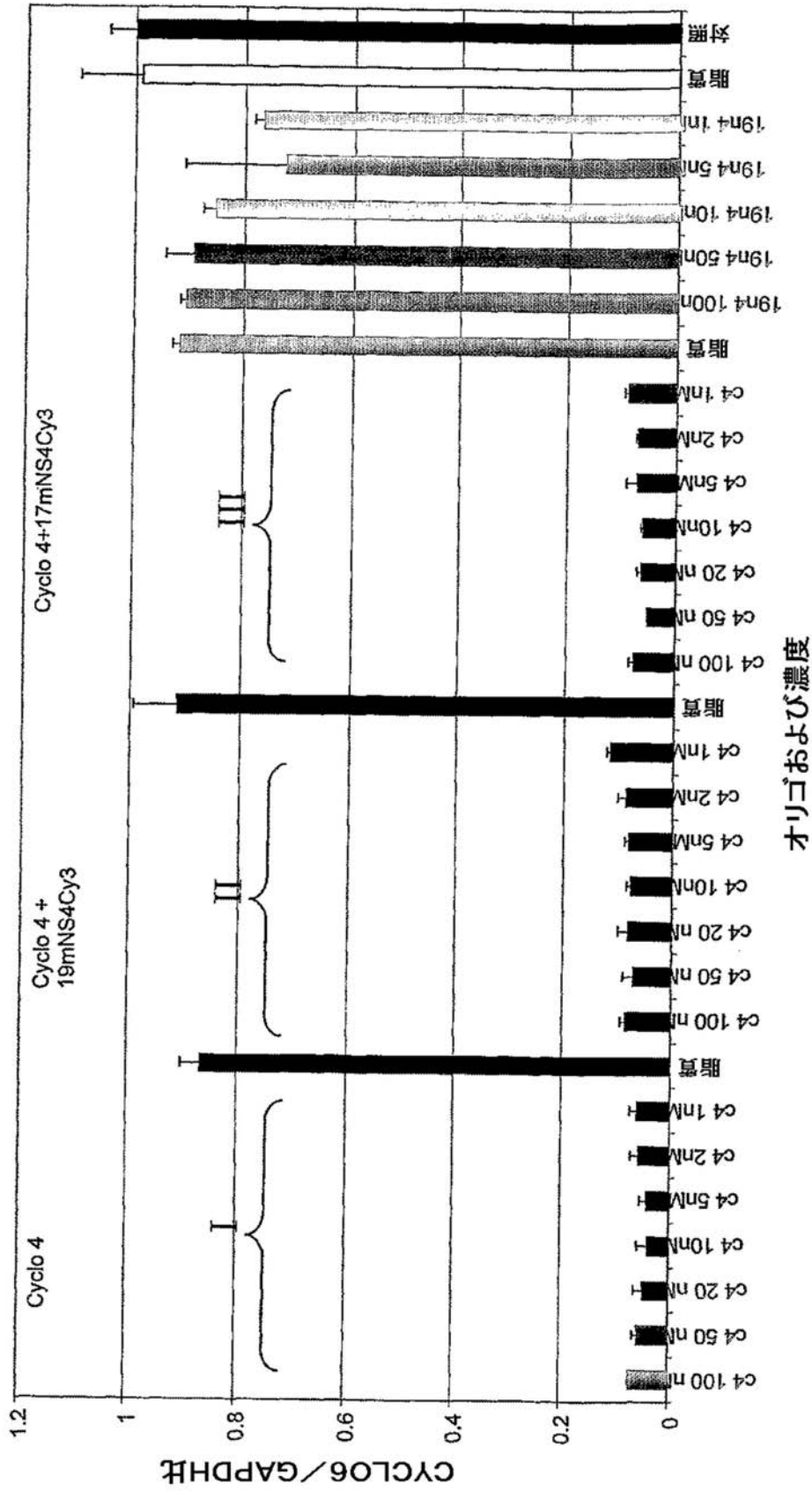


Figure 48A

【図 48 B】

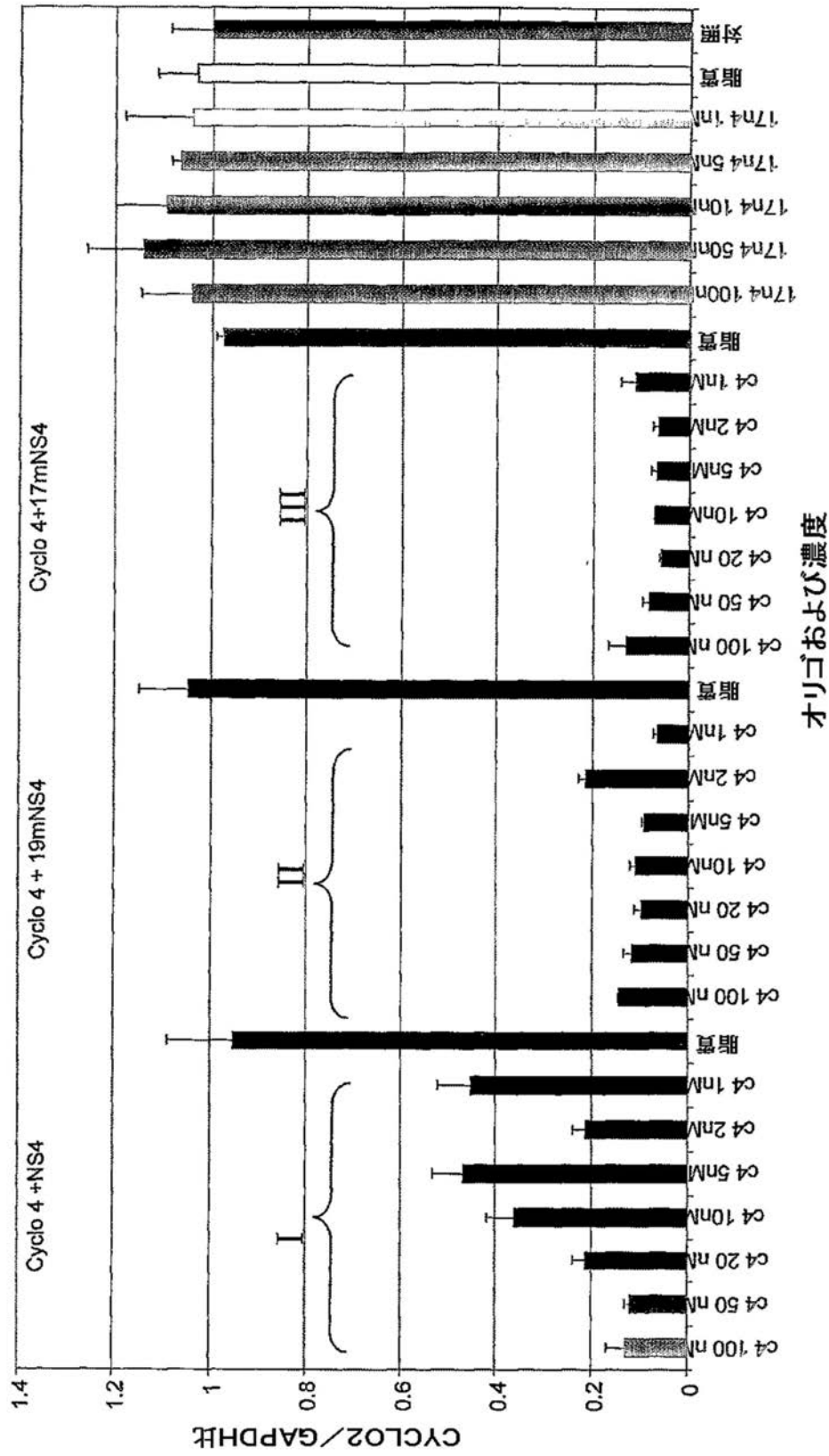


Figure 48B

【図 49】

GAPDH4競合アッセイ

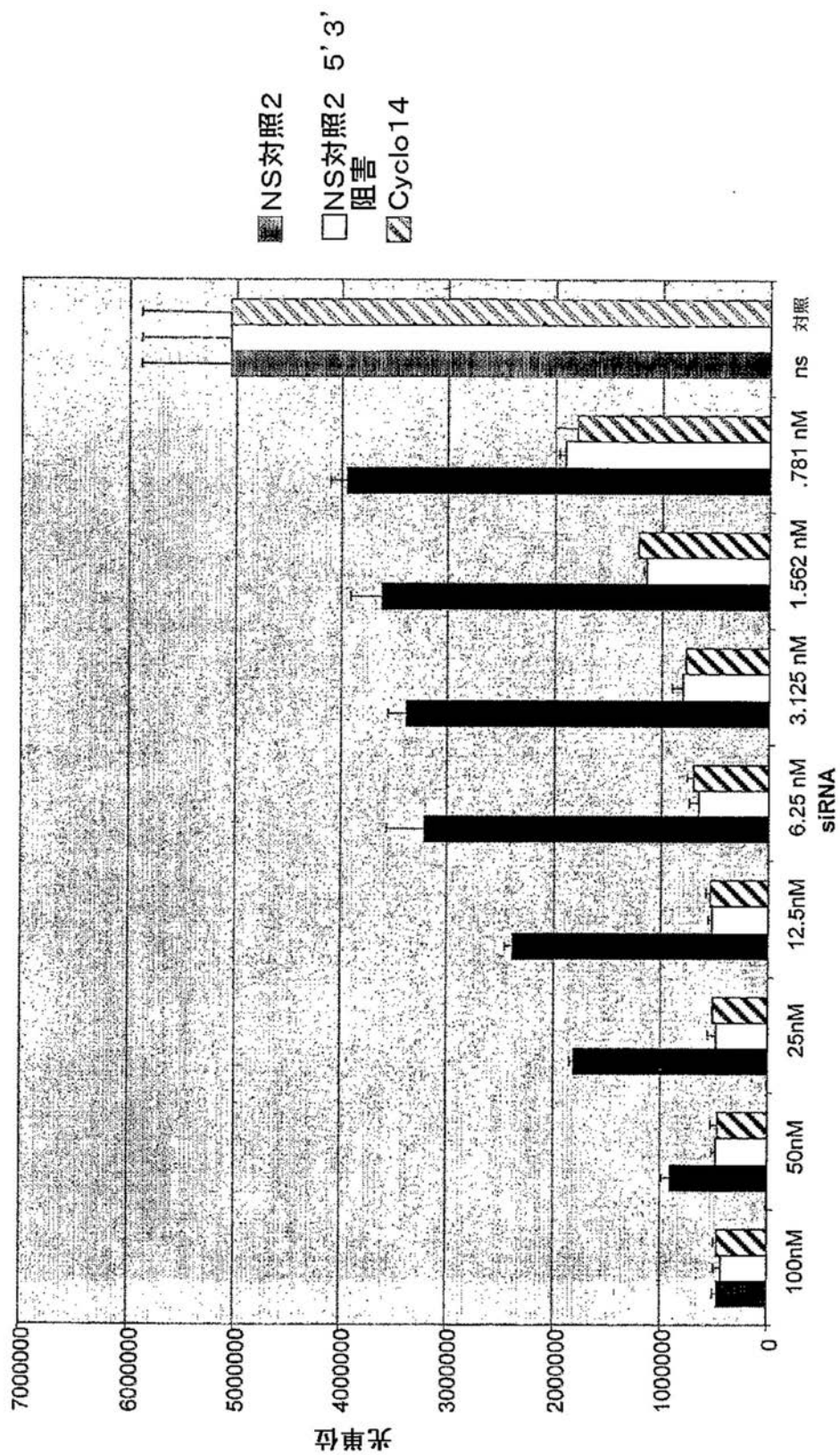


Figure 49

【配列表】

0005468978000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/542,668
(32)優先日 平成16年2月6日(2004.2.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/542,646
(32)優先日 平成16年2月6日(2004.2.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/543,640
(32)優先日 平成16年2月10日(2004.2.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/543,661
(32)優先日 平成16年2月10日(2004.2.10)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (72)発明者 デビン リーク
アメリカ合衆国 コロラド 80222, デンバー, エス. クラメリア ストリート 3050
(72)発明者 アンジェラ レイノルズ
アメリカ合衆国 コロラド 80433, コニファー, コニファー リッジ ドライブ 11445
(72)発明者 アンジェラ フボロバ
アメリカ合衆国 コロラド 80305, ボールダー, スクイレス サークル 4550
(72)発明者 ウィリアム マーシャル
アメリカ合衆国 コロラド 80303, ボールダー, モハウク ドライブ 495
(72)発明者 ユリー フェドロブ
アメリカ合衆国 コロラド 80027, スペリアー, アンドリュー ドライブ 2405
(72)発明者 キンバーリー ニコルス
アメリカ合衆国 コロラド 80027, ルイスビル, エステイー. アンドリューズ レーン 751

審査官 西村 亜希子

- (56)参考文献 国際公開第2002/044321 (WO, A1)
国際公開第2003/012052 (WO, A1)
国際公開第2004/015107 (WO, A1)
Nucleic Acids Res., 2003年, Vol.31, No.9, pp.2401-2407
Nucleic Acids Res., 2003年 6月 1日, Vol.31, No.11, pp.2705-2716
EMBO J., 2001年, Vol.20, No.23, pp.6877-6888
Nucleic Acids Res., 2002年, Vol.30, No.8, pp.1757-1766
Mol. Cell., 2000年, Vol.6, No.5, pp.1077-1087
Mol. Cell., 2002年, Vol.10, No.3, pp.549-561
Chem. Biol., 1994年, Vol.1, No.1, pp.39-45
Curr. Biol., 2001年, Vol.11, No.22, pp.1776-1780
Nucleic Acids Res., 2003年, Vol.31, No.2, pp.589-595
Cell, 2001年, Vol.107, No.3, pp.309-321

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/113
C12N 15/00

A61K 31/713

A61P 35/00

C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)