

(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2005-517430

(P2005-517430A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 3/04</b>	A 6 1 P 3/04	
<b>A 6 1 P 3/10</b>	A 6 1 P 3/10	
<b>A 6 1 P 29/00</b>	A 6 1 P 29/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-569774 (P2003-569774)	(71) 出願人	500203684
(86) (22) 出願日	平成15年2月11日 (2003. 2. 11)		サーナ・セラピューティクス・インコーポ
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月29日 (2004. 7. 29)		レイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004123		Sirna Therapeutics,
(87) 国際公開番号	W02003/070881		Inc.
(87) 国際公開日	平成15年8月28日 (2003. 8. 28)		アメリカ合衆国コロラド州80301, ボ
(31) 優先権主張番号	60/358, 580		ウルダー, ウィルダーネス・プレイス 2
(32) 優先日	平成14年2月20日 (2002. 2. 20)		950
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	60/363, 124		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成14年3月11日 (2002. 3. 11)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	60/386, 782	(74) 代理人	100105991
(32) 優先日	平成14年6月6日 (2002. 6. 6)		弁理士 田中 玲子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 短干渉核酸 (s i n A) を用いる蛋白質チロシンホスファターゼ-1 b (p t p - 1 b) 遺伝子発現のRNA干渉媒介性阻害

## (57) 【要約】

本発明は、種々の用途、例えば、治療、診断、標的評価およびゲノム発見用途における使用において、P T P - 1 B 遺伝子発現および P T P - 1 B 経路に関与する遺伝子を調節するのに有用な方法および試薬に関する。詳細には、本発明は、P T P - 1 B 遺伝子発現に対するRNA干渉 (R N A i) を媒介しうる短干渉核酸 (s i n A)、短干渉RNA (s i R N A)、二本鎖RNA (d s R N A)、マイクロ-RNA (m i R N A)、および短ヘアピンRNA (s h R N A) 分子に関する。短干渉核酸分子は、癌、炎症、肥満およびインスリン抵抗性 (例えば、I 型およびII型糖尿病) の治療に有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

R N A 干渉により 1 またはそれ以上の P T P - 1 B 遺伝子の発現をダウンレギュレートする短干渉核酸 ( s i N A ) 分子。

## 【請求項 2】

P T P - 1 B 遺伝子が G e n b a n k 受託番号 N M \_ 0 0 2 8 2 7 ( P T P N 1 ) を含む配列をコードする, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 3】

前記 s i N A 分子がリボヌクレオチドを含まない, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 4】

前記 s i N A 分子がリボヌクレオチドを含む, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 5】

前記 s i N A 分子が二本鎖である, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 6】

前記 s i N A 分子が P T P - 1 B 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含み, 前記 s i N A がさらにセンス鎖を含み, 前記センス鎖が P T P - 1 B 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む, 請求項 5 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 7】

前記アンチセンス鎖および前記センス鎖がそれぞれ約 19 - 約 29 ヌクレオチドを含み, 前記アンチセンス鎖および前記センス鎖が少なくとも約 19 の相補的なヌクレオチドを共有する, 請求項 6 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 8】

前記 s i N A 分子が P T P - 1 B 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み, 前記 s i N A 分子がさらにセンス領域を含み, 前記センス領域は P T P - 1 B 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部を含む, 請求項 5 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 9】

前記アンチセンス領域および前記センス領域がそれぞれ約 19 - 約 29 ヌクレオチドを含み, 前記アンチセンス領域および前記センス領域が少なくとも約 19 の相補的なヌクレオチドを共有する, 請求項 8 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 10】

前記 s i N A 分子が一本鎖である, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 11】

前記 s i N A が P T P - 1 B 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含む, 請求項 10 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 12】

前記 s i N A 分子が約 19 - 約 29 ヌクレオチドを有する配列を含む, 請求項 11 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 13】

前記 s i N A 分子がセンス領域およびアンチセンス領域を含み, 前記アンチセンス領域は P T P - 1 B 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み, 前記センス領域は前記アンチセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 14】

前記 s i N A 分子が 2 つのオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられ, 一方のフラグメントは前記 s i N A 分子のセンス領域を含み, 第 2 のフラグメントはアンチセンス領域を含む, 請求項 1 記載の s i N A 分子。

## 【請求項 15】

前記センス領域および前記アンチセンス領域が別々のオリゴヌクレオチドを含む, 請求項

10

20

30

40

50

13記載の s i N A 分子。

【請求項16】

前記センス領域および前記アンチセンス領域がリンカー分子により連結されている，請求項13記載の s i N A 分子。

【請求項17】

前記リンカー分子がポリヌクレオチドリンカーである，請求項16記載の s i N A 分子。

【請求項18】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである，請求項16記載の s i N A 分子。

【請求項19】

前記センス領域が3'末端オーバーハングを含み，前記アンチセンス領域が3'末端オーバーハングを含む，請求項13記載の s i N A 分子。 10

【請求項20】

前記3'末端オーバーハングがそれぞれ約2ヌクレオチドを含む，請求項19記載の s i N A 分子。

【請求項21】

アンチセンス領域の3'末端オーバーハングがPTP-1B蛋白質をコードするRNAに相補的である，請求項19記載の s i N A 分子。

【請求項22】

前記センス領域が1またはそれ以上の2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドおよび1またはそれ以上の2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む，請求項13記載の s i N A 分子。 20

【請求項23】

前記センス領域中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含み，前記センス領域中に存在する任意のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む，請求項13記載の s i N A 分子。

【請求項24】

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が2'-デオキシヌクレオチドである，請求項19記載の s i N A 分子。

【請求項25】

前記センス領域が3'末端および5'末端を含み，および末端キャップ成分が前記センス領域の5'末端，3'末端，または5'末端および3'末端の両方に存在する，請求項13記載の s i N A 分子。 30

【請求項26】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である，請求項25記載の s i N A 分子。

【請求項27】

前記アンチセンス領域が1またはそれ以上の2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドおよび1またはそれ以上の2'-O-メチルプリンヌクレオチドを含む，請求項13記載の s i N A 分子。

【請求項28】

前記アンチセンス領域中に存在する任意のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含み，前記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が2'-O-メチルプリンヌクレオチドを含む，請求項13記載の s i N A 分子。 40

【請求項29】

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が2'-デオキシヌクレオチドを含む，請求項19記載の s i N A 分子。

【請求項30】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む，請求項28記載の s i N A 分子。 50

## 【請求項 3 1】

前記アンチセンス領域が、前記アンチセンス領域の 3' 末端にグリセリル修飾を含む、請求項 1 3 記載の siNA 分子。

## 【請求項 3 2】

前記 3' 末端オーバーハングがデオキシリボヌクレオチドを含む、請求項 1 9 記載の siNA 分子。

## 【請求項 3 3】

PTP-1B 遺伝子が p 3 8 である、請求項 1 記載の siNA 分子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

本発明は、Beigelman, 米国特許出願 10 / 206, 705 (2002 年 7 月 26 日出願), Beigelman, 米国特許出願 60 / 358, 580 (2002 年 2 月 20 日出願), Beigelman, 米国特許出願 60 / 363, 124 (2002 年 3 月 11 日出願), Beigelman, 米国特許出願 60 / 386, 782 (2002 年 6 月 6 日出願), Beigelman 米国特許出願 60 / 406, 784 (2002 年 8 月 29 日出願), Beigelman, 米国特許出願 60 / 408, 378 (2002 年 9 月 5 日出願), Beigelman, 米国特許出願 60 / 409, 293 (2002 年 9 月 9 日出願), および Beigelman, 米国特許出願 60 / 440, 129 (2003 年 1 月 15 日出願) に基づく優先権を主張する。これらの出願は、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

20

## 【0002】

本発明は、蛋白質チロシンホスファターゼ 1B (PTP-1B) の遺伝子発現および / または活性の調節に応答する健康状態および疾病の研究、診断、および治療のための化合物、組成物、および方法に関する。本発明はまた、PTP-1B 経路に關与する遺伝子の発現および / または活性の調節に應答する健康状態および疾病に關連する化合物、組成物、および方法に関する。特に、本発明は、PTP-1B 遺伝子に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる小核酸分子、例えば短干渉核酸 (siNA), 短干渉 RNA (siRNA), 二本鎖 RNA (dsRNA), マイクロ RNA (miRNA), および短ヘアピン RNA (shRNA) 分子に關連する。

30

## 【背景技術】

## 【0003】

以下は RNAi に關係する關連技術の説明である。この説明は、以下に記載される本発明を理解するためにのみ提供される。この概要は、以下に記載される研究のいずれかが本発明に対する先行技術であると認めるものではない。

## 【0004】

RNA 干渉とは、動物において短干渉 RNA (siRNA) により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表す (Fire et al., 1998, Nature, 391, 806)。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたは RNA サイレncing と称され、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、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる叢および門が共通して有している (Fire et al., 1999, Trends Genet., 15, 358)。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖 RNA (dsRNA) の生成に應答して、相同的一本鎖 RNA またはウイルスゲノム RNA を特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのであろう。細胞における dsRNA の存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi 応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼ PKR および 2', 5' - オリゴアデニレートシンターゼの dsRNA 媒介性活性化の結果リボヌクレアーゼ L による mRNA の非特

40

50

異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

【0005】

細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼIII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAをプロセシングして短干渉RNA(sRNA)として知られる短い断片のdsRNAにすることに関与している(Berstein et al., 2001, Nature, 409, 363)。ダイサー活性から生ずる短干渉RNAは、典型的には約21-23ヌクレオチドの長さであり、約19塩基対のデュプレックスを含む(Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体RNAから21および22ヌクレオチドの小さな一時的RNA(stRNA)を切り出すことに関与することが示唆されている(Hutvagner et al., 2001, Science, 293, 834)。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導性サイレンシング複合体(RISC)と称されるエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsRNAデュプレックス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、sRNAデュプレックスのアンチセンス鎖に相補的な領域の中央部で生ずる(Elbashir et al., 2001, Genes Dev., 15, 188)。

【0006】

RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら(1998, Nature, 391, 806)は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WiannyおよびGoetz(1999, Nature Cell Biol., 2, 70)は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondら(2000, Nature, 404, 293)は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら(2001, Nature, 411, 494)は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュプレックスを導入することにより誘導されるRNAiを記載する。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)は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsRNAデュプレックスは3'末端ジヌクレオチドオーバーハングを含む場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsRNA鎖を2'-デオキシ(2'-H)または2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端sRNAオーバーハングヌクレオチドを2'-デオキシヌクレオチド(2'-H)で置換することは許容されることが示された。sRNAデュプレックスの中心における単一のミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsRNAガイド配列の3'末端ではなくガイド配列の5'末端により規定されることを示した(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は、sRNAデュプレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsRNA活性に必要であり、sRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示した(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)。

【0007】

2ヌクレオチドの3'-オーバーハングを有する21-merのsRNAデュプレックスの3'末端ヌクレオチドのオーバーハングしているセグメントをデオキシリボヌクレオチドで置き換えても、RNAi活性に有害な影響を有しないことが示されている。sRNAの各末端で4個までのヌクレオチドをデオキシリボヌクレオチドで置き換えることはよく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活性がなくなる(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。さらに、Elbashirら(上掲)はまた、sRNAを2'-

O - メチルヌクレオチドで置換すると, RNAi 活性が完全に破壊されたことを報告する。Li ら (国際公開 WO 00 / 44914) および Beach ら (国際公開 WO 01 / 68836) は, siRNA がリン酸 - 糖骨格またはヌクレオシドのいずれかに窒素またはイオウ複素原子の少なくとも 1 つを含むよう修飾することができることを予備的に示唆する。しかし, いずれの出願も, siRNA 分子においてそのような修飾がどの程度許容されるかを仮定しておらず, そのような修飾 siRNA のそれ以上の指針または実例を提供していない。Kreutzer ら (カナダ特許出願 2,359,180) もまた, dsRNA コンストラクトにおいて二本鎖 RNA 依存性蛋白質キナーゼ PKR の活性化を妨げる目的で用いるためのある種の化学的修飾, 特に 2' - アミノまたは 2' - O - メチルヌクレオチド, および 2' - O または 4' - C メチレン架橋を含むヌクレオチドを記載する。しかし, Kreutzer らも同様に, siRNA 分子においてこれらの修飾がどの程度許容されるかについての実例または指針を提供していない。

10

#### 【0008】

Parrish ら (2000, Molecular Cell, 6, 1977 - 1087) は, C. elegans において長い (>25 nt) siRNA 転写産物を用いて unc-22 遺伝子を標的とするある種の化学的修飾を試験した。著者らは, T7 および T3 RNA ポリメラーゼによりチオリン酸ヌクレオチド類似体を取り込ませることによりこれらの siRNA 転写産物中にチオリン酸残基を導入すること, および 2 個のホスホロチオエート修飾塩基を有する RNA も RNAi としての有効性を実質的に低下させたことを記載する。さらに, Parrish らは, 2 残基より多いホスホロチオエート修飾は, 干渉活性をアッセイすることができないほど大きくインビトロで RNA を不安定化させたことを報告する (同上, 1081)。著者らはまた, 長い siRNA 転写産物中のヌクレオチド糖の 2' 位におけるある種の修飾を試験して, 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および / またはシチジンからデオキシシチジンへの置換の場合に, 干渉活性が実質的に減少することを見いだした (同上)。さらに, 著者らは, ある種の塩基修飾, 例えば, siRNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖において, ウラシルの代わりに 4 - チオウラシル, 5 - プロモウラシル, 5 - ヨードウラシル, および 3 - (アミノアリル) ウラシル, およびグアニンの代わりにイノシンの置換を試験した。4 - チオウラシルおよび 5 - プロモウラシル置換は許容されたように見えたが, Parrish は, イノシンはいずれの鎖に取り込まれたときにも干渉活性における実質的な減少を生じたことを報告している。Parrish はまた, アンチセンス鎖における 5 - ヨードウラシルおよび 3 - (アミノアリル) ウラシルの取り込みによっても, RNAi 活性が実質的に減少したことを報告している。

20

30

#### 【0009】

より長い dsRNA の使用が記載されている。例えば, Beach ら (国際公開 WO 01 / 68836) は, 内因性 dsRNA を用いて遺伝子発現を弱めるための特定の方法を記載する。Tuschl ら (国際公開 WO 01 / 75164) は, ショウジョウバエのインビトロ RNAi システム, およびある種の機能的ゲノム用途およびある種の治療用途に特定の siRNA 分子を用いることを記載する。しかし, Tuschl (2001, Chem. Biochem., 2, 239 - 245) は, インターフェロン応答の活性化の危険性のため, 遺伝的疾患またはウイルス感染を治癒させるために RNAi を用いることができることは疑わしいと述べている。Li ら (国際公開 WO 00 / 44914) は, ある種の標的遺伝子の発現を弱めるために特定の dsRNA を用いることを記載する。Zernicka-Goezt ら (国際公開 WO 01 / 36646) は, ある種の dsRNA 分子を用いて哺乳動物細胞において特別の遺伝子の発現を阻害するある種の方法を記載する。Fire ら (国際公開 WO 99 / 32619) は, 遺伝子発現の阻害に用いるためにある種の dsRNA 分子を細胞内に導入するための特別の方法を記載する。Plaetinck ら (国際公開 WO 00 / 01846) は, 特定の dsRNA 分子を用いて細胞において特別の表現型を与える原因である特定の遺伝子を同定するある種の方法を記載する。Mello ら (国際公開 WO 01 / 29058) は, dsRNA 媒介性 RNAi に関与する

40

50

特定の遺伝子の同定を記載する。Deschamps Depailletteら（国際公開WO99/07409）は、ある種の抗ウイルス剤と組み合わせた特別のdsRNA分子からなる特定の組成物を記載する。Waterhouseら（国際公開99/53050）は、ある種のdsRNAを用いて植物細胞における核酸の表現型の発現を減少させるある種の方法を記載する。Driscollら（国際公開WO01/49844）は、標的生物において遺伝子サイレンシングを促進するのに用いるための特定のDNAコンストラクトを記載する。

#### 【0010】

他の者は、種々のRNAiおよび遺伝子サイレンシングシステムを報告している。例えば、Parrishら（2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087）は、C. elegansのunc-22遺伝子を標的とする特定の化学的に修飾されたsiRNAコンストラクトを記載する。Grossniklaus（国際公開WO01/38551）は、植物においてある種のdsRNAを用いてポリコム遺伝子発現を制御するためのある種の方法を記載する。Churikovら（国際公開WO01/42443）は、ある種のdsRNAを用いて生物の遺伝的特性を改変するある種の方法を記載する。Cogoniら（国際公開WO01/53475）は、Neurosporaのサイレンシング遺伝子を単離するある種の方法およびその用途を記載する。Reedら（国際公開WO01/68836）は、植物における遺伝子サイレンシングのある種の方法を記載する。Honerら（国際公開WO01/70944）は、ある種のdsRNAを用いてパーキンソン病のモデルとしてトランスジェニック線虫を用いる薬剤スクリーニングのある種の方法を記載する。Deakら（国際公開WO01/72774）は、ショウジョウバエにおけるRNAiに関連するかもしれないある種のショウジョウバエ由来遺伝子産物を記載する。Arndtら（国際公開WO01/92513）は、RNAiを増強する因子を用いて遺伝子抑制を媒介するある種の方法を記載する。Tuschlら（国際公開WO02/44321）は、ある種の合成siRNAコンストラクトを記載する。Pachukら（国際公開WO00/63364）およびSatishchandranら（国際公開WO01/04313）は、ある種のdsRNA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ためのある種の方法および組成物を記載する。Echeverriら（国際公開WO02/38805）は、RNAiにより同定されたある種のC. elegans遺伝子を記載する。Kreutzerら（国際公開WO02/055692, WO02/055693, およびEP1144623B1）は、RNAiを用いて遺伝子発現を阻害するある種の方法を記載する。Grahamら（国際公開WO99/49029およびWO01/70949, およびAU4037501）は、ベクターから発現されるある種のsiRNA分子を記載する。Fireら（US6,506,559）は、RNAiを媒介するある種のsiRNAコンストラクトを用いてインビトロで遺伝子発現を阻害するためのある種の方法を記載する。

#### 【0011】

McSwigganら（国際公開WO01/16312）は、PTP-1Bの核酸調節剤を記載する。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

#### 発明の概要

本発明は、短干渉核酸（siNA）、短干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、および短ヘアピンRNA（shRNA）分子を用いてRNA干渉（RNAi）により蛋白質チロシンホスファターゼ-1B（PTP-1B）遺伝子の発現および/またはPTP-1B経路に関与する遺伝子の発現を調節するのに有用な化合物、組成物および方法に関する。特に、本発明は、PTP-1B遺伝子の発現を調節するのに用いられる、短干渉核酸（siNA）、短干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、マイクロRNA（miRNA）、および短ヘアピンR

NA (shRNA) 分子および方法の特徴とする。本発明の siNA は、修飾しなくてもよく、化学的に修飾してもよい。本発明の siNA は、化学的に合成してもよく、ベクターから発現させてもよく、酵素的に合成してもよい。本発明はまた、RNA 干渉 (RNAi) により細胞における PTP-1B 遺伝子の発現または活性を調節しうる種々の化学的に修飾された合成短干渉核酸 (siNA) 分子の特徴とする。化学的に修飾された siNA を使用することにより、インビボでのヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、および/または細胞取り込みの改良のため、天然の siNA 分子の種々の特性が改良されると予測される。さらに、初期に発表された研究に反して、多くの化学的修飾を有する siNA はその RNAi 活性を保持している。本発明の siNA 分子は、種々の治療、診断、標的評価、ゲノム発見、遺伝子工学、およびファーマコゲノミクスの用途に有用な試薬および方法を提供する。 10

#### 【0013】

1つの態様においては、本発明は、独立して、または組み合わせて、PTP-1B 蛋白質をコードする遺伝子、例えば、表 I に示される GenBank 受託番号で表される配列を含む配列をコードする遺伝子 (本明細書において一般的に PTP-1B (PTPN1 としても知られる) と称される) の発現を調節する 1 またはそれ以上の siNA 分子および方法の特徴とする。以下に、例示的 PTP-1B 遺伝子を参照して本発明の種々の観点および態様を記載する。しかし、種々の観点および態様は、PTP-1B 制御経路に關与する他の遺伝子にも向けられている。したがって、本発明の種々の観点および態様は、遺伝子発現または活性の PTP-1B 経路に關与する他の遺伝子にも向けられている。これらの追加の遺伝子は、本明細書において PTP-1B 遺伝子について記載されている方法を用いて標的部位について分析することができる。すなわち、他の遺伝子の阻害およびそのような阻害の効果は、本明細書に記載されるようにして実施することができる。 20

#### 【0014】

1つの態様においては、本発明は、PTP-1B 遺伝子の発現をダウンレギュレートする siNA 分子の特徴とし、ここで、例えば、PTP-1B 遺伝子は PTP-1B コーディング配列を含む。

#### 【0015】

1つの態様においては、本発明は、PTP-1B RNA に対する RNAi 活性を有する siNA 分子の特徴とし、ここで、siNA 分子は、PTP-1B コーディング配列、例えば、表 I に示される GenBank 受託番号を有する配列を有する任意の RNA に相補的な配列を含む。表 IV に示されるかまたは本明細書に記載される化学的修飾を、本発明の任意の siNA コンストラクトに適用することができる。 30

#### 【0016】

別の態様においては、本発明は、PTP-1B 遺伝子に対する RNAi 活性を有する siNA 分子の特徴とし、ここで、siNA 分子は、PTP-1B 遺伝子のヌクレオチド配列、例えば表 I に示される GenBank 受託番号を有する PTP-1B 配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明の siNA 分子は、PTP-1B 遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用することができる、このことにより PTP-1B 遺伝子発現のサイレンシングを媒介することができるヌクレオチド配列を含み、ここで、siNA は、例えば、PTP-1B 遺伝子のクロマチン構造を調節し、PTP-1B 遺伝子の転写を防止する細胞プロセスにより PTP-1B 遺伝子発現の制御を媒介する。 40

#### 【0017】

別の態様においては、本発明は、ヌクレオチド配列、例えば、PTP-1B 遺伝子のヌクレオチド配列または配列の一部に相補的な siNA 分子のアンチセンス領域中のヌクレオチド配列を含む siNA 分子の特徴とする。別の態様においては、本発明は、PTP-1B 遺伝子配列を含む配列または配列の一部に相補的な領域、例えば、siNA コンストラクトのアンチセンス領域を含む siNA 分子の特徴とする。

#### 【0018】

1つの態様においては、PTP-1B siNA コンストラクトのアンチセンス領域は 50



、配列番号 1 - 185 または 371 - 374 のいずれかを有する配列に相補的な配列を含むことができる。アンチセンス領域はまた、配列番号 186 - 370、379 - 382、387 - 390、395 - 398、413、415、417、419、421、または 422 のいずれかを有する配列を含むことができる。別の態様においては、PTP - 1B コンストラクトのセンス領域は、配列番号 1 - 185、371 - 374、375 - 378、383 - 386、391 - 394、412、414、416、418、または 420 のいずれかを有する配列を含むことができる。センス領域は配列番号 401 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 402 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 403 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 404 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 405 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 406 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 407 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 408 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 409 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 410 の配列を含むことができる。センス領域は配列番号 407 の配列を含むことができ、アンチセンス領域は配列番号 411 の配列を含むことができる。1つの態様においては、本発明の siNA 分子は、配列番号 1 - 422 のいずれかを含むことができる。配列番号 1 - 422 に示される配列は限定的なものではない。本発明の siNA 分子は、任意の連続する PTP - 1B 配列（例えば、約 19 - 約 25 個（例えば、約 19、20、21、23、24 または 25 個）の連続する PTP - 1B ヌクレオチド）を含むことができる。

10

20

**【0019】**

さらに別の態様においては、本発明は、配列、例えば、表 I に示される GenBank 受託番号により表される配列を含む配列または配列の一部に相補的な siNA コンストラクトのアンチセンス配列を含む siNA 分子を特徴とする。表 IV に示されるかまたは本明細書に記載される化学修飾を、本発明の任意の siNA コンストラクトに適用することができる。

**【0020】**

本発明の 1つの態様においては、siNA 分子は、約 19 - 約 29 ヌクレオチドを有するアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、PTP - 1B 蛋白質をコードする RNA 配列に相補的であり、前記 siNA は、さらに約 19 - 約 29（例えば、約 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 または 29）ヌクレオチドを有するセンス鎖を含み、前記センス鎖および前記アンチセンス鎖は、少なくとも約 19 の相補的ヌクレオチドを有する別々のヌクレオチド配列である。

30

**【0021】**

本発明の別の態様においては、本発明の siNA 分子は、約 19 - 約 29（例えば、約 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 または 29）ヌクレオチドを有するアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域は PTP - 1B 蛋白質をコードする RNA 配列に相補的であり、前記 siNA はさらに約 19 - 約 29 ヌクレオチドを有するセンス領域を含み、ここで、前記センス領域および前記アンチセンス領域は、少なくとも約 19 の相補的ヌクレオチドを有する直鎖状分子を含む。

**【0022】**

本発明の 1つの態様においては、siNA 分子は PTP - 1B 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス鎖を含む。siNA はさらにセンス鎖を含み、ここで前記センス鎖は PTP - 1B 遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

40

**【0023】**

別の態様においては、siNA 分子は PTP - 1B 蛋白質をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含む。siNA 分子はさらにセンス領域を含み、ここで、前記センス領域は、PTP - 1B 遺伝子またはその一部のヌクレオチド配列を含む。

**【0024】**

50

1つの態様においては、本発明の *siNA* 分子は、PTP-1B 遺伝子によりコードされる RNA の発現を調節する RNA i 活性を有する。蛋白質チロシンホスファターゼ遺伝子はグループとして典型的に互いにある程度の配列ホモロジーを共有するため、*siNA* 分子は、種々の蛋白質チロシンホスファターゼ標的の間で共有されているか、あるいは特定の蛋白質チロシンホスファターゼ標的に独特である配列を選択することにより、一群の蛋白質チロシンホスファターゼ遺伝子を標的とするように、あるいは特定の蛋白質チロシンホスファターゼ遺伝子を標的とするように設計することができる。したがって、1つの態様においては、*siNA* 分子は、1つの *siNA* 分子でいくつかの蛋白質チロシンホスファターゼ遺伝子を標的とするために、いくつかの蛋白質チロシンホスファターゼ遺伝子の間でホモロジーを有する蛋白質チロシンホスファターゼ RNA 配列の保存領域を標的とするよう設計することができる。別の態様においては、*siNA* 分子が RNA i 活性を媒介するのに必要な高度の特異性のため、*siNA* 分子は特定の蛋白質チロシンホスファターゼ RNA 配列に独特の配列を標的とするよう設計することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0025】

1つの態様においては、RNA 干渉遺伝子サイレンシング応答のメディエータ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。別の態様においては、本発明の *siNA* 分子は、約 19 - 約 25 (例えば、約 19, 20, 21, 22, 23, 24 または 25) ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの間に約 19 塩基対を含むデュプレックスから構成される。さらに別の態様においては、本発明の *siNA* 分子は 1 - 3 (例えば、約 1, 2, または 3) ヌクレオチドのオーバーハング末端を有するデュプレックス、例えば、約 19 塩基対および 3' 末端モノヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはトリヌクレオチドオーバーハングを有する約 21 のヌクレオチドのデュプレックスを含む。

#### 【0026】

1つの態様においては、本発明は、PTP-1B を発現する核酸分子、例えば PTP-1B 蛋白質をコードする RNA に対する特異性を有する、1 またはそれ以上の化学的に修飾された *siNA* コンストラクトを特徴とする。そのような化学的修飾の非限定的例には、限定されないが、ホスホロチオエ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、"万能塩基"ヌクレオチド、"非環状"ヌクレオチド、5 - C - メチルヌクレオチド、および末端グリセリルおよび / または反転デオキシ無塩基残基を取り込むことが含まれる。これらの化学的修飾は、種々の *siNA* コンストラクト中で用いた場合、細胞において RNA i 活性を保ち、同時に、これらの化合物の血清安定性を劇的に増加させることが示されている。さらに、Parrish ら (上掲) により公表されたデータに反して、本発明においては、多数 (2 以上) のホスホロチオエート置換が十分に許容され、修飾 *siNA* コンストラクトの血清安定性を実質的に増加させることが示される。

#### 【0027】

1つの態様においては、本発明の *siNA* 分子は、RNA i を媒介する能力を維持しながら、修飾ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドを用いて、インビトロまたはインビボでの特性、例えば安定性、活性、および / または生物利用性を改良することができる。例えば、本発明の *siNA* 分子は、*siNA* 分子中に存在するヌクレオチドの総数のパーセンテージとして修飾ヌクレオチドを含むことができる。すなわち、本発明の *siNA* 分子は、一般に、約 5% - 100% の修飾ヌクレオチド (例えば、5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% または 100% の修飾ヌクレオチド) を含むことができる。所定の *siNA* 分子中に存在する修飾ヌクレオチドの実際のパーセンテージは、*siNA* 中に存在するヌクレオチドの総数によって異なるであろう。*siNA* 分子が一本鎖である場合、修飾のパーセントは一本鎖 *siNA* 分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。同様に、*siNA* 分子が二本鎖である場合、修飾のパーセントは、センス鎖、アンチセンス鎖、またはセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方に存在するヌクレオチドの総数に基づくことができる。

## 【 0 0 2 8 】

非限定的例においては、核酸分子中に化学的に修飾されたヌクレオチドを導入することは、外的にデリバリーされる天然のRNA分子に固有の、インビボ安定性および生物利用性の潜在的な制限を解消する有力な道具を提供する。例えば、化学的に修飾された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ため、化学的に修飾された核酸分子を用いることにより、所定の治療効果に必要な特定の核酸分子の投与量を低下させることができる。さらに、ある種の化学的修飾は、特定の細胞または組織を標的とすることにより、および/または核酸分子の細胞取り込みを改良することにより、核酸分子の生物利用性を改良することができる。したがって、化学的に修飾された核酸分子の活性が、天然の核酸分子と比較して、例えば、全RNA核酸分子と比較したときに低いとしても、分子の改良された安定性および/またはデリバリーのため、修飾核酸分子の全体的活性は天然の分子より高い可能性がある。天然の非修飾siRNAとは異なり、化学的に修飾されたsiRNAはまた、ヒトにおいてインターフェロン活性を活性化する可能性を最小限にすることができる。

10

## 【 0 0 2 9 】

本発明のsiRNA分子のアンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の3'末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。アンチセンス領域は、前記アンチセンス領域の5'末端に約1 - 約5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。本発明のsiRNA分子の3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、核酸の糖、塩基、または骨格で化学的に修飾されたりボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含むことができる。3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、1またはそれ以上の万能塩基リボヌクレオチドを含むことができる。3'末端ヌクレオチドオーバーハングは、1またはそれ以上の非環状ヌクレオチドを含むことができる。

20

## 【 0 0 3 0 】

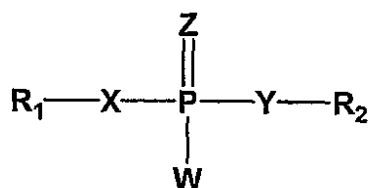
本発明の1つの態様は、本発明の少なくとも1つのsiRNA分子をコードする核酸配列を、核酸分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを提供する。本発明の別の態様は、そのような発現ベクターを含む哺乳動物細胞を提供する。哺乳動物細胞はヒト細胞であってもよい。発現ベクターのsiRNA分子は、センス領域およびアンチセンス領域を含むことができ、アンチセンス領域はPTP-1BをコードするRNAまたはDNA配列に相補的な配列を含むことができる。センス領域はアンチセンス領域に相補的な配列を含むことができる。siRNA分子は、相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有する2つの別々の鎖を含むことができる。siRNA分子は、相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有する一本の鎖を含むことができる。

30

## 【 0 0 3 1 】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてPTP-1Bに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(siRNA)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I:

## 【 化 1 】



40

[ 式中、

各R1およびR2は、独立して、任意のヌクレオチド、非ヌクレオチド、またはポリヌクレオチドであり、これは天然に生ずるものであっても化学的に修飾されたものでもよく、各XおよびYは、独立して、O、S、N、アルキル、または置換アルキルであり、各ZおよびWは、独立して、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、またはアラールキルであり、W、X、Y、およびZは任意に全てOでな

50

くてもよい]

を有する骨格修飾ヌクレオチド間結合を含む、1またはそれ以上(例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のヌクレオチドを含む。

【0032】

例えば任意のZ, W, X, および/またはYが独立してイオウ原子を含む式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合は、s i N Aデュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明のs i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の3'末端, 5'末端, または3'末端および5'末端の両方に、1またはそれ以上(例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)の式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の5'末端に、約1 - 約5個またはそれ以上(例えば、約1, 2, 3, 4, 5個またはそれ以上)の式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する1またはそれ以上(例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のピリミジンヌクレオチドを含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的s i N A分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、式Iを有する化学的に修飾されたヌクレオチド間結合を有する1またはそれ以上(例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上)のプリンヌクレオチドを含むことができる。別の態様においては、式Iのヌクレオチド間結合を有する本発明のs i N A分子はまた、式I - V I Iのいずれかを有する化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

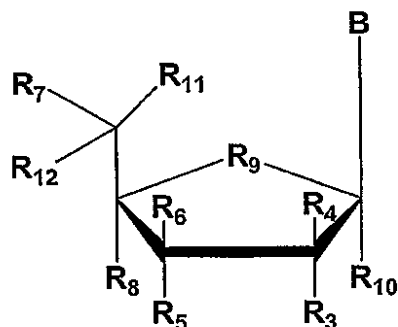
10

20

【0033】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系においてPTP-1Bに対するRNA干渉(RNAi)を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸(s i N A)分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は、式I I:

【化2】



30

[ 式中,

各R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11およびR12は、独立して、H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカリールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, 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, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式1を有する基であり; R9は、O, S, CH2, S=O, CHF, またはCF2であり、Bは、ヌクレオシド塩基, 例えば、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

40

50

ン，5 - メチルシトシン，2，6 - ジアミノプリン，または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない塩基，または非ヌクレオシド塩基，例えば，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，または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない万能塩基である]

を有する 1 またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5，6，7，8，9，10 個またはそれ以上）のヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

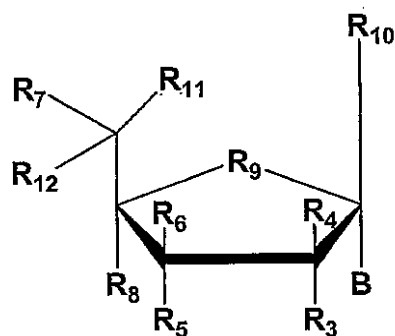
#### 【0034】

式 II の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドは，s i N A デュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖，例えば，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖に存在することができる。本発明の s i N A 分子は，1 またはそれ以上の式 II の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 3' 末端，5' 末端，または 3' 末端および 5' 末端の両方に含むことができる。例えば，本発明の例示的 s i N A 分子は，約 1 - 約 5 個またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5 個またはそれ以上）の式 II の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 5' 末端に含むことができる。別の非限定的例においては，本発明の例示的 s i N A 分子は，約 1 - 約 5 個またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5 個またはそれ以上）の式 II の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 3' 末端に含むことができる。

#### 【0035】

1 つの態様においては，本発明は，細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において P T P - 1 B に対する RNA 干渉 (RNA i) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とし，ここで，化学的修飾は，式 III：

#### 【化 3】



[ 式中，

各 R 3，R 4，R 5，R 6，R 7，R 8，R 10，R 11 および R 12 は，独立して，H，OH，アルキル，置換アルキル，アルカールまたはアラキル，F，Cl，Br，CN，CF<sub>3</sub>，OCF<sub>3</sub>，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 - OSH，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<sub>2</sub>，NO<sub>2</sub>，N<sub>3</sub>，NH<sub>2</sub>，アミノアルキル，アミノ酸，アミノアシル，ONH<sub>2</sub>，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，ポリアルキルアミノ，置換シリル，または式 1 を有する基であり；R 9 は，O，S，CH<sub>2</sub>，S = O，CHF，または CF<sub>2</sub> であり，B は，ヌクレオシド塩基，例えば，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，または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよいように用いることができる他の任意の天然に生じない塩基，または非ヌクレオシド塩基，例えば，フェニル，ナフチル，3 - ニトロピロール，5 - ニト

インドール，ネブラリン，ピリドン，ピリジノン，または標的 RNA に相補的であっても相補的でなくてもよい他の任意の天然に生じない万能塩基である]

を有する 1 またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5，6，7，8，9，10 個またはそれ以上）のヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。

#### 【0036】

式 III の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドは，s i N A デュープレックスの一方または両方のオリゴヌクレオチド鎖に，例えば，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖に存在することができる。本発明の s i N A 分子は，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 3' 末端，5' 末端，または 3' 末端および 5' 末端の両方に，1 またはそれ以上の式 III の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。例えば，本発明の例示的 s i N A 分子は，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 5' 末端に，約 1 - 約 5 個またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5 個またはそれ以上）の式 III の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。別の非限定的例においては，本発明の例示的 s i N A 分子は，センス鎖，アンチセンス鎖，または両方の鎖の 3' 末端に，約 1 - 約 5 個またはそれ以上（例えば，約 1，2，3，4，5 個またはそれ以上）の式 III の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含むことができる。

10

#### 【0037】

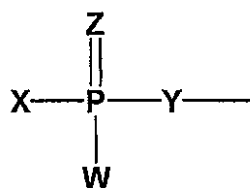
別の態様においては，本発明の s i N A 分子は，式 II または III を有するヌクレオチドを含み，ここで，式 II または III を有するヌクレオチドは反転のコンフィギュレーションである。例えば，式 II または III を有するヌクレオチドは，s i N A コンストラクトに 3' - 3'，3' - 2'，2' - 3'，または 5' - 5' コンフィギュレーションで，例えば，s i N A 鎖の一方または両方の 3' 末端，5' 末端，または 3' 末端および 5' 末端の両方に結合させることができる。

20

#### 【0038】

1 つの態様においては，本発明は，細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において P T P - 1 B に対する RNA 干渉 (RNA i) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 (s i N A) 分子を特徴とし，ここで，化学的修飾は，式 IV：

#### 【化 4】



30

[ 式中，

各 X および Y は，独立して，O，S，N，アルキル，置換アルキル，またはアルキルハロであり；各 Z および W は，独立して，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，アラキル，またはアルキルハロであり；W，X，Y および Z はすべて O ではない]

40

を有する 5' 末端リン酸基を含む。

#### 【0039】

1 つの態様においては，本発明は，標的 - 相補的鎖，例えば，標的 RNA に相補的な鎖に式 IV を有する 5' 末端リン酸基を有する s i N A 分子を特徴とし，ここで，s i N A 分子は，全 RNA s i N A 分子を含む。別の態様においては，本発明は，標的 - 相補的鎖に式 IV を有する 5' 末端リン酸基を有する s i N A 分子を特徴とし，ここで，s i N A 分子はまた，一方または両方の鎖の 3' 末端に約 1 - 約 4 個（例えば，約 1，2，3，または 4 個）のデオキシリボヌクレオチドを有する，約 1 - 3（例えば，約 1，2，または 3）ヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを含む。別の態様においては，式 IV を有する 5' 末端リン酸基は，本発明の s i N A 分子，例えば式 I - VII のい

50

ずれかを有する化学的修飾を有する s i N A 分子の標的 - 相補的鎖に存在する。

【 0 0 4 0 】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において P T P - 1 B に対する R N A 干渉 ( R N A i ) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし、ここで、化学的修飾は1またはそれ以上のホスホロチオエ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、一方の s i N A 鎖に約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) を特徴とする。さらに別の態様においては、本発明は、両方の s i N A 鎖に独立して約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) を特徴とする。ホスホロチオエートヌクレオチド間結合は、s i N A デュープレックスのオリゴヌクレオチド鎖の一方または両方に、例えば、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に存在することができる。本発明の s i N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3 ' 末端、5 ' 末端、または 3 ' 末端および 5 ' 末端の両方に 1 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、本発明の例示的 s i N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 5 ' 末端に、約 1 - 約 5 個またはそれ以上 (例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 個またはそれ以上) の連続するホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。別の非限定的例においては、本発明の例示的 s i N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、1またはそれ以上 (例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上) のピリミジンホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。さらに別の非限定的例においては、本発明の例示的 s i N A 分子は、センス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖に、1またはそれ以上 (例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上) のプリンホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

【 0 0 4 1 】

1つの態様においては、本発明は、センス鎖が1またはそれ以上、例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上 (例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上) の 2 ' - デオキシ、2 ' - O - メチル、2 ' - デオキシ - 2 ' - フルオロ、および/または1またはそれ以上の (例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上) の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にセンス鎖の 3 ' 末端、5 ' 末端、または 3 ' 末端および 5 ' 末端の両方に末端キャップ分子を含み；かつ、アンチセンス鎖が約 1 - 約 1 0 個またはそれ以上、特に約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または1またはそれ以上 (例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上) の 2 ' - デオキシ、2 ' - O - メチル、2 ' - デオキシ - 2 ' - フルオロ、および/または1またはそれ以上 (例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上) の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の 3 ' 末端、5 ' 末端、または 3 ' 末端および 5 ' 末端の両方に末端キャップ分子を含む s i N A 分子を特徴とする。別の態様においては、センスおよび/またはアンチセンス s i N A 鎖の1またはそれ以上の、例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2 ' - デオキシ、2 ' - O - メチルおよび/または2 ' - デオキシ - 2 ' - フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており、同じまたは異なる鎖に存在する、1またはそれ以上の、例えば、約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または3 ' 末端、5 ' 末端、または 3 ' 末端および 5 ' 末端の両方に末端キャップ分子を有していても有していなくてもよい。

【 0 0 4 2 】

別の態様においては、本発明は、センス鎖が約 1 - 約 5 個、特に約 1 , 2 , 3 , 4 , ま

たは5個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5個またはそれ以上）の2'-デオキシ，2'-O-メチル，2'-デオキシ-2'-フルオロ，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み，任意にセンス鎖の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含み；かつ，アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上，特に約1，2，3，4，5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の2'-デオキシ，2'-O-メチル，2'-デオキシ-2'-フルオロ，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み，任意にアンチセンス鎖の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含むs i N A分子を特徴とする。別の態様においては，センスおよび／またはアンチセンスs i N A鎖の1またはそれ以上，例えば約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは，2'-デオキシ，2'-O-メチルおよび／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており，同じまたは異なる鎖に存在する，約1-約5個またはそれ以上，例えば，約1，2，3，4，5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合，および／または3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を有していても有しなくてもよい。

10

20

30

40

50

#### 【0043】

1つの態様においては，本発明は，アンチセンス鎖が1またはそれ以上，例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の2'-デオキシ，2'-O-メチル，2'-デオキシ-2'-フルオロ，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み，任意にセンス鎖の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含み；かつ，アンチセンス鎖が約1-約10個またはそれ以上，特に約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の2'-デオキシ，2'-O-メチル，2'-デオキシ-2'-フルオロ，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み，任意にアンチセンス鎖の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含むs i N A分子を特徴とする。別の態様においては，センスおよび／またはアンチセンスs i N A鎖の1またはそれ以上，例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは，2'-デオキシ，2'-O-メチルおよび／または2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており，同じまたは異なる鎖に存在する1またはそれ以上，例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合，および／または3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を有していても有しなくてもよい。

#### 【0044】

別の態様においては，本発明は，アンチセンス鎖が約1-約5個またはそれ以上，特に約1，2，3，4，5個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の2'-デオキシ，2'-O-メチル，2'-デオキシ-2'-フルオロ，および／または1またはそれ以上（例えば，約1，2，3，4，5，6，7，8，9，10個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み，任意にセンス鎖の3'末端，5'末端，または3'末端および5'末端の両方に末端キャップ分子を含み；かつ，



アンチセンス鎖が約 1 - 約 5 個またはそれ以上、特に約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または 1 またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上）の 2' - デオキシ, 2' - O - メチル, 2' - デオキシ - 2' - フルオロ, および/または 1 またはそれ以上（例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上）の万能塩基修飾ヌクレオチドを含み、任意にアンチセンス鎖の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に末端キャップ分子を含む, s i N A 分子を特徴とする。別の態様においては, センスおよび/またはアンチセンス s i N A 鎖の 1 またはそれ以上, 例えば, 約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは, 2' - デオキシ, 2' - O - メチルおよび/または 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドで化学的に修飾されており, 同じ鎖または異なる鎖に存在する約 1 - 約 5 個, 例えば, 約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合, および/または, 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に末端キャップ分子を有していても有していなくてもよい。

10

#### 【0045】

1 つの態様においては, 本発明は, s i N A 分子の各鎖に約 1 - 約 5 個, 特に約 1, 2, 3, 4, 5 個またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する, 化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とする。

#### 【0046】

別の態様においては, 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, s i N A 配列鎖の一方または両方の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在することができる。さらに, 2' - 5' ヌクレオチド間結合は, s i N A 配列鎖の一方または両方の種々の他の位置に存在することができる, 例えば, s i N A 分子の一方または両方の鎖のピリミジンヌクレオチドの約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むことができ, または s i N A 分子の一方または両方の鎖のプリンヌクレオチドの約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上, 例えばすべてのヌクレオチド間結合は, 2' - 5' ヌクレオチド間結合を含むことができる。

20

#### 【0047】

別の態様においては, 本発明の化学的に修飾された s i N A 分子は, 2 つの鎖を有するデュプレックスを含み, この一方または両方を化学的に修飾することができ, 各鎖は約 18 - 約 27 (例えば, 約 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, または 27) ヌクレオチドの長さであり, デュプレックスは約 18 - 約 23 (例えば, 約 18, 19, 20, 21, 22, または 23) 塩基対を有し, 化学的修飾は, 式 I - V I I のいずれかを有する構造を含む。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的な s i N A 分子は 2 つの鎖を有するデュプレックスを含み, この一方または両方は式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾されていてもよく, 各鎖は約 21 ヌクレオチドからなり, それぞれは 2 - ヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを有し, デュプレックスは約 19 塩基対を有する。別の態様においては, 本発明の s i N A 分子は一本鎖ヘアピン構造を有し, ここで, s i N A は約 36 - 約 70 (例えば, 約 36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または 70) ヌクレオチドの長さであり, 約 18 - 約 23 (例えば, 約 18, 19, 20, 21, 22, または 23) 塩基対を有し, s i N A は式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む化学的修飾を含むことができる。例えば, 本発明の化学的に修飾された例示的な s i N A 分子は, 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された, 約 42 - 約 50 (例えば, 約 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または 50) ヌクレオチドを有する直鎖状オリゴヌクレオチドを含み, ここで, 直鎖状オリゴヌクレオチドは約 19 塩基対および 2 - ヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを有するヘアピン構造を形成する

30

40

50

。別の態様においては、本発明の直鎖状ヘアピン *s i N A* 分子はステムループモチーフを含み、ここで、*s i N A* 分子のループ部分は生物分解性である。例えば、本発明の直鎖状ヘアピン *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り 3' 末端オーバーハング、例えば約 2 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を有する二本鎖 *s i N A* 分子が生成されうるように設計される。

#### 【0048】

別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子は環状核酸分子を含み、ここで、*s i N A* は約 38 - 約 70 (例えば、約 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, または 70) ヌクレオチドの長さであり、約 18 - 約 23 (例えば、約 18, 19, 20, 21, 22, または 23) 塩基対を有し、*s i N A* は化学的修飾を含むことができ、これは式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する構造を含む。例えば、本発明の化学的に修飾された例示的な *s i N A* 分子は、式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学的修飾で化学的に修飾された約 42 - 約 50 (例えば、約 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, または 50) ヌクレオチドを有する環状オリゴヌクレオチドを含み、環状オリゴヌクレオチドは約 19 塩基対および 2 個のループを有するダンベル形状の構造を形成する。

10

#### 【0049】

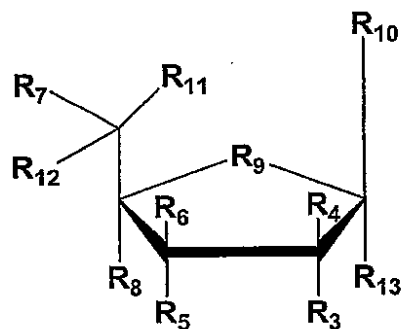
別の態様においては、本発明の環状 *s i N A* 分子は、2つのループモチーフを含み、ここで、*s i N A* 分子のループ部分の一方または両方は生物分解性である。例えば、本発明の環状 *s i N A* 分子は、*s i N A* 分子のループ部分のインビボでの分解により、3' 末端オーバーハング、例えば約 2 ヌクレオチドを含む 3' 末端ヌクレオチドオーバーハングを有する二本鎖 *s i N A* 分子が生成することができるように設計される。

20

#### 【0050】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、少なくとも 1つ (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) の無塩基成分、例えば、式 V :

【化5】



30

[ 式中、

各 R3, R4, R5, R6, R7, R8, R10, R11, R12, および R13 は、独立して、H, OH, アルキル, 置換アルキル, アルカールまたはアラキル, F, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, 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, ポリアルキルアミノ, 置換シリル, または式 1 を有する基であり; R9 は、O, S, CH2, S=O, CHF, または CF2 である ]

40

を有する化合物を含む。

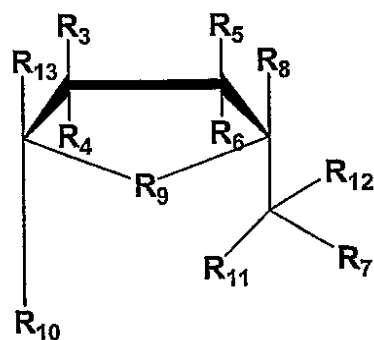
#### 【0051】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、少なくとも 1つ (例えば、約 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 個またはそれ以上) の反転無塩基成分、例えば、式

50

V I :

【化 6】



10

[ 式中 ,

各 R<sub>3</sub> , R<sub>4</sub> , R<sub>5</sub> , R<sub>6</sub> , R<sub>7</sub> , R<sub>8</sub> , R<sub>10</sub> , R<sub>11</sub> , R<sub>12</sub> , および R<sub>13</sub> は , 独立して , H , OH , アルキル , 置換アルキル , アルカリールまたはアラルキル , F , Cl , Br , CN , CF<sub>3</sub> , OCF<sub>3</sub> , 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 - OSH , 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<sub>2</sub> , NO<sub>2</sub> , N<sub>3</sub> , NH<sub>2</sub> , アミノアルキル , アミノ酸 , アミノアシル , ONH<sub>2</sub> , 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 , ポリアルキルアミノ , 置換シリル , または式 I を有する基であり ; R<sub>9</sub> は , O , S , CH<sub>2</sub> , S = O , CHF , または CF<sub>2</sub> であり , R<sub>2</sub> , R<sub>3</sub> , R<sub>8</sub> または R<sub>13</sub> のいずれかは , 本発明の siNA 分子への結合の点として働く ] を有する化合物を含む。

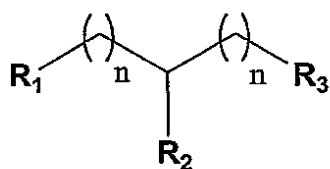
20

【 0 0 5 2 】

別の態様においては , 本発明の siNA 分子は , 少なくとも 1 つ ( 例えば , 約 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 , 9 , 10 個 , またはそれ以上 ) の置換ポリアルキル成分 , 例えば , 式 V I I :

30

【 化 7 】



[ 式中 , 各 n は , 独立して , 1 - 12 の整数であり , 各 R<sub>1</sub> , R<sub>2</sub> および R<sub>3</sub> は , 独立して , H , OH , アルキル , 置換アルキル , アルカリールまたはアラルキル , F , Cl , Br , CN , CF<sub>3</sub> , OCF<sub>3</sub> , 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 - OSH , 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<sub>2</sub> , NO<sub>2</sub> , N<sub>3</sub> , NH<sub>2</sub> , アミノアルキル , アミノ酸 , アミノアシル , ONH<sub>2</sub> , 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 , ポリアルキルアミノ , 置換シリル , または式 I を有する基であり , R<sub>1</sub> , R<sub>2</sub> または R<sub>3</sub> は , 本発明の siNA 分子への結合の点として働く ] を有する化合物を含む。

40

【 0 0 5 3 】

別の態様においては , 本発明は , R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> はヒドロキシル ( OH ) 基であり , n

50

は1であり、R3はOを含み、かつ本発明の二本鎖 siNA 分子の一方または両方の鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方への、または本発明の一本鎖 siNA 分子への結合の点である、式VIIを有する化合物を特徴とする。この修飾は、本明細書において"グリセリル"と称される(例えば、図10の修飾6を参照)。

【0054】

別の態様においては、式V、VIまたはVIIのいずれかを有する本発明の成分は、本発明の siNA 分子の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在する。例えば、式V、VIまたはVIIを有する成分は、 siNA 分子のアンチセンス鎖、センス鎖、またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在することができる。さらに、式VIIを有する成分は、本明細書に記載されるように、ヘアピン siNA 分子の3'末端または5'末端に存在することができる。

10

【0055】

別の態様においては、本発明の siNA 分子は、式VまたはVIを有する無塩基残基を含み、ここで、式VIまたはVIを有する無塩基残基は、3'-3'、3'-2'、2'-3'、または5'-5'コンフィギュレーションで、例えば、一方または両方の siNA 鎖の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方で siNA コンストラクトに結合している。

【0056】

1つの態様においては、本発明の siNA 分子は、例えば、 siNA 分子の5'末端、3'末端、5'末端および3'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)のロック核酸(LNA)ヌクレオチドを含む。

20

【0057】

別の態様においては、本発明の siNA 分子は、例えば、 siNA 分子の5'末端、3'末端、5'末端および3'末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせにおいて、1またはそれ以上(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上)の非環状ヌクレオチドを含む。

【0058】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された siNA がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸( siNA )分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の(例えば、1またはそれ以上、またはすべての)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、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、かつ、センス領域中に存在する任意の(例えば、1またはそれ以上、またはすべての)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、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである)。

30

40

【0059】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾された siNA がセンス領域を含む、本発明の化学的に修飾された短干渉核酸( siNA )分子を特徴とし、ここで、センス領域中に存在する任意の(例えば1またはそれ以上、またはすべての)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、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである)、かつ、センス領域中に存在する任意の(例えば、1またはそれ以上、またはすべての)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、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドであるか、

50

あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドである ) , ここで , 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。

【 0 0 6 0 】

1つの態様においては , 本発明は , 化学的に修飾された s i N A がアンチセンス領域を含む , 本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし , ここで , アンチセンス領域中に存在する任意の ( 例えば , 1またはそれ以上 , またはすべての ) 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 , すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか , あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである ) , かつ , アンチセンス領域中に存在する任意の ( 例えば , 1またはそれ以上 , またはすべての ) 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 , すべてのプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドであるか , あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドである ) 。

10

【 0 0 6 1 】

1つの態様においては , 本発明は , 化学的に修飾された s i N A がアンチセンス領域を含む , 本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし , ここで , アンチセンス領域中に存在する任意の ( 例えば , 1またはそれ以上 , またはすべての ) 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 , すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか , あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである ) , かつ , アンチセンス領域中に存在する任意の ( 例えば , 1またはそれ以上 , またはすべての ) 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り ( 例えば , すべてのプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドであるか , あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドである ) , ここで , 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。

20

【 0 0 6 2 】

1つの態様においては , 本発明は , 化学的に修飾された s i N A がアンチセンス領域を含む本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし , ここで , アンチセンス領域中に存在する任意の ( 例えば , 1またはそれ以上 , またはすべての ) 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 , すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか , あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである ) , かつ , アンチセンス領域中に存在する任意の ( 例えば , 1またはそれ以上 , またはすべての ) 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 , すべてのプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドであるか , あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドである ) 。

30

40

【 0 0 6 3 】

1つの態様においては , 本発明は , 細胞の内部または再構成されたインビトロ系において P T P - 1 B に対する R N A 干渉 ( R N A i ) を媒介しうる , 本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 ( s i N A ) 分子を特徴とし , ここで , 化学的に修飾された s i N A はセンス領域を含み , ここで , センス領域中に存在する 1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり ( 例えば , すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか , あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 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 1またはそれ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 , すべてのプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドである ) 。

50

チドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドである)、および、センス領域の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端、および 5' 末端の両方に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、センス領域はさらに約 1 - 約 4 個(例えば、約 1, 2, 3, または 4 個)の 2' - デオキシリボヌクレオチドを有する 3' 末端オーバーハングを含んでいてもよく; かつ、化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである) 10、アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上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り(例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドである)、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図 10 に示されるいずれかの修飾を含み、これは任意に、アンチセンス配列の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在してもよく、アンチセンス領域はさらに任意に、約 1 - 約 4 個(例えば、約 1, 2, 3, または 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含んでいてもよく、ここでオーバーハングヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上(例えば、1, 2, 3, または 4 個)のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学 20的に修飾された siNA の非限定的例は図 4 および 5 および本明細書の表 I I I および I V に示される。

#### 【0064】

1 つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において PTP - 1 B に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 (siNA) 分子を特徴とし、ここで、siNA はセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである) 30、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のプリンヌクレオチドはプリンリボヌクレオチドであり(例えば、すべてのプリンヌクレオチドがプリンリボヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドがプリンリボヌクレオチドである)、およびセンス領域の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に任意に存在していてもよい反転デオキシ無塩基修飾を含み、センス領域はさらに任意に、約 1 - 約 4 個(例えば、約 1, 2, 3, または 4 個)の 2' - デオキシリボヌクレオチドを有する 3' 末端オーバーハングを含み; かつ、siNA はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり(例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数の 40ピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロ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 - メチルプリンヌクレオチドであり(例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドである)、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図 10 に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在してもよく、アンチセンス領域はさらに任意に約 1 - 約 4 個(例えば、約 1, 2, 3, または 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含んでいてもよく、ここで、オー 50バーハングヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上(例えば、1, 2, 3, または 4 個)

のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。これらの化学的に修飾された *s i N A* の非限定的例は、図 4 および 5 および本明細書の表 I I I および I V に示される。

#### 【 0 0 6 5 】

1 つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において P T P - 1 B に対する R N A 干渉 ( R N A i ) を媒介しうる本発明の化学的に修飾された短干渉核酸 ( *s i N A* ) 分子を特徴とし、化学的に修飾された *s i N A* はセンス領域を含み、ここで、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり (例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 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、センス領域中に存在する 1 またはそれ以上のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) 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、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択され (例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) 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、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択されるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) 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、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択される)、かつ、任意にセンス領域の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に反転デオキシ無塩基修飾が存在していてもよく、センス領域はさらに任意に約 1 - 約 4 個 (例えば、約 1, 2, 3, または 4 個) の 2' - デオキシリボヌクレオチドを有する 3' 末端オーバーハングを含んでいてもよく; かつ、化学的に修飾された短干渉核酸分子はアンチセンス領域を含み、ここで、アンチセンス領域中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり (例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロ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 またはそれ以上のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) 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、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択され (例えば、すべてのプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) 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、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択されるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシヌクレオチド、ロック核酸 ( L N A ) 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、および 2' - O - メチルヌクレオチドからなる群より選択される)、および末端キヤップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図 10 に示されるいずれかの修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の 3' 末端、5' 末端、または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在していてもよく、アンチセンス領域はさらに任意に、約 1 - 約 4 個 (例えば、約 1, 2, 3, または 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含んでいてもよく、ここで、オーバーハングヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上 (例えば 1, 2, 3, または 4 個) のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができる。

#### 【 0 0 6 6 】

別の態様においては、本発明の *s i N A* 分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは、好ましくは、本発明の *s i N A* 分子のアンチセンス鎖に存在するが、また任意に、センスおよび / またはアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に存在していてもよく、これは、天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、本発明は、ノザンコンフォメーション (例えば、ノザン偽回転サイクル、例えば、

Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984を参照)を有する修飾ヌクレオチドを含む siNA 分子を特徴とする。このように、本発明の siNA 分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは、好ましくは、本発明の siNA 分子のアンチセンス鎖に存在するが、また任意にセンスおよび/またはアンチセンス鎖およびセンス鎖の両方に存在してもよく、これはヌクレアーゼ分解に対して耐性であると同時に RNAi を媒介する能力を維持する。ノザンコンフィギュレーションを有するヌクレオチドの非限定的例としては、ロック核酸 (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'-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、および 2'-O-メチルヌクレオチドが挙げられる。

10

#### 【0067】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部でまたは再構成されたインビトロ系において PTP-1B に対する RNA 干渉 (RNAi) を媒介しうる化学的に修飾された短干渉核酸分子 (siNA) を特徴とし、ここで、化学的修飾は、化学的に修飾された siNA 分子に共有結合したコンジュゲートを含む。別の態様においては、コンジュゲートは化学的に修飾された siNA 分子に生物分解性リンカーを介して共有結合している。1つの態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾された siNA 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端に結合している。別の態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾された siNA 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 5' 末端に結合している。さらに別の態様においては、コンジュゲート分子は、化学的に修飾された siNA 分子のセンス鎖、アンチセンス鎖、または両方の鎖の 3' 末端および 5' 末端の両方、またはそれらの任意の組み合わせに結合している。1つの態様においては、本発明のコンジュゲート分子は、化学的に修飾された siNA 分子の生物学的システム (例えば細胞) へのデリバリーを促進する分子を含む。別の態様においては、化学的に修飾された siNA 分子に結合したコンジュゲート分子は、ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、または細胞取り込みを媒介することができる細胞レセプターのリガンドである。化学的に修飾された siNA 分子に結合させることができる、本発明により企図される特定のコンジュゲート分子の例は、Vargeese ら (米国特許出願 10/201,394、本明細書の一部としてここに引用する) に記載される。用いられるコンジュゲートのタイプおよび本発明の siNA 分子のコンジュゲーションの程度は、同時に siNA が RNAi 活性を媒介する能力を維持しながら、siNA コンストラクトの改良された薬物動態学プロファイル、生物利用性、および/または安定性について評価することができる。このように、当業者は、例えば、当該技術分野において一般的に知られる動物モデルにおいて、種々のコンジュゲートで修飾された siNA コンストラクトをスクリーニングして、siNA コンジュゲート複合体が RNAi を媒介する能力を維持しながら改良された特性を有するかを判定することができる。

20

30

#### 【0068】

1つの態様においては、本発明は、siNA がさらに siNA のセンス領域と siNA のアンチセンス領域とを連結させるヌクレオチド、非ヌクレオチド、または混合ヌクレオチド/非ヌクレオチドリナーを含む本発明の短干渉核酸 (siNA) 分子を特徴とする。1つの態様においては、本発明のヌクレオチドリナーは、2ヌクレオチド以上の長さ、例えば、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドの長さのリナーでありうる。さらに別の態様においては、ヌクレオチドリナーは、核酸アプタマーであってもよい。本明細書において用いる場合、"アプタマー"または"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、ここで、核酸分子は、その天然の設定において標的分子により認識される配列を含む配列を有する。あるいは、アプタマーは天然には核酸に結合しない標的分子に結合する核酸分子であってもよい。標的分子は目的とする任意の分子でありうる。例えば、アプタマーを用いて蛋白質のリガンド結合ドメインに結合

40

50



させ、このことにより、天然に生ずるリガンドと蛋白質との相互作用を妨害することができる。これは非限定的例であり、当業者は当該技術分野において一般に知られる手法を用いて他の態様を容易に生成しうることを認識するであろう（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; および Jayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628を参照）。

#### 【0069】

さらに別の態様においては、本発明の非ヌクレオチドリinkerには、無塩基ヌクレオチド、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、または他のポリマー性化合物（例えば、ポリエチレングリコール、例えば2-100個のエチレングリコール単位を有するもの）が含まれる。特定の例としては、Seela and Kaiser, Nucleic Acids Res. 1990, 75:6353およびNucleic Acids Res. 1987, 75:3113; Cload and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 173:6324; Richardson and Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773:5109; Ma et al., Nucleic Acids Res. 1993, 27:2585およびBiochemistry 1993, 32:1751; Durand et al., Nucleic Acids Res. 1990, 75:6353; McCurdy et al., Nucleosides & Nucleotides 1991, 10:287; Jschke et al., Tetrahedron Lett. 1993, 34:301; Ono et al., Biochemistry 1991, 30:9914; Arnold et al., 国際公開WO89/02439; Usman et al., 国際公開WO95/06731; Dydycz et al., 国際公開WO95/11910およびFerentz and Verdine, J. Am. Chem. Soc. 1991, 773:4000（すべて本明細書の一部としてここに引用する）に記載されるものが挙げられる。"非ヌクレオチド"はさらに、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに糖および/またはリン酸置換のいずれかにより核酸鎖中に取り込むことができ、残りの塩基がその酵素活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、一般に認識されているヌクレオチド塩基、例えばアデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンを、例えば糖のC1位に含まない場合、無塩基でありうる。

#### 【0070】

1つの態様においては、本発明は、細胞の内部または再構成されたインビトロ系においてRNA干渉(RNAi)を媒介しうる短干渉核酸(sRNA)分子を特徴とし、ここで、2つの別々のオリゴヌクレオチドから組み立てられたsRNA分子の一方または両方の鎖はリボヌクレオチドを含まない。sRNA中のすべての位置は、sRNA分子が細胞におけるRNAi活性を支持する能力が維持される程度で、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび/または非ヌクレオチド、例えば式I, II, III, IV, V, VI, またはVIIを有するヌクレオチドまたは非ヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

#### 【0071】

1つの態様においては、本発明のsRNA分子は、細胞または再構成されたインビトロ系においてRNAi活性を媒介する一本鎖sRNA分子であり、ここで、sRNA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む。別の態様においては、本発明の一本鎖sRNA分子は、5'末端リン酸基を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖sRNA分子は5'末端リン酸基および3'末端リン酸基（例えば、2', 3'-環状リン酸）を含む。別の態様においては、本発明の一本鎖sRNA分子は、約

10

20

30

40

50

19 - 約29ヌクレオチドを含む。さらに別の態様においては、本発明の一本鎖 *s i N A* 分子は、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的に修飾されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドを含む。例えば、細胞中において *s i N A* 分子が *R N A i* 活性を支持する能力が維持される程度に、*s i N A* 分子中のすべての位置で、化学的に修飾されたヌクレオチド、例えば式 I - V I I のいずれかを有するヌクレオチドまたはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

#### 【0072】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、細胞または再構成されたインビトロ系において *R N A i* 活性を媒介する一本鎖 *s i N A* 分子であり、ここで、*s i N A* 分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、*s i N A* 中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロ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-メチルプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドであるか、あるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-O-メチルプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく、*s i N A* はさらに任意に、*s i N A* 分子の3'末端に約1 - 約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の末端2'-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで、末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ、*s i N A* はさらに任意に末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

#### 【0073】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、細胞または再構成されたインビトロ系において *R N A i* 活性を媒介する一本鎖 *s i N A* 分子であり、ここで、*s i N A* 分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、*s i N A* 中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドである）、および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'-デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドであるかあるいは複数のプリンヌクレオチドが2'-デオキシプリンヌクレオチドである）、および末端キャップ修飾、例えば、本明細書に記載されるかまたは図10に示される任意の修飾を含み、これは任意にアンチセンス配列の3'末端、5'末端、または3'末端および5'末端の両方に存在してもよく、*s i N A* はさらに任意に *s i N A* 分子の3'末端に約1 - 約4個（例えば、約1, 2, 3, または4個）の末端2'-デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく、ここで末端ヌクレオチドはさらに1またはそれ以上（例えば、1, 2, 3, または4個）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ、*s i N A* はさらに任意に、末端リン酸基、例えば5'末端リン酸基を含むことができる。

#### 【0074】

1つの態様においては、本発明の *s i N A* 分子は、細胞または再構成されたインビトロ系において *R N A i* 活性を媒介する一本鎖 *s i N A* 分子であり、ここで、*s i N A* 分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み、*s i N A* 中に存在する1またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、すべてのピリミジンヌクレオチドが2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであるか、あるいは複数のピリミジンヌクレ

オチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロ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ロック核酸 (LNA) ヌクレオチドであり (例えば, すべてのプリンヌクレオチドが LNA ヌクレオチドであるか, あるいは複数のプリンヌクレオチドが LNA ヌクレオチドである), および末端キャップ修飾, 例えば, 本明細書に記載されるかまたは図 10 に示される任意の修飾を含み, これは任意にアンチセンス配列の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在していてもよく, siNA はさらに任意に, siNA 分子の 3' 末端に約 1 - 約 4 個 (例えば, 約 1, 2, 3, または 4 個) の末端 2' - デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく, ここで末端ヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上 (例えば, 1, 2, 3, または 4 個) のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ, siNA はさらに任意に, 末端リン酸基, 例えば 5' 末端リン酸基を含むことができる。

10

#### 【0075】

1 つの態様においては, 本発明の siNA 分子は, 細胞または再構成されたインビトロ系において RNAi 活性を媒介する一本鎖 siNA 分子であり, ここで, siNA 分子は, 標的核酸配列に対する相補性を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含み, siNA 中に存在する 1 またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり (例えば, すべてのピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであるか, あるいは複数のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである), および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' - メトキシエチルプリンヌクレオチドであり (例えば, すべてのプリンヌクレオチドが 2' - メトキシエチルプリンヌクレオチドであるか, あるいは複数のプリンヌクレオチドが 2' - メトキシエチルプリンヌクレオチドである), および末端キャップ修飾, 例えば, 本明細書に記載されるかまたは図 10 に示される任意の修飾を含み, これは任意にアンチセンス配列の 3' 末端, 5' 末端, または 3' 末端および 5' 末端の両方に存在していてもよく, siNA はさらに任意に, siNA 分子の 3' 末端に約 1 - 約 4 個 (例えば, 約 1, 2, 3, または 4 個) の末端 2' - デオキシヌクレオチドを含んでいてもよく, ここで末端ヌクレオチドはさらに 1 またはそれ以上 (例えば, 1, 2, 3, または 4 個) のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含むことができ, siNA はさらに任意に, 末端リン酸基, 例えば 5' 末端リン酸基を含むことができる。

20

30

#### 【0076】

別の態様においては, 本発明の一本鎖 siNA 分子中に存在する任意の修飾ヌクレオチドは, 天然に生ずるリボヌクレオチドと類似する特性または特徴を有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば, 本発明は, ノザンコンフォメーション (例えば, ノザン偽回転 (pseudorotation) サイクル (例えば, Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984 を参照) を有する修飾ヌクレオチドを含む siNA 分子を特徴とする。このように, 本発明の一本鎖 siNA 分子中に存在する化学的に修飾されたヌクレオチドは, 好ましくは, ヌクレアーゼ分解に耐性であり, 同時に RNAi を媒介する能力を維持する。

40

#### 【0077】

1 つの態様においては, 本発明は, 細胞中において PTP - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし, 該方法は, (a) 本発明の siNA 分子を合成し, これは化学的に修飾してもよく, siNA 鎖の一方は PTP - 1 B 遺伝子の RNA に相補的な配列を含み; そして (b) 細胞における PTP - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で siNA 分子を細胞に導入する, ことを含む。

#### 【0078】

1 つの態様においては, 本発明は, 細胞中において PTP - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし, 該方法は, (a) 本発明の siNA 分子を合成し, これは化学的に修飾してもよく, siNA 鎖の一方は PTP - 1 B 遺伝子の RNA に相補的な配列を含み,

50

s i N A のセンス鎖配列は標的 R N A の配列と同一であり；そして（ b ）細胞中における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で s i N A 分子を細胞に導入することを含む。

【 0 0 7 9 】

別の態様においては、本発明は、細胞中において 2 以上の P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（ a ）本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方は P T P - 1 B 遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；そして（ b ）細胞における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で s i N A 分子を細胞に導入することを含む。

【 0 0 8 0 】

別の態様においては、本発明は、細胞中において 2 以上の P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（ a ）本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方は P T P - 1 B 遺伝子の R N A に相補的な配列を含み、s i N A のセンス鎖配列は、標的 R N A の配列と同一であり；そして（ b ）細胞における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で s i N A 分子を細胞に導入することを含む。

【 0 0 8 1 】

1 つの態様においては、本発明は、組織外植片における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（ a ）本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方は P T P - 1 B 遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；そして（ b ）組織外植片における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A 分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【 0 0 8 2 】

1 つの態様においては、本発明は、組織外植片において P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（ a ）本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方は P T P - 1 B 遺伝子の R N A に相補的な配列を含み、s i N A のセンス鎖配列は標的 R N A の配列と同一であり；そして（ b ）組織外植片における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A 分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【 0 0 8 3 】

別の態様においては、本発明は、組織外植片において 2 以上の P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（ a ）本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方は P T P - 1 B 遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；そして（ b ）組織外植片における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、s i N A 分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入することを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入することを含む。

【 0 0 8 4 】

1 つの態様においては、本発明は、生物において P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、（ a ）本発明の s i N A 分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、s i N A 鎖の一方は P T P - 1 B 遺伝子の R N A に相補的な配列を含み；そして（ b ）生物における P T P - 1 B 遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で s i N A 分子を生物に導入することを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 5 】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNA鎖の一方はPTP-1B遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；そして(b)生物におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を生物に導入する、ことを含む。

## 【 0 0 8 6 】

1つの態様においては、本発明は、細胞内においてPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはPTP-1B遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)細胞におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を細胞に導入する、ことを含む。

10

## 【 0 0 8 7 】

別の態様においては、本発明は、細胞内において2以上のPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはPTP-1B遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)細胞におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子をインビトロまたはインビボで細胞と接触させる、ことを含む。

## 【 0 0 8 8 】

1つの態様においては、本発明は、組織外植片においてPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはPTP-1B遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)組織外植片におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞と接触させる、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入する、ことを含む。

20

## 【 0 0 8 9 】

別の態様においては、本発明は、組織外植片において2以上のPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはPTP-1B遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)組織外植片におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を特定の生物に由来する組織外植片の細胞に導入する、ことを含む。別の態様においては、この方法はさらに、その生物におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、組織外植片をその組織が由来する生物に戻すかまたは別の生物に導入する、ことを含む。

30

## 【 0 0 9 0 】

1つの態様においては、本発明は、生物においてPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはPTP-1B遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)生物におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を生物に導入する、ことを含む。

40

## 【 0 0 9 1 】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾してもよく、siNAはPTP-1B遺伝子のRNAに対する相補性を有する一本鎖配列を含み；そして(b)生物におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下でsiNA分子を生物に導入する、ことを含む。

## 【 0 0 9 2 】

50

1つの態様においては、本発明は、生物においてPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、生物におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物を本発明のsiNA分子と接触させることを含む。

【0093】

別の態様においては、本発明は、生物において2以上のPTP-1B遺伝子の発現を調節する方法を特徴とし、該方法は、生物におけるPTP-1B遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、生物を1またはそれ以上の本発明のsiNA分子と接触させることを含む。

【0094】

本発明のsiNA分子は、種々のRNA分子を標的とするRNAiにより標的(PTP-1B)遺伝子の発現が阻害されるよう設計することができる。1つの態様においては、本発明のsiNA分子は、標的遺伝子に対応する種々のRNAを標的とするよう用いられる。そのようなRNAの非限定的例には、メッセンジャーRNA(mRNA)、標的遺伝子の選択的RNAスプライシング変種、標的遺伝子の転写後修飾RNA、標的遺伝子のブレ-mRNA、および/またはRNAテンプレートが含まれる。選択的スプライシングにより、適当なエクソンの使用により区別される転写産物のファミリーが生ずる場合には、本発明は、適当なエクソンにより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かまたはその間を区別するために用いることができる。例えば、選択的スプライシングされた貫膜ドメインを含む蛋白質を、膜結合型および分泌型の両方の形で発現させることができる。本発明を用いて貫膜ドメインを含むエクソンを標的とすることにより、分泌型の蛋白質に対して、膜結合型の薬学的ターゲティングの機能的な重要性を判定することができる。これらのRNA分子を標的とすることに関連する本発明の用途の非限定的例には、治療的医薬用途、医薬の発見用途、分子診断および遺伝子機能用途、および遺伝子マッピング、例えば本発明のsiNA分子を用いる単一ヌクレオチド多型のマッピングが含まれる。そのような用途は、既知の遺伝子配列を用いて、または発現配列タグ(EST)から入手可能な部分配列から実行することができる。

10

20

【0095】

別の態様においては、本発明のsiNA分子は、遺伝子ファミリー、例えば蛋白質チロシンホスファターゼ遺伝子に対応する保存配列を標的とするために用いられる。そのように、多くの蛋白質チロシンホスファターゼ標的を標的とするsiNA分子は、増加した治療効果を提供することができる。さらに、siNAは、種々の応用法において遺伝子機能の経路を特性決定するために用いることができる。例えば、本発明を用いて、経路における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、または翻訳分析において、特性決定されていない遺伝子の機能を決定することができる。本発明は、医薬開発に向けて、種々の疾病および健康状態に關与する可能性のある標的遺伝子経路を決定するために用いることができる。本発明は、例えば、インスリン抵抗性および/または肥満の進行および/または維持に關与する遺伝子発現の経路を理解するために用いることができる。

30

【0096】

1つの態様においては、本発明のsiNA分子および/または方法は、Genbank受託番号で表されるRNAをコードする遺伝子、例えば、本明細書においてGenbank受託番号(例えば表Iに示されるGenbank受託番号)で表されるRNA配列をコードするPTP-1B遺伝子の発現を阻害するために用いられる。

40

【0097】

1つの態様においては、本発明は、(a)予め決定された複雑性を有するsiNAコンストラクトのライブラリを生成し、そして(b)標的RNA配列中のRNAi標的部位を決定するのに適した条件下で、上述の(a)のsiNAコンストラクトをアッセイする、ことを含む方法の特徴とする。別の態様においては、(a)のsiNA分子は、固定された長さ、例えば、約23ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては、(a)のsiNA分子は、異なる長さのものであり、例えば、約19-約25(例えば、約

50

19, 20, 21, 22, 23, 24, または 25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては,アッセイは,本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含むことができる。別の態様においては,アッセイは,標的 R N A が発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては,標的 R N A のフラグメントを,例えば,ゲル電気泳動,ノザンプロット分析,または R N A s e 保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して,標的 R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 R N A 配列は,当該技術分野において知られるように,例えば,クローニングおよび/またはインビトロ系については転写,インビボ系においては細胞発現により,得ることができる。

#### 【0098】

1つの態様においては,本発明は,(a)予め決定された複雑性,例えば  $4^N$  (Nは, s i N A コンストラクトの鎖のそれぞれにおいて塩基対形成したヌクレオチドの数を示し,例えば,19塩基対を有する21ヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する s i N A コンストラクトについては,複雑性は  $4^{19}$  となる)を有するランダム化された s i N A コンストラクトのライブラリを生成し;そして(b)標的 P T P - 1 B R N A 配列中の R N A i 標的部位を決定するのに適した条件下で,上述の(a)の s i N A コンストラクトをアッセイする,の各工程を含む方法の特徴とする。別の態様においては,(a)の s i N A 分子は,固定された長さ,例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を含む。さらに別の態様においては,(a)の s i N A 分子は異なる長さのものであり,例えば,約19-約25(例えば,約19,20,21,22,23,24,または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては,アッセイは,本明細書の実施例7に記載されるような,再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含むことができる。別の態様においては,アッセイは,標的 R N A が発現されている細胞培養系を含むことができる。別の態様においては,P T P - 1 B R N A のフラグメントを,例えば,ゲル電気泳動,ノザンプロット分析,または R N A s e 保護アッセイにより検出可能なレベルの切断について分析して,標的 P T P - 1 B R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 P T P - 1 B R N A 配列は,当該技術分野において知られるように,例えば,クローニングおよび/またはインビトロ系については転写により,インビボ系においては細胞発現により,得ることができる。

#### 【0099】

別の態様においては,本発明は,: (a)標的遺伝子によりコードされる R N A 標的の配列を分析し;(b)(a)の R N A の1またはそれ以上の領域に相補的な配列を有する1またはそれ以上の s i N A 分子の組を合成し;そして(c)標的 R N A 配列中の R N A i 標的を決定するのに適した条件下で(b)の s i N A 分子をアッセイする,の各工程を含む方法の特徴とする。1つの態様においては,(b)の s i N A 分子は,固定された長さ,例えば約23ヌクレオチドの長さの鎖を有する。別の態様においては,(b)の s i N A 分子は,異なる長さ,例えば,約19-約25(例えば,約19,20,21,22,23,24,または25)ヌクレオチドの長さの鎖を有する。1つの態様においては,アッセイは,本明細書に記載されるような再構成されたインビトロ s i N A アッセイを含んでいてもよい。別の態様においては,アッセイは,標的 R N A が発現されている細胞培養系を含むことができる。標的 R N A のフラグメントを,検出可能なレベルの切断について,例えばゲル電気泳動,ノザンプロット分析,または R N A s e 保護アッセイにより分析して,標的 R N A 配列中の最も適当な標的部位を決定する。標的 R N A 配列は,当該技術分野において知られるようにして,例えば,クローニングおよび/またはインビトロ系については転写により,インビボ系においては発現により,得ることができる。

#### 【0100】

"標的部位"とは,アンチセンス領域中に標的配列に相補的な配列を含む s i N A コンストラクトにより媒介される切断の"標的とされる",標的 R N A 中の配列を意味する。

#### 【0101】

"検出可能なレベルの切断"とは,標的 R N A のランダム分解から生成する R N A のバッ

10

20

30

40

50

クグラウンドから切断産物を識別するのに十分な程度の標的RNAの切断（および切断産物RNAの形成）を意味する。ほとんどの検出方法について、標的RNAの1 - 5 %から切断産物が生成すれば、バックグラウンドから検出するのに充分である。

#### 【0102】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のsiNA分子を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、1またはそれ以上の遺伝子を標的とし、化学的に修飾されていてもよい本発明のsiNA分子を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む医薬組成物を特徴とする。別の態様においては、本発明は、被験者において疾病または健康状態を治療または予防する方法を特徴とし、該方法は、被験者における疾病または健康状態の治療または10 予防に適した条件下で、被験者に本発明の組成物を単独でまたは1またはそれ以上の他の治療用化合物と併用して投与することを含む。さらに別の態様においては、本発明は、被験者において組織拒絶を低減または予防する方法を特徴とし、該方法は、被験者における組織拒絶の低減または予防に適した条件下で被験者に本発明の組成物を投与することを含む。

#### 【0103】

別の態様においては、本発明は、PTP-1B遺伝子標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾されていてもよく、siNA鎖の一方はPTP-1B標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b)細胞、組織、または生物においてPTP-1B標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、20 siNA分子を細胞、組織、または生物に導入し；そして(c)細胞、組織、または生物における表現型変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

#### 【0104】

別の態様においては、本発明は、PTP-1B遺伝子標的を評価する方法を特徴とし、該方法は、(a)本発明のsiNA分子を合成し、これは化学的に修飾されていてもよく、siNA鎖の一方はPTP-1B標的遺伝子のRNAに相補的な配列を含み；(b)生物学的システムにおけるPTP-1B標的遺伝子の発現を調節するのに適した条件下で、siNA分子を生物学的システムに導入し；そして(c)生物学的システムにおける表現型の変化をアッセイすることにより、遺伝子の機能を決定する、ことを含む。

#### 【0105】

"生物学的システム"とは、生物または非生物起源、例えば、限定されないが、ヒト、動物、植物、昆虫、細菌、ウイルスまたは他の起源からの、精製されたまたは精製されていない形の物質を意味し、ここで、システムはRNAi活性に必要な成分を含む。"生物学的システム"との用語は、細胞、組織、または生物、またはそれらの抽出物を含むことができる。したがって、生物学的システムとの用語にはまた、インピトロの設定で用いることができる再構成されたRNAi系が含まれる。

#### 【0106】

"表現型変化"とは、本発明の核酸分子（例えばsiNA）との接触または処理にตอบสนองして生ずる任意の検出可能な細胞の変化を意味する。そのような検出可能な変化には、限定されないが、形状、サイズ、増殖、運動性、蛋白質発現またはRNA発現、または当該技術分野において知られる方法によりアッセイすることができる他の物理学的または化学的変化が含まれる。検出可能な変化にはまた、グリーン蛍光蛋白質（GFP）等のレポーター遺伝子/分子、または発現された蛋白質を同定するために用いられる種々のタグ、またはアッセイすることができる任意の他の細胞成分の発現が含まれる。

#### 【0107】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明のsiNA分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物におけるPTP-1B標的遺伝子の発現を調節するために用いることができる。別の態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい2以上の本発明のsiNA分子を含有するキットを特徴とし、これは細胞、組織、または生物において2以上のPTP-1B標的遺伝子の発現を調 50



節するために用いることができる。

【0108】

1つの態様においては、本発明は、化学的に修飾されていてもよい本発明の1またはそれ以上の s i N A 分子を含有する細胞を特徴とする。別の態様においては、本発明の s i N A 分子を含有する細胞は哺乳動物細胞である。さらに別の態様においては、本発明の s i N A 分子を含有する細胞はヒト細胞である。

【0109】

1つの態様においては、化学的に修飾されていてもよい本発明の s i N A 分子の合成は、(a) s i N A 分子の2つの相補的鎖を合成し；(b) 二本鎖 s i N A 分子を得るのに適した条件下で2つの相補的鎖と一緒にアニーリングさせる、ことを含む。別の態様においては、s i N A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相オリゴヌクレオチド合成により行う。さらに別の態様においては、s i N A 分子の2つの相補的鎖の合成は、固相タンデムオリゴヌクレオチド合成により行う。

10

【0110】

1つの態様においては、本発明は、s i N A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(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し、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用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(b) 第1のオリゴヌクレオチド配列鎖の足場上で s i N A の第2のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、第2のオリゴヌクレオチド配列鎖はさらに、s i N A デュープレックスを精製するために用いることができる化学成分を含み；(c) 2つの s i N A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュープレックスを形成するのに適した条件下で(a)のリンカー分子を切断し；そして(d) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化学成分を利用して s i N A デュープレックスを精製する、の各工程を含む。別の態様においては、上述の(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の間に、例えば、メチルアミン等のアルキルアミン塩基を用いて加水分解条件下で行う。1つの態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(CPG)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、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等の切断可能なリンカー上で合成される。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーと(a)の切断可能なリンカーの切断が同時に行われるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性を有することができる。別の態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列の単離に用いることができる(b)の化学成分は、ジメトキシトリチル基等のトリチル基を含み、これは本明細書に記載されるトリチルオン合成戦略において利用することができる。さらに別の態様においては、ジメトキシトリチル基等の化学成分は、精製の間に、例えば酸性条件を用いて除去する。

20

30

【0111】

さらに別の態様においては、s i N A 合成の方法は溶液相合成またはハイブリッド相合成であり、ここでは、第1の配列に結合され、第2の配列の合成の足場として作用する切断可能なリンカーを用いて、s i N A デュープレックスの両方の鎖をタンデムで合成することにより、二本鎖 s i N A 分子が形成される。

40

【0112】

別の態様においては、本発明は、s i N A デュープレックス分子を合成する方法を特徴とし、該方法は、(a) s i N A 分子の一方のオリゴヌクレオチド配列鎖を合成し、ここで、配列は他方のオリゴヌクレオチド配列の合成の足場として用いることができる切断可能なリンカー分子を含み；(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)の足場上で合成し、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、かつ、第2の配列はさらに、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる化学成分を含み；(c) 第2のオリゴヌクレオチド配列鎖の化

50

学成分を利用して、切断可能なリンカーにより接続された両方の s i N A オリゴヌクレオチド鎖を含む全長配列を単離するのに適した条件下で、かつ、2つの s i N A オリゴヌクレオチド鎖がハイブリダイズして安定なデュプレックスを形成するのに適した条件下で、(b)の生成物を精製する、の各工程を含む。1つの態様においては、上述の(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の間に、例えば加水分解条件下で行う。別の態様においては、上述の(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の後に行う。別の態様においては、合成の方法は、調整多孔ガラス(C P G)またはポリスチレン等の固体支持体上での固相合成を含み、ここで、(a)の第1の配列は、スクシニルリンカー等の切断可能なリンカー上で、固体支持体を足場として用いて合成する。(a)において第2の鎖を合成するための足場として用いられる切断可能なリンカーは、固体支持体誘導化リンカーおよび(a)の切断可能なリンカーが同時にまたは別々に切断されるように、固体支持体誘導化リンカーと同様の反応性または異なる反応性を有することができる。1つの態様においては、結合したオリゴヌクレオチド配列を単離するために用いることができる(b)の化学成分は、トリチル基、例えばジメトキシトリチル基を含む。

10

#### 【0113】

別の態様においては、本発明は、1回の合成プロセスで二本鎖 s i N A 分子を作製する方法を特徴とし、該方法は、(a)第1の配列および第2の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、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を介して第2の配列に連結されており、かつ、第2の配列を有するオリゴヌクレオチドには末端5'-保護基、例えば、5'-O-ジメトキシトリチル基(5'-O-DMT)が残存しており；(b)オリゴヌクレオチドを脱保護し、このことにより脱保護によって2つのオリゴヌクレオチド配列を結合しているリンカーが切断され；そして(c)二本鎖 s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、例えば本明細書に記載されるトリチル-オン合成戦略を用いて、(b)の生成物を精製する、の工程を含む。

20

#### 【0114】

別の態様においては、本発明の s i N A 分子の合成の方法は、S c a r i n g e らの米国特許5,889,136；6,008,400；および6,111,086(その全体を本明細書の一部としてここに引用する)の教示を含む。

30

#### 【0115】

1つの態様においては、本発明は P T P - 1 B に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、s i N A コンストラクトは、s i N A コンストラクトのヌクレアーゼ耐性を増加させる1またはそれ以上の化学的修飾、例えば、式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有する1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

#### 【0116】

別の態様においては、本発明は、ヌクレアーゼ耐性が増加している s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして(b)ヌクレアーゼ耐性が増加している s i N A 分子を単離するのに適した条件下で工程(a)の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

40

#### 【0117】

1つの態様においては、本発明は P T P - 1 B に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、s i N A コンストラクトは、s i N A コンストラクトのセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性を調節する、1またはそれ以上の本明細書に記載される化学的修飾を含む。

#### 【0118】

別の態様においては、本発明は、s i N A 分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分

50

子に導入し、そして(b) siNA分子のセンス鎖とアンチセンス鎖との間の結合親和性が増加している siNA 分子を単離するのに適した条件下で工程(a)の siNA 分子をアッセイする、ことを含む。

【0119】

1つの態様においては、本発明は、PTP-1Bに対するRNAiを媒介する siNA コンストラクトを特徴とし、 siNA コンストラクトは、 siNA コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的RNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0120】

1つの態様においては、本発明は、PTP-1Bに対するRNAiを媒介する siNA コンストラクトを特徴とし、 siNA コンストラクトは、 siNA コンストラクトのアンチセンス鎖と細胞中の相補的標的DNA配列との間の結合親和性を調節する本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0121】

別の態様においては、本発明は、 siNA 分子のアンチセンス鎖と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加している siNA 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを siNA 分子に導入し、そして(b) siNA 分子のアンチセンス鎖と相補的標的RNA配列との間の結合親和性が増加している siNA 分子を同定するのに適した条件下で工程(a)の siNA 分子をアッセイする、ことを含む。

【0122】

別の態様においては、本発明は、 siNA 分子のアンチセンス鎖と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加している siNA 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを siNA 分子に導入し、そして(b) siNA 分子のアンチセンス鎖と相補的標的DNA配列との間の結合親和性が増加している siNA 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)の siNA 分子をアッセイする、ことを含む。

【0123】

1つの態様においては、本発明は、PTP-1Bに対するRNAiを媒介する siNA コンストラクトを特徴とし、 siNA コンストラクトは、化学的に修飾された siNA コンストラクトに対する配列ホモロジーを有する追加の内因性 siNA 分子を生成しうる細胞性ポリメラーゼのポリメラーゼ活性を調節する、本明細書に記載される1またはそれ以上の化学的修飾を含む。

【0124】

別の態様においては、本発明は、化学的に修飾された siNA 分子に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性 siNA 分子を生成しうる細胞性ポリメラーゼのポリメラーゼ活性の増加を媒介することができる siNA 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a)式I-VIIのいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを siNA 分子に導入し、そして(b)化学的に修飾された siNA 分子に対して配列ホモロジーを有する追加の内因性 siNA 分子を生成しうる細胞性ポリメラーゼのポリメラーゼ活性の増加を媒介することができる siNA 分子を単離するのに適した条件下で、工程(a)の siNA 分子をアッセイする、ことを含む。

【0125】

1つの態様においては、本発明は、細胞においてPTP-1Bに対するRNAiを媒介する化学的に修飾された siNA コンストラクトを特徴とし、ここで、化学的修飾は、そのような siNA コンストラクトにより媒介されるRNAiの効率を低下させるような様式で、 siNA と標的RNA分子、DNA分子および/または蛋白質またはRNAiに必須の他の因子との相互作用に有意に影響を与えない。

【0126】

別の態様においては、本発明は、PTP-1Bに対する改良されたRNAi活性を有す

10

20

30

40

50

る s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、( a ) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして ( b ) 改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 ( a ) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

【 0 1 2 7 】

さらに別の態様においては、本発明は、P T P - 1 B 標的 R N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、( a ) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして ( b ) 標的 R N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 ( a ) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む

10

【 0 1 2 8 】

さらに別の態様においては、本発明は、P T P - 1 B 標的 D N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、( a ) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして ( b ) 標的 D N A に対する改良された R N A i 活性を有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 ( a ) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む

【 0 1 2 9 】

1 つの態様においては、本発明は、P T P - 1 B に対する R N A i を媒介する s i N A

20

【 0 1 3 0 】

別の態様においては、本発明は、改良された細胞取り込みを有する、P T P - 1 B に対する s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は ( a ) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを s i N A 分子に導入し、そして ( b ) 改良された細胞取り込みを有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 ( a ) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。

【 0 1 3 1 】

1 つの態様においては、本発明は、P T P - 1 B に対する R N A i を媒介する s i N A コンストラクトを特徴とし、ここで、s i N A コンストラクトは、例えば、s i N A コンストラクトの薬物動態学を改良するポリエチレングリコールまたは同等のコンジュゲート等のポリマー性コンジュゲートを結合させることにより、またはインビボで特定の組織のタイプまたは細胞のタイプにターゲティングするコンジュゲートを結合させることにより、s i N A コンストラクトの生物利用性を増加させる、本明細書に記載される 1 またはそれ以上の化学的修飾を含む。そのようなコンジュゲートの非限定的例は、V a r g e e s e e t a l . , 米国特許出願 1 0 / 2 0 1 , 3 9 4 ( 本明細書の一部としてここに引用する ) に記載されている。

30

【 0 1 3 2 】

1 つの態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明の s i N A 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、( a ) コンジュゲートを s i N A 分子の構造中に導入し、そして ( b ) 改良された生物利用性を有する s i N A 分子を単離するのに適した条件下で、工程 ( a ) の s i N A 分子をアッセイする、ことを含む。そのようなコンジュゲートには、細胞レセプターのリガンド、例えば、天然に生ずる蛋白質リガンドに由来するペプチド；蛋白質局在化配列、例えば細胞 Z I P コード配列；抗体；核酸アプタマー；ビタミンおよび他の補因子、例えば葉酸および N - アセチルガラクトースアミン；ポリマー、例えばポリエチレングリコール ( P E G ) ；リン脂質；ポリアミン、例えばスペルミンまたはスペルミジン；および他のものが含まれる。

40

【 0 1 3 3 】

50

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明の *s i N A* 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 賦形剤処方を *s i N A* 分子に導入し、そして (b) 改良された生物利用性を有する *s i N A* 分子を単離するのに適した条件下で、工程 (a) の *s i N A* 分子をアッセイする、ことを含む。そのような賦形剤には、ポリマー、例えばシクロデキストリン、脂質、カチオン性脂質、ポリアミン、リン脂質、およびその他のものが含まれる。

【0134】

別の態様においては、本発明は、改良された生物利用性を有する本発明の *s i N A* 分子を生成する方法を特徴とし、該方法は、(a) 式 I - V I I のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを有するヌクレオチドを *s i N A* 分子に導入し、そして (b) 改良された生物利用性を有する *s i N A* 分子を単離するのに適した条件下で工程 (a) の *s i N A* 分子をアッセイする、ことを含む。

10

【0135】

別の態様においては、本発明の *s i N A* 化合物にポリエチレングリコール (PEG) を共有結合的に結合させることができる。結合した PEG は、任意の分子量のものであってよく、好ましくは約 2,000 - 約 50,000 ダルトン (Da) である。

【0136】

本発明は、単独で、またはインビトロまたはインビボで RNA を試験サンプルおよび / または被験者に導入するのに必要な試薬の少なくとも 1 つを有するキットの成分として、用いることができる。例えば、キットの好ましい成分には、*s i N A* および *s i N A* の導入を促進するベヒクルが含まれる。そのようなキットはまた、キットのユーザが本発明を実施できるようにするための指針を含むことができる。

20

【0137】

本明細書において用いる場合、"短干渉核酸"、"*s i N A*"、"短干渉 RNA"、"*s i R N A*"、"短干渉核酸分子"、"短干渉オリゴヌクレオチド分子"、または"化学的に修飾された短干渉核酸分子"との用語は、配列特異的様式で RNA 干渉 "RNA i" または遺伝子サイレンシングを媒介しうる任意の核酸分子を表す (例えば、Bass, 2001, Nature, 411, 428 - 429; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494 - 498; および Kreutzer et al., 国際公開 WO 00 / 44895; Zernicka-Goetz et al., 国際公開 WO 01 / 36646; Fire, 国際公開 WO 99 / 32619; Plaetinck et al., 国際公開 WO 00 / 01846; Mello and Fire, 国際公開 WO 01 / 29058; Deschamps - Depailllette, 国際公開 WO 99 / 07409; および Li et al., 国際公開 WO 00 / 44914; Allshire, 2002, Science, 297, 1818 - 1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833 - 1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215 - 2218; および 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; および Reinhart & Bartel, 2002, Science, 297, 1831 を参照)。本発明の *s i N A* 分子の非限定的例は、図 4 - 6 および本明細書の表 I I, I I I および I V に示される。例えば、*s i N A* は、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子であってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。*s i N A* は 2 つ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、ここで一方の鎖はセンス鎖であり、他方はアンチセンス鎖であり、アンチセンス鎖およびセンス鎖は自己相補的であり (すなわち、各鎖は、他方の鎖中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む) ; ア

30

40

50

ンチセンス鎖は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を含む。あるいは、*siNA* は単一のオリゴヌクレオチドから組み立ててもよく、ここで、*siNA* の自己相補的センス領域およびアンチセンス領域は、核酸系または非核酸系のリンカーにより連結されている。*siNA* は、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は別の標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。*siNA* は2またはそれ以上のループ構造および自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を含むステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチドであってもよく、ここで、アンチセンス領域は標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、インビボまたはインビトロでプロセシングされて、*RNAi* を媒介しうる活性な *siNA* 分子を生ずることができる。*siNA* はまた、標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを含んでいてもよく（例えば、そのような *siNA* 分子が *siNA* 分子中に標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列の存在を必要としない場合）、ここで、一本鎖ポリヌクレオチドはさらに末端リン酸基、例えば 5' - リン酸（例えば、Martinez et al., 2002, Cell., 110, 563 - 574 および Schwarz et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537 - 568 を参照）、または 5', 3' - ニリン酸を含んでいてもよい。ある態様においては、本発明の *siNA* 分子は、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の態様においては、本発明の *siNA* 分子は、標的遺伝子の発現の阻害が引き起こされるように、標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。本明細書において用いる場合、*siNA* 分子は *RNA* のみを含む分子に限定される必要はなく、化学的に修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドも包含する。ある態様においては、本発明の短干渉核酸分子は 2' - ヒドロキシ（2' - OH）含有ヌクレオチドを欠失している。本出願人は、ある態様において、*RNAi* を媒介するために 2' - ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない短干渉核酸を記載する。すなわち、本発明の短干渉核酸分子は、任意にリボヌクレオチド（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* を支持するために *siNA* 分子中にリボヌクレオチドの存在を必要としないそのような *siNA* 分子は、2' - OH 基を有する1またはそれ以上のヌクレオチドを含む、結合したリンカーまたは他の結合しているかまたは会合している基、成分、または鎖を有することができる。任意に、*siNA* 分子は、ヌクレオチド位置の約 5, 10, 20, 30, 40, または 50% にリボヌクレオチドを含むことができる。本発明の修飾短干渉核酸分子はまた、短干渉修飾オリゴヌクレオチド "*siMON*" と称される。本明細書において用いる場合、*siNA* との用語は、配列特異的 *RNAi* を媒介しうる核酸分子を記述するために用いられる他の用語、例えば、短干渉 *RNA* (*siRNA*)、二本鎖 *RNA* (*dsRNA*)、マイクロ *RNA* (*miRNA*)、短ヘアピン *RNA* (*shRNA*)、短干渉オリゴヌクレオチド、短干渉核酸、短干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学的に修飾された *siRNA*、転写後遺伝子サイレンシング *RNA* (*ptgsRNA*)、および他のものと同様であることを意味する。さらに、本明細書において用いる場合、*RNAi* との用語は、配列特異的 *RNA* 干渉を記述する他の用語、例えば転写後遺伝子サイレンシング、または後成遺伝学 (*epigenetics*) と同様であることを意味する。例えば、本発明の *siNA* 分子を用いて、転写後レベルまたは転写前レベルの両方で後成的に遺伝子をサイレンシングさせることができる。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後成的制御は、クロマチン構造の *siNA* 媒介性修飾により生じて遺伝子発現を変化させることができる（例えば、Allshire, 2002, Science, 297, 1818 - 1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833 - 1837; Jenuei

n, 2002, Science, 297, 2215-2218; および Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237 を参照)。

【0138】

"調節する"とは、遺伝子の発現、または1またはそれ以上の蛋白質または蛋白質サブユニットをコードするRNA分子または同等のRNA分子のレベル、または蛋白質または蛋白質サブユニットの1またはそれ以上の活性が、発現、レベル、または活性が、調節剤の非存在下で観察されるより高いかまたは低いように、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされることを意味する。例えば、"調節する"との用語は、"阻害する"ことを意味しうるが、"調節する"との用語の使用はこの定義には限定されない。

【0139】

"阻害する"とは、遺伝子発現産物の活性または1またはそれ以上の遺伝子産物をコードするRNAまたは同等のRNAのレベルが、本発明の核酸分子の非存在下において観察されるレベルより減少することを意味する。1つの態様においては、siNA分子による阻害は、好ましくは、RNAi応答を媒介することができない不活性または減弱化分子の存在下で観察されるレベルより低い。別の態様においては、本発明のsiNA分子による遺伝子発現の阻害は、siNA分子の存在下において、存在しない場合よりも大きい。

【0140】

"遺伝子"または"標的遺伝子"とは、RNAをコードする核酸を意味し、例えば、限定されないが、ポリペプチドをコードする構造遺伝子などの核酸配列が含まれる。標的遺伝子は、細胞に由来する遺伝子、内因性遺伝子、トランスジーン、または外来遺伝子、例えば、病原体(例えばウイルス)の感染後に細胞中に存在する病原体の遺伝子でありうる。標的遺伝子を含む細胞は、任意の生物、例えば、植物、動物、原生動物、ウイルス、細菌または真菌に由来するかその中に含まれうる。植物の非限定的例には、単子葉植物、双子葉植物、または裸子植物が含まれる。動物の非限定的例には脊椎動物または無脊椎動物が含まれる。真菌の非限定的例には糸状菌または酵母が含まれる。

【0141】

"PTP-1B"とは、PTP-1B蛋白質をコードする任意の蛋白質チロシンホスファターゼ(PTP-1B)ポリペプチド、蛋白質および/またはポリヌクレオチド(例えば、表IのGenbank受託番号で表されるポリヌクレオチド、またはPTP-1B遺伝子に由来する他の任意のPTP-1B転写産物)を意味する。

【0142】

"PTP-1B蛋白質"とは、任意の有糸分裂促進物質活性化蛋白質キナーゼ(PTP-1B)ペプチドまたは蛋白質、またはこれらの成分を意味し、ここで、ペプチドまたは蛋白質は、PTP-1B遺伝子によりコードされるか、または蛋白質チロシンホスファターゼ-1B活性、例えばインスリンレセプターのリン酸化活性を有する。

【0143】

"高度に保存された配列領域"とは、標的遺伝子中の1またはそれ以上の領域のヌクレオチド配列が、1つの世代と他の世代とで、または1つの生物学的システムと他の生物学的システムとで有意に相違しないことを意味する。

【0144】

"センス領域"とは、siNA分子のアンチセンス領域に対する相補性を有する、siNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siNA分子のセンス領域は、標的核酸配列とホモロジーを有する核酸配列を含むことができる。

【0145】

"アンチセンス領域"とは、標的核酸配列に対する相補性を有する、siNA分子のヌクレオチド配列を意味する。さらに、siNA分子のアンチセンス領域は、siNA分子のセンス領域に対する相補性を有する核酸配列を任意に含むことができる。

【0146】

"標的核酸"とは、その発現または活性が調節されるべき任意の核酸配列を意味する。標的核酸はDNAまたはRNAでありうる。

10

20

30

40

50

## 【0147】

"相補性"とは、核酸が、伝統的なワトソン-クリックまたは他の非伝統的なタイプのいずれかにより、別の核酸配列と水素結合を形成しうることを意味する。本発明の核酸分子に関して、核酸分子とその相補的配列との結合自由エネルギーは、核酸の適切な機能、例えば、RNAi活性を進行させるのに十分なものである。核酸分子についての結合自由エネルギーの決定は当該技術分野においてよく知られている（例えば、Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII 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を参照）。相補性のパーセンテージは、核酸分子中の、第2の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン-クリック塩基対形成）を形成しうる連続する残基のパーセンテージを示す（例えば、10塩基中の5, 6, 7, 8, 9, 10塩基は、50%, 60%, 70%, 80%, 90%, および100%の相補性である）。"完全な相補性"とは、核酸配列の連続する残基がすべて第2の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合するであろうことを意味する。

## 【0148】

本発明のsiNA分子は、種々の疾病および状態、例えば、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病（例えば、II型およびI型糖尿病）および細胞または組織におけるPTP-1Bのレベルに応答しうる他の任意の適応症を治療する新規な治療方法である。

## 【0149】

本発明の1つの態様においては、本発明のsiNA分子の各配列は、独立して、約18 - 約24ヌクレオチドの長さであり、特定の態様においては、約18, 19, 20, 21, 22, 23, または24ヌクレオチドの長さである。別の態様においては、本発明のsiNAデュプレックスは、独立して、約17 - 約23（例えば、約17, 18, 19, 20, 21, 22または23）塩基対を含む。さらに別の態様においては、ヘアピンまたは環状構造を含む本発明のsiNA分子は、約35 - 約55（例えば、約35, 40, 45, 50または55）ヌクレオチドの長さであるか、または約38 - 約44（例えば、38, 39, 40, 41, 42, 43または44）ヌクレオチドの長さであり、約16 - 約22（例えば、約16, 17, 18, 19, 20, 21または22）塩基対を含む。本発明の例示的siNA分子は、表IIおよびIIIおよび図4および5に示される。本発明の例示的合成siNA分子は、表IIIおよび/または図4 - 5に示される。

## 【0150】

本明細書において用いる場合、"細胞"は、その通常の生物学的意味で用いられ、多細胞生物全体を指さず、特にヒトを指さない。細胞は生物中で、例えば、鳥類、植物および哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ヤギ、無尾サル、有尾サル、ブタ、イヌおよびネコ中で存在することができる。細胞は、原核生物（例えば細菌細胞）または真核生物（例えば哺乳動物または植物細胞）であってもよい。細胞は体細胞起源でも生殖細胞系起源でもよく、全能細胞でも多能性細胞でもよく、分裂していても分裂していなくてもよい。細胞はまた、配偶子または胚、幹細胞、または完全に分化した細胞に由来するか、またはこれらを含むものであってもよい。

## 【0151】

本発明のsiNA分子は、直接加えてもよく、またはカチオン性脂質と複合体化して、リボソーム中に封入して、または他の方法により、標的細胞または組織にデリバリーすることができる。核酸または核酸複合体は、関連する組織にエキスピボで、または注射、注入ポンプまたはステントを用いてインピボで、バイオポリマー中に取り込ませてまたは取り込ませずに、局所的に投与することができる。特定の態様においては、本発明の核酸分子は表II - IIIおよび/または図4 - 5に示される配列を含む。そのような核酸分子の例は、これらの表および図面において規定される配列から本質的になる。さらに、表IVに記載される化学的に修飾されたコンストラクトを本発明の任意のsiNA配列に適用することができる。

10

20

30

40

50



## 【0152】

別の観点においては、本発明は本発明の1またはそれ以上のs i N A分子を含む哺乳動物細胞を提供する。1またはそれ以上のs i N A分子は、独立して、同じまたは異なる部位を標的とすることができる。

## 【0153】

"RNA"とは、少なくとも1つ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、-D-リボフラノース成分の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、単離されたRNA、例えば部分的に生成されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え的に製造されたRNA、ならびに1またはそれ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または変更により天然に生ずるRNAと異なるように変更されたRNAを含む。そのような変更は、非ヌクレオチド物質の付加、例えば、s i N Aの末端または内部（例えばRNAの少なくとも1またはそれ以上のヌクレオチド）への付加を含むことができる。本発明のRNA分子中のヌクレオチドはまた、標準的ではないヌクレオチド、例えば、天然に生じないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドを含むことができる。これらの変更されたRNAは、類似体または天然に生ずるRNAの類似体と称することができる。

10

## 【0154】

"被験者"とは、外植された細胞のドナーまたはレシピエントである生物または細胞それ自体を意味する。"被験者"とはまた、本発明の核酸分子を投与することができる生物を表す。1つの態様においては、被験者は哺乳動物または哺乳動物細胞である。別の態様においては、被験者はヒトまたはヒト細胞である。

20

## 【0155】

本明細書において用いる場合、"ホスホロチオエート"との用語は、式I（式中、Zおよび/またはWはイオウ原子を含む）を有するヌクレオチド間結合を表す。したがって、ホスホロチオエートとの用語は、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートヌクレオチド間結合の両方を表す。

## 【0156】

本明細書において用いる場合、"万能塩基"との用語は、天然のDNA/RNA塩基のそれぞれと、これらをほとんど区別せずに塩基対を形成するヌクレオチド塩基類似体を表す。万能塩基の非限定的例としては、当該技術分野において知られるように（例えば、Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447を参照）、C-フェニル、C-ナフチルおよび他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、およびニトロアゾール誘導体、例えば、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、および6-ニトロインドールが挙げられる。

30

## 【0157】

本明細書において用いる場合、"非環状ヌクレオチド"との用語は、非環状リボース糖を有する任意のヌクレオチド、例えば、リボース炭素（C1、C2、C3、C4、またはC5）のいずれかが、独立してまたは組み合わせてヌクレオチド中に存在しないヌクレオチドを表す。

40

## 【0158】

本発明の核酸分子は、個別に、または他の薬剤と組み合わせてまたは一緒に、本明細書に記載される疾病または健康状態（例えば癌）を治療するために用いることができる。例えば、特定の疾病または健康状態を治療するために、治療に適した条件下で、s i N A分子を個別にまたは1またはそれ以上の薬剤と組み合わせて被験者に投与することができ、または当業者には明らかな他の適当な細胞に投与することができる。

## 【0159】

さらに別の態様においては、s i N A分子を他の既知の治療法と組み合わせて用いて、上述の健康状態または疾病を治療することができる。例えば、本明細書に記載される分子

50

を1またはそれ以上の既知の治療剤と組み合わせて用いて、疾病または健康状態を治療することができる。本発明の siNA 分子と容易に組み合わせることができる他の治療剤の非限定的例は、酵素的核酸分子、アロステリック核酸分子、アンチセンス、デコイ、またはアプタマー核酸分子、抗体、例えばモノクローナル抗体、小分子、および他の有機および/または無機化合物、例えば金属、塩およびイオンである。

#### 【0160】

1つの態様においては、本発明は、本発明の少なくとも1つの siNA 分子をコードする核酸配列を、その siNA 分子の発現を可能とするように含む発現ベクターを特徴とする。例えば、ベクターは、デュープレックスを含む siNA 分子の両方の鎖をコードする配列を含むことができる。ベクターはまた、自己相補的でありしたがって siNA 分子を形成する1つの核酸分子をコードする配列を含むことができる。そのような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; および Novina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi: 10.1038/nm725 に記載されている。

10

#### 【0161】

別の態様においては、本発明は、本発明の発現ベクターを含む哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞を特徴とする。

20

#### 【0162】

さらに別の態様においては、本発明の発現ベクターは、Genbank 受託番号、例えば表 I に示される Genbank 受託番号で表される RNA 分子に対する相補性を有する siNA 分子の配列を含む。

#### 【0163】

1つの態様においては、本発明の発現ベクターは、2またはそれ以上の siNA 分子をコードする核酸配列を含み、これらは同じであっても異なってもよい。

#### 【0164】

本発明の別の観点においては、標的 RNA 分子と相互作用して、標的 RNA 分子（例えば、本明細書において Genbank 受託番号で表される標的 RNA 分子）をコードする遺伝子をダウンレギュレートする siNA 分子は、DNA または RNA ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNA プラスミドまたはウイルスベクターでありうる。siNA を発現するウイルスベクターは、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、またはアルファウイルスに基づいて構築することができる。siNA 分子を発現しうる組換えベクターは、本明細書に記載されるようにデリバリーされ、標的細胞中に残留する。あるいは、siNA 分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、siNA 分子は結合して RNA 干渉 (RNAi) により遺伝子機能または発現をダウンレギュレートする。siNA を発現するベクターのデリバリーは、全身的（例えば、静脈内または筋肉内投与により）、被験者から外植された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の標的細胞中への導入を可能とする他のいずれかの手段により行うことができる。

30

40

#### 【0165】

"ベクター"とは、所望の核酸をデリバリーするために用いられる、任意の核酸および/またはウイルスに基づく手法を意味する。

#### 【0166】

本発明の他の特徴および利点は、以下の本発明の好ましい態様の説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

50

## 【0167】

## 図面の簡単な説明

図1は、s i N A分子を合成するスキームの非限定的例を示す。相補的 s i N A 配列鎖である鎖1および鎖2をタンデムで合成し、切断可能な結合、例えばヌクレオチドスクシネートまたは無塩基スクシネートで結合させる。これは、固体支持体上の固相合成において用いられる切断可能なリンカーと同じであっても異なっているいてもよい。合成は固相でも液相でもよく、示される例においては合成は固相合成である。合成は、タンデムオリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチド上にジメトキシトリチル基等の保護基が残るように実施する。オリゴヌクレオチドを切断および脱保護すると、2つの s i N A 鎖は自発的にハイブリダイズして s i N A デュープレックスを形成するため、末端保護基の性質を利用してデュープレックスを精製することができる。これは、例えば、末端保護基を有するデュープレックス/オリゴヌクレオチドのみが単離されるトリチルオン精製法を適用することにより行うことができる。

10

## 【0168】

図2は、本発明の方法により合成された精製 s i N A デュープレックスの M A L D I - T O V 質量分析を示す。示される2つのピークは、別々の s i N A 配列鎖の推定質量に対応する。この結果は、タンデム合成から生成された s i N A デュープレックスを、単純なトリチルオン精製方法論を用いて単一物質として精製しうることを示す。

## 【0169】

図3は、R N A i に関与する標的 R N A 分解の提唱されるメカニズムの非限定的例を示す図である。外来一本鎖 R N A、例えばウイルス、トランスポゾン、または他の外因性 R N A から R N A 依存性 R N A ポリメラーゼ ( R d R P ) により生成される二本鎖 R N A ( d s R N A ) が、ダイサー ( D I C E R ) 酵素を活性化し、次にこれは s i N A デュープレックスを生成する。あるいは、合成されたまたは発現された s i N A を適当な手段により細胞内に直接導入することができる。活性な s i N A 複合体が形成され、これは標的 R N A を認識し、その結果、R I S C エンドヌクレアーゼ複合体により標的 R N A が分解されるか、または R N A 依存性 R N A ポリメラーゼ ( R d R P ) により追加の R N A が合成され、これはダイサーを活性化して追加の s i N A 分子が生じ、このことにより R N A i 応答が増幅される。

20

## 【0170】

図4A - Fは、本発明の化学的に修飾された s i N A コンストラクトの非限定的例を示す。図中、Nは任意のヌクレオチド ( アデノシン、グアニン、シトシン、ウリジン、または任意にチミジン ) を表し、例えば、括弧 ( N N ) により表されるオーバーハング領域においてチミジンで置換されていてもよい。s i N A コンストラクトのセンス鎖およびアンチセンス鎖について種々の修飾が示されている。

30

## 【0171】

図4A：センス鎖は、4個のホスホロチオエート 5' - および 3' 末端ヌクレオチド間結合を有する 21ヌクレオチドを含み、ここで、2つの末端 3' - ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは ( N N ) ヌクレオチドを除き 2' - O - メチルまたは 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は 21ヌクレオチドを含み、任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に標的 R N A 配列に相補的であってもよく、1個の 3' 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合および4個の 5' 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは ( N N ) ヌクレオチドを除き 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

40

## 【0172】

50

図 4 B : センス鎖は 2 1 ヌクレオチドを含み, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは, 任意に塩基対形成してもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - O - メチルまたは 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, これはリボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は 2 1 ヌクレオチドを含み, 任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは, 任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, これはリボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

10

## 【 0 1 7 3 】

図 4 C : センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 2 1 ヌクレオチドを含み, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に塩基対形成していてもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - O - メチルまたは 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, これはリボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は, 2 1 ヌクレオチドを含み, 任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく, 1 個の 3' 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, これはリボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

20

## 【 0 1 7 4 】

図 4 D : センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 2 1 ヌクレオチドを含み, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, これはリボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができ, 存在しうるすべ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 2 1 ヌクレオチドを含み, これは任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく, 1 個の 3' 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, 存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドであり, これはリボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

30

## 【 0 1 7 5 】

図 4 E : センス鎖は 5' 末端キャップ成分および 3' 末端キャップ成分を有する 2 1 ヌクレオチドを含み, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, これは, リボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は 2 1 ヌクレオチドを含み, 任意に 3' 末端グリセリル成分を有していてもよく, ここで, 2 個の末端 3' - ヌクレオチドは任意に標的 RNA 配列に相補的であってもよく, 存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは 2' - デオキシ - 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドであり, 存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは (NN) ヌクレオチドを除き 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドであり, これは, リボヌクレオチド, デオキシヌクレオチド, 万能塩基, または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。

40

50

## 【0176】

図4F：センス鎖は5'末端キャップ成分および3'末端キャップ成分を有する21ヌクレオチドを含み、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に塩基対形成してもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。アンチセンス鎖は21ヌクレオチドを含み、任意に3'末端グリセリル成分を有していてもよく、ここで、2個の末端3'-ヌクレオチドは任意に標的RNA配列に相補的であってもよく、1個の3'末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有していてもよく、存在しうるすべてのピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチドであり、存在しうるすべてのプリンヌクレオチドは(NN)ヌクレオチドを除き2'-デオキシヌクレオチドであり、これはリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、万能塩基、または本明細書に記載される他の化学的修飾を含むことができる。コンストラクトA-Fのアンチセンス鎖は、本発明のいずれかの標的核酸配列に相補的な配列を含む。

10

## 【0177】

図5A-Fは、本発明の化学的に修飾された特定のsiNA配列の非限定的例を示す。A-Fは、図4A-Fに示される化学的修飾をPTP-1B siNA配列に適用したものである。

## 【0178】

図6は、本発明の種々のsiNAコンストラクトの非限定的例を示す。示される例(コンストラクト1, 2, および3)は典型的な19塩基対を有するが、本発明の異なる態様には本明細書に記載される任意の数の塩基対が含まれる。括弧内の領域は、例えば約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは約2ヌクレオチドを含むヌクレオチドオーバーハングを表す。コンストラクト1および2は、RNAi活性用に独立して用いることができる。コンストラクト2は、ポリヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリinkerを含むことができ、これは、任意に、生物分解性リンカーとして設計することができる。1つの態様においては、コンストラクト2に示されるループ構造は生物分解性リンカーを含むことができ、このことにより、インビボおよび/またはインビトロでコンストラクト1が形成される。別の例においては、同じ原理でコンストラクト2を生成するためにコンストラクト3を用いることができ、ここで、リンカーはインビボおよび/またはインビトロで活性なsiNAコンストラクト2を生成するために用いられ、これは任意に別の生物分解性リンカーを用いてインビボおよび/またはインビトロで活性なsiNAコンストラクト1を生成することができる。そのように、siNAコンストラクトの安定性および/または活性は、インビボまたはインビトロで、および/またはインビトロにおいて用いるためのsiNAコンストラクトの設計に基づいて調節することができる。

20

30

## 【0179】

図7A-Cは、siNAヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。

## 【0180】

図7A：5'-制限部位(R1)配列、次に予め決定されたPTP-1B標的配列と同一の配列を有する領域(siNAのセンス領域)を含むようにDNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21, または22ヌクレオチド(N)の長さを有し、その後例えば約3-約10ヌクレオチドを含む規定された配列(X)のループ配列を有する。

40

## 【0181】

7B：次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼにより伸長して、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成し、このことにより、PTP-1B標的配列に対する特異性を有し、自己相補的センス領域およびアンチセンス領域を有するsiNA転写産物が得られる。

50

## 【0182】

図7C：コンストラクトを加熱（例えば約95℃に）して、配列を直鎖状とすることにより、第1の鎖の3'-制限配列に対するプライマーを用いて相補的な第2のDNA鎖を伸長することができる。次に、二本鎖DNAを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。コンストラクトは、例えば、制限部位を設計することにより、および/またはPaulら（2002, Nature Biotechnology, 29, 505-508）に記載されるようにポリU末端領域を利用することにより、転写により3'末端ヌクレオチドオーバーハングが生ずるように設計することができる。

## 【0183】

図8A-Cは、発現カセットを作製して二本鎖siNAコンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

10

## 【0184】

図8A：5'-制限（R1）部位配列、次に予め決定されたPTP-1B標的配列と同一の配列を有する領域（siNAのセンス領域）を有するように、DNAオリゴマーを合成する。ここで、センス領域は、例えば、約19, 20, 21, または22ヌクレオチド（N）の長さを含み、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）を有する。

## 【0185】

図8B：次に、合成コンストラクトをDNAポリメラーゼで伸長させて、自己相補的配列を有するヘアピン構造を生成する。

20

## 【0186】

図8C：コンストラクトをR1およびR2に特異的な制限酵素で処理して二本鎖DNAを生成し、次にこれを細胞における発現用の適当なベクター中に挿入する。U6プロモーター領域がdsDNAの両側を挟むように転写カセットを設計し、このことによりsiNAの別々のセンス鎖およびアンチセンス鎖が生ずる。ポリT末端配列をコンストラクトに付加して、得られる転写産物中にUオーバーハングを生成することができる。

## 【0187】

図9A-Eは、特定の標的核酸配列、例えばメッセンジャーRNA中のsiNA媒介性RNAiの標的部位を決定するために用いられる方法の概略図である。

## 【0188】

30

図9A：siNAコンストラクトのアンチセンス領域が標的核酸配列の全域で標的部位に対する相補性を有し、センス領域がsiNAのアンチセンス領域に相補的な配列を含むよう、siNAオリゴヌクレオチドのプールを合成する。

## 【0189】

図9BおよびC：配列をプールし、ベクターの細胞中へのトランスフェクションによりsiNAが発現するように（図9C）、ベクター中に挿入する（図9B）。

## 【0190】

図9D：標的核酸配列の調節に伴う表現型の変化に基づいて細胞を分類する。

## 【0191】

図9E：分類された細胞からsiNAを単離し、シーケンスして、標的核酸配列中の有効な標的部位を同定する。

40

## 【0192】

図10は、例えば、本発明のsiNA配列の3'末端を安定化させるために用いることができる、種々の安定化化学（1-10）の非限定的例を示す：（1）[3-3']-反転デオキシリボース；（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；および（10）[5-3']-ジデオキシリボヌクレオチド。図面に示されている修飾および非修飾の骨格化学に加

50

えて、これらの化学を本明細書に記載されるような別の骨格修飾、例えば、式 I を有する骨格修飾と組み合わせることができる。さらに、示される末端修飾の 5' 側に示される 2'-デオキシヌクレオチドは、本明細書に記載される別の修飾または非修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド、例えば、式 I - V I I またはそれらの任意の組み合わせを有する修飾であってもよい。

#### 【0193】

図 11 は、ヌクレアーゼに耐性であるが RNAi 活性を媒介する能力を保持している本発明の化学的に修飾された siNA コンストラクトを同定するために用いられる戦略の非限定的例を示す。経験に基づく設計パラメータ（例えば、2'-修飾、塩基修飾、骨格修飾、末端キャップ修飾等の導入）に基づいて siNA コンストラクトに化学修飾を導入する。修飾されたコンストラクトを適当な系（例えば、示されるようにヌクレアーゼ耐性についてはヒト血清、または PK / デリバリーパラメータについては動物モデル）で試験する。平行して、例えば、細胞培養系において、例えばルシフェラーゼレポーターアッセイにより、RNAi 活性について siNA コンストラクトを試験する。次に、特定の特徴を有するが RNAi 活性を保持しているリード siNA コンストラクトを同定し、これをさらに修飾し、再びアッセイする。この同じ方法を用いて、改良された薬物動態学的プロファイル、デリバリー、および RNAi 活性を有する siNA - コンジュゲート分子を同定することができる。

10

#### 【0194】

図 12 は、A549 細胞における、PTP-1B mRNA を標的とする化学的に修飾された siNA により媒介される、PTP-1B mRNA の減少の非限定的例を示す。A549 細胞を 25 nM の siNA と複合体化した 0.25 μg / ウェルの脂質でトランスフェクトした。リボヌクレオチドおよび 3' 末端ジチミジンキャップを含む siNA コンストラクト (RPI # 31018 / 31307) を、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドおよびプリンリボヌクレオチドを含み、siNA のセンス鎖は 5' および 3' 末端反転デオキシ無塩基キャップでさらに修飾されており、アンチセンス鎖は 3' 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む化学的に修飾された siNA コンストラクト (RPI # 31306 / 31307) と比較した。これは、マッチした化学的反転対照 (RPI # 31318 / 31319) とも比較した。さらに、siNA コンストラクトはまた、未処理細胞、脂質でトランスフェクトした細胞およびスクランブル化 siNA コンストラクト (Scram1 および Scram2)、および脂質のみでトランスフェクトした細胞 (トランスフェクション対照) とも比較した。図に示されるように、いずれの siNA コンストラクトも、PTP-1B RNA 発現の有意な減少を示す。

20

30

#### 【0195】

#### 発明の詳細な説明

#### 本発明の核酸分子の作用のメカニズム

以下の議論は、現在知られている短干渉 RNA により媒介される RNA 干渉の提唱されるメカニズムを記載するが、限定を意味するものではなく、先行技術であると認めるものではない。本出願人は、本明細書において、化学的に修飾された短干渉核酸が siRNA 分子と類似のまたは改良された RNAi 媒介能力を有し、インピボで改良された安定性および活性を有すると予測されることを示す。したがって、この議論は、siRNA のみに限定されることを意味するものではなく、siNA 全体に適用することができる。"RNAi を媒介する改良された能力"または"改良された RNAi 活性"とは、インピト口および / またはインピボで測定された RNAi 活性を含むことを意味し、ここで、RNAi 活性は siNA が RNAi を媒介する能力と本発明の siNA の安定性との両方を反映する。本発明においては、これらの活性の積を、全 RNA siRNA または複数のリボヌクレオチドを含む siNA と比較して、インピト口および / またはインピボで増加させることができる。場合によっては、siNA 分子の活性または安定性は低下するかもしれないが（すなわち、10 分の 1 以下）、siNA 分子の全体的活性はインピト口および / またはインピボで増強される。

40

50

## 【0196】

RNA干渉とは、動物において短干渉RNA ( siRNA ) により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表す ( Fire et al. , 1998 , Nature , 391 , 806 )。植物における対応するプロセスは一般に転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと称され、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、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御メカニズムであると考えられており、異なる叢および門が共通して有している ( Fire et al. , 1999 , Trends Genet. , 15 , 358 )。そのような外来遺伝子発現からの防御は、ウイルス感染または宿主ゲノム中へのトランスポゾン要素のランダムインテグレーションから生ずる二本鎖RNA ( dsRNA ) の生成にตอบสนองして、相同的一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答により進化してきたのであろう。細胞におけるdsRNAの存在は、まだ完全には特性決定されていないメカニズムにより、RNAi応答を引き起こす。このメカニズムは、蛋白質キナーゼPKRおよび2' , 5' -オリゴアデニレートシンセターゼのdsRNA媒介性活性化の結果、リボヌクレアーゼLによるmRNAの非特異的切断が生ずるインターフェロン応答とは異なるようである。

10

## 【0197】

細胞中に長いdsRNAが存在すると、ダイサーと称されるリボヌクレアーゼIII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、dsRNAをプロセシングして短干渉RNA ( siRNA ) として知られる短い断片のdsRNAとすることに関与している ( Bernstet al. , 2001 , Nature , 409 , 363 )。ダイサー活性から生ずる短干渉RNAは、典型的には約21 - 23ヌクレオチドの長さであり、約19塩基対のデュプレックスを含む。ダイサーはまた、翻訳制御における関与が示唆されている保存された構造の前駆体RNAから21および22ヌクレオチドの小さな一時的RNA ( stRNA ) を切り出すことに関与することが示唆されている ( Hutvagner et al. , 2001 , Science , 293 , 834 )。RNAi応答はまた、一般にRNA誘導性サイレンシング複合体 ( RISC ) と称される、siRNAを含むエンドヌクレアーゼ複合体を特徴とし、これはsiRNAと相同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デュプレックスのガイド配列に相補的な領域の中央部で生ずる ( Elbashir et al. , 2001 , Genes Dev. , 15 , 188 )。さらに、RNA干渉には、小さいRNA ( 例えば、マイクロRNAまたはmiRNA ) に媒介される遺伝子サイレンシングが関与する場合もある。これはおそらく、クロマチン構造を制御する細胞性メカニズムによるものであり、このことにより標的遺伝子配列の転写が妨害される ( 例えば、Allshire , 2002 , Science , 297 , 1818 - 1819 ; Volpe et al. , 2002 , Science , 297 , 1833 - 1837 ; Jenuwein , 2002 , Science , 297 , 2215 - 2218 ; およびHall et al. , 2002 , Science , 297 , 2232 - 2237を参照)。このように、本発明のsiRNA分子は、RNA転写産物との相互作用を介して、あるいは特定の遺伝子配列との相互作用により、遺伝子サイレンシングを媒介するために用いることができ、そのような相互作用により転写レベルまたは転写後レベルのいずれかで遺伝子サイレンシングが生ずる。

20

30

40

## 【0198】

RNAiは種々の系で研究されてきた。Fireら ( 1998 , Nature , 391 , 806 ) は、C. Elegansにおいて最初にRNAiを観察した。WiannyおよびGoetz ( 1999 , Nature Cell Biol. , 2 , 70 ) は、マウス胚においてdsRNAにより媒介されるRNAiを記載する。Hammondら ( 2000 , Nature , 404 , 293 ) は、dsRNAでトランスフェクトしたショウジョウバエ細胞におけるRNAiを記載する。Elbashirら ( 2001 , Nature , 411 , 494 ) は、培養哺乳動物細胞、例えばヒト胚性腎臓細胞およびHeLa細胞において、合成の21ヌクレオチドRNAのデュプレックスを導入することにより誘

50



導されるRNAiを記載する。ショウジョウバエ胚溶解物における最近の研究は、効率的なRNAi活性を媒介するために必須であるsiRNAの長さ、構造、化学組成、および配列についてのある種の要件を明らかにした。これらの研究は、21ヌクレオチドのsiRNAデュプレックスは2つの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場合に最も活性であることを示した。さらに、一方または両方のsiRNA鎖を2'-デオキシまたは2'-O-メチルヌクレオチドで置換するとRNAi活性が破壊されるが、3'末端siRNAヌクレオチドをデオキシヌクレオチドで置換することは許容されることが示された。siRNAデュプレックスの中心におけるミスマッチ配列もまたRNAi活性を破壊することが示された。さらに、これらの研究はまた、標的RNAにおける切断部位の位置はsiRNAガイド配列の3'末端ではなく5'末端により規定されることを示した(Elbashir et al., 2001, EMBO J., 20, 6877)。他の研究は、siRNAデュプレックスの標的相補鎖の5'-リン酸がsiRNA活性に必要であり、siRNAの5'-リン酸成分を維持するためにATPが用いられることを示したが(Nykanen et al., 2001, Cell, 107, 309)、5'-リン酸を欠失したsiRNAは外的に導入したときに活性であり、このことは、インビボでsiRNAコンストラクトの5'-リン酸化が生じているかもしれないことを示唆する。

10

#### 【0199】

#### 核酸分子の合成

100ヌクレオチドを越える長さの核酸の合成は、自動化方法を用いては困難であり、そのような分子の治療コストは非常に高くなる。本発明においては、好ましくは、小さい核酸モチーフ("小さい"とは、100ヌクレオチド以下の長さ、好ましくは80ヌクレオチド以下の長さ、最も好ましくは50ヌクレオチド以下の長さの核酸モチーフ、例えば、別々のsiNAオリゴヌクレオチド配列またはタンデムで合成されたsiNA配列を表す)が外的デリバリーに用いられる。これらの分子は構造が簡単であるため、核酸が蛋白質および/またはRNA構造の標的領域に進入する能力が高い。本発明の例示的分子は化学的に合成するが、他の分子も同様に合成することができる。

20

#### 【0200】

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またはリボヌクレオチドを欠失しているオリゴヌクレオチドの一部)は、例えば、Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson et al., 国際公開99/54459, Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45, およびBrennan, 米国特許6,001,311に記載されるような、当該技術分野において知られるプロトコルを用いて合成する(これらの文献はすべて本明細書の一部としてここに引用する)。オリゴヌクレオチドの合成は、一般の核酸保護基およびカップリング基、例えば5'末端にジメトキシトリチル、および3'末端にホスホルアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で、0.2 μmolスケールのプロトコルで、2'-O-メチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程、および2'-デオキシヌクレオチドまたは2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチドについては45秒間のカップリング工程で、小スケールの合成を行う。表Vは、合成サイクルで用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2 μmolスケールでの合成は、96ウエルプレート合成機、例えば、Protogene(Palo Alto, CA)により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して33倍過剰(60 μLの0.11 M = 6.6 μmol)の2'-O-メチルホスホルアミダイトおよび105倍過剰のS-エチルテトラゾール(60 μLの0.25 M = 15

30

40

50

$\mu\text{mol}$ )を用いることができる。デオキシ残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して22倍過剰( $40\mu\text{L}$ の $0.11\text{M}=4.4\mu\text{mol}$ )のデオキシホスホルアミダイトおよび70倍過剰のS-エチルテトラゾール( $40\mu\text{L}$ の $0.25\text{M}=10\mu\text{mol}$ )を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は、トリチル画分の比色定量により決定して、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチレン中3% TCA (ABI) であり；キャッピングは、THF中16% N-メチルイミダゾール (ABI) およびTHF中10% 無水酢酸 / 10% 2, 6-ルチジン (ABI) 中で行い；酸化溶液は、THF中16.9 mM  $\text{I}_2$ , 49 mM ピリジン, 9% 水 (PERSEPTIVE (登録商標)) である。Burdick & Jackson 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S-エチルテトラゾール溶液 (アセトニトリル中0.25 M) は、American International Chemical, Inc. から入手した固体から作成する。あるいは、ホスホロチオエート結合の導入のためには、ボーケージ試薬 (3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド, アセトニトリル中0.05 M) を用いる。

10

#### 【0201】

DNA系オリゴヌクレオチドの脱保護は以下のように行う：ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを4 mL のガラスねじ蓋バイアルに移し、40% 水性メチルアミン (1 mL) の溶液中で65 で10分間懸濁する。20 に冷却した後、上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を1.0 mL の EtOH : MeCN :  $\text{H}_2\text{O}$  / 3 : 1 : 1 で3回洗浄し、ボルテックスし、次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して、白色粉末を得る。

20

#### 【0202】

本発明のある種の siNA 分子を含む RNA について用いられる合成方法は、Usmanら (1987 J. Am. Chem. Soc., 109, 7845), Scaringeら (1990 Nucleic Acids Res., 18, 5433) および Wincottら (1995 Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684), Wincottら (1997, Methods Mol. Bio., 74, 59) に記載の方法にしたがい、慣用の核酸保護基およびカップリング基、例えば、5' 末端にジメトキシトリチル、および3' 末端にホスホルアミダイトを用いて行う。非限定的例においては、小スケールの合成は、394 Applied Biosystems, Inc. 合成機で、改変した0.2  $\mu\text{mol}$  スケールのプロトコルを用いて、アルキルシリル保護ヌクレオチドについては7.5分間のカップリング工程を、2'-O-メチル化ヌクレオチドについては2.5分間のカップリング工程を行う。表Vは、合成サイクルにおいて用いる試薬の量および接触時間の概要を示す。あるいは、0.2  $\mu\text{mol}$  スケールの合成は、96 ウエルプレート合成機、例えば、Protogene (Palo Alto, CA) により製造される装置で、サイクルに最少の改変を加えて行うことができる。2'-O-メチル残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して33倍過剰( $60\mu\text{L}$ の $0.11\text{M}=6.6\mu\text{mol}$ )の2'-O-メチルホスホルアミダイトおよび75倍過剰のS-エチルテトラゾール( $60\mu\text{L}$ の $0.25\text{M}=15\mu\text{mol}$ )を用いることができる。リボ残基の各カップリングサイクルにおいては、ポリマー結合5'-ヒドロキシルに対して66倍過剰( $120\mu\text{L}$ の $0.11\text{M}=13.2\mu\text{mol}$ )のアルキルシリル (リボ) 保護ホスホルアミダイトおよび150倍過剰のS-エチルテトラゾール( $120\mu\text{L}$ の $0.25\text{M}=30\mu\text{mol}$ )を用いることができる。394 Applied Biosystems, Inc. 合成機における平均カップリング収率は、トリチル画分の比色定量により決定して、典型的には97.5-99%である。394 Applied Biosystems, Inc. 合成器で用いる他のオリゴヌクレオチド合成試薬は以下のとおりである：脱トリチル化溶液は塩化メチレ

30

40

50

ン中 3 % T C A ( A B I ) であり ; キャッピングは , T H F 中 1 6 % N - メチルイミダゾール ( A B I ) および T H F 中 1 0 % 無水酢酸 / 1 0 % 2 , 6 - ルチジン ( A B I ) 中で行い ; 酸化溶液は , T H F 中 1 6 . 9 m M I<sub>2</sub> , 4 9 m M ピリジン , 9 % 水 ( P E R S E P T I V E ( 登録商標 ) ) である。B u r d i c k & J a c k s o n 合成等級アセトニトリルは試薬瓶から直接用いる。S - エチルテトラゾール溶液 ( アセトニトリル中 0 . 2 5 M ) は , A m e r i c a n I n t e r n a t i o n a l C h e m i c a l , I n c . から入手した固体から作成する。あるいは , ホスホロチオエート結合の導入のためには , ボーテージ試薬 ( 3 H - 1 , 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1 , 1 - ジオキシド , アセトニトリル中 0 . 0 5 M ) を用いる。

#### 【 0 2 0 3 】

R N A の脱保護は , 2 ポットプロトコルまたは 1 ポットプロトコルのいずれかを用いて行う。2 ポットプロトコルについては , ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを 4 m L のガラスねじ蓋バイアルに移し , 4 0 % 水性メチルアミン ( 1 m L ) の溶液中で 6 5 ° で 1 0 分間懸濁する。 - 2 0 ° に冷却した後 , 上清をポリマー支持体から取り出す。支持体を 1 . 0 m L の E t O H : M e C N : H<sub>2</sub>O / 3 : 1 : 1 で 3 回洗浄し , ボルテックスし , 次に上清を最初の上清に加える。オリゴリボヌクレオチドを含む合わせた上清を乾燥して , 白色粉末を得る。塩基脱保護オリゴリボヌクレオチドを無水 T E A / H F / N M P 溶液 ( 1 . 5 m L N - メチルピロリジノン , 7 5 0 μ L T E A および 1 . 0 m L T E A · 3 H F の溶液 3 0 0 μ L , H F 濃度 1 . 4 M ) に再懸濁し , 6 5 ° に加熱する。1 . 5 時間後 , オリゴマーを 1 . 5 M N H<sub>4</sub>H C O<sub>3</sub> で反応を停止させる。

#### 【 0 2 0 4 】

あるいは , 1 ポットプロトコルのためには , ポリマー結合トリチルオンオリゴリボヌクレオチドを 4 m L のガラスねじ蓋バイアルに移し , 3 3 % エタノール性メチルアミン / D M S O : 1 / 1 ( 0 . 8 m L ) の溶液中で , 6 5 ° で 1 5 分間懸濁する。バイアルを室温にする。T E A · 3 H F ( 0 . 1 m L ) を加え , バイアルを 6 5 ° で 1 5 分間加熱する。試料を - 2 0 ° に冷却し , 次に 1 . 5 M N H<sub>4</sub>H C O<sub>3</sub> で反応を停止させる。

#### 【 0 2 0 5 】

トリチルオンオリゴマーの精製のためには , 停止した N H<sub>4</sub>H C O<sub>3</sub> 溶液を , アセトニトリル , 続いて 5 0 m M T E A A で予備洗浄した C - 1 8 含有カートリッジに負荷する。負荷したカートリッジを水で洗浄した後 , R N A を 0 . 5 % T F A で 1 3 分間脱トリチル化する。次にカートリッジを水で再び洗浄し , 1 M N a C l で塩交換し , 再び水で洗浄する。次に , 3 0 % アセトニトリルでオリゴヌクレオチドを溶出する。

#### 【 0 2 0 6 】

平均段階カップリング収率は , 典型的には > 9 8 % である ( W i n c o t t e t a l . , 1 9 9 5 N u c l e i c A c i d s R e s . 2 3 , 2 6 7 7 - 2 6 8 4 ) 。当業者は , 合成のスケールは , 上述の例より大きくまたは小さく , 例えば , 限定されないが , 9 6 ウェルのフォーマットに適合させることができること認識するであろう。

#### 【 0 2 0 7 】

あるいは , 本発明の核酸分子は , 別々に合成して , 合成後に例えばライゲーションにより ( M o o r e e t a l . , 1 9 9 2 , S c i e n c e 2 5 6 , 9 9 2 3 ; D r a p e r e t a l . 国際公開 W O 9 3 / 2 3 5 6 9 ; S h a b a r o v a e t a l . , 1 9 9 1 , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 1 9 , 4 2 4 7 ; B e l l o n e t a l . , 1 9 9 7 , N u c l e o s i d e s & N u c l e o t i d e s , 1 6 , 9 5 1 ; B e l l o n e t a l . , 1 9 9 7 , N u c l e o s i d e s & N u c l e o t i d e s , B e l l o n e t a l . , 1 9 9 7 , B i o c o n j u g a t e C h e m . 8 , 2 0 4 ) , または合成および / または脱保護の後にハイブリダイゼーションにより , 一緒につなげてよい。

#### 【 0 2 0 8 】

本発明の s i N A 分子はまた , 本明細書の実施例 1 に記載されるようにタンデム合成法により合成することができる。この方法では , 両方の s i N A 鎖を , 切断可能なリンカー

10

20

30

40

50

により分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドフラグメントまたは鎖として合成し、次にこれを切断して別々の s i N A フラグメントまたは鎖を生成し、これはハイブリダイズして s i N A デュープレックスの精製を可能とする。リンカーはポリヌクレオチドリリンカーであっても非ヌクレオチドリリンカーであってもよい。本明細書に記載される s i N A のタンデム合成は、マルチウエル/マルチプレート合成プラットフォーム、例えば 96 ウエルまたは同様のより大きなマルチウエルプラットフォームのいずれにも容易に適合させることができる。本明細書に記載される s i N A のタンデム合成はまた、バッチリアクター、合成カラムなどを用いる大規模合成プラットフォームにも容易に適合させることができる。

#### 【0209】

10

s i N A 分子はまた、一方のフラグメントが R N A 分子のセンス領域を含み、第 2 のフラグメントがアンチセンス領域を含む 2 つの別々の核酸鎖またはフラグメントから組み立ててもよい。

#### 【0210】

本発明の核酸分子は、広範囲に修飾して、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' - H による修飾により安定性を高めることができる（概説として、Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163 を参照）。s i N A コンストラクトは、一般的な方法を用いてゲル電気泳動により精製するか、または高速液体クロマトグラフィー（HPLC; Wincott et al., (上掲) を参照、その全体を本明細書の一部としてここに引用する）により精製し、水に再懸濁する。

20

#### 【0211】

本発明の別の観点においては、本発明の s i N A 分子は、DNA または R N A ベクター中に挿入された転写ユニットから発現される。組換えベクターは、DNA プラスミドまたはウイルスベクターでありうる。s i N A を発現するウイルスベクターは、限定されないが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスまた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 分子を発現しうる組換えベクターを本明細書に記載されるようにデリバリーし、標的細胞中に残留させることができる。あるいは、s i N A 分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いてもよい。

30

#### 【0212】

##### 本発明の核酸分子の活性の最適化

修飾（塩基、糖および/またはリン酸）を有する化学的に合成した核酸分子は、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、このことによりその抗力を高めることができる（例えば、Eckstein et al., 国際公開 WO 92/07065; 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 et al., 国際公開 WO 93/15187; Rossi et al., 国際公開 WO 91/03162; Sproat, 米国特許 5,334,711; Gold et al., US 6,300,074 および Burgin et al., (上掲) を参照（これらはすべて本明細書の一部としてここに引用する）。上述の参考文献はすべて、本明細書に記載される核酸分子の塩基、リン酸および/または糖成分になしうる種々の化学修飾を記載する。細胞中におけるその抗力を増強するように修飾し、およびオリゴヌクレオチドの合成時間を短縮し化学物質の必要性を減少するために核酸分子から塩基を除去することが望ましい。

40

#### 【0213】

当該技術分野には、そのヌクレアーゼ安定性および効力を有意に増強することができる、核酸分子中に導入することができる糖、塩基およびリン酸修飾を記述するいくつかの例がある。例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性基、例えば、2' - アミノ、

50

2' - C - アリル, 2' - フルオロ, 2' - O - メチル, 2' - O - アリル, 2' - H 等のヌクレオチド塩基修飾で修飾することにより, 安定性を高め, および/または生物学的活性を増強するために修飾される(総説については, Usman and Cedergren, 1992 TITBS 17, 34; Usman et al., 1994 Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163; Burgin et al., 1996 Biochemistry 35, 14090を参照)。核酸分子の糖修飾は, 当該技術分野において広く記載されている(Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; 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 et al. 国際公開WO93/15187; Sproat, 米国特許5, 334, 711, Beigelman et al., 1995 J. Biol. Chem. 270, 25702; Beigelman et al., 国際公開WO97/26270; Beigelman et al., 米国特許5, 716, 824; Usman et al., 米国特許5, 627, 053; Woolf et al., 国際公開WO98/13526; Thompson et al., 米国特許出願60/082, 404(1998年4月20日出願); 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; および Burlina et al., 1997, Bioorg. Med. Chem., 5, 1999-2010を参照, これらの参考文献はすべて, その全体を本明細書の一部としてここに引用する)。これらの刊行物は, 触媒活性を変更することなく, 糖, 塩基および/またはリン酸修飾等を核酸分子中に組み込む位置を決定する一般的方法および戦略を記載しており, 本明細書の一部としてここに引用する。このような教示の観点から, siNAが細胞においてRNAiを促進する能力が有意に阻害されない限り, 本明細書に記載されるように, 同様の修飾を用いて本発明のsiNA核酸分子を修飾することができる。

#### 【0214】

ホスホロチオエート, ホスホロジチオエート, および/または5' - メチルホスホネート結合によるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間結合の化学修飾は安定性を改良するが, 過剰な修飾はある種の毒性または活性の低下を引き起こしうる。したがって, 核酸分子を設計する場合, これらのヌクレオチド間結合の量は最小にすべきである。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。

#### 【0215】

活性を維持または増強する化学的修飾を有する短干渉核酸(siNA)分子が提供される。そのような核酸はまた, 一般に非修飾核酸よりヌクレアーゼに対する耐性が高い。したがって, インビトロおよび/またはインビボで活性は顕著に低下しないはずである。調節が目的である場合には, 外的にデリバリーされる治療用核酸分子は, 最適には, 望ましくない蛋白質のレベルが低下するのに充分長い時間標的RNAの翻訳が調節されるまで細胞内で安定であるべきである。この時間は, 疾病の状態により数時間から数日まで様々である。RNAおよびDNAの化学合成における進歩(Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677; Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19(本明細書の一部としてここに引用する))により, 上述の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り, 核酸分子を改変する可能性が拡大した。

#### 【0216】

10

20

30

40

50

1つの態様においては、本発明の核酸分子は、1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）の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り、ここで、修飾は、デュープレックス中の相補的グアニンのワトソン・クリックおよびフーグスティーン面の両方の水素結合の能力を与える。例えば、Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531-8532を参照。オリゴヌクレオチド中の単一のGクランプ類似体置換により、相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたときのらせん熱安定性およびミスマッチ識別性を実質的に増強することができる。そのようなヌクレオチドを本発明の核酸分子中に取り込ませることにより、核酸標的の相補的配列またはテンプレート鎖に対する親和性および特異性の両方が増強される。別の態様においては、本発明の核酸分子は1またはそれ以上（例えば、約1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上）のLNA "ロック核酸"ヌクレオチド、例えば、2', 4'-Cメチレンビシクロヌクレオチドを含む（例えば、Wengel et al., 国際公開WO 00 / 66604およびWO 99 / 14226を参照）。

10

20

30

#### 【0217】

別の態様においては、本発明は、本発明のsiNA分子のコンジュゲートおよび/または複合体を特徴とする。そのようなコンジュゲートおよび/または複合体は、生物学的システム、例えば細胞へのsiNA分子のデリバリーを容易にするために用いることができる。本発明により提供されるコンジュゲートおよび複合体は、治療用化合物を細胞膜を超えて輸送し、薬物動態学を変更し、および/または本発明の核酸分子の局在化を調節することにより、治療的活性を付与することができる。本発明は、分子、例えば、限定されないが、小分子、脂質、リン脂質、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、抗体、トキシン、負に荷電したポリマーおよび他のポリマー、例えば、蛋白質、ペプチド、ホルモン、炭水化物、ポリエチレングリコール、またはポリアミンを、細胞膜を横切ってデリバリーするための、新規コンジュゲートおよび複合体の設計および合成を包含する。一般に、記載されるトランスポーターは、個々にまたは多成分系の一部として、分解性リンカー付きでまたはなしで用いるよう設計される。これらの化合物は、血清の存在下または非存在下で、本発明の核酸分子を異なる組織に由来する多数の細胞タイプにデリバリーおよび/または局在化することを改良すると予測される（Sullenger and Cech, 米国特許5, 854, 038を参照）。本明細書に記載される分子のコンジュゲートは、生物分解性のリンカー、例えば生物分解性核酸リンカー分子を介して、生物学的に活性な分子に結合させることができる。

#### 【0218】

本明細書において用いる場合、"生物分解性リンカー"との用語は、1つの分子を別の分子に、例えば、生物学的に活性な分子を本発明のsiNA分子に、または本発明のsiNA分子のセンス鎖とアンチセンス鎖とを接続するための生物分解性リンカーとして設計される核酸または非核酸リンカー分子を表す。生物分解性リンカーは、特定の目的、例えば特定の組織または細胞タイプへのデリバリー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する。核酸に基づく生物分解性リンカー分子の安定性は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、および化学的に修飾されたヌクレオチド、例えば、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アミノ、2'-O-アミノ、2'-C-アシル、2'-O-アシル、および他の2'-修飾または塩基修飾ヌクレオチドの種々の組み合わせを用いることにより調節することができる。生物分解性核酸リンカー分子は、ダイマー、トリマー、テトラマー、またはより長い核酸分子、例えば、約2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, または20ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドであることができ、またはリン酸に基づく結合、例えば、ホスホルアミデートまたはホスホジエステル結合を有する単一のヌクレオチドを含むことができる。生物分解性核酸リンカー分子はまた、核酸骨格、核酸糖、または核酸塩基修飾を含むことができる。

40

#### 【0219】

50

本明細書において用いる場合，"生物分解性"との用語は，生物学的システムにおける分解，例えば酵素的分解または化学的分解を表す。

【0220】

本明細書において用いる場合，"生物学的に活性な分子"との用語は，システムにおいて生物学的応答を導き出すかまたは調節することができる化合物または分子を表す。本発明により単独または他の分子との組み合わせで企図される生物学的に活性な s i N A 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，ホルモン，抗ウイルス剤，ペプチド，蛋白質，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，アンチセンス核酸，トリプレックス形成オリゴヌクレオチド，2，5 - A キメラ，s i N A，d s R N A，アロザイム，アプタマー，デコイおよびこれらの類似体が含まれる。本発明の生物学的に活性な分子には，他の生物学的に活性な分子の薬物動態学および/または薬力学を調節することができる分子，例えば，脂質およびポリマー，例えば，ポリアミン，ポリアミド，ポリエチレングリコールおよび他のポリエーテルも含まれる。

10

【0221】

本明細書において用いる場合，"リン脂質"との用語は，少なくとも1つのリン酸基を含む疎水性分子を表す。例えば，リン脂質は，リン酸含有基および飽和または不飽和アルキル基を含むことができ，これは，OH，COOH，オキソ，アミン，または置換もしくは未置換アリール基で任意に置換されていてもよい。

【0222】

20

外的にデリバリーされた治療用核酸分子（例えば，s i N A 分子）は，最適には，R N A 転写産物のレベルが低下するのに充分長い時間 R N A の逆転写が調節されるまで細胞内で安定であるべきである。核酸分子は，有効な細胞内治療用薬剤として機能するためには，ヌクレアーゼに耐性である。本明細書におよび当該技術分野において記載される核酸分子の化学合成の改良により，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増強させることにより，核酸分子を修飾する可能性が拡大した。

【0223】

さらに別の態様においては，R N A i に関与する蛋白質の酵素活性を維持するかまたは増強させる化学的修飾を有する s i N A 分子が提供される。そのような核酸はまた，一般に非修飾核酸よりヌクレアーゼに対してより耐性が高い。したがって，インビトロおよび/またはインビボで，活性は顕著に低下しないであろう。

30

【0224】

本発明の核酸系分子の使用は，組み合わせ療法の可能性を提供することにより，疾病の進行のよりよい治療につながるであろう（例えば，異なる遺伝子を標的とする多数の s i N A 分子，既知の小分子阻害剤とカップリングさせた核酸分子，または分子（異なる酵素的核酸分子モチーフを含む）および/または他の化学的または生物学的分子の組み合わせによる間欠的治療）。s i N A 分子を用いる被験者の治療にはまた，異なる種類の核酸分子，例えば，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 オリゴアデニレート，デコイ，およびアプタマーの組み合わせが含まれる。

【0225】

40

別の観点においては，本発明の s i N A 分子は，1またはそれ以上の5'および/または3' - キャップ構造を，例えばセンス s i N A 鎖のみに，アンチセンス s i N A 鎖のみに，または両方の s i N A 鎖に含む。

【0226】

"キャップ構造"とは，オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれている化学的修飾を意味する（例えば，Adamic et al.，米国特許5，998，203（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。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，デリバリーおよび/または細胞中の局在化を助けるであろう。キャップは5'末端（5' - キャップ）に存在してもよく，または3'末端（3' - キャップ）に存在してもよく，両方の末端に存在してもよい。非限定的例においては，

50

5' - キャップは、グリセリル、反転デオキシ無塩基残基（成分）；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；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；ホスホロジチオエート結合；スレオ - ペントフラノシルヌクレオチド；非環状3'，4' - セコヌクレオチド；非環状3，4 - ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環状3，5 - ジヒドロキシペンチルヌクレオチド，3' - 3' - 反転ヌクレオチド成分；3' - 3' - 反転無塩基成分；3' - 2' - 反転ヌクレオチド成分；3' - 2' - 反転無塩基成分；1，4 - ブタンジオールリン酸；3' - ホスホルアミデート；ヘキシルリン酸；アミノヘキシルリン酸；3' - リン酸；3' - ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；または架橋または非架橋メチルホスホネート成分からなる群より選択される。

10

#### 【0227】

非限定的例においては、3' - キャップは、例えば、グリセリル、反転デオキシ無塩基残基（成分），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；ホスホロジチオエート；スレオペントフラノシルヌクレオチド；非環状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' - 反転ヌクレオチド成分；5' - 5' - 反転無塩基成分；5' - ホスホルアミデート；5' - ホスホロチオエート；1，4 - ブタンジオールリン酸；5' - アミノ；架橋および/または非架橋5' - ホスホルアミデート，ホスホロチオエートおよび/またはホスホロジチオエート，架橋または非架橋メチルホスホネートおよび5' - メルカプト成分からなる群より選択される（より詳細には，Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925（本明細書の一部としてここに引用する）を参照）。

20

#### 【0228】

"非ヌクレオチド"との用語は、1またはそれ以上のヌクレオチドユニットの代わりに核酸鎖中に導入することができ、糖および/またはリン酸置換のいずれかを含み、残りの塩基がその酵素的活性を発揮することを可能とする任意の基または化合物を意味する。基または化合物は、一般に認識されているヌクレオチド塩基、例えば、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミンを含まず、したがって1'位に塩基を欠失している場合、無塩基である。

30

#### 【0229】

"アルキル"基とは、飽和脂肪族炭化水素を表し、直鎖、分枝鎖、および環状アルキル基が含まれる。好ましくは、アルキル基は1 - 12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1 - 7個の炭素、より好ましくは1 - 4個の炭素を有する低級アルキルである。アルキルは置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合、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、NO<sub>2</sub>またはN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノ、またはSHである。この用語は、また、少なくとも1つの炭素 - 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を含み、直鎖、分枝鎖、および環状基を含む。好ましくは、アルケニル基は1 - 12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1 - 7個の炭素原子、より好ましくは1 - 4個の炭素原子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されていなくてもよい。置換されている場合、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、NO<sub>2</sub>、ハロゲン、N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、アミノ、またはSHから選択される。"アルキル"との用語はまた、少なくとも1つの炭素 - 炭素三重結合を含む不飽和の炭化水素基を有するアルキニル基を含み、直鎖、分枝鎖、および環状基を含む。好ましくは、アルキニル基は1 - 12個の炭素を有する。より好ましくは、これは1 - 7個の炭素、より好ましくは1 - 4個の炭素を有する低級アルキニル

40

50



である。アルキニル基は、置換されていてもされていなくてもよい。置換されている場合、置換基は、好ましくは、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、 $=O$ 、 $=S$ 、 $NO_2$ または $N(CH_3)_2$ 、アミノまたは $SH$ である。

#### 【0230】

そのようなアルキル基はまた、アリール、アルキルアリール、炭素環式アリール、複素環アリール、アミドおよびエステル基を含むことができる。"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つの環を有する芳香族基を表し、炭素環式アリール、複素環アリールおよびニアリール基が含まれる。これらはすべて任意に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、およびアミノ基である。"アルキルアリール"基は、アリール基(上述)に共有結合したアルキル基(上述)を表す。炭素環式アリール基は、芳香族環の環原子がすべて炭素原子である基である。炭素原子は任意に置換されていてもよい。複素環アリール基は、芳香族環中の環原子として1-3個の複素原子を有し、環原子の残りが炭素原子である基である。適当な複素原子には、酸素、イオウ、および窒素が含まれ、例えば、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、イミダゾリル等が挙げられる。これらはすべて任意に置換されていてもよい。"アミド"とは、 $-C(O)-NH-R$ (式中、 $R$ はアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。"エステル"とは、 $-C(O)-OR'$ (式中、 $R$ はアルキル、アリール、アルキルアリールまたは水素のいずれかである)を表す。

10

20

#### 【0231】

本明細書において用いる場合、"ヌクレオチド"は、当該技術分野においては、天然塩基(標準的)、および当該技術分野においてよく知られる修飾塩基を含むと認識されている。そのような塩基は、一般にヌクレオチド糖成分の1'位に位置する。ヌクレオチドは一般に、塩基、糖およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは、糖、リン酸および/または塩基成分において修飾されていてもされていなくてもよい(互換的に、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、非標準的ヌクレオチド等とも称される。例えば、Usman and McSwiggan(上掲); Eckstein et al., 国際公開WO92/07065; Usman et al., 国際公開WO93/15187; Uhlman & Peyman, (上掲)(すべて本明細書の一部としてここに引用する)を参照)。当該技術分野において知られる修飾核酸塩基のいくつかの例があり、Limbach et al., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 2183にまとめられている。核酸中に導入することができる塩基修飾のいくつかの非限定的例としては、例えば、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)または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン(例えば6-メチルウリジン)、プロピンおよびその他のものが挙げられる(Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 上掲)。この観点において、"修飾塩基"とは、1'位におけるアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基またはそれらの同等物を意味する。

30

40

#### 【0232】

1つの態様においては、本発明はリン酸骨格修飾を有する修飾された $sina$ 分子を特徴とし、これは1またはそれ以上のホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、モルホリノ、アミデート、カルバメート、カルボキシメチル、アセトアミデート、ポリアミド、スルホネート、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、および/またはアルキルシリル置換を含む。オリゴヌクレオチド骨格修飾の概説については、Hunziker and Le

50

umann, 1995, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, Modern Synthetic Methods, VCH, 331-417, および Mesmaeker et al., 1994, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39 を参照されたい。

#### 【0233】

"無塩基"とは、1'位において塩基を欠失しているか、または塩基の代わりに他の化学基を有する糖成分を意味する(例えば、Adamic et al., 米国特許5,998,203を参照)。

10

#### 【0234】

"非修飾ヌクレオシド"とは、-D-リボ-フラノースの1'炭素に結合した塩基、アデニン、シトシン、グアニン、チミンまたはウラシルのいずれかの塩基を意味する。

#### 【0235】

"修飾ヌクレオシド"とは、非修飾ヌクレオチドの塩基、糖および/また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は式I-VIIに示されるか、および/または本明細書に記載される他の修飾である。

#### 【0236】

本発明において記載される2'-修飾ヌクレオチドに関して、"アミノ"とは、2'-NH<sub>2</sub>または2'-O-NH<sub>2</sub>を意味し、これは修飾されていてもされていなくてもよい。そのような修飾基は、例えば、Eckstein et al., 米国特許5,672,695 および Matulic-Adamic et al., 米国特許6,248,878 (いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

20

#### 【0237】

核酸 siNA 構造に対する種々の修飾を作成して、これらの分子の有用性を高めることができる。例えば、このような修飾は、製品寿命、インビトロの半減期、安定性、およびそのようなオリゴヌクレオチドを標的部位に導入する容易さを高め、例えば、細胞膜の透過性を高め、標的とする細胞を認識し結合する能力を付与するであろう。

#### 【0238】

#### 核酸分子の投与

30

本発明の siNA 分子は、単独で、または他の療法と組み合わせて、種々の神経変性性疾患、例えば、肥満、糖尿病(例えば、I型およびII型)、および細胞または組織におけるPTP-1Bのレベルに応答しうる他の適応症の治療に用いるために適合させることができる。例えば、siNA分子は、被験者に投与するためのリポソーム等のデリバリーベヒクル、担体および希釈剤、およびそれらの塩を含むことができ、および/または薬学的に許容しうる処方中に存在することができる。核酸分子のデリバリーの方法は、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; および Lee et al., 2000, ACS Symp. Ser., 752, 184-192 (いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。Beigelman et al., 米国特許6,395,713 および Sullivan et al., PCT WO94/02595 は、さらに、核酸分子をデリバリーするための一般的な方法を記載する。これらのプロトコルを用いて、事実上いかなる核酸分子もデリバリーすることができる。核酸分子は当業者に知られる種々の方法によって細胞に投与することができ、これには、限定されないが、リポソームへの封入、イオントホレシス、または他のベヒクル、例えば、ヒドロゲル、シクロデキストリン(例えば、Gonzalez et al., 1999, Bioconj

40

50

gate Chem., 10, 1068-1074を参照), 生分解性ナノカプセル, および生体接着性小球体への組み込み, または蛋白質性ベクター(O'Hare and Normand, 国際公開WO00/53722)によるものが含まれる。あるいは, 核酸/ベヒクルの組み合わせを, 直接注入により, または注入ポンプを用いることにより局所的にデリバリーする。本発明の核酸分子の直接注入は, 標準的な針とシリンジの方法論を用いて, または例えばConry et al., 1999, Cliva. Cancer Res., 5, 2330-2337およびBarry et al., 国際公開WO99/31262に記載される無針手法により, 皮下, 筋肉内, または皮膚内に行うことができる。本発明の分子は医薬品として用いることができる。医薬品は, 被験者における疾病状態を予防し, 発症を調節しまたは治療する(症状をある程度, 好ましくは症状をすべて軽減する)。

10

#### 【0239】

すなわち, 本発明は, 本発明の1またはそれ以上の核酸を, 許容しうる担体, 例えば安定剤, 緩衝液等を含む医薬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, 緩衝液等を用いてまたは用いずに医薬組成物を形成することにより, 任意の標準的な手段により, 投与(例えば, RNA, DNAまたは蛋白質)し, 被験者に導入することができる。リボソームデリバリーメカニズムを利用することが望ましい場合には, リボソームを形成する標準的なプロトコルにしたがうことができる。本発明の組成物はまた, 経口投与用には錠剤, カプセルまたはエリキシルとして; 直腸投与用には座剤として; 滅菌溶液として; 注入投与の用には懸濁液として, および当該技術分野において知られる他の組成物として, 処方し使用することができる。

20

#### 【0240】

本発明はまた, 記載される化合物の薬学的に許容しうる処方を含む。これらの処方には, 上述の化合物の塩, 例えば, 酸付加塩(例えば, 塩酸, シュウ酸, 酢酸およびベンゼンスルホン酸の塩)が含まれる。

#### 【0241】

医薬組成物または処方は, 細胞または被験者(例えばヒト)への投与(例えば全身投与)に適当な形態の組成物または処方を表す。適当な形態は, 部分的には, 使用する投与経路(例えば経口, 経皮, または注射)に依存する。そのような形態は, 組成物または処方が標的細胞(すなわち, 負に荷電した核酸がデリバリーされることが望まれる細胞)に到達することを妨害してはならない。例えば, 血流中に注入される医薬組成物は可溶性でなければならぬ。他の因子は当該技術分野において知られており, 例えば, 毒性, および組成物または処方がその効果を発揮することを妨害する形態等を考慮することが含まれる。

30

#### 【0242】

"全身投与"とは, インビボでの全身吸収, または血流中における薬剤の蓄積の後に全身に分配されることを意味する。全身的吸収をもたらす投与経路には, 限定されないが, 静脈内, 皮下, 腹腔内, 吸入, 経口, 肺内および筋肉内が含まれる。これらの投与経路のそれぞれは, 本発明の siNA 分子をアクセス可能な疾患組織に暴露する。薬剤が循環中に入る速度は, 分子量またはサイズの関数であることが示されている。本発明の化合物を含むリボソームまたは他の薬剤担体を使用することにより, 薬剤を, 例えば, あるタイプの組織(例えば網状内皮系(RES)の組織)に局在化させることが可能である。薬剤と細胞(例えば白血球およびマクロファージ)の表面との会合を容易にすることができるリボソーム処方もまた有用である。この方法は, マクロファージおよび白血球による異常な細胞(例えば癌細胞)の免疫認識の特異性を利用することにより, 薬剤の標的細胞への輸送を増強するであろう。

40

#### 【0243】

"薬学的に許容しうる処方"とは, 本発明の核酸分子をその所望の活性に最も適した物理学的な位置に有効に分布させることができる組成物または処方を意味する。本発明の核酸分子とともに処方するのに適した薬剤の非限定的例には以下のものが含まれる: CNS 中へ

50

の薬剤の侵入を促進することができるP-糖蛋白質阻害剤(Pluronic P85等)(Jolliet-Riant and Tillement, 1999, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 13, 16-26); 大脳内移植後の徐放輸送用の生分解性ポリマー, 例えばポリ(DL-ラクチド-co-グリコリド)微小球(Emerich, DF et al, 1999, *Cell Transplant*, 8, 47-58)(Alkermes, Inc. Cambridge, MA); および薬剤を脳血管関門を越えて輸送することができ, 神経の取り込みメカニズムを変更しうる, 例えばポリブチルシアノアクリレートから作成される充填されたナノ粒子(Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999)。本発明の核酸分子のデリバリー戦略の他の非限定的例には, Boado et al., 1998, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1308-1315; Tyler et al., 1999, *FEBS 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; およびTyler et al., 1999, *PNAS USA.*, 96, 7053-7058に記載される物質が含まれる。

#### 【0244】

本発明はまた, ポリ(エチレングリコール)脂質(PEG-修飾, または長期間循環リポソームまたはステルスリポソーム)を含む表面修飾リポソームを含む組成物の使用を特徴とする。これらの処方, は, 標的組織における薬剤の蓄積を増加させる方法を提供する。この種類の薬剤担体は, 単核食細胞システム(MPSまたはRES)によるオプソニン作用および排除に抵抗性であり, したがって, 封入された薬剤の血流循環時間を長くし, 組織への暴露を増強する(Lasic et al. *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011)。そのようなリポソームは, おそらくは脈管新生標的組織における溢出および捕獲のため, 腫瘍中に選択的に蓄積することが示されている(Lasic et al., *Science* 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90)。長期間循環リポソームは, 特に, MPSの組織で蓄積することが知られている慣用のカチオン性リポソームと比べて, DNAおよびRNAの薬物動態学および薬力学を増強する(Liu et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., 国際公開WO96/10391; Ansell et al., 国際公開WO96/10390; Holland et al., 国際公開WO96/10392)。長期間循環リポソームはまた, 代謝的に攻撃的なMPS組織, 例えば肝臓および脾臓における蓄積を回避するその能力に基づいて, カチオン性リポソームと比較して薬剤をヌクレアーゼ分解からより強く保護するようである。

#### 【0245】

本発明はまた, 薬学的に有効量の所望の化合物を薬学的に許容しうる担体または希釈剤中に含む, 保存または投与用に調製される組成物を含む。治療用途に用いるための許容しうる担体または希釈剤は, 医薬の技術分野においてよく知られており, 例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985) (本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。例えば, 保存剤, 安定剤, 染料, および風味剤を用いることができる。これらには, 安息香酸ナトリウム, ソルビン酸, およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが含まれる。さらに, 抗酸化剤および懸濁剤を用いてもよい。

#### 【0246】

10

20

30

40

50

薬学的に有効な用量とは、疾患状態の予防、発症の阻害、または治療（症状をある程度緩和し、好ましくはすべての症状を緩和する）に必要な用量である。薬学的に有効な用量は、疾患の種類、用いる組成物、投与の経路、治療する哺乳動物の種類、考慮中の特定の哺乳動物の物理学的特性、同時に投与される薬剤、および医薬の分野の当業者が認識するであろう他の因子によって異なる。一般に、負に荷電したポリマーの効力に依存して、 $0.1 \text{ mg/kg} - 100 \text{ mg/kg}$  体重/日の活性成分を投与する。

【0247】

本発明の核酸分子およびその処方は、慣用的な無毒性の薬学的に許容しうる担体、アジュバントおよびベヒクルを含む用量単位処方中で、経口的に、局所的に、非経口的に、吸入またはスプレーにより、または直腸に投与することができる。本明細書において用いる場合、非経口的との用語には、経皮、皮下、血管内（例えば、静脈内）、筋肉内、または髄腔内注射または注入の手法等が含まれる。さらに、本発明の核酸分子および薬学的に許容しうる担体を含む医薬処方提供される。1またはそれ以上の本発明の核酸分子は、1またはそれ以上の無毒性の薬学的に許容しうる担体および/または希釈剤、および/またはアジュバント、および所望の場合には他の活性成分とともに存在することができる。本発明の核酸分子を含有する医薬組成物は、経口使用に適した形、例えば、錠剤、トローチ剤、菱形剤、水性または油性懸濁液、分散可能な粉体または顆粒、乳剤、硬カプセルまたは軟カプセル、またはシロップまたはエリキシル剤の形であることができる。

【0248】

経口で使用することが意図される組成物は、医薬組成物の製造について当該技術分野において知られる任意の方法にしたがって製造することができ、そのような組成物は、薬学的に洗練された口に向く製品を提供するために、1またはそれ以上のそのような甘味剤、芳香剤、着色剤または保存剤を含んでもよい。錠剤は、錠剤の製造に適した無毒性の薬学的に許容しうる賦形剤との混合物として活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム；顆粒化剤および崩壊剤、例えば、コーンスターチ、またはアルギン酸；結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム、および潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクでありうる。錠剤は被覆しなくてもよく、既知の手法により被覆してもよい。場合によっては、既知の手法によりそのような被覆を調製して、胃腸管における崩壊および吸収を遅延させ、このことによりより長い期間の持続的な作用を与えることができる。例えば、遅延用材料、例えばグリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレートを用いることができる。

【0249】

経口使用のための処方は、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリンと混合されている硬ゼラチンカプセル、または活性成分が水または油状媒体、例えば、ピーナッツ油、液体パラフィンまたはオリーブ油と混合されている軟ゼラチンカプセルであってもよい。

【0250】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤との混合物中に活性物質を含む。そのような賦形剤は、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、トララガントガムおよびアラビアゴムである。分散剤または湿潤剤は、天然に生ずるホフファチド、例えば、レシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物、例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール、またはエチレンオキシドと脂肪酸およびヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート、またはエチレンオキシドと脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導された部分エステルとの縮合生成物、例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエートであってもよい。水性懸濁液はまた、1またはそれ以上の保存剤、例えば、エチル-、またはn-プロピル-p-ヒドロキシベンゾエート、1また

はそれ以上の着色剤，１またはそれ以上の芳香剤，および１またはそれ以上の甘味剤，例えばショ糖またはサッカリンを含んでいてもよい。

【０２５１】

油性懸濁液は，活性成分を植物油，例えば，アラキス油，オリーブ油，ゴマ油またはココナツツ油，または無機油，例えば液体パラフィン中に懸濁させることにより処方することができる。油性懸濁液は，増粘剤，例えば，密ロウ，硬パラフィンまたはセチルアルコールを含むことができる。甘味剤および芳香剤を加えて，口に合う経口製品を得ることができる。これらの組成物は，抗酸化剤，例えばアスコルビン酸を加えることにより保存することができる。

【０２５２】

水を加えることにより水性懸濁液を製造するのに適した分散可能な粉体および顆粒は，活性成分を，分散剤または湿潤剤，懸濁剤および１またはそれ以上の保存剤との混合物中で与える。適当な分散剤または湿潤剤または懸濁剤は，上で例示したとおりである。さらに別の賦形剤，例えば，甘味剤，芳香剤および着色剤が存在していてもよい。

【０２５３】

本発明の医薬組成物はまた，水中油エマルジョンの形であってもよい。油相は，植物油またはミネラルオイルまたはこれらの混合物であってもよい。適当な乳化剤としては，天然に生ずるガム，例えば，アラビアゴムまたはトラガガントゴム，天然に生ずるホスファチド類，例えば，大豆，レクチン，および脂肪酸とヘキシトールから誘導されるエステルまたは部分エステル，無水物，例えば，ソルビタンモノオレエート，および前記部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物，例えば，ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートが挙げられる。エマルジョンは，甘味料および芳香剤を含んでいてもよい。

【０２５４】

シロップおよびエリキシルは，甘味剤，例えば，グリセロール，プロピレングリコール，ソルビトール，グルコースまたはショ糖を用いて処方することができる。このような処方ではまた，粘滑剤，保存剤および甘味料および着色料を含んでいてもよい。医薬組成物は，滅菌した注射可能な水性または油性の懸濁液の形であってもよい。この懸濁液は，上述した適当な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて，当該技術分野において知られるように処方することができる。滅菌した注射可能な製品はまた，無毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の滅菌した注射可能な溶液または懸濁液，例えば，１，３－ブタンジオール中の溶液であってもよい。用いることのできる許容可能なベヒクルおよび溶媒の例は，水，リンゲル溶液および等張塩化ナトリウム溶液である。さらに，滅菌し固定した油を溶媒または懸濁媒体として便利に用いることができる。この目的のためには，任意の非刺激性の固定した油，例えば，合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを用いることができる。さらに，脂肪酸，例えば，オレイン酸を注射可能な薬剤の製造において用いることができる。

【０２５５】

本発明の核酸分子はまた，例えば，薬剤の直腸投与用に，座剤の形で投与することができる。これらの組成物は，薬剤を，通常の温度では固体であるが直腸温度では液体であり，したがって直腸中で溶融して薬剤を放出する適当な非刺激性賦形剤と混合することにより製造することができる。そのような材料としては，カカオバターおよびポリエチレングリコールが挙げられる。

【０２５６】

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。薬剤は，使用するベヒクルおよび濃度に応じて，ベヒクル中に懸濁されていてもよく，溶解されていてもよい。アジュバント，例えば局所麻酔剤，保存剤および緩衝剤をベヒクル中に溶解することも有利である。

【０２５７】

上述した健康状態の治療には，体重１キログラムあたり１日あたり約０．１ｍｇ－約１４０ｍｇのオーダーの投与量レベルが有用である（被験者あたり１日あたり約０．５ｍｇ

10

20

30

40

50

- 約 7 g )。担体物質と組み合わせて 1 回投与量形を生成することができる活性成分の量は、治療される宿主および投与の特定のモードに依存して様々である。投与量単位形は、一般に、約 1 mg - 約 500 mg の活性成分を含む。

【0258】

特定の被験者についての特定の投与量レベルは、種々の因子、例えば、用いる特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、および排出速度、薬剤の組み合わせ、および治療をしている特定の疾病の重篤性に依存することが理解されるであろう。

【0259】

ヒト以外の動物に投与するためには、組成物を動物飼料または飲料水に加えてもよい。動物が治療上適当な量の組成物を飼料とともに接種できるよう、動物飼料および飲用水組成物を処方することが便利であろう。飼料または飲料水に加えるように組成物をプレミックスとして製造することも便利であろう。

【0260】

本発明の核酸分子はまた、他の治療用化合物と組み合わせて被験者に投与して、全体的治療効果を高めることができる。ある適応症の治療に複数の化合物を用いることにより、副作用の存在を低下させながら有益な効果を高めることができる。

【0261】

1 つの態様においては、本発明は、特定の細胞タイプに本発明の核酸分子を投与するのに適した組成物を含む。例えば、アシアロ糖蛋白質レセプター (ASGPR) (Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262, 4429 - 4432) は、肝細胞に独特であり、分枝鎖ガラクトース末端糖蛋白質、例えばアシアロオロソムコイド (ASOR) に結合する。別の例においては、多くの癌細胞中で葉酸レセプターが過剰発現されている。そのような糖蛋白質、合成グリココンジュゲート、または葉酸のレセプターへの結合は、オリゴサッカライド鎖の分枝の程度に強く依存する親和性で生ずる。例えば、三触角構造は、二触角または一触角鎖より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、ガラクトースと比較してレセプターに対してより高い親和性を有する N - アセチル - D - ガラクトースアミンを炭水化物成分として用いることによりこの高い特異性を得た。この "クラスターリング効果" はまた、マンノシル末端糖蛋白質またはグリココンジュゲートの結合および取込についても記載されている (Ponpipom et al., 1981, J. Med. Client., 24, 1388 - 1395)。ガラクトース、ガラクトースアミンまたは葉酸に基づくコンジュゲートを使用して外来性化合物を細胞膜を超えて輸送することにより、例えば、肝疾患、肝臓の癌、または他の癌の治療に標的化デリバリー法を提供することができる。また、バイオコンジュゲートの使用により、治療に必要な治療用化合物の必要用量を低下させることができる。さらに、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り、治療薬の生物利用性、薬力学、および薬物動態学的パラメータを調節することができる。そのようなバイオコンジュゲートの非限定的例は、Vargeese et al., 米国特許出願 10 / 201, 394, (2001 年 8 月 13 日出願); および Matulic - Adamic et al., 米国特許出願 60 / 362, 016 (2002 年 3 月 6 日出願) に記載されている。

【0262】

あるいは、本発明のある種の siNA 分子は、細胞中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 Antise 50

nse Res. Dev., 2, 3-15; Dropulich 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、真核生物細胞中で任意の核酸を適当なDNA/RNAベクターから発現させることができることを認識するであろう。そのような核酸の活性は、酵素的核酸によりそれらを一次転写産物から放出させることにより増大させることができる(Draper et al., PCT WO93/23569, Sullivan et al., PCT WO94/02595; 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)。

#### 【0263】

本発明の別の観点においては、本発明のRNA分子は、DNAまたはRNAベクター中に挿入された転写ユニットから発現させることができる(例えば Couture et al., 1996, TIG., 12, 510を参照)。組換えベクターは、DNAプラスミドであってもウイルスベクターであってもよい。siNAを発現するウイルスベクターは、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、またはアルファウイルスに基づいて構築することができる。別の態様においては、polIIIに基づくコンストラクトを用いて、本発明の核酸分子を発現させる(例えば、Thompson, 米国特許5,902,880および6,146,886を参照)。siNA分子を発現しうる組換えベクターは、上述のようにデリバリーされ、標的細胞中に残留することができる。あるいは、核酸分子の過渡的発現を与えるウイルスベクターを用いることもできる。そのようなベクターは、必要に応じて繰り返し投与することができる。いったん発現されれば、siNA分子は標的mRNAと相互作用して、RNAi応答を生ずる。siNA分子を発現するベクターの輸送は、全身的(例えば、静脈内または筋肉内投与により)、患者から外植された標的細胞に投与した後、被験者に再導入することにより、または所望の標的細胞中への導入を可能とする他のいずれかの手段により、行うことができる(総説については、Couture et al., 1996, TIG., 12, 510を参照)。

#### 【0264】

1つの観点においては、本発明は、少なくとも1つの本発明の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デュプレックスの一方または両方の鎖、または自己ハイブリダイズしてsiNAデュプレックスを生ずる1本の自己相補的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、そのsiNA分子の発現を可能とする様式で動作可能なように連結することができる(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; および Novina et al., 2002, Nature Medicine, advance online publication doi:10.1038/nm725を参照)。

#### 【0265】

別の観点においては、本発明は、以下を含む発現ベクターを特徴とする：a) 転写開始



領域（例えば真核生物 *pol I* , *II* または *III* の開始領域）；b）転写終止領域（例えば真核生物 *pol I* , *II* または *III* の終止領域）；および c）本発明の *siNA* 分子の少なくとも1つをコードする核酸配列を含み、前記配列は、*siNA* 分子の発現および/またはデリバリーを可能とする様式で、前記開始領域および前記終止領域に動作可能なように連結されている。ベクターは、任意に、本発明の *siNA* をコードする配列の5'側または3'側に動作可能なように連結された蛋白質のオープンリーディングフレーム（ORF）；および/またはイントロン（介在配列）を含んでいてもよい。

#### 【0266】

*siNA* 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*) , または RNA ポリメラーゼ III (*pol III*) のプロモーターにより推進させることができる。*pol II* または *pol III* プロモーターからの転写産物は、すべての細胞において高いレベルで発現される。あるタイプの細胞におけるある *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、サイレンサー等）の性質に依存する。原核生物 RNA ポリメラーゼ酵素が適当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また用いられる（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）。何人かの研究者が、そのようなプロモーターから発現した核酸分子が哺乳動物細胞中で機能しうることを示している（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）。より詳細には、転写ユニット、例えば U6 小核 (*snRNA*) , 転移 RNA (*tRNA*) およびアデノウイルス VA RNA をコードする遺伝子に由来するものは、細胞中において高濃度の所望の RNA 分子（例えば *siNA*）を生成するのに有用である（Thompson et al., (上掲); Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲); Noonberg et al., 1994, Nucleic Acid Res., 22, 2830; Noonberg et al., 米国特許 5,1624,803; Good et al., 1997, Gene Ther. 4, 45; Beicreelman et al., 国際公開 WO96/18736）。上述の *siNA* 転写ユニットは、哺乳動物細胞中に導入するために種々のベクター中に組み込むことができる。ベクターとしては、限定されないが、プラスミド DNA ベクター、ウイルス DNA ベクター（例えばアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクター）、またはウイルス RNA ベクター（例えばレトロウイルスまたはアルファウイルスベクター）が挙げられる（総説については、Couture and Stinchcomb, 1996, (上掲)を参照）。

#### 【0267】

別の観点においては、本発明は、本発明の *siNA* 分子の少なくとも1つをコードする核酸配列を、その *siNA* 分子の発現を可能とする様式で含む発現ベクターを特徴とする。1つの態様においては、発現ベクターは、a）転写開始領域；b）転写終止領域；および 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；この配列は、s

10

20

30

40

50

i N A 分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で , 開始領域および終止領域に動作可能なように連結されている。

#### 【 0 2 6 8 】

別の態様においては , 発現ベクターは , a ) 転写開始領域 ; b ) 転写終止領域 ; c ) オープンリーディングフレーム ; および d ) s i N A 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 , この配列は , オープンリーディングフレームの 3 ' - 末端に動作可能なように連結されており , 配列は , s i N A 分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で , 開始領域 , オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。さらに別の態様においては , 発現ベクターは , a ) 転写開始領域 ; b ) 転写終止領域 ; c ) イントロン ; および d ) 少なくとも 1 つの s i N A 分子をコードする核酸配列を含み ; この配列は , 核酸分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で , 開始領域 , イントロンおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

10

#### 【 0 2 6 9 】

別の態様においては , 発現ベクターは , a ) 転写開始領域 ; b ) 転写終止領域 ; c ) イントロン ; d ) オープンリーディングフレーム ; および e ) s i N A 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 , この配列は , オープンリーディングフレームの 3 ' - 末端に動作可能なように連結されており , 配列は , s i N A 分子の発現および / またはデリバリーを可能とする様式で , 開始領域 , イントロン , オープンリーディングフレームおよび終止領域に動作可能なように連結されている。

20

#### 【 0 2 7 0 】

#### P T P - 1 B の生物学および生化学

蛋白質チロシンのリン酸化および脱リン酸化は , 細胞成長 , 増殖 , および分化のプロセスを制御するシグナル伝達経路の制御における重要なメカニズムである ( F a n t l , W . J . , 1 9 9 3 , A n n u . R e v . B i o c h e m . , 6 2 , 4 5 3 - 4 8 1 ) 。 協調して作用する一群の酵素が蛋白質チロシンリン酸化および脱リン酸化事象を制御する。これらの広範な種類の酵素は , 蛋白質チロシンキナーゼ ( P T K ) および蛋白質チロシンホスファターゼ ( P T P ) から構成される。P T K および P T P は , レセプタータイプ貫膜蛋白質として , および細胞質蛋白質酵素としての両方で存在する。レセプターチロシンキナーゼは , 細胞外レセプター - リガンド相互作用によりシグナル伝達事象を伝搬し , P T K の細胞質ドメイン中のチロシンキナーゼ部分が活性化される。レセプター様貫膜 P T P は , 細胞質ホスファターゼドメインによる細胞内ホスホチロシン蛋白質の脱リン酸化を調節する細胞外リガンド結合を介して機能する。細胞質 P T K および P T P は , レセプター媒介性リガンド相互作用なしで酵素活性を発揮するが , リン酸化はこれらの酵素の活性を制御しうる。

30

#### 【 0 2 7 1 】

細胞質 P T P である蛋白質チロシンホスファターゼ 1 B は , 均一な形で単離され ( T o n k s , N . K . , 1 9 8 8 , J . B i o l . C h e m . , 2 6 3 , 6 7 2 2 - 6 7 3 0 ) , 特性決定され ( T o n k s , N . K . , 1 9 8 8 , J . B i o l . C h e m . , 2 6 3 , 6 7 3 1 - 6 7 3 7 ) , 配列決定された ( C h a r b o n n e a u , H . , 1 9 8 9 , B i o c h e m i s t r y , 8 6 , 5 2 5 2 - 5 2 5 6 ) , 最初の P T P である。細胞質およびレセプター様 P T P は , いずれも , ホスファターゼ活性に必須であるシステインおよびアルギニン残基を含む 1 1 個の保存アミノ酸により特徴づけられる触媒ドメインを共有する ( S t r e u l i , M . , 1 9 9 0 , E M B O , 9 , 2 3 9 9 - 2 4 0 7 ) 。 位置 2 1 5 のシステイン残基は , リン酸の酵素への共有結合を担う ( G u a n , K . , 1 9 9 1 , J . B i o l . C h e m . , 2 6 6 , 1 7 0 2 6 - 1 7 0 3 0 ) 。 ヒト P T P 1 B の結晶構造は , 酵素のリン酸結合部位が , 分子の表面のグリシンリッチな裂け目であり , この裂け目の底にシステイン 2 1 5 が位置することを規定した。システイン 2 1 5 の位置および裂け目の形が , チロシン残基に対するがセリンまたはトレオニン残基に対するものではない P T P a s e 活性の特異性を与える ( B a r f o r d , D . , 1 9 9 4 , S c i e n c e , 2 6 3 , 1 3 9 7 - 1 4 0 4 ) 。

40

50

## 【0272】

レセプターチロシンキナーゼおよび蛋白質チロシンホスファターゼの局在は、ホスホチロシン媒介性シグナル伝達の制御において鍵となる役割を果たしている。PTP-1B活性およびレセプターチロシンキナーゼのパネルに対する特異性は、基質間で明らかな相違を示し、このことは、細胞内コンパートメント化が酵素の活性および機能を規定する決定因子であることを示唆する(Lammers, R., 1993, J. Biol. Chem., 268, 22456-22462)。実験は、PTP-1Bがその35アミノ酸のカルボキシ末端配列により主として小胞体に局在することを示した。PTP-1Bはまた、細胞質に向いているその触媒ホスファターゼドメインを介してミクロソーム膜にぴったりと会合している(Frangioni, J. V., 1992, Cell, 68, 545-560)。

10

## 【0273】

PTP-1Bは、インスリン応答の負の調節剤として同定された。PTP-1Bは、インスリン感受性組織において広く発現されている(Goldstein, B. J., 1993, Receptor, 3, 1-15)。単離されたPTP-1Bは、インビトロでインスリンレセプターを脱リン酸化する(Tonks, N. K., 1988, J. Biol. Chem., 263, 6731-6737)。インスリンレセプターの多数のホスホチロシン残基のPTP-1Bによる脱リン酸化は、順番に進行し、レセプター自己活性化に重要な3つのチロシン残基に対する特異性がある(Ramachandran, C., 1992, Biochemistry, 31, 4232-4238)。インスリンレセプターの脱リン酸化に加えて、PTP-1Bはまた、インスリンレセプターの主要な基質であるインスリン関連基質1(IRS-1)を脱リン酸化する(Lammers, R., 1993, J. Biol. Chem., 268, 22456-22462)。

20

## 【0274】

PTP-1Bをアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすると、内因性蛋白質、例えばインスリンのβ-サブユニットおよびインスリン様成長因子レセプター蛋白質のインスリン刺激チロシンリン酸化が阻害される。得られる内因性PTPase活性に対して3-5倍の増加はまた、S6ペプチドキナーゼの活性化を妨害する(Cicirelli, M. F., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 5514-5518)。組換えラットPTP-1Bを抗体免疫沈澱で不活性化すると、インスリン刺激性DNA合成およびホスファチジルイノシトール3'-キナーゼ活性が劇的に増加する。PTP-1B阻害により、インスリン刺激性レセプター自己リン酸化およびインスリンレセプター基質1チロシンリン酸化も劇的に増加する(Ahmad, F., 1995, J. Biol. Chem., 270, 20503-20508)。

30

## 【0275】

増加したPTP-1B発現は、高血糖症培養繊維芽細胞においてインスリン抵抗性と相関する。この研究においては、レセプターのインスリン誘導性自己リン酸化の欠陥により減感作されたインスリンレセプター機能が観察された。インスリン感受性を正常化するチアゾリジン誘導体で処理すると、PTP-1B発現の正常化を通して高血糖症インスリン抵抗性が改善された(Maegawa, H., 1995, J. Biol. Chem., 270, 7724-7730)。ヘテロ三量体GTP結合蛋白質サブユニットGi-アルファ-2がロックアウトされているインスリン抵抗性のネズミモデルは、PTP-1Bの発現の増加と相関する2型糖尿病の表現型を与える(Moxam, C. M., 1996, Nature, 379, 840-844)。

40

## 【0276】

PTP-1Bは、活性化インスリンレセプターβ-サブユニットと直接相互作用する。PTP-1Bの不活性の類似体を用いて、精製したレセプター調製物および全細胞溶解物の両方において、活性化インスリンレセプターが沈澱した。PTP-1B相互作用にはインスリンレセプターのキナーゼドメイン中の3つのチロシン残基のリン酸化が必要である。さらに、インスリンは、PTP-1Bのチロシンリン酸化を刺激する(Seely, B

50

. L . , 1996 , Diabetes , 45 , 1379 - 1385 ) 。同様の研究により , P T P - 1 B とインスリンレセプター - サブユニットとの間の直接の相互作用 , ならびにレセプターおよび P T P - 1 B 中の必要な多数のリン酸化部位が確認された ( B a n d y o p a d h y a y , D . , J . B i o l . C h e m . , 272 , 1639 - 1645 ) 。

#### 【0277】

P T P - 1 B 遺伝子を欠失するノックアウトマウス ( ホモ接合体 P T P - 1 B <sup>-/-</sup> およびヘテロ接合体 P T P - 1 B <sup>+/-</sup> の両方 ) を用いて , インビボでインスリン作用に関連する P T P - 1 B の特定の役割が研究されている。得られた P T P - 1 B 欠損マウスは健康であり , 給餌状態で , P T P - 1 B <sup>+/-</sup> 発現同腹子の半分の低い血中グルコースおよび循環インスリンレベルを有する。これらの P T P - 1 B 欠損マウスは , グルコース試験およびインスリン抵抗性試験において増強されたインスリン感受性を示した。生理学的レベルにおいて , P T P - 1 B 欠損マウスはインスリン投与後にインスリンレセプターのリン酸化の増加を示した。高脂肪食を与えたとき , P T P - 1 B 欠損マウスは体重増加に抵抗性であり , インスリン感受性のままであった。これに対し , 正常 P T P - 1 B 発現マウスは急速に体重が増加し , インスリン抵抗性となった ( E l c h e b l y , M . , 1999 , Science , 283 , 1544 - 1548 ) 。このように , P T P - 1 B 発現の調節を用いて , インビボでインスリンレセプターの自己リン酸化を制御し , インスリン感受性を増加させることができるかもしれない。この調節は , インスリン関連性疾患状態の治療において有益であることが証明されるかもしれない。

10

20

#### 【0278】

上述の知見からみて , P T P - 1 B 発現が関与する特定の疾患状態には , 限定されないが , 以下のものが含まれる :

1 . 糖尿病 : P T P - 1 B 発現の調節により 1 型および 2 型糖尿病の両方を治療することができるであろう。2 型糖尿病は , 減感作されたインスリンレセプター機能と相関する ( W h i t e e t a l . , 1994 ) 。インスリンレセプターのインビボでの P T P - 1 B 脱リン酸化の破壊は , インスリン感受性および増加したインスリンレセプター自己リン酸化として現れる ( E l c h e b l y e t a l . , 1999 ) 。インスリン依存性糖尿病である 1 型は , 増加したインスリン感受性により P T P - 1 B 調節に応答するかもしれない。

30

#### 【0279】

2 . 肥満 : E l c h e b l y e t a l . , 1999 は , 高脂肪食を与えたとき , P T P - 1 B 欠損マウスは正常 P T P - 1 B を発現するマウスと比較して , 体重増加に抵抗性であることを示した。この知見は , 肥満の治療において P T P - 1 B 調節が有益であるかもしれないことを示唆する。A h m a d ら ( 1997 , Metab . Clin . Exp . , 46 , 1140 - 1145 ) は , 肥満患者における , 体重減少の後の脂肪組織における低下した P T P および改良されたインスリン感受性を記載する。

#### 【0280】

ヒトゲノムは , 100 種類までの P T P a s e を含むと考えられており , そのそれぞれは , 化学的にはわずかに相違するが , 機能においては大きく相違する。P T P - 1 B への共有結合またはその修飾により P T P - 1 B 活性を特異的に阻害するよう設計された化合物は , 多くの副作用の可能性を有する。他の P T P との相互作用による副作用が全くまたはほとんどなしに P T P - 1 B 活性を抑制しうるであろう一般的な薬剤物質は想像することが困難である。P T P - 1 B 調節のより魅力的な方法は , 核酸技術 , 例えば s i R N A 媒介性 R N A i を用いて P T P - 1 B 発現を特異的に制御することを含むであろう。

40

#### 【0281】

P T P - 1 B についての現在の理解に基づけば , P T P - 1 B および関連する遺伝子の調節は , 肥満および糖尿病の新規な治療法を開発する助けとなる。したがって , 小干渉核酸 ( s i N A ) 媒介性 R N A i を用いる P T P - 1 B の調節は , P T P - 1 B 活性および / または遺伝子発現に関連する疾患および状態の治療および研究の新規な方法である。

50

## 【実施例 1】

## 【0282】

以下は本発明の核酸の選択，単離，合成および活性を示す非限定的例である。

## 【0283】

実施例 1：s i N A コンストラクトのタンデム合成

本発明の例示的 s i N A 分子は，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，タンデムで合成する。本明細書に記載されるタンデム合成の後に，1 段階精製プロセスを行って，R N A i 分子を高収率で得る。この方法はハイスループット R N A i スクリーニングを支える s i N A 合成に非常に適しており，マルチカラムまたはマルチウエ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。

10

## 【0284】

5' 末端ジメトキシトリチル (5' - O - D M T) 基がそのまま残る s i N A オリゴおよびその相補鎖のタンデム合成 (トリチルオン合成) が完了した後，オリゴヌクレオチドを上述のようにして脱保護する。脱保護の後，s i N A 配列鎖を自発的にハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーションにより，一方の鎖が 5' - O - D M T 基を保持し，相補鎖が末端 5' - ヒドロキシルを含むデュープレックスが得られる。新たに形成されたデュープレックスは，1 つの分子のみがジメトキシトリチル基を有するにもかかわらず，日常的な固相抽出精製 (トリチルオン精製) の間，単一の分子として振る舞う。これらの鎖は安定なデュープレックスを形成するため，オリゴの対を例えば C 1 8 カートリッジを用いて精製するためには，このジメトキシトリチル基 (または同等の基，例えば他のトリチル基または他の疎水性成分) のみが必要である。

20

## 【0285】

タンデムリンカー，例えば反転デオキシ無塩基スクシネートまたはグリセリルスクシネートリンカー (図 1 を参照) または同等の切断可能なリンカーを導入する時点までは，標準的なホスホルアミダイト合成化学を用いる。用いることができるリンカー結合条件の非限定的例には，活性化剤，例えばプロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸 (P y B r O P) の存在下で，妨害塩基，例えばジイソプロピルエチルアミン (D I P A) および / または D M A P を使用することが含まれる。リンカーを結合させた後，標準的な合成化学を用いて第 2 の配列の合成を完了し，末端の 5' - O - D M T はそのまま残す。合成後，得られたオリゴヌクレオチドを本明細書に記載される方法にしたがって脱保護し，適当な緩衝液，例えば，5 0 m M N a O A c または 1 . 5 M N H <sub>4</sub> H <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> で反応を停止させる。

30

## 【0286】

s i N A デュープレックスの精製は，固相抽出，例えば，1 カラム容量 (C V) のアセトニトリル，2 C V の H <sub>2</sub> O，および 2 C V の 5 0 m M N a O A c で調整した W a t e r s C 1 8 S e p P a k 1 g カートリッジを用いて，容易に行うことができる。サンプルを負荷し，1 C V の H <sub>2</sub> O または 5 0 m M N a O A c で洗浄する。失敗配列は 1 C V の 1 4 % A C N (水性；5 0 m M N a O A c および 5 0 m M N a C l を含む) で溶出する。次にカラムを 1 C V の H <sub>2</sub> O 等で洗浄し，例えば，1 C V の 1 % 水性トリフルオロ酢酸 (T F A) をカラムに通し，次にさらに 1 C V の 1 % 水性 T F A をカラムに加えて約 1 0 分間放置することにより，カラム上で脱トリチル化を行う。残りの T F A 溶液を除去し，カラムを H <sub>2</sub> O で，次に 1 C V の 1 M N a C l および再度の H <sub>2</sub> O で洗浄する。次に，s i N A デュープレックス生成物を，例えば，1 C V の 2 0 % 水性 C A N を用いて溶出する。

40

## 【0287】

図 2 は，精製した s i N A コンストラクトの M A L D I - T O V 質量分析の例を示し，ここで，各ピークは s i N A デュープレックスの個々の 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 (C G E) で分析したときに 3 つのピークを与える。1 つのピークはおそらくデュープレックス s i N A に対応し，2 つのピークはおそらく個々の s i N A 配列鎖に対応する。同じ s i N A コンストラクトのイオン

50

交換 H P L C 分析では単一のピークしか示されない。以下に記載されるルシフェラーゼレポーターアッセイを用いる精製 s i N A コンストラクトの試験は、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 コンストラクトと比較して、R N A i 活性が同じであることを示した。

#### 【 0 2 8 8 】

##### 実施例 2：任意の R N A 配列中の潜在的 s i N A 標的部位の同定

目的とする R N A 標的、例えばウイルスまたはヒト m R N A 転写産物の配列を、例えばコンピュータフォールディングアルゴリズムを用いることにより、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、G e n b a n k 等のデータベースから得られる遺伝子または R N A 遺伝子転写産物の配列を用いて、標的に対して相補性を有する s i N A 標的を生成する。そのような配列は、データベースから得ることができるか、または当該技術分野において知られるよう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、リボザイムまたはアンチセンス等の他の核酸分子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ている標的部位、または疾病または健康状態と関連していることが知られている標的、例えば変異または欠失を含む部位を用いて、これらの部位を標的とする s i N A 分子を設計することもできる。種々のパラメータを用いて、標的 R N A 配列中でいずれの部位が最も適当な標的部位であるかを判定することができる。これらのパラメータには、限定されないが、二次または三次 R N A 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ホモロジーの程度、または R N A 転写産物中の標的配列の相対的位置が含まれる。これらの判定に基づいて、R N A 転写産物中の任意の数の標的 10 部位を選択して、例えば、インビトロ R N A 切断アッセイ、培養細胞、または動物モデルを用いることにより、効力について s i N A 分子を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、用いるべき s i N A コンストラクトのサイズに基づいて、転写産物中のいずれかの位置の 1 - 1 0 0 0 個の標的部位を選択する。当該技術分野において知られる方法、例えば標的遺伝子発現の有効な減少を判定するマルチウエルまたはマルチプレートアッセイを用いて、s i N A 分子をスクリーニングするための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。 20

#### 【 0 2 8 9 】

##### 実施例 3：R N A 中の s i N A 分子標的部位の選択

以下の非限定的工程を用いて、所定の遺伝子配列または転写産物を標的とする s i N A の選択を行うことができる。 30

#### 【 0 2 9 0 】

1. 標的配列をインシリコで解析して、標的配列中に含まれる特定の長さのすべてのフラグメントまたはサブ配列、例えば 2 3 ヌクレオチドフラグメントのリストを作成する。この工程は、典型的にはあつらえの P e r l スクリプトを用いて行うが、市販の配列分析プログラム、例えば、O l i g o , M a c V e c t o r , または t h e G C G W i s c o n s i n P a c k a g e も同様に用いることができる。

#### 【 0 2 9 1 】

2. 場合によっては、s i N A は 2 以上の標的配列に対応する。これは、例えば、同じ遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、2 以上の遺伝子の異なる転写産物を標的とする場合、またはヒト遺伝子と動物ホモログとの両方を標的とする場合に生じうる。この場合には、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、各リスト中でマッチング配列を見いだす。次に、サブ配列を、所定のサブ配列を含む標的配列の数にしたがってランク付けする。この目的は、標的配列のほとんどまたはすべてに存在するサブ配列を見いだすことである。あるいは、ランク付けにより、標的配列にユニークなサブ配列、例えば変異体標的配列を同定することができる。このような方法により、変異体配列を特異的に標的とし、正常な配列の発現に影響を及ぼさない s i N A の使用が可能となるであろう。 40

#### 【 0 2 9 2 】

3. 場合によっては、s i N A のサブ配列は、1 またはそれ以上の配列中には存在しな 50

いが、所望の標的配列中に存在する。これは、s i N A が標的とされないままに在るべきパラログファミリーのメンバーを有する遺伝子を標的とする場合に生じうる。上述のケース2におけるように、それぞれの標的について特定の長さのサブ配列のリストを生成し、次にリストを比較して、標的遺伝子中に存在するが標的ではないパラログ中には存在しない配列を見いだす。

#### 【0293】

4. ランク付けされた s i N A サブ配列をさらに分析して、G C 含量にしたがってランク付けすることができる。30 - 70 % の G C を含有する部位が好ましく、40 - 60 % の G C を含有する部位がさらに好ましい。

#### 【0294】

5. ランク付けされた s i N A サブ配列をさらに分析して、自己フォールディングおよび内部ヘアピンにしたがってランク付けすることができる。内部フォールディングがより弱いことが好ましい。強いヘアピン構造は回避すべきである。

#### 【0295】

6. ランク付けされた s i N A サブ配列をさらに分析して、配列中に G G G または C C C の連続を有するか否かにしたがってランク付けすることができる。いずれかの鎖に G G G (またはさらに多い G) が存在すると、オリゴヌクレオチド合成に問題が生じることがあり、R N A i 活性を妨害する可能性がある。したがって、よりよい配列が利用可能である限り、これは回避する。C C C はアンチセンス鎖に G G G を配置するため、標的鎖中で検索する。

#### 【0296】

7. ランク付けされた s i N A サブ配列をさらに分析して、配列の 3' 末端にジヌクレオチド U U (ウリジンジヌクレオチド) を、および/または配列の 5' 末端に A A (アンチセンス配列に 3' U U を生ずる) を有するか否かにしたがってランク付けする。これらの配列により、末端 T T チミジンジヌクレオチドを有する s i N A 分子を設計することが可能となる。

#### 【0297】

8. 上述のようにランク付けされたサブ配列のリストから4個または5個の標的部位を選択する。次に、例えば、23ヌクレオチドを有するサブ配列において、それぞれの選択された23-mer サブ配列の右側21ヌクレオチドを s i N A デュープレックスの上側(センス)鎖用に設計し合成し、一方、それぞれの選択された23-mer サブ配列の左側21ヌクレオチドの逆相補鎖を s i N A デュープレックスの下側(アンチセンス)鎖用に設計し合成する(表 I I および I I I を参照)。末端 T T 残基が配列にとって望ましい場合には(パラグラフ7に記載されるように)、オリゴを合成する前にセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方の2つの3'末端ヌクレオチドを T T で置き換える。

#### 【0298】

9. s i N A 分子をインビトロ、培養細胞または動物モデル系においてスクリーニングして、最も活性な s i N A 分子、または標的 R N A 配列中の最も好ましい標的部位を同定する。

#### 【0299】

別の方法においては、P T P - 1 B 標的配列に特異的な s i N A コンストラクトのプールを用いて、P T P - 1 B R N A を発現する細胞、例えば、ヒト腎臓線維芽細胞(例えば、293細胞)において、標的部位についてスクリーニングする。この方法において用いられる一般的戦略は図9に示される。そのようなプールの非限定的例は、配列番号1-185, 371-378, 383-386, および391-394を含むセンス配列、およびそれぞれ配列番号186-370; 379-382, 387-390, および395-398を含むアンチセンス配列を有する配列を含むプールである。P T P - 1 B を発現する293細胞を s i N A コンストラクトのプールでトランスフェクトし、P T P - 1 B 阻害に伴う表現型を示す細胞を分類する。s i N A コンストラクトのプールは、適当なベクター中に挿入された転写カセットから発現させることができる(例えば、図7および図

10

20

30

40

50

8を参照)。ポジティブの表現型変化(例えば、増殖の低下、PTP-1B mRNAレベルの低下、またはPTP-1B蛋白質発現の低下)を示す細胞からのsiNAをシーケンシングして、標的PTP-1B RNA配列中の最も適当な標的部位を決定する。

#### 【0300】

#### 実施例4：PTP-1Bを標的とするsiNAの設計

siNAの標的部位は、実施例3に記載されるsiNA分子のライブラリを用いて、あるいは本明細書の実施例6に記載されるようなインビトロsiNAシステムを用いて、PTP-1B RNA標的の配列を分析し、任意にフォールディング(s i N Aの標的へのアクセス可能性を判定するために分析される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付けることにより、選択した。siNA分子は、それぞれの標的に結合することができるよう設計し、任意に個々にコンピュータフォールディングにより分析して、siNA分子が標的配列と相互作用しうるか否かを評価した。種々の長さのsiNA分子を選択して、活性を最適化することができる。一般に、標的RNAと結合するかさもなくばこれと相互作用する十分な数の相補的ヌクレオチド塩基が選択されるが、種々の長さまたは塩基組成のsiNAデュプレックスに適応させるように、相補性の程度を調節することができる。そのような方法論を用いることにより、siNA分子は、任意の既知のRNA配列、例えば、任意の遺伝子転写産物に対応するRNA配列中の部位を標的とするよう設計することができる。

10

#### 【0301】

化学的に修飾されたsiNAコンストラクトを設計して、RNAi活性を媒介する能力を保存しながら、インビボでの全身投与のためのヌクレアーゼ安定性および/または改良された薬物動態学、局在化、およびデリバリー特性を提供することができる。本明細書に記載される合成方法および一般に当該技術分野において知られる合成方法を用いて、本明細書に記載される化学修飾を合成的に導入する。次に、血清および/または細胞/組織抽出物(例えば肝臓抽出物)中で、合成siNAコンストラクトをヌクレアーゼ安定性についてアッセイする。合成siNAコンストラクトはまた、適当なアッセイ、例えば本明細書に記載されるルシフェラーゼレポーターアッセイまたはRNAi活性を定量しうる他の適当なアッセイを用いて、RNAi活性についても平行して試験する。ヌクレアーゼ安定性およびRNAi活性の両方を有する合成siNAコンストラクトは、さらに改変して、安定性および活性のアッセイにおいて再評価することができる。次に、任意の選択されたRNAを標的とするいずれかのsiNA配列に安定化活性siNAコンストラクトの化学的修飾を適用して、例えば、標的スクリーニングアッセイにおいて用いて、治療薬を開発するためのsiNA化合物のリードを拾い上げることができる(例えば、図11を参照)。

20

30

#### 【0302】

#### 実施例5：siNAの化学合成および精製

siNA分子は、RNAメッセージ中の種々の部位、例えば、本明細書に記載されるRNA配列中の標的配列と相互作用するよう設計することができる。siNA分子の一方の鎖の配列は、上述した標的部位配列に相補的である。siNA分子は、本明細書に記載される方法を用いて化学的に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siNA分子は、siNA分子の配列を標的配列に相補的ではないようにスクランブル化することにより、合成することができる。一般に、siNAコンストラクトは、本明細書に記載されるように、固相オリゴヌクレオチド合成方法を用いて合成することができる(例えば、Usman et al., 米国特許5,804,683; 5,831,071; 5,998,203; 6,117,657; 6,353,098; 6,362,323; 6,437,117; 6,469,158; Scaringe et al., 米国特許6,111,086; 6,008,400; 6,111,086を参照(いずれもその全体を本明細書の一部としてここに引用する))。

40

#### 【0303】

非限定的例においては、RNAオリゴヌクレオチドは、当該技術分野において知られる

50



ように、ホスホルアミダイト化学を用いて段階的様式で合成する。標準的なホスホルアミダイト化学においては、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、およ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、および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。あるいは、Scarlinge（上掲）により記載されるように、RNAの合成において2'-O-シリルエーテルを酸不安定性2'-O-オルトエステル保護基と組み合わせて用いてもよい。異なる2'化学は異なる保護基を必要とし、例えば、Usman et al.、米国特許5,631,360（その全体を本明細書の一部としてここに引用する）に記載されるように、2'-デオキシ-2'-アミノヌクレオシドにはN-フタロイル保護を用いることができる。

10

#### 【0304】

固相合成の間に、各ヌクレオチドを順番に（3'-から5'-方向に）固体支持体結合オリゴヌクレオチドに付加する。鎖の3'末端の最初のヌクレオシドを種々のリンカーを用いて固体支持体（例えば、調整多孔ガラスまたはポリスチレン）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、および活性化剤を混合して、第1のヌクレオシドの5'末端上に第2のヌクレオシドホスホルアミダイトをカップリングさせる。次に支持体を洗浄し、未反応5'-ヒドロキシル基を無水酢酸等のカップリング試薬を用いてカップリングして、不活性な5'-アセチル成分を得る。次に3価リン結合を酸化してより安定なリン酸結合とする。ヌクレオチド付加サイクルの最後に、適当な条件下で（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を用いて）、5'-O-保護基を切断する。それぞれの次のヌクレオチドについてこのサイクルを繰り返す。

20

#### 【0305】

合成条件を改変して、例えば、合成すべきsiNA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、異なる固体支持体および固体支持体リンカー化学を用いることにより、カップリング効率を最適化することができる。siNAの脱保護および精製は、一般に記載されているようにして行うことができる（Vargeese et al.、米国特許出願10/194,875（その全体を本明細書の一部としてここに引用する）またはScarlinge（上掲））。

30

#### 【0306】

さらに、脱保護条件を改変して、可能な限り最高の収量および純度のsiNAコンストラクトを得る。例えば、本出願人は、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は不適切な脱保護条件下で分解しうることを見いだした。そのようなオリゴヌクレオチドは、水性メチルアミンを用いて約35℃で30分間脱保護する。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をも含む場合には、水性メチルアミンで約35℃で30分間脱保護した後、TEA-HFを加え、反応液をさらに15分間約65℃に維持する。

#### 【0307】

#### 実施例6：siNA活性を評価するためのRNAiインビトロアッセイ

40

RNAiを無細胞システムにおいて再現するインビトロアッセイを用いて、PTP-1B RNA標的を標的とするsiNAコンストラクトを評価する。アッセイは、Tuschlら（1999, Genes and Development, 13, 3191-3197）およびZamoreら（2000, Cell, 101, 25-33）に記載され、PTP-1B標的RNA用に適合させた系を含む。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インビトロでRNAi活性を再構築する。標的RNAは、PTP-1Bを発現する適当なプラスミドからT7RNAポリメラーゼを用いてインビトロ転写することにより、または本明細書に記載されるように化学合成により作製する。センスおよびアンチセンスsiNA鎖（例えば各20μM）は、緩衝液（例えば、100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH, pH7.4, 2mM酢酸マグネシウム）

50

中で90 で1分間，次に37 で1時間インキュベートすることによりアニーリングさせ，次に溶解緩衝液（例えば100 mM酢酸カリウム，30 mM HEPES-KOH（pH 7.4），2 mM酢酸マグネシウム）で希釈する。アニーリングは，アガロースゲルを用いてTBE緩衝液でゲル電気泳動し，臭化エチジウムで染色することによりモニターすることができる。ショウジョウバエの溶解物は，Oregon Rハエからの0-2時間齢の胚を用いて調製し，酵母糖蜜寒天上に回収し，絨毛膜を除去し溶解する。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（10-50 pMの最終濃度），およびsiNA（10 nMの最終濃度）を含む10% [vol/vol]溶解緩衝液を含有する反応混合物を含む。反応混合物はまた，10 mMのクレアチニン酸，10 μg/mlのクレアチンホスホキナーゼ，100 μMのGTP，100 μMのUTP，100 μMのCTP，500 μMのATP，5 mMのDTT，0.1 U/μLのRNasin（Promega），および100 μMの各アミノ酸を含む。酢酸カリウムの最終濃度は100 mMに調節する。反応は氷上で予め組立て，25 で10分間ブレインキュベートした後にRNAを加え，25 でさらに60分間インキュベートする。4倍容量の1.25x Passive Lysis Buffer（Promega）で反応を停止させる。標的RNAの切断は，RT-PCR分析または当該技術分野において知られる他の方法によりアッセイし，反応からsiNAが省略されている対照反応と比較する。

#### 【0308】

あるいは，アッセイ用の内部標識した標的RNAを[アルファ-<sup>32</sup>P]CTPの存在下でインビトロ転写により調製し，スピノクロマトグラフィーによりG50セファデックスカラムを通し，さらに精製することなく標的RNAとして用いる。任意に，標的RNAはT4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素を用いて5'-<sup>32</sup>P末端標識してもよい。アッセイは上述のようにして行い，標的RNAおよびRNAiにより生成する特異的RNA切断産物をゲルのオートラジオグラフィーで可視化する。切断のパーセントは，無傷の対照RNAまたはsiNAなしの対照反応からのRNA，およびアッセイにより生成する切断産物を表すバンドをPhosphorImager（登録商標）で定量することにより決定する。

#### 【0309】

1つの態様においては，このアッセイを用いて，siNA媒介性RNAi切断のためのPTP-1B RNA標的の標的部位を決定する。すなわち，例えば，標識した標的RNAの電気泳動によりアッセイ反応を分析することにより，またはノザンプロットにより，ならびに当該技術分野において知られる他の方法論により，複数のsiNAコンストラクトをPTP-1B RNA標的のRNAi媒介性切断についてスクリーニングする。

#### 【0310】

#### 実施例7：PTP-1B標的RNAのインビボでの核酸阻害

上述したようにして，ヒトPTP-1B RNAを標的とするsiNA分子を設計し，合成する。これらの核酸分子は，例えば以下の方法を用いることにより，インビボで切断活性について試験することができる。PTP-1B RNA中の標的配列およびヌクレオチドの位置は表IIおよびIIIに示される。

#### 【0311】

2つのフォーマットを用いて，PTP-1Bを標的とするsiNAの効力を試験する。第1に，例えば，培養ヒト腎臓線維芽細胞（例えば293細胞）を用いて，細胞培養において試薬を試験して，RNAおよび蛋白質の阻害の程度を決定する。本明細書に記載されるように，siNA試薬（例えば，表IIおよびIIIを参照）をPTP-1B標的に対して選択する。これらの試薬を適当なトランスフェクション試薬により，例えば，293細胞にデリバリーした後，RNA阻害を測定する。増幅のリアルタイムPCRモニタリング（例えば，ABI7700 Taqman（登録商標））を用いて，アクチンに対する標的RNAの相対量を測定する。無関係標的に対して，または同じ全体の長さおよび化学を有するがそれぞれの位置でランダムに置換されているランダム化siNA対照に対して

作製したオリゴヌクレオチド配列の混合物に対して、比較を行う。標的に対して一次および二次のリード試薬を選択し、最適化を行う。最適なトランスフェクション試薬濃度を選択した後、リード *siNA* 分子を用いて *RNA* の障害の経時変化を測定する。さらに、細胞播種フォーマットを用いて、*RNA* 障害を判定することができる。

#### 【0312】

##### *siNA* の細胞へのデリバリー

細胞（例えば 293）は、トランスフェクションの前日に、例えば、EGM-2（BioWhittaker）中で  $1 \times 10^5$  細胞/ウエルで 6 - ウエルディッシュに播種する。*siNA*（例えば最終濃度 20 nM）およびカチオン性脂質（例えば最終濃度 2  $\mu$ g/ml）を、ポリスチレン管で EGM 基礎培地（BioWhittaker）中で、37 で 30 分間複合体化させる。ボルテックスした後、複合体化した *siNA* を各ウエルに加え、示される時間インキュベートする。最初の最適化実験のためには、細胞を例えば、 $1 \times 10^3$  で 96 ウエルプレートに播種し、記載されるようにして *siNA* 複合体を加える。*siNA* の細胞へのデリバリーの効率は、脂質と複合体化した蛍光 *siNA* を用いて決定する。6 ウエルディッシュ中の細胞を *siNA* とともに 24 時間インキュベートし、PBS ですすぎ、2 % パラホルムアルデヒド中で室温で 15 分間固定する。*siNA* の取り込みは蛍光顕微鏡を用いて可視化する。

#### 【0313】

##### Taqman および光サイクラーによる mRNA の定量

*siNA* のデリバリーの後、例えば、6 ウエル用には Qiagen RNA 精製キットを、または 96 ウエルアッセイ用には Rneasy 抽出キットを用いて、細胞から総 RNA を調製する。Taqman 分析のためには、5' 末端に共有結合させたレポーター染料（FAM または JOE）および 3' 末端にコンジュゲート化したクエンチャー染料 TAMRA を有する二重標識プローブを合成する。1 段階 RT-PCR 増幅は、例えば、ABI PRISM 7700 Sequence Detector で、10  $\mu$ l の総 RNA、100 nM のフォワードプライマー、900 nM のリバースプライマー、100 nM のプローブ、1X TaqMan PCR 反応緩衝液（PE-Applied Biosystems）、5.5 mM  $MgCl_2$ 、300  $\mu$ M の各 dATP、dCTP、dGTP、および dTTP、10 U の RNase 阻害剤（Promega）、1.25 U の AmpliTaq Gold（PE-Applied Biosystems）および 10 U の M-M L V リバーストランスクリプターゼ（Promega）から構成される 50  $\mu$ l の反応液を用いて行う。熱サイクリング条件は、48 で 30 分間、95 で 10 分間、次に 95 で 15 秒間および 60 で 1 分間を 40 サイクルからなるものでありうる。mRNA レベルの定量は、段階的に希釈した総細胞 RNA（300, 100, 33, 11 ng/rxn）から生成した標準に対して行い、平行して TaqMan 反応で測定した - アクチンまたは GAPDH mRNA に対して標準化する。目的とする各遺伝子について、上側プライマーおよび下側プライマー、および蛍光標識したプローブを設計する。特定の PCR 産物中への SYBR Green I 染料のリアルタイム取り込みは、ガラスキャピラリー管で光サイクラーを用いて測定することができる。対照 cRNA を用いて、各プライマー対について標準曲線を作成する。値は、各サンプルにおいて GAPDH に対する相対的発現として表すことができる。

#### 【0314】

##### ウエスタンブロッティング

核抽出物は、標準的なマイクロ調製手法（例えば、Andrews and Fallier, 1991, Nucleic Acids Research, 19, 2499 を参照）を用いて調製することができる。例えば TCA 沈殿を用いて、上清からの蛋白質抽出物を調製する。等量の 20 % TCA を細胞上清に加え、氷上で 1 時間インキュベートし、5 分間の遠心分離によりペレット化する。ペレットをアセトンで洗浄し、乾燥し、水に再懸濁する。細胞蛋白質抽出物を 10 % Bis-Tris NuPage（核抽出物）または 4 - 12 % Tris - グリシン（上清抽出物）ポリアクリルアミドゲルに流し、ニトロ

セルロース膜に移す。非特異的結合は、例えば、5%無脂乳とともに1時間インキュベートすることによりブロッキングすることができ、次に一次抗体で4で16時間反応させる。洗浄した後、二次抗体、例えば(1:10, 000希釈)を室温で1時間適用し、SuperSignal試薬(Pierce)でシグナルを検出する。

#### 【0315】

実施例8：PTP-1B遺伝子発現のダウンレギュレーションを評価するのに有用なモデル

#### 細胞培養

直接的にまたは下流の効果を測定することにより間接的にPTP-1Bレベルの低下を分析するために用いることができる多くの細胞培養系が存在する。例えば、培養ヒト腎臓線維芽細胞細胞(例えば、293細胞)を細胞培養実験において用いて、本発明の核酸分子の効力を評価することができる。したがって、PTP-1B RNAを標的とする本発明の核酸分子(例えばsiNA)で処理した293細胞は、スクランブル化または不活性配列を有するマッチした対照核酸分子と比較してPTP-1B発現能力が低下していると予測される。非限定的例においては、ヒト腎臓線維芽細胞293細胞を培養し、例えば時間分割免疫蛍光アッセイによりPTP-1B発現を定量する。培養293細胞においてPTP-1BメッセンジャーRNA発現をRT-PCRで定量する。未処理細胞を、適当な試薬、例えば、リポフェクタミン等のカチオン性脂質、およびPTP-1B蛋白質でトランスフェクトし、siNA分子で処理した細胞と比較し、RNAレベルを定量する。次に、用量応答アッセイを行って、PTP-1B発現の用量依存的阻害を確立する。本発明の核酸分子をアッセイするために用いることができる細胞培養系の他の非限定的例には以下のものが含まれる：Maegawara(1995, J. Biol. Chem., 270, 7724-7730)は、ヒトインスリンレセプターを発現するRat1繊維芽細胞を高血糖症誘導性インスリン抵抗性のモデルとして用いることができる組織培養モデルを記載する。Maegawaraはまた、標識したリン酸化インスリンレセプターを用いて、および免疫酵素的手法によりPTPase活性を測定するアッセイを記載する。Moxham(1996, Nature, 379, 840-844)は、Gi-アルファ-2欠失を用いて高インスリン血症、グルコース抵抗性障害およびインスリン抵抗性をインビボで研究するネズミ組織培養モデルを記載する。PTPase活性およびインスリン-レセプター基質1のチロシンリン酸化のアッセイは当該技術分野において知られている。例えば、Wang(1999, Biochim. Biophys. Acta, 1431, 14-23)は、PTPの蛍光発生性基質としてのフルオレセイン-リン酸を記載しており、これはPTPase調節を研究するために用いることができる。そのような蛍光発生性PTP-1B基質を用いて、インビボでのsiRNAに基づくPTP-1Bの阻害の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。

#### 【0316】

いくつかの細胞培養系においては、カチオン性脂質が培養細胞に対するオリゴヌクレオチドの生物利用性を増強することが示されている(Bennet, et al., 1992, Mol. Pharmacology, 41, 1023-1033)。1つの態様においては、細胞培養実験用に本発明のsiNA分子をカチオン性脂質と複合体化させる。siNAおよびカチオン性脂質混合物を細胞に加える直前に無血清DMEM中で調製する。DMEMプラス添加物を室温(約20-25)に暖め、カチオン性脂質を所望の最終濃度に加え、溶液を軽くボルテックスする。siNA分子を所望の最終濃度に加え、溶液を再び軽くボルテックスし、室温で10分間インキュベートする。用量応答実験においては、10分間のインキュベート後にRNA/脂質複合体をDMEMで連続希釈する。

#### 【0317】

#### 動物モデル

動物モデルにおいて抗PTP-1B剤の効力を評価することは、ヒトの臨床試験の重要な前提条件である。肥満および2型糖尿病は、米国において成人の50%以上に影響を与えているという点において、最も一般的かつ重症の代謝性疾病である。これらの状態は、

異常な炎症性サイトカイン産生，急性期反応物の増加および他のストレス誘導性分子により特徴づけられる慢性炎症性応答を伴う。これらの変化の多くは，脂肪組織内で開始し，ここで持続するようである。脂肪組織による腫瘍壊死因子（TNF）-アルファの産生の上昇は，インスリンに対する感受性を減少させ，これはいくつかの実験的肥満モデルおよび肥満したヒトにおいて検出されている。遊離脂肪酸（FFA）もまた，肥満誘導性インスリン抵抗性および糖尿病の病因論においてその関与が示唆されている。研究により，肥満にはチロシンキナーゼ経路によるストレス活性化および炎症応答が伴うこと，および蛋白質キナーゼがこの状態における代謝制御の異常の原因として関連することが示されている（Hirosumi et al., 2002, Nature, 420, 333-336）。Hirosumiらは，PTP-1B遺伝子発現の評価に有用な肥満の食事および遺伝的（ob/ob）マウスモデルを記載する。他のモデルには，Khandelwalら（1995, Molecular and Cellular Biochemistry, 153, 87-94）により記載されるモデルが含まれ，彼らはインスリン依存性およびインスリン抵抗性糖尿病を研究するための4つの異なる動物モデルを記載する。これらのモデルを用いて，インスリン模倣物およびPTPase阻害剤であるバナジン酸がインスリンレセプターのインスリン刺激性リン酸化およびそのチロシンキナーゼ活性に及ぼす影響を調べた。Elcheblyら（1999, Science, 283, 1544-1548）は，ネズミPTP-1Bノックアウトモデルにおけるインスリン感受性および食物代謝の研究を記載する。得られたPTP-1B欠損マウス（ホモ接合体PTP-1B<sup>-/-</sup>およびヘテロ接合体PTP-1B<sup>+/-</sup>の両方）は健康であり，給餌状態で，PTP-1B<sup>+/-</sup>発現同腹子の半分の低い血中グルコースおよび循環インスリンレベルを有する。これらのPTP-1B欠損マウスは，グルコース試験およびインスリン抵抗性試験において増強されたインスリン感受性を示した。生理学的レベルにおいて，PTP-1B欠損マウスはインスリン投与後にインスリンレセプターのリン酸化の増加を示した。高脂肪食を与えたとき，PTP-1B欠損マウスは体重増加に抵抗性であり，インスリン感受性のままであった。これに対し，正常PTP-1B発現マウスは急速に体重が増加し，インスリン抵抗性となった。

#### 【0318】

このようなトランスジェニックマウスは肥満およびインスリン抵抗性のモデルとして有用であり，肥満およびインスリン抵抗性（例えば，I型およびII型糖尿病）の治療における治療用途をめざして，PTP-1B遺伝子発現および遺伝子機能を調節する本発明の核酸分子を同定するために用いることができる。

#### 【0319】

#### 実施例9：PTP-1B RNA発現のRNAi媒介性阻害

siNAコンストラクト（表III）を，A549細胞において，PTP-1B RNA発現を低下させる効力について試験した。A549細胞を，トランスフェクションの時点で細胞が70-90%コンフルエントであるように，トランスフェクションの約24時間前に，96ウエルプレートに5,000-7,500細胞/ウエル，100μl/ウエルで播種した。トランスフェクションのためには，アニーリングしたsiNAを50μl/ウエルの容量でトランスフェクション試薬（リポフェクタミン2000，Invitrogen）と混合し，室温で20分間インキュベートした。siNAトランスフェクション混合物を細胞に加えて，150μlの容量中最終siNA濃度を25nMとした。各siNAトランスフェクション混合物を3重のsiNA処理用に3つのウエルに加えた。細胞をsiNAトランスフェクション混合物の連続的存在下で37℃で24時間インキュベートした。24時間において，処理した細胞の各ウエルからRNAを調製した。まずトランスフェクション混合物を有する上清を除去して廃棄し，次に細胞を溶解し，各ウエルからRNAを調製した。処理後の標的遺伝子の発現を，標的遺伝子および標準化用に対照遺伝子（36B4，RNAポリメラーゼサブユニット）についてRT-PCRにより評価した。3回の実験のデータを平均し，各処理について標準偏差を求めた。標準化したデータをグラフに表し，活性なsiNAによる標的mRNAの減少のパーセントをそれぞれの反

転対照 *s i N A* と比較して判定した。

#### 【0320】

この実験の結果は図12に示される。リボヌクレオチドおよび3'末端ジチミジンキャップを含む *s i N A* コンストラクト (R P I # 3 1 0 1 8 / 3 1 0 9 4) を, 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドおよびプリンリボヌクレオチドを含み, *s i N A* のセンス鎖は5' および3' 末端反転デオキシ無塩基キャップでさらに修飾されており, アンチセンス鎖は3' 末端ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む化学的に修飾された *s i N A* コンストラクト (R P I # 3 1 3 0 6 / 3 1 3 0 7) とともにアッセイした。これはまた, マッチした化学的反転対照 (R P I # 3 1 3 1 8 / 3 1 3 1 9) ととも比較した。さらに, *s i N A* コンストラクトは, 未処理細胞, 脂質でトランスフェクトした細胞およびスクランブル化 *s i N A* コンストラクト (S c r a m 1 および S c r a m 2), および脂質のみでトランスフェクトした細胞 (トランスフェクション対照) ととも比較した。図に示されるように, いずれの *s i N A* コンストラクトも P T P - 1 B R N A 発現を有意に低下させる。

10

#### 【0321】

##### 実施例10：適応症

P T P - 1 B 研究における現在の一連の知識は, 研究, 診断および治療用途のために, P T P - 1 B 遺伝子産物の発現を制御しうる方法および化合物が必要とされていることを示す。P T P - 1 B 発現調節に関連しうる特定の変性性および疾病状態には, 限定されないが, 以下のものが含まれる:

20

#### 【0322】

糖尿病: 1型および2型糖尿病のいずれも, P T P - 1 B 発現の調節により治療することができる。2型糖尿病は, 脱感作されたインスリンレセプター機能と相関する (W h i t e e t a l . , 1 9 9 4)。インスリンレセプターの P T P - 1 B 脱リン酸化をインビボで破壊すると, インスリン感受性および増加したインスリンレセプター自己リン酸化として現れる (E l c h e b l y e t a l . , 1 9 9 9)。インスリン依存性糖尿病 (1型) は, インスリン感受性の増加を通して P T P - 1 B 調節に応答するであろう。

#### 【0323】

肥満: E l c h e b l y ら (1999) は, P T P - 1 B 欠損マウスは正常な P T P - 1 B 発現マウスと比較して高脂肪食を与えたときの体重増加に抵抗性であることを示した。この知見は, P T P - 1 B の調節が肥満の治療に有益であるかもしれないことを示唆する。A h m a d ら (1997, M e t a b . C l i n . E x p . , 4 6 , 1 1 4 0 - 1 1 4 5) は, 脂肪組織における P T P の減少および減量後の肥満の被験者におけるインスリン感受性の改良を記載する。

30

#### 【0324】

チアゾリジンジオン類 (T Z D), インスリン, および他のチロシンホスファターゼ阻害剤は, 本発明の核酸分子 (例えば *s i R N A* 分子) と組み合わせまたは併用しうる医薬品の非限定的例である。当業者は, 同様に他の薬剤, 例えば, 抗糖尿病および抗肥満化合物および療法を本発明の核酸分子 (例えば *s i N A* 分子) と容易に組み合わせることができ, したがって本発明の範囲内であることを理解するであろう。

40

#### 【0325】

##### 実施例11：診断用途

本発明の *s i N A* 分子は, 種々の応用において, 例えば, 臨床, 工業, 環境, 農業および/または研究の設定において, 種々の診断用途, 例えば分子標的 (例えば R N A) の同定に用いることができる。そのような *s i N A* 分子の診断における使用は, 再構成された R N A i 系, 例えば, 細胞溶解物または部分的に精製された細胞溶解物を利用することを含む。本発明の *s i N A* 分子を診断手段として使用し, 疾病に罹患した細胞内の遺伝的浮動および変異を検査するか, または細胞において内因性のまたは外来の (例えばウイルス) 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 の構造との間の密接な関係により, 分子のいずれの領域においても, 標的 R N A の塩基対形成および3次元構

50

造を変更する変異を検出することができる。本発明に記載される s i N A 分子を複数使用することにより、インビトロならびに細胞および組織における R N A の構造および機能に重要な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 の切断を使用して、遺伝子の発現を阻害し、疾病または感染の進行における特定の遺伝子産物の役割（本質的な）を明らかにすることができる。このようにして、他の遺伝子標的を疾病の重要な介在物として明らかにすることができる。これらの実験は、組み合わせ療法の可能性を提供することにより、疾病進行のよりよい治療につながるであろう（例えば、異なる遺伝子を標的とする多数の s i N A 分子、既知の小分子阻害剤と組み合わせた s i N A 分子、s i N A 分子および/または他の化学的または生物学的分子と組み合わせた間欠的治療）。本発明の s i N A 分子の他のインビトロにおける使用は当該技術分野においてよく知られており、これには、疾病、感染または関連する健康状態に伴う m R N A の存在の検出が含まれる。そのような R N A は、s i N A 分子で処理した後、標準的な方法論、例えば蛍光共鳴エネルギー移動（F R E T）を使用して切断産物の存在を判定することにより検出する。

#### 【0326】

特定の例においては、標的 R N A の野生型または変異型のみしか切断できない 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、野生型の標的 R N A のみを切断するもの）を用いて試料中の野生型 R N A の存在を同定し、第 2 の s i N A 分子（すなわち、変異型の標的 R N A のみを切断するもの）を用いて試料中の変異型 R N A を同定する。反応対照として、野生型および変異型の両方の R N A の合成基質を両方の s i N A 分子で切断し、反応における s i N A 分子の相対効率および"非標的" R N A 種を切断しないことを明らかにする。合成基質からの切断産物は、試料集団中の野生型および変異型 R N A の分析のためのサイズマーカーの生成にも役立つ。したがって、それぞれの分析は 2 つの s i N A 分子、2 つの基質、および 1 つの未知の試料を必要とし、これらを組み合わせて 6 つの反応を行う。切断産物の存在を R N a s e 保護アッセイを用いて確認し、各 R N A の完全長および切断フラグメント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する。標的細胞における変異体 R N A の発現および所望の表現型の変化の推定されるリスクへの洞察を得るために、必ずしも結果を定量する必要はない。その蛋白質産物が表現型（すなわち、疾病に関連するかまたは感染に関連する）の発生に関与することが示唆される m R N A の発現はリスクを確立するのに十分である。同等の比活性のプロープを両方の転写産物に使用すれば、R N A レベルの定性的比較で十分であり、初期の診断のコストが低減するであろう。R N A レベルを定性的に比較するにしても定量的に比較するにしても、より高い変異型と野生型の比率はより高いリスクと相関関係があるであろう。

#### 【0327】

本明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示す。本明細書において引用されるすべての参考文献は、それぞれの参考文献が個々にその全体が本明細書の一部としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

#### 【0328】

当業者は、本発明が、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るためによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される方法および組成物は、現在のところ好ましい態様の代表的なものであり、例示的なものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、特許請求の範囲において定義される本発明の精神の中に包含される変更および他の用途をなすであろう。

#### 【0329】

当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して種々の置換および改変をなすことが可能であることを容易に理解するであろう。すなわち、そのような追加の態様は、本発明および特許請求の範囲の範囲内である。本発明は、R N A i 活性を媒介する改良された活性を有する核酸コンストラクトを得るため

に本明細書に記載される化学的修飾の種々の組み合わせおよび／または置換を試験することを当業者に教示する。そのような改良された活性は、改良された安定性、改良された生物利用性、および／またはRNAiを媒介する細胞応答の改良された活性化を含むことができる。したがって、本明細書に記載される特定の態様は限定ではなく、当業者は、改良されたRNAi活性を有するsiNA分子を同定するために、過度の実験なしに本明細書に記載される修飾の特定の組み合わせを試験しうることを容易に理解することができる。

【0330】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定の開示されていない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、"・・・を含む"、"・・・から本質的になる"および"・・・からなる"との用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いられる用語および表現は、説明の用語として用いるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図するものではなく、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更が可能であることが理解される。すなわち、好ましい態様および任意の特徴により本発明を特定の開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更および変種が可能であり、そのような変更および変種も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

10

【0331】

さらに、発明の特徴および観点がマーカッシュグループまたは他の代替グループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、マーカッシュグループまたは他のグループの個々のメンバーまたはサブグループに関してもまた記載されていることを認識するであろう。

20

【0332】



表 I: PTP-1B 受託番号

LOCUS	PTPN1	3318 bp	mRNA	linear	PRI 09-JAN-2002
DEFINITION	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 (PTPN1), mRNA.				
ACCESSION	NM_002827				
LOCUS	AY029236	2119 bp	DNA	linear	PRI 02-JUL-2001
DEFINITION	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) gene, promoter and partial cds.				
ACCESSION	AY029236				
LOCUS	AX418608	3247 bp	DNA	linear	PAT 18-JUN-2002
DEFINITION	Sequence 3 from Patent WO0210378.				
ACCESSION	AX418608				
VERSION	AX418608.1 GI:21523469				

【表 2】

表 II: PTP-1B siNA および標的配列

NM\_002827 (PTPN1)

位置	標的配列	配列 番号	上側 位置	上側配列	配列 番号	下側 位置	下側配列	配列 番号
1	GUGAUGCGUAGUCCGGCU	1	1	GUGAUGCGUAGUCCGGCU	1	23	AGCCGGAACUACGCAUCAC	186
19	UGCCGGUUGACAAGAA	2	19	UGCCGGUUGACAAGAA	2	41	UUCUUCAUUGUCAACCGCA	187
37	AGCAGCAGCGGCUAGGGCG	3	37	AGCAGCAGCGGCUAGGGCG	3	59	CGCCCUAGCCGCGUGCUGCU	188
55	GGCGUAGCUGCAGGGGUC	4	55	GGCGUAGCUGCAGGGGUC	4	77	GACCCUAGCAGCUACCGCC	189
73	CGGGAUUGCAGCGGGCCU	5	73	CGGGAUUGCAGCGGGCCU	5	95	AGGCCCGUGCAUCCCCCG	190
91	UCGGGCUAAGAGCGCGAC	6	91	UCGGGCUAAGAGCGCGAC	6	113	GUCGCGUUCUAGCCCCGA	191
109	CGCGCCUAGAGCGGCAGA	7	109	CGCGCCUAGAGCGGCAGA	7	131	UCUGCCGCUUAGGCCGCG	192
127	ACGGCGAGUGGGCCGAGA	8	127	ACGGCGAGUGGGCCGAGA	8	149	UCUGCCCGCAGUGCGCCGU	193
145	AAGGAGGCGCAGCGCCGC	9	145	AAGGAGGCGCAGCGCCGC	9	167	GCGGCGCUGCGGCCUCCUU	194
163	CCUGGCCCGUCAUGGAGA	10	163	CCUGGCCCGUCAUGGAGA	10	185	UCUCCAUAGCGGCGCCAGGG	195
181	AUGGAAAGGAGUUCGAGC	11	181	AUGGAAAGGAGUUCGAGC	11	203	GCUCGAACUCCUUUCCAU	196
199	CAGUCCGACAAAGUCCGGGA	12	199	CAGUCCGACAAAGUCCGGGA	12	221	UCCCGGACUUGUCGAUCUG	197
217	AGCUGGGCGGCCAUUUACC	13	217	AGCUGGGCGGCCAUUUACC	13	239	GGUAAUUGGCCGCCACGCU	198
235	CAGGAUAUCCGACAUAGAAG	14	235	CAGGAUAUCCGACAUAGAAG	14	257	CUUCAUGUCGGAUACUCCUG	199
253	GCCAGUGACUCCCAUGUA	15	253	GCCAGUGACUCCCAUGUA	15	275	UACAUGGGAAGUCACUGGC	200
271	AGAGUGGCCAAGCUUCCUA	16	271	AGAGUGGCCAAGCUUCCUA	16	293	UAGGAAGCUUGGCCACUCU	201
289	AAGAACAACAAACCGAAUA	17	289	AAGAACAACAAACCGAAUA	17	311	UAUUCCGUUUUUGUUCUU	202
307	AGGUACAGAGACGUCAGUC	18	307	AGGUACAGAGACGUCAGUC	18	329	GACUGACGUCUCUGUACCU	203
325	CCUUUGACCAUAGUCGGA	19	325	CCUUUGACCAUAGUCGGA	19	347	UCCGACUAUGGUCAAAGGG	204
343	AUUAACUACAUCAAGAAG	20	343	AUUAACUACAUCAAGAAG	20	365	CUUCUUGAUGUAGUUUAU	205
361	GAUAAUGACUAUAUCAACG	21	361	GAUAAUGACUAUAUCAACG	21	383	CGUUGAUUAUAGUCAUUAUC	206
379	GCUAGUUUGAUAAAAAUGG	22	379	GCUAGUUUGAUAAAAAUGG	22	401	CCAUUUUUUACAACUAGC	207
397	GAAGAAGCCCAAGGAGUU	23	397	GAAGAAGCCCAAGGAGUU	23	419	AACUCCUUUGGCGUUCUUC	208
415	UACAUUCUUACCCAGGGCC	24	415	UACAUUCUUACCCAGGGCC	24	437	GGCCUUGGUAAGAAUGUA	209
433	CCUUUGCCUAAACACAUCCG	25	433	CCUUUGCCUAAACACAUCCG	25	455	CGCAUGUGUUUAGGCAAGG	210
451	GGUCACUUUUUGGGAGAUUG	26	451	GGUCACUUUUUGGGAGAUUG	26	473	CCAUCUCCCAAAAGUGACC	211
469	GUGUGGGAGCAGAAAAAGCA	27	469	GUGUGGGAGCAGAAAAAGCA	27	491	UGCUUUUCUGUCCCCACAC	212
487	AGGGGUGUCGUCAUGCUCA	28	487	AGGGGUGUCGUCAUGCUCA	28	509	UGAGCAUGACGACACCCCU	213
505	AACAGAGUGAUGGAGAAAG	29	505	AACAGAGUGAUGGAGAAAG	29	527	CUUUCUCCAUACACUCUGUU	214

【 0 3 3 4 】

10

20

30

40

【表 3】

523	GGUUCGUUAAAAUUGCGCAC	30	523	GGUUCGUUAAAAUUGCGCAC	30	545	GUGCGCAUUUUAACGAACC	215
541	CAAUACUUGGCCACAAAAAG	31	541	CAAUACUUGGCCACAAAAAG	31	563	CUUUUUGUGGCCAGUAUUUG	216
559	GAAGAAAAAGAGAUUAUCU	32	559	GAAGAAAAAGAGAUUAUCU	32	581	AGAUCACUCUUUUUCUUC	217
577	UUUGAAGACACAAAUUUGA	33	577	UUUGAAGACACAAAUUUGA	33	599	UCAAUUUUGUGUCUUCAAA	218
595	AAAUAAACAUUUAUCUCUG	34	595	AAAUAAACAUUUAUCUCUG	34	617	CAGAGAUCAAUGUUAAUUU	219
613	GAAGAUUAACAAGUCAUAUU	35	613	GAAGAUUAACAAGUCAUAUU	35	635	AAUAUGACUUUGAUUAUCUUC	220
631	UAUACAGUGCGACAGCUAG	36	631	UAUACAGUGCGACAGCUAG	36	653	CUAGCUGUCGCACUGUAUA	221
649	GAUUUGGAAAACCUUACAA	37	649	GAUUUGGAAAACCUUACAA	37	671	UUGUAAGGUUUUCCAAUUC	222
667	ACCCAAAGAAACUCGAGAGA	38	667	ACCCAAAGAAACUCGAGAGA	38	689	UCUCUCGAGUUUCUUGGGU	223
685	AUCUUAACAUUCCACUAUA	39	685	AUCUUAACAUUCCACUAUA	39	707	UAUAGUGGAAAUGUAAGAU	224
703	ACCACAUUGGCCUGACUUUG	40	703	ACCACAUUGGCCUGACUUUG	40	725	CAAAGUCAGGCCAUUGUGGU	225
721	GGAGUCCCUGAAUACCCAG	41	721	GGAGUCCCUGAAUACCCAG	41	743	CUGGUGAUUCAGGGACUCC	226
739	GCCUCAUUCUUGAACUUUC	42	739	GCCUCAUUCUUGAACUUUC	42	761	GAAAGUUAAGAAUUGAGGC	227
757	CUUUUCAAAAGUCCGAGAGU	43	757	CUUUUCAAAAGUCCGAGAGU	43	779	ACUCUCGGACUUUUGAAAAG	228
775	UCAGGGUACUCAGCCCGG	44	775	UCAGGGUACUCAGCCCGG	44	797	CCGGGUCGAGUGACCCUGA	229
793	GAGCACGGGCCGUUGUGG	45	793	GAGCACGGGCCGUUGUGG	45	815	CCACAACGGGCCCGUGCUC	230
811	GUGCACUGCAGUGCAGGCA	46	811	GUGCACUGCAGUGCAGGCA	46	833	UGCCUGCACUGCAGUGCAC	231
829	AUCGGCAGGUCUGGAACCU	47	829	AUCGGCAGGUCUGGAACCU	47	851	AGGUUCCAGACCCUGCCGUA	232
847	UUCUGUCUGGCUGAUACCU	48	847	UUCUGUCUGGCUGAUACCU	48	869	AGGUUACAGCCAGACAGAA	233
865	UGCCUCUUGCUGAUGGACA	49	865	UGCCUCUUGCUGAUGGACA	49	887	UGUCCAUACAGCAAGAGGCA	234
883	AAGAGGAAAAGACCCUUCU	50	883	AAGAGGAAAAGACCCUUCU	50	905	AAGAGGGUCUUUCCUCUU	235
901	UCCGUUGAUUAUCAAGAAAG	51	901	UCCGUUGAUUAUCAAGAAAG	51	923	CUUUCUUGAUUAUCAACGGA	236
919	GUGCUGUUAGAAUUGAGGA	52	919	GUGCUGUUAGAAUUGAGGA	52	941	UCCUCAUUUCUUAACAGCAC	237
937	AAGUUUCGGAUUGGGCUGA	53	937	AAGUUUCGGAUUGGGCUGA	53	959	UCAGCCCCAUUCCGAAACUU	238
955	AUCCAGACAGCCGACCAGC	54	955	AUCCAGACAGCCGACCAGC	54	977	GCUGGUCGGCUGUCUGGAU	239
973	CUGCGCUUCUCCUACCUGG	55	973	CUGCGCUUCUCCUACCUGG	55	995	CCAGGUAGGAGAGAGCGCAG	240
991	GCUGUGAUCGAAGGUGCCA	56	991	GCUGUGAUCGAAGGUGCCA	56	1013	UGGCACCUUCCGAUCACAGC	241
1009	AAAUCAUCAUGGGGGACU	57	1009	AAAUCAUCAUGGGGGACU	57	1031	AGUCCCCCAUGAUAUUU	242
1027	UCUCCGUGCAGGAUCAGU	58	1027	UCUCCGUGCAGGAUCAGU	58	1049	ACUGAUCCUGCAGCGGAAGA	243
1045	UGGAAGGAGCUUCCCCACG	59	1045	UGGAAGGAGCUUCCCCACG	59	1067	CGUGGGAAAGCUCCUCCCA	244
1063	GAGGACCUUGGAGCCCCCAC	60	1063	GAGGACCUUGGAGCCCCCAC	60	1085	GUGGGGGCUCACAGGUCCUC	245
1081	CCCGAGCAUAUCCCCCAC	61	1081	CCCGAGCAUAUCCCCCAC	61	1103	GUGGGGGGAUAUGCUCGGG	246
1099	CCUCCCCGCCACCCAAAC	62	1099	CCUCCCCGCCACCCAAAC	62	1121	GUUUUGGUGGCCGGGGAGG	247
1117	CGAAUCCUGGAGCCACACA	63	1117	CGAAUCCUGGAGCCACACA	63	1139	UGUGUGGCUCCAGGAUUCG	248
1135	AUUGGAAAUUGCAGGGAGU	64	1135	AUUGGAAAUUGCAGGGAGU	64	1157	ACUCCCGCAUUUCCCAUU	249
1153	UUUUUCCCAAAUACCCAGU	65	1153	UUUUUCCCAAAUACCCAGU	65	1175	ACUGGUGAUUUUGGGAAGAA	250

【 0 3 3 5 】

10

20

30

40

【表 4】

1171	UGGUGAAGGAAGAGACCC	66	1171	UGGUGAAGGAAGAGACCC	66	1193	GGGUCUCUCCUUCACCCCA	251
1189	CAGGAGGAUAAAGACUGCC	67	1189	CAGGAGGAUAAAGACUGCC	67	1211	GGCAGUCUUUAUCCUCCUG	252
1207	CCCAUCAAGGAAGAAAAG	68	1207	CCCAUCAAGGAAGAAAAG	68	1229	CUUUUCUCCUUGAUGGG	253
1225	GGAAGCCCCUUAUUGCCG	69	1225	GGAAGCCCCUUAUUGCCG	69	1247	CGGCAUUUAAGGGGCUUCC	254
1243	GCACCCUACGGCAUCGAAA	70	1243	GCACCCUACGGCAUCGAAA	70	1265	UUUCGAUGCCGUAAGGGUGC	255
1261	AGCAUGAGUCAAGACACUG	71	1261	AGCAUGAGUCAAGACACUG	71	1283	CAGUGUCUUGACUCAUGCU	256
1279	GAAGUUAGAAGUCGGGUCG	72	1279	GAAGUUAGAAGUCGGGUCG	72	1301	CGACCCGACUUCUAAACUUC	257
1297	GUGGGGGGAAGUCUUCGAG	73	1297	GUGGGGGGAAGUCUUCGAG	73	1319	CUCGAAGACUUCUCCCCCAC	258
1315	GGUGCCAGGUCGCCUCCC	74	1315	GGUGCCAGGUCGCCUCCC	74	1337	GGGAGGCAGCCUGGGCACCC	259
1333	CCAGCCAAAGGGGAGCCGU	75	1333	CCAGCCAAAGGGGAGCCGU	75	1355	ACGGCUCCCCUUGGCUUG	260
1351	UCACUGCCCGAGAAAGGACG	76	1351	UCACUGCCCGAGAAAGGACG	76	1373	CGUCCUUCUCGGGCGAGUGA	261
1369	GAGGACCAUGCACUGAGUU	77	1369	GAGGACCAUGCACUGAGUU	77	1391	AACUCAGUGCAUGGUCCUC	262
1387	UACUGGAAGCCCUUCCUGG	78	1387	UACUGGAAGCCCUUCCUGG	78	1409	CCAGGAAGGCUUCCAGUA	263
1405	GUCAACAUGUGCGUGGCUA	79	1405	GUCAACAUGUGCGUGGCUA	79	1427	UAGCCACGCACAUGUUUGAC	264
1423	ACGGUCCUCACGGCGCGCG	80	1423	ACGGUCCUCACGGCGCGCG	80	1445	CGCCGGCCGUGAGGACCCGU	265
1441	GCUUACCUCUGCUACAGGU	81	1441	GCUUACCUCUGCUACAGGU	81	1463	ACCUGUAGCAGAGGUAAAGC	266
1459	UUCUGUUCAACAGCAACA	82	1459	UUCUGUUCAACAGCAACA	82	1481	UGUUGCUGUUUAACAGGAA	267
1477	ACAUAGCCUGACCCUCCUC	83	1477	ACAUAGCCUGACCCUCCUC	83	1499	GAGGAGGUCAGGCUAUGU	268
1495	CCACUCCACCUCCACCCAC	84	1495	CCACUCCACCUCCACCCAC	84	1517	GUGGUGGAGGUGGAGUGG	269
1513	CUGUCCGCCUCUGCCCCGA	85	1513	CUGUCCGCCUCUGCCCCGA	85	1535	UGCGGCGAGAGGCGGACAG	270
1531	AGAGCCCAAGCCCGACUAG	86	1531	AGAGCCCAAGCCCGACUAG	86	1553	CUAGUCGGCGUGGGGCUUCU	271
1549	GCAGGCAUGCCCGGGUAGG	87	1549	GCAGGCAUGCCCGGGUAGG	87	1571	CCUACCCGCGCAUGGCCUGC	272
1567	GUAAAGGCCCGCGGACCGC	88	1567	GUAAAGGCCCGCGGACCGC	88	1589	GCGGUCCGGCGGCCCUUAC	273
1585	CGUAGAGAGCCGGGCCCGG	89	1585	CGUAGAGAGCCGGGCCCGG	89	1607	CGGGGCCCGGCGUCUCUACG	274
1603	GGACGGACGUUGGUUCUGC	90	1603	GGACGGACGUUGGUUCUGC	90	1625	GCAGAAACCAACGUCGCGUC	275
1621	CACUAAAACCCCAUCUCCC	91	1621	CACUAAAACCCCAUCUCCC	91	1643	GGGAAGAUGGGUUUUUAGUG	276
1639	CCGGAUGUGUGUCUCACCC	92	1639	CCGGAUGUGUGUCUCACCC	92	1661	GGGUGAGACACACAUCCGG	277
1657	CCUCAUCCUUUUACUUUUU	93	1657	CCUCAUCCUUUUACUUUUU	93	1679	AAAAAGUAAAAAGGAUGAGG	278
1675	UGCCCCUUCACUUUGAGU	94	1675	UGCCCCUUCACUUUGAGU	94	1697	ACUCAAAGUGGAAGGGGCA	279
1693	UACCAAUCCACAAAGCCAU	95	1693	UACCAAUCCACAAAGCCAU	95	1715	AUGGCUUGUGGAUUUUGGUA	280
1711	UUUUUUGAGGAGAGUGAAA	96	1711	UUUUUUGAGGAGAGUGAAA	96	1733	UUUCACUCUCCUCAA AAAA	281
1729	AGAGAGUACCAUGCUGGCG	97	1729	AGAGAGUACCAUGCUGGCG	97	1751	CGCCAGCAUGGUACUCUCU	282
1747	GGCGCAGAGGGAAGGGGCC	98	1747	GGCGCAGAGGGAAGGGGCC	98	1769	GGCCCCUUCCUUCUGCGCC	283
1765	CUACACCCGUCUUUGGGGCU	99	1765	CUACACCCGUCUUUGGGGCU	99	1787	AGCCCCAAGACCGGUGUAG	284
1783	UCGCCCCACCCAGGGGCUCC	100	1783	UCGCCCCACCCAGGGGCUCC	100	1805	GGAGCCCUUGGUGGGGCGA	285
1801	CCUCCUGGAGCAUCCCGAGG	101	1801	CCUCCUGGAGCAUCCCGAGG	101	1823	CCUGGGAUGCUCCAGGAGG	286

10

20

30

40

【表 5】

1819	GCGGGGGGACGCCAACAG	102	1819	GCGGGGGGACGCCAACAG	102	1841	CUGUUGGGUGGCCGCCGC	287
1837	GCCCCCCCUGAAUCUGC	103	1837	GCCCCCCCUGAAUCUGC	103	1859	GCAGAUUCAAGGGGGGGC	288
1855	CAGGAGCAACUCUCCACU	104	1855	CAGGAGCAACUCUCCACU	104	1877	AGUGGAGUUGCUCUCCUG	289
1873	UCCAUUUUUUUAAACAA	105	1873	UCCAUUUUUUUAAACAA	105	1895	UUGUUUUUUUUAAAUUGGA	290
1891	AUUUUUUUUUUUUUUUUUU	106	1891	AUUUUUUUUUUUUUUUUUU	106	1913	AUGCCUUUGGGGAAAAAU	291
1909	UCCAUAGUGCACUAGCAU	107	1909	UCCAUAGUGCACUAGCAU	107	1931	AUUGCUAGUGCACUAGGA	292
1927	UUUCUUGAACCAUUAUUGU	108	1927	UUUCUUGAACCAUUAUUGU	108	1949	ACAUUUUUUGUUAAGAAA	293
1945	UAUUUUUUUUUUUUUUUUUU	109	1945	UAUUUUUUUUUUUUUUUUUU	109	1967	ACAUUUUUUUUUUUUUUUUU	294
1963	UCAGCCUUGCAUCAAGGGC	110	1963	UCAGCCUUGCAUCAAGGGC	110	1985	GCCCUUGAUGCAAGGCUGA	295
1981	CUUUUAUCAAAGUACAAU	111	1981	CUUUUAUCAAAGUACAAU	111	2003	AUUGUACUUUUUGAUAAAAG	296
1999	UAUUUUUUUUUUUUUUUUUU	112	1999	UAUUUUUUUUUUUUUUUUUU	112	2021	ACUACCUUGAGGUAUUUA	297
2017	UACUGGGAUUGGAAGGCUU	113	2017	UACUGGGAUUGGAAGGCUU	113	2039	AAGCCUUCUUAUCCAGUA	298
2035	UUGCAUUGGGCCUGCUGCG	114	2035	UUGCAUUGGGCCUGCUGCG	114	2057	CGCAGCAGGCCCAUGGCAA	299
2053	GUCAGACCAGUACUGGGAA	115	2053	GUCAGACCAGUACUGGGAA	115	2075	UCCCCAGUACUGGUCUGAC	300
2071	AGGAGGACGGUUUAAGCA	116	2071	AGGAGGACGGUUUAAGCA	116	2093	UGC UUACACCGUCCUCCU	301
2089	AGUUGUUUUUUAGUUAU	117	2089	AGUUGUUUUUUAGUUAU	117	2111	AUAUCACUAAUAACAACU	302
2107	UUGUGGUAACGUGAGAAG	118	2107	UUGUGGUAACGUGAGAAG	118	2129	CUUCUCACGUUAACCCACAA	303
2125	GAUAGAACAUGCUUAU	119	2125	GAUAGAACAUGCUUAU	119	2147	AUUUAAGCAUUGUUCUAUC	304
2143	UAUUUUUUUAAGAAACAU	120	2143	UAUUUUUUUAAGAAACAU	120	2165	CCCACGUGUUAUUAUUA	305
2161	GUUUUUUUUAAGAAACAU	121	2161	GUUUUUUUUAAGAAACAU	121	2183	CAUGUUUUUUUAUUAUUA	306
2179	GAUGUGAGAUUAUUUUGUC	122	2179	GAUGUGAGAUUAUUUUGUC	122	2201	GACAAAGUAUUCUCACAU	307
2197	CCCGUUUAUUCUCCUCCU	123	2197	CCCGUUUAUUCUCCUCCU	123	2219	AGGGAGGAGAAUAGCGGG	308
2215	UGUUUAUCUGCUAGAUUAG	124	2215	UGUUUAUCUGCUAGAUUAG	124	2237	CUAGAUUAGCAGAUUAACA	309
2233	GUUCUCAUACACUGUCCU	125	2233	GUUCUCAUACACUGUCCU	125	2255	GGGAGCAGUUAUUGAGAAC	310
2251	CCCGUGUGUAUUAGAAUUG	126	2251	CCCGUGUGUAUUAGAAUUG	126	2273	GCAUUCUUAUACACACGGG	311
2269	CAUGUAAGGUCUUCUUGUG	127	2269	CAUGUAAGGUCUUCUUGUG	127	2291	CACAAGAGACCUUACAUG	312
2287	GUCCUGAUGAAAAUUAUUG	128	2287	GUCCUGAUGAAAAUUAUUG	128	2309	ACAUUUUUUUUAUACAGGAC	313
2305	UGCUUGAAUUGAGAAACUU	129	2305	UGCUUGAAUUGAGAAACUU	129	2327	AAGUUUCUUAUUAUUAAGCA	314
2323	UUGAUUCUCUGCUUAUUAU	130	2323	UUGAUUCUCUGCUUAUUAU	130	2345	AUUAGUAAGCAGAGAUCAA	315
2341	UGUGCCCCAUGUCCAAAGUC	131	2341	UGUGCCCCAUGUCCAAAGUC	131	2363	GACUUGGACAUUGGGGCACA	316
2359	CCAACCUGCCUGUGCAUGA	132	2359	CCAACCUGCCUGUGCAUGA	132	2381	UCAUGCACAGGCGAGGUUGG	317
2377	ACCUGAUCAUUAUAGGCGU	133	2377	ACCUGAUCAUUAUAGGCGU	133	2399	AGCCAUGUAUUAUAGCAGGU	318
2395	UGUGGUUCCUUAAGCCUGUU	134	2395	UGUGGUUCCUUAAGCCUGUU	134	2417	AACAGGCUUAGGAACCCACA	319
2413	UGCUGAAGUCAUUGUCGCU	135	2413	UGCUGAAGUCAUUGUCGCU	135	2435	AGCGACAAUAGACUUCAGCA	320
2431	UCAGCAAUAGGGUGCAGUU	136	2431	UCAGCAAUAGGGUGCAGUU	136	2453	AACUGCACCCUUAUUGCUGA	321
2449	UUUCCAGGAUAGGCAUUU	137	2449	UUUCCAGGAUAGGCAUUU	137	2471	AAUUGCCUUAUUCUUGGAAA	322

10

20

30

40

【表 6】

2467	UGCCUAAUUCUCCUGGCAUGA	138	2467	UGCCUAAUUCUCCUGGCAUGA	138	2489	UCAUGCCAGGAUUUAGGCA	323
2485	ACACUCUAGUGACUUCUCCUG	139	2485	ACACUCUAGUGACUUCUCCUG	139	2507	CAGGAAGUCACUAGAGUGU	324
2503	GGUGAGGCCAGCCUGUCC	140	2503	GGUGAGGCCAGCCUGUCC	140	2525	GGACAGGCGGGCCUCACC	325
2521	CUGGUACAGCAGGGUCUUG	141	2521	CUGGUACAGCAGGGUCUUG	141	2543	CAAGACCCUGGUCUACCCAG	326
2539	GCUGUAACUCAGACAUUCC	142	2539	GCUGUAACUCAGACAUUCC	142	2561	GGAAUGUCUGAGUJACAGC	327
2557	CAAGGGUAGGGAGGCCAU	143	2557	CAAGGGUAGGGAGGCCAU	143	2579	AUGGCUUCCCAUACCCUUG	328
2575	UAUUCACACCCUACGCUCU	144	2575	UAUUCACACCCUACGCUCU	144	2597	AGAGCGUGAGGUGUGAAUA	329
2593	UGGACAUGAUUUAGGGAG	145	2593	UGGACAUGAUUUAGGGAG	145	2615	CUUCCUAAAUAUAGUCCA	330
2611	GCAGGGACACCCCGGCC	146	2611	GCAGGGACACCCCGGCC	146	2633	GGGCGGGGGUGUCCUCCUG	331
2629	CCCCACCUUUGGGAUCAGC	147	2629	CCCCACCUUUGGGAUCAGC	147	2651	GCUGAUCCCAAAAGGUGGGG	332
2647	CCUCCGCCAUUCCAAGUCA	148	2647	CCUCCGCCAUUCCAAGUCA	148	2669	UGACUUUGGAUUGGCGGAGG	333
2665	AACACUCUUCUUGAGCAGA	149	2665	AACACUCUUCUUGAGCAGA	149	2687	UCUGCUCAAGAAAGAGUGUU	334
2683	ACCGUGAUUUGGAAGAGAG	150	2683	ACCGUGAUUUGGAAGAGAG	150	2705	CUCUCUCCAAAUCACGGU	335
2701	GGCACCUUGCUGGAAACCCAC	151	2701	GGCACCUUGCUGGAAACCCAC	151	2723	GUGGUUCCAGCAGGUGCC	336
2719	CACUUCUUAAAACAGCCUG	152	2719	CACUUCUUAAAACAGCCUG	152	2741	CAGGCUUUUUAAGAAAGUG	337
2737	GGGUGACGGUCCUUUAGGC	153	2737	GGGUGACGGUCCUUUAGGC	153	2759	GCCUAAAAGGACCCGUCACCC	338
2755	CAGCCUGCCCGCCGUCUCUG	154	2755	CAGCCUGCCCGCCGUCUCUG	154	2777	CAGAGACGGCGGAGGCUG	339
2773	GUCCCGGUUACCUUUGCCG	155	2773	GUCCCGGUUACCUUUGCCG	155	2795	CGGCAAGGUGAACCCGGGAC	340
2791	GAGAGAGCGCGUCUGCC	156	2791	GAGAGAGCGCGUCUGCC	156	2813	GGGCAGACGCGCCUCUCUC	341
2809	CCACCCUCAAAACCCUGUGG	157	2809	CCACCCUCAAAACCCUGUGG	157	2831	CCACAGGCUUUGAGGGUGG	342
2827	GGCCUGAUGGUGCUCACG	158	2827	GGCCUGAUGGUGCUCACG	158	2849	CGUGAGCACCAUCAGGCC	343
2845	GACUCUCCUGCAAAGGGA	159	2845	GACUCUCCUGCAAAGGGA	159	2867	UCCCUUUGCAGGAAGAGUC	344
2863	AACUGAAGACCCUCCACAUU	160	2863	AACUGAAGACCCUCCACAUU	160	2885	AUUGGAGGUCUUCAGUU	345
2881	UAAGUGGCUUUUUAACAUG	161	2881	UAAGUGGCUUUUUAACAUG	161	2903	CAUGUUAAAAGCCACUUA	346
2899	GAAAAACACGGCAGCUGUA	162	2899	GAAAAACACGGCAGCUGUA	162	2921	UACAGCUGCCGUGUUUUUC	347
2917	AGUCCCGAGCUACUCUCU	163	2917	AGUCCCGAGCUACUCUCU	163	2939	AGAGAGUAGCUCGGGAGCU	348
2935	UUGCCAGCAUUUUCACAUU	164	2935	UUGCCAGCAUUUUCACAUU	164	2957	AAUGUGAAAUAUGCUGGCAA	349
2953	UUUGCCUUUCUGUGGUAG	165	2953	UUUGCCUUUCUGUGGUAG	165	2975	CUACCACGAGAAAGGCAAA	350
2971	GAAGCCAGUACAGAGAAAU	166	2971	GAAGCCAGUACAGAGAAAU	166	2993	AUUUCUCUGUACUGGCUUC	351
2989	UUCUGUGGUGGGAAACAUC	167	2989	UUCUGUGGUGGGAAACAUC	167	3011	GAAUGUCCCCACACAGAA	352
3007	CGAGGUGUACCCUUGCAGA	168	3007	CGAGGUGUACCCUUGCAGA	168	3029	UCUGCAGGGUGACACCUUG	353
3025	AGCUAUGGUGAGGUGUGGA	169	3025	AGCUAUGGUGAGGUGUGGA	169	3047	UCCACACCCUACCAUAGCU	354
3043	AUAAGGCUUAGGUGCCAGG	170	3043	AUAAGGCUUAGGUGCCAGG	170	3065	CCUGGCACCUAAGCCUUAU	355
3061	GCUGUAAGCAUUCUGAGCU	171	3061	GCUGUAAGCAUUCUGAGCU	171	3083	AGCUCAGAAUGCUUACAGC	356
3079	UGGCGUUGUUGUUUUUAAAG	172	3079	UGGCGUUGUUGUUUUUAAAG	172	3101	CUUAAAAACAACAAGCCCA	357
3097	GUCCUGUAUUAUGUAUGAG	173	3097	GUCCUGUAUUAUGUAUGAG	173	3119	CUACAUAUAUACAGGAC	358

【 0 3 3 8 】

10

20

30

40

【 表 7 】

3115	GUAGUUUGGGUGUGUAUUAU	174	3115	GUAGUUUGGGUGUGUAUUAU	174	3137	AUAUACACACCCAAACUAC	359
3133	UAUAGUAGCAUUUUCAAAAU	175	3133	UAUAGUAGCAUUUUCAAAAU	175	3155	AUUUUGAAAUGCUCUAUA	360
3151	UGGACGUACUGGUUUUAACC	176	3151	UGGACGUACUGGUUUUAACC	176	3173	GGUUAAACCCAGUACGUCCA	361
3169	CUCCUAUCCUUGGAGAGCA	177	3169	CUCCUAUCCUUGGAGAGCA	177	3191	UGCUCUCCAAGGAUAGGAG	362
3187	AGCUGGCUCUCCACCCUUGU	178	3187	AGCUGGCUCUCCACCCUUGU	178	3209	ACAAAGGUGGAGAGCCAGCU	363
3205	UUACACAUUAUGUUAGAGA	179	3205	UUACACAUUAUGUUAGAGA	179	3227	UCUCUAACAUAAUGUGUAA	364
3223	AGGUAGCGAGCUGCUCUGC	180	3223	AGGUAGCGAGCUGCUCUGC	180	3245	GCAGAGCAGCUCGCUACCU	365
3241	CUAUUGCCUUUAAGCCAAU	181	3241	CUAUUGCCUUUAAGCCAAU	181	3263	AUUGGCUUAAGGCCAUUAUAG	366
3259	UAUUUACUCAUCAGGUCAU	182	3259	UAUUUACUCAUCAGGUCAU	182	3281	AUGACCUGAUGAGUAAUA	367
3277	UAUUUUUUUACAAUGGCCA	183	3277	UAUUUUUUUACAAUGGCCA	183	3299	UGGCCAUUUGUAAAAAUAA	368
3295	AUGGAAUAAACCAUUUUUA	184	3295	AUGGAAUAAACCAUUUUUA	184	3317	UAAAAAUGGUUUUAUCCAU	369
3300	AUAAACCAUUUUUACAAAA	185	3300	AUAAACCAUUUUUACAAAA	185	3322	UUUUGUAAAAAUGGUUUUAU	370

siNAコンストラクトの上側配列および下側配列の3'末端は、例えば、約1, 2, 3, または4ヌクレオチドの長さ、好ましくは2ヌクレオチドの長さのオーバーハング配列を含むことができ、下側配列のオーバーハング配列は任意に標的配列の一部と相補的であってもよい。上側配列はセンス鎖とも称され、下側配列はアンチセンス鎖とも称される。表中の上側配列および下側配列は、さらに式I-VIIまたはそれらの任意の組み合わせを有する化学修飾を含むことができる。

【 表 8 】

表 III: PTP-1B 合成修飾 siNA コンストラクト

標的位置	標的	配列 番号	別名	RPI 番号	配列	配列 番号
240	UAUCCGACAUGAAGCCAGUGACU	371	PTPN1:242U21 siRNA sense	31017	UCCGACAUGAAGCCAGUGATT	375
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:766U21 siRNA sense	31018	GUCCGAGAGUCAGGGUCACTT	376
872	UGCUGAUGGACAAGAGGAAAGAC	373	PTPN1:874U21 siRNA sense	31019	CUGAUGGACAAGAGGAAAGTT	377
3035	AGGUGUGGAUAAAGGCUUAGGUGC	374	PTPN1:3037U21 siRNA sense	31020	GUGUGGAUAAAGGCUUAGGUTT	378
240	UAUCCGACAUGAAGCCAGUGACU	371	PTPN1:260L21 siRNA (242C) antisense	31093	UCACUGGCCUUAUGUCGGATT	379
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:784L21 siRNA (766C) antisense	31094	GUGACCCUGACUCUCGGACTT	380
872	UGCUGAUGGACAAGAGGAAAGAC	373	PTPN1:892L21 siRNA (874C) antisense	31095	CUUUCUUCUUGUCCAUCAGTT	381
3035	AGGUGUGGAUAAAGGCUUAGGUGC	374	PTPN1:3055L21 siRNA (3037C) antisense	31096	ACCUAAGCCUUAUCCACACTT	382
240	UAUCCGACAUGAAGCCAGUGACU	371	PTPN1:242U21 siRNA stab04 sense	30865	B uccGAcAuGAAgcccAGuGATT B	383
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:766U21 siRNA stab04 sense	31306	B GuccGAGAGuAcGGGucAcTT B	384
872	UGCUGAUGGACAAGAGGAAAGAC	373	PTPN1:874U21 siRNA stab04 sense	30867	B cuGAuGGAcAAAGAGGAAAGTT B	385
3035	AGGUGUGGAUAAAGGCUUAGGUGC	374	PTPN1:3037U21 siRNA stab04 sense	30868	B GuGuGGAuAAAGGcuuAGGuTT B	386
240	UAUCCGACAUGAAGCCAGUGACU	371	PTPN1:260L21 siRNA (242C) stab05 antisense	30869	ucAcuGGGuucAuGucGGATsT	387
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:784L21 siRNA (766C) stab05 antisense	31307	GuGAcccuGAcucucGGAcTsT	388
872	UGCUGAUGGACAAGAGGAAAGAC	373	PTPN1:892L21 siRNA (874C) stab05 antisense		cuuuuccuuGuccAuAcAGTsT	389
3035	AGGUGUGGAUAAAGGCUUAGGUGC	374	PTPN1:3055L21 siRNA (3037C) stab05 antisense		AccuAAGGcuuAuuccAcAcTsT	390
240	UAUCCGACAUGAAGCCAGUGACU	371	PTPN1:242U21 siRNA stab07 sense		B uccGAcAuGAAgcccAGuGATT B	391
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:766U21 siRNA stab07 sense		B GuccGAGAGuAcGGGucAcTT B	392
872	UGCUGAUGGACAAGAGGAAAGAC	373	PTPN1:874U21 siRNA stab07 sense		B cuGAuGGAcAAAGAGGAAAGTT B	393
3035	AGGUGUGGAUAAAGGCUUAGGUGC	374	PTPN1:3037U21 siRNA stab07 sense		B GuGuGGAuAAAGGcuuAGGuTT B	394
240	UAUCCGACAUGAAGCCAGUGACU	371	PTPN1:260L21 siRNA (242C) stab11 antisense		ucAcuGGGuucAuGucGGATsT	395
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:784L21 siRNA (766C) stab11 antisense		GuGAcccuGAcucucGGAcTsT	396
872	UGCUGAUGGACAAGAGGAAAGAC	373	PTPN1:892L21 siRNA (874C) stab11 antisense		cuuuuccuuGuccAuAcAGTsT	397

10

20

30

40

50

【 0 3 4 0 】



【表 9】

3035	AGGUGUGGAUAAGGCUUAGGUGC	374	PTPN1:3055L21 siRNA (3037C) stab11 antisense		AccuAAGccuuAuccAcAcTsT	398
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:766U21 siRNA inv stab04 sense	31318	B cAcuGGGAcuGAGAGccuGTT B	399
764	AAGUCCGAGAGUCAGGGUCACUC	372	PTPN1:784L21 siRNA (766C) inv stab05 antisense	31319	cAGGcucucAGucccAGuGTsT	400

大文字 = リボヌクレオチド  
u,c = 2'-デオキシ-2'-フルオロ U,C  
T = チミン  
B = 反転デオキシ無塩基  
s = ホスホロチオエート結合  
A = デオキシアデニン  
G = デオキシグアニン

表IV

化学的に修飾されたsiNAコンストラクト用の安定化化学の非限定的例

化学	ピリミジン	プリン	キャップ	p=S	鎖
"Stab1"	リボ	リボ	—	5'末端に5 3'末端に1	S/AS
"Stab2"	リボ	リボ	—	全結合	通常はAS
"Stab3"	2'-フルオロ	リボ	—	5'末端に4 3'末端に4	通常はS
"Stab4"	2'-フルオロ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab5"	2'-フルオロ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab6"	2'-O-メチル	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab7"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab8"	2'-フルオロ	2'-O-メチル	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab9"	リボ	リボ	5'および3'末端	—	通常はS
"Stab10"	リボ	リボ	—	3'末端に1	通常はAS
"Stab11"	2'-フルオロ	2'-デオキシ	—	3'末端に1	通常はAS

Cap = 任意の末端キャップ, 例えば、図 10 を参照。

Stab 1-11 化学はすべて 3'-末端チミジン(TT) 残基を含むことができる。

Stab 1-11 化学はすべて、典型的には 21ヌクレオチドを含むが、本明細書に記載されるようにこれはさまざまであり得る。

S = センス鎖

AS = アンチセンス鎖

【表 1 1】

表V

A. 2.5  $\mu$ mol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間* DNA	待機時間* 2'-O-メチル	待機時間*RNA
ホスホルアミダイト	6.5	163 $\mu$ L	45 sec	2.5 min	7.5 min
S-エチルテトラゾール	23.8	238 $\mu$ L	45 sec	2.5 min	7.5 min
無水酢酸	100	233 $\mu$ L	5 sec	5 sec	5 sec
N-メチルイミダゾール	186	233 $\mu$ L	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	176	2.3 mL	21 sec	21 sec	21 sec
ヨウ素	11.2	1.7 mL	45 sec	45 sec	45 sec
ボーケージ	12.9	645 $\mu$ L	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	6.67 mL	NA	NA	NA

10

B. 0.2  $\mu$ mol 合成サイクル ABI 394 装置

試薬	当量	量	待機時間* DNA	待機時間* 2'-O-メチル	待機時間*RNA
ホスホルアミダイト	15	31 $\mu$ L	45 sec	233 sec	465 sec
S-エチルテトラゾール	38.7	31 $\mu$ L	45 sec	233 min	465 sec
無水酢酸	655	124 $\mu$ L	5 sec	5 sec	5 sec
N-メチルイミダゾール	1245	124 $\mu$ L	5 sec	5 sec	5 sec
TCA	700	732 $\mu$ L	10 sec	10 sec	10 sec
ヨウ素	20.6	244 $\mu$ L	15 sec	15 sec	15 sec
ボーケージ	7.7	232 $\mu$ L	100 sec	300 sec	300 sec
アセトニトリル	NA	2.64 mL	NA	NA	NA

20

C. 0.2  $\mu$ mol 合成サイクル 96 ウェル装置

試薬	当量:DNA/2'-O-メチル/リボ	量: DNA/2'-O-メチル/リボ	待機時間* DNA	待機時間* 2'-O-メチル	待機時間* リボ
ホスホルアミダイト	22/33/66	40/60/120 $\mu$ L	60 sec	180 sec	360sec
S-エチルテトラゾール	70/105/210	40/60/120 $\mu$ L	60 sec	180 min	360 sec
無水酢酸	265/265/265	50/50/50 $\mu$ L	10 sec	10 sec	10 sec
N-メチルイミダゾール	502/502/502	50/50/50 $\mu$ L	10 sec	10 sec	10 sec
TCA	238/475/475	250/500/500 $\mu$ L	15 sec	15 sec	15 sec
ヨウ素	6.8/6.8/6.8	80/80/80 $\mu$ L	30 sec	30 sec	30 sec
ボーケージ	34/51/51	80/120/120	100 sec	200 sec	200 sec
アセトニトリル	NA	1150/1150/1150 $\mu$ L	NA	NA	NA

30

40

- ・ 待機時間は輸送の間の接触時間を含まない
- ・ タンデム合成にはリンカー分子のダブルカップリングを利用する

## 【図面の簡単な説明】

## 【0343】

【図1】図1は、s i N A分子を合成するスキームの例を示す。

【図2】図2は、本発明の方法により合成された精製 s i N A デュープレックスの M A L D I - T O V 質量分析を示す。

【図3】図3は、R N A i に関する標的 R N A 分解の提唱されるメカニズムの例を示す

50

図である。

【図4】図4は、化学的に修飾された *siNA* コンストラクトの例を示す。

【図5】図5は、化学的に修飾された特定の *siNA* 配列の例を示す。

【図6】図6は、種々 *siNA* コンストラクトの例を示す。

【図7】図7は、*siNA* ヘアピンコンストラクトを生成するための発現カセットを作製するために用いられるスキームの概略図である。

【図8】図8は、発現カセットを作製して二本鎖 *siNA* コンストラクトを生成するために用いられるスキームの概略図である。

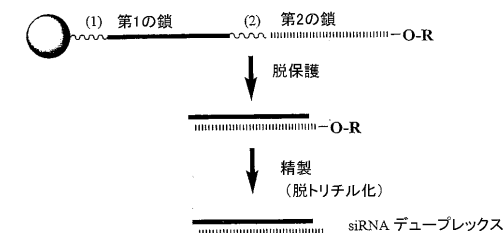
【図9】図9は、特定の標的核酸配列を決定するために用いられる方法の概略図である。

【図10】図10は、*siNA* 配列の3'末端を安定化させるために用いることができる、種々の安定化化学の例を示す。 10

【図11】図11は、化学的に修飾された *siNA* コンストラクトを同定するために用いられる戦略の例を示す。

【図12】図12は、PTP-1B mRNAを標的とする *siNA* により媒介される PTP-1B mRNAの減少の例を示す。

【図1】



● = 固体支持体

R = 末端保護基

例えば:

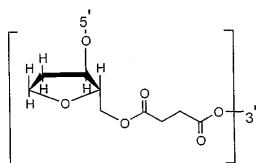
ジメチルシリル (DMT)

(1) = 切断可能リンカー

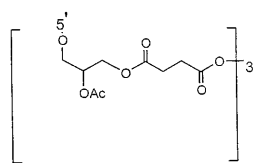
(例えば、ヌクレオチドスチンネートまたは反転デオキシ無塩基スチンネート)

(2) = 切断可能リンカー

(例えば、ヌクレオチドスチンネートまたは反転デオキシ無塩基スチンネート)

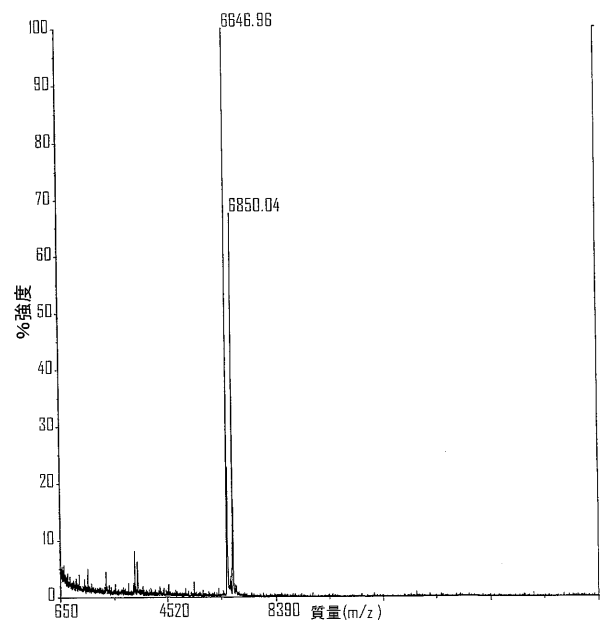


反転デオキシ無塩基スチンネート結合

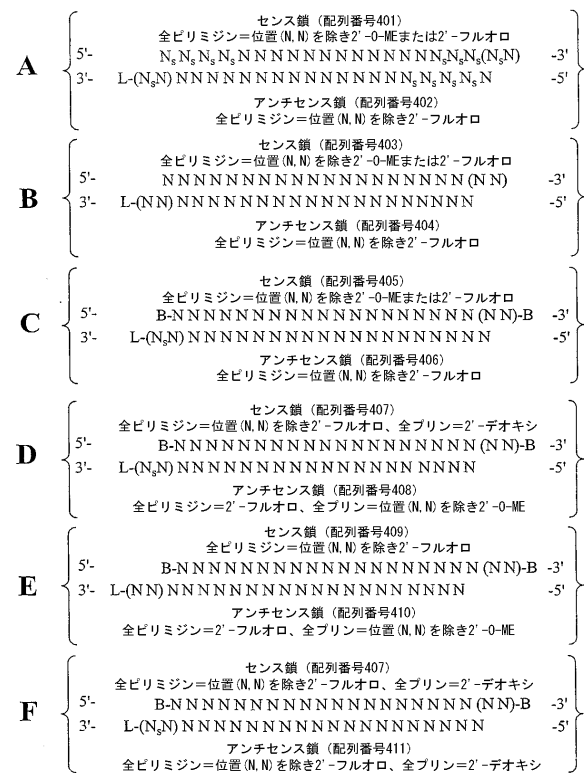


グリセリルスチンネート結合

【図2】



【 図 4 】



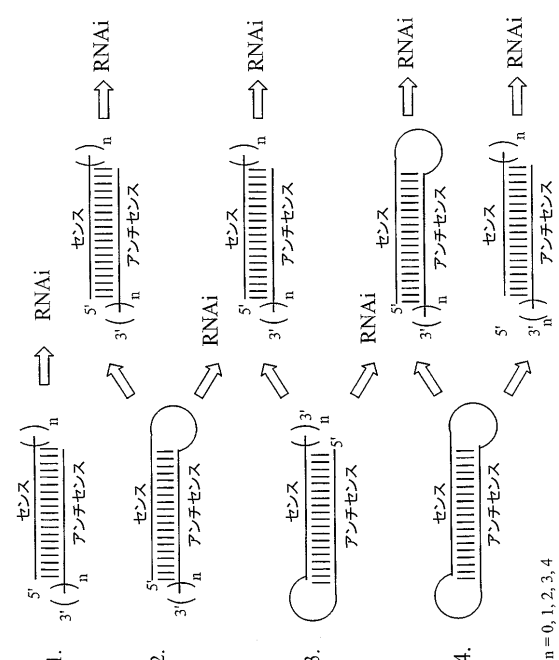
位置 (N, N) は任意のスクレオチド、例えばデオキシスクレオチド（例えばチミジン）または万能塩基を含むことができる

B=無塩基、反転無塩基、反転スクレオチドまたは任意に存在していてもよい他の末端キャップ

L=任意に存在していてもよいグリセリン成分

S=スホロチオエートまたはホスホロチオエート

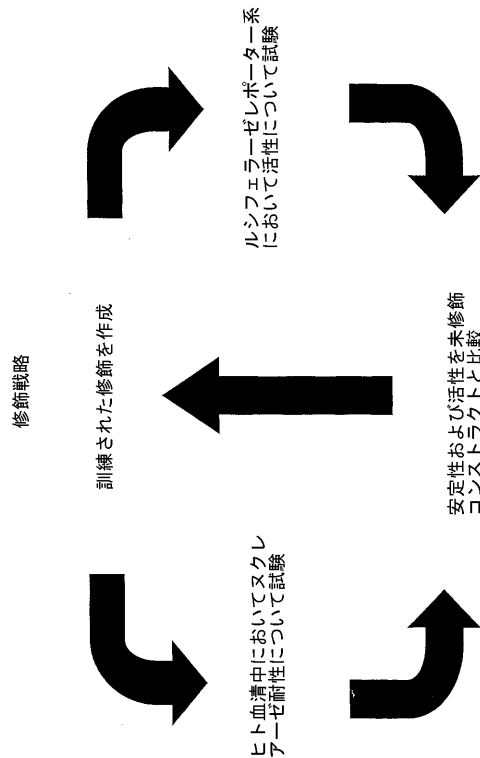
【 图 6 】



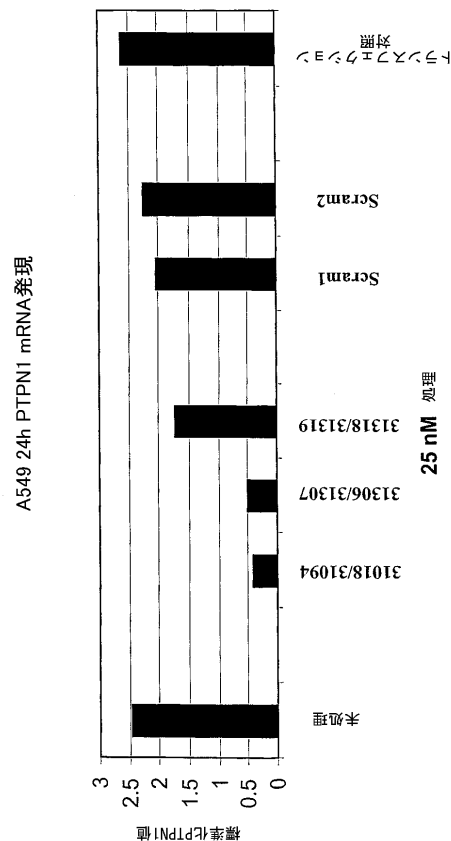
小文字=2'-0-メチルまたは2'-デオキシ-2'-フルオロ  
イタリック小文字=2'-デオキシ-2'-フルオロ  
下線=2'-0-メチル  
イタリック大文字=デオキシ  
B=反転デオキシ無塩基  
L=任意に存在していてもよい  
グリセリル成分  
S=ホスホロチオエートまたは  
ホスホロジチオエート



【図 1 1】



【図 1 2】



## 【手続補正書】

【提出日】平成16年10月5日(2004.10.5)

## 【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】

RNA干渉(RNAi)により蛋白質チロシンホスファターゼ-1B(PTB-1B)RNAの切断を指示する化学的に合成された二本鎖短干渉核酸(sina)分子であって、

a) 前記sina分子の各鎖は約19-約23ヌクレオチドの長さであり；

b) 前記sina分子の一方の鎖は、前記PTB-1B RNAに対して、sina分子がRNA干渉によりPTB-1B RNAの切断を指示するのに十分な相補性を有するヌクレオチド配列を含み；および

c) 前記sina分子はRNA干渉を媒介するためにsina分子中に2'-ヒドロキシ基を有するヌクレオチドの存在を必要としない、

ことを特徴とするsina分子。

## 【請求項2】

前記sina分子がリボヌクレオチドを含まない、請求項1記載のsina分子。

## 【請求項3】

前記sina分子がリボヌクレオチドを含む、請求項1記載のsina分子。

## 【請求項4】

前記二本鎖sina分子の一方の鎖はPTB-1B遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、前記二本鎖sina分子の第2の鎖は前記PT

B - 1 B RNA のヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 5】

s i N A 分子の各鎖は約 19 - 約 23 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な少なくとも約 19 ヌクレオチドを含む，請求項 4 記載の s i N A 分子。

【請求項 6】

前記 s i N A 分子は P T B - 1 B 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス領域を含み，前記 s i N A はさらにセンス領域を含み，前記センス領域は前記 P T B - 1 B 遺伝子のヌクレオチド配列またはその一部に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 7】

前記アンチセンス領域および前記センス領域は約 19 - 約 23 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な少なくとも約 19 ヌクレオチドを含む，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 8】

前記 s i N A 分子はセンス領域およびアンチセンス領域を含み，前記アンチセンス領域は P T B - 1 B 遺伝子によりコードされる RNA のヌクレオチド配列またはその一部に相補的なヌクレオチド配列を含み，および前記センス領域は前記アンチセンス領域に相補的なヌクレオチド配列を含む，請求項 1 記載の s i N A 分子。

【請求項 9】

前記 s i N A 分子は 2 つの別々のオリゴヌクレオチドフラグメントから組み立てられており，一方のフラグメントは前記 s i N A 分子のセンス領域を含み，第 2 のフラグメントは前記 s i N A 分子のアンチセンス領域を含む，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 10】

前記センス領域が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，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 11】

前記リンカー分子がポリヌクレオチドリンカーである，請求項 10 記載の s i N A 分子。

【請求項 12】

前記リンカー分子が非ヌクレオチドリンカーである，請求項 10 記載の s i N A 分子。

【請求項 13】

センス領域中のピリミジンヌクレオチドが 2' - O - メチルピリミジンヌクレオチドである，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 14】

センス領域中のプリンヌクレオチドが 2' - デオキシプリンヌクレオチドである，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 15】

センス領域中に存在するピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 16】

前記センス領域を含むフラグメントは，前記センス領域を含むフラグメントの 5' 末端，3' 末端，または 5' 末端および 3' 末端の両方に末端キャップ成分を含む，請求項 9 記載の s i N A 分子。

【請求項 17】

前記末端キャップ成分が反転デオキシ無塩基成分である，請求項 16 記載の s i N A 分子。

【請求項 18】

前記アンチセンス領域のピリミジンヌクレオチドが 2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 19】



前記アンチセンス領域のプリンヌクレオチドが 2' - O - メチルプリンヌクレオチドである，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 20】

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が 2' - デオキシ - プリンヌクレオチドを含む，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 21】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の 3' 末端にホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む，請求項 18 記載の s i N A 分子。

【請求項 22】

前記アンチセンス領域が前記アンチセンス領域の 3' 末端にグリセリル修飾を含む，請求項 6 記載の s i N A 分子。

【請求項 23】

前記 s i N A 分子の 2 つのフラグメントのそれぞれが 21 ヌクレオチドを含む，請求項 9 記載の s i N A 分子。

【請求項 24】

s i N A 分子の各フラグメントの約 19 ヌクレオチドは s i N A 分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成しており，s i N A 分子の各フラグメントの少なくとも 2 つの 3' 末端ヌクレオチドは s i N A 分子の他方のフラグメントのヌクレオチドと塩基対形成していない，請求項 23 記載の s i N A 分子。

【請求項 25】

s i N A 分子の各フラグメントの 2 つの 3' 末端ヌクレオチドのそれぞれが 2' - デオキシ - ピリミジンである，請求項 24 記載の s i N A 分子。

【請求項 26】

前記 2' - デオキシ - ピリミジンが 2' - デオキシ - チミジンである，請求項 25 記載の s i N A 分子。

【請求項 27】

s i N A 分子の各フラグメントの 21 ヌクレオチドすべてが s i N A 分子の他方のフラグメントの相補的ヌクレオチドと塩基対形成している，請求項 23 記載の s i N A 分子。

【請求項 28】

アンチセンス領域の約 19 ヌクレオチドが P T B - 1 B 遺伝子によりコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している，請求項 23 記載の s i N A 分子。

【請求項 29】

アンチセンス領域の 21 ヌクレオチドが P T B - 1 B 遺伝子によりコードされる R N A のヌクレオチド配列またはその一部と塩基対形成している，請求項 23 記載の s i N A 分子。

【請求項 30】

前記アンチセンス領域を含むフラグメントの 5' 末端が任意にリン酸基を含む，請求項 9 記載の s i N A 分子。

【請求項 31】

許容しうる担体または希釈剤中に請求項 1 記載の s i N A 分子を含む医薬組成物。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/04123

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07H 21/00; C12Q 1/68 US CL : 435/6; 536/23.1, 24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6; 536/23.1, 24.5  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West, Biosis, Medline, CA, Embase, SciSearch,		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 6,261,840 B1 (COWSERT et al) 17 July 2001 (17.07.2001). Particularly claims, and language reading "comprising"	1, 3, 4, 10-12, 15 ----- 1, and 3-33
Y	GOLDSTEIN BJ et al. Protine-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A Novel Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus, Obesity and Related States of Insulin Resistance. Curr. Drug Targets. 2001, Vol 1. pages 265-275, particularly 270.	1, 3
Y	PARRISH S. et al. Functional Anatomy of a dsRNA Trigger: Differential Requirement for the Two Trigger Strands in RNA Interference. Mol. Cell. November 2000, Vol. 6 pages 1077-1087, Throughout.	1, and 3-33
Y	ELBASHIR SM, et al. Functional Anatomy of siRNAs for Mediating Efficient RNAi in Drosophila melanogaster Embryo Lysate. EMBO J. Vol. 20 No. 23, pages 6877-6888, Throughout	1, and 3-33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 June 2003 (16.06.2003)		22 JUN 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer James Douglas Schultz <i>James J. Ford</i> Telephone No. 703-308-0196 <i>for</i>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US03/04123

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

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

1. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claim Nos.: 2  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
The claim identifies a sequence by GenBank Accession Number. This is not proper, because GenBank Accession numbers change with time, and thus the claimed subject matter is not considered to be clearly identified.
3. ☐ Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**
☐  
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(31)優先権主張番号 10/206,705  
 (32)優先日 平成14年7月26日(2002.7.26)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/406,784  
 (32)優先日 平成14年8月29日(2002.8.29)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/408,378  
 (32)優先日 平成14年9月5日(2002.9.5)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/409,293  
 (32)優先日 平成14年9月9日(2002.9.9)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/440,129  
 (32)優先日 平成15年1月15日(2003.1.15)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,PT,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114465  
 弁理士 北野 健  
 (72)発明者 マクスウィゲン, ジェームズ  
 アメリカ合衆国 8 0 3 0 1 コロラド州 ボールダー, フランクリン ドライブ 4 8 6 6  
 (72)発明者 ベージェルマン, レオニド  
 アメリカ合衆国 8 0 5 0 3 コロラド州 ロングモント, コルト ドライブ 5 5 3 0  
 (72)発明者 アスマン, ナシム  
 アメリカ合衆国 8 0 0 2 6 コロラド州 ラファイエット, ナイト スカイ レーン 2 1 2 9  
 Fターム(参考) 4B024 AA01 BA11 CA04 CA05 CA10 CA11 DA03 HA17  
 4C084 AA07 AA13 NA14 ZA70 ZB11 ZB26 ZC20 ZC35