

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成20年5月8日 (2008.5.8)

【公表番号】特表2007-529224(P2007-529224A)

【公表日】平成19年10月25日 (2007.10.25)

【年通号数】公開・登録公報2007-041

【出願番号】特願2007-504009(P2007-504009)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 1/00 (2006.01)

A 6 1 P 1/02 (2006.01)

A 6 1 P 1/16 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 5/14 (2006.01)

A 6 1 P 7/04 (2006.01)

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/06 (2006.01)

A 6 1 P 15/02 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/16 (2006.01)

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 21/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/08 (2006.01)

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/08 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 1/00

A 6 1 P 1/02

A 6 1 P 1/16

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 5/14

A 6 1 P 7/04

A 6 1 P 7/06

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 11/06

A 6 1 P 15/02

A 6 1 P 25/00  
A 6 1 P 25/02  
A 6 1 P 27/02  
A 6 1 P 27/16  
A 6 1 P 29/00 1 0 1  
A 6 1 P 19/02  
A 6 1 P 21/04  
A 6 1 P 31/08  
A 6 1 P 31/14  
A 6 1 P 37/02  
A 6 1 P 37/06  
A 6 1 P 37/08

【手続補正書】

【提出日】平成20年3月17日(2008.3.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5'末端及び3'末端を有する第1のオリゴクレオチド鎖並びに5'末端及び3'末端を有する第2のオリゴクレオチド鎖を含む単離された二本鎖核酸であって、前記第1のオリゴクレオチド鎖は少なくとも25ヌクレオチドを含み、かつ、生物学的条件で前記第2のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができ、並びに、前記第2のオリゴクレオチドは25～30ヌクレオチドからなり、前記第2のオリゴヌクレオチドの5'末端で第1のヌクレオチド(位置1)が始まる場合、位置1及び/又は2は前記第1のオリゴクレオチド鎖の対になったヌクレオチド残基とミスマッチを形成し、並びに、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖は、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも19ヌクレオチド長で標的RNAと十分に相補的で、前記二本鎖核酸を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させ、前記の鎖の少なくとも1及び好ましくは共に5'-リン酸基を含み、並びに、好ましくは、前記第1の鎖の5'末端及び前記第2の鎖の3'末端は平滑末端を形成している、前記二本鎖核酸。

【請求項 2】

5'末端及び3'末端を有する第1のオリゴクレオチド鎖並びに5'末端及び3'末端を有する第2のオリゴクレオチド鎖を含む単離された二本鎖核酸であって、前記第1のオリゴクレオチド鎖は25～30ヌクレオチドからなり、かつ、生物学的条件で前記第2のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができ、並びに、前記第1のオリゴヌクレオチドの3'末端で第1のヌクレオチド(位置1)が始まる場合、位置1及び/又は2は前記第2のオリゴクレオチド鎖の対になったヌクレオチド残基とミスマッチを形成し、並びに、前記第2のオリゴクレオチド鎖は少なくとも25ヌクレオチドを含み、かつ、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも19ヌクレオチド長で標的RNAと十分に相補的で、前記二本鎖核酸を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させ、前記の鎖の少なくとも1又は好ましくは共に5'-リン酸基を含み、並びに、好ましくは、前記第1の鎖の5'末端及び前記第2の鎖の3'末端は平滑末端を形成している、前記二本鎖核酸。

【請求項 3】

5'末端及び3'末端を有する第1のオリゴクレオチド鎖並びに5'末端及び3'末端を有する第2のオリゴクレオチド鎖を含む単離された二本鎖核酸であって、前記第1及び

第2のヌクレオチド鎖が各々リボヌクレオチドを含み、前記第1のオリゴヌクレオチド鎖は少なくとも25ヌクレオチドを含み、かつ、生物学的条件で前記第2のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができ、並びに、前記第2のオリゴヌクレオチドは25～30ヌクレオチドからなり、前記第2のオリゴヌクレオチドの5'末端で第1のヌクレオチド（位置1）が始まる場合、位置1、2及び/又は3は第1のオリゴヌクレオチド鎖の修飾ヌクレオチド残基と塩基対を形成し、前記第2鎖の3'末端は、前記第1鎖よりも1～4個のヌクレオチド長く、前記の鎖の少なくとも1又は好ましくは共に5'-リン酸基を含み、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも19ヌクレオチド長で標的RNAと十分に相補的で、前記二本鎖核酸を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させる、前記二本鎖核酸。

【請求項4】

5'末端及び3'末端を有する第1のオリゴヌクレオチド鎖並びに5'末端及び3'末端を有する第2のオリゴヌクレオチド鎖を含む単離された二本鎖核酸であって、前記第1及び第2のヌクレオチド鎖が各々リボヌクレオチドを含み、前記第1のオリゴヌクレオチド鎖は25～30ヌクレオチドからなり、かつ、生物学的条件で前記第2のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができ、並びに、前記第1のオリゴヌクレオチドの3'末端で第1のヌクレオチド（位置1）が始まる場合、位置1、2及び/又は3は修飾オリゴヌクレオチドと置換され、並びに、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖は少なくとも25ヌクレオチドを含み、かつ、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも19ヌクレオチド長で標的RNAと十分に相補的で、前記二本鎖核酸を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させ、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖の3'末端は、前記第1のオリゴヌクレオチド鎖よりも1～4個のヌクレオチド長く、好ましくは、第2のオリゴヌクレオチド鎖は25～30のヌクレオチドからなり、前記の鎖の少なくとも1又は好ましくは共に5'-リン酸基を含む、前記二本鎖核酸。

【請求項5】

5'末端及び3'末端を有する第1のオリゴヌクレオチド鎖並びに5'末端及び3'末端を有する第2のオリゴヌクレオチド鎖を含む単離された二本鎖核酸であって、前記第1及び第2のヌクレオチド鎖は各々同数のヌクレオチド残基からなり、その長さは25～30ヌクレオチドからなり、前記第1の鎖の3'末端の最後及び最後から2番目の残基及び前記第2の鎖の5'末端の最後及び最後から2番目の残基が1又は2のミスマッチした塩基対を形成し、前記第1の鎖の5'末端及び前記第2の鎖の3'末端が平滑末端を形成し、並びに、第2のオリゴヌクレオチド鎖は、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも19ヌクレオチド長で標的RNAと十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させ、好ましくは少なくとも1又はより好ましくは共に5'-リン酸基を含み、並びに、好ましくは前記第1及び第2の鎖は各々27ヌクレオチドからなる、前記二本鎖核酸。

【請求項6】

5'末端及び3'末端を有する第1のオリゴヌクレオチド鎖並びに5'末端及び3'末端を有する第2のオリゴヌクレオチド鎖を含む単離された二本鎖核酸であって、前記第1及び第2の鎖は各々35又はそれ以下からなり、前記第1の鎖の3'末端の最後及び最後から2番目の残基及び前記第2の鎖の5'末端の最後及び最後から2番目の残基が1又は2のミスマッチした塩基対を形成し、前記第1の鎖の5'末端及び前記第2の鎖の3'末端が平滑末端を形成し、並びに、第2のオリゴヌクレオチド鎖は、前記第2のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも19ヌクレオチド長で標的RNAと十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させ、好ましくは少なくとも1又はより好ましくは共に5'-リン酸基を含む、前記二本鎖核酸。

【請求項7】

二本鎖核酸がインビトロで哺乳類細胞中の標的遺伝子の発現を、少なくとも10%、少なくとも50%及び少なくとも80～90%からなる群から選択される発現量(%)を低下させる、請求項1～6のいずれか1項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 8】**

二本鎖核酸が哺乳類細胞中で内因的に切断されて、長さが 19 ~ 23 の範囲のヌクレオチドである二本鎖核酸を産生し、この二本鎖核酸は標的核酸発現を低下させ、好ましくは前記切断がダイサーにより行われる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 9】**

前記第 1 のオリゴヌクレオチド鎖の 3' 末端で第 1 のヌクレオチド (位置 1) が始まる場合、位置 1、2 及び / 又は 3 は、修飾ヌクレオチド、好ましくはデオキシヌクレオチド、アシクロヌクレオチド又は蛍光ヌクレオチド、より好ましくは前記第 1 のオリゴヌクレオチド鎖の 3' 末端の位置 1 がデオキシリボヌクレオチド又はアシクロヌクレオチドで、並びに、最も好ましくは前記第 1 のオリゴヌクレオチド鎖の 3' 末端の位置 1 がデオキシリボヌクレオチドで、置換される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 10】**

前記第 1 の鎖の 3' 末端及び前記第 2 の鎖の 5' 末端は平滑末端を形成している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 11】**

前記第 1 及び第 2 の鎖の長さが、少なくとも 26 及び最大で 30 である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 12】**

前記第 2 の鎖が標的 mRNA と完全に相補的である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 13】**

二本鎖核酸が化学修飾を含み、前記化学修飾が場合によっては：好ましくは 2' - デオキシ又は非環基である糖修飾であり；好ましくはホスホン酸、ホスホロチオエート又はホストリエステルであるリン酸骨格の修飾であり；塩基の修飾であり、修飾された塩基は、好ましくは、2' - O - アルキル修飾ピリジン、2' - フルオロ修飾ピリジン又は脱塩基糖である；請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 14】**

デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、アシクロヌクレオチド、3' - デオキシアデノシン (コーディセピン)、3' - アジド - 3' - デオキシチミジン (AZT)、2' , 3' - ジデオキシイノシン (ddI)、2' , 3' - ジデオキシ - 3' - チアシチジン (3TC)、2' , 3' - ジデヒドロ - 2' , 3' - ジデオキシチミジン (d4T)、3' - アジド - 3' - デオキシチミジン (AZT) 及び 2' , 3' - ジデオキシ - 3' - チアシチジン (3TC) のヌクレオチド 1 リン酸、2' , 3' - ジデヒドロ - 2' , 3' - ジデオキシチミジン (d4T) のヌクレオチド 1 リン酸、4 - チオウラシル、5 - プロモウラシル、5 - ヨードウラシル、5 - (3 - アミノアリル) - ウラシル、2' - O - アルキルリボヌクレオチド、2' - O - メチルリボヌクレオチド、2' - アミノリボヌクレオチド、2' - フルオロリボヌクレオチド及びロックされた核酸からなる群から選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 15】**

第 1 及び第 2 の鎖が化学結合で連結された、好ましくは、第 1 の鎖の 3' 末端及び第 2 の鎖の 5' 末端が化学結合で連結された、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 16】**

第 2 の鎖又は第 1 の鎖のヌクレオチドがダイサー切断に配向性がある修飾ヌクレオチドで置換された、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の単離された二本鎖核酸。

**【請求項 17】**

請求項 4 に記載の単離された二本鎖核酸であって、好ましくは、前記第 2 の鎖及び第 1 の鎖のヌクレオチドの相対的な長さが：第 2 鎖の長さが 26 ~ 29 ヌクレオチド残基のと

きに第1鎖の長さが25ヌクレオチド残基、第2鎖の長さが27~30ヌクレオチド残基のときに第1鎖の長さが26ヌクレオチド残基、第2鎖の長さが28~30ヌクレオチド残基のときに第1鎖の長さが27ヌクレオチド残基、第2鎖の長さが29~30ヌクレオチド残基のときに第1鎖の長さが28ヌクレオチド残基、第2鎖の長さが30ヌクレオチド残基のときに第1鎖の長さが29ヌクレオチド残基からなる群から選択され、より好ましくは前記第1の鎖の長さが25ヌクレオチド残基であり、前記第1のオリゴヌクレオチドの3'末端で第1のヌクレオチド(位置1)が始まる場合、位置1、2及び/又は3はデオキシリボヌクレオチドで置換され、前記第2の鎖の長さは27ヌクレオチド残基で、かつ、第1の鎖よりも3'末端が2ヌクレオチド長く、より好ましくは前記第1の鎖の長さは25ヌクレオチド残基であり、前記第1のオリゴヌクレオチドの3'末端で第1のヌクレオチド(位置1)が始まる場合、位置1はデオキシリボヌクレオチドで置換され、かつ、前記第2の鎖の長さは27ヌクレオチド残基で第1の鎖よりも3'末端が2ヌクレオチド長い、前記二本鎖核酸。

【請求項18】

請求項1~17のいずれか1項記載の単離された二本鎖核酸を包含する哺乳類細胞。

【請求項19】

請求項1~17のいずれか1項記載の単離された二本鎖核酸及び医薬的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項20】

請求項1~17のいずれか1項記載の単離された二本鎖核酸を含む製剤であって、前記二本鎖核酸がインビトロで哺乳類細胞に導入される場合に標的遺伝子の発現を、少なくとも10%、少なくとも50%及び少なくとも80~90%からなる群から選択される発現量(%)を低下させるのに有効な量で存在し、好ましくは前記二本鎖核酸は、1ナノモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的RNAの少なくとも19が同一のヌクレオチドに向けられた単離された21merのsiRNAより標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有し、より好ましくは前記二本鎖核酸は、200ピコモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的RNAの少なくとも19が同一のヌクレオチドに向けられた単離された21merのsiRNAより標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有し、最も好ましくは前記二本鎖核酸は、50ピコモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的RNAの少なくとも19が同一のヌクレオチドに向けられた単離された21merのsiRNAより標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有する、前記製剤。

【請求項21】

請求項1~17のいずれか1項記載の単離された二本鎖核酸を含む製剤であって、前記二本鎖核酸が哺乳類の対象の細胞に導入される場合に標的遺伝子の発現を少なくとも10%、少なくとも50%及び少なくとも80~90%からなる群から選択される発現量(%)を低下させるのに有効な量で存在し、前記二本鎖核酸は、1ナノモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的RNAの少なくとも19が同一のヌクレオチドに向けられた21merのsiRNAより標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有し、より好ましくは、前記有効な量は、1マイクログラム~5ミリグラム/前記対象のkg/日、100マイクログラム~0.5ミリグラム/kg、0.001~0.25ミリグラム/kg、0.01~20マイクログラム/kg、0.01~10マイクログラム/kg、0.01~5マイクログラム/kg及び0.10~2.5マイクログラム/kgからなる群から選択される用量である、前記製剤。

【請求項22】

リボヌクレオチドを含み5'末端及び3'末端を有する第1のオリゴヌクレオチド鎖及びリボヌクレオチドを含み5'末端及び3'末端を有する第2のオリゴヌクレオチド鎖を含む

単離された二本鎖核酸を含む製剤であって、前記第 1 及び第 2 の鎖の長さは各々少なくとも 25 及び最大で 30 ヌクレオチドであり、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖は、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19 ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させ、前記二本鎖核酸は前記製剤中に、前記二本鎖核酸が哺乳類細胞中に導入される場合に標的遺伝子の発現を低下させるのに有効な量で存在し、かつ、1 ナノモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的 RNA の少なくとも 19 が同一のヌクレオチドに向けられた単離された 21 mer の si RNA より標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有し、好ましくは前記二本鎖核酸は、200 ピコモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的 RNA の少なくとも 19 が同一のヌクレオチドに向けられた単離された 21 mer の si RNA より標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有し、並びにより好ましくは前記二本鎖核酸は、50 ピコモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的 RNA の少なくとも 19 が同一のヌクレオチドに向けられた単離された 21 mer の si RNA より標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有する、前記製剤。

【請求項 23】

第 2 の鎖の 3' 末端の長さだが第 1 の鎖よりも 1 ~ 4 ヌクレオチド長い、請求項 22 記載の製剤。

【請求項 24】

第 1 及び第 2 の鎖のヌクレオチド残基の数が同数である、請求項 22 記載の製剤。

【請求項 25】

第 1 の鎖の 3' 末端の最後及び最後から 2 番目の残基及び第 2 の鎖の 5' 末端の最後及び最後から 2 番目の残基が 1 又は 2 のミスマッチした塩基対を形成する、請求項 22 記載の製剤。

【請求項 26】

標的遺伝子の発現が、場合によっては、インビトロ又はインビボで低下する、哺乳類細胞中の前記標的遺伝子の発現を低下させるための請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項記載の二本鎖核酸を含む医薬組成物。

【請求項 27】

標的遺伝子の発現が、場合によっては、インビトロ又はインビボで低下する、哺乳類細胞中の前記標的遺伝子の発現を低下させるための請求項 20 ~ 25 のいずれか 1 項記載の製剤。

【請求項 28】

標的遺伝子の発現を低下させるのに十分な単離された二本鎖核酸の量が、前記細胞環境中に 1 ナノモル又はそれ以下、好ましくは 200 ピコモル又はそれ以下、より好ましくは 50 ピコモル又はそれ以下である、請求項 26 の医薬組成物。

【請求項 29】

標的遺伝子の発現を低下させるのに十分な単離された二本鎖核酸の量が、前記細胞環境中で 1 ナノモル又はそれ以下、好ましくは 200 ピコモル又はそれ以下、より好ましくは 50 ピコモル又はそれ以下である、請求項 27 記載の製剤。

【請求項 30】

単離された二本鎖核酸が、1 ナノモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的 RNA の少なくとも 19 が同一のヌクレオチドに向けられた単離された 21 mer の si RNA より標的遺伝子の発現を低下させることについて優れた効能を有する、請求項 26 の医薬組成物。

【請求項 31】

単離された二本鎖核酸が、1 ナノモル又はそれ以下の細胞の環境中で有効な濃度で哺乳類細胞中インビトロでアッセイをする場合に前記標的 RNA の少なくとも 19 が同一のヌクレオチドに向けられた単離された 21 mer の si RNA より標的遺伝子の発現を低下

させることについて優れた効能を有する、請求項 27 記載の製剤。

【請求項 32】

単離された二本鎖核酸の用量単位が 1 マイクログラム～5 ミリグラム / 当該哺乳類の kg / 日、100 マイクログラム～0.5 ミリグラム / kg、0.001～0.25 ミリグラム / kg、0.01～20 マイクログラム / kg、0.01～10 マイクログラム / kg、0.10～5 マイクログラム / kg 及び 0.1～2.5 マイクログラム / kg からなる群から選択される用量である、請求項 26 の医薬組成物。

【請求項 33】

単離された二本鎖核酸の用量単位が 1 マイクログラム～5 ミリグラム / 当該哺乳類の kg / 日、100 マイクログラム～0.5 ミリグラム / kg、0.001～0.25 ミリグラム / kg、0.01～20 マイクログラム / kg、0.01～10 マイクログラム / kg、0.10～5 マイクログラム / kg 及び 0.1～2.5 マイクログラム / kg からなる群から選択される用量である、請求項 27 記載の製剤。

【請求項 34】

医薬組成物が静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、輸液、経皮送達、噴霧、直腸送達、腔内送達、局所送達、経口送達及び吸入送達からなる群から選択される態様により対象に送達するために製剤化される、請求項 26 の医薬組成物。

【請求項 35】

製剤が静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、輸液、経皮送達、噴霧、直腸送達、腔内送達、局所送達、経口送達及び吸入送達からなる群から選択される態様により対象に送達するために製剤化される、請求項 27 記載の製剤。

【請求項 36】

哺乳類発現系で標的遺伝子の発現を低下させる効能が増大した二本鎖核酸を選択する方法であって、以下の

(a) コントロールの形質発現と比較して、50 ナノモル又はそれ以下の第 1 の二本鎖核酸の形質導入する濃度で哺乳類細胞で標的遺伝子発現の低下の量を決定する工程であって、前記第 1 の二本鎖核酸が、5' 末端及び 3' 末端を有する第 1 のオリゴヌクレオチド鎖及び 5' 末端及び 3' 末端を有する第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を含み、前記第 1 及び第 2 の鎖の長さが各々少なくとも 25 及び最大で 30 ヌクレオチドであり、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖は、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19 ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させる；

(b) 前記工程 (a) の標的遺伝子発現の低下を、コントロールの形質導入と比較した 50 ナノモル又はそれ以下の、5' 末端及び 3' 末端を有する第 1 のオリゴヌクレオチド鎖及び 5' 末端及び 3' 末端を有する第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を含む第 2 の二本鎖核酸の形質導入する濃度で哺乳類細胞で標的遺伝子発現を低下させる第 2 の二本鎖核酸の能力と、比較する工程であって、第 1 及び第 2 の鎖は各々 21～23 ヌクレオチドからなり、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19 ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させる；及び

(c) そして、工程 (b) の比較により、工程 (a) において決定された前記第 1 二本鎖核酸による前記標的遺伝子発現において、低下が少なくとも 50 % より高いと特定された場合は、効能が増大した二本鎖核酸の選択が可能となる工程を含む、前記方法。

【請求項 37】

哺乳類発現系で標的遺伝子の発現を低下させる効能が増大した二本鎖核酸を選択する方法であって、以下の

(a) コントロールの形質発現と比較して、50 ナノモル又はそれ以下の第 1 の二本鎖核酸の形質導入する濃度で哺乳類細胞で標的遺伝子発現の低下の量を決定する工程であって、前記第 1 の二本鎖核酸が、5' 末端及び 3' 末端を有する第 1 のオリゴヌクレオチド鎖

及び 5' 末端及び 3' 末端を有する第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を含み、前記第 1 及び第 2 の鎖の長さが各々少なくとも 25 及び最大で 30 ヌクレオチドであり、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖は、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19 ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させる；

(b) 前記工程 (a) の標的遺伝子発現の低下を、コントロールの形質導入と比較して 50 ナノモル又はそれ以下の第 2 の二本鎖核酸の形質導入する濃度で哺乳類細胞で標的遺伝子発現を低下させる、5' 末端及び 3' 末端を有する第 1 のオリゴヌクレオチド鎖及び 5' 末端及び 3' 末端を有する第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を含む第 2 の二本鎖核酸の能力と、比較する工程であって、第 1 及び第 2 の鎖は各々 21 ~ 23 ヌクレオチドからなり、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19 ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させる；及び

(c) そして、工程 (b) の比較により、工程 (a) において決定された前記第 1 二本鎖核酸による前記標的遺伝子発現において、低下が少なくとも 50 % より高いと特定された場合は、増大した効能のための二本鎖核酸の選択が可能となる工程を含む、前記方法。

【請求項 38】

形質導入する濃度が 1 ナノモル又はそれ以下、好ましくは 200 ピコモル又はそれ以下、より好ましくは 50 ピコモル又はそれ以下である、請求項 36 又は 37 記載の方法。

【請求項 39】

工程 (b) の比較により、前記第 1 の二本鎖核酸による標的遺伝子発現において低下が少なくとも 80 ~ 90 % よりも高いと特定された場合に二本鎖核酸の選択が可能となる、請求項 36 又は 37 記載の方法。

【請求項 40】

第 1 の二本鎖核酸の第 1 及び第 2 の鎖が各々 26 ~ 30 ヌクレオチドからなる、請求項 36 又は 37 記載の方法。

【請求項 41】

第 1 の二本鎖核酸の第 1 の鎖及び第 1 の二本鎖核酸の第 2 の鎖が同数のヌクレオチド残基を含む、請求項 36 又は 37 記載の方法。

【請求項 42】

第 1 の二本鎖核酸の第 1 のオリゴヌクレオチド鎖の 3' 末端ヌクレオチド残基及び第 1 の二本鎖核酸の第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の 5' 末端ヌクレオチド残基が相補的であり、かつ、第 2 のオリゴヌクレオチド鎖に長さが 1 ~ 4 ヌクレオチドの 3' 突出がある、請求項 36 又は 37 記載の方法。

【請求項 43】

請求項 1 の単離された二本鎖核酸を調製する方法であって、以下の：

標的遺伝子の RNA の標的配列を選択する工程であって、前記標的配列は少なくとも 19 ヌクレオチドを含む；

前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19 ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させるヌクレオチド配列を有する 25 ~ 30 ヌクレオチドを含む第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程；

生物学的条件で前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができる少なくとも 25 ヌクレオチドを含む第 1 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程であって、前記第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端で第 1 のヌクレオチド（位置 1）が始まる場合、位置 1 及び / 又は 2 は前記第 1 のオリゴヌクレオチド鎖の対になったヌクレオチド残基とミスマッチを形成し、前記の鎖の少なくとも 1 及び好ましくは共に 5' - リン酸基を含み、並びに、好ましくは、前記第 1 の鎖の 5' 末端及び前記第 2 の鎖の 3' 末端は平滑末端を形成する；及び



それにより請求項 1 に記載の二本鎖核酸を調製する工程；  
を含む、前記方法。

【請求項 4 4】

請求項 2 の単離された二本鎖核酸を調製する方法であって、以下の：

標的遺伝子の RNA の標的配列を選択する工程であって、前記標的配列は少なくとも 19ヌクレオチドを含む；

前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させるヌクレオチド配列を有する少なくとも 25ヌクレオチドを含む第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程；

生物学的条件で前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができる 25～30ヌクレオチドを含む第 1 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程であって、前記第 1 のオリゴヌクレオチドの 3'末端で第 1 のヌクレオチド（位置 1）が始まる場合、位置 1 及び / 又は 2 は前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の対になったヌクレオチド残基とミスマッチを形成し、前記の鎖の少なくとも 1 及び好ましくは共に 5' - リン酸基を含み、並びに、好ましくは、前記第 1 の鎖の 5'末端及び前記第 2 の鎖の 3'末端は平滑末端を形成する；及び

それにより請求項 2 に記載の二本鎖核酸を調製する工程；  
を含む、前記方法。

【請求項 4 5】

請求項 3 の単離された二本鎖核酸を調製する方法であって、以下の：

標的遺伝子の RNA の標的配列を選択する工程であって、前記標的配列は少なくとも 19ヌクレオチドを含む；

前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させるヌクレオチド配列を有する 25～30ヌクレオチドを含む第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程；

生物学的条件で前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができる少なくとも 25ヌクレオチドを含む第 1 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程であって、前記第 2 のオリゴヌクレオチドの 5'末端で第 1 のヌクレオチド（位置 1）が始まる場合、位置 1、2 及び / 又は 3 は第 1 のオリゴヌクレオチド鎖の修飾ヌクレオチド残基と塩基対を形成し、前記第 2 鎖の 3'末端は、前記第 1 鎖よりも 1～4 個のヌクレオチド長く、前記の鎖の少なくとも 1 又は好ましくは共に 5' - リン酸基を含む、及び

それにより請求項 3 に記載の二本鎖核酸を調製する工程；  
を含む、前記方法。

【請求項 4 6】

請求項 4 の単離された二本鎖核酸を調製する方法であって、以下の：

標的遺伝子の RNA の標的配列を選択する工程であって、前記標的配列は少なくとも 19ヌクレオチドを含む；

前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも 19ヌクレオチド長で標的 RNA と十分に相補的で、前記二本鎖核酸試薬を哺乳類細胞に導入する場合に標的遺伝子の発現を低下させるヌクレオチド配列を有する少なくとも 25ヌクレオチドを含む第 2 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程であって、好ましくは前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖は 25～30ヌクレオチドからなる；

生物学的条件で前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができる 25～30ヌクレオチドを含む第 1 のオリゴヌクレオチド鎖を合成する工程であって、前記第 1 のオリゴヌクレオチドの 3'末端で第 1 のヌクレオチド（位置 1）が始まる場合、位置 1、2 及び / 又は 3 は修飾オリゴヌクレオチドと置換され、前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖の 3'末端は、前記第 1 のオリゴヌクレオチド鎖よりも 1～4 個のヌクレオチド長く、前記の鎖の少なくとも 1 又は好ましくは共に 5' - リン酸基を含む；及び

それにより請求項 4 に記載の二本鎖核酸を調製する工程；  
を含む、前記方法。

【請求項 4 7】

請求項 5 の単離された二本鎖核酸を調製する方法であって、以下の：

標的遺伝子の RNA の標的配列を選択する工程であって、前記標的配列は少なくとも 19ヌクレオチドを含む；

選択した標的配列に相補的なヌクレオチド配列を有する 25～30ヌクレオチドを含む第 2 のヌクレオチド鎖を合成する工程；

生物学的条件で前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができる 25～30ヌクレオチドを含む第 1 のヌクレオチド鎖を合成する工程であって、前記第 1 の鎖の 3'末端の最後及び最後から 2 番目の残基及び前記第 2 の鎖の 5'末端の最後及び最後から 2 番目の残基が 1 又は 2 のミスマッチした塩基対を形成し、少なくとも 1 又は好ましくは共に 5'-リン酸基を含み、好ましくは前記第 1 及び第 2 の鎖は各々 27ヌクレオチドからなる；

それにより請求項 5 に記載の二本鎖核酸を調製する工程；  
を含む、前記方法。

【請求項 4 8】

請求項 6 の単離された二本鎖核酸を調製する方法であって、以下の：

標的遺伝子の RNA の標的配列を選択する工程であって、前記標的配列は少なくとも 19ヌクレオチドを含む；

選択した標的配列に相補的なヌクレオチド配列を有する 35又はそれ以下のヌクレオチドを含む第 2 のヌクレオチド鎖を合成する工程；

生物学的条件で前記第 2 のオリゴヌクレオチド鎖とアニーリングすることができる 35又はそれ以下のヌクレオチドを含む第 1 のヌクレオチド鎖を合成する工程であって、前記第 1 の鎖の 3'末端の最後及び最後から 2 番目の残基及び前記第 2 の鎖の 5'末端の最後及び最後から 2 番目の残基が 1 又は 2 のミスマッチした塩基対を形成し、少なくとも 1 又は好ましくは共に 5'-リン酸基を含む；

それにより請求項 6 に記載の二本鎖核酸を調製する工程；  
を含む、前記方法。