

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-504190

(P2009-504190A)

(43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 225 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-527139 (P2008-527139)	(71) 出願人	500203684
(86) (22) 出願日	平成18年8月17日 (2006. 8. 17)		サーナ・セラピューティクス・インコーポ レイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月11日 (2008. 4. 11)		Sirna Therapeutics, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/032168		アメリカ合衆国 94158 カリフォル ニア州 サンフランシスコ, オーウェンズ ストリート 1700, フォース フロ ア
(87) 国際公開番号	W02007/022369		
(87) 国際公開日	平成19年2月22日 (2007. 2. 22)		
(31) 優先権主張番号	11/205, 646	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成17年8月17日 (2005. 8. 17)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(31) 優先権主張番号	11/234, 730		弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成17年9月23日 (2005. 9. 23)	(74) 代理人	100140523
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡邊 千尋
(31) 優先権主張番号	60/737, 024		
(32) 優先日	平成17年11月15日 (2005. 11. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 RNA干渉を媒介する化学修飾低分子干渉核酸分子

(57) 【要約】

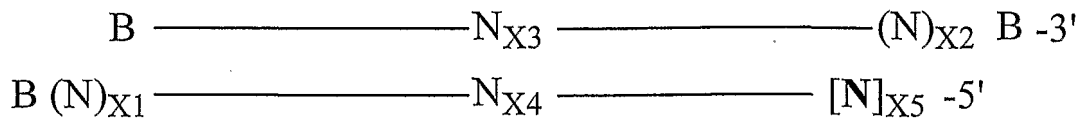
本発明は、遺伝子発現及び／又は活性の調節に応答した形質、疾患及び症状の研究、診断及び治療のための化合物、組成物及び方法に関する。本発明は、かかる形質、疾患及び症状の持続又は発生を媒介する遺伝子発現経路又は他の細胞プロセスに参与する遺伝子の発現及び／又は活性の調節に応答する形質、疾患及び症状に関与した化合物、組成物及び方法も対象とする。具体的には、本発明は、小核酸分子のカクテル、及び小核酸分子の脂質ナノ粒子 (LNP) 調合物を含めて、遺伝子発現に対するRNA干渉 (RNAi) を媒介し得る、低分子干渉核酸 (siNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、二本鎖RNA (dsRNA)、マイクロRNA (miRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA) 分子などの小核酸分子を含めた、二本鎖核酸分子に関する。本発明は、siNA、siRNAなどの小核酸分子にも関し、内因性RNA又は内因性RNAと結合したタンパク質 (例えば、RISC) の調節機能を妨害することによって遺伝子発現を調節するために、内因性マイクロRNA (miRNA) の機能を阻害し得る小核酸分子 (例えば、miRNA阻害剤)、内因性低分子干渉RNA (siRNA) の機能を阻害し得る小核酸分子 (例えば、siRNA阻害剤) などの内因性RNA分子の機能を阻害し得る小核酸分子、RISCの機能を阻害し得る小核酸分子 (例えば、RISC阻害剤) にも関し、かかる小核酸分子のカクテル及びかかる小核酸分子の脂質ナノ粒子 (LNP) 調合物にも関する。かかる小核酸分子は、例えば、対象又は生物体における遺伝子発現又は活性に関連した疾患、形質及び症状を予防、阻害又は抑制する組成物を提供するのに有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造 S I X を有する二本鎖核酸分子

【化 1】



SIX

10

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス(HBV)RNAに相補的である配列を含み、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

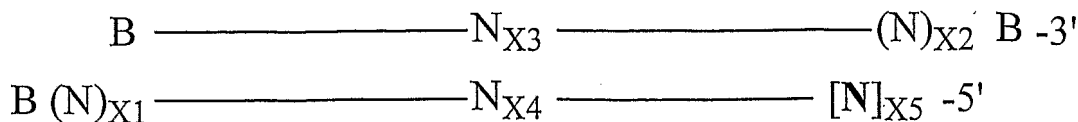
(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、および

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。))。

【請求項 2】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造 S X を有する二本鎖核酸分子

【化 2】



SX

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス(HBV)RNAに相補的である配列を含み、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、ならびに

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオ

40

50

チドであり、

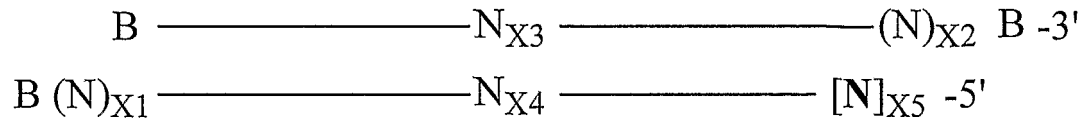
(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、および

(c) 任意の (N) ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。) 。

【請求項 3】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造 S X I を有する二本鎖核酸分子

【化 3】



10

SXI

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス (HBV) RNA に相補的である配列を含み、各 N は独立にヌクレオチドであり、各 B は存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N) は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N] はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X 1 及び X 2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、X 3 は約 9 から約 30 の整数であり、X 4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X 4 と X 5 の合計は約 17-36 であり、X 5 は約 1 から約 6 の整数であり、ならびに

20

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、[N] ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2'-O-メチルヌクレオチドであり、および

(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、

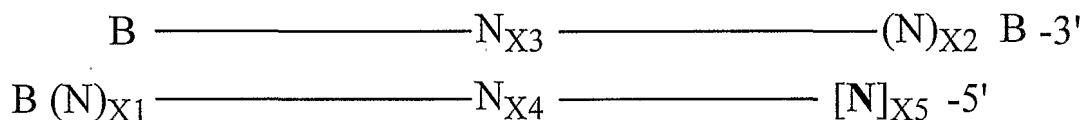
(c) 任意の (N) ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。) 。

30

【請求項 4】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造 S X I I を有する二本鎖核酸分子

【化 4】



SXII

40

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス (HBV) RNA に相補的である配列を含み、各 N は独立にヌクレオチドであり、各 B は存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N) は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N] はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X 1 及び X 2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、X 3 は約 9 から約 30 の整数であり、X 4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X 4 と X 5 の合計は約 17-36 であり、X 5 は約 1 から約 6 の整数であり、ならびに

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ

50

ー 2' -フルオロヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2' -O-メチルヌクレオチドであり、および

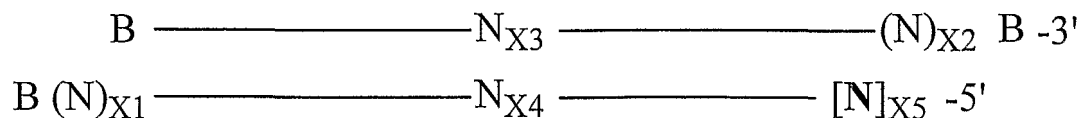
(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2' -デオキシー 2' -フルオロヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであり、

(c) 任意の (N)ヌクレオチドは、2' -O-メチル、2' -デオキシー 2' -フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。) 。

【請求項 5】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造 S X I I I を有する二本鎖核酸分子

【化 5】



SXIII

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス (HBV) RNA に相補的である配列を含み、各 N は独立にヌクレオチドであり、各 B は存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N) は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N] はリボヌクレオチドであるヌクレオチドであり、X 1 及び X 2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、X 3 は約 9 から約 30 の整数であり、X 4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X 4 と X 5 の合計は約 17 - 36 であり、X 5 は約 1 から約 6 の整数であり、ならびに

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様、ノーザン又は A 型ヘリックス配置を有するヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2' -O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボ様、ノーザン又は A 型ヘリックス配置を有するヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは 2' -O-メチルヌクレオチドであり、および

(c) 任意の (N)ヌクレオチドは、2' -O-メチル、2' -デオキシー 2' -フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。) 。

【請求項 6】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 1 の二本鎖核酸分子。

【請求項 7】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 2 の二本鎖核酸分子。

【請求項 8】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 3 の二本鎖核酸分子。

【請求項 9】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 4 の二本鎖核酸分子。

【請求項 10】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 5 の二本鎖核酸分子。

10

【請求項 11】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 1 の二本鎖核酸分子。

【請求項 12】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 2 の二本鎖核酸分子。

【請求項 13】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 3 の二本鎖核酸分子。

【請求項 14】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 4 の二本鎖核酸分子。

20

【請求項 15】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 5 の二本鎖核酸分子。

【請求項 16】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 1 の二本鎖核酸分子。

【請求項 17】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 2 の二本鎖核酸分子。

30

【請求項 18】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 3 の二本鎖核酸分子。

【請求項 19】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 4 の二本鎖核酸分子。

40

【請求項 20】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 5 の二本鎖核酸分子。

【請求項 21】

薬剤として許容される担体又は希釈剤中に請求項 1 の二本鎖核酸分子を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、遺伝子発現及び／又は活性の調節に応答した形質、疾患及び症状の研究、診断及び治療のための化合物、組成物及び方法に関する。本発明は、かかる形質、疾患及び症状の持続又は発生を媒介する遺伝子発現経路又は他の細胞プロセスに関与する遺伝子の発現及び／又は活性の調節に応答する形質、疾患及び症状に係した化合物、組成物及び方法も対象とする。具体的には、本発明は、小核酸分子のカクテル、及び小核酸分子の脂質ナノ粒子（LNP）調合物を含めて、遺伝子発現に対するRNA干渉（RNAi）を媒介し得る、低分子干渉核酸（siNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）分子などの小核酸分子を含めた、二本鎖核酸分子に関する。本発明は、siNA、siRNAなどの小核酸分子にも関し、内因性RNA又は内因性RNAと結合したタンパク質（例えば、RISC）の調節機能を妨害することによって遺伝子発現を調節するために、内因性マイクロRNA（miRNA）の機能を阻害し得る小核酸分子（例えば、miRNA阻害剤）、内因性低分子干渉RNA（siRNA）の機能を阻害し得る小核酸分子（例えば、siRNA阻害剤）などの内因性RNA分子の機能を阻害し得る小核酸分子、RISCの機能を阻害し得る小核酸分子（例えば、RISC阻害剤）にも関し、かかる小核酸分子のカクテル及びかかる小核酸分子の脂質ナノ粒子（LNP）調合物にも関する。かかる小核酸分子は、例えば、対象又は生物体における遺伝子発現又は活性に関連した種々の疾患、形質及び症状を予防、阻害又は抑制する組成物を提供するのに有用である。

10

【背景技術】

【0002】

20

以下は、RNAiに係する関連技術の考察である。この考察は、以下の本発明の理解のためにのみ提供される。要旨（summary）は、下記研究が本発明の従来技術であることを認めるものではない。

【0003】

RNA干渉とは、動物において低分子干渉RNA（siRNA）によって媒介される、配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを指す（Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Fire et al., 1998, Nature, 391, 806; Hamilton et al., 1999, Science, 286, 950-951; Lin et al., 1999, Nature, 402, 128-129; Sharp, 1999, genes & Dev., 13:139-141及びStrauss, 1999, Science, 286, 886）。植物における対応するプロセス（Heifetz他、国際公開第99/61631号）は、転写後遺伝子サイレンシング又はRNAサイレンシングと一般に称し、真菌ではクエリング（quelling）とも称する。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するのに使用される、進化的に保存された細胞防御機構であると考えられ、多様な叢及び門によって一般に共有されている（Fire et al., 1999, Trends genet., 15, 358）。外来遺伝子発現からのかかる保護は、相同な一本鎖RNA又はウイルスのゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答を介して、ウイルス感染に由来する、又は宿主ゲノム中へのトランスポゾンエレメントの無作為な組み込みに由来する、二本鎖RNA（dsRNA）の生成に応じて進化してきたと考えられる。細胞中にdsRNAが存在すると、RNAi応答が誘発されるが、その機序はまだ十分に解明されていない。この機序は、リボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断をもたらす、dsRNAによって媒介されるプロテインキナーゼPKR及び2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素の活性化に起因するインターフェロン応答など、二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼを含む他の公知の機序とは異なると考えられる（例えば、米国特許第6,107,094号；同5,898,031号；Clemens et al., 1997, J Interferon & Cytokine Res., 17, 503-524；Adah et al., 2001, Curr. Med Chem., 8, 1189参照）。

30

40

50

【0004】

細胞中に長鎖 dsRNA が存在すると、ダイサーと称するリボヌクレアーゼ III 酵素の活性が刺激される (Bass, 2000, Cell, 101, 235; Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293)。ダイサーは、低分子干渉 RNA (siRNA) として知られる dsRNA 小片への dsRNA のプロセッシングに關与する (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Bass, 2000, Cell, 101, 235; Berstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性に由来する低分子干渉 RNA は、典型的には約 21 から約 23 ヌクレオチド長であり、約 19 塩基対の二本鎖を含む (Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Elbashir et al., 2001, genes Dev., 15, 188)。ダイサーは、構造の保存された前駆体 RNA からの、翻訳調節に關係する 21 及び 22 ヌクレオチドの small temporal RNA (stRNA) の切り出しにも關係する (Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi 応答は、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) と一般に稱する、エンドヌクレアーゼ複合体も特徴とする。RISC は、siRNA 二本鎖のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖 RNA の切断を媒介する。標的 RNA の切断は、siRNA 二本鎖のアンチセンス鎖に相補的である領域の中央で起こる (Elbashir et al., 2001, genes Dev., 15, 188)。

【0005】

RNAi は種々の系で研究されている。Fire et al., 1998, Nature, 391, 806 は、線虫において RNAi を観察した最初であった。Brahmanian and Zarbl, 1999, Molecular and Cellular Biology, 19, 274-283 及び Wianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70 は、ほ乳動物系において dsRNA によって媒介される RNAi を記述している。Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293 は、dsRNA が移入されたショウジョウバエ細胞における RNAi を記述している。Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494 及び Tuschl 他、国際公開第 01/75164 号は、ヒト胚性腎臓及び HeLa 細胞を含めた培養ほ乳動物細胞において、合成 21 ヌクレオチド RNA 二本鎖の導入によって誘導される RNAi を記述している。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究 (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877 及び Tuschl 他、国際公開第 01/75164 号) によって、効率的 RNAi 活性を媒介するのに必要である、siRNA の長さ、構造、化学組成及び配列に対する一定の要件が明らかになった。これらの研究によれば、21 ヌクレオチド siRNA 二本鎖は、3' 末端ジヌクレオチドオーバーハングを含むときに最も活性である。また、一方又は両方の siRNA 鎖を 2'-デオキシ (2'-H) 又は 2'-O-メチルヌクレオチドで完全に置換すると、RNAi 活性が消失するのに対して、2'-デオキシヌクレオチド (2'-H) による 3' 末端 siRNA オーバーハングヌクレオチドの置換は許容されることが判明した。siRNA 二本鎖の中央における単一のミスマッチ配列も、RNAi 活性を消失させることが判明した。また、これらの研究は、標的 RNA 中の切断部位の位置が、siRNA ガイド配列の 3' 末端ではなくガイド配列の 5' 末端によって規定されることも示している (Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究によれば、siRNA 二本鎖の標的相補鎖上の 5' リン酸が siRNA 活性に必要であり、ATP を利用して siRNA 上の 5' リン酸部分が維持される (Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。

【0006】

幾つかの研究によれば、2ヌクレオチド3'オーバーハングを有する21量体 siRNA二本鎖の3'末端ヌクレオチドオーバーハングセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置換しても、RNAi活性に有害作用を及ぼさない。siRNA各末端のヌクレオチドを4個までデオキシリボヌクレオチドで置換することは十分許容されると報告されているが、デオキシリボヌクレオチドで完全に置換するとRNAi活性が失われる(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877及びTuschl他、国際公開第01/75164号)。また、Elbashir et al. (前掲)は、siRNAを2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が完全に消失することも報告している。Li他、国際公開第00/44914号及びBeach他、国際公開第01/68836号は、siRNAが、窒素又は硫黄ヘテロ原子の少なくとも1個を含むようにするリン酸-糖骨格又はヌクレオシドの修飾を含み得ることを示唆している。しかし、どちらの出願も、かかる修飾がsiRNA分子においてどの程度許容されるかを仮定しておらず、かかる修飾siRNAの更なるガイダンスや例も提供していない。Kreutzer他、カナダ特許出願第2,359,180号も、二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼPKRの活性化に対抗するために、dsRNA構築物において使用されるある種の化学修飾、具体的には2'-アミノ又は2'-O-メチルヌクレオチド、及び2'-O又は4'-Cメチレン架橋を含むヌクレオチドを記載している。しかし、Kreutzer他も、同様に、これらの修飾がdsRNA分子においてどの程度許容されるかに関する例又はガイダンスを提供していない。

【0007】

Parrish et al., 2000, Molecular Cell, 6, 1077-1087は、線虫において、長鎖(>25nt) siRNA転写物を用いて、unc-22遺伝子を標的としたある種の化学修飾を試験した。Parrish等は、T7及びT3 RNAポリメラーゼを用いてチオリン酸ヌクレオチド類似体を組み入れることによって、これらのsiRNA転写物にチオリン酸残基を導入することを記述しており、2個のホスホロチオアート修飾塩基を有するRNAのRNAiとしての有効性がかなり低下したことを認めた。また、Parrish等によれば、2個を超える残基のホスホロチオアート修飾によって、RNAがインビトロで著しく不安定化し、干渉活性を評価することができなかった(同書、1081)。Parrish等は、長鎖siRNA転写物においてヌクレオチド糖の2'位におけるある種の修飾も試験し、リボヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換すると、特にウリジンからチミジンへの置換、及び/又はシチジンからデオキシシチジンへの置換の場合には、干渉活性がかなり低下することを見出した(同書)。また、Parrish等は、siRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖における、4-チオウラシル、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル及び3-(アミノアシル)ウラシルによるウラシルの置換、及びイノシンによるグアノシンの置換を含めて、ある種の塩基修飾を試験した。4-チオウラシル及び5-ブロモウラシル置換は許容されることが考えられたが、Parrishは、イノシンを一方の鎖に組み入れると干渉活性がかなり低下することを報告した。Parrishは、5-ヨードウラシル及び3-(アミノアシル)ウラシルをアンチセンス鎖に組み入れても、RNAi活性がかなり低下することも報告した。

【0008】

より長鎖のdsRNAの使用が記述された。例えば、Beach他、国際公開第01/68836号は、内因的に誘導されたdsRNAを用いて遺伝子発現を減ずる特別な方法を記述している。Tuschl他、国際公開第01/75164号は、ショウジョウバエインビトロRNAi系、並びにある種の機能的ゲノム用途及びある種の治療用途への特定のsiRNA分子の使用を記述している。ただし、Tuschl, 2001, Chem. Biochem., 2, 239-245は、インターフェロン応答を活性化するおそれがあるために、RNAiを使用して、遺伝病又はウイルス感染を治療し得ることに疑念を抱いている。Li他、国際公開第00/44914号は、ある標的遺伝子の発現を減じるための特定の長鎖の(141bp-488bp)、酵素的に合成された、又はベ

クターによって発現された dsRNA の使用を記載している。Zernicka-Gottz 他、国際公開第 01/36646 号は、ある種の長鎖の (550bp-714bp)、酵素的に合成された、又はベクターによって発現された dsRNA 分子を用いて、ほ乳動物細胞における特定の遺伝子の発現を阻害するある種の方法を記載している。Fire 他、国際公開第 99/32619 号は、線形動物における遺伝子発現の阻害に用いられる細胞にある種の長鎖 dsRNA 分子を導入する特別な方法を記載している。Plaetinck 他、国際公開第 00/01846 号は、特定の長鎖 dsRNA 分子を用いて、細胞において特別な表現型を与える原因になる特殊な遺伝子を特定するある種の方法を記載している。Mello 他、国際公開第 01/29058 号は、dsRNA によって媒介される RNAi に関与する特殊な遺伝子の特定について記載している。Pachuck 他、国際公開第 00/63364 号は、ある種の長鎖 (少なくとも 200ヌクレオチド) dsRNA 構築物を記載している。Deschamps Depaillette 他、国際公開第 99/07409 号は、ある種の抗ウイルス剤と組み合わせた特別な dsRNA 分子からなる特定の組成物を記載している。Waterhouse 他、国際公開第 99/53050 号及び 1998, PNAS, 95, 13959-13964 は、ある種の dsRNA を用いて、植物細胞における核酸の形質発現を減少させる、ある種の方法を記載している。Driscoll 他、国際公開第 01/49844 号は、標的生物体における遺伝子サイレンシングの促進に用いられる特定の DNA 発現構築物を記載している。

【0009】

他の研究者も、種々の RNAi 系及び遺伝子サイレンシング系について報告している。例えば、Parrish et al., 2000, Molecular Cell, 6, 1077-1087 は、線虫の unc-22 遺伝子を標的とした、特定の化学修飾 dsRNA 構築物を記載している。Grossniklaus、国際公開第 01/38551 号は、ある種の dsRNA を用いて、植物におけるポリコム遺伝子発現を調節するある種の方法を記載している。Churikov 他、国際公開第 01/42443 号は、ある種の dsRNA を用いて、生物体の遺伝的特性を改変するある種の方法を記載している。Cogoni 他、国際公開第 01/53475 号は、ニューロスポラ (Neurospora) サイレンシング遺伝子を単離するある種の方法、及びその使用を記載している。Reed 他、国際公開第 01/68836 号は、植物におけるある種の遺伝子サイレンシング方法を記載している。Honer 他、国際公開第 01/70944 号は、トランスジェニック線形動物をパーキンソン病モデルとして用い、ある種の dsRNA を用いた、ある種の薬物スクリーニング方法を記載している。Deak 他、国際公開第 01/72774 号は、ショウジョウバエにおいて RNAi に関係し得る、ショウジョウバエ由来のある種の遺伝子産物を記載している。Arndt 他、国際公開第 01/92513 号は、RNAi を増強する因子を用いることによって遺伝子抑制を媒介するある種の方法を記載している。Tuschl 他、国際公開第 02/44321 号は、ある種の合成 siRNA 構築物を記載している。Pachuk 他、国際公開第 00/63364 号、及び Satishchandran 他、国際公開第 01/04313 号は、ベクターによって発現されたある種の (250bp を超える) 長鎖 dsRNAs を用いて、ある種のポリヌクレオチド配列の機能を阻害するある種の方法及び組成物を記載している。Echeverri 他、国際公開第 02/38805 号は、RNAi によって特定されたある種の線虫遺伝子を記載している。Kreutzer 他、国際公開第 02/055692 号、同 02/055693 号及び欧州特許第 1144623 号 B1 は、dsRNA を用いて遺伝子発現を阻害するある種の方法を記載している。Graham 他、国際公開第 99/49029 号及び同 01/70949 号並びにオーストラリア特許第 4037501 号は、ベクターによって発現されたある種の siRNA 分子を記載している。Fire 他、米国特許第 6,506,559 号は、RNAi を媒介するある種の長鎖 dsRNA (299bp-1033bp) 構築物を用いて、遺伝子発現をインビトロで阻害するある種の方法を記載している。Martinez et al., 2002, Cell, 110, 563-574 は、HeLa 細胞において RNA 干渉を媒介するある種の 5'リン酸化一本鎖 siR

10

20

30

40

50

NAを含めた、ある種の一本鎖siRNA構築物を記載している。Harborth et al., 2003, Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 13, 83-105は、化学的及び構造的に修飾されたある種のsiRNA分子を記載している。Chiu and Rana, 2003, RNA, 9, 1034-1048は、化学的及び構造的に修飾されたある種のsiRNA分子を記載している。Woolf 他、国際公開第03/064626号及び同03/064625号は、ある種の化学修飾sRNA構築物を記載している。Hornung et al., 2005, Nature Medicine, 11, 263-270は、形質細胞様樹状細胞におけるTLR7を介した低分子干渉RNAによる、IFNアルファの配列特異的な強力な誘導を記載している。Judge et al., 2005, Nature Biotechnology, Published online: 20 March 2005は、合成siRNAによる、ほ乳動物の自然免疫応答の配列依存的刺激を記載している。Yuki 他、国際公開第05/049821号及び同04/048566号は、低分子干渉RNA配列、及び最適化された活性を有するある種の低分子干渉RNA配列を設計するある種の方法を記載している。Saigo 他、米国特許出願公開第20040539332号は、RNA干渉を実現する、低分子干渉RNA配列を含めた、オリゴ又はポリヌクレオチド配列を設計するある種の方法を記載している。Tei 他、国際公開第03/044188号は、標的遺伝子の少なくとも部分ヌクレオチド配列と実質的に同一であるヌクレオチド配列を有するDNA及びRNAを含む二本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織又は個々の生物体に移入することを含む、標的遺伝子の発現を阻害するある種の方法を記載している。

10

20

【0010】

Mattick, 2005, Science, 309, 1527-1528; Claverie, 2005, Science, 309, 1529-1530; Sethupathy et al., 2006, RNA, 12, 192-197及びCzech, 2006 NEJM, 354, 11: 1194-1195; Hutvagner 他、米国特許出願公開第20050227256号及びTuschl 他、米国特許出願公開第20050182005号はすべて、miRNA機能を立体的遮断によって阻害し得るアンチセンス分子を記載しており、参照によりその全体を本明細書に組込む。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、遺伝子発現又は活性に関係する疾患、形質及び症状の発生又は持続に関連する遺伝子などの遺伝子の発現を、RNA干渉(RNAi)によって、低分子干渉核酸(sina)分子を用いて調節するのに有用である化合物、組成物及び方法に関する。本発明は、遺伝子発現経路及び／又は遺伝子活性に関与する1個以上の遺伝子の発現及び活性を、RNA干渉(RNAi)によって、小核酸分子を用いて調節するのに有用である化合物、組成物及び方法にも関する。特に、本発明は、低分子干渉核酸(sina)、低分子干渉RNA(sirna)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)分子などの小核酸分子を特徴とし、遺伝子発現経路及び／又は遺伝子活性に関与する、遺伝子及び／又は他の遺伝子の発現を調節するのに使用する方法を特徴とする。

40

【0012】

本発明は、sina、sirnaなどの小核酸分子にも関し、内因性RNA又は内因性RNAと結合したタンパク質(例えば、RISC)の調節機能を妨害することによって遺伝子発現を調節するために、内因性マイクロRNA(miRNA)の機能を阻害し得る小核酸分子(例えば、miRNA阻害剤)、内因性低分子干渉RNA(sirna)の機能を阻害し得る小核酸分子(例えば、sirna阻害剤)などの内因性RNA分子の機能を阻害し得る小核酸分子、RISCの機能を阻害し得る小核酸分子(例えば、RISC阻害剤

50

）にも関する。かかる分子を本明細書ではRNAi阻害剤と総称する。

【0013】

本発明のsiNA又はRNAi阻害剤は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい。本発明のsiNA又はRNAi阻害剤は、化学合成することができ、ベクターから発現させることができ、又は酵素的に合成することができる。本発明は、RNA干渉（RNAi）によって、細胞における標的遺伝子発現又は活性を調節することができる種々の化学修飾合成低分子干渉核酸（siNA）分子も特徴とする。本発明は、miRNA、siRNA又はRISCと相互作用し、したがって細胞又は生物体におけるRNA干渉（RNAi）、翻訳阻害又は転写サイレンシングを下方制御又は阻害することによって、細胞におけるRNAi活性を調節することができる、化学修飾された種々の合成低分子核酸（siNA）分子も特徴とする。化学修飾siNA及び／又はRNAi阻害剤を使用すると、インビボでのヌクレアーゼ分解に対する抵抗性が増大することによって、及び／又は細胞内取り込みが改善されることによって、未変性siNA分子及び／又はRNAi阻害剤の種々の性質が改善される。また、初期に発表された研究に反して、完全に修飾されたsiNAを含めて、複数の化学修飾を有する本発明のsiNA分子は、そのRNAi活性を保持する。したがって、出願人は、未変性siRNAの活性を保持する、又は更に改善する、（本明細書ではsiNAと総称する）化学修飾siRNAを本明細書で教示する。本発明のsiNA分子は、種々の治療、予防、獣医学、診断、標的確認（target validation）、ゲノム発見、遺伝子工学及び薬理ゲノミクスの各適用分野に有用である試薬及び方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0014】

一実施形態においては、本発明は、1種類以上のsiNA分子及び／又はRNAi阻害剤を特徴とし、また、その全部を参照により本明細書に組込む、米国仮出願第60/363,124号、米国特許出願第10/923,536号及びPCT/US03/05028に示されたGenBankアクセッション番号によって参照される配列を含む、本明細書では一般に「標的」配列と称する、遺伝子コード配列など、本明細書の、又は当分野で公知の疾患、形質、障害及び／又は症状の持続及び／又は発生に関連するタンパク質などのタンパク質をコードする標的遺伝子の発現を、独立に、又は組み合わせて、調節する方法を特徴とする。本発明の種々の態様及び実施形態を、本明細書では遺伝子標的と称する例示的標的遺伝子に関連して以下に記述する。本発明は、かかる形質、疾患及び症状の持続又は発生を媒介する遺伝子発現経路又は他の細胞プロセスに関与する遺伝子の発現及び／又は活性の調節に応答する形質、疾患及び症状に関係した化合物、組成物及び方法も対象とする。しかし、かかる参照は、単なる例示にすぎず、本発明の種々の態様及び実施形態は、本明細書の、又は当分野で公知の変異標的遺伝子、標的遺伝子のスプライスバリエント、種ごと又は対象ごとの標的遺伝子変種、他の標的経路遺伝子などの代替りの標的遺伝子を発現する他の遺伝子も対象とする。かかる追加の遺伝子の標的部位は、本明細書の例示的な標的遺伝子及び配列に対する本明細書の方法を用いて分析することができる。したがって、他の遺伝子の調節、及びかかる調節の効果は、本明細書に記載したとおりに実施することができる。換言すれば、以下に定義し、記載した実施形態に列挙する「標的」及び「標的遺伝子」という用語は、ポリペプチドをコードする遺伝子、調節ポリヌクレオチド（例えば、miRNA及びsiRNA）、変異遺伝子、及び遺伝子のスプライスバリエント、並びに遺伝子発現経路及び／又は遺伝子活性に関与する他の遺伝子など、本明細書の疾患、形質及び症状の発生及び／又は持続に関連する遺伝子を包含するものとする。したがって、「標的」という用語が本明細書で定義されるように、「標的」という用語に関連して本明細書に記載した実施形態の各々は、「標的」という用語によって網羅されるタンパク質、ペプチド、ポリペプチド及び／又はポリヌクレオチド分子の全部に適用可能である。包括的に、かかる遺伝子標的を本明細書では一般に「標的」配列とも称する。

【0015】

一実施形態においては、本発明は、標的RNA又はDNAの異なる領域（例えば、本明

細書のものなどの2つの異なる標的部位、又は標的若しくは経路標的の任意の組合せ)、コード標的と非コード標的の両方などの異なるポリヌクレオチド標的を標的とした、本発明の2種類以上の異なる s i N A 分子及び／又は R N A i 阻害剤(例えば、s i N A、二本鎖形成性(duplex forming) s i N A 若しくは多官能 s i N A 又はその任意の組合せ)を含む組成物を特徴とする。s i N A 分子のかかるプールは、治療効果を増大し得る。

【0016】

一実施形態においては、本発明は、標的 R N A 又は D N A の異なる領域(例えば、本明細書の2つの異なる標的部位、又は標的若しくは経路標的の任意の組合せ)、コード標的と非コード標的の両方などの異なるポリヌクレオチド標的に対して特異性を有する、本発明の2種類以上の異なる s i N A 分子(例えば、s i N A、二本鎖形成性(foming) s i N A 若しくは多官能 s i N A 又はその任意の組合せ)のプールを特徴とする。ここで、プールは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える異なる標的を標的にする s i N A 分子を含む。

10

【0017】

異なる生物体間、又は異なる対象間でゲノムの配列が変わり得るために、広範な治療用途向けの s i N A 分子を選択するには、遺伝子の保存領域を含む必要があると考えられる。一実施形態においては、本発明は、ゲノムの保存領域を、又は異なる標的間で保存された領域を標的にする s i N A 分子及び／又は R N A i 阻害剤に関する。種々の標的の保存領域を標的にするように設計された s i N A 分子及び／又は R N A i 阻害剤は、多様な患者集団において、標的遺伝子発現を効率的に阻害することができる。

20

【0018】

一実施形態においては、本発明は、二本鎖の一方が標的核酸分子又はその一部における所定のヌクレオチド配列に対して相補性を有するヌクレオチド配列を含む、s i N A 分子などの二本鎖核酸分子を特徴とする。所定のヌクレオチド配列は、本明細書の配列、当分野で公知の配列などのヌクレオチド標的配列であり得る。別の実施形態においては、所定のヌクレオチド配列は、当分野で公知の標的配列又は経路標的配列である。

【0019】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的 R N A の切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。ここで、前記 s i N A 分子は、約15から約28個の塩基対を含む。

30

【0020】

一実施形態においては、本発明は、標的 R N A の切断を誘導する二本鎖低分子干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。ここで、前記 s i N A 分子は、約15から約28個の塩基対を含む。

【0021】

一実施形態においては、本発明は、R N A 干渉(R N A i)による標的 R N A の切断を誘導する二本鎖低分子干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。ここで、二本鎖 s i N A 分子は第1の鎖と第2の鎖を含み、s i N A 分子の各鎖は約18から約28(例えば、約18、19、20、21、22、23、24、25、26、27又は28)ヌクレオチド長であり、s i N A 分子の第1の鎖は、s i N A 分子が R N A 干渉によって標的 R N A の切断を誘導するのに十分な相補性を標的 R N A に対して有するヌクレオチド配列を含み、前記 s i N A 分子の第2の鎖は、第1の鎖に相補的であるヌクレオチド配列を含む。特定の一実施形態においては、例えば、s i N A 分子の各鎖は、約18から約27ヌクレオチド長である。

40

【0022】

一実施形態においては、本発明は、R N A 干渉(R N A i)による標的 R N A の切断を誘導する二本鎖低分子干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。ここで、二本鎖 s i N A 分子は第1の鎖と第2の鎖を含み、s i N A 分子の各鎖は約18から約23(例えば、約18、19、20、21、22又は23)ヌクレオチド長であり、s i N A 分子の第1の

50

鎖は、s i N A分子がR N A干渉によって標的R N Aの切断を誘導するのに十分な相補性を標的R N Aに対して有するヌクレオチド配列を含み、前記s i N A分子の第2の鎖は、第1の鎖に相補的であるヌクレオチド配列を含む。

【0023】

一実施形態においては、本発明は、R N A干渉（R N A i）による標的R N Aの切断を誘導する、化学合成された二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、s i N A分子の各鎖は約18から約28ヌクレオチド長であり、s i N A分子の1本の鎖は、s i N A分子がR N A干渉によって標的R N Aの切断を誘導するのに十分な相補性を標的R N Aに対して有するヌクレオチド配列を含む。

【0024】

一実施形態においては、本発明は、R N A干渉（R N A i）による標的R N Aの切断を誘導する、化学合成された二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、s i N A分子の各鎖は約18から約23ヌクレオチド長であり、s i N A分子の1本の鎖は、s i N A分子がR N A干渉によって標的R N Aの切断を誘導するのに十分な相補性を標的R N Aに対して有するヌクレオチド配列を含む。

【0025】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的R N Aの切断を誘導する、s i N A分子を特徴とする。ここで、例えば、標的遺伝子又はR N Aはタンパク質コード配列を含む。一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的R N Aの切断を誘導する、s i N A分子を特徴とする。ここで、例えば、標的遺伝子又はR N Aは、標的遺伝子発現に関与する非コード配列又は調節エレメント（例えば、非コードR N A、m i R N A、s t R N Aなど）を含む。

【0026】

一実施形態においては、本発明のs i N Aを用いて、標的遺伝子又は標的遺伝子ファミリーの発現を阻害する。ここで、遺伝子又は遺伝子ファミリーの配列は、配列相同性を共有する。かかる相同配列は、例えば配列アラインメントによって、当分野で公知のとおりに特定することができる。s i N A分子は、例えば、完全な相補配列を用いて、又は追加の標的配列を与え得る非標準塩基対、例えばミスマッチ及び／又はゆらぎ塩基対を導入することによって、かかる相同配列を標的とするように設計することができる。ミスマッチが特定された場合には、非標準塩基対（例えば、ミスマッチ及び／又はゆらぎ塩基）を用いて、1個を超える遺伝子配列を標的にするs i N A分子を作製することができる。非限定的例においては、U U、C C塩基対などの非標準塩基対を用いて、配列相同性を共有する異なるポリヌクレオチド標的の配列を標的にすることができるs i N A分子を作製する。したがって、本発明のs i N Aを使用する一利点は、相同遺伝子間で保存されたヌクレオチド配列に相補的である核酸配列を含むように単一のs i N Aを設計できることである。この手法においては、異なる遺伝子を標的にするために1個を超えるs i N A分子を用いる代わりに、単一のs i N Aを用いて1個を超える遺伝子の発現を阻害することができる。

【0027】

一実施形態においては、本発明は、標的R N A（例えば、コード又は非コードR N A）に対するR N A i活性を有するs i N A分子を特徴とする。ここで、s i N A分子は、その全部を参照により本明細書に組込むP C T／U S 0 3／0 5 0 2 8、米国仮出願第6 0／3 6 3，1 2 4号及び／又は米国特許出願第1 0／9 2 3，5 3 6号に示されたG e n B a n kアクセス番号を有する配列などの任意のR N A配列に相補的である配列を含む。別の実施形態においては、本発明は、標的R N Aに対するR N A i活性を有するs i N A分子を特徴とする。ここで、s i N A分子は、変種コード配列を有する、例えば、本明細書の、又は当分野で公知の疾患、形質、障害及び／又は症状の持続及び／又は発生に関連することが当分野で知られている他の変異遺伝子を有するR N Aに相補的である配列を含む。表 I 又は本明細書の化学修飾は、本発明の任意のs i N A構築物に適用することができる。別の実施形態においては、本発明のs i N A分子は、標的遺伝子のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列と相互作用し、それによって標的遺伝子発現のサイレンシングを媒介し得るヌクレオチド配列を含む。ここで、例えば、s i N A は、クロマチン構造又は標的遺伝子のメチル化パターンを調節して、標的遺伝子の転写を防止する細胞プロセスによって、標的遺伝子発現の調節を媒介する。

【0028】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子を用いて、対象又は生物体において形質、疾患又は症状に関連するハプロタイプ多型から生じるタンパク質の発現を下方制御又は阻害する。遺伝子又はタンパク質若しくはRNAレベルを分析することによって、かかる多型を有する対象、又は本明細書の形質、症状若しくは疾患を発生するリスクのある対象を特定することができる。これらの対象は、治療、例えば、本発明の s i N A 分子、及び標的遺伝子発現に関係する疾患の治療に有用である任意の他の組成物を用いた治療に適している。したがって、タンパク質又はRNAレベルを分析することによって、対象を治療する治療タイプ及び療法のコースを決定することができる。タンパク質又はRNAレベルを監視することによって、治療の成果を予測し、また、形質、障害、症状又は疾患に関連したある種のタンパク質のレベル及び／又は活性を調節する化合物及び組成物の効力を求めることができる。

10

【0029】

本発明の一実施形態においては、s i N A 分子は、標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。s i N A は、センス鎖を更に含み、前記センス鎖は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部を含む。

20

【0030】

別の実施形態においては、s i N A 分子は、標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含む。s i N A 分子は、センス領域を更に含み、前記センス領域は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部を含む。

【0031】

別の実施形態においては、本発明は、ヌクレオチド配列を含む s i N A 分子、例えば、標的遺伝子のヌクレオチド配列又は配列の一部に相補的である、s i N A 分子のアンチセンス領域中のヌクレオチド配列を含む s i N A 分子を特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、領域、例えば、標的遺伝子配列又はその一部を含む配列に相補的である、s i N A 構築物のアンチセンス領域を含む s i N A 分子を特徴とする。

30

【0032】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子のセンス領域又はセンス鎖は、標的ポリヌクレオチド配列に相補的である、s i N A 分子のアンチセンス領域又はアンチセンス鎖の部分に相補的である。

【0033】

更に別の実施形態においては、本発明は、配列を含む s i N A 分子、例えば、その全部を参照により本明細書に組込む P C T / U S 0 3 / 0 5 0 2 8、米国仮出願第 6 0 / 3 6 3, 1 2 4 号及び／又は米国特許出願第 1 0 / 9 2 3, 5 3 6 号に示された G e n B a n k アクセッション番号によって表される配列を含む配列又は配列の一部に相補的である、s i N A 構築物のアンチセンス配列を含む s i N A 分子を特徴とする。表 I 及び本明細書の化学修飾は、本発明の任意の s i N A 構築物に適用することができる。表 I V の L N P 調合物は、本明細書の任意の s i N A 分子又は s i N A 分子の組合せに適用することができる。

40

【0034】

本発明の一実施形態においては、s i N A 分子は、約 1 5 から約 3 0（例えば、約 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0）ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖を含む。ここで、アンチセンス鎖は、標的 RNA 配列又はその一部に相補的である。前記 s i N A は、約 1 5 から約 3 0（例

50

えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを有するセンス鎖を更に含む。前記センス鎖と前記アンチセンス鎖は、異なるヌクレオチド配列であり、各鎖中の少なくとも約15ヌクレオチドは、他方の鎖に相補的である。

【0035】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子 (例えば、二本鎖核酸分子)は、標的 R N A 配列又はその一部に相補的である、約 15 から約 30 (例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを有するアンチセンス (ガイド) 鎖を含む。一実施形態においては、標的 R N A 配列の少なくとも 15ヌクレオチド (例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチド)は、本発明の s i N A 分子のアンチセンス (ガイド) 鎖に相補的である。

10

【0036】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子 (例えば、二本鎖核酸分子)は、標的 R N A の配列又はその一部を含む、約 15 から約 30 (例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを有するセンス (パッセンジャー) 鎖を含む。一実施形態においては、標的 R N A 配列の少なくとも 15ヌクレオチド (例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドは、本発明の s i N A 分子のセンス (パッセンジャー) 鎖を含む。

20

【0037】

本発明の別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、約 15 から約 30 (例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを有するアンチセンス領域を含む。ここで、アンチセンス領域は、標的 D N A 配列に相補的である。前記 s i N A は、約 15 から約 30 (例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを有するセンス領域を更に含む。前記センス領域と前記アンチセンス領域は線状分子に含まれ、センス領域は、アンチセンス領域に相補的である少なくとも約 15ヌクレオチドを含む。

【0038】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、遺伝子によってコードされる R N A の発現を調節する R N A i 活性を有する。各遺伝子はある程度の配列相同性を共有するので、s i N A 分子は、異なる標的間で共有される配列、又は特定の標的に特有の配列を選択することによって、あるクラスの遺伝子を標的にするように設計することができる。したがって、一実施形態においては、s i N A 分子は、1種類の s i N A 分子を用いてあるクラスの遺伝子を標的にするために、幾つかの遺伝子変種間で相同性を有する標的ポリヌクレオチド配列の保存領域を標的にするように設計することができる。したがって、一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における1種類以上の標的遺伝子アイソフォーム又は変種の発現を調節する。別の実施形態においては、s i N A 分子は、s i N A 分子が R N A i 活性を媒介するのに必要な高度の特異性のために、特定のポリヌクレオチド配列 (例えば、単一の標的遺伝子アイソフォーム又は一塩基多型 (S N P)) に特有の配列を標的にするように設計することができる。

30

40

【0039】

一実施形態においては、R N A 干渉遺伝子サイレンシング応答の媒介物質として作用する本発明の核酸分子は、二本鎖核酸分子である。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、約 15 から約 30 (例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド間の約 15 から約 30 塩基対を含む二本鎖核酸分子からなる。更に別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、約 1 から約 3 (例えば、約 1、2又は3)ヌクレオチドのオーバーハング末端を有する二本鎖核酸分子、例えば、約 19 塩基対と 3

50

’末端モノヌクレオチド、ジヌクレオチド又はトリヌクレオチドオーバーハングとを有する約21ヌクレオチド二本鎖を含む。更に別の実施形態においては、本発明のs i N A分子は、両末端が平滑末端である、又は両末端の一方が平滑末端である、平滑末端を有する二本鎖核酸分子を含む。

【0040】

一実施形態においては、二本鎖核酸（例えば、s i N A）分子は、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドオーバーハングを含む。「オーバーハング」とは、二本鎖核酸分子の2本の鎖の間で塩基対を形成していないヌクレオチド配列の末端部分を意味する（例えば、図6参照）。一実施形態においては、本発明の二本鎖核酸分子は、二本鎖核酸分子の一方又は両方の鎖の3’末端にヌクレオチド又は非ヌクレオチドオーバーハングを含み得る。例えば、本発明の二本鎖核酸分子は、二本鎖核酸分子のガイド鎖若しくはアンチセンス鎖／領域の3’末端に、パッセンジャー鎖若しくはセンス鎖／領域の3’末端に、又はガイド鎖若しくはアンチセンス鎖／領域とパッセンジャー鎖若しくはセンス鎖／領域の両方に、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドオーバーハングを含み得る。別の実施形態においては、本発明の二本鎖核酸（s i N A）分子のヌクレオチドオーバーハング部分は、2’-O-メチル、2’-デオキシ、2’-デオキシ-2’-フルオロ、2’-デオキシ-2’-フルオロアラビノ（F A N A）、4’-チオ、2’-O-トリフルオロメチル、2’-O-エチルトリフルオロメトキシ、2’-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、汎用塩基（u n i v e r s a l b a s e）、非環式、又は5-C-メチルヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、本発明の二本鎖核酸（s i N A）分子の非ヌクレオチドオーバーハング部分は、グリセリル、脱塩基又は反転（i n v e r t e d）デオキシ脱塩基非ヌクレオチドを含む。

【0041】

一実施形態においては、本発明の二本鎖核酸（例えば、s i N A）分子のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、s i N A分子の標的ポリヌクレオチド配列を含むヌクレオチドに対応する。したがって、かかる実施形態においては、本発明のs i N A分子のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列に基づく配列を含む。ここで、本発明のs i N A分子のガイド鎖又はアンチセンス鎖／領域のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列中のヌクレオチドに相補的であり得、本発明のs i N A分子のパッセンジャー鎖又はセンス鎖／領域のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列中のヌクレオチドを含み得る。かかるヌクレオチドオーバーハングは、s i R N Aへの未変性d s R N Aのダイサープロセッシングから生成する配列を含む。

【0042】

一実施形態においては、本発明の二本鎖核酸（例えば、s i N A）分子のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列に相補的であり、本明細書に記載したとおりに化学修飾されていてもよい。したがって、一実施形態においては、本発明のs i N A分子のガイド鎖又はアンチセンス鎖／領域のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列中のヌクレオチド、すなわち、s i N A分子のガイド鎖又はアンチセンス鎖／領域中のオーバーハングヌクレオチドのヌクレオチド位置に相補的である、標的ポリヌクレオチド配列中のヌクレオチド位置に相補的であり得る。別の実施形態においては、本発明のs i N A分子のパッセンジャー鎖又はセンス鎖／領域のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列中のヌクレオチド、すなわち、s i N A分子中のパッセンジャー鎖又はセンス鎖／領域中のオーバーハングヌクレオチドの同じヌクレオチド位置に対応する標的ポリヌクレオチド配列中のヌクレオチド位置を含み得る。一実施形態においては、オーバーハングは、標的ポリヌクレオチド配列の一部に相補的である2個のヌクレオチド（例えば、3’-G A、3’-G U、3’-G G、3’-G C、3’-C A、3’-C U、3’-C G、3’-C C、3’-U A、3’-U U、3’-U G、3’-U C、3’-A A、3’-A U、3’-A G、3’-A C、3’-T A、3’-T U、3’-T G、3’-T C、3’-A T、3’-U T、3’-G T、

3' - C T) オーバーハングを含む。一実施形態においては、オーバーハングは、標的ポリヌクレオチド配列の一部に相補的でない2個のヌクレオチド(例えば、3' - G A、3' - G U、3' - G G、3' G C、3' - C A、3' - C U、3' - C G、3' C C、3' - U A、3' - U U、3' - U G、3' U C、3' - A A、3' - A U、3' - A G、3' - A C、3' - T A、3' - T U、3' - T G、3' - T C、3' - A T、3' - U T、3' - G T、3' - C T) オーバーハングを含む。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子のオーバーハングヌクレオチドは、2' - O - メチルヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロアラビノ及び/又は2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドである。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子のオーバーハングヌクレオチドは、オーバーハングヌクレオチドがプリンヌクレオチドである場合には、2' - O - メチルヌクレオチドであり、及び/又はオーバーハングヌクレオチドがピリミジンヌクレオチドである場合には、2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチド若しくは2' - デオキシ - 2' - フルオロアラビノヌクレオチドである。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子のオーバーハング中のプリンヌクレオチドは(存在するときには)2' - O - メチルヌクレオチドである。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子のオーバーハング中のピリミジンヌクレオチドは(存在するときには)2' - デオキシ - 2' - フルオロ又は2' - デオキシ - 2' - フルオロアラビノヌクレオチドである。

10

【0043】

一実施形態においては、本発明の二本鎖核酸(例えば、s i N A)分子のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列に相補的でなく、本明細書に記載したとおりに化学修飾されていてもよい。一実施形態においては、オーバーハングは、標的ポリヌクレオチド配列の一部に相補的でない3' - U U オーバーハングを含む。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子のオーバーハング部分を含むヌクレオチドは、2' - O - メチルヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロアラビノ及び/又は2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドである。

20

【0044】

一実施形態においては、本発明の二本鎖核分子(例えば、s i N A)は、2又は3個のヌクレオチドオーバーハングを含み、オーバーハング中のヌクレオチドは同じであり、又は異なる。一実施形態においては、本発明の二本鎖核分子(例えば、s i N A)は、2又は3個のヌクレオチドオーバーハングを含み、オーバーハング中のヌクレオチドは、同じであり、又は異なり、オーバーハング中の1個以上のヌクレオチドは、塩基、糖及び/又はリン酸骨格において化学修飾されている。

30

【0045】

一実施形態においては、本発明は、DNA、タンパク質をコードするRNA、標的遺伝子の発現に関連する非コードRNAなどの標的核酸分子に特異的である1個以上の化学修飾 s i N A 構築物を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、本明細書の1個以上の化学修飾を含む核酸分子に特異的である、RNAベースの s i N A 分子(例えば、2' - O H ヌクレオチドを含む s i N A)を特徴とする。かかる化学修飾の非限定的例としては、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合、2' - デオキシリボヌクレオチド、2' - O - メチルリボヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロリボヌクレオチド、4' - チオリボヌクレオチド、2' - O - トリフルオロメチルヌクレオチド、2' - O - エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2' - O - ジフルオロメトキシ - エトキシヌクレオチド(例えば、参照により本明細書に組込む、2004年11月5日に出願された米国特許出願第10/981,966号参照)、「汎用塩基」ヌクレオチド、「非環式」ヌクレオチド、5 - C - メチルヌクレオチド、2' - デオキシ - 2' - フルオロアラビノ(FANA、例えば、Dowler et al., 2006, Nucleic Acids Research, 34, 1669-1675参照)及び末端グリセリル及び/又は反転デオキシ脱塩基残基の組み入れが挙げられるが、これらだけに限定されない。これらの化学修飾は、種々の s i N A 構築物(例えば、RNAベースの s i N A 構築物)において使用すると、細胞におけるRNA i 活性を維持し、同時に、これらの化合物の

40

50

血清安定性を劇的に増大させることが判明した。

【0046】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、本明細書の化学修飾（例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、4'-チオリボヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシヌクレオチド、L N A）を s i N A 分子の内部位置に含む。「内部位置」とは、s i N A 二本鎖の塩基対形成位置を意味する。

【0047】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、R N A i を媒介する能力を維持しつつ、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドを使用して、安定性、活性、毒性、免疫応答及び／又は生物学的利用能などのインビトロ又はインビボ特性を改善することができる。例えば、本発明の s i N A 分子は、s i N A 分子中に存在するヌクレオチドの総数の百分率として修飾ヌクレオチドを含み得る。したがって、本発明の s i N A 分子は、約5%から約100%の修飾ヌクレオチド（例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%の修飾ヌクレオチド）を一般に含み得る。例えば、一実施形態においては、本発明の s i N A 分子中のヌクレオチド位置の約5%から約100%（例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%の修飾ヌクレオチド）は、2'糖修飾、例えば、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ、2'-O-メトキシエチルヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチドなどの核酸糖修飾を含む。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子中のヌクレオチド位置の約5%から約100%（例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%の修飾ヌクレオチド）は、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュドウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン（例えば、5-メチルシチジン）、5-アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、5-ハロウリジン（例えば、5-ブロモウリジン）又は6-アザピリミジン又は6-アルキルピリミジン（例えば6-メチルウリジン）、プロピン修飾などの核酸塩基修飾を含む。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子中のヌクレオチド位置の約5%から約100%（例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%の修飾ヌクレオチド）は、本明細書の式Iの骨格修飾などの核酸骨格修飾を含む。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子中のヌクレオチド位置の約5%から約100%（例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%の修飾ヌクレオチド）は、核酸糖、塩基若しくは骨格修飾又はその任意の組合せ（例えば、本明細書の核酸糖、塩基、骨格又は非ヌクレオチド修飾の任意の組合せ）を含む。一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%の修飾ヌクレオチドを含む。所与の s i N A 分子中に存在する修飾ヌクレオチドの実際の割合は、s i N A 中に存在するヌクレオチドの総数に依存する。s i N A 分子が一本鎖である場合には、修飾率は、一本鎖 s i N A 分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づき得る。同様に、s i N A 分子が二本鎖である場合には、修飾率は、センス鎖、ア

10

20

30

40

50

ンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方中に存在するヌクレオチドの総数に基づき得る。

【0048】

本発明の s i N A 分子は、s i N A 分子内の種々の場所に修飾ヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、本発明の二本鎖 s i N A 分子は、s i N A 二本鎖内部の塩基対形成位置に修飾ヌクレオチドを含む。例えば、内部位置は、19塩基対と2個のヌクレオチド3'オーバーハングとを有する21ヌクレオチド s i N A 二本鎖のセンス鎖若しくは領域又はアンチセンス鎖若しくは領域のどちらかの5'末端から約3から約19ヌクレオチドの位置を含み得る。別の実施形態においては、本発明の二本鎖 s i N A 分子は、s i N A 分子の非塩基対形成領域、すなわちオーバーハング領域に修飾ヌクレオチドを含む。

「非塩基対形成」とは、センス鎖又はセンス領域とアンチセンス鎖又はアンチセンス領域又は s i N A 分子との間でヌクレオチドが塩基対を形成していないことを意味する。オーバーハングヌクレオチドは、対応する標的ポリヌクレオチド配列に相補的であり得、又は対応する標的ポリヌクレオチド配列と塩基対を形成し得る（例えば、図6C参照）。例えば、オーバーハング位置は、19塩基対と2個のヌクレオチド3'オーバーハングとを有する21ヌクレオチド s i N A 二本鎖のセンス鎖若しくは領域又はアンチセンス鎖若しくは領域のどちらかの5'末端から約20及び約21ヌクレオチドの位置を含み得る。別の実施形態においては、本発明の二本鎖 s i N A 分子は、s i N A 分子の末端位置に修飾ヌクレオチドを含む。例えば、かかる末端領域としては、s i N A 分子のセンス及び／又はアンチセンス鎖若しくは領域の3'と5'の両方の位置に対して、3'位置、5'位置が挙げられる。別の実施形態においては、本発明の二本鎖 s i N A 分子は、塩基対形成位置若しくは内部位置、非塩基対形成領域若しくはオーバーハング領域、及び／又は末端領域、又はその任意の組合せにおいて、修飾ヌクレオチドを含む。

【0049】

本発明の一態様は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的 R N A の切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子は、1個以上の化学修飾を含み、二本鎖 s i N A の各鎖は約21ヌクレオチド長である。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子は、リボヌクレオチドを含まない。別の実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子は、1個以上のリボヌクレオチドを含む。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子の各鎖は、約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチドを独立に含む。ここで、各鎖は、他方の鎖のヌクレオチドに相補的である約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチドを含む。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子の鎖の一方は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、二本鎖 s i N A 分子の他方の鎖は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部にかなり類似したヌクレオチド配列を含む。

【0050】

別の実施形態においては、本発明は、アンチセンス領域とセンス領域を含み、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的 R N A の切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部にかなり類似したヌクレオチド配列を含む。一実施形態においては、アンチセンス領域とセンス領域は、約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチドを独立に含む。ここで、アンチセンス領域は、センス領域のヌクレオチドに相補的である約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチドを含む。

【0051】

別の実施形態においては、本発明は、センス領域とアンチセンス領域を含み、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的RNAの切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域は、標的遺伝子によってコードされるRNAのヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域に相補的であるヌクレオチド配列を含む。

【0052】

一実施形態においては、本発明のsiNA分子は、平滑末端、すなわち、オーバーハングヌクレオチドを含まない末端を含む。例えば、本明細書の修飾を含み（例えば、式I-VIIのヌクレオチド、「Stab 00」-「Stab 36」若しくは「Stab 3F」-「Stab 36F」を含むsiNA構築物（表I）、又はその任意の組合せを含み）、及び／又は本明細書の任意の長さを含むsiNA分子は、平滑末端、すなわちオーバーハングヌクレオチドを含まない末端を含み得る。

【0053】

一実施形態においては、本発明の任意のsiNA分子は、1個以上の平滑末端を含み得る。すなわち、ここで、平滑末端は、オーバーハングヌクレオチドを含まない。一実施形態においては、平滑末端siNA分子は、siNA分子の各鎖中に存在するヌクレオチドと同数の塩基対を有する。別の実施形態においては、siNA分子は1個の平滑末端を含む。例えば、アンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖の3'末端はオーバーハングヌクレオチドを含まない。別の例においては、siNA分子は1個の平滑末端を含む。例えば、アンチセンス鎖の3'末端とセンス鎖の5'末端はオーバーハングヌクレオチドを含まない。別の例においては、siNA分子は2個の平滑末端を含む。例えば、アンチセンス鎖の3'末端とセンス鎖の5'末端、及びアンチセンス鎖の5'末端とセンス鎖の3'末端は、オーバーハングヌクレオチドを含まない。平滑末端siNA分子は、例えば、約15から約30ヌクレオチド（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチド）を含み得る。平滑末端siNA分子中に存在する他のヌクレオチドは、例えば、ミスマッチ、バルジ、ループ又はゆらぎ塩基対を含み、siNA分子の活性を調節して、RNA干渉を媒介することができる。

【0054】

「平滑末端」とは、対称な末端、又はオーバーハングヌクレオチドを含まない二本鎖siNA分子の末端を意味する。二本鎖siNA分子の2本の鎖は、末端にオーバーハングヌクレオチドを含まずに整合する。例えば、平滑末端siNA構築物は、siNA分子のセンス領域とアンチセンス領域の間で相補的である末端ヌクレオチドを含む。

【0055】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的RNAの切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、siNA分子は、2個の別々のオリゴヌクレオチド断片から組み立てられ、第1の断片はセンス領域を含み、第2の断片はsiNA分子のアンチセンス領域を含む。センス領域は、ポリヌクレオチドリンカー、非ヌクレオチドリンカーなどのリンカー分子を介してアンチセンス領域と連結し得る。

【0056】

一実施形態においては、本発明の二本鎖核酸分子（例えば、siNA）分子は、RNAi活性を維持又は増強する位置にリボヌクレオチドを含む。一実施形態においては、リボヌクレオチドは、siNA分子のセンス鎖又はセンス領域中に存在し、RISC内での酵素によるセンス鎖又はセンス領域の切断を可能にすることによってRNAi活性を付与し得る（例えば、RISC中でAGO2酵素によって切断される、19塩基対二本鎖のパッセンジャー鎖の位置9など、パッセンジャー鎖、センス鎖又はセンス領域の切断位置に存在するリボヌクレオチド。例えば、Matranga et al., 2005, Cell, 123:1-114及びRand et al., 2005, Cell,

10

20

30

40

50

1 2 3 : 6 2 1 - 6 2 9を参照されたい。) 。別の実施形態においては、s i N A分子の(アンチセンス鎖又はアンチセンス領域としても知られる)ガイド鎖又はガイド領域の5'末端にある1個以上(例えば、1、2、3、4又は5個)のヌクレオチドはリボヌクレオチドである。

【0057】

一実施形態においては、本発明の二本鎖核酸分子(例えば、s i N A)分子は、R I S C複合体中での酵素によるパッセンジャー鎖又はパッセンジャー領域の切断を可能にする(センス鎖又はセンス領域としても知られる)パッセンジャー鎖又はパッセンジャー領域内の位置に1個以上のリボヌクレオチドを含む(例えば、R I S C中で切断される、19塩基対二本鎖のパッセンジャー鎖の位置9など、パッセンジャー鎖の位置に存在するリボヌクレオチド。例えば、Mat r a n g a e t a l . , 2005, C e l l , 123:1-114及びRand e t a l . , 2005, C e l l , 123:621-629を参照されたい。)。 10

【0058】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、少なくとも2、3、4、5個又はそれを超える、同じでも、異なってもよい化学修飾を含む。一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、少なくとも2、3、4、5個又はそれを超える異なる化学修飾を含む。

【0059】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は二本鎖低分子干渉核酸(s i N A)であって、二本鎖核酸分子は、約15から約30(例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)個の塩基対を含み、s i N A分子の各鎖中のヌクレオチド位置の1つ以上(例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30個)は、化学修飾を含む。別の実施形態においては、s i N Aは、少なくとも2、3、4、5個又はそれを超える異なる化学修飾を含む。 20

【0060】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的R N Aの切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。ここで、s i N A分子は、約15から約30(例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)個の塩基対を含み、s i N A分子の各鎖は1個以上の化学修飾を含む。一実施形態においては、二本鎖s i N A分子の各鎖は、少なくとも2個の(例えば、2、3、4、5個又はそれを超える)異なる化学修飾、例えば、異なるヌクレオチド糖、塩基又は骨格修飾を含む。別の実施形態においては、二本鎖s i N A分子の鎖の一方は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、二本鎖s i N A分子の他方の鎖は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部にかなり類似したヌクレオチド配列を含む。別の実施形態においては、二本鎖s i N A分子の鎖の一方は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、二本鎖s i N A分子の他方の鎖は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部にかなり類似したヌクレオチド配列を含む。別の実施形態においては、s i N A分子の各鎖は、約15から約30(例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを含み、各鎖は、他方の鎖のヌクレオチドに相補的である少なくとも約15から約30(例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチドを含む。標的遺伝子は、例えば、本明細書で言及する配列、又は参照により本明細書に組込む配列を含み得る。遺伝子は、例えば、本明細書のG e n B a n kアクセッション番号によって参照される配列を含み得る。 30 40

【0061】

一実施形態においては、本発明の二本鎖 s i N A 分子の各鎖は、本明細書の任意の「S t a b 0 0」－「S t a b 3 6」又は「S t a b 3 F」－「S t a b 3 6 F」（表 I）修飾パターン、その任意の組合せなどの異なる化学修飾パターンを含む。種々の修飾パターンを有するかかる s i N A 分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖の非限定的例を表 I I 並びに図 4 及び 5 に示す。

【0062】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、リボヌクレオチドを含まない。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、1 個以上のリボヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超えるリボヌクレオチド）を含む。

10

【0063】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部にかなり類似したヌクレオチド配列を含むセンス領域を更に含む。別の実施形態においては、アンチセンス領域とセンス領域は、約 15 から約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）ヌクレオチドを各々含む。アンチセンス領域は、センス領域のヌクレオチドに相補的である少なくとも約 15 から約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）ヌクレオチドを含む。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子の各鎖は、少なくとも 2 個の（例えば、2、3、4、5 個又はそれを超える）異なる化学修飾、例えば、異なるヌクレオチド糖、塩基又は骨格修飾を含む。標的遺伝子は、例えば、本明細書で言及する配列、又は参照により本明細書に組込む配列を含み得る。別の実施形態においては、s i N A は二本鎖核酸分子であり、s i N A 分子の 2 本の鎖の各々は、約 15 から約 40（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、23、33、34、35、36、37、38、39 又は 40）ヌクレオチドを独立に含み、s i N A 分子の鎖の 1 本は、標的遺伝子の核酸配列又はその一部に相補的である少なくとも約 15（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 若しくは 25 又はそれを超える）ヌクレオチドを含む。

20

30

【0064】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、センス領域及びアンチセンス領域を含み、アンチセンス領域は、標的遺伝子によってコードされる R N A のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域に相補的であるヌクレオチド配列を含む。一実施形態においては、s i N A 分子は、2 個の別々のオリゴヌクレオチド断片から組み立てられ、第 1 の断片はセンス領域を含み、第 2 の断片は s i N A 分子のアンチセンス領域を含む。別の実施形態においては、センス領域は、リンカー分子を介してアンチセンス領域と連結されている。別の実施形態においては、センス領域は、ヌクレオチド、非ヌクレオチドリinkerなどのリンカー分子を介してアンチセンス領域と連結されている。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子の各鎖は、少なくとも 2 個の（例えば、2、3、4、5 個又はそれを超える）異なる化学修飾、例えば、異なるヌクレオチド糖、塩基又は骨格修飾を含む。標的遺伝子は、例えば、本明細書で言及する配列、又は参照により本明細書に組込む配列を含み得る。

40

【0065】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、1 個以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個又はそれを超える）2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジン修飾を含む（例えば、s i N A の 1 個以上又は全部のピリミジン（例えば、U 又は C）位置が 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで修飾されている。）。一実施形態においては、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジン修飾は、センス鎖中に存在する。一実施形態に

50

においては、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジン修飾は、アンチセンス鎖中に存在する。一実施形態においては、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジン修飾は、s i N A分子のセンス鎖中とアンチセンス鎖中の両方に存在する。

【0066】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、1個以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個又はそれを超える）2'-O-メチルプリン修飾を含む（例えば、s i N Aの1個以上又は全部のプリン（例えば、A又はG）位置が2'-O-メチルヌクレオチドで修飾されている。）。一実施形態においては、2'-O-メチルプリン修飾は、センス鎖中に存在する。一実施形態においては、2'-O-メチルプリン修飾は、アンチセンス鎖中に存在する。一実施形態においては、2'-O-メチルプリン修飾は、s i N A分子のセンス鎖中とアンチセンス鎖中の両方に存在する。

10

【0067】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、1個以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個又はそれを超える）2'-デオキシプリン修飾を含む（例えば、s i N Aの1個以上又は全部のプリン（例えば、A又はG）位置が2'-デオキシヌクレオチドで修飾されている。）。一実施形態においては、2'-デオキシプリン修飾は、センス鎖中に存在する。一実施形態においては、2'-デオキシプリン修飾は、アンチセンス鎖中に存在する。一実施形態においては、2'-デオキシプリン修飾は、s i N A分子のセンス鎖中とアンチセンス鎖中の両方に存在する。

20

【0068】

一実施形態においては、本発明は、センス領域とアンチセンス領域を含み、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的RNAの切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域は、標的遺伝子によってコードされるRNAのヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域に相補的であるヌクレオチド配列を含む。s i N A分子は、1個以上の修飾ピリミジン及び／又はプリンヌクレオチドを有する。一実施形態においては、二本鎖s i N A分子の各鎖は、少なくとも2個の（例えば、2、3、4、5個又はそれを超える）異なる化学修飾、例えば、異なるヌクレオチド糖、塩基又は骨格修飾を含む。一実施形態においては、センス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチド又は2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域中に存在するプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである。別の実施形態においては、センス領域中のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域中に存在するプリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。別の実施形態においては、センス領域中のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域中に存在するプリンヌクレオチドは2'-O-メチル又は2'-デオキシプリンヌクレオチドである。上記s i N A分子のいずれかの別の実施形態においては、センス鎖の非相補領域（例えば、オーバーハング領域）中に存在する任意のヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドである。

30

40

【0069】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的RNAの切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、s i N A分子は、2個の別々のオリゴヌクレオチド断片から組み立てられ、第1の断片はセンス領域を含み、第2の断片はs i N A分子のアンチセンス領域を含む。センス領域を含む断片は、断片の5'末端に、3'末端に、又は5'末端と3'末端の両方に、末端キャッ

50

ブ部分を含む。一実施形態においては、末端キャップ部分は、反転デオキシ脱塩基部分又はグリセリル部分である。一実施形態においては、s i N A分子の2個の断片の各々は、約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチドを独立に含む。別の実施形態においては、s i N A分子の2個の断片の各々は、約15から約40（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、23、33、34、35、36、37、38、39又は40）ヌクレオチドを独立に含む。非限定的例においては、s i N A分子の2個の断片の各々は、約21ヌクレオチドを含む。

【0070】

一実施形態においては、本発明は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを含むs i N A分子を特徴とする。ここで、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシヌクレオチド、又は本明細書及び参照により本明細書に組込む2004年11月5日に出願された米国特許出願第10/981,966号の任意の他の修飾ヌクレオチド／ヌクレオチドである。一実施形態においては、本発明は、少なくとも2個の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）修飾ヌクレオチドを含むs i N A分子を特徴とする。ここで、修飾ヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシヌクレオチド、又は本明細書及び参照により本明細書に組込む2004年11月5日に出願された米国特許出願第10/981,966号の任意の他の修飾ヌクレオチド／ヌクレオチドからなる群から選択される。修飾ヌクレオチド／ヌクレオチドは、同じでも、異なってもよい。s i N Aは、例えば、約15から約40ヌクレオチド長であり得る。一実施形態においては、s i N A中に存在する全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオピリミジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中の修飾ヌクレオチドは、少なくとも1個の2'-デオキシ-2'-フルオロシチジン又は2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、s i N A中の修飾ヌクレオチドは、少なくとも1個の2'-デオキシ-2'-フルオロシチジン及び少なくとも1個の2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンヌクレオチドを含む。一実施形態においては、s i N A中に存在する全ウリジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全シチジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロシチジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全アデノシンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全グアノシンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオログアノシンヌクレオチドである。S i N Aは、ホスホロチオアート結合などの少なくとも1個の修飾ヌクレオチド間結合を更に含み得る。一実施形態においては、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドを有する場所など、リボヌクレアーゼによる切断に敏感である、s i N A中の特に選択された場所に存在する。

【0071】

一実施形態においては、本発明は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドをs i N A分子中に導入することを含む、リボヌクレアーゼによる切断に対するs i N A分子の安定性を増大させる方法の特徴とする。ここで、修飾ヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。一実施

10

20

30

40

50

形態においては、s i N A中の修飾ヌクレオチドは、少なくとも1個の2'-デオキシ-2'-フルオロシチジン又は2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、s i N A中の修飾ヌクレオチドは、少なくとも1個の2'-フルオロシチジン及び少なくとも1個の2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンヌクレオチドを含む。一実施形態においては、s i N A中に存在する全ウリジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全シチジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロシチジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全アデノシンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全グアノシンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオログアノシンヌクレオチドである。S i N Aは、ホスホロチオアート結合などの少なくとも1個の修飾ヌクレオチド間結合を更に含み得る。一実施形態においては、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドを有する場所など、リボヌクレアーゼによる切断に敏感である、s i N A中の特に選択された場所に存在する。

10

【0072】

一実施形態においては、本発明は、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドをs i N A分子中に導入することを含む、リボヌクレアーゼによる切断に対するs i N A分子の安定性を増大させる方法の特徴とする。ここで、修飾ヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノピリミジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中の修飾ヌクレオチドは、少なくとも1個の2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノシチジン又は2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノウリジンヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、s i N A中の修飾ヌクレオチドは、少なくとも1個の2'-フルオロシチジン及び少なくとも1個の2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノウリジンヌクレオチドを含む。一実施形態においては、s i N A中に存在する全ウリジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノウリジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全シチジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノシチジンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全アデノシンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノアデノシンヌクレオチドである。一実施形態においては、s i N A中に存在する全グアノシンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノグアノシンヌクレオチドである。S i N Aは、ホスホロチオアート結合などの少なくとも1個の修飾ヌクレオチド間結合を更に含み得る。一実施形態においては、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドを有する場所など、リボヌクレアーゼによる切断に敏感である、s i N A中の特に選択された場所に存在する。

20

30

【0073】

一実施形態においては、本発明は、センス領域とアンチセンス領域を含み、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的RNAの切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸(s i N A)分子の特徴とする。ここで、アンチセンス領域は、標的遺伝子によってコードされるRNAのヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス領域は、アンチセンス領域に相補的であるヌクレオチド配列を含む。アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。代替の実施形態においては、アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドを含む。上記実施形態のいずれにおいても、アンチセンス領域は、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合をアンチセンス領域の3'末端に含み得る。或いは、上記実施形態のいずれにおいても、アンチセンス領域は、グリセリル修飾をアンチセンス領域の3'末端に含み得る。上記s i N A分子のいずれかの別の実施形態においては、アンチセンス鎖の非相補領域(例えば、オーバーハング領域)中に存在する任意

40

50

のヌクレオチドは 2'-デオキシヌクレオチドである。

【0074】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子のアンチセンス領域は、疾患又は形質特異的対立遺伝子に関連した一塩基多型 (SNP) を含む配列など、対象又は生物体における特定の疾患又は形質に関係する対立遺伝子に特有の配列を有する内因性転写物の一部に相補的である配列を含む。したがって、本発明の siNA 分子のアンチセンス領域は、特定の対立遺伝子に特有な配列であって、疾患、症状又は形質に関係する対立遺伝子に対して選択的な RNAi を媒介する特異性をもたらす配列に相補的である配列を含み得る。

【0075】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を下方制御する、又は標的 RNA の切断を誘導する、二本鎖低分子干渉核酸 (siNA) 分子を特徴とする。ここで、siNA 分子は、2 個の別々のオリゴヌクレオチド断片から組み立てられ、第 1 の断片はセンス領域を含み、第 2 の断片は siNA 分子のアンチセンス領域を含む。一実施形態においては、二本鎖 siNA 分子の各鎖は、約 21 ヌクレオチド長であり、siNA 分子の各断片の約 19 ヌクレオチドは、siNA 分子の他方の断片の相補ヌクレオチドと塩基対を形成し、siNA 分子の各断片の少なくとも 2 個の 3' 末端ヌクレオチドは、siNA 分子の他方の断片のヌクレオチドと塩基対を形成しない。別の実施形態においては、siNA 分子は二本鎖核酸分子であり、各鎖は約 19 ヌクレオチド長であり、siNA 分子の各断片のヌクレオチドは、siNA 分子の他方の断片の相補ヌクレオチドと塩基対を形成して、少なくとも約 15 (例えば、15、16、17、18 又は 19) 塩基対を形成し、siNA 分子の一方又は両方の末端は平滑末端である。一実施形態においては、siNA 分子の各断片の 2 個の 3' 末端ヌクレオチドの各々は、2'-デオキシチミジンなどの 2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。一実施形態においては、siNA 分子の各断片の 2 個の 3' 末端ヌクレオチドの各々は、2'-O-メチルウリジン、シチジン、チミジンなどの 2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の実施形態においては、siNA 分子の各断片の全ヌクレオチドは、siNA 分子の他方の断片の相補ヌクレオチドと塩基対を形成する。別の実施形態においては、siNA 分子は、センス領域及びアンチセンス領域を有する、約 19 から約 25 塩基対の二本鎖核酸分子であり、アンチセンス領域の約 19 ヌクレオチドは、標的遺伝子によってコードされる RNA のヌクレオチド配列又はその一部と塩基対を形成する。別の実施形態においては、アンチセンス領域の約 21 ヌクレオチドは、標的遺伝子によってコードされる RNA のヌクレオチド配列又はその一部と塩基対を形成する。上記実施形態のいずれにおいても、前記アンチセンス領域を含む断片の 5' 末端は、リン酸基を含んでいてもよい。

【0076】

一実施形態においては、本発明は、標的 RNA 配列の発現を阻害する二本鎖低分子干渉核酸 (siNA) 分子を特徴とする。ここで、siNA 分子はリボヌクレオチドを含まず、二本鎖 siNA 分子の各鎖は約 15 から約 30 ヌクレオチドである。一実施形態においては、siNA 分子は 21 ヌクレオチド長である。非リボヌクレオチド含有 siNA 構築物の例は、Stab 7/8、Stab 7/11、Stab 8/8、Stab 18/8、Stab 18/11、Stab 12/13、Stab 7/13、Stab 18/13、Stab 7/19、Stab 8/19、Stab 18/19、Stab 7/20、Stab 8/20、Stab 18/20、Stab 7/32、Stab 8/32、Stab 18/32 など、センス/アンチセンスケミストリーの任意の組合せの表 I に示す安定化ケミストリーの組合せである (例えば、Stab 7、8、11、12、13、14、15、17、18、19、20 又は 32 のセンス若しくはアンチセンス鎖又はその任意の組合せを有する任意の siNA)。本明細書では、数字で表した Stab ケミストリーは、表 I に示すケミストリーの 2'-フルオロと 2'-OCF₃ の両方のバージョンを含み得る。例えば、「Stab 7/8」は、Stab 7/8 と Stab 7F/8F の両方を指すなど。一実施形態においては、本発明は、RNA 干渉による標的 RNA の切断を誘導する、化学合成された二本鎖 RNA 分子を特徴とする。こ

ここで、前記RNA分子の各鎖は約15から約30ヌクレオチド長である。RNA分子の一方の鎖は、RNA分子がRNA干渉によって標的RNAの切断を誘導するのに十分な相補性を、標的RNAに対して有するヌクレオチド配列を含む。RNA分子の少なくとも一方の鎖は、デオキシヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノ、2'-O-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシヌクレオチドなど、又はその任意の組合せなど、ただしこれらだけに限定されない、本明細書の1個以上の化学修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0077】

一実施形態においては、本発明の標的RNAは、タンパク質をコードする配列を含む。

【0078】

一実施形態においては、本発明の標的RNAは、非コードRNA配列（例えば、miRNA、snRNA、siRNAなど）を含む。例えば、Mattick, 2005, Science, 309, 1527-1528; Claverie, 2005, Science, 309, 1529-1530; Sethupathy et al., 2006, RNA, 12, 192-197及びCzech, 2006 NEJM, 354, 11: 1194-1195を参照されたい。

【0079】

一実施形態においては、本発明は、本発明のsiNA分子を含む医薬品を特徴とする。

【0080】

一実施形態においては、本発明は、本発明のsiNA分子を含む活性成分を特徴とする。

【0081】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する、下方制御する、又は減少させるための二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子の使用を特徴とする。ここで、siNA分子は1個以上の化学修飾を含み、二本鎖siNAの各鎖は独立に約15から約30又はそれを超える（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30又はそれを超える）ヌクレオチド長である。一実施形態においては、本発明のsiNA分子は、1個以上の化学修飾を含む二本鎖核酸分子であり、siNA分子の2個の断片の各々は、約15から約40（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、23、33、34、35、36、37、38、39又は40）ヌクレオチドを独立に含み、鎖の1本は、標的コードRNAのヌクレオチド配列又はその一部に相補的である少なくとも15ヌクレオチドを含む。非限定的例においては、siNA分子の2個の断片の各々は、約21ヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、siNA分子は、1個以上の化学修飾を含む二本鎖核酸分子であり、各鎖は約21ヌクレオチド長であり、siNA分子の各断片の約19ヌクレオチドは、siNA分子の他方の断片の相補ヌクレオチドと塩基対を形成し、siNA分子の各断片の少なくとも2個の3'末端ヌクレオチドは、siNA分子の他方の断片のヌクレオチドと塩基対を形成しない。別の実施形態においては、siNA分子は、1個以上の化学修飾を含む二本鎖核酸分子であり、各鎖は約19ヌクレオチド長であり、siNA分子の各断片のヌクレオチドは、siNA分子の他方の断片の相補ヌクレオチドと塩基対を形成して、少なくとも約15（例えば、15、16、17、18又は19）塩基対を形成し、siNA分子の一方又は両方の末端は平滑末端である。一実施形態においては、siNA分子の各断片の2個の3'末端ヌクレオチドの各々は、2'-デオキシチミジンなどの2'-デオキシピリミジンヌクレオチドである。一実施形態においては、siNA分子の各断片の2個の3'末端ヌクレオチドの各々は、2'-O-メチルウリジン、シチジン、チミジンなどの2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである。別の実施形態においては、siNA分子の各断片の全ヌクレオチドは、siNA分子の他方の断片の相補ヌクレオチドと塩基対を形成

10

20

30

40

50

する。別の実施形態においては、s i N A 分子は、センス領域及びアンチセンス領域を有し、かつ、1 個以上の化学修飾を含む、約 1 9 から約 2 5 塩基対の二本鎖核酸分子であり、アンチセンス領域の約 1 9 ヌクレオチドは、標的遺伝子によってコードされる R N A のヌクレオチド配列又はその一部と塩基対を形成する。別の実施形態においては、アンチセンス領域の約 2 1 ヌクレオチドは、標的遺伝子によってコードされる R N A のヌクレオチド配列又はその一部と塩基対を形成する。上記実施形態のいずれにおいても、前記アンチセンス領域を含む断片の 5 ' 末端は、リン酸基を含んでいてもよい。

【0082】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する、下方制御する、又は減少させる、二本鎖低分子干渉核酸 (s i N A) 分子の使用を特徴とする。ここで、二本鎖 s i N A 分子の鎖の一方は、標的 R N A のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。一実施形態においては、各鎖は、ヌクレオチド、糖、塩基、骨格修飾などの同じでも、異なっているもよい、少なくとも 2 個の (例えば、2、3、4、5 個又はそれを超える) 化学修飾を有する。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子中に存在するプリンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。

【0083】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する、下方制御する、又は減少させる、二本鎖低分子干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とする。ここで、二本鎖 s i N A 分子の鎖の一方は、標的 R N A のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。一実施形態においては、各鎖は、ヌクレオチド、糖、塩基、骨格修飾などの同じでも、異なっているもよい、少なくとも 2 個の (例えば、2、3、4、5 個又はそれを超える) 化学修飾を有する。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。一実施形態においては、二本鎖 s i N A 分子中に存在するプリンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。

【0084】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する、下方制御する、又は減少させる、二本鎖低分子干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とする。ここで、二本鎖 s i N A 分子の鎖の一方は、タンパク質をコードする標的 R N A のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖であり、二本鎖 s i N A 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。一実施形態においては、s i N A 分子の各鎖は、約 1 5 から約 3 0 個又はそれを超える (例えば、約 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 若しくは 3 0 個又はそれを超える) ヌクレオチドを含み、他方の鎖のヌクレオチドに相補的である少なくとも約 1 5 ヌクレオチドを含む。一実施形態においては、s i N A 分子は、2 個のオリゴヌクレオチド断片から組み立てられ、第 1 の断片は s i N A 分子のアンチセンス鎖のヌクレオチド配列を含み、第 2 の断片は s i N A 分子のセンス領域のヌクレオチド配列を含む。一実施形態においては、センス鎖は、ポリヌクレオチドリンカー、非ヌクレオチドリンカーなどのリンカー分子を介して、アンチセンス鎖と連結されている。更なる実施形態においては、センス鎖中に存在するピリミジンヌクレオチドは、2 ' -デオキシ-2 ' フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域中に存在するプリンヌクレオチドは、2 ' -デオキシプリンヌクレオチドである。別の実施形態においては、センス鎖中に存在するピリミジンヌクレオチドは、2 ' -デオキシ-2 ' フルオロピリミジンヌクレオチドであり、センス領域中に存在するプリンヌクレオチドは、2 ' -O-メチルプリンヌクレオチドである。更に別の実施形態においては、アンチセンス

鎖中に存在するピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、アンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである。別の実施形態においては、アンチセンス鎖は、1個以上の2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチド及び1個以上の2'-O-メチルプリンヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、アンチセンス鎖中に存在するピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、アンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。更なる実施形態においては、センス鎖は、3'末端及び5'末端を含み、末端キャップ部分（例えば、反転チミジンなどの反転デオキシ脱塩基部分又は反転デオキシヌクレオチド部分）は、センス鎖の5'末端、3'末端、又は5'末端と3'末端の両方に存在する。別の実施形態においては、アンチセンス鎖は、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合をアンチセンス鎖の3'末端に含む。別の実施形態においては、アンチセンス鎖は、グリセリル修飾を3'末端に含む。別の実施形態においては、アンチセンス鎖の5'末端は、リン酸基を含んでいてもよい。

10

【0085】

二本鎖s i N A分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大多数が糖修飾を含む、標的遺伝子の発現を阻害する二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子の上記実施形態のいずれにおいても、s i N A分子の2本の鎖の各々は、約15から約30個又はそれを超える（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30個又はそれを超える）ヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、s i N A分子の各鎖の約15から約30個又はそれを超える（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30個又はそれを超える）ヌクレオチドは、s i N A分子の他方の鎖の相補ヌクレオチドと塩基対を形成する。別の実施形態においては、s i N A分子の各鎖の約15から約30個又はそれを超える（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30個又はそれを超える）ヌクレオチドは、s i N A分子の他方の鎖の相補ヌクレオチドと塩基対を形成する。ここで、s i N A分子の各鎖の少なくとも2個の3'末端ヌクレオチドは、s i N A分子の他方の鎖のヌクレオチドと塩基対を形成しない。別の実施形態においては、s i N A分子の各断片の2個の3'末端ヌクレオチドの各々は、2'-デオキシチミジンなどの2'-デオキシピリミジンである。一実施形態においては、s i N A分子の各鎖は、s i N A分子の他方の鎖の相補ヌクレオチドと塩基対を形成する。一実施形態においては、アンチセンス鎖の約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチドは、標的RNAのヌクレオチド配列又はその一部と塩基対を形成する。一実施形態においては、アンチセンス鎖の約18から約25（例えば、約18、19、20、21、22、23、24又は25）ヌクレオチドは、標的RNAのヌクレオチド配列又はその一部と塩基対を形成する。

20

30

【0086】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する二本鎖低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、二本鎖s i N A分子の鎖の一方は、標的RNAのヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。一実施形態においては、各鎖は、ヌクレオチド 糖、塩基、骨格修飾などの少なくとも2個の（例えば、2、3、4、5個又はそれを超える）異なる化学修飾を有する。一実施形態においては、二本鎖s i N A分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。一実施形態においては、二本鎖s i N A分子中に存在するプリンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。一実施形態においては、アンチセンス鎖の5'末端は、リン酸基を含んでいてもよい。

40

【0087】

50

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する二本鎖低分子干渉核酸（*siNA*）分子を特徴とする。ここで、二本鎖 *siNA* 分子の鎖の一方は、標的 *RNA* のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。二本鎖 *siNA* 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。アンチセンス鎖のヌクレオチド配列又はその一部は、標的 *RNA* の非翻訳領域のヌクレオチド配列又はその一部に相補的である。

【0088】

一実施形態においては、本発明は、標的遺伝子の発現を阻害する二本鎖低分子干渉核酸（*siNA*）分子を特徴とする。ここで、二本鎖 *siNA* 分子の鎖の一方は、標的 *RNA* のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖であり、他方の鎖は、アンチセンス鎖のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含むセンス鎖である。二本鎖 *siNA* 分子中に存在するピリミジンヌクレオチドの大多数は、糖修飾を含む。アンチセンス鎖のヌクレオチド配列は、標的 *RNA* のヌクレオチド配列、又は標的 *RNA* 中に存在するその一部に相補的である。

【0089】

一実施形態においては、本発明は、本発明の *siNA* 分子と薬剤として許容される担体又は希釈剤とを含む組成物を特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、本発明の2種類以上の *siNA* 分子（例えば、標的 *RNA* の異なる領域を標的にする *siNA* 分子、又は *SREBP1* 経路 *RNA* を標的にする *siNA* 分子）及び薬剤として許容される担体又は希釈剤を特徴とする。

【0090】

非限定的例においては、化学修飾ヌクレオチドを核酸分子に導入することは、外因的に送達される未変性 *RNA* 分子に固有のインビボでの安定性及び生物学的利用能の潜在的限界を克服する強力なツールとなる。例えば、化学修飾核酸分子を使用すると、化学修飾核酸分子は、血清中でより長い半減期を有する傾向にあるので、所与の治療効果に対する特定の核酸分子の用量を減少させることができる。また、ある種の化学修飾は、特定の細胞又は組織を標的にすることによって、及び／又は核酸分子の細胞内取り込みを改善することによって、核酸分子の生物学的利用能を改善することができる。したがって、化学修飾核酸分子の活性が未変性核酸分子よりも低い場合でも、例えば、全 *RNA*（*all-RNA*）核酸分子と比較したときに、分子の安定性及び／又は送達改善されたために、修飾核酸分子の全活性が、未変性分子の全活性よりも大きく得る。未変性無修飾 *siNA* とは異なり、化学修飾 *siNA* は、ヒトにおけるインターフェロン活性又は免疫賦活を活性化する可能性も最小化し得る。したがって、これらの諸性質は、研究と治療の両方の適用分野における使用を含めて、種々のインビトロ及びインビボでの設定において、未変性 *siRNA* 又は最小限に修飾された *siRNA* が *RNAi* を媒介する能力を更に改善する。出願人は、対応する無修飾 *siRNA* 分子又は最小限に修飾された *siRNA* 分子よりも *RNAi* 活性が改善された化学修飾 *siNA* 分子を本明細書に記述する。本明細書に開示する化学修飾 *siNA* モチーフは、無修飾活性 *siRNA* 又は最小限に修飾された活性 *siRNA* にかなり類似した *RNAi* 活性を維持する能力を提供し（例えば、Elbas et al., 2001, EMBO J., 20:6877-6888 参照）、同時に治療への応用に適切なヌクレアーゼ耐性及び薬物動態学的（*pharmacokinetic*）諸性質を提供する。

【0091】

本明細書の *siNA* 分子の実施形態のいずれにおいても、本発明の *siNA* 分子のアンチセンス領域は、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合を前記アンチセンス領域の3'末端に含み得る。本明細書の *siNA* 分子の実施形態のいずれにおいても、アンチセンス領域は、約1から約5個のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を前記アンチセンス領域の5'末端に含み得る。本明細書の *siNA* 分子の実施形態のいずれにおいても、本発明の *siNA* 分子の3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、核酸糖、塩基又は骨格にお

いて化学修飾されたりボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを含み得る。本明細書の s i N A 分子の実施形態のいずれにおいても、3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、1 個以上の汎用塩基リボヌクレオチドを含み得る。本明細書の s i N A 分子の実施形態のいずれにおいても、3' 末端ヌクレオチドオーバーハングは、1 個以上の非環式ヌクレオチドを含み得る。

【0092】

本発明の一実施形態は、核酸分子の発現が可能であるように、本発明の少なくとも1種類の s i N A 分子をコードする核酸配列を含む、発現ベクターを提供する。本発明の別の実施形態は、かかる発現ベクターを含むほ乳動物細胞を提供する。ほ乳動物細胞は、ヒト細胞であり得る。発現ベクターの s i N A 分子は、センス領域及びアンチセンス領域を含み得る。アンチセンス領域は、標的をコードする R N A 又は D N A 配列に相補的である配列を含み得る。センス領域は、アンチセンス領域に相補的である配列を含み得る。s i N A 分子は、相補センス及びアンチセンス領域を有する2本の異なる鎖を含み得る。s i N A 分子は、相補センス及びアンチセンス領域を有する一本鎖を含み得る。

10

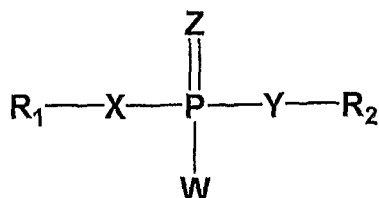
【0093】

一実施形態においては、本発明は、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内で R N A 干渉 (R N A i) を媒介し得る化学修飾低分子干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とする。ここで、化学修飾は、骨格が修飾された式 I

【0094】

【化6】

20



のヌクレオチド間結合を含む1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）ヌクレオチドを含む。

【0095】

ここで、各 R 1 及び R 2 は独立に、天然でも、化学修飾されていてもよい、s i N A 分子構造に含まれ得る、又は s i N A 分子との結合点として役立ち得る、任意のヌクレオチド、非ヌクレオチド又はポリヌクレオチドであり、各 X 及び Y は独立に O、S、N、アルキル又は置換アルキルであり、各 Z 及び W は独立に O、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカリール、アラルキル又はアセチルであり、W、X、Y 及び Z は全部が O とは限らない。別の実施形態においては、本発明の骨格修飾は、ホスホノアセタート及び／又はチオホスホノアセタートヌクレオチド間結合を含む（例えば、Sheehan et al., 2003, Nucleic Acids Research, 31, 4109-4118 参照）。

30

【0096】

例えば任意の Z、W、X 及び／又は Y が硫黄原子を独立に含む、式 I の化学修飾ヌクレオチド間結合は、s i N A 二本鎖の一方又は両方のオリゴヌクレオチド鎖中に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖中に存在し得る。本発明の s i N A 分子は、式 I の1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）化学修飾ヌクレオチド間結合を、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含み得る。例えば、本発明の例示的な s i N A 分子は、式 I の約1から約5個又はそれを超える（例えば、約1、2、3、4、5個又はそれを超える）化学修飾ヌクレオチド間結合を、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の5'末端に含み得る。別の非限定的例においては、本発明の例示的な s i N A 分子は、式 I の化学修飾ヌクレオチド間結合を有する1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）ピリミジンヌクレオチドを、セン

40

50

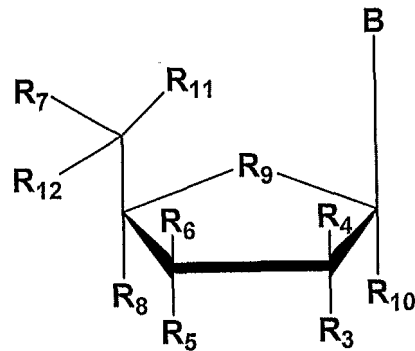
ス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖に含み得る。更に別の非限定的例においては、本発明の例示的な s i N A 分子は、式 I の化学修飾ヌクレオチド間結合を有する 1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）プリンヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖に含み得る。別の実施形態においては、式 I のヌクレオチド間結合を有する本発明の s i N A 分子は、式 I - V I I のいずれかの化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドも含む。

【0097】

一実施形態においては、本発明は、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内で R N A 干渉（R N A i）を媒介し得る化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、化学修飾は、式 I I

【0098】

【化 7】



の 1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含む。

【0099】

ここで、各 R 3、R 4、R 5、R 6、R 7、R 8、R 10、R 11 及び R 12 は独立に、いずれも s i N A 分子の構造に含まれ得る、又は s i N A 分子との結合点として役立ち得る、H、OH、アルキル、置換アルキル、アルカリール若しくはアラルキル、F、C l、B r、C N、C F 3、O C F 3、O C H 3、O C N、O - アルキル、S - アルキル、N - アルキル、O - アルケニル、S - アルケニル、N - アルケニル、S O - アルキル、アルキル - O S H、アルキル - O H、O - アルキル - O H、O - アルキル - S H、S - アルキル - O H、S - アルキル - S H、アルキル - S - アルキル、アルキル - O - アルキル、O N O 2、N O 2、N 3、N H 2、アミノアルキル、アミノ酸、アミノアシル、O N H 2、O - アミノアルキル、O - アミノ酸、O - アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキル（a l k y l）アミノ、置換シリル、又は式 I、I I、I I I、I V、V、V I 及び／又は V I I のいずれかの基であり、R 9 は、O、S、C H 2、S = O、C H F 又は C F 2 であり、B は、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、チミン、2 - アミノアデノシン、5 - メチルシトシン、2, 6 - ジアミノプリンなどのヌクレオシド塩基、又は標的 R N A に相補的でも、非相補的でもよい任意の他の非天然塩基、又はフェニル、ナフチル、3 - ニトロピロール、5 - ニトロインドール、ネブラリン、ピリドン、ピリジノンなどの非ヌクレオシド塩基、又は標的 R N A に相補的でも、非相補的でもよい任意の他の非天然汎用塩基である。一実施形態においては、R 3 及び／又は R 7 は、抱合部分（c o n j u g a t e m o i e t y）及びリンカー（例えば、本明細書の、又は当分野で公知の、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリナー）を含む。抱合部分の非限定的例としては、天然タンパク質リガンド由来のペプチドなどの細胞受容体のリガンド；細胞の Z I P コード配列を含めたタンパク質局在化配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸塩、N - アセチルガラクトサミンなどのビタミン及び他の補因子；ポリエチレングリコール（P E G）などのポリマー；リン脂質；コレステロール；ステロイド及び P E I、スペルミン、スペルミジンなどのポリアミンが挙げられる。一実施形態においては、本発明の式 I I のヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フ

ルオロヌクレオチドである。一実施形態においては、本発明の式 I I のヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドである。一実施形態においては、本発明の式 I I のヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチドである。

【0100】

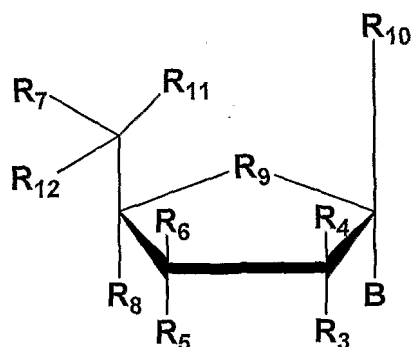
式 I I の化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドは、s i N A 二本鎖の一方又は両方のオリゴヌクレオチド鎖中に、例えばセンス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖中に存在し得る。本発明の s i N A 分子は、式 I I の 1 個以上の化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の 3' 末端に、5' 末端に、又は 3' 末端と 5' 末端の両方に含み得る。例えば、本発明の例示的な s i N A 分子は、式 I I の約 1 から約 5 個又はそれを超える（例えば、約 1、2、3、4、5 個又はそれを超える）化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の 5' 末端に含み得る。別の非限定的例においては、本発明の例示的な s i N A 分子は、約 1 から約 5 個又はそれを超える（例えば、約 1、2、3、4、5 個又はそれを超える）式 I I の化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の 3' 末端に含み得る。

【0101】

一実施形態においては、本発明は、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内で R N A 干渉（R N A i）を媒介し得る化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、化学修飾は、式 I I I

【0102】

【化 8】



の 1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含む。

【0103】

ここで、各 R 3、R 4、R 5、R 6、R 7、R 8、R 10、R 11 及び R 12 は独立に、いずれも s i N A 分子の構造に含まれ得る、又は s i N A 分子との結合点として役立ち得る、H、OH、アルキル、置換アルキル、アルカリール若しくはアラルキル、F、Cl、Br、CN、CF 3、OCF 3、OCH 3、OCN、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-O-SH、アルキル-OH、O-アルキル-OH、O-アルキル-SH、S-アルキル-OH、S-アルキル-SH、アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO 2、NO 2、N 3、NH 2、アミノアルキル、アミノ酸、アミノアシル、ONH 2、O-アミノアルキル、O-アミノ酸、O-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキル（alkyl）アミノ、置換シリル、又は式 I、I I、I I I、I V、V、V I 及び／又は V I I のいずれかの基であり、R 9 は、O、S、CH 2、S=O、CHF 又は CF 2 であり、B は、アデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、チミン、2-アミノアデノシン、5-メチルシトシン、2, 6-ジアミノプリンなどのヌクレオシド塩基、又は標的 R N A に相補的又は非相補的であるように使用することができる任意の他の非天然塩基、又はフェニル、ナフチル、3-

ニトロピロール、5-ニトロインドール、ネブラリン、ピリドン、ピリジノンなどの非ヌクレオシド塩基、又は標的RNAに相補的でも、非相補的でもよい任意の他の非天然汎用塩基である。一実施形態においては、R3及び／又はR7は、抱合部分及びリンカー（例えば、本明細書の、又は当分野で公知の、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリンカー）を含む。抱合部分の非限定的例としては、天然タンパク質リガンド由来のペプチドなどの細胞受容体のリガンド；細胞のZIPコード配列を含めたタンパク質局在化配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸塩、N-アセチルガラクトサミンなどのビタミン及び他の補因子；ポリエチレングリコール（PEG）などのポリマー；リン脂質；コレステロール；ステロイド及びPEI、スベルミン、スベルミジンなどのポリアミンが挙げられる。

【0104】

式IIIの化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドは、siNA二本鎖の一方又は両方のオリゴヌクレオチド鎖中に、例えばセンス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖中に存在し得る。本発明のsiNA分子は、式IIIの1個以上の化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含み得る。例えば、本発明の例示的なsiNA分子は、式IIIの約1から約5個又はそれを超える（例えば、約1、2、3、4、5個又はそれを超える）化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の5'末端に含み得る。別の非限定的例においては、本発明の例示的なsiNA分子は、約1から約5個又はそれを超える（例えば、約1、2、3、4、5個又はそれを超える）式IIIの化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを、センス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の3'末端に含み得る。

【0105】

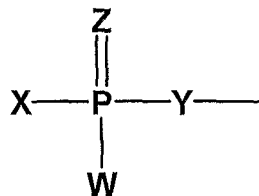
別の実施形態においては、本発明のsiNA分子は、式II又はIIIのヌクレオチドを含む。ここで、式II又はIIIのヌクレオチドは、反転した配置である。例えば、式II又はIIIのヌクレオチドは、一方又は両方のsiNA鎖の3'末端、5'末端、又は3'末端と5'末端の両方においてなど、3'-3'、3'-2'、2'-3'又は5'-5'配置でsiNA構築物に連結されている。

【0106】

一実施形態においては、本発明は、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内でRNA干渉（RNAi）を媒介し得る化学修飾低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、化学修飾は、式IV

【0107】

【化9】



の5'末端リン酸基を含む。

【0108】

ここで、各X及びYは独立にO、S、N、アルキル、置換アルキル又はアルキルハロであり、各Z及びWは独立にO、S、N、アルキル、置換アルキル、O-アルキル、S-アルキル、アルカール、アラールキル、アルキルハロ又はアセチルであり、W、X、Y及びZは全部がOとは限らず、YはsiNA分子との結合点として役立つ。

【0109】

一実施形態においては、本発明は、標的に相補的である鎖上に、例えば、標的RNAに相補的である鎖上に、式IVの5'末端リン酸基を有するsiNA分子を特徴とする。ここで、siNA分子は、全RNA siNA分子を含む。別の実施形態においては、本発

10

20

30

40

50

明は、標的に相補的である鎖上に式 I V の 5' 末端リン酸基を有する s i N A 分子を特徴とする。ここで、s i N A 分子は、一方又は両方の鎖の 3' 末端上に、約 1 から約 4（例えば、約 1、2、3 又は 4）個のデオキシリボヌクレオチドを有する、約 1 から約 3（例えば、約 1、2 又は 3）ヌクレオチド 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングも含む。別の実施形態においては、式 I V の 5' 末端リン酸基は、本発明の s i N A 分子の、例えば、式 I - V I I のいずれかの化学修飾を有する s i N A 分子の、標的に相補的である鎖上に存在する。

【0110】

一実施形態においては、本発明は、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内で R N A 干渉（R N A i）を媒介し得る化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、化学修飾は、1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む。例えば、非限定的例においては、本発明は、1 本の s i N A 鎖中に約 1、2、3、4、5、6、7、8 個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合を有する化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）を特徴とする。更に別の実施形態においては、本発明は、両方の s i N A 鎖中に約 1、2、3、4、5、6、7、8 個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合を個々に有する化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）を特徴とする。ホスホロチオアートヌクレオチド間結合は、s i N A 二本鎖の一方又は両方のオリゴヌクレオチド鎖中に、例えばセンス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖中に存在し得る。本発明の s i N A 分子は、1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の 3' 末端に、5' 末端に、又は 3' 末端と 5' 末端の両方に含み得る。例えば、本発明の例示的な s i N A 分子は、約 1 から約 5 個又はそれを超える（例えば、約 1、2、3、4、5 個又はそれを超える）連続したホスホロチオアートヌクレオチド間結合を、センス鎖、アンチセンス鎖、又は両方の鎖の 5' 末端に含み得る。別の実施形態においては、本発明の例示的な s i N A 分子は、1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）ピリミジンホスホロチオアートヌクレオチド間結合を、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖中に含み得る。更に別の実施形態においては、本発明の例示的な s i N A 分子は、1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）プリンホスホロチオアートヌクレオチド間結合を、センス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖中に含み得る。

【0111】

二本鎖 s i N A 分子の各鎖は、異なる化学修飾パターンを含むように、1 個以上の化学修飾を有し得る。異なる修飾パターンを生じ得る修飾スキームの幾つかの非限定的例を本明細書に示す。

【0112】

一実施形態においては、本発明は、センス鎖が、1 個以上の、例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は 1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、及び／又は約 1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌクレオチドを含み、末端キャップ分子をセンス鎖の 3' 末端に、5' 末端に、又は 3' 末端と 5' 末端の両方に含んでいてもよく、アンチセンス鎖が、約 1 から約 10 又はそれを超える、具体的には約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は 1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ、及び／又は 1 個以上の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌ

クレオチドを含み、末端キャップ分子をアンチセンス鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含んでいてもよい、siNA分子を特徴とする。別の実施形態においては、センス及び／又はアンチセンスsiNA鎖の1個以上の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ及び／又は2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾されている。1個以上の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は3'末端、5'末端、又は3'末端と5'末端の両方における末端キャップ分子は、同じ鎖又は異なる鎖中に、存在しても、しなくてもよい。

10

【0113】

別の実施形態においては、本発明は、センス鎖が、約1から約5個、具体的には約1、2、3、4又は5個のホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌクレオチドを含み、末端キャップ分子をセンス鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含んでいてもよく、アンチセンス鎖が、約1から約5又はそれを超える、具体的には約1、2、3、4、5個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌクレオチドを含み、末端キャップ分子をアンチセンス鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含んでいてもよい、siNA分子を特徴とする。別の実施形態においては、センス及び／又はアンチセンスsiNA鎖の1個以上の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ及び／又は2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾されている。約1から約5個又はそれを超える、例えば、約1、2、3、4、5個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は3'末端、5'末端、又は3'末端と5'末端の両方における末端キャップ分子は、同じ鎖又は異なる鎖中に、存在しても、しなくてもよい。

20

30

【0114】

一実施形態においては、本発明は、アンチセンス鎖が、1個以上の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は約1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌクレオチドを含み、末端キャップ分子をセンス鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含んでいてもよく、アンチセンス鎖が、約1から約10個又はそれを超える、具体的には約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチル-

40

50

トリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌクレオチドを含み、末端キャップ分子をアンチセンス鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含んでいてもよい、s i N A分子を特徴とする。別の実施形態においては、センス及び／又はアンチセンス s i N A 鎖の1個以上の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ及び／又は2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾されている。1個以上の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は3'末端、5'末端、又は3'末端と5'末端の両方における末端キャップ分子は、同じ鎖又は異なる鎖中に、存在しても、しなくてもよい。

10

【0115】

別の実施形態においては、本発明は、ここで、アンチセンス鎖が、約1から約5又はそれを超える、具体的には約1、2、3、4、5個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌクレオチドを含み、末端キャップ分子をセンス鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含んでいてもよく、アンチセンス鎖が、約1から約5個又はそれを超える、具体的には約1、2、3、4、5個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ、及び／又は1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、1、8、9、10個又はそれを超える）汎用塩基修飾ヌクレオチドを含み、末端キャップ分子をアンチセンス鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に含んでいてもよい、s i N A 分子を特徴とする。別の実施形態においては、センス及び／又はアンチセンス s i N A 鎖の1個以上の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超えるピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、4'-チオ及び／又は2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学修飾されている。約1から約5個、例えば、約1、2、3、4、5個又はそれを超えるホスホロチオアートヌクレオチド間結合、及び／又は3'末端、5'末端、又は3'末端と5'末端の両方における末端キャップ分子は、同じ鎖又は異なる鎖中に、存在しても、しなくてもよい。

20

30

【0116】

一実施形態においては、本発明は、約1から約5個又はそれを超える（具体的には約1、2、3、4、5個又はそれを超える）ホスホロチオアートヌクレオチド間結合を s i N A 分子の各鎖中に有する化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。

40

【0117】

別の実施形態においては、本発明は、2'-5'ヌクレオチド間結合を含む s i N A 分子を特徴とする。2'-5'ヌクレオチド間結合は、一方又は両方の s i N A 配列鎖の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に存在し得る。また、2'-5'ヌクレオチド間結合は、一方又は両方の s i N A 配列鎖内の種々の他の位置に存在し得る。例えば、s i N A 分子の一方又は両方の鎖中のピリミジンヌクレオチドのすべてのヌクレオチド間結合を含めた約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超え

50

るは、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含み得る。又は s i N A 分子の一方又は両方の鎖中のプリンヌクレオチドのすべてのヌクレオチド間結合を含めた約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超えるは、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含み得る。

【0118】

別の実施形態においては、本発明の化学修飾 s i N A 分子は、その一方又は両方が化学修飾され得る 2 本の鎖を有する二本鎖を含む。ここで、各鎖は独立に約 15 から約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）ヌクレオチド長であり、二本鎖は、約 15 から約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）個の塩基対を有し、化学修飾は式 I - V I I のいずれかの構造を含む。例えば、本発明の例示的な化学修飾 s i N A 分子は、その一方又は両方が式 I - V I I のいずれかの化学修飾又はその任意の組合せで化学修飾され得る 2 本の鎖を有する二本鎖を含む。ここで、各鎖は、2 ヌクレオチド 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを各々有する、約 21 ヌクレオチドからなり、二本鎖は約 19 塩基対を有する。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、一本鎖ヘアピン構造を含み、該 s i N A は、約 15 から約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）個の塩基対を有する約 36 から約 70（例えば、約 36、40、45、50、55、60、65 又は 70）ヌクレオチド長であり、式 I - V I I のいずれかの構造を含む化学修飾又はその任意の組合せを含み得る。例えば、本発明の例示的な化学修飾 s i N A 分子は、式 I - V I I のいずれかの化学修飾又はその任意の組合せで化学修飾された、約 42 から約 50（例えば、約 42、43、44、45、46、47、48、49 又は 50）個のヌクレオチドを有する線状オリゴヌクレオチドを含む。ここで、線状オリゴヌクレオチドは、約 19 から約 21（例えば、19、20 又は 21）個の塩基対と 2 ヌクレオチド 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングとを有するヘアピン構造を形成する。別の実施形態においては、本発明の線状ヘアピン s i N A 分子は、ステムループモチーフを含み、s i N A 分子のループ部分は生分解性である。例えば、本発明の線状ヘアピン s i N A 分子は、s i N A 分子のループ部分のインビボでの分解によって、約 2 個のヌクレオチドを含む 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングなどの 3' 末端オーバーハングを有する二本鎖 s i N A 分子が生成し得るように設計される。

【0119】

別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、ヘアピン構造を含み、該 s i N A は、約 3 から約 25（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25）個の塩基対を有する、約 25 から約 50（例えば、約 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 又は 50）ヌクレオチド長であり、式 I - V I I のいずれかの構造を含む 1 個以上の化学修飾又はその任意の組合せを含み得る。例えば、本発明の例示的な化学修飾 s i N A 分子は、式 I - V I I のいずれかの 1 個以上の化学修飾又はその任意の組合せで化学修飾された、約 25 から約 35（例えば、約 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 又は 35）個のヌクレオチドを有する、線状オリゴヌクレオチドを含む。ここで、線状オリゴヌクレオチドは、約 3 から約 25（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25）個の塩基対、及び本明細書に記載したとおりに化学修飾され得る 5' 末端リン酸基（例えば、式 I V の 5' 末端リン酸基）を有する、ヘアピン構造を形成する。別の実施形態においては、本発明の線状ヘアピン s i N A 分子は、ステムループモチーフを含み、s i N A 分子のループ部分は生分解性である。一実施形態においては、本発明の線状ヘアピン s i N A 分子は、非ヌクレオチドリンカーを含むループ部分を含む。

【0120】

別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、非対称ヘアピン構造を含み、該 s i N A は、約 3 から約 25（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25）個の塩基対を有する、約 25 から約 50（例えば、約 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 又は 50）ヌクレオチド長であり、式 I-V I のいずれかの構造を含む 1 個以上の化学修飾又はその任意の組合せを含み得る。例えば、本発明の例示的な化学修飾 s i N A 分子は、式 I-V I のいずれかの 1 個以上の化学修飾又はその任意の組合せで化学修飾された、約 25 から約 35（例えば、約 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 又は 35）個のヌクレオチドを有する、線状オリゴヌクレオチドを含む。ここで、線状オリゴヌクレオチドは、約 3 から約 25（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25）個の塩基対、及び本明細書に記載したとおりに化学修飾され得る 5' 末端リン酸基（例えば、式 I V の 5' 末端リン酸基）を有する、非対称ヘアピン構造を形成する。一実施形態においては、本発明の非対称ヘアピン s i N A 分子は、ステムループモチーフを含み、s i N A 分子のループ部分は生分解性である。別の実施形態においては、本発明の非対称ヘアピン s i N A 分子は、非ヌクレオチドリinkerを含むループ部分を含む。

10

【0121】

別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、センス及びアンチセンス領域を含む別々のポリヌクレオチド鎖を有する非対称二本鎖構造を含み、アンチセンス領域は、約 15 から約 30（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）ヌクレオチド長であり、センス領域は、約 3 から約 25（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25）ヌクレオチド長であり、センス領域及びアンチセンス領域は、少なくとも 3 個の相補ヌクレオチドを有し、s i N A は、式 I-V I のいずれかの構造を含む 1 個以上の化学修飾又はその任意の組合せを含み得る。例えば、本発明の例示的な化学修飾 s i N A 分子は、センス及びアンチセンス領域を含む別々のポリヌクレオチド鎖を有する非対称二本鎖構造を含み、アンチセンス領域は、約 18 から約 23（例えば、約 18、19、20、21、22、又は 23）ヌクレオチド長であり、センス領域は、約 3 から約 15（例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は 15）ヌクレオチド長であり、センス領域アンチセンス領域は、少なくとも 3 個の相補ヌクレオチドを有し、s i N A は、式 I-V I のいずれかの構造を含む 1 個以上の化学修飾又はその任意の組合せを含み得る。別の実施形態においては、非対称二本鎖 s i N A 分子は、本明細書に記載したとおりに化学修飾され得る 5' 末端リン酸基（例えば、式 I V の 5' 末端リン酸基）も有し得る。

20

30

【0122】

別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、環状核酸分子を含み、該 s i N A は、約 15 から約 30 個（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 個）の塩基対を有する約 38 から約 70（例えば、約 38、40、45、50、55、60、65 又は 70）ヌクレオチド長であり、式 I-V I のいずれかの構造を含む化学修飾又はその任意の組合せを含み得る。例えば、本発明の例示的な化学修飾 s i N A 分子は、式 I-V I のいずれかの化学修飾又はその任意の組合せで化学修飾された、約 42 から約 50（例えば、約 42、43、44、45、46、47、48、49 又は 50）個のヌクレオチドを有する環状オリゴヌクレオチドを含む。ここで、環状オリゴヌクレオチドは、約 19 個の塩基対及び 2 個のループを有するダンベル状構造を形成する。

40

【0123】

別の実施形態においては、本発明の環状 s i N A 分子は、2 個のループモチーフを含み

50

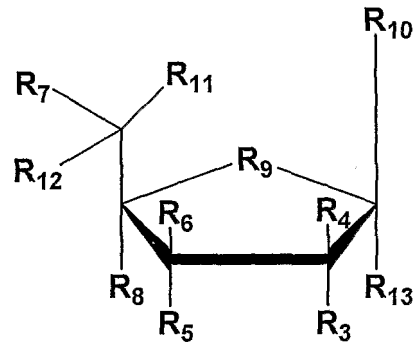
、s i N A分子の一方又は両方のループ部分は生分解性である。例えば、本発明の環状s i N A分子は、s i N A分子のループ部分のインビボでの分解によって、約2個のヌクレオチドを含む3'末端ヌクレオチドオーバーハングなどの3'末端オーバーハングを有する二本鎖s i N A分子が生成し得るように設計される。

【0124】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、少なくとも1個の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）脱塩基部分、例えば、式V

【0125】

【化10】



10

の化合物を含む。

20

【0126】

ここで、各R3、R4、R5、R6、R7、R8、R10、R11、R12及びR13は独立に、いずれもs i N A分子の構造に含まれ得る、又はs i N A分子との結合点として役立ち得る、H、OH、アルキル、置換アルキル、アルカール若しくはアラールキル、F、Cl、Br、CN、CF3、OCF3、OCH3、OCN、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-O-SH、アルキル-OH、O-アルキル-OH、O-アルキル-SH、S-アルキル-OH、S-アルキル-SH、アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO2、NO2、N3、NH2、アミノアルキル、アミノ酸、アミノアシル、ONH2、O-アミノアルキル、O-アミノ酸、O-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキル (alkyl) アミノ、置換シリル、又は式I、II、III、IV、V、VI及び/又はVIIのいずれかの基であり、R9は、O、S、CH2、S=O、CHF又はCF2である。一実施形態においては、R3及び/又はR7は、抱合部分及びリンカー（例えば、本明細書の、又は当分野で公知の、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリンカー）を含む。抱合部分の非限定的例としては、天然タンパク質リガンド由来のペプチドなどの細胞受容体のリガンド；細胞のZIPコード配列を含めたタンパク質局在化配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸塩、N-アセチルガラクトサミンなどのビタミン及び他の補因子；ポリエチレングリコール (PEG) などのポリマー；リン脂質；コレステロール；ステロイド及びPEI、スぺルミン、スぺルミジンなどのポリアミンが挙げられる。

30

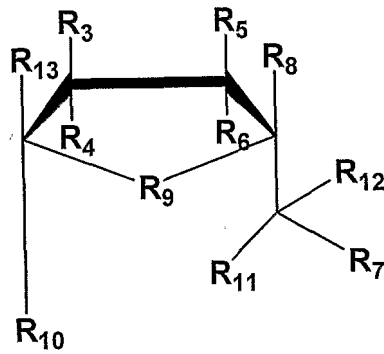
40

【0127】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、少なくとも1個の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）反転脱塩基部分、例えば、式VI

【0128】

【化 1 1】



10

の化合物を含む。

【0 1 2 9】

ここで、各 R 3、R 4、R 5、R 6、R 7、R 8、R 10、R 11、R 12 及び R 13 は独立に、いずれも s i N A 分子の構造に含まれ得る、又は s i N A 分子との結合点として役立ち得る、H、OH、アルキル、置換アルキル、アルカリール若しくはアラルキル、F、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、OCH₃、OCN、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-O-SH、アルキル-OH、O-アルキル-OH、O-アルキル-SH、S-アルキル-OH、S-アルキル-SH、アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、アミノアルキル、アミノ酸、アミノアシル、ONH₂、O-アミノアルキル、O-アミノ酸、O-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキル (a l k l y l) アミノ、置換シリル、又は式 I、II、III、IV、V、VI 及び／又は VII のいずれかの基であり、R 9 は、O、S、CH₂、S=O、CHF 又は CF₂ であり、R 2、R 3、R 8 又は R 13 は、本発明の s i N A 分子との結合点として役立つ。一実施形態においては、R 3 及び／又は R 7 は、抱合部分及びリンカー（例えば、本明細書の、又は当分野で公知の、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリナー）を含む。抱合部分の非限定的例としては、天然タンパク質リガンド由来のペプチドなどの細胞受容体のリガンド；細胞の Z I P コード配列を含めたタンパク質局在化配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸塩、N-アセチルガラクトサミンなどのビタミン及び他の補因子；ポリエチレングリコール (P E G) などのポリマー；リン脂質；コレステロール；ステロイド及び P E I、スペルミン、スペルミジンなどのポリアミンが挙げられる。

20

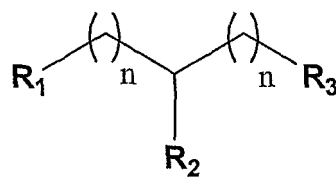
30

【0 1 3 0】

別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、少なくとも 1 個の（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれを超える）置換ポリアルキル部分、例えば、式 V I I

【0 1 3 1】

【化 1 2】



40

の化合物を含む。

【0 1 3 2】

ここで、各 n は独立に整数 1 から 12 であり、各 R 1、R 2 及び R 3 は独立に、いずれも s i N A 分子の構造に含まれ得る、又は s i N A 分子との結合点として役立ち得る、H、OH、アルキル、置換アルキル、アルカリール若しくはアラルキル、F、Cl、Br、

50

CN、CF₃、OCF₃、OCH₃、OCN、O-アルキル、S-アルキル、N-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、N-アルケニル、SO-アルキル、アルキル-OH、アルキル-OH、O-アルキル-OH、O-アルキル-SH、S-アルキル-OH、S-アルキル-SH、アルキル-S-アルキル、アルキル-O-アルキル、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、アミノアルキル、アミノ酸、アミノアシル、ONH₂、O-アミノアルキル、O-アミノ酸、O-アミノアシル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキル (alkyl) アミノ、置換シリル、又は式 I、II、III、IV、V、VI 及び/又は VII のいずれかの基である。一実施形態においては、R₃ 及び/又は R₁ は、抱合部分及びリンカー（例えば、本明細書の、又は当分野で公知の、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリナー）を含む。抱合部分の非限定的例としては、天然タンパク質リガンド由来のペプチドなどの細胞受容体のリガンド；細胞の ZIP コード配列を含めたタンパク質局在化配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸塩、N-アセチルガラクトサミンなどのビタミン及び他の補因子；ポリエチレングリコール (PEG) などのポリマー；リン脂質；コレステロール；ステロイド及び PEI、スペルミン、スペルミジンなどのポリアミンが挙げられる。

10

【0133】

「ZIP コード」配列とは、細胞のトポロジー形成シグナル伝達 (topogenic signaling) によって媒介される輸送に参与する任意のペプチド又はタンパク質配列を意味する（例えば、Ray et al., 2004, Science, 306 (1501): 1505 参照）。

20

【0134】

二本鎖 siNA 分子内の各ヌクレオチドは、式 I-VII のいずれかの構造を含む化学修飾を独立に有し得る。したがって、一実施形態においては、本発明の siNA 分子の 1 個以上のヌクレオチド位置は、式 I-VII のいずれかの構造を有する化学修飾、又は本明細書の任意の他の修飾を含む。一実施形態においては、本発明の siNA 分子の各ヌクレオチド位置は、式 I-VII のいずれかの構造を有する化学修飾、又は本明細書の任意の他の修飾を含む。

【0135】

一実施形態においては、本発明の二本鎖 siNA 分子の一方又は両方の鎖の 1 個以上のヌクレオチド位置は、式 I-VII のいずれかの構造を有する化学修飾、又は本明細書の任意の他の修飾を含む。一実施形態においては、本発明の二本鎖 siNA 分子の一方又は両方の鎖の各ヌクレオチド位置は、式 I-VII のいずれかの構造を有する化学修飾、又は本明細書の任意の他の修飾を含む。

30

【0136】

別の実施形態においては、本発明は、式 VII の化合物を特徴とする。ここで、R₁ 及び R₂ はヒドロキシル (OH) 基であり、n = 1 であり、R₃ は、O を含み、本発明の二本鎖 siNA 分子の一方又は両方の鎖の 3' 末端、5' 末端、若しくは 3' 末端と 5' 末端の両方との、又は本発明の一本鎖 siNA 分子との、結合点である。この修飾を本明細書では「グリセリル」と称する（例えば、図 10 の修飾 6）。

【0137】

別の実施形態においては、本発明の化学修飾ヌクレオシド又は非ヌクレオシド（例えば、式 V、VI 又は VII のいずれかの部分）は、本発明の siNA 分子の 3' 末端に、5' 末端に、又は 3' 末端と 5' 末端の両方にある。例えば、化学修飾ヌクレオシド又は非ヌクレオシド（例えば、式 V、VI 又は VII の部分）は、siNA 分子のアンチセンス鎖、センス鎖、又はアンチセンス鎖とセンス鎖の両方の 3' 末端に、5' 末端に、又は 3' 末端と 5' 末端の両方に存在し得る。一実施形態においては、化学修飾ヌクレオシド又は非ヌクレオシド（例えば、式 V、VI 又は VII の部分）は、本発明の二本鎖 siNA 分子のセンス鎖の 5' 末端及び 3' 末端並びにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する。一実施形態においては、化学修飾ヌクレオシド又は非ヌクレオシド（例えば、式 V、VI 又は VII の部分）は、本発明の二本鎖 siNA 分子のセンス鎖の 5' 末端及び 3' 末端並

40

50

びにアンチセンス鎖の3'末端の末端位置に存在する。一実施形態においては、化学修飾ヌクレオシド又は非ヌクレオシド（例えば、式V、VI又はVIIの部分）は、本発明の二本鎖s i N A分子のセンス鎖の5'末端及び3'末端並びにアンチセンス鎖の3'末端の2つの末端位置に存在する。一実施形態においては、化学修飾ヌクレオシド又は非ヌクレオシド（例えば、式V、VI又はVIIの部分）は、本発明の二本鎖s i N A分子のセンス鎖の5'末端及び3'末端並びにアンチセンス鎖の3'末端の最後から2番目の位置に存在する。また、式VIIの部分は、本明細書のヘアピンs i N A分子の3'末端又は5'末端に存在し得る。

【0138】

別の実施形態においては、本発明のs i N A分子は、式V又はVIの脱塩基残基を含む。ここで、式VI又はVIIの脱塩基残基は、一方又は両方のs i N A鎖の3'末端、5'末端、又は3'末端と5'末端の両方におけるなどの3'-3'、3'-2'、2'-3'又は5'-5'配置でs i N A構築物と連結されている。

【0139】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）ロックされた核酸（locked nucleic acid）（LNA）ヌクレオチドを、例えば、s i N A分子の5'末端に、3'末端に、5'末端と3'末端の両方に、又はその任意の組合せに含む。

【0140】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）4'-チオヌクレオチドを、例えば、s i N A分子の5'末端に、3'末端に、5'末端と3'末端の両方に、又はその任意の組合せに含む。

【0141】

別の実施形態においては、本発明のs i N A分子は、1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）非環式ヌクレオチドを、例えば、s i N A分子の5'末端に、3'末端に、5'末端と3'末端の両方に、又はその任意の組合せに含む。

【0142】

一実施形態においては、本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子は、1個以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれを超える）2'-O-アルキル（例えば、2'-O-メチル）、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、F A N A若しくは脱塩基化学修飾又はその任意の組合せを有するセンス鎖又はセンス領域を含む。

【0143】

一実施形態においては、本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子は、1個以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれを超える）2'-O-アルキル（例えば、2'-O-メチル）、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、F A N A若しくは脱塩基化学修飾又はその任意の組合せを有するアンチセンス鎖又はアンチセンス領域を含む。

【0144】

一実施形態においては、本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子は、1個以上の（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個又はそれを超える）2'-O-アルキル（例えば、2'-O-メチル）、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ、F A N A若しくは脱塩基化学修飾又はその任意の組合せを各々有する、センス鎖又はセンス領域及びアンチセンス鎖又はアンチセンス領域を含む。

10

20

30

40

50

【0145】

一実施形態においては、本発明は、センス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。）。

【0146】

一実施形態においては、本発明は、センス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、F A N Aピリミジンヌクレオチドである（例えば、全ピリミジンヌクレオチドはF A N Aピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドはF A N Aピリミジンヌクレオチドである。）。

【0147】

一実施形態においては、本発明は、アンチセンス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。）。

【0148】

一実施形態においては、本発明は、センス領域及びアンチセンス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域及びアンチセンス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。）。

【0149】

一実施形態においては、本発明は、センス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである。）。

【0150】

一実施形態においては、本発明は、アンチセンス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。）。

【0151】

一実施形態においては、本発明は、センス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。）、センス領

域中に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである。）。

【0152】

一実施形態においては、本発明は、センス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドである。）、センス領域中に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである。）、前記センス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドである。

【0153】

一実施形態においては、本発明は、センス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドである。）、センス領域中に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドである。）。

【0154】

一実施形態においては、本発明は、センス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子を特徴とする。ここで、センス領域に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドである。）。

リフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドである。) 、センス領域中に存在する任意(例えば、1個以上又は全部)のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドであり(例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の(すなわち1を超える)プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドである。) 、前記センス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドである。

10

【0155】

一実施形態においては、本発明は、アンチセンス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域中に存在する任意(例えば、1個以上又は全部)のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり(例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の(すなわち1を超える)ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドである。) 、アンチセンス領域中に存在する任意(例えば、1個以上又は全部)のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドである(例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の(すなわち1を超える)プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドである。) 。

20

30

【0156】

一実施形態においては、本発明は、アンチセンス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸(s i N A)分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域中に存在する任意(例えば、1個以上又は全部)のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり(例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の(すなわち1を超える)ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシピリミジンヌクレオチドである。) 、アンチセンス領域中に存在する任意(例えば、1個以上又は全部)のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシプリンヌクレオチドであり(例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメト

40

50

キシエトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである。）、前記アンチセンス領域中に存在する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含む任意のヌクレオチドは2'-デオキシヌクレオチドである。

【0157】

一実施形態においては、本発明は、アンチセンス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域中に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドである。）、アンチセンス領域中に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは2'-

10

20

【0158】

一実施形態においては、本発明は、アンチセンス領域を含む本発明の化学修飾低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、アンチセンス領域中に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドである。）、アンチセンス領域中に存在する任意（例えば、1個以上又は全部）のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである。）。

30

40

【0159】

一実施形態においては、本発明は、センス領域及びアンチセンス領域を含む、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内でRNA干渉（RNAi）を媒介し得る、本発明の化学修飾低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、センス領域中に存在する1個以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロ

50

メチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドである。）、センス領域中に存在する1個以上のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである。）、アンチセンス領域中に存在する1個以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドである。）、アンチセンス領域中に存在する1個以上のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである。）。センス領域及び／又はアンチセンス領域は、センス及び／又はアンチセンス配列の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に存在してもよい、本明細書の、又は図10に示す、任意の修飾などの末端キャップ修飾を有し得る。センス及び／又はアンチセンス領域は、約1から約4（例えば、約1、2、3又は4）個の2'-デオキシヌクレオチドを有する3'末端ヌクレオチドオーバーハングを更に含んでもよい。オーバーハングヌクレオチドは、1個以上の（例えば、約1、2、3、4又はそれを超える）ホスホロチオアート、ホスホノアセタート及び／又はチオホスホノアセタートヌクレオチド間結合を更に含み得る。これらの化学修飾s i N Aの非限定的例を本明細書の図4及び5並びに表I Iに示す。上記実施形態のいずれにおいても、センス領域に存在するプリンヌクレオチドは、或いは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである。）、アンチセンス領域中に存在する1個以上のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである。）。また、これらの実施形態の

10

20

30

40

50

いずれにおいても、センス領域中に存在する1個以上のプリンヌクレオチドは、或いは、プリンリボヌクレオチドであり（例えば、全プリンヌクレオチドはプリンリボヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドはプリンリボヌクレオチドである。）、アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである。）。さらに、これらの実施形態のいずれにおいても、センス領域中に存在する、及び／又はアンチセンス領域中に存在する、1個以上のプリンヌクレオチドは、或いは、2'-デオキシヌクレオチド、ロックされた核酸（LNA）ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシエトキシヌクレオチド及び2'-O-メチルヌクレオチドからなる群から選択される（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチド、ロックされた核酸（LNA）ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシエトキシヌクレオチド及び2'-O-メチルヌクレオチドからなる群から選択され、又は複数の（すなわち1を超える）プリンヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチド、ロックされた核酸（LNA）ヌクレオチド、2'-メトキシエチルヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシエトキシヌクレオチド及び2'-O-メチルヌクレオチドからなる群から選択される。）。

【0160】

別の実施形態においては、本発明の siNA 分子中に、好ましくは本発明の siNA 分子のアンチセンス鎖中に、ただし場合によってはセンス鎖中及び／又はアンチセンスとセンスの両方の鎖中に、存在する任意の修飾ヌクレオチドは、天然リボヌクレオチドと類似した諸性質又は諸特性を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、「リボ様」又は「A型ヘリックス」配置としても知られる、ノーザンコンホメーション（例えば、ノーザン擬回転サイクル。例えば、Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984 参照）を有する修飾ヌクレオチドを含む siNA 分子を特徴とする。したがって、本発明の siNA 分子中に、好ましくは本発明の siNA 分子のアンチセンス鎖中に、ただし場合によってはセンス鎖中及び／又はアンチセンスとセンスの両方の鎖中に、存在する化学修飾ヌクレオチドは、RNAi 媒介能力を同時に維持しながら、ヌクレアーゼ分解に耐性がある。ノーザン配置を有するヌクレオチドの非限定的例としては、ロックされた核酸（LNA）ヌクレオチド（例えば、2'-O、4'-C-メチレン（D-リボフラノシル）ヌクレオチド）；2'-メトキシエトキシ（MOE）ヌクレオチド；2'-メチルチオエチル、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-クロロヌクレオチド、2'-アジドヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシエトキシヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド及び2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。

【0161】

一実施形態においては、本発明の二本鎖 siNA 分子のセンス鎖は、反転デオキシ脱塩基（abaisc）部分などの末端キャップ部分を、センス鎖の3'末端に、5'末端に

、又は3'末端と5'末端の両方に含む（例えば、図10参照）。

【0162】

一実施形態においては、本発明は、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内でRNA干渉（RNAi）を媒介し得る化学修飾低分子干渉核酸分子（siNA）を特徴とする。ここで、化学修飾は、化学修飾siNA分子と共有結合した抱合体（conjugate）を含む。本発明で企図する抱合体の非限定的例としては、図面を含めて、参照によりその全体を本明細書に組込む、2003年4月30日に出願された、Vargeese他、米国特許出願第10/427,160号の抱合体及びリガンドが挙げられる。別の実施形態においては、抱合体は、生分解性リンカーを介して、化学修飾siNA分子と共有結合している。一実施形態においては、抱合分子は、化学修飾siNA分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の3'末端で結合している。別の実施形態においては、抱合分子は、化学修飾siNA分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又は両方の鎖の5'末端で結合している。更に別の実施形態においては、抱合分子は、化学修飾siNA分子のセンス鎖、アンチセンス鎖若しくは両方の鎖又はその任意の組合せの3'末端と5'末端の両方で結合している。一実施形態においては、本発明の抱合分子は、化学修飾siNA分子を細胞などの生物系に送達するのを促進する分子を含む。別の実施形態においては、化学修飾siNA分子と結合した抱合分子は、天然タンパク質リガンド由来のペプチドなどの細胞受容体のリガンド；細胞のZIPコード配列を含めたタンパク質局在化配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸塩、N-アセチルガラクトサミンなどのビタミン及び他の補因子；ポリエチレングリコール（PEG）などのポリマー；リン脂質；コレステロール；ステロイド及びPEI、スベルミン、スベルミジンなどのポリアミンである。本発明で企図する、化学修飾siNA分子と結合し得る具体的抱合分子の例は、参照により本明細書に組込む、2002年7月22日に出願された、Vargeese他、米国特許出願第10/201,394号に記載されている。使用される抱合体のタイプ、及び本発明のsiNA分子の抱合の程度は、RNAi活性を媒介するsiNAの能力を同時に維持しながら、siNA構築物の改善された薬物動態学的プロファイル、生物学的利用能、及び／又は安定性について評価することができる。したがって、当業者は、例えば当分野で一般に公知である動物モデルにおいて、種々の抱合体で修飾されたsiNA構築物をスクリーニングして、siNA抱合複合体（conjugate complex）が、RNAiを媒介する能力を維持しながら、改善された諸性質を有するかどうかを判定することができる。

【0163】

一実施形態においては、本発明は、本発明の低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、siNAは、siNAのセンス領域をsiNAのアンチセンス領域と連結する、ヌクレオチド、非ヌクレオチド又は混合ヌクレオチド／非ヌクレオチドリinkerを更に含む。一実施形態においては、ヌクレオチド、非ヌクレオチド、又は混合ヌクレオチド／非ヌクレオチドリinkerを使用して、例えば、抱合部分をsiNAと結合させる。一実施形態においては、本発明のヌクレオチドリinkerは、 ≥ 2 ヌクレオチド長、例えば、約3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチド長のリンカーであり得る。別の実施形態においては、ヌクレオチドリinkerは核酸アプタマーであり得る。本明細書では「アプタマー」又は「核酸アプタマー」とは、標的分子に特異的に結合する核酸分子を意味し、核酸分子は、その自然な状況において標的分子によって認識される配列を含む配列を有する。或いは、アプタマーは、標的分子が核酸と自然には結合しない場合、標的分子と結合する核酸分子であり得る。標的分子は、対象となる任意の分子であり得る。例えば、アプタマーを使用して、タンパク質のリガンド結合ドメインに結合させることができ、それによって天然のリガンドとタンパク質の相互作用を防止することができる。これは非限定的例であり、当業者は、他の実施形態を当分野で一般に公知である技術によって容易に作製できることを認識されたい。（例えば、Gold et al., 1995, Annu. Rev. Biochem., 64, 763; Brody and Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kusse

r, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Hermann and Patel, 2000, Science, 287, 820及びJayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628を参照されたい。)

【0164】

更に別の実施形態においては、本発明の非ヌクレオチドリinkerは、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、ポリ炭化水素 (polyhydrocarbon) 又は他の重合体化合物 (例えば、2から100エチレングリコール単位を含むポリエチレングリコールなどのポリエチレングリコール) を含む。具体例としては、参照により本明細書に組込む、Seela and Kaiser, Nucleic Acids Res. 1990, 75:6353及びNucleic Acids Res. 1987, 15:3113; Cload and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113:6324; Richardson and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113:5109; Ma et al., Nucleic Acids Res. 1993, 21:2585及びBiochemistry 1993, 32:1751; Durand et al., Nucleic Acids Res. 1990, 25:6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nucleotides 1991, 70:287; Jschke et al., Tetrahedron Lett. 1993, 34:301; Ono et al., Biochemistry 1991, 30:9914; Arnold他、国際公開第89/02439号; Usman他、国際公開第95/06731号; Dudycz他、国際公開第95/11910号並びに Ferentz and Verdine, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773:4000のものが挙げられる。「非ヌクレオチド」とは、糖置換及び/又はリン酸置換を含めて、1個以上のヌクレオチド単位の代わりに核酸鎖に組み入れることができ、残りの塩基がその酵素活性を示すのを可能にする、任意の基又は化合物を更に意味する。この基又は化合物は、例えば糖のC1位に、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミンなどの一般に認識されているヌクレオチド塩基を含まない点で、脱塩基であり得る。

【0165】

一実施形態においては、本発明は、細胞内で、又は再構成されたインビトロ系内でRNA干渉 (RNAi) を媒介し得る低分子干渉核酸 (siNA) 分子を特徴とする。ここで、2個の別々のオリゴヌクレオチドから組み立てられるsiNA分子の一方又は両方の鎖は、リボヌクレオチドを含まない。例えば、siNA分子は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、siNAのセンス及びアンチセンス領域は、オリゴヌクレオチド中に存在するリボヌクレオチド (例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド) を含まない、別々のオリゴヌクレオチドを含む。別の例においては、siNA分子は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てることができ、siNAのセンス領域とアンチセンス領域は、本明細書のヌクレオチド又は非ヌクレオチドリinkerによって連結又は環化され、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド中に存在するリボヌクレオチド (例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド) を含まない。出願人は、驚くべきことに、siNA分子内のリボヌクレオチド (例えば、2'ヒドロキシル基を有するヌクレオチド) の存在がRNAi活性の維持に不要である、又は必須でないことを見出した。したがって、一実施形態においては、siNA内の全位置は、細胞中でRNAi活性を維持するsiNA分子の能力が持続する程度に、式I、II、III、IV、V、VI若しくはVII又はその任意の組合せのヌクレオチド及び又は非ヌクレオチドなどの化学修飾ヌクレオチド及び/又は非ヌクレオチドを含むことができる。

【0166】

一実施形態においては、本発明のsiNA分子は、標的核酸配列に対して相補性を有す

る一本鎖ポリヌクレオチドを含み、細胞又は再構成されたインビトロ系においてRNA i活性を媒介する、一本鎖siNA分子である。別の実施形態においては、本発明の一本鎖siNA分子は、5'末端リン酸基を含む。別の実施形態においては、本発明の一本鎖siNA分子は、5'末端リン酸基及び3'末端リン酸基を含む（例えば、2'，3'一環式リン酸）。別の実施形態においては、本発明の一本鎖siNA分子は、約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチドを含む。更に別の実施形態においては、本発明の一本鎖siNA分子は、本明細書の1個以上の化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含む。例えば、siNA分子内の全位置は、細胞中でRNA i活性を維持するsiNA分子の能力が持続する程度に、式I-VIIのいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せなどの化学修飾ヌクレオチドを含み得る。

10

【0167】

一実施形態においては、本発明のsiNA分子は、標的核酸配列に対して相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、細胞又は再構成されたインビトロ系において、RNA i活性を媒介する、又はRNA i活性を交互に調節する、一本鎖siNA分子である。ここで、siNA中に存在する1個以上のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり（例えば、全ピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドであり、又は複数のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシピリミジンヌクレオチドである。）、アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ又は2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり（例えば、全プリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドであり、又は複数のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチル、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ若しくは2'-O-ジフルオロメトキシエトキシプリンヌクレオチドである。）、アンチセンス配列の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に存在してもよい、本明細書の、又は図10に示す、任意の修飾などの末端キャップ修飾。siNAは、約1から約4又はそれを超える（例えば、約1、2、3、4又はそれを超える）末端2'-デオキシヌクレオチドをsiNA分子の3'末端に更に含んでもよい。ここで、末端ヌクレオチドは、1個以上の（例えば、1、2、3、4又はそれを超える）ホスホロチオアート、ホスホノアセタート及び／又はチオホスホノアセタートヌクレオチド間結合を更に含み得、siNAは、5'末端リン酸基などの末端リン酸基を更に含んでもよい。これらの実施形態のいずれにおいても、アンチセンス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、或いは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドであり、又は複数のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドである。）。また、これらの実施形態のいずれにおいても、siNA中に存在する任意のプリンヌクレオチド（すなわち、センス及び／又はアンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチド）は、或いは、ロックされた核酸（LNA）ヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドはLNAヌクレオチドであり、又は複数のプリンヌクレオチドはLNAヌクレオチドである。）。また、これらの実施形態のいずれにおいても、siNA中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、或いは、2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドである（例えば、全プリンヌクレオチドは2'-メトキシエチルプリンヌクレオチドであり、又は複数のプリンヌクレオチドは2'-メトキシエチルプリンヌクレオチ

20

30

40

50

ドである。)。別の実施形態においては、本発明の一本鎖 s i N A 分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは、天然リボヌクレオチドと類似した諸性質又は諸特性を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、N o r t h e r n コンホメーション（例えば、N o r t h e r n 擬回転サイクル。例えば、S a e n g e r, P r i n c i p l e s o f N u c l e i c A c i d S t r u c t u r e, S p r i n g e r - V e r l a g e d., 1984 参照）を有する修飾ヌクレオチドを含む s i N A 分子を特徴とする。したがって、本発明の一本鎖 s i N A 分子中に存在する化学修飾ヌクレオチドは、好ましくは、R N A i 媒介能力を同時に維持しながら、ヌクレアーゼ分解に耐性がある。

【0168】

一実施形態においては、本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子は、2 個以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 又はそれを超える）2'-O-アルキル（例えば2'-O-メチル）修飾又はその任意の組合せを有するセンス鎖又はセンス領域を含む。別の実施形態においては、2'-O-アルキル修飾は、s i N A のセンス鎖又はセンス領域中の、位置1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 など、又は位置2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 などの交互の位置にある。

【0169】

一実施形態においては、本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子は、2 個以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 又はそれを超える）2'-O-アルキル（例えば2'-O-メチル）修飾又はその任意の組合せを有するアンチセンス鎖又はアンチセンス領域を含む。別の実施形態においては、2'-O-アルキル修飾は、s i N A のアンチセンス鎖又はアンチセンス領域中の、位置1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 など、又は位置2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 などの交互の位置にある。

【0170】

一実施形態においては、本発明の化学修飾低分子干渉核酸（s i N A）分子は、2 個以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個又はそれを超える）2'-O-アルキル（例えば、2'-O-メチル）、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-デオキシ若しくは脱塩基化学修飾又はその任意の組合せを各々有する、センス鎖又はセンス領域及びアンチセンス鎖又はアンチセンス領域を含む。別の実施形態においては、2'-O-アルキル修飾は、s i N A のセンス鎖又はセンス領域中の、位置1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 など、又は位置2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 などの交互の位置にある。別の実施形態においては、2'-O-アルキル修飾は、s i N A のアンチセンス鎖又はアンチセンス領域中の、位置1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 など、又は位置2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 などの交互の位置にある。

【0171】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、（例えば、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、2'-O-メチルヌクレオチドなどの式 I-VII のいずれかの）化学修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを、s i N A 分子の1 個以上の鎖又は領域内の交互の位置に含む。例えば、かかる化学修飾は、s i N A の3' 末端又は5' 末端から第1 又は第2 のヌクレオチドで始まる、R N A ベースの s i N A 分子の1 つ置き位置に導入することができる。非限定的例においては、s i N A の各鎖が21 ヌクレオチド長である、本発明の二本鎖 s i N A 分子を特徴とする。ここで、各鎖の位置1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 及

び21は、（例えば、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、2'-O-メチルヌクレオチドなどの式I-VIIのいずれかの化合物で）化学修飾されている。別の非限定的例においては、s i N Aの各鎖が21ヌクレオチド長である、本発明の二本鎖s i N A分子を特徴とする。ここで、各鎖の位置2、4、6、8、10、12、14、16、18及び20は、（例えば、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、2'-O-メチルヌクレオチドなどの式I-VIIのいずれかの化合物で）化学修飾されている。一実施形態においては、二本鎖s i N A分子の1本の鎖は、位置2、4、6、8、10、12、14、16、18及び20の化学修飾、並びに位置1、3、5、7、9、11、13、15、17、19及び21の化学修飾を含む。かかるs i N A分子は、本明細書の末端キャップ部分及び／又は骨格修飾を更に含み得る。

10

【0172】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は以下の特徴を含む。すなわち、プリンヌクレオチドが、s i N A分子の（ガイド配列又はガイド鎖とも称する）アンチセンス鎖又はアンチセンス領域の5'末端に（例えば、5'末端から1、2、3、4、5又は6位の末端ヌクレオチド位置のいずれかに）存在する場合には、かかるプリンヌクレオチドはリボヌクレオチドである。別の実施形態においては、プリンリボヌクレオチドは、存在するときには、s i N A分子の（パッセンジャー鎖とも称する）センス鎖又はセンス領域のヌクレオチドと塩基対を形成する。かかるプリンリボヌクレオチドは、それ以外は修飾ヌクレオチドを含むs i N A安定化モチーフ中に存在し得る。

20

【0173】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は以下の特徴を含む。すなわち、ピリミジンヌクレオチドが、s i N A分子の（ガイド配列又はガイド鎖とも称する）アンチセンス鎖又はアンチセンス領域の5'末端に（例えば、5'末端から1、2、3、4、5又は6位の末端ヌクレオチド位置のいずれかに）存在する場合には、かかるピリミジンヌクレオチドはリボヌクレオチドである。別の実施形態においては、ピリミジンリボヌクレオチドは、存在するときには、s i N A分子の（パッセンジャー鎖とも称する）センス鎖又はセンス領域のヌクレオチドと塩基対を形成する。かかるピリミジンリボヌクレオチドは、それ以外は修飾ヌクレオチドを含むs i N A安定化モチーフ中に存在し得る。

30

【0174】

一実施形態においては、本発明のs i N A分子は以下の特徴を含む。すなわち、ピリミジンヌクレオチドが、s i N A分子の（ガイド配列又はガイド鎖とも称する）アンチセンス鎖又はアンチセンス領域の5'末端に（例えば、5'末端から1、2、3、4、5又は6位の末端ヌクレオチド位置のいずれかに）存在する場合には、かかるピリミジンヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。別の実施形態においては、修飾ピリミジンヌクレオチドは、存在するときには、s i N A分子の（パッセンジャー鎖とも称する）センス鎖又はセンス領域のヌクレオチドと塩基対を形成する。修飾ピリミジンヌクレオチドの非限定的例としては、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、4'-チオ、2'-O-トリフルオロメチル、2'-O-エチルトリフルオロメトキシ、2'-O-ジフルオロメトキシ-エトキシ、2'-O-メチルヌクレオチドなどの式I-VIIのいずれかの修飾ピリミジンヌクレオチドが挙げられる。

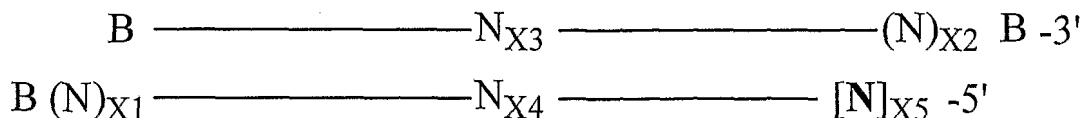
40

【0175】

一実施形態においては、本発明は、構造SIを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0176】

【化 1 3】



SI

【0 1 7 7】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

10

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-

20

デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

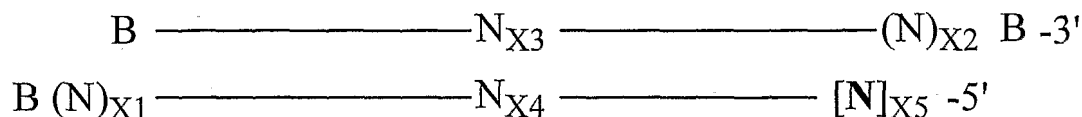
【0 1 7 8】

一実施形態においては、本発明は、構造S I Iを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

30

【0 1 7 9】

【化 1 4】



SII

【0 1 8 0】

40

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチド

50

は、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチドであり、

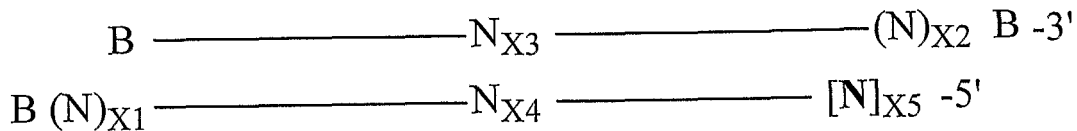
(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0181】

一実施形態においては、本発明は、構造S I I Iを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0182】

【化15】



SIII

【0183】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチドであり、

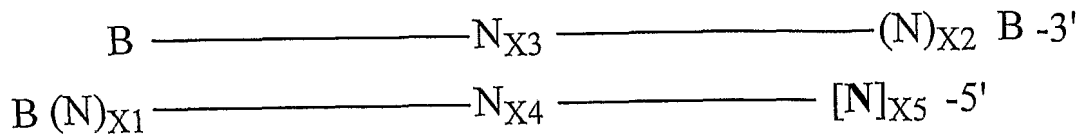
(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0184】

一実施形態においては、本発明は、構造S I Vを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0185】

【化16】



SIV

【0186】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX

10

20

30

40

50

2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドであり、

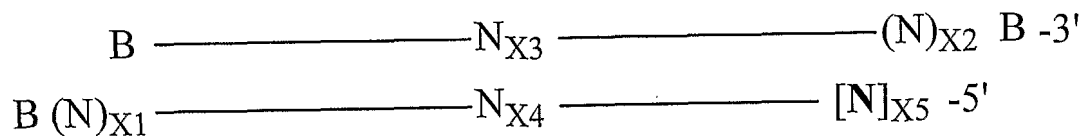
(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0187】

一実施形態においては、本発明は、構造SVを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0188】

【化17】



SV

【0189】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

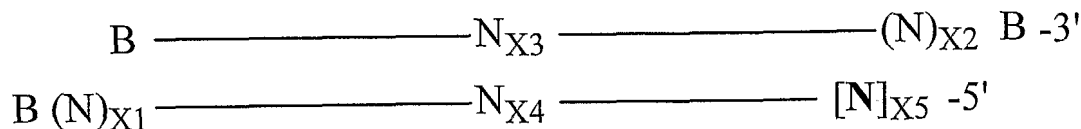
(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0190】

一実施形態においては、本発明は、構造SVIを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0191】

【化 1 8】



SVI

【0 1 9 2】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、アンチセンス鎖（下側の鎖）の5'末端をセンス鎖（上側の鎖）の5'末端よりも熱的に不安定にする配列を含むヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

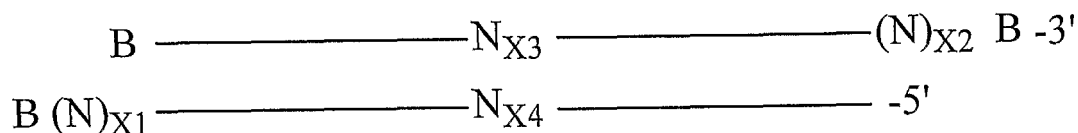
(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0 1 9 3】

一実施形態においては、本発明は、構造SVIIを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0 1 9 4】

【化 1 9】



SVII

【0 1 9 5】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であり、NX3はNX4に相補的であり、どの(N)ヌクレオチドも2'-O-メチル及び／又は2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドである。

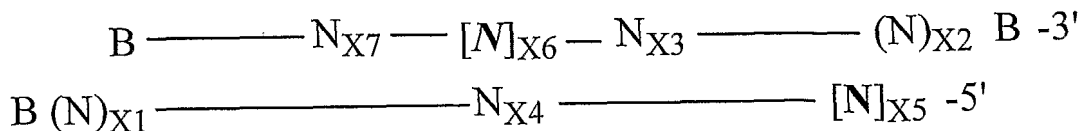
【0 1 9 6】

一実施形態においては、本発明は、構造SVIIIを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

る。

【0197】

【化20】



SVIII

10

【0198】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はアンチセンス鎖(下側の鎖)の5'末端をセンス鎖(上側の鎖)の5'末端よりも熱的に不安定にする配列を含むヌクレオチド位置であり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約15の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、X6は約1から約4の整数であり、X7は約9から約15の整数であり、NX7、NX6及びNX3は、NX4及びNX5に相補的であり、

20

(a) アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、[N]ヌクレオチド以外の2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、[N]ヌクレオチド以外の、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

30

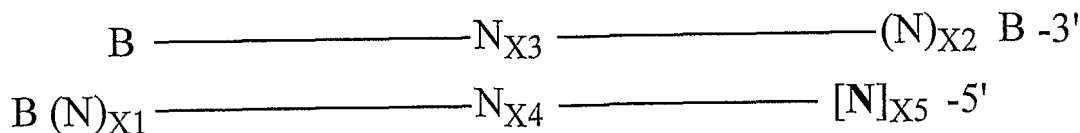
(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0199】

一実施形態においては、本発明は、構造SIXを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0200】

【化21】



40

SIX

【0201】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

50

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

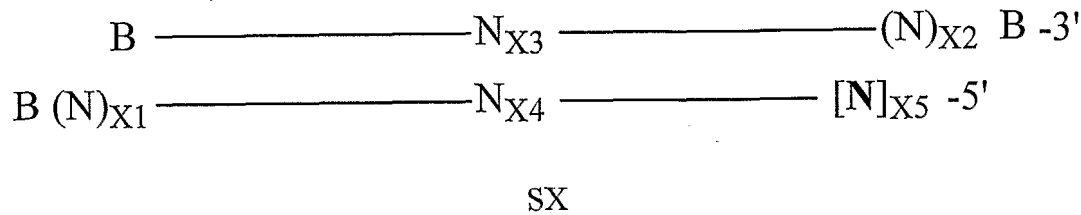
(c) 任意の (N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0202】

一実施形態においては、本発明は、構造 SX を有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0203】

【化22】



【0204】

ここで、各 N は独立にヌクレオチドであり、各 B は存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N) は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N] はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1 及び X2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、X3 は約 9 から約 30 の整数であり、X4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X4 と X5 の合計は 17-36 であり、X5 は約 1 から約 6 の整数であり、NX3 は NX4 及び NX5 に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチド（上側の鎖）はリボヌクレオチドであり、

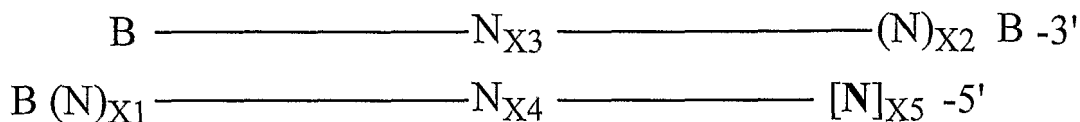
(c) 任意の (N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0205】

一実施形態においては、本発明は、構造 SX I を有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0206】

【化 2 3】



SXI

【0 2 0 7】

10

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X 1及びX 2は独立に約0から約4の整数であり、X 3は約9から約30の整数であり、X 4は約11から約30の整数であって、ただしX 4とX 5の合計は17-36であり、X 5は約1から約6の整数であり、NX 3はNX 4及びNX 5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

20

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

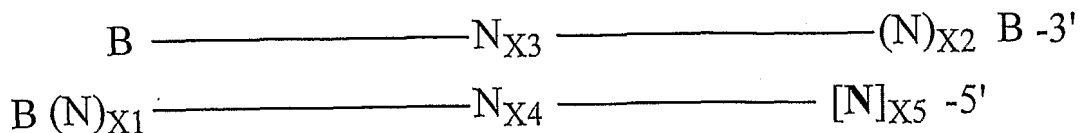
【0 2 0 8】

一実施形態においては、本発明は、構造SXIを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0 2 0 9】

30

【化 2 4】



SXII

【0 2 1 0】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X 1及びX 2は独立に約0から約4の整数であり、X 3は約9から約30の整数であり、X 4は約11から約30の整数であって、ただしX 4とX 5の合計は17-36であり、X 5は約1から約6の整数であり、NX 3はNX 4及びNX 5に相補的であり、

40

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオ

50

キシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドであり、

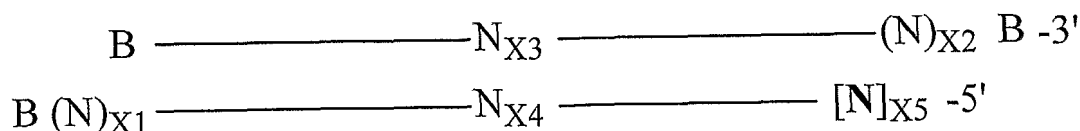
（c）任意の（N）ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0211】

一実施形態においては、本発明は、構造S X I I Iを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0212】

【化25】



10

SXIII

【0213】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、（N）は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

20

（a）アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリドミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

（b）センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

30

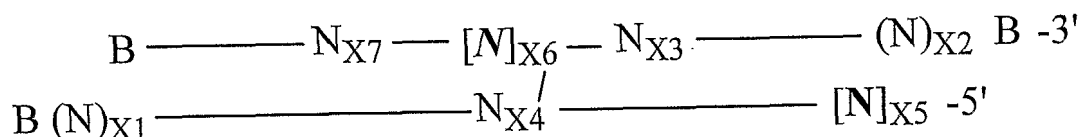
（c）任意の（N）ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0214】

一実施形態においては、本発明は、構造S X I Vを有する二本鎖核酸分子を特徴とする。

【0215】

【化26】



40

SXIV

【0216】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、（N）は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌ

50

クレオチド位置であり、[N] はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X 1 及び X 2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、X 3 は約 9 から約 15 の整数であり、X 4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X 4 と X 5 の合計は 17 - 36 であり、X 5 は約 1 から約 6 の整数であり、X 6 は約 1 から約 4 の整数であり、X 7 は約 9 から約 15 の整数であり、NX 7、NX 6 及び NX 3 は、NX 4 及び NX 5 に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N] ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、[N] ヌクレオチド以外の 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、[N] ヌクレオチド以外の、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(c) 任意の (N) ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【0217】

一実施形態においては、構造 S I、S I I、S I I I、S I V、S V、S V I、S V I I、S V I I I、S I X、S X、S X I I、S X I I I 又は S X I V のいずれかを有する二本鎖核酸分子は、核酸分子のアンチセンス鎖又はアンチセンス領域の 5' 末端に末端リン酸基を含む。

【0218】

一実施形態においては、構造 S I、S I I、S I I I、S I V、S V、S V I、S V I I、S V I I I、S I X、S X、S X I I、S X I I I 又は S X I V のいずれかを有する二本鎖核酸分子は、X 5 = 1、2 又は 3；各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2；X 3 = 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 並びに X 4 = 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 を含む。

【0219】

一実施形態においては、構造 S I、S I I、S I I I、S I V、S V、S V I、S V I I、S V I I I、S I X、S X、S X I I、S X I I I 又は S X I V のいずれかを有する二本鎖核酸分子は、X 5 = 1；各 X 1 及び X 2 = 2；X 3 = 19 並びに X 4 = 18 を含む。

【0220】

一実施形態においては、構造 S I、S I I、S I I I、S I V、S V、S V I、S V I I、S V I I I、S I X、S X、S X I I、S X I I I 又は S X I V のいずれかを有する二本鎖核酸分子は、X 5 = 2；各 X 1 及び X 2 = 2；X 3 = 19 並びに X 4 = 17 を含む。

【0221】

一実施形態においては、構造 S I、S I I、S I I I、S I V、S V、S V I、S V I I、S V I I I、S I X、S X、S X I I、S X I I I 又は S X I V のいずれかを有する二本鎖核酸分子は、X 5 = 3；各 X 1 及び X 2 = 2；X 3 = 19 並びに X 4 = 16 を含む。

【0222】

一実施形態においては、構造 S I、S I I、S I I I、S I V、S V、S V I、S V I I、S V I I I、S I X、S X、S X I I、S X I I I 又は S X I V のいずれかを有する二本鎖核酸分子は、センス鎖又はセンス領域の 3' 及び 5' 末端に B を含む。

【0223】

一実施形態においては、構造 S I、S I I、S I I I、S I V、S V、S V I、S V I

10

20

30

40

50

I、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、アンチセンス鎖又はアンチセンス領域の3'末端にBを含む。

【0224】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、センス鎖又はセンス領域の3'及び5'末端、並びにアンチセンス鎖又はアンチセンス領域の3'末端にBを含む。

【0225】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、核酸分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の3'末端上の第1の末端(N)に、1個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を更に含む。例えば、二本鎖核酸分子は、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合、例えば、(NsN)を含むオーバーハングヌクレオチド位置を有する、X1及び/又はX2=2を含み得る。ここで、「s」はホスホロチオアートを示す。

【0226】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、2'-O-メチルヌクレオチドである(N)ヌクレオチドを含む。

【0227】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、2'-デオキシヌクレオチドである(N)ヌクレオチドを含む。

【0228】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、アンチセンス(下側の)鎖のN及び[N]ヌクレオチドに相補的である標的ポリヌクレオチド配列中のヌクレオチドに相補的である(N)ヌクレオチドをアンチセンス鎖(下側の鎖)中に含む。

【0229】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、標的ポリヌクレオチド配列の約15から約30ヌクレオチドの隣接ヌクレオチド配列を含む(N)ヌクレオチドをセンス鎖(上側の鎖)中に含む。

【0230】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、センス鎖の隣接(N)及びNヌクレオチド配列が標的核酸配列のヌクレオチド配列を含むように、アンチセンス(下側の)鎖に相補的である標的ポリヌクレオチド配列に対応するヌクレオチド配列を含む(N)ヌクレオチドをセンス鎖(上側の鎖)中に含む。

【0231】

一実施形態においては、構造SVIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、二本鎖核酸分子のセンス(上側の)鎖の5'末端のみにBを含む。

【0232】

一実施形態においては、構造SI、SII、SIII、SIV、SV、SVI、SVII、SVIII、SIX、SX、SXII、SXIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、不對末端ヌクレオチドをアンチセンス(下側の)鎖の5'末端に更に含む。不對ヌクレオチドは、センス(上側の)鎖と相補的でない。一実施形態においては、不對の末端ヌクレオチドは、アンチセンス(下側の)鎖のN及び[N]ヌクレオチドに

10

20

30

40

50

相補的である標的ポリヌクレオチド配列に相補的である。別の実施形態においては、不對の末端ヌクレオチドは、アンチセンス（下側の）鎖のN及び[N]ヌクレオチドに相補的である標的ポリヌクレオチド配列に相補的でない。

【0233】

一実施形態においては、構造SVIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、 $X6 = 1$ 及び $X3 = 10$ を含む。

【0234】

一実施形態においては、構造SVIII又はSXIVのいずれかを有する二本鎖核酸分子は、 $X6 = 2$ 及び $X3 = 9$ を含む。

【0235】

一実施形態においては、本発明は、調合物LNP-051、LNP-053、LNP-054、LNP-069、LNP-073、LNP-077、LNP-080、LNP-082、LNP-083、LNP-060、LNP-061、LNP-086、LNP-097、LNP-098、LNP-099、LNP-100、LNP-101、LNP-102、LNP-103又はLNP-104（表IV参照）のいずれかとして調合されたsiNA分子又は二本鎖核酸分子又はRNAi阻害剤を含む組成物を特徴とする。

【0236】

一実施形態においては、本発明は、互いに相補的である第1の鎖と第2の鎖を各々有する、第1の二本鎖核酸分子と第2の二本鎖核酸分子とを含む組成物を特徴とする。ここで、第1の二本鎖核酸分子の第2の鎖は、第1の標的配列に相補的である配列を含み、第2の二本鎖核酸分子の第2の鎖は、第2の標的又は経路標的配列に相補的である配列を含む。一実施形態においては、組成物は、陽イオン性脂質、中性脂質及びポリエチレングリコール抱合体を更に含む。一実施形態においては、組成物は、陽イオン性脂質、中性脂質、ポリエチレングリコール抱合体及びコレステロールを更に含む。一実施形態においては、組成物は、ポリエチレングリコール抱合体、コレステロール及び界面活性剤を更に含む。一実施形態においては、陽イオン性脂質は、CLiNDMA、pCLiNDMA、eCLiNDMA、DMOBA及びDMLBAからなる群から選択される。一実施形態においては、中性脂質は、DSPC、DOBA及びコレステロールからなる群から選択される。一実施形態においては、ポリエチレングリコール抱合体は、PEG-ジミリスチルグリセリン及びPEG-コレステロールからなる群から選択される。一実施形態においては、PEGは2KPEGである。一実施形態においては、界面活性剤は、パルミチルアルコール、ステアシルアルコール、オレイルアルコール及びリノレイルアルコールからなる群から選択される。一実施形態においては、陽イオン性脂質はCLiNDMAであり、中性脂質はDSPCであり、ポリエチレングリコール抱合体は2KPEG-DMGであり、コレステロールはコレステロールであり、界面活性剤はリノレイルアルコールである。一実施形態においては、CLiNDMA、DSPC、2KPEG-DMG、コレステロール及びリノレイルアルコールは、それぞれ43:38:10:2:7のモル比で存在する。

【0237】

本明細書の実施形態のいずれにおいても、本発明のsiNA分子は、RNA干渉又はRNA干渉の阻害によって、1個以上の標的の発現を調節する。一実施形態においては、RNA干渉は、RISCによって媒介される標的の切断（例えば、siRNAによって媒介されるRNA干渉）である。一実施形態においては、RNA干渉は、標的の翻訳阻害（例えば、miRNAによって媒介されるRNA干渉）である。一実施形態においては、RNA干渉は、標的の転写阻害（例えば、siRNAによって媒介される転写サイレンシング）である。一実施形態においては、RNA干渉は細胞質中で起こる。一実施形態においては、RNA干渉は核中で起こる。

【0238】

本明細書の実施形態のいずれにおいても、本発明のsiNA分子は、内因性mRNA、siRNA、miRNAなどの内因性標的RNAの阻害によって、又はRISCの阻害によって、1個以上の標的の発現を調節する。

【0239】

一実施形態においては、本発明は、miRNA阻害、siRNA阻害又はRISC阻害によって、1個以上の遺伝子標的の発現を調節する1種類以上のRNAi阻害剤を特徴とする。

【0240】

一実施形態においては、本発明のRNAi阻害剤は、1個以上の標的miRNA又はsiRNA分子に相補的である1本以上の鎖を有する、本明細書のsiRNA分子である。

【0241】

一実施形態においては、本発明のRNAi阻害剤は、標的miRNA若しくはsiRNA分子又はその一部に相補的であるアンチセンス分子である。本発明のアンチセンスRNAi阻害剤は、約10から約40ヌクレオチド長（例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40ヌクレオチド長）の長さであり得る。本発明のアンチセンスRNAi阻害剤は、本明細書の1個以上の修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含み得る（例えば、本明細書の式I-VIIのいずれかの分子、又はその任意の組合せを参照されたい。）。一実施形態においては、本発明のアンチセンスRNAi阻害剤は、1個以上又は全部の2'-O-メチルヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、本発明のアンチセンスRNAi阻害剤は、1個以上又は全部の2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、本発明のアンチセンスRNAi阻害剤は、1個以上又は全部の（2'-メトキシエトキシ又はMOEとしても知られる）2'-O-メトキシエチルヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、本発明のアンチセンスRNAi阻害剤は、1個以上又は全部のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含み得る。一実施形態においては、アンチセンスRNA阻害剤又は本発明は、アンチセンスRNA阻害剤の3'末端に、5'末端に、又は5'末端と3'末端の両方に末端キャップ部分を含み得る。

【0242】

一実施形態においては、本発明のRNAi阻害剤は、調節可能なアプタマーなど、RISCに対する結合親和性を有する核酸アプタマーである（例えば、An et al., 2006, RNA, 12:710-716参照）。本発明のアプタマーRNAi阻害剤は、約10から約50ヌクレオチド長（例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49又は50ヌクレオチド長）の長さであり得る。本発明のアプタマーRNAi阻害剤は、本明細書の1個以上の修飾ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含み得る（例えば、本明細書の式I-VIIのいずれかの分子、又はその任意の組合せを参照されたい。）。一実施形態においては、本発明のアプタマーRNAi阻害剤は、1個以上又は全部の2'-O-メチルヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、本発明のアプタマーRNAi阻害剤は、1個以上又は全部の2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、本発明のアプタマーRNAi阻害剤は、1個以上又は全部の（2'-メトキシエトキシ又はMOEとしても知られる）2'-O-メトキシエチルヌクレオチドを含み得る。一実施形態においては、本発明のアプタマーRNAi阻害剤は、1個以上又は全部のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含み得る。一実施形態においては、アプタマーRNA阻害剤又は本発明は、アプタマーRNA阻害剤の3'末端に、5'末端に、又は5'末端と3'末端の両方に末端キャップ部分を含み得る。

【0243】

一実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾されていても、無修飾でもよい、本発明のsiRNA分子を合成すること（ここで、siRNA鎖の1本は、標的遺伝子のRNAに相補的である配列を含む。）、及び(b) 細胞における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下でsiRNA分子を細胞に導入することを含む、細胞

内の標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

【0244】

一実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾されていても、無修飾でもよい、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA 鎖の 1 本は、標的遺伝子の RNA に相補的である配列を含み、siNA のセンス鎖配列は、標的 RNA の配列と同一である、又はかなり類似した配列を含む。）、及び (b) 細胞における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で siNA 分子を細胞に導入することを含む、細胞内の標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

【0245】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾されていても、無修飾でもよい、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA 鎖の 1 本は、標的遺伝子の RNA に相補的である配列を含む。）、及び (b) 細胞における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で siNA 分子を細胞に導入することを含む、細胞内の 1 個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

10

【0246】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾されていても、無修飾でもよい、本発明の 1 個以上の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA 鎖は、標的遺伝子の RNA に相補的である配列を含み、siNA のセンス鎖配列は、標的 RNA の配列と同一である、又はかなり類似した配列を含む。）、及び (b) 細胞における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で siNA 分子を細胞に導入することを含む、細胞内の 2 個以上の標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

20

【0247】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾されていても、無修飾でもよい、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA 鎖の 1 本は、標的遺伝子の RNA に相補的である配列を含み、siNA のセンス鎖配列は、標的 RNA の配列と同一である、又はかなり類似した配列を含む。）、及び (b) 細胞における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で siNA 分子を細胞に導入することを含む、細胞内の 1 個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

【0248】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾されていても、無修飾でもよい、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA 鎖の 1 本は、標的遺伝子の RNA に相補的である配列を含み、siNA のセンス鎖配列は、標的 RNA の配列と同一である、又はかなり類似した配列を含む。）、及び (b) 細胞における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で siNA 分子を細胞に導入することを含む、細胞内の標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

30

【0249】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子は、生体外用途における試薬として使用される。例えば、siNA 試薬は、治療効果のために、対象に移植された組織又は細胞中に導入される。細胞及び／又は組織は、外植片をその後に移植される生物体又は対象から得ることができ、又は別の生物体又は対象から移植前に得ることができる。siNA 分子を使用して、細胞又は組織中の 1 個以上の遺伝子の発現を調節することができ、細胞又は組織は、所望の表現型を獲得し、又はインビボで移植したときに機能することができる。一実施形態においては、患者由来のある種の標的細胞を採取する。採取されたこれらの細胞を、これらの細胞による siNA の取り込みに適切な条件下で（例えば、細胞中への siNA の送達を促進するために、陽イオン性脂質、リボソームなどの送達試薬を用いて、又は電気穿孔法などの技術を用いて）、細胞内の特定のヌクレオチド配列を標的にした siNA と接触させる。次いで、同じ患者又は他の患者に細胞を再導入する。

40

【0250】

一実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾され得る、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA 鎖の 1 本は、標的遺伝子の RNA に相補的である配列を

50

含む。)、及び(b)組織外植片における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、特定の生物体由来の組織外植片の細胞にs i N A分子を導入することを含む、組織外植片における標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。別の実施形態においては、この方法は、組織が得られた生物体に、又は別の生物体に、生物体における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、組織外植片を戻すことを更に含む。

【0251】

一実施形態においては、本発明は、(a)化学修飾され得る、本発明のs i N A分子を合成すること(ここで、s i N A鎖の1本は、標的遺伝子のR N Aに相補的である配列を含む、s i N Aのセンス鎖配列は、標的R N Aの配列と同一である、又はかなり類似した配列を含む。)、及び(b)組織外植片における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、特定の生物体由来の組織外植片の細胞にs i N A分子を導入することを含む、組織外植片における標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。別の実施形態においては、この方法は、組織が得られた生物体に、又は別の生物体に、生物体における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、組織外植片を戻すことを更に含む。

10

【0252】

別の実施形態においては、本発明は、(a)化学修飾され得る、本発明のs i N A分子を合成すること(ここで、s i N A鎖の1本は、標的遺伝子のR N Aに相補的である配列を含む。)、及び(b)組織外植片における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、特定の生物体由来の組織外植片の細胞にs i N A分子を導入することを含む、組織外植片中の1個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。別の実施形態においては、この方法は、組織が得られた生物体に、又は別の生物体に、生物体における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、組織外植片を戻すことを更に含む。

20

【0253】

一実施形態においては、本発明は、(a)化学修飾され得る、本発明のs i N A分子を合成すること(ここで、s i N A鎖の1本は、標的遺伝子のR N Aに相補的である配列を含む。)、及び(b)対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、s i N A分子を対象又は生物体に導入することを含む、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。標的タンパク質又はR N Aのレベルは、当分野で周知の種々の方法によって求めることができる。

30

【0254】

別の実施形態においては、本発明は、(a)化学修飾され得る、本発明のs i N A分子を合成すること(ここで、s i N A鎖の1本は、標的遺伝子のR N Aに相補的である配列を含む。)、及び(b)対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、s i N A分子を対象又は生物体に導入することを含む、対象又は生物体における1個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。標的タンパク質又はR N Aのレベルは、当分野で公知のとおり求めることができる。

【0255】

一実施形態においては、本発明は、(a)化学修飾され得る、本発明のs i N A分子を合成すること(ここで、s i N Aは、標的遺伝子のR N Aに対して相補性を有する一本鎖配列を含む。)、及び(b)細胞における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下でs i N A分子を細胞に導入することを含む、細胞内の標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

40

【0256】

別の実施形態においては、本発明は、(a)化学修飾され得る、本発明のs i N A分子を合成すること(ここで、s i N Aは、標的遺伝子のR N Aに対して相補性を有する一本鎖配列を含む。)、及び(b)細胞における標的遺伝子の発現を調節する(例えば、阻害する)のに適切な条件下で、細胞をインビトロ又はインビボでs i N A分子と接触させる

50

ことを含む、細胞内の1個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

【0257】

一実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾され得る、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA は、標的遺伝子の RNA に対して相補性を有する一本鎖配列を含む。）、及び (b) 組織外植片における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、特定の対象又は生物体から得られた組織外植片の細胞を siNA 分子と接触させることを含む、組織外植片（（例えば、一生物体から別の生物体に移植することができる、又は器官、組織若しくは細胞が得られた同じ生物体に戻ることができる、任意の器官、組織又は細胞）における標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。別の実施形態においては、この方法は、組織が得られた対象若しくは生物体に、又は別の対象若しくは生物体に、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、組織外植片を戻すことを更に含む。

10

【0258】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾され得る、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA は、標的遺伝子の RNA に対して相補性を有する一本鎖配列を含む。）、及び (b) 組織外植片における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、特定の対象又は生物体から得られた組織外植片の細胞に siNA 分子を導入することを含む、組織外植片（例えば、一生物体から別の生物体に移植することができる、又は器官、組織若しくは細胞が得られた同じ生物体に戻ることができる、任意の器官、組織又は細胞）における1個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。別の実施形態においては、この方法は、組織が得られた対象若しくは生物体に、又は別の対象若しくは生物体に、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、組織外植片を戻すことを更に含む。

20

【0259】

一実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾され得る、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA は、標的遺伝子の RNA に対して相補性を有する一本鎖配列を含む。）、及び (b) 対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、siNA 分子を対象又は生物体に導入することを含む、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

【0260】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾され得る、本発明の siNA 分子を合成すること（ここで、siNA は、標的遺伝子の RNA に対して相補性を有する一本鎖配列を含む。）、及び (b) 対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、siNA 分子を対象又は生物体に導入することを含む、対象又は生物体における1個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

30

【0261】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の siNA 分子と接触させることを含む、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

40

【0262】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の siNA 分子と接触させることを含む、対象又は生物体における遺伝子発現又は活性に関係する疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。遺伝子発現の減少、したがってそれぞれのタンパク質/RNA のレベルの減少によって、疾患、障害、形質又は症状の症候がある程度緩和される。

【0263】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節す

50

るのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって癌を治療又は予防することができる、対象又は生物体における癌を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、癌細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における癌の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における癌の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

10

【0264】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって増殖性疾患又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における増殖性疾患又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、増殖性疾患に關与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における増殖性疾患又は症状の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における増殖性の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

20

【0265】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって移植片及び／又は組織拒絶反応（同種移植片拒絶）を治療又は予防することができる、対象又は生物体における移植片及び／又は組織拒絶反応（同種移植片拒絶）を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、移植片及び／又は組織拒絶反応（同種移植片拒絶）に關与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における移植片及び／又は組織拒絶反応（同種移植片拒絶）の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における移植片及び／又は組織拒絶反応（同種移植片拒絶）の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

30

40

【0266】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって自己免疫疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における自己免疫疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、自己免疫疾患、障害、形質又は症状に關与す

50

る細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における自己免疫疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に関与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における自己免疫疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

10

【0267】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含む、それによって感染性の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における感染性の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、感染性の疾患、障害、形質又は症状に関与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における感染性の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に関与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における感染性の疾患、形質又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

20

【0268】

一実施形態においては、本発明は、アデフォビルジピボキシルを本発明の s i N A 分子と組み合わせて対象に投与することを含む、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、アデフォビルジピボキシル及び s i N A 分子は、アデフォビルジピボキシル及び s i N A 分子による治療を受けていない対象に比較して、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、米国仮出願第 60/678,531 号、及び 2005 年 7 月 29 日に出願された、関係する米国仮出願第 60/703,946 号、及び 2005 年 11 月 15 日に出願された米国仮出願第 60/737,024 号（Vargeese 他）に記載された組成物として処方される。これらの仮出願全部を、参照によりその全体を本明細書に組込む。かかる s i N A 調合物を一般に「脂質核酸粒子」（LNP）と称する。

30

【0269】

一実施形態においては、本発明は、ラミブジン（3TC）を本発明の s i N A 分子と組み合わせて対象に投与することを含む、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、ラミブジン（3TC）及び s i N A は、ラミブジン（3TC）及び s i N A 分子による治療を受けていない対象に比較して、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明の s i N A 分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第 60/678,531 号、及び 2005 年 7 月 29 日に出願された、関係する米国仮出願第 60/703,946 号、及び 2005 年 11 月 15 日に出願された米国仮出願第 60/737,024 号（Vargeese 他）に記載された組成物として処方される。

40

【0270】

50

一実施形態においては、本発明は、アデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）を本発明の siNA 分子と組み合わせて対象に投与することを含む、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、アデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）並びに siNA 分子は、アデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）並びに siNA 分子による治療を受けていない対象に比較して、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明の siNA 分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第 60/678,531 号、及び 2005 年 7 月 29 日に出願された、関係する米国仮出願第 60/703,946 号、及び 2005 年 11 月 15 日に
10 出願された米国仮出願第 60/737,024 号（Vargeese 他）に記載された組成物として処方される。

【0271】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてアデフォビルジピボキシルを対象に投与することを含む、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は 15 から 28 ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも 15 ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B 型肝炎ウイルス（HBV）標的 RNA に対して相補性を有する。アデフォビルジピボキシル及び二本鎖核酸分子は、アデ
20 フォビルジピボキシル及び二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明の siNA 分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第 60/678,531 号、及び 2005 年 7 月 29 日に出願された、関係する米国仮出願第 60/703,946 号、及び 2005 年 11 月 15 日に出願された米国仮出願第 60/737,024 号（Vargeese 他）に記載された組成物として処方される。

【0272】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてラミブジン（3TC）を対象に投与することを含む、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス
30 鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は 15 から 28 ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも 15 ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B 型肝炎ウイルス（HBV）標的 RNA に対して相補性を有する。ラミブジン（3TC）及び二本鎖核酸分子は、ラミブジン（3TC）及び二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明の siNA 分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮
40 出願第 60/678,531 号、及び 2005 年 7 月 29 日に出願された、関係する米国仮出願第 60/703,946 号、及び 2005 年 11 月 15 日に出願された米国仮出願第 60/737,024 号（Vargeese 他）に記載された組成物として処方される。

【0273】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてアデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）を対象に投与することを含む、対象における B 型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は 15 から 28 ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも 15 ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B 型肝炎
50 ウイルス（HBV）標的 RNA に対して相補性を有する。アデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）並びに二本鎖核酸分子は、アデフォビルジピボキシル及びラミブ

ジン（3TC）並びに二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明のs i N A分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第60／678, 531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60／703, 946号、及び2005年11月15日に出願された米国仮出願第60／737, 024号（V a r g e e s e他）に記載された組成物として処方される。

【0274】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてアデフォビルジピボキシルを対象に投与することを含む、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は15から28ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも15ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス（HBV）標的RNAに対して相補性を有し、（e）二本鎖核酸分子の各鎖の内部ヌクレオチドの少なくとも20%は、化学修飾を有する修飾ヌクレオシドであり、（f）化学修飾の少なくとも2個は互いに異なる。アデフォビルジピボキシル及び二本鎖核酸分子は、アデフォビルジピボキシル及び二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明のs i N A分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第60／678, 531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60／703, 946号、及び2005年11月15日に出願された米国仮出願第60／737, 024号（V a r g e e s e他）に記載された組成物として処方される。

【0275】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてラミブジン（3TC）を対象に投与することを含む、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は15から28ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも15ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス（HBV）標的RNAに対して相補性を有し、（e）二本鎖核酸分子の各鎖の内部ヌクレオチドの少なくとも20%は、化学修飾を有する修飾ヌクレオシドであり、（f）化学修飾の少なくとも2個は互いに異なる。ラミブジン（3TC）及び二本鎖核酸分子は、ラミブジン（3TC）及び二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明のs i N A分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第60／678, 531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60／703, 946号、及び2005年11月15日に出願された米国仮出願第60／737, 024号（V a r g e e s e他）に記載された組成物として処方される。

【0276】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてアデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）を対象に投与することを含む、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は15から28ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも15ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス（HBV）標的RNAに対して相補性を有し、（e）二本鎖核酸分子の各鎖の内部ヌクレオチドの少なくとも20%は、化学修飾を有する修飾ヌクレオシドであり、（f）化学修飾の少なくとも2個は互いに異なる。アデフォビルジピボキシル及びラミブジ

ン（3TC）並びに二本鎖核酸分子は、アデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）並びに二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明のs i N A分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第60/678,531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60/703,946号、及び2005年11月15日に出願された米国仮出願第60/737,024号（Vargeese他）に記載された組成物として処方される。

【0277】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてアデフォビルジピボキシルを対象に投与することを含む、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は15から28ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも15ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス（HBV）標的RNAに対して相補性を有し、（e）二本鎖核酸分子の各鎖の内部ヌクレオチドの少なくとも20%は、糖修飾を有する修飾ヌクレオシドであり、（f）糖修飾の少なくとも2個は互いに異なる。アデフォビルジピボキシル及び二本鎖核酸分子は、アデフォビルジピボキシル及び二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明のs i N A分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第60/678,531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60/703,946号、及び2005年11月15日に出願された米国仮出願第60/737,024号（Vargeese他）に記載された組成物として処方される。

【0278】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてラミブジン（3TC）を対象に投与することを含む、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は15から28ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも15ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス（HBV）標的RNAに対して相補性を有し、（e）二本鎖核酸分子の各鎖の内部ヌクレオチドの少なくとも20%は、糖修飾を有する修飾ヌクレオシドであり、（f）糖修飾の少なくとも2個は互いに異なる。ラミブジン（3TC）及び二本鎖核酸分子は、ラミブジン（3TC）及び二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明のs i N A分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第60/678,531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60/703,946号、及び2005年11月15日に出願された米国仮出願第60/737,024号（Vargeese他）に記載された組成物として処方される。

【0279】

一実施形態においては、本発明は、化学合成された二本鎖核酸分子と組み合わせてアデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）を対象に投与することを含む、対象におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染を治療又は予防する方法を特徴とする。ここで、（a）二本鎖核酸分子は、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、（b）二本鎖核酸分子の各鎖は15から28ヌクレオチド長であり、（c）センス鎖の少なくとも15ヌクレオチドは、アンチセンス鎖に相補的であり、（d）二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖は、B型肝炎ウイルス（HBV）標的RNAに対して相補性を有し、（e）二本鎖核酸分子の各鎖の内部ヌクレオチドの少なくとも20%は、糖修飾を有する修飾ヌクレオシドであり、（f）糖修飾の少なくとも2個は互いに異なる。アデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）並びに二本鎖核酸分子は、アデフォビルジピボキシル及びラミブジン（3TC）

並びに二本鎖核酸分子による治療を受けていない対象に比較して、対象におけるB型肝炎ウイルス(HBV)レベルを低下させるのに、又は抑制するのに適切な条件下で投与される。一実施形態においては、本発明のs i N A分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第60/678, 531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60/703, 946号、及び2005年11月15日に出願された米国仮出願第60/737, 024号(Vargeese他)に記載された組成物として処方される。

【0280】

一実施形態においては、本発明は、アデフォビルジピボキシル及び本発明の1種類以上の二本鎖核酸分子又はs i N A分子を薬剤として許容される担体又は希釈剤中に含む組成物を特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、アデフォビルジピボキシル、ラミ

10

【0281】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明のs i N A分子と接触させることを含み、それによって年齢関連性の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における年齢関連性の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、年齢関連性の疾患、障害、形質又は症状に関与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明のs i N A分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における年齢関連性の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に関与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に(s i N Aの静脈内又は皮下投与などによって)全身投与することによって、対象又は生物体を本発明のs i N A分子と接触させることを特徴とする。本発明のs i N A分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A分子は、対象又は生物体における年齢関連性の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

20

【0282】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明のs i N A分子と接触させることを含み、それによって神経性又は神経変性の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における神経性又は神経変性の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、神経性又は神経変性の疾患、障害、形質又は症状に関与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明のs i N A分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における神経性又は神経変性の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に関与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に(s i N Aの静脈内又は皮下投与などによって)全身投与することによって、対象又は生物体を本発明のs i N A分子と接触させることを特徴とする。本発明のs i N A分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A分子は、対象又は生物体における神経性又は神経変性の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

30

40

【0283】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明のs i N A分子と接触させることを含み、それによって呼吸器の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における呼吸器の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴

50

とする。一実施形態においては、本発明は、呼吸器の疾患、障害、形質又は症状に関与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における呼吸器の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に関与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における呼吸器の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

10

【0284】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって眼球の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における眼球の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、眼球の疾患、障害、形質又は症状に関与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における眼球の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に関与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における眼球の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

20

【0285】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって皮膚の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における皮膚の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、皮膚の疾患、障害、形質又は症状に関与する細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における皮膚の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に関与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における皮膚の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

30

40

【0286】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって肝臓の疾患、障害、形質又は症状（例えば、肝炎、H C V、H B V、糖尿病（d i a b e t i s）、硬変、肝細胞癌など）を治療又は予防することができる、対象又は生物体における肝臓の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、肝臓の疾患、障害、形質又は症状に関与する肝臓

50

の細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における肝臓の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における肝臓の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

10

【0287】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって腎臓／腎性の疾患、障害、形質又は症状（例えば、多発性嚢胞腎など）を治療又は予防することができる、対象又は生物体における腎臓／腎性の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、腎臓／腎性の疾患、障害、形質又は症状に關与する腎臓／腎性の細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における腎臓／腎性の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における腎臓の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

20

【0288】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって聴覚の疾患、障害、形質又は症状（例えば、聴覚損失、難聴など）を治療又は予防することができる、対象又は生物体における聴覚の疾患、障害、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、聴覚の疾患、障害、形質又は症状に關与する耳、内耳（inner hear）、中耳の細胞及び組織など、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における聴覚の疾患、障害、形質又は症状の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内又は皮下投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における聴覚の疾患、形質、障害又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

30

40

【0289】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含み、それによって代謝の疾患、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における1つ以上の代謝の疾患、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、関連する組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態に

50

においては、本発明は、対象又は生物体（例えば、肝臓、すい臓、小腸、脂肪の組織又は細胞）における代謝の疾患、形質又は症状の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、關連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内、筋肉内、皮下、G I 投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体（例えば、肝臓、すい臓、小腸、脂肪の組織又は細胞）における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における代謝の疾患、形質又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。一実施形態においては、代謝病は、高コレステロール血症（h y p e c h o l e s t e r o l e m i a）、高脂血症、異脂肪血症、糖尿病（例えば、I 型及び／又は I I 型糖尿病）、インスリン抵抗性、肥満、又は睡眠時無呼吸、裂孔ヘルニア、逆流性食道炎（e s o p h a g i s i t i s）、骨関節炎、痛風、体重増加に關連した癌、胆石症、腎結石、肺高血圧症、不妊症、循環器疾患、正常値を超える重量、及び正常値を超える脂質レベル、尿酸レベル若しくはシュウ酸塩レベルを含めて、ただしこれらだけに限定されない関連症状からなる群から選択される。

10

【0290】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における遺伝子発現の阻害剤の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含む、対象又は生物体における1つ以上の代謝の疾患、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、遺伝子発現の阻害剤は m i R N A である。

20

【0291】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含む、それによって循環器の疾患、形質又は症状を治療又は予防することができる、対象又は生物体における1つ以上の循環器の疾患、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、本発明は、關連する組織又は細胞、例えば、肝臓、すい臓、小腸、脂肪の組織又は細胞組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における循環器の疾患、形質又は症状の持続又は発生に關与する組織又は細胞など、關連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内、筋肉内、皮下、G I 投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における循環器の疾患、形質又は症状の治療又は予防のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。一実施形態においては、循環器疾患は、高血圧症、冠動脈血栓症、発作、脂質症候群、高血糖症、高トリグリセリド血症、高脂血症、虚血、うっ血性心不全及び心筋梗塞からなる群から選択される。

30

40

【0292】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における遺伝子発現の阻害剤の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含む、対象又は生物体における1つ以上の循環器の疾患、形質又は症状を治療又は予防する方法を特徴とする。一実施形態においては、遺伝子発現の阻害剤は m i R N A である。

【0293】

一実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを含む、それによって減量することができる、対象又は生物体における減量方法を特徴とする。

50

一実施形態においては、本発明は、関連する組織又は細胞、例えば、肝臓、すい臓、小腸、脂肪の組織又は細胞に局所投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。一実施形態においては、本発明は、関連する組織又は細胞に（s i N A の静脈内、筋肉内、皮下、G I 投与などによって）全身投与することによって、対象又は生物体を本発明の s i N A 分子と接触させることを特徴とする。本発明の s i N A 分子は、対象又は生物体における適切な組織又は細胞を標的にするために、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、処方又は抱合することができる。s i N A 分子は、対象又は生物体における減量のための当分野で公知の他の治療処置及び様式と組み合わせることができる。

【0294】

10

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子又は二本鎖核酸分子は、米国仮出願第 60/678,531 号、及び 2005 年 7 月 29 日に出願された、関係する米国仮出願第 60/703,946 号、2005 年 11 月 15 日に提出された米国仮出願第 60/737,024 号、及び 2006 年 2 月 14 日に提出された米国特許出願第 11/353,630 号（V a r g e e s e 他）に記載された組成物として処方される。

【0295】

1 個以上の標的の発現を調節する、又は細胞、対象若しくは生物体における疾患、形質、症状若しくは表現型を治療若しくは予防する、本明細書の方法のいずれにおいても、本発明の s i N A 分子は、1 個以上の標的の発現を R N A 干渉によって調節する。一実施形態においては、R N A 干渉は、R I S C によって媒介される標的の切断（例えば、s i R N A によって媒介される R N A 干渉）である。一実施形態においては、R N A 干渉は、標的の翻訳阻害（例えば、m i R N A によって媒介される R N A 干渉）である。一実施形態においては、R N A 干渉は、標的の転写阻害（例えば、s i R N A によって媒介される転写サイレンシング）である。一実施形態においては、R N A 干渉は細胞質中で起こる。一実施形態においては、R N A 干渉は核中で起こる。

20

【0296】

本発明の治療方法のいずれにおいても、s i N A を対象に治療コースとして投与することができ、例えば、治療コースを通して 1 日 1 回、治療コースを通して 2 日ごとに 1 回、治療コースを通して 3 日ごとに 1 回、治療コースを通して 4 日ごとに 1 回、治療コースを通して 5 日ごとに 1 回、治療コースを通して 6 日ごとに 1 回、治療コースを通して 1 週間に 1 回、治療コースを通して隔週で 1 回、治療コースを通して 1 か月に 1 回などの種々の時間間隔で投与することができる。一実施形態においては、治療コースは、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 週ごとに 1 回である。一実施形態においては、治療コースは、約 1 から約 52 週間又はそれ以上（例えば、無期限）である。一実施形態においては、治療コースは、約 1 から約 48 か月間又はそれ以上（例えば、無期限）である。

30

【0297】

一実施形態においては、治療コースは、固定間隔（例えば、1×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×又はそれ以上）で 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 又はそれを超える週ごとに 1 回などの初期治療コースと、それに続く追加の固定間隔（例えば、1×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×又はそれを超える）で 4、6、8、10、15、20、25、30、35、40 又はそれを超える週ごとに 1 回などの治療維持コースとを含む。

40

【0298】

本発明の治療方法のいずれにおいても、s i N A は、本明細書の、又は当分野で公知のとおり、単独療法として単体で、又は追加の療法と組み合わせて、本明細書に記載するとおり、又は当分野で公知のとおり、対象に全身投与することができる。全身投与としては、例えば、当分野で一般に公知である、肺（吸入、噴霧など） 静脈内、皮下、筋肉内、カテーテル法、鼻咽頭（n a s o p h a r a n g e a l）、経皮又は経口／胃腸投与が挙げられる。

【0299】

50

一実施形態においては、本発明の治療又は予防の方法のいずれにおいても、s i N Aは、当分野で公知のとおり、単独療法として単体で、又は追加の療法と組み合わせて、本明細書に記載するとおり、又は当分野で公知のとおり、対象に局所的に、又は局所組織に、投与することができる。局所投与としては、例えば、当分野で一般に公知である、関連組織への吸入、噴霧、カテーテル法、移植、直接注射、皮膚／経皮投与、ステント術、点耳／点眼又は門脈投与、又は任意の他の局所投与技術、方法若しくは手順が挙げられる。

【0300】

一実施形態においては、本発明は、投与に適切な条件下で、s i N Aを内耳細胞、組織又は構造と接触させることを含む、本発明のs i N A分子及び組成物を内耳に投与する方法を特徴とする。一実施形態においては、投与は、参照により本明細書に組込む、米国特許第5,421,818号、同5,476,446号、同5,474,529号、同6,045,528号、同6,440,102号、同6,685,697号、同6,120,484号及び同5,572,594号、並びにSilverstein, 1999, Ear Nose Throat J., 78, 595-8, 600及びJackson and Silverstein, 2002, Otolaryngol Clin North Am., 35, 639-53の教示に記述され、本発明のs i N A分子用に改作された、方法及び装置を含む。

【0301】

別の実施形態においては、本発明は、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節する（例えば、阻害する）のに適切な条件下で、対象又は生物体を本発明の1個以上のs i N A分子と接触させることを含む、対象又は生物体における1個を超える標的遺伝子の発現を調節する方法を特徴とする。

【0302】

本発明のs i N A分子は、種々の核酸分子のRNA iターゲティングによって、標的遺伝子発現を下方制御又は阻害するように設計することができる。一実施形態においては、本発明のs i N A分子を用いて、例えば異質染色質サイレンシング又は転写阻害によって、標的遺伝子に対応する種々のDNAを標的にする。一実施形態においては、本発明のs i N A分子を用いて、例えばRNA標的切断又は翻訳阻害によって、標的遺伝子に対応する種々のRNAを標的にする。かかるRNAの非限定的例としては、メッセンジャーRNA (mRNA)、非コードRNA (ncRNA)、又はmiRNA及び他の低分子RNAを含む調節エレメント（例えば、Mattick, 2005, Science, 309, 1527-1528及びClaverie, 2005, Science, 309, 1529-1530参照）、標的遺伝子の代替RNAスプライスバリエント、標的遺伝子の転写後修飾RNA、標的遺伝子のpre-mRNA、及び／又はRNAテンプレートが挙げられる。代替(alternate)スプライシングによって、適切なエキソンを用いて区別される転写物ファミリーが生成する場合には、本発明によって適切なエキソンを介して遺伝子発現を阻害して、遺伝子ファミリーメンバーの機能を特異的に阻害する、又は区別することができる。例えば、選択的にスプライスされた膜貫通領域を含むタンパク質は、膜結合型と分泌型の両方で発現され得る。膜貫通領域を含むエキソンを標的にするために本発明を使用して、タンパク質の分泌型に対立するものとして、膜結合型の薬剤ターゲティングの機能的結果を判定することができる。これらのRNA分子のターゲティングに関係した本発明の非限定的適用例としては、治療薬剤用途、化粧品用途、獣医学用途、創薬用途、分子診断及び遺伝子機能用途、並びに、例えば本発明のs i N A分子を用いた一塩基多型マッピングによる、遺伝子地図が挙げられる。かかる適用例は、公知の遺伝子配列を用いて、又は発現配列タグ(EST)から利用可能な部分配列から、実施することができる。

【0303】

別の実施形態においては、本発明のs i N A分子を用いて、相同配列を有する遺伝子ファミリーなどの遺伝子ファミリーに対応する保存配列を標的にする。したがって、複数の

遺伝子又はRNA標的を標的にしたsiNA分子によって、治療効果を増大させることができる。一実施形態においては、本発明は、標的にされた標的遺伝子の保存配列を標的にすることによる、単一のsiNA分子を用いた、1個を超える標的遺伝子配列のターゲティング（切断、又は発現若しくは機能の阻害）を特徴とする。

【0304】

一実施形態においては、siNA分子を用いて、種々の用途における遺伝子機能の経路を特徴づけることができる。例えば、本発明によって、経路中の標的遺伝子の活性を阻害して、遺伝子機能分析、mRNA機能分析又は翻訳分析において、特徴づけられていない遺伝子の機能を明らかにすることができる。本発明によって、薬剤開発に向かって、種々の疾患及び症状に關与する標的遺伝子経路候補を決定することができる。本発明によって、例えば、本明細書の、又は当分野で公知の疾患、障害、形質及び症状に關与する遺伝子発現の経路を理解することができる。

【0305】

一実施形態においては、本発明のsiNA分子及び／又は方法を用いて、Genbankアクセッションによって参照されるRNAをコードする遺伝子、例えば、Genbankアクセッション番号、例えば、参照により本明細書に組込む、米国仮出願第60/363,124号、米国特許出願第10/923,536号及びPCT/US03/05028のGenbankアクセッション番号によって本明細書で参照されるRNA配列をコードする標的遺伝子の発現を下方制御する。

【0306】

一実施形態においては、本発明は、(a)所定の複雑性を有するsiNA構築物のライブラリーを作製すること、及び(b)標的RNA配列内のRNAi標的部位を決定するのに適切な条件下で、上記(a)のsiNA構築物を分析することを含む、方法を特徴とする。一実施形態においては、(a)のsiNA分子は、一定の長さ、例えば、約23ヌクレオチド長の鎖を有する。別の実施形態においては、(a)のsiNA分子は異なる長さ、例えば約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチド長の鎖を有する。一実施形態においては、アッセイは、本明細書の、再構成されたインビトロsiNAアッセイを含み得る。別の実施形態においては、アッセイは、標的RNAが発現される細胞培養系を含み得る。別の実施形態においては、標的RNA断片の切断の検出可能なレベルを、例えば、ゲル電気泳動、ノーザンブロット分析又はRNAse保護アッセイによって分析して、標的RNA配列内の最も適切な標的部位を決定する。標的RNA配列は、例えば、インビトロ系のクローニング及び／又は転写によって、また、インビボ系における細胞発現によって、当分野で公知のとおりになることができる。

【0307】

一実施形態においては、本発明は、(a) 4^N などの所定の複雑性を有するsiNA構築物の無作為化ライブラリーを作製すること（ここで、Nは、siNA構築物鎖の各々における塩基対形成ヌクレオチドの数である（例えば、19塩基対を含む、21ヌクレオチドセンス鎖及びアンチセンス鎖を有するsiNA構築物の場合、複雑性は 4^{19} となる。）。）、及び(b)標的RNA配列内のRNAi標的部位を決定するのに適切な条件下で、上記(a)のsiNA構築物を分析することを含む、方法を特徴とする。別の実施形態においては、(a)のsiNA分子は、一定の長さ、例えば、約23ヌクレオチド長の鎖を有する。更に別の実施形態においては、(a)のsiNA分子は異なる長さ、例えば約15から約30（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30）ヌクレオチド長の鎖を有する。一実施形態においては、アッセイは、本明細書の実施例6の、再構成されたインビトロsiNAアッセイを含み得る。別の実施形態においては、アッセイは、標的RNAが発現される細胞培養系を含み得る。別の実施形態においては、標的RNA断片の切断の検出可能なレベルを、例えば、ゲル電気泳動、ノーザンブロット分析又はRNAse保護アッセイによって分析して、標的RNA配列内の最も適切な標的部位を決定する。標的RNA

配列は、例えば、インビトロ系のクローニング及び／又は転写によって、また、インビボ系における細胞発現によって、当分野で公知のとおりに得ることができる。

【0308】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 標的遺伝子によってコードされるRNA 標的の配列を解析すること、(b) (a) のRNA の1 個以上の領域に相補的である配列を有する siNA 分子の1 組以上を合成すること、及び(c) 標的RNA 配列内のRNA i 標的を決定するのに適切な条件下で(b) の siNA 分子を分析することを含む、方法の特徴とする。一実施形態においては、(b) の siNA 分子は、一定の長さ、例えば、約23ヌクレオチド長の鎖を有する。別の実施形態においては、(b) の siNA 分子は異なる長さ、例えば約15から約30 (例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30)ヌクレオチド長の鎖を有する。一実施形態においては、アッセイは、本明細書の、再構成されたインビトロ siNA アッセイを含み得る。別の実施形態においては、アッセイは、標的RNA が発現される細胞培養系を含み得る。標的RNA 断片の切断の検出可能なレベルを、例えば、ゲル電気泳動、ノーザンブロット分析又はRNA se 保護アッセイによって分析して、標的RNA 配列内の最も適切な標的部位を決定する。標的RNA 配列は、例えば、インビトロ系のクローニング及び／又は転写によって、また、インビボ系における発現によって、当分野で公知のとおりに得ることができる。

【0309】

「標的部位」とは、標的配列に相補的である配列をそのアンチセンス領域内に含む siNA 構築物によって媒介される切断のために「標的にされ」る標的RNA 内の配列を意味する。

【0310】

「切断の検出可能なレベル」とは、標的RNA の無作為分解によって生成されるRNA のバックグラウンドを超えて、切断産物を識別するのに十分な程度の標的RNA の切断 (及び切断された生成物RNA の形成) を意味する。標的RNA の1-5%からの切断産物の生成は、大部分の検出方法のバックグラウンドを超えて検出するのに十分である。

【0311】

一実施形態においては、本発明は、薬剤として許容される担体又は希釈剤中に、本発明の化学修飾され得る siNA 分子を含む、組成物の特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、薬剤として許容される担体又は希釈剤中に、化学修飾され得る、1 個以上の遺伝子を標的にした、本発明の siNA 分子を含む、薬剤組成物の特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、対象における疾患、形質又は症状の診断に適切な条件下で、本発明の組成物を対象に投与することを含む、対象における疾患、形質又は症状を診断する方法の特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、対象における疾患、形質又は症状の治療又は予防に適切な条件下で、単独で、又は1 種類以上の他の治療化合物と併せて、本発明の組成物を対象に投与することを含む、対象における代謝及び／又は循環器の疾患、形質、症状又は障害などの疾患、形質又は症状を治療又は予防する方法の特徴とする。

【0312】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾され得る、本発明の siNA 分子を合成すること (ここで、 siNA 鎖の1 本は、標的遺伝子のRNA に相補的である配列を含む。)、(b) 細胞、組織、対象又は生物体における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、細胞、組織、対象又は生物体に siNA 分子を導入すること、及び(c) 細胞、組織、対象又は生物体における任意の表現型の変化を評価することによって、遺伝子の機能を明らかにすることを含む、標的遺伝子標的を確認する方法の特徴とする。

【0313】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 化学修飾され得る、本発明の siNA 分子を合成すること (ここで、 siNA 鎖の1 本は、標的遺伝子のRNA に相補的である配列を含む。)、(b) 生物系における標的遺伝子の発現を調節するのに適切な条件下で、生

物系に s i N A 分子を導入すること、及び (c) 生物系における任意の表現型の変化を評価することによって、遺伝子の機能を明らかにすることを含む、標的を確認する方法を特徴とする。

【0314】

「生物系」とは、ヒト又は動物を含めて、ただしこれらだけに限定されない生物学的出所から得られる精製又は未精製の材料を意味し、この系は、R N A i 活性に必要な成分を含む。「生物系」という用語は、例えば、細胞、組織、対象若しくは生物体又はその抽出物を含む。生物系という用語は、インビトロでの状況において使用することができる、再構成された R N A i 系も含む。

【0315】

「表現型の変化」とは、本発明の核酸分子（例えば、s i N A）による接触又は処理に応じて起こる、細胞の任意の検出可能な変化を意味する。かかる検出可能な変化としては、当分野で公知の方法によって評価することができる、形状、サイズ、増殖、運動性、タンパク質発現若しくは R N A 発現又は他の物理的若しくは化学的变化が挙げられるが、これらだけに限定されない。検出可能な変化としては、発現タンパク質、又は分析可能な任意の他の細胞成分を特定するのに用いられる、Green F l o r e s c e n t P r o t e i n (G F P)、種々のタグなどのレポーター遺伝子／分子の発現も挙げられる。

【0316】

一実施形態においては、本発明は、例えば、細胞、組織、対象又は生物体を含めて、生物系における標的遺伝子の発現の調節に使用することができる、本発明の化学修飾され得る s i N A 分子を含むキットを特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、例えば、細胞、組織、対象又は生物体を含めて、生物系における 1 個を超える標的遺伝子の発現の調節に使用することができる、本発明の化学修飾され得る 1 個を超える s i N A 分子を含む、キットを特徴とする。

【0317】

一実施形態においては、本発明は、本発明の化学修飾され得る 1 個以上の s i N A 分子を含む細胞を特徴とする。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子を含む細胞は、ほ乳動物細胞である。更に別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子を含む細胞は、ヒト細胞である。

【0318】

一実施形態においては、本発明の化学修飾され得る s i N A 分子の合成は、(a) s i N A 分子の 2 本の相補鎖の合成と、(b) 二本鎖 s i N A 分子を得るのに適切な条件下で 2 本の相補鎖と一緒にアニーリングすることを含む。別の実施形態においては、s i N A 分子の 2 本の相補鎖の合成は、固相オリゴヌクレオチド合成による。更に別の実施形態においては、s i N A 分子の 2 本の相補鎖の合成は、固相直列オリゴヌクレオチド合成による。

【0319】

一実施形態においては、本発明は、(a) s i N A 分子の第 1 のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成すること（ここで、第 1 のオリゴヌクレオチド配列鎖は、s i N A の第 2 のオリゴヌクレオチド配列鎖の合成の足場として使用することができる切断可能なリンカー分子を含む。）、(b) 第 1 のオリゴヌクレオチド配列鎖の足場の上に s i N A の第 2 のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成すること（ここで、第 2 のオリゴヌクレオチド配列鎖は、s i N A 二本鎖の精製に使用することができる化学部分を更に含む。）、(c) 2 本の s i N A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリッド形成して、安定な二本鎖を形成するのに適切な条件下で、(a) のリンカー分子を切断すること、及び (d) 第 2 のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学部分を利用して s i N A 二本鎖を精製することを含む、s i N A 二本鎖分子を合成する方法を特徴とする。一実施形態においては、上記 (c) におけるリンカー分子の切断は、例えばメチルアミンなどのアルキルアミン塩基を用いた加水分解条件下で、オリゴヌクレオチドの脱保護中に起こる。一実施形態においては、この合成方法は、c o n t r o l l e d p o r e g l a s s (C P G)、ポリスチレンなどの固体支持体上

10

20

30

40

50

での固相合成を含む。ここで、(a)の第1の配列は、固体支持体を足場として用いて、スクシニルリンカーなどの切断可能なリンカー上で合成される。第2の鎖の合成用足場として用いた(a)の切断可能なリンカーは、固体支持体によって誘導体化されたリンカーと類似の反応性を含み得る。したがって、固体支持体によって誘導体化されたリンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断は、同時に起こる。別の実施形態においては、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するのに使用することができる(b)の化学部分は、本明細書のトリチルオン(t r i t y l - o n)合成戦略に使用することができるトリチル基、例えば、ジメトキシトリチル基を含む。更に別の実施形態においては、ジメトキシトリチル基などの化学部分を、例えば酸性条件を用いて、精製中に除去する。

【0320】

更なる実施形態においては、s i N A合成方法は、溶液相合成又は混成相合成であり、s i N A二本鎖の両方の鎖は、第2の配列の合成用足場として作用する第1の配列に結合した切断可能なリンカーを用いて、タンデム合成される。別々のs i N A配列鎖のハイブリダイゼーションに適切な条件下でリンカーを切断すると、二本鎖s i N A分子が形成される。

【0321】

別の実施形態においては、本発明は、(a) s i N A分子の1本のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成すること(ここで、この配列は、別のオリゴヌクレオチド配列の合成用足場として使用することができる切断可能なリンカー分子を含む。)、(b)第1の配列鎖に対して相補性を有する第2のオリゴヌクレオチド配列を(a)の足場上に合成すること(ここで、第2の配列は、二本鎖s i N A分子の他方の鎖を含み、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に使用することができる化学部分を更に含む。)、(c)切断可能なリンカーによって連結された両方のs i N Aオリゴヌクレオチド鎖を含む完全長配列を単離するのに適切な条件下で、また、2本のs i N Aオリゴヌクレオチド鎖がハイブリッド形成して、安定な二本鎖を形成するのに適切な条件下で、第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学部分を利用して(b)の生成物を精製することを含む、s i N A二本鎖分子を合成する方法を特徴とする。一実施形態においては、上記(c)におけるリンカー分子の切断は、例えば加水分解条件下で、オリゴヌクレオチドの脱保護中に起こる。別の実施形態においては、上記(c)におけるリンカー分子の切断は、オリゴヌクレオチドの脱保護後に起こる。別の実施形態においては、この合成方法は、c o n t r o l l e d p o r e g l a s s (C P G)、ポリスチレンなどの固体支持体上での固相合成を含む。ここで、(a)の第1の配列は、固体支持体を足場として用いて、スクシニルリンカーなどの切断可能なリンカー上で合成される。第2の鎖の合成用足場として用いた(a)の切断可能なリンカーは、固体支持体によって誘導体化されたリンカーと類似の反応性又は異なる反応性を含み得る。したがって、固体支持体によって誘導体化されたリンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断は、同時又は逐次的に起こる。一実施形態においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に使用することができる(b)の化学部分は、トリチル基、例えば、ジメトキシトリチル基を含む。

【0322】

別の実施形態においては、本発明は、(a)第1と第2の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成すること(ここで、第1の配列は第2の配列に相補的であり、第1のオリゴヌクレオチド配列は、切断可能なリンカーによって第2の配列に連結されており、末端5'保護基、例えば、5'-O-ジメトキシトリチル基(5'-O-DMT)は、第2の配列を有するオリゴヌクレオチド上に残る。)、(b)オリゴヌクレオチドを脱保護し、それによって2個のオリゴヌクレオチド配列を連結しているリンカーが切断されること、及び(c)二本鎖s i N A分子の単離に適切な条件下で、例えば本明細書のトリチルオン合成戦略によって、(b)の生成物を精製することを含む、二本鎖s i N A分子を単一の合成プロセスで作製する方法を特徴とする。

【0323】

別の実施形態においては、本発明のs i N A分子の合成方法は、参照によりその全体を

本明細書に組込む、S c a r i n g e 他、米国特許第 5, 8 8 9, 1 3 6 号、同 6, 0 0 8, 4 0 0 号及び同 6, 1 1 1, 0 8 6 号の教示を含む。

【0324】

一実施形態においては、本発明は、標的ポリヌクレオチド（例えば、RNA又はDNA標的）に対してRNAiを媒介するsiNA構築物を特徴とする。ここで、siNA構築物は、siNA構築物のヌクレアーゼ耐性を増大させる、1個以上の化学修飾、例えば、式I-VIIのいずれかの1個以上の化学修飾又はその任意の組合せを含む。

【0325】

別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)ヌクレアーゼ耐性の増大したsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、ヌクレアーゼ耐性の増大したsiNA分子を生成する方法を特徴とする。

10

【0326】

別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド（例えば、表Iに示すsiNAモチーフ）又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)毒物学的プロファイルが改善されたsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、毒物学的プロファイルが改善された（例えば、免疫賦活性が減弱された、又は免疫賦活性がない）siNA分子を生成する方法を特徴とする。

【0327】

別の実施形態においては、本発明は、(a)本発明のsiNA分子と、本明細書の、又は当分野で公知の送達ビヒクル若しくは送達粒子とを含むsiNA調合物を生成すること、及び(b)毒物学的プロファイルが改善されたsiNA調合物の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA調合物を評価することを含む、毒物学的プロファイルが改善された（例えば、免疫賦活性が減弱された、又は免疫賦活性がない）siNA調合物を生成する方法を特徴とする。

20

【0328】

別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド（例えば、表Iに示すsiNAモチーフ）又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)インターフェロン応答を刺激しないsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、細胞、対象又は生物体においてインターフェロン応答を刺激しない（例えば、インターフェロン応答がない、又はインターフェロン応答が減弱された）siNA分子を生成する方法を特徴とする。

30

【0329】

別の実施形態においては、本発明は、(a)本発明のsiNA分子と、本明細書の、又は当分野で公知の送達ビヒクル若しくは送達粒子とを含むsiNA調合物を生成すること、及び(b)インターフェロン応答を刺激しないsiNA調合物の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA調合物を評価することを含む、細胞、対象又は生物体においてインターフェロン応答を刺激しない（例えば、インターフェロン応答がない、又はインターフェロン応答が減弱された）siNA調合物を生成する方法を特徴とする。一実施形態においては、インターフェロンは、インターフェロンアルファを含む。

40

【0330】

別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド（例えば、表Iに示すsiNAモチーフ）又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)サイトカイン応答を刺激しないsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、細胞、対象又は生物体において炎症性又は炎症誘発性サイトカインを刺激しない（例えば、サイトカイン応答がない、又はサイトカイン応答が減弱された）siNA分子を生成する方法を特徴とする。一実施形態においては、サイトカインは、インターロイキン6（IL-6）などのインターロイキン及び／又は腫瘍壊死因子（TNF- α ）を含む。

50

【0331】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 本発明の s i N A 分子と、本明細書の、又は当分野で公知の送達ビヒクル若しくは送達粒子とを含む s i N A 調合物を生成すること、及び (b) サイトカイン応答を刺激しない s i N A 調合物の単離に適切な条件下で、段階 (a) の s i N A 調合物を評価することを含む、細胞、対象又は生物体において炎症性又は炎症誘発性サイトカインを刺激しない (例えば、サイトカイン応答がない、又はサイトカイン応答が減弱された) s i N A 調合物を生成する方法を特徴とする。一実施形態においては、サイトカインは、インターロイキン 6 (I L - 6) などのインターロイキン及び／又は腫瘍壊死アルファ (T N F - α) を含む。

【0332】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 式 I - V I I のいずれかのヌクレオチド (例えば、表 I に示す s i N A モチーフ) 又はその任意の組合せを s i N A 分子に導入すること、及び (b) T L R 応答を刺激しない s i N A 分子の単離に適切な条件下で、段階 (a) の s i N A 分子を評価することを含む、細胞、対象又は生物体においてトール様受容体 (T L R) を刺激しない (例えば、T L R 応答がない、又は T L R 応答が減弱された) s i N A 分子を生成する方法を特徴とする。一実施形態においては、T L R は、T L R 3、T L R 7、T L R 8 及び／又は T L R 9 を含む。

【0333】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 本発明の s i N A 分子と、本明細書の、又は当分野で公知の送達ビヒクル若しくは送達粒子とを含む s i N A 調合物を生成すること、及び (b) T L R 応答を刺激しない s i N A 調合物の単離に適切な条件下で、段階 (a) の s i N A 調合物を評価することを含む、細胞、対象又は生物体においてトール様受容体 (T L R) を刺激しない (例えば、T L R 応答がない、又は T L R 応答が減弱された) s i N A 調合物を生成する方法を特徴とする。一実施形態においては、T L R は、T L R 3、T L R 7、T L R 8 及び／又は T L R 9 を含む。

【0334】

一実施形態においては、本発明は、R N A 干渉 (R N A i) による標的 R N A の切断を誘導する、化学合成された二本鎖低分子干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とする。ここで、(a) 前記 s i N A 分子の各鎖は約 18 から約 38 ヌクレオチド長であり、(b) 前記 s i N A 分子の 1 本の鎖は、s i N A 分子が R N A 干渉によって標的 R N A の切断を誘導するのに十分な相補性を、前記標的 R N A に対して有するヌクレオチド配列を含み、(c) 前記 s i N A 分子内のヌクレオチド位置は、対応する無修飾 s i R N A 分子のレベルよりも低いレベルに s i N A 分子の免疫賦活性を低下させるように化学修飾されている。かかる s i N A 分子は、無修飾又は最小限に修飾された s i N A よりも改善された毒物学的プロファイルの有すると言われる。

【0335】

「改善された毒物学的プロファイル」とは、化学修飾又は調合された s i N A 構築物が、細胞、対象又は生物体において、無修飾 s i N A、調合されていない s i N A、より少数の修飾を有する s i N A 分子、又は改善された毒物学 (t o x i c o l o g y) を付与するにはさほど有効でない修飾を有する s i N A 分子よりも毒性が減少していることを意味する。かかる s i N A 分子は、「改善された R N A i 活性」を有するとも考えられる。非限定的例においては、毒物学的プロファイルが改善された s i N A 分子及び調合物は、細胞、対象又は生物体において、無修飾 s i N A、調合されていない s i N A、より少数の修飾を有する s i N A 分子、又は改善された毒物学を付与するにはさほど有効でない修飾を有する s i N A 分子よりも低下した、減少した、又は減弱された免疫賦活性応答など、低下した免疫賦活性を伴う。かかる改善された毒物学的プロファイルは、インターフェロン (例えば、インターフェロンアルファ)、炎症性サイトカイン (例えば、I L - 6 などのインターロイキン、及び／又は T N F - アルファ) 及び／又はトール様受容体 (例えば、T L R - 3、T L R - 7、T L R - 8 及び／又は T L R - 9) の誘導の減少又は抑止など、抑止された、又は減少した免疫賦活を特徴とする。一実施形態においては、毒物学

10

20

30

40

50

的プロファイルが改善された s i N A 分子又は調合物は、リボヌクレオチドを含まない。一実施形態においては、毒物学的プロファイルが改善された s i N A 分子又は調合物は、5 個未満のリボヌクレオチド（例えば、1、2、3 又は 4 個のリボヌクレオチド）を含む。一実施形態においては、毒物学的プロファイルが改善された s i N A 分子又は調合物は、S t a b 7、S t a b 8、S t a b 11、S t a b 12、S t a b 13、S t a b 16、S t a b 17、S t a b 18、S t a b 19、S t a b 20、S t a b 23、S t a b 24、S t a b 25、S t a b 26、S t a b 27、S t a b 28、S t a b 29、S t a b 30、S t a b 31、S t a b 32、S t a b 33、S t a b 34、S t a b 35、S t a b 36 又はその任意の組合せを含む（表 I 参照）。本明細書では、数字で表した S t a b ケミストリーは、表 I に示すケミストリーの 2' -フルオロと 2' -O C F 3 の両方のバージョンを含む。例えば、「S t a b 7 / 8」は、S t a b 7 / 8 と S t a b 7 F / 8 F の両方を指すなど。一実施形態においては、毒物学的プロファイルが改善された s i N A 分子又は調合物は、本発明の s i N A 分子、及び図面を含めて、参照によりその全体を本明細書に組込む米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 0 7 7 8 2 9 号に記載された調合物を含む。

10

【0336】

一実施形態においては、所与の s i N A 分子に付随する免疫賦活性応答レベルは、本明細書のとおりに測定することができ、又は例えば、特定の s i N A 分子の免疫賦活性応答を定量するアッセイにおいて、P K R / インターフェロン応答、増殖、B 細胞活性化及び / 又はサイトカイン産生のレベルを求めることによって、当分野で公知のとおりに測定することができる（例えば、その全体を参照により組込む、L e i f e r e t a l . , 2 0 0 3 , J I m m u n o t h e r . 2 6 , 3 1 3 - 9 及び米国特許第 5 , 9 6 8 , 9 0 9 号を参照されたい。）。一実施形態においては、低下した免疫賦活性応答は、無修飾又は最小限に修飾された s i R N A 分子と比較して約 1 0 % 及び約 1 0 0 %、例えば、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 1 0 0 % 低下した免疫賦活性応答である。一実施形態においては、s i N A 分子に関連した免疫賦活性応答は、化学修飾の程度によって調節することができる。例えば、修飾 s i N A 分子中のヌクレオチド位置の約 1 0 % から約 1 0 0 %、例えば、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 若しくは 1 0 0 % 又は少なくとも約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 若しくは 1 0 0 % を有する s i N A 分子を、本明細書の対応する免疫賦活性度を有するように選択することができる。

20

30

【0337】

一実施形態においては、低下した免疫賦活性応答の程度を、R N A i 活性を最適化するために選択する。例えば、ある程度の免疫賦活を保持することは、ウイルス感染を治療するために好ましい場合がある。この場合、免疫賦活の 1 0 0 % 未満の減少が、最大の抗ウイルス活性に好ましい場合があるのに対して（例えば、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % 又は 9 0 % の免疫賦活の減少）、非特異的毒性又はオフターゲット（o f f t a r g e t）効果を防止するのに最小の免疫賦活性を有する s i N A 分子を用いて、内因性遺伝子標的の発現を阻止することが好ましい場合もある（例えば、約 9 0 % から約 1 0 0 % の免疫賦活の減少）。

40

【0338】

一実施形態においては、本発明は、R N A 干渉（R N A i）による標的 R N A の切断を誘導する、化学合成された二本鎖 s i N A 分子を特徴とする。ここで、（a）前記 s i N A 分子の各鎖は約 1 8 から約 3 8 ヌクレオチド長であり、（b）前記 s i N A 分子の 1 本の鎖は、s i N A 分子が R N A 干渉によって標的 R N A の切断を誘導するのに十分な相補性を、前記標的 R N A に対して有するヌクレオチド配列を含み、（c）前記 s i N A 分子の 1 個以上のヌクレオチドは、対応する無修飾 s i R N A 分子のレベルよりも低いレベルに s i N A 分子の免疫賦活性を低下させるように化学修飾されている。一実施形態においては、各鎖は、他方の鎖のヌクレオチドに相補的である少なくとも約 1 8 個のヌクレオチ

50

ドを含む。

【0339】

別の実施形態においては、s i N A 分子の免疫賦活性を低下させる修飾ヌクレオチドを含む s i N A 分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を有するアンチセンス領域を含み、センス領域を更に含む。ここで、前記センス領域は、前記標的遺伝子のヌクレオチド配列又はその一部にかなり類似したヌクレオチド配列を含む。その一実施形態においては、アンチセンス領域及びセンス領域は、約18から約38ヌクレオチドを含み、前記アンチセンス領域は、センス領域のヌクレオチドに相補的である少なくとも約18ヌクレオチドを含む。その一実施形態においては、センス領域中のピリミジンヌクレオチドは、2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドである。10
その別の実施形態においては、センス領域中のプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドである。その更に別の実施形態においては、センス領域に存在するピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。その別の実施形態においては、前記アンチセンス領域のピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである。その更に別の実施形態においては、前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。その更に別の実施形態においては、前記アンチセンス領域中に存在するプリンヌクレオチドは、2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、アンチセンス領域は、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合を前記アンチセンス領域の3'末端に含む。別の実施形態においては、アンチセンス領域は、グリセリル修飾を前記アンチセンス領域の3'末端に含む。20

【0340】

別の実施形態においては、s i N A 分子の免疫賦活性を低下させる修飾ヌクレオチドを含む s i N A 分子は、本明細書の s i N A 分子の構造上の特徴のいずれかを含み得る。別の実施形態においては、s i N A 分子の免疫賦活性を低下させる修飾ヌクレオチドを含む s i N A 分子は、本明細書の s i N A 分子の化学修飾のいずれかを含み得る。

【0341】

一実施形態においては、本発明は、(a) 1個以上の修飾ヌクレオチド分子を s i N A に導入すること、及び (b) 無修飾ヌクレオチドを有する対応する s i N A 分子よりも免疫賦活性が低下した s i N A 分子の単離に適切な条件下で、段階 (a) の s i N A 分子を評価することを含む、s i N A 分子の免疫賦活性を低下させる化学修飾ヌクレオチドを有する、化学合成された二本鎖 s i N A 分子を生成する方法を特徴とする。s i N A 分子の各鎖は、約18から約38ヌクレオチド長である。S i N A 分子の1本の鎖は、s i N A 分子が R N A 干渉によって標的 R N A の切断を誘導するのに十分な相補性を、標的 R N A に対して有する、ヌクレオチド配列を含む。一実施形態においては、低下した免疫賦活性は、s i N A が細胞、組織又は生物体に導入されるのに応答した、インターロイキン6 (I L - 6)、腫瘍壊死アルファ (T N F - α) などの炎症性又は炎症誘発性サイトカインの抑止された、又は低下した誘導を含む。別の実施形態においては、低下した免疫賦活性は、s i N A が細胞、組織又は生物体に導入されるのに応答した、T L R 3、T L R 7、T L R 8、T L R 9などのトール様受容体 (T L R) の抑止された、又は低下した誘導を含む。別の実施形態においては、低下した免疫賦活性は、s i N A が細胞、組織又は生物体に導入されるのに応答した、インターフェロンアルファなどのインターフェロンの抑止された、又は低下した誘導を含む。30
40

【0342】

一実施形態においては、本発明は、標的ポリヌクレオチドに対して R N A i を媒介する s i N A 構築物を特徴とする。ここで、s i N A 構築物は、s i N A 構築物のセンス鎖とアンチセンス鎖の結合親和性を調節する本明細書の1個以上の化学修飾を含む。

【0343】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 式 I - V I I のいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せを s i N A 分子に導入すること、及び (b) s i N A 分子のセンス鎖 50

とアンチセンス鎖の結合親和性が増加した s i N A 分子の単離に適切な条件下で、段階（a）の s i N A 分子を評価することを含む、s i N A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖の結合親和性が増加した s i N A 分子を生成する方法を特徴とする。

【0344】

一実施形態においては、本発明は、標的ポリヌクレオチドに対して R N A i を媒介する s i N A 構築物を特徴とする。ここで、s i N A 構築物は、s i N A 構築物のアンチセンス鎖と細胞内の相補的標的 R N A 配列との結合親和性を調節する本明細書の 1 個以上の化学修飾を含む。

【0345】

一実施形態においては、本発明は、標的ポリヌクレオチドに対して R N A i を媒介する s i N A 構築物を特徴とする。ここで、s i N A 構築物は、s i N A 構築物のアンチセンス鎖と細胞内の相補的標的 D N A 配列との結合親和性を調節する本明細書の 1 個以上の化学修飾を含む。

【0346】

別の実施形態においては、本発明は、（a）式 I - V I I のいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せを s i N A 分子に導入すること、及び（b）s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 R N A 配列との結合親和性が増加した s i N A 分子の単離に適切な条件下で、段階（a）の s i N A 分子を評価することを含む、s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 R N A 配列との結合親和性が増加した s i N A 分子を生成する方法を特徴とする。

【0347】

別の実施形態においては、本発明は、（a）式 I - V I I のいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せを s i N A 分子に導入すること、及び（b）s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 D N A 配列との結合親和性が増加した s i N A 分子の単離に適切な条件下で、段階（a）の s i N A 分子を評価することを含む、s i N A 分子のアンチセンス鎖と相補的標的 D N A 配列との結合親和性が増加した s i N A 分子を生成する方法を特徴とする。

【0348】

一実施形態においては、本発明は、標的ポリヌクレオチドに対して R N A i を媒介する s i N A 構築物を特徴とする。ここで、s i N A 構築物は、化学修飾 s i N A 構築物に対して配列相同性を有する追加の内因性 s i N A 分子を生成し得る細胞ポリメラーゼのポリメラーゼ活性を調節する、本明細書の 1 個以上の化学修飾を含む。

【0349】

別の実施形態においては、本発明は、（a）式 I - V I I のいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せを s i N A 分子に導入すること、及び（b）化学修飾 s i N A 分子に対して配列相同性を有する追加の内因性 s i N A 分子を生成し得る細胞ポリメラーゼの高いポリメラーゼ活性を媒介し得る s i N A 分子の単離に適切な条件下で、段階（a）の s i N A 分子を評価することを含む、化学修飾 s i N A 分子に対して配列相同性を有する追加の内因性 s i N A 分子を生成し得る細胞ポリメラーゼの高いポリメラーゼ活性を媒介し得る s i N A 分子を生成する方法を特徴とする。

【0350】

一実施形態においては、本発明は、細胞中の標的ポリヌクレオチドに対して s i N A を媒介する化学修飾 s i N A 構築物を特徴とする。ここで、化学修飾は、かかる s i N A 構築物によって媒介される R N A i の効力を減少させるように、s i N A と、標的 R N A 分子、D N A 分子及び／又はタンパク質、又は R N A i に必須である他の因子との相互作用をさほど引き起こさない。

【0351】

別の実施形態においては、本発明は、（a）式 I - V I I のいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せを s i N A 分子に導入すること、及び（b）R N A i 特異性が改善された s i N A 分子の単離に適切な条件下で、段階（a）の s i N A 分子を評価することを

10

20

30

40

50

含む、ポリヌクレオチド標的に対するRNAi特異性が改善されたsiNA分子を生成する方法を特徴とする。一実施形態においては、改善された特異性は、無修飾siNA分子に比較して低いオフターゲット効果を有することを含む。例えば、本発明のsiNA分子のセンス鎖又は領域の3'末端に、5'末端に、又は3'末端と5'末端の両方に末端キャップ部分を導入すると、センス鎖又はセンス領域に対して相補性を有する対応する標的に対するRNAi活性のテンプレートとしてセンス鎖又はセンス領域が作用するのを阻止することによって、siNAが、改善された特異性を有するようにすることができる。

【0352】

別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)RNAi活性が改善されたsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、標的ポリヌクレオチドに対するRNAi活性が改善されたsiNA分子を生成する方法を特徴とする。

【0353】

更に別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)標的RNAに対するRNAi活性が改善されたsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、標的RNAに対するRNAi活性が改善されたsiNA分子を生成する方法を特徴とする。

【0354】

更に別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)標的DNAに対するRNAi活性が改善されたsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、標的DNAに対するRNAi活性が改善されたsiNA分子を生成する方法を特徴とする。

【0355】

一実施形態においては、本発明は、標的ポリヌクレオチドに対してRNAiを媒介するsiNA構築物を特徴とする。ここで、siNA構築物は、siNAのコレステロール抱合などのsiNA構築物の細胞内取り込みを調節する本明細書の1個以上の化学修飾を含む。

【0356】

別の実施形態においては、本発明は、(a)式I-VIIのいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せをsiNA分子に導入すること、及び(b)細胞内取り込みが改善されたsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、細胞内取り込みが改善された、標的ポリヌクレオチドに対するsiNA分子を生成する方法を特徴とする。

【0357】

一実施形態においては、本発明は、標的ポリヌクレオチドに対してRNAiを媒介するsiNA構築物を特徴とする。ここで、siNA構築物は、例えば、siNA構築物の薬物動態学を改善する、ポリエチレングリコールなどの高分子抱合体、若しくは等価な抱合体を結合させることによって、又は特定の組織タイプ若しくは細胞タイプをインビボで標的にする抱合体を結合させることによって、siNA構築物の生物学的利用能を増大させる、本明細書の1個以上の化学修飾を含む。かかる抱合体の非限定的例は、参照により本明細書に組込む、Vargeese他、米国特許出願第10/201,394号に記述されている。

【0358】

一実施形態においては、本発明は、(a)抱合体をsiNA分子構造に導入すること、及び(b)生物学的利用能が改善されたsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、生物学的利用能が改善された、本発明のsiNA分子を生成する方法を特徴とする。かかる抱合体としては、天然タンパク質リガンド由

10

20

30

40

50

来のペプチドなどの細胞受容体のリガンド；細胞のZ I Pコード配列を含めたタンパク質局在化配列；抗体；核酸アプタマー；葉酸塩、N-アセチルガラクトサミンなどのビタミン及び他の補因子；ポリエチレングリコール（PEG）などのポリマー；リン脂質；コレステロール；コレステロール誘導体、スペルミン、スペルミジンなどのポリアミンなどが挙げられる。

【0359】

一実施形態においては、本発明は、標的RNA配列又はその一部に相補的である第1のヌクレオチド配列と、前記第1の配列に対して相補性を有する第2の配列とを含む、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、前記第2の配列は、RNA干渉を効率的に媒介するガイド配列としてもはや作用しないように、及び／又はRNAiを促進する細胞タンパク質によって認識されるように、化学修飾されている。一実施形態においては、siNAの第1のヌクレオチド配列は、本明細書のとおり化学修飾されている。一実施形態においては、siNAの第1のヌクレオチド配列は修飾されていない（例えば、全RNAである。）。

10

【0360】

一実施形態においては、本発明は、標的RNA配列又はその一部に相補的である第1のヌクレオチド配列と、前記第1の配列に対して相補性を有する第2の配列とを含む、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、第2の配列は、ガイド配列として、又は標的核酸（例えば、RNA）配列に相補的である配列としてRNAi経路に入るのを阻止するように、設計又は修飾されている。一実施形態においては、siNAの第1のヌクレオチド配列は、本明細書のとおり化学修飾されている。一実施形態においては、siNAの第1のヌクレオチド配列は修飾されていない（例えば、全RNAである。）。

20

【0361】

一実施形態においては、本発明は、標的RNA配列又はその一部に相補的である第1のヌクレオチド配列と、前記第1の配列に対して相補性を有する第2の配列とを含む、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、前記第2の配列は、RNA干渉を媒介するガイド配列として作用することができない。一実施形態においては、siNAの第1のヌクレオチド配列は、本明細書のとおり化学修飾されている。一実施形態においては、siNAの第1のヌクレオチド配列は修飾されていない（例えば、全RNAである。）。

30

【0362】

一実施形態においては、本発明は、標的RNA配列又はその一部に相補的である第1のヌクレオチド配列と、前記第1の配列に対して相補性を有する第2の配列とを含む、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、前記第2の配列は、末端5'ヒドロキシル（5'-OH）又は5'リン酸基を持たない。

【0363】

一実施形態においては、本発明は、標的RNA配列又はその一部に相補的である第1のヌクレオチド配列と、前記第1の配列に対して相補性を有する第2の配列とを含む、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、前記第2の配列は、末端キャップ部分を前記第2の配列の5'末端に含む。一実施形態においては、末端キャップ部分は、反転脱塩基、反転デオキシ脱塩基、反転ヌクレオチド部分、図10に示す基、アルキル若しくはシクロアルキル基、複素環、又は第2の配列がRNAiのガイド配列若しくはテンプレートとして役立つRNAi活性を阻止する任意の他の基を含む。

40

【0364】

一実施形態においては、本発明は、標的RNA配列又はその一部に相補的である第1のヌクレオチド配列と、前記第1の配列に対して相補性を有する第2の配列とを含む、二本鎖低分子干渉核酸（siNA）分子を特徴とする。ここで、前記第2の配列は、末端キャ

50

ップ部分を前記第2の配列の5'末端及び3'末端に含む。一実施形態においては、各末端キャップ部分は、反転脱塩基、反転デオキシ脱塩基、反転ヌクレオチド部分、図10に示す基、アルキル若しくはシクロアルキル基、複素環、又は第2の配列がRNAiのガイド配列若しくはテンプレートとして役立つRNAi活性を阻止する任意の他の基を個々に含む。

【0365】

一実施形態においては、本発明は、(a)1個以上の化学修飾をsiNA分子構造に導入すること、及び(b)特異性が改善されたsiNA分子の単離に適切な条件下で、段階(a)のsiNA分子を評価することを含む、標的核酸(例えば、遺伝子、その対応するRNAなどのDNA又はRNA)の発現を下方制御又は阻害する、特異性が改善された本発明のsiNA分子を生成する方法を特徴とする。別の実施形態においては、特異性の改善に使用される化学修飾は、siNA分子の5'末端、3'末端、又は5'末端と3'末端の両方の末端キャップ修飾を含む。末端キャップ修飾は、例えば、図10に示す構造(例えば、反転デオキシ脱塩基部分)、又はsiNA分子の一部(例えば、センス鎖)がオフターゲット核酸配列に対してRNA干渉を媒介できないようにする任意の他の化学修飾を含み得る。非限定的例においては、siNA分子は、RISCによって媒介される、対応する標的RNA配列の分解のガイド配列としてsiNA分子のアンチセンス配列のみが役立ち得るように設計される。これは、RNAi機構によってセンス鎖がガイド配列として認識されないようにする化学修飾をセンス鎖に導入して、siNAのセンス配列を不活性化することによって実施することができる。一実施形態においては、かかる化学修飾は、siNAのセンス鎖の5'末端における任意の化学基、又はRNA干渉を媒介するガイド配列としてのセンス鎖を不活性化するのに役立つ任意の他の基を含む。これらの修飾は、例えば、センス鎖の5'末端が、遊離5'ヒドロキシル(5'-OH)も、遊離5'リン酸基(例えば、リン酸、二リン酸、三リン酸、環式リン酸など)ももはや持たない分子をもたらし得る。かかるsiNA構築物の非限定的例は、「Stab 9/10」、「Stab 7/8」、「Stab 7/19」、「Stab 17/22」、「Stab 23/24」、「Stab 24/25」及び「Stab 24/26」(例えば、Stab 7、9、17、23又は24センス鎖を有する任意のsiNA)ケミストリー及びその変種など、本明細書に記載されている(表I参照)。ここで、siNAのセンス鎖の5'末端及び3'末端は、ヒドロキシル基もリン酸基も含まない。本明細書では、数字で表したStabケミストリーは、表Iに示すケミストリーの2'-フルオロと2'-OCF₃の両方のバージョンを含む。例えば、「Stab 7/8」は、Stab 7/8とStab 7F/8Fの両方を指すなど。

【0366】

一実施形態においては、本発明は、siNA分子の鎖又は一部がRNAi活性に対するテンプレート又はガイド配列として作用しないようにする1個以上の化学修飾をsiNA分子構造に導入することを含む、標的核酸(例えば、遺伝子、その対応するRNAなどのDNA又はRNA)の発現を下方制御又は阻害する、特異性が改善された本発明のsiNA分子を生成する方法を特徴とする。一実施形態においては、siNA分子の不活性鎖又はセンス領域は、siNA分子のセンス鎖又はセンス領域、すなわち標的核酸配列に対して相補性を持たない、siNAの鎖又は領域である。一実施形態においては、かかる化学修飾は、5'ヒドロキシル(5'-OH)も5'リン酸基も含まないsiNAのセンス鎖又は領域の5'末端における任意の化学基、又はRNA干渉を媒介するガイド配列としてのセンス鎖若しくはセンス領域を不活性化するのに役立つ任意の他の基を含む。かかるsiNA構築物の非限定的例は、「Stab 9/10」、「Stab 7/8」、「Stab 7/19」、「Stab 17/22」、「Stab 23/24」、「Stab 24/25」及び「Stab 24/26」(例えば、Stab 7、9、17、23又は24センス鎖を有する任意のsiNA)ケミストリー及びその変種など、本明細書に記載されている(表I参照)。ここで、siNAのセンス鎖の5'末端及び3'末端は、ヒドロキシル基もリン酸基も含まない。本明細書では、数字で表したStabケミストリ

ーは、表 I に示すケミストリーの 2' -フルオロと 2' -OCF₃ の両方のバージョンを含む。例えば、「Stab 7/8」は、Stab 7/8 と Stab 7F/8F の両方を指すなど。

【0367】

一実施形態においては、本発明は、(a) 複数の無修飾 siNA 分子を生成すること、(b) 標的核酸配列に対して RNA 干渉を媒介するのに活性である siNA 分子の単離に適切な条件下で、段階 (a) の siNA 分子をスクリーニングすること、及び (c) 化学修飾 (例えば、本明細書の、又は当分野で公知の化学修飾) を (b) の活性 siNA 分子に導入することを含む、標的核酸配列に対して RNA 干渉を媒介するのに活性である siNA 分子をスクリーニングする方法を特徴とする。一実施形態においては、この方法は、標的核酸配列に対して RNA 干渉を媒介するのに活性である化学修飾 siNA 分子の単離に適切な条件下で、段階 (c) の化学修飾 siNA 分子を再スクリーニングすることを更に含む。

10

【0368】

一実施形態においては、本発明は、(a) 複数の化学修飾 siNA 分子 (例えば、本明細書の、又は当分野で公知の siNA 分子) を生成すること、及び (b) 標的核酸配列に対して RNA 干渉を媒介するのに活性である化学修飾 siNA 分子の単離に適切な条件下で、段階 (a) の siNA 分子をスクリーニングすることを含む、標的核酸配列に対して RNA 干渉を媒介するのに活性である化学修飾 siNA 分子をスクリーニングする方法を特徴とする。

20

【0369】

「リガンド」という用語は、受容体などの別の化合物と直接的又は間接的に相互作用し得る、薬物、ペプチド、ホルモン、神経伝達物質などの任意の化合物又は分子を指す。リガンドと相互作用する受容体は、細胞の表面に存在し得、又は細胞間受容体であり得る。リガンドと受容体の相互作用は、生化学反応をもたらし得、又は単なる物理的相互作用若しくは会合であり得る。

【0370】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 賦形剤調合物を siNA 分子に導入すること、及び (b) 生物学的利用能が改善された siNA 分子の単離に適切な条件下で、段階 (a) の siNA 分子を評価することを含む、生物学的利用能が改善された、本発明の siNA 分子を生成する方法を特徴とする。かかる賦形剤としては、シクロデキストリンなどのポリマー、脂質、陽イオン性脂質、ポリアミン、リン脂質、ナノ粒子、受容体、リガンドなどが挙げられる。

30

【0371】

別の実施形態においては、本発明は、(a) 式 I-VII のいずれかのヌクレオチド又はその任意の組合せを siNA 分子に導入すること、及び (b) 生物学的利用能が改善された siNA 分子の単離に適切な条件下で、段階 (a) の siNA 分子を評価することを含む、生物学的利用能が改善された本発明の siNA 分子を生成する方法を特徴とする。

【0372】

別の実施形態においては、ポリエチレングリコール (PEG) が発明の siNA 化合物と共有結合し得る。結合する PEG は、任意の分子量とすることができ、好ましくは約 100 から約 50,000 ダルトン (Da) とすることができる。

40

【0373】

本発明は、単独で 사용할ことができ、又は試料及び/又は対象を試験するために RNA をインビトロ若しくはインビボで導入するのに必要な試薬の少なくとも 1 種類を含むキットの 1 構成要素として使用することができる。例えば、キットの好ましい成分としては、本発明の siNA 分子、及び (例えば、脂質、及び当分野で公知の他の移入方法を用いて) 本明細書の目的細胞への siNA の導入を促進するビヒクルが挙げられる (例えば、Beigelman 他、米国特許第 6,395,713 号参照)。キットは、遺伝子機能及び/又は活性の測定、薬物の最適化、創薬などにおける標的確認に使用することができ

50

る（例えば、U s m a n 他、米国特許出願第 6 0 / 4 0 2 , 9 9 6 号参照）。かかるキットは、キットの使用者が本発明を実施できるようにする説明書も含むことができる。

【 0 3 7 4 】

本明細書では「低分子干渉核酸」、「s i N A」、「低分子干渉 R N A」、「s i R N A」、「低分子干渉核酸分子」、「低分子干渉オリゴヌクレオチド分子」又は「化学修飾低分子干渉核酸分子」という用語は、R N A 干渉「R N A i」又は遺伝子サイレンシングを配列特異的に媒介することによって、遺伝子発現又はウイルス複製を阻害又は下方制御することができる任意の核酸分子を指す。これらの用語は、個々の核酸分子、複数のかかる核酸分子、又はかかる核酸分子のプールも表し得る。S i N A は、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む二本鎖核酸分子であり得る。ここで、アンチセンス領域は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列、及び標的核酸配列に対応するヌクレオチド配列又はその一部を有するセンス領域を含む。S i N A は、一方の鎖がセンス鎖であり、他方がアンチセンス鎖である、2 個の別々のオリゴヌクレオチドから組み立てることができる。ここで、アンチセンス鎖とセンス鎖は自己相補的である（すなわち、アンチセンス鎖とセンス鎖が二本鎖又は二本鎖構造を形成するなど、各鎖は、他方の鎖中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。ここで、例えば、二本鎖領域は、約 1 5 から約 3 0、例えば、約 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 塩基対である。アンチセンス鎖は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列又はその一部に対応するヌクレオチド配列を含む（例えば、s i N A 分子の約 1 5 から約 2 5 個又はそれを超えるヌクレオチドは、標的核酸又はその一部に相補的である）。或いは、s i N A は、単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ、s i N A の自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域は、核酸リンカー又は非核酸リンカーによって連結されている。S i N A は、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む、二本鎖、非対称二本鎖、ヘアピン又は非対称ヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであり得る。ここで、アンチセンス領域は、別個の標的核酸分子中のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列、及び標的核酸配列に対応するヌクレオチド配列又はその一部を有するセンス領域を含む。S i N A は、2 個以上のループ構造と、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む軸（s t e m）とを有する、環状一本鎖ポリヌクレオチドであり得る。ここで、アンチセンス領域は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列、及び標的核酸配列又はその一部に対応するヌクレオチド配列を有するセンス領域を含み、環状ポリヌクレオチドは、インビボ又はインビトロでプロセッシングを受けて、R N A i を媒介し得る活性な s i N A 分子を生成し得る。S i N A は、標的核酸分子中のヌクレオチド配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドも含み得る（例えば、かかる s i N A 分子は、標的核酸配列又はその一部に対応するヌクレオチド配列が s i N A 分子内に存在する必要がない。）。一本鎖ポリヌクレオチドは、5'リン酸（例えば、M a r t i n e z e t a l . , 2 0 0 2 , C e l l . , 1 1 0 , 5 6 3 - 5 7 4 及び S c h w a r z e t a l . , 2 0 0 2 , M o l e c u l a r C e l l , 1 0 , 5 3 7 - 5 6 8 参照）、5', 3'-二リン酸などの末端リン酸基を更に含み得る。ある実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、別々のセンス及びアンチセンス配列又は領域を含む。ここで、センス領域とアンチセンス領域は、当分野で公知のヌクレオチド又は非ヌクレオチドリinker分子によって共有結合しており、又はイオン相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水の相互作用及び／又はスタッキング相互作用によって交互に非共有結合している。ある実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、標的遺伝子の発現を阻害するように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書では、s i N A 分子は、R N A のみを含む分子に必ずしも限定されず、化学修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドも包含する。ある実施形態においては、本発明の低分子干渉核酸

分子は、2'ヒドロキシ(2'-OH)含有ヌクレオチドを欠く。出願人は、ある実施形態において、RNAiを媒介するのに2'ヒドロキシル基を有するヌクレオチドの存在が不要である低分子干渉核酸を記述する。したがって、本発明の低分子干渉核酸分子は、リボヌクレオチド(例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド)を含まなくてもよい。しかし、RNAiを維持するのにsiNA分子内のリボヌクレオチドの存在が不要であるかかるsiNA分子は、2'-OH基を有する1個以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカー、又は他の結合若しくは会合した基、部分若しくは鎖を有し得る。場合によっては、siNA分子は、ヌクレオチド位置の約5、10、20、30、40又は50%においてリボヌクレオチドを含み得る。本発明の修飾低分子干渉核酸分子は、低分子干渉修飾オリゴヌクレオチド「siMON」とも称し得る。本明細書ではsiNAという用語は、配列特異的RNAiを媒介し得る核酸分子、例えば、低分子干渉RNA(sRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、低分子干渉オリゴヌクレオチド、低分子干渉核酸、低分子干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学修飾siRNA、転写後遺伝子サイレンシングRNA(ptgsRNA)などの記述に用いられる他の用語と同義であるものとする。本発明のsiNA分子の非限定的例を本明細書の図4-6及び表I Iに示す。かかるsiNA分子は、リボザイム、アンチセンス、三重鎖形成、アプタマー、2,5-Aキメラ、デコイオリゴヌクレオチドなど、遺伝子発現の阻害を媒介する、当分野で公知の他の核酸技術とは異なる。

【0375】

「RNA干渉」又は「RNAi」とは、当分野で一般に公知であり、低分子干渉核酸分子によって媒介される、細胞における遺伝子発現を阻害又は下方制御する生物学的プロセスである。例えば、Zamore and Haley, 2005, Science, 309, 1519-1524; Vaughn and Martienssen, 2005, Science, 309, 1525-1526; Zamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33; Bass, 2001, Nature, 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494-498; 及び Kreutzer 他、国際公開第00/44895号; Zernicka-Goetz 他、国際公開第01/36646号; Fire、国際公開第99/32619号; Plaetnick 他、国際公開第00/01846号; Mello 及び Fire、国際公開第01/29058号; Deschamps-Depaillette、国際公開第99/07409号 及び Li 他、国際公開第00/44914号; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; 及び Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237; Hutvagner and Zamore, 2002, Science, 297, 2056-60; McManus et al., 2002, RNA, 8, 842-850; Reinhart et al., 2002, gene & Dev., 16, 1616-1626; 及び Reinhart & Bartel, 2002, Science, 297, 1831を参照されたい。)。また、本明細書では、RNAiという用語は、転写後遺伝子サイレンシング、翻訳阻害、転写阻害、エピジェネティクスなどの配列特異的RNA干渉の記述に用いられる他の用語と同義であるものとする。例えば、本発明のsiNA分子を用いて、転写後レベル又は転写前レベルで遺伝子をエピジェネティックにサイレンシングすることができる。非限定的例においては、本発明のsiNA分子による遺伝子発現のエピジェネティックな調節は、遺伝子発現を変える、クロマチン構造又はメチル化パターンの、siNAによって媒介される変化に起因し得る(例えば、Verdel et al., 2004, Science, 303, 672-676; Pal-Bhadra et al., 2004, Science, 303, 669-672; Allshire, 2002, Science, 297

10

20

30

40

50

, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218及びHall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237参照)。別の非限定的例においては、本発明の siNA 分子による遺伝子発現の調節は、RISC を介した、siNA によって媒介される RNA (コード又は非コード RNA) の切断、又は当分野で公知の翻訳阻害に起因し得る。別の実施形態においては、本発明の siNA 分子による遺伝子発現の調節は、転写阻害に起因し得る (例えば、Janowski et al., 2005, Nature Chemical Biology, 1, 216-222 参照)。

【0376】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子は、二本鎖形成性オリゴヌクレオチド「DFO」である (例えば、図 14-15、並びに 2003 年 12 月 3 日に出願された Vais 他、米国特許出願第 10/727,780 号、及び 2004 年 5 月 24 日出願された国際 PCT 出願第 US04/16390 号参照)。

【0377】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子は多官能 siNA である (例えば、図 16-28、並びに 2004 年 2 月 10 日に出願された Jadhav 他、米国特許出願第 60/543,480 号、及び 2004 年 5 月 24 日に出願された国際 PCT 出願第 US04/16390 号参照)。一実施形態においては、本発明の多官能 siNA は、例えば、標的 RNA の 2 個以上の領域を標的にした配列を含み得る (例えば、表 II 及び III の標的配列参照)。一実施形態においては、本発明の多官能 siNA は、SREBP1 のコード領域及び非コード領域を含めて、1 個以上の異なる標的を標的にした配列を含み得る。

【0378】

本明細書では「非対称ヘアピン」とは、アンチセンス領域と、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドを含み得るループ部分と、センス領域がアンチセンス領域と塩基対を形成して、ループを有する二本鎖を形成するのに十分な相補ヌクレオチドを有する程度にアンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含むセンス領域とを含む、線状 siNA 分子を意味する。例えば、本発明の非対称ヘアピン siNA 分子は、細胞又はインビトロ系において RNAi を媒介するのに十分な長さを有するアンチセンス領域 (例えば、約 15 から約 30、又は約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 若しくは 30 ヌクレオチド) と、約 4 から約 12 (例えば、約 4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12) 個のヌクレオチドを含むループ領域と、アンチセンス領域に相補的である約 3 から約 25 (例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25) 個のヌクレオチドを有するセンス領域とを含み得る。非対称ヘアピン siNA 分子は、化学修飾され得る 5' 末端リン酸基も含み得る。非対称ヘアピン siNA 分子のループ部分は、本明細書のヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカー分子又は抱合分子を含み得る。

【0379】

本明細書では「非対称二本鎖」とは、センス領域及びアンチセンス領域を含む 2 本の別々の鎖を有する siNA 分子を意味する。ここで、センス領域は、センス領域がアンチセンス領域と塩基対を形成して、二本鎖を形成するのに十分な相補ヌクレオチドを有する程度にアンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含む。例えば、本発明の非対称二本鎖 siNA 分子は、細胞又はインビトロ系において RNAi を媒介するのに十分な長さを有するアンチセンス領域 (例えば、約 15 から約 30、又は約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 若しくは 30 ヌクレオチド) と、アンチセンス領域に相補的である約 3 から約 25 (例えば、約 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25) 個のヌクレオチドを有するセンス領域とを含み得る

。

【0380】

「RNA i 阻害剤」とは、細胞又は生物体におけるRNA干渉機能又は活性を下方制御、減少又は阻害し得る任意の分子を意味する。RNA i 阻害剤は、RISCなどのタンパク質成分、又はmiRNA、siRNAなどの核酸成分を含めて、RNA i 経路の任意の成分と相互作用することによって、又は該成分の機能を妨害することによって、RNA i を下方制御、減少又は阻害し得る（例えば、RNA i によって媒介される標的ポリヌクレオチドの切断、翻訳阻害、又は転写サイレンシング）。RNA i 阻害剤は、RISC、miRNA若しくはsiRNA又は細胞若しくは生物体におけるRNA i 経路の任意の他の成分と相互作用する、又はその機能を妨害する、siNA分子、アンチセンス分子、アプタマー又は小分子であり得る。RNA i を阻害することによって（例えば、RNA i によって媒介される標的ポリヌクレオチドの切断、翻訳阻害、又は転写サイレンシング）、本発明のRNA i 阻害剤を用いて、標的遺伝子の発現を調節（例えば、上方制御又は下方制御）することができる。一実施形態においては、本発明のRNA i 阻害剤を用いて、翻訳阻害、転写サイレンシング、又はRISCによって媒介されるポリヌクレオチド（例えば、mRNA）の切断による遺伝子発現の内因的下方制御又は阻害を妨害（例えば、減少又は阻止）することによって、遺伝子発現を上方制御する。したがって、遺伝子発現の内因的抑制、サイレンシング又は阻害の機序を妨害することによって、本発明のRNA i 阻害剤を用いて、機能喪失に起因する疾患、形質又は症状の治療のために、遺伝子発現を上方制御することができる。一実施形態においては、「RNA i 阻害剤」という用語は、例えば、機能喪失の疾患、形質及び／又は症状の治療のために、遺伝子発現を増大させる効果を有する、本明細書の種々の実施形態における「siNA」という用語の代わりに使用される。

【0381】

本明細書では「アプタマー」又は「核酸アプタマー」とは、標的分子に特異的に結合するポリヌクレオチドを意味し、核酸分子は、その自然な状況において標的分子によって認識される配列とは異なる配列を有する。或いは、アプタマーは、標的分子が核酸と自然には結合しない場合、標的分子と結合する核酸分子であり得る。標的分子は、対象となる任意の分子であり得る。例えば、アプタマーを使用して、タンパク質のリガンド結合ドメインに結合させることができ、それによって天然のリガンドとタンパク質の相互作用を防止することができる。これは非限定的例であり、当業者は、他の実施形態を当分野で一般に公知である技術によって容易に作製できることを認識されたい。例えば、Gold et al., 1995, Annu. Rev. Biochem., 64, 763; Brody and Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kusser, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Hermann and Patel, 2000, Science, 287, 820及びJayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628を参照されたい。本発明のアプタマー分子は、当分野で一般に公知のとおり、又は本明細書のとおり、化学修飾され得る。

【0382】

本明細書では「アンチセンス核酸」という用語は、RNA-RNA又はRNA-DNA又はRNA-PNA（タンパク質核酸；Egholm et al., 1993 Nature 365, 566）相互作用によって標的RNAと結合し、立体的相互作用によって、又はRNase Hによって媒介される標的認識によって、標的RNAの活性を変える核酸分子を指す（総説として、Stein and Cheng, 1993 Science 261, 1004及びWoolf他、米国特許第5,849,902号を参照されたい。）。典型的には、アンチセンス分子は、アンチセンス分子の単一の隣接配列に沿った標的配列に相補的である。しかし、ある実施形態においては、アンチセンス分子は、基質分子がループを形成するように基質と結合し得、及び／又はアンチセンス分

子がループを形成するように結合し得る。したがって、アンチセンス分子は、2 個の（さらには、それを超える）非隣接基質配列に相補的であり得、又はアンチセンス分子の 2 個の（さらには、それを超える）非隣接配列部分は、標的配列に相補的であり得、又は両方である。現在のアンチセンス戦略の総説については、Schmajuk et al., 1999, J. Biol. Chem., 274, 21783-21789, Delihias et al., 1997, Nature, 15, 751-753, Stein et al., 1997, Antisense N. A. Drug Dev., 7, 151, Crooke, 2000, Methods Enzymol., 313, 3-45; Crooke, 1998, Biotech. genet. Eng. Rev., 15, 121-157, Crooke, 1997, Ad. Pharmacol., 40, 1-49 を参照されたい。また、2'-MOE 及び当分野で公知の他の修飾によって修飾された、アンチセンス DNA 又はアンチセンスを用いて、DNA-RNA 相互作用によって RNA を標的にすることができ、それによって二本鎖中の標的 RNA を消化する RNase H を活性化することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的 RNA の RNase H 切断を活性化し得る 1 個以上の RNase H 活性化領域を含み得る。アンチセンス DNA は、化学的に合成することができ、又は一本鎖 DNA 発現ベクター若しくはその等価物を用いて発現させることができる。本発明のアンチセンス分子は、当分野で一般に公知のとおり、又は本明細書のとおり、化学修飾され得る。

10

【0383】

20

「調節する」とは、遺伝子の発現、又は 1 個以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットをコードする RNA 分子若しくは等価な RNA 分子のレベル、又は 1 個以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットの活性を、発現、レベル又は活性が、調節物質の非存在下で認められるものよりも大きく、又は小さくなるように、上方制御又は下方制御することを意味する。例えば、「調節する」という用語は「阻害する」を意味し得るが、「調節する」という言葉の使用はこの定義に限定されない。

【0384】

「阻害する」、「下方制御する」又は「減少する」とは、遺伝子の発現、又は 1 個以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットをコードする RNA 分子若しくは等価な RNA 分子のレベル、又は 1 個以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子（例えば、siNA）の非存在下で認められるものよりも低下することを意味する。一実施形態においては、siNA 分子による阻害、下方制御又は減少は、不活性又は減弱された分子の存在下で認められるレベルよりも低い。別の実施形態においては、siNA 分子による阻害、下方制御又は減少は、例えば、スクランブル（scrambled）配列又はミスマッチを有する siNA 分子の存在下で認められるレベルよりも低い。別の実施形態においては、本発明の核酸分子による遺伝子発現の阻害、下方制御又は減少は、核酸分子の存在下の方が、核酸分子の非存在下よりも大きい。一実施形態においては、遺伝子発現の阻害、下方制御又は減少は、RNAi によって媒介される標的核酸分子（例えば RNA）の切断、翻訳阻害などの転写後サイレンシングと関連がある。一実施形態においては、遺伝子発現の阻害、下方制御又は減少は、DNA メチル化パターン及び DNA クロマチン構造の変化などによる転写前サイレンシングと関連がある。

30

40

【0385】

「上方制御する」又は「促進する」とは、遺伝子の発現、又は 1 個以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットをコードする RNA 分子若しくは等価な RNA 分子のレベル、又は 1 個以上のタンパク質若しくはタンパク質サブユニットの活性が、本発明の核酸分子（例えば、siNA）の非存在下で認められるものよりも増加することを意味する。一実施形態においては、siNA 分子による遺伝子発現の上方制御又は促進は、不活性又は減弱された分子の存在下で認められるレベルよりも高い。別の実施形態においては、siNA 分子による遺伝子発現の上方制御又は促進は、例えば、スクランブル配列又はミスマッチを有する siNA 分子の存在下で認められるレベルよりも高い。別の実施形態にお

50

いては、本発明の核酸分子による遺伝子発現の上方制御又は促進は、核酸分子の存在下の方が、核酸分子の非存在下よりも大きい。一実施形態においては、遺伝子発現の上方制御又は促進は、上方制御される目的遺伝子の発現を下方制御、阻害又はサイレンシングする、RNAiによって媒介されるコード又は非コードRNA標的の切断又はサイレンシングなどのRNAによって媒介される遺伝子サイレンシングの阻害と関連がある。遺伝子発現の下方制御は、例えば、負のフィードバック、拮抗作用などを介して、コードRNA又はそのコードされたタンパク質によって誘導され得る。遺伝子発現の下方制御は、例えば、翻訳阻害、クロマチン構造、メチル化、RISCによって媒介されるRNA切断、又は翻訳阻害を介して、遺伝子の発現を停止させることによって、目的遺伝子の調節制御を有する非コードRNAによって誘導され得る。したがって、目的遺伝子を下方制御、抑制又はサイレンシングする標的を阻害又は下方制御することによって、治療のために目的遺伝子の発現を上方制御又は促進することができる。

10

【0386】

一実施形態においては、本発明のRNAi阻害剤を用いて、RNAi又は遺伝子サイレンシングを阻害することによって、遺伝子発現を上方制御する。例えば、特定の遺伝子の1個の対立遺伝子に変異（例えば、フレームシフト、ミスセンス又はナンセンス変異）を保有して、変異遺伝子によってコードされるタンパク質の機能喪失をもたらすハプロ不全の場合などにおいて、本発明のRNAi阻害剤を用いて、遺伝子発現を上方制御することによって、機能喪失の疾患及び症状を治療することができる。かかる場合においては、RNAi阻害剤を用いて、野生型又は機能的対立遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を上方制御することができ、したがって変異遺伝子又はヌル対立遺伝子を補うことによって、ハプロ不全を矯正することができる。別の実施形態においては、本明細書の、又は当分野で公知の疾患、形質又は症状の治療などにおいて、本発明のsiNA分子を用いて、有毒な機能獲得型（toxic gain of function）対立遺伝子の発現を下方制御しつつ、本発明のRNAi阻害剤を同時に用いて、野生型又は機能的対立遺伝子の発現を上方制御する（例えば、Rhodes et al., 2004, PNAS USA, 101:11147-11152及びMeisler et al., 2005, The Journal of Clinical Investigation, 115:2010-2017参照）。

20

【0387】

「遺伝子」又は「標的遺伝子」若しくは「標的DNA」とは、RNAをコードする核酸、例えば、ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含めて、ただしこれだけに限定されない核酸配列を意味する。遺伝子又は標的遺伝子は、small temporal RNA (stRNA)、マイクロRNA (miRNA)、核内低分子RNA (snRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、核小体低分子RNA (snRNA)、リボソームRNA (rRNA)、転移RNA (tRNA)、その前駆体RNAなどの機能性RNA (fRNA) 又は非コードRNA (ncRNA) もコードし得る。かかる非コードRNAは、機能的又は調節性細胞プロセスに関与するfRNA又はncRNAの活性の調節において、siNAによって媒介されるRNA干渉の標的核酸分子として役立ち得る。したがって、疾患をもたらす異常なfRNA又はncRNA活性を本発明のsiNA分子によって調節することができる。fRNA及びncRNAを標的にしたsiNA分子を用いて、遺伝子刷り込み、転写、翻訳、核酸プロセッシング（例えば、アミノ基転移、メチル化など）などの細胞プロセスに介入することによって、対象、生物体又は細胞の遺伝子型又は表現型を操作又は変化させることもできる。標的遺伝子は、細胞、内在性遺伝子、導入遺伝子、又は感染後に細胞中に存在する病原体、例えば、ウイルスの遺伝子などの外因性遺伝子に由来する遺伝子であり得る。標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物体、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌若しくは真菌に由来し得、又はこれらに含まれ得る。植物の非限定的例としては、単子葉植物、双子葉植物又は裸子植物が挙げられる。動物の非限定的例としては、脊椎動物又は無脊椎動物が挙げられる。真菌の非限定的例としては、カビ又は酵母が挙げられる。総説については、例えば、Snyder and Gerstei

30

40

50

n, 2003, Science, 300, 258-260を参照されたい。

【0388】

「非標準塩基対」とは、flipped mismatches、単一の水素結合 mismatches、トランス型 mismatches、3塩基 (triple base) 相互作用及び4塩基 (quadruple base) 相互作用を含めた、 mismatches 及び／又はゆらぎ塩基対などの任意の非ワトソン・クリック塩基対を意味する。かかる非標準塩基対の非限定的例としては、AC逆フーグスティーン、ACゆらぎ、AU逆フーグスティーン、GUゆらぎ、AA N7アミノ、CC 2-カルボニルアミノ (H1)-N3アミノ (H2)、GA sheared型、UC 4-カルボニルアミノ、UUイミノ-カルボニル、AC逆ゆらぎ (reverse wobble)、AUフーグスティーン、AU逆ワトソン・クリック (reverse Watson Crick)、CG逆ワトソン・クリック、GC N3アミノ-アミノ N3、AA N1アミノ対称、AA N7アミノ対称、GA N7-N1アミノ-カルボニル、GA+カルボニルアミノ N7-N1、GG N1-カルボニル対称、GG N3アミノ対称、CCカルボニルアミノ対称、CC N3アミノ対称、UU 2-カルボニルイミノ対称、UU 4-カルボニルイミノ対称、AA アミノ-N3、AA N1アミノ、ACアミノ 2-カルボニル、AC N3アミノ、AC N7アミノ、AUアミノ-4-カルボニル、AU N1イミノ、AU N3イミノ、AU N7イミノ、CCカルボニルアミノ、GAアミノ-N1、GAアミノ-N7、GAカルボニルアミノ、GA N3アミノ、GCアミノ-N3、GCカルボニルアミノ、GC N3アミノ、GC N7アミノ、GGアミノ-N7、GGカルボニルイミノ、GG N7アミノ、GUアミノ-2-カルボニル、GUカルボニルイミノ、GUイミノ-2-カルボニル、GU N7イミノ、psi Uイミノ-2-カルボニル、UC 4-カルボニルアミノ、UCイミノ-カルボニル、UUイミノ-4-カルボニル、AC C2-H-N3、GAカルボニル-C2-H、UUイミノ-4-カルボニル 2カルボニル-C5-H、ACアミノ (A) N3 (C)-カルボニル、GCイミノアミノ-カルボニル、Gpsi イミノ-2-カルボニルアミノ-2-カルボニル及びGUイミノアミノ-2-カルボニル塩基対が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0389】

本明細書では「標的」とは、本明細書の、及び／又は参照により本明細書に組込む、米国仮出願第60/363,124号、米国特許出願第10/923,536号及び／又は PCT/US03/05028の Genbank アクセッション番号などによってコードされる任意の標的タンパク質、ペプチド又はポリペプチドを意味する。「標的」という用語は、本明細書及び／又は米国仮出願第60/363,124号、米国特許出願第10/923,536号及び／又は米国特許出願第PCT/US03/05028号の Genbank アクセッション番号を有する配列によってコードされるタンパク質、ペプチド、ポリペプチドなどの任意の標的タンパク質、ペプチド又はポリペプチドをコードする核酸配列又は標的ポリヌクレオチド配列も指す。対象となる標的としては、標的DNA、標的RNAなどの標的ポリヌクレオチド配列が挙げられる。「標的」という用語は、異なるアイソフォーム、変異標的遺伝子、標的ポリヌクレオチドのスプライスバリエント、標的多型、非コードポリヌクレオチド配列 (例えば、ncRNA、miRNA、stRNA)、本明細書の他の調節ポリヌクレオチド配列などの他の配列も含むものとする。したがって、本発明の種々の実施形態においては、標的RNAに対して相補性を有する本発明の二本鎖核酸分子 (例えば、siNA) を用いて、miRNA又は他のncRNA活性を阻害又は下方制御することができる。一実施形態においては、miRNA又はncRNA活性を阻害することによって、miRNA又はncRNA活性に依存する遺伝子発現 (例えば、本明細書の、又は当分野で公知の遺伝子標的) を下方制御又は阻害することができる。別の実施形態においては、miRNA又はncRNAに対して相補性を有する本発明の二本鎖核酸分子 (例えば、siNA) によってmiRNA又はncRNA活性を阻害することによって、miRNA又はncRNAによって下方制御、抑制又はサイレンシングされる標的遺伝子発現 (例えば、本明細書の、又は当分野で公知の遺伝子標的) を上方制御又は促

進することができる。かかる遺伝子発現の上方制御は、当分野で一般に公知である機能喪失又はハプロ不全に関連した疾患及び症状（例えば、筋ジストロフィー、嚢胞性線維症、又は乳児期の重度の間代性筋けいれん若しくはD r a v e t 症候群を含めたてんかんなどの本明細書の神経性疾患及び症状）の治療に使用することができる。

【0390】

「経路標的」とは、遺伝子発現又は活性の経路に関与する任意の標的を意味する。例えば、任意の所与の標的は、生物学的経路における上流、下流又は変更遺伝子を含み得る、関係する経路標的を有し得る。これらの経路標的遺伝子は、本明細書の疾患、症状及び形質の治療において相加又は相乗効果をもたらし得る。

【0391】

一実施形態においては、標的は、標的RNA又はその一部のいずれかである。

【0392】

一実施形態においては、標的は、任意の標的DNA又はその一部である。

【0393】

一実施形態においては、標的は、任意の標的mRNA又はその一部である。

【0394】

一実施形態においては、標的は、任意の標的miRNA又はその一部である。

【0395】

一実施形態においては、標的は、任意の標的siRNA又はその一部である。

【0396】

一実施形態においては、標的は、任意の標的stRNA又はその一部である。

【0397】

一実施形態においては、標的は、標的及び又は経路標的又はその一部である。

【0398】

一実施形態においては、標的は、本明細書、及び／又は米国仮出願第60／363, 124号、米国特許出願第10／923, 536号及び／又はPCT／US03／05028号の標的配列のいずれか（例えば、1個以上）又はその一部である。一実施形態においては、標的は、表I Iに示す標的配列のいずれか（例えば、1個以上）又はその一部である。別の実施形態においては、標的は、表I Iに示す任意の（例えば、1個以上の）上側の鎖、又は下側の鎖の標的配列に対応するsiRNA、miRNA若しくはtRNA又はその一部である。別の実施形態においては、標的は、本明細書又は米国仮出願第60／363, 124号、米国特許出願第10／923, 536号及び／又はPCT／US03／05028の配列に対応する任意の（例えば、1個以上）配列に対応する任意のsiRNA、miRNA又はtRNAである。

【0399】

「相同配列」とは、遺伝子、遺伝子転写物及び／又は非コードポリヌクレオチドなどの1個以上のポリヌクレオチド配列によって共有されるヌクレオチド配列を意味する。例えば、相同配列は、サイトカインとその対応する受容体など、遺伝子ファミリーの異なるメンバー、異なるタンパク質エピトープ、異なるタンパク質アイソフォーム、完全に異なる遺伝子などの関係する異なるタンパク質をコードする2個以上の遺伝子によって共有されるヌクレオチド配列であり得る。相同配列は、非コードDNA又はRNA、制御配列、イントロン、転写制御又は調節部位など、2個以上の非コードポリヌクレオチドによって共有されるヌクレオチド配列であり得る。相同配列は、1個を超えるポリヌクレオチド配列によって共有される保存配列領域も含み得る。相同性は、完全な相同性（例えば、100%）である必要はなく、部分的相同配列も本発明によって企図される（例えば、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%など）。

【0400】

「保存配列領域」とは、ポリヌクレオチド中の1個以上の領域のヌクレオチド配列が、世代間で、又は生物系、対象若しくは生物体間でさほど変化しないことを意味する。ポリ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドは、コード及び非コードのDNA及びRNAを含み得る。

【0401】

「センス領域」とは、siNA分子のアンチセンス領域に対して相補性を有する、siNA分子のヌクレオチド配列を意味する。また、siNA分子のセンス領域は、標的核酸配列と相同性を有する核酸配列を含み得る。一実施形態においては、siNA分子のセンス領域をセンス鎖又はパッセンジャー鎖と称する。

【0402】

「アンチセンス領域」とは、標的核酸配列に対して相補性を有する、siNA分子のヌクレオチド配列を意味する。また、siNA分子のアンチセンス領域は、siNA分子のセンス領域に対して相補性を有する核酸配列を含んでいてもよい。一実施形態においては、siNA分子のアンチセンス領域をアンチセンス鎖又はガイド鎖と称する。

【0403】

「標的核酸」又は「標的ポリヌクレオチド」とは、発現又は活性を調節すべき任意の核酸配列（例えば、任意の標的及び／又は経路標的配列）を意味する。標的核酸はDNA又はRNAであり得る。一実施形態においては、本発明の標的核酸は標的RNA又はDNAである。

【0404】

「相補性」とは、核酸が、伝統的なワトソン・クリック、又は本明細書の他の非伝統的なタイプによって別の核酸配列と水素結合を形成し得ることを意味する。一実施形態においては、各鎖が15から30ヌクレオチド長である、siNA分子などの本発明の二本鎖核酸分子は、二本鎖核酸分子の2本の鎖間の約10%から約100%（例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%）の相補性を含む。別の実施形態においては、一方の鎖がセンス鎖であり、他方の鎖がアンチセンス鎖であり、各鎖が15から30ヌクレオチド長である、siNA分子などの本発明の二本鎖核酸分子は、二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖中のヌクレオチド配列と、標的RNA、標的mRNA、ウイルスRNAなどのその対応する標的核酸分子のヌクレオチド配列との間で、少なくとも約10%から約100%（例えば、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%）の相補性を含む。一実施形態においては、一方の鎖がセンス領域と称するヌクレオチド配列を含み、他方の鎖がアンチセンス領域と称するヌクレオチド配列を含み、各鎖が15から30ヌクレオチド長である、siNA分子などの本発明の二本鎖核酸分子は、二本鎖核酸分子のセンス領域とアンチセンス領域の間で、約10%から約100%（例えば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%）の相補性を含む。本発明の核分子に関連して、その相補配列との核酸分子の結合自由エネルギーは、核酸の関連機能、例えば、RNAi活性が進行するのに十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの測定は当分野で周知である（例えば、Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LI pp. 123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785参照）。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合を形成（例えば、ワトソン・クリック塩基対形成）し得る、核酸分子中の隣接残渣の百分率を示す（例えば、10ヌクレオチドを有する第2の核酸配列と塩基対を形成した、第1のオリゴヌクレオチド中の合計10ヌクレオチドのうちの5、6、7、8、9又は10ヌクレオチドは、それぞれ50%、60%、70%、80%、90%及び100%相補的である。）。一実施形態においては、本発明のsiNA分子は、siNA分子のセンス鎖又はセンス領域とアンチセンス鎖又はアンチセンス領域との間で完全な相補性を有する。一実施形態においては、本発明のsiNA分子は、対応する標的核酸分子と完全に相補的である。「完全に相補的」とは、核酸配列の全隣接残基が第2の核酸配列中の同数の隣接残基と水素結合することを意味する。一実施形態においては、本発明のsiNA分子は、1個以上の標的核酸分子又はその一部に相

補的である、約15から約30個又はそれを超える（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30個又はそれを超える）ヌクレオチドを含む。一実施形態においては、本発明のs i N A分子は、s i N A分子のセンス鎖若しくはセンス領域とアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域との間で、又はs i N A分子のアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域と対応する標的核酸分子との間で部分的相補性（すなわち、100%未満の相補性）を有する。例えば、部分的相補性は、s i N A構造内の種々のミスマッチ又は非塩基対形成ヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、5個又はそれを超えるミスマッチ又は非塩基対形成ヌクレオチド）を含み得る。これは、s i N A分子のセンス鎖若しくはセンス領域とアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域との間で、又はs i N A分子のアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域と対応する標的核酸分子との間で生じるバルジ、ループ又はオーバーハングをもたらし得る。

10

【0405】

一実施形態においては、s i N A分子などの本発明の二本鎖核酸分子は、核酸分子のセンス鎖又はセンス領域とアンチセンス鎖又はアンチセンス領域との間で完全な相補性を有する。一実施形態においては、s i N A分子などの本発明の二本鎖核酸分子は、対応する標的核酸分子に完全に相補的である。

【0406】

一実施形態においては、s i N A分子などの本発明の二本鎖核酸分子は、二本鎖核酸分子のセンス鎖若しくはセンス領域とアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域との間で、又は核酸分子のアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域と対応する標的核酸分子との間で部分的相補性（すなわち、100%未満の相補性）を有する。例えば、部分的相補性は、二本鎖核酸分子構造内の種々のミスマッチ又は非塩基対形成ヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、5個又はそれを超えるミスマッチ又はヌクレオチドバルジなどの非塩基対形成ヌクレオチド）を含み得る。これは、二本鎖核酸分子のセンス鎖若しくはセンス領域とアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域との間で、又は二本鎖核酸分子のアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域と対応する標的核酸分子との間で生じるバルジ、ループ又はオーバーハングをもたらし得る。

20

【0407】

一実施形態においては、本発明の二本鎖核酸分子は、マイクロRNA (miRNA) である。「マイクロRNA」又は「miRNA」とは、mRNA切断、翻訳抑制/阻害又は異質染色質サイレンシングによって、標的メッセンジャーRNAの発現を調節する低分子二本鎖RNAを意味する（例えば、Ambros, 2004, Nature, 431, 350-355; Bartel, 2004, Cell, 116, 281-297; Cullen, 2004, Virus Research, 102, 3-9; He et al., 2004, Nat. Rev. genet., 5, 522-531; Ying et al., 2004, gene, 342, 25-28及びSethupathy et al., 2006, RNA, 12:192-197参照）。一実施形態においては、本発明のマイクロRNAは、miRNA分子のセンス鎖若しくはセンス領域とアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域との間で、又はmiRNAのアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域と対応する標的核酸分子との間で部分的相補性（すなわち、100%未満の相補性）を有する。例えば、部分的相補性は、二本鎖核酸分子構造内の種々のミスマッチ又は非塩基対形成ヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、5個又はそれを超えるミスマッチ又はヌクレオチドバルジなどの非塩基対形成ヌクレオチド）を含み得る。これは、miRNAのセンス鎖若しくはセンス領域とアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域との間で、又はmiRNAのアンチセンス鎖若しくはアンチセンス領域と対応する標的核酸分子との間で生じるバルジ、ループ又はオーバーハングをもたらし得る。

30

40

【0408】

一実施形態においては、標的遺伝子発現を下方制御する、又は減少させる、本発明のs

50

i N A 分子は、本明細書に記載するとおりに、又は当分野で公知のとおり、対象又は生物体における疾患、障害、症状又は形質の予防又は治療に使用される。

【0409】

本明細書では「増殖性疾患」又は「癌」とは、白血病、例えば、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ球性白血病（ALL）及び慢性リンパ性白血病、カポジ肉腫などの AIDS に関係する癌；乳癌；骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、線維肉腫、巨細胞腫、エナメル上皮腫、脊索腫などの骨癌；髄膜腫、グリア芽細胞腫、低悪性度星状細胞腫、乏突起こう腫、下垂体腫よう、シュワン腫、転移性脳腫ようなどの脳腫よう；外套細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、腺腫、へん平上皮癌、喉頭癌などの種々のリンパ腫を含めた頭頸部癌、胆嚢及び胆管癌、網膜芽細胞腫などの網膜の癌、食道癌、胃癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、子宮癌、甲状腺癌、精巣癌、子宮体癌、黒色腫、結腸直腸癌、肺癌、ぼうこう癌、前立腺癌、（非小細胞肺癌を含めた）肺癌、すい癌、肉腫、ウィルムス腫よう、子宮頸癌、頭頸部癌、皮膚癌、上咽頭癌、脂肪肉腫、上皮癌、腎細胞癌、胆嚢腺癌、耳下腺癌、子宮内膜肉腫、多剤耐性癌；及び腫よう血管新生に関連した新血管新生、黄斑変性症（例えば、しん出型／萎縮型 AMD）、角膜血管新生、糖尿病性網膜症、血管新生緑内障、近視性変性などの増殖性疾患及び症状、再狭窄、多発性嚢胞腎などの他の増殖性疾患及び症状、並びに細胞又は組織において、単独で、又は他の療法と組み合わせて、疾患に関係した遺伝子発現の調節に応答し得る、任意の他の癌又は増殖性疾患、症状、形質、遺伝子型若しくは表現型を含めて、当分野で公知である、未制御の細胞増殖又は複製を特徴とする任意の疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型を意味する。

10

20

【0410】

本明細書では「炎症性疾患」又は「炎症性症状」とは、炎症、急性炎症、慢性炎症、呼吸器疾患、アテローム性動脈硬化症、乾せん、皮膚炎、再狭窄、ぜん息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、敗血症ショック、リウマチ様関節炎、炎症性腸（bowel）疾患、炎症性骨盤疾患、とう痛、眼球の炎症性疾患、セリアック病、リー症候群、グリセロールキナーゼ欠損症、家族性好酸球増加症（FE）、常染色体劣性遺伝性けい性失調症、喉頭の炎症性疾患；結核、慢性胆嚢炎、気管支拡張症、ケイ肺症及び他の塵肺、並びに細胞又は組織において、単独で、又は他の療法と組み合わせて、疾患に関係した遺伝子発現の調節に応答し得る、任意の他の炎症性疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型など、当分野で公知である、炎症性又はアレルギー性プロセスを特徴とする、任意の疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型を意味する。

30

【0411】

本明細書では「自己免疫疾患」又は「自己免疫症状」とは、多発性硬化症、真性糖尿病、ループス、セリアック病、クローン病、潰よう性大腸炎、ギラン バレー症候群、強皮症、グッドパスチャー症候群、ウェゲナー肉芽腫症、自己免疫性てんかん、ラスムッセン脳炎、原発性胆汁性硬化症、硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、アジソン病、橋本甲状腺腫、線維筋痛、メニエール症候群；移植拒絶（例えば、同種移植片拒絶の予防） 悪性貧血、リウマチ様関節炎、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、及び細胞又は組織において、単独で、又は他の療法と組み合わせて、疾患に関係した遺伝子発現の調節に応答し得る、任意の他の自己免疫疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型など、当分野で公知である、自己免疫を特徴とする任意の疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型を意味する。

40

【0412】

「感染症」とは、ウイルス、細菌、真菌、プリオン、寄生虫などの感染体に関連した任意の疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型を意味する。本発明の s i N A 分子を用いて標的にすることができる、種々のウイルス遺伝子の非限定的例としては、C 型肝炎ウイルス（HCV、例えば、Genbank アクセッション番号 D11168、D50483.1、L38318 及び S82227）、B 型肝炎ウイルス（HBV、例えば、Genba

50

nkアクセッション番号AF100308.1)、1型ヒト免疫不全症ウイルス(HIV-1、例えば、Genbankアクセッション番号U51188)、2型ヒト免疫不全症ウイルス(HIV-2、例えば、Genbankアクセッション番号X60667)、西ナイルウイルス(WNV 例え、Genbankアクセッション番号NC_001563)、サイトメガロウイルス(CMV 例え、Genbankアクセッション番号NC_001347)、呼吸器合胞体ウイルス(RSV 例え、Genbankアクセッション番号NC_001781)、インフルエンザウイルス(例え、Genbankアクセッション番号AF037412、ライノウイルス(例え、GenBankアクセッション番号D00239、X02316、X01087、L24917、M16248、K02121、X01087)、パピローマウイルス(例え、Genbankアクセッション番号NC_001353)、単純ヘルペスウイルス(HSV 例え、Genbankアクセッション番号NC_001345)、及びHTLV(例え、Genbankアクセッション番号AJ430458)などの他のウイルスが挙げられる。多くのウイルスゲノムの配列は極めて変わりやすいので、広範な治療用途にsiNA分子を選択するには、ウイルスゲノムの保存領域を含む必要があると考えられる。ウイルスゲノムの保存領域の非限定的例としては、5'非コード領域(NCR)、3'非コード領域(NCR)及び/又は配列内リボソーム進入部位(IRES)が挙げられるが、これらだけに限定されない。種々のウイルスゲノムの保存領域に対して設計されたsiNA分子は、多様な患者集団におけるウイルス複製を効率的に阻害することができ、ウイルスゲノムの非保存領域における変異によって進化したウイルス疑似種に対するsiNA分子の有効性を確保することができる。細菌感染症の非限定的例としては、放線菌症、炭疽病、アスペルギルス症、菌血症、細菌感染症及び真菌症、バルトネラ感染症、ボツリヌス中毒、ブルセラ症、ブルクホルデリア感染症、カンピロバクター感染症、カンジダ症、ネコ引っ掻き病、クラミジア感染症、コレラ、クロストリジウム感染症、コクシジウム症、交差感染、クリプトコッカス症、皮膚真菌症、皮膚真菌症、ジフテリア、エーリキア症、大腸菌感染症、筋膜炎、壊死性、フソバクテリウム感染症、ガス壊疽、グラム陰性菌感染症、グラム陽性菌感染症、ヒストプラズマ症、膿か疹、クレブシエラ感染症、レジオネラ病、ライ病、レプトスピラ症、リステリア感染症、ライム病、マズラ菌症、類鼻疽、マイコバクテリウム感染症、マイコプラズマ症、真菌症、ノカルジア感染症、爪真菌症、鳥類病、ペスト、肺炎球菌性感染症、シュドモナス感染症、Q熱、鼠咬症、再帰熱、リウマチ熱、リケッチア感染症、ロッキー山紅斑熱、サルモネラ感染症、しょう紅熱、ツツガムシ病、敗血症、性感染症—細菌、細菌性皮膚病、ブドウ球菌感染症、連鎖球菌感染症、破傷風、ダニ媒介感染症、結核、野兎病、腸チフス、チフス、発疹チフス(Epidemic Louse-Borne)、ビブリオ感染症、フランベジア、エルシニア感染症、動物原性感染症及び接合菌症が挙げられる。真菌感染症の非限定的例としては、アスペルギルス症、プラストミセス症、コクシジウム症、クリプトコッカス症、爪及び足指爪の真菌感染症、真菌性副鼻腔炎、ヒストプラズマ症、ヒストプラズマ症、ムコール症、爪の真菌感染症、パラコクシジオイデス症、スポトリウム症、溪谷熱(コクシジウム症)及びカビアレルギーが挙げられる。

【0413】

「神経疾患(neurologic disease)」又は「神経学的疾患(neurological disease)」とは、ADHD、AIDS—神経合併症、透明中隔欠損症、後天性てんかん様失語症、急性播種性脳脊髄炎、副腎白質萎縮症、脳梁欠損症、失認、アイカルディ症候群、アレキサンダー病、アルパーズ病、交代性片麻痺、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、無脳症、動脈りゅう、アンジェルマン症候群、血管腫症、無酸素症、失語症、失行症、クモ膜嚢腫、くも膜炎、アーノルドキアリ奇形、動静脈奇形、アスパルテム、アスペルガー症候群、血管拡張性失調症、失調症、注意欠陥多動障害、自閉症、自律神経機能障害、背痛、バース症候群、バッテン病、ベーチェット病、ベル麻痺、良性本態性眼けんけいれん、良性限局性筋萎縮症、良性頭蓋内圧亢進、ベルンハルト—ロート症候群、ビンスワンガー病、眼けんけいれん、ブロッホ—ザルツバー

ガー症候群、腕神経叢出生時外傷、腕神経叢外傷、ブラッドバリー エグルストン症候群、
 脳動脈りゅう、脳傷害、脳及び脊髄の腫瘍、ブラウン セカール症候群、球脊髄性筋
 萎縮症、カナバン病、手根管症候群、灼熱痛、海綿腫、海綿状血管腫、海綿状血管奇形、
 中心性頸髄症候群、脊髄中心症候群、中枢痛症候群、頭部障害、小脳変性症、小脳低形成
 、脳動脈りゅう、脳動脈硬化症、脳萎縮症、脳性脚気、脳性巨人症、脳低酸素症、脳性麻
 ひ、脳眼顔骨症候群、シャルコー マリー トゥース病、キアリ奇形、舞踏病、有きよく
 赤血球舞踏病、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎（C I D P）、慢性起立耐性失調、慢性痛
 、I I型コケイン症候群、コフィン ローリー症候群、遷延性植物状態を含めた昏睡、複
 合性局所とう痛症候群、先天性両側顔面神経麻ひ、先天性筋無力症、先天性ミオパチー、
 先天性海綿状血管奇形、大脳皮質基底核変性症、頭蓋動脈炎、頭蓋骨癒合症、クロイツフ
 ェルト ヤコブ病、蓄積外傷疾患、クッシング症候群、巨細胞封入体症（C I B D）、サ
 イトメガロウイルス感染症、ダンシングアイズーダンシングフィート（D a n c i n g
 E y e s - D a n c i n g F e e t）症候群、ダンディー ウォーカー症候群、D a w
 s o n病、ド モルシェ症候群、デジェリン クルムブケ麻ひ、脳血管性認知症、皮質下
 認知症、レヴィー小体型認知症、皮膚筋炎、発達性統合運動障害、デビック症候群、糖尿
 病性神経障害、びまん性硬化症、D r a v e t症候群、自律神経障害、書字障害、失読症
 、えん下障害、統合運動障害、ジストニア、乳児早期てんかん性脳症、トルコ鞍空洞症候
 群、し眠性脳炎、脳炎及び髄膜炎、脳ヘルニア、脳症、脳三叉神経領域血管腫症、てんか
 ん、エルブ麻ひ、エルブ デュシェンヌ及びデジェリン クルムブケ麻ひ、ファブリー病
 、ファール症候群、失神、家族性自律神経障害、家族性血管腫、家族性特発性大脳基底核
 石灰化症、家族性けい性麻ひ、熱性けいれん（例えば、G E F S及びG E F S p l u s
 ）、フィッシャー症候群、低緊張乳児症候群、フリードライヒ失調症、ゴーシェ病、ゲル
 ストマン症候群、ゲルストマン シュトロイスラー シャインカー病、巨細胞性動脈炎、
 巨細胞封入体症、球様細胞白質萎縮症、舌咽神経痛、ギラン バレー症候群、H T L V -
 I 関連脊髄症、ハラーフォルデン シュパッツ病、頭部外傷、頭痛、持続性片側性頭痛、
 半側顔面けいれん、交代性片麻ひ、遺伝性神経障害、遺伝性けい性対麻ひ、遺伝性多発神
 経炎性失調、耳帯状ほう疹、帯状ほう疹、平山症候群、全前脳症、ハンチントン病、水無
 脳症、水頭症ー常圧、水頭症、水脊髄症、高コルチゾール血症、過眠症、高血圧症、低血
 圧症、低酸素症、免疫介在性脳脊髄炎、封入体筋炎、色素失調症、乳児性低血圧症（i n
 f a n t i l e h y p o t o n i a）、乳児性フィタン酸蓄積症、乳児型レフサム病、
 點頭てんかん、炎症性筋疾患、腸性脂肪異栄養症、頭蓋内嚢胞、頭蓋内圧亢進、アイザッ
 ク症候群、ジュベール症候群、カーンズ セイアー症候群、ケネディ疾患、K i n s b o
 u r n e症候群、クライン レビン症候群、クリッペル ファイル症候群、クリッペル
 トルノネー症候群（K T S）、クリューバー ビューシー症候群、コルサコフ健忘症候群
 、クラッペ病、クーゲルベルク ウェランダー病、クーラー、ランバート イートン筋無
 力症候群、ランドー クレッフナー症候群、外側大腿皮神経絞やく、延髄外側症候群、
 学習障害、リー病、レノックス ガスター症候群、レッシュ ナイハン症候群、白質萎縮
 症、レヴァイン クリッチュリー症候群、レヴィー小体型認知症、滑脳症、閉じ込め症候
 群、ルーゲーリッグ病、ループスー神経学的後遺症、ライム病ー神経合併症、マシャド
 ジョセフ病、大脳症、巨大脳症、メルカーソン ローゼンタール症候群、髄膜炎、メン
 ケス病、知覚異常性大腿神経痛、異染性白質ジストロフィー、小頭症、片頭痛、ミラー
 フィッシャー症候群、一過性脳虚血発作（M i n i - S t r o k e s）、ミトコンドリア
 筋症、メビウス症候群、単肢の筋萎縮症、運動ニューロン疾患、もやもや病、ムコ脂質症
 、ムコ多糖症、多発梗塞性認知症、多巣性運動ニューロパチー、多発性硬化症、起立性低
 血圧を有する多系統萎縮症、多系統萎縮症、筋ジストロフィー、先天性筋無力症、重症筋
 無力症、脱髄（m y e l i n o c l a s t i c）びまん性硬化症、乳児のミオクロノス
 脳症、ミオクロノス、先天性ミオパチー、甲状腺中毒性ミオパチー、筋疾患、先天性筋
 緊張症、ミオトニー、ナルコレプシー、神経有きよく赤血球症、脳の鉄沈着を伴う神経変
 性、神経線維腫症、神経遮断薬悪性症候群、A I D Sの神経合併症、ポンペ病の神経症状
 、視神経脊髄炎、神経性筋強直症、神経セロイドリポフスチン症、ニューロン遊走障害、

10

20

30

40

50

遺伝性神経障害、神経サルコイドーシス、神経毒性、海綿状母斑、ニーマン ピック病、O' Sullivan-McLeod 症候群、後頭神経痛、潜在性脊椎癒合不全シーケンス (occult spinal dysraphism sequence)、大田原症候群、オリブ橋小脳萎縮症、オブソクロヌス ミオクロヌス、起立性低血圧症、過度使用症候群、慢性とう痛、腫よう随伴症候群、知覚異常、パーキンソン病、先天性パーミオトニア (Paromyotonia)、発作性舞蹈病、発作性片側頭痛、パリー ロンベルク、ペリツェウス メルツバッヘル病、Pena Shokeir II 症候群、神経周囲の嚢胞、周期性麻痺、末梢神経障害、脳室周囲白質軟化症、遷延性植物状態、広汎発達障害、フィタン酸蓄積症、ピック病、梨状筋症候群、下垂体腫よう、多発性筋炎、ポンペ病、孔脳症、ポリオ後症候群、帯状ほう疹後神経痛、感染後脳脊髄炎、体位性低血圧症、起立性頻脈症候群、体位性頻脈症候群、原発性側索硬化症、プリオン病、進行性顔面半側萎縮症、進行性歩行運動失調症、進行性多巣性白質脳症、進行性硬化性ポリオジストロフィー、進行性核上性麻痺、偽脳腫よう、ピリドキシン依存性及びピリドキシン反応性けいれん、I 型ラムゼイ ハント症候群、II 型ラムゼイ ハント症候群、ラスムッセン脳炎及び他の自己免疫性てんかん、反射性交感神経性ジストロフィー症候群、乳児型レフサム病、レフサム病、反復運動障害、反復運動損傷、下肢静止不能症候群、レトロウイルスに起因する骨髄障害、レット症候群、ライ症候群、ライリー デイ症候群、SUNCT 頭痛、仙骨神経根嚢腫、舞蹈病、唾液腺疾患、サンドホフ病、シルダー病、裂脳症、発作性疾患、中隔視覚異形成症、乳児重症ミオクロニーてんかん (SMEI)、揺さぶられっこ症候群、帯状ほう疹、シャイ ドレーガー症候群、シェーグレン症候群、睡眠時無呼吸、睡眠病、ソトス症候群、けい縮、脊椎披裂、脊髄梗塞、脊髄損傷、脊髄腫よう、脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳萎縮症、スティール リチャードソン オルゼウスキー症候群、全身硬直症候群、線条体黒質変性症、発作、スタージ ウェーバー症候群、亜急性硬化性全脳炎、皮質下動脈硬化性脳症、えん下障害、シデナム 舞蹈病、失神、梅毒性脊髄性硬化症、水脊髄空洞症、脊髄空洞症、全身性エリテマトーデス、脊髄ろう、遅発性ジスキネジア、ターロヴ嚢胞、テイ サックス病、側頭動脈炎、係留脊髄症候群、トムゼン病、胸郭出口症候群、甲状腺中毒性ミオパチー、三叉神経痛性チック、トッド麻痺、トゥーレット症候群、一過性脳虚血発作、伝達性海綿状脳症、横断性脊髄炎、外傷性脳損傷、振戦、三叉神経痛、熱帯性けい性不全対麻痺症、結節性硬化症、血管勃起組織腫、側頭動脈炎を含めた血管炎、フォンエコノモ病、フォンヒッペル リンダウ病 (VHL)、フォンレックリングハウゼン病、ワレンベルク症候群、ウェルドニッヒ ホフマン病、ウェルニッケ コルサコフ症候群、ウエスト症候群、ホウィップル病、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、X連鎖性球脊髄性筋萎縮症及びツェルウェーガー症候群を含めて、中枢又は末梢神経系に影響を及ぼす、任意の疾患、障害又は症状を意味する。

【0414】

「呼吸器疾患」とは、ぜん息、慢性閉塞性肺疾患、すなわち「COPD」、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎、肺血管収縮、炎症、アレルギー、呼吸困難 (impeded respiration)、呼吸窮迫症候群、嚢胞性線維症、肺高血圧症、肺血管収縮、気腫、及び細胞又は組織において、単独で、又は他の療法と組み合わせて、疾患に関係した遺伝子発現の調節に応答し得る、任意の他の呼吸器疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型など、気道に影響を及ぼす任意の疾患又は症状を意味する。

【0415】

本明細書では「眼球疾患」とは、嚢胞様黄斑浮腫、星状硝子体症、病的近視及び後部ブドウ腫、トキソカラ症 (眼幼虫移行症)、網膜静脈閉塞症、後部硝子体剥離、牽引性網膜裂孔、網膜上膜、糖尿病性網膜症、格子状変性、網膜静脈閉塞症、網膜動脈閉塞症、黄斑変性症 (例えば、しん出型 AMD、萎縮型 AMD などの加齢黄斑変性症)、トキソプラズマ症、脈絡膜黒色腫、後天性網膜分離症、ホレンホースト斑、特発性中心性しょう液性網膜脈絡膜症、黄斑円孔、推定眼ヒストプラズマ症候群、網膜動脈りゅう、網膜色素変性症、網膜剥離、高血圧性網膜症、網膜色素上皮 (RPE) 剥離、乳頭静脈炎、眼球虚血症候群、コーツ病、Leber 粟粒動脈りゅう、結膜新生物、アレルギー性結膜炎、春季カタル

10

20

30

40

50

、急性細菌性結膜炎、アレルギー性結膜炎&春季角結膜炎、ウイルス性結膜炎、細菌性結膜炎、クラミジア&淋菌性結膜炎、結膜裂傷、上強膜炎、強膜炎、けん裂斑炎、翼状片、上輪部角結膜炎（TheodoreのSLK）、中毒性結膜炎、偽膜を伴う結膜炎、巨大乳頭性結膜炎、テリエン辺縁変性、アカントアメーバ角膜炎、真菌性角膜炎、糸状角膜炎、細菌性角膜炎、乾性角膜炎／眼球乾燥症候群、細菌性角膜炎、単純ヘルペス性角膜炎、無菌性角膜浸潤、フリクテン症、角膜剥離&再発性角膜びらん、角膜異物、化学熱傷（chemical burns）、上皮基底膜ジストロフィー（EBMD）、タイゲソン表層性点状角膜炎、角膜裂傷、ザルツマン結節状変性症、フックス内皮ジストロフィー、水晶体亜脱臼、毛様体ブロック緑内障、原発性開放隅角緑内障、色素散乱症候群及び色素性緑内障、偽落屑症候群及び偽剥脱性緑内障、前部ブドウ膜炎、原発性開放隅角緑内障、ブドウ膜炎緑内障&緑内障毛様体炎発症、色素散乱症候群&色素性緑内障、急性閉塞隅角緑内障、前部ブドウ膜炎、前房出血、隅角後退緑内障、水晶体原性緑内障、偽落屑症候群及び偽剥脱性緑内障、アクセンフェルトリーガー症候群、血管新生緑内障、へん平部炎、脈絡膜破裂、Duane退縮症候群、中毒性／栄養欠乏性視神経症、脳神経IIIの異所性再生、頭蓋内腫瘍性病変、頸動脈海綿静脈洞ろう、前部虚血性視神経症、視神経乳頭浮腫&うっ血乳頭、脳神経III麻痺、脳神経IV麻痺、脳神経V麻痺、脳神経VI（顔面神経）麻痺、ホルネル症候群、核間性眼筋麻痺、視神経乳頭低形成、乳頭小か、緊張性瞳孔、視神経乳頭ドルーゼン、脱髓性視神経症（視神経炎、球後視神経炎）、一過性黒内障及び一過性脳虚血発作、偽脳腫よう、下垂体腺腫、伝染性軟属腫、涙小管炎、ゆうぜい及び乳頭腫、シラミ寄生症及びシラミ症、眼けん炎、麦粒腫、隔壁前蜂巣炎、さん粒腫、基底細胞癌、眼部带状疱疹ヘルペス、シラミ寄生症&シラミ症、吹き抜け骨折、慢性流涙、涙腺炎、単純ヘルペス眼けん炎、眼か蜂巣織炎、老人性内反症、へん平上皮癌など、眼及び当分野で公知の関係する構造の任意の疾患、症状、形質、遺伝子型又は表現型を意味する。

【0416】

「皮膚の疾患」とは、皮膚、真皮、又は毛、毛嚢（follicle）などのその中の任意の下部構造の任意の疾患又は症状を意味する。皮膚の疾患、障害、症状及び形質としては、乾せん、異所性皮膚炎、黒色腫及び基底細胞癌などの皮膚癌、脱毛、除毛、色素沈着の変化、並びに皮膚、真皮、又はその中の構造に関連した任意の他の疾患、症状若しくは形質などが挙げられる。

【0417】

「聴覚の疾患」とは、内耳、中耳、外耳、聴神経、その中の任意の下部構造などの耳を含めて、聴覚系の任意の疾患又は症状を意味する。聴覚の疾患、障害、症状及び形質としては、聴覚損失、難聴、耳鳴、メニエール病、めまい、バランス及び運動障害、並びに耳又はその中の構造に関連した任意の他の疾患、症状若しくは形質などが挙げられる。

【0418】

「代謝病」とは、当分野で公知である、代謝経路に影響を及ぼす任意の疾患又は症状を意味する。代謝病は、遺伝性酵素異常（先天性代謝異常）のために先天的に、又は内分泌器官の疾患、若しくは肝臓などの代謝に重要な器官の不全のために後天的に、異常な代謝過程をもたらす得る。一実施形態においては、代謝病としては、高脂血症、高コレステロール血症、循環器疾患、アテローム性動脈硬化症、高血圧症、糖尿病（例えば、I型及び／又はII型糖尿病）、インスリン抵抗性及び／又は肥満が挙げられる。

【0419】

「循環器疾患」とは、冠動脈心疾患（CHD）、脳血管疾患（CVD）、大動脈弁狭窄、末梢血管疾患、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、心筋梗塞（心臓発作）、脳血管疾患（卒中）、一過性脳虚血発作（TIA）、（安定及び不安定な）アングナ、心房細動、不整脈、弁膜（valvular）症、うっ血性心不全、高コレステロール血症、I型高リポタンパク血症、II型高リポタンパク血症、III型高リポタンパク血症、IV型高リポタンパク血症、V型高リポタンパク血症、二次性高トリグリセリド血症、及び家族性レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ欠損症を含めて、ただしこれらだけに

限定されない心臓及び脈管構造に影響を及ぼす疾患又は症状を意味する。

【0420】

本発明の一実施形態においては、本発明の s i N A 分子の各配列は独立に約 15 から約 30 ヌクレオチド長であり、特定の実施形態においては、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 ヌクレオチド長である。別の実施形態においては、本発明の s i N A 二本鎖は、約 15 から約 30 塩基対（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）を独立に含む。別の実施形態においては、本発明の s i N A 分子の 1 本以上の鎖は、標的核酸分子に相補的である約 15 から約 30 ヌクレオチド（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30）を独立に含む。更に別の実施形態においては、ヘアピン又は環状構造を含む本発明の s i N A 分子は、約 35 から約 55（例えば、約 35、40、45、50 又は 55）ヌクレオチド長、又は約 38 から約 44（例えば、約 38、39、40、41、42、43 又は 44）ヌクレオチド長であり、約 15 から約 25（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25）塩基対を含む。本発明の例示的な s i N A 分子を表 I I 及び／又は図 4-5 に示す。

10

【0421】

本明細書では「細胞」は、その通常の生物学的意味で使用され、多細胞生物全体を指すのではなく、例えば、具体的にヒトを指すのではない。細胞は、生物体、例えば、トリ、植物、及びヒト、ウシ、ヒツジ、類人猿、サル、ブタ、イヌ、ネコなどのほ乳動物中に存在し得る。細胞は、原核細胞（例えば、細菌細胞）でも真核細胞（例えば、ほ乳動物又は植物細胞）でもよい。細胞は、体細胞又は生殖系列起源、全能性又は多能性、分裂又は非分裂であり得る。細胞は、配偶子若しくは胚、幹細胞、又は完全に分化した細胞に由来することもでき、又はこれらを含み得る。細胞は、当分野で一般に認識されている、単離細胞、精製細胞、又は実質的な精製細胞であり得る。

20

【0422】

本発明の s i N A 分子は、直接添加され、又は陽イオン性脂質と複合体（complex）を形成することができ、リポソームに入れることができ、又は標的細胞若しくは組織に送達することができる。核酸又は核酸複合体は、関連組織に生体外で、又は肺に局所送達することによってインビボで、生体高分子に組み入れて、又は組み入れずに、局所投与することができる。特定の実施形態においては、本発明の核酸分子は、表 I I 及び／又は図 4-5 に示す配列を含む。かかる核酸分子の例は、これらの表及び図に規定された配列から本質的になる。また、表 I の化学修飾構築物、及び表 I V に示す脂質ナノ粒子（LNP）調合物は、本発明の任意の s i N A 配列、又は s i N A 配列の群に適用することができる。

30

【0423】

別の態様においては、本発明は、本発明の 1 種類以上の s i N A 分子を含むほ乳動物細胞を提供する。1 種類以上の s i N A 分子は、本発明の標的ポリヌクレオチド内の同じ、又は異なる部位を独立に標的にすることができる。

【0424】

「RNA」とは、少なくとも 1 個のリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。「リボヌクレオチド」とは、 β -D-リボフラノース部分の 2' 位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、部分精製 RNA などの単離 RNA、本質的に純粋な RNA、合成 RNA、組み換え産生された RNA、並びに 1 個以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は変化によって天然 RNA とは異なる改変 RNA を含む。かかる変化は、s i N A の末端への、又は内部的に、例えば、RNA の 1 個以上のヌクレオチドにおけるなどの非ヌクレオチド材料の付加を含み得る。本発明の RNA 分子中のヌクレオチドは、非天然ヌクレオチド、化学合成ヌクレオチド、デオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドも含み得る。これらの改変 RNA は、類似体、又は天然 RNA の類似体と称することができる。

40

50

【0425】

「対象」とは、外植された細胞のドナー若しくはレシピエント、又は細胞自体である、生物体を意味する。「対象」とは、本発明の核酸分子を投与することができる生物体も指す。対象は、ヒト又はヒト細胞を含めて、ほ乳動物又はほ乳動物細胞であり得る。一実施形態においては、対象は乳児（例えば、1月齢未満、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11若しくは12月齢の対象）である。一実施形態においては、対象は幼児（例えば、1、2、3、4、5又は6歳）である。一実施形態においては、対象は（例えば、約65歳を超える）高齢者である。

【0426】

本明細書では「化学修飾」とは、未変性の s i R N A 又は R N A のヌクレオチドとは異なる、ヌクレオチドの化学構造の任意の修飾を意味する。「化学修飾」という用語は、本明細書の、又は当分野で公知の、修飾ヌクレオシド及び修飾ヌクレオチドを用いた、未変性の s i R N A 又は R N A のヌクレオシド及びヌクレオチドの付加、置換又は修飾を包含する。かかる化学修飾の非限定的例としては、本明細書の式 I、I I、I I I、I V、V、V I 若しくは V I I のいずれかの組成物、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、4'-チオリボヌクレオチド、2'-O-トリフルオロメチルヌクレオチド、2'-O-エチルトリフルオロメトキシヌクレオチド、2'-O-ジフルオロメトキシエトキシヌクレオチド（例えば、参照により本明細書に組込む、2004年11月5日出願された米国特許出願第10/981,966号参照）、F A N A、「汎用塩基」ヌクレオチド、「非環式」ヌクレオチド、5-C-メチルヌクレオチド、末端グリセリル及び／又は反転デオキシ脱塩基残基の組み入れ、又は本明細書の式 I-V I I のいずれかの修飾が挙げられるが、これらだけに限定されない。一実施形態においては、本発明の核酸分子（例えば、d s R N A、s i N A など）は、化学修飾によって部分的に修飾されている（例えば、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%修飾）。別の実施形態においては、本発明の核酸分子（例えば、d s R N A、s i N A など）は、化学修飾によって完全に修飾されている（例えば、約100%修飾）。

【0427】

本明細書では「ホスホロチオアート」という用語は、式 I のヌクレオチド間結合を指す。ここで、Z 及び／又は W は硫黄原子を含む。したがって、ホスホロチオアートという用語は、ホスホロチオアートヌクレオチド間結合とホスホロジチオアートヌクレオチド間結合の両方を指す。

【0428】

本明細書では「ホスホノアセタート」という用語は、式 I のヌクレオチド間結合を指す。ここで、Z 及び／又は W は、アセチル基、又は保護されたアセチル基を含む。

【0429】

本明細書では「チオホスホノアセタート」という用語は、式 I のヌクレオチド間結合を指す。ここで、Z は、アセチル基、又は保護されたアセチル基を含み、W は、硫黄原子、又はアセチル基、若しくは保護されたアセチル基を含み、Z は硫黄原子を含む。

【0430】

本明細書では「汎用塩基」という用語は、天然 D N A / R N A 塩基の各々とほとんど差別なく塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を指す。汎用塩基の非限定的例としては、当分野で公知である、C-フェニル、C-ナフチル及び他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、並びに3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体が挙げられる（例えば、Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447参照）。

【0431】

本明細書では「非環式ヌクレオチド」という用語は、例えば、リボース炭素（C 1、C 2、C 3、C 4又はC 5）のいずれかが、独立に、又は組み合わせて、ヌクレオチドから欠けている、非環式リボース糖を有する任意のヌクレオチドを指す。

【0432】

本発明の核酸分子は、個々に、又は組み合わせて、又は他の薬物と併せて、対象又は生物体における、本明細書の、又は当分野で公知の、疾患、障害、症状及び形質の予防又は治療に使用することができる。

【0433】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、個々に、又は1種類以上の薬物と組み合わせて、治療に適切な条件下で、対象に投与することができ、又は当業者に明らかである他の適切な細胞に投与することができる。

10

【0434】

更なる実施形態においては、s i N A 分子は、対象又は生物体において、疾患、障害又は症状を予防又は治療するために、他の公知の治療と併用することができる。例えば、当分野で公知である対象又は生物体における本明細書の疾患、障害、症状及び形質を予防又は治療するために、前記分子を1つ以上の公知の化合物、治療又は手順と併用することができる。

【0435】

一実施形態においては、本発明は、s i N A 分子の発現が可能であるように、本発明の少なくとも1種類のs i N A 分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを特徴とする。例えば、ベクターは、二本鎖を含むs i N A 分子の両方の鎖をコードする配列を含み得る。ベクターは、自己相補的であり、したがってs i N A 分子を形成する、単一の核酸分子をコードする配列も含み得る。かかる発現ベクターの非限定的例は、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500及びNovina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725に記載されている。

20

【0436】

別の実施形態においては、本発明は、本発明の発現ベクターを含むほ乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を特徴とする。

30

【0437】

更に別の実施形態においては、本発明の発現ベクターは、Genbankアクセッション番号、例えば、本明細書、又は米国仮出願第60/363,124号、米国特許出願第10/923,536号及び／又はPCT/US03/05028のGenbankアクセッション番号によって参照されるRNA分子に対して相補性を有するs i N A 分子の配列を含む。

【0438】

一実施形態においては、本発明の発現ベクターは、同じでも、異なってもよい、2個以上のs i N A 分子をコードする核酸配列を含む。

40

【0439】

本発明の別の態様においては、標的RNA分子と相互作用し、標的RNA分子（例えば、本明細書のGenbankアクセッション番号によって参照される標的RNA分子）をコードする遺伝子を下方制御するs i N A 分子は、DNA又はRNAベクターに挿入される転写単位から発現される。組み換えベクターは、DNAプラスミド又はウイルスベクターであり得る。s i N A を発現するウイルスベクターは、これらだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス又はアルファウイルスに基づいて構築することができる。s i N A 分子を発現可能である組み換えベクターは、本明細書のとおりに送達し、標的細胞中に存続させることができる。或いは、s i N A 分子の一過性

50

発現を与えるウイルスベクターを使用することができる。かかるベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。発現後、s i N A分子は、結合し、R N A干渉（R N A i）によって遺伝子の機能又は発現を下方制御する。s i N Aを発現するベクターの送達、静脈内又は筋肉内投与によって、対象から外植された標的細胞に投与し、続いて対象に再導入することによって、所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段によってなど、全身的であり得る。

【0440】

「ベクター」とは、所望の核酸の送達に使用される任意の核酸技術及び／又はウイルス技術を意味する。

【0441】

本発明の他の特徴及び効果は、以下の好ましい実施形態の説明、及び特許請求の範囲から明らかになるはずである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0442】

本発明の核酸分子の作用機序

以下の考察は、現在公知である低分子干渉R N Aによって媒介されるR N A干渉の提案されている機序を考察するものであり、限定的なものではなく、従来技術と認めるものでもない。出願人は、本明細書において、化学修飾低分子干渉核酸が、s i R N A分子と類似の、又は改善されたR N A i媒介能力を有し、改善された安定性及び活性をインビボで有すると予想されることを示す。したがって、この考察は、s i R N Aのみに限定されず、s i N A全体にあてはまる。「改善されたR N A i媒介能力」又は「改善されたR N A i活性」とは、インビトロ及び／又はインビボで測定されたR N A i活性を含むものとする。ここで、R N A i活性は、本発明のs i N AのR N A i媒介能力とs i N Aの安定性の両方を反映している。本発明では、これらの活性の成果は、全R N A s i R N A、又は複数のリボヌクレオチドを含むs i N Aよりも、インビトロ及び／又はインビボで増加し得る。s i N A分子の活性又は安定性は減少し得る場合もあるが（すなわち、10倍未満）、s i N A分子の全体的活性は、インビトロ及び／又はインビボで増強される。

【0443】

R N A干渉とは、動物において、低分子干渉R N A（s i R N A）によって媒介される配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを指す（F i r e e t a l. , 1998, N a t u r e, 391, 806）。植物における対応するプロセスは、転写後遺伝子サイレンシング又はR N Aサイレンシングと一般に称し、真菌においてはクエリングとも称される。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、多様な叢及び門によって一般に共有されている、外来遺伝子の発現を防止するのに使用される、進化的に保存された細胞防御機構であると考えられる（F i r e e t a l. , 1999, T r e n d s g e n e t. , 15, 358）。外来遺伝子発現からのかかる保護は、相異なる一本鎖R N A又はウイルスのゲノムR N Aを特異的に破壊する細胞応答を介して、ウイルス感染に由来する、又は宿主ゲノム中へのトランスポゾンエレメントの無作為な組み込みに由来する、二本鎖R N A（d s R N A）の生成に応じて進化してきたと考えられる。細胞中にd s R N Aが存在すると、特徴がまだ十分に明らかになっていない機序によってR N A i応答が誘発される。この機序は、リボヌクレアーゼLによるm R N Aの非特異的切断をもたらす、d s R N Aによって媒介されるプロテインキナーゼP K R及び2' , 5' -オリゴアデニル酸合成酵素の活性化に起因するインターフェロン応答とは異なると考えられる。

【0444】

細胞中に長鎖d s R N Aが存在すると、ダイサーと称するリボヌクレアーゼI I I酵素の活性が刺激される。ダイサーは、低分子干渉R N A（s i R N A）として知られるd s R N A小片へのd s R N Aのプロセッシングに関与する（B e r s t e i n e t a l. , 2001, N a t u r e, 409, 363）。ダイサー活性に由来する低分子干渉R N Aは、典型的には約21から約23ヌクレオチド長であり、約19塩基対の二本

10

20

30

40

50

鎖を含む。ダイサーは、構造の保存された前駆体RNAからの、翻訳調節に関係する21及び22ヌクレオチドのsmall temporal RNA (stRNA)の切り出しにも関係する(Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答は、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と一般に称する、siRNAを含むエンドヌクレアーゼ複合体も特徴とする。RISCは、siRNAと相同である配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する。標的RNAの切断は、siRNA二本鎖のガイド配列に相補的である領域の中央で起こる(Elbashir et al., 2001, genes Dev., 15, 188)。また、RNA干渉は、恐らくはクロマチン構造を調節し、それによって標的遺伝子配列の転写を防止する細胞機序によって、低分子RNA(例えば、マイクロRNA、すなわちmiRNA)によって媒介される遺伝子サイレンシングも含み得る(例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218及びHall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237)。したがって、本発明のsiRNA分子を用いて、RNA転写物との相互作用によって、又は特定の遺伝子配列との相互作用によって、遺伝子サイレンシングを媒介することができる。かかる相互作用は、転写レベル又は転写後レベルで遺伝子サイレンシングを生じる。

【0445】

RNAiは種々の系で研究されている。Fire et al., 1998, Nature, 391, 806は、線虫においてRNAiを観察した最初であった。Wanny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70は、マウス胚においてdsRNAによって媒介されるRNAiを記載している。Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293は、dsRNAが移入されたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記述している。Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494は、ヒト胚性腎臓及びHeLa細胞を含めた培養ほ乳動物細胞において、合成21ヌクレオチドRNA二本鎖の導入によって誘導されるRNAiを記述している。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究によって、効率的RNAi活性を媒介するのに必要である、siRNAの長さ、構造、化学組成及び配列に対する一定の要件が明らかになった。これらの研究によれば、21ヌクレオチドsiRNA二本鎖は、2個の2ヌクレオチド3'末端ヌクレオチドオーバーハングを含むときに最も活性である。また、一方又は両方のsiRNA鎖を2'-デオキシ又は2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が消失するのに対して、デオキシヌクレオチドによる3'末端siRNAヌクレオチドの置換は許容されることが判明した。siRNA二本鎖の中央におけるミスマッチ配列も、RNAi活性を消失させることが判明した。また、これらの研究は、標的RNA中の切断部位の位置が、siRNAガイド配列の3'末端ではなく5'末端によって規定されることも示している(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究によれば、siRNA二本鎖の標的相補鎖上の5'リン酸がsiRNA活性に必要であり、ATPを利用してsiRNA上の5'リン酸部分が維持される(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。しかし、5'リン酸を欠くsiRNA分子は、外因的に導入したときに活性であり、siRNA構築物の5'リン酸化がインビボで起こり得ることを示唆している。

【0446】

本発明の二本鎖形成性オリゴヌクレオチド(DFO)

一実施形態においては、本発明は、二本鎖オリゴヌクレオチドを自己組織化し得る二本鎖形成性オリゴヌクレオチド(DFO)を含むsiRNA分子を特徴とする。本発明の二本鎖形成性オリゴヌクレオチドは、化学合成することができ、又は転写単位及び／又はベクターから発現させることができる。本発明のDFO分子は、種々の治療、診断、農業、獣医学、標的確認、ゲノム発見、遺伝子工学及び薬理ゲノミクスの各適用分野に有用である

試薬及び方法を提供する。

【0447】

出願人は、二本鎖形成性オリゴヌクレオチド、すなわちDFO分子に限定されないが、本明細書では便宜上そのように称される、ある種のオリゴヌクレオチドが、遺伝子発現の配列特異的調節の強力な媒介物質であることを本明細書で示す。本発明のオリゴヌクレオチドは、二本鎖オリゴヌクレオチドを自己組織化するように設計されている線状ポリヌクレオチド配列のクラスである点で、当分野で公知である他の核酸配列（例えば、siRNA、miRNA、stRNA、shRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）とは異なる。二本鎖オリゴヌクレオチドの各鎖は、標的核酸分子に相補的であるヌクレオチド配列を含む。したがって、本発明の核酸分子は、二本鎖の各鎖が同じポリヌクレオチド配列を含み、標的核酸分子に相補的であるヌクレオチド配列を含む、機能的二本鎖を自己組織化することができる。

10

【0448】

一般に、二本鎖オリゴヌクレオチドは、2個の異なるオリゴヌクレオチド配列を組み立てることによって形成される。ここで、一方の鎖のオリゴヌクレオチド配列は、他方の鎖のオリゴヌクレオチド配列に相補的である。かかる二本鎖オリゴヌクレオチドは、2個の別々のオリゴヌクレオチドから組み立てられ、又はそれ自体の上で折り重なって二本鎖構造を形成する単一の分子から組み立てられ、当分野ではヘアピンステムループ構造（例えば、shRNA、すなわち短鎖ヘアピンRNA）と称されることが多い。当分野で公知であるこれらの二本鎖オリゴヌクレオチドはすべて、二本鎖の各鎖が異なるヌクレオチド配列を有する点で共通の特徴を有する。

20

【0449】

当分野で公知の二本鎖核酸分子とは別に、出願人は、一本鎖又は線状オリゴヌクレオチドから出発して、二本鎖核酸分子を形成する、潜在的に費用効果の高い、簡単な新規方法を開発した。本発明によって形成される二本鎖オリゴヌクレオチドの2本の鎖は、同じヌクレオチド配列を有し、互いに共有結合していない。かかる二本鎖オリゴヌクレオチド分子は、当分野で公知である方法及び試薬によって、合成後に容易に連結することができ、本発明の範囲内である。一実施形態においては、二本鎖オリゴヌクレオチドを形成する、本発明の一本鎖オリゴヌクレオチド（二本鎖形成性オリゴヌクレオチド）は、第1の領域と第2の領域を含む。ここで、一本鎖オリゴヌクレオチドが自己組織化して、二本鎖の一方の鎖のヌクレオチド配列が他方の鎖のヌクレオチド配列と同じである二本鎖オリゴヌクレオチドを形成するように、第2の領域は、第1の領域中のヌクレオチド配列又はその一部の逆方向反復であるヌクレオチド配列を含む。かかる二本鎖形成性オリゴヌクレオチドの非限定的例を図14及び15に示す。これらの二本鎖形成性オリゴヌクレオチド（DFO）は、ある種の回文構造又は反復配列を含んでいてもよい。かかる回文構造又は反復配列は、DFOの第1の領域と第2の領域の間に存在する。

30

【0450】

一実施形態においては、本発明は、標的核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する二本鎖形成性自己相補的核酸配列を含む二本鎖形成性オリゴヌクレオチド（DFO）分子を特徴とする。DFO分子は、かかる自己相補配列の組立てによって生じる、単一の自己相補配列又は二本鎖を含み得る。

40

【0451】

一実施形態においては、本発明の二本鎖形成性オリゴヌクレオチド（DFO）は、第1の領域と第2の領域を含み、第2の領域は、DFO分子から二本鎖オリゴヌクレオチドを組み立てることができるように、第1の領域のヌクレオチド配列の逆方向反復を含むヌクレオチド配列を含む。かかる二本鎖オリゴヌクレオチドは、遺伝子発現を調節する低分子干渉核酸（siNA）として作用し得る。本発明のDFO分子によって形成される二本鎖オリゴヌクレオチド二本鎖の各鎖は、標的核酸分子（例えば、標的RNA）中の同じヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列領域を含み得る。

【0452】

50

一実施形態においては、本発明は、二本鎖オリゴヌクレオチドに組み立て得る一本鎖 D F O を特徴とする。驚くべきことに、出願人は、自己相補性のヌクレオチド領域を有する一本鎖オリゴヌクレオチドを二本鎖オリゴヌクレオチド構築物に容易に組み立て得ることを見出した。かかる D F O は、遺伝子発現を配列特異的に阻害し得る二本鎖に組み立て得る。本発明の D F O 分子は、第 2 の領域のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する第 1 の領域を含み、第 1 の領域の配列は、標的核酸（例えば、R N A）に相補的である。D F O は、二本鎖オリゴヌクレオチドの各鎖の一部が、標的核酸配列に相補的である配列を含む、二本鎖オリゴヌクレオチドを形成し得る。

【0453】

一実施形態においては、本発明は、二本鎖オリゴヌクレオチドの 2 本の鎖が互いに共有結合せず、二本鎖オリゴヌクレオチドの各鎖が、標的核酸分子又はその一部（例えば、標的 R N A 標的）中の同じヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む、二本鎖オリゴヌクレオチドを特徴とする。別の実施形態においては、二本鎖オリゴヌクレオチドの 2 本の鎖は、少なくとも約 15、好ましくは少なくとも約 16、17、18、19、20 又は 21 ヌクレオチドの同一のヌクレオチド配列を共有する。

【0454】

一実施形態においては、本発明の D F O 分子は、式 D F O - I

【0455】

【化27】



の構造を含む。

【0456】

ここで、Z は、1 個以上の修飾ヌクレオチド（例えば、2-アミノプリン、2-アミノ-1, 6-ジヒドロプリン、汎用塩基などの修飾塩基を有するヌクレオチド）を含んでもよい、例えば偶数の約 2 から約 24 ヌクレオチド（例えば、約 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 又は 24 ヌクレオチド）長の、回文構造の核酸配列、又は反復核酸配列を含み、X は、例えば約 1 から約 21 ヌクレオチド（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又は 21 ヌクレオチド）長の、核酸配列であり、X' は、例えば配列 X 又はその一部に対するヌクレオチド配列相補性を有する約 1 及び約 21 ヌクレオチド（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又は 21 ヌクレオチド）長の、核酸配列を含み、p は、存在しても、しなくてもよい末端リン酸基を含み、配列 X と Z は、独立に、又は一緒に、標的核酸配列又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、標的核酸配列又はその一部（例えば、標的 R N A 標的）と相互作用する（例えば、塩基対形成する）のに十分な長さである。例えば、X は、標的 R N A 中のヌクレオチド配列又はその一部に相補的である、約 12 から約 21 又はそれを超える（例えば、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 又はそれを超える）ヌクレオチド長の配列を独立に含み得る。別の非限定的例においては、X が存在するときに、標的又はその一部（例えば、標的 R N A 標的）に相補的である、X と Z の一緒にヌクレオチド配列の長さは、約 12 から約 21 又はそれを超える（例えば、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 又はそれを超える）ヌクレオチドである。更に別の非限定的例においては、X が存在しないときには、標的又はその一部に相補的である Z のヌクレオチド配列の長さは、約 12 から約 24 又はそれを超える（例えば、約 12、14、16、18、20、22、24 又はそれを超える）ヌクレオチドである。一実施形態においては、X、Z 及び X' は独立に、X 及び／又は Z が、標的又はその一部（例えば、標的 R N A 標的）中のヌクレオチド配列と相互作用する（例えば、塩基対形成する）のに十分な長さのヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドである。一実施形態においては、オリゴヌクレオチド X と

X'の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとX'の長さは異なる。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとZ、又はZとX'、又はX、Z及びX'の長さは、同一であり、又は異なる。

【0457】

配列が、別の配列と相互作用する（すなわち、塩基対形成する）のに「十分な」長さであると本明細書で記述するときには、2個の配列間で形成される結合（例えば、水素結合）の数が、対象となる条件下で2個の配列が二本鎖を形成し得るのに十分であるような長さであることを意味する。かかる条件は、インビトロ（例えば、診断又はアッセイ目的）又はインビボ（例えば、治療目的）であり得る。かかる長さを決定することは簡単であり、定常的なことである。

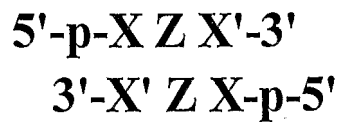
10

【0458】

一実施形態においては、本発明は、式DFO-I(a)

【0459】

【化28】



の二本鎖オリゴヌクレオチド構築物を特徴とする。

20

【0460】

ここで、Zは、1個以上の修飾ヌクレオチド（例えば、2-アミノプリン、2-アミノ-1,6-ジヒドロプリン、汎用塩基などの修飾塩基を有するヌクレオチド）を有する、例えば偶数の約2から約24ヌクレオチド（例えば、約2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22又は24ヌクレオチド）長の、回文構造の核酸配列、若しくは反復核酸配列、又は回文構造様（palindromic-like）核酸配列、若しくは反復様（repeat-like）核酸配列を含み、Xは、例えば約1から約21ヌクレオチド（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21ヌクレオチド）長の、核酸配列であり、X'は、例えば配列X又はその一部に対するヌクレオチド配列相補性を有する約1から約21ヌクレオチド（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21ヌクレオチド）長の、核酸配列を含み、pは、存在しても、しなくてもよい末端リン酸基を含み、各X及びZは、標的核酸配列又はその一部（例えば、標的RNA標的）に相補的であるヌクレオチド配列を独立に含み、その一部の標的核酸配列（例えば、標的RNA標的）と相互作用するのに十分な長さである。例えば、配列Xは、標的又はその一部（例えば、標的RNA標的）中のヌクレオチド配列に相補的である、約12から約21又はそれを超える（例えば、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21又はそれを超える）ヌクレオチド長の配列を独立に含み得る。別の実施形態においては、標的又はその一部に相補的である、（Xが存在するときの）XとZの一緒にヌクレオチド配列の長さは、約12から約21又はそれを超える（例えば、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21又はそれを超える）ヌクレオチドである。更に別の実施形態においては、Xが存在しないときには、標的又はその一部に相補的であるZのヌクレオチド配列の長さは、約12から約24又はそれを超える（例えば、約12、14、16、18、20、22、24又はそれを超える）ヌクレオチドである。一実施形態においては、X、Z及びX'は独立に、X及び／又はZが、標的又はその一部（例えば、標的RNA標的）中のヌクレオチド配列と相互作用する（例えば、塩基対形成する）のに十分な長さのヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドである。一実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとX'の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとZ、又はZとX'の長さは異なる。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとX'の長さは異なる。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとZ、又はZとX'の長さは異なる。

30

40

50

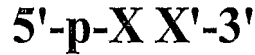
、又はX、Z及びX'の長さは、同一であり、又は異なる。一実施形態においては、式I(a)の二本鎖オリゴヌクレオチド構築物は、ミスマッチが、二本鎖オリゴヌクレオチドの標的遺伝子発現阻害能力をさほど低下させない程度に、1個以上、具体的には1、2、3又は4個のミスマッチを含む。

【0461】

一実施形態においては、本発明のDFO分子は、式DFO-I I

【0462】

【化29】



10

の構造を含む。

【0463】

ここで、各X及びX'は独立に約12ヌクレオチドから約21ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、Xは、例えば約12から約21ヌクレオチド（例えば、約12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21ヌクレオチド）長の核酸配列を含み、X'は、例えば配列X又はその一部に対してヌクレオチド配列相補性を有する約12から約21ヌクレオチド（例えば、約12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21ヌクレオチド）長の、核酸配列を含み、pは、存在しても、しなくてもよい末端リン酸基を含み、Xは、標的核酸配列（例えば、標的RNA）又はその一部に相補的であるヌクレオチド配列を含み、その一部の標的核酸配列と相互作用する（例えば、塩基対形成する）のに十分な長さである。一実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとX'の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとX'の長さは異なる。一実施形態においては、オリゴヌクレオチドX及びX'の長さは、比較的安定な二本鎖オリゴヌクレオチドを形成するのに十分である。

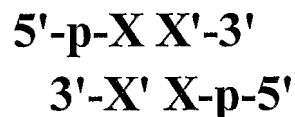
20

【0464】

一実施形態においては、本発明は、式DFO-I I(a)

【0465】

【化30】



30

の二本鎖オリゴヌクレオチド構築物を特徴とする。

【0466】

ここで、各X及びX'は独立に約12ヌクレオチドから約21ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、Xは、例えば約12から約21ヌクレオチド（例えば、約12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21ヌクレオチド）長の、核酸配列を含み、X'は、例えば配列X又はその一部に対してヌクレオチド配列相補性を有する約12から約21ヌクレオチド（例えば、約12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21ヌクレオチド）長の、核酸配列を含み、pは、存在しても、しなくてもよい末端リン酸基を含み、Xは、標的核酸配列又はその一部（例えば、標的RNA）に相補的であるヌクレオチド配列を含み、標的核酸配列（例えば、標的RNA）又はその一部と相互作用する（例えば、塩基対形成する）のに十分な長さである。一実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとX'の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドXとX'の長さは異なる。一実施形態においては、オリゴヌクレオチドX及びX'の長さは、比較的安定な二本鎖オリゴヌクレオチドを形成するのに十分である。一実施形態においては、式I I(a)の二本鎖オリゴヌクレオチド構築物は、ミスマッチが、二本鎖オリゴヌクレオチドの標的遺伝子発現阻害能力をさほど低下させない程度に、1個以上、具体的には1、2、3又は4個のミスマッチを含む。

40

50

【0467】

一実施形態においては、本発明は、式 D F O - I (b)

【0468】

【化31】



の D F O 分子を特徴とする。

【0469】

ここで、Z は、他のヌクレオチドとの塩基対形成を促進し得る、1 個以上の非標準又は修飾ヌクレオチド（例えば、2-アミノプリン、汎用塩基などの修飾塩基を有するヌクレオチド）を含んでいてもよい、回文構造の核酸配列、又は反復核酸配列を含む。Z は、例えば、標的核酸（例えば、標的 R N A）分子のヌクレオチド配列と相互作用する（例えば、塩基対形成する）のに十分な長さであり得、好ましくは少なくとも 12 ヌクレオチド長、具体的には約 12 から約 24 ヌクレオチド（例えば、約 12、14、16、18、20、22 又は 24 ヌクレオチド）長であり得る。p は、存在しても、しなくてもよい末端リン酸基である。

【0470】

一実施形態においては、式 D F O - I、D F O - I (a)、D F O - I (b)、D F O - I I (a) 又は D F O - I I のいずれかの D F O 分子は、例えば、式 I - V I I のいずれかのヌクレオチド、表 I の安定化ケミストリー、本明細書の種々の実施形態の修飾ヌクレオチドと非ヌクレオチドの任意の他の組合せなど、本明細書の化学修飾を、これらだけに限定されずに含み得る。

【0471】

一実施形態においては、式 D F O - I、D F O - I (a) 及び D F O - I (b) の D F O 構築物の Z 中の回文構造若しくは反復配列又は修飾ヌクレオチド（例えば、2-アミノプリン、汎用塩基などの修飾塩基を有するヌクレオチド）は、標的核酸配列（例えば、ワトソン クリック塩基対又は非ワトソン クリック塩基対を形成し得る修飾塩基類似体）の一部と相互作用し得る化学修飾ヌクレオチドを含む。

【0472】

一実施形態においては、本発明の D F O 分子、例えば、式 D F O - I 又は D F O - I I の D F O は、約 15 から約 40 個のヌクレオチド（例えば、約 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 又は 40 個のヌクレオチド）を含む。一実施形態においては、本発明の D F O 分子は、1 個以上の化学修飾を含む。非限定的例においては、化学修飾ヌクレオチド及び／又は非ヌクレオチドを本発明の核酸分子に導入することは、外因的に送達される無修飾 R N A 分子に固有のインビボでの安定性及び生物学的利用能の潜在的限界を克服する強力なツールとなる。例えば、化学修飾核酸分子を使用すると、化学修飾核酸分子は、血清中又は細胞若しくは組織中でより長い半減期を有する傾向にあるので、所与の治療効果に対する特定の核酸分子の用量を減少させることができる。また、ある種の化学修飾は、半減期を延長するだけでなく、特定の器官、細胞又は組織への核酸分子のターゲティングを容易にし、及び／又は核酸分子の細胞内取り込みを改善することによって、核酸分子の生物学的利用能及び／又は効力を改善することができる。したがって、化学修飾核酸分子の活性がインビトロで未変性／無修飾核酸分子よりも低い場合でも、例えば、無修飾 R N A 分子と比較したときに、分子の安定性、効力、有効期間、生物学的利用能及び／又は送達が改善されたために、修飾核酸分子の全活性が、未変性又は無修飾核酸分子よりも大きくなり得る。

【0473】

本発明の多官能又は多標的 s i N A 分子

一実施形態においては、本発明は、細胞、組織、生物体などの生体系において 1 個以上

の標的遺伝子の発現を調節する多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A）分子を含む s i N A 分子を特徴とする。本発明の多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A）分子は、標的核酸配列の 1 個を超える領域を標的にすることができ、又は 1 個を超える異なる標的核酸分子の配列（例えば、標的及び／又は経路標的の R N A 及び／又は D N A 配列）を標的にすることができる。本発明の多官能 s i N A 分子は、化学合成することができ、又は転写単位及び／又はベクターから発現させることができる。本発明の多官能 s i N A 分子は、種々のヒト用途、治療、診断、農業、獣医学、標的確認、ゲノム発見、遺伝子工学及び薬理ゲノミクスの各適用分野に有用である試薬及び方法を提供する。

【0474】

出願人は、多官能低分子干渉核酸、すなわち多官能 s i N A 分子に限定されないが、本明細書では便宜上そのように称される、ある種のオリゴヌクレオチドが、遺伝子発現の配列特異的調節の強力な媒介物質であることを本明細書で示す。本発明の多官能 s i N A 分子は、1 個以上の標的核酸分子中の異なる核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を多官能 s i N A 構築物の各鎖が含むように設計されたポリヌクレオチド分子のクラスである点で、当分野で公知である他の核酸配列（例えば、s i R N A、m i R N A、s t R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）とは異なる。したがって、本発明の単一の多官能 s i N A 分子（一般に二本鎖分子）は、1 個を超える（例えば、2、3、4、5 個又はそれを超える）異なる標的核酸分子を標的にすることができる。本発明の核酸分子は、同じ標的核酸配列の 1 個を超える（例えば、2、3、4、5 個又はそれを超える）領域を標的にすることもできる。したがって、本発明の多官能 s i N A 分子は、1 個以上の標的核酸分子の発現を下方制御又は阻害するのに有用である。1 個の多官能 s i N A 構築物を用いて 1 個を超える標的核酸分子の発現を低下させる、又は阻害することによって、本発明の多官能 s i N A 分子は、疾患（例えば、血管形成）に関係する経路内の複数の標的を同時に阻害することができる強力な治療薬のクラスである。かかる同時阻害は、別々の前臨床及び臨床開発労力や複雑な規制認可プロセスが不要である相乗的治療処置戦略をもたらし得る。

【0475】

標的核酸分子（例えば、標的 R N A 又は D N A）の 1 個を超える領域を標的にする多官能 s i N A 分子を使用すると、遺伝子発現を強力に阻害すると予想される。例えば、本発明の単一の多官能 s i N A 構築物は、標的核酸分子（例えば、標的 R N A 又は D N A）の保存領域と可変領域の両方を標的にすることができ、それによって例えば異なる標的アイソフォーム若しくは変種を下方制御若しくは阻害して、治療効力を最適化し、毒性を最小化することができ、又は標的核酸分子のコード領域と非コード領域の両方のターゲティングを可能にする。

【0476】

一般に、二本鎖オリゴヌクレオチドは、2 個の異なるオリゴヌクレオチド配列を組み立てることによって形成され、一方の鎖のオリゴヌクレオチド配列は、他方の鎖のオリゴヌクレオチド配列に相補的である。かかる二本鎖オリゴヌクレオチドは、2 個の別々のオリゴヌクレオチドから一般に組み立てられる（例えば、s i R N A）。或いは、二本鎖は、それ自体の上で折り重なる単一の分子から形成され得る（例えば、s h R N A、すなわち短鎖ヘアピン R N A）。これらの二本鎖オリゴヌクレオチドは、R N A 干渉を媒介することが当分野で知られている。これらの二本鎖オリゴヌクレオチドはすべて、一方のヌクレオチド配列領域（ガイド配列又はアンチセンス配列）のみが標的核酸配列と相補性を有し、他方の鎖（センス配列）が、標的核酸配列と相同であるヌクレオチド配列を含む、共通の特徴を有する。一般に、アンチセンス配列は、活性な R I S C 複合体中に保持され、アンチセンス配列と標的配列の相補的塩基対形成によって R I S C を標的ヌクレオチド配列に誘導して、配列特異的 R N A 干渉を媒介する。一部の細胞培養系においては、あるタイプの無修飾 s i R N A が「オフターゲット」効果を示し得ることが当分野で知られている。このオフターゲット効果は、R I S C 複合体中の s i R N A のアンチセンス配列の代わりにセンス配列の関与が必要であると仮定されている（例えば、S c h w a r z e t

a l . , 2003, Cell, 115, 199-208 参照)。この場合、センス配列は、RISC複合体を目的標的配列とは異なる配列（オフターゲット配列）に誘導し、オフターゲット配列を阻害すると考えられる。これらの二本鎖核酸分子においては、各鎖は、異なる標的核酸配列に相補的である。しかし、これらのdsRNAによって影響を受けるオフターゲットは、完全に予測可能であるわけではなく、非特異的である。

【0477】

当分野で公知の二本鎖核酸分子とは別に、出願人は、単一の多官能siNA構築物を用いて、1個を超える標的核酸配列の発現を下方制御又は阻害する、潜在的に費用効果の高い簡単な新規方法を開発した。本発明の多官能siNA分子は、多官能siNAの各鎖又は各領域の一部が、最適な標的核酸配列に相補的であるように、二本鎖又は部分的に二本鎖であるように設計されている。したがって、本発明の多官能siNA分子は、互いに相補的であるターゲティング配列に限定されず、任意の2個の異なる標的核酸配列である。本発明の多官能siNA分子は、所与の標的核酸配列に相補的である、多官能siNA分子の各鎖又は各領域が、標的核酸配列に対してRNA干渉を媒介するのに適切な長さ（例えば、約16から約28ヌクレオチド長、好ましくは約18から約28ヌクレオチド長）であるように設計されている。標的核酸配列と多官能siNAの鎖又は領域との相補性は、RNA干渉による標的核酸配列の切断に十分でなければならない（少なくとも約8塩基対）。本発明の多官能siNAは、Schwarz et al.（前掲）のものなどのある種のsiRNA配列で見られるオフターゲット効果を最小化すると予想される。

【0478】

29塩基対から36塩基対の長さのdsRNA（Tuschl他、国際公開第02/44321号）は、RNAiを媒介しないことが報告されている。これらのdsRNAが不活性である1つの理由は、恐らく、標的RNA配列と相互作用する鎖の代謝回転又は解離の欠如である。RISC複合体は、標的RNAの複数のコピーと効率的に相互作用することができず、RNAiプロセスの効力及び効率がかなり減少する。驚くべきことに、出願人は、本発明の多官能siNAが、この障害を克服することができ、RNAiプロセスの効率及び効力を増大できることを見出した。したがって、本発明のある実施形態においては、多官能siNA分子の各鎖の一部が、RNAiを効率的に媒介するのに十分な長さ（例えば、約15から約23塩基対）の標的核酸に相補的であるヌクレオチド配列領域と、標的核酸に相補的でないヌクレオチド配列領域とを含むように、約29から約36塩基対の長さの多官能siNAを設計することができる。多官能siNAの各鎖中に相補部分と非相補部分の両方を有することによって、多官能siNAは、代謝回転又は解離を妨げる（例えば、各鎖の長さが長すぎて、それぞれの標的核酸配列に対してRNAiを媒介することができない場合）ことなしに、標的核酸配列に対してRNA干渉を媒介することができる。また、内部重複領域を有する、本発明の多官能siNA分子を設計すると、多官能siNA分子は、RNA干渉を媒介するのに好都合な（小さい）サイズ、及び治療薬としての使用に適切なサイズになる（例えば、各鎖は独立に約18から約28ヌクレオチド長である。）。非限定的例を図16-28に示す。

【0479】

一実施形態においては、本発明の多官能siNA分子は、第1の領域と第2の領域を含み、多官能siNAの第1の領域は、第1の標的核酸分子の核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、多官能siNAの第2の領域は、第2の標的核酸分子の核酸配列に相補的である核酸配列を含む。一実施形態においては、本発明の多官能siNA分子は、第1の領域と第2の領域を含み、多官能siNAの第1の領域は、標的核酸分子の第1の領域の核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、多官能siNAの第2の領域は、標的核酸分子の第2の領域の核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。別の実施形態においては、多官能siNAの第1の領域と第2の領域は、ある程度の相補性（例えば、約1から約10個の相補ヌクレオチド）を共有する別々の核酸配列を含み得る。ある実施形態においては、別々の核酸配列を含む複数の多官能siNA構築物は、合成後に、当分野で公知である方法及び試薬によって容易に連結することができ、かかる連結され

た構築物は本発明の範囲内である。或いは、多官能 s i N A の第 1 の領域と第 2 の領域は、ヘアピン又はステムループ構造などのある程度の自己相補性を有する単一の核酸配列を含み得る。かかる二本鎖及びヘアピン多官能低分子干渉核酸の非限定的例をそれぞれ図 1 6 及び 1 7 に示す。これらの多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A ）は、ある種の重複ヌクレオチド配列を含んでいてもよい。かかる重複ヌクレオチド配列は、多官能 s i N A の第 1 の領域と第 2 の領域の間に存在する（例えば、図 1 8 及び 1 9 参照）。

【0480】

一実施形態においては、本発明は、多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A ）分子を特徴とする。ここで、多官能 s i N A の各鎖は、異なる標的核酸配列に相補的である核酸配列の第 1 の領域と、標的配列に相補的でないヌクレオチド配列の第 2 の領域とを独立に含む。各鎖の標的核酸配列は、同じ標的核酸分子、又は異なる標的核酸分子中に存在する。

10

【0481】

別の実施形態においては、多官能 s i N A は 2 本の鎖を含み、（a）第 1 の鎖は、標的核酸配列に対して配列相補性を有する領域（相補領域 1 ）と、標的ヌクレオチド配列に対して配列相補性を持たない領域（非相補領域 1 ）とを含み、（b）多官能 s i N A の第 2 の鎖は、第 1 の鎖のヌクレオチド配列に相補的である標的ヌクレオチド配列とは異なる標的核酸配列に対して配列相補性を有する領域（相補領域 2 ）と、相補領域 2 の標的ヌクレオチド配列に対して配列相補性を持たない領域（非相補領域 2 ）とを含み、（c）第 1 の鎖の相補領域 1 は、第 2 の鎖の非相補領域 2 中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、第 2 の鎖の相補領域 2 は、第 1 の鎖の非相補領域 1 中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。相補領域 1 と相補領域 2 の標的核酸配列は、同じ標的核酸分子、又は異なる標的核酸分子中に存在する。

20

【0482】

別の実施形態においては、多官能 s i N A は 2 本の鎖を含み、（a）第 1 の鎖は、遺伝子（例えば、第 1 の遺伝子）に由来する標的核酸配列に対して配列相補性を有する領域（相補領域 1 ）と、相補領域 1 の標的ヌクレオチド配列に対して配列相補性を持たない領域（非相補領域 1 ）とを含み、（b）多官能 s i N A の第 2 の鎖は、相補領域 1 の遺伝子とは異なる遺伝子（例えば、第 2 の遺伝子）に由来する標的核酸配列に対して配列相補性を有する領域（相補領域 2 ）と、相補領域 2 の標的ヌクレオチド配列に対して配列相補性を持たない領域（非相補領域 2 ）とを含み、（c）第 1 の鎖の相補領域 1 は、第 2 の鎖の非相補領域 2 中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、第 2 の鎖の相補領域 2 は、第 1 の鎖の非相補領域 1 中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。

30

【0483】

別の実施形態においては、多官能 s i N A は 2 本の鎖を含み、（a）第 1 の鎖は、遺伝子（例えば、遺伝子）に由来する標的核酸配列に対して配列相補性を有する領域（相補領域 1 ）と、相補領域 1 の標的ヌクレオチド配列に対して配列相補性を持たない領域（非相補領域 1 ）とを含み、（b）多官能 s i N A の第 2 の鎖は、相補領域 1 の標的核酸配列とは異なる標的核酸配列に対して配列相補性を有する領域（相補領域 2 ）（ただし、相補領域 1 の標的核酸配列と相補領域 2 の標的核酸配列はどちらも同じ遺伝子に由来する。）と、相補領域 2 の標的ヌクレオチド配列に対して配列相補性を持たない領域（非相補領域 2 ）とを含み、（c）第 1 の鎖の相補領域 1 は、第 2 の鎖の非相補領域 2 中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、第 2 の鎖の相補領域 2 は、第 1 の鎖の非相補領域 1 中のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。

40

【0484】

一実施形態においては、本発明は、2 個の相補核酸配列を含む、多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A ）分子を特徴とする。ここで、第 1 の配列は、第 1 の標的核酸分子内のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する第 1 の領域を含み、第 2 の配列は、同じ標的核酸分子内の異なるヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する第 1 の領域を含む。好ましくは、第 1 の配列の第 1 の領域は、第 2 の配列の第 2 の

50

領域のヌクレオチド配列にも相補的であり、第2の配列の第1の領域は、第1の配列の第2の領域のヌクレオチド配列に相補的である。

【0485】

一実施形態においては、本発明は、2個の相補核酸配列を含む、多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A）分子を特徴とする。ここで、第1の配列は、第1の標的核酸分子内のヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する第1の領域を含み、第2の配列は、第2の標的核酸分子内の異なるヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する第1の領域を含む。好ましくは、第1の配列の第1の領域は、第2の配列の第2の領域のヌクレオチド配列にも相補的であり、第2の配列の第1の領域は、第1の配列の第2の領域のヌクレオチド配列に相補的である。

10

【0486】

一実施形態においては、本発明は、第1の領域と第2の領域を含む多官能 s i N A 分子を特徴とする。ここで、第1の領域は、第1の標的核酸分子内の核酸配列に相補的である約18から約28ヌクレオチドを有する核酸配列を含み、第2の領域は、第2の標的核酸分子内の異なる核酸配列に相補的である約18から約28ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む。

【0487】

一実施形態においては、本発明は、第1の領域と第2の領域を含む多官能 s i N A 分子を特徴とする。ここで、第1の領域は、標的核酸分子内の核酸配列に相補的である約18から約28ヌクレオチドを有する核酸配列を含み、第2の領域は、同じ標的核酸分子内の異なる核酸配列に相補的である約18から約28ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む。

20

【0488】

一実施形態においては、本発明は、一方の鎖が、第1の標的核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する第1の領域を含み、他方の鎖が、第2の標的核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する第1の領域を含む、二本鎖多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A）分子を特徴とする。第1と第2の標的核酸配列は、別々の標的核酸分子中に存在し得、又は同じ標的核酸分子内の異なる領域であり得る。したがって、本発明の多官能 s i N A 分子を用いて、異なる遺伝子、同じ遺伝子のスプライスバリエント、1個以上の遺伝子転写物の変異領域と保存領域の両方、又は同じ若しくは異なる遺伝子若しくは遺伝子転写物のコード配列と非コード配列の両方の発現を標的にすることができる。

30

【0489】

一実施形態においては、本発明の標的核酸分子は、単一のタンパク質をコードする。別の実施形態においては、標的核酸分子は、1個を超えるタンパク質（例えば、1、2、3、4、5個又はそれを超えるタンパク質）をコードする。したがって、本発明の多官能 s i N A 構築物を用いて、幾つかのタンパク質の発現を下方制御又は阻害することができる。例えば、標的に由来する第1の標的核酸配列に対してヌクレオチド配列相補性を有する1本の鎖中の領域を含む多官能 s i N A 分子、及び2個のタンパク質（例えば、2種類の異なるタンパク質）をコードする遺伝子に由来する標的核酸分子中に存在する第2の標的核酸配列に対してヌクレオチド配列相補性を有する領域を含む第2の鎖。これを使用して、複数の経路標的遺伝子を標的にすることによって、特定の生物学的経路を下方制御、阻害又は遮断することができる。

40

【0490】

一実施形態においては、本発明は、異なる遺伝子変種中に存在する保存ヌクレオチド配列を利用する。一方の鎖が、種々の標的遺伝子ファミリーメンバー間で保存された1個以上の標的核酸配列に相補的である配列を含み、他方の鎖が、経路標的核酸配列に相補的である配列を含んでもよいように、多官能 s i N A を設計することによって、単一の多官能 s i N A を用いて、遺伝子疾患に関係する標的生物学的経路を選択的かつ効果的に阻害することができる。

【0491】

50

一実施形態においては、本発明の多官能低分子干渉核酸（多官能 s i N A）は、第 1 の領域と第 2 の領域を含み、第 1 の領域は、第 1 の標的の第 1 の標的 R N A に相補的であるヌクレオチド配列を含み、第 2 の領域は、第 2 の標的の第 2 の標的 R N A に相補的であるヌクレオチド配列を含む。一実施形態においては、第 1 と第 2 の領域は、同じ標的配列内の異なる標的部位の共有若しくは保存 R N A 配列、又は異なる標的配列間の共有 R N A 配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み得る。

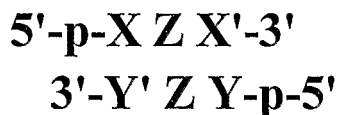
【0492】

一実施形態においては、本発明の二本鎖多官能 s i N A 分子は、式 M F - I

【0493】

【化32】

10



の構造を含む。

【0494】

ここで、各 5' - p - X Z X' - 3' 及び 5' - p - Y Z Y' - 3' は独立に、約 20 ヌクレオチドから約 300 ヌクレオチド長、好ましくは約 20 から約 200 ヌクレオチド長、約 20 から約 100 ヌクレオチド長、約 20 から約 40 ヌクレオチド長、約 20 から約 40 ヌクレオチド長、約 24 から約 38 ヌクレオチド長、又は約 26 から約 38 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、X Z は、第 1 の標的核酸配列に相補的である核酸配列を含み、Y Z は、第 2 の標的核酸配列に相補的である核酸配列を含むオリゴヌクレオチドであり、Z は、自己相補的である約 1 から約 24 ヌクレオチド（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 又は 24 ヌクレオチド）長のヌクレオチド配列を含み、X は、領域 Y' 中に存在するヌクレオチド配列に相補的である、約 1 から約 100 ヌクレオチド長、好ましくは約 1 から約 21 ヌクレオチド（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又は 21 ヌクレオチド）長のヌクレオチド配列を含み、Y は、領域 X' 中に存在するヌクレオチド配列に相補的である、約 1 から約 100 ヌクレオチド長、好ましくは約 1 から約 21 ヌクレオチド（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又は 21 ヌクレオチド）長のヌクレオチド配列を含み、各 p は、独立に存在する、又は存在しない末端リン酸基を含み、各 X Z 及び Y Z は独立に、それぞれ第 1 及び第 2 の標的核酸配列又はその一部と安定に相互作用する（すなわち、塩基対形成する）のに十分な長さである。例えば、各配列 X 及び Y は、標的 R N A 又はその一部など、異なる標的核酸分子中の標的ヌクレオチド配列に相補的である、約 12 から約 21 又はそれを超える（例えば、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 又はそれを超える）ヌクレオチド長の配列を独立に含み得る。別の非限定的例においては、第 1 の標的核酸配列又はその一部に相補的である、X と Z の一緒のヌクレオチド配列の長さは、約 12 から約 21 又はそれを超える（例えば、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 又はそれを超える）ヌクレオチドである。別の非限定的例においては、第 2 の標的核酸配列又はその一部に相補的である、Y と Z の一緒のヌクレオチド配列の長さは、約 12 から約 21 又はそれを超える（例えば、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 又はそれを超える）ヌクレオチドである。一実施形態においては、第 1 の標的核酸配列と第 2 の標的核酸配列は、同じ標的核酸分子（例えば、標的 R N A 又は経路標的 R N A）中に存在する。別の実施形態においては、第 1 の標的核酸配列と第 2 の標的核酸配列は、異なる標的核酸分子（例えば、標的 R N A と経路標的 R N A）中に存在する。一実施形態においては、Z は回文構造又は反復配列を含む。一実施形態においては、オリゴヌクレオチド X と X'

20

30

40

50

の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチド X と X' の長さは異なる。一実施形態においては、オリゴヌクレオチド Y と Y' の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチド Y と Y' の長さは異なる。一実施形態においては、式 I (a) の二本鎖オリゴヌクレオチド構築物は、ミスマッチが、二本鎖オリゴヌクレオチドの標的遺伝子発現阻害能力をさほど低下させない程度に、1 個以上、具体的には 1、2、3 又は 4 個のミスマッチを含む。

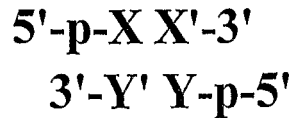
【0495】

一実施形態においては、本発明の多官能 siNA 分子は、式 MF-I I

【0496】

【化33】

10



の構造を含む。

【0497】

ここで、5'-p-XX'-3' 及び 5'-p-YY'-3' は独立に、約 20 ヌクレオチドから約 300 ヌクレオチド長、好ましくは約 20 から約 200 ヌクレオチド長、約 20 から約 100 ヌクレオチド長、約 20 から約 40 ヌクレオチド長、約 20 から約 40 ヌクレオチド長、約 24 から約 38 ヌクレオチド長、又は約 26 から約 38 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、X は、第 1 の標的核酸配列に相補的である核酸配列を含み、Y は、第 2 の標的核酸配列に相補的である核酸配列を含むオリゴヌクレオチドであり、X は、領域 Y' 中に存在するヌクレオチド配列に相補的である、約 1 から約 100 ヌクレオチド長、好ましくは約 1 から約 21 ヌクレオチド（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又は 21 ヌクレオチド）長のヌクレオチド配列を含み、Y は、領域 X' 中に存在するヌクレオチド配列に相補的である、約 1 から約 100 ヌクレオチド長、好ましくは約 1 から約 21 ヌクレオチド（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又は 21 ヌクレオチド）長のヌクレオチド配列を含み、各 p は、独立に存在する、又は存在しない末端リン酸基を含み、各 X 及び Y は独立に、それぞれ第 1 及び第 2 の標的核酸配列又はその一部と安定に相互作用する（すなわち、塩基対形成する）のに十分な長さである。例えば、各配列 X 及び Y は、標的 RNA 又はその一部など、異なる標的核酸分子中の標的ヌクレオチド配列に相補的である、約 12 から約 21 又はそれを超える（例えば、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 又はそれを超える）ヌクレオチド長の配列を独立に含み得る。一実施形態においては、第 1 の標的核酸配列と第 2 の標的核酸配列は、同じ標的核酸分子（例えば、標的 RNA 又は経路標的 RNA）中に存在する。別の実施形態においては、第 1 の標的核酸配列と第 2 の標的核酸配列は、異なる標的核酸分子（例えば、標的 RNA と経路標的 RNA）中に存在する。一実施形態においては、Z は回文構造又は反復配列を含む。一実施形態においては、オリゴヌクレオチド X と X' の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチド X と X' の長さは異なる。一実施形態においては、オリゴヌクレオチド Y と Y' の長さは同一である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチド Y と Y' の長さは異なる。一実施形態においては、式 I (a) の二本鎖オリゴヌクレオチド構築物は、ミスマッチが、二本鎖オリゴヌクレオチドの標的遺伝子発現阻害能力をさほど低下させない程度に、1 個以上、具体的には 1、2、3 又は 4 個のミスマッチを含む。

【0498】

一実施形態においては、本発明の多官能 siNA 分子は、式 MF-I I I

【0499】

50

【化 3 4】



の構造を含む。

【0500】

ここで、各X、X'、Y及びY'は独立に、約15ヌクレオチドから約50ヌクレオチド長、好ましくは約18から約40ヌクレオチド長、又は約19から約23ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、Xは、領域Y'中に存在するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、X'は、領域Y中に存在するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、各X及びX'は独立に、それぞれ第1及び第2の標的核酸配列又はその一部と安定に相互作用する（すなわち、塩基対形成する）のに十分な長さであり、Wは、配列Y'とYを連結するヌクレオチド又は非ヌクレオチドリinkerであり、多官能 siNAは、RNA干渉によって第1の標的配列と第2の標的配列の切断を誘導する。一実施形態においては、第1の標的核酸配列と第2の標的核酸配列は、同じ標的核酸分子（例えば、標的RNA又は経路標的RNA）中に存在する。別の実施形態においては、第1の標的核酸配列と第2の標的核酸配列は、異なる標的核酸分子（例えば、標的RNAと経路標的RNA）中に存在する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の3'末端を配列Yの3'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の3'末端を配列Yの5'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の5'末端を配列Yの5'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の5'末端を配列Yの3'末端と連結する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Xの5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列X'の5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Yの5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Y'の5'末端に存在する。一実施形態においては、Wは、生分解性リンカーを介して配列YとY'を連結する。一実施形態においては、Wは、抱合体、標識、アプタマー、リガンド、脂質又はポリマーを更に含む。

【0501】

一実施形態においては、本発明の多官能 siNA分子は、式MF-IV

【0502】

【化 3 5】



の構造を含む。

【0503】

ここで、各X、X'、Y及びY'は独立に、約15ヌクレオチドから約50ヌクレオチド長、好ましくは約18から約40ヌクレオチド長、又は約19から約23ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、Xは、領域Y'中に存在するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、X'は、領域Y中に存在するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、各Y及びY'は独立に、それぞれ第1及び第2の標的核酸配列又はその一部と安定に相互作用する（すなわち、塩基対形成する）のに十分な長さであり、Wは、配列Y'とYを連結するヌクレオチド又は非ヌクレオチドリinkerであり、多官能 siNAは、RNA干渉によって第1の標的配列と第2の標的配列の切断を誘導する。一実施形態においては、第1の標的核酸配列と第2の標的核酸配列は、同じ標的核酸分子中に存在する。別の実施形態においては、第1の標的核酸配列と第2の標的核酸配列は、異なる標的核酸分子中に存在する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の3'末端を配列Yの3'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の

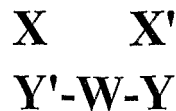
3'末端を配列Yの5'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の5'末端を配列Yの5'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の5'末端を配列Yの3'末端と連結する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Xの5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列X'の5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Yの5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Y'の5'末端に存在する。一実施形態においては、Wは、生分解性リンカーを介して配列YとY'を連結する。一実施形態においては、Wは、抱合体、標識 (l a b l e)、アプタマー、リガンド、脂質又はポリマーを更に含む。

【0504】

一実施形態においては、本発明の多官能 s i N A 分子は、式 M F - V

【0505】

【化36】



の構造を含む。

【0506】

ここで、各X、X'、Y及びY'は独立に、約15ヌクレオチドから約50ヌクレオチド長、好ましくは約18から約40ヌクレオチド長、又は約19から約23ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、Xは、領域Y'中に存在するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、X'は、領域Y中に存在するヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、各X、X'、Y又はY'は独立に、それぞれ第1、第2、第3又は第4の標的核酸配列又はその一部と安定に相互作用する（すなわち、塩基対形成する）のに十分な長さであり、Wは、配列Y'とYを連結するヌクレオチド又は非ヌクレオチドリinkerであり、多官能 s i N A は、RNA干渉によって第1、第2、第3及び／又は第4の標的配列の切断を誘導する。一実施形態においては、第1、第2、第3及び第4の標的核酸配列はすべて同じ標的核酸分子（例えば、標的RNA又は経路標的RNA）中に存在する。別の実施形態においては、第1、第2、第3及び第4の標的核酸配列は、異なる標的核酸分子（例えば、標的RNA及び経路標的RNA）中に独立に存在する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の3'末端を配列Yの3'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の3'末端を配列Yの5'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の5'末端を配列Yの5'末端と連結する。一実施形態においては、領域Wは、配列Y'の5'末端を配列Yの3'末端と連結する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Xの5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列X'の5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Yの5'末端に存在する。一実施形態においては、末端リン酸基は、配列Y'の5'末端に存在する。一実施形態においては、Wは、生分解性リンカーを介して配列YとY'を連結する。一実施形態においては、Wは、抱合体、標識、アプタマー、リガンド、脂質又はポリマーを更に含む。

【0507】

一実施形態においては、（例えば、式M F - I からM F - V のいずれかの）本発明の多官能 s i N A 分子の領域XとYは、同じ標的核酸分子の一部である異なる標的核酸配列に相補的である。一実施形態においては、かかる各標的核酸配列は、RNA転写物のコード領域内の異なる場所に存在する。一実施形態においては、かかる各標的核酸配列は、同じRNA転写物のコード及び非コード領域を含む。一実施形態においては、かかる各標的核酸配列は、交互にスプライスされた転写物の領域、又はかかる交互にスプライスされた転写物の前駆体の領域を含む。

【0508】

10

20

30

40

50

一実施形態においては、式MF-IからMF-Vのいずれかの多官能s i N A分子は、例えば、本明細書の式I-V I Iのいずれかのヌクレオチド、表Iの安定化ケミストリー、本明細書の種々の実施形態の修飾ヌクレオチドと非ヌクレオチドの任意の他の組合せなど、本明細書の化学修飾を、これらだけに限定されずに含み得る。

【0509】

一実施形態においては、式MF-I又はMF-I Iの多官能s i N A構築物のZ中の回文構造若しくは反復配列又は修飾ヌクレオチド（例えば、2-アミノプリン、汎用塩基などの修飾塩基を有するヌクレオチド）は、標的核酸配列（例えば、ワトソン クリック塩基対又は非ワトソン クリック塩基対を形成し得る修飾塩基類似体）の一部と相互作用し得る化学修飾ヌクレオチドを含む。

【0510】

一実施形態においては、本発明の多官能s i N A分子、例えばMF-IからMF-Vの多官能s i N Aの各鎖は、約15から約40個のヌクレオチド（例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40個のヌクレオチド）を独立に含む。一実施形態においては、本発明の多官能s i N A分子は、1個以上の化学修飾を含む。非限定的例においては、化学修飾ヌクレオチド及び／又は非ヌクレオチドを本発明の核酸分子に導入することは、外因的に送達される無修飾RNA分子に固有のインビボでの安定性及び生物学的利用能の潜在的限界を克服する強力なツールとなる。例えば、化学修飾核酸分子を使用すると、化学修飾核酸分子は、血清中又は細胞若しくは組織中でより長い半減期を有する傾向にあるので、所与の治療効果に対する特定の核酸分子の用量を減少させることができる。また、ある種の化学修飾は、半減期を延長するだけでなく、特定の器官、細胞又は組織への核酸分子のターゲティングを容易にし、及び／又は核酸分子の細胞内取り込みを改善することによって、核酸分子の生物学的利用能及び／又は効力を改善することができる。したがって、化学修飾核酸分子の活性がインビトロで未変性／無修飾核酸分子よりも低い場合でも、例えば、無修飾RNA分子と比較したときに、分子の安定性、効力、有効期間、生物学的利用能及び／又は送達が改善されたために、修飾核酸分子の全活性が、未変性又は無修飾核酸分子よりも大きくなり得る。

【0511】

別の実施形態においては、本発明は、2本の別々の二本鎖s i N Aから組み立てられ、2本のアンチセンスs i N A鎖が、一端で互いに繋留されたその対応するセンス鎖とアニールされるように、各センス鎖の末端の一方が、他方のs i N A分子のセンス鎖の末端に繋留された、多官能s i N Aを特徴とする（図22参照）。繋留鎖（tether）又はリンカーは、当分野で一般に公知であり、本明細書に記載された、ヌクレオチドリンカー又は非ヌクレオチドリンカーであり得る。

【0512】

一実施形態においては、本発明は、2本の別々の二本鎖s i N Aから組み立てられ、2本のアンチセンスs i N A鎖の5'末端が、互いに（反対方向に）離れた位置で、一端で互いに繋留されたその対応するセンス鎖とアニールされるように、s i N Aの1本のセンス鎖の5'末端が、他方のs i N A分子のセンス鎖の5'末端に繋留された、多官能s i N Aを特徴とする（図22（A）参照）。繋留鎖又はリンカーは、当分野で一般に公知であり、本明細書に記載された、ヌクレオチドリンカー又は非ヌクレオチドリンカーであり得る。

【0513】

一実施形態においては、本発明は、2本の別々の二本鎖s i N Aから組み立てられ、2本のアンチセンスs i N A鎖の5'末端が、向かい合って、一端で互いに繋留されたその対応するセンス鎖とアニールされるように、s i N Aの1本のセンス鎖の3'末端が、他方のs i N A分子のセンス鎖の3'末端に繋留された、多官能s i N Aを特徴とする（図22（B）参照）。繋留鎖又はリンカーは、当分野で一般に公知であり、本明細書に記載された、ヌクレオチドリンカー又は非ヌクレオチドリンカーであり得る。

【0514】

一実施形態においては、本発明は、2本の別々の二本鎖 s i N A から組み立てられ、アンチセンス s i N A 鎖の一方の 5' 末端が、他方のアンチセンス鎖の 3' 末端と向かい合っ
て、一端で互いに繋留されたその対応するセンス鎖とアニールされるように、s i N A の 1 本の
センス鎖の 5' 末端が、他方の s i N A 分子のセンス鎖の 3' 末端に繋留された、多官能 s i N A
を特徴とする（図 22（C-D）参照）。繋留鎖又はリンカーは、当分野で一般に公知であり、
本明細書に記載された、ヌクレオチドリinker又は非ヌクレオチドリinkerであり得る。

【0515】

一実施形態においては、本発明は、2本の別々の二本鎖 s i N A から組み立てられ、セ
ンス s i N A 鎖の一方の 5' 末端が、他方のセンス鎖の 3' 末端と向かい合っ
て、一端で互いに繋留されたその対応するアンチセンス鎖とアニールされるように、s i N A の 1 本の
アンチセンス鎖の 5' 末端が、他方の s i N A 分子のアンチセンス鎖の 3' 末端に繋留
された、多官能 s i N A を特徴とする（図 22（G-H）参照）。一実施形態においては
、第 1 のアンチセンス鎖の 5' 末端と第 2 のアンチセンス鎖の 3' 末端との結合は、容易
に切断されて（例えば、生分解性リンカー）、多官能 s i N A の各アンチセンス鎖の 5'
末端が、RNA 干渉による標的 RNA の切断を媒介するのに適切な遊離 5' 末端を有する
ように設計される。繋留鎖又はリンカーは、当分野で一般に公知であり、本明細書に記載
された、ヌクレオチドリinker又は非ヌクレオチドリinkerであり得る。

【0516】

一実施形態においては、本発明は、2本の別々の二本鎖 s i N A から組み立てられ、セ
ンス s i N A 鎖の一方の 3' 末端が、他方のセンス鎖の 3' 末端と向かい合っ
て、一端で互いに繋留されたその対応するアンチセンス鎖とアニールされるように、s i N A の 1 本の
アンチセンス鎖の 5' 末端が、他方の s i N A 分子のアンチセンス鎖の 5' 末端に繋留
された、多官能 s i N A を特徴とする（図 22（E）参照）。一実施形態においては、第
1 のアンチセンス鎖の 5' 末端と第 2 のアンチセンス鎖の 5' 末端との結合は、容易に切
断されて（例えば、生分解性リンカー）、多官能 s i N A の各アンチセンス鎖の 5' 末端
が、RNA 干渉による標的 RNA の切断を媒介するのに適切な遊離 5' 末端を有するよう
に設計される。繋留鎖又はリンカーは、当分野で一般に公知であり、本明細書に記載され
た、ヌクレオチドリinker又は非ヌクレオチドリinkerであり得る。

【0517】

一実施形態においては、本発明は、2本の別々の二本鎖 s i N A から組み立てられ、セ
ンス s i N A 鎖の一方の 5' 末端が、他方のセンス鎖の 3' 末端と向かい合っ
て、一端で互いに繋留されたその対応するアンチセンス鎖とアニールされるように、s i N A の 1 本の
アンチセンス鎖の 3' 末端が、他方の s i N A 分子のアンチセンス鎖の 3' 末端に繋留
された、多官能 s i N A を特徴とする（図 22（F）参照）。一実施形態においては、第
1 のアンチセンス鎖の 5' 末端と第 2 のアンチセンス鎖の 5' 末端との結合は、容易に切
断されて（例えば、生分解性リンカー）、多官能 s i N A の各アンチセンス鎖の 5' 末端
が、RNA 干渉による標的 RNA の切断を媒介するのに適切な遊離 5' 末端を有するよう
に設計される。繋留鎖又はリンカーは、当分野で一般に公知であり、本明細書に記載され
た、ヌクレオチドリinker又は非ヌクレオチドリinkerであり得る。

【0518】

上記実施形態のいずれにおいても、第 1 の標的核酸配列又は第 2 の標的核酸配列は、標
的 RNA、DNA 又はその一部を独立に含み得る。一実施形態においては、第 1 の標的核
酸配列は、標的 RNA、DNA 又はその一部であり、第 2 の標的核酸配列はその一部の標
的 RNA、DNA である。一実施形態においては、第 1 の標的核酸配列は、標的 RNA、
DNA 又はその一部であり、第 2 の標的核酸配列はその一部の別の RNA、DNA である

。

【0519】

核酸分子の合成

100ヌクレオチド長よりも大きい核酸の合成は、自動化された方法では困難であり、かかる分子の治療コストは法外である。本発明では、低分子核酸モチーフ（「低分子」とは、100ヌクレオチド長以下、好ましくは80ヌクレオチド長以下、最も好ましくは50ヌクレオチド長以下の核酸モチーフ、例えば、個々のs i N Aオリゴヌクレオチド配列、又はタンデム合成されたs i N A配列を指す。）は、外因的な送達に好ましくは使用される。これらの分子の構造が簡単であると、タンパク質及び／又はRNA構造の標的領域に侵入する核酸の能力が増大する。本発明の例示的な分子は化学合成され、他の分子も同様に合成することができる。

【0520】

オリゴヌクレオチド（例えば、ある種の修飾オリゴヌクレオチド、又はリボヌクレオチドを欠くオリゴヌクレオチドの部分）は、当分野で公知のプロトコルによって、例えば、Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19、Thompson他、国際公開第99/54459号、Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684、Wincott et al., 1997, Methods Mol. Biol., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45及びBrennan、米国特許第6,001,311号に記載したとおりに、合成される。これらの参考文献のすべてを参照により本明細書に組込む。オリゴヌクレオチドの合成は、5'末端におけるジメトキシトリチル、3'末端におけるホスホルアミダイトなどの一般的な核酸保護基及びカップリング基を利用する。非限定的例においては、394 Applied Biosystems, Inc. 合成装置を用いて、2'-O-メチル化ヌクレオチドに対する2.5分間のカップリング段階、及び2'-デオキシヌクレオチド又は2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドに対する45秒間のカップリング段階を含む、0.2 µmol 規模のプロトコルによって、小規模合成を実施する。表IIIは、合成サイクルに使用する試薬の量及び接触時間の概略である。或いは、0.2 µmol 規模の合成を、Protogene (Palo Alto, CA) 製装置などの96ウェルプレート合成装置を用いて、サイクルを最小限度に変更して、実施することができる。ポリマーに結合した5'ヒドロキシルを基準として、33倍過剰（0.11 M 60 µL = 6.6 µmol）の2'-O-メチルホスホルアミダイト及び105倍過剰のS-エチルテトラゾール（0.25 M 60 µL = 15 µmol）を、2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルに使用することができる。ポリマーに結合した5'ヒドロキシルを基準として、22倍過剰（0.11 M 40 µL = 4.4 µmol）のデオキシホスホルアミダイト及び70倍過剰のS-エチルテトラゾール（0.25 M 40 µL = 10 µmol）を、デオキシ残基の各カップリングサイクルに使用することができる。トリチル画分の比色定量によって求められる394 Applied Biosystems, Inc. 合成装置による平均カップリング収率は、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成装置用の他のオリゴヌクレオチド合成試薬としては、以下のものが挙げられる。脱トリチル化溶液は、3% TCAの塩化メチレン溶液（ABI）である。キャッピングは、16% N-メチルイミダゾールのTHF溶液（ABI）及び10%無水酢酸／10% 2,6-ルチジンのTHF溶液（ABI）を用いて行われる。酸化溶液は、16.9 mM I₂、49 mMピリジン、9%水のTHF溶液（PerSeptive Biosystems, Inc.）である。Burdick & Jackson Synthesis Gradeアセトニトリルを試薬瓶から直接使用する。S-エチルテトラゾール溶液（0.25 Mアセトニトリル溶液）をAmerican International Chemical, Inc. から入手した固体から調製する。或いは、ホスホロチオアート結合を導入するために、Beaueage試薬（3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド、0.05 Mアセトニトリル溶液）を使用する。

【0521】

DNAを主体にしたオリゴヌクレオチドの脱保護を以下のように実施する。ポリマーに結合したトリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4mLガラスねじぶた付きバイアルに移し、40%メチルアミン水溶液(1mL)の溶液に65℃で10分間懸濁させる。−20℃に冷却後、上清をポリマー支持体から除去する。支持体をEtOH:MeCN:H₂O/3:1:1 1.0mLで3回洗浄し、ボルテックス攪拌し、次いで上清を第1の上清に添加する。オリゴリボヌクレオチドを含む混合上清を乾燥させて白色粉末にする。一実施形態においては、参照によりその全体を本明細書に組込む、米国特許第6,995,259号、同6,686,463号、同6,673,918号、同6,649,751号、同6,989,442号及び米国特許出願第10/190,359号の方法によって、本発明の核酸分子を合成し、脱保護し、分析する。

10

【0522】

本発明のある種のsiNA分子を含めたRNAに対して用いられる合成方法は、Usman et al., 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe et al., 1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433及びWincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684 Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59の順に従い、5'末端におけるジメトキシトリチル、3'末端におけるホスホルアミダイトなどの一般的な核酸保護基及びカップリング基を利用する。非限定的例においては、394 Applied Biosystems, Inc. 合成装置を用いて、アルキルシリルで保護されたヌクレオチドに対する7.5分間のカップリング段階、及び2'-O-メチル化ヌクレオチドに対する2.5分間のカップリング段階を含む、0.2 μmol規模のプロトコルによって、小規模合成を実施する。表IIIは、合成サイクルに使用する試薬の量及び接触時間の概略である。或いは、0.2 μmol規模の合成を、Protogene (Palo Alto, CA) 製装置などの96ウェルプレート合成装置を用いて、サイクルを最小限度に変更して、実施することができる。ポリマーに結合した5'ヒドロキシルを基準として、33倍過剰(0.11M 60 μL=6.6 μmol)の2'-O-メチルホスホルアミダイト及び75倍過剰のS-エチルテトラゾール(0.25M 60 μL=15 μmol)を、2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルに使用することができる。ポリマーに結合した5'ヒドロキシルを基準として、66倍過剰(0.11M 120 μL=13.2 μmol)の、アルキルシリル(リボ)で保護されたホスホルアミダイト、及び150倍過剰のS-エチルテトラゾール(0.25M 120 μL=30 μmol)を、リボ残基の各カップリングサイクルに使用することができる。トリチル画分の比色定量によって求められる394 Applied Biosystems, Inc. 合成装置による平均カップリング収率は、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成装置用の他のオリゴヌクレオチド合成試薬としては、以下のものが挙げられる。脱トリチル化溶液は、3%TCAの塩化メチレン溶液(ABI)である。キャッピングは、16%N-メチルイミダゾールのTHF溶液(ABI)及び10%無水酢酸/10%2,6-ルチジンのTHF溶液(ABI)を用いて行われる。酸化溶液は、16.9mM I₂、49mMピリジン、9%水のTHF溶液(PerSeptive Biosystems, Inc.)である。Burdick & Jackson Synthesis Grade アセトニトリルを試薬瓶から直接使用する。S-エチルテトラゾール溶液(0.25Mアセトニトリル溶液)をAmerican International Chemical, Inc. から入手した固体から調製する。或いは、ホスホロチオアート結合を導入するために、Beaucage試薬(3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシド、0.05Mアセトニトリル溶液)を使用する。

20

30

40

【0523】

RNAの脱保護は、2ポット(two-pot)又は1ポット(one-pot)プロトコルによって実施される。2ポットプロトコルの場合、ポリマーに結合したトリチルオ

50

ンオリゴリボヌクレオチドを4 mLガラスねじぶた付きバイアルに移し、40%メチルアミン水溶液(1 mL)の溶液に65℃で10分間懸濁させる。−20℃に冷却後、上清をポリマー支持体から除去する。支持体をEtOH:MeCN:H₂O/3:1:1 1.0 mLで3回洗浄し、ボルテックス攪拌し、次いで上清を第1の上清に添加する。オリゴリボヌクレオチドを含む混合上清を乾燥させて白色粉末にする。塩基で脱保護されたオリゴリボヌクレオチドを無水TEA/HF/NMP溶液(N-メチルピロリジノン1.5 mL、TEA 750 μL及びTEA・3HF 1 mLの溶液300 μLで1.4 M HF濃度にする。)に再懸濁させ、65℃に加熱する。1.5時間後、オリゴマーを1.5 M NH₄HCO₃でクエンチする。一実施形態においては、参照によりその全体を本明細書に組込む、米国特許第6,995,259号、同6,686,463号、同6,673,918号、同6,649,751号、同6,989,442号及び米国特許出願第10/190,359号の方法によって、本発明の核酸分子を合成し、脱保護し、分析する。

【0524】

或いは、1ポットプロトコルの場合、ポリマーに結合したトリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mLガラスねじぶた付きバイアルに移し、33%エタノール性メチルアミン/DMSO:1/1(0.8 mL)の溶液に65℃で15分間懸濁させる。バイアルを室温にし、TEA・3HF(0.1 mL)を添加し、バイアルを65℃で15分間加熱する。試料を−20℃に冷却し、次いで1.5 M NH₄HCO₃でクエンチする。

【0525】

トリチルオンオリゴマーを精製する場合、クエンチしたNH₄HCO₃溶液を、アセトニトリル、続いて50 mM TEAAで予洗したC-18含有カートリッジに充填する。充填されたカートリッジを水で洗浄後、RNAを0.5% TFAで13分間脱トリチル化する。次いで、カートリッジを水で再洗浄し、塩を1 M NaClで交換し、水で再洗浄する。次いで、オリゴヌクレオチドを30%アセトニトリルで溶出させる。

【0526】

平均段階的カップリング収率は、典型的には>98%である(Wincott et al., 1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684)。当業者は、96ウェル形式を含めて、ただしこれだけに限定されない、上記例よりも大きい、又は小さい合成規模を適合させることができる。

【0527】

或いは、本発明の核酸分子は、別々に合成し、合成後に、例えばライゲーション(More et al., 1992, Science 256, 9923; Draper 他、国際公開第93/23569号; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204)によって、又は合成及び/又は脱保護後のハイブリダイゼーションによって、連結することができる。

【0528】

本発明のsiNA分子は、本明細書の実施例1のタンデム合成法によって合成することもできる。ここで、両方のsiNA鎖は、切断可能なリンカーによって分離された単一の隣接オリゴヌクレオチド断片又は鎖として合成される。続いて、切断可能なリンカーを切断して、別々のsiNA断片又は鎖を生成する。別々のsiNA断片又は鎖は、ハイブリッド形成し、siNA二本鎖の精製が可能になる。リンカーは、ポリヌクレオチドリンカーでも、非ヌクレオチドリンカーでもよい。本明細書に記載するsiNAのタンデム合成は、96ウェルなどのマルチウェル/マルチプレート合成プラットフォーム、又は同様により大きいマルチウェルプラットフォームに容易に適合させることができる。本明細書に記載するsiNAのタンデム合成は、回分式反応装置、合成カラムなどを使用した大規模合成プラットフォームに容易に適合させることもできる。

【0529】

s i N A分子は、一方の断片がセンス領域を含み、他方の断片がR N A分子のアンチセンス領域を含む、2個の異なる核酸鎖又は断片から組み立てることもできる。

【0530】

本発明の核酸分子は、ヌクレアーゼに耐性のある基、例えば、2'-アミノ、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-Hで修飾することによって、徹底して修飾して、安定性を高めることができる（総説については、Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163を参照されたい。）。s i N A構築物は、一般的な方法を用いたゲル電気泳動によって精製することができ、又は高圧液体クロマトグラフィー（HPLC; その全体を参照により本明細書に組込む、Wincott et al. (前掲) 参照) によって精製することができ、水に再懸濁させることができる。

10

【0531】

本発明の別の態様においては、本発明のs i N A分子は、DNA又はRNAベクター中に挿入された転写単位から発現される。組み換えベクターは、DNAプラスミド又はウイルスベクターであり得る。s i N Aを発現するウイルスベクターは、これらだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス又はアルファウイルスに基づいて構築することができる。s i N A分子を発現可能である組み換えベクターは、本明細書のとおりを送達し、標的細胞中に存続させることができる。或いは、s i N A分子の一過性発現を与えるウイルスベクターを使用することができる。

20

【0532】

本発明の核酸分子の活性の最適化

修飾（塩基、糖及び／又はリン酸）を有する化学合成された核酸分子は、血清リボヌクレアーゼによる分解を防止することができ、それによってその抗力を高めることができる（例えば、その全体を参照により本明細書に組込む、Eckstein他、国際公開第92/07065号; Perrault et al., 1990 Nature 344, 565; Pieken et al., 1991, Science 253, 314; Usman and Cedergren, 1992, Trends in Biochem. Sci. 17, 334; Usman他、国際公開第93/15187号; Rossi他、国際公開第91/03162号; Sproat, 米国特許第5, 334, 711号; Gold他、米国特許第6, 300, 074号及びBurgin et al. (前掲) 参照）。上記参考文献はすべて、本明細書に記載する核酸分子の塩基、リン酸及び／又は糖部分に対してなし得る種々の化学修飾を記載している。細胞におけるその抗力を増強するように修飾し、核酸分子から塩基を除去して、オリゴヌクレオチド合成時間を短縮し、化学物質の必要性を低下させることが望ましい。

30

【0533】

核酸分子に導入して、ヌクレアーゼ安定性及び効力をかなり増強させることができる、糖、塩基及びリン酸の修飾を記述した例が当分野では幾つかある。例えば、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2'-アミノ、2'-C-アリル、2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-H、ヌクレオチド塩基修飾でオリゴヌクレオチドを修飾することによって、安定性及び／又は生物活性を増強する（総説については、Usman and Cedergren, 1992, TIBS. 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163; Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090を参照されたい。）。核酸分子の糖修飾は、当分野では広範に記載されている（Eckstein他、国際公開第92/07065号; Perrault et al. Nature, 1990, 344, 565-568; Pieken et al. Science, 1991, 253, 314-317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci., 1992, 17, 334-339; Usman他、国際公開第93/

40

50

15187号; Sproat、米国特許第5,334,711号及びBeigelman et al., 1995, J. Biol. Chem., 270, 25702; Beigelman他、国際公開第97/26270号; Beigelman他、米国特許第5,716,824号; Usman他、米国特許第5,627,053号; Woolf他、国際公開第98/13526号; 1998年4月20日に出願されたThompson他、米国特許出願第60/082,404号; Karpeisky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 99-134並びにBurlina et al., 1997, Bioorg. Med. Chem., 5, 1999-2010参照。これらの参考文献のすべてを参照によりその全体を本明細書に組込む。) 。かかる刊行物は、触媒作用を調節せずに、糖、塩基及び／又はリン酸修飾などを核酸分子に組み入れる場所を決定する一般的方法及び戦略を記載しており、参照により本明細書に組込む。かかる教示を考慮して、細胞においてRNAiを促進するsiNAの能力がさほど阻害されない限り、類似の修飾を本明細書のとおりを用いて、本発明のsiNA核酸分子を修飾することができる。

【0534】

一実施形態においては、本発明の核酸分子は、参照によりその全体を本明細書に組込む、米国特許出願公開第20050020521号に記載したとおりに化学修飾される。

【0535】

ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート及び／又は5'-メチルホスホナート結合によるオリゴヌクレオチドヌクレオチド間結合の化学修飾は安定性を改善するが、過剰な修飾は幾らかの毒性を生じ、又は活性を低下させ得る。したがって、核酸分子を設計するときには、これらのヌクレオチド間結合の量を最小限に抑えるべきである。これらの結合の濃度を減少させると、毒性が低下し、これらの分子の効力が増加し、特異性が高くなるはずである。

【0536】

活性を維持又は増強する化学修飾を有する低分子干渉核酸 (siNA) 分子を提供する。また、かかる核酸は、ヌクレアーゼに対する耐性が無修飾核酸よりも一般に高い。したがって、インビトロ及び／又はインビボでの活性は、さほど低下しないはずである。調節を目的とする場合には、外因的に送達される治療用核酸分子は、最適には、標的RNAの翻訳が調節されて、望ましくないタンパク質のレベルが低下するまで、細胞内で安定であるべきである。この時間は、病態に応じて数時間から数日まで変動する。RNA及びDNAの化学合成が改善されたことによって ((参照により本明細書に組込む) Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677; Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19)、上述したように、ヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレアーゼ安定性を高めることによって核酸分子を修飾する能力が拡大した。

【0537】

一実施形態においては、本発明の核酸分子は、1個以上の (例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える) Gクランプヌクレオチドを含む。Gクランプヌクレオチドは、修飾シトシン類似体である。この修飾は、二本鎖内の相補グアニンのワトソン-クリック面とフーグスティーン面の両方の水素結合能力を与える。例えば、Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531-8532を参照されたい。オリゴヌクレオチド内の単一のGクランプ類似体を置換することによって、相補オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するときのらせんの熱安定性及びミスマッチ識別性を実質的に増強することができる。かかるヌクレオチドを本発明の核酸分子に含めることによって、核酸標的、相補配列又は

鋳型鎖に対する親和性と特異性の両方が増強される。別の実施形態においては、本発明の核酸分子は、1個以上の（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える）2', 4'-CメチレンビスクロヌクレオチドなどのLNA「ロックされた核酸」ヌクレオチドを含む（例えば、Wengel他、国際公開第00/66604号及び同99/14226号参照）。

【0538】

別の実施形態においては、本発明は、本発明のsiNA分子の抱合体及び／又は複合体を特徴とする。かかる抱合体及び／又は複合体を用いて、細胞などの生物系へのsiNA分子の送達を容易にすることができる。本発明によって提供される抱合体及び複合体は、治療化合物を細胞膜を越えて輸送し、薬物動態学を変更し、及び／又は本発明の核酸分子の局在化を調節することによって、治療活性を与えることができる。本発明は、小分子、脂質、コレステロール、リン脂質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、抗体、毒素、負に帯電したポリマー及び他のポリマー、例えば、タンパク質、ペプチド、ホルモン、炭水化物、ポリエチレングリコール又はポリアミンを含めて、ただしこれらだけに限定されない分子を、細胞膜を越えて送達するための新規抱合体及び複合体の設計及び合成を包含する。一般に、記載するトランスポーターは、個々に、又は多成分系の一部として、分解性リンカーと一緒に、又は分解性リンカーなしで、使用するよう設計される。これらの化合物は、血清の存在下又は非存在下で、異なる組織に由来する幾つかの細胞タイプへの本発明の核酸分子の送達及び／又は局在化を改善すると予測される（Sullenger及びCech、米国特許第5,854,038号参照）。本明細書に記載する分子の抱合体は、生分解性核酸リンカー分子などの生分解性リンカーを介して、生物活性分子に結合し得る。

【0539】

本明細書では「生分解性リンカー」という用語は、1個の分子を別の分子に、例えば、生物活性分子を本発明のsiNA分子に接続する、又は本発明のsiNA分子のセンス鎖及びアンチセンス鎖を接続する、生分解性リンカーとして設計される核酸又は非核酸リンカー分子を指す。生分解性リンカーは、特定の組織又は細胞タイプへの送達などの特定の目的のためにその安定性を調節することができるように設計される。核酸を主体とした生分解性リンカー分子の安定性は、種々のケミストリー、例えば、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド及び（2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アミノ、2'-O-アミノ、2'-C-アリル、2'-O-アリル、他の2'修飾又は塩基修飾ヌクレオチドなどの）化学修飾ヌクレオチドの組合せを用いることによって調節することができる。生分解性核酸リンカー分子は、2量体、3量体、4量体又はより長鎖の核酸分子、例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり得、又はリン系結合、例えば、ホスホルアミダート若しくはリン酸ジエステル結合を有する単一のヌクレオチドを含み得る。生分解性核酸リンカー分子は、核酸骨格、核酸糖又は核酸塩基修飾も含み得る。

【0540】

本明細書では「生分解性」という用語は、生物系における分解、例えば、酵素による分解、又は化学分解を指す。

【0541】

本明細書では「生物活性分子」という用語は、系において生物学的反応を誘発又は改変し得る化合物又は分子を指す。生物活性siNA分子単独の、又は本発明によって企図される他の分子と組み合わせた生物活性siNA分子の、非限定的例としては、治療上活性な分子、例えば、抗体、コレステロール、ホルモン、抗ウイルス剤、ペプチド、タンパク質、化学療法剤、小分子、ビタミン、補因子、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、酵素的核酸（enzymatic nucleic acid）、アンチセンス核酸、三重鎖形成オリゴヌクレオチド、2,5-Aキメラ、siNA、dsRNA、アロザイム、アプタマー、デコイ、その類似体など、治療に有効な分子が挙げられる。本発

明の生物活性分子としては、他の生物活性分子の薬物動態学及び／又は薬力学を調節することができる分子、例えば、脂質、及びポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、他のポリエーテルなどのポリマーも含まれる。

【0542】

本明細書では「リン脂質」という用語は、少なくとも1個のリン基（phosphorus group）を含む疎水性分子を指す。例えば、リン脂質は、リン含有基と、OH、COOH、オキソ、アミン又は置換若しくは非置換アリール基で置換されていてもよい飽和又は不飽和アルキル基とを含み得る。

【0543】

外因的に送達される治療用核酸分子（例えば、siNA分子）は、最適には、RNAの逆転写が調節されて、RNA転写物レベルが低下するまで、細胞内で安定であるべきである。核酸分子は、有効な細胞内治療薬として機能するために、ヌクレアーゼに抵抗性である。上述したように、本明細書及び当分野で記述される核酸分子の化学合成が改善されたことによって、ヌクレオチド修飾を導入してそのヌクレアーゼ安定性を高めることによって核酸分子を修飾する能力が拡大した。

【0544】

更に別の実施形態においては、RNAiに關与するタンパク質の酵素活性を維持又は増強する化学修飾を有するsiNA分子を提供する。また、かかる核酸は、ヌクレアーゼに対する耐性が無修飾核酸よりも一般に高い。したがって、インビトロ及び／又はインビボでの活性は、さほど低下しないはずである。

【0545】

本発明の核酸系分子を使用すると、併用療法（例えば、異なる遺伝子を標的とする複数のsiNA分子；公知の小分子調節物質とカップリングされた核酸分子；又は異なるモチーフ及び／又は他の化学若しくは生体分子を含めて、分子の組合せを用いた間欠的治療）が可能になることによって、治療がより良好なものになる。siNA分子を用いた対象の治療は、酵素的核酸分子（リボザイム）、アロザイム、アンチセンス、2，5-Aオリゴアデニラート、デコイ、アプタマーなどの異なるタイプの核酸分子の組合せも含み得る。

【0546】

別の態様においては、本発明のsiNA分子は、1個以上の5'及び／又は3'キャップ構造を、例えば、センスsiNA鎖のみに、アンチセンスsiNA鎖のみに、又は両方のsiNA鎖に含む。

【0547】

「キャップ構造」とは、オリゴヌクレオチドのどちらかの末端に組み入れられた化学修飾を意味する（例えば、参照により本明細書に組込む、Adamic他、米国特許第5,998,203号を参照されたい。）。これらの末端修飾は、核酸分子をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、細胞内の送達及び／又は局在化を助け得る。キャップは5'末端（5'キャップ）若しくは3'末端（3'キャップ）に存在し得、又は両方の末端に存在し得る。非限定的例においては、5'キャップとしては、グリセリル、反転デオキシ脱塩基残基（部分）；4',5'-メチレンヌクレオチド；1-（ベーターD-エリスロフラノシル）ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド；炭素環式ヌクレオチド；1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオアート結合；スレオ-ベントフラノシルヌクレオチド；非環式3',4'-セコヌクレオチド；非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環式3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-反転ヌクレオチド部分；3'-3'-反転脱塩基部分；3'-2'-反転ヌクレオチド部分；3'-2'-反転脱塩基部分；1,4-ブタンジオールリン酸；3'-ホスホルアミダート；ヘキシルリン酸；アミノヘキシルリン酸；3'-ホスファート；3'-ホスホロチオアート；ホスホロジチオアート；又は架橋若しくは非架橋メチルホスホナート部分が挙げられるが、これらだけに限定されない。キャップ部分の非限定的例を図10に示す。

【0548】

3' キャップの非限定的例としては、グリセリル、反転デオキシ脱塩基残基（部分）、4', 5'-メチレンヌクレオチド；1-（ベータ-D-エリスロフラノシル）ヌクレオチド；4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド；5'-アミノアルキルリン酸；1, 3-ジアミノ-2-プロピルリン酸；3-アミノプロピルリン酸；6-アミノヘキシルリン酸；1, 2-アミノドデシルリン酸；ヒドロキシプロピルリン酸；1, 5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド；アルファ-ヌクレオチド；修飾塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオアート；スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環式3', 4'-セコヌクレオチド；3, 4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；3, 5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5'-5'-反転ヌクレオチド部分；5'-5'-反転脱塩基部分；5'-ホスホルアミダート；5'-ホスホロチオアート；1, 4-ブタンジオールリン酸；5'-アミノ；架橋及び／又は非架橋5'-ホスホルアミダート、ホスホロチオアート及び／又はホスホロジチオアート、架橋又は非架橋メチルホスホナート及び5'-メルカプト部分が挙げられるが、これらだけに限定されない（より詳細には、参照により本明細書に組込む、Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925を参照されたい。）。10

【0549】

「非ヌクレオチド」という用語は、糖置換及び／又はリン酸置換を含めて、1個以上のヌクレオチド単位の代わりに核酸鎖に組み入れることができ、残りの塩基がその酵素活性を示すのを可能にする、任意の基又は化合物を意味する。この基又は化合物は、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミンなどの一般に認識されているヌクレオチド塩基を含まず、したがって1'位の塩基を欠く点で、脱塩基である。20

【0550】

「アルキル」基とは、直鎖、分枝鎖、及び環式アルキル基を含めて、飽和脂肪族炭化水素を指す。アルキル基は、1から12個の炭素を有することが好ましい。より好ましくは、アルキル基は、1から7個の炭素、より好ましくは1から4個の炭素の低級アルキルである。アルキル基は、置換されていても、いなくてもよい。置換されているときには、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O、=S、NO₂若しくはN(CH₃)₂、アミノ又はSHである。この用語は、直鎖、分枝鎖及び環式基を含めて、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を含む不飽和炭化水素基であるアルケニル基も含む。アルケニル基は、1から12個の炭素を有することが好ましい。より好ましくは、アルケニル基は、1から7個の炭素、より好ましくは1から4個の炭素の低級アルケニルである。アルケニル基は、置換されていても、いなくてもよい。置換されているときには、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O、=S、NO₂、ハロゲン、N(CH₃)₂、アミノ又はSHである。「アルキル」という用語は、直鎖、分枝鎖及び環式基を含めて、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を含む不飽和炭化水素基を有するアルキニル基も含む。アルキニル基は、1から12個の炭素を有することが好ましい。より好ましくは、アルキニル基は、1から7個の炭素、より好ましくは1から4個の炭素の低級アルキニルである。アルキニル基は、置換されていても、いなくてもよい。置換されているときには、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、=O、=S、NO₂若しくはN(CH₃)₂、アミノ又はSHである。30

【0551】

かかるアルキル基は、アリール、アルキルアリール、炭素環式アリール、複素環式アリール、アミド及びエステル基も含み得る。「アリール」基とは、共役したパイ電子系を有する少なくとも1個の環を有する芳香族基を指し、炭素環式アリール、複素環アリール及びビアリール基が含まれる。これらの基はすべて置換されていてもよい。アリール基の好ましい置換基は、ハロゲン、トリハロメチル、ヒドロキシル、SH、OH、シアノ、アルコキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル及びアミノ基である。「アルキルアリール」基は、（上記）アリール基と共有結合した（上記）アルキル基を指す。炭素環式アリール基は、芳香環の環原子がすべて炭素原子である基である。炭素原子は、置換されていてもよい。複素環式アリール基は、芳香環の環原子として1から3個のヘテロ原子を有する基40

10

20

30

40

50

であり、環原子の残りは炭素原子である。適切なヘテロ原子としては、酸素、硫黄及び窒素が挙げられ、いずれも置換されていてもよい、フラニル、チエニル、ピリジル、ピロリル、N-低級アルキルピロロ、ピリミジル、ピラジニル、イミダゾリルなどが挙げられる。「アミド」とは $-C(O)-NH-R$ を指す。ここで、Rは、アルキル、アリール、アルキルアリール又は水素である。「エステル」とは $-C(O)-OR'$ を指す。ここで、Rはアルキル、アリール、アルキルアリール又は水素である。

【0552】

本明細書では「ヌクレオチド」とは、(標準の)天然塩基、及び当分野で周知の修飾塩基を含むと当分野で認識されているとおりである。かかる塩基は、ヌクレオチド糖部分の1'位に一般に位置する。ヌクレオチドは、塩基、糖及びリン酸基を一般に含む。ヌクレオチドは、糖、リン酸及び/又は塩基成分において無修飾でも、修飾されていてもよい(ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、非天然ヌクレオチド、非標準ヌクレオチドなどとも区別なく称される。例えば、参照により本明細書に組込む、Usman and McCswiggen (前掲); Eckstein他、国際公開第92/07065号; Usman他、国際公開第93/15187号; Uhlman & Peyman (前掲)を参照されたい。)。Limbach et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183によって要約された、当分野で公知である修飾核酸塩基の幾つかの例がある。核酸分子中に導入することができる塩基修飾の非限定的例の一部としては、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュドウラシル、2, 4, 6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例えば、5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例えば、リボチミジン)、5-ハロウリジン(例えば、5-プロモウリジン)、6-アザピリミジン、6-アルキルピリミジン(例えば、6-メチルウリジン)、プロピン及び他の塩基修飾(Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman (前掲))が挙げられる。この態様において「修飾塩基」とは、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシン及びウラシル以外のヌクレオチド塩基又はその等価物を意味する。

【0553】

一実施形態においては、本発明は、1個以上のホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、メチルホスホナート、リン酸トリエステル、モルホリノ、アミダート、カルバマート、カルボキシメチル、アセトアミダート、ポリアミド、スルホナート、スルホンアミド、スルファメート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール及び/又はアルキルシリル、置換を含むリン酸骨格修飾を有する修飾s i n A分子を特徴とする。オリゴヌクレオチド骨格修飾の総説については、Hunziker and Leumann, 1995, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods, VCH, 331-417及びMesmaeker et al., 1994, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39を参照されたい。

【0554】

「脱塩基」とは、糖部分の1'位において、核酸塩基を欠く糖部分、又は核酸塩基の代わりに水素原子(H)若しくは他の非核酸塩基化学基を有する糖部分を意味する。例えば、Adamic他、米国特許第5, 998, 203号を参照されたい。一実施形態においては、本発明の脱塩基部分は、リボース、デオキシリボース又はジデオキシリボース糖である。

【0555】

「無修飾ヌクレオシド」とは、 β -D-リボフラノースの1'炭素と結合したアデニン、シトシン、グアニンチミン又はウラシル塩基の1つを意味する。

【0556】

「修飾ヌクレオシド」とは、無修飾ヌクレオチドの塩基、糖及び／又はリン酸の化学構造中に修飾を含む任意のヌクレオチド塩基を意味する。修飾ヌクレオチドの非限定的例を、式 I-VI 及び／又は他の本明細書の修飾によって示す。

【0557】

本発明の 2' 修飾ヌクレオチドに関連して、「アミノ」とは、修飾されていても、いなくてもよい、2'-NH₂ 又は 2'-O-NH₂ を意味する。かかる修飾基は、例えば、参照によりその全体を本明細書に組込む、Eckstein 他、米国特許第 5,672,695 号及び Matulic-Adamic 他、米国特許第 6,248,878 号に記載されている。

10

【0558】

核酸 s i N A 構造を種々修飾して、これらの分子の有用性を高めることができる。かかる修飾によって、有効期間、インビトロでの半減期、安定性が増大し、かかるオリゴヌクレオチドを標的部位に導入する容易さ、例えば、細胞膜の透過性が増大し、標的細胞を認識して、それに結合する能力が付与される。

【0559】

核酸分子の投与

本発明の s i N A 分子は、単独で、又は他の療法と組み合わせて、本明細書の、又は標的遺伝子若しくは標的経路遺伝子の発現に関係することが当分野で知られている疾患、形質、障害及び／又は症状の予防若しくは治療、及び／又は細胞若しくは組織において標的ポリヌクレオチド、若しくは標的ポリヌクレオチドから発現されるタンパク質のレベルに関係する、又は応答する任意の他の形質、疾患、障害若しくは症状の予防若しくは治療に用いるために適合させることができる。一実施形態においては、本発明の s i N A 分子及びその調合物又は組成物を、本明細書に記載する、また、当分野で一般に公知である、細胞、対象又は生物体に投与する。

20

【0560】

一実施形態においては、本発明の s i N A 組成物は、対象に投与するためのリボソームを含めた送達ビヒクル、担体及び希釈剤及びその塩を含むことができ、及び／又は薬剤として許容される剤形で存在し得る。核酸分子の送達方法は、その全部を参照により本明細書に組込む、Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., 1999, Mol. Membr. Biol., 16, 129-140; Hofland and Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137, 165-192 及び Lee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192 に記載されている。Beigelman 他、米国特許第 6,395,713 号及び Sullivan 他、国際公開第 94/02595 号は、核酸分子の一般的送達方法を更に記載している。これらのプロトコルは、実質的にあらゆる核酸分子の送達に利用することができる。核酸分子は、リボソーム封入、イオン泳動、又は生分解性ポリマー、ヒドロゲル、シクロデキストリン（例えば、Gonzalez et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074; Wang 他、国際公開第 03/47518 号及び同 03/46185 号参照）、ポリ（乳酸-α-グリコール酸）（PLGA）及び PLCA ミクロスフェア（例えば、米国特許第 6,447,796 号及び米国特許出願公開第 2002130430 号参照）、生分解性ナノカプセル剤、生体接着性（bioadhesive）ミクロスフェアなどの他のビヒクルへの組み入れ、又はタンパク質ベクター（O'Hare 及び Normand、国際公開第 00/53722 号）を含めて、ただしこれらだけに限定されない、当業者に公知である種々の方法によって細胞に投与することができる。別の実施形態においては、本発明の核酸分子は、ポリエチレンイミン-ポリエチレングリコール-N-

30

40

50

アセチルガラクトサミン（P E I - P E G - G A L）、ポリエチレンイミン-ポリエチレングリコールトリ-N-アセチルガラクトサミン（P E I - P E G - t r i G A L）誘導体などのポリエチレンイミン及びその誘導体と一緒に処方又は複合化することもできる。一実施形態においては、本発明の核酸分子は、参照によりその全体を本明細書に組込む米国特許出願公開第20030077829号に記載したとおりに処方される。

【0561】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、参照によりその全体を本明細書に組込む、米国仮出願第60/678,531号、及び2005年7月29日に出願された、関係する米国仮出願第60/703,946号、2005年11月15日に出願された米国仮出願第60/737,024号、及び2006年2月14日に出願された米国特許出願第11/353,630号（V a r g e e s e 他）に記載された組成物として処方される。かかる s i N A 調合物を一般に「脂質核酸粒子」（L N P）と称する。一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、本明細書の表 I V の1種類以上の L N P 組成物と一緒に調合される（米国特許出願第11/353,630号（前掲）参照）。

【0562】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子及びその調合物又は組成物を、米国特許出願公開第2006/0062758号、同2006/0014289号及び同2004/0077540号のとおり、肺組織及び細胞に投与する。

【0563】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子を、図面を含めて、参照によりその全体を本明細書に組込む米国特許出願公開第20010007666号のものなどの膜破壊剤（d i s r u p t i v e a g e n t）と複合化する。別の実施形態においては、膜破壊剤と s i N A 分子も、図面を含めて、参照によりその全体を本明細書に組込む米国特許第6,235,310号の脂質などの陽イオン性脂質又は補助（h e l p e r）脂質分子と複合化する。

【0564】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子を、図面を含めて、参照によりその全体を本明細書に組込む、米国特許出願公開第2003077829号、国際公開第00/03683号及び同02/087541号の送達系と複合化する。

【0565】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子を、図面を含めて、参照によりその全体を本明細書に組込む、米国特許出願公開第20050287551号、同20050164220号、同20050191627号、同20050118594号、同20050153919号、同20050085486号及び同20030158133号に一般に記載されている送達系と複合化する。

【0566】

一実施形態においては、本発明の核酸分子を、アテロコラーゲン複合化又は抱合によって、骨格組織（例えば、骨、軟骨、腱、靱帯）又は骨転移性腫ように投与する（例えば、T a k e s h i t a e t a l . , 2005, P N A S , 102, 12177-12182 参照）。したがって、一実施形態においては、本発明は、アテロコラーゲンと複合化された組成物としての1個以上の d s i N A 分子を特徴とする。別の実施形態においては、本発明は、本明細書に記載する、又は当分野で公知である、リンカーによって、アテロコラーゲンと抱合された1個以上の s i N A 分子を特徴とする。

【0567】

一実施形態においては、本発明の核酸分子、及びその調合物（例えば、本発明の二本鎖核酸分子の L N P 調合物）を、吸入装置又はネブライザーによって投与されるエアゾール剤又は噴霧乾燥剤の吸入などによる肺送達によって投与して、核酸分子に関連する肺組織に迅速に局所的に取り込ませる。微粉化核酸組成物の呼吸用乾燥粒子を含む固体粒子組成物は、乾燥又は凍結乾燥した核酸組成物を粉碎し、次いで微粉化組成物を、例えば、400メッシュスクリーンに通して、大きい凝集物を分解又は分離することによって調製す

10

20

30

40

50

ることができる。本発明の核酸組成物を含む固体粒子組成物は、エアゾール剤及び他の治療化合物の形成を容易にするのに役立つ分散剤を含んでいてもよい。適切な分散剤は、ラクトースであり、核酸化合物と1対1重量比などの任意の適切な比で混合することができる。

【0568】

本発明の核酸組成物を含む液体粒子のエアゾール剤は、ネブライザーなどの任意の適切な手段によって生成され得る（例えば、米国特許第4,501,729号参照）。ネブライザーは、圧縮ガス、典型的には空気若しくは酸素を細いベンチュリーオリフィスを通して加速することによって、又は超音波振動によって、活性成分の溶液又は懸濁液を治療用エアゾールミストに転換する市販装置である。ネブライザー用に適切な製剤は、製剤の最高40% w/w、好ましくは20% w/w未満の活性成分を液体担体中に含む。担体は、典型的には水又は希薄アルコール水溶液であり、好ましくは、例えば塩化ナトリウム又は他の適切な塩を添加することによって、体液と等張にされる。必須でない添加剤としては、製剤が無菌調製されていない場合には防腐剤、例えば、ヒドロキシ安息香酸メチル、抗酸化剤、香味剤、揮発油、緩衝剤、乳化剤、他の処方界面活性剤などが挙げられる。活性組成物を含む固体粒子と界面活性剤のエアゾール剤は、任意の固体粒子エアゾール発生器を用いて同様に生成させることができる。固体粒子治療剤を対象に投与するエアゾール発生器は、上で説明したように、呼吸用粒子を生成し、所定用量の治療用組成物を含有する一定体積のエアゾール剤をヒト投与に適切な速度で生成する。

【0569】

一実施形態においては、本発明の固体粒子エアゾール発生器は吸入器である。吸入器による投与に適切な製剤としては、吸入器によって送達することができる微粉碎散剤が挙げられる。吸入器では、散剤、例えば、本明細書に記載する治療の実施に有効なその一定用量を、典型的にはゼラチン又はプラスチックでできたカプセル又はカートリッジに入れる。カプセル又はカートリッジは、現場で貫通され、又は開口され、吸息又は手動操作のポンプによって装置を通して吸い込まれる空気によって散剤が送達される。吸入器に用いられる散剤は、活性成分のみからなり、又は活性成分と、ラクトースなどの適切な粉末希釈剤と、必須でない界面活性剤とを含む粉末混合物からなる。活性成分は、典型的には、製剤の0.1から100 w/wである。説明のためのエアゾール発生器の第2のタイプは、定量吸入器を含む。定量吸入器は、液化噴霧剤中に活性成分の懸濁液剤又は溶液剤を典型的には含む加圧エアゾール分注器である。使用中に、この装置は、一定体積を送達するようになされた弁を通して製剤を吐出して、活性成分を含む微粒子噴霧を生成する。適切な噴霧剤としては、ある種のクロロフルオロ炭素化合物、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、その混合物などが挙げられる。製剤は、1種類以上の共溶媒、例えばエタノール、乳化剤、及びオレイン酸、トリオレイン酸ソルビタンなどの他の処方界面活性剤、抗酸化剤、並びに適切な香味剤を更に含むことができる。他の肺送達方法は、例えば、参照により本明細書に組込む、米国特許出願公開第20040037780号及び米国特許第6,592,904号、同6,582,728号、同6,565,885号に記載されている。

【0570】

一実施形態においては、肺送達に用いられる本明細書のs i N A及びL N P組成物及び調合物は、1種類以上の界面活性剤を更に含む。本発明の組成物の取り込みを増大させる適切な界面活性剤又は界面活性剤成分としては、合成及び天然並びに完全型及び切断型の界面活性剤タンパク質A、界面活性剤タンパク質B、界面活性剤タンパク質C、界面活性剤タンパク質D及び界面活性剤タンパク質E、（ジパルミトイル以外の）二飽和（d i s a t u r a t e d）ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン；ホスファチジン酸、ユビキノン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリン、パルミトイルリゾホスファチジルコリン、デヒドロエピアンドロステロン、ドリコール、スルファチド（s

ulfatidic) 酸、グリセリン-3-ホスファート、ジヒドロキシアセトンリン酸、グリセリン、グリセロ-3-ホスホコリン、ジヒドロキシアセトン、パルミタート、シチジンニリン酸 (CDP) ジアシルグリセロール、CDP コリン、コリン、コリンリン酸、並びに界面活性剤成分の天然担体ビヒクルである天然及び人工の層状体、オメガ3 脂肪酸、ポリエン (polyenic) 酸、ポリエン (polyenoic) 酸、レシチン、パルミチン (palmitinic) 酸、エチレン又はプロピレンオキシドの非イオンブロック共重合体、ポリオキシプロピレン、単量体及び重合体、ポリオキシエチレン、単量体及び重合体、デキストラン及び／又はアルカノイル側鎖を有するポリ (ビニルアミン)、Br i j 35、T r i t o n X-100、並びに合成界面活性剤 A L E C、E x o s u r f、S u r v a n 及び A t o v a q u o n e がとりわけ挙げられる。これらの界面活性剤は、調合物中で、単一で、若しくは複数成分の界面活性剤の一部として、又は本明細書の薬剤組成物の核酸成分の 5' 及び／又は 3' 末端に共有結合付加して、使用することができる。

10

【0571】

本発明の組成物は、呼吸に適したサイズの粒子、例えば、吸入後、鼻、口及び喉頭を通過し、気管支及び肺胞を通過するのに十分に小さなサイズの粒子を含む製剤として、呼吸器系に投与することができる。一般に、呼吸用粒子は、約 0.5 から 10 ミクロンのサイズである。エアゾール剤に含まれる呼吸に不適当なサイズの粒子は、咽頭に付着しやすく、えん下されやすい。したがって、エアゾール剤中の呼吸に不適当な粒子の量は、最小限に抑えられる。経鼻投与の場合、鼻腔内に確実に保持するために、10-500 μ m の範囲の粒径が好ましい。

20

【0572】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子及びその調合物又は組成物を、当分野で一般に公知であるとおりに、肝臓に投与する (例えば、Wen et al., 2004, World J Gastroenterol., 10, 244-9; Mura o et al., 2002, Pharm Res., 19, 1808-14; Liu et al., 2003, gene Ther., 10, 180-7; Hong et al., 2003, J Pharm Pharmacol., 54, 51-8; Herrmann et al., 2004, Arch Virol., 149, 1611-7 及び Matsuno et al., 2003, gene Ther., 10, 1559-66 参照)。

30

【0573】

一実施形態においては、本発明は、本発明の核酸分子を中枢神経系及び／又は末梢神経系に送達する方法の使用を特徴とする。実験によって、ニューロンによるインビボでの効率的な核酸の取り込みが実証された。神経細胞への核酸の局所投与の例として、Sommer et al., 1998, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 8, 75 は、c-fos に対する 15 量体ホスホロチオアトアンチセンス核酸分子を微量注入によってラットの脳に投与する研究を記載している。テトラメチルローダミン-イソチオシアナート (TRITC) 又はフルオレセインイソチオシアナート (FITC) で標識されたアンチセンス分子は、注射後 30 分で専らニューロンによって吸収された。これらの細胞では、拡散した細胞質染色及び核染色が観察された。神経細胞への核酸の全身投与の例として、Epa et al., 2000, Antisense Nuc. Acid Drug Dev., 10, 469 は、ベーターシクロデキストリン-アダマンタン-オリゴヌクレオチド抱合体を用いて、神経に分化した PC12 細胞中の p75 ニューロトロフィン受容体を標的とした、インビボでのマウス試験を記載している。2 週間の IP 投与後、後根神経節 (DRG) 細胞において、p75 ニューロトロフィン受容体アンチセンスの顕著な取り込みが認められた。また、DRG ニューロンにおいて、p75 の著しい一貫した下方制御が認められた。ニューロンへの核酸の別のターゲティング手法は、Broadbush et al., 1998, J. Neurosurg., 88 (4), 734; Karle et al., 199

40

50

7, Eur. J. Pharmacol., 340 (2/3), 153; Bannai et al., 1998, Brain Research, 784 (1, 2), 304; Rajakumar et al., 1997, Synapse, 26 (3), 199; Wu-pong et al., 1999, Bio Pharm, 12 (1), 32; Bannai et al., 1998, Brain Res. Protoc., 3 (1), 83; Simantov et al., 1996, Neuroscience, 74 (1), 39に記載されている。したがって、本発明の核酸分子は、RE遺伝子発現の調節に対して反復伸長 (repeat expansion) 対立遺伝子変種を発現する細胞に送達され、取り込まれやすい。REを標的にした本発明の核酸分子は、多種多様な戦略によって送達される。使用することができるCNS送達の伝統的手法としては、鞘内及び脳室内投与、カテーテル及びポンプの埋め込み、傷害若しくは病変の部位における直接注射若しくは灌流、脳動脈系への注射、又は化学物質若しくは浸透圧による血液脳関門の開口が挙げられるが、これらだけに限定されない。他の手法としては、例えば抱合体及び生分解性ポリマーを用いた、種々の輸送及び担体系の使用も挙げられる。また、例えば、Kaplit 他、米国特許第6, 180, 613号及びDavidson、国際公開第04/013280号の遺伝子療法によって、CNSにおいて核酸分子を発現させることができる。

【0574】

本発明の核酸分子は、多種多様な戦略によってCNSに送達される。使用することができるCNS送達の伝統的手法としては、鞘内及び脳室内投与、カテーテル及びポンプの埋め込み、傷害若しくは病変の部位における直接注射若しくは灌流、脳動脈系への注射、又は化学物質若しくは浸透圧による血液脳関門の開口が挙げられるが、これらだけに限定されない。他の手法としては、例えば抱合体及び生分解性ポリマーを用いた、種々の輸送及び担体系の使用も挙げられる。また、例えば、Kaplit 他、米国特許第6, 180, 613号及びDavidson、国際公開第04/013280号の遺伝子療法によって、CNSにおいて核酸分子を発現させることができる。

【0575】

一実施形態においては、眼球の症状（例えば、黄斑変性症、糖尿病性網膜症など）の治療用化合物、分子又は組成物を、眼内に、又は眼内手段によって、対象に投与する。別の実施形態においては、眼球の症状（例えば、黄斑変性症、糖尿病性網膜症など）の治療用化合物、分子又は組成物を、眼周囲に、又は眼周囲手段によって、対象に投与する（例えば、Ahlim 他、国際公開第03/24420号参照）。一実施形態においては、siNA分子及び／又はその調合物若しくは組成物を、眼内に、又は眼内手段によって、対象に投与する。別の実施形態においては、siNA分子及び／又はその調合物若しくは組成物を、眼周囲に、又は眼周囲手段によって、対象に投与する。眼周囲投与は、一般に、siNA分子及びその調合物又は組成物を対象に投与する侵襲性の低い手法である（例えば、Ahlim 他、国際公開第03/24420号参照）。眼周囲投与を用いると、網膜剥離のリスクも最小化され、より頻繁な投薬又は投与が可能になり、黄斑変性症及び眼の他の症状に対して臨床的に関連する投与経路を提供し、薬物送達用貯蔵器（例えば、移植片、ポンプ又は他の装置）を使用することも可能である。一実施形態においては、本発明のsiNA化合物及び組成物を局所的に、例えば、注射、イオン泳動（例えば、国際公開第03/043689号及び同03/030989号参照）、移植片などの眼内又は眼周囲手段によって、約1－50週ごと（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49又は50週ごと）に、単独で、又は本明細書の他の化合物及び／又は療法と組み合わせて投与する。一実施形態においては、本発明のsiNA化合物及び組成物を（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、注入、ポンプ、移植片などによって）全身的に、約1－50週ごと（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49又は50週ごと)に、単独で、又は本明細書の、及び／又は当分野で公知の他の化合物及び／又は療法と組み合わせて、投与する。

【0576】

一実施形態においては、本発明は、本発明の核酸分子を、単球及びリンパ球を含めた造血細胞に送達する方法の使用を特徴とする。これらの方法は、Hartmann et al., 1998, J. Pharmacol. Exp. Ther., 285 (2), 920-928; Kronenwett et al., 1998, Blood, 91 (3), 852-862; Fillion and Phillips, 1997, Biochim. Biophys. Acta., 1329 (2), 345-356; Ma and Wei, 1996, Leuk. Res., 20 (11/12), 925-930及びBongartz et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22 (22), 4681-8に詳述されている。かかる方法は、上述したように、オリゴヌクレオチドを造血細胞に移入するために、遊離オリゴヌクレオチド、陽イオン性脂質調合物、pH感応性リポソーム及び免疫リポソームを含めたりポソーム調合物、及び膜融合ペプチドと抱合されたオリゴヌクレオチドを含めたバイオコンジュゲートの使用を含む。

【0577】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子及び組成物を、投与に適切な条件下で、蝸牛などの内耳細胞、組織又は構造と siNA を接触させることによって、内耳に投与する。一実施形態においては、投与は、参照により本明細書に組込む、米国特許第5,421,818号、同5,476,446号、同5,474,529号、同6,045,528号、同6,440,102号、同6,685,697号、同6,120,484号及び同5,572,594号、並びにSilverstein, 1999, Ear Nose Throat J., 78, 595-8, 600及びJackson and Silverstein, 2002, Otolaryngol Clin North Am., 35, 639-53の教示に記述され、本発明の siNA 分子用に改作された、方法及び装置を含む。

【0578】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子及びその調合物又は組成物を、当分野で一般に公知であるとおりに、真皮又は細胞に直接的に、又は局所的に (topically) (例えば、局所的に (locally)) 投与する (例えば、Brand, 2001, Curr. Opin. Mol. Ther., 3, 244-8; Regnier et al., 1998, J. Drug Target, 5, 275-89; Kanikkannan, 2002, BioDrugs, 16, 339-47; Wraight et al., 2001, Pharmacol. Ther., 90, 89-104及びPreat and Dujardin, 2001, STP PharmaSciences, 11, 57-68参照)。一実施形態においては、本発明の siNA 分子及びその調合物又は組成物を、アルコール (例えば、エタノール又はイソプロパノール)、水を含み、ミリスチン酸イソプロピル、カーボマー980などの追加の薬剤を含んでもよい、ヒドロアルコールゲル調合物によって、直接的に、又は局所的に投与する。

【0579】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子を、例えば特定の器官又は区画 (例えば、眼、眼底、心臓、肝臓、腎臓、ぼうこう、前立腺、腫瘍、CNSなど) に、イオン泳動によって投与する。イオン泳動による送達 of 非限定的例は、例えば、参照によりその全体を本明細書に組込む国際公開第03/043689号及び同03/030989号に記載されている。

10

20

30

40

50

【0580】

一実施形態においては、本発明の s i N A 化合物及び組成物を、全身的に、又は局所的に、約 1－50 週ごと（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 又は 50 週ごと）に、単独で、又は本明細書の他の化合物及び／又は療法と組み合わせて、投与する。一実施形態においては、本発明の s i N A 化合物及び組成物を（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、注入、ポンプ、移植片などによって）全身的に、約 1－50 週ごと（例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 又は 50 週ごと）に、単独で、又は本明細書の、及び／又は当分野で公知の他の化合物及び／又は療法と組み合わせて、投与する。

10

【0581】

一実施形態においては、本発明の送達系としては、例えば、水系及び非水系ゲル、クリーム、多相乳濁液（multiple emulsion）、マイクロエマルジョン、リポソーム、軟膏、水溶液及び非水溶液、ローション、エアゾール、炭化水素基剤及び粉末が挙げられ、可溶化剤、透過促進剤（permeation enhancer）（例えば、脂肪酸、脂肪酸エステル、脂肪アルコール及びアミノ酸）、親水性ポリマー（例えば、ポリカルボフィル及びポリビニルピロリドン）などの賦形剤を含むことができる。一実施形態においては、薬剤として許容される担体は、リポソーム又は経皮促進剤（transdermal enhancer）である。本発明に使用することができるリポソームの例としては、（1）Cellfectin、陽イオン性脂質 N，NI，NII，NIII－テトラメチル－N，NI，NII，NIII－テトラパルミト（tetrapalm it）－y－スベルミンとジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）の 1：1.5（M/M）リポソーム調合物（GIBCO BRL）、（2）Cyt of ec t in GSV、陽イオン性脂質と DOPE の 2：1（M/M）リポソーム調合物（Glen Research）、（3）DOTAP（N－[1－（2，3－ジオレオイルオキシ）－N，N，N－トリメチル－アンモニウムメチルスルファート）（Boehringer Mannheim）及び（4）Lipofectamine、ポリカチオン脂質 DOSPA と中性脂質 DOPE の 3：1（M/M）リポソーム調合物（GIBCO BRL）が挙げられる。

20

30

【0582】

一実施形態においては、本発明の送達系としては、貼付剤、錠剤、座剤、ペッサリー、ゲル及びクリームが挙げられ、本発明の送達系は、可溶化剤及びエンハンサー（例えば、プロピレングリコール、胆汁酸塩及びアミノ酸）、他のビヒクル（例えば、ポリエチレングリコール、脂肪酸エステル及び誘導体、並びにヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒアルロン酸などの親水性ポリマー）などの賦形剤も含み得る。

【0583】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子は、ポリエチレンイミン（例えば、線状又は分枝 PEI）及び／又は、例えば、ガラクトース PEI、コレステロール PEI、抗体によって誘導体化された PEI、そのポリエチレングリコール PEI（PEG－PEI）誘導体などのグラフト（grafted）PEI を含めたポリエチレンイミン誘導体と一緒に処方され、又は複合化される（例えば、参照により本明細書に組込む、Ogris et al.，2001，AAPA PharmSci，3，1－11；Furgeson et al.，2003，Bioconjugate Chem.，14，840－847；Kunath et al.，2002，Pharmaceutical Research，19，810－817；Choi et al.，2001，Bull. Korean Chem. Soc.，22

40

50

, 46-52; Bettinger et al., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 558-561; Peterson et al., 2002, Bioconjugate Chem., 13, 845-854; Erbacher et al., 1999, Journal of Gene Medicine Preprint, 1, 1-18; Godbey et al., 1999, PNAS USA, 96, 5177-5181; Godbey et al., 1999, Journal of Controlled Release, 60, 149-160; Diebold et al., 1999, Journal of Biological Chemistry, 274, 19087-19094; Thomas and Klibanov, 2002, PNAS USA, 99, 14640-14645及びSagara、米国特許第6, 586, 524号参照)。

10

【0584】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子は、バイオコンジュゲート、例えば、参照により本明細書に組込む、2003年4月30日に出願された Vargeese 他、米国特許出願第 10/427, 160 号、米国特許第 6, 528, 631 号、同 6, 335, 434 号、同 6, 235, 886 号、同 6, 153, 737 号、同 5, 214, 136 号、同 5, 138, 045 号の核酸抱合体を含む。

【0585】

したがって、本発明は、本発明の 1 種類以上の核酸を安定剤、緩衝剤などの許容される担体中に含む薬剤組成物を特徴とする。本発明のポリヌクレオチドは、安定剤、緩衝剤などを用いて、又は用いなくて、薬剤組成物を形成する任意の標準手段によって、対象に投与することができ(例えば、RNA、DNA 又はタンパク質)、導入することができる。リボソーム送達機構を利用することが望ましいときには、リボソームの標準形成プロトコルに従うことができる。本発明の組成物は、クリーム剤、ゲル剤、噴霧剤、オイル剤、及び当分野で公知である、局所、皮膚又は経皮投与に適切な他の組成物として、処方し、使用することもできる。

20

【0586】

本発明は、薬剤として許容される、上記化合物の調合物も含む。これらの調合物は、上記化合物の塩、例えば、酸付加塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、酢酸塩及びベンゼン

30

【0587】

薬理学的組成物又は調合物とは、例えばヒトを含めて、細胞又は対象に投与、例えば全身又は局所投与するのに適切な形態の組成物又は調合物を指す。適切な形態は、用途又は流入経路、例えば経口、経皮若しくは注射に応じて、ある程度決まる。かかる形態は、組成物又は調合物が標的細胞(すなわち、負に帯電した核酸の送達が望ましい細胞)に到達するのを妨害すべきではない。例えば、血流中に注射する薬理学的組成物は、可溶であるべきである。他の因子は、当分野で公知であり、毒性、組成物又は調合物がその効果を発揮するのを防止する形態などの考慮事項を含む。

【0588】

一実施形態においては、本発明の siNA 分子を、薬剤として許容される組成物又は調合物として全身投与によって対象に投与する。「全身投与」とは、インビボでの全身吸収、又は血流中の薬物の蓄積と、それに後く全身への分布を意味する。全身吸収に至る投与経路としては、静脈内、皮下、門脈、腹腔内、吸入、経口、肺内及び筋肉内が挙げられるが、これらだけに限定されない。これらの投与経路の各々によって、到達可能な患部組織(例えば、肺)が本発明の siNA 分子に暴露される。循環中への薬物の流入速度は、分子量又はサイズの関数であることが判明している。本発明の化合物を含むリボソーム又は他の薬物担体を使用すると、例えば、細網内皮系(RES)の組織などのある組織タイプに薬物を潜在的に局在化させることができる。リンパ球、マクロファージなどの細胞の表面と薬物との会合を容易にし得るリボソーム調合物も有用である。この手法は、マクロフ

40

50

ァージ及びリンパ球による異常細胞の免疫認識の特異性を利用することによって、標的細胞への薬物の送達を促進することができる。

【0589】

「薬剤として許容される調合物」又は「薬剤として許容される組成物」とは、本発明の核酸分子を、その所望の活性に最も適切である身体部位に有効に分布させることができる組成物又は調合物を意味する。本発明の核酸分子と一緒に処方するのに適切である薬剤の非限定的例としては、(Pluronic P85などの)P糖タンパク質阻害剤、徐放性送達用のポリ(DL-ラクチド-コグリコリド)ミクロスフェアなどの生分解性ポリマー(Emerich, DF et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58)、及びポリブチルシアノアクリレートでできたものなどの充填(loaded)ナノ粒子が挙げられる。本発明の核酸分子の送達戦略の他の非限定的例としては、Boado et al., 1998, J. Pharm. Sci., 87, 1308-1315; Tyler et al., 1999, FEB S Lett., 421, 280-284; Pardridge et al., 1995, PNAS USA., 92, 5592-5596; Boado, 1995, Adv. Drug Delivery Rev., 15, 73-107; Aldrian-Herrada et al., 1998, Nucleic Acids Res., 26, 4910-4916及びTyler et al., 1999, PNAS USA., 96, 7053-7058の材料が挙げられる。

【0590】

本発明は、ポリ(エチレングリコール)脂質(PEG修飾又は長時間循環型のリボソーム、すなわちステルスリボソーム)を含む表面修飾リボソームと本発明の核酸分子とを含む組成物の使用も特徴とする。これらの調合物は、標的組織における薬物(例えば、siNA)の蓄積を増加させる方法を与える。このクラスの薬物担体は、単核食細胞系(MPS又はRES)によるオプソニン作用及び排除に抵抗性であり、それによって、カプセル剤の血液循環時間を延長し、組織暴露を増強することができる(Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011)。かかるリボソームは、恐らくは新生血管標的組織における溢出及び捕獲によって、腫瘍中に選択的に蓄積することが判明している(Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90)。長時間循環型リボソームは、特に、MPSの組織で蓄積することが知られている従来の陽イオン性リボソームに比較して、DNA及びRNAの薬物動態学及び薬力学を増強する(Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi他、国際公開第96/10391号; Ansell他、国際公開第96/10390号; Holland他、国際公開第96/10392号)。長時間循環型リボソームは、肝臓、ひ臓などの代謝的に攻撃的なMPS組織における蓄積を回避するその能力に基づいて、陽イオン性リボソームと比較して、薬物をヌクレアーゼ分解からより強く保護する可能性もある。

【0591】

一実施形態においては、本発明のリボソーム調合物は、参照によりその全体を本明細書に組込む、米国特許第6,858,224号;同6,534,484号;同6,287,591号;同6,835,395号;同6,586,410号;同6,858,225号;同6,815,432号;同6,586,001号;同6,120,798号;同6,977,223号;同6,998,115号;同5,981,501号;同5,976,567号;同5,705,385号;米国特許出願公開第2006/0019912号;同2006/0019258号;同2006/0008909号;同2005/0255153号;同2005/0079212号;同2005/0008689号;同2003

／0077829号、同2005／0064595号、同2005／0175682号、同2005／0118253号；同2004／0071654号；同2005／0244504号；同2005／0265961号及び同2003／0077829号の化合物及び組成物と一緒に処方又は複合化された本発明の二本鎖核酸分子（例えば、siNA）を含む。

【0592】

本発明は、薬剤として許容される担体又は希釈剤中に薬学的有効量の所望の化合物を含む、保存又は投与用に調製された組成物も含む。治療用に許容される担体又は希釈剤は、薬剤分野ではよく知られており、例えば、参照により本明細書に組込むRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)に記載されている。例えば、防腐剤、安定剤、色素及び香味剤を用意することもできる。これらには、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びp-ヒドロキシ安息香酸エステルが含まれる。また、抗酸化剤及び懸濁剤も使用することができる。

【0593】

薬学的に有効な用量とは、病態の予防、発症の阻止、又は（症候をある程度軽減する、好ましくは症候の全部を軽減する）治療に必要な用量である。薬学的に有効な用量は、疾患のタイプ、用いる組成物、投与経路、治療するほ乳動物のタイプ、検討する特定のほ乳動物の身体特性、併用する薬物療法、及び医薬分野の当業者が認識する他の因子に応じて決まる。一般に、負に帯電したポリマーの効力に応じて、活性成分0.1mg/kgから約100mg/kg体重/日を投与する。

【0594】

本発明の核酸分子及びその調合物は、薬剤として許容される従来の無毒の担体、アジュバント及び／又はビヒクルを含む単位用量剤形で、経口的に、局所的に、非経口的に、吸入若しくは噴霧によって、又は直腸に、投与することができる。本明細書では非経口という用語は、経皮、皮下、血管内（例えば、静脈内）、筋肉内、髄腔内注射又は注入技術などを含む。また、本発明の核酸分子と、薬剤として許容される担体とを含む薬剤を提供する。本発明の1種類以上の核酸分子は、薬剤として許容される1種類以上の無毒の担体及び／又は希釈剤及び／又はアジュバント、並びに必要に応じて他の活性成分と一緒に存在し得る。本発明の核酸分子を含有する薬剤組成物は、経口用に適した剤形、例えば、錠剤、トローチ剤、舐剤、水性若しくは油性懸濁液剤、分散性散剤若しくは顆粒剤、乳剤、硬若しくは軟カプセル剤、又はシロップ剤若しくはエリキシル剤とすることができる。

【0595】

経口用組成物は、薬剤組成物製造分野で公知の任意の方法によって調製することができる。かかる組成物は、薬剤的に優れた口当たりの良い製剤を提供するために、1種類以上のかかる甘味剤、香味剤、着色剤又は防腐剤を含むことができる。錠剤は、錠剤の製造に適切である、薬剤として許容される無毒の賦形剤と混合された活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、リン酸ナトリウムなどの不活性希釈剤、顆粒化剤及び崩壊剤、例えば、コーンスターチ又はアルギン酸、結合剤、例えば、デンプン、ゼラチン又はアラビアゴム、並びに潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクとすることができる。錠剤は、被覆しなくても、公知技術によって被覆してもよい。かかる被覆を公知技術によって調製して、胃腸管における崩壊及び吸収を遅延させ、それによって長時間の持続作用を得ることができる場合もある。例えば、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリンなどの遅延物質を使用することができる。

【0596】

経口製剤は、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム又はカオリンと混合された硬ゼラチンカプセル剤とすることもでき、活性成分が水又は油媒体、例えば、落花生油、流動パラフィン又はオリーブ油と混合された軟ゼラチンカプセル剤とすることもできる。

【0597】

水性懸濁液剤は、水性懸濁液剤の製造に適切な賦形剤と混合された活性材料を含む。かかる賦形剤は、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム及びアラビアゴムであり、分散剤又は湿潤剤は、天然リン脂質、例えば、レシチン、又はアルキレンオキシドと脂肪酸の縮合物、例えば、ポリオキシエチレンステアレート、又はエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールの縮合物、例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、又はポリオキシエチレンソルビトールモノオレアートなど脂肪酸及びヘキシトールから誘導される部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物、又は脂肪酸及び無水ヘキシトールから誘導される部分エステルとエチレンオキシドとの縮合物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレアートとすることができる。水性懸濁液剤は、1種類以上の防腐剤、例えば、エチル又はn-プロピルp-ヒドロキシ安息香酸、1種類以上の着色剤、1種類以上の香味剤、及びスクロース、サッカリンなどの1種類以上の甘味剤を含むこともできる。

10

【0598】

油性懸濁液剤は、植物油中、例えば、落花生油、オリーブ油、ゴマ油若しくはヤシ油中、又は流動パラフィンなどの鉱物油中に活性成分を懸濁させることによって調剤することができる。油性懸濁液剤は、増粘剤、例えば、蜜ろう、固形パラフィン又はセチルアルコールを含むことができる。甘味剤及び香味剤を添加して、口当たりの良い経口製剤を提供することができる。これらの組成物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤を添加することによって保存することができる。

20

【0599】

水を添加することによって水性懸濁液剤を調製するのに適切な分散性散剤及び顆粒剤によって、分散剤又は湿潤剤、懸濁剤及び1種類以上の防腐剤と混合された活性成分が提供される。適切な分散剤若しくは湿潤剤又は懸濁剤は、上で例示したとおりである。追加の賦形剤、例えば、甘味剤、香味剤及び着色剤が存在してもよい。

【0600】

本発明の薬剤組成物は、水中油型乳剤の形にすることもできる。油相は、植物油、鉱油又はこれらの混合物とすることができる。適切な乳化剤は、天然ゴム、例えば、アラビアゴム又はトラガカントゴム、天然リン脂質、例えば、ダイズ、レシチン、及び脂肪酸とヘキシトール、無水物から誘導されるエステル又は部分エステル、例えば、ソルビタンモノオレアート、及び前記部分エステルとエチレンオキシドの縮合物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレアートであり得る。乳剤は甘味剤及び香味剤を含むこともできる。

30

【0601】

シロップ剤及びエリキシル剤は、甘味剤、例えば、グリセリン、プロピレングリコール、ソルビトール、グルコース又はスクロースを用いて処方することができる。かかる製剤は、粘滑剤、防腐剤、香味剤及び着色剤を含むこともできる。薬剤組成物は、無菌注射用水性又は油性懸濁液剤とすることができる。この懸濁液剤は、上述の適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤を用いて公知技術によって処方することができる。無菌注射用製剤は、親らしく許容される無毒の希釈剤又は溶媒の無菌注射液又は懸濁液、例えば1, 3-ブタンジオール溶液とすることもできる。使用可能な許容されるビヒクル及び溶媒は、水、リンゲル液及び等張性塩化ナトリウム溶液である。さらに、無菌不揮発性油が溶媒又は懸濁媒体として従来使用されている。この目的で、合成モノ又はジグリセリドを含めて、任意の無刺激性不揮発性油を使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸も注射用製剤に使用することができる。

40

【0602】

本発明の核酸分子は、例えば薬物を直腸投与するための、座剤の形で投与することもできる。常温では固体であるが直腸温度では液体であり、したがって直腸内で溶融して薬物を放出する適切な非刺激性賦形剤と薬物を混合することによって、これらの組成物を調製

50

することができる。かかる物質としては、カカオ脂、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。

【0603】

本発明の核酸分子は、滅菌媒体中で非経口的に投与することができる。薬物は、使用するビヒクル及び濃度に応じて、ビヒクル中に懸濁させても、溶解させてもよい。局所麻酔薬、防腐剤、緩衝剤などのアジュバントをビヒクルに溶解させることも有利である。

【0604】

約0.1mgから約140mg／キログラム体重／日の投与量レベルが上記症状の治療に有用である（約0.5mgから約7g／対象／日）。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、治療を受ける患者及び特定の投与方法に応じて変わる。単位用量剤形は、一般に、活性成分約1mgから約500mgを含む。

【0605】

特定の対象に対する具体的用量レベルは、用いる具体的化合物の活性、年齢、体重、全般的健康状態、性別、食餌、投与時間、投与経路、及び排出速度、薬物の組合せ、及び治療を受ける特定の疾患の重篤度を含めて種々の要因に応じて決まることを理解されたい。

【0606】

ヒト以外の動物に投与する場合には、組成物を動物飼料又は飲料水に添加することもできる。動物が治療上適切な量の組成物をその飼料と一緒に摂取するように、動物飼料及び飲用水組成物を処方することが好都合であり得る。飼料又は飲料水に添加するプレミックスとして組成物を提供することも好都合であり得る。

【0607】

本発明の核酸分子を他の治療化合物と組み合わせて対象に投与して、全体の治療効果を高めることもできる。ある適応症の治療に複数の化合物を用いると、副作用を減少させつつ、有益な効果を高めることができる。

【0608】

一実施形態においては、本発明は、本発明の核酸分子を特定の細胞タイプに投与するのに適切である組成物を含む。例えば、アシアロ糖タンパク質受容体（ASGPr）（Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432）は、肝細胞特有のものであり、アシアロオロソムコイド（ASOR）などの分枝ガラクトース末端糖タンパク質と結合する。別の例においては、葉酸受容体は、多数の癌細胞において過剰発現される。かかる糖タンパク質、合成複合糖質又は葉酸塩と受容体の結合は、オリゴ糖鎖の分岐度に大きく依存した親和性によって生ずる。例えば、三分岐（triatennary）構造は、二分岐（biatennary）又は単分岐（monoatennary）鎖よりも高い親和性で結合する（Baenziger and Fiete, 1980, Cell, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 939-945）。Lee and Lee, 1987, Glycoconjugate J., 4, 317-328は、受容体に対する親和性がガラクトースよりも高いN-アセチル-D-ガラクトサミンを炭水化物部分として使用することによって、この高い特異性を得た。この「クラスター形成効果」は、マンノシル末端糖タンパク質又は複合糖質の結合及び取り込みについても記載されている（Ponpipom et al., 1981, J. Med. Chem., 24, 1388-1395）。ガラクトース、ガラクトサミン又は葉酸塩の抱合体を用いて、外因性化合物を細胞膜を越えて輸送することによって、目標とした送達手法を、例えば、肝疾患、肝臓癌、又は他の癌の治療に提供することができる。バイオコンジュゲートを使用すると、治療に必要な治療化合物の必要用量を削減することもできる。また、本発明の核酸バイオコンジュゲートを使用することによって、治療薬の生物学的利用能、薬力学及び薬物動態パラメータを調節することができる。かかるバイオコンジュゲートの非限定的例は、2001年8月13日に出願された、Vargeese他、米国特許出願第10／201,394号、及び2002年3月6日に出願された、Matulic-Adamic他、米国特許出願第60／362,0

10

20

30

40

50

16号に記載されている。

【0609】

或いは、本発明のある種の siNA 分子は、細胞内で真核生物プロモーターから発現させることができる（例えば、Izant and Weintraub, 1985, Science, 229, 345; McGarry and Lindquist, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 399; Scanlon et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic et al., 1992, J. Virol., 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991, J. Virol., 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Sarver et al., 1990 Science, 247, 1222-1225; Thompson et al., 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Good et al., 1997, gene Therapy, 4, 45。当業者は、真核細胞中で任意の核酸を適切な DNA/RNA ベクターから発現させることができることを認識されたい。かかる核酸の活性は、核酸を酵素的核酸によって一次転写物から放出させることによって、増大させることができる（Draper 他、国際公開第 93/23569 号、及び Sullivan 他、国際公開第 94/02595 号; Ohkawa et al., 1992, Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira et al., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ventura et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chowrira et al., 1994, J. Biol. Chem., 269, 25856。

【0610】

本発明の別の態様においては、本発明の RNA 分子を、DNA 又は RNA ベクターに挿入された転写単位から発現させることができる（例えば、Couture et al., 1996, TIG., 12, 510）。組み換えベクターは、DNA プラスミド又はウイルスベクターであり得る。siNA を発現するウイルスベクターは、これらだけに限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス又はアルファウイルスに基づいて構築することができる。別の実施形態においては、pol III に基づく構築物を用いて、本発明の核酸分子を発現させる（例えば、Thompson、米国特許第 5,902,880 号及び 6,146,886 号参照）。siNA 分子を発現可能である組み換えベクターは、上述のとおりに送達し、標的細胞中に存続させることができる。或いは、核酸分子の一過性発現を与えるウイルスベクターを使用することができる。かかるベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。siNA 分子は、発現後、標的 mRNA と相互作用して、RNA i 応答を生ずる。siNA 分子を発現するベクターの送達は、静脈内又は筋肉内投与によって、対象から外植された標的細胞に投与し、続いて対象に再導入することによって、所望の標的細胞への導入を可能にする任意の他の手段によってなど、全身的であり得る（総説については、Couture et al., 1996, TIG., 12, 510 を参照されたい。）。

【0611】

一態様においては本発明は、本発明は、本発明の少なくとも 1 種類の siNA 分子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを特徴とする。発現ベクターは、siNA 二本鎖の一方若しくは両方の鎖をコードすることができ、又は siNA 二本鎖を自己ハイブリッド形成する単一の自己相補鎖をコードすることができる。本発明の siNA 分子をコードす

る核酸配列は、s i N A分子の発現を可能にするように作動可能に結合し得る（例えば、Paul et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, Nature Biotechnology, 19, 497; Lee et al., 2002, Nature Biotechnology, 19, 500及びNovina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725参照）。

【0612】

別の態様においては、本発明は、a) 転写開始領域（例えば、真核生物pol I、I I又はI I I開始領域）と、b) 転写終結領域（例えば、真核生物pol I、I I又はI I I終結領域）と、c) 本発明のs i N A分子の少なくとも1個をコードする核酸配列とを含む発現ベクターを特徴とする。ここで、前記配列は、s i N A分子の発現及び／又は送達を可能にするように、前記開始領域及び前記終結領域に作動可能に結合している。ベクターは、本発明のs i N Aをコードする配列の5'側又は3'側に作動可能に結合した、タンパク質のオープンリーディングフレーム（ORF）、及び／又はイントロン（介在配列）を含んでいてもよい。

【0613】

s i N A分子配列の転写は、真核生物RNAポリメラーゼI（pol I）、RNAポリメラーゼII（pol II）又はRNAポリメラーゼIII（pol III）のプロモーターから駆動され得る。pol II又はpol IIIプロモーターからの転写物は、すべての細胞において高レベルで発現される。所与の細胞タイプにおける所与のpol IIプロモーターのレベルは、近くに存在する遺伝子制御配列（エンハンサー、サイレンサーなど）の性質に依存する。原核生物RNAポリメラーゼ酵素が適切な細胞中で発現される限り、原核生物RNAポリメラーゼプロモーターも用いられる（Elroy-Stein and Moss, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6743-7; Gao and Huang 1993, Nucleic Acids Res., 21, 2867-72; Lieber et al., 1993, Methods Enzymol., 217, 47-66; Zhou et al., 1990, Mol. Cell. Biol., 10, 4529-37）。数名の研究者によれば、かかるプロモーターから発現された核酸分子は、ほ乳動物細胞中で機能し得る（例えば、Kashani-Sabet et al., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Ojwang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10802-6; Chen et al., 1992, Nucleic Acids Res., 20, 4581-9; Yu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992, EMBO J., 11, 4411-8; Lisziewicz et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 90, 8000-4; Thompson et al., 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Sullenger & Cech, 1993, Science, 262, 1566）。より具体的には、U6核内低分子（snRNA）、転移RNA（tRNA）及びアデノウイルスVA RNAをコードする遺伝子に由来する転写単位などの転写単位は、細胞において高濃度のs i N Aなどの所望のRNA分子を生成するのに有用である（Thompson et al.（前掲）; Couture and Stinchcomb, 1996（前掲）; Noonberg et al., 1994, Nucleic Acid Res., 22, 2830; Noonberg他、米国特許第5, 624, 803号; Good et al., 1997, gene Ther., 4, 45; Beigelman他、国際公

10

20

30

40

50

開第96/18736号。上記 siNA 転写単位は、ほ乳動物細胞に導入するために、プラスミド DNA ベクター、(アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクターなどの) ウィルス DNA ベクター又は(レトロウイルス、アルファウイルスベクターなどの) ウィルス RNA ベクターを含めて、ただしこれらだけに限定されない種々のベクターに組み入れることができる(総説については、Couture and Stinchcomb, 1996 (前掲)を参照されたい。))。

【0614】

別の態様においては、本発明は、本発明の siNA 分子の少なくとも1種類をコードする核酸配列を、その siNA 分子の発現が可能であるように含む、発現ベクターを特徴とする。一実施形態においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域と、b) 転写終結領域と、c) siNA 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列を含み、該配列は、siNA 分子の発現及び/又は送達を可能にするように、開始領域及び終結領域に作動可能に結合している。

10

【0615】

別の実施形態においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域と、b) 転写終結領域と、c) オープンリーディングフレームと、d) siNA 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列とを含み、該配列は、オープンリーディングフレームの3'末端に作動可能に結合し、siNA 分子の発現及び/又は送達を可能にするように、開始領域、オープンリーディングフレーム及び終結領域に作動可能に結合している。更に別の実施形態においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域と、b) 転写終結領域と、c) イントロンと、d) 少なくとも1個の siNA 分子をコードする核酸配列とを含み、該配列は、核酸分子の発現及び/又は送達を可能にするように、開始領域、イントロン及び終結領域に作動可能に結合している。

20

【0616】

別の実施形態においては、発現ベクターは、a) 転写開始領域と、b) 転写終結領域と、c) イントロンと、d) オープンリーディングフレームと、e) siNA 分子の少なくとも一方の鎖をコードする核酸配列とを含み、該配列は、オープンリーディングフレームの3'末端に作動可能に結合し、siNA 分子の発現及び/又は送達を可能にするように、開始領域、イントロン、オープンリーディングフレーム及び終結領域に作動可能に結合している。

30

【実施例】

【0617】

以下は、本発明の核酸の選択、単離、合成及び活性を示す非限定的例である。

【0618】

(実施例1)

siNA 構築物のタンデム合成

本発明の例示的な siNA 分子を、切断可能なリンカー、例えば、スクシニル系リンカーを用いて、タンデム合成する。本明細書のタンデム合成の後に、RNAi 分子を高収率で与える1段階精製工程が続く。この手法は、ハイスループット RNAi スクリーニングを支持する siNA 合成に極めて適しており、マルチカラム又はマルチウェルの合成プラットフォームに容易に適合させることができる。

40

【0619】

5'末端ジメトキシトリチル(5'-O-DMT)基が完全に残る siNA オリゴとその相補鎖(complement)のタンデム合成(トリチルオン合成)が完結した後、オリゴヌクレオチドを上述のとおり脱保護する。脱保護後、siNA 配列鎖を自発的にハイブリッド形成させる。このハイブリダイゼーションによって、一方の鎖が5'-O-DMT基を保持し、相補鎖が末端5'ヒドロキシルを含む、二本鎖が生成する。新規に形成された二本鎖は、一方の分子しかジメトキシトリチル基を持たないにもかかわらず、定常的な固相抽出精製(トリチルオン精製)の間、単一の分子として挙動する。鎖は安定な二本鎖を形成するので、例えばC18カートリッジを用いて、オリゴの対を精製するのに

50

必要であるのは、このジメトキシトリチル基（又は他のトリチル基、他の疎水性部分などの等価な基）のみである。

【0620】

反転デオキシ脱塩基スクシナート、グリセリルスクシナートリンカーなどのタンデムリンカー（図1参照）、又は等価な切断可能なリンカーを導入するまでは、標準ホスホリアミダイト合成化学反応を用いる。使用可能なリンカー結合条件の非限定的例は、プロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート（PyBrOP）などの活性化試薬の存在下での、ジイソプロピルエチルアミン（DIPA）及び／又はDMA Pなどのヒンダード塩基を含む。リンカーが結合した後、標準合成化学反応を利用して、第2の配列の合成を完了し、末端5'-O-DMTをそのまま残す。合成後、生成したオリゴヌクレオチドを、本明細書の手順に従って脱保護し、適切な緩衝剤、例えば、50mM NaOAc又は1.5M NH₄H₂CO₃でクエンチする。

10

【0621】

s i N A二本鎖の精製は、例えば、アセトニトリル 1カラム体積（CV）、H₂O 2CV、及び50mM NaOAc 2CVで調整したWaters C18 Sep Pak 1gカートリッジを用いて、固相抽出によって容易に実施することができる。試料を充填し、次いでH₂O又は50mM NaOAc 1CVで洗浄する。失敗配列（failure sequence）を14%ACN（50mM NaOAc及び50mM NaClを含む水溶液）1CVで溶出させる。次いで、カラムを例えばH₂O 1CVで洗浄後、例えば、1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液1CVをカラムに通し、次いで1%TFA水溶液1CVをカラムに追加し、約10分間放置することによって、カラム上で脱トリチル化する。残留TFA溶液を除去し、カラムをH₂O、続いて1M NaCl 1CV及び追加のH₂Oで洗浄する。次いで、S i N A二本鎖生成物を、例えば、20%CAN水溶液1CVによって溶出させる。

20

【0622】

図2は、精製s i N A構築物のMALDI-TOF質量分析の例である。各ピークはs i N A二本鎖の個々のs i N A鎖の計算質量に対応する。同じ精製s i N Aは、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）によって分析すると、3本のピークを与える。1本のピークは二本鎖s i N Aに対応し、2本のピークは別々のs i N A配列鎖に対応すると推定される。同じs i N A構築物（contract）のイオン交換HPLC分析では、単一のピークしか出現しない。以下のルシフェラーゼレポーターアッセイによる精製s i N A構築物の試験によれば、別々に合成したオリゴヌクレオチド配列鎖から生成したs i N A構築物とRNA i活性が同じであった。

30

【0623】

（実施例2）

任意のRNA配列におけるs i N A標的部位候補の特定

ヒトmRNA転写物（例えば、GenBankアクセッション番号によって本明細書で参照する配列のいずれか）などの目的RNA標的の配列を、例えばコンピュータ折りたたみアルゴリズムによって、標的部位についてスクリーニングする。非限定的例においては、Genbankなどのデータベースから得られる遺伝子又はRNA遺伝子転写物の配列を用いて、標的に対して相補性を有するs i N A標的を作製する。かかる配列は、データベースから得ることができ、又は当分野で公知のとおりに実験的に決定することができる。既知の標的部位、例えば他の核酸分子、例えばリボザイム又はアンチセンスを用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定された標的部位を用いて、又は変異若しくは欠失を含む部位などの疾患、形質若しくは症状と関連することが知られている標的を用いて、これらの部位を標的にするs i N A分子を設計することができる。種々のパラメータを用いて、標的RNA配列内の最も適切な標的部位である部位を決定することができる。これらのパラメータとしては、二次又は三次RNA構造、標的配列のヌクレオチド塩基組成、標的配列の種々の領域間の相同性の程度、又はRNA転写物内の標的配列の相対位置が挙げられるが、これらだけに限定されない。これらの決定に基づいて、RNA転写物内の

40

50

任意の数の標的部位を選択して、例えば、インビトロRNA切断アッセイ、細胞培養又は動物モデルを用いることによって、siNA分子を効力に関してスクリーニングすることができる。非限定的例においては、1から1000個の標的部位のどこでも、使用するsiNA構築物のサイズに基づいて、転写物内で選択される。マルチウェル、マルチプレートアッセイなどの当分野で公知の方法を用いてsiNA分子をスクリーニングして、標的遺伝子発現の効率的減少を求める、ハイスループットスクリーニングアッセイを開発することができる。

【0624】

(実施例3)

RNA中のsiNA分子標的部位の選択

10

以下の非限定的段階によって、所与の遺伝子配列又は転写物を標的にしたsiNAを選択することができる。

【0625】

1. 標的配列をコンピュータ解析して、標的配列内に含まれる特定の長さのすべての断片又は部分配列、例えば23ヌクレオチド断片のリストを作成する。この段階は、特化されたPerlスクリプトを用いて典型的には実施されるが、Oligo、MacVector、GCG Wisconsin Packageなどの市販配列解析プログラムも同様に使用することができる。

【0626】

2. siNAは、1個を超える標的配列に対応する場合もある。例えば、同じ遺伝子の異なる転写物を標的にする場合、1個を超える遺伝子の異なる転写物を標的にする場合、又はヒト遺伝子と動物相同体の両方を標的にする場合である。この場合には、特定の長さの部分配列リストを標的の各々について作成し、次いでリストを比較して、各リストにおけるマッチング配列を見つける。次いで、部分配列を、所与の部分配列を含む標的配列の数に従ってランク付けする。標的配列の大部分又はすべてに存在する部分配列を見つけることが目的である。或いは、ランク付けによって、変異標的配列など、標的配列に独特な部分配列を特定することができる。かかる手法によって、変異配列を特異的に標的にし、正常配列を発現させない、siNAの使用が可能になる。

20

【0627】

3. siNA部分配列は、所望の標的配列には存在するが、1個以上の配列には存在しない場合もある。これは、非標的のままにすべきであるパラログなファミリーメンバーを有する遺伝子を、siNAが標的にする場合である。上記2の場合と同様に、特定の長さの部分配列リストを標的の各々について作成し、次いでリストを比較して、標的遺伝子中には存在するが、非標的パラログ中には存在しない配列を見つける。

30

【0628】

4. ランク付けされたsiNA部分配列を更に解析して、GC含量に従ってランク付けすることができる。30-70%GCを含む部位が好ましく、40-60%GCを含む部位が更に好ましい。

【0629】

5. ランク付けされたsiNA部分配列を更に解析して、自己折りたたみ及び内部ヘアピンに従ってランク付けすることができる。より弱い内部折りたたみが好ましく、強いヘアピン構造は回避されるべきである。

40

【0630】

6. ランク付けされたsiNA部分配列を更に解析して、一続きのGGG又はCCCを配列中に有するか否かによってランク付けすることができる。どちらかの鎖のGGG（又は更に多いG）は、オリゴヌクレオチド合成に問題を生じるおそれがあり、RNAi活性を妨害するおそれがある。したがって、より良好な配列が利用可能であるときには常に回避される。標的鎖においてはCCCを検索する。というのは、CCCは、アンチセンス鎖ではGGGの位置にあるからである。

【0631】

50

7. ランク付けされた s i N A 部分配列を更に解析して、ジヌクレオチド U U (ウリジンジヌクレオチド) を配列の 3' 末端に有するか否か、及び／又は (アンチセンス配列に 3' U U を生ずる) A A を配列の 5' 末端に有するか否かによって、ランク付けすることができる。これらの配列によって、末端 T T チミジンジヌクレオチドを有する s i N A 分子の設計が可能になる。

【0632】

8. ランク付けされた上記部分配列リストから 4 又は 5 個の標的部位を選択する。次いで、例えば、23ヌクレオチドを有する部分配列において、選択した各 23 量体部分配列の右側の 21ヌクレオチドを s i N A 二本鎖の上側 (センス) 鎖用に設計して、合成し、次いで、選択した各 23 量体部分配列の左側の 21ヌクレオチドの逆相補鎖 (r e v e r s e c o m p l e m e n t) を s i N A 二本鎖の下側 (アンチセンス) 鎖用に設計して、合成する (表 I I 参照)。(パラグラフ 7 に記載したように) 末端 T T 残基が配列にとって望ましい場合には、オリゴを合成する前に、センス鎖とアンチセンス鎖の両方の 2 個の 3' 末端ヌクレオチドを T T で置換する。

10

【0633】

9. s i N A 分子をインビトロの細胞培養又は動物モデル系においてスクリーニングして、標的 R N A 配列内の最も活性な s i N A 分子、又は最も好ましい標的部位を特定する。

【0634】

10. 標的核酸配列を選択するときには、別の設計考慮事項を使用することができる。例えば、Reynolds et al., 2004, Nature Biotechnology Advanced Online Publication, 1 February 2004, doi:10.1038/nbt936 及び U i - T e i et al., 2004, Nucleic Acids Research, 32, doi:10.1093/nar/gkh247 を参照されたい。

20

【0635】

代替手法においては、標的配列に特異的である s i N A 構築物のプールを用いて、培養したジャーカット、HeLa、A549、293T 細胞など、標的 R N A を発現する細胞中の標的部位についてスクリーニングする。この手法に用いる一般戦略を図 9 に示す。標的 R N A を発現する細胞に s i N A 構築物のプールを移入し、標的阻害に関連した表現型を示す細胞を選別する。s i N A 構築物のプールは、適切なベクターに挿入された転写カセットから発現され得る (例えば、図 7 及び図 8 参照)。表現型のポジティブな変化 (例えば、増殖の減少、標的 m R N A レベルの低下、又は標的タンパク質発現の減少) を示す細胞から得られた S i N A の配列を決定して、標的標的 R N A 配列内の最も適切な標的部位を求める。

30

【0636】

一実施形態においては、本発明の s i N A 分子を以下の方法によって選択する。以下の指針を編集して、本明細書の化学修飾を含む異常に活性な s i N A を予測した。これらの規則は、幾つかの異なる標的に対して異常に活性な (標的 m R N A レベルの > 75% ノックダウン) s i N A と不活性な (標的 m R N A レベルの < 75% ノックダウン) s i N A との比較解析から明らかになった。合計 242 個の s i N A 配列を解析した。242 個の s i N A のうち、35 個の s i N A は異常に活性なグループに分類され、残りの s i N A は不活性なグループに分類された。異常に活性な s i N A は、s i N A 配列内の特定のヌクレオチド位置におけるある種の塩基に明らかに選択的であった。例えば、A 又は U 核酸塩基は、異常に活性な s i N A 中のセンス鎖の 19 位に圧倒的に存在し、不活性 s i N A では逆であった。異常に活性な s i N A 中のセンス鎖の 15-19 位間の A/U リッチ (5 塩基のうち 3 塩基が A 又は U) 領域、及び 1-5 位間の G/C リッチ領域 (5 塩基のうち 3 塩基が G 又は C) のパターンも存在した。表 V に示すように、異常に活性な s i N A に特徴的であるかか 12 パターンを特定した。すべてのパターンが、異常に活性な各 s i N A 中に存在するとは限らないことに留意されたい。したがって、異常に活性な s i N

40

50

Aを予測するアルゴリズムを設計するために、各パターンに対して異なるスコアを割り当てた。異常に活性なs i N Aと不活性s i N Aにおいてかかるパターンが出現する頻度に応じて、設計パラメータにスコアを割り当てた。10が最高であった。ある種の核酸塩基がある位置において好ましくない場合には、負のスコアを割り当てた。例えば、センス鎖の9及び13位において、Gヌクレオチドは、異常に活性なs i N Aにおいて好ましくなく、したがって-3（マイナス3）のスコアを割り当てた。各パターンに対する示差的なスコアを表Vに示す。パターン#4は、最大スコアの-100であった。これは、主に、一続きの4G又は4Cが合成に極めて不適合であり、配列を自己凝集させて、s i N Aを不活性にし得るので、一続きの4G又は4Cを含む配列を除去するためである。このアルゴリズムを用いて、任意のs i N Aに可能な最高スコアは66である。妥当なサイズ（約1000ヌクレオチド）の任意の所与の標的に対して可能なs i N A配列は多数あるので、このアルゴリズムは異常に活性なs i N Aを作製するのに有用である。

10

【0637】

一実施形態においては、表Vに示す規則1-11を用いて、本発明の活性なs i N A分子を作製する。別の実施形態においては、表Vに示す規則1-12を用いて、本発明の活性なs i N A分子を作製する。

【0638】

（実施例4）

s i N Aの設計

s i N A標的部位は、標的配列を解析し、上記実施例3に記載した規則に基づいて、又は折りたたみ（標的へのs i N Aの到達性を求めるために解析された任意の所与の配列の構造）に基づいて、標的部位に優先順位を場合によっては付けることによって選択され、又は実施例3に記載したs i N A分子のライブラリーを用いることによって選択され、又は本明細書の実施例6に記載するインビトロs i N A系を用いることによって選択された。各標的に結合し得るs i N A分子を設計した。s i N A分子を、上記アルゴリズムによって選択し、場合によっては、コンピュータ折りたたみによって個々に解析して、s i N A分子が標的配列と相互作用し得るか否かを判断する。s i N A分子の長さを変更して、活性を最適化するように選択することができる。一般に、標的RNAと結合又は相互作用するのに十分な数の相補ヌクレオチド塩基を選択するが、相補性の程度は、s i N A二本鎖又は種々の長さ又は塩基組成に適応するように調節することができる。かかる方法論を用いることによって、任意の既知のRNA配列内、例えば、任意の遺伝子転写物に対応するRNA配列内の部位を標的にするようにs i N A分子を設計することができる。

20

30

【0639】

標的配列を解析して、二本鎖s i N Aを設計する元になる標的を作製する（表II）。合成s i N A構築物を作製するために、実施例3のアルゴリズムを利用して、活性な二本鎖構築物及びその化学修飾二本鎖構築物を選択する。例えば、表IIにおいて、s i N A二本鎖の上側（センス鎖）及び下側（アンチセンス鎖）と一緒に標的配列を示す。異なる標的配列間の相同部位（例えば、相同性を共有した約5から約15ヌクレオチド領域）を探索し、非標準塩基対（例えばG：Uゆらぎ塩基対形成）又は塩基対のミスマッチを考慮することによって、多官能s i N Aを設計する。

40

【0640】

RNA i 活性媒介能力を維持しながら、インビボでの全身投与のためのヌクレアーゼ安定性及び／又は改善された薬物動態学、局在化及び送達特性を備えるように、化学修飾s i N A構築物を本明細書のとおり設計した（例えば、表I参照）。本明細書の化学修飾を、本明細書に記載する合成方法、及び当分野で一般に公知である合成方法によって、合成的に導入する。次いで、合成s i N A構築物のヌクレアーゼ安定性を、血清及び／又は細胞／組織抽出物（例えば、肝臓抽出物）中で評価する。合成s i N A構築物のRNA i 活性も、本明細書のルシフェラーゼレポーターアッセイ、RNA i 活性を定量することができる別の適切なアッセイなどの適切なアッセイによって、並行して試験する。ヌクレアーゼ安定性とRNA i 活性の両方を有する合成s i N A構築物を更に修飾して、安定性及

50

び活性のアッセイにおいて再評価することができる。次いで、安定化された活性 s i N A 構築物の化学修飾を、任意の選択 R N A を標的にする任意の s i N A 配列に適用して、例えば標的スクリーニングアッセイに用いて、創薬のためのリード s i N A 化合物を選択することができる（例えば、図 1 1 参照）。

【0641】

（実施例 5）

s i N A の化学合成及び精製

s i N A 分子は、R N A メッセージ中の種々の部位、例えば、本明細書の R N A 配列内の標的配列と相互作用するように設計することができる。s i N A 分子の一方の鎖の配列は、上記標的部位配列に相補的である。s i N A 分子は、本明細書の方法によって化学合成することができる。対照配列として用いられる不活性 s i N A 分子は、s i N A 分子の配列を標的配列に相補的でないようにスクランブルすることによって、合成することができる。一般に、s i N A 構築物は、本明細書の固相オリゴヌクレオチド合成方法によって合成することができる（例えば、参照によりその全体を本明細書に組込む、U s m a n 他、米国特許第 5, 8 0 4, 6 8 3 号、同 5, 8 3 1, 0 7 1 号、同 5, 9 9 8, 2 0 3 号、同 6, 1 1 7, 6 5 7 号、同 6, 3 5 3, 0 9 8 号、同 6, 3 6 2, 3 2 3 号、同 6, 4 3 7, 1 1 7 号、同 6, 4 6 9, 1 5 8 号、S c a r i n g e 他、米国特許第 6, 1 1 1, 0 8 6 号、同 6, 0 0 8, 4 0 0 号、同 6, 1 1 1, 0 8 6 号参照）。

【0642】

非限定的例においては、R N A オリゴヌクレオチドを、当分野で公知のホスホルアミダイト化学反応によって段階的に合成する。標準的なホスホルアミダイト化学反応は、5'-O-ジメトキシトリチル、2'-O-tert-ブチルジメチルシリル、3'-O-2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルホスホルアミダイト基及び環外アミン保護基（例えば、N6-ベンゾイルアデノシン、N4-アセチルシチジン及び N2-イソブチリルグアノシン）のいずれかを含むヌクレオシドを使用する。或いは、S c a r i n g e（前掲）によって記述されたとおりに、2'-O-シリルエーテルを酸に不安定な 2'-O-オルトエステル保護基と一緒に、R N A の合成に使用することができる。異なる 2' 化学反応は異なる保護基を必要とすることがあり、例えば、2'-デオキシ-2'-アミノヌクレオシドは、参照によりその全体を本明細書に組込む、U s m a n 他、米国特許第 5, 6 3 1, 3 6 0 号の N-フタロイル保護を利用することができる。

【0643】

固相合成中に、各ヌクレオチドを、固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドに（3' から 5' 方向に）順次付加させる。鎖の 3' 末端の第 1 のヌクレオシドを、種々のリンカーによって固体支持体（例えば、controlled pore glass 又はポリスチレン）に共有結合させる。ヌクレオチド前駆体、リボヌクレオシドホスホルアミダイト及び活性化物質を混合して、第 1 のヌクレオシドの 5' 末端に第 2 のヌクレオシドホスホルアミダイトを結合させる。次いで、支持体を洗浄し、未反応 5' ヒドロキシル基を無水酢酸などのキャッピング試薬を用いてキャッピングして、不活性 5' アセチル部分を得る。次いで、三価のリン結合を酸化して、より安定なリン酸結合にする。ヌクレオチド付加サイクルの最後に、5'-O-保護基を適切な条件下（例えば、トリチル系の基については酸性条件、シリル系の基についてはフッ化物）で切断する。後続の各ヌクレオチドについてこのサイクルを繰り返す。

【0644】

合成条件を変更して、例えば、合成すべき s i N A の特定の化学組成に応じて、異なるカップリング時間、異なる試薬／ホスホルアミダイト濃度、異なる接触時間、異なる固体支持体及び固体支持体リンカー化学反応を用いることによって、カップリング効率を最適化することができる。s i N A の脱保護及び精製は、一般に、参照によりその全体を本明細書に組込む U s m a n 他、米国特許第 5, 8 3 1, 0 7 1 号、同 6, 3 5 3, 0 9 8 号、同 6, 4 3 7, 1 1 7 号、及び B e l l o n 他、米国特許第 6, 0 5 4, 5 7 6 号、同 6, 1 6 2, 9 0 9 号、同 6, 3 0 3, 7 7 3 号、又は S c a r i n g e（前掲）のとお

りに実施することができる。さらに、脱保護条件を変更して、s i N A構築物の可能な最高の収率及び純度を得ることができる。例えば、出願人は、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが不適当な脱保護条件下で分解し得ることを認めた。かかるオリゴヌクレオチドは、メチルアミン水溶液を用いて、約35℃で30分間脱保護される。2'-デオキシ-2'-フルオロ含有オリゴヌクレオチドがリボヌクレオチドも含む場合には、メチルアミン水溶液で約35℃で30分間脱保護した後、TEA-HFを添加して、反応物 (reaction) を約65℃で更に15分間維持する。s i N Aの脱保護された一本鎖を、陰イオン交換によって精製して、高収率を維持しながら、高純度を得る。s i N A二本鎖分子を形成するために、一本鎖を食塩水中で等モル比で混合して、二本鎖を形成する。二本鎖s i N Aを濃縮し、正接 (tangential) ろ過によって脱塩した後、凍結乾燥する。

10

【0645】

(実施例6)

s i N A活性を評価するRNA i インビトロアッセイ

RNA i を無細胞系において再現する (recapitulate) インビトロアッセイによって、標的RNA標的を標的にするs i N A構築物を評価する。このアッセイは、標的RNAを用いた使用に適合させた、Tuschl et al., 1999, genes and Development, 13, 3191-3197及びZamore et al., 2000, Cell, 101, 25-33の系を含む。シンシウム胚盤葉に由来するショウジョウバエ抽出物を用いて、RNA i 活性をインビトロで再構成する。標的RNAは、T7 RNAポリメラーゼを用いて適切な標的発現プラスミドからインビトロで転写することによって、又は本明細書の化学合成によって、作製される。センスとアンチセンスの各s i N A鎖 (例えば、各200μM) を、(100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH、pH7.4、2mM酢酸マグネシウムなどの) 緩衝剤中で90℃で1分間、続いて37℃で1時間インキュベートすることによってアニールし、次いで溶解緩衝剤 (例えば、100mM酢酸カリウム、pH7.4の30mM HEPES-KOH、2mM酢酸マグネシウム) で希釈する。アガロースゲル上でTBE緩衝剤を用いてゲル電気泳動させ、臭化エチジウムで染色することによって、アニーリングを監視することができる。発酵させた糖蜜寒天上に収集し、じゅう毛膜を除去し、溶解させた、Oregon Rハエ由来の0から2時間齢の胚を用いて、ショウジョウバエ溶解物を調製する。この溶解物を遠心分離し、上清を単離する。アッセイは、50%溶解物 [vol/vol]、RNA (最終濃度10-50pM) 及びs i N A (最終濃度10nM) 含有10% [vol/vol] 溶解緩衝剤を含有する反応混合物を含む。反応混合物は、10mMクレアチンリン酸、10μg/mlクレアチンホスホキナーゼ、1000μM GTP、1000μM UTP、1000μM CTP、5000μM ATP、5mM DTT、0.1U/μL RNasin (Promega) 及び各アミノ酸100μMも含む。酢酸カリウムの最終濃度を100mMに調節する。反応物を氷上で前もって集め、25℃で10分間プレインキュベートした後、RNAを添加し、次いで25℃で更に60分間インキュベートする。反応物を1.25×Passive Lysis Buffer (Promega) 4体積でクエンチする。標的RNAの切断をRT-PCR分析、又は当分野で公知の他の方法によって評価し、s i N Aが反応から省略されている対照反応と比較する。

20

30

40

【0646】

或いは、アッセイ用に内部標識した標的RNAを、[アルファ-³²P] CTPの存在下でインビトロで転写することによって調製し、スピントマトグラフィーによってG50 Sephadexカラムに通し、更に精製せずに標的RNAとして用いる。場合によっては、標的RNAを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素を用いて5'-³²P末端標識してもよい。アッセイを上述のとおり実施し、標的RNA、及びRNA i によって生成する特定のRNA切断産物をゲルのオートラジオグラフ上で可視化する。完全な対照RNA、又はs i N Aのない対照反応から得られたRNA、及びアッセイによって生成した

50

切断産物を表すバンドを PHOSPHOR IMAGER（登録商標、オートラジオグラフィ）で定量することによって、切断割合を求める。

【0647】

一実施形態においては、このアッセイによって、s i N A によって媒介される R N A i 切断のための標的 R N A 標的中の標的部位を決定する。ここで、例えば、標識した標的 R N A の電気泳動によりアッセイ反応を分析することによって、又はノザンプロット法によって、また、当分野で周知である他の方法によって、R N A i によって媒介される標的 R N A 標的の切断について、複数の s i N A 構築物をスクリーニングする。

【0648】

（実施例7）

標的 R N A の核酸阻害

標的 R N A を標的にした s i N A 分子を、上述したとおりに設計し、合成する。これらの核酸分子のインビボでの切断活性を、例えば、以下の手順によって試験することができる。標的 R N A 内の標的配列及びヌクレオチドの位置を表 I I に示す。

【0649】

2つの形式によって、任意の標的配列を標的にする s i N A の効力を試験する。第1に、細胞培養における試薬を、Hep G 2、ジャーカット、He L a、A 5 4 9又は293 T細胞を用いて試験して、R N A 及びタンパク質の阻害の程度を求める。s i N A 試薬を、本明細書のとおり標的に対して選択する。適切な移入剤を用いてこれらの試薬を、例えば、Hep G 2、ジャーカット、He L a、A 5 4 9又は293 T細胞に送達した後に、R N A 阻害を測定する。アクチンに対する標的 R N A の相対量を、増幅のリアルタイム P C R モニタリング（例えば、A B I 7700 T A Q M A N（登録商標））によって測定する。無関係な標的に対して作製された各オリゴヌクレオチド配列の混合物を比較し、又は同じ全長及び化学的性質を有するが、各位置で無作為に置換された無作為化 s i N A 対照を比較する。一次及び二次リード試薬を標的に対して選択し、最適化を実施する。最適な移入剤濃度を選択後、R N A の経時阻害をリード s i N A 分子を用いて実施する。また、細胞プレーティング形式によって、R N A 阻害を求めることができる。

【0650】

細胞への s i N A の送達

細胞（例えば、Hep G 2、ジャーカット、He L a、A 5 4 9又は293 T細胞）を、移入の前日に、例えば、6ウェル皿の1ウェル当たり 1×10^5 細胞で E G M - 2（B i o W h i t t a k e r）中に蒔く。s i N A（最終濃度、例えば20 nM）と陽イオン性脂質（例えば、本明細書の L N P 調合物、又は L i p o f e c t a m i n e などの別の適切な脂質、最終濃度 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を、ポリスチレン管中の E G M 基本培地（B i o w h i t t a k e r）中で 37°C で30分間複合化させる。ボルテックス攪拌後、複合化した s i N A を各ウェルに添加し、示した時間インキュベートする。最初の最適化実験の場合、細胞を、例えば 1×10^3 で、96ウェルプレートに蒔き、記載したとおりに s i N A 複合体を添加する。細胞への s i N A の送達効率は、脂質と複合化した蛍光 s i N A を用いて求められる。6ウェル皿中の細胞を s i N A と一緒に24時間インキュベートし、P B S でリンスし、2%パラホルムアルデヒド中で室温で15分間固定する。s i N A の取り込みを蛍光顕微鏡によって可視化する。

【0651】

T A Q M A N（登録商標）（増幅のリアルタイム P C R モニタリング）及び L i g h t c y c l e r による m R N A の定量

s i N A 送達後、例えば、6ウェル用 Q i a g e n R N A 精製キット又は96ウェルアッセイ用 R n e a s y 抽出キットを用いて、細胞から全 R N A を調製する。T A Q M A N（登録商標）分析（増幅のリアルタイム P C R モニタリング）の場合、5'末端に共有結合したレポーター色素 F A M 又は J O E、及び3'末端に結合したクエンチャー色素 T A M R A を用いて、二重標識プローブを合成する。1段階 R T - P C R 増幅は、例えば、A B I P R I S M 7700 S e q u e n c e D e t e c t o r を用い、全 R N A

10

20

30

40

50

10 μ l、100 nM順方向プライマー、900 nM逆方向プライマー、100 nMプローブ、1×TaqMan PCR反応緩衝剤（PE-Applied Biosystems）、5.5 mM MgCl₂、各dATP、dCTP、dGTP及びdTTP 300 μ M、10 U RNase阻害剤（Promega）、1.25 U AMPLITAQ GOLD（登録商標）（DNAポリメラーゼ）（PE-Applied Biosystems）及び10 U M-MLV逆転写酵素（Promega）からなる反応物50 μ lを用いて実施される。サーマルサイクリング条件は、48℃30分間、95℃10分間、続いて95℃15秒間と60℃1分間を40サイクルからなり得る。mRNAレベルは、段階希釈された全細胞RNA（300、100、33、11 ng／反応）から作製した標準に対して定量され、並行TAQMAN（登録商標）反応（増幅のリアルタイムPCRモニタリング）における β アクチン又はGAPDH mRNAに対して標準化される。各目的遺伝子について、上側プライマーと下側プライマー及び蛍光標識プローブを設計する。特定のPCR産物へのSYBR Green I色素の実時間取り込みは、ガラスキャピラリー管中でlight cyclerを用いて測定することができる。各プライマー対に対する検量線を、対照cRNAを用いて作成する。値は、各試料におけるGAPDHに対する相対発現として表される。

【0652】

ウェスタンブロット法

核抽出物は、標準マイクロ調製技術（例えば、Andrews and Fallers, 1991, Nucleic Acids Research, 19, 2499 参照）によって調製することができる。上清からのタンパク質抽出物を、例えばTCA沈殿によって、調製する。等体積の20% TCAを細胞上清に添加し、氷上で1時間インキュベートし、5分間遠心分離してペレット化する。ペレットをアセトンで洗浄し、乾燥させ、水に再懸濁させる。細胞タンパク質抽出物を10% Bis-Tris NuPage（核抽出物）又は4-12% Tris-グリシン（上清抽出物）ポリアクリルアミドゲル上で泳動させ、ニトロセルロース膜に移す。非特異的結合は、例えば、5%脱脂乳と一緒に1時間、続いて一次抗体と一緒に4℃で16時間インキュベートすることによって、ブロックすることができる。洗浄後、二次抗体を例えば（1:10, 000希釈）室温で1時間適用し、Super Signal 試薬（Pierce）を用いてシグナルを検出する。

【0653】

（実施例8）

標的遺伝子発現の下方制御の評価に有用であるモデル

本発明のsiNA分子の効力を動物モデルで評価することは、ヒト臨床試験に対する重要な必要条件である。当分野で公知である、癌、増殖性、炎症性、自己免疫性、神経性、眼球、呼吸器、代謝的、聴覚、皮膚などの疾患、症状又は障害の種々の動物モデルは、治療用、化粧用又は研究用の標的遺伝子発現の調節において、本発明の核酸組成物の効力の前臨床評価に使用するために改作することができる。

【0654】

（実施例9）

RNAiによって媒介される標的遺伝子発現の阻害

インビトロでのsiNAによって媒介される標的RNAの阻害

siNA構築物（の、細胞（例えば、HEKn/HEKa、HeLa、A549、A375細胞）における標的RNA発現を減少させる効力を試験する。移入の時点で細胞が70-90%コンフルエントであるように、移入の約24時間前に、96ウェルプレートに5,000-7,500細胞／ウェル、100 μ l／ウェルで細胞を蒔く。移入の場合、アニールしたsiNAを体積50 μ l／ウェルの移入試薬（Lipofectamine 2000、Invitrogen）と混合し、室温で20分間インキュベートする。siNA移入混合物を細胞に添加して、体積150 μ l中の最終siNA濃度25 mMとする。各siNA移入混合物を、3つ組のsiNA処理用に3個のウェルに添加する。si

NA 移入混合物が連続して存在する下で、細胞を 37 ° で 24 時間インキュベートする。24 時間において、処理細胞の各ウェルから RNA を調製する。移入混合物を含む上清をまず取り出して廃棄し、次いで細胞を溶解させ、各ウェルから RNA を調製する。処理後の標的遺伝子発現を、標的遺伝子及び標準化用対照遺伝子 (36B4、RNA ポリメラーゼサブユニット) について RT-PCR によって評価する。3 つ組データを平均し、標準偏差を各処理について求める。標準化したデータをグラフにし、それぞれの逆対照 (inverted control) siNA と比較した、活性 siNA による標的 mRNA の減少割合を求める。

【0655】

(実施例 10)

1 個以上のリボヌクレオチドを選択位置に有する、安定化された siNA 構築物の効力
他の全部の化学修飾ヌクレオチドを維持しながら、センス鎖 (パッセンジャー鎖) 又は
アンチセンス (ガイド) 鎖に 6-リボヌクレオチドブロックを含むキメラ siNA 構築物
(表 I I 参照) を作製した。標的 HBV メッセージのノックダウンを、mRNA レベルの
代わりにタンパク質 (HBsAg) レベルを測定することによって観察した。siNA の
センス鎖又はガイド鎖の 5' 又は 3' 末端におけるリボヌクレオチドブロックの存在は、
強いサイレンシング活性を示した。これは、両末端のリボヌクレオチドブロックが反対側
の鎖にリボヌクレオチド対応物を有する siNA 構築物でも同様であった。HBV 部位 2
62 siNA 構築物のデータを図 30 に、部位 263 siNA 構築物のデータを図 3
1 に、部位 1583 siNA 構築物のデータを図 32 に示す。

【0656】

組織培養における IC50 値の測定によれば、HBV 部位 262、263 及び 1583
に対する siNA の末端位置に 6 リボヌクレオチドのブロックを含むキメラ siNA (図
33 及び 34 参照) は活性を保持した。リボヌクレオチド含量が、HBV 部位 263 に相
補的であるガイド鎖配列の 5' 末端位置にある単一のリボヌクレオチド残基に減少した、
別の構築物の RNAi 媒介能力を評価した。インビトロでの実験によれば、ガイド鎖の末
端 5' 位置にある単一のリボヌクレオチド残基は、化学修飾 siNA 二本鎖の活性を保持
した (7/23、7/24 及び / 又は 7/28 ケミストリー、図 35 参照)。単一のリボ
ヌクレオチド残基をアンチセンス鎖の 5' 末端ヌクレオチド位置に含む siNA 二本鎖は
、標的 RNA を触媒作用的に切断することができるので、siRNA 分子内の 2'-OH
基は、標的 RNA の触媒作用的切断に直接関与しないと更に推測することができる。St
ab 7/23、7/24、7/25、7/26、7/27 及び 7/28 安定化ケミスト
リー (表 I 参照) と命名された別の siNA 構築物の RNAi 媒介能力を評価した。7/
25 siNA 構築物のインビトロでの血清安定性によれば、この構築物は、ヒトの血清
中で > 24 時間の半減期を有する。

【0657】

出願人は、HeLa 細胞溶解物を RISC タンパク質源として用いたインビトロ RNA
i 切断アッセイを実施して、標的 RNA の切断を誘発する能力について種々の siNA 構
築物を評価した。stab 7/8 siNA 配置の部位 304 を標的にした抗 HCV
siNA 構築物をインビトロ RNAi 切断アッセイで評価した (表 I I 参照)。ガイド鎖
配列の 5' 末端から 10 nt の標的 RNA の部位特異的切断は、RISC によって媒介さ
れる切断の指標になる。実際、予想位置における標的 RNA の部位特異的切断が、st
ab 7/8 siRNA 配置の部位 304 を標的にした抗 HCV siNA を用いて観察
された。これは、十分に修飾された siRNA が、RNAi 機序によって働き、siNA
内の 2'-OH 基の存在が、RNAi によって媒介される標的 RNA の切断に不要であり
、siNA 内の 2'-OH 基が標的 RNA の切断に関与しないことを示している。

【0658】

上述したように、ガイド鎖の 5' 末端ヌクレオチド位置におけるリボヌクレオチド残基
の存在は、頑強な活性を有する siRNA をもたらした。2'-デオキシ-2'-フルオ
ロピリミジン及びプリンリボヌクレオチドを含むガイド鎖の最初の 3 個のヌクレオチドが

10

20

30

40

50

評価された s i R N A 構築物の活性。この安定化ケミストリーを S t a b 29 と名付ける (表 I)。S i N A は、S t a b 7 / 25 と S t a b 7 / 29 ケミストリーの両方で同等に十分働いた (図 36 参照)。したがって、5' 末端ヌクレオチド位置のプリン残基は、存在するときには、ガイド鎖中のリボヌクレオチドとして維持し得、ガイド鎖中のピリミジンヌクレオチドは、頑強な R N A i 活性を維持しながら化学修飾され得る。これらの s i N A が、R I S C によって媒介される特異的 R N A 分解を介しても働くことを立証するために、H e L a 細胞溶解物を用いたインビトロ R N A i アッセイを利用した。ガイド鎖の 5' 末端から 10 n t の標的 R N A の部位特異的切断は、R I S C によって媒介される切断の指標になる。実際、予想位置における標的 R N A の部位特異的切断が、S t a b 7 / 25 及び 7 / 25 配置の全 3 個の s i N A を用いて観察された。これは、これらの s i N A 構築物が R N A i 機序によって働くことを示唆している。 10

【0659】

材料及び方法

オリゴヌクレオチド合成及びキャラクタリゼーション

s i N A オリゴヌクレオチドを、本明細書のとおり合成し、脱保護し、精製した。最終化合物の完全性及び純度を、標準の H P L C、C E 及び M A L D I - T O F M S 法によって確認した。

【0660】

s i R N A アニールング

s i N A 鎖 (各鎖 20 μ M) を、100 mM 酢酸カリウム、p H 7.4 の 30 mM H E P E S - K O H、2 mM 酢酸マグネシウム中でアニールした。アニール混合物を最初に 90 $^{\circ}$ C で 1 分間加熱し、次いで 37 $^{\circ}$ C に 60 分間移した。アニールングを、非変性 P A G E、及び 150 mM N a C l 中での T m 評価によって確認した。 20

【0661】

血清安定性アッセイ

標準連結方法によって完全長センス又はアンチセンス鎖が生成するように、オリゴヌクレオチドを設計した。連結前に、[γ - 32 P] A T P を用いた標準キナーゼ方法によって、内部 32 P 標識を作製した。連結された材料を変性 P A G E によってゲル精製した。微量の内部標識センス (又はアンチセンス) を非標識材料に添加して、最終濃度 20 μ M にした。非標識相補鎖は 35 μ M で存在した。アニールングを上述したとおりに実施した。二本鎖の形成を、無修飾 P A G E と、それに続く M o l e c u l a r D y n a m i c s (S u n n y v a l e、C A) P h o s p h o i m a g e r による可視化によって確認した。 30

【0662】

内部標識二本鎖又は一本鎖 s i R N A をヒト血清に添加して、90 % 血清 (S i g m a、S t . L o u i s、M O) 及び 1.5 μ M 過剰の非標識一本鎖 s i R N A を含む 2 μ M s i R N A 二本鎖の最終濃度にした。試料を 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。一定分量を指定の時点において取り出し、50 mM T r i s - H C l p H 7.8、2.5 mM E D T A、2.5 % S D S 中で 5 秒間のプロテインナーゼ K (20 μ g) 消化 (A m e r s h a m、P i s c a t a w a y、N J) によってクエンチし、続いて 6 $\times$ 体積のホルムアミドローディングバッファー (90 % ホルムアミド、50 mM E D T A、0.015 % キシレンシアノール及びプロモフェノールブルー、放射性標識鎖と同じ配列の 20 μ M 非標識追跡 (c h a s e) オリゴヌクレオチド) を添加した。試料を非変性 P A G E によって分離し、M o l e c u l a r D y n a m i c s P h o s p h o i m a g e r によって可視化した。I m a g e Q u a n t (M o l e c u l a r D y n a m i c s) ソフトウェアを用いて定量した。 40

【0663】

細胞培養試験

ヒト肝芽腫細胞系 H e p G 2 を、10 % ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム及び 25 mM H e p e s を補充した最 50

小必須イーグル培地中で増殖させた。p s H B V - 1 ベクター由来の H B V ゲノム配列を切り取り、再連結して、複製能力のある c D N A を作製した。H e p G 2 細胞を 9 6 ウェルマイクロタイタープレートに蒔き (3×10^4 細胞/ウェル)、終夜インキュベートした。(最終濃度で)陽イオン性脂質 ($11 - 15 \mu\text{g}/\text{mL}$)、再連結された p s H B V - 1 ($4.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)、及び s i R N A (25 nM) を含む陽イオン性脂質/D N A / s i R N A 複合体を増殖培地中で形成した。 37°C で 15 分間インキュベーション後、抗生物質を含まない増殖培地 $80 \mu\text{L}$ 中で、蒔かれた H e p G 2 細胞に複合体 $20 \mu\text{L}$ を添加した。移入から 72 時間後に、H B s A g 分析用に培地を細胞から除去した。すべての移入を 3 つ組で実施した。

【0664】

10

H B s A g E L I S A アッセイ

G e n e t i c S y s t e m s / B i o - R a d (R i c h m o n d , V A) H B s A g E L I S A キットを製造者の指示に従って用いて、H B s A g レベルを測定した。H B V ベクターを移入していない細胞の吸光度をアッセイのバックグラウンドとして用い、実験試料の値から減算した。

【0665】

(実施例 12)

H B V 感染の慢性モデルにおいて異なるオーバーハングケミストリーを有する調合 s i N A 構築物の効力

H B V に対して化学的に安定化された s i N A ナノ粒子 (参照により本明細書に組込む、V a r g e e s e 他、米国仮出願第 60 / 678, 531 号、及び 2005 年 7 月 29 日に出願された、関係する米国仮出願第 60 / 703, 946 号、及び 2005 年 11 月 15 日に出願された米国仮出願第 60 / 737, 024 号参照) 組成物の活性を評価するために、マウス系統 N O D . C B 17 - P r k d c s c i d / J (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r H a r b o r , M E) において、H B V ベクターの流体力学的注入 (h y d r o d y n a m i c i n j e c t i o n) (H D I) に続いて、調合 s i N A 組成物 (調合物 L - 086 及び L - 061。表 I V、並びに 2005 年 11 月 15 日に出願された米国仮出願第 60 / 737, 024 号参照) の全身投薬を実施した。雌性マウスは試験時に 5 - 6 週齢であり、約 20 グラムであった。使用した H B V ベクター p W T D は、完全 H B V ゲノムの頭 - 尾 (h e a d - t o - t a i l) 2 量体である。20 グラムのマウスの場合、食塩水中に p W T D を含む全量 1.6 mL を尾静脈に 5 秒以内に注射した。マウス 1 匹当たり全量 $0.3 \mu\text{g}$ の H B V ベクターを注射した。H D I によって引き起こされる破壊から肝臓を回復させるために、調合 s i N A 組成物の投薬を H D I 後 6 日目から開始した。封入された活性 s i R N A 又は負の対照 s i R N A を、標準 I V 注射によって $3 \text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$ で 3 日間投与した。10 日目に最後の投与後に動物を屠殺し、血清 H B V D N A レベルを測定した。H B V D N A 滴定量を定量リアルタイム P C R によって測定し、平均 $\log 10$ コピー/ mL ($\pm \text{SEM}$) として表した。P B S 群と負の対照群の両方と比較して、活性調合 s i N A 組成物処置群において、10 日の時点で血清 H B V D N A の有意な減少が認められた (図 37)。

20

30

【0666】

40

オリゴヌクレオチド合成及びキャラクタリゼーション

全部の R N A を本明細書のとおり合成した。相補鎖を P B S 中でアニールし、脱塩し、凍結乾燥させた。活性部位 263 H B V s i N A の配列を図 37 の S i r n a 化合物番号で参照して、以下に示す。インビボで用いられる修飾 s i N A を、その L N P 調合物 L - 086 又は L - 061 に従って名付ける (表 I V、及び 2005 年 11 月 15 日に出願された米国仮出願第 60 / 737, 024 号参照)。

【0667】

活性 H B V s i N A の s i N A 配列は、以下のとおりである。

【0668】

【化 3 7】

セシ鎖: 5' B *GG*AcuucucucA*Auuuu*cuTT B 3' (配列番号: 60) 化合物番号 33214

アンチセシ鎖: 5' *AG*AAAA*AuuGAGAGAA*GuccUU 3' (配列番号: 61) 化合物番号 38749

アンチセシ鎖: 5' *AG*AAAA*AuuGAGAGAA*GuccAC 3' (配列番号: 62) 化合物番号 47675

アンチセシ鎖: 5' *AG*AAAA*AuuGAGAGAA*GuccTT 3' (配列番号: 63) 化合物番号 37793

アンチセシ鎖: 5' *AG*AAAA*AuuGAGAGAA*GuccTsT 3' (配列番号: 64) 化合物番号 35092

HBV 逆対照の s i N A 配列は、以下のとおりである。

【0 6 6 9】

【化 3 8】

セシ鎖: 5' B *ucuuuuA**Acucuc*uucAGGTT B 3' (配列番号: 65) 化合物番号 33578

アンチセシ鎖: 5' *ccuGAAGAGAG*uuAAAAGATsT 3' (配列番号: 66) 化合物番号 46419

(ここで、小文字 = 2'-デオキシ-2'-フルオロ (f l o u r o)、大文字斜字体 = 2'-デオキシ、大文字下線 = 2'-O-メチル、大文字太字 = リボヌクレオチド、T = チミジン、B = 反転デオキシ脱塩基及び s = ホスホロチオアート)

【0 6 7 0】

HBV DNA 解析

Q I A m p 9 6 DNA B l o o d キット (Q i a g e n、V a l e n c i a、C A) を用いて、製造の指示に従って、ウイルス DNA をマウス血清 50 μ L から抽出した。A B I P r i s m 7 0 0 0 配列検出器 (A p p l i e d B i o s y s t e m s、F o s t e r C i t y、C A) を用いて、HBV DNA レベルを分析した。定量実時間 PCR を以下のプライマー及びプローブ配列を用いて実施した: 順方向プライマー 5'-C C T G T A T T C C C A T C C C A T C G T (配列番号 69、HBV ヌクレオチド 2006-2026)、逆方向プライマー 5'-T G A G C C A A G A G A A A C G G A C T G (配列番号 70、HBV ヌクレオチド 2063-2083) 及びプローブ FAM 5'-T T C G C A A A A T A C C T A T G G G A G T G G G C C (配列番号 71、HBV ヌクレオチド 2035-2062)。完全長 HBV ゲノムを含む p s H B V - 1 ベクターを検量線として用いて、血清 1 m L 当たりの HBV コピーを計算した。

【0 6 7 1】

(実施例 13)

HBV 感染マウスモデルにおける L N P 調合 HBV s i N A の活性

全身投与経路による治療用 s i R N A (s i N A) の開発は、物理的安定性を改善する RNA の化学修飾と、適切な組織ターゲティング及び細胞の取り込みを促進する処方との両方に依拠する。この実施例においては、ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) を標的にした化学修飾 s i N A を、肝臓栄養性 (l i v e r - t r o p h i c) 脂質を主体とするナノ粒子に封入した。化学修飾 s i N A は、マウス複製 HBV において循環 HBV DNA の 2.5-3.0 l o g 10 の減少を示した。また、肝臓中のウイルス RNA レベルは、R I S C によって媒介される標的切断の結果として、R A C E 分析によって求めて > 90 % 減少した。これは、ナノ粒子によって媒介される送達を用いても、抗 HBV s i N A の化学修飾が、ウイルス RNA の非サイトカイン媒介性ノックダウンに重要であることを示している。ナノ粒子調合物は、s i N A 投与量の 65 % を肝臓に送達する。s i N A は、単回投与から 14 日後に肝臓で検出することができる。これらの調合 s i N A の静脈内注射によるマウスへの投与は、A S T 及び A L T レベルを含めた臨床化学によって測定して、耐容性が良好である。これらの結果は、HBV、H C V などの肝臓の重要なヒトウイルス病原体に対する、s i N A に基づく創薬を支持するものである。

【0 6 7 2】

10

20

30

40

50

上記実施例に記載したように、HBVゲノム中の幾つかの活性s i N A標的部位を細胞培養試験で特定した。特に強力なs i N Aは、HBV RNAのS領域中の5'ヌクレオチド263 (HBV 263 M) から始まる。HBV 263 s i N A分子は、上記実施例12に記載されており、配列番号60からなるセンス鎖と配列番号64からなるアンチセンス鎖とを有する。

【0673】

【化39】

センス鎖: 5' B GGAcuucucucAuuuuucuTT B 3' (配列番号: 60) 化合物番号33214

アンチセンス鎖: 5' AGAAAAuuGAGAGAAAGuccTsT 3' (配列番号: 64) 化合物番号35092

10

【0674】

この試験において記述される研究は、肝臓へのs i N Aの送達を増加をもたらす新規脂質ナノ粒子 (LNP) s i N A送達技術の使用を規定し、肝臓におけるHBV RNAのかなりの減少を含めて、インビボでのs i N A効力及び抗HBV活性期間を劇的に改善する。また、ウイルスRNAの減少は、s i N Aによって媒介される標的切断の直接的な結果であることが判明した。

【0675】

s i N Aの調合

この試験で利用するLNP調合物はLNP-086である (表IV参照)。S i N Aは、緩衝剤中のs i N Aを脂質混合物のアルコール性溶液に混合し、続いて段階的な透析ろ過工程によって、高い封入効率で脂質ナノ粒子に取り込まれた。HPLCを用いた直交方法 (orthogonal method) (陰イオン交換とサイズ排除クロマトグラフィー) 及びRiboGreenアッセイ (洗浄剤を用いた、及び用いない蛍光変化の測定) によって封入効率を求めた。粒径及び電荷密度をBrookhaven (Holtsville, NY) ZetaPal粒径測定器によって測定した。

20

【0676】

HBsAg ELISAアッセイ

Genetic Systems/Bio-Rad (Richmond, VA) HBsAg ELISAキットを製造者の指示に従って用いて、HBsAgレベルを測定した。HBVベクターを移入していない細胞の吸光度をアッセイのバックグラウンドとして用い、実験試料の値から減算した。

30

【0677】

HBVベクターを用いたマウスモデル

HBVに対して化学的に安定化されたs i N Aの活性を評価するために、マウス系統NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) において、HBVベクターの流体力学的注入 (HDI) に続いて、s i N Aの全身投薬を実施した。雌性マウスは試験時に5-6週齢であり、約20gであった。使用したHBVベクターpWTDは、完全HBVゲノムの頭-尾 (head-to-tail) 2量体である。20グラムのマウスの場合、食塩水中にpWTDを含む全量1.6 mlを尾静脈に5秒以内に注射した。マウス1匹当たり全量0.3 µgのHBVベクターを注射した。s i N Aの標準全身投薬は、0.3から10 mg/kg/日であった。HDIによって引き起こされる破壊から肝臓を回復させるために、全身投薬をHDI後6日目から開始した。

40

【0678】

HBV DNA解析

QIAmp 96 DNA Bloodキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、製造の指示に従って、ウイルスDNAをマウス血清50 µLから抽出した。ABI Prism 7000配列検出器 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、HBV DNAレベルを分析した。定量実時間PCRを以下のプライマー及びプローブ配列を用いて実施した: 順方向プライマー5'

50

—CCTGTATTCCCATCCCATCGT（配列番号69、HBVヌクレオチド2006—2026）、逆方向プライマー5′—TGAGCCAAAGAGAAACGGACTG（配列番号70、HBVヌクレオチド2063—2083）及びプローブFAM 5′—TTCGCA A AATACCTATGGGAGTGGGCC（配列番号71、HBVヌクレオチド2035—2062）。完全長HBVゲノムを含むp s HBV—1ベクターを検量線として用いて、血清1 mL当たりのHBVコピーを計算した。

【0679】

HBV RNA解析

Tri-Reagent（Sigma、St. Louis MO）を用いて製造の指示に従って、全細胞RNAをマウス肝臓組織約100mgから単離した。複合（multiplex）反応において、実時間逆転写（RT）—PCRによって、HBV RNAレベルを定量し、マウスGAPDH RNAに対して標準化した。HBVとGAPDH RNAの両方の相対量を、HBVを注射したマウスから得られた全肝臓RNAの検量線から計算した（300から1 ng RNA／反応まで3倍段階希釈）。HBVプライマー及びプローブは上記のとおりである。マウスGAPDHプライマー及びプローブ配列は、以下のとおりである：順方向プライマー5′—GCATCTTG G GCTACAC TGAGG（配列番号72、mGAPDHヌクレオチド855—875）、逆方向プライマー5′—GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG（配列番号73、mGAPDHヌクレオチド903—925）及びプローブVIC 5′—ACCAAGGTGTCTCTCTGC GACTTTC AACAG（配列番号74、mGAPDHヌクレオチド876—913）。肝臓HBV RNAレベルをHBVとGAPDH RNAの比として表す。

10

20

【0680】

標的RNA切断の5′ RACEアッセイ

全RNAを前処理しない以外は、GeneRacer Kit（Invitrogen、Carlsbad、CA）プロトコルに従って、RACE分析を実施した。活性siNA及び対照siNAで処理した動物から得られた全肝臓RNA（5 μg）をGeneRacerアダプター分子に連結した。連結されたRNAを、HBV特異的プライマーを用いて逆転写した（VSP1：5′—TGAGCCAAAGAGAAACGGACTG、配列番号75）。続いて、アダプター（GR5′—5′—CGACTGGAGCACGAGGACACTGA、配列番号76）及びHBV（VSP2：5′—GCATGGTCCCGTACTGGTTGT、配列番号77）に相補的であるプライマーを用いてPCR増幅した。プライマー（GR5′ネステッド5′—GGACACTGACATGGACTGAAAGAGGTA、配列番号78）と（VSP3：5′CAGACACATCCAGCGATAACCAAG、配列番号79）を用いたネステッドPCR、及び未変性PAGE上の電気泳動によって、切断産物（145 bp）のサイズを更に確認した。約145 bpの増幅産物をゲル精製し、クローン化し、配列を決定して、siNA切断部位を明らかにした。

30

【0681】

免疫刺激の分析

5から6週齢の雄性CD—1マウス（Charles River、Wilmington、MA）の外側尾静脈に、HBV263M—LNP又はPBS対照の単回3 mg／kg用量を標準静脈内注射によって注射した。マウスをCO₂吸入によって安楽死させ、続いてすぐに投薬後2.5及び8時間にしゃ血した（n = 5／時点）。血液を大静脈から収集し、分析用血清として処理した。全サイトカインを、サンドイッチELISAキットを用いて、製造者の指示に従って定量した。全サイトカインは、マウスIL—6、TNFアルファ、IFNガンマ及びIFNアルファであった（すべてR&D Systems、Minneapolis、MN）。

40

【0682】

薬物動態学

雄性CD—1マウスをCharles River（Wilmington、MA）から入手した。雄性CD—1マウスは、試験時約30 gであった。HBV263M—LNP

50

を標準 I V ボーラス (100-120 μ L) として約 3 mg/kg の用量で外側尾静脈に投与した。選択した時点 (投薬後 2 及び 15 分、1、3 及び 6 時間、並びに 1、5、10 及び 14 日) においてマウスを CO₂ 吸入によって安楽死させ、続いてすぐにしゃ血した。血液を心臓穿刺によって収集し、EDTA 及び血しょうを含む Microtainer (登録商標) ブランドの管に収集した。しゃ血後、マウスに獣医学グレードの無菌食塩水を心臓を介して灌流させた肝臓を計量し、前もって計量した均質化管 (homogenization tube) に試料 (約 100 mg) を入れ、ドライアイスで凍結させた。

【0683】

血しょう及び肝臓試料中の siNA を、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイによって、パッセンジャー鎖に対して 0.026-6.815 ng/mL 及びガイド鎖に対して 0.027-6.945 ng/mL の濃度範囲で定量した。肝臓試料を組織均質化緩衝剤 (3 M グアニジンイソチオシアナート、0.5 M NaCl、0.1 M Tris pH 7.5、10 mM EDTA) 中 100 mg/mL の濃度で調製した。この混合物を、Bio-101 Homogenizer (Savant, Carlsbad, CA) を用いて速度設定 6.0 及び運転時間 10 秒で 1 回ホモジナイズした。ホモジナイズした肝臓溶液を 1 M GITC 緩衝剤 (1 M グアニジンイソチオシアナート、0.5 M NaCl、0.1 M Tris pH 7.5、10 mM EDTA) で 10 mg/ml に希釈し、次いで更に希釈して (1:2 から 1:10) アッセイに用いた。血しょう試料を 1 M GITC 緩衝剤で ≥ 25 倍希釈した。パッセンジャー及びガイド鎖濃度を加算して、全 siNA 濃度を計算した。WinNonLin Professional (ver 3.3) を用いて、得られた濃度時間データのノンコンパートメント薬物動態解析を実施した。

【0684】

毒性評価

20 匹の CD-1 雄性マウスに HBV 263M-LNP を単回 I V 大量瞬時投与によって 3 mg/kg の用量で投与し (n=10)、又は PBS を投与した (n=10)。試験前に、及び投薬から 1 又は 14 日後の試料収集前に、体重を測定した。適切な時点において、マウスを CO₂ 吸入によって安楽死させ、続いてすぐにしゃ血し (n=5/時点)、血清の化学的性質の分析用に血液を収集した。また、肝臓及び心臓の重量を収集し、器官と体重の比を計算した。

【0685】

結果

LNP 調合 HBV siNA

LNP-086 調合物 (表 I V 参照) を用いて、配列番号 60 からなるセンス鎖と配列番号 64 からなるアンチセンス鎖とを含む活性 HBV 263M siNA、及び配列番号 65 からなるセンス鎖と配列番号 66 からなるアンチセンス鎖とを含む HBV 263 invM の対応する逆対照調合物を封入した。

【0686】

【化 40】

センス鎖: 5' B ucuuuuAAcucucuucAGGTT B 3' (配列番号: 65) 化合物番号 33578

アンチセンス鎖: 5' ccuGAAGAGAGuuAAAAGATsT 3' (配列番号: 66) 化合物番号 46419

【0687】

脂質と siNA 溶液の同時混合と、それに続く段階的な透析ろ過によって、siNA を脂質ナノ粒子に高効率で組み入れるプロセスを開発した。このプロセスを用いて、HBV 263M 及び対照 HBV 263M inv siNA を LNP-086 調合物に封入した。平均 siNA 封入効率は、HPLC 及び Ribogreen アッセイで求めて $84 \pm 2\%$ であった。平均粒径は 167 ± 10 nm、多分散性は 0.15 ± 0.05 であった。LNP は、わずかに正の表面電荷密度 30 ± 2 mV を有した。

【0688】

LNP調合物に封入された化学修飾HBV263M s i N Aの活性を、HBV細胞培養系において最初に評価した。HBVを複製するHep G2細胞をHBV263M-LNPで1回処理すると、HBsAgレベルが用量依存的に減少し、IC50は1nMであった（データ示さず）。

【0689】

LNPに封入されたHBV263Mのインビボでの活性

LNPに封入されたs i N Aのインビボでの活性を評価するために、複製能力のあるHBVベクターの流体力学的注入（HDI）によって肝細胞内でウイルスが複製する、HBV複製のマウスモデルを用いた。このモデルでは、HBVは、免疫無防備状態のマウスの肝臓中で最高80日間複製し、検出可能なレベルのHBV RNA及び抗原を肝臓中で生成し、血清中のHBV DNA及び抗原の力価は、慢性的に感染した患者で見られるレベルと類似したレベルである。

10

【0690】

HBV263M-LNP-086のインビボでの効力及び特異性を評価するために、その活性を対照s i N A HBV263 i n v M-LNP-086と比較した。HBV複製マウスを0.3、1又は3mg/kg/日の用量で3日間処理し、血清HBV DNA及びHBsAgの各レベルを最後の投与から3日後に測定した。HBV DNAとHBsAgの両方の血清力価の用量依存的減少が認められた。対照s i N A群又はPBS群と比較して、HBV DNA血清力価の3.0、2.3及び1.1 log10 (p0.0001)の減少（図38A）、並びに血清HBsAgレベルの2.4、2.2及び1.5 log10 (p0.0001)の減少（図38B）が、それぞれ3、1及び0.3mg/kg処理群において認められた。血清HBV DNA又はHBsAgのレベルは、対照s i N AとPBS処置群において同等であり、抗HBV活性の配列特異性、及び非特異的脂質効果の非存在が実証された。

20

【0691】

s i N Aによって媒介されるHBVレベルの減少期間をマウスモデルにおいて検討した。HBV複製マウスを3mg/kg/日の用量のHBV263M-LNP-086又はHBV263M i n v-LNP-086で3日間処理し、続いてHBV血清力価を最後の投与から3、7及び14日後に分析した。抗HBV活性は持続し、かなりの活性が7日（2.0 log10の減少）及び14日（1.5 log10の減少（図39））でも認められた。HBVに対するs i N A活性のこの長期間にわたる持続は、化合物の数少ない投与が有効であり得ることを示唆している。HBVマウスモデルを用いて、週1回の投薬の効果を評価した。マウスをHBV263M-LNP-086又はHBV263M i n v-LNP-086 3mg/kg/日で第1週の1日及び4日、次いで毎週1回更に3週間処理した。血清HBV DNA力価を7、14、21及び28日目に求めた。HBV263M-LNP-086処置群は、PBS処置群と比較して、7、14、21及び28日目のHBV血清力価が、それぞれ1.7、1.7、1.8及び1.3 log10減少した（図40）。これらの結果は、HBV力価の減少がHBV263M-LNP-086の週1回の投薬によって維持され得ることを示唆している。

30

【0692】

特異的s i N Aによって媒介される肝臓HBV RNAの切断

活性HBV263M-LNP-086調合物によって媒介される肝臓特異的HBV RNAの切断を検討するために、HBVを複製するマウスを0.3、1、3、10mg/kg/日の用量のHBV263M-LNP-086、又は10mg/kgの用量のHBV263 i n v M-LNP対照で3日間処理し、最後の投与から3日後に肝臓HBV RNAレベルを測定した。肝臓HBV RNAの用量依存的な減少が認められ（図41）、10mg/kgのHBV263 i n v M-LNP-086対照と比較して、10、3、1及び0.3mg/kgのHBV263M-LNP処理群において、それぞれ90%、66.5%、18%及び4%減少した。

40

【0693】

50

マウスモデルにおいて認められた肝臓HBV RNAの減少が、RNAiによって媒介されるHBV RNAの切断のためであることを直接実証するために、5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 分析によって、予測された部位におけるHBV RNAの切断を検出した。HBV複製マウスを、3 mg/kg/dの用量のHBV 263M-LNP-086又はHBV 263Minv-LNP-086で3日間処理した。マウスを最後の投与から3、7又は14日後に屠殺し、全肝臓RNAを単離した。アダプター配列をRNA集団の遊離5'末端に連結し、続いてアダプターとHBV特異的プライマーを用いたRT-PCRによって、HBV RNAが予測標的部位において切断された場合に、145bpのPCR産物が得られると予想された。図42に示すように、予想された増幅産物が、HBV 263活性siNAで処理した試料において各時点で観察されたが、HBV 263対照試料においては観察されなかった。次いで、PCR産物をサブクローニングし、配列を決定して、アダプター配列とHBV 263 siNAの予測切断部位との連結が正確であることを確認した。この結果から、肝臓において認められたHBV RNAの減少が、肝臓における特異的RNAiによって媒介されたHBV RNAの切断によるものであったことが立証される。また、7及び14日の時点において特異的HBV RNA切断産物が検出されたことは、HBVに対するsiNA活性期間が、HBV RNAの継続的な切断によるものであることを示している。

10

【0694】

siNAによって誘導される免疫賦活の分析

インビボでの送達用に処方された無修飾合成siNAは、インビトロでのヒト末梢血単核球(PBMC)及びインビボでのマウスにおいて、炎症性サイトカイン及びインターフェロンの合成を配列特異的に誘発することが判明した。化学修飾HBV 263M-LNP-086 siNAが、無修飾のもの(HBV 263R-LNP-086)に比較して、このタイプの免疫応答を誘発する能力を調べた。

20

【0695】

【化41】

セシ鎖: 5' B GGACUUCUCUCAAUUUUCUTT B 3' (配列番号67) 化合物番号 34526

7nチシ鎖: 5' AGAAAAUUGAGAGAAGUCCTT 3' (配列番号68) 化合物番号 34527

30

【0696】

CD-1マウスに単一の3 mg/kg用量のHBV 263M-LNP-086又はHBV 263R-LNP-086を注射した。投薬後2.5又は8時間にマウスを屠殺し、血液を収集した。ピーク血中濃度を検出するために、2.5時間の時点でIL-6及びTNF- α を測定し、注射から8時間後にIFN- γ 及びIFN- α レベルを分析した。HBV 263M-LNP-086処置群においては、平均IL-6レベルは 33 ± 21 pg/mlであり、 13 ± 4 のPBS対照群とさほど異ならないレベルであった(表VII)。また、HBV 263M-LNP-086処置群においては、TNF- α IFN- α 又はIFN- γ の誘導は認められなかった。これに対し、HBV 263R-LNP-086処理動物においては全4種類のサイトカインのかなりの誘導が認められた(表VI)。これらの結果によれば、無修飾HBV 263R-LNP-086 siNAによって誘発された極めて強い応答と比較して、修飾HBV 263M-LNP-086 siNAは、マウスにおいてサイトカインを誘導しなかった。HBV 263M-LNP-086によってサイトカインが誘導されないことは、マウスモデルにおいて認められる抗HBV活性が、特異的siNAによって媒介される、HBV遺伝子発現のサイレンシングによるものであることを更に示している。

40

【0697】

LNP調合siNAの薬物動態学

HBV 263M-LNP-086の薬物動態学的諸性質をマウスにおいて単一の3 mg/kg投与後に求めた。ハイブリダイゼーション法によって、血しょう及び肝臓における

50

HBV 263M siNAを経時的に検出した(図43)。HBV 263Mは、血しょう中で迅速に排出され、排出 $T_{1/2}$ は約1.7時間であった。しかし、HBV 263Mは、肝臓において14日間の試料採取期間を通して検出され、排出 $T_{1/2}$ は4日であった。最大濃度 $31.3 \pm 17.8 \text{ ng/mg}$ (平均±標準偏差)が肝臓において1時間で観測され、siNA用量の $65 \pm 32\%$ に相当した。14日目に、用量の $1.4 \pm 0.7\%$ が肝臓中で完全な形で残留した。マウスモデルにおいて認められる、siNAによって媒介される長期の抗HBV活性は、肝臓におけるsiNAのこの長い滞留時間と良好な相関がある。

【0698】

HBV 263M-LNP毒性の評価

10

HBV 263M-LNP-086の潜在的毒性作用を明らかにするために単回投与試験を実施した。HBV 263M-LNP-086の投与は、病的状態も死亡もなく、動物による耐容性が良好であった。HBV 263M-LNP 3 mg/kg の投与から1又は14日後に、体重変化も、肝臓及びひ臓の器官と体重の比の変化も認められなかった(表VII)。肝臓又はひ臓の肉眼的形態変化は認められなかった。また、HBV 263M-LNP-086の投与に起因し得る、血清の化学的性質の変化は認められなかった(表VII)。全体的に見て、LNP-086に封入されたHBV 263 siNAは、HBVマウスモデルにおいてウイルス力価をかなり減少させるのに用いられる用量レベルにおいて、耐容性が良好である。

【0699】

20

この試験では、siNA送達用の新規脂質調合物の使用を記述する。HBV感染のマウスモデルにおいて、肝臓へのsiNAの送達がかなり改善され、効力が増大し、HBV力価の減少が持続する。LNP調合siNAの薬物動態学的特性と、インビボでのsiNA活性の効力及び期間との優れた相関が認められた。HBV 263M-LNP-086 3 mg/kg/日 を3回投与すると、血清HBV DNAが対照siNAよりも 2.5 から $3.0 \log_{10}$ 減少した。HBV 263M-LNP-086処理は、抗HBV活性のかなりの持続時間をもたらし、血清HBV DNAが7日目で $2.0 \log_{10}$ 減少し、14日目で $1.3 \log_{10}$ 減少した。

【0700】

この試験は、LNP調合物に封入された化学修飾siRNAを使用すると、siRNAによって媒介される、インビボでのサイトカインの誘導が抑止されることも示している。まとめると、HBV 263M-LNP-086 siRNAの好都合な薬物動態学的プロファイル及び効力プロファイルによって、治療に潜在的に関連する抗ウイルス化合物が創出される。この調合物は、siRNAを効果的に肝臓に送達し、内因性疾患に関連した肝臓標的のノックダウンに利用することができる。

30

【0701】

(実施例14)

適応症

遺伝子発現の調節に関連し得る特定の症状及び病態としては、本明細書に記載する、又は当分野で公知である、癌、増殖性、炎症性、自己免疫性、神経性、眼球、呼吸器、代謝的、皮膚、聴覚、肝臓、腎臓、感染性などの疾患、症状又は障害、及び単独で、又は他の療法と組み合わせて、細胞又は組織における標的(例えば、標的タンパク質又は標的ポリヌクレオチド)のレベルに関係又は応答する任意の他の疾患、症状又は障害が挙げられるが、これらだけに限定されない。

40

【0702】

(実施例15)

多官能siNAによる標的RNA発現の阻害

多官能siNAの設計

多官能siNA構築物に対する標的部位を特定した後、異なる標的核酸配列に相補的である、例えば約18から約28ヌクレオチド長の、相補領域を有するsiNAの各鎖を設

50

計する。標的配列に相補的でないが、他方の配列の相補領域に対する相補性を含む、約4から約22ヌクレオチドの隣接するフランキング領域を有する各相補領域を設計する（例えば、図16参照）。ヘアピン構築物を同様に設計することができる（例えば、図17参照）。異なる標的核酸配列間で共有される相補的回文構造又は反復配列を特定することによって、多官能 siNA 構築物の全長を短縮することができる（例えば、図18及び19参照）。

【0703】

非限定的例においては、単一の siNA 分子によって複数の標的をサイレンシングし得る別の多官能 siNA 設計の3つの追加のカテゴリーが存在する。第1の方法は、リンカーを利用して、siNA（又は多官能 siNA）を直接連結させる。これによって、インターフェロン応答を誘発し得る一連の長鎖 RNA を生成せずに、最も強力な siNA を連結することができる。第2の方法は、重複した、又は連結された、多官能設計のデンドリマー的な伸長、或いは超分子形式の siNA の組織化である。第3の方法は、30塩基対を超えるヘリックス長を利用する。これらの siNA のダイサーによるプロセッシングによって、新しい活性5'アンチセンス末端が出現する。したがって、長鎖 siNA は、元の5'末端によって規定される部位、及びダイサープロセッシングによって作製される新しい末端によって規定される部位を標的にすることができる。（センス鎖とアンチセンス鎖が標的を各々規定する）伝統的な多官能 siNA と併用すると、この手法を用いて、例えば4個以上の部位を標的にすることができる。

【0704】

1. 繫留 (tethered) 二官能性 siNA

基本的な考え方は、2本のアンチセンス siNA 鎖が単一のセンス鎖とアニールされる多官能 siNA の設計に対する新規な取り組みである。センス鎖オリゴヌクレオチドは、リンカー（例えば、本明細書の非ヌクレオチドリンカー）と、アンチセンス siNA 鎖にアニールされる2個のセグメントを含む（図22参照）。リンカーは、ヌクレオチド系リンカーを含んでいてもよい。この手法の幾つかの潜在的利点及び変形としては、これらだけに限定されないが、以下のものが挙げられる。

【0705】

1. 2個のアンチセンス siNA は独立している。したがって、標的部位の選択は、2個の部位間の配列保存の要件によって束縛されない。任意の2個の高活性 siNA を組み合わせて、多官能 siNA を形成することができる。

【0706】

2. 相同性を有する標的部位と併用するときには、2個の遺伝子（例えば、異なるアイソフォーム）中に存在する配列を標的にする siNA、この設計を用いて、2個を超える部位を標的にすることができる。例えば、単一の多官能 siNA を用いて、2個の異なる標的 RNA の RNA を標的にすることができる。

【0707】

3. センス鎖とアンチセンス鎖の両方を使用して1個の遺伝子を標的にする多官能 siNA も、繫留多機能設計に組み入れることができる。これによって、6個以上の部位を単一の複合体で標的にする可能性が残される。

【0708】

4. 2個を超えるアンチセンス鎖 siNA を単一の繫留センス鎖にアニールすることができる。

【0709】

5. この設計は、一連の長鎖 dsRNA の発生を防止する。したがって、インターフェロン応答を惹起する可能性は低い。

【0710】

6. リンカー（又は本明細書の抱合体など、リンカーに結合した修飾）は、複合体の薬物動態学的諸性質を改善し、又はリボソームへの複合体の取り込みを改善する。リンカーに導入された修飾は、siNA に直接結合した場合と同じ程度に、siNA 活性に影響

10

20

30

40

50

を及ぼすべきではない（例えば、図 2 7 及び 2 8 参照）。

【0711】

7. センス鎖は、アニールされたアンチセンス鎖を越えて伸長して、抱合体が結合するための追加の部位を与え得る。

【0712】

8. 複合体の極性は、アンチセンス 3' 末端の両方がリンカーに隣接し、5' 末端がリンカーの遠位にあるように、又はその組合せになるように、転換することができる。

【0713】

デンドリマー及び超分子 s i N A

デンドリマー s i N A 手法においては、s i N A の合成は、デンドリマーテンプレート
をまず合成することによって開始され、続いて種々の官能性 s i N A を結合させる。種々
の構築物を図 2 3 に示す。結合し得る官能性 s i N A の数は、使用するデンドリマーの寸
法によってのみ限定される。

【0714】

多官能 s i N A に対する超分子手法

超分子形式は、デンドリマー合成の難題を簡単にする。この形式では、s i N A 鎖は、
標準の R N A 化学反応と、それに続く種々の相補鎖のアニールリングによって合成される。
個々の鎖の合成は、5' 末端における 1 個の s i N A のアンチセンスセンス配列、続いて
ヘキサエチレングリコール (hexaethylene glycol) などの核酸又は合成
リンカー、続いて別の s i N A の 5' から 3' 方向のセンス鎖を含む。したがって、s i
N A 鎖の合成は、標準の 3' から 5' 方向に実施され得る。三官能及び四官能 s i N A の
代表例を図 2 4 に示す。種々の鎖が効率的にアニールされる限り、類似の原理に基づいて
、より高い官能性の s i N A 構築物を設計することができる。

【0715】

ダイサーを使用可能な多官能 s i N A

複数の標的の生物情報学的解析によって、異なる標的配列間で共有される、約 2 から約
1 4 ヌクレオチド長の一連の同一配列を特定することができる。ダイサーによるプロセシ
ングによって、第 2 の機能的 5' アンチセンス部位が出現するように、これらの同一領域
を設計して、長鎖 s i N A ヘリックス（例えば、> 3 0 塩基対）にすることができる（例
えば、図 2 5 参照）。例えば、s i N A アンチセンス鎖（例えば、3' - T T オーバーハ
ングを有する二本鎖中の 2 1 ヌクレオチド鎖）の最初の 1 7 ヌクレオチドが標的 R N A に
相補的であるときには、2 5 n M で頑強なサイレンシングが認められた。同じ形式の 1 6
ヌクレオチドのみの相補性によって 8 0 % のサイレンシングが認められた。

【0716】

約 3 0 から 4 0 又はそれを超える塩基対の s i N A の設計にこの性質を組み入れること
によって、更に別の多官能 s i N A 構築物が得られる。図 2 5 の例は、3 0 塩基対二本鎖
が、D i c e r - R N a s e I I I によるプロセシング後に、3 個の異なる配列を標的に
することができる方法を示している。ウイルス因子、宿主因子メッセージ、所与の経路（
例えば、炎症性カスケード）に沿った複数のポイントなど、これらの配列は、同じ m R N
A 上、又は別々の R N A 上に存在し得る。また、4 0 塩基対の二本鎖は、二官能性設計を
直列に組み合わせて、4 個の標的配列を標的にする単一の二本鎖を与え得る。更に大規模
な手法は、1 個の多官能二本鎖で 5 又は 6 個の標的をサイレンシングし得る相同配列の使用
を含み得る。図 2 5 の例は、その達成方法を示している。3 0 塩基対二本鎖は、ダイサ
ーによってどちらかの末端から 2 2 と 8 塩基対の生成物に開裂する（8 b. p. 断片は示
さず。）。見やすくするために、ダイサーによって作製されるオーバーハングを示してい
ない（しかし、埋め合わせられ得る。）3 個のターゲティング配列を示す。重なった必要
な配列同一性を灰色の枠で示す。親の 3 0 b. p. s i N A の各 N は、安定化された化
学反応で試験した場合にダイサー切断を可能にする 2' - O H 位置の示唆される部位であ
る。D i c e r - R N a s e I I I による 3 0 量体二本鎖のプロセシングは、正確な 2
2 + 8 開裂を与えず、一連の密接に関係した生成物を生成することに留意されたい（2 2

10

20

30

40

50

+ 8 は主要な部位である。) 。したがって、ダイサーによるプロセッシングによって、一連の活性な s i N A が生成する。別の非限定的例を図 2 6 に示す。4 0 塩基対二本鎖は、ダイサーによって、一方の末端から 2 0 塩基対生成物に開裂する。見やすくするために、ダイサーによって作製されるオーバーハングを示していない (しかし、埋め合わせられ得る。) 4 個のターゲティング配列を 4 色、すなわち、青色、淡青色、赤色及びオレンジ色で示す。重なった必要な配列同一性を灰色の枠で示す。この設計形式は、より大きな R N A に拡張することができる。化学的に安定化された s i N A がダイサーによって結合する場合には、戦略的に配置されたりボヌクレオチド結合によって、本発明者らの多官能性設計のより広範なレパートリーを可能にする切断産物の設計が可能になり得る。例えば、約 2 2 ヌクレオチドのダイサー標準に限定されない切断産物は、例えば、約 3 から約 1 5 ヌクレオチドの標的配列同一性の重なりを有する多官能 s i N A 構築物を可能にし得る。

10

【0717】

(実施例 1 4)

診断用途

本発明の s i N A 分子は、種々の応用分野、例えば、臨床、工業、環境、農業及び／又は研究の場面における分子標的 (例えば、R N A) の特定などの種々の診断用途に使用することができる。s i N A 分子のかかる診断上の使用は、再構成された R N A i 系の利用、例えば、細胞溶解物、又はある程度精製された細胞溶解物の使用を含む。本発明の s i N A 分子を診断ツールとして用いて、疾患細胞内の遺伝的浮動及び変異を検査することができ、又は細胞における内因性若しくは外因性の、例えばウイルス性の、R N A の存在を検出することができる。s i N A 活性と標的 R N A の構造との密接な関係によって、分子の任意の領域において、標的 R N A の塩基対形成及び 3 次元構造を変化させる変異を検出することができる。本発明の複数の s i N A 分子を使用することによって、インビトロ並びに細胞及び組織における R N A の構造及び機能に重要であるヌクレオチド変化をマッピングすることができる。s i N A 分子による標的 R N A の切断によって、遺伝子発現を阻害し、疾患又は感染の進行における特定の遺伝子産物の役割を規定することができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾患の重要な媒介物質として規定することができる。これらの実験は、併用療法 (例えば、異なる遺伝子を標的にする複数の s i N A 分子、公知の小分子阻害剤と組み合わせた s i N A 分子、又は組合せ s i N A 分子及び／又は他の化学若しくは生体分子を用いた間欠的治療) が可能になることによって、疾患進行のより良好な治療につながる。本発明の s i N A 分子の他のインビトロでの使用は、当分野でよく知られており、疾患、感染、又は関係する症状に関連する m R N A の存在の検出を含む。かかる R N A は、s i N A で処理した後、標準の方法、例えば蛍光共鳴発光移動 (f l u o r e s c e n c e r e s o n a n c e e m i s s i o n t r a n s f e r) を用いて、切断産物の存在を判定することによって検出される。

20

30

【0718】

特定の例においては、標的 R N A の野生型又は変異型のみを切断する s i N A 分子をアッセイに使用する。第 1 の s i N A 分子 (すなわち、標的 R N A の野生型のみを切断する s i N A 分子) を用いて、試料中に存在する野生型 R N A を特定し、第 2 の s i N A 分子 (すなわち、標的 R N A の変異型のみを切断する s i N A 分子) を用いて、試料中の変異型 R N A を特定する。反応対照として、野生型と変異型の両方の R N A の合成基質を両方の s i N A 分子によって切断して、反応における相対 s i N A 効率、及び「非標的」R N A 種の切断が存在しないことを実証する。合成基質からの切断産物は、試料集団中の野生型及び変異型 R N A の分析のためのサイズマーカーの作製にも役立つ。したがって、各分析は 2 種類の s i N A 分子、2 種類の基質、及び 1 種類の未知試料を必要とし、これらを組み合わせて 6 つの反応物にする。各 R N A の完全長及び切断断片をポリアクリルアミドゲルの 1 レーンで分析できるように、切断産物の存在を R N a s e 保護アッセイによって判定する。標的細胞における変異 R N A の発現、及び所望の表現型の変化の推定されるリスクを洞察するために、結果を定量することが絶対に必要というわけではない。タンパク質産物が表現型 (すなわち、疾患に関係する表現型、又は感染に関係する表現型) の発生

40

50

に関係しているmRNAの発現は、リスクを築くのに十分である。比活性の類似したプローブを両方の転写物に使用する場合には、RNAレベルの定性的比較が適切であり、初期診断コストを削減する。RNAレベルを定性的に比較しても、定量的に比較しても、変異型と野生型のより高い比率は、より高いリスクと相関する。

【0719】

本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者の技術レベルを示している。この開示において引用するすべての参考文献を、各参考文献を参照によりその全体を個々に組込む場合と同じ程度に、参照により本明細書に組込む。

【0720】

当業者は、本発明が、その目的を実行して、記載した結果及び効果、並びに本発明に固有の結果及び効果を得るのに、十分に適合していることを容易に理解するはずである。好ましい実施形態の現時点での代表として本明細書に記載する方法及び組成物は、例示的なものであって、本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に記載する方法及び組成物の変更及び他の用途が当業者に生起するはずであるが、それらは、本発明の精神に包含され、特許請求の範囲によって規定される。

【0721】

本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、本明細書に開示する本発明に種々の置換及び改変をなし得ることを、当業者は容易に理解できるはずである。すなわち、かかる追加の実施形態は、本発明及び以下の特許請求の範囲の範囲内である。本発明は、RNAi活性を媒介する、活性の改善された核酸構築物を作製するために、本明細書に記載する化学修飾の種々の組合せ及び／又は置換を試験することを当業者に教示する。かかる活性の改善は、安定性の改善、生物学的利用能の改善、及び／又はRNAiを媒介する細胞応答の活性化の改善を含み得る。したがって、本明細書に記載する特定の実施形態は限定的なものではなく、RNAi活性が改善されたsiNA分子を特定するために、本明細書に記載する修飾の特定の組合せを過度の実験なしに試験し得ることを当業者は容易に理解することができる。

【0722】

本明細書に説明的に記載される本発明は、本明細書に具体的に開示しない任意の要素、制約の非存在下で適切に実施し得る。すなわち、例えば、本明細書の各例においては、「を含む」、「から本質的になる」及び「からなる」という用語のいずれも、他の2つの用語のどちらかと置換し得る。使用した用語及び表現は、説明の用語として使用され、限定的な用語ではない。かかる用語及び表現の使用においては、示した、また、記述した特徴又はその一部の任意の等価物を除外することを意図したものではない。そうではなく、特許請求する本発明の範囲内で種々の改変が可能であることを認識されたい。かくして、本発明を好ましい実施形態、必須でない特徴によって具体的に開示したが、本明細書で開示する概念の改変及び変形が当業者によってなされ得るものであり、かかる改変及び変形は、明細書本文及び添付の特許請求の範囲に規定された本発明の範囲内とみなされることを理解すべきである。

【0723】

また、発明の特徴又は態様がマーカッシュ群又は他の代替物の分類の観点から記載されている場合には、それによって、本発明が、マーカッシュ群又は他の群の任意の個々の構成要素又は構成要素の亜群の観点からも記載されていることを当業者は認識されたい。

【0724】

【表 1】

表 1

化学的に修飾された s i R N A 構築物に対する安定化化学の非限定的な例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	P=S	鎖
「Stab00」	リボ	リボ	3'末端に TT		S/AS
「Stab1」	リボ	リボ	—	5'末端に 5 3'末端に 1	S/AS
「Stab2」	リボ	リボ	—	全ての結合	通常 AS
「Stab3」	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に 4 3'末端に 4	通常 S
「Stab4」	2'-フルオロ	リボ	5'及び 3'末端	—	通常 S
「Stab5」	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に 1	通常 AS
「Stab6」	2'-O-メチル	リボ	5'及び 3'末端	—	通常 S
「Stab7」	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'及び 3'末端	—	通常 S
「Stab8」	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に 1	S/AS
「Stab9」	リボ	リボ	5'及び 3'末端	—	通常 S
「Stab10」	リボ	リボ	—	3'末端に 1	通常 AS
「Stab11」	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に 1	通常 AS
「Stab12」	2'-フルオロ	LNA	5'及び 3'末端		通常 S
「Stab13」	2'-フルオロ	LNA		3'末端に 1	通常 AS
「Stab14」	2'-フルオロ	2'-デオキシ		5'末端に 2 3'末端に 1	通常 AS
「Stab15」	2'-デオキシ	2'-デオキシ		5'末端に 2 3'末端に 1	通常 AS
「Stab16」	リボ	2'-O-メチル	5'及び 3'末端		通常 S
「Stab17」	2'-O-メチル	2'-O-メチル	5'及び 3'末端		通常 S
「Stab18」	2'-フルオロ	2'-O-メチル	5'及び 3'末端		通常 S
「Stab19」	2'-フルオロ	2'-O-メチル	3'末端		S/AS
「Stab20」	2'-フルオロ	2'-デオキシ	3'末端		通常 AS
「Stab21」	2'-フルオロ	リボ	3'末端		通常 AS
「Stab22」	リボ	リボ	3'末端		通常 AS
「Stab23」	2'-フルオロ*	2'-デオキシ*	5'及び 3'末端		通常 S
「Stab24」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*	—	3'末端に 1	S/AS
「Stab25」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*	—	3'末端に 1	S/AS
「Stab26」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*	—		S/AS
「Stab27」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*	3'末端		S/AS
「Stab28」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*	3'末端		S/AS
「Stab29」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*		3'末端に 1	S/AS
「Stab30」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*			S/AS
「Stab31」	2'-フルオロ*	2'-O-メチル*	3'末端		S/AS
「Stab32」	2'-フルオロ	2'-O-メチル			S/AS
「Stab33」	2'-フルオロ	2'-デオキシ*	5'及び 3'末端	—	通常 S
「Stab34」	2'-フルオロ	2'-O-メチル*	5'及び 3'末端		通常 S
「Stab35」	2'-フルオロ**	2'-O-メチル*			通常 AS
「Stab36」	2'-フルオロ**	2'-O-メチル*			通常 AS
「Stab 3F」	2'-OCF3	リボ	—	5'末端に 4 3'末端に 4	通常 S
「Stab 4F」	2'-OCF3	リボ	5'及び 3'末端	—	通常 S
「Stab 5F」	2'-OCF3	リボ	—	3'末端に 1	通常 AS
「Stab 7F」	2'-OCF3	2'-デオキシ	5'及び 3'末端	—	通常 S
「Stab 8F」	2'-OCF3	2'-O-メチル	—	3'末端に 1	S/AS
「Stab11F」	2'-OCF3	2'-デオキシ	—	3'末端に 1	通常 AS

「Stab12F」	2'-OCF3	LNA	5'及び3'末端		通常 S
「Stab13F」	2'-OCF3	LNA		3'末端に 1	通常 AS
「Stab14F」	2'-OCF3	2'-デオキシ		5'末端に 2 3'末端に 1	通常 AS
「Stab15F」	2'-OCF3	2'-デオキシ		5'末端に 2 3'末端に 1	通常 AS
「Stab18F」	2'-OCF3	2'-O-メチル	5'及び3'末端		通常 S
「Stab19F」	2'-OCF3	2'-O-メチル	3'末端		S/AS
「Stab20F」	2'-OCF3	2'-デオキシ	3'末端		通常 AS
「Stab21F」	2'-OCF3	リボ	3'末端		通常 AS
「Stab23F」	2'-OCF3*	2'-デオキシ*	5'及び3'末端		通常 S
「Stab24F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*	—	3'末端に 1	S/AS
「Stab25F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*	—	3'末端に 1	S/AS
「Stab26F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*	—		S/AS
「Stab27F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*	3'末端		S/AS
「Stab28F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*	3'末端		S/AS
「Stab29F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*		3'末端に 1	S/AS
「Stab30F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*			S/AS
「Stab31F」	2'-OCF3*	2'-O-メチル*	3'末端		S/AS
「Stab32F」	2'-OCF3	2'-O-メチル*			S/AS
「Stab33F」	2'-OCF3	2'-デオキシ*	5'及び3'末端		通常 S
「Stab34F」	2'-OCF3	2'-O-メチル*	5'及び3'末端		通常 S
「Stab35F」	2'-OCF3*†	2'-O-メチル*†			通常 AS
「Stab36F」	2'-OCF3*†	2'-O-メチル*†			通常 AS

キャップ=あらゆる末端キャップ、例えば、実施例 10 参照。

全ての Stab00-34 化学は、3' -末端チミジン (TT) 残基を含むことができる。

全ての Stab00-34 化学は、典型的には、約 21 のヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されているように変動することができる。

全ての Stab00-36 化学は、アンチセンス又はガイド鎖の 5' 末端から決定された二本鎖核酸二重鎖のセンス又はパッセンジャー鎖中の 11 番目の塩基対形成された位置に、単一のリボヌクレオチドを含むこともできる (図 6C 参照)

S=センス鎖

AS=アンチセンス鎖

*Stab 23 は、3' -CAP に隣接する単一のリボヌクレオチドを有する。

*Stab 24 及び Stab 28 は、5 末端に単一のリボヌクレオチドを有する。

*Stab 25、Stab 26、Stab 27、Stab 35 及び Stab 36 は、5' 末端に 3 つのリボヌクレオチドを有する

*Stab 29、Stab 30、Stab 31、Stab 33 及び Stab 34 5' 末端から最初の 3 つのヌクレオチド位置における何れかのプリンがリボヌクレオチドである

p = ホスホロチオアート結合

†Stab 35 は、3' 突出部に 2' -O-メチルU を有し、5' 末端に 3 つのリボヌクレオチドを有する。

†Stab 36 は、標的配列に対して相補的である 2' -O-メチル突出部 (天然に存在する突出部) を有し、5' 末端に 3 つのリボヌクレオチドを有する。

【0725】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

化合物番号	合成番号	通称	配列	配列番号
33717	50400	HBV:262U21 siNA	B uGGAcuucucucAAuuuuUttB	1
33718	50401	HBV:262U21 siNA	B uGGAcuucucucAAUUUUUcTTB	2
33719	50402	HBV:262U21 siNA	B uGGAcuUCUcUCACAAuuuucTTB	3
33720	50403	HBV:262U21 siNA	B UGGACUucucucAAuuuucTTB	4
33721	50404	HBV:280L21 siNA (262C)	IAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> ATsT	5
33722	50405	HBV:280L21 siNA (262C)	GAAAAuGAGAGAA <u>Gucc</u> ATsT	6
33723	50406	HBV:280L21 siNA (262C)	GAAAAuUGAGAGAA <u>Gucc</u> ATsT	7
33724	50407	HBV:280L21 siNA (262C)	GAAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> ATsT	8
35098	52100	HBV:280L21 siNA (262C)	GAAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> ATsT	9
35099	52101	HBV:280L21 siNA (262C)	GAAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> ATsT	10
35100	52102	HBV:280L21 siNA (262C)	GAAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> ATsT	11
33711	50392	HBV:263U21 siNA	B GGAcuucucucAAUUUUcUTT B	12
33712	50393	HBV:263U21 siNA	B GGAcuuCUCUCAAuuuucUTT B	13
33713	50394	HBV:263U21 siNA	B GGACUucucucAAuuuucUTT B	14
33714	50395	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> TsT	15
33715	50396	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAUUUGAGAGAA <u>Gucc</u> TsT	16
33716	50397	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> TsT	17
33703	50378	HBV:1583U21 siNA	B GcAcuucGcuucAccuculTT B	18
33704	50379	HBV:1583U21 siNA	B GcAcuucGcuucACCUCUGTT B	19
33705	50380	HBV:1583U21 siNA	B GcAcuuCGCUUCAccucugTT B	20
33706	50381	HBV:1583U21 siNA	B GCACUUCGcuucAccucugTT B	21
33707	50382	HBV:1601L21 siNA (1583C)	UAGAGGuGAAGcGAAGuGcTsT	22
33708	50383	HBV:1601L21 siNA (1583C)	CAGAGGuGAAGcGAAGuGcTsT	23
33709	50384	HBV:1601L21 siNA (1583C)	cAGAGGuGAAGCGAA <u>Gc</u> TsT	24
33710	50385	HBV:1601L21 siNA (1583C)	cAGAGGuGAAGcGAAGUGcTsT	25
35075	52063	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAUUUGAGAGAA <u>Gucc</u> CTT	26
35076	52064	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAA <u>Gucc</u> CTT	27
35077	52065	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAUUUGAGAGAA <u>Gucc</u> CTT	28

10

20

30

40

34714	51673	HBV:263U21 siNA	GGACUUCUCUCAAAuuuuuuTT	29
34715	51674	HBV:263U21 siNA	GGACUUCucucucAAUUUUUCUTT	30
34716	51675	HBV:263U21 siNA	GGAcuuCUCUCUCAAUUUUCUTT	31
35086	52088	HBV:263U21 siNA	B GGAcuucucucAAuuuuuUUTT B	32
35088	52090	HBV:263U21 siNA	B GGAcuucucucAAuuuuuCTT B	33
35087	52089	HBV:263U21 siNA	B GGAcuucucucAAuuuuUUTT B	34
35090	52092	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAGAGuccTsT	35
35091	52093	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAGAGuccTsT	36
35092	52094	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAGAGuccTsT	37
35093	52095	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAGAGuccTsT	38
35094	52096	HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAuuGAGAGAGAGuccTsT	39
30607		HBV:262U21 siNA	B uGGAcuucucucAAuuuuuTTB	40
33214		HBV:263U21 siNA	B GGAcuucucucAAuuuuuTT B	41
32429		HBV:1583U21 siNA	B GcAcuucGcuucAccucGTT B	42
33591		HBV:263U21 siNA	B GGACUUCUCUCUCAUUUUUCUTT B	43
33593		HBV:281L21 siNA (263C)	AGAAAAUUGAGAGAGAGUCCTsT	44
33701		HBV:263U21 siNA inv	B UCUUUUAACUCUCUUCAGGTT B	45
33702		HBV:281L21 siNA (263C) inv	CCUGAAGAGAGAGUUAAAAGATsT	46
32448		HBV:1583U21 siNA	B GCACUUCGCUUCACCCUCUGTT B	47
32458		HBV:1601L21 siNA (1583C)	CAGAGUGAGAGCGAAGUGCTsT	48
32488		HBV:1583U21 siNA inv	B GUCUCCACUUCGCUUCACGTT B	49
32498		HBV:1601L21 siNA (1583C) inv	CGUGAAGCGAAGUGGAGACTsT	50

33139	56164	HCVa:282U21 siRNA stab07	B GcGAAAGGccuuGuGGuAcTT B	51
38279	56171	HCVa:300L21 siRNA (282C) stab25	GUAccAcAAGGccuuuGcTsT	52
38296	56172	HCVa:300L21 siRNA (282C) stab29	GuAccAcAAGGccuuuGcTsT	53
33149	56158	HCVa:304U21 siRNA stab07	B cuGAuAGGGuGcuuGcGAGTT B	54
33189	56119	HCVa:322L21 siRNA (304C) stab08	cucGcAAAGcAcccuAucAGTsT	55
35180	52274	HCVa:322L21 siRNA (304C) stab25	CUCGcAAGcAcccuAucAGTsT	56
31703	56161	HCVa:327U21 siRNA stab07	B ccGGGAGGucucGuAGAcTT B	57

【 0 7 2 6 】

35175	56124	HCVa:345L21 siRNA (327C) stab25	GGUcuAcGAGAccucccGGTsT	58
35176	56127	HCVa:345L21 siRNA (327C) stab29	GGucuAcGAGAccucccGGTsT	59
33214	49777	HBV:263U21 siRNA stab07	B GGAcuucucucAAuuuuuuTT B	60
38749	56694	HBV:281L21 siRNA (263C) stab35	AGAAAAuuGAGAGAAAGuccUU	61
47675	62734	HBV:281L21 siRNA (263C) stab36	AGAAAAuuGAGAGAAAGuccAC	62
37793	55512	HBV:281L21 siRNA (263C) stab26	AGAAAAuuGAGAGAAAGuccTT	63
35092	52094	HBV:281L21 siRNA (263C) stab25	AGAAAAuuGAGAGAAAGuccTsT	64
33578	50194	HBV:263U21 siRNA inv stab07	B uuuuuuAAcucucuuucAGGTT B	65
35092	52094	HBV:281L21 siRNA (263C) stab25	AGAAAAuuGAGAGAAAGuccTsT	66
34526	51436	HBV:263U21 siRNA stab00	GGACUUCUCUCAUUUUUCUTT	67
34527	51437	HBV:281L21 siRNA (263C) stab00	AGAAAAUUUGAGAGAAAGUCCTT	68

大文字=リボスクレオチド

小文字=2'-デオキシ-2'-フルオロ

下線 = 2'-O-メチル

斜体 = 2'-デオキシ

B = 逆位デオキシ脱塩基

s = ホスホロチオアート

I = イノシン

10

20

30

40

【表 3】

表 3

A. 2. 5 μmol 合成サイクルABI 394 装置

試薬	当量	量	待ち時間*DNA	待ち時間*2'-O-メチル	待ち時間*RNA
ホスホルアミ ダイト	6.5	163 μL	45 秒	2.5 分	7.5 分
S-エチルテト ラゾール	23.8	238 μL	45 秒	2.5 分	7.5 分
無水酢酸	100	233 μL	5 秒	5 秒	5 秒
N-メチルイミ ダゾール	186	233 μL	5 秒	5 秒	5 秒
TCA	176	2.3mL	21 秒	21 秒	21 秒
ヨウ素	11.2	1.7mL	45 秒	45 秒	45 秒
ビューケージ	12.9	645 μL	100 秒	300 秒	300 秒
アセトニトリ ル	NA	6.67 μL	N/A	NA	NA

B. 0. 2 μmol 合成サイクルABI 394 装置

試薬	当量	量	待ち時間*DNA	待ち時間*2'-O-メチル	待ち時間*RNA
ホスホルアミ ダイト	15	31 μL	45 秒	233 秒	465 秒
S-エチルテト ラゾール	38.7	31 μL	45 秒	233 分	465 秒
無水酢酸	655	124 μL	5 秒	5 秒	5 秒
N-メチルイミ ダゾール	1245	124 μL	5 秒	5 秒	5 秒
TCA	700	732 μL	10 秒	21 秒	10 秒
ヨウ素	20.6	244 μL	15 秒	15 秒	15 秒
ビューケージ	7.7	232 μL	100 秒	300 秒	300 秒
アセトニトリ ル	NA	2.64mL	N/A	NA	NA

B. 0. 2 μmol 合成サイクル96 ウェル装置

試薬	当量	量	待ち時間*DNA	待ち時間*2'-O-メチル	待ち時間*RNA
ホスホルアミ ダイト	22/33/68	40/60/120 μL	60 秒	180 秒	360 秒
S-エチルテト ラゾール	70/105/210	40/60/120 μL	60 秒	180 分	360 秒
無水酢酸	265/265/265	50/50/50 μL	10 秒	10 秒	10 秒
N-メチルイミ ダゾール	502/502/502	50/50/50 μL	10 秒	10 秒	10 秒
TCA	238/475/475	250/500/500 μL	15 秒	15 秒	15 秒
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	80/80/80 μL	30 秒	30 秒	30 秒
ビューケージ	34/51/51	80/120/120	100 秒	200 秒	200 秒
アセトニトリ ル	NA	1150/1150/1150 μL	N/A	NA	NA

- ・待ち時間には、輸送中の接触時間は含まれない。
- ・直列合成は、リンカー分子の二重カップリングを使用する

【表 4】

表 4

脂質ナノ粒子 (LNP) 製剤

製剤番号	組成	モル比
L051	CLinDMA/DSPC/Chol/PEG-n-DMG	48/40/10/2
L053	DMOBA/DSPC/Chol/PEG-n-DMG	30/20/48/2
L054	DMOBA/DSPC/Chol/PEG-n-DMG	50/20/48/2
L069	CLinDMA/DSPC/コレステロール/PEG-コレステロール	48/40/10/2
L073	pCLinDMA 又は CLinDMA/DMOBA/DSPC/Chol/PEG-n-DMG	25/25/20/28/2
L077	eCLinDMA/DSPC/コレステロール/2KPEG-Chol	48/40/10/2
L080	eCLinDMA/DSPC/コレステロール/2KPEG-DMG	48/40/10/2
L082	pCLinDMA/DSPC/コレステロール/2KPEG-DMG	48/40/10/2
L083	pCLinDMA/DSPC/コレステロール/2KPEG-Chol	48/40/10/2
L086	CLinDMA/DSPC/コレステロール/2KPEG-DMG/リノレイルアルコール	43/38/10/2/7
L061	DMLBA/コレステロール/2KPEG-DMG	52/45/3
L060	DMLBA/コレステロール/2KPEG-DMG 5 の N/P 比	52/45/3
L097	DMLBA/DSPC/コレステロール/2KPEG-DMG	50/20/28
L098	DMOBA/コレステロール/2KPEG-DMG、3 の N/P 比	52/45/3
L099	DMOBA/コレステロール/2KPEG-DMG、4 の N/P 比	52/45/3
L100	DMOBA/DOBA/3% PEG-DMG、3 の N/P 比	52/45/3
L101	DMOBA/コレステロール/2KPEG-コレステロール	52/45/3
L102	DMOBA/コレステロール/2KPEG-コレステロール、5 の N/P 比	52/45/3
L103	DMLBA/コレステロール/2KPEG-コレステロール	52/45/3
L104	CLinDMA/DSPC/コレステロール/2KPEG-コレステロール/リノレイルアルコール	43/38/10/2/7
L105	DMOBA/コレステロール/2KPEG-Chol、2 の N/P 比	52/45/3
L106	DMOBA/コレステロール/2KPEG-Chol、3 の N/P 比	67/30/3
L107	DMOBA/コレステロール/2KPEG-Chol、1.5 の N/P 比	52/45/3
L108	DMOBA/コレステロール/2KPEG-Chol、2 の N/P 比	67/30/3
L109	DMOBA/DSPC/コレステロール/2KPEG-Chol、2 の N/P 比	50/20/28/2

10

20

30

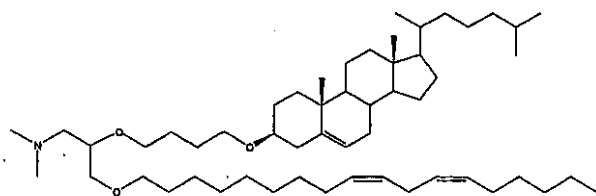
40

L110	DMOBA/コレステロール/2KPEG-DMG、1.5 の N/P 比	52/45/3
L111	DMOBA/コレステロール/2KPEG-DMG、1.5 の N/P 比	67/30/3
L112	DMLBA/コレステロール/2KPEG-DMG、1.5 の N/P 比	52/45/3
L113	DMLBA/コレステロール/2KPEG-DMG、1.5 の N/P 比	67/30/3
L114	DMOBA/コレステロール/2KPEG-DMG、2 の N/P 比	52/45/3
L115	DMOBA/コレステロール/2KPEG-DMG、2 の N/P 比	67/30/3
L116	DMLBA/コレステロール/2KPEG-DMG、2 の N/P 比	52/45/3
L117	DMLBA/コレステロール/2KPEG-DMG、2 の N/P 比	52/45/3

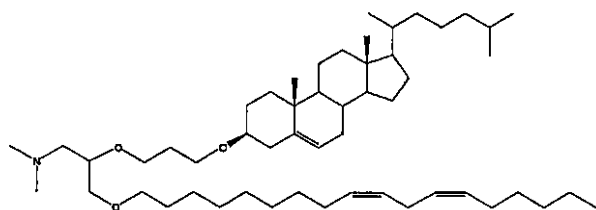
N/P 比＝陽イオン脂質と核酸間の窒素：リン比

【 0 7 2 8 】

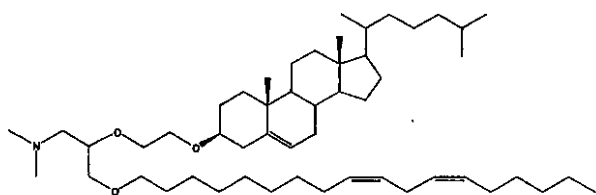
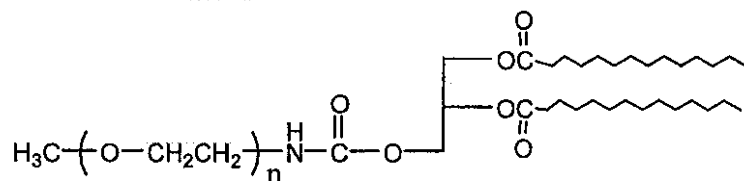
【化 3 2】

CLinDMA* 構造**pCLinDMA* 構造**

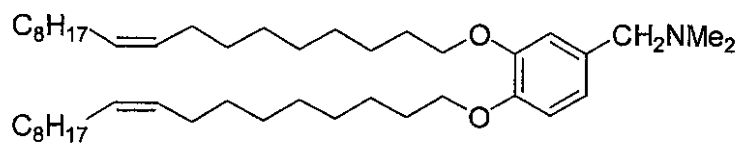
10

***eCLinDMA* 構造**

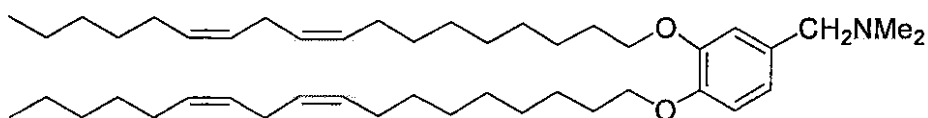
20

***PEG-n-DMG* 構造**

30

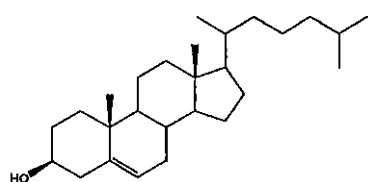
DMOBA* 構造**DMLBA* 構造**

40

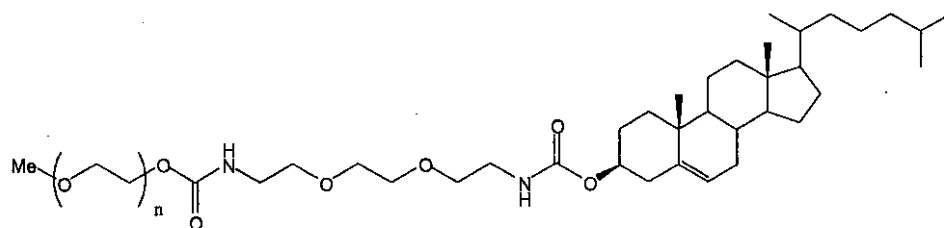
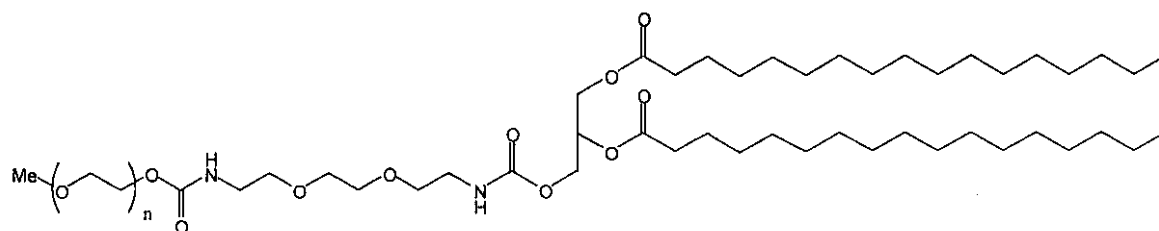


CCCCCCCC/C=C\CCCCCCCCOc1ccc(CO)cc1OCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC*N(CCCOP(=O)(OC(COC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC)OC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC)C)C

コレステロール



2KPEG-コレステロール

2KPEG-*DMG*

40

【表 5】

表 5

パターンの記載	パターン 番号	スコア
1 位に G 又は C	1	5
19 位に A 又は U	2	10
15-19 位の間が A/U に富む	3	10
4G 又は 4C のストリング (好ましくない)	4	-100
1-5 位の間が G/C に富む	5	10
18 位に A 又は U	6	5
10 位に A 又は U	7	10
13 位に G (好ましくない)	8	-3
13 位に A	9	3
9 位に G (好ましくない)	10	-3
9 位に A	11	3
14 位に A 又は U	12	1

表 5：高度に活性な s i N A を予測するための、それらの相対スコアを有するパターンを記載する S i r n a アルゴリズム。記載されているすべての位置は、19 マーの s i N A のセンス鎖に対するものである。

【0730】

【表 6】

表 6. LNP 調合された s i R N A の単回 3 m g / k g 注射で処理された C D - 1 マウス中の免疫刺激。I L - 6 および T N F - α レベルは、注射から 2.5 時間後に測定し、I F N - γ および I F N - α レベルは、処置から 8 時間後に測定された。値は、平均 $\pm$ 標準偏差として示されている、n = 5

PBS	13 $\pm$ 4	BLOD ^a	BLOQ ^b	BLOD
HBV263M-LNP-086	33 $\pm$ 21	BLOD	BLOQ	BLOD
HBV263R-LNP-086	2035 $\pm$ 378	169 $\pm$ 61	756 $\pm$ 345	41822 $\pm$ 11321

^aBLOD - 検出の限界以下

^bBLOQ - 定量の限界以下

【0731】

10

20

30

【表 7】

表 7. マウスでの、HBV 2 6 3-LNP-0 8 6 又は PBS の投与から 1 日後および 14 日後の体重および臓器重量。投薬群当り 5 匹の動物を、時点ごとに安楽死させた。体重は、安楽死直前に測定した。値は、平均±標準偏差として示されている。

投薬	投薬後の 日数	体重 (g)	肝臓重量(g)	肝 臓 : 体 重 (g/g)	脾臓重量 (g)	脾臓対体 重(g/g)
PBS	1	34.5±3.3 ^a	2.119±0.178	0.057±0.002	0.125 ± 0.022	0.003 ± 0.001
	14	36.5±3.5	1.991±0.275	0.055±0.002	0.110 ± 0.034	0.003 ± 0.001
HBV263-LNP-086 3mg/kg	1	33.6±2.8 ^a	1.970±0.119	0.055±0.003	0.106 ± 0.017	0.003 ± 0.001
	14	35.1±1.2	1.944±0.101	0.055±0.001	0.112 ± 0.025	0.003 ± 0.001

^a n = 投薬から 1 日後の体重に対して n = 10

【 0 7 3 2 】

【表 8】

表 8. マウスでの、3 mg/kg HBV263-LNP-086 又は PBS の投与から 1 日後および 14 日後における血清化学値。値は、平均 ± 標準偏差として示されている、n = 5。

投薬	投薬後の 日数	Alk Phos (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	アルブミン (g/dL)	総タンパク質 (g/dL)	グロブリン (g/dL)	総ビリルビン (mg/dL)	BUN (mg/dL)	コレステロール (mg/dL)	グルコース (mg/dL)
PBS	1	129 ± 22	39 ± 6	46 ± 5	2.9 ± 0.1	5.4 ± 0.2	2.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	25 ± 4	185 ± 28	242 ± 14
	14	170 ± 66	48 ± 12	48 ± 5	3.0 ± 0.1	5.4 ± 0.2	2.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	28 ± 4	195 ± 20	242 ± 25
HBV263- LNP-086 3mg/kg	1	154 ± 33	44 ± 14	58 ± 21	2.9 ± 0.2	5.4 ± 0.3	2.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1	27 ± 2	167 ± 11	259 ± 30
	14	141 ± 72	40 ± 11	50 ± 10	3.0 ± 0.1	5.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0	28 ± 2	178 ± 20	274 ± 48

【図面の簡単な説明】

【0733】

【図 1】図 1 は、低分子干渉核酸分子の合成のためのスキームに関する非限定的な例を示す。相補的低分子干渉核酸配列鎖である鎖 1 及び鎖 2 は、直列で合成され、固体支持体上

10

20

30

40

50

で固相合成のために使用される開裂可能なリンカーと同一又は別異であり得る、コハク酸ヌクレオチド又は脱塩基コハク酸塩等の開裂可能な連結によって接続される。合成は、固相又は液相の何れかであり得、示されている例において、合成は固相合成である。合成は、ジメトキシトリチル基等の保護基が直列型オリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドにおいて変化しないままであるように実施される。オリゴヌクレオチドの開裂及び脱保護の際、2つの低分子干渉核酸鎖は、低分子干渉核酸二本鎖を形成するように自発的にハイブリダイズし、これにより、末端保護基の特性を利用することによって、例えば末端保護基を有する二本鎖／オリゴヌクレオチドのみが単離される精製法においてトリチルを適用することによって前記二本鎖を精製できる。

【図2】図2は、本発明の方法によって合成される精製された低分子干渉核酸二本鎖のMALDI-TOF質量スペクトルを示す。示されている2つのピークは、個別の低分子干渉核酸配列鎖の推定質量に相当する。本結果は、直列型合成から生じた低分子干渉核酸二本鎖が、トリチルを適用する単純な精製法を使用して、単一の実体として精製できることを示す。

【図3】図3は、RNA干渉に関与する標的RNA分解に関する非限定的な提唱された機序の提示を示す。外来の一本鎖RNA、例えばウイルス、トランスポゾン、又は他の外因性RNAからRNA依存的RNAポリメラーゼ(RdRP)によって生じる二本鎖RNA(dsRNA)は、ダイサー酵素を活性化し、ダイサー酵素が次に低分子干渉核酸二本鎖を発生させる。あるいは、合成の又は発現された低分子干渉核酸は、適切な手段によって細胞中へ直接導入することができる。標的RNAを認識する活性型低分子干渉核酸複合体が形成し、RNA誘導サイレンシング複合体エンドヌクレアーゼ複合体による標的RNAの分解又はRNA依存的RNAポリメラーゼ(RdRP)による更なるRNAの合成を生じ、これがダイサーを活性化でき、更なる低分子干渉核酸分子を生じ、これによりRNA干渉反応を増幅できる。

【図4】図4AないしFは、本発明の化学的に修飾された低分子干渉核酸コンストラクトの非限定的な例を示す。前記図において、Nは、何れかのヌクレオチド(アデノシン、グアノシン、シトシン、ウリジン、又は場合によってチミジン)を表し、例えばチミジンは、括弧(N N)によって指定される突出領域において置換できる。多様な修飾が、低分子干渉核酸コンストラクトのセンス鎖及びアンチセンス鎖に関して示されている。(N N)ヌクレオチド位置は、本明細書のとおり化学的に修飾することができ(例えば、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ等)、対応する標的核酸配列から誘導され得、又は誘導されえない(例えば、図6Cを参照されたい。)。更に、図4に示されている配列は、場合によって、センス鎖の5'末端から9番目の位置に又はガイド鎖の5'末端にある11個のヌクレオチド位置を計数することによってガイド鎖の5'末端を基礎とした11番目の位置にリボヌクレオチドを含み得る(図6C参照)。図4A:センス鎖は、21個のヌクレオチドを含み、この中で、2つの末端の3'ヌクレオチドは、場合によって塩基対形成され、存在する全てのヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る(N N)ヌクレオチドを除くリボヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって、3'末端グリセリル部分を有する21個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端の3'ヌクレオチドは場合によって標的RNA配列と相補的であり、存在する全てのヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載されている他の化学的修飾を含み得る(N N)ヌクレオチドを除くリボヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載されている他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において(N N)ヌクレオチドを場合によって接続する。図4B:センス鎖は、21個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端3'ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載されている他の化

10

20

30

40

50

学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-O-メチル修飾されたヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここ中で、2つの末端の 3' ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2' デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-O-メチル修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載された他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、センス鎖及びアンチセンス鎖において (N N) ヌクレオチドを場合によって接続する。図 4 C: センス鎖は、5' 末端及び 3' 末端のキャップ部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端 3' ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-O-メチル又は 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端の 3' ヌクレオチドは、場合によって標的 RNA 配列と相補的であり、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書の他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において (N N) ヌクレオチドを場合によって接続する。図 4 D: センス鎖は、5' 末端及び 3' 末端のキャップ部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端 3' ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端の 3' ヌクレオチドは場合によって標的 RNA 配列と相補的であり、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-O-メチル修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書の他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において (N N) ヌクレオチドを場合によって接続する。図 4 E: センス鎖は、5' 末端及び 3' 末端のキャップ部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、その中で、2つの末端 3' ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3' 末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端の 3' ヌクレオチドは場合によって標的 RNA 配列と相補的であり、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書に記載されている他の化学的修飾を含み得る (N N) ヌクレオチドを除く 2'-O-メチル修飾されたヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載されている他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において (N N) ヌクレオチドを場合

10

20

30

40

50

によって接続する。図 4 F：センス鎖は、5'末端及び3'末端のキャップ部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端 3'ヌクレオチドは場合によって塩基対形成され、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る（N N）ヌクレオチドを除く 2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、2'-デオキシヌクレオチドである。アンチセンス鎖は、場合によって 3'末端グリセリル部分を有する 21 個のヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端の 3'ヌクレオチドは、場合によって標的 RNA 配列と相補的であり、1つの 3'末端ホスホロチオアートヌクレオチド間連結を有し、存在し得る全てのピリミジンヌクレオチドは、2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾されたヌクレオチドであり、存在し得る全てのプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、普遍的な塩基、又は本明細書の他の化学的修飾を含み得る（N N）ヌクレオチドを除く 2'-デオキシヌクレオチドである。「s」として示される、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート又は本明細書に記載されている他の修飾されたヌクレオチド間連結等の修飾されたヌクレオチド間連結は、アンチセンス鎖において（N N）ヌクレオチドを場合によって接続する。コンストラクト A ないし F のアンチセンス鎖は、本発明の何れかの標的核酸配列と相補的な配列を含む。更に、グリセリル部分（L）が、図 4 A ないし F に示される何れかのコンストラクトのためのアンチセンス鎖の 3'末端に存在するとき、修飾されたヌクレオチド間連結は場合によって存在する。

【図 5】図 5 A ないし F は、本発明の化学的に修飾された具体的な低分子干渉核酸配列の非限定的な例を示す。A ないし F は、図 4 A ないし F に記載されている化学的修飾を典型的な低分子干渉核酸配列に当てはまる。このような化学的修飾は、何れかの標的のために何れかの低分子干渉核酸配列へ適用できる。更に、図 5 に示される配列は、場合によって、センス鎖の 5'末端から 9 番目の位置に又はガイド鎖の 5'末端にある 11 個のヌクレオチド位置を計数することによってガイド鎖の 5'末端を基礎とした 11 番目の位置にリボヌクレオチドを含み得る（図 6 C 参照）。更に、図 5 に示されている配列は、アンチセンス鎖の 5'末端の最大約 4 個の位置で末端リボヌクレオチド（例えば、アンチセンス鎖の 5'末端での約 1、2、3、又は 4 個の末端リボヌクレオチド）を場合によって含み得る。

【図 6 A】図 6 A ないし C は、本発明の異なる低分子干渉核酸コンストラクトの非限定的な例を示す。図 6 A に示されている例（コンストラクト 1、2、及び 3）は、19 個の代表的な塩基対を有するが、本発明の別の実施形態は、本明細書に記載されている塩基対の何れかの数を含む。括弧の領域は、例えば長さ約 1、2、3、又は 4 個のヌクレオチド、好ましくは約 2 個のヌクレオチドを含むヌクレオチドのオーバーハングを表す。コンストラクト 1 及び 2 は、RNA 干渉活性のために独立して使用できる。コンストラクト 2 は、生分解性リンカーとして場合によって設計できるポリヌクレオチド又は非ヌクレオチドリリンカーを含み得る。ある実施形態において、コンストラクト 2 に示されているループ構造は、インビボ及び／又はインビトロでのコンストラクト 1 の形成をもたらす生分解性リンカーを含み得る。別の例において、コンストラクト 3 は、同一原理の下でコンストラクト 2 を作製するために使用することが可能であり、ここで、リンカーは、インビボ及び／又はインビトロでの活性型低分子干渉核酸コンストラクト 2 を作製するために使用され、前記コンストラクト 2 は、インビボ及び／又はインビトロで活性型低分子干渉核酸コンストラクト 1 を作製するために、別の生分解性リンカーを場合によって利用できる。このように、低分子干渉核酸コンストラクトの安定性及び／又は活性は、インビボ又はインビトロで及び／又はインビトロで使用するための低分子干渉核酸コンストラクトの設計に基づいて調節できる。

【図 6 B】図 6 A ないし C は、本発明の異なる低分子干渉核酸コンストラクトの非限定的な例を示す。図 6 B に示されている例は、マイクロ RNA 等の、突出部、バルジ、ループ及び部分的な相補性から生じるステムループを含み得る、本発明の二本鎖核酸分子の異なる変動を表す。バルジ、ループ、及びステムループを有するこのようなモチーフは一般的に

、マイクロRNAの特徴である。バルジ、ループ及びステムループは、本発明の二本鎖核酸分子の1つの鎖又は両方の鎖において約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれ以上のヌクレオチドのミスマッチ又はバルジ等の部分的な相補性の何れかの程度から生じ得る。

【図6C】図6AないしCは、本発明の異なる低分子干渉核酸コンストラクトの非限定的な例を示す。図6Cに示される例は、ジヌクレオチド3'突出部を有する2つの21ヌクレオチド配列の19塩基対二本鎖を含む本発明のモデルの二本鎖核酸分子を表す。上の鎖(1)は、センス鎖(パッセンジャー鎖)を表し、中間の鎖(2)は、アンチセンス(ガイド鎖)を表し、下の鎖(3)は、標的ポリヌクレオチド配列を表す。ジヌクレオチド突出部(NN)は、標的ポリヌクレオチドから誘導された配列を含み得る。例えば、ガイド鎖中の3'-(NN)配列は、標的ポリヌクレオチドの5'-[NN]配列と相補的であり得る。更に、パッセンジャー鎖の5'-(NN)配列は、標的ポリヌクレオチド配列の5'-[NN]配列と同一の配列を含み得る。他の実施形態において、突出部(NN)は、例えばガイド鎖中の3'-(NN)配列が標的ポリヌクレオチドの5'-[NN]配列と相補的ではなく、パッセンジャー鎖の5'-(NN)配列が標的ポリヌクレオチド配列の5'-[NN]配列とは異なる配列を含み得る標的ポリヌクレオチド配列からは誘導されない。更なる実施形態において、全ての(NN)ヌクレオチドは、例えば2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、及び/又は本明細書の他の修飾のように化学的に修飾される。更に、パッセンジャー鎖は、パッセンジャー鎖のリボヌクレオチド位置Nを含み得る。示されている代表的な19塩基対21塩基長の二本鎖に関して、位置Nは、パッセンジャー鎖の3'末端からの9個のヌクレオチドであり得る。しかしながら、異なる長さの二本鎖において、位置Nは、ガイド鎖の5'末端から11個のヌクレオチド位置を計数し、パッセンジャー鎖中の対応する塩基対形成したヌクレオチドを選ぶことによって、ガイド鎖の5'末端をベースに決定される。Ago2による開裂は、矢印によって示されるように、位置10と位置11との間で生じる。更なる実施形態において、ガイド鎖の5'末端から10個及び11個のヌクレオチド位置を計数し、パッセンジャー鎖中の相当の塩基対形成したヌクレオチドを選ぶことによって、ガイド鎖の5'末端をベースにした位置10及び位置11にある2つのリボヌクレオチドNNが存在する。

【図7】図7AないしCは、低分子干渉核酸ヘアピン状コンストラクトを作製するための発現カセットを作製する際に利用されるスキームの図を示したものである。図7A：5'制限部位(R1)配列の後に、所定の標的配列と同一の配列を有する領域(低分子干渉核酸のセンス領域)が続くDNAオリゴマーが合成され、ここで、センス領域は例えば、長さ約19、20、21、又は22個のヌクレオチド(N)を含み、その後例えば約3ないし約10個のヌクレオチドを含む所定の配列(X)のループ配列が続く。図7B：次に、合成コンストラクトはDNAポリメラーゼにより伸長され、標的配列に対する特異性を有し、自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域を有する低分子干渉核酸転写産物を生じる自己相補的配列を有するヘアピン状構造を生じる。図7C：配列を直鎖化するためにコンストラクトは(例えば約95℃に)加熱し、これにより、プライマーを使用して、相補的な第二DNA鎖を第一鎖の3'制限配列へと伸長することが可能となる。二本鎖DNAは次に、細胞中での発現のために適切なベクター中に挿入される。コンストラクトは、3'末端ヌクレオチド突出部が、例えば制限部位を設計すること及び/又はPaul et al., 2002, Nature Biotechnology, 29, 505-508に記載されているとおりポリU末端領域を利用することによって転写から生じるように設計できる。

【図8】図8AないしCは、二本鎖低分子干渉核酸コンストラクトを作製するための発現カセットを作製する際に利用されるスキームの図を示したものである。図8A：5'制限(R1)部位配列の後に、所定の標的配列と同一の配列を有する領域(低分子干渉核酸のセンス領域)が続くDNAオリゴマーが合成され、ここでセンス領域は例えば、長さ約19、20、21、又は22個のヌクレオチド(N)を含み、その後規定された配列(X)のループ配列に隣接する3'制限部位(R2)が続く。図8B：次に、合成コンストラ

クトがDNAポリメラーゼによって伸長され、自己相補的配列を有するヘアピン状構造を生じる。図8C：コンストラクトは、R1及びR2に特異的な制限酵素によって加工され、二本鎖DNAを生じ、次に、前記DNAが細胞中での発現のために適切なベクター中に挿入される。転写カセットは、U6プロモーター領域が、低分子干渉核酸の個別のセンス鎖及びアンチセンス鎖を生じる二本鎖DNAの各側と隣接するように設計される。ポリT末端配列は、前記コンストラクトへ付加でき、得られた転写産物中にU字型突出部を生じ得る。

【図9】図9AないしEは、メッセンジャーRNA等の特定の標的核酸配列内で低分子干渉核酸により媒介されたRNA干渉のための標的部位を決定するために使用される方法の図を示したものである。図9A：低分子干渉核酸オリゴヌクレオチドのプールが合成され、ここで、低分子干渉核酸コンストラクトのアンチセンス領域は、標的核酸配列にわたって標的部位との相補性を有し、センス領域は、低分子干渉核酸のアンチセンス領域との配列相補性を含む。図9B及びC：（図9B）配列はプールされ、細胞中へのベクターの形質移入が低分子干渉核酸の発現を生じる（図9C）ように、ベクター中へと挿入される。図9D：細胞は、標的核酸配列の調節と関連した表現型の変化に基づいて選択される。図9E：低分子干渉核酸は、選択された細胞から単離され、標的核酸配列内での有効な標的部位を同定するために配列決定される。

【図10】図10は、例えば、（1）[3-3']逆方向デオキシリボース、（2）デオキシリボヌクレオチド、（3）[5'-3']-3'-デオキシリボヌクレオチド、（4）[5'-3']-リボヌクレオチド、（5）[5'-3']-3'-O-メチルリボヌクレオチド、（6）3'-グリセリル、（7）[3'-5']-3'-デオキシリボヌクレオチド、（8）[3'-3']-デオキシリボヌクレオチド、（9）[5'-2']-デオキシリボヌクレオチド、及び（10）[5-3']-ジデオキシリボヌクレオチドを含む、本発明の低分子干渉核酸配列の3'末端を安定化させるために使用できる異なる安定化化学反応（1ないし10）の非限定的な例を示す。図に示されている修飾された及び修飾されていない主鎖の化学反応に加え、これらの化学反応は、本明細書の異なる主鎖の修飾、例えば式Iを有する主鎖修飾と組み合わせられ得る。更に、示されている5'から示された末端の修飾までの2'-デオキシヌクレオチドは、本明細書の、修飾された又は修飾されていない別のヌクレオチド又は非ヌクレオチドであり得、例えば式IないしVIの何れか又はその何れかの組み合わせを有する修飾であり得る。

【図11】図11は、RNA干渉活性を媒介する能力を保存しながら、ヌクレアーゼ耐性を有する本発明の化学的に修飾された低分子干渉核酸コンストラクトを同定するために使用される戦略の非限定的な例を示す。化学的修飾は、教育された設計因子（例えば、2'-修飾を導入すること、塩基修飾、主鎖修飾、末端キャップ修飾等）をベースにした低分子干渉核酸コンストラクト中へ導入される。修飾したコンストラクトは、適切な系（例えば、示されているヌクレアーゼ耐性のためのヒト血清、又はPK/送達因子のための動物モデル）において検査される。並行して、低分子干渉核酸コンストラクトは、例えばルシフェラーゼリポーターアッセイ等の細胞培養系においてRNA干渉活性に関して検査される。次に、RNA干渉活性を維持しながら特定の特徴を有する先導低分子干渉核酸コンストラクトが同定され、更に修飾することができ、もう一度アッセイできる。この同一アプローチは、改善された薬物動態学的特性、送達、及びRNA干渉活性を有する低分子干渉核酸-抱合体分子を同定するのに使用できる。

【図12】図12は、直鎖及び二本鎖コンストラクト及びその非対称性誘導体を含む、本発明のリン酸化された低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示す。

【図13】図13は、本発明の化学的に修飾された末端リン酸基の非限定的な例を示す。

【図14A】図14Aは、標的核酸配列中に同定された回文構造核酸配列及び／又は反復核酸配列を利用する自己相補的なDFOコンストラクトを設計するのに使用される方法論の非限定的な例を示している。（i）回文構造配列又は反復配列は、核酸標的配列中で同定される。（ii）標的核酸配列及び回文構造配列と相補的な配列が設計される。（iii）相補的な配列の非回文構造部分／反復部分の逆方向の反復配列が、相補的な配列の3

10

20

30

40

50

’末端に付加され、核酸標的と相補的な配列を含む自己相補的DFO分子を生じる。(iv) DFO分子は、自己重合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成できる。

【図14B】図14Bは、二本鎖を形成するオリゴヌクレオチド配列に関する非限定的な代表例を示す。

【図14C】図14Cは、二本鎖を形成する代表的なオリゴヌクレオチド配列の自己重合模式図の非限定的な例を示す。

【図14D】図14Dは、二本鎖を形成する代表的なオリゴヌクレオチド配列の模式的な自己重合の後の、遺伝子発現の調節を生じる標的核酸配列との相互作用に関する非限定的な例を示す。

【図15】図15は、目的の何れかの標的核酸配列と相補的な配列を有するDFOコンストラクト中へ組み込まれる回文構造核酸配列及び／又は反復核酸配列を利用する自己相補的なDFOコンストラクトのデザインに関する非限定的な例を示す。これらの回文構造配列／反復配列の組み込みによって、各鎖が、例えばRNA干渉による標的遺伝子発現の調節を仲介できる二本鎖を、DFOコンストラクトのデザインが形成できる。第一に、標的配列が同定される。次に、相補的な配列が生じ、その中で、(X又はYとして示される)ヌクレオチド又は非ヌクレオチド修飾が、(図中でXYXYXYとして示される)人工的な回文構造を生じる相補的な配列中に導入される。非回文構造／反復相補的配列の逆方向の反復は、相補的な配列の3’末端へ付加され、核酸標的と相補的な配列を含む自己相補的なDFOを生じる。DFOは、自己重合して二本鎖オリゴヌクレオチドを形成できる。

【図16】図16は、異なる標的核酸配列のRNA干渉によって誘導される開裂を各々媒介することができる2つの個別のポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示す。図16Aは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域(相補性領域1)及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域(相補性領域2)を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中の各ポリヌクレオチド配列の3’末端に配置されている。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図16Bは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域(相補性領域1)及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域(相補性領域2)を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中の各ポリヌクレオチド配列の5’末端に配置される。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。

【図17】図17は、異なる標的核酸配列のRNA干渉によって誘導される開裂を各々媒介することができる別個の領域を含む単一ポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示す。図17Aは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域(相補性領域1)及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域(相補性領域2)を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第二相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中のポリヌクレオチド配列の3’末端に配置されている。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図17Bは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域(相補性領域1)及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域(相補性領域2)を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第一相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中のポリヌクレオチド配列の5’末端に配置される。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。ある実施形態において、これらの多機能性低分子干渉核酸コンストラクトは、インビボ又はインビトロで加工され、図16に示されているような多機能性低分子干渉核酸コンストラクトを生じる。

【図18】図18は、異なる標的核酸配列のRNA干渉によって誘導された開裂を各々媒

10

20

30

40

50

介することができる2つの個別のポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、多機能性低分子干渉核酸コンストラクトは更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含み、従って、より短い二機能性低分子干渉核酸コンストラクトが、異なる標的核酸配列に対するRNA干渉を媒介することができる。図18Aは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域（相補性領域1）及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域（相補性領域2）を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中の各ポリヌクレオチド配列の3'末端に配置されており、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図18Bは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域（相補性領域1）及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域（相補性領域2）を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第一及び第二相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中の各ポリヌクレオチド配列の5'末端に配置され、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。

【図19】図19は、異なる標的核酸配列のRNA干渉によって誘導された開裂を各々媒介することができる別個の領域を含む単一ポリヌクレオチド配列を含む、本発明の多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、多機能性低分子干渉核酸コンストラクトは更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含み、従って、より短い二機能性低分子干渉核酸コンストラクトが、異なる標的核酸配列に対するRNA干渉を媒介することができる。図19Aは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域（相補性領域1）及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域（相補性領域2）を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第二相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中のポリヌクレオチド配列の3'末端に配置され、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。図19Bは、第一標的核酸配列と相補的な第一領域（相補性領域1）及び第二標的核酸配列と相補的な第二領域（相補性領域2）を有する多機能性低分子干渉核酸分子の非限定的な例を示し、ここで、第一相補性領域は、多機能性低分子干渉核酸中のポリヌクレオチド配列の5'末端に配置され、第一及び第二相補性領域は更に、自己相補的領域、回文構造領域、又は反復領域を含む。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各ポリヌクレオチド配列の点線部分は、低分子干渉核酸二本鎖の相当する部分に関して相補性を有するが、標的核酸配列との相補性は有しない。ある実施形態において、これらの多機能性低分子干渉核酸コンストラクトは、インビボ又はインビトロで加工され、図18に示されるような多機能性低分子干渉核酸コンストラクトを生じる。

【図20】図20は、本発明の多機能性低分子干渉核酸分子が、異なるタンパク質（例えば、本明細書の標的の何れか）、例えばサイトカイン及びその対応する受容体、異なるウイルス系、ウイルス感染又は複製に関与するウイルス及び細胞内タンパク質、又は疾病の進行の持続に関与する共通の又は異なる生物学的経路に関与する異なるタンパク質をコードする個別のRNA分子等の、2つの個別の標的核酸分子をどのように標的化できるかに関する非限定的な例を示す。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各鎖は、個別の標的核酸分子との相補性を有する領域を含む。多機能性低分子干渉核酸分子は、低分子干渉核酸の各鎖がRNA誘導サイレンシング複合体によって利用され、その対応する標的のRNA干渉によって媒介される開裂を開始できるように設計される。これらのデザイン因子は、低分子干渉核酸コンストラクトの各末端の脱安定化を含み得る（例えば、Schwartz et al., 2003, Cell, 115, 199-208を参照されたい。

10

20

30

40

50

）。このような脱安定化は、例えばグアノシンーシチジン塩基対、代替的な塩基対（例えば、ゆらぎ）を使用することによって、又は本分野で公知のように末端ヌクレオチドの位置で化学的に修飾されたヌクレオチドを脱安定化することによって達成できる。

【図 2 1】図 2 1 は、本発明の多機能性低分子干渉核酸分子が、RNA の別のコード領域、RNA のコード及び非コード領域、又は RNA の選択的スプライシング変異体領域等の、同一標的核酸分子内の 2 つの個別の標的核酸配列を標的化する方法に関する非限定的な例を示す。多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの各鎖は、標的核酸分子の個別の領域との相補性を有する領域を含む。多機能性低分子干渉核酸分子は、低分子干渉核酸の各鎖が RNA 誘導サイレンシング複合体によって利用され、その相当する標的領域の RNA 干渉により媒介される開裂を開始できるように設計される。これらのデザイン因子は、低分子干渉核酸コンストラクトの各末端の脱安定化を含み得る（例えば、Schwarz et al., 2003, Cell, 115, 199-208 を参照されたい。）。このような脱安定化は、例えばグアノシンーシチジン塩基対、代替的な塩基対（例えば、ゆらぎ）を使用することによって、又は本分野で公知のように末端ヌクレオチドの位置で化学的に修飾されたヌクレオチドを脱安定化することによって達成できる。

【図 2 2】図 2 2 (A ないし H) は、本発明の繋ぎ止められた多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの非限定的な例を示す。示されている例において、リンカー（例えば、ヌクレオチド又は非ヌクレオチドリリンカー）は、2 つの低分子干渉核酸領域（例えば、2 つのセンス領域、2 つのアンチセンス領域、あるいは 1 つのセンス領域及び 1 つのアンチセンス領域の両者）を接続する。第一標的配列及び第二標的配列に対応する個別のセンス（又はセンス及びアンチセンス）配列は、多機能性低分子干渉核酸中のそれらの対応するセンス及び／又はアンチセンス配列とハイブリダイズする。更に、多様な抱合体、リガンド、アダプター、ポリマー又はリポーター分子は、選択的な又は改善された送達特性及び／又は薬物動態学的特性のためのリンカー領域へ結合することができる。

【図 2 3】図 2 3 は、多様なデンドリマーベースの多機能性低分子干渉核酸デザインの非限定的な例を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、超分子の多様な多機能性低分子干渉核酸デザインの非限定的な例を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、30 ヌクレオチドの前駆体の低分子干渉核酸コンストラクトを使用するダイサーにより可能となった多機能性低分子干渉核酸デザインの非限定的な例を示す。30 塩基対の二本鎖は、ダイサーによって何れかの末端から 22 塩基対及び 8 塩基対の産物へと開裂される（8 塩基対断片は示されていない。）。表示を簡単にするため、ダイサーによって生成された突出部は示されていないが、補うことができる。3 つの標的化配列が示されている。必要とされる重なった配列同一性は、灰色の箱型によって示されている。親の 30 塩基対の低分子干渉核酸の N は、これが安定化した化学反応において検査される場合、ダイサー開裂を可能にする 2'-OH 位置の示唆される部位である。ダイサー RNase III による 30 塩基長二本鎖の加工は、正確な 22+8 開裂を付与しないが、むしろ、密接に関連する一連の産物を生じる（22+8 が一次的な部位である。）ことに留意されたい。それゆえ、ダイサーによる加工は、一連の活性型低分子干渉核酸を生じる。

【図 2 6】図 2 6 は、40 ヌクレオチドの前駆体の低分子干渉核酸コンストラクトを使用するダイサーにより可能となった多機能性低分子干渉核酸デザインの非限定的な例を示す。40 塩基対の二本鎖は、ダイサーによって何れかの末端から 20 塩基対の産物へと開裂される。表示を簡単にするために、ダイサーによって生じたオーバーハングは示されていないが、補うことが可能である。4 つの標的化配列が示されている。相同性を有する標的配列は、箱型によって囲まれている。このデザインフォーマットは、より大きな RNA へと拡張できる。化学的に安定化された低分子干渉核酸がダイサーによって結合される場合、戦略的に配置されたりボヌクレオチド結合によって、多機能性デザインのより大規模なレパートリーを可能とするデザイナー開裂産物が可能となる。例えば、約 22 ヌクレオチドのダイサー標準物質に限定されない開裂産物によって、例えば約 3 ないし約 15 のヌク

レオチドに及ぶ標的配列同一性重複を有する多機能性低分子干渉核酸コンストラクトが可能となる。

【図 27】図 27 は、本発明の更なる多機能性低分子干渉核酸コンストラクトデザインの非限定的な例を示す。ある実施形態において、抱合体、リガンド、アプタマー、標識又は他の部分が、多機能性低分子干渉核酸の一領域へ結合し、送達特性又は薬物動態学的特性を改善することができる。

【図 28】図 28 は、本発明の更なる多機能性低分子干渉核酸コンストラクトデザインの非限定的な例を示す。ある実施形態において、抱合体、リガンド、アプタマー、標識又は他の部分が、多機能性低分子干渉核酸の一領域へ結合し、送達特性又は薬物動態学的特性を改善することができる。

【図 29】図 29 は、本発明のコレステロールによって抱合された低分子干渉核酸分子を合成するために使用できるコレステロールにより連結されたホスホラミダイトの非限定的な例を示す。コレステロール部分が低分子干渉核酸分子のセンス鎖の 5' 末端へ連結された例が示されている。

【図 30】図 30 は、選択位置でリボヌクレオチドを含み、HBV の 262 の部位の RNA を標的化する選択修飾パターンを有する多様な低分子干渉核酸コンストラクトを使用するインビトロでの HBV S 抗原 (HBsAg) の阻害に関する非限定的な例を示す。

【図 31】図 31 は、選択位置でリボヌクレオチドを含み、HBV の 263 の部位の RNA を標的化する選択修飾パターンを有する多様な低分子干渉核酸コンストラクトを使用するインビトロでの HBV S 抗原 (HBsAg) の阻害に関する非限定的な例を示す。

【図 32】図 32 は、選択位置でリボヌクレオチドを含み、HBV の 1583 の部位の RNA を標的化する選択修飾パターンを有する多様な低分子干渉核酸コンストラクトを使用するインビトロでの HBV S 抗原 (HBsAg) の阻害に関する非限定的な例を示す。

【図 33】図 33 は、選択位置でリボヌクレオチドを含み、HBV の 1583 の部位の RNA を標的化する選択修飾パターンを有する 2 つの異なる低分子干渉核酸コンストラクトを使用するインビトロでの HBV S 抗原 (HBsAg) の用量依存的阻害に関する非限定的な例を示す。

【図 34】図 34 は、選択位置でリボヌクレオチドを含み、HBV の 1583 の部位の RNA を標的化する選択修飾パターンを有する 2 つの異なる低分子干渉核酸コンストラクトを使用するインビトロでの HBV S 抗原 (HBsAg) の用量依存的阻害に関する非限定的な例を示す。

【図 35】図 35 は、選択位置でリボヌクレオチドを含み、HBV の 262 及び 263 の部位の RNA を標的化する選択修飾パターンを有する多様な低分子干渉核酸コンストラクトを使用するインビトロでの HBV S 抗原 (HBsAg) の阻害に関する非限定的な例を示す。

【図 36】図 36 は、327、282、及び 304 の部位の RNA を標的化するスタブ 25 及びスタブ 29 の低分子干渉核酸コンストラクトを用いた、インビトロでの HCV RNA 発現の用量依存的な阻害に関する非限定的な例を示す。

【図 37】図 37 は、異なる突出部化学反応を用いて LNP-086 及び LNP-061 製剤化された本発明の低分子干渉核酸分子を使用する、マウスにおける HBV DNA のインビボでの阻害に関する非限定的な例を示す。活性な LNP-086 及び LNP-061 低分子干渉核酸コンストラクトを、PBS コントロール及び逆方向の対照群と比較して評価した。図に示されているように、2'-O-メチルオーバーハングを有する低分子干渉核酸コンストラクトは、本モデルにおいて強力な抗 HBV 活性を付与する。

【図 38A】図 38 は、対照低分子干渉核酸群又は PBS 群と比較した、0.3、1、又は 3 mg/kg/日の用量で 3 日間処理された HBV 複製マウスにおけるインビボでの血清 HBV DNA のレベルの、HBV 263M-LNP-086 によって媒介された低下に関する非限定的な例を示す。血清 HBV DNA のレベルは、コントロール低分子干渉核酸群及び PBS 処理群において等しく、抗 HBV 活性の配列特異性、及び非特異的脂質効果の欠如を示した。

10

20

30

40

50

【図 38 B】図 38 は、対照低分子干渉核酸群又は P B S 群と比較した、0.3、1、又は 3 mg / k g / 日の用量で 3 日間処理された H B V 複製マウスにおけるインビボでの血清 H B V D N A のレベルの、H B V 2 6 3 M - L N P - 0 8 6 によって媒介された低下に関する非限定的な例を示す。血清 H B V D N A のレベルは、コントロール低分子干渉核酸群及び P B S 処理群において等しく、抗 H B V 活性の配列特異性、及び非特異的脂質効果の欠如を示した。

【図 39】図 39 は、コントロール低分子干渉核酸群又は P B S 群と比較した、0.3、1、又は 3 mg / k g / 日の用量で 3 日間処理した H B V 複製マウスにおけるインビボでの血清 H B V H B s A g のレベルの、H B V 2 6 3 M - L N P - 0 8 6 によって媒介された低下に関する非限定的な例を示す。血清 H B V H B s A g のレベルは、対照低分子干渉核酸群及び P B S 処理群において等価であり、抗 H B V 活性の配列特異性及び非特異的脂質効果の欠如を示した。

【図 40】図 40 は、H B V 感染のマウスモデルにおける H B V レベルの低分子干渉核酸によって媒介される低下の期間に関する非限定的な例を示す。H B V 複製マウスを H B V 2 6 3 M - L N P - 0 8 6 又は H B V 2 6 3 M i n v - L N P - 0 8 6 で、3 mg / k g / 日の用量で 3 日間処理した後、最後の投与の 3、7 及び 14 日後に H B V 血清力価を分析した。図に示されるように、抗 H B V 活性は持続的であり、有意な活性は、7 日目 (2.0 log 10 の低下) 及び 14 日目 (1.5 log 10 の低下) でさえ観察された。

【図 41】図 41 は、H B V 感染のマウスモデルにおける活性な H B V 2 6 3 M - L N P - 0 8 6 製剤により仲介される肝臓特異的 H B V R N A 開裂に関する非限定的な例を示す。H B V を複製するマウスを、0.3、1、3、10 mg / k g / 日での H B V 2 6 3 M - L N P - 0 8 6 の投与で、又は 10 mg / k g での H B V 2 6 3 i n v M - L N P 対照の投与で 3 日間処理し、肝臓 H B V R N A のレベルを最後の投与から 3 日後に測定した。肝臓 H B V R N A の用量依存的低下が観察され、10 mg / k g での H B V 2 6 3 i n v M - L N P - 0 8 6 対照と比較して 10、3、1、及び 0.3 mg / k g の H B V 2 6 3 M - L N P 処理群においてそれぞれ 90%、66.5%、18% 及び 4% の低下が観察された。

【図 42】図 42 は、肝臓 H B V R N A の低下が、H B V R N A の R N A 干渉により媒介される開裂によることを示す非限定的な例を示す。5' の R A C E (R A C E) 分析を使用して、推定された部位での H B V R N A の開裂を検出した。H B V 2 6 3 M - L N P - 0 8 6 又は H B V 2 6 3 M i n v - L N P - 0 8 6 で H B V 複製マウスを 3 mg / k g / 日の用量で 3 日間処理した。最後の投与の 3、7、又は 14 日後に動物を屠殺し、肝臓の R N A 全体を単離した。アダプター配列の R N A 集団の遊離 5' 末端への連結、並びにアダプター及び H B V 特異的プライマーによるその後の R T - P C R によって、H B V R N A が推定された標的部位で開裂された場合、145 塩基対の P C R 産物を生じることが予測された。図に示されるように、予測される増幅産物は、各時点での H B V 2 6 3 活性型低分子干渉核酸により処理された試料中で観察されたが、H B V 2 6 3 対照試料中では観察されなかった。次に、P C R 産物をサブクローニングし、配列決定すると、アダプター配列と H B V 2 6 3 低分子干渉核酸の推定開裂部位との間の正確な接合部が確認された。本結果は、肝臓中で観察された H B V R N A の低下が、肝臓中の H B V R N A の特異的 R N A 干渉によって媒介される開裂によるものであったことを確立する。更に、7 日及び 14 日の時点での特異的 H B V R N A 開裂産物の検出は、H B V に対する低分子干渉核酸の活性の期間が、H B V R N A の持続した開裂によることを示す。

【図 43】図 43 は、単一の 3 mg / k g 投与後のマウスにおいて測定される H B V 2 6 3 M - L N P - 0 8 6 の薬物動態学的特性に関する非限定的な例を示す。ハイブリダイゼーション法を使用して、血漿及び肝臓中の H B V 2 6 3 M 低分子干渉核酸を経時的に検出した。H B V 2 6 3 M は、血漿中で迅速に除去され、除去 $T_{1/2}$ は約 1.7 時間であった。しかしながら、H B V 2 6 3 M は、14 日間のサンプリング期間を通じて肝臓中で検出され、4 日間の除去 $T_{1/2}$ であった。31.3 ± 17.8 ng / mg (平均 ± 標準偏差) の最大濃度が 1 時間で肝臓中に観察され、低分子干渉核酸用量の 65 ± 32% に相当

10

20

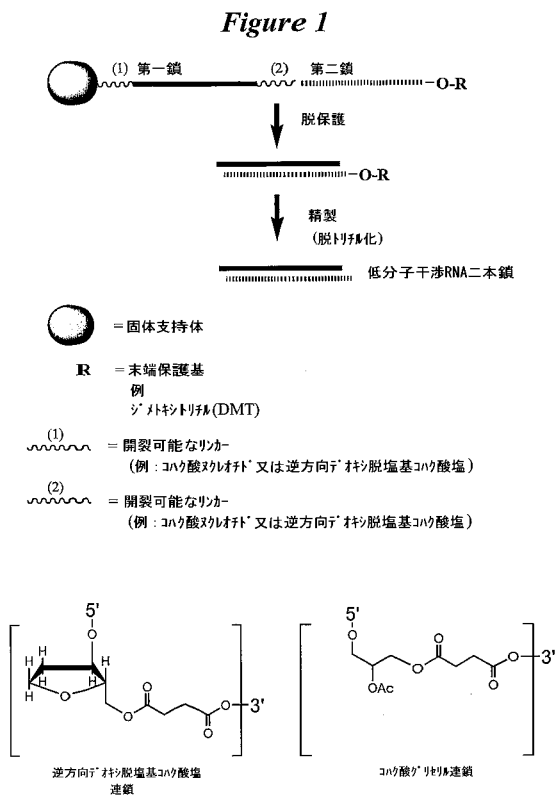
30

40

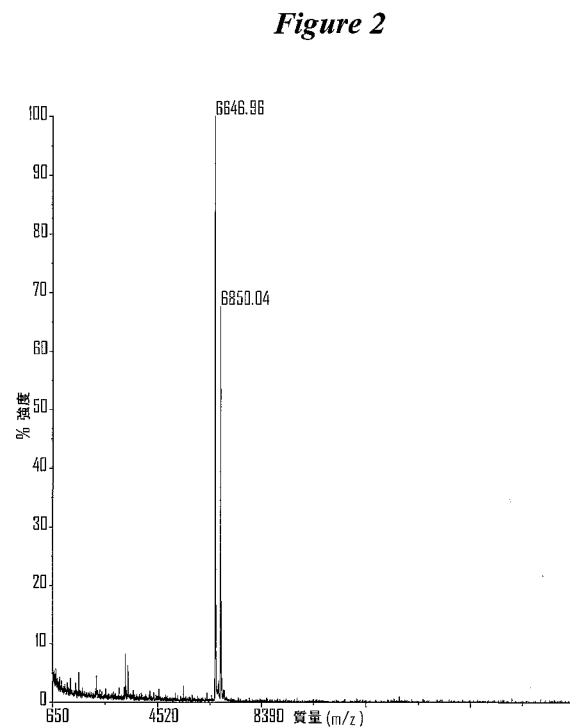
50

した。14日目に、用量の $1.4 \pm 0.7\%$ が肝臓中で未変化のままであった。マウスモデルにおいて観察された低分子干渉核酸により長期間媒介される抗HBV活性は、肝臓中の低分子干渉核酸のこの延長した残留時間と極めて相関する。

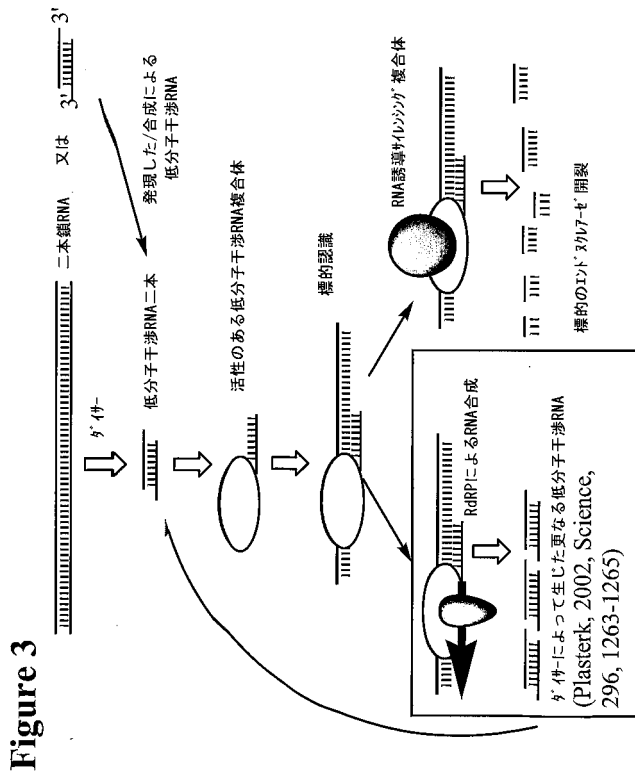
【図1】



【図2】

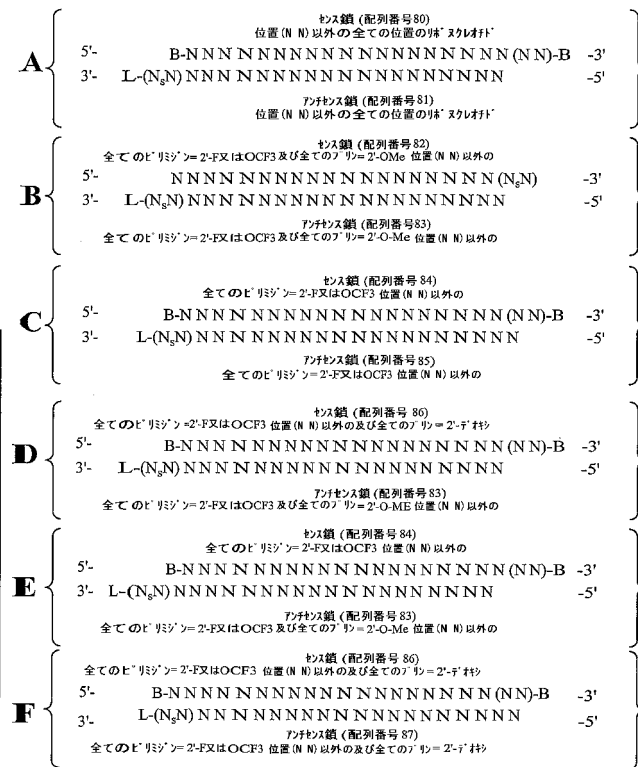


【図 3】



【図 4】

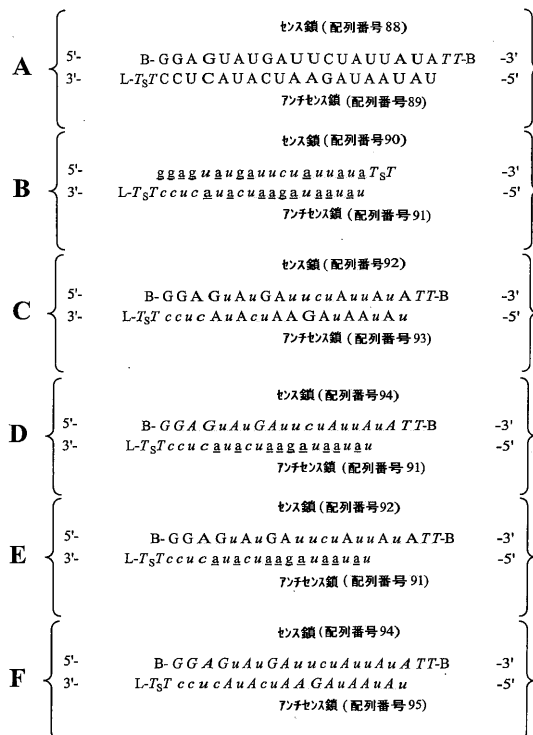
Figure 4



位置 (NN) は、 π - σ 共役系 (例、 C_6H_5) 又は普遍的な塩基等の何れかの σ 軌道を含み得る。
 B = 必要に応じて存在する脱塩基の、逆方向の脱塩基の、逆方向の σ 軌道又は他の末端 π 軌道
 L = π 軌道又は必要に応じて存在する B
 S = 必要に応じて存在しない σ 軌道又は π 軌道

【図 5】

Figure 5



斜字体の小文字 = 2° _レ オキシ 2° 、 2° FCF₃ B = 必要に応じて存在する炭塩基の、逆方向の炭塩基の
逆方向の対列付^{*}又は他の末端キツ^{*}

下線部 = 2° -O-メチル

斜字体の大文字 = デオキシ

L = 必要に応じて存在するか^{*}リビド部分又はB
S = 必要に応じて存在するか^{*}と α キエトリス又は β キエトリス

【図 6 A】

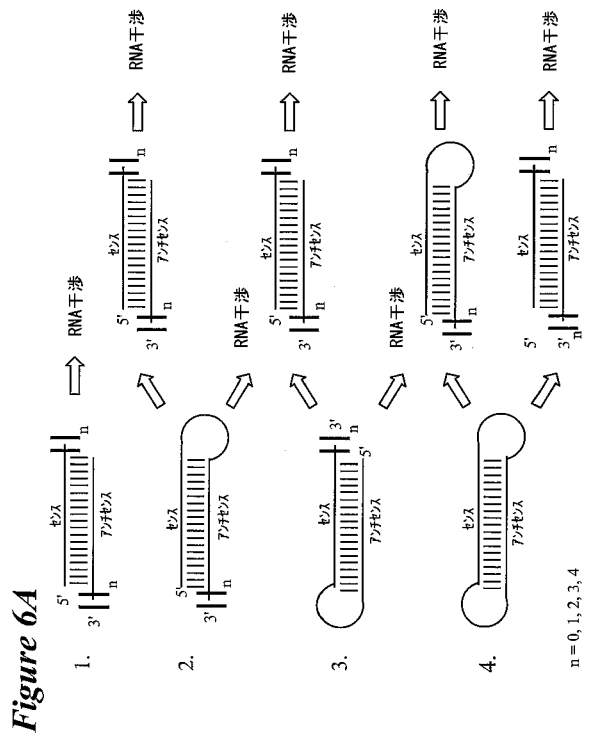


Figure 6A

Figure 14B: 回文構造配列又は反復配列を利用するリコ'スクリプト'配列を形成する二本鎖の例

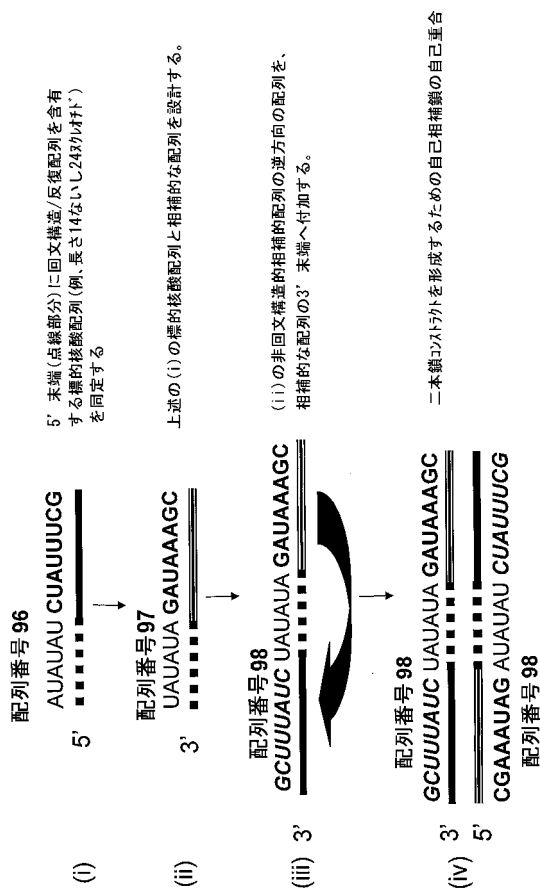


Figure 13: 5' リン酸塩の修飾

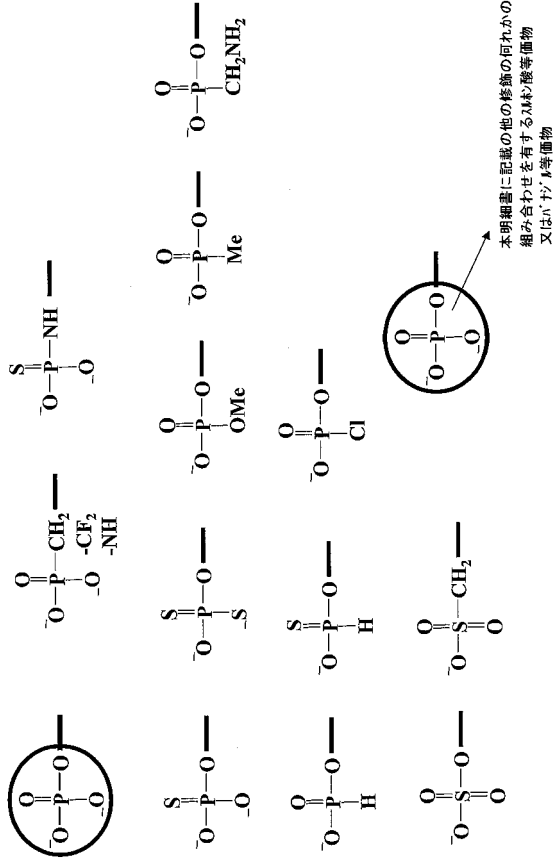


Figure 14C: 回文構造配列又は反復配列、自己重合を利用する、二本鎖を形成するリコ'スクリプト'配列の例

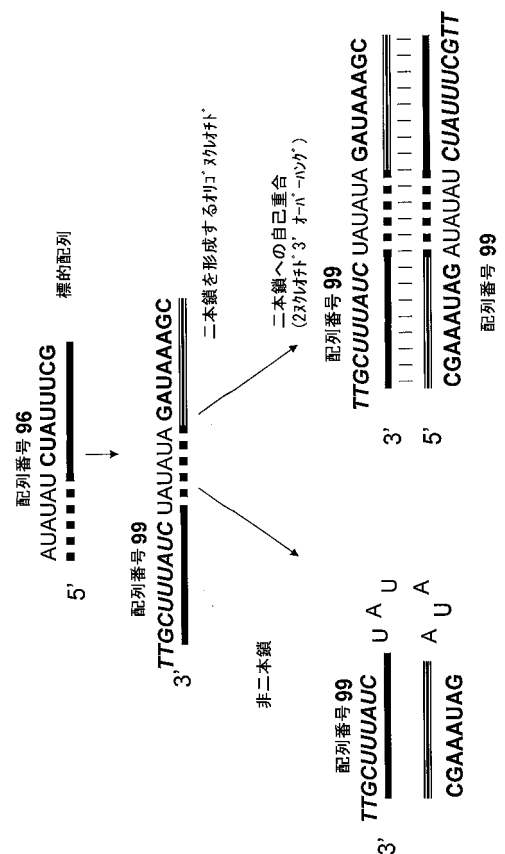
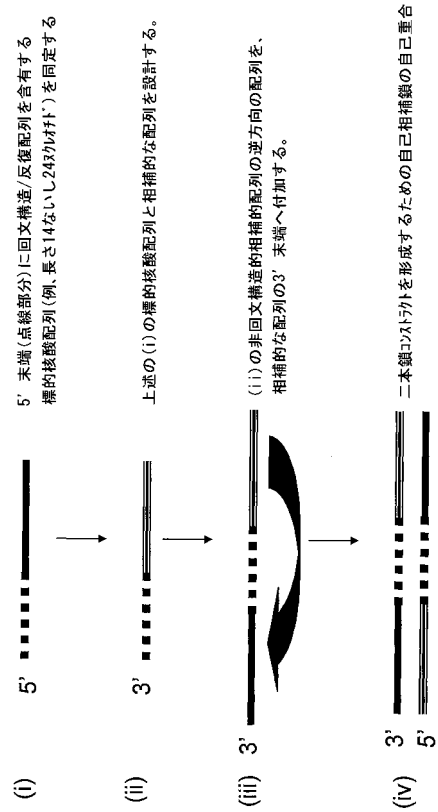
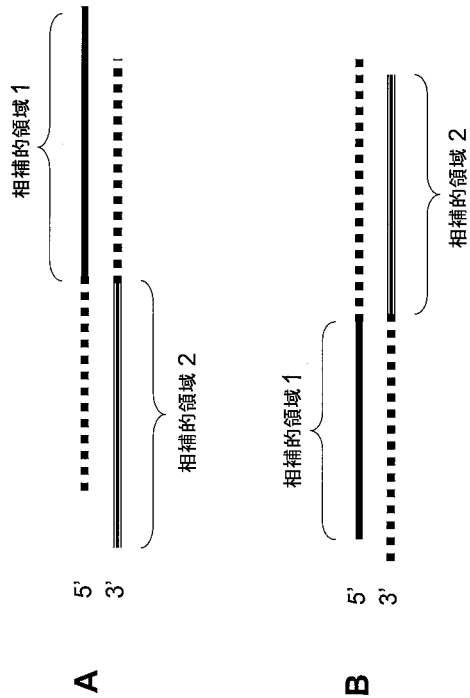


Figure 14A: 回文構造又は反復配列を利用する、二本鎖を形成するリコ'スクリプト'コンストラクト



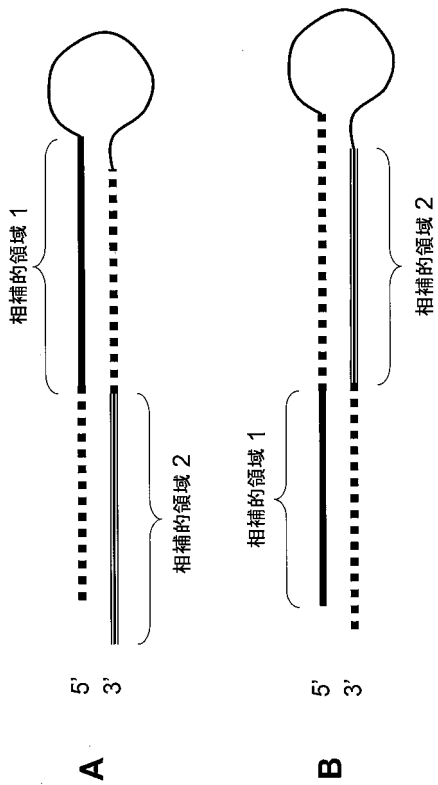
【図 16】

Figure 16: 別個の相補的領域を有する二本鎖にわたった多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの例



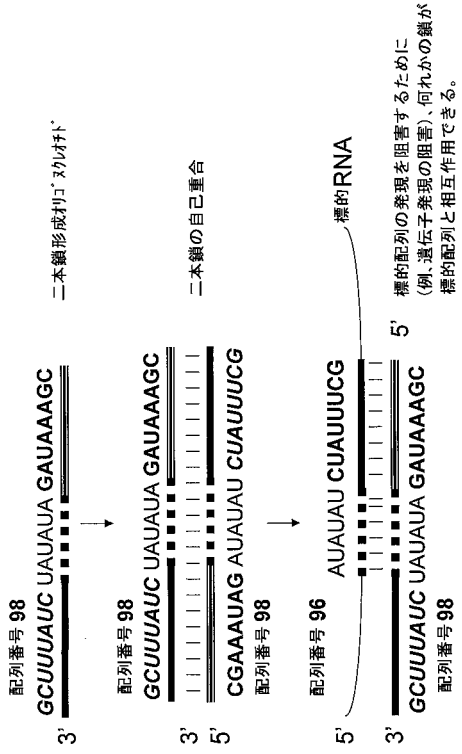
【図 17】

Figure 17: 別個の相補的領域を有するヘアピン状多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの例



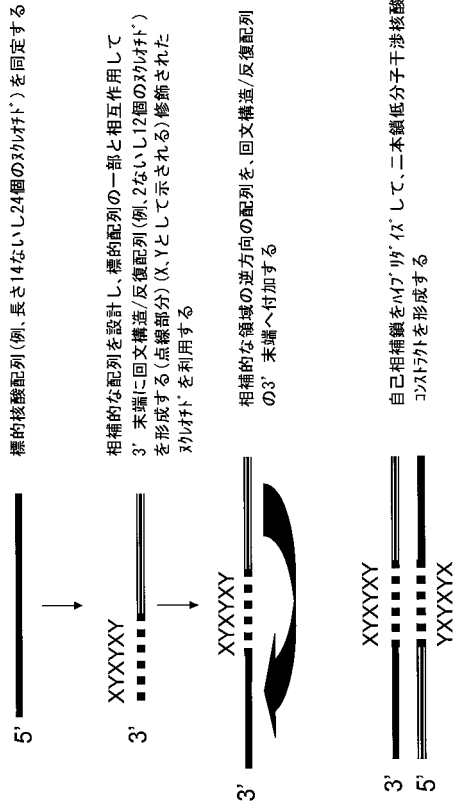
【図 14D】

Figure 14D: 回文構造配列又は反復配列、自己重合及び標的配列発現の阻害を利用する二本鎖形成リボスライフト配列の例



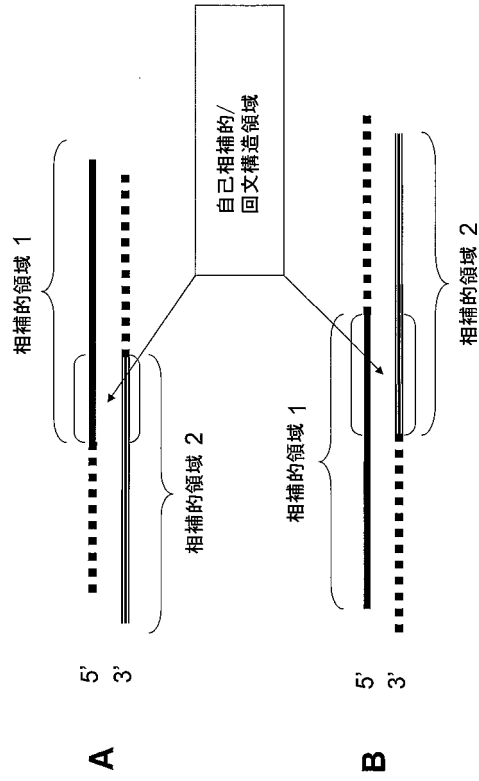
【図 15】

Figure 15: 人工的な回文構造配列又は反復配列を利用する二本鎖形成リボスライフトコンストラクト



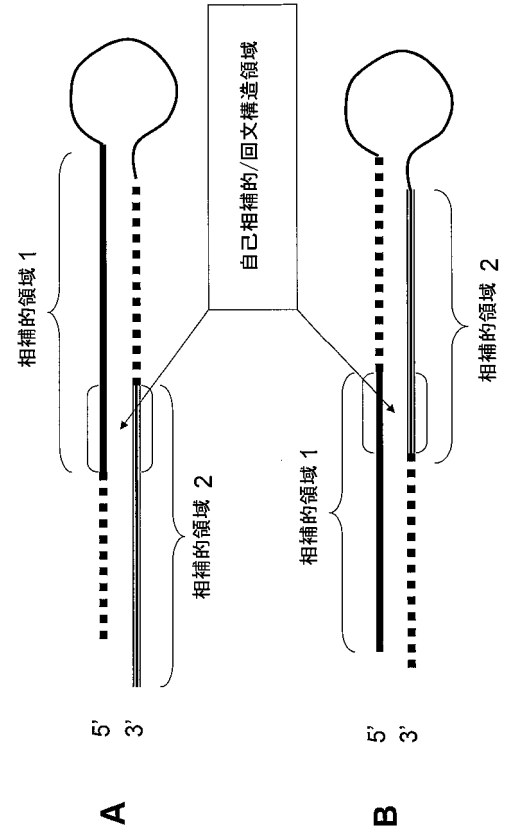
【図 18】

Figure 18: 別個の相補的領域及び自己相補的/回文構造領域を有する二本鎖になった多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの例



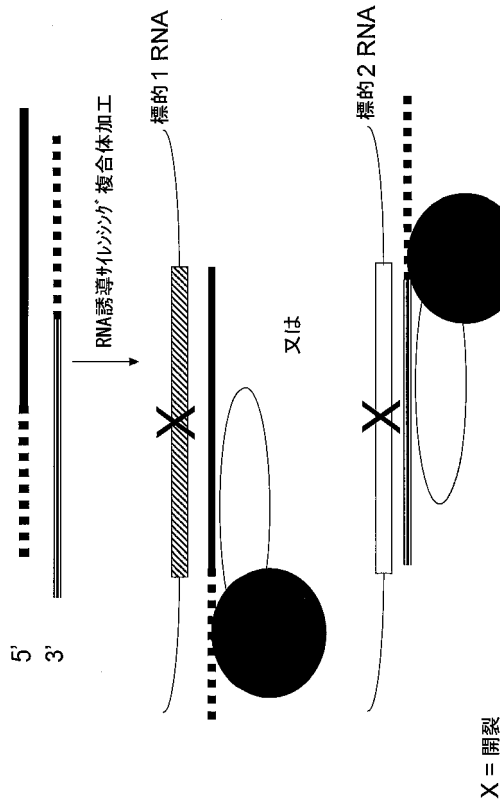
【図 19】

Figure 19: 別個の相補的領域及び自己相補的/回文構造領域を有するヘアピン状多機能性低分子干渉核酸コンストラクトの例



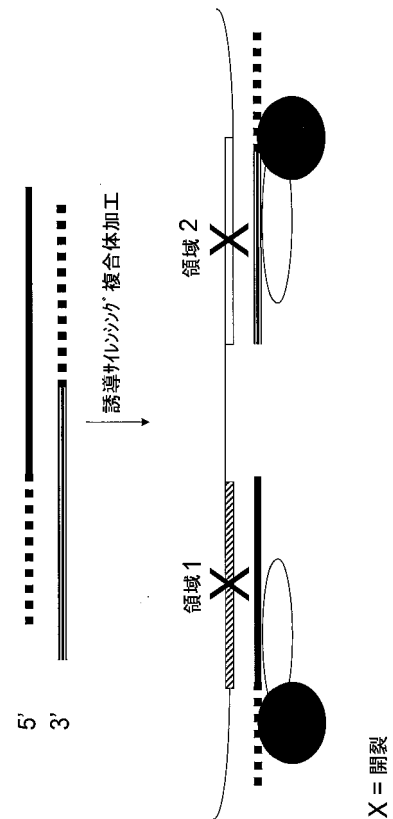
【図 20】

Figure 20: 2つの個別の標的核酸配列を標的化する多機能性低分子干渉核酸の例



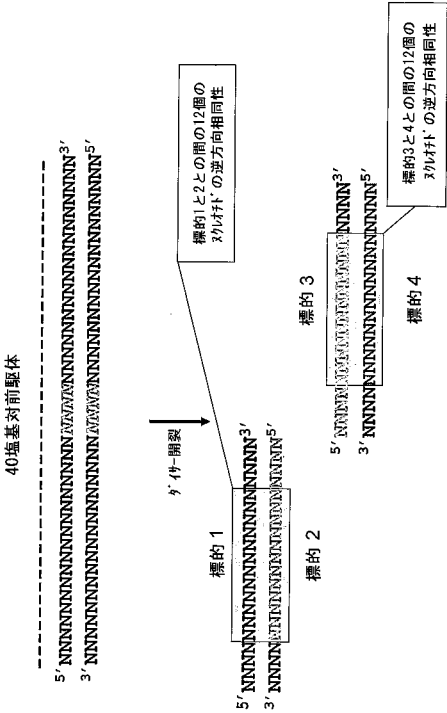
【図 21】

Figure 21: 同一標的核酸配列内の2つの領域を標的化する多機能性低分子干渉核酸の例



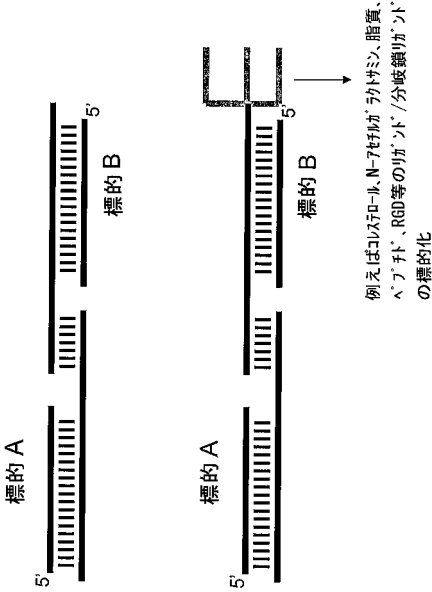
【図 26】

Figure 26: ガイナにより可能になった多機能性低分子干渉核酸の設計



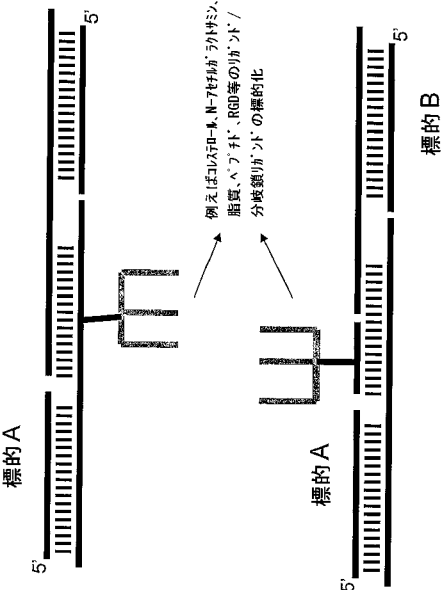
【図 27】

Figure 27: 付加的な多機能性低分子干渉核酸の設計



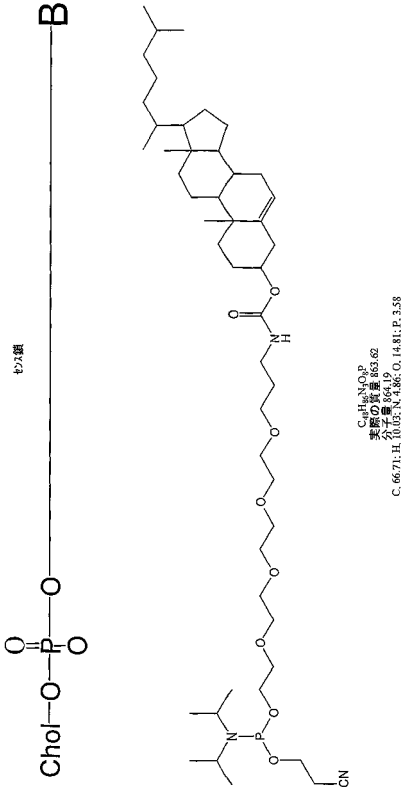
【図 28】

Figure 28: 付加的な多機能性低分子干渉核酸の設計



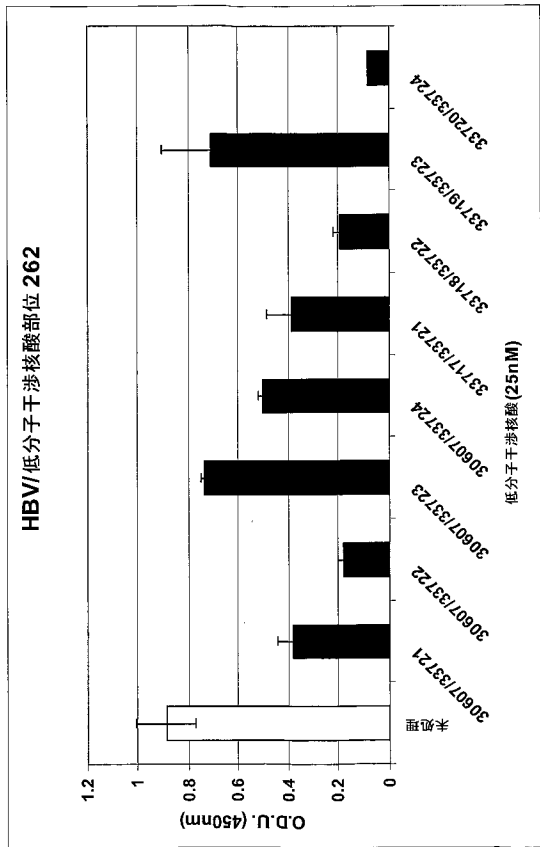
【図 29】

Figure 29: コリスチロール抱合体による770nm



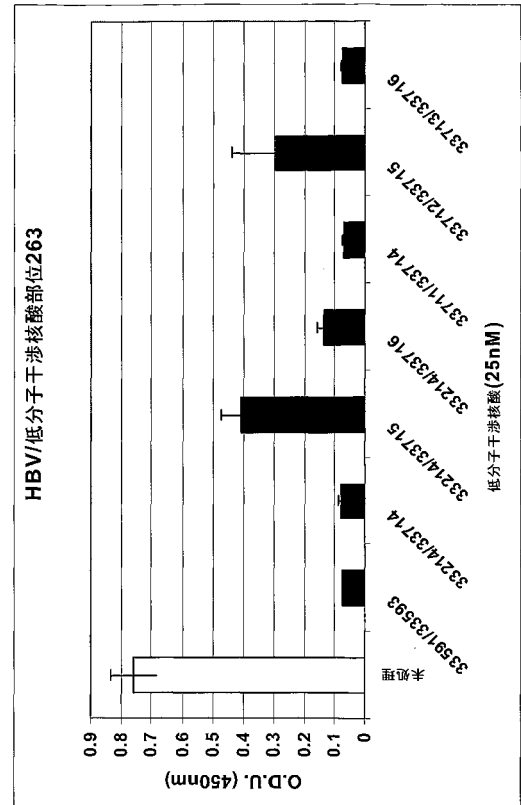
【図 30】

Figure 30: HBV部位番号262低分子干渉核酸の細胞培養活性



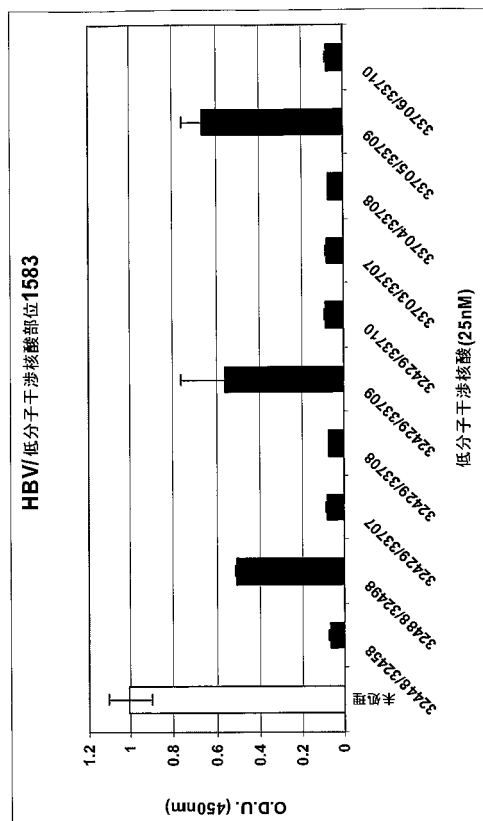
【図 31】

Figure 31: HBV部位番号263低分子干渉核酸の細胞培養活性



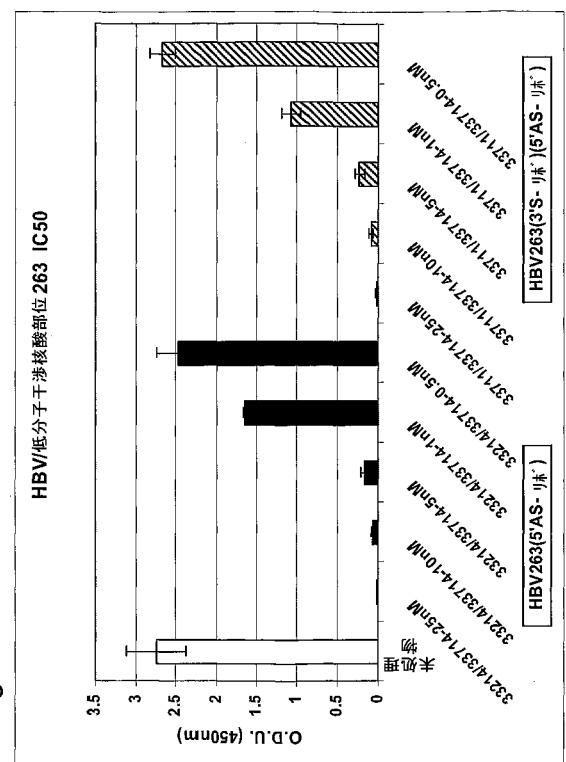
【図 32】

Figure 32: HBV部位番号1583低分子干渉核酸の細胞培養活性



【図 33】

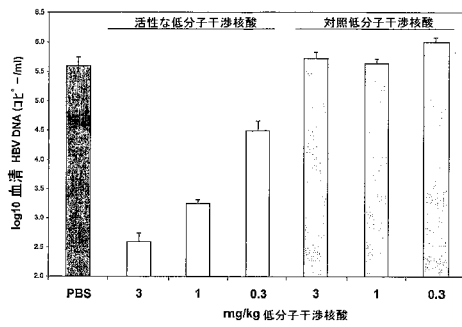
Figure 33: 用量反応性HBV部位番号1583低分子干渉核酸



【図 38 A】

Figure 38

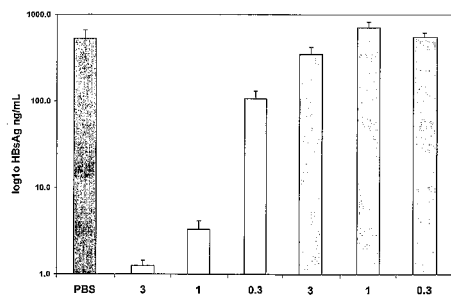
A.



【図 38 B】

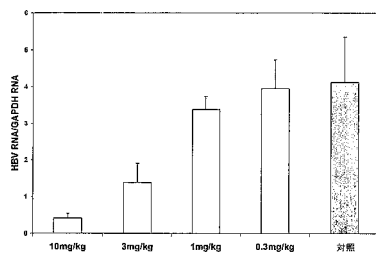
Figure 38

B.



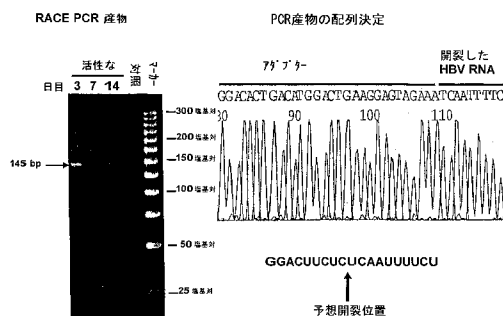
【図 41】

Figure 41



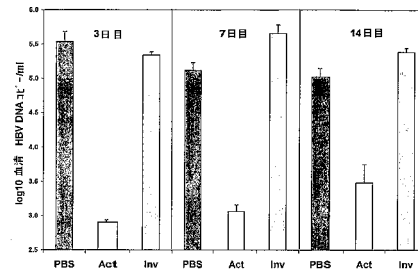
【図 42】

Figure 42



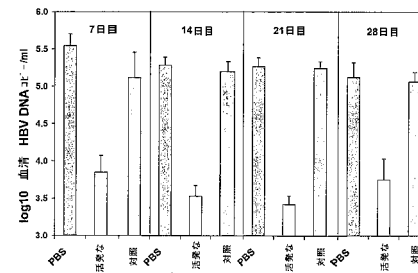
【図 39】

Figure 39



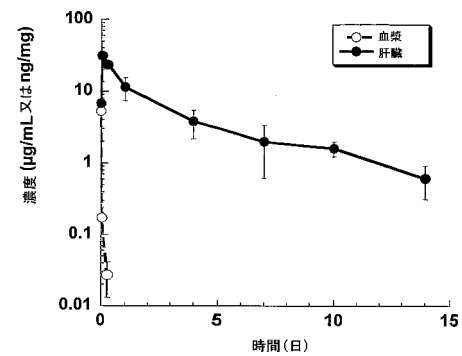
【図 40】

Figure 40



【図 43】

Figure 43



【配列表】

2009504190000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成20年4月17日(2008.4.17)

【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

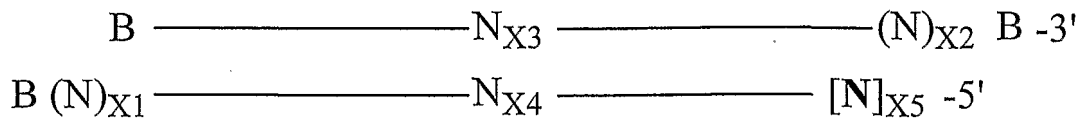
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造 S I Xを有する二本鎖核酸分子

【化1】



SIX

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、標的RNAに相補的である配列を含み、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

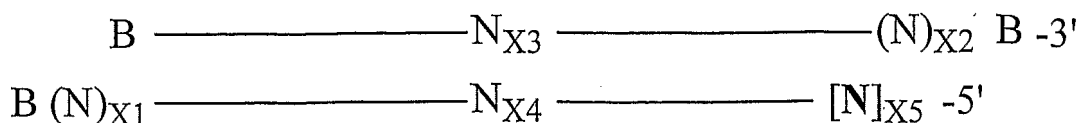
(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、および

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。))。

【請求項2】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造 SXを有する二本鎖核酸分子

【化2】



SX

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、標的RNAに相補的である配列を含み、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、

レオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、ならびに

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオチドであり、

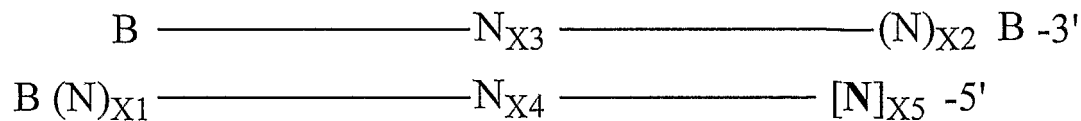
(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、および

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。)

【請求項3】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造SXIを有する二本鎖核酸分子

【化3】



SXI

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、標的RNAに相補的である配列を含み、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、ならびに

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオチドであり、および

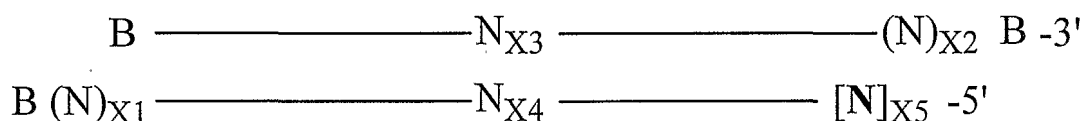
(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。)

【請求項4】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造SXIIを有する二本鎖核酸分子

【化4】



SXII

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、標的RNAに相補的である配列を含み、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、ならびに

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオチドであり、および

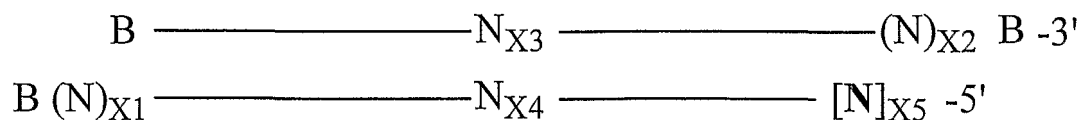
(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。)

【請求項5】

センス鎖とアンチセンス鎖を含む構造S X I I Iを有する二本鎖核酸分子

【化5】



SXIII

(ここで、二本鎖核酸分子の上側の鎖はセンス鎖であり、下側の鎖はアンチセンス鎖であり、前記アンチセンス鎖は、標的RNAに相補的である配列を含み、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチドであり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は約17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、ならびに

(a) アンチセンス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様、ノーザン又はA型ヘリックス配置を有するヌクレオチドであり、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外のアンチセンス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボ様、ノーザン又はA型ヘリックス配置を有するヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチドは2'-O-メチルヌクレオチドであり、および

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。)

【請求項6】

X5 = 1、2又は3；各X1及びX2 = 1又は2；X3 = 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30、並びにX4 = 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30である、請求項1の二本鎖核酸分子。

【請求項7】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 2 の二本鎖核酸分子。

【請求項 8】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 3 の二本鎖核酸分子。

【請求項 9】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 4 の二本鎖核酸分子。

【請求項 10】

X 5 = 1、2 又は 3 ; 各 X 1 及び X 2 = 1 又は 2 ; X 3 = 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0、並びに X 4 = 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 又は 3 0 である、請求項 5 の二本鎖核酸分子。

【請求項 11】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 1 の二本鎖核酸分子。

【請求項 12】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 2 の二本鎖核酸分子。

【請求項 13】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 3 の二本鎖核酸分子。

【請求項 14】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 4 の二本鎖核酸分子。

【請求項 15】

B が、センス鎖の 3' 及び 5' 末端ならびにアンチセンス鎖の 3' 末端に存在する、請求項 5 の二本鎖核酸分子。

【請求項 16】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 1 の二本鎖核酸分子。

【請求項 17】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 2 の二本鎖核酸分子。

【請求項 18】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 3 の二本鎖核酸分子。

【請求項 19】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 4 の二本鎖核酸分子。

【請求項 20】

s i N A 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖又はセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の 3' 末端上の第 1 の末端 (N) における 1 個以上のホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 5 の二本鎖核酸分子。

【請求項 21】

標的 R N A が B 型肝炎ウイルス (H B V) R N A である、請求項 1 から 20 のいずれかの二本鎖核酸分子。

【請求項 22】

薬剤として許容される担体又は希釈剤中に請求項 1 の二本鎖核酸分子を含む、組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0177

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0177】

ここで、各 N は独立にヌクレオチドであり、各 B は存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N) は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N] は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1 及び X2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、X3 は約 9 から約 30 の整数であり、X4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X4 と X5 の合計は 17-36 であり、X5 は約 1 から約 6 の整数であり、NX3 は NX4 及び NX5 に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖 (下側の鎖) 中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖 (下側の鎖) 中に存在する、[N] ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖 (上側の鎖) 中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖 (上側の鎖) 中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(c) 任意の (N) ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0180

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0180】

ここで、各 N は独立にヌクレオチドであり、各 B は存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N) は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N] は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1 及び X2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、X3 は約 9 から約 30 の整数であり、X4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X4 と X5 の合計は 17-36 であり、X5 は約 1 から約 6 の整数であり、NX3 は NX4 及び NX5 に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖 (下側の鎖) 中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖 (下側の鎖) 中に存在する、[N] ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは

、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0183

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0183】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0186

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0186】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0189

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0189】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、任意のプリンヌクレオチドが、存在するときには、リボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0192

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0192】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]は、アンチセンス鎖（下側の鎖）の5'末端をセンス鎖（上側の鎖）の5'末端よりも熱的に不安定にする配列を含むヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0198

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0198】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はアンチセンス鎖(下側の鎖)の5'末端をセンス鎖(上側の鎖)の5'末端よりも熱的に不安定にする配列を含むヌクレオチド位置であり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約15の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、X6は約1から約4の整数であり、X7は約9から約15の整数であり、NX7、NX6及びNX3は、NX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、[N]ヌクレオチド以外の2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、[N]ヌクレオチド以外の、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0201

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0201】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は2'-デオキシリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フル

オロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0204

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0204】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドはリボヌクレオチドであり、センス鎖中に存在する任意のプリンヌクレオチド(上側の鎖)はリボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0207

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0207】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖(下側の鎖)中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖(上側の鎖)中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、リボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0210

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0210】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0213

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0213】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1及びX2は独立に約0から約4の整数であり、X3は約9から約30の整数であり、X4は約11から約30の整数であって、ただしX4とX5の合計は17-36であり、X5は約1から約6の整数であり、NX3はNX4及びNX5に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、リボ様配置（例えば、ノーザン又はA型ヘリックス配置）のヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2'-O-メチルヌクレオチドであり、

(c) 任意の(N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0216

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0216】

ここで、各Nは独立にヌクレオチドであり、各Bは存在しても、しなくてもよい末端キャップ部分であり、(N)は、無修飾でも、化学修飾されていてもよい、非塩基対形成ヌクレオチド又はオーバーハングヌクレオチドであり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、[N]はリボヌクレオチドであるヌクレオチド位置であり、X1

及び X_2 は独立に約 0 から約 4 の整数であり、 X_3 は約 9 から約 15 の整数であり、 X_4 は約 11 から約 30 の整数であって、ただし X_4 と X_5 の合計は 17 - 36 であり、 X_5 は約 1 から約 6 の整数であり、 X_6 は約 1 から約 4 の整数であり、 X_7 は約 9 から約 15 の整数であり、 NX_7 、 NX_6 及び NX_3 は、 NX_4 及び NX_5 に相補的であり、

(a) アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、アンチセンス鎖（下側の鎖）中に存在する、[N]ヌクレオチド位置のプリンヌクレオチド以外の任意のプリンヌクレオチドは独立に、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシリボヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(b) センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドは、[N]ヌクレオチド以外の 2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドであり、センス鎖（上側の鎖）中に存在する任意のプリンヌクレオチドは独立に、[N]ヌクレオチド以外の、2'-デオキシリボヌクレオチド、2'-O-メチルヌクレオチド、又は 2'-デオキシリボヌクレオチドと 2'-O-メチルヌクレオチドの組合せであり、

(c) 任意の (N)ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ又はデオキシリボヌクレオチドであってもよい。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/032168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 C07K14/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/206887 A1 (MORRISSEY DAVID [US] ET AL) 6 November 2003 (2003-11-06) the whole document	1-20
X	WO 03/070918 A2 (RIBOZYME PHARM INC [US]; MCSWIGGEN JAMES [US]; BEIGELMAN LEONID [US];) 28 August 2003 (2003-08-28) claims 44,68,118	1-20
Y	SEMIZAROV DIMITRI ET AL: "siRNA-mediated gene silencing: a global genome view" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 32, no. 13, 2004, pages 3836-3845, XP002404760 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-20

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May 2007

Date of mailing of the international search report

06/06/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, Elena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/032168

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CZAUDEIRA FRANK ET AL: "Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 31, no. 11, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 2705-2716, XP002270732 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-20
Y	ALLERSON CHARLES R ET AL: "Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved in vitro potency and stability compared to unmodified small interfering RNA" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 4, 24 February 2005 (2005-02-24), pages 901-904, XP002404763 ISSN: 0022-2623 the whole document	1-20
Y	PRAKASH THAZHA P ET AL: "Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 13, June 2005 (2005-06), pages 4247-4253, XP002404764 ISSN: 0022-2623 the whole document	1-20
Y	WO 2005/028650 A (SIRNA THERAPEUTICS INC [US]; JADHAV VASANT [US]; KOSSEN KARL [US]; ZIN) 31 March 2005 (2005-03-31) the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/032168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003206887	A1	06-11-2003	NONE
WO 03070918	A2	28-08-2003	NONE
WO 2005028650	A	31-03-2005	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/20	(2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 27/16	(2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 1/18	(2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 3/06	(2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/04	(2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/08	(2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/06	(2006.01)	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 K 31/712	(2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 31/7125	(2006.01)	A 6 1 K 31/7125	

(31)優先権主張番号 11/299,254

(32)優先日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 モリシー, デイビッド

アメリカ合衆国、コロラド・80301、ボールダー、タングルウッド・トレイル・4769

(72)発明者 マクスウィゲン, ジェームズ

アメリカ合衆国、コロラド・80301、ボールダー、フランクリン・ドライブ・4866

(72)発明者 ベーグルマン, レオニード

アメリカ合衆国、コロラド・80503、ロングモント、コルト・ドライブ・5530

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA06 CA11 DA02 EA10 GA11 HA17
4C084 AA13 MA55 MA66 NA14 ZA02 ZA15 ZA16 ZA33 ZA34 ZA36
ZA42 ZA59 ZA66 ZA70 ZA75 ZA89 ZA94 ZA96 ZB26
4C086 AA01 AA02 AA04 EA16 MA01 MA04 MA55 MA66 NA14 ZA02
ZA15 ZA16 ZA33 ZA34 ZA36 ZA42 ZA59 ZA66 ZA70 ZA75
ZA89 ZA94 ZA96 ZB26